

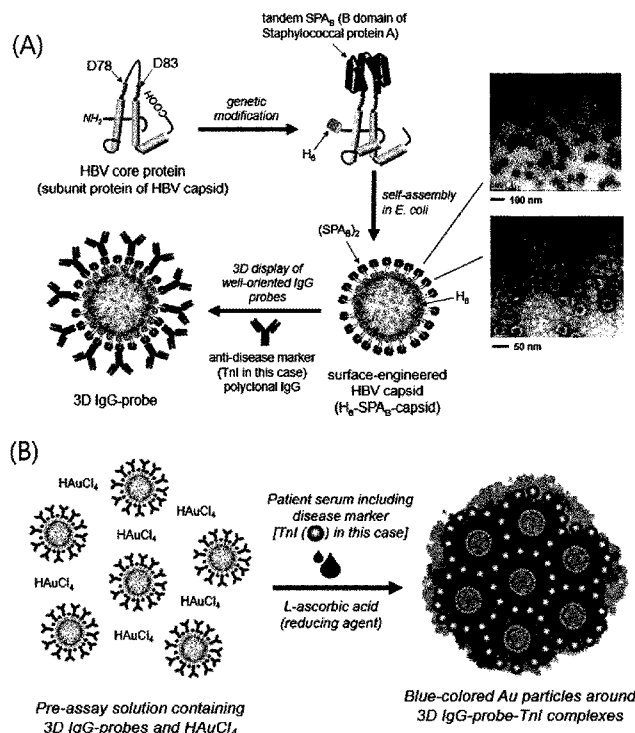


2018 년 10 월 18 일 (18.10.2018) WIPO | PCT

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/543* (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01) *G01N 33/52* (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/004313
- (22) 국제출원일: 2018 년 4 월 13 일 (13.04.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0047841 2017 년 4 월 13 일 (13.04.2017) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145 고려대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이지원 (LEE, Jeewon); 06707 서울시 서초구 남부순환로309길 38 5-522, Seoul (KR). 권정혁 (KWON, Jeong-Hyeok); 13613 경기도 성남시 분당구 청자일로 55 102-301, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 이치영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06133 서울시 강남구 테헤란로 123 11층, Seoul (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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,

(54) Title: ACCURATE, RAPID AND CONVENIENT SINGLE-STEP DISEASE DIAGNOSTIC METHOD USING SELF-AMPLIFICATION PRINCIPLE OF DETECTION SIGNAL

(54) 발명의 명칭: 검출 신호의 자가 증폭 원리를 이용한 정확, 신속, 편리한 단일 단계 질병 진단 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method and a kit for accurately, rapidly, and conveniently detecting a disease marker by linking immunodiagnostics and Au particle formation at the same time and realizing self-amplification of a detection signal and, more particularly, to a method and a kit for detecting a disease-specific marker by using self-amplification of a detection signal, the method comprising the steps of: (a) simultaneously inducing an antigen-antibody immune response and an Au particle formation reaction by reduction of Au ions in an assay solution produced by adding a sample and a reducing agent into a pre-assay solution, wherein the pre-assay solution comprises simultaneously antibodies or antigens for detection of a disease-specific marker, free Au ions and

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, ST, 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 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

adsorbing Au ions, and the sample contains disease-specific antigens or antibodies specifically binding to the antibodies or the antigens; and (b) confirming the presence or absence of a disease-specific marker by a chromogenic reaction through the Au particle formation. The method according to the present invention can diagnose a disease in a single step without any processes such as immobilization and washing processes that usually accompany a conventional diagnosis such as ELISA; can be effectively used for diagnosis of diseases, in particular in patients in an emergency, since the time required for a diagnostic test, which conventionally took several hours or even several days, is as short as about 10 minutes; and furthermore, is useful because a detection result can be confirmed by the naked eye without a separate analyzer, and therefore, the detection cost can be minimized.

(57) 요약서: 본 발명은 면역진단과 금 입자 형성을 동시에 연계시켜, 검출 신호의 자가 증폭을 구현함으로써 정확, 신속, 편리한 질병 마커의 검출 방법 및 키트에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 (a) 질병 특이적 마커 검출용 항체 또는 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 상기 항체 또는 항원에 특이적으로 결합하는 질병 특이적 항원 또는 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution) 내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및 (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 질병 특이적 마커의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 질병 특이적 마커의 검출 방법 및 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 방법은 기존의 ELISA와 같은 진단에서 통상적으로 수반되는 고정화 및 워싱(washing)작업 등의 과정 없이 단일 단계로 질환의 진단이 가능하며, 몇 시간 길게는 며칠이나 걸리는 진단 검사의 시간도 10 분 안팎으로 짧아 특히 응급 상황의 환자와 같은 질환 진단에 효과적으로 이용할 수 있을 뿐만 아니라, 별도의 분석기기 없이 육안으로 검사 결과를 확인할 수 있어 검출 비용을 최소화할 수 있으므로 유용하다.

명세서

발명의 명칭: 검출 신호의 자가 증폭 원리를 이용한 정확, 신속, 편리한 단일 단계 질병 진단 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 면역진단과 금 입자 형성을 동시에 연계시켜, 검출 신호의 자가 증폭을 구현함으로써 정확, 신속, 편리한 질병 마커의 검출 방법 및 키트에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 (a) 질병 특이적 마커 검출용 항체 또는 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 상기 항체 또는 항원에 특이적으로 결합하는 질병 특이적 항원 또는 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution) 내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및 (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 질병 특이적 마커의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 질병 특이적 마커의 검출 방법 및 키트에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 현대 질환 진단 방법에 있어서 가장 이상적인 방법은 빠르면서, 정확하고 간단한 절차를 가진 진단 방법이다. 그리고 이러한 빠른 진단은 급성 심근 경색과 같은 응급 상황의 환자들의 경우에 더 중요하다. 응급환자들의 경우 이러한 빠르고 정확한 진단에 따른 적절한 치료는 생존율과 직접적으로 연관되기 때문에 응급환자가 아닌 경우보다 더욱 중요한 요인이 된다.
- [4] 임상검사 분야에서, 생체 시료(혈액, 뇨 등)를 이용하여 각종 질환들의 진단을 수행하고 있는데, 이러한 진단방법으로서, 각종 측정법이 개발되어 이용되고 있다. 이러한 측정방법의 대표적인 방법으로서, 효소반응을 이용한 생화학적 측정법 또는 항원-항체반응을 이용한 면역측정법을 들 수 있다. 최근에는 생체 시료중의 성분을 정밀하게 측정하는 것이 요구되고, 특이성이 높은 항원-항체반응을 이용한 면역측정방법이 폭넓게 이용되고 있다.
- [5] 면역측정방법은 항원-항체의 결합 능력을 활용하는 방법이다. 주로, 면역분석법은 샘플 내 특정 항원(또는 항체)-특이적 항체(또는 항원)의 존재를 분석하는데 사용된다. 이는 고체 지지체에 고정화된 특정 항원(또는 항체) 위로 샘플을 흐르게 하고(wash), 뒤이어 다양한 기법을 이용하여 결합된 항체(또는 항원)를 시각화하여 수행된다.
- [6] 일반적으로, 면역측정방법은 미지의 샘플에 대한 농도를 정하기 (assign) 위하여 교정기(calibrator)의 이용을 요구한다. 고전적인 면역분석법에서, 교정기의 세트가 실행되고, 신호 대 농도의 교정 곡선(calibration curve)이 플로팅되며(plotted) 미지의 샘플의 농도가 내삽법(interpolation)에 의해

결정된다(Ibrahim A. Darwish, International Journal of Biomedical Science, Vol. 2 pp. 217-235, 2006).

- [7] 면역측정법으로는 그 검출 원리 및 방법에 따라 방사성 동위원소를 사용하여 신호를 검출하는 방사면역분석법(RIA: radioimmunoassay), 효소에 의한 신호증폭을 사용하는 효소면역측정법(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, 혹은 EIA: enzyme immunoassay), 형광을 이용하여 검출하는 형광항체법(FA:fluorescence antibody technique), 화학발광을 사용하는 화학발광면역측정법(CLIA: chemiluminescence immunoassay) 등으로 나눌 수 있으며, 그 밖에도 표지물질의 사용 방법이나 기질의 종류에 따라 다양한 분류가 가능하다.
- [8] 효소면역측정방법은 크게 직접효소면역측정법(Direct ELISA), 간접면역측정법(indirect ELISA), 샌드위치 면역효소측정법(Sandwich ELISA) 및 경쟁적 효소면역측정법(Competitive ELISA)로 구분할 수 있다.
- [9] 직접효소면역측정법은 항원을 96-웰 플레이트 등에 고정시킨 다음, 효소와 결합한 항체를 주입하여 항원-항체 반응을 일으킨 뒤, 워싱(washing) 과정을 거친 후, 항체에 붙은 효소에 의해 기질이 생산물로 변화된 양을 측정하는 방법으로, 다른 ELISA에 비해 빠르다는 장점이 있으나, 민감도가 낮고, 각각의 ELISA를 위해 특정항체가 필요하며, 시간이 오래 걸리고 비싸다는 단점이 있다.
- [10] 간접효소면역측정법은 항원을 96-웰 플레이트에 고정시킨 다음, 1차 항체를 처리하여 항원-항체 반응을 유도하고, 1차 항체의 Fc 도메인과 결합할 수 있으며 효소가 결합된 2차 항체를 처리한 뒤, 효소에 의해 기질이 생산물로 변화된 양을 측정하는 방법으로, 민감도가 높고, 상대적으로 저렴하며 다양한 종류의 1차 항체를 사용할 수 있다는 장점이 있으나, 2차 항체들 사이의 교차 반응에 의한 위양성이 높고, 복잡한 단계와 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다.
- [11] 샌드위치 효소면역측정법은 항원과 결합할 수 있는 포획 항체(capture-antibody)를 96-웰 플레이트에 고정시킨 다음, 항원이 함유된 샘플을 주입하고, 항원의 다른 에피토프와 결합할 수 있는 검출 항체(detection-antibody)를 주입하여 포획항체-항원-검출항체의 샌드위치 구조를 검출 항체의 Fc 도메인과 결합할 수 있고, 효소가 결합된 2차 항체로 검출하는 방법으로, 샘플 준비 단계가 가장 최소화 되고, 높은 민감도 및 정확도를 가진다는 장점이 있으나, 1차 항체와 2차 항체가 항원의 서로 다른 에피토프에 결합하도록 제조해야 하고, 시간이 오래 걸리며 비싸다는 단점이 있다.
- [12] 경쟁적 효소면역측정법은 샘플에 항체를 투입하여 항원-항체 반응을 유도한 다음, 항원이 코팅된 96-웰 플레이트에 상기 항원-항체 복합체가 존재하는 상태로 투입한 뒤, 효소가 결합된 2차 항체를 투입하여 기질로부터 생산물의 변화양을 측정하는 방법으로, 샘플 내 항원이 많이 존재할수록 2차 항체에 의해 변화되는 생산물의 양이 감소하는 방식으로, 샘플 준비 단계가 최소화되고, 넓은 범위의 항원양을 측정할 수 있으며, small molecule과 같은 에피토프가 적은

항원도 검출 할 수 있는 장점이 있으나, 희석된 샘플에서는 사용할 수 없는 단점이 있다(Karichma Sha et al., British Journal of Hospital Medicine, Vol. 77, No. 7, 2016).

- [13] 전기-화학발광(ECL) 반응은 전극(electrode)의 표면에서 전기화학(electrochemistry)에 의해 유도되는 특이적 화학발광 반응이다. 항원-항체(antigen-antibody) 복합체 및 루테늄 피리딘의 접합체(conjugate)는 트리프로필아민의 존재 하에 전기화학에 의해 여기(excited)되고, 산화환원반응(redox reaction)이 광자(photons)를 방출하기 위해 발생하고, 이는 광전자증배관(photomultiplier tube)에 의해 수집될 수 있다. 이 과정은 많은 광자를 생산하기 위해 반복적으로 수행되고, 이는 광학 신호(optical signal)를 증폭한다. 일반적으로 전기화학발광 분석에 사용되는 표지들(labels)은 표지된 항체 또는 항원을 생산하기 위한, 다른 화학 구조를 가진 항체 또는 항원 분자에 결합할 수 있는 표지들이다(Michael Vogesser et al., Ther. Drug Monit. Vol. 36, No. 5, pp. 640-650, 2014).
- [14] 이러한 ELIA 방법은 고감도, 빠른 분석 속도, 자동화가 쉽다는 장점이 있으나, 여러 단계를 거쳐야 하며, 표지된 항체 또는 항원에 대한 제작비가 비싸며, 주로 사용되는 루테늄 피리딘(ruthenium pyridine)의 경우, 전극 물질에 의해 크게 영향을 받고, 발광 효율이 제한적이며, 비싸다는 단점이 있다.
- [15] 이러한 단점을 극복하기 위해 대한민국 특허 제10-1495665호에서는 마그네틱을 이용한 형광다중면역검사법을 개발하였으나, 여전히 여러 단계를 거쳐야 하기 때문에 시간이 오래 걸린다는 단점이 있으며, 대한민국 특허 제10-2014-0151305호에서는 단백질 입자를 이용하여 항원을 단백질 입자의 표면에 올바른 배향성을 가지고 표출되도록 하여 민감도가 향상된 방법을 개발하였지만, 여전히 여러 단계가 필요하며, 시간이 오래 걸린다는 단점이 있어, 쉽고 빠른 검출 방법이 필요한 실정이다.
- [16]
- [17] 이에, 본 발명자들은 면역분석방법의 단점을 개선하기 위해 예의 노력한 결과, 금 이온의 환원 반응을 이용한 금 입자 형성과 항원-항체 면역반응을 동시에 유도할 경우, 금 입자의 응집체 형성에 따라 검출 신호가 자가 증폭되어 빠르게 질병 특이적 마커의 존재 유무를 검출할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [18]
- [19] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.
- [20]
- [21] 발명의 요약

- [22] 본 발명의 목적은 검출 신호의 자가 증폭 원리를 이용한 정확, 신속, 편리한 단일 단계 질병 특이적 마커의 검출 방법을 제공하는 것이다.
- [23] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 질병 특이적 마커 검출용 항체 또는 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 상기 항체 또는 항원에 특이적으로 결합하는 질병 특이적 항원 또는 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution) 내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및 (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 질병 특이적 마커의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 질병 특이적 마커의 검출 방법을 제공한다.
- [24] 본 발명은 또한, (a) 항 바이러스 항체 검출용 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항 바이러스 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution) 내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및 (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 바이러스의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 항 바이러스 항체의 검출 방법을 제공한다.
- [25] 본 발명은 또한, (a) 질병 특이적 마커 검출용 항체 또는 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 상기 항체 또는 항원에 특이적으로 결합하는 질병 특이적 항원 또는 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution) 내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및 (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 질병 특이적 마커의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 질병 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다.
- [26] 본 발명은 또한, (a) 질병 특이적 마커 검출용 항체 또는 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 상기 항체 또는 항원에 특이적으로 결합하는 질병 특이적 항원 또는 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution) 내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및 (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 질병 특이적 마커의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 질병 진단 방법을 제공한다.

[27]

도면의 간단한 설명

- [28] 도 1의 (A)는 본 발명의 방법에 의한 금성 심근 경색 진단을 위한 단백질 입자에 대한 모식도 및 생성된 단백질 입자를 전자현미경으로 확인한 결과이며, (B)는 본 발명의 원리에 대한 모식도로서, 금 입자의 형성과 항원-항체 반응이 동시에

일어나면서 클러스터가 형성되어 급격한 자가 신호 증폭이 발생하는 과정을 나타낸 것이다

- [29] 도 2의 (A)는 급성 심근경색 환자와 정상인 혈청의 one-step 진단 결과를 나타낸 것이고, (B)는 심근경색 환자의 진단에서 이러한 색깔 변화가 빛을 흡수하는 특정 파장에서 흡광도의 차이가 생김으로써 나타난다는 것과 각 시간대에서의 환자와 정상인 사이의 흡광도의 크기차이를 나타내는 실험결과이다.
- [30] 도 3의 (A)는 급성 심근 경색 마커 troponin I를 검지 해내는 ELISA 키트를 이용하여 동일한 환자의 혈청을 진단한 것을 나타내는 실험 결과이며, (B)는 정량화의 가능성을 확인하기 위하여 추가적으로 환자의 혈청을 녹십자 진단 센터에서 troponin I의 양을 ECLIA로 정량화한 결과(윗 패널) 및 이 환자 혈청을 이용하여 one-step 진단을 실행한 결과(아래 패널)이다.
- [31] 도 4는 시간대 별 환자의 진단 용액(assay solution) 내의 금 입자 응집체를 TEM으로 이미지를 찍어 확인한 결과이다.
- [32] 도 5의 (A)는 금 입자 응집체가 형성되는 원리를 시뮬레이션으로 확인한 결과이며, (B)는 응집체의 크기에 비례하여 흡광도가 커지는 것을 확인한 것으로, 응집체의 크기에 비례하여 흡광도가 커지는 양상이 같은 파장대에서 일어나는 것을 확인한 결과이다.
- [33] 도 6은 one-step 진단의 원리를 확인하기 위한 대조군 실험들을 나타낸 결과로서, 자유 금 이온이 존재하고, 단백질 입자에 의한 항원-항체 복합체가 모두 형성되어야만 복합체가 생성되어 환자에서만 발색반응이 나타나는 것(5)을 확인한 결과이다.
- [34] 도 7은 금 이온과 환원성 펩타이드 간의 상호 작용과 환자 검체 내의 troponin I과 단백질 입자의 상호 작용, 그리고 이로 인한 신호 자가 증폭 작용이 어떻게 이 진단에서 일어나는 지에 대한 모식도이다.
- [35] 도 8은 본원 발명의 방법으로 C형 간염 바이러스(HCV)를 진단하기 위해 제조한 단백질 입자의 모식도 및 제조한 단백질 입자를 전자현미경으로 관찰한 결과이다.
- [36] 도 9는 본원 발명의 방법으로 C형 간염 환자의 혈액 샘플 내에 존재하는 HCV 항체를 검출하는 원리를 나타낸 모식도이다.
- [37] 도 10의 (A)는 본원 발명의 방법으로 C형 간염 환자 및 정상인의 혈액 샘플을 테스트한 결과를 나타낸 것이다. 도 10의 (B)는 C형 간염 환자의 항원-항체 복합체 크기에 의한 흡광도 및 시간에 따른 흡광도 변화를 측정한 결과로서, 시간이 흐름에 따라 588nm라는 특정한 파장에서 흡광도가 증가하는 양상을 측정한 결과이고 TEM 이미지에서와 같은 모양의 클러스터가 형성된다는 것을 보여주는 것이 또한 box plot 도표는 정상인군과 환자군의 각 시간별 흡광도의 차이를 측정한 결과이다.
- [38] 도 11의 (A)는 본원 발명의 방법으로 HIV를 보유한 환자 및 정상인의 혈액 샘플을 테스트한 결과를 나타낸 것이고, (B)는 HIV 보유 환자의 항원-항체

복합체 크기에 의한 흡광도 및 시간에 따른 흡광도 변화를 측정한 결과로서, 시간이 흐름에 따라 555nm라는 특정한 파장에서 흡광도가 증가하는 양상을 측정한 결과이고 TEM 이미지에서와 같은 모양의 클러스터가 형성된다는 것을 보여주는 것이며, 또한 box plot 도표는 정상인군과 환자군의 각 시간별 흡광도의 차이를 측정한 결과이다.

- [39] 도 12의 왼쪽 패널은 본원 발명의 방법으로 HAV를 보유한 환자 및 정상인의 혈액 샘플을 테스트한 결과를 나타낸 것이고, 오른쪽 패널은 HAV 보유 환자의 항원-항체 복합체 크기에 의한 흡광도 및 시간에 따른 흡광도 변화를 측정한 결과로서, 시간이 흐름에 따라 574nm라는 특정한 파장에서 흡광도가 증가하는 양상을 측정한 결과이다.
- [40] 도 13은 환자 혈청 내 TnI에 대한 신뢰성 있는 정량 분석 여부를 평가하기 위한 테스트 결과로서, (A)는 진단 개시 후 15분 시점에서의 각 표준 혈청 별 흡광도를 측정한 결과이며, (B)는 진단 개시 후 20분 시점, (C)는 25분 시점, (D)는 30분 시점에서의 검출 신호 측정 결과이다.
- [41] 도 14 내지 16은 녹십자 의료재단의 ECLIA 진단 기기(Roche E-170 모델)에서의 정량 분석 여부를 확인한 결과로서, 도 14는 정상인 시료(A), 도 15는 정상인 시료(B) 및 도 16은 정상인 시료(C)를 이용하여 분석한 결과이다.
- [42] 도 17 내지 19는 Elascience 사의 ELISA 진단키트(E-EL-H0144)에서의 정량 분석 여부를 확인한 결과로서, 도 17은 정상인 시료(A), 도 18는 정상인 시료(B) 및 도 19는 정상인 시료(C)를 이용하여 분석한 결과이다.
- [43] 도 20 내지 22는 Abbexa Ltd.사의 ELISA 진단키트(abx050255)에서의 정량 분석 여부를 확인한 결과로서, 도 20은 정상인 시료(A), 도 21은 정상인 시료(B) 및 도 22는 정상인 시료(C)를 이용하여 분석한 결과이다.
- [44] 도 23 내지 25는 ALPCO 사의 ELISA 진단키트(25-TR1HU-E01)에서의 정량 분석 여부를 확인한 결과로서, 도 23은 정상인 시료(A), 도 24는 정상인 시료(B) 및 도 25는 정상인 시료(C)를 이용하여 분석한 결과이다.
- [45] 도 26은 본원 발명의 방법을 이용하여 급성심근경색을 진단하는 경우의 검출한계(LOD) 평가를 위한 정량화 실험의 결과이다.
- [46] 도 27은 본원 발명의 방법을 이용하여 C형 간염을 진단하는 경우의 검출한계(LOD) 평가를 위한 정량화 실험의 결과이다.
- [47] 도 28은 본원 발명의 방법을 이용하여 에이즈(AIDS)를 진단하는 경우의 검출한계(LOD) 평가를 위한 정량화 실험의 결과이다.

[48]

[49] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

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

[51]

[52] 본 발명에서는 질병 특이적 마커 검출용 항체 또는 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 상기 항체 또는 항원에 특이적으로 결합하는 질병 특이적 항원 또는 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution) 내에서, 항원-항체 면역반응과 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성에 따른 검출 신호의 자가 증폭이 일어나, 질병 특이적 마커의 검출이 가능한지 확인하고자 하였다.

[53] 본 발명에서는 제조합 B형 간염 바이러스 캡시드(HBV-capsid) 유래 코어(core) 단백질의 표면에 금 이온 흡착용 태그 및 항체 Fc 도메인 결합용 태그가 표출된 단백질 입자를 제조한 다음, 급성 심근 경색의 마커를 검지할 수 있는 항체를 상기 단백질 입자의 표면에 부착한 후, 금 이온을 흡착시킨 단백질 입자 수용액을 제조하였다. 상기 수용액에 급성 심근 경색 마커 및 환원제를 투입하여 5분 만에 육안으로 확인 가능한 발색반응이 나타나는 것을 확인하였다.

[54] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 HBV 코어 단백질의 N-말단에 금 이온을 흡착할 수 있는 6개의 히스티딘(hexa-histidine)을 발현시키고, loop 부분에 링커 아미노산과 항체의 Fc 도메인과 결합할 수 있는 Staphylococcal Protein A의 B 도메인이 결합되어 표면이 개질된 제조합 HBV 캡시드 단백질 입자를 제조하였다(도 1).

