



등록특허 10-2250446



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월10일

(11) 등록번호 10-2250446

(24) 등록일자 2021년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

C07K 7/08 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0047556

(22) 출원일자 2020년04월20일

심사청구일자 2020년04월20일

(56) 선행기술조사문헌

US20090098056 A1

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 20 항

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

변재철

서울특별시 서초구 잠원로 46-38, 101동 301호(잠원동, 브라운스톤잠원)

(74) 대리인

남건필, 박중수, 정지향, 차상윤

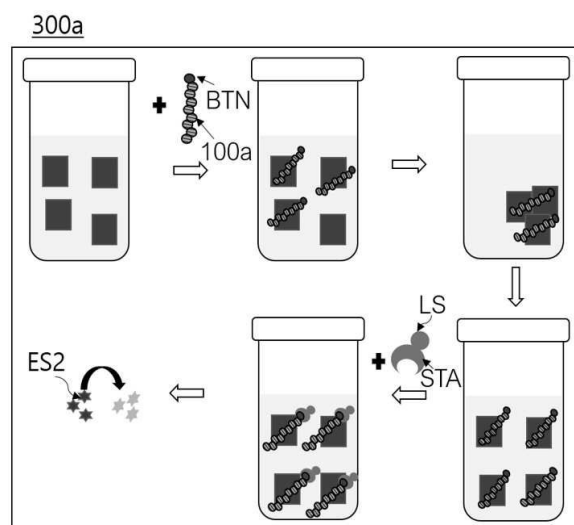
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 통풍 또는 가성 통풍 진단을 위한 진단 시약, 진단 프로브, 진단 키트 및 정보 제공 시스템

(57) 요약

본 발명은 통풍 또는 가성 통풍 진단 펩타이드, 진단 프로브, 진단 키트 및 이를 이용한 정보 제공 시스템에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1의 아미노산 서열 내지 3의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상 또는 서열번호 4 아미노산 서열 내지 서열번호 6의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하는 합성 펩타이드를 포함하는 진단 시약, 진단 프로브, 진단 키트 및 정보 제공 시스템이 제공된다.

대표도 - 도1c



(52) CPC특허분류

G01N 21/314 (2013.01)

G01N 33/581 (2013.01)

G01N 33/6887 (2013.01)

G01N 2800/107 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

JP2015231993 A

CN110297082 A

US20140080727 A1

US20180363024 A1

명세서

청구범위

청구항 1

calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정에 선택적으로 반응하는 합성 펩타이드로서,

서열번호 1의 아미노산 서열 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하는 상기 합성 펩타이드로 구성된 진단 시약.

청구항 2

적어도 하나 이상의 표지 물질 또는 적어도 하나 이상의 1차 발현 기질과 결합되어 있는 합성 펩타이드를 포함하고,

상기 표지 물질은 촉매 반응에 의하여 2차 발현 기질의 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상을 일으키고,

상기 1차 또는 상기 2차 발현 기질은 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하며,

상기 합성 펩타이드는, 서열번호 1의 아미노산 서열 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하는 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정에 선택적으로 결합하는 진단 프로브.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 합성 펩타이드는 비오틴과 결합되고(biotinylated) 상기 비오틴이 상기 표지 물질과 결합하는 진단 프로브.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 표지 물질은 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP), β -갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 아세틸콜린스테라제, 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparaginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스탕필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스산화효소, 사이토크롬 P450 및 퍼옥시다아제 화합물 중 적어도 어느 하나 이상을 포함하는 진단 프로브.

청구항 5

서열번호 1의 아미노산 서열 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하며 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정에 선택적으로 결합하는 합성 펩타이드;

상기 하나 이상의 합성 펩타이드들 중 적어도 어느 일부에 결합되는 표지 물질; 및

상기 표지 물질의 촉매 작용에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상을 나타내며, 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하는 2차 발현 기질을 포함하는 진단 키트.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 하나 이상의 합성 펩타이드들 중 적어도 어느 일부에 결합하며, 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이

들의 조합을 포함하는 1차 발현 기질을 더 포함하는 진단 키트.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 합성 펩타이드는 비오틴 결합(biotinylated)되어 상기 표지 물질과 결합하며, 상기 표지 물질은 스트렙트 아비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP), β -갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 아세틸콜린스 테라제, 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparaginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스타필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스산 화효소, 사이토크롬 P450, 퍼옥시다아제 화합물 및 퍼옥시다아제 화합물 중 적어도 어느 하나 이상을 포함하는 진단 키트.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 진단 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트를 포함하는 진단 키트.

청구항 9

제 5 항에 있어서,

상기 광학적 변이는 발광 반응, 발색 반응 또는 형광 반응을 포함하며,

상기 전기적 변이는 전류계, 전압계 크로노암페로메트리(chronoamperometry) 또는 크로노볼타메트리(chronovoltammetry) 중 적어도 어느 하나 이상에 의하여 정량되는 진단 키트.

청구항 10

통풍 또는 가성 통풍 진단을 위한 정보 제공 시스템으로서,

환자로부터 추출된 관절액에 포함된 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정과 서열번호 1의 아미노산 서열 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하고, 상기 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정에 선택적으로 결합하는 합성 펩타이드를 제공하여 반응시키는 표적 타겟팅부;

상기 합성 펩타이드와 결합하는 표지 물질의 촉매 작용에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 하나 이상을 나타내는 2차 발현 기질을 제공하는 발현 준비부; 및

상기 2차 발현 기질이 나타내는 변이에 의하여 상기 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정의 존재 여부를 판단하는 발현 측정부를 포함하는 정보 제공 시스템.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 2차 발현 기질이 나타내는 상기 광학적 변이, 상기 전기적 변이 또는 상기 화학적 변이에 의한 신호를 측정하여 상기 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD)의 결정을 정량하는 정량 분석부를 더 포함하며,

상기 표적 타겟팅부는, 상기 관절액을 특정 효소와 반응시켜 상기 관절액 내부의 물질을 분해하는 관절액 분해부;

분해된 관절액이 미세 여과막을 통하여 여과하고, 상기 미세 여과막 상에 남아있는 결정을 용매에 용해시키는 결정 용해부; 및

상기 CPPD 결정이 용해된 결정 용액에 상기 합성 펩타이드를 제공하는 펩타이드 결합부를 포함하는 정보 제공 시스템.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 2차 발현 기질은 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)를 포함하며,

상기 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD)의 결정의 양은 상기 2차 발현 기질의 흡광도를 측정하여 얻어지며, 상기 흡광도는 450 nm의 전자기파에서 측정되는 정보 제공 시스템.

청구항 13

monosodium urate (MSU) 결정에 선택적으로 반응하는 합성 펩타이드로서,

서열번호 4의 아미노산 서열 내지 서열번호 6의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하는 상기 합성 펩타이드로 구성된 진단시약.

청구항 14

적어도 하나 이상의 표지 물질 또는 적어도 하나 이상의 1차 발현 기질과 결합되어 있는 합성 펩타이드를 포함하고,

상기 표지 물질은 촉매 반응에 의하여 2차 발현 기질의 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상을 일으키고,

상기 1차 또는 상기 2차 발현 기질은 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하며,

상기 합성 펩타이드는, 서열번호 4의 아미노산 서열 내지 서열번호 6의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하는 monosodium urate (MSU) 결정에 선택적으로 결합하는 진단 프로브.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

상기 합성 펩타이드는 비오틴과 결합되고(biotinylated) 상기 비오틴이 상기 표지 물질과 결합하며,

상기 표지 물질은 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP), β -갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 아세틸콜린스테라제, 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparaginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스탕필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스산화효소, 사이토크롬 P450 및 퍼옥시다아제 화합물 중 적어도 어느 하나 이상을 포함하는 진단 프로브.

청구항 16

서열번호 4의 아미노산 서열 내지 서열번호 6의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하며 monosodium urate (MSU) 결정에 선택적으로 결합하는 합성 펩타이드;

상기 하나 이상의 펩타이드들 중 적어도 어느 일부에 결합되는 표지 물질; 및

상기 표지 물질의 촉매 작용에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상을 나타내며, 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하는 2차 발현 기질을 포함하는 진단 키트.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

상기 하나 이상의 합성 펩타이드들 중 적어도 어느 일부에 결합하며, 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하는 1차 발현 기질을 더 포함하는 진단 키트.

청구항 18

제 16 항에 있어서,

상기 진단 키트 내에 상기 monosodium urate (MSU) 결정과 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정을 각각 진단할 수 있도록 2개의 독립된 센서부들이 제공되는 진단 키트.

청구항 19

통풍 또는 가성 통풍 진단을 위한 정보 제공 시스템으로서,

환자로부터 추출된 관절액에 포함된 monosodium urate (MSU) 결정과 서열번호 4의 아미노산 서열 내지 서열번호 6의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하고, 상기 monosodium urate (MSU) 결정에 선택적으로 결합하는 합성 펩타이드를 제공하여 반응시키는 표적 타겟팅부;

상기 합성 펩타이드와 결합하는 표지 물질의 촉매 작용에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 하나 이상을 나타내는 2차 발현 기질을 제공하는 발현 준비부; 및

상기 2차 발현 기질이 나타내는 변이에 의하여 상기 monosodium urate (MSU) 결정의 존재 여부를 판단하는 발현 측정부를 포함하는 정보 제공 시스템.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 2차 발현 기질이 나타내는 상기 광학적 변이, 상기 전기적 변이 또는 상기 화학적 변이에 의한 신호를 측정하여 상기 monosodium urate (MSU) 결정을 정량하는 정량 분석부를 더 포함하며,

상기 표적 타겟팅부는, 상기 관절액을 특정 효소와 반응시켜 상기 관절액 내부의 물질을 분해하는 관절액 분해부;

분해된 관절액이 미세 여과막을 통하여 여과하고, 상기 미세 여과막 상에 남아있는 결정을 용매에 용해시키는 결정 용해부; 및

상기 monosodium urate (MSU) 결정이 용해된 결정 용액에 상기 합성 펩타이드를 제공하는 펩타이드 결합부를 포함하며,

상기 2차 발현 기질은 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)를 포함하며,

상기 monosodium urate (MSU) 결정의 양은 상기 2차 발현 기질의 흡광도를 측정하여 얻어지며, 상기 흡광도는 450 nm의 전자기파에서 측정되는 정보 제공 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오 센싱 기술에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 통풍 또는 가성 통풍을 진단하기 위한 진단 시약, 진단 프로브, 진단 키트 및 정보 제공 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 통풍은 관절내에 일나트륨 요산화물(monosodium urate; MSU)의 침상 결정이 생성되는 질환으로, 상기 침상 결정이 관절을 자극하거나 상기 결정 생성 후 면역 반응을 통해 염증이 유발되어 통증을 초래하는 질환이다. 상기 통풍은 신체의 퓨린 대사(purine nucleotide) 과정에서 생성되는 요산이 과다하게 생성되거나 체외로 적절하게 배설되지 못하는 경우에 상기 요산이 과포화되고, 상기 과포화된 요산이 결정화되어 상기 MSU의 침상형 결정을 형성하면서 유발된다.

