



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0051398
(43) 공개일자 2020년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/22 (2006.01) G01N 33/487 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 27/22 (2013.01)
A61B 5/4088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0134736
(22) 출원일자 2018년11월05일
심사청구일자 2018년11월05일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
가천대학교 산학협력단
경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)
주식회사 캔티스
경기도 안산시 상록구 해안로 705, 알아이티센터 610호 (사동, 경기테크노파크)
(72) 발명자
최성혜
인천광역시 중구 인항로 27, 인하대병원 신경과(신흥동3가)
김영효
인천광역시 중구 인항로 27, 인하대병원 이비인후과(신흥동3가)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이은철, 이수찬

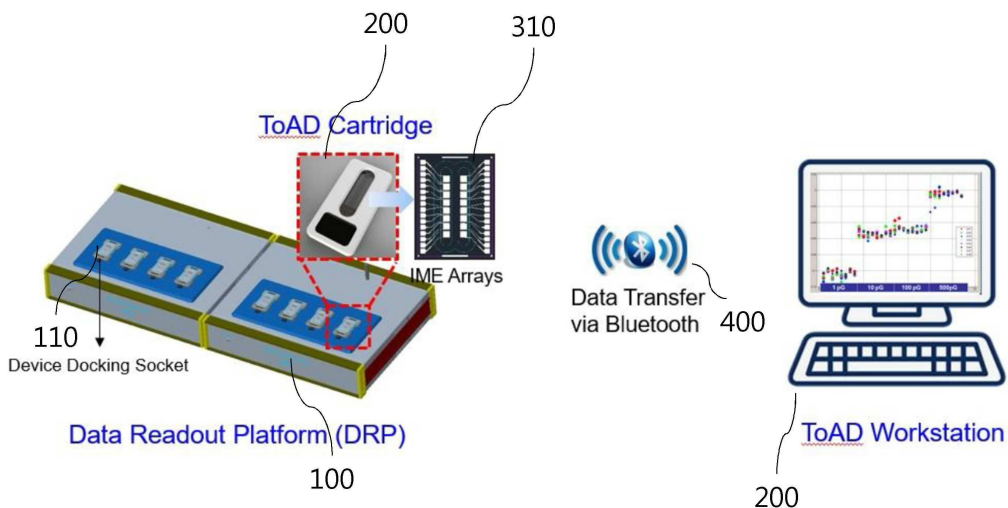
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치 및 방법

(57) 요약

본 발명에서는 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치 및 방법을 개시한다. 본 발명은 마이크로 시린지 펌프와 도킹 소켓을 구비하는 데이터 판독 플랫폼과, 도킹 소켓에 장착 및 제거 가능한 카트리지가, 마이크로 시린지 펌프를 제어하고, 데이터 판독 플랫폼으로부터 데이터를 얻고, 데이터를 시각화 하는 제어기를 포함한다. 데이터 판독 플랫폼은 카트리지로 전달된 시료의 전기용량 데이터를 이용하여, 검사가 용이하면서도 정확한 치매 판단을 할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/48785 (2013.01)
G01N 2333/4709 (2013.01)
G01N 2800/2814 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

(72) 발명자

이상명

서울특별시 관악구 관악로30길 27, 103동 602호(봉천동, 관악푸르지오아파트)

조원우

경기도 안산시 상록구 해안로 705, 경기테크노파크 RIT센터 610호(사동)

조성보

경기도 성남시 수정구 성남대로 1342, 가천대학교 IT대학 전자공학과(북정동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2018M3A9F1023697
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	콧물 분석 기반 알츠하이머 진단용 헬스케어기기 개발
기 여 율	1/1
주관기관	가천대학교
연구기간	2018.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

마이크로 시린지 펌프와 도킹 소켓을 구비하는 데이터 판독 플랫폼;

상기 도킹 소켓에 장착 및 제거 가능한 카트리지; 및

상기 마이크로 시린지 펌프를 제어하고, 상기 데이터 판독 플랫폼으로부터 데이터를 얻고, 상기 데이터를 시각화 하는 제어기;를 포함하며,

상기 데이터 판독 플랫폼은 상기 카트리지로 전달된 시료의 전기용량 데이터를 얻는 것을 특징으로 하는 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 카트리지는,

전극이 형성되어 있는 글래스 칩;

상기 전극을 포함하여 채널을 형성하는 패키징; 및

상기 전극을 상기 도킹 소켓에 연결시키는 전기 인터페이스;를 포함하는 것을 특징으로 하는 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 전극은, 서로 각지 끼워진 형태의 인터디지테이트 마이크로 전극(IME)인 것을 특징으로 하는 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 마이크로 실린지 펌프에 의해 용액을 상기 채널로 전달하는 마이크로 실린지;를 더 포함하는 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 임피던스 분석기와 제어기 사이에 무선통신 모듈;을 더 포함하는 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치.

청구항 6

비강 분비물을 채취하여 시료를 준비하는 단계;

상기 시료를 마이크로 시린지에 주입하는 단계;

마이크로 시린지 펌프를 구동하여 상기 시린지의 시료를 카트리지의 미세유동채널로 전달하는 단계;

상기 카트리지를 실온에서 20분 동안 보관하여, 카트리지 내의 시료를 배양하는 단계;

유체 채널을 세척하는 단계;

마이크로 전극에서 정전용량의 변화를 측정하는 단계; 및

치매 여부를 판단하는 단계;를 포함하는 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 비강 분비물 시료에 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline; PBS)를 추가하여 상기 비강 분비물 시료의 농도가 25%가 되도록 희석하는 단계;를 더 포함하는 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 유체 채널을 세척하는 단계는,

Tween 20이 포함된 PBS(x 1)와 PBS (x 3)를 순차적으로 공급하여 세척하는 것을 특징으로 하는 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 정전용량의 변화를 측정하는 단계는,

총 A β 의 분자를 포획하여 정전용량의 변화를 측정하는 pre-EPPS 단계; 및

EPPS를 미세 유체 채널에 주입하면서 제2 용량측정을 수행하는 EPPS 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 치매 여부를 판단하는 단계는,

EPPS 단계의 정전용량 변화값을 pre-EPPS 단계의 정전용량 변화값으로 나누어서 치매 여부를 판단하는 것을 특징으로 하는 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치 및 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 마이크로 시린지 펌프와 도킹 소켓을 구비하는 데이터 판독 플랫폼과, 도킹 소켓에 장착 및 제거 가능한 카트리지가, 마이크로 시린지 펌프를 제어하고, 데이터 판독 플랫폼으로부터 데이터를 얻고, 데이터를 시각화 하는 제어기를 포함하는 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치 및 분석 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 카트리지로 전달된 시료의 전기용량 데이터를 이용하여, 검사가 용이하면서도 정확한 치매 판단을 할 수 있다.