[55] 상기 단백질 입자에 급성 심근 경색 시, 과발현되는 troponin I(TnI)에 대한 항체를 결합시켜 항체가 올바르게 배향된 단백질 입자를 제조한 다음, L-아스코르빅 산(L-ascorbic acid, LAA) 및 TnI 함유 환자 혈액 샘플을 주입하여 응집 반응을 유도(도 1, B)한 결과, 5분 만에 환자에서 육안으로 확인 가능한 발색 반응이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 2).

[56]

[57] 따라서 본 발명은 일 관점에서, (a) 질병 특이적 마커 검출용 항체 또는 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 상기 항체 또는 항원에 특이적으로 결합하는 질병 특이적 항원 또는 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution) 내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및 (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 질병 특이적 마커의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 질병 특이적 마커의 검출 방법에 관한 것이다.

[58] 본 발명에서 사용되는 용어 “사전 진단 용액(pre-assay solution)”은 흡착 금 이온, 자유 금 이온 및 검출하고자 하는 항원(또는 항체)에 특이적으로 결합하는 항체(또는 항원)를 포함하고 있는 용액을 의미하며, 반응 조건을 위한 기타 버퍼 및 항체 또는 항원 및 금 이온을 흡착하는 아미노산이 표출된 입자 등을 추가로 포함할 수 있다.

[59] 본 발명에 사용되는 용어 “진단 용액(assay solution)”은 상기 사전 진단 용액에

샘플 및 환원제를 투입한 용액을 의미하고, 상기 샘플에는 검출하고자 하는 항원 또는 항체가 포함될 수 있다.

[60]

[61] 본 발명에서 사용되는 용어 "항체"는 IgA, IgE, IgM, IgD, IgY 및 IgG로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역글로불린으로, 목표 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 경쇄(light chain)와 중쇄(heavy chain) 각각 2개씩 모여 이루어지며, 각각의 사슬은 아미노산 서열이 가변적인 가변영역(variable domain)과 일정한 서열을 가지는 고정영역(constant domain)으로 이루어져 있다. 가변영역의 3차원구조 말단에 항원이 결합하는 부위가 위치하며, 이 부위는 경쇄와 중쇄에 각각 3개씩 존재하는 상보성결정부위(complementarity determining region)들이 모여서 형성된다. 상보성결정부위는 가변영역 중에서도 아미노산 서열의 가변성이 특히 높은 부분이며, 이러한 높은 가변성에 의해 다양한 항원에 대해 특이적 항체가 찾아질 수 있다. 본 발명의 범위에는 완전한 항체 형태뿐 아니라, 상기 항체 분자의 항원 결합 단편도 포함된다.

[62] 본 발명에서 사용되는 용어 "ScFv (single-chain Fv, 단일사슬단편항체 또는 항체 단편)"는 경쇄 및 중쇄의 가변영역을 연결한 항체이다. 경우에 따라서, 15개 내외의 아미노산이 연결된 펩타이드 사슬로 이루어진 링커(linker, 연결부위)를 포함할 수 있으며, 이 때, ScFv는 경쇄 가변영역-연결부위-중쇄 가변영역, 또는 중쇄 가변영역-연결부위-경쇄 가변영역의 구조를 가질 수 있으며, 원 항체와 동일 혹은 유사한 항원특이성을 가진다.

[63] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.

[64] 항체의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 다이 설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO88/10649, WO88/106630, WO88/07085, WO88/07086 및 WO88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv, scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로

연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수도 있다.

[65] 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fvs(scFV), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFV) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 또는 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[66]

[67] 본 발명에 있어서, 상기 흡착 금 이온은 금 이온을 흡착할 수 있는 물질에 흡착되는 것이면 모두 가능하고, 바람직하게는 아미노산에 흡착될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 히스티딘, 라이신 및 아르기닌으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산에 흡착되는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[68] 본 발명에 있어서, 상기 환원제는 본 발명의 반응조건에서 금 이온을 금 입자로 환원 시킬 수 있는 물질이면 모두 이용가능하며, 바람직하게는 아스코르빅 산, 이미다졸, 피라졸, 히스타민, 히드록실 아민, 구연산 및 소듐 보로하이드라이드로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[69] 본 발명에 있어서, 상기 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 타액, 구강 점막 및 침으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[70] 본 발명에 있어서, 사전 진단 용액 내에 존재하는 상기 금 이온(자유 금 이온 + 흡착 금 이온)의 농도는 1 mM ~ 10 mM인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[71] 본 발명에 있어서, 진단 용액 내에 존재하는 상기 환원제의 농도는 0.005 M~0.1 M인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[72] 본 발명에 있어서, 상기 샘플의 양은 10 μ l ~30 μ l인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[73] 본 발명에 있어서, 상기 금 이온의 농도, 환원제의 농도 및 샘플의 양이 기준값보다 적을 경우에는 효과적인 질병 마커 검출이 수행되지 않고, 기준 농도 이상일 경우에는 위양성 등의 부정적 효과가 나타날 수 있다.

[74] 본 발명에 있어서, 상기 질병 특이적 마커 검출용 항원 또는 항체는 단백질 입자의 표면에 표출되어 있는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 단백질 입자는 금 이온을 흡착할 수 있는 히스티딘, 라이신 및 아르기닌으로 구성된 군에서 선택되는 태그가 추가로 그 표면에 표출되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[75] 본 발명에 있어서, 상기 질병 특이적 마커 검출용 항원 또는 항체의 면역반응은 단백질 입자의 표면에서 발생하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 태그는 금 이온을 흡착하여 환원제의 존재 하에 금 입자의 응집반응을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [76] 본 발명에 있어서, 상기 단백질 입자는 단백질의 자가조립 기능에 의해 형성되는 입자는 모두 이용가능하고, 바람직하게는 페리틴(ferritin), 페리틴 유사 단백질(ferritin-like protein), 마그네토솜(magnetosome) 구성단백질, 바이러스 구성단백질(e.g. hepatitis B virus core protein, tobacco mosaic virus) DPS(DNA binding protein), 및 Proteosome로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 본 발명에 있어서 상기 바이러스 구성 단백질은 인간 B형 간염 바이러스의 캡시드 단백질로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [77] 본 발명에 있어서, 상기 단백질 입자의 크기는 10nm-50nm인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [78] 본 발명에 있어서, 상기 단백질 입자 표면에 표출되어 있는 질병 특이적 마커 검출용 항체는 상기 항체의 Fc 도메인에 결합할 수 있는 도메인이 상기 단백질 입자 표면에 표출되어 상기 도메인과 상기 질병 특이적 마커 검출용 항체가 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [79] 본 발명에 있어서, 상기 항체의 Fc 도메인과 결합할 수 있는 도메인은 Staphylococcal protein A의 B domain 및 protein G으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [80] 본 발명에 있어서, 상기 항체의 Fc 도메인과 결합할 수 있는 도메인은 상기 단백질 입자의 표면에 표출 되는데, 이러한 표출은 링커 단백질로 인해 더 효과적으로 표출되는 것이 특징이다.
- [81] 본 발명에 있어서, 상기 링커 단백질은 상기 항체의 Fc 도메인과 결합할 수 있는 도메인을 단백질 입자의 표면에 효과적으로 표출시킬 수 있는 아미노산이면 모두 이용가능하나, 바람직하게는 G4SG4T 또는 G4SG4 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [82] 본 발명에 있어서, 상기 발색반응은 환자의 샘플이 주입된 군에서 정상 샘플이 주입된 군보다 더 빨리 나타날 수 있고, 환자의 경우에는 최소 5분 최대 10분 안에 나타나는 것을 특징으로 할 수 있으나, 반응 시간은 조건에 따라 달라 질 수 있다.
- [83] 본 발명에 있어서, 상기 발색반응은 가시광선의 변화를 검출할 수 있는 방법이면 어떤 방법을 이용해서 검출 할 수 있으며, 바람직하게는 육안 또는 분광감도계(spectrophotometer)로 검출하는 것을 특징으로 할 수 있고, 500-600nm의 흡광도를 측정하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [84] 본 발명에 있어서, 검출 신호의 자가 증폭은 소량의 질환 마커를 검지하여 그 결과를 육안으로 확인할 수 있는 색깔의 변화로 나타내게 된다. 이러한 신호의 자가 증폭은 진단을 위한 용액 안에 녹아있는 금 이온이 환원제에 의해 금 입자로 환원되는 현상에 의하여 일어나고, 발생하는 금 입자의 크기가 커지면서 그 색깔의 변화가 육안으로 확인 가능한 수준의 신호로 나타나게 된다.

- [85] 본 발명에서 사용하는 단백질 입자들은 그 단량체들에 헥사-히스티딘이 융합 발현되어 있는데, 금 이온과 히스티딘 아미노산이 결합하는 성질이 있기 때문에 항원-항체 반응에 의하여 만들어진 응집체에 결합되어 있는 금 이온들이 환원제와 반응하여 금 입자로 환원이 되는데 여기에 계속해서 다른 금 이온들이 환원되면서 크기가 커지면서 커다란 금 입자를 이루고 이 응집체로 인해 색깔을 가지게 된다.
- [86] 정상인 혈청의 경우, 항원-항체 반응이 일어나지 않기 때문에, 금 입자에 의한 응집체가 만들어지는 속도가 느려 같은 색깔이 나타나는 시간이 현저히 늦고, 이러한 색깔 변화의 유무를 통해서 환자와 정상인의 구분이 가능해진다.
- [87]
- [88] 본 발명에서는 또한, 검출 신호의 자가 증폭을 이용하여 바이러스를 검출 할 수 있는지 확인하고자 하였다.
- [89] 즉, 본 발명의 다른 실시예에서는 C형 간염 환자에서 C형 간염 바이러스(HCV) 특이적 항체를 검출하기 위하여 본 발명의 방법을 이용하였다. 먼저, 대장균에서 1) H6-SPAB-HBVC capsid 구조의 발현벡터, 2) H6-c33c(HCV 에피토프)-HBVC capsid 구조의 발현벡터 및 3) hFTN(인간 웨리틴)-511p-c100p-c22p(HCV 에피토프)-H6 구조의 발현벡터를 각각 발현하여 3가지 종류의 단백질 입자를 제조하였다(도 8). 1)번 벡터로 제조되는 단백질 입자는 표면에 헥사-히스티딘 및 SPAB가 표출되어 금 이온 및 항체의 Fc 도메인과 결합하는 기능을 하고, 2)번 및 3)번 벡터는 표면에 C형 간염 특이적 에피토프가 표출되어 환자 샘플 내 HCV 특이적 항체와 결합할 것으로 예상하였다(도 9).
- [90] 단백질 입자들이 섞인 수용액에 금 이온을 흡착시킨 다음, 환자의 혈액 샘플 및 정상인의 혈액 샘플을 주입한 결과, 환자의 혈액 샘플에서만 단백질 입자와 금 입자의 클러스터가 형성되어 파란색 발색반응이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 10, 도 11).
- [91] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, (a) 항 바이러스 항체 검출용 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항 바이러스 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution)내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및 (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 바이러스의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 항 바이러스 항체의 검출 방법에 관한 것이다.
- [92] 본 발명에서 용어 “바이러스 검출용 항원”은 바이러스를 검출할 수 있는 항체에 특이적으로 결합하는 바이러스 단백질이면 모두 이용가능하며, 바이러스 단백질뿐만 아니라, 바이러스 펩타이드, 에피토프 등 바이러스 유전자에 의해 번역되는 모든 종류의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [93] 본 발명에서 용어 “에피토프”는 항원 분자상 항체 또는 T 세포 수용체(TCR)과 구조적 복합 적합체(MHC)결합체에 결합하는 특정부위를 의미하며,

항원결정인자(antigenic determinant)와 같은 의미로 사용된다.

- [94] 예를 들어, C형 간염 바이러스(Hepatitis C virus, HCV)는 비A형 및 비B형 간염을 일으키는 Flaviviridae과에 속하는 바이러스로서, HCV 게놈은 단일가닥 RNA로서 약 3,010개의 아미노산으로 이루어진 단일복합단백질(polyprotein)을 발현한다(Choo et al., Science, 244:359-362, 1989). HCV에 의해 발현되는 단일복합단백질은 숙주세포와 바이러스의 프로테아제에 의해 10개의 서로 다른 기능을 가지는 단백질들로 다시 절단되게 된다.
- [95] HCV의 유전자 구성은 NH₂-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH이다(Steven Rosenberg, J. Mol. Biol., 313:451-464, 2001). 상기 단백질은 크게 C(Core), E1, E2, 및 p7을 포함하는 구조를 이루는 구조단백질들과 NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, 및 NS5B로 이루어진 비구조단백질들로 나눌 수 있다.
- [96] HCV의 C(core) 단백질은 HCV 게놈 RNA를 둘러싸는(encapsidation) 구조적 역할을 할 뿐 아니라 숙주세포의 유전자 전사, 성장 및 증식을 조절하여 간암으로 발전하는데 역할을 할 것으로 믿어지며, E1 및 E2 단백질은 타입 1 막(transmembrane) 단백질이며 바이러스 외피 단백질로서 세포 감염 시 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. E1 단백질의 경우 중화 항체를 유도하지 못한다는 점 때문에 큰 관심을 받지 못하고 있어 왔으나, 최근 벨기에의 이노제네틱스(Innogenetics) 사에서는 치료용 백신으로 개발하여 침팬지 실험과 1상 임상시험을 성공적으로 마친 후 2상 임상시험을 진행 중이고, 특히 알파 인터페론 이용으로 효과를 보지 못하고 있는 1b 타입의 HCV 감염에도 좋은 효과를 보여주어 상당히 고무적인 것으로 평가 받고 있다.
- [97] E2 단백질은 바이러스의 주요 외피(envelope) 단백질로서 구조적 역할 외에 추정되는 세포수용체인 CD81과 결합하며 숙주의 면역 시스템 및 인터페론 매개 항-바이러스 반응으로부터의 도피와 종양발생(oncogenesis) 또는 자가면역 간질환(autoimmune liver disease)을 일으키는 등 다기능 단백질로 알려져 있어 효과적인 HCV 백신 개발을 위한 주된 항원일 뿐 아니라 항-HCV 약제 개발을 위한 주된 표적으로 인지되고 있다. P7 단백질의 기능은 알려지지 않았으며, NS2는 금속-단백질 분해효소(metallo-protease)의 일부이며 NS3은 바이러스의 세린 단백질 분해효소 도메인을 N-말단에, RNA 헬리카제(helicase) 도메인을 C-말단에 가지고 있다.
- [98] NS4A는 바이러스 단백질 분해효소의 보조인자(cofactor)이며, NS4B는 잠재적인 종양발생 능력을 가진 것으로 보고되었다. NS5A는 HCV가 인터페론에 저항성을 가지게 하는 기능을 나타내며 항세포자살(antiapoptotic) 기능을 갖고 있는 것으로 보고되었고 NS5B는 바이러스의 RNA 의존적 RNA 중합효소로서 기능한다고 알려져 있으며, 이러한 HCV 구성 단백질의 에피토프가 본원 발명의 바이러스 특이적 에피토프로 사용될 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다.
- [99] 본 발명에 있어서 상기 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 존재하는 항

바이러스(HCV) 항체 검출용 항원은 c22p, c33c, 5-1-1p, c100p, 및 이들이 2이상 융합된 에피토프로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 2이상 융합된 에피토프는 c22p-c33c, c22p-5-1-1p, c22p-c100p, c33c-5-1-1p, c33c-c100p, 5-1-1p-c100p 및 c22p-5-1-1p-c100p 로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[100]

[101] 본 발명에서 사용한 용어 "바이러스"는 편성 세포 내 기생체(obligatory intracellular parasite)로서 핵산으로 DNA 또는 RNA을 갖고, 증식은 핵산으로 시작되고 2분열법으로 증식되지 않으며 ATP 생산에 필요한 효소계를 갖고 있지 않은 것을 의미한다.

[102] 본 발명의 바이러스는 노출 바이러스(naked virus)와 외막 바이러스(enveloped virus)를 포함하고, 구체적으로 본 발명의 일 예에 따른 바이러스는 외막 바이러스(enveloped virus) 일 수 있다.

[103] 본 발명에 있어서, 상기 외막 바이러스는 구체적으로 헤르페스바이러스(herpesvirus), 폭스바이러스(poxvirus) 및 헤파드나바이러스(hepadnavirus)를 포함하는 DNA 바이러스와 플라비바이러스(flavivirus), 토가바이러스(togavirus), 코로나바이러스(coronavirus), 헤파타이티스 C(hepatitis C), 오소믹소바이러스(orthomyxovirus), 파라믹소바이러스(paramyxovirus), 랍도바이러스(rhabdovirus), 분야바이러스(bunyavirus), 필로바이러스(filovirus), 인간면역결핍바이러스(HIV) 및 레트로바이러스(retrovirus)를 포함하는 RNA 바이러스에 속하는 것이면 모두 포함할 수 있다.

[104] 상기 오소믹소바이러스는 인플루엔자 바이러스 A, 인플루엔자 바이러스 B, 인플루엔자 바이러스 C, 이사바이러스(isavirus), 소고토바이러스(thogotovirus) 및 쿼란자바이러스(quarantavirus) 속에 포함되는 모든 바이러스를 포함한다.

[105] 상기 코로나바이러스는 알파코로나바이러스(alphacoronavirus), 베타코로나바이러스(betacoronavirus), 감마코로나바이러스(gammacoronavirus) 및 델타코로나바이러스(deltacoronavirus) 속에 포함되는 모든 바이러스를 포함한다.

[106] 상기 파라믹소바이러스는 파라믹소바이러스, 루블라바이러스, 모빌리바이러스 및 뉴모바이러스 속에 포함되는 모든 바이러스를 포함한다.

[107] 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 유전체는 아홉 개의 바이러스 유전인자를 암호화하고 있는 2벌의 양성 단일가닥 RNA로 구성되어 있다. RNA는 바이러스 단백질 p24 2,000개 가량으로 구성된 원뿔형의 캡시드로 둘러싸여 있다. 바이러스 내부는 단일가닥 RNA와 핵캡시드 단백질 p7과 비리온단백질 형성에 필수적 효소(역전사효소, 단백질 분해효소, 리보뉴클레이스, 인테그레이스)가 포함되어 있다.

[108] 바이러스 단백질 p17로 구성된 기질이 비리온의 보전을 위해 다시 캡시드를

둘러싸고 있다. 기질은 다시 인지질 2중층으로 이루어진 바이러스막에 둘러싸여 있다. 바이러스막은 숙주세포로부터 새로 바이러스가 출아되어 나올 때 가장 먼저 형성된다. 생성 중인 바이러스막은 숙주세포의 세포막에 묻혀있는 형태로 숙주세포의 단백질과 바이러스 입자 표면으로 비어져 나오는 70여개의 복합 HIV단백질로 구성된다.

- [109] Env라고 알려진 복합HIV단백질은 glycoprotein120 3분자로 구성된 모자와 gp41 3분자로 구성된 줄기(단백질 구조물을 바이러스막에 고정하는 역할을 함)로 구성되어 있다. 당단백질 결합체는 감염주기를 시작하는데 중요한데 바이러스가 목표세포에 부착하여 융합하는 것을 가능하게 한다. 바이러스의 2가지 표면당단백질 특히 gp120은 향후 치료제나 백신의 개발대상으로 알려져 있다.
- [110] 2개의 TAT 단백질(p14, p16)은 TAR RNA에 결합하여 작동하는 LTR 프로모터인자에 대한 활성제이다. TAR은 아포토시스 유전자(ERCC1과 IER3)를 조절하는 마이크로RNA에 의해 처리될 수도 있다. Rev 단백질(p19)은 RNA를 PRE RNA 분자에 결합하여 핵에서 세포질로 옮기는 데 관련이 있다. Vif단백질(p23)은 APOBEC3G(DNA: RNA 하이브리드의 아민을 제거하거나 Pol 단백질을 간섭하는 세포 단백질)의 기능을 저해하며 Vpr단백질(p14)는 숙주세포를 G2/M단계에서 묶어 세포분열을 막는다. Nef단백질(p27)은 T세포의 CD4(주요 바이러스 수용체)뿐만 아니라 MHC class I, MHC class II 분자를 저해한다.
- [111] Nef는 또한 SH3 도메인과 상호작용한다. Vpu단백질(p16)은 감염된 세포로부터 새로운 바이러스 입자를 방출하는 데 영향을 준다. GAG 유전자는 바이러스 입자를 만드는 중심이 되는 매트릭스 단백질 (MA, GAG p17)과 캡시드 단백질 (CA, GAG p24), 핵산캡시드 (NC, GAG p7)등을 발현하는 유전자이며, Pol 유전자는 바이러스 증식 관련 효소 유전자를 포함하는데, 바이러스 RNA의 역전사효소 발현에 관여하는 RT 부분과 단백질 분해효소를 담당하는 PR, 인티그라제 관련 부분인 IN등으로 구성된다.
- [112] 이 외에 TAT 유전자는 감염 과정에서 바이러스의 증식을 활성화시키는 조절인자를 발현하는 것으로 알려져 있으며, Nef 유전자는 반대로 LTR 부분과 함께 바이러스의 증식을 억제시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 전체 HIV RNA의 양쪽 끝부분에는 같은 염기 서열이 반복적으로 존재하는 LTR (Long Term Repeat)가 붙어있다. LTR부위는 새로운 바이러스의 생산을 조절하는 스위치 역할을 하거나 HIV나 숙주세포의 단백질에 의해 유발될 수 있다. 레트로바이러스 Psi요소는 바이러스 유전체를 포장하고 GAG와 Rev단백질에 의해 인지되는 데 관련이 있다. SLIP 요소(TTTTTT)는 기능적인 Pol을 만들기 위해 필요한 GAG-Pol 해독구조에서 구조이동과 관련이 있다고 알려져 있으며, 이러한 HIV의 에피토프가 본 발명의 바이러스 검출에 이용될 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다.

