



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0151293
(43) 공개일자 2021년12월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/545 (2006.01) C08G 61/12 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/545 (2013.01)
C08G 61/126 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0067724
(22) 출원일자 2020년06월04일
심사청구일자 2020년06월04일
- (71) 출원인
창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 창원대학교 20(퇴촌동)
- (72) 발명자
이용일
경상남도 창원시 의창구 중동로 78, 402동 2701호(중동, 창원중동유니시티4단지)
- (74) 대리인
김정수

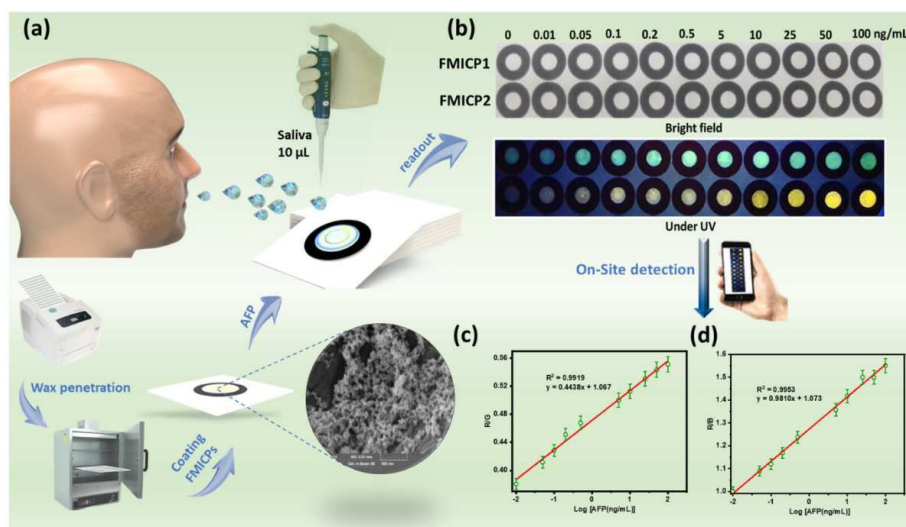
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 바이오마커 검출용 형광분자각인 고분자 및 이를 이용한 검출시스템

(57) 요약

본 발명은 분자각인 중합체 조성물 및 이를 이용한 바이오마커 검출에 관한 것으로, 본 발명의 콘쥬게이트된 싸이오펜 중합체 나노 입자는 우수하고 안정적인 형광 특성을 가지며 바이오마커 검출을 위해 효소나 항체가 요구되지 않으며 종이 기반의 진단 플랫폼으로 이용할 수 있으므로 저렴한 비용, 휴대성 및 사용 용이성이 우수하다. 또한 상기 중합체를 나노 섬유 형태로 이용하는 경우 검출 한도가 매우 낮으므로 정밀한 진단도 가능하므로 암을 비롯한 다양한 질환의 진단에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5a



(52) CPC특허분류

G01N 33/54346 (2013.01)
G01N 33/57473 (2013.01)
G01N 33/57476 (2013.01)
C08G 2261/1422 (2013.01)
C08G 2261/1424 (2013.01)
C08G 2261/1426 (2013.01)
C08G 2261/3223 (2013.01)
C08G 2261/3243 (2013.01)
G01N 2600/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2020R1A2C2007028
과제번호	NRF-2020R1A2C2007028
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구사업
연구과제명	다중 암 바이오마커의 초감도 동시 검출을 위한 새로운 다기능성 종이기반 분석디바이스의 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	창원대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

콘쥬게이트된 싸이오펜 중합체 및 봉산화합물을 포함하는, 분자각인 중합체 조성물.

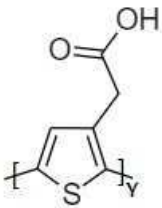
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 분자각인 중합체는 바이오마커에 대한 각인 사이트를 포함하는 것인, 분자각인 중합체 조성물.

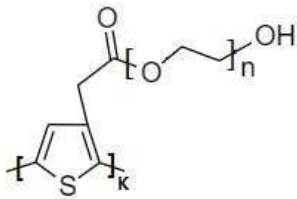
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 싸이오펜 중합체는 하기 화학식 1 내지 화학식 3으로 표시되는 단위체 및 이들의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상을 포함하는 것인, 분자각인 중합체 조성물.

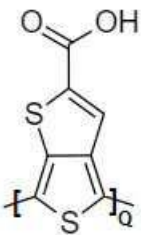
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]

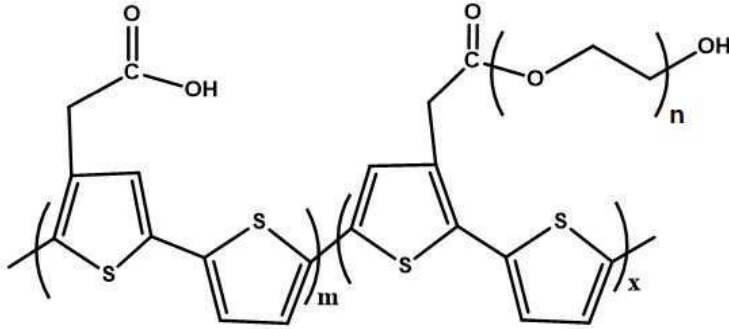


(상기 화학식 1 내지 3에서 상기 Y, K, Q는 각각 1 내지 100의 정수이며, 상기 화학식 2에서 n 은 1 내지 100의 정수이다)

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 싸이오펜 중합체는 하기 화학식 4로 표시되는 단위체 또는 이의 염을 포함하는 것인, 분자각인 중합체 조성물.

[화학식 4]

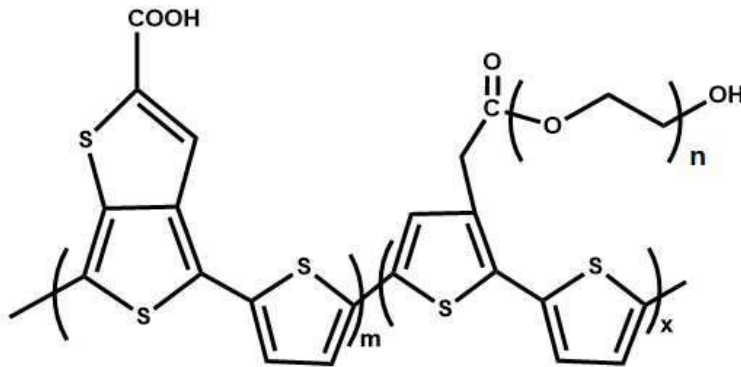


(상기 화학식 4에서 m, x 및 n은 각각 1 내지 100의 정수이다)

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 싸이오펜 중합체는 하기 화학식 5로 표시되는 단위체 또는 이의 염을 포함하는 것인, 분자각인 중합체 조성물.

[화학식 5]



(상기 화학식 5에서 m, x 및 n은 각각 1 내지 100의 정수이다)

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 분자각인 중합체 조성물은 바이오마커의 형상 및 기능성 그룹의 위치에 대해 선택성을 갖는 것인, 분자각인 중합체 조성물.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 바이오마커는 암에 대한 바이오마커인 것인, 분자각인 중합체 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 암은 간암인 것인, 분자각인 중합체 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 암 바이오마커는 알파-태아단백(α -fetoprotein, AFP) 또는 암배 항원(carcinoembryonic antigen, CEA)인 것인, 분자각인 중합체 조성물.

청구항 10

제1항의 분자각인 중합체를 포함하는 나노섬유.

청구항 11

제1항의 분자각인 중합체를 포함하는 바이오마커 검출용 조성물.

청구항 12

제11항의 조성물을 포함하는 바이오마커 검출용 키트.

청구항 13

- a) 제11항의 조성물에 검체를 처리하는 단계 및
- b) 상기 검체 처리된 조성물에서 검사 대상 바이오마커의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 바이오마커 검출방법.

청구항 14

- a) 콘주게이트된 싸이오펜 중합체 및 붕산화합물을 포함하는 조성물에 검출 대상인 바이오마커를 각인시키는 단계 및
- b) 상기 a)단계에서 각인된 바이오마커를 제거하는 단계를 포함하는, 분자각인 중합체 조성물 제조방법.

청구항 15

제11항의 조성물을 포함하는 바이오마커 검출장치.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 장치는 상기 조성물과 바이오마커 사이에 반응이 일어나는 검사부 및 상기 바이오마커의 농도를 측정하기 위한 측정부를 포함하는 것인, 바이오마커 검출장치.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 검사부는 상기 조성물을 함유하는 종이인 것인, 바이오마커 검출장치.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 측정부는 RGB 분석 수단이 구비된 전자기기인 것인, 바이오마커 검출장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 분자각인 중합체 조성물 및 이를 이용한 바이오마커 검출에 관한 분야이다.

배경 기술

[0002] 질병 바이오마커 검출을 위한 감도 및 비용 효율이 높고, 사용하기에 편리한 전략을 개발하는 것은 현재 많은 과학자들의 관심을 끄는 트렌드이며 보람 있는 도전으로 여겨진다. 효소 결합 면역 흡착분석법(ELISA)은 간단한 절차, 직접 가능한 판독 및 높은 실현 가능성으로 인해 널리 인정되는 임상 진단을 위한 분석법이다. 그럼에도 불구하고, 이들의 실질적인 수행은 전적으로 특정 인식을 위한 항체 또는 복잡한 효소 라벨링에 기초하고 있어, 암 바이오마커의 조기 검출과 같은 많은 중요한 응용 분야에서 사용되지 못한다. 시간이 많이 소모되는 절차, 낮은 열안정성, 많은 노동력의 필요 등 항체 스크리닝과 관련된 단점들은 진단 수행을 심각하게 지연시키고, 부적합한 조건에서의 실행을 크게 방해한다. 따라서, 바이오마커 검출을 위해 효소 및 항체의 대체물로서 새롭고 단순하며 신속하고 저비용의 휴대 가능한 분석법을 개발하는 것이 매우 가치있을 것이다.

[0003] 이와 관련하여, 항체의 대안으로 분자 각인 및 보로네이트에 대한 친화성에 기초한 전략이 개발되었으며, 이는 연역 분석법에 광범위하게 사용되는 항체에 의해 나타나는 동일한 우수한 성능을 제공할 가능성을 입증한다. Fe_3O_4 , Pd-Ir 및 Au@Pt 나노 입자와 같은 고유한 과산화효소-유사 활성을 갖는 특정 나노 입자를 조립함으로써 감도를 개선하기 위한 효소 비사용 신호 증폭방법도 보고되고 있다.

[0004] 하지만, 이러한 방법은 여전히 존재하는 제한점을 극복하지 못하고 효소의 성능에 크게 의존한다. 이러한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 종이 기반 진단 플랫폼의 많은 두드러지는 장점(즉, 저렴한 비용, 휴대성 및 사용 용이성)을 활용하면서 ELISA와 비교할만한 분석 수치들을 가진 광범위하게 적용 가능한 분석법을 개발하고자 했다.

[0005] 종이 기반 분석법이 많은 관심을 끌었다는 사실은 놀라운 일이 아니며 이는 다용도성, 사용 용이성 및 저렴한 비용으로 인한 것이다. 종이 기반 분석법은 자원이 적거나 제한된 지역의 실험실에서는 이용할 수 없는 고가의 장비나 장치를 사용하지 않고도 현장 및 육안 검출을 위한 빠르고 적절한 방법을 제공할 수 있다. 이러한 분석법은 형광 및 플라즈몬 방법에 기초한 분석과 같은, 그리고 센서 효율에 영향을 미치는 다양한 변수의 감시가 진전됨으로 인해 바이오센서 개발을 위한 강력한 방법으로 부상하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 10-2011-0076359

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 콘จู게이트된 싸이오펜 중합체 및 봉산화합물을 포함하는, 분자각인 중합체 조성물을 제공하는 것이다.

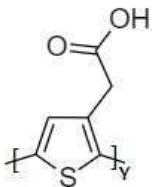
[0008] 본 발명의 목적은 상기 분자각인 중합체를 포함하는 나노섬유를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 목적은 상기 분자각인 중합체를 포함하는 바이오마커 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

- [0010] 본 발명의 목적은 상기 조성물을 포함하는 바이오마커 검출용 키트를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 목적은 a) 상기 조성물에 검체를 처리하는 단계 및
- [0012] b) 상기 검체 처리된 조성물에서 검사 대상 바이오마커의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 바이오마커 검출방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 목적은 a) 콘쥬게이트된 싸이오펜 중합체 및 붕산화합물을 포함하는 조성물에 검출 대상인 바이오마커를 각인시키는 단계 및
- [0014] b) 상기 a)단계에서 각인된 바이오마커를 제거하는 단계를 포함하는, 분자각인 중합체 조성물 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 목적은 상기 조성물을 포함하는 바이오마커 검출장치를 제공하는 것이다.

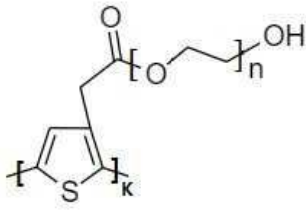
과제의 해결 수단

- [0016] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위해 본 발명은 콘쥬게이트된 싸이오펜 중합체 및 붕산화합물을 포함하는, 분자각인 중합체 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 분자각인 중합체를 포함하는 나노섬유를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 분자각인 중합체를 포함하는 바이오마커 검출용 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 바이오마커 검출용 키트를 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 a) 상기 조성물에 검체를 처리하는 단계 및
- [0021] b) 상기 검체 처리된 조성물에서 검사 대상 바이오마커의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 바이오마커 검출방법을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 a) 콘쥬게이트된 싸이오펜 중합체 및 붕산화합물을 포함하는 조성물에 검출 대상인 바이오마커를 각인시키는 단계 및
- [0023] b) 상기 a)단계에서 각인된 바이오마커를 제거하는 단계를 포함하는, 분자각인 중합체 조성물 제조방법을 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 바이오마커 검출장치를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예로 상기 분자각인 중합체는 바이오마커에 대한 각인 사이트를 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예로 상기 싸이오펜 중합체는 하기 화학식 1 내지 화학식 3으로 표시되는 단위체 및 이들의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상을 포함할 수 있다.
- [0027] [화학식 1]



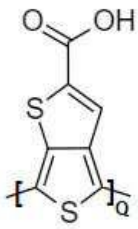
[0028]

[0029] [화학식 2]



[0030]

[0031] [화학식 3]

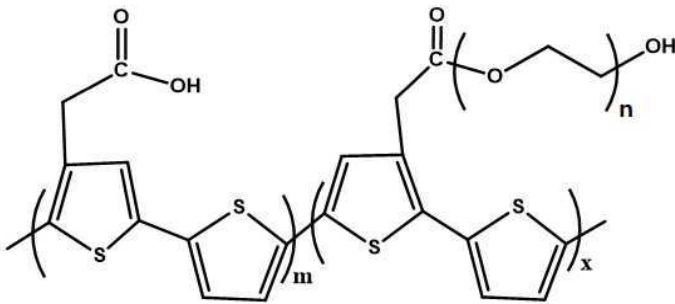


[0032]

[0033] (상기 화학식 1 내지 3에서 상기 Y, K, Q는 각각 1 내지 100의 정수이며, 상기 화학식 2에서 n 은 1 내지 100의 정수이다)

[0034] 본 발명의 일 구현예로 상기 싸이오펜 중합체는 하기 화학식 4로 표시되는 단위체 또는 이의 염을 포함할 수 있다:

[0035] [화학식 4]

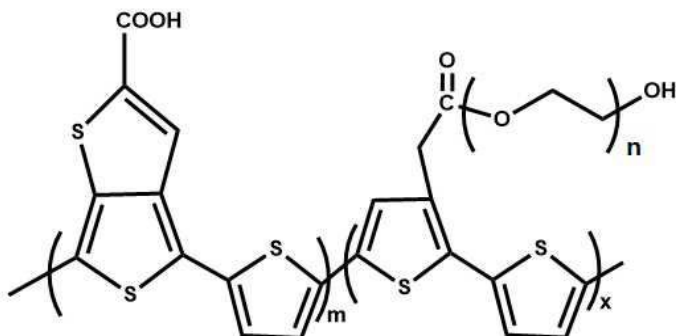


[0036]

[0037] (상기 화학식 4에서 m, x 및 n은 각각 1 내지 100의 정수이다)

[0038] 본 발명의 일 구현예로 상기 싸이오펜 중합체는 하기 화학식 5로 표시되는 단위체 또는 이의 염을 포함할 수 있다.

[0039] [화학식 5]



[0040]

- [0041] (상기 화학식 5에서 m, x 및 n은 각각 1 내지 100의 정수이다)
- [0042] 본 발명의 일 구현예로 상기 분자각인 중합체 조성물은 바이오마커의 형상 및 기능성 그룹의 위치에 대해 선택성을 가질 수 있다.
- [0043] 본 발명의 일 구현예로 상기 바이오마커는 암에 대한 바이오마커일 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예로 상기 암은 간암일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예로 상기 암 바이오마커는 알파-태아단백(α -fetoprotein, AFP) 또는 암배 항원(carcinoembryonic antigen, CEA)일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 구현예로 상기 장치는 상기 조성물과 바이오마커 사이에 반응이 일어나는 검사부 및 상기 바이오마커의 농도를 측정하기 위한 측정부를 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예로 상기 검사부는 상기 조성물을 함유하는 종이일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 구현예로 상기 측정부는 RGB 분석 수단이 구비된 전자기기일 수 있다.

발명의 효과

- [0049] 본 발명의 콘주게이트된 사이오펜 중합체 나노 입자는 우수하고 안정적인 형광 특성을 가지며 바이오마커 검출을 위해 효소나 항체가 요구되지 않으며 종이 기반의 진단 플랫폼으로 이용할 수 있으므로 저렴한 비용, 휴대성 및 사용 용이성이 우수하다. 또한 상기 중합체를 나노 섬유 형태로 이용하는 경우 검출 한도가 매우 낮으므로 정밀한 진단도 가능하므로 암을 비롯한 다양한 질환의 진단에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0050] 도 1은 각인 조건의 특성화 및 최적화에 대한 데이터를 나타낸 것으로, 도 1a는 DI water 중 1.0 mg/mL 농도의 CP1 및 CP2의 UV-vis 흡수 스펙트럼을, 도 1b는 DI water 중 1.0 mg/mL의 농도에서 UV에 의해 조사된 각 용액의 CP1 (360 nm에서 λ_{ex}) 및 CP2 (435 nm에서 λ_{ex})의 PL 스펙트럼을, 도 1c 및 1d는 FMICP1(미세척), FMICP1(세척), FNICP1, FMICP2(미세척), FMICP2(세척), FNICP2의 FTIR 스펙트럼을, 도 1e는 공기 중 실온에서 800 °C까지 10 °C min⁻¹의 가열 속도에서 CP1, CP2, FMICP1 및 FMICP2의 TGA 열 분석도를, 도 1f는 중합 pH의 함수로서 AFP-각인 FMICP1 및 FMICP2의 FL 강도를, 도 1g는 AFP-각인 FMICP1 및 FMICP2에 대한 VPBA 농도의 효과를, 도 1h는 AFP-각인 FMICP1 및 FMICP2에 대한 중합 시간의 영향을, 도 1i는 FMICP1 및 FMICP2의 결합 등온선 및 비표면 각인 FNICP1 및 FNICP2, Q는 평형 상태에서 FMICPs 및 비표면 각인 FNICPs에 결합된 AFP의 양을 나타낸다. 에러바는 3개의 독립적 측정의 표준 편차를 보여준다.

도 2는 FMICP NFs의 특성화 및 FMICP의 검출 성능에 대한 내용으로, 도 2a는 FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs의 FTIR 스펙트럼을, 도 2b는 FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs의 XPS 스캔, 삽입: FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs B1s의 고해상도 XPS를, 도 2c 및 도 2d는 제조된 FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs의 직경을 나타내는 SEM 이미지 및 히스토그램을, 도 2e는 AFP 존재시 FMICP1, FMICP2, FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs 센서의 형광 강도에 대한 pH를, 도 2f는 배양 시간의 영향으로 AFP 및 센서의 농도는 각각 100 ng/mL 및 0.1 mg/mL이다. 도 2g 및 2h는 다양한 농도의 AFP (0-100 ng/mL)를 함유하는 PBS 용액 (pH 9.0)에서 FMICP1 및 FMICP2의 검출 성능으로, 삽입(위)은 AFP를 추가하기 전과 후에 PBS에서 센서 용액의 색상을 보여준다 (365nm에서 UV에 노출됨). 도 2i는 AFP 농도에 대한 FMICP1 및 FMICP2의 방출 강도의 의존성을 나타내며 에러바는 3개의 독립적 측정의 표준 편차를 보여준다.

도 3은 FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs의 검출 성능 및 선택성 연구결과로, 도 3a는 FMICP1 NFs의 성능을, 도 3b는 다양한 농도의 AFP (0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 15 및 25 ng/mL)를 포함하는 PBS 솔루션 (pH 9.0)에서 FMICP2 NFs의 성능을 나타낸다(삽입 : AFP 농도에 대한 F/F₀ 플롯). 도 3c는 PBS 용액에 용해시킨 타겟 AFP (10 ng/mL), CEA (1000 ng/mL), OVA (1000 ng/mL), BSA (1000 ng/mL), 포도당 (1000 ng/mL), 요산 (1000 ng/mL)에 대한 제안된 방법의 특이성 및 선택성을, 도 3d는 교차 반응성 시험 결과로, 샘플: 10 ng/mL AFP 및 동등한 간섭 물질을 나타낸다. 도 3e는 휴대용 UV광 (365nm)에서 다양한 타겟에 노출되었을 때 왁스 프린팅 된 종이센서의 사진을 나타내며, 에러바는 3개의 독립적 측정의 표준 편차를 보여준다.

도 4는 일반적인 적용 가능성 및 실제 적용 분야를 확인한 것으로, 도 4a 내지 4d는 각각 FMICP1, FMICP2, FMICP1 NFs 및 다양한 농도의 CEA (0-200 ng/mL)를 포함하는 PBS 솔루션 (pH 9.0)에서 FMICP2 NFs의 검출 성능

을 나타낸 것이고, 삽입 : F/F_0 는 AFP (365 nm에서 UV 램프 하에서 조사)를 첨가하기 전후의 PBS에서 CEA 농도 및 센서 용액의 색상에 대해 얻어졌다. 도 4e는 간암 환자의 인간 혈청에서 FMICP1, FMICP2, FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs 분석 및 ELISA (효소 결합 면역 흡착 분석법)에 의해 검출된 AFP 농도를 나타낸 것으로, 삽입: 간암 환자로부터의 인간 혈청에 대한 FMICPs 분석 결과의 인쇄된 종이 이미지이다. 도 1f는 AFP 정량화에서 FMICPs 분석과 ELISA 간의 상관 분석($R^2 = 0.985, 0.987, 0.994$ 및 0.993) 내용으로 에러바는 3개의 독립적 측정의 표준 편차를 보여준다.

도 5는 스마트폰 및 저가의 진단 장치와 결합된 종이 인쇄 현장 진단 형광 분석에 관한 내용으로, 구체적으로 도 5a는 스마트폰과 결합된 이중 방출 종이 인쇄 센서를 사용한 AFP의 현장 진단이며, (a) AFP-왁스 프린팅 된 종이 센서. (b) $10 \mu\text{L}$ 의 다양한 농도의 AFP 용액 ($0-100 \text{ ng/mL}$)을 첨가하기 전후에 UV광 아래에서의 형광 종이 센서 색상. c, d) 각각 FMICP1 및 FMICP2를 사용하는 스마트폰 애플리케이션과 결합된 형광 종이 기반 센서의 RGB 값에 기초한 AFP 농도의 비색 분석 및 검정 곡선을 나타내고, 도 5b는 AFP의 현장 진단 검출을 위한 휴대용 장치 및 잉크젯 프린팅 된 종이의 설계 내용으로 (a) FMICP1- 및 FMICP2-코팅된 종이와 함께 사용되는 휴대용 장치의 개략도. (b, c) FMICP1- 및 FMICP2-코팅된 종이 센서에서 광다이오드의 색상 강도와 타액의 AFP 농도 간의 선형 관계. (d) 잉크젯 프린팅 공정의 그림 및 FMICP1 및 FMICP2의 잉크 용액의 사진 이미지. AFP에 대응하는 FMICP1-녹색 및 FMICP2-황색 잉크 용액을 사용하여 여과지에 “AFP (Alpha Fetoprotein)”를 출력한 사진 이미지를 나타낸다. 에러바는 3개의 독립적 측정의 표준 편차를 보여준다.

도 6은 (A) FMICP1 및 (B) FMICP2(120초 각인된 시간)의 FE-SEM 이미지를 나타낸다.

도 7은 CEA-각인된 FMICP NF의 EDX 스펙트럼과 (A) FMICP1 NF 및 (B) FMICP2 NF의 해당 요소 분석 결과를 나타낸다.

도 8은 (A) 중합 시간이 CEA- 각인된 FMICP1 및 FMICP2에 미치는 영향 (B) 중합화 pH의 함수로써 CEA-각인된 FMICP1과 FMICP2의 FL 강도를 나타낸다. 오류 표시줄은 세 가지 독립적인 측정치의 표준 편차를 보여준다.

도 9는 (A) CEA가 있고 CEA가 없는 FMICP1의 형광 스펙트럼 및 (B) CEA가 있고 CEA가 없는 FMICP2의 형광 스펙트럼을 나타낸다.

도 10은 PBS 용액에 용해된 대상 CEA(10 ng/mL), AFP(1000 ng/mL), OVA(1000 ng/mL), BSA(1000 ng/mL), 포도당(1000 ng/mL), 요산(1000 ng/mL)에 대해 제안된 방법의 특이성 및 선택성을 나타내며, 오류 표시줄은 세 가지 독립적인 측정치의 표준 편차를 보여준다.

도 11은 대기 중 실온에서 800°C 까지 $10^\circ\text{C min}^{-1}$ 의 가열율로 FMICP1, FMICP2, FMICP1 NF, FMICP2 NF의 TGA 분석 결과를 보여준다.

도 12는 a. AFP와 함께 있고 AFP가 없는 FMICP1 및 b. AFP가 있고 AFP가 없는 FMICP2의 형광 스펙트럼을 나타낸다.

도 13은 FMICP1, FMICP1 NF, FMICP2 및 FMICP2 NF의 방출 스펙트럼과 AFP 바이오마커의 흡수 스펙트럼 사이의 스펙트럼 겹침을 나타낸다.

도 14는 (A) FMICP1 및 FMICP1-AFP, (B) FMICP1 NF 및 FMICP1 NFs-AFP, (C) FMICP2 및 FMICP2-AFP, (D) FMICP2 NF 및 FMICP2 NF-AFP의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸다.

도 15는 다양한 농도의 AFP ($0-100 \text{ ng / mL}$)를 함유하는 PBS 용액 (pH 9.0) 중 (a) FNICP1 및 (b) FNICP2의 검출 성능을 나타낸다.

