



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0136407
(43) 공개일자 2022년10월07일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/72 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
G01N 33/5438 (2013.01)
G01N 33/57419 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7030390</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년02월08일
심사청구일자 2022년09월01일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2022년09월01일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2021/017082</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/159074
국제공개일자 2021년08월12일</p> <p>(30) 우선권주장
62/970,919 2020년02월06일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
그래핀-디엑스, 아이엔씨.
미국, 매사추세츠 02139, 캠프리지, 유닛 2에이,
바사르 스트리트 325</p> <p>(72) 발명자
나와나, 나말
미국, 매사추세츠 02493, 웨스트, 웨스트클리프
로드 33
아베디, 메흐디
미국, 매사추세츠 02135, 브라이언, 아파트먼트
13, 라로즈 플레이스 2
몰라아가바바, 레자
미국, 매사추세츠 01760, 네이틱, 브룩 스트리트 17</p> <p>(74) 대리인
최윤서</p> |
|---|--|

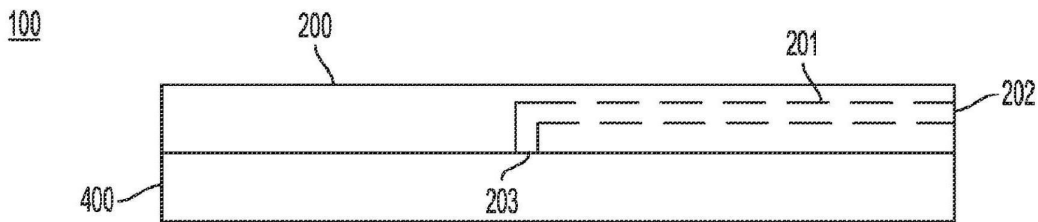
전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 생물학적 샘플 내 헤모글로빈을 검출하기 위한 그래핀-기반 센서

(57) 요약

일 양태에서, 샘플에서 헤모글로빈 단백질(예를 들어, 인간 헤모글로빈 단백질)을 검출하고, 그래핀 층, 기능화된 그래핀 층을 생성하기 위해 그래핀 층에 연결되는 복수의 결합 에이전트(binding agent), 여기서 결합 에이전트는 헤모글로빈 단백질(예를 들어, 인간 헤모글로빈 단백질)과 특이적 결합을 나타내고, 기능화된 그래핀 층의 적어도 하나의 전기적 특성(예를 들어, DC 전기적 저항)을 측정하기 위해 기능화된 그래핀 층에 전기적으로 연결되는 복수의 전기 전도체를 포함하는 센서가 개시된다. 일부 실시형태에서 이러한 결합 에이전트는 단클론 항체이고, 다른 실시형태에서는 다중클론 항체이다.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 33/57484 (2013.01)

G01N 33/721 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

샘플 내 헤모글로빈(hemoglobin)을 검출하기 위한 센서로서, 상기 센서는:

그래핀 층;

기능화된 그래핀 층을 생성하기 위해 상기 그래핀 층에 연결되는 복수의 결합 에이전트(binding agent)로서, 상기 결합 에이전트는 헤모글로빈 단백질(hemoglobin protein)에 결합하는, 복수의 결합 에이전트; 및

상기 기능화된 그래핀 층의 적어도 하나의 전기적 특성을 측정하기 위해 상기 기능화된 그래핀 층에 전기적으로 연결되는 복수의 전기 전도체를 포함하는, 센서.

청구항 2

제1 항에 있어서,

상기 결합 에이전트는 상기 헤모글로빈 단백질과 특이적 결합을 나타내는 항체를 포함하는, 센서.

청구항 3

제1 항에 있어서,

상기 결합 에이전트는 상기 헤모글로빈 단백질과 특이적 결합을 나타내는 아타머(aptamer)를 포함하는, 센서.

청구항 4

제1 항에 있어서,

상기 센서는, 상기 기능화된 그래핀 층에 기준 AC 신호를 인가하는 기준 전극을 더 포함하는, 센서.

청구항 5

제4 항에 있어서,

상기 기준 AC 신호는 1kHz 내지 1MHz의 주파수를 갖는, 센서.

청구항 6

제1 항에 있어서,

상기 샘플은, 생물학적 샘플(biological sample)을 포함하는, 센서.

청구항 7

제6 항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은, 인간 배설물을 포함하는, 센서.

청구항 8

제7 항에 있어서,

상기 센서는, 인간 배설물 내 헤모글로빈 검출을 위한 $10 \mu\text{g} \cdot \text{Hb}/\text{g} \cdot \text{feces}$ 의 검출 한도를 가지는, 센서.

청구항 9

제1 항에 있어서,

상기 결합 에이전트는 항-인간(anti-human) 헤모글로빈 항체를 포함하는, 센서.

청구항 10

제1 항에 있어서,

상기 결합 에이전트는 복수의 링커(linker)를 통해 그래핀 층에 연결되는, 센서.

청구항 11

제10 항에 있어서,

상기 링커 각각은 상기 링커 각각의 일 단부에서 그래핀 층에 공유적으로 부착되고 다른 단부에서 적어도 하나의 헤모글로빈 프로테인에 공유적으로 부착되는, 센서.

청구항 12

제10 항에 있어서,

상기 링커는 1-피렌부톤산 숙시니미딜 에스테르(1-pyrenebutonic acid succinimidyl ester)를 포함하는, 센서.

청구항 13

제1 항에 있어서,

상기 그래핀 층은 복수의 하이드록실기로 기능화된, 센서.

청구항 14

제13 항에 있어서,

상기 결합 에이전트는 복수의 알데하이드 부분(aldehyde moiety)을 통해 상기 복수의 하이드록실기 중의 하나 이상에 연결되는, 센서.

청구항 15

생물학적 샘플(biological sample) 내 헤모글로빈(hemoglobin)을 검출하기 위한 방법으로서, 상기 방법은:

헤모글로빈에 결합하는 복수의 결합 에이전트(binding agent)로 기능화된 그래핀 층에 상기 생물학적 샘플을 도

포하는 단계;

상기 기능화된 그래핀 층의 적어도 하나의 전기적 특성을 측정하는 단계; 및

상기 샘플 내 헤모글로빈이 존재하는지 여부를 결정하기 위해 상기 측정된 전기적 특성을 이용하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 16

제15 항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 인간 배설물을 포함하는, 방법.

청구항 17

제15 항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 소변을 포함하는, 방법.

청구항 18

제15 항에 있어서,

상기 기능화된 그래핀 층의 상기 적어도 하나의 전기적 특성은 상기 기능화된 그래핀 층의 DC 전기 저항을 포함하는, 방법.

청구항 19

제15 항에 있어서,

상기 측정된 전기적 특성을 이용하는 단계는 상기 기능화된 그래핀 층과 상기 샘플의 상호작용에 응답하는 상기 전기적 특성의 변화를 모니터링하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 20

제15 항에 있어서,

상기 방법은 대장암의 검출을 위해 상기 생물학적 샘플 내 상기 헤모글로빈의 검출과 조합하여 유전자 선별 (genetic screening)을 활용하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 21

생물학적 샘플 내 헤모글로빈 프로테인(hemoglobin protein)을 검출하기 위한 센서를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은:

하부 기판 상에 증착된 그래핀 층에 복수의 링커를 공유적으로 부착하는 단계; 및

헤모글로빈 프로테인에 특이적 결합을 나타내는 복수의 결합 에이전트를 상기 링커에 공유적으로 연결하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 22

샘플 내 헤모글로빈 단백질(hemoglobin protein)을 검출하는 처분가능한(disposable) 카트리지로써, 상기 카트리는:

샘플을 수용하기 위한 입구 포트와 출구 포트를 가지는 미세유체 구성요소(microfluidic component); 및

상기 출구 포트로부터 상기 샘플의 적어도 일부를 수용하는 상기 미세유체 구성요소에 유체적으로 결합된 센서를 포함하고,

상기 센서는:

그래핀 층;

기능화된 그래핀 층을 생성하기 위해 상기 그래핀 층에 연결되는 복수의 결합 에이전트(binding agent)로서, 상기 결합 에이전트는 헤모글로빈 단백질(hemoglobin protein)에 결합하는, 복수의 결합 에이전트; 및

상기 기능화된 그래핀 층의 적어도 하나의 전기적 특성을 측정하기 위해 상기 기능화된 그래핀 층에 전기적으로 연결되는 복수의 전기 전도체를 포함하는, 카트리지.

청구항 23

제22 항에 있어서,

상기 미세유체 구성요소는 폴리머 재료(polymeric material)를 포함하는, 처분가능한 카트리지.

청구항 24

제23 항에 있어서,

상기 폴리머 재료는 PDMS(polydimethylsiloxane) 및 PMMA(polymethyl methacrylate) 중 어느 하나를 포함하는, 처분가능한 카트리지.

청구항 25

임의의 대장암(colorectal cancer) 및 전암성 대장 신생물(pre-malignant colorectal neoplasia)을 선별하는 방법으로서, 상기 방법은:

대상으로부터 대변 샘플을 수집하는 단계;

원층 용액에 수집된 대변 샘플을 용해시켜 테스트링(testing) 샘플을 형성하는 단계;

헤모글로빈 단백질(hemoglobin protein)에 특이적 결합을 나타내는 복수의 결합 에이전트(binding agent)로 기능화된 그래핀 층을 포함하는 센싱 요소(sensing element)에 상기 테스트링 샘플을 도입하는 단계;

상기 테스트링 샘플에 대한 노출에 응답하여 적어도 하나의 상기 기능화된 그래핀 층의 전기적 특성을 측정하는 단계; 및

상기 테스트링 샘플 내 헤모글로빈이 상기 센싱 요소의 민감도와 관련된 임계값을 초과하여 존재하는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 26

제25 항에 있어서,

상기 방법은 상기 테스트링 샘플 내 상기 헤모글로빈의 농도를 수량화하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 27

제25 항에 있어서,

상기 수량화된 농도를 대장암 또는 전암성 대장 신생물의 존재 또는 부존재와 상관시키는, 방법.

청구항 28

제25 항에 있어서,

상기 테스트 샘플에는 안정화 시약(stabilizing reagent)이 걸여된, 방법.

청구항 29

제25 항에 있어서,

상기 방법은 상기 헤모글로빈 프로테인의 검출과 조합하여 적어도 하나의 유전자 선별(genetic screening) 방법을 활용하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 30

제29 항에 있어서,

상기 유전자 선별 방법은 하나 이상의 KRAS(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue) 돌연변이를 검출하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 31

대변 샘플을 테스트하기 위한 시스템으로서, 상기 시스템은:

수집 튜브의 입구를 통해 대변 샘플을 수용하는, 수집 튜브;

상기 수집 튜브의 입구에 제거가능하고 및 교체가능하게 결합되고, 상기 샘플을 처리하기 위한 하나 이상의 시약을 저장하는 파우치(pouch) 및 작동시에 파우치에 구멍을 내어 상기 하나 이상의 시약을 방출하는 혼합 요소(mixing element)를 가지는 덮개; 및

상기 샘플 내 헤모글로빈 프로테인(hemoglobin protein)을 검출하기 위한 센서를 포함하고,

상기 센서는:

그래핀 층;

기능화된 그래핀 층을 생성하기 위해 상기 그래핀 층에 연결되는 복수의 결합 에이전트(binding agent)로서, 상기 결합 에이전트는 헤모글로빈 프로테인(hemoglobin protein)에 결합하는, 복수의 결합 에이전트; 및

상기 기능화된 그래핀 층의 적어도 하나의 전기적 특성을 측정하기 위해 상기 기능화된 그래핀 층에 전기적으로 연결되는 복수의 전기 전도체를 포함하는, 카트리지.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조(cross-reference to related application)

[0002] 본 출원은 2020년 2월 6일에 출원된 미국 임시 출원 번호 제62/970,919호에 대한 우선권을 주장하며, 해당 출원은 그 전체로서 참조에 의해 본 개시에 통합된다.

[0003] 본 개시는 일반적으로 샘플 내 헤모글로빈 프로테인을 검출하기 위한, 보다 구체적으로 인간 배설물과 같은 생물학적 샘플 내 헤모글로빈 프로테인(hemoglobin protein)을 검출하기 위한 센서 및 이 센서를 이용한 방법에 관련된다.

배경 기술

[0004] 대장암(CRC)은 남성 및 여성의 모든 암의 각각 10.0% 및 9.2%를 차지한다. CRC의 생존 비율은 진단 단계에 따라서 크게 다르다. 예를 들어, 국한 단계(localized stage)에서 CRC가 검출된 경우 5년 생존 비율은 90%의 범위이고; 국소(regional)일 경우 70%; 원격 전이가 발생한 사람은 10%까지 감소한다. 따라서, CRC의 조기 검출을 위한 진단 방법에 대한 수요가 높다.

[0005] 대장내시경검사는 CRC 진단에 있어 최적 표준으로 남아 있다. 배설물 잠혈 검사(fecal occult blood test, FOBT)는 또한 귀중한 선별 도구로서 배설물 샘플 내 헤모글로빈을 검출하는 수단으로 사용된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 배설물 샘플 내 헤모글로빈 프로테인을 검출하기 위한 개선된 센서, 그리고 특히 배설물 샘플 내 헤모글로빈 프로테인을 신속하게 검출할 수 있는 저-비용의, 현장-진료(point-of-care) 센서에 대한 요구가 여전히 존재한다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양태에서, 그래핀 층, 기능화된 그래핀 층을 생성하기 위해 그래핀 층과 연결된 복수의 항-헤모글로빈 항체 및/또는 압타머(aptamer), 및 기능화된 그래핀 층의 적어도 하나의 전기적 특성을 측정하기 위해 기능화된 그래핀 층에 전기적으로 연결된 복수의 전기 전도체를 포함하는, 샘플 내 헤모글로빈을 검출하는 센서가 개시된다.

[0008] 항-헤모글로빈 항체 및/또는 압타머는 헤모글로빈 프로테인에 특이적 결합을 나타내는 항체 및/또는 압타머로 구성된다. 일부 실시예에서, 항체는 항-인간(anti-human) 헤모글로빈 항체를 포함한다. 일부 실시예에서, 항체는 복수의 링커(linker)를 이용해 하부 그래핀 층에 연결된다. 이러한 일부 실시예에서, 각각의 링커는, 예컨대 π - π 결합을 통해, 그것의 한 단부에서 그래핀 층에 부착되고, 그리고, 예컨대 공유 결합을 통해, 다른 단부에서 적어도 하나의 헤모글로빈 프로테인과 부착된다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 링커는 1-피렌부톤산 숙시니미딜 에스테르(1-pyrenebutonic acid succinimidyl ester)일 수 있다.

[0009] 일부 실시예에서, 센서는 데이터 획득(data acquisition)동안 기준(reference) AC 전압 및/또는 전류(본 명세서에서 또한 "AC 신호"라고 지칭됨) 뿐만 아니라, 일부 실시예에서 기능화된 그래핀 층에 대한 DC 오프셋 전압(예컨대, DC 램프 전압)을 인가하기 위한 기준 전극을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 기준 AC 신호는 약 10 kHz에서 약 100 kHz의 범위, 또는 약 50 kHz에서 약 200 kHz의 범위, 또는 약 200 kHz에서 약 300 kHz의 범위, 또는 약 400 kHz에서 약 700 kHz의 범위와 같은, 약 1 kHz에서 약 1 MHz의 범위의 주파수를 가질 수 있고, 또한 인가된 AC 전압의 진폭(예컨대, 피크-투-피크 진폭)은, 예를 들어, 약 100 밀리볼트에서 약 3 볼트의 범위, 예컨대 약 1 볼트에서 약 2 볼트의 범위가 될 수 있다.

[0010] 상기 언급한 바와 같이, 일부 실시예에서, DC 램프 전압은 데이터 획득(data acquisition)동안, AC 전압과 함께 AC 전극에 인가된다. DC 램프 전압은, 예를 들어, 약 -10 볼트에서부터 약 +10 볼트까지, 예컨대, 약 -5 볼트에서부터 약 +5 볼트까지의 범위에서, 또는 약 -3 볼트에서부터 약 +3 볼트까지의 범위에서, 또는 약 -1 볼트에서부터 약 +1 볼트까지의 범위까지 확장될 수 있다.

[0011] 일부 실시예에서 기준 전극은 기능화된 그래핀 층 위에 위치될 수 있고, 다른 실시예에서 기준 전극은 그래핀 층이 배치되는 기관 위에 위치될 수 있다. 이러한 일부 실시예에서, 기준 전극은 기능화된 그래핀 층을 적어도 부분적으로 둘러쌀(partially surround) 수 있다.

[0012] 많은 실시예에서, 샘플은 배설물(예컨대, 인간 배설물), 소변 또는 혈액과 같은 생물학적 샘플을 포함한다.

[0013] 일부 실시예에서, 센서는 인간 배설물 내 헤모글로빈 프로테인을 검출을 위해 최소한 10 $\mu\text{g} \cdot \text{Hb}/\text{g} \cdot \text{feces}$ 의 검출 민감도(검출 한도(limit-of-detection, LOD))를 가지도록 구성된다.

[0014] 일부 실시예에서, 본 교시에 따른 센서는 본 교시에 따른 그래핀-기반 센싱 요소와 커뮤니케이션하는 입구 포트로부터 출구 포트를 향해 샘플을 인도하는 적어도 하나의 미세유체(microfluidic) 채널을 포함할 수 있다. 일부

실시예에서, 미세유체 채널은 샘플을 혼합하기 위한 수동 및/또는 능동 혼합 요소를 가질 수 있다.

