

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022년 10월 6일 (06.10.2022) WIPO | PCT

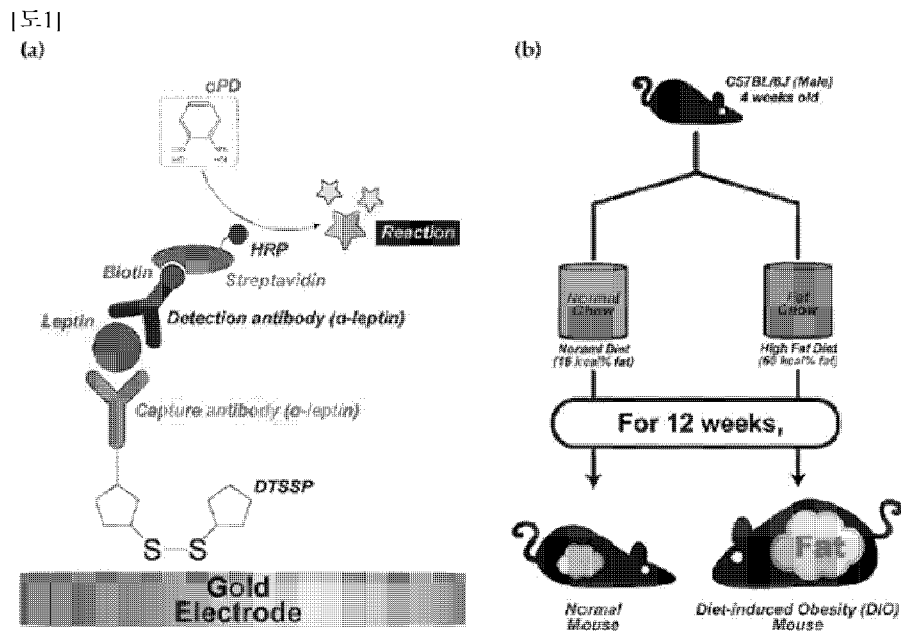


(10) 국제공개번호
WO 2022/211221 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/74 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/019558
- (22) 국제출원일: 2021년 12월 22일 (22.12.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2021-0041098 2021년 3월 30일 (30.03.2021) KR
- (71) 출원인: 계명대학교 산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY) [KR/KR]; 42601 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 201호(신당동), Daegu (KR).
- (72) 발명자: 허윤석 (HEO, Yun Seok); 10248 경기도 고양시 일산서구 탄현로 136, 115-904, Gyeonggi-do (KR). 성룡 (SUNG, Ryong); 42919 대구광역시 달성군 다사읍 대실역남로 35, 403-805, Daegu (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울특별시 금천구 가산디지털1로 151 이노플렉스1차 601호, 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, IT, 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,

(54) Title: SANDWICH ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY-BASED LEPTIN BIOSENSOR, AND METHOD FOR DETECTING LEPTIN BY USING SAME

(54) 발명의 명칭: 샌드위치 효소면역측정법 기반 렙틴 바이오센서 및 이를 이용한 렙틴 검출방법



(57) Abstract: The present invention relates to a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based leptin biosensor, and a method for detecting leptin by using same, and, more specifically, to a technique for electrochemically detecting leptin by using the oxidation reaction of o-phenylenediamine (oPD) on a screen-printed gold electrode (SPGE) on the basis of a sandwich ELISA [DTSSP/leptin Ab (capture antibody)/leptin/biotinylated leptin Ab (detection antibody)/streptavidin-HRP]. When the sandwich ELISA-based leptin biosensor of the present invention was used, a leptin concentration detection curve was identified to be in the range of 0.1-20 ng/mL, and stability, sensitivity, selectivity and effectiveness that are higher than those of commercial ELISA measurement were exhibited, and thus the biosensor is applied in clinics and point-of-care testing (POCT) so as to be applicable as a medical device capable of readily

[다음 쪽 계속]



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 역
내 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), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, 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))

checking the criterion for obesity and obesity-mediated diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 샌드위치 효소면역측정법 기반 렙틴 바이오센서 및 이를 이용한 렙틴 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 스크린 프린트 된 금 전극(SPGE)에 샌드위치 ELISA[DTSSP/leptin Ab(capture antibody)/leptin/biotinylated leptin Ab(detection antibody)/streptavidin-HRP]를 기반으로 o-페닐렌디아민(OPD)의 산화반응을 이용하여 렙틴을 전기화학적으로 검출하는 기술에 관한 것이다. 본 발명에 따른 샌드위치 효소면역측정법 기반 렙틴 바이오센서를 이용하면, 렙틴 농도 검출곡선은 0.1 ~ 20 ng/mL 범위에서 확인되었고, 상용 ELISA 측정과 비교하여 높은 안정성, 민감도, 선택성 및 효과성을 나타내었기 때문에, 상기 바이오센서는 의료기관 및 POCT(point-of-care testing) 수준에서 활용되어 비만과 비만 매개 질환의 척도를 손쉽게 확인할 수 있는 의료기기로 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 샌드위치 효소면역측정법 기반 렙틴 바이오센서 및 이를 이용한 렙틴 검출방법

