

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 9월 10일 (10.09.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/180138 A1

(51) 국제특허분류:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 21/65 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/003145

(22) 국제출원일:

2020년 3월 6일 (06.03.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0025702 2019년 3월 6일 (06.03.2019) KR

10-2020-0027910 2020년 3월 5일 (05.03.2020) KR

(71) 출원인: 한양대학교 에리카산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY ERICA CAMPUS) [KR/KR]; 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학교로 55, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 김종호 (KIM, Jong Ho); 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학교로 55 제5공학관 422호, Gyeonggi-do (KR). 양진경 (YANG, Jin-Kyoung); 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학교로 55 제5공학관 422호, Gyeonggi-do (KR). 황인준 (HWANG, In Jun); 15588 경기도 안산시 상록구 한양대학교로 55 제5공학관 422호, Gyeonggi-do (KR). 김혜인 (KIM, Hye In); 16496 경기도 수원시 팔달구 권광로364번길 7-2 현대아파트 19동 302호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인다해 (DAHAI INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM); 06156 서울시 강남구 삼성로 531 고운빌딩 3층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

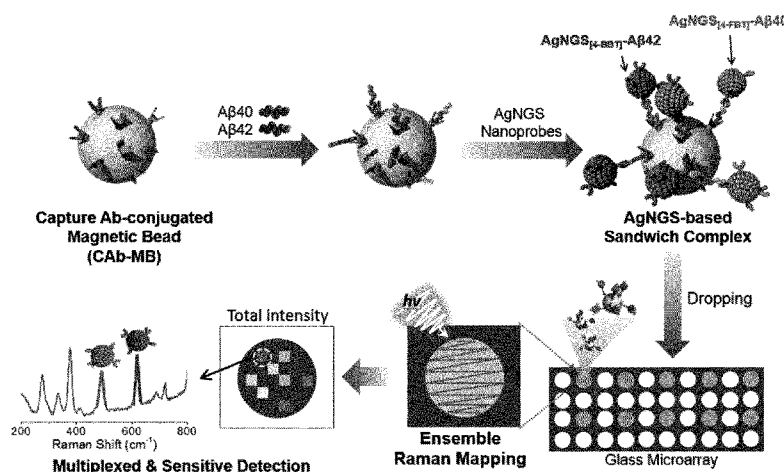
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING ALZHEIMER'S DISEASE USING SILVER NANOGAP SHELL

(54) 발명의 명칭: 은 나노갭 셸을 이용한 알츠하이머병 진단방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for diagnosing Alzheimer's disease by using a silver nanogap shell, the method enabling non-invasive early diagnosis of AD via multiplexed detection of a plurality of AD target biomarkers with high sensitivity.

(57) 요약서: 본 발명은 다수의 AD 표적 바이오마커를 고감도로 다중 검출하여 AD를 비침습적으로 조기 진단할 수 있는 은 나노갭 셸을 이용한 알츠하이머병 진단방법에 관한 것이다.



WO 2020/180138 A1

명세서

발명의 명칭: 은 나노갭 셸을 이용한 알츠하이머병 진단방법 기술분야

- [1] 본 발명은 은 나노갭 셸(Ag Nanogapshell, AgNGS)을 이용한 알츠하이머병 진단방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 은 나노갭 셸 기반 SERS 면역측정법을 이용한 알츠하이머 진단방법에 관한 것으로, 다수의 알츠하이머병 표적 바이오마커를 고감도로 다중 검출하여 알츠하이머를 비침습적으로 조기진단할 수 있는 진단방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 임상에서의 알츠하이머병 (Alzheimer's Disease, AD) 진단은 PET 등의 뇌영상 이미징 기법, 문진, 뇌척수액에 존재하는 A β 40, A β 42 등의 효소결합면역흡착검사 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)에 의존해 왔다. 최근에는 AD 진단의 정확도 및 조기 진단을 위하여 다양한 나노 기술에 기반한 진단법이 개발되고 있다. 특히, SERS 기반의 진단법은 민감도 및 다중검출 측면에서 상당한 주목을 받고 있으나, 종래기술에 의해 개발된 SERS 기반의 진단법은 단일 표적에 대한 검출에 국한되어 있으며 민감도도 상당히 떨어지는 문제점이 있다. 따라서 고민감도로 혈액 내의 다수의 표적 바이오마커를 검출할 수 있는 SERS 기반의 AD 진단법을 개발하기 위한 연구가 계속 진행되고 있다.
- [4] 종래의 방법은 고가의 장비를 필요로 하며, 침습적인 뇌척수액 시료 채취로 인해 환자의 고통을 수반한다. 또한 질병의 진행 정도를 추적할 수 없어 증상이 상당히 진행되고 나서야 진단이 가능하다는 치명적인 문제점을 지닌다. 또한, 복잡한 기작의 AD 발병 및 진행 정도를 추적하기 위해서는 관련된 다수의 바이오마커를 동시에 추적하는 기술이 질병 진단의 정확도 및 조기진단 가능성을 높이기 위해 필수적이나, 종래의 기술은 단일 바이오마커를 추적하는데 그친다는 한계가 있다. 아울러, 조기진단을 위해서는 비침습적 또는 최소 침습적 방법을 통해 혈액 등의 환자 시료로부터 다수의 바이오마커를 검출하는 기술이 요구되고 있으나, 혈액 시료에는 pg/mL 수준의 극소량의 AD 표적 바이오마커가 존재하기 때문에 이를 검출하기 위한 매우 민감한 진단 기술이 필요하지만 ELISA와 같은 종래의 기술은 해당 민감도에 도달하지 못하지 못하는 문제가 있다. 따라서 고민감도로 비침습적 다중 검출 및 AD를 조기에 진단하기 위한 기술이 여전히 요구되고 있다.