배경 기술

[0002] 알츠하이머 병(Alzheimer's disease; AD)은 치매의 가장 흔한 원인이며 치매의 전반적인 유병율의 60-70 %를 차지한다. 알츠하이머 병은 서서히 진행성으로 발병하며, 인식과 기능적 능력 및 행동의 점진적인 저하를 특징으로 하는 신경 퇴행성 장애이다. 아세틸콜린 에스터라제(acetylcholinesterase) 억제제 및 N-메틸-D-아스파테이트(N-methyl-D-aspartate) 수용체 길항제인 메만틴(memantine)과 같은 현재의 치료법은 증상에 관해 경감을 제공할 수 있지만, 알츠하이머 병을 근원적으로 치료할 수 있는 것은 아니다.

[0003] 알츠하이머 병의 신경 병리학적 특징으로는 뇌 전체에 걸쳐 발견되는 아밀로이드 베타(amyloid β ; A β) 함유 플라크(plaques)와 타우 함유 신경섬유 덩어리(tangles)가 있다. 이러한 특징들은 현재의 약물 개발의 주요 목표가 되고 있다. 그러나 A β 를 목표로 한 몇몇 약물 후보자는 대규모의 다기관 임상 시험에서 성공적인 결과를 얻지 못했다. 이것은 임상 연구에서 진단된 환자의 상당수가 양전자 방출 단층 촬영(positron emission

tomography; PET)에서 아밀로이드 병리학적 증거를 보이지 않기 때문에 알려져 있다. 알츠하이머 병에 대한 최근 연구는 알츠하이머 병의 임상적 발병 20-30 년 전에 아밀로이드 병리가 시작된다는 것을 보여준다. 이러한 결과는 약물 개발 및 임상 실습에서 검증된 바이오 마커의 필요성을 나타낸다.

- [0004] 지난 10여년 동안 알츠하이머 병 바이오 마커 연구에서 놀라운 발전이 이루어졌다. A β 플라크에 대한 바이오 마커는 피질 아밀로이드 PET 리간드와 저농도의 뇌척수액 (cerebrospinal fluid; CSF) A β_{42} 를 포함한다. 신경 섬유 타우에 대한 바이오 마커는 고농도의 뇌척수액(CSF) 인산화된 타우(phosphorylated tau; p-tau)와 피질 타우 PET 리간드를 포함한다.
- [0005] 신경 변성 또는 신경 손상의 바이오 마커는 CSF 전체 타우(total tau; t-tau), 플루오로디옥시글루코스 (fluorodeoxyglucose; FDG) PET의 대사저하(hypometabolism), 그리고 자기공명영상(magnetic resonance imaging; MRI)의 위축(strophy) 등이다.
- [0006] 그러나 PET와 MRI는 고가이며, CSF 바이오 마커 분석은 두통과 허리 통증과 같은 부작용 가능성이 있는 침습적 절차인 요추 천자(lumbar puncture)를 필요로 한다. 뿐만 아니라 CSF 바이오 마커 분석은 실험실 간 차이도 크다.
- [0007] 최근 혈장 A β 와 타우(tau)와 같은 알츠하이머 병 병리학의 혈액 기반 바이오 마커에 대한 연구 결과가 보고되었다. "혈액 기반 바이오 마커에 대한 안전하고 최소한의 침습성으로 인해 간단하고 저렴한 검사가 바람직하다. 대부분의 혈중 바이오 마커가 연구를 통해 일관성을 유지하는지, 다른 동질집단(cohort)에서 유효성 확인이 필요하며, 알츠하이머 병의 조기 진단을 위한 다른 비용 효과적이고 가능한 방법이 필요하다.
- [0008] 최근 연구에서 후각 기능 장애를 가진 노인들은 5년 후에 치매가 발병 할 확률이 2배 이상 높았으며, 냄새 식별 오류는 치매 진단의 확률이 더 높았다. A β PP / PS1 트랜스 제닉 생쥐에서, A β 의 침착은 후각에서 시작하여 해마와 피질로 퍼졌다. 쥐의 실험에서 뇌실에 주입된 동위 원소 표지된 A β 펩타이드 (¹²⁵I-A β 40)가 비강으로 옮겨지는 것으로 나타났다. 또 다른 최근의 연구에서 중간 비점 및 구취에서 p-tau / t-tau 비율의 중앙값은 대조군에 비해 알츠하이머 병 환자에서 유의하게 높았으나, A β_{42} 와 A β_{40} 은 0에 가깝고, 알츠하이머 병 환자와 대조군간에 차이가 없었다. 그러나 이 연구에서 사용된 방법은 비강 분비에서 매우 낮은 수준의 A β 를 검출하지 못하였다.
- [0009] 등록특허공보 제10-1758611호 “바이오센서를 이용하여 용액에 포함된 미량의 아밀로이드베타를 검출하는 방법”에서는 알츠하이머병 등의 조기 진단을 위해 바이오센서를 이용하여 용액에 포함된 미량의 아밀로이드베타를 검출하는 방법이 개시되어 있다. 다만, 항원항체 반응과 형광반응을 이용하므로 과정이 복잡하고 고가의 광학계 장비가 필요하다.
- [0010] 공개특허공보 제10-2018-0108469호 “뇌의 베타 아밀로이드 축적 감별용 혈중 바이오마커”에서는 알츠하이머성 치매 원인물질인 아밀로이드 베타의 뇌침착에 대한 혈액 바이오마커에 관하여 개시하고 있다. 혈액을 이용하는 반면에 다양한 검출 조성물이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 등록특허공보 제10-1758611호 “바이오센서를 이용하여 용액에 포함된 미량의 아밀로이드베타를 검출하는 방법”
- (특허문헌 0002) 공개특허공보 제10-2018-0108469호 “뇌의 베타 아밀로이드 축적 감별용 혈중 바이오마커”

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은, 알츠하이머 병에 의한 치매의 조기 진단이 가능한 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치 및 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은, 알츠하이머 병에 의한 치매의 진단이 가능한 저가의 치매 진단을 위한 비강 분비물 내

단백질 분석 장치 및 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은, 침습적 절차 없이 알츠하이머 병에 의한 치매의 진단이 가능한 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치 및 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 목적은 이상에서 언급된 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 다른 목적들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태에 따르면, 본 발명은 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치에 있어서, 마이크로 시린지 펌프와 도킹 소켓을 구비하는 데이터 판독 플랫폼; 상기 도킹 소켓에 장착 및 제거 가능한 카트리지; 및 상기 마이크로 시린지 펌프를 제어하고, 상기 데이터 판독 플랫폼으로부터 데이터를 얻고, 상기 데이터를 시각화 하는 제어기; 를 포함한다.