기술분야

- [1] 본 발명은 샌드위치 효소면역측정법 기반 렙틴 바이오센서 및 이를 이용한 렙틴 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 스크린 프린트 된 금 전극(SPGE)에 샌드위치 ELISA[DTSSP/leptin Ab(capture antibody)/leptin/biotinylated leptin Ab(detection antibody)/streptavidin-HRP]를 기반으로 o-페닐렌디아민(OPD)의 산화반응을 이용하여 렙틴을 전기화학적으로 검출하는 기술에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 렙틴(leptin)은 주로 지방 조직에서 생성되는 펩타이드(peptide)계 호르몬이다. 지방에서 분비되는 렙틴은 체내 지방조직의 숫자와 크기가 많을수록 혈중 농도가 정비례한다. 렙틴과 비만은 밀접한 상관관계를 가지고 있는데, 특히 비만은 대부분 비만 매개 질환 예를 들어, 고혈압, 심혈관계 질환 등을 동반할 수 있다.
- [3] 즉 렙틴은 비만과 비만 매개 질환에 대한 중요한 바이오마커(biomarker)로 생각되고 있다. 그러므로 렙틴을 특이적으로 검출할 수 있는 바이오센서(biosensor)를 사용하여 혈중 렙틴의 농도를 측정할 수 있다면, 생체 내 비만과 관련된 여러 가지 생리학 및 병리학적 변화를 손쉽게 확인할 수 있다. 따라서, 비만 및 비만 매개 질환에 대한 의료 정보를 제공하기 위해 렙틴 수준을 측정하는 것은 필수적이다.
- [4] 한편, 대부분의 실제 분야에서 방사 면역 분석법(RIA), 효소 결합 면역 흡착제 분석(ELISA) 및 웨스턴 블롯팅이 일반적으로 렙틴 수준을 측정하는 데 사용되어 왔다. 이러한 기술들은 효과적이고 잘 확립되어 있지만 복잡성, 비용, 시간 소모적인 절차 등으로 인해 한계가 있고, 특히 상당한 규모의 장비, 숙련된 장비 기술자 및 복잡한 프로토콜의 사용을 필요로 한다.
- [5] 전기 화학적 기술은 다양한 유형의 분자 검출에 있어서 고감도, 적절한 선택성, 저비용, 시간 절약 및 장기 안정성과 같은 장점을 가진다. 특히, 전기 화학 바이오센서는 임상 및 상업 분야에서 특정 바이오마커(DNA, RNA, 단백질, 이온 및 저분자물질)를 측정하기 위해 주목을 받고 있다. ELISA는 우수한 성능으로 특정 바이오마커를 정량화하는 데 가장 효과적이고 일반적으로 사용되는 방법 중 하나이다.
- [6] 이에, 렙틴의 효율적인 검출을 위한 새로운 바이오센서의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 이에, 본 발명의 목적은 스크린 프린트 된 금 전극(SPGE)에 샌드위치 ELISA[DTSSP/leptin Ab(capture antibody)/leptin/biotinylated leptin Ab(detection antibody)/streptavidin-HRP]를 기반으로 o-페닐렌디아민(oPD)의 산화반응을 이용하여 렙틴을 전기화학적으로 검출하는 바이오센서 및 이의 의학적 응용을 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 스크린 프린트 된 금 전극(screen-printed gold electrode; SPGE) 상에 o-페닐렌디아민(o-Penylenediamine, oPD)을 전자 매개체로서 적용한 것을 특징을 하는, 샌드위치 효소면역측정법 기반 렙틴 바이오센서 및 이의 제조방법을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 바이오센서를 포함하는 비만 또는 비만 매개 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 인체로부터 분리된 샘플을 상기 바이오센서에 처리하는 단계를 포함하는, 렙틴 검출방법을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 인체로부터 분리된 샘플을 상기 바이오센서에 처리하는 단계를 포함하는, 비만 또는 비만 매개 질환 진단방법을 제공한다.

발명의 효과

- [12] 본 발명에 따른 샌드위치 효소면역측정법 기반 렙틴 바이오센서를 이용하면, 렙틴 농도 검출곡선은 0.1 ~ 20 ng/mL 범위에서 확인되었고, 상용 ELISA 측정과 비교하여 높은 안정성, 민감도, 선택성 및 효과성을 나타내었기 때문에, 상기 바이오센서는 의료기관 및 POCT(point-of-care testing) 수준에서 활용되어 비만과 비만 매개 질환의 척도를 손쉽게 확인할 수 있는 의료기기로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 본 발명에 따른 샌드위치 효소면역측정법 기반 렙틴 바이오센서의 모식도(a)이고, C57BL/6J 수컷 마우스를 이용한 식이 유도 비만(DIO) 모델 개발의 모식도(b)를 나타낸 것이다.
- [14] 도 2는 고지방 식이(HFD) 마우스 및 정상식이(ND) 마우스의 특징을 비교한 것으로, (a)는 ND 및 HFD 마우스의 외관, (b)는 각 실험군에서 시간에 따른 체중 변화를 나타낸 그래프, (c)는 각 실험군에서 간 질량 변화를 나타낸 그래프, (d)는 각 실험군에서 부고환 질량 변화를 나타낸 그래프, (e)는 각 실험군에서 피하지방 질량 변화를 나타낸 그래프를 나타낸 것이다.
- [15] 도 3은 본 발명에 따른 샌드위치 효소면역측정법 기반 렙틴 바이오센서의 순환전압전류법(CV) 전기화학적 분석 결과를 나타낸 것으로, (a) 10 ~ 300 mV/s 스캔 속도로 안정성에 대한 순환전압전류법(CV) 분석 결과, (b) a 그래프로부터 산화 및 환원 전락 피크, (c) 18 일에 걸쳐 4°C의 가습 조건 하에서 장기 저장 능력 테스트 결과를 나타낸 것이다.

