



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0067005
(43) 공개일자 2024년05월16일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>G01N 33/543</i> (2006.01) <i>G01N 21/25</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/553</i> (2006.01) <i>G01N 33/68</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>G01N 33/54346</i> (2013.01)
 <i>G01N 33/54373</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0146562
 (22) 출원일자 2023년10월30일
 심사청구일자 2023년10월30일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020220142895 2022년10월31일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
 심상준
 서울특별시 영등포구 의사당대로 127, 102동 1401호
 김수현
 서울특별시 중랑구 면목로72길 14, 바동 302호
 이중욱
 서울특별시 구로구 경인로67길 33, 101동 1102호</p> <p>(74) 대리인
 정은열, 김태훈</p> |
|--|---|

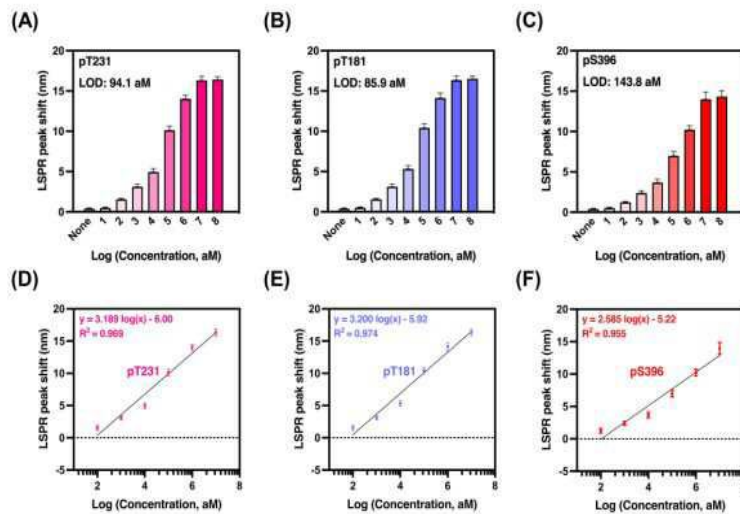
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 알츠하이머병과 경도인지장애의 조기 진단 및 감별이 가능한 나노플라즈모닉 바이오센서 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 플라즈몬 공명 효과를 이용한 알츠하이머병과 경도인지장애의 조기진단이 가능한 고감도 나노플라즈모닉 바이오센서에 관한 것이다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

G01N 33/553 (2013.01)

G01N 33/6896 (2013.01)

G01N 2021/258 (2013.01)

G01N 2440/14 (2013.01)

G01N 2800/2814 (2013.01)

G01N 2800/2821 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465035560
과제번호	HU21C0335010022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	치매극복연구개발사업(복지부)
연구과제명	나노플라즈모닉 치매 진단 플랫폼 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711166836
과제번호	2019R1A2C3009821
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	생물분자 유도 비대칭성 나노입자 합성을 이용한 광학기반 정밀의료용 난치성 질환

액체생검 바이오플랫폼 개발

기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711166410
과제번호	2020R1A5A1018052
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	나노-광 융합 바이오의료 진단 연구센터
기 여 율	1/3
과제수행기관명	중앙대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

제1 구형 금속 나노입자 및 제2 구형 금속 나노입자가 이중가닥 DNA로 연결된, 알츠하이머 진단을 위한 바이오 센서 기관용 비대칭 금속 나노 이합체로서,

상기 2개의 구형 금속 나노입자는 크기가 동일하지 않은 비대칭 구조인 것이 특징인, 비대칭 금속 나노 이합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 구형 금속 나노입자의 직경은 3 내지 7nm이고,

상기 제2 구형 금속 나노입자의 직경은 13 내지 17nm인 것인, 비대칭 금속 나노 이합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제1 구형 금속 나노입자와 제2 구형 금속 나노입자의 크기 비율은 2.5 내지 2.8인 것인, 비대칭 금속 나노 이합체.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 크기 비율은 제1 구형 금속 나노입자의 직경과 제2 구형 금속 나노입자의 직경의 비인 것인, 비대칭 금속 나노 이합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 금속은 금(Au), 구리(Cu), 백금(Pt) 및 팔라듐(Pd)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것인, 비대칭 금속 나노 이합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 이중가닥 DNA는 100 내지 150bp로 이루어진 것인, 비대칭 금속 나노 이합체.

청구항 7

기관;

상기 기관에 고정된, 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체가 연결된 제1항 내지 제6항 중

어느 한 항의 비대칭 금속 나노 이합체; 및,

상기 비대칭 금속 나노 이합체에서의 국소 표면 플라스몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 인산화된 타우 단백질 측정용 고감도 나노 플라스모닉 바이오센서.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 바이오센서는 인산화된 타우 단백질의 특이적 결합으로 발생하는 레일리 산란 스펙트럼의 변화를 측정하여 인산화된 타우 단백질을 검출하는 것을 특징으로 하는, 인산화된 우 단백질 측정용 고감도 나노 플라스모닉 바이오센서.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 인산화된 타우 단백질은 타우 단백질을 구성하는 아미노산 서열에서 181번 트레오닌, 231번 트레오닌 또는 396번 세린이 인산화된 것인, 인산화된 타우 단백질 측정용 고감도 나노 플라스모닉 바이오센서.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 타우 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 인산화된 타우 단백질 측정용 고감도 나노 플라스모닉 바이오센서.

청구항 11

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항의 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계를 포함하는, 인산화된 타우 단백질의 검출 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

인산화된 타우 단백질과 항체의 결합 분석에 의해 인산화된 타우 단백질을 확인하는 것을 특징으로 하는, 인산화된 타우 단백질의 검출 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 바이오마커 혼합물은 혈액 또는 응집소가 제거된 혈장인 것인, 인산화된 타우 단백질의 검출 방법.

청구항 14

기관;

상기 기관에 고정된, 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체가 연결된 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 비대칭 금속 나노 이합체; 및,

상기 비대칭 금속 나노 이합체에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 알츠하이머 진단용 고감도 나노 플라즈모닉 바이오센서.

청구항 15

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항의 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및
인산화된 타우 단백질을 검출하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 진단 방법.

청구항 16

기관;

상기 기관에 고정된, 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체가 연결된 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 비대칭 금속 나노 이합체; 및,

상기 비대칭 금속 나노 이합체에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 알츠하이머병과 경도인지장애 감별용 고감도 나노 플라즈모닉 바이오센서.

청구항 17

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항의 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및
인산화된 타우 단백질을 검출하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병과 경도인지장애 감별 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 플라즈몬 공명 효과를 이용한 알츠하이머병과 경도인지장애의 조기진단과 감별이 가능한 나노플라즈모닉 바이오센서 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 전 세계적으로 수천만 명이 치매를 앓고 있으며, 2030년까지 치매 유병률은 2배로 증가할 것으로 예상된다. 대부분의 치매는 알츠하이머병(AD)에 의해 발생하며, 돌이킬 수 없는 기억 상실 및 심각한 인지 기능 저하와 같은 증상이 특징이다. 경도인지장애(MCI)는 알츠하이머병의 초기 단계로 알츠하이머병과 경도인지장애(MCI)에 대한 정확한 진단은 알츠하이머병 치매 환자의 알츠하이머병 진행을 지연시키고 적절한 치료를 유도하는 데 매우 중요한 요소이다. 이에 따라 인지 기능 저하에 대한 표적 치료와 환자 관리를 위해 MCI와 AD를 감별하는 감별 진단 기술의 필요성이 증가하고 있는 추세이다.

[0004] MCI와 AD 단계를 감별 진단하기 위한 최근 임상시험은 신경심리 검사와 양전자방출단층촬영(PET)과 같은 신경영상에 크게 의존하고 있다. 그러나 신경심리 검사는 대부분 주관적인 매개변수로 결과를 도출하기 때문에, 진단 정확도가 상대적으로 낮다. 반면, 신경영상 기반 임상 방법은 진단 정확도가 높은 반면, 개인에게 막대한 재정적 부담과 건강적인 위험을 초래한다. 또한, 이러한 방법들은 알츠하이머 증상이 나타난 후에야 효율적이며, 증상이 나타나기 전에 알츠하이머를 진단하는 데는 상당한 시간이 필요하다. 따라서, 증상 발현 전에 신뢰할 수 있는 결과를 도출할 수 있는, 체액(예: 혈장, 혈청, 타액 등)을 기반으로 하는 진단 방법이 요구되어 왔다.

[0006] 한편, 혈액 내 수많은 생체 분자 중 타우 단백질은 알츠하이머 치매의 개별화된 예측을 위한 1차 진단 및 예후 예측 도구로 관심을 끌고 있다. 일반적으로 타우 단백질은 신경세포 미세소관에 결합되어 있지만, 비정상적인

인산화는 미세소관에서 분리되어 신경섬유영킴(neurofibrillary tangles, NFTs)으로 응집을 유도한다. 미세소관의 파괴와 비정상적으로 인산화된 타우 단백질(p-tau)의 응집체는 세포 독성을 유발하여, AD에서 신경세포 손실을 초래한다. AD가 진행됨에 따라 타우 단백질의 여러 특정 부위가 연속적으로 인산화되는 것으로 알려져 있으므로, 특정 부위에서 p-tau를 차별적으로 검출하는 것은 인지장애 및 AD 환자의 감별 진단에 유망한 도구이다.

[0007] 그러나 무한히 적은 양의 p-tau와 많은 양으로 공존하는 비특이적 단백질은 혈액에서 p-tau를 정확하고 신뢰할 수 있게 검출하는 것을 어렵게 만든다. 따라서, 임상적으로 MCI와 AD의 감별 진단이 유용하게 이용되기 위해서는 높은 감도와 정확도로 p-tau를 검출할 수 있는 새로운 접근 방식이 필요하다.

[0009] 단일 나노 입자 기반 나노 플라즈몬 바이오센서(single nanoparticle-based nanoplasmonic biosensors, SNPB)는 입사광과 상호작용하고 입사 전자기 복사에 반응하여 입자 표면에 국한된 전도 전자의 집단 진동으로 발생하는 국소 표면 플라즈몬 공명(localized surface plasmon resonance, LSPR)을 유도할 수 있기 때문에, 혈액 내 미량의 생체 분자를 검출하는 분야의 관심을 끌고 있다. SNPB에서 각 플라즈모닉 나노입자는 국소 굴절률(RI)의 변화를 공진 주파수에서 산란 스펙트럼 변화로 변환하는 변환기 역할을 한다.

[0010] 따라서, SNPB는 감지 부피가 작아 검출 한계(LOD)가 셀 수 없을 정도로 많은 분자에 도달하는 나노미터 규모의 생물학적 과정을 감지하고 추적하는 데 이점을 제공할 수 있다. 또한, SNPB 성능은 플라즈몬 나노입자의 기하학적 정보에 따라 크게 달라진다. 이러한 이유로 플라즈몬 나노입자의 광학적 특성을 이해하고 분자 감지 응용분야에서 이 시스템의 잠재력을 실현하려면 플라즈몬 나노 입자의 조립을 제어하는 것이 필수적이다.

