



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년06월16일

(11) 등록번호 10-2543773

(24) 등록일자 2023년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61B 10/00 (2006.01) B01L 3/00 (2023.01)

G01N 33/487 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61B 10/0045 (2019.05)

B01L 3/502 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7009473

(22) 출원일자(국제) 2017년08월31일

심사청구일자 2020년08월31일

(85) 번역문제출일자 2019년04월02일

(65) 공개번호 10-2019-0043598

(43) 공개일자 2019년04월26일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/049689

(87) 국제공개번호 WO 2018/045208

국제공개일자 2018년03월08일

(30) 우선권주장

62/383,234 2016년09월02일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

US20120080592 A1*

JP2012528320 A*

JP2012519847 A*

US20120053065 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

더 보드 오브 리첸츠 오브 더 유니버시티 오브 텍
사스 시스템

미국, 텍사스 78701, 오스틴, 210 웨스트 7 스트
리트

(72) 발명자

에버린 리비아 스치아비나토

미국 텍사스 78752 오스틴 웨스트 호텔 스트리트
201

밀너 토마스

미국 텍사스 78621 엘긴 에프엠 1704 1800

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 32 항

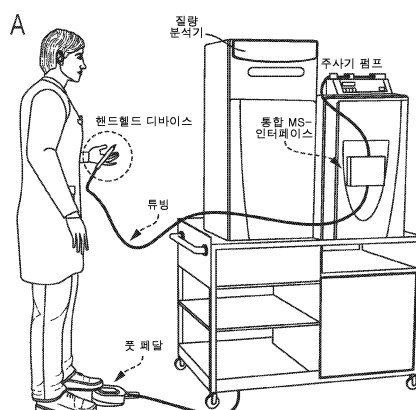
심사관 : 장기완

(54) 발명의 명칭 수집 프로브 및 이들의 사용 방법

(57) 요약

방법 및 디바이스는 분자 분석을 사용하여 피험자의 복수의 조직의 부위들로부터의 조직 샘플을 평가하기 위해 제공된다. 특정 양태에서, 실시예의 디바이스는 액체 조직 샘플의 수집 및 질량 분석을 위한 샘플의 전달을 허용한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

G01N 33/487 (2013.01)

G01N 33/6848 (2013.01)

B01L 2200/0605 (2013.01)

B01L 2400/0655 (2013.01)

G01N 2560/00 (2013.01)

(72) 발명자

장 지아령

미국 텍사스 78741 오스틴 에이피티. 3314 크로싱
플레이스 1300

린 존

미국 텍사스 77059 휴스턴 로키 오크 코트 15410

렉터 존

미국 텍사스 75229 댈러스 원더랜드 11050

카타 니테쉬

미국 텍사스 78705 오스틴 에이피티. 202 웨스트
29번가 203

자혜디바쉬 아이딘

미국 텍사스 78750 오스틴 페퍼빈 코브 6902

(30) 우선권주장

62/462,524 2017년02월23일 미국(US)

62/411,321 2016년10월21일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

장치에 있어서,

용매(solvent)를 포함하는 챔버;

질량 분석기(mass spectrometer);

저장소(reservoir), 제 1 도관, 제 2 도관 및 제 3 도관을 포함하는 프로브로서,

상기 저장소는 상기 제 1 도관, 상기 제 2 도관 및 상기 제 3 도관과 유체 연통하며;

상기 제 1 도관은 상기 챔버와 상기 저장소 사이에 유체 연통(fluid communication)을 제공하도록 구성되며;

상기 제 2 도관은 가스 공급원과 상기 저장소 사이에 유체 연통을 제공하도록 구성되며;

상기 제 3 도관은 질량 분석기와 상기 저장소 사이에 유체 연통을 제공하도록 구성되며,

상기 제 1, 제 2 및 제 3 도관들은 각각 상기 저장소에 각각의 종단부(terminus)를 포함하는, 상기 프로브; 및

제어 시스템으로서,

상기 챔버로부터 상기 제 1 도관을 통해 상기 저장소로의 용매 흐름; 및

상기 저장소로부터 상기 제 3 도관을 통해 상기 질량 분석기로 샘플 흐름을 제어하도록 구성된, 상기 제어 시스템을 포함하는, 장치.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 장치는 이온화 소스와 독립적으로 작동하도록 구성되는, 장치.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 프로브는 핸드 헬드(hand-held)로 구성된 하우징을 포함하는, 장치.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 프로브는 복강경 수술 디바이스에 결합되도록 구성된 하우징을 포함하는, 장치.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 저장소는 상기 용매의 액적(droplet)을 형성하고 보유하도록 구성되는, 장치.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 가스 공급원은 공기, 질소 또는 이산화탄소를 상기 프로브에 제공하는, 장치.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 챔버는 이산 용적의 용매를 상기 챔버로부터 상기 제 1 도관으로 전송하도록 구성된 펌프에 연결되는, 장치.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 펌프는 상기 용매를 상기 제 1 도관을 통해 상기 저장소로 펌프하도록 구성되는, 장치.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 저장소는 상기 용매를 노출시켜 조직 부위(tissue site)와 직접 접촉하도록 구성되는, 장치.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 제 3 도관으로부터 상기 질량 분석기로의 흐름을 제어하도록 구성된 제 1 밸브를 더 포함하는, 장치.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 제 3 도관은 상기 제 1 밸브가 개방 위치에 있을 때 진공에 결합되는, 장치.

청구항 16

제 14 항에 있어서, 상기 제 2 도관을 통하여 가스의 흐름을 제어하도록 구성된 제 2 밸브를 더 포함하는, 장치.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

제 1 항에 있어서, 상기 용매는 1 내지 25% 에탄올을 포함하는 수용성 혼합물을 포함하는, 장치.

청구항 21

삭제

청구항 22

제 1 항에 있어서, 상기 프로브는 배출될 수 있는 수집 팁(collection tip)을 포함하는, 장치.

청구항 23

제 1 항에 있어서, 상기 저장소는 5.0 와 20 마이크로리터 사이의 용적을 갖는, 장치.

청구항 24

제 1 항에 있어서, 상기 프로브는 상기 프로브의 위치를 추적하도록 구성된 추적 디바이스(tracking device)를 포함하는, 장치.

청구항 25

삭제

청구항 26

제 1 항에 있어서, 상기 제어 시스템은,

1초 내지 3초의 시간 기간 동안 200 내지 400 마이크로리터/분의 유량(flow rate)으로 용매 흐름을 제어하고;

10초에서 15초 사이의 시간 기간 동안 상기 샘플 흐름을 제어하도록 구성된, 장치.

청구항 27

제 1 항에 있어서, 상기 제어 시스템은 상기 용매 흐름을 개시하는 페달을 포함하는, 장치.

청구항 28

제 1 항에 있어서, 상기 질량 분석기는 샘플 분석을 제공하도록 구성된 컴퓨터와 전자 통신하는, 장치.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 상기 컴퓨터는 상기 샘플 분석의 시각적 또는 청각적 판독 값을 제공하도록 구성되는, 장치.

청구항 30

제 1 항에 있어서, 상기 제 3 도관과 유체 연통하는 폐액 용기를 더 포함하는, 장치.

청구항 31

제 30 항에 있어서, 샘플 흐름을 상기 제 3 도관으로부터 상기 폐액 용기로 분기(diverge) 시키도록 구성된 밸브를 더 포함하는, 장치.

청구항 32

삭제

청구항 33

제 1 항에 있어서, 상기 제 3 도관과 유체 연통하는 펌프를 더 포함하는, 장치.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 상기 펌프는 상기 제 3 도관 내의 샘플 흐름 속도를 제어하도록 구성되는, 장치.

청구항 35

제 1 항에 있어서, 상기 제 3 도관에 결합된 가열 소자를 더 포함하는, 장치.

청구항 36

제 35 항에 있어서, 상기 가열 소자는 열선을 포함하는, 장치.

청구항 37

제 1 항에 있어서, 상기 제 3 도관과 유체 연통하는 이온화 디바이스를 더 포함하는, 장치.

청구항 38

제 37 항에 있어서, 상기 이온화 디바이스는 전자 분무 이온화 (ESI : electrospray ionization) 디바이스인, 장치.

청구항 39

제 37 항에 있어서, 상기 이온화 디바이스는 대기압 화학적 이온화 (APCI : atmospheric pressure chemical ionization) 디바이스인, 장치.

청구항 40

제 37 항에 있어서, 상기 이온화 디바이스는 상기 질량 분석기의 입구에 근접하여 분무를 형성하도록 구성되는, 장치.

청구항 41

삭제

청구항 42

제 1 항에 있어서, 상기 제 3 도관과 유체 연통하는 벤투리 디바이스(venturi device)를 더 포함하는, 장치.

청구항 43

제 1 항에 있어서, 상기 장치는 초음파 또는 진동 에너지의 인가를 위한 디바이스와 독립적으로 작동하도록 구성되는, 장치.

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 출원은 2016 년 9 월 2 일자로 출원된 미국 가특허 출원 제 62/383,234; 2016 년 10 월 21 일자로 출원된 62/411,321; 및 2017년 2월 23일자로 출원된 62/462,524의 이익을 주장하고, 이들 각각은 그 전체가 본 출원에 참고로서 통합된다.
- [0002] 본 발명은 국립 보건원 (National Institutes of Health)이 수여한 No. R00 CA190783의 보조금으로 정부의 지원을 받아 수행되었다. 정부는 발명에 대해 특정 권리를 가지고 있다.
- [0003] 기술 분야
- [0004] 본 발명은 전반적으로 의학, 분자 생물학 및 생화학 분야에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 질량 분석법을 사용하여 조직 샘플을 평가하는 방법 및 디바이스에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 임상 진단은 통상 환자의 치료 과정의 여러 단계에서 수술 전, 수술 중, 수술 후 조직 샘플 평가를 통해 수행된다. 조직 평가는 암 환자의 진단 및 관리에 매우 중요하다. 예를 들어, 절개된 조직의 수술 중 병리학적 평가는 다양한 암 수술에서 진단 및 수술 마진(margin) 평가를 위해 일상적으로 수행된다. 절제된 조직 검체들은 조직 준비, 염색 및 평가를 위해 흔히 "냉동실(frozen room)"이라고 하는 근처 방으로 보내진다. 조직 검체는 수술 마진에 암 세포가 있는지 (양의 마진(positive margin)) 또는 없는지 (음의 마진(negative margin))를 주의 깊게 평가하는 전문가 병리학자가 광학 현미경을 사용하여 동결, 절편, 염색 및 정보를 얻는다(interrogate). 수술 중 동결 절편 분석(intraoperative frozen section analysis)은 수십 년 동안 임상에서 수행되었지만 많은 어려움이 있다. 동결 아티팩트(freezeing artifact)는 조직 처리 중에 발생하며 조직 구조 및 세포 형태를 방해하여 병리학적 해석을 복잡하게 한다. 게다가, 특정 종양 세포는 성장 및 형상의 비정형 패턴으로 인해 인식하기가 매우 어렵다. 분자 접근법은 조직 샘플에 대해 매우 정확하고 잠재적으로 실시간 평가를 제공할 수 있다. 그러나, 지금까지 적절한 조직 샘플의 효과적인 분자 평가를 제공하는 디바이스 또는 방법이 개발되지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0006] 제 1 실시예에서, 질량 분석 프로파일을 획득하기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은, 고정 또는 이산 용적의 용매를 분석 부위(예를 들어, 조직 부위)에 인가하기 위해 프로브를 사용하는 단계; 상기 액체 샘플을 획득하는 데 상기 인가된 용매를 수집하기 위해 상기 프로브를 사용하는 단계; 및 상기 액체 샘플에 질량 분석법 분석을 행하는 단계를 포함한다. 추가 실시예에서 조직 샘플들을 평가하기 위한 방법이 제공되고, 상기 방법은 피험자의 복수의 조직 부위로부터 복수의 액체 샘플을 획득하는 단계 및 상기 복수의 액체 샘플에 질량 분석을 행하는 단계를 포함한다.

- [0007] 또 다른 실시예는 질량 분석법 분석을 위해 샘플(예를 들어, 조직으로부터)을 획득하기 위한 장치를 제공하며, 상기 장치는: 용매를 포함하는 챔버; 가압 가스 공급원; 질량 분석기; 저장소, 제 1 도관, 제 2 도관 및 제 3 도관을 포함하는 프로브로서, 상기 저장소는 상기 제 1 도관, 상기 제 2 도관 및 상기 제 3 도관과 유체 연통하며; 제 1 (용매) 도관은 챔버와 유체 연통하며; 제 2 (가스) 도관은 가압 가스 공급원과 유체 연통하며; 제 3 (수집) 도관은 질량 분석기와 유체 연통한다. 추가의 양태에서, 질량 분석기는 샘플 분석을 제공하는 컴퓨터와 통신한다. 특정 양태에서, 각 샘플 분석의 결과는 컴퓨터로부터의 시각 또는 청각 출력에 의해 제공된다. 예를 들어, 컴퓨터에 의한 각 시료 분석의 결과는 조명되어 다른 색상의 빛 또는 생성된 다른 주파수의 사운드에 의해 표시될 수 있다. 일부 양태에서, 질량 분석기는 모바일 질량 분석기이다. 또 다른 양태에서, 질량 분석기는 무정전 파워 서플라이(예를 들어, 배터리 파워 서플라이)를 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 질량 분석기는 기구 진공을 유지하도록 폐쇄 될 수 있는 입구를 포함한다. 또 다른 양태에서, 질량 분석기는 메쉬 필터 (예를 들어, 오염을 차단하기 위해)에 의해 프로브로부터 분리된다.
- [0008] 일부 양태들에서, 저장소는 용매의 액적을 형성하도록 구성된다. 특정 양태에서, 가압 가스 공급원은 0.1 psig 내지 5.0 psig 의 압력에서 프로브에 가스를 제공한다. 추가의 양태에서, 가압 가스 공급원은 0.5 psig 내지 2.5 psig 의 압력에서 프로브에 가스를 제공한다. 몇몇 양태들에서, 가압 가스 공급원은 프로브에 공기를 제공한다. 다른 양태에서, 가압 가스 공급원은 질소 또는 이산화탄소와 같은 불활성 가스를 프로브에 제공한다.
- [0009] 추가의 양태에서, 상기 디바이스는 챔버로부터 제 1 도관으로 용매를 전송하도록 구성된 펌프를 더 포함한다. 추가의 양태에서, 상기 디바이스는 제 3 도관으로부터 질량 분석기로의 흐름을 제어하도록 구성된 제 1 밸브를 포함할 수 있다. 일부 양태들에서, 제 3 밸브는 제 1 밸브가 개방 위치에 있을 때 진공 상태에 있다. 다른 양태에서, 상기 디바이스는 제 2 도관을 통해 가압된 가스의 흐름을 제어하도록 구성된 제 2 밸브를 포함할 수 있다.
- [0010] 특정 양태에서, 용매는 물 및/또는 에탄올을 포함할 수 있다. 여러 양태에서, 프로브는 폴리디메틸실록산 (PDMS) 및/또는 폴리테트라플루오르에틸렌 (PTFE)으로 형성된다. 일부 양태에서, 상기 프로브는 일회용이다. 특정 양태에서, 프로브는 배출 가능한(예를 들어, 프로브로부터 배출될 수 있음) 수집 팁을 포함할 수 있다. 추가 양태에서, 프로브는 프로브의 위치를 추적하도록 구성된 추적 디바이스를 포함한다. 일부 양태에서, 저장소는 1 마이크로리터 내지 500 마이크로리터, 약 1 마이크로리터 내지 100 마이크로리터 또는 약 2 마이크로리터 내지 50 마이크로리터의 용적을 갖는다. 추가 양태에서, 저장소는 5.0 마이크로리터와 20 마이크로리터 사이의 용적을 갖는다.
- [0011] 또 다른 양태에서, 상기 디바이스는 : 제 1 도관을 통해 상기 챔버로부터 상기 저장소로 용매 흐름 (예를 들어, 용매의 고정 또는 이산 용적의 흐름); 상기 가압 가스 공급원으로부터 상기 제 2 도관을 통해 상기 저장소로 가압된 가스 흐름; 및 상기 저장소로부터 상기 제 3 도관을 통해 상기 질량 분석기로 샘플 흐름을 제어하도록 구성된 제어 시스템을 더 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 제어 시스템은 1 내지 3 초 사이의 시간 기간 동안 100 내지 5000 마이크로리터/분 (예를 들어, 200 내지 400 마이크로리터/분)의 유량으로 용매 흐름을 제어하고; 10 내지 15 초 사이의 시간 기간 동안 1 내지 10 psig의 유량으로 가압된 가스 흐름을 제어하고; 10 초에서 15 초 사이의 시간 기간 동안 샘플 흐름을 제어 할 수 있다. 예를 들어, 일부 양태들에서, 제어 시스템은 용매 흐름을 개시하기 위한 트리거 또는 버튼을 포함한다. 추가의 양태에서, 제어 시스템은 용매 흐름을 개시하기 위한 페달 (즉, 발 동작에 의해 조작될 수 있는)을 포함한다. 숙련된 당업자는 제 1 및/또는 제 2 도관의 길이가 시스템의 특정 사용에 적합하도록 조정될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 또 다른 양태에서, 제어 시스템은 챔버로부터 제 1 도관을 통해 저장소로 용매 흐름 (예를 들어, 고정된 시간 기간 동안의 유량)을 제어하도록 구성된다. 추가의 양태에서, 실시예의 장치는 초음파 또는 진동 에너지를 생성 하기 위한 디바이스 (예를 들어, 조직을 파괴 시키기에 충분한 양에)를 포함하지 않는다.
- [0012] 피험자(subject)로부터의 조직 샘플을 평가하는 방법이 추가 실시예가 제공되고, 상기 방법은 상기 피험자의 조직 부위에 용매를 인가하는 단계; 상기 액체를 수집하여 액체 샘플을 획득하는 단계, 및 상기 샘플에 질량 분석법 분석을 행하는 단계(subjecting)를 포함한다. 특정 양태에서, 용매는 멸균일 수 있다. 일부 양태에서, 용매는 약학적으로 허용 가능한 제제 이다. 특정 양태에서, 용매는 수용액이다. 예를 들어, 용매는 멸균수이거나 본질적으로 물로 이루어질 수 있다. 다른 양태에서, 용매는 약 1% 내지 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 또는 30%의 알코올을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 용매는 0.1 내지 2%의 알코올, 1 내지 10%의 알코올 또는 1 내지 5% 1 내지 10%의 알코올 (예를 들어, 에탄올)을 포함한다. 어떤 경우에는 알코올이 에탄올일 수 있다.
- [0013] 일부 양태에서, 상기 조직에 용매를 인가하는 단계는 조직 부위에 용매의 이산 용적(volume)을 인가하는 단계를

포함한다. 일부 양태에서, 용매는 단일 액적으로 인가된다. 추가의 양태에서, 용매는 제 1 내지 10의 이산 수의 액적으로 인가된다. 일부 실시예에서, 용매는 가압된 가스와 무관한 채널을 통해 저장소로부터 샘플에 인가된다. 추가 실시예에서, 용매는 저압하에서 샘플에 인가된다. 예를 들어, 일부 측면에서, 용매는 기계적 펌프에 의해 인가되어 용매는 최소의 힘으로 조직 부위에 인가되어 (예를 들어, 조직 부위와 접촉하는 저장소로 이동됨) 조직 부위에 최소의 압력을 발휘한다 (및 최소의 손상을 야기한다). 저압은 100 psig 미만, 90 psig 미만, 80 psig 미만, 70 psig 미만, 60 psig 미만, 50 psig 미만 또는 25 psig 미만일 수 있다. 일부 실시예에서, 저압은 약 0.1 psig 내지 약 100 psig, 약 0.5 psig 내지 약 50 psig, 약 0.5 psig 내지 약 25 psig, 또는 0.1 psig 내지 약 10 psig이다. 특정 양태에서, 이산 용매 용적은 약 0.1 내지 100 μ L, 또는 약 1 내지 50 μ L 이다. 추가의 양태에서, 인가된 용매를 수집하는 단계는 인가 단계 후에 0.1 내지 30 초이다. 특정 양태에서, 인가된 용매를 수집하는 단계는 인가 단계 후 1 내지 10 초 (예컨대, 적어도 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 초) 이다. 추가의 양태에서, 실시 양태의 방법은 샘플 또는 조직에 초음파 또는 진동 에너지를 인가하는 단계를 포함하지 않는다. 일부 양태에서, 수술적으로 평가되는 내부 조직 부위의 조직 부위이다.

[0014] 또 다른 양태에 있어서, 실시예들의 방법은 용매 도관을 통하여 조직 부위로 (예를 들어, 기계적 펌프를 사용하여) 용매의 고정 또는 이산 용적을 인가하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 용매의 고정 또는 이산 용적은 용매 도관을 통해 그것이 조직 부위와 직접 접촉하는 저장소 (예를 들어, 0.5 내지 5.0 초 동안)로 이동된다. 추가의 양태에서, 인가된 용매를 수집하는 단계는 샘플을 수집 도관 내로 끌어 들이기 위해 부압을 인가하는 단계 및/또는 샘플을 수집 도관 내로 가압하기 위해 가스 압력을 인가하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 용매는 수집 도관과 별개인 용매 도관을 통해 인가된다. 가스 압력이 샘플을 수집 도관 내로 가압하도록 적용되는 추가의 양태에서, 가스 압력은 용매 도관 및 수집 도관으로부터 분리된 가스 도관을 통해 인가된다. 샘플을 수집 도관 내로 가압하기 위해 가스 압력이 가해지는 특정 양태에서, 100 psig 미만의 인가된 가스 압력. 예를 들어, 가스 압력은 바람직하게는 10 psig 미만, 예컨대 0.1 내지 5 psig이다. 또 다른 양태에서, 실시예의 방법은 평가되는 조직에 어떠한 검출 가능한 물리적 손상도 일으키지 않는 것으로 정의된다.

[0015] 또 다른 양태에서, 상기 방법은 추가로 복수의 조직 부위들로부터 복수의 액체 샘플을 수집하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에는, 전자 디바이스 (예를 들어, 프로브)는 각 샘플 수집 사이 세척된 샘플을 수집하는데 사용된다. 다른 양태에서, 샘플을 수집하는데 사용되는 디바이스는 각 샘플 수집 사이에 바뀌어질 수 있는 일회용 수집 팁 (프로브)을 포함한다. 특정 양태들에서, 수집 팁은 배출 가능할 수 있다 (예를 들어, 디바이스로부터 배출될 수 있다). 특정 양태에서, 복수의 조직 부위는 생체내 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 조직 부위를 포함한다. 또 다른 양태에서, 다수의 조직 부위는 수술로 절제된 조직의 섹션 (예를 들어, 생체외)을 둘러싸고 있다. 특정 양태에서, 절제된 조직은 종양이다. 일부 양태에서, 상기 방법은 수술중 (interoperative) 방법으로 정의 될 수 있다.

[0016] 추가 실시예는 샘플링된 조직 부위를 식별하는 방법 및 디바이스 (프로브) 조작자에게 부위의 위치를 전달하는 방법을 제공한다. 샘플링된 조직 부위의 식별은 조작자가 조직으로부터 수집된 분자를 샘플링 한 후에 한 번에 샘플링된 조직 부위에 기록된 분자 정보에 액세스할 수 있게 한다. 최소한 세 가지 유형의 식별 접근법이 인식된다. 제 1 접근법에서, 샘플링된 분자 정보를 식별하는 샘플링된 조직 부위에 외인성 재료가 부착된다. 제 2 접근법에서, 디바이스 (프로브)는 프로브 (디바이스)의 위치를 기록하고 분자 정보가 샘플링될 때 이미징 디바이스와 통신할 수 있도록 하는 추적 센서/에미터를 갖추고 있다. 제 3 접근법에서, 조직 영역은 조직 분자를 수확한 후에 해당 부위가 쉽게 식별될 수 있도록 변형된다. 제 1 접근법에서, 샘플링된 조직 부위에 부착될 수 있는 재료는 예를 들어, 봉합선, 외과용 클립, 조직에 부착되는 생체 적합성 폴리머 또는 용이하게 하는 판독 및 제거할 수 있는 자기 비드에 부착된 RFID 칩을 포함한다. 제 2 접근법 유형에서, 프로브는 RF 수술 추적 시스템의 일부인 RF 에미터, 수술 중 US 이미징 시스템의 일부인 초음파 에미터 또는 반사기를 포함할 수 있다. 이 제 2 접근법에서, 운영자가 조직 분자 수집을 시작하면, 추적 시스템은 디바이스와 통신할 수 있는 관련 이미징 시스템 (예를 들어, RF, US, CT, MRI)에 프로브 위치를 기록한다. 운영자는 샘플링된 부위의 위치를 운영자에게 표시할 수 있는 기록된 이미지(들)를 참조함으로써 나중에 샘플링된 조직 부위 중 임의의 것을 식별할 수 있다. 제 3 접근법에서, 조직이 변형된다. 이 제 3 접근법에서, 프로브와 통신하는 레이저 소스는 샘플링된 부위를 식별하는 조직으로 패턴을 절제 또는 응고 시키는데 사용될 수 있다. 이들 세 가지 접근법들 중 하나가 결합될 수 있다. 예를 들어, 접근법 1, 2 및 3은 결합되어 여기서, 조직 분자를 수거한 후에 외인성 재료가 조직 부위에 부착되고 레이저가 외인성 조직을 패턴화하는 한편 RF 센서가 수거 위치의 위치를 기록하고 이미징 디바이스와 통신한다.

[0017] 또 다른 양태들에서, 질량 분광법은 주변 이온화 MS를 포함한다. 여러 양태에서, 샘플에 질량 분석법 분석을 행

하는 단계는 조직 부위에 대응하는 프로파일을 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 양태에서, 상기 방법은 추가로 환부 조직을 포함하는 조직의 부위를 식별하는 기준 프로파일 상기 프로파일을 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 양태에서, 상기 방법은 또한 환부 조직을 포함하도록 식별된 조직 부위를 절제하는 단계를 포함한다. 일부 양태들에서, 방법은 상술한 실시예들 및 양상태 중 임의의 것에 따른 장치를 사용하여 수행된다.

[0018] 추가 실시예에서, 본 발명은 조직 샘플을 평가하기 위한 *생체 외(ex vivo)* 방법을 제공하고, 상기 방법은 피검자의 복수의 조직 부위로부터 복수의 액체 샘플을 획득하는 단계, 상기 조직 부위에 대응하는 복수의 프로파일을 획득하기 위해 상기 복수의 액체 샘플에 질량 분석을 행하는 단계, 및 병이 있는 조직을 포함하는 조직 부위를 식별하기 위해 상기 복수의 프로파일을 기준 프로파일과 비교하는 단계를 포함한다. 특정 양태에서, 액체 샘플은 용매에 포함된다. 추가의 양태에서, 환부 조직은 암세포를 포함한다.

[0019] 실시예의 일부 양태에서, 방법 및 디바이스의 실시예에 의한 평가의 질병 조직 부위는 암세포를 포함한다 (또는 포함하는 것으로 의심되는). 실시예에 따라 평가될 수 있는 암세포는 갑상선, 림프절, 방광, 혈액, 뼈, 골수, 뇌, 유방, 결장, 식도, 위장관, 검(gum), 머리, 신장, 간, 폐, 인두, 목, 난소, 전립선, 피부, 위, 고환, 허, 또는 자궁 (또는 이런 종양을 둘러싼 조직)으로부터의 세포 또는 종양 조직을 포함하지만, 이것에 한정되지는 않는다. 일부 측면들에서, 암은 신생물, 악성 종양; 암종; 암종, 미분화; 자이언트 및 스핀들 세포 암종; 소세포 암종; 유두암; 편평 세포 암종; 림프 상피 암종; 기저 세포 암; 피라마트릭스 암종; 전이 세포 암종; 유두 전이 세포 암종; 선암; 가스트린, 악성; 담관암; 간세포 암; 간세포 암 및 담관암을 합친 것; 섬유유 선암; 선구체 낭성 암종; 선종성 용종의 선암; 선암, 가족 성 폴립시스 콜리; 고형암; 카르시노이드, 악성; 지류-폐포 선암; 유두 선암; 발색 선암 (chromophobe carcinoma); 호산성 암종; 호산세포 선암; 호염기성 암; 명확한 세포 선암; 과립 세포 암종; 여포 선암; 유두 및 여포 선암; 비 캡슐화 경화 암종; 부신 피질 암종; 자궁 내막 암종; 피부 부속기 암종; 아포크린 선암종; 피지 선암; 백질 선암; 점 표피 세포 암; 낭포 선암; 유두낭 모세포종; 유두 장액성 낭성 선암; 점액성 낭성 선암; 점액성 선암; 인장 링 세포 암종; 침윤성 덕트 암종; 수질 암종; 소엽 상피암; 염증성 암종; 조류 독감, 유방암; 선상 세포 암종; 선 편평 상피암; 편평 상피화를 동반한 선암; 악성 흉선종; 난소 간질 종양, 악성; 육종, 악성; 과립막 세포 종양, 악성 종양; 악성 및 골수종; 세르톨리 세포 암종; 라이디히 세포 종양, 악성; 지질 세포 종양, 악성; 부신결정종(paraganglioma), 악성; 유방 외과 선종, 악성; 갈색 세포종 (pheochromocytoma); 녹내장 육종; 악성 흑색종; 무착색 흑색종; 표재성 확산 흑색종; 거대한 색소성 모반의 악성 흑색 종; 상피 세포성 흑색종; 악성 파란색 모반; 육종; 섬유 육종; 섬유성 조직 구종, 악성; 점액 육종; 지방 육종; 평활근 육종; 횡문근 육종; 배아성 횡문근 육종; 폐포 횡문근 육종; 간질 육종; 혼합 종양, 악성; 물러 혼합 종양; 신장 모세포종; 간 모세포종; 암 육종; 간엽종, 악성; 브레너 종양, 악성;엽상 종양, 악성; 활막 육종; 악성 중피종; 이중 기종; 배아 암종; 테라토마, 악성; 난소 갑상선종(struma ovarii), 악성; 고지암; 중성 흑색종, 악성; 혈관 육종; 혈관 내피종, 악성; 카포시 육종; 악성 혈관 주위 세포종; 림프관 육종; 골육종; 병변이 있는 골육종; 연골 육종; 연골 세포종, 악성; 중간엽 연골 육종; 거대한 뼈의 세포 종양; 유잉 육종; 치원성 종양, 악성; 모세 혈관성 육아 육종; 범람모세포종 (ameloblastoma), 악성; 모세 혈관성 섬유 육종; 송과체부종양(pinealoma), 악성; 척골종; 신경 교종, 악성; 뇌질피복 세포종(ependymoma); 성상 세포종; 원형질 성상 세포종; 섬유성 성상 세포종; 성상 세포종; 교모세포종; 희소 돌기 세포종; 과발성골 모세포종(oligodendroblastoma); 원시 신경 외배엽; 소뇌 육종; 신경절 아세포종; 신경 모세포종; 망막 모세포종; 후각 신경 종양; 수막종, 악성; 신경 섬유 육종; 신경초종, 악성; 과립 세포 종양, 악성; 악성 림프종; 호지킨 병; 호지킨 (hodgkin 's); 또는 파라육아종(paragranuloma)일 수 있다. 추가의 양태에서, 암은 갑상선암, 뇌암 (예를 들어, 신경아 교종), 전립선 암, 유방암 (예를 들어, 삼중 음성 암), 췌장암 (예를 들어, 췌장관 선암), 급성 골수성 백혈병 (AML), 흑색종, 신장 세포 암 또는 림프절로 전이된 암이다.

