



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0023563
(43) 공개일자 2018년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/535 (2006.01) G01N 33/558 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/535 (2013.01)
G01N 33/558 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0109111
(22) 출원일자 2016년08월26일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
바디텍메드(주)
강원도 춘천시 동내면 거두단지1길 43 ()
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
박용범
서울특별시 서초구 명달로11길 29-3
최의열
강원도 춘천시 동면 만천로 242
(뒷면에 계속)

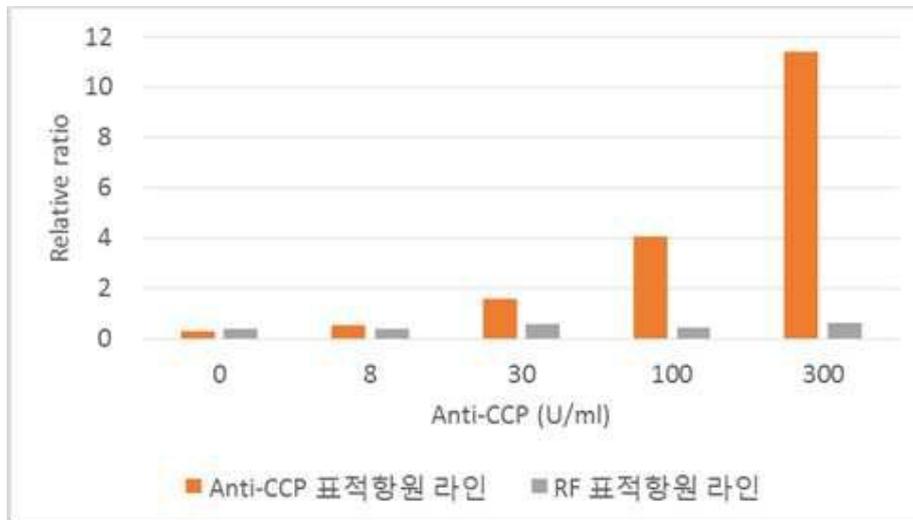
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **측방유동 면역 분석 기반의 항CCP 항체 및 류마티스인자를 이용한 류마티스 관절염 진단 방법**

(57) 요약

본원은 류마티스 관절염 진단을 위한 측방유동 면역 분석 기반의 항CCP 항체 및 류마티스인자를 이용한 류마티스 관절염 진단 방법을 개시한다. 본원에 따른 방법은 두 가지 마커의 동시 검출이 가능하여 보다 신속하고 정확한 진단을 가능하게 한다.

대표도 - 도5a



(52) CPC특허분류
G01N 2800/102 (2013.01)

이미숙
강원도 춘천시 우묵길78번길 25

(72) 발명자
주후돈
강원도 춘천시 춘주로 176-22

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI14C1324
부처명	보건복지부
연구관리전문기관	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료기술연구개발사업
연구과제명	글로벌 의료수요 해결을 위한 전략적 기술통합의 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축
기여율	1/1
주관기관	연세대학교 세브란스병원
연구기간	2016.02.01 ~ 2017.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

류마티스 관절염 진단이 필요한 대상체 유래의 시료를 제공하는 단계;

상기 시료를 항CCP 항체 및 류마티스인자 검출에 필요한 시약을 제공하는 단계;

상기 혼합물을 상기 항CCP 항체 및 류마티스인자 검출 물질을 포함하는 측방유동 스트립에 로딩하는 단계로 그 결과 상기 시료 중의 항CCP 항체 및 류마티스 인자와 각각의 검출 시약의 복합체가 형성되고; 상기 복합체를 검출하는 탐지 항체를 로딩하는 단계로, 그 결과 상기 복합체와 검출항체의 제2 복합체가 형성되고; 제2 복합체에서 방출하는 신호를 검출하는 단계를 포함하는 인비트로에서 측방유동 기반의 류마티스 관절염 마커의 동시 검출 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 시료는 전혈, 혈청 또는 혈장인, 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 검출은 정량 또는 정성 분석인, 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 시료의 양은 5 내지 20 마이크로리인, 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 측방유동 분석에 사용되는 스트립은 전혈패드를 포함하는 것인, 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 시료 및 항CCP 항체 및 류마티스인자 검출에 필요한 시약은 상기 스트립에 각각 로딩되는 것인, 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 항CCP 항체 및 상기 류마티스인자가 모두 양성 또는 두 가지 중 한가지가 양성인 경우, 고위험군 양성으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] POCT (Point of care test) 기반의 류마티스 관절염 진단 기술이다.

배경 기술

[0003] 류마티스 관절염(Rheumatoid Arthritis, RA)은 만성적 진행성 전신(progressive systemic) 염증질환으로 주로 여러 관절의 윤활막을 침범하여 뼈와 연골을 파괴시킨다. RA는 전세계 성인의 0.5%~1%에서 나타나며, 모든 인종 및 민족들에서 비슷하게 나타나지만 여성이 남성보다 2-3배 높은 빈도를 보인다. RA가 모든 연령에서 나타날 수 있지만 40-60세 사이의 연령에서 두드러지게 나타나는 질환이다.

