



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0126958
(43) 공개일자 2024년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/327 (2006.01) G01N 27/02 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 27/327 (2021.01)
G01N 27/02 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2023-0019748
(22) 출원일자 2023년02월15일
심사청구일자 2023년02월15일

(71) 출원인
가천대학교 산학협력단
경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
조성보
경기도 성남시 수정구 성남대로 1342, 전자공학 (복정동, 가천대학교 IT대학)
히엔티웅옥르
경기도 성남시 수정구 성남대로 1342, 전자공학 (복정동, 가천대학교 IT대학)
(74) 대리인
특허법인도담

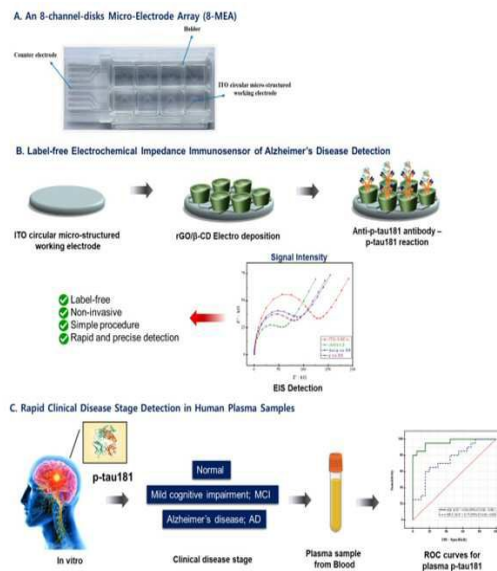
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 사이클로텍스트린/환원 그래핀 산화물/전극 기반의 나노-하이브리드 구조를 이용하여 시료 내 알츠하이머 질환의 바이오마커인 p-타우 181 단백질을 검출하는 방법

(57) 요약

본 개시 내용의 구체예에 따르면, 사이클로텍스트린/환원 그래핀 산화물(CD/rGO) 나노-하이브리드 구조를 기반으로 하여 시료 내에 다른 분자들과 혼재되어 있는 알츠하이머 질환의 바이오마커인 p-타우 181 단백질을 높은 감도로 검출하는 방법이 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/6896 (2013.01)

G01N 2800/2821 (2013.01)

(72) 발명자

마이반티유

경기도 성남시 수정구 성남대로 1342, 전자공학 (복정동, 가천대학교 IT대학)

최성혜

서울특별시 강남구 압구정로 401, 53동 207호 (압구정동, 한양아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

임피던스 센서를 이용한 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법으로서,

- 분석 대상인 액상 시료를 제공하는 단계;
- 상기 액상 시료에 임피던스 센서를 접촉시켜 임피던스를 측정하는 단계;
- 상기 측정된 임피던스 값을 하기 수학식 1에 따라 피팅시킴으로써 액상 시료 내 p-타우 181 단백질의 농도에 대한 전하전달저항(R_{ct})의 변화를 지시하는 선형 교정 곡선(calibration curve)을 도출하는 단계; 및
- 상기 도출된 선형 교정 곡선에 근거하여 시료 내 p-타우 181 단백질을 정성적 및/또는 정량적으로 검출하는 단계;

를 포함하고,

상기 임피던스 센서는,

전극;

상기 전극 상에 형성된 환원 그래핀 산화물 층;

상기 환원 그래핀 산화물 층 상에 형성된 사이클로텍스트린 층; 및

호스트-게스트 상호작용을 통하여 상기 사이클로텍스트린 층에 고정되며, 액상 시료와 접촉 시, 액상 시료 내에 함유된 p-타우 181 단백질과 특이적으로 바인딩되는 항-p-타우 181 항체;

를 포함하며,

상기 액상 시료 내에 p-타우 181 단백질이 함유된 경우에 항-p-타우 181 항체와의 바인딩에 의한 임피던스 값의 변화가 발생하는, 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법:

[수학식 1]

$$R_{ct} = (Z - R_s) / \{1 - j \omega C_{dl}(Z - R_s)\} - Z_w$$

상기 식에서, R_{ct} 는 전하전달저항, Z 는 측정된 임피던스, R_s 는 용액저항, j 는 허수단위, ω 는 각 주파수, 그리고 Z_w 는 확산 임피던스임.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 전극은 기관 상에 형성되는 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 기관은 실리콘, 석영, 글라스, 세라믹 및 고분자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 재질인 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 전극은 인듐-주석-산화물(ITO), 인듐-아연-산화물(IZO), 안티몬주석산화물(ATO), 아연산화물(ZnO), 주석산화물(SnO_2), 갈륨-아연-산화물(GZO), 알루미늄-아연-산화물(AZO) 및 카드뮴-주석-산화물(CTO)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 재질인 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 전극은 마이크로-디스크 전극인 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 마이크로-디스크 전극의 직경은 100 내지 1000 μm 범위인 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 호스트-게스트 상호작용에 의하여 β -사이클로텍스트린과 항-p-타우 181 항체 간에 거대 분자 포접 복합체가 형성되는 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 사이클로텍스트린 층은 β -사이클로텍스트린 층인 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 환원 그래핀 산화물 층의 두께는 1 내지 3 nm의 범위이고, 상기 환원 그래핀 산화물 층의 비표면적(BET)은 50 내지 150 m^2/g 의 범위인 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 환원 그래핀 산화물 층의 중량 기준으로, 상기 사이클로텍스트린 층의 함량은 3 내지 12 중량%의 범위에서 정하여지는 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 임피던스 센서는 하기의 단계를 포함하는 방법에 의하여 제조되는 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법:

- (i) 전극을 제공하는 단계;
- (ii) 상기 전극의 표면 상에 환원 그래핀 산화물(rGO) 층을 부착하는 단계;
- (iii) 상기 환원 그래핀 산화물 층에 사이클로텍스트린(CD) 층을 부착하여 CD/rGO 나노-하이브리드를 형성하는 단계; 및
- (iv) 상기 CD/rGO 나노-하이브리드 내 사이클로텍스트린에 항-p-타우 181 항체를 고정하되, 호스트-게스트 상호작용을 통하여 호스트인 사이클로텍스트린의 내측 캐비티 내로 게스트 분자인 항-p-타우 181 항체를 도입하는 단계.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 단계 d) 중 게스트 분자인 항-p-타우 181 항체가 호스트인 사이클로텍스트린의 내측 캐비티로 정전기적 포접 상호작용 및/또는 수소 결합에 의하여 침투함으로써 거대분자 호스트-게스트 포접 복합체를 형성하는 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 액상 시료는 혈장(plasma)인 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 임피던스 센서의 혈장에서의 검출 한계(LOD)는 5 fg/mL 이하이고, 그리고 LRD(linear range of detection)는 10^0 내지 10^6 fg/mL의 범위인 것을 특징으로 하는 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시 내용은 사이클로텍스트린/환원 그래핀 산화물/전극 기반의 나노-하이브리드 구조를 이용하여 시료 내 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease; AD)의 바이오마커인 p-타우 181 단백질을 검출하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 개시 내용은 사이클로텍스트린/환원 그래핀 산화물(CD/rGO) 나노-하이브리드 구조를 기반으로 하여 시료 내에 다른 분자들과 혼재되어 있는 알츠하이머 질환의 바이오마커인 p-타우 181 단백질을 높은 감도로 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알츠하이머 질환은 기억력, 인지 능력, 추론 등과 같은 정신 작용의 저하와 관련된 증상으로 정의되는 가장 흔한 질환이다. 세계보건기구(WHO) 및 ADI(Alzheimer's Disease International)의 보고서에 따르면, 알츠하이머 환자의 수는 2050년경에는 2019년 대비 3배 수준으로 증가할 것으로 전망하고 있다. 이처럼, 알츠하이머 질환은 치매를 유발하는 가장 큰 원인의 하나로, 알츠하이머 환자 수는 점점 증가하고 있으나, 정확한 원인이 규명되지 않고 있으며, 효과적인 치료법 역시 개발되지 않은 상태이다. 현재 알츠하이머 질환의 진행을 늦출 수 있는 약물이 활용되고는 있으나, 이에 대한 초기 단계에서의 진단이 곤란하기 때문에 통상적으로 늦게 처방되고 있는 실정이다.

[0003] 기억력 손실 또는 다른 인지능(예를 들면, 언어 및 시력)의 감퇴 역시 질환의 초기 단계인 경도 인지 장애(mild cognitive impairment; MCI)의 증상일 수 있다. 신경변성장애에 대한 암시로서, MCI는 질환 진행의 초기 단계일 수 있고, 알츠하이머 질환의 전-증상기(pre-symptomatic phase)로 인한 것이다. 그러나, 알츠하이머 질환과 구별되는 MCI에 대한 진단은 임상 및 인지 증후군에 대한 많은 진단 기준으로 인하여 여전히 해결해야 할 과제이며, MCI 진단이 정상 진단과 알츠하이머 질환 사이의 회색 영역을 반영한다고 추측할 뿐이다.

[0004] 현재, 알츠하이머 질환 및 MCI를 진단하기 위하여, 통상적으로 신경심리화학적 검사(GDS, MMSE), 또는 양전자 방출 단층 촬영(PET), 자기공명영상(MRI) 등의 진단 장치를 이용하고 있다(Alzheimer's & Dementia, Vol. 14, Issue 4, 535-562 (2018) 등). 그러나, 이러한 진단 기술의 경우, 많은 시간 및 비용이 소요되며, 특히 PET 및 MRI는 구역질, 두통, 구토 등과 같은 부작용을 일으킬 수 있다. 더 나아가, PET 측정 방식의 경우, 방사선 조영제 주입, 환자 거동제한, 낮은 영상분해능, 복잡한 고가의 측정기기 사용 등으로 인하여 채택 진단 및 일상적 건강관리 활용 측면에서 불리하다.

[0005] 한편, 인산화된 타우 트레오닌 181 (p-tau 181) 단백질은 알츠하이머 질환(AD)의 주요 단백질 마커 중 하나로서 최근 연구결과에 따르면 경도 인지 장애(MCI) 및 치매 초기 증상과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.

[0006] 임상 환자에 대한 알츠하이머 질환 및 MCI 진단 기술의 발전은 질환 모니터링뿐만 아니라, 신속하고 효과적인 치료에 있어서도 필수적이라 할 수 있다. p-타우 181의 검출은 초기 알츠하이머 질환 진단, 급성 알츠하이머 질환의 예후, 및 다른 신경변성 질환 대비 효과적인 혈장 알츠하이머 질환 진단에 있어서 진일보한 방안으로 고려될 수 있다. 특히, 건강한 고령자와 비교하면, 알츠하이머 질환 및 MCI를 갖는 환자는 현저히 풍부하게 발현하는 혈장 타우를 갖는 것으로 관찰된 바 있다.

[0007] 그러나, 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)의 추출을 기반으로 하는 방식은 뇌척수액의 추출 시 침습성으로 인하여 인체의 고통 및 후유증을 유발하는 문제점을 갖고 있다. 반면, 혈액, 구체적으로 인체 혈장으로부터 바이오마커를 검출하는 방식은 임상 또는 방문 시 고령 환자의 혈액으로부터 용이하게 채취할 수 있다. 따라서, 초기 검출 및 환자 추적에 위하여는 인체 혈장은 신뢰성 있는 진단 및 예후 인자로 볼 수 있다. 그럼에도 불구하고, 알츠하이머 질환의 임상 상태에서 혈장 p-타우 181을 측정하고 평가하기 위한 분석 감도에 대한 기준은 확립되지 않은 실정이다. 특히, 건강한 대상은 물론, MCI를 갖는 환자와 알츠하이머 질환을 갖는 환자를 알츠하이머 질환의 초기 진단에서 구별할 수 있는 검출(또는 진단) 플랫폼에 대한 필요성이 높다. 더욱이, 혈액과 같은 시료 내에는 p-타우 181 이외에 다양한 알츠하이머 질환의 바이오마커가 함유되어 있어 p-타우 181 검출 시 간섭을 유발할 가능성이 있다.

[0008] 따라서, 인체로부터 쉽게 채취할 수 있는 혈액(특히, 혈청)과 같은 시료 내에 미량 또는 극미량으로 함유되어 있는 알츠하이머 질환의 바이오마커인 p-타우 181 단백질을 높은 정확도 및 신뢰도로 간편하게 검출할 수 있고,

더 나아가 별도의 표지(label)를 사용하지 않는 등, 경제적으로 알츠하이머 질환을 조기 진단할 수 있는 방안이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 개시 내용에 따른 일 구체예에서는 시료 내 미량으로 함유된 알츠하이머 질환의 바이오마커로서 p-타우 181(p-tau 181) 단백질을 간편하게 검출하기 위한 나노-하이브리드 기반의 센서 또는 검출 플랫폼을 제공하고자 한다.