- [113] 본 발명에 있어서, 상기 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 존재하는 항 바이러스(HIV) 항체 검출용 항원은 gp41, p24 및 gp100으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [114] 인간 유두종바이러스(HPV)의 DNA는 8000개의 염기쌍을 포함하고 있고 지질막이 아니라 오량체의 캡시드 단백질에 둘러싸여 존재한다. 캡시드 단백질은 2개의 구조 단백질인 L1과 L2로 이루어 졌고 이 단백질은 바이러스 복제 사이클의 후기에서 발현된다. 모든 인간 유두종바이러스(HPV)의 게놈에서는 8개의 ORF가 존재하고 각 ORF는 3가지의 기능적 부위로 구분된다. 바이러스의 복제에 필요한 유전자인 E1-E7, 비리온(virion)을 구성하는 구조 단백질을 발현하는 유전자 L1-L2, 마지막으로 바이러스의 복제와 전사를 조절하는 LCR로 구성된다.
- [115] E6는 p53에 결합하여 p53의 유비퀴틴화를 촉진시킴으로써 암종양 억제 유전자로서의 p53의 기능을 저해시킨다. 또한 세포자살 단백질(pro-apoptotic protein)인 BAK의 분해를 유도한다. 텔로머레이스(telomerase)의 활성화를 통하여 숙주세포의 세포주기를 활성화시키고, E7은 RB(retinoblastoma)와 상호작용하여 RB를 분해한다. 이를 통하여 RB에 의해 저해되고 있던 전사촉진 인자인 E2F를 방출시킨다. 게다가, 세포주기 S기에 작용하는 사이클린 E(cyclin E)와 사이클린 A(cyclin A)를 활성화시켜 숙주세포의 세포주기를 활성화시키며, 이 두 유전자의 활성을 통하여 인간 유두종바이러스가 감염되었을 때, 자궁경부암으로 야기될 수 있다. 하지만 HPV에서 그 이외의 E1, E2, E4같은 유전자들은 암을 발생하는 과정에서 어떠한 역할을 하는지는 아직 밝혀지지 않았다.
- [116] L1은 자기들 스스로 조립되어 오량체의 캡소머를 형성한다. 이 캡소머들은 인접한 L1 분자들과의 이황화결합을 통하여 캡시드를 형성하여 인간유두종 바이러스 DNA를 패키징하며, L2는 L1보다는 그 양이 적게 존재하며, 바이러스 게놈이 패키징 되는 것을 촉진시킨다. 뿐만 아니라, 인간 유두종바이러스가 새로운 숙주세포에 침투할 때, 중요한 기능을 한다고 알려져 있다.
- [117] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 존재하는 항 바이러스(HPV) 항체 검출용 항원은 L1 또는 L2일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [118] 코로나바이러스의 일종인 중동호흡기증후군 코로나바이러스(MERS-CoV)는 사우디아라비아 지다의 급성 폐렴 및 급성 신부전 증세를 보이는 60세 남성의 허파에서 채취된 표본에서 발현되었으며, 플러스-센스, 외가닥 선종 RNA 베타코로나바이러스로서, 중동호흡기증후군을 발생시키는 것으로 알려져 있다.
- [119] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 존재하는 항 바이러스(MERS-CoV) 항체 검출용 항원은 MERS-CoV 표면 단백질 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [120] A형 간염바이러스(Hepatitis A Virus, HAV)는 Picornaviridae과 Hepatovirus

속으로 분류되고, 피막이 없으며 정20면체이며, 입자의 크기는 27-32nm로 비리온은 세 개의 주요 구조 폴리펩타이드(VP1, VP2 및 VP3)으로 구성되어 있다.

- [121] 따라서, 본 발명에 있어서, 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 존재하는 항 바이러스(HAV) 항체 검출용 항원은 VP1, VP2, VP3 또는 이들의 일부분을 추출 또는 연결하여 제조한 에피토프 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [122] 본 발명에 있어서, 상기 흡착 금 이온은 금 이온을 흡착할 수 있는 물질에 흡착되는 것이면 모두 가능하고, 바람직하게는 아미노산에 흡착될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 히스티딘, 라이신 및 아르기닌으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산에 흡착되는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [123] 본 발명에 있어서, 상기 환원제는 본 발명의 반응조건에서 금 이온을 금 입자로 환원 시킬 수 있는 물질이면 모두 이용가능하며, 바람직하게는 아스코르빅 산, 이미다졸, 피라졸, 히스타민, 히드록실 아민, 구연산 및 소듐 보로하이드라이드로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [124] 본 발명에 있어서, 상기 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 타액, 구강 점막 및 침으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [125] 본 발명에 있어서, 사전 진단 용액 내에 존재하는 상기 금 이온(자유 금 이온 + 흡착 금 이온)의 농도는 1 mM ~ 10 mM인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [126] 본 발명에 있어서, 진단 용액 내에 존재하는 상기 환원제의 농도는 0.005 M~0.1 M인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [127] 본 발명에 있어서, 상기 샘플의 양은 10 μ l ~30 μ l인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [128] 본 발명에 있어서, 상기 금 이온의 농도, 환원제의 농도 및 샘플의 양이 기준값보다 적을 경우에는 효과적인 질병 마커 검출이 수행되지 않고, 기준 농도 이상일 경우에는 위양성 등의 부정적 효과가 나타날 수 있다.
- [129] 본 발명에 있어서, 상기 바이러스 검출용 항원은 단백질 입자의 표면에 표출되어 있는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 단백질 입자는 금 이온을 흡착할 수 있는 히스티딘, 라이신 및 아르기닌으로 구성된 군에서 선택되는 태그가 추가로 그 표면에 표출되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [130] 본 발명에 있어서, 상기 바이러스 검출용 항원의 면역반응은 단백질 입자의 표면에서 발생하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 태그는 금 이온을 흡착하여 환원제의 존재 하에 금 입자의 응집반응을 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [131]
- [132] 본 발명에 있어서, 상기 단백질 입자는 단백질의 자가조립 기능에 의해 형성되는 입자는 모두 이용가능하고, 바람직하게는 페리틴(ferritin), 페리틴 유사

단백질(ferritin-like protein), 마그네토솜(magnetosome) 구성단백질, 바이러스 구성단백질(e.g. hepatitis B virus core protein, tobacco mosaic virus) DPS(DNA binding protein), 및 Proteosome로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 본 발명에 있어서 상기 바이러스 구성단백질은 인간 B형 간염 바이러스의 캡시드 단백질로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[133] 본 발명에 있어서, 상기 단백질 입자의 크기는 10nm-50nm인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[134] 본 발명에 있어서, 검출 신호의 자가 증폭은 소량의 항 바이러스 항체를 검지하여 그 결과를 육안으로 확인할 수 있는 색깔의 변화로 나타내게 된다. 이러한 신호의 자가 증폭은 진단을 위한 용액 안에 녹아있는 금 이온이 환원제에 의해 금 입자로 환원되는 현상에 의하여 일어나고, 발생하는 금 입자의 크기가 커지면서 그 색깔의 변화가 육안으로 확인 가능한 수준의 신호로 나타나게 된다.

[135] 본 발명에서 사용하는 단백질 입자들은 그 단량체들에 헥사-히스티딘이 융합 발현되어 있는데, 금 이온과 히스티딘 아미노산이 결합하는 성질이 있기 때문에 항원-항체 반응에 의하여 만들어진 응집체에 결합되어 있는 금 이온들이 환원제와 반응하여 금 입자로 환원이 되는데 여기에 계속해서 다른 금 이온들이 환원되면서 크기가 커지면서 커다란 금 입자를 이루고 이 응집체로 인해 색깔을 가지게 된다.

[136] 정상인 혈청의 경우, 항원-항체 반응이 일어나지 않기 때문에, 금 입자에 의한 응집체가 만들어지는 속도가 느려 같은 색깔이 나타나는 시간이 현저히 늦고, 이러한 색깔 변화의 유무를 통해서 바이러스 보유 환자와 정상인의 구분이 가능해진다.

[137] 본 발명에 있어서, 샘플 내에 함유있는 항 바이러스 항체는 단백질 입자 표면에 표출되어 상기 항체의 Fc 도메인에 결합할 수 있는 도메인과 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[138] 본 발명에 있어서, 상기 항체의 Fc 도메인에 결합할 수 있는 도메인은 Staphylococcal protein A의 B domain 및 protein G로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[139] 본 발명에 있어서, 상기 항체의 Fc 도메인에 결합할 수 있는 도메인은 상기 단백질 입자의 표면에 표출되어 있는 링커 단백질과 결합되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[140] 본 발명에 있어서, 상기 링커 단백질은 상기 항체의 Fc 도메인과 결합할 수 있는 도메인을 단백질 입자의 표면에 효과적으로 표출시킬 수 있는 아미노산이면 모두 이용가능하나, 바람직하게는 G4SG4T 또는 G4SG4의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[141] 본 발명에 있어서, 상기 발색반응은 환자의 샘플이 주입된 군에서 정상 샘플이 주입된 군보다 더 빨리 나타날 수 있고, 환자의 경우에는 최소 5분 최대 10분

안에 나타나는 것을 특징으로 할 수 있으나, 반응 시간은 조건에 따라 달라 질 수 있다.

- [142] 본 발명에 있어서, 상기 발색반응은 가시광선의 변화를 검출할 수 있는 방법이면 어떤 방법을 이용해서 검출 할 수 있으며, 바람직하게는 육안 또는 분광감도계(spectrophotometer)로 검출하는 것을 특징으로 할 수 있고, 500-600nm의 흡광도를 측정하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [143]
- [144] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 질병 특이적 마커 검출용 항체 또는 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 상기 항체 또는 항원에 특이적으로 결합하는 질병 특이적 항원 또는 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution) 내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및 (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 질병 특이적 마커의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 질병 진단을 위한 정보의 제공방법에 관한 것이다.
- [145] 본 발명은 또한, (a) 질병 특이적 마커 검출용 항체 또는 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 상기 항체 또는 항원에 특이적으로 결합하는 질병 특이적 항원 또는 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution) 내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및 (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 질병 특이적 마커의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 질병 진단 방법에 관한 것이다.
- [146]
- [147] 본 발명의 일 실시예에서는 급성 심근 경색이 발생한 환자의 혈액 샘플과 정상인 환자의 혈액 샘플에서 트로포닌 I(Troponin I, TnI)에 특이적으로 결합하는 항체를 본원 발명의 단백질 입자에 표출시켜 환자의 혈액 샘플에서 발색반응이 빠르게 나타나는 것을 확인하였다(도 2). 즉, 본원 발명의 방법으로 질병 특이적 마커를 검출하게 되면, 상기 질병을 진단할 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다.
- [148] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 질병은 급성 심근 경색일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [149] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 급성 심근 경색일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 트로포닌 I(troponin I)에 특이적으로 결합하는 항체 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [150] 본 발명에 있어서, 상기 질병은 C형 간염, 후천성 면역 결핍 증후군(AIDS) 또는 A형 간염일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [151] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 C형 간염일 경우, 상기 질병 특이적 항체는

HCV에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있고, 단백질 입자의 표면에 항원을 표출하는 경우에는, HCV의 c22p, c33c, 5-1-1p, c100p, 및 이들이 2이상 융합된 에피토프로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 2이상 융합된 에피토프는 c22p-c33c, c22p-5-1-1p, c22p-c100p, c33c-5-5-1p, c33c-c100p, 5-1-1p-c100p 및 c22p-5-1-1p-c100p 로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[152] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 후천성 면역 결핍 중후군인 경우, 상기 질병 특이적 항체는 HIV에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있고, 단백질 입자의 표면에 항원을 표출하는 경우에는, HIV의 gp41, p24 및 gp100으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[153] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 A형 간염일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 HAV에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있고, 단백질 입자의 표면에 항원을 표출하는 경우에는, VP1, VP2, VP3 또는 이들의 일부분을 추출 또는 연결하여 제조한 에피토프로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 에피토프인 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[154]

[155] 본 발명에 있어서, 상기 질병은 암 일 수 있고, 상기 암은 폐암, 기관지암, 결장 직장암, 전립선암, 유방암, 췌장암, 위암, 난소암, 방광암, 뇌암, 갑상선암, 식도암, 자궁암, 간암, 신장암, 담도암, 교모세포종 및 고환암으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[156] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 암인 경우, 상기 질병 특이적 항체는 종양 표지자에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[157] 본 발명에 있어서, 상기 종양 표지자는 암 종별로 하기의 표 1과 같을 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[158]

[159] [표1]

암 종별 종양 표지자

암 종	종양표지자
뇌, 경종양	SCC
폐암	SLX, NSE, SCO, ADH, ACTH
간암	AFP, PIVKA-II, ALP
위, 십이지장암	CA19-9, CEA, AFP
전립선암	PSA, PA
고환암	AFP, HCO, NSE
갑상선암	CEA, Calcitonin, Thyroglobulin
유방암	CA 15-3, CEA, CA549, TPA
췌장암	CA19-9, Elastase I, CA50, Du-Pan-2, SPAN-1, KMO1, POA, PST
대장암	CEA, NCC-ST-439
자궁암	SCC, CEA, hCG
난소암	CA125, CA72-4
혈액암	β -2-Microglobulin

[160]

[161] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 림프종 또는 백혈병일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 CD20, CD30, CD33 또는 CD52에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[162] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 유방암, 대장암, 폐암, 또는 난소암일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 EGFR, ERBB2, ERBB3, MET, IGF1R, EPHA3, TRAILR1, TRAILR2, FAP, Tenascin, EpCAM, CEA, gpA33, Mucin, TAG-72, CAIX, PSMA 또는 Folate-결합 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[163] 본 발명에 있어서, 상기 질병은 감염성 질환일 수 있고, 상기 감염성 질환은 독감(인플루엔자), 천연두, 소아마비, 구제역, 에볼라, 홍역, 황열, 뎅기열, SARS, 폐렴, 결핵, 콜레라, 장티푸스, 이질, 디프테리아 및 라임병으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[164] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 인플루엔자일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 인플루엔자 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[165] 인플루엔자 바이러스는 Orthomyxoviridae에 속하는 single stranded RNA 바이러스로서 두 가지의 당단백 표면 항원인 hemagglutinin과 neuraminidase를

가지고 있으며, 항원성에 따라 인플루엔자 A, B, C형으로 분류된다. A형과 B형이 주로 유행을 일으키는데, A형은 HA(H1-H15)와 NA(N1-N9)의 특성에 따라 아형으로 분류되며, B형은 아형이 없다. 따라서, 본 발명의 방법으로 독감을 진단할 경우, 본 발명에 사용되는 항체는 각각의 인플루엔자 바이러스 아형 특이적 항체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[166] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 소아마비일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 폴리오바이러스에 특이적으로 결합하는 항체 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[167] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 에볼라일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 에볼라 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 질병이 홍역일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 파라믹소 바이러스의 일종인 옹역 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 질병이 황열일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 플라비비르스과에 속하는 황열 바이러스(yellow fever virus)에 특이적으로 결합하는 항체 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 질병이 뎅기열일 경우, 질병 특이적 항체는 뎅기 바이러스(dengue virus)에 특이적으로 결합하는 항체 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[168]

[169] 본 발명에 있어서, 상기 질병은 자가면역 질환일 수 있고, 상기 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 1형 당뇨병, 크론병, 궤양성 대장염, 베체트 병, 루푸스, 경피증, 건선 및 백반증으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[170] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 쇼그렌 증후군일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 항-Ro(Sjogren's syndrome A, SSA) 항체 또는 항-La(Sjogren's syndrome B, SSB) 항체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[171] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 다발성 경화증일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 항-MOG 항체, 항-미엘린(anti-myelin) 항체 또는 항-KIR4.1 항체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[172] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 뇌졸중일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 항-NR2A/2B and metalloproteinases(MMPs) 항체, 항핵항체(ANA), 항인지질 항체(APL), 항 D-dimer 항체, 항 S100 β 항체, 항 B-type natriuretic peptide(BNP) 항체 또는 항카디올리핀 항체(ACL)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[173] 본 발명에 있어서, 상기 질병이 뇌출혈일 경우, 상기 질병 특이적 항체는 항 Glial fibrillary acidic protein(GFAP) 항체, 항 Asymmetric dimethylarginine(ADMA) 항체, 항 D-dimer 항체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[174]

[175] 본 발명은 또한 검출 신호 자가 증폭을 이용한 질병 진단 키트에 관한 것이다.

[176] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 질병 특이적 마커 검출용 항원 또는 항체, 자유

금 이온 및 흡착 금 이온을 함유하는 사전 진단 용액(pre-assay solution) 및 환원제를 포함할 수 있으며, 상기 사전 진단 용액(pre-assay solution)과 환원제는 서로 다른 용기에 함유되는 것이 바람직하다.

[177] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성요소들의 사용에 관한 사용설명서를 포함할 수 있다.

[178]

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

[180]

[181] 실시예 1. hFTN, HBV capsid단백질 입자의 합성을 위한 발현 벡터 제조

[182] 하기 표 1에 기재된 벡터 모식도에 따라 PCR을 통하여 단백질 입자

H6-SPAB-capsid, H6-c33c-capsid, H6-gp41-capsid, H6-p24-capsid, hFTN-511p-c100p-c22p-H6, hFTN-ep1-H6, hFTN-ep2-H6, 그리고 hFTN-ep3-H6 제작하기 위한 발현벡터를 제조하였다.

[183] 제조된 모든 플라스미드 발현 벡터는 아가로스 젤- 정제 후 전체 DNA 서열을 확인하였다.

[184] 구체적으로, 표 2의 프라이머 세트를 이용하여 각각의 발현벡터 제조에 필요한 PCR 산물을 제조한 다음, PCR 산물을 순차적으로 pT7-벡터에 삽입하여 각각의 단백질 입자를 발현 할 수 있는 발현 벡터를 구성하였다.

[185] 각각의 단백질 입자들의 발현용 벡터들은 pT7-H6-SPAB-capsid, pT7-H6-c33c-capsid, pT7-H6-gp41-capsid, pT7-H6-p24-capsid, pT7-hFTN-511p-c100p-c22p-H6, pT7-hFTN-ep1-H6 pT7-hFTN-ep2-H6 그리고 pT7-hFTN-ep3-H6이다.

[186]

[187] [표2]

단백질 입자 제작을 위한 발현 벡터 구성

단백질 입자	발현 벡터
H ₆ -SPA _B -capsid	NH ₂ - <i>Nde</i> I-H ₆ -HBVC-(SPA _B) ₂ -HBVC- <i>Cla</i> I-COOH
H ₆ -c33c-capsid	NH ₂ - <i>Nde</i> I-H ₆ -HBVC-c33c-HBVC- <i>Cla</i> I-COOH
H ₆ -gp41-capsid	NH ₂ - <i>Nde</i> I-H ₆ -HBVC-gp41-HBVC- <i>Cla</i> I-COOH
H ₆ -p24-capsid	NH ₂ - <i>Nde</i> I-H ₆ -HBVC-p24-HBVC- <i>Cla</i> I-COOH
hFTN-511p-c100p-c22p-H ₆	NH ₂ - <i>Nde</i> I-hFTN- <i>Xho</i> I-linker(G3SG3TG3SG3)-511p-c100p-c22p-H ₆ - <i>Hind</i> III-COOH
hFTN-ep1-H ₆	NH ₂ - <i>Nde</i> I-hFTN- <i>Xho</i> I-linker(G3SG3TG3SG3)-ep1-H ₆ - <i>Hind</i> III-COOH
hFTN-ep2-H ₆	NH ₂ - <i>Nde</i> I-hFTN- <i>Xho</i> I-linker(G3SG3TG3SG3)-ep2-H ₆ - <i>Hind</i> III-COOH
hFTN-ep3-H ₆	NH ₂ - <i>Nde</i> I-hFTN- <i>Xho</i> I-linker(G3SG3TG3SG3)-ep3-H ₆ - <i>Hind</i> III-COOH

[188]

[189] [표3]

발현 벡터 제조를 위한 PCR용 프라이머 구성

단백질 입자	프라이머
H ₆ -SPA _B -capsid	5'primer : CTC GAG GCA CCG AAA GCT GAT AAC 3'primer : GGA TCC GTC AGC TTT TAG TGC TTG
H ₆ -c33c-capsid	5'primer : CTC GAG GCG GTG GAC TTT ATC CCT 3'primer : GGA TCC ACA CGT ATT GCA GTC TAT
H ₆ -gp41-capsid	5'primer : CTC GAG ATC CTG GCT GTG GAA CGC 3'primer : GGA TCC GAT CAA CTT TCC ACT AGC
H ₆ -p24-capsid	5'primer : CTC GAG CCG GAA GTA ATC CCG ATG 3'primer : GGA TCC TCC CAC TCC CTG ACA TGC

[190]

[191] 실시예 2. hFTN, HBV capsid단백질 입자의 생합성 및 분리 정제

[192] 2-1. 단백질 입자의 생합성

[193] 대장균 균주 BL21(DE3)[F-ompThsdSB(rB-mB-)]를 실시예 1에서 제조한 발현 벡터를 통해 각각 형질 전환하고, 앰피실린-저항성 형질 전환체를 선택하였다. 형질 전환된 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani (LB) 배지(100 mg L⁻¹ 앰피실린 함유)를 함유하는 플라스크(250 mL Erlenmeyer flasks, 37°C, 150 rpm)에서

배양하였다.

- [194] 배지의 탁도(O.D 600)가 약 0.4-0.6에 도달할 때, IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) (1.0 mM)을 주입하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. 20°C에서 12~16 시간 배양한 후, 배양한 대장균을 4,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여 균체 침전물을 얻어낸 후 5 mL의 파쇄 용액(10 mM Tris-HCl 완충액, pH 7.5, 10 mM EDTA)에 현탁하여 초음파 파쇄기(Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA)를 이용하여 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다. 분리된 상등액을 이용하여 정제를 진행하였다.
- [195]
- [196] 2-2. 단백질 입자 정제
- [197] 실시예 2-1에서 발현된 자가 조립으로 재조합된 융합 단백질 입자를 정제하기 위하여 하기 3단계의 정제 과정을 진행하였다. 먼저 1) 재조합 단백질에 융합 발현된 히스티딘과 니켈의 결합을 이용한 Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 진행한 후, 2) 재조합 단백질을 농축하고 농축된 단백질의 버퍼를 교환하는 과정을 통하여 모노머들의 자가조립을 진행하였으며, 3) 자가 조립된 단백질 입자만을 분리하기 위하여 수크로스 구배 ultracentrifugation을 진행하였다. 각 단계별 상세한 기제는 아래와 같다.
- [198]
- [199] 1) Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피
- [200] 재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기 명시된 방법으로 배양된 대장균을 회수하여 그 세포 펠렛을 5 mL 파쇄 용액(pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole)에 재부유하고 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액만 분리한 후 각 재조합 단백질을 Ni²⁺-NTA 컬럼(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 각각 분리하였다 (세척 버퍼: pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole / 용출 버퍼: pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 100 mM imidazole).
- [201] 2) 농축과 버퍼교환
- [202] Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 거쳐 용출된 3mL의 재조합 단백질을 Ultracentrifugal filter (Amicon Ultra 10K, Millipore, Billerica, MA) 에 담아 5,000 rpm으로 컬럼 위에 1mL 의 용액이 남을 때까지 원심 분리를 진행하였다. 단백질 입자를 Tris-HCl (50mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7.0) 버퍼 (hFTN입자의 경우에는 PBS 버퍼 (2.7mM KCl, 137mM NaCl, 2mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄, pH 7.4))로 버퍼교환을 해줌으로써 단량체들의 자가조립을 진행하였다.
- [203] 3) 수크로스 구배 초고속 원심 분리
- [204] Tris-HCl (50mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7.0) 버퍼에 (hFTN입자의 경우에는 PBS 버퍼 (2.7mM KCl, 137mM NaCl, 2mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄, pH 7.4)

수크로스를 농도별로 각각 첨가하여 60%, 50%, 40%, 30%, 20%의 수크로스를 포함하는 용액을 각각 준비한 후 초고속 원심 분리용 튜브 (ultraclear 13.2ml tube, Beckman) 에 각 농도별 (60~20%) 수크로스 용액을 농도가 높은 용액부터 2 ml씩 담는다. 용액을 담은 후 마지막에 제조합 단백질 용액을 1ml 채운 후 24,000rpm으로 16시간 동안 4°C 로 초고속 원심 분리를 시행하였다 (Ultracentrifuge L-90k, Beckman). 원심 분리 후 조심스럽게 파이펫을 이용하여 40~50% 수크로스 용액 부분을 따서 2) 에 명시된 바와 같이 ultracentrifugal filter와 Tris-HCl 버퍼를 이용하여 제조합 단백질의 버퍼를 교체해 주었다.

