



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0039582
(43) 공개일자 2024년03월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/552 (2014.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
B82Y 15/00 (2017.01) B82Y 40/00 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 21/554 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2023-0084546
(22) 출원일자 2023년06월29일
심사청구일자 2023년06월29일
- (30) 우선권주장
1020220118099 2022년09월19일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
심상준
서울특별시 영등포구 의사당대로 127, 102동 1401호
송소진
서울특별시 서초구 현릉로8길 58, 103동 603호
이중욱
서울특별시 구로구 경인로67길 33, 101동 1102호
- (74) 대리인
정은열, 김태훈

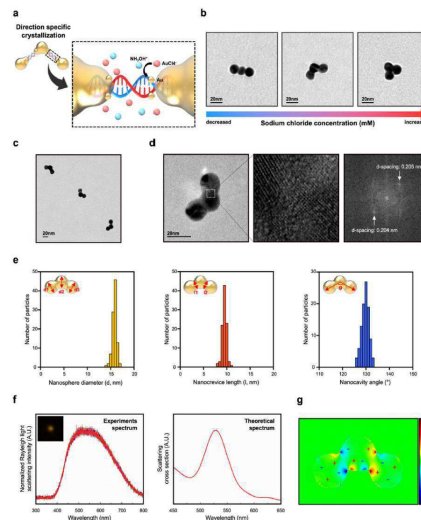
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 생체분자를 기반으로 하는 곡면 금속 나노구조 및 이를 이용한 나노 플라즈모닉 바이오센서

(57) 요약

본 발명은 생체분자를 기반으로 하는 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 및 이를 이용한 나노 플라즈모닉 바이오센서에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

B82Y 15/00 (2013.01)

B82Y 40/00 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711166836
과제번호	2019R1A2C3009821
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	생물분자 유도 비대칭성 나노입자 합성을 이용한 광학기반 정밀의료용 난치성 질환
액체생검 바이오 플랫폼 개발	
기 여 율	1/3
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

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

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 구조를 가지는 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조:

제1 금속 나노입자, 제2 금속 나노입자 및 제3 금속 나노입자를 포함하고,

상기 제2 금속 나노입자의 중점으로부터 상기 제1 금속 나노입자의 중점을 잇는 가상의 제1 직선과, 상기 제2 금속 나노입자의 중점으로부터 상기 제2 금속 나노입자의 중점을 잇는 가상의 제2 직선 사이의 사잇각이 125 내지 135도가 되도록 배열되어, 상기 제1 금속 나노입자, 상기 제2 금속 나노입자 및 상기 제3 금속 나노입자에 의해 둘러싸이는 나노캐비티가 형성되며,

제1 금속 나노입자와 제2 금속 나노입자 사이, 및 제2 금속 나노입자와 제3 금속 나노입자 사이에 나노미터 크기로 이격되어 형성된 나노갭이 구비됨.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 나노갭의 직경은 8 내지 10nm인 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 금속 나노입자의 직경은 13 내지 20nm인 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제2 금속 나노입자는 나노입자 양 쪽에 단일가닥 DNA가 접합되고, 상기 제1 및 제3 금속 나노입자는 상기 제2 나노입자에 접합된 단일가닥 DNA에 상보적인 단일가닥 DNA가 접합된 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 나노구조는 바이오센서용인 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 금속은 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu), 백금(Pt) 및 팔라듐(Pd)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조.

청구항 7

기관;

상기 기관에 고정된, 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브가 접합된 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조; 및,

상기 곡면 플라즈모닉 나노구조에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 표적 바이오마커는 DNA, miRNA, 펩타이드 및 단백질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 miRNA는 엑소좀 유래인 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 miRNA는 exo-miR125b, exo-miR135a, exo-miR15a, exo-miR20a 또는 이들의 조합인 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 바이오센서는 엑소좀 유래 miRNA와 단백질의 특이적 결합으로 발생하는 레일리 산란 스펙트럼의 변화를 측정하여 엑소좀 유래 miRNA 및 단백질을 검출하는 것을 특징으로 하는 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 바이오센서는 exo-miR125b, exo-miR135a, exo-miR15a 또는 exo-miR20a가 단일 점 돌연변이를 가질 때 레일리 산란 스펙트럼 변화가 없는 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 단백질은 아밀로이드 β (A β)인 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 아밀로이드 β 는 아밀로이드 β 40 및 아밀로이드 β 42로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서.

청구항 15

제7항에 있어서,

상기 바이오센서는 신경 퇴행성 질환 진단용인 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머 치매, 또는 경도 인지장애(mild cognitive impairment)인 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서.

청구항 17

제7항에 있어서,

상기 포획 프로브는 DNA, LNA 또는 항체를 포함하는 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서.

청구항 18

제7항 내지 제17항 중 어느 한 항의 바이오센서에 신경 퇴행성 질환 유래 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계를 포함하는, 신경 퇴행성 질환 유래 엑소좀 miRNA 및 단백질의 검출 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 바이오마커 혼합물은 혈액 또는 응집소가 제거된 혈청인 것인, 신경 퇴행성 질환 유래 엑소좀 miRNA 및 단백질의 검출 방법.

청구항 20

제18항에 있어서,

상기 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머 치매 또는 경도 인지 장애인 것인, 신경 퇴행성 질환 유래 엑소좀 miRNA 및 단백질의 검출 방법.

청구항 21

제18항에 있어서,

상기 엑소좀 miRNA는 exo-miR125b, exo-miR135a, exo-miR15a 및 exo-miR20a로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것인, 신경 퇴행성 질환 유래 엑소좀 miRNA 및 단백질의 검출 방법.

청구항 22

제18항에 있어서,

상기 단백질은 아밀로이드 β 인 것인, 신경 퇴행성 질환 유래 엑소좀 miRNA 및 단백질의 검출 방법.

청구항 23

제7항 내지 제17항 중 어느 한 항의 바이오센서에 신경 퇴행성 질환 유래 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계;
및

엑소좀 유래 miRNA 또는 단백질 검출 프로브를 처리하는 단계를 포함하는, 신경 퇴행성 질환 진단 방법.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 검출 프로브는 DNA 또는 LNA를 포함하는 것인, 신경 퇴행성 질환 진단 방법.

청구항 25

제7항 내지 제17항 중 어느 한 항의 바이오센서에 신경 퇴행성 질환 유래 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계;
및

엑소좀 유래 miRNA 또는 단백질 검출 프로브를 처리하는 단계를 포함하는, 신경 퇴행성 질환 구별 방법.

청구항 26

제25항에 있어서,

알츠하이머 치매와 경도 인지 장애를 구분하는 것인, 신경 퇴행성 질환 구별 방법.

청구항 27

(a) 금속나노입자를 1단일가닥 DNA와 함께 배양하는 단계;

(b) 상기 1단일가닥 DNA가 접합된 1단일가닥-금속나노입자를 분리하는 단계;

(c) 1단일가닥 DNA-금속나노입자의 DNA 서열과 상보적인 서열을 가지는 2단일가닥DNA-금속나노입자를 2:1로 혼성화한 후 혼성화된 금속시드를 분리하는 단계;

(d) 상기 금속시드를 코팅하는 단계;

(e) 상기 코팅된 금속시드를 염화나트륨 하에서 금속 전구체 및 환원제를 처리하여 결정화하는 단계;를 포함하는,

곡면 플라즈모닉 나노구조의 제조방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 염화나트륨은 50 내지 100mM의 농도로 처리되는 것인, 제조방법.

청구항 29

제27항에 있어서,

상기 제조된 나노구조는 염화나트륨 처리로,

2단일가닥-DNA가 이와 상보적인 서열을 가지는 1단일가닥-DNA와 각각 결합하여 3개의 금속나노입자를 포함하고,

각 금속나노입자 사이에 나노미터 크기로 이격되어 형성된 나노갭을 포함하고,

3개의 각 금속 나노입자의 중점을 잇는 가상의 직선 사이의 사잇각이 125 내지 135도가 되도록 배열되어 상기 3개의 금속 나노입자에 의해 둘러싸이는 나노캐비티를 포함하는 것이 특징인, 제조방법.

청구항 30

(a) 금속나노입자를 1단일가닥 DNA와 함께 배양하는 단계;

(b) 상기 1단일가닥 DNA가 접합된 1단일가닥-금속나노입자를 분리하는 단계;

(c) 1단일가닥 DNA-금속나노입자의 DNA 서열과 상보적인 서열을 가지는 2단일가닥DNA-금속나노입자를 2:1로 혼성화한 후 혼성화된 금속시드를 분리하는 단계;

(d) 상기 금속시드를 코팅하는 단계;

(e) 상기 코팅된 금속시드를 염화나트륨 하에서 금속 전구체 및 환원제를 처리하여 결정화함으로써 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조를 수득하는 단계;

(f) 상기 곡면 플라즈모닉 나노구조를 기판에 고정시키는 단계; 및

(g) 분리된 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브를 곡면 플라즈모닉 나노구조에 접합하는 단계;를 포함하는,

곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서의 제조방법.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 코팅은 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 하는 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서의 제조방법.

청구항 32

제30항에 있어서,

상기 (d) 단계 전에 (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTES) 또는 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES)로 기판을 코팅하는 단계를 더 포함하는 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서의 제조방법.

청구항 33

제30항에 있어서,

상기 결정화는 pH 5에서 수행하는 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서의 제조방법.

청구항 34

제30항에 있어서,

상기 바이오센서는 신경 퇴행성 질환 진단용인 것인, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체분자를 기반으로 하는 곡면 금속 나노구조 및 이를 이용한 나노 플라즈모닉 바이오센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 통계에 따르면 전 세계적으로 약 5천만 명이 치매로 고통받고 있으며 이 수치는 20년마다 2배로 증가하여 2050년에는 약 1억 5천 2백만 건에 이를 것으로 예상된다. 그 중, 알츠하이머 병(Alzheimer's Disease, AD)은 노인들에게 가장 흔한 신경 퇴행성 질환으로, 점진적인 인지 및 기능 저하로 특징되며 그 주요 증상은 기억 상실과 새로운 기억을 만들 수 없다는 것이다. 특히, 알츠하이머 병은 일정 수준 이상으로 질환이 진행될 경우 병세 진행속도를 늦출 수만 있을 뿐 회복이 불가능한 질환이라 조기진단 및 병세판단이 매우 중요한 질환이다.

[0004] 지금까지 알츠하이머병은 아밀로이드 캐스케이드, 타우인산화, 신경전달물질, 흥분독성이나 산화 스트레스 등 다양한 복잡한 병리학적 및 생리학적 조건에 의해 유발된다고 보고되고 있다. 이에 따라, 알츠하이머병은 발병이나 진행을 예방하는 것이 매우 어려워, 현재는 진행을 늦추고 인지 저하를 개선하기 위한 조기 진단 및 치료로 초점이 옮겨졌다.

[0005] 알츠하이머병(AD)은 β -아밀로이드($A\beta$) 펩타이드의 대뇌 축적이나 타우의 신경원섬유 엉킴(NFT)이 주요 병리적 특징이며, 그것의 발병 중에 뉴런 및 시냅스의 독성 및 파괴로 이어지는 신경퇴행 메커니즘과 밀접하게 관련된다.

[0006] 현재까지의 진단법으로는 뇌 영상촬영, 인지기능검사, 뇌척수액을 통한 검사법 등이 존재하나, 이 방법들은 알츠하이머 질환의 증상이 상당 부분 발현된 후에 적용하는 것이 가능하기 때문에 조기진단에는 역부족한 실정이다. 또한, 경제적으로도 많은 진단 비용을 필요로 하며, 침습적 절차로 인해 잠재적 위험이 있는 등, 이러한 바이오마커의 테스트가 항상 실행 가능한 것이 아니라는 점에서 한계가 있다.

[0007] 반면, 혈액 기반 진단은 비침습적이고 저렴하며 대규모에서도 다중 샘플링이 가능하기 때문에 이러한 단점을 극복하는 데 도움이 될 수 있다. 이에 따라, 최근 많은 연구에서 혈액 기반 알츠하이머병 바이오마커와 뇌의 병리학적 변화 사이의 상관관계를 조사하였다. 그러나 이러한 노력에도 불구하고 알츠하이머병의 발병과 진행을 직접적으로 반영할 수 있는 혈액 기반 알츠하이머병 바이오마커 기반의 검사 방법은 여전히 부족한 실정이다.

[0009] 한편, 엑소좀은 중추신경계(CNS)를 비롯한 다양한 유형의 세포에서 방출되는 30~100nm 크기 범위의 작은 소포로서, 이들은 병원성 단백질의 확산과 뇌에서 $A\beta$, 타우 및 프리온과 같은 단백질의 응집에 역할을 한다고 보고된다. 또한, 신경 기능과 관련된 다양한 유전 물질(DNA, miRNA, 단백질 등)을 운반하면서 혈액뇌장벽(BBB)을 통과할 수 있기 때문에, 뇌의 상태에 대한 정보를 보다 쉽게 얻을 수 있다. 특히, 엑소좀 miRNA(exo-miRs)는 성숙한 뉴런의 뉴런 분화, 발달, 기능 등 중추신경계의 다양한 기본 과정에 참여하기 때문에, 질병 진행에 따른 알츠하이머병의 다양한 특성에 대한 정확한 정보를 제공할 수 있다. 따라서, exo-miR가 AD에 대한 새로운 진단 및 치료 바이오마커로 강조되고 있다. 그러나, 혈액 기반 바이오마커의 농도는 뇌척수액에서 발견되는 농도보다 10~100배 낮고, 혈액에는 다른 많은 방해 물질도 포함되어 있어, 이러한 바이오마커를 검출하기 위해 정확하고 신뢰할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

[0010] 나아가, 최근 정량적 역전사 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)과 마이크로어레이 기술을 이용하여 exo-miR을 검출하는데, 이러한 기술은 주로 형광을 기반으로 하기 때문에, 형광 염료와 관련된 문제(예컨대, 광표백 및 깜박임 등)로 검출 신뢰성과 감도를 감소시키는 한계가 있다. 또한, miRNA의 특성(예컨대, 체액의 짧은 길이, 높은 상동성, 낮은 발현 수준 등)으로 인해 정확한 분석을 얻기가 쉽지 않다는 한계도 있다.

[0012] 최근, 플라즈몬 단일 나노입자(NP) 기반 센서가 입사광과 상호 작용하여 국부적 표면 플라즈몬 공명(LSPR)을 생성하는 능력으로 이러한 한계를 극복하기 위한 대안으로 관심이 증가되고 있다. 이 물리적 현상은 NP 주변의 굴절률(RI) 변화를 흡수하고 산란 스펙트럼의 플라즈몬 밴드의 이동으로 변환하는 것으로 표현됨으로써 단일 NP가 작은 크기에 대해서도 초민감성을 허용하게끔 한다. 또한, LSPR 현상은 나노입자의 모양, 크기, 국소적 RI, 배열에 크게 의존하기 때문에 나노입자 기반 LSPR 바이오센서의 감도는 이러한 요인을 조정하여 쉽게 개선할 수 있다. 이러한 트렌드를 반영하듯, 최근 여러 연구에서 miRNA 검출을 위한 LSPR 기반 센서를 도입하였다. 그러나, 여전히 exo-miR의 불충분한 검출 감도와 낮은 재현성 및 선택성으로 인하여 여전히 임상 응용 분야에서 사용이 제한되어, 이를 극복하기 위한 연구가 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명은 곡면 형태를 띤 플라즈몬 금속 나노구조 기반 바이오센서와 이를 활용한 분리된 혈청에서 알츠하이머병 또는 경도 인지 장애의 exo-miR 또는 엑소좀 유래 아밀로이드 베타 40 및 아밀로이드 베타 42 바이오마커를 정확하게 그리고 동시에 매우 낮은 검출한계에서도 검출할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명을 구현하는 하나의 양태는 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조이다.

[0017] 하나의 구체예에서, 상기 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조는 하기의 구조를 가지는 것을 특징으로 한다: 제1 금속 나노입자, 제2 금속 나노입자 및 제3 금속 나노입자를 포함하고, 상기 제2 금속 나노입자의 중점으로부터 상기 제1 금속 나노입자의 중점을 잇는 가상의 제1 직선과, 상기 제2 금속 나노입자의 중점으로부터 상기 제2 금속 나노입자의 중점을 잇는 가상의 제2 직선 사이의 사잇각이 125 내지 135도가 되도록 배열되어, 상기 제1 금속 나노입자, 상기 제2 금속 나노입자 및 상기 제3 금속 나노입자에 의해 둘러싸이는 나노캐비티가 형성되며, 제1 금속 나노입자와 제2 금속 나노입자 사이, 및 제2 금속 나노입자와 제3 금속 나노입자 사이에 나노미터 크기로 이격되어 형성된 나노갭이 구비됨.

[0018] 다른 하나의 구체예에서, 상기 나노갭의 직경은 8 내지 10nm인 것을 특징으로 한다.

[0019] 또 다른 구체예에서, 상기 금속 나노입자의 직경은 13 내지 20nm인 것을 특징으로 한다.

[0020] 또 다른 구체예에서, 상기 제2 금속 나노입자는 나노입자 양 쪽에 단일가닥 DNA가 접합되고, 상기 제1 및 제3 금속 나노입자는 상기 제2 나노입자에 접합된 단일가닥 DNA에 상보적인 단일가닥 DNA가 접합된 것을 특징으로 한다.

[0021] 또 다른 구체예에서, 상기 나노구조는 바이오센서용인 것을 특징으로 한다.