[0003] 상기 통풍과 비슷한 증상을 갖지만, 상기 통풍과 구별되는 발명 원인을 갖는 질환이 가성 통풍이다. 상기 가성 통풍은 칼슘인산염(calcium pyrophosphate dihydrate; CPPD)의 판상형 결정이 생성되는 질환으로, 상기 CPPD 결정생성 후 면역반응을 통해 염증이 유발되며 상기 결정이 관절을 자극하여 통증을 유발하는 질환이다. 관절의 연골이나 관절 주위 조직에 축적되어 염증이 생기는 통증을 초래하는 질환이다.

[0004] 상기 통풍 및 가성 통풍의 증상과 발생부위가 서로 매우 유사한 특성을 가지고 있다. 그러나, 양 질환의 발병 요인은 서로 전혀 다르며, 그에 따라 치료 방법도 상이하여 양 질환의 구분은 매우 중요한 진단 사항이다.

[0005] 종래의 통풍 진단 검사는 편광 현미경을 이용한 전문의의 MSU 결정의 관찰에 의하여 이루어졌으며, 상기 진단 검사는 10분 이상의 장기간 검사 시간이 요구되고, 관절액 내에 상기 MSU 결정의 농도가 낮은 경우가 많아, 관정의 오류가 자주 발견되는 것으로 보고된다. 가성 통풍 진단 검사는 상기 CPPD 결정의 광학적 특성으로 인하여, 상기 통풍 진단과 달리 편광 현미경으로는 관찰이 어려워, 라만 분광법 또는 X 선 분석을 통해 수행된다. 그러나, 이러한 분석법에 의한 상기 CPPD의 검출은 고도의 기술을 요구하므로, 실제 적용에 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는, 통풍과 가성 통풍을 용이하고 신뢰성 있게 구별하여 진단할 수 있는 진단 시약을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 다른 기술적 과제는, 통풍과 가성 통풍을 용이하고 신뢰성 있게 구별하여 진단할 수 있는 진단 프로브를 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는, 통풍과 가성 통풍을 용이하고 신뢰성 있게 구별하여 진단할 수 있는 진단 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는, 통풍과 가성 통풍을 용이하고 신뢰성 있게 구별하여 진단할 수 있는 정보 제공 시스템을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 통풍 또는 가성 통풍을 유발하는 monosodium urate (MSU) 결정 또는 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정에 합성 펩타이드가 결합되고, 상기 펩타이드가 형광물질이 표지 되어 정량적으로 상기 MSU 또는 CPPD 결정이 존재하는지 판단할 수 있는 통풍 또는 가성 통풍 진단용 합성 펩타이드를 발견하여 본 발명을 완성하였다. 상기 합성 펩타이드를 포함하는 시약에 의해 통풍 또는 가성 통풍의 신뢰성 있는 조기 진단과 중증도의 정확한 판별이 가능하게 된다.

[0011] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 진단 시약은, 서열번호 1의 아미노산 서열 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하는 합성 펩타이드를 포함하고, 상기 합성 펩타이드는 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정에 선택적으로 반응할 수 있다.

[0012] 상기 다른 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 진단 프로브는 적어도 하나 이상의 표지 물질 또는 적어도 하나 이상의 1차 발현 기질과 결합되어 있는 합성 펩타이드를 포함하고, 상기 표지 물질은 촉매 반응에 의하여 2차 발현 기질의 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상을 일으키고, 상기 1차 또는 상기 2차 발현 기질은 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하며, 상기 합성 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하는 CPPD 결정에 선택적으로 결합할 수 있는 합성 펩타이드이다.

[0013] 다른 실시예에서는, 상기 합성 펩타이드는 비오틴과 결합되고(biotinylated) 상기 비오틴이 상기 표지 물질과 결합할 수 있고, 선택적으로는, 상기 표지 물질은 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP), β -갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 아세틸콜린스테라제, 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparaginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스탕필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스산화효소, 사이토크롬 P450 및 퍼옥시다아제 화합물 중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있고 이로 제한되는 것은 아니다.

[0014] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 진단 키트는, 서열번호 1의 아미노산 서열 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하며 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정에 선택적으로 결합하는 합성 펩타이드, 하나 이상의 상기 합성 펩타이드들 중 적어도 어느 일부에 결합되는 표지 물질 및 상기 표지 물질의 촉매 작용에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상을 나타내며, 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하는 2차 발현 기질을 더 포함할 수 있다. 다른 실시예에서는, 상기 하나 이상의 합성 펩타이드들 중 적어도 어느 일부에 결합하며, 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하는 1차 발현 기질을 더 포함할 수 있다. 상기 합성 펩타이드는

비오틴 결합(biotinylated)되어 상기 표지 물질은 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP), β -갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 아세틸콜린스테라제, 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스탕필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스산화효소 및 퍼옥시다아제 화합물 중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있고 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 진단 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트를 포함할 수 있다.

[0015] 또 다른 실시예에서, 상기 면역분석(immunoassay)용 키트는 루미넥스 분석, 단백질 마이크로어레이 분석, 엘리사(ELISA) 분석, 캡처-ELSA 분석, ELISPOT 분석, 방사선 면역 분석(RIA), 방사 면역 침전 분석, 면역 침전 분석, 면역조직화염색 분석, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산 분석, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역 전기 영동 분석, 조직면역 염색 분석, 보체 고정 분석, FACS 분석, 단백질 칩 분석, 면역 형광 염색 분석 및 면역 친화성 정제 분석에 따라 응용할 수 있다.

[0016] 또 다른 실시예에서, 상기 광학적 변이는 발광 반응, 발색 반응 또는 형광 반응을 포함할 수 있으며, 상기 전기적 변이는 전류계, 전압계 크로노암페로메트리(chronoamperometry) 또는 크로노볼타메트리(chronopotammetry)에 의하여 정량 될 수 있다.

[0017] 상기의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 또는 가성 통풍 진단을 위한 정보 제공 시스템은 환자로부터 추출된 관절액에 포함된 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정과 서열번호 1의 아미노산 서열 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하고, 상기 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정에 선택적으로 결합하는 합성 펩타이드를 제공하여 반응시키는 표적 타겟팅부, 상기 펩타이드와 결합하는 표지 물질의 촉매 작용에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상을 나타내는 2차 발현 기질을 제공하는 발현 준비부 및 상기 2차 발현 기질이 나타내는 변이에 의하여 상기 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정의 존재 여부를 판단하는 발현 측정부를 포함할 수 있다.

[0018] 다른 실시예에서, 상기 2차 발현 기질이 나타내는 상기 광학적 변이, 상기 전기적 변이 또는 상기 화학적 변이에 의한 신호를 측정하여 상기 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD)의 결정을 정량하는 정량 분석부를 더 포함할 수 있고, 상기 2차 발현 기질은 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)를 포함하며, 상기 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD)의 결정의 양은 상기 2차 발현 기질의 흡광도를 측정하여 얻어지며, 상기 흡광도는 파장 450nm의 전자기파에서 측정될 수 있다.

[0019] 또 다른 실시예에서, 상기 표적 타겟팅부는, 상기 관절액을 특정 효소와 반응시켜 상기 관절액 내부의 물질을 분해하는 관절액 분해부, 상기 분해된 관절액이 미세 여과막을 통하여 여과하고, 상기 미세 여과막 상에 남아있는 결정을 용매에 용해시키는 결정 용해부 및 상기 결정이 용해된 결정 용액에 상기 펩타이드를 제공하는 펩타이드 결합부를 포함할 수 있으며, 선택적으로, 상기 용매는 염기성 용액을 포함할 수 있고, 상기 특정 효소는, 히알루로니다아제(hyaluronidase) 또는 단백분해효소 케이(proteinase K) 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0020] 상기의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 진단 시약은, 서열번호 4의 아미노산 서열 내지 서열번호 6의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하는 펩타이드를 포함하고, 상기 펩타이드는 monosodium urate (MSU)에 선택적으로 반응할 수 있다.

[0021] 상기의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예들에 따른 진단 프로브는 적어도 하나 이상의 표지 물질 또는 1차 발현 기질과 결합되어 있는 펩타이드를 포함하고, 상기 표지 물질은 촉매 반응에 의하여 2차 발현 기질의 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상을 일으키고, 상기 1차 또는 상기 2차 발현 기질은 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하며, 상기 펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열 내지 서열번호 6의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하며 monosodium urate (MSU) 결정에 선택적으로 결합할 수 있는 합성 펩타이드이다. 다른 실시예에서는, 상기 monosodium urate(MSU) 결정에 선택적으로 결합할 수 있는 상기 합성 펩타이드는 비오틴과 결합되고(biotinylated) 상기 비오틴이 상기 표지 물질과 결합할 수 있고, 선택적으로는, 상기 표지 물질은 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP), β -갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 아세틸콜린스테라제, 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제

(malate dehydrogenase), 스탕필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스산화효소 및 퍼옥시다아제 화합물 중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있고 이로 제한되는 것은 아니다.

[0022] 상기의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 진단 키트는, 서열번호 4의 아미노산 서열 내지 서열번호 6의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하며 monosodium urate (MSU) 결정에 선택적으로 결합하는 합성 펩타이드, 상기 하나 이상의 합성 펩타이드들 중 적어도 어느 일부에 결합되는 표지 물질 및 상기 표지 물질의 촉매 작용에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상을 나타내며, 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하는 2차 발현 기질을 포함할 수 있고, 다른 실시예에서는, 상기 하나 이상의 합성 펩타이드들 중 적어도 어느 일부에 결합하며, 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하는 1차 발현 기질을 더 포함할 수 있으며, 상기 합성 펩타이드는 비오틴 결합(biotinylated)되어 상기 표지 물질과 결합할 수 있다. 또 다른 실시예에서는, 상기 표지 물질은 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP), β -갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 아세틸콜린스테라제, 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparaginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스탕필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스산화효소 및 퍼옥시다아제 화합물 중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있으며, 상기 진단 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트를 포함할 수 있다.

[0023] 또 다른 실시예에서, 상기 면역분석(immunoassay)용 키트는 루미넥스 분석, 단백질 마이크로어레이 분석, 엘리사(ELISA) 분석, 캡처-ELSA 분석, ELISPOT 분석, 방사선 면역 분석(RIA), 방사 면역 침전 분석, 면역 침전 분석, 면역조직화학염색 분석, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산 분석, 억제 또는 경계 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역 전기 영동 분석, 조직면역 염색 분석, 보체 고정 분석, FACS 분석, 단백질 칩 분석, 면역 형광 염색 분석 및 면역 친화성 정제 분석에 따라 응용할 수 있다.

[0024] 또 다른 실시예에서, 상기 광학적 변이는 발광 반응, 발색 반응 또는 형광 반응을 포함할 수 있으며, 상기 전기적 변이는 전류계, 전압계 크로노암페로메트리 (chronoamperometry) 또는 크로노볼타메트리 (chronovoltammetry)에 의하여 정량될 수 있다.

[0025] 또 다른 실시예에서, 상기 진단 키트는 상기 MSU 결정과 CPPD 결정을 각각 진단할 수 있도록 2 개의 독립된 센서부들이 제공될 수 있다.