[0004] RA의 진단에서는 누구나 인정할 수 있는 생화학적 지표나 병리소견, 영상소견 등의 소위 골드 스탠다드가 없기 때문에 여러 지표의 조합을 사용한 분류기준이라는 방법을 통하여 진단하게 된다. 류마티스 인자는 1987년 이후로 미국 류마티스학회 (American College of Rheumatology, ACR)에서 류마티스 진단에서 혈청학적 검사로 사용되고 있다. 류마티스 인자는 면역글로블린 IgG의 Fc 영역에 결합하는 자가항체이며, 류마티스 관절염 환자의 약 80%에서 증가되어 있지만, 관절염에 대한 특이도가 높지 않으며, 다른 자가 면역 질환이나 만성 염증, 악성종양, 건강한 노인에게서도 나타나는 단점이 있다. 류마티스 관절염 환자에서 발견되는 그 외의 자가 항체 들로는 RA33 및 Sa, p68, calpastatin, perinuclear factor 등에 대한 자가 항체가 존재하나 이들에 대한 혈청학적 검사는 아직 개발되어 있지 않다.

[0005] 미국 및 유럽 류마티스 학회는 2010년에 개정한 류마티스 진단 분류에서 혈청학적 검사로 항CCP항체 검사를 추가하였다. 항CCP (Cyclic Citrullinated Peptide) 항체는 시트룰린 잔기를 포함하는 항원결정기에 반응하는 자가항체로 항fillagrin 항체의 한 종류이다. 최근 류마티스 인자와 비슷한 민감도를 보이면서 더 우수한 특이도 (80~100%)를 가진 2세대 항CCP 항체가 개발되어 이용되고 있다. 항CCP항체는 높은 진단 특이도와 더불어 환자들의 기능적 상태와도 관련이 있으며, 조기 류마티스 관절염 환자에서 관절손상과도 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다.

[0007] 기존 방법은 다음과 같다.

[0008] 항CCP 항체 검사는 주로 microplate ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)와 자동화장비 이용한 검사법이 사용되고 있다. 측방유동 분석법으로 Euro-diagnosis사의 CCPpoint 제품의 rapid kit가 상용화되어 있다. Microplate ELISA 검사법은 CCP가 코팅된 플레이트에 시료를 희석하여 반응시킨 후 효소결합 항체를 반응시킴으로써 항CCP 항체를 검사한다. 자동화장비를 이용한 검사법은 chemiluminescent microparticle immunoassay, electrochemiluminescence immunoassay 방법들이 사용된다 (아래 표 참조).

[0009] <Microplate ELISA 분석법>

제조사	Incubation time (serum, conjugate, substrate), min	No. of calibrator	Conjugate	Substrate	Proposed cutoff
Axis-Shield Diagnostics	60; 30; 30	5	AP anti-human IgG	Phenolphthalein monophosphate (PMP)	5 U/ml
Euroimmune	60; 30; 30	5	AP anti-human IgG	TMB	5 U/ml
Imtec	60; 30; 25	5	HRP anti-human IgG	TMB	25 U/ml
Bio-Rad	60; 30; 30	6	AP anti-human IgG	Phenolphthalein monophosphate (PMP)	5 U/ml

[0010]

[0011] <자동화 분석법>

	Architect i2000	AxSYM	E411
Assay format	Chemiluminescent microparticle immunoassay	Microparticle enzyme immunoassay	Electrochemiluminescence immunoassay
Labelled substance	Acridinium	Alkaline phosphatase	Ruthenium
Measuring range (U/ml)	0.5-200	1-200	7-1000
Proposed cutoff	5	5	17

[0012]

[0014] 류마티스인자 검사법은 RF-IgM을 검사하는 정량법은 인간 혹은 동물의 IgG가 코팅된 particles (예, latex, sheep erythrocytes)의 응집반응을 주로 사용한다. Latex 응집법은 매우 민감한 방법이나 위양성이 높게 나타날 수 있으며, 정상인에서 비특이적 응집반응 또한 나타난다. 현재는 nephelometry/turbidimetry 분석법을 이용한 정량검사법이 가능한 자동화 분석법이 가장 널리 사용되고 있다 (아래표 참조).

[0015] <RF 검사법>

Test	Principle	Calculation	Isotype	Remarks
Latex agglutination	Latex beads coated with human gamma-globulin are agglutinated when mixed with serum sample containing RF	Semi-quantitative "antibody titer"	IgM	Suitable as a first-time screening test high number of false positives
Waalser-Rose test	Sheep red blood cells coated with rabbit antibodies are agglutinated after addition of a serum sample containing RF	Semi-quantitative "antibody titer"	IgM	For confirmation of latex agglutination test, historical test
Turbidimetry	Turbidity due to the formation of immune complexes of heat-aggregated IgG and RF in a sample is measured photometrically	Quantitative	IgM	Presence of IgG or IgA RF may lead to poor agglutination, false negative
Nephelometry	Cloudiness caused by the interaction of heat aggregated human IgG with RF in the sample is measured by light scattering	Quantitative	IgM	Presence of IgG or IgA RF may lead to poor agglutination, false negative
ELISA	IgM-, IgG- or IgA-RF present in the serum sample binds to human IgG immobilized on a microtiter plate to form antigen-antibody complexes. Enzyme-conjugated anti-human IgM, IgG, IgA is added and binds to the antigen-antibody complex. Bound enzyme conjugate begins a hydrolytic reaction causing color development, which is measured photometrically.	Quantitative	IgM, IgG, IgA	Greater sensitivity and measuring IgG RF and IgA RF in addition to IgM RF common laboratory method, easy to perform, automation possible