[0022] 또 다른 구체예에서, 상기 금속은 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu), 백금(Pt) 및 팔라듐(Pd)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

[0024] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 곡면 플라즈모닉 나노구조 기반 바이오센서이다.

[0025] 하나의 구체예에서, 상기 바이오센서는 기관; 상기 기관에 고정된, 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브가 접합된 곡면 플라즈모닉 나노구조; 및, 상기 곡면 플라즈모닉 나노구조에서의 국소 표면 플라즈몬

공명 현상을 측정하는 측정부를 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [0026] 다른 구체예로서, 상기 표적 바이오마커는 DNA, miRNA, 펩타이드 및 단백질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0027] 또 다른 구체예로서, 상기 miRNA는 엑소좀 유래인 것을 특징으로 한다.
- [0028] 또 다른 구체예로서, 상기 miRNA는 exo-miR125b, exo-miR135a, exo-miR15a, exo-miR20a 또는 이들의 조합인 것을 특징으로 한다.
- [0029] 또 다른 구체예로서, 상기 바이오센서는 엑소좀 유래 miRNA와 단백질의 특이적 결합으로 발생하는 레일리 산란 스펙트럼의 변화를 측정하여 엑소좀 유래 miRNA 및 단백질을 검출하는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 또 다른 구체예로서, 상기 바이오센서는 exo-miR125b, exo-miR135a, exo-miR15a 또는 exo-miR20a가 단일 점 돌연변이를 가질 때 레일리 산란 스펙트럼 변화가 없는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 또 다른 구체예로서, 상기 단백질은 아밀로이드 β (A β)인 것을 특징으로 한다.
- [0032] 또 다른 구체예로서, 상기 아밀로이드 β 는 아밀로이드 β (A β) 40 및 아밀로이드 베타 42로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0033] 또 다른 구체예로서, 상기 바이오센서는 신경 퇴행성 질환 진단용인 것을 특징으로 한다.
- [0034] 또 다른 구체예로서, 상기 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머 치매, 또는 경도 인지장애(mild cognitive impairment)인 것을 특징으로 한다.
- [0035] 또 다른 구체예로서, 상기 포획 프로브는 DNA, LNA 또는 항체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0037] 본 발명을 구현하는 다른 양태는 상기 바이오센서에 신경 퇴행성 질환 유래 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계를 포함하는, 신경 퇴행성 질환 유래 엑소좀 miRNA 및 단백질의 검출 방법이다.
- [0038] 하나의 구체예로서, 상기 바이오마커 혼합물은 혈청, 혈액 또는 응집소가 제거된 혈장인 것을 특징으로 한다.
- [0039] 또 다른 구체예로서, 상기 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머 치매 또는 경도 인지 장애인 것을 특징으로 한다.
- [0040] 또 다른 구체예로서, 상기 엑소좀 miRNA는 exo-miR125b, exo-miR135a, exo-miR15a 및 exo-miR20a로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0041] 또 다른 구체예로서, 상기 단백질은 아밀로이드 β (A β)인 것을 특징으로 한다.
- [0042] 또 다른 구체예로서, 상기 아밀로이드 β 는 아밀로이드 β (A β) 40 및 아밀로이드 베타 42로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0044] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 상기 바이오센서에 신경 퇴행성 질환 유래 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및 엑소좀 유래 miRNA 또는 단백질 검출 프로브를 처리하는 단계를 포함하는, 신경 퇴행성 질환 진단 방법이다.
- [0045] 하나의 구체예로서, 상기 검출 프로브는 DNA, LNA 또는 항체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0047] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 신경 퇴행성 질환 구분 방법이다.
- [0048] 하나의 구체예로서, 상기 바이오센서에 신경 퇴행성 질환 유래 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및 엑소좀 유래 miRNA 또는 단백질 검출 프로브를 처리하는 단계를 포함하는, 신경 퇴행성 질환 구분 방법인 것을 특징으로 한다.
- [0049] 다른 하나의 구체예로서, 상기 방법은 알츠하이머 치매와 경도 인지 장애를 구분하는 것을 특징으로 한다.
- [0051] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 곡면 플라즈모닉 나노구조의 제조방법이다.

- [0052] 하나의 구체예로서, (a) 금속나노입자를 1단일가닥 DNA와 함께 배양하는 단계; (b) 상기 1단일가닥 DNA가 접합된 1단일가닥-금속나노입자를 분리하는 단계; (c) 1단일가닥 DNA-금속나노입자의 DNA 서열과 상보적인 서열을 가지는 2단일가닥DNA-금속나노입자를 2:1로 혼성화한 후 혼성화된 금속시드를 분리하는 단계; (d) 상기 금속시드를 코팅하는 단계; (e) 상기 코팅된 금속시드를 염화나트륨 하에서 금속 전구체 및 환원제를 처리하여 결정화하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0053] 다른 하나의 구체예로서, 상기 염화나트륨은 50 내지 100mM의 농도로 처리되는 것을 특징으로 한다.
- [0054] 또 다른 구체예로서, 상기 제조된 나노구조는 염화나트륨 처리로, 2단일가닥-DNA가 이와 상보적인 서열을 가지는 1단일가닥-DNA와 각각 결합하여 3개의 금속나노입자를 포함하고, 3개의 각 금속 나노입자의 중점을 잇는 가상의 직선 사이의 사잇각이 125 내지 135도가 되도록 배열되어 상기 3개의 금속 나노입자에 의해 둘러싸이는 나노캐비티를 포함하는 것이 특징으로 한다.
- [0056] 본 발명을 구현하는 또 다른 양태는 곡면 플라즈모닉 나노구조 기반 바이오센서 제조방법이다.
- [0057] 하나의 구체예에서, 상기 방법은 (a) 금속나노입자를 1단일가닥 DNA와 함께 배양하는 단계; (b) 상기 1단일가닥 DNA가 접합된 1단일가닥-금속나노입자를 분리하는 단계; (c) 1단일가닥 DNA-금속나노입자의 DNA 서열과 상보적인 서열을 가지는 2단일가닥DNA-금속나노입자를 2:1로 혼성화한 후 혼성화된 금속시드를 분리하는 단계; (d) 상기 금속시드를 코팅하는 단계; (e) 상기 코팅된 금속시드를 염화나트륨 하에서 금속 전구체 및 환원제를 처리하여 결정화함으로써 곡면 플라즈모닉 나노구조를 획득하는 단계; (f) 상기 곡면 플라즈모닉 나노구조를 기판에 고정시키는 단계; 및 (g) 분리된 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브를 곡면 플라즈모닉 나노구조에 접합하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0058] 다른 하나의 구체예에서, 상기 코팅은 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 하는 것을 특징으로 한다.
- [0059] 또 다른 하나의 구체예에서, 상기 (d) 단계 전에 (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTES) 또는 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES)로 기판을 코팅하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0060] 또 다른 하나의 구체예에서, 상기 결정화는 pH 5에서 수행하는 것을 특징으로 한다.
- [0061] 또 다른 하나의 구체예에서, 상기 바이오센서는 신경 퇴행성 질환 진단용인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0063] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 혈액 내에 존재하는 신경 퇴행성 질환의 발병 표지 인자, 예를 들어 엑소솜 유래 miRNA 및/또는 단백질을 높은 선택성, 고감도로 검출할 수 있으며, 따라서 miRNA 또는 단백질 관련 질병의 진단 및 임상적 적용에 효과적으로 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0065] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 향상된 광학적 특성을 가진 프로그래밍 가능한 곡면 플라즈몬 나노구조의 설계를 나타낸다. 구체적으로, a)는 Au 나노삼량체 간극(상단 패널 왼쪽; 180°, 상단 패널 중앙; 130° 및 상단 패널 오른쪽; 70°)과 Au 나노 아키텍처(하단 패널 왼쪽; 180°, 하단 패널 중앙; 130°, 및 하단 패널 오른쪽; 70°)의 간극을 나타내고, b)는 Au 나노트리머 갭(상단 패널 왼쪽; 180°, 상단 패널 중앙; 130° 및 상단 패널 오른쪽; 70°) 및 Au 나노아키텍처(하단 패널 왼쪽; 180°, 하단 패널 중앙; 130° 및 하단 패널 오른쪽; 70°)에 대한 굴절률 민감도 결과를 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 준비된 프로그래밍 가능한 곡면 플라즈몬 아키텍처 시드를 나타낸다. a)는 단일 가닥 DNA-접합 금 나노입자이고, b)는 겔 전기영동으로 혼성화 후 아키텍처 시드를 분리한 것을 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 프로그래밍 가능한 곡면 플라즈몬 나노구조의 합성 및 특성화를 확인한 도이다. 구체적으로, a)는 방향별 결정화 방법을 사용한 결정화 메커니즘을 보여주는 개략도이다. b)는 합성된 새로운 나노구조체의 NaCl 농도에 따른 EF-TEM 이미지이고, c)는 pH 5 및 NaCl 농도 75mM에서 합성된 프로그래밍 가능한 곡선형 플라즈몬 나노구조의 EF-TEM 이미지, d)는 DNA 방향별 결정화 기술로 합성된 프로그래밍 가능한

곡면 플라즈몬 나노구조의 EF-TEM 이미지 및 FFT 패턴이며, 여기에서 결정격자면의 간격은 $0.2045 \pm 0.0005 \text{ nm}$ 로 화살표로 나타내었다. e)는 이미지 J로 확인한 프로그래밍 가능한 곡선형 플라즈몬 나노아키텍처의 직경(왼쪽), 나노틈새 길이(가운데) 및 나노캐비티 각도(오른쪽)의 크기 분포로, 100개 나노아키텍처의 통계 결과를 나타낸 도이다. f)는 실험적으로 관찰하고(왼쪽, $n = 100$) 이론적으로 계산한(오른쪽) 프로그래밍 가능한 곡선형 플라즈몬 나노구조의 공명 레일리 광산란 스펙트럼이고, 삽입된 도면은 단일 나노 아키텍처의 암시야 이미지이다. g)는 529 nm에서 여기 시 프로그래밍 가능한 곡선형 플라즈몬 나노구조의 전하 밀도 분포를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 갭 스페이스를 갖는 곡면 입자의 성장 패턴으로 염화나트륨(NaCl)의 농도에 따른, a) 제타 전위와 b) 동적 광산란(DLS)을 나타낸 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 LSPR 시스템의 구성을 보여주는 개략도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 알츠하이머병 진단을 위한 프로그래밍 가능한 곡면 플라즈몬 나노아키텍처 기반 플라즈몬 바이오센서를 제작한 도이다. a)는 프로그래밍 가능한 곡면 나노구조 기반 광학 바이오센서를 이용한 표적 exomiR(exomiR-125b, exomiR-135a, exomiR-15a 및 exomiR-20a) 검출을 보여주는 개략도이고, b)는 바인딩 exomiR에 따른 개별 프로그램 가능 곡면 나노아키텍처의 대표적인 Rayleigh 광산란 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 센서 감도와 선택도를 검증한 도이다. LSPR 피크는 a) exomiR-125b, b) exomiR-135a, c) exomiR-15a 및 d) exomiR-20a의 농도가 $10^{-0.5}$ 에서 $10^{9.5}$ aM 범위인 다양한 농도의 검출에 반응하여 이동하는 것을 나타낸다. a) exomiR-125b, b) exomiR-135a, c) exomiR-15a 및 d) exomiR-20a와 $10^{0.5}$ 에서 $10^{8.5}$ aM 범위의 농도에서 LSPR 피크 이동 사이의 강한 선형성을 나타낸다. e) exomiR-125b, f) exomiR-135a, g) exomiR 15a 및 h) exomiR-20a는 유형 A(3' 말단 돌연변이), 유형 B(중간 부위 돌연변이) 및 유형 C(5' 말단 돌연변이) 단일 점 돌연변이를 포함하는 세 가지 유형의 miRNA 서열은 센서 특이성을 테스트하기 위해 사용되었다. 프로브 및 miRNA 서열은 표 2에 자세히 설명되어 있다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 혈청 유래 엑소좀의 HR-TEM 이미지를 나타낸다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 임상 샘플에서 감지되는 AD 바이오마커. 박스 플롯으로, a) exomiR-125b, b) exomiR-135a, c) exomiR-15a 및 d) HCs($n = 5$), AD 환자($n = 24$) 및 MCI 환자($n = 14$)의 혈청으로부터의 exomiR-20a의 평가된 LSPR 신호를 나타낸다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 임상 혈청 샘플에서 AD 바이오마커 감지 박스 플롯으로 HC($n=5$), AD 환자($n=24$) 및 MCI 환자($n=14$)의 혈청 샘플에서 a) exomiR-125b, b) exomiR-135a, c) exomiR-15a 및 d) exomiR-20a의 발현 수준을 나타낸다. qRT-PCR으로 AD 바이오마커의 수준을 확인하였다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 AD 환자($n=24$)와 HC($n=5$)를 구별하기 위한 단일 AD 바이오마커 a) exomiR-125b, b) exomiR-135a, c) exomiR-15a 및 d) exomiR-20a의 수신자 작동 특성 곡선을 나타낸다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 MCI 환자($n=14$)와 HC($n=5$)를 구별하기 위한 단일 AD 바이오마커 a) exomiR-125b, b) exomiR-135a, c) exomiR-15a 및 d) exomiR-20a의 수신자 작동 특성 곡선을 나타낸다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 임상 샘플에서 감지되는 AD 바이오마커를 나타낸다. AD 환자와 HC를 구별하기 위한 A β 42와 a) exomiR-125b, c) exomiR-135a, e) exomiR-15a 및 g) exomiR-20a 사이의 AD 바이오마커 비율의 ROC 곡선을 나타낸다. 박스 플롯은 AD 환자($n = 24$) 및 HC($n = 5$)의 혈청에서 추출한 b) exomiR-125b/A β 42, d) exomiR-135a/A β 42, f) exomiR-15a/A β 42, h) exomiR-20a/A β 42의 추정 비율을 나타낸다. MCI 환자와 HC를 구별하기 위한 A β 42와 i) exomiR-125b, k) exomiR-135a, n) exomiR-15a 및 o) exomiR-20a 사이의 AD 바이오마커 비율의 ROC 곡선을 나타낸다. 박스 플롯은 MCI 환자($n = 14$) 및 HC($n = 5$)의 혈청에서 추출한 j) exomiR-125b/A β 40, l) exomiR-135a/A β 42, m) exomiR-15a/A β 42, p) exomiR-20a/A β 42의 추정 비율을 나타낸다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 AD 환자($n=24$)와 HC($n=5$)를 구별하기 위한 A β 1-40과 a) exomiR-125b, c) exomiR-135a, e) exomiR-15a 및 g) exomiR-20a 사이의 비율을 나타낸 수신기 작동 특성 곡선(receiver operating characteristic curve)이다. 박스 플롯은 AD 환자($n=24$) 및 HC($n=5$)의 혈청 샘플에서 b) exomiR-125b/A β 40, d) exomiR-135a/A β 40, f) exomiR-15a/A β 40 및 h) exomiR-20a/A β 40의 추정 비율을 나타낸다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 MCI 환자($n=14$)와 HC($n=5$)를 구별하기 위한 A β 1-40과 a) exomiR-125b,

c) exomiR-135a, e) exomiR-15a 및 g) exomiR-20a 사이 비율에 대한 수신기 작동 특성 곡선이다. 박스 플롯은 MCI 환자(n=14)의 혈청 샘플에서 b) exomiR-125b/Aβ 40, d) exomiR-135a/Aβ 40, f) exomiR-15a/Aβ 40 및 h) exomiR-20a/Aβ 40의 추정 비율을 나타낸다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 MCI 환자(n=14)와 AD 환자(n=24)를 구별하기 위한 Aβ 1-40과 a) exomiR-125b, c) exomiR-135a, e) exomiR-15a 및 g) exomiR-20a 간의 비율에 대한 수신기 작동 특성 곡선이다. 박스 플롯은 MCI 환자(n=14) 및 AD 환자(n=24)의 혈청 샘플에서 b) exomiR-125b/Aβ 40, d) exomiR-135a/Aβ 40, f) exomiR-15a/Aβ 40 및 h) exomiR-20a/Aβ 40의 추정 비율을 나타낸다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 MCI 환자(n=14)와 AD 환자(n=24)를 구별하기 위한 Aβ 1-42와 a) exomiR-125b, c) exomiR-135a, e) exomiR-15a 및 g) exomiR-20a 사이의 비율에 대한 수신기 작동 특성 곡선이다. 박스 플롯은 MCI 환자(n=14)와 AD 환자(n=24)의 혈청 샘플에서 (b) exomiR-125b/Aβ 42, d) exomiR-135a/Aβ 42, f) exomiR-15a/Aβ 42, 및 h) exomiR-20a/Aβ 42의 추정 비율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0066] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0067] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0069] 본 발명은 종래 웨스턴 블롯팅 또는 qRT-PCR이 알츠하이머병 관련 표적 바이오마커를 검출하는데 있어 한계를 가지는 문제점을 해결하고자 안출된 것이다.
- [0070] 이에 본 발명에서는, 하나의 양태로 본 발명은 다음의 구조를 가지는 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조를 제공한다: 제1 금속 나노입자, 제2 금속 나노입자 및 제3 금속 나노입자를 포함하고, 상기 제2 금속 나노입자의 중점으로부터 상기 제1 금속 나노입자의 중점을 잇는 가상의 제1 직선과, 상기 제2 금속 나노입자의 중점으로부터 상기 제2 금속 나노입자의 중점을 잇는 가상의 제2 직선 사이의 사잇각이 125 내지 135도가 되도록 배열되어, 상기 제1 금속 나노입자, 상기 제2 금속 나노입자 및 상기 제3 금속 나노입자에 의해 둘러싸이는 나노캐비티가 형성되며, 제1 금속 나노입자와 제2 금속 나노입자 사이, 및 제2 금속 나노입자와 제3 금속 나노입자 사이에 나노미터 크기로 이격되어 형성된 나노갭이 구비됨.
- [0071] 또한, 다른 하나의 양태로 상기 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 나노 플라즈모닉 바이오센서를 제공한다.
- [0072] 구체적으로, 상기 바이오센서는 기관; 상기 기관에 고정된, 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브가 접합된 곡면 플라즈모닉 나노 구조; 및, 곡면 플라즈모닉 나노 구조에서의 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 측정하는 측정부를 포함할 수 있다.
- [0074] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0076] 본 발명에서 용어, “나노 플라즈모닉 바이오센서 “은 플라즈몬을 측정할 수 있는 바이오센서로서, 여기에서 플라즈몬은 전자 혹은 양공 밀도 진공, 즉 플라즈마 진동의 양자(quantum)를 지칭하는 것을 의미하고, 이러한 금속 내의 자유전자가 집단적으로 진동하는 유사 입자인 플라즈몬을 측정할 수 있는 측정부를 포함하는 바이오센서를 말한다.
- [0077] 상기 바이오센서는 곡면 플라즈모닉 나노구조 기반인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0078] 본 발명에서 용어, “곡면 플라즈모닉 금속 나노구조”는 DNA가 접합된 진보된 플라즈모닉 금속 나노입자가 세 개 결합되어 삼단량체 구조를 형성하고, 상기 삼단량체가 특정 각도를 형성하여 곡면의 형태를 띠고 있는 플라즈모닉 금속 나노구조를 의미한다.