[0017] 상기 데이터 판독 플랫폼은 상기 카트리지로 전달된 시료의 전기용량 데이터를 얻을 수 있다.

[0018] 상기 카트리지는, 전극이 형성되어 있는 글래스 칩; 상기 전극을 포함하여 채널을 형성하는 패키징; 및 상기 전극을 상기 도킹 소켓에 연결시키는 전기 인터페이스;를 포함할 수 있다.

[0019] 상기 전극은, 서로 각지 끼워진 형태의 인터디지테이트 마이크로 전극(IME)으로 구성할 수 있다.

[0020] 상기 단백질 분석 장치는, 상기 마이크로 실린지 펌프에 의해 용액을 상기 채널로 전달하는 마이크로 실린지;를 더 포함할 수 있다.

[0021] 상기 단백질 분석 장치는, 상기 임피던스 분석기와 제어기 사이에 무선통신 모듈;을 더 포함할 수 있다.

[0022] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 양태로서, 본 발명은 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 방법에 있어서, 비강 분비물을 채취하여 시료를 준비하는 단계; 상기 시료를 마이크로 시린지에 주입하는 단계; 마이크로 시린지 펌프를 구동하여 상기 시린지의 시료를 카트리지의 미세유동채널로 전달하는 단계; 상기 카트리지를 실온에서 20분 동안 보관하여, 카트리지 내의 시료를 배양하는 단계; 유체 채널을 세척하는 단계; 마이크로 전극에서 정전용량의 변화를 측정하는 단계; 및 치매 여부를 판단하는 단계;를 포함한다.

[0023] 상기 단백질 분석 방법은, 상기 비강 분비물 시료에 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline; PBS)를 추가하여 상기 비강 분비물 시료의 농도가 25%가 되도록 희석하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0024] 상기 유체 채널을 세척하는 단계는, Tween 20이 포함된 PBS(x 1)와 PBS (x 3)를 순차적으로 공급하여 세척할 수 있다.

[0025] 상기 정전용량의 변화를 측정하는 단계는, 총 A β 의 분자를 포획하여 정전용량의 변화를 측정하는 pre-EPPS 단계; 및 EPPS를 미세 유체 채널에 주입하면서 제2 용량측정을 수행하는 EPPS 단계;를 포함할 수 있다.

[0026] 상기 치매 여부를 판단하는 단계는, EPPS 단계의 정전용량 변화값을 pre-EPPS 단계의 정전용량 변화값으로 나누어서 치매 여부를 판단할 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 따른 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치 및 방법은, 아밀로이드 베타를 이용하여 알츠하이머 병에 의한 치매의 조기 진단이 가능하다.

[0028] 본 발명에 따른 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치 및 방법은, 정전용량의 변화를 검출하여 알츠하이머 병에 의한 치매를 진단하므로 진단 비용이 저렴한 장점이 있다.

[0029] 본 발명에 따른 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치 및 방법은, 침습적 방법이 아닌, 혈액으로 검사하므로 진단 과정이 간단하고 용이하다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 ToAD-1 진단시스템의 구성도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 아밀로이드 β 의 측정 방법과 데이터 수집 및 데이터 처리 흐름을 나타내는 개념도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 알츠하이머 병 치매의 진단에 사용된 정전용량 변화 지수의 수신기 동작 특성 곡선을 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 알츠하이머 병 치매의 진단에 사용된 정전용량 변화 지수의 수신기 동작 특성 곡선을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하, 첨부한 도면들 및 후술되어 있는 내용을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시 예들을 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되어지는 실시 예들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되어지는 것이다. 명세서 전체에 걸쳐서 동일한 참조번호들은 동일한 구성요소들을 나타낸다. 한편, 본 명세서에서 사용된 용어는 실시 예들을 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급되지 않는 한 복수형도 포함된다. 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprises)" 및/또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 구성요소, 단계, 동작 및/또는 소자가 하나 이상의 다른 구성요소, 단계, 동작 및/또는 소자의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.
- [0032] 본 발명을 위한 연구 또는 시험에서는 알츠하이머 병 환자의 비강 분비물에서 아밀로이드 베타(amyloid β ; A β) 농도를 조사하고, 알츠하이머 병(Alzheimer's disease; AD)의 진단을 위해 비강 분비물의 A β 예측치를 조사 하였다. 본 발명을 위한 연구 또는 시험은 국제 조화 회의(International Harmonization Conference)의 우수 임상 시험 지침(Good Clinical Practice)에 따라 수행되었으며, 연구 개시 전에 인하 대학교 병원의 기관 검토위원회의 승인을 받았다. 연구에 참여하기 전에 모든 피험자 또는 법적대리인으로부터 연구 참여에 대한 서면 동의를 받았다.
- [0033] 전기적 임피던스 바이오 센서는 DNA, 단백질 및 세포의 형태학적 및 생리학적 변화에 대한 레이블 없는 실시간 모니터링이 가능하다. 표본의 전기 임피던스 측정을 위해 마이크로 또는 나노 크기의 전극 기반 센서를 사용할 수 있다. 따라서, 서로 각지 끼워진 형태의 인터디지테이트 마이크로 전극(interdigitated microelectrode; IME) 바이오 센서는 체액에서 매우 낮은 수준의 단백질을 측정할 수 있다.
- [0034] 인터디지테이트 마이크로 전극(IME) 바이오 센서를 사용하여 알츠하이머 병(AD) 환자의 비강 분비물에서 아밀로이드 베타(A β)의 수준을 조사한 다음, 알츠하이머 병 진단을 위해 비강 분비물에서 A β 의 예측 가치를 결정하였다. 비강 분비물은 알츠하이머 병(AD) 치매군 11명, 다른 신경장애(other neurological disorders; OND)와 관련된 인지능력 저하군 5명, 인지장애가 없는(cognitively unimpaired; CU) 그룹 10명에게서 얻어졌다.
- [0035] 마이크로 전극(IME)의 정전용량 변화는 총 A β ($\Delta C_{tA\beta}$)를 포착하여 측정된다. 4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진 프로판 술폰산 주입 후, 올리고머 A β 로부터 분해된 단량체 A β 로 인한 용량 변화가 결정된다($\Delta C_{oA\beta}$). 정전용량 변화 지수(capacitance change index; CCI)는 두 값을 나누어 계산한다($\Delta C_{oA\beta} \times 100 / \Delta C_{tA\beta}$, %). CCI는 알츠하이머 병(AD) 치매군에서 OND군($p = 0.001$)과 CU군($p = 0.013$)보다 높았다. 알츠하이머 병 진단에 대한 CCI의 민감도와 특이도는 3.2 %의 컷오프 포인트에서 각각 81.8 %와 90.0 %이다(수신기 작동 곡선의 아래 면적 = 0.900, 95 % 신뢰 구간 = 0.769-1.000). 이러한 결과는 비강 분비물의 올리고머 A β_{42} 수치가 알츠하이머 병(AD) 치매군에서 증가한다는 것을 보여준다. 비강 분비물에서 올리고머 A β_{42} 의 수준을 반영하는 CCI는 알츠하이머 병의 예측에 효과적이다.
- [0036] 이하, 실시예와 도면을 참조하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 치매 진단을 위한 비강 분비물 내 단백질 분석 장치 및 방법에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- [0037] <실시예> 피험자 모집
- [0038] 비강 분비물은 50 세에서 90 세 사이의 26 명의 참가자들에게서 얻은 것인데, 알츠하이머 병(AD) 치매군 11명, 인지장애가 있는 다른 신경장애(other neurological disorders; OND) 그룹 5명, 인지장애가 없는(cognitively unimpaired; CU) 그룹 10명에게서 얻어진 것이다.
- [0039] 인하 대학교 의과 대학 인천 성모 병원 메모리얼 클리닉에서 알츠하이머 병 치매 또는 OND 환자를 모집하였고, 2015년 10월부터 2016년 12월까지 AD 치매 환자 11명, 인지 기능 저하(OND) 환자 5명, CU 노인 대조군

