(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0058189
(43) 공개일자 2024년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) *B01J 20/26* (2006.01)
B01J 20/28 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56983 (2013.01)
B01J 20/268 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7012946
(22) 출원일자(국제) 2022년09월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년04월18일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/076119
(87) 국제공개번호 WO 2023/041808
국제공개일자 2023년03월23일
(30) 우선권주장
21197636.0 2021년09월20일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
엠아이피 디스커버리 리미티드
영국 엠케이44 1엘큐 베드퍼드셔 샌브룩 콜웰스 파크 더 익스체인지
(72) 발명자
톰슨 앨런
영국 피이28 0티와이 헌팅던 이스턴 더 레인 오차드 하우스
존슨 리애넌
영국 엠케이41 7피더블유 베드포드셔 베드포드 클라팜 로드 68 플랫 4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

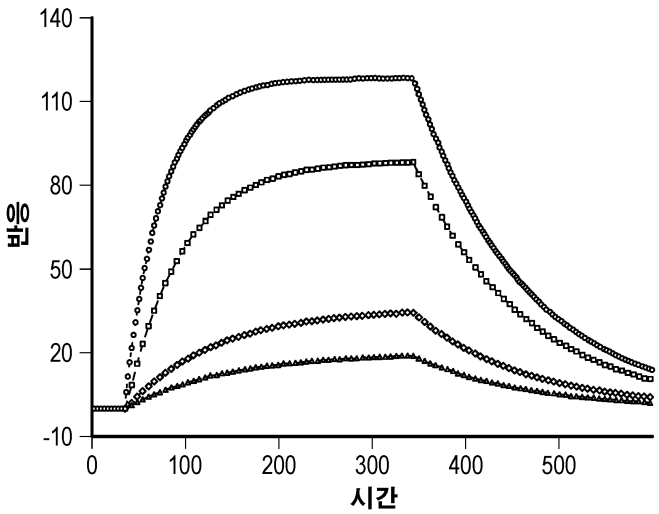
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **SARS-CoV-2의 검출**

(57) 요 약

SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인의 하위서열에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 주형 분자에 상보적인 적어도 하나의 인식 부위를 포함하는 분자 각인 중합체로서, 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고 (i) NSNNLDSKVGG,(ii) NYNYLYRLFRKS, (iii) YRLFRKSNLKPF, (iv) STEIYQAGSTPC, (v) CNGVEGFNCYF, (vi) GSTPCNGVEGF, (vii) CYFPLQSYGFQP, (viii) GFQPTNGVGYQ 및 (ix) LQSYGFQPTNG로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 분자 각인 중합체. 분자 각인 중합체를 제조하는 방법이 또한 제공된다. 분자 각인 중합체 및 형광단을 포함하는 접합체가 또한 본 발명의 분자 각인 중합체 및 접합체를 함유하는 조성물로서 제공된다. 분자 각인 중합체, 접합체 및 조성물은 SARS-CoV-2 검출에 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
B01J 20/28004 (2013.01)
G01N 33/582 (2013.01)
G01N 2600/00 (2013.01)
(72) 발명자
출락 조안나
영국 엠케이41 7큐에스 베드포드셔 베드포드 말라드 힐 48
구에레이로 안토니오
영국 엠케이43 0디에이 크랜필드 머천트 레인 5
그로브스, 알리스테어
영국 엔엔10 0엔에이 러쉬덴 하버러 로드 하버러 플레이스 3
칸파로타 프란체스코
영국 엔엔15 5지에이 노샘프턴셔 버튼 래티머 버지니아 크레센트 40

명 세 서

청구범위

청구항 1

SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인의 하위서열에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 주형 분자에 상보적인 적어도 하나의 인식 부위를 포함하는 분자 각인 중합체(molecularly imprinted polymer)로서, 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고

(i) NSNNLDSKVGG,

(ii) NYNYLYRLFRKS,

(iii) YRLFRKSNLKPF,

(iv) STEIYQAGSTPC,

(v) CNGVEGFNCYF,

(vi) GSTPCNGVEGF,

(vii) CYFPLQSYGFQP,

(viii) GFQPTNGVGYQ 및

(ix) LQSYGFQPTNG

로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 분자 각인 중합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열은

(i) NSNNLDSKVGG,

(ii) STEIYQAGSTPC 및

(iii) CYFPLQSYGFQP

로부터 선택되는 것인 분자 각인 중합체.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열은 NSNNLDSKVGG인 분자 각인 중합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체의 크기는 500 nm 미만, 바람직하게는 250 nm 미만 및 훨씬 더 바람직하게는 100 nm 미만인 분자 각인 중합체.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) N-플루오레세이닐 아크릴아미드,

(ii) 아크릴아미드,

(iii) Tert-부틸 아크릴레이트(TBAc),

(iv) 3-O-아크릴로일-1,2:5,6-비스-O-이소프로필리덴-D-글루코푸라노스,

(v) 2,2,2-트리플루오로에틸 메타크릴레이트(CF3),

(vi) N-(3-아미노프로필) 메타크릴아미드 염산염(APMA),

(vii) 스퀘어아미드 단량체 7(SQ7) 및

(viii) N,N'-메틸렌비스(아크릴아미드)(BIS)

로 이루어진 군으로부터의 단량체를 포함하는 분자 각인 중합체.

청구항 6

제5항에 있어서, 중합체는 N-플루오레세이닐 아크릴아미드 및/또는 3-O-아크릴로일-1,2;5,6-비스-O-이소프로필리덴-D-글루코푸라노스를 포함하는 것인 분자 각인 중합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 중합체는 (i)-(viii) 모두를 포함하는 것인 분자 각인 중합체.

청구항 8

SARS-CoV-2에 결합하는 적어도 하나의 인식 부위를 포함하는 분자 각인 중합체를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은

(a) 표면에 노출되도록 고정화된 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인의 하위서열에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 주형 분자를 갖는 캐리어 물질을 제공하는 단계;

(b) 표면과 접촉하는 중합가능한 조성물을 제공하는 단계;

(c) 표면과 접촉하는 중합가능한 조성물의 제어된 중합을 수행하여 분자 각인 중합체를 생성하는 단계; 및

(d) 분자 각인 중합체를 표면으로부터 분리하는 단계

를 포함하고,

아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고

(i) NSNNLDSKVGG,

(ii) NYNYLYRLFRKS,

(iii) YRLFRKSNLKPF,

(iv) STEIYQAGSTPC,

(v) CNGVEGFNCYF,

(vi) GSTPCNGVEGF,

(vii) CYFPLQSYGFQP,

(viii) GFQPTNGVGYQ 및

(ix) LQSYGFQPTNG

로부터 선택된 서열을 포함하는 것인, 상기 분자 각인 중합체를 제조하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 서열은:

(x) NSNNLDSKVGG,

(xi) STEIYQAGSTPC,

(xii) CYFPLQSYGFQP

로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 서열은 NSNNLDSKVGG인 방법.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 주형 분자는 추가적인 시스테인 잔기를 포함하도록 N 말단에서 변형되는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 주형 분자는 주형의 시스테인 잔기와 마지막 잔기 사이에 글리신 잔기를 포함하도록 변형되는 것인 방법.

청구항 13

(i) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 분자 각인 중합체 및

(ii) 형광단

을 포함하는 접합체.

청구항 14

SARS-CoV-2의 검출에 있어서 (1) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 분자 각인 중합체, 또는 (2) 제13항의 접합체의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 SARS-CoV-2 검출용 화합물, 이를 생성하는 방법 및 이를 포함하는 접합체, SARS-CoV-2 검출용 조성물 및 보다 특히 SARS-CoV-2 검출에서의 전술한 것의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 2019년에 새로운 코로나바이러스인 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)의 발생은 팬데믹을 일으켰고, 이는 결국 세계적인 규모로 공중 보건과 경제 위기를 초래하였다.

[0003] 국제 사회는 진단 및 항체 검사 모두가 각각 바이러스의 추가 전염을 예방하고 바이러스의 유병률을 이해하는 데 중요하다는 것을 빠르게 인식했지만, 신뢰할 수 있고 생성 비용이 저렴하며 사용하기 쉬운 검사 키트에 대한 수요가 여전히 높다.

[0004] 진단 검사와 관련하여, 현재 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)에 기반한 검사는 의료 제공자가 시민을 평가하는 주요 수단이다. RT-PCR 검사는 종종 비인두 면봉을 통해 얻은 호흡기 샘플에서 바이러스 리보핵산(RNA)을 검출함으로써 작동한다.

[0005] RT-PCR 검사는 널리 보급되어 있지만 문제가 있다. RT-PCR 검사를 수행하는 것은 노동 집약적일 수 있으며, 매우 숙련된 인력이 필요하며, 예컨대 샘플링 오류나 부적절한 샘플 처리로 인해 위음성 결과가 발생할 수 있다. 실제로, 위양성 결과는, 예컨대 샘플 교차 오염으로 인해 발생할 수도 있다. 상기 검사는 또한 비싸고, 결과에 대해 소요 시간(1-2일)이 길다.

[0006] 신속 항원 검사는 또한 집단 스크리닝에도 사용되며 개인의 편의에 따라 수행될 수 있는 휴대가 쉽고 신속한(15~30분) 분석을 제공한다. 그러나, 이들은 민감도가 부족하고 항체를 수용체로 활용하므로 좁은 온도와 pH 범위에서만 기능할 수 있으며, 이는 이들의 광범위한 사용을 제한한다.

[0007] 분자 각인 중합체(Molecularly imprinted polymers, MIPs)는 SARS-CoV-2 검출에 사용하기 위한 대체 수용체로 제안되었다.

[0008] Cennamo 등은 "플라즈몬 광섬유 및 분자 각인 중합체에 의한 SARS-CoV-2의 빠르고 매우 민감한 현장 검출을 위한 개념 증명"에서 MIP와 커플링된 플라스틱 광섬유(POF) 기반 표면 플라즈몬 공명(SPR) 센서의 생성을 상세히

설명한다. MIP는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 S1 하위단위에 대해 만들어졌다.

[0009] Parisi 등은 "분자 각인 중합체 기반의 SARS-CoV-2에 대한 "단일클론 유형" 플라스틱 항체"에서 SARS-CoV-2 수용체 결합 도메인(RBD)을 주형으로 사용하는 MIP의 제조를 설명한다.

[0010] Cubuk 등은 "유망한 COVID-19 검출을 위한 분자 각인에 사용되는 기능적 단량체의 컴퓨터 분석"에서 SARS-CoV-2에 대한 MIP를 생성하기 위한 주형 및 적합한 단량체를 식별하는 것을 목표로 하는 컴퓨터 연구를 설명한다.

[0011] WO 2021/195626 A1은 전체 바이러스가 주형으로 사용되는 SARS-CoV-2에 대한 MIP의 제조를 개시한다.

[0012] MIP를 생성하는 방법도 알려져 있다 - 예컨대 US 10 189 934B2, Piletsky 등 "세포 인식을 위한 분자 각인 중합체" 및 Malik 등 "인간 바이러스 병원체 검출을 위한 분자 각인 중합체"를 참조한다.

[0013] MIP의 생성을 위해 전체 바이러스, SARS-CoV-2의 전체 S1 하위단위 또는 전체 RBD를 사용하는 것은 확장성과 관련하여 중요한 문제를 초래한다.

[0014] RT-PCR 및 신속 항원 검사와 달리 항체 검사는 RT-PCR 및 신속 항원 검사의 경우에서 개인이 현재 바이러스를 갖는지 여부보다는 개인이 이미 바이러스를 가졌을 수 있는지 여부를 확인하기 위한 시도로 수행된다. 항체 검사는 종종 환자의 혈액 샘플에 대해 수행되며 환자의 혈액 샘플에서 합성 항원 및 항체(존재하는 경우) 사이의 결합의 존재를 검출함으로써 작동한다.

[0015] 따라서, 본 발명의 한 가지 목적은 SARS-CoV-2를 검출하기 위한 대체 수단을 제공하는 것이다. 추가 목표는 이러한 수단이 현재 사용되는 중합효소 연쇄 반응 기반 분석 및 신속 항원 검사에 대한 대안을 제공할 것이라는 것이다. 본 발명의 특정 구현예의 목적은 개선된 검출 수단을 제공하는 것을 포함한다.

발명의 내용

[0016] 따라서, 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인의 하위서열에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 주형 분자에 상보적인 적어도 하나의 인식 부위를 포함하는 분자 각인 중합체(molecularly imprinted polymer)로서, 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고

[0017] (i) NSNNLDSKVGG,

[0018] (ii) NYNYLYRLFRKS,

[0019] (iii) YRLFRKSNLKPF,

[0020] (iv) STEIYQAGSTPC,

[0021] (v) CNGVEGFNCYF,

[0022] (vi) GSTPCNGVEGF,

[0023] (vii) CYFPLQSYGFQP,

[0024] (viii) GFQPTNGVGYQ 및

[0025] (ix) LQSYGFQPTNG

[0026] 로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 분자 각인 중합체를 제공한다.

[0027] 본 발명은 또한 하기 단계

[0028] (a) 표면에 노출되도록 고정화된 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인의 하위서열에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 주형 분자를 갖는 캐리어 물질을 제공하는 단계;

[0029] (b) 표면과 접촉된 중합가능한 조성물을 제공하는 단계;

[0030] (c) 표면과 접촉된 중합가능한 조성물의 제어된 중합을 수행하여 분자 각인 중합체를 생성하는 단계; 및

[0031] (d) 분자 각인 중합체를 표면으로부터 분리하는 단계

[0032] 를 포함하는, SARS-CoV-2에 결합하는 적어도 하나의 인식 부위를 포함하는 분자 각인 중합체를 제조하는 방법으로서,

[0033] 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고

[0034] (i) NSNNLDSKVGG,

[0035] (ii) NYNYLYRLFRKS,

[0036] (iii) YRLFRKSNLKPF,

[0037] (iv) STEIYQAGSTPC,

[0038] (v) CNGVEGFNCYF,

[0039] (vi) GSTPCNGVEGF,

[0040] (vii) CYFPLQSYGFQP,

[0041] (viii) GFQPTNGVGYQ 및

[0042] (ix) LQSYGFQPTNG

[0043] 로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0044] 본 발명의 분자 각인 중합체 및 형광단을 포함하는 접합체가 추가로 제공된다.

[0045] 본 발명의 분자 각인 중합체 또는 접합체를 포함하는 조성물이 추가로 제공된다.

[0046] 본 발명의 분자 각인 중합체, 본 발명의 접합체 및 본 발명의 조성물 모두는 SARS-CoV-2의 검출에 사용될 수 있다.

[0047] 발명의 상세한 설명

[0048] 본 발명은 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인의 하위서열에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 주형 분자에 상보적인 적어도 하나의 인식 부위를 포함하는 분자 각인 중합체(molecularly imprinted polymer)로서, 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고

[0049] (i) NSNNLDSKVGG,

[0050] (ii) NYNYLYRLFRKS,

[0051] (iii) YRLFRKSNLKPF,

[0052] (iv) STEIYQAGSTPC,

[0053] (v) CNGVEGFNCYF,

[0054] (vi) GSTPCNGVEGF,

[0055] (vii) CYFPLQSYGFQP,

[0056] (viii) GFQPTNGVGYQ 및

[0057] (ix) LQSYGFQPTNG

[0058] 로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 분자 각인 중합체를 제공한다.

[0059] 분자 각인, 기능성, 및 때로는 가교 결합에서, 단량체는 각인될 화합물의 존재 하에 적절한 용매에서 중합된다. 각인될 화합물은 주형으로 알려져 있다. 중합 단계 동안, 단량체는 정전기성, 소수성 또는 기타 상호작용을 통해 주형과 상호작용하여 주형 분자에 상보적인 인식 부위로 알려진 중합체 내의 결합 부위를 형성시킨다. 주형의 제거 후, 중합체 매트릭스는 주형에 상보적인 인식 부위를 유지한다. 이러한 의미에서 상보적이라는 것은 중합체 내의 상호작용 기가 주형 분자 및 하위구조로서 주형 분자, 즉 본 발명에서 SARS-CoV-2를 함유하는 다른 분자와 상호작용하는 적합한 위치에 있도록 놓여지는 것을 의미한다.

[0060] SARS-CoV-2의 서열은 알려져 있다. SARS-CoV-2는 조밀하게 글리코실화된 스파이크 단백질을 사용하여 숙주 세포 내로 진입한다. 스파이크 단백질은 동종삼량체성 당단백질이며 각 단량체는 막 부착 및 막 융합을 각각 매개하는 2개의 하위단위 S1과 S2를 함유한다. S1 하위단위의 수용체 결합 도메인(RBD)은 숙주 세포 수용체 결합에 관여하는 것으로 나타났다.

[0061] SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 RBD의 서열이 알려져 있고, 이론적으로는 그 안의 어떤 서열도 주형으로 사용될 수 있지만, 비보존된 표적 내의 서열을 주형으로 선택하는 것이 일부 하류 응용분야에 유리하다. 이는 분자 각인 중합체가 원하는 표적에 높은 특이성으로 결합하는 것을 보장한다.

[0062] Wrapp 등 2020[1]의 보충 도면 5는 SARS-CoV-2 및 2개의 다른 코로나바이러스 균주인 SARS-CoV 및 RaTG13의 스파이크 단백질의 서열 정렬을 보여준다. RBD가 강조 표시되어 있다. 상이한 균주 사이에 보존되는 서열과 보존되지 않는 서열이 또한 강조 표시되어 있다.

[0063] 본 발명에서, 분자 각인 중합체 내의 '적어도 하나의 인식 부위'는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인의 하위서열에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 주형 분자에 상보적이며, 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고 (i) NSNNLDSKVGG, (ii) NYNYLYRLFRKS, (iii) YRLFRKSNLKPF, (iv) STEIYQAGSTPC, (v) CNGVEGFNCYF, (vi) GSTPCNGVEGF, (vii) CYFPLQSYGFQP, (viii) GFQPTNGVGYQ 및 (ix) LQSYGFQPTNG로부터 선택된 서열을 포함한다.

[0064] 분자 각인 중합체 내의 '적어도 하나의 인식 부위'가 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인의 하위서열에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 주형 분자에 상보적이며, 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고 (i) NSNNLDSKVGG, (ii) STEIYQAGSTPC 및 (iii) CYFPLQSYGFQP로부터 선택된 서열을 포함하는 것이 바람직하다.

[0065] 특히 바람직한 구현예에서, 분자 각인 중합체 내의 '적어도 하나의 인식 부위'는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인의 하위서열에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 주형 분자에 상보적이며, 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고 서열 NSNNLDSKVGG를 포함한다.

[0066] 더욱 특히 바람직한 구현예에서, 분자 각인 중합체 내의 '적어도 하나의 인식 부위'는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인의 하위서열에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 주형 분자에 상보적이며, 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고 서열 CYFPLQSYGFQP를 포함한다.

[0067] 본 발명에서, 주형의 크기는 최대 50개 아미노산 범위이다. 바람직하게는, 주형은 50개 미만의 아미노산일 것이고, 더욱 바람직하게는 주형은 30개 미만의 아미노산일 것이며; 가장 바람직하게는 주형은 20개 미만의 아미노산, 예를 들어 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 19개 아미노산이다.

[0068] 짧은 펩타이드 서열(예컨대, 전체 스파이크 단백질 또는 RBD와 대조적으로)의 사용은 시약 비용을 극적으로 줄이고 표적 단백질의 특정 영역에 대한 높은 친화성 결합 부위를 생성하므로, 분자 각인 중합체의 단일클론성을 향상시킨다.