[0020] 본 출원에 사용되는, "샘플"또는 "액체 샘플"은 실시예에 따라, 용매로 조직 또는 생물학적 검체에 컨택시켜 획득된 조직들 또는 다른 생물학적 검체로부터 추출하는 것을 의미할 수 있다(예를 들어, 단백질 및 대사 물질을 포함하는 추출). 일부 양태에서, 검체는 비 생물학적 검체 예컨대, 피험자의 표면 (예를 들어, 법의학 검체)로부터의 추출물일 수 있다.

[0021] 특정 컴포넌트의 관점에서 본 출원에서 사용되는, "본질적으로 없는"는 지정된 성분들 중에 어떤 것도 의도적으로 조성물로 제제화되지 않거나 및/또는 오염물이나 미량으로 존재하는 것을 의미하는 것으로 사용된다. 따라서, 조성물의 의도하지 않은 오염으로 인한 특정 성분의 총량은 잘해야 0.01% 미만이다. 가장 바람직한 것은 특정 성분의 양이 표준 분석 방법으로 검출 될 수 없는 조성물이다.

[0022] 명세서 및 청구 범위에서 본 출원에 사용되는, "a" 또는 "an"는 하나 이상을 의미할 수 있다. 단어 "포함하는"이라는 단어와 함께 사용될 때, 본 명세서 및 청구 범위에서 본 출원에 사용되는, 단어 "a" 또는 "an"은 하나

또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 명세서 및 청구 범위에서 본 출원에서 사용되는, "다른" 또는 "추가"는 적어도 두번째 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

[0023] 명세서 및 청구 범위에서 본 출원에 사용되는, 용어 "도관(conduit)" 및 "튜브(tube)"는 상호 교환적으로 사용되며, 가스 또는 액체의 흐름을 직접 사용될 수 있는 구조를 언급한다.

[0024] 명세서 및 청구 범위에서 본 출원에 사용되는, 용어 "약"은 값이 디바이스 에러의 고유 변화를 포함하는 것을 나타내기 위해 사용되며, 해당 방법은 값 또는 피험자간에 존재하는 변이를 판별하기 위해 사용된다.

[0025] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점은 이하의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 본 발명의 특정 실시예를 나타내는 상세한 설명 및 특징에는 단지 예시의 방식으로 주어지는데, 이는 본 발명의 사상 및 범위 내의 다양한 변화 및 수정예들이 이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명확해질 것이다 때문이라는 것이 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 이하의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 특정 양태를 추가로 예시하기 위해 포함된다. 본 발명은 본 출원에 제시된 특정 실시예의 상세한 설명과 결합하여 이들 도면 중 하나 이상을 참조하여 더 잘 이해될 수 있다.

도 1a-q : 매스스펙 펜(MasSpec Pen) 시스템과 작동 단계의 도식적 표현. A) 펜 크기의 핸드 헬드 디바이스는 PTFE 튜빙(tubing) (또는 다른 소수성이 높은 재료)을 통해 실험실에서 만든 질량 분광기(mass spectrometer) 인터페이스에 직접 통합된다. 이 인터페이스에는 시스템을 질량 분석기 입구에 연결하는 핀치 밸브, 마이크로 컨트롤러 및 튜빙을 수용한다. 시스템은 풋 페달(foot pedal)을 통해 사용자에게 의해 자동으로 트리거된다. B) 매스스펙 펜은 PDMS 3D 프린트된 팁과 3 개의 PTFE 도관으로 디자인되어, 이는 유입되는 물 대 팁, 가스 및 나가는 액적(droplet)을 위한 도관을 제공한다. C) 팁은 분석을 위해 조직과 접촉하고, 3 개의 도관과 용매 저장소로 디자인되었다. 페달을 통한 사용에 의해 시스템이 트리거되면($t=0$ 초), 주사기 펌프(syringe pump)는 제어되는 양의 물을 저장소로 전달한다. 이산의 액적은 조직과 상호 작용하여 분자를 추출한다. 이 경우, 추출 3 초 후, 진공 및 가스 도관은 분자 분석을 위한 튜빙 시스템을 통해 매스스펙 펜으로부터 질량 분석기로 액체 방울을 운반하기 위해 의도적으로 개방된다. D) 매스스펙 펜 디바이스 의 예시적인 기능 소자의 개략도를 도시한다. E-F)는 예시적인 매스스펙 펜 팁의 확대도를 도시한다. G-Q) 실시예의 시스템의 대안 구성을 도시한다.

도면들 2a-2b : Q Exactive Orbitrap 질량 분광기를 사용하여 매스스펙 펜으로부터 마우스(mouse) 뇌 조직 섹션의 질량 스펙트럼. A) 마우스 뇌 섹션의 질량 스펙트럼, B) 총 이온 크로마토그래피, 삽입 스펙트럼은 깨끗한 유리 슬라이드 백그라운드로부터 이다 (백그라운드 및 마우스 뇌 조직의 세기 스케일은 동일하게 설정되었다).

도면들 3a-3b : A) 에탄올:H₂O (1:20) 또는 에탄올:H₂O (1:5) 로 구성된 용매를 사용하여 얻은 생물학적 샘플의 질량 스펙트럼을 비교하여 도시한다. B) 다양한 비율로 물과 에탄올의 혼합물을 사용하여 마우스 뇌 조직 섹션에서 얻은 대표적인 음이온(negative ion) 모드 매스스펙 펜 질량 스펙트럼.

도면들 4a-4b : a) 마우스 뇌 섹션 및 b) 마우스 뇌 신선한 조직으로부터 수집 된 매스스펙 펜을 사용하는 질량 스펙트럼의 비교.

도 5a-e : 여러가지 상이한 암 유형에 대한 암 조직 대(vs) 정상 조직의 질량 스펙트럼 비교 : 유방암 (A); 신장 암 (B); 암 림프절 (C) 난소 암 (D) 및 갑상선암 (E).

도면들 6a-6c : A) 매스스펙 펜 및 B) DESI 로부터 수집 된 질량 스펙트럼의 비교. C) 마우스 뇌 조직 섹션으로부터 획득된 매스스펙 펜과 DESI 음이온 모드 질량 스펙트럼 사이의 비교.

도 7 : 음이온 모드에서 인체 조직에서 검출된 티모신 β -4의 스펙트럼.

도면들 8a-8b : A) 새로 생긴(fresh) 갑상선 정상 검체 및 암 검체로부터 획득된 스펙트럼의 비교. B) 갑상선 유두암과 정상 조직 섹션의 매스스펙 펜 분석. (상부) 정상 갑상선 조직 섹션으로부터 획득된 대표적인 음이온 모드 매스스펙 펜 질량 스펙트럼과 (아래) 갑상선 유두암 조직 섹션이 도시되어 있다. 가장 풍부한 분자 이온의 식별이 제공된다. 삽도(inset)는 조직 병리학에 의해 평가된 H & E 염색된(stained) 조직 섹션의 광학 이미지를 도시한다.

도 9 : 정상 및 종양 갑상선 및 유방 조직 섹션을 포함한 인체 조직 섹션에 대해 획득된 데이터의 PCA. 스코어

플롯에서 관측된, PC1과 PC2는 갑상선 조직 데이터 세트의 전체 편차의 47.9%를 설명하는 반면, PC1과 PC3는 유방 조직 데이터 세트의 전체 편차의 46.1%를 설명한다. 분석된 각 조직 유형에 대한 로딩 플롯(loading plot)도 포함된다.

도면들 10a-10b : 인체의 새로 생긴 조직에 대한 주 성분 분석 결과. A) 정상 및 종양 갑상선의 차별. B) 정상 및 종양 림프질의 차별.

도 11 : 매스스펙 펜을 사용하여 조직 샘플로부터 획득된 분자 정보는 인체 암의 진단이다. 유방암, 갑상선암, 난소 암, 폐암 및 정상 조직 샘플을 포함하여 총 253 개의 환자 조직 샘플이 분석되었다. 3D PCA (PC1, PC2 및 PC3) 플롯은 암과 정상 질량 스펙트럼 사이의 분리를 보여준다.

도면들 12a-12e : 샘플 스팟 1 (도 12a), 샘플 스팟 2 (도 12b), 샘플 스팟 3 (도 12c), 샘플 스팟 4 (도 12d), 및 샘플 스팟 (5) (도 12e)의 매핑(mapping).

도면들 13a-13e : 샘플 스팟 1-5의 질량 스펙트럼로서, 전체 질량 범위에서 (도 13a), 500-1800 질량 범위에서 (도 13b), 500-1000 질량 범위에서 (도 13c), 785-809 질량 범위에서 (도 13d) 및 870-920 질량 범위에서 (도 13e).

도면들 14a-14b : 혼합 조직학적 구성을 갖는 HGSC 조직 샘플의 매스스펙 펜 분석. A) 광학 이미지는 1.5mm 직경의 매스스펙 펜을 사용하여 경계 스팟 (1-5)에서 분석된 조직 샘플을 도시한다. 매스스펙 펜 분석 후, 조직 샘플을 동결하고, 섹션화하고, H & E 염색되었다. 스팟 3에서 획득된 H & E 염색된 조직 섹션의 광학 이미지가 도시되고 암과 인접한 정상 기질(stroma) 조직을 포함한 혼합 조직학적 구성을 제시한다. B) 매스스펙 펜 음이온 모드 질량 스펙트럼은 스팟 1 (정상 기질), 스팟 3 (정상 기질과 암의 혼합물), 스팟 5 (암)에 대해 도시된다. C) 분석된 5 개 스팟의 병리학적 진단 및 이 독립적인 데이터 세트에 대한 라소(Lasso) 예측 결과가 도시된다.

도면들15a-15b : 매스스펙 펜은 조직 샘플을 부드럽고 비파괴적인 분자 분석을 허용한다. A) 광학 이미지는 매스스펙 펜 분석 전, 분석 중 및 분석 후에 폐 선암종(lung adenocarcinoma) 조직 샘플을 보여준다. 조직 검체의 확대는 매스스펙 펜으로 분석한 조직 영역에 어떠한 매크로스코픽 손상을 나타내지 않는다. B) 분석된 조직 영역에 대해 획득된 음이온 모드 질량 스펙트럼은 가장 풍부한 분자 이온의 확인을 포함하여 표시된다.

도면들 16a-16b : 뮤어린(murine) 동물 모델에서 수술 중 종양 및 정상 조직의 생체 내(in vivo) 분석. A) 실험은 마취하에 마우스에서 수행되었다. 광학 이미지는 매스스펙 펜 분석 전, 분석 중 및 분석 후에 생체 내 및 동물을 보여준다. B) 대표적인 음이온 모드 질량 스펙트럼은 정상 및 종양 조직으로부터의 별개의 분자 프로파일을 나타낸다.

도 17 : 매스스펙 펜의 다양한 샘플링 직경을 사용하여 획득된 대표적인 음이온 모드 매스스펙 펜 질량 스펙트럼.

도 18 : 마우스 뇌 조직의 대표적인 양이온(positive ion) 모드 질량 스펙트럼. 높은 상대적 존재량(abundance)에서 관측된 이온은 질량 스펙트럼에 주석으로 표시된 대로 탠덤(tandem) 질량 분석법을 사용하여 글리세로포스포콜린 및 디아실글리세리드 지질의 칼륨 (K+) 및 나트륨 (Na+) 부가물로서 식별되었다.

도 19 : 정상 및 암 조직의 영역을 포함하는 HGSC 조직 샘플로부터 획득된 대표적인 음이온 모드 매스스펙 펜 질량 스펙트럼.

도 20 : 매스스펙 펜 분석 후 같은 영역으로부터 획득된 H & E 염색 조직 섹션의 생체 내 분석의 광학 이미지.

도 21: 마우스 모델로부터 동일한 종양 샘플의 생체 내(in vivo) 및 생체 외(ex vivo) 획득된 매스스펙 펜 음이온 모드 질량 스펙트럼간의 비교.

도 22 : 상이한 추출 시간 5초, 3초, 1초를 갖는 마우스 뇌 조직 섹션으로부터 획득된 대표적인 음이온 모드 질량 스펙트럼.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 본 실시 형태

특정 양태에서, 본 출원은 조직 샘플과 같은 샘플의 분자 평가를 위한 방법 및 디바이스를 제공한다. 특히, 방법은 조직의 수술 (또는 생검) 동안 다수의 조직 부위를 평가하는데 사용될 수 있다. 이 피치는 외과вра가 주위

의 정상 조직과 관련하여 환부 조직만을 보다 정확하게 다룰 수 있도록 "실시간(real-time)" 으로 환부 조직 (예를 들어, 암 세포를 보유하는 조직 부위)을 정확한 식별을 허용한다. 특정 양태에서, 본 출원에 개시된 방법은 고정 또는 이산 용적의 용매를 조직 부위에 전달한 다음, 상기 부위로부터 액체 샘플을 수집하고 질량 분석 법에 의해 액체 샘플을 분석하는 것을 포함할 수 있다. 중요한 것은, 고압 스프레이에 적용되는 것이 아니라, 용매가 별도의 작은 액적과 낮은 압력으로 인가된다는 것이다. 이러한 방법은 평가되는 조직의 손상을 피하면서 별개의 조직 부위의 샘플을 정확하게 수집할 수 있게 한다. 수집된 샘플로부터 생성된 결과적인 질량 분석 프로파일은 환부 조직 부위 대(vs) 정상 조직 부위의 구별을 허용한다. 이 방법은 분자 변화 (예를 들어, 조직 내) 를 매우 정확하게 매핑하기 위해 다수의 관심 부위에서 반복될 수 있다. 중요하게도, 샘플의 프로파일은 이온화 소스를 사용 하지 않아도 차별화될 수 있다. 따라서, 실시예의 방법은 이온화 소스와 함께 사용될 수 있지만, 이러한 소스의 사용이 요구되지는 않는다. 이들 방법론들은 짧은 시간 범위에 걸쳐 복수의 조직 부위를 평가할 수 있게 함으로써 환부 조직 대(vs) 정상 조직의 경계의 매우 정확한 평가를 허용한다.

[0029] 일부 양태에서, 본 출원에 설명된 방법은 다양한 소스로부터 샘플을 수집하고 분석하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 방법은 법의학, 농업, 약물 남용, 의약품 및/또는 오일/석유 샘플을 평가하는데 사용될 수 있다.

[0030] 일부 양태에서, 실시예의 디바이스에 사용되는 재료 (PDMS 및 PTFE) 및 용매 (예, 단지 물 용매)는 생물학적으로 호환 가능하여 그것들은 실시간 분석을 위한 수술에 사용될 수 있다. 더욱이, 디바이스가 매우 콤팩트할 수 있기 때문에, 휴대용 또는 예컨대, 다빈치(Da Vinci) 수술 시스템 (예를 들어, 자동화 시스템)과 같은 로봇 수술 시스템에 통합될 수 있다. 따라서, 인체의 체강(human cavity) 내 많은 영역이 수술 중에 신속하게 샘플링되고 분석될 수 있다 (예를 들어, 분자 시그니처(molecular signature) 및 기계 학습 알고리즘 데이터베이스를 사용하여). 따라서, 각 샘플링된 영역에 대해 진단 결과가 실시간으로 제공될 수 있다. 이들 방법에서 사용하기 위한 예시적인 디바이스가 이하에 상술된다.

[0031] 도 1d를 참조 하면, 질량 분석을 위해 조직을 샘플링하는 장치 (100)가 도시된다. 이 실시예에서, 디바이스 (100)는 프로브 (110), 용매를 갖는 챔버 (120), 가압 가스 공급원 (130) 및 질량 분석기(140)를 포함한다. 일부 양태에서, 프로브는 하우징에 포함된다(예를 들어, 핸드 헬드 디바이스의 경우에 그림을 제공). 추가의 양태에서, 하우징은 프로브를 통한 유체 및/또는 가스 흐름을 제어하는데 사용될 수 있는 클릭커 피쳐(clicker feature) (예를 들어, 트리거, 버튼 또는 페달)을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 프로브는 PDMS 및/또는 PTFE 를 포함하는 재료로 구성된다. 일부 양태에서, 프로브는 3D 프린팅 프로세스에 의해 생성된다.

[0032] 도 1e는 프로브 (110)의 보다 상세한 단면도를 제공하며, 프로브 (110)는 제 1 도관 (111), 제 2 도관 (112), 제 3 도관 (113) 및 저장소 (115)를 포함한다. 예시된 실시예에서, 제 1 도관 (111)은 챔버 (120)와 유체 연통하고, 제 2 도관 (112)은 가압 가스 공급원(130)과 유체 연통하고, 제 3 도관 (113)은 질량 분석 기(140)와 유체 연통한다. 도 1f는 특정 실시예에 대한 치수를 갖는 프로브의 추가적인 단면도를 제공한다.

[0033] 특정 실시예에서, 도관 (111, 112, 113)의 각각은 (임의의 원하는 길이를 가질 수 있는) 별도의 컴포넌트를 포함할 수 있다. 예를 들어, 프로브 (110)내의 도관의 각각의 부분은 프로브(110)의 제조 동안에 일체 채널로서 형성될 수 있다. 추가하여, 프로브(110)과 챔버(120), 가압 가스 공급원(130) 및 질량 분석기(140) 사이의 도관의 각각의 부분은 유체 흐름을 제공하는데 적절한 튜빙 또는 다른 컴포넌트들일 수 있다.

[0034] 이 실시예에서, 장치 (100)는 챔버(120)로부터 제 1 도관(111) 및 저장소(115)로 용매를 전송하도록 구성된 펌프(125)를 포함할 수 있다. 도시된 실시예에서, 장치(100)은 저장소(115)로부터 제 3 도관(113)을 통해 질량 분석기(140)로 샘플 흐름을 제어하도록 구성된 제 1 밸브(121)을 또한 포함할 수 있다. 장치(100)는 제 2 도관 (112)를 통해 저장소(115)로의 가압 가스의 흐름을 제어하도록 구성된 제 2 밸브(122)를 또한 포함할 수 있다.

[0035] 제어 시스템 (160)은 장치 (100)의 동작 파라미터들을 제어하도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 제어 시스템 (160)은 펌프 (125)의 동작을 제어함으로써 제 1 도관 (111)을 통해 챔버 (120)로부터 저장소 (115)로 용매의 흐름을 제어하도록 구성될 수 있다. 또한, 제어 시스템 (160)은 제 1 밸브 (121)의 개방 및 폐쇄를 제어함으로써 저장소 (115)로부터 질량 분석기 (140)로의 샘플 흐름을 제어하도록 구성될 수 있다. 제어 시스템 (160)은 제 2 밸브(122)의 개방 및 폐쇄를 제어함으로써 가압 가스 용기 (130)로부터 저장소 (115)로 가압 가스 흐름을 제어하도록 추가로 구성될 수 있다.

[0036] 장치 (100)의 동작 동안, 사용자는 저장소(115)가 샘플 부위(150)에 위치되도록 프로브(110)을 위치시킬 수 있다. 제어 시스템(160)은 제 1 도관 (111)을 통해 챔버 (120)로부터 저장소(115)로 원하는 용적의 용매를 전송하기 위해 특정 시간 기간동안 펌프(125)를 동작시킬 수 있다. 예시적인 실시예에서, 챔버 (120) 내의 용매는 본

석을 위해 조직 샘플 부위 (150)로부터 분자들의 효율적인 추출을 도울 수 있다.

- [0037] 추가하여, 제어 시스템(160)은 제 1 밸브 (121)의 개방 및 펌프 (125)의 동작 사이의 특정 시간 기간을 허용할 수 있다. 이것은 질량 분석기(140)로부터 진공을 허용하여 (또는 별개의, 보조 진공 시스템) 제 3 도관 (113)을 통하여 저장소 (115)로부터 질량 분석기 (140)로 샘플 재료들 (예를 들어, 조직 샘플 부위 (150)로부터 분자)을 끌어당길 수 있다(draw).
- [0038] 제 1 밸브 (121)가 개방된 때, 제어 시스템 (160)이 또한 제 2 밸브(122)를 개방하여 불활성 가스 (예를 들어, N₂ 또는 CO₂)가 제 2 도관 (112)를 통해 가압 가스 공급원 (130)으로부터 저장소(115)로 전송되는 것을 허용할 수 있다. 불활성 가스는 분석 전에 샘플 조직을 건조시키는 것 뿐만 아니라 제 1 도관 (111) 내의 용매 갭을 방지하는 것을 도울 수 있다(예를 들어, 저장소 (115)가 샘플 부위 (150)를 컨택할 때 질량 분석기(140)에 의해 뽑아지는 진공의 결과로서). 불활성 가스는 또한 샘플 부위 (150)로부터 질량 분석기 (140)로 제 3 도관 (113)을 통해 용매 전송을 도울 수 있다.
- [0039] 제어 시스템 (160)은 장치(100)의 다양한 컴포넌트의 동작에 적절한 하드웨어 및 소프트웨어를 포함할 수 있다. 도 1의 개략도에 도시된 다양한 컴포넌트들의 특정 실시예가 예제 1로 제목 달린 섹션을 포함하여 이하에서 논의되는 예들에 제공된다.
- [0040] 도 1g는 이전의 도 1d에 도시된 실시예와 유사한 장치 (100)의 실시예를 도시한다. 도 1g의 실시예에서, 그러나, 장치 (100)는 도관(113)과 유체 연통하는 펌프(141)를 더 포함한다. 특정 실시예에서, 펌프(141)는 도관 (113)을 통해 질량 분석기로의 샘플 부분의 속도를 증가시키도록 작동될 수 있는 외부 진공 펌프일 수 있다. 이전의 실시예들에서 설명된 장치 (100)의 컴포넌트들은 이 실시예 (및 후속하여 설명된 실시예들)에서 증가의 방식으로 동작한다는 것이 이해되어야 한다. 명료함을 위해, 모든 컴포넌트가 각각의 도면에서 참조 번호로 표시되어 있는 것은 아니다. 추가하여, 전술한 실시예에서의 컴포넌트와 동등한 컴포넌트의 동작 양상은 이 또는 후속 실시예에 대한 설명에서 반복되지 않을 것이다.
- [0041] 도 1h는 전술한 실시예들과 유사하지만 또한 밸브 (142), 폐액 용기(waste container) (143) 및 도관 (113)과 유체 연통하는 펌프 (144)를 또한 포함하는 장치 (100)의 다른 실시예를 도시한다. 특정 실시예에서, 밸브 (142)는 세정 단계 동안 도관 (113)으로부터 폐액 용기 (143)로 용매 또는 다른 세정 용액을 분기(diverge)시키는데 사용될 수 있다. 폐액 용기 (143)는 펌프 (144)의 동작을 통해 비워질 수 있다. 예시적인 실시예에서, 다른 용매뿐만 아니라, 물, 에탄올, 임의의 비율에 물과 에탄올의 혼합물을 사용하는 세정이나 세척의 단계는 이 월 효과(carryover effect)를 줄이기 위해서 샘플 분석의 임의의 단계에서 사용될 수 있다. 특정 실시예에서, 프로브 (110)는 또한 각각의 사용 사이에서 스위칭될 수 있다. 더구나, 프로브 (110)는 자동 세척 단계 전후에 세정을 돕기 위해 가스 (버블링)를 사용하여 세척 단계를 위한 용매를 함유한 바이알에 삽입될 수 있다. 멸균 용액으로 닦는 것을 포함하는 다른 세정 방법이 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 임의의 실시예들은 : 1. 프로브 교체; 2. 50/50 에탄올/물의 용액으로 세척; 3. 100% 에탄올로 세척의 세정 프로토콜을 사용할 수 있다.
- [0042] 도 1i 는 전술한 실시예들과 유사하지만 도관 (113)상에 가열 소자 (heating element)(145)를 포함하는 장치 (100)의 또 다른 실시예를 도시한다. 특정 실시예에서, 가열 소자 (145)는 도관 (113) 둘레에 감겨질 수 있는 열선으로서 구성된다. 실시예에서 예를 들어 세라믹 히터를 포함하는 상이한 가열 소자 구성을 포함할 수 있다. 도관 (113)은 가열되어 질량 분석기 (140)로의 물 또는 용매 전송을 개선할 수 있을 뿐만 아니라, 본 출원에 설명된 임의의 예시적인 실시예에서 이온화를 도울 수 있다. 가열은 전체 도관 시스템 또는 특정 위치에서 구현될 수 있다.
- [0043] 도 1j는 전술한 실시예의 피처를 결합하는 장치 (100)의 일 실시예를 도시한다. 특히, 이 도면에 도시된 실시예는 도관 (113) 및 펌프 (141)상의 가열 소자 (145)를 포함한다. 가열 소자 (145) 및 펌프 (141)의 동작 양태는 도면들 1i 및 1g의 설명에서 앞서 논의되었고, 간결함을 위해 여기서는 반복하지 않을 것이다.
- [0044] 도 1k는 전술한 실시예들과 유사하지만 질량 분석기 (140)의 입구에 인접하여 스프레이를 형성하는 이온화 디바이스(ionization device) (146)를 또한 포함하는 장치 (100)의 실시예를 도시한다. 특정 실시예에서, 이온화 디바이스 (146)는 예를 들어, 전자 분무 이온화 (ESI : electrospray ionization) 디바이스, 나노 ESI 디바이스 또는 대기압 화학적 이온화 (APCI) 디바이스 일 수 있다. 특정 실시예들에서, 도관 (113)은 질량 분석기 (140)에 직접 연결되지 않고 벤투리 디바이스(venturi device) (147)가 이온화 디바이스(146) 및 질량 분석기 (140)의 인터페이스로 샘플(150)의 액적(droplet)을 전송하기 위해 사용될 수 있다. 벤투리 디바이스를 포함하는 장치 (100)의 일 실시예의 질량 분석기 프로파일이 도 1l에 도시된다. 도 1l에 도시된 바와 같이, 획득된 프로파

일은 도관 (113)을 질량 분석기 (140)의 입구에 직접 연결하는 실시예와 유사하다.

[0045] 이제 도 1m을 참조하여, 장치 (100)의 일 실시예는 도시된 대로 외부 펌프 (141) (앞서 도 1g에서 도시되고 설명된) 및 이온화 디바이스 (146) 및 벤투리 디바이스 (147) (앞서 도 1k에서 도시되고 설명된)를 포함한다.

[0046] 도 1n의 실시예에 도시된 바와 같이, 장치 (100)의 실시예는 도시된 대로 가열 소자 (145) (앞서 도 1i에 도시되고 설명된) 및 이온화 디바이스 (146) 및 벤투리 디바이스 (147) (앞서 도 1k에 도시되고 기술된)를 포함한다.

[0047] 도 1o의 실시예에 도시된 바와 같이, 장치 (100)의 실시예는 도시된 대로 가열 소자 (145) (앞서 도 1i에 도시되고 설명된) 및 이온화 디바이스 (146)와 같이 벤투리 디바이스 (147) (앞서 도 1k에 도시되고 설명된)를 포함한다. 추가하여, 본 실시예는 외부 펌프 (141)을 또한 포함한다 (앞서 도 1g에 도시되고 설명된).

[0048] 도 1p에 도시된 바와 같이, 장치 (100)의 일 실시예는 밸브 (142), 폐액 용기 (143) 및 펌프 (144)를 포함한다 (앞서 도 1h에 도시되고 설명된). 추가하여, 본 실시예는, 또한 도시된 대로 이온화 디바이스 (146) 및 벤투리 디바이스 (147) (도 1k에 앞서 도시되고 설명된)를 포함한다.

[0049] 도 1q에 도시된 바와 같이, 장치 (100)의 일 실시예는 밸브 (142), 폐액 용기 (143) 및 펌프 (144)를 포함한다 (앞서 도 1h에 도시되고 설명된). 추가하여, 본 실시예는, 또한 도시된 대로 이온화 디바이스 (146) 및 벤투리 디바이스 (147) (앞서 도 1k에 도시되고 설명된)를 포함한다. 본 실시예는 가열 소자 (145)를 더 포함한다 (앞서 도 1i에 도시되고 설명된).

[0050] II. 분석 방법론들 (Assay Methodologies)

[0051] 일부 양태에서, 본 발명은 질량 분석기 프로파일의 특정 패턴을 식별함으로써 생물학적 검체의 분자 시그니처 (molecular signature)를 검출하거나 환부 조직의 존재(예를 들어, 종양 조직)를 결정하는 방법을 제공한다. 분석을 위한 생물학적 검체는 생물학적 분자 또는 유기체와 직접 접촉하는 동물, 식물 또는 임의의 재료(살아있거나 또는 살아있지 않은)로부터 얻을 수 있다. 생물학적 검체는 *생체 내에서* (예를 들어, 수술 중) 또는 *생체 외* 샘플들일 수 있다.

[0052] 실시예의 방법에 의해 획득된 프로파일은 분석된 생물학적 검체 또는 조직 부위로부터의 예를 들어, 단백질, 대사 재료, 또는 지질에 대응할 수 있다. 이러한 패턴은 질량 분석법을 사용하여 특정 이온의 존재를 측정함으로써 결정될 수 있다. 이 디바이스에 결합될 수 있는 이온화 방법의 일부 비 제한적인 예는 화학적 이온화, 레이저 이온화, 대기압 화학적 이온화, 전자 이온화, 고속 원자 충격법, 전자 분무 이온화, 열 이온화를 포함한다. 추가 이온화 방법은 유도 결합 플라즈마 소스, 광 이온화, 글로 방전, 필드 탈착, 열 스프레이, 실리콘의 탈착/이온화, 실시간의 직접 분석, 2 차 이온 질량 분광법, 스파크 이온화 및 열 이온화를 포함한다.

[0053] 특별히, 본 발명의 방법은 추출 주변 이온화 소스와 같은 질량 스펙트럼 데이터를 취득하기 위한 주변 이온화 소스 또는 방법에 결합되거나 또는 적용될 수 있다. 추출 주변 이온화 소스는 이 경우에는 액체 추출 프로세스 동적으로 이어지는 이온화를 갖는 방법이다. 추출 주변 이온화 소스의 일부 비 제한적인 예는 공기 흐름 보조 탈착 전자 스프레이 이온화 (AFADESI), 실시간 직접 분석 (DART), 탈착 전자 스프레이 이온화 (DESI), 전하 교환에 의한 탈착 이온화 (DICE), 전극 보조 탈착 전자 분무 이온화 (EADESI), 전자 분무 레이저 탈착 이온화 (ELDI), 정전기 분무 이온화 (ESTASI), 제트 탈착 전기 분무 이온화 (JeDI), 레이저 보조 탈착 전자 분무 이온화 (LADESI), 레이저 탈착 전자 분무 이온화 (LDESI), 매트릭스 보조 레이저 탈착 전자 분무 이온화 (MALDESI), 나노 분무 탈착 전자 분무 이온화 (nano-DESI) 또는 전송 모드 탈착 전자 분무 이온화 (TM-DESI)를 포함한다.

