

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0029727
(43) 공개일자 2025년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/34 (2006.01) G01N 21/84 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/34 (2013.01)
C12Y 302/01035 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0081348
(22) 출원일자 2024년06월21일
심사청구일자 2024년06월21일
(30) 우선권주장
1020230110684 2023년08월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정영도
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
이관희
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

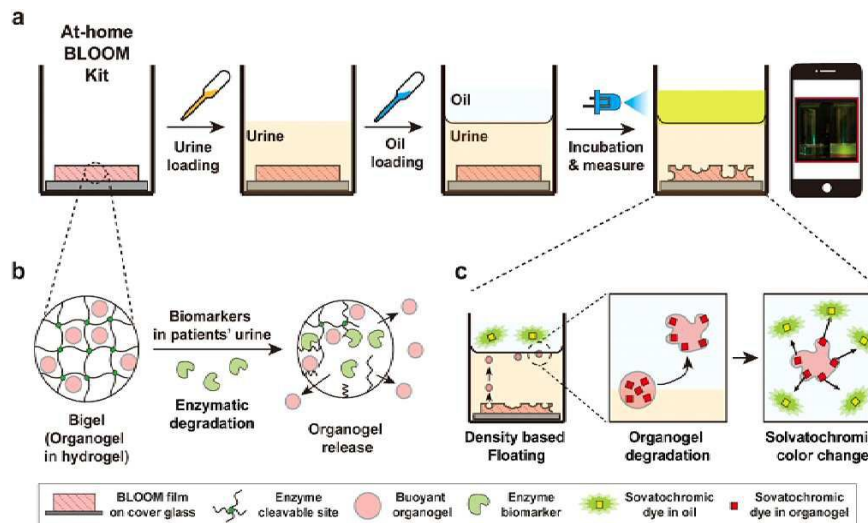
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 상-이동 프로브를 포매한 바이오마커 검출용 링커

(57) 요약

본 발명은 물층과 기름층으로 이루어진 biphasic system 하에서 작동하는 바이오마커에 의해 그 구조가 변형되는 그물 또는 케이지 구조의 링커를 제공한다. 상기 링커는 바이오마커의 존재 하에서 구조가 변형되어 내부에 포함하는 상-이동 프로브를 방출하고, 방출된 상-이동 프로브는 기름층에서 검출할 수 있다. 본 발명의 링커를 이용한 biphasic system 하에서 바이오마커 검출은 표적의 인식과 상기 인식에 의한 신호의 검출이 물층과 기름층으로 분리되어 높은 정확도로 표적 검출이 가능하다. 또한, 본 발명의 시스템은 샘플의 전처리가 불요하여, 임상검체 전처리에 요구되는 값비싼 장비와 전문인력 없이도 고감도로 신속하고 정확하게 정량적인 바이오마커의 검출이 가능하다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 21/84 (2013.01)

G01N 2800/34 (2013.01)

(72) 발명자

김호준

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

강석호

서울특별시 송파구 올림픽로 135, 215동 503호 (잠실동, 리센츠)

윤성구

서울특별시 성북구 고려대로 73, 2층 비뇨기과 외래 (안암동5가, 고려대학교 병원)

심지성

서울특별시 중구 다산로 32, 20동 1708호 (신당동, 남산타운)

노태일

서울특별시 성북구 보문사길 111, 103동 802호 (보문동6가, 보문파크뷰자이)

명세서

청구범위

청구항 1

그물 또는 케이지 구조의 바이오마커 검출용 링커로서,

상기 링커는 물층(water layer)에서 기름층(oil layer)으로 이동능을 가지는 상-이동 프로브를 그 구조 내에 내포하고 있으며,

상기 링커는 바이오마커와 접촉하여 그 구조가 변형되며,

상기 상-이동 프로브는 신호발생물질을 포함하는 것인, 바이오마커 검출용 링커.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신호발생물질은 기름층에서 검출가능한 전기적 또는 광학적 신호를 발생시키는 것인, 바이오마커 검출용 링커.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 신호발생물질은 형광체, 발색체, 촉매, 염료, 및 전해질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 바이오마커 검출용 링커.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 상-이동 프로브는 물층의 비중보다 낮거나 양친매성인 것 또는 유기젤인, 바이오마커 검출용 링커.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 링커는 겔(gel) 형태인 것인, 바이오마커 검출용 링커.

청구항 6

상-이동 프로브를 포함하는 비뇨생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔으로써,

상기 상-이동 프로브는 물층(water layer)에서 기름층(oil layer)으로 이동능을 가지고,

상기 상-이동 프로브는 기름층에서 검출가능한 전기적 또는 광학적 신호를 발생시키는 신호 물질을 내부에 포함하는 것인, 비뇨생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 상-이동 프로브는 양친매성 분자에 의한 미셀(micelle) 구조체 또는 유기젤인 것인, 비뇨생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔에 포매된 것.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 유기젤은 12-하이드록시스테아릭산(12-hydroxystearic acid), 올레산(oleic acid), 및 이들의 혼합으로 이

루어진 군으로부터 선택된 1 이상인 것인, 비노생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 상-이동 프로브는 톨루엔과 올레산이 2:1 부피비로 혼합된 혼합용매에 5 중량%의 12-하이드록시스테아릭산을 첨가하고 초음파 처리하여 단분산화된 에멀전 형태인 것인, 비노생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 상-이동 프로브는 물보다 밀도가 낮아 부력에 의해 물층에서 기름층으로 이동능을 갖는 것인, 비노생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 신호 물질은 형광체, 발색체, 촉매, 염료, 및 전해질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 비노생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 신호물질은 용매화발색 염료인 것인, 비노생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 용매화발색 염료는 나일 레드(Nile red)인 것인, 비노생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔.

청구항 14

제6항에 있어서,

상기 히알루론산 하이드로겔은 히알루론산과 글루타르알데히드(glutaraldehyde)을 1:2 중량비로 혼합하여 가교된 것인, 비노생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔.

청구항 15

제6항에 있어서,

상기 비노생식질환은 방광암인 것인, 비노생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔.

청구항 16

제6항 내지 제15항 중 하나의 비노생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔이 바닥면에 고정된 용기(container)와 물과 섞이지 않는 비극성 용매를 포함하는 비노생식질환 진단용 키트.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 비극성 용매는 히알루론산 하이드로겔이 바닥면에 고정된 용기와 별도의 용기에 보관된 것인, 비노생식질환 진단용 키트.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 비극성 용매는 도데칸(dodecan)인 것인, 비뇨생식질환 진단용 키트.

청구항 19

제16항에 있어서,

상기 키트는 청색 LED를 추가로 포함하는 것인, 비뇨생식질환 진단용 키트.

청구항 20

하기 단계를 포함하는 비뇨생식질환 진단을 위한 정보제공방법:

- (1) 개체로부터 분리된 소변 샘플을 준비하는 단계;
- (2) 제1항 내지 제9항 중 하나의 비뇨생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔이 바닥면에 고정된 용기(container)에 상기 소변 샘플을 첨가하여 물층(water layer)를 형성하는 단계;
- (3) 상기 소변 샘플이 첨가된 용기에 물보다 밀도가 낮은 비극성 용매를 첨가하여 기름층(oil layer)를 형성하는 단계; 및
- (4) 상기 기름층에서 전기적 또는 광학적 신호를 검출하는 단계.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 정보제공방법은 개체로부터 분리된 소변 샘플의 전처리를 포함하지 않는 것인, 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 물층과 기름층으로 이루어진 biphasic system 하에서 액체생검 내에 존재하는 바이오마커를 검출하기 위한 그물 또는 케이지 구조의 링커 등에 관한 것으로서, 구체적으로 본 발명은 비뇨생식질환의 액체 생검에서 확인되는 또는 높은 농도로 확인되는 바이오마커를 검출하여 해당 질환을 진단하는 방법 등에 이용될 수 있으며, 보다 구체적으로 환자의 소변에서 검출되는 히알루로니다제를 검출하여 방광암의 진단할 수 있는 히알루론산 하이드로겔 등으로 이용될 수 있다.

배경 기술

[0003] 바이오마커(biomarker)는 생물학적 또는 의학적 검체 내에 존재하는 일종의 생체분자로서, 이들의 구조나 농도의 변화를 정성적 및/또는 정량적으로 탐지함으로써 질병의 상태를 진단하고, 약물의 치료효과 및 다른 질병과의 연관성을 종합적으로 판단하게 해주는 표식자 역할을 수행한다.

[0004] 생물학적 또는 의학적 검체는 액체생검(liquid biopsy)와 조직생검(tissue biopsy)로 구분된다. 조직생검은 침습적 방법으로 획득되는 것으로서 임상적으로 검증되고 조직학적 평가를 제공하는 장점이 있으나 그 분리 비용이 높고 검체 획득과정에 환자의 고통이 수반되며 감염 등의 위험이 있으며 분석에 장시간이 소요되는 단점이 있다. 반면, 액체생검은 혈액, 소변, 침 등 비침습적 방법에 의해 획득되는 것으로서 조직학적 평가를 제공하지는 못하지만 그 분리가 쉽고 환자에 위험이 없으며 비교적 빠르게 분석할 수 있다는 장점이 있다.

[0005] 한편, 방광암(Bladder cancer, BC)은 전 세계적으로 가장 흔한 비뇨생식기 암으로, 매년 ~500,000 건의 사건이 발생하고 ~200,000명의 사망이 보고된다. 방광암은 암의 단계에 따라서, Ta, T1, 및 Tis 단계의 비근침윤성 방광암(non-muscle-invasive BC, NMIBC)과 T2 내지 T4 단계의 근침윤성 방광암(muscle-invasive BC, MIBC)으로 구분되고, 약 70~80%의 방광암 환자는 비근침윤성 방광암으로 재발률이 높고 근침윤성 방광암으로 진행될 가능성이 높다. 방광암 환자의 5년 생존율은 초기단계(NMIBC)의 경우 95%이고, 전이가 확인된 환자의 경우 10%로 감소한다. 또한, 근침윤성 방광암 환자의 대다수는 방광 절제술이 필요하며, 방광의 절제는 환자의 삶의 질을 현저하게 떨어뜨린다. 따라서, 주기적으로 반복적인 검진을 통한 방광암의 정확한 조기 진단이 필요하다.

[0006] 현재, 방광암의 임상 진단은 방광에 광학 기구를 삽입하여 병변을 영상화하는 방광경 검사(cystoscopy)과 요세

포 검사에 의존한다. 방광경 검사와 세포검사는 숙련된 기술자가 필요하지만, 비근침윤성 방광암의 형태학적 이질성은 세포 샘플과 기술자의 숙련도에 따라 낮은 방광암 진단에 낮은 정확도를 나타낸다. 또한, 방광경 검사는 높은 수준의 침습성으로 비용이 많이 드는 것은 재차하고, 상당한 통증과 감염 위험도가 높은 부작용이 있다. 또한, 요세포 검사는 요세포 배양과 염색 이후에 병리학자의 주관적 판단에 따라 진단되어 15.8%의 낮은 민감도를 나타낸다. 두 검사의 프로토콜 모두 표준 임상 절차이지만, 고도로 훈련된 기술자가 요구되고, 통증 등의 부작용을 유발하는 침습적 검사이며, 초기 방광암에 대한 낮은 진단 정확도로 인하여 방광암 환자의 추적 검사와 방광암이 의심되는 환자의 진단에 부족한 점이 있다.

[0007] 최근 질병의 진단에 있어서 침습적 방법에서 비침습적 방법으로, 질적 분석에서 정량적 분석으로 패러다임이 전환됨에 따라서, PCR 검사를 포함한 다양한 소변 기반의 진단 방법이 개발되고 있으며, 초기 방광암의 진단에 대한 잠재력을 보여주고 있다. 소변 샘플의 채취의 용이함에도 불구하고, 아직까지는 검사를 위한 소변 샘플의 전처리 과정이 요구되며 이는 실험실 수준 장비와 숙련된 기술자를 필요로 한다. 일부 POC(point-of-care)가 비숙련자가 소변 샘플을 이용하여 테스트할 수 있도록 개발되었으나, 아직까지는 정확도와 민감도가 낮으며, 특히 초기 방광암의 경우 소변 샘플 내의 낮은 바이오마커 농도와 많은 비표적 물질로 인하여 진단에 어려움이 있다. 특히, 방광암 환자의 85%의 소변은 혈뇨이며, 이는 1mM 이상의 농도로 약 20,000 개 단백질을 포함하여 원하는 표적 신호의 발생과 전달에 방해가 된다. 따라서, 소변 샘플의 이질성에도 불구하고 숙련된 기술자 없이도 방광암을 조기에 진단할 수 있는 높은 민감도와 정확도의 POC 기반의 테스트 개발이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) KR 10-1345674
(특허문헌 0002) KR 10-1612095

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 비침습적 방법으로 수득되는 액체 생검을 이용하여 비뇨생식질환을 진단할 수 있는 biphasic system을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 biphasic system 하에서 질병과 관련성이 밝혀진 바이오마커를 검출하기 위해 이용되는 하이드로겔을 제공하고, 하이드로겔을 이용하여 액체 생검의 전처리 없이도 고감도로 정량적인 타겟을 검출하는 방법과 이를 수행하기 위한 키트 제공을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 비뇨생식질환의 진단을 위한 바이오마커를 검출할 수 있는 히알루론산 하이드로겔 제공을 목적으로 한다.

[0013] 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.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 액체 생검의 전처리 없이, 액체생검에서 바이오마커를 검출하기 위한 biphasic system을 제공한다.

[0016] 본 발명의 biphasic system은 액체 생검이 포함되는 물층(water layer) 및 상기 물층과 혼합되지 않는 기름층(oil layer)을 포함한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 biphasic system하에서 작동하는 상-이동 프로브(Phase-transfer probe, PTP)를 제공하며, 상기 상-이동 프로브는 링커에 의해 물층에 고정되는 것일 수 있다.