[0069] 본 발명의 분자 각인 중합체의 크기는 분자 각인 중합체의 의도된 하류 용도에 의해 크게 좌우될 것이다. 그렇긴 하지만, 적합하게는 분자 각인 중합체는 500 nm 미만, 더 적합하게는 250 nm 미만 및 훨씬 더 적합하게는 100 nm 미만일 것이며, 90 nm 미만, 또는 심지어 70 nm 미만일 수 있다.

[0070] 본 발명의 분자 각인 중합체를 포함하는 조성물이 또한 본 발명에 의해 제공된다. 적합하게는, 이러한 조성물 내의 분자 각인 중합체는 500 nm 미만, 더 적합하게는 250 nm 미만 및 훨씬 더 적합하게는 100 nm 미만의 평균 크기를 가질 것이며, 90 nm 미만, 또는 심지어 70 nm 미만일 수 있다.

[0071] 분자 각인 중합체의 크기를 결정하기 위한 적합한 방법은, 예컨대 Zetasizer Ultra(Malvern Panalytical)를 사용하는 동적 광 산란, 디스크 원심분리, 예컨대 NanoSight NS300(Malvern Panalytical)을 사용하는 나노입자 추적 분석, 조정가능한 저항 펄스 감지, 원자력 현미경법 및 전자 현미경법을 포함한다. 나노입자 추적 분석, 조정가능한 저항 펄스 감지, 원자력 현미경법 및 전자 현미경법이 단일 분자 각인 중합체의 크기를 결정하는 데 특히 적합하다. 본원에 제공된 실시예에서, 분자 각인 중합체의 크기는 NanoSight NS300 장비를 사용하여 결정되었다.

[0072] 분자 각인 중합체의 맥락에서 크기는 분자 각인 중합체의 직경을 지칭한다.

[0073] 분자 각인 중합체의 제조에 사용될 수 있는 단량체는 비닐 단량체, 알릴 단량체, 아세틸렌, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아미드, 메타크릴아미드, 클로로아크릴레이트, 이타코네이트, 트리플루오로메틸아크릴레이트, 아미노산의 유도체(예컨대, 에스테르 또는 아미드), 뉴클레오사이드, 뉴클레오타이드, 및 탄수화물을 포함한다. 분자 각인 중합체를 안정화하는 데 도움이 되는 가교 단량체가 또한 포함될 수 있다. 분자 각인 중합체를 제조하는 데 적합한 가교 단량체의 전형적인 예는, 비제한적으로 에틸렌 글리콜

디메타크릴레이트, 트리메틸올프로판 트리메타크릴레이트, 디비닐벤젠, 메틸렌 비스아크릴아미드, 에틸렌 비스아크릴아미드, N,N'-비스아크릴로일피페라진 및 N,N'-메틸렌비스(아크릴아미드)(BIS)를 포함한다. 당업자는 특정 주형에 적합한 단량체 및 가교 단량체를 선택할 수 있다. 대안적으로, 다양한 조합 및 컴퓨터 방법이 이러한 선택을 돕는 데 사용될 수 있다.

[0074] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 분자 각인 중합체는 (i) N-플루오레세이닐 아크릴아미드, (ii) 아크릴아미드, (iii) Tert-부틸 아크릴레이트(TBAc), (iv) 3-O-아크릴로일-1,2:5,6-비스-O-이소프로필리덴-D-글루코푸라노스, (v) 2,2,2-트리플루오로에틸 메타크릴레이트(CF3), (vi) N-(3-아미노프로필) 메타크릴아미드 염산염(APMA), (vii) 스퀘어아미드 단량체 7(SQ7) 및 (viii) N,N'-메틸렌비스(아크릴아미드)(BIS)로 이루어진 군으로부터의 적어도 하나의 단량체를 포함할 것이다. 더욱 바람직하게는, 분자 각인 중합체는 적어도 N-플루오레세이닐 아크릴아미드 및/또는 3-O-아크릴로일-1,2;5,6-비스-O-이소프로필리덴-D-글루코푸라노스를 포함할 것이다. 가장 바람직하게는, 분자 각인 중합체는 (i) 내지 (viii) 모두를 포함할 것이다. 이러한 맥락에서, 분자 각인 중합체는 중합체이고, 식별된 단량체를 포함하는 단량체의 혼합물을 중합함으로써 제조된 경우 식별된 단량체를 포함한다고 하는 것으로 이해된다.

[0075] 유리하게도, 본 발명의 분자 각인 중합체는 견고하고 광범위한 온도 및 pH에서 기능하여 개선된 보관 수명 및 보관 조건을 초래하며, 이는 이들이 보다 도전적인 환경에서 기능할 수 있음을 의미한다. 이들은 또한 탁월한 생체적합성을 가지며, 빠른 결합 동역학을 갖는다.

[0076] (a) 표면에 노출되도록 고정화된 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 수용체 결합 도메인의 하위서열에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 주형 분자를 갖는 캐리어 물질을 제공하는 단계;

[0077] (b) 표면과 접촉된 중합가능한 조성물을 제공하는 단계;

[0078] (c) 표면과 접촉된 중합가능한 조성물의 제어된 중합을 수행하여 분자 각인 중합체를 생성하는 단계; 및

[0079] (d) 분자 각인 중합체를 표면으로부터 분리하는 단계

[0080] 를 포함하는, SARS-CoV-2에 결합하는 적어도 하나의 인식 부위를 포함하는 분자 각인 중합체를 제조하는 방법으로서,

[0081] 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고

[0082] (i) NSNNLDSKVGG,

[0083] (ii) NYNYLYRLFRKS,

[0084] (iii) YRLFRKSNLKPF,

[0085] (iv) STEIYQAGSTPC,

[0086] (v) CNGVEGFNCYF,

[0087] (vi) GSTPCNGVEGF,

[0088] (vii) CYFPLQSYGFQP,

[0089] (viii) GFQPTNGVGYQ 및

[0090] (ix) LQSYGFQPTNG

[0091] 로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 방법이 또한 본 발명에 의해 제공된다.

[0092] 상기 방법의 장점은 MIP가 결합 부위 친화성의 보다 균일한 분포를 가지며, 주형 용출이 향상되고 하류 주형 침출이 방지되는 수단을 제공한다는 것이다.

[0093] 적합한 캐리어 물질은 중합체 수지, 다당류, 유리 또는 금속 표면을 포함한다.

[0094] 캐리어 물질은 비드, 섬유, 막 또는 모세관 형태일 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 캐리어 물질은 유리이다. 캐리어 물질이 유리 비드 형태인 것이 더욱 바람직하다.

[0095] 중합가능한 조성물은 중합에 필요한 단량체를 함유해야 한다. 적합한 단량체는 본원의 다른 곳에서 논의된다.

[0096] 단계 (c)는 제어된 중합의 적용을 포함한다. 제어된 중합에 의해 분자 각인 중합체를 생성하기 위한 다양한 기

술이 당업자에게 공지되어 있다.

[0097] 제어된 중합의 예는 라디칼 중합, 예컨대 제어된 리빙 라디칼 중합(living radical polymerisation, LRP), 리빙 음이온 중합, 리빙 양이온 중합, 및 제어된 축중합(polycondensation)을 포함한다.

[0098] 중합은, 예컨대 가열에 의해, 전류 인가(전기중합)에 의해, 산화환원 촉매(들), 과황산염 또는 과산화물의 첨가에 의해, 감마 방사선을 포함한 방사선 조사에 의해 또는 마이크로파 방사선 조사에 의해 또는 UV 또는 가시광선 조사에 의해 개시될 수 있으며, 일반적으로 수 분 내지 수 시간이 걸린다. 본원에 기재된 실시예에서, 중합은 과황산염을 사용하여 개시되었다.

[0099] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 중합 반응은 합성된 분자 각인 중합체의 크기가 비교적 작을 때의 단계에서 종료된다. 크기에 관한 선호는 본원의 다른 곳에서 논의된다.

[0100] 분자 각인 중합체가 합성되면, 이들은 분리 및 수집되어야 한다. 고정화된 주형으로부터 높은 친화성 분자 각인 중합체를 분리하는 것은 복합체 형성을 방해하는 가열에 의해, 용액 pH를 변경시킴으로써, 이온 강도를 변경시킴으로써, 또는 요소, 구아니딘 또는 분자 각인 중합체보다 주형과 더 강하게 상호작용하는 물질의 첨가를 통해 달성될 수 있다.

[0101] 방법의 바람직한 구현예에서, 분리 단계 전에, 약하게 결합된 물질은 세척에 의해 제거된다.

[0102] 일단 수집되면, 분자 각인 중합체는, 예컨대 크로마토그래피, 여과 및/또는 전기영동에 의해 더 정제될 수 있다.

[0103] 본 발명의 분자 각인 중합체와 관련하여 상기 언급된 이유로 인해, 본 발명의 방법의 바람직한 구현예에서, 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고, (i) NSNNLDSKVGG, (ii) STEIYQAGSTPC 및 (iii) CYFPLQSYGFQP로부터 선택된 서열을 포함한다. 특히 바람직한 구현예에서, 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고, 서열 NSNNLDSKVGG를 포함한다. 추가의 특히 바람직한 구현예에서, 아미노산 서열은 50개 이하의 아미노산 길이이고, 서열 CYFPLQSYGFQP를 포함한다.

[0104] 주형 분자가 캐리어 물질에 고정화되는 방법은 중요하지 않다. 그러나, 일부 방법의 경우, 주형 분자의 말단 중 하나에 시스테인 잔기가 존재하는 것이 유리하다. 이와 같이, 주형 분자가 자연적으로 말단 시스테인 잔기를 포함하지 않는 방법의 구현예의 경우, 주형 분자가 추가 시스테인 잔기를 포함하도록 N 말단에서 변형되는 것이 바람직하다.

[0105] 본 발명의 일부 구현예에서, 추가적인 시스테인 잔기는 주형 분자의 말단에 직접 부착되는 반면, 다른 구현예에서 스페이서가 말단 시스테인과 주형 분자 사이에 포함된다. 바람직한 구현예에서, 스페이서는 글리신 잔기를 포함한다.

[0106] 따라서, 본 발명의 특히 바람직한 구현예에서, 주형 분자는 아미노산 서열 NSNNLDSKVGG를 포함하고, 시스테인(C) 잔기 및 글리신(G) 잔기를 포함하도록 N 말단에서 변형되어 각인에 사용되는 분자는 CGNSNNNLDSKVGG이다.

[0107] 본 발명의 일부 구현예에서, 주형 분자는 캐리어 물질에 직접 부착되는 반면, 다른 구현예에서 하나 이상의 링커가 캐리어 물질과 주형 분자 사이에 포함된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 링커는 당업자에게 잘 알려져 있다. 본원에 제공된 실시예에서, 사용된 캐리어 물질은 유리 비드였으며 이들은 주형 분자의 고정화 전에 (3-아미노프로필)트리메톡시실란(APTMS)을 사용하여 실란화되었다. APTMS는 유리 비드의 표면과 주형 분자 사이에 링커로서 작용한다. 본원에 제공된 실시예에서, APTMS는 주형 고정화 전에 n-석신이미딜 아이오도아세테이트(SIA)를 사용하여 변형되었다.

[0108] 링커 및 스페이서는 입체 장애에 의해 발생하는 부작용을 방지하는 기능을 한다.

[0109] 본 발명의 방법의 장점은 빠르고 확장가능하며 짧은 주형만 사용한다는 점이다.

[0110] 본 발명의 분자 각인 중합체 및 형광단을 포함하는 접합체가 본 발명에 의해 추가로 제공된다.

[0111] 형광단은 특정 파장인 흡수 또는 여기 파장에서 빛을 흡수한 다음, 더 높은 파장인 방출 파장에서 빛을 방출하는 능력을 가진 분자이다.

[0112] 시각화 목적을 위해 분자에 형광단을 접합시키는 것은 당업계에서 일반적이다. 이와 같이, 이러한 접합 방법 역시 잘 알려져 있다. 예를 들어, 형광단은 아미노, 티올 또는 탄수화물 기를 통해 접합될 수 있다. 본원에 제공된 실시예에서, 형광단은 분자 각인 중합체 내의 아미노 단량체에 의해 제공된 아민 기를 통해 분자 각인 중합

체에 접합되었다.

[0113] 임의의 형광단이 본 발명의 접합체에 사용될 수 있지만, 밝고 안정적인 형광단을 선택하는 것이 일부 하류 응용분야, 특히 진단 응용분야에 유리하다.

[0114] 접합된 중합체 나노입자(Conjugated Polymer Nanoparticles, CPNs)™는 생체적합성 계면활성제 내에 캡슐화된 반도체 발광 중합체(LEP) 코어를 포함하는 형광성이 높은 나노입자이다. CPN은 이들이 높은 수준의 민감도를 갖는다는 것을 의미하는 이들의 강한 형광성, 및 이들의 높은 정도의 광안정성으로 인해 진단 응용분야에 사용하기에 특히 적합하다. CPN은 약 70-80 nm 크기이며, 현재 스트림 바이오(Stream Bio)로부터 이용가능한 CPN은 420 nm 내지 1130 nm의 방출 파장을 갖는 형광을 나타낸다. 본원에 제공된 실시예에서, 본 발명의 분자 각인 중합체는 모두 스트림 바이오로부터 이용가능한 CPN510 및 CPN610에 접합되었다.

[0115] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 형광단은 CPN이다.

[0116] 본 발명의 접합체를 포함하는 조성물이 또한 본 발명에 의해 제공된다.

[0117] 본 발명의 분자 각인 중합체, 접합체 및 조성물은 다양한 응용분야에서 사용될 수 있다.

[0118] 본 발명의 분자 각인 중합체, 접합체 및 조성물이 SARS-CoV-2의 검출에 사용되는 것이 구체적으로 고려된다. 분자 각인 중합체, 접합체 및 조성물은 분석, 예를 들어 의료 또는 현장 진단 환경에서 사용될 수 있는 진단 분석에 사용될 수 있다. 이러한 분석의 예는 고처리량 스크리닝에 사용될 수 있는 측면 유동 분석(LFA) 및 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA) 유형 분석을 포함한다. 본 발명의 분자 각인 중합체, 접합체 및 조성물은 또한 센서에서 사용될 수 있다.

[0119] 본원에 제공된 실시예에서, nanoMIP-SPR 센서는 4% 머캅토운데칸산(MUDA) 칩(에탄올 중의 4% MUDA의 자가 조립된 단층으로 기능화된, Biacore SIA 키트 Au 표면을 사용하여 제조됨) 상에 nanoMIP를 공유 고정화시킴으로써 제조되었다. NanoMIP 기능화된 스크린 인쇄 전극(SPE)은 또한 열 검출 방법에 사용하기 위해 제조되었다.

[0120] 본 발명의 분자 각인 중합체, 접합체 및 조성물은 또한 연구 환경에서 SARS-CoV-2의 검출에 사용될 수 있다.

[0121] 본 발명의 분자 각인 중합체, 접합체 및 조성물은 또한 의약품으로 사용될 수 있다.

[0122] 본 발명의 분자 각인 중합체는 SARS-CoV-2에 대해 높은 친화성을 갖는 것이 바람직하다. 본 명세서의 맥락에서 높은 친화성은 분자 각인 중합체가 SARS-CoV-2와 결합하는 친화성이 '블랭크(blank)' 분자 각인 중합체가 SARS-CoV-2와 결합하는 친화성을 적어도 3배, 바람직하게는 적어도 5배, 보다 바람직하게는 적어도 10배 초과한다는 것을 의미한다. 이 맥락에서 블랭크는 주형의 부재 하에 형성된 분자 각인 중합체를 의미한다.

[0123] 결합 친화성은 단일 분자와 그의 결합 파트너, 예컨대, 본 경우에서, 분자 각인 중합체와 그의 표적 SARS-CoV-2 사이의 결합 상호작용의 강도이다. 결합 친화성은 전형적으로 평형 해리 상수(K_D)에 의해 측정 및 보고된다. K_D 값이 작을수록 두 분자 사이의 결합 친화성은 크다.

[0124] 본 발명의 분자 각인 중합체, 접합체 및 조성물이 SARS-CoV-2의 검출에 사용되는 경우, 분자 각인 중합체는 500 nM 미만, 바람직하게는 250 nM 미만 및 훨씬 더 바람직하게는 200 nM 미만의 K_D로 SARS-CoV-2에 결합하는 것이 바람직하다.

[0125] K_D를 측정하기 위한 적합한 방법은, 예컨대 Biacore 시리즈 기기(Cytiva) 또는 MP-SPR Navi 기기(BioNavis)를 사용하여 수행될 수 있는 표면 플라스몬 공명(SPR)을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0126] 실시예

본 발명은 이제 첨부 도면을 참조하여 특정 실시예에서 추가로 설명된다:

도 1은 펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP와 SARS-CoV-2 S 재조합 단백질에 대한 결합 동역학을 보여주는 2개의 표면 플라즈몬 공명 센서그램을 보여준다.

도 2는 펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP와 CPN510의 성공적인 접합을 보여주는 NanoSight NS300 기기를 사용하여 수득된 트레이스(trace)이다.

도 3은 펩타이드 1과 3에 대해 각인된 nanoMIP와 재조합 SARS-CoV-2 S 단백질 사이의 결합의 특이성을 보여주는 도트 블롯이다.

도 4는 펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP와 SARS-CoV-2 사이의 결합의 특이성을 보여주는 도트 블롯이다.

도 5는 펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP와 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질(S1) 사이의 결합의 특이성을 보여주는 도트 블롯이다.

도 6은 펩타이드 1(도 6a) 및 펩타이드 3(도 6b)에 대한 NanoMIP로 기능화된 스크린 인쇄 전극(SPE)에 PBS 중의 SARS-CoV-2 ORF8(1 fg/mL - 10 pg/mL)을 첨가하는 것에 대한 R_{th} 대 시간의 원시 열 전달 방법 데이터 플롯이다.

도 7은 펩타이드 1에 대한 NanoMIP로 기능화된 스크린 인쇄 전극(SPE)에 PBS 중의 SARS-CoV-2 S 단백질 RBD(1 fg/mL-10 pg/mL)를 첨가하는 것에 대한 R_{th} 대 시간의 원시 열 전달 방법 데이터 플롯(도 7a) 및 R_{th} 값의 % 변화를 시스템 내로 주입된 SARS-CoV-2 S 단백질 RBD의 농도에 대해 플롯팅한 용량 반응 곡선(도 7b)이다.

도 8은 펩타이드 3에 대한 NanoMIP로 기능화된 스크린 인쇄 전극(SPE)에 PBS 중의 SARS-CoV-2 S 단백질 RBD(1 fg/mL-10 pg/mL)를 첨가하는 것에 대한 R_{th} 대 시간의 원시 열 전달 방법 데이터 플롯(도 8a) 및 R_{th} 값의 % 변화를 시스템 내로 주입된 SARS-CoV-2 S 단백질 RBD의 농도에 대해 플롯팅한 용량 반응 곡선(도 8b)이다.

도 9는 극한의 온도 및 pH를 견디는 펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP의 능력을 보고한다. 도 9a는 실온, 37℃ 및 50℃에서 공기 중의 Au 표면 상의 단리된 nanoMIP의 전형적인 원자력 현미경(AFM) 높이 이미지(더 큰 척도 이미지에서 녹색 상자로 표시됨)를 보여준다. 도 9b는 각 온도에서 nanoMIP의 상응하는 단면 프로파일 플롯을 보여준다. 도 9c는 다양한 pH 수준에서 AFM 이미지로부터 nanoMIP 부피(n = 120)를 비교하는 박스 차트를 보여준다. 도 9d는 임상 기준 액체(범용 수송 매체) 및 다이어트 코카콜라(pH = 3.5)에 대한 nanoMIP 기반 센서의 열 반응을 비교한다. 도 9e는 다이어트 코카콜라를 검사 액체로 사용하였을 때의 위양성 결과를 제공하는 상업적인 신속 항원 검사를 보여준다.

