(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2011 년 12 월 29 일 (29.12.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/162563 A2

(51) 국제특허분류:
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01) *G01N 23/225* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/004610

(22) 국제출원일: 2011 년 6 월 24 일 (24.06.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2010-0059834 2010 년 6 월 24 일 (24.06.2010) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **한국표준과학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE.)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 도룡동 1, 305-340 Daejeon (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **이태걸 (LEE, Tae Geol)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 신성동 153 하나아파트 107 동 1407 호, 305-721 Daejeon (KR). **조영래 (CHO, Young-Lai)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 도룡동 383-2 번지 과기원교수아파트 2 동 105 호, 305-340 Daejeon (KR). **손미영 (SON, Mi Young)** [KR/KR]; 전라북도 전주시 덕진구 우아동 3 가 743-132, 561-223 Jeonllabuk-do (KR).

(74) 대리인: **권오식 (KWON, Oh-Sig)** 등; 대전광역시 서구 둔산동 921 주은리더스텔 4 층, 302-120 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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.

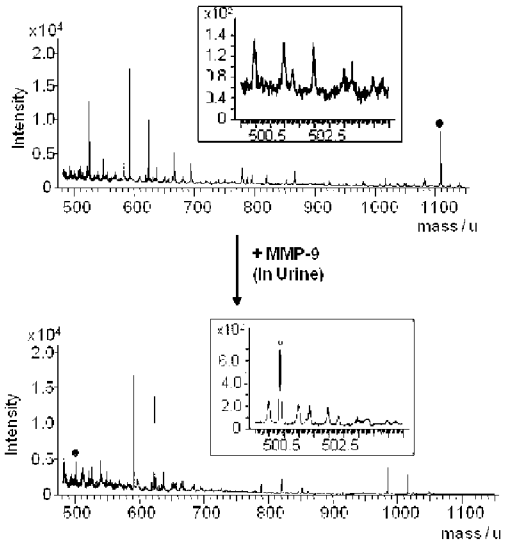
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: DISEASE MARKER DETECTION KIT AND DISEASE MARKER DETECTION METHOD

(54) **발명의 명칭** : 질병 지표 검출 키트 및 질병 지표 검출 방법

[Fig. 3]



(57) **Abstract**: A detection kit according to the present invention is a disease detection kit which is used together with secondary ion mass spectrometry to detect the disease marker contained in a biological sample. The detection kit comprises: a base on which a noble metal film is formed; a reactant which contains a peptide that specifically reacts with the disease marker; first storage means in which the reactant is stored; a sample which contains the biological sample of a possible disease carrier; second storage means in which the sample is stored; mixing means for mixing the reactant and the sample to produce a detection substance which contains the peptide which specifically reacts with the disease marker contained in the biological sample; and contact means for enabling the detection substance produced by the mixing means to contact the base, so as to bind the specifically reacted material to the noble metal film of the base.

(57) **요약서**: 본 발명에 따른 검출 키트는 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표를 검출하기 위해, 이차이온 질량분석기와 함께 사용되는 질병 검출 키트로, 귀금속 박막이 형성된 기재; 상기 질병 지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드(Peptide)를 함유하는 반응물; 상기 반응물이 담긴 제 1 보관수단; 질병 보유 가능자의 생물학적 샘플을 함유하는 시료; 상기 시료가 담긴 제 2 보관수단; 상기 반응물과 상기 시료를 혼합하여 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표에 특이적으로 반응한 펩타이드를 함유하는 검출물을 제조하는 혼합수단; 및 상기 혼합수단에 의해 제조된 검출물과 상기 기재를 접촉시켜 상기 특이반응물질을 상기 기재의 귀금속 박막에 결합시키는 접촉수단;을 포함하는 특징이 있다.

WO 2011/162563 A2

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 질병 지표 검출 키트 및 질병 지표 검출 방법

기술분야

[1] 본 발명은 표지물질 없이 질병의 보유 여부를 판별할 수 있는 질병 지표의 종류 및 함량을 검출하는 질병 지표 검출 키트 및 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 검출 키트 및 검출 방법은 초진, 예후 및 질병 모니터링 등에 사용될 수 있다.

배경기술

[2] 최근 한국인의 사망원인 중 가장 큰 비중을 차지한 것은 악성 신생물(암)으로 조사됨에 따라 암의 조기 진단과 정확한 진단법 개발의 필요성이 커지고 있다.

[3] 초기 암 진단은 암 세포의 성장에 따른 생체 조직의 외적 변화에 근거하였으나, 근래에 들어 혈액, 당쇄, DNA등 생물의 조직 또는 세포에 미량 존재하는 생체 분자를 이용한 진단 및 검출이 시도되고 있다.(대한민국 공개특허 제2008-0003472호, 국제공개특허 제2000-004149호, 미국공개특허 제2004-586856, 미국공개특허 제 2003-690880호)

[4] 그러나 가장 보편적으로 사용되는 암 진단 방법은 생체조직검사를 통해 얻어진 조직 샘플을 이용하거나, 화상을 이용한 진단이다.

[5] 그러나 생체조직검사는 환자에게 큰 고통을 야기하며, 고비용이 들 뿐만 아니라, 진단까지 긴 시간이 소요되는 단점이 있다. 또한 환자가 실제 암에 걸린 경우, 생체조직검사 과정 중 암의 전이가 유발될 수 있는 위험이 있으며, 생체조직검사를 통한 조직 샘플을 얻을 수 없는 부위의 경우, 외과적인 수술을 통해 의심되는 조직의 적출이 이루어지기 전에는 질병의 진단이 불가능한 단점이 있다.

[6] 화상을 이용한 진단은 X-레이, 질병 표적물질이 부착된 조영제를 사용한 핵자기 공명 영상법, 핵영상등을 통해 얻어진 이미지를 기반으로 암을 판정한다. 그러나, 이러한 화상 진단은 시술자 또는 판독자의 숙련도에 따라 오진의 가능성이 크며, 화상을 얻는 기기의 정밀도에 크게 의존하는 단점이 있다. 더 나아가, 가장 정밀한 기기조차도 수 mm 이하의 종양은 검출이 불가능하여, 발병 초기 단계에서는 검출이 어려운 단점이 있다. 또한, 화상을 얻기 위해 환자 또는 질병 보유 가능자가 유전자의 돌연변이를 유발하는 고에너지의 전자기파에 노출되므로, 또 다른 질병을 야기할 수 있을 뿐만 아니라, 화상을 통한 진단 횟수가 제한되는 단점이 있다.

[7] 소화기 계통의 암은 통상적으로 내시경을 이용한 육안 영상관찰을 통해 질병의 유무를 판단하나, 그 과정이 환자에게 무척 고통스러우며, 육안 영상관찰을 통해 이상이 발견된 경우라 할지라도, 악성/양성 종양, 용종 등의 정확한 질병 판별을 위해서는 생체조직검사가 필수적으로 수행되어야 한다.

[8] 혈액, 당쇄, DNA등 생물의 조직 또는 세포에 미량 존재하는 생체 분자를 이용한 진단 및 검출의 일 예로, 세포벽 분해효소의 검출을 들 수 있다.

[9] 암세포의 증식, 침윤 및 전이가 발생하기 위해서는 그 첫 단계로서 기저막의 파괴가 필수적이며 암세포가 혈관 내로 침투하기 위해서는 주로 타입 IV 콜라겐(type collagen)으로 구성되고 있는 내피세포하층의 기저막을 용해시켜야 한다. 이와 같은 단백분해과정은 기질 메탈로프로테인네이즈(Matrix metalloproteinases, MMPs)가 관여하고 있는 것으로 알려져 있으며, 최근 21종 이상이 알려진 MMPs는 각각 서로 다른 질량을 가지며 다양한 기질 특이성을 지닌 부위를 가지고 있다.

[10] MMPs는 거의 모든 사람의 암세포와 암조직에서 높게 발현됨에 따라 사람의 혈청에서 MMPs의 양 측정은 암 진단 마커로 사용된다.(Lein, M. 1997, Clinic. Biochem, 491-496; Nikkola, J. 2005, Clin. Cancer Res, 5158-5166).

[11] 일반적으로 MMPs의 활성을 측정하는 방법으로 젤라틴 융해성(Gelatin Zymography)의 활성을 측정하는 젤라틴-기질-단백분해효소 분석법을 사용한다. 이 방법은 기질 단백이 포함되어 있는 젤을 이용하여 젤 염색 후 효소의 유무에 따른 각각의 MMPs 질량 밴드의 흡광값에 따라 MMPs의 활성을 측정하는 것으로 효소의 양이 많이 필요하며, 여러 단계를 거쳐 실험을 함으로써 생기는 실험적인 오차와 재현성에 문제가 지적되어 왔다.