- [0018] 또한, 본 발명은 상기 biphasic system하에서 작동하여 바이오마커를 검출할 수 있는 링커를 제공하며, 상기 링커는 그물 또는 케이지 구조를 가지고, 상기 그물 또는 케이지 구조 내에 상기 상-이동 프로브를 포함하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 링커는 바이오마커가 포함된 액체생검과 접촉 시 그 구조가 변형되어 상-이동 프로브의 비(非)-고정 상태로 변경시키는 것이며, 본 명세서에서 바이오마커의 존재하에서 상기 물층에 고정된 상-이동 프로브의 비-고정 상태로의 변경은 상-이동 프로브의 링커로부터 해리, 방출 등으로 표현된다.
- [0020] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 상-이동 프로브는 신호발생물질을 포함하거나 신호발생물질 자체일 수 있다. 상-이동 프로브는 링커로부터 해리, 방출된 후 물층에서 기름층으로 이동하기 위해 낮은 밀도를 통해 물에서 떠서 상층의 기름층으로 이동하거나 (하층:물층, 상층:기름층), 반대로, 높은 밀도로 하층의 기름층으로 이동할 수 있다 (하층: 기름층, 상층:물층).
- [0021] 상기 상-이동 프로브는 링커에 의해 물층에 고정되고 바이오마커의 존재 하에서 유리되어 신호발생물질을 기름층으로 전달하는 신호 메신저(signal messenger)로써 기능한다. 따라서, 본 명세서에서 용어 “상-이동 프로브”는 “신호 메신저” 용어와 혼용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 신호발생물질은 기름층에서 검출가능한 전기적 또는 광학적 신호를 발생시키는 것이라면 제한되지 아니하며, 그 비제한적 예로는 형광체, 발색체, 촉매, 염료, 및 전해질 등이 있다. 상기 신호의 발생은 기름층에서 검출가능한 전기적 또는 광학적 신호로 변환되는 화학적 또는 물리적 변화를 유도하는 것을 포함하는 의미로 사용된다.
- [0023] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 링커에 의한 고정은 상기 상-이동 프로브가 기름층 또는 물층과 기름층의 계면으로 이동하지 못하도록 하는 것을 의미하고, 상기 링커는 바이오마커와 반응하여 물층에 고정된 상기 상-이동 프로브를 자유롭게 하는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 링커는 그물 또는 케이지의 구조로 그 내부에 상-이동 프로브를 고정하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 링커는 겔(gel) 상일 수 있으며, 보다 구체적으로 하이드로겔일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 링커는 바이오마커와 반응할 수 있으며, 상기 링커가 겔상인 경우 상기 링커와 바이오마커의 반응은 상기 겔을 분해하는 것일 수 있으며, 링커가 그물 또는 케이지 구조인 경우 그 구조를 느슨하게 하거나 이를 분해하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 구현예로서, 물층에 고정된 상-이동 프로브가 상기 링커와 바이오마커의 반응에 의해 해리(고정되지 않은 상태)되는 경우, 상-이동 프로브의 전부 또는 일부는 물층에서 기름층 또는 기름층의 계면으로 이동한다.
- [0028] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 상-이동 프로브의 물층에서 기름층으로의 이동은 확산, 부력, 표면장력, 또는 자기력에 의한 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 상-이동 프로브는 양친매성 분자로 이루어질 수 있으며, 상기 양친매성 분자에 의한 미셀(micelle) 구조체 또는 유기겔(organogel) 일 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 상-이동 프로브가 포매된 링커가 바닥면에 고정된 용기(container)와 기름층을 형성할 수 있는 비극성 용매를 포함하는 바이오마커 검출용 키트를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 비극성 용매는 물보다 밀도가 낮은 것일 수 있고, 상기 비극성 용매는 상기 하이드로겔이 바닥면에 고정된 용기와 별도의 용기에 보관된 것일 수 있다. 또한, 그 반대인 물보다 밀도가 높은 비극성 용매도 가능하며, 이 경우 하이드로겔은 상층의 벽면에 고정될 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 biphasic system하에서 작동하는 비뇨생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔을 제공한다.
- [0033] 본 발명에서 비뇨생식질환은 방광암일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 히알루론산 하이드로겔은 물층에서 기름층으로 이동능을 가지는 상-이동 프로브를 포함한다. 구체적으로 상기 상-이동 프로브는 상기 하이드로겔의 히알루론산 네트워크 구조 내에 포매(embedded)된다.

- [0035] 본 발명의 상-이동 프로브는 양친매성 분자에 의한 미셀(micelle) 구조체 또는 유기젤일 수 있으며, 그 내부에 신호발생물질을 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 상-이동 프로브는 톨루엔과 올레산이 2:1 부피비로 혼합된 혼합용매에 5 중량%의 12-하이드록시스테아릭산을 첨가하고 초음파 처리하여 단분산 오가노겔 입자일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 상-이동 프로브는 물보다 밀도가 낮은 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 상-이동 프로브의 밀도는 870 내지 990 kg/m³일 수 있으며, 바람직하게는 880 내지 890 kg/m³일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 상-이동 프로브 내부에 포함된 신호발생물질은 형광체, 발색체, 촉매, 염료, 및 전해질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 용매화발색 염료일 수 있고, 상기 용매화발색 염료는 나일 레드 일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 히알루론산 하이드로겔은 히알루론산과 글루타르알데히드(glutaraldehyde)을 1:2 중량비로 혼합하여 가교된 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 O2 플라즈마로 개질된 글라스(glass) 위에서 상기 혼합물을 가교시켜 제작된 것일 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명은 상기 비노생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔이 바닥면에 고정된 용기(container)와 기름층을 형성할 수 있는 비극성 용매를 포함하는 비노생식질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0041] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 비극성 용매는 물보다 밀도가 낮은 것일 수 있고, 상기 비극성 용매는 상기 히알루론산 하이드로겔이 바닥면에 고정된 용기와 별도의 용기에 보관된 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 키트는 청색 LED를 추가로 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 키트는 상기 LED를 작동시킬 수 있는 배터리를 추가로 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 키트는 오렌지색 아크릴 필터를 추가로 포함할 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 비노생식질환 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:
- [0046] (1) 개체로부터 분리된 소변 샘플을 준비하는 단계;
- [0047] (2) 상술한 비노생식질환 진단용 히알루론산 하이드로겔이 바닥면에 고정된 용기(container)에 상기 소변 샘플을 첨가하여 물층(water layer)을 형성하는 단계;
- [0048] (3) 상기 소변 샘플이 첨가된 용기에 물보다 밀도가 낮은 비극성 용매를 첨가하여 기름층(oil layer)을 형성하는 단계; 및
- [0049] (4) 상기 기름층에서 전기적 또는 광학적 신호를 검출하는 단계.
- [0050] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (4) 단계에서 신호 물질에 의한 전기적 또는 광학적 신호가 검출되는 경우 상기 개체는 비노생식질환이 발병하였거나, 발병가능성이 높은 것으로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (1) 단계의 소변 샘플은 개체로부터 분리되고 별도의 전처리를 수행하지 않은 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0053] 본 발명은 물층과 기름층으로 이루어진 biphasic system 하에서 작동하는 바이오마커에 의해 그 구조가 변형되는 그물 또는 케이지 구조의 링커를 제공한다. 상기 링커는 바이오마커의 존재 하에서 구조가 변형되어 내부에 포함하는 상-이동 프로브를 방출하고, 방출된 상-이동 프로브는 기름층에서 검출할 수 있다. 본 발명의 링커를 이용한 biphasic system 하에서 바이오마커 검출은 표적의 인식과 상기 인식에 의한 신호의 검출이 물층과 기름층으로 분리되어 높은 정확도로 표적 검출이 가능하다. 또한, 본 발명의 시스템은 샘플의 전처리가 불요하여, 임상검체 전처리에 요구되는 값비싼 장비와 전문인력 없이도 고감도로 신속하고 정확하게 정량적인 바이오마커 검출이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0055]

도 1은 방광압 진단을 위한 BLOOM assay를 도식화한 것이다.

도 1a에 a는 BLOOM assay의 워크플로(workflow)이고, b는 바이오마커에 의해 분해되는 비겔 필름에 의해 방출되는 오가노겔 메신저이고, c는 밀도 기반의 부유를 통해서 유기층으로 이동하는 용매화발색 염료(solvatochromic dye)이다.

도 1b는 소변샘플을 대상으로 바이오마커를 검출하기 위하여, UV 광 조사 하에서 biphasic system 상의 BLOOM assay를 수행 단계를 촬영한 사진이다.

도 1c는 혈뇨를 대상으로 바이오마커를 검출하기 위하여, UV 광 조사 하에서 biphasic system 상의 BLOOM assay를 수행 단계를 촬영한 사진이다.

도 2a는 용매화발색 염료인 나일 레드를 포함하는 보얀트 오가노겔 메신저 제조 과정의 모식도와 상기 메신저가 물에 분산된 사진이다.

도 2b는 상기 보얀트 오가노겔 메신저의 공초점 현미경 이미지이다(scale bar: 40 μm).

도 2c는 보얀트 오가노겔 입자의 크기 분포 그래프이다($n=100$).

도 2d는 보얀트 오가노겔 기반의 자율적인 신호 전달의 매커니즘을 도식화한 것이다. 구체적으로, 용매발색화 나일 레드를 포함하는 오가노겔 메신저는 낮은 밀도의 물질($\rho=885.7 \text{ kg/m}^3$)에서부터 부력에 의해 상승한다. 도데칸과 물의 계면에서 오가노겔은 도데칸에 의해 분해되고 오가노겔로부터 방출된 나일레드는 오가노겔 형광과 상이한 녹색 형광을 방출한다.

도 2e는 오가노겔 입자가 분산된 biphasic system의 사진으로, 왼쪽은 UV 조사를 하지 않은 경우이고, 오른쪽은 UV 조사 하에서 촬영한 것이다.

도 2f는 UV-Vis 흡수 파장 그래프이다.

도 2g는 물 또는 도데칸에 용해된 오가노겔의 형광의 파장이다.

도 2h는 상이한 농도의 혈액이 포함된 인공 혈뇨 샘플(NPU 및 혈액이 포함됨)을 대상으로 biphasic system 하에서 BLOOM assay 수행 사진이다.

도 2i는 보얀트 오가노겔 메신저 제작에서 올레산과 톨루엔의 혼합 부피비에 따른 극성 용매에서 비극성용매로의 이동을 나타낸 모식도이다.

도 2j는 올레산과 톨루엔의 부피비를 달리하여 합성된 보얀트 오가노겔 메신저의 신호 전달 효율을 확인한 도면이다.

도 3a는 히알루로니다제에 의해 분해되는 비겔 필름 합성의 모식도이다.

도 3b는 비겔 필름의 광학 이미지이다($d=15\text{mm}$).

도 3c는 주사전자현미경을 이용한 비겔 필름의 단면 이미지이다. 캡슐화된 오가노겔 입자는 보라색으로 표시하였다.

도 3d는 공초점 현미경을 이용한 비겔 필름 내의 보얀트 오가노겔의 형광 이미지이다.

도 3e는 공초점 현미경을 이용하여 확인된 비겔 필름 내의 보얀트 오가노겔의 크기 분포 그래프이다($n=40$).

도 3f는 비겔 필름의 UV-Vis 흡수 및 형광 스펙트럼이다((excitation: 510 nm; inset: photograph of bigel films under UV irradiation).

도 3g는 글루타르알데히드 가교결합이 있거나 없는 경우의 비겔 필름의 적외선 스펙트럼이다.

도 4a는 UV를 조사한 biphasic system 상에서 Hdase 검출 사진이다. Hdase 반응성 비겔 필름은 글라스 바이알의 바닥면에 위치하고, biphasic system은 상부의 도데칸 층과 하부에 NPU이 위치한다(Left: control, Right: 1 U/mL of Hdase). 배양 20분 후에 비겔 필름에 포획된 보얀트 오가노겔은 부력에 의해 부유하고 NPU-도데칸의 계면에 위치하게된다.

도 4b는 biphasic system 하에서 Hdase 부존재 샘플을 적용한 BLOOM 분석에서 60분 동안 형광 강도를 관독기로 측정된 결과이다(excitation: 460 nm).

도 4c는 biphasic system 하에서 1 U/mL 농도의 Hdase가 포함된 NPU를 적용한 BLOOM 분석에서 형광 강도를 관독기로 측정된 결과이다(excitation: 460 nm).

도 4d는 Hdase 존부를 달리한 샘플을 대상으로 biphasic system 하에서 시간의 경과에 따른 540 nm에서 형광 강도를 측정된 결과이다.

도 4e는 Hdase 농도를 0.1 mU/mL에서 1 U/mL까지 달리한 NPU에서 정규화된 형광 강도의 표준 곡선이다.

도 4f는 소변에서 Hdase와 비타겟 피분석물(analytes)(10 mM for ions, urea, glucose, and amino acids and 1.4 mg/mL for proteins))의 정규화된 형광강도를 비교한 것이다.

도 4g는 Hdase 검출을 위한 monophasic BLOOM system (소변 단독 또는 혈뇨 샘플)에서 보양트 신호 메신저안에 나일 레드의 정규화된 형광 스펙트럼과 상기 시스템의 모식도이다.

도 4h는 Hdase 검출을 위한 biphasic BLOOM system (상부: 도데칸, 하부: 소변 또는 혈뇨 샘플)에서 도데칸 층에서 나일 레드의 정규화된 형광 스펙트럼과 상기 시스템의 모식도이다. 형광은 1 U/mL의 Hdase를 포함하는 250 RBCs/HPF(red blood cells per high-power field)의 인공 혈뇨 샘플을 60분 동안 배양하며 측정되었다(excitation: 460 nm wavelength).

도 4i는 Hdase 농도에 따른 소변과 혈뇨(250 RBCs/HPF)의 정규화된 형광 강도의 비교 그래프이다.