[205]

[206] 실시예 3: 단백질 입자의 조립 검증

[207] 실시예 2에서 정제한 제조합 단백질 입자의 구조 분석을 위하여 투과전자현미경 (TEM)으로 제조합 단백질 입자를 촬영하였다. 먼저 염색하지 않은 정제한 단백질 샘플을 탄소 코팅된 구리 전자 현미경 그리드(grid)에 올린 후 자연 건조하였다. 단백질 입자의 염색된 이미지를 얻기 위해, 자연 건조된 샘플을 포함하는 전자 현미경 그리드를 2% (w/v) 수성 우라닐 아세테이트 용액과 함께 10분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 증류수로 3-4회 세척하였다.

[208] 금 입자들이 모여있는 응집체의 이미지를 얻을 경우에는 별도의 염색 과정을 거치지 않고 진단에 사용한 색깔이 변한 진단 용액(assay solution) 샘플을 그리드에 올린 후 자연 건조하였다.

[209] 단백질 입자와 금 입자 응집체의 이미지들은 Philips Technai 120 kV 전자 현미경을 이용하여 관찰한 결과 각각의 단백질 입자들은 구형, 금 입자의 응집체는 방사형 모양의 입자를 형성함을 확인하였다(도 1, 도 4, 도 8 및 도 11).

[210]

[211] 실시예 4: 신호 자가 증폭을 이용한 one-step 진단 시행

[212] 4-1. 항원 검지를 통한 질병 특이적 마커 검출

[213] 급성 심근 경색(AMI)의 경우에는 실시예 2에서 제조하여, 1.25 mg/ml로 농도를 맞춘 H₆-SPA_B-capsid 단백질 입자 800 µL에 1 mg/ml의 농도를 갖는 Goat anti-TnI polyclonal IgG (cat. no. 70-XG82, Fitzgerald, Acton, MA, U.S.A) 항체를 200 µL 넣어서 12~16시간 4°C 에서 섞어 결합 시켰다.

[214] 항체가 고정된 단백질 입자에 0.5% (w/v) Au³⁺이온 용액 (HAuCl₄ (cat. no. 254169, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A) 500 µL를 넣어서 12~16시간 4°C 에서 섞어 결합 시켰다.

[215] 이렇게 항체와 금 이온이 고정된 단백질 입자 용액(사전 진단 용액(pre-assay solution))을 96-well plate (cat. no. 3599, Costar, NY, U.S.A.)의 각 well당 60 µL를 넣은 다음, 여기에 AMI환자나 정상인의 혈청 샘플 20 µL를 넣고, 곧이어 0.05 M L-ascorbic acid (cat. no. A7506, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 환원제를 20 µL 넣어 자가 신호를 증폭한 결과, 5분 만에, 환자의 혈청 샘플이 들어간 웰에서 발색반응이 나타나는 것을 확인하였다(도 2 A).

- [216] 또한 이러한 색깔의 변화가 576nm 파장대에서의 흡광도가 높아서 나타나는 것을 확인하고 이 파장대에서의 환자와 정상인의 혈청 사이의 흡광도 차이를 microplate reader (Infinite M200 Pro, TECAN, Zurich, Switzerland) 로 확인하였다(도 2 B)
- [217]
- [218] 4-2. 항체 검지를 통한 질병 특이적 마커 검출
- [219] 1) 인간 C형 간염 바이러스(HCV) 진단
- [220] HCV의 경우에는 실시예 2에서 제조한 1.0 mg/ml의 H₆-SPA_B-capsid 단백질 입자 500μL에 2.0mg/ml의 H₆-c33c-capsid 단백질 입자 250 μL 그리고 1.0mg/ml 의 H₆-hFTN-511p-c100p-c22p 단백질 입자 250 μL을 넣어서 단백질 입자 혼합용액을 제조한 다음, 여기에 0.5% Au³⁺이온 용액을 500 μL 넣어서 12~16시간동안 4°C 에서 섞어 결합시켰다.
- [221] 이렇게 준비한 용액(사전 진단 용액(pre-assay solution))을 96 well plate의 각 well에 60μL씩 넣었다. 여기에 C형 간염 환자나 정상인의 혈청 샘플을 20μL를 넣고, 곧이어 0.05M L-ascorbic acid를 20μL 넣어, 자가 신호를 증폭한 결과, 5분 만에, 환자의 혈청 샘플이 들어간 웰에서 발색반응이 나타나는 것을 확인하였다(도 10 A)
- [222] 또한, 이러한 색깔의 변화가 588nm 파장대에서의 흡광도가 높아서 나타나는 것을 확인하고 이 파장대에서의 환자와 정상인의 혈청 사이의 흡광도 차이를 microplate reader로 확인하였다.(도 10 B)
- [223] 2) 인간면역결핍바이러스(HIV) 진단
- [224] HIV의 경우에는 상기 HCV의 경우와 실험 절차는 동일하나 단백질 입자의 혼합 용액의 조성을 달리하였다. 즉, 1.0mg/ml의 H₆-SPA_B-capsid 단백질 입자 500μL에 3.0mg/ml의 H₆-gp41-capsid 단백질 입자 250μL 그리고 1.0mg/ml 의 H₆-p24-capsid 단백질 입자 250μL을 넣어서 단백질 입자 혼합용액을 제조한 다음, 여기에 0.5% Au³⁺이온 용액을 500μL 넣어서 12~16시간동안 4°C 에서 섞어 결합시켰다.
- [225] 이렇게 준비한 용액(사전 진단 용액(pre-assay solution))을 96 well plate의 각 well에 60μL씩 넣었다. 여기에 HIV 보유 환자나 정상인의 혈청 샘플을 20μL를 넣고, 곧이어 0.05M L-ascorbic acid를 20μL 넣어, 자가 신호를 증폭한 결과, 5분 만에, 환자의 혈청 샘플이 들어간 웰에서 발색반응이 나타나는 것을 확인하였다(도 11).
- [226] 3) 인간 A형 간염 바이러스(HAV) 진단
- [227] HAV의 경우에는 실시예 2에서 제조한 1.0mg/ml의 H₆-SPA_B-capsid 단백질 입자 600μL에 2.0mg/ml의 hFTN-ep1-H₆ 단백질 나노입자 200μL, 2.0mg/ml의 hFTN-ep2-H₆ 단백질 나노입자 200μL 그리고 1.0mg/ml 의 hFTN-ep3-H₆ 단백질 나노입자 200μL을 넣어서 단백질 입자 혼합용액을 제조한 다음, 여기에 0.5% Au³⁺이온 용액을 600μL 넣어서 12~16시간동안 4°C 에서 섞어 결합시켰다.

- [228] 이렇게 준비한 용액(사전 진단 용액(pre-assay solution))을 96 well plate의 각 well에 60 μ L씩 넣었다. 여기에 A형 간염 환자나 정상인의 혈청 샘플을 20 μ L를 넣고, 곧이어 0.05M L-ascorbic acid를 20 μ L 넣어, 자가 신호를 증폭한 결과, 5분 만에, 환자의 혈청 샘플이 들어간 웰에서 발색반응이 나타나는 것을 확인하였다(도 12)
- [229]
- [230] 실시예 5: ELISA와 ECLIA 대조군 실험
- [231] AMI 환자의 혈청을 가지고 ELISA와 ECLIA를 통해 대조군 실험을 진행하였다. ELISA의 경우 12.5pg/ml의 검출 한계를 갖는 키트(Abbexa, U.K., abx252868)를 이용하였고, ECLIA의 경우는 0.16 ng/ml의 검출 한계를 갖는 것으로 확인되었다(Modular Analytics E170, Roche, Germany)
- [232] 동일한 20명의 환자 혈청 샘플을 이용하였고 실험 결과를 통해 자가 신호 증폭을 이용한 one-step 진단 방법이 더 민감하고 빠르며 정확하다는 것을 확인하였다(도 3)
- [233]
- [234] 실시예 6: 금 나노 응집체 모형 시뮬레이션 실험.
- [235] 실시예 4에서 진행한 one-step 진단 실험에서 환자의 경우 빠르게 푸른색으로 변하는 것을 확인하였는데, 이렇게 변하는 원인에 대해서 확인해보고자 유한차분시간영역법 시뮬레이션(FDTD simulation) 실험을 진행하였다(Lumerical Solutions, ver. 8.15.736).
- [236] 시뮬레이션 결과 도 5A에 개시된 바와 같은 라즈베리 모양의 단백질-금속 복합 구조체가 형성된다. 이러한 형식으로 응집체가 구성된다는 가정하에 그 크기를 변화시켰을 때, 흡수 단면적의 변화를 파장에 따라 나타낸 것이 도면 5 B 그래프이다. 흡수 단면적은 입자를 포함한 주변 영역에 저장된 흡수 파워를 광원의 세기로 나누어 그 값을 구한 것이다.
- [237] 또한 도 5A에 개시된 바와 같은 라즈베리 모양의 시뮬레이션 모델의 경우에, 응집체의 크기가 커질수록 흡광도가 다른 파장대로 분리되는 것이 아닌 같은 파장대에서 커지는 것을 확인하였다(도 5 B). 이는 실제 one-step 진단의 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었다.
- [238]
- [239] 실시예 7: one-step 진단 실험의 원리 분석을 위한 대조군 실험.
- [240] One-step 진단의 원리를 분석하기 위한 대조군 실험을 진행하였다. 금 이온과 결합하는 아미노산인 히스티딘에 잘 결합한다고 알려진 Ni²⁺을 가지고 단백질 입자의 히스티딘에 붙여서 진행한 대조군 실험을 진행하여 금 이온과 단백질 입자의 히스티딘과의 결합이 이 실험이 미치는 영향을 확인하였고, 단백질 입자에 붙어있는 금 이온뿐만 아니라 용액 내에 자유롭게 존재하는 금 이온의 양이 어느 정도 이상 존재해야 one-step 진단 실험이 원활히 일어난 다는 것을 실험결과 확인할 수 있었다(도 6, 7).

- [241] 도 6 각 번호의 실험 조건은 하기와 같다.
- [242] 1: 아무 물질 처리 없이 단순히 Ni^{2+} 용액과 환자 및 정상인 혈청 그리고 환원제 LAA를 처리하여 Ni^{2+} 가 LAA를 만나 환원되면서 색깔을 나타내는가를 확인하기 위한 실험군
- [243] 2: 다른 물질 처리 없이 단순히 Au^{3+} (금이온) 용액과 환자 및 정상인 혈청 그리고 환원제 LAA를 처리하여 색깔 변화를 측정하여, 환자와 정상인 구분 없이 금이온들이 환원되어 입자를 이루면서 푸른색으로 변하는 것을 확인함.
- [244] 3: 단백질 입자에 금이온만 붙인 것과 환자 및 정상인 혈청 그리고 환원제를 처리한 결과로, 자유로이 돌아다니는 자유 금이온이 없기 때문에 두 가지 경우 모두 색깔이 변화가 없는 것을 확인할 수 있음.
- [245] 4: 단백질 입자에 항체를 붙이고, 금이온까지 붙인 후에 환자 및 정상인 혈청 그리고 환원제를 처리한 결과로, 앞서 3번의 경우에서 항체가 없기 때문에 이 경우와 비교하기 위하여 항체까지 결합시켜 실험하였으며, 그 결과 자유 금이온이 없기 때문에 색깔 변화가 일어나지 않는 것을 확인하였음.
- [246] 5: 기존의 진단 방식 그대로 재현한 결과로서, 환자에서만 색깔이 변하는 것을 확인할 수 있음.
- [247] 6: 항체를 붙인 단백질 입자에 금이온이 붙지 않도록 미리 Ni^{2+} 이온을 처리한 단백질 입자에 자유 금이온이 존재하도록 하고 거기에 환자 및 정상인 혈청 그리고 환원제를 처리한 결과로서, 자유 금이온에 의하여 환원이 일어나 색깔이 변하는 것을 확인할 수 있으나, 항체가 붙은 단백질 입자들에 금 이온이 없기 때문에 클러스터를 형성하는 데 도움을 주지 못하여, 정상인과 환자 사이의 구분이 없는 것을 확인할 수 있음.
- [248]
- [249] 실시예 8: one-step 진단 실험 및 공지 진단 키트의 신뢰성 있는 정량 분석 여부 확인
- [250] 8-1. 본원 발명의 One-step 진단 방법의 정량 분석 여부 확인
- [251] 인간 혈청 유래의 TnI 표준시료 (30-AT43, Fitzgerald, Acton, MA, U.S.A.)를 3종류의 정상인 혈청에 각각 spiking하여 각 정상인 혈청 별로 다른 농도(0, 2, 5, 10, 20, 30 ng/ml)의 표준 혈청 시료를 제작하였고 이 혈청을 실시예 4의 방법을 통해 진단 개시 후, 15분(도 13의 A), 20분(B), 25분(C) 및 30분(D)되는 시점에서 검출 신호를 576nm에서의 흡광도로 측정하였다.
- [252] 그 결과, 도 13에 개시된 바와 같이 검출 신호 측정값의 선형 비례성은 진단 개시 후 15, 20분 시점이 가장 좋은 것으로 확인하였고, 진단 개시 후 15~20분의 시점에서는 질환의 발병 유무는 물론, 정량적 분석도 가능한 것을 확인하였다.
- [253] 8-2. 공지 진단 키트의 정량 분석 여부 확인
- [254] 1) 녹십자 의료재단의 ECLIA 진단기기
- [255] 녹십자 의료재단의 ECLIA 진단기기(Roche E-170 모델)를 이용하여 실시예 8-1에서 제작한 표준 혈청 시료(정상인 시료 A: 도 14, 정상인 시료 B: 도 15,

- 정상인 시료 C: 도 16)를 이용하여 정량 분석 여부를 확인하였다.
- [256] 그 결과, 도 14 내지 도 16에 개시된 바와 같이, 실제 TnI의 농도가 커질수록 과장된 분석결과를 보이는 경향이 나타나고, 20 ng/ml 이상 농도에서 이러한 경향이 심해지며, 측정값의 편차도 혈청별로 많은 차이가 있는 것을 확인하였다.
- [257] 2) Elabscience 사의 ELISA 진단기기
- [258] Elabscience사의 진단 기기(E-EL-H0144, Elabscience, 14780 Memorial Drive, Suite 216, Houston, Texas 77079, U.S.A.)를 이용하여 실시예 8-1에서 제작한 표준 혈청 시료(정상인 시료 A: 도 17, 정상인 시료 B: 도 18, 정상인 시료 C: 도 19)를 이용하여 정량 분석 여부를 확인하였다.
- [259] 그 결과, 도 17 내지 도 19에 개시된 바와 같이, ECLIA 진단기기 분석 결과와는 반대로 모든 혈청 시료에 대해서 실제 농도보다 낮은 검출 신호가 측정되었으며, 편차는 적으나 신뢰성 있는 농도 구간이 없는 것을 확인하였다.
- [260] 3) Abbexa 사의 ELISA 진단기기
- [261] Abbexa 사의 진단기기(abx050255, Abbexa Ltd. Cambridge Science Park, Cambridge, CB4 0EY, U.K.)를 이용하여 실시예 8-1에서 제작한 표준 혈청 시료(정상인 시료 A: 도 20, 정상인 시료 B: 도 21, 정상인 시료 C: 도 22)를 이용하여 정량 분석 여부를 확인하였다.
- [262] 그 결과, 도 20 내지 도 22에 개시된 바와 같이, Elabscience사의 진단 결과와 비슷하게 실제 농도보다 낮은 검출신호를 측정하였으며, 농도에 따른 검출신호 측정값의 비례성이 전혀 없는 것을 확인하여, 신뢰성 있는 정량분석 결과를 얻지 못함을 알 수 있었다.
- [263] 4) ALPCO 사의 ELISA 진단기기
- [264] ALPCO사의 진단기기(25-TR1HU-E01, ALPCO. 26-G Keewaydin Drive, Salem, NH 03079, U.S.A.)를 이용하여 실시예 8-1에서 제작한 표준 혈청 시료(정상인 시료 A: 도 23, 정상인 시료 B: 도 24, 정상인 시료 C: 도 25)를 이용하여 정량 분석 여부를 확인하였다.
- [265] 그 결과, 도 23 내지 도 25에 개시된 바와 같이, 상기 2종류의 ELISA 진단키트에 비해서는 실제 농도에 가장 근접하는 검출 신호가 측정되는 것을 확인하였으나, 전체 농도 범위에서는 적지 않은 편차가 발생하고 있으며, 농도에 따른 선형 비례성이 높지 않았기 때문에 신뢰성있는 정량분석 결과는 얻지 못하는 것을 확인하였다.
- [266]
- [267] 실시예 9: one-step 진단 방법의 검출한계(Limit of Detection, LOD) 확인
- [268] 9-1. 급성심근경색 진단 시 검출한계 확인
- [269] 정상인 혈청에 0.002~2 ng/ml의 농도 범위의 질환 마커인 Troponin I를 spiking하여 표준 혈청 시료를 제작하여 이를 실시예 4의 방법으로 검출한계 측정 실험을 진행하였다. 96 well plate 내 시료의 색 변화를 확인함과 동시에 576 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

- [270] 그 결과, 도 26에 개시된 바와 같이 급성심근경색 진단에서의 TnI 검출한계는 최소 0.02 ng/ml (0.83 pM)에서 최대 0.2 ng/ml (8.3 pM)의 농도 범위 내에 존재하는 것을 확인하였다. 이는 ECLIA 기반 진단 기기의 검출한계 (0.16 ng/ml)보다 현저히 낮은 수준이다.
- [271] 9-2. C형 간염 진단 시 검출한계 확인
- [272] 정상인 혈청에 0.001~10 ng/ml의 농도 범위의 질환 마커인 anti-HCV(c33c) IgG standard (LS-C103178, LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, WA, U.S.A.)를 spiking하여 표준 혈청 시료를 제작하여 이를 실시예 4의 방법으로 검출한계 측정 실험을 진행하였다. 96 well plate 내 시료의 색 변화를 확인함과 동시에 588 nm에서의 흡광도를 측정하였다.
- [273] 그 결과, 도 27에 개시된 바와 같이 C형 간염 진단에서의 항-HCV 항체의 검출한계는 최소 0.1 ng/ml (0.67 pM)에서 최대 1.0 ng/ml (6.7 pM)의 농도 범위 내에 존재하는 것을 확인하였다. 이는 ELISA 기반 진단 기기의 검출한계 (nM 수준)보다 현저히 낮은 수준이다.
- [274] 9-3. 에이즈(AIDS) 진단 시 검출한계 확인
- [275] 정상인 혈청에 0.001~10 ng/ml의 농도 범위의 질환 마커인 anti-HIV(gp41) IgG standard (2509, ImmunoDX, LLC., Woburn, MA, U.S.A.)를 spiking하여 표준 혈청 시료를 제작하여 이를 실시예 4의 방법으로 검출한계 측정 실험을 진행하였다. 96 well plate 내 시료의 색 변화를 확인함과 동시에 555 nm에서의 흡광도를 측정하였다.
- [276] 그 결과, 도 28에 개시된 바와 같이 AIDS에서의 항-HIV 항체의 검출한계는 최소 0.1 ng/ml (0.67 pM)에서 최대 1.0 ng/ml (6.7 pM)의 농도 범위 내에 존재하는 것을 확인하였다. 이는 ELISA 기반 진단 기기의 검출한계 (nM 수준)보다 현저히 낮은 수준이다.
- [277] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[278]

산업상 이용가능성

- [279] 본 발명에 따른 질병 특이적 마커의 검출 방법은 기존의 ELISA와 같은 진단에서 통상적으로 수반되는 고정화 및 워싱(washing)작업 등의 과정 없이 단일 단계로 질환의 진단이 가능하며, 몇 시간 길게는 며칠이나 걸리는 진단 검사의 시간도 10분 안팎으로 짧아 특히 응급 상황의 환자와 같은 질환 진단에 효과적으로 이용할 수 있을 뿐만 아니라, 별도의 분석기기 없이 육안으로 검사 결과를 확인할 수 있어 검출 비용을 최소화할 수 있으므로 유용하다.

[280]

서열목록 **Free Text**

[281]

전자파일 첨부하였음.

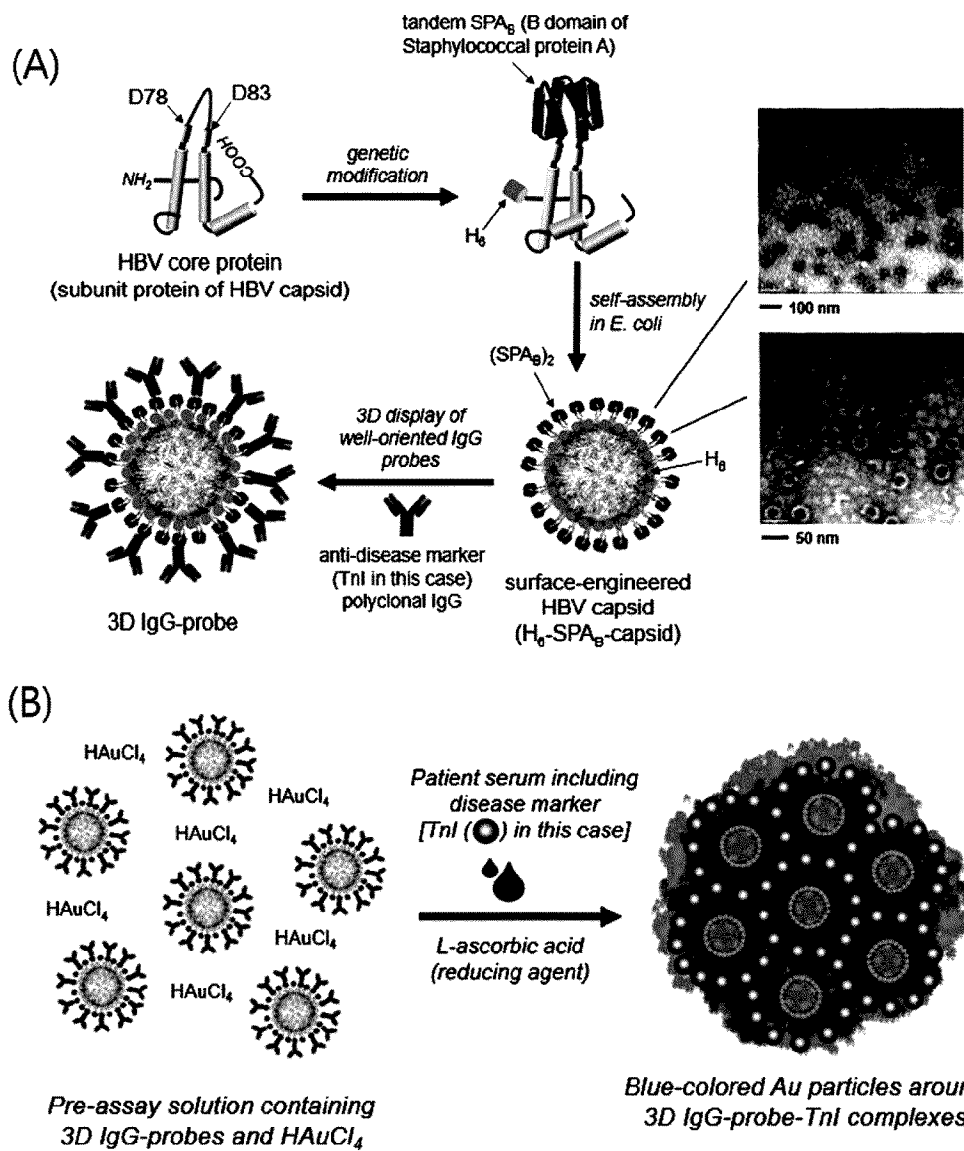
청구범위

- [청구항 1] 다음 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 질병 특이적 마커의 검출 방법:
- (a) 질병 특이적 마커 검출용 항체 또는 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액(pre-assay solution)에 상기 항체 또는 항원에 특이적으로 결합하는 질병 특이적 항원 또는 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution) 내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및
- (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 질병 특이적 마커의 유무를 확인하는 단계.
- [청구항 2] 다음 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 항 바이러스 항체의 검출 방법:
- (a) 항 바이러스 항체 검출용 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액 내에서, 상기 항원에 특이적으로 결합하는 항 바이러스 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액(assay solution) 내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및
- (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 바이러스의 유무를 확인하는 단계.
- [청구항 3] 다음 단계를 포함하는 검출 신호 자가 증폭을 이용한 질병 진단을 위한 정보의 제공 방법:
- (a) 질병 특이적 마커 검출용 항체 또는 항원, 자유 금 이온 및 흡착 금 이온이 동시에 존재하는 사전 진단 용액에 상기 항체 또는 항원에 특이적으로 결합하는 질병 특이적 항원 또는 항체를 함유하는 샘플 및 환원제를 투입하여 조성된 진단 용액 내에서, 항원-항체 면역반응 및 금 이온의 환원에 의한 금 입자 형성 반응을 동시에 유도하는 단계; 및
- (b) 금 입자 형성에 의한 발색반응으로 질병 특이적 마커의 유무를 확인하는 단계.
- [청구항 4] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 흡착 금 이온은 히스티딘, 라이신 및 아르기닌으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산에 흡착되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환원제는 아스코르빅 산, 이미다졸, 피라졸, 히스타민, 하이드록실아민, 구연산 및 소듐 보로하이드라이드로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 타액, 구강 점막 및 침으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

