



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0127833
(43) 공개일자 2017년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/68 (2013.01)
G01N 33/5304 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0058549
(22) 출원일자 2016년05월13일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
광주과학기술원
광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동)
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
박성규
광주광역시 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원
생명과학부 (오룡동)
이건호
광주광역시 남구 노대일로 33, 510동 301호 (노대
동, 송화마을휴먼시아5단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

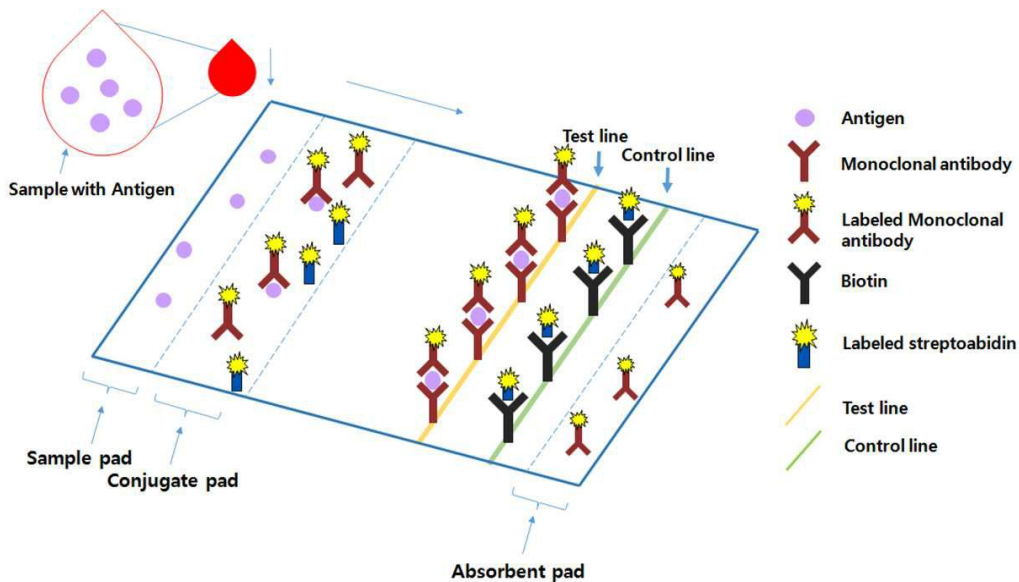
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 진단용 키트

(57) 요약

본 발명은 진단용 키트, 특히 자가면역(autoimmune) 질환 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명의 여러 구현예에 따르면, 혈액 내에 존재하는 다양한 자가면역 항체들에 대해 질병 특이적인 자가면역 항체를 선별해 낼 수 있을 뿐만 아니라, 종래의 진단 키트보다 크게 향상된 민감성을 지니는 효과를 보인다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/582 (2013.01)

G01N 2800/24 (2013.01)

(72) 발명자

최석원

광주광역시 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원
생명과학부 (오룡동)

심규영

광주광역시 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원
생명과학부 (오룡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NN14910

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 뇌영상근거 알츠하이머성 치매 환자에 대한 바이오 마커 발굴 및 조기진단 플랫폼을 통한
예측기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 서울대학교

연구기간 2015.07.01 ~ 2016.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711028068

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 MRI 기반 알츠하이머성 치매 특이 뇌 손상 규명 및 뇌지도 구축

기 여 율 1/2

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2015.07.01 ~ 2016.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

(A) 샘플 패드 영역, (B) 혈액 진행 방향을 기준으로 상기 샘플 패드 영역 후단에 위치한 결합 패드 영역, (C) 혈액 진행 방향을 기준으로 상기 결합 패드 영역 후단에 위치한 혈액 전개 막 영역, (D) 혈액 진행 방향을 기준으로 상기 혈액 전개 막 후단에 위치하는 흡수 패드 영역을 포함하는 진단 키트로서,

상기 혈액 전개 막 영역에는 표면에 (c1) 테스트 라인과 (c2) 컨트롤 라인을 포함되고,

상기 결합 패드 영역은 표지된 글로불린 항체와 타겟 항체와 특이적 결합을 할 수 있는 바이오티닐 펩타이드 및 상기 타겟 항체와 특이적 결합을 할 수 있는 발색 펩타이드를 포함하며,