[12] 이 밖에 효소면역 진단방법 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)과 같은 용액 내 항원-항체반응을 통하여 MMPs의 활성 측정이 이루어지고 있다. 그러나 이 방법 역시 그러나 이 방법은 항원-항체 반응과 함께 형광 혹은 발광물질의 표지방식을 이용한 것으로, 표지방식으로 인하여 발생할 수 있는 실험적인 오차(표지로 인한 단백질 변형 및 표지자체의 비안정성으로 인한 오차 등)를 극복하지 못하고 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[13] 본 발명의 목적은 비침윤적(non-invasive)이며 무표지로 질병 보유 가능자의 질병 보유 여부를 판별하는데 사용되는 질병 지표의 종류 및 함량을 검출하는 검출 키트를 제공하는 것이며, 간편하고 빠르며 정확하고 재현성 있게 질병 지표의 함량을 검출하는 검출 키트를 제공하는 것이며, 저비용으로 대량 생산 가능한 검출 키트를 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 비침윤적(non-invasive)이며 무표지로 질병 보유 가능자의 질병 보유 여부를 판별하는데 사용되는 질병 지표의 함량을 검출하는 방법을 제공하는 것이며, 검출 방법이 간단하고 검출에 소요되는 시간이 매우 짧으며 정확하고 재현성 있게 질병 지표의 함량을 검출하는 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[15] 본 발명에 따른 질병 검출 키트는, 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표를 검출하기 위해, 이차이온 질량분석기와 함께 사용되는 질병 검출 키트로, 귀금속 박막이 형성된 기재; 상기 질병 지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드(Peptide)를 함유하는 반응물; 상기 반응물이 담긴 제1보관수단; 질병 보유 가능자의 생물학적 샘플을 함유하는 시료; 및 상기 시료가 담긴 제2보관수단;을 포함하는 특징이 있다.

[16] 특징적으로, 본 발명에 따른 질병 검출 키트는, 상기 반응물과 상기 시료를 혼합하여 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표에 특이적으로 반응한 펩타이드인 특이반응물질을 함유하는 검출물을 제조하는 혼합수단; 및 상기 혼합수단에 의해 제조된 검출물과 상기 기재를 접촉시켜 상기 특이반응물질을 상기 기재의 귀금속 박막에 결합시키는 접촉수단;을 더 포함한다.

[17] 보다 특징적으로, 본 발명에 따른 질병 검출 키트는, 상기 검출물의 특이반응물질이 상기 기재의 귀금속 박막에 결합된 시험 샘플의 이차이온질량 스펙트럼인 시험 스펙트럼을 저장하는 저장부; 및 상기 저장부에 저장된 시험 스펙트럼에 존재하는 픽(peak)의 이차이온질량 및 강도에서 하나 이상 선택된 인자(factor)를 기반으로 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표의 종류 및 함량을 판별하는 판별부;를 더 포함한다.

[18] 특징적으로, 본 발명에 따른 질병 검출 키트에서 검출하는 상기 질병 지표의 질병은 암이며, 상기 질병 지표는 세포벽 분해효소이며, 상기 세포벽 분해효소는 콜라게나제 1(Collagenase 1), 젤라티나제 A(Gelatinase A), 스트로멜리신 1(Stromelysin 1), 매트리리신(Matrilysin), 콜라게나제 2(Collagenase 2), 젤라티나제 B(Gelatinase B), 스트로멜리신 2(Stromelysin 2), 스트로멜리신 3(Stromelysin 3), 매크로포제 엘라스타제(Macrophage elastase), 콜라게나제 3(Collagenase 3), MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, 콜라게나제 4(Collagenase 4), MMP-19, 에나멜리신(Enamelysin), XMMP, CMMP 및 MMP-23에서 하나 이상 선택된 MMP(Matrix metalloproteinase)인 특징이 있다.

[19] 본 발명에 따른 질병 검출 키트에 있어, 상술한 세포벽 분해효소와 특이적으로 반응하기 위해, 상기 펩타이드(Peptide)는 각 분해효소의 특이적 아미노산 부위를 가지는 표지 기질인 특징이 있으며, 상기 세포벽 분해효소와 특이적으로 반응한 펩타이드인 특이반응물질이 상기 기판의 귀금속 박막에 최대한 단일층으로 균질하게 결합하기 위해 상기 펩타이드는 아민말단 또는 카르복실기 말단부분의 아미노산이 시스테인인 특징이 있다.

[20] 바람직하게, 상기 귀금속박막은 금 박막이다.

[21] 상기 생물학적 샘플은 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액, 조직, 조직 균질물, 조직의 부분, 세포, 세포 추출물, 또는 체외 세포 배양물이다.

[22] 본 발명에 따른 질병 지표 검출방법은 질병 진단에 필요한 정보를 제공하기

위하여 질병 지표의 함량을 검출하는 방법으로, a) 상기 질병 지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드(Peptide)를 함유하는 반응물과 질병 보유 가능자의 생물학적 샘플을 함유하는 시료를 혼합하여, 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표에 특이적으로 반응한 펩타이드인 특이반응물질을 함유하는 검출물을 제조하는 단계; b) 상기 검출물을 귀금속 박막이 형성된 기재와 접촉시켜 미반응 펩타이트 및 특이반응물질을 상기 귀금속 박막에 결합시키는 단계; c) 상기 검출물과 접촉된 기재를 이차이온 질량분석하여 귀금속 박막에 결합된 물질의 이차이온질량 스펙트럼인 시험 스펙트럼을 얻는 단계; 및 d) 상기 시험 스펙트럼에 존재하는 픽(peak)의 이차이온질량 및 강도에서 하나 이상 선택된 인자(factor)를 기반으로 질병 지표의 종류 및 함량을 검출하는 단계;를 포함하여 수행되는 특징이 있다.

[23] 특징적으로, 본 발명에 따른 징별 지표 검출방법에 있어, 상기 검출 방법은 a) 단계 전, 면역침강법(Immunoprecipitation)을 이용하여 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표를 침강시키는 단계;를 더 포함하며, 상기 시료는 상기 면역침강법에 의해 침강된 침강물인 특징이 있다.

[24] 특징적으로, 본 발명에 따른 질병 지표 검출방법에 있어, 상기 질병 지표의 질병은 암이며, 상기 질병 지표는 세포벽 분해효소이며, 상기 세포벽 분해효소는 콜라게나제 1(Collagenase 1), 젤라티나제 A(Gelatinase A), 스트로멜리신 1(Stromelysin 1), 매트리리신(Matrilysin), 콜라게나제 2(Collagenase 2), 젤라티나제 B(Gelatinase B), 스트로멜리신 2(Stromelysin 2), 스트로멜리신 3(Stromelysin 3), 매크로포제 엘라스타제(Macrophage elastase), 콜라게나제 3(Collagenase 3), MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, 콜라게나제 4(Collagenase 4), MMP-19, 에나멜리신(Enamelysin), XMMP, CMMP 및 MMP-23에서 하나 이상 선택된 MMP(Matrix metalloproteinase)인 특징이 있다.

[25] 본 발명에 따른 질병 지표 검출방법에 있어, 상기 펩타이드(Peptide)는 질병 지표와 특이적으로 반응하는 아미노산 부위를 가지는 무표지 기질인 특징이 있으며, 상기 펩타이드는 서로 다른 둘 이상의 질병지표 각각에 특이적으로 반응하는 아미노산 부위를 가지는 무표지 기질을 포함한다.

[26] 보다 특징적으로, 상기 펩타이드(Peptide)는 상술한 각 분해효소와 특이적으로 반응하는 아미노산 부위(특이적 아미노산 부위)를 가지는 무표지 기질인 특징이 있으며, 상기 펩타이드(Peptide)는 서로 다른 둘 이상의 세포벽 분해효소에 특이적으로 반응하는 아미노산 부위를 가지는 무표지 기질을 포함한다.

[27] 상기 세포벽 분해효소와 특이적으로 반응한 펩타이드가 상기 기판의 귀금속 박막에 최대한 단일층으로 균질하게 결합하기 위해 상기 펩타이드는 아민말단 또는 카르복실기 말단부분의 아미노산이 시스테인인 것 펩타이드인 특징이 있다.

[28] 바람직하게, 상기 귀금속박막은 금 박막이다.

[29] 상기 생물학적 샘플은 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의

외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액, 조직, 조직 균질물, 조직의 부분, 세포, 세포 추출물, 또는 체외 세포 배양물이다.

발명의 효과

[30] 본 발명의 진단 키트는 비침윤적(non-invasive)이며 무표지로 질병 보유 가능자의 질병 보유 여부를 판별하는데 사용되는 질병 지표의 종류 및 함량을 검출하는 장점이 있으며, 간편하고 빠르며 정확하고 재현성 있게 질병 지표의 함량을 검출하는 장점이 있으며, 저비용으로 대량 생산 가능한 장점이 있다.