[5]

발명의 상세한 설명 기술적 과제

- [6] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 알츠하이머병 진단을 위한 복수 개의 바이오마커를 동시에 검출할 수 있는 은나노캡셀을 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [7] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 진단용 조성물을 이용한 알츠하이머병 진단 방법과 알츠하이머병 및 경도인지장애를 감별하여 진단하는 방법을 제공하는 것이다.
- [8] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[9]

과제 해결 수단

- [10] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 아밀로이드 베타(Amyloid beta: A β) 40에 특이적인 항체 및 A β 42에 특이적인 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 항체가 도입된 은나노캡셀을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 A β 40 또는 A β 42에 특이적인 항체가 도입된 은나노캡셀 및 상기 은나노캡셀이 고정된 기판을 포함하는 알츠하이머병 진단용 바이오센서를 제공한다.
- [12] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 기판은 자성비드를 포함하고, 자성비드를 이용하여 은나노캡셀을 고정하고 있는 것일 수 있다.
- [13] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 알츠하이머병 진단방법과 알츠하이머병 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:
- [14] (1) 은나노캡셀(AgNGS)의 표면에 아밀로이드 베타(Amyloid beta: A β) 40에 특이적인 항체를 접합하여 AgNGS-A β 40 제조하는 단계; (2) AgNGS의 표면에 A β 42에 특이적인 항체를 접합하여 AgNGS-A β 42를 제조하는 단계; (3) 상기 AgNGS-A β 40 및 AgNGS-A β 42와 생물학적 시료를 생체 외에서 혼합하여 은나노캡셀 기반의 샌드위치 복합체(AgNGS-based Sandwich complex) 형성을 유도하는 단계; (4) 상기 시료에서 각 복합체의 라만 신호를 측정하여 A β 40와 A β 42의 비를 계산하는 단계; 및 (5) 상기 A β 40와 A β 42의 비가 2.5 내지 999 인 경우 알츠하이머병인 것으로 판정하는 단계.
- [15] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 생물학적 시료는 혈액 또는 혈청일 수 있으며, 바람직하게는 혈청일 수 있다.
- [16] 또한, 본 발명은 A β 40에 특이적인 항체가 도입된 은나노캡셀(AgNGS-A β 40); 및 A β 42에 특이적인 항체가 도입된 은나노캡셀(AgNGS-A β 42);을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병과 경도인지장애 감별 진단용 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 AgNGS-A β 40과 AgNGS-A β 42가 기판에 고정된 알츠하이머병과 경도인지장애 감별 진단용 바이오센서를 제공한다.

- [18] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 알츠하이머병과 경도인지장애를 감별하여 진단하는 방법 및 감별 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:
- [19] 하기 단계를 포함하는 알츠하이머병과 경도인지장애의 감별 진단을 위한 정보제공방법:
- [20] (1) 은나노겍셀(AgNGS)의 표면에 아밀로이드 베타(Amyloid beta: A β) 40에 특이적인 항체를 접합하여 AgNGS-A β 40 제조하는 단계; (2) AgNGS의 표면에 A β 42에 특이적인 항체를 접합하여 AgNGS-A β 42를 제조하는 단계; (3) 상기 AgNGS-A β 40 및 AgNGS-A β 42와 생물학적 시료를 생체 외에서 혼합하여 은나노겍셀 기반의 샌드위치 복합체(AgNGS-based Sandwich complex) 형성을 유도하는 단계; (4) 상기 시료에서 각 복합체의 라만 신호를 측정하여 A β 40와 A β 42의 비를 계산하는 단계; 및 (5) -999 내지 1.1 인 경우 정상인으로 구분하고, 1.1 내지 2.5 인 경우 경도인지장애로 구분하고, 2.5 내지 999 인 경우 알츠하이머병인 것으로 구분하는 단계.
- [21] 또한, 본 발명은 알츠하이머병과 경도인지장애의 감별 진단을 위한 AgNGS-A β 40 및 AgNGS-A β 42의 용도를 제공한다.

[22]

발명의 효과

- [23] 본 발명에 따른 은 나노겍 셀을 이용한 알츠하이머병 진단방법에 따르면, 표지자 고유의 특이적 표면증강 라만 산란(Surface-enhanced Raman scattering, SERS) 신호를 매우 강하게 나타내는 AgNGS 나노프로브와 자성 비드를 이용하여 2종의 아밀로이드 펩타이드 (A β 40, A β 42)를 면역측정법으로 동시에 검출할 수 있다.
- [24] 특히, AgNGS 기반 SERS 면역측정법은 A β 40, A β 42에 대하여 1 pg/mL 미만의 초고감도 검출을 가능하게 하였으며, 각 표적에 대하여 특이적으로 반응하기 때문에 간섭없이 다수의 표적 바이오마커의 동시 검출이 가능한 이점이 있다.
- [25] 아울러, 본 발명에 따르면 복잡한 환경의 인간 혈청 조건에서도 A β 40, A β 42를 고민감도로 다중 검출함으로써 혈액 기반의 AD 비침습 조기 진단 가능성이 있으며, 이는 AD 이외에도 고감도 및 다중 검출능을 요구하는 다수의 질병의 진단과 추적에 활용 가능한 이점이 있다.

[26]

도면의 간단한 설명

- [27] 도 1은 표적 특이적 항체로 개질된 자성비드 및 AgNGS를 이용한 면역측정법 및 라만 신호 측정 방법에 대한 모식도이다.
- [28] 도 2는 알츠하이머병(AD) 바이오마커 2종 (A β A β)에 대한 검출 결과를 나타내는 도면이다((a) A β 검출에 대한 농도별 마이크로어레이 맵핑 이미지, (b) (a)에 표시된 영역에 대한 AgNGS의 라만 신호를 나타낸 그래프, (c) (a)의 농도별 신호에 대한 그래프, (d) A β 검출에 대한 농도별 마이크로어레이 맵핑 이미지, (e)

(d)에 표시된 영역에 대한 AgNGS의 라만 신호, (f) (d)의 농도별 신호에 대한 그래프).

- [29] 도 3은 AgNGS 기반 SERS 면역반응의 특이성 검증을 나타내는 도면이다.
- [30] 도 4는 혈액 샘플에서의 다중검출능을 나타내는 도면이다.
- [31] 도 5는 임상 샘플에서 A β 40와 A β 42의 검출 결과와 그 비(ratio)를 나타내는 도면이다.