상기 테스트 라인에는 스트렙타비딘이 고정되어 있고, 상기 컨트롤 라인에는 글로불린 항체가 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 타겟 질환 진단용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 타겟 항체는 자가면역 항체이고, 상기 타겟 질환은 자가면역 질환인 것을 특징으로 하는 타겟 질환 진단용 키트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 바이오티닐 펩타이드의 바이오티닐을 제외한 영역과 상기 발색 펩타이드의 발색단을 제외한 영역은 서로 동일하거나 상이하며,

상기 바이오티닐 펩타이드의 바이오티닐을 제외한 영역과 상기 발색 펩타이드의 발색단을 제외한 영역은 모두 상기 타겟 항체와 특이적으로 결합할 수 있는 펩타이드 에피토프를 포함하는 것을 특징으로 하는 타겟 질환 진단용 키트.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 컨트롤 라인은 혈액 진행 방향을 기준으로 상기 테스트 라인 후단에 위치하는 것을 특징으로 하는 타겟 질환 진단용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 진단용 키트, 특히 자가면역(autoimmune) 질환 진단용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기존의 생물학적 시료를 이용한 진단 키트는 항원-항체 반응을 이용한 키트가 대부분을 이루며, 생물학적 시료 내에 항원으로 작용될 물질을 지표로 하여 진단하도록 설계되어 있는 것이 통상적이다. 현재 상용화되어 널리 이용되고 있는 진단 키트 중 하나인 임신 진단 키트는 혈액 내 Hcg(Human chorionic gonadotropin)를 지표로 하여 진단이 되도록 설계되어 있는데, 이러한 Hcg는 진단 키트의 적용된 항원-항체 반응 중 항원에 해당되는 물질들로 항체와 특이적으로 결합하여 진단이 가능할 수 있도록 한다.

[0003] 다만, 이와 같은 종래의 진단 키트는 통상적으로 ELISA 방법과 anti-human IgG 항체가 사용되는데, 이 경우 무작위하게 혈액 내 자가면역 항체와 결합하게 되므로, 혈액 내에 존재하는 다양한 자가면역 항체들(autoimmune antibodies)에 대한 질병 특이적인 자가면역 항체를 선별해 내지 못하는 문제점이 있다. 또한, 예를 들어 HIV와 같은 감염성 질병 진단 시 혈액 속에 항원이 극소량 존재하기 때문에, 이와 같은 종래의 진단 키트는 민감성이 낮을 수밖에 없는 한계를 지닌다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0004] (특허문헌 0001) PCT 국제공개 WO 2008/029981
 (특허문헌 0002) PCT 국제공개 WO 2008/108510
 (특허문헌 0003) PCT 국제공개 WO 2001/095784
 (특허문헌 0004) PCT 국제공개 WO 2010/047448
 (특허문헌 0005) PCT 국제공개 WO 2012/044938

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 따라서, 본 발명은 이와 같은 종래의 진단 키트의 문제점을 해결할 수 있도록 항체를 진단 인자로 활용한 진단 키트를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명의 대표적인 일 측면에 따르면, (A) 샘플 패드 영역, (B) 혈액 진행 방향을 기준으로 상기 샘플 패드 영역 후단에 위치한 결합 패드 영역, (C) 혈액 진행 방향을 기준으로 상기 결합 패드 영역 후단에 위치한 혈액 전개 막, (D) 혈액 진행 방향을 기준으로 상기 혈액 전개 막 후단에 위치하는 흡수 패드 영역을 포함하는 진단 키트로서, 상기 혈액 전개 막은 표면에 (c1) 테스트 라인과 (c2) 컨트롤 라인을 포함하고, 상기 결합 패드 영역은 표시된 글로불린 항체와 타겟 항체와 특이적 결합을 할 수 있는 바이오티닐 웹타이드 및 상기 타겟 항체와 특이적 결합을 할 수 있는 발색 웹타이드를 포함하며, 상기 테스트 라인에는 스트렙타비딘이 고정되어 있고, 상기 컨트롤 라인에는 글로불린 항체가 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 타겟 질환 진단용 키트에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0007] 본 발명의 여러 구현예에 따르면, 혈액 내에 존재하는 다양한 자가면역 항체들에 대해 질병 특이적인 자가면역 항체를 선별해 낼 수 있을 뿐만 아니라, 종래의 진단 키트보다 크게 향상된 민감성을 지니는 효과를 보인다.