[31] 본 발명의 검출 방법은 비침윤적(non-invasive)이며 무표지로 질병 보유 가능자의 질병 보유 여부를 판별하는데 사용되는 질병 지표의 종류 및 함량을 검출하는 장점이 있으며, 검출 방법이 간단하고 검출에 소요되는 시간이 매우 짧으며 정확하고 재현성 있게 질병 지표의 종류 및 함량을 검출하는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[32] 도 1은 본 발명의 검출 키트에 구비되는 귀금속 박막이 형성된 기재의 일 예를 도시한 것이며,

[33] 도 2는 본 발명의 검출 키트에 구비되는 제1보관수단의 일 예를 도시한 것이며,

[34] 도 3은 소변을 생물학적 샘플로 하되 MMP-9의 특이적 서열을 지닌 기질을 이용하여 MMP-9의 활성을 검출한 결과를 도시한 도면이며,

[35] 도 4는 소변을 생물학적 샘플로 하되 MMP의 일반적 기질을 이용하여 MMP-9의 활성을 검출한 결과를 도시한 도면이다.

발명의 실시를 위한 형태

[36] 이하 첨부한 도면들을 참조하여 본 발명의 제조방법을 상세히 설명한다. 다음에 소개되는 도면들은 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 예로서 제공되는 것이다. 따라서, 본 발명은 이하 제시되는 도면들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 이하 제시되는 도면들은 본 발명의 사상을 명확히 하기 위해 과장되어 도시될 수 있다. 또한 명세서 전체에 걸쳐서 동일한 참조번호들은 동일한 구성요소들을 나타낸다.

[37] 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

[38] 본 발명에 따른 질병 검출 키트는, 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표를 검출하기 위해, 이차이온 질량분석기와 함께 사용되는 질병 검출 키트로, 귀금속 박막이 형성된 기재, 상기 질병 지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드(Peptide)를 함유하는 반응물, 상기 반응물을 밀폐 보관하는 제1보관수단, 질병 보유 가능자의 생물학적 샘플을 함유하는 시료, 및 상기 시료를 밀폐 보관하는

제2보관수단;을 포함하는 특징이 있다.

[39] 상기 질병 검출 키트의 상기 기재는 상기 귀금속 박막을 지지하며 귀금속 박막이 형성되는 공간을 제공하는 역할을 수행하기 위한 것으로, 이차이온 질량분석시 분석결과에 영향을 미치지 않으며, 상기 반응물 및 상기 시료와 화학적으로 반응하지 않고, 상기 귀금속 박막과의 결합력이 우수한 물질이면 사용 가능하다. 상기 기재의 형상은 귀금속 박막이 균일하고 편평하게 형성될 수 있는 판 형상인 것이 바람직하다. 상기 기재의 예로, 유리를 포함한 비정질 기판, 산화물 기판, 질화물 기판, 반도체 기판 또는 이들의 적층 기판을 사용할 수 있다. 이때, 상기 산화물 기판, 질화물 기판 또는 반도체 기판은 다결정체, 단결정체 또는 비정질일 수 있다.

[40] 상기 기재에 형성되는 귀금속 박막은 상기 펩타이드와 결합되어 상기 펩타이드를 상기 기재에 고정시키며, 상기 펩타이드(펩타이드 자체 및 질병지표와 특이적으로 반응한 펩타이드를 포함함)의 이차이온 질량 신호를 증폭시키는 역할을 수행함에 따라, 상기 펩타이드의 말단을 구성하는 아미노산에 속하는 원소와 자발적으로 결합하며 펩타이드의 이차이온을 효과적으로 증폭시키는 금 박막인 것이 바람직하다.

[41] 도 1(a)에 도시한 바와 같이, 상기 기재(100)의 일 표면에 상기 귀금속 박막(200)이 형성되며, 상기 기재(100)에 형성되는 귀금속 박막(200)은 다각형, 타원형 또는 원형의 귀금속 막(201~203)을 포함한다.

[42] 도 1(b)에 도시한 바와 같이, 상기 귀금속 박막(200)은 서로 이격되어 분리된 상태로 상기 기재(100)의 표면에 형성된 다수개의 귀금속 막(201~203)을 포함한다.

[43] 또한, 도 1(c)에 도시한 바와 같이, 상기 기재는 적어도 하나 이상의 요부홈이 형성된 기재(100')를 포함하며, 상기 요부홈의 바닥면에 상기 귀금속 막(201~203)이 형성되어, 상기 귀금속 막(201~203)과 상기 기재의 표면 사이에 일정 단차가 형성된 것이 바람직하다.

[44] 상기 요부홈의 측면(바닥면을 제외한 면)은 이차이온 질량분석시 이차이온 물질들의 원활한 검출을 위해 일정 각도로 기울어진 측면(테이퍼된 측면)일 수 있으며, 상기 요부홈의 측면이 기울어진 경우, 요부홈의 바닥면 방향으로 점점 좁아지도록 측면이 기울어진 것이 바람직하다. 상기 요부홈의 바닥면은 다각형, 타원형 또는 원형을 포함한다.

[45] 본 발명에 따른 질병 지표 검출 키트는 상기 귀금속 박막이 형성된 기재와 함께, 상기 질병 지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드(Peptide)를 함유하는 반응물이 담긴 제1보관수단 및 질병 보유 가능자의 생물학적 샘플을 함유하는 시료가 담긴 제2보관수단을 포함한다.

[46] 상기 제1보관수단에 담긴 상기 반응물의 펩타이드는 상기 제2보관수단에 담긴 상기 시료의 생물학적 샘플과 접촉 혼합되며, 상기 생물학적 샘플에 상기 질병 지표가 함유되어 있는 경우, 상기 펩타이드가 상기 질병 지표에 특이적으로

반응하여, 질병 지표에 특이적으로 반응한 펩타이드인 특이반응물질이 생성된다.

[47] 상세하게, 질병 지표 검출 키트는 상기 금 박막에 의해 펩타이드의 이차이온질량 신호가 매우 효과적으로 증폭됨을 이용하여 질병 보유 가능자의 질병 보유 여부를 판별하기 위해 사용되는 질병 지표를 검출하기 위해 상기 질병 지표를 상기 펩타이드와 반응시켜 상기 질병 지표에 반응한 펩타이드(특이반응물질)를 상기 금 박막에 자기 조립 시킨 후, 상기 금 박막을 이용하여 상기 질병 지표에 반응한 펩타이드의 이차이온 질량 신호를 증폭시킨다. 이에 따라, 상기 질병 지표와의 특이적 반응 의해 변화된 펩타이드(특이반응물질)의 이차이온질량 스펙트럼의 위치, 강도 또는 위치와 강도를 이용하여 질병 지표의 종류 및 질병 지표의 함량을 매우 민감하고 정밀하며 재현성 있게 측정하게 된다.

[48] 본 발명을 상술함에 있어, 상기 질병 지표의 함량은 질병 지표가 검출되지 않는 경우를 포함하며 질병 지표가 검출되지 않은 경우 0의 함량으로 지칭된다.

[49] 상기 반응물은 상기 질병 지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드가 일정한(predetermined) 농도로 분산 희석된 용액인 것이 바람직하며, 둘 이상의 서로 다른 질병 지표를 동시에 검출하기 위해, 상기 질병 지표 별로 각 질병 지표에 대해 특이성을 갖는 둘 이상의 서로 다른 펩타이드를 함유할 수 있다. 이때, 상기 반응물에 함유된 둘 이상의 서로 다른 펩타이드는 서로 다른 일정한 농도를 가질 수 있다.

[50] 상기 펩타이드가 분산되는 용액은 장시간동안 안정적으로 상기 펩타이드에 생화학적 변화를 야기하지 않는 멸균 액상 물질이면 사용가능하며, 인산완충용액(phosphate buffered saline), 3차 증류수 또는 DMSO (Dimethyl sulfoxide)를 사용할 수 있다.

[51] 상기 시료는 질병 보유 가능자로부터 채취 또는 채취 후 처리된 생물학적 샘플을 함유하는 용액이며, 상기 생물학적 샘플은 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액, 조직, 조직 균질물, 조직의 부분, 세포, 세포 추출물, 또는 체외 세포 배양물이다.

[52] 상기 반응물과 유사하게, 상기 시료 또한 일정한 프로토콜(protocol)에 따라 채취 및 처리된 상기 생물학적 샘플이 일정한(predetermined) 농도로 분산 희석된 용액이다. 상기 생물학적 샘플이 분산되는 용액은 장시간동안 안정적으로 생물학적 샘플에 생화학적 변화를 야기하지 않는 멸균 액상 물질이면 사용가능하며, 인산완충용액(phosphate buffered saline) 혹은 3차 증류수를 사용할 수 있다.

[53] 상기 제1보관수단은 상기 반응물을 담을 수 있으며 상기 반응물이 유입되는 유입구가 형성된 용기부 및 상기 용기부의 상기 유입구와 연결되어 상기 반응물을 외부와 밀폐시키는 캡부를 포함하여 구성된다. 이때, 상기 용기부는

상기 유입구를 제외하고 밀폐된 것이 바람직하다.

[54] 상기 용기부는 액상의 물질을 담을 수 있는 용기 형상으로 가공이 용이하며, 상기 반응물에 불순물을 야기하지 않으며, 상기 반응물에 생화학적 변화를 야기하지 않으며, 용기부 외부와 상기 반응물을 물리적 화학적으로 단절시키는 물질이면 사용가능하며, 일 예로, 유리 혹은 플라스틱을 들 수 있다.