[0026] 상기의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 또는 가성 통풍 진단을 위한 정보 제공 시스템은 환자로부터 추출된 관절액에 포함된 monosodium urate (MSU) 결정과 서열번호 4의 아미노산 서열 내지 서열번호 6의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하고, 상기 monosodium urate (MSU) 결정에 선택적으로 결합하는 펩타이드를 제공하여 반응시키는 표적 타겟팅부, 상기 펩타이드와 결합하는 표지 물질의 촉매 작용에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상을 나타내는 2차 발현 기질을 제공하는 발현 준비부 및 상기 2차 발현 기질이 나타내는 변이에 의하여 상기 monosodium urate (MSU) 결정의 존재 여부를 판단하는 발현 측정부를 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 2차 발현 기질이 나타내는 상기 광학적 변이, 상기 전기적 변이 또는 상기 화학적 변이에 의한 신호를 측정하여 상기 monosodium urate (MSU)의 결정을 정량하는 정량 분석부를 더 포함할 수 있고, 상기 2차 발현 기질은 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)를 포함하며, 상기 monosodium urate (MSU)의 결정의 양은 상기 2차 발현 기질의 흡광도를 측정하여 얻어지며, 상기 흡광도는 파장 450nm의 전자기파에서 측정될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 표적 타겟팅부는, 상기 관절액을 특정 효소와 반응시켜 상기 관절액 내부의 물질을 분해하는 관절액 분해부, 상기 분해된 관절액이 미세 여과막을 통하여 여과하고, 상기 미세 여과막 상에 남아있는 결정을 용매에 용해시키는 결정 용해부 및 상기 결정이 용해된 결정 용액에 상기 합성 펩타이드를 제공하는 펩타이드 결합부를 포함할 수 있으며, 선택적으로, 상기 용매는 염기성 용액을 포함할 수 있고, 상기 특정 효소는, 히알루로니다아제(hyaluronidase), 엘라스타제(elastase), 콜라게나제(collagenase) 또는 단백분해효소 케이(proteinase K) 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 통풍 또는 가성 통풍을 유발하는 monosodium urate (MSU) 결정 또는 calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) 결정과 선택적으로 반응하는 복수 개의 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을

구성함으로써 통풍 또는 가성 통풍 진단에 이용 가능한 펩타이드를 이용한 진단 시약, 진단 프로브 및 진단 키트가 제공될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 환자로부터 추출된 관절액에 시약을 이용한 전처리 과정을 도입함으로써 자동화된 진단 시스템을 구현할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 가성 통풍 진단을 위한 진단 시약을 도시하고, 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 가성 통풍 진단을 위한 진단 프로브를 나타낸 그림이며, 도 1c는 일 실시예에 따른 진단 키트를 이용한 가성 통풍 진단 과정을 나타내는 모식도이다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 진단을 위한 진단 시약을 도시하고, 도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 진단을 위한 진단 프로브를 나타낸 그림이며, 도 2c는 일 실시예에 따른 진단 키트를 이용한 통풍 진단 과정을 나타내는 모식도이다.

도 3는 일 실시예에 따른 통풍 또는 가성 통풍 진단이 각각 가능하도록 구성된 진단 키트를 나타내는 모식도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 또는 가성 통풍 진단을 위한 정보 제공 시스템의 구성도이다.

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 CPPD 결정 모양의 현미경 사진이고, 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 CPPD 결정의 XRD 측정 결과이고, 도 5c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 MSU 결정 모양의 현미경 사진이며, 도 5d는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 MSU 결정의 XRD 측정결과이다.

도 6a 내지 6c는 일 실시예에 따라 제조된 CPPD 결정에 선택적으로 흡착하는 합성 펩타이드(서열번호 1 내지 서열번호 3)을 형광표지한 후, CPPD 결정과 MSU 결정에 처리한 형광 사진이며, 도 6d 내지 6f는 일 실시예에 따라 제조된 MSU 결정에 선택적으로 흡착하는 합성 펩타이드(서열번호 4 내지 서열번호 6)을 형광표지한 후, CPPD 결정과 MSU 결정에 처리한 형광 사진이다.

도 7a는 일 실시예에 따른 서열번호 1 내지 서열번호 3의 아미노산 서열의 합성 펩타이드를 이용한 면역분석 결과를 CPPD 결정의 농도에 따라 나타낸 그래프이며, 도 7b는 일 실시예에 따른 서열번호 4 내지 서열번호 6의 아미노산 서열의 합성 펩타이드를 이용한 면역분석 결과를 MSU 결정의 농도에 따라 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[0031] 본 발명의 실시예들은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위하여 제공되는 것이며, 하기 실시예는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 오히려, 이들 실시예는 본 개시를 더욱 충실하고 완전하게 하고, 당업자에게 본 발명의 사상을 완전하게 전달하기 위하여 제공되는 것이다.

[0032] 도면에서 동일 부호는 동일한 요소를 지칭한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는"은 해당 열거된 항목 중 어느 하나 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다.

[0033] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예를 설명하기 위하여 사용되며, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다. 또한, 본 명세서에서 단수로 기재되어 있다 하더라도, 문맥상 다수를 분명히 지적하는 것이 아니라면, 복수의 형태를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprise)" 및/또는 "포함하는(comprising)"이란 용어는 언급한 형상들, 숫자, 단계, 동작, 부재, 요소 및/또는 이들 그룹의 존재를 특정하는 것이며, 다른 형상, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 그룹들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니다.

[0034] 본 명세서에서 기관 또는 다른 층 "상에(on)" 형성된 층에 대한 언급은 상기 기관 또는 다른 층의 바로 위에 형성된 층을 지칭하거나, 상기 기관 또는 다른 층 상에 형성된 중간 층 또는 중간 층들 상에 형성된 층을 지칭할 수도 있다. 또한, 당해 기술 분야에서 숙련된 자들에게 있어서, 다른 형상에 "인접하여(adjacent)" 배치된 구조 또는 형상은 상기 인접하는 형상에 중첩되거나 하부에 배치되는 부분을 가질 수도 있다.

[0035] 본 명세서에서, "아래로(below)", "위로(above)", "상부의(upper)", "하부의(lower)", "수평의(horizontal)" 또는 "수직의(vertical)"와 같은 상대적 용어들은, 도면들 상에 도시된 바와 같이, 일 구성 부재, 층 또는 영역

들이 다른 구성 부재, 층 또는 영역과 갖는 관계를 기술하기 위하여 사용될 수 있다. 이들 용어들은 도면들에 표시된 방향뿐만 아니라 소자의 다른 방향들도 포괄하는 것임을 이해하여야 한다.

[0036] 이하에서, 본 발명의 실시예들은 본 발명의 이상적인 실시예들(및 중간 구조들)을 개략적으로 도시하는 단면도들을 참조하여 설명될 것이다. 이들 도면들에 있어서, 예를 들면, 부재들의 크기와 형상은 설명의 편의와 명확성을 위하여 과장될 수 있으며, 실제 구현시, 도시된 형상의 변형들이 예상될 수 있다. 따라서, 본 발명의 실시예는 본 명세서에 도시된 영역의 특정 형상에 제한된 것으로 해석되어서는 아니 된다. 또한, 도면의 부재들의 참조 부호는 도면 전체에 걸쳐 동일한 부재를 지칭한다.

[0037] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 가성 통풍 진단을 위한 진단 시약(100)을 도시하며, 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 가성 통풍 진단을 위한 진단 프로브(200a)를 나타낸 그림이고, 도 1c는 일 실시예에 따른 진단 키트를 이용한 가성 통풍 진단 과정(300a)을 나타내는 모식도이다.

[0038] 도 1a 및 도 1b를 참조하면, 일 실시예에 따른 진단 시약(100)은, CPPD 결정(CR1)에 선택적으로 결합할 수 있는 합성 펩타이드(100a)를 포함할 수 있다. 본 발명의 펩타이드는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드는 화학적 합성, 예컨대 고체상 기술 및 자동화된 펩타이드 합성기에 의해, 또는 재조합 수단에 의해 생산될 수 있다. 본 발명의 상기 합성 펩타이드(100a)는 하기 아미노산 서열을 가지며, 상기 아미노산 서열은 라이브러리를 이용하여 선정되고 구성될 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에서, 합성 펩타이드(100a)는 서열번호 1의 아미노산 서열 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 ARC CGN ILA WRD YWG이고, 상기 서열번호 2의 아미노산 서열은 ARG YAH FIG RSD FWG이며, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열은 ARC LEL LGR KID FWG를 포함할 수 있다. 상기 아미노산 서열들의 처음의 AR 및 마지막의 WG로 구성된 아미노산 서열을 제외한 가운데 11 개의 아미노산이 CPPD 결정(CR1)에 선택적으로 결합하여 반응할 수 있다. 하기 [표 1]은 상기 서열번호 1 내지 서열번호 3의 아미노산 서열이다.

표 1

실시예	서열(N-terminal → C-terminal)	서열번호
Peptide 1	ARC CGN ILA WRD YWG	1
Peptide 2	ARG YAH FIG RSD FWG	2
Peptide 3	ARC LEL LGR KID FWG	3

[0041] 도 1b를 참조하면, 일 실시예에 따른 진단 프로브(200a)는 합성 펩타이드(100a), 합성 펩타이드(100a)에 결합되는 적어도 하나 이상의 표지 물질(LS) 또는 적어도 하나 이상의 1차 발현 기질(미도시)을 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 1차 발현 기질(미도시)은 합성 펩타이드(100a)에 직접 결합되어 발색, 발광 및 형광을 나타낼 수 있다. 상기 1차 발현 기질(미도시)은 발색, 발광, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0042] 상기 합성 펩타이드(100a)는 서열번호 1의 아미노산 서열 내지 서열번호 3의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있고, CPPD(CR1)에 선택적으로 결합하여 반응할 수 있다. 상기 합성 펩타이드(100a)에 대한 상세한 설명은 전술한 개시 사항을 참조할 수 있다.

[0043] 일 실시예에서, 합성 펩타이드(100a)는 표지 물질(LS)과 결합하기 위한 결합부를 포함할 수 있다. 예를 들면 합성 펩타이드(100a)의 결합부는 비오틴(BTN)일 수 있다. 상기 비오틴(BTN)은 비타민 H로 알려진 생체 유래 물질이며, 비방사성 표지 방법에 응용되는 표지 물질인 아비딘과 특이적으로 강하게 결합할 수 있어 상기 합성 펩타이드(100a)를 이용하는 바이오 분석에 이용될 수 있다.

[0044] 일 실시예에서, 2차 발현 기질(ES2)이 제공될 수 있다. 표지 물질(LS)은 촉매 반응에 의하여 2차 발현 기질(ES2)의 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상을 일으킬 수 있다. 예를 들면, 일 실시예에서, 상기 표지 물질(LS)은 스트렙트아비딘(STA)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP), 퍼옥시다아제 화합물을 포함할 수 있으며, 예시적으로, β -갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 아세틸콜린스테라제, 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparaginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스태필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스산화효소, 사이토크롬 P450 및 퍼옥시다아제 화합물 중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 전술한 물질은 예시적이며, 발색 반응, 형광 반응, 발광

반응 또는 적외선 반응을 촉매 하는 효소 및 상기 효소와 같은 역할을 하는 물질들은 모두 해당될 수 있으며, 특정 물질들로 제한되지 않는다.

