



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월19일

(11) 등록번호 10-2125190

(24) 등록일자 2020년06월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/00 (2006.01) *G01N 30/72* (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)

(52) CPC특허분류
B01L 3/5088 (2013.01)
G01N 30/7233 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0062449(분할)

(22) 출원일자 2020년05월25일

심사청구일자 2020년05월25일

(65) 공개번호 10-2020-0062121

(43) 공개일자 2020년06월03일

(62) 원출원 특허 10-2018-0145803

원출원일자 2018년11월22일

심사청구일자 2018년11월22일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170021398 A*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 김민석

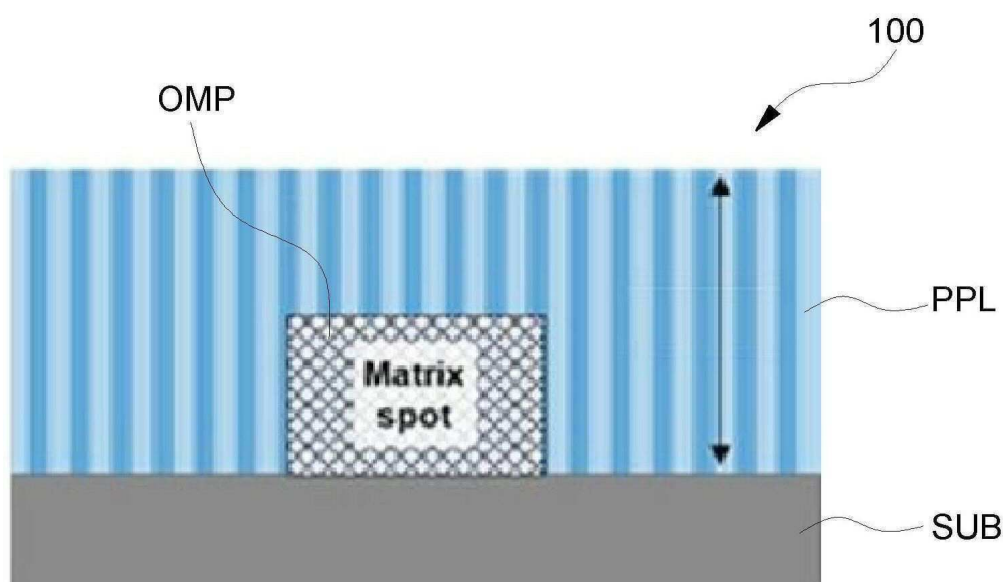
(54) 발명의 명칭 폐혈증 진단을 위한 질량 분석용 샘플 플레이트 및 이를 이용한 질량 분석 방법

(57) 요약

본 발명은 폐혈증의 진단을 위한 샘플 플레이트 및 이를 이용한 질량 분석 방법이 제공된다. 상기 샘플 플레이트는 타겟 기관, 상기 타겟 기관 상에 형성된 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들 및 상기 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들이 형성된 상기 기관 상에 상기 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들을 전부 덮도

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



록 적층된 파릴렌 층을 포함하며, 상기 파릴렌 층 상에 피검사자의 혈액에서 분리된 혈청으로부터 얻어진 피분석 샘플이 배치되고, 상기 피분석 샘플은 레이저 조사에 의해 이온화되고, 상기 샘플 플레이트는 상기 이온화된 피분석 샘플로부터 질량 대 전하량(mass-to-charge: m/z)이 496.4 또는 518.5에 해당하는 피크를 검출하여 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(LPC 16:0)를 동정하도록 적용되며, 패혈증 환자의 혈청으로부터 얻어진 피분석 샘플에서 검출된 상기 피크의 크기가 정상인의 혈청으로부터 얻어진 피분석 샘플에서 검출된 상기 피크의 크기보다 작은 점을 이용해서 상기 패혈증 진단을 수행하도록 적용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

B01L 2300/0819 (2013.01)
B01L 2300/0887 (2013.01)
B01L 2300/161 (2013.01)
G01N 2030/8813 (2013.01)
G01N 2800/26 (2013.01)

(72) 발명자

정경수

서울특별시 은평구 백련산로2길 19, 백련산힐스테이트 1차 101동 204호

구남수

경기도 고양시 일산동구 강송로 153 강촌마을3단지 아파트 305동 1401호

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160009740 A
KR1020150052898 A
KR1020180068238 A

Dinkla, Sip, et al. "Inflammation-associated changes in lipid composition and the organization of the erythrocyte membrane." BBA clinical 5 (2016): 186-192.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C1324

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 연세대학교 산학협력단

연구사업명 연구중심병원 R&D

연구과제명 글로벌 의료수요 해결을 위한 전략적 기술통합의 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.01 ~ 2023.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10063335

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 연세대학교 산학협력단

연구사업명 산업핵심기술개발사업

연구과제명 나노기술 기반 생체 저분자물질 정량 표면 질량분석 플랫폼 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

패혈증 진단을 위한 질량 분석 방법으로서,

타겟 기관과 상기 기관 상에 형성된 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들 및 상기 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들이 형성된 상기 기관 상에 상기 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들을 전부 덮도록 적층된 파릴렌 층을 포함하는 샘플 플레이트를 제공하는 단계;

상기 파릴렌 층 상에 피검자의 혈액에서 분리된 혈청으로부터 얻어진 피분석 샘플을 제공하는 단계;

상기 피분석 샘플에 레이저를 조사하여 상기 피분석 샘플을 이온화시키는 단계; 및

상기 이온화된 상기 피분석 샘플을 질량 분석하여, 질량 대 전하량(mass-to-charge: m/z)이 496.4 또는 518.5에 해당하는 피크를 검출하여 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(LPC 16:0)를 동정하는 단계를 포함하며,

패혈증 환자의 혈청으로부터 얻어진 피분석 샘플에서 검출된 상기 피크의 크기가 정상인의 혈청으로부터 얻어진 피분석 샘플에서 검출된 상기 피크의 크기보다 작은 점을 이용해서 상기 패혈증 진단을 수행하도록 구성되는,