[0011] SNPB에서 독립적인 신호 변환기로 사용되는 NP(나노입자)의 구조와 크기는 감지 성능을 결정하는 데 필수적인 역할을 하기 때문에 SNPB의 핵심 요소이다. 또한 나노입자의 대칭성 파괴는 개별 나노 입자의 혼성화를 통해 새로운 플라즈몬 모드를 생성하기 때문에 전례 없는 광학적 특성을 가져 외부 빛에 더 민감하게 반응할 수 있으며, 최근 임상 진단용 플라즈몬 바이오센서의 신호 변환기로서 우수한 후보가 되고 있으나, 비대칭 나노입자는 대칭적인 모양으로 성장하는 경향이 있기 때문에 기존의 열역학 제어에서는 제조하기가 어려운 한계가 있었다.

[0013] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 플라즈몬 비대칭 나노브릿지(PAN) 기반 센싱 플랫폼이 대칭이 깨진 두 개의 불일치 구형 나노입자 사이의 공진 결합으로 인하여, 기존 p-tau 검출 방법에 비하여 알츠하이머 진행과 관련된 다양한 표적 p-tau를 원자 농도까지 안정적으로 검출할 수 있고, 매우 낮은 검출 한계와 $10^2 \sim 10^7$ aM의 넓은 감지 범위를 가지며, 교차 반응 없이 검출 타겟 p-tau에 대한 높은 선택성을 가지는 것을 확인함으로써, MCI, AD 및 정상 인지환자 간의 정확한 감별 및 진단을 할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 하나의 목적은 제1 구형 금속 나노입자 및 제2 구형 금속 나노입자가 이중가닥 DNA로 연결된, 알츠하이머 진단을 위한 바이오센서 기관용 비대칭 금속 나노 이합체로서, 상기 2개의 구형 금속 나노입자는 크기가 동일하지 않은 비대칭 구조인 것이 특징인, 비대칭 금속 나노 이합체를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 하나의 목적은 기관; 상기 기관에 고정된, 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체가 연결된 상기 비대칭 금속 나노 이합체; 및, 상기 비대칭 금속 나노 이합체에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 인산화된 타우 단백질 측정용 고감도 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및 인산화된 타우 단백질을 검출하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 진단 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계를 포함하는, 인산화된 타우 단백질의 검출 방법을 제공하는 것이다.

- [0019] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 기관; 상기 기관에 고정된, 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체가 연결된 상기 비대칭 금속 나노 이합체; 및, 상기 비대칭 금속 나노 이합체에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 알츠하이머병 진단용 고감도 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및 인산화된 타우 단백질을 검출하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 진단 방법을 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 기관; 상기 기관에 고정된, 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체가 연결된 상기 비대칭 금속 나노 이합체; 및, 상기 비대칭 금속 나노 이합체에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 알츠하이머병과 경도인지장애 감별용 고감도 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제공하는 것이다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및 인산화된 타우 단백질을 검출하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 감별 방법을 제공하는 것이다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 인산화된 타우 단백질 검출용 고감도 나노플라즈모닉 바이오센서의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0025] 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0026] 본 발명은 제1 구형 금속 나노입자 및 제2 구형 금속 나노입자가 이중가닥 DNA로 연결된, 알츠하이머 진단을 위한 바이오센서 기관용 비대칭 금속 나노 이합체로서, 상기 2개의 구형 금속 나노입자는 크기가 동일하지 않은 비대칭 구조인 것이 특징인, 비대칭 금속 나노 이합체를 제공할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 제1 구형 금속 나노입자의 직경은 3 내지 7nm이고, 상기 제2 구형 금속 나노입자의 직경은 13 내지 17nm를 포함하는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 제1 구형 금속 나노입자와 제2 구형 금속 나노입자의 크기 비율은 2.5 내지 2.8인 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 크기 비율은 제1 구형 금속 나노입자의 직경과 제2 구형 금속 나노입자의 직경의 비일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 금속은 금(Au), 구리(Cu), 백금(Pt) 및 팔라듐(Pd)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 이중가닥 DNA는 100 내지 150bp로 이루어진 것일 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0034] 기관; 상기 기관에 고정된, 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체가 연결된 상기 비대칭 금속 나노 이합체; 및, 상기 비대칭 금속 나노 이합체에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 인산화된 타우 단백질 측정용 고감도 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제공할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 바이오센서는 인산화된 타우 단백질의 특이적 결합으로 발생하는 레일리 산란 스펙트럼의 변화를 측정하여 인산화된 타우 단백질을 검출하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 인산화된 타우 단백질은 타우 단백질을 구성하는 서열에서 181번 트레오닌, 231번 트레오닌 또는 396번 세린이 인산화된 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 타우 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

- [0039] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 상기 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계를 포함하는, 인산화된 타우 단백질의 검출 방법을 제공할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 인산화된 타우 단백질과 항체의 결합 분석에 의해 인산화된 타우 단백질을 확인하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 바이오마커 혼합물은 혈액 또는 응집소가 제거된 혈장인 것일 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 기관; 상기 기관에 고정된, 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체가 연결된 상기 비대칭 금속 나노 이합체; 및, 상기 비대칭 금속 나노 이합체에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 알츠하이머병 진단용 고감도 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제공할 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 상기 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및 인산화된 타우 단백질을 검출하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 진단방법을 제공할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 기관; 상기 기관에 고정된, 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체가 연결된 상기 비대칭 금속 나노 이합체; 및, 상기 비대칭 금속 나노 이합체에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 알츠하이머병과 경도인지장애 감별용 고감도 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제공할 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 상기 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및 인산화된 타우 단백질을 검출하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병과 경도인지장애 감별법을 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0049] 본 발명에 따른 나노플라즈모닉 바이오센서는 추가적인 표지자 없이도 알츠하이머병과 경도인지장애와 관련된 타우 단백질을 극미량에서도 검출이 가능하고, 혈중 인산화 타우 단백질을 특이적으로 다중 검지하고 비교/분석함으로써 기존의 단일 바이오마커 검출 기반의 알츠하이머 질환 진단보다 더욱 정확한 진단이 가능하고, 특히 경도인지장애와의 감별이 가능하여 조기 진단에도 응용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1은 PAN 사전 설계를 나타낸 도면으로, (A)는 대칭형 Au 나노브릿지(왼쪽), 나노 갭이 있는 비대칭형 Au 이합체(가운데), 유한 차분 시간 영역(FDTD) 방법을 통해 계산된 본 발명의 PAN(오른쪽)의 플라즈몬 전자기장 분포도이고, (B)는 각 구조에 대한 AuNP를 둘러싼 레일리 광 산란 피크 시프트 및 굴절률(RI)을 나타낸 도이다.
- 도 2는 크기 비율이 각각 2.17(왼쪽), 2.67(오른쪽), 3.17(오른쪽)인 PAN의 플라즈몬 전자기장 분포로 FDTD 시뮬레이션으로 계산한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 PAN의 특성화 결과로, (A)는 PAN 합성을 위한 DNA 유도 결정화 방법의 모식도이고, (B)는 PAN의 브릿지 영역(왼쪽)과 강조 표시된 영역(오른쪽)의 고속 푸리에 변환 패턴의 EF-TEM 이미지(스케일 막대, 5 nm)이며, (C)는 PAN의 특정 지점(큰 구형 끝(파란색), 브릿지(녹색), 작은 구형 끝(빨간색)에서의 전자 에너지 손실 분광법(EELS) 스펙트럼의 플라즈몬 피크에 근접한 모습이고, (D)는 단일 PAN(n=5)에서 실험적으로 측정된 레일리 광 산란 스펙트럼의 신호 재현성(왼쪽) 및 FDTD 방법으로 시뮬레이션한 PAN의 산란 스펙트럼(오른쪽) 결과이고, (E)는 553.0nm 입사광에서 여기 시 PAN의 전하 밀도 분포를 나타낸 결과이다.
- 도 4는 (A)는 한 가닥 DNA를 가진 5nm AuNP와 (B) 한 가닥 DNA를 가진 15nm AuNP를 전기영동으로 정제하는 결과이고, (C) PAN 합성을 위한 나노시드로 사용될 두 종류의 AuNP/DNA 접합체의 혼성화 생성물 정제하고, (D) 나노 시드와 성공적으로 합성된 PAN의 EF-TEM 이미지 (스케일 막대, 50nm)를 나타낸 도이다.

도 5는 PAN의 형태학적 정보로, (A) 더 큰 구형 끝 (B) 더 작은 구형 끝 (C) 브리지 길이 (D) 브리지 높이를 ImageJ 소프트웨어로 측정된 결과이다(n=100).

도 6은 PAN 기반 나노 프로브 제작 공정의 제타 전위 데이터를 나타낸 도이다.

도 7은 PAN 기반 나노 프로브 제작 공정의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 8은 PAN 기반 SNPB의 제작을 나타낸 도로, (A) 알츠하이머병 특이적 p-tau 종의 검출 과정을 설명하는 PAN 기반 SNPB의 모식도, (B) 표적 p-tau 종의 결합에 대응하는 PAN 기반 SNPB의 대표적 레이저 광 산란 스펙트럼 행을 나타낸 도이다.

도 9는 PAN 기반 SNPB의 민감도 테스트 결과로, $10^0 \sim 10^8$ aM 범위의 농도에서 (A) pT231, (B) pT181 및 (C) pS396 검출 결과이고, $10^2 \sim 10^7$ aM 범위에서 (D) pT231, (E) pT181, (F) pS396의 LSPR 피크 시프트 사이의 선형 회귀 관계를 나타낸 도이다.

도 10은 PAN 기반 SNPB의 선택성 테스트 결과로, 3개의 서로 다른 표적 p-tau를 포함하는 샘플에서 (A) pT231, (B) pT181 및 (C) pS396에 대한 나노 프로브의 검출 선택성을 검증한 결과이다.

도 11은 PAN 기반 SNPB의 선택성 테스트로, 혼합 타겟 타우스픽 샘플에서의 선택성 테스트이다. 구체적으로, (A) pT231+pT181, (B) pT231+pS396, (C) pT181+pS396 및 (D) pT181+pT231+pS396 스파이크 샘플에서 LSPR 피크 시프트를 측정된 결과이다.

도 12는 AD 환자(n=20), MCI 환자(n=16), HC(n=11)의 인간 혈장에서 (A) pT181, (B) pT231, (C) pS396의 계산된 LSPR 피크 이동을 나타내는 박스 플롯(****p<0.0001, ***p<0.001, *p<0.05, ns; 유의하지 않음)을 나타낸 결과이다

도 13은 계산된 각 p-tau의 농도를 나타내는 박스 및 위스커 플롯 결과이다. 구체적으로, 종의 계산된 농도를 나타내는 박스형 및 수염형 플롯(그림 8). (A) pT231, (B) pT181, (C) pS396의 p-tau 종 농도를 나타내는 박스 플롯(****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05, ns; 유의하지 않음) 결과이다.

도 14는 MCI 환자, AD 환자, HC를 감별하기 위한 개별 p-tau 발현 분석의 ROC 곡선을 나타낸 결과이다.

도 15는 인간 혈장에서 바이오마커 조합의 계산된 LSPR 피크 이동을 나타내는 박스 및 수염 플롯을 나타낸 결과이다.

도 16은 MCI 환자, AD 환자 및 HC를 감별하기 위한 p-tau 조합의 ROC 곡선 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0053] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0055] 본 발명은 종래 웨스턴 블롯팅 또는 ELISA가 타우 단백질을 검출하는데 있어 한계를 가지는 문제점을 해결하고자 안출된 것이다.