- [0015] 관련 양태에서, 생물학적 샘플 내 헤모글로빈을 검출하는 방법이 개시되고, 이는 복수의 항-헤모글로빈 항체 (예컨대, 항-인간 헤모글로빈 항체) 및/또는 압타머로 기능화된 그래핀 층에 샘플을 도포하고, 기능화된 그래핀 층의 적어도 하나의 전기적 특성을 측정하고, 그리고 샘플 내 헤모글로빈이 존재하는지 여부를 결정하기 위해 측정된 전기적 특성을 이용하는 것을 포함한다. 일부 실시예에서, 그래핀 층의 측정된 전기적 특성은, 예를 들어, 전자 이동도(electron mobility), 전기 임피던스 (electrical impedance, 예컨대, DC 또는 AC 전기 저항 또는 둘 다), 및 전기 커패시턴스(electrical capacitance)를 포함할 수 있다.
 - [0016] 일부 실시예에서, 생물학적 샘플은, 예를 들어, 인간 배설물, 소변 또는 혈액이 될 수 있다.
 - [0017] 관련 양태에서, 생물학적 샘플 내 헤모글로빈을 검출하기 위한 센서를 제조하는 방법이 개시되며, 이는 하부 기판 상에 놓여진 그래핀 층에 복수의 링커를 부착하는 것, 그리고 헤모글로빈 프로테인 (예컨대, 항-인간 헤모글로빈 프로테인)에 특이적 결합을 나타내는 복수의 항체 및/또는 압타머를 링커에 공유적으로 연결하는 것을 포함한다.
 - [0018] 관련 양태에서, 생물학적 샘플 (예컨대 인간 배설물) 내 헤모글로빈을 검출하기 위한 처분가능한(disposable) 카트리지가 개시되며, 이는 샘플을 수용하기 위한 입구 포트와 출구 포트를 가지는 미세유체 구성요소 (microfluidic component)를 포함한다. 센서는 출구 포트로부터 샘플의 적어도 일부를 수용하는 미세유체 구성요소와 유체적으로 연결된다. 그 센서는 그래핀 층, 항체 및/또는 압타머-기능화된 그래핀 층을 생성하기 위해 그래핀 층에 연결된 복수의 항-헤모글로빈 항체를 포함할 수 있다. 복수의 전기 전도체는 항체 및/또는 압타머-기능화된 그래핀 층의 샘플에의 노출에 응답하여 기능화된 그래핀 층의 전기적 특성을 측정하기 위해 기능화된 그래핀 층에 전기적으로 연결된다.
 - [0019] 일부 실시예에서, 미세유체 구성요소는 PDMS (polydimethylsiloxane) 또는 PMMA (polymethyl methacrylate)와 같은, 폴리머 재료(polymeric material)로 형성된다.
 - [0020] 일부 실시예에서, 본 교시에 따른 센서는 인간 배설물 내 헤모글로빈을 검출하기 위해 사용될 수 있고 그 결과는 대장암 및/또는 전암성(pre-malignant) 대장 신생물(neoplasia)을 검출하기 위해 그것 단독으로, 또는 유전자 검사와 조합하여 사용될 수 있다.
 - [0021] 관련 양태에서, 임의의 대장암 및 전암성 대장 신생물을 선별하기 위한 방법이 개시되고, 이는 대상으로부터 대변 샘플을 수집하는 것, 테스트 샘플을 형성하기 위해 하나 또는 그 이상의 시약 (예컨대, 완충 용액)에 수집된 대변 샘플을 용해하는 것, 헤모글로빈 프로테인에 대해 특이적 결합을 나타내는 복수의 항체 및/또는 압타머로 기능화된 그래핀 층을 포함하는 센싱 요소에 테스트 샘플을 도입하는 것, 항체 및/또는 압타머-기능화된 그래핀 층의 테스트 샘플에 노출에 응답하여 적어도 하나의 전기적 특성을 측정하는 것, 및 테스트 샘플 내 헤모글로빈 프로테인이 센싱 요소의 검출 한도 (LOD)에 대응하는 임계값을 초과하는지 여부를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시예에서, 대변 샘플을 하나 또는 그 이상의 시약에 용해시키는 것에 더하여, 또한 샘플은 혼합의 대상이 될 수 있다.
 - [0022] 선택적으로, 방법은 테스트 샘플 내 헤모글로빈 프로테인의 농도를 수량화하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 그 다음, 헤모글로빈 프로테인의 수량화된 농도는 대장암 또는 전암성 대장 신생물의 존재 또는 부재와 상관될 수 있다.
 - [0023] 일부 실시예에서, 테스트 샘플을 형성하기 위해 사용되는 하나 또는 그 이상의 시약은 안정화 시약이 없다 (또는 실질적으로(substantially) 없다).
 - [0024] 일부 실시예에서, 적어도 하나의 유전자 선별 방법이 대장암 또는 전암성 대장 신생물의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 헤모글로빈 프로테인의 검출과 조합되어 활용된다. 다른 실시예에서, 대장암 또는 전암성 대장 신생물의 검출을 위한 바이오마커(biomarker)로서 오직 헤모글로빈 프로테인만이 사용된다.
- 발명의 효과**
- [0025] 일부 실시예에서, 본 교시에 따른 센서는 적어도 2개의 센싱 유닛을 포함할 수 있고, 여기서 센싱 유닛 중 하나는 생물학적 샘플 (예컨대, 배설물) 내의 헤모글로빈의 검출을 위해 구성되고, 다른 센싱 유닛은 대장암 및/또는 전암성 대장 이형성(dysplasia)과 관련된 하나 또는 그 이상의 유전적 바이오마커를 검출하기 위해 구성된다. 이러한 일부 실시예에서, 헤모글로빈-검출 센싱 유닛은 본 명세서에 개시된 것과 같은 구조를 가질

수 있고 바이오마커 센싱 유닛은 관심 있는 DNA 서열과 상보적인 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 서열을 가지는 sgRNA에 있어 촉매적으로(catalytically) 비활성화된 CRISPR 복합체로 기능화된 그래핀 층을 가질 수 있다. 만약 DNA 서열 (예컨대, 표적 돌연변이, 예컨대, KRAS 유전자에서 대장암과 관련된 돌연변이를 가진 DNA 서열)이 샘플 (예컨대, 배설물 샘플) 내 존재하는 경우, DNA 서열의 sgRNA에의 결합은 기능화된 그래핀 층의 적어도 하나의 전기적 특성의 변화를 야기할 수 있고, 이는 게놈(genome) 내 돌연변이의 존재를 식별하기 위해 아래에서 논의된 바처럼 측정되고 분석될 수 있다. 이러한 일부 실시예에서, 하나 또는 그 이상의 표적 돌연변이 및/또는 특이적 서열과 함께 선택된 임계값을 초과하는 헤모글로빈의 식별은 대장암 또는 전암성 대장 이형성의 존재를 암시할 수 있다.

[0026] 본 명세서에 개시된 것을 포함한, 다양한 공지된 유전자 선별 방법들은, 본 교시의 실시예에 사용될 수 있다. 아래에서 더 자세히 논의되는 바와 같이, 이러한 일부 유전자 선별 방법은 KRAS 돌연변이 및/또는 비정상적인 메틸화의 검출에 의존할 수 있다.

[0027] 본 교시의 다양한 양태에 대한 추가 이해는 아래에서 간략하게 설명되는 관련 도면과 함께 다음의 상세한 설명을 참조함으로써 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1a는 일 실시예에 따른 샘플 내 헤모글로빈을 검출하는 처분가능한(disposable) 카트리지를 개략적으로 도시한다.

도 1b는 도 1a에서 도시된 카트리지에 사용되는 그래핀-기반 센서를 개략적으로 도시한다.

도 2는 일 실시예에 따른 복수의 금속성 패드를 포함하여 검사 중인 샘플과의 상호작용에 응답하여 그것의 전기적 특성을 측정하기 위한 그래핀-기반 센서의 개략도이다.

도 3a는 항체-기능화된 그래핀 층(antibody-functionalized graphene layer)에 인가된 전류에 응답하여, 항체-기능화된 그래핀 층에 걸쳐 유도된 전압을 측정하기 위해 사용될 수 있는 전압-측정 디바이스(device)의 예시 회로도도를 도시한다.

도 3b는 항체-기능화된 그래핀 층에 인가된 전류는 물론 전압-측정 디바이스에 의해 측정된 전압을 수신하기 위해 도 3a에서 도시된 전압-측정 디바이스와 커뮤니케이션하는 분석기(analyzer)를 개략적으로 도시한다.

도 3c는 도 3a에 도시된 분석기의 구현 예를 도시한다.

도 4a는 일 실시예에 따른, AC 기준 전극 (AC reference electrode)을 포함하는 센서를 개략적으로 도시한다.

도 4b는 일 실시예에 따른, 기판 상에 AC 기준 전극을 포함하는 센서를 개략적으로 도시한다.

도 4c는 본 교시의 일 실시예에 따른 센서의 기준 전극에 인가되는 램프 전압(ramp voltage) 및 AC 전압의 조합(combination)을 개략적으로 도시한다.

도 5는 일 실시예에 따른 그래핀-기반 센서의 어레이(array)를 개략적으로 도시한다.

도 6a는 하이드록실-기능화된(hydroxyl-functionalized) 그래핀 층을 개략적으로 도시한다.

도 6b는 항체가 부착된 하이드록실-기능화된 그래핀 층을 개략적으로 도시한다.

도 7a는 미세유체 채널을 통과하는 샘플의 수동 혼합을 야기하는 본 교시에 따른 센서의 일부 실시예에서 사용될 수 있는 구불구불한(serpentine) 미세유체(microfluidic) 채널을 개략적으로 도시한다.

도 7b는 미세유체 채널을 통과하는 샘플의 수동 혼합을 야기하는 본 교시에 따른 센서의 일부 실시예에서 사용될 수 있는 나선형(spiral) 미세유체 채널을 개략적으로 도시한다.

도 7c는 능동 혼합 요소가 통합된 미세유체 채널이 입구 포트로부터 본 교시에 따른 그래핀-기반 센싱 요소로 샘플을 인도하는 실시예에 따른 센서를 개략적으로 도시한다.

도 8a, 8b, 및 8c는 대변 샘플을 수집하고 그 안에 헤모글로빈 단백질의 존재에 대해 샘플을 테스트하는 본 교시의 일 실시예에 따른 시스템을 개략적으로 도시한다.

도 9는 일부 실시예에서 다양한 무선 프로토콜을 통해 로컬 및 원격 디바이스에 커뮤니케이션하는 커뮤니케이션 모듈을 포함할 수 있는 도 8a, 8b, 및 8c에 도시된 시스템의 덮개(lid)를 개략적으로 도시한다.

도 10a, 10b, 10c, 및 10d는 본 교시의 일 실시예에 따른 샘플 수집 및 처리 시스템을 개략적으로 도시한다.

도 11 및 12는 본 교시에 따른 그래핀-기반 센서의 일 실시예를 개략적으로 도시한다.

도 13은 도 11 및 12에서 도시된 실시예에 대한 측정 방식의 구현을 개략적으로 도시한다.

도 14는 도 11 및 12에서 도시된 실시예에 대한 측정 방식의 다른 구현을 개략적으로 도시한다.

도 15는 본 교시에 따른 그래핀-기반 센서의 센싱 유닛의 다른 실시예를 개략적으로 도시한다.

도 16은 헤모글로빈-함유 샘플에 노출된 경우 헤모글로빈 항체 및 동형 대조군 항체(isotype control antibody)로 기능화된 그래핀 층의 전자 이동도를 비교한 실험 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 개시는 일반적으로 인간 배설물과 같은, 샘플 내 헤모글로빈 단백질을 검출하기 위해 사용될 수 있는 그래핀-기반 센서에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용되는 다양한 용어는 당업계의 통상적인 의미에 따라 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "약"은 해당 숫자 값을 중심으로 최대 5%, 10%, 15%, 또는 20%의 변동을 나타낸다. 용어 "검출 한도"는 본 교시에 따른 센서를 사용하여 양성으로 검출될 수 있는, 예컨대 해당 실시예의 헤모글로빈 단백질과 같은, 분석물의 최소 농도를 지칭한다.
- [0030] 일 양태에서, 본 개시는 기능화된 그래핀 층의 생성을 위해 그래핀 층에 연결된 결합 에이전트에 대한 헤모글로빈의 결합과 기능화된 그래핀 층의 적어도 하나의 전기적 특성 변화의 측정을 통해 조사중인 샘플 내 임의의 헤모글로빈을 검출할 수 있도록 하는 교시를 제공한다. 이러한 결합 에이전트의 일부 예로는, 아타머(aptamer), 항체, 항체 단편(antibody fragment) 등을 포함하고, 이에 한정되지 않는다. 다음의 설명에서, 설명의 용이성을 위해, 용어 "항체"는 임의의 적절한 결합 에이전트, 즉, 헤모글로빈에 특이적 결합을 나타내는 임의의 결합 에이전트를 지칭하도록 의도된다.
- [0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는, 특이적 결합 친화성을 나타내는 폴리펩타이드, 예컨대, 적어도 하나의 기능성 면역글로불린 가변 도메인 서열(immunoglobulin variable domain sequence)을 포함하는, 면역글로불린 쇠(immunoglobulin chain) 또는 그것의 단편을 지칭할 수 있다. 항체는 전장(full length) 항체 및 항체 단편을 아우른다. 일부 실시예에서, 항체는 항원 결합 또는 전장 항체의 기능적 단편, 또는 전장 면역글로불린 쇠를 포함한다. 예를 들어, 전장 항체는 자연적으로 발생하거나 정상적인 면역글로불린 유전자 단편 재조합 과정을 통해 형성되는 면역글로불린(Ig) 분자(예컨대, IgG 항체)이다. 실시예에서, 항체는 면역학적으로 활성화된, 항체 단편과 같은, 면역글로불린 분자의 항원-결합 부분을 지칭한다. 예컨대, 기능적 단편(functional fragment)과 같은 항체 단편은, 항체의 일부, 예컨대, Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, 가변 단편(Fv), 도메인 항체(dAb), 또는 단일 쇠 가변 단편(scFv)을 포함한다. 기능적 항체 단편은 온전한(예컨대, 전장) 항체에 의해 인식된 항원과 동일한 항원에 결합한다.
- [0032] 용어 "항체"는 또한 "sdAb" 또는 "VHH"라고 지칭될 수 있는 도메인, 또는 신호 도메인, 항체의 전체 또는 항원 결합 단편을 아우른다. 도메인 항체는 독립형 항체 단편으로 작용할 수 있는 VH 또는 VL 중 하나를 포함한다. 또한, 도메인 항체는 중쇄-전용 항체(heavy-chain-only antibodies, HCAbs)를 포함한다. 항체 분자는 단일특이성(monospecific, 예컨대, 1가 또는 2가), 이중특이성(bispecific, 예컨대, 2가, 3가, 4가, 5가, 또는 6가), 삼중특이성(trispecific, 예컨대, 3가, 4가, 5가, 6가), 또는 더 높은 차수의 특이성(예컨대, 사중특이성(tetraspecific)) 및/또는 6가 이상의 원자가 차수가 될 수 있다. 항체 분자는 경쇄(light chain) 가변 영역의 기능적 단편 및 중쇄 가변 영역의 기능적 단편을 포함할 수 있고, 또는 중쇄 및 경쇄가 단일 폴리펩타이드로 함께 융합될 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 용어 "아타머"는 표적 분자와의 특이적 결합을 나타내는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 또는 펩타이드(peptide) 분자를 지칭한다. 아타머는 일반적으로 올리고뉴클레오타이드 또는 펩타이드 서열의 큰 무작위 풀(pool)에서 선택되어 생성되지만, 천연 아타머도 또한 존재한다.
- [0034] 본 명세서에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오타이드 결합 요소"는 RNA 또는 단일 가닥 DNA 절편과 같은, 표적 올리고뉴클레오타이드에 특이적 결합을 나타내는 임의의 단백질, 펩타이드 및/또는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0035] 본 명세서에서 사용되는 용어 "전기적 특성"은 전자 이동도(electron mobility), 전기 임피던스(electrical impedance, 예컨대, DC 또는 AC 전기 저항 또는 둘 다), 및/또는 전기 커패시턴스(electrical capacitance)를

포함할 수 있다.