- [0045] 일 실시예에서, 2차 발현 기질(ES2)은 상기 표지 물질(LS)의 촉매반응에 의해 변이가 나타난다. 구체적으로, 적어도 하나 이상의 표지 물질(LS)이 결합되어 있는 합성 펩타이드(100a)를 포함하는 진단 프로브(200a)가 CPPD 결정(CR1)에 선택적으로 결합되고, 상기 합성 펩타이드(100a)에 결합되어 있는 상기 표지 물질(LS)이 반응 영역에 잔존하며, 상기 반응 영역에 상기 2차 발현 기질(ES2)이 제공되어, 상기 2차 발현 기질(ES2)이 상기 표지 물질(LS)의 촉매 반응에 의하여 발색 반응, 발광 반응, 형광 반응 중 적어도 어느 하나를 나타낼 수 있다.
- [0046] 다른 실시예에서, 상기 표지 물질(LS)이 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP)를 포함하는 경우에는, 상기 2차 발현 물질로 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색 물질이 이용될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 표지 물질(LS)이 호스래디쉬 퍼옥시다아제인 경우에는, 상기 2차 발현 물질로 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazolinesulfonate]), O-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate)와 같은 물질들이 이용될 수 있다. 전술한 물질들은 예시에 불과하고 표지 물질(LS)의 촉매반응에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이를 나타내는 것이라면 모두 적용될 수 있으며 특정 물질에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 도 1c를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 진단 키트는 CPPD 결정(CR1)에 선택적으로 결합하는 합성 펩타이드(100a), 합성 펩타이드(100a)의 일부에 결합되는 표지 물질(LS) 및 상기 표지 물질(LS)의 촉매 작용에 의하여 변이 가능한 2차 발현 기질(ES2)을 포함할 수 있다. 선택적으로, 상기 합성 펩타이드(100a)에는 표지 물질(LS)과의 결합을 위한 결합부, 예를 들면 비오틴(BTN)이 포함될 수 있다. 합성 펩타이드(100a), 비오틴(BTN), 표지 물질(LS) 및 2차 발현 물질에 대한 상세한 설명은 전술한 개시 사항을 참조할 수 있다. 다른 실시예에 따른 진단 키트는 하나 이상의 합성 펩타이드(100a)들 중 적어도 어느 일부에 결합하며, 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하는 1차 발현 기질(미도시)을 더 포함할 수 있다.
- [0048] 진단 키트를 이용하여 다음의 진단 과정(300a)이 수행될 수 있다. 가성 통풍 환자의 관절액 내부에 CPPD 결정(CR1)이 포함되어 있는 경우를 가정하면, 상기 CPPD 결정(CR1)은 세척 용액인 인산 완충 용액(Phosphate Buffered Saline, PBS) 내에 함유될 수 있다. 합성 펩타이드(100a)는 CPPD 결정(CR1)에 선택적으로 반응하여 결합될 수 있다. 예시적으로, 합성 펩타이드(100a)는 기관에 고정되거나, 기관에 고정되지 않고 용매 내에 존재할 수 있다.
- [0049] 이후, 원심 분리기를 사용하여 약 12,000g에서 약 3분간 원심 분리 공정이 수행될 수 있다. 상기 원심 분리 공정에 의해 상기 합성 펩타이드가 흡착된 CPPD 소결체(pellet)를 얻을 수 있다. 상기 CPPD 결정(CR1)에 흡착 또는 결합된 상기 합성 펩타이드(100a)에 상기 표지 물질(LS)을 제공하는 경우 상기 표지 물질(LS)이 상기 합성 펩타이드(100a)와 결합될 수 있다.
- [0050] 이후, 2차 발현 기질(ES2)이 제공되면 표지 물질(LS)의 촉매 반응에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이가 나타날 수 있다. 예를 들면, 2차 발현 기질(ES2)의 광학적 변이의 경우, 발광, 발색 또는 형광 반응을 포함할 수 있으며, 전기적 변이의 경우, 상기 2차 발현 기질(ES2)의 산화-환원 반응에 의하여 발생한 전자의 전류 신호에 의해 상기 CPPD 결정(CR1)이 정량화 될 수 있다.
- [0051] 다른 실시예에서, 상기 전기적 변이는 전류계, 전압계, 크로노암페로메트리 (chronoamperometry), 크로노볼타메트리 (chronovoltammetry)에 의하여 정량될 수 있다. 전기적 변이에 따른 CPPD 결정의 정량화 방법에 대해 상세한 설명은 후술하는 실시예 3를 참조할 수 있다.
- [0052] 도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 진단을 위한 진단 시약(100)을 도시하고, 도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 진단을 위한 진단 프로브(200b)를 나타낸 그림이며, 도 2c는 일 실시예에 따른 진단 키트를 이용한 통풍 진단 과정(300b)을 나타내는 모식도이다.
- [0053] 도 2a 및 도 2b를 참조하면, 일 실시예에 따른 진단 시약(100)은, MSU 결정(CR2)에 선택적으로 결합할 수 있는 합성 펩타이드(100b)를 포함할 수 있다. 상기 합성 펩타이드(100b)는 서열번호 4의 아미노산 서열 내지 서열번호 6의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 서열번호 4의 아미노산 서열 내

지 서열번호 6의 아미노산 서열은 아미노산 라이브러리를 이용하여 선정되고 구성될 수 있으며, 상기 서열번호 4의 아미노산 서열은 ARY AGS LES GAD DWG이고, 상기 서열번호 5의 아미노산 서열은 ARC ESG RPG SVD FWG이며, 상기 서열번호 6의 아미노산 서열은 ARC VDG ISR LRD DWG를 포함할 수 있다. 전술한 서열번호 1 내지 3 상기 아미노산 서열의 경우와 마찬가지로, 처음의 AR 및 마지막의 WG로 구성된 아미노산 서열을 제외한 가운데 11 개의 아미노산이 MSU 결정(CR2)에 선택적으로 결합하여 반응할 수 있다. 하기 [표 2]은 서열번호 4 내지 서열번호 6의 아미노산 서열이다.

표 2

실시예	서열(N-terminal → C-terminal)	서열번호
Peptide 4	ARY AGS LES GAD DWG	4
Peptide 5	ARC ESG RPG SVD FWG	5
Peptide 6	ARC VDG ISR LRD DWG	6

[0054]

도 2b를 참조하면, 일 실시예에 따른 진단 프로브(200b)는 합성 펩타이드(100b), 합성 펩타이드(100b)에 결합되는 적어도 하나 이상의 표지 물질(LS) 또는 적어도 하나 이상의 1차 발현 기질, 및 상기 표지 물질 또는 1차 발현 기질(미도시)을 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 1차 발현 기질(미도시)은 상기 합성 펩타이드(100b)에 직접 결합하여 발색, 발광 및 형광을 나타낼 수 있다. 상기 1차 발현 기질(미도시)는 발색, 발광, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0055]

상기 합성 펩타이드(100b)는 서열번호 4의 아미노산 서열 내지 서열번호 6의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있고, MSU(CR2)에 선택적으로 결합하여 반응할 수 있다. 상기 합성 펩타이드(100b)에 대한 상세한 설명은 전술한 개시 사항을 참조할 수 있다.

[0056]

일 실시예에서, 합성 펩타이드(100b)는 표지 물질(LS)과 결합하기 위한 결합부를 포함할 수 있다. 예를 들면 상기 합성 펩타이드(100b)는 비오틴(BTN)과 결합될 수 있다. 상기 비오틴(BTN), 표지물질(LS)에 대한 상세한 설명은 전술한 진단 프로브(200a)에 관한 기재사항을 참조할 수 있다.

[0057]

일 실시예에서, 2차 발현 기질(ES2)이 제공될 수 있다. 2차 발현 기질(ES2)은 상기 표지 물질(LS)의 촉매반응에 의해 변이가 나타난다. 상기 2차 발현 기질(ES2)에 대한 상세한 설명과 예시는 전술한 기재사항을 참조할 수 있다.

[0058]

도 2c를 참조하면, 진단 키트를 이용하여 다음의 진단 과정(300b)이 수행될 수 있다. 상기 진단 과정(300b)는 합성 펩타이드(100b), 합성 펩타이드(100b) 일부에 결합되는 표지 물질(LS), 및 2차 발현 기질(ES2)을 포함할 수 있다. 선택적으로, 상기 합성 펩타이드(100a)에는 표지 물질(LS)과의 결합을 위한 결합부, 예를 들면 비오틴(BTN)이 포함될 수 있다. 합성 펩타이드(100b), 표지 물질(LS), 비오틴(BTN) 및 2차 발현 물질에 대한 상세한 설명은 전술한 개시 사항을 참조할 수 있다. 또 다른 실시예에 따른 진단 키트의 진단 과정(300b)는 합성 펩타이드(100b) 일부에 결합하며, 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하는 1차 발현 기질을 더 포함할 수 있다.

[0059]

진단 키트를 이용하여 진단 과정(300b)을 수행할 수 있다. 통풍 환자의 통풍 환자의 관절액 내부에 MSU 결정(CR2)이 존재할 수 있다. 합성 펩타이드(100b)는 상기 MSU 결정(CR2)에 선택적으로 반응하여 결합될 수 있다. 예시적으로, 상기 합성 펩타이드(100b)는 기관에 고정되거나, 기관에 고정되지 않고 용매 내에 존재할 수 있다. MSU에 흡착 또는 결합된 합성 펩타이드(100b)에 표지 물질(LS)을 제공하는 경우 표지 물질(LS)이 합성 펩타이드(100b)와 결합될 수 있다. 이후, 2차 발현 기질(ES2)이 제공되면 표지 물질(LS)의 촉매 반응에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상이 나타날 수 있다. 상기 광학적 변이와 상기 전기적 변이에 대한 상세한 설명은 진단 과정(300a)에서 기재한 사항을 참조할 수 있다.

[0060]

도 1c 및 도 2c를 참조하여 설명된 진단 키트의 가성 통풍을 진단하기 위한 진단 과정(300a) 또는 통풍을 진단하기 위한 진단 과정(300b)은 면역분석(immunoassay) 방식을 따라 진단될 수 있다. 예를 들면, 진단 키트는 루미넥스 분석, 단백질 마이크로어레이 분석, 엘리사(ELISA) 분석, 캡처-ELSA 분석, ELISPOT 분석, 방사선 면역 분석(RIA), 방사 면역 침전 분석, 면역 침전 분석, 면역조직화학염색 분석, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산 분석, 억제 또는 경재 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역 전기 영동 분석, 조직면역 염색 분석, 보체 고정 분석, FACS 분석, 단백질 칩 분석, 면역 형광 염색 분석 및 면역 친화성 정제 분석 방식에 따라 응용될 수도 있다. 전술한 분석 방식은 예시적일 뿐, 상용화된 다른 분석 방법이 진단 키트가 통풍

[0061]

또는 가성통풍 진단을 위해 이용될 수 있다.

[0062] 도 3는 일 실시예에 따른 통풍 또는 가성 통풍 진단을 위한 진단 키트(300)를 나타내는 모식도이다.

