

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 4월 5일 (05.04.2018)

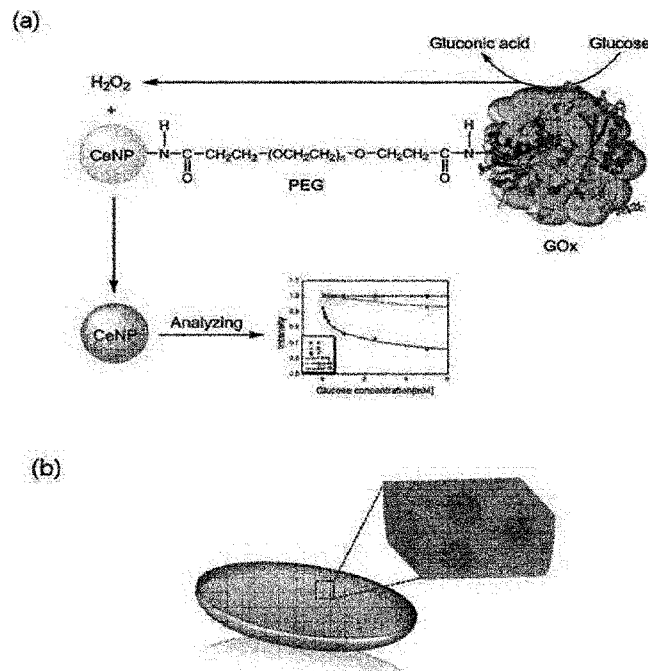


(10) 국제공개번호
WO 2018/062830 A1

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/64* (2006.01) *C12Q 1/54* (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/010680
- (22) 국제출원일: 2017년 9월 27일 (27.09.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0124660 2016년 9월 28일 (28.09.2016) KR
- (71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 04763 서울특별시 성동구 왕십리로 222 한양대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이동윤 (LEE, Dong Yun); 06000 서울시 강남구 압구정로 113, 28동 1701호(압구정동, 미성아파트), Seoul (KR). 배우리 (BAE, Woori); 04764 서울시 성동구 살곶이8길 22, 풀하우스 101호(행당동), Seoul (KR). 박시진 (PARK, Sijin); 07016 서울시 동작구 동작대로11나길 9, 201호(사당동), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11 광성빌딩 신관 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

(54) Title: GLUCOSE DETECTING COMPLEX AND CONTACT LENS-TYPE SENSOR COMPRISING SAME FOR DETECTING GLUCOSE IN TEARS

(54) 발명의 명칭: 포도당 검출용 복합체 및 이를 포함하는 눈물 내 포도당 검출을 위한 콘택트렌즈형 센서



(57) Abstract: The present invention relates to a glucose detecting complex and a contact lens-type sensor comprising the same for detecting glucose in tears. The contact lens-type sensor for detecting glucose according to the present invention includes a complex in which glucose oxidase is coupled to a cerium oxide nanoparticle. Such a configuration allows the visualization of changes in glucose concentrations and the quantitative measured of glucose in a simpler and more economical way. In addition, glucose concentrations can be monitored in real time through a non-invasive method by measuring the concentration of glucose in tears rather than in blood in comparison with the conventional blood glucose measurement method. Therefore, the present invention can be widely applied in the technical field for the early diagnosis and prevention of diabetes.

[다음 쪽 계속]



WO 2018/062830 A1



PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 포도당 검출용 복합체 및 이를 포함하는 눈물 내 포도당 검출을 위한 콘택트렌즈형 센서에 관한 것이다. 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서는, 산화세륨 나노입자에 포도당 산화효소가 결합된 복합체를 포함하며, 이러한 구성을 통해, 더욱 간단하고 경제적인 방법으로 포도당의 농도 변화를 시각화하고, 정량적으로 측정할 수 있다. 또한, 종래의 혈당 측정법과 비교하여, 혈액이 아닌, 눈물 내 포도당 농도를 측정함으로써, 비침습적인 방법으로 포도당의 농도를 실시간으로 모니터링할 수 있는바, 당뇨병의 조기 진단 및 예방을 위한 기술 분야에 폭넓게 적용될 수 있을 것이다.

명세서

발명의 명칭: 포도당 검출용 복합체 및 이를 포함하는 눈물 내 포도당 검출을 위한 콘택트렌즈형 센서

기술분야

- [1] 본 발명은 포도당 검출용 복합체 및 이를 포함하는 눈물 내 포도당 검출을 위한 콘택트렌즈형 센서에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 당뇨병은 세계적으로 19명 중의 1명이 걸리는 심각한 질병으로서, Credit Suisse Research Institute의 보고에 따르면, 전 세계적으로 약 4억 명에 달하는 환자들이 제2형 당뇨병으로 고통을 받고 있으며, 상기 환자들의 수는 점차 증가하고 있는 경향을 보인다. 우리나라의 경우에도 고령화의 진행, 식습관의 변화, 및 기대여명의 증가 등으로 당뇨병과 같은 만성 질환의 발병률이 많이 증가함에 따라 개인과 사회의 의료비 부담이 증대되고 있다. 이러한 당뇨병 및 이에 의한 합병증(예: 심근경색, 뇌졸중, 망막증, 신부전 등)을 예방 및 최소화하기 위한 방법의 하나로, 개인 스스로가 평소에 지속적으로 혈당 수치를 자가 모니터링할 수 있도록 하는 방법이 있으며, 실제로, 당뇨 환자들의 경우, 자신의 혈당 수치를 하루에도 몇 번씩 측정하면서 당뇨병에 따른 생체 변화를 모니터링하고 있다.
- [3] 종래의 방법으로, 손가락 끝을 바늘로 찔러 채취한 혈액을 혈당 측정기에 처리하는 측정방법이 있으나, 수차례 반복되는 불편함과 고통의 증가 때문에 자신의 건강 유지를 위해 필요함에도 불구하고, 널리 이용되고 있지 못하고 있는 실정이다. 즉, 당뇨병 환자들은 이러한 불편함을 내포하고 있는 UI/UX(user interface/user experience) 형태의 혈당 측정기에 대한 심한 거부감을 가지고 있는바, 생체 내 포도당을 손쉽게 검출할 수 있는 비침습적(non invasive), 연속적(continuous), 및 자가 진단 모니터링 기술(Self-monitoring)의 개발이 절실히 요구되고 있다.
- [4] 현재, 대다수의 포도당 측정을 위한 바이오센서는 포도당 산화효소를 포도당을 인식하는 물질로 사용하고 있다. 다만, 종래의 센서들은, 포도당의 농도를 산출하려는 방법으로서, 산소의 소모량, 과산화수소의 생산량 또는 pH 변화를 직접 측정하거나; 효소 반응으로 생성된 전기적 신호 변화를 cyclic voltammetry로 측정하거나; 및 생산물과 형광 물질의 2차 반응으로 인해 생기는 광학적 변화를 fluorescence resonance energy transfer(FRET)와 같은 방법으로 측정하는 하는 방법을 이용하고 있었는바, 부가적인 측정 장비를 필요로 한다는 단점이 존재하였다. 아울러, 최근 주목받고 있는 '스마트 콘택트렌즈' 기술에는, 대부분 potentiometry 또는 amperometry 기술이 적용되고 있어, 이러한 '스마트'한 기능을 구현하기 위한 각종 컨트롤 회로, 통신 회로, 안테나 등이 극소형화되어야 하는바, 상용화를 위해서는 이와 관련된 추가적인 기술의 개발이

요구되고 있다.

- [5] 이러한 배경하에서, 당뇨병 진단 및 예방의 일환으로서, 비침습적이면서도 더욱 간편한 혈당 또는 포도당 농도의 측정 기술에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나(한국 특허공개 번호 10-2008-0109328), 아직은 미비한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은, 산화세륨 나노입자에 포도당 산화효소를 결합시킨 복합체를 이용함으로써, 산화세륨의 발색 반응을 통해 포도당을 더욱 손쉽게 검출할 수 있었으며, 이러한 결과에 기반하여, 상기 복합체를 포함하는, 본 발명의 콘택트렌즈형 센서로 눈물 내 포도당을 측정할 결과, 눈물 내 포도당을 간단하고 비침습적으로 검출할 수 있음을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [7] 이에, 본 발명의 목적은, 포도당의 검출을 위한, 산화세륨(Cerium oxide, CeO_2) 나노입자 및 포도당 산화효소(Glucose oxidase)를 포함하는, 복합체를 제공하는데 있다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은, 눈물 내 포도당의 검출을 위한, 상기 복합체를 포함하는, 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서를 제공하는데 있다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 복합체의 포도당 검출을 위한 신규 용도를 제공하는데 있다.
- [10]
- [11] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 산화세륨 나노입자 및 포도당 산화효소를 포함하는, 포도당 검출용 복합체를 제공한다.
- [13] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 복합체는 산화세륨 나노입자, 생체적합성 고분자, 및 포도당 산화효소가 순차적으로 결합되어 있을 수 있으며, 상기 생체적합성 고분자는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol; PEG), 폴리(아크릴아마이드)(poly(acrylamide; PAM), 폴리(알릴아민)(poly(allylamine); PAL), 폴리(에틸렌이민)(poly(ethyleneimine; PEI), 폴리(아마이드아민)(poly(amidoamine); PAMAM), 폴리라이신(polylysine; PL), 폴리(락티드)(poly(lactide; PLA), 폴리(아크릴릭산)(poly(acrylic acid; PAA), 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)(poly(N-isopropylacrylamide; PNIPAM), 폴리(2-(디메틸-아미노)에틸 메타크릴레이트(poly(2-(dimethyl-amino)ethyl methacrylate; PDMAEMA), 폴리(카프로락톤)(poly(caprolactone; PCL),

키토산(chitosan), 폴리(N-비닐카프로락탐)(poly(N-vinylcaprolactam; PVCL), 덱스트란(dextran), 폴리(스티렌 설페이트)(poly(styrene sulfonate; PSS), 및 폴리(비닐설폰산)(poly(vinylsulfonic acid; PVSA)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 상기 산화세륨 나노입자, 생체적합성 고분자, 및 포도당 산화효소간 순차적인 결합은 공유결합, 보다 구체적으로, 아마이드 결합일 수 있다.

[14] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 산화세륨 나노입자의 농도는 복합체 전체의 부피에 대하여, 0.1 내지 0.6 w/v%일 수 있다.

[15] 또한, 본 발명은 상기 복합체를 포함하는 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서를 제공한다.

[16] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 복합체는 생체적합성 중합체에 포집(Entrapment)되어 있을 수 있다.

[17] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 생체적합성 중합체의 모노머는 2-하이드록시에틸 메타크릴레이트(2-Hydroxyethyl Methacrylate; HEMA), N-비닐 피롤리돈(N-vinyl pyrrolidone; NVP), 메타크릴레이트(Methacrylate; MMA), 메틸 메타크릴레이트(Methyl methacrylate; MMA), 및 비닐 피롤리돈(Vinyl pyrrolidone; VP)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[18] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 복합체는 콘택트렌즈형 센서 전체 부피에 대하여, 0.3 내지 2.5 중량%(w/v)로 포함될 수 있다.

[19] 또한, 본 발명은 상기 나노입자 복합체를 포함하는, 포도당 검출용 조성물; 포도당 검출을 위한 상기 복합체의 용도; 및 상기 복합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 포도당 검출방법을 제공한다.

[20] 또한, 본 발명은 포도당 검출을 위한 상기 콘택트렌즈형 센서의 용도; 및 상기 콘택트렌즈형 센서를 개체에 투여 또는 처리하는 단계를 포함하는, 포도당 검출방법을 제공한다.

발명의 효과

[21] 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서는, 산화세륨 나노입자에 포도당 산화효소가 결합된 복합체를 포함하며, 이러한 구성을 통해, 더욱 간단하고 경제적인 방법으로 포도당의 농도 변화를 시각화하고, 정량적으로 측정할 수 있다. 또한, 종래의 혈당 측정법과 비교하여, 혈액이 아닌, 눈물 내 포도당 농도를 측정함으로써, 비침습적인 방법으로 포도당의 농도를 실시간으로 모니터링할 수 있는바, 당뇨병의 조기 진단 및 예방을 위한 기술 분야에 폭넓게 적용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[22] 도 1은, 본 발명의 구체적인 구현예로서, (a) 포도당 검출용 복합체를 활용한 포도당 농도 검출 과정, 및 (b) 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 구성을 개략적으로 나타낸 도이다.

- [23] 도 2a는, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자에 아민기가 도입되는 과정($\text{CeO}_2\text{-NH}_2$)을 개략적으로 나타낸 것으로서, 하이드록시기를 아민기로 치환시키는 과정에서의 peak shifting을 XPS를 이용하여 확인한 결과이다.
- [24] 도 2b는, 산화세륨 나노입자와 PEG간 결합 여부를 ATR-FTIR spectroscopy를 이용하여 확인한 결과이다.
- [25] 도 3은, 본 발명에 따른 나노입자에 PEG가 도입되는 과정($\text{CeO}_2\text{-PEG-COOH}$)을 개략적으로 나타낸 것으로서, 산화세륨 나노입자와 PEG간 결합 여부를 ATR-FTIR spectroscopy를 이용하여 확인한 결과이다.
- [26] 도 4는, 본 발명에 따른 나노입자에 포도당 산화효소를 conjugation시키는 과정($\text{CeO}_2\text{-PEG-GOx}$)을 개략적으로 나타낸 것으로서, 포도당 산화효소의 conjugation 여부를 BCA assay를 이용하여 확인한 결과이다.
- [27] 도 5는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 복합체의 합성을 (a) Absorbance 스펙트라, 및 (b) SDS-PAGE를 통해 확인한 결과이다.
- [28] 도 6a는, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자의 물리적 특성을 확인한 것으로서, 산화세륨 나노입자의 크기와 구조를 HR-TEM를 이용하여 확인한 결과이다.
- [29] 도 6b는, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자의 물리적 특성을 확인한 것으로서, 산화세륨 나노입자의 크기와 구조를 DLS를 이용하여 확인한 결과이다.
- [30] 도 6c는, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자의 물리적 특성을 확인한 것으로서, 산화세륨 나노입자의 합성여부를 XRD를 이용하여 확인한 결과이다.
- [31] 도 6d는, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자의 물리적 특성을 확인한 것으로서, 산화세륨 나노입자의 합성여부를 XPS를 이용하여 확인한 결과이다.
- [32] 도 6e는, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자의 물리적 특성을 확인한 것으로서, 산화세륨 나노입자 내 세륨 이온의 활성도를 Absorbance 변화를 통해 확인한 결과이다.
- [33] 도 7은, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자(1 w/v%)를 다양한 농도(0, 0.5, 1, 2.5, 5mM)의 과산화수소와 반응시킨 후, 이에 대한 발색 반응을 육안으로 확인한 결과이다.
- [34] 도 8은, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자(1 w/v%)를 포도당 분해효소 및 다양한 농도(0, 0.5, 1, 2.5, 5mM)의 포도당과 반응시킨 후, 이에 대한 (a) 발색 반응을 육안으로 확인한 결과, 및 (b) 색상 강도 분석(B value)을 실시한 결과이다.
- [35] 도 9a는, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자(0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 w/v%)를 다양한 농도(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mM)의 과산화수소와 반응시킨 후, 이에 대한 발색 반응을 육안으로 확인한 결과이다.
- [36] 도 9b는, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자(0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 w/v%)를 다양한 농도(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mM)의 과산화수소와 반응시킨 후, 색상 강도 분석(RGB value)을 실시한 결과이다.
- [37] 도 10a는, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자(0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 w/v%)를 다양한 농도(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mM)의 포도당과 반응시킨 후, 이에 대한 발색

반응을 육안으로 확인한 결과이다.

- [38] 도 10b는, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자(0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 w/v%)를 다양한 농도(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mM)의 포도당과 반응시킨 후, 색상 강도 분석(RGB value)을 실시한 결과이다.
- [39] 도 11은, 본 발명에 따른 포도당 검출용 복합체를 다양한 농도(0, 0.25, 0.5, 1, 2.5mM)의 포도당과 반응시킨 후, 이에 대한 (a) 발색 반응을 육안으로 확인한 결과, 및 (b) 색상 강도 분석(RGB value)을 실시한 결과이다.
- [40] 도 12a는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 복합체 (0.1, 0.25, 0.5, 1 w/v%)를 다양한 농도(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6mM)의 포도당과 반응시킨 후, 이에 대한 발색 반응을 육안으로 확인한 결과이다.
- [41] 도 12b는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 복합체 (0.1, 0.25, 0.5, 1 w/v%)를 다양한 농도(0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6mM)의 포도당과 반응시킨 후, 이에 대한 색상 강도 분석(RGB value)을 실시한 결과이다.
- [42] 도 13은, 본 발명에 따른 포도당 검출용 복합체에 여러 종류의 Carbohydrate(Fructose, Galactose, Sucrose)를 처리한 후, 이에 따른 (a) 발색 반응을 육안으로 확인한 결과, 및 (b) 색상 강도 분석(RGB value)을 실시한 결과이다.
- [43] 도 14a는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서를 육안으로 확인한 결과이다.
- [44] 도 14b는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 탄성 변화를 pHEMA 콘택트렌즈와 비교한 결과이다.
- [45] 도 15a는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서에서, 건조 전의 지름 및 높이를 일반적인 pHEMA 콘택트렌즈와 비교한 결과이다.
- [46] 도 15b는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서에서, 건조 후의 지름 및 높이를 일반적인 pHEMA 콘택트렌즈와 비교한 결과이다.
- [47] 도 16은, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서에서, 포도당 검출용 복합체의 농도(1 또는 10w/v%)에 따른 탄성계수(Elastic modulus) 변화를 측정한 결과이다.
- [48] 도 17은, CeO₂-PEG-GOx 복합체의 함량(115, 230, 465, 930μg/lens)에 따른 콘택트렌즈형 센서의 투명도 변화를 (a) 육안으로 확인한 결과, 및 (b) 색상 강도 분석(RGB value)을 실시하여 비교한 결과이다.
- [49] 도 18은, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서를 버퍼 용액 내 다양한 농도 (1-10mM)의 포도당과 반응시킨 후, 이에 따른 발색 반응을 육안으로 확인한 결과 및 RGB 색상 강도 분석(B value)을 실시한 결과이다.
- [50] 도 19는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서를 인공눈물 내 다양한 농도 (0.2-2mM)의 포도당과 반응시킨 후, 이에 따른 발색 반응을 육안으로 확인한 결과 및 색상 강도 분석(B value)을 실시한 결과이다.
- [51] 도 20a는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서 내 포도당 검출용 복합체의 농도 (0.1, 0.25, 0.5, 1, 또는 2%(w/v))에 따른 포도당 농도별(0.01mM

- 내지 0.5mM) 센서의 색상 변화를 육안으로 확인한 결과이다.
- [52] 도 20b는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서 내 포도당 검출용 복합체의 농도 (0.1, 0.25, 0.5, 1, 또는 2%(w/v))에 따른 포도당 농도별(0.01mM 내지 0.5mM) 센서의 색상 변화를 정량적으로 분석한 결과 (B value)이다.
- [53] 도 21a는, 다양한 양의 포도당 검출용 복합체(115, 230, 465, 930 μ g/lens)를 포함하는 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서와 일정한 농도의 포도당(0.6mM)을 반응시킨 후, 시간의 경과에 따라 색상 변화를 육안으로 확인한 결과이다.
- [54] 도 21b는, 다양한 양의 포도당 검출용 복합체(115, 230, 465, 930 μ g/lens)를 포함하는 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서와 일정한 농도의 포도당(0.6mM)을 반응시킨 후, 시간의 경과에 따라 색상 강도 분석 (RGB value)을 실시한 결과이다.
- [55] 도 22a는, 포도당 검출용 복합체를 포함하는 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서와 다양한 농도의 포도당 (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 mM)을 버퍼 내에서 반응시킨 후, 시간의 경과에 따라 색상 변화를 육안으로 확인한 결과이다.
- [56] 도 22b는, 포도당 검출용 복합체를 포함하는 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서와 다양한 농도의 포도당 (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 mM)을 버퍼 내에서 반응시킨 후, 시간의 경과에 따라 색상 강도 분석 (RGB value)을 실시한 결과이다.
- [57] 도 23a는, 포도당 검출용 복합체를 포함하는 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서와 다양한 농도의 포도당 (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 mM)을 인공 눈물 내에서 반응시킨 후, 시간의 경과에 따라 색상 변화를 육안으로 확인한 결과이다.
- [58] 도 23b는, 포도당 검출용 복합체를 포함하는 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서와 다양한 농도의 포도당 (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 mM)을 인공 눈물 내에서 반응시킨 후, 시간의 경과에 따라 색상 강도 분석 (RGB value)을 실시한 결과이다.
- [59] 도 24는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서를 0.9% NaCl 용액에서 1개월 동안 보관한 후, UV-Vis spectrum을 이용하여 용액 내 산화세륨 나노입자를 확인한 결과이다.
- [60] 도 25a는, 다양한 농도의 포도당 검출용 복합체 (1-10000 μ g/ml)를 세포에 처리하고, 24시간 경과 후, 세포의 생존률을 확인한 결과이다.
- [61] 도 25b는, 다양한 농도의 포도당 검출용 복합체 (1-10000 μ g/ml)를 세포에 처리하고, 48시간 경과 후, 세포의 생존률을 확인한 결과이다.
- [62] 도 25c는, 다양한 농도의 포도당 검출용 복합체 (1-10000 μ g/ml)를 세포에 처리하고, 72시간 경과 후, 세포의 생존률을 확인한 결과이다.
- [63] 도 26a는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 세포 독성을 평가한 것으로서, 본 실시예에서 세포에 대한 상기 콘택트렌즈형 센서의 처리 방식을 개략적으로 나타낸 모식도이다.
- [64] 도 26b는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 세포 독성을 평가한 것으로서, 도 26a와 같은 처리에 따른 세포의 분포를 확인한 결과이다.

- [65] 도 26c는, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 세포 독성을 평가한 것으로서, 도 26a와 같은 처리에 따른 세포 생존률을 확인한 결과이다.
- [66] 도 27a는, 고혈당을 일시적으로 유도한 동물모델을 대상으로 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 발색 반응을 육안으로 확인한 결과이다.
- [67] 도 27b는, 고혈당을 일시적으로 유도한 동물모델을 대상으로 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 발색 반응에 대하여 색상 강도 분석(RGB value)을 실시한 결과이다.
- [68] 도 28a는, 고혈당을 일시적으로 유도한 동물모델을 대상으로, 눈물 내 포도당 농도 변화에 따라, 본 발명에 따른 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 발색 반응을 육안으로 확인한 결과이다.
- [69] 도 28b는, 고혈당을 일시적으로 유도한 동물모델을 대상으로, 측정된 색상 강도를 통해 눈물 내 포도당 농도를 분석한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [70] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.
- [71]
- [72] 본 발명은, 산화세륨 나노입자 및 포도당 산화효소를 포함하는, 포도당 검출용 복합체를 제공한다.
- [73] 본 발명에서 사용되는 포도당 산화효소는, 생체 내 포도당을 인식하는 물질로서, 포도당과의 반응으로 과산화수소(H_2O_2)를 생성하며, 생성된 과산화수소는 산화세륨의 발색 반응을 유도하는 역할을 한다.
- [74] 본 발명에서 사용되는 산화세륨 나노입자는, 검출된 포도당 또는 이의 농도를 시각화하는 물질로서, 상기 나노입자를 구성하는 세륨은 란타넘계의 희토류 원소이며, 산화수 3과 4를 순환하는 특성에 의해 가역적인 산화/환원이 가능하다. 특히, 과산화수소와 반응할 경우, Ce^{3+} 가 과산화수소로부터 생성되는 하이드록시 라디칼과 반응하여 Ce^{4+} 로 산화되고, 이에 따라 무색에서 노란색으로 변화한다. 본 발명의 복합체에서, 생체 내 포도당과 포도당 산화효소간 반응을 통해 과산화수소가 생성되며, 생성된 과산화수소는 산화세륨 나노입자의 색변화를 유도하게 되는바, 이러한 발색 반응을 통해 포도당을 검출할 수 있다.
- [75] 전술한 바와 같은 포도당 검출을 위하여, 상기 산화세륨 나노입자는 복합체 전체의 부피에 대하여, 0.1 내지 0.6 w/v%의 농도로 포함될 수 있다. 상기 범위를 벗어나 산화세륨 나노입자의 농도가 너무 낮으면, 발색 반응의 검출 자체가 어려울 수 있고, 산화세륨 나노입자의 농도가 너무 높으면, 포도당 농도에 따른 발색 반응의 차이를 명백히 구분할 수 없다는 문제가 야기될 수 있다. 특히, 본 발명의 복합체가 콘택트렌즈형 센서로 구현될 경우, 임상적으로 적용 및 활용 가능한 눈물 내 포도당 농도의 범위 (0.5-1.0mM)에서 발색 반응의 차이를 통해 눈물 내 포도당 농도를 측정할 수 있어야 한다는 점을 고려해 볼 때, 상기

산화세균 나노입자의 농도는 중요한 기술적 요소 중 하나이다.