질량 분석 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 타겟 기관 상의 적어도 일부에 형성된 친수성 폴리머층을 더 포함하며, 상기 친수성 폴리머층 상에 상기 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들이 형성되는 질량 분석 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 친수성 폴리머층은 상기 타겟 기관 상에 분할된 패턴을 갖도록 형성된 질량 분석 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 친수성 폴리머층은 하이드록실기, 아민기, 및 카르복실기 중 적어도 어느 하나를 포함하는 질량 분석 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 유기 매트릭스 패턴들은 a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid, 2,5-Dihydroxybenzoic acid, sinapic acid, picolinic acid, 및 9-aminoacridine 중 적어도 어느 하나를 포함하는 질량 분석 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 타겟 기관은 금속으로 형성되거나 금속 표면 층을 갖는 질량 분석 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 파릴렌 층은 파릴렌-N, 파릴렌-C 또는 이의 혼합물을 포함하는 질량 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 바이오 마커를 이용한 진단 기술에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는, 패혈증 진단을 위한 질량 분석용 샘플 플레이트 및 이를 이용한 질량 분석 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 패혈증(sepsis)은 감염에 대한 인체의 비정상적인 전신성 염증 반응이다. 대식세포의 활성화와 이에 따른 염증 관련 인자들의 과도한 생성이 연관되어 있는 것으로 알려져 있으며, 이로 인해 매년 약 750,000 명이 생명을 잃고 있는 것으로 보고되고 있다(Angus et al. (2001) Crit Care Med 29: 1303-1310).
- [0003] 다양한 종류의 병원체로 인해 패혈증이 발생할 수 있으며, 박테리아에 의한 발생률이 가장 높으며, 그 외에도 바이러스나 균류에 의해서도 일어날 수 있다. 폐에 감염을 일으키는 폐렴, 방광과 신장에 감염을 일으키는 요도감염, 피부에 일어나는 봉소염, 복부에 일어나는 충수염 또는 뇌에 일어나는 뇌막염으로부터 패혈증이 유도될 수 있다. 예를 들면, 폐렴 환자가 패혈증에 걸리게 되면 뇌, 심장, 간, 폐 또는 신장에 손상이 일어나며 중증으로 진전되는 경우 환자의 약 20 ~ 50%는 패혈증성 쇼크에 의해 사망할 수 있다. 또한, 수술 후 감염에 의해 패혈증이 발생하기도 한다.
- [0004] 상기 패혈증의 진단은 통상적으로 체온이 38 °C 이상 혹은 36 °C 이하, 맥박과 호흡수가 각각 분당 90회 또는 20회 이상, 백혈구 수가 12,000개/mm³ 이상 혹은 4,000개/mm³ 이하, 혈중에 어린 백혈구가 10% 이상 존재하는 4 가지 증상 중 2가지 이상의 증상이 나타나면 패혈증 진단을 할 수 있다. 또한, 혈액, 소변, 뇌척수액 배양 검사가 이루어지고 더불어 감염의 의심되는 부위에 추가적인 검사를 통해 진단을 한다. 그러나, 이러한 진단은 비특정 생리학적 범주(non-specific physiological criteria)와 병원균 검출에 의존하는 것이 대부분이다. 그러나, 이러한 진단 방법은 불확실성, 항생제의 오남용, 및 면역중재(immunomodulatory) 치료가 유익한 환자를 식별하는 것을 어렵게 할 뿐만 아니라 패혈증이 빠르게 진전됨에도 진단에 장시간이 소요되어 오히려 치료가 지연되는 장해 요인이 되기도 한다. 따라서, 분석을 위한 소요 시간이 짧아 치료를 위한 의사 결정에 신속한 도움을 줄 수 있으며, 감별(screening), 진단(diagnosis), 위험 계층화(risk stratification), 및 치료에 대한 환자 반응 모니터링에 대한 정보를 광범위하게 줄 수 있는 패혈증 진단은 매우 중요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 패혈증의 바이오 마커인 LPC를 신속하고 정확하게 검출할 수 있도록 질량 분석을 용이하게 수행할 수 있는 샘플 플레이트(또는 LPC 질량 분석 칩)를 제공하는 것이다.
- [0006] 또한, 상기 샘플 플레이트를 이용한 패혈증의 진단을 위한 신뢰성 있는 질량 분석 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명의 일 실시예에 따른 샘플 플레이트는, 패혈증 진단을 위한 질량 분석용 샘플 플레이트이다. 일 실시예에서, 샘플 플레이트는, 타겟 기관; 상기 기관 상에 형성된 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들; 및 상기 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들이 형성된 상기 기관 상에, 상기 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들을 전부 덮도록 적층된 파릴렌 층을 포함하며, 피분석 샘플이 상기 파릴렌 층 상에 배치되고, 상기 피분석 샘플로부터 질량 대 전하량(mass-to-charge: m/z)이 496.4 또는 518.5에 해당하는 피크를 검출하여 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(LPC16:0)를 동정한다.
- [0008] 일 실시예에서, 상기 샘플 플레이트는, 타겟 기관 상의 적어도 일부에 형성된 친수성 폴리머 층을 더 포함하며, 상기 친수성 폴리머층 상에 상기 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들이 형성될 수 있다. 상기 친수성 폴리머층은 상기 기관 상에 분할된 패턴을 갖도록 형성될 수 있다. 일 실시예에서, 상기 친수성 폴리머층은 하이드록실기, 아민기, 및 카르복실기 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0009] 상기 타겟 기관은 금속으로 형성되거나 금속 표면 층을 가질 수 있다. 상기 유기 매트릭스 패턴들은 a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid, 2,5-Dihydroxybenzoic acid, sinapic acid, picolinic acid, 및 9-aminoacridine 중

적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. 상기 파릴렌 층은 파릴렌-N, 파릴렌-C 또는 이의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0010] 다른 실시예에 따르면, 패혈증 진단을 위한 질량 분석 방법이 제공될 있다. 상기 질량 분석 방법은, 타겟 기관; 상기 기관 상에 형성된 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들; 및 상기 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들이 형성된 상기 타겟 기관 상에, 상기 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들을 전부 덮도록 적층된 파릴렌 층을 포함하는 샘플 플레이트를 제공하는 단계; 피분석 샘플을 상기 파릴렌 층 상에 제공하는 단계; 상기 피분석 샘플에 레이저를 조사하여 상기 피분석 샘플을 이온화 및 탈착시키는 단계; 및 상기 이온화 및 탈착된 상기 피분석 샘플을 질량 분석하여, 질량 대 전하량(mass-to-charge: m/z)이 496.4 또는 518.5에 해당하는 피크를 검출하여 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(LPC16:0)를 동정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0011] 상기 샘플 플레이트는 상기 타겟 기관 상의 적어도 일부에 형성된 친수성 폴리머 층을 더 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 친수성 폴리머층 상에 상기 적어도 하나 이상의 유기 매트릭스 패턴들이 형성될 수 있다. 상기 친수성 폴리머층은 상기 기관 상에 분할된 패턴을 갖도록 형성될 수 있다. 일 실시예에서, 상기 친수성 폴리머층은 하이드록실기, 아민기, 및 카르복실기 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0012] 상기 유기 매트릭스 패턴들은 a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid, 2,5-Dihydroxybenzoic acid, sinapic acid, picolinic acid, 및 9-aminoacridine 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. 상기 타겟 기관은 금속으로 형성되거나 금속 표면 층을 가질 수 있다. 상기 파릴렌 층은 파릴렌-N, 파릴렌-C 또는 이의 혼합물을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 질량 분석을 통한 패혈증의 진단은, 패혈증의 바이오 마커인 1-acyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine(LPC라 칭함)에 속하는 1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(LPC16:0라 칭함)에 해당하는 질량 대 전하량(mass-to-charge: m/z)의 496.4 또는 518.5 질량 피크를 갖는 저분자량 물질의 검출을 통해 수행된다. 상기 질량 피크는 저분자량 영역이어서 노이즈로 인해 질량 분석을 통한 검출이 어렵지만 본 발명의 실시예에서는, 저분자량 영역에 속하는 샘플 플레이트를 통해 노이즈를 억제하고, 2 개의 질량 피크가 특이적 이온화 경향을 이용하여 질량 피크를 검출함으로써 LPC 16:0을 정확하게 동정하여, 패혈증에 대한 특이성과 선택성이 극대화되고 신속하고 정확한 진단이 가능한 샘플 플레이트가 제공될 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 실시예에 따르면, 패혈증에 대한 진단 효율과 정확성이 확보된 질량 분석 방법이 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 샘플 플레이트의 단면도이고, 도 1b는 도 1a의 샘플 플레이트의 유기 매트릭스 패턴의 주사전자현미경 이미지이고, 도 1c는 유기 매트릭스 패턴들의 어레이를 갖는 샘플 플레이트를 나타내며, 도 1d는 샘플 플레이트의 파릴렌 층(PPL)의 분자식을 예시한다.

도 2a 및 도 2b는 각각 본 발명의 일 실시예에 따른 샘플 플레이트와 비교예에 따른 파릴렌 층이 없는 2,5-dihydroxybenzoic acid(DHB)계 유기 매트릭스 패턴을 갖는 종래의 샘플 플레이트를 사용하여 말디툼 질량분석법에 의해 분석된 LPC16:0의 측정 결과를 나타내는 질량분석도이다.

도 3a는 본 발명의 실시예에 따른 샘플 플레이트의 표면을 나타내는 주사전자현미경 이미지이며, 도 3b는 도 2b의 비교예에 따른 샘플 플레이트의 표면을 나타내는 주사전자현미경 이미지이다.

도 4a 내지 도 4c는 본 발명의 실시예에 따른 샘플 플레이트를 이용하여 각각 정상인의 혈청, 폐렴환자의 혈청 및 패혈증 환자의 혈청을 분석한 결과이다.

도 5a 및 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 샘플 플레이트를 이용하여 탠덤매스법을 사용하여 측정한 합성된 LPC16:0와 패혈증 환자 혈청으로부터 얻어진 피분석 샘플의 질량분석도이다.

도 6a 내지 도 6c는 본 발명의 일 실시예에 따른 샘플 플레이트를 이용하여 측정한 정상인, 폐렴환자, 및 패혈증환자 혈청의 질량분석결과, 질량분석결과의 박스 플롯 및 질량분석결과의 ROC 플롯을 각각 나타내는 그래프들이다.