도면의 간단한 설명

- [0008] 도 1은 종래 항원을 진단 인자로 활용한 기존 키트의 개략도이다.
 도 2는 본 발명의 일 구현예에 따라 항체를 진단 인자로 활용한 진단 키트의 개략도이다.
 도 3은 본 발명의 일 구현예에 따른 진단 키트를 위와 옆에서 각각 바라본 평면도와 측면도이다.
 도 4는 본 발명의 일 구현예에 따른 진단 키트의 작동 상태를 설명하기 위한 개략도이다. 즉, 테스트 라인과 컨트롤 라인 모두 짙은 색의 띠가 형성되면 혈액 시료에 검출 한계 이상의 타겟 항체가 포함된 것으로 진단되며, 컨트롤 라인에만 짙은 색 띠가 형성되면 혈액 시료에 타겟 항체의 농도가 검출 한계 미만으로 낮거나 존재하지 않는 것으로 진단된다. 또한, 테스트 라인과 컨트롤 라인 어느 곳에서도 짙은 색 띠가 형성되지 않으면 본 발명에 따른 진단의 기초가 되는 특이적 결합이 어떠한 이유로 실패되었음을 의미하는 것으로 진단이 잘못되었거나 또는 해당 키트의 작동에 문제가 있다고 해석될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0009] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.
 [0010] 특정 질병에 걸린 환자에게서는 해당 질병에 대한 자가면역 항체가 체내에 생성되어 존재하게 된다. 본 발명은 이러한 환자의 혈액 내에 존재하며 질병의 유무를 판별할 수 있는 자가면역 항체의 존재 여부를 확인하고 이를 활용함으로써 질병을 진단할 수 있는 키트에 관한 것이다.