[55] 상기 캡부는 상기 용기부의 유입구와 결합하여 상기 용기부에 담긴 반응물을 외부로부터 밀폐시킨다. 상기 캡부와 상기 유입구와의 결합은 물리적 결합, 접착제를 포함한 화학적 결합 또는 용해 결합을 포함한다.

[56] 상기 캡부의 물질 또한 가공성을 가지며, 반응물에 생화학적 변화를 야기하지 않으며, 외부와 상기 반응물을 물리적 화학적으로 효과적으로 단절시키는 물질이면 사용 가능하나, 바람직하게 유리 혹은 플라스틱이다.

[57] 상기 제1보관수단과 유사하게, 상기 제2보관수단은 상기 시료를 담을 수 있으며 상기 시료가 유입되는 유입구가 형성된 용기부 및 상기 용기부의 상기 유입구와 연결되어 상기 시료를 외부와 밀폐시키는 캡부를 포함하여 구성된다. 이때, 상기 용기부는 상기 유입구를 제외하고 밀폐된 것이 바람직하다.

[58] 상기 제1보관수단의 용기부와 유사하게, 상기 제2보관수단의 용기부는 액상의 물질을 담을 수 있는 용기 형상으로 가공이 용이하며, 상기 시료에 불순물을 야기하지 않으며, 상기 시료에 생화학적 변화를 야기하지 않으며, 용기부 외부와 상기 시료를 물리적 화학적으로 단절시키는 물질이면 사용가능하며, 플라스틱을 들 수 있다.

[59] 상기 제1보관수단의 캡부와 유사하게, 상기 제2보관수단의 캡부는 상기 용기부의 유입구와 결합하여 상기 용기부에 담긴 시료를 외부로부터 밀폐시킨다. 상기 캡부와 상기 유입구와의 결합은 물리적 결합, 접착제를 포함한 화학적 결합 또는 용해 결합을 포함한다.

[60] 상기 캡부의 물질 또한 가공성을 가지며, 시료에 생화학적 변화를 야기하지 않으며, 외부와 상기 시료를 물리적 화학적으로 효과적으로 단절시키는 물질이면 사용 가능하나, 바람직하게 플라스틱을 사용한다.

[61] 도 2는 용기부(301)와 캡부(302)를 포함하여 구성되어, 상기 반응물(400)이 밀폐 보관된 제1보관수단을 도시한 일 예이다. 도면에 도시하지 않았으나, 상기 제2보관수단 또한 도 2와 유사한 형상을 가질 수 있다.

[62] 본 발명에 따른 질병 검출 키트는, 상기 반응물과 상기 시료를 혼합하여 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표에 특이적으로 반응한 펩타이드인 특이반응물질을 함유하는 검출물을 제조하는 혼합수단; 및 상기 혼합수단에 의해 제조된 검출물과 상기 기재를 접촉시켜 상기 특이반응물질을 상기 기재의 귀금속 박막에 결합시키는 접촉수단;을 더 포함하는 특징이 있다.

[63] 상기 제1보관수단에 담긴 반응물과 상기 제2보관수단에 담긴 시료는 상기 혼합수단에 의해 혼합되며, 상기 혼합수단에 의해 특이반응물질을 함유하는 검출물이 제조된다.

[64] 상기 혼합수단은 상기 제1보관수단으로부터 상기 반응물이 유입되고 상기 제2보관수단으로부터 상기 시료가 유입되어 상기 반응물 및 시료를 밀폐 보관하는 밀폐용기부; 및 상기 밀폐용기부에 진동 또는 회전을 인가하는 교반부;를 포함하여 구성되는 것이 바람직하다. 이때, 상기 혼합수단은 상기 밀폐용기부의 온도를 일정하게 유지하는 항온부;를 더 포함할 수 있다.

[65] 상기 밀폐용기부는 상기 도2와 같은 제1보관수단(또는 제2보관수단)과 유사하며, 상기 교반부는 교반기 또는 믹서를 들 수 있다.

[66] 상기 혼합수단에 의해 제조된 검출물은 상기 접촉수단에 의해 상기 기재와 접촉하게 되며, 상기 접촉에 의해 상기 검출물 내에 함유된 상기 특이반응물질이 상기 기재의 귀금속 박막과 결합된다.

[67] 이때, 상기 검출물에 질병 지표와 반응하지 않은 펩타이드가 존재하는 경우, 상기 특이반응물질과 함께 상기 펩타이드(미반응 펩타이드) 또한 상기 귀금속 박막의 표면 원자와 결합함은 물론이다.

[68] 상기 혼합수단에 의해 제조된 검출물은 상기 접촉수단에 의해 기판의 귀금속 박막과 접촉하여 상기 검출물에 함유된 특이반응물질 및 펩타이드(미반응 펩타이드)에서 선택된 적어도 하나 이상의 물질이 상기 귀금속 박막과 결합하여 기판에 고정된다.

[69] 상기 접촉수단은 상기 검출물을 보관하며 상기 기판이 상기 검출물에 담지되거나, 또는 상기 혼합수단으로부터 상기 검출물을 일정량(predetermined value) 채취하여 상기 기판에 떨어뜨리거나, 상기 검출물이 일정 속도로 상기 기판 표면을 흐르도록 하는 수단이며, 상기 접촉수단은 상기 검출물과 상기 기판과의 접촉시 진동을 인가하는 수단을 더 포함할 수 있으며, 상기 검출물 및 검출물과 접촉하는 기판의 온도를 일정하게 유지시키는 온도유지수단을 더 포함할 수 있다. 상기 접촉수단의 일 예로, 간단한 스포이드에서 상기 기판과 결합 밀폐되어 검출물이 흐르는 마이크로 채널을 들 수 있다.

[70] 본 발명에 따른 질병 검출 키트는, 상기 검출물의 특이반응물질이 상기 기재의 귀금속 박막에 결합된 시험 샘플의 이차이온질량 스펙트럼인 시험 스펙트럼을 저장하는 저장부; 및 상기 저장부에 저장된 시험 스펙트럼에 존재하는 픽(peak)의 이차이온질량 및 강도에서 하나 이상 선택된 인자(factor)를 기반으로 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표의 종류 및 함량을 판별하는 판별부;를 더 포함한다.

[71] 바람직하게, 상기 저장부에는 상기 반응물 자체가 상기 기재의 귀금속 박막과 접촉하여 상기 반응물의 펩타이드(미반응 펩타이드)가 상기 귀금속 박막에 결합된 기준 샘플의 이차이온질량 스펙트럼인 기준 스펙트럼이 더 저장된 것이 바람직하다.

[72] 또한, 상기 저장부에는 상기 제1보관수단의 반응물에 함유된 펩타이드의 종류 및 펩타이드의 함량별로 상기 기준 스펙트럼이 저장된 것이 바람직하며, 상기 제2보관수단의 시료에 함유된 생물학적 샘플의 종류 및 상기 시료의 생물학적

샘플의 함량 정보 또한 저장된 것이 바람직하며, 상기 혼합수단에 의해 제조된 검출물의 일부가 상기 접촉수단에 의해 상기 귀금속 박막이 형성된 기판과 접하게 되는 경우, 상기 기판과 접하게 되는 검출물의 부피 정보 또한 저장된 것이 바람직하다.

[73] 본 발명에 따른 질병 검출 키트에서, 상기 질병 지표의 질병은 암이며, 상기 질병 지표는 세포벽 분해효소인 특징이 있다.

[74] 보다 특징적으로, 상기 세포벽 분해효소는 콜라게나제 1(Collagenase 1), 젤라티나제 A(Gelatinase A), 스트로멜리신 1(Stromelysin 1), 매트리리신(Matrilysin), 콜라게나제 2(Collagenase 2), 젤라티나제 B(Gelatinase B), 스트로멜리신 2(Stromelysin 2), 스트로멜리신 3(Stromelysin 3), 매크로포제 엘라스타제(Macrophage elastase), 콜라게나제 3(Collagenase 3), MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, 콜라게나제 4(Collagenase 4), MMP-19, 에나멜리신(Enamelysin), XMMP, CMMP 및 MMP-23에서 하나 이상 선택된 MMP(Matrix metalloproteinase)이며, 상기 생물학적 샘플에 함유된 상기 MMPs의 종류 및 상기 MMPs의 함량에서 선택된 하나 이상의 인자를 통해 생물학적 샘플을 채취한 질병 보유 가능자의 질병 보유 유무를 판별하는 기준이 마련된다.

[75] 이때, 상기 저장부에는 상기 반응물로부터 얻어진 기준 스펙트럼과 함께, 상술한 MMPs의 물질 및 함량별로 제조된 MMPs액(하나 이상의 MMP가 정해진 농도로 분산된 액)이 상기 반응물과 혼합되고, 상기 귀금속 박막과 접한 후 측정된 이차이온질량 스펙트럼인 MMPs스펙트럼이 또 다른 기준 스펙트럼으로 더 저장될 수 있다.