- [0036] 도 1a는 일 실시예에 따른 카트리지(100, 본 명세서에서 또한 카세트라고 지칭됨)를 개략적으로 도시하는데 이는 예컨대 인간 배설물과 같은 샘플 내, 헤모글로빈 단백질을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 많은 실시예에서, 카트리지(100)는 1회용(single-use) 및 처분가능한(disposable) 카트리지이다.
- [0037] 카트리지(100)는 조사 중인 샘플을 센서(400)에 전달하는 미세유체 전달 구성요소(microfluidic delivery component, 200)를 포함한다. 해당 실시예에서, 미세유체 전달 구성요소(200)는 샘플이 미세유체 전달 구성요소 내로 도입될 수 있는 입구 포트(202)로부터 샘플이 센서(400)로 전달될 수 있는 출구 포트(203)로 확장하는 적어도 하나의 유체 채널 (201)을 포함한다. 일부 실시예에서, 미세유체 채널은 모세관 현상(capillary action)에 기초하여 기능할 수 있다. 일부 실시예에서, 미세유체 전달 구성요소(200)는 PDMS (polydimethylsiloxane) 또는 PMMA (polymethyl methacrylate)와 같은 폴리머 재료(polymeric material)로 구성될 수 있고, 미세유체 채널은 에칭(etching) 또는 당업계에 공지된 다른 기술로 형성될 수 있다.
- [0038] 도 1b에 도시된 바와 같이, 해당 실시예에서, 센서(400)는 하부 기관(12) 상에 배치되는 그래핀 층(14)을 포함한다. 일부 실시예에서 기관은 반도체일 수 있고, 다른 실시예에서는, 폴리머 기관일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시예에서는, 기관은 실리콘 기관일 수 있고, 다른 실시예에서는 플라스틱 기관일 수 있다. 예를 들어, 하부 기관은 PDMS로 형성될 수 있다. 그리고, 다른 실시예에서는, 하부 기관은 구리 기관과 같은, 금속 기관일 수 있다. 일부 실시예에서, SiO₂ 층은 하부 실리콘 기관으로부터 그래핀 층을 분리한다.
- [0039] 해당 실시예에서, 그래핀 층은 예컨대, 인간 헤모글로빈 단백질과 같은, 헤모글로빈 단백질에 특이적 결합을 나타내는 복수의 결합 에이전트(16, 예컨대, 항체 및/또는 aptamer)로 기능화된다. 헤모글로빈은 4개의 단백질 사슬(chain), 2개의 알파(alpha) 사슬 및 2개의 베타(beta) 사슬로 구성되고, 각각 철 원자를 포함하는 고리-모양 헴 그룹(heme group)이 있다. 산소는 이 철 원자에 가역적으로(reversibly) 결합하고 혈액을 통해 운반된다. 예를 들어, 항-인간 헤모글로빈 항체는 제품 코드 H4890-2ML의 Sigma Aldrich로부터 얻어질 수 있다.
- [0040] 아래에서 더 상세히 논의될 바와 같이, 결합 에이전트(16)는 단클론(monoclonal) 또는 다중클론(polyclonal) 항체일 수 있다. 도 1b에서 개략적으로 도시된 바와 같이, 항-헤모글로빈 항체(anti-hemoglobin antibodies)를 하부 그래핀 층에 연결하기 위하여, 다양한 링커 분자(linker molecules, 18)가 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 1-피렌부톤산 숙시니미딜 에스테르 (1-pyrenebutonic acid succinimidyl ester)가 하부 그래핀 층에 항-헤모글로빈 항체를 연결하는 것을 용이하게 하기 위하여 링커로서 사용된다. 해당 실시예에서, 복수의 항-헤모글로빈 항체는 그래핀 층의 일부, 또는 전체 표면을 커버할 수 있다. 다양한 실시예에서, 분율(fraction)은 그래핀 층 표면의 적어도 약 60% 이상, 적어도 약 70% 이상, 적어도 약 80% 이상, 또는 100%일 수 있다. 그래핀 층 표면의 나머지 부분 (즉, 항-헤모글로빈 항체로 기능화되지 않은 표면)은 패시베이션 층(passivation layer, 20)을 통해 패시베이트(passivate)될 수 있다. 예를 들어, 패시베이션 층은 Tween 20, BLOTTO, BSA (Bovine Serum Albumin), 젤라틴 또는 3mM APA (amino-PEGs-alcohol)를 이용하여 형성될 수 있지만, 다른 시약도 또한 이용할 수 있다. 패시베이션 층은 그래핀 층 상에 도입된 관심 있는 샘플과 항-헤모글로빈 항체로 기능화되지 않은 그래핀 층의 영역과의 상호작용을 억제할 수 있고, 바람직하게는 방지할 수 있다. 이는 결과적으로 항체 분자와 관심 있는 분석물의 상호작용의 결과로서 생성될 전기 신호 내 노이즈를 낮출 수 있다.
- [0041] 예를 들어, 일부 실시예에서, 하부 기관 (예컨대, 플라스틱, 실리콘과 같은 반도체, 또는 구리 필름과 같은 금속 기관) 상에 형성된 그래핀 층은 상온에서 몇 시간 (예컨대, 2 시간)동안 링커 분자 (예컨대, 1-피렌부톤산 숙시니미딜 에스테르의 5 mM 용액)와 함께 인큐베이트(incubate)될 수 있다.
- [0042] 그 다음 링커 변형된 그래핀 층(linker modified graphene layer)은 선택된 온도 및 선택된 기간 (예컨대, 섭씨 4도에서 7-10 시간) 동안 완충 용액 (예컨대, NaCO₃-NaHCO₃ 완충 용액 (pH 9))에서 관심 있는 항체와 함께 인큐베이트될 수 있고, 이어서 탈이온(DI) 수 및 인산염 완충 용액(phosphate buffered solution, PBS)으로 헹군다. 미반응 숙시니미딜 에스테르 기를 켄치(quench)하기 위해, 변형된 그래핀 층은 에탄올아민(ethanolamine)과 함께 인큐베이트될 수 있다. (예컨대, 1 시간 동안 pH 9의 0.1 M 용액).
- [0043] 그 후에, 비-기능화된 그래핀 영역은 도 1b에 개략적으로 도시된 패시베이션 층(20)과 같은, 패시베이션 층을 통해 패시베이트될 수 있다. 예를 들어, 그래핀 층의 비-기능화된 영역의 패시베이션은 예컨대 0.1% Tween 20을 통해 이루어질 수 있다.
- [0044] 도 2는 일부 실시예에 따른 센서(200)를 도시하고, 이는 전기 전도성 패드 (22a, 22b, 24a 및 24b)를 포함하고,

이는 샘플 내 존재하는 헤모글로빈 단백질과 그래핀 층(14)에 연결된 항-헤모글로빈 항체의 상호작용에 응답하여 기능화된 그래핀 층(14)의 전기적 특성의 변조(modulation)의 4-점 측정(four-point measurement)을 가능하게 한다. 특히, 해당 실시예에서, 그래핀 층(14)에 연결된 항-헤모글로빈 항체와 검사 중인 샘플 내 헤모글로빈 단백질의 상호작용에 의해 발생하는 하부 그래핀 층(14)의 전기적 특성의 변화를 측정을 가능하게 하기 위해 전도 패드(22a/22b)는 기관(11) 상에 배치되고 기능화된 그래핀 층(14)의 일 단부에 전기적으로 연결되고 또한 전도 패드(24a/24b)는 기관(11) 상에 배치되고 기능화된 그래핀 층(14)의 반대편 단부에 전기적으로 연결된다. 예를 들어, 해당 실시예에서, 하부 그래핀 층(14)의 DC 저항의 변화는 검사 중인 샘플 내 헤모글로빈 단백질의 존재를 결정하기 위하여 모니터링될 수 있다. 다른 실시예에서, 그래핀/항체 시스템의 DC 저항 및 커패시턴스의 조합(combination)에 의해 특징지어지는 그래핀 층(14)의 전기 임피던스의 변화는 검사 중인 샘플 내 헤모글로빈 단백질이 존재하는지 여부를 결정하기 위해 모니터링될 수 있다. 전기 전도 패드는 무엇보다도, 구리 및 구리 합금과 같은, 다양한 금속을 사용하여 형성될 수 있다.

[0045] 예를 들어, 도 3a는 본 교시의 일부 실시예에서 사용될 수 있는 전압 측정 회로(301)를 개략적으로 도시한다. 이 개략도는 항체-기능화된 그래핀 층에 대응하는 등가 회로로서의 센서(302)를 도시한다. 고정 전압 V (예컨대, 1.2 볼트)은 버퍼 연산 증폭기(buffer operational amplifier, 303)의 출력에서 생성된다. 이 전압은 다운스트림(downstream) 연산 증폭기(304)의 한 입력(A)에 인가되고 증폭기의 다른 입력 B가 저항 $R1$ 을 통해 $VR1$ 접지에 연결된다. 연산 증폭기(304)의 출력 (V_{out1})은 센서(302)의 한 단부에 연결되고 $VR1$ 접지에 연결되지 않은 저항 $R1$ 의 단부는 센서(302)의 다른 단부에 연결된다(이 개략도에서, 저항 $R2$ 는 등가 센서(302)의 한 단부에 있는 두 전극 패드 사이의 저항을 표시하고, 저항 $R3$ 은 센서의 두 내부 전극 사이에서 확장되는 그래핀 층의 저항을 표시하고, 그리고 저항 $R4$ 는 센서의 다른 단부에 있는 두 전극 패드 사이의 저항을 표시한다). 연산 증폭기가 $VR1$ 접지에 연결되지 않은 저항 $R1$ 의 단부의 전압을 그것의 입력 (A)에 인가되는 고정 전압, 예컨대 1.2 볼트로 유지함에 따라, 센서(302)를 통해 정전류 흐름(constant current flow)을 제공하고 저항 $R1$ 및 $VR1$ 을 통해 접지로 복귀하는 정전류 소스(constant current source)가 생성된다.

[0046] 항체-기능화된 그래핀 층에 걸쳐 생성된 전압은 센서의 두 내부 전극을 통해 측정된다. 구체적으로, 한 쌍의 내부 전극 패드는 버퍼 연산 증폭기(306)에 연결되고 다른 한 쌍은 그리고 다른 버퍼 연산 증폭기(308)에 연결된다. 항체-기능화된 그래핀 층에 걸친 전압 차이를 제공하는 출력 포트를 가진 차동 증폭기(310)의 입력 포트에 버퍼 연산 증폭기의 출력이 인가된다. 그 다음 이러한 전압 차이($V_{out1} - GLO$)는 항체-기능화된 그래핀 층에 의해 나타나는 저항을 측정하기 위해 이용될 수 있다. $R3$ 을 통해 강제되는 전류는 $I = (V_{ref} - VR1)/R1$ 에 의해 정해지고, 여기서 $VR1$ 의 값은 디지털적으로 제어된다. 전류 I 의 각각의 값들에 대하여, 상응하는 전압 (V_{out1_GLO})은 측정되고 저장된다. 항체-기능화된 그래핀 층의 저항은 전류 I 에 대한 전압인 V_{out1_GLO} 의 미분으로 계산될 수 있고, 즉, $R = dV/dI$ 이다.

[0047] 도 3b에서 개략적으로 도시된 바와 같이, 일부 실시예에서는, 분석기(600)는 인가된 전류 및 측정된 전압 값을 수신하고 이 값들을 항체-기능화된 그래핀 층의 저항을 계산하는데 이용하기 위해 전압 측정 회로(301)와 커뮤니케이션할 수 있다. 그 다음, 분석기(600)는 계산된 저항값, 예컨대 조사 중인 샘플에 대한 항체-기능화된 그래핀 층의 노출에 응답한 저항의 변화를 사용하여, 샘플이 헤모글로빈 단백질을 함유하는지 여부를 본 교시에 따라 결정하기 위해 사용할 수 있다.

[0048] 예를 들어, 도 3c에서 개략적으로 도시된 바와 같이, 해당 실시예에서, 분석기(600)는 프로세서(602), 분석 모듈(604), 랜덤 액세스 메모리(RAM, 606), 영구 메모리(608), 데이터베이스(610), 커뮤니케이션 모듈(612), 그래픽 유저 인터페이스(GUI, 614)를 포함할 수 있다. 분석기(600)는 인가된 전류 및 측정된 전압의 값을 수신하기 위하여 전압 측정 회로(301)와 커뮤니케이션하는 커뮤니케이션 모듈(612)을 사용할 수 있다. 커뮤니케이션 모듈(612)은 유선 또는 무선 커뮤니케이션 모듈일 수 있다. 분석기(600)는 사용자가 분석기(600)와 상호작용할 수 있도록 하는 그래픽 유저 인터페이스(614)를 더 포함한다.

[0049] 분석 모듈(604)은 조사 중인 샘플에 대한 항체-기능화된 그래핀 층의 노출에 응답하여 항체-기능화된 그래핀 층의 저항의 변화를 계산하기 위하여 항체-기능화된 그래핀 층에 인가된 전류의 값은 물론 그래핀 층에 걸쳐 유도된 전압을 사용할 수 있다(예컨대, 옴의 법칙을 이용하여). 이러한 계산을 위한 명령은 영구 메모리(608)에 저장될 수 있고 분석 모듈(604)에 의해 사용하기 위해 프로세서(602)를 통해 런타임(runtime)에 RAM(606)으로 전송될 수 있다. GUI(614)는 사용자가 분석기(600)와 상호작용할 수 있도록 한다.

[0050] 일부 실시예에서, 분석기(600)는 AC (alternating current) 전류원을 포함할 수 있고, 이는 그래핀 층에 공지된

진폭 및 주파수를 가지는 AC 전류를 인가할 수 있다. 특히, 다양한 실시예는 약 1 kHz에서 약 1 MHz의 범위의, 예컨대, 약 10 kHz에서 약 500 kHz의 범위, 또는 약 20 kHz에서 약 400 kHz의 범위, 또는 약 30 kHz에서 약 300 kHz의 범위, 또는 약 40 kHz에서 약 200 kHz의 범위의 주파수를 가지는 AC 전압을 유리하게 사용할 수 있다. 예를 들어, 기준 전극에 인가되는 AC 전압의 진폭은 약 1 밀리볼트에서 약 3 볼트의 범위, 예컨대 약 100 밀리볼트에서 약 2 볼트의 범위, 또는 약 200 밀리볼트에서 약 1 볼트의 범위, 또는 약 300 밀리볼트에서 약 1 볼트의 범위, 예컨대, 약 0.5 볼트에서 1 볼트의 범위일 수 있다.

[0051] 분석기(600)는 그래핀 층에 대한 AC 전류의 인가에 응답하여 그래핀 층에 걸쳐 유도되는 AC 전압을 측정하기 위해 AC 전압계 회로를 더 포함할 수 있다. 유도된 AC 전압의 진폭 및/또는 위상 변화를 측정함으로써, 그래핀 층의 전기 임피던스는 당업계에 공지된 방식으로 결정될 수 있다. 다른 실시예에서, 고정된 주파수 및 진폭을 가지는 AC 전압이 기능화된 그래핀 층에 인가될 수 있고 그래핀 층에 연결된 항체에 대한 헤모글로빈의 특이적 결합을 검출하기 위해 모니터링될 수 있다.

[0052] 본 교시의 일부 실시예의 실시예에 사용될 수 있는 적합한 분석기에 대한 추가 세부사항은, 예컨대 "Device and Method for Chemical Analysis," 라는 제목의 미국 특허번호 제9,664,674호에서 찾을 수 있으며, 이는 그 전체로서 참조에 의해 본 개시에 통합된다.

[0053] 도 4a 및 도 4b는 본 교시에 따른 센서(700)의 다른 실시예를 개략적으로 도시한다. 센서(700)는 예컨대 반도체 기관인, 하부 기관(702) 상에 배치되고, 헤모글로빈 (예컨대, 인간 헤모글로빈)에 특이적 결합을 나타낼 수 있는 관심 있는 항체(703)로 기능화된 그래핀 층(701)을 포함할 수 있다. 샘플과 기능화된 그래핀 층의 상호작용에 응답하여 기능화된 그래핀 층의 하나 또는 그 이상의 전기적 파라미터의 변화를 측정할 수 있도록 허용하는 000 소스 전극 (S) 및 드레인 전극 (D)은 그래핀 층에 전기적으로 결합된다. 도 4b를 참조하면, 기능화된 그래핀 층(701)의 전기적 특성 변조의 4점 측정을 위하여, 센서(700)는 도 2에 도시된 실시예와 비슷하게 전기 전도 패드 (722a, 722b, 724a, 및 724b)를 포함할 수 있다. 센서(700)는 그래핀 층(701)이 배치된 것과 동일한 기관 (702)에 배치된 기준 전극(G, 705)을 더 포함한다(즉, 기준 전극(705)은 그래핀 층(701)과 실질적으로 동일한 평면에 있음). 일부 실시예에서, 기준 전극(705)은 그래핀 층(701)을 실질적으로 둘러쌀(substantially surround) 수 있다. 위에서 논의된 방식으로, 기준 전극(705)에 AC 전압은 물론 DC 램프 전압의 인가를 허용하기 위하여 기준 전극(705)은 추가 전도 패드(726, 728)에 전기적으로 연결될 수 있다.

[0054] 사용 시에, 일부 실시예에서, 샘플에 헤모글로빈 항체가 존재하는지 여부를 결정하기 위하여 기능화된 그래핀 층과, 예컨대 인간 배설물과 같은, 샘플의 상호작용에 대해 응답하여 기능화된 그래핀 층의 전기 저항의 변화가 측정될 수 있다. 예를 들어, 샘플이 특정 농도 임계값, 예컨대 10 $\mu\text{g} \cdot \text{Hb}/\text{g} \cdot \text{feces}$ 를 초과하는 헤모글로빈 프로테인을 함유하고 있는 경우, 그래핀 층에 연결된 항체와 헤모글로빈 프로테인의 상호작용은 그래핀 층의 전기적 특성 (예컨대, DC 저항)의 변조를 야기할 수 있고 따라서 샘플 내 헤모글로빈 프로테인의 존재를 표시하는 신호를 제공할 수 있다.

