



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월19일

(11) 등록번호 10-2125169

(24) 등록일자 2020년06월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6887 (2013.01)

G01N 33/53 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2019-0057386

(22) 출원일자 2019년05월16일

심사청구일자 2019년05월16일

(56) 선행기술조사문헌

CN1854730 A

US20090098056 A1

US20140080727 A1

JP2015231993 A

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

변재철

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

(74) 대리인

김권석

전체 청구항 수 : 총 20 항

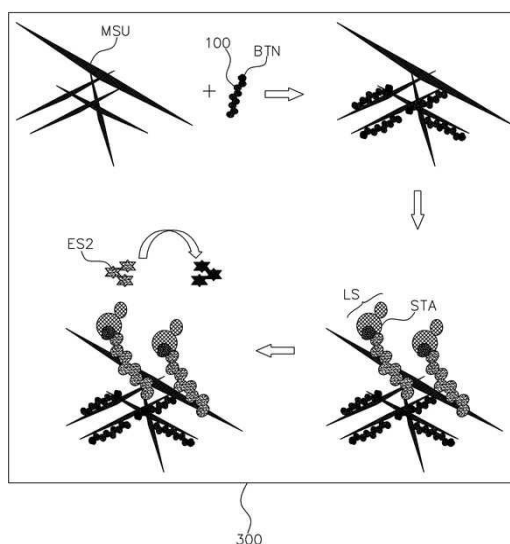
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 통풍 진단 펩타이드, 통풍 진단 프로브, 통풍 진단 키트 및 이를 이용한 정보 제공 시스템

(57) 요약

본 발명은 통풍 진단 펩타이드, 통풍 진단 프로브, 통풍 진단 키트 및 이를 이용한 정보 제공 시스템에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1 서열의 아미노산 서열 내지 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하는 통풍 진단 펩타이드, 상기 펩타이드를 포함하는 통풍 진단 프로브가 제공된다.

대표도 - 도1c



(52) CPC특허분류

G01N 33/582 (2013.01)

G01N 2800/107 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B4004077

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 대장균 표면발현 항체-라이브러리를 이용한 의료진단용 모노크로날 항체개발

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

monosodium urate (MSU)에 선택적으로 반응하는 통풍 진단 펩타이드로서,

서열번호 1 서열의 아미노산 서열 내지 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하는 통풍 진단 펩타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 통풍 진단 펩타이드는, 상기 서열번호 4 서열의 아미노산 서열을 포함하며, 평균 길이가 1 μm 내지 4 μm 의 범위 내인 monosodium urate (MSU)에 선택적으로 반응하는 통풍 진단 펩타이드.

청구항 3

적어도 하나 이상의 표지 물질 또는 적어도 하나 이상의 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 1 서열의 아미노산 서열 내지 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하는 monosodium urate (MSU)에 선택적으로 결합하는 통풍 진단 프로브.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 1차 발현 기질은, 서열번호 1 서열, 3 서열 및 4 서열의 펩타이드와 결합되는 경우 FAM 형광 물질을 포함하며,

서열번호 2 서열 및 5 서열의 펩타이드와 결합되는 경우 TAMRA 형광 물질을 포함하는 통풍 진단 프로브.

청구항 5

제 3 항에 있어서,

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

청구항 6

제 3 항에 있어서,

상기 표지 물질은 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP) 또는 퍼옥시다아제 화합물 중 적어도 어느 하나 이상을 포함하는 통풍 진단 프로브.

청구항 7

서열번호 1 서열의 아미노산 서열 내지 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하며 monosodium urate (MSU)에 선택적으로 결합하는 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 통풍 진단

키트.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

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

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 펩타이드는 비오틴 결합(biotinylated)되어 상기 표지 물질과 결합하는 통풍 진단 키트.

청구항 10

제 7 항에 있어서,

상기 표지 물질은 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP) 또는 퍼옥시다아제 화합물 중 적어도 어느 하나 이상을 포함하는 통풍 진단 키트.

청구항 11

제 7 항에 있어서,

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

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 면역분석(immunoassay)용 키트는 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 또는 엘리사(ELISA) 키트인 통풍 진단 키트.

청구항 13

제 7 항에 있어서,

상기 광학적 변이는 발광 반응, 발색 반응 또는 형광 반응을 포함하는 통풍 진단 키트.

청구항 14

제 7 항에 있어서,

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

청구항 15

통풍 진단을 위한 정보 제공 시스템으로서,

환자로부터 추출된 관절액에 포함된 monosodium urate (MSU)와 서열번호 1 서열의 아미노산 서열 내지 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하고, monosodium urate (MSU)에 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 monosodium urate (MSU)의 존재 여부를 판단하는 발현 측정부를 포함하는 정보 제공 시스템.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 2차 발현 기질이 나타내는 상기 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이에 의한 신호를 측정하여 상기 monosodium urate (MSU)의 결정을 정량하는 정량 분석부를 더 포함하는 정보 제공 시스템.

청구항 17

제 15 항에 있어서,

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 440 nm 내지 460 nm의 전자기파에서 측정되는 정보 제공 시스템.

청구항 18

제 15 항에 있어서,

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 포함하는 정보 제공 시스템.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

상기 용매는 염기성 용액을 포함하는 정보 제공 시스템.

청구항 20

제 18 항에 있어서,

상기 특정 효소는, 히알루로니다아제(hyaluronidase) 또는 단백분해효소 케이 (proteinase K) 중 적어도 하나 이상을 포함하는 정보 제공 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오 센싱 기술에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는, 통풍 진단 펩타이드, 통풍 진단 프로브, 통풍 진단 키트 및 이를 이용한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 통풍은 관절내에 관절 내에 결정이 생성되는 질환으로 결정생성 후 면역반응을 통해 염증이 유발되고, 이는 침상 결정이 관절을 자극하여 통증을 유발하는 질환이다. 통풍은 신체의 퓨린 대사(purine nucleotide) 과정에서 생성되는 요산이 과다하게 생성되거나 체외로 적절하게 배설되지 못하는 경우에 요산이 과포화되고, 상기 과포화된 요산이 결정화되어 일나트륨 요산화물(monosodium urate; MSU)의 침상형 결정을 형성하면서 유발된다. 상기 monosodium urate (MSU) 결정에 대하여 면역계가 면역 반응을 일으키는 경우 급성 통풍 발작을 유발할 수 있어 조기 치료가 중요하다.