- [76] 본 발명에서, 상기 산화세균 나노입자와 포도당 산화효소는 생체적합성 고분자와의 결합을 통해 연결될 수 있고, 상기 생체적합성 고분자는 바람직하게 생체 친화적인 특징이 있는 모노머의 단량체 또는 다량체 ($n=1$ 내지 30)일 수 있으며, 보다 바람직하게, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리(아크릴아마이드), 폴리(알릴아민), 폴리(에틸렌이민), 폴리(아마이드아민), 폴리라이신, 폴리(락티드), 폴리(아크릴릭산), 폴리(N-이소프로필아크릴아미이드), 폴리(2-(디메틸-아미노)에틸 메타크릴레이트, 폴리(카프로락톤), 키토산, 폴리(N-비닐카프로락탐), 텍스트란, 폴리(스티렌 설페이트), 또는 폴리(비닐설폰산), 가장 바람직하게, 폴리에틸렌 글리콜일 수 있으나, 말단의 작용기로, hydroxyl, carboxyl, amine group을 포함하는 고분자라면, 제한없이 포함될 수 있고, 필요에 따라 homofunctional 또는 heterofunctional polymer의 형태로 적용될 수 있다. 또한, 산화세균 나노입자, 생체적합성 고분자, 및 포도당 산화효소는 순차적으로 결합되어 있을 수 있으며, 상기 결합은 바람직하게 공유결합, 보다 바람직하게 아마이드 결합 (펩티드 결합)일 수 있으나, 단일의 복합체를 형성할 수 있는 결합이라면, 제한없이 포함될 수 있다.

[77]

- [78] 본 발명의 다른 양태로서, 상기 복합체를 포함하는, 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서를 제공한다.

- [79] 기존의 침습형 혈당 측정법은 환자에게 스트레스와 고통을 유발할 뿐만 아니라, 피부에 상처를 유발하고, 혈액을 통한 외부 감염 가능성을 지니고 있는바, 반복적인 포도당 측정을 해야 하는 당뇨병 환자들에게 적용함에 다소 무리가 있었으며, 다른 비침습적 측정 방법으로서, 땀이나 침을 이용한 포도당을 측정하는 방법이 있으나, 이는 오차의 범위가 커 정확한 측정이 어렵다는 단점이 존재하였다. 이에, 본 발명은 눈물 내 포도당 농도와 혈액의 포도당 농도간 밀접한 관련성이 있다는 사실에 기반을 두어 눈물 내 포도당을 검출할 수 있는 복합체를 포함하는, 콘택트렌즈형 센서를 제조하였다.

- [80] 본 발명에 따른 콘택트렌즈형 센서는 콘택트렌즈 본체 (기재); 및 상기 콘택트렌즈 본체 내부에 존재하는, 포도당 검출용 복합체를 포함하도록 마련될 수 있다.

- [81] 본 발명에 따른 콘택트렌즈형 센서는 안구에 직접 적용 가능한 물리적 특성 (ex. 탄성계수 등)을 가질 수 있도록 적절한 농도의 포도당 검출용 복합체를 포함하여야 하며, 상기 콘택트렌즈형 센서 내 포도당 검출용 복합체는, 당업계에 보편적으로 알려져 있는 렌즈를 기준으로 하여, 115 내지 930 μg 의 범위로 포함될 수 있고, 보다 구체적으로, 콘택트렌즈형 센서 전체 부피에 대하여, 0.3 내지 2.5 중량%(w/v)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 범위를 벗어나 포도당 검출용 복합체의 농도가 너무 낮으면, 포도당 검출을 위한 발색 반응이 미약할 수 있고, 포도당 검출용 복합체의 농도가 너무 높으면, 콘택트렌즈형

센서 자체가 노란색을 띄게 되어, 렌즈 본연의 기능에 악영향을 미칠 뿐만 아니라, 색상 강도 측정을 통한 포도당 농도의 측정에도 영향을 미칠 염려가 있다.

[82]

[83] 한편, 오늘날 연구 중에 있는 콘택트렌즈형 센서로는 크게 전류 측정을 위해 전극을 포함하는 형태, 포도당과의 반응에 의해 형광을 발하는 물질을 포함하는 형태가 있다. 다만, 이들은 포도당 측정을 위하여 부가적인 측정 장비를 필요로 한다는 단점이 존재하며, 특히, 전자의 경우, 극소형화된 형태의 각종 컨트롤 회로, 통신 회로, 안테나 등이 콘택트렌즈 내 삽입되어 있는바, 회로에서 발생하는 열에 의해 안구가 손상될 가능성이 있고, 후자의 경우에도, 포도당 측정을 위하여 외부의 광원을 안구에 직접 조사해야 하므로, 상기 조사된 광원에 의해 안구가 손상될 가능성이 존재하였다. 이에, 본 발명에 따른 콘택트렌즈형 센서는, 포도당과 특이적으로 반응할 수 있는 포도당 산화효소; 및 상기 반응을 통해 생성된 과산화수소에 의해 발색되는 산화세륨 나노입자를 포함하는, 복합체를 포함함으로써, 보다 간이하게 눈물 내 포도당을 검출하고자 하였다.

[84]

이 뿐만 아니라, 상기 콘택트렌즈형 센서 내 복합체는 생체적합성 중합체에 포집(Entrapment)되어 있는 형태로 제조 및 배치됨으로써, 안구에 미칠 수 있는 부작용을 최소화하고 포도당 검출 효율을 향상시키고자 하였다. 구체적으로, 합성한 복합체를 콘택트렌즈에 로딩하는 방법은 크게 세 가지로 분류될 수 있다; 1) 포집방법, 2) 콘택트렌즈 표면 작용기와 화학적 conjugation시키는 방법, 3) 리포솜과 같은 캐리어에 로딩하여 콘택트렌즈에 넣는 방법. 우선, 콘택트렌즈형 센서 표면의 작용기와 복합체를 직접 결합시키는 경우, 표면(평면) 상에서 결합이 이루어짐에 따라, 공간적 제약으로 인해 센서 내 다량의 복합체를 함유할 수 없고, 세포 독성을 야기할 우려가 있다. 또한, 캐리어를 이용하는 경우, 기질인 포도당이 콘택트렌즈형 센서 내 복합체와 반응하기 위하여, 콘택트렌즈를 구성하는 폴리머 및 캐리어 층을 통과하여야 하는 바, 반응성 감소의 우려가 존재하였다. 다만, 본 발명에서는 이들 중 포집방법을 사용함으로써, 로딩 과정에서 야기되는 복합체의 변형, 구체적으로, 작용기의 변형으로 인한 나노입자의 활성 변화를 최소화시키면서, 렌즈의 두께와 부피만큼의 복합체를 다량 함유할 수 있어 포도당 검출의 효율을 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라, 콘택트렌즈형 센서 내부에 복합체가 혼입되므로써, 상기 센서로부터 복합체가 재방출되지 않는 한, 세포 독성에 대한 우려가 거의 없다는 장점이 있다.

[85]

또한, 본 발명에 따른 콘택트렌즈형 센서는 당뇨 환자의 눈물 내 포도당 농도(0.5-1.0mM)를 포함하는 약 0.2 내지 2mM 농도 범위의 포도당 조건에서 유의적인 발색 반응을 보이며, 이러한 발색 반응은 포도당 농도와 선형비례 관계에 있음을 실험적으로 확인할 수 있었는바, 당업계에 공지되어 있는 색 분석 기술(예를 들어, RGB 색상 강도 분석)을 이용하여 포도당 농도에 대한 정량적인 검출이 가능하다는 장점이 있다(실시예 9 참고).

- [86] 상기 생체적합성 중합체의 모노머는 바람직하게, 2-하이드록시에틸 메타크릴레이트, N-비닐 피롤리돈, 메타크릴레이트, 메틸 메타크릴레이트 또는 비닐 피롤리돈일 수 있으나, 종래의 콘택트렌즈의 제조에 적용될 수 있는 모노머라면, 제한없이 포함될 수 있다.
- [87] 본 발명의 일 실시예에서는, 산화세륨 나노입자에 폴리에틸렌 글리콜 및 포도당 산화효소를 순차적으로 결합시켜 포도당 검출용 복합체를 제조하였으며, 상기 포도당 검출용 복합체는 포도당의 농도에 따라 발색되며, 이러한 발색의 강도는 포도당의 농도와 선형 비례 관계에 있음을 확인할 수 있었다(제조예 1 및 실시예 3 참고).
- [88] 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 포도당 검출용 복합체를 기반으로 하여, 눈물 내 포도당을 검출할 수 있는 콘택트렌즈형 센서를 제조하였고 상기과 마찬가지로, 산화세륨의 발색 반응을 통해 포도당 농도를 정량적으로 측정할 수 있었으며, 안구에 직접 적용될 수 있는 콘택트렌즈로서의 물리적 성질, 보관 안정성, 및 세포 독성여부 등 역시 우수함을 확인할 수 있었다(제조예 2, 및 실시예 4 내지 9 참고).
- [89] 이에, 본 발명은 상기 나노입자 복합체를 포함하는, 포도당 검출용 조성물; 포도당 검출을 위한 상기 복합체의 용도; 및 상기 복합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 포도당 검출방법을 제공한다.
- [90] 또한, 본 발명은 포도당 검출을 위한 상기 콘택트렌즈형 센서의 용도; 및 상기 콘택트렌즈형 센서를 개체에 투여 또는 처리하는 단계를 포함하는, 포도당 검출방법을 제공한다.
- [91] 본 발명에서, 상기의 처리에 의한 콘택트렌즈형 센서를 대상으로 색상 강도 분석을 실시하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 포도당 검출용 복합체 및 콘택트렌즈형 센서의 발색 반응과 포도당 농도는 선형비례 관계에 있음을 확인할 수 있었다. 따라서, 상계 단계에서는 이들간 관계식에 기초하여, 눈물 내 포도당 농도를 구체적으로 정량화하고, 궁극적으로 혈중 포도당 농도를 도출할 수 있다.
- [92] 본 발명에서, 상기 개체에 투여 또는 처리하는 단계는, 본 발명의 목적상, 개체의 안구에 상기 콘택트렌즈를 착용하는 형태로 실시할 수 있다.
- [93] 본 발명에서, "개체"는 당뇨와 같은 질병의 진단 및 모니터링을 위하여 포도당의 검출을 필요로 하는 대상을 의미하며, 보다 구체적으로 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [94]
- [95] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 (a) 생적합성 중합체의 모노머, 가교제 등을 포함하는 혼합 용액에 본 발명의 포도당 검출용 복합체를 첨가하는 단계; 및
- [96] (b) 상기 복합체가 첨가된 혼합 용액을 콘택트렌즈 형태의 몰드에 첨가하고 가교시키는 단계를 포함하는, 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 제조방법을

제공한다.

[97]

[98] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[99]

[100] **[제조예]**

[101] 제조예 1. 산화세륨 기반의 포도당 검출용 복합체의 제조

[102] 우선, $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1.736 g), NaOH (400mg), 및 증류수 (128 ml)를 실온에서 48시간 동안 교반기 내에서 교반시킨 후, 증류수로 불순물을 제거하여 산화세륨 나노입자(CeO_2 nanoparticle; CNP)를 수득하였다. 이후, 상기 산화세륨 나노입자 (250mg)를 NaOH (1M)에 용해시킨 후, epichlorohydrin과 NaOH (2M)를 첨가하여 8시간 동안 교반시킨 뒤 세척하였으며, 여기에 다시 30% NH_4OH 를 첨가하여 14시간 동안 교반시킨 뒤 세척함으로써, 산화세륨 나노입자에 아민기를 도입하였다($\text{CeO}_2\text{-NH}_2$; m.w. 150kDa). 이후, 아민기가 도입된 산화세륨 나노입자와 bifunctional PEG(NHS-PEG-COOH; m.w. 2kDa)를 1:4의 molar ratio로 버퍼에 첨가하였으며, 이를 60분간 동안 교반시킨 뒤 세척하여 PEG를 도입하였다($\text{CeO}_2\text{-PEG-COOH}$). 끝으로, PEG가 도입된 산화세륨 나노입자가 1mg/ml의 농도로 용해되어 있는 MES 버퍼(pH6)에 EDC(2mM), 및 NHS (5mM)을 첨가하고 실온에서 20분간 교반시켰으며, 이후, pH를 7.4로 맞춘 뒤, 포도당 산화효소 (GOx)를 첨가하고 1시간 동안 교반시킨 후, 증류수로 불순물을 제거하여 포도당 산화효소가 conjugation된, 산화세륨 기반의 포도당 검출용 복합체를 제조하였다(이하의 실시예에서는, 산화세륨 기반의 포도당 검출용 복합체를 포도당 검출용 복합체 또는 $\text{CeO}_2\text{-PEG-GOx}$ 복합체로 명명함.).

[103]

[104] 제조예 2. 눈물 내 포도당 검출을 위한 콘택트렌즈형 센서의 제조

[105] HEMA(Hydroxyethyl Methacrylate; 4ml)에 MAA(methacrylic acid, 34ul), EGDMA(Ethylene glycol dimethacrylate; 105 ul)를 용해시킨 뒤, 광개시제(photoinitiator)인 Darocure (17 ul)를 첨가하였다. 이후, 여기에 상기 제조예 1의 포도당 검출용 복합체($\text{CeO}_2\text{-PEG-GOx}$)를 첨가하고 Sonification을 실시하여 혼합 용액을 분산시켰다. 상기 용액을 콘택트렌즈 형상을 제조하기 위한 몰드에 주입하고, 30분 동안 UV polymerization(365nm 15 mW/cm²)을 실시한 뒤, 증류수와 NaCl(0.9 %)로 이를 간격으로 세척하여, 본 발명에 따른 눈물 내 포도당 검출을 위한 콘택트렌즈형 센서를 제조하였다(이하의 실시예에서는, 이를 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서 또는 콘택트렌즈형 센서로 명명함.). 상기 제조된 콘택트렌즈형 센서는 사용 전까지 NaCl(0.9%) 용액 내에서 냉장 보관하였다.

[106]

[107] [실시예]

[108] 실시예 1. 포도당 검출용 복합체 제조과정에서의 생성물 확인

[109] 상기 제조예 1의 포도당 검출용 복합체 제조과정은, 크게 1) 산화세륨 나노입자에 아민기를 도입하는 과정($\text{CeO}_2\text{-NH}_2$), 2) 상기 나노입자에 PEG를 도입하는 과정($\text{CeO}_2\text{-PEG-COOH}$), 3) 상기 PEG에 포도당 산화효소를 conjugation시키는 과정($\text{CeO}_2\text{-PEG-GOx}$)으로 이루어지며, 본 실시예에서는, 이러한 제조과정에서 각각의 생성물을 확인하고자 하였다. 구체적으로, 산화세륨 나노입자 표면의 하이드록시기를 아민기로 치환시키는 과정에서 peak shifting을 관찰하여 아민기가 도입된 산화세륨 나노입자의 합성 여부를, ATR-FTIR spectroscopy을 실시하여 산화세륨 나노입자와 PEG간 결합 여부를, 및 BCA assay를 통해 포도당 산화효소의 양을 측정하여 PEG와 포도당 산화효소간 conjugation 여부를 각각 확인하였다. 또한, 상기 제조예 1의 포도당 검출용 복합체의 합성 및 상기 복합체의 SDS-PAGE 결과 (lane 3)를 포도당 산화효소(lane 1 및 2)만 로딩한 경우, 또는 포도당 산화 효소와 나노복합체를 함께 로딩한 경우(lane 3)와 비교하여, 포도당 검출용 복합체의 순도(purity)를 평가하였다.

[110]

[111] 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이, 아민기로 치환시키는 과정에서, epichlorohydrin의 O peak가 543.9eV에서 533.9eV로 shifting되는 것을 통해 epichlorohydrin의 ring이 열리면서, 아민기가 형성됨을 알 수 있었고, $\text{CeO}_2\text{-PEG-COOH}$ 에서, CH_2 str(2900 cm^{-1}), CH_2 bend($1300\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$), 및 C-O str peak(1100 cm^{-1})를 통해 PEG와의 결합이 형성됨을 알 수 있었으며(도 2a 참고), IR을 통하여 CeO_2 와 PEG간 결합을 재차 확인하였는바(도 2b 참고), 아민기 또는 PEG가 도입된 산화세륨 나노입자의 합성을 확인할 수 있었다(도 3 참고). 또한, 도 4에 나타낸 바와 같이, $\text{CeO}_2\text{-PEG-GOx}$ 에서, 복합체 1mg/ml 당 약 $248.17\mu\text{g/ml}$ 농도의 포도당 산화효소를 검출함으로써, 충분한 양의 포도당 산화효소(Gox)가 PEG를 통해 산화세륨 나노입자에 conjugation됨을 확인할 수 있었다.

[112] 한편, 도 5에 나타낸 바와 같이, Absorbance 스펙트라를 통해 $\text{CeO}_2\text{-PEG-GOx}$ 복합체의 합성을 검증하였으며(도 5a 참고), 본 발명의 포도당 검출용 복합체는 응집 현상으로 인해 stacking gel의 웰에 전혀 로딩되지 않았을 뿐만 아니라, lane 1, 2 및 4의 밴드, 즉, 포도당 산화 효소를 나타내는 단백질 밴드가 전혀 검출되지 않았는바 (도 5b 참고), 상기 포도당 검출용 복합체의 높은 순도를 확인할 수 있었다.

[113]

[114] 실시예 2. 산화세륨 나노입자의 물리적 특성 및 발색 반응을 통한 포도당 검출능 확인

[115] 본 실시예에서는, 상기 제조예 1의 포도당 검출용 복합체의 주요 구성인 산화세륨 나노입자의 물리적 특징 및 이의 발색 반응성을 확인하였다.

[116]

[117] **2-1. 산화세륨 나노입자의 물리적 특성 확인**

[118] 상기 제조예 1에 따른 산화세륨 나노입자(CeO_2 nanoparticle)의 크기와 구조를 HR-TEM(High-resolution transmission electron microscopy), DLS(Dynamic light scattering), 및 XRD(X-ray diffraction, Reference; JCPDS 34-0394)를 이용하여 확인하였고, XPS(X-ray photoelectron spectroscopy)를 이용하여 산화세륨 나노입자의 이온 비율을 측정함으로써, 상기 나노입자의 합성을 재차 검증하였다. 이 뿐만 아니라, 과산화수소와의 반응에 의한 Absorbance 변화를 관찰하여 산화세륨 나노입자 내 세륨 이온의 활성화 변화, 즉, 3+에서 4+로의 변화 여부를 확인하였다.

[119]

[120] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 산화세륨 나노입자는 HR-TEM에서 나노입자 특유의 격자무늬(lattice structure)가 유지되어 있었고, 나노입자의 지름은 약 6 내지 7nm임을 확인할 수 있었다(도 6a 및 도 6b 참고). 또한, Reference 피크와 일치하는 peak가 검출되었고, O 1s, 및 Ce3d에서 각각 62.24%, 37.76%의 atomic percentage를 나타내었는바, 산화세륨 나노입자가 합성되었음을 알 수 있었으며(도 6c 및 도 6d 참고). 과산화 수소의 농도가 증가함에 따라(0, 0.5, 1, 2.5, 5 mM), 산화세륨 나노입자 내 Ce^{4+} 이 증가됨을 확인함으로써, 나노입자 형성에도 불구하고, 산화세륨 자체의 활성이 유지되고 있음을 알 수 있었다(도 6e 참고).

[121]

[122] **2-2. 산화세륨 나노입자의 발색 반응을 통한 포도당 검출능 확인**

[123] 우선, 다양한 농도(0, 0.5, 1, 2.5, 5mM)의 과산화수소에서, 1w/v%의 산화세륨 나노입자와의 반응에 따른 발색 반응을 확인하였으며, 이에 기초하여, 상기 나노입자가 포도당으로부터 발생된 과산화수소에 대해서도 상기와 마찬가지로 발색 반응이 일어날 수 있는지 확인하고자 하였다. 구체적으로, 1 w/v% 산화세륨 나노입자를 100 U/ml 농도의 포도당 산화효소(GOx)와 섞은 뒤, 다양한 농도의 포도당(0, 0.5, 1, 2.5, 5mM)을 첨가하여 약 2분 동안 반응시킨 후, 산화세륨 나노입자의 발색 반응을 확인하였으며, RGB 색상 강도 분석(B value)을 실시하여, 산화세륨 나노입자의 색상 강도와 포도당 농도간 관계를 확인하였다.

[124] 아울러, 다양한 농도의 산화세륨 나노입자 (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 w/v%)에 대하여 과산화수소 또는 포도당 농도 변화 (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mM)에 따른 RGB 색상 강도 분석(RGB value)을 실시하여, 색상 강도에 따라 포도당 농도를 정량적으로 분석할 수 있는 산화세륨 나노입자의 농도를 도출하였다.

[125]

[126] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 산화세륨 나노입자는 약 0.5mM 이상의 과산화수소 농도를 처리하는 즉시 발색되었다. 또한, 포도당 산화효소에 의한 포도당 분해 과정에서 발생하는 과산화수소에 대해서도, 도

8에 나타낸 바와 같이, 산화세륨 나노입자가 충분히 발색됨을 확인할 수 있었으며(도 8a 참고), 이러한 색상 강도는 B value에 있어서, 포도당 농도와 높은 연관성 (선형 비례 관계; $R^2 = 0.98$)을 나타내었다(도 8b 참고). 즉, 산화세륨 나노입자의 발색 반응을 통해 포도당 산화효소의 산물을 정량적으로 측정할 수 있음을 알 수 있었고, 이는 궁극적으로 포도당의 농도를 효과적으로 검출할 수 있음을 나타내는 것이다.

[127] 또한, 도 9 및 도 10에 나타낸 바와 같이, 상기의 결과와 마찬가지로, 과산화수소 또는 포도당 농도 변화에 따라 산화세륨 나노입자의 색상 강도 변화 (RGB value)를 확인할 수 있었고, 특히, 산화세륨 나노입자의 농도가 0.5w/v% 이하인 경우, 포도당 농도에 따른 색상 강도의 차이가 현저하였다.

[128]

[129] 실시예 3. 포도당 검출용 복합체의 발색 반응 확인

[130] 본 실시예에서는, 상기 실시예 2-2와 마찬가지로, 포도당의 농도에 따라 CeO_2 -PEG-GOx 복합체가 발색되는지 확인하고자 하였다. 구체적으로, 상기 복합체를 다양한 농도(0, 0.25, 0.5, 1, 2.5mM)의 포도당과 반응시킨 후, 이에 따른 발색 반응의 확인 및 RGB 색상 강도 분석 (B value 또는 RGB value)을 실시하였다. 아울러, 포도당에 대한 선택적 반응성을 확인하기 위하여, 여러 종류의 Carbohydrate(Fructose, Galactose, Sucrose)를 CeO_2 -PEG-Gox 복합체에 처리한 뒤, 각각에 대한 RGB 색상 강도 분석(RGB value)을 실시하였다.

[131]

[132] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, CeO_2 -PEG-GOx 복합체는 다양한 농도의 포도당 (0, 0.25, 0.5, 0.25mM)과 반응하여 발색되었고, 상기과 마찬가지로, 발색 강도 (B value)는 포도당 농도와 선형 비례 관계($R^2 = 0.97$)에 있음을 알 수 있었다. 또한, 도 12에 나타낸 바와 같이, RGB value로 측정한 경우에도, CeO_2 -PEG-GOx 복합체는 다양한 농도의 포도당 (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6mM)에 대하여 유의적인 색상 강도의 차이를 나타내었다.

[133] 또한, 도 13에 나타낸 바와 같이, CeO_2 -PEG-GOx 복합체의 색상 강도의 유의적인 변화는 오직 포도당을 처리한 군에서만 관찰되었는바, 포도당에 대한 높은 선택성을 확인할 수 있었다. 이로부터, 본 발명에 따른 CeO_2 -PEG-GOx 복합체는 정량적이고 특이적인 포도당 검출에 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

[134]

[135] 실시예 4. 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 물리적 특성 확인

[136] 본 실시예에서는, 상기 제조예 2의 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 물리적 특성을 확인하고자 하였다. 우선, 1w/v%의 CeO_2 -PEG-GOx 복합체를 포함하는, 콘택트렌즈형 센서의 외관을 육안으로 관찰하였으며, 이들의 평형 수분함량(Equilibrium water content; EWC)을 하기 식 1을 통해 산출하였다.

[137]

[138] [수학식 1]

[139] $W_s - W_d / W_s \cdot 100 = \text{Equilibrium water content (EWC)}$

[140] (W_s : 건조 전 수분 함량, W_d : 건조 후 수분 함량)

[141]

[142] 또한, 일반적인 pHEMA 콘택트렌즈와 본 발명에 따른 콘택트렌즈형 센서간, 건조 전 또는 후의 지름 및 높이를 비교하여 구조적 변화를 확인하였으며, CeO_2 -PEG-GOx 복합체의 농도 (1 또는 10w/v%)에 따른 탄성계수(Elastic modulus) 변화를 측정함으로써, 안구에 직접 적용 가능한 적절한 물리적 특성을 지닌, 콘택트렌즈형 센서 내 CeO_2 -PEG-GOx 복합체의 농도를 도출하고자 하였다.

[143]

[144] 그 결과, 도 14 및 도 15에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 콘택트렌즈형 센서는 CeO_2 -PEG-GOx 복합체를 함유함으로써, 약간 반투명하였으나, 몰드에 의해 형성된 콘택트렌즈 형상 또는 탄성을 여전히 유지하고 있었으며(도 14 (a) 및 14 (b) 참고), 이의 평형 수분함량은 38.2%로서, 일반적인 pHEMA 콘택트렌즈의 EWC 범위인 38-40% 내에 해당함을 알 수 있었다. 또한, 콘택트렌즈는 물을 포함하기 때문에 건조 전, 후에 지름과 높이의 변화가 발생하나, pHEMA 콘택트렌즈와 본 발명의 콘택트렌즈형 센서간에는 차이가 거의 없었는바(도 15 참고), 상기 결과를 통하여, CeO_2 -PEG-GOx 복합체를 포함할지라도 콘택트렌즈의 구조적인 차이는 거의 발생하지 않음을 확인할 수 있었다.