- [0011] 즉, 종래 진단 기술은 혈액 내에 존재하는 다양한 자가면역 항체들에 대해서 질병 특이적인 자가면역 항체를 선별해 내지 못한다. 이는 기존 진단 키트의 ELISA 방법에서 사용되는 anti-human IgG 항체가 무작위적으로 혈액 내 자가면역 항체와 결합하므로 생기는 문제이다. 본 발명에서는 혈액 내 특정 자가면역 항체만을 선별해 낼 수 있는 새로운 진단 키트 시스템을 제공하고, 또한 진단 키트가 잘 작동이 되었는지 쉽게 판별이 가능한 시각화 시스템을 제공하고자 한다.
- [0012] 본 발명의 일 측면은 (A) 샘플 패드 영역, (B) 혈액 진행 방향을 기준으로 상기 샘플 패드 후단에 위치한 결합 패드 영역, (C) 혈액 진행 방향을 기준으로 상기 결합 패드 후단에 위치한 혈액 전개 막 영역, (D) 혈액 진행 방향을 기준으로 상기 혈액 전개 막 후단에 위치하는 흡수 패드 영역을 포함하는 진단 키트로서, 상기 혈액 전개 막은 표면에 (c1) 테스트 라인과 (c2) 컨트롤 라인을 포함하고, 상기 결합 패드 영역은 표지된 글로불린 항체와 타겟 항체와 특이적 결합을 할 수 있는 바이오티닐 펩타이드 및 상기 타겟 항체와 특이적 결합을 할 수 있는 발색 펩타이드를 포함하며, 상기 테스트 라인에는 스트렙타비딘이 고정되어 있고, 상기 컨트롤 라인에는 글로불린 항체가 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 타겟 질환 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0013] 즉, 본 발명에 따른 진단용 키트는 네 개의 다공질 막 또는 패드로 이루어지며, 이러한 네 개의 막은 각각 샘플 패드, 결합 패드, 혈액 전개용 막(예: 니트로셀룰로오스 막), 흡수 패드이다.
- [0014] 위 네 개의 다공성 막은 도 3과 같이 플라스틱 또는 유리 지지막 위에 고정되어 진단용 키트를 구성할 수 있고, 이때 상기 샘플 패드, 결합 패드, 혈액 전개 막, 흡수 패드는 혈액 전개가 끊이지 않고 유지될 수 있도록 각각의 끝부분을 조금씩, 예를 들어 서로 3 mm씩 겹치도록 고정할 수도 있다.
- [0015] 샘플 패드 영역은 글로불린과 타겟 항체를 포함하는 환자의 혈액이 수용되는 영역으로, 버퍼시약 등을 미리 처리할 수도 있다. 이렇게 샘플 패드 영역에 수용된 혈액은 전개되면서 순차적으로 결합 패드, 혈액 전개 막, 그 위에 형성되어 있는 테스트 라인과 컨트롤 라인(또는 컨트롤 라인과 테스트 라인)을 통과하여, 흡수 패드에 도달하게 된다.
- [0016] 결합 패드 영역에는 표지된 글로불린 항체와 상기 타겟 항체와 특이적 결합을 할 수 있는 바이오티닐 펩타이드 및 상기 타겟 항체와 특이적 결합을 할 수 있는 발색 펩타이드가 포함되어 있다. 전개되는 혈액 내 상기 글로불린은 상기 표지된 글로불린 항체와 결합하게 되고, 상기 타겟 항체는 2개의 펩타이드와 결합할 수 있기 때문에 첫째 2개의 상기 바이오티닐 펩타이드와 결합할 수도 있고, 둘째 2개의 상기 발색 펩타이드와 결합할 수도 있으며, 또는 셋째 상기 바이오티닐 펩타이드 및 상기 발색 펩타이드 모두와 결합할 수도 있다.
- [0017] 테스트 라인은 스트렙타비딘이 결합되어 있어서, 이 라인을 통과하는 위 3종류의 타겟 항체 중에 2개의 바이오티닐 펩타이드와 결합한 타겟 항체와 바이오티닐 펩타이드와 발색 펩타이드 모두와 결합한 타겟 항체가 이 라인에 고정되게 되며, 특히 이 중에서 바이오티닐 펩타이드와 발색 펩타이드 모두와 결합한 타겟 항체의 발색 펩타이드 영역이 발색하면서 라인이 관찰될 수 있다.
- [0018] 컨트롤 라인에는 글로불린 항체가 고정되어 있으며, 이 라인을 통과하는 발색 글로불린 항체와 결합한 글로불린이 상기 글로불린 항체와도 결합하게 되고, 상기 발색 글로불린 항체 영역이 발색하면서 라인이 관찰될 수 있다.
- [0019] 흡수 패드 영역은 혈액 전개 막을 통과하여 흘러온 혈액 시료의 저장소 역할을 한다.
- [0020] 일 구현예에 따르면, 상기 타겟 항체는 자가면역 항체이고, 상기 타겟 질환은 자가면역 질환이다.
- [0021] 이와 같이 본 발명은 특정한 타겟 질환으로 인해 생성되고 혈액 내에 포함되어 있는 타겟 항체를 진단 타겟으로 삼고 있다. 예를 들어, 자가면역 질환을 앓고 있는 환자의 혈액 내에는 자가면역 항체가 포함되어 있고, 본 발명에서 자가면역 질환을 타겟으로 하는 경우 이와 같은 자가면역 항체가 타겟 항체가 된다.
- [0022] 다른 구현예에 따르면, 상기 컨트롤 라인은 혈액 진행 방향을 기준으로 상기 테스트 라인 후단에 위치한다.
- [0023] 또 다른 구현예에 따르면, 상기 바이오티닐 펩타이드의 바이오티닐을 제외한 영역과 상기 발색 펩타이드의 발색단을 제외한 영역은 서로 동일하거나 상이할 수 있으며, 다만 두 영역 모두 상기 타겟 항체와 특이적으로 결합할 수 있는 펩타이드 에피토프를 포함한다. 이와 같이, 하나의 자가면역 항체는 두 개의 펩타이드 에피토프와 결합할 수 있다는 특징을 이용하여, 본 발명에서는 각각 발색이 가능하고 바이오티닐로 인하여 특정 위치에서 결합이 가능하도록 표지하여 진단 키트를 구성하고 있다.