[32]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [33] 본 발명자들은 비침습적 시료로부터 다중 바이오마커를 고민감도로 검출하여 AD를 조기에 진단하기 위한 기술에 대해 예의 연구하여 본 발명을 완성하였다.
- [34] 알츠하이머 (Alzheimer's Disease, AD) 치매는 퇴행성 뇌 질환으로, 초기에는 주로 최근 일에 대한 기억력 저하로 시작하여 병이 진행되면 여러 인지기능의 이상을 동반하게 된다. 알츠하이머 환자의 뇌 조직을 검사하면 신경반과 신경섬유다발이 관찰되고, MRI를 이용한 뇌 구조 영상에서는 신경세포 소실로 인한 전반적 뇌 위축(brain atrophy) 소견이 나타난다. 질병 초기에는 주로 기억력을 담당하는 주요 뇌 부위인 해마(hippocampus)와 내후각 뇌피질(entorhinal cortex) 부위에 국한되어 나타나지만 점차 두정엽, 전두엽 등을 거쳐 뇌 전체로 퍼져나간다. 특히, 알츠하이머 치매는 apolipoprotein E(APOE) epsilon 4 allele 유전자를 가지는 경우 유병률이 높은 것으로 알려져 있고, APOE epsilon 유전자 중 epsilon 4를 제외하고는 아밀로이드 베타 단백질 (amyloid beta protein: A β protein) 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다.
- [35] 본 발명자들은 비침습적 시료(특히, 혈액)를 대상으로 은 나노갭 셸(Ag Nanogapshell, AgNGS) 기반의 SERS 면역측정법을 이용하는 경우 매우 높은 민감도로 알츠하이머병 진단의 바이오마커 검출이 가능하고 2종 이상의 바이오마커의 동시 검출이 가능함을 확인하였다.
- [36] 이에, 본 발명은 A β 40 및/또는 A β 42에 특이적인 항체가 도입된 은나노갭셸을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물을 제공할 수 있다.
- [37] 본 발명의 조성물은 상기 항체가 도입된 은나노갭셸 이외에 약리학적으로나 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 조성물에 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토오스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 비정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 상기 조성물은 약제화하는 경우, 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

- [38] 본 발명에서 은나노갭셸(Ag Nanogap Shell: AgNGS)은 베이스 입자로서 실리카 파티클; 및 상기 실리카 파티클을 둘러싸고 있으며, 복수 개의 갭(gap)이 존재하고, 은(Ag)을 포함하는 금속층으로 이루어진 나노프로브(nanoprobe)로서, 상기 금속층에 존재하는 갭(gap)에 라만 표지자가 도입되어 표면증강 라만산란 신호를 나타내며, 금속층의 표면에 A β 40 또는 A β 42에 특이적인 항체가 도입되어 각각 AgNGS-A β 40 또는 AgNGS-A β 42을 형성한다 상기 AgNGS-A β 40 및 AgNGS-A β 42를 구성하고 있는 항체는 각각 시료에 포함된 A β 40 또는 A β 42와 높은 특이성을 가지고 결합하여 은나노갭셸 기반의 샌드위치 복합체 (AgNGS-based sandwich complex)를 형성한다. 본 발명자들은 상기 복합체의 표면증강 라만 산란 (Surface-enhanced Raman scattering, SERS) 신호를 검출하는 경우 매우 높은 민감도로 A β 40 및/또는 A β 42의 검출이 가능함을 확인하였다.
- [39] 한편, 경도인지장애 (mild cognitive impairment, MCI)는 정상에 비해 인지기능이 떨어져 있는 상태로 알츠하이머 치매의 전조라고 알려져 있으나, 일상생활을 수행하는 능력은 보존되어 있어 아직은 치매가 아닌 상태를 의미한다. 경도인지장애 환자의 경우 알츠하이머병으로 진행될 가능성이 상당하나, 조기에 적절한 치료를 받는 경우 경도인지장애 환자의 25~30%가 정상으로 회복하는 것으로 알려져 있다. 알츠하이머병을 예방하고 발병 후 가능한 빠른 치료를 위해서는 경도인지장애 환자를 조기에 진단할 수 있어야 하며, 적절한 치료를 위해 경도인지장애 환자와 알츠하이머병 환자의 감별진단이 가능한 것이 바람직하다.
- [40] 이에, 본 발명자들은 정상인과, 경도인지장애 또는 알츠하이머병으로 확진된 환자의 혈청샘플과 본 발명의 AgNGS-A β 40 및 AgNGS-A β 42을 반응시켜 복합체 형성을 유도하고 SERS 신호값으로부터 하기의 식 1에 따라 A β 40과 A β 42의 비율을 계산하였다.
- [41] [식 1]
- [42]
- $$A\beta 40 / A\beta 42 = \sum_{1}^{n>0} I_{320-430} / \sum_{1}^{n} I_{450-510}$$
- I_{A-B} = A~B 범위의 Raman intensity를 모두 더한 값.
- [43] 그 결과, 정상인, 경도인지장애 및 알츠하이머 각각의 샘플은 상이한 A β 40/A β 42 값을 가지며, 상기 결과값이 작을수록 인지능력이 정상이며, 결과값이 클수록 인지능력 등에 문제가 발생되었음을 알 수 있었다. 구체적으로 경도인지장애의 경우 A β 40/A β 42 값이 1.1 내지 2.5 범위 내에 있으며, 이보다 작은 값을 갖는 경우 정상으로 판정하고, 이보다 높은 값을 갖는 경우 알츠하이머병인 것으로 판정할 수 있음을 알 수 있었다.
- [44] 이에, 본 발명자들은 신속하고 정확하게 치매환자와 경도인지장애 환자를

감별하여 진단할 수 있고, 특히 비침습적 시료(혈청)를 이용하여 정확한 진단결과를 제공할 수 있다는 점에서 간단하게 추적검사를 통한 치매의 예방 또는 조기진단을 통한 적시에 적절한 치료가 가능할 수 있다.

[45]

발명의 실시를 위한 형태

[46] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[47]

[48] [실시예]

[49] 실시예 1. AgNGS-A β 40 및 AgNGS-A β 42의 제조

[50] 하기의 방법에 따라 A β 40 또는 A β 42에 특이적인 항체가 독립적으로 도입된 은나노캡셀을 제조하였다(KR 10-1944346 참조).

[51] 1-1. 실리카입자 합성 및 thiol 작용기 형성

[52] (1) Tetraethylorthosilicate 를 40 ml absolute ethanol에 녹인 후 ammonium hydroxide를 첨가하여 상온에서 20시간 반응한다.

[53] (2) Centrifuge를 이용하여 미 반응물을 제거한 후 최종 1mg/ml의 농도로 희석시킨다.