도 10은 다양한 SARS-CoV-2 항원에 대한 펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP의 민감도를 보고하고, SARS-CoV-2 항체에 대한 nanoMIP의 민감도를 비교한다. 도 10a는 1 fg mL^{-1} - 10 pg mL^{-1}의 SARS-CoV-2 RBD를 함유하는 PBS에 노출시 nanoMIP 기능화된 SPE의 전형적인 열 전달 방법 데이터를 보여준다. 도 10b-10d는 (i) 스파이크 단백질에 대한 nanoMIP 및 항체 센서(nanoMIP는 알파 및 델타 변이체 모두의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대해 검사되었음)(도 10b) (ii) SARS-CoV-2 RBD에 대한 nanoMIP 및 항체 센서(도 10c), 및 iii) SARS-CoV-2 항원 및 음성 대조군 ORF8, IL-6, 및 HSA에 대한 nanoMIP 센서의 열 반응을 보여주는 전형적인 용량-반응 곡선(오차 막대는 SD를 나타냄)을 보여준다. 스파이크 단백질에 대한 NIP 기반 센서의 반응이 또한 나타나 있다(도 10d). 도 10e는 본 발명의 nanoMIP에 대한 LoD 값을 상업적인 신속 항원 검사 및 문헌으로부터 최근에 개발된 수많은 항원 검사와 비교한다.

도 11은 펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP와 임상 샘플로부터의 SARS-CoV-2 사이의 결합을 보여준다. 도 11a는 3D 인쇄 프로토타입 부가 셀의 개략도이다: 1) 열전대 입구, 2) 기능화된 SPE, 3) 액체의 수동 추가를 용이하게 하는 개방 바닥 저장소, 및 4) 실험 노이즈를 줄이기 위한 탈착식 뚜껑. 도 11b는 도 11a에 나타낸 부가 셀의 사진이다. 도 11c는 인산염 완충 식염수(PBS) 중의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(1 fg mL^{-1} - 10 pg mL^{-1})의 열 검출을 위해 프로토타입 부가 셀을 사용할 때 수득된 전형적인 용량-반응 곡선을 보여준다. 도 11d는 COVID 양성 및 음성 환자(n = 7)의 임상 샘플에 대한 nanoMIP 센서의 열 반응을 보여준다.

도 12는 NanoSight 입자 분석기를 사용하여 측정된 nanoMIP의 크기를 보여준다.

도 13은 PBS 중의 SARS-CoV-2 알파, 베타 및 감마 변이체로부터의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 nanoMIP - LSPR 센서 매개 검출을 보여준다. 도 13a는 SARS CoV-2의 알파 변이체의 10 aM 내지 100 nM 범위의 농도에 대한 파장 대 흡광도 플롯에서 LSPR 스펙트럼을 보여준다. 도 13b는 SARS-CoV-2 알파, 베타 및 감마 변이체의 농도를 10 aM부터 100 nM까지 변경시 Ag-MIP 복합체의 LSPR 파장의 변화를 보여준다.

도 14는 혈청에서 SARS-CoV-2 알파, 베타 및 감마 변이체로부터의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질의 nanoMIP - LSPR 매개 검출을 보여준다. 도 14a는 SARS-CoV-2의 알파 변이체의 100 fM 내지 100 nM 범위의 농도에 대한 파장 대 흡광도 플롯에서 LSPR 스펙트럼을 보여준다. 도 14b는 SARS-CoV-2 알파, 베타 및 감마 변이체의 농도를

100 fM부터 100 nM까지 변경시 Ag-MIP 복합체의 LSPR 파장의 변화를 보여준다.

도 15는 펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP 및 원래의 SARS-CoV-2 S(스파이크) 재조합 단백질 및 또는 오미크론 변이체로부터의 것에 대한 결합 동역학을 보여주는 2개의 겹쳐진 표면 플라즈몬 공명 센서그램을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0127] **실시예 1: SARS-CoV-2에 대한 NanoMIP의 합성**

[0128] **각인에 적합한 SARS-CoV-2로부터 3개의 펩타이드의 선택**

[0129] Wrapp 등 2020[1]의 보충 도면 5는 SARS-CoV-2 및 2개의 다른 코로나바이러스 균주인 SARS-CoV 및 RaTG13의 스파이크 단백질의 서열 정렬을 보여준다. RBD가 강조 표시되어 있다. SARS-CoV-2의 RBD로부터 3개의 펩타이드 서열(펩타이드 1: NSNNLDSKVGG, 펩타이드 2: STEIYQAGSTPC 및 펩타이드 3: CYFPLQSYGFQP)은 SARS-CoV 및 RaTG13의 각 서열에 대한 보존 부족을 기반으로 각인을 위한 잠재적 후보로서 본 발명자들에 의해 선택되었다.

[0130] **SARS-CoV-2에 대한 NanoMIP의 고체상 합성**

[0131] 펩타이드 1, 2 및 3을 nanoMIP 합성 전에 실란화된 유리 비드 상에 고정화시켰다.

[0132] 펩타이드 고정화에 말단 시스테인이 필요하다는 것을 근거로, 펩타이드 1, 2 및 3을 중국 온토레스(Ontores)로부터 주문했을 때, 시스테인 잔기를 펩타이드 1의 N 말단에 부가하였다. 스페이서로의 기능을 하는 추가적인 글리신 잔기를 또한 시스테인 및 N 말단 아스파라긴 사이에 부가하였다. 따라서, 각인에 사용하기 위해 Ontores로부터 공급받은 펩타이드는

[0133] 펩타이드 1: CGNSNNLDSKVGG

[0134] 펩타이드 2: STEIYQAGSTPC

[0135] 펩타이드 3: CYFPLQSYGFQP

[0136] 였다.

[0137] 펩타이드 고정화를 다음과 같이 수행하였다: 유리 비드(대략 100 μM 직경, Microbeads AG로부터 공급받음)을 4 M NaOH에서 10분 동안 끓여서 활성화시켰다. 그 다음, 유리 비드를 먼저 탈이온수 및 이후에 아세톤으로 세척한 다음, 80℃에서 2시간 동안 건조시켰다. 그 다음, 유리 비드를 3시간 동안 톨루엔에서 2% v/v (3-아미노프로필)트리메톡시실란(APTMS)과 함께 인큐베이션하고, 아세톤으로 세척하고, 2시간 동안 0.2 mg/ml n-석신이미딜 아이오도아세테이트(SIA)를 갖는 PBS, pH 7.4에 둔 다음, 아세토니트릴로 세척하였다. 그 다음, 주형(펩타이드 1, 2 또는 3)을 최소 4시간 동안 0.4 mg/ml 트리스(2-카르복시에틸) 포스핀 염산염(TCEP) 및 0.1 mg/ml의 펩타이드를 갖는 PBS, pH 7.4 용액에서 인큐베이션하여 유리 비드 상에 고정화시켰다. 과량의 주형을 물과 메탄올로 세척함으로써 제거하였다.

[0138] 펩타이드 코팅된 유리 비드를 하기와 같이 각인된 nanoMIP의 합성에 사용하였다: 단량체 용액을 제조하고, 10분 동안 초음파 처리하고, 5분 동안 질소로 퍼징하였다. 제조된 단량체 용액의 한 가지 예는 3 mg N-플루오레세이닐 아크릴아미드, 24.2 mg 아크릴아미드, 31.7 μL Tert-부틸 아크릴레이트(TBAc), 36 mg 3-O-아크릴로일-1,2:5,6-비스-O-이소프로필리덴-D-글루코푸라노스, 13.8 μL 2,2,2-트리플루오로에틸 메타크릴레이트(CF3), 3.9 mg N-(3-아미노프로필) 메타크릴아미드 염산염(APMA), 1.3 mg 스퀘어아미드(Squareamide) 단량체 7(SQ7) 및 9 mg N,N'-메틸렌비스(아크릴아미드)(BIS))를 포함한다. 그 다음, 100 ml의 단량체 용액을 60 g의 펩타이드 코팅된 유리 비드를 함유하는 250 ml 듀란(Duran) 플라스크에 넣었다. 그 다음, 60 μL/ml의 *N,N,N′,N′*-테트라메틸에틸렌디아민(TEMED)과 함께 0.5 ml의 60 mg/ml 과황산암모늄(APS)을 첨가하여 중합을 개시하였고, 실온에서 1시간 동안 수행하였다. 그 다음, 다른 구성요소로부터 나노입자가 부착된 유리 비드를 분리하기 위해, 플라스크의 내용물을 20 μM 다공성 프릿이 장착된 고체상 추출(SPE) 카트리지에 부었다. 그 다음, 각각 대략 25 ml의 실온수로 10회의 세척 단계를 수행하여 낮은 친화성 물질을 제거하였다. 이들 세척 단계 각각으로부터 잔류물을 버렸다. 그 다음, 각각 10 ml의 60℃ 에탄올로 9회 세척 단계를 수행함으로써 높은 친화성 nanoMIP를 유리 비드로부터 분리하였다. nanoMIP를 함유하는 이들 각 세척으로부터 잔류물을 수집하였다. 그 다음, nanoMIP를 대략 10 ml로 농축하고 용매를 증류수로 교환하였다.

[0139] 각인된 nanoMIP는 NanoSight NS300에 의해 계산된 바와 같이 59 nm의 평균 직경을 가지고 있었다.

[0140] **실시예 2: SARS-CoV-2 펩타이드에 대한 NanoMIP의 표면 플라스몬 공명(SPR) 분석**

[0141] 본 연구에서는 Biacore 3000 기기를 사용하였다.

[0142] 표면 활성화 및 nanoMIP 고정화.

[0143] NanoMIP-SPR 센서를 4% 머캅토운데칸산(MUDA) 칩(에탄올 중의 4% MUDA의 자가 조립된 단층으로 기능화된, Biacore SIA 키트 Au 표면을 사용하여 제조됨) 상에 nanoMIP(실시예 1)를 공유 고정화시킴으로써 제조하였다.

[0144] 더 상세히, 물을 기기를 5 μL/분의 일정한 유속으로 프라이밍하는 데 활용하였다. 물을 30 μl/분의 일정한 유속으로 칩 제조 전반에 걸쳐 러닝 완충액으로서 활용하였다. 안정적인 기저선이 달성될 때까지 물을 흐르게 하였다. N-하이드록시석신이미드(NHS) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드(EDC)의 혼합물(400 uL의 물 중에서 2 mg EDC + 3 mg NHS)을 센서 표면 전체에 걸쳐 주입(8 μL/분의 유속으로 8분)하여 표면을 활성화시켰다(혼합물은 칩 표면 상의 카르복실 말단 기를 N-하이드록시-석신이미드 에스테르로 변환시킴). 그 다음, NanoMIP(5 nM)를 칩 상의 4개의 모든 플로우 셀 내로 주입(8 μL/분의 유속으로 8-10분)하였다. 마지막으로, 반응하지 않은 NHS 에스테르를 탄산 완충액(pH 9.2)을 주입(5 내지 30 μL/분의 유속으로 30분)함으로써 가수분해하였다.

[0145] nanoMIP와 SARS-CoV-2 펩타이드 사이의 상호작용의 검출

[0146] SPR에서 검사하기 전에, 각각의 펩타이드 1, 2 및 3을 소 혈청 알부민(BSA)에 접합시켰다.

[0147] 러닝 완충액을 물에서 PBS로 전환하여 안정적인 기저선을 얻으면, BSA 또는 BSA-펩타이드 접합체의 7개의 희석물(PBS 중의 2.33 mg/ml, 0.777 mg/ml, 259 ug/ml, 86 ug/ml, 28.8 ug/ml, 9.6 ug/ml, 3.2 ug/ml)을 다음과 같이 주입하였다(5분 결합 단계, 4분 해리 단계, 28 μl/분 유속): BSA 단독을 플로우 셀 1에, BSA-펩타이드 1을 플로우 셀 2에, BSA-펩타이드 3을 플로우 셀 3에 주입하였다.

[0148] 펩타이드 3에 대해 각인된 nanoMIP에 대해 양호한 선택성이 관찰되었으며, 이에 대해 소프트웨어는 160 nM의 K_D를 계산하였다(데이터는 표시되지 않음).

[0149] **실시예 3: SARS-CoV-2 S 단백질에 대한 NanoMIP의 표면 플라즈몬 공명 분석**

[0150] 본 연구에서는 Biacore 3000 기기를 사용하였다.

[0151] 표면 활성화 및 SARS-CoV-2 S 단백질 고정화.

[0152] SARS-CoV-2 S 단백질-SPR 센서를 4% 메르캅토운데칸산(MUDA) 칩(에탄올 중의 4% MUDA의 자가 조립된 단층으로 기능화된, Biacore SIA 키트 Au 표면을 사용하여 제조됨) 상에 재조합 SARS-CoV-2 S 단백질(The Native Antigen Company로부터 공급받은 재조합 전장 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질)을 공유 고정화시켜 제조하였다.

[0153] 더 상세히, 물을 기기를 5 μl/분의 일정한 유속으로 프라이밍하는 데 활용하였다. 물을 또한 30 μl/분의 일정한 유속으로 칩 제조 전반에 걸쳐 러닝 완충액으로서 활용하였다. 안정적인 기저선이 달성될 때까지 물을 흐르게 하였다. N-하이드록시석신이미드(NHS) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드(EDC)의 혼합물(400 uL의 물 중에서 2 mg EDC + 3 mg NHS)을 센서 표면 전체에 걸쳐 주입(8 μL/분의 유속으로 8분)하여 표면을 활성화시켰다(혼합물은 칩 표면 상의 카르복실 말단 기를 N-하이드록시-석신이미드 에스테르로 변환시킴). 그 다음, 대조군(1% BSA(w/v) 및 0.5% Pluronic F127(w/v)) 및 2개의 상이한 농도의 재조합 SARS-CoV-2 S 단백질(60 nM 및 600 nM)을 칩 상의 각각 유동 셀 1, 2 및 3 내로 주입(8 μL/분의 유속으로 6분 15초)하였다. 마지막으로, 반응하지 않은 NHS 에스테르를 탄산 완충액(pH 9.2)을 주입(30 μL/분의 유속으로 1분)함으로써 가수분해하였다.

[0154] SARS-CoV-2 S 단백질과 nanoMIP 사이의 상호작용의 검출

[0155] 러닝 완충액을 물에서 PBS로 전환하여 안정적인 기저선을 얻으면, 펩타이드 1에 대해 각인된 30 nM(및 이의 1:1 연속 희석물) nanoMIP를 주입하였다(5분 결합 단계, 3분 해리 단계, 28 μl/분 유속).

[0156] 소프트웨어는 5 nM(도 1a) 및 15 nM(도 1b)의 K_D를 계산하였다.

[0157] **실시예 4: SARS-CoV-2에 대한 NanoMIP와 CPN의 접합**

[0158] 펩타이드 1과 3에 대해 각인된 NanoMIP를 스트림 바이오(Stream Bio)에서 친수성 캡핑제 내에 캡슐화된 반도체 발광 중합체 코어를 함유하는 형광성이 높은 나노입자인 접합된 중합체 나노입자(CPN)에 커플링시켰다. 사용된

CPN은 NanoSight 3000에 의해 측정된 바와 같이 70-80 nm의 직경을 갖는 CPN510 및 CPN610이었다.

[0159] 도 2는 펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP와 CPN510의 성공적인 접합을 보여준다. 원래의 비접합된 nanoMIP는 주로 59 nm였지만, CPN510에 접합될 때, 입자 크기의 유의한 이동이 관찰되며, 119 nm에서의 피크를 참조한다.

[0160] **실시예 5: NanoMIP 및 SARS-CoV-2 S 단백질 사이의 결합의 도트-블롯 분석.**

[0161] 상이한 농도(290 ng, 145 ng, 73 ng, 36 ng, 18 ng, 9 ng, 5 ng, 2 ng, 1 ng, 0.6 ng, 0.3 ng 및 0.14 ng)의 재조합 SARS-CoV-2 S 단백질(The Native Antigen Company로부터 공급받음)을 니트로셀룰로오스 막 상에 블롯팅한 후, 막을 건조시켰다. 그 다음, 막을 실온에서 30-60분 동안 PBS-T(PBS 중의 0.05% Tween-20) 중의 5% BSA에 담가서 차단시켰다. 차단 후, 막을 PBS-T 중의 5% BSA에 용해된 (1) NanoMIP-CPN510(펩타이드 1에 대해 각인됨), (2) NanoMIP-CPN510(펩타이드 3에 대해 각인됨) 또는 (3) CPN510 단독(대조군)과 함께 실온에서 30-60분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 막을 PBS-T로 매회 5분 동안 3회 세척하였다. 그 다음, 형광을 UV 하에서 관찰하였다. 도 3에 나타낸 바와 같이, NanoMIP-CPN510(펩타이드 1에 대해 각인됨)을 사용한 검출 한계는 CPN510 단독(대조군)을 사용하여 달성된 것보다 훨씬 낮은 0.3 ng이었으며, 이는 적어도 펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP가 SARS-CoV-2 S 단백질과 특이적으로 상호작용한다는 것을 나타낸다.

[0162] **실시예 6: NanoMIP와 SARS-CoV-2 바이러스 사이의 결합의 도트 블롯 분석.**

[0163] SARS-CoV-2(2×10^4 pfu)를 2개의 니트로셀룰로오스 막 상에 블롯팅하였다. 또한 양성 대조군으로서 75 ng의 재조합 SARS-CoV-2 S 단백질(The Native Antigen Company로부터 공급받음) 및 음성 대조군으로서 배양 배지를 각 니트로셀룰로오스 막 상에 블롯팅하였다. 그 다음, 막을 건조 때까지 방치하였다. 그 다음, 막을 실온에서 30-60분 동안 PBS-T(PBS 중의 0.05% Tween-20) 중의 5% BSA에 담가서 차단시켰다. 차단 후, 막을 PBS-T 중의 5% BSA에 용해된 NanoMIP-CPN510(펩타이드 1에 대해 각인됨) 또는 (2) NanoMIP-CPN510(트로포닌에 대해 각인됨)(음성 대조군)과 함께 실온에서 30-60분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 막을 PBS-T로 매회 5분 동안 3회 세척하였다. 그 다음, 형광을 UV 하에서 관찰하였다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 배양 배지로 블롯팅된 니트로셀룰로오스 막의 영역에서 또는 NanoMIP-CPN510(트로포닌에 대해 각인됨)(음성 대조군)과 함께 인큐베이션된 경우, 형광이 관찰되지 않았다. 대조적으로, 니트로셀룰로오스 막이 SARS-CoV-2 및 또한 SARS-CoV-2 S 단백질 양성 대조군 모두에 대해 NanoMIP-CPN510(펩타이드 1에 대해 각인됨)과 함께 인큐베이션되었을 때 형광이 관찰되었다. 이는 적어도 펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP가 SARS-CoV-2와 특이적으로 상호작용한다는 것을 나타낸다.