- [0024] 컨트롤 라인 발색 여부에 의해 혈액이 제대로 전개하는지 등 키트 제품의 정상적 작동 여부를 체크할 수 있는데, 또 다른 구현예에 따라 테스트 라인을 지나 컨트롤 라인까지 혈액이 전개되었는지 체크하기 위해서는 테스트 라인보다는 혈액 전개 방향 후단에 위치하는 것이 바람직하지만, 반드시 그러한 위치가 필수적인 것은 아니며 때에 따라 테스트 라인 전단에 위치할 수도 있는 경우가 배제되는 것은 아니다.
- [0025] 이하에서는, 도면을 참조하여 본 발명의 일부 구현예를 더욱 상세히 설명하며, 다만 이하의 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위해 예시로 제조되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 범위나 내용이 제한되어서는 안 된다.
- [0026] 도 1은 기존 진단 키트는 항원을 지표로 하여 진단하는 키트에 관한 개략도로서, 이러한 진단 키트는 크게 나이트로셀룰로스 막과 3개의 패드(샘플 패드, 결합 패드, 흡수 패드) 및 테스트 라인과 컨트롤 라인으로 구성된다. 나이트로셀룰로스 막은 혈액을 흡수 패드까지 전개해주는 전개용 매질 역할을 하며, 샘플 패드는 환자의 혈액이 떨어지면 이를 받아 주는 역할을 한다.
- [0027] 기존 진단 키트의 결합 패드는 혈액 속 항원에 대한 발색 항체와 발색 스트렙타비딘으로 구성되며, 테스트 라인은 혈액 속 항원에 대한 항체가, 컨트롤 라인에는 스트렙타비딘과 결합하는 바이오틴이 고정되어 있다.
- [0028] 혈액이 떨어지면 그 안에 항원이 샘플 패드로 들어가고 결합 패드로 이동한다. 결합 패드에서 항원은 해당 항원에 대한 발색 항체와 결합하며, 결합 패드에 있는 발색 스트렙타비딘과 함께 테스트 라인으로 이동한다.
- [0029] 발색 항체와 결합된 혈액 내 항원 복합체는 테스트 라인에 고정되어 있는 항원에 대한 항체와 결합하여 샌드위치 형태로 고정되고 항원의 유무가 선을 통해 나타난다. 발색 스트렙타비딘은 컨트롤 라인에서 고정되어 있는 바이오틴과 결합하여 선으로 나타나고, 이를 통해 정상 작동 여부를 판단한다.
- [0030] 도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 진단용 키트에 대한 개략도로서, 크게 나이트로셀룰로스 막과 3개의 패드(샘플 패드, 결합 패드, 흡수 패드), 테스트 라인과 컨트롤 라인으로 구성된다는 점은 기존 진단용 키트와 크게 다르지 않다.
- [0031] 다만, 기존 진단용 키트와 다른 점은 결합 패드와 테스트 라인, 컨트롤 라인에 포함되어 있는 구성 성분인데, 우선 결합 패드에는 자가면역 항체에 결합하는 발색 펩타이드와 바이오티닐 펩타이드, 그리고 글로불린과 결합하는 표지 글로불린 항체가 존재한다.
- [0032] 흡수 패드는 나이트로셀룰로스에 의해 전개된 남은 혈액을 담는 역할을 하고, 테스트 라인은 바이오틴과 결합할 수 있는 스트렙타비딘이 고정되어 있으며, 컨트롤 라인에는 글로불린 항체가 고정되어 있다.
- [0033] 환자의 혈액이 샘플 패드에 떨어지면 혈액 속의 질병 특이적으로 존재하는 자가면역 항체와 모든 사람에게 있는 글로불린이 결합 패드로 이동하게 된다.
- [0034] 결합 패드에서는 자가면역 항체만이 펩타이드와 특이적으로 결합하며 글로불린은 표지된 글로불린 항체와 결합한다. 하나의 자가면역 항체는 두 개의 펩타이드와 결합할 수 있기 때문에 발색 펩타이드 두 개와 결합한 자가면역 항체, 바이오닐 펩타이드 두 개와 결합한 자가면역 항체, 발색 펩타이드와 바이오닐 펩타이드와 결합된 자가면역 항체 3가지 종류의 결합의 경우가 나타난다.
- [0035] 혈액은 테스트 라인을 거치게 되며 바이오틴은 고정되어 있는 스트렙타비딘과 특이적 결합을 하고 나머지는 지나간다. 발색 펩타이드, 바이오티닐 펩타이드와 각각 결합한 자가면역 항체는 바이오틴에 의해 테스트 라인에 고정되며 발색 펩타이드에 의해 선이 나타난다.
- [0036] 질병 특이적 자가면역 항체가 없는 정상인의 경우 발색 펩타이드가 테스트 라인에 고정될 수 없으므로 테스트 라인에서는 선이 나타나지 않는다. 글로불린에 대한 항체가 고정되어 있는 컨트롤 라인에서는 발색 글로불린 항체와 결합한 글로불린이 결합하게 되고 발색 글로불린 항체에 의해 선이 나타난다.
- [0037] 이용자는 컨트롤 라인을 통해서 혈액이 정상적으로 전개되었는지 확인할 수 있으며, 이를 통해 제품의 불량성과 작동 여부를 확인할 수 있다. 이용자는 선의 유무를 통해 혈액 내 자가면역 항체의 유무를 확인할 수 있고, 이를 통해 질병을 판별할 수 있다.
- [0038] 이와 같이, 기존 진단용 키트와 본 발명의 일 구현예에 따른 진단용 키트의 차이점 중 하나는 테스트에 이용될 지표와 테스트 라인과 컨트롤 라인에서의 결합 원리이다. 본 발명의 일 구현예에 따른 진단용 키트는 혈액 속