도 7a 내지 도 7c는 비교예에 따른 LC-MS법을 이용하여 측정한 정상인, 폐렴환자, 및 패혈증환자 혈청의 질량분

석결과, 질량분석결과의 박스 플롯 및 질량분석결과의 ROC플롯을 각각 나타내는 그래프들이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 샘플 플레이트를 이용하여 측정된 정상인, 폐렴환자, 폐혈증환자 혈청의 질량분석결과와 비교예에 따른 LC-MS법을 이용하여 측정된 결과의 유사성 분석을 위한 블런트-알트만 플롯이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.
- [0017] 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.
- [0018] 또한, 이하의 도면에서 각 층의 두께나 크기는 설명의 편의 및 명확성을 위하여 과장된 것이며, 도면상에서 동일 부호는 동일한 요소를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는" 는 해당 열거된 항목 중 어느 하나 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다.
- [0019] 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 실시예를 설명하기 위하여 사용되며, 본 발명을 제한하기 위한 것이 아니다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 다른 경우를 분명히 지적하는 것이 아니라면, 복수의 형태를 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 경우 "포함한다(comprise)" 및/또는 "포함하는(comprising)"은 언급한 형상들, 숫자, 단계, 동작, 부재, 요소 및/또는 이들 그룹의 존재를 특정하는 것이며, 하나 이상의 다른 형상, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 그룹들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니다.
- [0020] 본 명세서에서 제 1, 제 2 등의 용어가 다양한 부재, 부품, 영역, 층들 및/또는 부분들을 설명하기 위하여 사용되지만, 이들 부재, 부품, 영역, 층들 및/또는 부분들은 이들 용어에 의해 한정되어서는 안됨은 자명하다. 이들 용어는 하나의 부재, 부품, 영역, 층 또는 부분을 다른 영역, 층 또는 부분과 구별하기 위하여만 사용된다. 따라서, 이하 상술할 제 1 부재, 부품, 영역, 층 또는 부분은 본 발명의 가르침으로부터 벗어나지 않고서도 제 2 부재, 부품, 영역, 층 또는 부분을 지칭할 수 있다.
- [0021] 폐혈증의 바이오 마커인 LPC는 주로 액체크로마토그래피와 질량분석기(LC-MS)를 통해 분석되어 왔으나, 본 발명의 실시예에서는 폐혈증 의심 환자 또는 폐혈증 환자로부터 얻은 피분석 샘플에 대해 질량 분석, 바람직하게는 말디툼 질량 분석을 수행하여 질량 대 전하량(mass-to-charge: m/z)이 496.4 피크 또는 518.5 피크를 갖는 LPC 16:0에 대한 동정을 수행함으로써 측정 시간과 비용 측면에서 우수하고, LPC 16:0이 갖는 특이성과 선택성에 기반하여 폐혈증에 대한 정확하고 신속한 진단과 그에 따른 적절한 치료가 이루어질 수 있도록 한다.
- [0022] 질량 분석을 위한 피분석 샘플의 이온화는 전자빔 조사를 통한 전자이온화법, 고속의 원자를 충돌시키는 방법, 레이저 조사를 통한 이온화법 또는 피분석 샘플을 전기장 속에서 분사하는 방법이 있으며, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니지만 본 발명의 실시예에서는 주로 레이저 조사에 의한다.
- [0023] 이하에서는, 종래의 질량 분석 방법으로는 유기 매트릭스에서 발생하는 노이즈로 인해 본 발명에서 폐혈증 진단을 위해 측정하고자 하는 LPC16:0의 $m/z=496.4$ 와 $m/z=518.5$ 질량 피크의 관측이 어렵지만, 본 발명의 실시예에 따른 샘플 플레이트를 이용할 경우 상기 두 피크에 대한 선택적 이온화 경향을 이용하여 종래의 LC-MS의 측정 결과에 비해 높은 특이성과 선택성을 갖는 질량 분석을 통한 폐혈증의 진단이 가능하다.
- [0024] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 샘플 플레이트(100)의 단면도이고, 도 1b는 도 1a의 샘플 플레이트(100)의 유기 매트릭스 패턴의 주사전자현미경 이미지이고, 도 1c는 유기 매트릭스 패턴들의 어레이를 갖는 샘플 플레이트(200)를 나타내며, 도 1d는 샘플 플레이트(100)의 파릴렌 층(PPL)의 분자식을 예시한다.
- [0025] 도 1a를 참조하면, 샘플 플레이트(100)는 타겟 기관(SUB), 타겟 기관(SUB) 상의 유기 매트릭스 패턴(OMP) 및 유기 매트릭스 패턴(OMP)을 전부 덮도록 타겟 기관(SUB) 상에 적층된 파릴렌 층(PPL)을 포함한다. 일 실시예에서, 타겟 기관(SUB)은 전체가 금속이거나 상부 표면에 금속층을 포함할 수 있다. 상기 금속은 예를 들면, 스테인레스일 수 있으며, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 유기 매트릭스 패턴(OMP)은 타겟 기관(SUB) 상에 유기 매트릭스 용액을 점적하고, 용매를 건조시켜 형성될 수 있다. 비제한적 예로서, LPC 분자의 이온화에 적합한 유기 매트릭스로서, α -시아노(ciano)-4-하이드록시시나믹산(hydroxycinnamic)(CHCA) 유기 매트릭스를 형성하기 위하여 유기 매트릭스 용액으로서 물, 아세트나이트릴 또는 이의 혼합 용매에 α -시아노(ciano)-4-하이드록시시나믹산(hydroxycinnamic)(CHCA)이 용해된 용액을 사용

할 수 있다. 상기 유기 매트릭스 용액은 분석하려는 화합물의 종류에 따라서 다양하게 선택가능한 것이며 본 발명의 유기 매트릭스 패턴이 이에 한정되는 것은 아니며, 다른 말디톱 질량 분석에 사용되는 유기 매트릭스도 이용될 수 있다. 예를 들면, 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), sinapic acid, picolinic acid, 9-aminoacridine를 포함하는 유기 매트릭스가 사용될 수 있다.

[0027] 도 1b를 참조하면, 스프레이 또는 점적 방식으로 코팅되고 건조되어 형성된 유기 매트릭스 패턴(OMP, 또는 유기 매트릭스 스폿이라 함)이다. 일 실시예에서, 유기 매트릭스 패턴(OMP)의 크기는 도시된 것과 같이 1.5 mm 정도의 평균 직경을 가질 수 있으며, 높이는 수 μm 에 해당한다. 이러한 유기 매트릭스 패턴(OMP)의 크기와 두께는 예시적일 뿐 0.1 mm 내지 수 cm의 평균 직경과 1 μm 내지 수 100 μm 의 두께를 가질 수 있다. 또한, 다른 실시예에서, 유기 매트릭스 패턴이 아닌 층 형태로 타겟 기관(SUB) 상에 연속적인 유기 매트릭스 층이 형성될 수도 있을 것이다.

[0028] 일 실시예에서, 유기 매트릭스 패턴(OMP)은 타겟 기관(SUB) 상에 1 개 또는 복수의 서로 이격된 어레이 형태로 배치될 수 있다. 도 1c는 타겟 기관(SUB) 상에 어레이 형태로 배치된 유기 매트릭스 패턴들(OMP)을 도시한다. 타겟 기관(SUB) 상에 9×9 행렬로 배열된 유기 매트릭스 패턴들(OMP)이 예시되어 있다. 일 실시예에서는, 유기 매트릭스 패턴들(OMP)d1 형성될 영역이 개구된 마스크 필름(미도시)을 타겟 기관(SUB) 상에 고정하고, 전술한 유기 매트릭스 용액을 스프레이 코팅 또는 점적한 후 용매를 예를 들면 상온에서 건조시킨 후 상기 마스크 필름을 제거하여 타겟 기관(SUB) 상에 유기 매트릭스 패턴들(OMP)을 잔존시켜 유기 매트릭스 패턴들(OMP)의 어레이를 형성할 수 있다.

[0029] 일 실시예에서는, 유기 매트릭스 패턴들(OMP)을 형성하기 전에 타겟 기관(SUB) 상에 친수성 폴리머층(미도시)을 더 형성할 수도 있다. 이 경우, 상기 친수성 폴리머층 상에 유기 매트릭스 패턴들(OMP)이 형성될 수 있다. 상기 친수성 폴리머층은 유기 매트릭스 패턴들(OMP)이 금속성의 타겟 기관(SB) 상에 안정적으로 형성되고 변성되지 않도록 하며, LPC의 이온화를 촉진시킨다. 일 실시예에서, 상기 친수성 폴리머층은 하이드록실기, 아민기 및 카르복실기 중 적어도 어느 하나를 포함하는 폴리머일 수 있다.

[0030] 유기 매트릭스 패턴(OMP)을 덮는 파릴렌 층(PPL)은 유기 매트릭스 패턴(OMP)을 완전히 덮도록 한다. 파릴렌 층(PPL)에 의해 유기 매트릭스 패턴(OMP)은 후술하는 피분석 물질인 LPC와 완전히 물리적으로 분리된다. 일부 유기 매트릭스 패턴(OMP)이 노출되는 경우, 질량 분석을 위해 인입되는 레이저에 노출되어 파편화될 수 있으며, 이는 피분석 샘플인 LPC의 측정 피크에 대하여 노이즈로 작용되어 LPC의 분석을 불가능하게 한다. 이와 같이 파릴렌 층(PPL)은 자외선에 노출된 유기 매트릭스 패턴(OMP)의 이온 또는 이의 파편을 차단시켜 질량 분석기로 인입되는 것을 방지하면서도 LPC의 이온화를 위한 유기 매트릭스 패턴(OMP)의 작용을 방해하지 않는 장벽층으로 기능할 수 있다.