도 4k는 증가하는 RBCs/HPF 및 1U/mL의 Hdase를 함유하는 인공 혈뇨 샘플을 배양한 도데칸 층에서 정규화된 형광 강도의 비교 결과이다(inset: photographs of artificial hematuria samples with different RBCs/HPF values). 비교는 Two-tailed Student's *t*-tests를 이용하였고, 3회 반복 실험의 means±SD 값으로 나타내었다(N.S: not significant).

도 5a는 병원에서 임상 진단과 BLOOM 및 NMP22BC® rapid kit를 이용한 임상 샘플의 진단을 대조 확인 테스트의 개략도이다.

도 5b는 근침윤성 방광암(muscle-invasive bladder cancers, MIBCs) 환자(T2)와 비근침윤성 방광암(non-muscle-invasive bladder cancers, NMIBCs) 환자(Ta 및 T1)의 암 조직 검사, 방광경 검사(cystoscopy), MRI(magnetic resonance images) 이다.

도 5c는 방광암 환자(bladder cancer, BC)의 소변 샘플을 이용하여 수행된 BLOOM 분석에서 획득된 정규화된 형광 강도를 비-종양 개체(비뇨생식기 질환 환자 및 건강한 개체)와 Two-tailed Student's *t*-tests를 이용하여 비교한 것이다(****p<0.0001).

도 5d는 NMIBC 환자의 소변 샘플을 이용하여 수행된 BLOOM 분석에서 획득된 정규화된 형광 강도를 비-종양 개체(비뇨생식기 질환 환자 및 건강한 개체)와 Two-tailed Student's *t*-tests를 이용하여 비교한 것이다(****p<0.0001).

도 5e는 BC 및 NMIBC 진단의 민감도 및 특이성 예측을 위한 수신기(receiver)의 작동 특성 곡선이다.

도 5f는 105개의 소변 샘플을 대상으로 BLOOM 또는 NMP22BC®의 진단 결과와 임상 진단 결과의 일치 정도를 나타낸 것이다.

도 6은 BLOOM POC 장치와 이를 이용한 BLOOM 분석결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 종래의 시료 분석 방법은 피분석물(analyte)에서 타겟의 인식(recognition), 신호의 발생, 및 검출이 하나의 상에서 수행된다. 이때, 타겟의 인식과 발생된 신호의 검출은 피분석물에 포함된 타겟 외의 물질에 의해 간섭되어 깨끗한 결과를 확보하기 어렵다.

[0057] 본 발명자들은 액체 생검의 대부분이 물로 이루어져 있으며, 생검 내의 물질이 대부분 수용성 물질인 점에 착안하여, 시료의 전처리 없이도 비-표적 물질에 의한 간섭없이 고감도로 바이오마커를 검출하기 위하여 타겟의 인식(recognition)과 신호의 발생 및 검출이 서로 다른 상에서 발생하는 biphasic system을 개발하였다.

- [0058] 본 발명에서 biphasic system은 액체생검이 포함되는 물층(water layer), 이와 혼합되지 않는 기름층(oil layer), 및 물층에서 기름층으로 이동할 수 있는 상-이동 프로브(Phase-Transfer Probe, PTP)를 포함한다. 상기 상-이동 프로브는 신호발생물질을 포함하고, 타겟 물질의 존재 하에서 물층에서 기름층으로 이동하여 기름층으로 신호발생물질을 전달한다.
- [0059] 본 발명은 상기 biphasic system하에서 수행되는 바이오마커 검출에 있어서, 바이오마커 존재 하에서 그 구조가 변형되는 그물 또는 케이지 구조의 링커를 개발하여 제공한다.
- [0060] 본 발명에서 상기 상-이동 프로브는 그물 또는 케이지 구조의 링커에 포매되고, 액체생검이 포함되거나 이로 이루어지는 물층에 링커에 의해 고정된다. 상기 물층은 액체생검의 투여로 형성되거나 액체생검이 투여되는 것일 수 있고, 상기 액체생검에 바이오마커가 존재하는 경우 상기 바이오마커는 링커의 구조를 분해하거나 느슨하게 하여 상기 상-이동 프로브를 링커로부터 해리되도록 한다.
- [0061] 본 발명에서 검출 표적이 되는 바이오마커는 링커의 구조를 변경할 수 있는 것으로서, 상기바이오마커가 질병과 관련성이 밝혀진 바이오마커인 경우 본 발명의 링커는 질병 진단의 용도에 이용될 수 있다.
- [0062] 예를 들어, 히알루로니다제(Hyaluronidase, Hdase)는 히알루론산(hyaluronic acid)을 분해하는 효소로 방광암 환자의 소변에서 증가하는 것으로 알려져 있다. 이에, 본 발명의 검출 표적을 Hdase로 설정한 경우 본 발명의 링커는 히알루론산을 포함하거나 이로 이루어진 겔로 설계하여 방광암의 진단을 위해 이용될 수 있다.
- [0063] 본 발명자들은 상기 biphasic system을 소변 샘플에서 히알루로니다제를 검출하여 방광암의 진단에 적용할 수 있음을 입증하여, 본 발명의 그물 또는 케이지 구조의 링커의 biphasic system 하에서의 작용을 검증하였다.
- [0064] 히알루로니다제는 히알루론산을 분해할 수 있는 바, 신호 메신저는 히알루론산 하이드로겔(hyaluronic acid hydrogel)에 의하여 물층에 고정되도록 설계하였다.
- [0065] 방광암 환자의 소변은 혈액이 혼합된 혈뇨인 경우가 빈번하고, 혈뇨는 적혈구 외에도 단백질 등의 비표적 물질이 다량 포함되어 검사 이전에 전처리가 필수적이지만, 본 발명이 제공하는 시스템은 소변샘플의 전처리 없이도 소변 샘플 내의 표적 물질, 즉 히알루로니다제의 기질 특이성을 이용하여 높은 민감도로 표적 검출이 가능하고, 효소 작용을 통한 표적의 인식과 상기 인식에 의한 신호의 검출이 물층과 기름층으로 분리되어 높은 정확도로 표적 검출이 가능하다.
- [0066] 본 발명의 방광암 진단을 위한 biphasic system은 액체생검이 포함되는 물층, 이와 혼합되지 않는 기름층, 및 히알루론산 하이드로겔에 포매되어(embedded) 물층에 고정된 신호 메신저를 포함한다. 상기 액체생검에 Hdase가 포함된 경우, 히알루론산 하이드로겔의 네트워크 구조는 붕괴되고 자연히 상기 하이드로겔에 매립된 신호 메신저는 유리되어 물층과 기름층의 계면으로 이동하고, 기름층으로 신호 물질을 전달한다. 이때, 기름층에서 신호 발생물질에 의한 전기적 또는 광학적 신호를 검출하여 액체생검에 Hdase의 존재를 판정할 수 있으며, 상기 신호의 강도는 액체생검 내에 존재하는 Hdase의 양과 비례하는 바, 액체생검 내의 Hdase의 정량적 분석이 가능하다.
- [0067] 본 발명에서 “물층(water layer)”은 물과 혼합될 수 있는 극성 용매라면 그 종류에 제한되지 아니하고 포함될 수 있고, 단순히 액체생검으로만 이루어질 수도 있다.
- [0068] 본 발명에서 “기름층(oil layer)”은 물층과 혼합되지 아니하고 분리될 수 있는 비극성 용매라면 그 종류에 제한되지 아니하고 포함될 수 있다. 본 발명의 구체적인 실험에서는 비극성 용매로 도데칸(dodecan)을 이용하였으나, 이에 제한되지 아니한다.
- [0069] 본 발명의 biphasic system은 바이오마커의 존재 하에서 물층에 고정된 상-이동 프로브가 해리되고, 상기 해리된 상-이동 프로브는 물층에서 기름층 또는 물층과 기름층의 계면층으로 이동한다.
- [0070] 상기 상-이동 프로브의 기름층 또는 계면층으로의 “이동”은 상기 상-이동 프로브의 내재적 특성에 의한 것일 수 있고, 단순히 확산에 의한 것일 수 있고, 부력, 중력, 전기력 또는 자기력 등의 외력에 의한 것일 수 있다. 예를들어, 상-이동 프로브의 물층에서 기름층으로의 이동능은 물층을 이루는 액체와의 밀도 차이일 수 있다. 구체적으로 물층의 비중이 기름층보다 높은 경우 상-이동 프로브의 비중은 물층의 비중보다 낮다.
- [0071] 본 발명의 구체적인 실험에서는 상기 상-이동 프로브의 밀도를 물보다 낮게 제작하여 부력에 의해 기름층으로 이동할 수 있도록 하였다.
- [0072] 본 발명의 상-이동 프로브는 신호발생물질이 부착되거나 이를 내포하는 나노입자 또는 마이크로 입자 수

있으며, 고분자 입자, 또는 금속입자일 수 있다.

- [0073] 본 발명에서 상기 금속입자를 이루는 금속은 아연(Zn), 셀레늄(Se), 텔루리움(Te), 세슘(Cs), 구리(Cu), 납(Pb), 니켈(Ni), 망간(Mn), 수은(Hg), 코발트(Co), 크롬(Cr), 카드뮴(Cd), 스트론튬(Sr), 철(Fe), 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt), 프라세오디뮴(Pr), 가돌리늄(Gd), 바륨(Ba), 지르코늄(Zr), 몰리브데넘(Mo), 인듐(In), 주석(Sn), 란타넘(La), 세륨(Ce), 네오디뮴(Nd), 사마륨(Sm), 이트륨(Y), 알루미늄(Al) 및 유로퓸(Eu) 등 제한이 없으나, 바람직하게는 반응성이 낮은 금, 은, 구리 및 백금, 실리콘, 및 철로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 금속으로 이루어질 수 있다.
- [0074] 또한, 본 발명의 상-이동 프로브는 그 표면에 친수성 리간드(hydrophilic ligand)와 소수성 리간드(hydrophobic ligand)가 부착되어 양친매성 특성을 포함하여 물과 기름층 계면에 오래 머물 수 있는 성질이 갖는 것일 수 있으며, 또한 신호발생물질을 기름층에 전달할 수 있는 기능이 있는 물질이다.
- [0075] 본 발명에서 “신호발생물질”은 검출가능한 전기적 또는 광학적 신호를 발생시키는 것이라면 제한되지 아니하며, 상기 신호의 발생은 기름층에서 전기적 또는 광학적 신호로 변환 가능한 화학적 또는 물리적 변화를 포함한다. 따라서, 본 발명에서 신호발생물질은 전기적 또는 광학적 신호 그 자체 또는 상기 신호로 변환 가능한 물리적 또는 화학적 변화를 야기하는 것이라면 제한되지 아니하며, 그 비제한적인 예로는 형광체, 발색체, 촉매, 염료, 전해질, 산성 또는 염기성 물질 등이 있고, 본 발명의 구체적인 실험에서는 용매화발색 염료(solvatochromic dye)를 신호발생 물질로 이용하였다.
- [0076] 본 발명에서 “용매화발색 염료(solvatochromic dye)”는 용매의 성질에 따라서 특이적인 파장을 흡수 또는 방출하는 염료 또는 형광분자이고, 본 발명의 구체적인 실험에서는 나일 레드(Nile red)를 이용하였으나, 이에 제한되지 아니한다.
- [0077] 본 발명에서 액체 생검은 인간으로부터 분리된 생물학적 시료를 의미하며, 방광암 진단에서 액체생검은 소변을 의미한다.
- [0078] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상-이동 프로브는 보안트 오가노겔(buoyant organogel)로 용매화발색(Solvatochromic) 염료(구체적으로, 나일레드)를 신호발생물질로 포함한다. 보안트 오가노겔은 물보다 낮은 밀도를 가지도록 제작하였다.
- [0079] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 물층에 상-이동 프로브 고정은 히알루론산과 보안트 오가노겔을 혼합하고 글루타르알데히드(glutaraldehyde, GA)를 첨가하여 가교시켜 O2 플라즈마로 처리된 커버 글라스에 드롭 캐스팅(drop-casting)하여 히알루로니다제에 의해 분해되는 비겔 필름(bigel film)을 제작하고, 상기 비겔 필름으로 개질된 커버 글라스를 biphasic system을 형성할 용기의 바닥면에 위치시킴으로써 수행된다. 구체적인 실험에서 커버 글라스 표면에 부착된 비겔 필름의 평균 두께는 20 μm 이다. 상기 비겔 필름은 소변 샘플에 히알루로니다제가 포함된 경우 분해되어 보안트 오가노겔을 자유 상태로 유리시킨다. 유리된 보안트 오가노겔은 물보다 낮은 밀도로 부유하여 물층과 기름층의 계면으로 이동하고, 기름층에서 보안트 오가노겔은 신호 물질을 기름층으로 방출하여 기름층에서 특이적인 형광을 검출할 수 있도록 한다(도 1a).
- [0080] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비겔 필름의 가교 밀도는 오가노겔 방출에 영향을 미친다. 따라서, 미량의 Hdase에 의해 분해 가능하되, Hdase 부존재 조건 하에서 단순한 팽창으로 오가노겔을 방출하지 않는 비겔 네트워크 구조 형성을 위하여 다양한 중량비로 히알루론산과 글루타르알데히드를 혼합하여 비겔 필름을 제작하여 팽창 안정성과 Hdase에 의한 분해에 따른 신호 발생 정도를 확인한 결과, 히알루론산과 글루타르알데히드를 1:2 중량비로 혼합하여 제작된 비겔 필름이 높은 팽창 안정성을 가지면서도 Hdase에 대하여 민감하게 분해될 수 있음을 알 수 있었다.
- [0081] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 보안트 오가노겔은 미셀(micelle) 구조체로서 소변 샘플에 히알루로니다제가 존재하는 경우 붕괴되는 히알루론산 네트워크 구조에서 유리되어 기름층으로 이동하고, 기름층의 비극성 용매와 접촉하여 역미셀(reverse micelle)에 의하여 내부에 포함된 신호 물질을 기름층으로 방출한다.
- [0082] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 미셀 구조의 보안트 오가노겔 입자는 그 습윤성에 따라서 물층-기름층의 계면에서 발생하는 신호 전달 효율에 영향을 미친다. 오가노겔 입자의 습윤성 최적화를 위하여 톨루엔과 올레산을 2:1 부피비로 혼합한 혼합용매에 5 중량%의 12-하이드록시스테아릭산을 첨가하고 초음파 처리하여 단분산 오가노겔 입자를 제작하였다.
- [0083] 이하, 본 발명의 구체적인 실시예에서 물층에서 기름층으로 부력에 의해 이동할 수 있는 보안트 오가노겔은

BLOOM(buoyancy-lifted bio-interference-orthogonal organogel messenger)이라고 하고, 상기 BLOOM을 biphasic system 하에서 바이오마커 존부에 따른 상-이동을 통한 바이오마커 검출 분석을 BLOOM 분석이라고 한다.