[0054] 많은 질량 분광법의 방법으로, 이온화 효율은 수집 또는 용매 상태들 예컨대, 용매 성분들, pH, 가스 유량, 인가된 전압 및 샘플 용액의 이온화에 영향을 미치는 다른 측면들을 수정함으로써 최적화될 수 있다. 특히, 본 방법은 인체 문제와 양립할 수 있는 용매 또는 용액의 사용을 고려한다. 이온화 용매로서 사용될 수 있는 용매의 일부 비 제한적인 예는 물, 에탄올, 메탄올, 아세토니트릴, 디메틸포름아미드, 산 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 일부 예에서, 방법은 아세토니트릴과 디메틸포름아미드의 혼합물을 고려한다. 아세토니트릴 및 디메틸포름아미드의 양은 샘플로부터의 분석 물질의 추출을 향상시키고 샘플의 이온화 및 휘발성을 증가시키기 위해 변화될 수 있다. 일부 실시예에서, 조성물은 약 5:1 (v/v) 디메틸포름아미드:아세토니트릴 내지 약 1:5 (v/v) 디메틸포름아미드:아세토니트릴, 예컨대, 1:1 (v/v) 디메틸포름아미드:아세토니트릴을 함유한다. 그러나, 바람직한 실시예에서, 실시 양태에 따라 사용하기 위한 용매는 약학적으로 허용 가능한 용매, 예컨대 멸균 수 또는 완충 수용액이다.

[0055] III. 예제들

- [0056] 이하의 예제들은 본 발명의 바람직한 실시예를 입증하기 위해 포함된다. 하기 실시예에 개시된 기술은 본 발명의 실시에서 잘 기능하기 위해 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내므로 그 실시를 위해 바람직한 모드를 구성하는 것으로 간주될 수 있다는 것은 당업자에 의해 이해되어야 한다. 그러나, 당업자는 본 개시에 비추어 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 개시된 특정 실시예에서 많은 변화가 이루어질 수 있고 여전히 같거나 유사한 결과를 얻을 수 있음을 이해해야 한다.
- [0057] **예제 1 - 스마트 매스스펙 펜 디자인**
- [0058] 매스스펙 펜 (도 1a)은 이산 물 액적(discrete water droplet)을 이용하여 조직 샘플에서 분자의 부드러운, 시간 및 볼륨 제어 추출을 허용하는 자동화된 생체 적합한 핸드헬드 샘플링 프로브로서 개발되었다. 시스템의 여러 프로토타입은 조직 손상을 최소화하고 조직-분석 물질 추출을 최대화하며 질량 분석기로 용매 전송을 최대화한다는 목표로 디자인되었다.
- [0059] 이 개발된 시스템은 세 개의 주요 부분으로 구성된다 : 1) 제어된 유량을 이용하여 이산 용매 용적을 전달하도록 프로그래밍된 주사기 펌프; 2) 제어된 용매 전송을 위한 양방향 핀치 밸브에 통합된 튜빙 시스템; 3) 생물학적 조직의 직접 샘플링에 사용되는 프로브 팁. 조직 손상을 최소화하고, 조직-분석물 추출을 최대화하며, 질량 분석기로의 용매 전달을 최대화한다는 궁극적인 목표를 가지고 시스템의 여러 반복이 조사되고 최적화되었다. 도 1a는 생물학적 조직을 분석하기 위한 진단 펜 (매스스펙 펜)을 포함하는 장치의 일 예의 개략도를 도시한다.
- [0060] 최적화 시스템은 세 개의 주요 컴포넌트를 포함한다 : 1) 프로브로 정의된 물의 용적 (4-10 μL)을 전달하도록 프로그래밍된 주사기 펌프 ; 2) 펌프에서 조직으로 그리고 조직에서 질량 분석기로 제어되는 용매를 전송하기 위해 고속 (8 ms) 양방향 핀치 밸브에 통합된 작은 직경 (ID 800 μm) 폴리테트라플루오로 에틸렌 (PTFE) 튜빙 도관 3) 생물학적 조직의 직접 샘플링을 위한 핸드헬드 펜 크기의 프로브.
- [0061] 핸드헬드 펜 크기 프로브의 주요 컴포넌트는 3D 프린팅된 폴리디메틸실록산(PDMS) 팁 (도 1b)이고 여기서 용매는 조직과 상호 작용하는 동안 보유된다. 팁은 3D 프린팅을 사용하여 제조되었으며 생물학적으로 호환가능한 폴리디메틸실록산(PDMS : polydimethylsiloxane)으로 만들어졌다. 팁은 세 가지 주요 포트에 디자인된다 : 유입 (용매) 도관 시스템 (튜브(111) 또는 도관 (1))에 대한 하나, 가스 (N_2 , CO_2 또는 공기) 전달을 위한 중심 포트 (튜브(112) 또는 도관 (2)) 및 물 액적의 분자 성분을 조직에서 질량 분석기로 전송하기 위한 나가는 포트 (튜브 (113) 또는 도관 (3)). 프로브 팁에서, 모든 포트는 하나의 액적이 유지되고 제어된 시간 양 (3초) 동안 조직 샘플에 노출되어 효율적인 분석 물질 추출을 허용하는 작은 저장소에 결합된다. 저장소의 직경은 조직에 대한 용매의 용적과 디바이스의 공간 해상도를 결정한다. 현재 공구를 사용하는, 매스스펙 펜 팁은 1.5 mm에서 5.0 mm 범위의 크기로 샘플링하게 디자인되었고, 이는 저장소 직경에 의해 결정된다. 2.77mm 저장소 직경에서, 10 μL 의 용매 용적이 저장소에 보유되고 지정된 시간 동안 조직 샘플에 접촉되고 한편 직경 1.5 mm의 저장소에 4.4 μL 가 보유된다. 3초 추출 기간 후, 매스스펙 펜(MasSpec Pen)은 조직에서 제거된다. 수반되어, 도관 (3)은 개방되어 질량 분석기로 액적의 진공 추출을 허용하고, 도관 (2)를 통해 저압 가스 전달 (<10 psi)의 양압을 공급한 다음 시스템을 세정하는 플러시 단계(flush step)를 수행한다. 액적(droplet)과 조직 사이의 접촉 시간은 1초, 3초 및 5초가 평가되었다 (도 22)는 것에 유의한다. 3초의 접촉 시간은 사용자에게 의한 조작의 편의를 허용하고 충분한 전체 이온 세기를 갖는 질량 스펙트럼을 산출하기 때문에 모든 실험에 대해 선택되었다. 제 2 튜브에 의해 제공된 가스는 추출 프로세스에 관여하지 않지만, 사용된 진공으로 인한 시스템의 접힘(collapse)을 방지하고 조직으로부터 질량 분석기 로의 용매 전송을 돕기 위해 사용된다. 유사하게, 플러시 단계는 이 기간 동안 조직과의 접촉이 없기 때문에 조직으로부터 생체 분자를 추출하는데 사용되지 않는다. 도관 (3)은 질량 분해 능력이 높은 오비트랩(Orbitrap) 질량 분석기의 전달 튜브에 직접 연결되어 질량 분석기 진공 시스템의 부압(negative pressure)이 이온화 및 질량 분석을 위해 저장소에서 질량 분석기로의 액적의 이동을 유도한다. 다양한 연결 및 이온화 방법이 우리 시스템에 결합될 수는 있지만 이 셋 업은 조작 단계를 단순화하고 이온화 소스의 사용을 배제한다. 기하학적 또는 공간적 제약없이 조작자가 디바이스를 자유로운 핸드헬드 사용을 허용할 수 있도록 1.5 미터의 튜브 길이가 모든 도관에 사용되었다.
- [0062] 폴리테트라플루오로에틸렌 (PTFE)으로 만들어진 세개의 도관은 또한 생물학적 호환가능하다. 튜브 (111)은 주사기 펌프에서 프로브 팁까지 용매를 전달하는데 사용된다. 튜브 (112)는 일부 경우들에서, 불활성 가스 (N_2 또는 CO_2)를 프로브 팁에 전달하는데 사용된다. 가스는 세 가지 주요 목적을 수행한다 : 1) 분석 전 조직 건조; 2) 저장소가 조직 검체를 접촉함으로써 폐쇄될 때 질량 분석기의 진공으로 인한 튜브 (111)의 용매 캡을 방지; 2) 튜브 (113)을 통해 조직에서 질량 분석기로의 용매 전송을 보조. 그러나, 일부 경우에는 가스를 사용할 필요가 없다. 튜브 (113)은 질량 분석기의 입구에 직접 연결되어 질량 분석기 진공 시스템의 양압이 저장소에서 이온화

를 위해 질량 분석기 입구로 액적(droplet)을 유도하는데 사용된다.

[0063] 디바이스 조작에 관련된 타임 이벤트는 자동화되고 정확하게 아두이노(Arduino) 시스템 및 두 개의 양방향 핀치 밸브와 통신하는 소프트웨어에 의해 제어된다. 모든 핀치 밸브는 프로세스가 개시될 때까지 폐쇄된다: 1. 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ 이하에서, 펌프에 펄스를 발송하고 2초 동안 용매를 주입하고 정지시켜 매스스펙 펜 저장소에 충전하는 10 μL 의 액적을 생성한다; 2. 튜브(112) 및 튜브(113)이 폐쇄되고, 분자를 추출하기 위해 3초동안 저장소에 용매가 조직과 상호작용하는 것을 허용; 3. 튜브(112 및 113)를 제어하는 핀치 밸브가 액적이 이온화 및 분자 분석을 위해 질량 분석기로 전송될 수 있도록, 동시에 개방된다. 4. 추출된 모든 분자를 질량 분석기로 완전히 유도시키기 위해 펄스가 펌프로 발송되어 용매를 12초 동안 주입하고 정지한다. 5. 튜브 (112 및 113)을 추가 20 초 동안 개방하여 두고 튜브 (113)의 모든 용매 가 질량 분석기로 들어갈 수 있도록 한다 총 분석 시간은 37초이다.

[0064] 팁은 세개의 도관 튜브들을 사용하여, 고속 작동되는 핀치 밸브를 사용하여 디자인되어 액적 모션의 정밀한 제어를 허용하고, 탁월한 성능 및 강건성을 보였다. 샘플링에서 질량 스펙트럼 획득까지의 전체 프로세스는 10초 이내에 완료되며 아두이노(Arduino) 마이크로 컨트롤러를 사용하여 완전히 자동화되어 각 취득 및 분석이 콧 페달을 사용하여 한 번의 클릭으로 개별적으로 트리거된다. 시스템 자동화는 각 용매 액적이 입구에 개별적으로 전달되도록 하여 샘플의 최종 분자 프로파일에 대하여 평균되어 여러 질량 스펙트럼을 산출하는 것을 보장한다. 더구나, 제어된 액적 전달은 질량 분석기가 성능 저하없이 작동할 수 있게 해준다. 사용 후, 매스스펙 펜은 잔류물이 관측되면 신속하고 자동 세척 플러시를 통해 또는 일회용 팁을 교체하여 세정될 수 있다.

[0065] 예제 2 - 분자 프로파일 및 분석

[0066] 본 출원에 설명된 시스템은 분자 분석을 위해 질량 분석기로 분석 물질-함유 용매 전송을 위해 질량 분석기에 수집 도관을 직접 연결함으로써 작동된다. 이 셋업 은 작동 세부 사항을 크게 단순화하고 이온화 소스의 사용을 배제한다. 프로브가 조직과 상호 작용한 후, 용매는 질량 분석기로 전송되어 추가적인 이온화 소스가 필요없이 직접 주입된다. 시스템이 완전히 자동화되어 각 10 μL 용매 액적이 입구에 별도로 전달되기 때문에 질량 분석기는 성능에 영향을 주지 않고 작동한다. 풍부한 분자 정보는 탈착 전자 분무 이온화와 같은 다른 용매 추출 주변 이온화 기술(solvent-extraction ambient ionization)에서 관측되는 것과 유사한 방식으로 방식으로 획득된다. 이온화 메커니즘은 입구 이온화와 유사할 수 있다. 입구 이온화 방법(inlet ionization method)의 경우, 이온화는 대기와 진공 사이의 입구 압력 강하 영역에서 발생한다. 몇몇 용매 시스템들이 디바이스에 사용될 수 있다. 이 예에서, 디바이스의 전체 생체 호환성 물을 보장하기 위해, 다른 비율의 에탄올과 물의 혼합물이 조사되었고 유사한 결과를 획득하였지만, 물이 유일한 용매로서 사용되었다. 이를 입증하기 위해서, 샘플은 5:1 및 20:1 ($\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$)로 이루어진 용매로 추출 후에 분석되었고, EtOH가 더 많은 PE 지질(lipid), PE(40:6) (m/z 790.539) 및 PE (38:4) (m/z 766.540)와 같은 것을 추출하는데 도움이 될 것이다(도 3의 결과 참조).

[0067] 분자 정보를 획득하는데 매스스펙 펜의 효과는 조직 섹션과 조직 샘플의 부분을 분석함으로써 테스트되었다. 먼저, 순수한 물을 용매로 사용하여 매스스펙 펜에서 설명한 자동화된 조작 단계에 따라 표준 조직학 유리 슬라이드에서 16 μm 두께의 조직 섹션을 분석했다. 매스스펙 펜의 다양한 저장소 직경을 가진 몇몇 프로브 팁을 테스트하여 더 큰 샘플링 크기에 대해 마우스(mouse) 뇌 조직 회색질, 백색 재료 또는 혼합 조성물의 지질 중 특성을 나타내는 질량 스펙트럼을 산출했다. 도 2 는 마우스 뇌 조직 섹션의 회색질 영역(grey matter region)으로부터의 2.7 mm 펜 팁 및 유리 슬라이드 영역 (샘플 없음)으로부터 획득된 대표적인 백그라운드 질량 스펙트럼을 사용하여 음이온 모드에서 획득된 대표적인 질량 스펙트럼을 도시한다. 매스스펙 펜의 몇 가지 직경을 시험하여, 큰 펜 팁 직경에 대해 관측된 전체 이온 카운트가 증가하는 유사한 질량 스펙트럼 프로파일을 산출하였다 (도 17).

[0068] 도 2b는 전체 분석 기간 동안 획득된 총 이온 크로마토그램을 나타낸다. 0.5 분에서 (도 2b에 삽도 참조), 백그라운드 질량 스펙트럼은 순수한 유리 컨택에 의해 획득되었다. 질량 스펙트럼에서 알 수 있듯이, 이 질량 범위에서 현저하게 깨끗한 백그라운드 신호가 획득되었다. 3.4분 (도 2a)에서, 매스스펙 펜은 전술한 바와 같은 절차에 따라 마우스 뇌 조직 섹션에 인가되었다. 현저하게, 풍부한 분자 프로파일이 관측되었다. 생물학적 조직들의 주변 이온화 질량 분광법을 이용하여 통상 감지된 지질 신호들은 지방산(FA), 세라마이드 (Cer), 글리세로포스포이노시톨 (PI), 글리세로포스 포에탄올아민 (PE), 글리세로포스포세린 (PS) 및 스테롤 지질 (ST)를 포함하는 음이온 모드 질량 스펙트럼에서 높은 상대적 세기에서 관측되었다. 일차 및 이차 내성(endogenous) 대사 재료 또한 질량 스펙트럼에서 관측되었다. 양이온 모드에서는 디아릴글리세롤(DG), 글리세로포스포콜린 (PC) 및 포스포스핑고지질 (SM)도 검출되었다. 스펙트럼에서 대부분의 지질을 확인하기 위해 고분해 분말 질량 분석기

(분해능은 140,000으로 설정됨)가 사용되었다.

[0069] 용매기반 주변 이온화 MS 기술을 이용하여 생물학적 조직들로부터 통상 감지되는 지질 종들의 탈프로톤화된(deprotonated) 또는 클로라이드 부가물에 대응하는 여러 이온들을 포함하는 풍부한 분자 정보를 제시하는 마우스 뇌 조직 섹션의 회색질 영역으로부터 음이온 모드 질량 스펙트럼이 획득되었다. 높은 상대적 존재량의 피크는 m/z 120-350 에서 지방산 (FA), m/z 700-1100에서 설파티드와 같은 스펅고지질 및 m/z 500-700 에서 세라마이드 (Cer)의 염화물 첨가물 및 m/z 700-1100에서 글리세로인지질(GL) 예컨대, 글리세로포스포이노시톨(PI), 글리세로포스포에탄올아민(PE), 글리세로포스포세린 (PS) 및 이중 대전된 카르디올리핀 (CL)로 식별되었다. 더 높은 질량 범위 m/z 1100-1800에서, GL 다이머 및 단일 대전된 CL 관측되었다. m/z 145.061에서 글루타민, m/z 146.045에서 글루타민산염, m/z 174.041에서 N-아세틸아스파르트 산 및 m/z 215.033에서 헥소오스의 클로라이드 부가물을 포함하는 작은 대사 산물로서 잠정적으로 식별된 다양한 피크가 높은 질량 정밀도 측정 및 탠덤 질량 분석 데이터를 기반으로 m/z 120-250의 범위에 더 낮은 질량에서 감지되었다 (표 1). 중요한 것은 동일한 마우스 뇌의 다른 조직 섹션로부터 획득된 회색 재료로부터 획득된 음이온 모드 질량 스펙트럼이 DESI-MSI (RSD=8.0%, N=5)에 대하여 동일한 방법을 이용하여 보고된 것에 필적할만한 재현성 (RSD=9.3%, n=9)이었다. 양이온 모드에서, 획득된 질량 스펙트럼은 디아실글리세롤 (DG), PE 및 글리세로포스포콜린 (PC)으로서 식별된 통상 관측되는 분자 종들의 높은 상대적 존재량(relative abundance)을 제시하였다(도 18). 구조 해석을 위해 적절한 세기의 단편 이온이 얻어지면 높은 질량 정확도 측정 및 탠덤 MS 분석을 사용하여 잠정적인 할당을 수행했다. 표 1, 2, 3, 4 및 5의 표에 원고(manuscript)에서 식별된 모든 종에 대한 탠덤 MS 실험으로 획득된 단편 이온 m/z 및 질량 오차가 설명되어 있다. 합성 지질의 FA 사슬에서 이중 결합의 이성질체가 정확한 구조적 할당을 복잡하게 하고, 이는 FA 사슬이 지질 종에 대해 잠정적으로 할당되는 이유이다 (Dill *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 12, 2011).

[0070] 매스스펙 펜 스펙트럼이 유사한 MS 파라미터하에서 그러나 생물학적 조직으로부터 지질을 추출하는 높은 효율을 통상 인가되는 아세토 니트릴, 디메틸포름아미드 용매 시스템을 사용하여 획득된 DESI 스펙트럼과 비교되었다. 흥미롭게도, 음이온 모드에서 물을 추출 용매로 사용하는 매스스펙 펜의 스펙트럼은 m/z 500 내지 m/z 1800의 다량의 분자 종을 ACN과 DMF를 사용하는 DESI의 스펙트럼과 공유했으며, PE 지질 예컨대, PE (40:6) (m/z 790.539) 및 PE (38:4) (m/z 766.539)의 비율은 약간 더 높았다. 도 6a 내지 도 6b는 매스스펙 펜 및 DESI로부터의 스펙트럼 모두에서 PI (38:4) (m/z 885.550) 및 PS (38:6) (m/z 834.529)가 지배적인 피크임을 보여준다. 게다가, 스펙트럼에서, 더 높은 m/z 를 갖는 이온 그룹이 m/z 1500 내지 m/z 1600의 질량 범위에서 목격되었고, 이는 단일 대전된 단독 카디올리핀(CL) 및/또는 글리세로포스포 다이머에 잠정적으로(tentatively) 할당되었다.

[0071] 추가로, 분석은 용매와 유사한 실험 조건으로서 물을 사용하여 동일한 마우스 뇌의 연속 조직 섹션에서 취득한 DESI 질량 스펙트럼에서 관측된 것과 음이온 모드에서 검출된 분자 종을 비교하였다. 매스스펙 펜(MasSpec Pen) 및 DESI를 사용하여 획득된 질량 스펙트럼은 0.9의 계산된 코사인 유사성과 유사하고, 필적할만한 상대적 존재량 및 S/N (singal-to-noise) 비율 (도 6c)에서 다수의 분자 종을 공유한다. 다양한 비율로 물과 에탄올의 혼합물을 포함하는 다른 용매 시스템도 매스스펙 펜 용 용매 시스템으로 연구되었다. 획득된 질량 스펙트럼은 순수한 물을 사용하여 획득된 질량 스펙트럼에서 관측된 것과 유사한 지질 종을 제시하였고, 이들의 상대적 존재량의 편차가 있었다 (도 3b). 따라서, 디바이스의 완전한 생체 적합성을 보장하기 위해, 이하의 모든 매스스펙 펜 실험을 수행 할 때 물을 용매로 선택했다.

[0072] 시스템 성능을 평가하기 위해, 연속적인 분석은 동일한 조직 섹션 및 다른 조직 섹션상에서 수행되었고, 시스템은 샘플 내 그리고 다른 샘플들에 걸쳐 높은 재현성을 보여 주었다.

[0073] 인간의 암과 정상 조직 섹션들의 분자 분석. 주변 이온화 질량 분석법(Ambient ionization mass spectrometry)은 인간 암 조직의 분자 진단을 위해 광범위하게 연구되어 왔다. 정상 및 종양 샘플을 분화시키는 본 출원에서 설명된 매스스펙 펜 시스템의 성능을 시험하기 위해, 유방, 신장, 림프절, 갑상선 및 난소를 포함하는 5 개의 상이한 조직 유형의 62 개의 인체 조직 샘플을 분석하였다. 각각의 조직 유형에 대해 물을 용매 시스템으로 사용하는 음이온 모드로부터 획득된 질량 스펙트럼은 DESI-MS에 의해 통상 관측되는 분자 이온을 나타내었으며, 대사 산물과 지질의 상대적 존재량이 높았다. 주 성분 분석 (PCA : principal component analysis)은 인간 검체의 중간 및 군내 분석에서 매스스펙 펜의 성능을 통계적으로 평가하기 위해 사용되었다. 전체 분산(variance)의 85% 이상을 포괄하는 처음 세개의 컴포넌트가 현재 작업에 사용된다는 점에 유의해야 한다. 도면들 9a-b에서 보여지는 것처럼, 정상 갑상선 및 신장 조직은 종양 조직과 잘 구별되었다. 놀랍게도, 음이온 모드에서 인체 조직 섹션을 분석하는 동안 일련의 다중 대전된 종이 검출되었고, 고 질량 정확도 측정 및 탠덤 질량 분석에 의

해 티모신 β -4로 식별되었다 (도 7). 각각의 검체의 대표적인 스펙트럼들이 도 5에 도시되었다. 놀랍게도, 인간의 정상 갑상선과 암 조직로부터 획득된 분자 프로파일은 질병 상태의 진단인 별개의 분자 패턴을 보여주었다. 분석된 다른 모든 암 조직에 대해서도 유사한 결과가 획득되었다.

[0074] 이 매스스펙 펜의 성능이 정상 및 종양 인간 유방 (n=5 정상 유방, n=5 유방 유관 암종) 및 갑상선 (n=5 정상 갑상선, n=4 유두 갑상선 암종, n=1 여포성 갑상선 선종) 조직의 20개의 얇은 조직 섹션을 분석하기 위해 테스트되었다. 각 조직 유형에 대해 음이온 모드로부터 획득된 질량 스펙트럼은 DESI-MSI에 의해 통상 인체 조직에서 관측되는 다양한 종류의 분자 이온을 제시하였고 대사 산물, 지방산 및 복합 지질의 상대적 존재량이 높았다. 예를 들어, 유두 갑상선 암종의 조직 섹션에 대해 획득된 질량 스펙트럼은 이중 대전된 CL 및 다른 다른 글리세로 인지질 예컨대, PI (38:4) (m/z 885.550), PI (36:4) (m/z 857.518), PE (38:4) (m/z 766.539), 및 PE (36:2) (m/z 742.539) (표 2)을 포함하여 DESI-MSI (Zhang *et al.*, *Cancer Research* 76, 2016)에 의한 진단 마커들로서 앞에서 식별된 지질 종들을 제시하였다. 뚜렷한 질량 스펙트럼 프로파일이 정상 갑상선 조직 섹션에서 획득되었으며, 요오드로 식별된 m/z 126.904, 글루타민으로 식별된 m/z 145.050, 아스코르브 산으로 식별된 m/z 175.024, C36H78O9N3I 에 잠정적으로 할당된 m/z 822.472 및 PI (38:4)로 식별된 m/z 885.551의 높은 상대적 존재량을 제시하였다 (도 8b). 흥미롭게도, m/z 991.091 (z=-5), m/z 1239.113 (z=-4), 및 m/z 1652.484 (z=-3)를 포함하는 상이한 전하 상태 (z)에서 일련의 다중 대전된 분자 이온들이 분석된 모든 조직 섹션으로부터 획득된 질량 스펙트럼에서 검출되었다. 이들 이온들은 높은 질량 정확도 측정에 기초하여 단백질 티모신 β -4의 상이한 전하 상태로 잠정적으로 식별되었다(도 7 및 표 1). 특히, 인체 조직 섹션에서 획득된 데이터상에 수행된 주 성분 분석 (PCA)는 종양 및 정상 조직간의 분리를 보였다 (도 9).

[0075] 새로 생긴(fresh) 조직 샘플의 분자 분석. 매스스펙 펜 디바이스가 모폴러지에 상관 없이 새로 생긴 조직 샘플 상에서 작동하도록 디자인되었다. 새로 생긴 조직 분석을 위해 디바이스를 테스트하기 위해, 새로 생긴 마우스 뇌 조직이 시작단계에서 사용되었다. 마우스 뇌 조직 섹션 또는 새로 생긴 뇌 조직으로부터 획득된 스펙트럼에는 상당한 차이가 관측되지 않았다. 도면들 4a-4b는 마우스 뇌 새로 생긴 조직 및 조직 섹션으로부터 거의 동일한 질량 분석 패턴을 보여 주며, 이는 매스스펙 펜 으로부터의 추출 프로세스가 상이한 샘플 준비 단계에 대해 유사하게 작용함을 예시한다. 그런 다음, 갑상선과 림프절의 두 가지 유형의 새로 생긴 인간 검체를 추가로 분석했다. 정상 및 암 갑상선의 새로 생긴 조직 샘플로부터의 스펙트럼이 도 8에 도시되었다.

[0076] 조직 बैं크(bank)로부터 획득된 모든 냉동 검체들은 냉동고에서 -80 °C에서 잘 보존되었고 사용하기 전에 실온에서 해동되었다는 것에 유의하여야 한다. 새로 생긴 인간 검체로부터 수집된 데이터도 PCA에 의해 처리되었다. 기록된 스펙트럼의 PCA는 정상 및 종양 샘플 간의 분명한 구별 표시 (도면들 10a-10b)를 보여주었다. 따라서, 매스스펙 펜이 새로 생긴 정상 및 질병 샘플들을 구별하는데 사용될 수 있다고 평가된다. 샘플링 프로세스에 의한 조직에 손상이 관측되지 않았다는 것에 유의하여야 한다.

[0077] 표 1 : 마우스 뇌 조직에서 선택된 음이온 모드 분자 이온의 식별을 위해 획득된 데이터.

제안된 식별		제안된 화학식	측정된 m/z	이론적인 m/z	질량 오차 (ppm)	MS/MS ^a 상의 메인 단편 이온
티모신 β -4		$C_{212}H_{350}N_{56}O_7$ 8S1	991.091 (-5) 1239.113 (-4) 1652.484 (-3)	991.090 (-5) 1239.114 (-4) 1652.488 (-3)	<1 (-5) <1 (-4) 2.4 (-3)	NA
ST	t42:1	$C_{48}H_{92}NO_{12}S$	906.634	906.635	-1.1	NA
PI	38:4	$C_{47}H_{82}O_{13}P$	885.550	885.550	<1	152.995, 241.011,

[0078]

						283.264, 303.233, 419.257, 581.309
PS	40:6	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₀ P	834.529	834.529	<1	152.994, 283.264, 327.233, 419.256, 437.267, 747.497
PE	40:6	C ₄₅ H ₇₇ NO ₈ P	790.539	790.539	<1	283.243, 283.264, 327.232, 480.309
	38:4	C ₄₃ H ₇₇ NO ₈ P	766.539	766.539	0	259.243, 283.263, 303.232, 480.309
	P-38:6	C ₄₃ H ₇₃ NO ₇ P	746.513	746.513	<1	283.243, 327.232, 436.282
	O-36:3	C ₄₁ H ₇₇ NO ₇ P	726.545	726.544	1.4	140.010, 152.994, 281.248, 444.288, 462.299
	P-36:4	C ₄₁ H ₇₃ NO ₇ P	722.513	722.513	<1	152.994, 259.243, 303.233, 418.273, 436.283
Cer	36:1	C ₃₆ H ₇₁ NO ₃ Cl	600.513	600.513	<1	NA
FA	22:6	C ₂₂ H ₃₁ O ₂	327.233	327.233	<1	229.195, 283.243, 309.174
	20:4	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303.233	303.233	<1	205.195, 259.243, 284.991
	18:0	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	283.264	283.264	<1	265.130
	16:0	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	255.233	255.233	<1	237.043
N- 아세틸아스파르트산		C ₆ H ₈ NO ₅	174.040	174.041	-5.7	58.028, 88.039, 130.049
헥소오스		C ₆ H ₁₂ O ₆ Cl	215.033	215.034	-4.7	NA
글루타메이트		C ₅ H ₈ NO ₄	146.045	146.046	-6.8	102.054, 128.034
글루타민		C ₅ H ₉ N ₂ O ₃	145.061	145.062	-6.9	127.050, 128.034

[0079]

[0080] ^a NA(이용가능하지 않은)은 높은 질량 정확도만이 잠정 이온 식별을 위해 사용하는 것을 의미한다.

[0081] 표 2. 인간 갑상선 조직으로부터 선택된 음이온 모드 분자 이온을 식별을 위해 획득된 데이터.

제안된 식별		제안된 화학식	측정된 m/z	이론적인 m/z	질량 오차 (ppm)	MS/MS ^a 상의 메인 단편 이온
PI	40:5	C ₄₉ H ₈₄ O ₁₃ P	911.566	911.566	<1	NA
	38:4	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885.550	885.550	<1	152.994, 223.006, 241.011, 283.264, 303.233, 419.256, 581.310
	36:4	C ₄₅ H ₇₈ O ₁₃ P	857.518	857.518	<1	152.994, 241.011, 279.233, 415.226, 577.278
	34:1	C ₄₅ H ₈₀ O ₁₃ P	835.534	835.534	<1	152.994, 241.011, 255.232, 391.226, 553.277
PE	38:4	C ₄₃ H ₇₇ NO ₈ P	766.539	766.539	<1	140.010, 152.995, 259.243, 283.264, 303.233, 480.309
	36:2	C ₄₁ H ₇₇ NO ₈ P	742.539	742.540	-1.3	140.010, 152.994, 281.248
	P-36:4	C ₄₁ H ₇₃ NO ₇ P	722.513	722.513	<1	140.010, 196.037, 259.243, 303.233, 418.270, 436.283
CL	74:7	C ₈₃ H ₁₄₆ O ₁₇ P ₂	738.502	738.502	<1	NA
	72:8	C ₈₁ H ₁₄₀ O ₁₇ P ₂	723.479	723.479	<1	NA
Cer	34:1	C ₃₄ H ₆₇ NO ₃ C _l	572.481	572.482	-1.7	NA
FA	20:4	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303.233	303.233	<1	205.195, 259.243, 284.992
	18:0	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	283.265	283.264	3.5	265.130
	18:1	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281.250	281.249	3.6	NA
	18:2	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	279.234	279.233	3.6	261.222
	16:0	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	255.233	255.233	<1	NA
아스코르브산		C ₆ H ₇ O ₆	175.024	175.025	-5.7	87.007, 115.002
글루타민		C ₅ H ₉ N ₂ O ₃	145.050	145.062	-8.3	NA
I-			126.904	126.905	-7.9	NA

[0082]

[0083] ^a NA(이용가능하지 않은)은 높은 질량 정확도만이 잠정 이온 식별을 위해 사용하는 것을 의미한다.