[0031] 파릴렌 층(PPL)은 도 1d에 도시된 것과 같이, 파릴렌-N, 파릴렌-C 또는 이의 혼합물을 포함할 수 있으며, 파릴렌 층(PPL)은 열증착, 레이저 증발법과 같은 기상 증착법에 의해 타겟 기관(SUB) 상에 형성될 수 있다. 예를 들어, 파릴렌 층(PPL)은 poly(p-xylylene)계 층일 수 있다. 일 실시예에서, 파릴렌 층(PPL)은 10 nm 내지 100 nm 일 수 있다. 10 nm 미만의 두께를 갖는 경우, 레이저 조사에 의한 유기 매트릭스 패턴(OMP)으로부터 유래된 불순물을 차단하는 장벽층으로서의 기능을 할 수 없으며, 100 nm를 초과하는 경우 레이저 조사에 의한 LPC의 이온화 효율이 저감될 수 있다.

[0033] 도 2a 및 도 2b는 각각 본 발명의 일 실시예에 따른 샘플 플레이트와 비교예에 따른 파릴렌 층이 없는 2,5-dihydroxybenzoic acid(DHB)계 유기 매트릭스 패턴을 갖는 종래의 샘플 플레이트를 사용하여 말디톱 질량분석법에 의해 분석된 LPC16:0의 측정 결과를 나타내는 질량분석도이다.

[0034] 도 2a를 참조하면, 본 발명의 실시예에 따른 샘플 플레이트의 경우, 유기 매트릭스에 의해 발생할 수 있는 저분자 영역의 노이즈 피크의 발생이 억제되는 것이 관찰되며, 패혈증의 바이오 마커인 LPC16:0의 질량 피크인 $m/z=496.6$ 가 저분자영역의 유기 매트릭스 노이즈와 분리되어 관측되었다. 이때 신호대잡음비는 135.91이다.

[0035] 도 2b를 참조하면, 비교예에 따른 파릴렌 층이 없는 DHB계 유기 매트릭스 패턴을 갖는 샘플 플레이트에서는, 유기 매트릭스가 레이저의 조사에 의해 조각나면서 저분자 영역($m/z < 1000$)에서 상기 유기 매트릭스 분자의 파편에 의한 질량 피크가 관찰된다. 그에 따라, 상기 LPC16:0의 질량 피크인 $m/z=496.6$ 도 저분자 영역의 유기 매트릭스 노이즈와 함께 관찰되었다. 비교예에 따른 샘플 플레이트를 이용한 질량 분석의 경우에는 질량 피크가 측정이마다 다르게 나타나게 될 수 있으므로, 저분자 영역에서 분석물의 질량 피크를 정확히 구별해 내기 어렵다. 도 2a와 도 2b를 비교하면, 본 발명의 실시예에 따른 샘플 플레이트를 사용하는 경우 신호대잡음비 8.21에 비해

15배 이상 현저히 신호의 측정 감도가 향상되는 것을 확인할 수 있다.

- [0037] 도 3a는 본 발명의 실시예에 따른 샘플 플레이트의 표면을 나타내는 주사전자현미경 이미지이며, 도 3b는 도 2b의 비교예에 따른 샘플 플레이트의 표면을 나타내는 주사전자현미경 이미지이다.
- [0038] 도 3a를 참조하면, 본 발명의 실시예에 따른 파릴렌 층이 형성된 샘플 플레이트에서는 유기 매트릭스 패턴의 건조된 표면 거칠기가 작아 유기 매트릭스의 결정 생성과 그 크기가 균일한 것을 알 수 있다. 그러나, 도 3b를 참조하면, 비교 실시예의 샘플 플레이트에서는, 표면 거칠기가 크고, 그에 따라 유기 매트릭스의 결정이 불균일하게 생성되고, 결정의 크기도 불균일한 것으로 확인된다.
- [0040] 도 4a 내지 도 4c는 본 발명의 실시예에 따른 샘플 플레이트를 이용하여 각각 정상인의 혈청, 패혈증 환자의 혈청 및 패혈증 환자의 혈청을 분석한 결과이다. 도 4a 내지 도 4c에서 분석된 혈청 시료들은 모두 연세대학교 세브란스병원에서 수집되었고, 총 166개의 시료 중 정상 시료는 10개, 패혈증 시료는 12개, 패혈증 시료는 144개로, 패혈증 환자는 중증 패혈증 및 패혈증 쇼크 관리를 위한 국제 가이드라인(international guidelines for management of severe sepsis and septic shock)을 따라 진단된 환자로부터 얻어진 피분석 샘플들이다.
- [0041] 환자 입실 24시간 이내에 혈액을 채취한 후 혈청을 분리하였으며, 분리된 혈청시료는 혈청부피 4 배의 아세트나이트릴을 첨가, 혼합하여 혈청내 단백질을 분리시키고 동시에 측정하고자 하는 LPC16:0을 추출하였다. 이후 원심분리기를 이용하여 침전된 단백질을 제거하고 상층액을 분리하여 말디툼 질량 분석을 위한 피분석 샘플이 제작되었다. 이러한 샘플의 제작 방법은 예시적이며, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다. 패혈증을 진단하기 위한 LPC는 혈청 이외에도 혈액, 혈장, 혈액 분획, 관절액, 소변, 정액, 타액, 대변, 뇌척수액, 위 내용물(gastric content), 질 분비물, 조직 균질물, 골수 흡인물(bone marrow aspirate), 뼈 균질물(bone homogenate), 담(sputum), 흡인물, 스왑(swab) 및 스왑 린세이트(swab rinsate), 다른 체액 등에서도 피분석 샘플이 얻어질 수 있다. 그러나, 혈청이나 혈장과 같이 혈액으로부터 얻어진 샘플이 LPC의 검출을 위해 다른 불순물의 혼합 정도가 적어 단백질의 제거만으로 용이하게 말디툼 질량 분석을 피분석 샘플을 얻을 수 있으므로 바람직하다.
- [0042] 도 4a 및 도 4b를 참조하면, 각 피분석 샘플(H1 ~ H10; P1 ~ P12)의 질량분석도에서, 대개의 피분석 샘플들에서는 유사한 레벨의 강도를 갖는 $m/z=496.6$ 과 $m/z=518.5$ 의 2 개의 질량 피크가 관찰된다. 도 4c를 참조하면, 측정된 패혈증 환자 혈청의 질량분석도에서 많은 샘플들(S1 ~ S38)에서 $m/z=496.6$ 과 $m/z=518.5$ 의 2 개의 질량 피크 강도가 도 4a와 도 4b의 경우와 비교할 때 크게 감소한 것으로 나타났다.
- [0043] 이와 같이 정상인과 패혈증 환자의 경우와 달리 $m/z=496.6$ 과 $m/z=518.5$ 의 2 개의 질량 피크가 패혈증에서 차이를 보임에 따라 두 질량 피크에 해당하는 물질을 동정하고자 하였다. Human metabolite database를 통해 $m/z=496.6$ 에 해당하는 정보를 검색한 결과 lysophosphatidylcholine (LPC 16:0)이 후보 물질임을 확인되었다. 피분석 샘플에서 관찰되는 $m/z = 496.6$ 인 질량 피크가 LPC 16:0임을 확인하기 위해 탄템메스법을 사용하여 검증하였다. 탄템메스법은 특정 m/z 값을 갖는 이온을 고속으로 가속된 기체와 충돌시켜 파편을 만들고 파편화된 물질들에 대해 질량 분석을 수행하여 동정하는 방법이다. 일반적으로 동일한 분자는 가속된 기체와 충돌시 동일한 파편을 만들게 되므로 특정시료에서 발생한 이온의 파편을 비교하여 특정시료임을 동정할 수 있다.
- [0045] 도 5a 및 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 샘플 플레이트를 이용하여 탄템메스법을 사용하여 측정된 합성된 LPC 16:0과 패혈증 환자 혈청의 질량분석도이다. 본 발명자는 혈청 시료의 $m/z = 496.6$ 질량 피크와 합성된 LPC 16:0을 탄템메스법을 이용하여 분석하여 $m/z=496.6$ 피크가 LPC16:0임을 확인하였다.
- [0046] 도 5a를 참조하면, 합성된 LPC16:0은 $m/z=496.4$ 피크를 나타내며, 탄템메스로 분석한 결과 $m/z=478.3$ 피크를 나타낸다. 또한 $m/z=478.3$ 피크를 다시 탄템메스로 파편을 만들어 분석한 결과 $m/z=163.0, 283.3, 419.3$ 의 피크가 관측됨을 확인하였다.
- [0047] 도 5b를 참조하면, 도 5a와 같은 방법으로 탄템메스법을 이용하여 분석한 결과 패혈증 환자의 혈청 샘플은 $m/z=496.4$ 피크를 나타내며, 해당 피크를 탄템메스로 분석한 결과 합성된 LPC 16:0과 같이 $m/z=478.3$ 피크가 관측되었다. 또한 $m/z=478.3$ 피크를 다시 탄템메스로 파편을 만들어 분석한 결과 합성된 LPC16:0과 같이 $m/z = 163.0, 283.3, 419.3$ 의 질량 피크가 관측됨을 확인하였다. 이상의 결과는 환자시료에서 발견되는 $m/z = 496.4$ 피크가 LPC 16:0에 의한 것임을 나타내는 것이다.
- [0048] 전술한 질량 분석 결과들로부터 저분자 영역에서 노이즈 피크를 제거할 수 있는 본 발명의 실시예에 따른 샘플 플레이트를 이용하여 정상인, 패혈증 환자, 패혈증환자 혈청에 대해 LPC 16:0에 해당하는 $m/z=496.4$ 피크에 대한