[0084] 본 발명자들이 제안하는 방광암 진단을 위한 POC 테스트 방법은 biphasic system 하에서 수행되는 BLOOM 분석을 이용하는 것일 수 있다.

[0086] 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.

[0087] [실험 방법 및 재료]

[0088] 1. 재료

[0089] 나일 레드(Nile red, NR), 12-하이드록시스테아릭산(12-hydroxystearic acid, HAS) 및 글루타르알데히드(glutaraldehyde, GA)는 TCI Chemicals에서 구입하였다. bovine tests의 히알루로니다제(Hyaluronidase, Hdase), *Streptococcus equi*의 히알루론산나트륨염(hyaluronic acid sodium salt, HA), 브로민화 세트리모늄(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB), 도데칸(dodecane), 톨루엔(toluene, Tol), 및 올레산(oleic acid, OA)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. Sealing tape (clear polyolefin) 및 laked horse blood는 Thermo Fisher Scientific에서 구입하였다. Microscope cover glass (15 mm, round) 및 인간 기증자의 NPU(normal pooled urine)는 Marienfeld superior 및 LEE biosolutions에서 획득하였다. NPU는 반복적인 동결-해동 후 사용하였다. 모든 화학물질은 추가 정제 없이 바로 사용하였다.

[0091] 2. 도구

[0092] 에멀전(emulsion)과 비겔(bigel)의 형태(morphology)와 크기는 공초점 현미경(LSM 800, Zeiss) 및 초저온 주사전자현미경(cryogenic scanning electron microscope) (Quanta 3D, FEI)으로 측정하였다. 비겔 필름의 형성은 푸리에 변환 적외선 분광기(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) (Nicolet™iS20 FTIR, Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 확인하였다. 자외선 가시광선 분광기(ultraviolet-visible spectroscopy) (S-3100 spectrophotometer, Scinco)과 형광 분광기(fluorescence spectroscopy) (SpectraMax®M2 Multi-Mode Microplate reader, Molecular Devices)는 특성화 및 감지 실험에 이용하였다.

[0094] 3. 용매화발색(Solvatochromic) 염료를 함유한 보얀트 오가노겔(buoyant organogel) 입자의 제조

[0095] 10 mM의 NR을 Tol 및 OA (Tol/OA [v/v]=2:1; total 1 mL)에 용해시켰다. 상기 용액을 65° C의 heating bath에서 5분 동안 배양하여 NR 염료를 혼합 용매에 완전히 용해시켰다. 이어서, 5 wt% HSA (43.7 mg)을 상기 Tol/OA 혼합물에 첨가하여 스톡용액 1(stock solution 1)을 준비하였다. 이어서, 상기 스톡용액 1과 탈이온수를 1:25의 부피비로 혼합한 혼합물을 준비하였다(200 μ L of stock solution and 5 mL of deionized water; total 5.2 mL). 그리고, tip sonicator(Branson 450 digital Sonifier®)를 이용하여 오일-물 혼합물을 초음파 처리하여 에멀전(emulsion)을 제조하였다. 단분산 에멀전 형성을 위한 초음파 처리 조건은 160W 진폭 및 5분 이상의 generation time으로 최적화되었다. 공초점 이미지로부터 무작위로 선택된 100개의 획득된 에멀전의 크기는 $\sim 4.1 \pm 0.7$ μ m이다. 오가노겔 입자(organogel particles)는 25° C에서 냉각시켜 형성되었다.

[0097] 4. biphasic solvent system 하에서 신호 전달(Signal transduction)

[0098] 보얀트 오가노겔 입자(buoyant organogel particles)의 습윤성(wettability)은 binary system 하에 유체-유체 계면에서 효율적인 신호 전달에 영향을 미친다. 보얀트 오가노겔 입자의 습윤성 최적화를 위하여 OA와 Tol을 1:2 부피비로 혼합한 혼합물을 이용하였다. 상기 OA 및 Tol 혼합물은 추가적인 처리 없이 이용되었다. binary

system 하에서 신호 전달/오가노겔 용해를 평가하기 위하여, 200 μ L의 오가노겔 분산액을 binary system(1 mL of deionized water and 1 mL dodecane)의 바닥면에 위치하는 물층에 부었다. 도데칸(dodecane) 층의 NR 형광 강도는 60분 동안 측정되었다(excitation: 460 nm, emission: 540 nm). 또한, 하향 조절된 binary system 하에서 신호전달 및 오가노겔 용해를 측정하기 위하여, 5 mM CTAB를 물층에 첨가하고, 도데칸 층에서 NR의 형광 강도를 60분 동안 측정하였다(여기: 460nm, 방출: 540nm 파장). NPU 와 5% laked horse blood으로 구성된 인공 혈뇨 샘플을 준비하고 NPU와 인공 혈뇨 샘플 사이의 신호 전달 효율을 평가하였다.

5. Hdase 분해성 비겔 필름 제조

비겔 개질을 위하여, HA (1 wt%)를 1.6 mL 물에 혼합하고, 상기 혼합물을 65° C로 가열된 수조(bath)에서 6시간 동안 가열하여 HA를 용해시켰다. 이어서, 1 wt% HA 용액을 3.2 mL의 오가노겔 분산물과 혼합하였다. HA 용액과 오가노겔 분산액의 혼합용액에 GA를 첨가하고, HCl (0.02 N)을 이용하여 pH를 3으로 조절함으로써, 하이드로겔 제조를 위한 HA 가교결합을 유도하였다(mass ratio of HA to GA=1:2). 부드럽게 혼합하고, 200 μ L의 혼합물을 02 플라즈마로 처리된 커버 글라스에 드롭 캐스팅(drop-casting) 하였다(power supply, 70 W; generation time, 1.5 min; FEMTO Science). 균일한 두께의 Hdase-분해성 비겔 필름은 상기 02 플라즈마 처리된 커버 글라스를 30° C의 건조 오븐(BF-80N, Biofree)에서 24시간 동안 배양하여 GA 및 HA의 가교를 유도함으로써 형성하였다.

다양한 중량비로 혼합한 HA 및 GA 혼합 용액(mass ratio of HA and GA=1:2, 1:4, 1:6, and 1:8)을 이용하여 비겔 필름 가교를 최적화하였다. 비겔 필름의 제조 최적화를 위하여 6, 18, 또는 24 시간 동안 건조 오븐에서 배양하여 비겔 필름을 제작하였다.

6. biphasic system 하에서 BLOOM을 이용한 Hdase 검출

biphasic system 하에서 BLOOM의 Hdase의 정량적 검출 능력을 확인하기 위하여, 0.1 mU/mL 내지 1 U/mL 농도의 Hdase를 포함하는 NPU를 준비하였다. 24-well plate에 BLOOM 비겔 필름을 배치하고, 상이한 농도로 Hdase를 포함하는 NPU 용액 1 mL를 각 웰에 첨가하였다. 이어서, 도데칸 1mL를 Hdase 포함 용액의 상부에 부드럽게 첨가하고, 형광 분광계는 37° C로 세팅하고 유기층에서 NR의 여기(460nm) 및 방출(540nm) 파장을 측정하였다.

7. 인공 혈뇨에서 Hdase 검출

인공 혈뇨 샘플은 의도된 농도의 laked horse blood를 NPU에 첨가하여 제조하였다. 상기 인공 혈뇨 샘플에서 적혈구(RBC)의 수를 측정하였다. laked horse blood의 농도에 해당하는 적혈구의 수는 $\times 400$ HPF의 공초점 현미경을 이용하여 계산하였다. 표준곡선은 RBCs/HPF 값을 기반으로 계산하였다. NPU내 1% laked horse blood의 적혈구 수는 253 ± 0.7 이다. 이어서, biphasic system 하에서 NPU 대신 Hdase를 포함하는 인공 혈뇨 샘플을 이용하여 상술한 BLOOM 분석과 동일하게 Hdase를 검출하였다.

인공 혈뇨에서 BLOOM assay의 신호 획득이 biphasic system 이 효과적인지 확인하기 위하여, 상부에 유기층이 없는 단상 시스템(monophasic system)을 구축하였다. 상기 단상 시스템은 1 mL의 소변/인공혈뇨 샘플과 1 mL의 도데칸의 이중층 대신에 도데칸이 없는 2 mL의 소변/인공혈뇨 샘플을 석영셀(quartz cuvette)에 추가하여 제작된다. 단상 시스템 실험은 1 U/mL에서 250 RBCs/HPF의 인공 혈뇨 샘플을 이용하였다. Biphasic 및 monophasic 시스템 하에서 형광 강도는 상부 1mL에서 형광 분광기를 사용하여 측정하였다.

8. 임상 샘플 수집

blinded manner로 채취된 BC 의심 환자(BC 및 GU 환자)와 건강한 사람의 소변 검체를 고려대학교 안암병원에서 제공받았다. 모든 임상 샘플은 임상시험심사위원회의 승인을 받아 프로토콜에 따라 수집되었다(2018AN0332). 모든 환자 및 정상인은 참여 전에 동의서에 서명하였고, 모든 참가자의 연령, 성별, 및 병리학적 진단은 익명으로 기록되었다. 소변 샘플 중 어느 것도 동일한 환자에서 유래되지 않았으며, 임상 샘플은 수집 후 가능한 빠르게 실험에 이용되었다.

[0114] **9. 임상샘플을 대상으로 BLOOM 분석**

[0115] 임상샘플을 이용한 BLOOM 분석을 수행하기 위하여, 500 μ L의 각 임상샘플을 반응버퍼(sodium acetate buffer, pH 4, 0.1 M)과 1:1 비율로 혼합하여 pH를 조절하였다. 분석 수행 이전에, 24-well plate 상에 비겔 필름을 PBS(phosphate-buffered saline)로 3회 세척하여 Hdase를 분해할 수 있는 과도한 GA를 제거하였다. 이어서, 1 mL의 임상샘플과 1mL의 도데칸을 비겔 필름에 첨가하여 biphasic system을 형성하였다. 대조군으로는 수회 동결-해동 주기를 거친 NPU를 사용하였다. 37° C에서 배양한 후에, 형광 분광기를 이용하여 460 nm (excitation) 및 540 nm (emission)에서 형광 강도를 측정하였다.

[0117] **10. 임상샘플을 대상으로 NMP22 BladderChek® 테스트**

[0118] NMP22 BladderCheck®(Abbott) 시스템을 제조사의 프로토콜에 따라서 이용하였다. 간략하게 임상샘플 4방울을 테스트 카트리지 상에 각 샘플 웰에 첨가하였다. 카트리지 주위 온도에서 최소 30분 동안 배양하고 휴대전화기 카메라를 이용하여 사진을 찍었다. 시험 영역에서 육안으로 발색된 선이 확인되는 경우 양성으로 간주하였다.

[0120] **11. BLOOM POC 리더 장치의 구조**

[0121] BLOOM POC 리더 장치는 Autodesk Fusion 360 3D CAD 소프트웨어를 이용하여 설계하였다. 하우징 및 기타 다른 구성은 JGMaker A5S printer (JGMaker)를 사용하여 인쇄하였다. 구체적인 장치의 구조는 도 6에 a와 같다. 형광 강도 측정에서 반사율을 최소화하기 위하여 검은색 폴리젯산(poly-lactic acid)을 3D 프린팅용 재료로 이용하였다. 발광 다이오드(LED)로 조명할때, 도데칸 층의 NR의 방출 파장(540nm)보다 짧은 파장의 빛을 제거하기 위하여 오렌지색 acrylic sheet (Inventables)를 필터로 이용하였다. polyimide heater (Alibaba), LED lights (Adafruit), 및 temperature controller (Digikey)를 이용하였다. POC 장치의 내부 온도는 37° C로 유지된다. 모든 구성요소와 전자 회로는 단일 하우징 장치에 장착된다. 구성요소의 배치 설계도는 도 6에 a와 같고, 실물 사진은 도 6에 c에 나타내었다.

[0123] **12. POC 리더기를 이용하여 임상 샘플의 BLOOM 분석**

[0124] NMIBC 환자의 소변/혈뇨 샘플을 대상으로 POC 장치를 이용한 BLOOM 분석을 수행하기 위하여, 1mL의 반응버퍼 (acetate buffer, pH 4, 0.1 M)와 바닥면에 Hdase-분해성 비겔 필름을 포함하는 샘플 바이알(sample vial)에 임상샘플 1mL를 로딩하였다. 2 mL의 반응버퍼와 Hdase-반응성 비겔 필름을 포함하는 바이알은 대조군으로 이용하였다. 이어서, 3mL의 도데칸을 부드럽게 임상샘플과 대조군에 각각 첨가하였다. 그리고, BLOOM POC 장치에서 히터를 작동시키고 3시간 동안 배양하였다.

[0125] 1단계: 탈착가능한 스마트폰 홀더에 스마트폰을 장착하고, 스위치로 LED 빛을 작동시킨 후 실험군 및 대조군의 도데칸 층에 NR 형광강도를 스마트폰을 이용하여 획득한다.

[0126] 2단계: 실험군과 대조군의 바이알에서 획득된 형광강도의 정량분석은 ImageJ 1.53e software를 사용하여 수행하였고, 샘플 바이알의 NFI ($I_{\text{sample}}/I_{\text{control}}$)을 사용하였다.