[0084] 표 3. 인간 난소 조직으로부터 선택된 음이온 모드 분자 이온을 식별을 위해 획득된 데이터.

제안된 식별		제안된 화학식	측정된 m/z	이론적인 m/z	질량 오차 (ppm)	MS/MS ^a 상의 메인 단편 이온
PI	40:4	C ₄₉ H ₈₆ O ₁₃ P	913.581	913.581	<1	223.000, 241.011, 283.264, 331.264, 419.257, 581.309
	38:4	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885.549	885.550	-1.1	152.994, 223.000, 241.011, 283.264, 303.233, 419.256, 439.225, 581.309
	36:1	C ₄₅ H ₈₄ O ₁₃ P	863.565	863.566	-1.2	152.995, 241.011, 281.248, 283.264, 419.256
	34:1	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₃ P	835.534	835.534	<1	152.994, 223.000, 241.011, 255.233, 281.248, 391.225, 553.278

[0085]

PS	38:3	C ₄₄ H ₇₉ NO ₁₀ P	812.544	812.545	-1.2	152.994, 283.264, 305.248, 419.256, 437.266, 725.514
	36:1	C ₄₂ H ₇₉ NO ₁₀ P	788.545	788.545	<1	281.248, 283.264, 417.242, 419.256, 437.268, 701.512
PE	38:4	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₃ P	766.539	766.539	<1	259.243, 283.264, 303.233, 480.309
	O-38:5	C ₄₃ H ₇₇ NO ₇ P	750.544	750.544	<1	259.243, 303.233, 446.303, 464.313
	P-35:4	C ₄₁ H ₇₃ NO ₇ P	722.512	722.513	-1.4	259.243, 303.233, 418.273, 436.283
FA	16:0	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	255.232	255.233	-3.9	NA
아스코르브산		C ₆ H ₇ O ₆	175.024	175.024	<1	87.007, 115.002

[0086]

[0087] ^a NA(이용가능하지 않은)은 높은 질량 정확도만이 잠정 이온 식별을 위해 사용하는 것을 의미한다.

[0088] 표 4. 인간 폐 조직으로부터 선택된 음이온 모드 분자 이온을 식별을 위해 획득된 데이터.

제안된 식별		제안된 화학식	측정된 m/z	이론적인 m/z	질량 오차 (ppm)	MS/MS ^a 상의 메인 단편 이온
PI	40:4	C ₄₉ H ₈₆ O ₁₃ P	913.580	913.581	-1.1	152.994, 223.000, 241.010, 283.264, 331.264, 419.256, 581.311
	38:4	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885.550	885.550	<1	152.994, 223.000, 241.011,

[0089]

						283.264, 303.233, 419.256, 581.311
	36:1	C ₄₅ H ₈₄ O ₁₃ P	863.565	863.566	-1.2	152.994, 241.011, 281.248, 283.264, 419.256, 581.311
	36:2	C ₄₅ H ₈₂ O ₁₃ P	861.548	861.549	-1.2	152.994, 223.000, 241.011, 281.256, 417.241
PG	36:2	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₀ P	773.542	773.534	10	152.994, 281.256, 417.241, 491.278, 509.288
	34:1	C ₄₀ H ₇₆ O ₁₀ P	747.514	747.517	-4.0	152.994, 255.233, 281.256, 391.226, 417.241, 491.277
PE	38:4	C ₄₃ H ₇₇ NO ₈ P	766.535	766.539	-5.2	140.010, 283.256, 303.233, 480.309,
	36:1	C ₄₁ H ₇₉ NO ₈ P	744.552	744.555	-4.0	140.011, 281.256, 283.264, 480.307
	P-38:4	C ₄₃ H ₇₇ NO ₇ P	750.534	750.544	-13	259.243, 303.233, 464.314
	P-36:4	C ₄₁ H ₇₃ NO ₇ P	722.511	722.513	-2.8	259.243, 303.233, 418.273, 436.283
	O-34:2	C ₃₉ H ₇₅ NO ₇ P	700.527	700.529	-2.9	NA
Cer	34:1	C ₃₄ H ₆₇ NO ₃ Cl	572.479	572.482	-5.2	NA
FA	18:1	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281.249	281.249	<1	NA
아스코르브산		C ₆ H ₇ O ₆	175.023	175.024	-5.7	115.002

[0090]

[0091] ^a NA(이용가능하지 않은)은 높은 질량 정확도만이 잠정 이온 식별을 위해 사용하는 것을 의미한다.

[0092] 표 5. 인간 유방 조직으로부터 선택된 음이온 모드 분자 이온을 식별을 위해 획득된 데이터.

제안된 식별		제안된 화학식	측정된 m/z	이론적인 m/z	질량 오차 (ppm)	MS/MS ^a 상의 메인 단편 이온
PI	38:4	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885.550	885.550	<1	152.994, 223.000, 241.011, 283.264, 303.233, 419.257, 581.310, 599.319
	36:1	C ₄₅ H ₈₄ O ₁₃ P	863.565	863.566	-1.2	152.994, 223.000, 241.011, 281.248, 283.264, 419.256, 581.309
PG	36:2	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₀ P	773.542	773.534	10	152.994, 281.248, 417.240, 491.276
FA	20:4	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303.233	303.233	<1	205.195, 259.243, 284.991
	18:1	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281.249	281.249	<1	NA

[0093]

[0094] ^a NA(이용가능하지 않은)은 높은 질량 정확도만이 잠정 이온 식별을 위해 사용하는 것을 의미한다.

[0095] 표 6. 이 연구에 사용된 253 인간 조직 샘플들의 환자 인구 통계 자료

환자 진단		중위 연령, 나이	연령 범위, 나이	성에 의한 환자 수 (남성, 여성)	종족에 의한 환자 수 (백인, 블랙, 아시안, 무명인)
유방	정상	47	24-76	(0, 29)	(21, 7, 1, 0)
	암	58	41-75	(2, 14)	(10, 2, 4, 0)
폐	정상	57	12-82	(33, 14)	(35, 12, 0, 0)
	암	66	22-84	(25, 23)	(35, 7, 0, 6)
난소	정상	50	31-80	(0, 29)	(22, 7, 0, 0)
	암	62	30-83	(0, 28)	(25, 2, 0, 1)
갑상선	정상	40	18-80	(10, 17)	(18, 7, 0, 2)
	종양	49	16-81	(12, 17)	(21, 4, 0, 4)

[0096]

[0097] 재료 및 방법

[0098] **질량 분석기.** Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap 질량 분석기 (Thermo Scientific, San Jose, CA)를 사용했다. 풀 스캔(full)이 m/z 120-1800의 범위에서 수행되었고, 다른 질량 분석 파라미터들이 아래와 같이 열거된다 : 해상력(resolving power) 140 000, 마이크로 스캔 (2), 최대 주입 시간 300 ms, 모세관 온도 350℃ 및 S-lens RF 레벨 100.

[0099] **생물학적 조직.** 야생 유형 마우스 뇌는 Bioreclamation IVT에서 구입했다. 갑상선, 림프절, 난소, 신장 등 62 개의 냉동 인체 조직 검체는 Cooperative Human Tissue Network 및 Baylor College Tissue Bank 에서

획득했다. 샘플들은 -80 °C의 냉동고에 저장되었다. 조직 슬라이드는 CryoStar™ NX50 크라이오스타트를 사용하여 16 μm로 섹션을 만들었다. 냉동된 조직 검체들은 사용 전에 실온에서 해동시켰다.

통계적 분석. IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)을 사용하여 주성분 분석 (PCA)을 수행하여 데이터의 패턴을 나타냈다. 분석은 미가공(raw) 데이터를 사용하여 직접 수행되었다. 700-900의 m/z 범위에서 최고 상대 세기의 10 개의 피크가 PCA에 사용되었다. 전형적으로, 전체 분산의 85% 이상을 포괄하는 처음 세개의 컴포넌트가 현재 결과에 사용된다.

예제 3 - 핸드 헬드 및 복강경 사용을 위한 시스템 자동화

매스스펙 펜 디자인에 사용되는 모든 재료 (PDMS 및 PTFE) 및 용매 (오로지 물)가 생물학적으로 호환 가능하기 때문에, 시스템은 실시간 분석을 위해 핸드 헬드 방식으로 수술에 사용될 높은 가능성을 가진다. 그 보다는, 디바이스의 작은 크기로 인해, 심지어, 로봇 수술 시스템 예컨대, 액세서리 포트 또는 로봇 팔 중 하나를 통해 다빈치(Da Vinci) 수술 시스템에 통합될 수 있다. 인간의 체강 내 여러 부위를 수술 중에 신속하게 샘플링할 수 있으며, 분자 시그니처의 데이터베이스와 기계 학습 알고리즘을 사용하여 분석할 수 있다. 따라서, 진단 결과는 각각의 샘플링 영역에 대해 실시간으로 제공될 수 있다. 이 시스템은 조직의 실시간 특성 및 진단이 요구되는 매우 다양한 종양 및 다른 수술 개입(예컨대, 자궁 내막증과 같은)에 광범위하게 사용될 수 있다.

예제 4 - 조직 샘플의 예측 분석

매스스펙 펜 디자인은 정상 조직 샘플과 함께 유방암, 폐암, 난소 암, 갑상선 암을 갖는 환자로부터 조직 샘플을 분석하는데 사용된다. 이 샘플을 분석하기 전에, 질량 대 전하 비율 (m/z)을 가장 가까운 0.01로 반올림하고 총 이온 크로마토그램 (TIC)을 정규화하여 샘플이 처리되었다. 모든 백그라운드 m/z 피크와 환자 샘플의 10% 미만으로 나타난 해당 피크들도 또한 제거되었다. 전체 질량 범위가 분석에서 사용되었다. 트레이닝된(trained) 분류기는 라소 로지스틱 리그레션 모델(lasso logistic regression model)였다. 암의 존재를 분석한 조직 샘플의 경우, 모든 분류기에 대한 전반적인 수행 결과가 표 7에 도시된다. 전체 결과는 96.3%의 정확도, 96.4%의 감도 및 96.2%의 특이성을 나타낸다.

표 7 : 모든 정상 대(vs) 모든 암 의 진실 결정과 관련된 조직 샘플 예측*

		예측	
		정상	암
진실	정상	127	5
	암	4	106

* 양성 갑상선을 포함하지 않음

폐 암에 존재가 분석된 조직 샘플에 대하여, 표 8은 해당 특정 값에 대하여 관련 계수와 함께 조직 샘플의 구별에 사용된 질량 대 전하의 값 (m/z)을 보여준다.

[0109] 표 8 : 폐 암 질량 대 전하 값 (m/z) 및 정상 폐 대(vs) 폐암에 대한 계수

m/z	계수
175.02	32.51042
187.01	492.94937
201.04	324.19856
215.03	-134.54101
313.16	-711.31964
330.98	31.73486
332.90	-49.54229
357.10	-903.32504
409.23	218.36836
615.17	-418.02900
722.51	42.39442
744.55	780.14488
747.52	-248.52283
748.52	-494.98929
771.52	6.80739
773.53	-292.30917
863.57	-722.21921
885.55	703.46083
886.55	8.82125

[0110]

[0111] 표 9는 분석 속도 및 행(row)에 진실 (조직학적)결정 및 열(column)에 예측값을 갖는 각각의 샘플의 분류. 암 조직 샘플에 대하여, 샘플은 96.8%의 정확도, 97.9%의 감도, 95.7%의 특이성 및 0.97 AUC로 식별되었다.

[0112] 표 9 : 폐암에 대한 진실 결정에 관련된 조직 샘플 예측

		예측		비례 보정
		정상	암	
진실	정상	45	2	0.957
	암	1	47	0.979

[0113]

[0114] 유사한 분석이 표 10 및 표 11에 나타난 바와 같이 정상 폐 대(vs) 폐선암종(adenocarcinoma)에 대하여 수행되었다. 샘플은 92.2%의 정확도, 88.2%의 감도, 93.6%의 특이성 및 0.98의 AUC로 식별되었다.

[0115] 표 10 : 폐 암 질량 대 전하 값 (m/z) 및 정상 폐 대(vs) 폐선암종에 대한 계수

m/z	계수
175.02	78.79492
201.04	113.95819
747.52	-134.59620
773.53	-17.30482
885.55	205.16262

[0116]

[0117] 표 11 : 폐 편평상피(Squamous) 세포 암종에 대한 진실 결정(True Determination)과 관한 조직 샘플 예측

		예측		비례 보정
		정상	암	
진실	정상	44	3	0.936
	암	2	15	0.882

[0118]

[0119] 유사한 분석이 표 12 표 13에 나타난 바와 같이 정상 폐 대(vs) 편평상피 샘플에 대하여 수행되었다. 샘플은 93.8%의 정확도, 88.2%의 감도, 95.7%의 특이성 및 0.93의 AUC로 식별되었다.

[0120] 표 12 : 폐암 질량 대 전하 값 (m/z) 및 정상 폐 대 편평상피 세포 폐암에 대한 계수

m/z	계수
201.04	203.209288
306.08	2.171805
747.52	-83.325218
773.53	-101.591552
861.55	-22.995934
885.55	248.475559

[0121]

[0122] 표 13 : 폐암에 대한 진실 결정에 관한 조직 샘플 예측

		예측		비례 보정
		정상	암	
진실	정상	45	2	0.957
	암	2	15	0.882

[0123]

[0124] 상기에서 설명된 폐암에 대하여 수행된 분석에 유사하게, 유사한 분석이 난소, 갑상선, 유방 암에 수행되었고, 개별 m/z 피크 및 각각 샘플 세트에 대한 계수를 도출하였다. 난소 암 샘플은 94.7%의 정확도, 100%의 감도, 89.7%의 특이성 및 0.98의 AUC로 검출되었다. 갑상선암 샘플은 94.7%의 정확도, 90.9%의 감도, 96.3%의 특이성 및 0.93의 AUC로 검출되었다. 마지막으로, 유방암 샘플은 95.6%의 정확도, 87.5%의 감도, 100%의 특이성 및 1.00의 AUC로 검출되었다.

[0125] 표 14 : 난소 암 질량 대 전하 값(m/z)와 계수

m/z	계수
124.01	-0.39418349
175.02	-0.44099907
175.03	-0.65091248
283.27	-0.19534503
313.16	0.13896620
341.27	-0.01845538

[0126]

[0127] 표 15 : 난소 암에 대한 진실 결정과 관한 조직 샘플 예측

예측			비례 보정
	정상	암	
정상	26	3	0.897
암	0	28	1.000

[0128]

[0129] 표 16 : 갑상선 암 질량 대 전하 값 (m/z) 및 정상적인 종양 대(vs) 양성 종양에 대한 계수

m/z	계수
175.02	0.050122579
191.02	-0.009462112
191.05	-0.354060964
283.27	-0.471995496
341.27	-0.151684619
615.17	-0.208451792
822.47	-1.009896669
822.48	-1.045185471

[0130]

[0131] 표 17 : 정상 갑상선 대(vs) 양성 종양에 대한 진실 결정과 관한 조직 샘플 예측

		예측		비례 보정
		정상	암	
진실	정상	26	1	0.963
	암	1	10	0.909

[0132]

[0133] 표 18 : 갑상선 암 질량 대 전하 값 (m/z) 및 정상 갑상선 대 악성 종양에 대한 계수

m/z	계수
175.02	-0.13520642
283.27	-0.41455282
341.27	-0.16730814
353.16	-0.06014487
432.20	-0.31647335
433.21	-0.07291166
615.17	-0.61749889
822.47	-0.53746679
822.48	-1.04230818

[0134]

[0135] 표 19 : 정상 갑상선 대(vs) 양성 종양에 대한 진실 결정과 관련된 조직 샘플 예측

		예측		비례 보정
		정상	암	
진실	정상	26	1	0.963
	암	1	10	0.909

[0136]

[0137] 표 20 : 갑상선 암 질량 대 전하 값 (m/z) 및 정상 유방 대(vs) 유방암에 대한 계수

m/z	계수
187.04	476.70006
268.80	-190.32304
279.92	79.49933
283.27	-31.45926
341.27	-11.77054
345.16	-154.78978
381.21	-68.13689
687.51	-39.13906
742.54	1771.27018
766.54	1663.80192

[0138]

[0139] 표 21 : 정상 유방 대(vs) 유방암을 위한 진실 결정과 관련있는 조직 샘플 예측

		예측		비례 보정
		정상	암	
진실	정상	29	0	1.000
	암	2	14	0.875

[0140]

[0141] 예제 5 - 매스스펙 펜 시스템의 공간 해상도

[0142] 매스스펙 펜 시스템의 공간 해상도는 특정 스팟(spot)을 사용하여 더 높은 공간 해상도가 결정될 수 있다고 테스트되고 판단되었다. 테스트는 마우스 뇌에서 화이트 vs. 회색 재료를 사용하여 수행되었다. 도 11a-11e에 도시된 도면들은 스팟의 특정 크기로 테스트된 뇌의 부분을 도시한다. 특히, 샘플 스팟 1은 스팟이 주로 회색 재료로 구성되었음을 보여준다

[0143] 예제 6 - 조직 샘플의 비파괴 분자 분석

[0144] 매스스펙 펜은 조직 강성도 및 모폴러지와 관계없이 조직 검체상에 직접적으로 작동하도록 디자인되었다. 매스스펙 펜의 성능은 마우스의 뇌와 인간의 유방, 갑상선, 폐, 난소 조직을 포함하는 다양한 장기에서 연부 조직

샘플(0.1 - 5g)을 분석하기 위해 테스트되었다. 조직 분석은 앞에서 설명된 동일한 자동화된 동작 단계에 따라 간단한 한 단계 실험을 통해 주변 조건(ambient condition)에서 수행되었다. 매스스펙 펜 팁은 3초 동안 조직 샘플의 표면에 부드럽게 컨택되면서 추출을 수행했다. 마우스 뇌에서 회색 재료의 영역에 대해 획득된 질량 스펙트럼은 재현 가능하였으며 (RSD=4.6%, n=10), 마우스 뇌 조직 섹션 질량 스펙트럼 (코사인 유사도 0.93)과 매우 유사하여 (도 4), 따라서, 이는 조직 표면에서의 추출 프로세스가 조직 형태 및 강성과 무관하게 효율적으로 발생하였음을 나타낸다. 유사하게, 인체 조직 샘플의 매스스펙 펜 분석은 풍부한 분자 정보, 특히 상피 세포 및 암세포로 구성된 조직의 풍부한 분자 정보를 제공한다. 기질과 같은 연성 결합 조직으로 주로 구성된 비 암 조직 검체는 덜 풍부한 질량 스펙트럼 프로파일을 제공했다. 특히, 분석된 많은 정상 유방 암 조직 샘플은 지방 함량을 나타내었으며, 이는 물과 섞이지 않아서 유방암 조직 또는 정상 유방 암 분비샘과 비교되었을 때 질량 스펙트럼에서 덜 풍부한 총 이온 카운트가 획득되었다.

[0145] 매스스펙 펜 분석 후 모든 조직 샘플의 시각 및 현미경 검사는 프로브된 영역에서 조직 샘플 모폴러지에 검출 가능한 손상을 보이지 않았다. 도 15는 매스스펙 펜 분석 전, 분석 동안, 그리고 분석 후의 폐 조직 샘플로부터 획득된 광학 이미지를 도시한다. 풍부한 질량 스펙트럼 프로파일이 획득되었지만, 어떠한 조직에 대한 관측가능한 손상이 분석된 영역에서 보이지 않았다(도 15). 매스스펙 펜의 자동 및 시간 제어 작동 단계는 조직이 작은 액적에만 노출되고 저장소에서 질량 분석기로 액적을 전송하는데 사용되는 진공이 아니라 조직 손상을 방지한다. 따라서, 이들 결과는 매스스펙 펜이 조직 검체로부터 풍부한 분자 정보를 얻기 위한 비파괴적인 접근법이라는 증거를 제공한다.

[0146] 예제 7 - 인체 조직에서의 암의 분자 진단 및 통계적 예측

[0147] 매스스펙 펜을 사용하여 인간의 조직 샘플로부터 획득된 분자 정보는 질병 상태의 진단 및 예측인 경우 다음에 평가되었다. 총 95 개 폐 샘플 (47 정상, 17 폐암선종, 17 편평상피 세포 암종 및 14 다른 조직학적 아형들의 암 샘플을 포함하는 48 암 샘플), 57개 난소 샘플 (정상 29 정상 및 28 HGSC), 57 갑상선 샘플 (27 정상, 11 여포성 갑상선 선종, 18 유두 갑상선 암종), 45 유방 샘플 (29 정상, 16 관암종)을 포함하는 매스스펙 펜을 사용하여 253 인체 조직 검체 (도 11). 환자 인구 통계 정보가 표 6에 제공된다. 매스스펙 펜 분석 후, 분석된 영역은 일련의 광학 이미지를 통해 구분되고 등록되었다. 이어서, 평행한 샘플 조각을 냉동시키고, 경계 영역에서 섹션을 만들고, H & E 염색되고 조직 병리학에 의해 평가하여 진단을 도출하였다. 지배적인 세포 구성과 명확한 진단을 갖춘 샘플만 분자 데이터베이스를 구축하는데 사용되었다. 암 샘플에 대해 획득된 조직학적으로 검증된 질량 스펙트럼은 주변 이온화 MS 기술을 사용하여 잠재적인 질병 마커로서 앞에서 설명된 여러 지질 및 대사 산물로 식별된 분자 종을 제시하였다. 폐암 조직의 경우, 특성 분자 마커들 예컨대, PI (36:1)로 식별된 m/z 863.565, PG (36:2)로 식별된 m/z 773.542, PG (34:1)로 식별된 m/z 747.514 및 FA(18:1)로 식별된 m/z 281.249 로서의 지방산이 관측되었다 (도 15 및 표 4). 정상 폐에 대하여, PI (38:4)로 식별된 m/z 885.550, m/z 744.552, PE (36:1)로 식별된 m/z 744.552가 관측되었다. 유방암 조직으로부터 획득된 질량 스펙트럼은 PI (38:4)로 식별된 m/z 885.550, PI (36:1)로 식별된 m/z 863.565, PG (36:2)로 식별된 m/z 773.542, 여러 FA 예컨대, FA (20:4)로 식별된 m/z 303.233, 및 FA (18:1)로 식별된 m/z 281.249를 포함하여 DESI-MSI (29, 30)에 의해 앞에서 설명된 진단 지질 마커들을 제시하였다(표 5). 분석된 모든 253 인체 조직 샘플에 대해 획득된 데이터에서 수행된 PCA는 각 장기에 대하여 암과 정상 조직 사이의 분리를 보여준다(도 11).

[0148] 매스스펙 펜 분자 시그니처가 암과 정상 조직의 예측인지 평가하기 위해, 라소 방법이 적용되어 조직학적으로 검증된 질량 분광 데이터베이스를 이용하여 분류 모델을 구축하였다. 모델의 성능은 일대일 탈회(leave-one-patient-out) 교차 검증 접근법을 통해 평가되었으며, 정확도와 AUC 뿐만 아니라 암에 대한 감도와 특이성에 의해 측정되었다 (표 22). 유방암 (n=45)의 경우, 87.5%의 감도, 100%의 특이성 (AUC=1.0), 95.6%의 전체 정확도가 달성되었으며, 이는 DESI-MSI (98.2%의 정확도, n=126) (Guenther *et al.*, *Cancer Research* 75, 2015), iKnife (95.5%의 정확도, n=10) ((Balog *et al.*, *Science Translational Medicine*, 5, 2013), 지질 및 단백질의 MALDI 이미징 (94.1%의 정확도, n=68) (31)를 이용하여 보고된 결과에 필적할만하다. HGSC (n=57)에 대하여, 100% 감도, 89.7% 특이성, 및 94.7%의 정확도를 달성하였으며(AUC=0.98), 이는 DESI-MSI (97.1%의 정확도, n=31)(Sans *et al.*, *Cancer Research*, 2017)에 의해 획득된 분류 결과와 유사하다. 폐암 (n=956)에 대하여, 98.097.9%의 감도, 95.7%의 특이성 및 96.89%의 정확도가 달성되었다 (AUC=0.97). 폐암 조직학상 아형을 근거로 예측할 때, 편평상피 세포 암종과 폐선암종 각각 93.8%와 92.2%의 정확도가 달성되었다. 조사한 갑상선 종양 샘플은 양성 여포 갑상선 선종 (FTA)과 악성 유두 갑상선암종 (PTC) 샘플이 포함되었다. 각각에 대한 분류 기준은 FTA에 대해 94.7%의 정확도와 PTC에 대해 97.8%의 정확도를 산출하는 것으로 수립되었다. 조사한 4 가지 유형의 암 모두에 대해 전용적으로 96.4%의 감도, 96.2%의 특이성 및 96.3%의 정확도가 달성되었다. 이들 결과는 매스

스펙 펜에 의해 인체 조직 샘플로부터 획득된 분자 정보가 암을 매우 예측가능하다는 것을 보여준다. 더구나, 매스스펙 펜을 사용하여 획득된 분자 데이터를 기반으로 구축된 통계 분류기는 강건하며 조직 샘플의 신속한 임상 진단을 위해 자동화된 접근법으로 사용될 수 있다는 것을 결과는 표시한다.

[0149] 표 22 : 매스스펙 펜을 사용하여 획득된 샘플 및 결과의 설명 병리학적 진단, 환자 샘플 수 및 라소(Lasso) 예측 감도, 특이성, 정확도 및 일대일 탈회(leave-one-out) 교차 검증 접근법을 사용하여 획득된 곡선 아래 면적이 도시된다.

장기	병리학적 평가		환자의 수	라소 예측			
	진단	조직학적 유형		감도	특이성	정확도	AUC
유방	정상		29				
	암	관암종	16	87.5%	100.0%	95.6%	1.00
폐 ^a	정상		47	98.0%	95.7%	96.9%	0.97
	암	선암종	17	88.2%	93.6%	92.2%	0.98
		편평상피 세포	17	88.2%	95.7%	93.8%	0.93
		기타	14	-	-	-	-
난소	정상		29				
	암	고도 장액성 난소암	28	100.0%	89.7%	94.7%	0.98
갑상선 ^b	정상		27	-	-	-	-
	종양	갑상선 유두암	18	94.4%	100.0%	97.8%	0.99
		소포샘종	11	90.9%	96.3%	94.7%	0.93

[0150]

[0151] ^a 폐암에 대한 라소 예측 결과는 정상 대 모든 암 조직 (제 1 행), 이어 정상 대 폐 선암종 (중간 행)과 정상 대 편평상피 세포 암종 (마지막 행)이 도시된다.

[0152] ^b 갑상선암에 대한 라소 예측 결과는 정상 대 악성 유두상 암종 및 정상 대 양성 소포샘종(follicular adenoma)에 대해 도시된다.

[0153] **예제 8 - 조직 특이성 및 암 마진 조직 영역의 샘플 간(intra-sample) 분석**

[0154] 조직학적으로 별개의 영역을 식별하는 매스스펙 펜의 능력은 정상 난소 기질 조직에 인접한 HGSC의 영역을 함유한 단일 인체 조직 샘플에서 평가되었다. 조직 샘플에서 5 개의 연속적인 스왑은 도 14a에 도시된 광학 이미지에서 경계가 정해지는 바와 같이 1.5 mm 직경의 매스스펙 펜을 사용하여 분석되었다. 매스스펙 펜으로 분석된 영역을 포함하는 샘플의 조직 섹션은 H & E 염색되고 조직 병리학에 의해 평가하였다. 스왑 1과 스왑 2는 전문의 병리학자들에 의해 정상 기질로 진단되었지만, 영역 4와 5는 HGSC로 진단되었다. 스왑 3은 암과 정상 기질 조직 영역 사이에 마진에 있었고, ~ 50% 종양 조직과 ~ 50% 정상 기질 조직을 나타냈다. 도 14b는 스왑 1, 3 및 5에 대해 획득된 질량 스펙트럼을 도시한다. 스왑 5에 대해 획득된 스펙트럼, HGSC는 우리의 통계적 분류기를 구축하기 위해 생체 외(ex vivo) 분석된 HGSC 조직에서 검출된 특징적인 지질 마커를 제시하였다 (표 3). 정상 난소 기질 조직으로 진단된 스왑 1에 대해 획득된 질량 스펙트럼은 생체 외 분석된 기질 조직에 대해서도 관측된 바와 같이 덜 풍부한 분자 이온을 나타냈다. 스왑 3은 분석된 영역 내에 존재하는 정상 기질 조직의 기여로 인해 더 낮은 총 존재량을 갖는 HGSC의 특징적인 분자 프로파일을 나타냈다. 5 개의 스왑에 대해 획득된 질량 스펙트럼을 우리의 난소 암 분자 분류기에 의해 독립적인 검증 세트로 평가했다. 놀랍게도, 이것은 정상으로 스왑 1 및 2를 정확하게 예측하고, 암으로서 3, 4 및 5를 정확하게 예측하였다 (도 14c). 유사한 결과가 조직학적으로 별개의 영역을 갖는 상이한 조직 샘플에 대해 획득되었다 (도 19). 이 결과는 매스스펙 펜으로 획득된 분자 정보가 정상 세포와 암세포가 혼합된 마진 영역의 암을 검출하는데 사용될 수 있음을 보여준다.

[0155] **예제 9 - 수술 중 인간 유방암의 뮤어린 모델의 생체 내 분석**

[0156] 매스스펙 펜은 같은 생체 내 분자 진단 도구로서 완전한 호환성을 보장하기 위해 생체 적합성 재료로 디자인되었다. 매스스펙 펜은 인체 유방암의 뮤어린 모델을 사용하여 생체 내 조직 분석에 대하여 테스트되었다. BT474HER2+ 유방암 세포가 누드 흉선 마우스 (n=3)에 피하 주입되었다. 종양은 4 주 동안 평균 250mm³로 성장했다. 모든 수술 및 매스스펙 펜 분석 절차는 마취하에 수행되었다. 수술 블레이드를 사용하여 종양 주위의 피부 피관(flap)을 개방하고 나서 피부 피관이 종양의 표면에서 날카롭게 절개되었다. 노출된 종양은 이전에 설명한 동일한 자동화된 실험 단계에 따라 매스스펙 펜을 사용하여 분석되었다. 도 16a는 수술 개시 전, 분석 전 (및 피부의 수술 제거 후), 매스스펙 펜 분석 동안, 및 분석 후 마취하에 있는 동물의 광학 이미지를 도시한다. 인접한 정상 연성 결합 조직 뿐만 아니라 일부 종양 절제술 후 종양 코어, 종양 상단의 여러 위치를 포함하여 조사한 각 동물에 대해 여러 조직 영역을 분석했다. 종양 영역에 대해 획득된 질량 스펙트럼은 인접한 정상 연성 결합 조직 영역 (도 16b)에 대해 획득된 것과 명확하게 특징이 다른 프로파일을 갖는, 인간 유방 조직에서 관측된 많은 분자 종을 나타내었다. 광학 현미경을 사용하여, H & E 염색된 조직 섹션 (도 20)의 광학 이미지에 의해 입증된 바와 같이, 분석된 조직 영역에 어떠한 관측 가능한 육안 또는 현미경 손상이 매스스펙 펜 분석으로 인해 검출되지 않았다. 더구나, 수술 중 매스스펙 펜 분석으로 인해 동물의 건강에 어떠한 뚜렷한 영향도 관측되지 않았다. 생체 내 분석 결과 후에, 새롭게 절제된 종양 검체가 또한 생체 외 분석되었고, 동일한 조직 영역의 재 분석 처리 가능성이 있을 것 같은 상대적 존재량에서의 변동에도 불구하고 생체 내 분석에서 관측된 것과 공통 지질 종의 질량 스펙트럼을 획득하였다(도 21). 이들 결과는 매스스펙 펜이 생체 내 분자 평가 및 암 진단에 적합함을 시사한다.

