

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0008134 (43) 공개일자 2014년01월21일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>G01N 33/50</i> (2006.01) <i>G01N 33/66</i> (2006.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01) <i>A61B 5/145</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0075297 (22) 출원일자 2012년07월10일 심사청구일자 2012년07월10일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145 (안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스) (72) 발명자 백세환 서울특별시 광진구 아차산로 552 극동아파트 10동 503호 백성호 서울특별시 광진구 아차산로 552 극동아파트 10동 503호 (74) 대리인 김선애

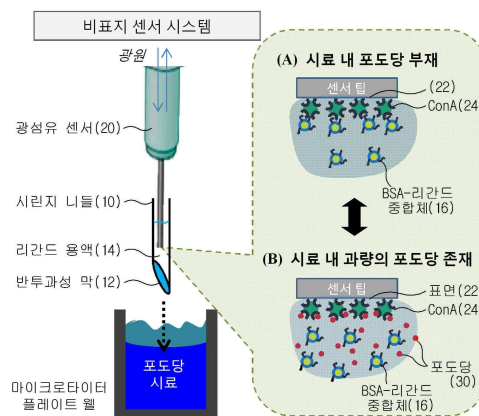
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서

(57) 요약

본 발명은 포도당 분자를 선택적으로 투과하는 반투과성 막을 구비하며, 상기 반투과성 막으로 구획된 내부 공간에 포도당 부착물질(glucose binder)에 가역적으로 부착가능한 포도당 유사 물질을 포함하는 리간드 용액이 채워진 니들(needle); 및 상기 리간드 용액에 접하는 센서 말단 표면에 포도당 부착물질이 고정되어 있으며, 센서 말단 표면에 형성된 분자층의 두께 변화를 탐지할 수 있으며, 상기 니들에 체결되는 광섬유센서;를 포함하는 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서, 상기 바이오센서를 이용하는 연속 혈당 측정 장치 및 연속 혈당 측정 방법을 제공한다. 상술한 본 발명에 의하면, 신체에 이식이 용이하며, 경제적 부착을 이용한 간접적인 방법으로 표지 없이 혈당을 감도 높고 연속적으로 검출 및 정량할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011K000857
부처명	교육과학기술부
연구사업명	신기술 융합형 성장동력사업
연구과제명	[3차년도] 연속 나노진단 기술 개발
기 여 율	1/2
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.07.01 ~ 2012.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	1003374720111310031001391810034042201113
부처명	지식경제부
연구사업명	산업원천기술개발사업
연구과제명	[3차년도]유헬스용 연속 혈당 측정 센서 기술 개발
기 여 율	1/2
주관기관	한국전자부품연구원
연구기간	2011.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

포도당 분자를 선택적으로 투과하는 반투과성 막을 구비하며,
상기 반투과성 막으로 구획된 내부 공간이 형성된 니들(needle); 및
센서 말단 표면에 형성된 분자층의 두께 변화를 탐지할 수 있으며,
상기 니들에 체결되는 광섬유센서;를 포함하고,

- a) 상기 니들 내부 공간에는 포도당 부착물질에 가역적으로 부착가능한 포도당 유사 물질을 포함하는 리간드 용액이 채워지고, 상기 리간드 용액에 접하는 광섬유센서 말단 표면에는 포도당 부착물질이 고정되어 있거나, 또는
- b) 상기 니들 내부 공간에는 포도당 부착물질을 포함하는 용액이 채워지고, 상기 용액에 접하는 광섬유센서 말단 표면에는 포도당 부착물질에 가역적으로 부착가능한 포도당 유사 물질이 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 포도당 부착물질은 콘카나발린 A(conanavalin A), 조효소가 제거된 아포글루코오스 옥시다제(apo-glucose oxidase), 글루코오스 디하이드로게나제(glucose dehydrogenase), 포도당 부착 단백질(glucose binding protein), 유기 붕소산(organic boronic acids), 단일클론 항체, 압타머, 또는 폴리 펩타이드인 것을 특징으로 하는 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 리간드 용액은
포도당 유사물질인 다당류 리간드; 및
상기 다당류 리간드와 화학적 혹은 물리적으로 결합된 운반 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 다당류는 마노오즈, 텍스트란 또는 아미노페닐 글루코오스인 것을 특징으로 하는 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 리간드 용액에는 포도당 부착물질이 더 추가되는 것을 특징으로 하는 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 광섬유센서는 입사광과 반사광을 안내할 수 있는 광 안내 부재를 포함하는 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 반투과성 막은 폴리카보네이트 막이고, 상기 반투과성 막의 세공 크기(pore size)는 상기 포도당 부착물질에 가역적으로 부착가능한 포도당 유사 물질이 니들 외부로 확산하지 않도록 조정된 것을 특징으로 하는 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서.

청구항 8

제1항에 있어서, 니들 용량은 0.2 ~ 1.0 μl 인 것을 특징으로 하는 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 의한 바이오센서;

상기 바이오센서 말단 표면에 광을 조사하기 위한 발광부; 및

상기 바이오센서 말단 표면으로부터 반사되는 광의 세기를 측정하는 검출부를 포함하는 것을 특징으로 하는 개체의 연속 혈당 측정이 가능한 연속 혈당 측정용 장치.

청구항 10

하기 단계를 포함하는, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 의한 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서를 이용한 실시간 연속 혈당 측정 방법:

- a) 상기 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서를 개체에 부착하는 단계;
- b) 상기 니들에 유입된 포도당이 포도당 부착물질에 부착하는 단계;
- c) 포도당 부착물질과 포도당의 부착에 의한 센서 말단 표면에 형성된 분자층의 두께 변화로 인한 신호를 상기 광섬유센서로 탐지하는 단계; 및
- d) 상기 신호로부터 상기 포도당의 양을 산출하는 단계.

청구항 11

제10항에 있어서, 포도당 유사물질 부착 신호로부터 포도당 부착신호를 차감하는 단계를 더 포함하는 실시간 연속 혈당 측정 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 신체에 이식이 용이하며, 경쟁적 부착을 이용하여 표지 없이 혈당을 감도 높고 연속적으로 검출 및 정량할 수 있는 니들 타입 바이오센서, 이를 이용한 연속 혈당 측정 장치 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 당뇨병은 혈당 농도를 조절함으로써 관리할 수 있는 질병이다(Paek et al. 2011). 이 질환관리는 폐회로 인슐린 공급(closed-loop insulin delivery)에 의존하는데 이것은 인슐린 탱크에 직접 신호를 전달하는 연속혈당 모니터링(continuous glucose monitoring; CGM) 시스템을 이용하면 가능하게 된다(Leney and Tavar 2009). 그러나, 손가락 끝에서 혈액을 채취하는 기존 효소센서는 측정 빈도를 제한하므로(Dunn et al. 2004) 이러한 CGM에 이용될 수 없다(Steiner et al. 2011). 최근에 신체에 부착할 수 있는 개선된 버전의 효소센서가 개발되었고 며칠 간 혈당을 연속 측정할 수 있도록 병원에서 제공되고 있다(Wei et al. 2010). 그러나 이러한 방법에도 몇 가지 제한점이 있는데, 특히 하루 몇 번씩 조정(calibration)이 필요하고 또한 체액을 계속 소모할 뿐 아니라 정해진 시간간격으로만 불연속적으로 측정할 수 있다(Boss et al. 2011).

[0003] 현존하는 CGM 시스템이 갖고 있는 몇 가지 문제점들은 포도당 부착물질(glucose binder)을 이용하는 비효소 센서를 도입함으로써 해결될 수 있는데, 특히 유기 붕소산(organic boronic acids(Li et al. 2008), 콘카나발린 A(concanavalin A; Con A; Boss et al. 2011), 포도당-부착 아포엔자임(glucose-binding apoenzymes; Chaudhary et al. 2009), 포도당 부착 단백질(Jin et al. 2011), 그리고 포도당 부착 단일클론 항체(Paek et al. 2011)와 같은 부착물질이 사용될 수 있다. 이 물질들은 모두 포도당과 가역적으로 반응하여 농도에 비례한 결합체(complex)를 형성하므로 실제로 연속측정에 이용될 수 있다. 형성된 결합체의 정량분석 방법으로 부착성분에 대한 경쟁부착 혹은 상호작용 시 구조형태 변화에 의해 야기되는 형광발생 억제에 기초한 광학적인 측정방법들이 널리 적용되어 왔다(Steiner et al. 2011). 이와 같은 신호발생은 화학적 혹은 생물학적인 형광물질 및 효소와 같은 표지성분을 도입하여 이루어지는데 결국 신호를 간단한 트랜스듀서에 의해 탐지하기 위함이다. 따

라서 이러한 센서의 성능은 표지성분의 안정성을 저해하는 요인이나 탐지기로의 신호전달을 방해하는 요인들에 의해 영향을 받는다(Steiner et al. 2011).

[0004] 표지성분을 이용하는 분석의 대안수단으로서, 포도당이 부착성분에 직접 반응하거나 혹은 다른 리간드와의 경쟁 반응을 통하여 포도당을 측정하는데 비표지 방법이 이용될 수 있다(Paek et al. 2011). 기존에 연구된 CGM 시스템들에서도 상호작용에 따른 삼투압(Krushinitskaya et al. 2011), 점도(Steiner et al. 2011), 혹은 표면질량(Mori et al. 2009) 등의 변화를 각 호환성이 있는 탐지기를 이용하여 측정한 적이 있다. 이러한 시스템들은 표지물질을 결합시키는 부담이 없고 또한 고감도를 요구하지 않는 시료의 분석에 더 적합하다. 최근에, 광섬유 센서를 이용한 광학측정 방법이 소개되었는데 고체표면에서의 부착반응으로 야기되는 간섭에 의해 유도된 광의 파장 변화를 측정하도록 개발되었다(Paek et al. 2011). 이러한 광섬유 센서기술은 고체표면에서의 광학신호를 간섭없이 공간적으로 분리된 탐지장치로 전달할 수 있기 때문에 특히 관심이 높다. 더욱이 이러한 탐지장치는 신체표면에 부착할 수 있을 정도로 소형화가 가능하고 전자기장의 영향을 받지 않는다(Wang 2007).

[0005] 한편, 본 발명의 배경이 되는 기술로, 대한민국 특허등록 제0467315호(2005.01.24)에는 경쟁결합을 이용한 바이오센서 및 이를 이용한 글루코스 검출장치 및 방법에 대해 공개되어 있다. 또한, 대한민국 특허등록 제0958198호(2010.05.07)에는 시료유입 채널, 시료 분석 사이트 및 시료 배출 채널을 포함하고, 상기 시료 분석 사이트는 가역반응성 포획 인식성분 및 시료 내의 분석물질-포획인식성분 결합체로부터 발생한 신호를 탐지하는 센서를 포함하는 실시간 연속 검출장치가 공개되어 있다. 그러나, 상기 문헌들에는 센서 표면에 형성된 분자층의 두께 변화를 측정하는 광섬유센서를 포함하는 니들 타입 바이오센서에 대해서는 기재가 없다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 신체에 쉽게 이식될 수 있도록 시린지 니들의 하단 조각 내에 광섬유를 삽입한 바이오 증 간섭형 혈당 센서를 개발하여 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록 제0467315호(2005.01.24)

(특허문헌 0002) 대한민국 특허등록 제0958198호(2010.05.07)

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Boss, C., Meurville, E., Sallese, J.-M., Ryser, P., 2011. Biosens. Bioelectron. 30(1), 223-228.

(비특허문헌 0002) Chaudhary, A., Raina, M., Harma, H., Hanninen, P., McShane, M.J., Srivastava, R., 2009. Biotechnol. Bioeng. 104(6), 1075-1085.

(비특허문헌 0003) Dunn, T.C., Eastman, R.C., Tamada, J.A., 2004. Diabetes Care 27(9), 2161-2165.

(비특허문헌 0004) Grimaldi, J.J., Sykes, B.D., 1975. J. Biol. Chem. 250(5), 1618-1624.

(비특허문헌 0005) Hovorka, R., 2011. Nat. Rev. Endocrinol. 7(7), 385-395.