[0056] 이에 본 발명에서는, 하나의 양태로 제1 구형 금속 나노입자 및 제2 구형 금속 나노입자가 이중가닥 DNA로 연결된, 알츠하이머 진단을 위한 바이오센서 기반용 비대칭 금속 나노 이합체로서, 상기 2개의 구형 금속 나노입자는 크기가 동일하지 않은 비대칭 구조인 것이 특징인, 비대칭 금속 나노 이합체를 제공하고자 한다.

[0057] 또한, 다른 양태로 기관; 상기 기관에 고정된, 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체가 연결된 상기 비대칭 금속 나노 이합체; 및, 상기 비대칭 금속 나노 이합체에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 인산화된 타우 단백질 측정용 고감도 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제공하고자 한다.

- [0058] 또한, 다른 양태로 상기 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및 인산화된 타우 단백질을 검출하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 진단 방법을 제공하고자 한다.
- [0059] 또한, 다른 양태로 상기 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계를 포함하는, 인산화된 타우 단백질의 검출 방법을 제공하고자 한다.
- [0060] 또한, 다른 양태로 기관; 상기 기관에 고정된, 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체가 연결된 상기 비대칭 금속 나노 이합체; 및, 상기 비대칭 금속 나노 이합체에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 알츠하이머병 진단용 고감도 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제공하고자 한다.
- [0061] 또한, 다른 양태로 상기 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및 인산화된 타우 단백질을 검출하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 진단 방법을 제공하고자 한다.
- [0062] 또한, 다른 양태로 기관; 상기 기관에 고정된, 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체가 연결된 상기 비대칭 금속 나노 이합체; 및, 상기 비대칭 금속 나노 이합체에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 알츠하이머병과 경도인지장애 감별용 고감도 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제공하고자 한다.
- [0063] 또한, 다른 양태로 상기 바이오센서에 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및 인산화된 타우 단백질을 검출하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 감별 방법을 제공하고자 한다.
- [0065] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0067] 본 발명에서 용어, “비대칭 금속 나노 이합체”는 제1 구형 금속 나노입자 및 제2 구형 금속 나노입자가 이중가닥 DNA로 연결된 형태로, 상기 2개의 구형 금속 나노입자는 크기가 동일하지 않은 비대칭 구조인 것이 특징이다.
- [0068] 상기 제1 구형 금속 나노입자의 직경은 3 내지 7nm이고, 상기 제2 구형 금속 나노입자의 직경은 13 내지 17nm일 수 있으며, 구체적으로는 상기 제1 구형 금속 나노입자는 5 내지 6nm이고, 상기 제2 구형 금속 나노입자 직경은 15 내지 16nm일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [0069] 상기 제1 구형 금속 나노입자와 제2 구형 금속 나노입자의 크기 비율은 2.5 내지 2.8일 수 있으며, 구체적으로는 2.67일 수 있으나 상기 범위라면 제한없이 포함될 수 있다.
- [0070] 이 때, 상기 크기 비율은 제1 구형 금속 나노입자의 직경과 제2 구형 금속 나노입자의 직경의 비, 또는 비율을 의미한다.
- [0071] 상기 금속은 금(Au), 구리(Cu), 백금(Pt) 및 팔라듐(Pd)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나이거나, 구체적으로는 금일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [0072] 본 발명에서 용어, “금속 나노시드”는 나노 형태의 금속을 말하는 것으로서, 특별히 그 형태는 제한되지 않으나, 나노구(nanosphere), 나노막대(nanorod), 나노프리즘(nanoprism) 및 나노판(nanoplate)으로 구성된 군에서 선택된 하나일 수 있고, 구체적으로는 나노구 또는 금속구일 수 있다.
- [0073] 본 발명에서 상기 제1 구형 금속 나노입자와 제2 구형 금속 나노입자는 이중가닥 DNA로 연결될 수 있으며, 상기 이중가닥 DNA를 구성하는 각각의 단일 가닥 DNA는 상기 제1 및 제2 금속 나노입자 각각에 고정되어 있다가 서로 상보적으로 혼성화되어 이중가닥 DNA가 제1 및 제2 구형 금속 나노입자에 연결된 것일 수 있다.
- [0074] 상기 이중가닥 DNA의 길이는 특별히 제한되지 않으나, 구체적으로는 100 내지 150 bp일 수 있고, 보다 구체적으로는 120 내지 130 bp, 보다 더 구체적으로는 125bp일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [0075] 본 발명에서 용어, “금속 나노입자”는 상기 구형 금속 나노입자 2개 사이에 생체분자, 구체적으로는 이중가닥 DNA가 고정된 것을 말하는 것을 말한다.
- [0077] 본 발명에서 용어, “타우 단백질”은 미세소관 연관 단백질 타우(MAPT 또는 타우)로 불리며, 뉴런의 형태학 및 생리학에서 필수적인 역할을 한다. 타우는 전장 단백질의 6개의 상이한 아이소폼을 가지고 있으며, 아

세틸화, 글리코실화 및 인산화를 포함하여 다수의 가능한 번역 후 변형을 겪는다. 인산화는 축색돌기의 안정화에서 타우의 정상 기능을 조절하는 데 중요하며, 80개가 넘는 상이한 잔기에서 발생할 수 있다. 그러나, 타우의 과도한 인산화는 주로 과인산화된 타우로 구성되는, 세포 내 불용성 쌍의 나선형 필라멘트(PHF) 및 신경원섬유 엉킴(NFT)으로 타우 응집의 확률을 증가시키는 것으로 보인다.

[0078] 상기 타우 단백질은 인산화된 타우 단백질일 수 있으며, 구체적으로는 181번(pT181) 또는 231번 트레오닌이 인산화(pT231)되거나, 396번 세린이 인산화된 타우 단백질(pS396) 일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.

[0079] 본 발명에서 용어, “나노 플라즈모닉 바이오센서”은 플라즈몬을 측정할 수 있는 바이오센서로서, 여기에서 플라즈몬은 전자 혹은 양공 밀도 진공, 즉 플라즈마 진동의 양자(quantum)를 지칭하는 것을 의미하고, 이러한 금속 내의 자유전자가 집단적으로 진동하는 유사 입자인 플라즈몬을 측정할 수 있는 측정부를 포함하는 바이오센서를 말한다.

[0080] 예컨대, 인산화된 타우 단백질을 포함하는 혼합물과 상기 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체와의 특이적 결합을 통해, 금속 나노입자의 레일리 산란 스펙트럼의 변화를 발생시키는데, 이러한 스펙트럼의 변화를 확인할 수 있는 바이오센서일 수 있다.

[0081] 상기 바이오센서는 인산화된 타우 단백질의 특이적 결합으로 발생하는 레일리 산란 스펙트럼의 변화를 측정하여 상기 인산화된 타우 단백질을 검출하는 것일 수 있다.

[0082] 또한, 상기 바이오센서는 펩토몰 내지 나노몰의 광범위한 범위에서 인산화된 타우 단백질을 검출하는 것이 특징일 수 있다.

[0083] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 바이오센서는 인산화된 타우 단백질에 대해 낮은 검출 한계에서도 검출하는 것이 특징일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.

[0084] 상기 용어, “단일클론항체”는 하나의 항원결정기에만 항체반응을 하는 항체를 말하는 것으로서, 구체적으로는 타우 단백질에만 특이적으로 결합하는 단일클론항체를 의미할 수 있으며, 보다 구체적으로는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 타우 단백질에서 181번 트레오닌, 231번 트레오닌 또는 396번 세린이 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하는 단일클론항체일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.

[0085] 상기 금속 나노입자에 연결된 단일클론항체는 인산화된 타우 단백질에 특이적으로 결합하여 레일리 산란 스펙트럼의 변화를 발생시킬 수 있는 것으로서, 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이 구체적으로는 타우-mAb일 수 있다.

[0086] 용어, “기판”은 현미경 등에서 관찰을 할 수 있도록 상기 금속 나노입자 플랫폼이 고정될 수 있는 판을 의미하는 것으로서, 구체적으로는 유리 슬라이드일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.

[0087] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 비대칭 금속 나노 이합체를 제조한 후, 여기에 인산화된 타우 단백질에 특이적인 단일클론항체를 접합한 후, 이를 유리 슬라이드에 고정시킨 나노플라즈모닉 바이오센서가, 인산화된 타우 단백질을 극미량에서도 효과적으로 검출함을 확인하였다.

[0088] 특히, 본 발명의 비대칭 금속 나노 이합체 기반의 바이오센서가 인산화된 타우 단백질을 극미량에서도 효과적으로 검출함으로써 알츠하이머병과 경도인지장애를 효과적으로 감별하고 조기진단할 수 있음을 확인하였다.

[0090] 본 발명에서 용어, “바이오마커 혼합물”은 본 발명에서 검출하고자 하는 바이오마커가 혼합된 혼합물을 의미하는 것으로서, 구체적으로는 혈액, 보다 구체적으로는 응집소가 제거된 혈장일 수 있으나, 본 발명에서 측정하고자 하는 인산화된 타우 단백질 관련 바이오마커를 포함하는 혼합물이면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0092] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0094] 재료 및 방법

[0095] 실험예 1: FDTD(finite-difference time-domain) 시뮬레이션을 통한 비대칭 Au(금)-브릿지 나노입자 설계

[0096] 광 산란 스펙트럼과 전자기장을 계산하기 위한 FDTD 시뮬레이션을 루메리컬(Lumerical) 솔루션 프로그램(Lumerical Inc., 캐나다 밴쿠버, BC주)으로 수행하였다. 2개의 서로 다른 금 나노스피어(직경: 16nm 및 6nm)로 PAN을 설계하고, 금 나노브릿지가 금 나노스피어 간의 간극을 연결하도록 제조하였다. 또한, 상기 PAN과의 비교를 위해, 전체 길이(직경: 11nm)가 동일한 대칭형 금 나노브릿지와 나노 브릿지가 없는 비대칭 금 나노브릿지를 함께 설계하였다.

[0098] 실험예 2: DNA를 이용한 금 나노입자 정제

[0099] 티올화 단일 가닥 DNA(100 bp; 한국 바이오니어)를 50mM NaCl을 함유한 0.5×TBE에 BSPP로 덮인 금 나노입자(AuNP; 영국 BBI 솔루션)와 혼합하였다. 상기 혼합물을 실온에서 하룻밤 동안 부드럽게 흔들며 배양하였다. 배양 후, 3% 아가로스 겔(0.5×TBE)로 10 V/cm에서 1시간 동안 겔 전기영동을 수행하여, 하나의 단일 가닥 DNA(AuNP-1DNA)와 접합된 AuNP를 수득하였다. 겔 전기영동 후, AuNP-1DNA에 해당하는 밴드를 잘라 0.5×TBE에 일주일 동안 보관하여 겔 슬라이스에서 확산되도록 하였다.