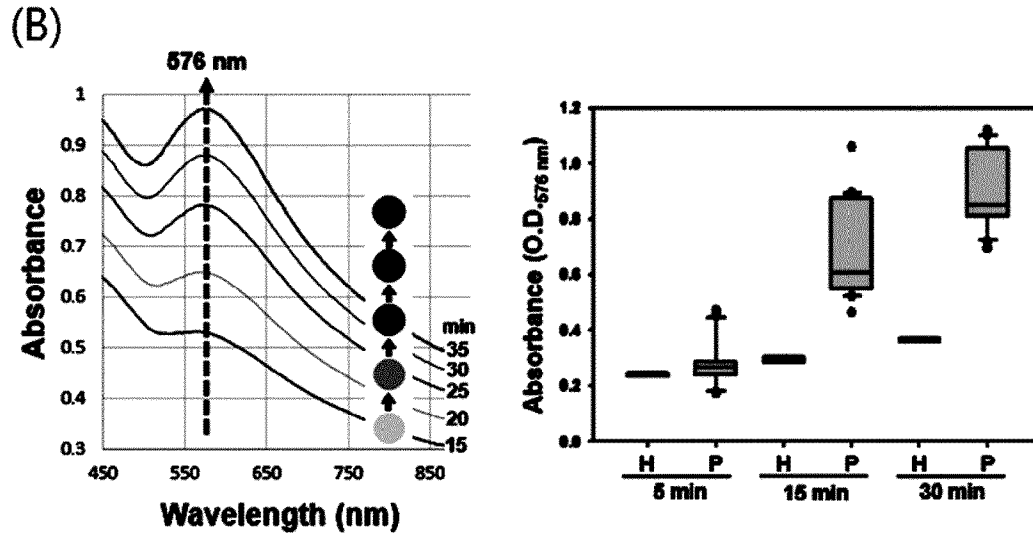
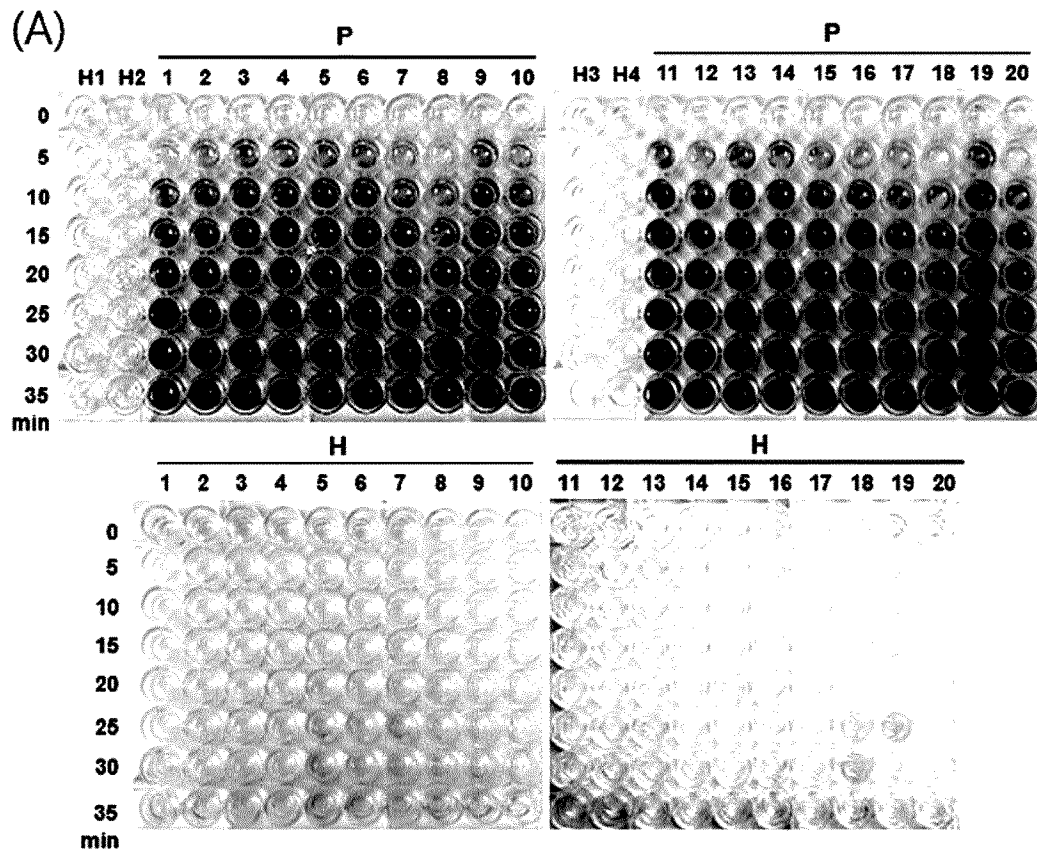
- [청구항 7] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 사전 진단 용액 내에 존재하는 상기 금 이온의 농도는 1 mM ~ 10 mM 인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 진단 용액 내에 존재하는 상기 환원제의 농도는 0.005 M ~ 0.1 M 인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플의 양은 10 μ l ~ 30 μ l 인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 질병은 급성심장질환, 인간면역결핍증, C형 간염, 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증후군 A형 간염, 뇌졸중 및 뇌출혈로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발색 반응은 최소 5 분~10 분 안에 나타나는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발색 반응은 500-600 nm의 흡광도를 측정하여 확인하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 13] 제1항 또는 제3항에 있어서, 상기 질병 특이적 마커 검출용 항원 또는 항체는 단백질 입자의 표면에 표출되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 단백질 입자는 금 이온을 흡착할 수 있는 히스티딘, 라이신 및 아르기닌으로 구성된 군에서 선택되는 태그가 추가로 그 표면에 표출되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 질병 특이적 마커 검출용 항원 또는 항체의 면역반응은 단백질 입자의 표면에서 발생하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 태그는 금 이온을 흡착하여 환원제의 존재 하에 금 입자의 응집반응을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 17] 제2항에 있어서, 상기 바이러스 검출용 항원은 단백질 입자의 표면에 표출되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 단백질 입자는 금 이온을 흡착할 수 있는 히스티딘, 라이신 및 아르기닌으로 구성된 군에서 선택되는 태그가 추가로 그 표면에 표출되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 19] 제17항에 있어서, 상기 바이러스 검출용 항원 또는 항체의 면역반응은 단백질 입자의 표면에서 발생하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 20] 제18항에 있어서, 상기 태그는 금 이온을 흡착하여 환원제의 존재 하에 금 입자의 응집반응을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 21] 제13항에 있어서, 상기 단백질 입자는 페리틴(ferritin), 페리틴 유사 단백질(ferritin-like protein), 마그네토솜(magnetosome) 구성단백질, 바이러스 구성단백질(e.g. hepatitis B virus core protein, tobacco mosaic virus), DPS(DNA binding protein), 및 proteasome으로 구성된 군에서 선택되는 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 22] 제17항에 있어서, 상기 단백질 입자는 페리틴(ferritin), 페리틴 유사 단백질(ferritin-like protein), 마그네토솜(magnetosome) 구성단백질,

바이러스 구성단백질(e.g. hepatitis B virus core protein, tobacco mosaic virus), DPS(DNA binding protein), 및 proteasome으로 구성된 군에서 선택되는 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[51]

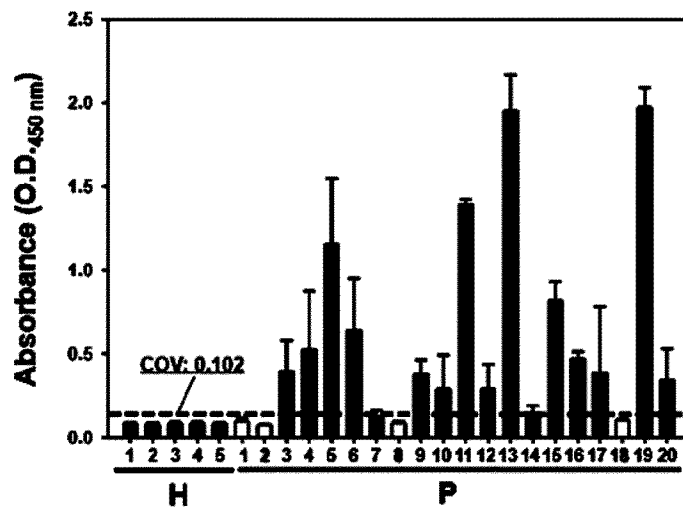


[도2]



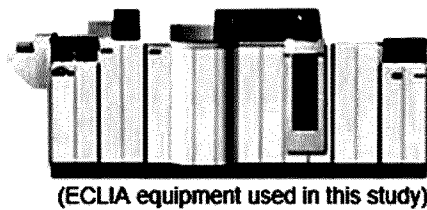
[도3]

(A)



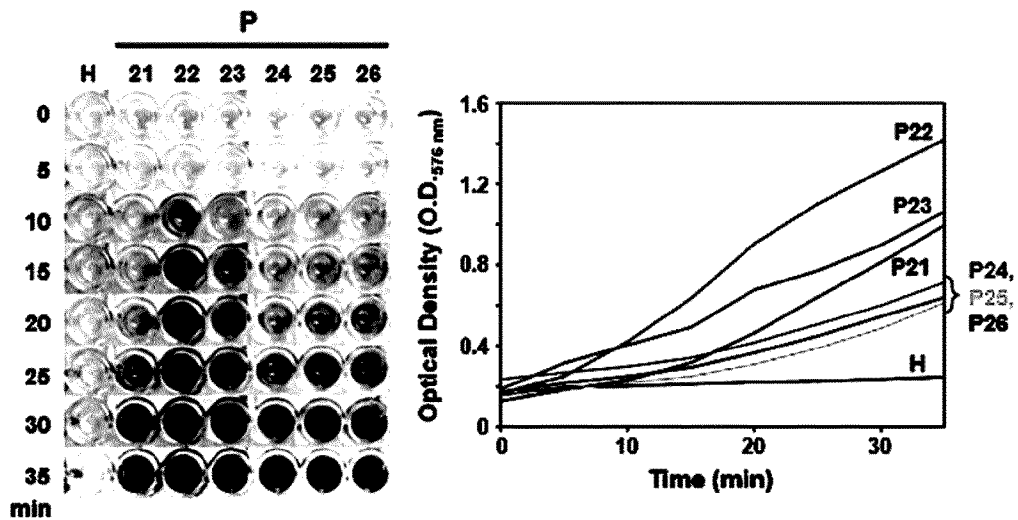
(B)

AMI patient sera	Troponin-I concentration* (ng/ml)
21	ND**
22	18.25
23	0.47
24	ND
25	ND
26	ND

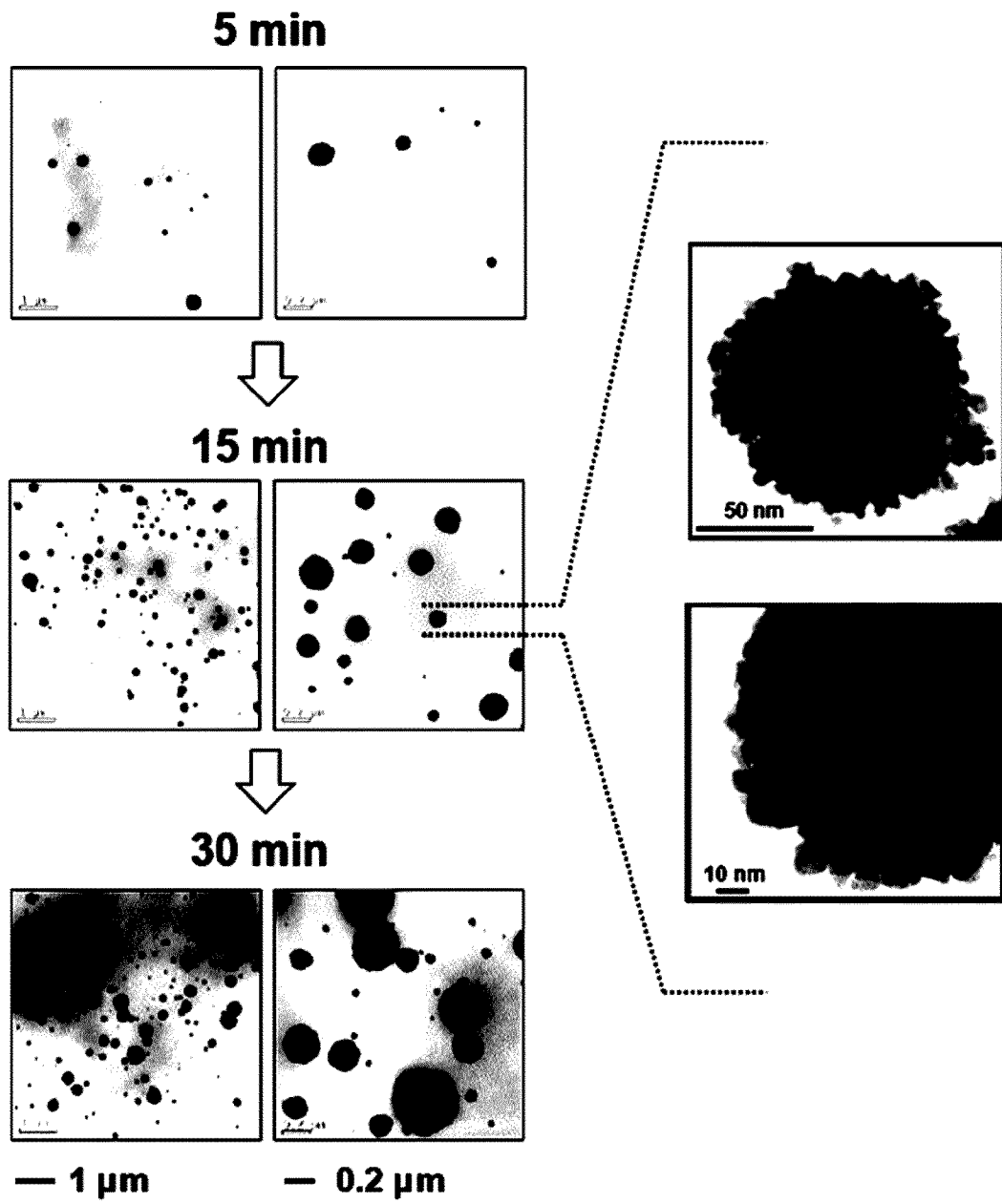


* Measured by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)

** Not detected (detection limit: 0.16 ng/mL)

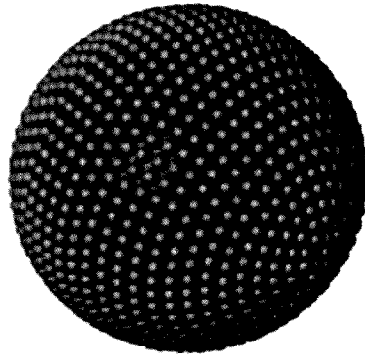


[도4]

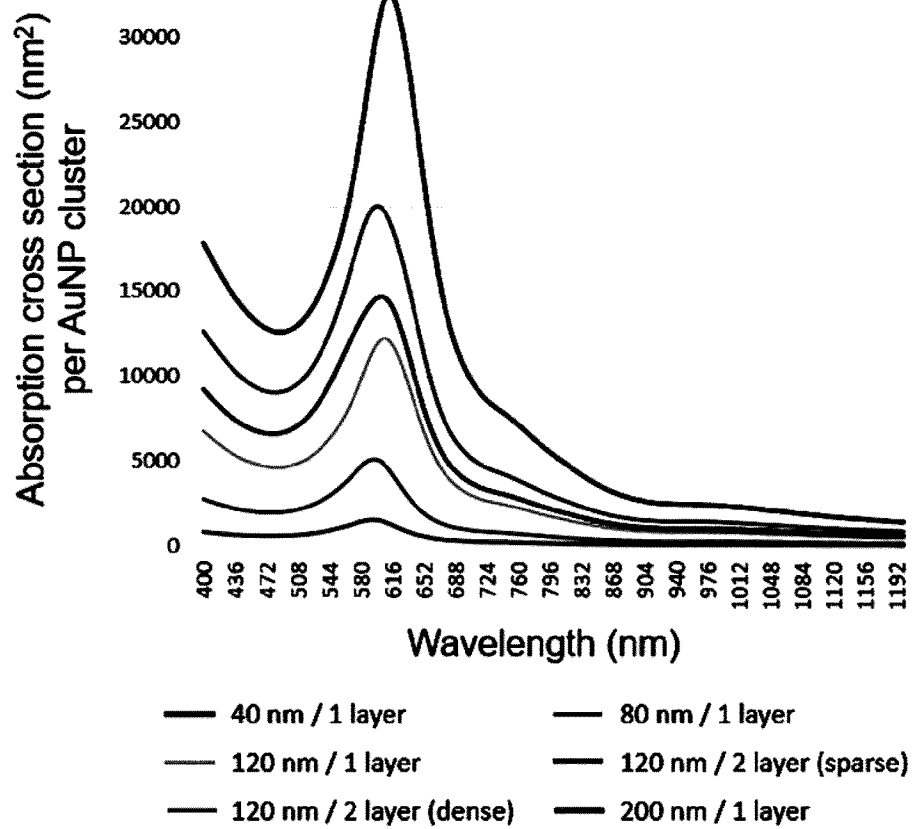


[도5]

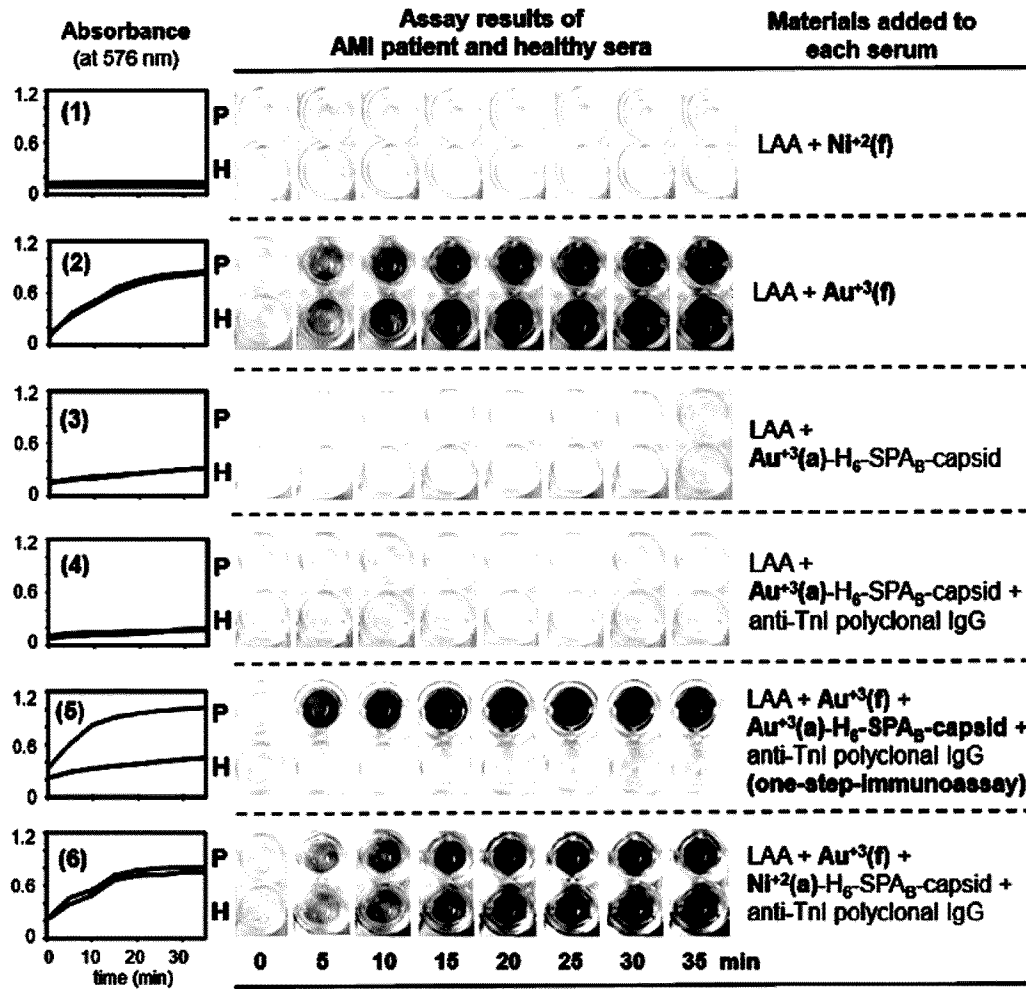
(A)