- [0079] 구체적으로, 상기 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조는 제1 금속 나노입자, 제2 금속 나노입자 및 제3 금속 나노입자를 포함하고, 상기 제2 금속 나노입자의 중점에서부터 상기 제1 금속 나노입자의 중점을 잇는 가상의 제1 직선과, 상기 제2 금속 나노입자의 중점에서부터 상기 제2 금속 나노입자의 중점을 잇는 가상의 제2 직선 사이의 사잇각이 125 내지 135도가 되도록 배열되어, 상기 제1 금속 나노입자, 상기 제2 금속 나노입자 및 상기 제3 금속 나노입자에 의해 둘러싸이는 나노캐비티가 형성되며, 제1 금속 나노입자와 제2 금속 나노입자 사이, 및 제2 금속 나노입자와 제3 금속 나노입자 사이에 나노미터 크기로 이격되어 형성된 나노갭이 구비된 것일 수 있다.
- [0080] 상기 용어, “나노갭”은 나노미터 크기의 벌어진 틈을 의미하는 것으로서, 구체적으로는 금속 나노입자 2개가 브릿지 형태로 연결되면서 그 사이로 형성된 틈 또는 갭을 의미하는 것으로서, 나노크레비스(nanocrevise), 나노틈, 또는 나노틈새와 혼용되어 사용될 수 있으며, 금속 나노입자가 평행을 이루면서 일부 중첩되어 형성된 인터갭(inter-gap)과는 다르다..
- [0081] 상기 나노갭의 직경은 6 내지 12nm, 구체적으로는 8 내지 10nm일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0082] 본 발명의 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조는 세 개의 금속 나노입자가 특정 각도를 이루며 곡면 형태로 이루어져 있어, 제1 금속 나노입자와 제2 금속 나노입자 사이 및 제2 금속 나노입자와 제3 금속 나노입자 사이로 2개의 나노갭을 포함할 수 있다.
- [0083] 상기 용어, “나노캐비티(nanocavity)”는 세 개의 금속 나노입자가 특정 각도를 이루면서 생기는 나노공간을 의미한다.
- [0084] 구체적으로, 상기 나노캐비티는 중앙에 위치한 상기 제2 금속 나노입자의 중점에서부터 상기 제1 금속 나노입자의 중점을 잇는 가상의 제1 직선과, 상기 제2 금속 나노입자의 중점에서부터 상기 제2 금속 나노입자의 중점을 잇는 가상의 제2 직선 사이의 사잇각이 125 내지 135도(°)가 되도록 배열되어, 이로 인해, 상기 제1 금속 나노입자, 상기 제2 금속 나노입자 및 상기 제3 금속 나노입자에 의해 둘러싸여 형성될 수 있다.
- [0085] 상기 용어, “금속 나노입자”는 금속으로 이루어진 나노미터(nm) 크기의 입자를 의미하는 것으로, 상기 금속 나노입자의 지름은 13 내지 20nm, 구체적으로는 14 내지 16nm일 수 있고, 나노구, 나노스피어와 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0086] 상기 금속은 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu), 백금(Pt) 및 팔라듐(Pd)으로 구성된 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0087] 상기 제2 금속 나노입자는 나노입자 양 쪽에 단일가닥 DNA가 접합되고, 상기 제1 및 제3 금속 나노입자는 상기 제2 나노입자에 접합된 단일가닥 DNA에 상보적인 단일가닥 DNA가 접합된 것일 수 있다.
- [0088] 또한, 상기 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조는 1단일가닥 DNA와 이의 상보적인 서열로 이루어진 2단일가닥 DNA를 2:1로 포함하는 것일 수 있다.
- [0089] 상기 1단일가닥 DNA는 하나의 가닥으로 이루어진 DNA를 의미하며, 1단일가닥 DNA가 접합된 나노입자는 나노입자의 한쪽면에 1개의 단일가닥 DNA가 접합된 나노입자를 의미한다.
- [0090] 상기 2단일가닥 DNA는 하나의 가닥으로 이루어진 DNA를 2개 포함하는 것으로서, 나노입자의 양 쪽, 구체적으로는 125 내지 135도를 이루도록 2개의 단일가닥 DNA를 접합하는 것을 의미하며, 이 때, 1단일가닥 DNA와 2단일가닥 DNA는 서로 혼성화할 수 있도록 상보적인 서열일 수 있다.
- [0091] 상기 1단일가닥 DNA가 접합된 나노입자와 2단일가닥 DNA가 접합된 나노입자는 2:1로 이루어질 수 있으며, 1개의 1단일가닥 DNA와 2단일가닥 DNA의 1개의 가닥이 서로 상보적으로 결합할 수 있고, 또 다른 1개의 1단일가닥 DNA와 2단일가닥 DNA의 나머지 1개의 가닥이 상보적인 결합을 할 수 있다.
- [0092] 이로써, 3개의 나노입자가 각각의 DNA의 상보적인 결합을 통하여 혼성화하여 3개의 나노입자(나노구)가 브릿지 구조를 형성하되, 180도의 평행구조가 아닌 125 내지 135도의 특정 각도를 이루는 곡면 형태를 띌 수 있다.
- [0093] 상기 DNA는 상보적인 결합을 할 수 있는 것이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 그 길이는 일 예로 75bp 내지 150bp, 다른 예로 85bp 내지 120bp, 또 다른 예로 100bp일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0094] 상기 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조는 나노입자 3개에 각각 단일가닥 DNA 서열을 포함하여, 2개의 단일가닥 DNA를 가지는 제2 나노입자를 중심으로 양 쪽에 1개의 단일가닥 DNA를 가지는 나노입자가 상보적인 결합을 하여 혼성화하고, 이후 결정화되면서 pH 5에서 DNA 방향으로 결정화되며, 특히 염화나트륨을 처리함으로써 125 내지

135도의 특정 각도를 가지는 구조를 이루는 것을 말한다.

- [0096] 상기 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조는 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브가 접합된 것일 수 있다.
- [0097] 본 발명에서 용어, “표적 바이오마커”는 생체에서 수득한 분리된 형태의 검출 또는 진단하고자 하는 바이오마커를 의미하는 것으로서, 일 예로 DNA, miRNA, 펩타이드 및 단백질로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있고, 다른 예로 miRNA, 단백질 또는 이의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0098] 상기 miRNA는 microRNA로, mRNA의 안정성과 번역 모두에 영향을 주어 다세포 유기체에서 유전자 발현의 전사 후 조절에 관여하는 짧은(20-24 nt) 비암호화 RNA이다. 상기 miRNA는 일 예로 엑소솜 유래일 수 있으며, 다른 예로 알츠하이머병이나 경도 인지 장애를 가지는 개체에서 수득된 엑소솜 유래 miRNA일 수 있다.
- [0099] 상기 엑소솜은 세포 내에서 생성되어 외부로 방출되는 소낭(extracellular vesicles, EVs)의 일종으로, 진행성 물에서 세포간 정보교환을 통해 분비되는 50 내지 150nm 크기의 소포체이다.
- [0100] 상기 엑소솜 유래 miRNA는 exo-miR125b, exo-miR135a, exo-miR15a, exo-miR20a 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0101] 상기 단백질은 아밀로이드 β (A β)일 수 있다.
- [0102] 상기 아밀로이드 β 는 아밀로이드(amyloid)는 36-43개의 펩타이드(peptide)로서 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD) 환자의 뇌에서 발견되는 아밀로이드 플라크(amyloid plaque)의 주성분이다. 아밀로이드 플라크는 알츠하이머병과 밀접한 관계를 가지고 있기에, 알츠하이머병 질병인자(biomarker)로 분류된다. 상기 아밀로이드 β 는 아밀로이드 β 1 내지 42를 포함할 수 있고, 일 구체예로 아밀로이드 베타 40, 아밀로이드 베타 42, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0103] 또한 다른 일 구체예로, exo-miR와 아밀로이드 베타 간의 조합을 포함할 수 있다.
- [0104] 또한, 다른 일 구체예로, exo-miR125b, exo-miR135a, exo-miR15a, exo-miR20a, 아밀로이드 베타 40, 아밀로이드 베타 42, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0105] 상기 바이오센서는 엑소솜 유래 miRNA와 단백질의 특이적 결합으로 발생하는 레일리 산란 스펙트럼의 변화를 측정하여 엑소솜 유래 miRNA 및 단백질을 검출하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0106] 특히, 상기 바이오센서는 exo-miR125b, exo-miR135a, exo-miR15a 또는 exo-miR20a가 단일 점 돌연변이를 가질 때 레일리 산란 스펙트럼 변화가 없는 것일 수 있다.
- [0107] 상기 바이오센서는 신경 퇴행성 질환 진단용일 수 있다.
- [0108] 상기 용어, “신경 퇴행성 질환”은 신경변성질환이라고도 하며 광의로는 신경세포(nerve cell)가 퇴행하는 병태 전부를 포함하지만 일반적으로는 뇌혈관장애, 외상(外傷), 대사이상 등, 뚜렷한 신경계세포외의 요인이 될 수 있는 것은 포함하지 않는다. 구체적으로 상기 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머 치매 또는 경도인지장애일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0109] 상기 용어, “알츠하이머 치매(Alzheimer's disease, AD)”는 알츠하이머병이라고 하며, 아밀로이드 캐스케이드, 타우인산화, 신경전달물질, 흥분독성이나 산화 스트레스 등 다양한 복잡한 병리학적 및 생리학적 조건에 의해 유발된다고 보고되는 질병으로, β -아밀로이드(A β) 펩타이드의 대뇌 축적이나 타우의 신경원섬유 엉킴(NFT)이 주요 병리적 특징이며, 발병 중에 뉴런 및 시냅스의 독성 및 파괴로 이어지는 신경퇴행 메커니즘과 밀접하게 관련된다고 보고되는 질병이다.
- [0110] 상기 용어, “경도 인지 장애(mild cognitive impairment, MCI)”는 동일 연령에 비해 인지기능이 떨어져 있으나, 일상생활동작의 독립성은 보존되어 있는 상태를 의미하는 것으로서, 아직은 치매가 아닌 상태를 의미한다. 이 상태가 섬망이나 다른 정신과적 질환의 진단기준을 만족시키지 않는 상태여야 한다. 즉 치매 고위험군 상태로써 정상노인의 경우 매년 1~2%만이 치매로 진행하지만, 경도인지장애는 매년 약 10~15%가 치매로 진행한다. 또한 이 상태는 치매를 가장 이른 시기에 발견할 수 있는 단계이며 치료효과를 극대화시킬 수 있다는 점에서 임상적으로 중요하다고 알려져 있다.
- [0111] 상기 용어, “포획 프로브”는 결합 프로브, 캡처 프로브 등으로 혼용되어 사용될 수 있으며, 검출하고자 하는

표적 또는 타겟 바이오마커에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0112] 상기 포획 프로브는 DNA, LNA 또는 항체를 포함하는 것일 수 있다.
- [0113] 상기 용어, “LNA”는 센서의 감도와 선택성을 더욱 향상시키기 위하여 도입한 것으로서, 0-메틸렌 브릿지(0-methylene bridge)를 통해 2'-산소와 4'-탄소 사이에 고정된 키메릭 리보스 링(chimeric ribose ring)의 모이 어티를 포함할 수 있다. 이러한 LNA의 구조는 바이오센서의 혼성화 특이성(hybridization specificity), 듀플렉 스 안정성(duplex stability) 및 결합 친화성(binding affinity)을 향상시킬 수 있다.
- [0114] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 곡면 플라즈몬 나노 구조 기반 바이오센서에 2 개의 LNA를 포 함하는 프로브와 완전히 일치하는 상보적 서열을 갖는 표적 exo-miRNA가 결합되어 이로 인해 샌드위치 구조가 안정적으로 유지되어, 안정적으로 검출 신호를 제공함을 확인하였다.
- [0116] 상기 바이오센서는 엑소솜 유래 miRNA의 특이적 결합으로 발생하는 레일리 산란 스펙트럼의 변화를 측정하여 엑 소솜 유래 miRNA 단백질을 검출하는 것일 수 있다.
- [0117] 또한, 상기 바이오센서는 아토몰의 매우 적은 함량 범위에서 엑소솜 유래 miRNA를 검출하는 것이 특징일 수 있 다.
- [0118] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 바이오센서는 엑소솜 유래 miRNA에 대해 낮은 검출 한계에서도 검출하는 것이 특징일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [0120] 용어, “기관”은 현미경 등에서 관찰을 할 수 있도록 상기 금속 나노입자 플랫폼이 고정될 수 있는 판을 의미 하는 것으로서, 구체적으로는 유리 슬라이드일 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다.
- [0121] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조를 제조한 후 이를 기관에 고정시키고 분 리된 표적 바이오마커, 일 예로는 엑소솜 유래 miRNA 또는 단백질에 특이적인 DNA 또는 LNA를 포함하는 포획 프 로브를 접합한 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서가, 표적 바이오마커인 엑소솜 유래 miRNA 또는 단백질, 특히 exo-miR125b, exo-miR135a, exo-miR15a, exo-miR20a 또는 이들의 조합이나 단백질인 아밀로이드 베타 40 및/또는 42를 주입하였을 때 검출 프로브를 통해 아토몰의 극미량에서도 효과적으로 검출함을 확인하였 다.
- [0123] 다른 하나의 양태로 본 발명은 상기 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서에 신경 퇴행성 질환 유래 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계를 포함하는, 엑소솜 유래 miRNA 및 단백질의 검출 방법을 제공한다.
- [0124] 상기 용어, “곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서”, “엑소솜”, “miRNA”, “신경 퇴행성 질환 ” 및 “단백질”은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0125] 본 발명에서 용어, “바이오마커 혼합물”은 본 발명에서 검출하고자 하는 바이오마커가 혼합된 혼합물을 의미 하는 것으로서, 일 예로 혈장, 혈액, 또는 응집소가 제거된 혈장일 수 있고, 다른 예로 상기 바이오마커 혼합물 은 엑소솜 유래 miRNA이나 단백질 또는 이들의 조합을 포함하는 것일 수 있으며, 또 다른 예로, 알츠하이머병이 나 경도 인지 장애를 가진 개체에서 분리한 엑소솜 유래 miRNA나 단백질 또는 이들의 조합을 포함할 수 있고, 또 다른 예로 exo-miR125b, exo-miR135a, exo-miR15a exo-miR20a 또는 이들의 조합이나 여기에 아밀로이드 베 타 40 및/또는 42와 같은 단백질을 포함하는 것일 수 있으나, 본 발명에서 측정하고자 하는 miRNA나 단백질을 포함하는 혼합물이면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0127] 또 다른 하나의 양태로 본 발명은 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서에 신경 퇴행성 질환 유래 바 이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및 엑소솜 유래 miRNA 또는 단백질 검출 프로브를 처리하는 단계를 포함하는, 신경 퇴행성 질환 진단 방법을 제공한다.
- [0128] 상기 용어, “곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서”, “엑소솜”, “miRNA”, “신경 퇴행성 질환 ”, “바이오마커 혼합물” 및 “단백질”은 상기에서 설명한 바와 같다.