[0164] **실시예 7: (1) NanoMIP 및 4개의 상이한 인간 코로나바이러스(SARS-CoV-2, HCoV-OC43, HCoV-229E 및 HCoV-HKU1) 및 (2) 항체 및 4개의 상이한 인간 코로나바이러스(SARS-CoV-2, HCoV-OC43, HCoV-229E 및 HCoV-HKU1) 사이의 결합을 비교하는 도트-블롯 분석.**

[0165] 0.5 μL SARS-CoV-2 스파이크 당단백질(S1)(The Native Antigen Company), 인간 코로나바이러스 OC43 스파이크 당단백질(S1)(The Native Antigen Company), 인간 코로나바이러스 229E 스파이크 당단백질(S1)(The Native Antigen Company) 및 인간 코로나바이러스 HKU1 스파이크 당단백질(S1)(The Native Antigen Company)(0.6 mg/mL)을 3 반복으로 니트로셀룰로오스 막에 블롯팅한 후(도 5의 개략도에 나타낸 바와 같음), 막을 건조시켰다. 그 다음, 막을 1시간 동안 2 mL BSA(PBS 중의 1%)에 담가서 차단하였다. 차단 후, 막을 (1) NanoMIP - CF770(펩타이드 1에 대해 각인됨) 및 (2) SARS-CoV-2 스파이크(RBD)에 특이적인 3개의 상이한 단일클론 항체인 Mab RBD1106-CF770, Mab RBD107-CF770 및 Mab RBD5305-CF770(모두 내부에서 제조되고 0.01% BSA에서 희석됨)과 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 막을 2 mL PBST로 5분 동안 세척하였다. 그 다음, 형광을 UV 하에서 관찰하였다. 도 5에 나타낸 바와 같이, nanoMIP는 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질(S1)에 선택적으로 결합하였고, 인간 코로나바이러스 OC43 스파이크 당단백질(S1), 인간 코로나바이러스 229E 스파이크 당단백질(S1) 또는 인간 코로나바이러스 HKU1 스파이크 당단백질(S1) 중 어느 것에도 결합하지 않았다. 또한, nanoMIP는 검사된 각 항체에 대해 유사한 선택성 및 결합을 갖는 것으로 나타났다.

[0166] **실시예 8: 열 검출 방법을 사용한 NanoMIP 및 SARS-CoV-2 S 단백질 RBD 사이의 결합의 분석.**

[0167] 열 검출 방법에 사용하기 위한 nanoMIP 기능화된 스크린 인쇄 전극(SPE)의 제조.

[0168] 수성 HCl(0.5 M) 중의 4-ABA(2 mM) 및 아질산나트륨(2 mM)의 용액을 제조하고, 궤도 진탕기에서 10분 동안 부드럽게 혼합하였다. 스크린 인쇄 전극(SPE)을 용액에 침지하고, 순환 전압전류법을 Ag/AgCl 기준 전극(Alvatek Ltd., Romsey, UK)을 사용하여 100 mV s^{-1}에서 +0.2 V부터 -0.6 V까지 수행하였다. SPE/4-ABA로 표시된 수득된 전극을 탈이온수로 완전히 헹구어 임의의 결합되지 않은 4-ABA를 제거하고 질소로 건조시켰다. 그 다음, PBS 완

충액(pH = 5) 중의 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드(EDC)(100 mM) 및 N-하이드록시석신이미드(NHS)(20 mM)의 용액과의 인큐베이션을 통해 카르복실기를 활성화시켰다. 드롭캐스팅(dropcasting)을 활용하여 8 μL의 EDC/NHS 용액을 SPE의 작업 전극에 증착하였다. 1시간 후, 전극을 탈이온수로 헹구고 건조시켜 SPE/4-ABA/EDC+NHS 전극을 얻었다. 이후, 8 μL의 주어진 nanoMIP 용액(펩타이드 1에 대해 각인된 NanoMIP 'P1C6' 또는 펩타이드 3에 대해 각인된 NanoMIP 'P3C6')을 부드러운 볼텍싱 후 작업 전극에 증착하였다. 3시간 후, SPE/4-ABA/EDC+NHS/nanoMIP 전극을 탈이온수로 헹구고 부드러운 질소 흐름으로 건조시킨 후, 사용할 때까지 4℃에서 PBS에서 보관하였다.

[0169] nanoMIP 기능화된 스크린 인쇄 전극(SPE)을 사용한 NanoMIP 및 SARS-CoV-2 S 단백질 RBD 사이의 결합의 검출.

[0170] 상기 기재된 nanoMIP 기능화된 SPE를 사용한 측정을 용이하게 하기 위해 3D 인쇄된 유동 셀을 사용하였다. SPE를 셀 내에 장착하고 열전대는 액체 내의 온도(T_2)를 측정하였다. 각 측정을 위해, 새로 제조된 nanoMIP 기능화된 SPE를 사용하였다. 유동 셀을 van Grinsven 등에 의해 기재된 열 전달 장치에 연결하였다. 장치를 생체내 조건을 모방하기 위해 37.00 ± 0.02℃로 설정된 방열판(구리 블록, T_1)의 온도를 능동적으로 제어하는 LabView 소프트웨어로 조종하였다. 전력 저항기(22 Ω)에 부착된 비례-적분-미분(PID) 제어기는 Geerets 등에 기재된 바와 같이 신호 상의 피드백을 조절하였다. PID 매개변수를 모든 실험에 대해 P=1, I=10, 및 D=0.2의 최적화된 값으로 고정시켰다.

[0171] 모든 측정에서, 유동 셀을 PBS로 채우고, 기저선 온도 신호의 안정화를 보장하기 위해 30분 동안 방치한 후, PBS의 첫 번째 주입을 추가하여 블랭크 측정으로 작용시켰다. 각 표적 바이오마커(SARS-CoV-2 S 단백질 RBD 또는 SARS-CoV-2 ORF8(음성 대조군으로서))의 증가하는 농도(0-10 pg mL^{-1})의 용액(3 mL)을 실험 전에 PBS에서 제조하고, 필요할 때까지 4℃에서 보관하였다. 각 바이오마커 주입을 LSP02-1B 이중 채널 주사기(Longer Precision Pump Co., Hebei, China) 펌프를 사용하여 12분 동안 250 μL $분^{-1}$에서 수행하였다. 각각의 바이오마커 주입 후, 다음 주입 전에 시스템을 30분 동안 안정화시켰다. 방열판을 37.00℃로 유지하는 데 필요한 전력으로 온도 구배(T_1-T_2)를 나누어 실험 전반에 걸쳐 열 저항(R_{th})을 결정되었다. R_{th} 및 표준 편차(SD)를 각각 각 농도의 기저선 신호와 초기 PBS 주입으로부터 600개 데이터 포인트의 평균을 사용하여 계산하였다(도 6, 7a, 및 8a). 이 데이터를 사용하여 용량-반응 곡선을 제작하고, 이로부터 센서의 선형 범위에서 3-시그마 방법을 사용하여 검출 한계(LoD)를 계산하였다(도 7b 및 8b). 그래프의 오차 막대는 SD 값과 관련이 있다. 도 6은 SARS-CoV-2 ORF8에 대한 열 반응이 매우 제한적임을 보여주는 반면, 도 7 및 8은 펩타이드 1 및 3 모두에 대해 각인된 nanoMIP에 대해 SARS-CoV-2 S 단백질 RBD에서 양호한 반응이 관찰되었음을 보여준다.

[0172] **실시예 9: nanoMIP 견고성의 분석**

[0173] 극한의 온도와 pH를 견디는 펩타이드 1에 대해 각인된 MIP의 능력을 조사하였다.

[0174] 온도

[0175] 실온, 37℃, 및 50℃에서 동일한 nanoMIP를 이미지화함으로써 온도를 증가시키는 것이 흡수된 nanoMIP의 형태에 얼마나 영향을 미치는지 조사하기 위해 원자력 현미경(AFM)을 활용하였다.

[0176] AFM 측정을 JPK Nanowizard 4 XP Bioscience(Bruker, Nano GmbH, Berlin, Germany)에서 수행하였다. 공기 중의 측정을 ~225 μm의 캔틸레버(cantilever) 길이 및 ~48 N m^{-1}의 스프링 상수를 갖는 PPP-NCL-W 프로브(Nanosensors, Neuchatel, Switzerland)를 사용하여 태핑 모드(tapping mode)에서 수행하였다. 액체 중의 측정을 ~140 μm의 캔틸레버 길이 및 ~0.1 N m^{-1}의 스프링 상수를 갖는 MLCT-E 프로브(Bruker, Ca, USA)를 사용하여 정량적 이미징(QI) 모드에서 수행하였다. Au 코팅된 Si 칩을 기판으로 사용하였다(Si-Mat, Kaufering, Germany). 드롭캐스팅 전에, 칩을 75℃에서 가열된 milli-Q 물, 암모니아, 및 과산화수소의 5:1:1 혼합물에 5분 동안 침지하여 세정하였다. 그 다음, 칩을 milli-Q 물에서 헹구고 질소로 건조시켰다. NanoMIP 용액을 milli-Q 물에서 ~2.54 μg mL^{-1}로 희석하고, Au 코팅된 표면에 드롭캐스팅(20 μL)하고, 페트리 디쉬에서 최소 4시간 동안 주변 조건에서 건조시켰다. 37℃ 및 50℃에서 이미징을 용이하게 하기 위해 고온 가열 단계(HTHS, JPK BioAFM - 0.1℃의 분해능)를 온도 제어기로서 사용하였다.

[0177] 전형적인 AFM 이미지 및 상응하는 단면 프로파일 플롯을 각각 보여주는 도 9a 및 9b는 nanoMIP 형태가 온도를 증가시킴으로써 영향을 받지 않았음을 보여준다.

[0178] NanoMIP 부피를 Gwyddion을 사용하여 계산하였다. 수많은 액적의 추적은 실온부터 50℃까지 평균 nanoMIP 부피의 최소 변화(~6% 감소)를 밝혀내었다.

[0179] 따라서, nanoMIP 형태는 비교적 넓은 온도 범위에 걸쳐 일관되게 유지된다.

[0180] Biacore 3000 기기를 사용한 SPR 결합 분석을 또한 121℃의 최대 온도로 15분간 고압멸균을 겪은 nanoMIP를 사용하여 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대해 수행하였다.

[0181] 더 상세히, 직접 제조되거나 121℃에서 대략 15분 동안 고압멸균 후의 nanoMIP(실시예 1)를 바로 아래 공정에 따라 4% 메르캅토운데칸산(MUDA) 칩(에탄올 중의 4% MUDA의 자가 조립된 단층으로 기능화된, Biacore SIA 키트 Au 표면을 사용하여 제조됨) 상에 공유 고정화시킴으로써 2개의 nanoMIP-SPR 센서를 제조하였다.

[0182] 물을 기기를 5 μL/분의 일정한 유속으로 프라이밍하는 데 사용하였다. 물을 30 μl/분의 일정한 유속으로 칩 제조 전반에 걸쳐 러닝 완충액으로서 활용하였다. 안정적인 기저선이 달성될 때까지 물을 흐르게 하였다. N-하이드록시석신이미드(NHS) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드(EDC)의 혼합물(400 uL의 물 중에서 2 mg EDC + 3 mg NHS)을 센서 표면 전체에 걸쳐 주입(8 μL/분의 유속으로 8분)하여 표면을 활성화시켰다(혼합물은 칩 표면 상의 카르복실 말단 기를 N-하이드록시-석신이미드 에스테르로 변환시킴). 그 다음, NanoMIP(5 nM)를 칩 상의 4개의 모든 유동 셀 내로 주입(8 μL/분의 유속으로 8-10분)하였다. 마지막으로, 반응하지 않은 NHS 에스테르를 탄산 완충액(pH 9.2)을 주입(5 내지 30 μL/분의 유속으로 30분)함으로써 가수분해하였다.

[0183] 러닝 완충액을 물에서 PBS로 전환하여 안정적인 기저선을 얻으면, SARS-CoV-2 S 단백질(The Native Antigen Company로부터 공급받은 재조합 전장 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질)의 5개의 희석물(PBS 중의 30, 15, 7.5, 3.75 및 1.88 mM)을 대조군 채널에서 적합한 대조군과 함께 주입하였다(약 5분 결합 단계, 적어도 2분 해리 단계, 28 μl/분 유속). 그 다음, 2개의 칩의 결과를 중첩하였고, 소프트웨어는 고압멸균 전후의 nanoMIP에 대해 매우 유사한 KD 값을 계산하였으며(각각 7 nM 및 3 nM), 이는 고온에 노출된 후 결합 친화성에 영향이 없음을 입증한다. 고압멸균(멸균)이 박테리아 분해 없이 물에서 이들의 장기간 보관을 용이하게 하므로, 이는 nanoMIP 보관 수명에 매우 유리하다. 대조적으로, 항체는 37℃ 초과의 온도에서 친화성의 유의한 저하를 경험한다.

[0184] pH

[0185] AFM을 또한 사용하여 다양한 pH 수준의 액체 내의 흡수된 nanoMIP(n = 120)의 부피를 측정함으로써 극한의 pH를 견딜 수 있는 nanoMIP의 능력을 평가하였다. 보다 구체적으로, QI 측정을 AFM의 작동 조건 내에서 상이한 pH 수준(5.5-8.5)의 액체에서 실온(23±1℃)에서 수행하였다. 초기 측정을 순수한 milli-Q 물(pH 5.5)에서 수행하였고, pH는 이후에 암모니아의 첨가로 증가하였다.

[0186] 위와 같이, nanoMIP 부피를 Gwyddion을 사용하여 계산하였고, 이는 pH 5.5부터 8.5까지 평균 nanoMIP 부피에 대한 무시할 수 있는 변화(~3% 감소)를 밝혀내었고, 이는 흡수된 nanoMIP 형태가 광범위한 pH 범위에 걸쳐 일관적이었음을 강조한다(도 9c 참조).

[0187] 또한, 임상 기준 액체(범용 수송 매체, UTM) 및 다이어트 코카콜라(pH = 3.5)에 대한 개발된 nanoMIP 검사(실시예 10 참조)의 열 반응을 비교하였다. 결과는 두 액체의 열 반응 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없음을 입증하였다(도 9d 참조). 반면, 상업적인 항체 기반 신속 항원 검사는 pH 변화에 큰 영향을 받으며, 산성 청량 음료(다이어트 코카콜라)를 검사 액체로 사용할 경우 위양성 결과가 발생한다(도 9e 참조).

[0188] **실시예 10: 열 검출 방법을 사용한 NanoMIP와 SARS-CoV-2 항원 및 SARS-CoV-2 항체와 SARS-CoV-2 항원 사이의 결합의 비교.**

[0189] NanoMIP 기능화된 스크린 인쇄 전극(SPE)(펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP 사용)을 실시예 8의 절차에 따라 제조하였다.

[0190] SARS-CoV-2 항체 기능화된 SPE를 또한 실시예 8의 절차에 따라 제조하였다.

[0191] nanoMIP- 또는 SARS-CoV-2 항체 기능화된 스크린 인쇄 전극(SPE)을 사용한 NanoMIP 또는 SARS-CoV-2 항체 및 SARS-CoV-2 항원 사이의 결합의 검출.

[0192] SARS-CoV-2 항원(The Native Antigen Company로부터 공급받은 재조합 전장 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질(알파 변이체), Abbexa, Cambridge, UK로부터 공급받은 재조합 SARS-CoV-2 스파이크 수용체 결합 도메인(RBD)(델타 변이체) 또는 Medical Research Council Protein Phosphorylation and Ubiquitylation Unit(Dundee, UK)으로부터의 SARS-CoV-2 RBD)을 nanoMIP 기능화된 SPE를 3D 인쇄 수지 유동 셀 내로 장착하여 방열판 및 액체 저장소

사이에 계면을 생성함으로써 열적으로 검출하였다. 2개의 열전대는 1초마다 방열판(T_1) 및 액체 저장소(T_2) 온도를 측정하고, 방열판을 37.00 ± 0.02℃로 유지하는 데 필요한 전력으로 온도 구배(T_1-T_2)를 나누어 열 저항(R_{th})을 수득하였다. nanoMIP에 타겟이 부착됨에 따라, 고체-액체 계면에서의 열 전달이 감소하였고(더 큰 온도 구배), 이는 R_{th}의 측정가능한 증가를 초래하였다.

[0193] 모든 실험의 경우, 열 측정 장치를 LabView 소프트웨어를 사용하여 제어하였고, 전력 저항기(22Ω)에 부착된 비례-적분-미분(PID) 제어기는 신호 상의 피드백을 조절하였다. PID 매개변수를 노이즈를 줄이기 위해 최적화하였고 P= 1, I = 13, 및 D = 0.2로 설정하였다.

[0194] 액체 저장소를 PBS로 채우고 기저선 R_{th} 신호의 안정화를 보장하기 위해 30분 동안 방치하였다. 이후, 증가하는 농도의 SARS-CoV-2 항원(1 fg mL^{-1} - 10 pg mL^{-1})을 갖는 5개의 스파이크된 PBS 용액(3 mL)을 자동 주사기 펌프(LSP02-1B, Longer Precision Pump Co., Hebei, China)를 사용하여 12분 동안 250 μL $분^{-1}$의 속도로 유동 셀에 주입하였다. 각 후속 주입 전에 시스템을 30분 동안 안정화시켰다. 실험은 R_{th}의 단계적 증가를 표시하는 원시 열 데이터 플롯을 생성하였고, 여기서 각 안정화된 정체기(plateau)는 점점 더 농축된 스파이크된 용액의 주입을 나타낸다(도 10a 참조). 각 농도 주입으로부터 안정화된 정체기의 평균 및 표준 편차(SD)를 취함으로써 열 플롯으로부터 용량-반응 곡선(도 10b-d)을 만들었다. 검출 한계(LoD) 값을 선형 범위에서 3-시그마 방법(3×기준 SD)을 사용하여 용량-반응 곡선으로부터 계산하였다.

[0195] SARS-CoV-2 항체 기능화된 SPE를 nanoMIP의 감지 성능 및 항체 수용체의 감지 성능 사이의 직접적인 비교를 용이하게 하는 데 사용하였다. 열 검출 결과(도 10b 참조)는 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(알파 변이체)에 대한 반응이 nanoMIP(LoD = 9.9 ± 2.5 fg mL^{-1}) 및 항체(LoD = 8.9 ± 4.1 fg mL^{-1}) 기반 센서와 매우 유사하였음을 밝혀내었고, 이는 스파이크 단백질에 대한 nanoMIP의 특이성이 상업적인 검사에 사용되는 항체와 유사함을 강조한다.

[0196] 바이러스 돌연변이를 검출하는 nanoMIP 수용체의 능력을 또한 SARS-CoV-2 스파이크 단백질(델타 변이체)에 대한 이들의 특이성을 측정함으로써 조사하였다. 결과는 생성된 LoD(6.1 ± 2.9 fg mL^{-1})가 알파 변이체에 대해 수득된 값과 매우 유사하였기 때문에 nanoMIP 센서가 델타 변이체를 검출하는 데 효과적이었음을 보여준다(도 10b). 이는 nanoMIP 센서가 동일하게 낮은 양의 알파 및 델타 변이체 스파이크 단백질 모두를 검출할 수 있음을 보여주며, 이는 새로운 변이체의 존재로 인한 검사 효율의 감소와 관련된 지속적인 우려가 있는 잠재적인 상업적인 응용분야에 매우 유망하다.