[0010] 본 개시 내용에 따른 다른 구체예에서는 나노-하이브리드 기반의 센서 또는 검출 플랫폼을 이용하여 별도의 표지를 사용하지 않고도 시료 내 p-타우 181 단백질을 높은 정확도 및 감도로 검출하고, 이에 따라 알츠하이머 질환에 대한 조기 진단 정확도를 높일 수 있는 방안을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 개시 내용의 제1 면에 따르면,
- [0012] 임피던스 센서를 이용한 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법으로서,
- [0013] a) 분석 대상인 액상 시료를 제공하는 단계;
- [0014] b) 상기 액상 시료에 임피던스 센서를 접촉시켜 임피던스를 측정하는 단계;
- [0015] c) 상기 측정된 임피던스 값을 하기 수학적 식 1에 따라 피팅시킴으로써 액상 시료 내 p-타우 181 단백질의 농도에 대한 전하전달저항(R_{ct})의 변화를 지시하는 선형 교정 곡선(calibration curve)을 도출하는 단계; 및
- [0016] d) 상기 도출된 선형 교정 곡선에 근거하여 시료 내 p-타우 181 단백질을 정성적 및/또는 정량적으로 검출하는 단계;
- [0017] 를 포함하고,
- [0018] 상기 임피던스 센서는,
- [0019] 전극;
- [0020] 상기 전극 상에 형성된 환원 그래핀 산화물 층;
- [0021] 상기 환원 그래핀 산화물 층 상에 형성된 사이클로텍스트린 층; 및
- [0022] 호스트-게스트 상호작용을 통하여 상기 사이클로텍스트린 층에 고정되며, 액상 시료와 접촉 시, 액상 시료 내에 함유된 p-타우 181 단백질과 특이적으로 바인딩되는 항-p-타우 181 항체;
- [0023] 를 포함하며,
- [0024] 상기 액상 시료 내에 p-타우 181 단백질이 함유된 경우에 항-p-타우 181 항체와의 바인딩에 의한 임피던스 값의 변화가 발생하는, 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출 방법이 제공된다:
- [0025] [수학적 식 1]
- [0026]
$$R_{ct} = (Z - R_s) / \{1 - j \omega C_{dl}(Z - R_s)\} - Z_w$$
- [0027] 상기 식에서, R_{ct} 는 전하전달저항, Z 는 측정된 임피던스, R_s 는 용액저항, j 는 허수단위, ω 는 각 주파수, 그리고 Z_w 는 확산 임피던스이다.
- [0028] 예시적 구체예에 따르면, 상기 단계 d)를 통하여 도출된 시료 내 p-타우 181 단백질의 농도가 $12.505 \text{ pg mL}^{-1}$ 를 초과하는 경우에는 알츠하이머 질환군(AD) 시료, 12.505 내지 $11.441 \text{ pg mL}^{-1}$ 인 경우에는 경도 인지 장애군(MCI) 시료, 그리고 $11.441 \text{ pg mL}^{-1}$ 미만인 경우에는 정상군 시료로 구분할 수 있다.
- [0029] 예시적 구체예에 따르면, 상기 전극은 기관 상에 형성될 수 있다.

- [0030] 예시적 구체예에 따르면, 상기 전극은 마이크로-디스크 전극일 수 있다.
- [0031] 예시적 구체예에 따르면, 상기 마이크로-디스크 전극의 직경은 100 내지 1000 μm 범위일 수 있다.
- [0032] 예시적 구체예에 따르면, 상기 호스트-게스트 상호작용에 의하여 β -사이클로덱스트린과 항-p-타우 181 항체 간에 거대분자 포접 복합체(supermolecular inclusion complex)가 형성될 수 있다.
- [0033] 예시적 구체예에 따르면, 상기 사이클로덱스트린 층은 β -사이클로덱스트린 층일 수 있다.
- [0034] 예시적 구체예에 따르면, 상기 기판은 실리콘, 석영, 글라스, 세라믹 및 고분자로 이루어지는 군으로부터 적어도 하나가 선택되는 재질일 수 있다.
- [0035] 예시적 구체예에 따르면, 상기 임피던스 센서는 하기의 단계를 포함하는 방법에 의하여 제조될 수 있다:
- [0036] (i) 전극을 제공하는 단계;
- [0037] (ii) 상기 전극의 표면 상에 환원 그래핀 산화물(rGO) 층을 부착하는 단계;
- [0038] (iii) 상기 환원 그래핀 산화물 층에 사이클로덱스트린(CD) 층을 부착하여 CD/rGO 나노-하이브리드를 형성하는 단계; 및
- [0039] (iv) 상기 CD/rGO 나노-하이브리드 내 사이클로덱스트린에 항-p-타우 181 항체를 고정하되, 호스트-게스트 상호작용을 통하여 호스트인 사이클로덱스트린의 내측 캐비티 내로 게스트 분자인 항-p-타우 181 항체를 도입하는 단계.
- [0040] 예시적 구체예에 따르면, 상기 액상 시료는 혈장일 수 있다.

발명의 효과

- [0041] 본 개시 내용의 구체예에 따라 제공되는 p-타우 181 단백질 검출용 임피던스 센서는 호스트-게스트 상호작용에 의하여 사이클로덱스트린 및 환원 그래핀 산화물의 나노-하이브리드 구조에 항-p-타우 181 항체를 고정시켜 시료 내 알츠하이머 질환의 바이오마커인 p-타우 181을 검출함으로써 기존의 PET 및 MRI 테크닉을 통하여 알츠하이머 질환을 진단하는 방식에 비하여 간편하고 경제적이다. 특히, 검출 시료 내에 극미량으로 함유된 p-타우 181에 대하여도 고감도로 검출할 수 있기 때문에, 기존의 뇌척수액 대신에 용이하게 추출할 수 있는 혈액(구체적으로 혈장)을 검출 시료로 사용할 수 있다.
- [0042] 이외에도, 전술한 나노-하이브리드의 검출 플랫폼을 이용하되, p-타우 181 단백질에 대한 전하전달저항의 보상을 통한 선형 교정 곡선에 근거하여 시료 내 p-타우 181 단백질을 높은 감도로 검출함으로써 질환의 초기 단계에서 알츠하이머 질환(AD)과 MCI를 효과적으로 구별할 수 있고, 시료 내 다른 바이오마커의 간섭에 의하여 실질적으로 영향받지 않으면서 극미량의 p-타우 181 단백질에 대한 검출 신뢰성을 높일 수 있는 점에서 유리하다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은, 예시적 구체예에 따라 알츠하이머 질환(AD) 및 MCI를 갖는 환자, 그리고 건강한 대조군에 있어서 혈장 p-타우 181 단백질을 인-시튜로 검출하는 원리를 개략적으로 도시하는 도면으로서, (A) p-타우 181 단백질을 위한 β -사이클로덱스트린/환원 그래핀산화물/ITO (β -CD/rGO/ITO) 센서 8채널 어레이(8-MEA)의 외관 사진, (B) 개별 전극 표면에 흡착된 rGO/ β -CD/항체 단백질 결합 과정, 그리고 (C) 제작된 p-타우 181 검출 센서를 이용하여 60개의 인체 혈장 내 시료를 테스트함으로써 알츠하이머 질환, MCI 및 건강한 대조군을 신속하게 진단/식별함으로써 알츠하이머 질환의 조기 진단에 활용하는 순차적인 과정을 예시하는 도면이고;
- 도 2는, (A) GO, (B) rGO, (C) β -CD, 및 (D) rGO/ β -CD의 SEM 사진이고;
- 도 3은 8-MEA 상에 형성된, GO, rGO, 및 rGO/ β -CD에 대하여 취득된 라만 스펙트럼이고;
- 도 4는 8-MEA 상에 형성된, (A) GO 및 rGO, 그리고 (B) β -CD 및 rGO/ β -CD의 XRD 스펙트럼이고;
- 도 5는, (A) 등가 회로 모델(삽입 도면)을 이용한 나이퀴스트 플롯, 및 (B) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1 비율)이 함유된, 0.1 M KCl 용액(pH 7.4) 내 베어(bare) ITO, rGO/ β -CD, 및 항-p-타우 181 각각의 어셈블리 층에 대한 CV 곡선이고;
- 도 6은 EIS에 의하여 측정 및 분석된 p-타우 181에 대한 바이오센서의 응답 특성으로서, (A) 1 mM

$K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1 비율)이 함유된 0.1 M KCl의 PBS 용액(pH 7.4) 내 p-타우 181의 농도 범위(10^0 내지 10^6 fg/mL)에서의 나이퀴스트 플롯, (B) 바이오센서에 의한 p-타우 181의 검출을 위한 전하전달저항 값 변화를 나타내는 곡선(기호 및 바(bar)는 각각 3회의 독립적인 실험(N=3)의 평균 및 표준 오차를 의미함), 그리고 (C) 해리 상수(K_D)를 도출하기 위하여 그래프를 PBS 내 p-타우 181 농도 범위(10^0 내지 10^6 fg/mL)에서 $[p\text{-tau181}]$ vs. $[p\text{-tau181}]/\Delta R$ 간의 2 지점(two-site) Langmuir 모델로 피팅하여 도출된 선형 교정곡선이고;

도 7은 상이한 비특이적 분자($A\beta$ 1-40: 100 ng/mL, $A\beta$ 1-42: 1 ng/mL) 및 특이적 타겟 분자(p-타우 181: 10^5 fg/mL)에 대한 바이오센서의 R_{ct} 응답의 백분율 변화를 나타내는 그래프이고;

도 8은 알츠하이머 질환을 갖는 환자(N=20), MCI를 갖는 환자(N=20) 및 건강한 대조군(N=20)의 60개의 혈장 임상 시료 내 측정된 p-타우 181의 레벨을 나타내는 플롯이고;

도 9는 인체 혈장 임상 시료 내 바이오센서의 응답을 나타내는 그래프이고;

도 10은, (a) 10 Hz의 주파수에서 측정된 시료의 임피던스 값과 시료 내 p-타우 181 단백질 농도 간의 교정 곡선, 그리고 (b) 측정된 임피던스를 수학적 1로 피팅하여 도출된 전하전달저항 값(R_{ct})의 변화와 시료 내 p-타우 181 단백질 농도 간의 교정 곡선이고;

도 11은 실시예에서 사용된 검출 플랫폼을 이용하고, 10 Hz의 주파수에서 측정된 임피던스 값의 변화를 이용하여 도출된 알츠하이머 질환군(AD) 시료에 대한 민감도(sensitivity), 특이도(specificity) 및 ROC 곡선 아래의 면적(area under the ROC curve; AUC)을 보여주는 그래프이고; 그리고

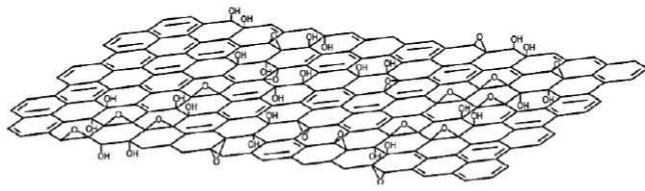
도 12는 실시예에서 사용된 검출 플랫폼을 이용하고, 전하전달저항 값(R_{ct})의 변화를 이용하여 도출된 알츠하이머 질환군(AD) 시료에 대한 민감도(sensitivity), 특이도(specificity) 및 ROC 곡선 아래의 면적(area under the ROC curve; AUC)을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 본 발명은 하기의 설명에 의하여 모두 달성될 수 있다. 하기의 설명은 본 발명의 바람직한 구체예를 기술하는 것으로 이해되어야 하며, 본 발명이 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 첨부된 도면은 이해를 돕기 위한 것으로, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니며, 개별 구성에 관한 세부 사항은 후술하는 관련 기재의 구체적 취지에 의하여 적절히 이해될 수 있다.
- [0045] 본 명세서에서 사용되는 용어는 하기와 같이 정의될 수 있다.
- [0046] "센서"는 검출 소자로 불리기도 하며, 물리·화학량의 변화를 감지하는 디바이스를 의미하는 바, 크게 물리량을 측정하는 물리 센서 및 화학물질 측정을 위한 화학 센서로 구분될 수 있다. 이와 유사하게, "바이오센서"는 특정 바이오 물질의 물리량 또는 화학량을 선택적으로 포착하여 측정 가능한 신호로 변화시키는 디바이스를 의미한다.
- [0047] "임피던스 센서"는 바이오 시료의 임피던스 변화를 측정하는 디바이스로서, 이때 임피던스는 전류에 대한 전압의 비이며, 교류 회로에서의 임피던스는 직류 회로에서 저항의 역할과 유사한 역할을 수행한다.
- [0048] "바이오마커"는 알츠하이머 질환을 알츠하이머 질환이 아닌 상태와 구분할 수 있도록 지시하는 물질을 지칭할 수 있다.
- [0049] "기판(substrate)"은 포괄적으로는 1 또는 2 이상의 부재 또는 부품(예를 들면, 센서, 세포 등)을 지지할 수 있는 고체 표면을 의미할 수 있다. 구체적으로, 그 위에 부착(고정) 또는 코팅(도포) 가능한 표면을 제공하는 구조 또는 구조물을 의미할 수 있으며, 전형적으로 2차원의 표면을 제공할 수 있다.
- [0050] "그래핀(graphene)"은 sp^2 탄소 원자들이 6각형의 하니컴(honeycomb) 격자를 형성하는 형태의 2차원 나노시트(2-D nanosheet) 단일 층의 탄소 구조체를 의미할 수 있다. 즉, 그래핀은 6각형의 격자점 평면에 꼭 들어찬 2차원(평면)의 탄소 원자면 구조를 갖고 있다.
- [0051] "그래핀 산화물(GO)"은 하기 구조식 1과 같이 산소-함유 기능기(예를 들면, 에폭시 또는 히드록시기)으로 기능화된 그래핀, 구체적으로 단일층 그래파이트 산화물(C-O 공유 결합을 도입함으로써 그래핀으로부터 유도된 2차

원 물질)을 의미할 수 있고, 그래핀의 엣지(edge) 부위에는 카르보닐기 및 카르복시기가 존재하여 극성 표면 특성을 나타낼 수 있다.

[0052] [구조식 1]



[0053]

[0054] 예를 들면, 카르복시기의 존재로 인하여 친수성을 나타내어 물에 용이하게 분산되어 콜로이드 용액을 형성할 수 있다. 그래핀 산화물은 그래핀계 격자 및 다양한 산소-함유 그룹의 존재로 인하여 그래핀 산화물 표면의 작용기는 다양한 활성종을 고정하기 위한 앵커 사이트로 작용할 수 있고, 조절 가능한 전자적 특성을 갖게 된다.

[0055] "환원 그래핀 산화물(rGO)"는 그래핀과 유사한 구조를 갖는 물질로서 높은 비표면적, 박막 및 도전성을 나타낼 수 있다. 전형적으로, 그래핀 산화물은 절연 특성을 갖게 되는 바, 시트 저항은 $10^{12} \Omega/\text{sq}$ 이상을 나타낸다. 그러나, 그래핀 산화물이 환원될 경우, 시트 저항은 현저히 감소하여 도전체 또는 반도체로 전환될 수 있다.

[0056] "나노시트"는 단일 또는 수개의 단일 층 두께를 가질 수 있는 2차원 재료와 유사할 수 있으며, 수백 나노미터에서 수십 마이크로미터의 형 치수를 가질 수 있다.