[0128] **13. 통계 분석**

[0129] 각 샘플에서 통계적 차이를 분석하기 위하여 Student's t-test를 사용하여 비교하였다. 통계분석은 GraphPad Prism 9.1.0을 사용하여 수행하였다. 정량적 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차로 표시하였다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, 및 **** $p < 0.0001$ 의 차이는 유의한 것으로 간주하였다.

[0131] **[실험 결과]**

[0132] **1. 메신저(messenger) 제조 및 용매화발색(solvatochromic) 신호 전달**

[0133] 균일한 크기의 보얀트 오가노겔 메신저 제조를 위하여, 증류수, 12-하이드록시스테아릭산(12-hydroxystearic acid, HSA)을 유기화겔제(organogelator)로 포함하는 톨루엔(Tol), 계면활성제로 올레산(oleic acid, OA), 및 형광 신호 물질로 나일레드(Nile red, NR)를 팁 소닉(tip sonication)에서 겔화 온도 이상에서 가열하여 유화시켰다(도 2a). 25° C에서 에멀전을 냉각하고, 생성된 오가노겔 입자의 평균 직경은 $4.1 \pm 0.7 \mu\text{m}$ 이고, 물의 밀도보다 낮은 밀도로 물에서 부유할 수 있다(895 kg/m^3 for OA and 867 kg/m^3 for Tol; calculated density of organogel = 885.7 kg/m^3 ; 도 2b 내지 도 2e). 도데칸 층과 접촉하였을 때 오가노겔 입자는 NR 분자를 용해 및 방출하고, 이때 NR은 오가노겔에서 관찰되는 적색 형광과 상이한 녹색 형광을 방출한다(도 2d 및 도 2). 관측하는 파장은 물층에서 오가노겔의 형광과 중첩되는 것을 배제하기 위하여 540nm로 선택하였다(도 2f 및 도 2g).

[0134] 신호 메신저의 자체 부유 과정은 생화학적으로 직교하기 때문에, 도데칸 층의 신호 발생은 의도된 설계에 따라서 임상 샘플 환경과 무관할 것이라고 가설을 세웠다. 상기 가설을 검증하기 위하여, NPU(normal pooled urine) 또는 인공 혈뇨 샘플과 도데칸을 이용하여 biphasic system을 형성하였다(각각 5% and 50% of blood concentration in NPU). 보얀트 신호 메신저를 물층의 바닥면에 주입하였을 때, 부유하는 입자와 밝은 녹색 형광이 도데칸 층에서 관찰되었다(도 2h). 모든 시스템의 형광 강도는 일관되고, 맑은 소변과 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이는 간섭 물질 등의 제거를 위한 전처리 없이도 임상 혈뇨 샘플에서 직접 신호를 생성하는 BLOOM 분석의 안정성을 보여준다.

[0136] 2. 보얀트 오가노겔 입자의 상-이동 최적화

[0137] 오가노겔 입자의 친수성-친유성 균형은 신호 메신저의 상-이동능을 향상시키기 위하여 biphasic system 하에서 입자의 안정화된 계면 에너지를 기반으로 최적화되었다. 콜로이드 입자에 의한 계면 안정화는 벌크 상(bulk phase)에서 기름-물 계면으로의 전달 효율과 밀접한 관련이 있다. 구형 입자의 벌크에서 계면으로의 전달과 관련된 자유 에너지(ΔE_p)는 아래 식 1로 표현할 수 있다

[0138] [식 1]

$$\Delta E_p = -\pi R^2 \gamma (1 \pm \cos \theta)^2$$

[0139]

[0140] 상기 식 1에서 R는 입자의 반지름, θ 는 계면장력, θ 는 입자와 계면 사이에 삼상 접촉각(three-phase contact angle)이다. 상기 식 1에 따르면, 계면 자유 에너지(ΔE_p)는 콜로이드 입자의 습윤성을 이용하여 조절할 수 있다. 오가노겔 입자의 습윤성을 최적화하기 위하여, OA:Tol 부피비를 조절하여 다양한 계면활성제를 입자 표면에 개질시킨 일련의 오가노겔을 제조하였다(도 2j). OA가 없는 경우, 오가노겔 입자는, 계면활성제 존재 하에서 합성된 오가노겔 입자와 달리, 불안정하고 비정질(amorphous) 응집체를 형성하였다. 오가노겔의 Tol 함량을 OA 부피의 2배로 증가시키면, 도데칸 층에서 형광강도는 Tol이 없는 것과 비교하여 1.7배 증가하였다. 상기 결과를 기초로, 추가실험에서 오가노겔의 비율을 결정하였다. 또한, 이온성 계면활성제인 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)을 biphasic system에 첨가함으로써 계면 장력을 낮추면 신호 전달이 개선되고 형광 강도가 3배 증가하였다.

[0142] 3. Hdase 분해성 비겔 필름 제조

[0143] 오가노겔 제조 최적화 이후에, 커퍼 글라스상에서 보얀트 오가노겔 입자를 포획하여 캡슐화하는 Hdase 분해성 필름을 제작하였다($d=15 \text{ mm}$; 도 3a). 산소 플라즈마 처리된 글라스 상에 1 wt% HA이 포함된 수용액 및 보얀트 오가노겔 분산액의 혼합물을 드롭 캐스트 하였다. HA의 겔화(gelation)을 위하여, GA(glutaraldehyde)을 산성 pH에서 가교제로 이용하였다. 글라스 상에 필름을 건조한 후에 Hdase-분해성 비겔 필름이 형성되었다(도 3b).

[0144] 극저온 주사전자현미경 사진을 이용하여 하이드로겔의 형성과 비겔 필름의 균일한 두께($20 \mu\text{m}$)를 확인할 수 있었고(도 3c), 그 내부에 구형 오가노겔 입자를 확인할 수 있었다. 공초점 현미경을 이용하여 획득된 형광 이미지는 필름 상에 오가노겔의 분포를 나타내었다(도 3d). 비겔 필름상에 오가노겔 입자의 직경은 $4.8 \pm 1.4 \mu\text{m}$ 이고, 이는 자유롭게 분산된 오가노겔과 비교하여 약간 큰 정도로, 건조 과정에서 응집이 많이 발생하지 않음을 나타낸다(도 3e). 비겔 필름의 흡수 파장은 550nm, 방출 형광 파장은 610nm 였고, 이는 수성 분산액 속에 오가

노겔의 그것과 일치한다(도 3f). 비겔 필름의 적외선 분광은 $2,940\text{ cm}^{-1}$ 에서 피크가 확인되었고, 이는 HA와 GA의 가교와 대응되는 피크로 비겔 필름의 가교 네트워크 구조를 확인할 수 있었다(도 3g).

4. BLOOM 분석을 수행한 Hdase 검출

BLOOM 분석의 Hdase 검출능을 측정하였다. Hdase (1 U/mL)가 포함된 NPU를 비겔 필름에 부으면 배양 20분 후에 필름이 분해되었다. 이는 Hdase에 의해서 HA를 포함하는 네트워크 구조가 분해되었음을 시사한다(도 4a). 필름이 분해되는 동안, 비겔 필름에 갇힌 보얀트 오가노겔은 도데칸-NPU 계면으로 부유하여 형광 신호를 도데칸 층으로 전도하였다. Hdase가 없는 NPU(대조군)에서 배양된 비겔 필름은 부풀었지만, 도데칸 층에서 자력 부유하는 오가노겔 또는 형광 신호를 확인할 수 없었다. 이어서, 각 실험군과 대조군에서 시간의 경과에 따른 형광 강도를 측정하였다(도 4b 및 도 4d). 대조군 실험에서 60분 동안 배양에서 관찰되지 않은 540nm 방출 파장과 달리, Hdase를 포함한 NPU의 BLOOM 분석에서는 점진적으로 형광 강도가 증가하였으며, 비겔 필름의 610nm에서 NR 방출과 중첩되지 않았다(도 4c 및 도 4d). 상기 결과는 임상 샘플을 이용한 BLOOM 분석에서 부유 과정 및 용매발색화 형광의 관찰함으로써 Hdase 검출을 제시한다.

이어서, Hdase의 민감한 검출을 위하여 비겔 필름을 최적화하였다. 비겔의 조밀한 네트워크 구조는 하이드로겔을 충분하게 분해하여 보얀트 오가노겔 입자를 방출하기 위하여 많은 양의 Hdase의를 요구한다. 대조적으로 비겔의 엉성한 네트워크는 Hdase의 부존재하에서도 단순히 부풀어 오른 경우에도 오가노겔을 방출할 수 있다. 따라서, 미량의 Hdase에 의해 분해 가능하고 물에서 팽창 시에도 안정적인 비겔 네트워크를 제작하기 위하여 비겔의 가교 밀도를 조정하였다(HA:GA mass ratio=1:2, 1:4, 1:6, 및 1:8). 1:2 비율은 팽창 안정성과 Hdase를 향한 강한 형광강도를 나타내어, 최적 조건으로 확인되었다. 효소의 최적 활성을 고려하여 37°C 에서 BLOOM 분석을 수행하였다.

정량 분석으로서, 다양한 농도의 Hdase (0.1 mU/mL 내지 1 U/mL)를 포함하는 일련의 NPU를 이용하여 BLOOM 분석을 수행하였다. 상기 실험에서 Hdase의 농도 증가시키면 형광 강도가 증가하였으며, 검출 한계는 0.28 mU/mL로 나타났다($\sim 6.44\text{ pM}$, three standard deviations above the background; 도 4e).

또한, BLOOM 분석에서 Hdase에 대한 특이성을 확인하기 위하여, 사람의 소변 샘플에 존재하는 다양한 경쟁 물질을 사용하여 분석을 수행하였다(도 4f). 일반적으로 과도한 양의 다양한 비-타겟 물질 {예를 들어, 이온(NaCl, KCl, MgCl_2 , CaCl_2 , NaHPO_4 , 및 KHPO_4 ; 10 mM), 소분자(urea 및 glucose; 10 mM), 아미노산(histidine 및 tyrosine; 10 mM), 단백질(bovine serum albumin, lysozyme, fibrinogen, cathepsin, caspase, trypsin, 및 thrombin; 1.4 mg/mL)}이 NPU에 포함되어있다. BLOOM 분석은 Hdase를 제외한 모든 물질에 대해 반응하지 않았으며, 상기 결과는 BLOOM 분석이 Hdase에 민감하고 특이적인 검출 시스템을 시사한다.

5. 인공 혈뇨에서 Hdase 검출

혈뇨는 BC 환자의 85 %에서 나타난다. 그러나 증상이 있는 환자의 5%만이 BC로 진단된다. 이러한 증상은 배경 신호와 같은 오류 신호의 증가가 실제 신호와 중첩되어 정확한 정량 분석을 방해하기 때문이다. 심지어 혈액 농도의 샘플 간 차이도 보정을 통한 정확한 신호 획득을 방해한다. 본 발명에서 설계된 시스템 기반으로 BLOOM 분석이 혈액과 소변의 간섭을 완화할 수 있는지 조사한 결과, 본 발명의 biphasic system에서는 혈뇨 상태에 무관하게 일관된 신호를 획득할 수 있었다. 대조군으로는 도데칸 층이 없는 monophasic system을 준비하고, 인공 혈뇨 샘플(NPU with 250 red blood cells per high-power field (RBCs/HPF))을 대상으로 Hdase 첨가 후에 인공 혈뇨 샘플 상부에 분산된 보얀트 올리고머의 올리고머 방출을 관찰하였다(도 4g). 인공 혈뇨 샘플의 상부에 비겔 필름으로부터 보얀트 오가노겔 메신저가 방출에도 불구하고, 어떠한 처리 없는 NPU 샘플과 비교하여 610 nm에서 형광강도의 차이가 관찰되었으며, 이는 혈뇨 샘플에서 물질에 의한 형광 신호 소멸을 의미한다. biphasic system에서 540 nm에서 NR 단량체 방출의 녹색 형광은 인공 혈뇨 샘플의 도데칸 층에서 관찰되었다. 이는 NPU의 그것과 큰 차이를 보이지 않았다(도 4h). 혈액 함량(1250 RBCs/HPF)이 높은 인공 혈뇨 샘플이 비겔 필름에서 보얀트 오가노겔의 적색 형광을 나타내에도 불구하고, biphasic system의 도데칸 층의 형광은 Hdase가 존재하는 경우에 식별 가능한 신호를 나타내었다(도 4i). 이어서, 다양한 농도의 Hdase 농도를 이용하여 인공 혈뇨 샘플 (250 RBCs/HPF)에서 NPU에서 정규화된 형광 강도(normalized fluorescence intensities, NFI)와 비교하여 BLOOM 분석의 일관된 신호 획득이 가능한지 확인하였다. 1 mU/mL 내지 1 U/mL의 Hdase에서 NPU 및 인공혈뇨 샘플의 NFI는 유의한 차이를 나타내지 않았다(도 4j). 인공 혈뇨 샘플에서 적혈구 수와 무관하게, 인공 혈뇨 샘플

에서 형광 신호는 BLOOM 시스템 하에서 유사하였다(1 U/mL Hdase; 도 4k). 상기 결과는 biphasic system이 이질적인 혈뇨 조건으로 인한 장애를 극복하고 충분히 신뢰가능한 신호를 효율적으로 생성함을 보여준다.