[0157] **예제 10 - 재료 및 방법**

[0158] **연구 계획 :** 본 연구의 목적은 인간의 조직 샘플에서 암을 비파괴적으로 분석하고 진단하는 새로운 질량 분석기 기반 프로브의 가능성을 평가하기 위한 것이었다. 이 연구에서는, 정상 및 암 유방암, 폐, 갑상선 및 난소 조직을 포함한 282 명의 환자로부터 획득된 인체 조직 샘플의 분자 프로파일이 조사되었다. 모든 환자 샘플은 승인된 IRB(Institutional Review Board) 의정서에 협동 인체 조직 네트워크 (CHTN), Asterand Biosciences (디트로이트, MI), MD Anderson Tissue Bank 및 Baylor College of Medicine Tissue Bank에서 입수했다. 조직 샘플에서 매스스펙 펜을 사용하여 획득된 질량 스펙트럼을 정규화하고 백그라운드를 빼고 통계 기법을 사용하여 분류 모델을 구축했다. 전문가, 보드 인증 병리학자 (JL, WY 및 NC)는 분석된 조직 샘플로부터 획득된 H & E 염색된 조직 섹션을 평가했다. 병리학자들은 질량 분석 분석으로부터 취득에 관한 정보를 알지 못했다. 병리학자가 28 개 샘플을 포함한 세포 조성에 상당한 불균질성을 갖는 것으로 결정한 경우 샘플은 통계적 분석에서 제외했다. 생체 내 동물 모델 실험이 IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee) 의정서에 따라 수행하였다.

[0159] **매스스펙 펜 디자인과 공학 :** 3D 프린터 (모델 uPrint SE plus)는 핵심 컴포넌트 - PDMS (다우 코닝, 미들랜드, MI, USA) 프로브 팁을 인쇄하는데 사용되었다. 펜 팁은 음형 주형으로부터 탄성 폴리머를 주조하고 주형을 용해시켜서 제조되었다. 음형 주형(negative mold)는 SolidWorks CAD (computer aided design) 소프트웨어를 사용하여 디자인한 다음 ABS 플라스틱 (Stratasys, Eden Prairie, MN, USA) 및 가용성 지지체 재료를 사용하여 3D 프린터로 모델링된 용융 증착했다. 부품은 그런 다음 지지체 재료가 완전히 용해될 때까지 24 시간 동안 70℃에서 지지 세정 디바이스 (SCA-1200HT, SCA) 및 용매 (EcoWorks)를 사용하여 지지체 재료를 제거하기 위해 세척하였다. 주조 단계에 대하여, PDMS 탄성폴리머 기재와 경화제의 혼합물 (Sylgard 184, Dow Corning)은 10:1의 중량비로 각각 준비되었다. 혼합물을 1h 동안 74℃에서 오븐 (10GCE-LT, Quincy Lab)으로 양생된 3-D 프린트된 주형에 붓고, 용해시키기 위해 아세톤(Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)과 함께 밀폐 용기에 놓는다. 최종 세척 단계에서 임의의 남아있는 ABS.PTFE 튜빙 (ID 1/32 인치, OD 1/16 인치, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA)을 제거하기 위해 팁을 아세톤으로 초음파 처리하여 실험을 위한 프로브 팁에 직접 삽입했다.

[0160] **데이터 취득 :** 모든 실험은 Q Exactive hybrid Quadrupole-Orbitrap 질량 분석기 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA)상에서 수행되었다. 분해능 140,000, 모세관 온도 350℃ 및 S-lens RF 레벨 100을 사용하여 m/z 120-1800의 범위에서 풀 스캔을 수행하였다. 야생 유형 마우스 뇌를 BioreclamationIVT (Westbury, NY)에서 구매하였다. 유방, 갑상선, 난소 및 폐를 포함한 총 282 개의 인체 조직 검체를 동결해 획득된 다음 실온에서 해동될 때 분석 때 까지 -80 ℃의 냉동고에 저장했다. 조직을 표면에 놓고 설명된 실험 단계를 사용하여 매스스펙 펜으로 분석했다. 실험 후, 분석된 조직 영역에 주석을 달고 동결 시켰으며 CryoStarTM NX50 크라이오스테트를 사용하여 16 μm 조직 섹션을 준비했다. 조직 조각의 상이한 영역에서 추가적인 조직 섹션을 MS 분석을 위해 획득

특하였다. 조직 섹션은 분석 때까지 동결 유지되어 그것들이 실온에서 분석될 때 매스스펙 펜으로 분석되었다. 조직 섹션은 그런다음 H & E 염색되고 병리학자에 평가되었다. 병리학적 진단은 우리의 분자 데이터베이스에 대한 기준으로 사용되었다.

[0161]

생체 내 실험 : 생체 내 실험은 마우스가 마취되어 마우스 동물 모델을 이용하여 종양의 수술 절제 동안 수행되었다 (2% 이소플루란, 98% O₂). BT474 HER2+ 세포가 5% O₂ 및 37 °C 에서 80-90% 컨플루언시(confluency)로 10% FBS, 1% L- 글루타민 및 1% 인슐린이 보충된 개선된 최소 필수 배지 (IMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 성장되었다. 혈구계(hemocytometer)와 트립판 블루 염료(trypan blue dye) 배제를 통해 세포 수를 카운트하였다. 누드 흉선 암컷 마우스 (N=3)는 0.72 mg, 60 일 방출, 17β-에스트라다올 펠릿 (Innovative Research of America, Sarasota, FL)을 목덜미에 피하 주입하였다. 약 24 시간 후, 20% 성장 인자가 감소된 매트릭젤 (Matrigel)을 함유한 무 혈청 IMEM 배지에서 BT474 유방암 세포 (10⁷)를 마우스의 오른쪽 측면 (총 100 μL 주입)에 피하 주사하였다. 종양은 직경 0.7-1.0 cm (평균 250 mm³)에 도달할 때까지 매주 성장을 관측했다. 그 시점에서, 모든 수술 절차는 마우스가 마취 (2% 이소플루란, 98% O₂) 하에서 수행되었다. 외과용 블레이드를 사용하여 피부 피판을 개방하고 종양 주위에 대략 1-2 cm의 공간을 남긴 다음 피부 피판을 종양 표면에서 절개하였다. 피부를 플랩(flap)하여 종양 및 인접한 정상 조직을 노출시키고, 매스스펙 펜을 사용하여 여러 영역에서 분석하였다. 종양 조각을 스칼펠(scalpel)를 사용하여 절제하고 생체 외 분석했다. 매스스펙 펜으로 분석한 종양 조직 부위에 주석을 달고, 급속 동결하고, 섹션을 만들고, 진단을 위해 H & E 염색을 시행했다.

[0162]

통계적 분석 : 각 10초 매스스펙 펜 분석로부터 획득된 세개의 질량 스펙트럼의 평균은 분자 데이터베이스를 구축하였다. Xcalibur 미가공 데이터는 마이크로소프트 엑셀 (Microsoft Excel) 스프레드 시트 형식으로 변환되었다. 스펙트럼의 전체 질량 범위는 m/z 값을 가장 가까운 백분율로 반올림하여 빈 (bin)으로 분할되었다. 모든 질량 스펙트럼은 처음에 총 이온 수 (TIC) 또는 m/z 885.55의 절대 세기에 따라 실험간에 발생할 수 있는 신호 세기의 약간의 변동을 설명하기 위해 정규화되었다. 그런 다음 분석된 샘플의 최소 10%에 나타나지 않는 피크와 백그라운드 피크가 랜덤 노이즈를 줄이기 위해 제외되었다.

[0163]

각각의 조직 섹션 (유방 또는 갑상선)의 경우, 분석된 각각의 조직에 대한 네개의 대표적인 질량 스펙트럼은 웹사이트 빌트 인 기능을 이용하여 주성분 분석 (PCA)에 대한 metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>)로 импорт(import)되었다. 각 조직 유형별 웹사이트를 통해 스코어 플롯 및 로딩 플롯이 생성되었다. 각각의 연부 조직 샘플 유형 (유방, 갑상선, 폐 및 난소)에 대해, 데이터는 R 프로그래밍 언어로 импорт되었다. PCA는 R에서 prcomp 함수를 사용하여 주 성분을 계산하고 사전 처리된 데이터를 평균 제로(0)에 중앙에 놓음으로써 수행되었다. 첫 번째 3 개의 주 성분은 R에 대한 rgf 및 pca3d 패키지로 시각화되었다. 조직 분류의 경우, 라소 방법은 CRAN R 언어 라이브러리의 glmnet 패키지를 사용하여 적용하였다. 라소를 사용하여 생성된 모델은 다른 정규화 방법보다 해석하기가 더 쉽다 "스파스(sparse)" 모델, 즉 피처의 하위 세트만 포함하는 모델을 생성하기 때문이다. 통계적으로 유용한 각 피처에 대한 수학적 가중치는 질량 스펙트럼 특성이 특정 등급(암 대 정상, 또는 암 서브 유형 대 정상)을 특성화하는데 있어서 중요성에 따라 라소에 의해 계산된다. 분류는 트레이닝 세트 내에서 예측 정확도를 평가하기 위해 일대일 탈회(leave-one-out) 교차 검증 접근법을 사용하여 수행되었다. 트레이닝 된 분류기의 성능은 감도, 특이성, 정확도 및 AUC로 측정되었다.

[0164]

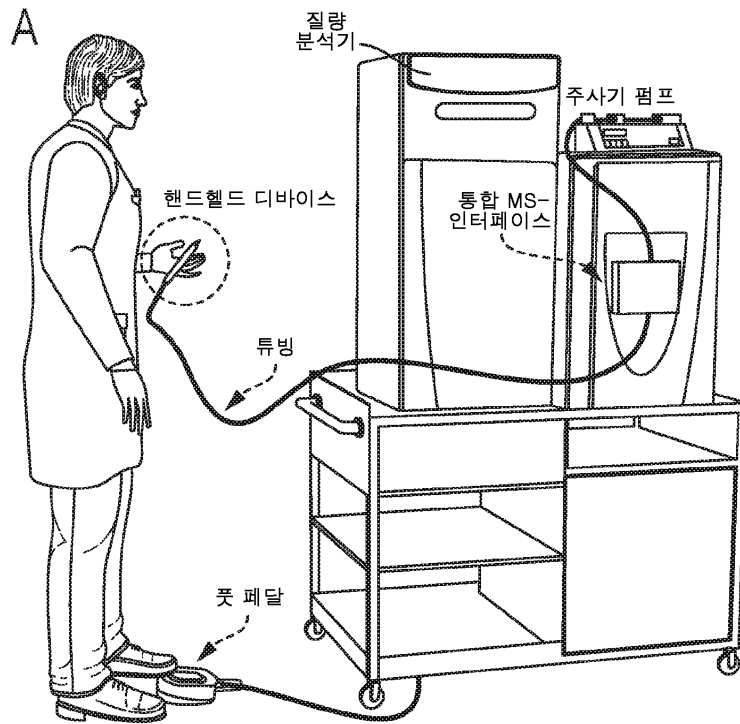
* * *

[0165]

본 출원에 개시되고 청구된 모든 방법들은 본 발명을 고려하여 과도한 실험없이 이루어지고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법을 바람직한 실시예의 양태로 설명하였지만, 당해 기술 분야의 당업자는 본 발명의 개념, 취지 및 범위를 벗어나지 않고서 방법 및 단계 또는 본 출원에 설명된 방법의 단계의 시퀀스에 변형을 적용할 수 있음이 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적으로 및 생리학적으로 관련있는 특정 제제가 동일하거나 유사한 결과가 달성하면서도 본 출원에 설명된 제제를 대체할 수 있음은 자명할 것이다. 당업자에게 명백한 이러한 모든 유사한 대체물 및 변형은 첨부된 청구 범위에 의해 한정된 본 발명의 취지, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.

도면

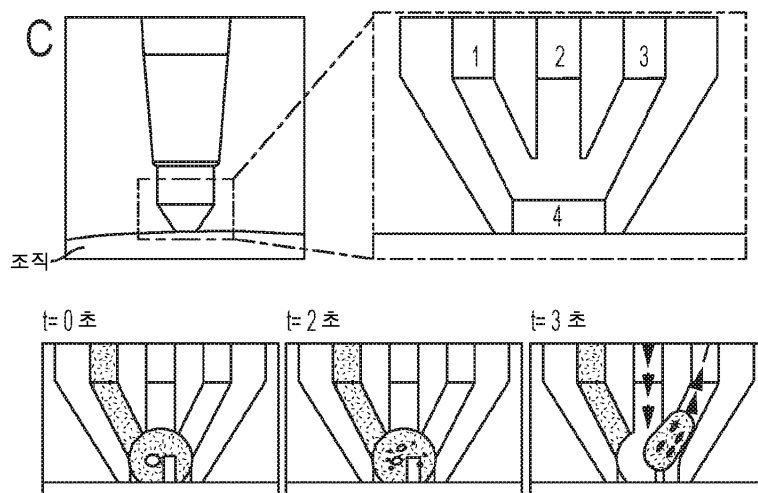
도면1a



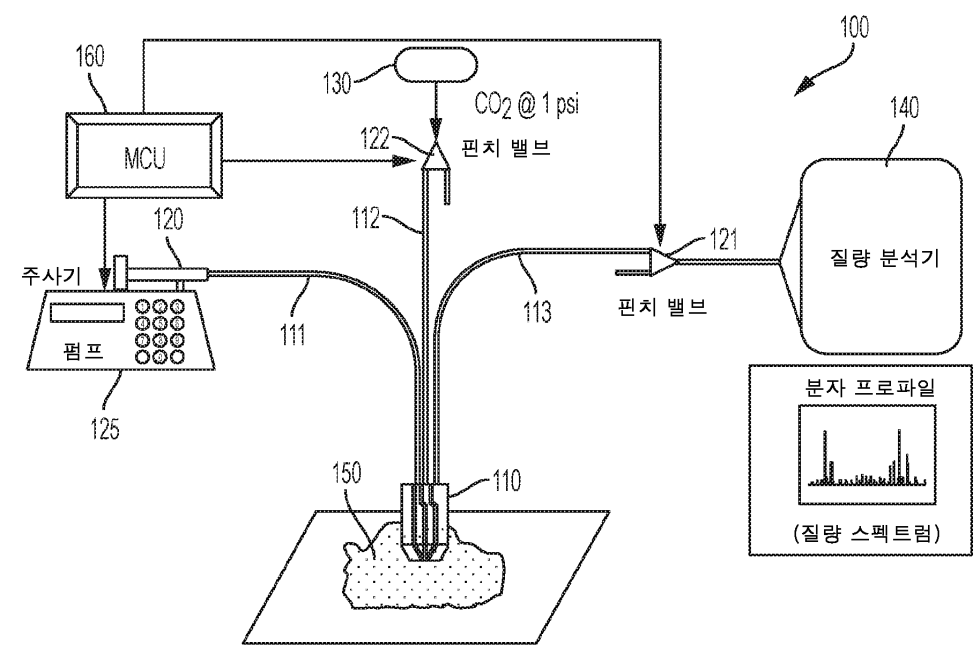
도면1b



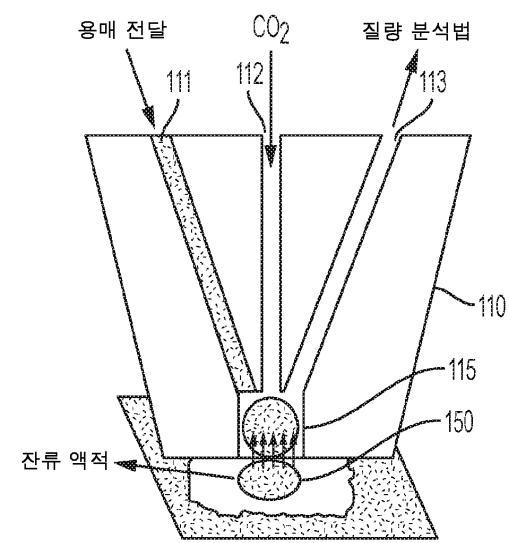
도면1c



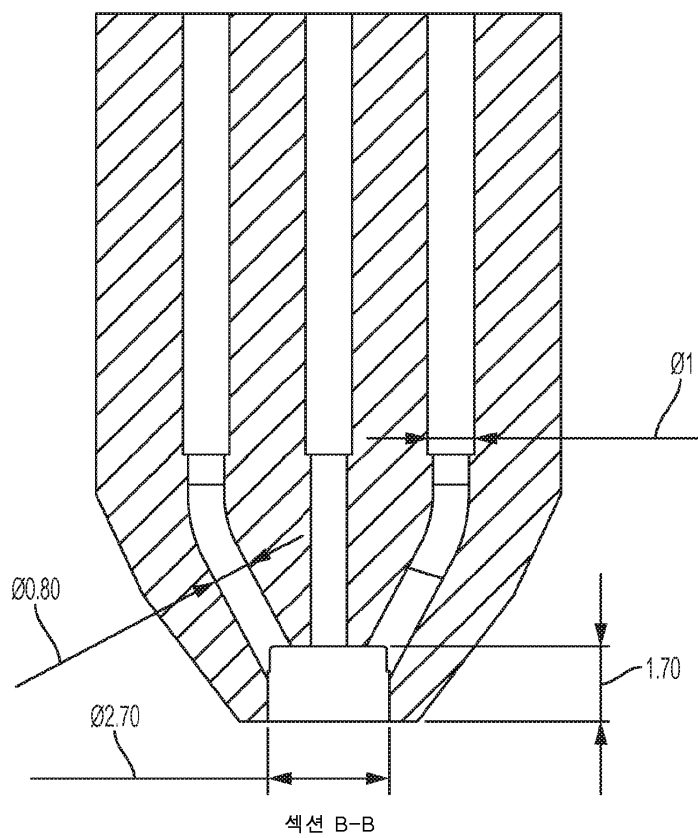
도면1d



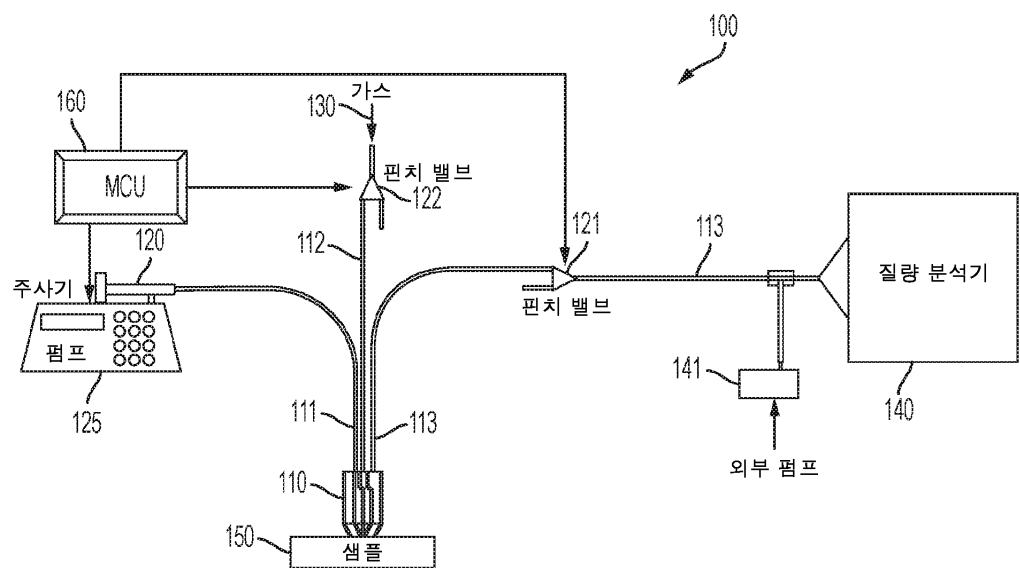
도면1e



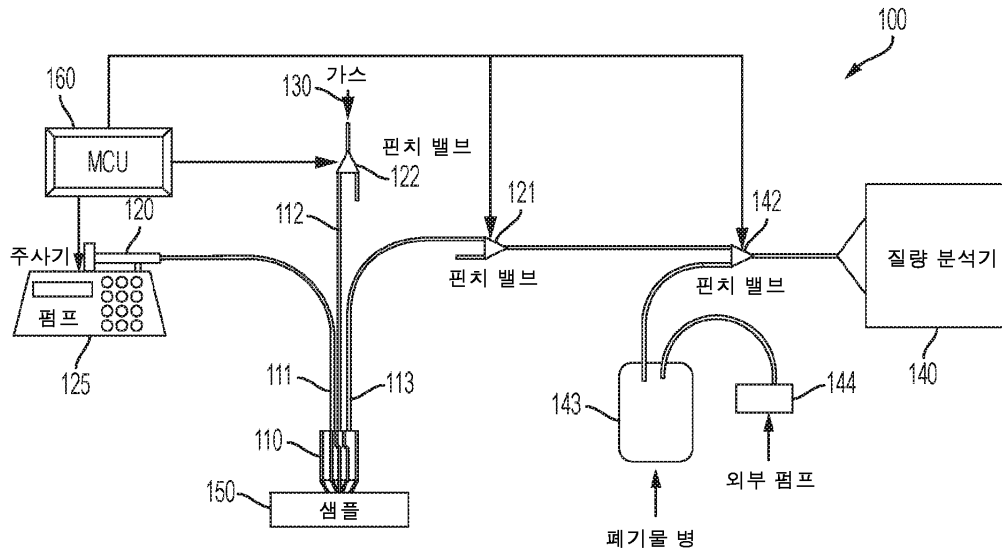
도면1f



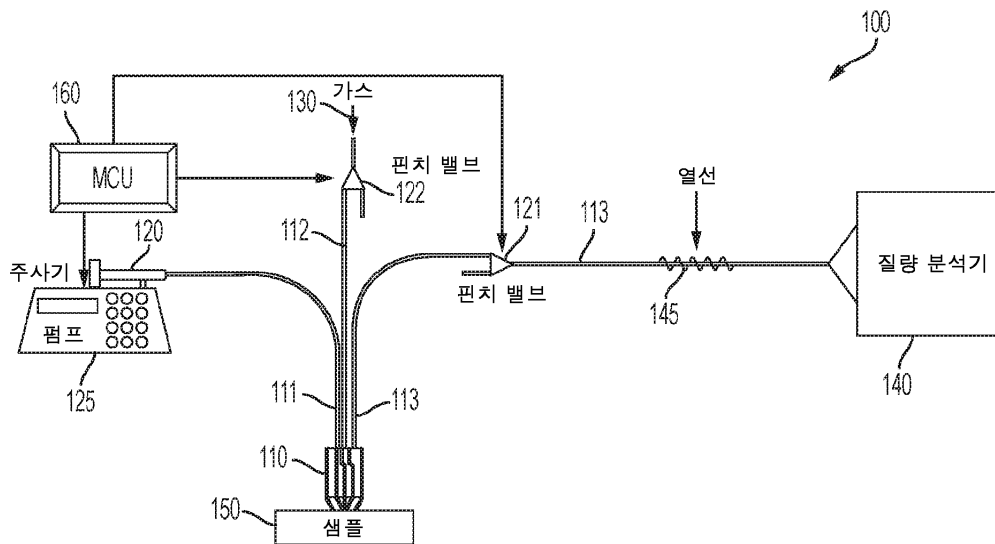
도면1g



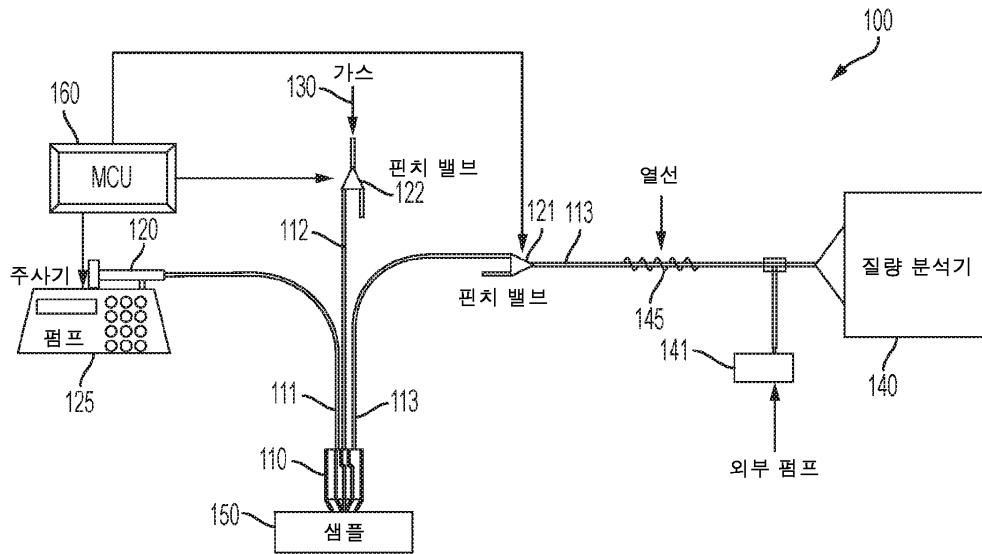
도면1h



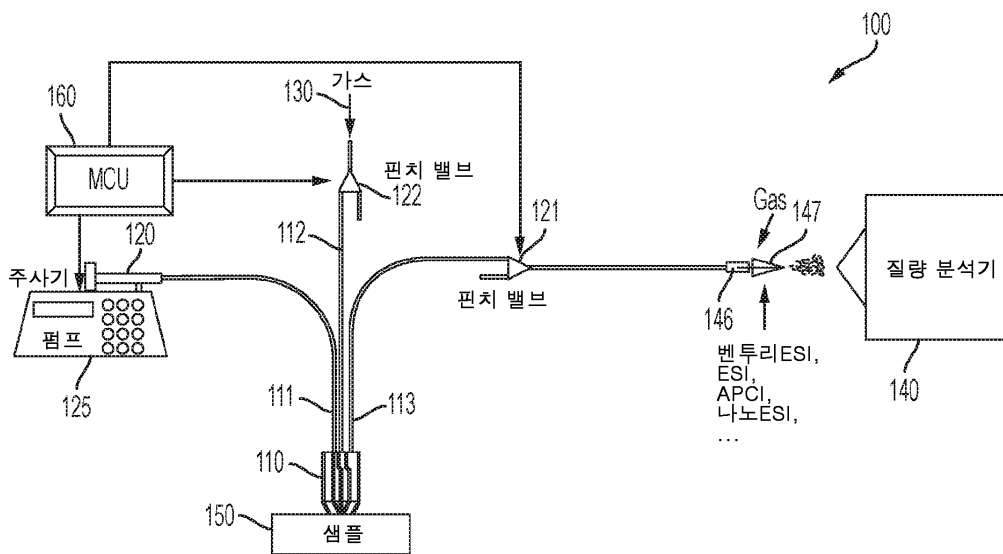
도면1i



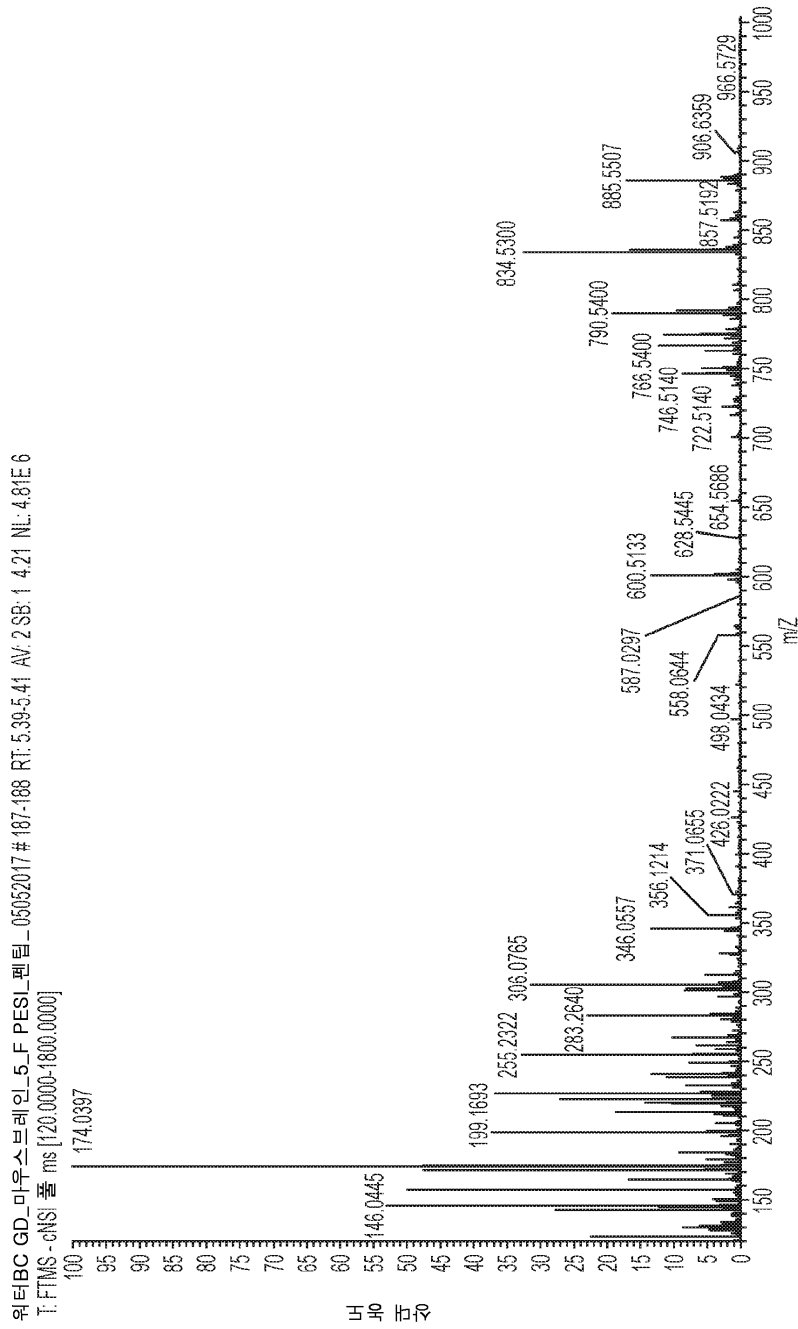
도면1j



도면1k

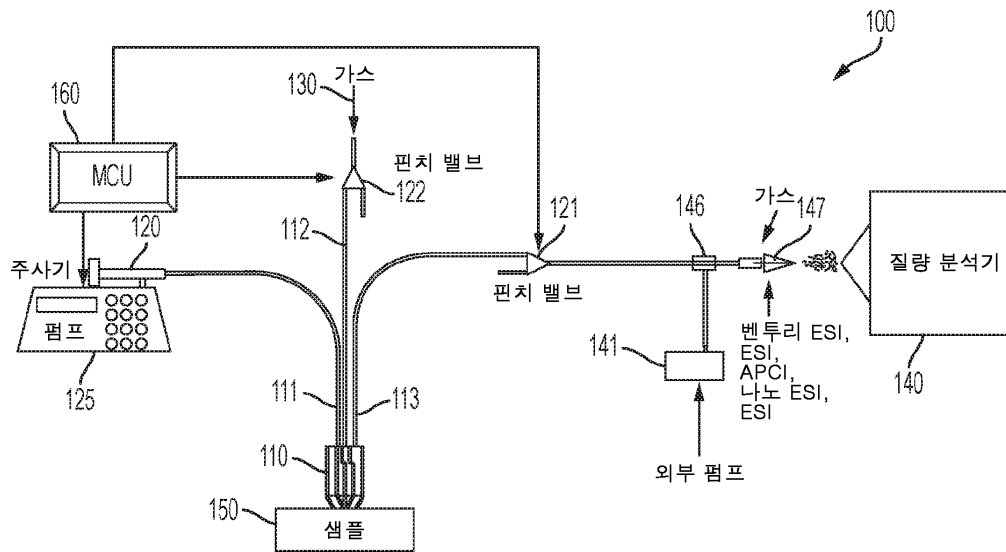


도면11

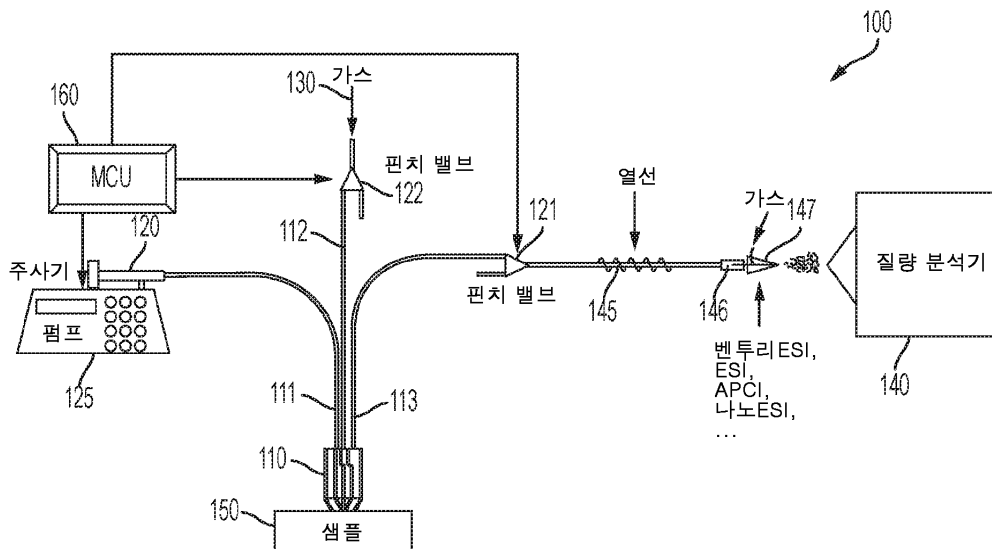


도 11 - 벤투리-ESI 소스(슬라이드 8에 유사하게 디자인)에 연결된 매스펙 펜을 이용하여 마우스 뇌 조직 섹션으로부터의
풀이온 모드 질량 스펙트럼