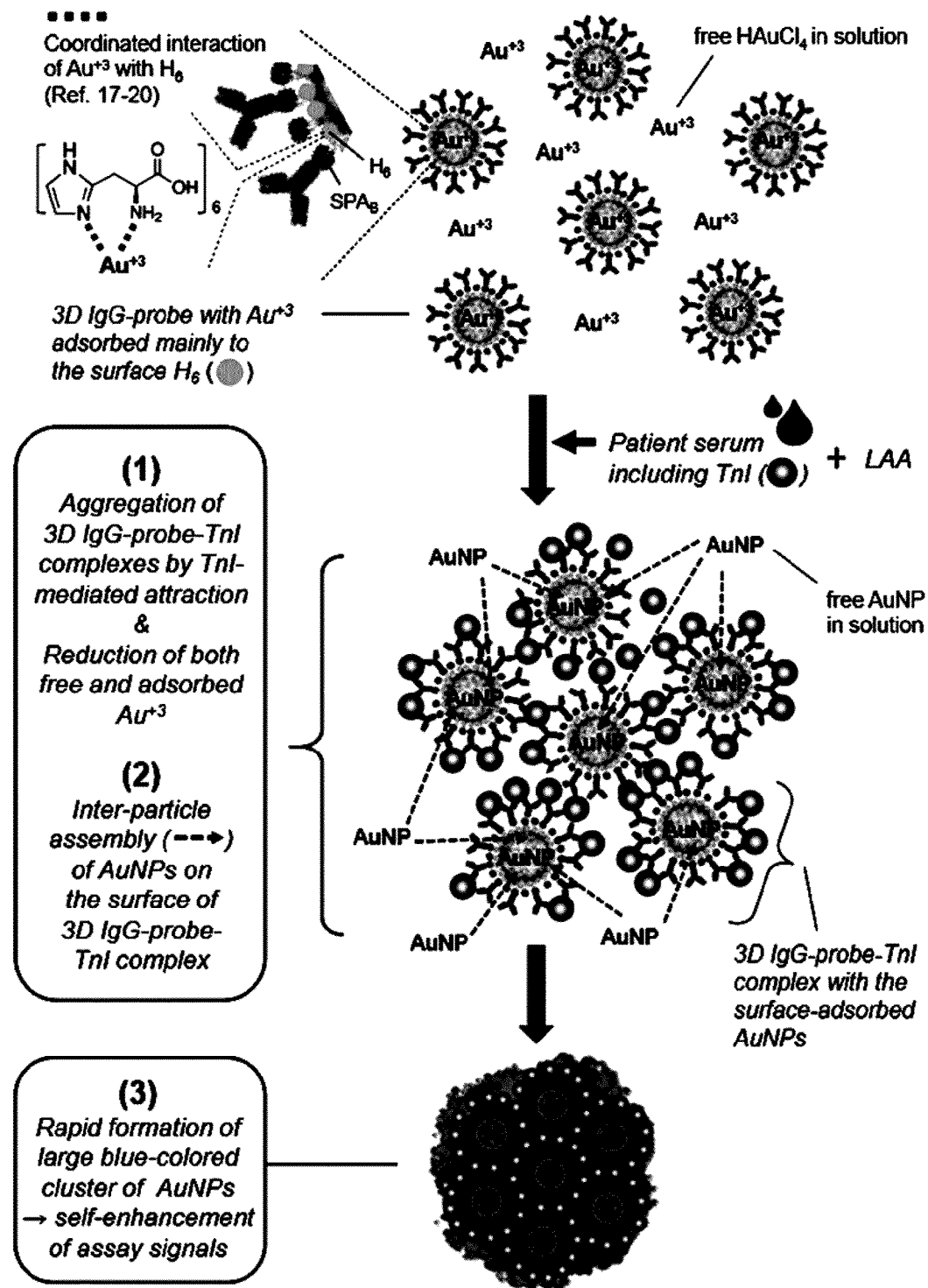
(B)



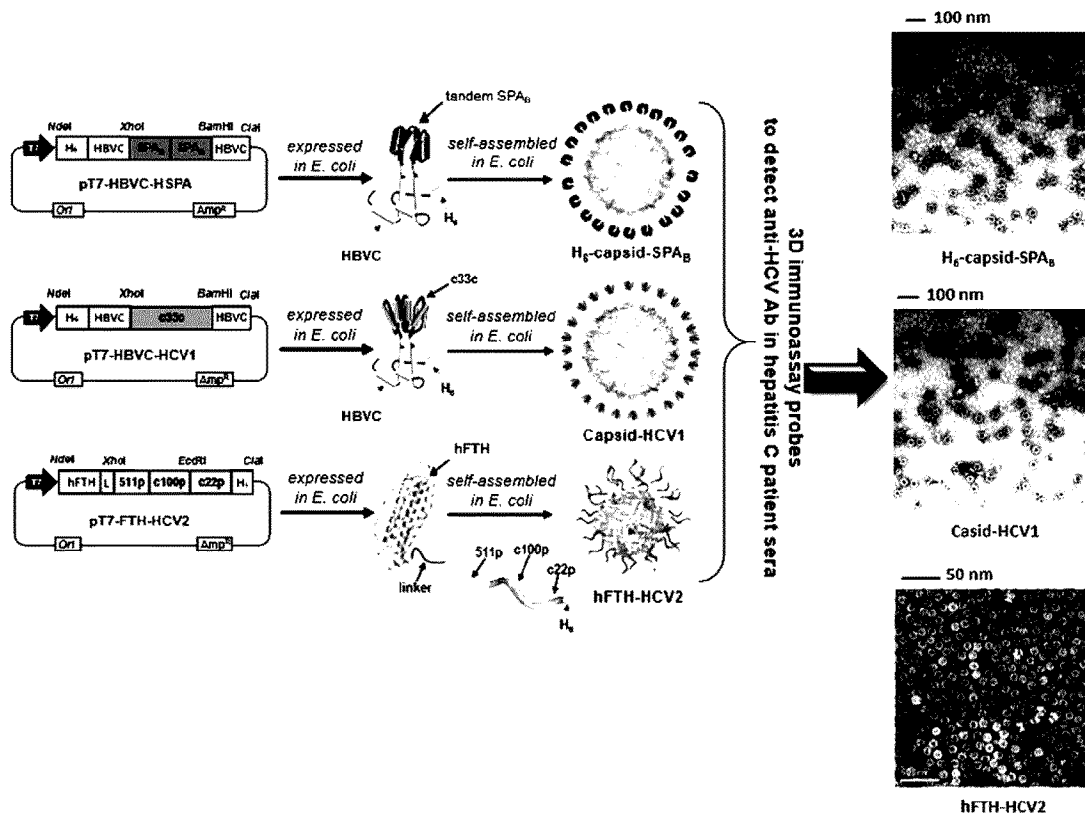
[도6]



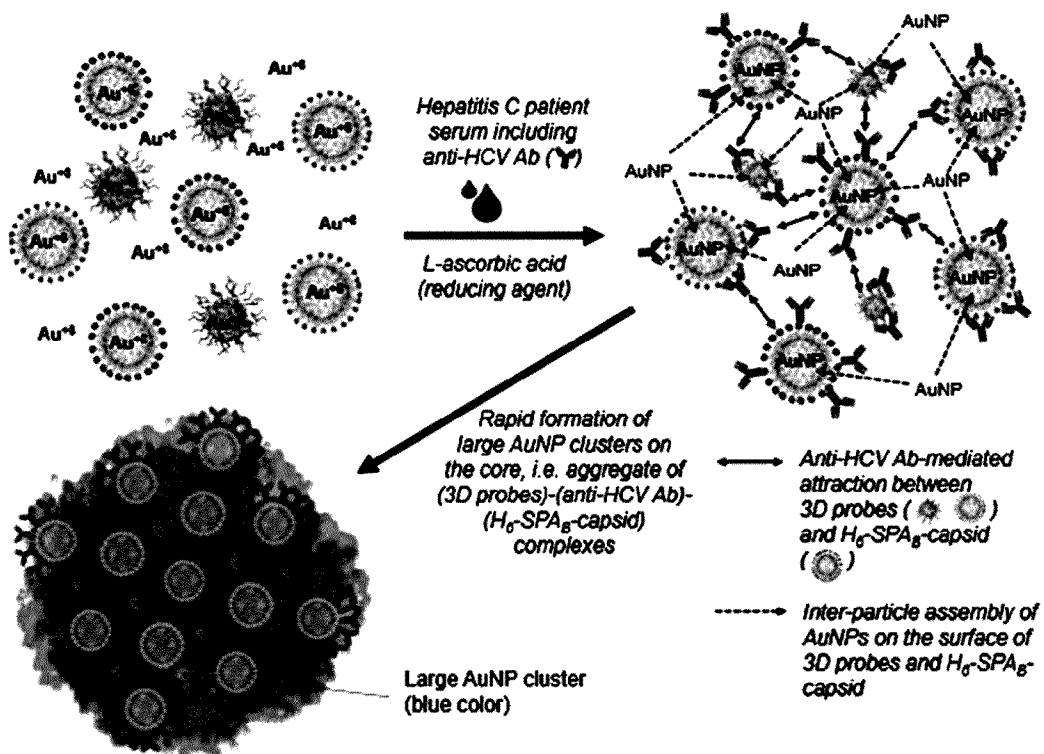
[도7]



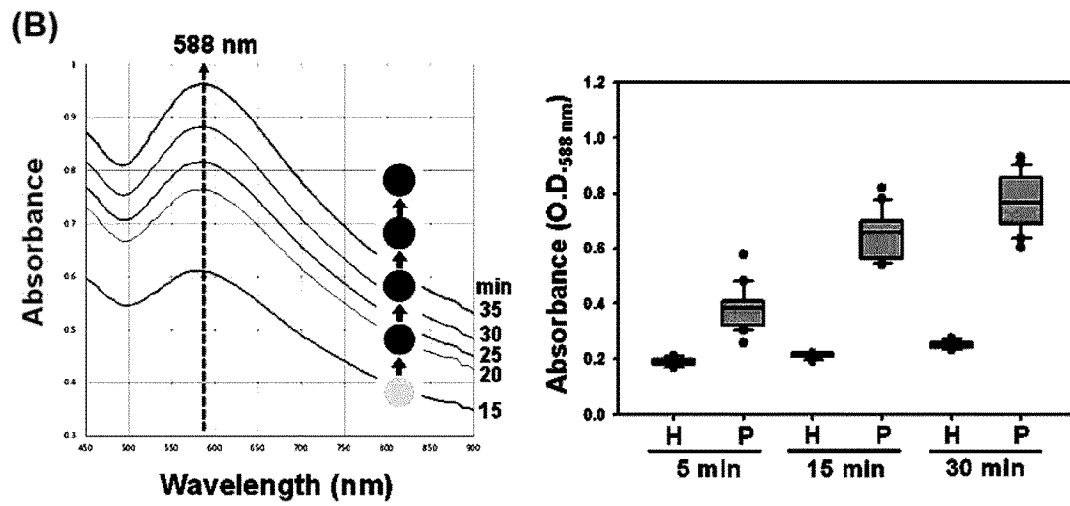
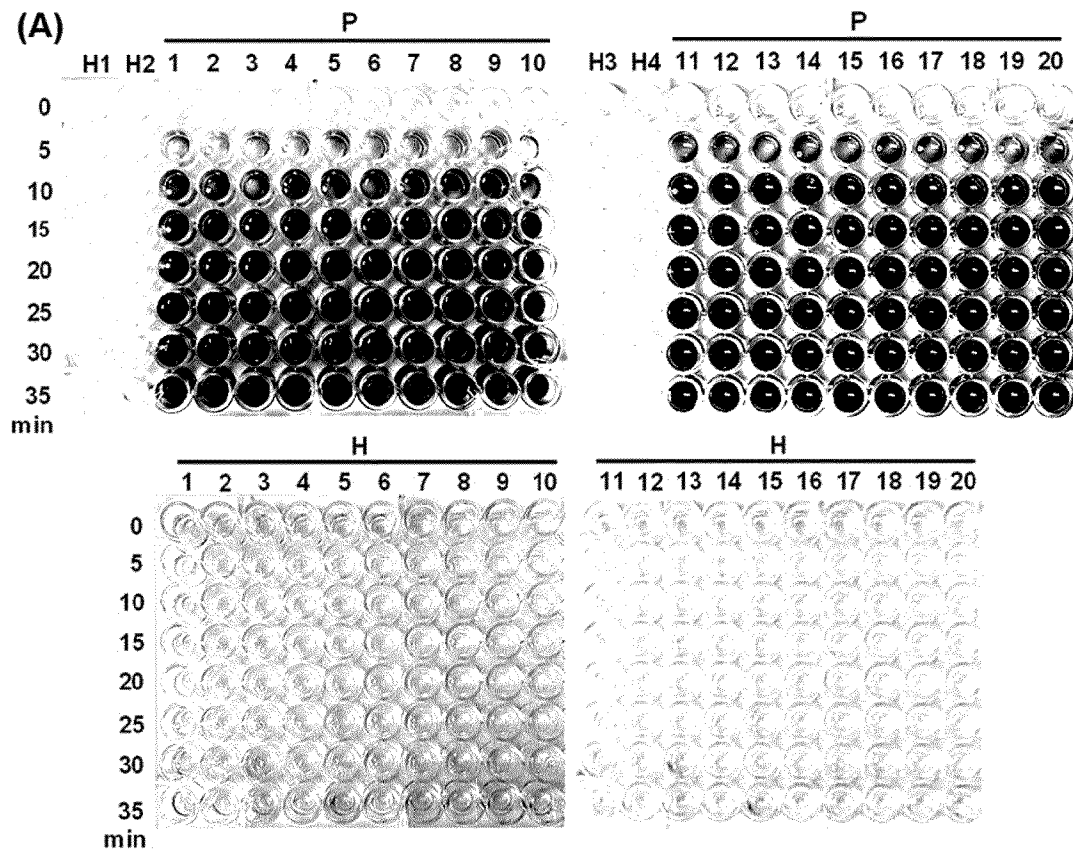
[도8]



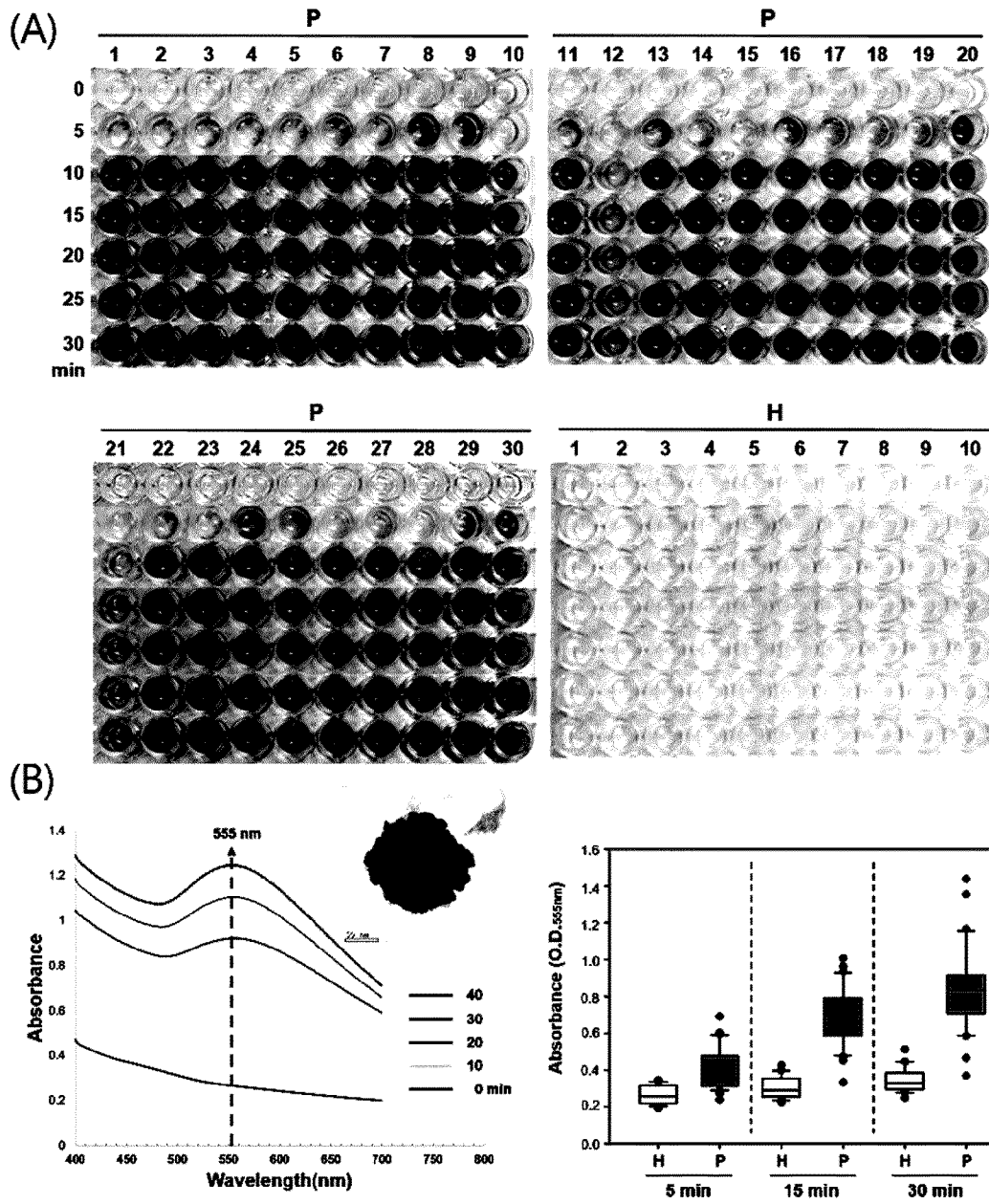
[도9]



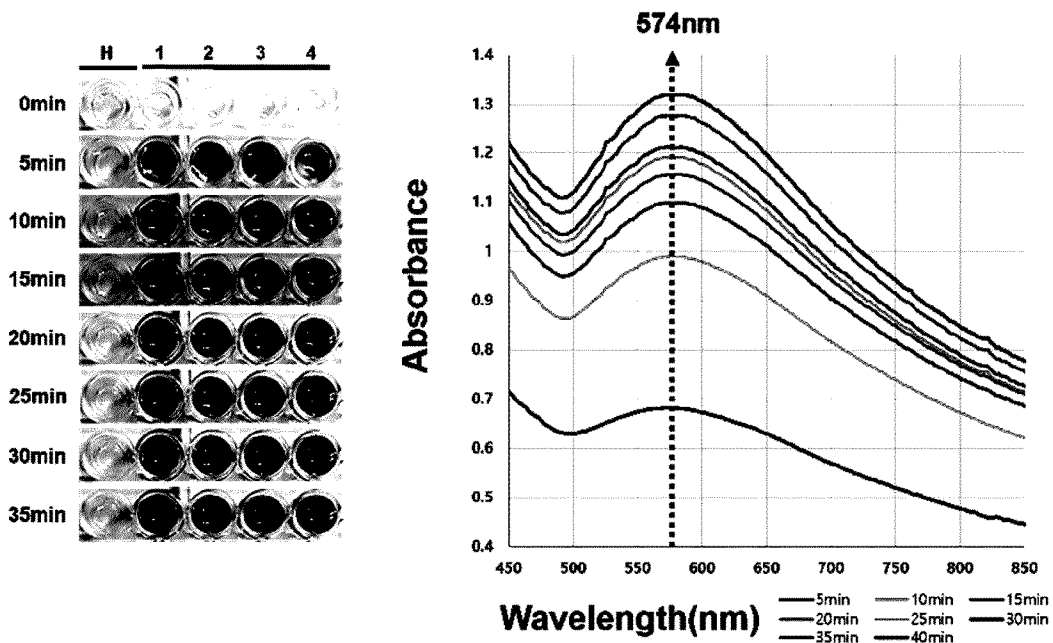
[도10]



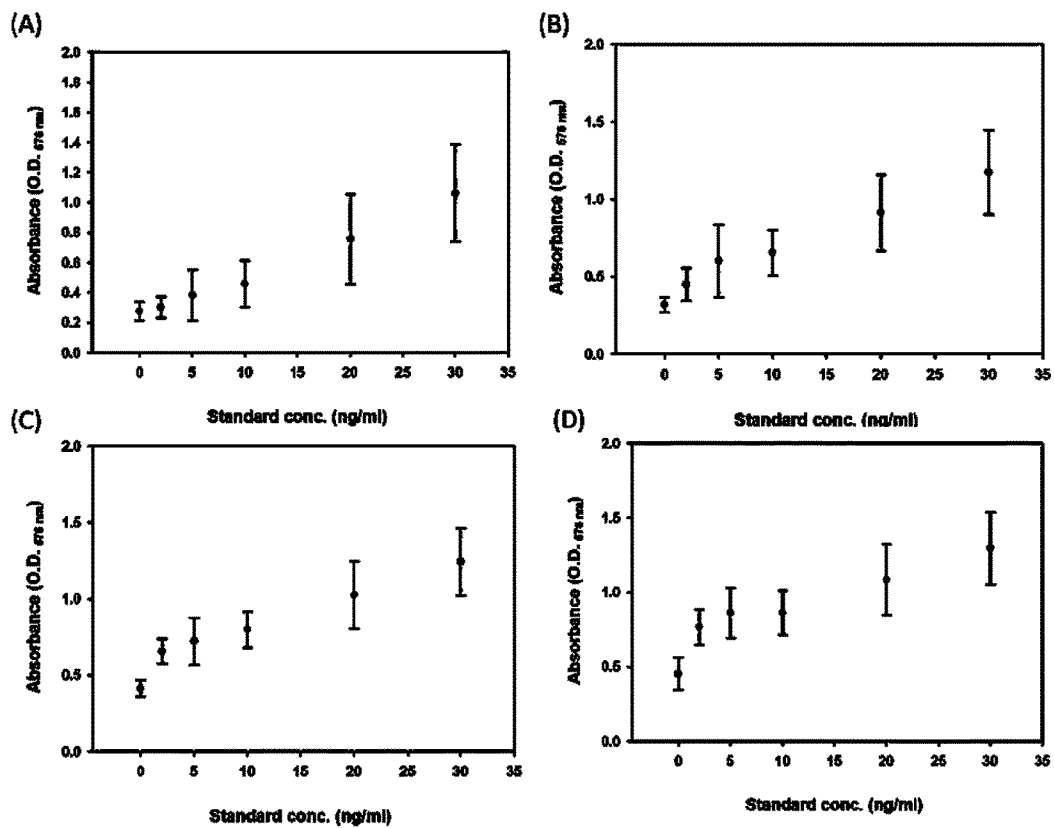
[도11]



[도12]

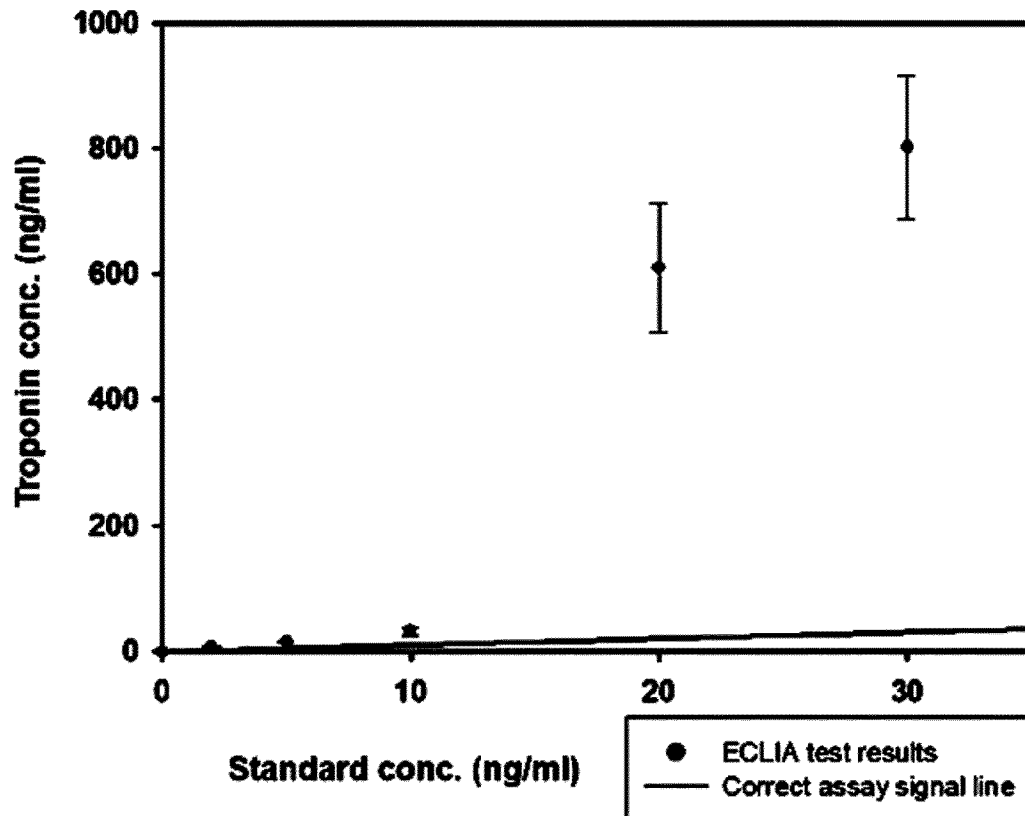


[도13]