- [0129] 본 발명에서 용어, “검출 프로브”는 바이오센서가 포함하는 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조에 결합된 포획 프로브에 상보결합된 타겟 miRNA나 단백질을 검출할 수 있는 프로브, 일 예로 타겟 miRNA나 단백질에 상보결합하여 검출할 수 있도록 하는 프로브로, 다른 예로 DNA 또는 LNA를 포함하는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0131] 또 다른 하나의 양태로 상기 곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서에 신경 퇴행성 질환 유래 바이오마커 혼합물을 처리하는 단계; 및 엑소좀 유래 miRNA 또는 단백질 검출 프로브를 처리하는 단계를 포함하는, 신경 퇴행성 질환 구분 방법을 제공한다.
- [0132] 상기 용어, “곡면 플라즈모닉 금속 나노구조 기반 바이오센서”, “엑소좀”, “miRNA”, “신경 퇴행성 질환”, “바이오마커 혼합물”, “검출 프로브” 및 “단백질”은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0134] 또 다른 하나의 양태로 본 발명은 금속나노입자를 1단일가닥 DNA와 함께 배양하는 단계; (b) 상기 1단일가닥 DNA가 접합된 1단일가닥-금속나노입자를 분리하는 단계; (C) 1단일가닥 DNA-금속나노입자의 DNA 서열과 상보적인 서열을 가지는 2단일가닥DNA-금속나노입자를 2:1로 혼성화한 후 혼성화된 금속시드를 분리하는 단계; (d) 상기 금속시드를 코팅하는 단계; (e) 상기 코팅된 금속시드를 염화나트륨 하에서 금속 전구체 및 환원제를 처리하여 결정화하는 단계;를 포함하는, 곡면 플라즈모닉 나노구조의 제조방법을 제공한다.
- [0135] 상기 용어, “곡면 플라즈모닉 금속 나노구조”, “금속 나노입자”, “1단일가닥DNA-금속나노입자”, “혼성화” 및 “이의 상보적인 서열을 가지는 2단일가닥DNA-금속나노입자”는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0136] 상기 용어, “코팅”은 물질의 겉면을 특정 물질로 얇은 막을 가지도록 입히는 것을 의미하는 것으로서, 일 예로 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 코팅할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0137] 상기 용어, “결정화”는 금속 시드를 금속 전구체와 환원제로 환원제는 나노구조 합성 동안 AuCl₄-를 Au 원자로 환원시켜 결정화를 하는 것을 말하며 금속 결정화는 금속 NP의 표면보다 dsDNA 가닥을 따라 일어날 수 있다.
- [0138] 또한, 상기 결정화는 pH를 적정 범위로 조정하여 보다 곡면 형태의 나노 구조가 잘 형성될 수 있도록 할 수 있는데, 일 예로 pH 5로 수행할 수 있다.
- [0139] 상기 염화나트륨은 50 내지 100mM, 구체적으로는 70 내지 80mM의 농도로 처리될 수 있으며, 특정 범위의 염화나트륨 처리로, 2단일가닥-DNA가 이와 상보적인 서열을 가지는 1단일가닥-DNA와 각각 결합하여 3개의 금속나노입자를 포함하고, 각 금속나노입자 사이에 나노갭을 포함하고, 3 개의 금속 나노입자 사이에 나노캐비티를 포함하고, 상기 나노캐비티 각도가 125 내지 135도인 것을 특징으로 하는 곡면 형태의 금속 나노구조를 제조할 수 있다.
- [0141] 또 다른 하나의 양태로 본 발명은 (a) 금속나노입자를 1단일가닥 DNA와 함께 배양하는 단계; (b) 상기 1단일가닥 DNA가 접합된 1단일가닥-금속나노입자를 분리하는 단계; (c) 1단일가닥 DNA-금속나노입자의 DNA 서열과 상보적인 서열을 가지는 2단일가닥DNA-금속나노입자를 2:1로 혼성화한 후 혼성화된 금속시드를 분리하는 단계; (d) 상기 금속시드를 코팅하는 단계; (e) 상기 코팅된 금속시드를 염화나트륨 하에서 금속 전구체 및 환원제를 처리하여 결정화함으로써 곡면 플라즈모닉 나노구조를 수득하는 단계; (f) 상기 곡면 플라즈모닉 나노구조를 기관에 고정시키는 단계; 및 (g) 분리된 표적 바이오마커에 특이적으로 결합하는 포획 프로브를 곡면 플라즈모닉 나노구조에 접합하는 단계;를 포함하는, 곡면 플라즈모닉 나노구조 기반 바이오센서의 제조방법을 제공한다.
- [0142] 상기 용어, “곡면 플라즈모닉 금속 나노구조”, “금속 나노입자”, “1단일가닥DNA-금속나노입자”, “혼성화”, “이의 상보적인 서열을 가지는 2단일가닥DNA-금속나노입자”, “포획 프로브”, “코팅”, “결정화” 및 “기관”은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0143] 상기 (d) 단계 전에 (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MPTES) 또는 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES)로 기관을 코팅하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0145] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위

한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0147] **실험예 1: 재료**

[0148] 시그마 알드리히 코리아(Sigma Aldrich Korea, Republic 한국)에서 무수 에틸 알코올(Anhydrous ethyl alcohol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, $\geq 99.5\%$), 1,4-디티오테이트(1,4-dithiothreitol, DTT), 에틸 아세테이트(ethyl acetate, 무수, 99.8%), 비스(p-설토나토페닐)페닐포스핀 이수화물 이칼륨염(bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine dihydrate dipotassium salt, BSPP), 에탄올아민, 금(III) 염화물 삼수화물($\geq 99.0\%$), 염산(HCl, 37 wt% in water), 3-메르캅토프로필트리메톡시실란(3-mercaptopropyl)trimethoxysilane(MPTES), 도데실황산나트륨(sodium dodecyl sulfate, SDS), 염화나트륨(NaCl)을 구입하였다. 또한, 퓨처켄(Futurechem, 대한민국)에서 메톡시폴리에틸렌 글리콜-티올(Methoxypolyethylene glycol-thiol, mPEG-SH)을 구입하였다.

[0149] 영국 바이오셀 인터내셔널(British BioCell International, UK)에서 금 나노시드(AuNS; 15nm) 용액을 구입하였다. 바이오세상(대한민국)에서 식염수 구연산나트륨(SSC) 완충액, 5X TBE 완충액 및 디에틸 피로카보네이트(DEPC) 처리수를 구입하였다. 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific, USA)에서 Ambion™ 다이에틸피로카본산(diethylpyrocarbonate, DEPC) 처리수, 전체 엑소좀 RNA 분리 키트(total Exosome RNA Isolation kit), TaqMan™ 마이크로RNA 분석 키트(MicroRNA Assay kit, has-miR-125b, has-miR-135a, has-miR-15a, has-miR-20a, 및 U6 snRNA), TaqMan™ 유니버설 마스터 믹스 II(Universal Master Mix II) 및 TaqMan™ 마이크로RNA 역전사 키트를 구입하였다. 텍글라서(Deckglaser, 독일)에서 커버슬립 슬라이드($22 \times 40 \times 0.1\text{mm}$)를 구입하였다. 에펜도르프(Eppendorf, 독일)에서 DNA LoBind 튜브와 단백질 LoBind 튜브를 구입하였다. 마크로젠(Macrogen, 대한민국)에서 포획/검출(Capture/Detection) DNA/LNA 프로브, 표적 miRNA 및 단일점 돌연변이 miRNA를 합성하였다.

[0151] **실험예 2: 혈청 유래 엑소좀 miRNA(exomiRs) 추출**

[0152] qEV 크기 배제 크로마토그래피 컬럼(Izon Science Ltd., New Zealand)에 1mL 혈청 시료를 로딩한 후 제조업체의 프로토콜에 따라 PBS 버퍼로 엑소좀을 용출하였다. Amicon Ultra 15 mL 및 0.5 mL 원심분리 필터(Merck Millipore, USA)로 $4,000 \times g$ 및 $14,000 \times g$ 에서 20분간 상기 분리된 혈청 유래 엑소좀을 각각 원심분리하여 농축하였다. 그 후, Total Exosome RNA 및 Protein Isolation Kit(Invitrogen, USA)로 제조업체 프로토콜에 따라 엑소좀 유래 miRNA를 분리하였다. 이후 나노드롭 분광광도계(NANODROP2000, ThermoFisher Scientific, USA)로 상기 분리된 exomiR의 농도와 순도를 측정하였다.

[0154] **실험예 3: 정량적 역전사 증합효소 연쇄 반응(qRT-PCR) 분석**

[0155] qRT-PCR로 6명의 건강한 대조군(HC)과 10명의 AD 환자의 혈청 유래 엑소좀 miRNA 함량을 추정하였다. 구체적으로, 총 RNA($2\text{ng}/\mu\text{L}$)는 TaqMan miRNA 역전사 키트(ThermoFisher Scientific, USA)로 16°C 에서 30분, 42°C 에서 30분, 85°C 에서 5분, 4°C 에서 5분 동안 cDNA로 역전사하였다. 다음으로, Real-time qPCR은 TaqMan miRNA assay kit(ThermoFisher science, USA)와 Applied Biosystems StepOnePlus real-time PCR 시스템(Applied Biosystems)으로 95°C 에서 10분간, 이어서 95°C 에서 15초 동안, 그리고 60°C 에서 1분간 42회(cycle) 수행하였다. SDS 프로그램(v2.0.1; Applied Biosystems)으로 주기 임계값(Ct) 값을 생성 후, 내부 정규화 대조군(U6)으로 표적 엑소좀 miRNA의 상대 발현 수준을 정규화 후 계산하였다.

[0157] **실험예 4: qRT-PCR을 이용한 혈청 유래 exomiRs 상대 발현 수준 분석**

[0158] 총 RNA $2\text{ng}/\mu\text{L}$ 및 TaqMan miRNA 역전사 키트(ThermoFisher Scientific, USA)로 ExomiR를 cDNA로 역전사시켰다. 16°C 에서 30분, 42°C 에서 30분, 85°C 에서 5분, 4°C 에서 5분 동안 반응시켰다. 이 경우, 합성된 cDNA는 -20°C 에서 2개월 동안 보관할 수 있다. 이후 95°C 에서 10분, 95°C 에서 15초씩 45주기, 60°C 에서 1분의

조건으로 qRT-PCR을 순차적으로 수행하였다. 이 때, TaqMan miRNA 분석 키트(ThermoFisher Scientific, USA) 및 Applied Biosystems StepOnePlus 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems)을 이용하였다. ThermoFisher Scientific(v2.0.1; Applied Biosystems)에서 제공하는 SDS 프로그램으로 각 exomiR의 주기 역치(Ct) 값을 계산하였다. 이후 각 대상 exomiRs의 상대적인 발현 수준을 U6를 내부 통제로 정규화한 후 확인하였다.

실험예 5: 검출 한계(LOD) 계산

4개의 AD 마커의 선형 회귀 방정식을 다음과 같은 식으로 계산하였다:

$$\text{exomiR-125b: } y=2.292\log(x) + 2.205 \quad (R^2=0.994)$$

$$\text{exomiR-135a: } y=2.316\log(x) + 2.169 \quad (R^2=0.998)$$

$$\text{exomiR-15a: } y=2.318\log(x) + 1.847 \quad (R^2=0.998)$$

$$\text{exomiR-20a: } y=2.363\log(x) + 1.848 \quad (R^2=0.997)$$

또한, 센서의 감지 한계(LOD)를 다음의 방정식으로 계산하였다.

$$\text{LOD}=3.3 \times \delta / S$$

여기서 δ 는 블랭크의 표준 편차(SD), S는 검량선 기울기, 센서의 LOD는 exomiR-125b, exomiR-135a, exomiR-15a 및 exomiR-20a에 대해 각각 3.49 aM, 3.37 aM, 4.03 aM 및 4.01 aM으로 계산한 것이다.

실험예 6: 통계 분석

OriginPro 8 소프트웨어(OriginLab) Pearson 상관 관계로 AD 관련 임상 매개변수(연령 및 MMSE)와 miRNA 발현 수준 간의 상관 관계를 확인하였다. 상관 관계의 통계적 유의성은 표준 양측 스튜던트 t-검정으로 계산하였다. 여기에서 $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주된다.

실시예 1: 유한차분시간영역(finite-difference time-domain, FDTD) 시뮬레이션으로 프로그램 가능한 곡면 플라즈몬 나노아키텍처의 사전 설계

광학 특성이 강화된 본 발명의 새로운 나노구조를 FDTD 시뮬레이션(Lumerical Inc., Vancouver, Canada)을 이용하여 미리 설계하였다.

구체적으로, 금 나노점(나노크레비스, 직경 9.5nm)을 사용하여 130°와 70°의 굽힘 각도로 3개의 금 나노구(직경 15.8nm)를 연결하여 새로운 나노구조를 설계하였다. 또한, 굽힘각이 각각 130°와 180°인 2가지 유형의 나노구 트리머 갭(1.0nm 간격)과 선형 형태의 나노구조와에 대하여 각 나노구조의 전기장(EF) 분포를 비교하였다. 이 때, 빛의 파장 범위는 400~1000nm, 메쉬 크기는 0.5nm였다. 산란 단면적의 경우 1.33~1.45의 재료 범위를 둘러싼 주변 굴절률(RI) 범위를 변경하여 계산하였다.

실시예 2: 사전 설계된 프로그래밍 가능 곡면 플라즈몬 나노아키텍처의 합성

상기 실시예 1로 사전 설계된 프로그래밍 가능 곡선 플라즈몬 나노아키텍처를 하기와 같이 합성하였다.

구체적으로, AuNPs(직경 15.0nm)를 25℃에서 밤새 티올 변형된 단일 가닥 DNA(ssDNA; 100bp)와 함께 배양하였다. ssDNA-접합된 금 나노입자를 75V에서 50분 동안 겔 전기영동으로 분리하였다. 1개 및 2개의 ssDNA-접합된 금 나노입자에 해당하는 밴드를 절단하고 0.5mM Bis(p-설포나토페닐)페닐포스핀 이수화물(BSPP)을 함유하는 0.5X TBE 완충액에서 용출시켰다. 상기 정제된 1개 및 2개의 ssDNA 결합 금 나노입자를 37℃에서 밤새 2:1의 농도비로 혼성화시켰다. 이후 상기 혼성화된 금 시드를 75V에서 25분 동안 겔 전기영동으로 분리하였다. 상기 혼성화된 금 시드가 있는 밴드를 절단 후 완충 용액에서 용출시켰다. 상기 정제된 금 시드를 14,000rpm, 4℃

에서 30분간 원심분리하여 농축하였다. 그런 다음, UV-VIS 분광법으로 농도를 확인하였다. 그 후 상기 금 시드를 mPEG-SH(Mw 2000)와 1:100M 비율로 혼합 후 25℃에서 밤새 배양하였다. 상기 금 시드(0.5nM)를 pH 5.0 및 50mM 내지 100mM 범위의 NaCl 농도에서 각각 1시간 및 3시간 동안 금 전구체(HAuCl₄, 0.03%) 및 환원제(NH₂OH · HCl, 1mM)와 반응시켰다. 이후 에너지 필터링 TEM으로 합성된 금 나노구조의 형태를 확인하였다. 또한 Image J 소프트웨어로 나노 구조 크기와 각도를 분석하였다.

[0182] 실시예 3: 포획 프로브가 결합된 단일 프로그래밍 가능 곡면 플라즈몬 나노아키텍처의 준비

[0183] LNA 포획 프로브를 나노아키텍처 표면에 결합시키기 위해, LNA 포획 프로브의 5'-말단을 티올 그룹으로 변형시켰다. 상기 LNA 포획 프로브를 DTT 용액으로 15분 동안 처리하여 이황화 결합을 끊고, 동량의 아세트산을 첨가하여 상등액을 제거하는 과정을 3회 반복하였다. 그 후, 티올 그룹 활성화 LNA 포획 프로브를 100:1M 비율로 상기 실시예 2의 금 나노구조와 함께 25℃에서 밤새 배양하였다. LNA 포획 프로브가 접합된 금 나노아키텍처를 4℃, 8000rpm에서 30분 동안 원심분리하였다. 그런 다음 펠렛을 DEPC 처리수에 재현탁하였다.

[0185] 실시예 4: 단일 프로그래밍 가능한 곡면 플라즈몬 나노아키텍처(나노구조) 기반 바이오센서 제작

[0186] 단일 나노아키텍처 기반의 센서 플랫폼을 제작하기 위하여, 상기 실시예 3에서 제조된 포획 프로브가 접합된 금 나노아키텍처 용액을 광학 밀도 0.02로 희석하고 10 μL의 금 나노아키텍처를 MPES 처리된 슬라이드 글라스에 드롭 코팅하였다. 상기 코팅된 슬라이드 글라스를 미세 유체 이미징 챔버에 고정하였다. 이후 슬라이드 표면에 결합되지 않은 불순물과 나노 구조는 DEPC 처리수를 사용하여 150 μL/min의 유속으로 1시간 동안 세척하였다. 그 후, 200 μL의 에탄올 아민 용액(0.1 M)을 주입하고 30분 동안 배양하여 포획 프로브가 결합된 나노구조의 비반응성 표면을 차단하였다. 과량의 에탄올 아민 분자를 DEPC 처리수로 150 μL/min의 유속으로 5분 동안 세척하였다. 순차적으로, 각각의 표적 바이오마커($10^{-0.5}$ aM- $10^{9.5}$ aM 농도 범위)를 포함하는 200 μL의 인간 혈청을 20 μL/min의 유속으로 주입하였다. ExomiR 및 검출 LNA 프로브 혼합 샘플을 60℃에서 4시간 동안 배양하였다. 마지막으로, 나노구조 표면상의 포획 프로브에 결합되지 않은 표적 생체분자를 DEPC-water로 유속 150 μL/min으로 5분 동안 세척하였다.

[0187] 이후, 모든 단계에서 Rayleigh 산란 측정으로 각 단일 나노구조 표면의 생물학적 변화를 분석하였다. 나노 구조의 스펙트럼을 현미경과 CCD를 사용하여 백색광 하에서 기록하였다. OriginPro 8 프로그램으로 Lorentz 공식을 이용하여 LSPR 스펙트럼 변화를 계산하였다.