10 명이 피험자로 연구에 참여했다.

- [0040] 알츠하이머 병(AD) 치매 환자는 국립 노화 방지 협회(National Institute on Aging-Alzheimer's Association; NIA-AA)의 핵심 임상 기준에 의한 알츠하이머 병 치매의 기준을 충족시켰다.
- [0041] OND 그룹은 뇌졸중 후 인지기능 장애를 가진 2명의 환자, 전두 측두엽 변성 환자 1명, 파킨슨 병 환자 1명, 간질 환자 1 명이다.
- [0042] CU 피험자는 다른 이유로 (예 : 현기증, 고혈압, Bell의 마비) 동일한 병원의 신경 클리닉을 방문한 환자로부터 모집되었다. CU 피험자는 뇌졸중, 발작, 파킨슨 병, 다발성 경화증, 뇌성 마비, 헌팅턴 병, 뇌염, 뇌수막염 등의 인지기능 저하와 연관된 28 가지 질병을 가지지 않았다. 또한 뇌 수술, 뇌 동맥 수술, 인슐린 조절이 필요한 당뇨병, 잘 조절되지 않은 고혈압, 지난 3 년 이내에 진단 된 피부암 이외의 암, 가만히 앉아있는 동안의 호흡 곤란, 집에서의 산소 사용, 기억 등에 영향을 미치는 심장마비, 신장 투석, 간 질환, 지난 5 년 동안의 정신적 또는 정서적 문제에 대한 입원, 정신적 또는 정서적 문제에 대한 약물의 현재 사용, 1 일 3 잔 이상의 알코올 소비, 지난 5 년간 약물 남용, 지난 5 년간 알코올 남용 치료, 비 음주 머리 외상으로 인한 일박성 입원, 기억력이나 다른 정신 기능의 영구적 인 저하를 초래하는 질병, 안경으로도 평범한 책을 읽지 못하는 시력 장애, 보청기를 착용하더라도 대화를 이해하기 어려운 청력 등의 문제가 없었다.
- [0043] CU 피험자의 MMSE 점수는 연령 및 교육 조정 기준치보다 1.5 표준 편차 이상 높았다.
- [0044] 시험 진입 1 주 이내에 비강에 영향을 미치는 약을 복용 한 환자, 3 개월 이내에 비강 수술을 받은 환자, 단순한 엑스레이 또는 전산화 단층 촬영 스캔으로 비염 또는 부비동염으로 진단받은 환자, 현재 화학 요법 자극제, 현재 흡연자, 중증 또는 통제되지 않은 의학적 질병이 있는 사람, 임신 중이거나 수유중인 사람은 제외되었다.
- [0045] 모든 피험자는 광범위하게 표준화된 신경 심리학 검사인 신경심리검사(Seoul Neuropsychological Screening Battery; SNSB)를 포함하여 포괄적인 신체적 및 신경학적 검사를 받았다. 피험자들은 뇌 MRI와 갑상선 기능 검사, 혈청 비타민 검사 B12 및 엽산 수치, 그리고 VDRL(Venereal Disease Research Laboratory) 테스트도 받았다.
- [0046] 두뇌 아밀로이드 병리학의 증거는 3명의 AD 치매 환자에서 나타난 양성 피츠버그 화합물(^{11}C -Pittsburgh compound-B; ^{11}C -PIB) PET 영상과, 1명의 AD 치매 환자에서 나타난 양성 florbetapir(^{18}F -florbetapir) PET 영상이다. 나머지 2명의 AD 치매 환자에서 나타난 뇌척수액(CSF)의 낮은 $\text{A}\beta_{42}$ 수치도 아밀로이드 병리학을 입증한다.
- [0047] OND 그룹의 참가자 2 명과 CU 그룹의 참가자 3 명은 ^{18}F -florbetaben PET 영상에서 아밀로이드 음성 결과를 보였다. CU 그룹의 한 참가자도 ^{11}C -PIB PET 영상에서 아밀로이드 음성 결과를 보였다.
- [0048] 표 1은 각 군(그룹)에 따른 참가자의 기본 인구 통계학적 및 임상적 특징을 나타낸다.