[0055] 일부 실시예에서, 기준 전극에 대한 AC (alternating current) 전압원(704)을 통한 AC 기준 전압의 인가는 하나 또는 그 이상의 기능화된 그래핀의 전기적 특성, 예컨대, 항체에 대한 특이적 결합을 나타내는 분석물과 항체의 상호작용에 응답하여 그것의 저항의 변화의 검출을 용이하게 할 수 있다. 특히, 일부 실시예에서, 약 1 kHz에서 약 1 MHz의 범위의 주파수, 예컨대, 약 10 kHz에서 약 500 kHz의 범위, 또는 약 20 kHz에서 약 100 kHz의 범위의 주파수를 가진 AC 전압이 이와 관련해 특히 유리하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 기준 전극에 인가되는 AC 전압의 진폭은 약 1 밀리볼트에서 약 3 볼트의 범위, 예를 들어, 0.5 볼트에서 1 볼트의 범위일 수 있다. 또한, 일부 경우에, 기준 전극에 인가되는 전압은 AC 성분 및 DC 오프셋을 가질 수 있고, DC 오프셋은 약 -40 볼트에서 약 +40 볼트의 범위, 예컨대 -1 볼트에서 약 +1 볼트의 범위일 수 있다.

[0056] 예시로서, 도 4c는 전압(3014)을 초래하는, 기준 전극에 인가되는 AC 전압(3010) 및 DC 오프셋 전압(3012)의 조합(combination)을 개략적으로 도시한다. 예를 들어, DC 오프셋 전압은 약 -10 볼트에서부터 약 10 볼트까지 (예컨대, -1 볼트에서부터 약 1 볼트까지) 확장될 수 있고, 인가된 AC 전압은 상기에 개시된 주파수 및 진폭을 가질 수 있다.

[0057] 임의의 특정 이론에 제한되지 않고, 일부 실시예에서, 기준 전극(705)에 대한 이러한 전압(3014)의 인가는 샘플이 테스트될 때, 기능화된 그래핀 층이 접촉하게 되는 샘플, 예컨대 액체 샘플에 관련된 유효 커패시턴스를 최소화, 및 바람직하게는 제거할 수 있고, 이에 의해 항체(703)와 각각의 항원의 상호작용에 응답하여 하부 그래핀 층의 저항의 변화의 검출을 용이하게 한다. 일부 경우에, 샘플의 유효 커패시턴스는 샘플 내 존재하는 이온 및/또는 기능화된 그래핀 층 위 액체 이중 층의 형성으로 인한 것일 수 있다.

- [0058] 본 교시의 센서 및 방법은, 예컨대 소변, 혈액 또는 배설물과 같은, 다양한 샘플 내 헤모글로빈 단백질의 존재를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 헤모글로빈의 검출은 샘플 내 헤모글로빈이 센서의 검출 한도(limit-of-detection, LOD)에 기초하여 그것의 양성(positive) 식별을 할 수 있도록 하는 임계값을 초과하여 존재할 때 표시된다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 헤모글로빈 검출을 위한 임계값은 약 10 $\mu\text{g} \cdot \text{Hb}/\text{g} \cdot \text{feces}$ 일 수 있다.
- [0059] 일부 실시예에서, 본 교시에 따른 센서는 센싱 요소의 어레이(array of sensing elements)를 포함할 수 있고 이것의 신호는 예컨대 인간 배설물과 같은, 샘플 내 헤모글로빈 단백질의 존재 또는 부존재를 표시하는 결과 신호(예컨대, 기정의된 임계값 초과)를 생성하기 위하여 평균화될 수 있다.
- [0060] 예를 들어, 도 5는 이러한 복수의 센싱 요소(52a, 52b, 52c, 및 52d, 본 명세서에서는 집합적으로 센싱 요소(52)라고 지칭됨), 및 센싱 요소(54a, 54b, 54c, 및 54d, 본 명세서에서는 집합적으로 센싱 요소(54)라고 지칭됨)를 가진 센서(50)를 개략적으로 도시한다. 센싱 요소(52 및 54) 각각은 항-헤모글로빈 항체로 기능화된 그래핀 층을 포함하고 센서(400)와 관련하여 상기 논의된 바와 유사한 구조를 가진다. 일부 실시예에서, 상이한 센싱 요소는 상이한 종류의 항-헤모글로빈 항체로 기능화될 수 있다. 일부 실시예에서, 센싱 요소(52)에 의해 생성되는 신호는 결과 신호를 생성하기 위하여 평균화될 수 있다. 또한, 일부 실시예에서, 센싱 요소(52)의 적어도 하나는 샘플 내 존재하는 샘플 내 존재하는 헤모글로빈의 수량화(quantification)를 허용하는 교정 센싱 요소(calibration sensing element)로 구성될 수 있다. 예를 들어, 교정은 교정된 샘플을 활용하고 교정 샘플에 노출에 응답하는 기능화된 그래핀 층의 적어도 하나의 전기적 특성의 변화를 검출함으로써 달성될 수 있다.
- [0061] 사용 시에, 배설물 샘플은 적절한 액체 시약과 혼합될 수 있고 혼합물은 본 교시에 따른 센서에 도입될 수 있다. 예를 들어, 액체 시약은 대변 샘플을 용해시키기 위한 수성 완충제(aqueous buffer)일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시예에서, 인산염 완충제(예컨대, 1 g 대변당/ 25 ml 인산염 완충액)가 사용될 수 있다. 항체-기능화된 그래핀 층의 전기 저항은 배설물 샘플 내 헤모글로빈이 기정의된 임계값을 초과하는 농도로 존재하는지 여부를 결정하기 위하여 모니터링되고 분석될 수 있다. 예를 들어, 기정의된 임계값을 초과하는 항체-기능화된 그래핀 층의 DC 저항의 변화는 배설물 샘플 내 헤모글로빈 단백질의 검출과 상관관계가 있을 수 있다.
- [0062] 도 6a 및 6b를 참조하면, 일부 실시예에서, 센서는 알데하이드 부분(aldehyde moiety)를 함유하는 분자를 통해 항-인간 헤모글로빈 항체로 추가로 기능화된 하이드록실-기능화된 그래핀 층(1000)을 포함할 수 있다.
- [0063] 보다 구체적으로, 도 6b를 참조하면, 해당 실시예에서, 하이드록실-기능화된 그래핀 층은 표면의 수성 실란화(aqueous silanization)을 허용하기 위해 1시간 동안 95% 에탄올 내 2% 3-아미노프로필 트리에톡시 실란(3-Aminopropyl triethoxy silane, APTES)에 인큐베이트될 수 있다. 그래핀 층은 몇 시간동안(예컨대, 2시간동안) 밀리-큐 워터(milli-Q water) 내 2.5% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)에서 인큐베이트될 수 있다. 이 인큐베이션은 알데하이드기(aldehyde group, -COH)를 만들 수 있고, 이는 예컨대 공유 결합을 통해, 항체의 아민기(amine group, -NH₂)와 반응할 수 있고, 따라서 항체를 하이드록실-기능화된 그래핀 층에 연결할 수 있다.
- [0064] 이전 실시예와 유사하게, 해당 실시예에서, 그래핀 층은 하부 기판(1002)에 초기에 놓일 수 있다. 하부 기판(1002)은, 예를 들어, 실리콘과 같은, 반도체, 또는 예컨대 플라스틱과 같은, 폴리머 기판일 수 있다.
- [0065] 도 6b에는 도시되지 않았지만, 상기 센서(700)와 유사하게, 센서(1000)는 항체-기능화된 그래핀 층에 대한 전기 신호(예컨대, 전류 또는 전압)의 인가를 허용하고 항체-기능화된 그래핀 층의 적어도 하나의 전기적 특성, 예컨대 그것의 DC 전기 저항을 모니터링할 수 있는 금속 패드를 포함한다.
- [0066] 대장내시경검사가 대장암 조기 검출을 위한 최적 표준으로 남아있지만, 배설물 샘플 내 헤모글로빈의 검출은 대장암 및 전암성 대장 신생물의 검출을 위한 단독으로 또는 유전자 선별과 조합하여 사용될 수 있는 귀중한 선별 도구이다.
- [0067] 일부 실시예에서, 대변 샘플 내 헤모글로빈 단백질을 검출하기 위한, 예컨대 10 $\mu\text{g} \cdot \text{Hb}/\text{g} \cdot \text{feces}$ 보다 뛰어난 LOD를 특징으로 하는, 본 교시에 따른 그래핀-기반 센서의 높은 민감도는 대장암 및 전암성 대장 신생물의 검출을 위한 바이오마커로서 오직 헤모글로빈 단백질을 사용하는 것을 허용할 수 있다.
- [0068] 본 교시에 따른 그래핀-기반 센서의 또 다른 장점은 샘플 수집 지점에서 활용될 수 있다는 것이다. 그래서, 테스트 결과를 잠재적으로 방해할 수 있는 안정화 시약과 샘플을 혼합할 필요를 제거한다.
- [0069] 또한, 일부 경우에, 본 교시에 따른 센서를 이용해 대변 샘플 내 헤모글로빈 단백질의 검출은 대장암 및 전암

성 대장 신생물의 검출을 위해 유전자 선별과 조합될 수 있다.

- [0070] 예를 들어, 이러한 유전자 선별 테스트는 KRAS 돌연변이 검출에 의존할 수 있으며, 이는 대장암 및 전암성 대장 신생물의 최대 35%에서 검출되어 왔다.
- [0071] 일부 공지된 유전자 선별 양식은 DNA 마커를 검출하기 위해 다중-표적 접근법을 사용하고 헤모글로빈은 대장암 및 전암성 대장 신생물의 검출을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 유전자 선별의 일부 공지된 방법에서 3가지 독립적인 범주의 바이오마커가 모니터링된다. 이러한 바이오마커의 하나의 범주는 DNA 메틸화와 관련된 유전자 비정상적인 프로모터 영역 내 후성유전학적 DNA 변화가 포함된다. 메틸화된 유전자 표적의 예로는 N-Myc Downstream-Regulated Gene 4가 포함된다. 바이오마커의 다른 범주는 (NDRG4) 및 골 형태발생 단백질 3 (Bone Morphogenetic Protein 3, BMP3)에 대한 반응으로 일시적으로 활성화되는 작은 GTPase를 암호화하는 v-Ki-Ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) 내 DNA 점 돌연변이(point mutation)가 포함된다. 하나의 공지된 접근법에서, DNA 서열 내 비-메틸화 사이토신 잔기의 유라실로의 바이설파이트(bisulfite) 전환은 대장암 및 전암성 대장 신생물과 관련된 과메틸화의 민감한 검출을 가능하게 하기 위해 사용된다.
- [0072] 대장암 및 전암성 대장 신생물의 검출을 위한 또 다른 바이오마커는 만성 출혈과 관련될 수 있는 헤모글로빈 프로테인이다. 비정상적인 메틸화 및 돌연변이는 물론 본 교시에 따른 센서를 이용한 헤모글로빈 분석의 결과는 대장암 및 전암성 대장 신생물에 대한 양성 또는 음성 표시를 총체적으로 제공할 수 있다.
- [0073] 다음 프로토콜은 대장암 및 전암성 대장 신생물과 관련된 바이오마커의 존재를 결정하기 위한 개인의 대변에서 추출한 DNA 샘플을 테스트하기 위해 알려져 있다. 한 접근방식에서, 대변 샘플을 수집하고, QuARTSTM (Quantitative Allele-specific Real-time Target and Signal Amplification) 기술이 메틸화된 표적 DNA (NDRG4, BMP3), KRAS 점 돌연변이 및 ACTM (참조 샘플 내 인간 DNA의 총량을 수량적으로 추정하기 위해 사용될 수 있는 참조 유전자)의 검출 및 증폭에 사용된다. 다중 QuARTS 반응은 독립적인 형광 검출 채널을 통해 개별적으로 모니터링되는 각 바이오마커 (NDRG4, BMP3, KRAS, 및 ACTB)와 함께 실시간 사이클러(cycler)를 이용해 처리될 수 있다. 대장암과 관련된 바이오마커의 추출 및 검출에 관한 추가 세부사항은, 미국 특허번호 제 10,301,680호에서 찾을 수 있으며, 이는 그 전체로서 참조에 의해 본 개시에 통합된다.
- [0074] 본 교시에 따른 센서는 대변 샘플 내 헤모글로빈 프로테인의 검출을 위해 사용될 수 있다. 테스트 결과의 신뢰성을 보장하기 위해 대조 샘플을 사용할 수 있다.
- [0075] 상기 언급한 바와 같이, 일부 실시예에서, 본 교시에 따른 센서는 예컨대, 대변 샘플과 같은 샘플을, 샘플을 수송하는 입구 포트로부터 샘플이 이를 통해 본 교시에 따른 그래핀-기반 센싱 요소로 전달되는 출구 포트에 인도하는 미세유체 채널을 포함할 수 있다. 이러한 일부 실시예에서, 이러한 미세유체 채널은 샘플이 미세유체 채널을 통해 통과할 때 샘플을 혼합하기 위해 수동 및/또는 능동 혼합 요소를 포함할 수 있다.
- [0076] 예를 들어, 도 7a는 입구 포트(901)에서 출구 포트(902)까지 확장된 구불구불한 형상을 갖는 이러한 미세유체 채널(900)을 개략적으로 도시하고, 여기서 미세유체 채널의 구불구불한 형상은 샘플이 채널을 통해 통과할 때 샘플의 수동적인 혼합을 제공한다. 도 7b는 입구 포트(921)에서 출구 포트(922)까지 확장된 나선형 형상을 갖는 이러한 미세유체 채널(920)을 개략적으로 도시하고, 여기서 미세유체 채널의 구불구불한 형상은 샘플이 채널을 통해 통과할 때 샘플의 수동적인 혼합을 제공한다. 다른 형상, 예컨대 헤링본(herringbone)과 같은 형상도 또한 샘플 (예컨대, 대변 샘플)의 혼합을 제공할 수 있는 미세유체 채널을 위해 사용될 수 있다. 또한, 일부 실시예에서, 샘플이 채널을 통해 통과할 때 샘플의 혼합을 제공하기 위해 채널의 형상을 구성하는 대신 또는 이에 더하여 미세유체 채널에 장애물이 제공될 수 있다.
- [0077] 또한, 다른 실시예에서, 본 교시에 따른 센서는 예컨대 대변 샘플과 같은, 샘플의 혼합을 위하여 능동 혼합 요소, 미세유체 펌프(micro-fluidic pump)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 도 7c에서 개략적으로 도시된 바와 같이, 일부 실시예에서, 하나 또는 그 이상의 압전 소자(940)는 미세유체 채널(941) 내 배치될 수 있고, 이는 입구 포트(943)에서 출구 포트(944)로 확장되고, 샘플을 본 교시에 따른 그래핀-기반 센싱 요소(945)에 전달한다. 압전 소자(940)는 샘플이 미세유체 채널(941)을 통해 통과할 때 샘플의 혼합을 야기하기 위해 작동될 수 있다.
- [0078] 다양한 디바이스가 샘플, 예컨대 대변 샘플을 수집하고 처리하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 도 8a, 8b, 및 8c를 참조하면, 대변 샘플을 수집하고 샘플 내 헤모글로빈 프로테인의 존재에 대해 샘플을 테스트하기 위한 본 교시의 일 실시예에 따른 시스템(960)은 변기 좌석 어댑터(961) 및 대변 샘플 수집 튜브(962)를 포함한다. 샘플 수집 튜브(962)는 각각의 입구가 실질적으로 정렬되도록 변기 좌석 어댑터(961)와 탈착 및 교체 가능하게

결합할 수 있고, 따라서 샘플 채취 튜브(962) 내 대변 샘플의 수집을 허용할 수 있다.