(비특허문헌 0006) Jin, S., Veetil, J.V., Garrett, J.R., Ye, K., 2011. Bioelectron. 26(8), 3427-3431.

(비특허문헌 0007) Krushinitskaya, O., TØnessen, T.I., Jakobsen, H., Johannessen, E., 2011. Biosens. Bioelectron. 28(1), 195-203.

(비특허문헌 0008) Leney, S.E., Tavaré J.M., 2009. J. Endocrinol. 203(1), 1-18.

(비특허문헌 0009) Li, S., Davis, E.N., Anderson, J., Lin, Q., Wang, Q., 2008. Biomacromolecules

10(1), 113-118.

(비특허문헌 0010) Liu, S., Weaver, J.V.M., Save, M., Armes, S.P., 2002. Langmuir 18(22), 8350-8357.

(비특허문헌 0011) Ma, C., Wang, A., 2010. Opt. Lett. 35(12), 2043-2045.

(비특허문헌 0012) Mandal, D.K., Kishore, N., Brewer, C.F., 1994. Biochemistry 33(5), 1149-1156.

(비특허문헌 0013) Mori, T., Toyoda, M., Ohtsuka, T., Okahata, Y., 2009. Anal. Biochem. 395(2), 211-216.

(비특허문헌 0014) Ohyama, Y., Kasai, K., Nomoto, H., Inoue, Y., 1985. J. Biol. Chem. 260(11), 6882-6887.

(비특허문헌 0015) Schramm, W., Paek, S.-H., 1992. Anal. Biochem. 205, 47-56.

(비특허문헌 0016) Paek, S.-H., Cho, I.-H., Seo, S.-M., Kim, D.-H., Paek, S.-H., 2011. Analyst 136(20), 4268-4276

(비특허문헌 0017) Steiner, M.-S., Duerkop, A., Wolfbeis, O.S., 2011. Chem. Soc. Rev. 40(9) 4805-4839.

(비특허문헌 0018) Wang, J., 2007. Chem. Rev. 108(2), 814-825.

(비특허문헌 0019) Wei, C., Lunn, D.J., Acerini, C.L., Allen, J.M., Larsen, A.M., Wilinska, M.E., Dunger, D.B., Hovorka, R., 2010. Diabetic Med. 27(1), 117-122.

(비특허문헌 0020) Yin, R., Han, J., Zhang, J., Nie, J., 2010. Colloids. Surface. B. 76(2), 483-488.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 신체에 이식이 용이하고, 표지가 필요하지 않고 원하는 시간에 정확하고 신속하게 연속적으로 혈당을 검출 및 정량할 수 있는 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은, 상기 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서를 이용한 연속 혈당 측정 장치를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서를 이용하여 체내의 혈당을 연속적으로 측정할 수 있는 연속 혈당 측정 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 포도당 분자를 선택적으로 투과하는 반투과성 막을 구비하며, 상기 반투과성 막으로 구획된 내부 공간이 형성된 니들(needle); 및 센서 말단 표면에 형성된 분자층의 두께 변화를 탐지할 수 있으며, 상기 니들에 체결되는 광섬유센서;를 포함하고,
- [0014] a) 상기 니들 내부 공간에는 포도당 부착물질에 가역적으로 부착가능한 포도당 유사 물질을 포함하는 리간드 용액이 채워지고, 상기 리간드 용액에 접하는 광섬유센서 말단 표면에는 포도당 부착물질이 고정되어 있거나, 또는
- [0015] b) 상기 니들 내부 공간에는 포도당 부착물질을 포함하는 용액이 채워지고, 상기 용액에 접하는 광섬유센서 말단 표면에는 포도당 부착물질에 가역적으로 부착가능한 포도당 유사 물질이 고정되어 있는 것을 특징으로 하는 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서를 제공한다.
- [0016] 상기 본 발명에 의한 바이오센서는 니들 타입이며 광섬유 센서를 포함하는 구성으로, 그 부피를 최소화할 수 있어 개체(individual)에 용이하게 이식되며, 비표지 센싱 원리를 이용하여 표지 없이 개체의 혈당을 원하는 시간

에 정확하고 신속하게 연속적으로 측정할 수 있다.

- [0017] 본 발명에 있어, 개체는 온혈동물, 특히 인간, 침팬지 등 포유동물뿐만 아니라, 가축, 애완동물, 실험동물 등을 포함하며 본 발명은 이에 모두 적용이 가능하다.
- [0018] 보다 구체적으로 본 발명은 포도당 부착물질에 포도당 및 포도당 유사 물질이 가역적이고 경쟁적으로 부착하는 것을 이용하여 광섬유 센서 말단 표면에 형성된 분자층의 두께 변화를 탐지하여 포도당 농도를 간접적으로 측정하는 원리로, 형광물질 등 표지를 사용할 필요가 없고 센서의 재사용이 용이하며, 간단한 구조에 의해 포도당을 감도 높게 검출 및 정량할 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어, 상기 포도당 부착물질은 포도당 유사 물질과 경쟁하여 포도당이 가역적으로 부착할 수 있으면 특별한 제한이 없으나, 바람직하게 콘카나발린 A(concanavalin A, Con A), 조효소가 제거된 아포글루코오스 옥시다제(apo-glucose oxidase), 글루코오스 디하이드로게나제(glucose dehydrogenase), 포도당 부착 단백질(glucose binding protein), 유기 붕소산(organic boronic acids), 단일클론 항체, 압타머, 또는 폴리 펩타이드일 수 있고, 더욱 바람직하게 콘카나발린 A일 수 있다. 또한, 상기 포도당 부착물질은 개체에 이식하는 것을 고려하여 독성이 낮을수록 바람직하다. 상기 포도당 부착물질은 광섬유센서의 말단 표면에 고정되어 있기 때문에, 개체 내부로 삽입되는 리간드 용액에 포함되어 있는 것에 비해 개체에 이식되었을 때 개체에 미치는 영향을 최소화할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어, 상기 리간드 용액은 포도당 부착물질에 가역적으로 부착가능한 포도당 유사물질을 포함하며, 바람직하게 상기 리간드 용액은 포도당 유사물질인 다당류 리간드, 및 상기 다당류 리간드와 화학적 혹은 물리적으로 결합된 운반 단백질(carrier protein)을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명에 있어, 상기 다당류는 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게 마노오즈, 아미노페닐 글루코스, 텍스트란 또는 아미노페닐 글루코오스이며, 더욱 바람직하게는 마노오즈이다. 마노오즈는 다른 다당류에 비해 높은 결합력을 나타내고, 상대적으로 낮은 농도에서 포화상태에 이른다.
- [0022] 본 발명에 있어, 상기 운반 단백질은 다당류 리간드에 결합할 수 있는 운반 단백질이면 특별한 제한이 없으나, 예를 들어 우혈청알부민(bovine serum albumin, BSA), 카제인(casein), 열쇠구멍갯조개헤모시아닌(keyhole-limpethemocyanin)일 수 있다. 또한 다당류 리간드와 운반 단백질은 예를 들어 DVS(divinyl sulfone), 글루타르알데히드(glutaraldehyde), 페리오데이트(periodate)를 이용하여 가교 결합으로 중합체(conjugate)를 형성할 수 있다.
- [0023] 상기 다당류 리간드-운반 단백질 중합체는 포도당이 니들 내부로 유입되지 않을 때에는, 광섬유센서 말단 표면에 고정된 포도당 부착물질과 부착하여 광섬유센서 말단 표면에 일정 두께의 분자층을 형성하고 있다. 한편 포도당이 니들 내부로 유입될 때에는 포도당 부착물질에 포도당이 부착하고, 상기 다당류 리간드-운반 단백질 중합체는 포도당 부착물질과 분리된다. 이때, 포도당은 다당류 리간드-운반 단백질 중합체에 비해 상대적으로 작은 분자이므로 광섬유센서 말단 표면의 분자층의 두께가 얇아지게 된다.
- [0024] 상기 리간드 용액에는 포도당 부착물질이 더 추가될 수 있다. 이 경우 포도당 부착물질이 고상과 액상에서 다당류 리간드-운반 단백질의 중합체와 상호 가교결합 할 수 있어, 바이오센서로부터 탐지할 수 있는 신호가 증폭될 수 있는 이점이 있다. 또한 포도당 유사물질이 광섬유센서 말단 표면에 고정된 경우, 포도당 부착물질 용액에는 텍스트란 중합체를 추가하여 신호를 증폭할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어, 상기 광섬유센서는 입사광과 반사광을 안내하는 광 안내 부재를 포함하고, 광원으로부터의 입사광이 센서 말단 표면에 반사되어 나갈 때 반사광의 세기를 측정할 수 있는 센서이다. 이러한 광섬유센서는 상술한 센서 말단 표면의 분자 반응에 의한 센서 말단 표면의 분자층의 두께 변화를, 내적대조층(internal reference layer)과 대비하여 포도당 부착물질이 고정된 층에서 반사된 백색광의 간섭패턴(interference pattern)의 변화로 검출하게 된다.
- [0026] 상기 광섬유센서는 다양한 구성요소로 구성될 수 있다. 본원발명이 속하는 기술분야에 공지된 기술을 이용할 수

있다. 예를 들어 광섬유센서는 광원으로부터 입사광을 유도하거나 광섬유센서 말단 표면에서 반사된 반사광을 유도하는 1 쌍의 광섬유(이하, 화이버와 혼용하여 사용함), 상기 광섬유 말단에 구비되며, 투명 광부재(transparent optical element, 예를 들어 SiO_2 또는 투명한 폴리머로 형성될 수 있음)가 중간에 개재된 상부반사면 및 하부반사면을 포함할 수 있다. 본원발명의 구체적인 실시예에서는 상업적으로 구입가능한 Octet Red 화이버 센서(ForteBio, San Francisco, CA)를 이용하였다.

[0027] 본 발명에 있어, 상기 반투과성 막은 포도당 분자를 선택적으로 투과할 수 있으면 특별한 제한이 없으며, 이에 한정되는 것은 아니나 바람직하게는 폴리카보네이트 막이다.

[0028] 상기 반투과성 막의 세공크기(pore size)는 상기 포도당 부착물질에 가역적으로 부착가능한 포도당 유사 물질, 특히 리간드 중합체(또는 포도당 부착물질)가 니들 외부로 확산하지 않으며, 포도당의 투과속도를 제한하지 않도록 조정된 것을 특징으로 한다. 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 30 ~ 70 nm pore size를 갖고, 더욱 바람직하게는 50 nm이다. 막의 세공 크기가 80 nm를 넘어가는 경우, 리간드 중합체가 니들 외부로 유실될 수 있다.

[0029] 상기 니들은 반응시간을 고려하여 적절한 용량의 니들을 채택하는 것이 바람직하다. 이는 바이오센서의 내부는 정제되어 동요가 없으므로, 확산에 의한 분자적 이동만이 반응시간과 직접적인 관련성이 있기 때문이다. 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게 니들 용량은 0.2 ~ 1.0 μl 이다. 실시예에 의하면 17 게이지 니들(약 2.5 μl 용액 수용) 보다는 19 게이지 니들(약 0.7 μl 용액 수용)이 바람직한 것으로 나타났다. 그러나 화이버 센서의 두께가 가늘수록 더 작은 니들을 사용할 수 있어서 분자확산거리를 더욱 단축시키는 효과를 얻을 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어, 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 반투과성 막의 설치는 비스듬히 절단된 시린지 니들에 의료용 에폭시를 이용하여 접착할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어, 상기 니들과 광섬유센서는 다양한 공지의 방법에 의해 체결될 수 있다. 예를 들어 광섬유센서 화이버는 반투과성 막이 부착된 시린지 니들의 상단 입구를 통하여 리간드 용액이 채워져 있는 니들 내부의 공간으로 첨가된다. 이때 시린지 니들의 벽면과 맞닿는 센서 화이버 부위에 파라필름으로 감싸 니들 내부 벽면과 센서 화이버가 일정한 간격을 유지하도록 한다. 이 후 센서 화이버가 삽입된 니들의 입구 부분은 미네랄 오일과 실리콘을 순차적으로 이용하여 완전히 밀폐된다.