[0057] "항원"은 특이한 면역 반응을 일으킬 수 있는 임의의 물질(substance)로서, 구체적으로 적어도 하나의 항체에 의하여 인식 가능한 임의의 분자 또는 분자 그룹을 의미할 수 있다. 항원은 적어도 하나의 에피토프(epitope; 항체의 의하여 인식될 수 있는 특정 생화학적 유닛)을 함유한다.

[0058] "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하는, 항원을 특이적으로 인식하는 수용체 역할을 하는 단백질 분자를 의미할 수 있다. 구체적으로, 완전한 다클론(또는 폴리클론) 또는 단클론(모노클론) 항체뿐만 아니라, 이의 단편(예를 들면, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일사슬(ScFv), 다이아바디, 항체 단편들로 형성된 다중특이적 항체, 그의 돌연변이, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 요망되는 특이성의 항체 인식 부위를 포함하는 면역 글로불린 분자의 임의의 기타 변형 배열을 의미할 수 있다. 항체로는 임의의 범주에 해당되는 항체, 예를 들면 IgG, IgA, 또는 IgM (또는 그의 서브클래스), 및 특정 클래스에 속하지 않는 항체를 포함할 수 있다.

[0059] "바인딩(binding)"은 표면에 공유 또는 비공유 방식으로 결합 또는 연결되는 것을 의미할 수 있다.

[0060] "고정(immobilization)"은 임의의 물질 또는 생활성체가 기재에 공유적 또는 비공유적으로 직접 또는 간접 방식에 의하여 바인딩되는 것을 의미할 수 있다.

[0061] "작업 전극"은 특정(관심) 반응이 일어나는 전기화학 시스템 내 전극을 의미할 수 있고, "기준 전극"은 안정적이고 공지된 전극 전위를 갖는 전극을 의미할 수 있다. 또한, "상대 전극"은 전류가 전기화학 시스템을 통과하는 것을 보조하며 작업 전극으로 흐르는 전하와는 상반된 부호의 전하가 흐르는 전극으로서 전형적으로 특정(관심) 반응은 상대 전극에서는 일어나지 않는다.

[0062] "시료" 또는 "액상 시료"는 검출하고자 하는 타겟 검체 또는 바이오물질을 함유할 수 있는 한, 특정 종류 또는 형태로 한정되는 것은 아니다. 예시적으로, 시료는 생물학적 시료, 예를 들면 생물학적 유체(fluid)일 수 있다. 생물학적 유체는, 예를 들면, 체액(body fluid), 구체적으로는, 혈액(전혈), 혈장, 혈청, 타액, 정액, 소변, 대변, 가래, 뇌척수액, 간질액, 복막액, 눈물, 타액, 양수 등을 들 수 있고, 보다 구체적으로 혈액, 특히 구체적으로 혈장(plasma)일 수 있다. 이때, 시료는 생체 시료 자체뿐만 아니라, 이를 처리한 것도 포함할 수 있는 바, 이러한 처리로서 여과, 증류, 추출, 농축, 희석, 간섭 물질의 비활성화, 시약 첨가 등으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다.

[0063] 본 명세서에서 수치 범위가 하한값 및/또는 상한값으로 특정된 경우, 해당 수치 범위 내에 임의의 서브 조합도 개시된 것으로 이해될 수 있다. 예를 들면, "1 내지 5"로 기재된 경우, 1, 2, 3, 4 및 5는 물론, 이들 간의 임의의 서브-조합도 포함할 수 있다.

[0064] "상에" 및 "위에"라는 표현은 상대적인 위치 개념을 언급하기 위하여 사용되는 것으로 이해될 수 있다.

따라서, 언급된 층에 다른 구성 요소 또는 층이 직접적으로 존재하는 경우뿐만 아니라, 그 사이에 적어도 하나의 다른 층(중간층 또는 개재층)이 존재하거나, 또는 추가 구성 요소가 개재되거나 존재할 수도 있다. 이와 유사하게, "하측에", "하부에" 및 "아래에"라는 표현 및 "사이에"라는 표현 역시 위치에 대한 상대적 개념으로 이해될 수 있을 것이다. 또한, "순차적으로"라는 표현 역시 상대적인 위치 개념으로 이해될 수 있다.

[0065] "접촉한다"는 용어의 경우, 협의로는 2개의 대상 간의 직접적인 접촉을 의미하기는 하나, 광의로는 임의의 추가 구성 요소가 개재될 수 있는 것으로 이해될 수 있다.

[0066] 본 명세서에 있어서 임의의 구성 요소 또는 부재가 다른 구성 요소 또는 부재와 "연결된다" 또는 "연통된다"고 기재되어 있는 경우, 달리 언급되지 않는 한, 상기 다른 구성 요소 또는 부재와 직접 연결 또는 연통되어 있는 경우뿐만 아니라, 다른 구성 요소 또는 부재의 개재 하에서 연결 또는 연통되어 있는 경우도 포함되는 것으로 이해될 수 있다.

[0067] p-타우 181 단백질 검출 센서(검출 플랫폼) 및 이의 제조

[0068] 본 개시 내용의 일 구체예에 따르면, 전극 상에 형성된 나노-하이브리드(nanohybrid)를 기반으로 하는 임피던스 센서 또는 플랫폼을 이용하여 시료(예를 들면, 혈액, 구체적으로 혈장(plasma)) 내에 존재하는 알츠하이머 질환의 바이오마커인 p-타우 181 단백질을 검출(예를 들면, 정량적 및/또는 정성적 검출)하는 방법을 제공한다.

[0069] 일 구체예에 따르면, 임피던스 센서에 있어서, 전극 상에 환원 그래핀 산화물 및 사이클로텍스트린(CD)이 순차적으로 형성된 나노-하이브리드 구조에 p-타우 181 단백질과 특이적으로 바인딩되는 항-p-타우 181 항체가 고정되거나, 또는 항-p-타우 181 항체로 기능화된다(예를 들면, 항원-항체 상호작용에 의함). 이와 같이, 항-p-타우 181 항체가 고정된 나노-하이브리드/전극 구조물은 임피던스 센서의 작업 전극(working electrode)으로 기능할 수 있다.

[0070] 현재, 알츠하이머의 뚜렷한 단계 없이도 구별되는 농도의 바이오마커를 검출하고 많은 혈장 임상 시료를 검출하는데 효과적인 방법의 결여로 인하여 p-타우 181 분자의 검출은 제한적이다. 그러나, 본 구체예에 따른 센서 플랫폼을 통하여 인체로부터 입수된 액상 시료(예를 들면 혈액, 구체적으로 혈장)로부터 p-타우 181 바이오마커를 모니터링하는데 유용하고, 더 나아가 불필요한 단계를 제거(또는 생략)하고 경제적이면서 생산성이 높고 표지를 요하지 않는 검출을 수행할 수 있다.

[0071] 예시적 구체예에 따르면, 센서 플랫폼을 구성하는 전극은 도전성 재료로 이루어질 수 있다. 일 예로서, 전극 재질은 도전성 금속, 탄소나노튜브(CNT)와 같은 전도성 탄소 소재, 전도성 고분자(예를 들면, PEDOT/PSS, 폴리 아닐린, 및 폴리피롤(PPy)) 등으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 예시적 구체예에 따르면, 도전성 전극은 인듐-주석-산화물(ITO), 인듐-아연-산화물(IZO), 안티몬주석산화물(ATO), 아연산화물(ZnO), 주석산화물(SnO₂), 갈륨-아연-산화물(GZO), 알루미늄-아연-산화물(AZO), 카드뮴-주석-산화물(CTO) 등의 금속 산화물 중에서 적어도 하나가 선택되는 재질일 수 있다. 다른 예시적 구체예에 따르면, 도전성 금속은 금(Au), 은(Ag), 백금(Pt), 구리(Cu), 알루미늄(Al), 텅스텐(W), 니켈(Ni) 등으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다. 다만, 본 개시 내용이 상기 예시된 종류로 한정되는 것은 아니다.

[0072] 특정 구체예에 있어서, 전극 재질은 ITO일 수 있는 바, 높은 광 투과성 및 전도성으로 인한 광학-전기적 특성 동시 분석능, 낮은 배경전류, 그리고 높은 전기화학적 안정성을 갖는 점에서 유리할 수 있다.

[0073] 예시적 구체예에 따르면, 전극(또는 전극 층)은 기판 상에 형성될 수 있으며, 예를 들면 패터닝(예를 들면, 마스크를 이용한 패터닝) 공정을 통하여 원하는 패턴, 형상 및/또는 치수를 갖도록 형성될 수 있다. 일 예로서, 물리적 증착법(PVD; 예를 들면 스퍼터링, 열 증착(thermal vapor deposition), E-beam 증착 등), 화학적 증착법(CVD; 예를 들면, 플라즈마 화학기상증착(PECVD), 열적 화학기상 증착(thermal CVD)) 등을 적용할 수 있다. 택일적으로, 당업계에서 공지된 다양한 금속 산화물 형성 방법, 예를 들면 수열합성법, 전기화학증착법, 이온빔 증착법 등을 채택할 수 있으며, 보다 구체적으로 전기화학증착법을 적용할 수 있다. 전극의 형성 및/또는 패터닝 기술은 당업계에 공지된 만큼, 이에 대한 구체적인 설명은 생략하기로 한다.

[0074] 예시적 구체예에 따르면, 상술한 바와 같이 형성된 전극 또는 전극 층의 두께는, 예를 들면 약 5 내지 1000 nm, 구체적으로 약 50 내지 600 nm, 보다 구체적으로 약 100 내지 400 nm의 범위에서 정하여질 수 있으나, 이는 예시적 취지로 이해될 수 있다.

[0075] 예시적 구체예에 따르면, 전극은 마이크로전극일 수 있는 바, 소량의 활성 건극 물질로 높은 전류 밀도를 제공할 수 있는 점에서 유리할 수 있다. 특정 구체예에서 마이크로전극은 마이크로-디스크 전극일 수 있다. 마이

크로-디스크 전극은 절연체 내 마이크론 수준의 반경을 갖는 디스크 형상의 전극이 매립되면서 노출된 형태의 전극일 수 있다. 예시적으로, 전극은 마이크로-디스크 전극이 복수 전극(예를 들면, 적어도 약 2개, 구체적으로 약 4 내지 20개, 보다 구체적으로 약 6 내지 10개)의 어레이로 패턴화된 형태일 수 있다(예를 들면, 도 1A에 나타난 바와 같은 8-채널 전극 어레이 패턴). 또한, 예시적 구체예에 따르면, 마이크로-디스크 전극의 직경은, 예를 들면 약 100 내지 1000 μm , 구체적으로 약 200 내지 800 μm , 구체적으로 약 400 내지 700 μm 의 범위에서 정하여질 수 있다.

[0076] 한편, 전극이 형성될 수 있는 기판은 절연 및 방수 특성을 갖는 한, 당업계에서 공지된 재질을 특별한 제한 없이 사용할 수 있다. 일 예로서, 기판의 재질은 실리콘(예를 들면, 단결정 실리콘 등), 석영(예를 들면, 단결정 석영, 용융(fused) 또는 비정질 석영 등), 글라스, 세라믹, 고분자(예를 들면, 투명 플라스틱) 등으로 이루어지는 군으로부터 적어도 하나일 수 있고, 보다 구체적으로 글라스일 수 있다. 예시적으로, 기판의 두께는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 약 0.5 내지 2 mm, 구체적으로 약 0.7 내지 1.5 mm, 보다 구체적으로 약 0.9 내지 1.1 mm의 범위일 수 있다.

[0077] 예시적 구체예에 있어서, p-타우 181 단백질 검출을 위한 센서 구조 중 개별 전극 표면에 흡착된 rGO/ β -CD/항체 단백질의 결합 과정은 도 1B와 같이 도시될 수 있다.

[0078] 상기 도면을 참조하면, 작업 전극으로 기능하는 전극 또는 전극 층(예를 들면, ITO 재질의 환형 마이크로 구조를 갖는 전극) 상에 환원 그래핀 산화물(rGO) 층이 부착될 수 있다. 이와 관련하여, rGO는 사이클로텍스트린을 전극 상에 고정시키는데 효과적인 소재로서, 나노시트 구조, 넓은 비표면적, 양호한 전도성, 그리고 환원 프로세스 후에 탄소 골격의 표면 상에 잔류하는 산소 기능기로 인하여 공유 결합 및 π - π 상호작용을 통하여 후술하는 바와 같이 그 위에 사이클로텍스트린을 고정시킬 수 있다.

[0079] 예시적 구체예에 따르면, rGO 층을 형성하기 위하여, 당업계에서 알려진 부착(deposition) 테크닉을 활용할 수 있다. 일 예로서, 전기화학적 부착 테크닉을 이용하여 전극 상에 환원 그래핀 산화물 층을 형성할 수 있는 바, 나노 시트 구조, 넓은 표면적, 및 우수한 전도도로 제공할 수 있고, 항체 결합을 위한 다수의 사이클로텍스트린을 고정화할 수 있는 점에서 유리하다(특히, 한정된 면적에서 보다 많은 항체 결합을 유도할 수 있음). 이와 같이, 전기화학적 테크닉을 통하여 rGO를 부착할 경우, 예를 들면 2전극 시스템 또는 3전극 시스템을 기반으로 할 수 있는 바, 작업 전극은 전술한 바와 같이 형성된 전극(예를 들면, ITO 재질의 마이크로-디스크 전극)일 수 있다.

[0080] 또한, rGO의 전기화학적 부착 시, 상대 전극(counter electrode)으로서, 예를 들면 백금 전극(백금 필라멘트 전극, 백금 링 전극 등), 금 전극, 은 전극(또는 은 네트 전극) 등과 같은 전도성 금속 재질 또는 이의 조합(백금/금 전극)으로 이루어진 전극; 전도성 입자가 코팅된 유리, 석영, 플라스틱 필름, 마이카 및 알루미늄 판; 티타늄 전극; 은/수은 필름 전극 등을 사용할 수 있다. 또한, 3전극 시스템을 사용할 경우, 기준 전극은 통상적으로 사용되는 Hg_2SO_4 , Ag/AgCl , Ag/Ag^+ , $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4$, RE-6H, Hg/HgO , KCl 포화된 칼로멜 반전지(SCE), 염다리 백금 필라멘트 기준 전극 등일 수 있다.