- [0079] 시스템(960)은 수집 튜브(962)와 탈착 및 교체 가능하게 연결될 수 있는 자동-잠금 덮개(963)을 더 포함한다. 해당 실시예에서, 덮개(963)는 아래에서 더 상세히 논의되는 것처럼 대변 샘플을 처리하기 위해 하나 또는 그 이상의 시약이 저장될 수 있는 파우치(pouch, 964)를 포함한다. 또한, 덮개(963)는 혼합 요소(965)를 포함할 수 있고, 이는 해당 실시예에서 날(blade) 형태이고, 샘플을 분쇄하기 위해 본 명세서에서 논의된 방식으로 활성화될 수 있다. 해당 실시예에서, 파우치(964) 및 혼합 요소(965)에 더하여, 본 교시에 따른 그래핀-기반 센싱 요소는 물론 샘플에 대한 노출에 응답하여 센싱 요소의 전기적 특성을 측정하기 위한 전자장치 및 측정된 그래핀-기반 센싱 요소의 전기적 특성을 분석하는 분석 모듈 또한 덮개 내에 포함된다 (본 명세서에서 총체적으로 요소(966)으로 지칭된다). 그래핀-기반 센싱 요소는 물론 센싱 요소의 전기적 특성을 측정하는 전자장치 및 분석 모듈은 상기 논의된 방식으로 구현될 수 있다. 다른 실시예에서, 뚜껑은 센싱 요소, 전자장치 및 분석 모듈이 별도로 제공되는 동안 샘플을 처리하기 위한 하나 또는 그 이상의 시약만을 포함하는 파우치 및 혼합 요소만을 포함한다.
- [0080] 사용 시에, 대변 샘플은 수집 튜브(962)에 도입되고 덮개(963)는 수집 튜브(962)에 부착될 수 있다. 이어서, 도 8c에 도시된 바와 같이, 수집 튜브(962)는, 그 후 액추에이터(actuator, 971), 예를 들어, 모터가 배치되는, 베이스(970)에 반전되고(inverted) 연결될 수 있다. 액추에이터(971)는 혼합 요소 (965, 즉, 날(blade))를 작동시킬 수 있으며, 이는, 작동시에, 파우치(964)에 구멍을 내어, 파우치(964)에 포함된 (예컨대, 완충제와 같은) 시약(들)을 수집 튜브(962)로 방출한다. 대변 샘플의 시약(들)과의 혼합은 물론 혼합 요소의 혼합 작용은 감지 요소(966)에의 도입을 위해 샘플을 처리한다.
- [0081] 도 8c를 참조하면, 해당 실시예에서, 복수의 위킹 요소(972)는 처리된 샘플을 센싱 요소(966) 내로 끌어당길 수 있다.
- [0082] 도 9에 도시된 바와 같이, 일부 실시예에서, 덮개(963) 내의 전자장치는 네트워크(3002, 예컨대, 인터넷)을 통해 예컨대 의사의 컴퓨터 또는 이동식 전화기(3004a), 및/또는 전자 건강 기록 (EHR) 시스템(3004b)과 같은, 하나 또는 그 이상의 원격 장치(3004)에 분석 결과를 커뮤니케이션할 수 있는 커뮤니케이션 모듈(3000, 예컨대, Wi-Fi)을 포함할 수 있다. 또한, 일부 실시예에서, 커뮤니케이션 모듈은 예컨대 이동식 전화기(3005)와 같은 로컬 장치에, Bluetooth®와 같은, 임의의 적절한 통신 프로토콜을 사용하여, 결과를 커뮤니케이션하는 것을 허용할 수 있다.
- [0083] 추가적인 도시예를 들면, 도 10a, 10b, 10c, 및 10d를 참조하면, 일 실시예에 따른 시스템(4000)은 대변 샘플 수집 용기(4002) 및 일단 대변 샘플이 용기에 위치되면 용기를 밀봉하기 위해 샘플 수집 용기와 탈착 및 교체 가능하게 결합할 수 있는 덮개(4004)를 포함한다.
- [0084] 해당 실시예에서, 덮개(4004)는 수집된 샘플을 혼합하기 위해 사용될 수 있는 혼합 요소(4003, 예컨대, 임펠러(impeller) 또는 자석)를 포함한다. 파우치(4011)는 샘플을 처리하기 위한 하나 또는 그 이상의 처리용 시약을 저장하기 위해 덮개(4004) 내 제공된다. 파우치(4011)는 용기(4002) 내 함유된 샘플과 혼합하기 위해 용기(4002) 내로 그것의 내용물을 방출하도록 작동되면 혼합 요소(4003)에 의해 구멍이 내릴 수 있다.
- [0085] 해당 실시예에서, 덮개(4004)는 혼합 요소(4003)를 활성화하기 위한 액추에이터(actuator)가 안에 배치된 베이스(4005) 안에 구비된 결합 커넥터(4009, 예컨대, 커넥터(4007)를 수용하기 위한 용기)와 맞물릴 수 있는 그것의 외부 표면 상에 구비된 커넥터(4007)를 포함한다. 커넥터의 결합은 혼합 요소(4003)을 활성화하기 위해 혼합 요소(4003)에 에너지 (예컨대, 전기 에너지)의 인가를 허용한다. 혼합 요소(4003)의 활성화는 혼합을 야기한다 (예컨대, 혼합 요소(4003)가 날 형태인 일부 실시예에서 샘플의 분쇄). 용기(4002)와 관련 덮개(4004)는 처분가능한(disposable) 품목이고, 베이스(4005)는 재사용할 수 있게 만들어질 수 있다.
- [0086] 해당 실시예에서, 사용자에게 테스트의 결과를 나타내는 디스플레이(4010)가 제공된다. 용기(4002), 덮개(4004), 및 디스플레이(4010)과 같은, 시스템의 다양한 구성요소는 처분 가능할 수 있고 (예컨대, 가정에서의 사용을 위한) 베이스(4005)는 재사용할 수 있다. 다른 실시예에서, 베이스(4005) 또한 처분 가능할 수 있다.
- [0087] 센싱 요소가 덮개에 통합되지 않은 다른 실시예에서, 덮개는 제거될 수 있고 처리된 샘플의 적어도 일부는, 예컨대 주사기 또는 다른 적절한 디바이스를 통해, 튜브로부터 추출되고, 본 교시에 따른 센서로 도입될 수 있다.
- [0088] 일부 실시예에서, 등은 DNA 증폭은 DNA를 증폭하고 이에 따라 대장암 및 전암성 대장 신생물과 관련된 바이오마커에 대한 유전자 선별을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 등은 증폭을 수행하기 위한 다양한 접근법이 당 업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 일부 그러한 접근법은 프라이머(primer)에서 개시 이후 이중-가닥 DNA

(double-stranded DNA, dsDNA)의 가닥을 분리하기 위해 DNA 중합효소를 이용하는 것에 의존한다. 다양한 다른 접근법도 또한 공지되어 있다. 예를 들어, 이러한 한 접근법은 박테리오파지 T4의 단일 가닥 DNA 결합 단백질 gp32와 가닥-배치(strand-displacing) DNA 중합효소를 사용한다. DNA (및 RNA) 등은 증폭을 위한 이러한 접근법에 관한 추가 세부사항은, Scientific Reports (7: 8497,2017)에서 찾을 수 있으며, 이는 그 전체로서 참조에 의해 본 개시에 통합된다.

[0089] 본 교시에 따른 센서는 예컨대 배설물 샘플과 같은, 생물학적 샘플 내 헤모글로빈을 검출하기 위해 사용되는 빠르고, 비용-효율적이고 사용하기-쉬운 도구를 제공한다.

[0090] 도 11 및 12를 참조하면, 일부 실시예에서, 본 교시에 따른 센서(1200)는 적어도 두 개의 센싱 유닛 (1210 및 1220)을 포함할 수 있고, 여기서 센싱 유닛(1210)은 예컨대 배설물 샘플과 같은, 샘플 내 헤모글로빈의 존재를 검출하기 위해 본 교시에 따른 그래핀-기반 센서로 구성된다. 센싱 유닛(1220)은 조사 중인 샘플 내 존재하는 일반 물질(들) 내 하나 또는 그 이상의 돌연변이 (예컨대, 결실 또는 추가)를 검출하기 위해 구성된 그래핀-기반 센서이다. 아래에서 더 자세히 논의되는 바와 같이, 일부 실시예에서, 본 명세서에서 개시된 방식으로 처리된 예컨대 배설물 샘플과 같은 샘플의 일부는, 센싱 유닛(1210)으로 도입될 수 있고 샘플의 다른 일부는 센싱 유닛(1220)으로 도입될 수 있다. 상기에서 논의된 바와 같이, 계층 내 하나 또는 그 이상의 돌연변이의 식별과 함께 특정 임계값을 초과하는 헤모글로빈의 존재는 대장암 또는 전암성 대장 신생물의 검출을 표시할 수 있다.

[0091] 도 12를 참조하면, 상기에서 논의된 그래핀-기반 센싱 유닛과 유사하게, 그래핀-기반 센싱 유닛(1220)은 SiO₂ 층 상에 배치되는 그래핀 층(1201)을 포함하고, 이는 차례로 하부 실리콘 층(1202)에 배치된다. 해당 실시예에서, 그래핀 층(1201)은 촉매적으로 비활성화된 Cas9 (dCas9) CRISPR 복합체(1203, 예컨대 Cas9 (dCas9) CRISPR 복합체)로 기능화된다. 아래에서 논의되는 바와 같이, 표적 DNA 서열 (예컨대, 관심 있는 돌연변이를 함유하는 표적 DNA 서열)은 CRISPR 복합체에 선택적으로 혼성화될 수 있고 이러한 표적 DNA 서열 (샘플 DNA의 한 가닥의 일부)의 혼성화는 기능화된 그래핀 층(1201)의 적어도 하나의 전기적 특성을 변조시키고, 이는 돌연변이 (예컨대, 대장 신생물과 관련된 돌연변이)의 존재를 표시할 수 있다.

[0092] 일부 실시예에서, 그래핀 층(1201)은 예컨대 상기 논의된 방식으로, 하부 그래핀 층(1201)과의 π - δ 방향족 적층을 통해 분자 링커(1204, 예컨대 1-피렌부탄산(1-pyrenebutanic acid))로 기능화될 수 있다. 그 다음, dCas9 복합체(1203)는 예컨대 카르보디이미드 가교 화학(carbodiimide cross-linking chemistry)을 통해, 분자 링커(1204)에 고정될 수 있다. 그 다음, 기능화되지 않은 그래핀 층(1201)의 부분은 비-표적 분자의 그래핀 층(1201)의 기능화되지 않은 부분에 대한 비-특이적 결합을 방지하기 위해 상기 논의된 방식과 같은 차단 에이전트 (blocking agent, 예컨대, amino-PEG5-alcohol 및/또는 에탄올아민 히드로클로라이드(ethanolamine hydrochloride))로 이러한 부분을 차단함으로써 패시베이트(passivate)될 수 있다. 그 다음, dCas9 복합체(1203)는 관심 있는 표적 DNA 서열에 대해 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)에 연결될 수 있다.

[0093] 기능화된 그래핀 층(1201)과 샘플과의 상호작용에 응답하여 기능화된 그래핀 층(1201)의 적어도 하나의 전기적 특성 (예컨대, 그것의 임피던스)의 측정을 허용할 수 있도록 복수의 전도성 전극(1205)이 그래핀 층 상에 놓인다. 이러한 일부 실시예에서, 하나의 전극은 소스 전극으로서 기능할 수 있고 반대편 전극은 드레인 전극으로서 기능할 수 있다.

[0094] 또한, 이전 실시예와 유사하게, 센서(1200)는 DC 램프 전압과 조합된 DC 전압 또는 AC 전압이 인가될 수 있는 게이트 (기준) 전극(1206)을 포함할 수 있다 (예컨대, 상기 논의된 방식으로 (예컨대, 도 4a 및 4b 참조)).

[0095] 예를 들어, 도 12에 도시된 바와 같이, 전류 소스(current source)는 그래핀 층(1201)에 기정의된 정전류를 인가할 수 있고 AC/DC 전압 소스는 게이트 전극(1206)에 DC 램프 전압과 함께 AC 전압을 인가한다. 상기 실시예와 유사하게, 센서(1200)는 그것의 입구(1231)를 통해, 조사 중인 샘플을 수용할 수 있는, 유체 매니폴드(1230)를 포함한다. 유체 매니폴드(1230)는 수용된 샘플의 일부를 센싱 유닛(1210)으로의 분배 및 수용된 샘플의 다른 부분을 센싱 유닛(1220)으로의 분배할 수 있게 하는 복수의 내부 채널을 포함한다.

[0096] 도 13에 도시된 실시예에서, 2개의 측정 회로 (1240a 및 1240b)는 센싱 유닛 (1210 및 1220)의 기능화된 그래핀 층에 걸친 전압을 모니터링할 수 있게 한다. 도 14에 도시된 것처럼, 일부 실시예에서, 각각의 센싱 유닛에 대한 전용 측정 회로를 제공하는 대신, 단일 측정 회로(1240)이 제공되고, 이는 서로 다른 시간 간격 내 (예컨대, 연속적인 시간 간격동안) 센싱 유닛 (1210/1220)에 걸친 전압을 모니터링하기 위해 멀티플렉서(multiplexer, 1250)를 통해 센싱 유닛에 연결된다.

[0097] 다시 도 13 및 14를 참조하면, 측정 회로(1240)과 커뮤니케이션하는 분석기(1260)는 센싱 유닛(1210/1220)에 의해 생성된 신호 (예컨대, 기능화된 그래핀 층에 걸친 전압 측정)를 수신할 수 있고 조사 중인 샘플 내 헤모글로빈이 센싱 유닛(1210)의 검출 한도(LOD)를 초과하여 존재하는지 여부 및 센싱 유닛(1220)에 의해 생성된 신호가 샘플 내 DNA 내 표적 돌연변이의 존재를 표시하는지 여부를 결정하기 위해 이 신호를 처리할 수 있다.

[0098] 일부 실시예에서, 샘플을 센서에 도입하기 전에, 상기 논의된 바와 같은 DNA 증폭 기술이, 예컨대 상기 논의된 방식으로, 샘플 내 DNA를 증폭시키기 위하여 사용될 수 있다.

[0099] 도 15는 본 명세서에서 개시된 바와 같이, 예컨대 대변 샘플과 같은, 샘플 내 헤모글로빈 검출을 위한 헤모글로빈 센싱 유닛(1210)은 물론, 샘플 내 존재하는 DNA 및/또는 RNA에서, 단일-염기(single-base) 돌연변이를 포함한, 돌연변이를 검출하기 위해 구성되는 센싱 유닛(1220)을 함께 센서(1200)에 포함될 수 있는 센싱 유닛의 다른 실시예를 개략적으로 도시한다. 이전 실시예와 달리, 센싱 유닛(1220')의 해당 실시예에서, CRISPR 복합체가 아닌 올리고뉴클레오타이드-결합 요소는 표적 올리고뉴클레오타이드 (예컨대, DNA 또는 RNA) 절편 (예컨대, DNA 서열의 단일 가닥의 일부)을 검출하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프로브(oligonucleotide probe, 예컨대 DNA 또는 RNA 프로브)로서 그래핀 층(1201)에 연결될 수 있다. 예를 들어, 해당 실시예에서, 그래핀 층(1201)은, 예컨대 돌연변이를 갖는 DNA 또는 RNA 서열, 예컨대 프로브 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드와 단일 염기가 일치하지 않는, 표적 뉴클레오타이드 서열과 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 가지는 복수의 올리고뉴클레오타이드(1203')로 기능화될 수 있다.

[0100] 해당 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드(1203')는 상기 논의된 1-피렌부톤산 숙시니미딜과 같은, 링커(1204)을 이용해 그래핀 층(1201)에 연결될 수 있다. 링커(1204)의 숙시니미드(succinimide) 부분(1204-2)이 올리고뉴클레오타이드(1203')의 아민 부분에 공유적으로 결합할 수 있는 동안, 링커는 그래핀 표면 상의 그것의 피렌기(pyrene group, 1204-1)의 π 적층을 통해 그래핀 층(1201)에 연결될 수 있다. 사용 시에, 그래핀 층(1201)에 연결된 프로브 올리고뉴클레오타이드(1203')에 대한 표적 올리고뉴클레오타이드 서열 (예컨대, 표적 단일 가닥 DNA 절편)의 혼성화는 그래핀 층(1201)의 적어도 하나의 전기적 특성 (예컨대, 그것의 DC 저항과 같은, 그것의 전기적 임피던스)의 변화를 야기할 수 있고, 이는 본 명세서에서 개시된 방식으로 검출될 수 있다.

[0101] 다른 실시예에서, 올리고뉴클레오타이드 결합 요소의 다른 유형도 사용될 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오타이드 결합 요소의 일부 예에는 다른 것보다도, 징크 핑거(zinc finger), 및 TALENs (transcription activator-like effector nucleases)의 DNA 결합 도메인이 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[0102] 예시

[0103] 본 교시에 따른 프로토타입(prototype) 센서가 상기 기술된 바와 같이 제조되었고 다양한 농도의 헤모글로빈 항원을 가지는 샘플을 이용해 테스트되었다. 센서의 그래핀 층은 Abeam이 제품 코드 Ab77125로 판매하는 귀 단클론 항-헤모글로빈 항체 (7E1F)로 기능화되었다. 또한, 그래핀 층의 기능화되지 않은 부분은 폴리에틸렌 글리콜 (polyethylene glycol, PEG) 및 에탄올아민을 이용해 패시베이트시켰다. 동형 대조군(isotype control) 항체로 기능화되었던 대조군 센서도 또한 제조되었다. 두 센서에는 0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도의 헤모글로빈 항원을 포함하는 샘플이 로드(load)되었고 전자 이동도가 측정되었다. 표 1 및 도 16에 도시된 바와 같이, 프로토타입 센서는 헤모글로빈과의 상호작용에 응답하여 전자 이동도의 변화 (즉, 항원을 포함하지 않는 완충제 및 헤모글로빈 항원을 포함하는 샘플 사이의 전도도 또는 전자 이동도의 백분율 변화)가 대조군 센서보다 통계적으로 더 높게 나타났다.

[0104] 표 1은 다양한 헤모글로빈 (항원) 농도에 대한 전자 이동도를 나타낸다.

표 1

[0105]

	10 $\mu\text{g/mL}$		1 $\mu\text{g/mL}$		0 $\mu\text{g/mL}$	
	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차
헤모글로빈 mAb	377.25	120.09	172.89	34.14	73.39	47.17
동형 대조군	103.68	24.71	112.78	23.87	51.11	21.99

[0106] 당업계에 평균적인 기술을 가진 자는 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 상기 실시예에 대한 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

[0107] 결론 및 일반 용어

[0108] 다양한 실시예에서, 개시된 모듈 중 하나 이상은 대응하는 모듈의 기능을 수행하기 위한 하나 이상의 컴퓨터 프로그램을 통해, 또는 이러한 프로그램을 실행하는 컴퓨터 프로세서를 통해 구현된다. 일부 실시예에서, 개시된 모듈 중 하나 이상은 대응하는 모듈의 기능을 수행하기 위한 펌웨어를 실행하는 하나 이상의 하드웨어 모듈을 통해 구현된다. 다양한 실시예에서, 개시된 모듈 중 하나 이상은 모듈에 의해 사용되는 데이터를 저장하기 위한 저장 매체, 또는 모듈에 의해 실행되는 소프트웨어 또는 펌웨어 프로그램을 포함한다. 다양한 실시예에서, 개시된 모듈 또는 개시된 저장 매체 중 하나 이상은 개시된 시스템의 내부 또는 외부에 있다. 일부 실시예에서, 개시된 모듈 또는 개시된 저장 매체 중 하나 이상은 컴퓨터 "클라우드"를 통해 구현되고, 여기에는 개시된 시스템이 네트워크 연결을 통해 연결되고 그에 따라 외부 모듈 또는 저장 매체를 사용한다. 일부 실시예에서, 정보를 저장하기 위한 개시된 저장 매체는 CD-ROM, 컴퓨터 저장 장치, 예컨대 하드 디스크, 플래시 메모리와 같은, 비-일시적 컴퓨터-판독가능 매체를 포함한다. 또한, 다양한 실시예에서, 저장 매체 중 하나 이상은 다양한 모듈에 의해 실행되는 데이터 또는 컴퓨터 프로그램을 저장하거나, 본 명세서에 개시된 다양한 기술 또는 흐름도를 구현하는 비-일시적 컴퓨터-판독가능 매체이다.