[0016]

[0017] 류마티스 관절염은 그 원인이 분명하지 않으며, 유전적, 환경적 및 기회적 요인 등이 관련되어 있는 것으로 생각되며, 확실하게 진단하는 방법은 현재까지 없으며, 특히 분자수준에서 두 가지이상의 마커 검출이 가능한 POCT (point of care treatment)기반의 검출방법은 현재까지 개발되지 않았다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본원은 류마티스 질환을 진단하기 위해 항CCP 항체와 류마티스 인자를 단일 키트에서 동시에 정량할 수 있는 측방유동기반의 인비트로 형광 면역분석방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0021] 본원은 측방유동 방식 기반의 항CCP 항체 및 류마티스인자를 이용한 류마티스 관절염 진단 방법 및 상기 방법에 사용되는 키트, 및 시스템을 제공한다.

[0022] 한 양태에서 본원은 류마티스 관절염 진단이 필요한 대상체 유래의 시료를 제공하는 단계; 상기 시료를 항CCP 항체 및 류마티스인자 검출 시약을 포함하는 측방유동 스트립에 로딩하는 단계로 그 결과 상기 시료 중의 항CCP 항체 및 류마티스 인자와 각각의 검출 시약의 복합체가 형성되고, 이어, 상기 복합체를 검출하는 탐지 항체를 로딩하는 단계로, 그 결과 상기 복합체와 검출항체의 제2 복합체가 형성되고, 이어 제2 복합체에서 방출하는 신호를 검출하는 단계를 포함하는 인비트로에서 측방유동 기반의 류마티스관절염 마커의 검출 방법을 제공한다.

[0023] 본원에 따른 일 구현예에서 상기 시료는 전혈, 혈청 또는 혈장이다.

[0024] 본원에 따른 일 구현예에서 상기 검출은 정량 또는 정성 분석이다.

[0025] 본원에 따른 검출방법은 류마티스 관절염의 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본원은 류마티스 관절염 진단을 위한 측방유동 면역 분석 기반의 항CCP 항체 및 류마티스인자를 이용한 류마티스 관절염 진단 방법을 개시한다. 본원에 따른 방법은 두 가지 마커의 동시 검출이 가능하여 보다 신속하고 정확한 진단을 가능하게 한다. 특히 측방 유동 방식의 검출 기술을 사용하여 신속한 것은 물론 정확한 정량을 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본원의 일 구현예에 따른 측방유동 시스템에 사용되는 스트립을 도식적으로 나타낸 것이다.

도 2는 본원에 따른 스트립이 장착되어 사용되는 카트리지 하우징을 도식적으로 나타낸 것이다.

도 3은 3 RA 확진 환자 혈청 (n=44)과 건강한 사람의 혈청 (n=32)을 시료로 사용하여 anti-CCP를 본원에 따른 방법으로 정량한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 RA 확진 환자 혈청 (n=46)과 건강한 사람의 혈청 (n=44)을 시료로 사용하여 RF IgM을 본원에 따른 방법으로 정량한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 항-CCP항체와 RF IgM을 검사하기 위한 포획물질이 스트립의 test line 1과 2에 고정된 단일 스트립에서 항CCP 항체 표준물질을 분석한 결과로, 도 5a 및 5b는 각각 표준물질에 대한 반응성 및 표준곡선 분석 결과이다. 이에 나타난 바와 같이 test 1 라인에서의 항-CCP 항체 표준물질에 대한 형광을 정량하여 표준그래프를 작성한 결과 표준물질의 농도에 의존적으로 증가하는 패턴을 보였으며, test 2 라인에서의 RF 표적인자와의 반응성은 0.6 이하로 반응성의 차이를 보이지 않았다. 이를 바탕으로 표준정량곡선의 curve fitting을 한 결과는 도 5b에서 보이는 바와 같이 상관성 r-sq. >0.99를 나타냈다.

도 6은 항-CCP항체와 RF IgM을 검사하기 위한 포획물질이 스트립의 test line 1과 2에 고정된 단일 스트립에서 RF 표준물질을 분석한 결과로, 도 6a 및 6b는 각각 표준물질에 대한 반응성 및 표준곡선 분석 결과이다. 이에 나타난 바와 같이 test 1 라인에서의 RF 표준물질에 대한 형광의 정량값은 test 1/control ratio 0.7 이하로 반응성의 차이는 없었다. 반면 test 2 라인에서의 RF 표적인자와의 반응성은 표준물질에 따라 반응성 증가패턴을 보였다. 이를 바탕으로 표준정량곡선의 curve fitting을 한 결과는 도 6b에서 보이는 바와 같이 상관성 r-sq. >0.99를 나타냈다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본원은 측방유동 분석을 이용한 인비트로에서 류마티스 관절염 마커의 검출 방법에 관한 것이다.

[0030] 본원에 따른 방법에 채용되는 마커는 항CCP 항체와 류마토이드 인자 (RF)이다. 본원 도 3에 나타난 바와 같이 상기 마커는 류마티스 관절염 환자에서 그 발현이 증가한 것으로 나타났다.

[0031] 본원에서 류마티스 관절염은 만성적 진행형 전신 자가면역 질환으로, 노화로 인해 주로 연골손상을 특징으로 하는 비염증성 만성관절염인 퇴행성관절염과는 구분된다.