[0101] 실험예 3: 금 나노시드(nanoseed) 준비

[0102] 수득한 AuNP-1DNA 쌍(5nm AuNP-1DNA 및 15nm AuNP-1DNA*, 두 개의 DNA는 서로 상보적으로 결합할 수 있음)을 이론공연비(stoichiometric ratio)로 1:1로 혼합하고 37℃에서 하룻밤 배양하여 혼성화를 진행하였다. 배양 후, 겔 전기 영동으로 혼성화된 AuNP-1DNA 쌍(5nm AuNP-dsDNA-15nm AuNP)을 불순물로부터 분리하였다. 5nm AuNP-dsDNA-15nm AuNP에 해당하는 밴드를 절단하여 50mM의 NaCl을 함유한 0.5×TBE에 일주일 동안 보관하여 5nm AuNP-dsDNA-15nm AuNP가 겔 슬라이스에서 확산되도록 하였다. 그 후 이를 금 나노시드로 사용하였다.

[0104] 실험예 4: PAN 합성

[0105] 메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)-티올(mPEGSH, Mw=2000)(미국 레이션 바이오)로 상기 실험예 3의 금 나노시드를 PEG화 하였다. 상기 mPEG-SH를 금 나노시드와 혼합하였으며, 이 때 mPEG-SH/AuNP 비율을 100으로 혼합하였다. 상기 혼합물을 하룻밤 동안 배양 후, 케도형 셰이커로 부드럽게 흔들었다. 그런 다음, 상기 혼합물을 15,000rpm으로 1시간 동안 원심분리하여 용액 내 과량의 mPEG-SH를 제거하였다. 이후 상층액을 버리고, 용액을 원래 부피로 되돌리기 위해 50mM의 NaCl 용액을 추가하여 용액을 원래 부피로 만들었다. PEG화 금 나노시드로 DNA 유도 AuNP 결정화를 통해 PAN을 합성하였다. 0.03% HAuCl₄(시그마 알드리치, 미국) 및 환원제 (NH₂OH·HCl, 1mM)(미국 시그마 알드리치)를 각각 물에 용해하고, HCl과 NaOH를 사용하여 각 용액의 pH를 5로 설정하였다. 0.5nM의 금 PEG화 금 나노시드 100 μl를 8.1 μl의 HAuCl₄와 14.2 μl의 환원제와 부드럽게 교반하였다. 이후 상기 혼합물을 3시간 동안 배양한 다음, 상기 배양된 샘플을 45분간 15,000rpm으로 원심분리한 후 생리식염수에 재분산하였다.

[0107] 실험예 5: PAN의 특성 분석

[0108] 상기 실험예 4에서 제조된 PAN의 특성을 분석하기 위해, 최종 생성물 5-10 μl를 400 메쉬 Cu 그리드(미국 테드 펠라)에 떨어뜨려 하룻밤 동안 건조시켰다. 에너지 필터링 TEM(EF-TEM, Carl Zeiss AG, 독일)으로 TEM 이미지를 촬영하고, 차가운 FEG를 사용한 Cs 보정 STEM(Cs-STEM, JEOL Ltd, 일본)으로 PAN의 결정 구조 정보를 특성화하였다. 이 때, PAN의 구조 정보는 ImageJ 소프트웨어로 분석하였다.

[0110] 실험예 6: PAN 기반 SNPB 제작

[0111] PAN 기반 SNPB를 제작하기 위해 먼저 상기 실험예 4에서 제조된 PAN을 카르복실화된 PEG-티올(CM-PEG-SH, Mw: 2,000)로 하룻밤 동안 PEG화(폐길화, PEGylation)시킨 후, NHS/EDC (1 mg/ml) 용액에 첨가하여 CM-PEG의 카르복실기를 NHS 에스테르로 전환시켰다. 30분 후, 상기 용액을 원심분리하여 반응하지 않은 NHS/EDC를 제거하고, 표적 단백질 항체 용액(0.05 mg/ml) 4 μl를 에스테르가 활성화된 PAN에 첨가하였다. 용액을 2시간 동안 배양하여 PAN에 항체를 고정시켰다. 에탄올아민을 나노 프로브에 첨가하고, 30분간 배양하여 활성화된 NHS/EDC가 혈장 샘플에서 표적화되지 않은 생체 분자와 결합하는 것을 방지하였다. 25° C, pH 7에서 제타 전위(Otsuka

Electronics, ESLZ-1000, 일본)를 측정하여, PAN의 표면 변형을 확인하였다. PAN에 대한 항체 결합을 확인하기 위해, FT-IR(Agilent, Cary 660, USA)을 추가로 수행하였다. LSPR 측정용 유리 슬라이드 기판을 30분간 초음파 처리하여 아세톤으로 세척한 후, 에탄올로 3회 깨끗이 세척하였다. 그런 다음, 유리 슬라이드를 피라냐 용액 ($H_2SO_4/H_2O_2 = 3:1$)에서 하룻밤 배양한 후, 생리식염수와 절대 에탄올로 완전히 세척하여 잔여 불순물을 제거하였다.

[0112] 상기 세척된 유리 슬라이드를 질소 가스로 건조시킨 후, 99.9% 절대 에탄올에 10% MPES(미국 시그마 알드리치)를 20분간 처리하였다. 마지막으로, 유리 슬라이드를 생리식염수에서 세 번 초음파 처리한 후, 60° C에서 하룻밤 동안 건조시켰다. 전처리된 유리 슬라이드에 10 μ l의 PAN 용액을 떨어뜨린 후, 실온에서 2시간 동안 건조시킨 후 LSPR을 측정하였다.

[0114] 실험예 7: 임상 샘플

[0115] 참가자의 혈장 샘플을 항응고제인 EDTA 튜브를 사용하여 채취하였다. 채취한 혈장 샘플을 3,000rpm으로 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 수집하여 즉시 -80° C에서 보관하였다. 여기에는 20 명의 AD 환자, 16 명의 MCI 환자 및 11 명의 HC 피험자가 포함되었다. 본 발명에서 분석된 임상 샘플은 고려대학교 안암병원(IRB-0201AN0286)과 인하대학교 병원(INHAUH-2022-01-021)에서 제공받았다.

[0117] 실험예 8: 라일리 광 산란을 통한 LSPR 피크 시프트 분석

[0118] PAN의 LSPR 피크 시프트를 분석하기 위해 항체 코팅된 PAN을 액적 형태로 주입하여 원하는 마이크로웰에 고정시켰다. 생리식염수를 마이크로웰에 20분간 주입하여 오염물질과 결합되지 않은 PAN을 제거하였다. 세척 후, 샘플 용액을 챔버에 1시간 동안 주입하여, 항원이 PAN에 성공적으로 결합되었는지 확인하였다. 단일 PAN에서 발생하는 LSPR 스펙트럼의 플라즈몬 시프트($\Delta \lambda_{max}$)를 로렌치안 알고리즘을 장착한 후 OriginPro 9.0 소프트웨어 및 GraphPad Prism 5 소프트웨어로 하기의 공식으로 계산하였다: $\lambda_{max}(\text{반응 후}) - \lambda_{max}(\text{반응 전})$.

[0119] 검출 한계(LOD)는 다음의 공식으로 계산하였다: ($LOD = 3.3 * \delta / m$, δ : 표준 편차 공백, m : 보정 곡선의 기울기).

[0120] 맨-윌트니 U 테스트(Mann-Whitney U test)로 통계적 유의성을 계산하였다.

[0122] 실시예 1: PAN의 설계

[0123] 비대칭 나노입자인 PAN을 설계하기 위하여, 형태적 다양성과 구조적 균일성이 매우 뛰어난 금속 나노구조 합성을 위한 스캐폴드 물질로 DNA 분자를 이용하여 설계하였다. 특히, 전자기(EM)장 강화를 증가시키기 위해 다양한 크기의 구형 끝이 일치하지 않는 PAN을 설계하였다. 이는, 서로 다른 크기의 구형 나노입자 두 개를 좁은 전도성 접합부를 가진 선형으로 배치함으로써, 대칭을 깨고 복잡한 플라즈몬 모드 간의 결합 효과를 향상시켰다.

[0124] 구체적으로, 본 발명에서는 감별 진단 바이오마커로서 p-tau를 검출하는 데 PAN을 사용하는 것이 적합한지 확인하기 위해, 유한차분시간영역(FDTD) 시뮬레이션으로 본 발명의 PAN, 대칭형 Au 나노브릿지, 나노 갭이 있는 비대칭 나노입자 등 다양한 나노구조의 전기장(EM) 분포를 분석하고 비교하였다(도 1A). 그 결과, 도 1A에서 확인할 수 있는 것과 같이, 본 발명의 PAN은 표면 전체에 걸쳐 강한 전기장이 강화되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 두 개의 구형 끝단을 연결하여 용량 모드가 매우 민감한 작은 접합부와, 두 개의 비대칭 구형 나노 입자 사이의 공진 결합에서 생성된 깨진 대칭 구조에서의 결합 4중극자(BQP) 모드에서 EM 장이 크게 강화되는 것을 확인할 수 있었다.

[0125] 본 발명의 PAN은 나노 갭이 있는 대칭 금 나노브릿지 및 비대칭형 금 나노입자(금 이합체)와 비교하여, 각각 3.79배 및 1.98배 높은 플라즈몬 강화 전자장을 보였다.

[0126] 이와 대조적으로, 대칭 금 나노브릿지와 나노 갭이 있는 비대칭 금 나노입자는 두 구형입자 사이의 나노 갭에서만 전자기장이 강화되는 것을 확인할 수 있었다(도 1A). 이러한 결과는 나노갭이 있는 비대칭 금 나노입자의 경우 입자 간 접합이 없어 전자의 이동이 제한되고, 대칭 금 나노브릿지의 경우 훨씬 약한 BQP 모드 때문인 것을 알 수 있다.