[0109] 상기 상세한 설명은 첨부된 도면을 참조한다. 동일하거나 또는 유사한 참조 번호는 도면 또는 설명에서 동일 또는 유사한 부분을 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 유사하게 명명된 요소는 달리 명시되지 않는 한, 유사한 기능을 수행하고 유사하게 설계될 수 있다. 예시적인 실시예의 이해를 제공하기 위해 세부사항이 제시된다. 실시예, 예컨대, 대안적인 실시예는, 이러한 세부사항의 일부 없이도 실시될 수 있다. 다른 예에서, 잘 알려진 기술, 절차, 및 구성요소는 설명된 실시예를 모호하게 하는 것을 피하고자 상세하게 설명하지 않았다.

[0110] 실시예의 전술한 설명은 단지 예시의 의도로 제시되었다. 이는 빠짐없이 나타낸 것이 아니며 실시예를 개시된 정확한 형태로 제한하지 않는다. 몇몇 예시적인 실시예 및 특징이 설명되었지만, 실시예의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서, 수정, 개조, 및 다른 구현이 가능할 수 있다. 따라서, 명시적으로 달리 언급되지 않는 한, 설명은 하나 이상의 실시예에 관련된 것이고 전체로서 실시예를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 이는 개시가 특징이 "어느(a)," "그(the)," "한(one)," "하나 이상(one or more)," "일부(some)," 또는 "다양한(various)" 실시예와 관련된다고 언급하는지 아닌지 여부와 관계없이 사실이다. 본 명세서에서 사용된, 단수 형태 "어느(a)," "어느(an)," 및 "그(the)"는 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않는 한 복수 형태를 포함할 수 있다. 또한, 용어 "연결된(coupled)"은 두 연결된 항목 사이에 중간 요소의 존재를 배제하지 않는다. 또한, 특징이 존재할 수 있다는 언급은 그 특징이 하나 이상의 실시예에서 존재할 수 있음을 나타낸다.

[0111] 본 명세서에서, 용어 "포함하다(include)," "포함하다(comprise)," "함유하다(contain)," 및 "가지다(have),"가 세트 또는 시스템 뒤에 사용될 때, 개방형 포함(open inclusion)을 의미하고 세트에 대해 또는 시스템에 대해 비-열거된, 다른, 구성의 추가를 배제하지 않는다. 또한, 달리 언급하거나 문맥에서 달리 제하지 않는 한, 접속사 "또는(or),"이 사용될 경우, 이는 배타적이지 않고, 대신 의미 및/또는(and/or)을 포함한다. 또한, 이러한 용어가 사용되는 경우, 집합(set)의 부분집합(subset)은 집합의 구성원의 하나 또는 하나 초과를 포함하고, 전부를 포함할 수도 있다.

[0112] 개시된 시스템, 방법, 및 장치는 임의의 특정 양태 또는 특징 또는 이들의 조합(combination)에 제한되지 않으며, 개시된 시스템, 방법, 및 장치는 임의의 하나 이상의 특정 이점이 존재하거나 또는 문제가 해결될 것을 요구하지 않는다. 임의의 작동 이론은 설명을 용이하게 하기 위한 것이고, 개시된 시스템, 방법, 및 장치는 이러한 작동 이론에 제한되지 않는다.

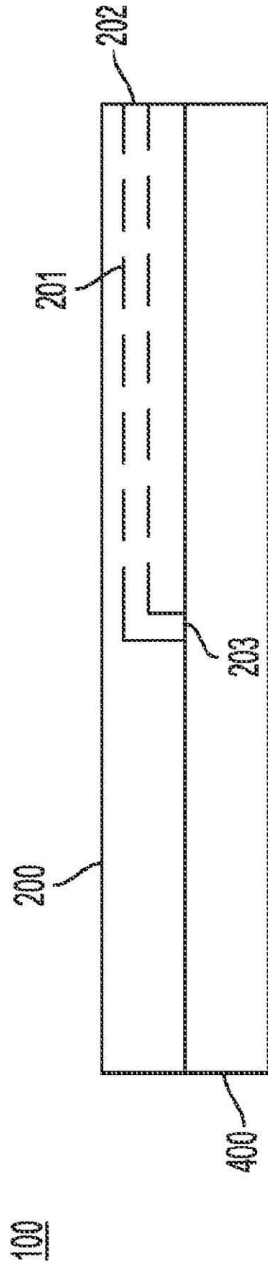
[0113] 수정 및 변형은 상기 교시에 비추어 가능하거나 실시예의 실시로부터 얻어질 수 있다. 예를 들어, 설명된 단계는 논의된 순서 또는 동일한 정도의 분리로 동일하게 수행될 필요가 없다. 마찬가지로, 동일하거나 유사한 목적을 이루기 위하여, 필요에 따라, 다양한 단계가 생략되거나, 반복되거나, 결합되거나, 또는 병렬로 수행될 수 있다. 유사하게, 설명된 시스템은 반드시 실시예에서 설명된 모든 부분을 포함할 필요 없으며, 또한 실시예에서 설명되지 않은 다른 부분을 포함할 수 있다. 따라서, 실시예는 상기-설명된 세부사항에 제한되지 않고, 대신 그들의 균등물의 전체 범위에 비추어 첨부된 청구범위에 의해 정의된다. 또한, 본 개시는 다양한 개시된 실시예, 단독으로 그리고 서로 간의 다양한 조합(combination) 및 하위-조합(sub-combination)의 모든 신규하고 그리고 비-자명한 특징 및 양태에 관한 것이다.

[0114] 본 개시가 특정 실시예에 관련하여 특히 설명되었지만, 많은 대안, 수정, 및 변형은 전술한 설명에 비추어 명백할 것이다. 따라서 첨부된 청구범위는 본 개시의 진정한 사상 및 범위 내에 속하는 임의의 이러한 대안, 수정,

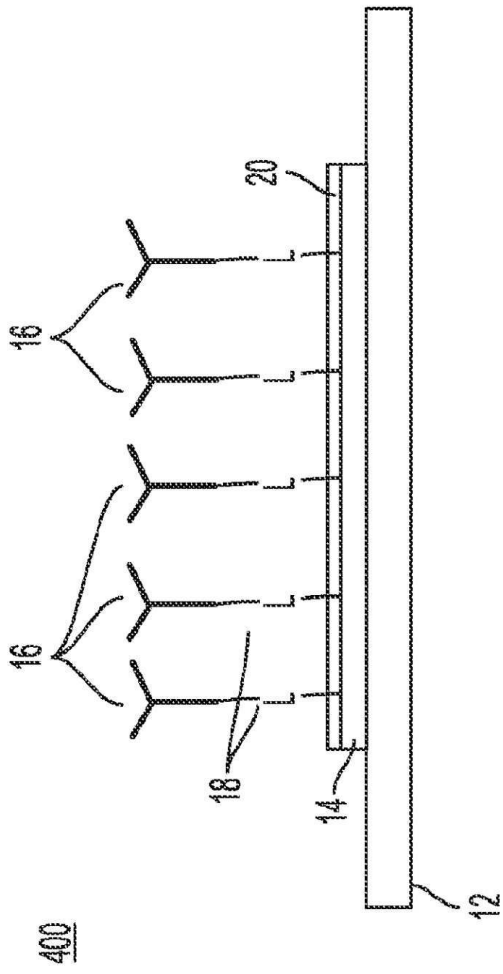
및 변형을 포함할 것으로 고려된다.