[54] (3) 1 ml의 합성된 실리카입자(1 mg/ml)에 Mercaptopropyltrimethoxysilane과 ammonium hydroxide를 첨가하여 상온에서 12시간 반응한다.

[55] (4) Centrifuge를 이용하여 미 반응물을 제거한다. (MPTS-silica)

[56]

[57] 1-2. Thiol-은 결합력을 이용한 실리카입자 표면에 은나노캡셀 형성

[58] (1) MPTS-silica, PVP, AgNO₃를 ethylene glycol 50 ml에 녹인 후 Octylamine을 첨가하여 환원반응을 시킨다. Octylamine을 첨가한 후 1분 뒤 Raman label (4-Fluorethiophenol, 4-bromothiophenol, 4-chlorothiophenol, benzenethiol)을 첨가한다.

[59] (2) Centrifuge를 이용하여 미 반응물을 제거한다. (AgNGS)

[60]

[61] 1-3. 은나노캡셀 표면에 화학작용기 도입을 위해 mercaptoundecanoic acid와 mercaptohexanol을 이용한 자가조립단분자막 형성

[62] (1) 합성된 AgNGS에 mercaptohexanol과 mercaptoundecanoic acid를 첨가한 후 1시간 ethanol에서 반응시킨다.

- [63] (2) Centrifuge를 이용하여 미 반응물을 제거한다. (SAM-AgNGS)
- [64]
- [65] 1-4. 은나노캡셀 표면에 A β 혹은 A β 에 선택적으로 결합하는 항체 도입
- [66] (1) 합성된 SAM-AgNGS에 EDC/NHS (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide/N-Hydroxysuccinimide) coupling agent를 첨가한 후 30분간 pH 6.0 100mM PBS용액에서 반응시킨다.
- [67] (2) Centrifuge를 이용하여 미 반응물을 제거한다.
- [68] (3) AB0 혹은 AB2에 선택적으로 반응하는 항체 (1 mg/ml 10 l)를 넣고 교반하여 pH 7.4 100 mM PBS 버퍼에서 2시간 반응시킨다.
- [69] (4)Centrifuge를 이용하여 미 반응물을 제거한 후 1% BSA solution에 분산시켜 냉장보관한다.
- [70]
- [71] 실시예 2. 알츠하이머병(AD) 바이오마커 2종 (A β A β 에 대한 검출
- [72] 도 2는 알츠하이머병(AD) 바이오마커 2종 (A β A β 에 대한 검출 결과를 나타내는 도면이다((a) A β 검출에 대한 농도별 마이크로어레이 맵핑 이미지, (b) (a)에 표시된 영역에 대한 AgNGS의 라만 신호를 나타낸 그래프, (c) (a)의 농도별 신호에 대한 그래프, (d) A β 검출에 대한 농도별 마이크로어레이 맵핑 이미지, (e) (d)에 표시된 영역에 대한 AgNGS의 라만 신호, (f) (d)의 농도별 신호에 대한 그래프).
- [73] 도 2를 참조하면, AgNGS 기반 SERS 면역측정법을 통해 A β A β 를 농도 의존적 검출할 수 있음을 확인할 수 있다.
- [74]
- [75] 실시예 3. AgNGS 기반 SERS 면역반응의 특이성 검증
- [76] 도 3은 AgNGS 기반 SERS 면역반응의 특이성 검증을 나타내는 도면이다.
- [77] 도 3(a)는 각 표적에 특이적인 항체로 개질된 AgNGS는 각각에 특이적으로 반응하는 표적 바이오마커에 대해서만 면역반응을 하여 라만 신호를 나타낸다. 도 3(b)는 A β 2 농도가 10 ng/mL로 고정되고, A β 의 농도는 0 ~ 10 ng/mL로 변할 때, 두 바이오마커의 혼합용액에 대해 AgNGS 기반 SERS 면역측정법은 두 바이오마커의 농도변화를 반영하는 라만 신호 경향성을 보인다. 또한, 도 3(c)를 참조하면, A β 과 A β 가 x축의 비율로 존재할 때, AgNGS 기반 SERS 면역측정법은 두 바이오마커의 농도 변화를 반영하는 라만 신호 경향성을 보인다. 해당 결과를 통해 AgNGS 기반 SERS 면역측정법이 다중 바이오마커에 대해 cross-reactivity 없이 특이적으로 반응할 수 있음을 증명할 수 있다.
- [78]
- [79] 실시예 4. 혈액 샘플에서의 다중검출능 확인
- [80] 도 4는 혈액 샘플에서의 다중검출능을 나타내는 도면이다. 도 4를 참조하면, A β 40과 A β 가 0 ~ 1000 ng/mL 농도로 존재하는 인간 혈청 샘플에서 AgNGS기반 SERS 면역측정법을 통해 A β 과 A β 를 검출하였을 때, 두 바이오마커의

농도변화를 반영하는 라만 신호 경향성을 보였다. 이를 통해 복잡한 구성의 혈액 시료에서도 A β 과 A β 를 특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있다.

[81]

[82] 실시예 5. 임상 샘플에서 A β 과 A β 의 비(ratio)를 이용한 진단

[83] 정상인과 경도인지장애 또는 알츠하이머로 확진받은 환자의 혈청 샘플을 보라매병원으로부터 제공받아 이용하였다.

[84] 도 5는 임상 샘플에서의 A β 과 A β 의 검출 결과를 나타낸 도면이다. 도 5를 참조하면, AgNGS기반 SERS 면역측정법을 이용하여 알츠하이머병 환자 혈청에 존재하는 A β 과 A β 를 검출하여 두 바이오마커의 농도 비율을 계산한 결과, 경도인지장애 환자 시료의 경우 상기 비율이 1.1~2.5 범위 내에 존재하며, 정상인의 경우 1.1 미만의 값을 갖고, 알츠하이머병의 경우 2.5 초과 값을 나타냄을 알 수 있었다. 상기 결과로부터 알츠하이머병 환자와 경도인지장애 환자(MCI) 및 일반인 (NC)을 구분하여 진단할 수 있음을 알 수 있다.