[0063] 도 3를 참조하면, 진단 키트(300)는, 가성 통풍의 진단 과정(300a) 또는 통풍의 진단 과정(300b)을 신속하고 정확하게 수행할 수 있도록 한다. 진단 키트(300)는 MSU 결정 또는 CPPD 결정을 진단할 수 있도록 기관(310)과 독립된 센서부(320)이 구비될 수 있다. 상기 기관(310)은 글라스, 실리콘, 고분자 수지, 세라믹, 금속 또는 다공체 중 하나 이상을 포함할 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 상기 센서부(320)은 전술한 상기 진단 과정(300a) 또는 상기 진단 과정(300b)을 통해 통풍 또는 가성통풍을 진단할 수 있는 부분을 말한다.

[0065] 일 실시예에서, 진단키트(300)는 센서부가 2개로 구성된 것으로 각각 CPPD 결정(CR1)과 MSU 결정(CR2)을 진단할 수 있다. 하나의 센서부(320)가 CPPD 결정(CR1)을 진단하고, 다른 센서부(320)가 MSU 결정(CR2)를 진단하여, 통풍 또는 가성통풍 증상을 가진 환자로부터 추출된 관절액을 차례대로 센서부에 놓아 CPPD 결정(CR1)이 강하게 정량화 될 경우 가성통풍으로, MSU 결정(CR2)이 강하게 정량화 될 경우 통풍으로 진단할 수 있다. 환자가 통풍 또는 가성통풍에 해당하는지를 신속하고 정확하게 진단할 수 있게 된다. 다른 실시예로, 상기 센서부(320)은 복수개의 센서부(320)을 가질 수도 있다.

[0066] 또한, 진단 키트의 일 모양으로 사각형이 표현되어 있으나, 이는 예시적인 것에 불과하고 원형, 타원형, 사다리꼴 또는 비대칭의 도형으로 표현될 수 있다.

[0067] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 또는 가성 통풍 진단을 위한 정보 제공 시스템의 구성도이다.

[0068] 도 4를 참조하면, 일 실시예에 따른 정보 제공 시스템(400)은 표적 타겟팅부(410), 발현 준비부(420), 발현 측정부(430) 및 정량 분석부(440)를 포함할 수 있다. 정보 제공 시스템(400)은 자동화 장치이거나 자동화된 진단 시스템일 수 있다. 단, 설명의 편의를 위해 진단의 수행 주체는 그 기재가 생략될 수 있다. 이하에서, 다수의 동작을 수행하기 위한 구성 요소들이 분리되어 있으나, 이는 본 발명의 목적을 달성하기 위한 바람직한 실시예일 뿐이며, 필요에 따라 일부 구성 요소가 추가되거나 삭제될 수 있음은 물론이다. 화살표는 가성통풍 또는 통풍 진단 대상이 되는 관절액의 처리 과정을 나타내는 것이고, 상기 처리 과정의 순서는 바뀔 수 있고, 도 4의 화살표는 예시에 불과하며 이에 한정되는 것은 아니다. 이는 후술할 진단 대상이 되는 관절액을 처리하는 과정과 동일하다.

[0069] 표적 타겟팅부(410)는 일 실시예로, 환자로부터 추출된 관절액에 포함된 CPPD 결정과 합성 펩타이드(100a)를 제공하여 반응시킬 수 있다. 예를 들면, 상기 관절액이 플레이트에 제공되고 상기 플레이트에 합성 펩타이드(100a)가 제공되거나, 플레이트에 이미 제공되어 있는 상기 합성 펩타이드(100a)가 있고 상기 플레이트 상에 상기 관절액을 제공할 수도 있다.

[0070] 다른 실시예로, 상기 표적 타겟팅부(410)는 MSU 결정(CR2)과 합성 펩타이드(100b)를 제공하여 반응시킬 수 있다. 이에 대한 예시는 전술한 합성 펩타이드(100a)의 경우와 동일하다. 상기 플레이트는 용액이 제공될 수 있는 반응 영역이면 특정 형태로 제한되지 않으며, 유리, 플라스틱, 고분자와 같은 재료를 포함하는 복수의 웰(well), 셀(cell), 기관 또는 플레이트와 같은 모든 종류의 용기를 포함할 수 있다.

[0071] 다른 실시예에서, 표적 타겟팅부(410)는 관절액 분해부(411), 결정 용해부(412) 및 펩타이드 결합부(413)를 포함할 수 있다. 관절액 분해부(411)는 상기 관절액을 특정 효소와 반응시켜 상기 관절액 내부의 물질을 분해할 수 있다. 상기 관절액은 높은 히알루론산(hyaluronic acid)의 농도로 인해 점성이 높아 정밀한 진단을 위해서는 상기 분해 효소에 의하여 상기 히알루론산 및 기타 체내 물질들이 분해되어야 한다. 일 실시예에서, 상기 분해 효소는 히알루로니다아제(hyaluronidase), 엘라스타제(elastase), 콜라게나제(collagenase) 또는 단백질 분해효소 케이(proteinase K) 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있지만, 이에 한정하는 것은 아니다. 또한, 일 실시예에서 상기 관절액은 골관절염 혹은 류마티스성 관절염을 가지지 않은 환자로부터 추출될 수 있다.

[0072] 결정 용해부(412)는 상기 분해된 관절액이 미세 여과막을 통하여 여과하고, 상기 미세 여과막 상에 남아 있는 결정을 용매에 용해시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 용매는 수산화나트륨(NaOH) 용액과 같은 염기성 용액을 포함하지만, 이에 한정하는 것은 아니다. 1 M 농도의 수산화나트륨(NaOH) 용액으로 상기 결정을 60 °C에서 30 분간 용해시킨 경우, 상기 CPPD 결정 또는 MSU 결정이 모두 용해될 수 있다.

[0073] 또한, 펩타이드 결합부(413)는 상기 결정이 용해된 결정 용액에 상기 합성 펩타이드(100a) 또는 상기 합성 펩타이드(100b)를 제공할 수 있으며, 상기 합성 펩타이드(100a) 또는 상기 합성 펩타이드(100b)의 제공 방법은 표적

타겟팅부(410)에 관하여 전술한 개시 사항을 참조할 수 있다.

- [0074] 발현 준비부(420)는 합성 펩타이드(100a) 또는 합성 펩타이드(100b)와 결합하는 표지 물질(LS)의 촉매 작용에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이 중 적어도 어느 하나 이상을 나타내는 2차 발현 기질(ES2)을 제공할 수 있다. 상기 표지 물질(LS) 및 상기 2차 발현 기질(ES2)에 대한 상세한 설명은 전술한 개시 사항을 참조할 수 있다.
- [0075] 일 실시예에서, 표지 물질(LS)은 미리 합성 펩타이드(100a)와 결합된 진단 프로브(200a)로 제조되어 제공되거나, 다른 실시예에서는, 합성 펩타이드(100a)에 표지 물질(LS)이 별도로 제공되어 상기 표지 물질(LS)이 상기 합성 펩타이드(100a)와 결합할 수도 있다. 또 다른 실시예에서, 합성 펩타이드(100b)의 경우도, 표지 물질(LS)과 미리 결합되어 진단 프로브(200b)로 제조되어 제공되거나, 또 다른 실시예에서는 합성 펩타이드(100b)에 표지 물질(LS)가 별도로 제공되어 상기 합성 펩타이드(100b)와 결합할 수도 있다. 상기 물질들이 제공되는 작동들은 수동적으로 수행되거나 자동화 장치에 의하여 수행될 수 있다.
- [0076] 발현 측정부(430)는 일 실시예로, 2차 발현 기질(ES2)이 나타내는 변이에 의하여 CPPD 결정(CR1)의 존재 여부를 판단할 수 있다. 예를 들어, 2차 발현 기질(ES2)이 나타내는 발광 반응, 형광 반응, 발색 반응의 광 에너지를 측정하거나, 상기 반응들을 측정할 수 있는 카메라와 같은 광학적 장치에 의하여 통풍의 발병여부를 진단할 수 있다. 다른 실시예에서, 2차 발현 기질(ES2)에 의한 전압 또는 전류의 전기적 신호의 변화를 측정할 수 있고, 또 다른 실시예에서는, 수정 미세저울(quartz crystal microbalance; QCM), 마이크로캔틸레버(microcantilever)와 같은 질량 기반 면역 분석 방법이 사용될 수 있다. 다른 실시예로, 발현 측정부(430)은 2차 발현 기질(ES2)이 나타내는 변이에 의하여 MSU 결정(CR2)의 존재 여부를 판단할 수 있으며, 이에 대한 예시는 전술한 CPPD 결정(CR1)의 존재 여부를 판단할 수 있는 발현 측정부(430)의 기재 사항을 참조할 수 있다.
- [0077] 발현 측정부(430)는 CPPD 결정(CR1)의 구조를 수동 또는 자동으로 촬영할 수 있는 촬영부를 더 포함할 수 있으며, 상기 촬영부는 카메라일 수 있다. 또한, 상기 촬영된 이미지를 정량 분석부(440)로 송신할 수 있다. 또한, 상기 촬영부는 예시적으로는 진단 키트(300)에 포함될 수 있다. 또한, 상기 촬영부는 CPPD 결정(CR1)을 확대 촬영하기 위한 렌즈를 포함할 수 있다. 다른 실시예로, 상기 발현 측정부(430)에 포함될 수 있는 상기 촬영부의 경우, 상기 전술한 기재 사항과 마찬가지로, MSU 결정(CR2)를 촬영할 수 있고, 상기 MSU결정(CR2)를 확대하는 렌즈를 포함할 수 있다.
- [0078] 정량 분석부(440)는 2차 발현 기질(ES2)이 나타내는 상기 광학적 변이, 상기 전기적 변이 또는 상기 화학적 변이에 의한 신호를 측정하여 상기 CPPD 결정(CR1)을 정량할 수 있다. 다른 실시예로, MSU 결정(CR2)의 경우도 동일한 방법으로 정량할 수 있다.
- [0079] 일 실시예에서는, 상용화된 면역분석법(immunoassay)을 이용할 수 있다. 상용화된 면역분석법은 진단 키트의 가성 통풍 진단 과정(300a) 또는 통풍 진단 과정(300b)에서 제시한 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0080] 실시예 1. CPPD 결정과 MSU 결정의 합성
- [0081] 실시예 1-1. CPPD 결정의 합성
- [0082] 본 실시예에서 사용된 CPPD 결정을 합성하기 위해, 10mg/ml의 CPPD 결정에 펩티드를 1 Mm의 농도로 준비하여 각 100 μ l를 혼합한 후 상온에서 1 시간동안 반응하였다. 본 실시예에서 사용한 CPPD 결정은 0.665 g의 sodium pyrophosphate를 60 mM의 HCl 50 ml에 첨가한 용액(용액 1)와 1.11 g의 calcium chloride를 증류수 50 ml에 첨가한 용액(용액 2)을 혼합하여 60℃에서 5 일 동안 인큐베이션하여 합성하였다.
- [0083] 도 5a는 본 발명의 실시를 위해 합성된 CPPD 결정(CR1) 모양의 현미경 사진이며, 도 5b는 본 실시예에 따라 합성된 CPPD 결정(CR1)의 XRD 측정결과이다. X선 회절의 2 θ , d, Height, FWHM는 하기 [표 3]와 같을 수 있다.