도 16은 AFP의 정량적 결정을 위한 상업적 효소 연계 면역 분석 키트 및 검출 한도가 2.0 ng/mL 인 ELISA의 AFP 농도 대 $A_{450 \text{ nm}}$ 값의 해당 그림을 나타낸다.

도 17은 FMICP1, FMICP2, FMICP1 NF 및 FMICP2 NF의 형광증진효율(a) 및 형광 강도(b)를 비교한 것이다.

도 18은 (A) FMICP 및 FMICP NF 분석의 안정성 분석 결과 및 (B) FMICP 및 FMICP NF 분석의 열 안정성 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 19는 FMICP1 및 FMICP2 센서를 사용하여 사람 타액 샘플에서 AFP 감지 결과로, (A) 인간 타액에 다양한 농도의 AFP가 추가된 FMICP1의 형광 방출 스펙트럼, (B) FMICP1을 사용한 AFP의 교정 곡선, (C) 인간 타액에서 다양한 농도의 AFP가 첨가된 FMICP2의 형광 방출 스펙트럼 및 (D) FMICP2를 사용한 AFP의 교정 곡선을 나타낸 것이다

다.

도 20은 FMICP1 NF 및 FMICP2 NF를 사용하여 인간 타액 샘플에서 AFP 검출 결과로, (A) 인간 타액에서 다양한 농도의 AFP가 추가된 FMICP1 NF의 형광 방출 스펙트럼, (B) FMICP1 NF를 사용한 AFP의 교정 곡선, (C) 인간 타액에서 다양한 농도의 AFP가 첨가된 FMICP2 NF의 형광 방출 스펙트럼 및 (D) FMICP2 NF를 사용한 AFP의 교정 곡선을 나타낸 것이다.

도 21은 FMICP1 및 FMICP2를 사용하여 인간 혈청 샘플에서 AFP의 검출 결과로, (A) 인간 혈청에서 다양한 농도의 AFP를 첨가한 FMICP1의 형광 방출 스펙트럼, (B) FMICP1을 사용한 AFP의 교정 곡선, (C) 인간 혈청에서 다양한 농도의 AFP를 첨가한 FMICP2의 형광 방출 스펙트럼 및 FMICP2를 사용한 AFP의 교정 곡선을 나타낸 것이다.

도 22는 FMICP1 NF 및 FMICP2 NF를 사용하여 인간 혈청 샘플에서 AFP의 검출 결과로, (A) 인간 혈청에서 다양한 농도의 AFP를 추가 한 FMICP1 NF의 형광 방출 스펙트럼, (B) FMICP1 NF를 사용한 AFP의 교정 곡선, (C) 인간 혈청에서 다양한 농도의 AFP가 첨가된 FMICP2 NF의 형광 방출 스펙트럼 및 (D) FMICP2 NF를 사용한 AFP의 보정 곡선을 나타낸 것이다.

도 23은 AFP 용지 기반 센서 제작 결과로, 필터 용지 (왼쪽), FMICP1 (중간)으로 코팅된 AFP 용지 기반 센서 및 FMICP2(오른쪽)로 코팅된 AFP 테스트 스트립의 SEM 이미지를 나타낸다. SEM 이미지의 스케일 바는 500 nm이다.

도 24는 왁스 인쇄 용지의 TGA 곡선을 나타낸 것이다.

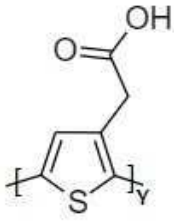
도 25는 (A) FMICP1-AFP 잉크와 (B) FMICP2-AFP 잉크가 포함된 잉크젯 인쇄 용지의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

도 26은 본 발명의 개념을 개략적으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

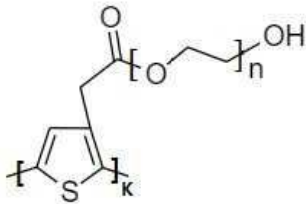
- [0051] 본 발명은 콘주게이트된 싸이오펜 중합체 및 봉산화합물을 포함하는, 분자각인 중합체 조성물을 제공한다.
- [0052] 본 발명에서 상기 분자 각인 중합체(molecularly imprinted polymer, MIP)는 적당한 주형물질(template)과 단량체(또는 단위체)를 이용하여 중합체를 합성한 후 주형물질을 제거함으로써 주형물질의 형상을 기억하고 그와 동일한 공간을 포함하고 있는 중합체를 말한다.
- [0053] 본 발명에서 콘주게이트된 싸이오펜 중합체에서 싸이오펜의 하나 이상의 수소는 히드록시기 또는 카르복실기 등 수소결합 가능한 그룹으로 치환될 수 있으며 치환되는 그룹은 사슬형 또는 고리형 화합물일 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 봉산화합물이란 봉산 구조를 포함하고 있는 화합물을 말하며 바람직하게는 $-B(OH)_2$ 그룹을 포함하고 있는 화합물일 수 있다. 더욱 바람직하게는 4-vinylphenylboronic acid (VPBA)일 수 있으나 이제 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명의 조성물은 콘주게이트된 싸이오펜 중합체 및 봉산화합물 이외에 다른 물질을 더 포함할 수 있다. 일례로 상기 조성물은 각인시키기 위한 대상(주형) 물질을 더 포함할 수 있으며, 상기 물질을 분산시키기 위한 용액을 더 추가할 수 있다. 또한 주형 물질을 고정시키기 위한 가교제 등을 더 포함할 수 있으나 이제 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명에서 상기 분자각인 중합체는 바이오마커에 대한 각인 사이트를 포함할 수 있다.
- [0057] 상기 각인 사이트란 분자각인 중합체에서 주형물질을 제거한 후 원래 주형물질에 대해 선택성 있게 결합할 수 있는 공동(空洞)을 의미한다.
- [0058] 본 발명에서 상기 바이오마커란 생물학적으로 정상인 과정과 병리적인 과정을 객관적으로 측정 평가할 수 있는 지표를 의미하며 단백질이나 DNA, RNA(리복핵산), 대사 물질 등이 해당할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명에서 상기 싸이오펜 중합체는 하기 화학식 1 내지 화학식 3으로 표시되는 단위체 및 이들의 염으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상을 포함할 수 있다.

[0060] [화학식 1]



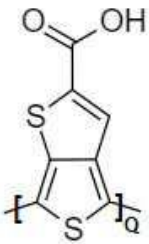
[0061]

[0062] [화학식 2]



[0063]

[0064] [화학식 3]



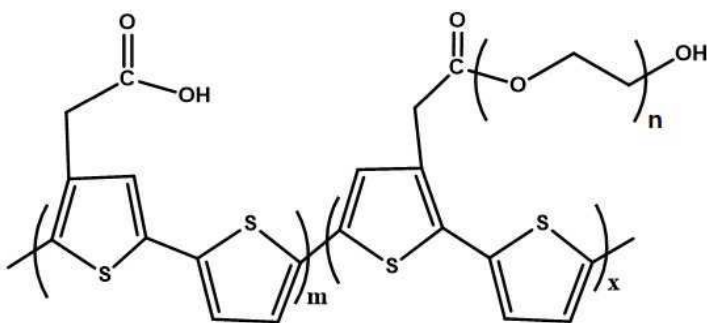
[0065]

[0066] (상기 화학식 1 내지 3에서 상기 Y, K, Q는 각각 1 내지 100의 정수이며, 상기 화학식 2에서 n 은 1 내지 100의 정수이다)

[0067] 또한 상기 화학식 1 내지 3에서 Y, K, Q, n은 각각 1 내지 50의 정수, 1 내지 25의 정수 또는 1 내지 10의 정수일 수 있다.

[0068] 본 발명에서 상기 싸이오펜 중합체는 하기 화학식 4로 표시되는 단위체 또는 이의 염을 포함할 수 있다.

[0069] [화학식 4]



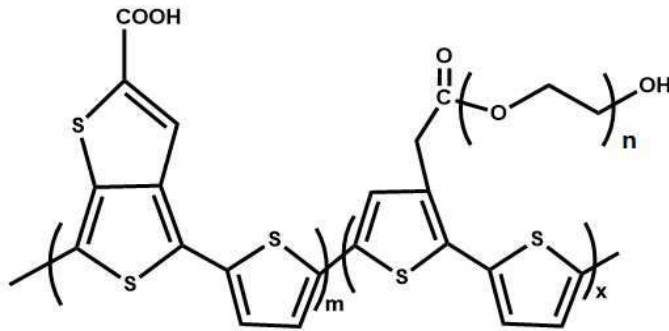
[0070]

[0071] (상기 화학식 4에서 m, x 및 n은 각각 1 내지 100의 정수이다)

[0072] 또한 상기 화학식 4에서 m, x 및 n은 1 내지 50의 정수, 1 내지 25의 정수 또는 1 내지 10의 정수일 수 있다.

[0073] 본 발명에서 상기 싸이오펜 중합체는 하기 화학식 5로 표시되는 단위체 또는 이의 염을 포함할 수 있다.

[0074] [화학식 5]



[0075]

[0076] (상기 화학식 5에서 m, x 및 n은 각각 1 내지 100의 정수이다)

[0077] 또한 상기 화학식 5에서 m, x 및 n은 1 내지 50의 정수, 1 내지 25의 정수 또는 1 내지 10의 정수일 수 있다.

[0078] 본 발명에서 상기 분자각인 중합체 조성물은 바이오마커의 형상 및 기능성 그룹의 위치에 대해 선택성을 가질 수 있다.

[0079] 본 발명에서 상기 바이오마커는 암에 대한 바이오마커일 수 있으며, 바람직하게는 간암 또는 위장관암 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0080] 본 발명에서 상기 암 바이오마커는 알파-태아단백(α -fetoprotein, AFP) 또는 암배 항원(carcinoembryonic antigen, CEA)일 수 있다.

[0081] 다른 양태로서 본 발명은 상기 분자각인 중합체를 포함하는 나노섬유를 제공한다. 본 발명의 중합체가 나노섬유 형태로 제공되는 경우 뛰어난 다공성 FMICP NFs의 고유한 네트워크 구조로 인해 더 많은 감지 장치와 분석물 결합 자리로 구성되어 활성 자리 수를 크게 늘릴 수 있다. 또한, 전자 방사된 FMICP NFs의 크게 확대된 표면적은 추가적인 바이오마커를 포착하기에 충분한 공간을 효율적으로 제공할 수 있다. 나아가, 보로네이트-친화성, 정전기 및 다수의 수소-결합 상호 작용과 같은 상호작용들은 AFP에 대한 결합을 증가시키고 형광을 보다 효율적으로 향상시킨다. 그 결과 상기 나노 섬유를 이용한 센서는 극히 낮은 LOD를 가질 수 있다.

[0082] 다른 양태로서 본 발명은 분자각인 중합체를 포함하는 바이오마커 검출용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 분자각인 중합체 이외에도 바이오마커 검출을 위해 당해 기술분야에서 통상적으로 이용하는 성분을 더 포함할 수 있다.

[0083] 다른 양태로서 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 바이오마커 검출용 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 상기 조성물 이외에도 상기 조성물을 키트로 이용하기 위해 당해 기술분야에서 통상적으로 이용하는 성분을 더 포함할 수 있다.

[0084] 다른 양태로서 본 발명은 a) 상기 조성물에 검체를 처리하는 단계 및

[0085] b) 상기 검체 처리된 조성물에서 검사 대상 바이오마커의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 바이오마커 검출방법을 제공한다.

[0086] 상기 농도를 측정한다는 것의 의미는 검사 대상 바이오마커의 유무를 확인한다는 개념을 포함한다. 상기 농도 측정 방법은 당업계에서 통상적으로 이용되는 방법을 적용 가능하며 바람직하게는 형광 강도를 측정하는 방법일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 바이오마커의 유무 또는 농도에 근거하여 특정 질병의 발병 여부 및 진행상황을 진단할 수 있다.

[0087] 다른 양태로서 본 발명은 a) 콘쥬게이트된 싸이오펜 중합체 및 붕산화합물을 포함하는 조성물에 검출 대상인 바이오마커를 각인시키는 단계 및

[0088] b) 상기 a)단계에서 각인된 바이오마커를 제거하는 단계를 포함하는, 분자각인 중합체 조성물 제조방법을 제공한다.

[0089] 본 발명에서 상기 제조방법은 b) 단계에서 얻어진 분자각인 중합체 조성물을 나노 섬유로 제조하는 단계를 더 포함할 수 있으며 전기방사를 이용한 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0090] 다른 양태로서 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 바이오마커 검출장치를 제공한다. 상기 장치는 상기 조성물과 바이오마커 사이에 반응이 일어나는 검사부 및 상기 바이오마커의 농도를 측정하기 위한 측정부를 포함할 수 있으며, 상기 검사부는 상기 조성물을 함유하는 종이일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 측정부는 RGB 분석수단이 구비된 전자기기일 수 있으며 바람직하게는 포터블(portable)한 기기일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0092] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0094] <실시예 1: 재료 및 준비>

[0095] 실시예 1-1. 시약 및 재료

[0096] Alpha-fetoprotein (AFP) 및 carcinoembryonic antigen (CEA), Lee Biosolutions, Inc (USA)에서 구입하였다. Albumin glycoprotein (OVA), bovine serum albumin (BSA), uric acid (UA), glucose (GL), 3-thiopheneacetic acid (98%), N-bromosuccinimide (NBS), polyethylene glycol (Mn 2000 g/mol), n-butyllithium (1.6 M in hexane), ethyl mercapto acetate, cupric oxide nanopowder, dicyclohexyl carbodiimide (DCC, 99%), 4-(N,N-dimethylamino)-pyridine (DMAP, 98%), N-hydroxysuccinimide (NHS, 98%), 2,5-thiophenediboronic acid, tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0), potassium carbonate, 1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone, 4-vinylphenylboronic acid (VPBA), tetraethylorthosilicate (TEOS), polyvinylpyrrolidone (PVP, Mw = 360, 000 g/mol) 및 poly(ethylene glycol) diacrylate (Mn 575, PEGDA)는 Sigma-Aldrich에서 구매하였다. 상업적인 AFP 효소-결합 면역 흡착 분석 키트는 Aviva Systems Biology, Corp (미국)으로부터 구매하였다. 모든 시약 및 용매는 추가 정제없이 받은 그대로 사용하였다. 모든 실험에 사용된 증류수는 Milli-Q 정수 시스템에서 $18\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ 이상의 저항을 가진다. 크로마토그래피 용지 grade 1은 영국 GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont에서 구매했다.

[0098] 실시예 1-2. 기기

[0099] FT-IR 스펙트럼은 FT/IR-6300 푸리에 변환 적외선 분광계(Jasco, Japan)로 측정하였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 브루커 NMR 기기를 사용해 400 MHz에서 측정하였다. 원소 분석은 vario El 원소 분석기에서 수집되었다. 질량 스펙트럼은 Q Exactive Plus orbital LC-MS/MS 시스템에서 수행되었다. 형광 실험은 1 cm 경로 길이를 갖는 석영 큐벳을 사용하여 FP-6500 분광형광계(Jasco, Japan)에서 수행하였다. 흡수 스펙트럼은 Agilent 8543 (Agilent, USA) UV/Vis 분광 광도계를 사용하여 얻었다. 각인 중합체, 나노 섬유 및 인쇄된 종이의 형태는 전계 방사 주사 전자 현미경(FE-SEM; CZ/MIRA I LMH microscope)에 의해 결정되었다. 섬유 평균 직경은 Image J 소프트웨어 프로그램을 통해 계산되었다. 콘주게이션 된 폴리싸이오펜의 분자량은 Viscotek GPCmax 2001 + Viscotek TDA (RI + VISC + RALS)장치로 측정하였다; 이동상: 폴리(에틸렌 옥사이드)표준으로 보정된 0.02 % 아지드하나트륨 용액과 0.05 M 질산나트륨. 중합체의 열 안정성은 35-800 ° C의 온도 범위 내에서 20 mL/분의 일정한 N_2 흐름 속도에서 10 ° C/분의 가열 속도로 SDT Q600 V20.9 Build 20을 사용하여 열 중량 분석(TGA)으로 연구하였다. 샘플의 표면 성분 조사는 Al K α 단색화 복사선을 사용하는 X-선 광전자 분광법 (XPS; AXIS Nova)에 의해 수행되었다. 설계된 종이 센서를 왁스 프린터(ColoQube 8570DN, Xerox, USA)를 사용하여 Whatman grade #1의 시트에 인쇄한 다음, 종이에 왁스가 완전히 침투될 때까지 120 ° C 건조기에서 가열하였다. 본 발명에서는 종이 소수화 및 절연체로 왁스 잉크를 사용하였다. 바이오 잉크(AFP-based)는 Canon Pixma iP2770 잉크젯 프린터(Japan)를 사용하여 Whatman grade #1에 인쇄되었다.

[0101] 실시예 1-3. (2,5-dibromo-thiophene-3-yl)-acetic acid (이하, M1)의 합성

[0102] 싸이오펜-3-아세트산(0.5g, 3.5 mmol)과 N-브로모숙신이미드(0.64 g, 3.59 mmol)를 30 mL 건조 DMF에 용해시킨다. 혼합물은 질소 대기하에 실온의 어두운 곳에서 24시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 염수로 행구고(3회) 수성층을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 분리하고 Na_2SO_4 로 건조시키고 용매를 감압을 통해 농축

시켰다. 생성물은 헥세인 : 에틸 아세테이트(8:2)로 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 연한 노란색 고체를 수득하였다. 수율: 86%; Mp: 121 °C; FTIR (KBr): ν 3430 cm^{-1} (O-H), 3100 cm^{-1} (=C-H), 2923 cm^{-1} (C-H), 1707 cm^{-1} (C=O 산), 1414 cm^{-1} (C=C), 1126 cm^{-1} (C-O), 740 cm^{-1} (C-S), 626 cm^{-1} (C-Br); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.188 (s, 1H, 싸이오펜 부분), 12.630 (s, 1H, COOH), 3.57 (s, 2H, ph-CH₂-COOH); HRMS (ESI-MS) m/z 계산. C₆H₄Br₂O₂S에 대한 [M]⁺, 298.8178; found, 298.8199; 원소 분석: C₆H₄Br₂O₂S에 대한 계산 계산치: C, 24.53; H, 1.39; S, 10.69; 실측치: C, 24.66; H, 1.36; S, 10.65.

[0104] **실시예 1-4: dibromothiophene-conjugated PEG (이하, M2)의 합성**

[0105] 2,5-디브로모싸이오펜-3-아세트산(M1) (0.299 g, 1.0 mmol), DMAP (0.0122 g, 0.1 mmol), 및 PEG2000-OH (10 g, 5 mmol)를 무수 CH₂Cl₂에 용해시키고 혼합물을 질소 대기하에 교반하였다. 그 후, 0.226 g (1.1 mmol)의 DCC(무수 CH₂Cl₂에 용해됨)를 질소 하에 한방울씩 떨어뜨린다. 그 후, 혼합물 용액을 실온에서 48시간 동안 교반한 다음, 혼합물을 여과하고 100 mL의 CH₂Cl₂로 세척한다. 유기층을 10 % NaHCO₃ 및 염수로 세척한 다음 Na₂SO₄으로 건조한다. 용매를 진공 하에서 제거하고 미정제 중합체를 차가운 디에틸 에테르에 침전시키고 건조시켜 M2를 얻었다. 수율: 85%; Mp: 59 °C; FT-IR (KBr): ν 3468 cm^{-1} (O-H), 2886 cm^{-1} (C-H), 1735 cm^{-1} (C=O 에스터), 1472 cm^{-1} (C=C), 1106 cm^{-1} (C-O), 839 cm^{-1} (C-S), 618 cm^{-1} (C-Br); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 4.24 (COOCH₂), 3.75-3.4 (m, 4H, PEG 단위의CH₂O), 7.15 (s, 1H, 싸이오펜 부분), 3.54 (s, 2H, ph-CH₂-COOH), 1.2 (s, 1H, OH). GPC (물, 폴리(에틸렌 옥사이드)표준), Mn :2,400 g/mol; PDI: 1.24.

[0107] **실시예 1-5. 4,6-dibromothieno[3,4-b] thiophene-2-carboxylic acid (이하, M3)의 합성**

[0108] (i)4-bromothiophene-3-carbaldehyde의 합성: 3,4-디브로모싸이오펜(10.0 mmol)을 25 mL 디에틸 에테르에 용해시키고 78 ° C에서 30분 동안 N₂대기 하에서 교반한 다음, n-부틸 라튬(10.0 mmol)을 용액에 주입한다. 추가로 30분 동안 교반한 후, 디메틸포름아마이드(10.0 mmol)를 혼합물에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 추가로 교반하였다. 에테르 및 진공 증발로 추출한 질은 주황색 액체를 컬럼 크로마토그래피(헥세인:에테르=3:1)를 사용하여 정제하여 4-브로모싸이오펜-3-카르브알데하이드를 노란색의 오일로 얻었다. 수율 70%; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.36 ppm (d, 1H, 싸이오펜 부분), 8.15 ppm (d, 1H, 싸이오펜 부분), 9.75 ppm (s, 1H, CHO).

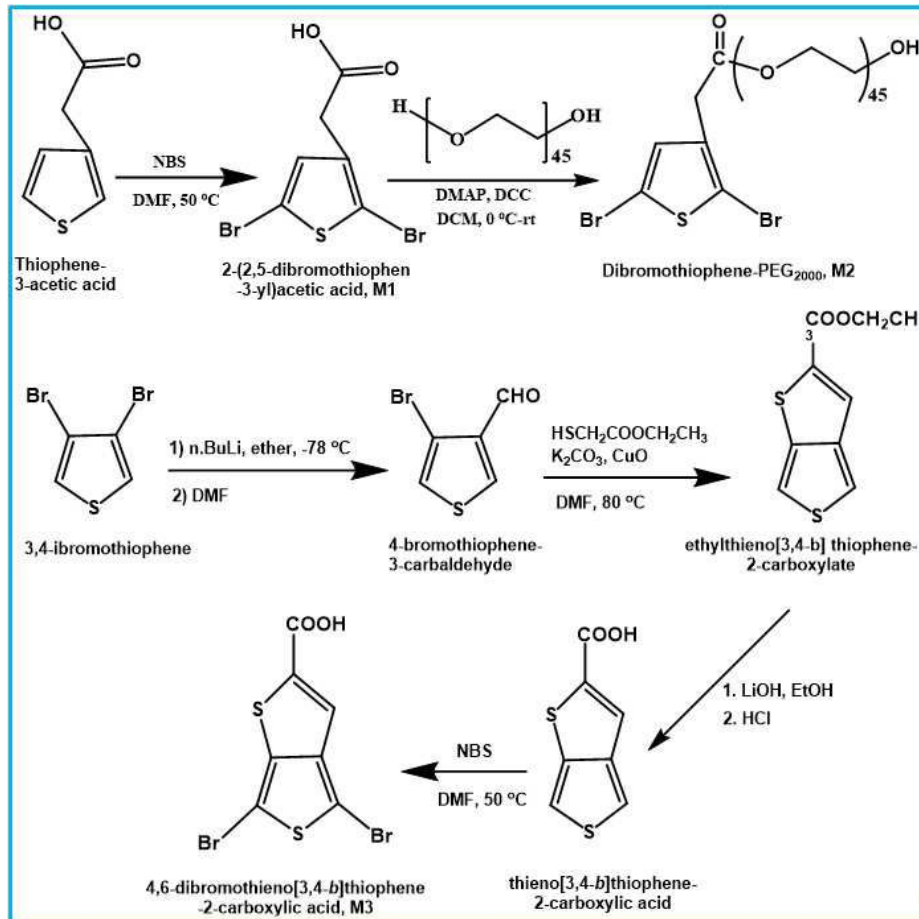
[0109] (ii) thieno[3,4-b] thiophene-2-carboxylic acid의 합성: 4-브로모싸이오펜-3-카르브알데하이드 (2.615 mmol, 디포름아마이드 25 mL에 용해), HSCH₂COOC₂H₅ (2.875 mmol), K₂CO₃ (3.923 mmol) 및 CuO 나노파우더 (0.0785 mmol)를 연속적으로 첨가한다. 혼합물을 80 ° C에서 12시간동안 교반한다. 에테르로 추출한 후, 진동 하에서 용매를 증발시키고 컬럼 크로마토그래피(헥세인:에테르=3:1)를 사용하여 정제하여, ethylthieno[3,4-b] thiophene-2-carboxylate(회색 분말)를 81 % 수율로 얻었다. ethylthieno[3,4-b] thiophene-2-carboxylate(0.8 mmol)와 LiOH(2.4 mmol)를 함유하는 에탄올 용액을 2시간동안 78 ° C로 가열함으로써 카복실산으로 에틸 에스테르의 가수분해를 수행하였다. 실온으로 냉각 후, HCl(1.0 M)을 첨가하고 추가로 30분간 교반하였다. 생성된 현탁액을 에틸 아세테이트로 추출하고 Na₂SO₄으로 건조시켰다. 용매를 진공에서 증발시켜 얻은 분홍색 고체를 얻었으며, 이를 추가 정제없이 다음 단계에 바로 사용하였다. 수율: 90%; ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 12.91 ppm (s, 1H), 7.60 ppm (s, 1H), 7.32 ppm (s, 1H), 7.19 ppm (s, 1H).

[0110] (iii) 4,6-dibromothieno[3,4-b] thiophene-2-carboxylic acid의 합성: thieno[3,4-b] thiophene-2-carboxylic acid (0.184 g, 1 mmol)과 NBS (0.356 g, 2 mmol) 화합물용액을 질소 대기 하에서 20 mL 건조 DMF에 용해시키고 어두운 곳에서 24시간동안 실온에서 교반하였다. CH₂Cl₂로 추출한 후, 유기상을 염수로 세척하고 Na₂SO₄으로 건조시켰다. 용매를 증발시킨 후, 갈색 고체를 실리카-겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 연한 노란색 생성물을 얻었다. 수율: 80%; FTIR (KBr): ν 3430 cm^{-1} (O-H), 3085 cm^{-1} (=C-H), 1705 cm^{-1} (C=O 산), 1483

cm^{-1} (C=C), 1185 cm^{-1} (C-O), 824 cm^{-1} (C-S), 594 cm^{-1} (C-Br); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 12.88 ppm (s, 1H), 7.75 ppm (s, 1H); HRMS (ESI-MS) m/z 계산치. $\text{C}_7\text{H}_2\text{Br}_2\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}]^+$ 에 대해, 341.8372; 실측치, 341.8375. 원소 분석: $\text{C}_7\text{H}_2\text{Br}_2\text{O}_2\text{S}_2$ 에 대한 계산 계산치: C, 25.58; H, 0.79; S, 18.75 실측치: C, 25.35; H, 0.76; S, 18.62.

이하 M1 내지 M3의 합성 방법을 요약하면 아래 반응식 1과 같다.