[85]

[86] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[87]

청구범위

- [청구항 1] 아밀로이드 베타(Amyloid beta: A β) 40에 특이적인 항체 및 A β 42에 특이적인 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 항체가 도입된 은나노겔셀을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 은나노겔셀은 실리카 입자(silica particle); 및 상기 실리카 입자를 완전히 둘러싸고 복수의 갭(gap)이 형성된 표면을 갖는 금속층(metal layer)으로 이루어진 것으로서,
상기 금속층은 은을 포함하고, 상기 은 갭 내에 라만 표지자가 도입되고,
상기 항체는 상기 금속층 표면에 도입된 것을 특징으로 하는,
알츠하이머병 진단용 조성물.
- [청구항 3] 하기 단계를 포함하는 알츠하이머병 진단을 위한 정보제공방법:
(1) 은나노겔셀(AgNGS)의 표면에 아밀로이드 베타(Amyloid beta: A β) 40에 특이적인 항체를 접합하여 AgNGS-A β 40 제조하는 단계;
(2) AgNGS의 표면에 A β 42에 특이적인 항체를 접합하여 AgNGS- A β 42를 제조하는 단계;
(3) 상기 AgNGS-A β 40 및 AgNGS-A β 42와 생물학적 시료를 생체 외에서 혼합하여 은나노겔셀 기반의 샌드위치 복합체(AgNGS-based Sandwich complex) 형성을 유도하는 단계;
(4) 상기 시료에서 각 복합체의 라만 신호를 측정하여 A β 40와 A β 42의 비를 계산하는 단계; 및
(5) 상기 A β 40와 A β 42의 비가 2.5 내지 999 인 경우 알츠하이머병인 것으로 판정하는 단계.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 혈액 및 혈청으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 비침습적 시료인 것을 특징으로 하는, 알츠하이머병 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 5] 하기 단계를 포함하는 알츠하이머병 진단방법:
(1) 은나노겔셀(AgNGS)의 표면에 아밀로이드 베타(Amyloid beta: A β) 40에 특이적인 항체를 접합하여 AgNGS-A β 40 제조하는 단계;
(2) AgNGS의 표면에 A β 42에 특이적인 항체를 접합하여 AgNGS- A β 42를 제조하는 단계;
(3) 상기 AgNGS-A β 40 및 AgNGS-A β 42와 생물학적 시료를 생체 외에서 혼합하여 은나노겔셀 기반의 샌드위치 복합체(AgNGS-based Sandwich complex) 형성을 유도하는 단계;
(4) 상기 시료에서 각 복합체의 라만 신호를 측정하여 A β 40와 A β 42의 비를 계산하는 단계; 및

(5) 상기 A β 40와 A β 42의 비가 2.5 내지 999 인 경우 알츠하이머병인 것으로 진단하는 단계.

[청구항 6] 아밀로이드 베타(Amyloid beta: A β) 40에 특이적인 항체가 도입된 은나노겔; 및 A β 42에 특이적인 항체가 도입된 은나노겔;을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병과 경도인지장애 감별 진단용 조성물.

[청구항 7] 하기 단계를 포함하는 알츠하이머병과 경도인지장애의 감별 진단을 위한 정보제공방법:

(1) 은나노겔(AgNGS)의 표면에 아밀로이드 베타(Amyloid beta: A β)

40에 특이적인 항체를 접합하여 AgNGS-A β 40 제조하는 단계;

(2) AgNGS의 표면에 A β 42에 특이적인 항체를 접합하여 AgNGS- A β 42를 제조하는 단계;

(3) 상기 AgNGS-A β 40 및 AgNGS-A β 42와 생물학적 시료를 생체 외에서 혼합하여 은나노겔 기반의 샌드위치 복합체(AgNGS-based Sandwich complex) 형성을 유도하는 단계;

(4) 상기 시료에서 각 복합체의 라만 신호를 측정하여 A β 40와 A β 42의 비를 계산하는 단계; 및

(5) -999 내지 1.1 인 경우 정상인으로 구분하고, 1.1 내지 2.5 인 경우 경도인지장애로 구분하고, 2.5 내지 999 인 경우 알츠하이머병인 것으로 구분하는 단계.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 혈액 및 혈청으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 비침습적 시료인 것을 특징으로 하는, 알츠하이머병과 경도인지장애의 감별 진단을 위한 정보제공방법.

[청구항 9] 하기 단계를 포함하는 알츠하이머병과 경도인지장애의 감별 진단방법:

(1) 은나노겔(AgNGS)의 표면에 아밀로이드 베타(Amyloid beta: A β) 40에 특이적인 항체를 접합하여 AgNGS-A β 40 제조하는 단계;

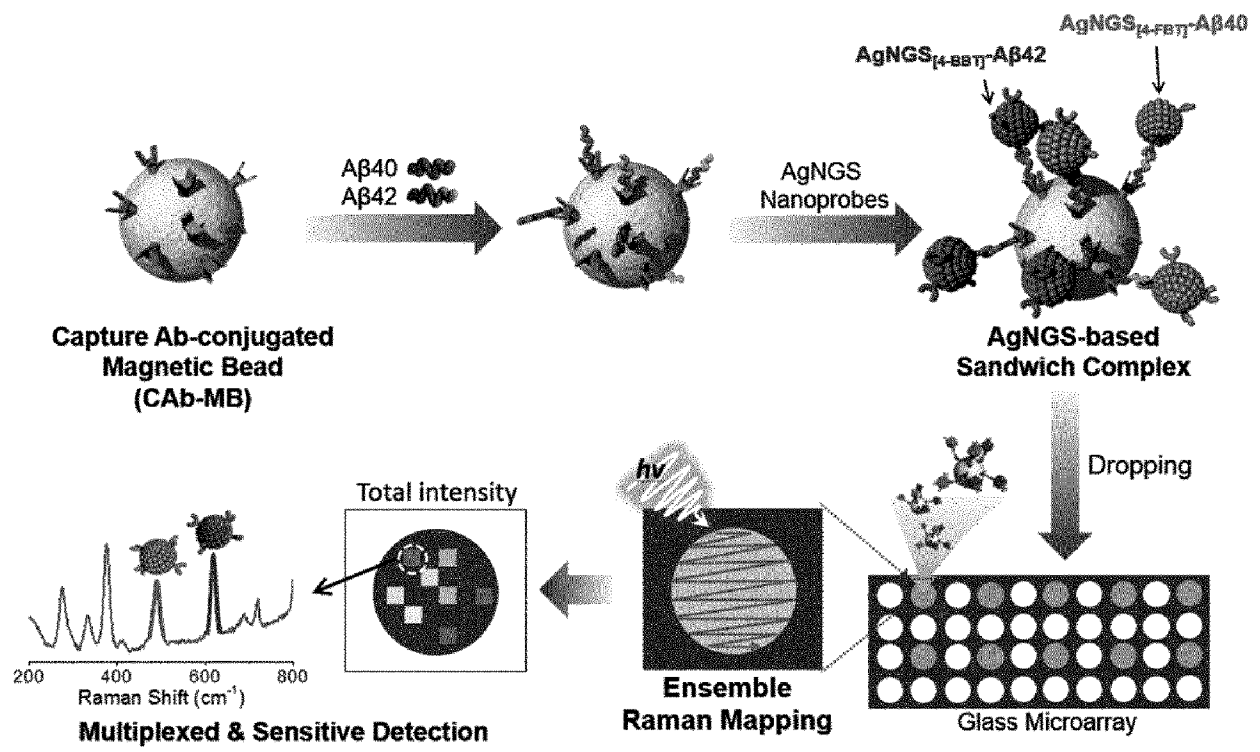
(2) AgNGS의 표면에 A β 42에 특이적인 항체를 접합하여 AgNGS- A β 42를 제조하는 단계;