[0155] 6. 임상 샘플에서 BC 진단을 위한 BLOOM 평가

[0156] 검사 결과를 이용하여 BLOOM 분석의 임상에서 수행을 평가하고, 비뇨기과 의사의 임상 진단 결과를 평가하며, 105개의 임상 소변 샘플(60명의 BC 환자, BC(GU) 이외의 비뇨생식질환 환자 20명, 건강한 사람 25명)을 이용하여 NMP22BC®rapid kit의 판독값을 평가하였다. BC 및 GU 환자의 소변 샘플은 임상 검증을 위한 동의를 얻어 이중 블라인드 테스트를 위하여 수집되었다. 비뇨기과 의사는 BC 진단과 암 단계 분류를 위하여 원내에서 환자별로 H&E(hematoxylin and eosin) 조직학적 분석, 방광경 검사, 자기공명영상검사를 시행하였다(도 5b). 확보된 샘플 중 66.7%는 5 RBCs/HPF 이상인 혈뇨로 측정되었으며, 이는 바이오마커의 민감하고 정확한 검출을 방해한다. translational study에서 임상 소변 샘플의 BLOOM 분석에서 얻은 NFI 값(NFIV)을 직접 사용하였고, 이를 해당 Hdase 값으로 변환하지 않았다. BC 환자의 소변 샘플의 평균 NFIV($I/I_0=1.78\pm0.52$)는 건강한 대조군과 GU 환자($p<0.0001$)를 포함한 비흡연자($I/I_0=1.21\pm0.19$)보다 높았다. 건강한 대조군의 소변 샘플의 NFIV($I/I_0=1.18\pm0.15$, $p<0.0001$)와 비교했을 때, BC에 대한 정확한 진단과 적극적인 감시가 필요한 증상을 가진 GU 환자 샘플의 NFIV($I/I_0=1.23\pm0.22$, $p<0.0001$)와 구별될 수 있었다. 건강한 대조군의 평균 NFIV는 GU 환자의 평균 NFIV보다 낮았고, NFIV 분포에 약간의 차이가 있었으며, 이는 BC 환자의 소변 샘플에서 Hdase 농도가 증가하는 이전 연구와 일치한다. 특히, BLOOM 분석은 초기 단계(Tis, Ta 및 T1)를 포함한 NMIBC 환자($I/I_0=1.73\pm0.48$)를 비종양 개인(건강한 대조군의 경우 $p<0.0001$, GU 환자의 경우 $p<0.0001$, 도 5d)에서 식별할 수 있었다.

[0157] 다음으로 BLOOM 분석의 ROC(receiver operating characteristic) 곡선을 작성하고 곡선 아래 면적(AUC)을 계산하여 BLOOM의 진단 정확도를 조사하였다(도 5e). BLOOM 분석에서 비종양 개인 대비 BC 및 NMIBC 환자의 추정 AUC 값은 각각 0.93 및 0.92였다. BC 환자와 NMIBC 환자 간에 유사한 값을 얻었다. 혈뇨 및 GU 검체가 포함된 연구 설계 세트의 상기 결과는 BLOOM 분석이 BC의 조기 진단을 위한 가정 내 POC 테스트로 실용적으로 이용가능성을 제시한다. 종양이 없는 BC 환자에 대한 BLOOM 검사의 민감도와 특이도는 각각 88.3%와 88.9%였다(도 5f). 대조적으로, 식품의약품 승인된 NMP22BC®는 바이오마커로 NMP22(nuclear matrix protein)을 채택했으며 소변 샘플에 대한 BLOOM 분석보다 낮은 민감도를 보였습니다(sensitivity: 20.0% and specificity: 97.8% against no-tumor individuals). NMP22®의 민감도는 기존에 연구의 보고 보다보다 낮았다(56%, from the 19 studies). 이러한 낮은 민감도는 실험에 참여한 환자 인구의 대부분이 NMIBCs(78.3%)를 가지고 있었고, GU 환자를 비-종양 대조군 그룹에 포함되며(44.4%), 혈뇨의 높은 빈도에 의한 것으로 예상된다.

[0158] 또한, 본 발명자들은 BLOOM 분석에서 표적 바이오마커인 Hdase가 BC 진행중에 BC 상피 세포에 의해 더 많은 Hdase가 분비되기 때문에 BC의 단계와 상관관계가 있고, Hdase가 암 세포의 침습성과 전이와 연관이 있다고 가정하였다. 상기 가정 하에서, 다양한 T 단계에서 BC 환자를 구별하는 BLOOM의 능력을 조사하였다. BLOOM 검사의 AUC는 BC의 T 단계(Ta의 경우 0.904, T1의 경우 0.935, T2의 경우 0.938 이하)에 따라 증가하여 BC의 단계 식별에 도움이 됨을 확인하였다.

[0160] 7. 초기 NMIBC 식별을 위한 BLOOM POC 장치

[0161] 다음으로, BLOOM 시스템을 위한 사용자 친화적인 스마트폰 기반 휴대용 형광 판독기를 제작했다. 리더기는 온도 조절을 위한 폴리이미드 발열 패드(polyimide heating pad), 형광을 위한 청색 발광 다이오드, 오렌지색 필터, 정확한 신호 강도 판독을 위해 스마트폰 카메라와 샘플 사이의 거리를 일정하게 유지하는 스마트폰 홀더를 포함한다. 구성요소에는 BLOOM POC 장치(형광 판독기), reference solution (buffer)을 위한 2개의 샘플 바이알 및 소변 샘플, 2개의 BLOOM 비겔 필름, 소변과 도데칸용 액체 디스펜서, 도데칸용 2개의 용기가 포함된다. 형광 판독기를 포함한 재사용 가능한 구성 요소와 1회용 비겔 필름(약 0.11달러)의 저렴한 가격으로 테스트당 비용이 저렴한 대규모 인구에 대한 공격적인 감시와 광범위한 정기 검사를 반복적으로 수행할 수 있다.

[0162] POC 장치로 BLOOM 검사는 장치의 진단 워크플로우가 다음과 같은 두 가지 간단한 단계로 구성되므로 가정 내 테스트에 적합하다: 1단계: 반응 버퍼와 도데칸이 들어 있는 샘플 바이알에 소변 샘플을 로드하고, 액체 디스펜서를 사용하여 컨트롤(버퍼 용액)과 샘플 바이알에 모두 로드하고, 2단계: 히터 스위치를 켜고 바이알을 37° C에서 배양한 다음 스마트폰을 사용하여 형광 이미지를 획득한다(도 6b, c). 다음으로 POC 장치의 분석 성능을 검

증하기 위해 NMIBC 환자와 BC가 없는 환자의 희석된 일련의 임상 샘플을 사용하여 이미지 처리를 통해 BLOM POC 장치의 스마트폰 사진에서 형광 신호(I/I_{control})를 추출했다(도 6d). 임상 검체의 희석 정도에 따라 형광 신호 강도가 감소하여 우리 장치를 사용한 Hdase의 정량적 검출을 나타냈다. 이어서, NMIBC(n=10) 환자와 BC(n=5; 도 6e 및 도 6f)가 없는 환자의 임상 검체에 대한 I/I_{control} 를 분석했다. NMIBC 샘플($I/I_0=3.11\pm0.83$)의 신호 강도는 BC가 없는 개인 샘플($I/I_0=1.55\pm0.24$, $p<0.0001$)의 신호 강도보다 상당히 높아 BLOM POC 장치의 진단 능력을 입증했다.

[0164]

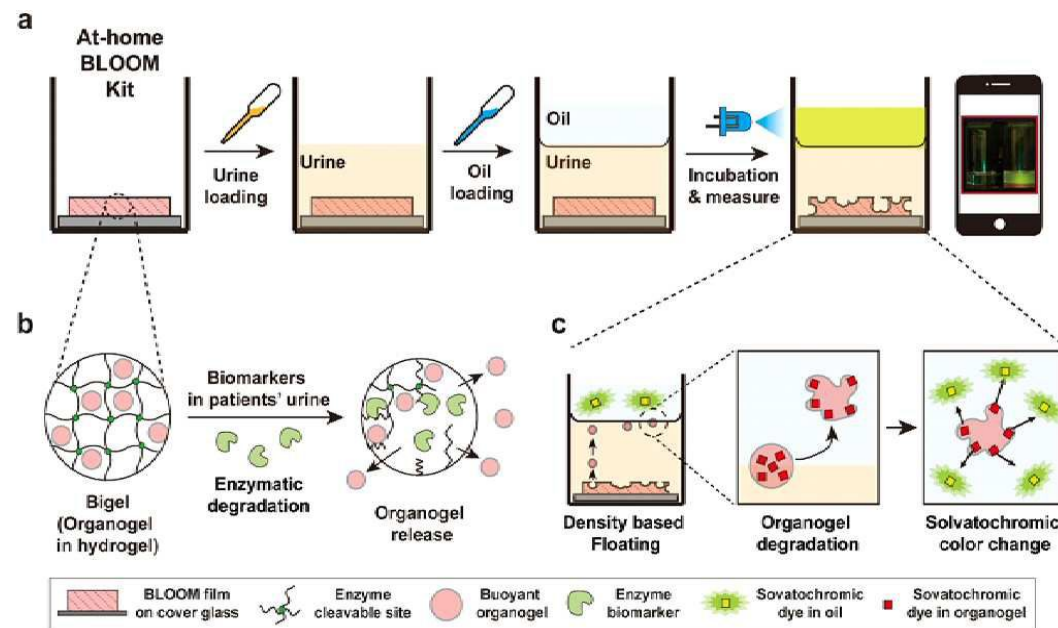
이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[0165]

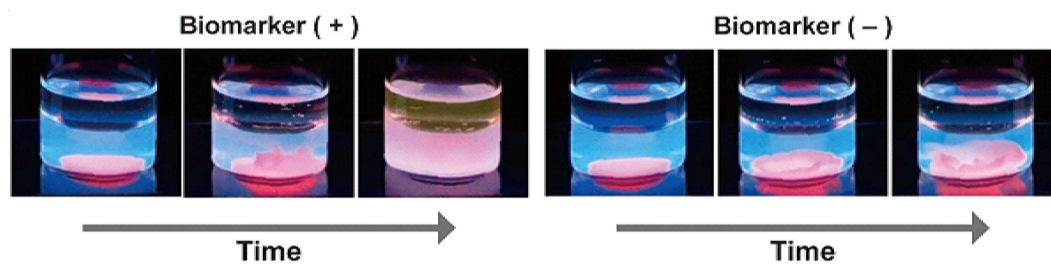
그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