[0081] 이외에도, rGO를 전기화학적으로 부착하기 위하여, 순환 전압 전위법(cyclic voltammetry) 또는 전류법(amperometry)을 적용할 수 있는 바, 이러한 방식 각각의 기본적 원리는 당업계에 알려져 있다. 일 예로서, 전자의 경우에는 사이클이 증가할수록 rGO 층의 두께가 증가하는 한편, 후자의 경우에는 시간이 증가할수록 rGO 층의 두께가 증가할 수 있다.

[0082] 특정 구체예에 있어서, 전류법, 구체적으로 시간대 전류법(chronoamperometry)을 이용할 수 있다. 이때, 그래핀 산화물(GO)의 용액(구체적으로, 수용액)을 제조하여 사용할 수 있는 바, GO 용액의 농도는, 예를 들면 약 0.1 내지 10 mg/mL, 구체적으로 약 0.4 내지 5 mg/mL, 보다 구체적으로 약 0.8 내지 2 mg/mL의 범위에서 정하여질 수 있으나, 이는 예시적 취지로 이해될 수 있다. 또한, 전기화학적 반응을 통하여 인가되는 전압은, 예를 들면 약 -2 내지 -0.5 V, 구체적으로 약 -1.7 내지 -0.9 V, 보다 구체적으로 약 -1.5 내지 -1.3 V 범위에서 선택될 수 있다. 또한, 부착 시간은, GO 용액의 농도 및 전극 구조를 고려하여 조절될 수 있는 바, 예를 들면 약 10 내지 60 초, 구체적으로 약 20 내지 55 초, 보다 구체적으로 약 25 내지 40 초의 범위일 수 있다.

[0083] 상술한 절차를 통하여 형성된 rGO 층의 두께는, 예를 들면 약 1 내지 3 nm, 구체적으로 약 1.3 내지 2.5 nm, 보다 구체적으로 약 1.5 내지 2 nm의 범위일 수 있다. 또한, 형성된 rGO 층의 비표면적(BET)은, 예를 들면 약 50 내지 150 m^2/g , 구체적으로 약 65 내지 135 m^2/g , 보다 구체적으로 약 80 내지 110 m^2/g 의 범위일 수 있다. 이외에도, rGO 층은 카본나노튜브(CNT) 보다 높은 전도도 및 산화환원 전류 전달능을 나타낼 수 있다.

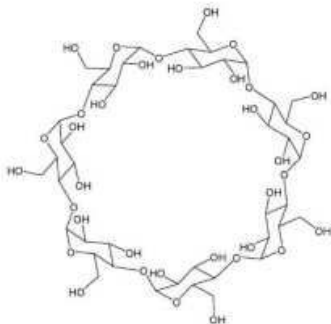
[0084] 한편, 일 구체예에 따르면, 전극(또는 전극 층) 상에 환원 그래핀 산화물(rGO) 층이 형성된 후에는 사이클로덱스트린(CD) 층이 형성된다(도 1B 참조).

[0085] 사이클로덱스트린(CD)은 물에서 안정한 비독성 당 고분자, 구체적으로 복수의 글루코오스 서브유닛을 포함하는 사이클릭 올리고사카라이드로서, 크게 알파-사이클로덱스트린(α -CD), 베타사이클로덱스트린(β -CD) 및 감마-사이클로덱스트린(γ -CD)으로 구분되는 바, 이들 각각은 6개, 7개 및 8개의 글루코오스 서브유닛을 갖고 있다. 사이클로덱스트린은 통상적으로 결정성이 높고, 수분을 흡수하지 않는 성상을 갖고 있다.

[0086] 특히, 사이클로덱스트린은 친수성의 외측 표면과 소수의 내측 캐비티(동공)를 갖는 환상면체(toroidal) 형상을 갖는 바, 소수성의 캐비티는 작은 크기의 유기 분자를 부분적으로 또는 완전히 캡슐화하는 성상을 갖고 있다. 이처럼, 사이클로덱스트린은 특유의 컵 형상의 구조를 갖고 있어 일정한 분자량 범위(약 300 이하)의 분자들을 컵 내부에 포획할 수 있는 가능성을 갖는다. 이처럼, 외부로부터의 분자(게스트)가 컵 구조 내부에 도입되어 형성되는 복합체를 호스트-게스트 복합체로 지칭할 수 있다.

[0087] 예시적 구체예에 따르면, 사이클로덱스트린으로서 하기 화학식 1로 표시되는 β -사이클로덱스트린(β -CD)이 사용될 수 있는 바, 도넛 형태의 내측은 소수성, 외측은 친수성을 띄어 항체 분자를 선택적으로 사이클로덱스트린의 캐비티에 위치시켜 안정적인 거대분자(또는 초분자) 호스트-게스트 포접 복합체(supermolecular inclusion complex)가 형성이 가능한 점에서 유리할 수 있다.

[0088] [화학식 1]



[0089]

[0090]

[0091] 예시적으로, β -CD는 일반적으로 전분 소스로부터 효소적으로 제조할 수 있는 바, 이때 사용되는 효소는, 예를 들면 알파-아밀로스와 함께 사이클로덱스트린 글리코실트랜스퍼라아제(glycosyltransferase)가 사용 가능하다. 특히, β -CD의 캐비티 직경은 약 6 내지 6.4 Å, 외측 직경은 약 15.4 Å, 그리고 높이는 약 7.8 Å이다.

[0092] 예시적 구체예에 따르면, rGO 층 상에 사이클로덱스트린이 형성됨으로써 나노-하이브리드(즉, CD/rGO nanohybrid)를 형성하는 바, 이러한 나노-하이브리드는 큰 비표면적 및 균일한 필름을 형성함으로써 베이스 용액 및 베어 전극 사이의 전자 전달을 촉진시킬 수 있다. 또한, CD/rGO(구체적으로, β -CD/rGO) 나노-하이브리드는 사이클로덱스트린의 내측 캐비티가 갖는 호스트 특성 구조로 인하여 게스트 분자에 대한 높은 거대분자 인식(supramolecular recognition) 특성을 나타낼 수 있다. 즉, 사이클로덱스트린은 호스트(host)로 기능하여 게스트(guest) 분자와 호스트-게스트 상호작용을 통하여 게스트 분자를 내측 캐비티 내로 도입하거나 고정시킬 수 있다.

[0093] 예시적 구체예에 따르면, 사이클로덱스트린은 당업계에 공지된 테크닉을 이용하여 환원 그래핀 산화물(rGO) 상에 부착될 수 있는 바, 예를 들면 전기화학적 부착, 화학적 부착 등을 예시할 수 있다.

[0094] 특정 구체예에 있어서, 사이클로덱스트린을 전기화학적으로 환원 그래핀 산화물 층 상에 부착할 수 있는 바, 예를 들면 순환전압 전위법(cyclic voltammetry)을 적용할 수 있다. 이와 관련하여, 3전극 시스템을 이용하여 사이클로덱스트린을 부착할 수 있는 바, 이때 작업 전극은 rGO 층이 형성된 전극일 수 있으며, 기준 전극 및 상대 전극 각각은 앞서 기술된 바와 같다.

[0095] 이때, 사이클로덱스트린은 부착 과정에 용액 형태로 제공될 수 있는 바, 이때 액상 매질로, 예를 들면 PBS(phosphate-buffered solution), 탈이온수 등으로부터 적어도 하나를 선택하여 사용할 수 있으며, 용액의 pH는, 예를 들면 약 6 내지 9, 구체적으로 약 7 내지 8의 범위에서 조절될 수 있다. 또한, 사이클로덱스트린의 농도는, 예를 들면 약 0.005 내지 0.025 M, 구체적으로 약 0.008 내지 0.02 M, 보다 구체적으로 약 0.01 내지

0.015 M의 범위에서 조절 가능하다. 다만, 이는 예시적 취지로 이해될 수 있다.

- [0096] 한편, 순환전압 전위법을 적용할 경우, 인가되는 전압은, 예를 들면 약 -1.5 내지 1.5 V, 구체적으로 약 -1.2 내지 1.2 V, 보다 구체적으로 약 -1 내지 1 V 범위에서 정하여질 수 있다. 또한, 순환전압 전위법에서 전압을 인가할 경우, 주사속도는, 예를 들면 약 5 내지 500 mV/s, 구체적으로 약 10 내지 300 mV/s, 보다 구체적으로 약 30 내지 100 mV/s의 범위에서 적절히 조절할 수 있는 바, 산화-환원반응에서 산화 피크 및 환원 피크를 통하여 분극 현상 및 전기 전도 저항을 관찰할 수 있고, 사이클로텍스트린 층이 형성되는지 확인할 수 있다. 이외에도, 사이클로텍스트린의 로딩 량의 경우, 사이클 회수에 따라 조절 가능한 바, 예시적으로 사이클 회수는, 예를 들면 약 2 내지 50 사이클, 구체적으로 약 3 내지 20 사이클, 보다 구체적으로 약 4 내지 10 사이클의 범위에서 정하여질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0097] 또한, CD/rGO 나노-하이브리드에 있어서, rGO(또는 rGO 층)의 중량 기준으로, CD(또는 CD 층)의 함량은, 예를 들면 약 3 내지 12 중량% 구체적으로 약 5 내지 10 중량% 보다 구체적으로 약 7 내지 9 중량%의 범위에서 정하여질 수 있는 바, CD 층과 rGO 층 간의 균형잡힌 비율을 설정할 경우, 항체 고정화를 극대화함으로써 센서 제작 효율을 높일 수 있다. 다만, 본 개시 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0098] 한편, 일 구체예에 따르면, CD/rGO 나노-하이브리드를 기반으로 하고, 호스트-게스트 상호작용을 통하여 항-p-타우 181 항체를 고정할 수 있다. 이때, CD/rGO 나노-하이브리드는 거대분자 호스트-게스트 포접 복합체(supramolecular host-guest inclusion complex)를 형성하는 방식으로 다량의 항체를 고정할 수 있는 캐리어로서 기능할 수 있다. 구체적으로, 게스트 분자인 항-p-타우 181 항체는 호스트인 CD/rGO 나노-하이브리드 중 CD(구체적으로 β -CD)의 내측 캐비티로 침투하게 되는 바, 이때 정전기적 포접 상호작용, 수소 결합 등이 작용하게 되며, 그 결과 거대분자 호스트-게스트 포접 복합체를 형성하게 된다.
- [0099] 예시적 구체예에 따르면, 항-p-타우 181 항체를 CD/rGO 나노-하이브리드에 고정 또는 도입하기 위하여, 예를 들면 항체 및 나노-하이브리드를 인큐베이션시킬 수 있다. 이때, 항체의 농도는, 예를 들면 약 0.01 내지 0.5 mg/mL, 구체적으로 약 0.05 내지 0.2 mg/mL, 보다 구체적으로 약 0.08 내지 0.15 mg/mL의 범위에서 정하여질 수 있으나, 이는 예시적 취지로 이해될 수 있다. 또한, 인큐베이션 온도는, 예를 들면 약 1 내지 7 °C, 구체적으로 약 2 내지 6 °C, 보다 구체적으로 약 3 내지 5 °C의 범위에서 조절될 수 있다. 인큐베이션 온도는 단백질 변성에 영향을 미칠 수 있으므로, 전술한 범위 내에서 조절하는 것이 유리할 수 있다. 한편, 인큐베이션 시간은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 약 0.1 내지 5 시간, 구체적으로 약 0.5 내지 3 시간, 보다 구체적으로 약 0.8 내지 2 시간의 범위에서 조절될 수 있다.
- [0100] 이처럼, 항-p-타우 181 항체가 CD/rGO 나노-하이브리드에 고정될 경우, CD와 항-p-타우 181 항체 간의 거대분자 포접 복합체가 형성됨으로써 전극/용액 계면에서의 전자 전달을 억제하게 된다.
- [0101] 임피던스 센서 또는 검출 플랫폼을 이용한 시료 내 p-타우 181 단백질의 검출(진단)
- [0102] 본 개시 내용의 일 구체예에 따르면, 전술한 바와 같이 항-p-타우 181 항체가 고정된 사이클로텍스트린(CD)/환원 그래핀 산화물(rGO)/전극 구조를 구비하는 임피던스 센서 또는 검출 플랫폼을 이용하여 시료 내 알츠하이머 질환의 바이오마커인 p-타우 181 단백질을 정성적 및/또는 정량적으로 검출(또는 진단)하는 방법이 제공된다. 이와 관련하여, 전술한 임피던스 센서 또는 검출 플랫폼을 이용하여 알츠하이머 질환을 진단하는 과정을 도 1B 및 도 1C에서 예시하였다.
- [0103] 일 구체예에 따르면, 임피던스 센서를 시료와 접촉시키는 바, 이때 시료는 액상 시료일 수 있고, 예를 들면 체액, 구체적으로 혈액, 보다 구체적으로 혈장(human plasma)일 수 있다. 일 예로서, 임피던스 센서는 시료와 접촉 후 인큐베이션 과정을 거칠 수 있다. 이때, CD/rGO 나노-하이브리드 및 항-p-타우 181 항체 간의 복합체가 형성된 후에는 외부 성분 등에 의하여 오염되는 등의 현상을 억제할 목적으로, 선택적으로(optionally) BSA, 브로커 카제인(blocker casein) 등에 의하여 블로킹 처리할 수 있다.
- [0104] 예시적 구체예에 따르면, 임피던스 센서는 항-p-타우 181 항체가 고정된 사이클로텍스트린(CD)/환원 그래핀 산화물(rGO)/전극을 작업 전극으로 하고, 상대 전극(2전극 시스템), 또는 상대 전극 및 기준 전극(3전극 시스템)이 구비될 수 있다. 이때, 전극 각각은 도전성의 컨택부 또는 패드를 통하여 회로와 연결됨으로써 전기적 신호를 전달할 수 있다.
- [0105] 이와 같이, 액상 시료에 임피던스 센서를 접촉시킴에 따라 임피던스 측정 값의 변화가 일어나며, 이와 같이 변화하는 임피던스 값을 측정한다. 상기 도면을 참조하면, 시료(구체적으로, 액상 시료) 내에 p-타우 181 단백질이 함유될 경우, 항체와 항원 간 특이적 상호작용을 통하여 항원인 p-타우 181이 사이클로텍스트린의 내측 캐

비티에 침투된 항체(항-p-타우 181 항체)와 특이적으로 바인딩되며, 이에 따른 임피던스를 측정한다.