[145] 아울러, 도 16에 나타낸 바와 같이, 1w/v% CeO_2 -PEG-GOx 복합체를 포함하는 콘택트렌즈형 센서의 경우, pHEMA 콘택트렌즈에 비해, elastic modulus가 약간 감소됨으로써 착용감을 증가시키고, mechanically-induced ocular complication을 감소시킬 수 있을 것으로 유추할 수 있었던 반면, 10w/v% CeO_2 -PEG-GOx 복합체를 포함하는 콘택트렌즈형 센서의 경우에는, 지나치게 많은 복합체를 포함함에 따라 elastic modulus가 pHEMA 콘택트렌즈에 비해 크게 증가됨을 확인할 수 있었는바, 상기 결과로부터, 1 w/v% CeO_2 -PEG-GOx 복합체를 포함하는 콘택트렌즈형 센서가 안구에 직접 적용 가능한 콘택트렌즈로서, 적절한 물리적 특성을 지니고 있음을 알 수 있었다.

[146] 또한, CeO_2 -PEG-GOx 복합체의 함량 (115, 230, 465, 930 $\mu\text{g}/\text{lens}$)에 따른 콘택트렌즈형 센서의 변화를 관찰한 결과, 도 17에 나타낸 바와 같이, 복합체의 함량이 증가함에 따라 렌즈의 투명도가 감소함을 확인할 수 있었는바, 콘택트렌즈형 센서에 적용함에 있어, 적절한 양의 CeO_2 -PEG-GOx 복합체가 포함되어야 함을 알 수 있었다.

[147]

[148] 실시예 5. 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 발색 반응 확인

[149] 본 실시예에서는, 포도당의 농도에 따라 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서가 발색되는지 확인하고자 하였다. 우선, 버퍼 용액 속에서 다양한 농도(1-10mM)의 포도당을 상기 콘택트렌즈형 센서와 반응시킨 경우, 이에 따른 발색 반응의 확인 및 RGB 색상 강도 분석을 실시하였다. 또한, 이와 마찬가지로, 인공눈물

조건에서 다양한 농도(0.2-2mM)의 포도당을 상기와 동일하게 반응시킨 후, 발색 반응의 확인 및 RGB 색상 강도 분석 (B value)을 실시하였으며, 한편, 인공눈물은 방부제를 함유하고 있지 않은 아이미루 콘택트 퓨어 점안액(CJ, Korea)을 이용하였다.

[150]

[151] 그 결과, 도 18 및 도 19에 나타낸 바와 같이, 버퍼 또는 인공눈물 조건 모두에서, 포도당의 농도가 증가함에 따라, 발색의 정도가 증가됨을 확인할 수 있었으며, 포도당 농도와 색상 강도간의 관계는 모두 선형 비례 관계(버퍼; $R^2=0.98$, 인공눈물; $R^2=0.96$)에 있음을 확인할 수 있었다. 특히, 정상인의 눈물 내 포도당 농도는 약 0.1-0.4mM, 당뇨 환자의 눈물 내 포도당 농도는 약 0.5-1.0mM라는 점을 고려해 볼 때, 인공눈물 조건에서 정량적인 발색 반응을 통해 약 0.2 내지 2mM 농도의 범위의 포도당까지 검출할 수 있다는 점은, 당뇨 환자 또는 당뇨 의심 환자를 대상으로 하는 포도당 검출 또는 당뇨 진단에 유용하게 활용될 수 있음을 시사한다.

[152]

[153] 실시예 6. 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서 내 복합체의 농도에 따른 검출 효능 확인

[154] 본 실시예에서는, 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서 내 포도당 검출용 복합체에 대한 최적의 농도를 도출하고자 하였다. 구체적으로 0.1, 0.25, 0.5, 1, 또는 2%(w/v)의 포도당 검출용 복합체가 포함된 콘택트렌즈형 센서를 제조한 후, 다양한 농도(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5mM)의 포도당에 대한 이들의 색상 변화를 관찰하였다.

[155] 또한, 다양한 양의 CeO_2 -PEG-GOx 복합체(115, 230, 465, 930 $\mu\text{g}/\text{lens}$)를 포함하는 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서와 일정한 농도의 포도당(0.6mM)간 반응에 따른 센서의 색상 강도 변화 (RGB value)를 시간의 경과에 따라 관찰하였고, 뒤이어, 버퍼 또는 인공 눈물 내 포도당 농도 변화에 따른 센서의 색상 강도 변화 (RGB value)를 시간의 경과에 따라 관찰하였다.

[156]

[157] 그 결과, 도 20에 나타낸 바와 같이, 0.01mM 내지 0.5mM의 포도당 농도 하에서, 농도에 의존하여 콘택트렌즈형 센서의 색상이 무색에서 노란색으로 변화하였으며, 콘택트렌즈 전 부분에 고르게 발색됨을 확인할 수 있었다. 또한, 포도당 농도에 따른 발색 차이가 뚜렷할수록 보다 정확한 측정이 가능하다는 점을 고려해 볼 때, 콘택트렌즈형 센서 내 포도당 복합체의 농도는 적어도 0.5%(w/v) 이상 포함되어야 함을 알 수 있었다.

[158]

또한, 도 21에 나타낸 바와 같이, 일정한 농도의 포도당과 반응하는 경우, CeO_2 -PEG-GOx 복합체가 250 내지 1000 $\mu\text{g}/\text{lens}$ 함량의 범위 내에서 일정한 색상 강도를 나타내었으며, 도 22 및 도 23에 나타낸 바와 같이, 버퍼 또는 인공 눈물 모두에서, 포도당 농도 변화에 상응하여 본 발명에 따른 콘택트렌즈형 센서의

색상 강도가 변화함을 확인할 수 있었다.

[159]

[160] 실시예 7. 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 안정성 확인

[161] 본 실시예에서는, 장기간 보관 가능성을 확인하기 위하여 용액 내에서의 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 안정성을 확인하고자 하였다. 상기 콘택트렌즈형 센서를 0.9% NaCl 용액에서 1개월 동안 보관한 후, 이들의 구조 변화를 육안으로 관찰하였을 뿐만 아니라, UV-Vis spectrum 분석을 통해 용액 내 산화세륨 나노입자의 존재 여부를 확인하였다.

[162]

[163] 그 결과, 도 24에 나타낸 바와 같이, 1개월이 경과한 후에도 콘택트렌즈형 센서의 구조가 그대로 유지되어 있었으며, 산화세륨을 나타내는 245nm의 peak가 관찰되지 않았는바, 용액 내로 산화세륨 나노입자의 방출이 없었음을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 콘택트렌즈형 센서는 장기간 용액 내에서 보관할 수 있는 우수한 안정성을 지니고 있음을 알 수 있었다.

[164]

[165] 실시예 8. 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 세포 독성 실험

[166] 본 실시예에서는, 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 독성을 평가하고자, HUVECs(Human Umbilical Vein Endothelial Cells)를 대상으로 Cell Counting Kit-8(CCK-8)을 이용하여 세포 독성을 평가하였다. 우선, 다양한 농도의 CeO_2 -PEG-GOx 복합체 (1-10000 $\mu\text{g/ml}$)를 세포에 24시간, 48시간 및 72시간 처리한 뒤, 이들 각각에 대한 세포 생존률을 평가하였다. 또한, 1%(w/v)의 포도당 검출용 복합체가 포함된 콘택트렌즈형 센서를 지름 5mm로 자른 뒤, (A) 이를 세포와 함께 24시간 동안 배양한 경우; (B) 상기 콘택트렌즈형 센서를 24-well insert plate의 insert에 넣고 세포와 함께 24시간 동안 배양한 경우; (C) 별도의 배지에 상기 콘택트렌즈형 센서를 배양한 후, 이를 세포가 포함된 배지에 첨가한 경우 각각에 대한 세포 독성을 평가하였다 (도 26 (a) 참고). 비교군으로 상기 센서를 처리하지 않은 군, 및 포도당 검출용 복합체가 첨가되지 않은 HEMA contact lens를 처리한 군을 이용하였다.

[167]

[168] 그 결과, 도 25에 나타낸 바와 같이, CeO_2 -PEG-GOx 복합체의 농도가 20 $\mu\text{g/ml}$ 이하인 경우, 시간의 경과에도 불구하고 유의적인 세포 생존률 감소가 확인되지 않았다. 또한, 도 26에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서와 세포를 함께 배양한 경우, 비교군들에 비해 생존 세포 수의 유의적인 감소는 나타나지 않았으며, 그 밖의 다른 경우에도 상기와 마찬가지로, 유의적인 세포 독성은 관찰되지 않았다. 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 콘택트렌즈형 센서는 우수한 생체 적합성을 지니고 있음을 알 수 있었다.

[169]

[170] 실시예 9. 동물모델을 이용한 포도당 검출 및 정량화

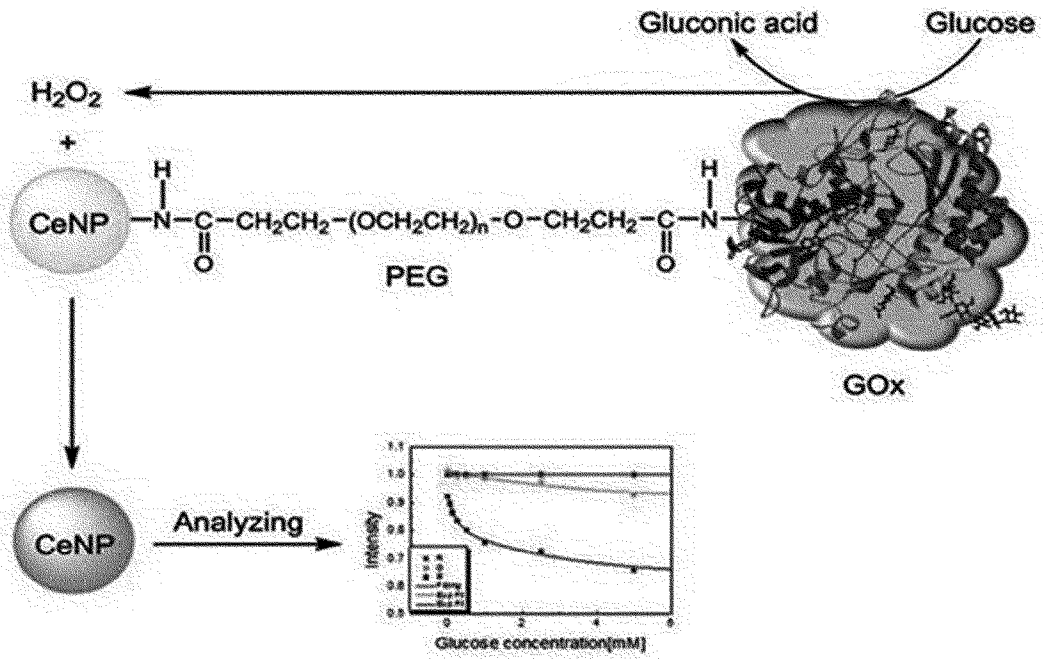
- [171] 본 실시예에서는, 고혈당을 일시적으로 유도한 동물모델 (토끼)을 대상으로, 본 발명의 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 발색 반응을 확인하고, 이러한 결과들을 바탕으로 포도당 농도를 정량화하였다. 구체적으로, 상기 동물모델의 안구에 콘택트렌즈형 센서를 30분 동안 끼운 뒤 제거하였으며, 상기 콘택트형 센서를 대상으로 RGB 색상 강도 분석 (RGB value)을 실시하였다.
- [172]
- [173] 그 결과, 도 27에 나타낸 바와 같이, 30분 경과 후 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서의 투명도가 현저하게 감소함을 알 수 있었으며, 색상 강도의 유의적인 변화를 확인할 수 있었다. 또한, 도 28에 나타낸 바와 같이, 눈물 내 포도당 농도와 색상 강도간 관계를 정의한 기존의 식을 바탕으로, 정규화된 RGB value로부터 눈물 내 포도당 농도를 추정할 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 콘택트렌즈형 센서는 체내 포도당 농도를 비침습적이면서 효과적인 방법으로 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 색상 강도 분석을 통해 체내 포도당 농도에 대한 정량적 데이터를 제공할 수 있을 것이다.
- [174]
- [175] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

청구범위

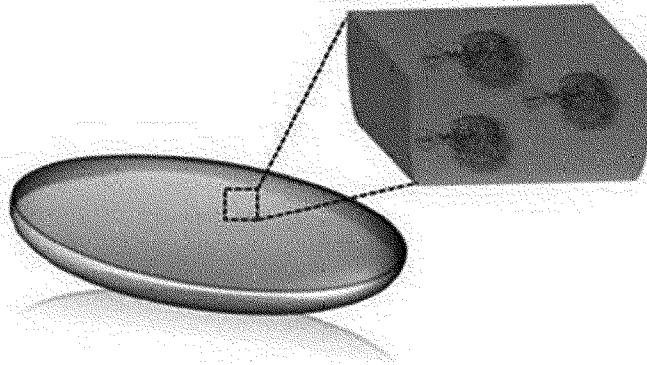
- [청구항 1] 산화세륨(Cerium oxide, CeO_2) 나노입자 및 포도당 산화효소(Glucose oxidase)를 포함하는, 포도당 검출용 복합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 복합체는 산화세륨 나노입자, 생체적합성 고분자, 및 포도당 산화효소가 순차적으로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는, 포도당 검출용 복합체.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리(아크릴아마이드), 폴리(알릴아민), 폴리(에틸렌아민), 폴리(아마이드아민), 폴리라이신, 폴리(락티드), 폴리(아크릴릭산), 폴리(N-이소프로필아크릴아미드), 폴리(2-(디메틸-아미노)에틸 메타크릴레이트, 폴리(카프로락톤), 키토산, 폴리(N-비닐카프로락탐), 텍스트란, 폴리(스티렌 설페이트), 및 폴리(비닐설폰산)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 포도당 검출용 복합체.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 산화세륨 나노입자, 생체적합성 고분자, 및 포도당 산화효소간 순차적인 결합은 공유 결합인 것을 특징으로 하는, 포도당 검출용 복합체.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 공유 결합은 아마이드 결합인 것을 특징으로 하는, 포도당 검출용 복합체.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 산화세륨 나노입자의 농도는 복합체 전체의 부피에 대하여, 0.1 내지 0.6 w/v%인 것을 특징으로 하는, 포도당 검출용 복합체.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 복합체를 포함하는, 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 복합체는 생체적합성 중합체에 포집(Entrapment)되어 있는 것을 특징으로 하는, 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 생체적합성 중합체의 모노머는 2-하이드록시에틸 메타크릴레이트, N-비닐 피롤리돈, 메타크릴레이트, 메틸 메타크릴레이트, 및 비닐 피롤리돈으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서.
- [청구항 10] 제7항에 있어서, 상기 복합체는, 콘택트렌즈형 센서 전체 부피에 대하여, 0.3 내지 2.5 중량%(w/v)로 포함되는 것을 특징으로 하는, 포도당 검출용 콘택트렌즈형 센서.
- [청구항 11] 제7항의 콘택트렌즈형 센서를 개체에 투여 또는 처리하는 단계를 포함하는, 포도당 검출방법.

[도1]

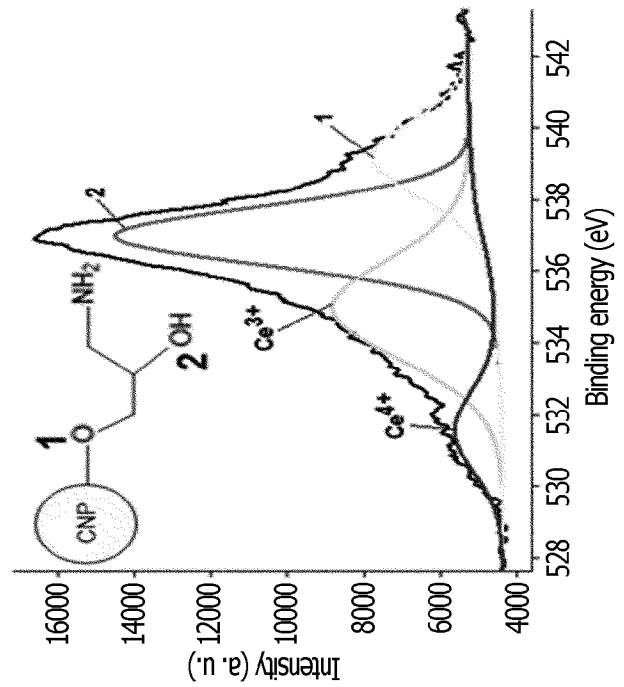
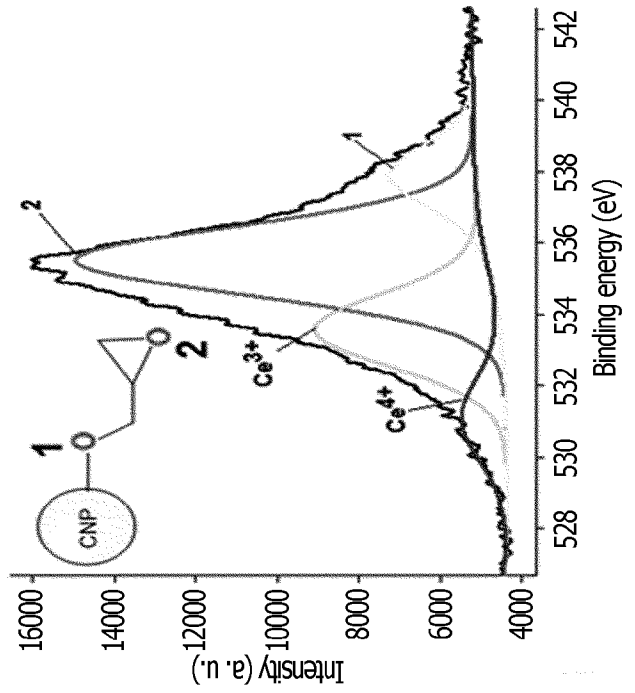
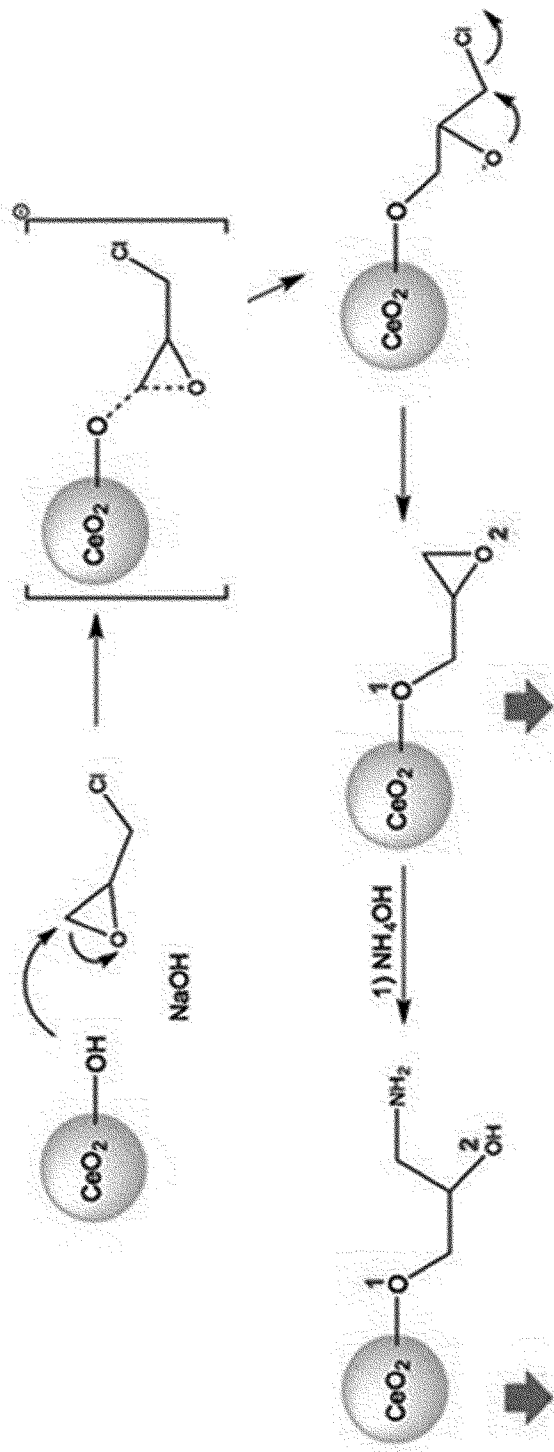
(a)



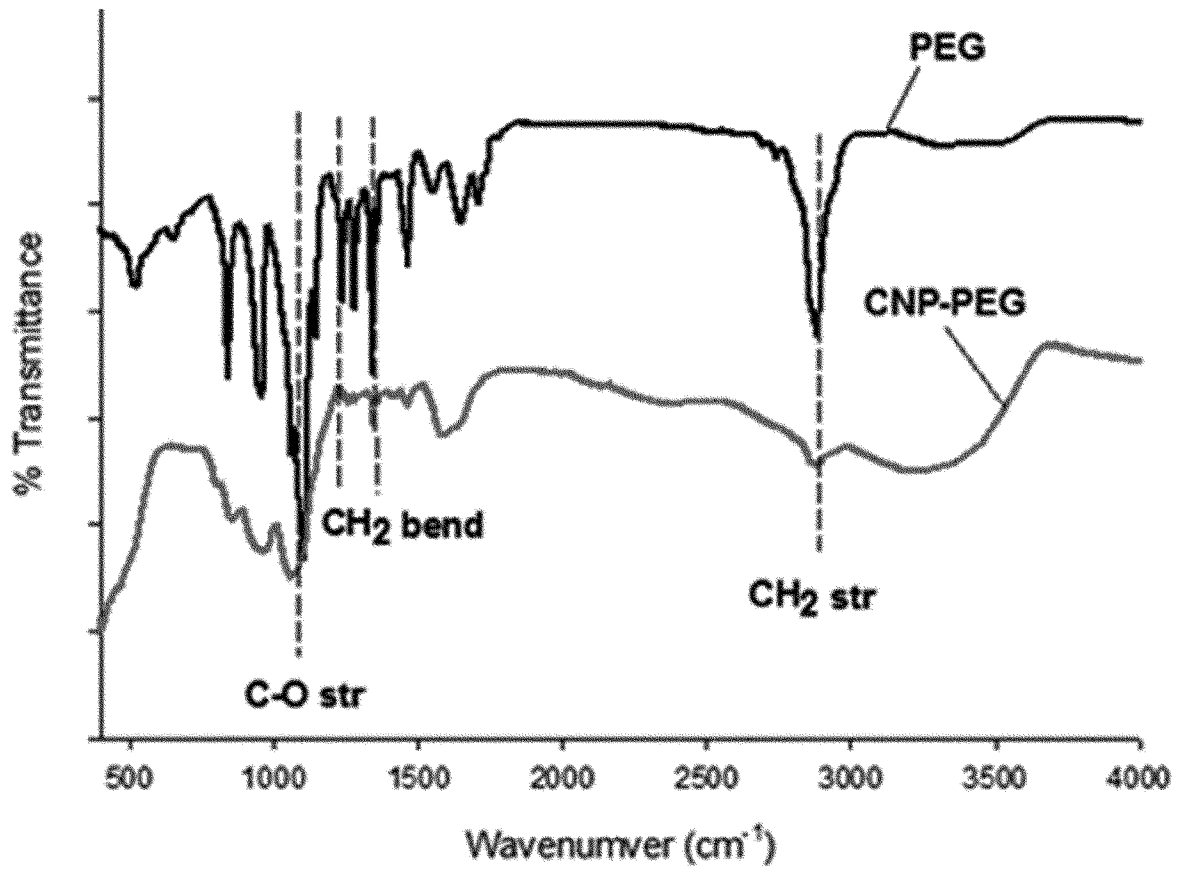
(b)



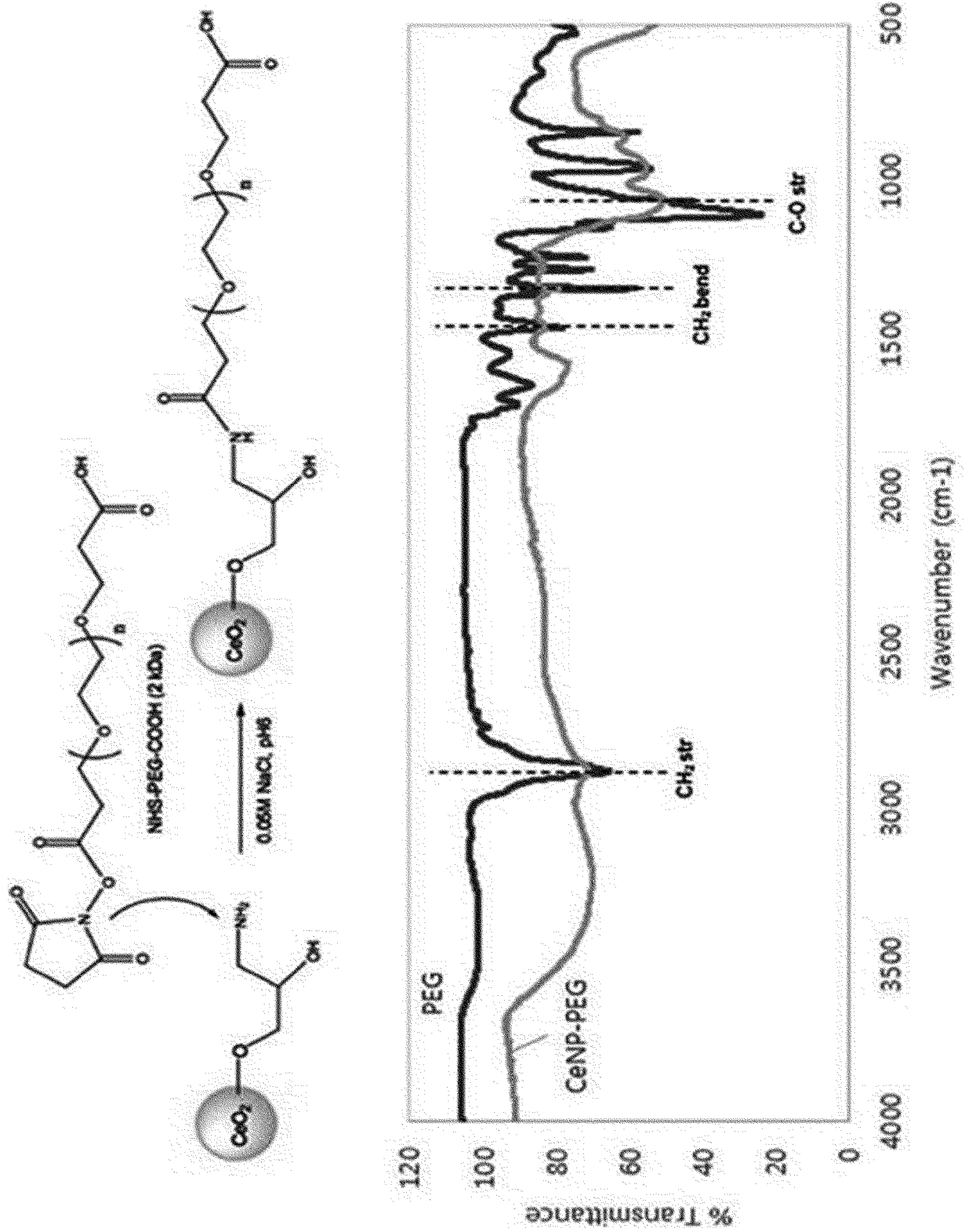
[도2a]