[0197] nanoMIP 수용체의 다재다능성을 또한 SARS-CoV-2 RBD에 대한 이들의 열 반응을 측정함으로써 조사하였다(도 10c 참조). 직접적인 비교를 위해 항체 수용체를 또한 검사하였다. SARS-CoV-2 RBD의 LoD 값은 항체 센서(85.5 ± 15.0 fg mL^{-1})와 비교하여 nanoMIP 센서(3.9 ± 1.0 fg mL^{-1})에 대해 ~20배 더 작았다. 결과적으로, 이는 nanoMIP가 전장 스파이크 단백질에 대해 비슷한 LoD를 가졌으나 RBD에 대해 유의하게 낮은 LoD를 가졌기 때문에 항체보다 더 큰 다재다능성을 가지고 있었음을 입증한다.

[0198] nanoMIP 센서의 선택성을 또한 임상 샘플에서 일반적인 간섭물질인 3개의 음성 대조군인 오픈 리딩 프레임 8(ORF8), 인터루킨-6(IL-6), 및 인간 혈청 알부민(HSA)을 사용하여 종합적으로 조사하였다. 높은 정도의 결합이 SARS-CoV-2 항원 및 nanoMIP 사이에서 발생하였고, 이는 스파이크 단백질(0.23 ℃ W^{-1}) 및 RBD(0.35 ℃ W^{-1})에 대해 최고 농도(10 pg mL^{-1})에서 큰 $\triangle R_{th}$ 값으로 이어졌다. 대조적으로, 최소 결합이 음성 대조군에서는 발생하였고, 이는 ORF8(0.00 ℃ W^{-1}), IL-6(0.06 ℃ W^{-1}), 및 HSA(0.05 ℃ W^{-1})에 대해 유의하게 낮은 $\triangle R_{th}$ 값으로 이어졌다. 상기 결과는 nanoMIP 센서의 열 반응이 음성 대조군과 비교하여 SARS-CoV-2 항원에 대해 상당히 더 컸음을 입증하였고, 이는 nanoMIP 센서의 탁월한 선택성을 강조하였다. 추가 대조군 실험을 또한 SPE(실시예 8의 절차에 따라 제조된 NIP 기능화된 SPE)에 고정화된 비각인 중합체(NIP)를 사용하여 수행하였다. NIP가 중합 동안 표적 에피토프에 노출되지 않아 표적 결합을 용이하게 하는 특이적인 공동(cavity)을 갖지 않았다는 점을 제외하고 nanoMIP와 동일한 합성 프로토콜을 사용하여 NIP를 제조하였다. 스파이크 단백질에 대한 nanoMIP 기능화된 SPE의 열 반응은 NIP 기능화된 SPE(0.04 ℃ W^{-1})와 비교하여 ~6배 더 컸으며, 이는 스파이크 단백질 및 nanoMIP 공동 사이에 특이적 결합이 발생했음을 보여준다.

[0199] nanoMIP 센서, 상업적인 신속 항원 검사, 및 문헌[4-15]으로부터의 최근 개발된 수많은 항원 검사의 LoD 값이 도 10e에 나타나 있다. 하기 표 1은 실험 설정에 대한 추가의 세부사항을 제공한다. nanoMIP 센서에 대한 LoD 값은 상업적인 신속 항원 검사(20 pg mL^{-1})보다 ~6000배 낮다. 이러한 상당히 낮은 LoD는 nanoMIP 수용체가 효과적인 집단 선별을 위해 적절한 민감도를 갖춘 신속한 항원 검사를 생성하는 데 유익한 도구일 수 있음을 강조한다. 또한, nanoMIP 센서의 LoD는 문헌 내의 최근 개발된 항원 검사의 LoD 중 가장 낮은 값에 속한다. 이는 nanoMIP를 사용한 열 검출이 최근 문헌으로부터의 가장 성능이 뛰어난 항원 검사와 경쟁할 수 있으면서도 극한의 온도와 pH를 견딜 수 있다는 추가 이점을 보유한다는 것을 입증한다.

[0200] [표 1]

바이오센서 [a]	방법 [b]	분석물 [c]	검출 한계	도 10e의 표지	참고문헌
NanoMIP 기반의 열 센서	SPE 상에 고정화된 NanoMIP. HTM이 검출에 사용됨	RBD 및 스파이크 단백질	RBD:3.9 fg mL^{-1} S 단백질: 9.9 fg mL^{-1}	1	현재 연구
WANTAI SARS-CoV-2 Ag 신속 검사 LFA	이중 항체 샌드위치 방법과 조합된 측면 유동 면역크로마토그래피	뉴클레오캡시드 단백질	20 pg mL^{-1}	2	4
절반-스트립 LFA	고정화된 항체 및 광학 판독을 이용한 검사 스트립	뉴클레오캡시드 단백질	0.65 ng mL^{-1}	3	5
형광 미소구체 LFA 바이오센서	형광 미소구체 표지화 및 면역크로마토그래피 기술을 조합하는 검사 스트립	뉴클레오캡시드 단백질	100 ng mL^{-1}	4	6
나노자임 CL 종이 검사	측면 유동 스트립과 조합된 나노자임 및 효소적 CL 면역분석법	스파이크 단백질	100 pg mL^{-1}	5	7
Cu_2O 나노큐브 코팅을 갖는 전기화학적 면역센서	Cu_2O 나노큐브로 변형된 SPE 상에 고정화된 스파이크 항체, CV 및 EIS가 검출에 사용됨	스파이크 단백질	0.04 fg mL^{-1}	6	8
MIP 기반의 전기화학적 센서	ncovNP-MIP로 변형된 일회용 Au-TFE 칩. DPV가 검출에 사용됨	뉴클레오캡시드 단백질	0.7 pg mL^{-1}	7	9
FET 기반의 바이오센서	스파이크 단백질로 기능화된 그래핀 기반의 FET를 사용하는 전기화학적 측정	스파이크 단백질	1 fg mL^{-1}	8	10
AuNP를 사용한 비색 분석법	뉴클레오캡시드 단백질에 특이적인 티올 변형된 ASO로 캡핑된 AuNP. SPR이 검출에 사용됨, RNase H의 첨가는 시각 검출을 위한 침전물을 생성함.	뉴클레오캡시드 단백질	180 ng mL^{-1}	9	11

[0201]

세포 기반의 바이오센서	스파이크 항체의 전기삽입에 의해 조작된 포유동물 베로 세포. 생물전기 특성의 변화가 BERA 의 원리를 사용한 세포-바이오센서 설정으로 측정됨	스파이크 단백질	1 fg mL^{-1}	10	12
SERS 기반의 바이오센서	스파이크 항체가 부착된 SERS-활성 기판을 형성하기 위해 Si 웨이퍼 상에 고정화된 AuNP. 라만 리포터-표지된 면역-AgNP 가 검출을 위한 SERS 나노태그로 사용됨.	스파이크 단백질	6 fg mL^{-1}	11	13
ePAD	ePAD 표면 상에 고정화된 스파이크 항체, SWV 가 검출에 사용됨.	스파이크 단백질	110 pg mL^{-1}	12	14
자성 비드 기반의 전기화학적 면역센서	면역학적 사슬을 위한 지지체로서 사용되고 카본 블랙 기반의 SPE 와 조합된 자성 비드. DPV 가 검출에 사용됨	스파이크 및 뉴클레오캡시드 단백질	S 단백질: 19 ng mL^{-1} N 단백질: 8 ng mL^{-1}	13	15

[a] 측면 유동 분석법(LFA); 화학발광(CL); 분자 각인 중합체(MIP); 전계 효과 트랜지스터(FET); 금 나노입자(AuNP); 표면 향상 라만 분산(SERS); 전기화학 종이 기반의 분석물 장치(ePAD).

[b] 스크린 인쇄 전극(SPE); 열 전달 방법(HTM); 순환 전압전류법(CV); 전기화학 임피던스 분광법(EIS); 금-박막 전극(Au-TFE); SARS-CoV-2 뉴클레오캡시드 단백질에 대한 선택성을 갖는 분자 각인 중합체(ncovNP-MIP); 시차 펄스 전압전류법(DPV); 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO); 표면 플라즈몬 공명(SPR); 리보뉴클레아제 H(RNase H); 생물전기 인식 분석법(BERA); 은 나노입자(AgNP); 방형파 전압전류법(SWV).

[c] 수용체 결합 도메인(EBD)

[0202]

[0203] **실시예 11: 임상 샘플에서 SARS-CoV-2를 검출하기 위한 NanoMIP의 사용**

[0204] 프로토타입 3D 인쇄 수지 부가 셀(도 11a 및 11b)을 일회용 구성요소를 사용한 임상 분석을 위해 개발하였다. 실시예 10에서와 같이, 열 측정 장치를 LabView 소프트웨어를 사용하여 제어하였고, 전력 저항기(22 Ω)에 부착된 비례-적분-미분(PID) 제어기는 신호 상의 피드백을 조절하였다. PID 매개변수를 노이즈를 줄이기 위해 최적화하였고, P= 1, I = 14, D = 0으로 설정하였다.

[0205] 부가 셀 디자인을 검증하기 위해, PBS 중의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질을 사용하여 열 검출 실험을 수행하였다. 부가 셀 센서는 LoD 값(7.0 ± 4.0 fg mL^{-1})이 유동 셀 디자인(9.9 ± 2.5 fg mL^{-1}(실시예 10))을 사용할 때 수득된 결과와 매우 유사하였기 때문에 스파이크 단백질(도 11c)에 대해 양호한 열 반응을 나타내었다.

[0206] 초기 검증 후, 임상 측정을 코로나 양성(<20 PCR 사이클 후 양성) 및 음성 환자 샘플(n = 7)을 사용하여 수행하였다.

[0207] UTM 및 VPM(바이러스 보존 배지)을 각각 음성 및 양성 샘플에 대한 기준 액체로서 사용하였다. 측정 동안, 100 μL의 기준 액체(UTM/VPM)을 저장소에 피펫팅하고, R_{th} 신호를 10분 동안 안정화시켰다. 그 후, 기준 액체을 피펫으로 빼내고 100 μL의 샘플을 첨가하였다. 피펫의 사용은 주사기 펌프를 사용하는 것과 비교하여 시스템에 대한 더 적은 방해(예컨대, 유동, 기포 추가)를 초래하였음에 유의한다. 이는 샘플 부피가 인후 및 비강 면봉에 의해 수집된 것(100 μL)과 유사하고 측정 시간이 ~15분으로 감소되었으며 장치 작동이 간단했기 때문에 임상 분석에 매우 유리하다.

[0208] 열 검출 결과(도 11d)는 nanoMIP 공동에 대한 특이적 결합이 양성 샘플의 측정 동안 발생하였고, 이는 큰 평균 $\triangle R_{th}$ 값(0.27 ℃ W^{-1})으로 이어졌음을 보여준다. 대조적으로, 음성 샘플을 측정할 때 nanoMIP에 대한 비특이적 결합만이 발생하였고, 이는 0.00 ℃ W^{-1}의 평균 $\triangle R_{th}$를 초래하였다. $\triangle R_{th}$ 값의 전체 범위는 음성 샘플(0.10 ℃ W^{-1})과 비교하여 양성 샘플(0.41 ℃ W^{-1})에 대해 훨씬 더 컸으며, 이는 상이한 COVID 양성 환자의 바이러스 부하의 변화로 인한 것이다. 중요하게도, 음성 샘플에 대한 가장 큰 $\triangle R_{th}$가 양성 샘플에 대한 가장 작은 $\triangle R_{th}$보다 ~4배 낮기 때문에 임의의 양성 및 음성 측정에서 중복이 없었다. 이는 nanoMIP 센서가 임상 샘플에서 SARS-CoV-2의 검출을 위한 탁월한 민감도 및 특이성을 가지고 있음을 강조한다. 추가로, nanoMIP 센서의 측정 시간(~15분)은 잠재적인 집단 선별 응용분야에 매우 중요한 상업적인 신속 항원 검사와 비슷하다.

[0209] **실시예 12: nanoMIP 및 SARS-CoV-2 변이체 알파, 베타 및 감마 사이의 결합의 분석.**

[0210] NanoMIP 합성

[0211] 펩타이드 1을 실시예 1의 절차에 따라 nanoMIP 합성 전에 실란화된 유리 비드 위에 고정화시켰다.

[0212] 펩타이드 코팅된 유리 비드를 하기와 같이 각인된 nanoMIP의 합성에 사용하였다: 단량체 용액(실시예 1 참조)을 진공 하에서 탈기하고 5분 동안 초음파 처리한 다음, 20분 동안 N_2로 퍼징한 후, 60 g의 펩타이드 1 코팅된 유리 비드를 첨가하였다. 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)의 과황산암모늄 수용액(800 μL, 60 mg/mL) 및 N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민(24 μL)을 첨가함으로써 중합을 개시하였다. 상부공간을 N_2로 플러싱하고, 병을 나사 캡으로 밀봉하였다. 중합을 실온에서 1시간 동안 수행하였다. 이후, 중합 용기의 내용물을 프릿(20 μm 다공성)이 장착된 고체상 추출(SPE) 카트리지(60 mL)에 부었다. 낮은 친화성 nanoMIP, 중합체 및 반응하지 않은 단량체를 제거하기 위해 20℃의 증류수 20 mL로 총 9회 세척을 수행하였다. 그 후, 고체상을 함유하는 SPE 카트리지를 70℃의 수조에 15분 동안 두었다. 65℃에서 미리 예열된 20 mL의 증류수의 분취액을 SPE에 부어 높은 친화성 nanoMIP를 수집하였다. 물 중의 높은 친화성 nanoMIP의 약 100 mL의 용액이 수집될 때까지 이 작업을 5회 반복하였다. 대량의 나노입자로부터 임의의 잠재적인 미반응 단량체를 완전히 제거하기 위해, 수집된 용액을 농축하고 SnakeSkin 막(분자량 컷오프 10 kDa)으로 투석하였다.

[0213] 각인된 nanoMIP는 NanoSight NS300에 의해 계산된 바와 같이 69.3 nm의 평균 직경을 가지고 있었다(도 12).

[0214] 센서 제작

[0215] 일단 생성되면 펩타이드 1에 대해 각인된 nanoMIP를 은 나노입자(AgNP) 기반의 국소 표면 플라즈몬 공명(LSPR) 센서에서 통합하였다.

[0216] 더 상세히, 50 μl의 nanoMIP 스톡 용액(DI 물 중의 5 μg/ml)을 Ag-LSPR 칩에 분주하였다. 그 후, Ag 칩을 가습 챔버 내부에 3시간 동안 넣어 nanoMIP를 Ag 나노입자의 표면에 고정화시켰다. nanoMIP가 아민 기를 가지므로, 음의 LSPR Ag 표면 및 양으로 하전된 nanoMIP 사이의 정전기적 상호작용(-Ag와 NH3+)은 nanoMIP를 표면에 결합시켰다. 이후, Ag 기판을 DI 물로 완전히 헹구어 전극 표면으로부터 임의의 느슨하게 결합된 중합체를 제거하였다. 그 다음, 칩을 4℃에 보관하였다.

[0217] nanoMIP - LSPR 센서의 검출 성능.

[0218] 그 다음, nanoMIP-LSPR 센서의 LSPR 성능을 PBS 중의 SARS-CoV-2 바이러스의 알파, 베타 및 감마 변이체의 스파이크 단백질(모두 안티바디즈-온라인(antibodies-online)으로부터 구입함; 알파, SARS-CoV-2 스파이크 단백질 계통 B.1.1.7, 제품 번호: ABIN6963738; 베타, SARS-CoV-2 스파이크 단백질 계통 B.1.351, 제품 번호: ABIN6963739; 감마, SARS-CoV-2 스파이크 단백질 계통 P.1, 제품 번호: ABIN6964442)을 검출함으로써 평가하였다. 대조군의 경우, 인간 코로나바이러스 균주 HCoVOC43, HKU1 및 HCoV-229E의 스파이크 단백질에 대한 nanoMIP-LSPR 센서의 LSPR 성능을 NIP 기반의 LSPR 센서의 LSPR 성능과 마찬가지로 검사하였다.

[0219] 도 13에 나타낸 바와 같이, 센서는 모든 SARS-CoV-2 변이체의 성공적인 검출을 입증하였다. 도 13a는 다양한 농도의 알파 변이체의 결합시 전형적인 LSPR 센서 반응과 상응하는 흡광도를 보여준다. 도 13b는 알파, 베타 및 감마의 농도를 10 aM부터 100 nM까지 변경시 Ag-MIP 복합체의 LSPR 파장의 변화를 보여준다.

[0220] 파장 데이터를 사용한 검출 한계(LOD)는 466.37 nm, 467.13 nm 및 467.71 nm에서 발견되었으며 이는 알파, 베타 및 감마에 대해 각각 9.71 fM, 7.32 fM 및 8.81 pM에 해당한다. LOD를 블랭크 한계(LOB) 및 측정의 표준 편차의 사용을 포함하는 경험식을 사용하여 계산하였고, 여기서 블랭크는 MIP(임의의 단백질이 없음)에 대한 PBS의 효과를 지칭한다 - 하기를 참조한다.

[0221] LOD 계산

[0222] LSPR 센서의 LOD를 얻기 위해, 파장 변화를 방정식 1 및 2를 사용하여 계산한 다음, 알파, 베타 및 감마 변이체의 스파이크 단백질의 농도로 변환하였다.

[0223] 블랭크 한계(LOB) = $평균_{블랭크}$ + 1.645($SD_{블랭크}$)(방정식 1)

[0224] 검출 한계(LOD) = LOB + 1.645($SD_{최저\ 농도}$)(방정식 2)

[0225] PBS에서 바이러스 샘플을 성공적으로 검출한 후, 임상적으로 관련된 유체 인간 혈청을 사용하여 유사한 실험을 수행하였다. 특히, 혈청에 100 fM, 10 pM, 1 nM 및 100 nM 농도의 알파, 베타 및 감마 스파이크 단백질을 스파

이킹하고, 파장 및 흡광도 이동을 측정하였다. PBS를 사용한 상기 실험에 대해, 대조군 실험을 또한 인간 코로나바이러스 균주 HCoVOC43, HKU1 및 HCoV-229E의 스파이크 단백질을 사용하여 수행하였고, NIP 기반 LSPR 센서의 LSPR 성능을 또한 검사하였다. 도 14a는 다양한 농도의 알파 스파이크 단백질이 스파이킹된 혈청에 대한 전형적인 LSPR 센서 반응을 보여준다. 도 14b는 알파, 베타 및 감마 스파이크 단백질의 농도를 10 aM부터 100 nM까지 변경시 Ag-MIP 복합체의 LSPR 파장의 변화를 보여준다.

[0226] 파장 데이터를 사용하여 알파 및 베타에 대해 계산된 LOD는 457.54 nm 및 460.49 nm인 것으로 나타났다. 이러한 LOD 값은 알파의 경우 14 fM 및 베타의 경우 94 fM의 농도에 해당한다. 계산된 LOD는 감마 결합에 대해 관찰된 파장 변화에 대해 130 fM(457.37 nm)이었다. LOD 값을 결정하는 방법은 상기에 나타나 있다. 본 실험에서는 LOD 계산에 필요한 LOB 계산을 위해 단백질이 없는 혈청에서의 측정을 블랭크 샘플로 간주하였음에 유의한다.