[0032] 류마티스 관절염은 그 원인이 분명하지 않으며, 유전적, 환경적 및 기회적 요인 등이 관련되어 있는 것으로 생각되며, 확실하게 진단하는 방법은 현재까지 없으며, 특히 분자수준에서 마커 검출이 가능한 POCT (point of care treatment)기반의 검출방법은 현재까지 개발되지 않았다.

[0033] 본원에서는 류마티스 관절염 마커로서 항CCP 항체 및 류마토이드 인자를 동시에 정량 및 정성적 수준에서 검출이 가능한 방법이다.

[0034] 본원에 따른 방법에 사용되는 생물학적 시료는 전혈, 혈장 또는 혈청을 포함하나, 상기 마커의 검출이 가능한 것이라면 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0035] 본원에 따른 일 구현예에서는 혈장 또는 혈청이 사용된다.

- [0036] 본원에 따른 방법에서 마커는 상기 크로마토그래피 분석, 특히 측방유동분석을 통해 검출된다.
- [0037] 측방유동 분석은 시료에 포함된 목표 분석물, 예를 들면 특정 핵산 또는 단백질을 정량 또는 정성적으로 검사하는 방법으로, 예를 들면 일정한 서열의 핵산에 교잡하는 올리고뉴클레오타이드 또는 특정 항체 및/또는 항원이 특정 위치에 결합되어 있는 나이트로셀룰로스 막(전개용 매질)을 포함하는 스트립이 이용된다. 스트립은 크로마토그래피 방법으로 시료를 이동시켜 서열 특이적 교잡반응 또는 항원 항체 반응을 통해 시료 중의 특정 핵산 또는 단백질의 검출에 사용된다. 예를 들면 대한민국 공개 특허공보 제2003-0065341호, 제2011-0007699호, 제2011-0127386호, 및 등록공보 제1149357호 등에 기재된 것을 참조할 수 있다.
- [0038] 본원에 따른 일 구현예에서 스트립은 도 1을 참조로 설명하면, 프리패드, 샘플분리 패드, 전개용 매질, 및 흡수 패드를 포함하며, 이들은 지지대 상에 위치한다. 상기 프리패드 및 흡수패드는 서로 겹치거나 또는 서로 겹치지 않도록 상기 지지대의 양 단부에 각 각 위치되어 있으며, 상기 전개용 매질은 상기 샘플분리 패드 및 상기 흡수 패드의 사이에 위치하고, 상기 전개용 매질의 양 단부는 각 각 상기 흡수 패드의 한 단부 및 상기 샘플 분리 패드의 한 단부와 접해 있으며, 상기 전개용 매질 (test line)에는 류마티스 관절염 마커인 항CCP 항체 및 류마티스 인자를 포획할 수 있는 포획자가 부착되어 있다. 시료가 전개되면 시료 중의 항CCP 항체 및 류마티스 인자 상기 포획자에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하고 상기 복합체는 형광물질로 표시된 탐지항체에 의해 검출된다.
- [0039] 측방유동분석을 위해서는 상술한 바와 같이 시료를 전개시키고, 반응물을 검출하는 스트립과 상기 스트립이 장착되는 하우징 또는 카트리지를 포함할 수 있다.
- [0040] 도 2를 참조하면, 측방유동 분석용 카트리지는 통상 베이스 부재; 및 상기 베이스 부재와 체결되는 커버 부재를 포함하고, 상기 베이스 부재는, 상기 측방유동 분석에 사용되는 스트립을 수용하는 스트립 수용부를 포함하며, 상기 커버 부재는 상기 베이스 부재와 체결시, 상기 스트립 수용부와 대응되는 부분에 형성된 측정창 및 탐지항체 도입구 및 선택적으로 시료 도입구를 포함한다.
- [0041] 본원에 따른 류마티스 관절염 마커의 검출을 위한 측방유동 분석은 다음과 같은 특징을 갖는다. 스트립에 컨주게이션 패드를 사용하지 않고, 전혈시료의 사용이 가능하면, 이를 위해 스트립에 전혈패드 (또는 샘플 분리패드) 또는 일반패드를 접합한 접합패드가 사용된다. 또한 분석적 감도 향상을 위해 단일 스트립 상에 시료와 탐지항체가 별도로 적하되며 하우징에 이에 상응하는 도입구가 형성되어 있다. 분석에 필요한 시료는 전혈, 혈장, 혈청이 가능하며 사용가능한 양은 최대 20ul, 최소 5ul 사용이 가능하다. 정량이 가능하며, 형광으로 표시된 탐지항체를 사용하며, 형광신호는 레이저 유발 표면 형광 검출장치를 통해 검출하고 정량을 한다.
- [0043] **실시예**
- [0044] **실시예 1: 항CCP항체와 IgM-RF를 동시 검출 측방유동 분석**
- [0045] 본 방법은 항CCP항체와 IgM-RF를 동시 검사하는 측방유동 형광 면역분석법이다. 이 방법은 분석시료 (전혈, 혈장, 혈청)내 존재하는 자가항체가 2개의 capture line에 있는 IgG의 Fc 부분과 anti-human IgG와 결합하도록 설계되었다. 이 방법은 추가 세척과정을 거치지 않으며, 15분내에 반응이 종료되어 레이저 유발 표면형광 검출기를 이용하여 탐지항체-항CCP항체와 결합할 수 있는 CCP conjugator와 anti-human IgM-와 결합된 형광체의 형광 양을 정량화하였다.
- [0046] RF를 검사하기 위해 NC (HF90, HF135 & HF180) 막에 포획항원으로 면역글로블린 G의 Fc를 고정하며, 탐지항체로 anti-human IgM과 형광체를 결합하여 사용하였다.
- [0047] 항CCP항체를 검사하기 위해 포획항원은 (특허 EP 1 456 662 B1, EP 2 058 663 A1)에 사용된 펩타이드를 2중~4종을 혼합하여 사용하였으며, 탐지항체는 항인간항체의 면역글로블린 G를 사용하였다. NC 막에 anti-human IgG를 고정하고, 탐지항체로 cyclic citrullinated peptide와 Biotin, 혹은 BSA를 포함한 고분자 단백질을 conjugation 후 형광체를 결합시켜 사용하였다. 카트리지의 시료 도입구에 RA 환자의 혈청, 혈장 혹은 전혈을 도입한 직후에 탐지항체를 포함한 버퍼용액을 탐지항체 도입구에 도입 후 12분간 측방유동 면역반응을 진행하였다. 이어 레이저 유발 표면형광 검출기를 이용하여 형광 양을 정량화하였다.
- [0048] 결과는 도 3 내지 도 6 및 표 1 내지 표 3에 기재되어 있다.
- [0049] 시료도입구가 탐지항체를 포함하는 버퍼용액 도입구와 분리된 경우와 분리되어 있지 않은 각각의 하우징을 이용