[0003] 종래의 통풍 진단 검사는 편광 현미경을 이용한 전문의의 관찰에 의하여 이루어졌으며, 상기 진단 검사는 10분 이상의 장시간 검사 시간이 요구되고, 잘못된 양성 판정이 자주 일어나는 문제가 있었다. 또한, 사람의 관찰에 의한 진단은 통풍의 심각도를 정량화하여 나타내기에 부적절하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는, 전문의의 관찰에 의존하지 않음으로써 신속하고 신뢰도 높은 통풍의 진단이 가능하고, 통풍의 심각도를 정량화 가능한 통풍 진단 펩타이드, 통풍 진단 프로브 및 통풍 진단 키트를 제공하는 것이다.
- [0005] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는, 전술한 이점을 가지며, 사람에 의하여 수행되는 단계를 최소화하여 자동화된 시스템에 의하여 구현되는 통풍 진단을 위한 정보 제공 시스템을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0006] 상기의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 monosodium urate (MSU)에 선택적으로 반응하는 통풍 진단 펩타이드는 서열번호 1 서열의 아미노산 서열 내지 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있고, 상기 통풍 진단 펩타이드는, 상기 서열번호 4 서열의 아미노산 서열을 포함하며, 평균 길이가 1 μ m 내지 4 μ m의 범위 내인 monosodium urate (MSU)에 선택적으로 반응할 수 있다.
- [0007] 상기의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 진단 프로브는 적어도 하나 이상의 표지 물질 또는 적어도 하나 이상의 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,
- [0008] 상기 1차 또는 상기 2차 발현 기질은 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하며, 상기 펩타이드는, 서열번호 1 서열의 아미노산 서열 내지 서열번호 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하는 monosodium urate (MSU)에 선택적으로 결합할 수 있다. 다른 실시예에서는, 상기 1차 발현 기질은, 서열번호 1 서열, 3 서열 및 4 서열의 펩타이드와 결합되는 경우 FAM 형광 물질을 포함하며, 서열번호 2 서열 및 5 서열의 펩타이드와 결합되는 경우 TAMRA 형광 물질을 포함할 수 있다. 또 다른 실시예에서는, 상기 펩타이드는 비오틴과 결합되고(biotinylated) 상기 비오틴이 상기 표지 물질과 결합할 수 있고, 선택적으로는, 상기 표지 물질은 스트렙타아비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP) 또는 퍼옥시다아제 화합물 중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0009] 상기의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 진단 키트는, 서열번호 1 서열의 아미노산 서열 내지 서열번호 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하며 monosodium urate (MSU)에 선택적으로 결합하는 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 포함할 수 있고, 다른 실시예에서는, 상기 하나 이상의 펩타이드들 중 적어도 어느 일부에 결합하며, 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하는 1차 발현 기질을 더 포함할 수 있으며, 상기 펩타이드는 비오틴 결합(biotinylated)되어 상기 표지 물질과 결합할 수 있다. 또 다른 실시예에서는, 상기 표지 물질은 스트렙타아비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP) 또는 퍼옥시다아제 화합물 중 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있으며, 상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트를 포함할 수 있다.
- [0010] 또 다른 실시예에서, 상기 면역분석(immunoassay)용 키트는 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 또는 엘리사(ELISA) 키트일 수 있고, 상기 광학적 변이는 발광 반응, 발색 반응 또는 형광 반응을 포함할 수 있으며, 상기 전기적 변이는 전류계, 전압계 크로노암페로메트리(chronoamperometry) 또는 크로노볼타메트리(chronoovoltametry)에 의하여 정량될 수 있다.
- [0011] 상기의 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 진단을 위한 정보 제공 시스템은 환자로부터 추출된 관절액에 포함된 monosodium urate (MSU)와 서열번호 1 서열의 아미노산 서열 내지 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하고, monosodium urate (MSU)에 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 monosodium urate (MSU)의 존재 여부를 판단하는 발현 측정부를 포함할 수

있다. 다른 실시예에서, 상기 2차 발현 기질이 나타내는 상기 광학적 변이, 전기적 변이 또는 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 440 nm 내지 460 nm의 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 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.

발명의 효과

- [0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 통풍을 유발하는 원인인 monosodium urate (MSU)의 침상형 결정과 선택적으로 반응하는 복수 개의 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 구성함으로써 통풍 진단에 이용 가능한 펩타이드, 상기 펩타이드를 이용한 통풍 진단 프로브 및 통풍 진단 키트가 제공될 수 있다.
- [0013] 또한, 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 환자로부터 추출된 관절액에 시약을 이용한 전처리 과정을 도입함으로써 자동화된 통풍 진단 시스템을 구현할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 monosodium urate (MSU) 결정 및 통풍 진단 프로브의 구성 요소인 통풍 진단 펩타이드 및 표지 물질을 나타낸 그림이고, 도 1b는 통풍 진단 프로브의 구성을 나타낸 그림이며, 도 1c는 일 실시예에 따른 통풍 진단 키트를 이용한 통풍 진단 과정을 나타내는 모식도이다.
- 도 2a는 일 실시예에 따라 monosodium urate (MSU) 결정 및 분쇄된 monosodium urate (MSU) 결정을 현미경으로 촬영한 이미지이고, 도 2b는 서열번호 4의 펩타이드와 반응시킨 분쇄 이전과 분쇄 이후의 monosodium urate (MSU) 결정을 및 마이크로비드(micro bead)의 크기를 형광세포분석(Fluorescence-activated cell sorting; FACS)를 이용하여 측정한 결과이고, 도 2c는 도 2a의 분쇄 이전과 분쇄 이후의 monosodium urate (MSU) 결정을 서열번호 4의 펩타이드와 반응시킨 형광세포분석 결과이며, 도 2d는 monosodium urate (MSU) 결정 및 분쇄된 monosodium urate (MSU) 결정의 형광 세기를 서열번호 4의 펩타이드의 농도에 따라 나타낸 그래프이다.
- 도 3a는 서열번호 1의 펩타이드의 농도에 따른 형광세포분석의 결과를 나타낸 그래프이며, 도 3b는 서열번호 2의 펩타이드, 도 3c는 서열번호 3의 펩타이드, 도 3d는 서열번호 4의 펩타이드, 도 3e는 서열번호 5의 펩타이드의 분석 결과이며, 도 3f는 서열번호 1 내지 5의 펩타이드의 형광세포분석 결과의 형광 세기를 비교한 그래프이다.
- 도 4a는 일 실시예에 따른 monosodium urate (MSU)에 1차 발현 기질이 결합된 서열번호 1의 펩타이드를 선택적으로 반응시켜 현미경으로 촬영한 이미지이고, 도 4b는 서열번호 2의 펩타이드를 반응시킨 이미지이고, 도 4c는 서열번호 3의 펩타이드를 반응시킨 이미지이고, 도 4d는 서열번호 4의 펩타이드를 반응시킨 이미지이며, 도 4e는 서열번호 5의 펩타이드를 반응시킨 이미지이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 진단을 위한 정보 제공 시스템의 구성도이다.
- 도 6는 일 실시예에 따른 서열번호 1 내지 서열번호 5의 펩타이드를 이용한 면역분석 결과를 MSU 결정의 농도에 따라 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.
- [0016] 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.
- [0017] 도면에서 동일 부호는 동일한 요소를 지칭한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는"은 해

당 열거된 항목 중 어느 하나 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다.