[0227] PBS 및 혈청에서의 상기 각 실험에 대해, 대조군으로 사용된 인간 코로나바이러스의 스파이크 단백질을 포함한 모든 스파이크 단백질을 제조하거나 상이한 농도(10 aM 내지 100 nM)의 PBS/혈청으로 희석하였다. Ag-MIP 기능화된 기판을 상이한 농도의 각각의 단백질에 노출시켰다. 이는 50 μl의 샘플을 Ag-MIP에 드롭캐스팅함으로써 이뤄졌다. 센서의 표면을 주어진 농도에 노출시킨 후, 단백질이 MIP와 상호작용할 수 있도록 20분의 인큐베이션 기간을 포함시켰다. 그 후, 센서의 표면을 PBS(PBS 및 혈청 샘플 모두)로 세척하고 LSPR 신호를 측정하였다. 신호를 획득하기 위해, 30초 시간을 포함시켰고, 이 시간 동안 오션뷰 소프트웨어(하기 참조)가 다중 스펙트럼을 획득하고 5의 박스 카 폭(voc car width)을 갖는 평균 10개의 스펙트럼을 표시하였다. LSPR 스펙트럼을 나중에 저장하였고, 파장/흡광도 이동을 그래프패드 프리즘(Graphpad Prism) 소프트웨어를 사용하여 기록, 분석 및 플롯팅하였다.

[0228] LSPR 신호를 오션 옵틱스(Ocean Optics)로부터 구입한 구성요소인 분광계 FLAME-T-XR1-ES, 반사 프로브 QR400-7-SR-BX, UV-Vis 패치 연결기, DH-2000 중수소-텅스텐 할로겐 램프(DH 2000-S-DUV-TTL), RTL-T 스테이지, 및 오션뷰 소프트웨어로 구성된 내부 설정을 사용하여 획득하였다. LSPR 스펙트럼을 획득하기 전에, 유리 슬라이드를 기준으로 사용하여 배경 노이즈 제거를 위한 암흑 및 기준 신호를 측정하였다. 이 유리 슬라이드는 Ag가 증착된 동일한 기판이었다. 1시간 동안 아세톤에서 기판을 초음파 처리한 다음 이소프로판올 와이프를 사용하여 표면을 세정하여 기판 중 하나로부터 Ag 나노입자를 완전히 제거함으로써 이 기준 기판을 생성하였다. 모든 생성된 데이터를 그래프패드 프리즘 9 소프트웨어의 내장 기능을 사용하여 분석하고 플롯팅하였다.

[0229] **실시예 13: 2개의 상이한 SARS-CoV-2 변이체 균주로부터의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질에 대한 NanoMIP의 표면 플라스몬 공명(SPR) 분석.**

[0230] 본 연구에서는 Biacore T200 기기를 사용하였다.

[0231] 표면 활성화 및 nanoMIP 고정화.

[0232] NanoMIP-SPR 센서를 제조업체 지침에 따라 Cytiva의 CM5 칩에 nanoMIP(실시예 1)를 공유 고정화시킴으로써 제조하였다.

[0233] 더 상세히, 물을 기기를 5 μL/분의 일정한 유속으로 프라이밍하는 데 활용하였다. 물을 5 μl/분의 일정한 유속으로 칩 제조 전반에 걸쳐 러닝 완충액으로서 활용하였다. 안정적인 기저선이 달성될 때까지 물을 흐르게 하였다. N-하이드록시석신이미드(NHS) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드(EDC)의 혼합물(400 uL의 물 중 2 mg EDC + 3 mg NHS)을 센서 표면에 걸쳐 주입(5 μL/분의 유속으로 8분)하여 표면을 활성화시킨다(혼합물은 칩 표면 상의 카르복실 말단 기를 N-하이드록시-석신이미드 에스테르로 변환시킴). 그 다음, NanoMIP(5 nM)를 칩 상의 여러 유동 셀에 주입(5 μL/분의 유속으로 7분)하였다. 마지막으로, 반응하지 않은 NHS 에스테르를 물 중의 에탄올아민을 주입함으로써 불활성화시켰다.

[0234] nanoMIP 및 2개의 상이한 SARS-CoV-2 변이체로부터의 SARS-CoV-2 스파이크 단백질 사이의 상호작용의 검출

[0235] 러닝 완충액을 물에서 PBS로 전환하여 안정적인 기저선을 얻으면, 재조합 SARS-CoV-2 S 단백질(Wuhan Hu 1 원래 균주 또는 오미크론 균주로서 지정된, The Native Antigen Company로부터 공급받은 재조합 전장 SARS-CoV-2 스파이크 당단백질)의 5개 희석물(PBS 중의 1.23, 3.7, 11.11, 33.33 및 100 nM)을 한 용액으로부터 다음 용액으로의 이동으로 인해 최소 해리 시간만을 가지고 순차적으로 주입(5 μL/분으로 309초)하였다. 2개의 스파이크 단백질 변이체의 결과를 중첩하여 결합 반응의 상대적 크기를 비교할 수 있었다. 도 15에서 나타낸 바와 같이, nanoMIP는 오미크론 균주의 스파이크 단백질 내의 돌연변이에도 불구하고 성능이 약간만 감소하면서 계속 기능하였다. K_D 값을 도출하는 것은 필요한 것으로 간주되지 않았다.

[0236] **참고문헌**

1. Wrapp et al., Science 367, 1260–1263 (2020)
2. van Grinsven, B.; Eersels, K.; Peeters, M.; Losada-Pérez, P.; Vandenryt, T.; Cleij, T. J.; Wagner, P. The Heat-Transfer Method: A Versatile Low-Cost, Label-Free, Fast, and User-Friendly Readout Platform for Biosensor Applications. ACS Appl. Mater. Interfaces 2014, 6, 13309–13318.
3. Geerets, B.; Peeters, M.; van Grinsven, B.; Bers, K.; de Ceuninck, W.; Wagner, P. Optimizing the Thermal Read-out Technique for MIP-Based Biomimetic Sensors: Towards Nanomolar Detection Limits. Sensors 2013, 13, 9148–9159.
4. Diagnostics Wantai SARS-CoV-2. WANTAI SARS-CoV-2 Ag Rapid Test (Colloidal Gold); 2020.
5. Grant, B. D.; Anderson, C. E.; Williford, J. R.; Alonzo, L. F.; Glukhova, V. A.; Boyle, D. S.; Weigl, B. H.; Nichols, K. P. SARS-CoV-2 Coronavirus Nucleocapsid Antigen Detecting Half-Strip Lateral Flow Assay toward the Development of Point of Care Tests Using Commercially Available Reagents. Anal. Chem. 2020, 92, 11305–11309.
6. Zhang, C.; Zhou, L.; Du, K.; Zhang, Y.; Wang, J.; Chen, L.; Lyu, Y.; Li, J.; Liu, H.; Huo, J.; Li, F.; Wang, J.; Sang, P.; Lin, S.; Xiao, Y.; Zhang, K.; He, K. Foundation and Clinical Evaluation of a New Method for Detecting SARS-CoV-2 Antigen by Fluorescent Microsphere Immunochromatography. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020, 10, 10.3389/fcimb.2020.553837.
7. Liu, D.; Ju, C.; Han, C.; Shi, R.; Chen, X.; Duan, D.; Yan, J.; Yan, X. Nanozyme Chemiluminescence Paper Test for Rapid and Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Antigen. Biosens. Bioelectron. 2021, 173, 10.1016/j.bios.2020.112817.
8. Rahmati, Z.; Roushani, M.; Hosseini, H.; Choobin, H. Electrochemical Immunosensor with Cu2O Nanocube Coating for Detection of SARS-CoV-2 Spike Protein. Microchim. Acta 2021, 188, 10.1007/s00604-021-04762–04769.

[0237]

9. Raziq, A.; Kidakova, A.; Boroznjak, R.; Reut, J.; Öpik, A.; Syritski, V. Development of a Portable MIP-Based Electrochemical Sensor for Detection of SARS-CoV-2 Antigen. Biosens. Bioelectron. 2021, 178, 10.1016/j.bios.2021.113029.
10. Seo, G.; Lee, G.; Kim, M. J.; Baek, S. H.; Choi, M.; Ku, K. B.; Lee, C. S.; Jun, S.; Park, D.; Kim, H. G.; Kim, S. J.; Lee, J. O.; Kim, B. T.; Park, E. C.; Kim, S. Il. Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor. ACS Nano 2020, 14, 5135– 5142.
11. Moitra, P.; Alafeef, M.; Alafeef, M.; Alafeef, M.; Dighe, K.; Frieman, M. B.; Pan, D.; Pan, D.; Pan, D. Selective Naked-Eye Detection of SARS-CoV-2 Mediated by N Gene 11 Targeted Antisense Oligonucleotide Capped Plasmonic Nanoparticles. ACS Nano 2020, 14, 7617–7627.
12. Mavrikou, S.; Moschopoulou, G.; Tsekouras, V.; Kintzios, S. Development of a Portable, Ultra-Rapid and Ultra-Sensitive Cell-Based Biosensor for the Direct Detection of the SARS-CoV-2 S1 Spike Protein Antigen. Sensors 2020, 20, 10.3390/s20113121.
13. Zhang, M.; Li, X.; Pan, J.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Wang, C. Ultrasensitive Detection of SARS-CoV-2 Spike Protein in Untreated Saliva Using SERS-Based Biosensor. Biosens. Bioelectron. 2021, 190, 10.1016/j.bios.2021.113421.
14. Yakoh, A.; Pimpitak, U.; Rengpipat, S.; Hirankarn, N.; Chailapakul, O.; Chaiyo, S. PaperBased Electrochemical Biosensor for Diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 Antibodies and Antigen. Biosens. Bioelectron. 2021, 176, 10.1016/j.bios.2020.112912.
15. Fabiani, L.; Saroglia, M.; Galatà, G.; De Santis, R.; Fillo, S.; Luca, V.; Faggioni, G.; D'Amore, N.; Regalbuto, E.; Salvatori, P.; Terova, G.; Moscone, D.; Lista, F.; Arduini, F. Magnetic Beads Combined with Carbon Black-Based Screen-Printed Electrodes for COVID-19: A Reliable and Miniaturized Electrochemical Immunosensor for SARS-CoV2 Detection in Saliva. Biosens. Bioelectron. 2021, 171, 10.1016/j.bios.2020.112686.

[0238]

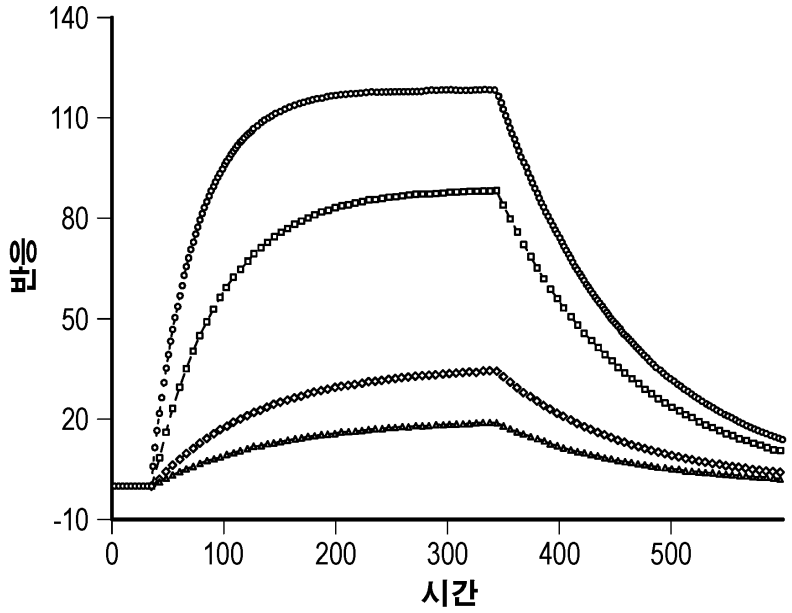
[0239] **서열 요약**

서열번호:	아미노산 서열
1	NSNNLDSKVGG
2	NYNYLYRLFRKS
3	YRLFRKSNLKPF
4	STEIYQAGSTPC
5	CNGVEGFNCYF
6	GSTPCNGVEGF
7	CYFPLQSYGFQP
8	GFQPTNGVGYQ
9	LQSYGFQPTNG

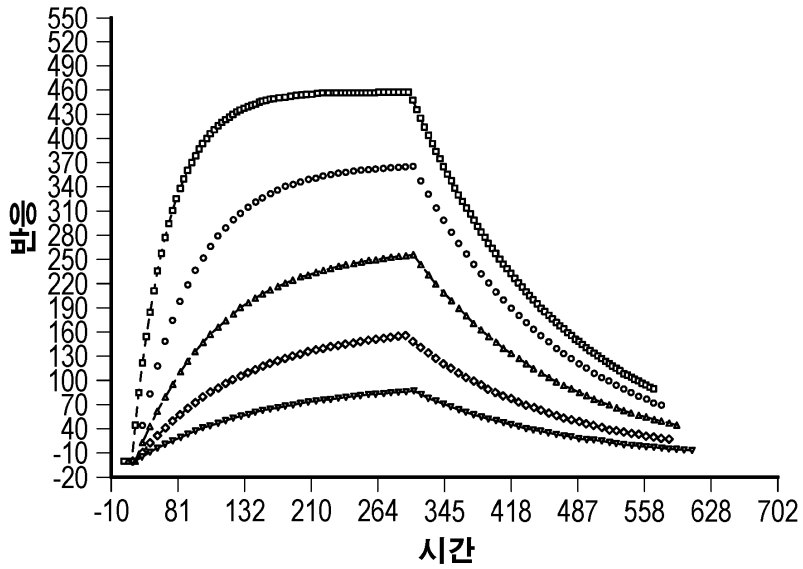
[0240]

도면

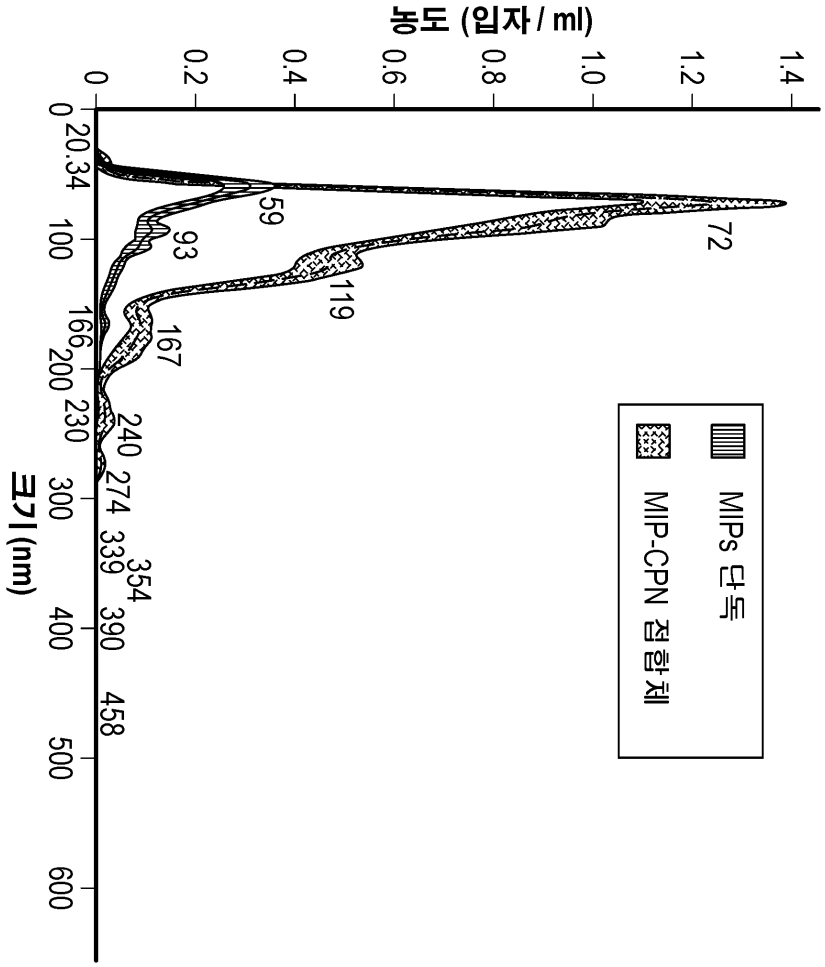
도면1a


140
110
80
50
20
-10
응답
0
100
200
300
400
500
시간

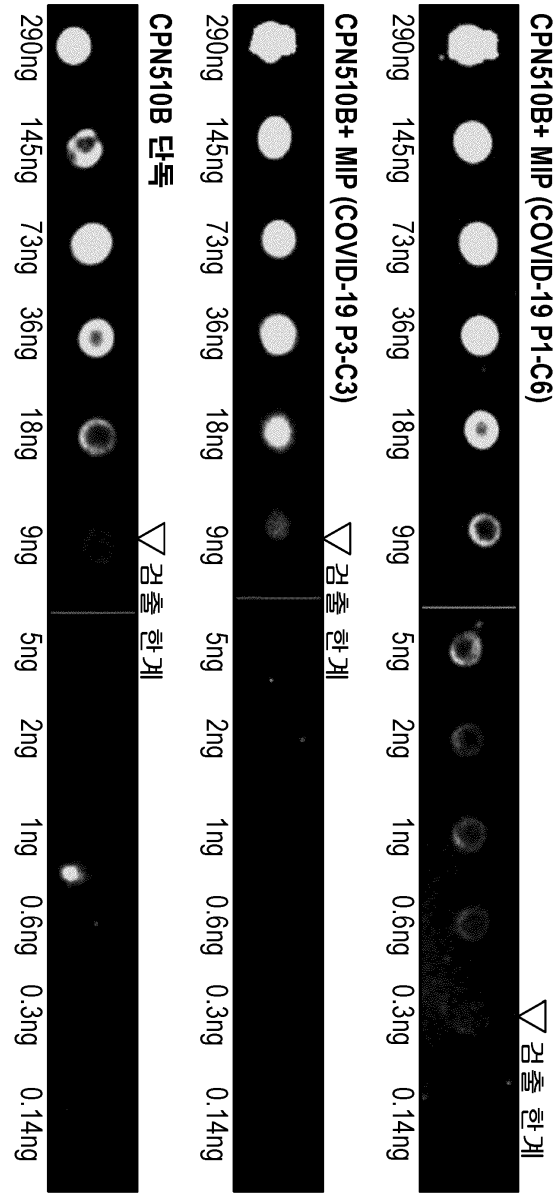
도면1b


550
520
490
460
430
400
370
340
310
280
250
220
190
160
130
100
70
40
-10
-20
응답
-10
81
132
210
264
345
418
487
558
628
702
시간