도면1a

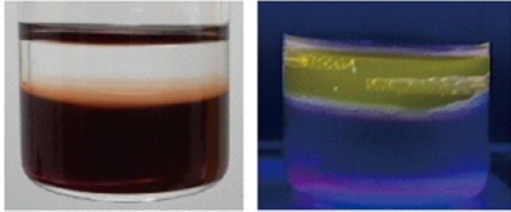


도면1b

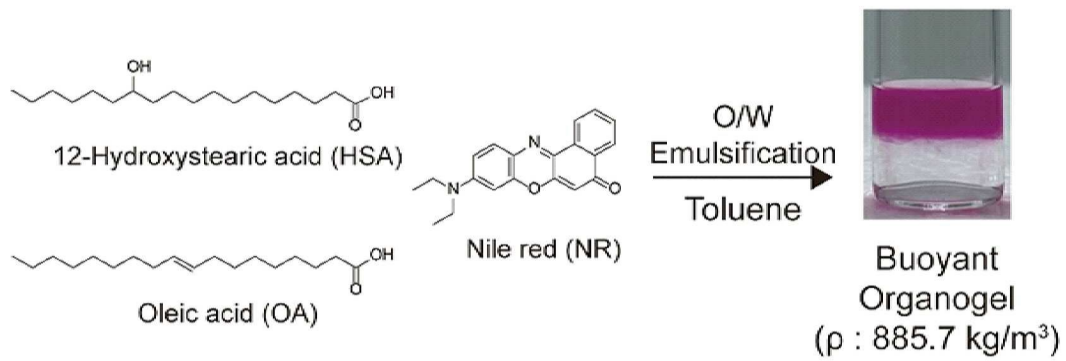


도면1c

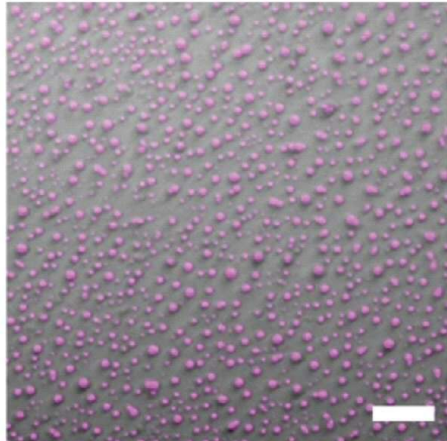
Hematuria



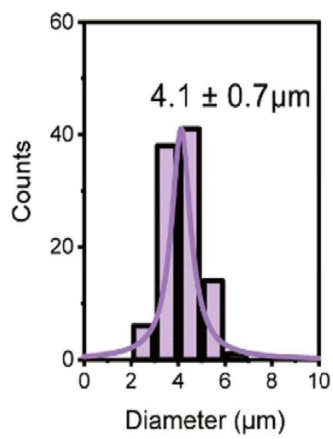
도면2a



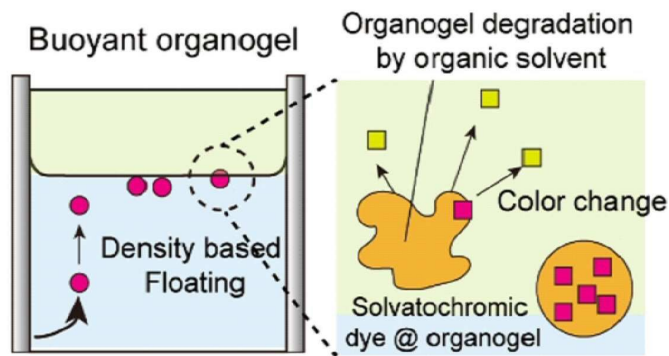
도면2b



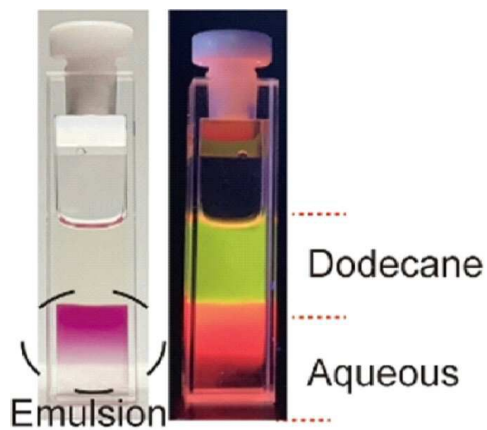
도면2c



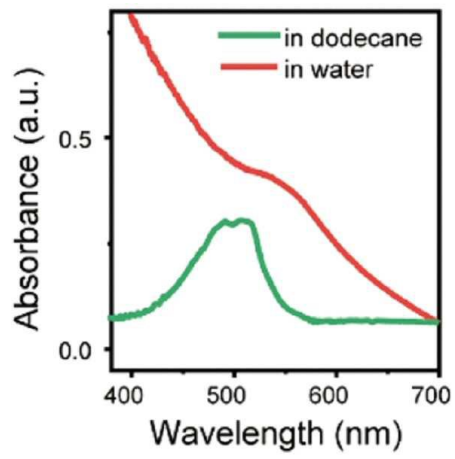
도면2d



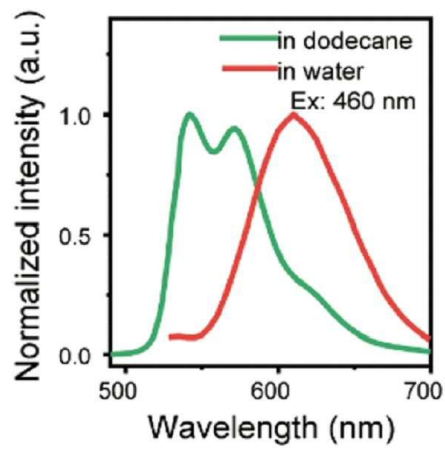
도면2e



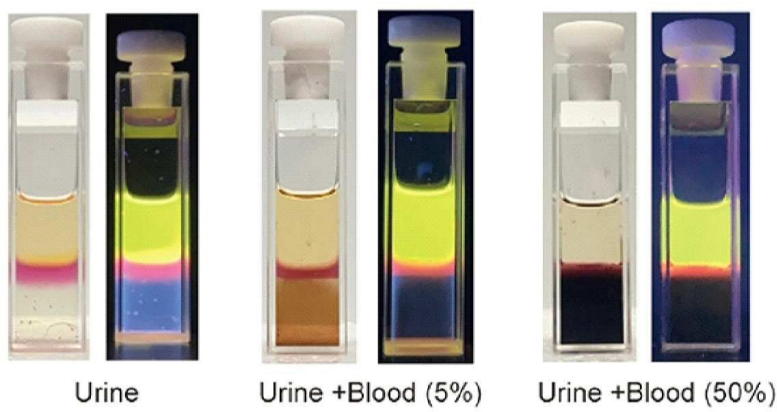
도면2f



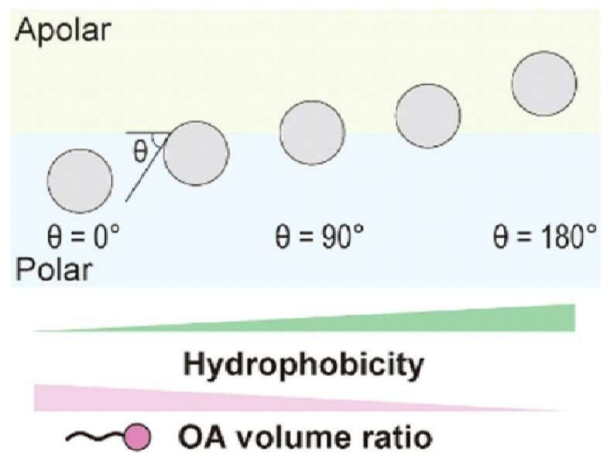
도면2g



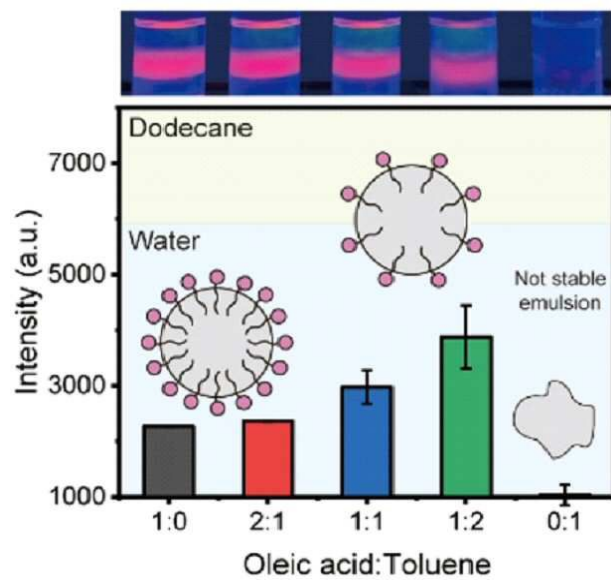
도면2h



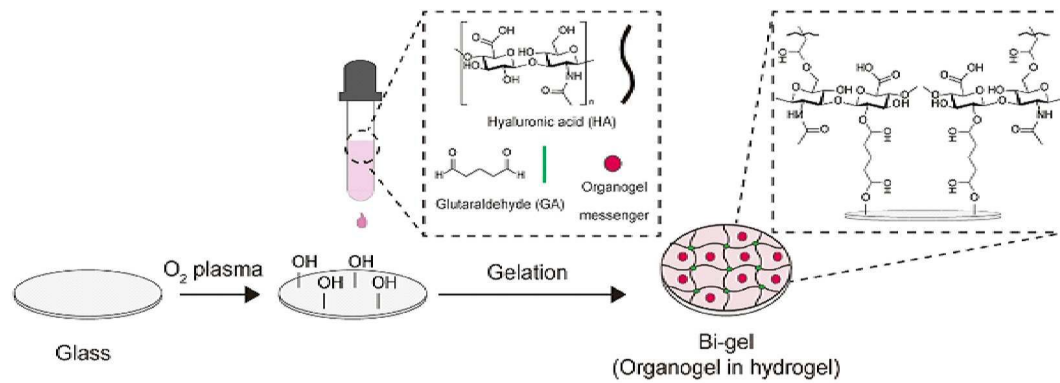
도면2i



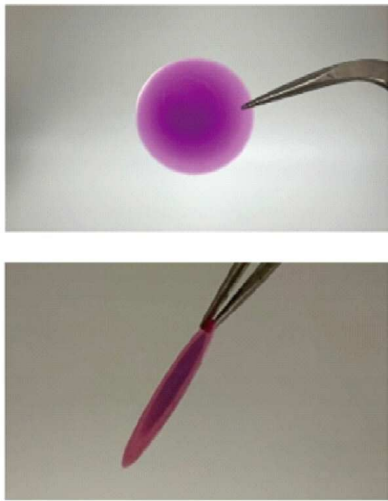
도면2j



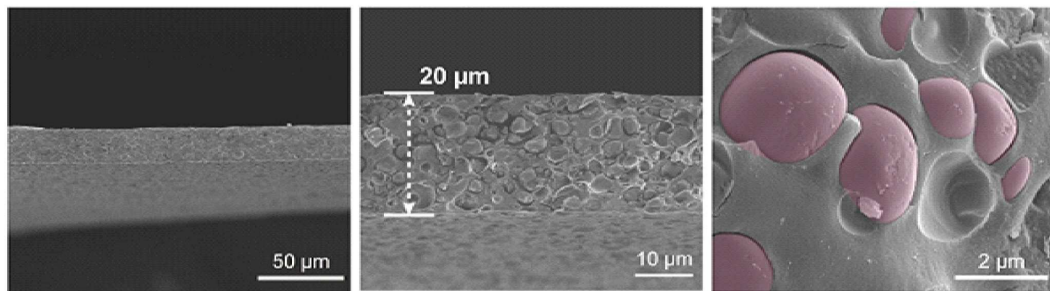
도면3a



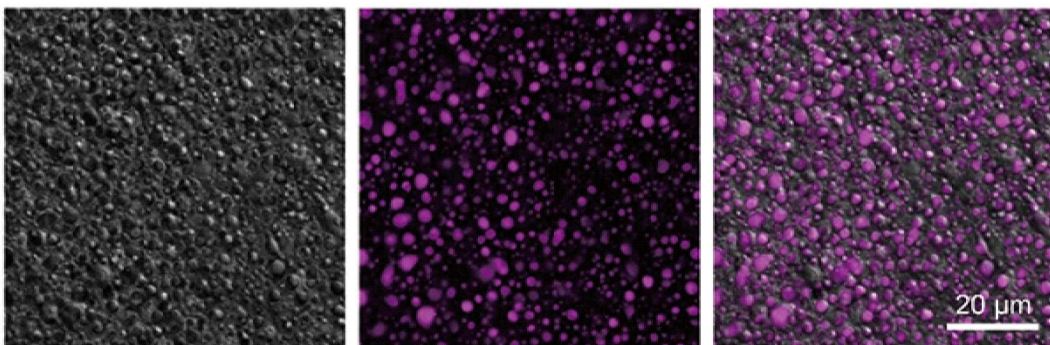
도면3b



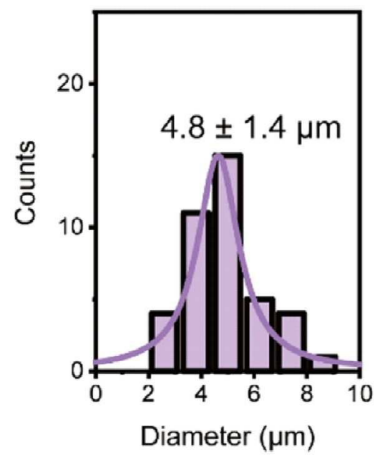
도면3c



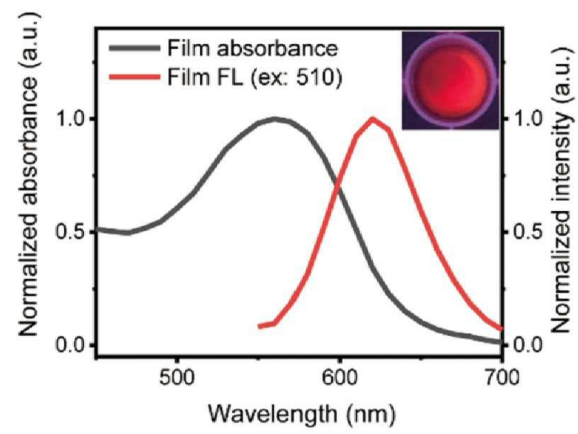
도면3d



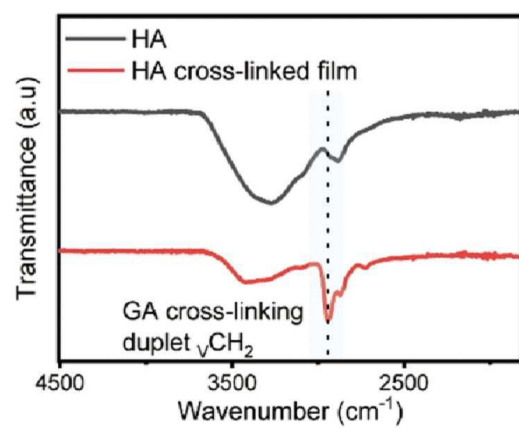
도면3e



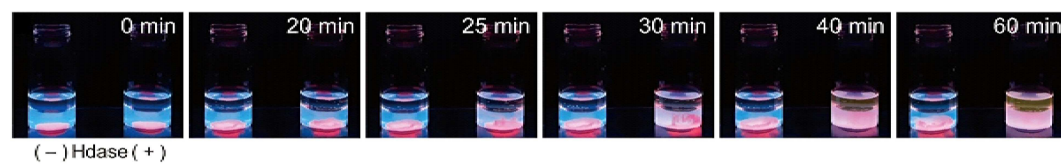