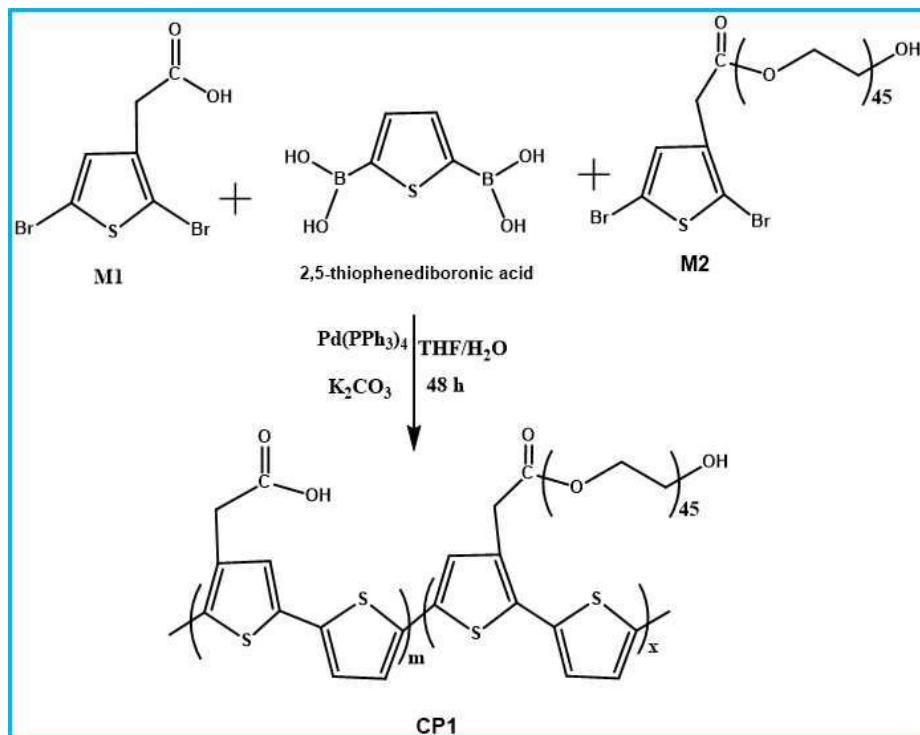
[반응식 1]



실시예 1-6. CP(conjugated polythiophenes)1 및 CP2의 합성

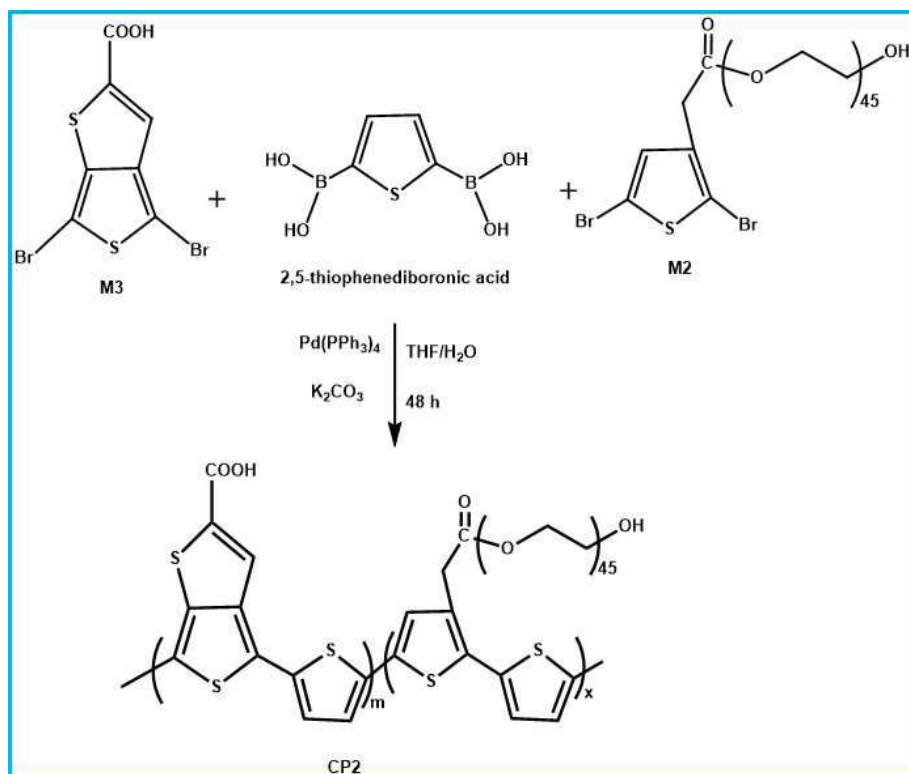
비이온성 콘쥬게이트 된 폴리싸이오펜은 하기 반응식 2 및 3에 나타난 스즈키 커플링 반응을 통해 합성되었다.

[0117] [반응식 2]



[0118]

[0119] [반응식 3]



[0120]

[0121] 100 mL 플라스크에서, M1 (0.3 g, 1.0 mmol), M2 (0.23 g, 0.10 mmol), 또는 M3 (0.342 g, 1.0 mmol) 및 2,5-싸이오펜보론산(0.206 g, 2.2 mmol)을 15 mL THF에 용해시켰다, 이어서 2.0 M K_2CO_3 수용액을 첨가하였다. 그 후, $\text{Pd(PPh}_3)_4(0)$ (27 mg, 0.023 mmol)의 첨가 전후로 반응 혼합물을 진공으로 만들고 질소로 여러번 퍼지하였다. 용액을 질소 하에 70 ° C에서 48시간동안 교반한 다음, 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 120 mL의 메탄올을 첨가하여 콘쥬게이트 된 중합체를 침전시켰다. 중합체를 여과를 통해 수집하고, 메탄올 및 아세톤으로 여

러번 세척하여 올리고머와 촉매 잔류물을 제거하였다. 생성된 미정제물을 CH_2Cl_2 로 추출하고, 염수(3회)에이더 탈이온수(3회)로 세척하였다. 유기 추출물을 무수 MgSO_4 로 건조하고, 여과하고, 용매는 회전 증발로 제거하였다. 콘쥬게이트 된 중합체를 CHCl_3 /메탄올에 재침전시키고 아세톤으로 세척하여 흰색 분말의 형광성 CP1 및 밝은 노란색 고체 CP2를 얻었다.

[0122] CP1: 수율: 78%; FT-IR (KBr): ν 3425 cm^{-1} (O-H), 2887 cm^{-1} (C-H), 1744 cm^{-1} (C=O 에스터), 1701 cm^{-1} (C=O 산), 1477 cm^{-1} (C=C 결합), 1112 cm^{-1} (C-O), 845 cm^{-1} (C-S), 699 cm^{-1} (C-Br); ^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ 11.01 (s, 1H, OH), 7.58 (d, 1H, 싸이오펜 부분), 7.01 (s, 1H, 싸이오펜 부분), 4.28 (t, 2H, $-\text{OCH}_2$), 3.45-3.8 (m, nH, PEG 단위의 OCH_2CH_2), 2.11 (t, 1H, $-\text{OH}$); GPC (물, 폴리(에틸렌 옥사이드)표준), M_n : 14,584 g/mol; PDI: 1.09.

[0123] CP2: 수율: 76%; FT-IR (KBr): ν 3430 cm^{-1} (O-H), 2892 cm^{-1} (C-H), 1744 cm^{-1} (C=O 에스터), 1705 cm^{-1} (C=O 산), 1471 cm^{-1} (C=C 결합), 1122 cm^{-1} (C-O), 840 cm^{-1} (C-S), 715 cm^{-1} (C-Br); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.11 (s, 1H, 싸이오펜 부분), 7.82 (d, 1H, 싸이오펜 부분), 7.55 (d, 1H, 싸이오펜 부분), 6.85 (s, 1H, 싸이오펜 부분), 4.30 (t, 2H, $-\text{OCH}_2$), 3.23-3.87 (m, nH, PEG 단위의 OCH_2CH_2), 3.21 (t, 1H, $-\text{OH}$); GPC (물, 폴리(에틸렌 옥사이드)표준), M_n : 21,175 g/mol; PDI: 1.28.

[0125] 실시예 1-7. 양자 수율의 결정(QY)

[0126] CP1 및 CP2의 양자 수율은 CP1 및 CP2의 적분 형광강도 및 흡광도 값을 기준, 로다민 B ($\Phi = 0.31$)와 비교함으로써 얻어지고, 합성된 콘쥬게이트 된 폴리 싸이오펜은 탈이온수에서 측정되었다($n = 1.33$). 분광광도계는 CP1과 CP2의 방출 값을 각각 360, 435 nm의 들뜸 파장으로 측정하는데 사용되었다. 들뜸 및 방출 슬릿 폭은 3 nm로 설정되었다. 양자수율 (QY)은 식 (1)을 사용하여 결정되었다

[0127] 식 (1)

$$\Phi_x = \Phi_r \times \frac{I_x}{I_r} \times \frac{A_r}{A_x} \times \frac{n_r^2}{n_x^2}$$

[0128]

[0129] 여기서 Φ_x 는 QY, I 는 적분 형광강도, A 는 흡광도, n 은 용매의 굴절률; r 은 표준을 x 는 샘플을 나타낸다.

[0131] 실시예 1-8. 형광 분자각인 콘쥬게이트 된 폴리싸이오펜(FMIPs)의 합성

[0132] 형광 분자각인 콘쥬게이트 된 폴리싸이오펜은 Liu's 그룹에 의해 보고된 방법을 변형하여 시행되었다. AFP-각인 CP의 합성을 위해, 10 mg의 CP1과 60 μM 의 VPBA를 초음파 처리로 2 mL 포스페이트 완충용액(PBS, 0.2 M, pH 9.0)에 분산시켰다. 이어서, 1 mL의 AFP 저장 용액(2 $\mu\text{g/mL}$)을 용액에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 흔들어 주형을 고정시켰다. 이 혼합물에 2.0 μM 의 PEGDA (가교제) 및 0.1 mM의 1-하이드록시사이클로헥실페닐케톤(광개시제)을 첨가하였다. 사전 중합 용액을 질소로 간단히 버블링하고 365 nm UV 조명(25 mW/cm^2) 하에 (0.5 - 4.0 분) 동안 중합하여 FMICP1을 얻었다. CP1 대신 CP2를 사용하고 VPBA는 30 μM 를 사용한 것을 제외하고 FMICP2의 합성에 동일한 실험 절차를 수행하였다. AFP 주형을 제거하기 위해, FMICP1 및 FMICP2를 20 mL 아세트산:메탄올(1:9) 혼합물에 분산시키고 120분 동안 실온에서 흔들었다.

[0133] CEA-각인 FMIPs의 합성을 위해, 중합 시간을 0.6, 1, 2, 3, 4 및 5분으로 설정하였다. 다른 단계는 AFP 각인 실험 절차와 동일하다.

[0135] 실시예 1-9. Non-imprinting FMIPs의 합성

[0136] 각인되지 않은 콘쥬게이트 된 싸이오펜 중합체(FNICP1 및 FNICP2)는 주형이 없다는 것만 제외하고 상기와 동일

한 절차를 사용하여 작성되었다.

[0138] 실시예 1-10. 바인딩 실험

[0139] 2 mg FMICP1, FMICP2, FNICP1 또는 FNICP2(2.0분 각인 시간)를 5 mL AFP 인산염 완충액(0.05, 0.10, 0.15, 0.30, 0.40, 0.60, 0.70, 0.90, 0.90 mg/mL)으로 용해하여 2시간 동안 배양하였다. 원심분리 후, 상층액 중 AFP 농도는 280 nm에서 UV/vis 분광계에서 측정되었다. FMICP1과 FMICP2 또는 대조군 FNICP1과 FNICP2가 흡착된 AFP(Q, mg/g)의 양은 다음 공식을 사용하여 계산했다.

[0140] 식 (2)

$$Q = \frac{(C_0 - C_e)V}{W}$$

[0141]

[0142] 여기서 C_0 과 C_e (mg/mL)는 각각 흡착 전과 후의 용액 농도다. V는 초기 용액량(mL)을 나타내며, W(g)는 FMICP1과 FMICP2 또는 FNICP1과 FNICP2의 질량을 나타낸다.

[0143] 다음 방정식에 따라 인식 능력을 추정하기 위해 임프린팅 계수(IF)를 사용했다.

[0144] 식 (3)

$$IF = Q_{MIP}/Q_{NIP}$$

[0145]

[0146] 여기서 Q_{MIP} 와 Q_{NIP} 는 각각 FMICP1과 FMICP2 또는 FNICP1과 FNICP2에 있는 AFP의 흡착량을 나타낸다.

[0148] 실시예 1-11. 형광 분자 각인 콘쥬게이트 된 싸이오펜 중합체 나노 섬유 제조

[0149] 형광 분자 각인 콘쥬게이트 된 싸이오펜 중합체 나노섬유(FMICP1 NFs 및 FMICP2 NF)는 DMF(5.0g)에서 용해된 PVP(1.2g)와 2.5g DMSO(FMICP1 또는 FMICP2, 0.3g)를 혼합하여 제조하였으며, TEOS (3.2g)를 염산 (37 wt %, 0.6mL)과 에탄올 (0.9mL)로 20시간 동안 병에서 교반하여 미리 겔화를 시켰다. 이 용액은 21 게이지 바늘에 연결된 3 mL 주사기에 주입되어 주사기 펌프에 장착되었다. 그 결과, 발생하는 섬유는 습도가 50%인 25° C에서 전기적으로 팽창되어 알루미늄 호일에 수집되었다. 평균 직경이 106-108nm인 나노 섬유에 10Kv의 전압을 가한 후 바늘에서 집열기까지의 거리를 15cm로 설정하고 유량을 0.5mL/h로 조정하여 준비하였다. 그 결과로 생긴 FMICP1 NF와 FMICP2 NF는 일정한 무게가 될 때까지 60 °C에서 진공 오븐으로 건조시킨 다음 사용하기 전에 건조된 밀폐된 상자에 보관한다. CEA 바이오마커용 형광 분자 각인 콘쥬게이트 된 싸이오펜 중합체 나노섬유도 동일한 절차를 사용하여 준비했다.

[0151] 실시예 1-12. 암 바이오마커 검사를 위한 FMICP 및 FMICP NF

[0152] 일반적인 FMICP 분석에서는 검출용 암 바이오마커(AFP 100ng/mL, CEA 200ng/mL)용액을 PBS(pH 9.0, 0.2 mol/L)에 준비하여 4 °C에 저장하였다. 5 mL 교정 시험관에는 1.0 mL의 FMICP1 또는 FMICP2(0.1 mg/mL), 1.0 mL의 PBS, 다른 농도의 AFP 또는 CEA를 순차적으로 추가하였다. 혼합물을 완전히 혼합한 후 25 ° C에서 20분간 배양하였다. 분광계에서 슬릿 폭을 3 nm로 유지하여 형광 측정에서 발광과 방출을 모두 측정하였다. 표본의 형광 스펙트럼은 FMICP1과 FMICP2에 대해 각각 360과 435 nm에서 측정되었다. 또한 FNICP1 NF와 FNICP2 NF의 검출 성능도 동일한 절차를 사용하여 조사하였다.

[0154] 실시예 1-13. FMICP 및 FMICP NF의 선택성 시험

[0155] FMICP와 FMICP NF의 선택성을 입증하기 위해 인간 α-태아 단백질(AFP), 카르시노 배아항원(CEA), 알부민 당 단

백질(OVA), 소 혈청 알부민(BSA), 포도당, 요산이 도입되었다. 준비된 FMICP1, FMICP1 NFs, FMICP2 및 FMICP2 NFs 센서는 AFP와 이성분 혼합물(CEA, OVA, BSA, 포도당, 요산, AFP 등으로 이루어짐)에 의해 별도로 배양되었다. AFP와 간섭제의 농도는 각각 10 ng/mL, 1000 ng/mL이었다. 선택성을 추가로 확인하기 위해 인쇄 용지 센서도 적용되었다.

[0157] 실시예 1-14. 사람의 타액과 혈청 샘플에서 암바이오마커의 결정

[0158] 실제 샘플에서 AFP의 검출은 검출 전 PBS 용액(0.2 mol/L, pH 9.0)으로 타액과 혈청 샘플을 50배 희석시켜 진행되었다. 대표적인 실험에서는 다른 농도의 AFP(0.1, 1.0, 10, 20ng/mL)와 FMICP, FMICP NF(0.1 mg/mL)를 사람의 타액과 혈청 샘플에 첨가하여 스파이크 시료를 준비하였다. 샘플들을 검출하기 전에 실온에서 20분간 배양했다. 형광 방출 스펙트럼은 360과 435 nm의 파장을 사용하여 기록되었다. 실제 인간 혈청 샘플에서 CEA를 검출하기 위해 CEA의 스파이크 농도는 0.01, 0.5, 1.0, 5.0ng/mL이었다. 다른 단계는 AFP 검출 절차 단계와 같았다.

[0160] 실시예 1-15. 임상 ELISA에 의한 AFP 탐지

[0161] AFP 검출도 5ng/mL에서 300ng/mL까지의 검출 범위를 가진 상용 AFP ELISA 키트에 의해 실시되었다. AFP 항체를 코팅한 96웰 플레이트에는 각각 AFP(0, 5, 20, 50, 150, 300 ng/mL) 20 μL를 넣고 실온(25 ° C)에서 30분간 배양했다. 이후 각각의 웰을 탈이온수로 5회 세척한 후, 상온에서 30분간 HRP-conjugate 시약 150 μL를 첨가하여 배양하였다. 마이크로타이타 웰을 다시 5회 세척한 후 TMB 시약 100 μL를 각각의 웰에 넣었다. 상온에서 20분간 배양한 후 100 μL의 정지용액을 첨가하고 450nm의 흡광도 값을 마이크로타이타 판독기로 측정하였다.

[0163] 실시예 1-16. 임상 인간 혈청 샘플 분석

[0164] 간암 환자들의 인간 혈청 샘플은 BioIVT(-Westbury, NY, USA), 창원 요양병원(창원, 대한민국)으로부터 얻었다. 혈청 샘플에서 AFP 바이오마커의 농도는 우리가 정한 방법과 비교를 위해 클리닉에서 사용되는 ELISA 방법에 의해 결정되었다. 표준 AFP 샌드위치 면역측정기(ELISA kit)는 제조사의 지시에 따라 수행되었다. FMICP 측정의 경우 간암 환자의 샘플을 희석 없이 바로 수행했다.

[0166] 실시예 1-17. 암바이오마커 탐지를 위한 스마트폰과 결합한 왁스 프린트 용지 제작

[0167] 지름 0.5cm의 원형 부분은 Adobe Illustrator CS4 소프트웨어에 의해 설계되었다. 설계 패턴은 Whatman No.1 필터 용지에 제록스 ColorQube 8570 왁스 프린터를 사용하여 인쇄한 후 오븐에서 가열(2분 동안 120° C, 도 5a의 (a) 참조)하여 인쇄된 왁스를 용해하여 소수성 장벽을 형성하였다. 종이의 다공성 구조 때문에 왁스는 그것을 통해 확산되어 양쪽에 동일한 소수성 패턴을 형성한다. 그 후, 피펫으로 인쇄된 왁스의 검출 부위에 FMICP1과 FMICP2(0.1mg/mL) 10 μL를 떨어뜨렸다. 그리고 종이를 꺼내 상온에 말려서 AFP 용지 기반 센서를 만들었다. 종이에 FMICP1이나 FMICP2의 형태 및 중량 비율을 정량하기 위해 SEM과 TGA 분석을 이용하였다. 사람의 타액 샘플에서 AFP를 검출하기 위해 AFP 농도가 다른 10 μL의 타액 샘플을 가공된 왁스 프린트 용지에 떨어뜨렸다. 그 후 365 nm UV 램프 하에서 해당 형광 색상이 시각화 되었다. 각 색상에 대한 RGB 값은 무료 컬러 분석 앱(PAD Analysis app)을 통해 얻었는데, 스마트폰 온라인으로 쉽게 다운로드할 수 있다. 반 정량적 AFP 분석을 위한 RGB 값에 기초한 검정곡선은 실제 타액 샘플에서 AFP 용액(0.01~100ng/mL)을 사용하여 구했다.

[0169] 실시예 1-18. FMICP를 이용한 암 바이오마커의 신속하고 저비용 검출을 위한 장치

[0170] 현장에서 정확한 분석을 수행하기 위해 왁스 인쇄 용지 센서 영역에서 결과를 판독할 수 있는 저렴한 휴대용 장치를 개발하고자 하였다. 빛의 강도와 그 색상에 대한 분석은 큰 비용을 필요로 하지 않기 때문에 단일 보드 컴퓨터에 비해 상대적으로 저렴한 마이크로 컨트롤러를 선택했다. 가시광선의 넓은 범위에 대해 감도가 좋은 AS7262-6채널-Vis 색상 센서를 사용했다. 개발된 기기는 내부에 365nm UV LED를 장착한 종이 홀더와 2패스 필터, AS7262-6 채널 RGB 센서와 결합한 민감한 아르뒤노 마이크로컨트롤러로 구성된다. 이 장치는 휴대성을 보장하기 위해 마이크로컨트롤러와 배터리에 연결된 TFT 디스플레이로 구성된다. 디스플레이에 시각화된 정보는

암 바이오마커(AFP)의 추가에 근거한 색상 강도의 변화이다. 센서와 TFT 디스플레이가 있는 마이크로컨트롤러의 개략적인 연결은 도 5b의 (a)에 나타나 있다. 시스템을 수리하기 위해 3D 모델은 퓨전 360 소프트웨어를 통해 설계되었으며 3D 프린터 Delta 300로 인쇄되었다.

[0172] 실시예 1-19. 잉크젯 인쇄 및 이미징 실험

[0173] 잉크 제조를 위해, 준비된 소수성 FMICP1 또는 FMICP2의 10배를 물(0.5 mL)과 에틸렌 글라이콜(0.1 mL)의 혼합 용매에 용해시켰다. 카트리지 내부에 존재하는 상업용 잉크를 완전히 제거한 다음, 카트리지는 인슐린 주사기를 사용하여 탈이온수 및 100% 에탄올로 여러 번 세척되고 N₂ 바람으로 건조되었다. 그 후 FMICP1 또는 FMICP2 잉크를 카트리지에 다시 넣었다. 그 후, AFP 용액을 카트리지에 추가했고, "AFP(Alpha Fetoprotein)"라는 패턴의 단어를 생성하기 위해 바이오잉크로 사용되었다. 인쇄는 Whatman 필터 용지에 이루어졌으며 원하는 인쇄 패턴은 Microsoft PowerPoint를 사용하여 만들었다. 인쇄 후 패턴이 있는 기판을 건조시켰다. FMICP1 또는 FMICP2 잉크로 설계 패턴을 인쇄한 후 SEM을 사용하여 인쇄 용지의 형태를 조사하였다(도 18 참조). SEM 이미지는 종이 표면에 집계된 인쇄 패턴에서 FMICP1과 FMICP2의 유무를 보여주었다.

[0175] <실시예 2: 형광 분자 각인 콘쥬게이트 된 싸이오펜 중합체: 설계, 특성화, 최적화>

[0176] 암 바이오마커 인식에 항체를 사용하는 단점을 극복하기 위해, 고성능의 분자 각인 콘쥬게이트 된 싸이오펜 중합체를 설계하고 인공 항체 기반의 인식 전략으로서 보로네이트 친화성을 이용했다. 이 전략은 바이오마커의 cis-diol 그룹과 FMICPs의 봉산 그룹 사이의 가역적이고 순조로운 공유 상호 작용으로 인해 바이오마커에 결합하기 위한 항체의 특성을 모방하는 효율적인 기술인 것으로 밝혀졌다. 동시에, 분자 각인 콘쥬게이트 된 싸이오펜 중합체는 분석물을 효율적으로 제거하고, 기존의 각인 중합체에 비해 강력한 결합 부위를 생성했다. CP를 도입하는 데는 세 가지 이유가 있다. 첫 번째로, 비이온성 중합체 (생물유체 샘플에서 비특이적 결합을 억제하기 위해 사용되는 PEG 단위)로서 CP를 사용함으로써 각인된 표면의 친수성을 현저하게 향상시킬 수 있다. 둘째, CP 표면의 다수의 히드록실기 및 카르복실기는 수소 결합을 통해 AFP와 상호 작용하여 각인된 물질의 감도를 증가시킬 수 있다. 셋째, CP는 π -콘쥬게이션 된 그룹 및 분자에서의 전자 비편재화에 기반한 높은 형광 세기 및 양자 수율로 인해 강력한 신호 판독 요소로 선택되었다.

[0177] 먼저, CP는 합성된 기능성 단량체 (M1, M2 또는 M3)와 2,5-thiophene boronic acid (TDBA)를 사용하여 Suzuki 중축합 반응을 통해 제조되었다. GPC 분석 결과, 공중합체 CP1 및 CP2의 분자량(Mn)은 각각 14.58×10^3 g/mol 및 21.17×10^3 g/mol이며, 다분산 지수(PDI)는 각각 1.09 및 1.28이었다 (표 1 참조).

[0178] [표 1]

Samples	Yield (%)	Mn × 10 ³ g/mol	PDI	$\lambda_{\max,abs}$ (nm)	$\lambda_{\max,em}$ (nm)	Φ_x (%)
CP1	78	14.58	1.09	360	490	35
CP2	76	21.17	1.28	435	577	55

[0179]

[0180] CP1 및 CP2의 구조는 FTIR 분석에 의해 확인되었으며, 이는 각각 C=O (에스터) 및 C=O (산) 그룹에서 기인한 1744 cm^{-1} 및 1701 cm^{-1} 에서 주요 특성 밴드를 나타냈다. CP1 및 CP2의 구조는 또한 ¹H-NMR 분석에 의해서도 확인되었으며, 싸이오펜 중합체 단위의 특성 신호는 각각 CP1 및 CP2에 대해 7.01-7.58 ppm 및 6.85-8.11 ppm에 나타났다. PEG 단위의 특징적인 피크는 각각 CP1 및 CP2에 대해 3.45-4.28 ppm 및 3.23-4.30 ppm에 나타났다. CP1과 CP2의 광학적 특성은 DI water에서 조사되고 측정되었다 (도 1a 및 1b). CP1 및 CP2의 형광 스펙트럼은 각각 360 및 435 nm에서 여기되었고 각각 약 490 및 577 nm에서 얻어졌다. 또한, CP1 및 CP2의 형광 양자 수율(Φ_x)은 수용액에서 각각 35% 및 55 %인 것으로 계산되었다.