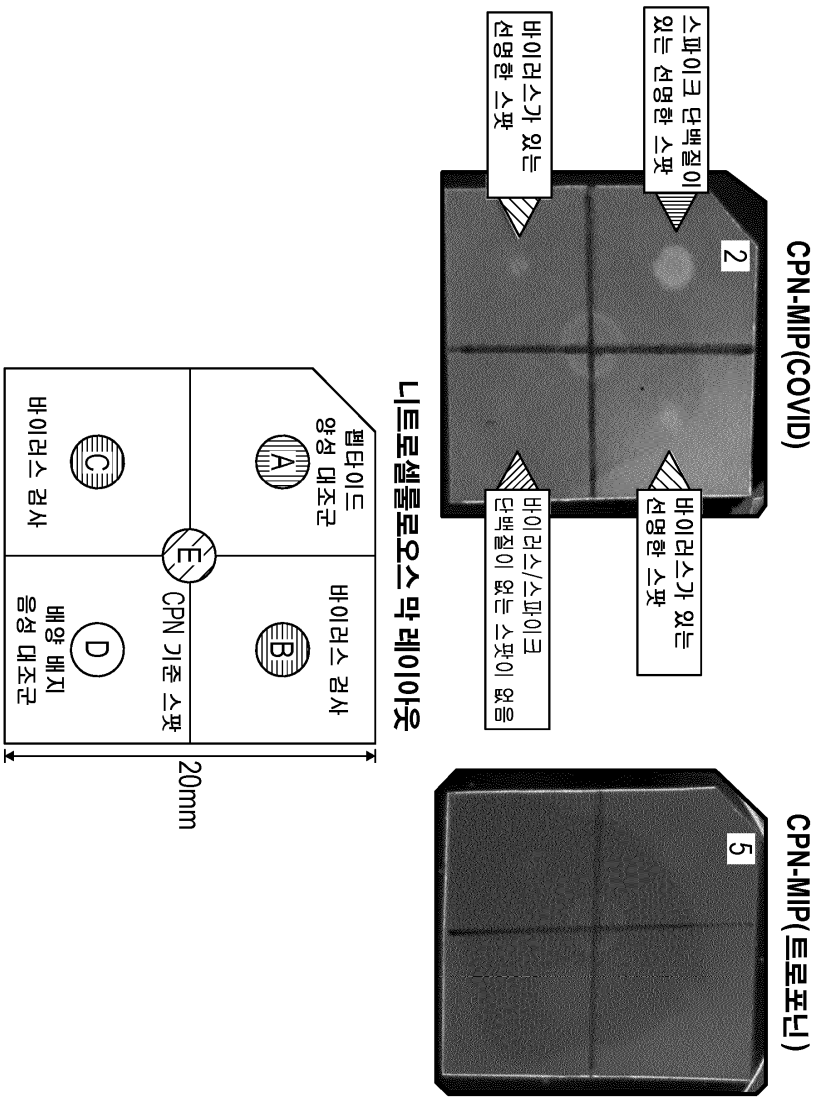
도면2


농도 (입자 / ml)
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
크기 (nm)
0
20.34
100
166
200
230
300
400
500
600
59
93
119
167
240
274
339
354
390
458
72
MIPs 단독
MIP-CPN 접합체

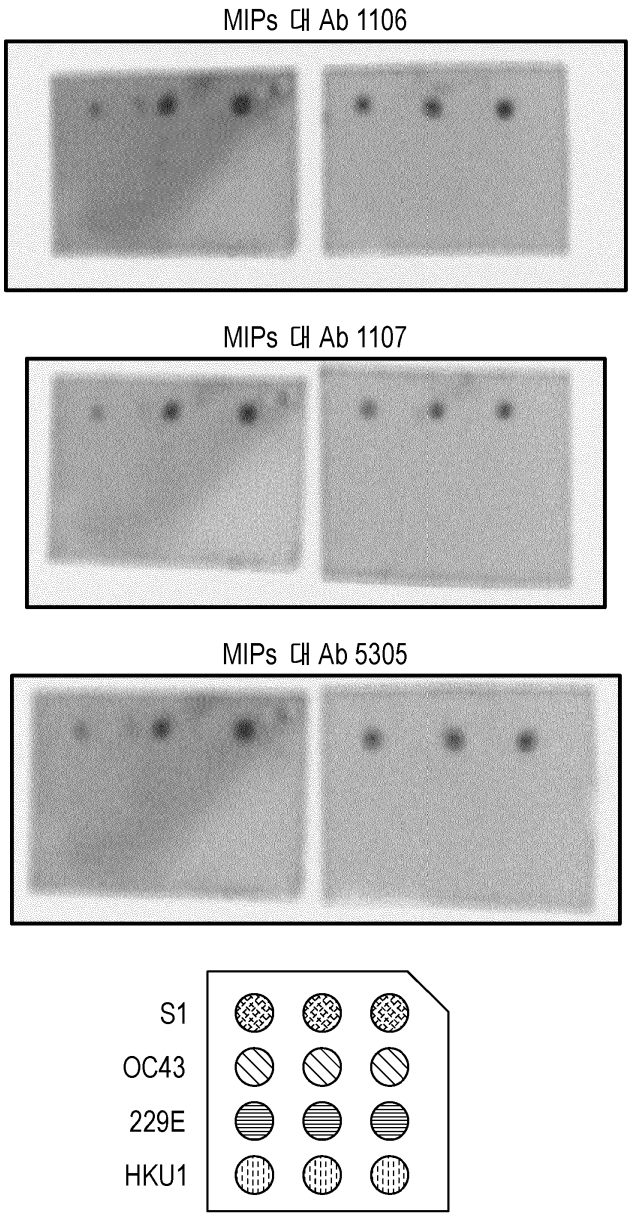
도면3


CPN510B+ MIP (COVID-19 P1-C6)
290ng 145ng 73ng 36ng 18ng 9ng 5ng 2ng 1ng 0.6ng 0.3ng 0.14ng
▽ 검출 한계
CPN510B+ MIP (COVID-19 P3-C3)
290ng 145ng 73ng 36ng 18ng 9ng 5ng 2ng 1ng 0.6ng 0.3ng 0.14ng
▽ 검출 한계
CPN510B 단독
290ng 145ng 73ng 36ng 18ng 9ng 5ng 2ng 1ng 0.6ng 0.3ng 0.14ng
▽ 검출 한계

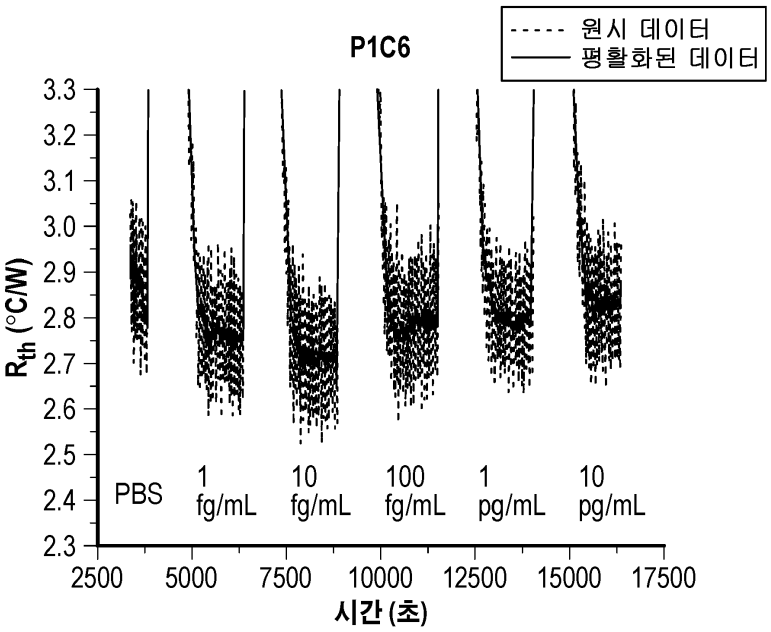
도면4


CPN-MIP(COVID)
2
스파이크 단백질이 있는 선명한 스팟
바이러스가 있는 선명한 스팟
바이러스가 있는 선명한 스팟
바이러스/스파이크 단백질이 없는 스팟이 없음
CPN-MIP(트로포닌)
5
니트로셀룰로오스 막 레이아웃
펩타이드 양성 대조군
A
바이러스 검사
B
바이러스 검사
C
CPN 기준 스팟
E
배양 배지 음성 대조군
D
20mm

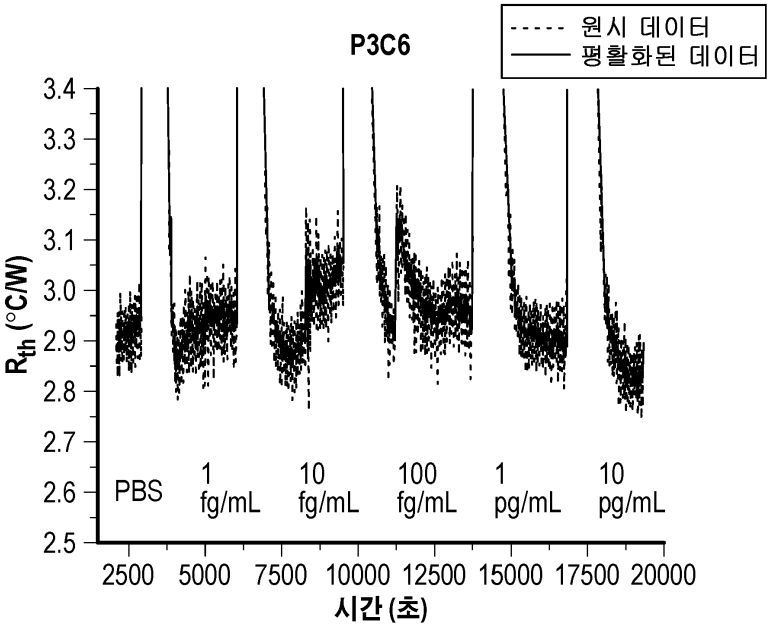
도면5



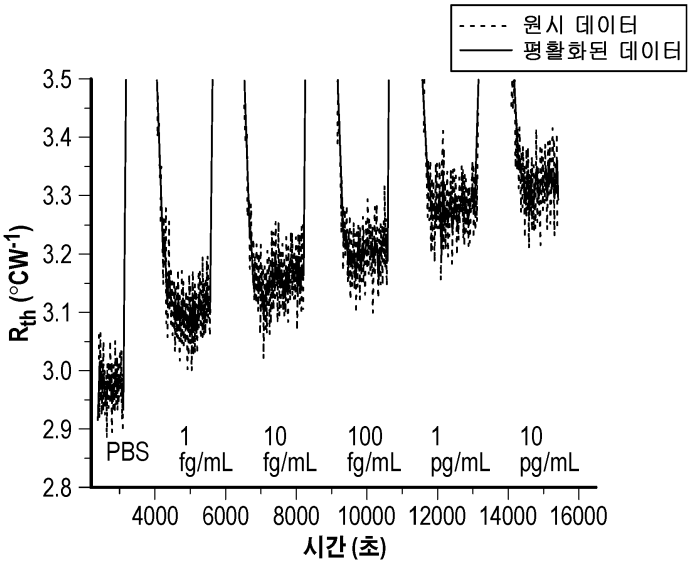
도면6a


P1C6
원시 데이터
평활화된 데이터
R_{th} (°C/W)
3.3
3.2
3.1
3.0
2.9
2.8
2.7
2.6
2.5
2.4
2.3
PBS
1 fg/mL
10 fg/mL
100 fg/mL
1 pg/mL
10 pg/mL
2500
5000
7500
10000
12500
15000
17500
시간 (초)

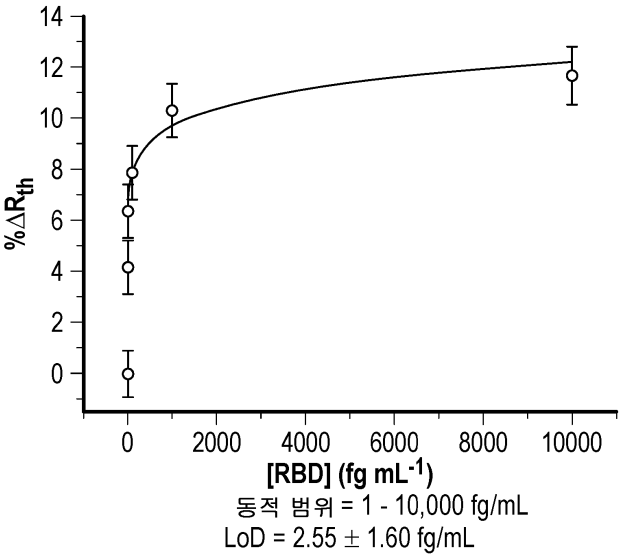
도면6b


P3C6
원시 데이터
평활화된 데이터
R_{th} (°C/W)
3.4
3.3
3.2
3.1
3.0
2.9
2.8
2.7
2.6
2.5
PBS
1 fg/mL
10 fg/mL
100 fg/mL
1 pg/mL
10 pg/mL
2500
5000
7500
10000
12500
15000
17500
20000
시간 (초)

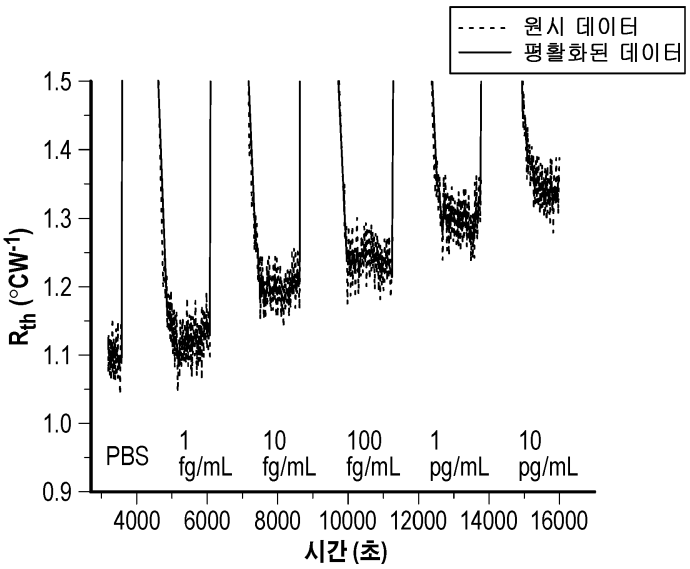
도면7a


원시 데이터
평활화된 데이터
R_{th} (°CW^{-1})
3.5
3.4
3.3
3.2
3.1
3.0
2.9
2.8
PBS
1 fg/mL
10 fg/mL
100 fg/mL
1 pg/mL
10 pg/mL
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
시간 (초)

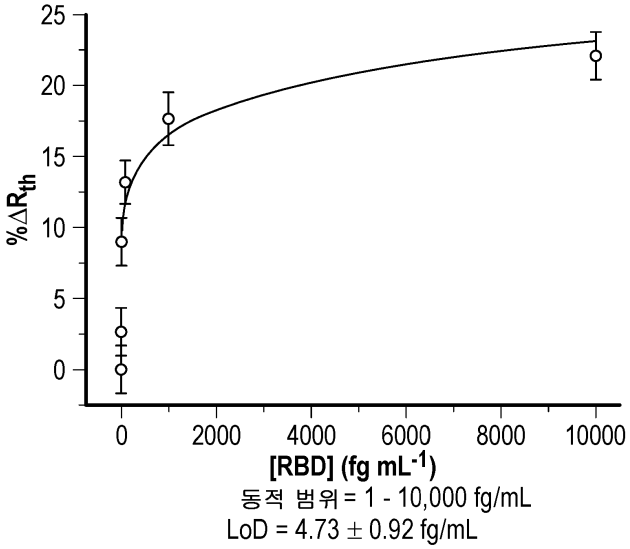
도면7b


%ΔR_{th}
14
12
10
8
6
4
2
0
0
2000
4000
6000
8000
10000
[RBD] (fg mL^{-1})
동적 범위 = 1 - 10,000 fg/mL
LoD = 2.55 ± 1.60 fg/mL