- [0018] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예를 설명하기 위하여 사용되며, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다. 또한, 본 명세서에서 단수로 기재되어 있다 하더라도, 문맥상 단수를 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.
- [0019] 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.
- [0020] 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 영역들이 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.
- [0021] 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.
- [0022] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 일나트륨 요산화물(monosodium urate; MSU) 결정 및 통풍 진단 프로브(200)의 구성 요소인 통풍 진단 펩타이드(100) 및 표지 물질(LS)을 나타낸 그림이고, 도 1b는 통풍 진단 프로브(200)의 구성을 나타낸 그림이며, 도 1c는 일 실시예에 따른 통풍 진단 키트(300)를 이용한 통풍 진단 과정을 나타내는 모식도이다.
- [0023] 도 1a 및 도 1b를 참조하면, 일 실시예에 따른 통풍 진단 프로브(200)는 monosodium urate (MSU)에 선택적으로 반응하는 통풍 진단 펩타이드(100) 및 표지 물질(LS)을 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 표지 물질(LS)은 스트렙타비딘(streptavidin)(STA)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP)일 수 있다. 통풍 진단 펩타이드(100)는 서열번호 1 서열의 아미노산 서열 내지 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다. 통풍 진단 펩타이드(100)는 아미노산 라이브러리를 이용하여 monosodium urate (MSU)에 선택적으로 반응하는 아미노산 서열을 구성하였다. 상기 아미노산 서열은 1 peptide: ARGVNP GIMGRDYWG (서열번호 1), 2 peptide: ARYAGSLESGADDWG (서열번호 2), 3 peptide: ARCESGRPGSVDFWG (서열번호 3), 4 peptide: ARCLELLGRKIDFWG (서열번호 4) 및 5 peptide: ARCDVGISRLRDDWG (서열번호 5)를 포함할 수 있으며, 상기 아미노산 서열들의 처음의 AR 및 마지막의 WG로 구성된 아미노산 서열을 제외한 가운데 11 개의 아미노산이 monosodium urate (MSU)에 선택적인 반응성을 가질 수 있다.
- [0024] 다른 실시예에서, 펩타이드(100)는 표지 물질(LS)과 결합하기 위한 결합부를 포함할 수 있으며, 예를 들면 상기 결합부는 비오틴(BTN)일 수 있다. 중복된 설명을 피하기 위하여 상기 결합부에 관한 설명은 후술하기로 한다.
- [0025] 도 2a는 일 실시예에 따라 monosodium urate (MSU) 결정 및 분쇄된 monosodium urate (MSU) 결정을 현미경으로 촬영한 이미지이고, 도 2b는 서열번호 4의 펩타이드(100)와 반응시킨 분쇄 이전과 분쇄 이후의 monosodium urate (MSU) 결정을 및 마이크로비드(micro bead)의 크기를 형광세포분석(Fluorescence-activated cell sorting; FACS)를 이용하여 측정한 결과이고, 도 2c는 도 2a의 분쇄 이전과 분쇄 이후의 monosodium urate (MSU) 결정을 서열번호 4의 펩타이드(100)와 반응시킨 형광세포분석 결과이며, 도 2d는 monosodium urate (MSU) 결정 및 분쇄된 monosodium urate (MSU) 결정의 형광 세기를 서열번호 4의 펩타이드(100)의 농도에 따라 나타낸 그래프이다. 일 실시예에 따른 구체적인 실험 방법은 실시예 1에서 후술하기로 한다.
- [0026] 도 2a를 참조하면, monosodium urate (MSU) 결정은 침상 구조를 가지며, monosodium urate (MSU) 결정이 분쇄된 경우에는 분쇄 전의 침상 구조물이 대부분 입자 형태로 변화될 수 있다. 인체 내의 요산이 적절히 배출되지 못하여 석출되기 시작하는 초기에는 monosodium urate (MSU) 결정이 침상 구조가 아닌 상기 입자 형태를 띌 수 있으며, 이는, 본원 발명의 통풍 진단 펩타이드(100)가 상기 입자 형태의 monosodium urate (MSU) 결정과 선택적으로 반응하는 경우 통풍의 초기 진단이 가능할 수 있음을 의미한다.

- [0027] 도 2b를 참조하면, 분쇄 이전의 monosodium urate (MSU) 결정의 상기 침상 구조의 평균 크기는 4 μm 이상이며, 상기 침상 구조의 크기는 1 μm 내지 10 μm 까지 넓은 분포를 보이는 것을 볼 수 있으며, 분쇄 이후의 monosodium urate (MSU) 결정은 주로 평균 지름이 1 μm 내지 2 μm 범위 내인 것을 볼 수 있다. 이는, 서열번호 4의 펩타이드(100)를 이용하는 경우 1 μm 내외의 미세한 monosodium urate (MSU) 결정의 검출이 가능함을 의미한다. 따라서, 일 실시예에서, 서열번호 4의 펩타이드(100)를 이용하는 경우 평균 길이가 1 μm 내지 4 μm 의 범위 내인 monosodium urate (MSU) 결정을 검출할 수 있다.
- [0028] 도 2c를 참조하면, 분쇄 이전의 monosodium urate (MSU) 결정은 형광세포분석 결과의 최소값이 10 AU이며, 분쇄 이후의 monosodium urate (MSU) 결정은 최소값이 5 AU인 것을 볼 수 있다. 도 2c의 그래프에서 MSU-4 Peptide는 서열번호 4의 펩타이드(100)를 이용하여 monosodium urate (MSU) 결정과 반응시켜 분석된 결과임을 의미하고, 왼쪽의 그래프는 분쇄 이전의 monosodium urate (MSU) 결정의 분석 결과이며, 오른쪽의 그래프는 분쇄 이후의 monosodium urate (MSU) 결정(Crushed MSU)의 분석 결과이다. 상기 형광세포분석 결과의 세기는 입자의 크기에 비례하므로 분쇄 이후의 monosodium urate (MSU) 결정의 경우 아주 작은 크기의 결정까지 측정이 가능함을 알 수 있다. 또한 도 2d를 참조하면, 상기 형광세포분석 결과의 형광의 세기는 펩타이드(100)의 농도가 커질수록 증가하는 것을 알 수 있다.
- [0029] 도 3a는 서열번호 1의 펩타이드(100)의 농도에 따른 형광세포분석의 결과를 나타낸 그래프이며, 도 3b는 서열번호 2의 펩타이드(100), 도 3c는 서열번호 3의 펩타이드(100), 도 3d는 서열번호 4의 펩타이드(100), 도 3e는 서열번호 5의 펩타이드(100)의 분석 결과이며, 도 3f는 서열번호 1 내지 5의 펩타이드(100)의 형광세포분석 결과의 형광 세기를 비교한 그래프이다. 구체적인 실험 방법은 실시예 2에서 후술하기로 한다. 도 3a 내지 도 3f의 그래프에서 MSU-1 Peptide는 서열번호 1의 펩타이드(100)를 이용하여 monosodium urate (MSU) 결정과 반응시켜 분석된 결과임을 의미하고, MSU-2 Peptide는 서열번호 2, MSU-3 Peptide는 서열번호 3, MSU-4 Peptide는 서열번호 4, MSU-5 Peptide는 서열번호 5의 펩타이드(100)를 이용한 분석 결과임을 의미한다.
- [0030] 도 3a 내지 도 3e를 참조하면, 서열번호 1 내지 서열번호 5의 펩타이드(100)를 이용하여 monosodium urate (MSU)를 검출하기 위한 펩타이드(100)의 최소 농도는 서열번호 1의 펩타이드(100)는 50 μM , 서열번호 2의 펩타이드(100)는 50 μM , 서열번호 3의 펩타이드(100)는 5 μM , 서열번호 4의 펩타이드(100)는 0.005 μM , 서열번호 5의 펩타이드(100)는 5 μM 임을 알 수 있다. 또한, 도 3f를 참조하면, 형광 세기의 크기는 서열번호 4, 서열번호 3, 서열번호 1, 서열번호 5, 서열번호 2의 펩타이드(100) 순으로 작아지는 것을 볼 수 있으며, 이는 서열번호 4의 펩타이드(100)가 monosodium urate (MSU)와 가장 큰 선택적 반응성을 가지는 것을 의미할 수 있다. 따라서, 일 실시예에서는, 통풍 환자의 진행 정도에 맞추어 적절한 펩타이드(100)를 이용하여 통풍 진단 프로브(200) 또는 통풍 진단 키트(300)를 구성할 수 있다. 예를 들어, monosodium urate (MSU) 결정을 아주 소량 함유하고 있는 통풍 초기 환자의 경우, 서열번호 4의 펩타이드(100)를 이용하여 진단하는 것이 바람직할 수 있다. 다른 실시예로는, 상기 펩타이드(100)들의 조성비를 조절하여 통풍 진단의 민감도를 조절할 수 있다. 예를 들면, 통풍의 정도가 심각한 환자만을 타겟으로하는 경우에는, 서열번호 2의 펩타이드(100)의 조성비를 높여 진단 검사를 수행할 수 있다.
- [0031] 다시 도 1b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 진단 프로브(200)는 적어도 하나 이상의 표지 물질(LS) 또는 적어도 하나 이상의 1차 발현 기질과 결합되어 있는 펩타이드(100)를 포함할 수 있다. 펩타이드(100)는, 서열번호 1 서열의 아미노산 서열 내지 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있고, monosodium urate (MSU)에 선택적으로 결합하는 반응성을 가질 수 있다. 펩타이드(100)에 대한 상세한 설명은 도 1a 및 도 2a 내지 도 3f에서 전술한 개시 사항을 참조할 수 있다.
- [0032] 일 실시예에서, 펩타이드(100)는 표지 물질(LS)과 결합하기 위한 결합부를 포함할 수 있다. 예를 들면, 펩타이드(100)는 비오틴(BTN)과 결합되고(biotinylated), 펩타이드에 결합된 비오틴(BTN)이 결합부의 역할을 하여 표지 물질(LS)과 결합할 수 있다. 표지 물질(LS)은 스트렙타아비딘(STA)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP)일 수 있다. 비오틴(BTN)은 스트렙타아비딘(STA)(streptavidin) 또는 아비딘(avidin)과 높은 친화력을 가짐으로써 펩타이드(100) 또는 단백질 분자를 이용하는 바이오 분석에 이용될 수 있다.
- [0033] 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, 표지 물질(LS)은 스트렙타아비딘(STA)(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP), 퍼옥시다아제 화합물을 포함할 수 있으며, 예시적으로, β -갈락토시다아제, 호