도면

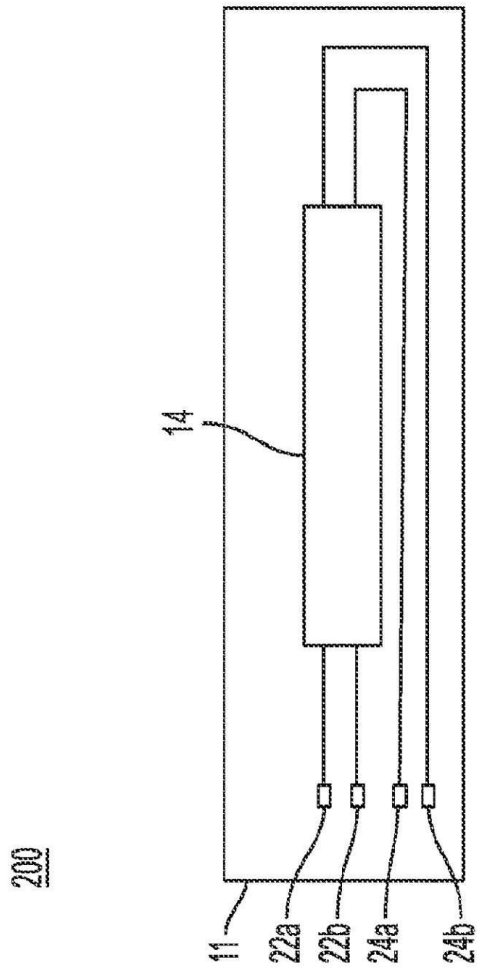
도면1a



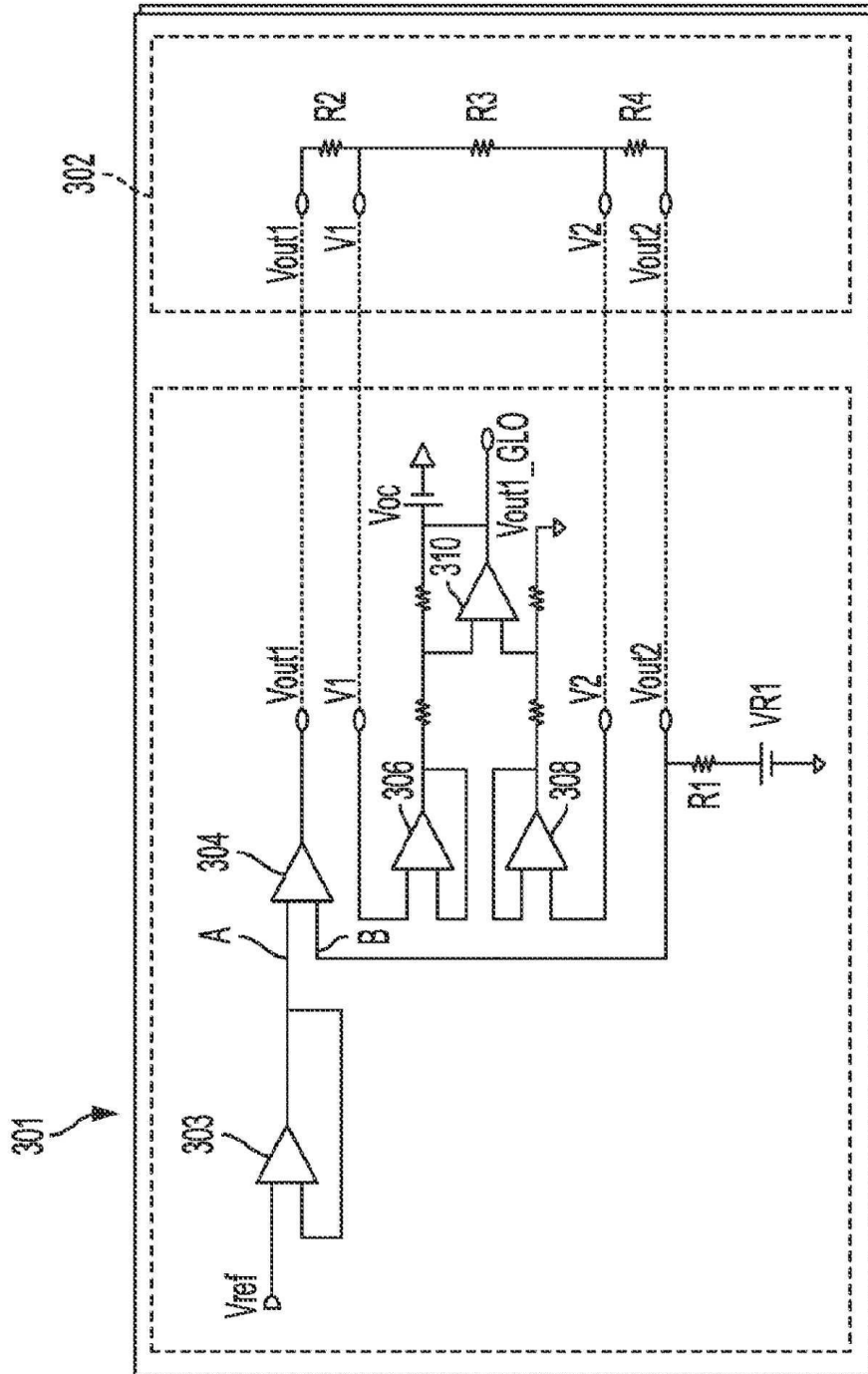
도면1b



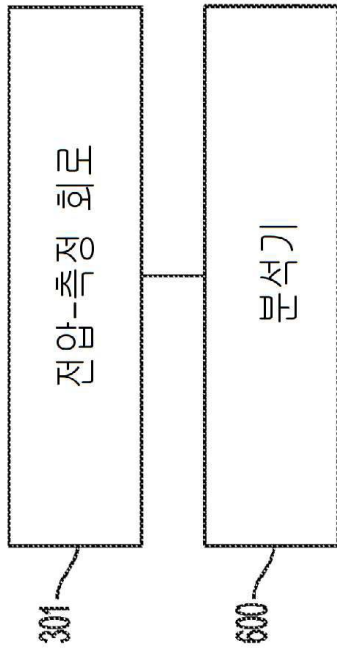
도면2



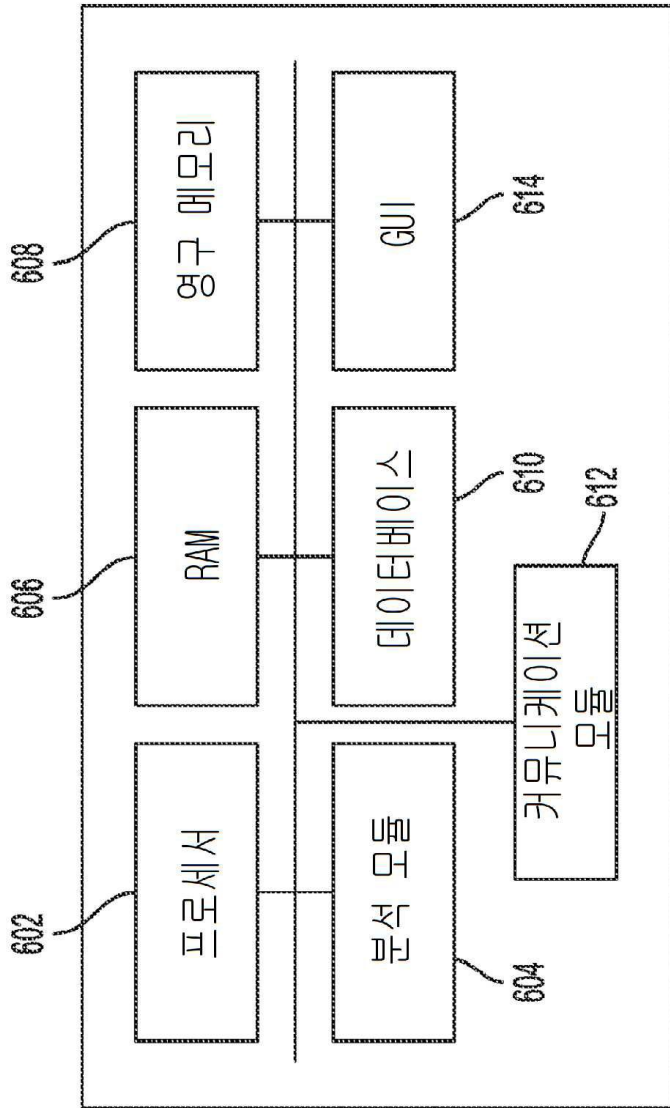
도면3a



도면3b



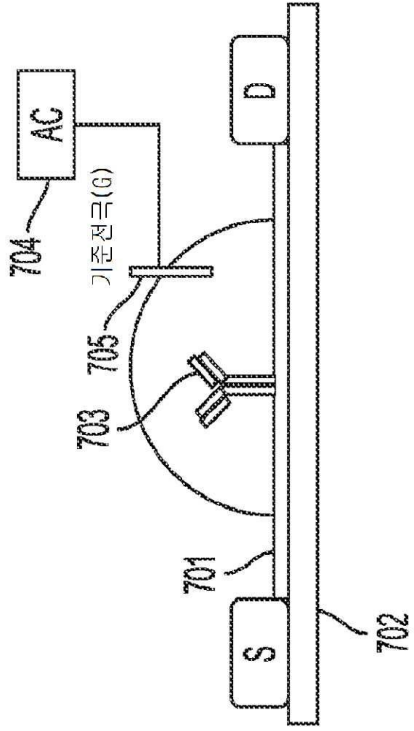
도면3c



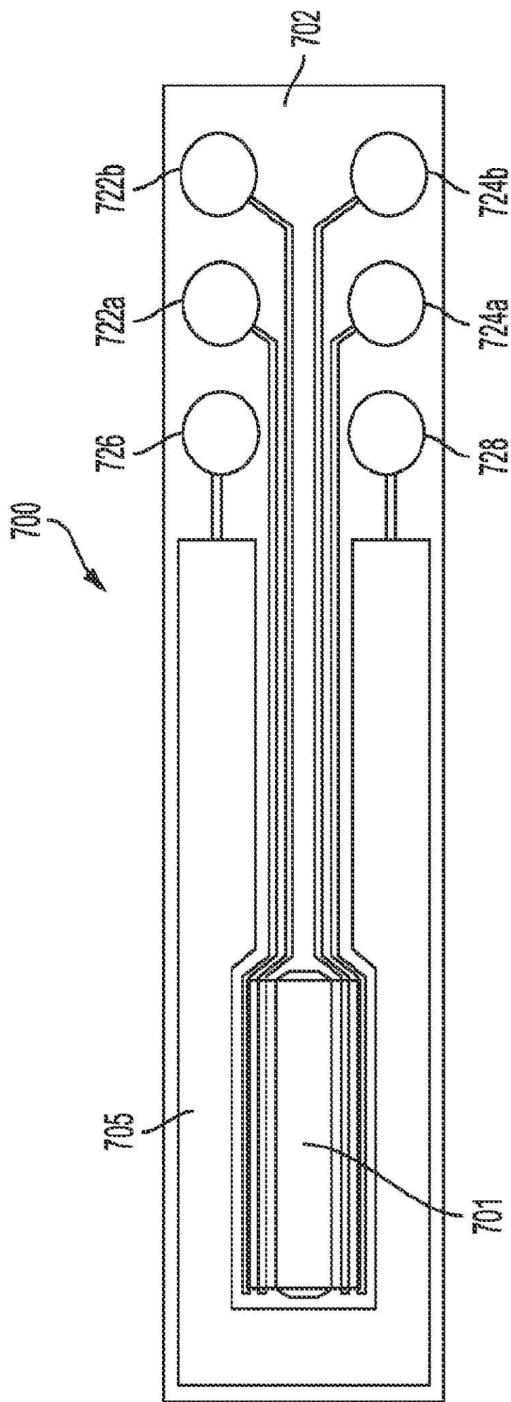
600

도면4

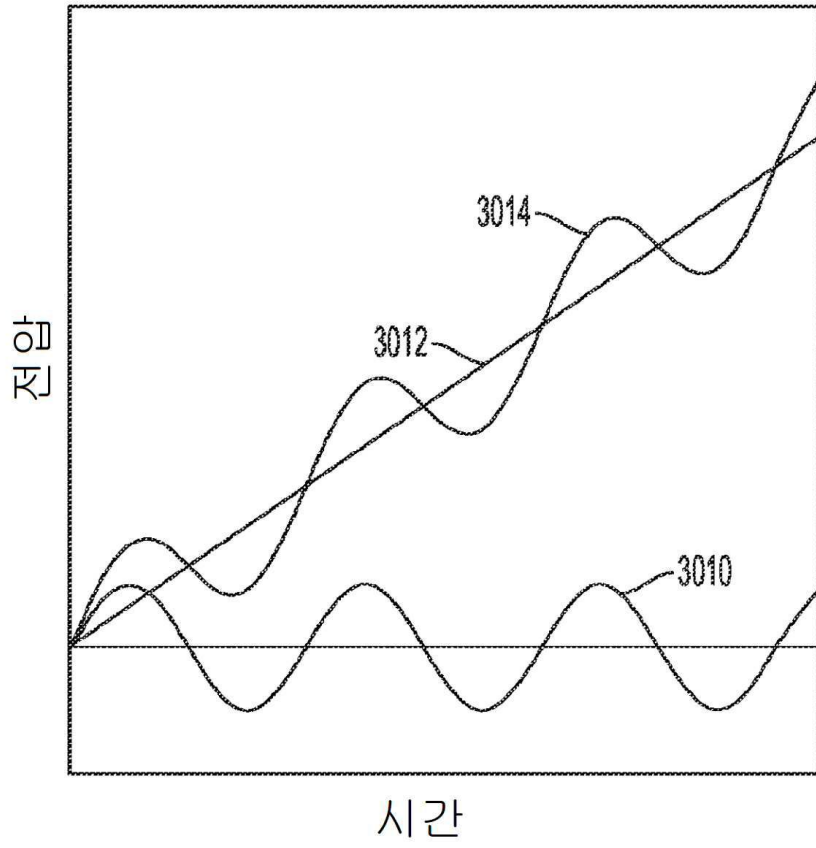
700



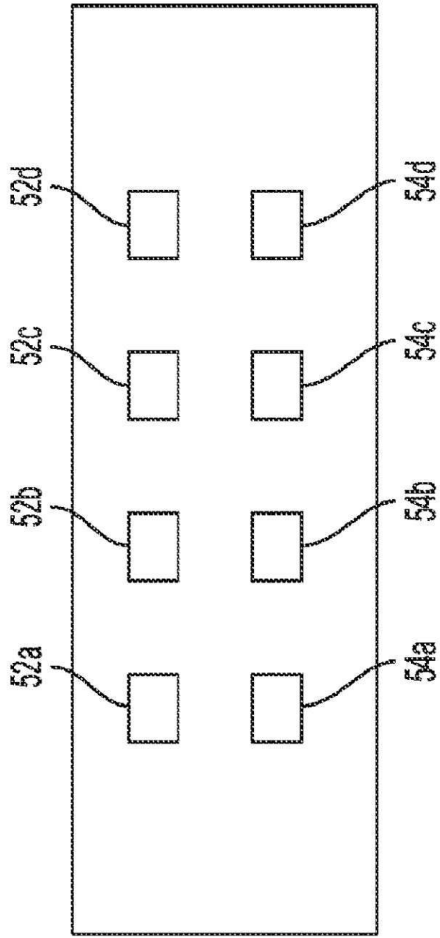
도면4b



도면4c

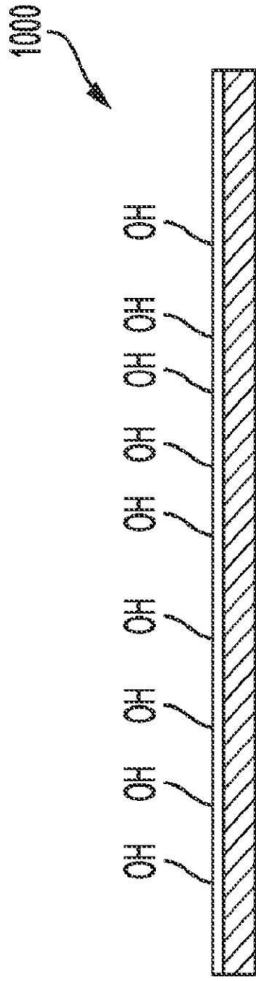


도면5

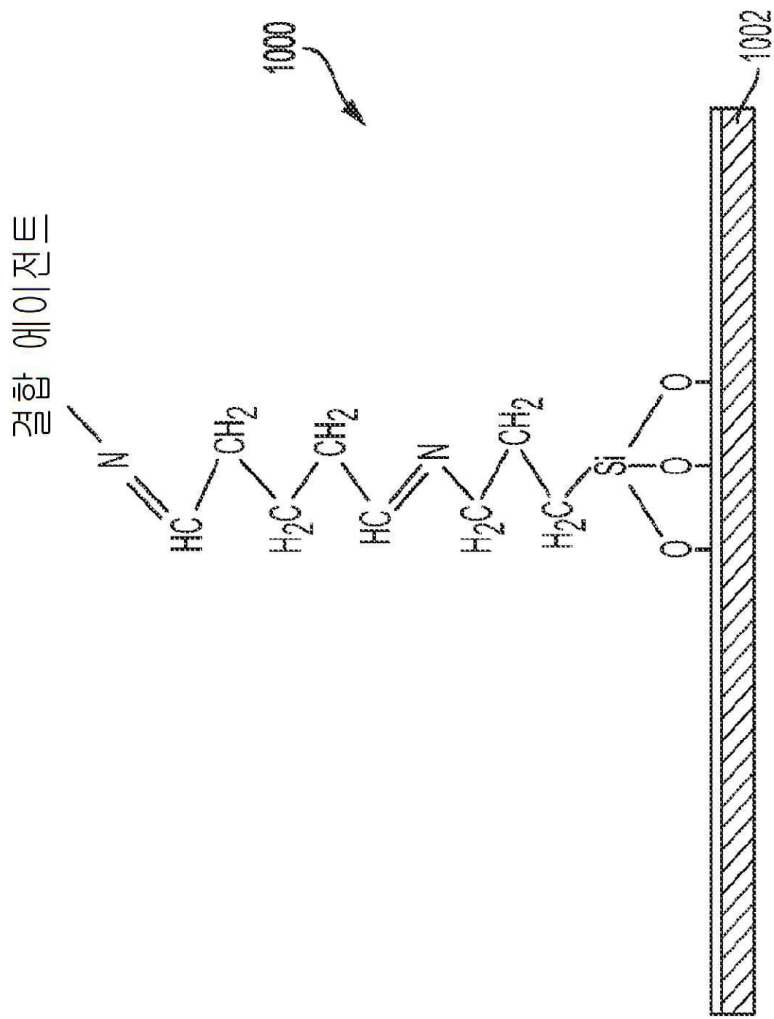


50

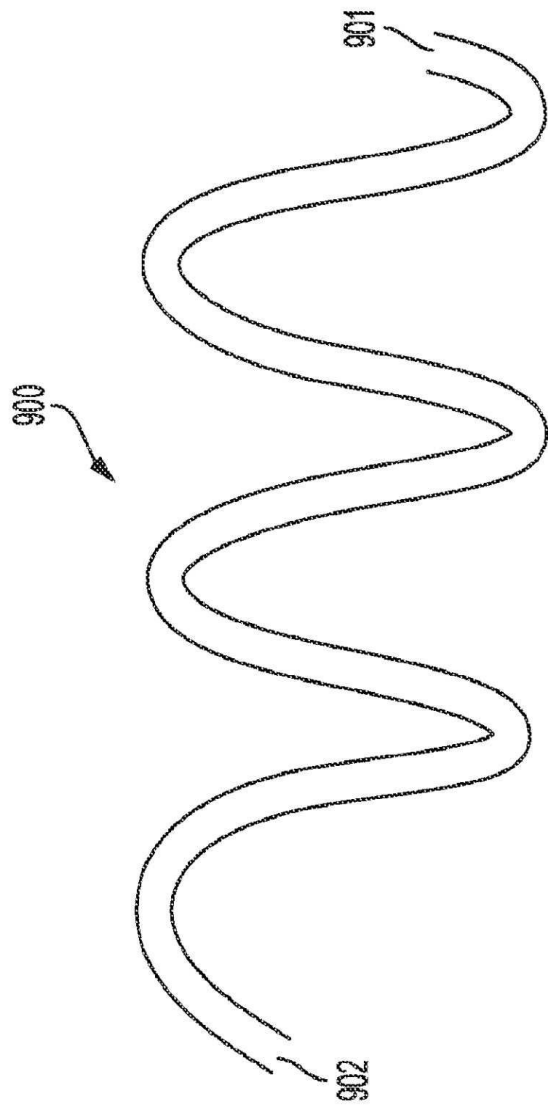
도면6a



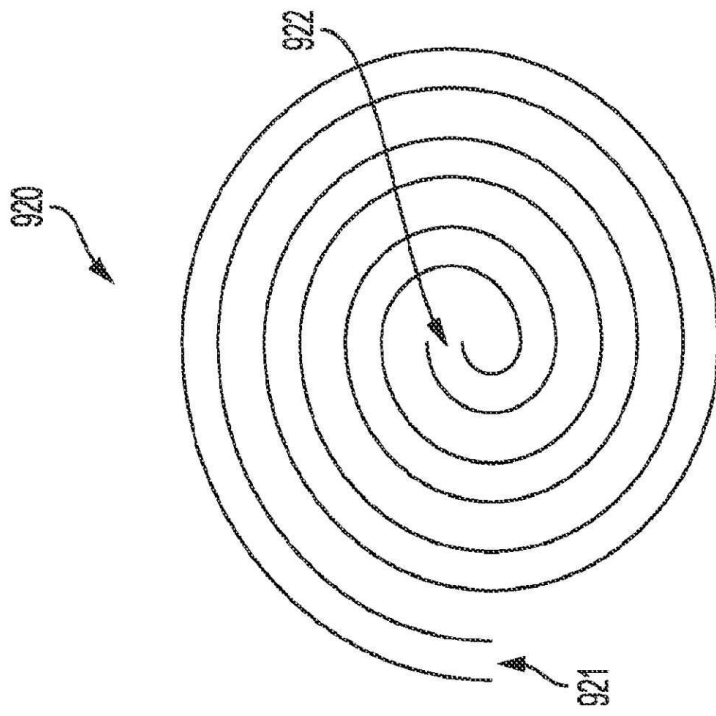
도면6b



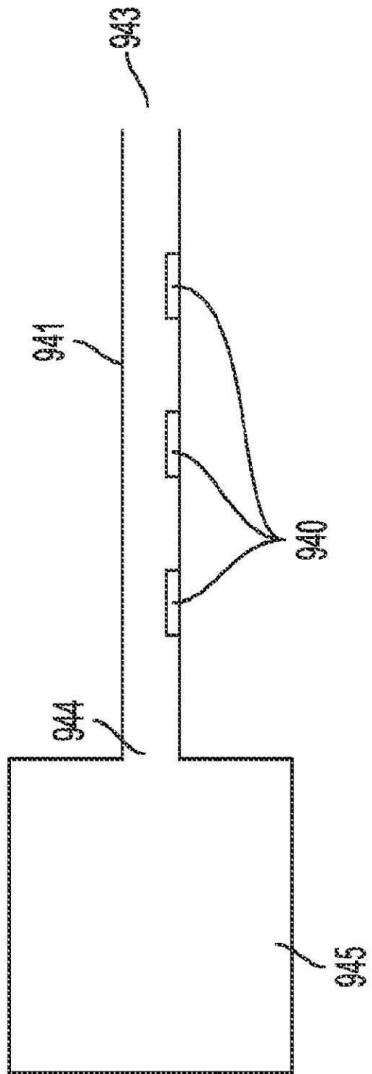