[76] 나아가, 상기 저장부에는 이차이온 질량분석을 위한 이온빔의 물질, 이온빔의 에너지, 질량분석 모드 및 분석 면적을 포함한 질량분석 조건, 반응물에 함유된 펩타이드 종류 및 펩타이드 함량을 포함한 분석파라메터 정보가 더 저장되는 것이 바람직하며, 상기 기준 스펙트럼과 상기 시험 스펙트럼을 얻기 위한 이차이온질량 분석을 수행하는 경우, 동일한 분석 파라메터가 유지되는 것이 바람직하다.

[77] 더 나아가, 상기 저장부에는 계획된 실험을 통해, 질병지표의 종류, 상기 반응물에 함유된 질병지표의 농도, 질병지표에 특이적으로 반응하는 펩타이드의 종류, 상기 반응물에 함유된 상기 펩타이드의 농도를 변수로 하여, 각 변수 별로, 질병지표에 특이적으로 반응한 펩타이드의 이차이온질량 강도를 측정하고, 이를 룩업 테이블화한 정보가 더 저장된 것이 바람직하다. 상기 룩업 테이블은 상기 반별부에서 수행되는 질병 지표의 종류 및 함량의 판별시 사용될 수 있음은 물론이다.

[78] 상기 저장부의 일 예로, RAM, ROM, CD, 자기기록매체를 포함한 컴퓨터 판독 가능한 저장매체를 들 수 있다.

[79] 상기 판별부는 상기 시험 스펙트럼에 존재하는 픽(peak)의 이차이온질량 및 강도에서 하나 이상 선택된 인자(factor)를 기반으로 상기 생물학적 샘플에

함유된 질병 지표의 종류 및 함량을 판별하여 상기 시험 스펙트럼이 얻어진 생물학적 샘플을 채취한 질병 보유 가능자의 질병 보유 유무를 판별하는 기준을 제공한다.

[80] 바람직하게, 상기 판별부는 상기 저장부와 연동하여 상기 시험 스펙트럼을 얻기 위해 사용된 반응물의 기준 스펙트럼을 로딩하고, 상기 기준 스펙트럼의 이차이온질량 픽의 이차이온질량과 강도 및 상기 시험 스펙트럼의 이차이온질량 픽의 이차이온질량과 강도를 비교한다.

[81] 상기 비교를 통해 상기 기준 스펙트럼에서 소멸 또는 감소된 픽의 해당 이차이온질량과 상기 시험 스펙트럼에서 생성된 픽의 해당 이차이온질량을 추출하여, 상기 펩타이드와 특이적으로 반응한 질병지표를 산출하여 질병 지표의 종류를 도출한다.

[82] 또한, 상기 비교를 통해, 상기 기준 스펙트럼에서 소멸 또는 감소된 픽의 이온 강도와 상기 시험 스펙트럼에서 생성된 픽의 이온 강도를 통해 상기 시료에 함유된 질병 지표의 함량을 도출한다.

[83] 이때, 상기 판별부에서 도출된 질병지표의 종류 및 질병지표의 함량 자체가 질병보유 가능자의 질병 보유 유무를 판별하는 기준이 될 수 있으며, 상기 판별부에서 도출된 질병지표의 종류 및 질병지표의 함량(측정값)과 상기 저장부에 기 저장된 질병 보유자 판단의 기준이 되는 질병 지표별 질병지표 함량 정보(외부 입력값)를 비교하여 상기 질병 보유 유무 자체를 판별할 수 있다.

[84] 상술한 바와 같이, 본 발명의 질병 지표 검출 키트는 암을 검출하는 지표를 검출하는 키트인 특징이 있으며, 상기 질병 지표는 세포벽 분해효소인 특징이 있다.

[85] 보다 특징적으로 상기 세포벽 분해효소는 콜라게나제 1(Collagenase 1), 젤라티나제 A(Gelatinase A), 스트로멜리신 1(Stromelysin 1), 매트리리신(Matrilysin), 콜라게나제 2(Collagenase 2), 젤라티나제 B(Gelatinase B), 스트로멜리신 2(Stromelysin 2), 스트로멜리신 3(Stromelysin 3), 매크로포제 엘라스타제(Macrophage elastase), 콜라게나제 3(Collagenase 3), MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, 콜라게나제 4(Collagenase 4), MMP-19, 에나멜리신(Enamelysin), XMMP, CMMP 및 MMP-23에서 하나 이상 선택된 MMP(Matrix metalloproteinase)인 특징이 있다.

[86] 상기 MMP는 질량범위가 800에서 1300 (Da)사이의 펩타이드와 특이적으로 반응하여 기질의 특정부위를 자름으로써 잘린 기질을 상기 귀금속 박막의 매트릭스 작용에 의해 효과적으로 이차이온 질량의 검출이 가능하며, 이로 인해 MMP의 활성도(activity)를 효과적으로 측정할 수 있다. 이 검출 방법은 기존의 방법에 비해 검출 방법이 간단하고 검출에 소요되는 시간이 매우 짧으며 정확하고 재현성 있게 측정할 수 있다. MMPs는 거의 모든 암환자의 암세포와 암조직에서 높게 발현됨에 따라 조직이나 체액에서 MMPs의 양 측정은 암 진단 마커로 사용되기 충분하다. 유방암의 경우 소변이나 혈청과 같은 체액과

조직에서 MMP-2와 9이 많이 검출되고 있으며, 방광암의 경우 MMP-9가 뇌의 경우 MMP-2와 9이 소변에서 검출된다 (Roy, R. 2009, J Clin Oncol, 5287-5297)

[87] 상세하게, 상기 시료에 함유된 MMP는 상기 반응물에 함유된 펩타이드와 특이적으로 반응하여, MMP 기질특이성에 따라 기질의 특이부위가 잘리게 되며, 상기 잘린 기질과 잘리지 않은 원래 기질 모두 상기 기판의 귀금속 박막에 자기조립되어 귀금속 박막과 결합한다.

[88] 상기 귀금속 박막에 결합된 펩타이드는 상기 이차이온 질량 분석을 위한 이온빔이 조사될 때, 상기 귀금속 박막에 의한 펩타이드의 신호 증강 효과에 의해, MMPs의 유무에 따른 질량이 다른 두 펩타이드의 이차이온질량 스펙트럼을 용이하고 민감하게 측정할 수 있다.

[89] 질병 검출 키트에 있어, 상술한 세포벽 분해효소와 특이적으로 반응하기 위해, 상기 펩타이드(Peptide)는 각 분해효소의 특이적 아미노산 부위를 가지는 특징이 있으며, 무표지의 기질인 특징이 있다. 일 예로, MMP-2와 9의 경우 펩타이드의 아미노산 서열 중 Gly-Val, Gly-Leu, Gly-Gly, Gly-Asn, 그리고 Gly-Ser을 특이적으로 인식하여 분해시킬 수 있다.

[90] 상기 세포벽 분해효소와 특이적으로 반응한 펩타이드가 상기 기판의 귀금속 박막에 단일층으로 균질하게 결합하기 위해 상기 펩타이드는 아민말단 또는 카르복실기 말단부분의 아미노산이 시스테인인 것 펩타이드인 특징이 있으며, 상기 특이반응물질의 펩타이드가 상기 귀금속 박막에 자발적으로 결합(자기조립)되며 결합된 특이반응물질의 이차이온 질량 효율을 효과적으로 증진시키기 위해, 상기 귀금속박막은 금 박막인 것이 바람직하다.

[91] 상술한 바와 같이, 상기 시료에 함유되는 상기 생물학적 샘플은 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액, 조직, 조직 균질물, 조직의 부분, 세포, 세포 추출물, 또는 체외 세포 배양물이다.

[92] 이때, 상기 질병 지표의 질병이 암이며, 상기 질병 지표가 세포벽 분해효소인 경우, 상기 생물학적 샘플은 소변, 혈장, 혈청 또는 췌장액인 특징이 있다.

[93] 이하, 본 발명에 따른 질병 지표 검출방법에 대해 상술한다.

[94] 본 발명에 따른 질병 지표 검출방법은 질병 보유 가능자의 질병 보유 여부 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여 질병 지표의 함량을 검출하는 방법으로, a)상기 질병 지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드(Peptide)를 함유하는 반응물과 질병 보유 가능자의 생물학적 샘플을 함유하는 시료를 혼합하여, 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표에 특이적으로 반응한 펩타이드인 특이반응물질을 함유하는 검출물을 제조하는 단계; b) 상기 검출물을 귀금속 박막이 형성된 기재와 접촉시켜 미반응 펩타이트 및 특이반응물질을 상기 귀금속 박막에 결합시키는 단계; c) 상기 검출물과 접촉된 기재를 이차이온 질량분석하여 귀금속 박막에 결합된 물질의 이차이온질량 스펙트럼인 시험 스펙트럼을 얻는 단계; 및 d) 상기 시험 스펙트럼에 존재하는 픽(peak)의

이차이온질량 및 강도에서 하나 이상 선택된 인자(factor)를 기반으로 질병 지표의 종류 및 함량을 검출하는 단계;를 포함하여 수행되는 특징이 있다.