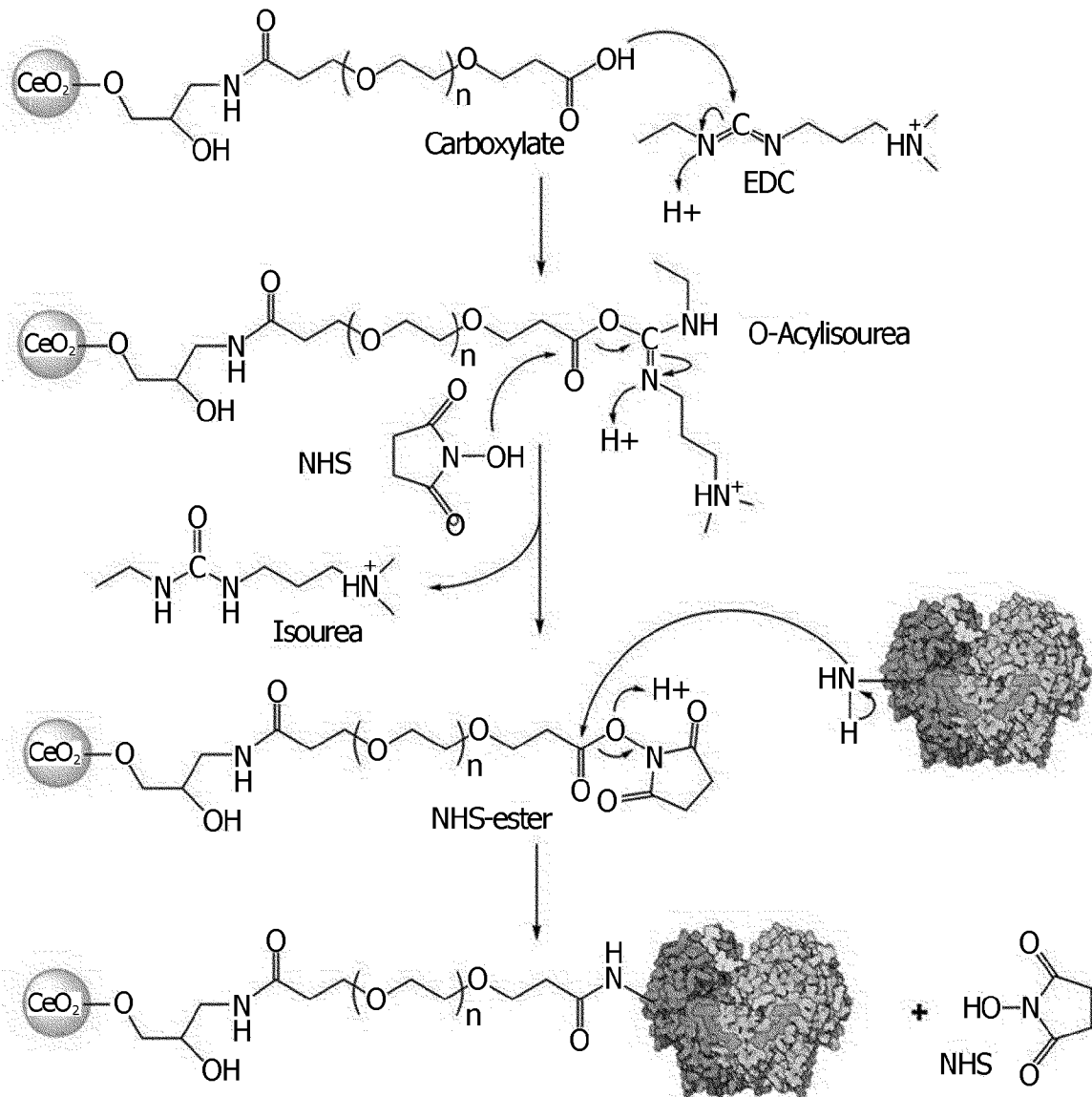
[도2b]



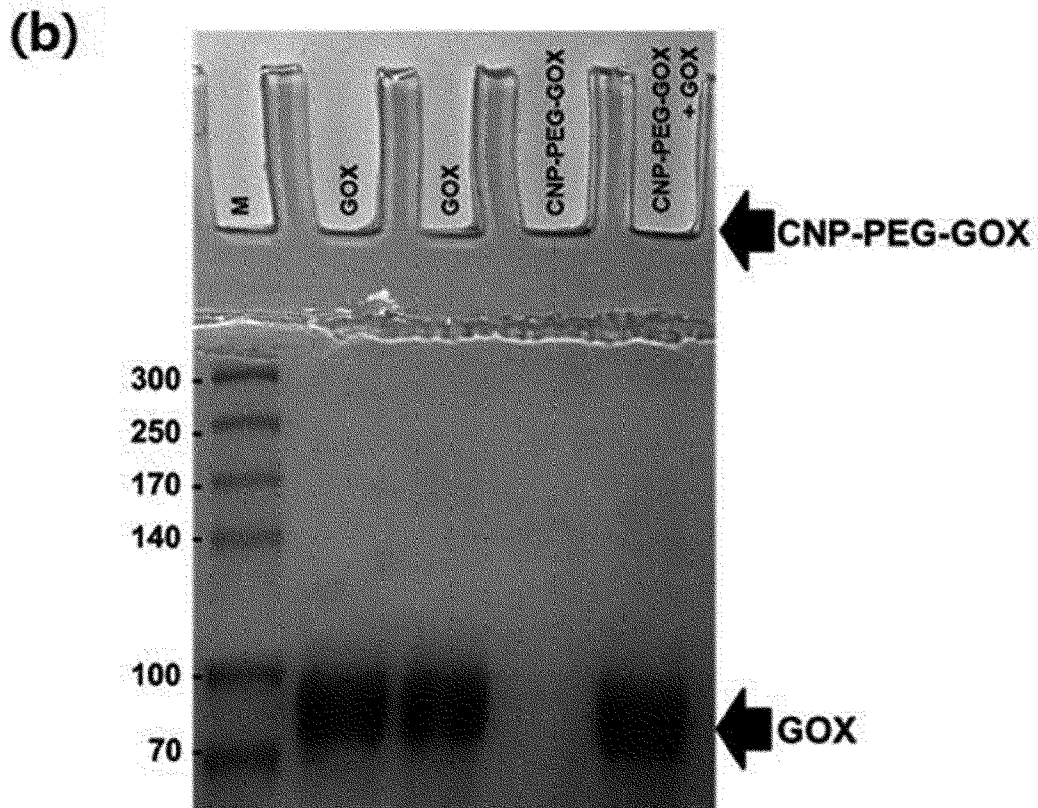
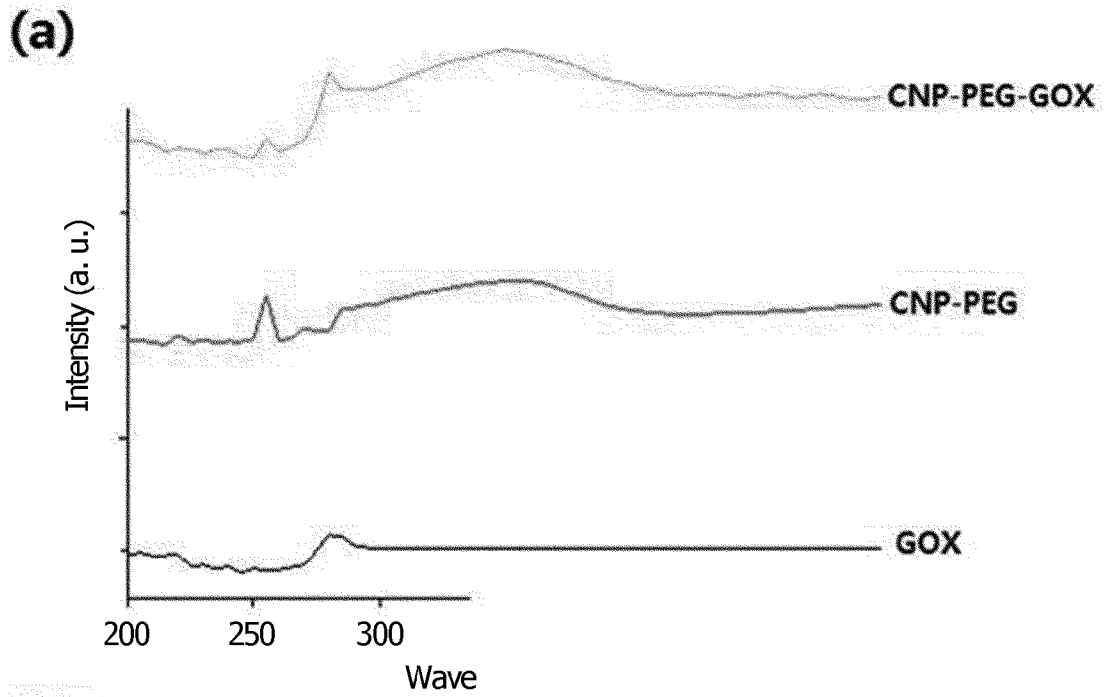
[도3]



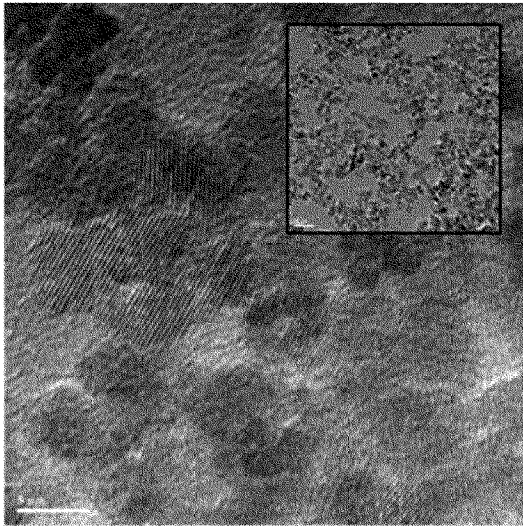
[도4]

**Samples****CeNP-PEG-GOx****Amount of enzyme conjugated**248.17 $\mu\text{g-protein/ml}$

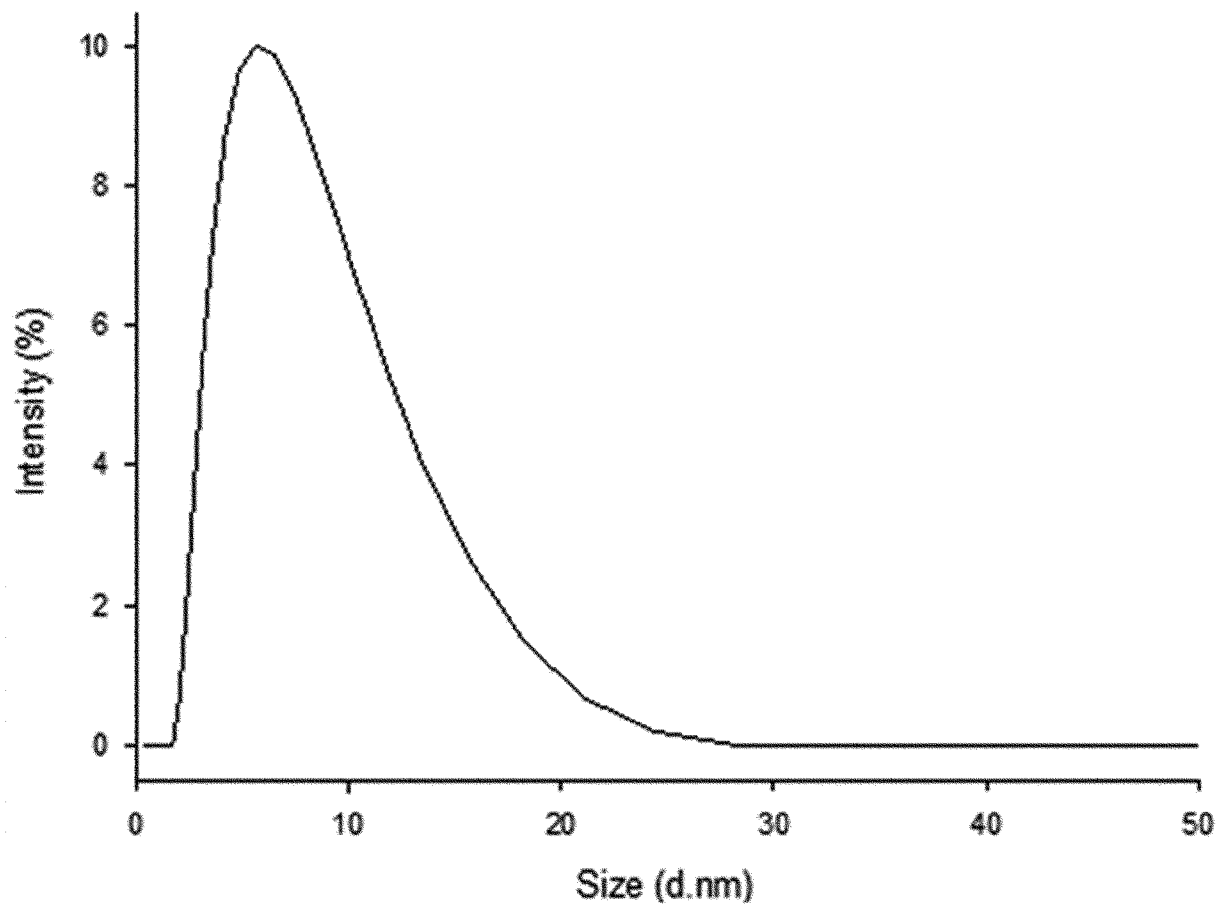
[도5]



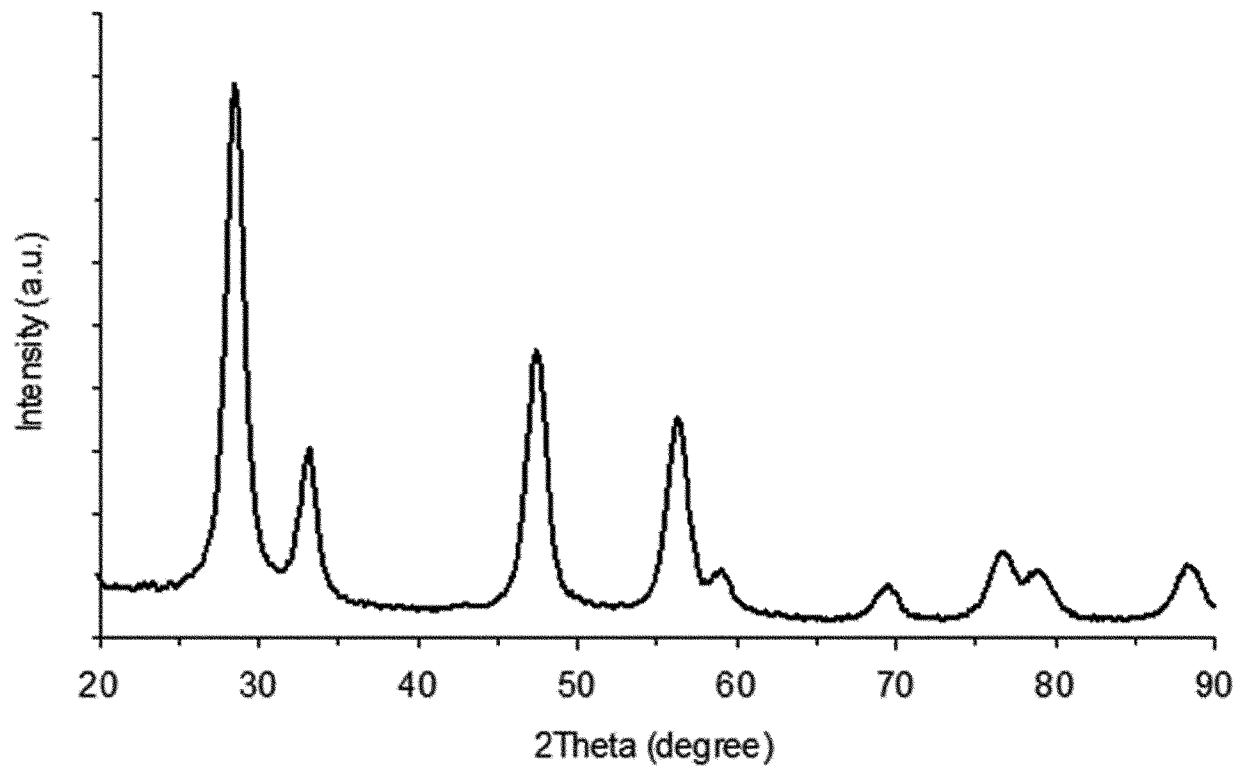
[도6a]



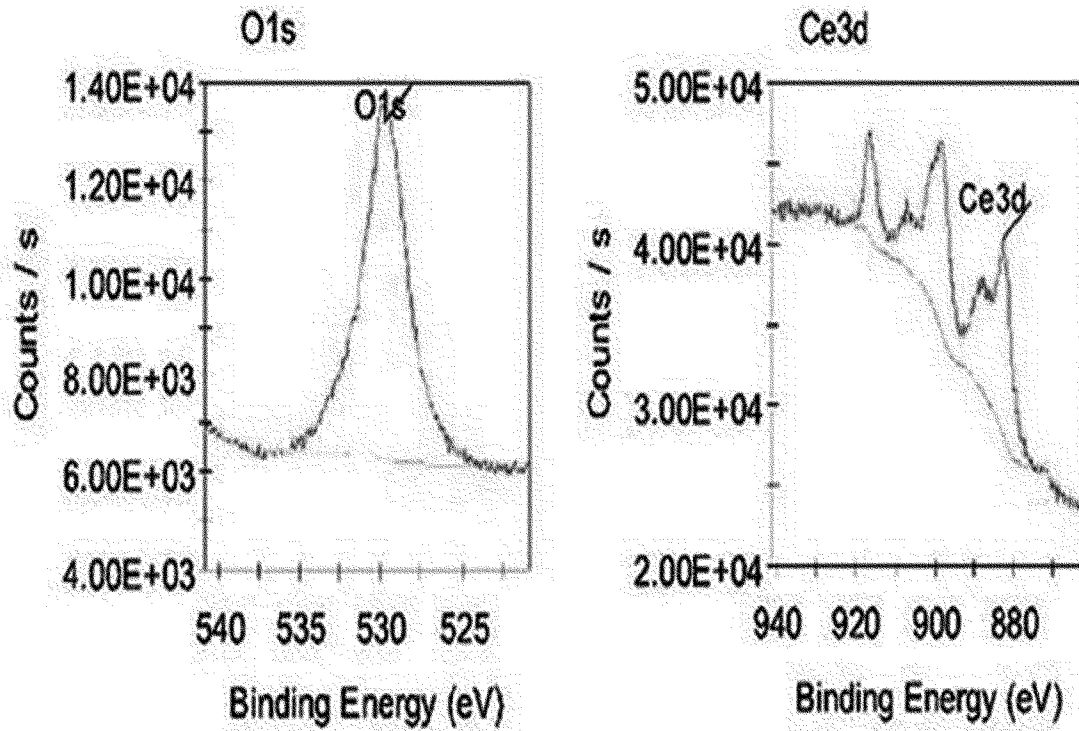
[도6b]



[도6c]

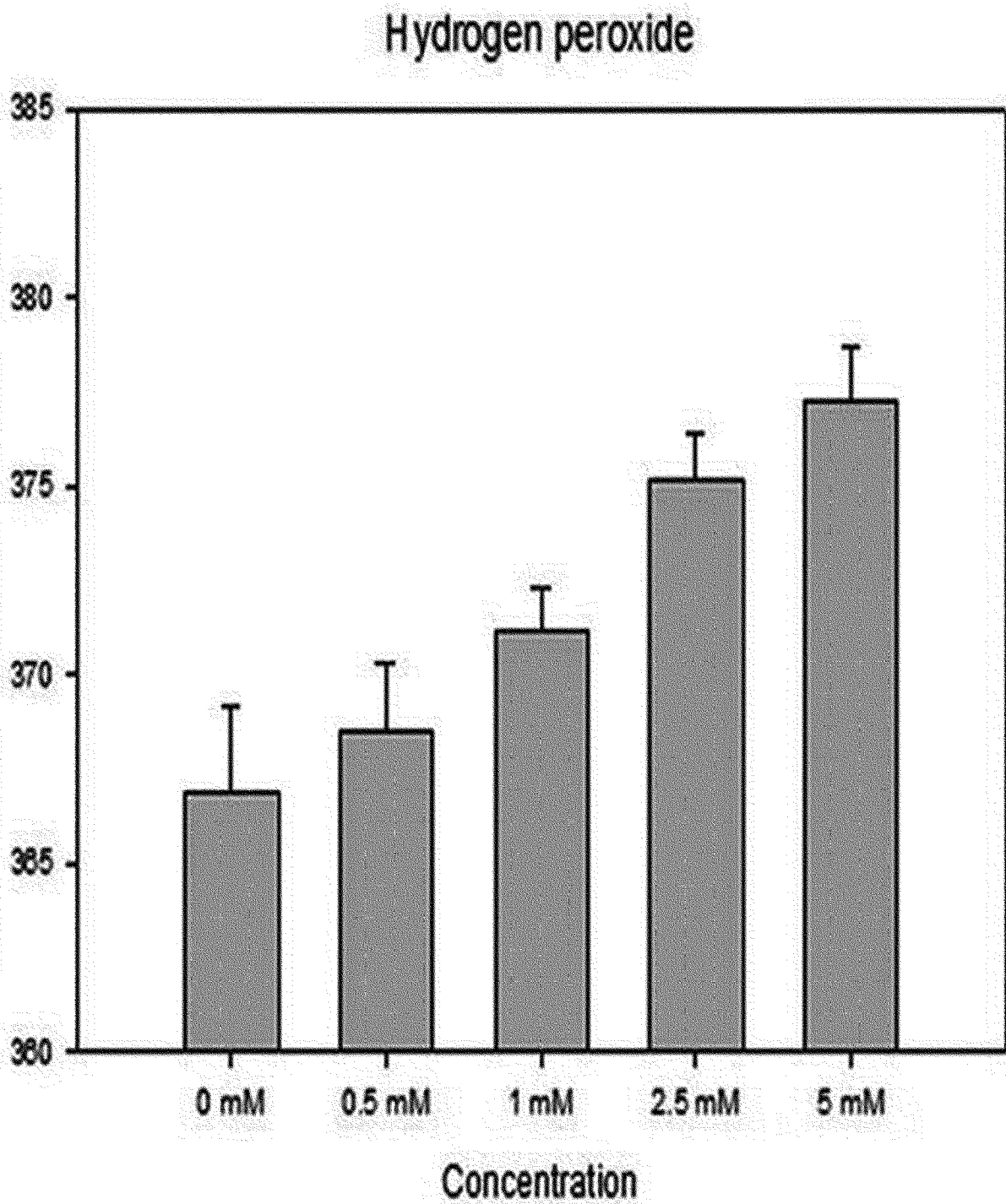


[도6d]

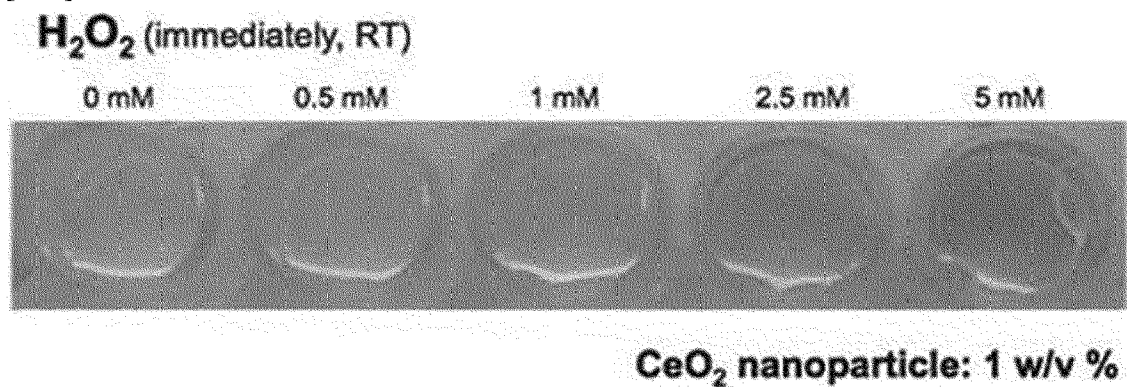


Name	Peak BE	FWHM	Area	At %
O1s	529.72	2.96	26849.37	62.24
Ce3d	882.58	4.62	217720.12	37.76