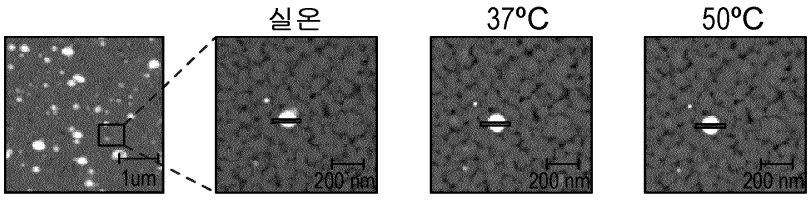
도면8a



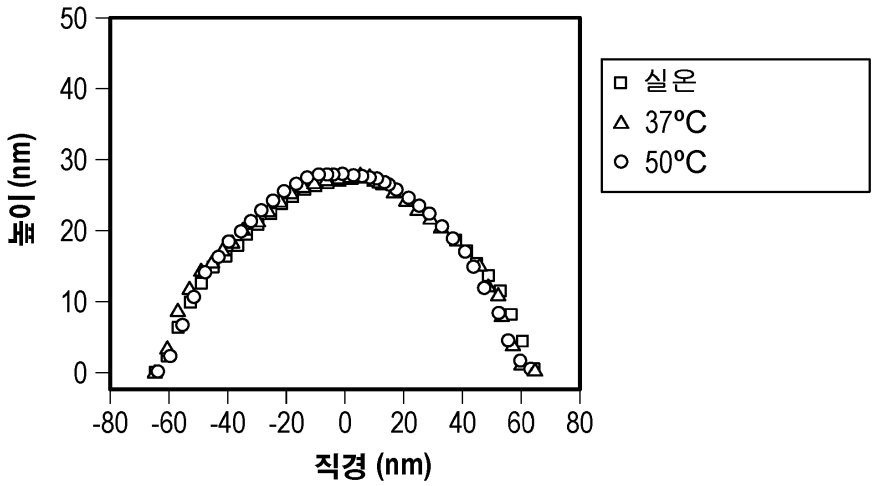
도면8b



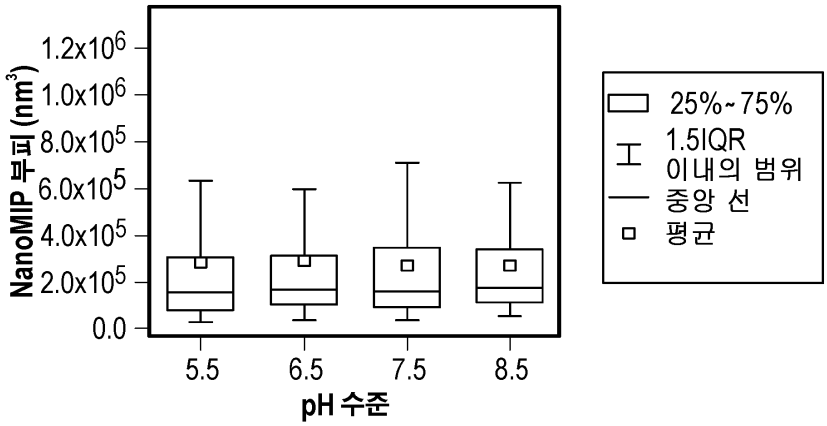
도면9a



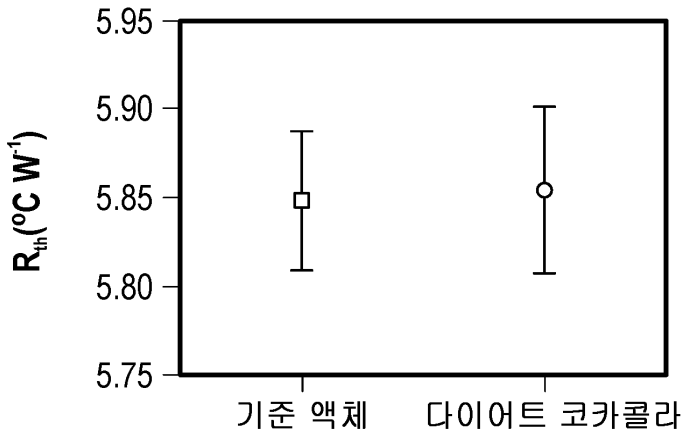
도면9b



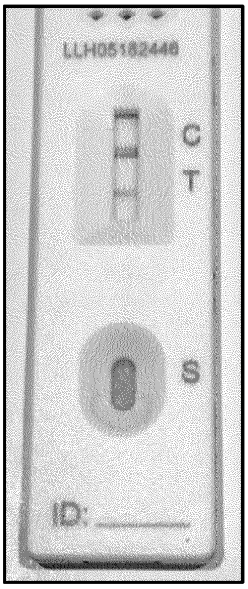
도면9c



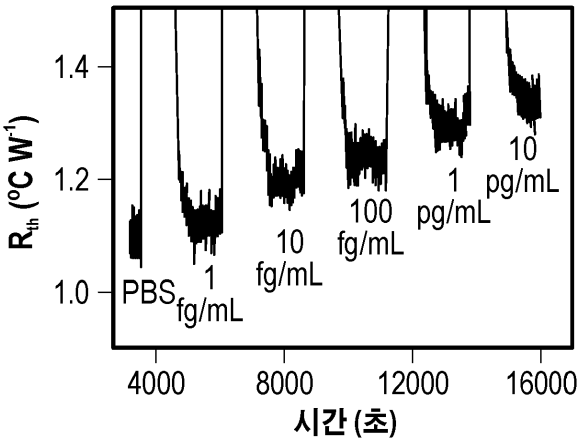
도면9d



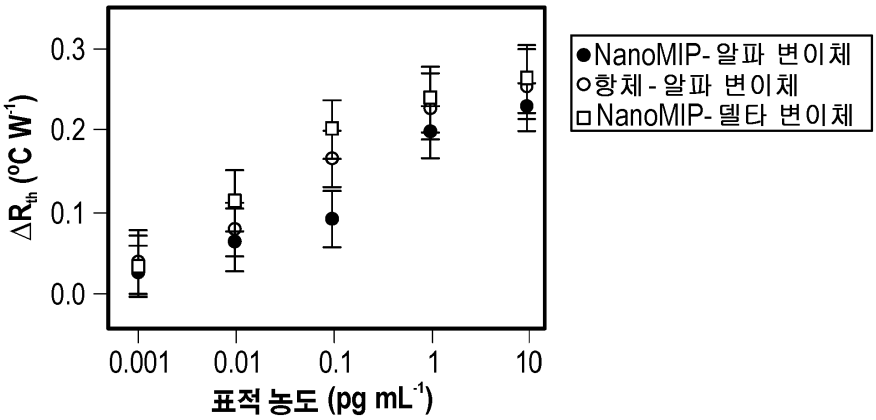
도면9e



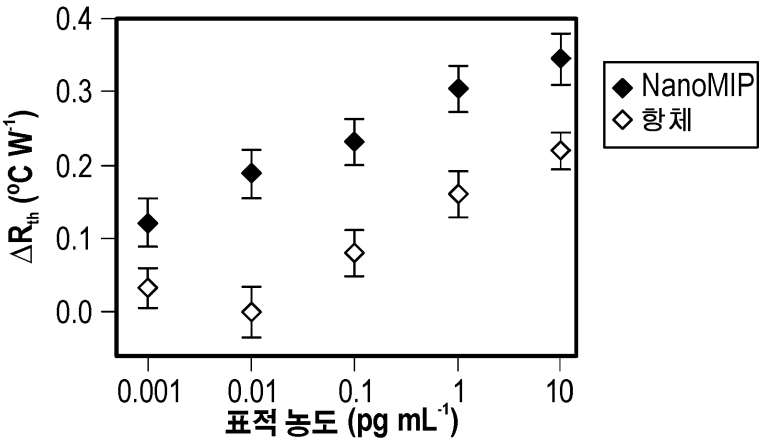
도면10a



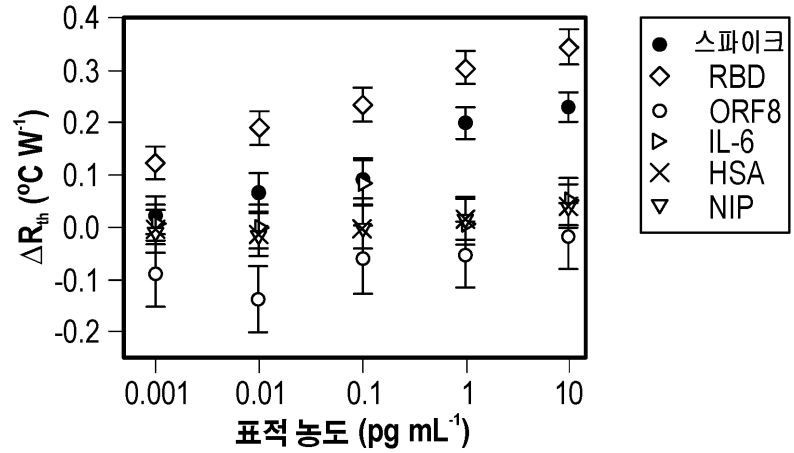
도면10b



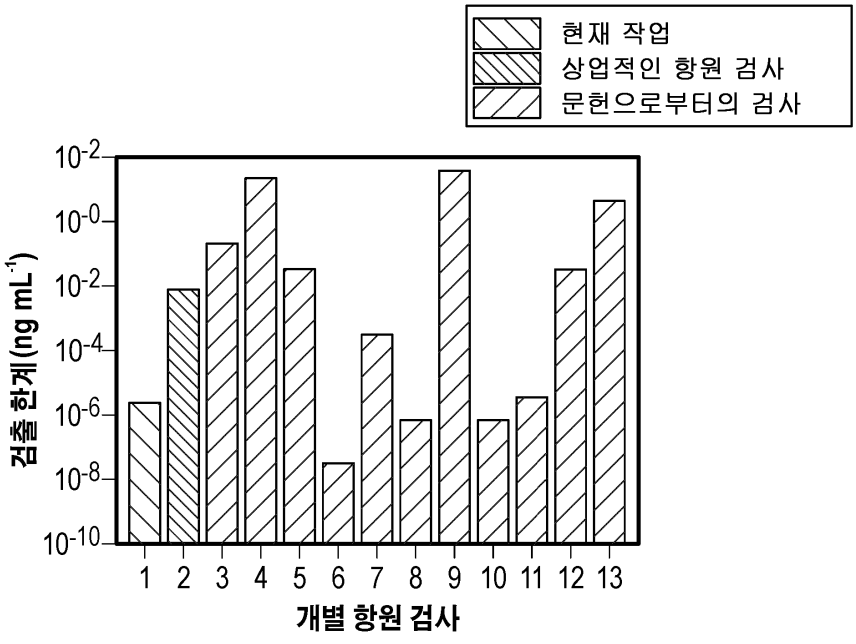
도면10c



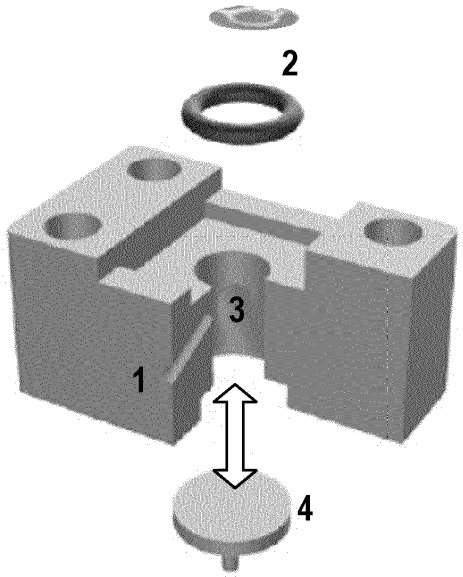
도면10d



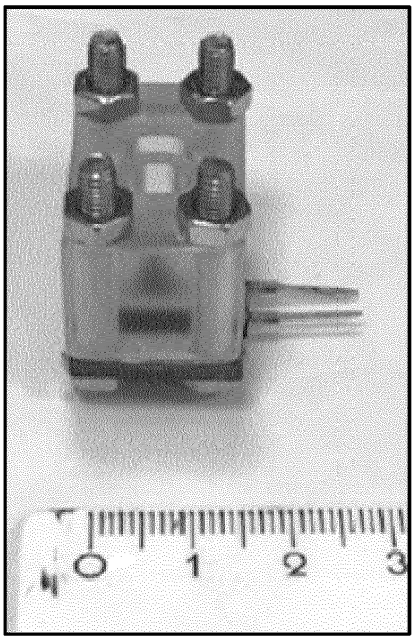
도면10e



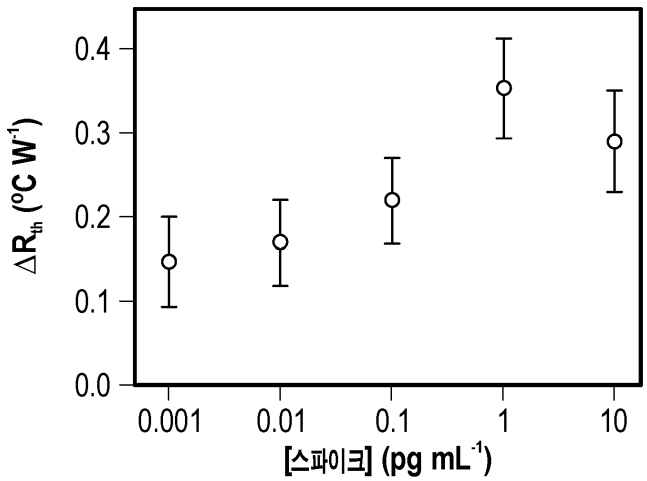
도면11a



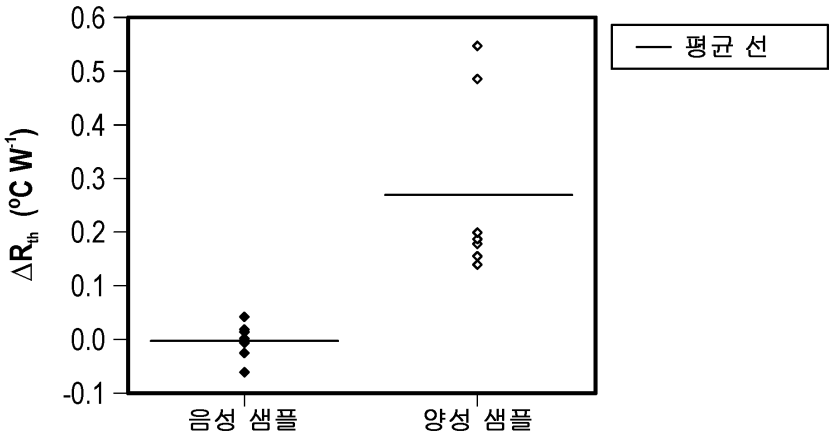
도면11b



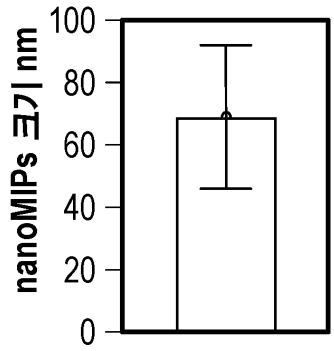
도면11c



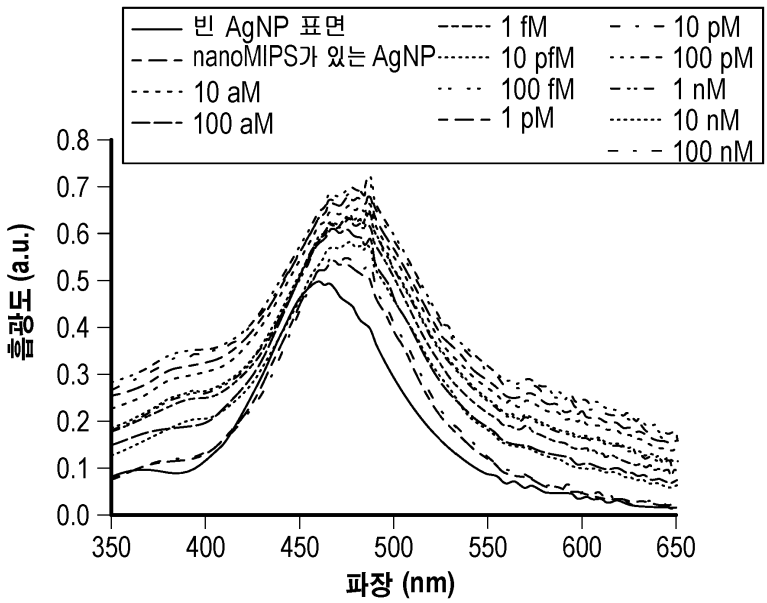
도면11d



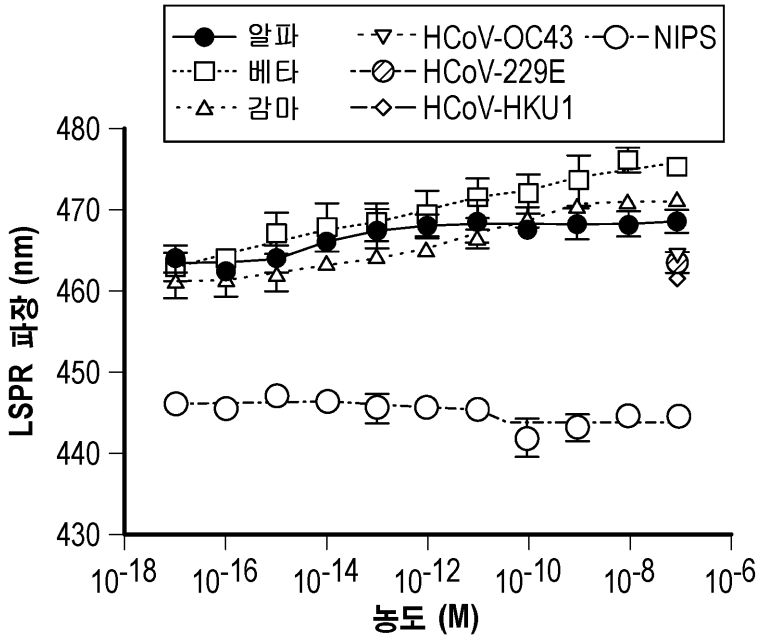
도면12



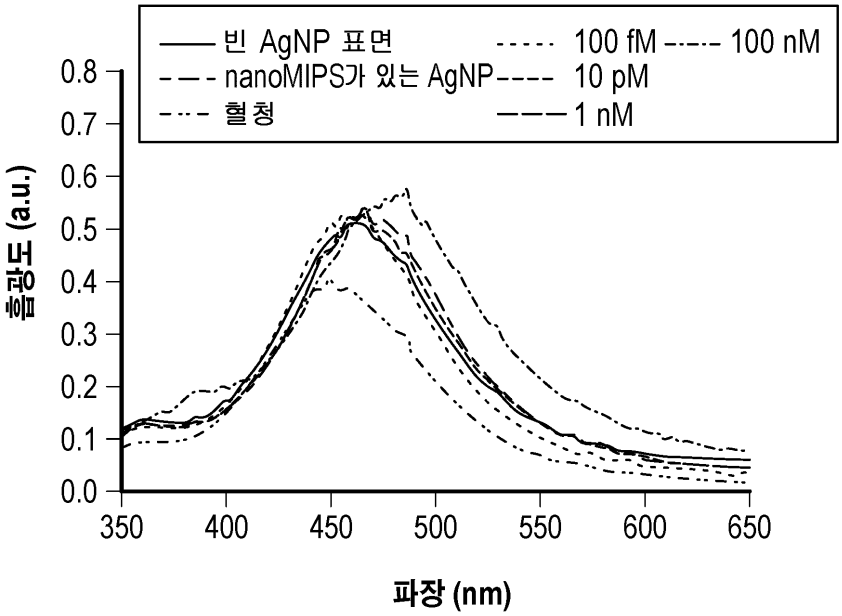
도면13a


빈 AgNP 표면
nanoMIPS가 있는 AgNP
10 aM
100 aM
1 fM
10 pfM
100 fM
1 pM
10 pM
100 pM
1 nM
10 nM
100 nM
흡광도 (a.u.)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
350
400
450
500
550
600
650
파장 (nm)

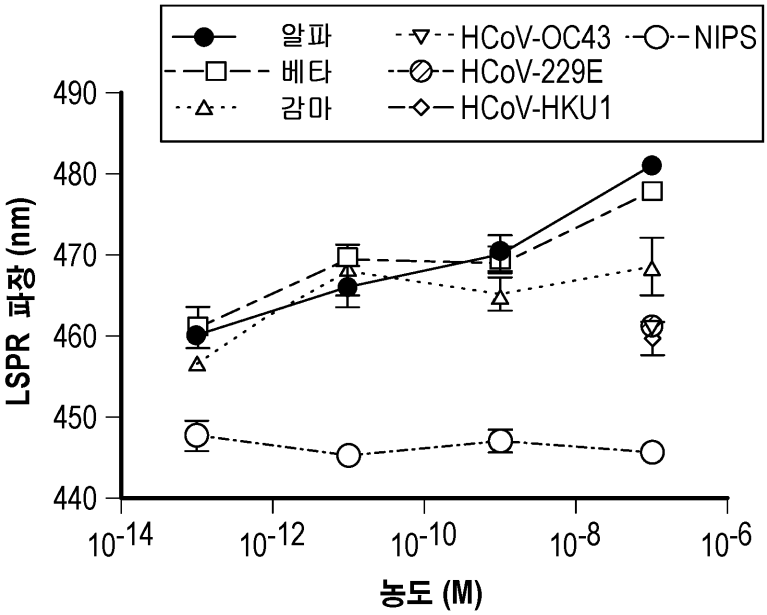
도면13b


알파
베타
감마
HCoV-OC43
HCoV-229E
HCoV-HKU1
NIPS
LSPR 파장 (nm)
430
440
450
460
470
480
10-18
10-16
10-14
10-12
10-10
10-8
10-6
농도 (M)

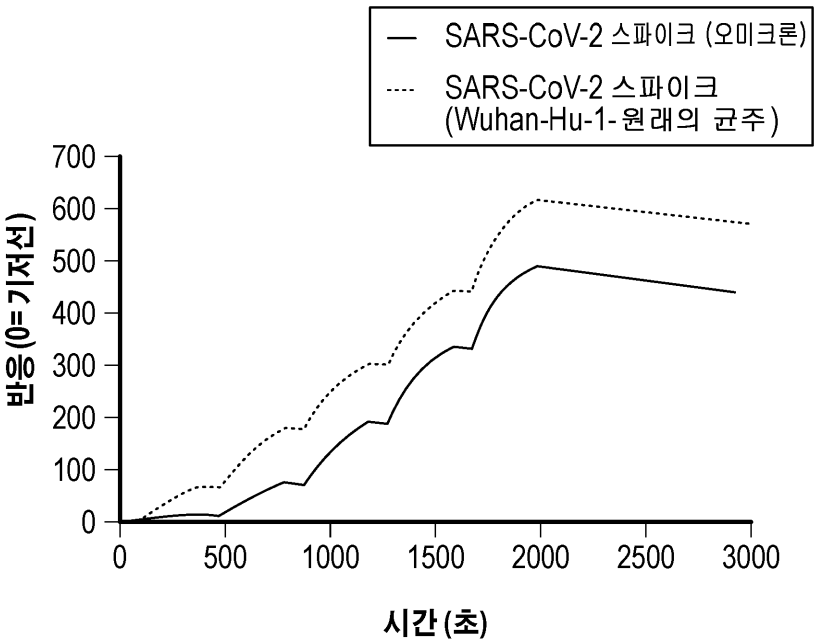
도면14a


빈 AgNP 표면
nanoMIPS가 있는 AgNP
혈청
100 fM
100 nM
10 pM
1 nM
흡광도 (a.u.)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
350
400
450
500
550
600
650
파장 (nm)

도면14b


알파
베타
감마
HCoV-OC43
HCoV-229E
HCoV-HKU1
NIPS
LSPR 파장 (nm)
490
480
470
460
450
440
10-14
10-12
10-10
10-8
10-6
농도 (M)

도면15


SARS-CoV-2 스파이크 (오미크론)
SARS-CoV-2 스파이크
(Wuhan-Hu-1-원래의 균주)
반응(0=기저선)
700
600
500
400
300
200
100
0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
시간(초)