[0032] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은, 상기 바이오센서; 상기 바이오센서 말단 표면에 광을 조사하기 위한 발광부; 및 상기 바이오센서 말단 표면으로부터 반사되는 광의 세기를 측정하는 검출부를 포함하는 것을 특징으로 하는 개체의 연속 혈당 측정이 가능한 연속 혈당 측정용 장치를 제공한다.

[0033] 상기 발광부는 넓은 스펙트럼을 발광하는 광원을 포함하는 것이 바람직하며, 예를 들어 LED와 같은 백색광원일 수 있다. 상기 검출부는 반사되는 광의 세기를 측정할 수 있으면 특별한 제한은 없다. 예를 들어 상기 광섬유센서에서 반사된 간섭광의 스펙트럼을 기록할 수 있는 전하결합소자(charge-coupled device, CCD)와 같은 스펙트로미터일 수 있다. 또한 광검출기(photodetector), 또는 광의 세기를 검출할 수 있는 다수의 필터일 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 연속 혈당 측정용 장치는 연속 혈당 측정 장치의 작용 여부를 감시하고, 측정된 혈당 데이터를 유/무선으로 수신받아 혈당 데이터를 분석, 비교, 저장, 전송, 표시하는 통합 관리 단말기부를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 통합 관리 단말기로부터 수신된 데이터를 유/무선으로 환자, 주치의, 병원 등의 가입자에게 송신하여 당뇨병 환자의 원격관리가 가능하게 된다. 따라서 본 발명의 장치는 폐회로 인슐린 전달시스템에도 적용이 가능하다.

[0035] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 상기 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서를 이용한 실시간 연속 혈당 측정 방법을 제공한다:

[0036] a) 상기 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서를 개체에 부착하는 단계;

- [0037] b) 상기 니들에 유입된 포도당이 포도당 부착물질에 부착하는 단계;
- [0038] c) 포도당 부착물질과 포도당의 부착에 의한 센서 말단 표면에 형성된 분자층의 두께 변화로 인한 신호를 상기 광섬유센서로 탐지하는 단계; 및
- [0039] d) 상기 신호로부터 상기 포도당의 양을 산출하는 단계.
- [0040] 상기 방법에 있어서, 포도당 유사물질 부착 신호로부터 포도당 부착신호를 차감하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 포도당 유사물질 부착 신호는 포도당 부착물질에 포도당 유사물질이 부착된 상태의 센서 표면 분자층으로부터 반사된 백색광의 간섭패턴 등의 신호를 의미하며, 포도당 부착신호는 포도당 부착물질에 포도당이 부착된 상태의 센서 표면 분자층으로부터 반사된 백색광의 간섭패턴 등의 신호를 의미한다. 상기한 구성에 의하면, 포도당 유사물질 부착 반응시 그리고 경쟁에 의한 탈착 반응시 모두 응답시간을 5분 이내로 단축할 수 있다.
- [0041] 상기 리간드 용액을 제조하는 단계는, 상기 포도당 부착물질의 농도 및 상기 포도당 부착물질에 가역적으로 부착가능한 포도당 유사 물질의 농도를 조절함으로써 상기 포도당 측정 범위를 조절하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0042] 상기 포도당 부착물질의 농도, 특히 콘카나발린 A의 농도는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자가 용이하게 광섬유센서로 포도당 농도를 신속하게 정확하게 검출할 수 있도록 조절할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니나 바람직하게는 1 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$, 더욱 바람직하게는 5 $\mu\text{g/mL}$ 이다.
- [0043] 상기 포도당 유사물질의 농도, 특히 BSA-마노오즈 중합체의 농도는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자가 용이하게 광섬유센서로 포도당 농도를 신속하게 정확하게 검출할 수 있도록 조절할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니나 바람직하게는 1 ~ 5 mg/mL , 더욱 바람직하게는 3 mg/mL 이다.
- [0044] 상술한 바와 같이, 본 발명의 실시예에 의한 연속 혈당 측정 장치는 탈부착 반응이 신속한 가역 반응성 포도당 부착물질을 광섬유센서 표면에 고정하여 사용함으로써, 개체의 혈당을 반영구적이고 실시간으로 측정할 수 있다.

발명의 효과

- [0045] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 연속 혈당 측정용 바이오센서는 니들 타입이고 광섬유 센서를 이용하여 소형화가 가능하여 체내 이식이 용이하며, 나아가 폐회로 인슐린 전달시스템에도 적용이 가능하다.
- [0046] 또한, 본 발명에 따라 제작된 혈당 센서는 시료(혈액, 간질액 등)에 담그면, 센서 하단에 설치한 반투과성 막을 통해 포도당이 내부로 유입되고 리간드 중합체와의 Con A에 대한 경쟁부착으로 인하여 비표지 광섬유 센서의 광학 신호가 변화되므로 혈당 농도 측정 시 간섭없이 연속적인 탐지가 가능한 장점이 있다. 즉, 본 발명에서는 경쟁적 부착을 이용한 간접적인 방법으로 혈당을 측정하는 비표지 광섬유 센서를 이용하여 1) 표지가 불필요하고, 2) 간섭없이 광학 신호 전달이 가능하고, 그리고 3) 고농도 분석물질에 적합하다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의해, 연속혈당측정(CGM)을 위해 포도당 부착성분으로 Con A를 이용하는 비표지 센서 시스템의 구성 및 시료 내 포도당 농도 등락(A, B)에 따른 혈당 검출원리를 개략적으로 나타내는 도면이다.
- 도 2a는 DVS를 이용한 BSA-당 중합체 합성 후 전기영동 분석 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 2b는 합성된 BSA-당 중합체의 Con A에 대한 부착성능 특성화 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 3a 및 도 3b는 리간드 중합체 및 포도당 부착성분으로서 Con A를 이용한 비표지 센서의 다양한 재배치 모델

(A-1, A-2, B-1, B-2) 그리고 포도당 농도 등락에 따른 각 센서 모델의 응답성능을 비교한 결과를 나타내는 도면이다.

도 4a는 Con A에 대한 포도당 부착반응 시험한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 Con A에 대한 마노오즈-BSA 중합체의 부착반응 시, 도 4a의 포도당 부착신호를 제외한 순효과(net effect)를 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5a는 본 발명에 의한 연속 혈당 측정용 비표지 니들 타입 혈당 센서의 제작 과정을 개략적으로 보여주는 사진이다.

도 5b는 본 발명에 의한 센서 말단에 설치된 반투과성 막의 종류에 따른 성능을 비교한 결과를 나타내는 도표이다.

도 6a는 본 발명에 의한 센서에 사용할 수 있는 다양한 니들을 보여주는 도면이다.

도 6b는 본 발명에 의한 센서의 니들 선택에 따른 센서의 응답시간에 대한 내부 부피 변화의 효과를 나타내는 도면이다.

도 6c는 본 발명에 의한 센서의 반투과성 막의 선택에 따른 리간드 중합체의 센서 내 유지 여부에 대한 실험결과를 나타내는 도면이다.

도 7a는 시료 내 포도당 농도 변화에 대한 19 G 니들 타입 혈당 센서의 응답 실험결과로서, 포도당 농도 변화에 대해 중합체 부착 신호 및 중합체 없이 포도당 부착 신호를 각각 측정된 결과이다.

도 7b는 도 7a의 실험결과에서 차감신호를 측정하여 혈당 센서의 농도응답을 구한 결과를 나타낸다.

도 7c는 도 7a의 각 농도 변화 개시 후 15분에 탐지된 신호 값을 이용하여 농도응답곡선을 작성한 결과를 나타낸 그래프이다. 이는 혈청을 실제 시료로 가정하여 측정된 센서의 신호패턴과 크게 다르지 않은 것으로 나타났다(도 7a의 삽입 그래프 참조).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 1) 연속 혈당 측정용 니들 타입 바이오센서 구축의 예시

[0049] 본 발명에 의하면 광섬유센서 표면에 고정된 Con A에 대한, 시료로부터 유입된 포도당과 당 리간드-단백질 중합체 간에 경쟁적 부착 기반의 새로운 CGM 시스템을 제공할 수 있다.

[0050] 도 1은 본 발명에 의한 연속혈당측정(CGM)을 위해 포도당 부착성분으로 Con A를 이용하는 비표지 센서 시스템의 구성 및 시료 내 포도당 농도 등락(A,B)에 따른 혈당 검출원리를 개략적으로 나타내는 도면이다. 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명에 의한 니들 타입 바이오센서는 시린지 니들(10) 및 광섬유센서(20)를 포함하여 구성된다. 상기 니들(10)은 비스듬히 절단된 말단에 포도당 분자를 선택적으로 투과하는 반투과성 막(12)을 구비하며, 상기 반투과성 막(12)으로 구획된 내부 공간에 포도당 부착물질에 가역적으로 부착가능한 포도당 유사 물질을 포함하는 리간드 용액(14)이 채워져 있다.

[0051] 즉, 연속측정을 위해서는 센서 구성성분들의 재활용이 선행조건이므로, 시린지 니들(10)의 하단을 반투과성 막(12)으로 봉하여 내부 빈 공간을 시료로부터 분리시킨 후 그 공간구획 내에 구성성분들을 위치시켰다(도 1의 왼쪽). 이 경우 분석물질인 포도당은 분자크기가 작으므로 막을 자유롭게 통과하여 드나들 수 있다. 따라서 센서 구성성분들은 일정한 농도로 유지되는 반면에 포도당 농도가 유일한 변수가 되므로, 센서 표면에서의 부착경쟁은 시료 내 포도당 농도에 의해 변화된다.

[0052] 상기 광섬유센서(20)는 상기 니들(10) 상부에 체결되며, 상기 리간드용액(14)에 접하는 센서 말단 표면(22)에 포도당 부착물질인 Con A(24)가 고정되어 있으며, 센서 말단 표면에 형성된 분자층의 두께 변화를 탐지할 수 있다.

[0053] 부착경쟁을 탐지하기 위해, 예를 들어 상업화된 비표지 센서장치인 Octet Red를 이용하였다. 상기 비표지 센서 장치에서는 센서 상의 분자 간 상호작용에 의한 표면분자 층으로부터 반사된 백색광의 간섭패턴이 내장된 대조군과 비교하여 변화를 보이게 된다. 그 결과로 파장이 변화되는데 이것은 센서표면층의 두께 변화에 대한 직접적인 측정치로 사용될 수 있다.

[0054] 상기와 같이 본 발명에서는 경쟁부착반응에 기초한 바이오센서 시스템을 개발하였는데, 이를 위해 부착성분으로

Con A를 센서표면에 고정시켰고 마노우즈가 화학결합된 운반단백질(예: 우혈청 알부민(BSA), 16)을 리간드로서 용액상태로 센서 내부에 첨가하였다. 다른 형태의 구성성분 배치도 가능하지만 더 자세한 설명은 추후 실시예에서 설명된다. 시료 내 포도당이 없거나 농도가 매우 낮을 경우, Con A(24)에 반응하는 유일한 성분인 BSA-리간드 중합체(16)가 센서 말단 표면(22)에 부착하여 비표지 센서시스템으로부터의 신호가 평형에 도달할 때까지 증가한다(도 1의 (A) 참조). 시료 내에 과량의 포도당(30)이 포함되어 있을 경우, 포도당(30)은 반투과성 막(12)을 통해 센서 내부로 유입되어 Con A(24) 부착에 대해 BSA-리간드 중합체(16)와 경쟁한다. 이러한 경쟁반응은 결국 BSA-리간드 중합체(16)를 센서 말단 표면(22)으로부터 탈착시키므로 신호는 최소 수준까지 급격히 감소한다(도 1의 (B) 참조). 이와 같은 양 극단을 포함한 부착반응 상태는 가역적이어서 시료 내 포도당(22) 농도 변화에 따라 변화한다.