표 1

	AD 치매군	OND군	CU군	P
피험자 수	11	5	10	
나이(년)	74.6 (68.0-83.0)	72.4 (63.0-79.0)	69.2 (65.0-75.3)	0.15
여성 피험자 수	8 (72.7%)	1 (20.0%)	9 (90.0%)	0.02
교육 경험(년)	7.3 (3.0-12.0)	8.6 (4.5-13.0)	6.2 (4.5-9.5)	0.51
MMSE	15.5 (14.0-17.0) † ‡	24.6 (21.5-27.0)*	27.3 (24.5-29.8)*	<0.001
CDR	1.00 (0.50-1.00) ‡	0.50 (0.50-0.50) ‡	0.15 (0.00-0.50)* †	<0.001
CDR-SB	5.91 (3.00-8.00) † ‡	1.80 (1.00-2.75)* ‡	0.15 (0.00-0.13)* †	<0.001
APOE ε 4 보균자	3/11 (27.3%)	0/3 (0%)	2/7 (28.6%)	0.58

- [0050] 표 1에서 AD 치매군(AD dementia)은 알츠하이머 병으로 진단된 치매 그룹을 나타내고, OND군은 기타 신경 질환으로 진단된 피험자 그룹을 나타내고, CU군은 인지적으로 손상되지 않은 피험자 그룹을 나타낸다. 그리고 MMSE는 간이 정신 상태 검사(Mini-Mental State Examination)를 나타내고, CDR은 임상 치매 등급(Clinical Dementia Rating)을 나타내고, CDR-SB는 CDR 각 항목의 점수의 합(Sum of Boxes)을 나타내고, APOE는 아포리포

프로테인(apolipoprotein) E를 나타낸다.

- [0051] 표 1의 값은 중앙값(사분위 범위) 또는 숫자(%)로 표시하였다. Bonferroni 보정 방법을 사용하면, * 표시가 된 것은 AD 치매군에 대해 $p < 0.0167$ 이고, † 표시가 된 것은 OND군에 대해 $p < 0.0167$ 이고, ‡ 표시가 된 것은 CU군에 대해 $p < 0.0167$ 이다.
- [0052] MMSE, CDR 척도 및 CDR-SB 점수는 그룹 간에 유의미한 차이를 나타낸다. MMSE ($p < 0.001$), CDR ($p < 0.001$) 및 CDR-SB ($p < 0.001$) 점수는 AD 치매군에서 CU군보다 유의하게 낮았다. MMSE ($p = 0.002$)와 CDR-SB ($p = 0.012$) 점수는 AD 치매군에서 OND군보다 유의하게 낮았다. 마지막으로, CDR ($p = 0.013$)과 CDR-SB ($p = 0.001$) 점수는 OND군에서 CU군보다 유의하게 낮았다. 여성 성별의 비율은 OND군에서 AD 치매군 및 CU군보다 낮았다. 그 밖의 연령, 교육 수준, APOE ε4 보균자(carrier)는 집단간에 유의한 차이는 관찰되지 않았다.
- [0053] **<실시예> 비강 분비물 수집**
- [0054] 비강 분비물은 다음과 같은 방법에 따라 수집된다. Merozel® 스폰지를 환자의 양쪽 비강 내에 1 분간 둔다. 이 단계에서 스폰지는 비강 지붕쪽으로 배치되어 가능한 후각 구근에 가깝게 배치한다. 피험자의 코에서 떼어낸 스폰지를 깔때기가 달린 특수 튜브에 삽입한다. 스폰지가 이 튜브의 깔때기에 놓이게 되면, 스폰지에 흡수된 비강 분비물은 아래로 흐르도록 설계된 깔때기를 통해 아래로 흐른다. 스폰지에서 얻은 모든 비강 분비물을 분리하기 위해 4℃에서 5000 rpm으로 10 분간 원심 분리를 수행한다. 얻어진 비강 분비물은 추가 분석시까지 -80℃의 온도에서 보관한다.
- [0055] **<실시예> 시스템 준비**
- [0056] 인간 코 분비물을 분석하기 위하여 전기적인 정전용량 측정 시스템(electrical capacitance measurement system)을 사용하였다. 정전용량 측정 시스템으로는 ToAD-1(Cantis Inc., South Korea)을 사용하였다.
- [0057] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 ToAD-1 진단시스템의 구성도이다.
- [0058] 정전용량 측정 시스템 ToAD-1은 데이터 판독 플랫폼(data readout platform; DRP)(100), 데이터 판독 플랫폼(DRP)으로부터 데이터를 얻는 제어기(200), 제거 가능한 카트리지(300)를 포함한다.
- [0059] 데이터 판독 플랫폼(100)은 임피던스 분석기를 변형시켜 제작할 수 있다. 데이터 판독 플랫폼(DRP)은 디바이스 도킹 소켓(110)과 마이크로 실린지 펌프(미도시)를 포함한다. 도 1에는 디바이스 도킹 소켓(110)이 8개 도시되어 있다.
- [0060] 제어기(200)는 워크스테이션 컴퓨터를 통해 구현할 수 있으며, 데이터 판독 플랫폼(DRP)으로부터 데이터 획득하고, 획득된 데이터를 시각화하고, ToAD-1 카트리지에 연결된 마이크로 실린지 펌프의 동작을 제어할 수 있다.
- [0061] 마이크로 실린지 펌프를 포함하는 데이터 판독 플랫폼과 제어기의 통신(400)은 블루투스 뿐만 아니라 와이파이, LTE, Zigbee, LoRa 등과 같은 유·무선기술을 이용하여 이루어질 수 있다.
- [0062] 제거 가능한 ToAD-1용 카트리지(300)는 일회용으로 제작될 수 있으며, ToAD-1 시스템의 데이터 판독 플랫폼(DRP)의 도킹 소켓(110)에 장착된다.
- [0063] 카트리지(300)는 글래스 칩(glass chip), 폴리카보네이트(polycarbonate; PC) 패키징(packaging), 전기 인터페이스(electric interface)를 포함한다.
- [0064] 글래스 칩은 그 위에 서로 각지 결합된 마이크로 전극(interdigitated microelectrode; IME) 어레이(310)를 구비한다. 마이크로 전극은 산화환원 반응이 어려운 백금 재질로 제작하는 것이 바람직하다. 도 1에는 16 쌍의 백금 마이크로 전극(pt-IME)이 구비된 경우가 도시되어 있다. 글래스 칩은 유리판으로 제작하는 것이 바람직하나, 반응성이 없는 플라스틱 등을 이용하여 제작할 수 있다.
- [0065] PC 패키징은 2 개의 마이크로 유체 채널을 구비할 수 있다. 즉, 각 유체 채널이 8 쌍의 전극을 포함하도록 구성할 수 있다. 유체 채널에는 마이크로 실린지가 연결되어, 마이크로 실린지 펌프의 구동에 의해 유체가 전달될 수 있다.
- [0066] 전기 인터페이스는 백금 마이크로 전극(Pt-IME)과 도킹 소켓(110)을 연결한다.
- [0067] 샘플을 분석하기 위해, 올리고머 Aβ₄₂를 포획하기 위해 사용되는 Aβ 항체 (6E10)를 ToAD-1 카트리지의 Pt-IME 사이에 고정시킨다.