[0181] 두 번째로, FMICP의 설계 절차는 두 단계로 이루어졌다: (1) 주형 AFP가 각인 방법 동안 보로네이트 및 분자 상호 작용에 대한 친화성을 통해 VPBA 및 CP에 단단히 고정된 분자 각인 (2) AFP 방출. 또한 비표면 각인 FNICPs를 합성하여 결합 효능이 콘쥬게이트 된 싸이오펜 중합체의 각인 공동(空洞)에서 기인할 수 있는지 여부를 결정

했다. 분자 각인 싸이오펜 중합체는 FTIR, FE-SEM 및 TGA 기술을 사용하여 특성화되었다. 도 1c 및 1d는 주형과 FNICPs를 제거하기 전과 후의 FMICPs FTIR 스펙트럼이다. 2942-2951 cm^{-1} , 2866-2868 cm^{-1} , 1734-1735 cm^{-1} , 1663-1973 cm^{-1} 및 1100-1105 cm^{-1} 에서의 피크는 각각 (CH_2), C=O, C=C 및 C-O 그룹의 진동에서 기인한 것이다. 1347 cm^{-1} 에서 B-O 신축 모드의 특성 피크는 VPBA가 FMICP에 성공적으로 결합되었음을 나타낸다. 그러나 세척되지 않은 FMICPs의 피크 강도가 가장 강하므로 AFP가 중합체 입자에 각인되었음을 알 수 있다. 또한, 세척되지 않은 FMICPs는 AFP의 특성 밴드 (3451-3446 cm^{-1} , -OH/COOH; 1528 cm^{-1} , N-H amide)를 나타낸다. FTIR 결과로부터 AFP 표적이 폴리머 매트릭스에 성공적으로 각인되었음을 확인했다. FE-SEM 기술을 사용하여 FMICPs의 형태를 확인하고, 얻어진 FE-SEM 이미지들은 도 6에 나타내었다. FMICP 표면은 낮은 배율에서 비교적 다공성 표면을 가졌다. FMICPs에 공동이 존재한다는 것은, FMICPs 표면에 생성된 공동이 주형 제거로 인한 것임을 나타낸다. 또한, CP1, CP2, FMICP1 및 FMICP2의 TGA 열분석도는 유사한 분해 패턴을 나타내며 (도 1e), 이는 CPs가 FMICPs에 비해 열 안정성이 낮음을 시사한다. 이는 각인에 사용된 중합체 매트릭스와 비교하여 CPs의 분자량이 더 낮기 때문일 수 있으며 이는 FMICPs가 고온에서 매우 안정적이라는 것을 나타낸다.

[0182] 중합 반응을 수행하는 pH, VPBA의 양, 및 중합 시간 (도 1f 내지 1h)을 포함하는 각인 조건은 주형인 AFP의 존재하에 조사되었고, 실험은 pH 9.0에서, VPBA의 양은 60 및 30 μM 이고 중합 시간은 2분으로 설정되었다. FMICP1, FMICP2, FNICP1 및 FNICP2의 결합 성능을 도 1i에 나타난 바와 같이 조사하였다. FMICPs는 분자 비각인 FNICPs에 비해 AFP에 대한 훨씬 더 강한 친화성을 보였다. 더욱이, 각인 효과는 각인 인자 (IF)에 의해 평가되었으며, 이는 FNICPs에 대한 FMICPs에 의해 인식된 AFP의 양의 비에 기초하여 결정되었다. 주목할만한 것은 FMICP1 및 FMICP2 둘 모두의 IF가 2분 중합 시간에서 각각 현저하게 높다(즉, 각각 8.4 및 9.8)는 것이다. 이러한 결과는 싸이오펜 중합체에서 설계된 각인 공동이 AFP에 대한 강력한 친화성을 나타낸다는 것을 잘 입증했다.

[0183] 암 바이오마커 검출을 위한 FMICPs의 일반적인 적용 가능성을 입증하기 위해, 우리는 또 다른 CEA 각인 FMICPs를 개발했다. CEA 각인 FMICPs의 합성, 특성화 및 최적화에 대한 세부 사항은 도 7 내지 도 10에 제시되어 있다. 결과는 최적 중합 시간 및 pH가 각각 2분 및 pH 9.0이고, 최적 FMICPs 및 FMICP NFs는 CEA에 대해 우수한 특이성을 가진다는 것을 보여주었다. 이러한 발견은 상응하는 주형이 사용되는 한 FMICPs 및 FMICP NFs가 다양한 암 바이오마커를 인식할 수 있음을 입증하였다.

[0184] 한편, 합성된 FMICP의 형광증진 효율과 선형탐지범위는 아내 표 2에 나타나 있다.

[0185] [표 2]

SENSORS	CPs (mg)	Template, AFP ($\mu\text{g/mL}$)	VPBA (μM)	PEGDA (μM)	Initiator (mM)	FL enhancement efficiency ($(F-F_0)/F_0$)	Linear range (ng/mL)
FMICP1	10	0.02	10	2.0	0.1	29.3%	0.25-50
FMICP1	10	0.2	30	2.0	0.1	35.6%	0.5-100
FMICP1	10	2.0	60	2.0	0.1	49.8 %	0.025-100
FMICP1	10	20.0	90	2.0	0.1	30.4%	0.025-20
FMICP1	10	50.0	150	2.0	0.1	19.8%	0.025-50
FMICP2	10	0.2	10	2.0	0.1	42.7%	0.10-100
FMICP2	10	2.0	30	2.0	0.1	57.0%	0.01-100
FMICP2	10	8.0	60	2.0	0.1	54.9%	0.10-100
FMICP2	10	20.0	90	2.0	0.1	44.9%	0.025-100
FMICP2	10	50.0	150	2.0	0.1	39.1%	0.01-50

[0186]

[0188] <실시예 3: 형광 분자 각인 콘쥬게이트 된 싸이오펜 중합체 나노 섬유의 제조>

[0189] FMICP1 또는 FMICP2를 사용한 간편하고 저렴한 전기 방사 전략을 통해 각인 콘쥬게이트 된 싸이오펜 중합체 나노 섬유를 제조하여 검출 감도를 크게 개선시켰다. 전기 방사 조건의 최적화를 통해 표면이 매끄럽고 작은 직경

을 가지며 직경 분포가 좁은 FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs를 제작할 수 있다. 콘쥬게이트 된 NFs의 구조를 확인하기 위해, FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs의 FTIR 스펙트럼이 측정되었다(도 2a). 스펙트럼은 OH기로 인한 3258 cm^{-1} 에서의 피크, 2969 cm^{-1} 및 2878 cm^{-1} 에서의 진동(C-H 신축)과 같은 FMICP NFs의 특성 피크를 나타냈다. 1732 cm^{-1} 및 1650 cm^{-1} 에서의 진동은 각각 에스터의 C=O 및 아마이드기의 C=O의 존재를 나타내지만, 1468, 1387, 1290, 1062, 955 및 789 cm^{-1} 부근의 흡수 피크는 C=C, B(OH)₂, C-N, Si-O-Si, Si-OH 및 C-S기에서 기인한다. 또한 XPS 분석을 이용하여 NFs의 표면 조성을 확인하였다(도 2b). FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs의 XPS 결과는 105eV에서 Si_{2p}, 163eV에서 S_{2p}, 195eV에서 B_{1s}, 286.5eV에서 C_{1s}, 400eV에서 N_{1s}, 533.6eV에서 O_{1s}의 강한 신호를 나타냈다. 또한, 준비된 FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs의 FE-SEM 및 크기 분포 측정(도 2c 및 2d)에서 각각 평균 직경이 $108 \pm 3.35\text{ nm}$ 및 $106 \pm 4.55\text{ nm}$ 인 매끄럽고 균일한 표면이 드러났다. TGA는 FMICP1 및 FMICP2의 약 35 및 28 %가 FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs에 각각 포함되어 있다고 밝혔다(도 11).

[0191] <실시예 4: 암 바이오마커를 위한 FMICPs 형광 강화의 원리 및 전략>

[0192] FMICPs 및 FMICP NFs의 우수한 인식능력 및 강력한 방출 특성을 고려하여, 암 바이오마커 검출에 FMICPs 및 FMICP NFs의 적용 가능성을 평가하였다. 본 연구진들은 루이스 산과 유사한 봉산 그룹이 공유 상호작용(당 단백질내의 cis-diols과 봉산 그룹 사이) 및 B-N 상호작용(AFP 바이오마커의 N-말단과 봉산 그룹 사이)을 이용한 보로네이트-친화성 전략을 통해 단백질을 신속하게 통합할 수 있음을 관찰하였다. 이와는 별도로 CPs의 카르복실 또는 히드록실 그룹과 AFP 당 단백질의 아미노 그룹 사이에 수소결합 상호작용이 발생한다. 결과적으로, 개발된 센서가 FMICPs 수용체를 구성하기 위해 보로네이트-친화성 접근법을 이용함으로써 성공적으로 AFP를 표적으로 삼을 수 있었다. 이 바람직한 특성은 효소와 항체가 없는 분석법 설계에 대한 새로운 비전을 제공할 수 있다.

[0193] 종래의 ELISA 분석에서 신호 판독은 라벨링 과정 동안 사용된 효소에 크게 의존한다. 종래의 ELISA는 주로 확산 제한 반응을 발생시키기 위한 긴 접촉 시간을 요구하며 예측할 수 없는 발암성 기질 및 금속성 불순물로 인한 활동성 감소와 같은 몇 가지 위험들을 가진다. 다행스럽게도, FMICPs 기반 보로네이트-친화성 접근법의 라벨링 기술은 종래 기술들의 한계를 극복할 수 있다. 게다가, FMICPs 센서는 짧은 배양시간(단 20분 소요)동안 AFP를 신속하게 검출할 수 있다. 표준 ELISA 분석법에서 항체를 고체 기질에 부착함으로써 표적이 인식되고, 이후 분석물은 효소적 자극을 통해 적절한 신호-구성 화합물로 라벨링된다. 많은 연구에서 효소를 사용한 라벨링 과정에는 정적 상호작용이 포함되며 시약의 확산은 제한된다. 확산 제한 라벨링 반응의 단점에서 기인한 수 시간 또는 하룻밤 정도의 배양 시간을 요구하는 종래의 ELISA와 달리 FMICPs 및 FMICP NFs는 명백하게 매우 유리하다.

[0194] AFP를 향한 FMICPs의 가능한 형광 증강 메커니즘: FMICP1과 FMICP2의 형광 신호는 AFP 주형을 제거하기 전에 크게 향상되었으며(도 12), 이는 FMICP1과 FMICP2가 AFP와 상호 작용했음을 암시한다. 결과적으로, 형광 공명 에너지전이는 AFP의 흡수 피크와 FMICP1, FMICP1 NFs, FMICP2 및 FMICP2 NFs의 방출 스펙트럼 사이의 중첩이 없기 때문에 형광 증강을 위한 가능한 메커니즘으로서 제안되지 않았다(도 13). 대신 형광 증강 반응은 다음과 같은 방법들을 통해 FMICPs와 AFP 사이의 전자 이동에 기여할 수 있다: (1) AFP 내의 cis-diol기와 봉산 그룹 사이의 에스터 형성을 통한 빠른 공유결합, (2) AFP의 N-말단과 봉산 그룹 간의 정전기적 또는 B-N 상호작용, (3) 기능화된 콘쥬게이션 싸이오펜 중합체과 AFP 사이의 수소결합 형성 및 (4) AFP-결합된 FMICPs 사이의 라벨링 상호 작용, 이 방법들은 확산에 영향을 받지 않는다.

[0195] FMICP1, FMICP1 NFs, FMICP2, 및 FMICP2 NFs와 AFP 사이의 공유결합 상호작용(보로네이트-친화성) 및 분자 상호작용(수소결합 및 정전기적 상호작용)의 존재를 확인하기 위해 FTIR 및 제타 전위(ζ)분석을 수행하였다. FMICP1, FMICP1 NFs, FMICP2 및 FMICP2 NFs의 FTIR 스펙트럼은 도 14에 제시되었다. OH, C=O 및 B(OH)₂ 결합은 3449 cm^{-1} , 1636 cm^{-1} 및 1347 cm^{-1} 에서 관찰되었으며, 이는 AFP와의 상호작용 후 각각 3435 cm^{-1} , 1658 cm^{-1} , 및 1392 cm^{-1} 로 현저하게 이동되었다. 한편 FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs 표면의 C-N 및 Si-OH 결합은 1290 및 1062 cm^{-1} 에서 관찰되었으며, AFP의 첨가 이후 각각 1305 및 859 cm^{-1} 로 상당히 이동하였다. 제타 전위값의 변화를 확인함으로써 정전기적 상호작용 또한 확인되었다. 초기에 FMICP1, FMICP1 NFs, FMICP2 및 FMICP2 NFs는 각각 약 -11.7, -3.72, -12.47 및 -3.63mV의 ζ 값을 보였으며 AFP와 상호작용한 후에 약 -30.95, -40.5, -38.0 및 -40.01mV로 변화하였다. 센서 ζ 값의 이 현저한 변화는 센서와 AFP 사이의 정전기적 상호작용이 있음을 보여준

다.

[0197] <실시예 5: FMICP의 감지 성능>

[0198] 먼저 본 연구진은 분석조건의 pH 및 배양 시간을 최적화하여 제안된 분석법의 고유 감도를 확인하였다. 결과는 형광 강도가 pH 9.0 및 배양 시간 20분에서 최대에 도달함을 보여주었다(도 2e 및 2f 참조). AFP 측정을 위한 FMICP1 및 FMICP2의 감지 성능을 최적화된 조건에서 조사하였다. 도 2g 및 2h에 나타난 바와 같이 신호 강도는 AFP농도가 0.01 ng/mL에서 100 ng/mL로 증가함에 따라 크게 향상되는 반면, FNICP1 및 FNICP2의 신호 강도는 AFP농도가 증가함에 따라 크게 증가하지 않았다(도 15). 신호 강도는 FMICP1 및 FMICP2에 대해 각각 AFP 농도가 0.025 ng/mL에서 100 ng/mL로, 0.01 ng/mL에서 100 ng/mL로 변화함에 따라 선형적으로 증가하였으며 각각 $R^2 = 0.9974$ 및 $R^2 = 0.9939$ 값을 가짐을 확인하였다(도 2i). 도 2g, 도 2h 및 도 15를 비교하여 분석해보면 FMICP1 및 FMICP2 두 물질 모두 AFP와 강하게 결합하는 반면에 FNICP1 및 FNICP2는 AFP에 약하게 결합함을 확인할 수 있다. 이러한 향상된 반응이 중요한 이유는 FMICPs가 인식 자리를 통해 타겟인 AFP를 훨씬 더 효과적으로 식별할 수 있다는 점이다. 검출 한계(LODs)는 각각 FMICPs의 보정된 바탕신호의 표준편차와 보정곡선의 기울기인 " σ "와 " s "를 사용한 식 $3\sigma/s$ 를 기반으로 결정되었고 FMICP1 및 FMICP2에 대해 각각 2.5 pg/mL 및 1.20 pg/mL로 계산되었으며 두 물질 모두 피코그램 수준의 검출한계를 가짐을 확인하였다. 본 연구진이 조사한 바에 따르면 FMICP1 및 FMICP2의 LOD는 최신 보고된 AFP센서(표 3 참조)의 LOD에 비해 낮았으며 상용 ELISA 키트(2000 pg/mL, 도 16 참조)보다 각각 800배 그리고 1600배 낮다. 이는 항체와 유사한 FMICPs의 탁월한 인식 능력, 보로네이트에 대한 친화성 및 CP의 높은 효율로 인해 감도가 상당히 향상되었음을 의미한다. FMICP1 및 FMICP2의 감도를 추가로 평가하기 위해 UV광 조사하에서 AFP-의존적 색 향상을 확인하였다(도 2g 및 2h의 삽입 그림 참조). AFP 농도가 증가함에 따라 녹색 및 황색 형광 색상의 점진적인 향상이 관찰되었다.

[0199] [표 3]

Analytical methods	Enzyme & Antibody used	Linear range (ng/mL)	LODs (pg/mL)	Incubation time	Ref
ELISA	horseradish peroxidase	/	2000	0.5 h at 37 °C	7
Chemiluminescence	AFP antibodies	0.1-60	70	25 min at RT	8
Potentiometry	AFP antibodies	0.1-100	68	12 min at RT	9
Paper-based sandwich ELISA	horseradish peroxidase	0.1-11.2	40	45 min at RT	10
Wax-printed paper lateral flow device	monoclonal antibodies	0.1-100	1000	1 h at 37 °C	11
Fluorescent immunosensor	AFP antibodies	0.025-5.0	120	2 h at 37 °C	12
Electrochemistry	AFP antibody	0.1-100	72	1 h at RT	13
Magnetic nanoparticles and CdTe quantum dots	AFP antibodies	1.0-200	320	4 h at 37 °C	14
Paper-based microfluidic immunosensor	horseradish peroxidase	0.01-100	5	20 min at RT	15
Peptide modified paper based impedimetric immunoassay	monoclonal antibodies	1-10000	1000	30 min at RT	16
Lanthanide nanoprobe	AFP antibodies	0.01-60	20	4 h at 37 °C	17
Allochroic-Graphene Oxide Linked 3D Oriented Surface Imprinting Strategy	No need	0.1-2000	100	10 min at RT	18
Electrochemical immunoassay	AFP antibody enzyme-DNA	0.1-100	87	2.2 h at 37 °C	19
Colorimetric immunoassay	AFP antibody	0.1-10 000	460	1 h at 37 °C	20
Molecularly imprinted conjugated polythiophenes and their nanofibers	No need	0.025-100	2.5	25 min at RT	This work
(FMICP1, FMICP2, FMICP1 NFs, FMICP2 NFs)		0.001-25	0.05	15 min at RT	
		0.005-25	0.015	RT	

[0200]

[0202] <실시예 6: FMICP 나노 섬유 접착 성능>

[0203] 동일한 검출 방법을 사용하여 전자 방사 감지 나노섬유, FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs의 감지 성능을 도 3a 및 3b에 나타난 바와 같이 0.001 ng/mL 내지 25 ng/mL 범위의 상이한 AFP 농도에서 측정함으로써 평가하였다. AFP 농도가 증가함에 따라 형광 신호는 점차 향상되었다. 주목할만한 점은 FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs 센서는 각각 0.001 ng/mL~25 ng/mL와 0.005 ng/mL~15 ng/mL 범위의 F/F₀와 AFP의 로그 농도 간 우수한 선형성을 보였고 선형 회귀 계수는 각각 0.992 및 0.9913로 확인되었다(도 3a 및 3b의 삽입 그림 참조). 이 결과들은 이들이 50 fg/mL 및 15 fg/mL의 극도로 낮은 LOD를 가지는 것을 가능하게 하며, 이는 본래의 FMICP1 및 FMICP2의 LOD에 비해 각각 약 50배 및 80배 향상되었다는 것을 나타낸다. 놀랍게도, 이러한 LOD는 표준 효소 기반 분석법보다 LOD가 약 3배 낮았으며 다른 보고된 방법들보다 낮은 값을 가짐을 확인하였다(상기 표 3 참조). 요약하자면 분석물들을 감지하는 FMICP NFs(도 17의 a 참조)의 눈에 띄는 감도 향상은 다음과 같은 이유에서 기인한다. (1) 뛰어난 다공성 FMICP NFs의 고유한 네트워크 구조로 인해 더 많은 감지 장치와 분석물 결합 자리로 구성되어 활성 자리 수를

크게 늘릴 수 있다. (2) 전자 방사된 FMICP NFs의 크게 확대된 표면적은 추가적인 바이오마커를 포착하기에 충분한 공간을 효율적으로 제공할 수 있다. (3) 보로네이트-친화성, 정전기 및 다수의 수소-결합 상호 작용과 같은 상호작용들은 AFP에 대한 결합을 증가시키고 형광을 보다 효율적으로 향상시켰으며 이러한 결과로 제안된 센서의 초민감도가 관찰되었다. 또한 FMICP2 NFs 센서는 표면적이 넓고 직경이 작으며(106 ± 4.55 nm), 형광 양자 수율(55 %)이 높기 때문에 다른 세 센서보다 우수한 검출 성능을 보여주었다.

[0205] <실시예 7: FMICP 및 FMICP NFs 분석의 선택성 평가>

[0206] 선택성 시험은 인간 알파태아단백질(α -fetoprotein, AFP), 암배 항원(carcinoembryonic antigen, CEA), 알부민 당 단백질(albumin glycoprotein, OVA), 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA), 포도당 및 요산을 대상으로 실험하여 입증되었다. 준비한 FMICP1, FMICP1 NFs, FMICP2 및 FMICP2 NFs 센서를 AFP(도 3c 참조)와 별도로 배양하였고 CEA, OVA, BSA, 포도당, 요산과 AFP의 이성분의 혼합물(도 3d 참조)로 배양하였다. AFP 및 간섭 물질의 농도는 각각 10 ng/mL 및 1000 ng/mL였다. 도 3c에 제시된 바와 같이 AFP에 의해 생성된 신호는 다른 간섭제들에 의해 생성된 신호보다 매우 강했다. 더욱이, 간섭 단백질과 AFP혼합물의 형광 강도 반응은 별도로 제조된 AFP시료의 반응에 비해 분명한 변화를 나타내지 않았다(도 3d 참조). 이러한 결과는 FMICP 및 FMICP NFs를 기반으로 한 접근 방식의 뛰어난 특이성을 시사하며 이는 간섭 물질이 AFP-각인 부위에 구조적으로 대응하지 않기 때문일 수 있다. 또한, 인쇄된 종이 센서를 적용하여 선택성을 확인하였고 UV광 하에서 AFP에 대한 상당한 형광 증강이 관찰되었다(도 3e 참조). 따라서, AFP를 선택적으로 감지하는 데 이 인쇄된 종이 센서를 간편하게 적용할 수 있다.

[0208] <실시예 8: FMICP 및 FMICP NFs 분석의 신뢰성 평가>

[0209] FMICP 및 FMICP NFs의 인식 성능은 6회 사용 후 명백한 감소를 보이지 않았으며(도 17의 b 참조), 이는 바람직한 재활용 가능성과 AFP의 임상 진단법에 대한 잠재적 적용 가능성이 있음을 시사한다.

[0210] FMICPs 및 FMICP NFs의 보관 및 열 안정성은 임상 응용 분야에서 매우 중요하다. FMICP1, FMICP1 NFs, FMICP2 및 FMICP2 NFs 센서의 보관 안정성은 4 ° C에서 저장하여 시험하였다. 90일 이후 센서는 각각 약 초기 신호의 92.87 %, 94.83 %, 95.49 % 및 96.66 %를 유지하였다(도 18의 a 참조). 도 18의 b에서 볼 수 있듯이 개발된 FMICPs 및 FMICP NFs의 형광 강도 값은 서로 다른 온도(4, 18, 25, 37, 45 및 60 ° C)에서 명확한 변화없이 거의 일정하게 유지됨을 확인하였고 이는 이들이 우수한 열 안정성을 가짐을 시사한다. 작업 온도에서 효소의 성능에 크게 의존하는 기존의 효소 기반 분석과 달리 개발된 FMICPs 및 FMICP NFs의 우수한 안정성은 분자 각인 싸이오펜 중합체과 나노섬유의 우수한 생체 적합성에 기여할 수 있다.

[0212] <실시예 9: 검출 분석의 일반화>

[0213] 본 연구진의 접근 방식이 여러 종류의 암 바이오마커를 검출하는데 사용될 수 있음을 입증하기 위해 CEA-각인 FMICPs를 또한 개발하였다. CEA-각인 FMICPs의 합성, 평가 및 최적화에 대한 세부 사항은 상술한 바와 같다. FMICP1, FMICP2, FMICP1 NF 및 FMICP2 NF는 각각 0.01~50 ng/mL, 0.01~100 ng/mL, 0.001~200 ng/mL 및 0.001~200 ng/mL CEA농도 범위에서 선형성을 보였으며 또한 각각 3 pg/mL, 1.3 pg/mL, 40 fg/mL 및 3.5 fg/mL의 LOD(도 4a 내지 도 4d)을 가짐을 확인하였다. 게다가, CEA의 스파이크 시료에 대한 재현성은 인간 혈청 시료에서 97% 내지 110%의 범위였으며 이는 FMICPs 및 FMICP NFs가 바람직한 정확도를 가짐을 시사한다(표 4). 또한, AFP, OVA, BSA, 포도당 및 요산을 간섭제로서 사용하여 FMICPs 및 FMICP NFs의 선택성을 확인하였다(도 10 참조). 이러한 결과는 FMICPs 및 FMICP NFs의 일반적인 적용 가능성을 시사한다.

[0214] [표 4]

Sensors	Spiked (ng/mL)	Found (ng/mL)	Recovery (%)	RSD % (n = 5)
FMICP1	0.01	0.01	100	2.55
	0.5	0.49	98	1.66
	1.0	0.995	99.5	3.02
	5.0	5.01	100.2	2.55
FMICP2	0.01	0.011	110	1.77
	0.5	0.495	99	2.65
	1.0	1.05	105	1.91
	5.0	4.89	97.8	1.87
FMICP1 NFs	0.01	0.0099	99	3.25
	0.5	0.51	102	2.05
	1.0	0.97	97	2.09
	5.0	5.03	100.6	1.81
FMICP2 NFs	0.01	0.011	110	3.05
	0.5	0.488	97.6	2.82
	1.0	1.06	106	3.32
	5.0	4.99	99.8	1.97

[0215]

[0216] <실시예 10: 실제 응용>

[0217] AFP는 일반적으로 임상 검사를 위해 간암 바이오마커로서 이용된다. 인간 타액 및 혈청 시료에서 미량의 AFP를 검출하기 위한 실험이 수행되었다(도 19 내지 22 참조). 타액 시료에서 FMICP1, FMICP2, FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs는 각각 2.1, 1.1, 0.5 및 0.1 pg/mL의 LOD를 가진다. 한편, 혈청 시료에서의 이들의 LOD는 각각 5.0, 2.2, 0.25 및 0.02 pg/mL로 임상 진단의 조기 AFP 진단 요구 사항(양성 임계 값: 5 ng/mL)을 쉽게 충족한다. 게다가, 인간 타액의 AFP 스파이크 시료에서의 이 센서들의 재현성은 96.9~110 %, 98.9~101 %, 97.3~110 %, 및 99~103 %의 범위로 확인되었다. 한편, 스파이크 혈청 시료에서 센서들의 재현성은 98.9~110 %, 98.9~105 %, 99.0~101 % 및 97.6~110 %의 범위로 확인되어 이는 FMICP1, FMICP1 NFs, FMICP2 및 FMICP2 NFs의 탁월한 정확성을 입증하였다(표 5). 이 결과는 설계된 FMICP 및 FMICP NF 센서의 광범위한 적용 가능성을 시사한다.