[0189] 실시예 5: 향상된 광학적 특성을 가진 프로그래밍 가능한 곡면 플라즈몬 나노아키텍처(나노구조) 설계

[0190] 임상용 바이오센서 개발에 있어 필수적인 요소는 생체분자를 검출하는 능력이다. 따라서 표적 분자를 정확하고 민감하게 감지할 수 있는 성능이 향상된 인식 변환기를 구축할 필요가 있다. AuNP의 고유한 물리적 및 화학적 특성은 기하학적 및 구조적 매개변수를 변경하여 쉽게 조절할 수 있기 때문에 효율적인 인식 및 변환 프로세스를 가능하게 하는 변환기 구성 요소로 가장 자주 사용된다.

[0191] 플라즈몬 금속 구조의 광학적 특성은 나노갭(nanogap), 나노캐비티(nanocavity), 나노크레비스(nanocrevise)와 같은 나노공간을 도입함으로써 크게 향상될 수 있다. 이러한 구조는 전자기장을 강력하게 증폭하고 플라즈몬 모드 혼성화를 일으키는 하위 파장 볼륨에 입사광을 집중시킨다. 따라서 본 발명에서는 나노구(나노스피어) 사이에 나노크레비스를 도입하고 나노구조를 추가로 130° 구부려 단일 나노캐비티를 만들어 분광 감도를 향상시키는 방식으로 나노구조를 설계하였다. 플라즈몬 나노구조의 민감도를 더 알아보기 위해 FDTD 시뮬레이션으로 3개의 조밀한 나노입자와 사전 설계된 구조로 구성된 나노삼량체의 전자기장 분포와 RI 민감도를 비교하였다(도 1).

[0192] 그 결과, 도 1에서 확인할 수 있듯이, 나노갭이 1nm인 트리머와 비교하여 두 개의 좁은 틈이 있는 프로그래밍 가능한 곡선형 플라즈몬 나노 구조는 전체 구조 표면에 걸쳐 균일하고 강력한 전자기장 분포를 형성하였으며, RI 민감도는 2.50배 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 전하 이동으로 나노갭(나노크레비스)이 목 공간(neck space)에서 더 강한 전자기장을 생성하여 전자 밀도와 유도된 표면 쌍극자를 높이는 반면, 인터갭은 나노구조의 갭 내부에서만 더 강한 전자기장을 생성하기 때문인 것으로 해석된다. 그 후, 굽힘 각도에 따른 나노캐

비터에서의 전자기장 및 RI 민감도의 영향을 확인하였다. 그 결과, 130° 곡면을 가진 프로그래밍 가능한 곡선형 플라즈몬 나노구조가 180° 및 70° 곡선형 나노구조보다 전자기장 및 RI 민감도를 향상시키는 것을 확인하였다. 휘어진 나노구조물 내부의 나노캐비티는 전자기장을 서브파장 공간으로 가두기 때문에 틸새 공간만 있는 선형 구조(180°)보다 휘어진 나노구조물에서 전자기장이 더 강하게 생성된다. 또한, 구부러진 나노구조는 나노입자 경계에서 입사광의 전기장 순환을 일으켜 인접한 공간에서 강한 자기 공명을 유도한다. 이러한 현상은 나노갭 크기에 크게 영향을 받으며, 70° 휘어진 나노구조 내의 공간은 3개의 밀집된 나노입자로 구성된 나노삼량체의 나노갭과 같은 크기를 가지므로, 130° 곡면 나노구조와 비교하여 전자기장 증폭이 상대적으로 약하게 일어난다. 이러한 시뮬레이션 결과를 바탕으로 전자기장과 RI 감도가 크게 개선된 미리 설계된 프로그래밍 가능한 곡선형 플라즈몬 나노 아키텍처(130°)는 바이오 센싱 재료로 사용하기에 충분한 가능성을 확인할 수 있었다.

[0194] **실시예 6: 프로그래밍 가능한 곡면 플라즈몬 나노구조의 합성 및 특성화**

[0195] 상기 실시예 5에서 미리 설계된 새로운 나노 구조를 합성하기 위하여, 겔 전기영동으로 DNA로 인코딩된 금 시드(Au seed)를 준비하고(도 2), 방향별 결정화 기술을 기반으로 합성 공정을 진행하여, 이중 가닥 DNA(dsDNA)(도 3a) 기반으로 Au 원자의 정밀하게 제어된 결정화를 진행하였다. Au 시드의 금속화 공정에서 PEG 및 용액 pH는 dsDNA를 따라 금 이온의 방향성에 따른 성장에 있어 중요한 요소이다. PEG 코팅은 입자 표면의 활성화 에너지를 증가시켜 DNA 표면의 결정화 반응이 나노입자 표면보다 빠르게 진행되도록 한다. DNA는 pH5에서 중성(dsDNA의 등전점(pI) = 4.0~4.5)에 가까운 약간의 음전하를 띠고 있어 환원제 효과를 극대화하여 DNA 주변에 금 이온을 집중시킨다. 따라서, Au 원자의 결정화는 나노입자-dsDNA 계면에서 시작하여 dsDNA의 중심을 향해 성장한다. 염화나트륨의 농도에 따른 나노크레비스와 나노캐비티를 포함하는 간극이 있는 곡선형 나노구조물의 성장 패턴을 TEM, 제타 전위, 동적 광산란(DLS)으로 확인하였다. 그 결과, 도 3b에서 확인할 수 있듯이, 염화나트륨의 농도가 증가함에 따라 삼량체 나노구조의 양쪽 끝에서 나노입자 사이의 거리가 가까워지는 것을 확인할 수 있었다(도 3b). 또한, DNA로 암호화된 Au 시드의 표면 전하는 음전하에서 중성으로 변화였고, 염화나트륨 농도가 증가함에 따라 입자의 크기가 커지는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 염화나트륨이 금 나노입자의 표면 전하로 인해 생성된 에너지 장벽을 감소시켜 감소시키기 때문이다.

[0196] 또한, 도 4에서 확인할 수 있듯이, 염화나트륨은 나노입자 사이의 반발력과 개별 입자가 서로 상호 작용할 수 있도록 한다(도 4). 특히, 내부 굽힘각도가 130° 로 미리 설계된 프로그래밍 가능한 곡면 플라즈몬 나노구조는 염화나트륨 농도 75mM에서 합성되는 것을 확인할 수 있었다(도 3c).

[0197] 나아가, 고속 푸리에 변환(FFT) 회절 패턴 분석 결과에서, 금의 FCC(face-centered cubic) 결정 구조의 결정 방향에 해당하는 격자 무늬가 확인되어 DNA 연결 영역에서 금의 결정화가 성공적으로 진행된 것을 확인할 수 있었다(도 3d). 또한, 입자의 직경은 15.82 ± 0.50 nm, 나노갭은 9.49 ± 0.49 nm, 캐비티의 벤딩(Cavity Bending) 각도는 $129.70 \pm 1.57^\circ$ 로 사전 설계된 입자와 매우 유사하여 형태 균일성과 크기 균질성을 나타내는 것도 확인하였다(도 3e). 곡면 플라즈몬 나노구조의 수율은 77.78%인 것으로 확인하였다. 이를 종합하면 본 발명의 나노 구조가 감지 물질로서 높은 신호 재현성을 가질 것이라고 예측할 수 있다.

[0198] 한편, 본 발명의 나노구조가 광학 바이오 센서의 기본 재료로 적용 가능한 것을 확인하기 위해, 백색 광원을 사용하여 분광법으로 개별 나노 아키텍처에서의 공진 레일리 산란을 측정하였다(도 5). 그 결과, 프로그래밍 가능한 곡선형 플라즈몬 나노구조는 암시야 현미경에서 노란색-오렌지색으로 표시되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 플라즈몬 나노구조의 스펙트럼은 이론적 산란 스펙트럼 결과($\lambda_{\max} = 529.0$ nm)와 일치하는 531.04 ± 0.49 nm에서 단일 균일 피크를 가지는 것을 확인하였다(도 3f). 본 발명에서는 결합(σ) 플라즈몬 모드에 할당된 단일 피크만이 산란 스펙트럼에 나타났으며, C2v 포인트 그룹에 해당하는 프로그래밍 가능한 곡선 플라즈몬 나노 구조의 비대칭 특성으로 인해 반결합(σ^*) 플라즈몬의 모드 피크가 확인되지 않았다. σ 및 σ^* 플라즈몬 모드를 형성하는 두 금속 나노입자 사이의 플라즈몬 혼성화와 달리, 이 비대칭 특성은 나노 구조의 비전통적인 전하 분포에도 영향을 미치므로 양전하와 음전하 사이의 모든 지역에서 명확한 구분이 없다(도 3g). 이러한 결과는 사전 설계된 나노입자가 DNA 방향별 Au 결정화 기술을 통해 상당한 정밀도로 구현될 수 있으며, 프로그래밍 가능한 곡선형 플라즈몬 나노구조의 광학적 특성이 의도된 목적에 따라 조정될 수 있음을 시사하는 결과이다.

[0200] **실시예 7: 알츠하이머병 진단을 위한 프로그래밍 가능한 곡면 플라즈몬 나노아키텍처 기반 플라즈몬 바이오센서**

제작 및 성능 검증

[0201] 앞서 설명한 프로그래밍 가능한 곡선 균질 나노구조를 기반으로, 정확한 알츠하이머병 진단을 위한 exomiR-125b, exomiR-135a, exomiR-15a 및 exomiR-20a를 포함하는 4개의 혈청 유래 exomiR를 진단 마커로 검출 가능한 임상 플라즈몬 바이오센서를 제작하였다. 참고로, 상기 exomiR은 AD 환자 혈액에서 상향 조절되고 A β 축적 촉진, A β 플라크 유발 염증 반응 및 아밀로이드 전구체 단백질(APP) 관련 유전자(예: APP, 베타-세크레타제 1 (BACE1) 및 aph-1 상동체 A(APH1A)) 조절에 의한 뉴런(neuronal) 사멸과 같은 A β 대사(metabolism)와 연관되어 있다.

[0202] 고감도, 선택성 및 결합 친화도를 가진 표적 exomiR 분석을 위해, 본 발명의 플랫폼은 exomiR과 LNA(잠금 핵산) 포획/검출 프로브 사이의 샌드위치 하이브리드화로 Watson-Crick 염기쌍 결합 강도를 향상시켰다(도 6a). miRNA 검출을 위한 센서의 타당성을 평가하기 위해 온전한 exomiR-125b를 플랫폼에 주입하여 LSPR 신호 생성을 확인하였다(도 6b). 그 결과, 도 6b에서 확인할 수 있듯이, 22.52 ± 1.41 nm의 상당한 신호 이동을 확인할 수 있었으며, 이는 표적 exomiR과 두 LNA 프로브 사이에서 완벽한 결합이 이루어져 안정적인 샌드위치 구조가 형성되었음을 나타낸다. 이러한 결과는 본 발명의 바이오센서 시스템이 표적 miRNA를 안정적으로 분석할 수 있음을 시사하므로, 본 발명의 플랫폼은 AD 유래 exomiR 프로파일링을 수행하여 환자에게 제공할 수 있음을 나타내는 것이다.

[0203] 한편, 본 발명의 바이오센서를 임상 진단에 적용하기 위해서는 높은 민감도와 선택도로 질병 관련 생체분자를 검출하는 능력이 필수적이다. 본 발명의 바이오센서 시스템에서 LOD는 LSPR 신호와 목표 생체 분자 농도의 비율에서 파생될 수 있다. 일반적으로 감도는 검출 신호와 측정된 분석 물질 간의 비율이며 시스템 전달 방정식의 기울기로 계산할 수 있다. 이 때 기울기는 안정적으로 감지할 수 있는 가장 낮은 대상 분석 물질 농도인 센서 LOD를 얻는 데 사용된다. 따라서 다양한 농도 범위에서 모방된 혈청에서 4개의 AD 바이오마커 각각에 대한 LSPR 신호를 측정하여 센서의 LOD를 확인하였다. 그 결과, 도 7의 a 내지 d에서 확인할 수 있듯이, 본 발명에서는 4개의 exomiR 바이오마커(exomiR-125b, exomiR-135a, exomiR-15a 및 exomiR-20a)가 각각 $10^{0.5}$ 에서 $10^{8.5}$ aM 범위의 대수 농도에서 LSPR 이동과 강한 선형 관계를 나타냄을 확인할 수 있었다(도 7의 a-d). 또한, 기울기의 계수(R²)는 0.99 이상으로 확인되었다. 나아가 LOD를 4개의 AD 바이오마커에 대하여 3.37에서 4.01까지 지원하는 온라인 방법에 설명된 선형 회귀 방정식으로 계산하였다. 이 값은 환자 혈액 샘플의 AD 바이오마커 수보다 $10^4 \sim 10^6$ 배 낮았다. 이러한 본 발명의 바이오센서에서의 극히 낮은 LOD 값은 나노갭과 나노캐비티가 구조 내부의 입사광을 효과적으로 가두기 때문에 프로그래밍 가능한 곡면 플라즈몬 나노아키텍처의 표면에 걸쳐 전자기장의 강력한 증폭이 일어나 가능한 것으로 해석된다.

[0204] 또한, 하기 표 1에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 바이오 센서의 검출 센서는 기존에 보고된 AD 바이오마커 검출 센서에 비하여 민감도가 최소 422배 이상 향상된 것임을 확인하였다(표 1). 이러한 결과는 본 발명의 바이오센서 시스템은 임상 샘플에서 exomiR 바이오마커를 민감하고 정확하게 검출하는 능력을 가지는 것을 입증하는 것이다. 인간 생체액에는 혈액, 혈청, 혈장, 소변 등 비특이적 생체분자가 풍부하기 때문에 임상 현장에 적용되는 센서는 선택성에 대해 엄격하게 평가되어야 한다.

표 1

Method	Target	LOD	Dynamic range	Sample type	Disease	References
LSPR	miR-125b	3.49 aM	$10^{0.5}$ aM – $10^{8.5}$ aM	Serum	AD	
	miR-135a	3.37 aM	$10^{0.5}$ aM – $10^{8.5}$ aM			
	miR-15a	4.03 aM	$10^{0.5}$ aM – $10^{8.5}$ aM			
	miR-20a	4.01 aM	$10^{0.5}$ aM – $10^{8.5}$ aM			
EIS	miR-137	1.70 fM	5 fM – 750 fM	Serum	AD	(Dong et al. 2015)
FRET	miR-29a	745 pM	0 nM – 20 nM	Serum	AD	(Kim et al. 2020)
Fluorescence and GO	miR-137	82 pM	0.05 nM – 5 nM	Serum	AD	(Rahaie and Noroozi 2019)
	miR-142					

*LSPR: Localized Surface Plasmon Resonance, EIS: Electrochemical Impedance Spectroscopy, FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer, GO: Graphene Oxide.

[0207] 특히, miRNA 계열 구성원 간의 높은 서열 유사성으로 인해 임상 진단을 위한 miRNA 분석에서 가장 중요한 과제 중 하나는 단일 염기 차이로 동일한 계열의 miRNA를 정확하게 구별하는 것이다. 이를 위해 본 발명에서는 세 가지 유형의 모방 샘플을 사용하여 표적 exomiR에 대한 프로그래밍 가능한 곡선 플라즈몬 나노 아키텍처 기반 플라즈몬 바이오 센서의 선택성을 확인해 보았다(도 7의 e-h). 하기 표 2에서 확인할 수 있듯이, 유형 A, B 및 C는 각각 표적 miRNA 서열의 3' 말단, 중간 및 5' 말단에 미스센스 돌연변이를 가지고 있다(표 2).

표 2

[0208]

Assigned name		Sequence (5' →3')	Length (bp)	T _m (°C)
miRNA	miR-125b	UCCUGAGACCCUAAUUGUGA	22	
	miR-125bA	UCCUGAGACCCUAAUUGAGA	22	
	miR-125bB	UCGUGAGACCCUAAUUGUGA	22	
	miR-125bC	UCCUGAGACCCUAAUUGUGA	22	
	miR-135a	UAUAGGGAUUGGAGCCGUGGCG	22	
	miR-135aA	UAUAGGGAUUGGAGCCGUGCCG	22	
	miR-135aB	UAUAGGGAUUGGAGCCGUGGCG	22	
	miR-135aC	UAAAGGGAUUGGAGCCGUGGCG	22	
	miR-15a	UAGCAGCACAAUUGGUUUGUG	22	
	miR-15aA	UAGCAGCACAAUUGGUUUCUG	22	
	miR-15aB	UAGCAGCACAAUUGGUUUGUG	22	
	miR-15aC	UACCAGCACAAUUGGUUUGUG	22	
	miR-20a	UAAAGUGCUAAUAGUCAGGUAG	23	
	miR-20aA	UAAAGUGCUAAUAGUCAGGAAG	23	
	miR-20aB	UAAAGUGCUAAAGUCAGGUAG	23	
	miR-20aC	UAUAGUGCUAAUAGUCAGGUAG	23	
LNA capture probe	miR-125b	Thiol-T[C]A[C]A[A][G]TT[A]G	11	71
	miR-135a	Thiol-C[G]CCACGGCTC	11	73
	miR-15a	Thiol-C[A][C]AAA[C][C]ATT	11	73
	miR-20a	Thiol-CTA[C]CT[G]CACT	11	71
LNA detection probe	miR-125b	GGT[C]TCAG[G]GA	11	71
	miR-135a	C[C]AAT[C]CTA[T]A	11	72
	miR-15a	AT[G]TG[C]T[G]CTA	11	72
	miR-20a	A[T]AA[G]C[A][C]TTTA	12	71

[0210] 여기에서 LNA 프로브는 표적 프로브와 특이적이고 선택적으로 혼성화하는 구조를 형성함으로써 바이오센서의 감지 성능을 향상시킨다. 그 결과, 도 7의 e 내지 h에서 확인할 수 있듯이, 각 대상 exomiR을 포함하는 샘플만이 20.00 nm보다 큰 LSPR 신호 변화를 나타내는 것을 확인하였다. 이와는 달리, 단일 점 돌연변이(2.00 nm 미만)를 포함하는 miRNA에 대해서는 명백한 LSPR 이동이 발생하지 않는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 본 발명의 바이오센서가 단일 염기 차이를 구별하기 위해 특정 miRNA 감지하는 것을 보여준다. 따라서 본 발명의 바이오센서는 실제 혈액 샘플에서 exomiR 시그니처 발현 프로파일링을 통해 AD의 중증도와 뇌 상태의 변화를 적용할 수 있을 것이다.