- [16] 도 4는 본 발명에 따른 샌드위치 효소면역측정법 기반 랩틴 바이오센서의 사각과 전압전류법(SWV) 전기화학적 분석 결과를 나타낸 것으로, (a) 다양한 농도의 랩틴 용액(0.1 ~ 20 ng/mL)에 대한 바이오센서의 사각과 전압전류법(SWV) 반응 곡선, (b) SWV 피크 간의 강력한 선형 관계를 표시하는 교정 플롯을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [17] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [18] 본 발명자들은 상용 ELISA 측정과 비교하여 높은 안정성, 민감도, 선택성 및 효과성을 나타내는 샌드위치 효소면역측정법 기반 랩틴 바이오센서를 개발하고자 예의노력한 결과, 스크린 프린트 된 금 전극(SPGE)에 샌드위치 ELISA[DTSSP/leptin Ab(capture antibody)/leptin/biotinylated leptin Ab(detection antibody)/streptavidin-HRP]를 기반으로 o-페닐렌디아민(oPD)의 산화반응을 이용하여 랩틴을 전기화학적으로 검출하는 기술을 개발하여 본 발명을 완성하였다.
- [19] 이에, 본 발명은 스크린 프린트 된 금 전극(screen-printed gold electrode; SPGE) 상에 o-페닐렌디아민(o-Penylenediamine, oPD)을 전자 매개체로서 적용한 것을 특징을 하는, 샌드위치 효소면역측정법 기반 랩틴 바이오센서를 제공한다.
- [20] 상기 바이오센서는, a) 스크린 프린트 된 금 전극(screen-printed gold electrode; SPGE); b) 상기 전극 상에 형성된 3,3'-디티오비스(설포숙신이미딜 프로피오네이트)(DTSSP); c) 상기 DTSSP와 결합하며, 랩틴을 포획하는 항-랩틴 포획 항체; d) 랩틴; e) 상기 랩틴을 검출하는, 비오틴이 결합된 항-랩틴 검출 항체; 및 f) 상기 항-랩틴 검출 항체에 결합된 스트렙타비딘-호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)를 포함하며, o-페닐렌디아민(o-Penylenediamine, oPD)을 전자 매개체로서 적용할 수 있다.
- [21] 상기 바이오센서는, 랩틴 검출을 통해 비만 또는 비만 매개 질환을 진단할 수 있으며, 상기 비만 매개 질환으로는 고혈압 또는 심혈관계 질환에서 선택된 하나 이상의 질환일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [22] 또한, 본 발명은 상기 바이오센서를 포함하는 비만 또는 비만 매개 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [23] 상기 비만 매개 질환으로는 고혈압 또는 심혈관계 질환에서 선택된 하나 이상의 질환일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [24] 또한, 본 발명은 인체로부터 분리된 샘플을 상기 바이오센서에 처리하는 단계를 포함하는, 랩틴 검출방법을 제공한다.
- [25] 또한, 본 발명은 인체로부터 분리된 샘플을 상기 바이오센서에 처리하는 단계를 포함하는, 비만 또는 비만 매개 질환 진단방법을 제공한다.
- [26] 상기 샘플은 혈액, 혈장, 소변, 타액, 조직 및 뇌척수액으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [27] 상기 비만 매개 질환으로는 고혈압 또는 심혈관계 질환에서 선택된 하나 이상의 질환일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [28] 또한, 본 발명은 a) 스크린 프린트 된 금 전극(screen-printed gold electrode; SPGE) 상에 3,3'-디티오비스(설포숙신이미딜 프로피오네이트)(DTSSP)를 형성하는 단계; b) 상기 DTSSP와 결합하며, 랩틴을 포획하는 항-랩틴 포획 항체를 첨가하고 반응시키는 단계; c) 상기 반응시킨 반응물에 랩틴을 포함한 분석 대상 물질을 첨가하는 단계; d) 비오틴이 결합된 항-랩틴 검출 항체를 첨가하여 상기 랩틴을 검출하는 단계; e) 스트렙타비딘-호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)를 첨가하여 상기 항-랩틴 검출 항체를 검출하는 단계; 및 f) HRP 기질로서 o-페닐렌디아민(o-Penylenediamine, oPD)을 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 샌드위치 효소면역측정법 기반 랩틴 바이오센서 제조방법을 제공한다.
- [29] 상기 제조방법은 a) 단계 이전에 스크린 프린트 된 금 전극(screen-printed gold electrode; SPGE)을 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [30] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [31] **참조예 1. 장치, 전극 및 시약 준비**
- [32] 1.1. 장치 및 전극
- [33] 모든 전기 화학 측정은 CH Instruments (Austin, TX, USA)로부터 구매한 CHI760E 전기화학 워크스테이션을 사용하여 수행되었다. 스크린 프린트 된 금 전극[SPGE(DRP-C220AT)]은 Dropsens에서 구입하였다. 상기 금 전극은 (i) 금 작업 전극 (직경 = 4 mm), (ii) 금 상대 전극 및 (iii) 은 기준 전극으로 이루어지며, 케이블 커넥터는 SPGE를 워크스테이션에 연결하였다.
- [34] 1.2. 시약
- [35] 모든 화학 물질 및 시약은 분석 등급이었으며 더 이상 정제 없이 사용하였다. 인산염 완충 식염수(PBS), Triton X-100, o-페닐렌디아민 이염산염(oPD), 소 혈청 알부민(BSA), 칼륨 헥사시아노페레이트 III($K_3[Fe(CN)_6]$) 및 칼륨 헥사시아노페레이트 II($K_4[Fe(CN)_6]$) 삼수화물은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 3,3'-디티오비스(설포숙신이미딜 프로피오네이트)(DTSSP)는 ThermoFisher에서 구입하였다. 스트렙타비딘-HRP (호스래디쉬 퍼옥시다제) 솔루션은 Abcam에서 구입하였다. 마우스 랩틴 ELISA 키트는 Merck Millipore에서 구입하였다. 마우스 랩틴 재조합 단백질, 마우스 단클론 항-랩틴 항체(포획 항체) 및 마우스 폴리클로날 항-랩틴 항체(비오틴-접합, 검출 항체)는 Enzo Life Sciences에서 구입하였다. 모든 스타크 및

버퍼 용액은 오토클레이브 된 Milli-Q 초여과 증류 및 탈 이온수(18.2 MW-cm)를 사용하여 준비되었다. 모든 실험은 실온($23\pm1^{\circ}\text{C}$)에서 수행되었다.

[36] 실시예 1. 식이 유도 비만 마우스 모델

[37] 모든 동물 실험 절차 및 프로토콜은 계명대학교 의과대학 동물 관리 및 사용 위원회(KM-2019-18R2)에 의해 승인되었다. 수컷 C57BL/6J 마우스(4 주령)는 효창 과학(대한민국 대구)에서 제공되었으며, 상대 습도 $50\pm5\%$, $23\pm1^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 12 시간 명암 주기로 표준 케이지에 사육하였다.

[38] 식이요법을 변경하기 전에 마우스는 정상적인 식이요법으로 일주일 동안 적응하였고, 모든 마우스는 무게가 일치하는 두 그룹(그룹당 $n=5$)으로 나누어 고지방 식이(HFD) 마우스 및 정상식이(ND) 마우스로 구분하였다. HFD 마우스는 고지방 사료(지방으로부터 60% kcal)를 먹였고, ND 그룹은 정상적인 사료를 먹였다(지방으로부터 15% kcal). 두 그룹 모두 자유롭게 12주 동안 먹이고, 매일 체중을 측정하였다. 혈액은 절식 15시간 후 K3 EDTA 코팅 튜브를 이용하여 심장 천자에 의해 혈액을 수집하고 4°C 에서 원심 분리하였다. 혈장은 분리하여 분석할 때까지 80°C 에서 보관하였다. 장기 및 조직(간, 부고환 및 피하지방)을 채혈한 후 수집하고 무게를 측정하였다.

[39] 도 1b에서 수컷 C57BL/6J 마우스를 사용한 DIO 모델 개발 모식도를 나타내었고, 도 2에서는 고지방 식이(HFD) 마우스 및 정상식이(ND) 마우스의 특징을 비교하였다. 도 2b와 같이, HFD 마우스의 체중($29.96\pm3.33\text{g}$)은 ND 마우스($21.33\pm2.48\text{g}$)보다 유의성 있게 증가하였다. 또한, 도 2c, 2d 및 2e와 같이, HFD 마우스의 간, 부고환 및 피하지방의 각 질량도 유의성 있게 증가하였다.

[40] 따라서 DIO 마우스는 성공적으로 확립되었다.

[41] 실시예 2. 렙틴 바이오센서 제작(SPGE/DTSSP/anti-Leptin/Leptin/Biotinylated anti-leptin/스트렙타비딘-HRP/oPD)

[42] 본 발명에 따른 샌드위치 ELISA 기반 전기 화학 바이오센서의 개략도는 도 1a와 같다.

[43] 먼저, 바이오센서를 준비하기 전에 SPGE는 순수 에탄올에 보관되었다. 4°C 에서 밤새 불순물을 제거하고 질소가스 흐름으로 부드럽게 건조하였다. 그 후, 5 mM DTSSP 용액의 50 μL 액적을 전극(작업영역에만)에 적용하고, 2시간 동안 배양하였다. 항-렙틴 항체 용액 50 μL 액적($10\text{ }\mu\text{g/mL}$)을 1 시간 동안 전극 상에 포획 항체로서 적용하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위해, 차단 버퍼(1% BSA, 1% Triton X-100)를 전극에 1시간 동안 넣은 다음 차단 버퍼로 부드럽게 행구었다. 그 후, 항원 용액 (렙틴 용액 또는 마우스 혈장)의 50 μL 액적을 상기 전극 상에 적용하고 가습 챔버에서 4°C 에서 배양하였다. 또한, 비오틴이 결합된 항-렙틴 항체 용액($10\text{ }\mu\text{g/mL}$)의 50 μL 액적을 상기 전극 상 실온에서 1시간 동안 적용하였다. 스트렙타비딘-HRP 용액($0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$)을 상기 전극 상 실온에서 30분 동안 적용하였다.