항원을 키트의 지표로 이용하는 것이 아니라, 자가면역 항체를 지표로 이용하며, 혈액 속 글로불린을 이용하여 키트의 작동 여부를 파악한다.

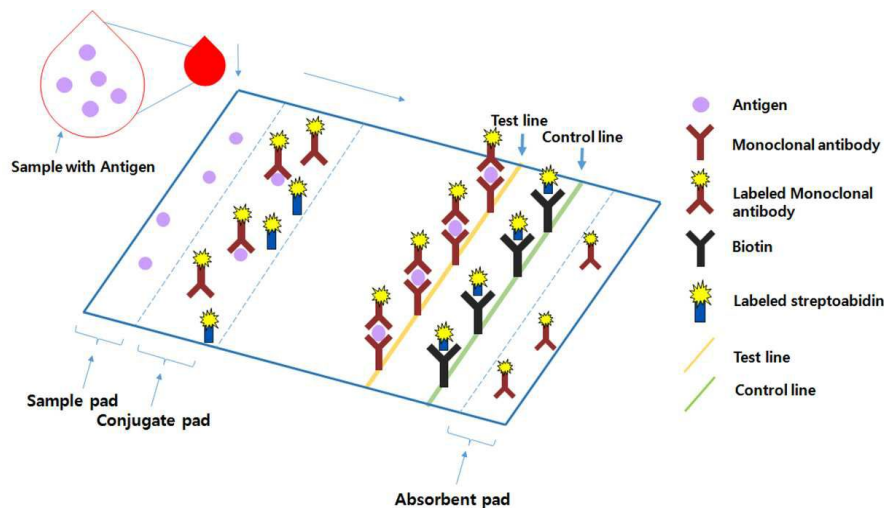
[0039] 항체는 특정 항원에 대해 B세포가 만든 방어 기작으로 항원에 비해서 훨씬 민감성이 크다. 따라서 HIV 같은 감염성 질병 진단 시 혈액 속에 극소량 존재하는 항원 대신 민감성이 큰 항체를 사용하며, 이로 인해 테스트 라인의 결합 원리는 기존의 항원을 지표로 사용하는 키트와는 매우 다르다.