하여 감도를 비교하였다. 그 결과 분리된 하우징을 사용할 경우, 혈청 시료 5ul를 적하 후 바로 버퍼를 100ul를 적하하였다. 분리되지 않은 하우징을 사용할 경우 시료 5ul와 버퍼 100ul를 섞은 후 100ul를 적하하였다. 각각 12분 경과 후 test, control 라인에서의 형광체의 양을 분석 후 test/control의 ratio를 구하였으며, 음성 시료의 ratio 값 평균+3SD를 기준으로 하였을 때 양성시료의 양성판정률 (%)을 확인하였다.

[0050] 결과는 표 1에 기재되어 있다. 시료도입구가 따로 분리 되어있지 않은 경우에 있어서 anti-CCP 검사 민감도 차이를 분석하였을 때, 건강인 혈청수 25개와 류마티스 환자 혈청수 31개, 총 56개의 혈청시료에서의 민감도는 시료도입구가 없는 경우보다 있는 경우 12%의 감도 향상 효과가 있었다.

[0051] [표 1]

총시료수 (N)=56	시료도입구	
	무	유
% 특이도 (N=25)	100% (N=25)	100% (N=25)
% 민감도 (N=31)	65%(N=20)	77% (N=24)

[0052]

[0053] 또한 분석 가능한 시료양의 검증을 위해 최대 40ul에서 최소 3ul까지 anti-CCP 양/음성 control을 적용한 결과 아래 표 2에 나타난 바와 같이 최소 5ul, 최대 20ul를 사용할 경우 양/음성 control ratio의 차이가 6배 이상, 재현성 10% 이내를 유지할 수 있음을 확인하였다.

[0054] [표 2]

시료양	Relative ratio of pos vs. neg	재현성 (% CV)
40ul	2.1	26.4
30ul	3.6	17.3
20ul	6.8	8.3
10ul	7.4	5.1
5ul	7.9	2.3
4ul	3.4	34.2
3ul	2.1	28.9

[0055]

시료양 (혈청/전혈)	혈청 (음성 대비 양성시료의 ratio 비율 / %CV)	전혈 (음성 대비 양성시료의 ratio 비율 / %CV)
40ul	2.1/26.4	1.2/31.5
30ul	3.6/17.3	3.9/22.9
20ul	6.8/8.3	6.5/14.3
10ul	7.4/5.1	6.9/14.1
5ul	7.9/2.3	3.5/30.8
4ul	3.4/34.2	-
3ul	2.1/28.9	-

[0056]

[0057] 또한 RA 확진 환자 혈청 (n=44)과 건강인 혈청 (n=32)을 아이크로마 Anti-CCP를 정량화하였다. 시료 5ul를 시료도입구에 적하 후 바로 버퍼용액을 100ul를 적하하여 12분 경과 후 test/control 라인에서의 형광양을 정량하여 ratio를 구하고 음성 시료의 ratio 값 평균+3SD를 기준으로 하였을 때 양성시료의 양성판정률 (%)을 확인하였다. 결과는 도 3 및 아래 표 3과 같이 임상적 민감도와 특이도를 확인한 결과 특이도 97%, 민감도 80% 결과를 나타냈다.

[0058] [표 3]

		아이크로마 anti-CCP		
		pos	neg	Total
Diagnosis	RA	35	9	44
	non-RA	1	31	32
	Total	36	40	76
% specificity		97		
% sensitivity		80		

[0059]

[0060]

또한 RA 확진환자 혈청 (n=46)과 건강인 혈청 (n=44)을 아이크로마 RF IgM을 정량화하였다. 시료 5ul를 시료도 입구에 적하 후 바로 버퍼용액을 100ul를 적하하여 5분 경과 후 test/control 라인에서의 형광양을 정량하여 ratio를 구하고 음성 시료의 ratio 값 평균+3SD를 기준으로 하였을 때 양성시료의 양성판정률 (%)을 확인하였다. 결과는 도 4 및 아래 표 4와 같이 민감도와 특이도를 확인한 결과 특이도 70%, 민감도 85% 결과를 나타냈다.