[0055] Con A는 혈당 농도 측정을 위해 자주 쓰이는 당 부착 단백질로서 다양한 센서시스템에 도입되어 왔다(Boss et al. 2011). 본 발명에서는 Con A를 비표지 광학센서 장치와 결합시켜 사용하였는데 체내 이식이 가능한 시린지니들의 내부에 삽입할 수 있는 광섬유를 제조할 경우(Ma and Wang 2010) 장치의 초소형화가 가능하다. 궁극적으로 이것을 CGM에 도입하려면 측정범위, 응답시간, 측정재현성, 보정용이성, 생체호환성 등을 포함한 임상요구조건들을 만족시켜야 하며, 특히 임상농도 범위의 혈당 측정과 체내 혈당의 변화추이를 충분히 따라갈 수 있는 신속한 응답시간이 중요하다고 할 수 있다.

[0056] 2) 분석성능 조절 인자 발굴

[0057] 본 발명에서는 센서의 구성성분 제조 및 응답시간과 측정범위를 조절하는 인자들의 최적화를 실시하였다. 최적조건이 제공되도록 특히 리간드가 결합된 단백질을 제조하였고, 구성성분의 재배열을 통해 최적 배열상태를 결정하였고, 그리고 적절한 반투과성 막 및 시린지니들을 선택하였다.

[0058] 2-1) 단백질과 당 리간드 간 화학 중합

[0059] 당 리간드가 반투과성 막에 의해 센서구획 내부에 가두어져 있도록, 당은 운반단백질(carrier protein)인 우혈청 알부민(bovine serum albumin; BSA)과 중합되었다. 당 리간드로 분자량 10,000인 텍스트란과 Con A에 부착하는 마노오즈를 선택하였다(Ohyama et al. 1985). 리간드들은 개별적으로 DVS를 이용하는 가교반응에 의해 단백질과 중합되었는데(도 2a), DVS는 pH 조건에 따라 당의 하이드록실 그룹과 단백질의 아미노 그룹 간에 공유결합 시킨다(Liu et al. 2002). 중합 후, 평균 분자크기는 단분자 크기에서 170,000(170 kDa) 이상의 크기로 전환되었다. 이와 같이 분자크기가 큰 중합체는 높은 MWCO(molecular weight cut-off)를 지닌 반투과성 막에 의해 센서구획 내에 충분히 가두어져 있을 수 있다. 이러한 조건하에서 반투과성 막을 통한 포도당의 투과는 빨라지므로 센서 성능에 대한 저해효과는 최소화될 것이다.

[0060] 분리(fractionation) 후, 각 당-단백질 중합체는 센서표면에 고정된 Con A에 대한 반응성을 평가하여 기능적으로 특성화되었다(도 2b). Con A는 4개의 subunit로 구성되며 각 subunit는 1개의 당 부착자리와 Mn^{2+} 및 Ca^{2+} 에 대한 두 개의 금속 부착자리를 보유한다(Boss et al. 2011). 이 단백질은 마노오즈와 강하게 반응하고 또한 다른 당 성분들과도 각기 다른 부착력으로 반응한다(Mandal et al. 1994). 부착반응 실험 시, Con A를 비표지 센서시스템인 Octet Red의 광섬유 센서 말단 표면에 고정시켜서 부착반응에 의해 센서 말단 표면에 형성된 분자층 두께 변화를 측정할 수 있도록 하였다(Paek et al. 2011).

[0061] 센서 팁 표면(residual surface)을 블로킹한 후, 각 말단(tip)을 다른 농도로 희석된 리간드 중합체와 반응시켜 부착을 유도한 다음 다시 완충용액에 담가 탈착을 유도하였다. 텍스트란과 마노오즈 중합체는 모두 BSA만으로 코팅된 대조군의 결과와 비교하여 Con A와 반응하는 것으로 나타났다. 반응한 정도는 첨가한 중합체 농도에 비례하였는데 BSA-마노오즈 중합체가 더 높은 반응성을 보였고 따라서 상대적으로 적은 양에서 포화수준에 도달하였다(도 2b의 오른쪽 그래프). 과거에 보고된 바와 같이(Mori et al. 2009), 두 경우 모두 탈착속도는 부착속도에 비해 느렸으며 이것은 중합체 내 다중 결합된 당 분자들이 센서표면에 코팅된 Con A에 동시에 부착했기 때문으로 예측된다.

[0062] 2-2) 센서 내 구성성분의 재배치

[0063] 리간드 중합체와 Con A를 구성성분으로 사용하여 포도당 분석시스템을 다양한 형태로 고안하였다(도 3a 및 도 3b). 도 1에서와 같이, Con A를 센서표면에 고정하였고 Con A에 대한 중합체와 포도당 간 부착경쟁을 유도하였다(모델 A-1). 이와 같이 Con A를 고정하여 사용할 경우, Con A가 다중 부착반응 할 기회가 억제되고 또한 센서를 체내 이식할 경우 Con A에 의해 잠재적으로 야기될 수 있는 독성효과가 차단된다. 다른 대안으로, 두 구성성분 중 중합체를 고체표면에 고정시키고 Con A를 액상상태로 배치할 수 있다(모델 B-1). 이때 Con A는 고체상의 다중 당 리간드와 상호작용하므로 이러한 형태는 센서로부터의 신호발생을 증가시킬 목적으로 이용할 수 있다. 부가하여, 한 성분에 의해 다른 성분을 가교결합 시키는 형태도 고려할 수 있다. 실제로 두 성분 모두 부착반응에 있어서 다중 결합가를 나타내므로 한 성분은 고상과 액상에 동시에 존재하는 다른 성분을 가교결합시킬 수 있다(모델 A-1과 B-1에 각각 상응하는 A-2 및 B-2; 도 2 참조). 이러한 접근방식은 신호증폭에 유용하다. 전체적으로, 모델 A-1은 센서표면에서의 부착반응속도 및 경쟁에 의한 탈착반응속도에 있어서 다른 모델들보다 우수한 것으로 나타났다. 센서의 기준선도 드리프트 없이 안정된 점으로부터 반복적인 반응 양상의 재현성이 높음을 알 수 있었다. 따라서 배치 모델 A-1을 분석에 이용하였는데 추후 체내 포도당 농도 변화를 정확하게 측정할 수 있을 것으로 기대된다.

[0064] 주목할 사항으로, 모델 A-1에서 조차 부착결합체 형성이 부착 및 탈착 반응속도가 같은 평형상태에 도달하는 것이 지연되었다. 이를 규명하기 위해 실험한 결과, 광섬유 센서 내에 리간드 중합체를 포함하지 않더라도 배경신호가 포도당 존재 시 증가하였고 부재 시에 다시 감소하였다(도 4a). 이러한 배경신호 패턴의 등락은 매우 재현성이 높았다. 그러나 이러한 현상은 시료에 포도당 대신 갈락토오스를 첨가 시 관찰되지 않았다. 당 성분을 포함하지 않는 음성 대조군에 대해서도 신호가 변화하지 않고 안정되었다. 따라서 이러한 배경 응답은 센서표면에 고정된 Con A에 대한 포도당의 특이반응으로 판단되었다. 실제로 Con A는 식물 렉틴으로 그 포켓에 포도당이 부착할 때 구조형태 변화를 겪는 것으로 알려져 있는데(Grimaldi and Sykes 1975) 이것은 단백질의 센서표면 점유율을 변경시킬 수 있는데 결과적으로 표면 분자 층의 평균 두께를 변화시킨다. 이것을 시료 내 포도당 농도변화를 나타내는 신호로서 취급할 수 있지만 그 농도응답 속도가 느리고 신호세기도 약해서 신호로 사용할 수 없었다(도 4a, 포도당 참조). 이와 같은 현상에 대한 순효과(net effect)를 측정하기 위해, 포도당 부착 신호를 마노오즈 중합체 부착 신호로부터 제외시킴으로서(도 4b, 상단) 차감신호(differential signal)를 측정하였다(하단). 중합체에 대한 차감 신호곡선으로부터 부착반응 시 그리고 경쟁에 의한 탈착반응 시 모두 5분 이내의 응답시간을 보이는 것으로 나타났다. 이러한 센서의 대칭 농도응답 패턴은 또한 Con A와 리간드 중합체 간의 부착반응이 유사 1차 반응역학(pseudo first-order kinetics)을 따르는 것으로 나타났다.

[0065] 2-3) 반투과성 막을 통한 포도당 투과

[0066] 포도당 농도의 연속측정을 위해, 센서구획은 반투과성 막을 이용하여 시료용액으로부터 분리될 필요가 있다(도 5a). 이것은 센서 구성성분을 재활용하기 위함인데 이러한 설계는 바이오센서를 궁극적으로 체내 이식 시 특히 중요하다. 그러나 막의 설치에 센서구획 안팎으로의 포도당 물질전달에 대한 저항으로 작용할 수 있다(Boss et al. 2011). 혈당 농도는 식품섭취에 따라 신속히 변동하므로 센서는 포도당 농도 변화에 대해 빠른 응답시간을 유지하여야 한다. 그러므로 반투과성 막의 선택 시 리간드 중합체와 같은 구성성분을 탐지 공간 내에 가둘 수 있어야 할 뿐만 아니라 막을 통한 포도당의 투과속도도 제한하지 않도록 고려하여야 한다.

[0067] 연속 포도당 측정에 적절한 막을 선택하기 위해, 다른 세공크기(30 ~ 80 nm)를 지닌 폴리카보네이트 막을 포도당 센서에 장착 후 그 성능을 기존 투석에 이용되던 재생 셀룰로오스 막의 성능과 비교하였다(도 5b). 각 센서들을 0 혹은 500 mg/dL 포도당을 함유한 시료가 담긴 용기에 각 60분씩 담가 측정하였다. 이때 Octet 시스템으로부터 발생된 신호를 제조사가 제공한 컴퓨터 프로그램에 의해 시간의 함수로서 기록하였고 각 신호들을 초기 상태에서는 동일하도록 맞추어 표준화하였다. 이러한 과정을 통하면 중합체가 부착반응 할 때 설치한 막들 간의 성능을 쉽게 비교할 수 있는데(도 5b의 왼쪽) 이 경우 초기 기울기는 센서구획으로부터 포도당의 유출속도를 반영한다. 그 속도는 폴리카보네이트 막의 세공크기에 정비례하였고 사용된 세공크기에 상관없이 그 성능은 모두 재생 셀룰로오스 막의 성능보다 우수하였다. 포도당 투과속도 신속성과 센서 내 리간드 유지(자세한 사항은 아

래에서 설명)를 동시에 제공하는 적절한 세공크기는 50 nm인 것으로 결정되었다. 그러나 각 응답시간은 반투과성 막을 설치하지 않은 대조군과 비교하여 느렸는데 이것은 율속단계(rate-limiting step)로서 포도당 투과 외에 다른 프로세스가 또 존재함을 나타내었다.

[0068] 2-4) 센서 내 리간드 중합체의 분자확산

[0069] 시료에 포함된 포도당 농도 변화 때문에, 도 1에 나타난 바와 같은 경쟁부착은 용액과 고체표면 사이에 리간드 중합체의 농도기울기를 생성시킨다. 이러한 원동력은 중합체의 물질이동을 초래하고 이동방향은 포도당 농도에 따라 결정된다. 센서 내부의 용액은 정체되어 요동이 없으므로 리간드는 단지 분자확산에 의해 이동된다(Boss et al., 2011). 이 프로세스는 센서의 총괄 성능 특히 응답시간을 지배할 수 있는데 분자이동거리에 따라 변화될 수 있다.