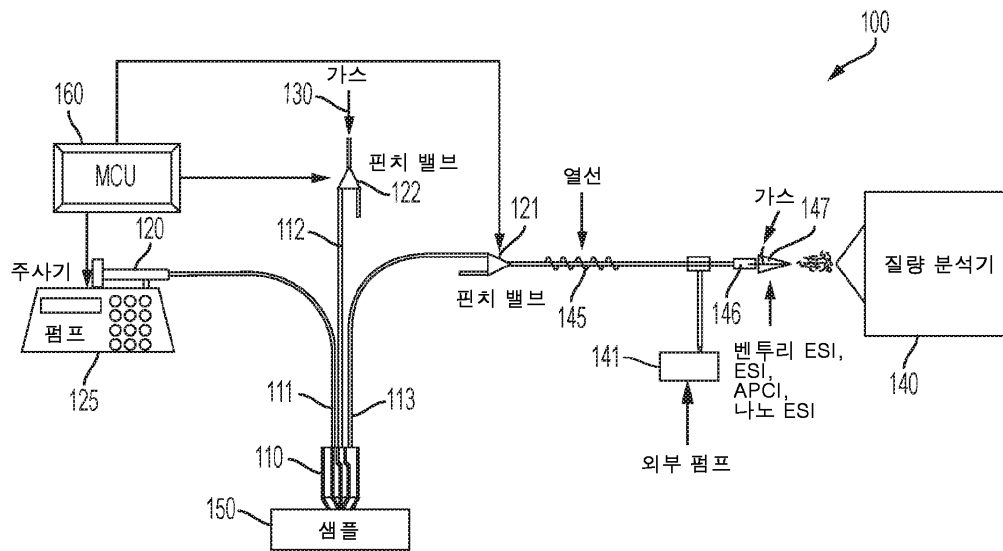
도면 1m



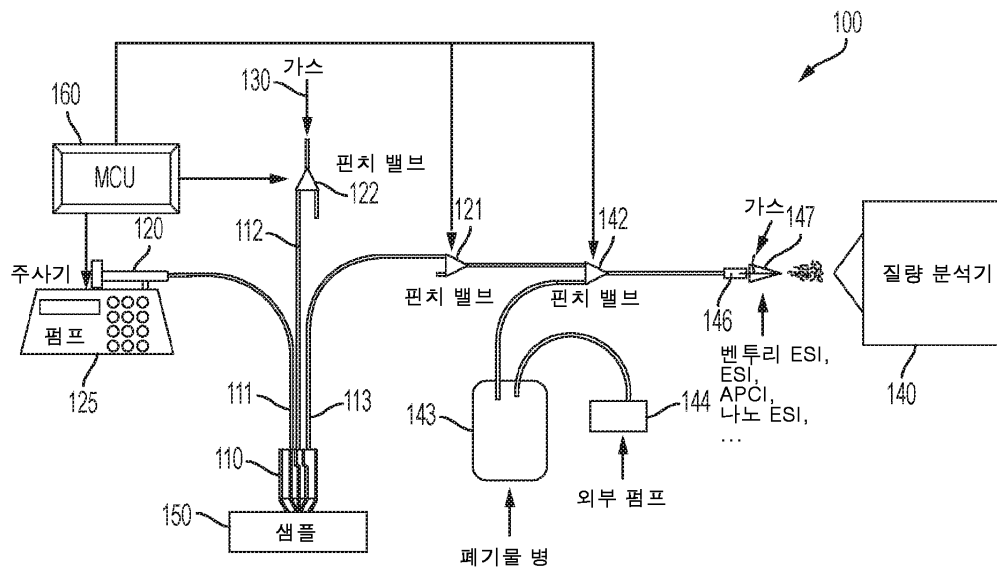
도면 1n



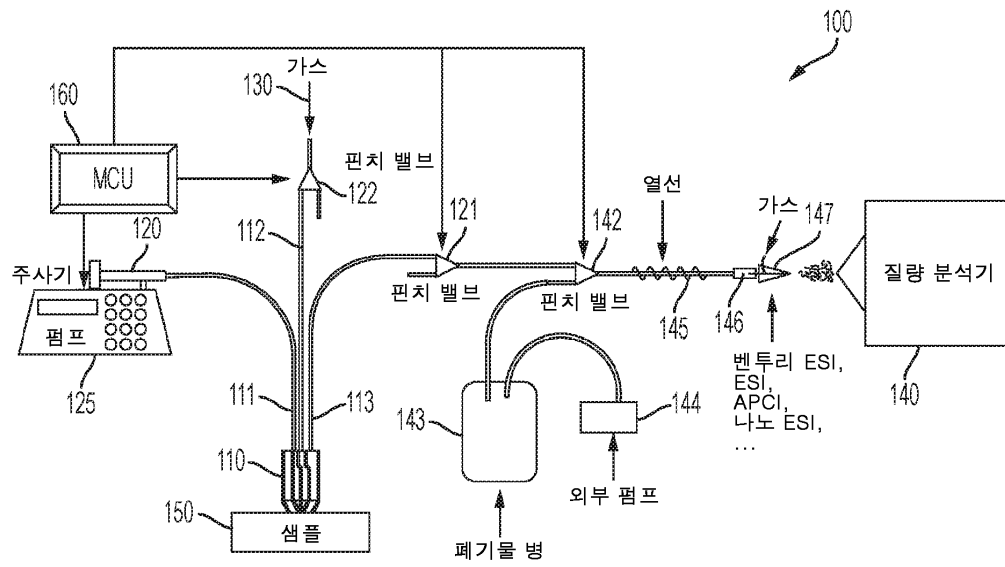
도면1a



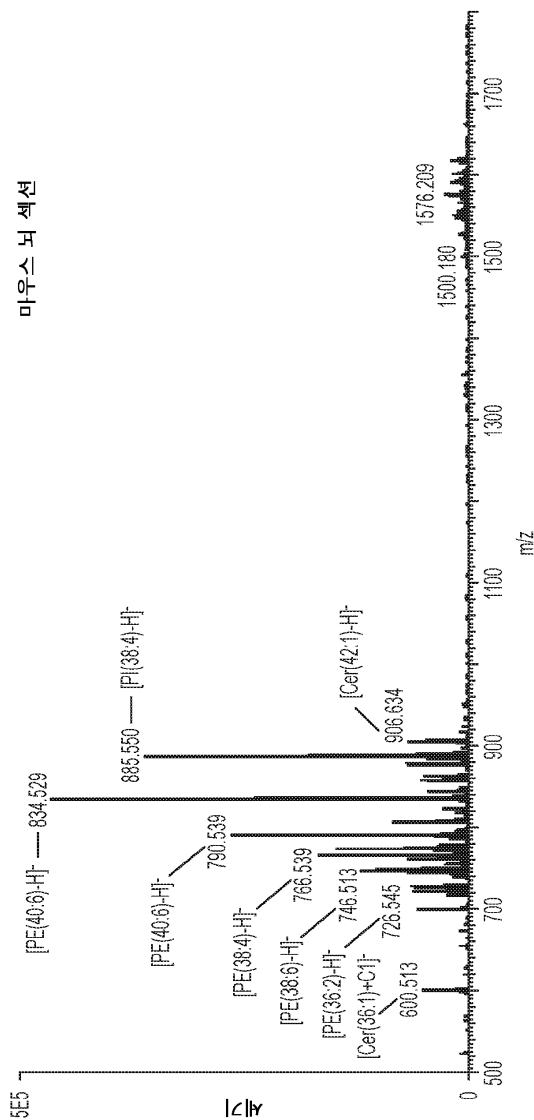
도면1p



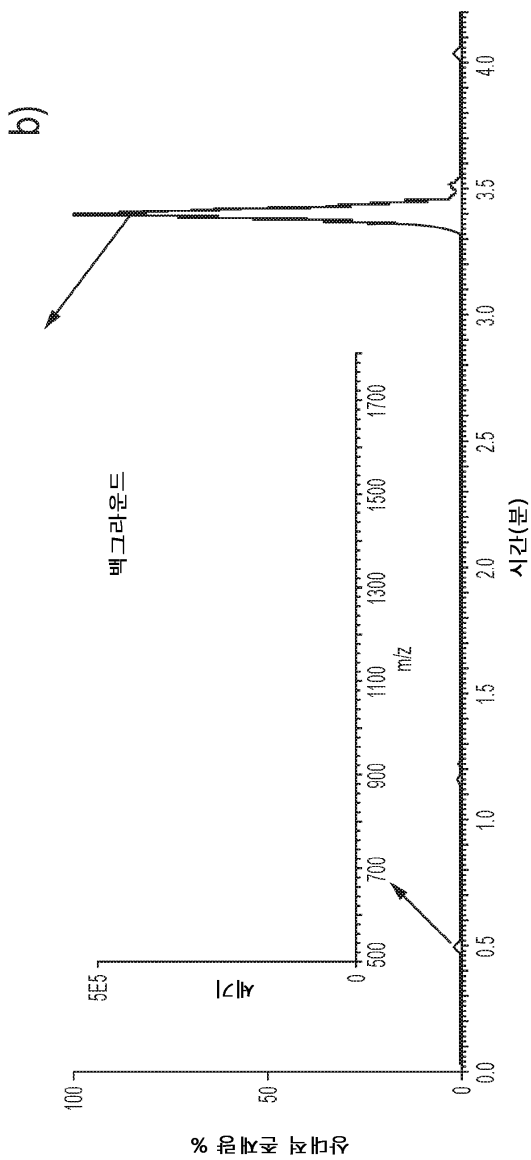
도면1q



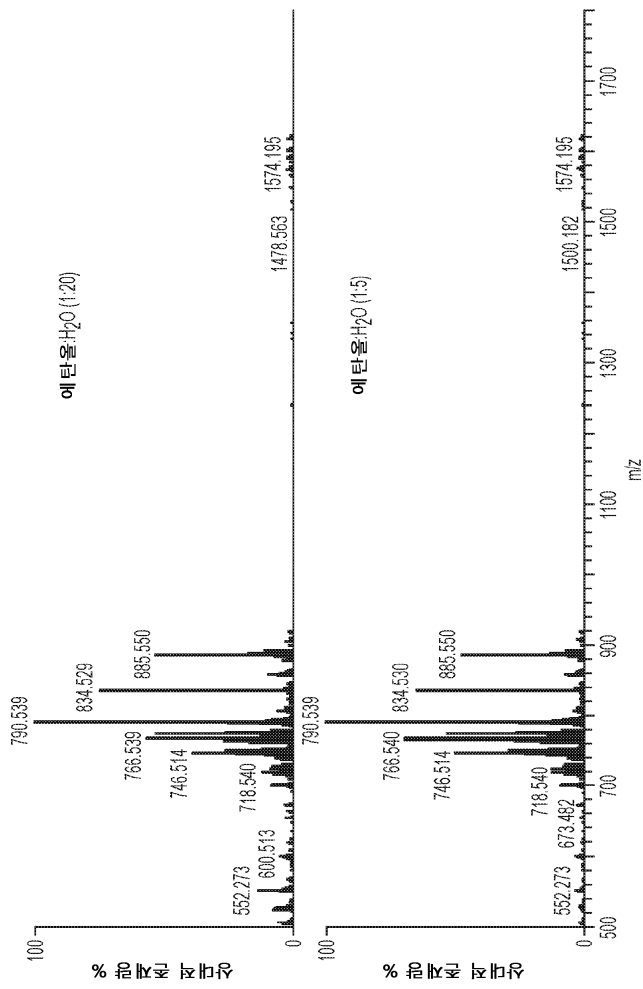
도면2a



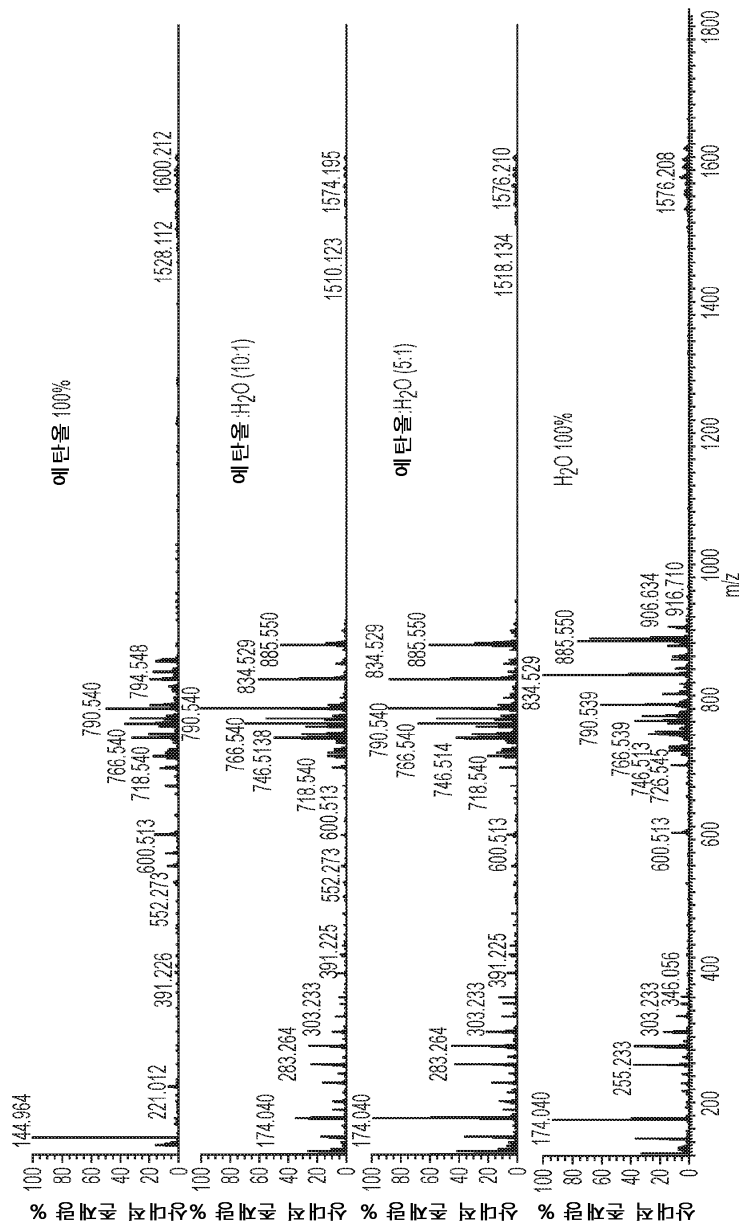
도면2b



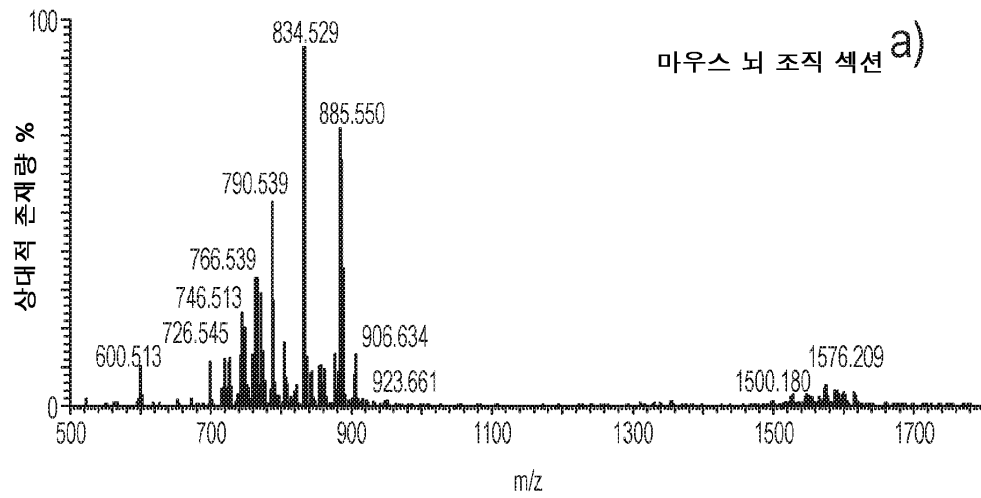
도면3a



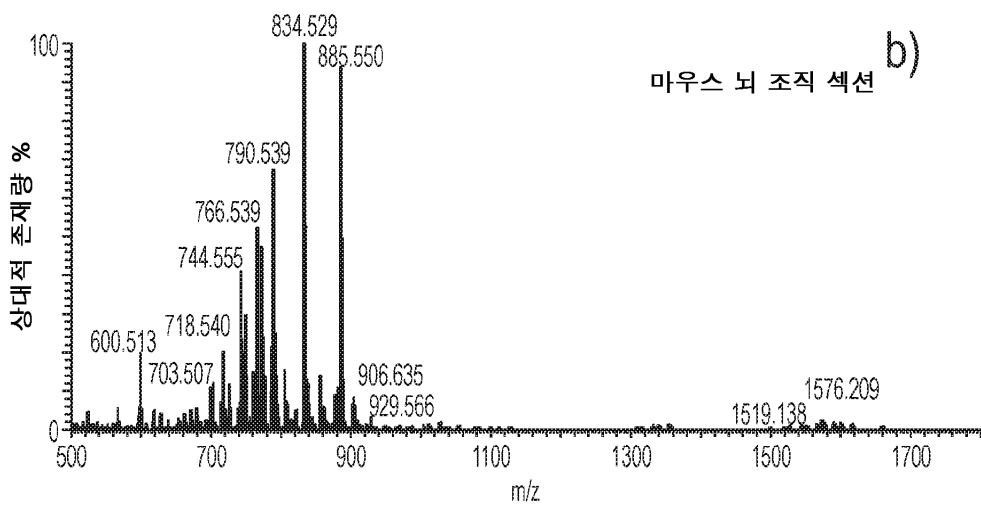
도면3b



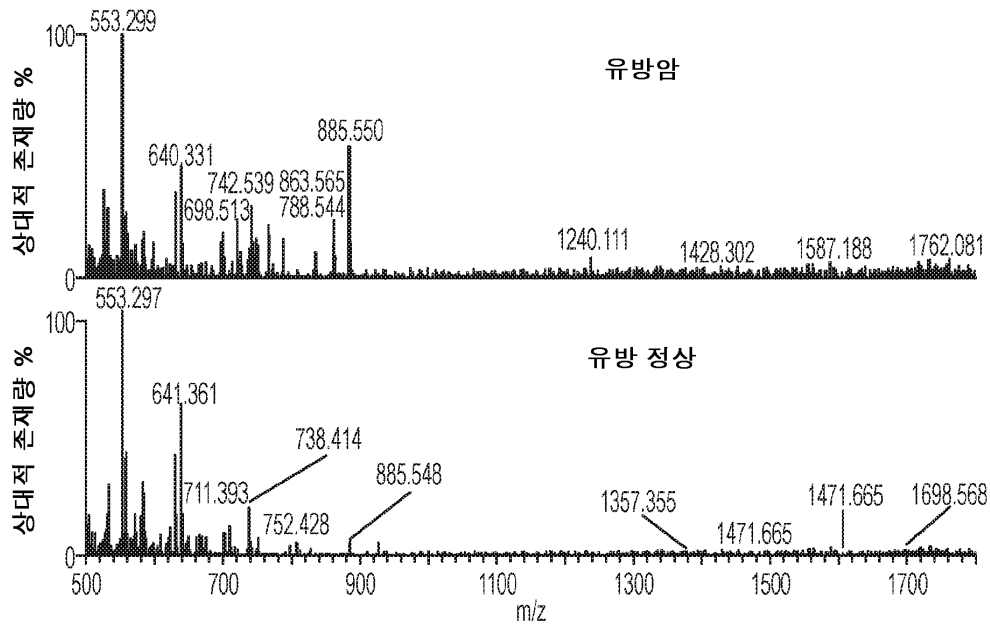
도면4a



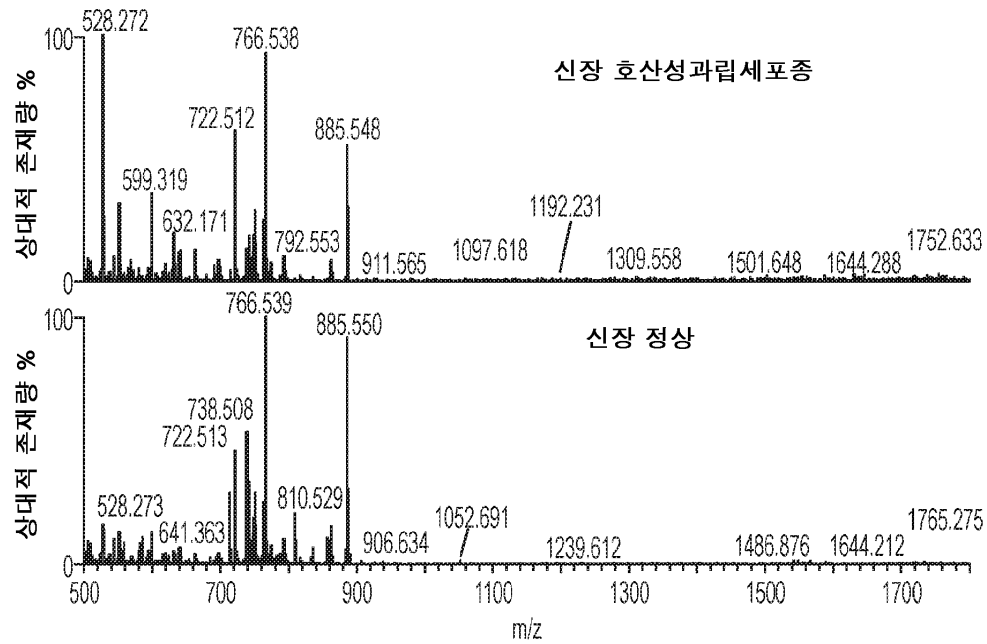
도면4b



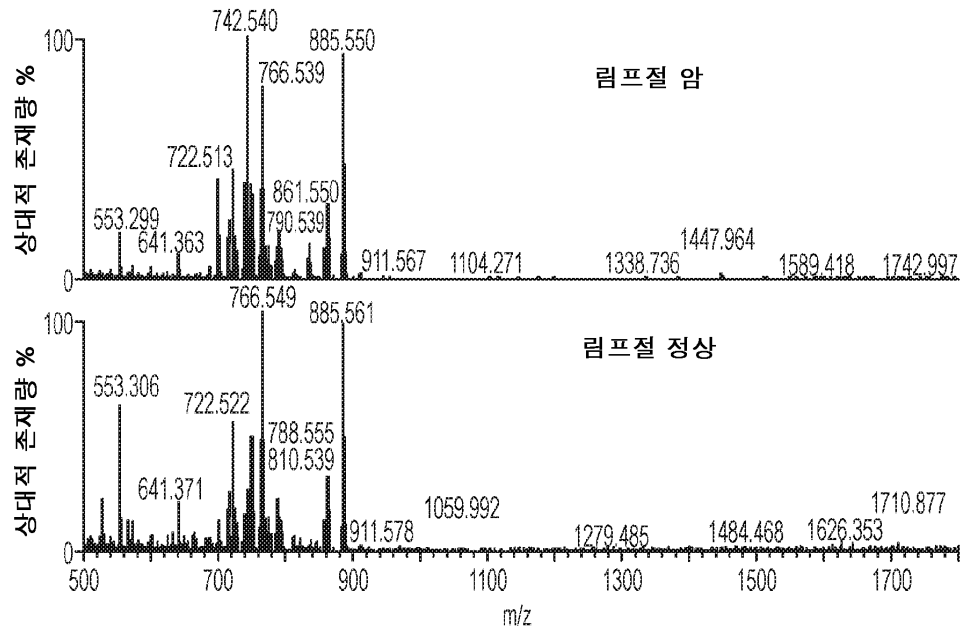
도면5a



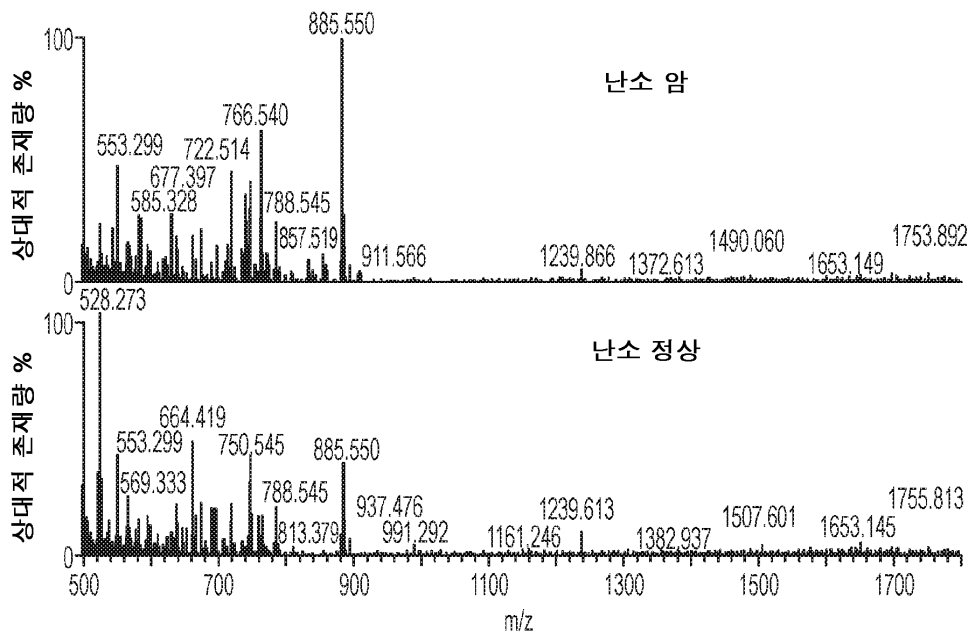
도면5b



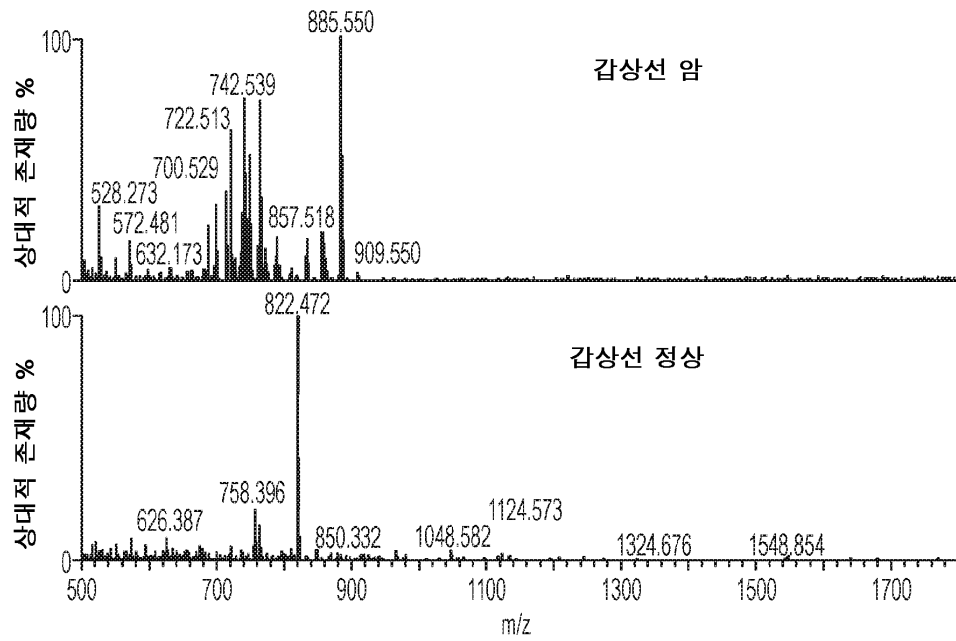
도면5c



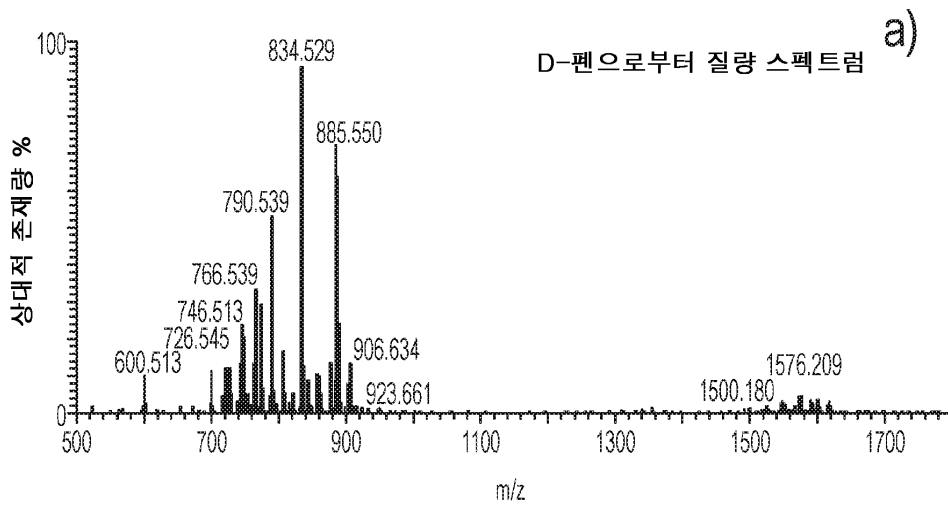
도면5d



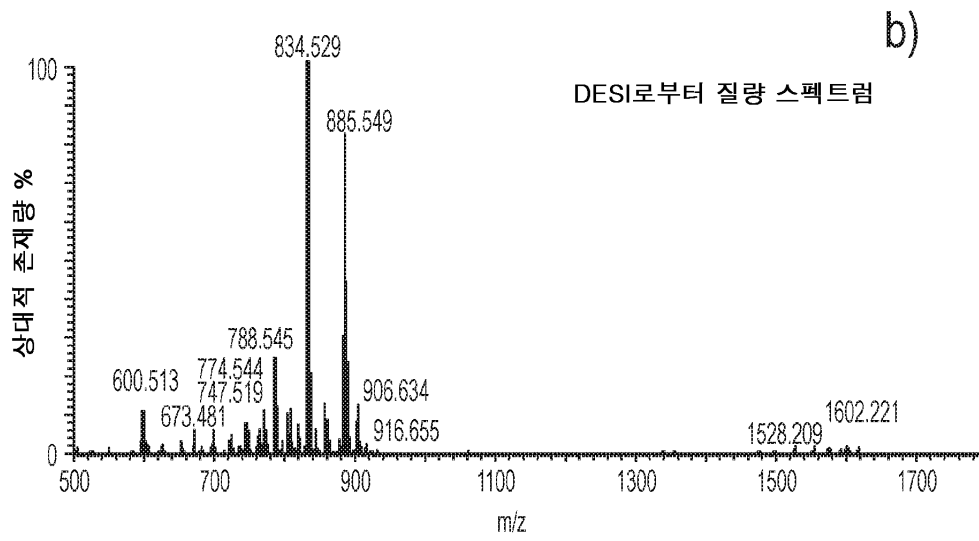