[95] 이때, 상기 a) 단계 수행 전, a') 상기 질병 지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드를 함유하는 반응물 자체를 귀금속 박막이 형성된 기재와 접촉시켜 반응물에 함유된 펩타이드를 상기 귀금속 박막에 자기결합시키고, 상기 자기결합된 펩타이드를 이차이온 질량분석하여 펩타이드의 이차이온질량 스펙트럼인 기준 스펙트럼을 얻는 단계가 더 수행되는 것이 바람직하다.

[96] 상기 펩타이드는 질병 지표와 특이적으로 반응하는 아미노산 부위를 가지는 무표지 기질인 특징이 있으며, 상기 펩타이드는 서로 다른 둘 이상의 질병지표 각각에 특이적으로 반응하는 아미노산 부위를 가지는 무표지 기질을 포함한다.

[97] a) 단계 수행 전, a') 단계와는 독립적으로, 면역침강법(Immunoprecipitation)을 이용하여 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표를 침강시키는 전처리 단계가 더 수행되는 것이 바람직하며, 이때, 상기 시료는 상기 면역침강법에 의해 침강된 침강물, 또는 상기 침강물을 함유하는 액인 것이 바람직하다.

[98] 상세하게, 상기 면역침강법에 의해 침강된 침강물을 상등액과 분리 회수한 후, 상기 침강물과 상기 질병지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드를 혼합하여 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표에 반응한 펩타이드인 반응물질을 함유하는 검출물을 제조하는 것이 바람직하다.

[99] 이때, 상기 분리 회수된 침강물을 액상 물질에 분산시켜 시료를 제조할 수 있음은 물론이며, 상기 액상 물질은 장시간동안 안정적으로 생물학적 샘플에 생화학적 변화를 야기하지 않는 멸균 액상 물질이면 사용가능하며, 일 예로, 인산완충용액(phosphate buffered saline) 또는 3차 증류수를 사용할 수 있다.

[100] 상기 생물학적 샘플(일 예로, 혈청)이 목적하는 질병 지표 외의 생물학적 물질(일 예로, 단백질)을 다수 포함하는 경우, 상기 펩타이드가 서로 다른 둘 이상의 질병지표 각각에 특이적으로 반응하는 아미노산 부위를 가지는 경우, 귀금속 박막과의 결합 및/또는 측정의 정확성을 높이기 위해 상기 전처리 단계가 수행되는 것이 바람직하다.

[101] 상기 a) 단계 또는 a')단계에서의 상기 반응물은 상기 질병 지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드가 일정한(predetermined) 농도로 분산 희석된 용액이며, 둘 이상의 서로 다른 질병 지표를 동시에 검출하기 위해, 상기 질병 지표 별로 각 질병 지표에 대해 특이성을 갖는 둘 이상의 서로 다른 펩타이드를 함유할 수 있으며, 둘 서로 다른 질병 지표 모두에 대해 특이성을 갖는 단일한 펩타이드를 함유할 수 있다. 이때, 상기 반응물이 둘 이상의 서로 다른 펩타이드를 함유하는 경우, 상기 펩타이드는 서로 다른 농도를 가질 수 있음은 물론이다.

[102] 상기 펩타이드가 분산되는 용액은 장시간동안 안정적으로 상기 펩타이드에 생화학적 변화를 야기하지 않는 멸균 액상 물질이면 사용가능하며, 일 예로, 인산완충용액(phosphate buffered saline), 3차 증류수 또는 DMSO (Dimethyl sulfoxide)를 사용할 수 있다.

[103] 상기 a) 단계에서의 상기 시료와의 혼합에 의한 특이반응물질의 용이한 생성 및 상기 b) 단계의 귀금속 박막이 형성된 기판과의 접촉시 균일하고 일정한 밀도로 상기 귀금속 박막에 자기결합된 막이 형성되어 재현성 있고 신뢰성 높은 질량지표 검출 결과를 얻기 위해, 상기 반응물의 펩타이드는 귀금속 박막상 모노레이어의 자기결합막을 형성하기에 충분한 농도의 펩타이드를 함유하는 것이 바람직하며, 생물학적 샘플에 함유될 수 있는 질병 지표의 최대 함량 이상의 펩타이드를 함유하는 것이 바람직하다. 일 예로, 상기 반응물은 1 내지 30 마이크로몰 농도의 펩타이드를 함유한다.

[104] a) 단계에서의 상기 시료는 질병 보유 가능자로부터 채취 또는 채취 후 처리된(전처리된) 생물학적 샘플을 함유하는 용액이며, 상기 생물학적 샘플은 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액, 조직, 조직 균질물, 조직의 부분, 세포, 세포 추출물, 또는 체외 세포 배양물이다.

[105] 이때, 상기 생물학적 샘플이 소변과 같은 액상인 경우, 상기 생물학적 샘플 그 자체가 시료로 사용될 수 있음은 물론이며, 상기 시료가 전처리된 생물학적 샘플인 경우, 상기 전처리는 상술한 면역침강법에 의한 처리를 포함한다.

[106] 생물학적 샘플을 분산시킨 액을 시료로 사용하는 경우, 상기 시료는 일정한 프로토콜(protocol)에 따라 채취 및 처리된 상기 생물학적 샘플을 일정한 부피 또는 중량으로 액상 물질에 투입 혼합한 액을 사용한다. 상기 시료의 액상 물질은 장시간동안 안정적으로 생물학적 샘플에 생화학적 변화를 야기하지 않는 멸균 액상 물질이면 사용가능하며, 일 예로, 인산완충용액(phosphate buffered saline) 또는 3차 증류수를 사용할 수 있다.

[107] 이때, 상기 a) 단계에서 서로 다른 반응물과 시료가 혼합되어 제조된 둘 이상의 검출물이 제조될 수 있으며, 일 예로, 제1반응물과 제1시료를 혼합하여 제1검출물을 제조하고, 제1반응물과 독립적인 제2반응물과 제1시료와 독립적인 제2시료를 혼합하여 제조된 제2검출물을 제조한다.

[108] a) 단계에서의 검출물 제조시, 상기 반응물과 시료는 일정 온도(일 예로, 20~40℃, 실질적인 일 예로 37℃)에서 혼합되어 반응된다.

[109] a) 단계에서 둘 이상 서로 다른 검출물이 제조되는 경우, 검출물별로 귀금속 박막의 서로 다른 영역에 도포되어 상기 귀금속 박막의 영역별로 서로 다른 특이반응물질이 자기조립될 수 있다. 이를 위해, 상술한 바와 같이, 상기 도 1(b) 내지 도 1(c)와 같은 귀금속 박막이 형성된 기판을 사용하는 것이 바람직하다.

[110] 특징적으로 본 발명에 따른 질병 지표 검출방법은 암 지표의 검출 방법으로, 상기 질병 지표는 세포벽 분해효소인 특징이 있으며, 상세하게, 상기 세포벽 분해효소는 콜라게나제 1(Collagenase 1), 젤라티나제 A(Gelatinase A), 스트로멜리신 1(Stromelysin 1), 매트리리신(Matrilysin), 콜라게나제 2(Collagenase 2), 젤라티나제 B(Gelatinase B), 스트로멜리신 2(Stromelysin 2), 스트로멜리신 3(Stromelysin 3), 매크로포제 엘라스타제(Macrophage elastase), 콜라게나제

3(Collagenase 3), MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, 콜라게나제 4(Collagenase 4), MMP-19, 에나멜리신(Enamelysin), XMMP, CMMP 및 MMP-23에서 하나 이상 선택된 MMP(Matrix metalloproteinase)인 특징이 있다.

[111] 상기 질병 지표가 세포벽 분해효소인 경우, 상기 생물학적 샘플은 소변, 혈장, 혈청 또는 췌장액인 특징이 있다.

[112] 이때, 상기 반응물에 함유된 펩타이드는 상술한 세포벽 분해효소와 특이적으로 반응하기 위해, 상기 펩타이드(Peptide)는 각 분해효소의 특이적 아미노산 부위를 가지는 특징이 있으며 무표지 기질인 특징이 있다.

[113] 이때, 상기 반응물에 함유된 펩타이드는 서로 다른 둘 이상의 세포벽 분해효소 모두에 특이적으로 반응하는 아미노산 부위를 가지는 무표지 기질을 포함한다.

[114] 상기 세포벽 분해효소와 특이적으로 반응한 펩타이드가 상기 기판의 귀금속 박막에 최대한 단일층으로 균질하게 결합하기 위해 상기 펩타이드는 아민말단 또는 카르복실기 말단부분의 아미노산이 시스테인인 것이 바람직하다.

[115] 상기 b) 단계의 접촉은 상기 검출물 내로의 상기 기판의 함침, 일정 부피의 상기 검출물의 상기 귀금속 박막이 형성된 기판으로의 점적, 또는 상기 귀금속 박막이 형성된 기판 상 일정 속도의 상기 검출물의 흐름을 포함한다.