(3) 상기 AgNGS-A β 40 및 AgNGS-A β 42와 생물학적 시료를 생체 외에서 혼합하여 은나노겔 기반의 샌드위치 복합체(AgNGS-based Sandwich complex) 형성을 유도하는 단계;

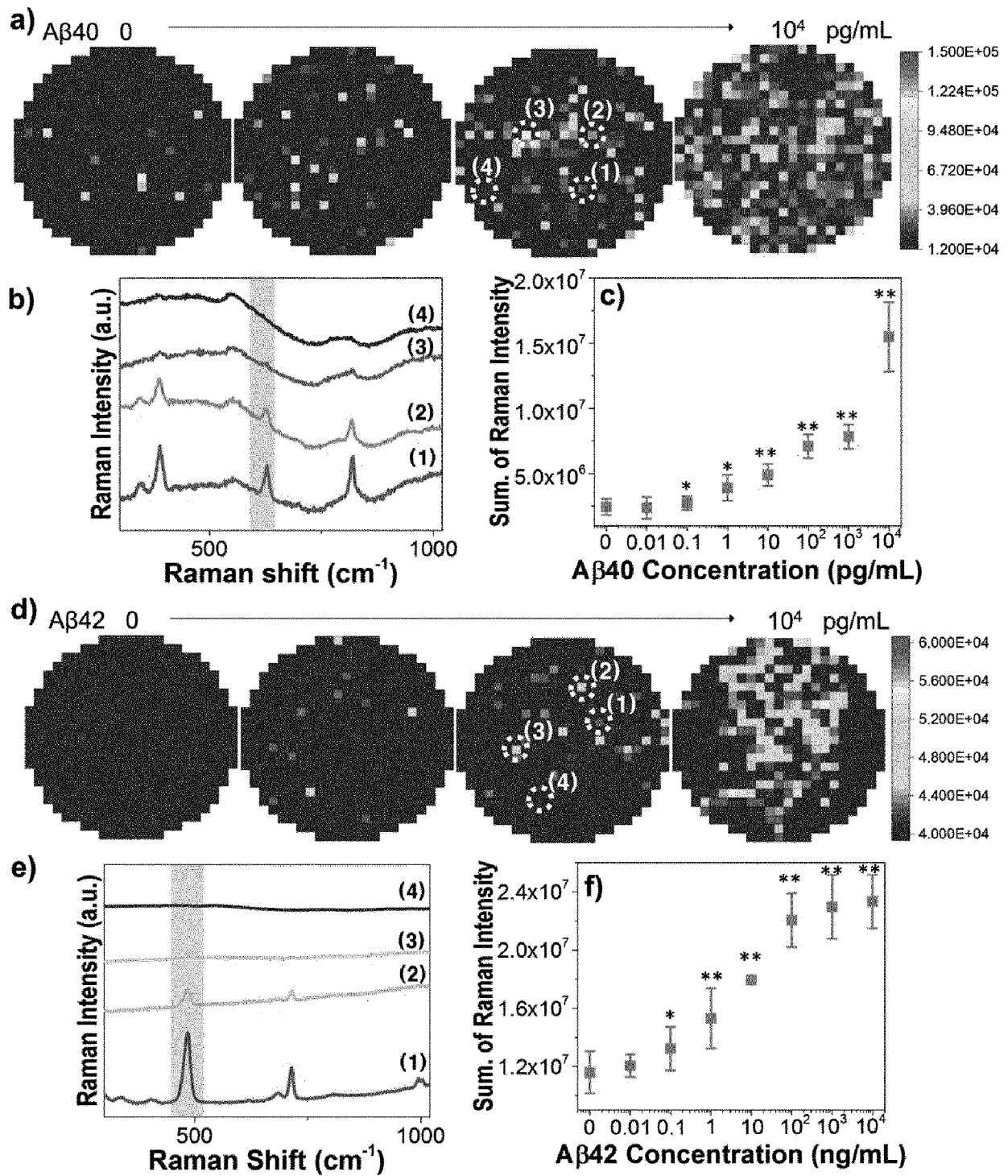
(4) 상기 시료에서 각 복합체의 라만 신호를 측정하여 A β 40와 A β 42의 비를 계산하는 단계; 및

(5) -999 내지 1.1 인 경우 정상인으로 판정하고, 1.1 내지 2.5 인 경우 경도인지장애로 진단하고, 2.5 내지 999 인 경우 알츠하이머병인 것으로 진단하는 단계.