질량 분석을 실시하여 패혈증 진단이 정확하게 이루어질 수 있음을 확인할 수 있다.

- [0050] 도 6a 내지 도 6c는 본 발명의 일 실시예에 따른 샘플 플레이트를 이용하여 측정한 정상인, 패혈증환자, 및 패혈증환자 혈청의 질량분석결과, 질량분석결과와 박스 플롯 및 질량분석결과와 ROC 플롯을 각각 나타내는 그래프들이다.
- [0051] 도 6a를 참조하면, 측정결과로부터 정상인과 패혈증환자의 경우 패혈증환자의 측정결과와 달리 LPC16:0의 농도가 높은 것으로 관찰되었다. 패혈증 환자의 체내에서는 과다 분비된 염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokines)에 의해 포스포리파아제 D(phospholipase D)와 라이소포스파티딜콜린 아실트랜스퍼라제 (lysophosphatidylcholine acyltransferase, LPCAT)가 활성화된다. 포스포리파아제 D에 의해 포스파티딜콜린 (phosphatidylcholine)인 LPC16:0의 분해가 촉진되며, LPCAT에 의해 LPC16:0의 PC전환량이 증가하므로 결과적으로 패혈증 환자 혈청에서 LPC16:0 농도가 낮아지게 된다.
- [0052] 도 6b를 참조하면, 정상인과 패혈증환자의 경우 중앙값(박스플롯의 중앙선)은 패혈증 환자와 현저한 차이를 보이며 분포역시 현저한 차이를 보임을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 본 발명의 실시예에 따른 샘플 매트릭스를 이용하여 LPC 16:0에 해당하는 $m/z = 496.4$ 피크를 분석하면 패혈증의 진단이 가능함을 보여준다.
- [0053] 도 6c를 참조하면, 패혈증 환자로 진단하는 질량 피크의 세기는 5465.5 (AU)로 계산되었고 패혈증 환자를 패혈증 환자로 진단하는 특이성은 97.9 %, 비패혈증 환자를 비패혈증 환자로 진단할 선택성은 95.5 %로 계산되었다. 이와 같은 결과는 샘플 플레이트를 이용하여 LPC 16:0에 해당하는 $m/z = 496.4$ 피크를 분석하면 패혈증의 진단이 높은 정확도로 가능함을 보여준다.
- [0055] 도 7a 내지 도 7c는 비교예에 따른 LC-MS법을 이용하여 측정한 정상인, 패혈증환자, 및 패혈증환자 혈청의 질량분석결과, 질량분석결과와 박스 플롯 및 질량분석결과와 ROC플롯을 각각 나타내는 그래프들이다.
- [0056] 도 7a를 참조하면, 샘플 플레이트를 이용하여 정상인, 패혈증환자, 패혈증환자의 혈청을 분석하여 $m/z=496.4$ 피크를 분석한 결과를 기존에 사용하는 방법인 LC-MS 법과 비교하였다. 기존 LC-MS 법은 혈청시료를 LC를 이용하여 분리를 진행하면서 발생하는 $m/z = 496.4$ 에 대한 피크를 모아 분석하여 진행하였다. $m/z = 496.4$ 피크를 나타내는 이온에 고속 기체를 충돌시켰을 때 생성되는 파편 중 $m/z = 478$ 피크를 이용하여 정량분석되었다. 사용된 혈청시료는 도 6a에서 사용한 것과 동일한 시료를 동일한 순서로 사용하였다.
- [0057] 도 7b를 참조하면, 정상인과 패혈증환자의 경우 중앙값(박스플롯의 중앙선)은 패혈증 환자와 현저한 차이를 나타내며, 분포도 현저한 차이를 보이고 있다. 그러나, 본 발명의 실시예에 따른 샘플 플레이트를 이용한 도 6b의 분석 결과와 비교하면 실험 결과가 넓게 분포하는 차이가 있다. 이와 같은 결과는 샘플 플레이트를 이용하여 LPC 16:0에 해당하는 $m/z = 496.4$ 피크를 분석하면 패혈증의 정밀한 진단이 가능함을 나타낸다.
- [0058] 도 7c를 참조하면, ROC 플롯을 분석한 결과, 패혈증 환자로 진단하는 질량피크의 세기는 108181 (AU)로 계산되었고 패혈증 환자를 패혈증 환자로 진단하는 특이성은 78.9 %, 비패혈증 환자를 비패혈증 환자로 진단할 선택성은 72.7 %로 계산되었다. 이와 같은 결과는 도 6c에서 샘플 플레이트를 이용하여 LPC 16:0에 해당하는 $m/z = 496.4$ 피크를 분석한 결과와 차이를 나타내며, 본 발명의 실시예에 따르면, 패혈증의 진단이 높은 진단 정확도로 가능함을 나타낸다.
- [0059]
- [0060] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 샘플 플레이트를 이용하여 측정한 정상인, 패혈증환자, 패혈증환자 혈청의 질량분석결과와 비교예에 따른 LC-MS법을 이용하여 측정한 결과의 유사성 분석을 위한 블런트-알트만 플롯이다.
- [0061] 도 8을 참조하면, 비교되는 2 가지 방법에서 얻어진 결과를 분석한 결과는 ± 1.96 SD (표준편차) 이내에 존재하므로 2 가지 방법은 95% 신뢰도 구간에서 동일한 결과를 내어주는 것이라는 통계적인 판단이 가능하다. 즉, 샘플 플레이트를 이용하여 측정한 질량분석결과와 기존 LC-MS법을 이용하여 LPC 16:0에 해당하는 $m/z = 496.4$ 피크를 분석한 패혈증의 진단결과는 통계적으로 동일함을 보여준다.
- [0063] 진술한 것과 같이, 본 발명에서는 패혈증 환자의 진단에 사용가능한 샘플 플레이트 제공한다. 기존 질량분석 방법은 매트릭스에서 발생하는 노이즈로 인해 본 발명에서 패혈증 진단을 위해 측정하고자 하는 $m/z = 496.4$ 와 $m/z = 518.5$ 피크의 관찰이 어려운 문제를 본 발명의 실시예에 따른 샘플 플레이트를 이용하여 극복하였다. 또한, 상기 샘플 플레이트를 이용할 경우 상기 2 피크가 같은 선택적 이온화 경향을 이용하여 기존 액체크로마토그래피와 질량분석기 (LC-MS)의 측정 결과에 비해 높은 특이성과 선택성을 갖는 패혈증의 진단이 가능함이 시연

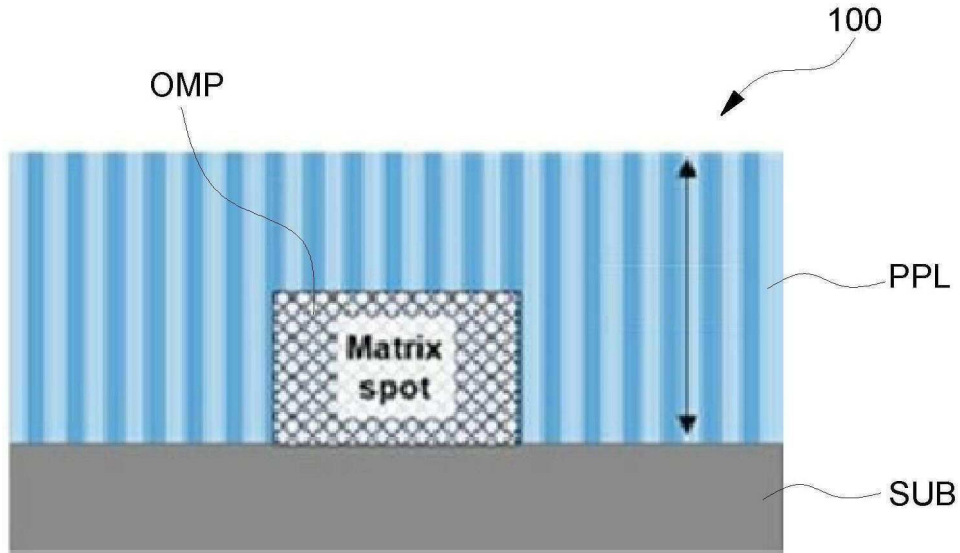
되었다.