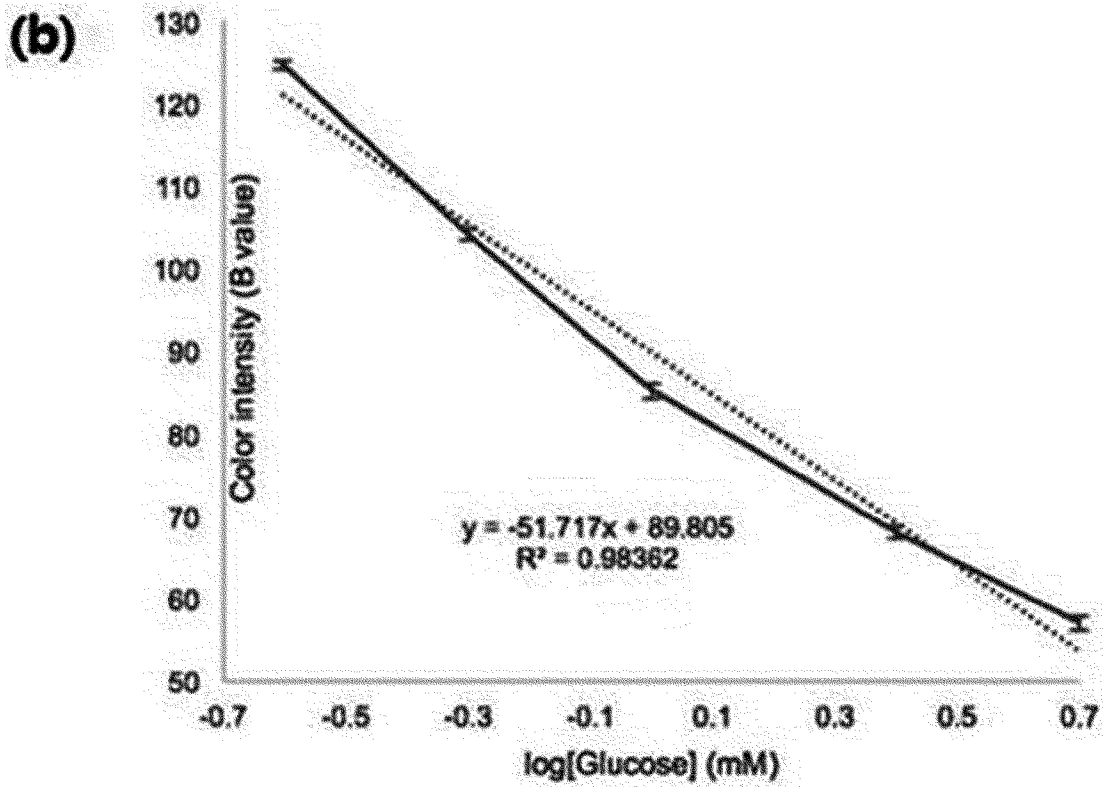
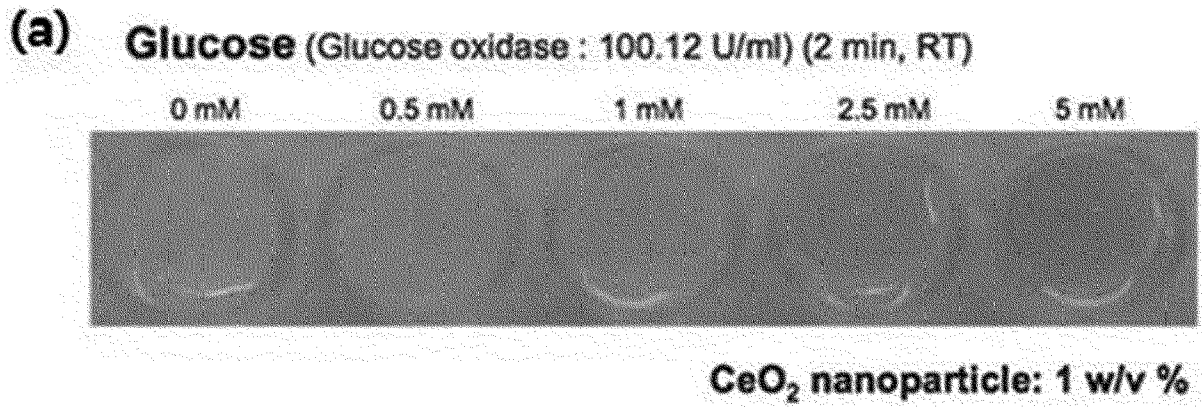
[도6e]



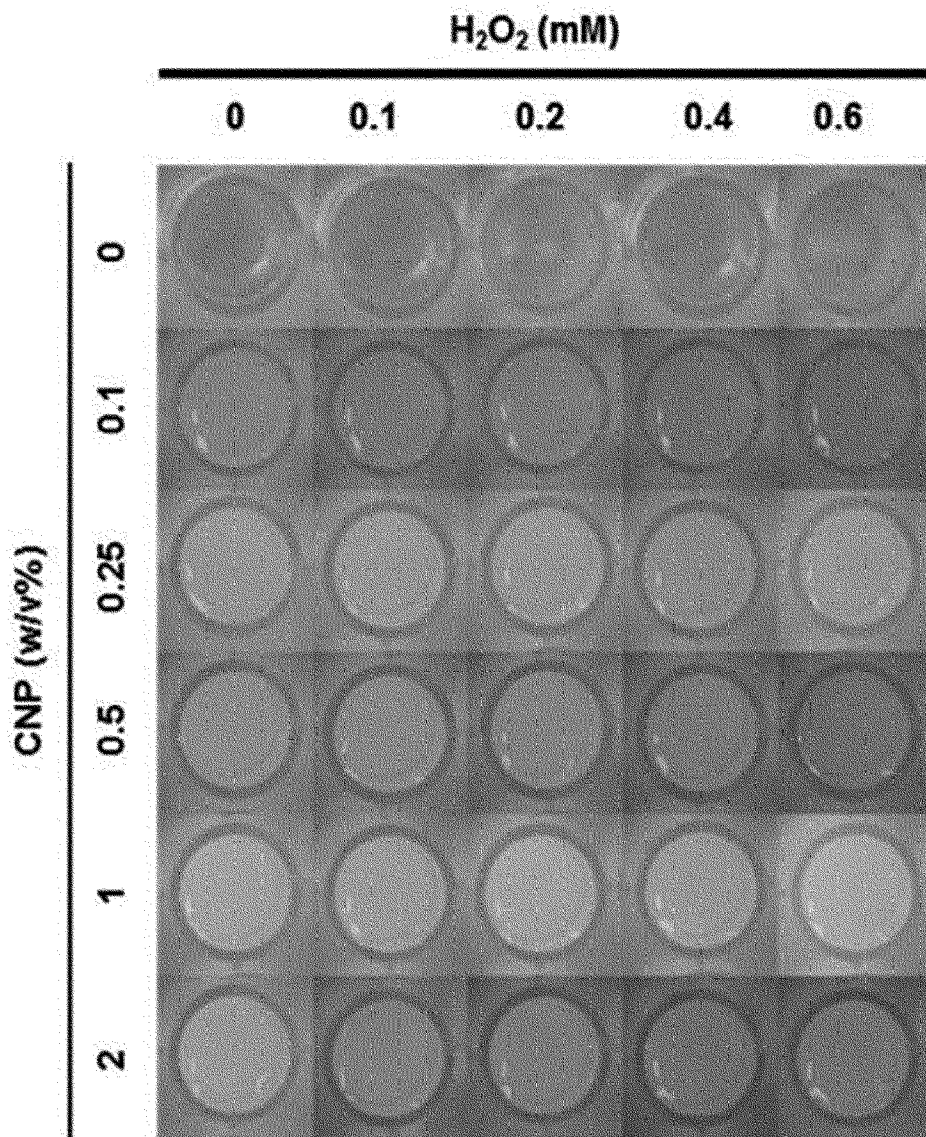
[도7]



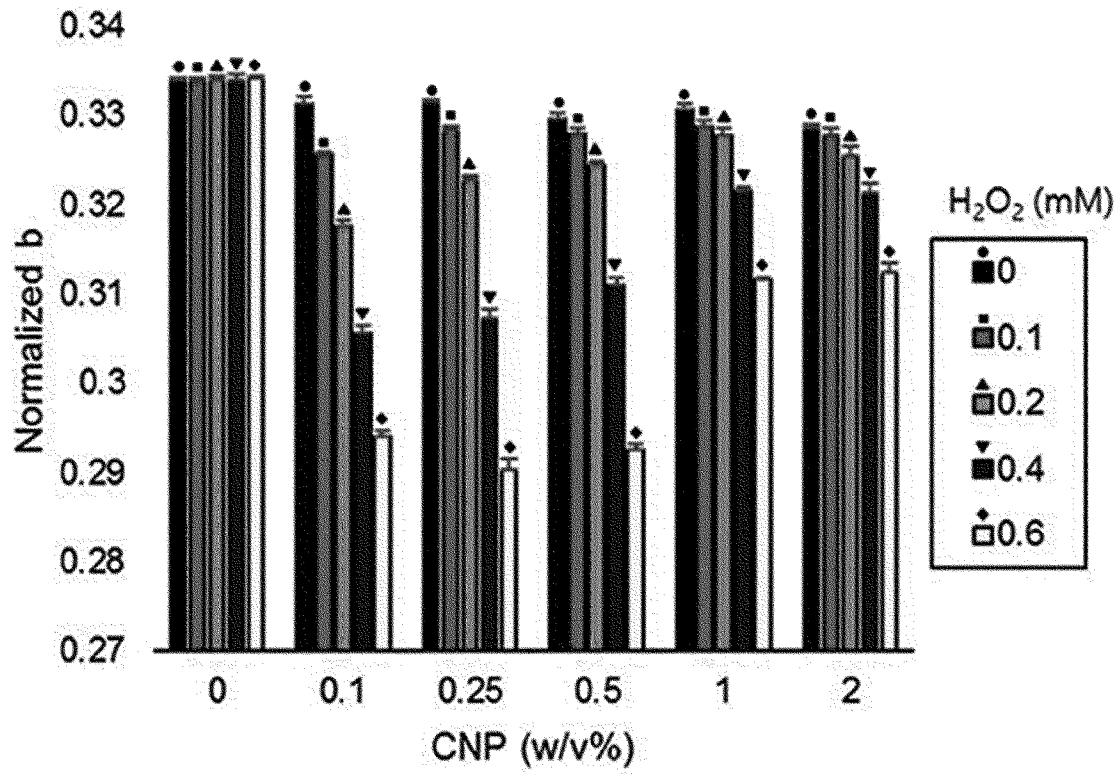
[도8]



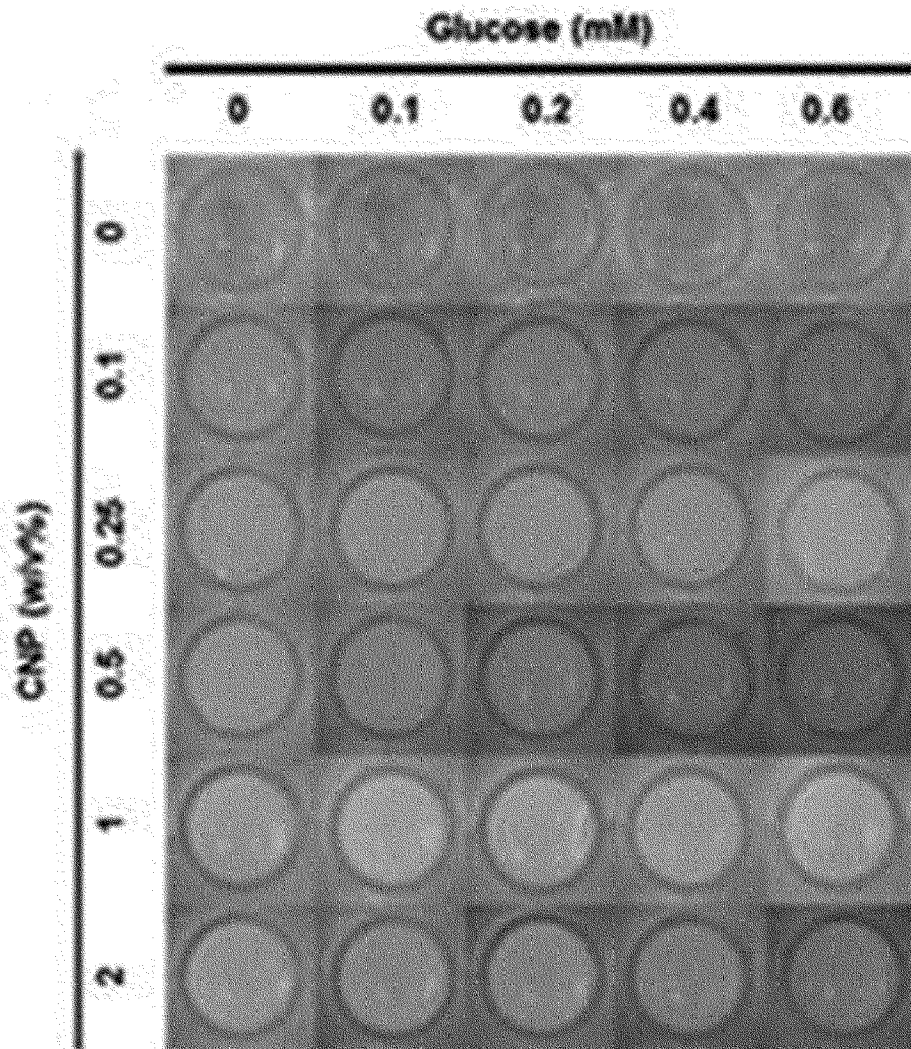
[도9a]



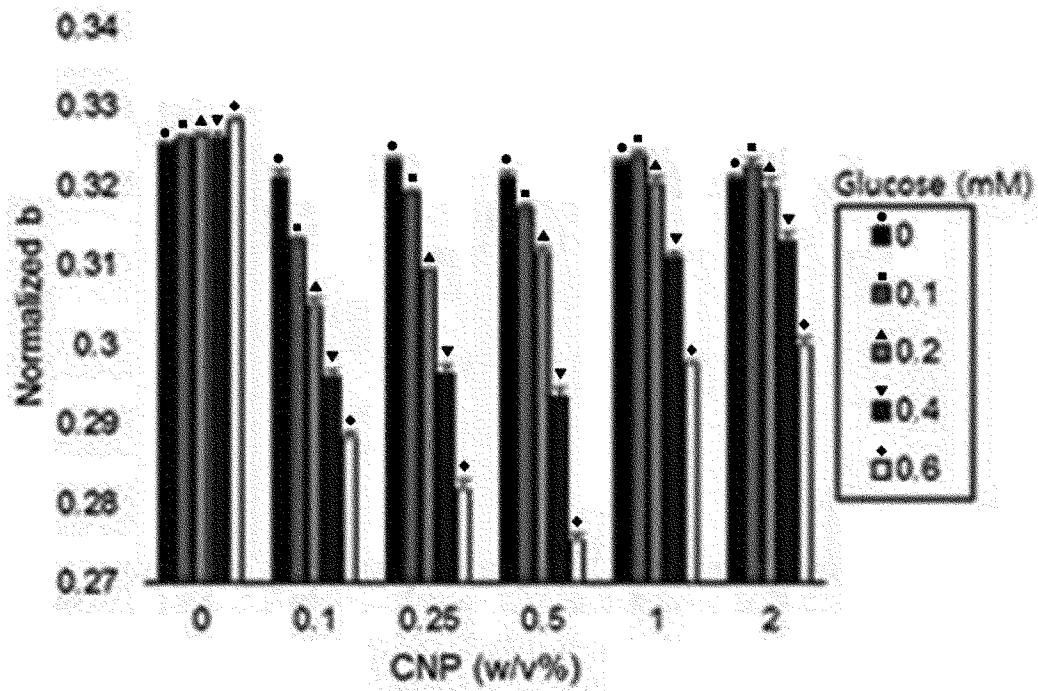
[도9b]



[도10a]



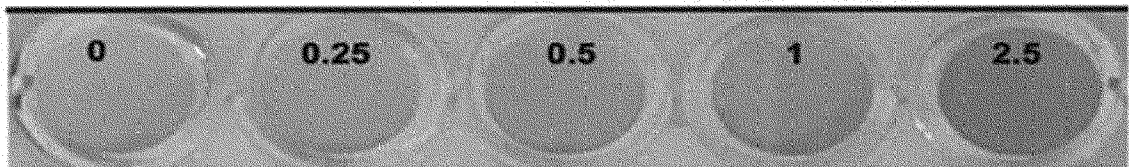
[도10b]



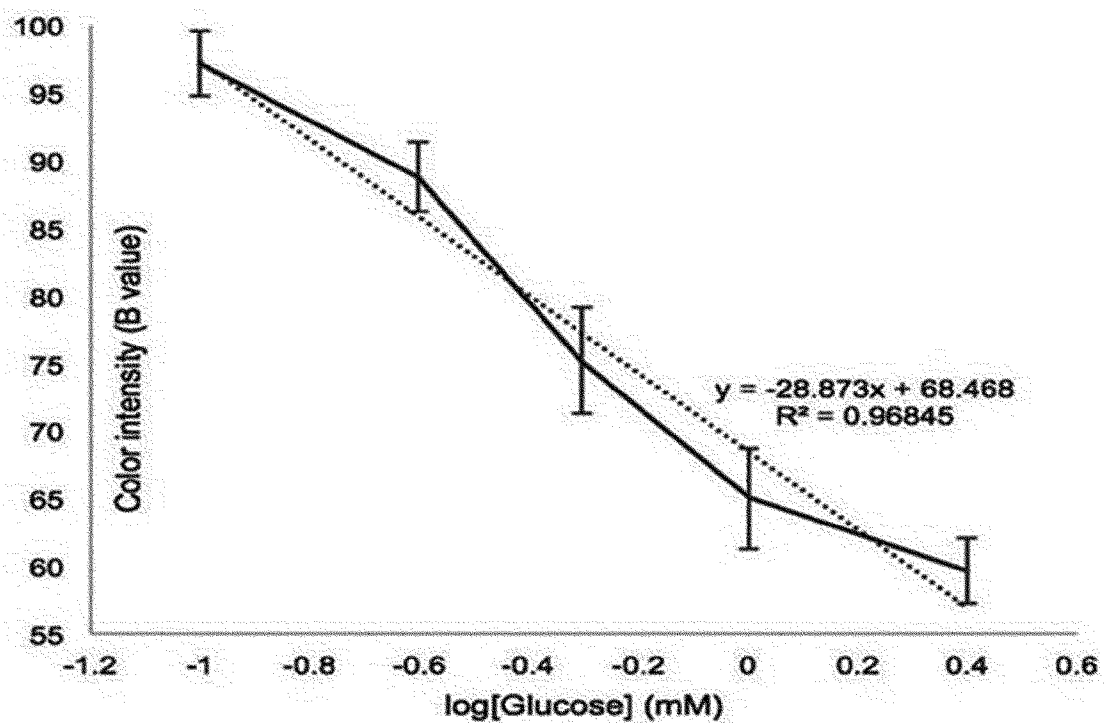
[도11]

(a)

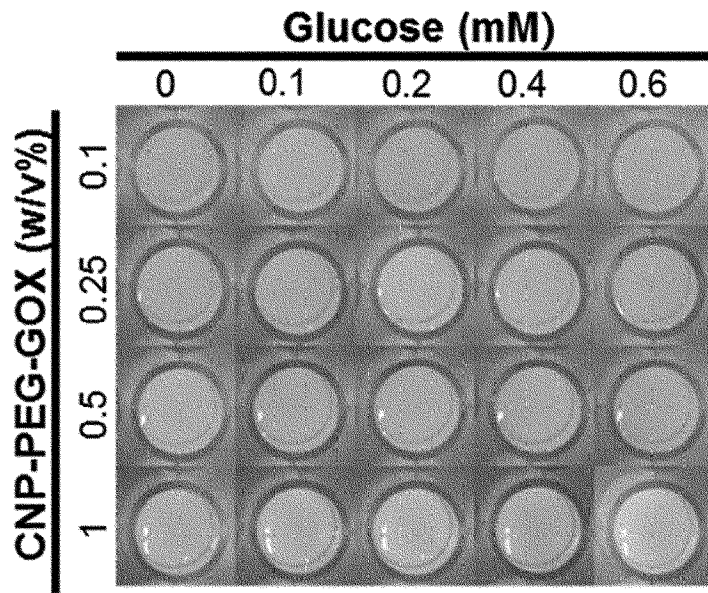
포도당 (immediately, RT, mM)



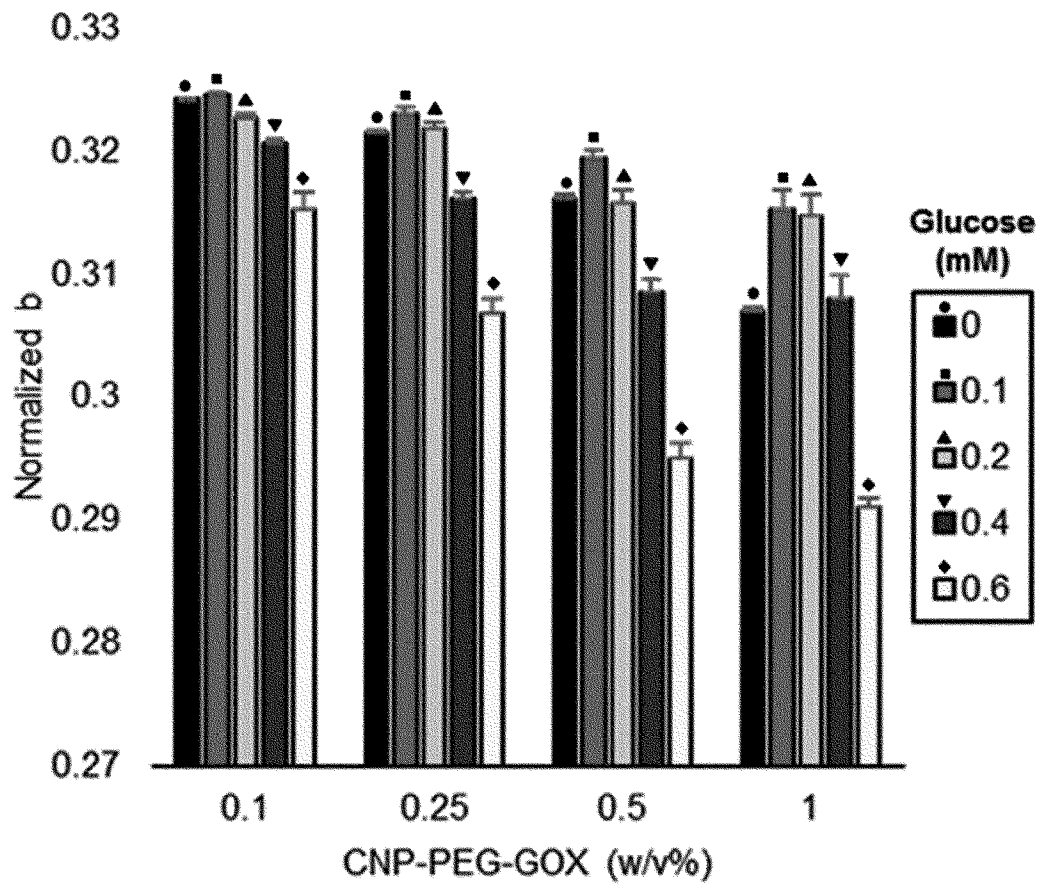
(b) ❖ RGB analysis



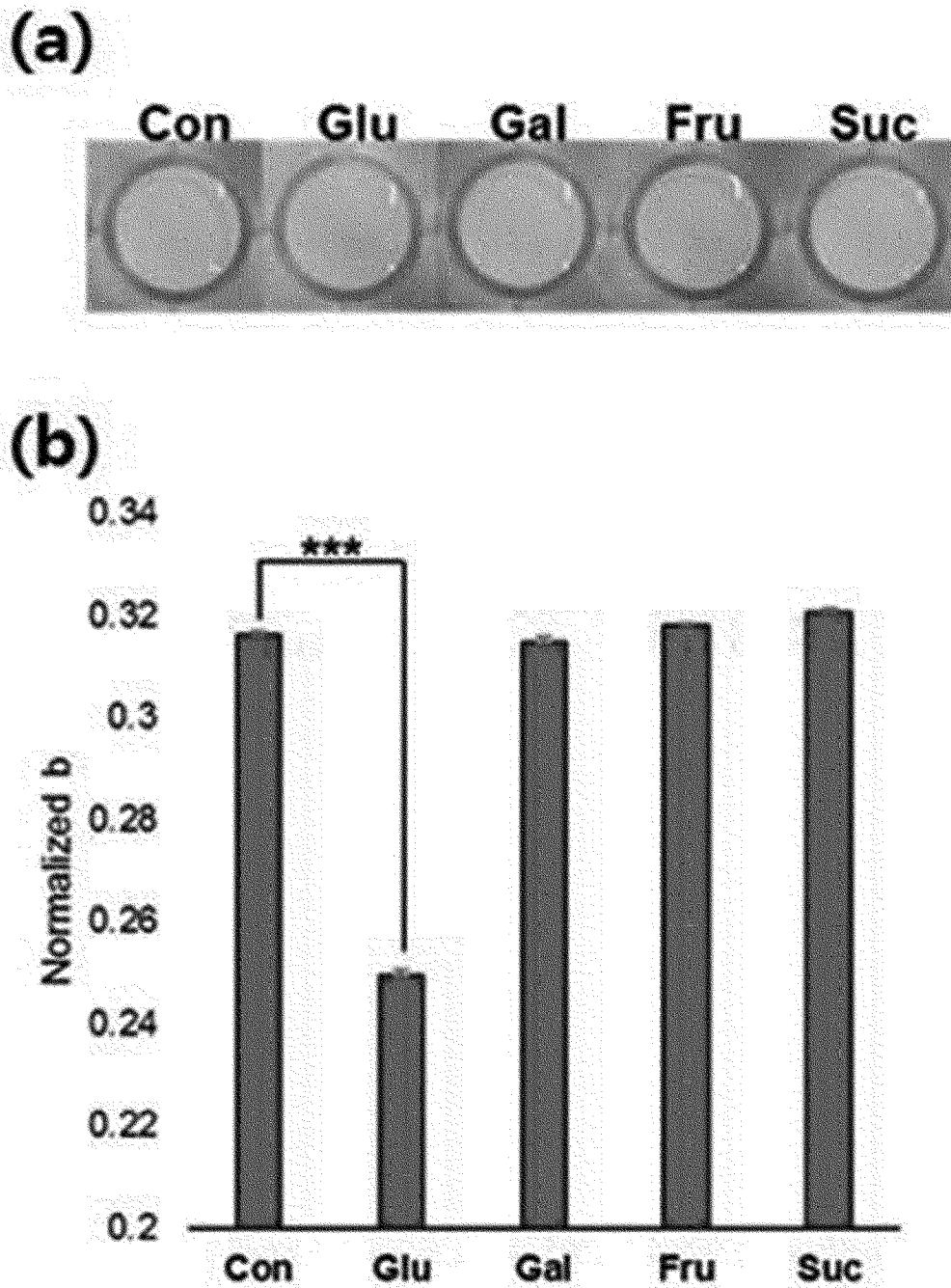
[도12a]