[116] 상기 d) 단계에서, 상기 시험 스펙트럼에 존재하는 픽(peak)의 이차이온질량 및 강도에서 하나 이상 선택된 인자(factor)를 기반으로 질병 지표의 종류 및 함량을 검출하는 단계가 수행된다. 이때, 상기 a')의 단계를 통해 얻어진 기준 스펙트럼과 상기 시험 스펙트럼의 이차이온질량 픽의 위치 및 강도의 변화를 기반으로 상기 d) 단계가 수행되는 것이 바람직하다.

[117] 상세하게, 상기 d) 단계는 d1) 상기 기준 스펙트럼의 이차이온질량 픽의 이차이온질량과 강도 및 상기 시험 스펙트럼의 이차이온질량 픽의 이차이온질량과 강도를 비교하는 단계; d2) 상기 기준 스펙트럼에서 소멸 또는 감소된 픽의 해당 이차이온질량과 상기 시험 스펙트럼에서 생성된 픽의 해당 이차이온질량을 추출하여, 상기 펩타이드와 특이적으로 반응한 질병 지표의 종류를 도출하고, 상기 기준 스펙트럼에서 소멸 또는 감소된 픽의 이온 강도와 상기 시험 스펙트럼에서 생성된 픽의 이온 강도를 통해 상기 시료에 함유된 질병 지표의 함량을 도출하는 단계를 포함하여 수행되는 것이 바람직하다.

[118] 이때, 상기 d) 단계에서 도출된 질병지표의 종류 및 질병지표의 함량 자체가 질병보유 가능자의 질병 보유 유무를 판별하는 기준이 될 수 있으며, 기 설정된 질병 지표의 종류 및 해당 질병 지표의 이차이온질량 임계 강도를 d) 단계에서 도출된 질병지표의 종류 및 질병지표의 강도(측정값)와 비교하여 상기 질병 보유 유무 자체를 판별할 수 있다.

[119] 또한, 계획된 실험을 통해, 질병지표의 종류, 상기 반응물에 함유된 질병지표의 농도, 질병지표에 특이적으로 반응하는 펩타이드의 종류, 상기 반응물에 함유된 상기 펩타이드의 농도를 변수로 하여, 각 변수 별로, 질병지표에 특이적으로 반응한 펩타이드의 이차이온질량 강도를 측정하고, 이를 룩업 테이블화하여,

상기 d) 단계에서 실제 측정하고자 하는 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표의 종류 및 농도를 산출할 수 있음은 물론이다.

[120] 도 3은 정상인으로부터 채취한 소변(250 uL)에 MMP-9을 로딩한 샘플을 생물학적 샘플로 하고, Ac-KGPRQITAGGGC(acetylation-KGPRQITAGGGC)를 질병 지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드로 하여, 펩타이드를 금 박막이 형성된 기재와 접촉시킨 후 측정한 이차이온질량 스펙트럼(기준 스펙트럼, 도 3의 왼쪽 그래프)과 소변과 혼합한 펩타이드를 금 박막이 형성된 기재와 접촉시킨 후 측정한 이차이온질량 스펙트럼(시험 스펙트럼, 도 3의 오른쪽 그래프)을 측정 도시한 도면이다.

[121] 상세하게, MMP-9이 포함된 소변에 MMP-9의 특이적 기질인 Ac-KGPRQITAGGGC를 25 μM 넣고 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. MMP-9의 활성에 의해 펩타이드 서열의 Gln과 Ile사이의 결합이 끊어지게 되며, MMP-9의 활성도에 따라 기존의 펩타이드 (Mass 1109.5)와 반응 후 생성된 펩타이드인 특이반응물질(Mass 500.5)이 만들어지게 된다. 이 반응물을 금박막 기판에 30분간 결합 시킨 후, 금박막에 결합된 펩타이드만을 측정하기위하여 금박막기판을 3차 증류수로 워싱한 후 비행시간 이차이온질량 분광법(TOF-SIMS)을 이용하여 이차이온 질량 분석을 수행하였다.

[122] 도 3에서 알 수 있듯이, 금 박막과 펩타이드 Ac-KGPRQITAGGGC에 의해, 소변에 함유된 세포벽 분해효소의 이차이온질량이 효과적으로 검출됨을 확인할 수 있었으며, 기준 스펙트럼과 시험 스펙트럼의 이차이온질량 픽의 위치 및 강도를 통해, 소변에 활성화된 젤라티나제 B(MMP-9)가 존재함을 알 수 있다.

[123] 도 4는 정상인으로부터 채취한 소변(250 uL)에 MMP-9을 로딩한 후 면역침강법에 의해 전처리된 샘플을 생물학적 샘플로 하고, 세포벽 분해효소의 일반적인 펩타이드인 Ac-GPLGMRGLC(acetylation-GPLGMRGLC)를 MMP-9의 기질로 하여, 펩타이드를 금 박막이 형성된 기재와 접촉시킨 후 측정한 이차이온질량 스펙트럼(기준 스펙트럼, 도 4의 왼쪽 그래프)과 소변으로부터 면역침강법에 의해 분리된 침강물과 혼합한 펩타이드를 금 박막이 형성된 기재와 접촉시킨 후 측정한 이차이온질량 스펙트럼(시험 스펙트럼, 도 4의 오른쪽 그래프)을 측정 도시한 도면이다.

[124] 상세하게, 면역침강법에 의한 전처리는, 소변에 MMP-9의 특이적 항원을 첨가하고 2시간동안 반응시켜 면역복합체를 형성한 후, 프로테인 G 아가로스(protein G Agarose)를 첨가하여 면역복합체를 침강시켰다. 침강된 아가로스(면역복합체)에 MMP-9의 기질인 Ac-GPLGMRGLC를 2μM 넣고 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응시 존재하는 MMP-9의 활성에 의해 펩타이드 서열의 Gly과 Met사이의 결합이 끊어지게 된다. 따라서 MMP-9의 활성도에 따라 미반응으로 잔류하는 기존의 펩타이드 (Mass 867.7)와 반응 후 생성된 펩타이드인 특이반응물질(Mass 501.4)이 만들어지게 된다. 이 반응물을 금박막 기판에 도포하여 30분간 결합 시킨 후, 금박막에 결합된 펩타이드만을

측정하기위하여 금박막기판을 3차 증류수로 워싱한 후 ToF-SIMS로 측정하였다.

[125] 이상과 같이 본 발명에서는 특정된 사항들과 한정된 실시예 및 도면에 의해 설명되었으나 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다.

[126] 따라서, 본 발명의 사상은 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등하거나 등가적 변형이 있는 모든 것들은 본 발명 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표를 검출하기 위해, 이차이온 질량분석기와 함께 사용되는 질병 검출 키트로,
귀금속 박막이 형성된 기재;
상기 질병 지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드(Peptide)를 함유하는 반응물;
상기 반응물이 담긴 제1보관수단;
질병 보유 가능자의 생물학적 샘플을 함유하는 시료;
상기 시료가 담긴 제2보관수단;
을 포함하는 것을 특징으로 하는 검출키트.

[청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 검출 키트는
상기 반응물과 상기 시료를 혼합하여 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표에 특이적으로 반응한 펩타이드인 특이반응물질을 함유하는 검출물을 제조하는 혼합수단; 및
상기 혼합수단에 의해 제조된 검출물과 상기 기재를 접촉시켜 상기 특이반응물질을 상기 기재의 귀금속 박막에 결합시키는 접촉수단;
을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 검출키트.

[청구항 3] 제 2항에 있어서,
상기 검출 키트는
상기 검출물의 특이반응물질이 상기 기재의 귀금속 박막에 결합된 시험 샘플의 이차이온질량 스펙트럼인 시험 스펙트럼을 저장하는 저장부; 및
상기 저장부에 저장된 시험 스펙트럼에 존재하는 픽(peak)의 이차이온질량 및 강도에서 하나 이상 선택된 인자(factor)를 기반으로 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표의 종류 및 함량을 판별하는 판별부;
를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 검출키트.

[청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 질병 지표의 질병은 암이며, 상기 질병 지표는 세포벽 분해효소인 것을 특징으로 하는 검출키트.

[청구항 5] 제 4항에 있어서,
상기 세포벽 분해효소는 콜라게나제 1(Collagenase 1), 젤라티나제 A(Gelatinase A), 스트로멜리신 1(Stromelysin 1), 매트리리신(Matrilysin), 콜라게나제 2(Collagenase 2), 젤라티나제 B(Gelatinase B), 스트로멜리신 2(Stromelysin 2), 스트로멜리신

3(Stromelysin 3), 매크로포제 엘라스타제(Macrophage elastase), 콜라게나제 3(Collagenase 3), MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, 콜라게나제 4(Collagenase 4), MMP-19, 에나멜리신(Enamelysin), XMMP, CMMP 및 MMP-23에서 하나 이상 선택된 MMP(Matrix metalloproteinase)인 것을 특징으로 하는 검출키트.