도면5e



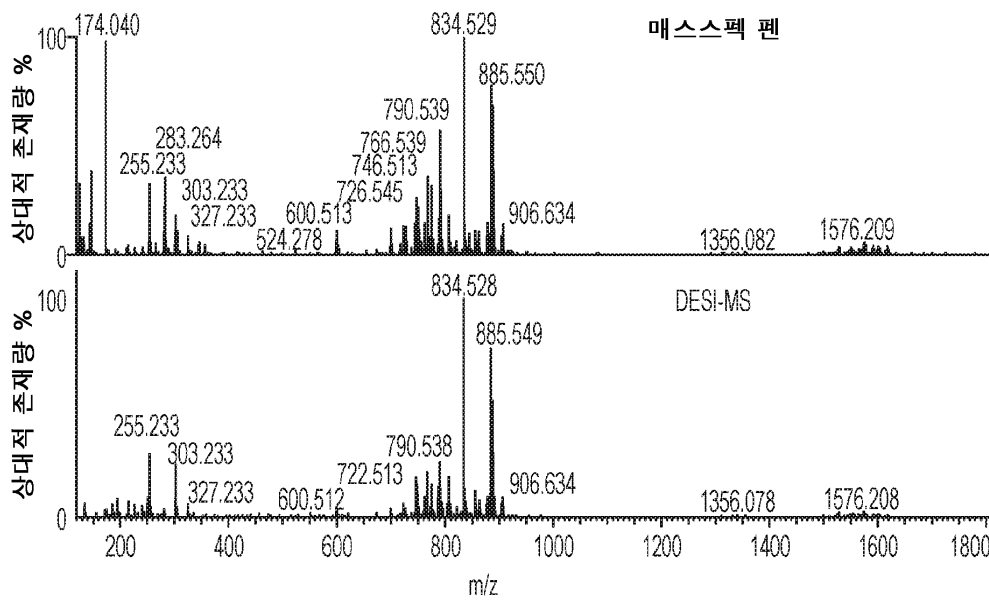
도면6a



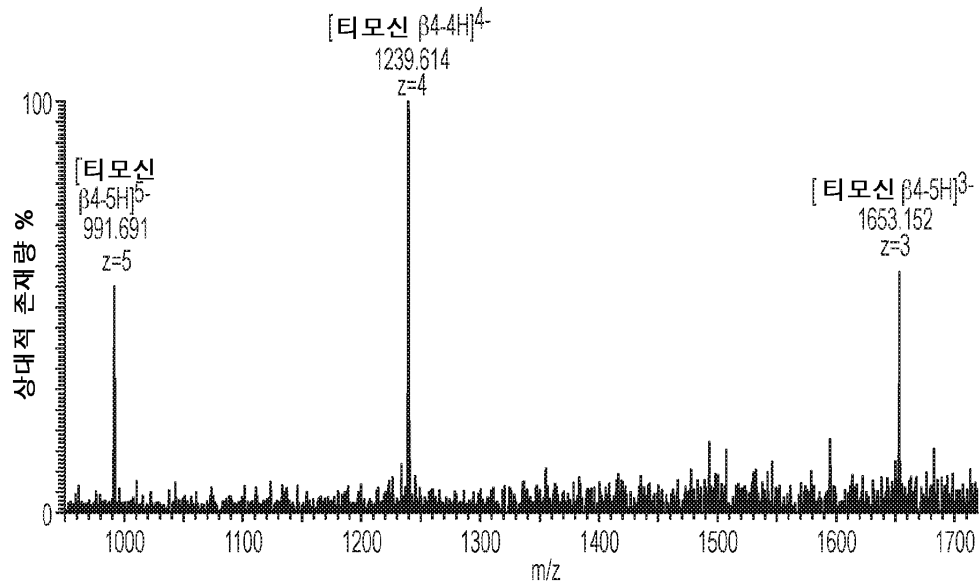
도면6b



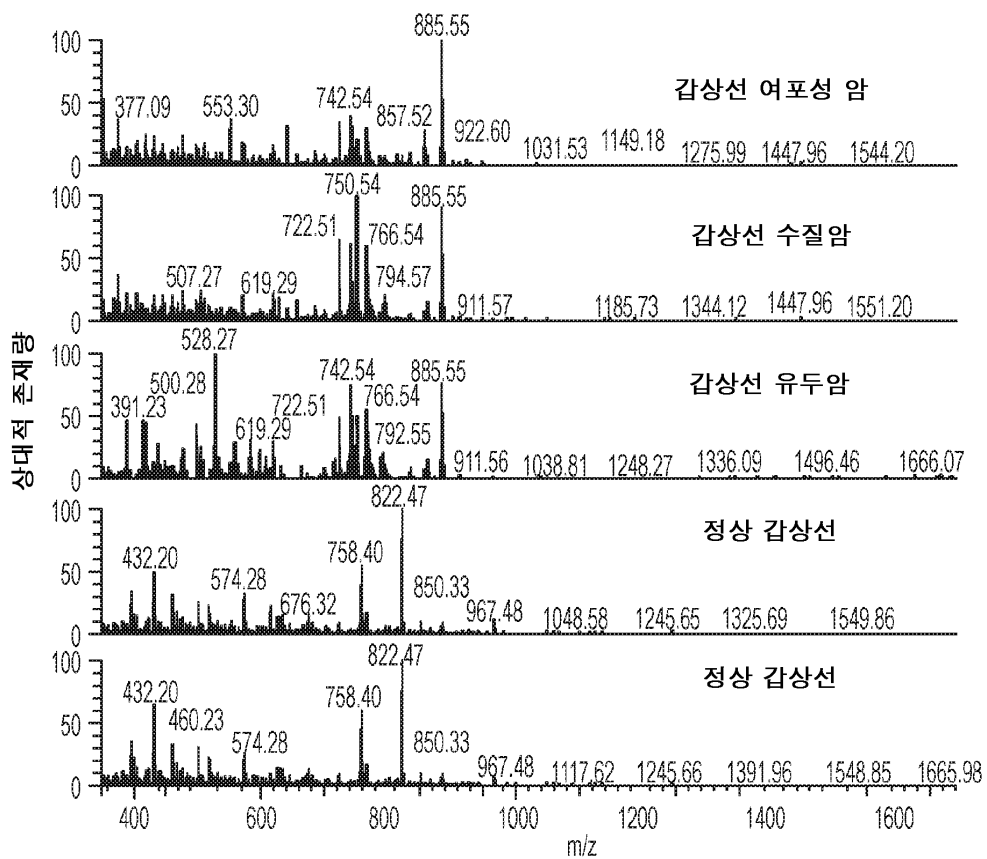
도면6c



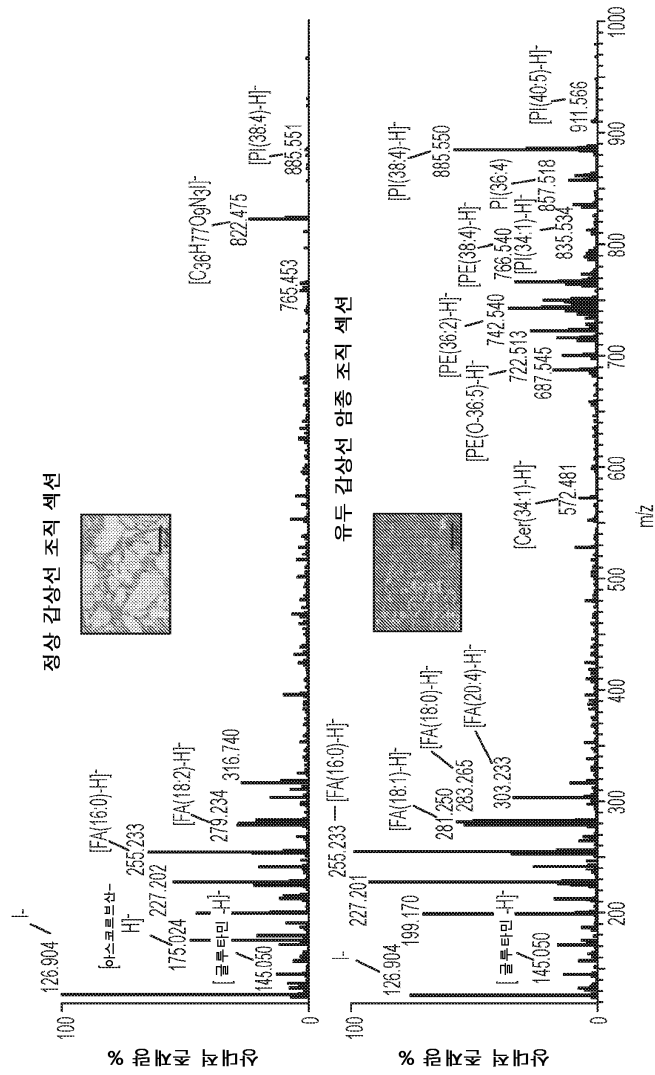
도면7



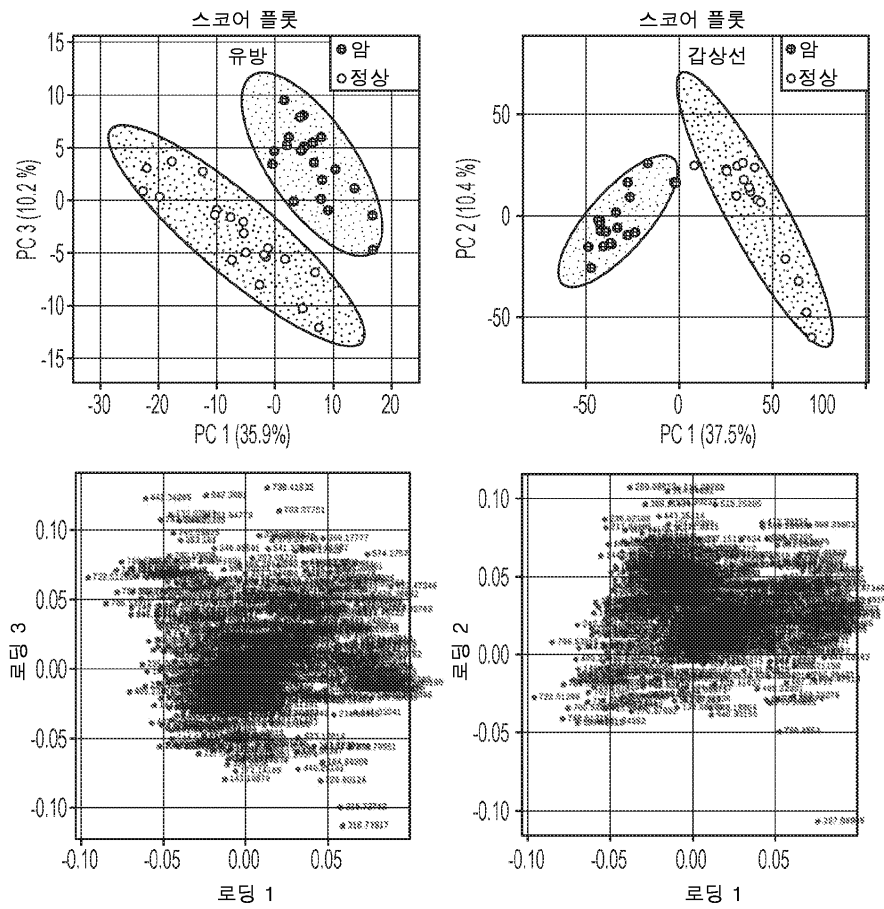
도면8a



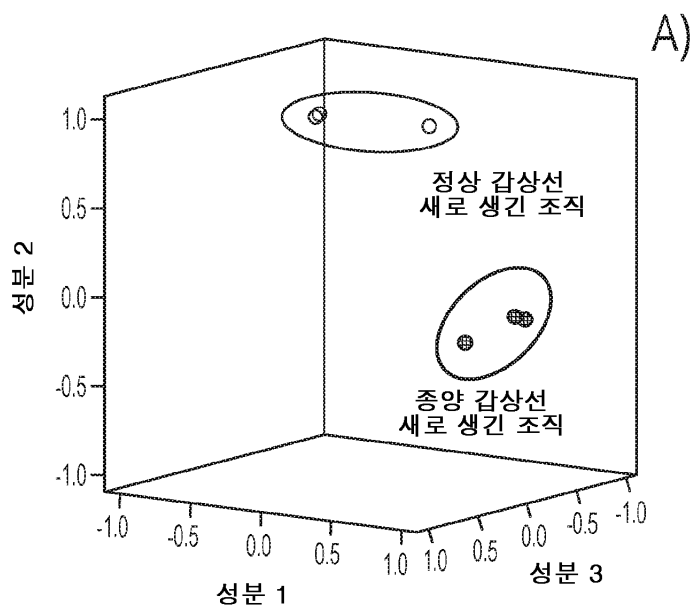
도면8b



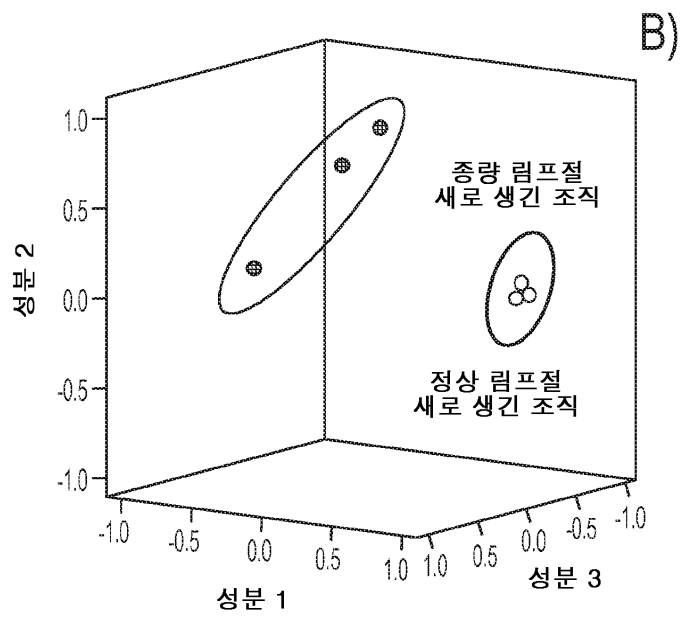
도면9



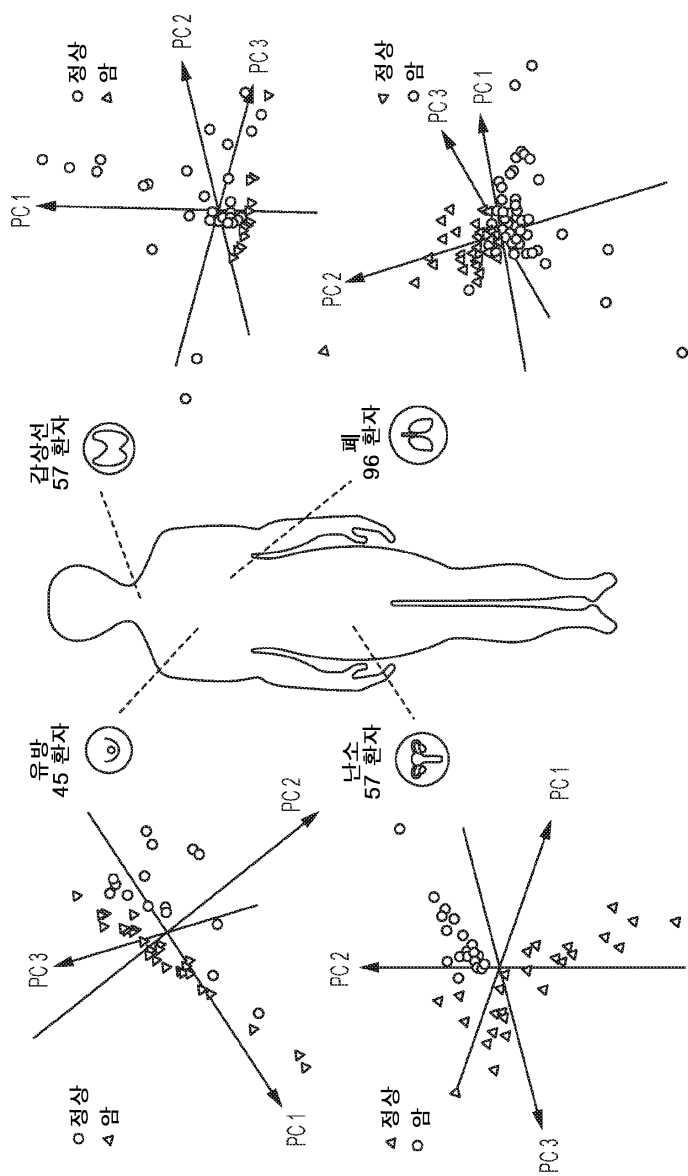
도면10a



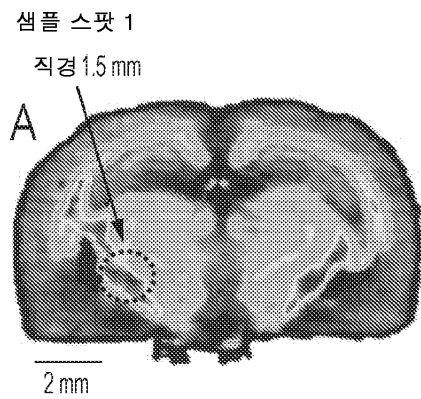
도면10b



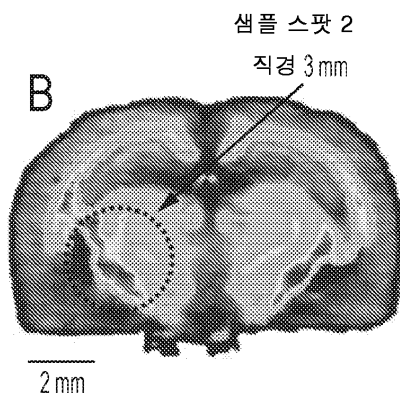
도면11



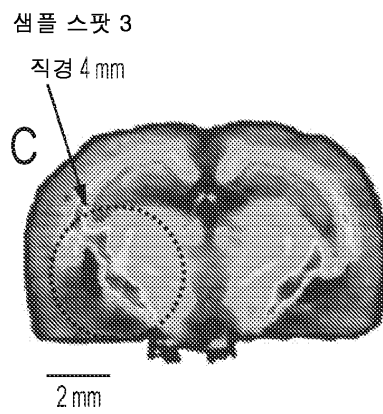
도면12a



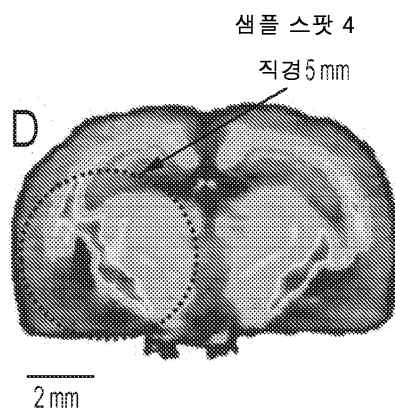
도면12b



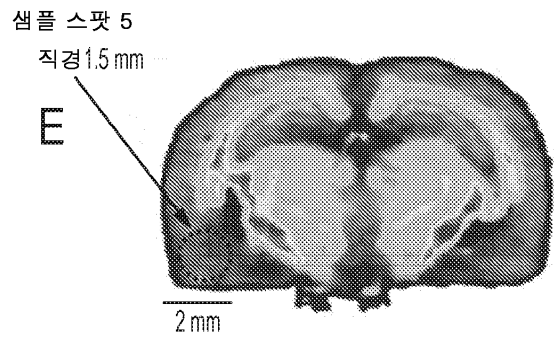
도면12c



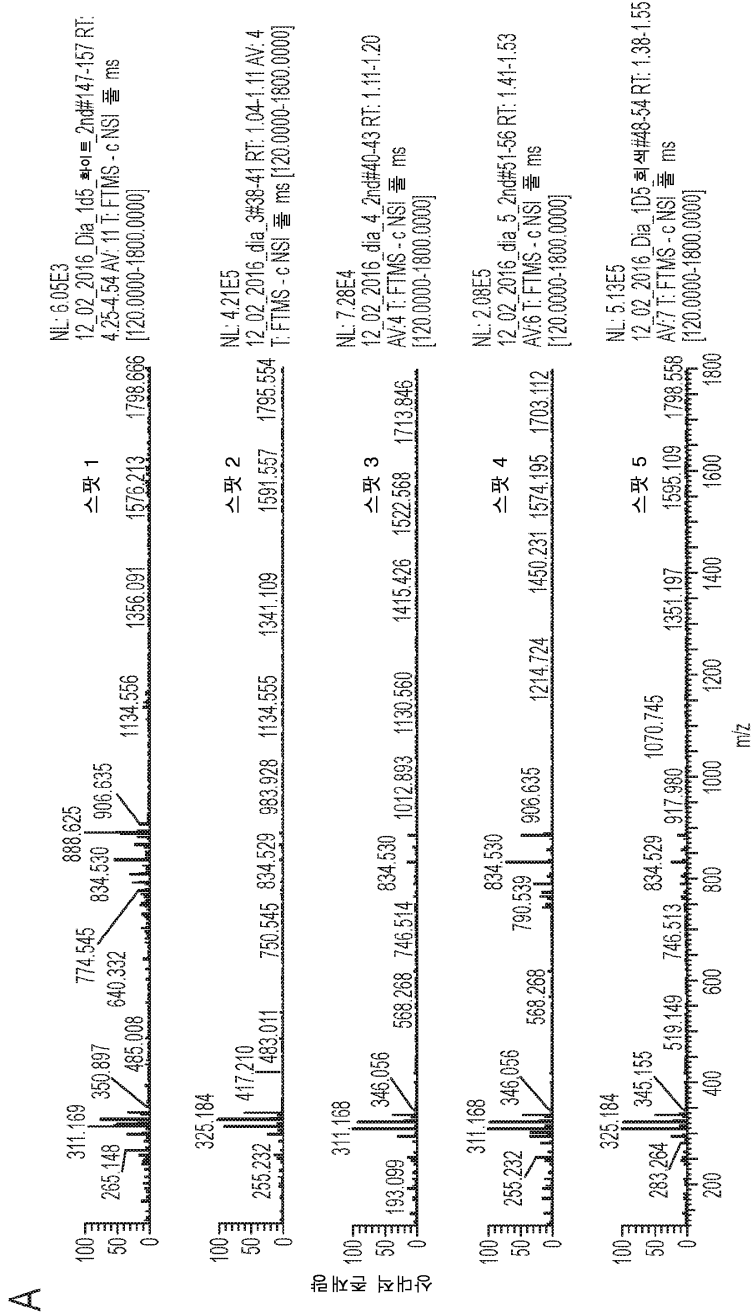
도면12d



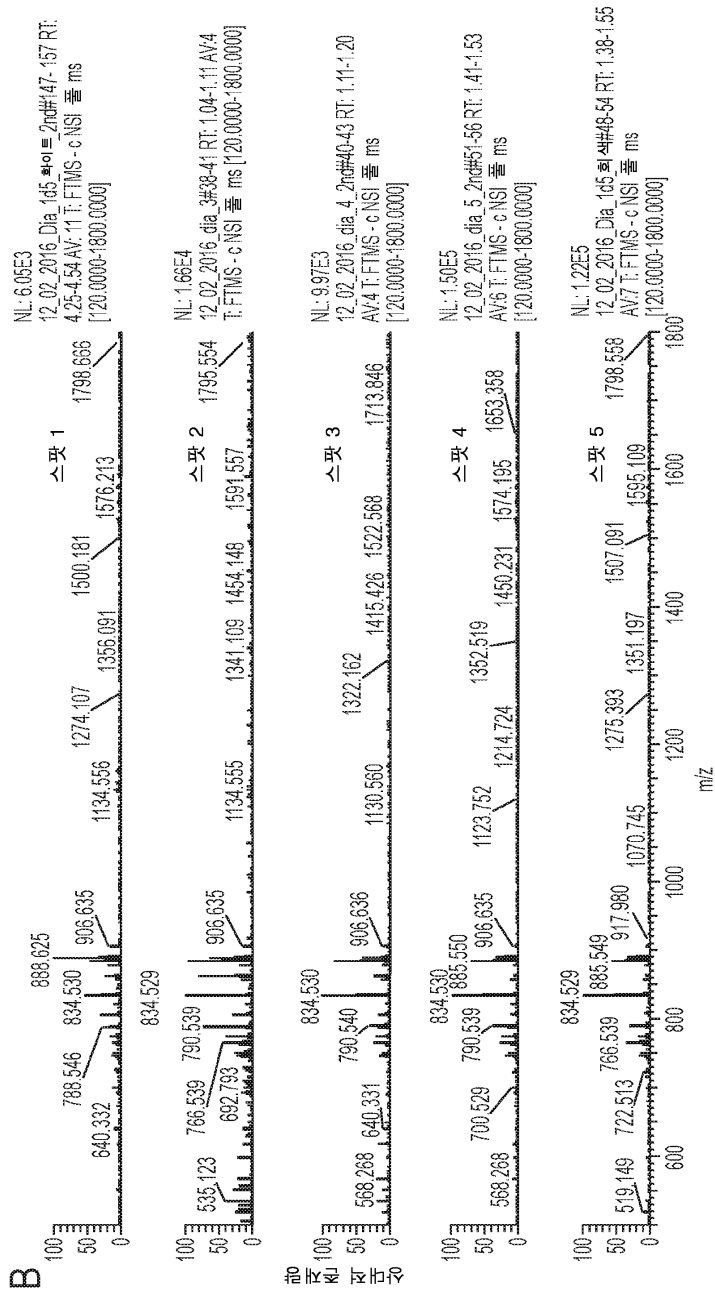
도면12e



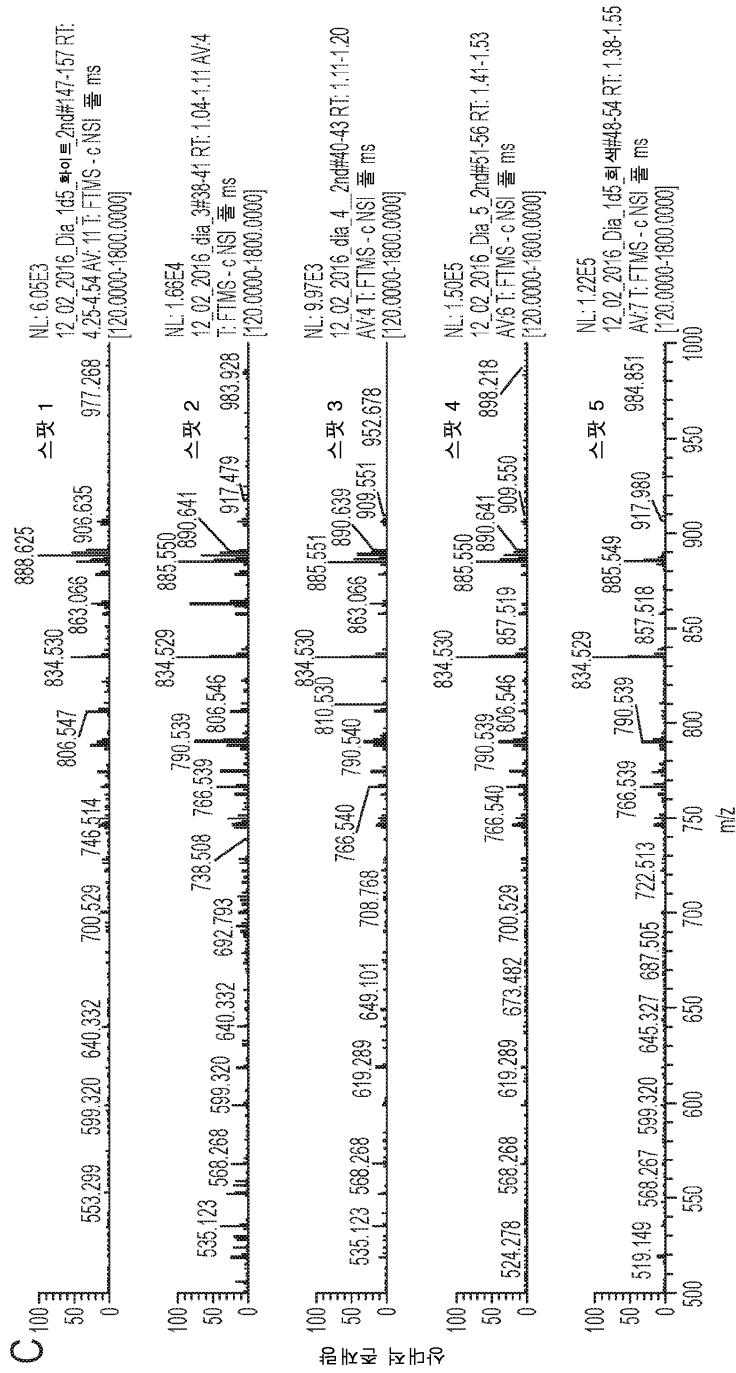