[0065]

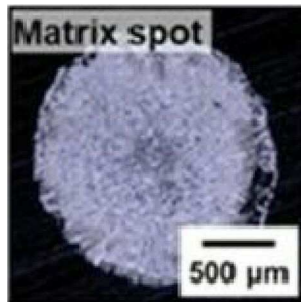
이상에서 설명한 본 발명이 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러가지 치환, 변형 및 변경이 가능하다는 것은, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

도면

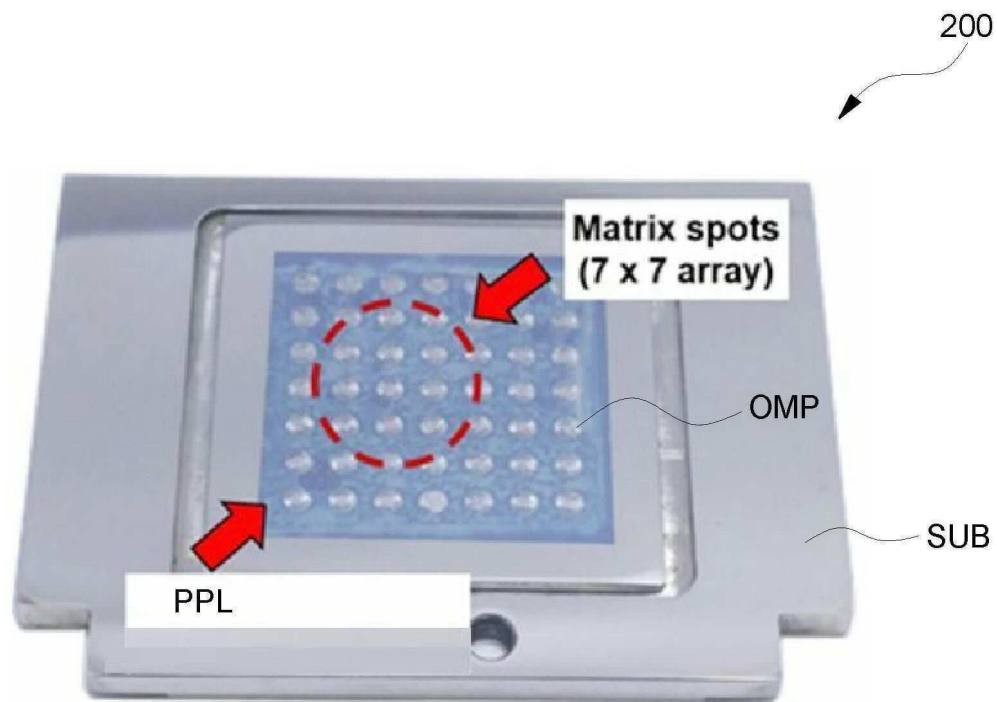
도면1a



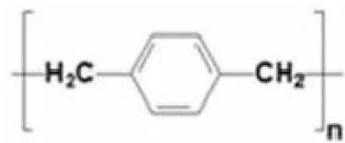
도면1b



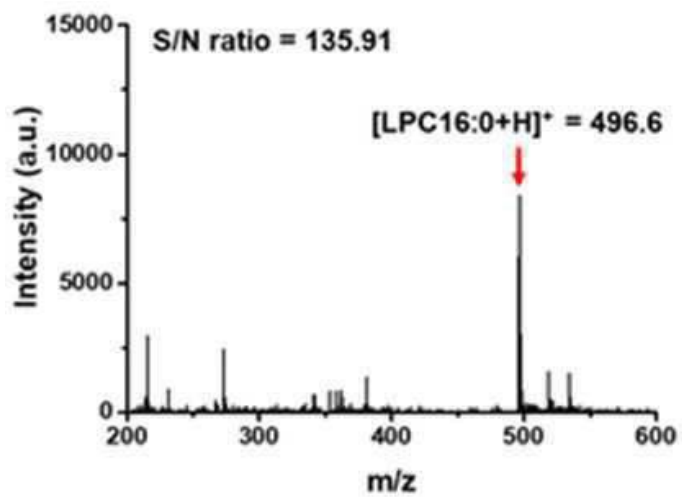
도면1c