도면7a



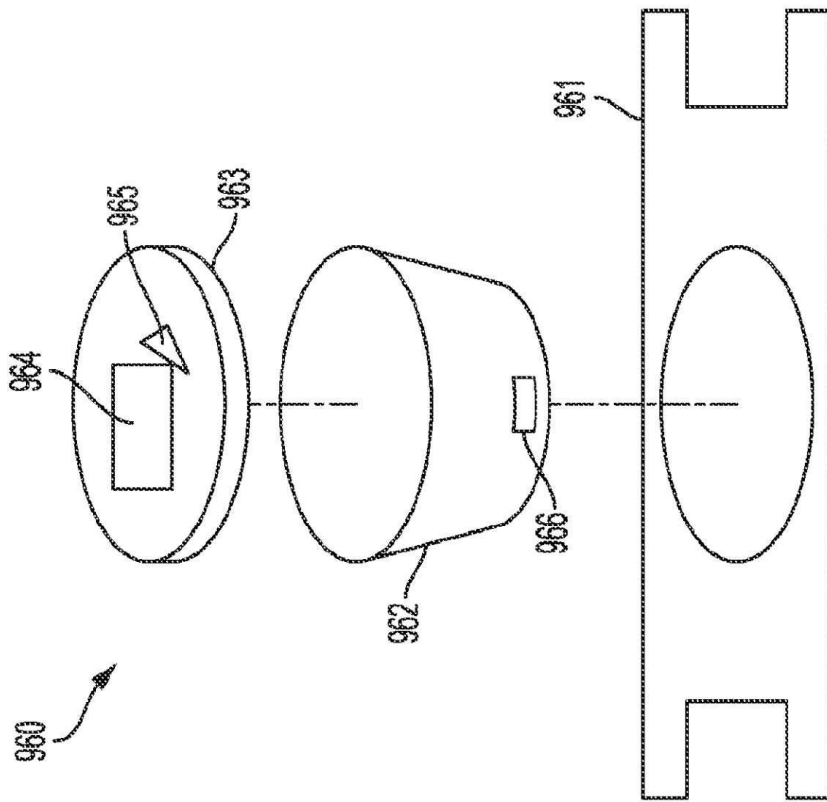
도면7b



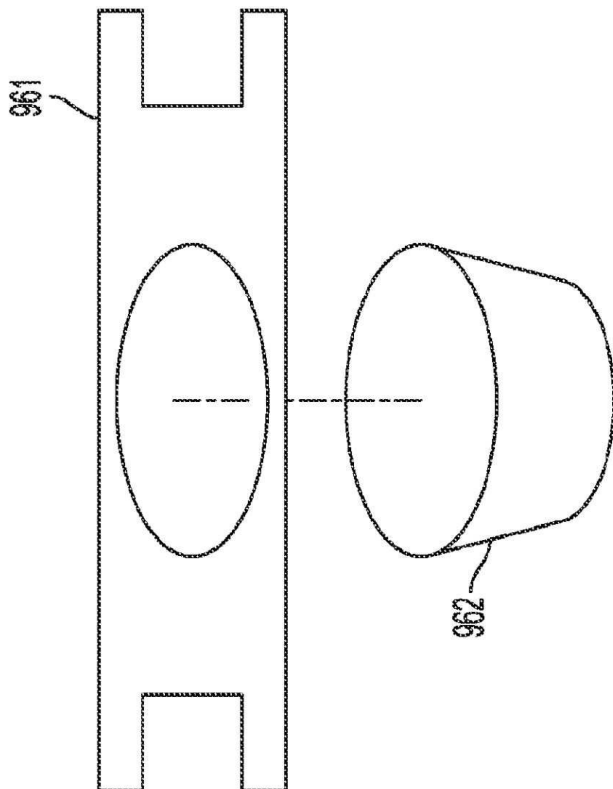
도면7c



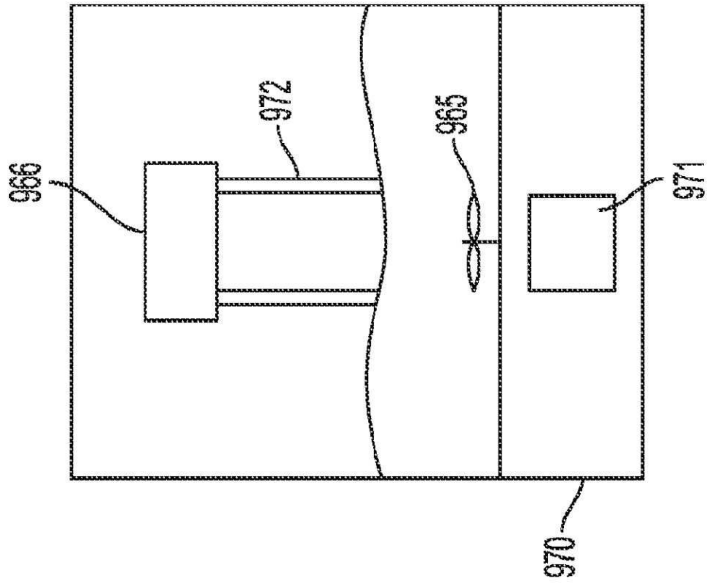
도면8a



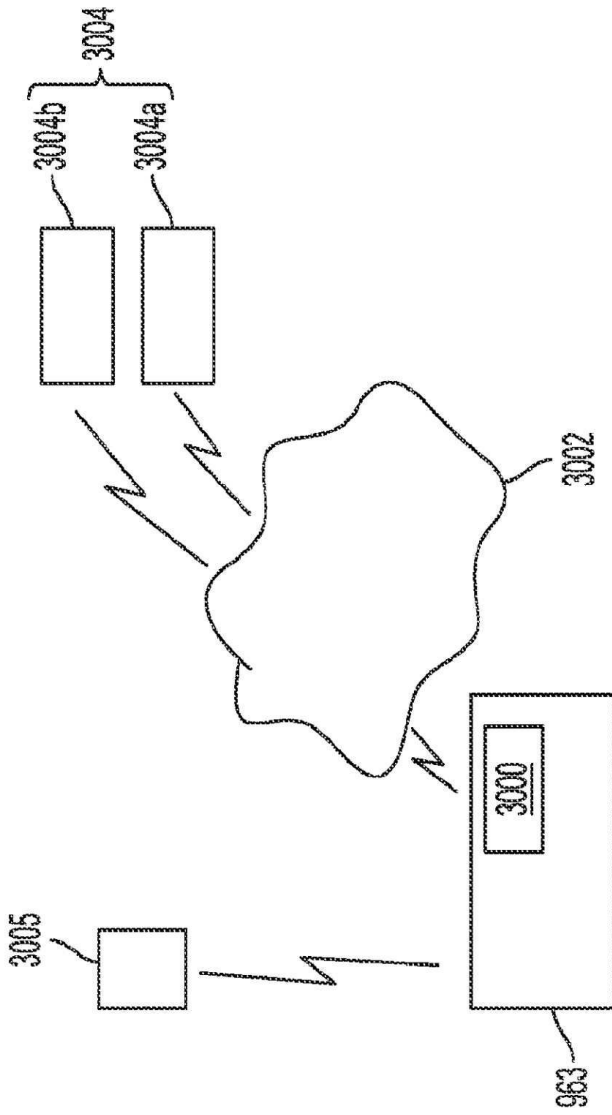
도면8b



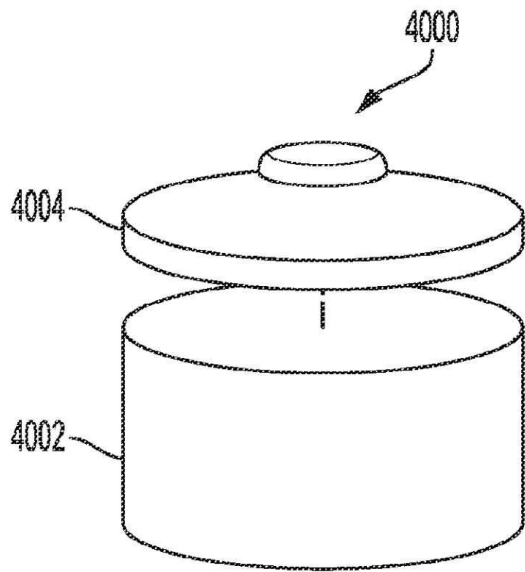
도면8c



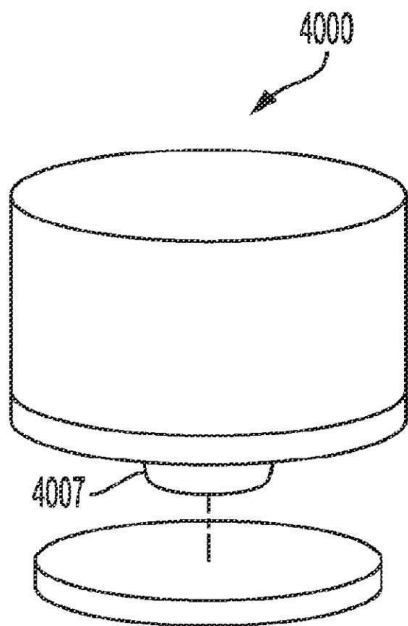
도면9



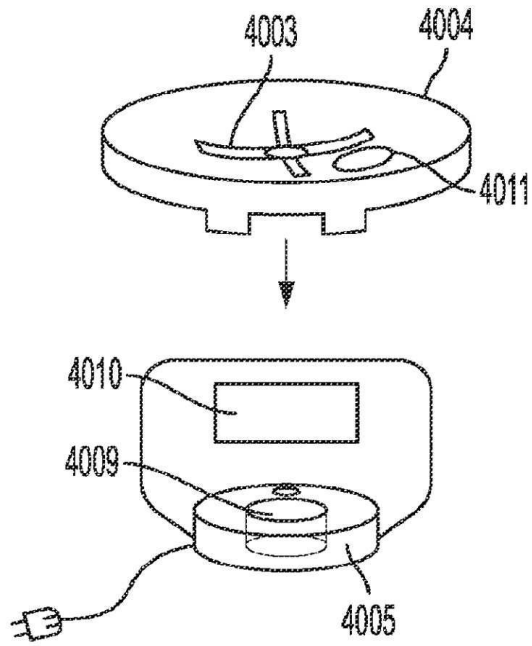
도면10a



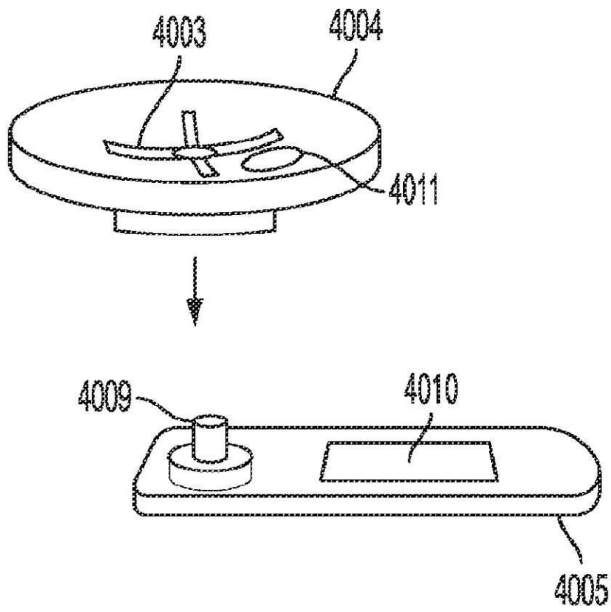
도면10b



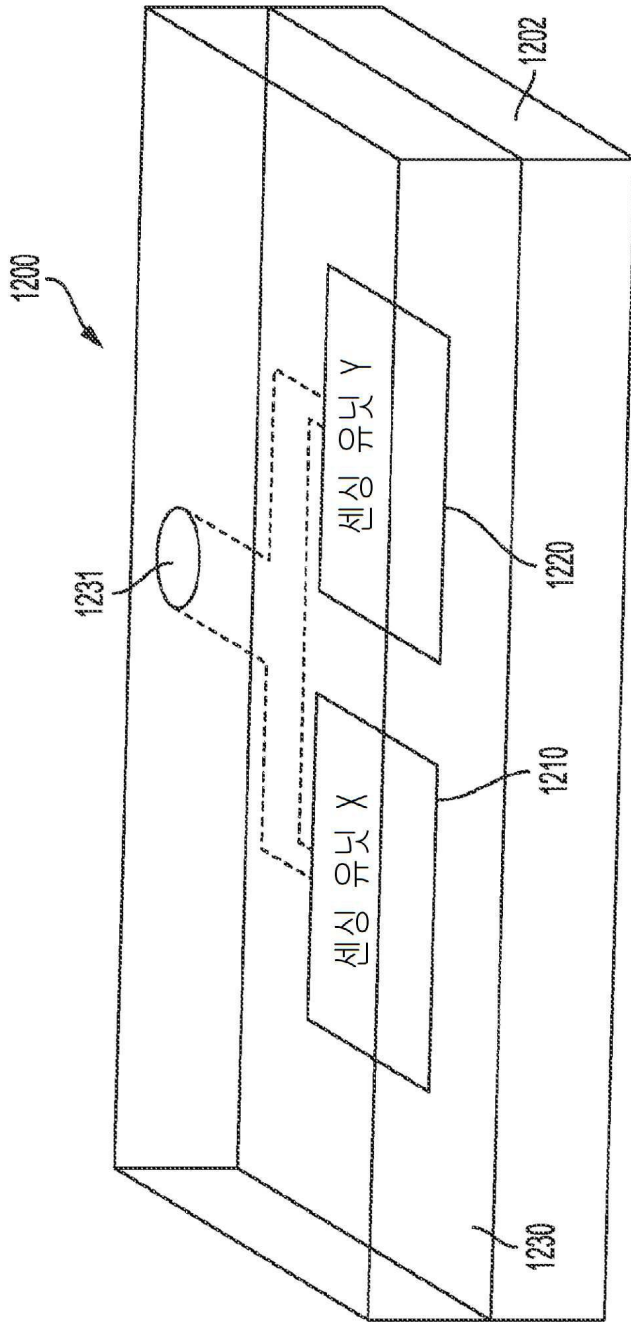
도면10c



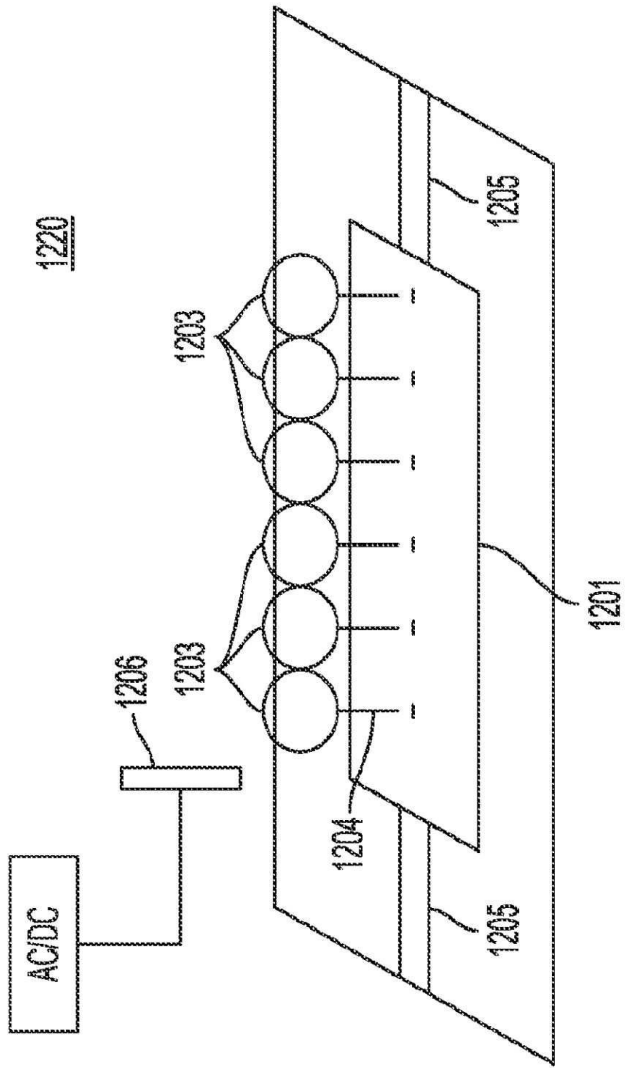
도면10d



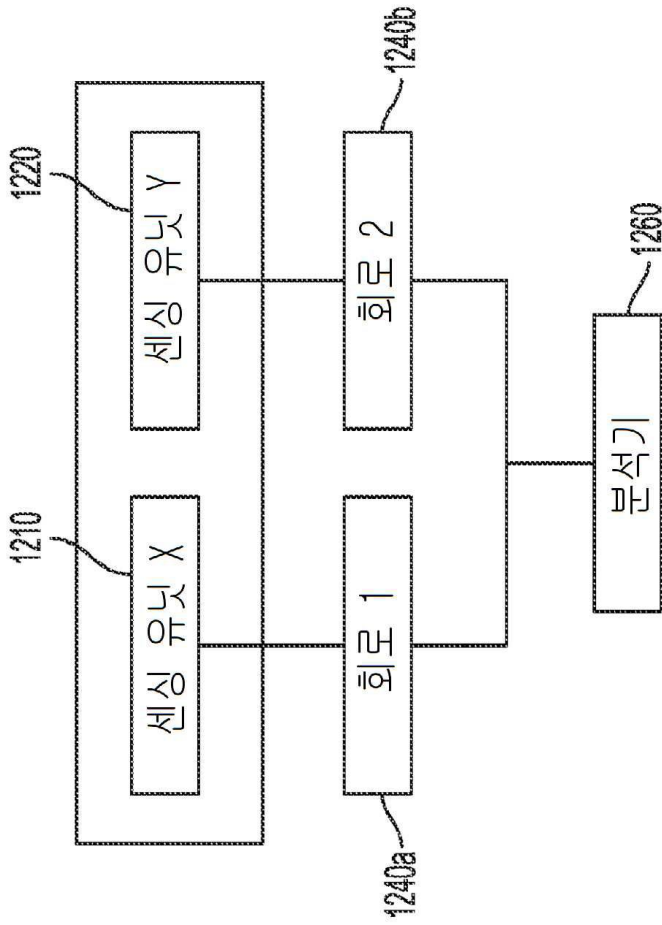
도면11



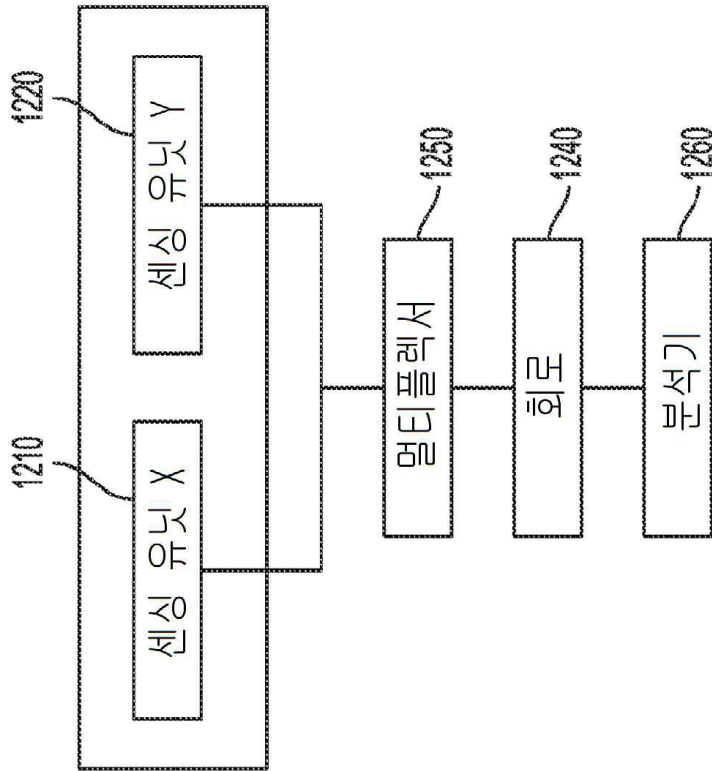
도면12



도면13



도면14



도면16