[0218] [표 5]

Samples	Saliva				Serum			
	Spiked	Found	Recovery	RSD %	Spiked	Found	Recovery	RSD %
Sensors	(ng/mL)	(ng/mL)	(%)	(n = 5)	(ng/mL)	(ng/mL)	(%)	(n = 5)
FMICP1	0.1	0.102	102.0	2.55	0.01	0.011	110	3.65
	1.0	1.100	110.0	4.21	0.1	0.1	100	3.11
	10	9.690	96.90	2.11	1.0	0.99	99	2.12
	20	19.95	99.75	1.91	10	9.89	98.9	1.56
FMICP2	0.1	0.110	110.0	3.66	0.01	0.0105	105	2.98
	1.0	0.980	98.00	2.43	0.1	0.098	98	3.66
	10	10.91	109.10	3.20	1.0	1.01	101	2.01
	20	19.46	97.30	2.88	10	9.98	99.8	1.88
FMICP1 NFs	0.1	0.100	100.0	1.65	0.01	0.0101	101	4.01
	1.0	1.010	101.0	1.98	0.1	0.099	99.0	3.55
	10	9.890	98.90	2.33	1.0	1.00	100	1.89
	20	19.95	99.75	2.03	10	9.99	99.9	2.11
FMICP2 NFs	0.1	0.099	99.00	2.19	0.01	0.0098	98	2.15
	1.0	1.030	103.0	2.77	0.1	0.11	110	4.12
	10	10.01	100.1	1.77	1.0	1.03	103	3.22
	20	19.86	99.30	3.05	10	9.76	97.6	1.77

[0219]

[0220]

5명의 간암 환자로부터 얻은 인간 혈청 시료에서 AFP의 수준을 측정함으로써 임상 혈청 시료의 분석에 대한 FMICP 및 FMICP NFs의 적용 가능성을 평가하였다. 이 연구에서 확립된 검정 곡선에 기반하여 FMICP 및 FMICP NFs에 의해 시험된 임상 혈청 시료의 결과를 임상의 효소 결합 면역 흡착 분석법(ELISA)에 의해 획득된 것과 비교하였다(도 4e 참조). 이 인쇄된 종이 센서는 간암 환자의 혈청 시료에 의해 생성된 신호가 건강한 사람의 혈청에 의해 생성된 신호보다 현저히 강하고 육안으로 쉽게 구별될 수 있음을 보여준다(도 4e의 삽입 내용 참조). 본 연구진은 FMICP1, FMICP2, FMICP1 NFs 및 FMICP2 NFs 분석에 의해 측정된 AFP 수준은 각각 0.985, 0.987, 0.994 및 0.993의 상관 계수를 가지며 임상 ELISA에 의해 측정된 것과 상당히 밀접한 상관 관계가 있음을 발견하였다(도 4f 참조). 이러한 결과는 FMICPs가 불필요하고 값비싼 치료를 피하는데 사용될 수 있으며 임상 진단 요구사항을 충족하도록 잘 적용되었음을 시사한다.

[0222]

<실시예 11: 스마트폰 기반 검출>

[0223]

AFP 검출 절차를 단순화하기 위해 실제 타액 샘플에서 AFP를 간단, 신속, 휴대 가능하며 현장에서 진단할 수 있도록 새로운 이중 방출 종이 기반 센서가 개발되었다. FMICP1 및 FMICP2 (0.1 mg/mL)를 사용하여 왁스 인쇄 용지를 코팅하여 종이 기반 AFP 센서를 준비했다(도 5a의 (a)). 도 23은 녹색 방출 FMICP1 및 황색 방출 FMICP2로 성공적으로 코팅 제조된 인쇄 용지의 SEM 이미지를 보여준다. 코팅된 종이 표면의 FMICP1 및 FMICP2의 중량 백분율은 TGA 결과로부터 각각 17.9 및 18.53 %인 것으로 추정된다(도 24 참조). 실제 샘플에서 AFP를 육안으로 검출하기 위해 다양한 농도의 AFP(0-100 ng/mL)가 포함된 10 μ L의 타액 시료를 왁스 코팅 종이에 떨어 뜨린 후 공기에 노출시키며 건조시켰다(도 5a의 (a) 참조). 종이 기반 분석은 AFP 농도가 증가함에 따라 진해진 색을 보여준다(도 5a의 (b) 참조). 흥미롭게도, 종이 센서는 ≈ 10 pg/mL 정도의 AFP 농도를 검출할 수 있으며 육안

으로도 식별할 수 있다. 타액에서 AFP의 다른 농도를 나타내는 종이에서 상당히 다른 색상으로 인해 이미지를 스마트폰으로 캡처한 다음 RGB 분석을 위해 “PAD 분석” 응용 프로그램으로 스캔했다. R/G 및 R/B 비율과 AFP 농도를 사용하여 다음 방정식으로 설명할 수 있는 적합 곡선을 얻었다: FMICP1 및 FMICP2의 LOD가 각각 2.7 pg/mL 및 1.34 pg/mL인 $y = 0.4438x + 1.067$ ($R^2 = 0.9919$), $y = 0.9810x + 1.073$ ($R^2 = 0.9953$) (도 5a의 (c) 및 도 5a의 (d)), 이는 본 발명에서 설명된 형광에 기반한 검출 방법과 높은 일치성을 보여준다. 연구 결과에 따르면 현장 분석 센서는 반응이 좋고 유망하며 분석에서는 휴대용 UV램프와 스마트폰만 있으면 된다.

[0225] <실시예 12: 저비용 정량 진단 장치>

[0226] 본 연구진은 실제 타액 샘플에서 FMICP1 또는 FMICP2 코팅 종이로 AFP 분석을 위한 감지 장치의 소형 휴대용 프로토타입을 고안했다. (도 5b의 (a) 참조). 본 발명에서 설명된 감지 방법을 테스트하기 위해 내장된 장치가 사용되었으며, 정확도는 0.01 ng/mL만큼 높은 것으로 결정되었다. AFP의 강도(baud) 대 농도는 도 5b의 (b) 및 도 5b의 (c)에 제시되어 있으며, $R^2 = 0.979$ 및 0.983로 잘맞는 곡선을, FMICP1 및 FMICP2에 대해 각각 1.40 pg/mL 및 1.04 pg/mL의 LOD를 보여준다. 이러한 결과는 AFP센서로서 FMICP의 탁월한 성능과 신뢰성을 강조하며, 휴대용 장치와 결합하여 특히 자원이 제한된 지역에서 암 진단을 위한 사용자 친화적인 종이 기반 센서로서의 잠재력을 확립했다.

[0228] <실시예 13: 잉크젯 프린팅 Point-of-Care 형광 분석>

[0229] 이러한 결과에 힘입어 잉크젯 프린팅을 통해 종이 센서를 설계하기 위한 바이오 잉크로 FMICP1 또는 FMICP2를 조사했다. Canon Pixma iP2770 잉크젯 프린터를 사용하여 FMICP1 또는 FMICP2와 AFP가 혼합된 바이오 잉크를 사용하여 Whatman 여과지에 “Alpha Fetoprotein(AFP)” 라는 텍스트를 인쇄했다. 종이에 인쇄된 이미지는 가시광선과 자외선에서 모두 관찰할 수 있었다. 이미지는 자외선 아래에서 FMICP1 잉크는 녹색, FMICP2는 황색이었다. (도 5b의 (d) 참조). 이 증명 테스트는 FMICP1 또는 FMICP2와 AFP를 종이에 함께 인쇄하면 표준 ELISA에서 일반적으로 사용되는 다단계 절차를 제거함으로써 바이오마커 검출 분석을 매우 단순화한다는 것을 나타낸다. 또한 FMICP 기반 분석으로 다중 검출이 가능해야 한다고 제안한다.

[0231] <보충 자료>

[0232] 이하 보충 자료는 본 발명의 내용을 좀 더 명확히 이해하기 위한 자료로서 이러한 내용으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0234] 콘쥬게이트된 싸이오펜 중합체의 광학적 특성

[0235] CP1과 CP2의 광학적 특성은 탈이온수에서 측정되었다. 도 1a는 CP1과 CP2의 UV-vis 스펙트럼을 보여준다. CP1은 360nm에서 강한 흡수 밴드를 나타내는데, 이는 메인 체인에 부착된 콘쥬게이트 된 싸이오펜 링에서 비롯되며, CP2는 435nm와 315nm에서 분자 내 전하 전이 전환과 $\pi-\pi^*$ 에 기인할 수 있는 두 개의 독특한 흡수 피크를 나타낸다. 도 1b는 각각 약 490 및 577 nm 주위에서, 그리고 360nm, 435nm에서 얻은 CP1과 CP2의 형광 스펙트럼을 나타낸다. 이것은 고전자밀도 싸이오노[3,4-b] 싸이오펜 단위를 중합체에 도입하면 CP1의 정상 녹색 방출이 적색 이동의 결과로 CP2의 황색 방출로 변한다는 것을 의미한다. 장파장 방출은 주로 싸이오노[3,4-b] 싸이오펜 단위에 의해 제공되었다. 또한 CP1과 CP2의 형광 양자수율(Φ_x)은 각각 수용액에서 35%와 55%를 기준으로 로다민 B를 사용하여 계산하였다(표 1 참조).

[0236] Gaussian 09 Revision-D.01 패키지를 사용한 이론의 B3LYP/LanL2DZ 레벨에서 콘쥬게이트 된 중합체, CP1 및 CP2의 최적화된 기하학과 HOMO 및 LUMO 에너지 수준은 각각 -5.604와 -2.546 eV 및 -5.702 및 -3.144 eV로 계산되었다. HOMO 및 LUMO 표면은 Gauss View 버전 6.0.16을 사용하여 도식되었다. 계산을 단순화하기 위해 결합 중합체의 PEG 체인은 하나만 사용하였다. CP1과 CP2의 HOMO는 분자 골격에 고르게 분포하고, LUMO는 주로 전자 부족 단위에 위치한다. HOMO의 확대된 비편재화에 의해 궤도 중첩이 증가되었다.

[0238] **각인 조건 최적화**

[0239] AFP 템플릿의 농도, 중합화를 수행할 pH, VPBA의 양, 중합화 시간을 포함한 각인 조건을 조사하였다. 실험에서는 FMICP1과 FMICP2의 형광 강도를 사용하여 인식 성능을 측정하였다. 표 2는 다른 템플릿 농도와 FL 강도 향상 사이의 관계를 연구하여 최적의 성능을 선택했음을 보여준다. 형광 강도는 0.02 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 범위에서 AFP의 농도에 정비례한다. 단, AFP의 농도가 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 를 초과할 경우 형광 강도는 줄어들었다(표 2 참조). 템플릿 AFP의 농도는 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 결정되어 안정적이고 강한 형광 향상은 물론 넓은 선형 범위를 제공한다.

[0240] 도 1f에서 보듯이 pH 9.0에서의 중합화는 pH 5.0, 7.0, 8.0 및 10에서와 비교하여 형광 반응을 향상시킨다. 보로네이트 친화도를 촉진하는 기본 pH에서의 중합화는 AFP의 보다 효율적인 인식을 가져왔다. 이러한 발견들은 붕산 그룹이 AFP의 확인을 성공적으로 안정시키고 AFP를 보완하는 구멍의 생성을 가능하게 한다는 것을 암시한다. 또한, VPBA 비율에 대한 적절한 템플릿을 결정하기 위해, FMICP1/FMICP2 센서는 AFP 농도가 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 이고 10 ~ 150 μM 인 다른 VPBA 농도의 용액에 준비되었다. 도 1g와 같이, 60 μM VPBA와 30 μM VPBA로 준비된 FMICP1과 FMICP2는 각각 VPBA 농도가 60 μM 과 30 μM 을 초과하면서 감소하기 시작한 AFP에 대한 최상의 대응을 보여주고 있다(도 1g). 이는 VPBA의 양이 많을수록 AFP에 대한 부착에 대한 입체 장애가 증가하여 AFP가 각인된 표면에 결합하는 정도가 감소하기 때문이다. 따라서 FMICP의 결합 공동 및 두께는 수용기 단위체로 사용되는 VPBA의 양을 변경하여 조정할 수 있다. 적절한 중합 시간은 UV 램프($25\text{mW}/\text{cm}^2$)를 사용하고 중합 시간(0.5-4분)을 변경하여 결정하였다(도 1h 참조). 최대 형광 강도는 2.0분에서 관찰되었다. 따라서, 다음의 실험은 pH 9.0에서 실시되었으며, VPBA의 양은 60, 30 μM , 중합 시간은 2.0분이었다.

[0242] **검사 조건 최적화**

[0243] 먼저 검출 조건의 pH와 배양 시간을 최적화하여 제안된 분석의 민감도를 연구했다. 그 결과는 각인된 센서의 방출이 용액의 pH와 배양 시간에 영향을 받는다는 것을 보여주었다. 도 2e 및 2f는 pH와 배양 시간이 FMICP1, FMICP2, FMICP1 NF 및 FMICP2 NF의 AFP 인식 능력에 영향을 미치는 정도를 명확히 나타낸다. 도 2e에 나타낸 바와 같이, 5-9의 pH 범위에서 형광 강도가 지속적으로 증가하여 FMICP1, FMICP2, FMICP1 NF 및 FMICP2 NF에서 많은 수의 붕산 그룹이 알칼리성 수용액에서 AFP와 결합됨을 나타낸다. 형광 강도는 최대 pH 9.0에 도달하지만, 이 값을 초과하면 형광 강도는 서서히 감소한다. 이는 알칼리성 용액에서 AFP가 붕산과 반응하여 가역성 에스테르화 반응을 통해 순환적인 붕산 음이온을 산출할 수 있다는 사실로 설명할 수 있다. 더욱이, 개발된 센서를 이용하여 AFP를 검출하기 위한 응답 시간을 조사하였다. 도 2f는 FMICP1, FMICP2, FMICP1 NF 및 FMICP2 NF에 의한 AFP의 바인딩이 1분에서 20분으로 증가됨을 나타낸다. 20분간 배양하면 FMICP1, FMICP2, FMICP1 NF 및 FMICP2 NF에 의한 AFP 바인딩 범위가 거의 일정 해진다. 이 결과는 개발된 센서의 표면이 AFP로 포화상태가 된다는 것을 암시한다. 따라서 바이오센서와 AFP 사이의 배양 시간은 20분으로 선택되었다(AFP의 추가 연구는 도 2e 및 2f 참조).

[0245] **용지 기반 센서의 저장 안정성**

[0246] 종이 기반 센서의 저장 안정성은 최적의 실험 조건에서 조사되었다. FMICP1 및 FMICP2-코팅 인쇄 용지 센서는 60일 동안 4° C에서 저장되었다. 종이 센서는 60일 후 색 강도가 초기 강도의 92.34%와 93.88%를 유지한다는 것을 보여주었으며, FMICP1과 FMICP2 기반 종이 센서는 안정성과 응용 가능성이 우수하다는 것을 보여주었다.

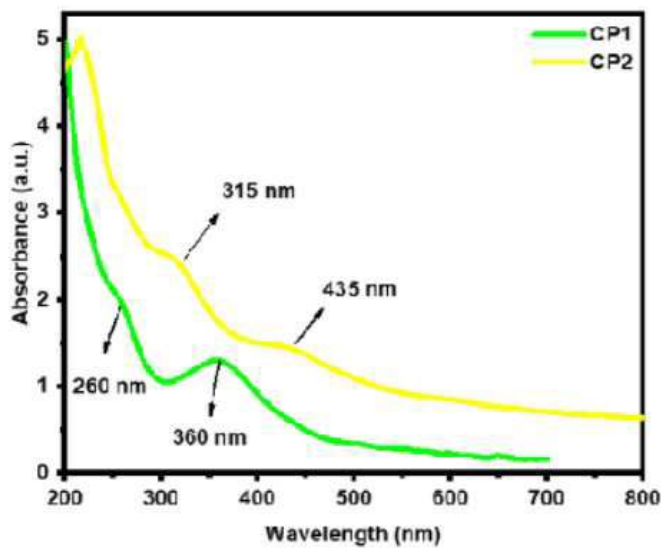
[0248] **FMICP를 이용한 AFP의 신속하고 저비용 검출을 위한 장치**

[0249] 저장 수명을 연장하기 위해 반복적인 교정과 세심한 정비가 필요한 휴대용 장치에 기초한 기존의 전기화학 검출 방법과는 별도로, 기존의 비색 감지 용액은 간섭을 일으키기 쉬우며 복잡한 샘플 준비 절차가 필요한 큰 샘플이 요구된다. 따라서 이러한 기법은 자격을 갖춘 기술자가 실험실에서 사용하도록 제한되어 있어 숙련되지 않은 사용자를 위한 매우 바람직하며 빠르고 강력한 접근방식임을 시사한다. 이 문제를 해결하기 위해, 우리는 FMICP1 또는 FMICP2 코팅 인쇄 용지를 사용하여 AFP 분석을 위한 감지 장치의 휴대용 소형 프로토타입을 고안했다(도 5b의 (a) 참조). 내장형 기기는 내부 종이 홀더가 특징이며 UV LED(365nm)와 필터 2개, 감도가 높은 광다이오드(광다이오드)를 작동 증폭기와 결합해 장착했다. 이 장치는 12V 전원으로 구동되며 마이크로컨트롤러(Arduino UNO)에 결합된 TFT 디스플레이를 통합한다. 측정은 FMICP1 또는 FMICP2로 코팅된 AFP 테스트 용지를 통해 자외

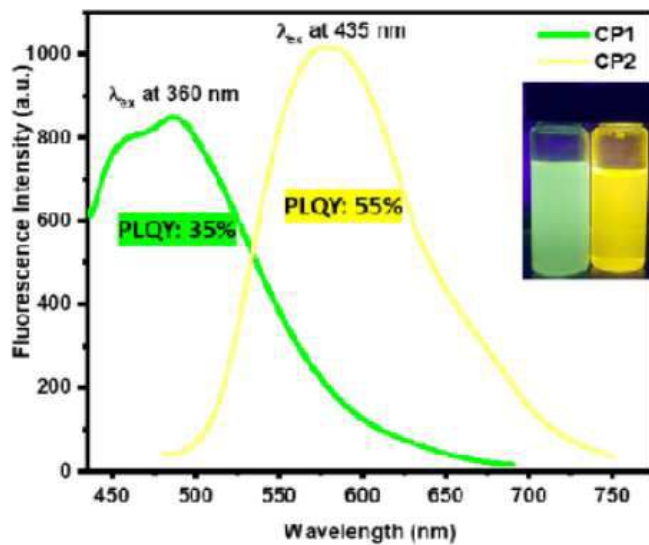
선을 통과하며 측정된다. 센서에 의해 발생하는 출력파는 센서 영역의 강도에 바로 반응한다. 그런 다음 이 파형은 마이크로컨트롤러로 들어가는데, 마이크로컨트롤러는 초당 비트 수(bps) 단위로 보드 속도를 결정하고, 그에 상응하는 광도를 계산하며, TFT 디스플레이에 보드 속도를 표시한다. 이 시스템은 본 발명에 기술된 감지 방법을 시험하기 위해 사용하였다. 정밀도는 0.01 ng/mL까지로 측정되었다. AFP의 강도(보드) 대 농도는 도 5b의 (b) 및 도 5b의 (c)에 제시되어 있으며, 양호한 적합곡선은 각각 $R^2 = 0.979$ 와 0.983 으로, LOD는 각각 FMICP1과 FMICP2에 대해 약 1.40pg/mL, 1.04pg/mL로 보여준다. 이러한 결과는 형광성 및 스마트폰 기반 평가와 잘 일치한다. 보고된 다른 검출기와 비교하여 이 프로토타입은 가시 범위 내에 위치한 다른 파장의 강도를 측정할 수 있는 가능성을 제공하기 때문에 휴대용 분광계로서 사용될 수 있다는 점에 유의해야 한다. 이러한 결과는 AFP 센서로서의 FMICP의 우수한 성능과 신뢰성을 부각시키며, 휴대용 장치와 결합하여 이 방법은 특히 자원이 제한된 영역에서 간접 진단을 위한 사용자 친화적인 종이 기반 센서로서의 잠재력을 확립했다.