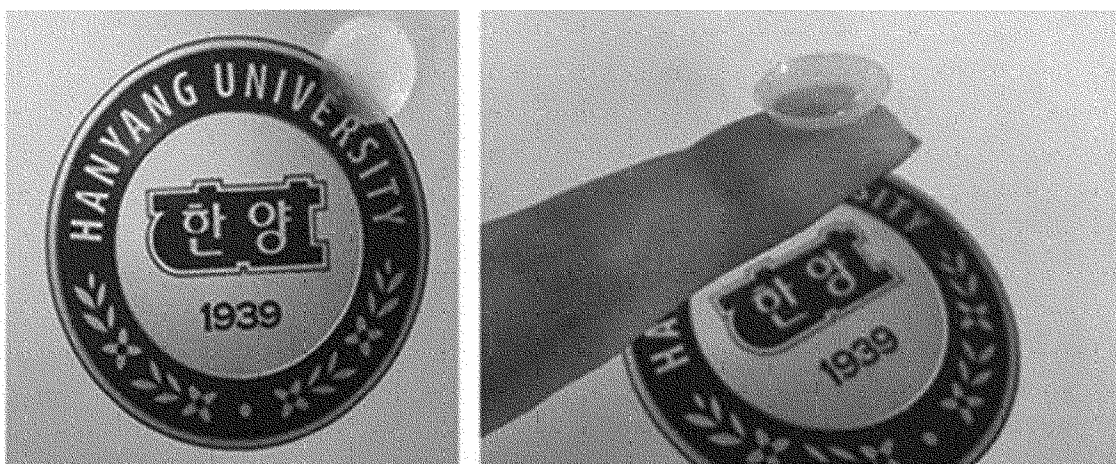
[도12b]



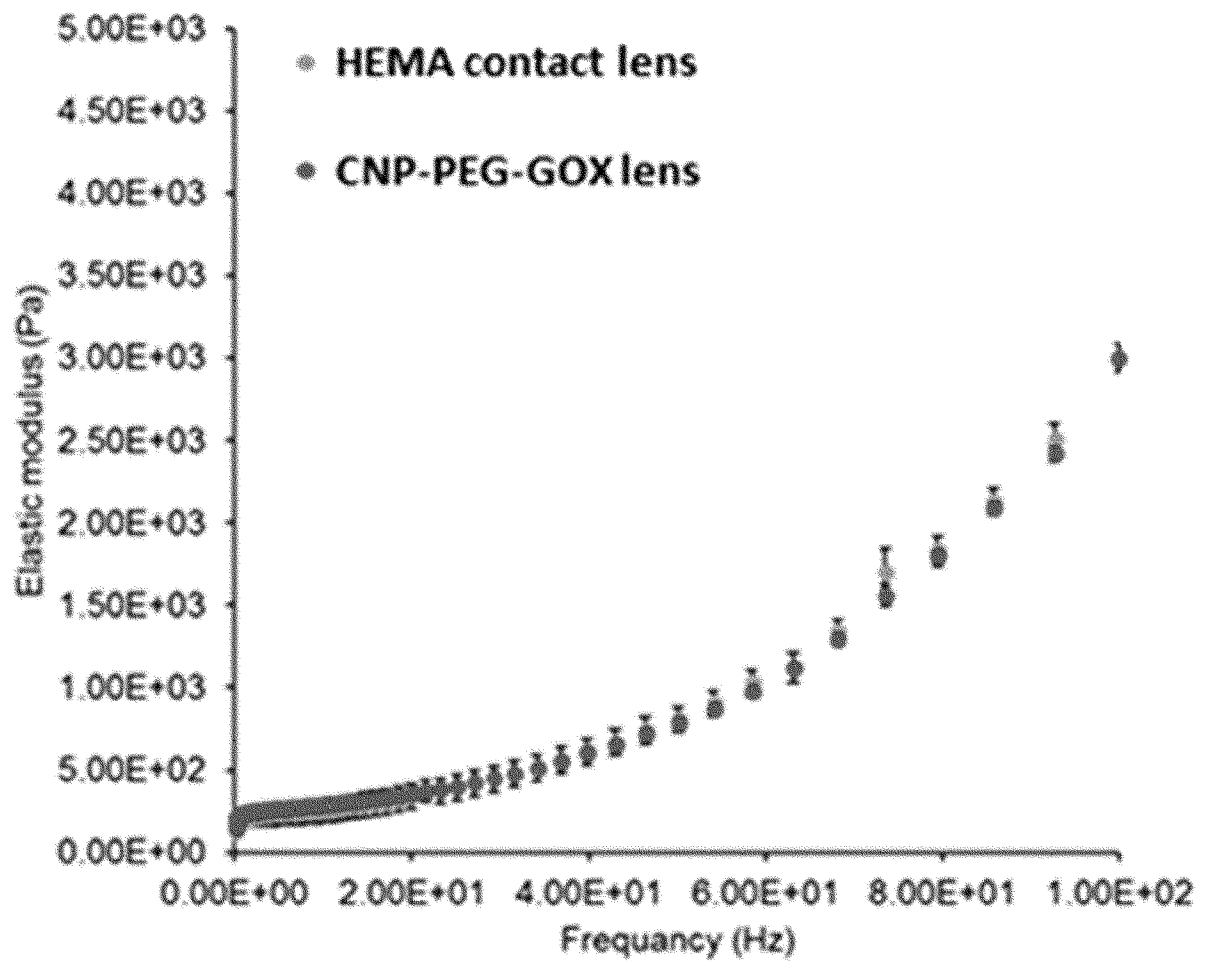
[도13]



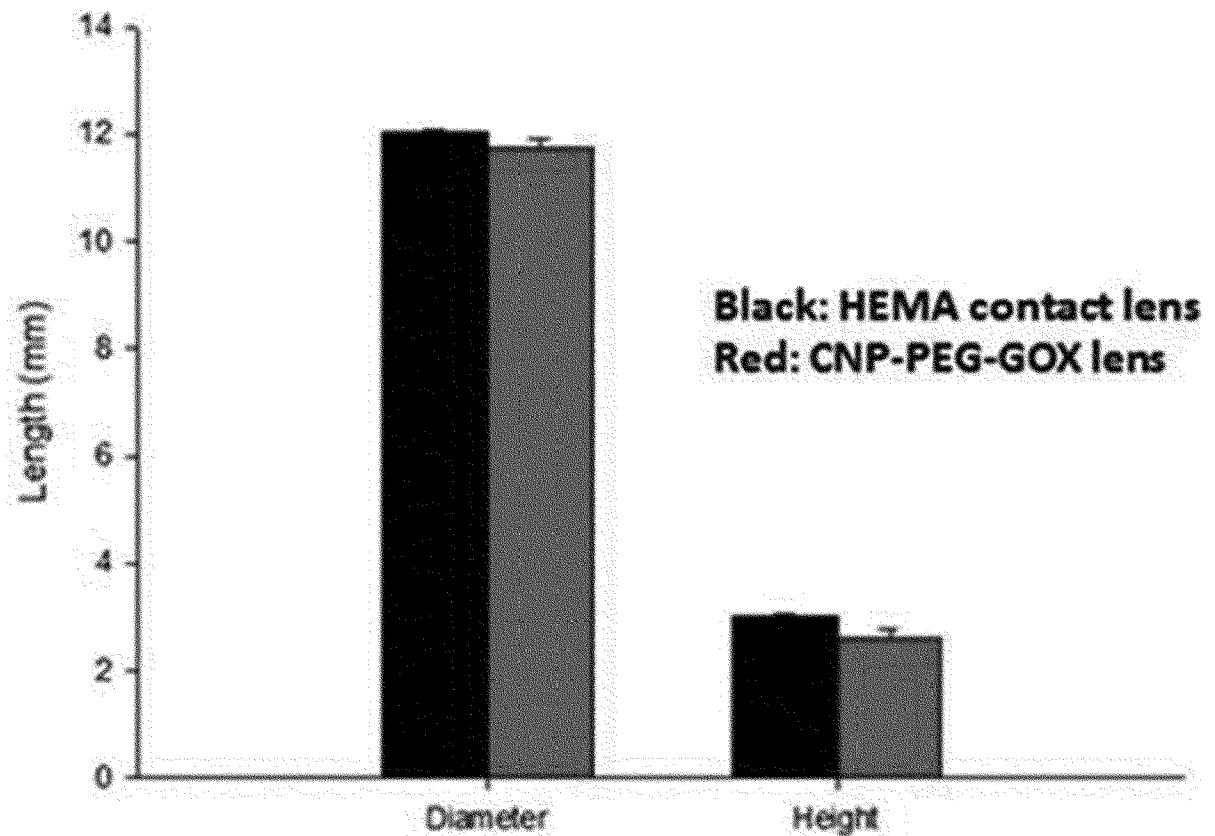
[도14a]



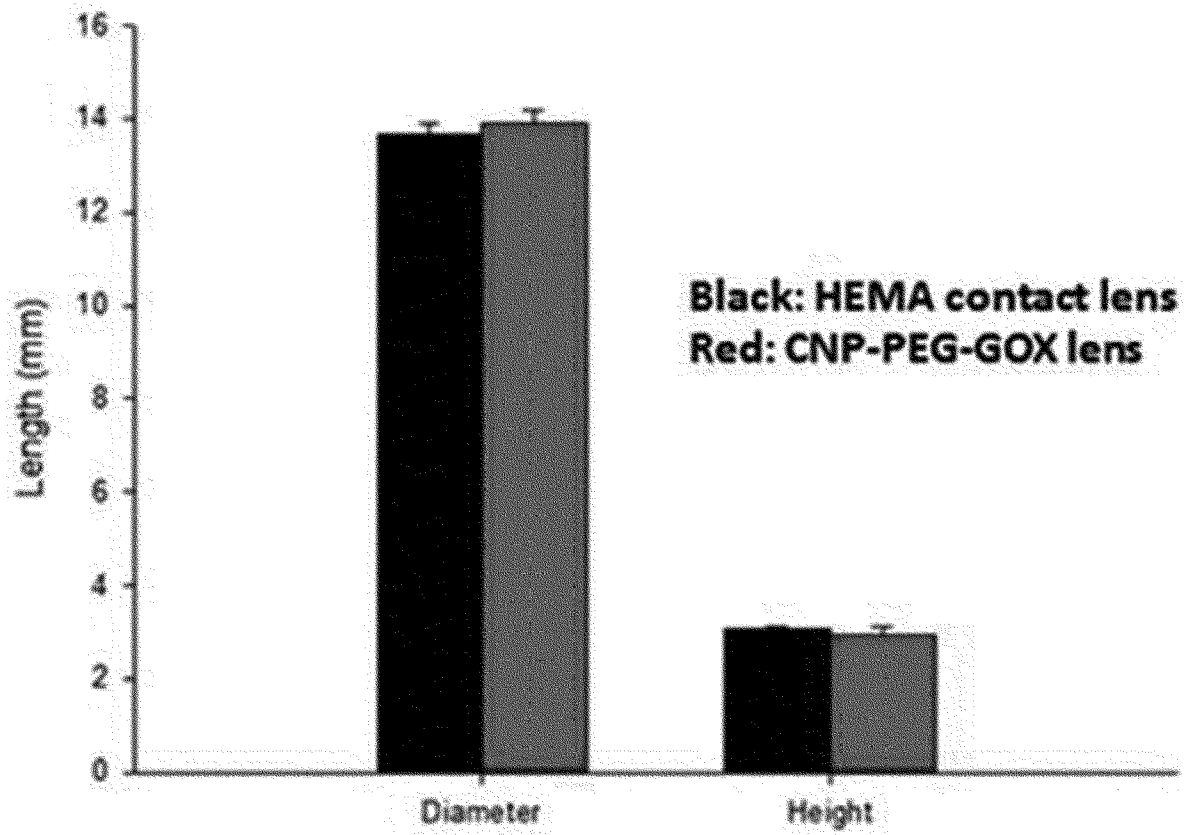
[도14b]



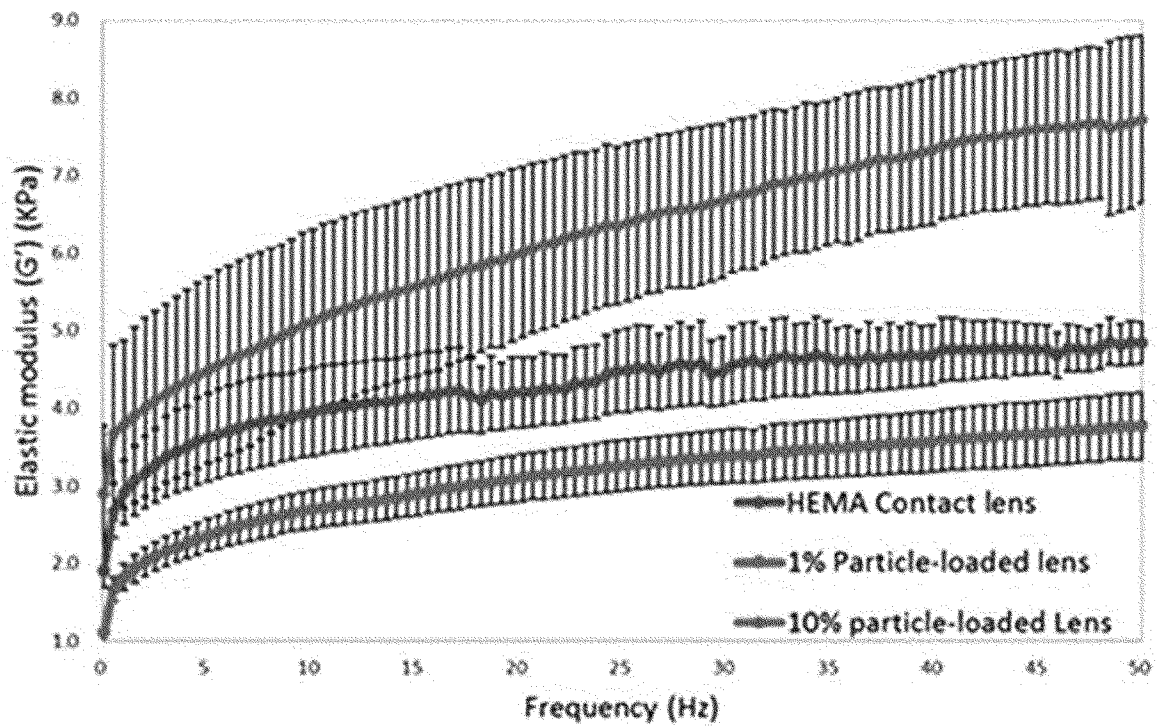
[도15a]



[도15b]

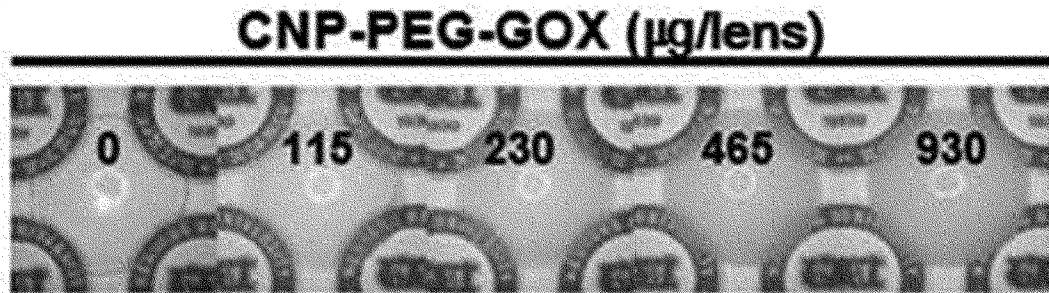


[도16]

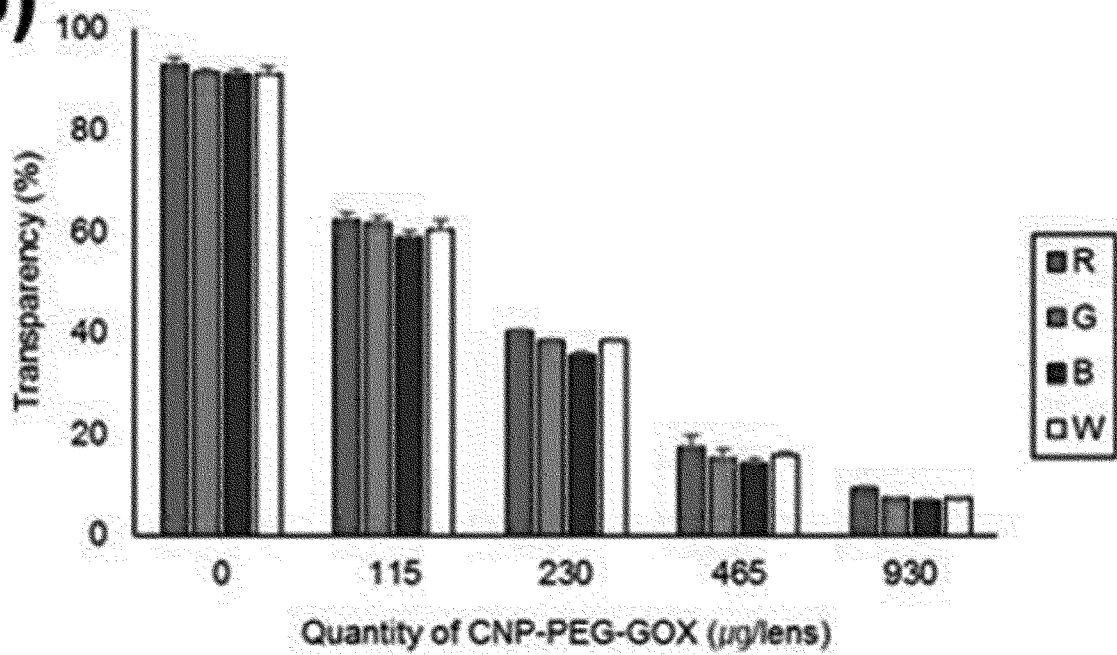


[도17]

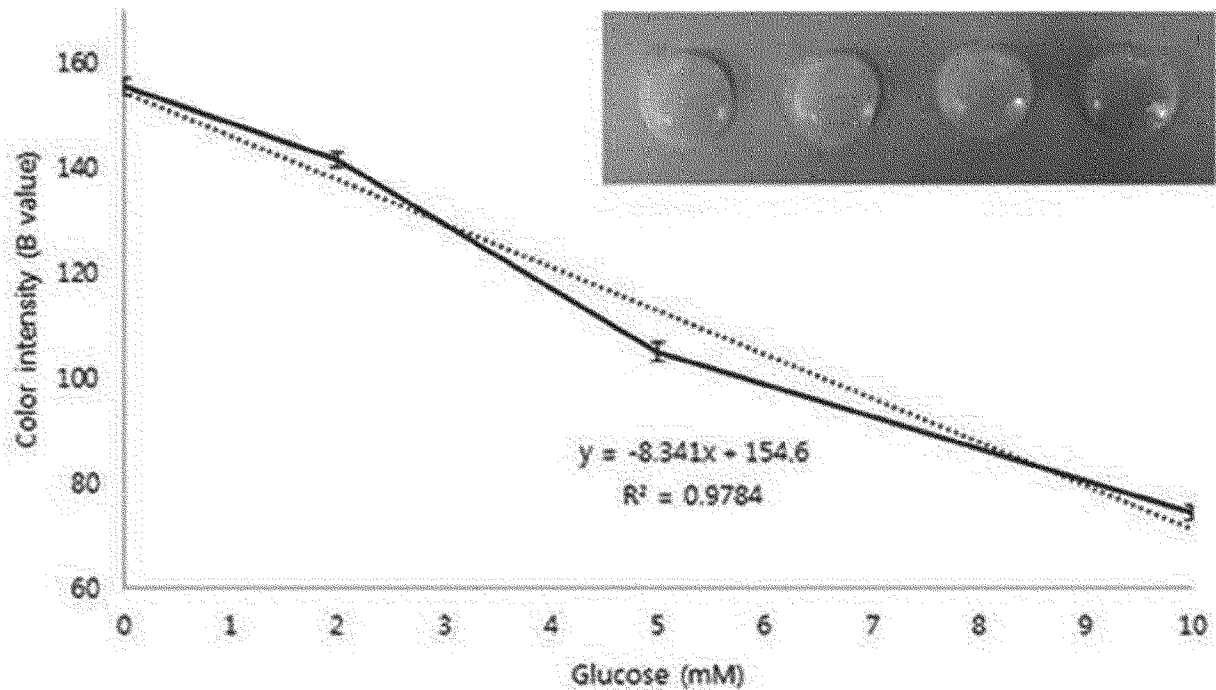
(a)



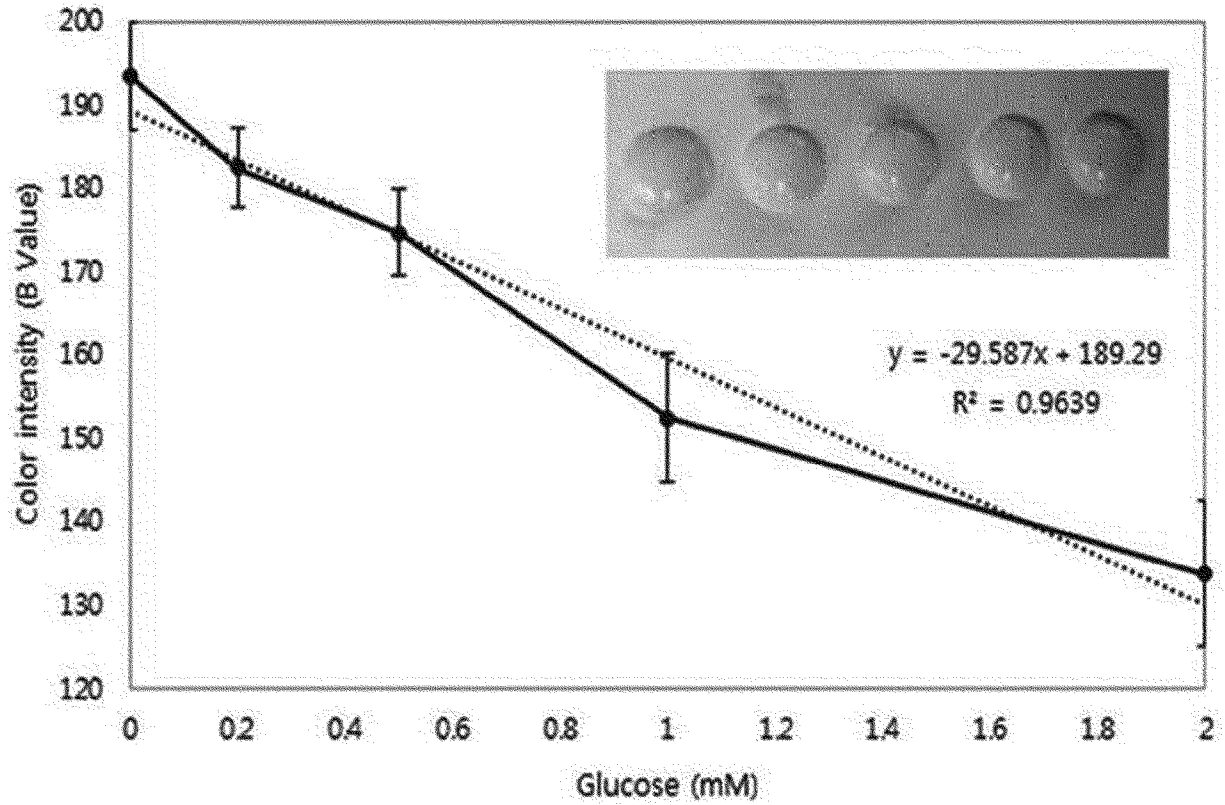
(b)



[도18]