[0068] <실시예> 샘플 분석 프로토콜

[0069] 먼저, 비강 분비물을 점도를 조절하기 위해 인산염 완충 식염수 (phosphate-buffered saline; PBS) (1X, pH 7.4)에서 원래의 농도의 25 %로 희석한다. 그 후 희석액을 200 μ l 주사기에 넣는다. 마이크로 시린지 펌프를 구동하여 최대 16 개의 시료를 ToAD-1 카트리지의 미세 유체 채널에 조심스럽게 전달한다. 그 후 샘플을 실온에서 20분 동안 배양한다.

[0070] 마이크로 전극(IME) 및 채널을 세정하기 위해 샘플 용액을 펌프에 압력을 가해 제거하고, Tween 20이 포함된 PBS(x 1)와 PBS (x 3)를 순차적으로 공급하여 마이크로 유체 채널을 세척한다.

[0071] 마이크로 전극(IME)에서 정전용량(capacitance)의 변화는 이 단계 (pre-EPPS 단계, 1000 Hz, 20분)에서 총 A β 의 분자를 포획함으로써 측정한다. 측정 후, 4- (2- 히드록시에틸) -1- 피페라진프로판 술폰산(4- (2-hydroxyethyl) -1- piperazinepropanesulfonic acid; EPPS)을 미세 유체 채널에 조심스럽게 주입함과 동시에, 제2 용량측정을 수행한다(1000 Hz, 1시간).

[0072] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 아밀로이드 β 의 측정 방법과 데이터 수집 및 데이터 처리 흐름을 나타내는 개념도이다.

[0073] 도 2는 희석된 비강 분비물에서 올리고머성 아밀로이드 β 의 측정을 위한 분석 프로토콜과, ToAD 진단 시스템에서 전자적으로 데이터를 수집하는 과정, 그리고 커패시턴스 변화 지수를 계산하는 데이터 표준화 과정을 나타낸다.

[0074] 도 2를 참조하면, post-EPPS 단계에서 시간 경과에 따른 정전용량 변화는 EPPS에 의해 올리고머 A β 으로부터 해체된 단량체 A β 분자가 A β 항체의 비어있는 항원 결합 단편(Fab) 결합 부위와 점차적으로 결합되고 있음을 나타낸다.

[0075] <실시예> 데이터 측정 및 통계분석

[0076] 데이터 판독 플랫폼(DRP)으로 측정된 모든 데이터는 측정 중에 Bluetooth를 통해 자발적으로 ToAD-1 워크스테이션으로 전송된다. 원칙적으로 ToAD-1 분석기는, 단일 마이크로 유체 채널에서 8-IME 어레이로부터 얻은 정전용량 데이터를 평균화하고, 전기 매개 변수 설정 및 알고리즘에 따라 이들 데이터를 표준화하여, pre-EPPS 단계 ($\Delta C_{tA\beta}$)에서 정전용량 변화를 산출한다. 및 EPPS 단계 이후의 올리고머 A β ($\Delta C_{oA\beta}$)의 값을 나타낸다. 정전용량 변화를 사용하여 시스템은 감지 영역과 터미널 패드 사이의 전송 라인의 길이와 위치에 따라 결정된 IME 어레이의 정전용량 값의 편차를 피할 수 있었습니다. 표준화 된 정전용량 변화는 정전용량 변화 지수(capacitance change index; CCI)에 따라 정의되었다. 마지막으로 CCI는 두 가지 정전용량(capacitance) 변화 값 ($\Delta C_{oA\beta} \times 100 / \Delta C_{tA\beta}$, %)을 나누어 계산했다.

[0077] 특성 데이터는 중앙값 및 사분위수 범위(interquartile range; IQR) 또는 보급률(percentages for prevalence)로 제시되었다. Kruskal-Wallis 검사는 연령, 교육 수준, MMSE 점수, CDR 척도, CDR-SB 및 CCI를 그룹간에 비교하는 데 사용되었다. 사후 분석은 Bonferroni 보정 방법을 사용하여 수행되었다. Spearman 's rho는 CCI와 광역 인지기능 간의 상관관계를 측정하는 데 사용되었다. 카테고리 변수, 즉 성별 및 아포리포프로테인 E (APOE) ϵ 4 캐리어 상태에 대해, 주파수를 계산하고 χ^2 테스트를 사용하여 그룹 간의 차이를 비교하였다. 알츠하이머 병 치매 진단을 위한 CCI의 민감도와 특이도는 ROC 곡선 분석에 의해 평가되었다. 모든 검사에 대한 유의성은 $\alpha = 0.05$, 양측 꼬리로 설정되었다. 모든 통계 분석은 SPSS 19.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행되었다.

[0078] <실시예> 측정 결과 및 분석

[0079] 비강 분비물은 알츠하이머 병(AD) 치매군 11 명, 인지 장애가 있는 다른 신경 장애(OND)군 5 명, 인지 장애가 없는(CU)군 10 명에게서 얻어졌다.

[0080] 표 2는 각 군(그룹)에 따른 비강 분비물의 정전용량 변화 지수(CCI)를 나타낸다.