[0212] 실시예 8: 임상 혈청 샘플에서 AD 바이오마커 검출

[0213] 본 발명의 바이오센서의 임상적 적용 가능성을 확인하기 위하여, AD, MCI 환자 및 HC(Healthy Control)를 포함한 3개 병원 기반 코호트의 임상 혈청 샘플에서 표적 바이오마커 검출을 수행하였다(참가자의 자세한 임상 정보는 하기 표 3과 같음).

표 3

[0215]

Patients number	Type	Gender	Ethnicity	Age	MMSE score	CDR	Diagnosis
KUMC-0050	Serum	M	Asian	33	30		HC
KUMC-0051	Serum	M	Asian	32	30		HC
KUMC-0054	Serum	M	Asian	31	30		HC
KUMC-0055	Serum	M	Asian	29	30		HC
KUMC-0056	Serum	M	Asian	30	30		HC
KUMC-0001	Serum	M	Asian	79	19	0.5	AD
KUMC-0003	Serum	F	Asian	78	23	0.5	AD
KUMC-0010	Serum	F	Asian	71	22	0.5	AD
KUMC-0011	Serum	M	Asian	57	15	1	AD
KUMC-0017	Serum	M	Asian	77	15	1	AD
KUMC-0020	Serum	F	Asian	62	24	0.5	AD
KUMC-0021	Serum	F	Asian	58	18	1	AD
KUMC-0024	Serum	F	Asian	89	13	NA	AD
KUMC-0025	Serum	F	Asian	67	2	3	AD
KUMC-0026	Serum	M	Asian	64	17	1	AD
KUMC-0029	Serum	F	Asian	70	26	0.5	AD
KUMC-0030	Serum	F	Asian	75	24	0.5	AD
KUMC-0031	Serum	F	Asian	72	25	0.5	AD
KUMC-0035	Serum	F	Asian	67	23	0.5	AD
KUMC-0037	Serum	M	Asian	78	22	0.5	AD
KUMC-0040	Serum	F	Asian	77	20	0.5	AD
KUMC-0041	Serum	M	Asian	65	23	0.5	AD
KUMC-0042	Serum	M	Asian	67	NA	NA	AD
KUMC-0045	Serum	F	Asian	77	26	0.5	AD
KUMC-0049	Serum	F	Asian	66	18	0.5	AD
KUMC-0062	Serum	M	Asian	84	27	0.5	AD
KUMC-0067	Serum	F	Asian	66	22	0.5	AD
KUMC-0069	Serum	M	Asian	78	26	0.5	AD
KUMC-0070	Serum	M	Asian	83	26	0.5	AD
KUMC-0004	Serum	M	Asian	63	28	0.5	MCI
KUMC-0005	Serum	M	Asian	73	26	0.5	MCI
KUMC-0006	Serum	M	Asian	62	27	0.5	MCI
KUMC-0009	Serum	F	Asian	65	30	0.5	MCI
KUMC-0013	Serum	M	Asian	63	25	0.5	MCI
KUMC-0015	Serum	F	Asian	67	28	0.5	MCI
KUMC-0018	Serum	M	Asian	79	21	0.5	MCI
KUMC-0022	Serum	M	Asian	79	20	0.5	MCI
KUMC-0023	Serum	M	Asian	79	26	0.5	MCI
KUMC-0034	Serum	M	Asian	65	29	0.5	MCI
KUMC-0039	Serum	M	Asian	66	29	0.5	MCI
KUMC-0052	Serum	F	Asian	78	24	1	MCI
KUMC-0057	Serum	M	Asian	70	29	0.5	MCI
KUMC-0064	Serum	M	Asian	77	21	0.5	MCI

[0217]

임상 샘플을 테스트하기 전에 exomiR 검출을 위해 혈청에서 엑소좀을 분리하고 TEM으로 크기와 형태를 확인하였다(도 8). 그런 다음 exomiR을 추출하고 LSPR 기반 센싱을 사용하여 3개의 병원 기반 코호트 간의 AD 바이오마커의 평균 발현 수준을 분석하였다. 그 결과, 도 9에서 확인할 수 있듯이, 4개의 exomiR은 HC에 비해 AD 및 MCI 환자에서 더 높은 발현 수준을 보이는 것을 확인할 수 있었다(도 9). ExomiR-125b 발현은 HC에 비해 AD 및 MCI 환자에서 각각 2.22배(t-test, $p = 0.0003$) 및 2.67배(t-test, $p = 0.0008$) 더 높았다. 이러한 결과는 이 4가지 AD 바이오마커의 발현 패턴이 qRT-PCR의 기존 분석 방법의 결과와 잘 일치하는 것을 나타낸다(도 10).

[0218] 본 발명의 바이오센서를 이용한 단일 알츠하이머병 바이오마커 기반 치매 진단 효율을 확인하기 위해 진단 도구의 민감도, 선택도, 정확도를 평가하는 통계적 방법인 수신자 작동 특성 곡선(ROC) 분석을 통해 AUC 값을 확인하였다(표 4). 이 때, AUC 값은 보다 정확한 임상 예측을 나타내는 1.0에 가까운 값으로 분석 방법의 효율성을 정량화하는 방법이다(Rifai et al., 2006).

표 4

[0219]

	Biomarkers	Cut-off value (nm)	Sensitivity (%)	Selectivity (%)	Accuracy (%)	AUC
HC vs AD	A β 1-40	15.55	83.33	60.00	88.23	0.858
	A β 1-42	12.32	62.50	60.00	71.43	0.629
	ExomiR-125b	8.62	91.67	80.00	97.78	0.908
	ExomiR-135a	8.39	87.50	80.00	96.55	0.933
	ExomiR-15a	11.80	91.30	80.00	97.67	0.948
	ExomiR-20a	14.75	91.67	80.00	97.78	0.900
HC vs MCI	A β 1-40	15.53	71.43	60.00	78.95	0.793
	A β 1-42	12.31	50.00	60.00	60.00	0.571
	ExomiR-125b	9.16	92.86	80.00	98.11	0.929
	ExomiR-135a	8.45	85.71	80.00	96.00	0.943
	ExomiR-15a	11.76	85.71	80.00	96.00	0.929
	ExomiR-20a	14.75	91.67	80.00	97.78	0.914
AD vs MCI	A β 1-40	15.64	57.14	54.17	61.18	0.525
	A β 1-42	12.31	50.00	50.00	50.00	0.557
	ExomiR-125b	9.89	57.14	58.33	65.11	0.594
	ExomiR-135a	9.13	64.29	62.50	75.00	0.699
	ExomiR-15a	12.84	71.43	69.57	85.11	0.677
	ExomiR-20a	15.48	57.14	54.17	61.18	0.580

[0221] 그 결과 도 6에서 확인할 수 있듯이, 4개의 exomiR 마커를 이용한 진단 알츠하이머병의 AUC 값은 0.90 이상, 정확도는 96.55% 이상으로 알츠하이머 핵심 바이오마커보다 높은 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 발명의 바이오센서가 기존 분석법에 비해 우수한 진단 성능을 가질 뿐만 아니라, 본 발명에서 제안한 단일 exomiR 바이오마커 기반 진단 센서 시스템이 AD 및 MCI 환자를 HC와 정확하게 구별할 수 있음을 나타내는 것이다(도 11 및 12).

[0222] 또한, AD 환자와 HC를 구별할 확률을 높이기 위해 핵심 AD 바이오마커인 A β 와 exomiR의 조합을 조사해 보았다. 구체적으로, 그룹 간 혈청에서 서로 다른 AD 바이오마커 조합을 사용한 ROC 분석을 통해 진단 성능을 비교하였다(표 5-6). 그 결과, 도 13에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 바이오센서를 이용 시 exomiRs와 A β 1-42 검출의 조합이 평균 민감도 95.83%, 선택도 80.0%, 정확도 98.62%로 HC와 AD 환자를 성공적으로 구별할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 exomiR-125b와 A β 1-42를 진단마커로 적용하여 MCI 환자를 민감도 100.0%, 선택도 80.0%, 정확도 100.0%로 진단할 수 있음도 확인하였다. 두 임상 시험 그룹의 AUC 값은 0.936에서 0.957 범위였다(도 13 및 표 5).

표 5

[0223]

	Biomarkers	Cut-off value	Sensitivity (%)	Selectivity (%)	Accuracy (%)	AUC
HC vs AD	ExomiR-125b /A β 1-42	0.685	100.00	80.00	100.00	0.925
	ExomiR-135a /A β 1-42	0.675	91.67	80.00	97.78	0.946
	ExomiR-15a /A β 1-42	0.945	95.83	80.00	98.92	0.958
	ExomiR-20a /A β 1-42	1.195	95.83	80.00	98.92	0.929

HC vs MCI	ExomiR-125b /Aβ 1-42	0.710	100.00	80.00	100.00	0.957
	ExomiR-135a /Aβ 1-42	0.685	85.71	80.00	96.00	0.957
	ExomiR-15a /Aβ 1-42	0.955	92.86	80.00	96.00	0.936
	ExomiR-20a /Aβ 1-42	1.195	92.86	80.00	98.11	0.936
AD vs MCI	ExomiR-125b /Aβ 1-42	0.795	64.29	58.33	71.59	0.604
	ExomiR-135a /Aβ 1-42	0.750	64.29	66.67	78.27	0.704
	ExomiR-15a /Aβ 1-42	1.045	71.43	70.83	85.86	0.682
	ExomiR-20a /Aβ 1-42	1.265	57.14	58.33	65.11	0.592

[0225] 이러한 결과는 현재 알츠하이머병 진단에서 가장 정확도가 높은 것으로 간주되는 핵심 알츠하이머 바이오마커 기반 진단 접근법과 비교하여 향상된 진단 효율성을 가지는 것임을 입증하는 것이다(Li et al., 2022; Verberk et al., 2020). 반면 치매 환자에서 exomiR/Aβ 1-40 조합에 따른 진단 정확도는 단일 exomiR보다 낮은 것으로 평가되었다(표 6 및 도 14~16).

표 6

[0226]

	Biomarkers	Cut-off value	Sensitivity (%)	Selectivity (%)	Accuracy (%)	AUC
HC vs AD	ExomiR-125b /Aβ 1-40	0.550	87.50	80.00	96.55	0.892
	ExomiR-135a /Aβ 1-40	0.535	87.50	60.00	91.31	0.883
	ExomiR-15a /Aβ 1-40	0.745	91.67	60.00	94.29	0.883
	ExomiR-20a /Aβ 1-40	0.945	75.00	60.00	81.82	0.746
HC vs MCI	ExomiR-125b /Aβ 1-40	0.585	85.71	80.00	96.00	0.929
	ExomiR-135a /Aβ 1-40	0.545	85.71	80.00	96.00	0.936
	ExomiR-15a /Aβ 1-40	0.755	85.71	80.00	96.00	0.886
	ExomiR-20a /Aβ 1-40	0.945	71.43	60.00	78.95	0.743
AD vs MCI	ExomiR-125b /Aβ 1-40	0.625	64.29	58.33	71.59	0.601
	ExomiR-135a /Aβ 1-40	0.585	64.29	58.33	71.59	0.692
	ExomiR-15a /Aβ 1-40	0.810	64.29	66.67	78.27	0.658
	ExomiR-20a /Aβ 1-40	0.985	57.14	54.17	61.18	0.573

[0228] MCI는 중증 치매로 발전할 가능성이 높기 때문에 본 발명의 바이오센서가 MCI와 AD 환자를 정확하게 분류하는 능력은 치매의 조기 진단을 달성하고 환자에게 효과적인 치료를 제공하는 수단이 될 수 있을 것이다. 이러한 측면에서 본 발명의 바이오센서를 이용하여 exomiR/Aβ 결합 바이오마커를 기반으로 MCI와 AD 환자를 구별하기 위한 센서의 진단 성능을 확인하였다. 특히 진단 분류 정확도는 exomiR-15a와 Aβ 1-42의 조합을 기준으로 85.86% (민감도 = 71.43%, 선택도 = 70.83%, AUC = 0.682)였다(도 17). 따라서 본 발명의 혈액 기반 곡면 플라즈모닉

바이오센서는 CSF 기반 분석을 위한 유망한 대체 진단 기술로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 심각한 병태생리학적인 변화가 발생하기 전에 치매를 인식하기 위한 분석 도구로 사용될 수 있음을 시사한다.

[0230]

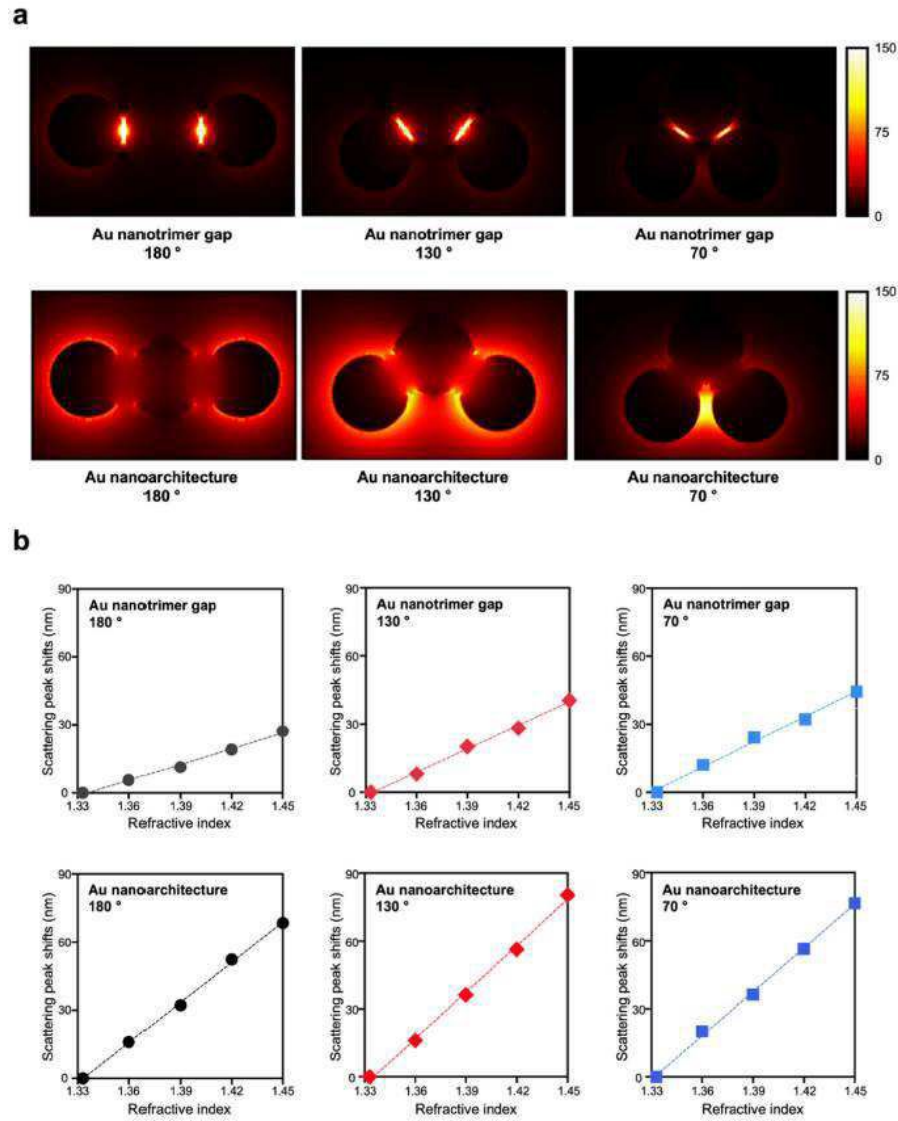
종합하면, 본 발명은 알츠하이머병의 임상 진단을 위해 프로그래밍 가능한 곡면 플라즈몬 나노아키텍처 기반의 바이오센서를 제안하는 것으로서, 사전 설계된 나노구조는 시뮬레이션을 통해 강력한 전자기장을 발생시키는 나노공간(예: 나노크레비스 및 나노캐비티)을 도입한 후 굽힘각이 제어된 DNA 방향 결정화 기술로 구현한다. 이 전략은 나노미터 수준에서 구조를 조정하여 다양한 모양과 이상에 가까운 맞춤형 물리 화학적 특징을 가진 고급 광학 나노 구조의 합성을 가능하게 한다. RI 민감도 측면에서 본 발명의 프로그래밍 가능한 곡면 나노구조는 이전에 개발된 다른 구조보다 높은 민감도 수준을 가지는 것을 특징으로 하기 때문에, 우수한 바이오센서 신호 변환기로 활용될 수 있다. 따라서 새로 합성된 나노아키텍처 기반 플라즈몬 바이오센서는 아토몰 수준에서 AD 관련 병리학적인 과정을 직접적으로 반영하는 혈청 유래 ExomiR의 검출을 가능하게 한다. 또한 miRNA와 LNA 프로브 간의 혼성화에 기반한 바이오마커 분석은 miRNA 계열 그룹의 단일 염기 차이를 구별하여 센서가 특정 대상 exomiR을 정확하게 인식할 수 있도록 한다. 또한 임상 적용을 위한 곡선형 나노아키텍처 기반 플라즈몬 바이오센서의 타당성을 확인한 결과, 본 발명의 곡면 플라즈몬 바이오센서는 exomiR-125b, -135a, -15a 및 -20a를 포함한 exomiR을 프로파일링하여 임상적으로 진단된 AD, MCI 환자 및 HC를 97.21% 이상의 정확도로 성공적으로 분류하였다. 나아가 여러 엑소좀 바이오마커의 분석 패턴을 통합하여 HC 대상에서 AD 및 MCI 환자를 분류하기 위한 진단 성능을 향상시킬 수 있음도 확인하였다. 따라서 본 발명에서 제안하는 프로그래밍 가능한 곡면 플라즈몬 나노구조 기반 바이오센서는 향후 miRNA 프로파일링을 통해 치매의 신경병리를 규명함으로써 치매 조기진단에 유망한 도구가 될 것임을 알 수 있다.