- [0127] 상기 결과를 통해, 본 발명의 PAN은 강력한 레일리 광 산란 신호를 생성하는 우수한 나노 프로브로 활용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0128] 또한, RI 감도는 센싱 성능과 밀접한 관련이 있기 때문에, 다양한 RI 조건에서 도출된 단일 NP의 LSPR 피크 시프트 변화를 분석하여 단일 NP의 광학 시뮬레이션을 추가로 수행하였다. 그 결과인 RI에 따른 LSPR 산란 피크 시프트는 도 1B에 나타내었다.
- [0129] 여기에서, 각 선의 기울기는 각 입자의 RI 감도를 의미한다. FDTD 시뮬레이션 결과와 일치하는 것처럼 크기 비율이 2.67인 PAN이 RI 감도에서 가장 우수한 성능을 보였다. 따라서 크기 비율이 2.67인 PAN이 단일 분자 검출에서 물질을 감지하는 데 강력한 성능을 보여주는 가장 좋은 후보임을 알 수 있다.
- [0130] 실제로 크기에 있어서도 비대칭 2개 구형 간의 최적 비율을 확인하기 위해, 두 구형 끝의 비율이 다른 다양한 PAN을 설계하여 비교해 보았다. 그 결과, 도 2에서 확인할 수 있듯이, 2.67(6nm 및 16nm)의 비율을 가진 PAN에서 가장 강력한 EM 필드 향상이 나타나는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다(도 2).
- [0131] 일반적으로 비대칭이 증가함에 따라 EM 필드 향상도 증가한다. 그러나 비대칭이 지속적으로 증가하면 불균일 산란 기여도가 증가하여 전하 전달 플라즈몬 모드에서 강도가 감소하기 때문에 적절한 비율의 크기를 확정하는 것이 필요한 것을 알 수 있다.
- [0133] **실험예 2: PAN의 합성 및 특성 분석**
- [0134] 앞서 확인한 이론적 예측을 검증하기 위해, 비대칭 이합체를 나노 시드로 하여 DNA 유도 결정화 방법으로 미리 설계된 PAN을 합성하였다. 본 발명의 비대칭 이합체 구조는 두 개의 서로 다른 크기의 구형 금 나노입자(AuNP)가 DNA 분자로 연결된 구조로 이루어져 있다(도 3). 젤 전기영동으로 정제된 비대칭 이합체(도 4A 내지 C)는 DNA 방향 결정화 방법으로 PAN 합성을 유도할 수 있는데, 이는 표면 에너지가 가장 낮은 대칭 구조를 형성하는 나노 결정의 고유한 경향을 극복하고 NP의 크기와 모양을 정교하게 제어할 수 있기 때문이다.
- [0135] DNA 유도 결정화는 주로 용액의 pH와 나노시드 표면의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 코팅에 의해 영향을 받는다. 구체적으로, pH 5에서 dsDNA가 약간 음전하를 띠게 하고 주변에 NH_3OH^+ 가 집중되도록 하여 AuCl_4^- 의 환원을 더 효과적으로 유도하였다. 이후 dsDNA를 따라 환원제를 감소시킴으로써 Au의 결정화가 가속화되게 하였다. 이때, AuNP 표면의 PEG는 AuCl_4^- 를 환원시키는 데 필요한 활성화 에너지를 낮추어 합성 방향을 유도하였다. 그 결과, dsDNA 근처의 NH_3OH^+ 이온은 AuNP의 dsDNA 앵커링 포인트에서 시작하여 DNA 가닥을 따라 Au의 결정화를 유도하였다.
- [0137] 상기 합성된 PAN을 특성화하기 위해 TEM으로 나노구조를 확인하였다(도 4D). 그 결과, 도 4D에서 확인할 수 있는 것과 같이, 합성된 PAN은 구형 끝 길이(큰) $15.90 \pm 0.80\text{nm}$, 구형 끝 길이(작은) $6.31 \pm 0.60\text{nm}$, 간격 $0.53 \pm 0.10\text{nm}$, 교량 직경 $5.33 \pm 0.50\text{nm}$ 로 미리 설계한 나노구조와 매우 유사하게 합성되어 높은 형태적 균일성을 갖는 비대칭 구조를 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 5).
- [0138] 또한, 해당 고속 푸리에 변환(FFT) 회절 패턴에서 확인된 PAN의 면 중심 입방(FCC) 결정 구조의 성장 방향의 격자 프린지는 dsDNA가 지시하는 Au의 결정화가 이루어지는 영역을 의미하는 것으로, $0.206 \pm 0.005 \text{ nm}$ (41)의 결정 격자 평면 간격을 보여주었다(도 3B). 또한, 두 구형 끝단 사이의 다리가 금으로 구성되어 있음을 확인하기 위해 전자 에너지 손실 분광법(EELS)을 수행하였다. 그 결과, 더 큰 구형 끝, 더 작은 구형 끝, 전도성 접합부의 세 지점에서 PAN의 플라즈몬 피크가 25.0 eV로 계산되어, 이를 통해 세 지점이 동일한 구성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(도 3C).
- [0140] 다음으로, 백색 광원을 통한 단일 입자 플라즈몬 감지로 단일 PAN의 공진 레일리 산란 응답을 확인하였다. 그 결과, 도 3D에서 확인할 수 있는 것과 같이, PAN의 스펙트럼은 $553.89\text{nm} \pm 0.34\text{nm}$ 에서 하나의 뚜렷한 피크를 가지며, 이는 553.55nm에서 시뮬레이션된 산란 스펙트럼과 일치하는 결과로, 이는 전도성 접합의 두께와 구형 끝의 높이가 거의 같기 때문에 입자가 단일 공명 피크를 표시하기 때문으로 보인다(도 3D). 고주파 횡방향 및

저주파 결합 플라즈몬 모드를 갖는 비대칭 나노스피어 이합체와 달리, 비대칭 나노입자 사이의 접합은 전자의 전달을 가능하게 하고, 적외선 주파수에서 약한 전하 전달 모드를 형성함으로써 횡방향 플라즈몬 모드를 더 분할한다. 또한, 비대칭 특성에 따라 모든 PAN 영역에서 극적인 부분 전하 분포가 나타나지 않고, 하나의 공명 피크만을 나타내는 PAN에 영향을 미치는 것으로 확인되었다(도 3E). 이러한 결과는 미리 설계된 구조를 갖는 PAN을 DNA 분자가 주도하는 방향 결정화를 통해 상당한 정밀도로 합성할 수 있으며, 응용 분야에 따라 PAN의 플라즈몬 특성을 최적화할 수 있음을 시사하는 결과라 할 수 있다.

[0142] 실시예 3: AD 감별 진단을 위한 PAN 기반 SNPB의 준비 및 제작

[0143] NFT의 85개 이상의 p-tau 종은 다양한 알츠하이머병의 병리학적 상태를 나타내는 것으로 알려져 있다. 다양한 p-타우 종과 AD 병리 사이의 높은 상관관계로 인해, p-타우 종의 발현을 감지하는 것은 알츠하이머병의 정확한 감별 진단을 가능하게 하며, 알츠하이머병의 진행 단계를 정확하게 분류할 수 있다. 본 발명에서는 알츠하이머병의 감별 진단을 개선하기 위해, 세 가지 pT231, pT181, pS396 p-tau 종을 검출하기 위해 PAN을 기반으로 SNPB를 제작하였다. 상기 3 종의 p-tau 종은 주로 다양한 형태학적 단계에서 관찰되기 때문에 선택하였다(구체적으로, pT231의 경우 NFT 전 단계, pT181의 경우 신경세포 내 NFT, pS396의 경우 신경세포 외 NFT).

[0145] 먼저 표적 p-tau 종에 대한 특이성을 도입하기 위해, 항체를 카르복시메틸-PEG-티올(CM-PEG-SH)로 변형된 PAN에 연결하였다. PAN 표면의 변형과 항체 접합을 X선 광전자 분광법(XPS)으로 확인하였다(표 1).

표 1

Sample	XPS elemental composition (%)			
	C _{1s}	O _{1s}	N _{1s}	S _{2p}
Bare PAN	38.7	56.4	4.6	< 0.1
PAN-PEG	34.2	56.8	5.3	2.5
PAN-PEG-antibody	59.9	24.0	12.1	3.5

[0148] 상기 표 1에서 확인할 수 있듯이, PAN에 CM-PEG-SH의 결합은 S_{2p} 피크를 유도하는 반면, PEG의 카르복실기와 항체의 아민기 사이의 아마이드 결합 (-CO-NH-)을 통해 PAN에 항체가 고정화되면 O_{1s} 피크는 감소하고, 동시에 C_{1s} 및 N_{1s} 신호가 생성되는 것을 확인할 수 있다. 항체 접합 과정에서 S_{2p} 스펙트럼이 불투명해진 것은 주목할 만 한데, 이는 반응 후에도 PEG 분자가 여전히 PAN 표면에 안정적으로 부착되어 있음을 나타낸다. 제타 전위 측정은 카르복실-PEG와 항체가 PAN에 결합할 때 표면 전하가 약한 양전하에서 음전하로 단계적으로 변화하는 것을 보여준다(도 6). 또한, 푸리에 변환 적외선 분광법 (FT-IR)의 결과에서는 도 7에서 확인할 수 있는 것과 같이, CM-PEGSH 결합 후 각각 C-H 스트레칭 및 C-O-C 스트레칭에 해당하는 2,900cm⁻¹ 및 1,080cm⁻¹에서 강한 밴드를 나타냈으며, 항체 고정 후 추가 -NH 변형 3,300cm⁻¹ 피크를 나타냈다(도 7). 표적 p-tau를 인식하기 위해 제조된 PAN 기반 SNPB의 타당성은 단일 SNPB의 공진 레일리 광 산란(RLS) 반응 측정으로 확인하였다. 항체-결합 PAN과 함께 p-tau 함유 샘플을 배양한 후, PAN의 LSPR 피크 파장($\lambda_{\max}$)은 570.0 ± 0.3nm에서 585.3 ± 0.2nm로 적색편이되는 것을 확인할 수 있었다(도 8). 이러한 LSPR 피크의 강한 적색 편이는 표적이 SNPB에 결합하여 국소 RI 변화를 유발하기 때문으로, 이는 라벨링 과정 없이 표적 p-tau 종을 검출하는 데 활용될 수 있음을 시사한다.

[0150] 실시예 4: PAN 기반 SNPB의 센싱 성능 평가

[0151] 본 발명의 PAN 기반 SNPB의 민감도를 평가하기 위하여, 다양한 농도 범위에서 인간 혈장 샘플에 스파이크된 표적 p-tau 종에 의해 유도된 LSPR $\lambda_{\max}$ 시프트($\Delta \lambda_{\max}$)를 측정하여 검출 한계와 동적 범위를 확인하였다(도

9A-C).

[0152] 그 결과, 도 9에서 확인할 수 있듯이, 각 표적 p-tau가 인간 혈장의 생리학적 p-tau 농도를 포함하는 10^2 및 10^7 aM(소멸 계수 $R^2 \geq 0.950$) 범위의 로그 농도에서 $\Delta \lambda_{max}$ 와 강력한 선형 관계를 갖는 것을 확인할 수 있었다(도 9D-F).

[0153] 상기 실험예의 선형 회귀 방정식을 사용하여 LOD를 계산한 결과, pT231의 경우 94.1 aM, pT181의 경우 85.9 aM, pS396의 경우 143.8 aM으로 매우 우수한 감도를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 뛰어난 감도는 PAN의 비대칭 배향에 기인한 플라즈몬 결합으로 인해 근처의 RI 변화에 매우 민감한 반응을 촉진하기 때문인 것으로 보인다. 이러한 표적 p-tau 종에 대한 LOD 값은 AD 환자의 혈액 내 발현 수준보다 50배 이상 낮은 것으로 보이므로 본 발명의 PAN 기반 SNPB가 임상 조건에서 p-tau를 검출하고 정량화하는 데 적합한 것을 알 수 있다.

[0155] 다음으로, 다양한 단백질이 존재하는 혈액 샘플을 이용하여 본 발명의 바이오센서가 특정 p-tau 종을 정량화하는데 우수한 효과를 가지는지 확인하였다.

[0156] 구체적으로, SNPB의 선택성을 확인하기 위해 다양한 p-tau 종을 포함하는 샘플과의 교차 반응성을 확인하였다. 표적 p-tau가 존재할 경우 눈에 띄는 $\Delta \lambda_{max}$ 가 관찰된 반면, 비표적 p-tau 종의 경우 표적 p-tau 종보다 농도가 100배 높았지만 유의미한 $\Delta \lambda_{max}$ 가 발생하지 않았다(도 10 및 도 11). 또한 모든 p-타우 스파이크 혈장에 대한 회수 테스트 결과는 95.0%에서 102.0%까지인 것을 확인하였다(표 2).