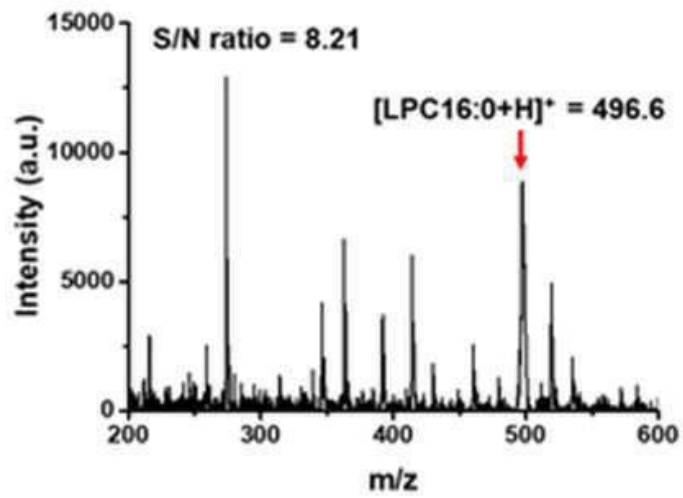
도면1d



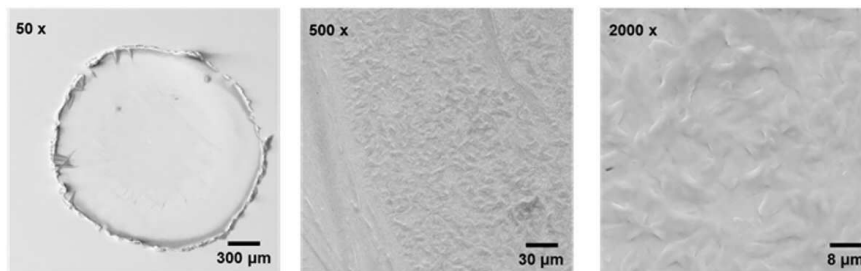
도면2a



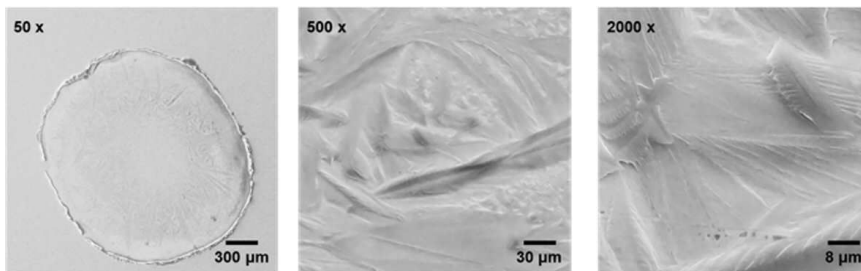
도면2b



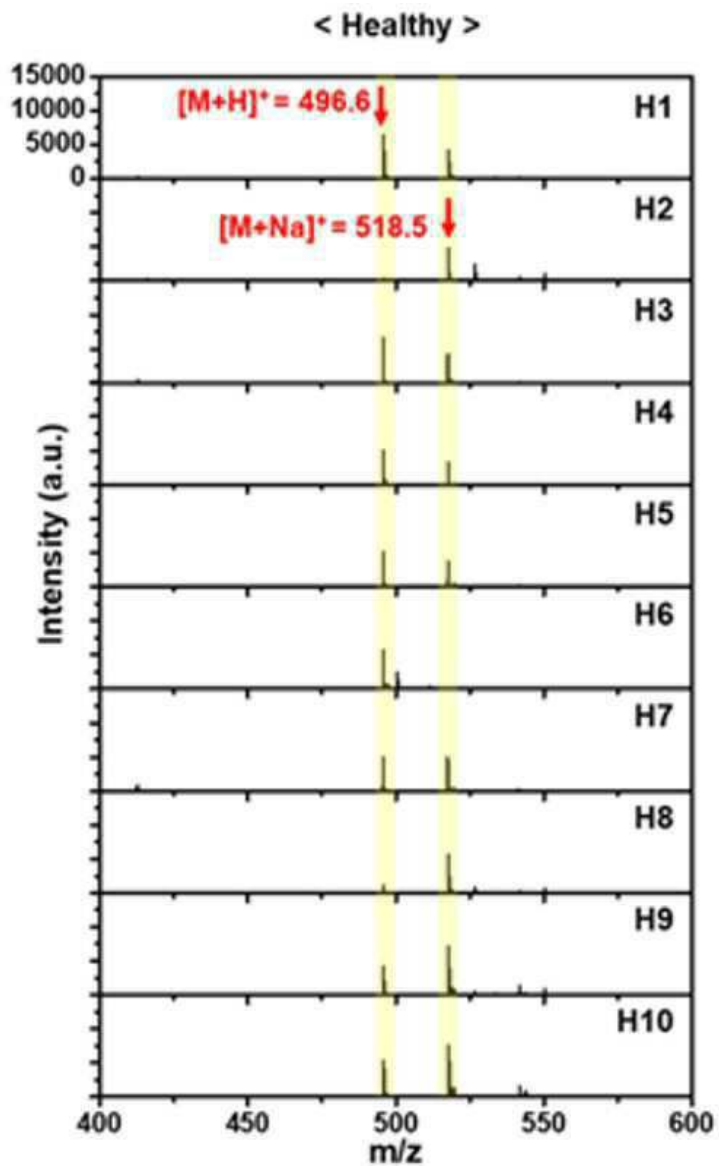
도면3a



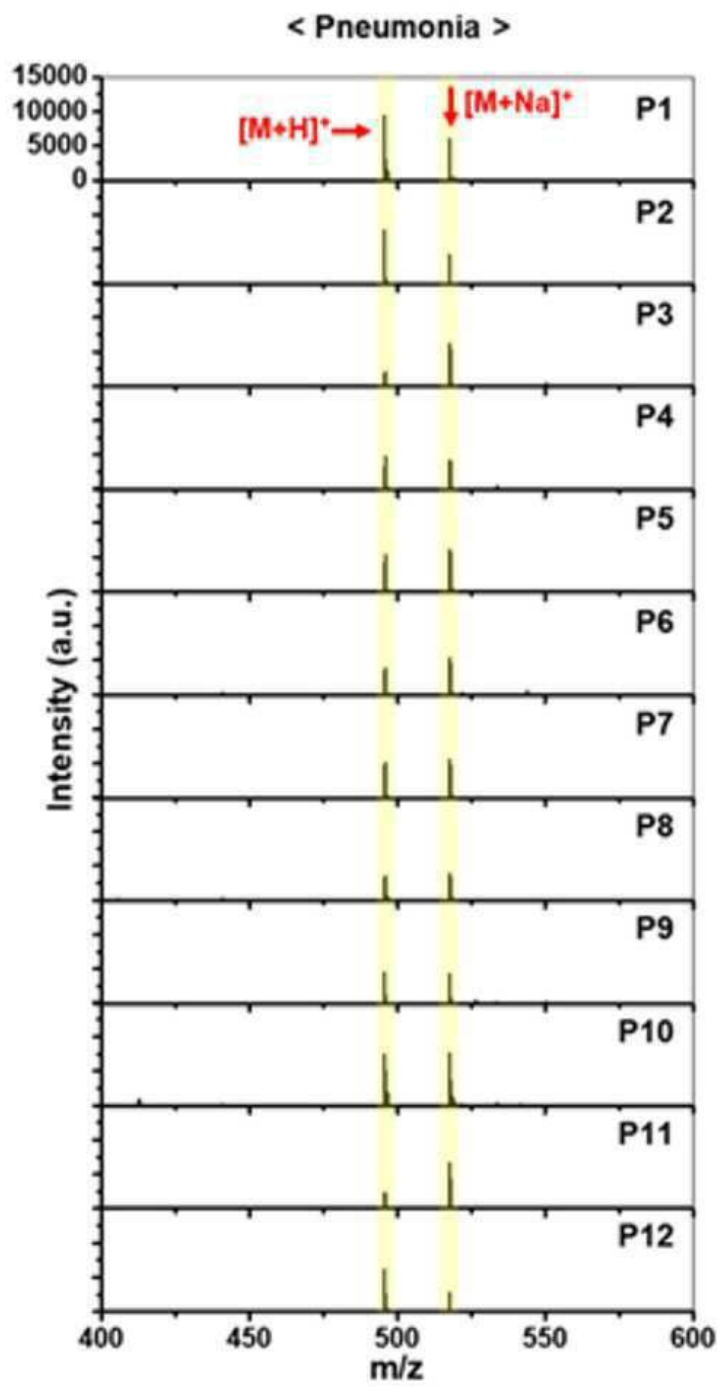
도면3b



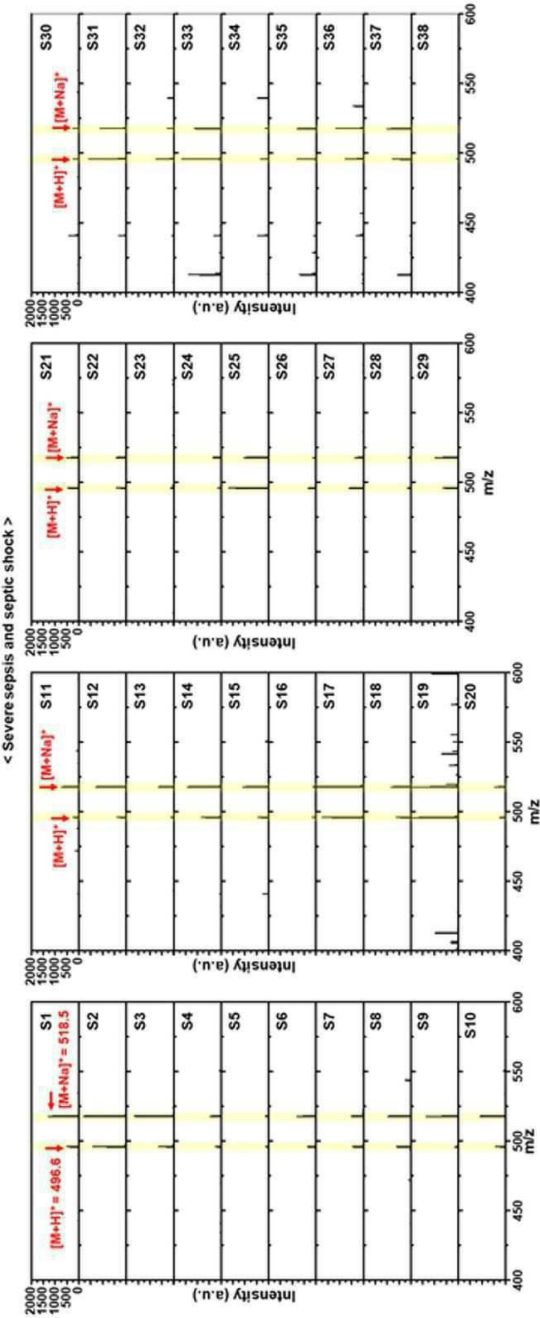
도면4a



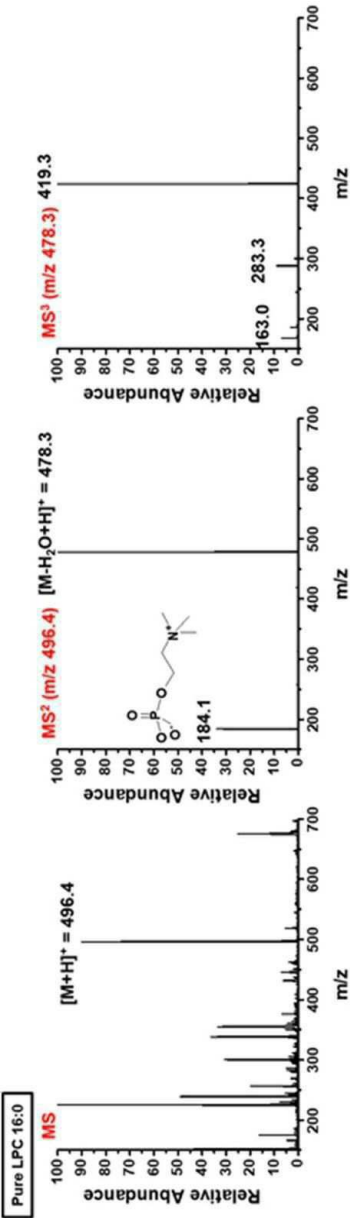
도면4b