[44] 렙틴 검출을 위한 ELISA 기반 전기 화학적 바이오센서 제작을 완료하기 위해,

oPD 용액의 50 μL 액적을 변형된 전극 상에 전자 매개체로서 배치한 후, 실온에서 30분 동안 배양하였다.

[45] 실시예 3. 전기화학적 검출

[46] 1. 전기화학적 검출방법

[47] 실시예 1에서 제작한 바이오센서를 이용하여 2가지 전기화학적 검출을 수행하였다; 순환전압전류법(cyclic voltammetry; CV) 및 사각파전압전류법(square-wave voltammetry; SWV).

[48] CV 동안, 순환전압전류도는 100 mV/s의 스캔 속도로 -0.5V ~ 0.7V 범위의 전위에서 기록되었다. SWV의 경우 15 Hz의 주파수 및 0.025V의 진폭으로 -0.8V ~ 0.0V 범위의 전위에서 구형파전압전류도가 기록되었다. 모든 실험은 실온에서 3회 수행되고 분석되었다.

[49] 2. 안정성

[50] 본 발명에 따른 바이오센서의 안정성과 장기 보관 능력을 분석하였다. 먼저, 다양한 스캔 속도에서 CV에 의한 어떤 개질도 하지 않은 스크린 프린트된 금 전극(나전극)의 안정성을 평가하였다. 5 mM 칼륨 페리시안화물(III) 용액을 포함한 0.1M KCl 용액을 이용하여 10 ~ 300 mV/s의 스캔 속도로 적용하였다. 도 3a와 같이 음극 및 양극 피크 전류의 절대값은 스캔 속도의 제곱근과 선형 상관관계를 나타내었다. 이때, 상관 계수는 0.992 및 0.993이었다(도 3b). 이러한 결과는 SPGE 표면의 전기 화학적 반응은 확산 제어 과정임을 확인한 것이다.

[51] 또한, 본 발명에 따른 바이오센서의 보관 후 장기 보관 능력을 분석을 위해, 4°C에서 최대 18일 동안 차단 버퍼(1X PBS 용액에 0.1% Triton X-100 포함 1% BSA) 하에서 유지시킨 후, 분석하였다. 도 3c와 같이, 18일 후 바이오센서의 전기화학적 반응은 첫날 측정된 최초 반응 대비 80.29% 유지되는 것을 확인하였다.

[52] 3. 민감도

[53] 본 발명에 따른 바이오센서의 민감도를 분석하기 위해, 렙틴 정량 검출을 렙틴 용액(0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10 및 20 ng/ml)에 대한 SWV 측정에 의해 평가하였다. 렙틴 용액은 렙틴 항체와 특이적 결합 친화력을 갖는 마우스 렙틴 재조합 단백질로 준비하였다. 도 4a에서는 다양한 농도의 렙틴 용액(0.1 ~ 20 ng/mL)에 대한 바이오센서의 사각파 전압전류법(SWV) 반응 곡선을 나타낸 것이고, 도 4b에서는 SWV 피크 전류와 렙틴 농도 대수 간의 강력한 선형 관계를 표시하는 교정 플롯($R^2 = 0.9867$)을 나타낸 것이다.

[54] 본 발명에 따른 바이오센서의 검출 한계(LOD)는 3σ 규칙에 따라 0.033 ng/mL로 결정되었고, 선형성과 낮은 LOD는 본 발명에 따른 샌드위치 ELISA 기반 전기 화학적 바이오센서는 정확하고 높은 감도로 포유류의 생리학적 범위에 걸친 렙틴 농도를 정량화 할 수 있음을 의미한다.

[55] 4. 선택성

[56] 본 발명에 따른 바이오센서의 선택성과, 혈장과 같은 체액 혼합물에서 렙틴과

같은 특이적 바이오마커를 식별할 수 있는 능력을 검토하였다. 하기 표 1에서 렙틴과 인슐린, 글루코스 및 요소가 혼합된 샘플에서 렙틴 회수율을 나타내었고, 본 발명에 따른 바이오센서를 이용할 경우 거의 100%에 가까운 렙틴 회수율을 나타내었다.

[57] [표1]

Sample(ng/mL)	Added(ng/mL)	Found(ng/mL)	Recovery(%)
Leptin	5.0(Leptin)	4.69±0.36	93.8
Leptin+Insulin	5.0(Leptin)+5.0(Insulin)	5.40±0.34	108
Leptin+Glucose	5.0(Leptin)+5.0(Glucose)	4.96±0.55	99.2
Leptin+Urea	5.0(Leptin)+5.0(Urea)	4.71±0.76	94.2
Leptin+Insulin+Glucose	5.0(Leptin)+5.0(Insulin)+5.0(Glucose)	5.51±0.61	110

[58] 5. 효율성

[59] 본 발명에 따른 바이오센서 관련, ND 및 HFD 마우스 두 그룹의 비회석 혈액 내 렙틴 수준을 구별하는 유효성을 검토하였다. 하기 표 2에서 본 발명에 따른 바이오센서를 이용한 ND 마우스 그룹(3.08-5.86 ng/mL) 및 HFD 마우스 그룹(11.58-18.58 ng/mL)의 렙틴 농도를 요약하였다.

[60] 또, 본 발명에 따른 바이오센서와 상용 ELISA 키트를 이용한 마이크로 플레이트 리더를 각각 이용하여 렙틴 수준을 비교한 결과, 표 2와 같이 본 발명에 따른 바이오센서와 상용 ELISA 키트 간의 정량 차이는 10% 미만으로 확인되었다.

[61] [표2]

Samples (plasma)	Commercial Leptin ELISA Kit(Absorbance) (ng/mL)	Sandwich ELISA-Based Leptin Biosensor* (ng/mL)	Difference(%)
ND S1	04.25	04.64±0.26	8.40
ND S2	05.27	05.02±0.37	4.98
ND S3	03.21	03.08±0.49	4.22
ND S4	03.11	03.42±0.22	9.06
ND S5	06.18	05.86±0.39	5.46
HFD S1	12.69	11.58±0.41	9.59
HFD S2	17.25	18.58±0.55	7.16
HFD S3	15.58	15.02±0.49	3.73
HFD S4	11.08	12.20±0.71	9.18
HFD S5	16.93	15.82±0.65	7.02

[62] 이러한 결과를 종합하면, 본 발명에 따른 바이오센서는 상용 ELISA 측정과 비교하여 높은 안정성, 민감도, 선택성 및 효과성을 나타내므로, 의료기관 및 POCT(point-of-care testing) 수준에서 활용되어, 비만과 비만 매개 질환의 척도를 손쉽게 확인할 수 있는 의료기기로 활용될 수 있을 것이다.