스래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P450을 포함할 수 있다. 전술한 물질은 예시적이며, 발색 반응, 형광 반응, 발광 반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소 및 상기 효소와 같은 역할을 하는 물질들은 모두 해당될 수 있으며, 특정 물질들로 제한되지 않는다.

[0034] 일 실시예에서, 1차 발현 기질(미도시) 또는 2차 발현 기질(ES2)은 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 1차 발현 기질은 펩타이드(100)에 직접 결합되어 발색 반응, 발광 반응 및 형광 반응을 나타낸다. 다른 실시예에서, 적어도 하나 이상의 표지 물질(LS)이 결합되어 있는 펩타이드(100)를 포함하는 통풍 진단 프로브(200)가 monosodium urate (MSU)에 선택적으로 결합되고, 펩타이드(100)에 결합되어 있는 표지 물질(LS)은 세척 공정 후에도 반응 영역에 잔존하며, 상기 반응 영역에 2차 발현 기질(ES2)을 제공하면 표지 물질(LS)의 촉매 반응에 의하여 2차 발현 기질(ES2)이 발색 반응, 발광 반응, 형광 반응 중 적어도 어느 하나를 나타낸다. 또 다른 실시예에서, 표지 물질(LS)이 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP)를 포함하는 경우에는, 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, 표지 물질(LS)이 호스래디쉬 퍼옥시다아제인 경우에는, 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-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)와 같은 물질들이 이용될 수 있으며, 전술한 물질들은 예시에 불과하고 표지 물질(LS)의 촉매 반응에 의하여 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이를 나타내는 것이면 모두 적용될 수 있으며 특정 물질에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 도 4a는 일 실시예에 따른 monosodium urate (MSU)에 1차 발현 기질이 결합된 서열번호 1의 펩타이드(100)를 선택적으로 반응시켜 현미경으로 촬영한 이미지이고, 도 4b는 서열번호 2의 펩타이드(100)를 반응시킨 이미지이고, 도 4c는 서열번호 3의 펩타이드(100)를 반응시킨 이미지이고, 도 4d는 서열번호 4의 펩타이드(100)를 반응시킨 이미지이며, 도 4e는 서열번호 5의 펩타이드(100)를 반응시킨 이미지이다. 구체적인 실험 방법은 실시예 3에서 설명하도록 한다.

[0036] 도 4a 내지 도 4e를 참조하면, 1차 발현 물질이 결합된 펩타이드(100)가 monosodium urate (MSU)와 선택적으로 반응하는 경우, 현미경으로 관찰하여 monosodium urate (MSU)의 침상 구조를 나타낼 정도의 높은 반응성을 보이는 것을 알 수 있다. 일 실시예에서는, 1차 발현 물질을 이용하여 통풍 환자의 관절 내의 monosodium urate (MSU)가 생성된 위치의 분포를 발광, 형광과 같은 광학적 반응, 전기적 반응 또는 화학적 반응으로 검출하는 것이 가능하다.

[0037] 일 실시예에서, 1차 발현 기질은 서열번호 1 서열, 3 서열 및 4 서열의 펩타이드(100)와 결합되는 경우 FAM 형광 물질을 포함하며, 서열번호 2 서열 및 5 서열의 펩타이드(100)와 결합되는 경우 TAMRA 형광 물질을 포함할 수 있다. 상기 FAM 형광 물질 및 상기 TAMRA 형광 물질은 펩타이드(100)의 C 터미널에 결합될 수 있다. 상기 FAM 형광 물질 또는 상기 TAMRA 형광 물질과 같이 강한 세기의 형광을 관찰할 수 있는 1차 발현 기질을 사용함으로써 신속하고 용이한 통풍 발병 여부의 진단이 가능할 수 있다. 다만, 전술한 물질들은 예시에 불과하며, 형광, 발광, 발색과 같은 광학적 반응, 화학적 반응 또는 전기적 반응을 일으키는 물질들이 제한 없이 적용될 수 있다.

[0038] 일 실시예에서, 통풍 진단 키트(300)는 서열번호 1 서열의 아미노산 서열 내지 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하며 monosodium urate (MSU)에 선택적으로 결합하는 펩타이드(100), 하나 이상의 펩타이드(100)들 중 적어도 어느 일부에 결합되는 표지 물질(LS) 및 표지 물질(LS)의 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 기질(ES2)을 포함할 수 있다. 서열번호 1 서열 내지 5 서열의 펩타이드(100), 표지 물질(LS) 및 2차 발현 물질에 대한 상세한 설명은 전술한 개시 사항을 참조할 수 있다. 다른 실시예에 따른 통풍 진단 키트(300)는 하나 이상의 펩타이드(100)들 중 적어도 어느 일부에 결합하며, 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질 또는 이들의 조합을 포함하는 1차 발현 기질을 더 포함할 수 있다.

[0039] 다시 도 1c를 참조하면, 통풍 진단 키트(300)의 작동 원리는 다음과 같다. 통풍 환자의 관절액 내부에 monosodium urate (MSU) 결정이 존재할 수 있고, 통풍 진단 펩타이드(100)는 monosodium urate (MSU)결정에 선택적으로 반응하여 결합될 수 있다. 예시적으로, 펩타이드(100)는 기관에 고정되거나, 기관에 고정되지 않고

용매 내에 존재할 수 있다. 선택적으로, 통풍 진단 펩타이드(100)에는 표지 물질(LS)과의 결합을 위한 결합부, 예를 들면 비오틴(BTN)이 포함될 수 있다. monosodium urate (MSU)에 흡착 또는 결합된 펩타이드(100)에 표지 물질(LS)을 제공하는 경우 표지 물질(LS)이 펩타이드(100)와 결합될 수 있다. 선택적으로, 펩타이드(100)에 결합되지 않은 표지 물질(LS)을 제거하기 위한 세척 공정이 수행될 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 있으며, 예를 들면, 2차 발현 기질(ES2)의 산화-환원 반응에 의하여 발생한 전자의 전류 신호일 수 있다.

[0040] 일 실시예에 따른 통풍 진단 키트(300)는 면역분석(immunoassay)용 키트를 포함할 수 있으며, 예를 들면, 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 또는 엘리사(ELISA) 키트일 수 있다. 다양한 실시예에서는, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA, 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석용 키트들에 관하여 상용화된 분석 방법에 관한 설명이 적용될 수 있다.