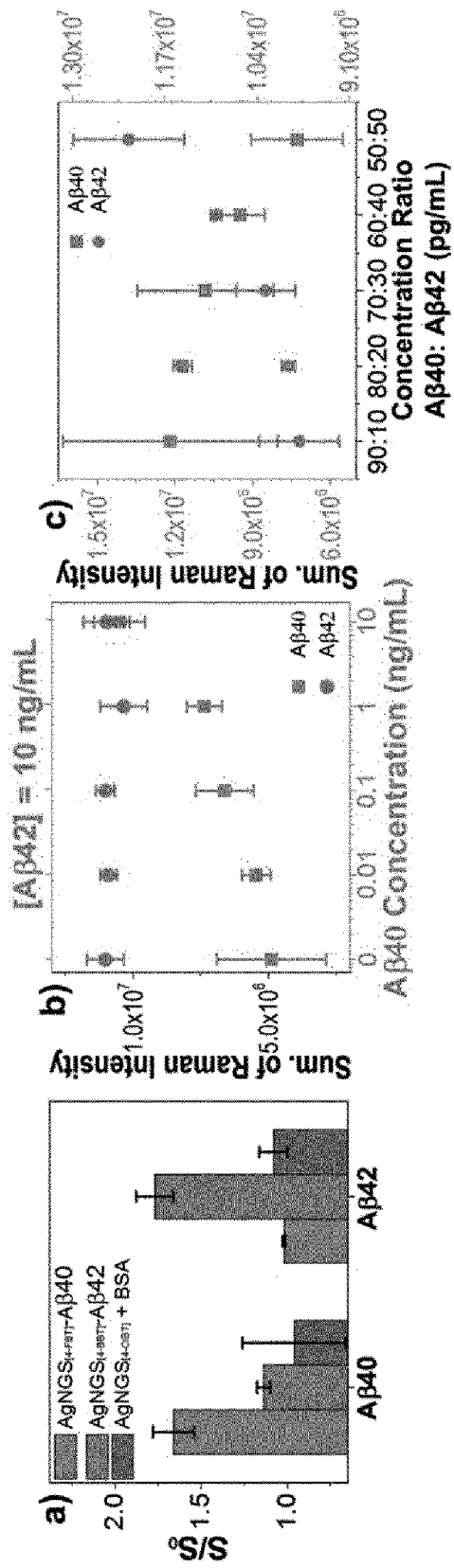
[도 1]



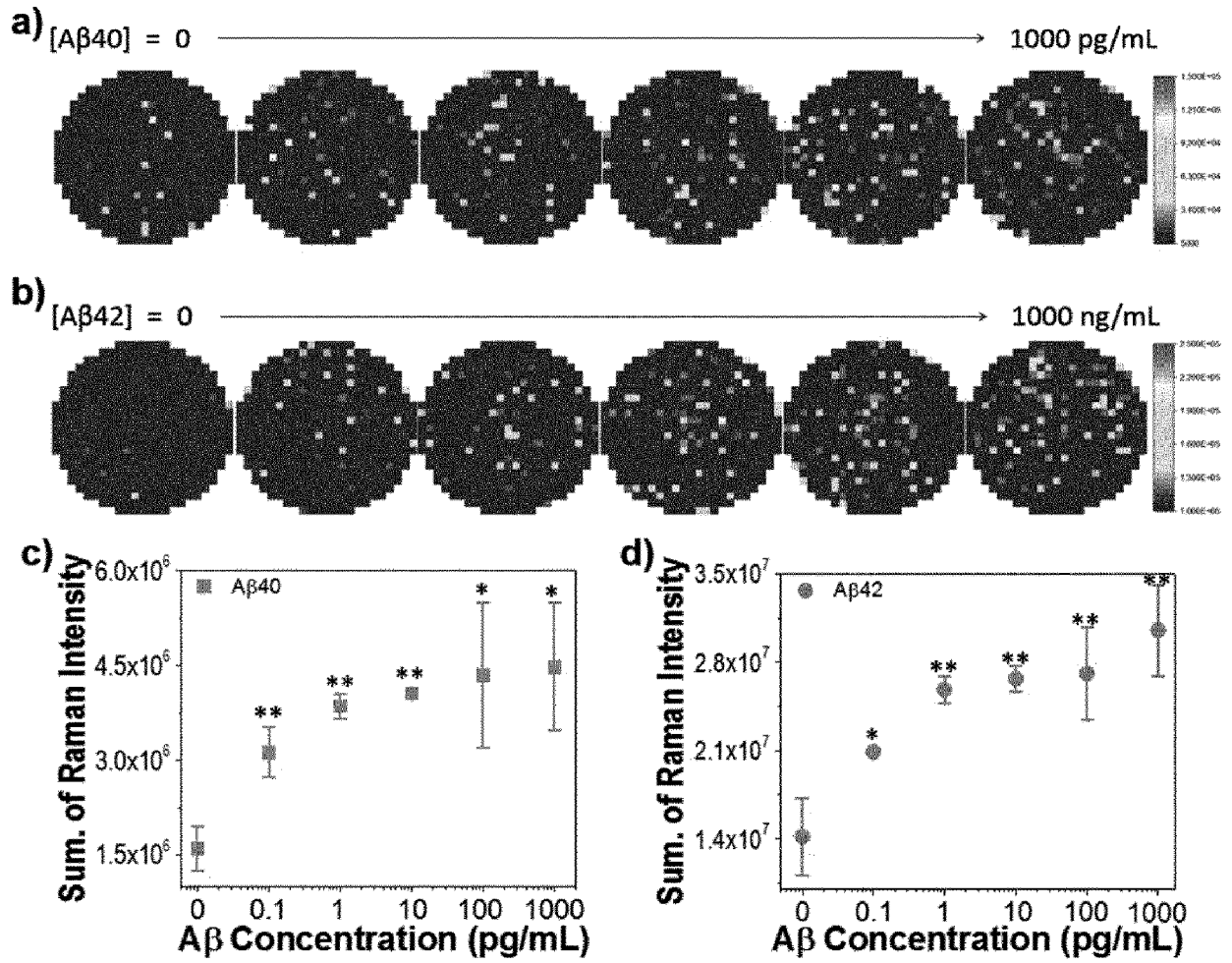
[도2]