[63] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 스크린 프린트 된 금 전극(screen-printed gold electrode; SPGE) 상에 o-페닐렌디아민(o-Penylenediamine, oPD)을 전자 매개체로서 적용한 것을 특징을 하는, 샌드위치 효소면역측정법 기반 랩틴 바이오센서.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 바이오센서는,
 a) 스크린 프린트 된 금 전극(screen-printed gold electrode; SPGE);
 b) 상기 전극 상에 형성된 3,3'-디티오비스(설포숙신이미딜 프로피오네이트)(DTSSP);
 c) 상기 DTSSP와 결합하며, 랩틴을 포획하는 항-랩틴 포획 항체;
 d) 랩틴;
 e) 상기 랩틴을 검출하는, 비오틴이 결합된 항-랩틴 검출 항체; 및
 f) 상기 항-랩틴 검출 항체에 결합된 스트렙타비딘-호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)를 포함하며, o-페닐렌디아민(o-Penylenediamine, oPD)을 전자 매개체로서 적용한 것을 특징을 하는, 샌드위치 효소면역측정법 기반 랩틴 바이오센서.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 바이오센서는, 랩틴 검출을 통해 비만 또는 비만 매개 질환을 진단하는 것을 특징으로 하는, 샌드위치 효소면역측정법 기반 랩틴 바이오센서.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 비만 매개 질환은, 고혈압 또는 심혈관계 질환에서 선택된 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는, 샌드위치 효소면역측정법 기반 랩틴 바이오센서.
- [청구항 5] 제1항 또는 제2항에 따른 바이오센서를 포함하는 비만 또는 비만 매개 질환 진단용 키트.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 비만 매개 질환은, 고혈압 또는 심혈관계 질환에서 선택된 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 키트.
- [청구항 7] 인체로부터 분리된 샘플을 제1항 또는 제2항에 따른 바이오센서에 처리하는 단계를 포함하는, 랩틴 검출방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 샘플은 혈액, 혈장, 소변, 타액, 조직 및 뇌척수액으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 검출방법.
- [청구항 9] 인체로부터 분리된 샘플을 제1항 또는 제2항에 따른 바이오센서에 처리하는 단계를 포함하는, 비만 또는 비만 매개 질환 진단방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 비만 매개 질환은, 고혈압 또는 심혈관계 질환에서 선택된 하나 이상의 질환인 것을 특징을 하는 진단방법.
- [청구항 11] a) 스크린 프린트 된 금 전극(screen-printed gold electrode; SPGE) 상에

3,3'-디티오비스(설포숙신이미딜 프로피오네이트)(DTSSP)를 형성하는 단계;

b) 상기 DTSSP와 결합하며, 렙틴을 포획하는 항-렙틴 포획 항체를 첨가하고 반응시키는 단계;

c) 상기 반응시킨 반응물에 렙틴을 포함한 분석 대상 물질을 첨가하는 단계;

d) 비오틴이 결합된 항-렙틴 검출 항체를 첨가하여 상기 렙틴을 검출하는 단계;

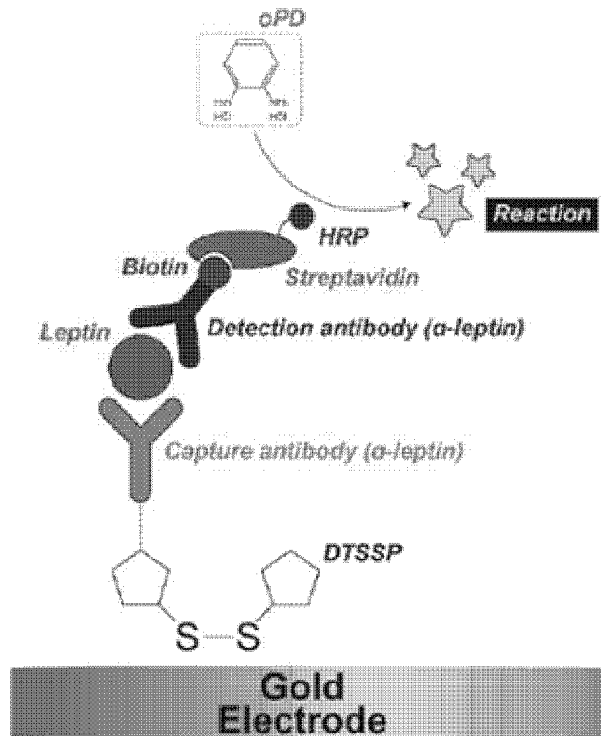
e) 스트렙타비딘-호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)를 첨가하여 상기 항-렙틴 검출 항체를 검출하는 단계; 및

f) HRP 기질로서 o-페닐렌디아민(o-Penylenediamine, oPD)을 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는, 샌드위치 효소면역측정법 기반 렙틴 바이오센서 제조방법.

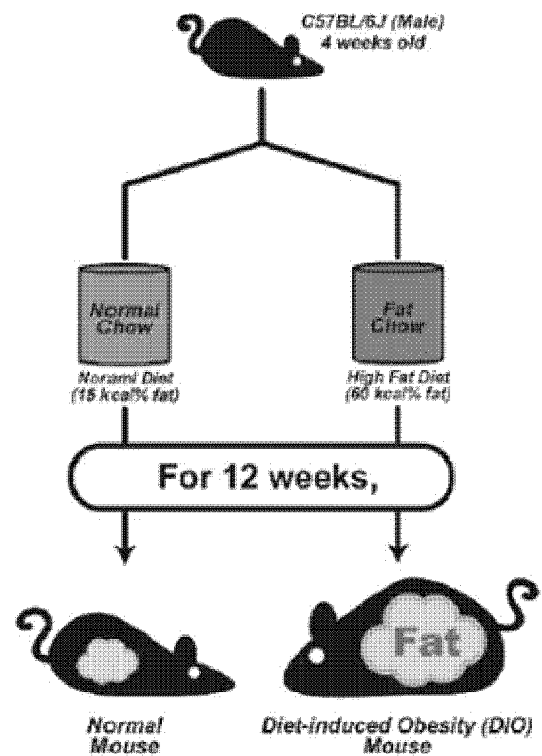
[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 a) 단계 이전에 스크린 프린트 된 금 전극(screen-printed gold electrode; SPGE)을 세척하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

[도1]

(a)

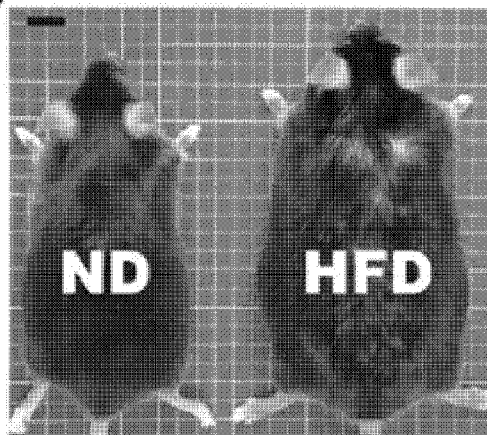


(b)