[0232]

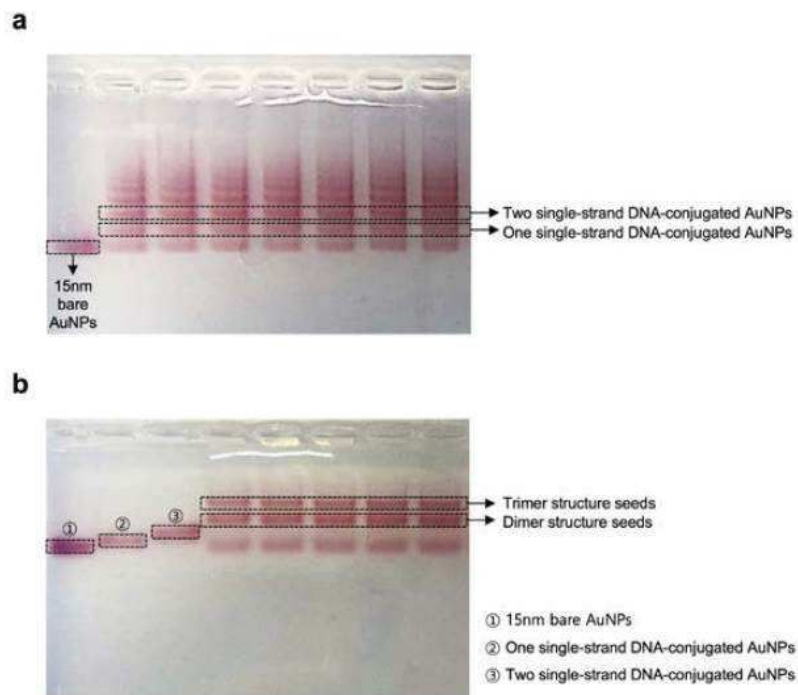
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