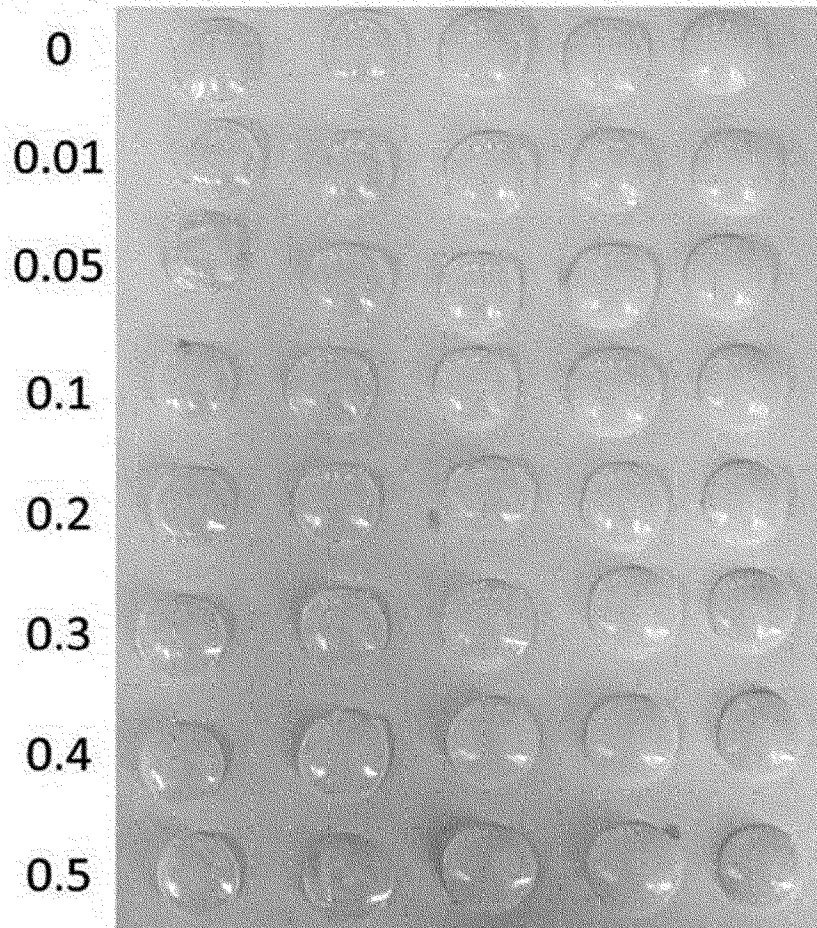


[도19]

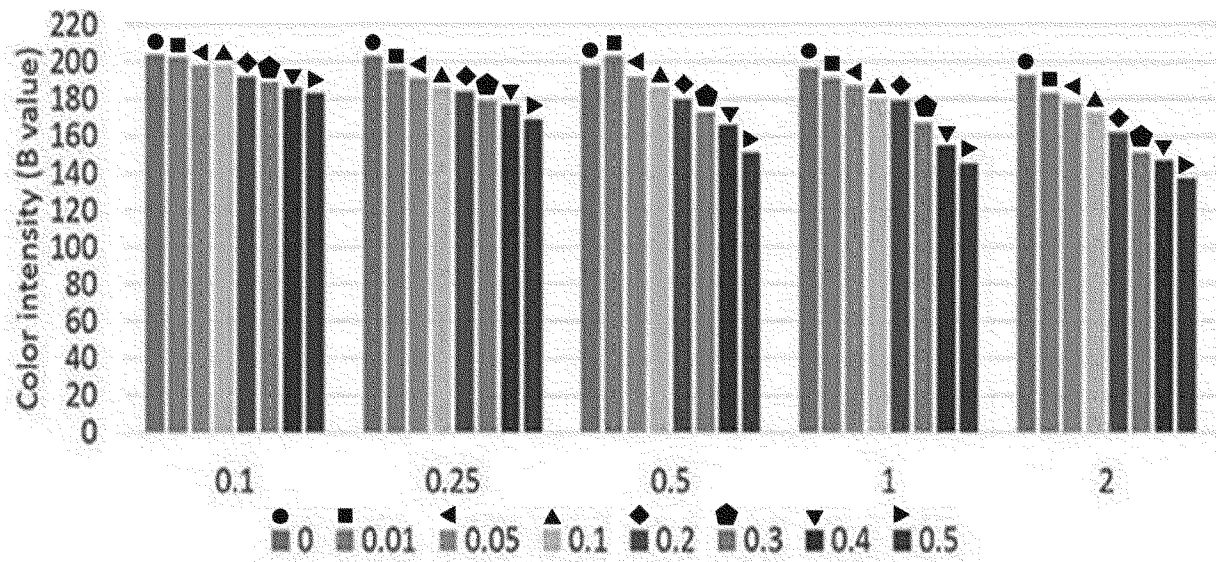


[도20a]

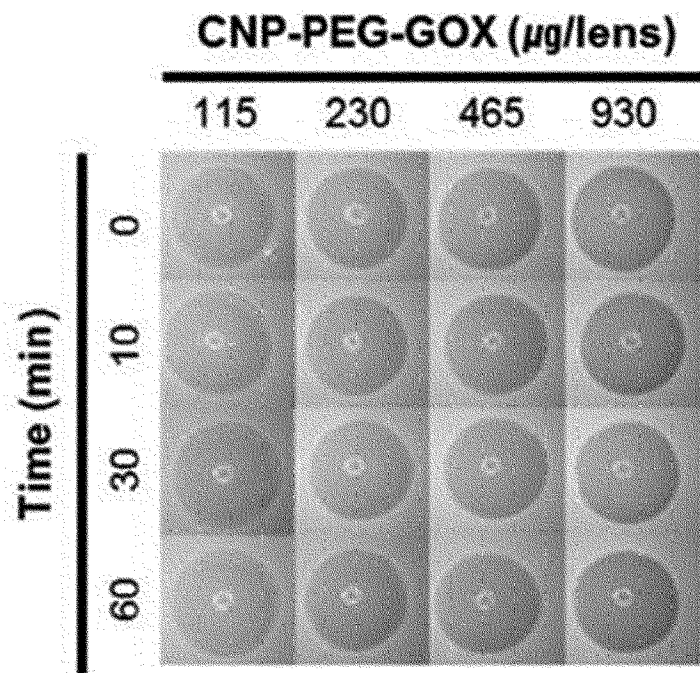
Glucose (mM) 0.1 0.25 0.5 1 2 (w/v)%



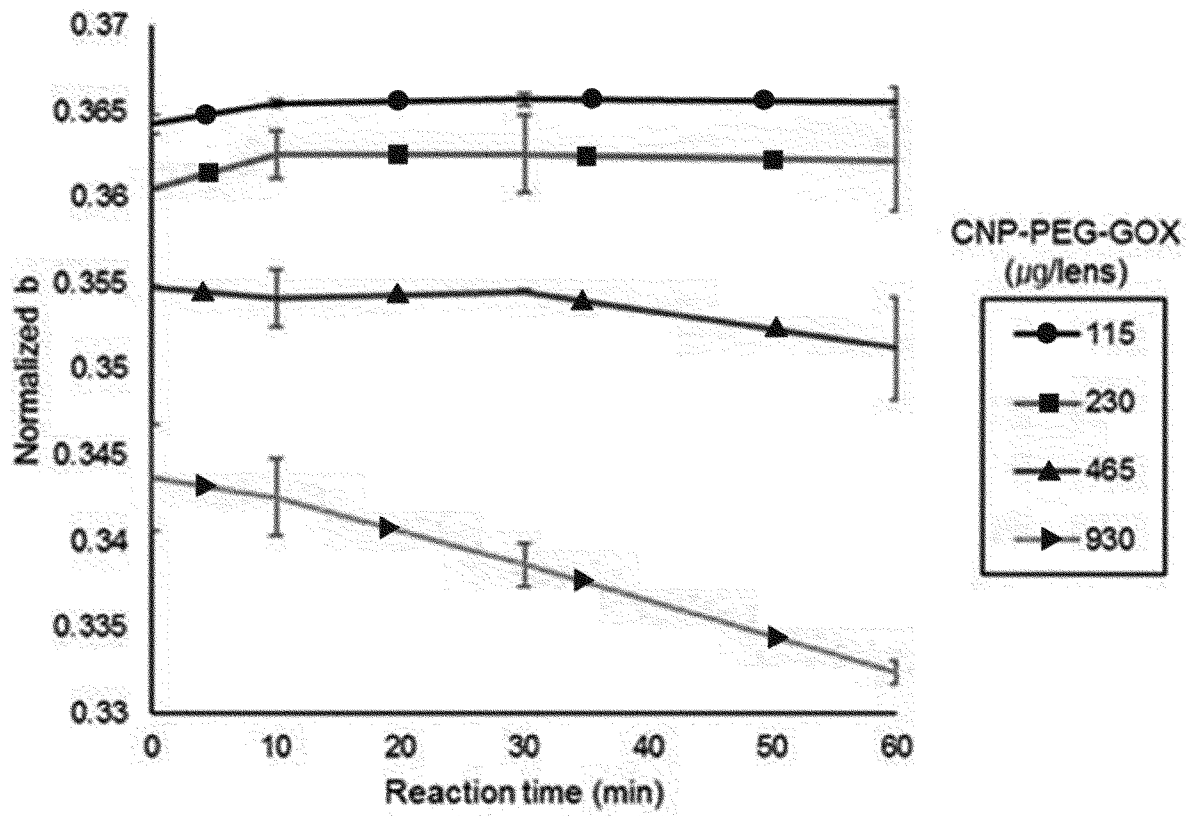
[도20b]



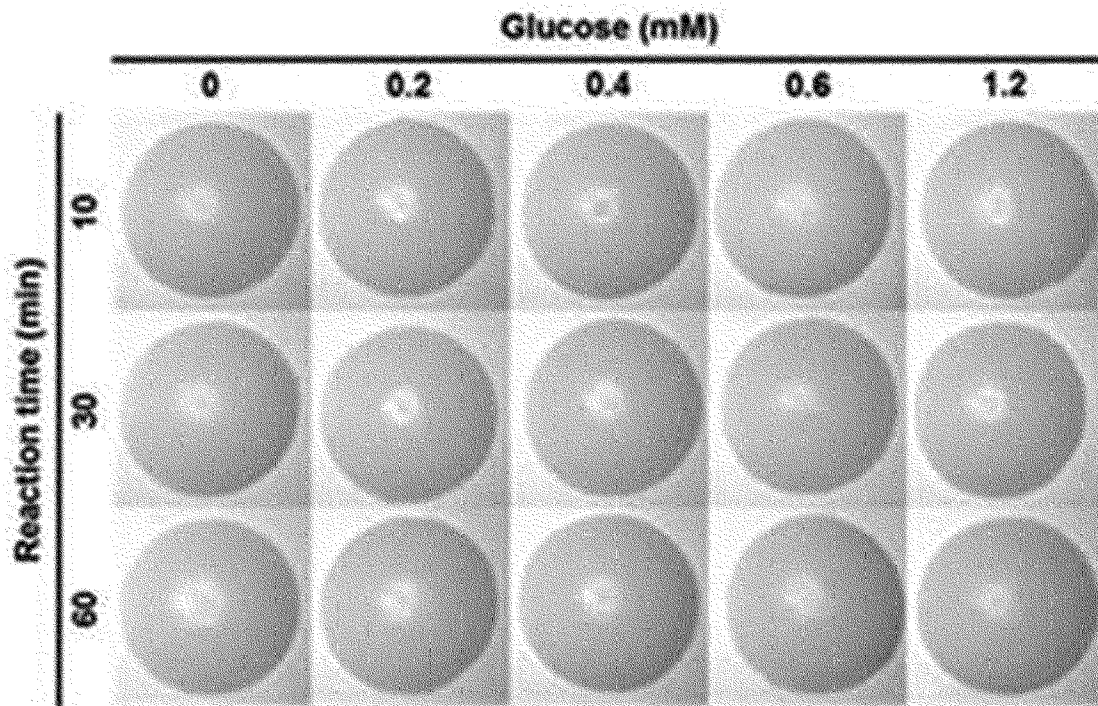
[도21a]



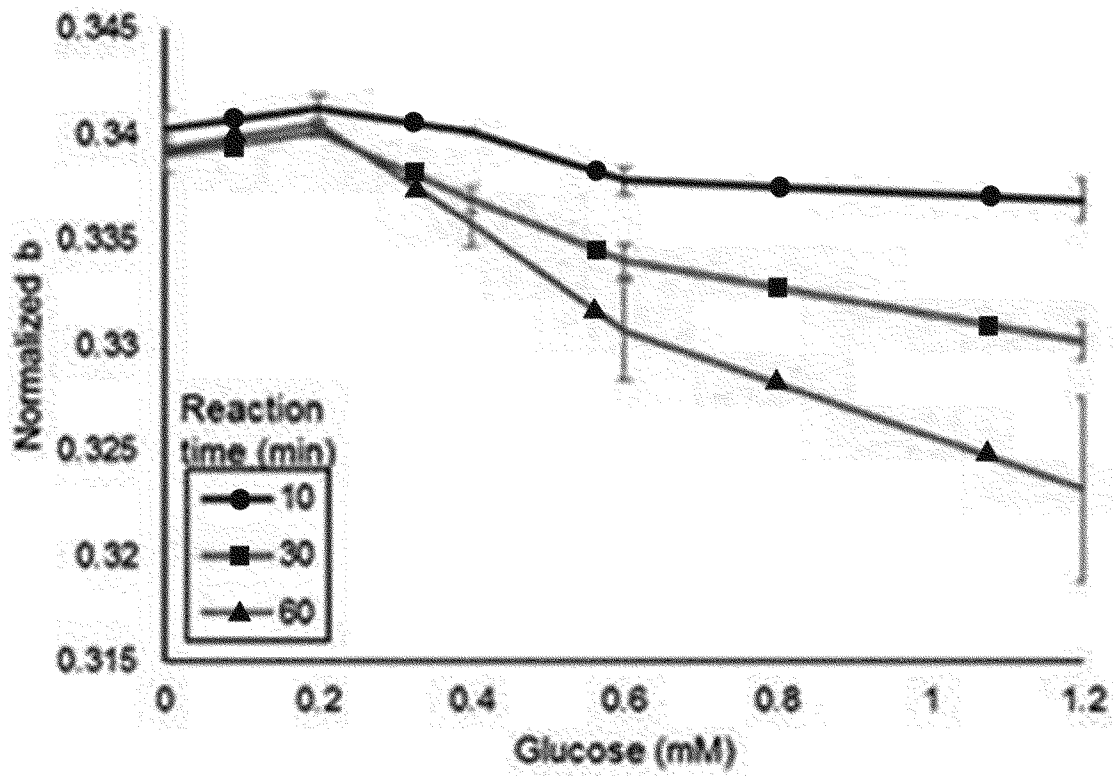
[도21b]



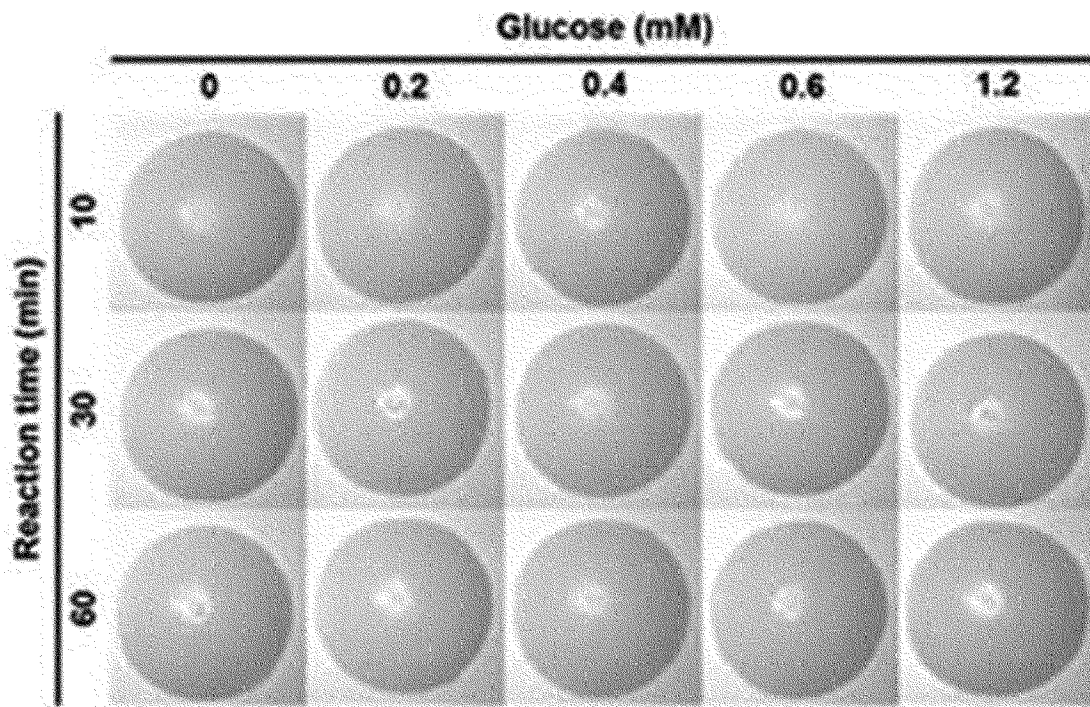
[도22a]



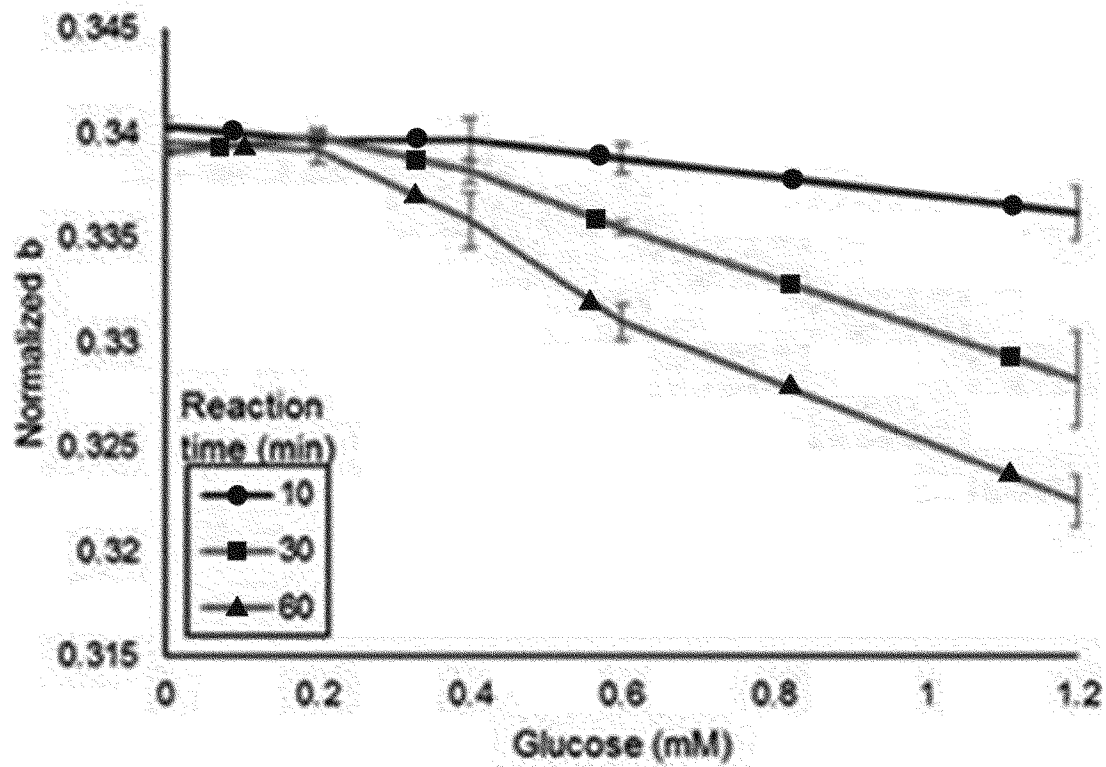
[도22b]



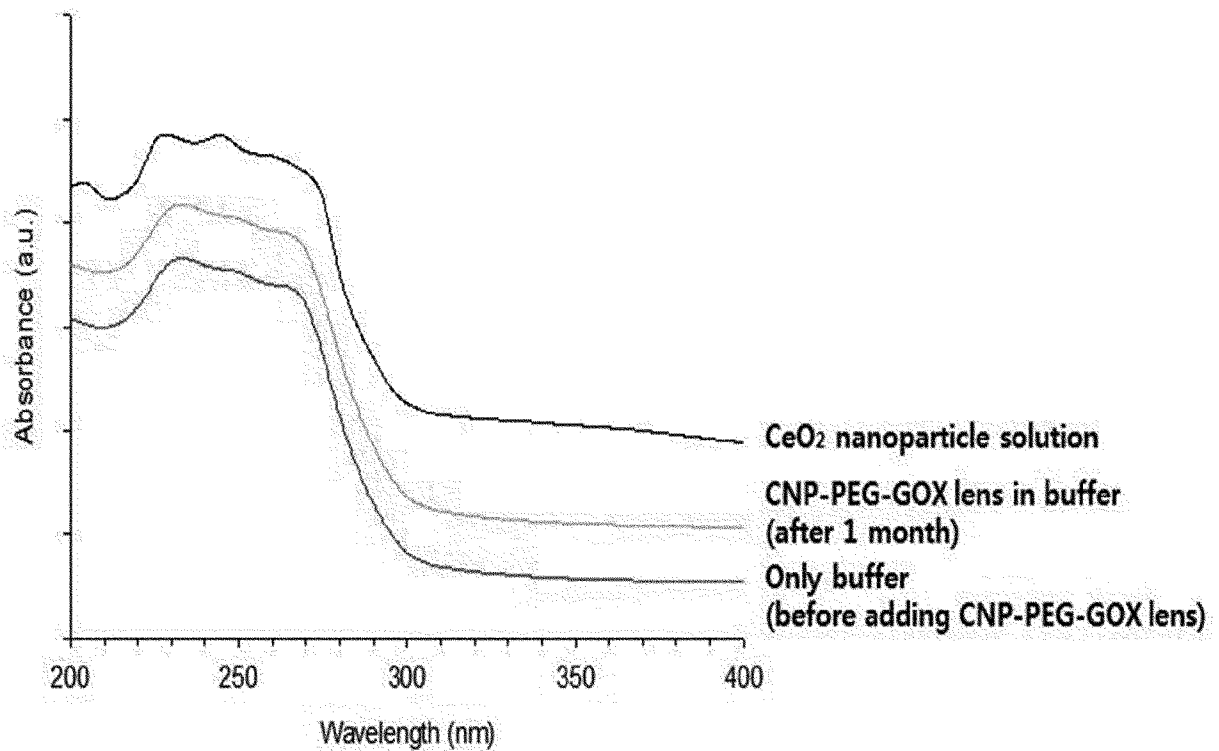
[도23a]



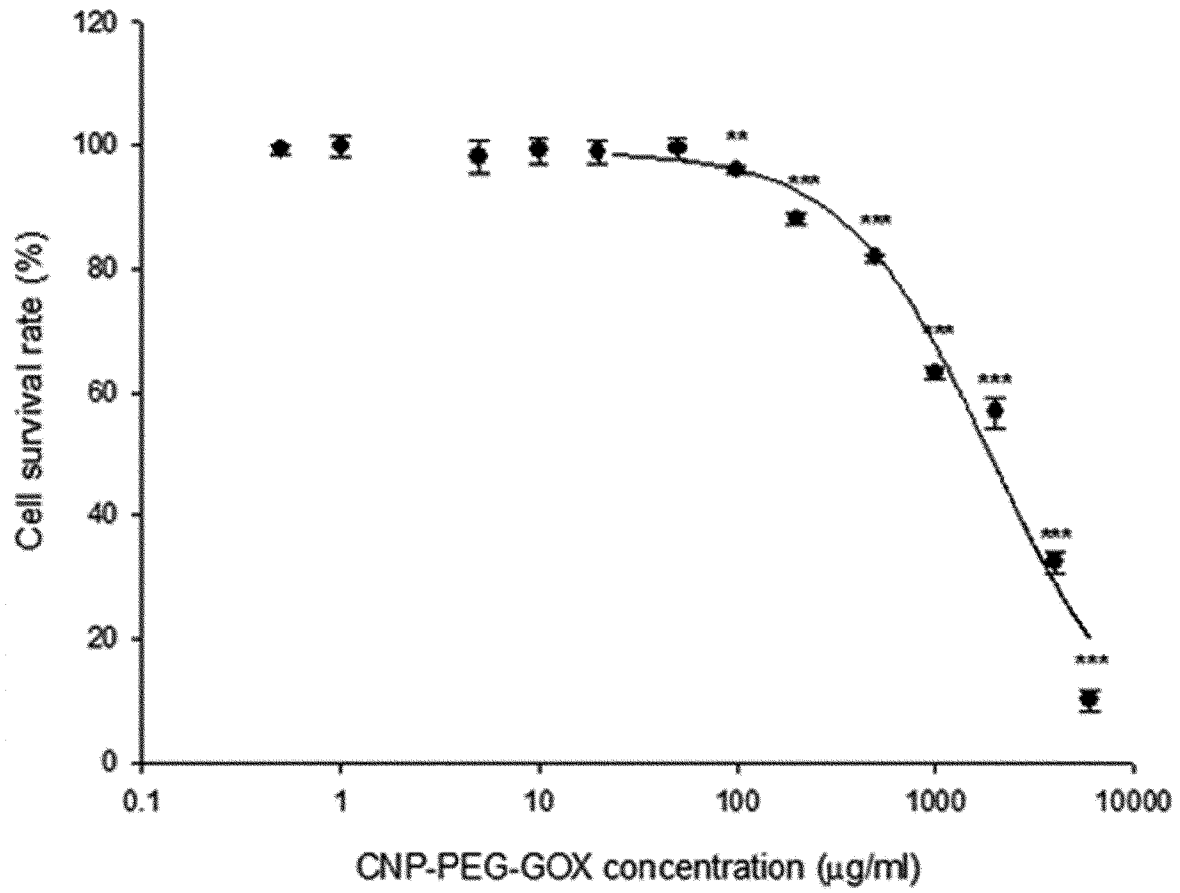
[도23b]