[청구항 6] 제 5항에 있어서,
상기 펩타이드(Peptide)는 세포벽 분해효소의 특이적 아미노산 부위를 가지며 무표지 기질인 것을 특징으로 하는 검출 키트.

[청구항 7] 제 6항에 있어서,
상기 펩타이드의 아민말단 또는 카르복실기 말단부분의 아미노산이 시스테인인 것을 특징으로 하는 검출키트.

[청구항 8] 제 1항에 있어서,
상기 귀금속박막은 금 박막인 것을 특징으로 하는 검출키트.

[청구항 9] 제 1항에 있어서,
상기 생물학적 샘플은 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액, 조직, 조직 균질물, 조직의 부분, 세포, 세포 추출물, 또는 체외 세포 배양물인 것을 특징으로 하는 검출키트.

[청구항 10] 질병 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 질병 지표를 검출하는 방법으로,
a) 상기 질병 지표와 특이적으로 반응하는 펩타이드(Peptide)를 함유하는 반응물과 질병 보유 가능자의 생물학적 샘플을 함유하는 시료를 혼합하여,
상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표에 특이적으로 반응한 펩타이드인 특이반응물질을 함유하는 검출물을 제조하는 단계;
b) 상기 검출물을 귀금속 박막이 형성된 기재와 접촉시켜 미반응 펩타이트 및 특이반응물질을 상기 귀금속 박막에 결합시키는 단계
c) 상기 검출물과 접촉된 기재를 이차이온 질량분석하여 귀금속 박막에 결합된 물질의 이차이온질량 스펙트럼인 시험 스펙트럼을 얻는 단계; 및
d) 상기 시험 스펙트럼에 존재하는 픽(peak)의 이차이온질량 및 강도에서 하나 이상 선택된 인자(factor)를 기반으로 질병 지표의 종류 및 함량을 검출하는 단계;
를 포함하는 질병 지표 검출방법.

[청구항 11] 제 10항에 있어서,
상기 검출 방법은 a) 단계 전,

면역침강법(Immunoprecipitation)을 이용하여 상기 생물학적 샘플에 함유된 질병 지표를 침강시키는 단계;를 더 포함하며, 상기 시료는 상기 면역침강법에 의해 침강된 침강물을 포함하는 것을 특징으로 하는 질병 지표 검출방법.

[청구항 12] 제 10항 또는 제 11항에 있어서,
상기 질병 지표의 질병은 암이며, 상기 질병 지표는 세포벽 분해효소인 것을 특징으로 하는 질병 지표 검출방법.

[청구항 13] 제 12항에 있어서,
상기 세포벽 분해효소는 콜라게나제 1(Collagenase 1), 젤라티나제 A(Gelatinase A), 스트로멜리신 1(Stromelysin 1), 매트리리신(Matrilysin), 콜라게나제 2(Collagenase 2), 젤라티나제 B(Gelatinase B), 스트로멜리신 2(Stromelysin 2), 스트로멜리신 3(Stromelysin 3), 매크로포제 엘라스타제(Macrophage elastase), 콜라게나제 3(Collagenase 3), MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, 콜라게나제 4(Collagenase 4), MMP-19, 에나멜리신(Enamelysin), XMMP, CMMP 및 MMP-23에서 하나 이상 선택된 MMP(Matrix metalloproteinase)인 것을 특징으로 하는 질병 지표 검출방법.

[청구항 14] 제 13항에 있어서,
상기 펩타이드(Peptide)는 세포벽 분해효소에 특이적으로 반응하는 아미노산 부위를 가지며 무표지 기질인 것을 특징으로 하는 질병 지표 검출방법.

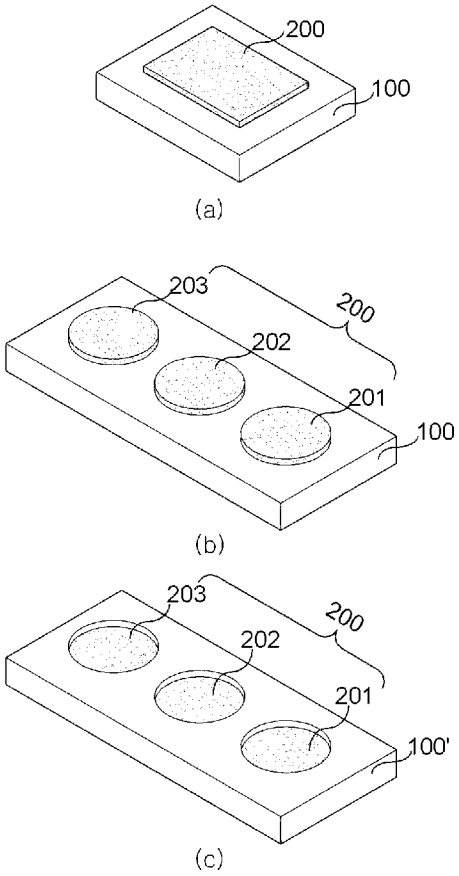
[청구항 15] 제 12항에 있어서,
상기 펩타이드(Peptide)는 서로 다른 둘 이상의 세포벽 분해효소에 특이적으로 반응하는 아미노산 부위를 가지며 무표지 기질인 것을 특징으로 하는 질병 지표 검출방법.

[청구항 16] 제 12항에 있어서,
상기 펩타이드의 아민말단 또는 카르복실기 말단부분의 아미노산이 시스테인인 것을 특징으로 하는 질병 지표 검출방법.

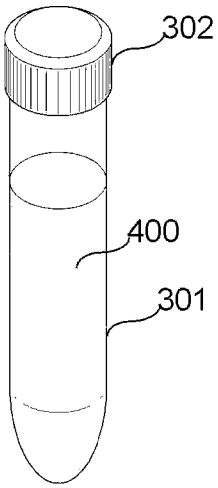
[청구항 17] 제 10항에 있어서,
상기 귀금속박막은 금 박막인 것을 특징으로 하는 질병 지표 검출방법.

[청구항 18] 제 12항에 있어서,
상기 생물학적 샘플은 분변, 소변, 눈물, 타액, 피부의 외부 분비물, 호흡관의 외부 분비물, 장관의 외부 분비물, 소화관의 외부 분비물, 혈장, 혈청, 혈액, 척수액, 림프액, 체액, 조직, 조직 균질물, 조직의 부분, 세포, 세포 추출물, 또는 체외 세포 배양물인 것을 특징으로 하는 질병 지표 검출방법.

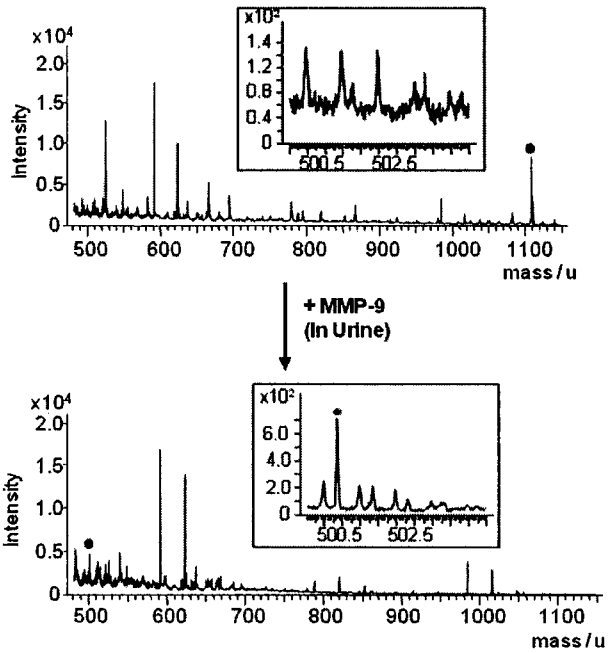
[Fig. 1]



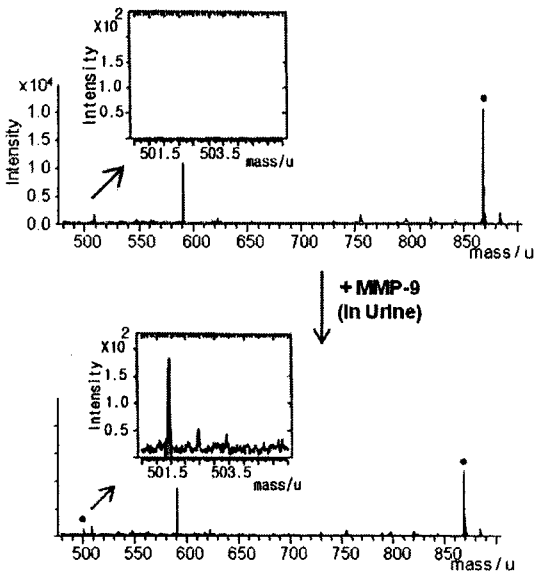
[Fig. 2]



[Fig. 3]


x10⁴
Intensity
mass/u
x10²
500.5
502.5
+ MMP-9
(In Urine)

[Fig. 4]


x10⁴
Intensity
mass/u
x10²
501.5
503.5
+ MMP-9
(In Urine)