도면

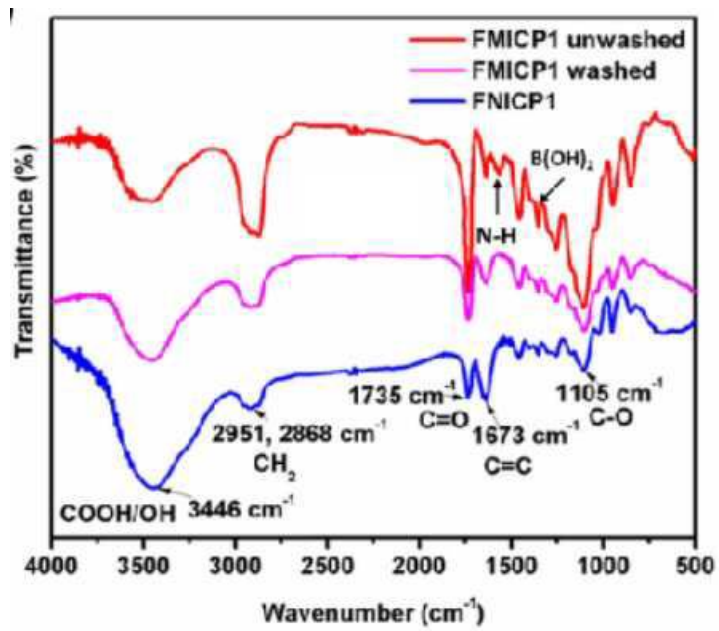
도면1a



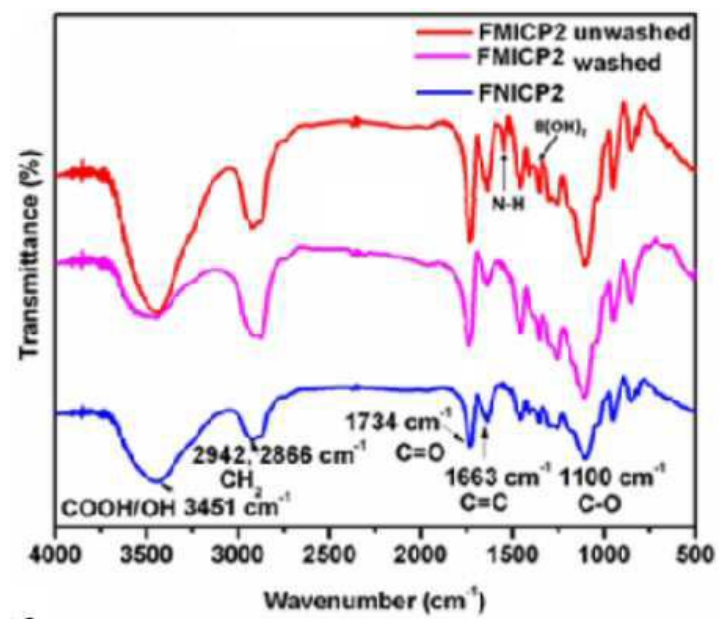
도면1b



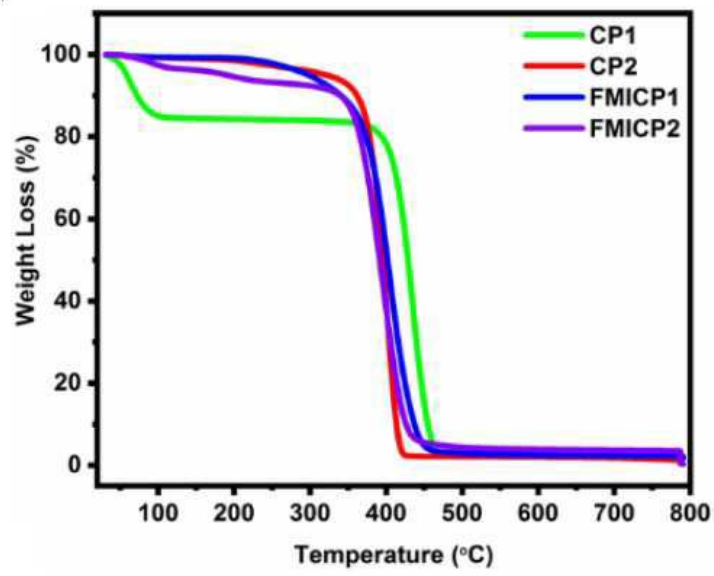
도면1c



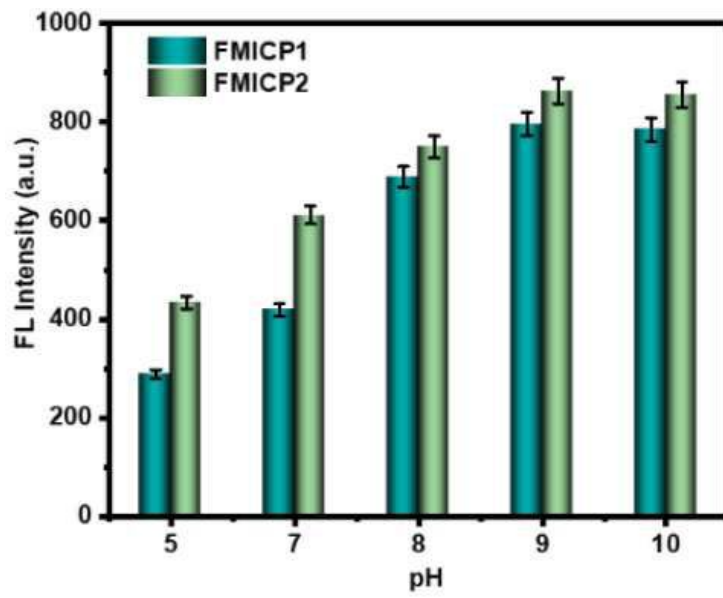
도면1d



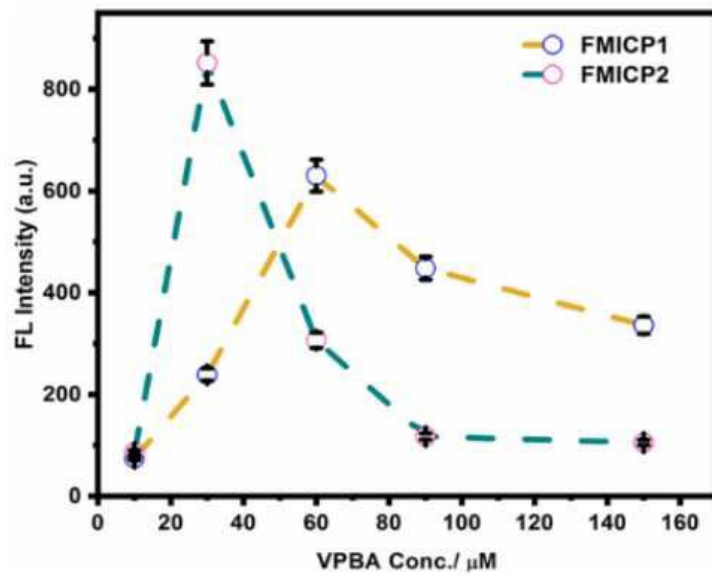
도면1e



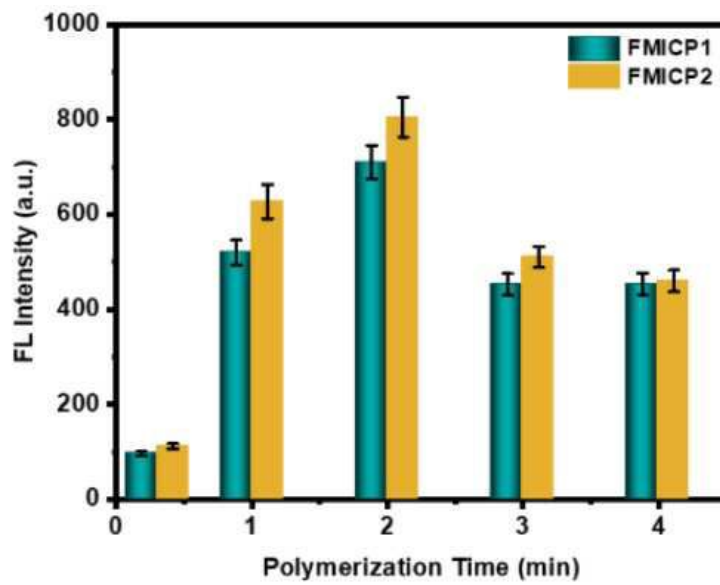
도면1f



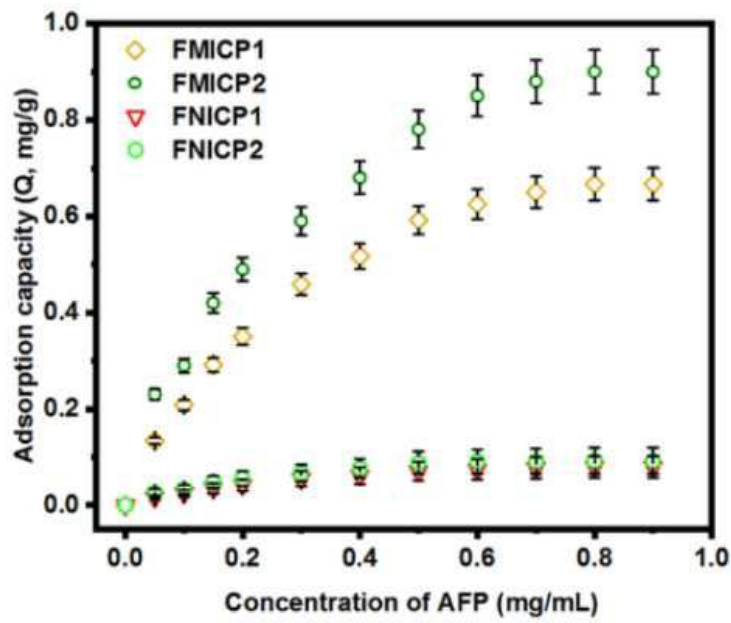
도면1g



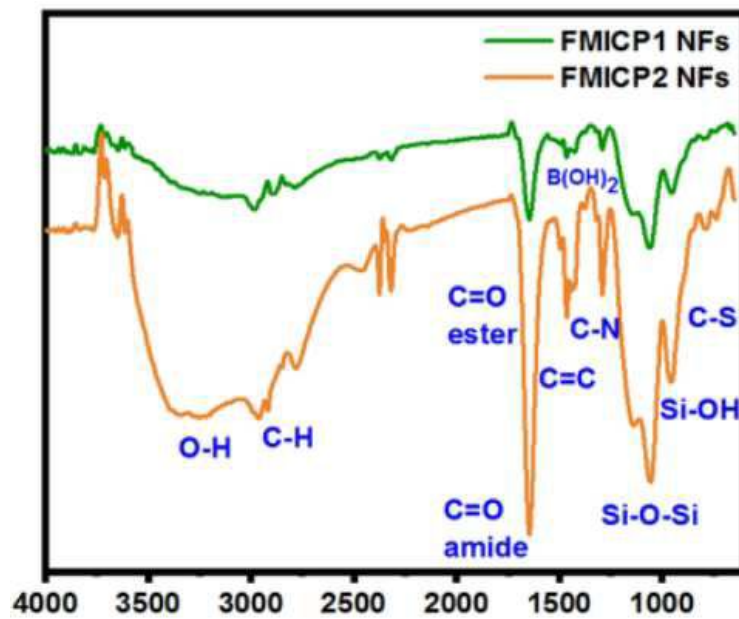
도면1h



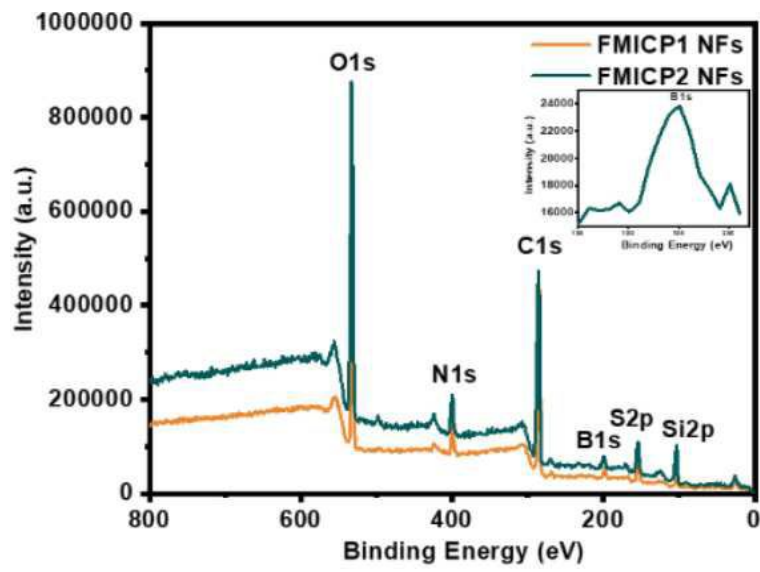
도면1i



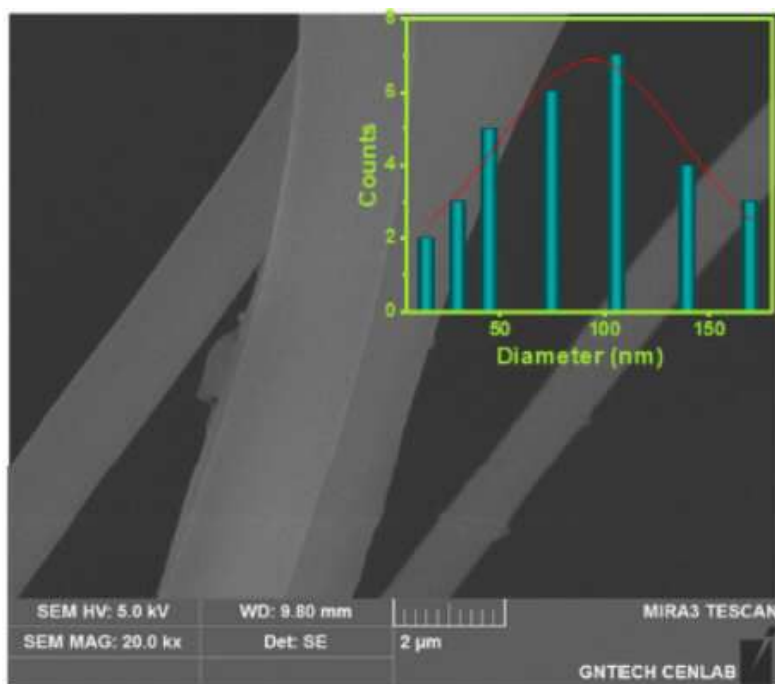
도면2a



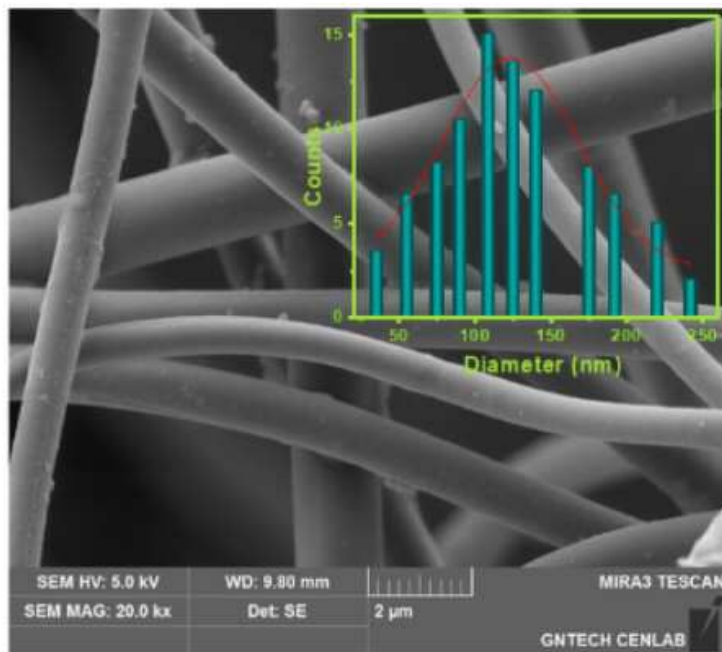
도면2b



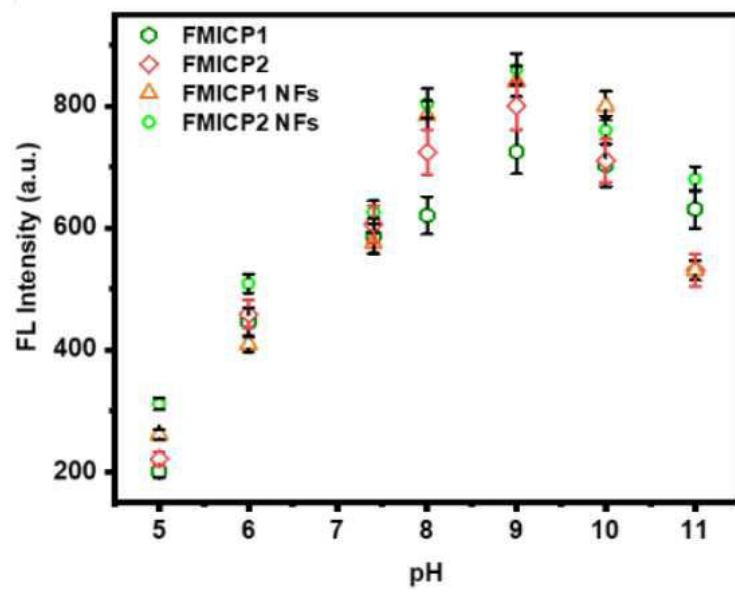
도면2c



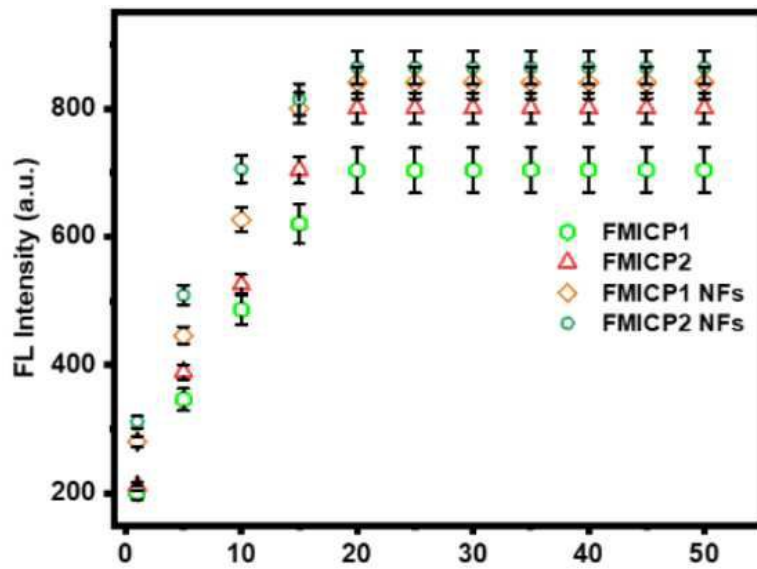
도면2d



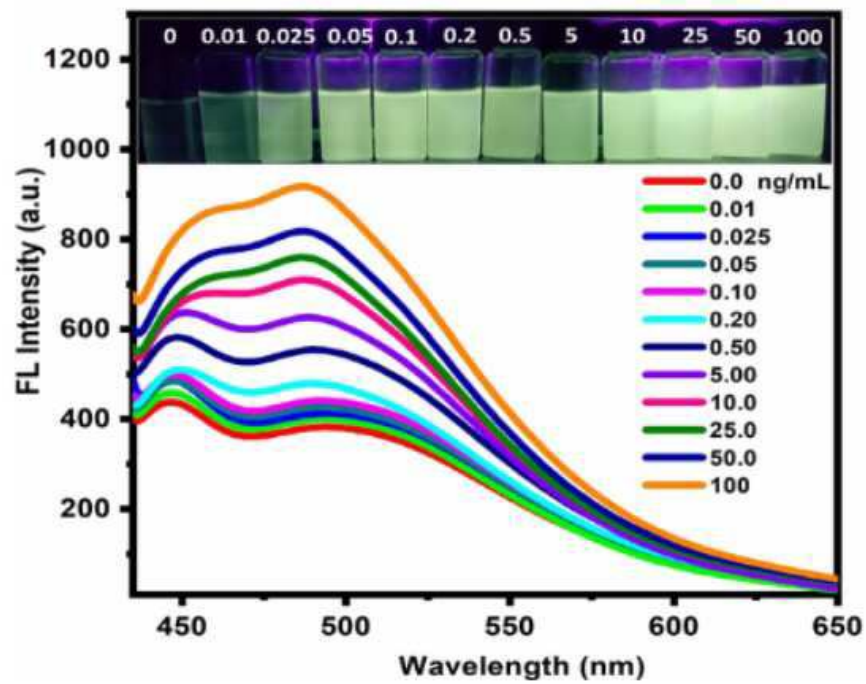
도면2e



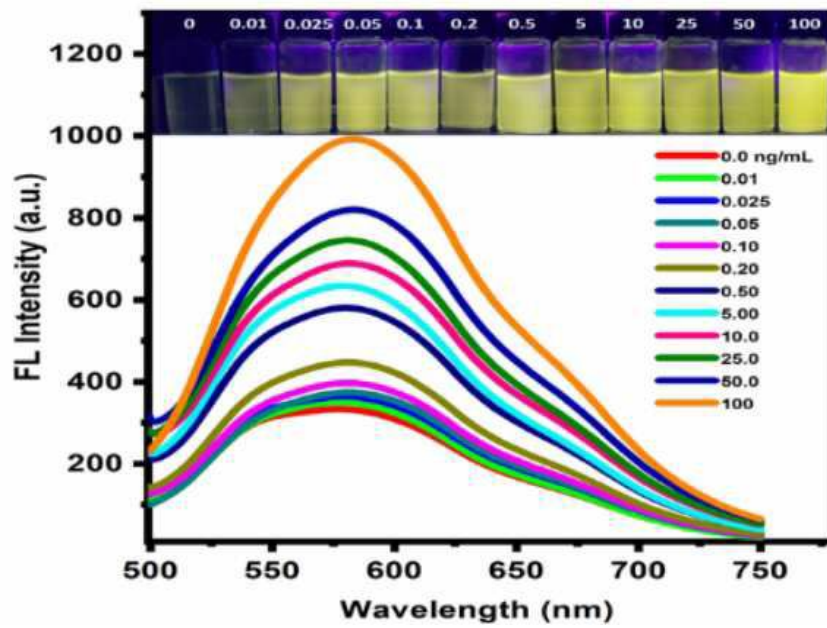
도면2f



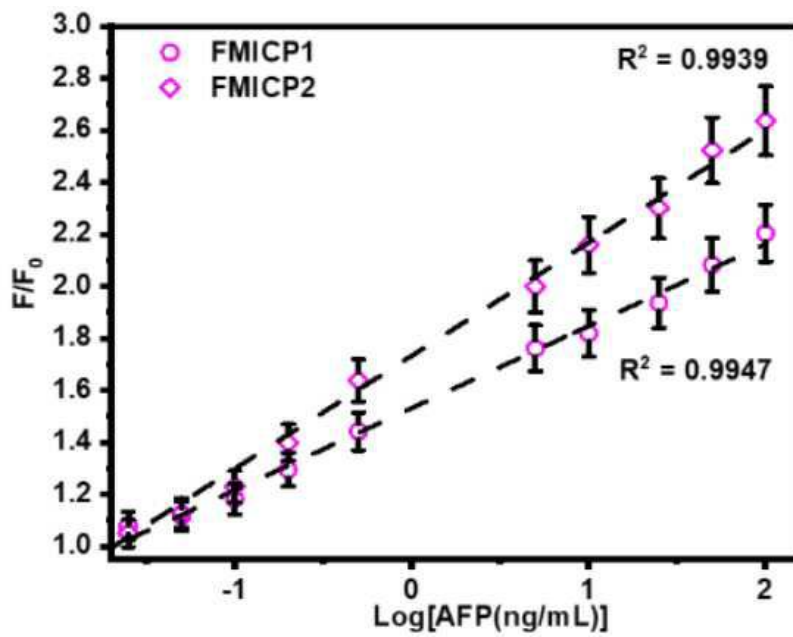
도면2g