[0041] 다른 실시예에서, 2차 발현 기질(ES2)의 상기 광학적 변이는 발광 반응, 발색 반응 또는 형광 반응을 포함할 수 있으며, 또 다른 실시예에서, 상기 전기적 변이는 전류계, 전압계, 크로노암페로메트리(chronoamperometry), 크로노볼타메트리(chronoovoltametry)에 의하여 정량될 수 있다. 예를 들면, 2차 발현 기질(ES2)이 TMB인 경우, 표지 물질(LS)에 의하여 산화-환원 반응을 일으킬 수 있고, 상기 산화-환원 반응을 위하여 전자의 이동이 수반될 수 있다. 상기 전자의 이동에 의하여 반응 영역 상에 전기적 신호가 발생하는 경우 상기 전기적 신호의 크기를 측정하여 monosodium urate (MSU)를 정량할 수 있다.

[0042] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 통풍 진단을 위한 정보 제공 시스템의 구성도이다.

[0043] 도 5를 참조하면, 일 실시예에 따른 통풍 진단을 위한 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. 다른 실시예에서, 발현 측정부(430)는 MSU 결정의 침상 구조를 수동 또는 자동으로 촬영할 수 있는 촬영부를 더 포함할 수 있으며, 상기 촬영부는 카메라일 수 있다. 또한, 상기 촬영부는 촬영된 이미지를 정량 분석부(440)로 송신할 수 있다. 상기 촬영부는 예시적으로는 통풍 진단 키트(300)에 포함될 수 있다. 또한, 상기 촬영부는 MSU 결정을 확대 촬영하기 위한 렌즈를 포함할 수 있다. 단, 설명의 편의를 위해 통풍 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 통풍 진단 대상이 되는 관절액의 처리 과정을 나타내는 것이고, 상기 처리 과정의 순서는 바뀔 수 있고, 도 5의 화살표는 예시에 불과하며 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 표적 타겟팅부(410)는 환자로부터 추출된 관절액에 포함된 monosodium urate (MSU)와 서열번호 1 서열의 아미노산 서열 내지 5 서열의 아미노산 서열 중 적어도 하나 이상을 포함하고, monosodium urate (MSU)에 선택적으로 결합하는 펩타이드(100)를 제공하여 반응시킬 수 있다. 예를 들면, 상기 관절액이 플레이트에 제공되고 상기 플레이트에 펩타이드(100)가 제공되거나, 플레이트에 이미 제공되어 있는 펩타이드(100)가 있고 상기 플레이트 상에 상기 관절액을 제공할 수도 있다. 상기 플레이트는 용액이 제공될 수 있는 반응 영역이면 특정 형태로 제한되지 않으며, 유리, 플라스틱, 고분자와 같은 재료를 포함하는 복수의 웰(well), 셀(cell), 기판 또는 플레이트와 같은 모든 종류의 용기를 포함할 수 있다.

[0045] 발현 준비부(420)는 펩타이드(100)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. 표지 물질(LS) 및 2차 발현 기질(ES2)에 대한 상세한 설명은 전술한 개시 사항을 참조할 수 있다. 일 실시예에서, 표지 물질(LS)은 미리 펩타이드(100)와 결합된 통풍 진단 프로브(200)로 제조되어 제공될 수 있으며, 다른 실시예에서는, monosodium urate (MSU)에 선택적으로 반응하여 흡착 또는 결합되어 있는 펩타이드(100)에 표지 물질(LS)이 별도로 제공되어 표지 물질(LS)이 펩타이드(100)와 결합할 수도 있다. 상기 물질들이 제공되는 작동들은 수동적으로 수행되거나 자동화 장치에 의하여 수행될 수 있다.

[0046] 발현 측정부(430)는 2차 발현 기질(ES2)이 나타내는 변이에 의하여 monosodium urate (MSU)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 발병 여부를 진단할 수 있다. 다른 실시예에서, 2차 발현 기질(ES2)에 의한 전압 또는 전류의 전기적 신호의 변화를 측정할 수 있고, 또

다른 실시예에서는, 수정 미세 저울(quartz crystal microbalance; QCM), 마이크로캔틸레버(microcantilever)와 같은 질량 기반 면역 분석 방법이 사용될 수 있다.

[0047] 정량 분석부(440)는 2차 발현 기질(ES2)이 나타내는 상기 광학적 변이, 전기적 변이 또는 화학적 변이에 의한 신호를 측정하여 상기 monosodium urate (MSU)의 결정을 정량할 수 있다. 일 실시예에서는, 상용화된 면역분석법(immunoassay)을 이용할 수 있다. 예를 들면, 루미넥스 분석, 단백질 마이크로어레이 분석 또는 엘리사(ELISA) 분석을 포함할 수 있다. 다양한 실시예에서는, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, 면역조직화학염색, ELISA, 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하며, 광학적, 전기적 또는 화학적 반응 또는 변이에 의한 신호는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있으며, 특정 방법에 제한되지 않는다.

[0048] 도 6는 일 실시예에 따른 서열번호 1 내지 서열번호 5의 펩타이드(100)를 이용한 면역분석 결과를 MSU 결정의 농도에 따라 나타낸 그래프이다. 도 6의 그래프에서 MSU-1 Peptide(Biotin)은 비오틴(BTN)과 결합한 서열번호 1의 펩타이드(100)를 monosodium urate (MSU) 결정과 반응시킨 분석 결과임을 의미하며, Peptide 앞의 숫자들은 각 펩타이드(100)들의 서열번호를 의미한다.

[0049] 도 6을 참조하면, 일 실시예에서, MSU 결정의 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 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)인 경우에 450 nm 파장에서의 흡광도를 측정하여 관절액 내부에 존재하는 MSU 결정의 농도를 정량할 수 있다. 다른 실시예에서, 통풍 환자의 초기 진단을 위해서는 서열번호 4의 펩타이드(100)를 이용하고, 통풍의 진행 정도를 판단하기 위해서는 서열번호 2의 펩타이드(100)를 이용하는 정량법이 적용될 수 있다. 이는, 펩타이드(100)의 종류에 따라서 MSU 결정 농도의 증가에 따른 2차 발현 기질(ES2)의 반응의 크기의 증가율이 다르기 때문이다. 서열번호 4의 펩타이드(100)를 이용하는 경우 비선형적 비례관계를 보이며, 서열번호 2의 펩타이드(100)의 경우 서열번호 4의 펩타이드(100)에 비하여 선형적인 비례관계를 보이는 것을 알 수 있다. 상기 면역분석의 구체적인 실험 방법은 실시예 3에서 후술하기로 한다.

[0050] 일 실시예에서, 2차 발현 기질(ES2)은 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)를 포함할 수 있으며, monosodium urate (MSU)의 결정의 양은 2차 발현 기질(ES2)의 흡광도를 측정하여 얻어지며, 상기 흡광도는 파장 440 nm 내지 460 nm의 전자기파에서 측정될 수 있다. 예를 들어, TMB는 홀스래디시 퍼옥시다아제와 같은 과산화효소(peroxidase)에 의하여 산화될 수 있다. 무색의 TMB가 산화되면, 푸른색(650nm)의 TMB(ox-1 TMB)가 생성되고 상기 ox-1 TMB가 다시 산화되면 노란색(450nm)의 TMB(ox-2)가 생성된다. 이 때, ox-1 TMB는 산성 조건에서 급격한 속도로 ox-2 TMB로 산화된다. 따라서, ox-2 TMB의 환원반응을 용이하게 측정할 수 있다.

[0051] 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) 또는 단백질분해효소 케이(proteinase K) 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다. 또한, 일 실시예에서 상기 관절액은 골관절염 혹은 류마티스성 관절염을 가지지 않은 환자로 부터 추출될 수 있다.