[0070] 시린지 17 게이지(gauge; G) 니들(도 6a 내의 예시 참조)이 초기 연구기간 동안 사용되어 왔으나 크기가 더 작은 19 G 니들이 센서 내 확산거리를 줄이기 위해 사용을 검토하였다. 시린지 19 G 니들의 내부 직경은 Octet 센서 화이버가 딱 맞을 정도의 크기이고 이것을 사용할 경우 센서구획 부피를 72% 줄일 수 있었다. 추가적인 장점으로, 센서 화이버와 니들 내부 벽 간 불필요한 공간도 제거할 수 있었다. 센서 성능에 대한 니들 크기의 효과를 시험하기 위해, 17 G 및 19 G 니들을 각각 이용하여 센서를 만든 다음 포도당 0 혹은 500 mg/dL를 포함한 시료에 30분씩 담가 신호를 측정하였다(도 6b). 19 G 니들로 만든 센서는 17 G로 만든 것보다 현저히 빠른 응답을 나타내었을 뿐만 아니라 막을 탑재하지 않은 대조군의 포도당 농도 변화 후 시간응답 패턴과도 가깝게 일치하였다. 더욱이 12회 반복 측정에서도 50 nm 세공크기 반투과성 막 사용 시에 초기에 첨가한 리간드 중합체는 센서 구획 내에 그대로 유지되었다(도 6c). 그러나 80 nm 세공크기 막 사용 시에는 신호가 점차 감소하였는데 이것은 세공을 통해 중합체가 누출됨을 나타내었다.

[0071] Octet 신호에서 포도당 부착효과를 배제한 후(도 4b 참조) 테스트 센서의 응답시간을 비교하였다. 이를 위해 테스트 센서 신호에서 대조군 센서 신호를 차감하여 배경효과를 상쇄시켰다(도 6b의 우측 삽입 그래프). 이러한 방법을 통해 19 게이지 센서는 포도당 농도 변화 후 15분 이내에 평형상태에 도달함을 확인하였다. 반면에 17 G 센서의 응답시간은 평형에 도달하는데 30분 이상 걸렸다. 따라서 확산제한 조건 하에서는 센서의 내부부피를 축소시키면 응답시간이 현저히 단축되었다.

[0072] 실제로 당뇨병 환자가 식품을 섭취하면 혈당 농도는 전형적으로 2 mg/dL/min 속도로 증가한다(Dunn et al., 2004). 연속측정 시 시간지연이 일어나지 않도록 하려면 센서 응답속도는 포도당 농도 변화 속도보다 느려서는 안 된다. 임상조건 하에서 요구되는 응답시간은 약 10분인 것으로 알려져 있다(Boss et al., 2011). 따라서, 본 발명에 있어서는 다른 조건들을 최적화하고 니들의 크기(내부 용량)를 감축할 경우 응답시간을 10분 이하로 단축할 수 있다. 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 니들 용량은 0.2 ~ 1.0 μ L로 하는 것이 바람직하다.

[0073] 3) 포도당 농도 변화에 대한 센서의 응답

[0074] 포도당 센서의 성능을 평가하기 위해 니들 타입 바이오센서를 제작하였고 포도당 농도의 순차적이고 단계적인 변화를 측정하는 능력을 시험하였다(도 7a ~ 도 7c). 표준 포도당 농도를 함유한 시료를 준비하였고 Octet 센서 시스템 내 위치되는 마이크로타이터 플레이트의 각 용기에 분주하였다. 센서를 순서에 따라 30°C로 유지되는 각 용기 내에서 900초간 반응시킨 다음 각 표준시료에 상응하는 신호를 컴퓨터 프로그램을 이용하여 기록하였다(도 7a, 중합체 부착반응). 동일한 과정을 통해 니들 구획 내에 리간드 중합체를 포함하지 않은 동일한 센서를 이용하여 배경신호를 측정하였다(도 7a, 포도당 부착반응). 차감 신호는 중합체 부착신호로부터 포도당 부착신호를 제하여 계산하였는데 이 신호의 세기는 시료 내의 포도당 농도에 반비례하였다(도 7b). 각 농도에 해당하는 신호는 15분 이내에 평형에 도달하였는데 그 결과를 보면 변화무쌍한 포도당 농도의 연속측정을 근사하게 모방하였다. 센서의 신호를 분석물질에 대해 도식한 결과 센서는 농도 10 ~ 500 mg/dL 범위의 포도당을 탐지할 수 있는 것으로 나타내었다(도 7c). 표준곡선은 실제로 포도당 임상농도 범위인 50 ~ 500 mg/dL 사이에서 선형관계를 나타내었다. 이러한 성능은 최근에 보고된 용액의 점도 변화를 이용하는 센서의 성능과 매우 유사하였다(Boss

et al. 2011).

[0075] 주목할 만한 사항으로, 센서에 사용된 반투과성 막은 50 nm 세공크기를 갖는데 실재시료(예: 혈청) 내의 어떤 당단백질은 이 막을 통해 센서구획 내부로 투과될 수 있다. 그럼에도 시료온반응액으로 인간혈청을 이용할 경우에도 위에서 나타낸 농도응답과 동일한 패턴을 얻을 수 있었다(도 7a의 삽입 그림). 이것은 센서 내에서 일어나는 Con A 기반의 경쟁부착이 시료 내 당단백질 조성 변화에 대해 둔감하다는 것을 나타낸다. 마찬가지로, 고농도 범위에서 리간드 양의 증가(예: 1 mg/mL 이상)는 최대 신호세기를 거의 변화시키지 않았다(도 2b, 마노오즈 중합체 참조). 그러나 이 센서신호는 센서 내 포도당이 존재하면 급격히 감소하였는데(도 3a 및 도 3b 참조), 이것은 임상농도 범위의 포도당 분자들이 리간드에 비해 매우 우수한 경쟁부착 능력을 보여준 것이다. 따라서 사용된 실험조건 하에서 리간드 농도 변화는 센서의 성능을 의미있게 변화시키지 못한다.

[0076] 또 다른 주목할 사항으로, 센서의 주기적인 농도응답에 있어서 포도당 부착신호는 중합체 부착신호보다 한 농도 단계 늦게 따라오는 것으로 나타났다(도 7a 참조). 특히 중합체 신호가 제일 높은 포도당 농도에서 최저 수준을 보인 반면에 포도당 신호는 그 다음 농도에서 최저 수준에 도달함으로써 지연되는 양상을 보였다. 이것은 분자 크기에 따른 접근성 때문에 각 리간드가 반응할 수 있는 Con A 상의 부착자리의 수가 크게 다르기 때문이다 (Schramm and Paek 1992). 포도당과 같은 작은 분자가 접근할 수 있는 부착자리는 마노오즈-단백질 중합체와 같은 분자크기가 큰 물질과 반응하는 부착자리보다 훨씬 더 많다. 리간드 중합체가 접근이 어려운 부착자리는 고체표면에 의해 접근이 방해될 뿐만 아니라 또한 서로 밀집한 단백질 분자들에 의해 가려질 수 있다. 이러한 부착자리에 대해 포도당 분자들조차 접근하기 어려운 정도를 도 4b(포도당)에서 보여준 포도당의 느린 부착 및 탈착 속도로부터 예측할 수 있다.

[0077] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0078] 실험재료

[0079] Con A, 마노오즈, 포도당, 텍스트란(분자량 크기 (MW) 10K), 다이비닐 설펜(DVS), 세파텍스 (G-50 와 G-100), 우혈청 알부민(BSA), 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH), 트윈 20 계면활성제(Tween 20) 셀룰로오즈 반투과성 막 MWCO 12 K, 그리고 인간혈청은 Sigma 사(St. Louis, MO, 미국)로부터 취득하였다. Octet Red aminopropylsilane(APS) 와 streptavidin(SA) 센서 팁은 ForteBio 사(San Francisco, CA, 미국)에서 구매하였다. 폴리카보네이트 막(세공 크기: 15 ~ 80 nm), 2개의 6-aminocaproic acid spacer를 포함하는 N-hydroxysuccinimide (NHS)로 활성화된 biotin(NHS-LC-LC-Biotin), 그리고 시린지 니들 (17 G 과 19 G)는 각각 Whatman 사(Florham Park, NJ, 미국), Thermo Scientific 사(Rockford, IL, 미국), 그리고 Korea Vaccine Co. (서울, 한국)로부터 공급받았다. 본 발명에서 사용된 다른 시약들은 모두 분석용 급으로 한정하였다.

[0080] 실시예 1. 분석 구성성분의 준비

[0081] 1) 단백질과 다당류 간 중합

[0082] 마노오즈는 DVS를 이용한 가교반응 통하여(Paek et al. 2011) 운반단백질인 BSA와 중합되었다. 140 mM 의 염화나트륨을 포함한 pH 7.4 의 10 mM 인산버퍼(phosphate-buffered saline; PBS)에 용해된 BSA(75 mM)를 150배 물의 DVS와 반응시켜 단백질의 아미노 그룹을 활성화시켰다. 이 혼합용액을 37℃에서 1.5시간 동안 반응시킨 이후 pH 10.3의 100 mM 카보네이트 버퍼에 3회 투석하여 잔여 DVS를 제거하고 또한 pH도 조정하였다. 활성화된 단백질은 고체상으로 준비된 마노오즈와 반응시켰으며 이때 반응한 마노오즈의 농도는 운반단백질 대비 5,000 물비로 사용하였다. 마노오즈와 혼합 후 37℃에서 10시간 동안 반응시켰으며 반응 후 반응용액은 PBS에서 3회 투석되었으며 4℃에서 사용 시까지 보관되었다.

[0083] 텍스트란(MW 10K)도 마노오즈와 마찬가지로 화학적 가교반응을 이용하여 운반단백질과 중합하였다(Paek et al. 2011). 먼저 pH 10.3 카보네이트 버퍼에 용해된 텍스트란 용액에 150배 물의 DVS를 첨가하여 텍스트란의 하이드

록실 그룹을 활성화시켰다. 반응용액을 37℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBS를 이용하여 3회 투석하여 잔존하는 DVS를 제거하였으며 pH 또한 7.4로 조정하였다. 이렇게 활성화된 텍스트란은 다시 280몰 배의 BSA와 혼합 후 중합하였으며 마지막으로 반응하지 않은 단백질 및 당 분자들은 겔 크로마토그래피를 통하여 분리되었고 제작된 중합체는 4℃에서 보관되었다.

[0084] 중합 후, 평균 분자크기는 단분자 크기에서 170,000 이상의 크기로 전환되었다(도 2a). 이와 같이 분자크기가 큰 중합체는 높은 MWCO를 지닌 반투과성 막에 의해서도 센서구획 내에 충분히 가두어져 있을 수 있다. 이러한 조건하에서 반투과성 막을 통한 포도당의 투과는 빨라지므로 센서 성능에 대한 저해효과는 최소화될 것이다.

[0085] 2) 당 중합체의 특성화

[0086] 합성이 완료된 당 중합체는 분자적 측면에서의 변화와 Con A와의 부착반응 여부의 관찰을 통하여 분석하였다. 첫 번째로, 분자적 크기의 관찰은 전기영동(SDS-PAGE) 분석을 이용하였으며 두 번째로, Con A와의 반응여부는 streptavidin(SA)이 코팅되어 있는 비표지센서 화이버에 streptavidin-biotin 결합을 이용하여 Con A를 고정시킨 후 센서에 부착반응하는 중합체의 반응신호 양상을 통하여 확인하였다. 이때 비표지센서 측정시스템으로 Octet Red(ForteBio, San Francisco, CA, 미국)를 사용하였고 Con A에 대한 바이오틴 중합은 NHS-LC-LC-바이오틴을 이용하였다(Papalia and Myszk 2010).

[0087] 먼저 PBS 상에서 10분 동안 안정화를 마친 SA 센서 말단(SA sensor tip)은 0.5% BSA, 200 mM NaCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1% Tween 20, 그리고 보존제로 0.01% Proclin 300을 포함한 20 mM Tris 버퍼(pH 7.4; Tris-BSA)에 300초 동안 반응시키면서 센서 화이버의 잔여표면을 충분히 블로킹 하였다. 이후 센서 팁은 미리 짠 컴퓨터 프로그램에 의해 Tris-BSA에 희석된 바이오틴-Con A 중합체를 포함하는 마이크로타이터 플레이트의 웰로 이동되었다. 30℃에서 900초 동안 Con A 고정화를 진행한 후 센서 팁은 다시 블로킹 및 세척을 위해 Tris-BSA가 포함된 웰로 이동되었다. 이후 각 센서를 Tris-BSA에 희석된 당 중합체를 포함하고 있는 웰로 이동시켜 30℃에서 900초 동안 당 중합체와의 부착반응을 유도하였고 다시 탈착을 유도하기 위해 블로킹 버퍼로 이동시켰다. 각각의 중합체에 대한 부착속도 상수 및 탈착속도 상수는 제조사로부터 공급받은 프로그램(Data Analysis 7.0)을 통해 실시간으로 분석되었다.