표 2

Samples	pT231	pT181	pS396
Added (fM)	10.0	10.0	10.0
Found (fM)	9.6	10.2	9.53
RSD (%)	2.16	4.89	5.79
Recovery (%)	96.0	102.0	95.3

[0157]

[0159] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명의 바이오센서가 AD 진행을 구별하는 방해 요소에 의해 방해받지 않고, 실제 임상 샘플에서 p-타우 종을 정확하게 식별하는 강력한 도구임을 알 수 있다.

[0161] 실시예 5: 임상 혈장 샘플에 적용

[0162] 최근 연구에 따르면 정상 인지 노화와 초기 치매 사이의 과도기적 상태에 있는 MCI 피험자는 정상 인지 노화와 초기 치매 사이의 과도기적 상태에 있는 MCI 피험자는 알츠하이머병으로 전환될 위험이 높은 것으로 나타났다. 따라서 MCI와 알츠하이머를 조기에 감별 진단하는 것이 필수적이다.

[0164] 본 발명의 바이오센서를 이용하여 MCI와 AD의 감별 진단에 대한 임상 적용 가능성 여부를 확인하기 위해, 20명의 AD 환자, 16명의 MCI 환자, 11명의 HC로부터 임상 혈장 샘플을 준비하였다. 이 때 모든 샘플의 자세한 인구통계학적 정보는 하기 표 3에 나타났다.

표 3

Patient No.	Gender	Age (years)	Education (years)	MMSE	CDR	Diagnostic Results
1	F	62	12	30	0	HC
2	M	77	16	27	0	HC
3	F	76	9	25	0	HC
4	F	75	3	19	0	HC
5	M	80	18	27	0	HC
6	M	59	12	28	0	HC
7	M	73	18	30	0	HC
8	F	60	5	20	0	HC
9	M	70	16	27	0	HC
10	F	73	6	28	0	HC
11	M	62	16	29	0	HC
12	F	86	2	11	1	AD
13	F	90	14	21	1	AD
14	M	84	15	15	1	AD
15	M	82	16	17	1	AD
16	F	80	6	15	0.5	AD
17	M	85	10	5	1	AD
18	F	75	9	24	0.5	AD
19	F	80	11	11	1	AD
20	F	71	6	21	0.5	AD
21	F	77	7	12	1	AD
22	F	78	12	18	1	AD
23	F	75	12	22	0.5	AD
24	F	63	12	19	0.5	AD
25	F	81	9	17	1	AD
26	F	84	6	24	0.5	AD
27	M	81	6	7	2	AD
28	M	81	16	13	3	AD
29	M	55	14	19	0.5	AD
30	F	80	1	9	1	AD
31	M	77	6	25	0.5	AD
32	M	63	7	28	0.5	MCI
33	M	73	12	26	0.5	MCI
34	M	62	12	27	0.5	MCI
35	F	65	12	30	0.5	MCI
36	M	63	6	25	0.5	MCI
37	F	67	7	28	0.5	MCI
38	M	79	2	21	0.5	MCI
39	M	79	0.5	20	0.5	MCI
40	M	79	12	26	0.5	MCI
41	F	58	9	23	0.5	MCI
42	M	65	13	29	0.5	MCI
43	M	66	14	29	0.5	MCI
44	M	77	12	29	0	MCI
45	F	78	2	24	1	MCI
46	M	70	16	29	0.5	MCI
47	F	66	6	24	0.5	MCI

[0165]

[0167] 그런 다음 인간 혈장 내 p-tau 발현 수준의 다중 정량적 프로파일링을 수행하였다.

[0168] 먼저 LSPR 피크 시프트의 광학 신호를 측정하였다. 그 결과, 도 12에서 확인할 수 있듯이, LSPR 피크 시프트로 측정된 p-tau 발현의 패턴을 측정한 결과, 세 그룹 간에 세 그룹으로 명확하게 구분되는 것을 확인할 수 있었다 (도 12). 맨-윌트니 U 테스트에 따르면 세 그룹은 다음과 같이 유의미한 차이를 보여 (HC의 MCI 환자 ($p < 0.0001$), AD 환자($p < 0.0001$) HC ($p < 0.0001$)), MCI 환자에서 AD 환자 ($p < 0.0001$)로 각각 구분할 수 있음을 알 수 있다.

[0170] HC에 비해 세 가지 p-tau 모티프 모두 AD 환자에서 더 많이 발현되었지만 MCI 환자에서는 발현 경향이 다양하였다. pS396의 농도는 MCI 환자 샘플의 pS396 농도는 HC와 크게 다르지 않았고, pT181 MCI의 농도는 AD 환자와 HC의 농도 사이에 있었다. 대조적으로, MCI 환자의 pT231 수치는 AD 환자보다 훨씬 높았다. 이러한 결과는 트레오닌 231에서의 인산화가 인산화 반응의 시작점임을 나타낸다. 타우 단백질의 인산화 캐스케이드에서 가장 먼저 일어나는 인산화는 트레오닌 231이며, 그 다음에는 순차적으로 트레오닌 181과 세린 396이 순차적으로 인산화되는 것으로 나타났다. 흥미롭게도 pT231 발현 수준은 AD 진행과 반비례하는 것으로 나타났다. 타우 단백질의 추

가 인산화로 인한 형태학적 변화뿐만 아니라 pT231 에피토프를 숨길뿐만 아니라 pT231을 불용성 엉킴으로 격리시킨다. 이 때 ELISA 결과는 PAN 기반 SNPB와 상당한 일치도를 보였지만(도 13), 각 환자 간의 통계적 유의성 그룹은 PAN 기반 SNPB에 비해 감소했다. 이는 종의 혈장 내 발현 수준이 ELISA의 LOD보다 낮았기 때문이다(표 4).

표 4

Target	LOD	Detection range	Company	Cat. No
pT181	1.0 pg/ml	6.25 pg/ml – 200 pg/ml	MyBiosource	MBS109463
pT231	1.0 pg/ml	6.25 pg/ml – 200 pg/ml	MyBiosource	MBS108985
pS396	2.0 pg/ml	15.6 pg/ml – 1000 pg/ml	Invitrogen	KHB7031

[0171]

[0173] 세 개의 p-tau 종을 사용한 SNPB의 진단 효능을 평가하기 위해 관련 수신기 작동 특성(ROC) 분석을 수행하였다(도 14).

[0174] 그 결과, 도 14에서 확인할 수 있듯이, 민감도 91.27%, 특이도 88.83%, 정확도 97.73%의 결과를 얻을 수 있었으며, 특히 평균 91.27%의 민감도로 각 환자 그룹을 성공적으로 차별화할 수 있었다.

[0175] 또한, 진단 효율을 정량화하기 위해 ROC 곡선 아래 면적(AUC)을 계산하였다. (표 5-7).

표 5

Combination of Biomarkers	AUC	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
pT181	0.9357	93.8	81.8	98.5
pT231	0.9659	93.8	90.9	99.3
pS396	0.5114	37.5	90.9	83.3
pT181 + pT231	1.000	100	90.9	100
pT181 + pS396	0.8920	93.8	81.8	98.5
pT231 + pS396	0.8864	68.8	90.9	95.5
pT181 + pT231 + pS396	1.000	100	90.9	100

[0176]

표 6

Combination of Biomarkers	AUC	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
pT181	0.9682	95.0	81.8	97.5
pT231	0.7000	75.0	72.7	92.6
pS396	0.8909	75.0	81.8	96.7
pT181 + pT231	0.9636	90.0	81.8	98.9
pT181 + pS396	0.9909	95.0	81.8	99.5
pT231 + pS396	0.8227	75.0	81.8	96.7
pT181 + pT231 + pS396	0.9818	95.0	90.9	98.9

[0178]

표 7

Combination of Biomarkers	AUC	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)
pT181	0.7500	65.0	93.8	96.4
pT231	0.9063	85.0	81.25	96.0
pS396	0.8438	70.0	87.5	93.9
pT181 + pT231	0.5656	60.0	75.0	77.8
pT181 + pS396	0.9313	85.0	93.8	98.8
pT231 + pS396	0.5219	75.0	50.0	66.7
pT181 + pT231 + pS396	0.7500	45.0	93.8	91.9

[0180]

[0182]

진단 방법의 임상적 예측은 AUC 값이 1.0일 때 완벽한 것으로 간주된다. 이를 토대로 보면, pT231이 MCI 환자를 가장 잘 구별하는 것으로 나타났다. HC 및 AD 환자에서는 각각 0.9659 및 0.9063의 AUC를 나타냈다. 이러한 결과는 AD 초기에 발현되는 pT231이 각 질환을 가장 잘 구분할 수 있는 지표로 사용될 수 있음을 보여준다. 반면, pT181은 AD의 증상 단계 이후에 높게 발현되기 때문에 HC에서 AD 환자를 식별하는 데 가장 좋은 지표임을 확인할 수 있다(AUC=0.9682).

[0184]

또한, 여러 p-tau 종의 조합이 더 나은 임상 예측을 제공할 수 있는지 알아보기 위해 ROC 분석을 수행하였다(도 15 및 도 16). 그 결과, 도 15 및 도 16에서 확인할 수 있듯이, 임상 예측에서 유의미한 임상 예측의 개선이 나타나지 않는 것으로 확인되었다. 특히 알츠하이머병 환자에서 MCI 환자를 식별하는 경우, p-tau종 분석의 조합은 일반적으로 더 나쁜 성능을 보이는 것으로 확인되었다. 이 결과는 본 발명에서 선택된 p-tau 종들이 알츠하이머병 진행 단계에 매우 특이적이어서 감별 진단에 충분한 정확도를 제공한다는 것을 시사한다.

[0186]

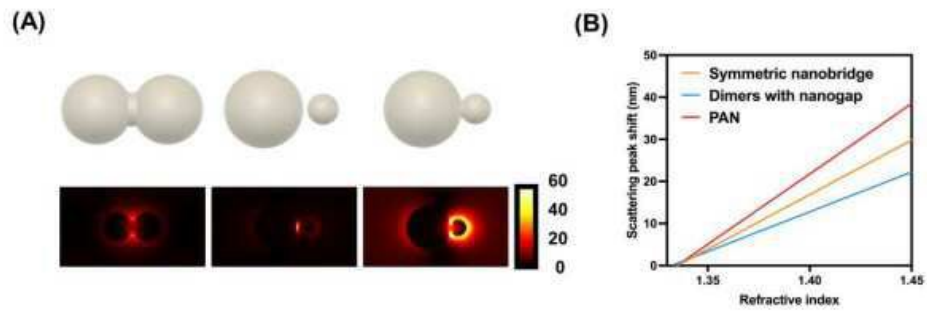
종합하면, 본 발명의 PAN 기반으로 제조된 SNP는 3 종의 p-tau 바이오마커를 이용하여 96.4% 이상의 정확도로 알츠하이머 연속체 전반에 걸쳐 알츠하이머 진행을 식별할 수 있음을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 PAN 기반 SNP는 알츠하이머병의 감별 진단을 위한 강력한 도구로 활용될 수 있으며, 기존 진단 기술을 대체하여 혈액 샘플을 이용한 병리학적 변화를 감별하는 강력한 도구로 활용될 수 있음을 알 수 있다.