[0052] 결정 용해부(412)는 상기 분해된 관절액이 미세 여과막을 통하여 여과하고, 상기 미세 여과막 상에 남아있는 결정을 용매에 용해시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 용매는 수산화나트륨(NaOH) 용액과 같은 염기성 용액을 포함할 수 있다. 1 M 농도의 수산화나트륨(NaOH) 용액으로 상기 결정을 60 °C에서 30 분간 용해시킨 경우 상기 결정이 모두 용해될 수 있다. 또한, 펩타이드 결합부(413)는 상기 결정이 용해된 결정 용액에 상기 펩타이드(100)를 제공할 수 있으며, 펩타이드(100)의 제공 방법은 표적 타겟팅부(410)에 관하여 전술한 개시 사항을 참조할 수 있다.

[0053] 실시예 1. 분쇄된 monosodium urate (MSU) 결정의 검출 가능 여부

[0054] 실시예 1-1. monosodium urate (MSU) 결정의 분쇄

[0055] MSU결정의 분쇄를 위해서 막자사발을 이용하여 분쇄한다. 도 2a를 참조하면, 분쇄된 MSU 결정의 모양을 현미경으로 관찰한 결과 분쇄 이전의 침상구조물이 거의 입자 형태로 바뀌었음을 관찰할 수 있다.

[0056] 실시예 1-2. 분쇄된 MSU 결정의 크기 분포 측정(도 2b)

- [0057] 분쇄된 MSU 결정의 크기 분포를 파악하기 위해 직경을 알고 있는 합성 마이크로비드와 혼합 후 형광세포분석(FACS)을 이용하여 분석한다. 분쇄 이전 및 이후의 MSU 결정과 형광 표지된 펩타이드(100)를 반응시킨다. 본 실시예에서는 10 mg/ml의 분쇄 이전 및 분쇄 이후의 MSU 결정 용액에 서열번호 4의 펩타이드(100)를 1 mM의 농도로 준비하여 MSU 결정 용액 및 펩타이드(100) 용액을 각각 100 μ l를 혼합한 후 상온에서 1 시간동안 반응하였다. 또한, 크기 비교를 위한 합성 마이크로비드의 지름은 1.0 μ m, 2.8 μ m, 4.0 μ m, 10.0 μ m, 25 μ m의 것을 사용하였다.
- [0058] 실시예 2. 서열번호 1 내지 서열번호 5의 펩타이드(100)의 임계 감지 농도 및 형광 세기 비교(도 3a 내지 도 3f)
- [0059] 10 mg/ml의 MSU 결정 용액을 준비하고, 형광 물질과 결합된 서열번호 1의 펩타이드(100) 용액을 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1.0 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M의 농도로 준비하였다. 이후, 상기 서열번호 1의 펩타이드(100) 용액들 100 μ l와 상기 MSU 결정 용액 100 μ l를 각각 혼합한 후 상온에서 1 시간동안 반응시킨다. 형광세포분석 결과에서 보이는 바와 같이 펩타이드(100)를 섞지 않은 경우(peptide free)를 기준으로 하여 펩타이드(100)의 농도가 높아질수록 측정된 형광의 세기가 증가하며, 이는 펩타이드(100)와 결합된 MSU 결정의 양이 증가하기 때문이다. 전술한 실험 방법을 서열번호 2 내지 서열번호 5의 펩타이드(100)에 대하여 동일하게 적용하였다. 상기 서열번호 2 내지 서열번호 5의 펩타이드(100)에서도 펩타이드(100)의 농도가 높아질수록 형광의 세기가 증가하는 경향성을 보였으며, 형광의 세기 및 MSU 결정을 측정할 수 있는 펩타이드(100) 용액의 최소 농도인 임계 감지 농도는 각각 상이하였다.
- [0060] 또한, 상기 서열번호 1 내지 서열번호 5의 펩타이드(100)를 형광 물질과 결합시키고, 상기 형광 물질과 결합된 펩타이드(100)를 포함하는 용액을 0.5mM로 준비하였다. 이후, 상기 용액들을 동일한 조건으로 MSU 결정과 반응시켜 상기 펩타이드(100)들이 MSU 결정과 결합하는 정도를 비교하였다. 형광세포분석에 의하여 측정된 형광 세기는 서열번호 1의 펩타이드(100)는 108 AU, 서열번호 2의 펩타이드(100)는 25.9 AU, 서열번호 3의 펩타이드(100)는 225 AU, 서열번호 4의 펩타이드(100)는 661 AU, 서열번호 5의 펩타이드(100)는 47.8 AU로 분석되었다. 상기 형광세포분석의 결과에 의하여 서열번호 4, 서열번호 3, 서열번호 1, 서열번호 5, 서열번호 2의 펩타이드(100) 순서로 MSU 결정과 강하게 결합하는 것을 알 수 있다.
- [0061] 실시예 3. MSU 결정 농도에 따른 면역 분석 결과(도 6)
- [0062] 서열번호 1 내지 5의 펩타이드(100)를 비오틴(BTN)과 결합시킨 후, 1mM로 준비하였다. MSU 결정 용액은 0 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml, 600 μ g/ml, 800 μ g/ml, 1000 μ g/ml 및 2000 μ g/ml의 농도로 준비하고, 상기 각각의 펩타이드(100) 용액 10 μ l와 MSU 결정 용액 490 μ l를 혼합한 후 상온에서 1 시간 동안 반응시킨다. 이후, 10 μ g/ml 농도의 스트렙타비딘(STA)(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제를 포함하는 용액을 처리한 후, TMB를 이용하여 발색 반응을 진행하였다. 또한, 면역 분석 결과의 결합 곡선을 라인위버-버크 플롯으로 피팅을 진행하여 얻어진 결합상수(Kd) 값은 서열번호 1의 펩타이드(100)는 807.9 μ g/ml, 서열번호 2는 920.1 μ g/ml, 서열번호 3은 846.9 μ g/ml, 서열번호 4는 475.4 μ g/ml, 서열번호 5는 515.8 μ g/ml로 분석되었다.
- [0063] 이상에서 설명한 본 발명이 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러가지 치환, 변형 및 변경이 가능하다는 것은, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

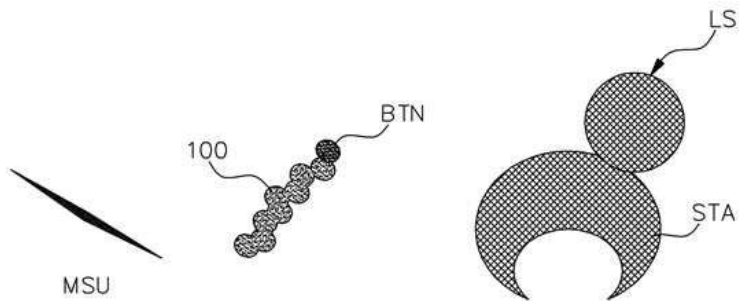
부호의 설명

- [0064] 100: 통풍 진단 펩타이드
200: 통풍 진단 프로브
300: 통풍 진단 키트
400: 정보 제공 시스템
BTN: 비오틴(biotin)
STA: 스트렙타비딘(streptavidin)
LS: 표지 물질