도면13a



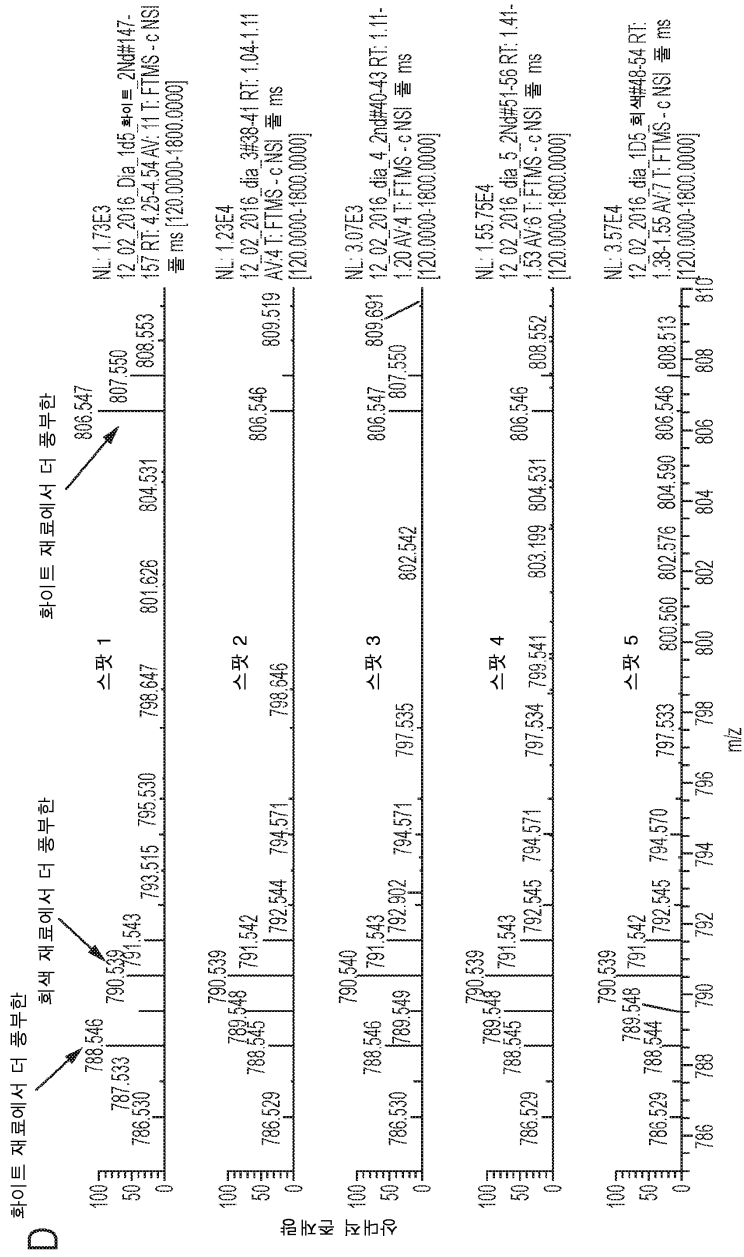
도면13b



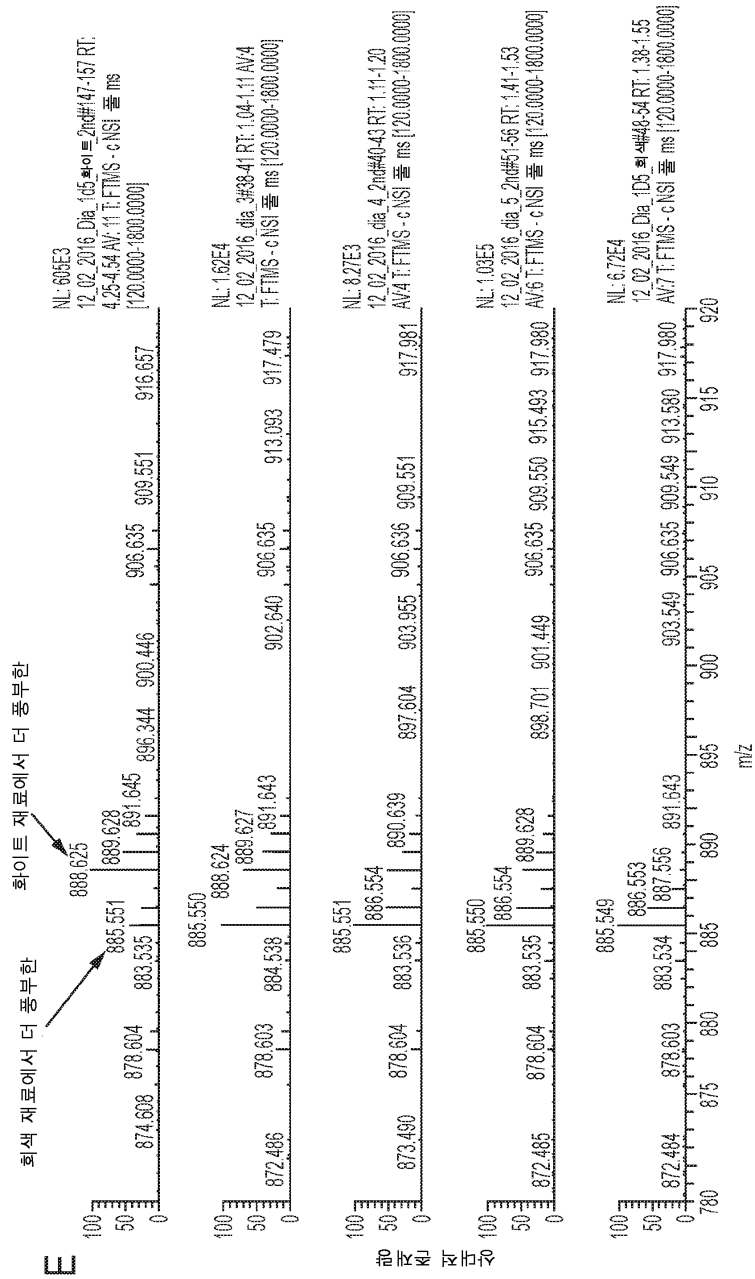
도면13c



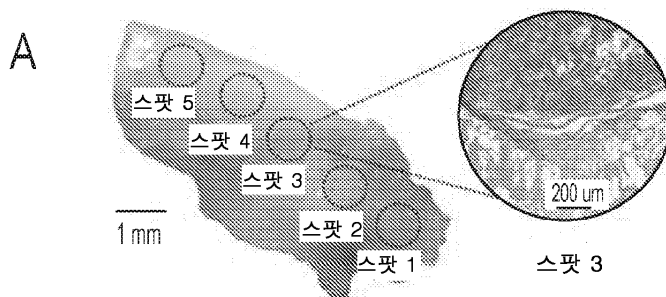
도면 13d



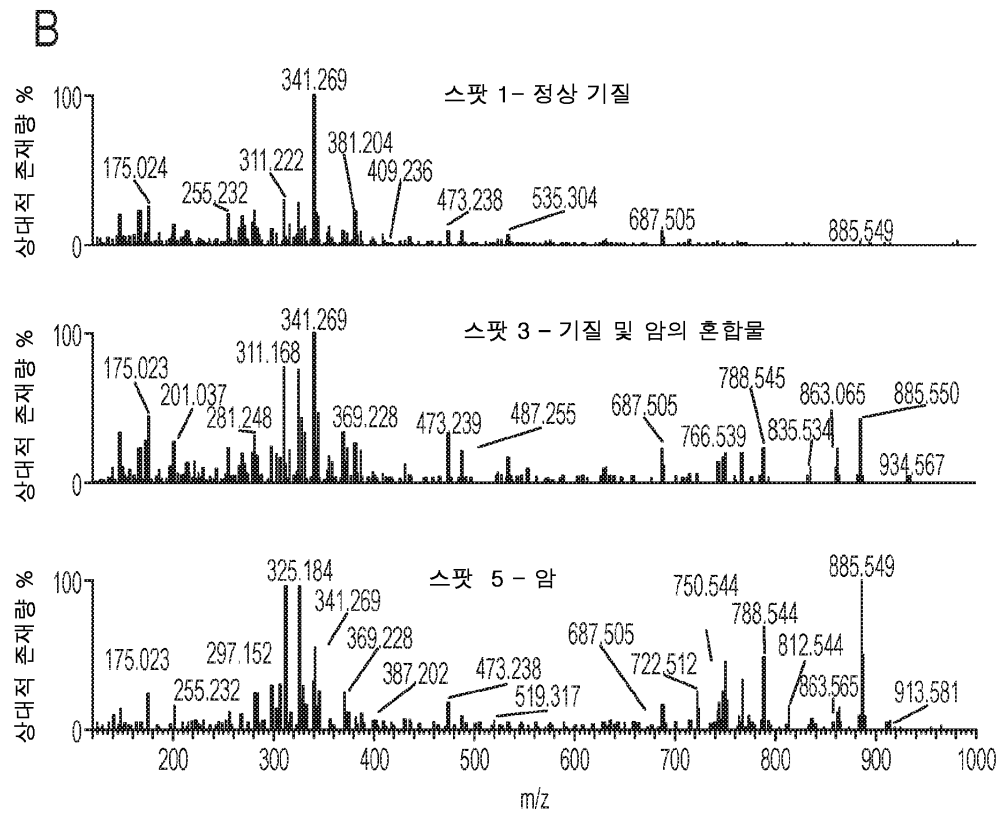
도면 13e



도면 14a



도면14b

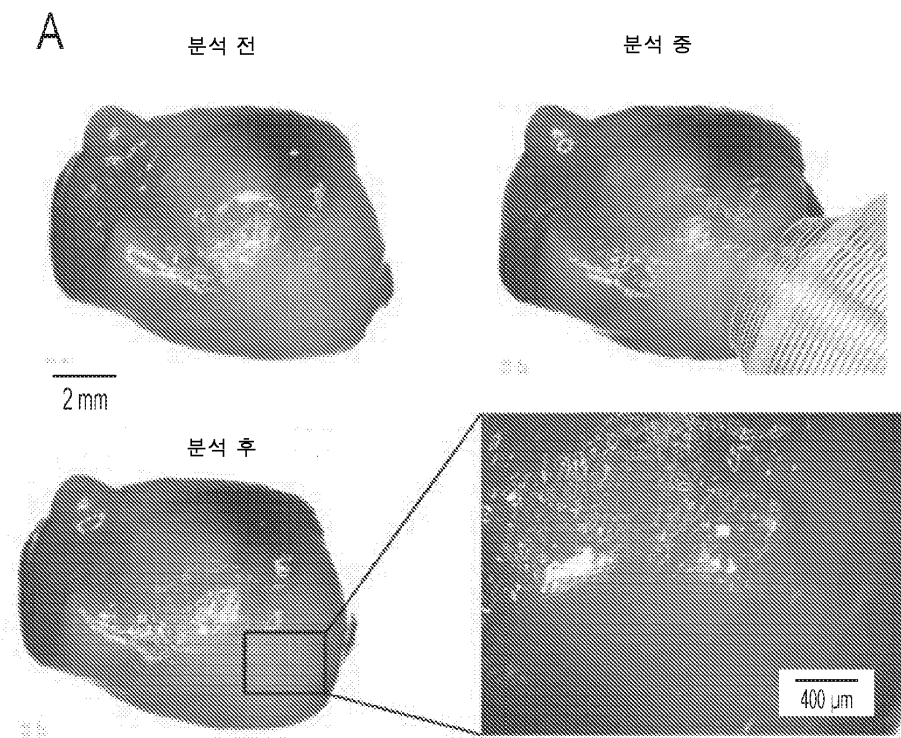


도면14c

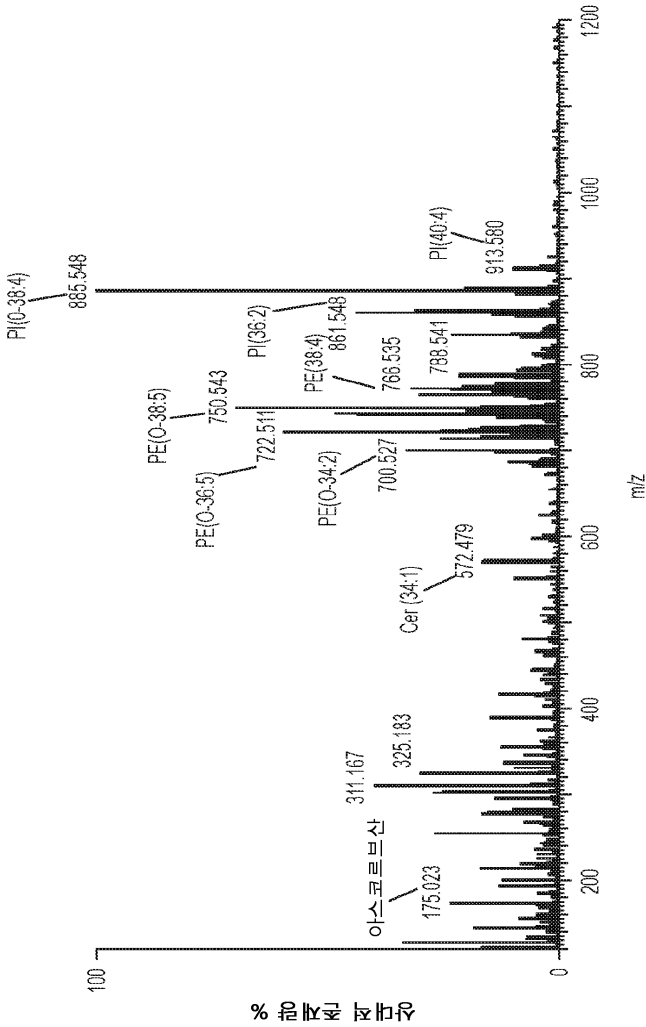
C

스팟	병리학적 진단	라소 예측
1	정상 기질	정상
2	정상 기질	정상
3	기질 (~50%) 및 암 (~50%)	암
4	난소 암	암
5	난소 암	암

도면15a

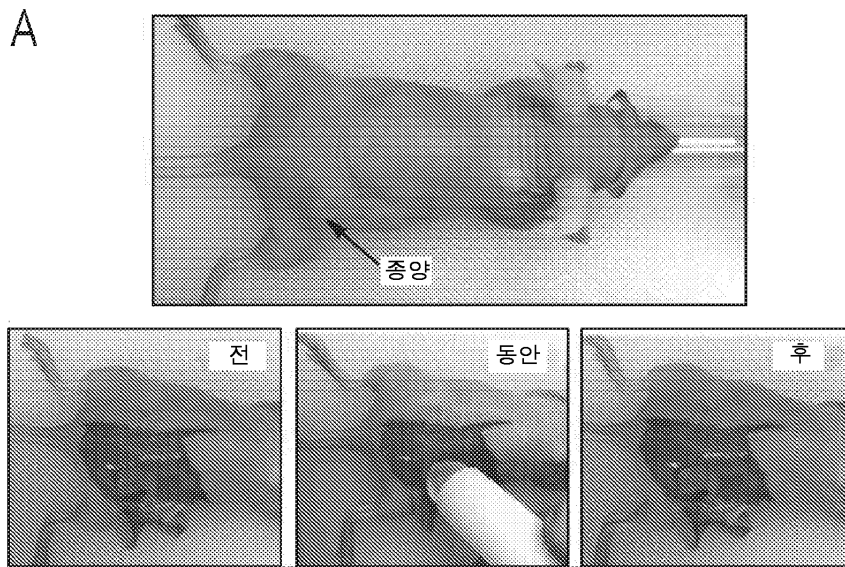


도면15b

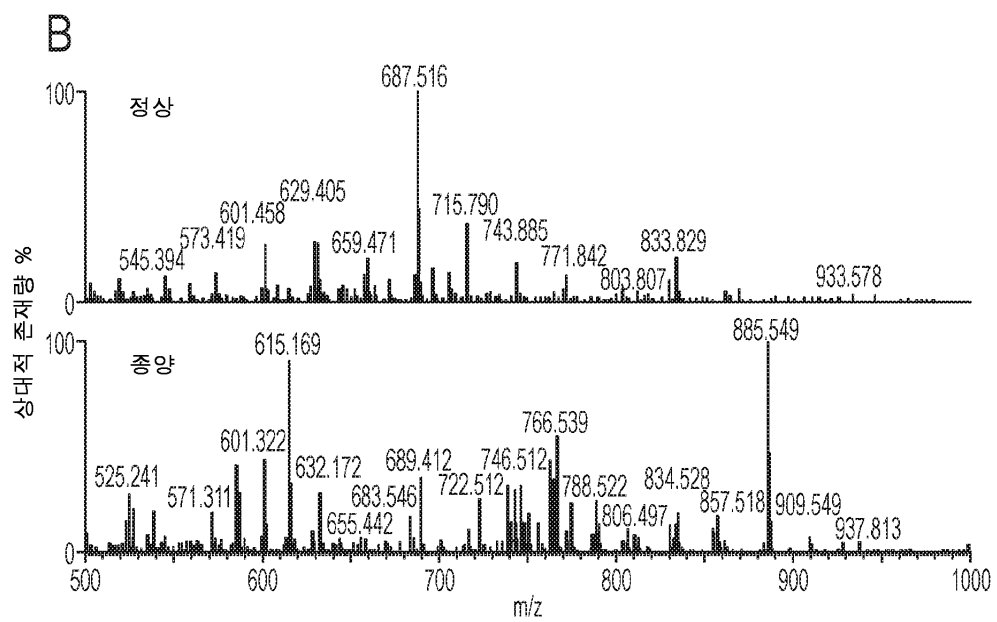


B

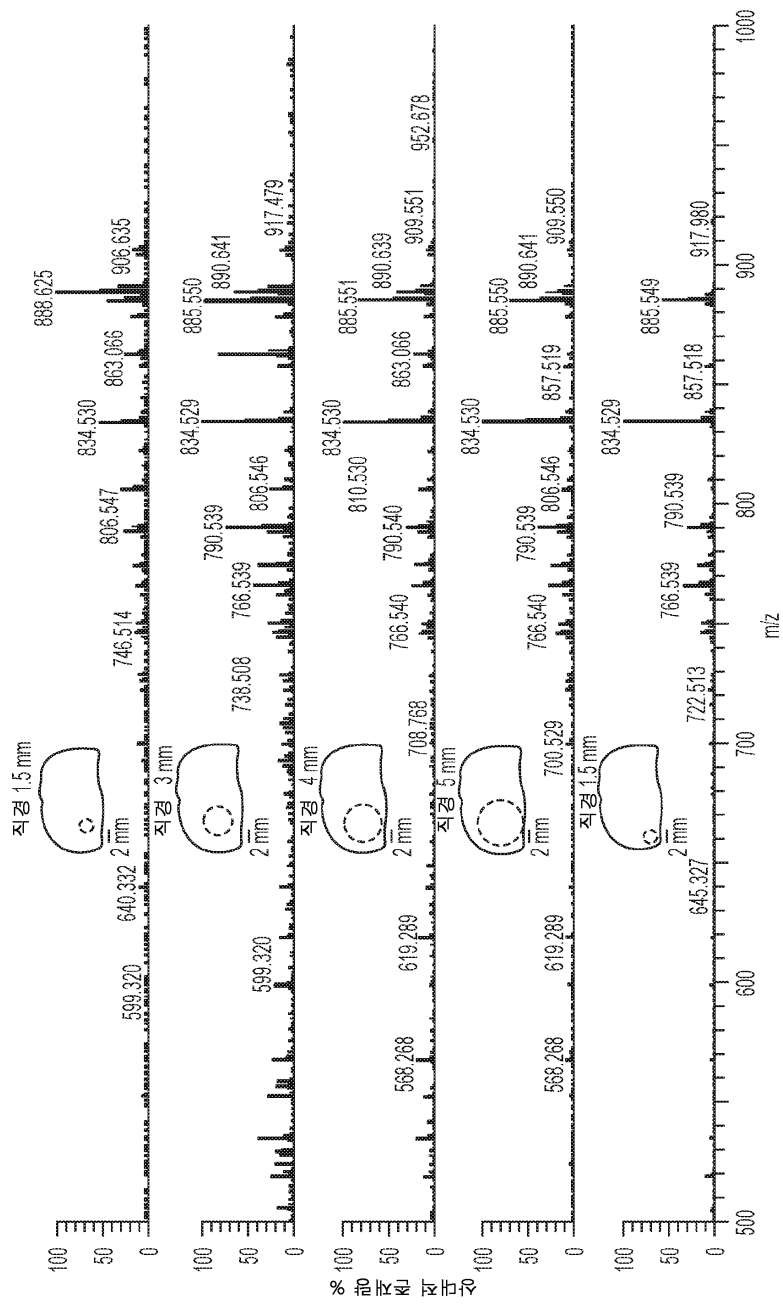
도면16a



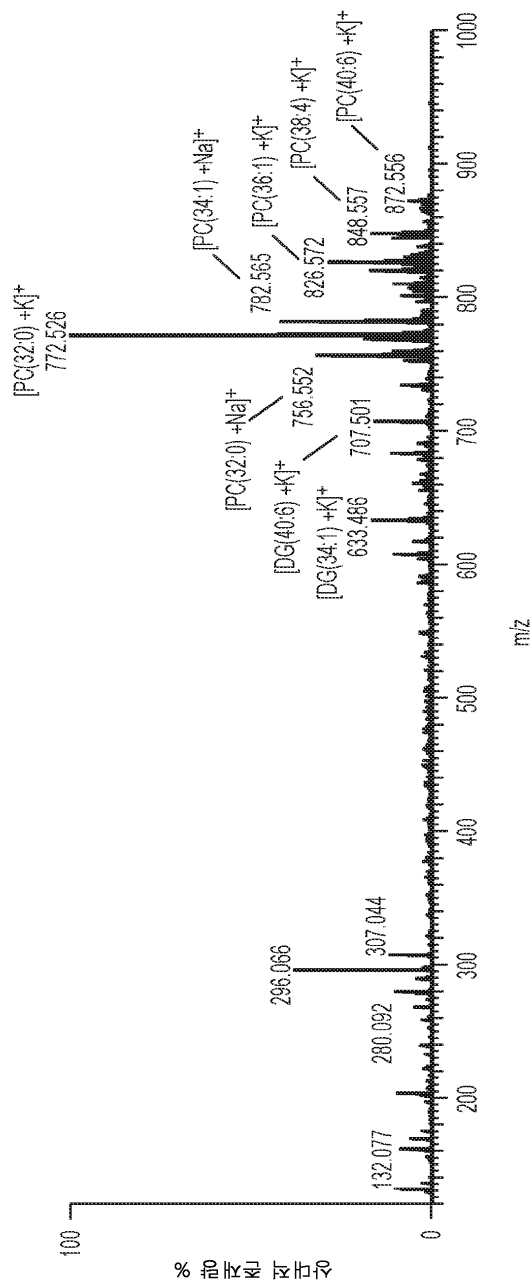
도면16b



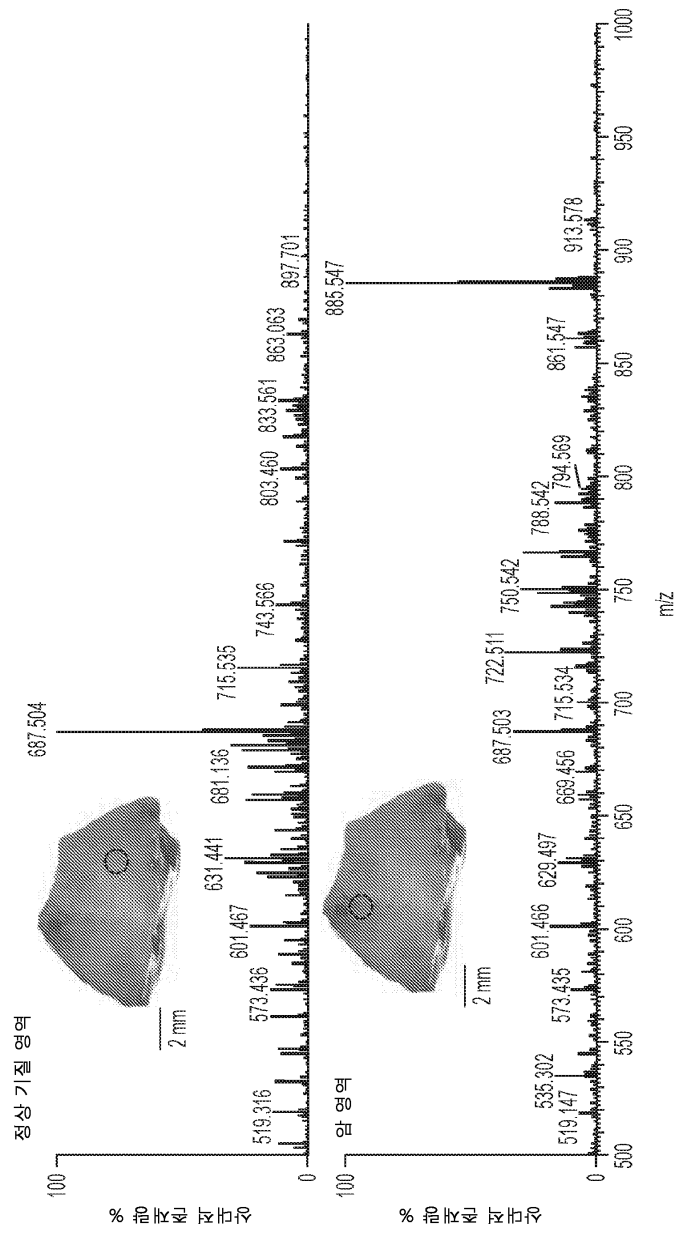
도면17



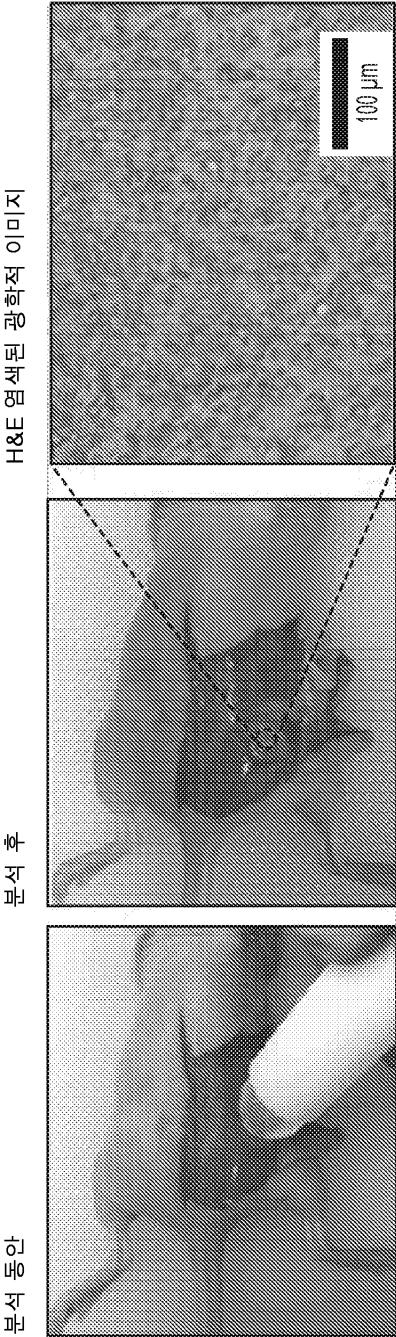
도면18



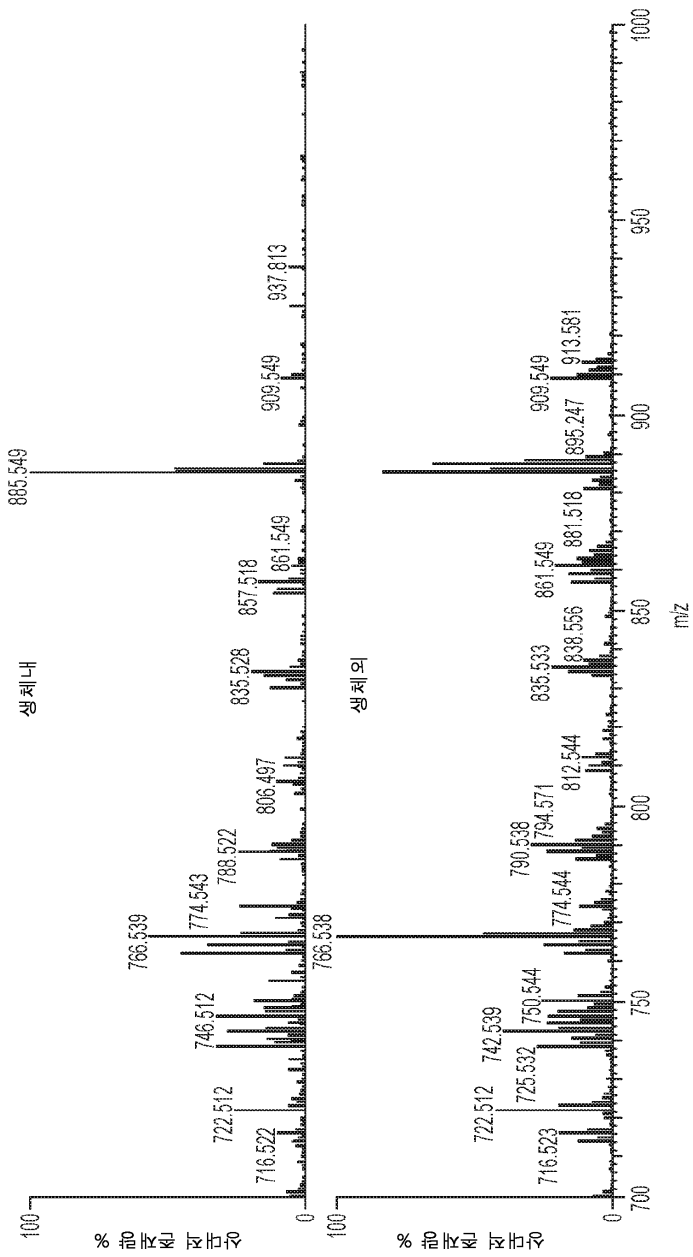
도면19



도면20



도면21



도면22