표 3

2θ	d	Height	FWHM	2θ	d	Height	FWHM
10.937	8.083	1638	0.089	34.545	2.5943	389	0.094
11.381	7.768	167	0.092	35.445	2.5305	307	0.06
12.5898	7.0253	22574	0.07	35.532	2.5245	535	0.13
16.029	5.525	263	0.086	35.993	2.4932	58	0.1
16.538	5.356	212	0.101	36.918	2.4328	315	0.087
16.876	5.2494	571	0.066	37.469	2.39832	1156	0.088
19.666	4.5105	379	0.093	38.244	2.3514	702	0.093
21.222	4.183	159	0.095	38.515	2.3356	336	0.093
21.521	4.1257	412	0.083	39.207	2.29589	424	0.089
21.994	4.0381	1020	0.084	39.408	2.2847	95	0.066
22.954	3.8713	396	0.074	39.75	2.26578	381	0.054
23.628	3.7624	208	0.101	39.827	2.2616	2077	0.131
25.343	3.5115	1056	0.104	40.341	2.234	112	0.079
25.667	3.4679	1743	0.088	40.646	2.2179	115	0.15
26.135	3.4069	474	0.09	41.08	2.1954	268	0.106
26.64	3.344	128	0.41	41.267	2.1859	45	0.08
27.455	3.246	7317	0.092	42.319	2.134	93	0.07
27.896	3.1957	677	0.09	42.753	2.1133	701	0.119
28.536	3.1255	2495	0.079	43.449	2.08106	259	0.092
28.67	3.1111	313	0.07	43.699	2.0698	193	0.093
28.966	3.08	2405	0.085	43.935	2.0592	162	0.093
29.909	2.985	1215	0.108	44.282	2.0438	169	0.1
31.29	2.8564	163	0.07	44.44	2.03692	377	0.1
31.426	2.8443	137	0.07	44.61	2.02958	319	0.097
32.096	2.7865	1811	0.1	44.9	2.01714	476	0.082
32.421	2.7593	247	0.15	45.165	2.0059	625	0.179
32.601	2.7444	289	0.099	45.528	1.9908	57	0.12
32.882	2.7216	399	0.11	45.936	1.974	324	0.088
33.423	2.67879	2026	0.102	46.531	1.9502	173	0.084
33.679	2.6591	273	0.084	46.806	1.9393	394	0.083
34	2.6347	114	0.074	47.715	1.9045	370	0.136
34.185	2.6208	650	0.093	48.349	1.881	170	0.08

[0084]

[0085]

도 5a를 참조하면, 본 발명의 실시를 위해 합성된 CPPD 결정(CR1)은 판상 구조를 보이는 것을 확인할 수 있다. 펄타이드의 결합을 확인하기 위해 CPPD 결정(CR1)과 서열번호 1 내지 서열번호 3의 합성 펄타이드(100a)를 반응할 수 있다. 상기 CPPD 결정(CR1)의 경우, 관절액으로부터 얻어질 수 있으며 본원 발명의 상기 합성 펄타이드(100a)는 상기 CPPD 결정(CR1)과 선택적으로 흡착할 수 있어 가성통풍의 진단이 가능할 수 있다.

[0086]

도 5b를 참조하면, 상기 합성된 CPPD 결정(CR1)은 선행문헌 [1. Brown, E. H., et al. "Fertilizer materials, preparation and characterization of some calcium pyrophosphates." Journal of Agricultural and Food Chemistry 11.3 (1963): 214-222.1. Brown, E. H., et al. "Fertilizer materials, preparation and characterization of some calcium pyrophosphates." Christoffersen, Margaret R., et al. "Kinetics of dissolution of triclinic calcium pyrophosphate dihydrate crystals." Journal of crystal growth 203.1-2 (1999): 234-243.]에서 알려진 바와 같이 Bravais lattice 중 하나로 3개의 결정축 길이가 각각 다르고 서로 직교하지 않는 Triclinic 구조의 결정구조를 가지는 것으로 분석되었다. 상기 합성된 CPPD 결정(CR1)은 기존에 알려진 가성통풍을 일으키는 생체결과와 동일함을 확인할 수 있다. 이는 상기 합성 펄타이드(100a)가 상기 합성된 CPPD 결정(CR1)에 선택적으로 결합하여 반응하는 것으로 실제 관절액에서 추출된 CPPD 결정(CR1)에도 동일하게 선택적으로 결합할 수 있어 초기에 통풍 또는 가성통풍 진단이 용이하다는 것을 의미한다.

[0087]

실시에 1-2. MSU 결정의 합성

[0088]

본 실시예에서 사용한 MSU 결정(CR2)은 0.8 g의 uric acid를 50℃ 증류수 160 ml에 넣은 후, 5.125ml의 NaOH를 첨가하여 uric acid를 용해시켜, 4℃에서 350 rpm으로 교반시키며 5 일 동안 인큐베이션하여 합성하였다.

[0089]

도 5c는 본 발명의 실시를 위해 합성된 MSU 결정 모양의 현미경 사진이며, 도 5d는 본 발명의 일 실시예에 따라 합성된 MSU 결정(CR2)의 XRD 측정 결과이다. X선 회절의 2θ, d, Height, FWHM는 하기 [표 4]와 같을 수 있다.

표 4

2θ	d	Height	FWHM	2θ	d	Height	FWHM
11.626	7.606	887	0.21	33.697	2.6577	1266	0.352
16.5	5.356	405	0.371	34.09	2.628	173	0.62
17.948	4.9382	983	0.204	35.398	2.5337	214	0.39
18.879	4.6968	2207	0.203	36.395	2.4666	516	0.401
19.533	4.541	490	0.176	37.175	2.4166	151	0.19
21.55	4.12	50	0.84	37.872	2.3737	270	0.35
25.529	3.4863	762	0.25	39.27	2.2923	124	0.31
26.125	3.4082	441	0.189	39.94	2.2554	241	0.37
27.01	3.298	204	0.17	40.82	2.2089	150	0.46
28.214	3.1604	6156	0.273	41.317	2.1834	247	0.19
28.986	3.078	154	0.07	42.21	2.1393	234	0.2
29.33	3.042	551	0.174	44.306	2.0428	383	0.314
31.02	2.881	321	0.58	44.977	2.0139	120	0.27
32.22	2.776	614	0.138	47.02	1.931	71	0.46
32.394	2.7615	380	0.12	49.16	1.8518	51	0.23

[0090]

[0091]

도 5c를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따라 합성된 MSU 결정(CR2)은 침상구조를 보이는 것을 확인할 수 있다. 펩타이드의 결합을 확인하기 위해 MSU 결정(CR2)과 서열번호 4 내지 서열번호 6의 합성 펩타이드를 반응할 수 있다. 상기 MSU 결정(CR2)의 경우, 관절액으로부터 얻어질 수 있으며, 본원 발명의 상기 합성 펩타이드(100b)는 상기 합성된 MSU 결정(CR2)과 선택적으로 흡착할 수 있어 통풍의 진단이 가능할 수 있다.

[0092]

도 5d를 참조하면, 상기 합성된 MSU 결정(CR2)은 선행 문헌 [1. Mandel, Neil S., and Gretchen S. Mandel. "Monosodium urate monohydrate, the gout culprit." Journal of the American Chemical Society 98.8 (1976): 2319-2323 ; 2. Martillo, Miguel A., Lama Nazzal, and Daria B. Crittenden. "The crystallization of monosodium urate." Current rheumatology reports 16.2 (2014): 400.1. Mandel, Neil S., and Gretchen S. Mandel. "Monosodium urate monohydrate, the gout culprit." Journal of the American Chemical Society 98.8 (1976): 2319-23231. Mandel, Neil S., and Gretchen S. Mandel. "Monosodium urate monohydrate, the gout culprit." Journal of the American Chemical Society 98.8 (1976): 2319-2323.. Martillo, Miguel A., Lama Nazzal, and Daria B. Crittenden. "The crystallization of monosodium urate." Current rheumatology reports 16.2 (2014): 400]에서 알려진 바와 같이 Triclinic 구조의 결정구조를 가지는 것으로 분석되었다. 이와 같이 상기 합성된 MSU 결정(CR2)은 기존에 알려진 통풍을 일으키는 생체결정과 동일함을 확인할 수 있다. 상기 합성 펩타이드(100b)가 상기 합성된 MSU 결정(CR2)에 선택적으로 결합하여 반응하는 것으로 실제 관절액에서 추출된 MSU 결정(CR2)에도 동일하게 선택적으로 결합할 수 있어 조기에 통풍 또는 가성통풍 진단이 용이하다는 것을 의미한다.

[0093]

실시예 2. 서열번호 1 내지 서열번호 3의 펩타이드와 서열번호 4 내지 서열번호 6의 펩타이드를 형광표지한 후 CPPD 결정과 MSU 결정에 처리시 형광사진

[0094]

실시예 2-1. 서열번호 1 내지 서열번호 3의 펩타이드를 형광 표지한 후 CPPD 결정과 MSU 결정에 처리시 형광 사진

[0095]

도 6a 내지 6c는 일 실시예에 따라 제조된 CPPD 결정(CR1)에 선택적으로 흡착하는 합성 펩타이드(서열번호 1 내지 서열번호 3)을 형광 표지한 후, CPPD 결정(CR1)과 MSU 결정(CR2)에 처리한 형광 사진이다. 구체적으로 6a는 서열번호 1, 6b는 서열번호 2, 6c는 서열번호 3의 펩타이드를 형광 표지한 후 CPPD 결정(CR1)과 MSU 결정(CR2)에 처리한 형광 사진이다.

[0096]

도 6a 내지 6c를 참조하면, 형광 표지된 서열번호 1 내지 서열번호 3의 합성 펩타이드는 MSU 결정(CR2)와는 결합하지 않으며, CPPD 결정(CR1)와는 강하게 결합하는 것을 확인할 수 있다. 상기 서열번호를 가지는 합성 펩타이드는 MSU 결정(CR2)과 CPPD 결정(CR1)이 공존하는 관절액 내부라 할지라도 CPPD 결정(CR2)에 강하게 결합하는 점을 통해 통풍과 가성통풍의 구별이 가능하게 된다.