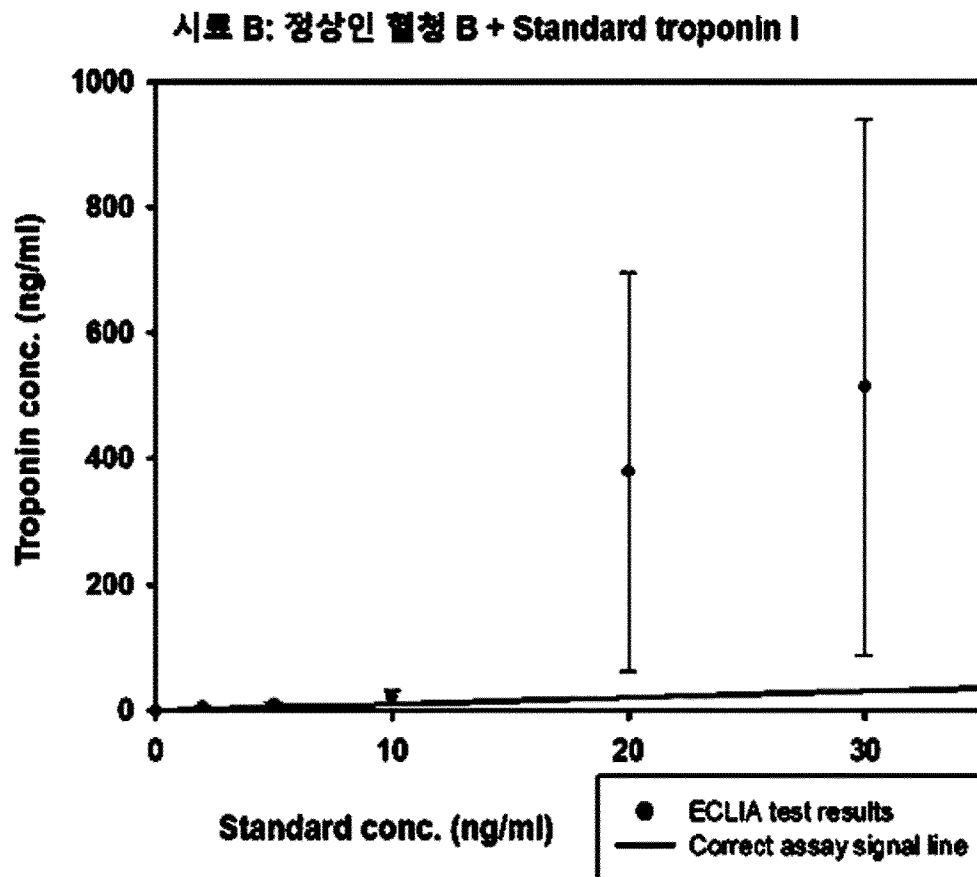
[도14]

시료 A: 정상인 혈청 A + Standard troponin I



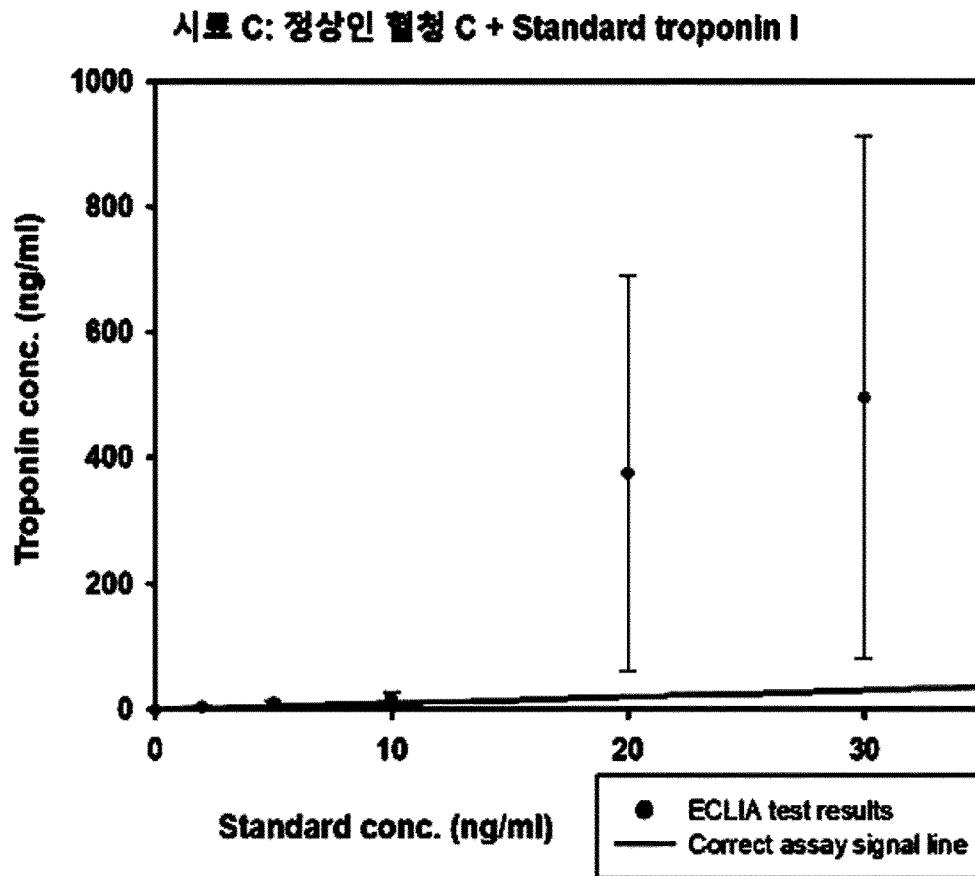
Standard conc.	ECLIA (Mean ± s.d.)
30 ng/ml	801.8 ± 115.0 ng/ml
20 ng/ml	609.8 ± 103.7 ng/ml
10 ng/ml	31.5 ± 6.2 ng/ml
5 ng/ml	14.7 ± 0.6 ng/ml
2 ng/ml	6.9 ± 0.7 ng/ml
0 ng/ml	< 0.16 ng/ml

[도15]



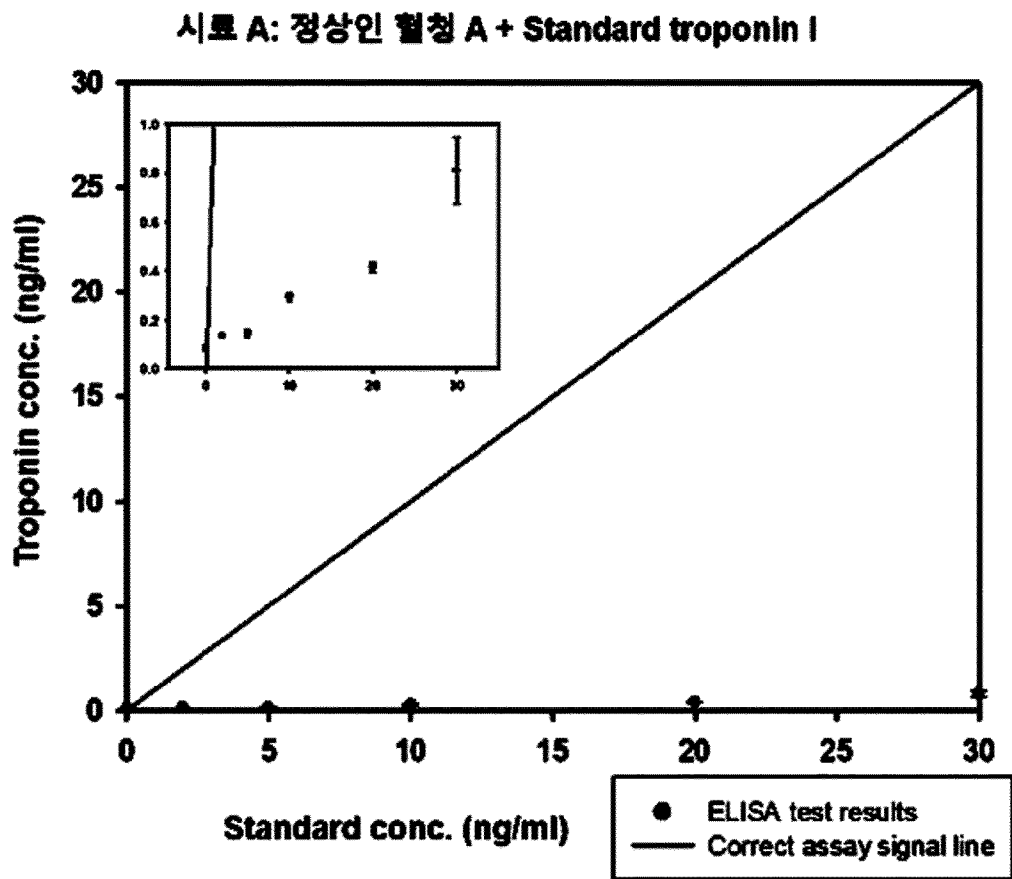
Standard conc.	ECLIA (Mean ± s.d.)
30 ng/ml	513.7 ± 425.8 ng/ml
20 ng/ml	378.7 ± 316.4 ng/ml
10 ng/ml	20.9 ± 9.3 ng/ml
5 ng/ml	9.6 ± 3.7 ng/ml
2 ng/ml	5.0 ± 1.9 ng/ml
0 ng/ml	< 0.16 ng/ml

[도16]



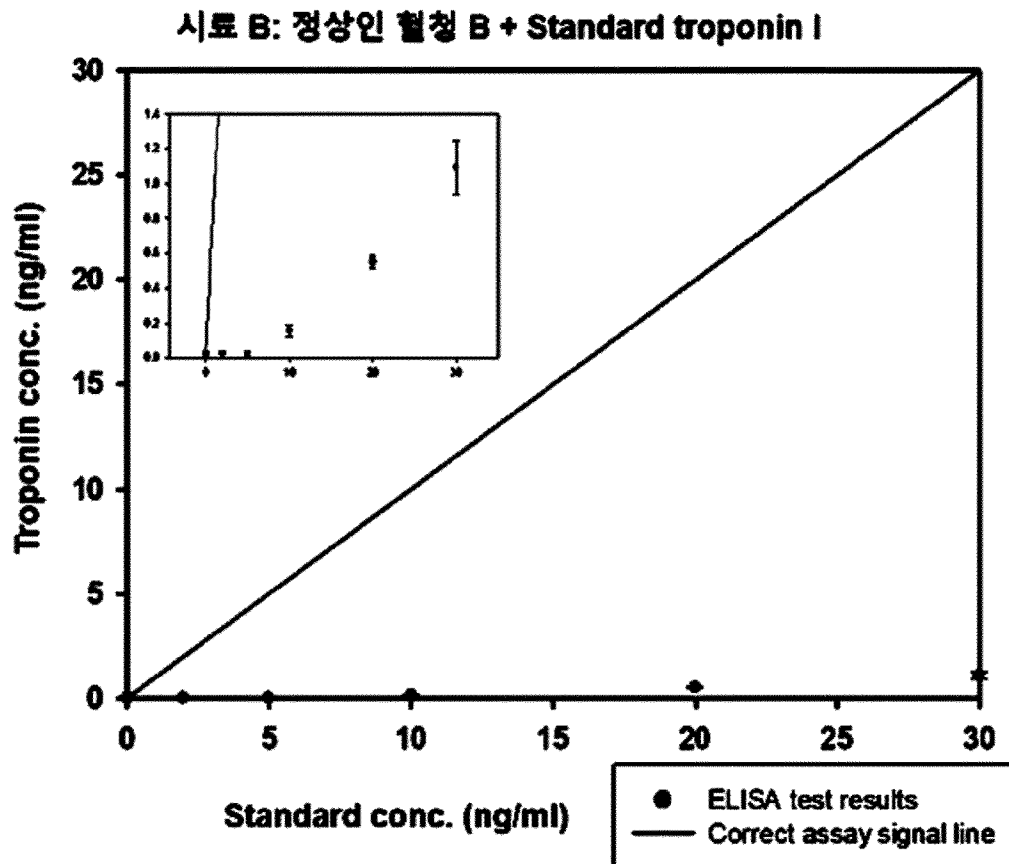
Standard conc.	ECLIA (Mean ± s.d.)
30 ng/ml	496.4 ± 414.9 ng/ml
20 ng/ml	375.0 ± 315.5 ng/ml
10 ng/ml	17.4 ± 9.6 ng/ml
5 ng/ml	9.0 ± 4.9 ng/ml
2 ng/ml	4.1 ± 2.2 ng/ml
0 ng/ml	< 0.16 ng/ml

[도17]



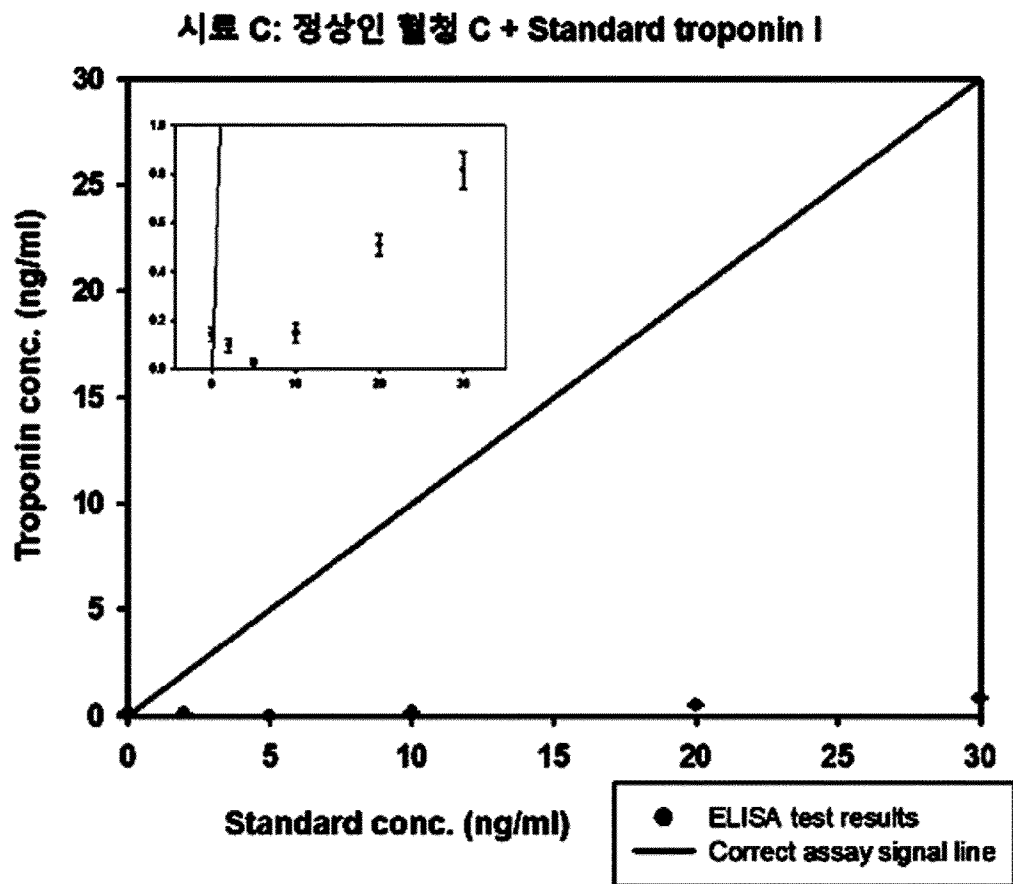
Standard conc.	ELISA (Mean ± s.d.)
30 ng/ml	0.81 ± 0.14 ng/ml
20 ng/ml	0.42 ± 0.02 ng/ml
10 ng/ml	0.30 ± 0.02 ng/ml
5 ng/ml	0.15 ± 0.02 ng/ml
2 ng/ml	0.14 ± 0.01 ng/ml
0 ng/ml	0.09 ± 0.01 ng/ml

[도18]



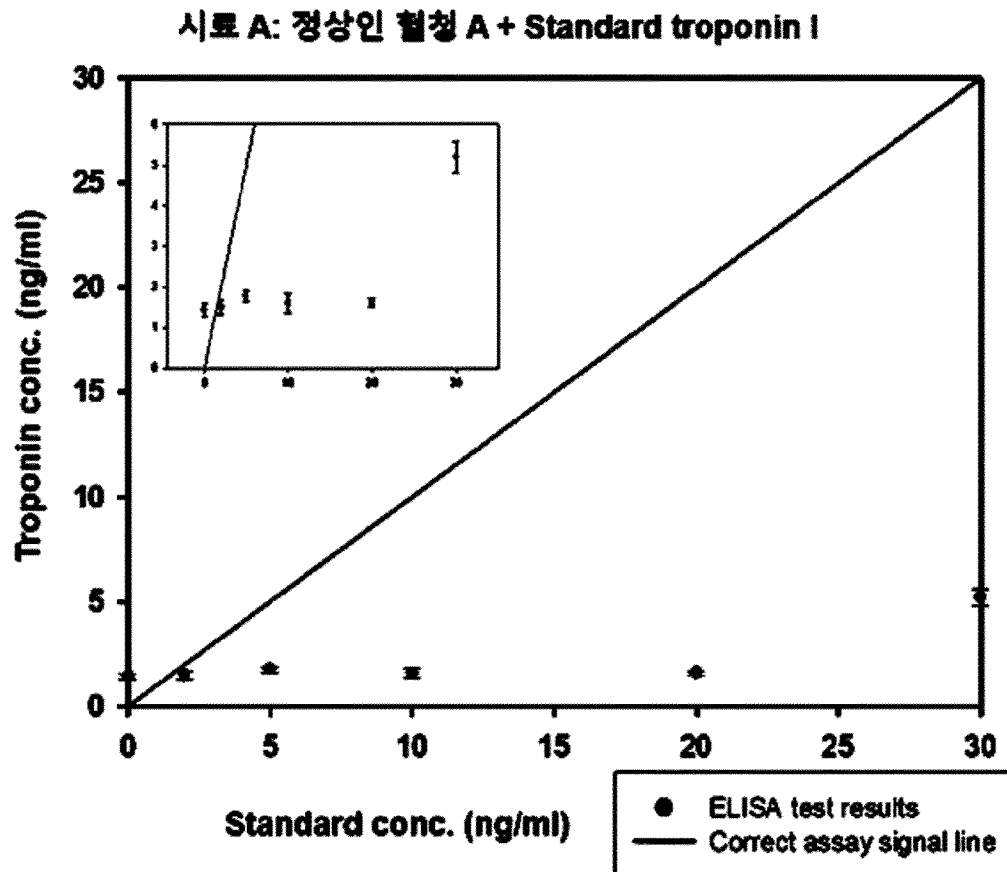
Standard conc.	ELISA (Mean $\pm$ s.d.)
30 ng/ml	1.09 $\pm$ 0.15 ng/ml
20 ng/ml	0.55 $\pm$ 0.04 ng/ml
10 ng/ml	0.15 $\pm$ 0.03 ng/ml
5 ng/ml	0.02 $\pm$ 0.01 ng/ml
2 ng/ml	0.02 $\pm$ 0.02 ng/ml
0 ng/ml	0.03 $\pm$ 0.01 ng/ml

[도19]



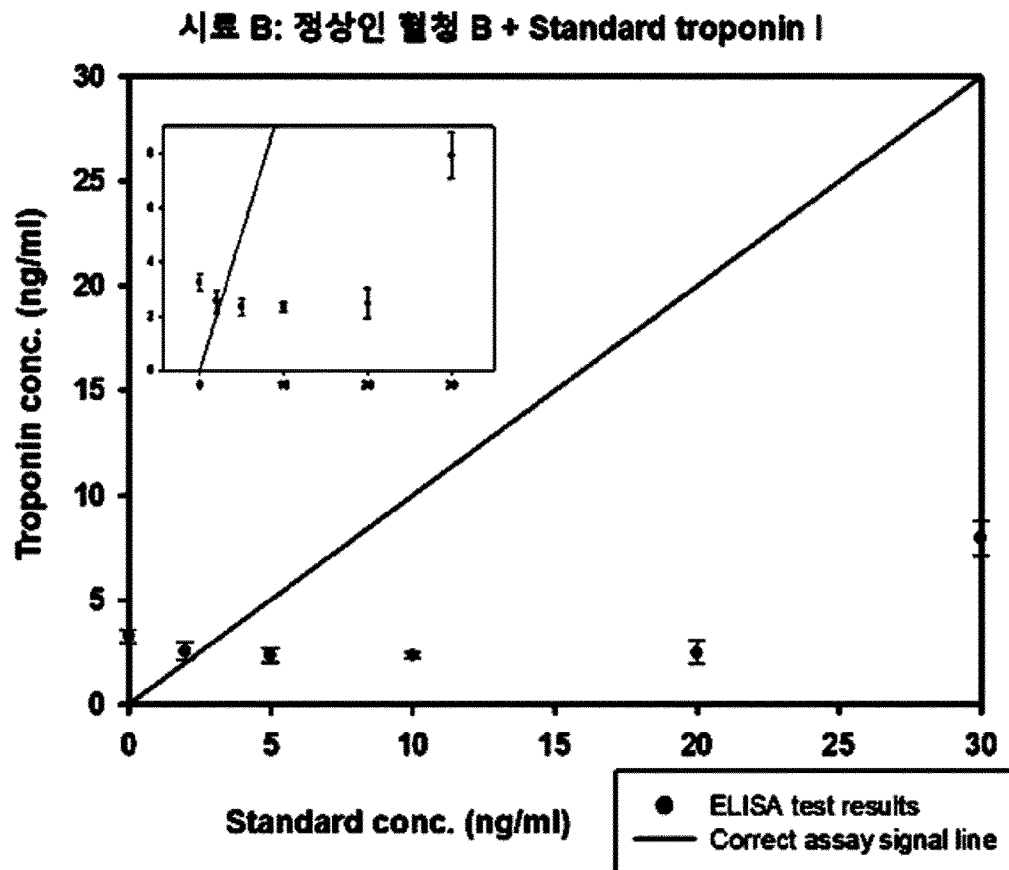
Standard conc.	ELISA (Mean $\pm$ s.d.)
30 ng/ml	0.81 $\pm$ 0.08 ng/ml
20 ng/ml	0.51 $\pm$ 0.04 ng/ml
10 ng/ml	0.15 $\pm$ 0.04 ng/ml
5 ng/ml	0.02 $\pm$ 0.02 ng/ml
2 ng/ml	0.10 $\pm$ 0.03 ng/ml
0 ng/ml	0.14 $\pm$ 0.03 ng/ml

[도20]