[0061]

[표 4]

		아이크로마 anti-CCP		
		pos	neg	Total
Diagnosis	RA	39	5	46
	non-RA	13	31	44
	Total	52	36	90
% specificity		70		
% sensitivity		85		

[0062]

[0064]

또한 항CCP항체와 RF IgM을 검사하기 위한 포획물질을 test line 1과 2에 고정된 단일 키트내에서 항CCP 항체 표준물질을 분석하였다. 결과는 도 5에 기재되어 있다. 표준물질에 대한 반응성 분석 (a) 및 표준곡선 분석 (b)에서 test 1 라인에서의 항CCP 항체 표준물질에 대한 형광의 정량값은 표준물질에 따라 반응 의존적으로 증가하는 패턴을 보였으며, test 2 라인에서의 RF 표적인자와의 반응성은 0.6이하로 반응성의 차이를 보이지 않았다. 이를 바탕으로 표준정량곡선의 curve fitting 을 한 결과는 (b)에서 보이는 바와 같이 상관성 r-sq. >0.99 를 나타냈다.

[0065]

아울러, 항CCP항체와 RF IgM을 검사하기 위한 포획물질을 test line 1과 2에 고정된 단일 키트내에서 RF 표준 물질을 분석하였다. 결과는 도 6에 기재되어 있다. 표준물질에 대한 반응성 분석 (a) 및 표준곡선 분석 (b)에서 test 1 라인에서의 RF 표준물질에 대한 형광의 정량값은 test 1/control ratio 0.7 이하로 반응성의 차이는 없었다. 반면 test 2 라인에서의 RF 표적인자와의 반응성은 표준물질에 따라 반응성 증가패턴을 보였다. 이를 바탕으로 표준정량곡선의 curve fitting 을 한 결과는 (b)에서 보이는 바와 같이 상관성 r-sq. >0.99를 나타냈다.

[0067]

실시예 2. 동시검사 카트리지에서 환자검체의 검사

[0068]

NC (HF90, HF135 & HF180) 막에 포획항원으로 항인간항체의 면역글로블린 G (1mg/ml)를 test line 1, 면역글로블린 G의 Fc (1mg/ml)를 test line 2에 고정하였다. 고정화된 포획항원은 최대 3mg/ml까지 사용할 수 있다.

[0069]

항CCP항체의 탐지물질은 biotin이 conjugation 되어 있는 CCP 펩타이드를 형광체가 결합된 스트렙타비딘 (streptavidin)와 37도에서 2시간 반응시킨 복합체를 1~4ug/ml로 사용하였다. Biotin과 streptavidin의 반응 비율은 molar ratio를 1:2~1:10까지 사용할 수 있다. 이때 검출을 위한 표지자는 효소, 골드입자 등이 사용 가능하며 형광으로 국한되지는 않는다.

[0070]

RF 탐지항체는 anti-human IgM을 형광체가 결합시켜 사용 (2ug/ml) 하였으며, 4ug/ml 까지 사용할 수 있다. 이

때 검출을 위한 표지자는 효소, 골드입자 등이 사용 가능하며 형광으로 국한되지는 않는다.

- [0071] 시료는 건강인 혈청수 20개와 류마티스 환자 혈청수 30개, 총 50개의 혈청시료를 사용하였다
- [0072] 각 도입구가 분리된 경우의 카트리지에서는 환자 혈청을 5ul 적하 후 전개용액 도입구에 탐지항체를 포함한 용액 100ul를 적하하여 12분 경과 후 형광 양을 정량화하였다.
- [0073] Test1, test 2, control 라인에서의 형광양을 정량하여 ratio를 구하고 음성시료의 ratio 값의 평균+2SD를 기준으로 판정하였다.
- [0074] 동일 검체내에서 동시검사를 통한 양성판정률을 분석한 결과 항CCP항체 검사와 RF IgM 검사 모두에서 양성 판정된 검체 수는 16 검체로 나타났으며, 각 검사별 양성판정 검체수는 항CCP항체 검사에서 5 검체, RF 검사에서 4 검체로 나타났다. 따라서 총 30검체 중 양성 판정 검체 수는 25검체로 양성판정률은 83.3%로 나타났다. 이는 항CCP항체 검사만에서의 양성판정률은 70%, RF 검사만으로 66.7%로 판정된 결과보다 양성 진단 확률을 높인 결과로서 동시검사가 단일검사에 비하여 RA 환자를 신속하게 스크린 검사하는데 효과적임을 예측할 수 있다. 또한 2010년의 류마티스 관절염의 진단기준에 따라 위험환자를 판정하는데 적합하다고 할 수 있다.
- [0075] 한편, 음성판정률을 분석한 결과, 각 검사별 음성판정 검체수는 항CCP항체 검사에서 1 검체, RF 검사에서 7 검체로 나타났으며, 항CCP항체 검사와 RF IgM 검사 모두에서 음성 판정된 검체 수는 12 검체로 나타났다. 따라서 총 20검체 중 음성 판정 검체 수는 12검체로 음성 판정률은 60.0%로 나타났다. 그러나 이는 2010년 류마티스 관절염 진단기준에 따라 두가지 항목의 결과값이 동시에 제공되므로 위험도를 판정할 수 있고, 의심환자에서 스크린검사로서 사용되는 경우 높은 민감도가 중요하므로 진단적으로 제공되는 효과로 충분한 수준이다.
- [0076] 따라서 본 발명의 동시검사법은 RF와 항CCP항체 검사의 양/음성 결과를 동시에 제시함으로써, 2010년 류마티스 관절염 환자의 진단 가이드라인에서 요구되는 두가지 항목의 결과를 높은 양성검출률로 신속하게 제공함으로써 환자 위험도를 쉽게 판단할 수 있도록 하여 신속한 진단, 치료를 유도할 수 있다.