[0097]

실시예 2-2. 서열번호 4 내지 서열번호 6의 펩타이드를 형광 표지한 후 CPPD 결정과 MSU 결정에 처리시 형광사진

- [0098] 도 6d 내지 6f는 일 실시예에 따라 제조된 MSU 결정(CR2)에 선택적으로 흡착하는 합성 펩타이드(서열번호 4 내지 서열번호 6)을 형광 표지한 후, CPPD 결정(CR1)과 MSU 결정(CR2)에 처리한 형광 사진이다. 구체적으로 6d는 서열번호 4, 6e는 서열번호 5, 6f는 서열번호 6의 펩타이드를 형광 표지한 후 CPPD 결정(CR1)과 MSU 결정(CR2)에 처리한 형광 사진이다.
- [0099] 도 6d 내지 6f를 참조하면, 형광 표지된 서열번호 4 내지 서열번호 6의 합성 펩타이드는 CPPD 결정(CR1)과는 결합하지 않으며, MSU 결정(CR2)과는 강하게 결합하는 것을 확인할 수 있다. 상기 서열번호를 가지는 합성 펩타이드는 MSU 결정(CR2)와 CPPD 결정(CR1)이 공존하는 관절액 내부라 할지라도 MSU 결정(CR2)에 강하게 결합하는 점을 통해 통풍과 가성통풍의 구별이 가능하게 된다.
- [0100] 실시예 3. 서열번호 1 내지 서열번호 3의 펩타이드의 CPPD 결정 농도에 따른 면역 분석 결과와 서열번호 4 내지 서열번호 6의 펩타이드의 MSU 결정 농도에 따른 면역 분석 결과
- [0101] 도 7a는 일 실시예에 따른 서열번호 1 내지 서열번호 3의 아미노산 서열의 합성 펩타이드를 이용한 면역분석 결과를 CPPD 결정의 농도에 따라 나타낸 그래프이며, 도 7b는 일 실시예에 따른 서열번호 4 내지 서열번호 6의 아미노산 서열의 합성 펩타이드를 이용한 면역분석 결과를 MSU 결정의 농도에 따라 나타낸 그래프이다.
- [0102] 도 7a 및 도 7b를 참조하면, 일 실시예에서, calcium pyrophosphate dihydrate(CPPD) 결정(CR1) 또는 monosodium urate(MSU) 결정(CR2)의 농도가 증가함에 따라 면역분석법에 의하여 측정된 2차 발현 기질(ES2)의 발색 반응의 크기가 증가함을 알 수 있다. 예를 들면, 2차 발현 기질(ES2)이 홀스래디시 퍼옥시다아제(HRP)의 발색기질인 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(TMB)인 경우에 파장 440 nm 내지 460 nm의 파장, 바람직하게는 450 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 관절액 내부에 존재하는 CPPD 결정(CR1) 또는 MSU 결정(CR2)의 농도를 정량할 수 있다. 예를 들어, TMB는 홀스래디시 퍼옥시다아제(HRP)와 같은 과산화효소(peroxidase)에 의하여 산화될 수 있는 발색기질에 해당한다. 무색의 TMB가 산화되면, 푸른색(650m)의 TMB⁺가 생성되고 상기 TMB⁺가 다시 산화되면 노란색(450nm)의 TMB²⁺가 생성된다. 이 때, TMB⁺는 산성 조건에서 급격한 속도로 TMB²⁺로 산화된다. 따라서, TMB²⁺의 환원반응을 용이하게 측정할 수 있다.
- [0103] 구체적으로, 서열번호 1 내지 서열번호 3의 펩타이드를 비오틴(BTN)과 결합시킨 후, 1 mM로 준비하였다. CPPD 결정 용액은 0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml 및 300 µg/ml의 농도로 준비하고, 상기 각각의 펩타이드 용액 10 µl와 CPPD 결정 용액 490 µl 혼합한 후 상온에서 1 시간동안 반응시킨다. 이후 1 µg/ml 농도의 스트렙타비딘(STA)(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(HRP)를 포함하는 용액을 처리한 후 HRP의 발색기질인 TMB를 이용하여 발색반응을 진행하였다. 면역노어세이 결과 CPPD 결정에 대해 강하게 결합하는 펩타이드의 순서는 서열번호 1, 서열번호 3, 서열번호 2의 순서로 확인되었다.
- [0104] 서열번호 4 내지 서열번호 6의 펩타이드를 비오틴(BTN)과 결합시킨 후, 1 mM로 준비하였다. MSU 결정 용액은 0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml 및 300 µg/ml의 농도로 준비하고, 상기 각각의 펩타이드 용액 10 µl와 MSU 결정 용액 490 µl 혼합한 후 상온에서 1 시간동안 반응시킨다. 이후 1 µg/ml 농도의 스트렙타비딘(STA)(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(HRP)를 포함하는 용액을 처리한 후 HRP의 발색기질인 TMB를 이용하여 발색반응을 진행하였다. 면역노어세이 결과 MSU 결정에 대해 강하게 결합하는 펩타이드의 순서는 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 5의 순서로 확인되었다.
- [0105] 이상에서 설명한 본 발명이 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능하다는 것은, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

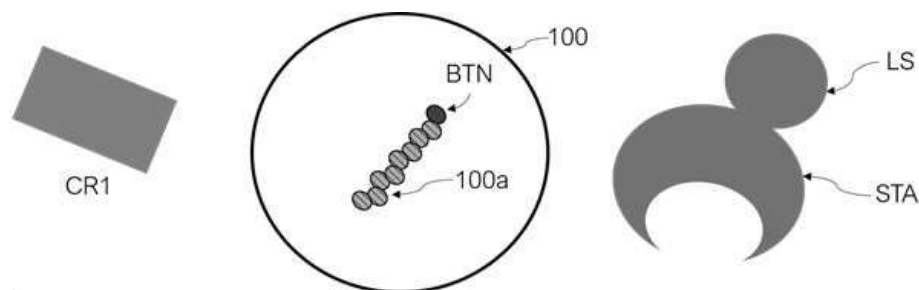
부호의 설명

- [0106] 100: 진단 시약
- 100a, 100b: 합성 펩타이드
- 200a, 200b: 진단 프로브
- 300: 진단 키트
- 300a, 300b: 진단 과정

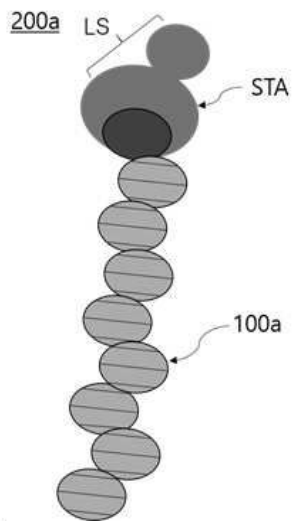
310: 기관부
 320: 센서부
 400: 진단 정보 제공 시스템
 410: 표적 타겟팅부
 411: 관절액 분해부
 412: 결정 용해부
 413: 펩타이드 결합부
 420: 발현 준비부
 430: 발현 측정부
 440: 정량 측정부
 BTN: 비오틴(biotin)
 STA: 스트렙타비딘(streptavidin)
 LS: 표지 물질
 ES2: 2차 발현 기질
 CR1: 칼슘인산염(calcium pyrophosphate dihydrate; CPPD) 결정
 CR2: 일나트륨 요산화물(monosodium urate; MSU) 결정