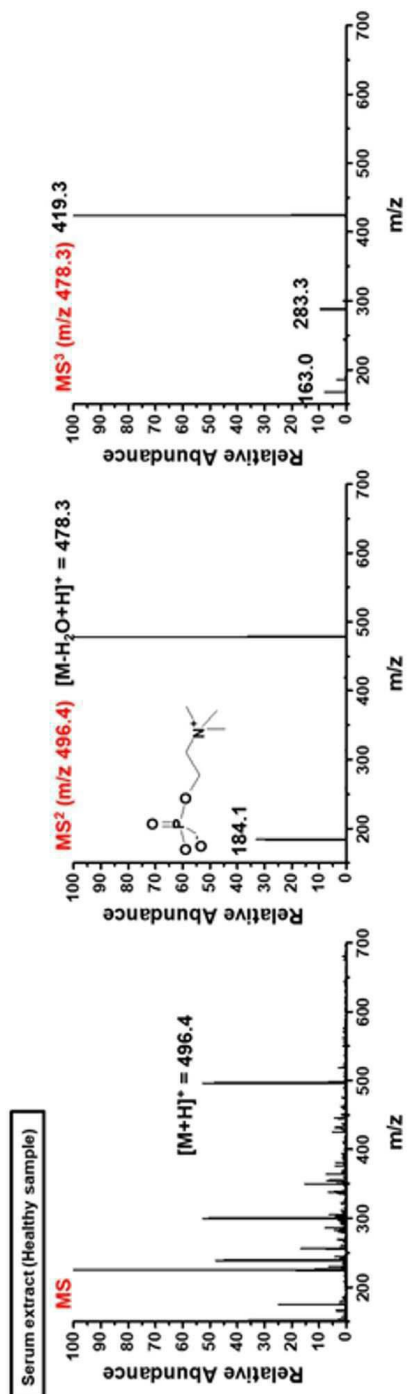
도면4c



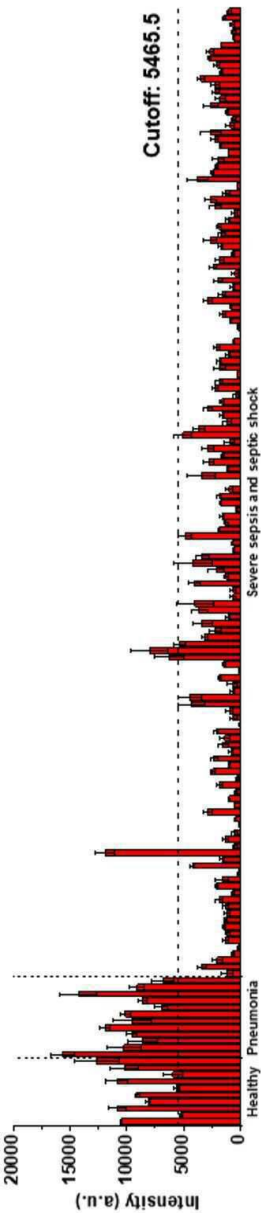
도면5a



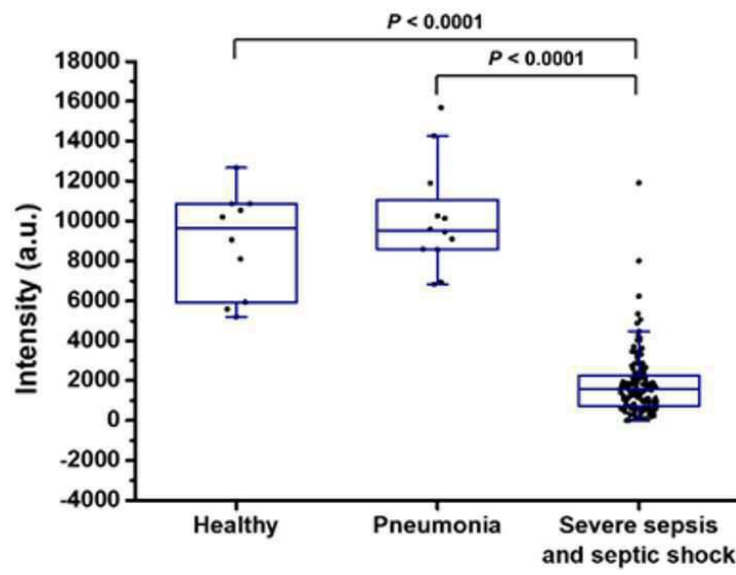
도면 5b



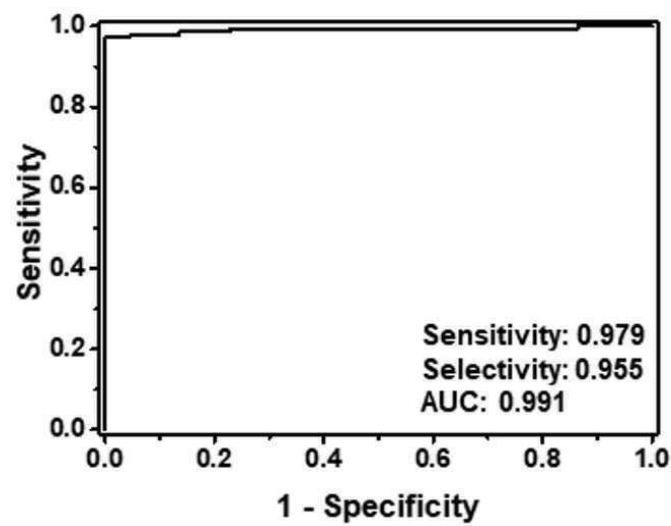
도면6a



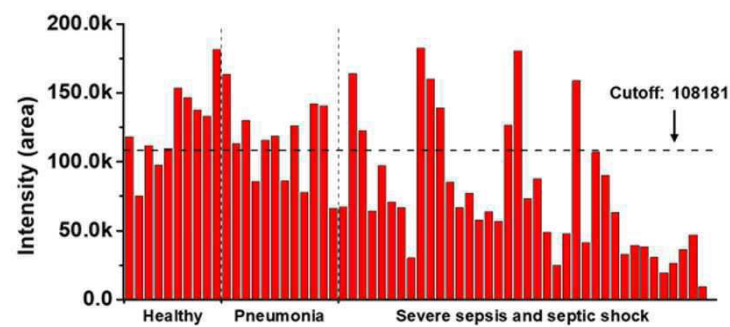
도면6b



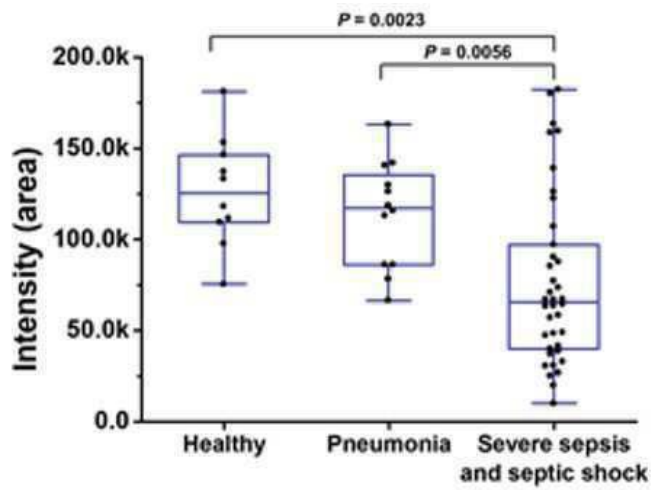
도면6c



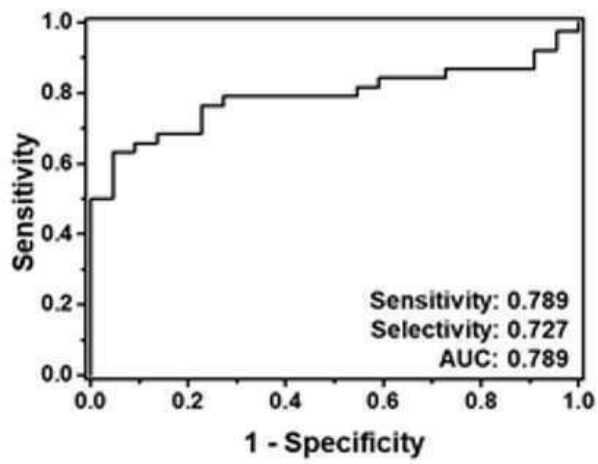
도면7a



도면7b



도면7c



도면8