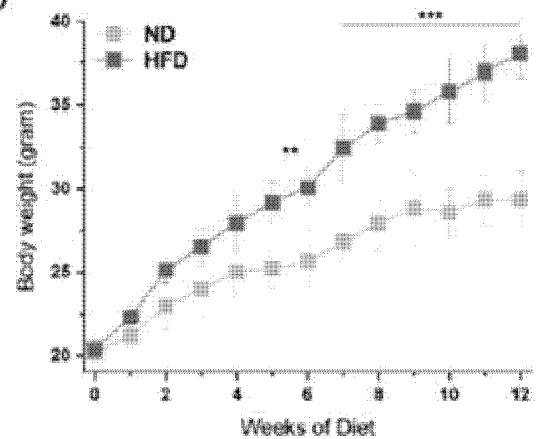


[도2]

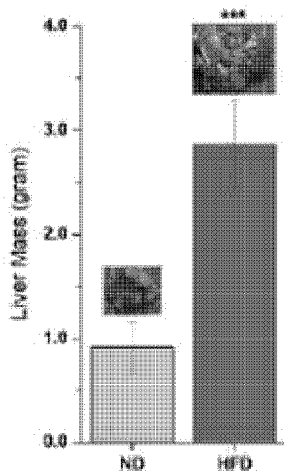
(a)



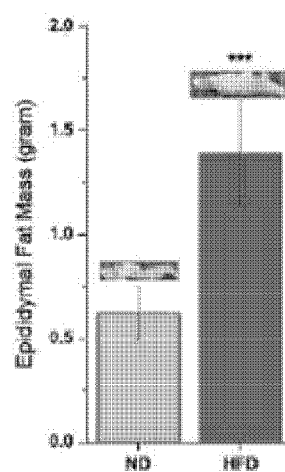
(b)



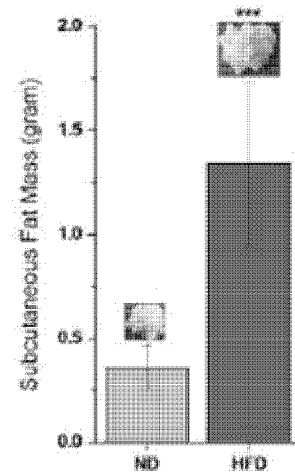
(c)



(d)

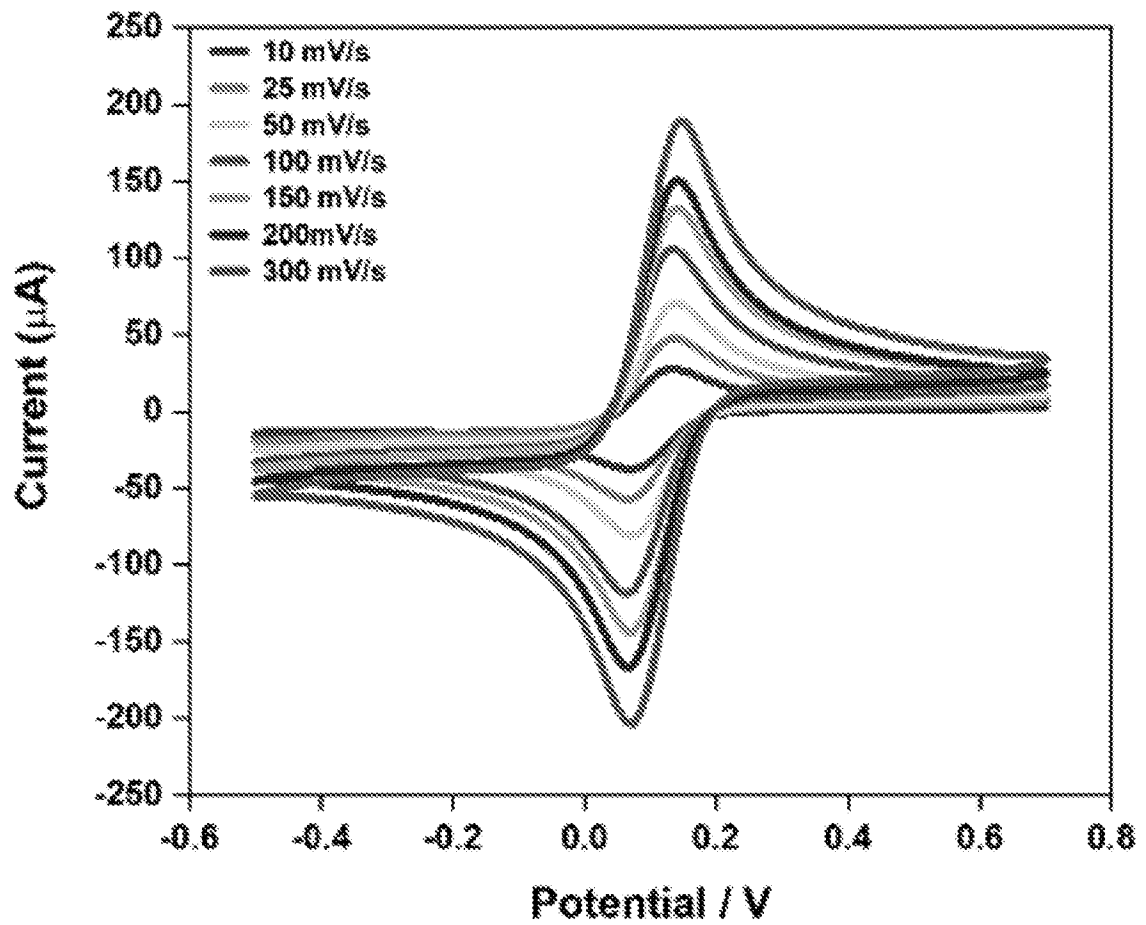


(e)