[0188]

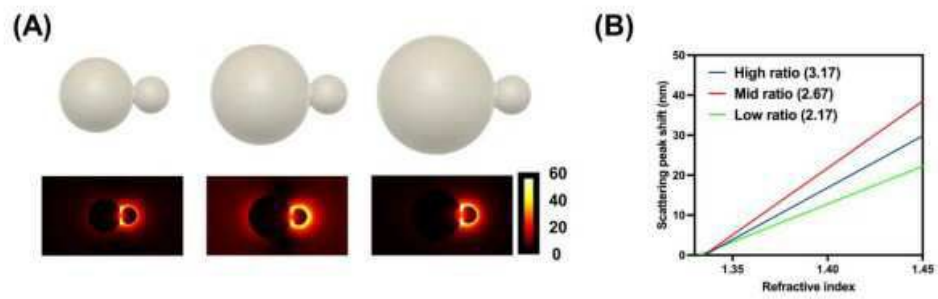
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

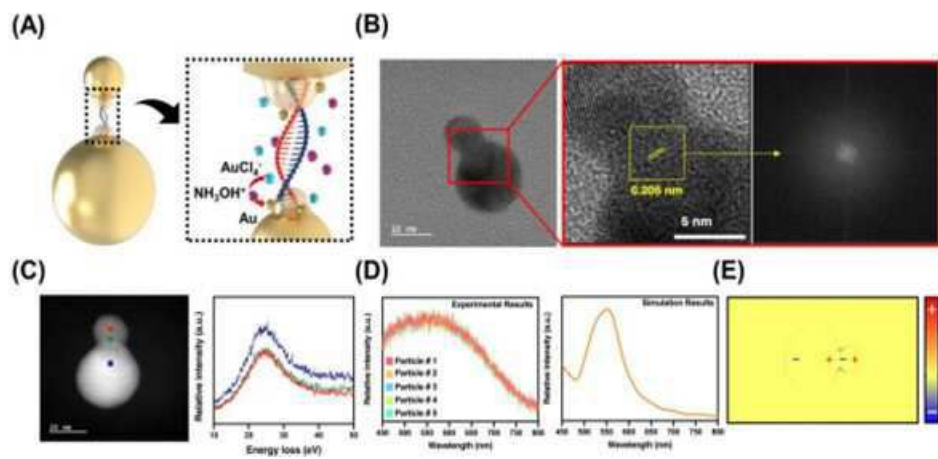
도면1



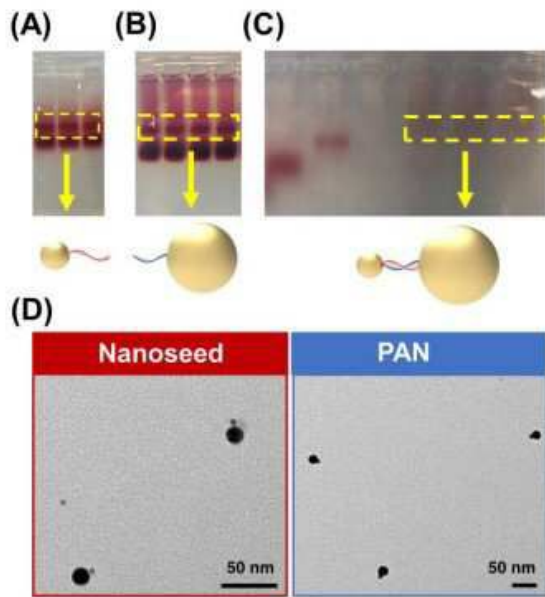
도면2



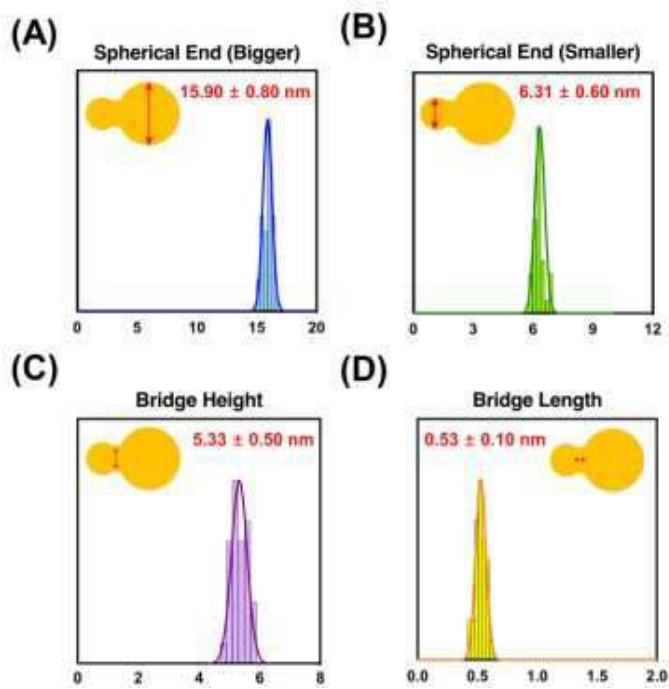
도면3



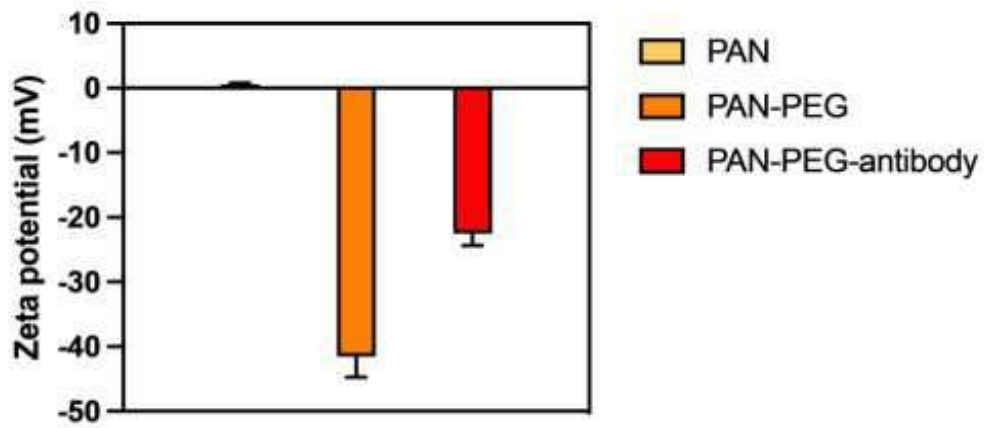
도면4



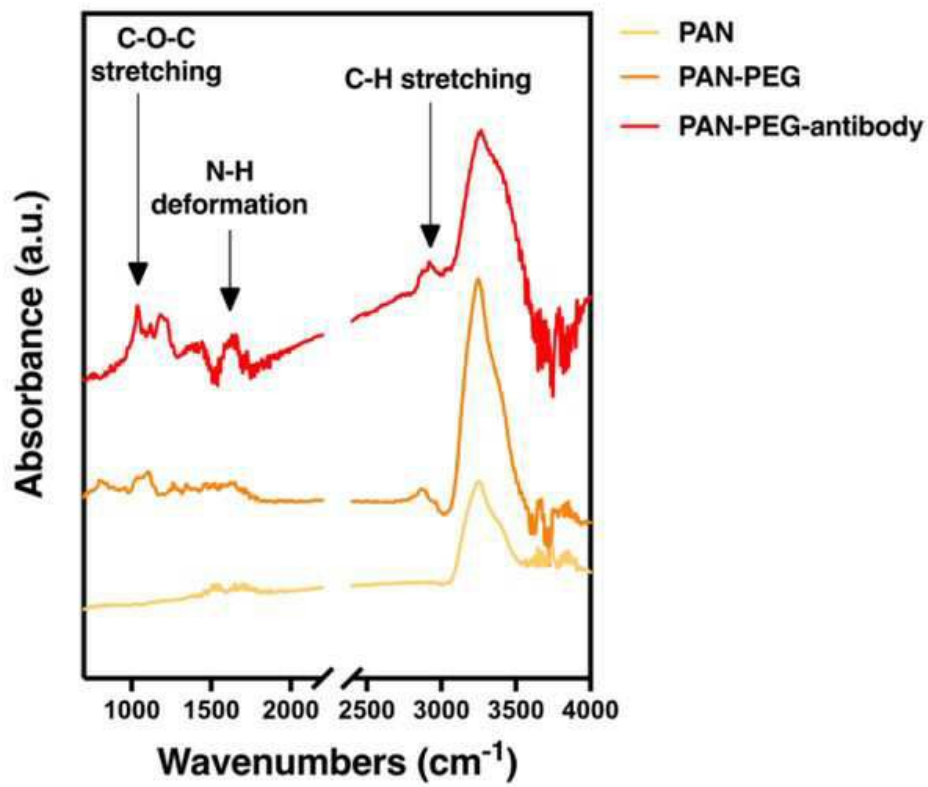
도면5



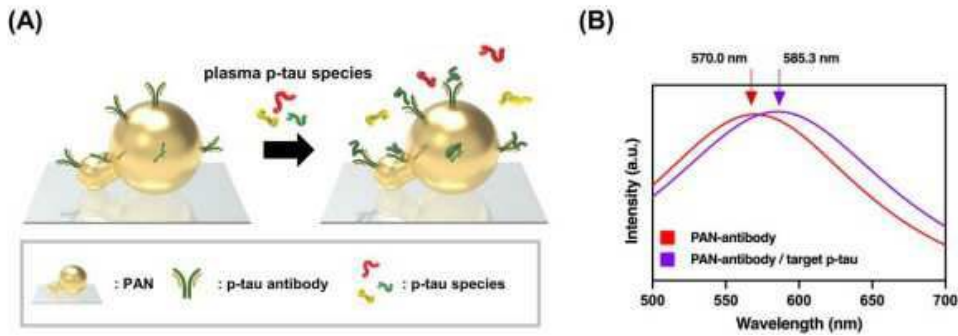
도면6



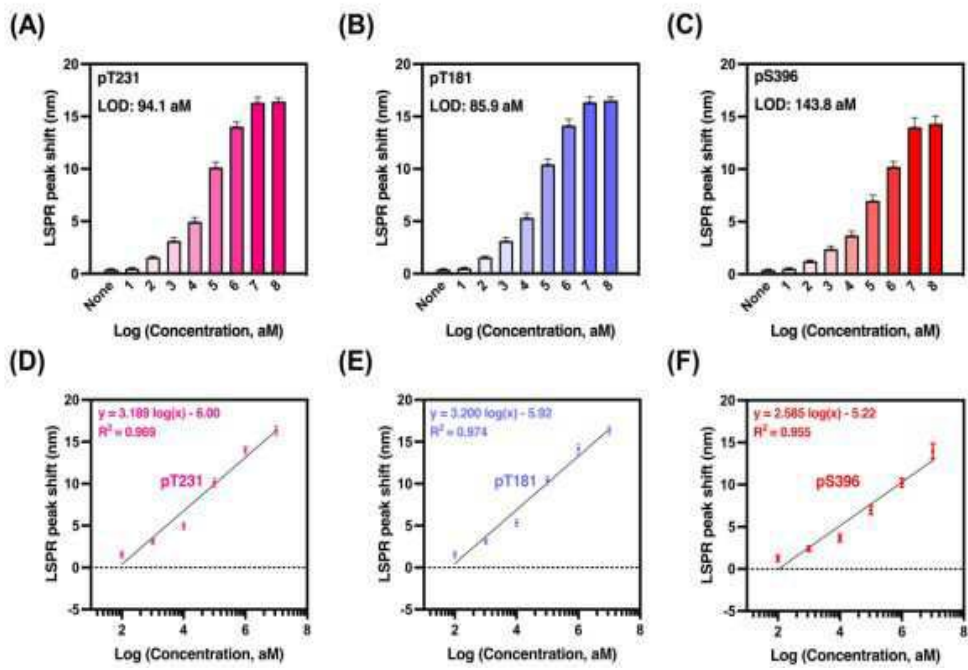