[0106] 본 구체예에 있어서, 측정된 임피던스 값을 하기 수학적 식 1에 따라 피팅시킴으로써 액상 시료 내 p-타우 181 단백질의 농도에 대한 전하전달저항 (R_{ct})의 변화를 지시하는 교정 곡선(calibration curve)을 얻을 수 있다.

[0107] [수학적 식 1]

$$R_{ct} = (Z - R_s) / \{1 - j \omega C_{dl}(Z - R_s)\} - Z_w$$

[0109] 상기 식에서, R_{ct} 는 전하전달저항, Z 는 측정된 임피던스, R_s 는 용액저항, j 는 허수단위, ω 는 각 주파수, 그리고 Z_w 는 확산 임피던스이다.

[0110] 이처럼, 측정된 임피던스를 수학적 식 1에 의하여 피팅하여 도출된 전하전달저항 (R_{ct})의 변화의 교정 곡선으로부터 액상 시료 내 p-타우 181 단백질을 정량적 및/또는 정성적 검출을 수행할 수 있으며, 임피던스 측정 값에 비하여 감도 특성이 개선된 센싱 결과를 얻을 수 있다.

[0111] 특히 주목할 점은 시료 내 p-타우 181 단백질의 존재 여부는 물론, 이의 농도를 높은 민감도로 검출할 수 있기 때문에 건강한 인체로부터 유래하는 시료는 물론, 경도 인지 장애(MCI)로부터 알츠하이머 질환(AD)을 효과적으로 식별할 수 있다는 것이다. 구체적으로, ROC 분석을 통해 제시한 컷오프 값 기준에 따라 상술한 방법으로 도출된 시료 내 p-타우 181 농도 값으로부터 질환 단계, 즉 정상인, 경도 인지 장애 및 알츠하이머 질환을 각각 구별할 수 있다. 일 예로서, 시료 내 p-타우 181 단백질의 농도가 $12.505 \text{ pg mL}^{-1}$ 를 초과하는 경우에는 알츠하이머 질환군(AD) 시료, 12.505 내지 $11.441 \text{ pg mL}^{-1}$ 인 경우에는 경도 인지 장애군(MCI) 시료, 그리고 $11.441 \text{ pg mL}^{-1}$ 미만인 경우에는 정상군 시료로 구분할 수 있다.

[0112] 예시적 구체예에 따르면, 전술한 나노하이드브리드 센싱 플랫폼을 기반으로 하고, 전하전달저항 (R_{ct}) 변화의 교정 곡선을 이용하여 측정된 시료 내 p-타우 181 단백질의 농도에 따라 알츠하이머 질환군/정상군을 구별할 경우, 감도(sensitivity)는, 예를 들면 적어도 약 95%, 구체적으로 적어도 약 99%, 보다 구체적으로 적어도 약 99.5%일 수 있고, 특이도(specificity)는, 예를 들면 적어도 약 75%, 구체적으로 적어도 약 78%, 보다 구체적으로 적어도 약 80%일 수 있다. 한편, 경도 인지 장애(MCI)군/정상군을 구별할 경우, 감도(sensitivity)는, 예를 들면 적어도 약 95%, 구체적으로 적어도 약 99%, 보다 구체적으로 적어도 약 99.5%일 수 있고, 특이도(specificity)는, 예를 들면 적어도 약 60%, 구체적으로 적어도 약 65%, 보다 구체적으로 적어도 약 70%일 수 있다. 더 나아가, 교정 곡선에서 높은 선형성을 얻을 수 있는 바, 예를 들면 R^2 가, 예를 들면 적어도 약 0.95, 구체적으로 적어도 약 0.97, 보다 구체적으로 적어도 약 0.98일 수 있다.

[0113] 상술한 바와 같이, 본 구체예에 따른 검출 플랫폼을 이용한 임피던스 값의 측정, 그리고 수학적 식 1에 의하여 임피던스 값을 피팅함으로써 도출된 전하전달저항 (R_{ct}) 변화의 교정 곡선을 통하여 액상 시료 내 p-타우 181 단백질을 타겟 분자 또는 바이오마커로 하여 검출할 경우, 알츠하이머 질환을 조기 진단할 수 있다. 특히, 높은 감도로 신뢰성 있는 시료 내 p-타우 181 단백질 농도를 구할 수 있고, 이는 기존 기술에서 구별이 용이하지 않은 경도 인지 장애(MCI)와 알츠하이머 질환(AD) 간의 구별을 보다 명확히 할 수 있는 점은 주목할 만하다.

[0114] 예시적 구체예에 따른 검출 센서의 액상 시료, 구체적으로 혈액, 보다 구체적으로 혈장(plasma)에서의 검출 한계(LOD)는, 예를 들면 약 5 fg/mL 이하, 구체적으로 약 2.5 fg/mL 이하, 보다 구체적으로 약 1 fg/mL 이하, 특히 구체적으로 약 0.95 fg/mL 이하의 낮은 수준일 수 있는 바, 이는 기존의 다른 센서 및 뇌척수액 추출 방식에서의 바이오마커 측정 시 보고된 결과에 비하여 현저히 낮은 수준이다. 이처럼, 전술한 바와 같이, 높은 선형성의 교정 곡선 및 낮은 검출 한계를 동시에 구현할 수 있다.

[0115] 이외에도, 본 구체예에 따른 검출 센서의 혈액, 구체적으로 혈장에서의 LRD(linear range of detection)는, 예를 들면 약 10^0 내지 10^6 fg/mL , 구체적으로 약 2 내지 10^5 fg/mL , 보다 구체적으로 약 3 내지 10^4 fg/mL 의 범위일 수 있다.

[0116] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해 바람직한 실시예를 제시하지만, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0117] 실시예

- [0118] 본 실시예에서 사용된 물질 및 장치는 하기와 같다.
- [0119] 물질
- [0120] - β -사이클로렉스트린, 페로시아나이드($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$), 페리시아나이드($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$), 및 염화칼륨은 각각 Sigma-Aldrich사(South Korea)로부터 구입하였다.
- [0121] - 그래핀 산화물(GO)은 Graphene-Supermarket (USA)로부터 구입하였다.
- [0122] - BSA(bovine serum albumin; 0.5% in $1 \times$ PBS, pH 7.4)는 Tech and Innovation (대한민국)으로부터 구입하였다.
- [0123] - PBS($1 \times$, pH 7.4 ± 0.1)는 WELGENE Inc.(대한민국)으로부터 구입하였다.
- [0124] - 항-타우 (phospho T181)-BSA에 대한 재조합 항-래빗 단일클론 [EPADXR4] 및 아자이드-미함유 항-타우 (phospho T181) 항체 [EPADXR4] 블로킹 펩타이드, 인간 아밀로이드 베타 1-40 (A β 1-40) ELISA 키트 내 인간 아밀로이드-베타 스탠다드, 및 인간 아밀로이드 베타 1-42 (A β 1-42) ELISA 키트 내 동결건조된 스탠다드는 Abcam (Cambridge, UK)으로부터 구입하였다.
- [0125] - 모든 용액은 정수 시스템을 이용하여 제조되었다($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$).
- [0126] - 모든 물질은 분석 그레이트이었다.
- [0127] - 모든 실험은 $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 수행하였다.
- [0128] 장치
- [0129] - 주사전자현미경(SEM) 사진은 FE-SEM(field-emission scanning electron microscope) S-4700(Hitachi High-Tech Corporation (Japan))을 이용하여 수행하였다.
- [0130] - X-ray diffractometer (XRD)는 Rigaku, SmartLab (Japan; 40 kV, Cu K α (1.54 $\text{\AA}$)), 그리고 Raman 스펙트로스코프는 niD2G, UniNano Tech Co. (대한민국)을 이용하여 수행하였다.
- [0131] - 전기화학적 임피던스 스펙트로스코피(EIS) 및 CV(cyclic voltammetry)는 SP-200 정전위기(Bio-Logic Science Instruments, Seyssinet-Pariset, France)를 이용하여 수행하였다.
- [0132] 실시예 1
- [0133] rGO/ β -CD 나노-하이브리드 플랫폼이 구비된 8-채널-디스크 마이크로전극 어레이의 제작
- [0134] 표준 미세제조 테크놀로지를 이용하여 제작된 8개의 ITO 환형 작업 전극으로 이루어지는 8-MEA 상에 바이오센서를 구현하여, 슬라이드 글라스($75 \text{ mm} \times 25 \text{ mm} \times 1.1 \text{ mm}$) 상에 작업 전극 당 균일한 디스크(직경: 0.5 mm) 및 하나의 공유 상대 전극을 형성하였다. 전기화학적 부착 및 측정 과정 동안 용액을 보유하기 위하여, 실리콘 케이스를 이용하여 8개의 제작된 ITO 작업 전극 영역 상으로 폴리스티렌 재질의 챔버 시스템을 부착시켰다.
- [0135] 후속적으로, 70% 에탄올 용액 및 탈이온수로 8-MEA를 세척하고, 질소 가스를 이용하여 건조시켰다. GO 용액(1 mg/mL , DI water)을 사용하고, 8-MEA, Pt 코일 및 Ag/AgCl을 각각 작업 전극, 보조 전극 및 기준 전극으로 하는 3-전극 시스템을 이용한 시간대 전류법을 통하여 rGO를 전기화학적으로 부착하였다. 이때, 초기 전압은 1.4 V , 그리고 부착 시간은 50초 씩 변화시켰다(온도: $25 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$).
- [0136] β -CD를 부착하기 위하여, rGO가 부착된 전극을, 10 mM β -CD를 함유하는 PBS에 침적시켰다. 3전극 구조에서 CV를 이용하여 전위가 -1 내지 1 V 에서 사이클링되었고, 주사 속도 50 mV/s 에서 0 V 로 복귀하였다. 그 다음, 8-MEA를 탈이온수 및 PBS로 세척하였고, 질소 가스 내에서 건조시켰다.
- [0137] 8-MEA 플랫폼 상에 rGO/ β -CD 나노-하이브리드(나노복합체)로 기능화한 다음, 항-p-타우 181 항체(0.1 mg/mL)을 PBS 내 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 90분 동안 8-MEA 표면 상에서 인큐베이션시켰다(도 1 참조). 최종적으로, 바이오센서를 탈이온수 및 PBS 내에서 세척하고, 실험에 적용할 수 있도록 질소 가스를 흘려주었다.
- [0138] - 전기화학적 임피던스 스펙트로스코피 분석
- [0139] 바이오센서 어셈블리의 개별 단계에서, 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($1 : 1$ 비율) 0.1 M KCl (pH 7.4) 용액을 전해질 용액으로 사용하여 EIS 측정을 통하여 전극 바인딩 표면을 특성화하였다. 측정을 위하여, 8-MEA의 2 전

극 구성에서 1 Hz 내지 100 kHz 범위의 주파수 및 50 mV의 사인 전압으로 EIS를 적용하였다. 완전히 제작된 바이오센서에 대하여, 10^0 - 10^6 fg mL/mL 범위 내 상이한 농도의 20 μ L p-타우 181로 일련의 인큐베이션을 수행하였다(시간: 30 분, 온도: 25 ± 0.1 °C). 각각의 반응 이후, 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 내에서 EIS를 측정하기 전에 바이오센서 전극을 탈이온수로 1회 세척하고, PBS 300 μ L로 2회 세척하였다. 나이퀴스트 플롯으로 표현된 EIS 결과는 랜들 등가회로 모델(Randle's equivalent circuit model)에서 4개의 파라미터(R_s (용액 저항), R_{ct} (반원 직경은 전하-전달 저항에 상응함), C_{dl} (전극/전해질 계면에서의 이중층 커패시턴스), 및 W (Warburg 확산 임피던스)를 포함함)로 이루어졌으며, 이는 Bio-Logic Science Instruments (Seyssinet-Pariset, France)의 EC-Lab 소프트웨어를 이용하여 EIS 데이터를 피팅하는데 적용되었다.

[0140]

[0141]

- 순환전압전류법 (Cyclic Voltammetry, CV)

[0142]

8-MEA, Pt 코일 및 포화 Ag/AgCl을 각각 작업 전극, 보조 전극 및 기준 전극으로 하는 3-전극 시스템을 이용하여 바이오센서에 대하여 CV를 수행하였다. CV는 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1 : 1 비율) 0.1 M KCl (pH 7.4) 용액 내에서 측정하였다. 50 mV/s의 주사속도에서 4개의 사이클이 수행되었는 바, 이때 전위는 -0.5 내지 1 V 사이에서 사이클링되었다.

[0143]

- 인체 임상 혈장 시료

[0144]

인체 임상 혈장 시료는 인하대학교 병원(대한민국, 인천)에서 수집하였다. 인지 장애로 인하여 인하대학교 병원 외래병동을 방문한 고령자로부터 참여자를 모집하였다. 모든 참여자는 55 내지 90세의 연령 범위이었다.

[0145]

모든 참여자들은 신체 및 신경 검사, 그리고 면밀한 진단 절차(MMSE, CDR-SB(CDR-Sum of Boxes) 및 CDR)를 거쳤다. 알츠하이머 질환 중 3개의 임상 단계를 진단하기 위하여, 인체 혈장 시료는 1 : 2로 희석하였고, 20 μ L의 희석된 혈장 시료를 분석에 사용하였다.