[0040] 또한, 임신 진단 키트의 테스트 라인은 샌드위치 ELISA 방식 즉, 두 가지 항체를 이용한 항원의 판단하는 방법을 이용한다. 하지만 본 발명의 일 구현예에 따른 진단용 키트는 자가면역 항체를 측정하기 위해 자가면역 항체의 구조적 특징(결합 부위가 2개인 점)을 이용하였고, 한 쪽은 발색을, 다른 한 쪽은 고정을 담당하는 펩타이드를 결합시켜 자가면역 항체의 여부를 선으로 나타나게 하였다.

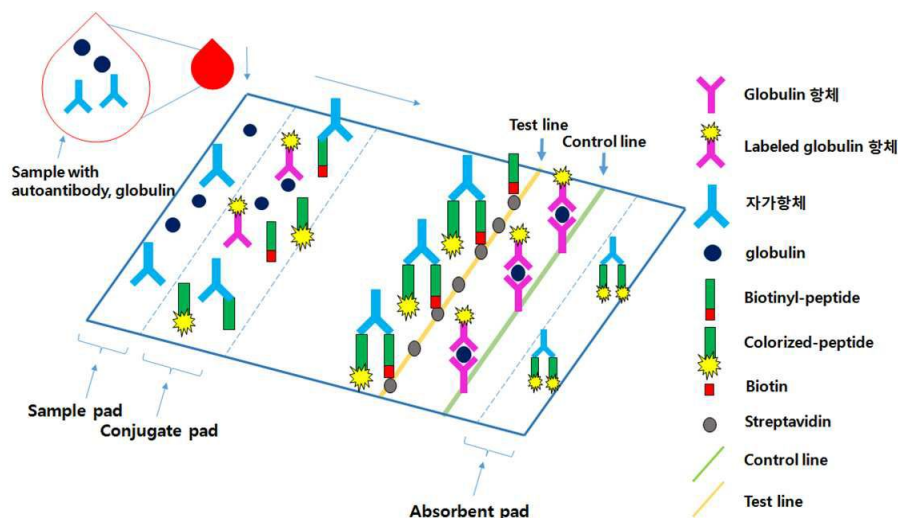
[0041] 본 발명품의 컨트롤 라인 결합원리 역시 다르다. 임신 진단 키트는 결합 패드 속에 존재하는 발색 스트렙타비딘과 컨트롤 라인의 바이오틴의 결합을 이용하여 단순 액체의 흐름 여부로 정상작동을 판단한다. 반면, 본 발명의 일 구현예에 따른 진단용 키트의 컨트롤 라인은 혈액 속에 존재하는 글로불린 항원을 이용하여 혈액의 흐름에 대한 직접적인 판별로 키트의 작동여부를 정확하게 판단할 수 있게 하였다.

도면

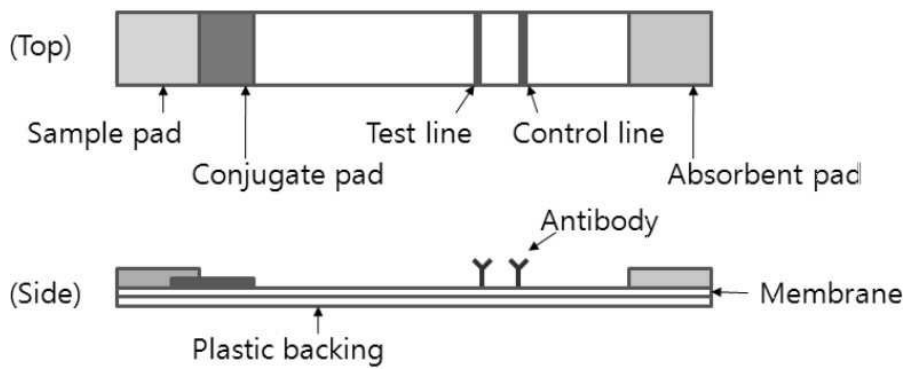
도면1



도면2



도면3



도면4