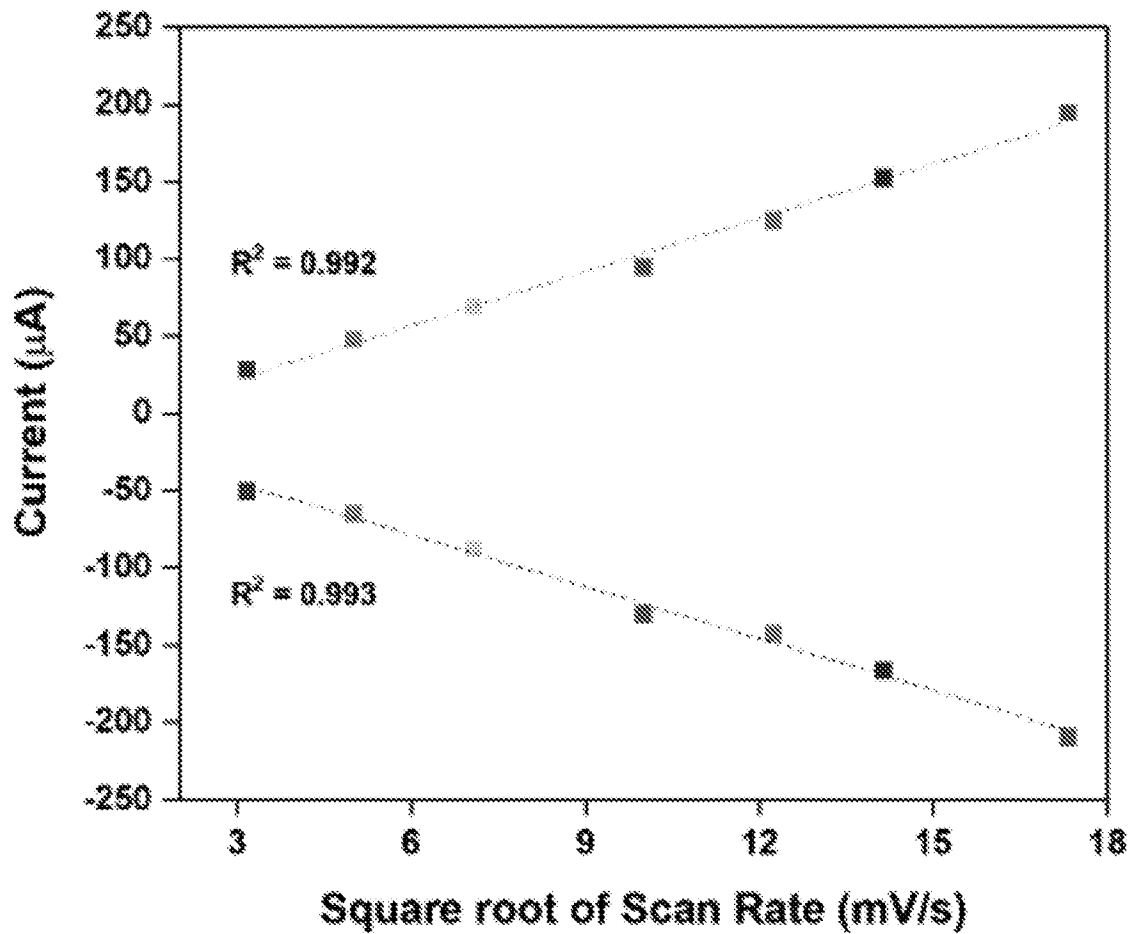
[도 3a]

(a)



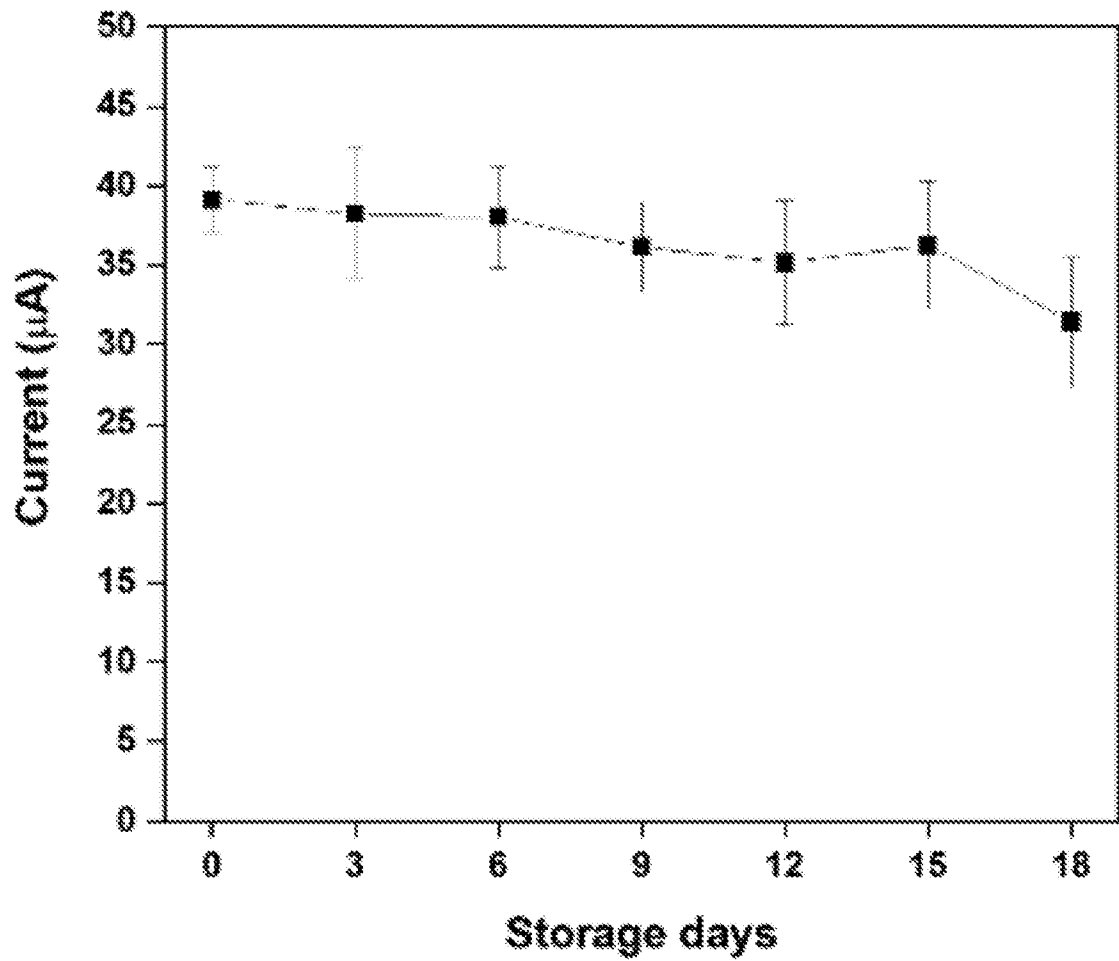
[도 3b]

(b)