도면

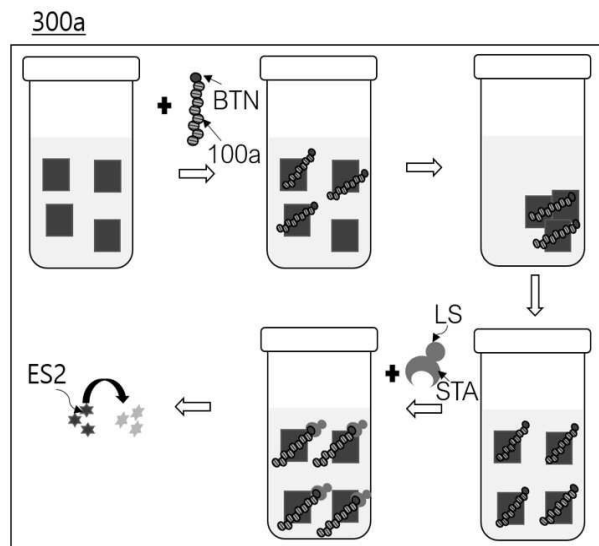
도면1a



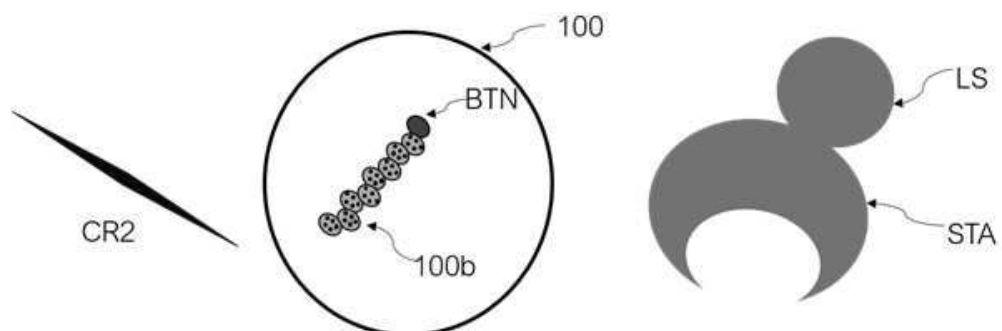
도면 1b



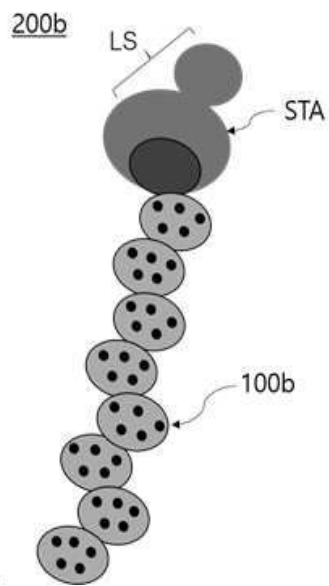
도면 1c



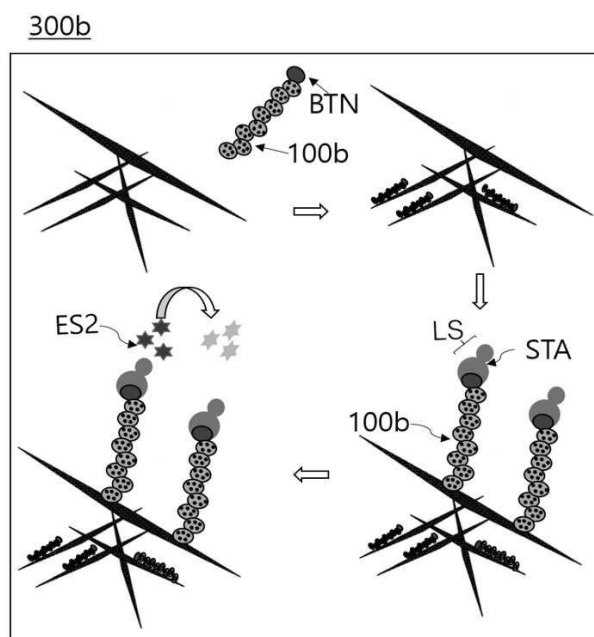
도면 2a



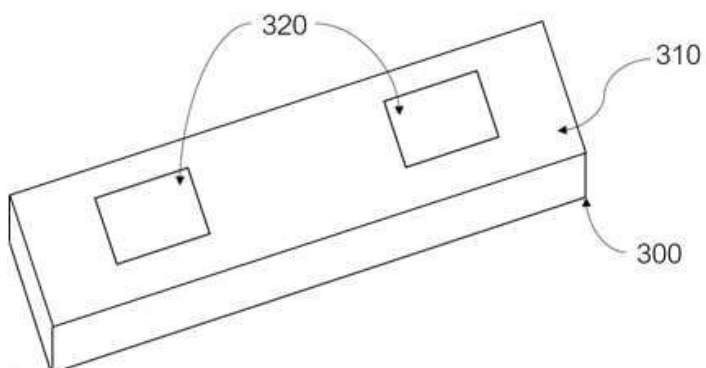
도면2b



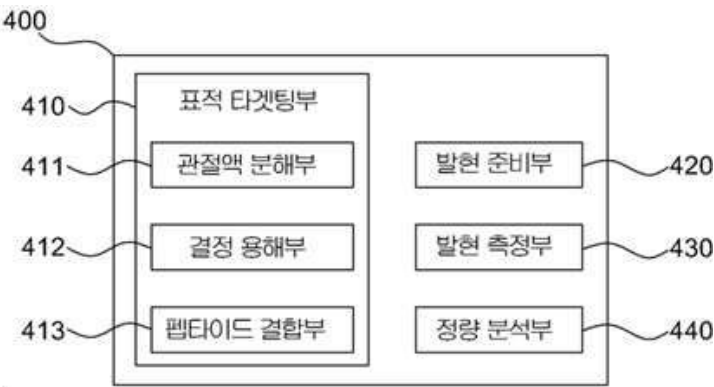
도면2c



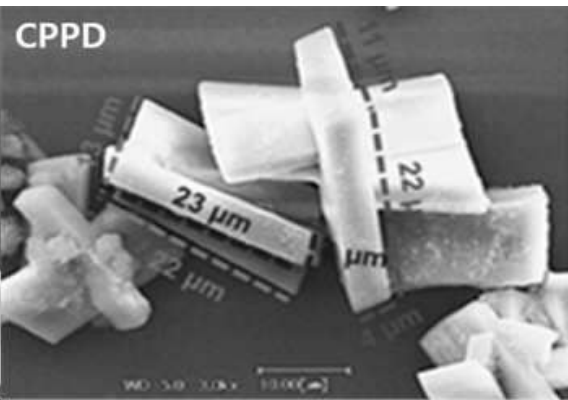
도면3



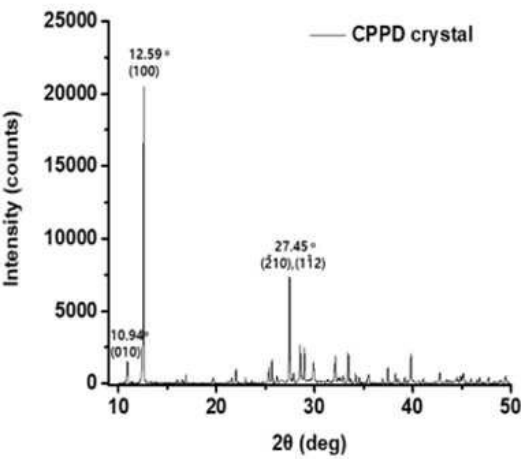
도면4



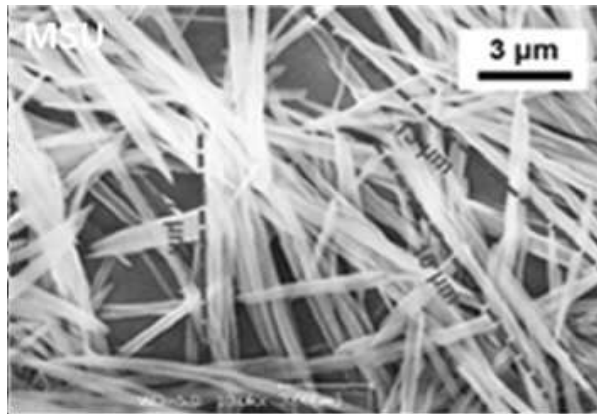
도면5a



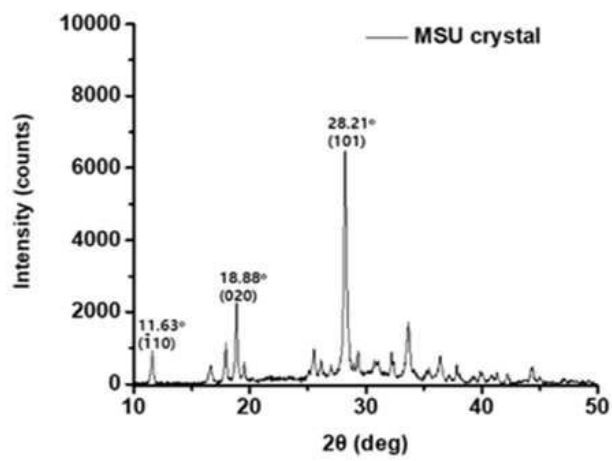
도면5b



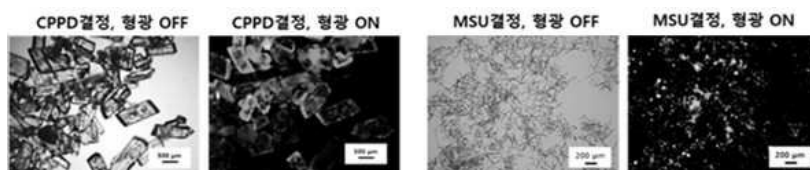
도면5c



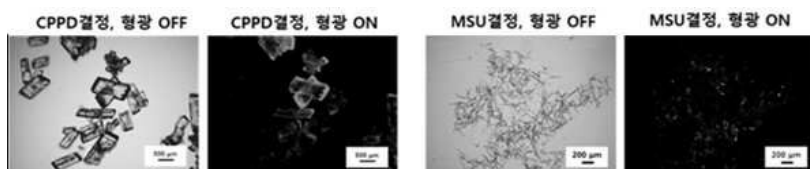
도면5d



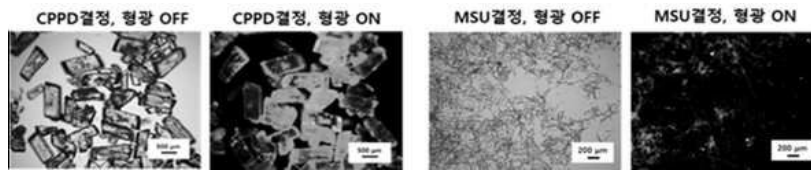
도면6a



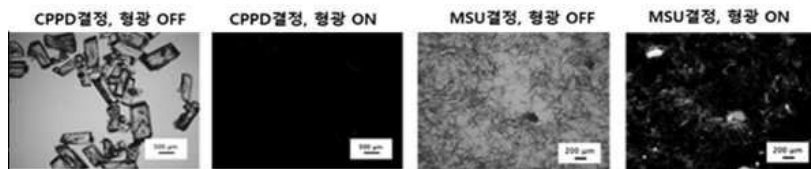
도면6b



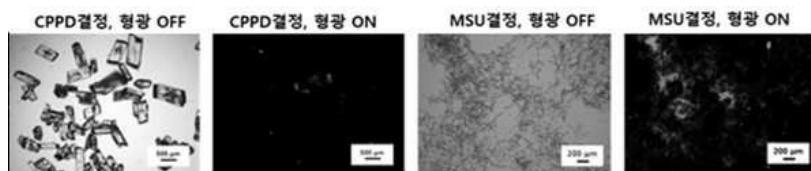
도면6c



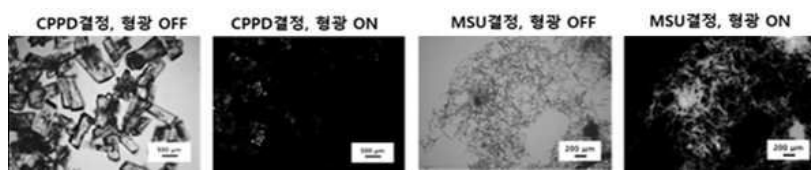
도면6d



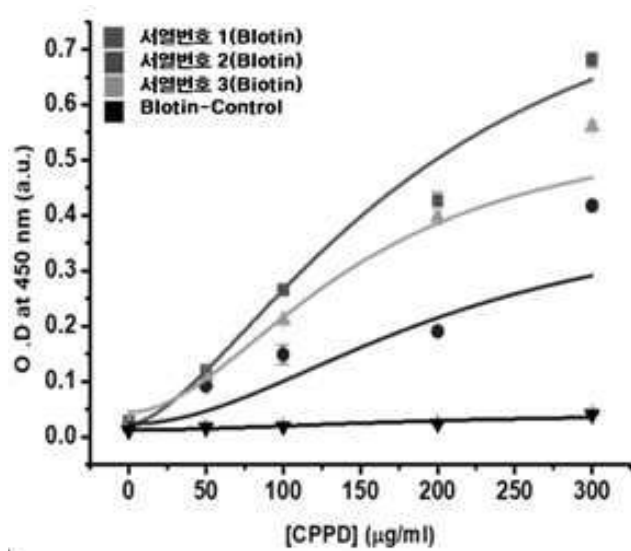
도면6e



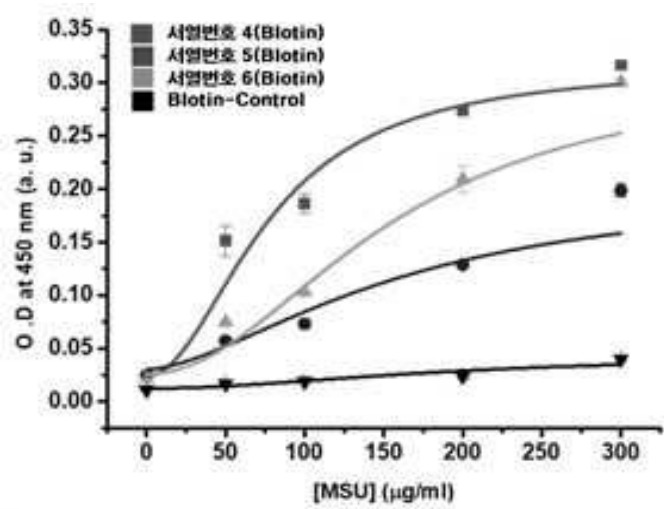
도면6f



도면7a



도면7b



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION YONSEI UNIV
- <120> Diagnosis reagent, diagnosis probe, information providing system for diagnosing Gout or Pseudogout using the same
- <130> DP-2020-0270
- <160> 6
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> peptide 1
- <400> 1

Ala Arg Cys Cys Gly Asn Ile Leu Ala Trp Arg Asp Tyr Trp Gly
1 5 10 15

<210> 2

<

211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 2

<400> 2

Ala Arg Gly Tyr Ala His Phe Ile Gly Arg Ser Asp Phe Trp Gly
1 5 10 15

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> peptide 3
 <400> 3
 Ala Arg Cys Leu Glu Leu Leu Gly Arg Lys Ile Asp Phe Trp Gly
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 4
 <400> 4
 Ala Arg Tyr Ala Gly Ser Leu Glu Ser Gly Ala Asp Asp Trp Gly
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 5
 <400> 5
 Ala Arg Cys Glu Ser Gly Arg Pro Gly Ser Val Asp Phe Trp Gly
 1 5 10 15

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 6
 <400> 6
 Ala Arg Cys Val Asp Gly Ile Ser Arg Leu Arg Asp Asp Trp Gly
 1 5 10 15