[0146]

- 통계 분석

[0147]

모든 데이터는 Origin statistics를 이용하여 분석하였다(3회 반복실험을 거친 평균 $\pm$ 표준편차를 제공함). 일원배치분산 분석(one-way ANOVA)으로 테스트한 후, Tukey 사후검정(Post-Hoc test)을 이용하여 복수의 비교값을 평가하였다. $p > 0.05$, $*(p \leq 0.05)$, $**(p \leq 0.01)$, 및 $***(p \leq 0.0001)$ 를 유의성이 있는 것으로 간주하였다. ROC(Receiver operating characteristic) 분석은 인체 혈장 p-타우 181의 검출을 위하여 제작된 바이오센서의 특이성 및 민감도를 결정하도록 곡선 아래 면적(AUC)를 제공하였으며, 이에 따라 임상 질환 단계 사이를 구별하도록 하였다.

[0148]

결과 및 토의

[0149]

가. 특성화

[0150]

- SEM 분석

[0151]

GO, rGO, β -CD, 및 rGO/ β -CD 각각의 SEM 분석 결과를 도 2에 나타내었다.

[0152]

도 2A 및 도 2B를 참조하면, rGO의 형태학적 특징은 GO의 전기화학적 환원 처리 후, GO 내 산소 기능기의 제거로 인하여 주름진 시트의 박리 층 구조를 나타내었다. 또한, 도 2C 및 도 2D에 따르면, rGO/ β -CD 나노-하이브리드(나노복합체)는 rGO 층 상에 다량의 β -CD가 전기증착되어 있는, 응집된 플레이크 형태의 구조를 갖고 있다.

[0153]

- 라만 스펙트럼 분석

[0154]

8-MEA 상에 형성된 GO, rGO, 및 rGO/ β -CD에 대하여 수득된 라만 스펙트럼을 도 3에 나타내었다. 상기 도면에 따르면, 1335 cm^{-1} 및 1575 cm^{-1} 에서 뚜렷한 D 및 G 피크가 각각 관찰되었다. 산출된 I_D/I_G 비로부터 rGO가 성공적으로 형성됨을 알 수 있다.

[0155]

- XRD 분석

[0156]

8-MEA 상에 형성된, (A) GO 및 rGO, 그리고 (B) β -CD 및 rGO/ β -CD의 XRD 스펙트럼을 도 4에 나타내었다.

[0157] 상기 도면을 참조하면, GO 시트의 (001) 탄소 특성 피크는 10° 근처에서 나타났는 바, 이는 8 Å의 d-스페이싱에 대응한다. rGO 및 rGO/ β -CD에서는 GO의 특성 피크가 사라지고 새롭게 넓은 피크가 25° 근처의 (002)에서 관찰되었는 바, 이는 그래핀 내 약 4 Å의 층간 거리에 대응한다. 이러한 결과는 전기화학적 환원 프로세스 중 GO로부터 산소 기능이 제거되는 것에 상당한다. rGO/ β -CD의 XRD 결과, rGO의 특성 피크 및 β -CD의 다결정성 구조의 복수의 피크가 관찰되었는 바, 이는 rGO 및 rGO/ β -CD의 성공적인 전기화학적 부착을 지시한다.

[0158] - EIS 및 CV를 이용한 바이오센서 구조의 특성화

[0159] 도 1A에 나타낸 바와 같이, 8-MEA의 8개의 ITO 작업 전극 상에 바이오센서를 형성하였다. rGO/ β -CD 나노-하이브리드(나노복합체)를 ITO 전극 상에 부착한 다음, 세척 후 $1\times$ PBS 내에서 90분 동안 항-p-타우 181 항체로 인큐베이션하였다. 바이오센서의 구조를 확인하기 위하여, CV 및 EIS 측정은 전극 개질 과정 중 개별 단계에서 수행하였다.

[0160] EIS 측정은 바이오센서 어셈블리 과정의 개별 단계마다 수행하였고(베어(bare) ITO, rGO/ β -CD, 및 항-p-타우 181 항체), 도 5A에 나타낸 바와 같이 나이퀴스트 플롯(Nyquist plot)에 의하여 표시하였다(도 5A의 삽입 도면). 나이퀴스트 플롯의 반원 형상의 직경은 랜들 등가회로 모델 내 R_{ct} 에 대응하고, 전극 표면에서의 변화를 평가하기 위한 파라미터로 사용하였다. 랜들 등가회로 모델을 이용하여 EIS-나이퀴스트 플롯을 피팅하였고(도 5A), 베어 ITO 전극의 측정된 R_{ct} 값은 110 k Ω 이었다. ITO 상에 rGO/ β -CD 나노-하이브리드(나노복합체)를 전기화학적으로 부착한 후, R_{ct} 값은 54 k Ω 로 감소하였다. 또한, 도 5B에 따르면, 전류 세기 역시 증가하였다. R_{ct} 값의 감소 및 CV 전류의 증가는 나노-하이브리드의 높은 전기화학적 전도도때문이며, ITO 전극 상에 rGO/ β -CD가 성공적으로 부착됨을 지시한다.

[0161] 항-p-타우 181 항체의 부착 시, R_{ct} 값은 87 k Ω 으로 증가하였고, CV 전류 세기는 감소하였다(도 5B 참조). 이러한 현상은 rGO/ β -CD 나노-하이브리드(나노복합체)에 있어서 β -CD의 내측 캐비티 내 항-타우 181 항체와 같은 특정 물질이 고정되어 전극-용액 계면에서 전자 전달을 방해하여 표면 저항을 증가시켰기 때문이다. EIS 및 CV 결과는 바이오센서가 성공적으로 제작되었음을 지시한다.

[0162] 나. p-타우 181의 검출(교전 곡선 및 해리 상수)

[0163] 바이오센서를 연속적인 p-타우 181 농도(10^0 내지 10^6 fg/mL)로 각각 30분 동안 인큐베이션시킨 다음, 탈이온수 및 PBS로 세척하였다. 바이오센서를 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1 비율)이 함유된 0.1 M KCl(pH 7.4)에 침적시킨 상태에서 100 kHz 내지 1 Hz의 주파수 범위에 걸쳐 EIS를 기록하였다. 시료 바이오센서로부터 측정된 EIS 데이터는 도 6A에서 나이퀴스트 플롯으로 제공된다. 도 6A에서 나타낸 나이퀴스트 플롯을 랜들 등가회로 모델로 피팅한 후의 등가회로 요소 값을 하기 표 1에 나타내었다(값은 표준 에러(N=3)와 함께 얻어짐).

표 1

[0164]

전극		R_s (Ω)	C_{dl} (nF)	R_{ct} (k Ω)
p-타우 181 농도(fg/mL)	바이오센서	728.6 ± 5	18.84 ± 0.16	87.73 ± 2
	10^0	712.35 ± 5.05	18.86 ± 0.04	74.63 ± 2.3
	10^1	706.25 ± 1.75	18.87 ± 0.03	72.73 ± 2.22
	10^2	731 ± 1	18.77 ± 0.04	71.92 ± 2.20
	10^3	690.35 ± 0.95	18.89 ± 0.01	69.58 ± 2.08
	10^4	698.5 ± 0.5	18.97 ± 0.02	68.51 ± 2.06
	10^5	695.6 ± 1	18.97 ± 0.03	66.65 ± 2.01
	10^6	690 ± 0.5	18.87 ± 0.03	64.12 ± 1.9

[0165]

[0166] 도 6A에서 반원 나이퀴스트 곡선의 높이 및 직경이 감소한 점을 고려하면, 첨가되는 p-타우 181의 농도(10^0 내지 10^6 fg/mL)가 증가함에 따라 R_{ct} 값은 감소하였고, 이는 첨가되는 p-타우 181의 농도(10^0 내지 10^6 fg/mL)가

증가함에 따라 R_{ct} 값이 선형적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

- [0167] 전체 실험에 있어서, 바이오센서 표면 상의 p-타우 181 및 항-p-타우 181 항체의 특이적 바인딩을 통하여 p-타우 181 검출을 평가하기 위한 파라미터로 산출된 R_{ct} 값을 사용하였다.
- [0168] 도 6B에 나타낸 바와 같이, R_{ct} 의 변화(ΔR)는 상이한 농도에서 p-타우 181 검출을 평가하기 위하여 R_{ct} 로부터 유도된 값이며($|(R_{ct}-R_{ct0})/R_{ct0}|$), 여기서 R_{ct0} 은 항-p-타우 181 항체가 부착된 바이오센서의 R_{ct} 데이터를 나타내고, 그리고 R_{ct} 는 p-타우 181이 인큐베이션된 바이오센서의 R_{ct} 데이터를 나타낸다.
- [0169] 3개의 독립적인 실험으로부터, ΔR 과 p-타우 181 농도(10^0 내지 10^6 fg/mL) 사이의 교정 곡선으로서 선형 관계가 얻어졌고, 이때 선형 회귀식 $y = 0.014x + 0.168$, $R^2 = 0.98$ 이었다. 또한, p-타우 181 검출을 위한 LOD는 0.92 fg/mL이었고, IUPAC에 따라 산출하였다. 10^0 내지 10^6 fg/mL의 선형 범위 검출(Linear range detection; LRD)이 달성되었다.
- [0170] 한편, 본 실시예에서는 하기 수학적 식 2에 따른 $[p\text{-tau181}]$ vs. $[p\text{-tau181}]/\Delta R$ 데이터의 최소제곱(least-squares) 피팅을 이용하여 항-p-타우 181 항체와 p-타우 181 간의 해리 상수(K_D)를 산출하였다. 이때, 항체와 이의 항원 간의 바인딩 친화도는 K_D 값에 반비례하며, 이는 K_D 값이 감소함에 따라 바인딩 친화도가 증가함을 의미한다.
- [0171] [수학적 식 2]
- [0172] $[p\text{-tau 181}]/\Delta R = [p\text{-tau 181}]/\Delta R_{\max} + K_D/\Delta R_{\max}$
- [0173] 상기 식에서, $[p\text{-tau 181}]$ 는 용액 내 p-타우 181의 농도(fg/mL)이고, ΔR 은 바이오센서를 이용한 p-타우 181의 검출 시 R_{ct} 의 변화이고, $\Delta R_{\max}$ 는 p-타우 181에 대한 바이오센서 응답의 최대 ΔR 값이며, 그리고 K_D 는 p-타우 181와 항-p-타우 181 항체 간의 해리 상수이다.
- [0174] 전술한 수학적 식 2에 따른 Langmuir 등은 식을 이용하여, $[p\text{-tau181}]$ vs. $[p\text{-tau181}]/\Delta R$ 간의 선형 회귀식을 도출하였고($[p\text{-tau 181}]$ 는 10^0 내지 10^6 fg/mL의 농도 범위 내임), $y = 0.968x + 0.774$, $R^2 = 0.99$ 로 기재된다. 따라서, K_D 는 절편을 기울기로 나누어 구하였는 바, 0.8 fg/mL이었으며, 이는 0.533 pM에 상당한다. 높은 친화도의 항체는 전형적으로 피코몰 범위의 K_D 값을 갖는 것으로 고려된다. 항-p-타우 181 항체와 p-타우 181 간의 K_D 값이 0.533 pM이라는 점은 p-타우 181 바이오마커를 검출하기 위한 바이오센서로 적합함을 뒷받침한다.
- [0175] 다. 바이오센서의 선택도 및 간섭 테스트
- [0176] 인체 혈장 임상 분석에 앞서, p-타우 181의 검출에 대한 바이오센서의 선택도 및 간섭을 알츠하이머 질환의 바이오마커들(p-타우 181 바이오센서의 검출 결과에 영향을 미치는 바이오마커로서 A β 1-40 100 ng/mL 및 A β 1-42 1 ng/mL)과 함께 인큐베이션함으로써 측정하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0177] - 도 7A에서 나타낸 그래프는 각각의 비특이적 및 특이적 분자로 인하여 발생하는 복수의 바이오센서 저항 변화를 보여준다. 이때, 복수의 바이오센서(N=3)를 p-타우 181, A β 1-40 및 A β 1-42의 존재 하에서 인큐베이션하였고, 각각의 바이오마커 농도에 대한 바이오센서의 R_{ct} 변화를 기록하였다. A β 1-40 및 A β 1-42 인큐베이션로부터 도출된 바이오센서 결과는 항-p-타우 181 항체와의 비특이적 상호작용으로 인하여 현저히 낮은 값이었는 바, 이는 센서가 타겟 분자에 대하여 특이성을 나타내도록 한다. 상술한 결과는 제작된 바이오센서의 선택도가 양호하였고, 정확한 p-타우 181 검출이 가능함을 의미한다(즉, 바이오센서가 비특이적 분자에 응답하지 않으면서 p-타우 181에 응답함을 지시함).
- [0178] - 간섭 분자로서 전술한 바이오마커를 타겟(p-타우 181)의 존재 하에 바이오센서 상에 도입함으로써 간섭 테스트를 수행하였으며, 그 결과를 도 7B에 나타내었다. 상기 도면은 p-타우 181 단독, 그리고 이와 A β 1-40 및 A β 1-42 각각을 함유하는 혼합물이 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1 비율)이 함유된 0.1 M KCl의 PBS 용액(pH 7.4)에서 바이오센서의 응답에 미치는 영향을 나타낸다(N=3, *p $\leq$ 0.05, ns = p > 0.05).
- [0179] 상기 도면을 참조하면, p-타우 181의 존재 하에서 R_{ct} 데이터의 변화 차이는 거의 일어나지 않았다. 이러한 관

찰 결과는 바이오센서 플랫폼이 다른 비-타겟 분자에 의한 현저한 간섭 없이 타겟 분자를 선택적으로 인식할 수 있음을 시사한다.