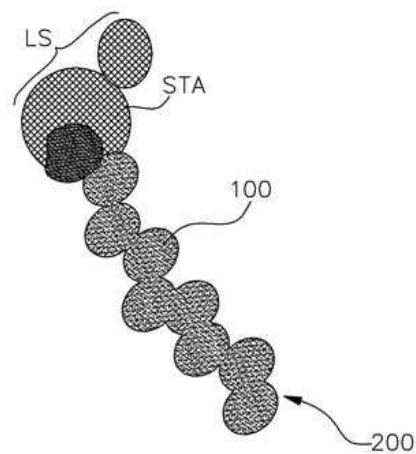
ES2: 2차 발현 기질
 410: 표적 타겟팅부
 411: 관절액 분해부
 412: 결정 용해부
 413: 펩타이드 결합부
 420: 발현 준비부
 430: 발현 측정부
 440: 정량 분석부

도면

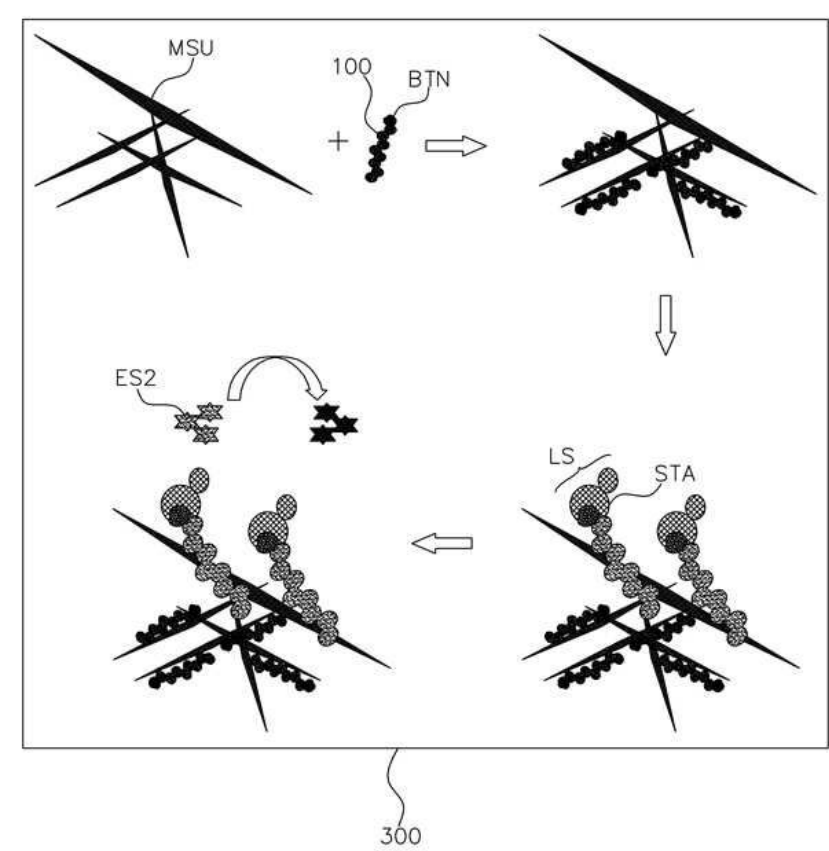
도면1a



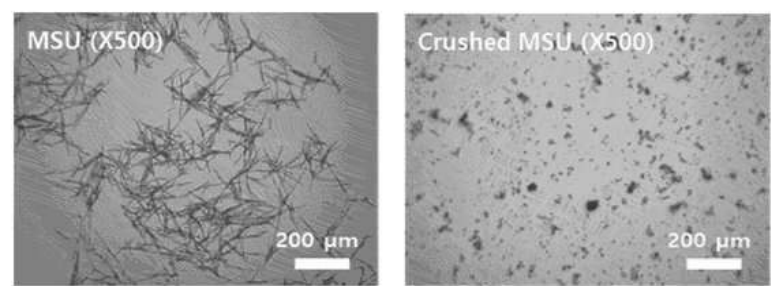
도면1b



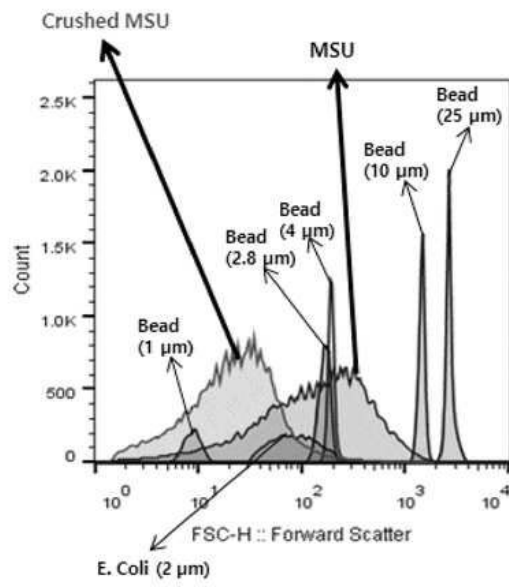
도면1c



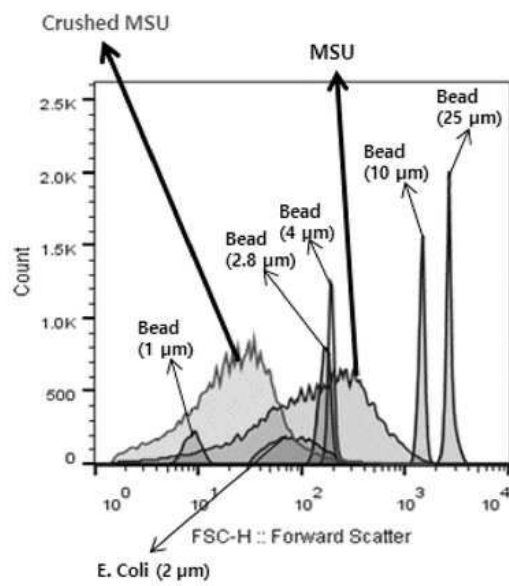
도면2a



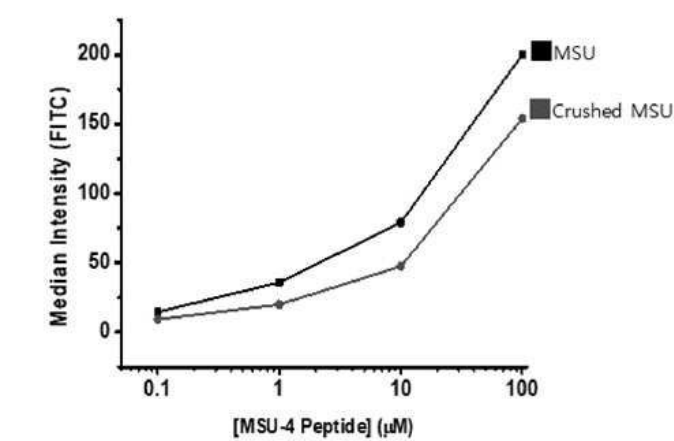
도면2b



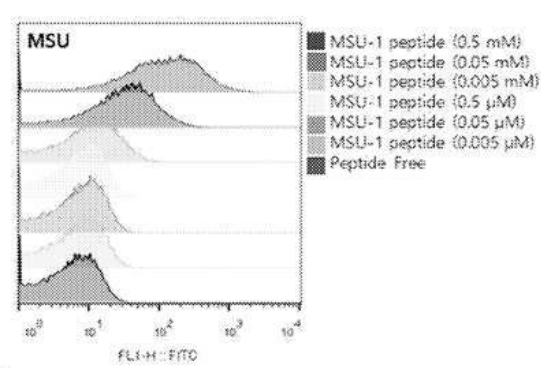
도면2c



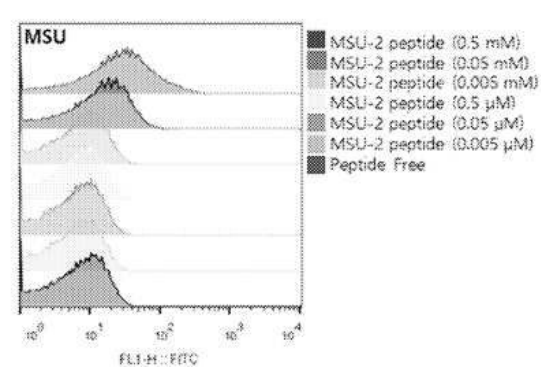
도면2d



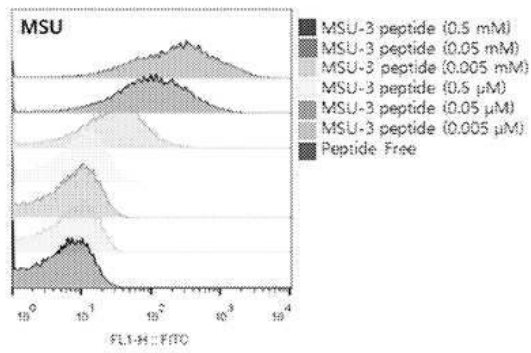
도면3a



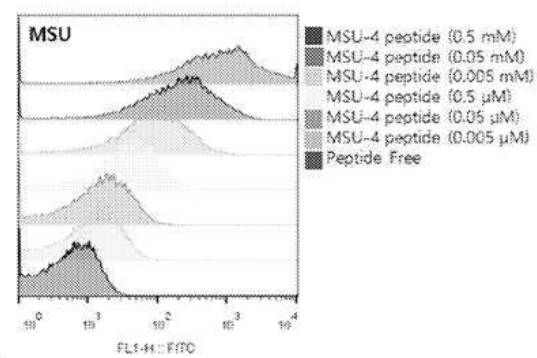
도면3b



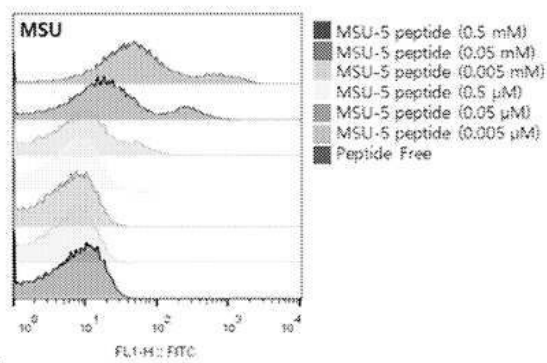
도면3c



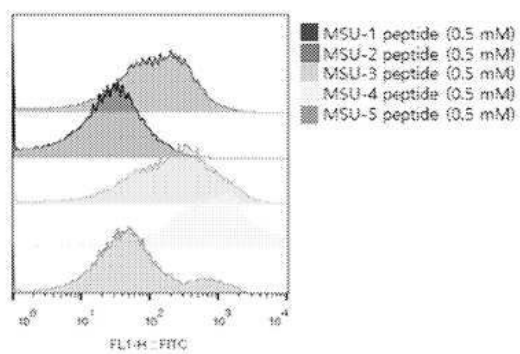
도면3d



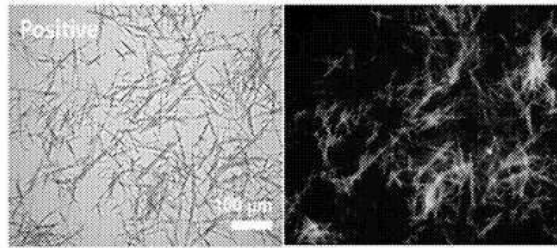
도면3e