[0088] 텍스트란과 마노오즈 중합체는 모두 단지 BSA로 코팅된 대조군과 비교하여 Con A와 반응하는 것으로 나타났다(도 2b). 반응한 정도는 첨가한 중합체 농도에 비례하였는데 BSA-마노오즈 중합체가 더 높은 반응성을 보였고 따라서 상대적으로 적은 양에서 포화수준에 도달하였다. 과거에 보고된 바와 같이(Mori et al. 2009), 두 경우 모두 탈착속도는 부착속도에 비해 느렸으며 이것은 중합체 내 다중 결합된 당 분자들이 센서표면에 코팅된 Con A에 동시에 부착했기 때문으로 예측된다.

[0089] 3) 구성성분의 재배치를 통한 반응시스템의 구성

[0090] 혈당 연속 측정 시 가장 적합한 반응조건을 구현하기 위하여, 반응물질의 배치를 바꾸면서 반응신호 및 평형반응 도달시간을 기준으로 서로 다른 양상을 나타낸 4가지 재배치 모델이 설계되었다. 첫 번째 모델에서는 앞에서 언급된 바와 같이 SA-바이오틴 결합을 통해 Con A를 센서 화이버에 고정시켰다(모델 A-1). 이 센서를 Tris-BSA 버퍼에서 블로킹한 후 리간드 (BSA-mannose; 100 µg/mL)가 포함된 마이크로타이터 플레이트 웰로 이동시켜 600초 동안 반응시켰으며 그 후 리간드와 더불어서 500 mg/dL의 포도당을 포함하고 있는 웰로 이동시켜 600초 동안 반응과정을 거쳤다. 앞서 부착과 탈착 과정은 총 3회에 걸쳐 반복되었다. 다음으로 두 번째 모델에서는 첫 번째 모델에서와 같은 실험 구성을 한 상태에서 신호증폭을 위해 반응 웰에 Con A를 추가적으로 포함 시켰다(100 mg/mL) (모델 A-2). 세 번째로 두 반응 구성 물질, Con A와 리간드의 위치를 서로 반대로 바꾸어 배치하였다. 즉, 중합체(10 mg/mL)를 APS 센서 화이버에 고정시켰으며 Con A(100 mg/mL)를 웰의 액상에 첨가하였다(B-1). 마지막으로, 네 번째 모델에서는 두 번째 신호 증폭 모델과 마찬가지로 세 번째 모델에 추가적으로 텍스트란으로 중합된 리간드를 포함시켰다(B-2). 모든 반응은 위에서와 마찬가지로 30℃에서 진행되었다.

[0091] 전체적으로, 모델 A-1은 센서표면에서의 부착반응속도 및 경쟁에 의한 탈착반응속도에 있어서 다른 모델들보다 우수한 것으로 나타났다(도 3a 및 도 3b). 센서의 기준선도 드리프트 없이 안정된 점으로부터 반복적인 반응 양상의 재현성이 높음을 알 수 있었다. 따라서 배치 모델 A-1을 향후 혈당센서 구축에 이용하였다.

[0092] **4) Con A에 대한 포도당의 반응성 확인**

[0093] Con A와 포도당 분자 간 반응 시 Con A의 특이적인 구조변화를 확인하였다. 이를 측정하기 위해 앞서 언급된 A-1 모델과 같은 시스템 구성을 하였으나 예외적으로 마이크로 타이터 플레이트의 반응 웰에는 중합체를 첨가하지 않고 단지 포도당만을 넣어 포도당의 유무(0 및 500 mg/dL)에 대한 Con A의 반응신호를 측정하였다. 유사하게, Con A의 반응신호를 포도당 외에 갈락토오스를 사용하는 경우와 당을 전혀 포함하지 않은 경우에서도 측정하여 비교하였다. 최종적으로, Con A에 대한 리간드 반응신호와 포도당에 의한 구조적 변화 신호를 동시에 비교하기 위해 앞서 언급된 A-1 모델을 이용하여 측정하였다. 신호의 차감은 Data Analysis 7.0 컴퓨터 프로그램을 이용하여 수행하였다.

[0094] 광섬유 센서 내에 리간드 중합체를 포함하지 않더라도 배경신호가 포도당 존재 시 증가하였고 부재 시에 다시 감소하였다(도 4a). 이러한 배경신호 패턴의 등락은 매우 재현성이 높았다. 그러나 이러한 현상은 시료에 포도당 대신 갈락토오스를 첨가 시 관찰되지 않았다. 당 성분을 포함하지 않는 음성 대조군에 대해서도 신호가 변화하지 않고 안정되었다. 따라서 이러한 배경 응답은 센서표면에 고정된 Con A에 대한 포도당의 특이반응으로 판단되었다. 이와 같은 현상에 대한 차감효과를 보기 위해 포도당 부착 신호를 마노오즈 중합체 부착 신호로부터 제외시킴으로서(도 4b의 상단) 특이 농도응답 신호를 측정하였다(하단). 중합체에 대한 차감 신호곡선으로부터 부착반응 시 그리고 경쟁에 의한 탈착반응 시 모두 5분 이내의 응답시간을 보이는 것으로 나타났다.

[0095] **실시예 2. 반투과성 막이 설치된 니들 타입 혈당 센서의 제작**

[0096] **1) 반투과성 막의 설치**

[0097] 반투과성 막 설치를 위해 17 G 및 19 G 크기의 시린지 니들을 끝으로부터 각각 6.5 mm와 4.5 mm로 절단하였다. 절단된 주사침은 70% 에탄올로 소독하였으며 끝 부분 대각선 형태로 깎여 있는 면적에 의료용 에폭시를 사용하여 반투과성 막을 접착하였다. 반투과성 막이 설치된 시린지 니들은 사용 전 Tween 20이 포함된 PBS 용액(PBS-TW)에 60분 동안 충분히 담가 반투과성 막이 활성화 되도록 하였다.

[0098] **2) 니들 타입 혈당 센서의 조립(도 5a 참조)**

[0099] 반투과성 막이 부착된 17 G 및 19 G 시린지 니들은 사용하기 전에 증류수로 세척하였으며 1 mL 시린지를 이용하여 3 mg/mL 당 리간드(BSA-마노오즈 중합체)를 니들의 내부 공간으로 주입하였다. Con A가 고정된 SA 센서 화이버는 앞서 A-1 모델에서 언급된 것과 같은 과정에 의해 제작되었다. 제작된 센서 화이버는 반투과성 막이 부착된 시린지 니들의 상단 입구를 통하여 리간드가 채워져 있는 니들 내부의 공간으로 첨가되었다. 이때 시린지 니들의 벽면과 맞닿는 센서 화이버 부위에 파라필름으로 감싸 니들 내부 벽면과 센서 화이버가 일정한 간격을 유지하도록 하였다. 센서 화이버가 삽입된 니들의 입구 부분은 미네랄 오일과 실리콘을 순차적으로 이용하여 완전히 밀폐되었다. 이렇게 주입된 리간드 수용액의 부피는 각각 17 G 시린지 니들의 경우 2.5 μ L 그리고 19 G 시린지 니들의 경우 0.7 μ L인 것으로 측정되었다. 제작된 니들 센서는 사용하기 전까지 Tris-BSA 버퍼에 담가 안정화되도록 하였다.

[0100] **실시예 3. 혈당센서 성능에 대한 율속인자의 결정**

[0101] **1) 반투과성 막의 세공크기**

[0102] 혈당센서 작동 시 시료 내 포도당에 대한 최대의 투과도를 확보하기 위해 서로 다른 종류의 반투과성 막이 부착된 센서 니들을 이용하여 상호 간 포도당 투과속도를 비교하였다. 반투과성 막으로 먼저 MWCO 12K의 재생 셀룰로오스 막과 30 nm 내지 80 nm의 세공 크기를 지닌 폴리 카보네이트 막을 선택하여 사용하였다. 각각의 반투과성 막을 17 G 시린지 니들의 끝에 부착시킨 후 니들의 내부 공간에 리간드(BSA-마노오즈 중합체)를 주입하였고,

위에서 언급한 것과 같은 방식으로 Con A가 고정화된 SA 센서 화이버를 (A-1 모델 참고) 그 내부에 장착하였다. 제작된 니들 센서는 Tris-BSA 버퍼에서 안정화 과정을 거친 이후 미리 짠 컴퓨터 프로그램에 의해 3,600초 동안 포도당이 존재하지 않는 마이크로타이터 플레이트 웰과 500 mg/dL 포도당을 포함한 웰을 각각 순차적으로 오가며 그 반응 신호를 측정하였다. 또한, 포도당의 투과 정도가 제한받지 않는 대조군 센서(즉, 반투과성 막이 설치되지 않은 센서)를 두어 마이크로타이터 플레이트 웰에 준비된 리간드(BSA-마노오즈 중합체; 100 μ g/mL)에 대한 부착반응 신호를 동시에 확인하였다. 최종적으로 획득한 반응 신호는 제조사로부터 제공된 Data Acquisition 7.0 프로그램을 이용하여 실험 결과를 정리 및 분석하였다.

[0103] Octet 시스템으로부터 발생된 신호를 초기상태에서는 동일하도록 맞추어 표준화하였다(도 5b). 이러한 과정을 통하면 중합체가 부착반응 할 때 설치한 막들 간의 성능을 쉽게 비교할 수 있는데 이 경우 초기 기울기는 센서 구획으로부터 포도당의 유출속도를 반영한다. 그 속도는 폴리카보네이트 막의 세공크기에 정비례하였고 사용된 세공크기에 상관없이 그 성능은 모두 재생 셀룰로오스 막의 성능보다 우수하였다. 포도당 투과속도 신속성과 센서 내 리간드 유지를 동시에 제공하는 적절한 세공크기는 50 nm인 것으로 결정되었다.

[0104] 2) 니들 내부 부피

[0105] 니들 센서의 내부 부피는 서로 다른 규격을 지닌 시린지 니들(17 G 및 19 G)을 사용하여 조절하였다(도 6a). 두 가지 시린지 니들의 경우 모두 위에서 언급한 것과 동일한 방법으로 50 nm 폴리카보네이트 막을 부착하였고 리간드(BSA-마노오즈 중합체) 3 mg/mL를 니들 내부에 주입한 후 Con A가 고정화된 센서 화이버를 장착하였다. 제작된 니들 센서는 Tris-BSA 버퍼에 다른 농도의 포도당 시료(0 및 500 mg/dL)가 담긴 마이크로타이터 플레이트 웰 간을 미리 짜여진 컴퓨터 프로그램에 의해 오가며 그 반응 신호를 측정하였으며 각 반응 시간은 1,800초로 설정하였다. 실험결과 분석은 위에서와 마찬가지로 Data Acquisition 7.0을 이용하여 수행하였으며, 시린지 니들을 사용하지 않은 일반 센서를 대조군으로 사용하였다.

[0106] 3) 센서 내 중합체 유지

[0107] 반투과성 막의 세공크기에 따른 니들 센서 내 리간드 유지 여부를 판단하기 위하여 19 G 시린지 니들에 각각 50 nm 와 80 nm 폴리카보네이트 막을 부착하여 위에서 언급한 것과 같은 방법으로 센서 니들을 제작하였으며, 0 및 500 mg/mL로 준비된 포도당 시료를 오가며 총 12회 반복하여 반응 신호를 측정하였다. 실험 결과는 Data Acquisition 7.0을 이용하여 분석하였다.