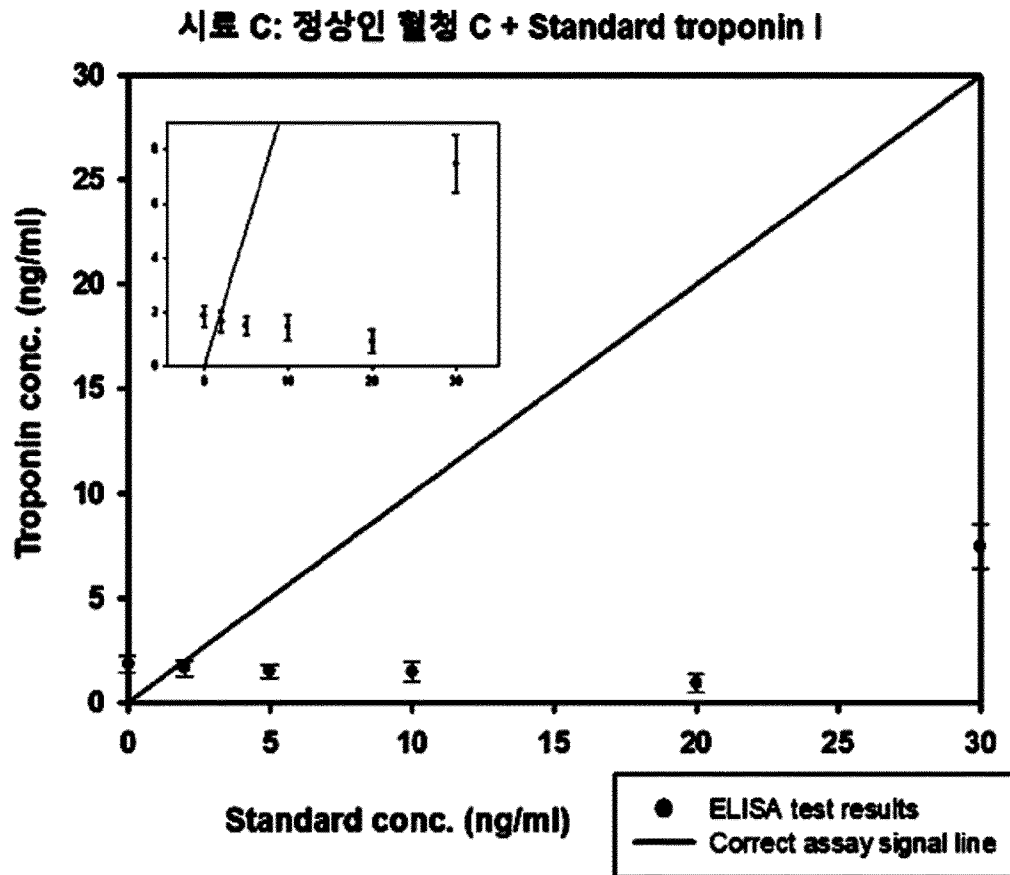
Standard conc.	ELISA (Mean $\pm$ s.d.)
30 ng/ml	5.19 $\pm$ 0.39 ng/ml
20 ng/ml	1.62 $\pm$ 0.09 ng/ml
10 ng/ml	1.59 $\pm$ 0.23 ng/ml
5 ng/ml	1.78 $\pm$ 0.12 ng/ml
2 ng/ml	1.50 $\pm$ 0.19 ng/ml
0 ng/ml	1.43 $\pm$ 0.14 ng/ml

[도21]



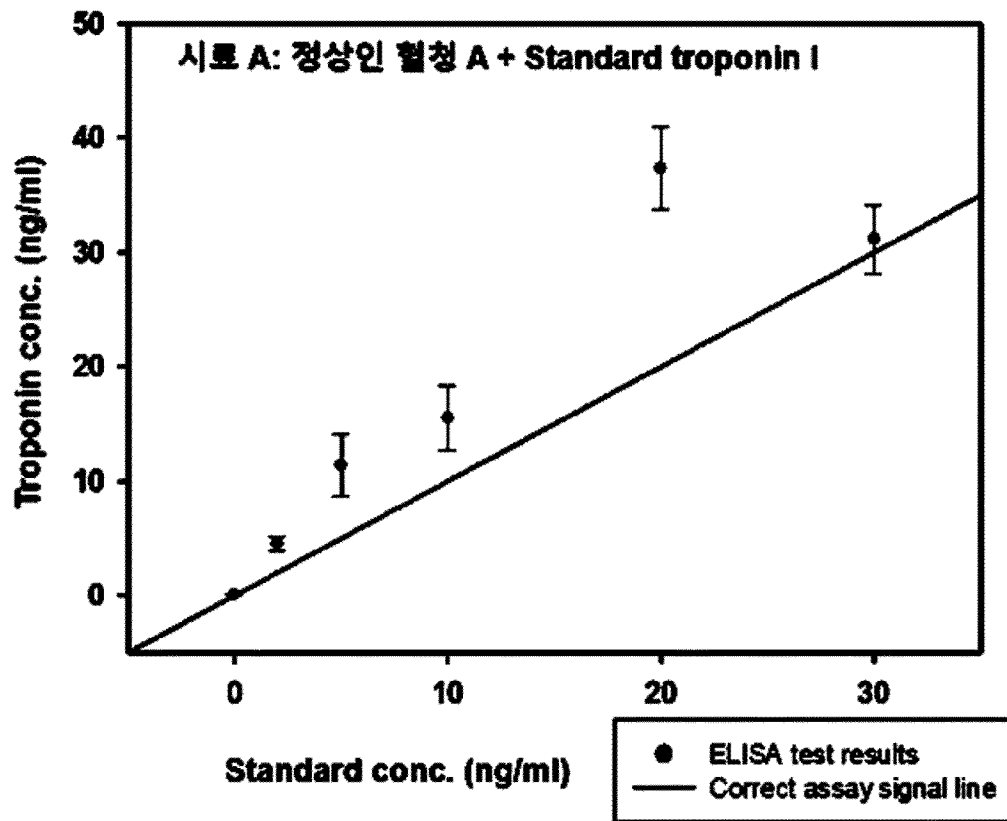
Standard conc.	ELISA (Mean ± s.d.)
30 ng/ml	7.95 ± 0.83 ng/ml
20 ng/ml	2.48 ± 0.55 ng/ml
10 ng/ml	2.33 ± 0.17 ng/ml
5 ng/ml	2.35 ± 0.32 ng/ml
2 ng/ml	2.55 ± 0.42 ng/ml
0 ng/ml	3.26 ± 0.30 ng/ml

[도22]



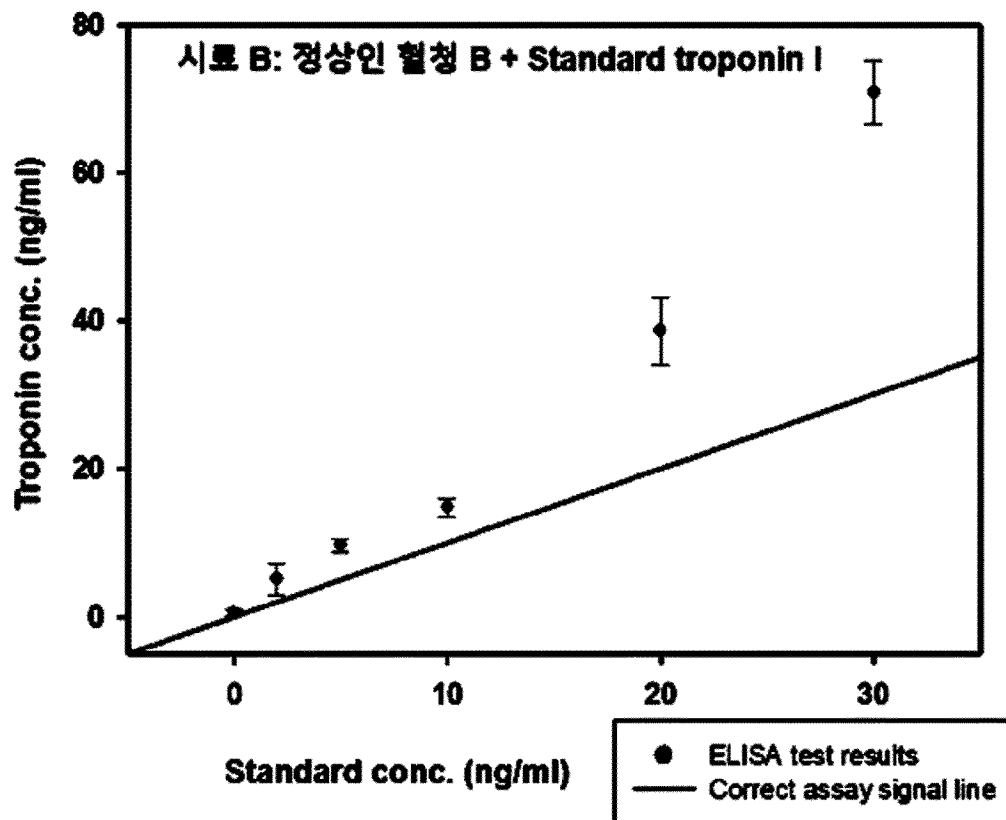
Standard conc.	ELISA (Mean ± s.d.)
30 ng/ml	7.46 ± 1.07 ng/ml
20 ng/ml	0.93 ± 0.44 ng/ml
10 ng/ml	1.45 ± 0.46 ng/ml
5 ng/ml	1.51 ± 0.32 ng/ml
2 ng/ml	1.65 ± 0.37 ng/ml
0 ng/ml	1.86 ± 0.39 ng/ml

[도23]



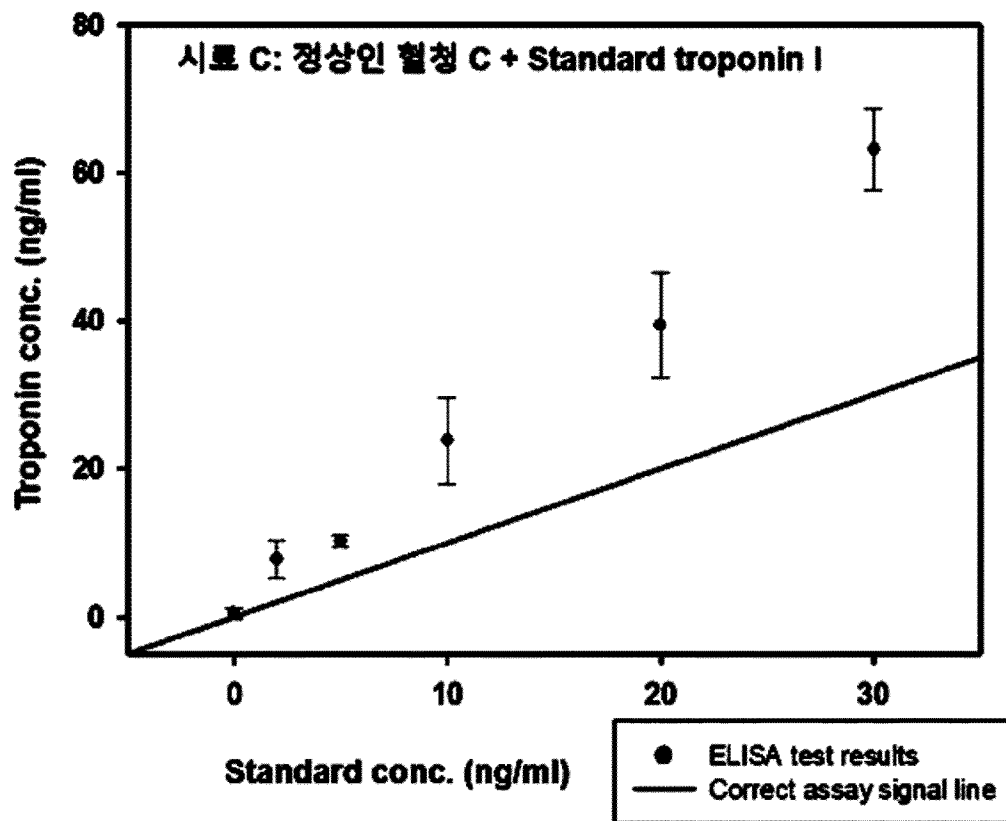
Standard conc.	ELISA (Mean ± s.d.)
30 ng/ml	31.15 ± 2.96 ng/ml
20 ng/ml	37.32 ± 3.57 ng/ml
10 ng/ml	15.53 ± 2.78 ng/ml
5 ng/ml	11.41 ± 2.72 ng/ml
2 ng/ml	4.54 ± 0.61 ng/ml
0 ng/ml	0.06 ± 0.04 ng/ml

[도24]



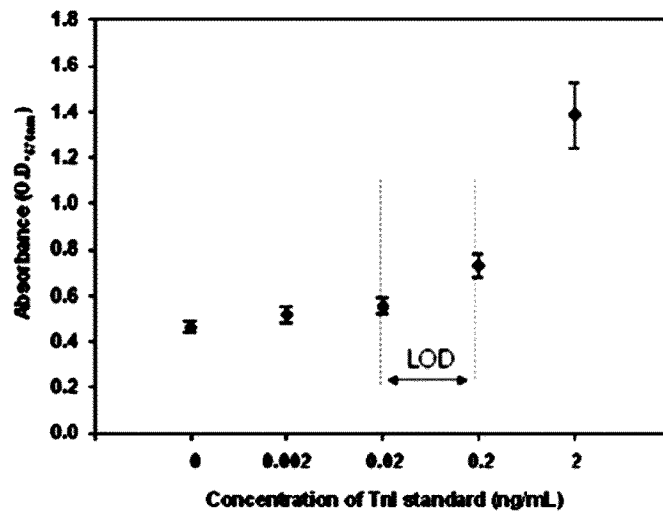
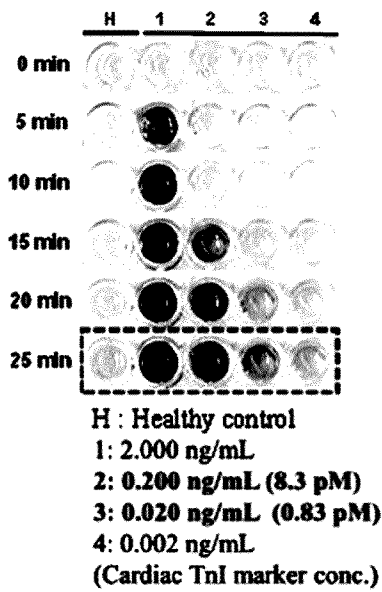
Standard conc.	ELISA (Mean ± s.d.)
30 ng/ml	70.81 ± 4.31 ng/ml
20 ng/ml	38.70 ± 4.58 ng/ml
10 ng/ml	14.84 ± 1.25 ng/ml
5 ng/ml	9.70 ± 0.86 ng/ml
2 ng/ml	5.11 ± 2.10 ng/ml
0 ng/ml	0.57 ± 0.51 ng/ml

[도25]

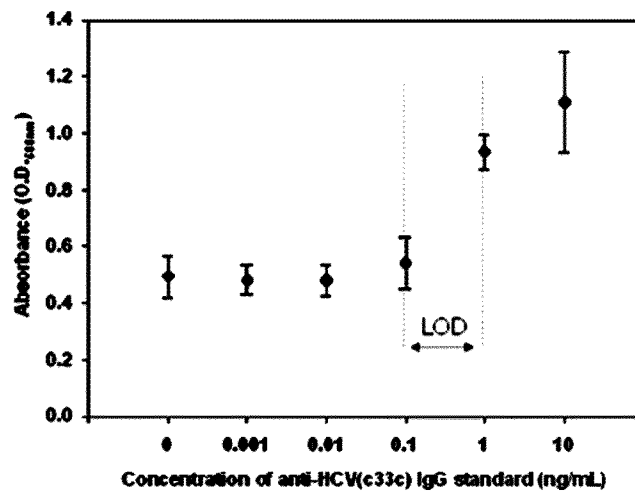
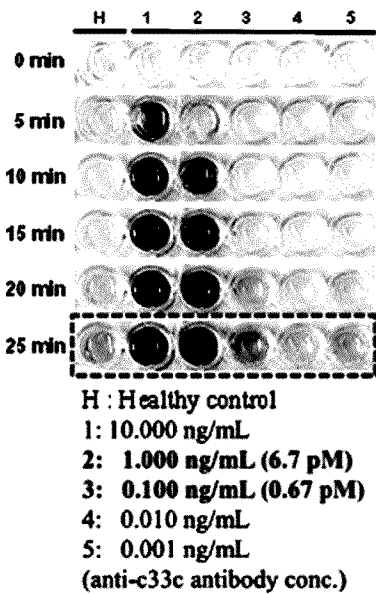


Standard conc.	ELISA (Mean ± s.d.)
30 ng/ml	63.15 ± 5.51 ng/ml
20 ng/ml	39.36 ± 7.16 ng/ml
10 ng/ml	23.84 ± 5.85 ng/ml
5 ng/ml	10.24 ± 0.84 ng/ml
2 ng/ml	7.77 ± 2.58 ng/ml
0 ng/ml	0.51 ± 0.65 ng/ml

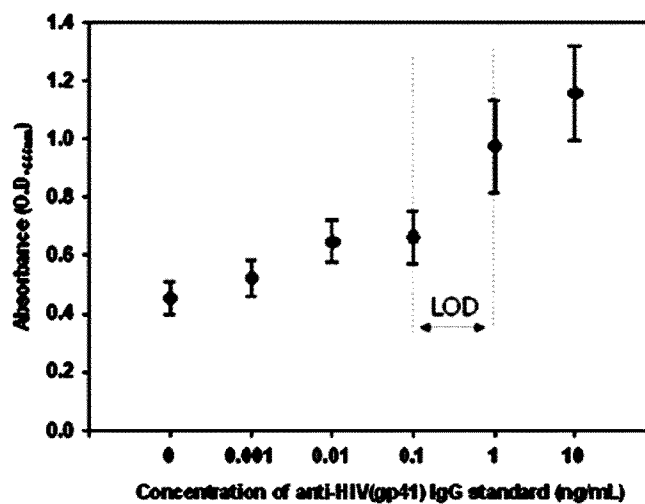
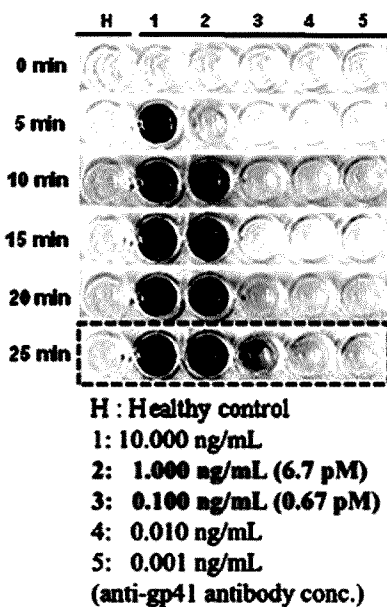
[도26]



[도27]



[도28]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/004313

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/543(2006.01)i, G01N 33/553(2006.01)i, G01N 33/536(2006.01)i, G01N 33/569(2006.01)i, G01N 33/52(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 33/543; C12N 15/63; C07K 19/00; B82Y 5/00; G01N 33/483; C12Q 1/26; G01N 33/53; G01N 33/50; G01N 33/553; G01N 33/536; G01N 33/569; G01N 33/52

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: gold ion, reduction, gold grain, gold adsorbed peptide, antigen, antibody, detection

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2016-0117688 A (ELECTRONICS AND TELECOMMUNICATIONS RESEARCH INSTITUTE) 11 October 2016 See paragraphs [0005], [0029]-[0036], [0055]-[0063]; claims 1-10; and figures 1a-4.	1-22
Y	KR 10-2010-0128550 A (INFOPIA CO., LTD.) 08 December 2010 See paragraphs [0018], [0019], [0041]; claims 1, 4; figures 1, 2.	1-22
Y	KR 10-2016-0061304 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 31 May 2016 See paragraphs [0007], [0033]; and claims 5, 6.	4,13-22
A	KR 10-2011-0090347 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 10 August 2011 See the entire document.	1-22
A	JP 2017-037014 A (IKEDA SHOKKEN KK. et al.) 16 February 2017 See the entire document.	1-22



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

20 AUGUST 2018 (20.08.2018)

Date of mailing of the international search report

03 SEPTEMBER 2018 (03.09.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/004313

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0117688 A	11/10/2016	NONE	
KR 10-2010-0128550 A	08/12/2010	CN 102449482 A CN 102449482 B EP 2437058 A2 EP 2437058 B1 US 2012-0070822 A1 WO 2010-137807 A2 WO 2010-137807 A3	09/05/2012 01/04/2015 04/04/2012 16/08/2017 22/03/2012 02/12/2010 03/03/2011
KR 10-2016-0061304 A	31/05/2016	KR 10-1836921 B1 KR 10-2014-0133478 A US 2016-0074511 A1 US 2018-0028833 A1 US 9814907 B2 WO 2014-182136 A1	12/03/2018 19/11/2014 17/03/2016 01/02/2018 14/11/2017 13/11/2014
KR 10-2011-0090347 A	10/08/2011	NONE	
JP 2017-037014 A	16/02/2017	JP 2017-037015 A WO 2017-026505 A1	16/02/2017 16/02/2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/543(2006.01)i, G01N 33/553(2006.01)i, G01N 33/536(2006.01)i, G01N 33/569(2006.01)i, G01N 33/52(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/543; C12N 15/63; C07K 19/00; B82Y 5/00; G01N 33/483; C12Q 1/26; G01N 33/53; G01N 33/50; G01N 33/553; G01N 33/536; G01N 33/569; G01N 33/52

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: 금 이온, 환원, 금 입자, 금 흡착 펩타이드, 항원, 항체, 검출

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2016-0117688 A (한국전자통신연구원) 2016.10.11 단락 [0005], [0029]-[0036], [0055]-[0063]; 청구항 1-10; 및 도면 1a-4 참조.	1-22
Y	KR 10-2010-0128550 A (주식회사 인포피아) 2010.12.08 단락 [0018], [0019], [0041]; 청구항 1, 4; 도면 1, 2.	1-22
Y	KR 10-2016-0061304 A (고려대학교 산학협력단) 2016.05.31 단락 [0007], [0033]; 및 청구항 5, 6 참조.	4, 13-22
A	KR 10-2011-0090347 A (고려대학교 산학협력단) 2011.08.10 전체 문헌 참조.	1-22
A	JP 2017-037014 A (IKEDA SHOKKEN KK 등) 2017.02.16 전체 문헌 참조.	1-22

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 08월 20일 (20.08.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 09월 03일 (03.09.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

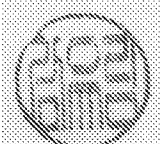
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0117688 A	2016/10/11	없음	
KR 10-2010-0128550 A	2010/12/08	CN 102449482 A CN 102449482 B EP 2437058 A2 EP 2437058 B1 US 2012-0070822 A1 WO 2010-137807 A2 WO 2010-137807 A3	2012/05/09 2015/04/01 2012/04/04 2017/08/16 2012/03/22 2010/12/02 2011/03/03
KR 10-2016-0061304 A	2016/05/31	KR 10-1836921 B1 KR 10-2014-0133478 A US 2016-0074511 A1 US 2018-0028833 A1 US 9814907 B2 WO 2014-182136 A1	2018/03/12 2014/11/19 2016/03/17 2018/02/01 2017/11/14 2014/11/13
KR 10-2011-0090347 A	2011/08/10	없음	
JP 2017-037014 A	2017/02/16	JP 2017-037015 A WO 2017-026505 A1	2017/02/16 2017/02/16