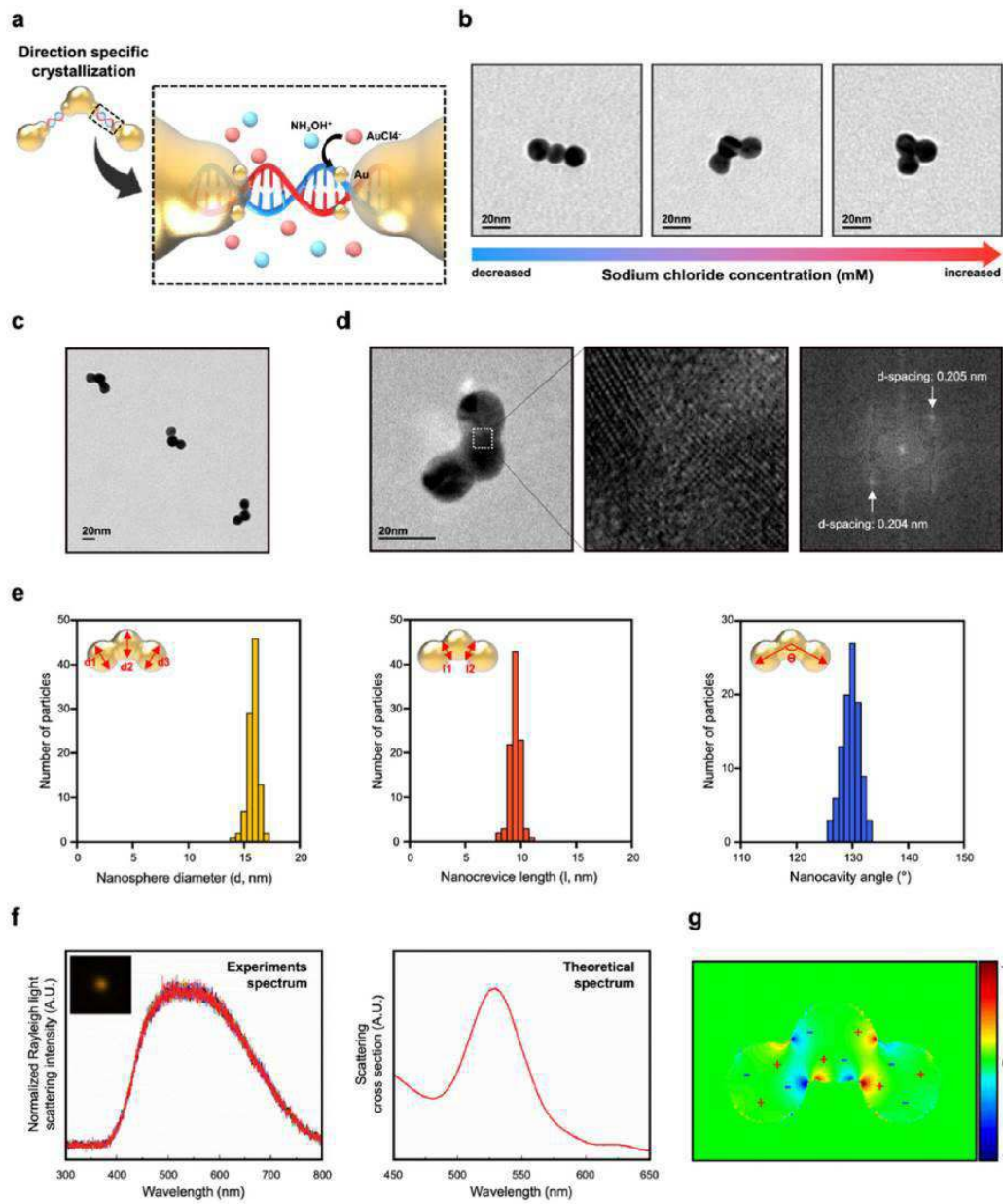
도면1



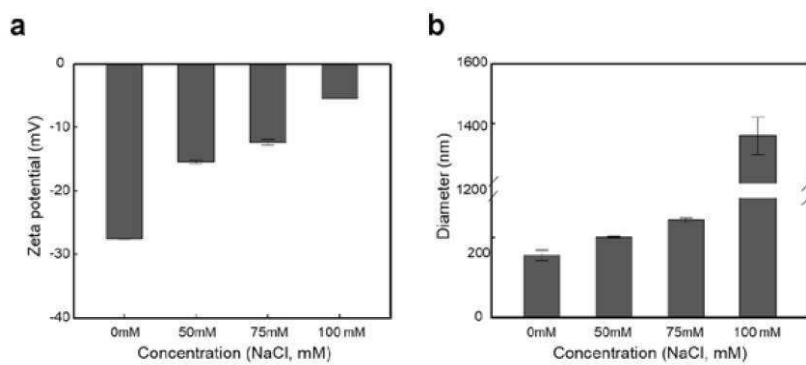
도면2



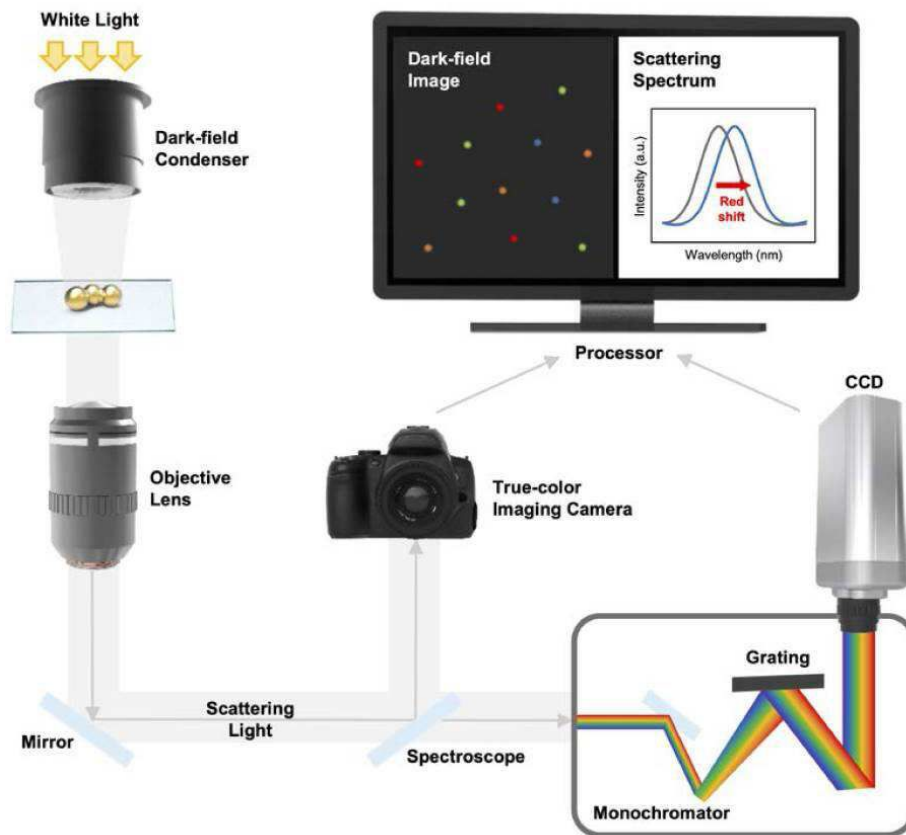
도면3



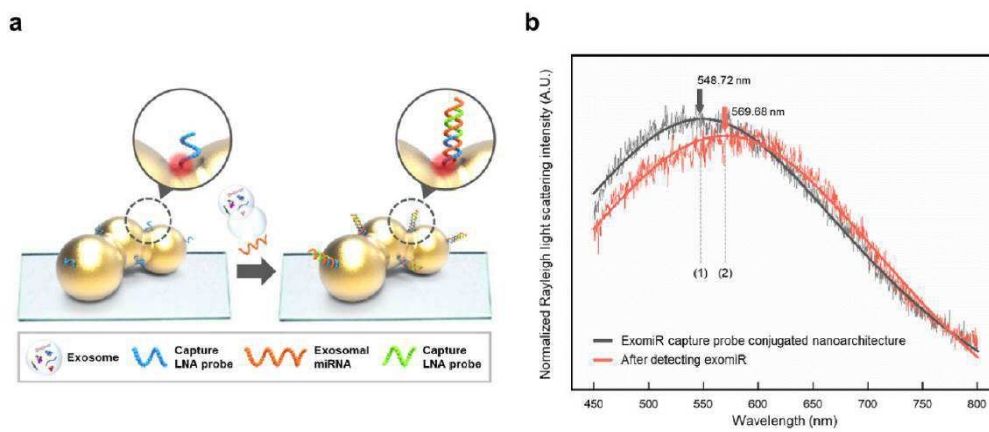
도면4



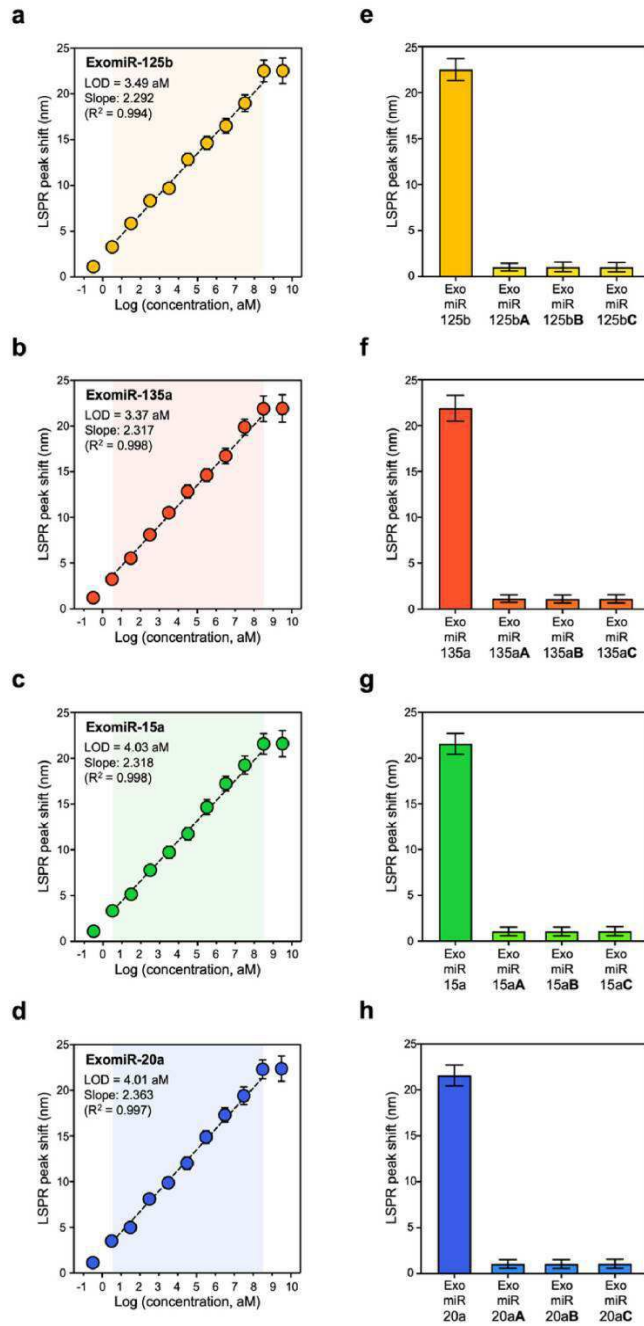
도면5



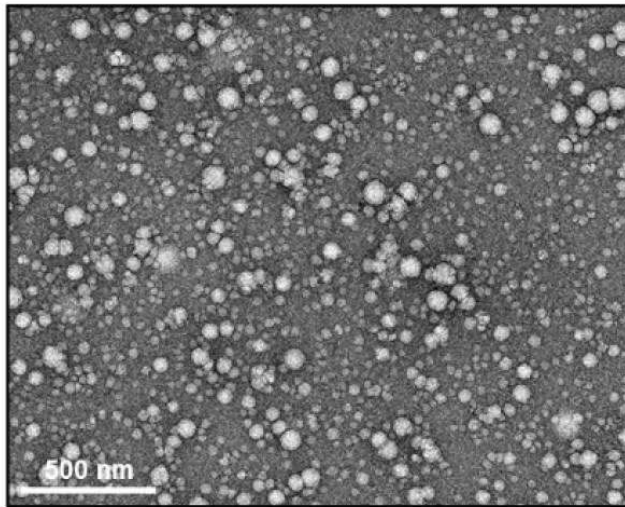
도면6



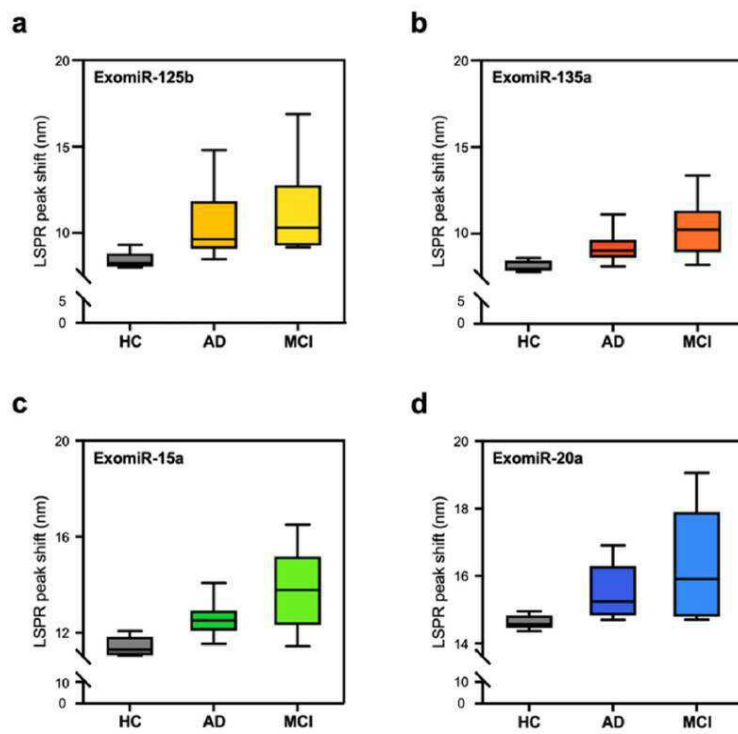
도면7



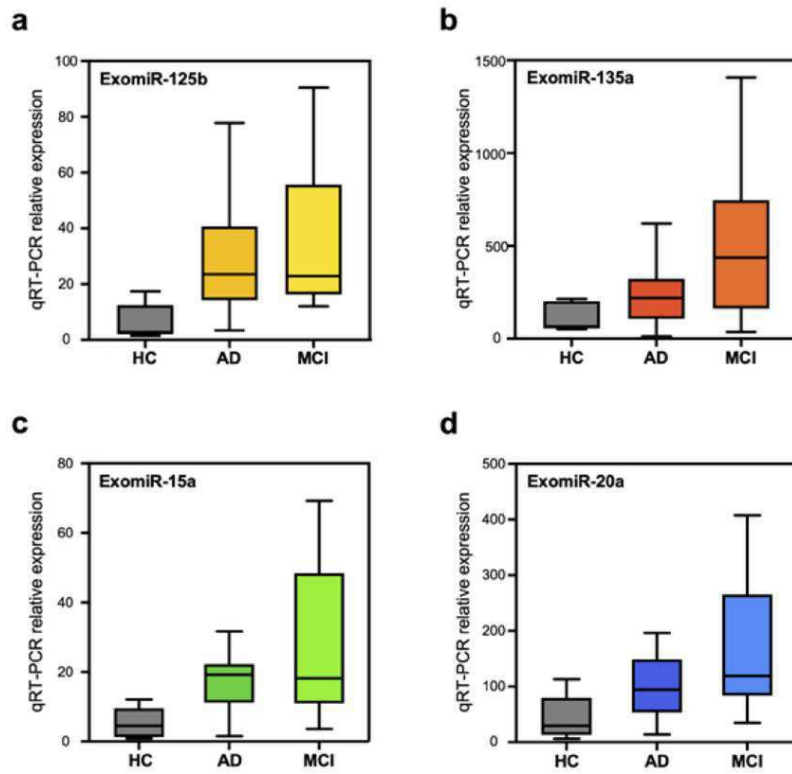
도면8



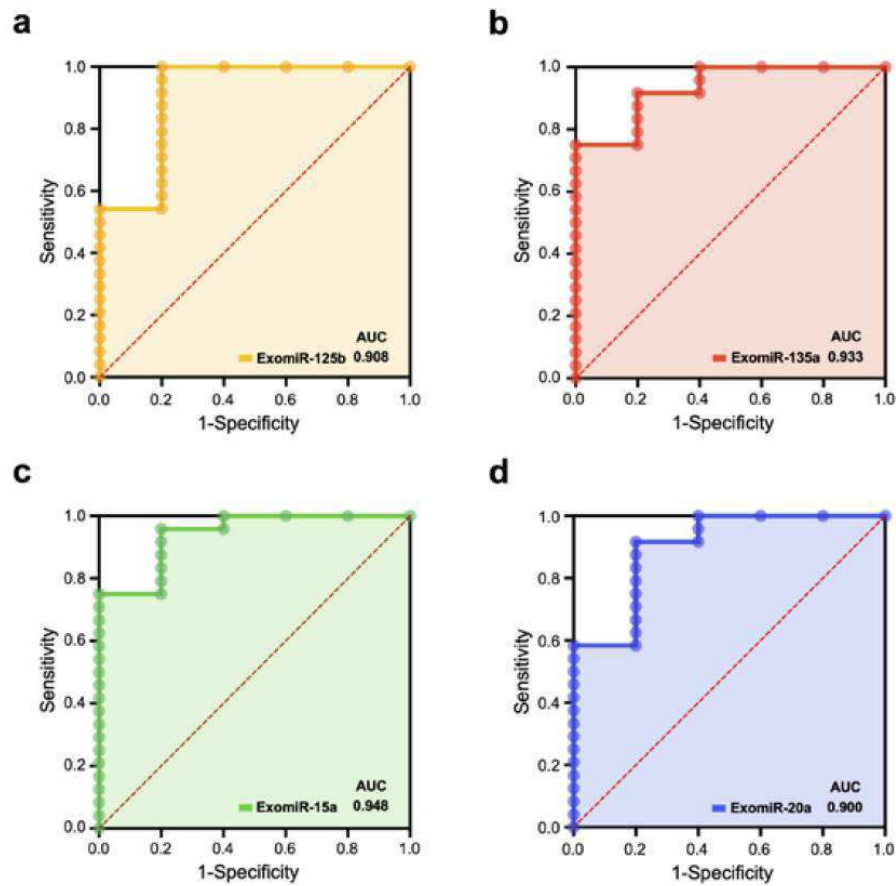
도면9



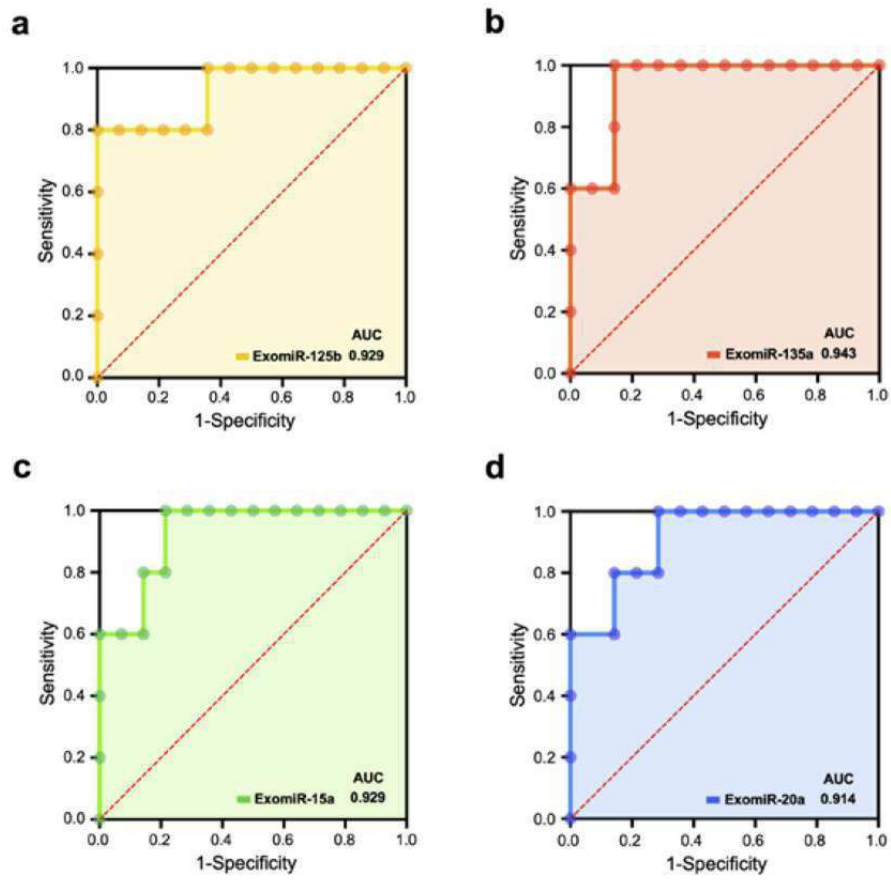
도면10



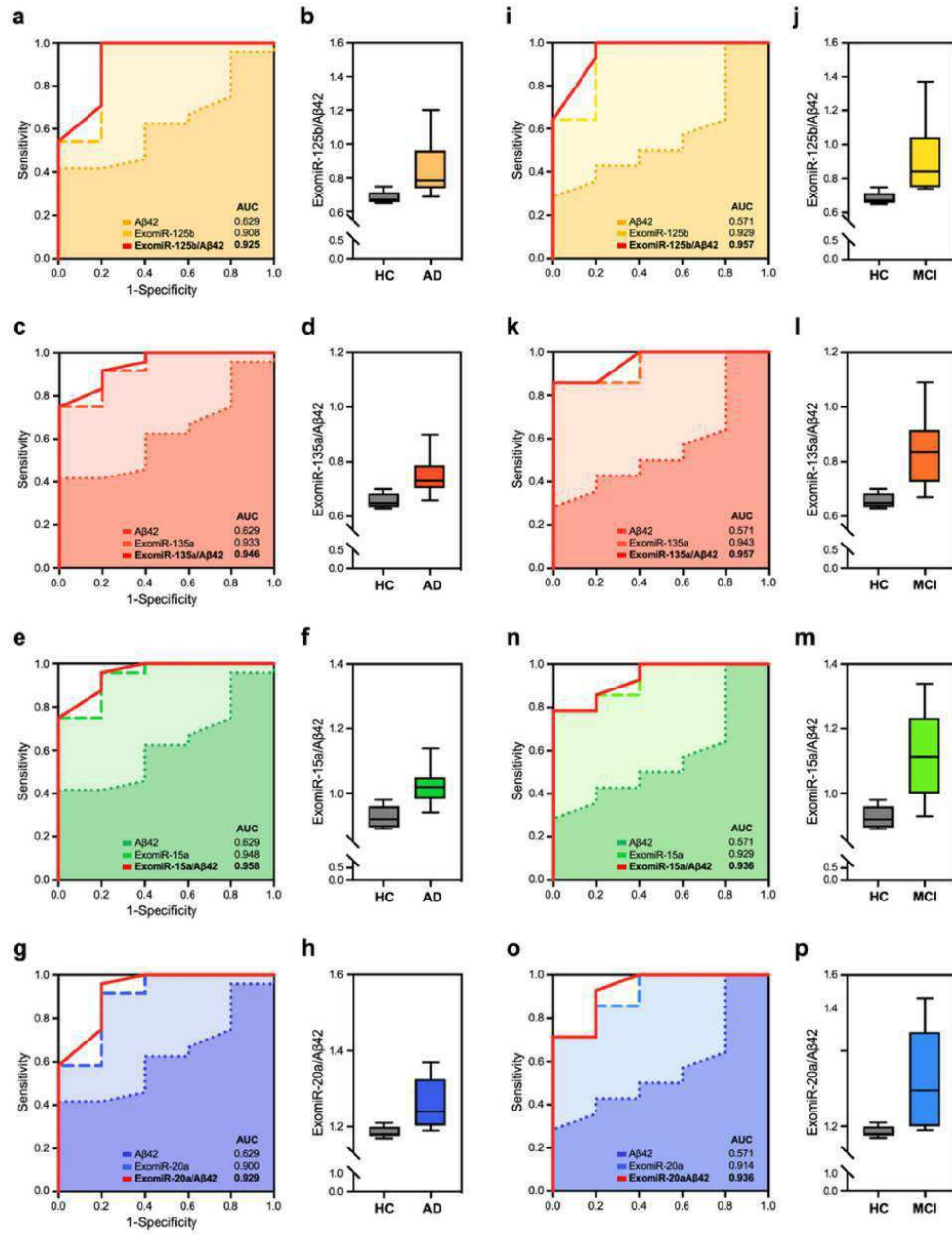
도면11



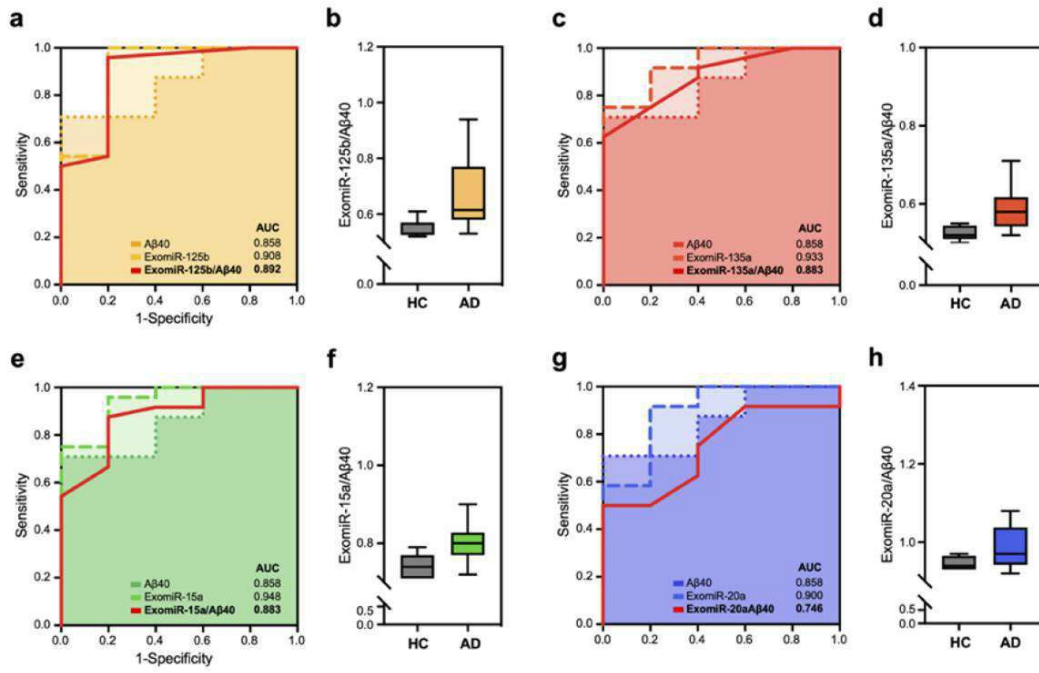
도면12



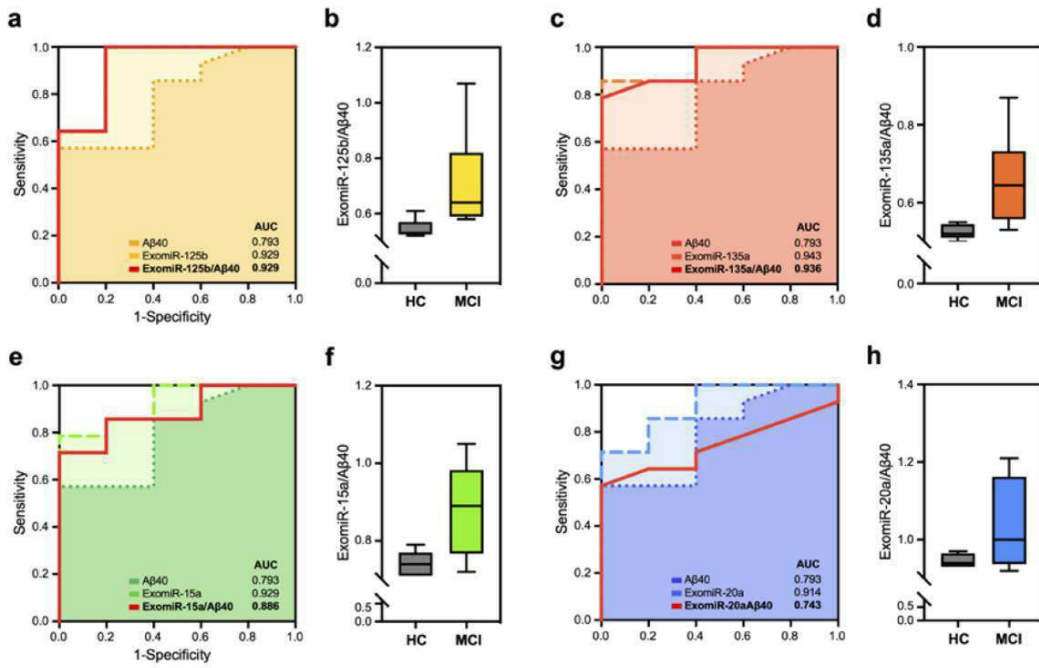
도면13



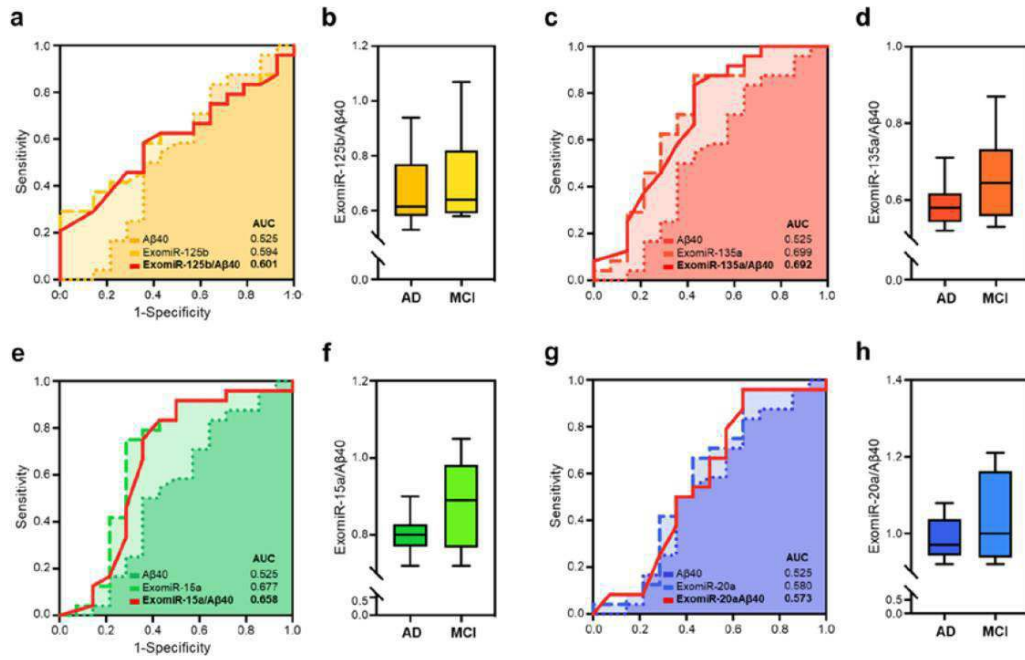
도면14



도면15



도면16



도면17