[0108] 19 G 니들로 만든 센서는 17 G로 만든 것보다 현저히 빠른 응답을 나타내었을 뿐만 아니라 막을 탑재하지 않은 대조군의 포도당 농도 변화 후 시간응답 패턴과도 가깝게 일치하였다(도 6b). 더욱이 12회 반복 측정에서도 50 nm 세공크기 반투과성 막 사용 시에 초기에 첨가한 리간드 중합체는 센서구획 내에 그대로 유지되었다(도 6c). 그러나 80 nm 세공크기 막 사용 시에는 신호가 점차 감소하였는데 이것은 세공을 통해 중합체가 누출됨을 나타내었다.

[0109] 실시예 4. 혈당 센서 성능평가

[0110] 1) 니들 타입 센서의 농도응답

[0111] 최적화된 조건에서 니들 타입 센서 화이버의 성능을 평가하기 위해 혈당 임상 농도 범위 내 포도당 시료의 단계적 변화에 대한 반응 신호를 측정하였다. 앞에서 언급한 것과 같은 방법을 이용하여 50 nm 폴리카보네이트 막이 부착된 19 G 시린지 니들에 3 mg/mL의 리간드(BSA-마노오즈 중합체)를 주입하여 니들 타입 센서 화이버를 제작하였으며 1000 mg/dL의 포도당이 포함된 Tris-BSA 버퍼에 12시간 이상 유지시킨 이후 사용하기 직전 1시간 동안 다시 Tris-BSA 버퍼에 안정화시켰다. 이후 혈당 임상 농도 범위 내의 10, 25, 50, 100, 250, 500 mg/dL 농도의 표준 포도당 시료를 총 1회 순환하며 오가도록 하였으며 각 구간을 900초로 설정하여 반응신호를 측정하였다(도 7a, 중합체 부착). 이와 동시에 포도당 부착에 의한 Con A의 구조적 변화 신호를 탐지하기 위하여 동일한 조건의 반투과성 막을 설치하되 리간드를 주입하지 않은 니들 타입 센서 화이버를 사용하였다(도 7a, 포도당 부착).

혈당 임상 농도 범위 내에서 측정된 두 가지 신호는 Data Analysis 7.0 컴퓨터 프로그램을 이용하여 평준화하였으며, 이렇게 평준화된 신호를 통해 포도당 농도에 대한 반응신호 그래프를 얻었다. 모든 니들 타입 센서 화이버는 각각 2개씩을 사용하여 변이를 측정하였으며, 측정된 변이 신호는 막대 그래프를 이용하여 표시하였다.

도 7a에서의 중합체 신호로부터 포도당 신호를 차감한 신호는 시료 내의 포도당 농도에 반비례하였다(도 7b). 각 농도에 해당하는 신호는 15분 이내에 평형에 도달하였는데 그 결과를 보면 변화무쌍한 포도당 농도의 연속측정을 근사하게 모방하였다. 센서의 신호를 분석물질에 대해 도식한 결과 센서는 농도 10-500 mg/dL 범위의 포도당을 탐지할 수 있는 것으로 나타내었다(도 7c). 표준곡선은 실제로 포도당 임상농도 범위인 50-500 mg/dL 사이에서 선형관계를 나타내었다.

2) 실제시료 테스트.

니들 타입 센서를 이용한 연속 혈당 측정에 대한 임상 실험을 시뮬레이션하기 위하여, 인간 혈청을 이용하여 동일한 분석과정을 통해 반응 신호 값을 측정하였다. 혈청에 기본적으로 포함되어있는 포도당 농도는 통상 100 mg/dL 이었는데 이는 일회용 혈당 센서를 이용하여 확인하였다(Abbott; Alameda, CA, 미국). 인간 혈청을 이용한 고혈당 범위의 측정을 위해 준비된 혈청에 임의로 포도당을 첨가하여 최종 농도가 500 mg/dL이 되도록 설정하여 각각의 포도당 농도범위를 오가며 반복적으로 측정하였다. 각각의 반응 구간은 900초 이었으며 측정된 신호는 Data Analysis 7.0 컴퓨터 프로그램을 이용하여 실시간으로 분석되었다. 이와 같이 시료온반응액으로 인간 혈청을 이용할 경우에도 위에서 나타난 농도응답과 동일한 패턴을 얻을 수 있었다(도 7a, 삽입그림).

혈당 측정을 위해 포도당과 마도오즈 특이 액틴인 Con A를 혈당 부착성분으로 이용하였고 나아가 폐회로 인슐린 전달시스템에도 적용할 수 있도록 고안하였다(Hovorka 2011). Con A는 체내 독성효과를 야기한다는 보고가 있기 때문에(Li et al. 2008) 광섬유 센서의 말단 표면에 고정시켰고, 당 리간드-단백질 중합체는 반투과성 막으로 끝이 막힌 니들의 내부 빈 공간에 용액상태로 첨가하여 혈당 센서를 완성하였다. 혈당 검출원리를 개발하기 위해 상업적으로 제공되는 비표지 탐지시스템을 이용하였고 분석성능을 조절하는 율속 단계를 결정하였다.

본 발명에서, 연속혈당측정을 위한 비표지 광학측정 방법의 잠재성을 도 1에 제시된 분석원리를 실험모델에 적용함으로써 증명할 수 있었다. 전체적인 센서응답 패턴은 측정범위 내에서 대칭적인데 즉, 포도당 농도 등락에 따른 신호의 증감이 일정하였다. 농도응답 곡선은 히스테리시스 현상을 보였는데 포도당 농도변화 방향에 따라 Con A와 리간드의 부착반응 역학과 부착결합체의 탈착반응 역학 간의 차이로 인해 발생한 현상이다. 이러한 센서의 성능은 넓은 측정범위에서 변화하는 포도당의 신속하고 연속적인 측정에 대한 임상적 필요성을 충족시켰고 또한 나아가 스마트한 인슐린의 전달에도 이용될 수도 있다(Yin et al. 2010). 그 응답시간은 혈청시료에 대해서 조차 15분 이내로 유지되었고, 더욱이 율속인자 분석에 따르면 센서의 크기를 더욱 소형화하면 응답시간을 약 5분까지 줄일 수도 있다. 본 발명에 의한 바이오 층 간섭 포도당 센서는 처음으로 비표지 광학 바이오센싱 방법을 제시한다. 그 장점으로, 1) 표지가 불필요하고, 2) 간섭없이 광학신호 전달이 가능하고, 그리고 3) 고농도 분석물질에 적합하다는 점을 들 수 있다. 나아가, 광섬유센서를 신체에 부착할 정도로 소형화하여 혈당 농도를 실시간으로 측정하기 위해 니들 타입 센서를 신체 내 쉽게 이식할 용도로 사용할 수 있다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

부호의 설명

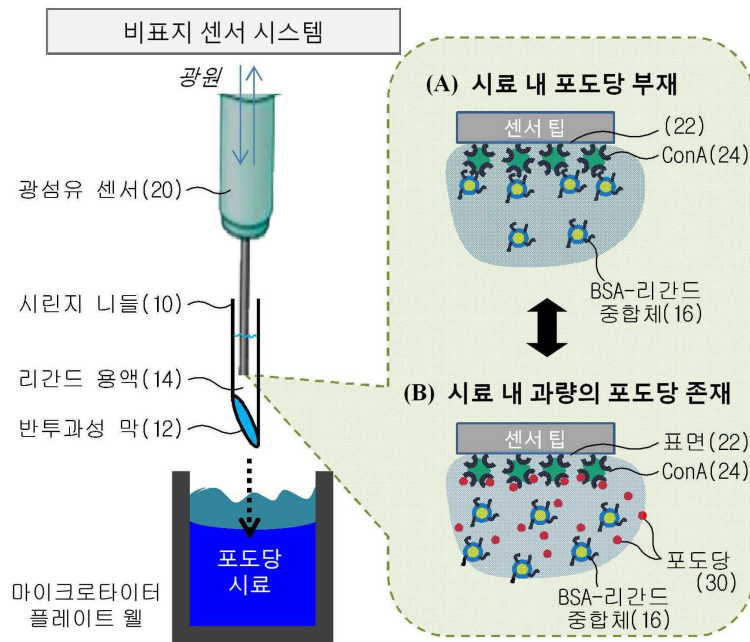
10: 시린지 니들	12: 반투과성 막
14: 리간드 용액	16: BSA-리간드 중합체
20: 광섬유 센서	22: 센서 말단 표면

24: Con A

30: 포도당

도면

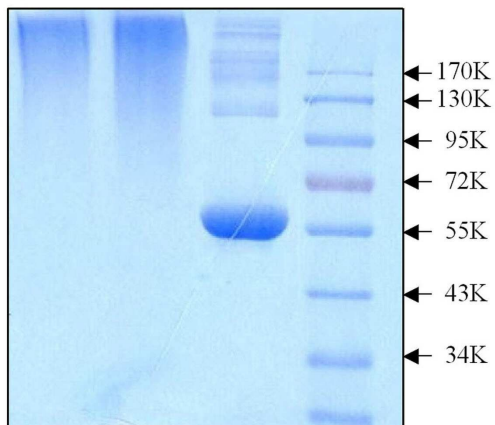
도면1



도면2a

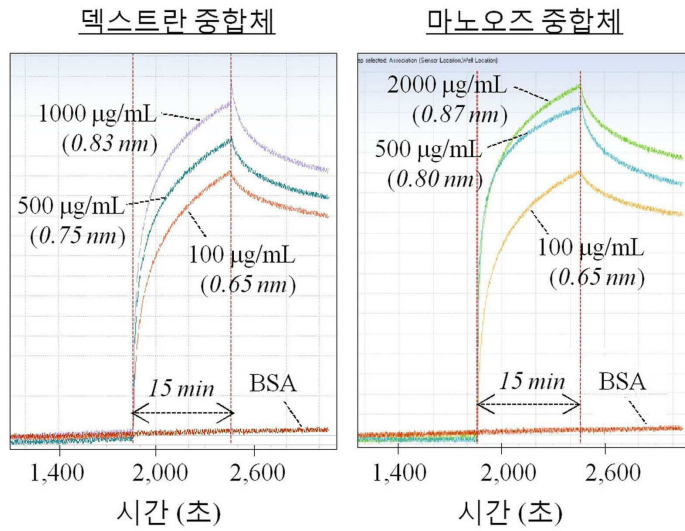
DVS를 이용한 당 리간드와 운반단백질 간 화학중합

BSA- BSA-
덱스트란 마노오즈 BSA 마커
(1:150) (1:150)

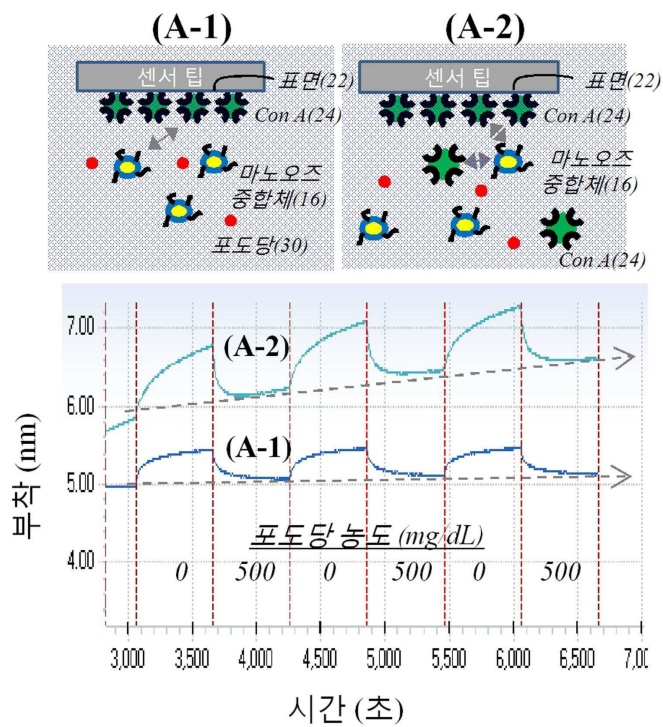


도면2b

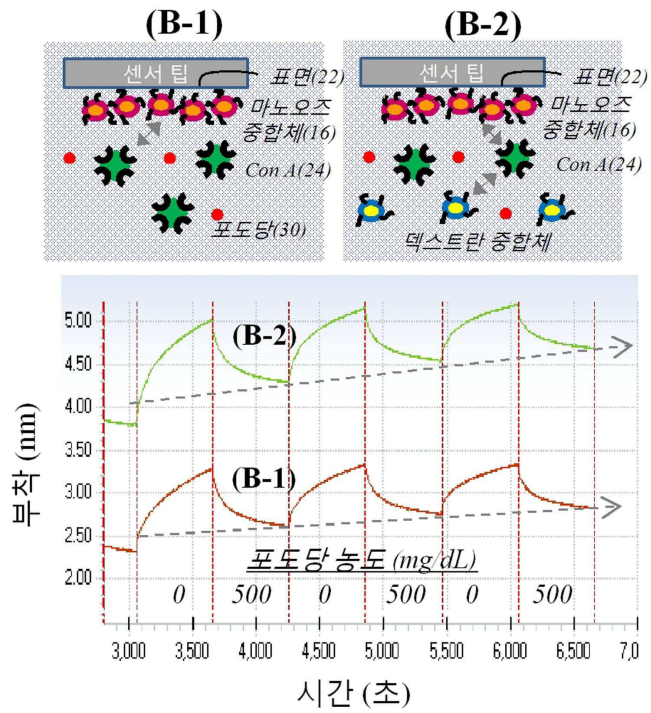
중합체 특성화 (Con A에 대한 부착 반응성)