도면7



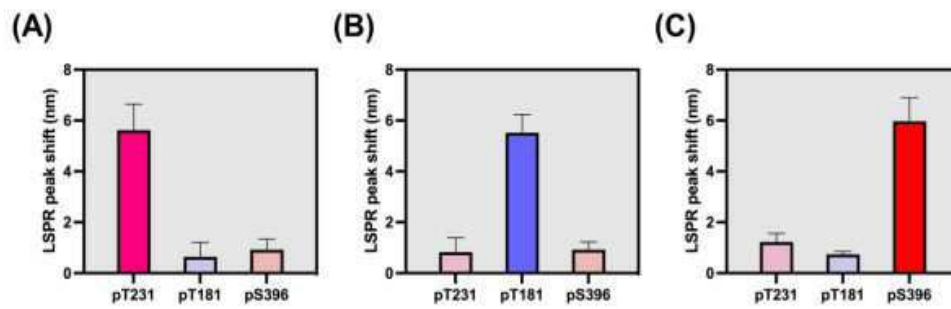
도면8



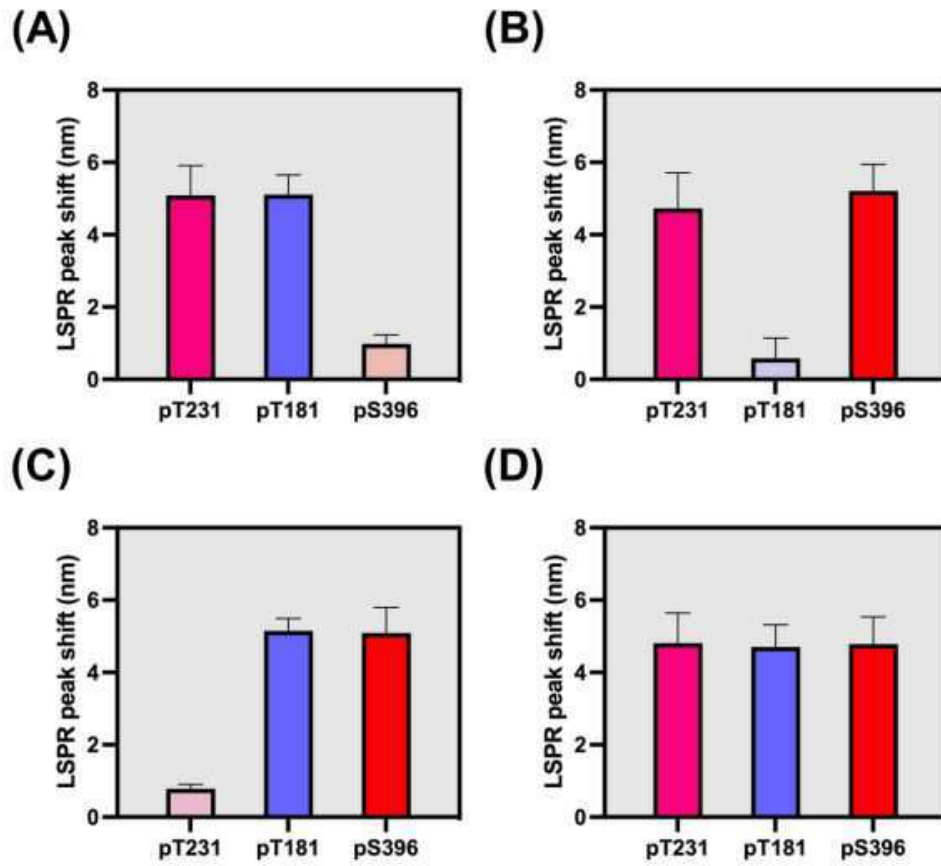
도면9



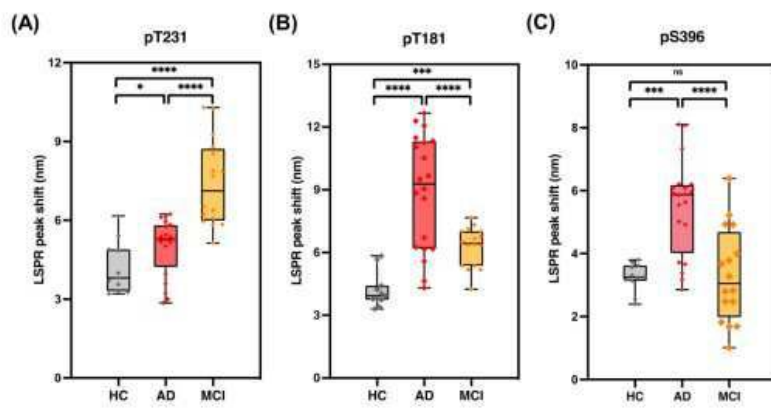
도면10



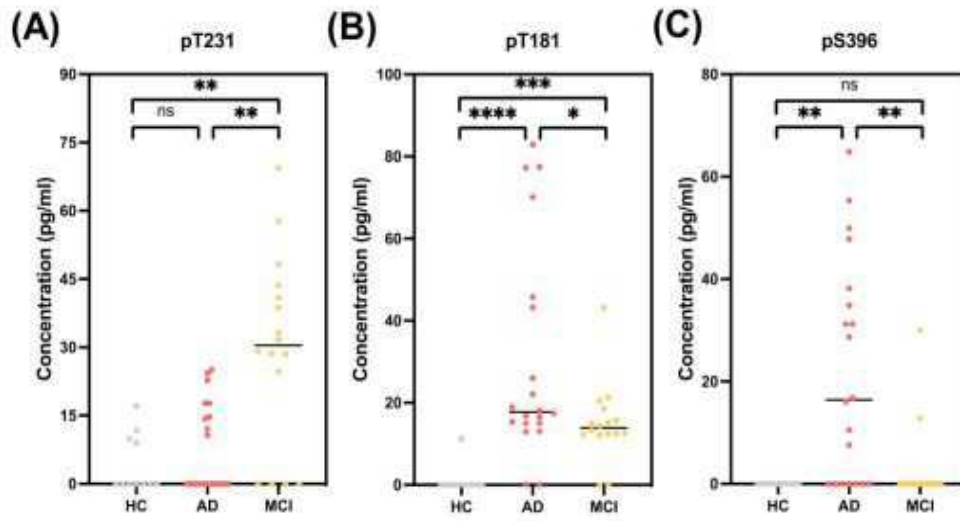
도면11



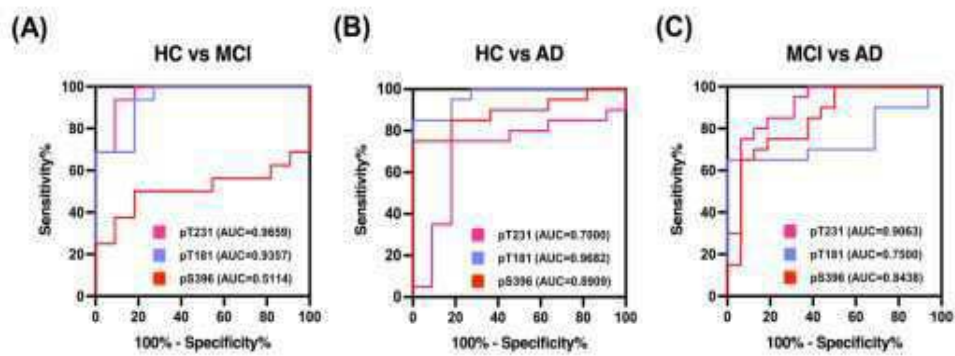
도면12



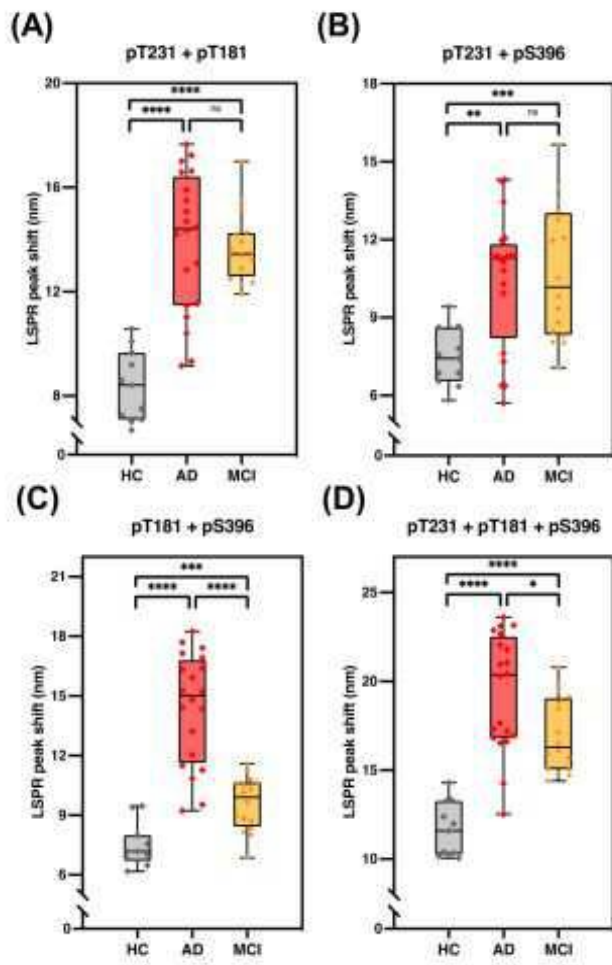
도면13



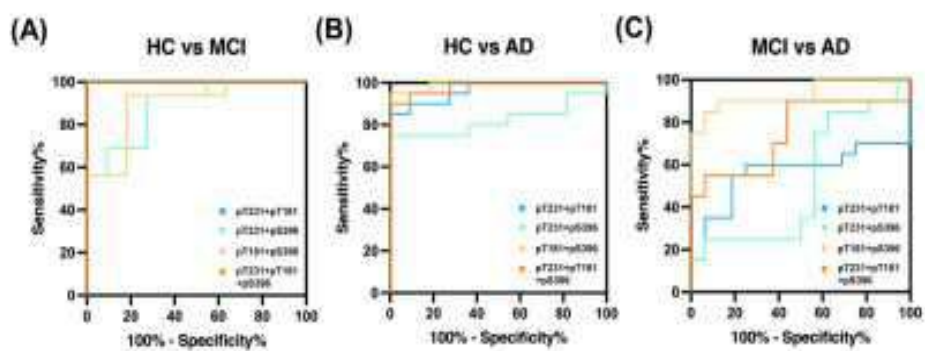
도면14



도면15



도면16



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.