도면3f



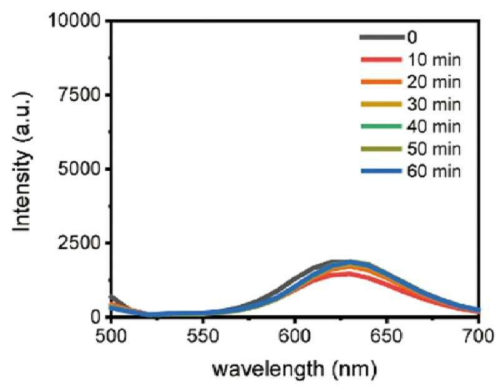
도면3g



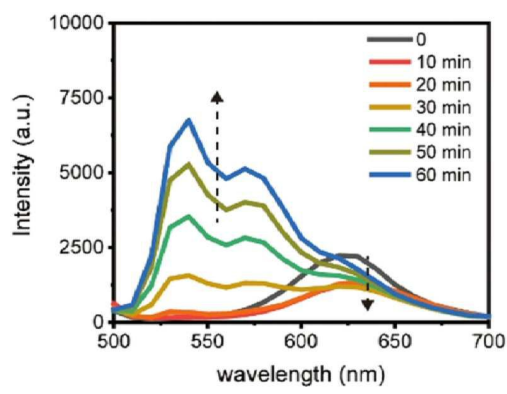
도면4a



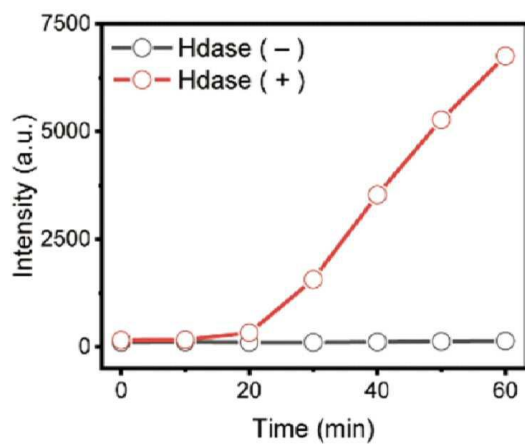
도면4b



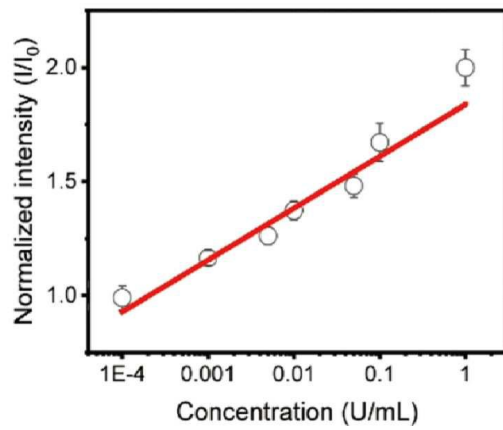
도면4c



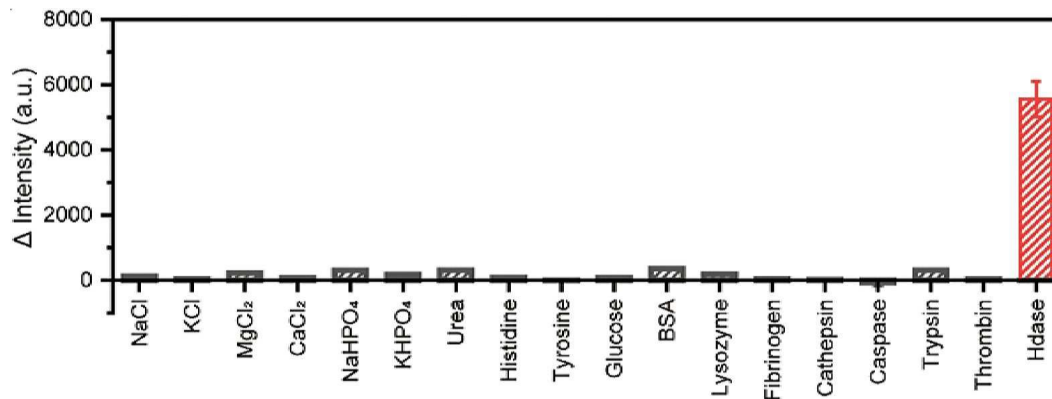
도면4d



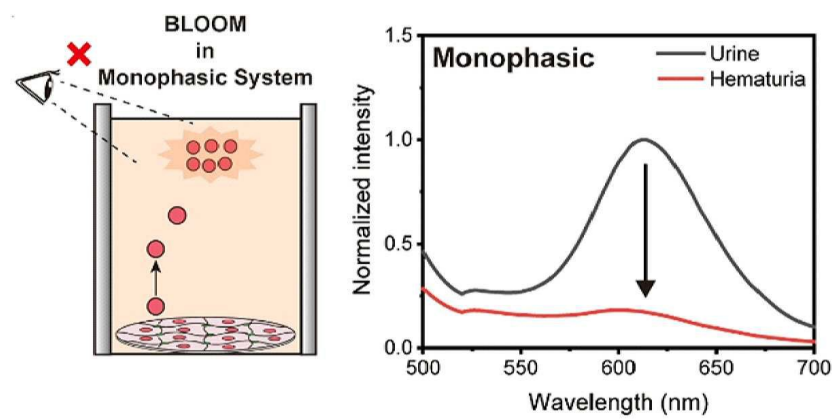
도면4e



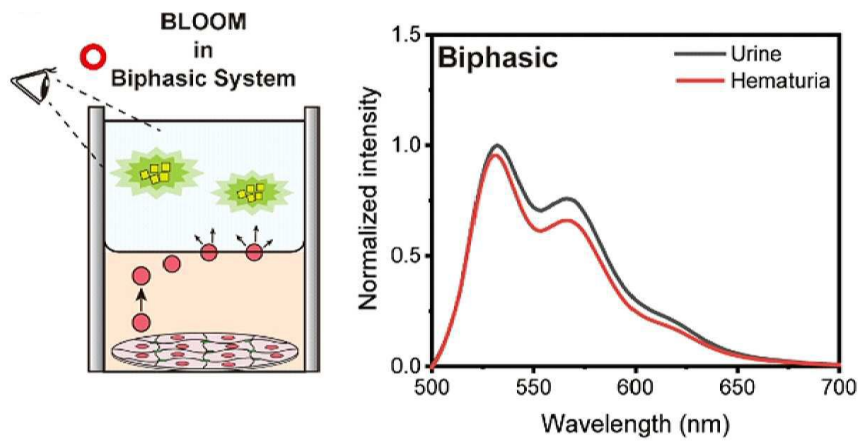
도면4f



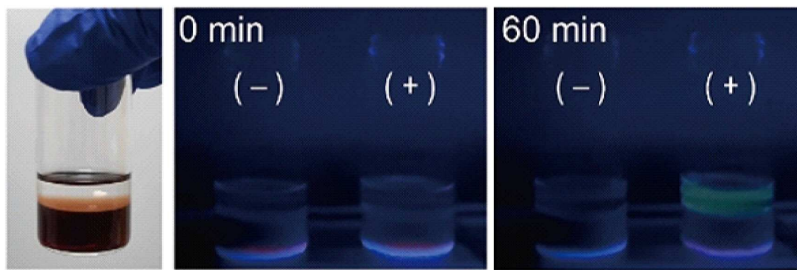
도면4g



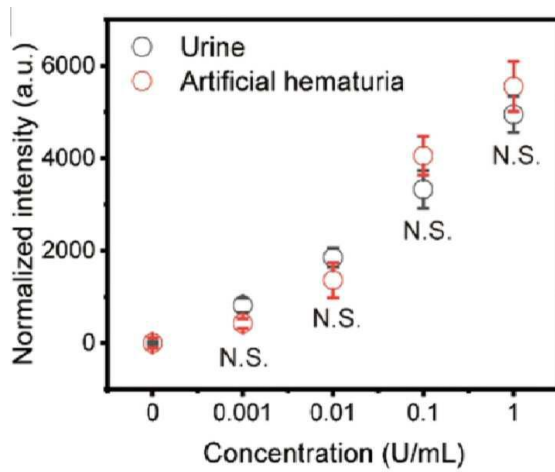
도면4h



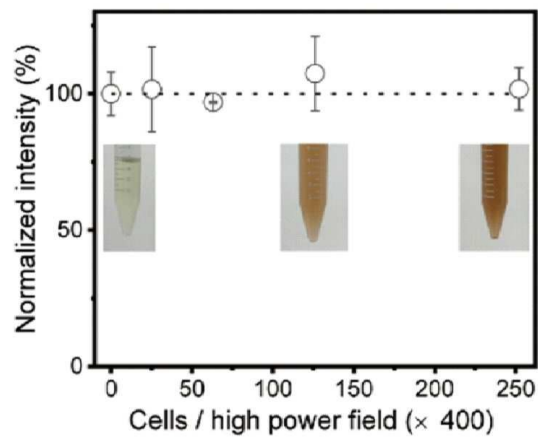
도면4i



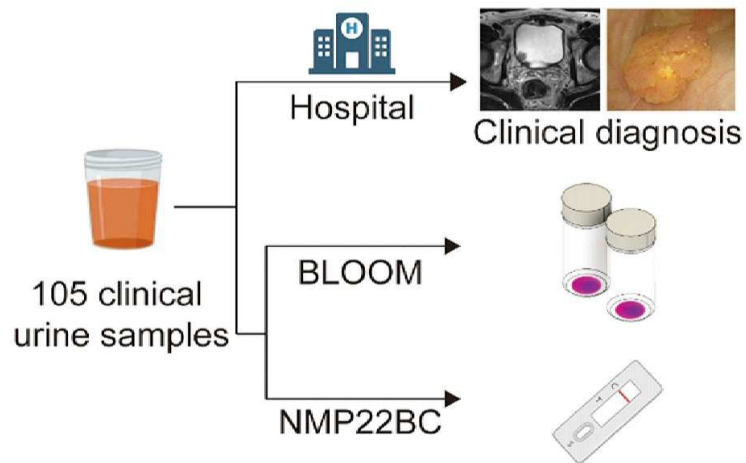
도면4j



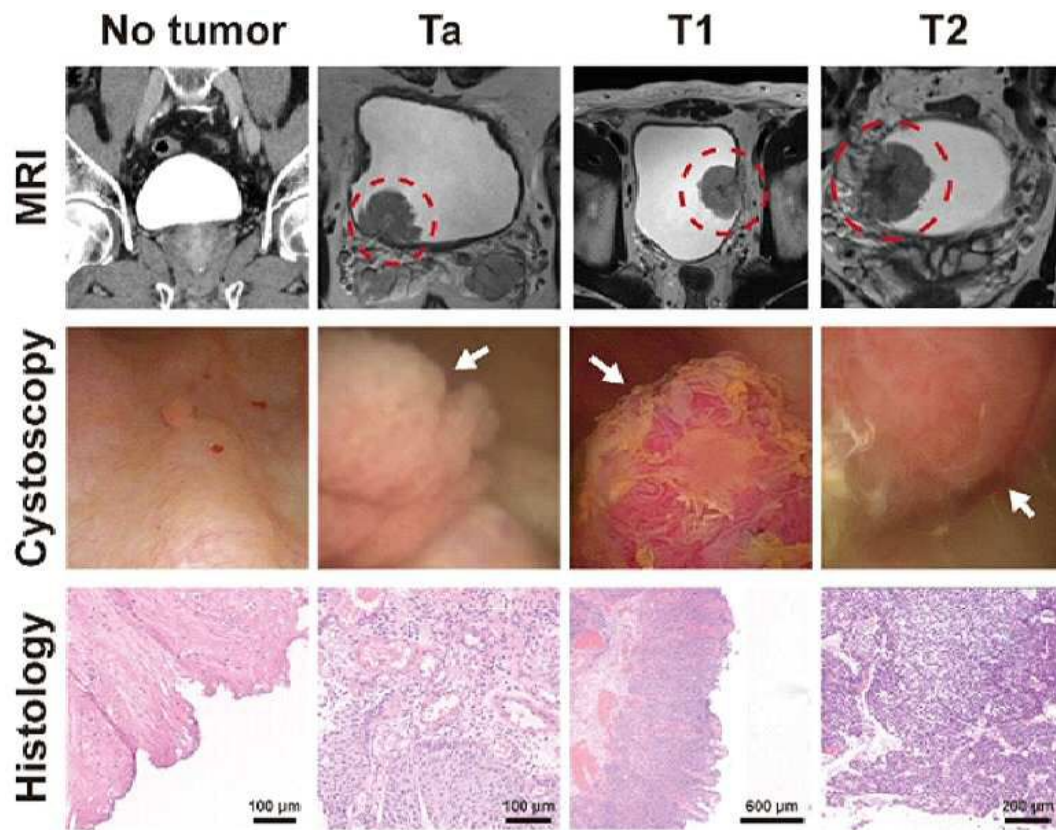
도면4k



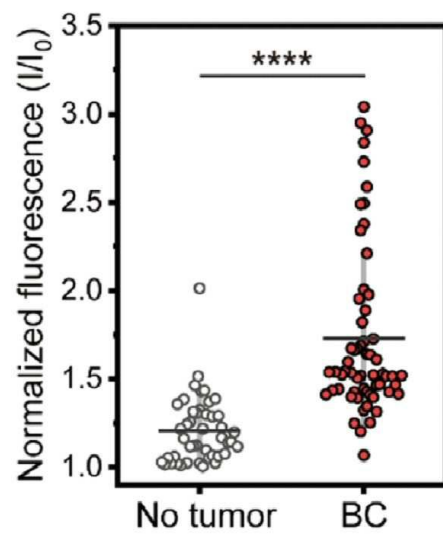
도면5a



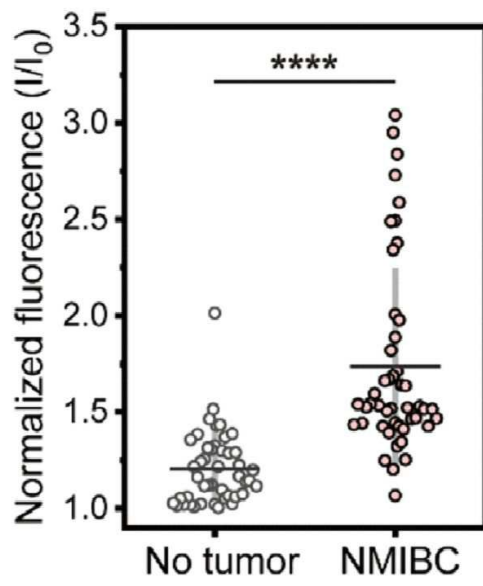
도면5b



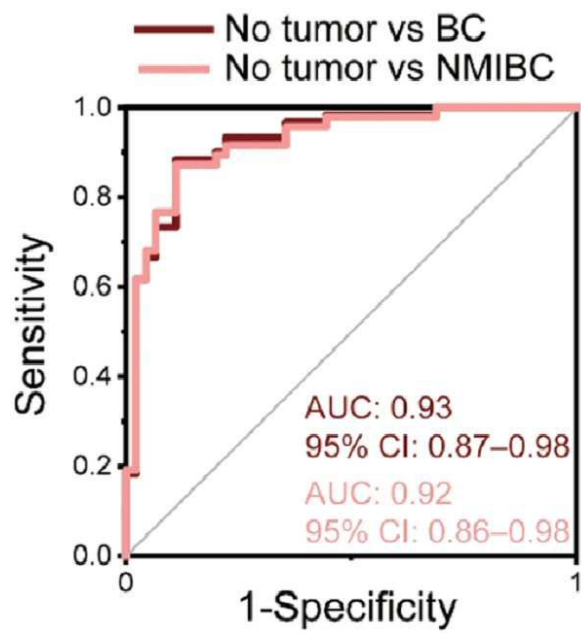
도면5c



도면5d



도면5e



도면5f

		Diagnosis		
		+	-	
BLOOM	+	53	5	Sensitivity : 88.3%
	-	7	40	Specificity : 88.9%
		+	-	
NMP22BC	+	12	1	Sensitivity : 20.0%
	-	48	44	Specificity : 97.8%

도면6