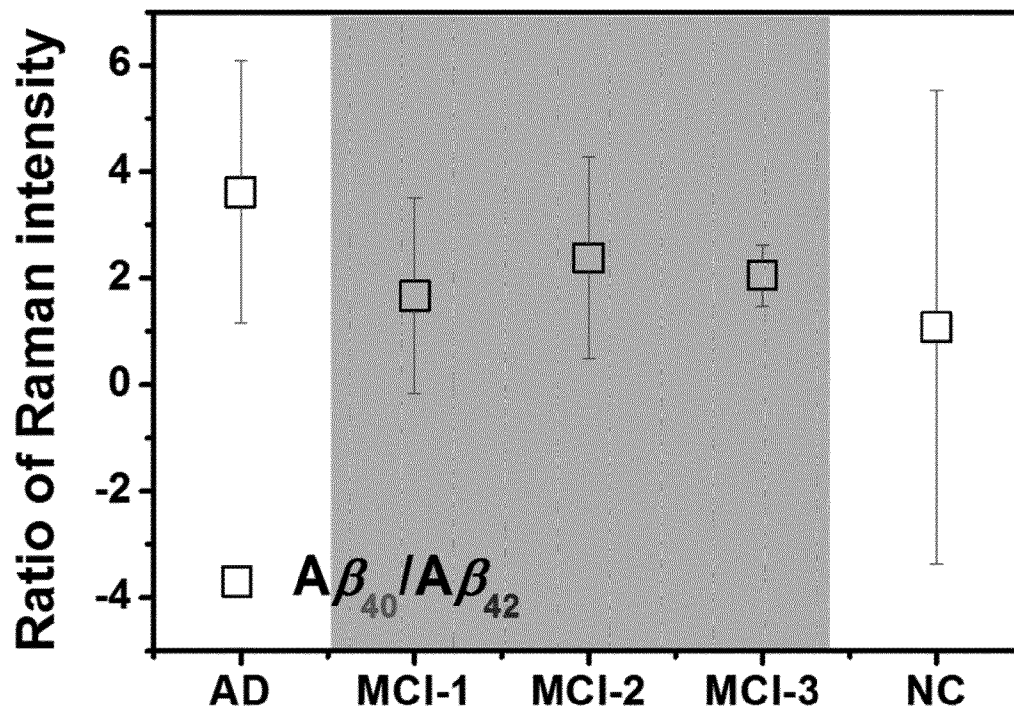
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/003145

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/543(2006.01)i, G01N 33/553(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 21/65(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/543; C01B 31/02; C01G 5/00; G01J 3/44; G01N 21/63; G01N 21/65; G01N 33/15; G01N 33/553; G01N 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: silver nanogap shell, amyloid beta, surface enhanced raman scattering

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BEIER, H. T. et al. Application of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Detection of Beta Amyloid Using Nanoshells. Plasmonics. no. 2, 2007, pages 55-64 See abstract; pages 57-59.	1-9
A	XING, Y. et al. A sensitive and selective electrochemical biosensor for the determination of beta-amyloid oligomer by inhibiting the peptide-triggered in situ assembly of silver nanoparticles. International Journal of Nanomedicine. no. 12, 2017, pages 3171-3179 See the entire document.	1-9
A	KR 10-2012-0056024 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY et al.) 01 June 2012 See the entire document.	1-9
A	KR 10-1792951 B1 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 01 November 2017 See the entire document.	1-9
A	KR 10-2012-0132668 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 07 December 2012 See the entire document.	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 JUNE 2020 (19.06.2020)

Date of mailing of the international search report

19 JUNE 2020 (19.06.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/003145

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0056024 A	01/06/2012	CN 103403546 A	20/11/2013
		CN 103403546 B	08/07/2015
		EP 2645104 A2	02/10/2013
		JP 2014-508916 A	10/04/2014
		JP 5813128 B2	17/11/2015
		KR 10-1352342 B1	17/02/2014
		US 2013-0330839 A1	12/12/2013
		US 9482618 B2	01/11/2016
		WO 2012-070893 A2	31/05/2012
		WO 2012-070893 A3	27/09/2012
KR 10-1792951 B1	01/11/2017	None	
KR 10-2012-0132668 A	07/12/2012	CN 103718038 A	09/04/2014
		CN 103718038 B	22/06/2016
		EP 2717052 A2	09/04/2014
		JP 2014-515496 A	30/06/2014
		JP 5917686 B2	18/05/2016
		KR 10-1361652 B1	14/02/2014
		US 2014-0113283 A1	24/04/2014
		US 9459257 B2	04/10/2016
		WO 2012-165837 A2	06/12/2012
		WO 2012-165837 A3	07/02/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/543(2006.01)i, G01N 33/553(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 21/65(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/543; C01B 31/02; C01G 5/00; G01J 3/44; G01N 21/63; G01N 21/65; G01N 33/15; G01N 33/553; G01N 33/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 은나노갭셸(silver nanogap shell), 아밀로이드 베타(amyloid beta), 표면 증감 라만 산란(surface enhanced raman scattering)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	BEIER, H. T. 등, "Application of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Detection of Beta Amyloid Using Nanoshells", Plasmonics, 2호, 2007, 페이지 55-64 요약; 페이지 57-59	1-9
A	XING, Y. 등, "A sensitive and selective electrochemical biosensor for the determination of beta-amyloid oligomer by inhibiting the peptide-triggered in situ assembly of silver nanoparticles", International Journal of Nanomedicine, 12호, 2017, 페이지 3171-3179 전문	1-9
A	KR 10-2012-0056024 A (한국화학연구원 등) 2012.06.01 전문	1-9
A	KR 10-1792951 B1 (성균관대학교산학협력단) 2017.11.01 전문	1-9
A	KR 10-2012-0132668 A (한국화학연구원) 2012.12.07 전문	1-9

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 "X"에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 06월 19일 (19.06.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 06월 19일 (19.06.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



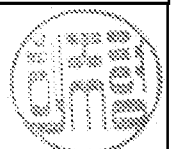
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0056024 A	2012/06/01	CN 103403546 A CN 103403546 B EP 2645104 A2 JP 2014-508916 A JP 5813128 B2 KR 10-1352342 B1 US 2013-0330839 A1 US 9482618 B2 WO 2012-070893 A2 WO 2012-070893 A3	2013/11/20 2015/07/08 2013/10/02 2014/04/10 2015/11/17 2014/02/17 2013/12/12 2016/11/01 2012/05/31 2012/09/27
KR 10-1792951 B1	2017/11/01	없음	
KR 10-2012-0132668 A	2012/12/07	CN 103718038 A CN 103718038 B EP 2717052 A2 JP 2014-515496 A JP 5917686 B2 KR 10-1361652 B1 US 2014-0113283 A1 US 9459257 B2 WO 2012-165837 A2 WO 2012-165837 A3	2014/04/09 2016/06/22 2014/04/09 2014/06/30 2016/05/18 2014/02/14 2014/04/24 2016/10/04 2012/12/06 2013/02/07