표 2

	AD 치매군	OND군	CU군	P
피험자 수	11	5	10	
평균 CCI (SD), %	4.4 (1.5)	2.3 (1.2)	2.2 (1.1)	

메디안 CCI (IQR), %	4.3 (3.2-5.9)†‡	1.9 (1.4-3.5)*	2.2 (1.3-3.1)*	0.003
------------------	-----------------	----------------	----------------	-------

[0082] 표 2에서 SD는 표준 편차(standard deviation)을 나타내고, IQR은 사분위 범위(interquartile range)를 나타낸다. P값은 Kruskal-Wallis 테스트 결과이다. 나머지 약어 또는 기호는 표 1에 사용된 것과 동일한 의미로 사용하였다.

[0083] 도 3은 각 그룹에 따른 비강 분비물의 정전용량 변화 지수의 분포 패턴이다.

[0084] 알츠하이머 병(AD) 치매군, 다른 신경질환(OND)군 및 인지기능이 손상되지 않은(CU)군의 비강 분비물에 대한 정전용량 변화 지수(CCI)의 분포를 나타내었다.

[0085] 비강 분비물의 정전용량 변화 지수(CCI)는 각 그룹 간에 유의한 차이를 보여준다. 비강 분비물에서의 CCI는 Bonferroni 보정 방법을 사용한 post hoc 분석에 의하면, AD 치매군에서 OND군(p = 0.001) 및 CU군(p = 0.013)보다 유의하게 높았다.

[0086] 표 3은 정전용량 변화 지수와 전체인지 기능 간의 상관 관계를 나타낸다.

표 3

	정전용량 변화 지수(CCI)	
	Spearman's rho	P
MMSE	-0.564	0.004
CDR	0.409	0.038
CDR-SB	0.534	0.005

[0088] 표 3의 약어는 표 1 또는 표 2에서 사용한 것과 동일한 의미를 나타낸다.

[0089] 표 3에서 비강 분비물의 CCI는 MMSE 점수와 부정적인 상관관계를 나타내고, CDR 또는 CDR-SB 점수와 양의 상관관계를 나타낸다.

[0090] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 알츠하이머 병 치매의 진단에 사용된 정전용량 변화 지수의 수신기 동작 특성 곡선을 나타내는 그래프이다.

[0091] 알츠하이머 병(AD) 치매의 진단을 위해 비강 분비물의 정전용량 변화 지수(CCI) 예측 값을 조사하기 위해 수신기 동작 특성(receiver operating characteristic; ROC) 곡선을 사용하였다.

[0092] 도 4(A)에서 AD 치매군 및 인지 장애가 없는(CU)군에서 AD 치매 진단을 위한 CCI의 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)는 3.2 %의 컷오프 포인트에서 각각 81.8 %와 90.0 %였다. ROC 곡선 아래의 면적(area under the ROC curve; AUC)은 0.900 (95 % 신뢰 구간 (confidence interval; CI) = 0.769-1.000, 표준 오차 (standard error; SE) = 0.067)이었다.

[0093] 도 4(B) AD 치매군 및 기타 신경 질환을 앓고 있는(OND)군에서 AD 치매 진단을 위한 비강 분비물의 CCI의 민감도와 특이도는 컷오프 포인트 3.1 %에서 각각 81.8 %와 80.0 %였다. ROC곡선 아래의 면적(AUC)은 0.891 (95 % CI = 0.722-1.000, SE = 0.086)이었다.

[0094] 본 발명을 위한 연구에서 코 분비물의 CCI는 알츠하이머 병 치매 환자에서 CU 피험자 및 OND 환자보다 높았다. 비강 분비물에서의 올리고머 Aβ₄₂의 농도가 높을수록 비강 분비물의 CCI가 더 컸다. 이 결과는 비강 분비물에서 Aβ₄₂ 올리고머가 CU 피험자 및 OND 환자보다 알츠하이머 병 치매 환자에서 높게 나타남을 보여준다. 또한, 이 결과는 비강 분비물의 CCI가 알츠하이머 병 치매의 예측에 유효함을 보여준다. 비강 분비물에서 CCI의 절단값은 알츠하이머 병 치매의 진단에 대해 우수한 특이성과 민감성을 보였다. 알츠하이머 병 치매의 예측을 위한 비강 분비물에서 CCI의 예측 정확도는 이전 연구에서 발견된 아밀로이드 PET 리간드 및 CSF 알츠하이머 병 생체 마커의 예측 정확도와 유사하였다.

[0095] 알츠하이머 병 치매와 OND 환자를 구별하기 위한 비강 분비물의 CCI 예측 정확도 또한 유효했다. 알츠하이머 병 치매의 진단 마커가 되기 위해서는 바이오 마커가 알츠하이머 병 환자를 정상적인 사람뿐만 아니라 다른 질병을 앓고 있는 환자와 구별할 수 있어야 한다. 따라서, 비강 분비물에서 올리고머 Aβ₄₂ 수준을 반영하는 CCI는 알츠

하이머 병의 진단 마커가 될 수 있다.

[0096] CCI는 전체적인 인지기능 척도와 적절하게 상관관계가 있었다. CCI가 높을수록 광역 인지기능이 낮아지므로 CCI는 알츠하이머 병의 자연 경과를 반영할 수 있다.

[0097] 비강 분비물에서 올리고머 $A\beta_{42}$ 의 극도로 민감한 검출은 IME 방법을 사용하여 수행 할 수 있었다. 즉, 비강 분비물의 아밀로이드 베타는 알츠하이머 병의 잠재적인 생체 표지 물질이다

[0098] 이상에서 대표적인 실시 예를 통하여 본 발명에 대하여 상세하게 설명하였으나, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 상술한 실시 예에 대하여 본 발명의 범주에서 벗어나지 않는 한도 내에서 다양한 변형이 가능함을 이해할 것이다. 그러므로 본 발명의 권리 범위는 설명된 실시 예에 국한되어 정해져서는 안 되며, 후술하는 특허청구범위뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태에 의하여 정해져야 한다.