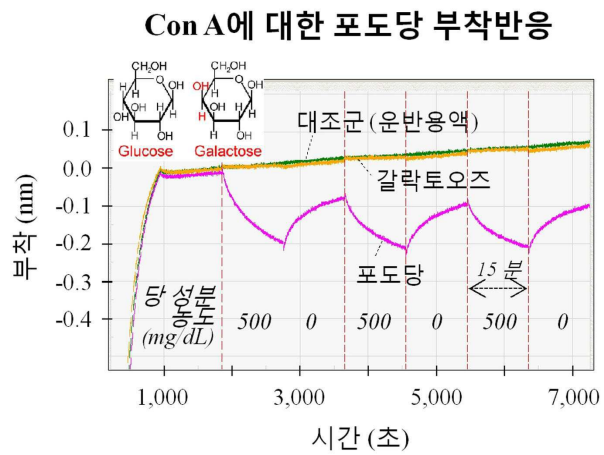
도면3a



도면3b

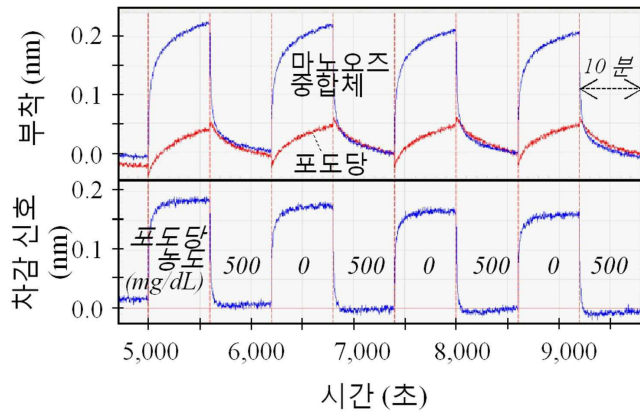


도면4a



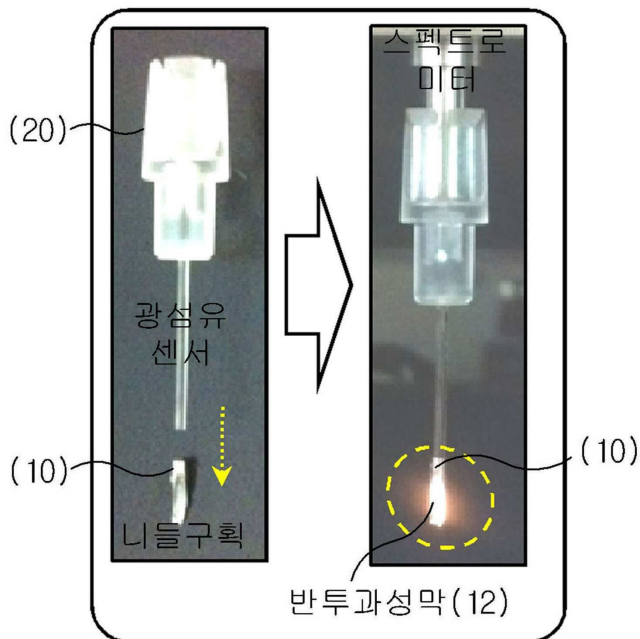
도면4b

중합체 부착반응의 순효과

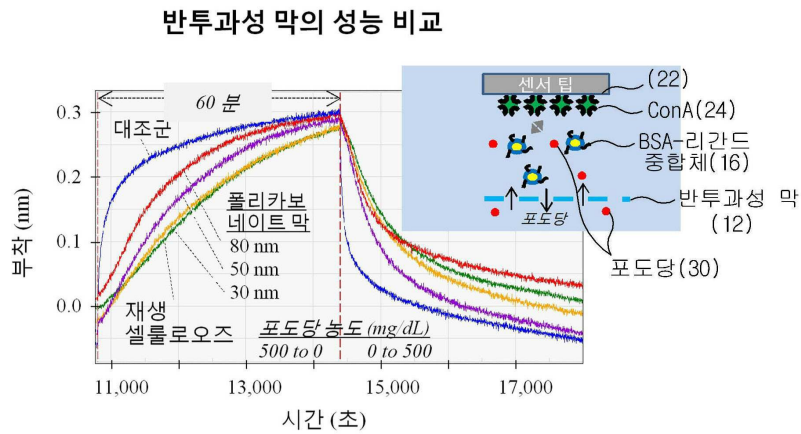


도면5a

니들타입 혈당센서 제작

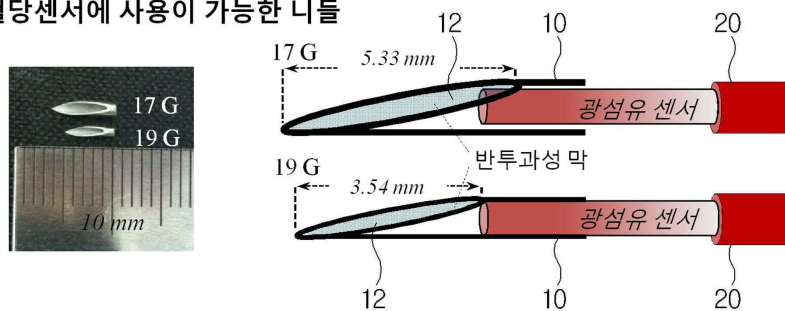


도면5b



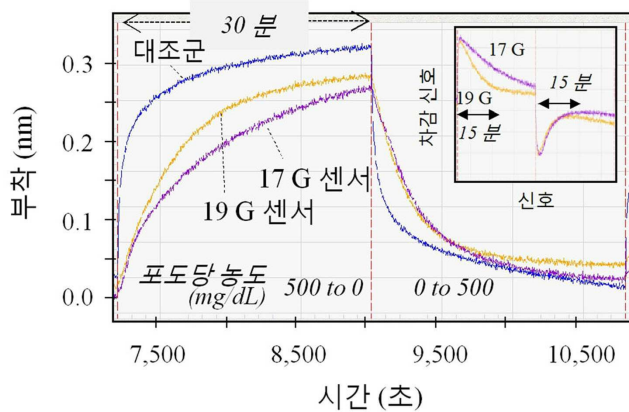
도면6a

혈당센서에 사용이 가능한 니들



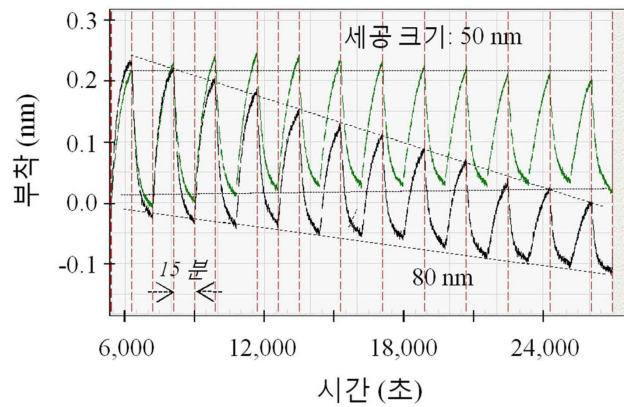
도면6b

센서의 내부 부피 변화 효과



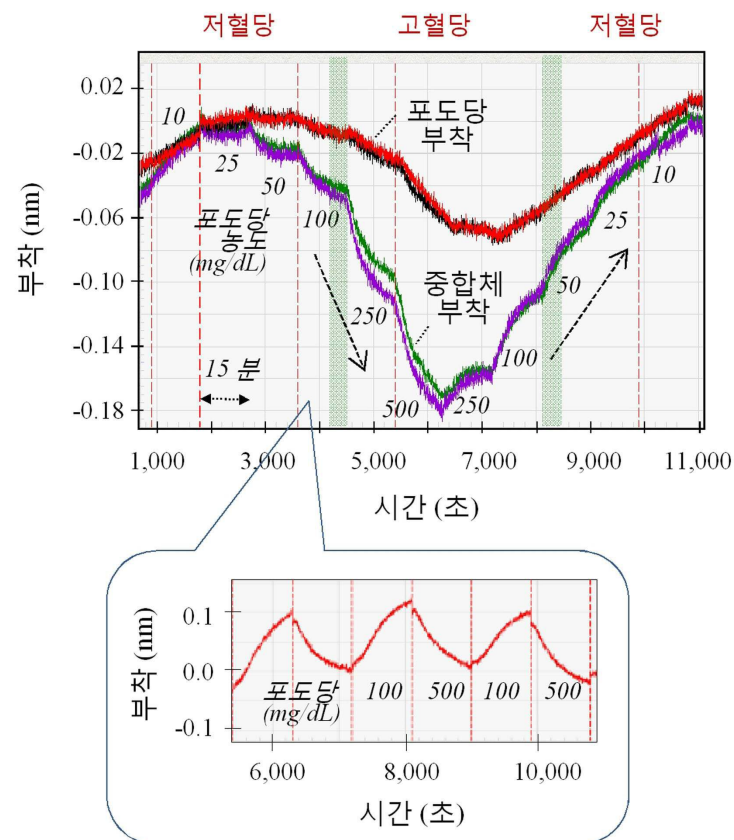
도면6c

리간드 중합체의 센서 내 유지

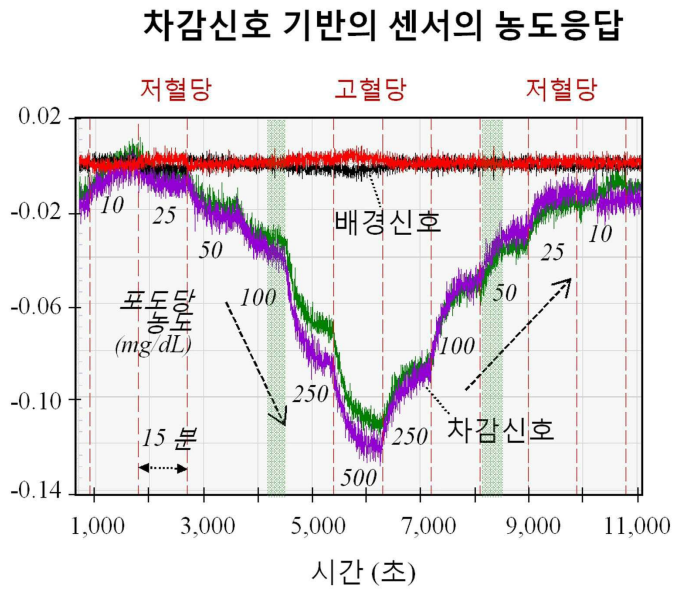


도면7a

포도당에 대한 센서의 농도응답



도면7b



도면7c