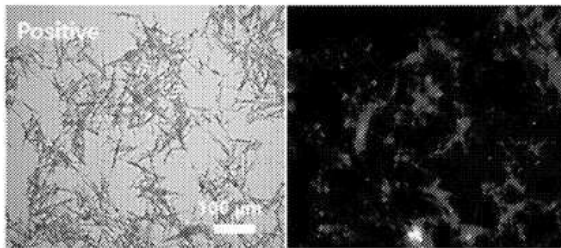
도면3f



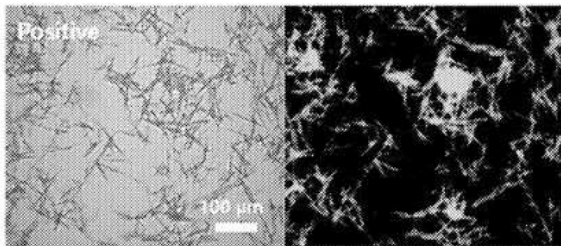
도면4a



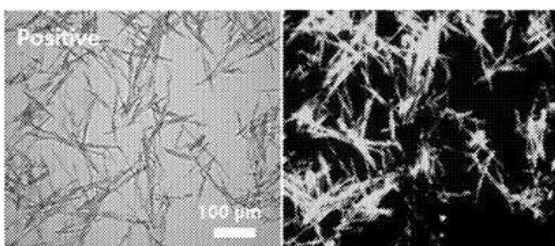
도면4b



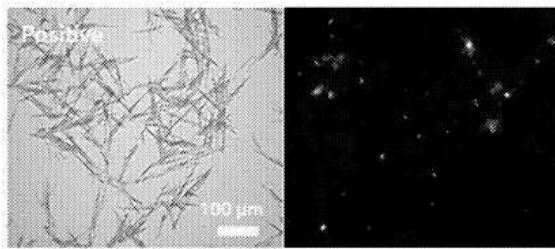
도면4c



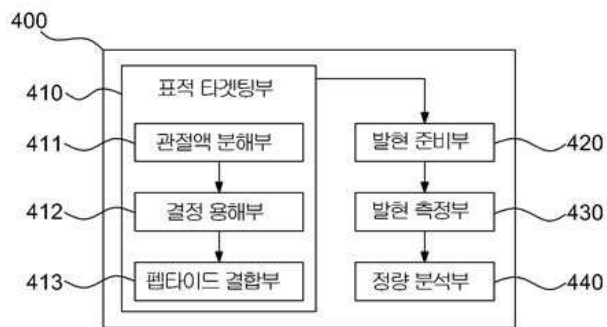
도면4d



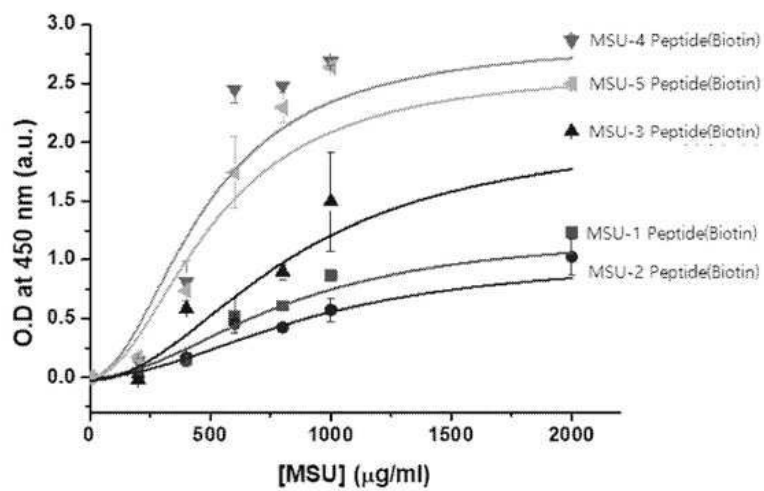
도면4e



도면5



도면6



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION YONSEI UNIV
- <120> Gout diagnosis peptide, gout diagnosis probe, information providing system using the same
- <130> DP-2018-1364
- <160> 5
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

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

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide 5

<400> 5

Ala Arg Cys Val Asp Gly Ile Ser Arg Leu Arg Asp Asp Trp Gly

1

5

10

15