부호의 설명

[0099] 100 : 데이터 판독 플랫폼(DRP)

110 : 도킹 소켓

200 : 제어기

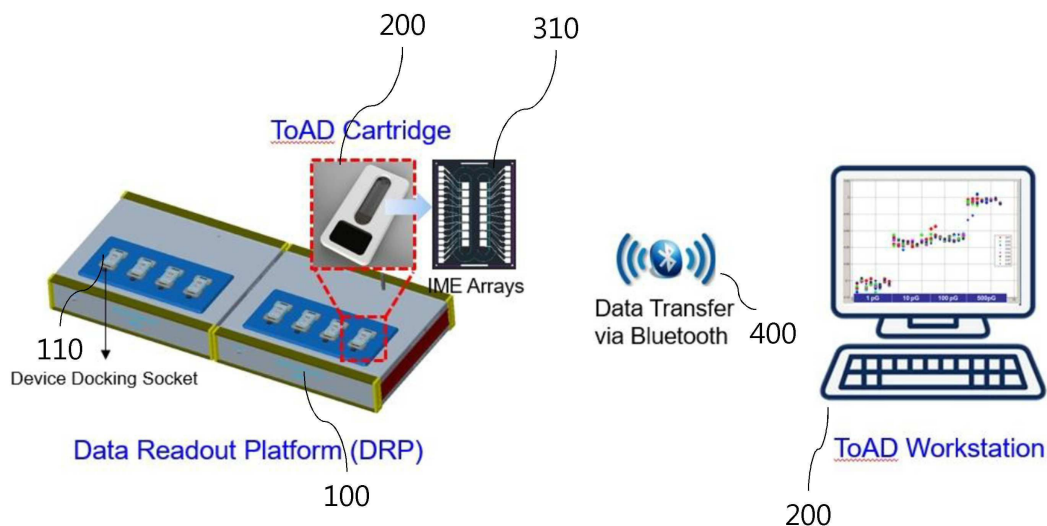
300 : 카트리지

310 : IME 어레이

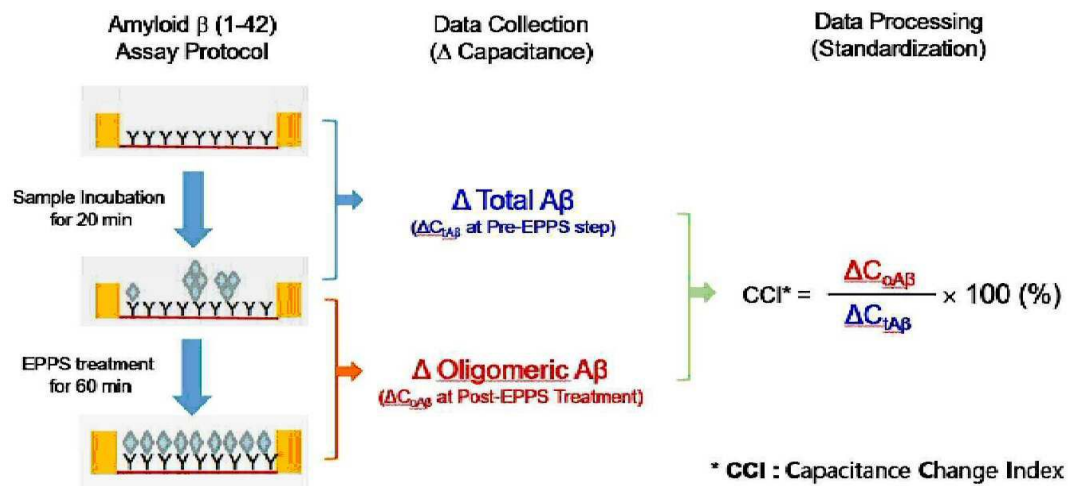
400 : 무선통신

도면

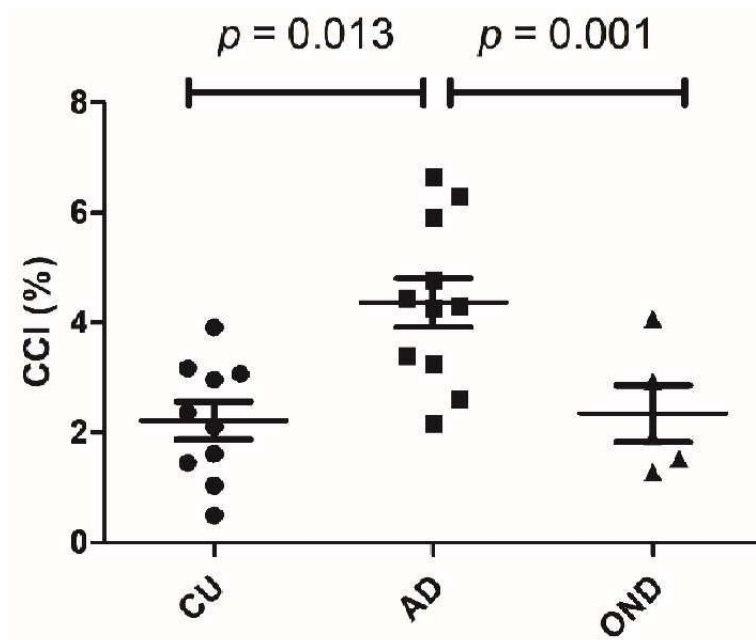
도면1



도면2

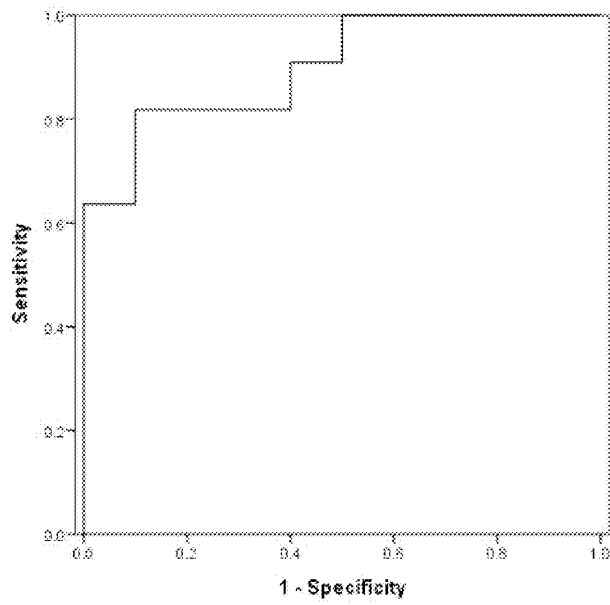


도면3



도면4

(A)



(B)