[0180] 라. 알츠하이머 질환(AD), MCI 및 건강한 대조군 간의 구별을 위하여 제작된 바이오센서를 이용하여 인체 혈장 임상 시료 내 p-타우 181의 농도 결정

[0181] 60명의 성인(건강한 대조군 20명(남성: 5명, 여성: 15명), 20명의 MCI 환자(남성: 7명, 여성: 13명), 그리고 20명의 알츠하이머 환자(남성: 9명, 여성: 11명))을 대상으로 하였다. 인하대학교 병원에 의하여 제공된 인구통계적 특성은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0182]

구 분	건강한 대조군 (N= 20)	MCI 환자 (N= 20)	알츠하이머 환자 (N= 20)
성별, 남/여	5/15	7/13	9/11
Ages mean $\pm$ SD (range)	72.5 $\pm$ 5.27 ^a (64-81)	74.6 $\pm$ 7.70 ^a (59-85)	74.85 $\pm$ 8.27 ^a (55-86)
신경심리학 MMSE	26.65 $\pm$ 2.91 ^a	23.45 $\pm$ 2.99 ^b	17.15 $\pm$ 5.28 ^c
질환 중증도 CDR-SB	0.08 $\pm$ 0.18 ^b	1.53 $\pm$ 1.11 ^b	6.5 $\pm$ 3.93 ^a
CDR	0.03 $\pm$ 0.11 ^c	0.5 ^b	1.13 $\pm$ 0.63 ^a

[0183] ^{a-c} 동일 열 내 상이한 문자는 유의차를 지시함($p \leq 0.05$, Tukey's test)

[0184] 상기 표에 따르면, MMSE(Mini-Mental State Examination)의 수행 시, 대조군(26.65 $\pm$ 2.91)은, 알츠하이머 질환군(17.15 $\pm$ 5.28)을 능가하는 MCI 환자 (23.45 $\pm$ 2.99)보다 현저히 높은 점수를 얻었다. 알츠하이머 질환군은 가장 높은 평균 CDR-SB(Clinical dementia rating sum of boxes) 및 CDR(Clinical dementia rating) 점수를 나타내었고, 이후 MCI 및 대조군의 순이었다.

[0185] 60개의 인체 혈장 임상 시료 내 p-타우 181의 검출을 위한 바이오센서의 임상능은 EIS 측정에 의하여 테스트하였으며, 임상 시료 내 p-타우 181의 농도는 교정 곡선을 통하여 수집 및 분석하였다. 인체 혈장 p-타우 181 농도는 다른 그룹과 대비하면, 알츠하이머 질환군에서 차이를 나타내었다(하기 도 8 및 도 9).

[0186] 흥미로운 점은 알츠하이머 질환군은 대조군 (24.02 $\pm$ 7.91 vs. 9.30 $\pm$ 3.49 pg/mL, $p \leq 0.0001$) 및 MCI 군 (24.02 $\pm$ 7.91 vs. 12.8 $\pm$ 4.08 pg/mL, $p \leq 0.0001$)과 대비하면, 현저히 높은 혈장 p-타우 181을 갖는 것으로 확인되었다. 이는 인체 혈장 p-타우 181이 이상적으로 알츠하이머 질환을 지시한다는 가정을 뒷받침한다.

[0187] ROC 분석은 센싱 플랫폼의 진단 감도, 특이도 및 정확도를 평가하기 위한 표준 통계법이다. 알츠하이머 질환 (AD) vs. 대조군 간의 비교 시, 혈장 p-타우 181의 컷오프는 12.505 pg/mL, 그리고 AUC는 0.94 [95% CI 0.90-0.99, 감도 95%, 및 특이도 85%]이었다. 대조군 vs. MCI 환자 간의 대비 결과, AUC는 0.75 [95% CI 0.60-0.90], 컷오프는 11.441 pg/mL, 감도는 80%, 그리고 특이도는 65%이었다. 임상 단계에서 p-타우 181의 측정된 레벨을 갖는 개인의 데이터는 알츠하이머 질환에 대한 혈장 내 p-타우 181의 농도에 관한 연구 결과와 부합하였다. 이처럼, 실시예에 따른 바이오센서는 p-타우 181 바이오마커에 대한 높은 특이적 인식능을 갖는 바, 초기 알츠하이머 질환에 대한 전기적 센싱 플랫폼으로 유용함을 알 수 있다.

[0188] 마. 전하전달저항(R_{ct}) 변화를 이용한 검출 플랫폼의 검출 성능 평가

[0189] 도 10에서 (a) 10 Hz의 주파수에서 측정된 시료의 임피던스 값과 시료 내 p-타우 181 단백질 농도 간의 교정 곡선, 그리고 (b) 측정된 임피던스를 수학적 1로 피팅하여 도출된 전하전달저항 값(R_{ct})의 변화와 시료 내 p-타우 181 단백질 농도 간의 교정 곡선을 나타내었다.

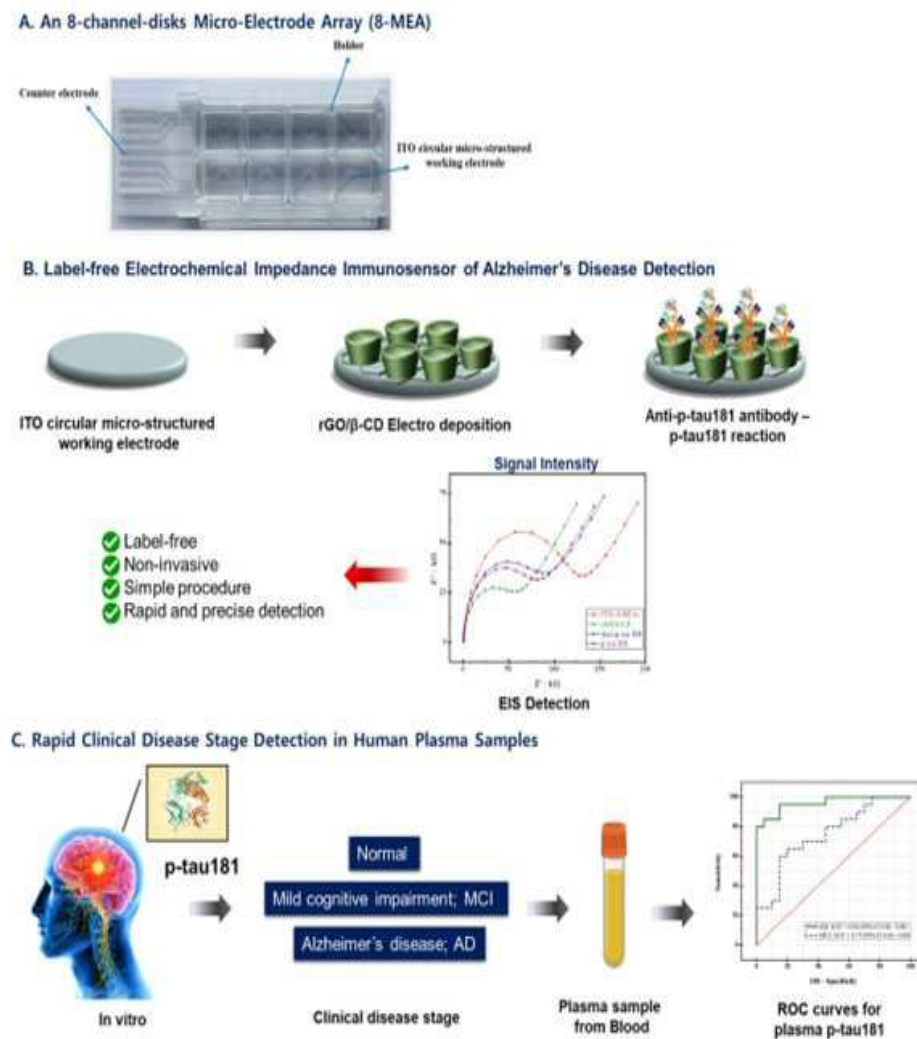
[0190] 상기 도면을 참조하면, 10 Hz에서 측정된 임피던스 값의 변화를 기초로 하여 시료 내 p-타우 181의 농도와 관계를 분석한 결과, LOD가 1.10 fg/mL, 그리고 선형성은 0.98 (R^2)이었다. 한편, 측정된 임피던스를 수학적 1로 피팅하여 도출된 전하전달저항 값(R_{ct})의 변화와 시료 내 p-타우 181 단백질 농도 간의 관계를 분석한 결과, LOD

가 0.92 fg/mL, 그리고 선형성은 0.98 (R^2)이었다.

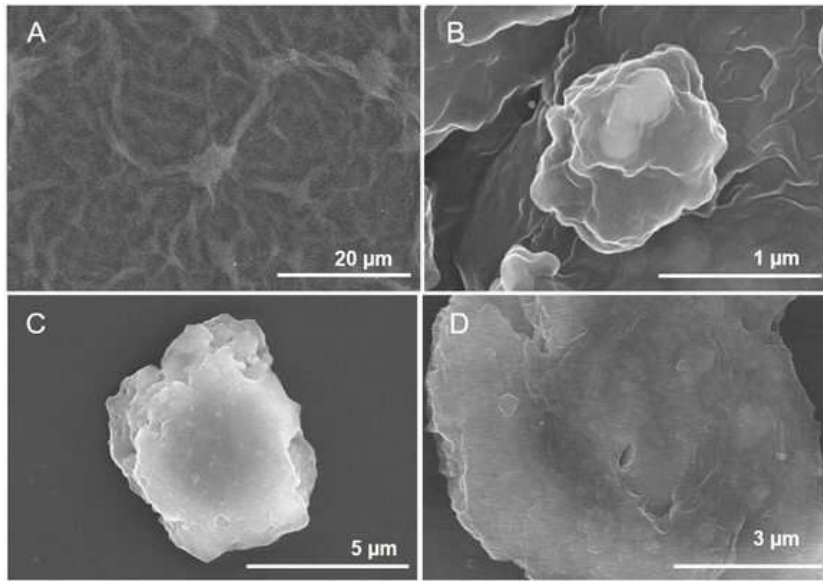
- [0191] 상술한 결과는 동일한 검출 플랫폼(나노-하이브리드)를 기반으로 하는 경우에도, Raw 임피던스 값의 변화를 측정하는 경우에 비하여 수학적 1로 피팅된 전하전달저항 값(R_{ct})의 변화를 측정함으로써 시료 내 p-타우 181 단백질 농도에 대하여 보다 낮은 LOD 및 보다 높은 선형성을 동시에 구현할 수 있음을 지시한다.
- [0192] 실시예에서 사용된 검출 플랫폼을 이용하고, 10 Hz의 주파수에서 측정된 임피던스 값의 변화, 그리고 전하전달저항 값(R_{ct})의 변화를 각각 이용하여 알츠하이머 질환군(AD) 시료에 대한 민감도(sensitivity), 특이도(specificity) 및 ROC 곡선 아래의 면적(area under the ROC curve; AUC)을 측정하였으며, 그 결과를 도 11 및 도 12에 나타내었다.
- [0193] 상기 도면을 참조하면, 전하전달저항 값(R_{ct})의 변화를 이용할 경우, 임피던스 값의 변화를 이용하는 경우와 대비하면, 감도는 100%(대조군: 95%), 그리고 특이도는 80%(대조군: 75%)로서 유의미한 검출 개선 효과를 달성할 수 있다.
- [0194] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 이용될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면