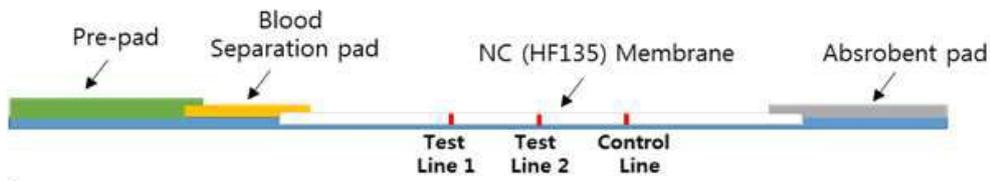
[표 5]

	항CCP항체	RF IgM	n	판정
RA	+	+	16	positive
	+	-	5	positive
	-	+	4	positive
	-	-	5	false negative
양성판정률 (%)	83.3			
	항 CCP 항체	RF IgM	n	판정
Healthy	-	-	12	negative
	-	+	7	false positive
	+	-	0	false positive
	+	+	1	false positive
음성판정률 (%)	60.0			

[0078]

도면

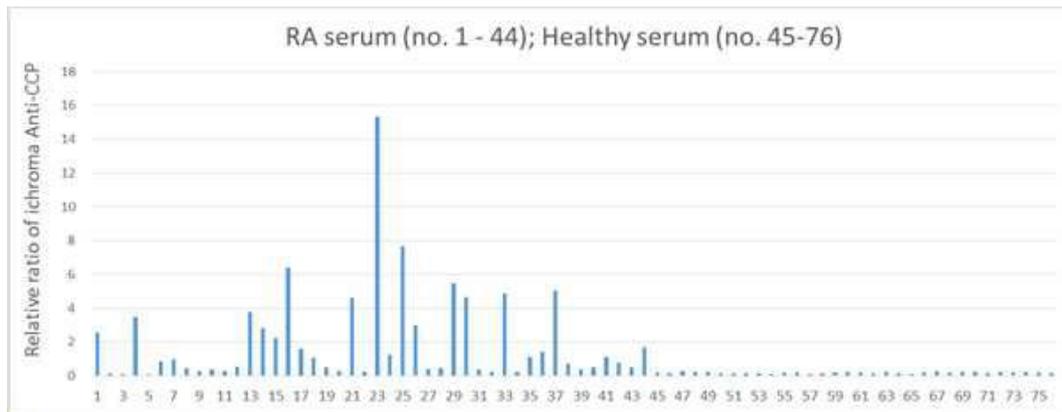
도면1



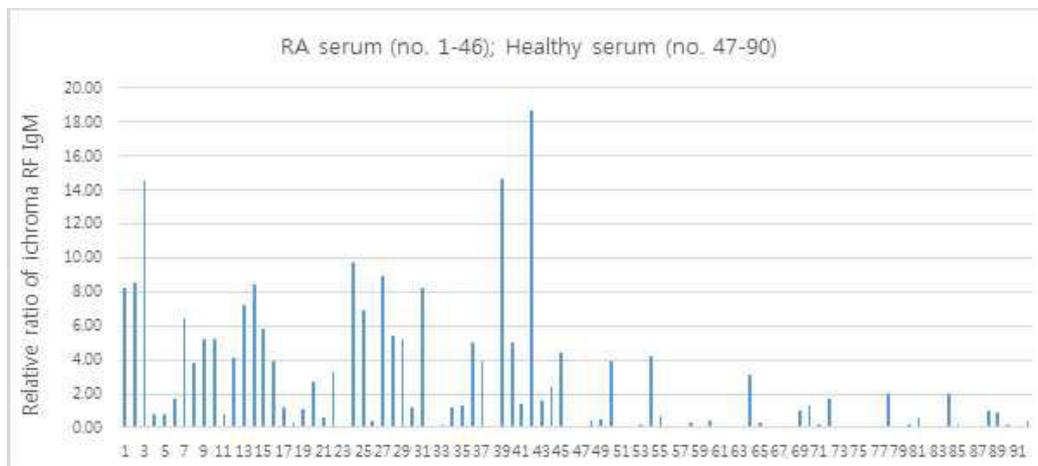
도면2



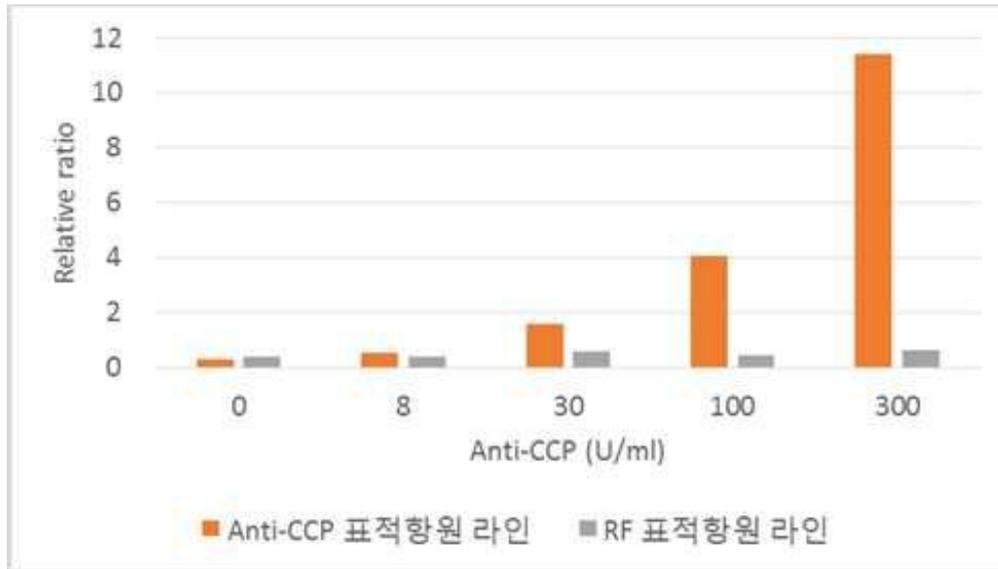
도면3



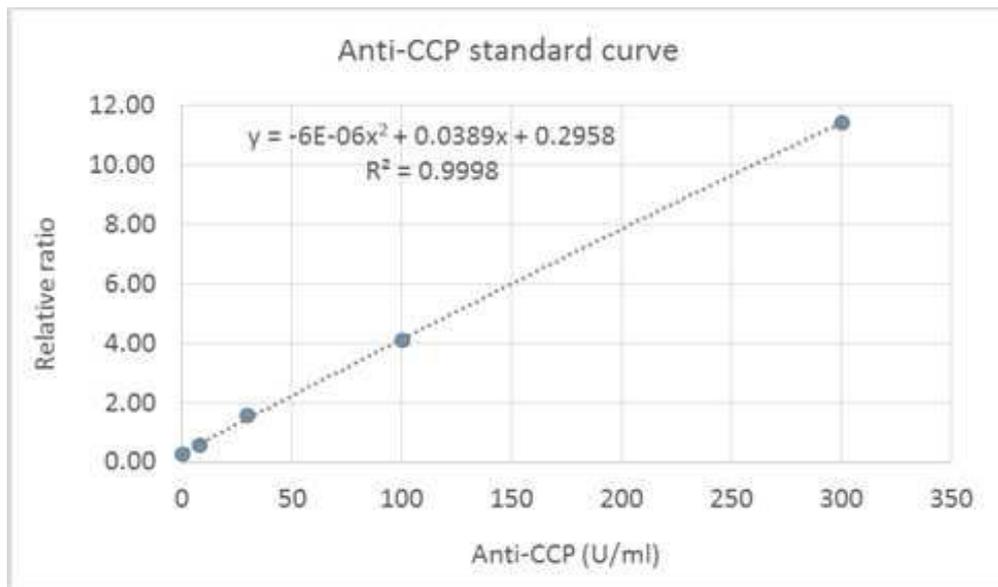
도면4



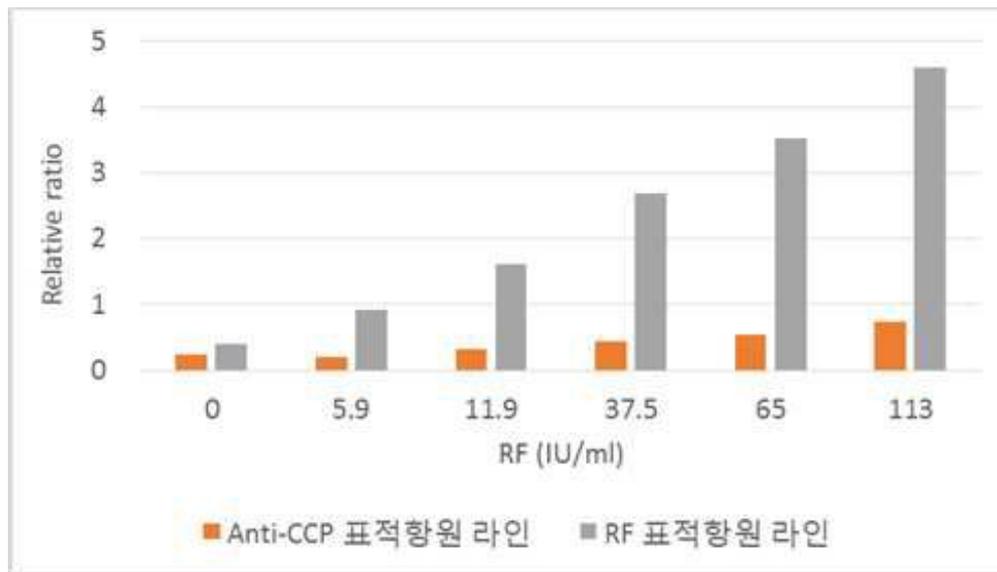
도면5a



도면5b



도면6a



도면6b