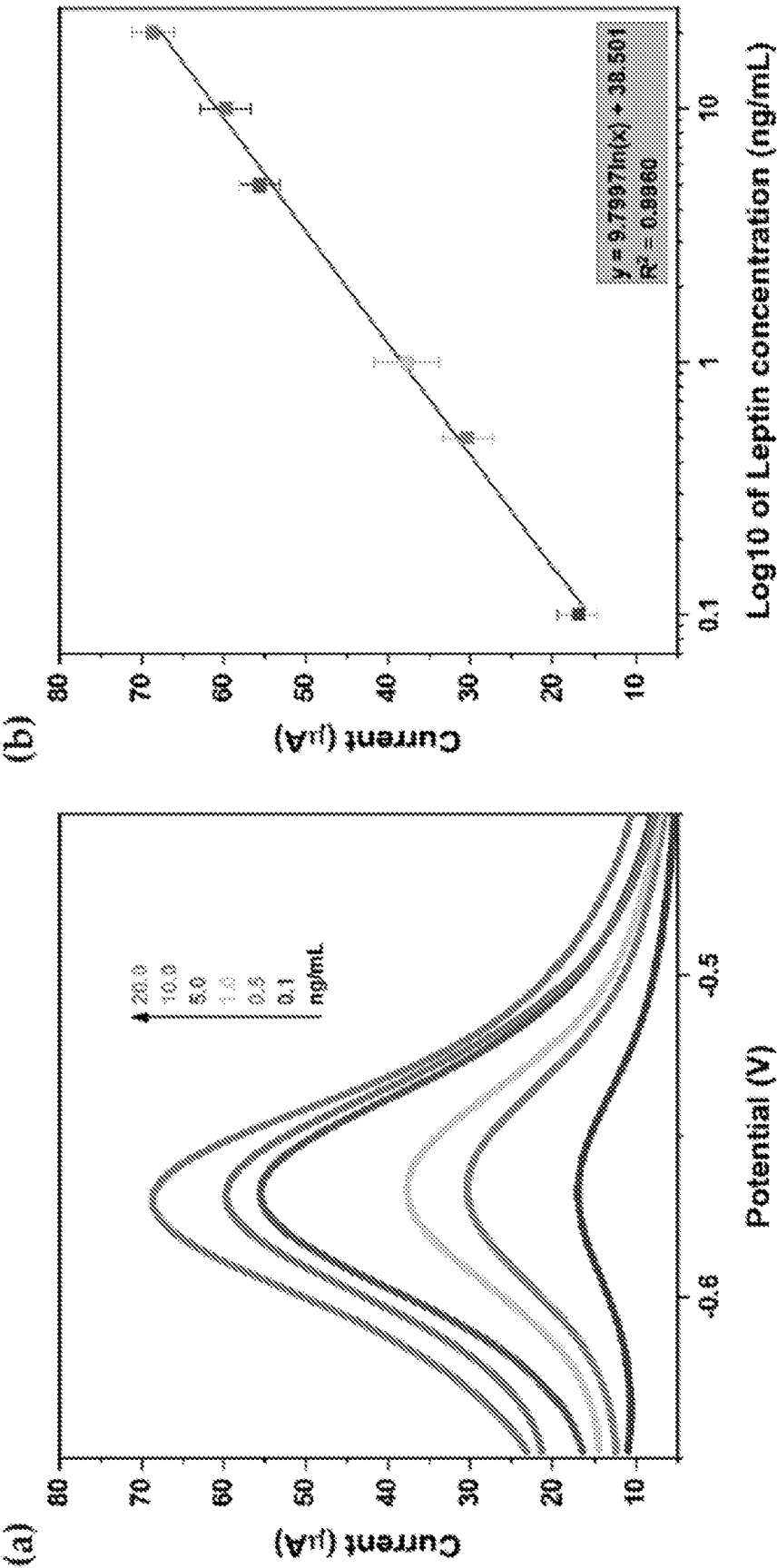


[도 3c]

(c)



[도 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/019558

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/74(2006.01)i; G01N 33/535(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/68(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 33/74(2006.01); G01N 21/76(2006.01); G01N 33/68(2006.01) 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: 렙틴 바이오센서(leptin biosensor), 샌드위치 효소면역측정법(sandwich ELISA), 스크린 프린트된 금 전극(screen-printed gold electrode), o-페닐렌디아민(o-phenylenediamine), 3,3'-디티오비스(셀포숙신 이미딜 프로피오네이트)(DTSSP), 비만 관련 질환 진단(obesity-associated disease diagnosis)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUNG, Ryong et al. Sandwich ELISA-based electrochemical biosensor for leptin in control and diet-induced obesity mouse model. Biosensors. 2021 (online publication date: 24 December 2020), vol. 11, no. 7, pp. 1-9. See abstract; pages 1-3; and scheme 1.	1-12
A	HERRASTI, Zorione et al. Developing enhanced magnetoimmunosensors based on low-cost screen-printed electrode devices. Reviews in Analytical Chemistry. 2016, vol. 35, no. 2, pp. 53-85. See entire document.	1-12
A	SEKIGUCHI, Satoshi et al. Chemiluminescent enzyme immunoassay for measuring leptin. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2011, vol. 75, no. 4, pp. 752-756. See entire document.	1-12
A	ESCAMILLA-GOMEZ, Vanessa et al. Gold screen-printed-based impedimetric immunobiosensors for direct and sensitive Escherichia coli quantisation. Biosensors and Bioelectronics. 2009, vol. 24, pp. 3365-3371. See entire document.	1-12
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 28 March 2022		Date of mailing of the international search report 28 March 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/019558**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAMAL EDDIN, Faten Bashar et al. Recent advances in electrochemical and optical sensing of dopamine. Sensors. 14 February 2020, vol. 20, Article No. 1039, pp. 1-47. See entire document.	1-12
A	US 2020-0217801 A1 (UNIVERSITI BRUNEI DARUSSALAM) 09 July 2020 (2020-07-09) See entire document.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/019558

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	2020-0217801	A1	09 July 2020	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/74(2006.01)i; G01N 33/535(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/74(2006.01); G01N 21/76(2006.01); G01N 33/68(2006.01) 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: 렙틴 바이오센서(leptin biosensor), 샌드위치 효소면역측정법(sandwich ELISA), 스크린 프린트된 금 전극(screen-printed gold electrode), o-페닐렌디아민(o-phenylenediamine), 3,3'-디티오비스(설펀숙신이미딜 프로피오네이트)(DTSSP), 비만 관련 질환 진단(obesity-associated disease diagnosis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SUNG, RYONG 등, "Sandwich ELISA-based electrochemical biosensor for leptin in control and diet-induced obesity mouse model", Biosensors, 2021(온라인 공개일: 2020.12.24), 11권, 7호, 페이지 1-9 요약, 페이지 1-3; 및 scheme 1 참조.	1-12
A	HERRASTI, ZORIONE 등, "Developing enhanced magnetoimmunosensors based on low-cost screen-printed electrode devices", Reviews in Analytical Chemistry, 2016, 35권, 2호, 페이지 53-85 전체 문헌 참조.	1-12
A	SEKIGUCHI, SATOSHI 등, "Chemiluminescent enzyme immunoassay for measuring leptin", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2011, 75권, 4호, 페이지 752-756 전체 문헌 참조.	1-12
A	ESCAMILLA-GOMEZ, VANESSA 등, "Gold screen-printed-based impedimetric immunobiosensors for direct and sensitive Escherichia coli quantisation", Biosensors and Bioelectronics, 2009, 24권, 페이지 3365-3371 전체 문헌 참조.	1-12
A	KAMAL EDDIN, FATEN BASHAR 등, "Recent advances in electrochemical and optical sensing of dopamine", Sensors, 2020.02.14, 20권, Article No.1039, 페이지 1-47 전체 문헌 참조.	1-12
☒ 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 이후에 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 2022년03월28일(28.03.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년03월28일(28.03.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2020-0217801 A1 (UNIVERSITI BRUNEI DARUSSALAM) 2020.07.09 전체 문헌 참조.	1-12

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2020-0217801 A1	2020/07/09	없음	