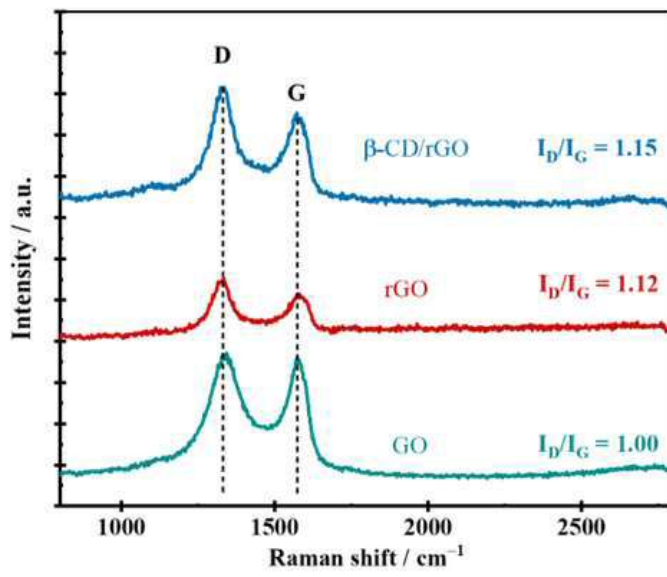
도면1



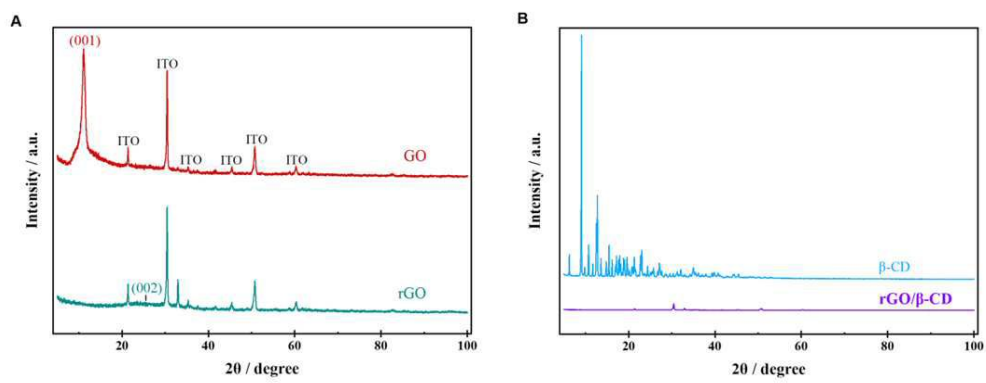
도면2



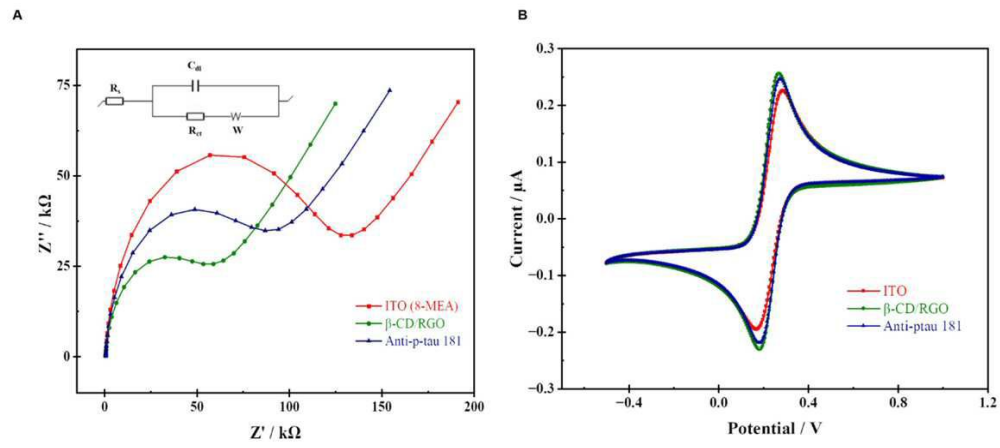
도면3



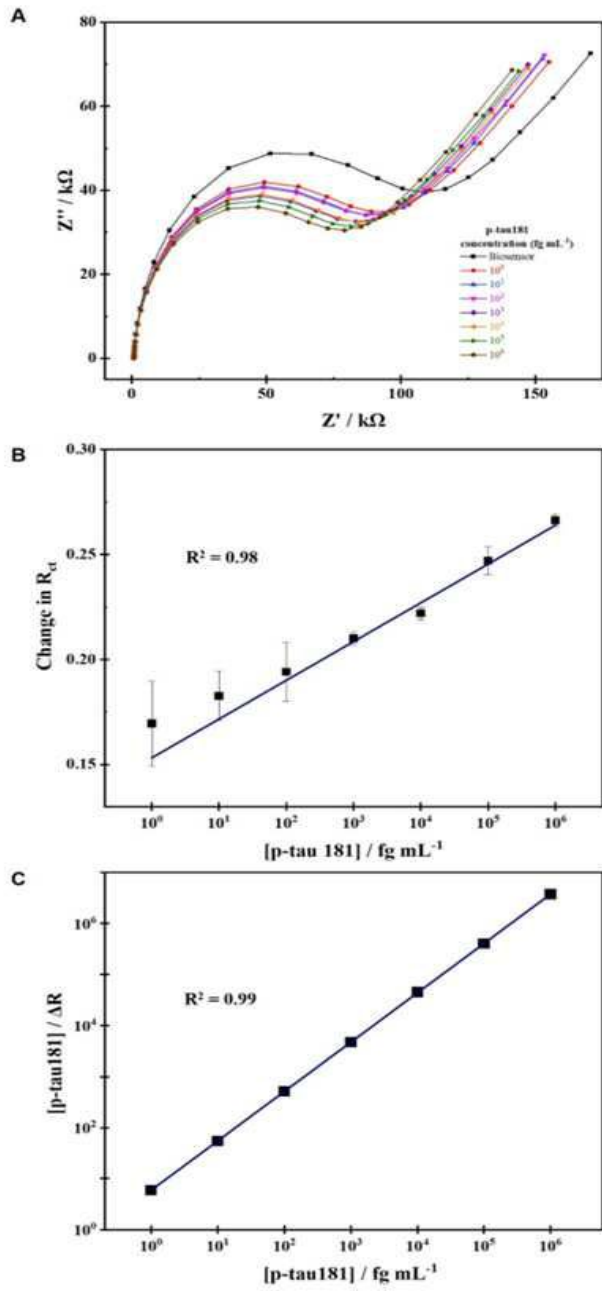
도면4



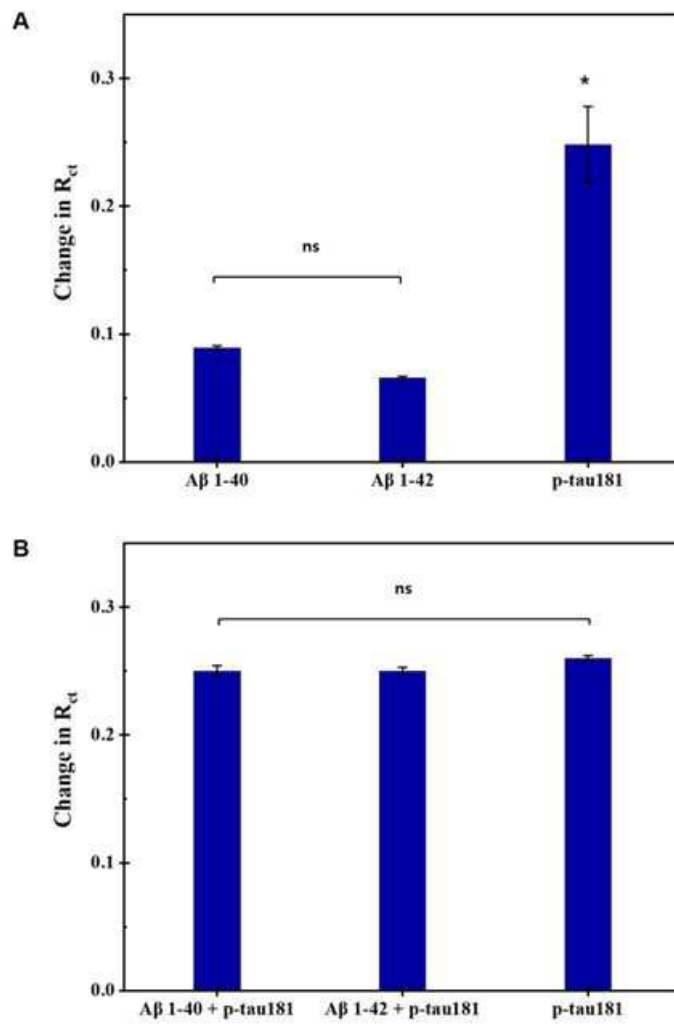
도면5



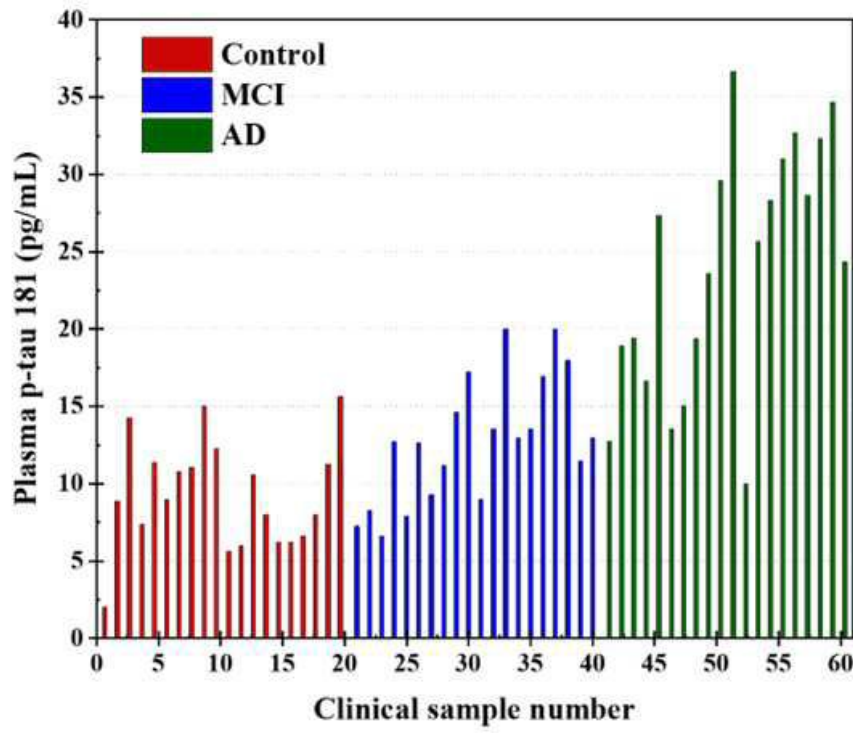
도면6



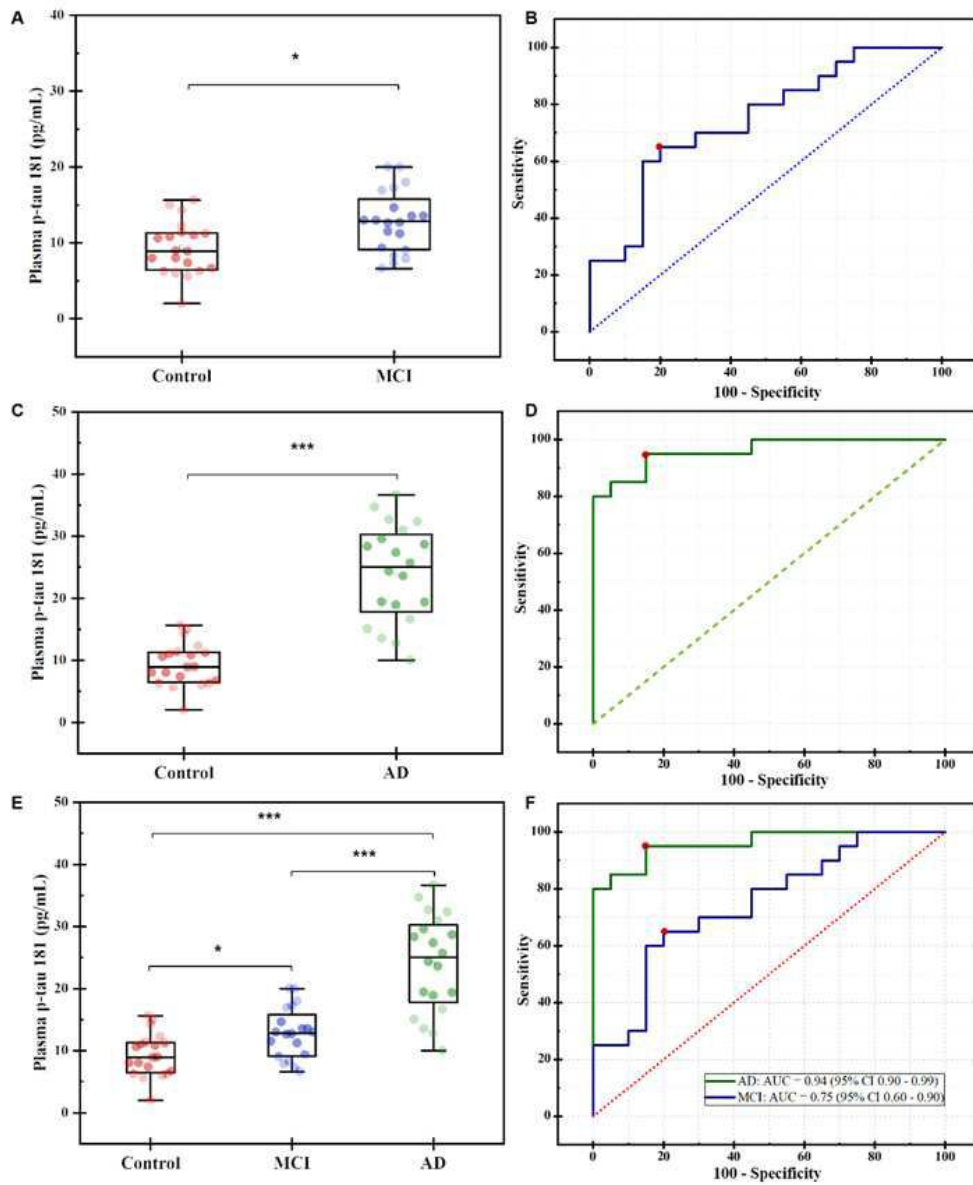
도면7



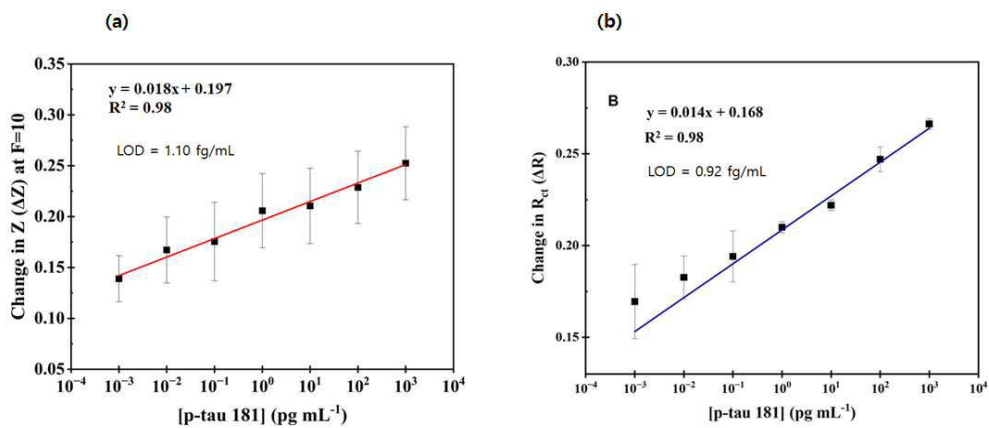
도면8



도면9

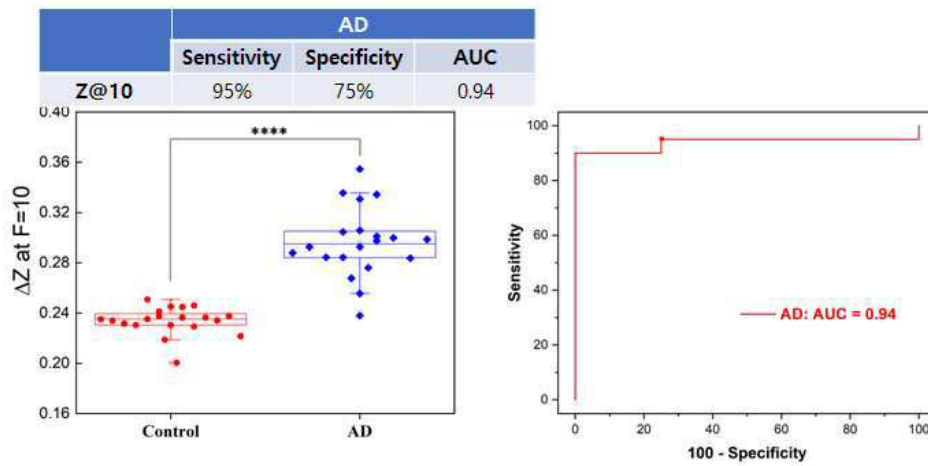


도면10



도면11

Sensitivity and Specificity using Z@10Hz



도면12

Sensitivity and Specificity using Rct