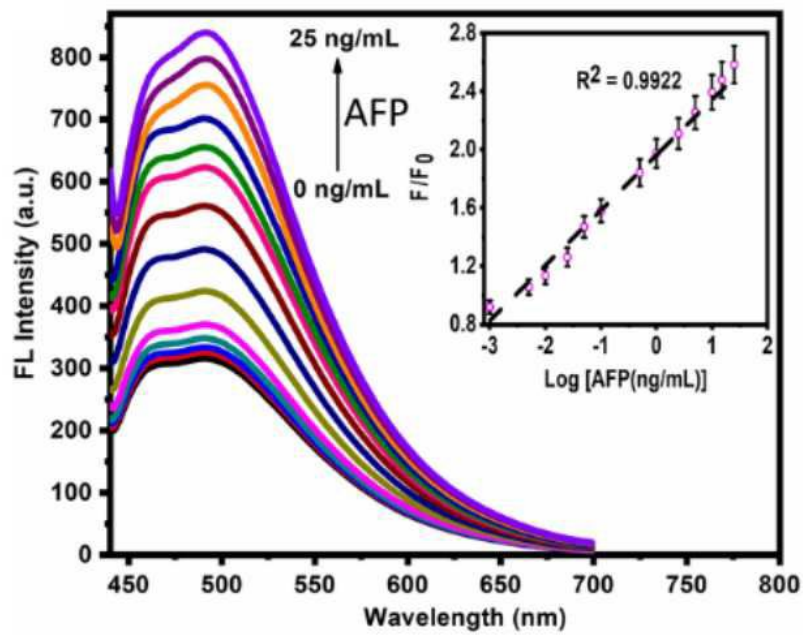
도면2h



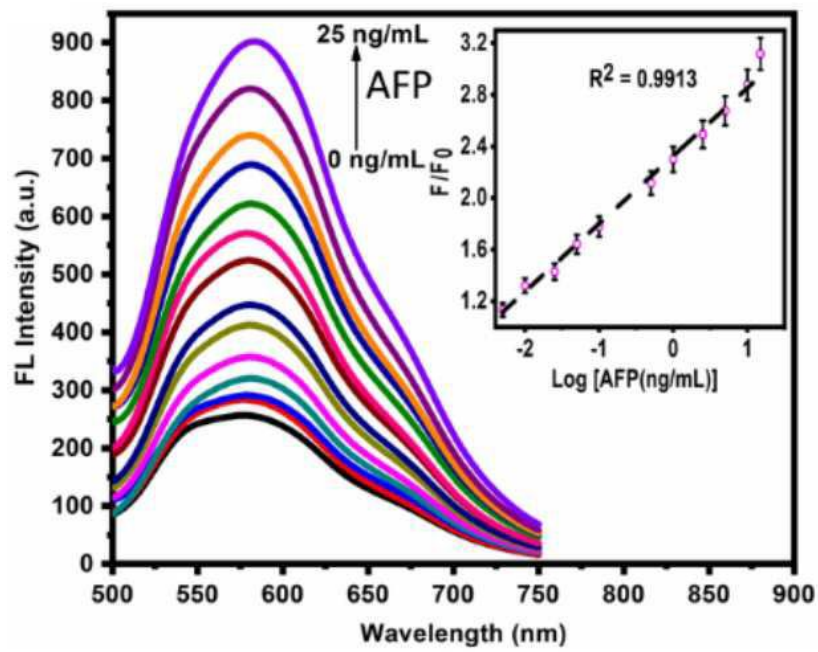
도면2i



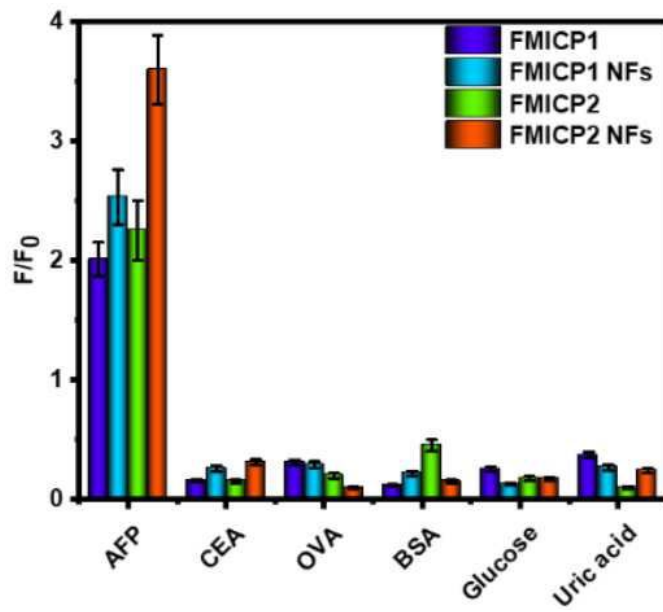
도면3a



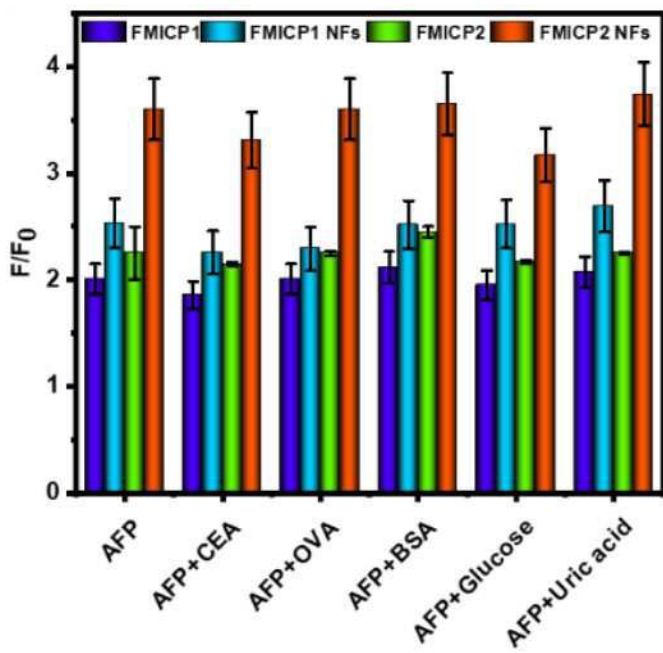
도면3b



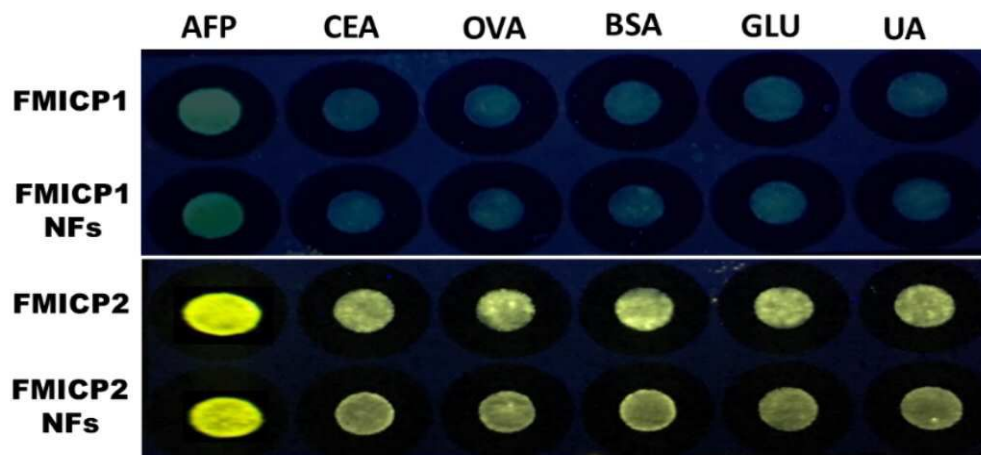
도면3c



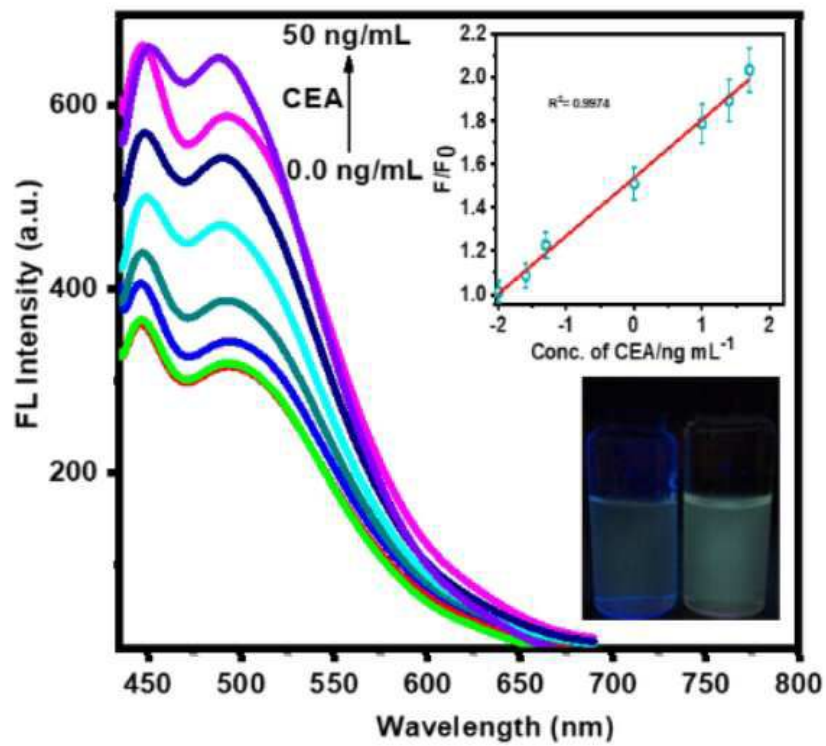
도면3d



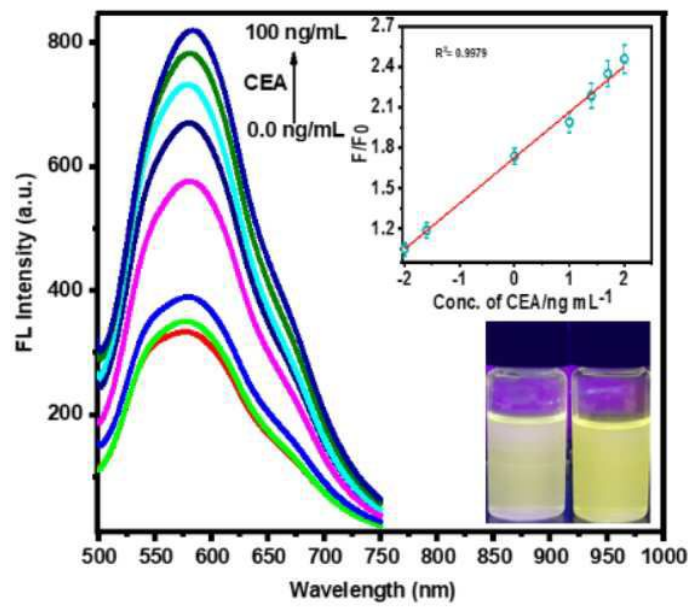
도면3e



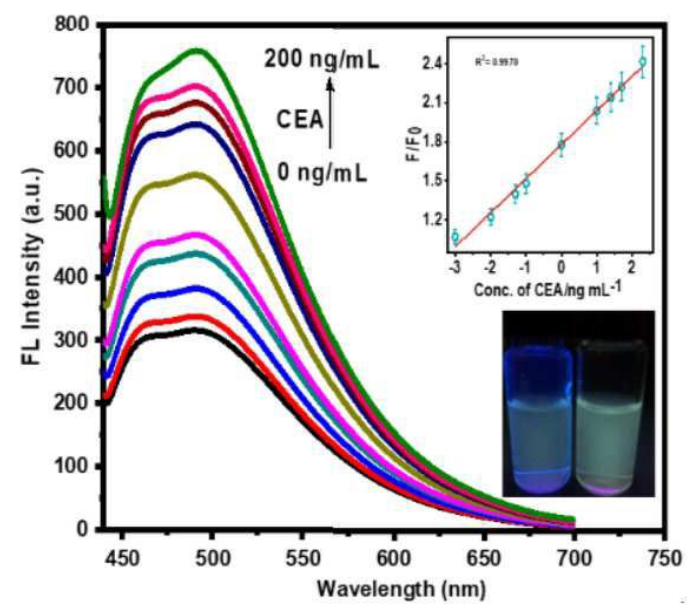
도면4a



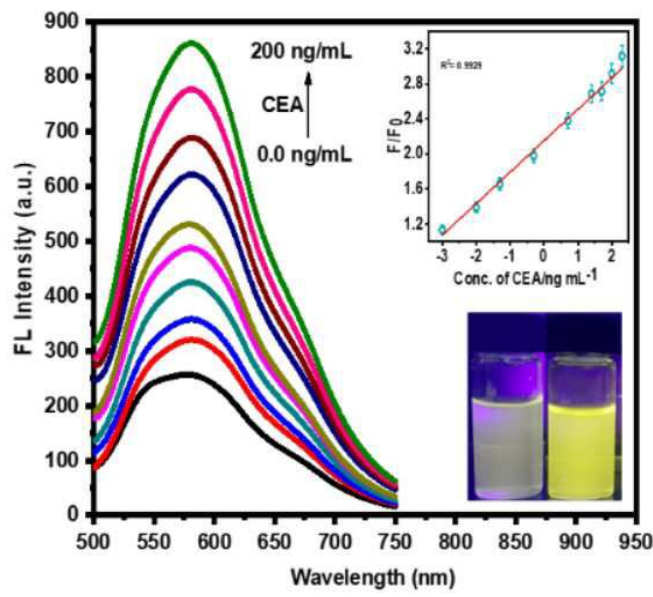
도면4b



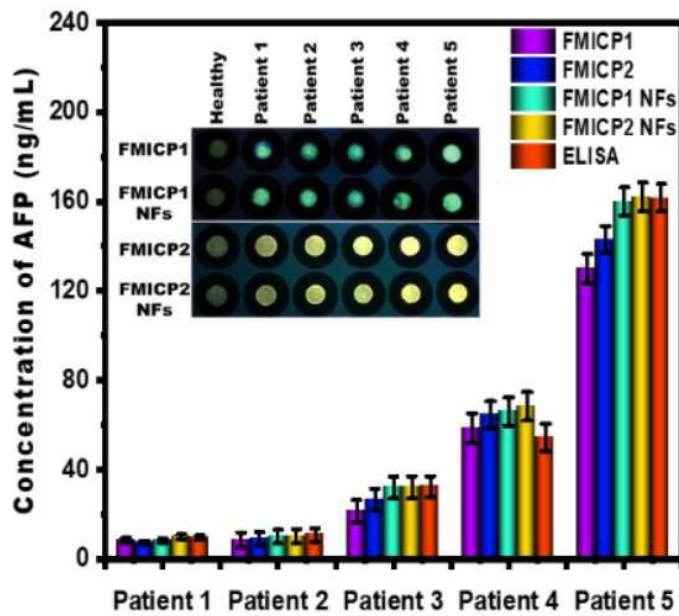
도면4c



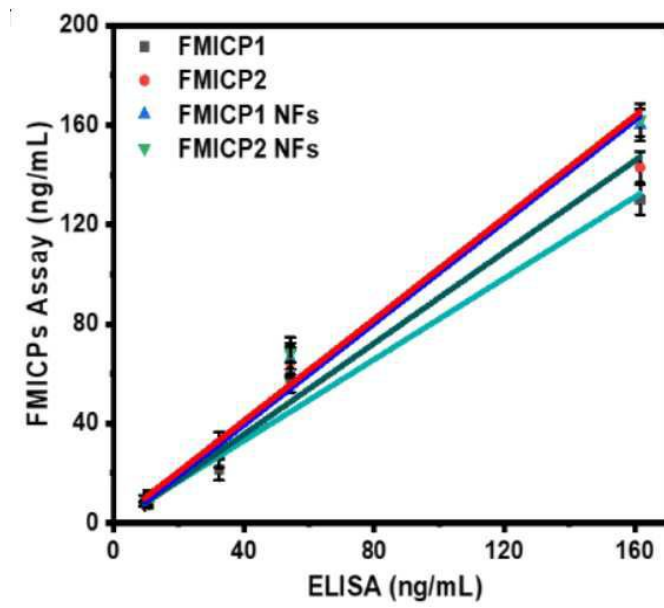
도면4d



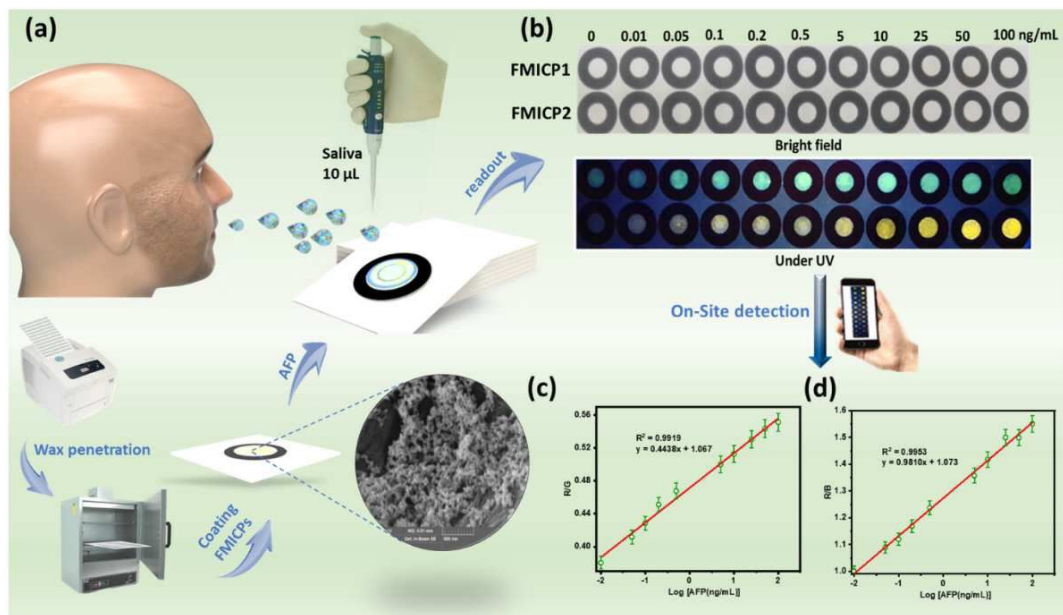
도면4e



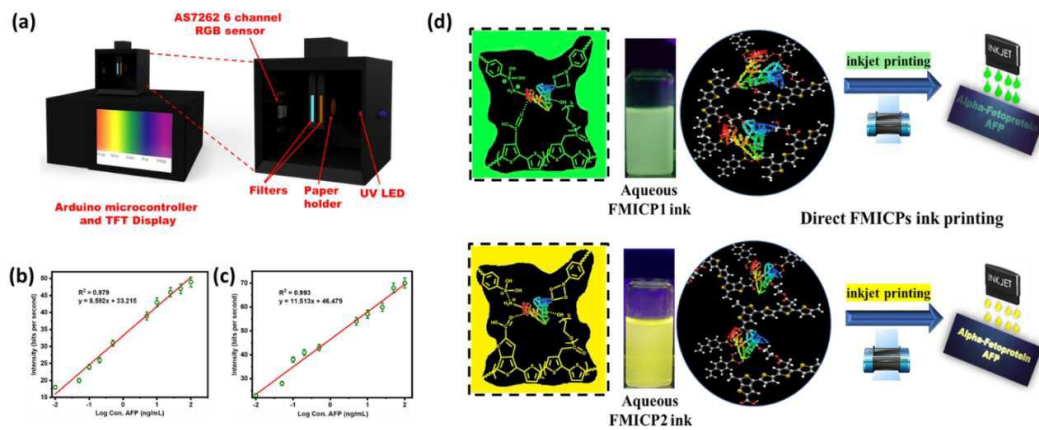
도면4f



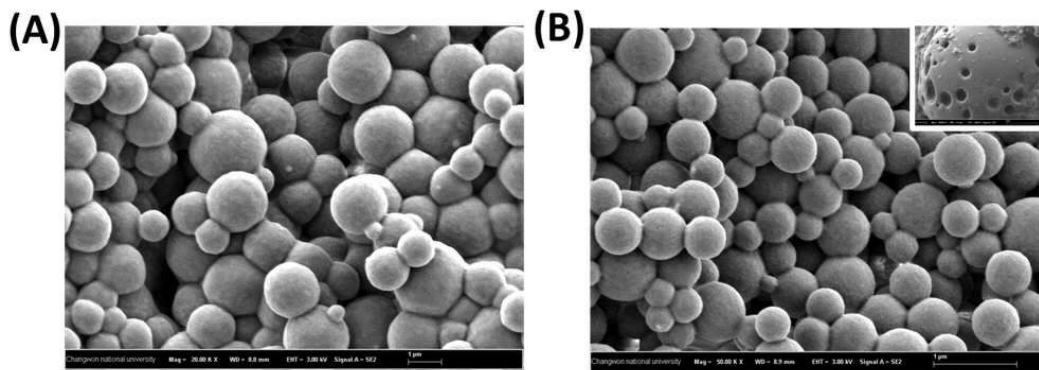
도면5a



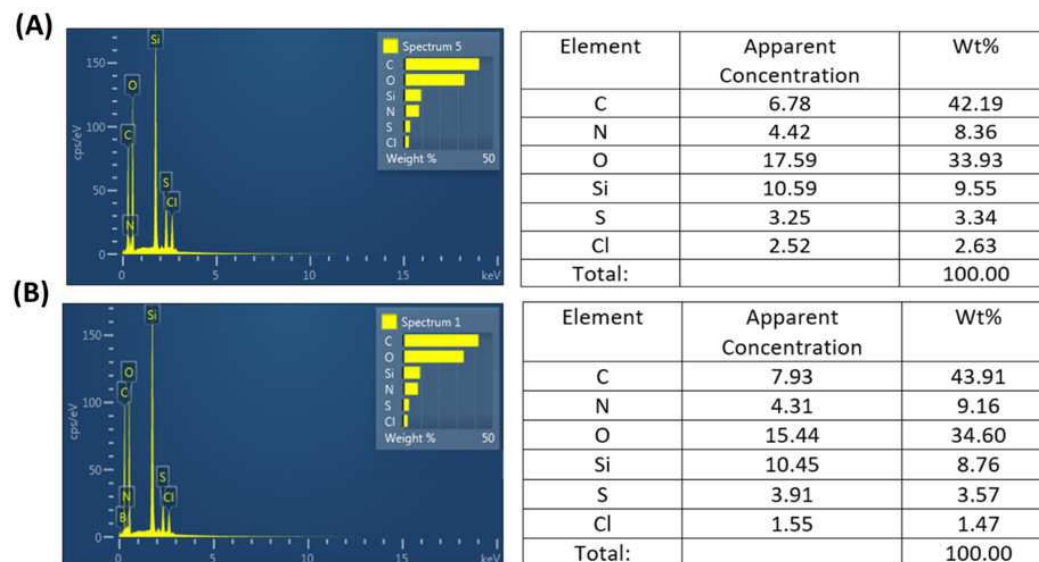
도면5b



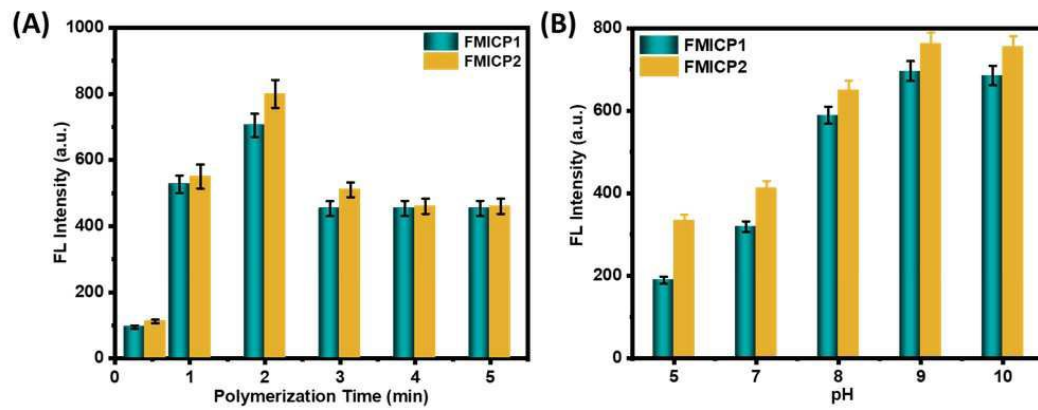
도면6



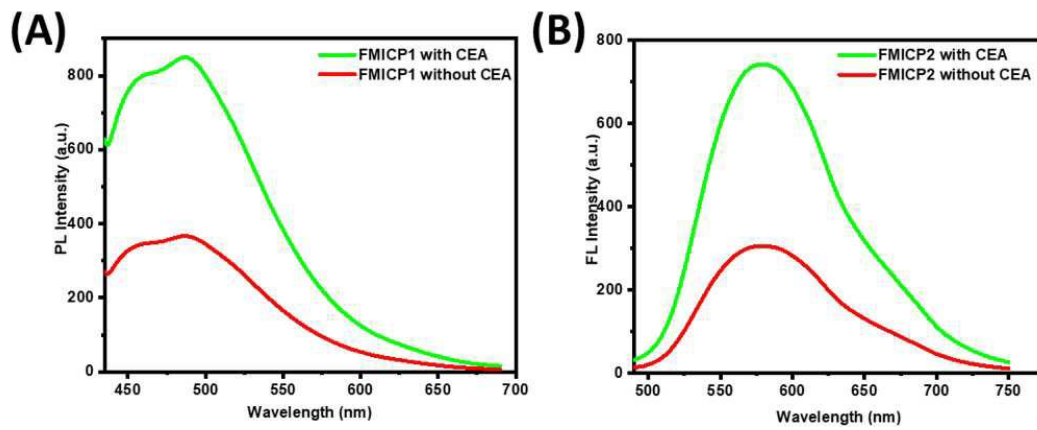
도면7



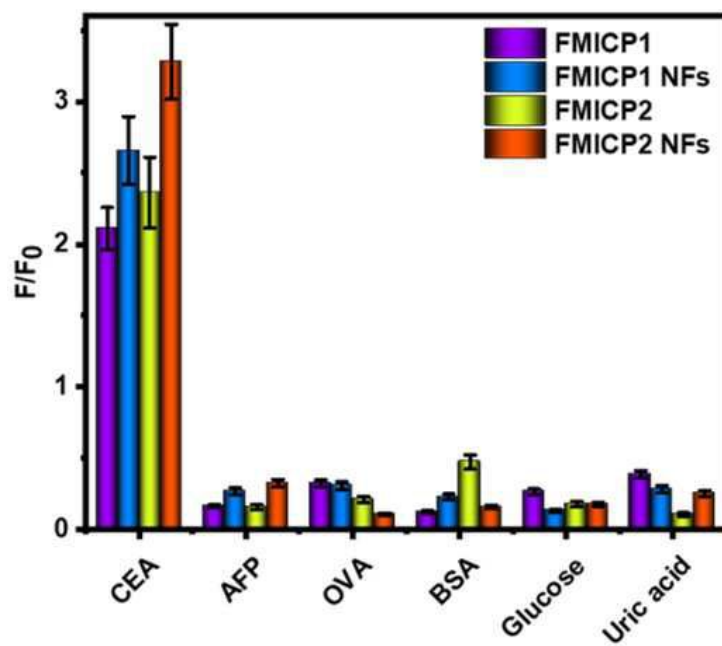
도면8



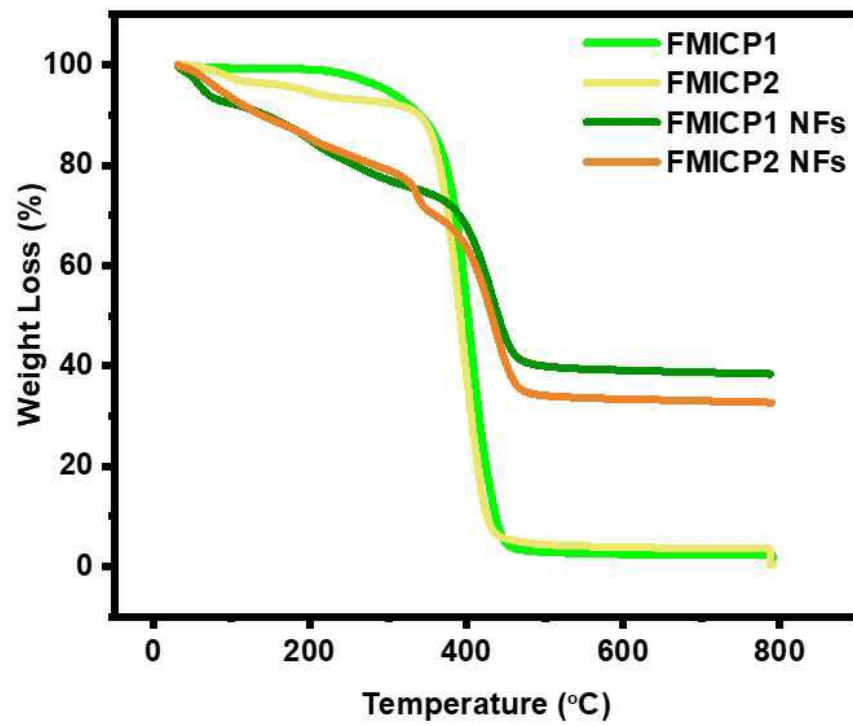
도면9



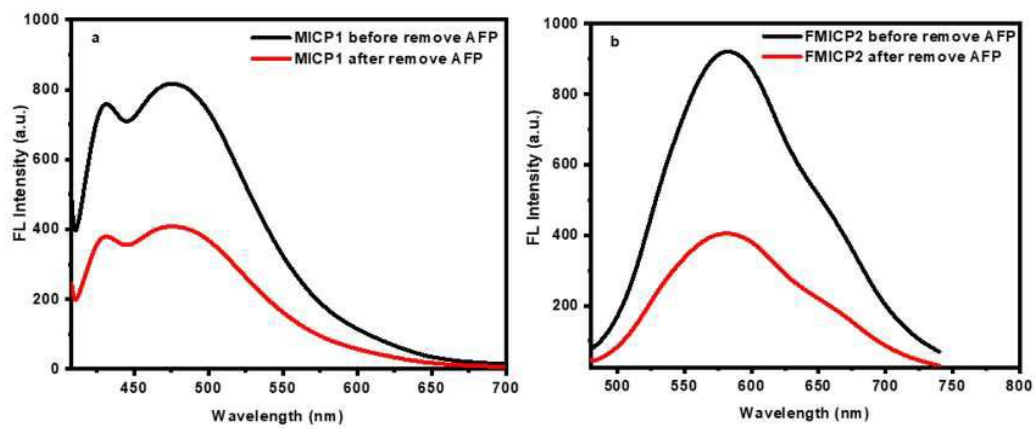
도면10



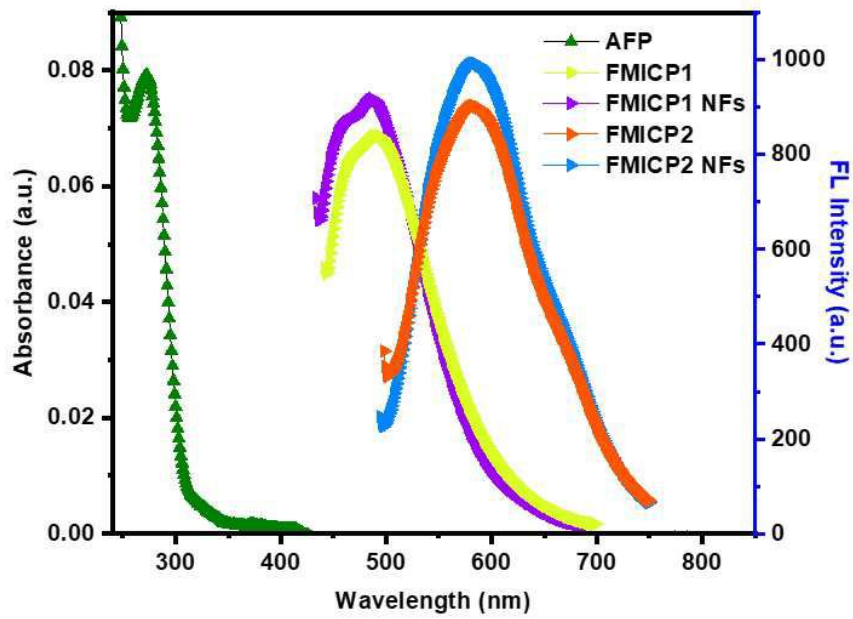
도면11



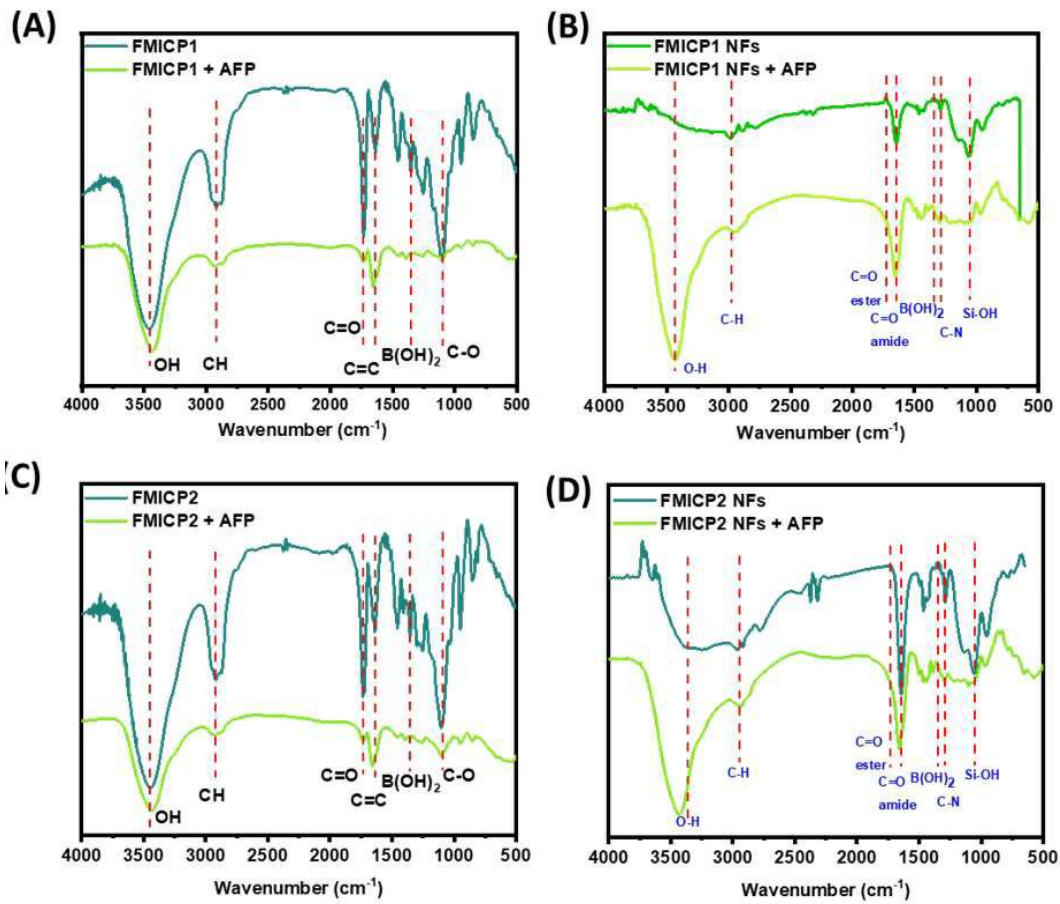
도면12



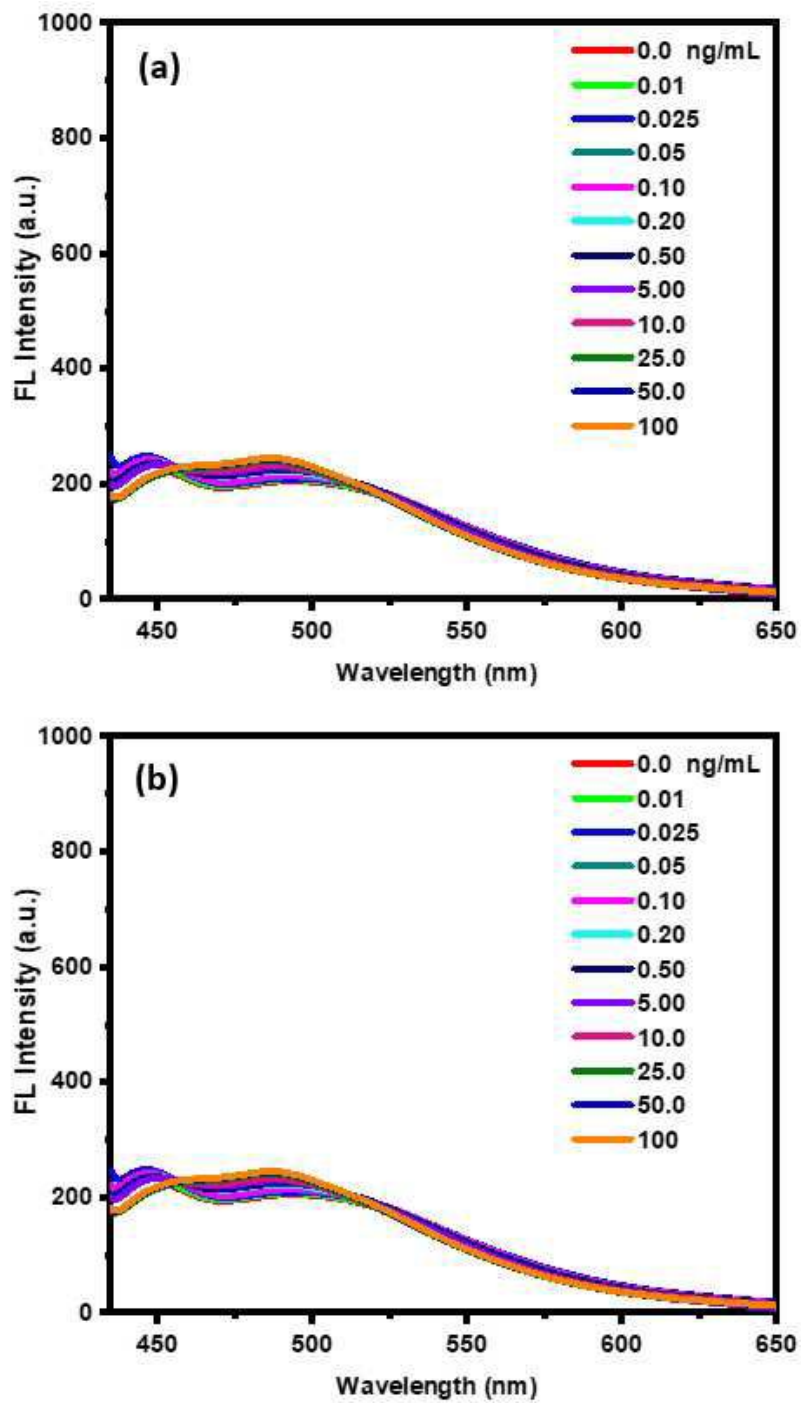
도면13



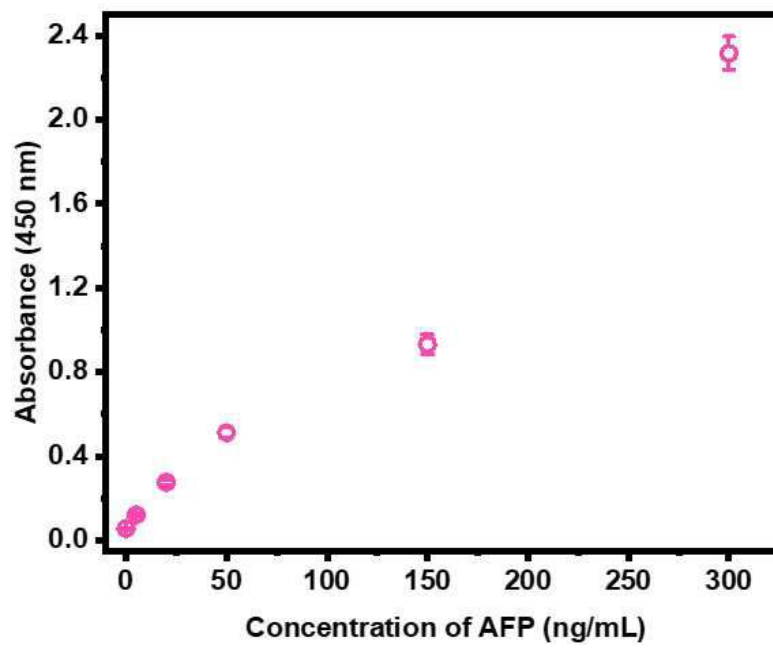
도면14



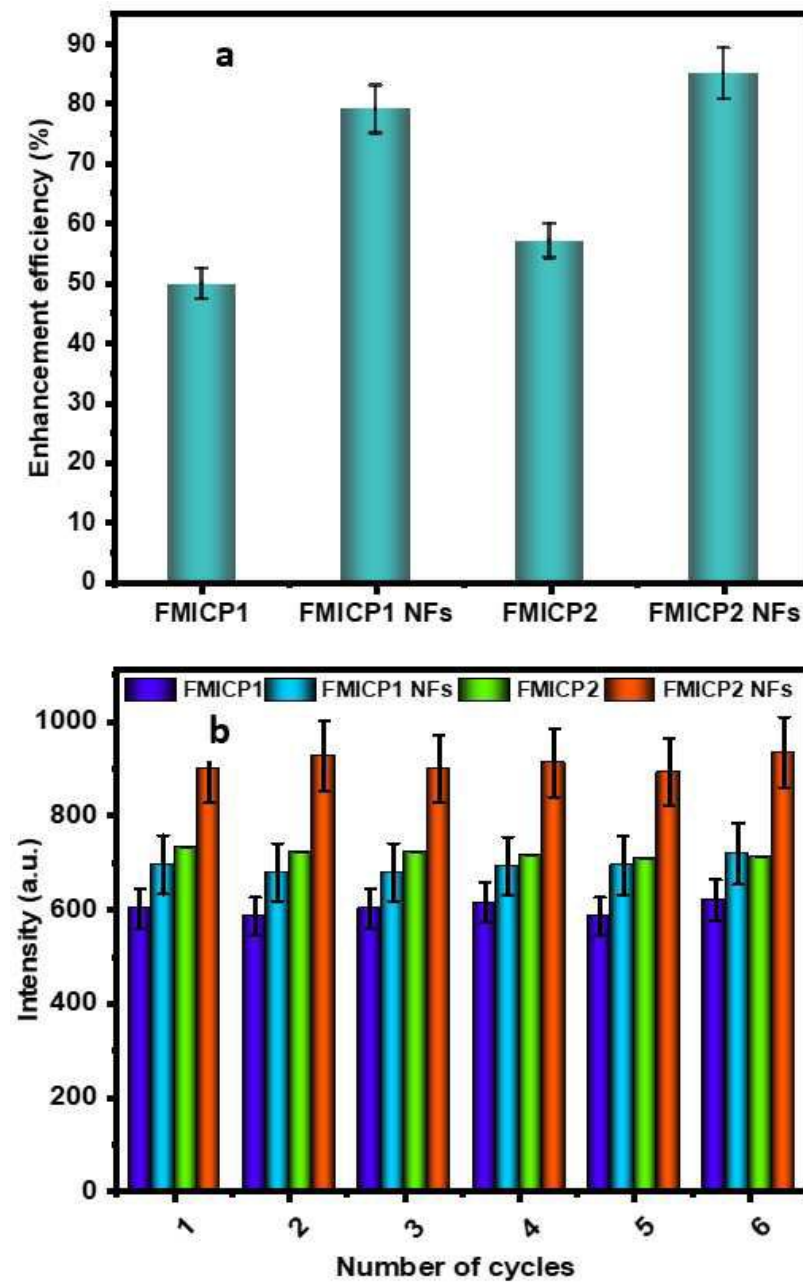
도면15



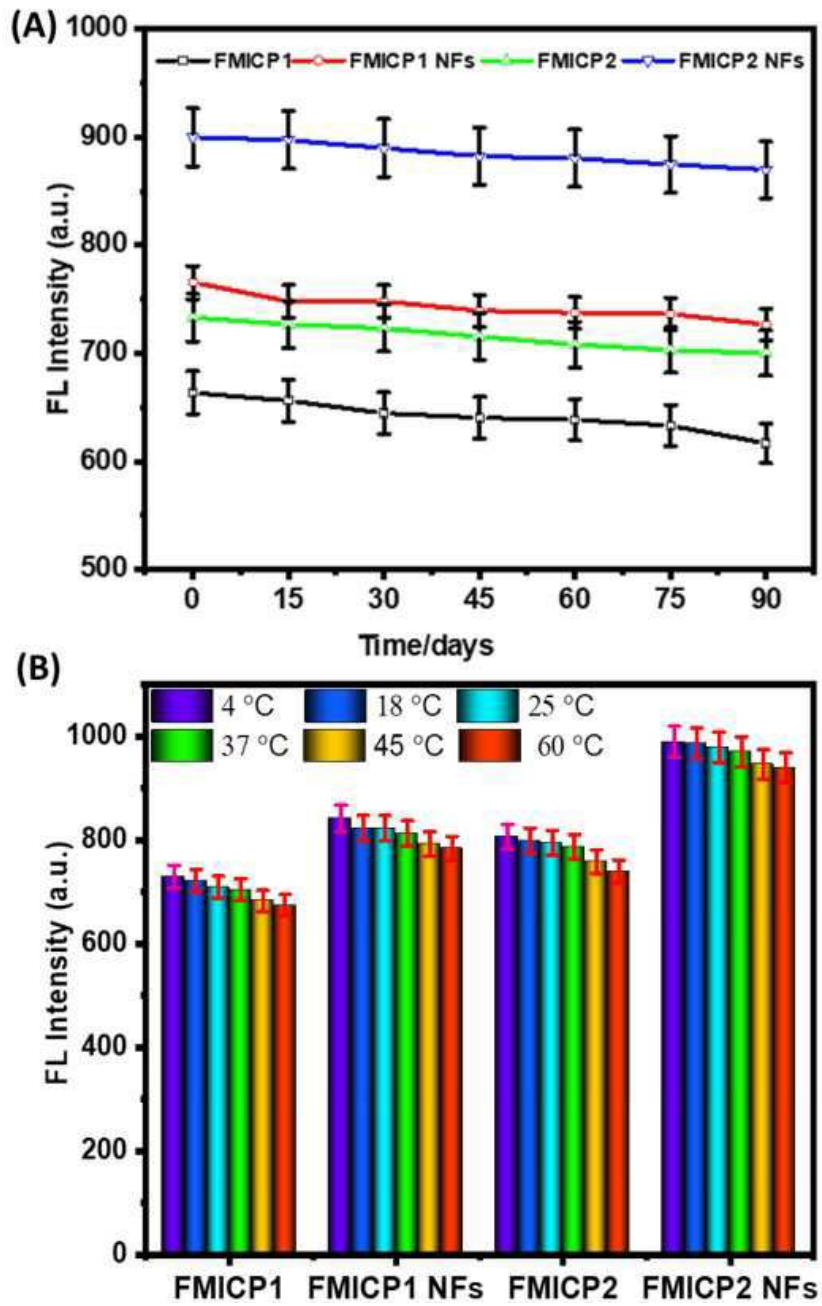
도면16



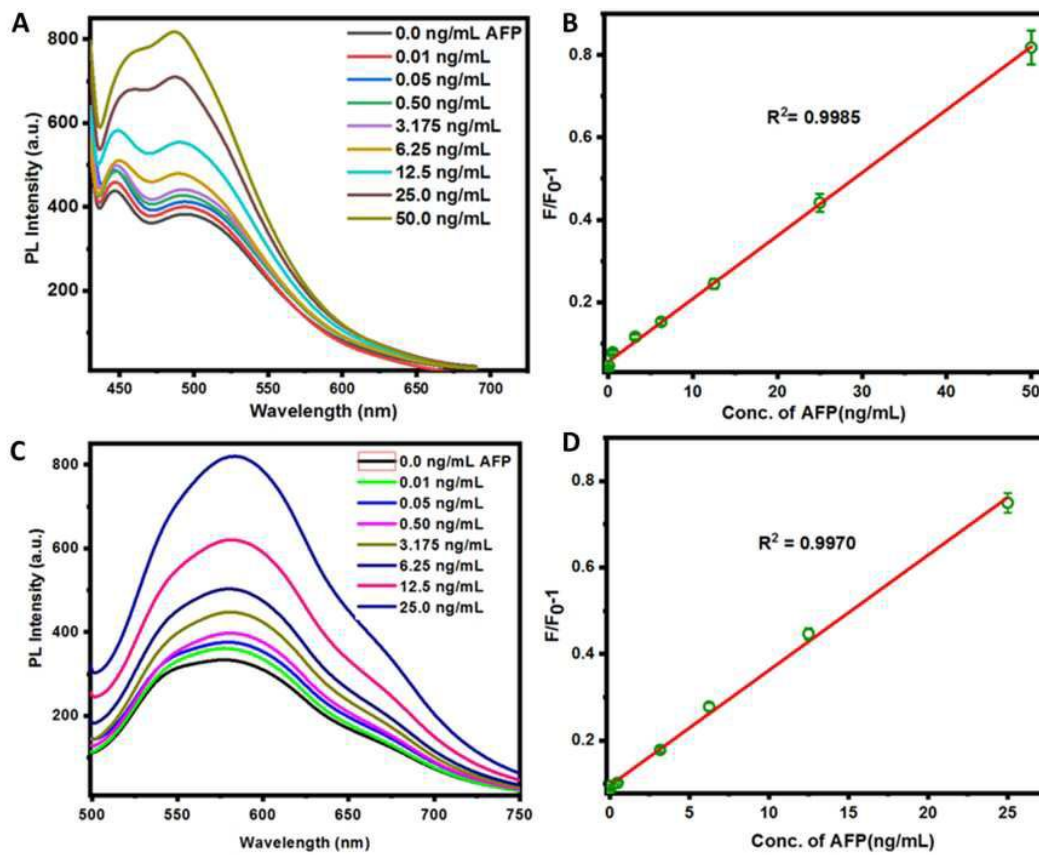
도면17



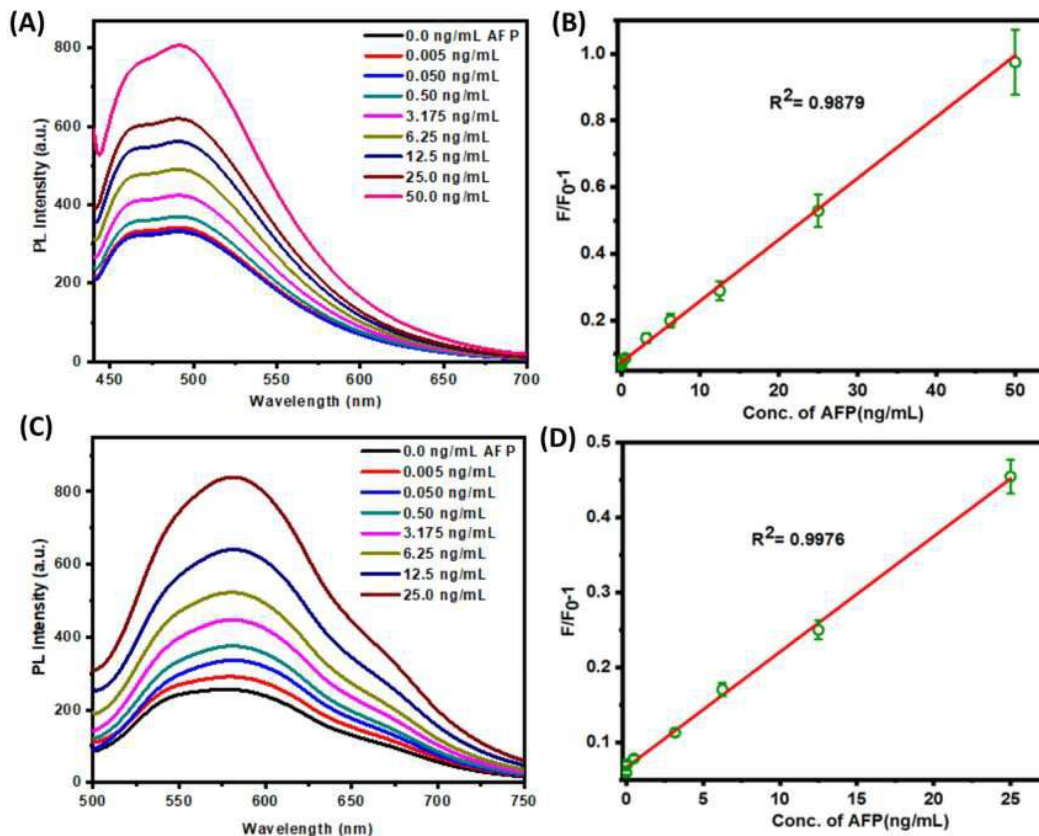
도면18



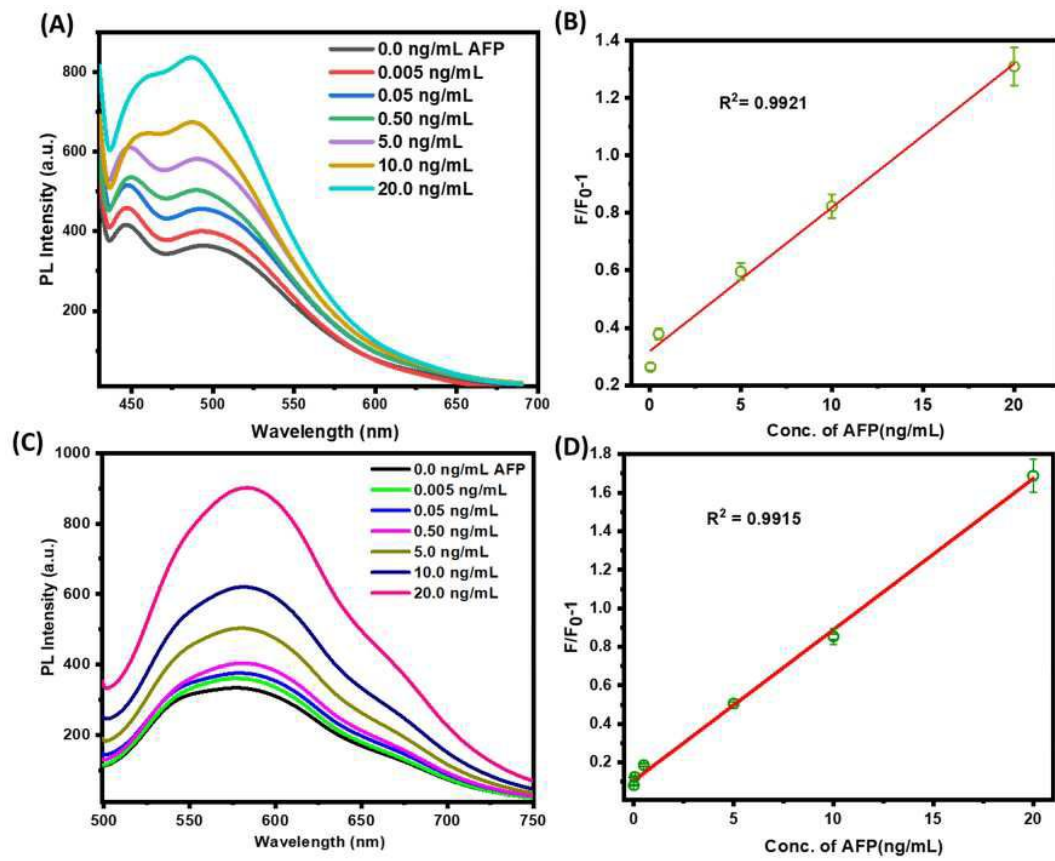
도면19



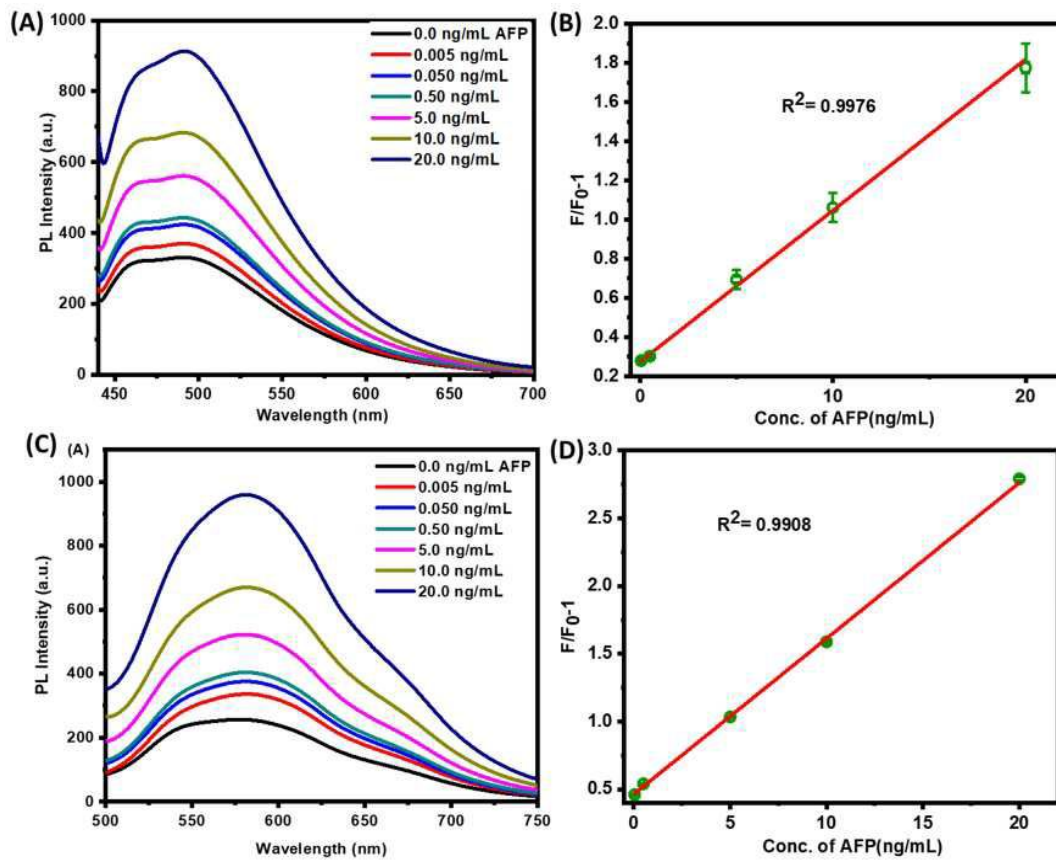
도면20



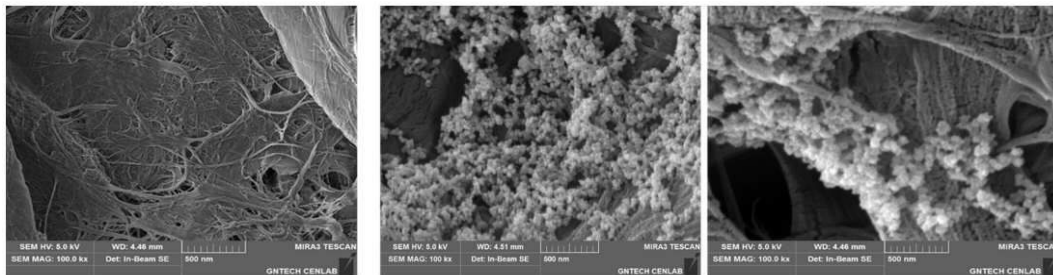
도면21



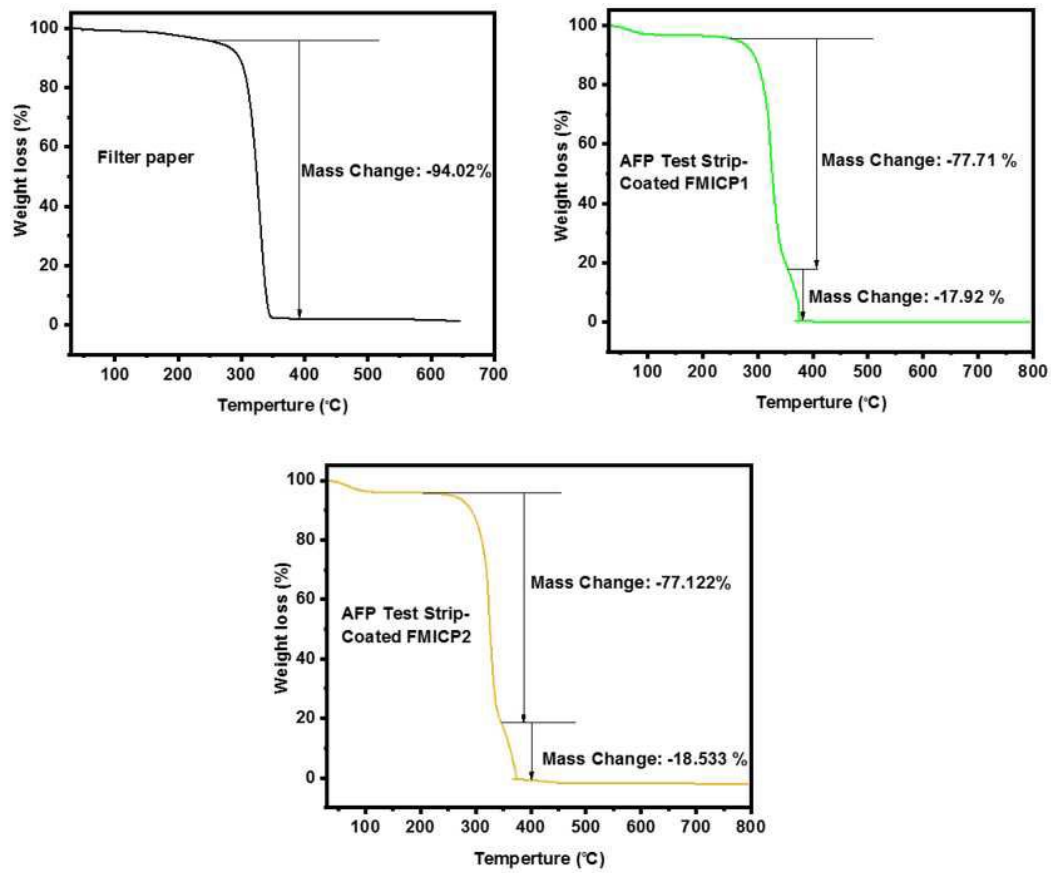
도면22



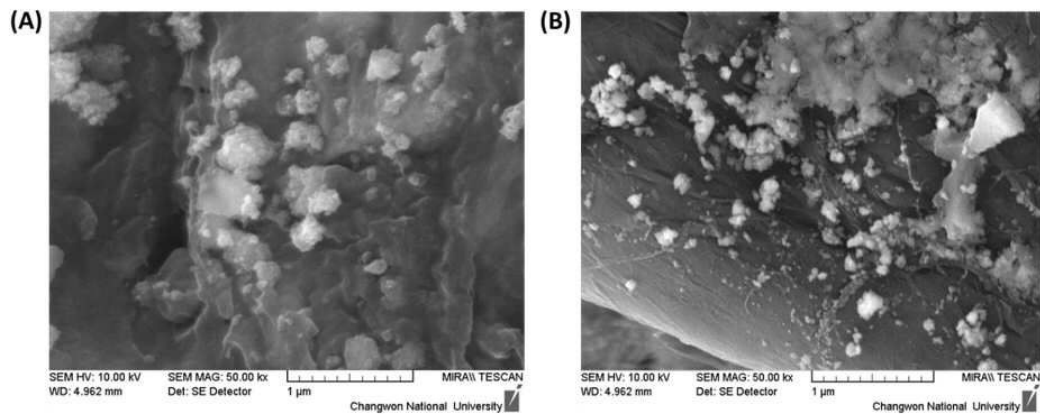
도면23



도면24



도면25



도면26