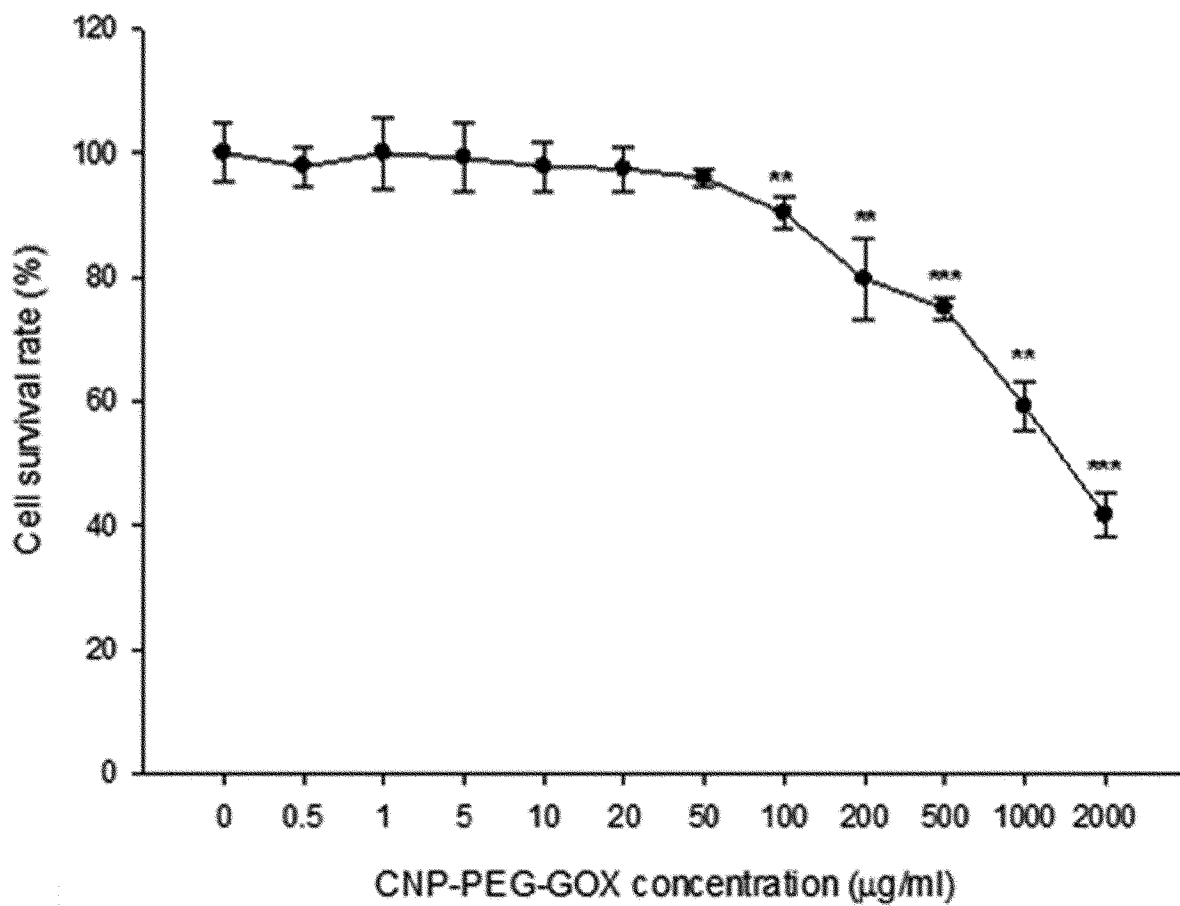
[도24]



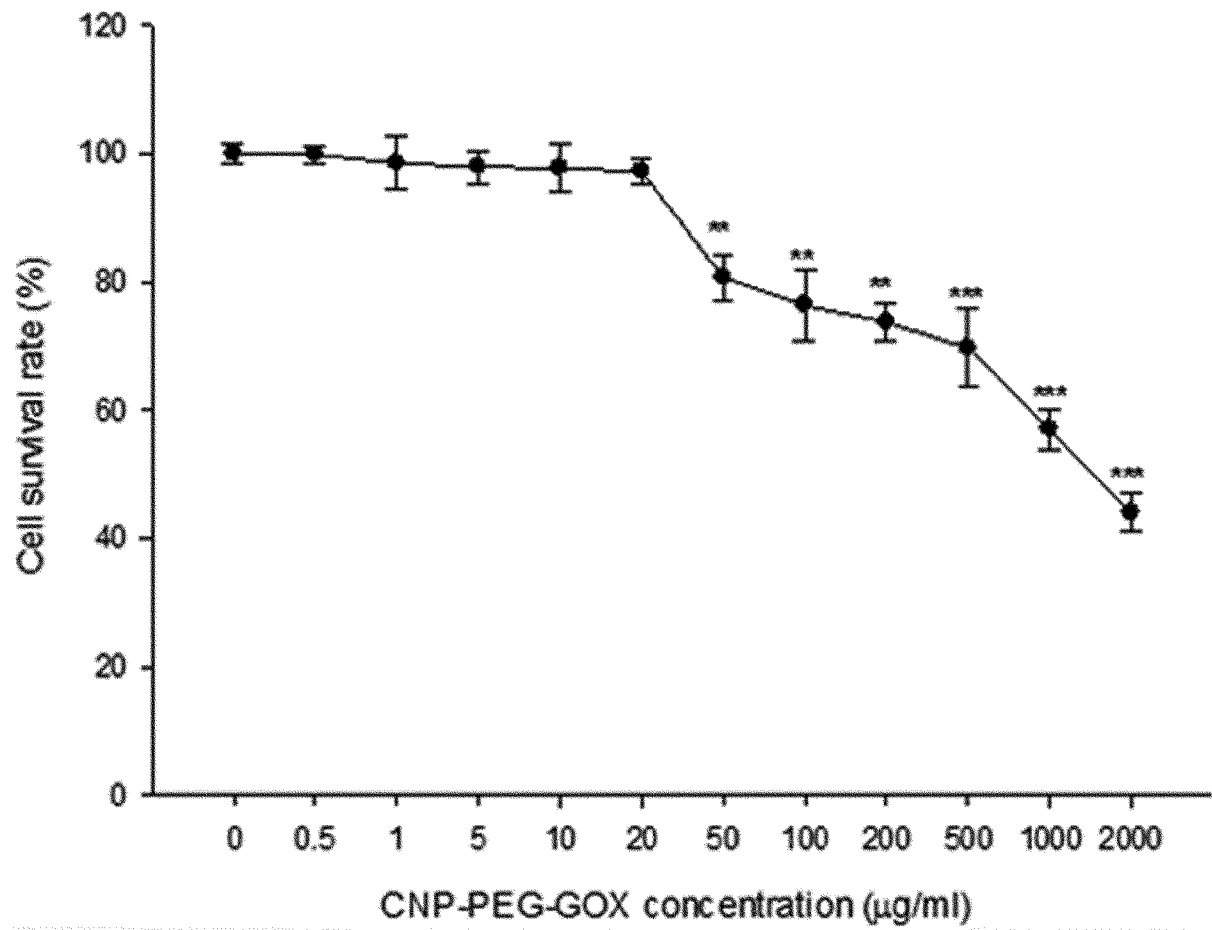
[도25a]



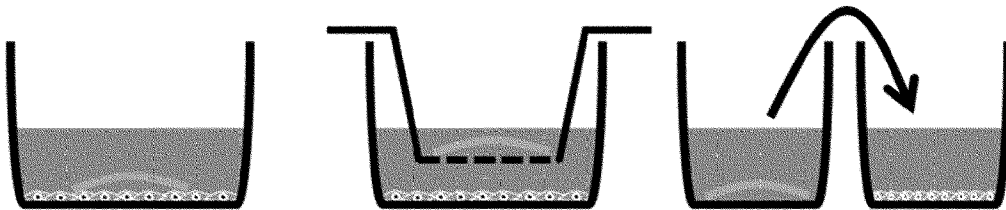
[도25b]



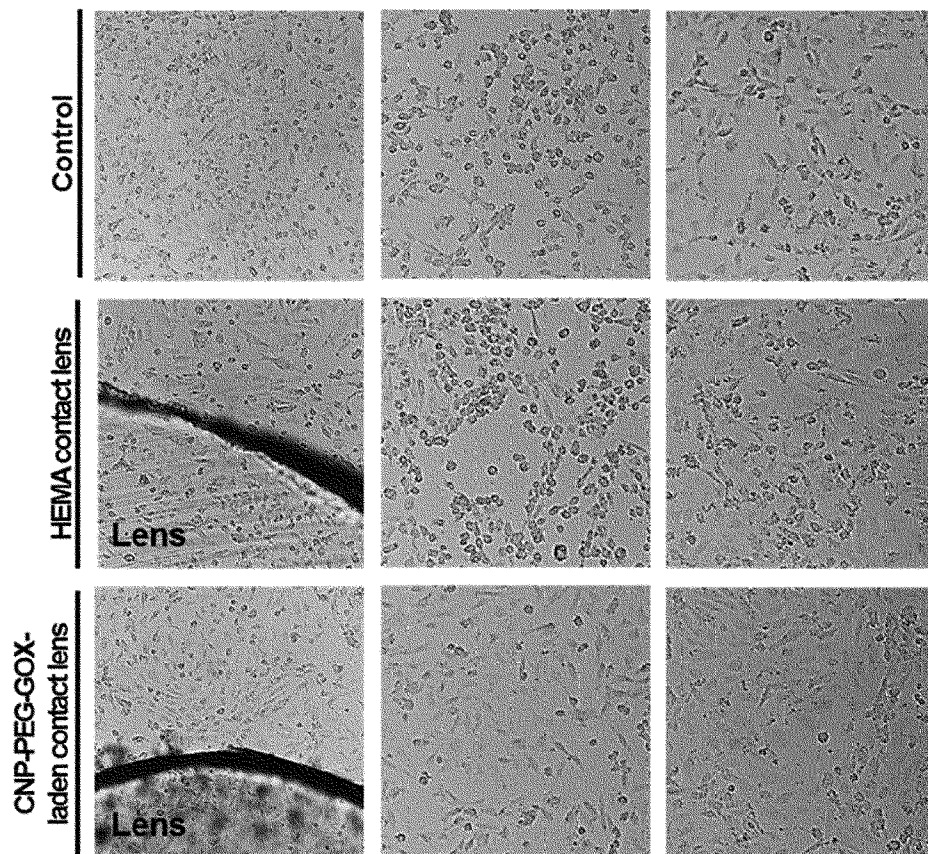
[도25c]



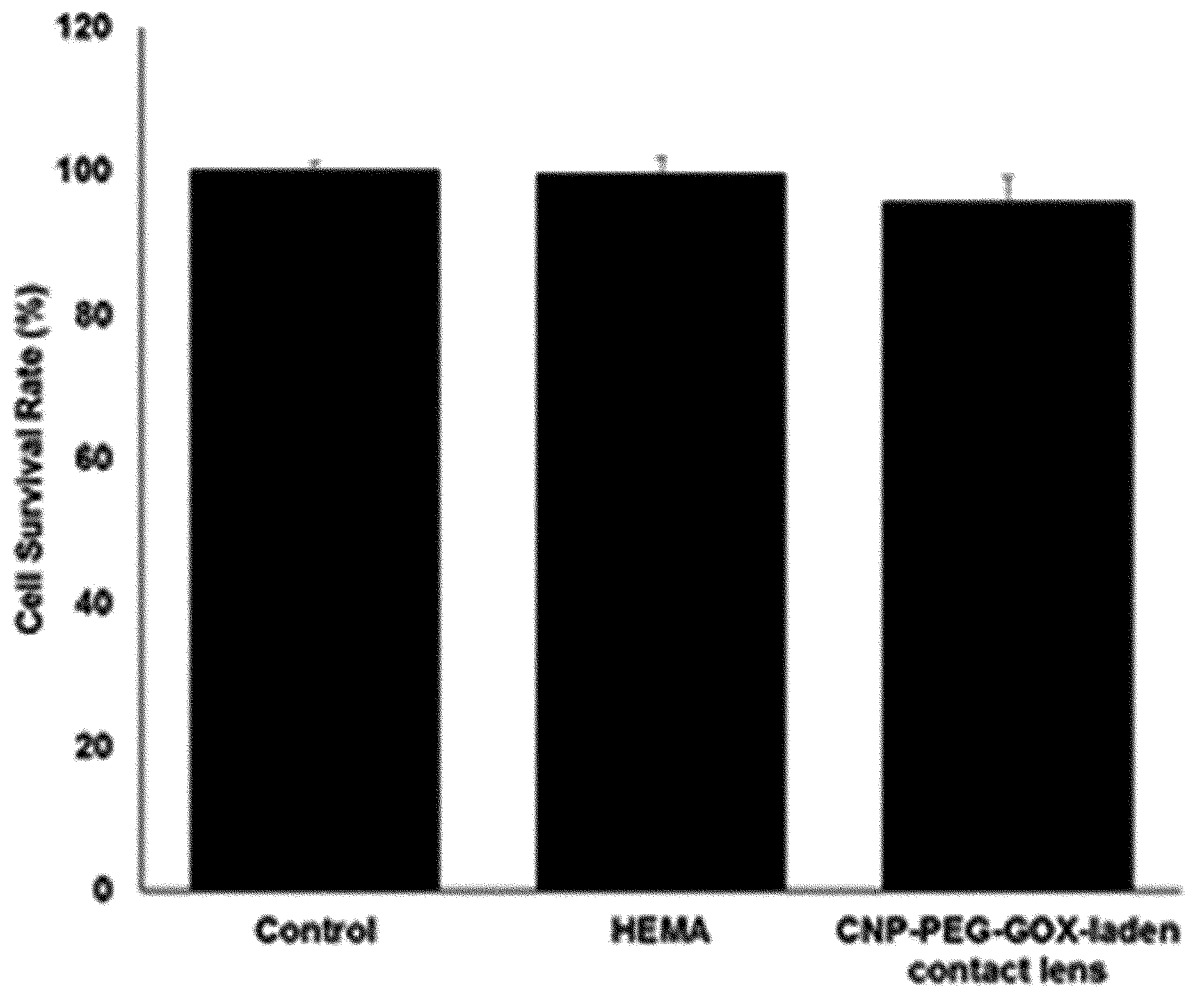
[도26a]



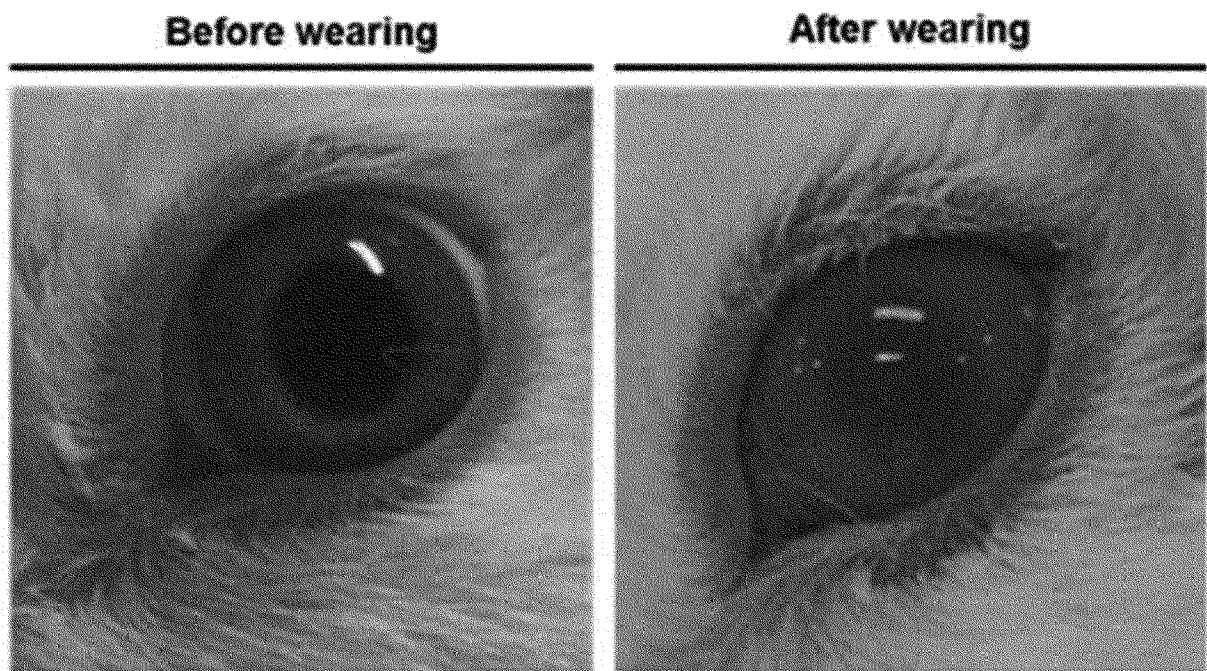
[도26b]



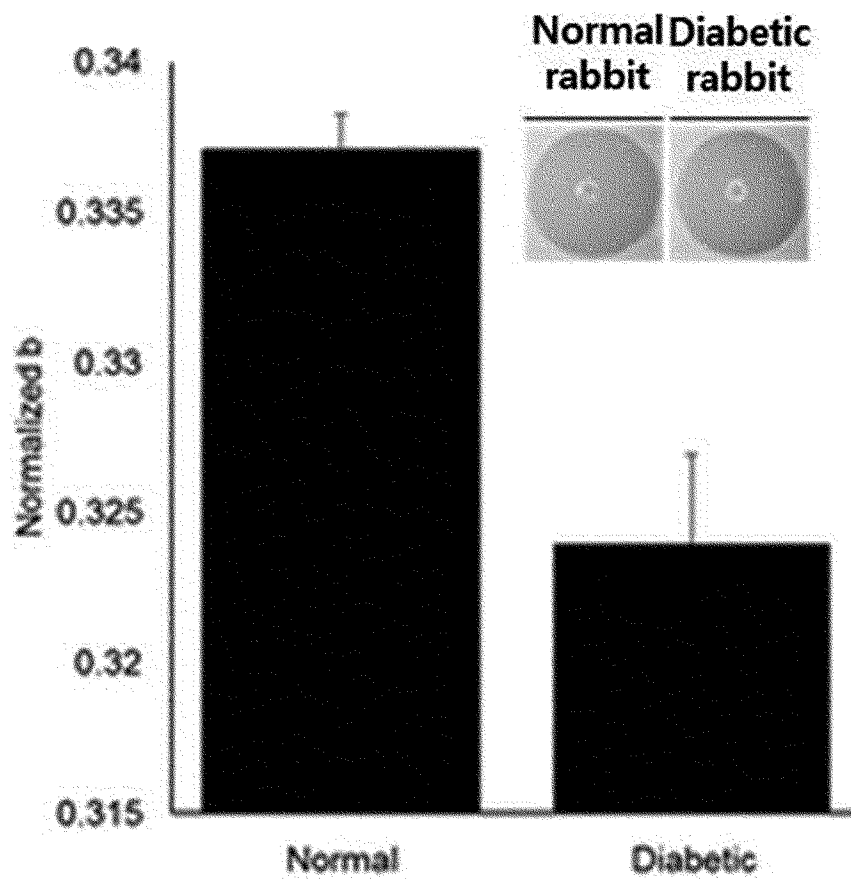
[도26c]



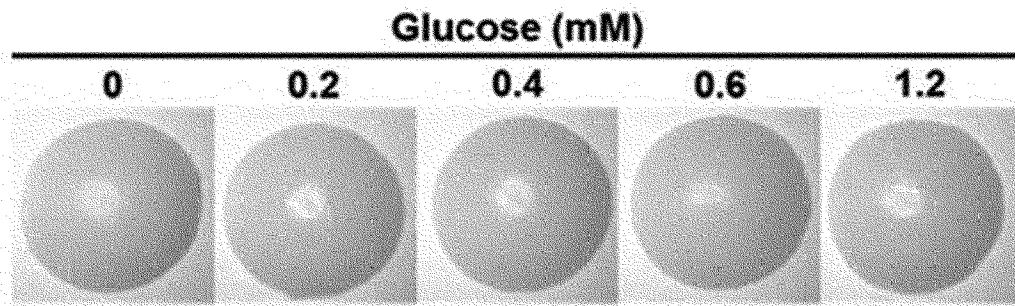
[도27a]



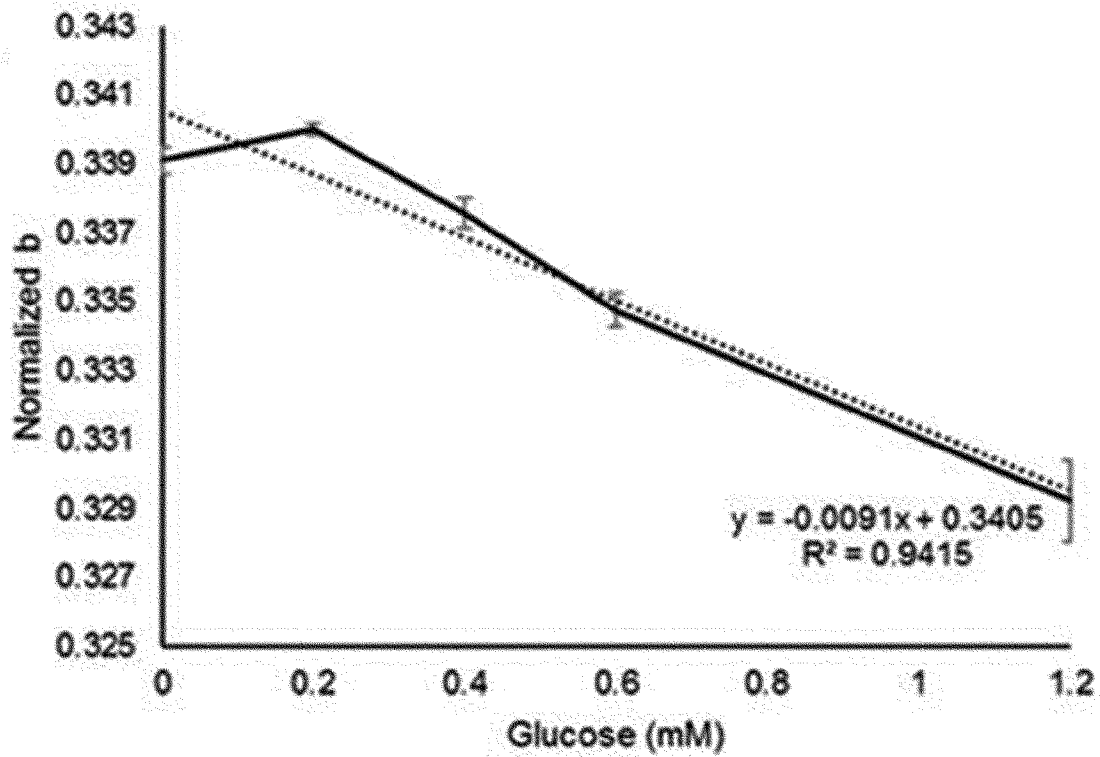
[도27b]



[도28a]



[도28b]



	blood glucose level (mg/dl)	tear glucose level (mM)
Normal	141	0.378152
Diabetic	540	1.818213

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/010680**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/64(2006.01)i, C12Q 1/00(2006.01)i, C12Q 1/54(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/64; A61M 31/00; C12Q 1/60; C12Q 1/54; A61B 5/1455; A61B 6/00; B29D 11/00; A61B 5/00; C12Q 1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: glucose detection, cerium oxide nano particle, glucose oxidase, biocompatible polymer, contact lens type sensor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014-0220608 A1 (ANDREESCU, E. S. et al.) 07 August 2014 See paragraphs [0039], [0041], [0045], [0056], [0058], [0069], [0085]; and figures 3-4B.	1-10
A	US 2010-0113901 A1 (ZHANG, J. et al.) 06 May 2010 See the entire document.	1-10
A	US 2012-0259188 A1 (BESLING, W. F. A.) 11 October 2012 See the entire document.	1-10
A	US 2012-0245444 A1 (OTIS, B. et al.) 27 September 2012 See the entire document.	1-10
A	US 2007-0016074 A1 (ABREU, M. M.) 18 January 2007 See the entire document.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 JANUARY 2018 (16.01.2018)

Date of mailing of the international search report

16 JANUARY 2018 (16.01.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/010680

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **11**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 11 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/010680

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2014-0220608 A1	07/08/2014	CA 2838591 A1	13/12/2012
		EP 2718711 A2	16/04/2014
		US 2012-0315659 A1	13/12/2012
		US 2014-0162368 A1	12/06/2014
		US 8691520 B2	08/04/2014
		US 8969085 B2	03/03/2015
		WO 2012-170851 A2	13/12/2012
		WO 2012-170851 A3	28/02/2013
		WO 2014-031633 A1	27/02/2014
US 2010-0113901 A1	06/05/2010	CA 2683467 A1	24/04/2010
		CA 2683467 C	26/01/2016
		US 8385998 B2	26/02/2013
US 2012-0259188 A1	11/10/2012	CN 102727218 A	17/10/2012
		EP 2508935 A1	10/10/2012
		US 9737245 B2	22/08/2017
US 2012-0245444 A1	27/09/2012	US 2011-0012217 A1	20/01/2011
		US 2012-0038881 A1	16/02/2012
		US 2013-0270664 A1	17/10/2013
		US 2015-0145095 A1	28/05/2015
		US 8394660 B2	12/03/2013
		US 8579434 B2	12/11/2013
		US 8608310 B2	17/12/2013
		US 8963268 B2	24/02/2015
		WO 2009-062055 A1	14/05/2009
US 2007-0016074 A1	18/01/2007	AT 531315 T	15/11/2011
		AU 1904900 A	22/05/2000
		AU 2001-284656 B2	10/07/2008
		AU 2008-229673 A1	30/10/2008
		AU 2008-229673 B2	17/06/2010
		AU 2010-221813 A1	07/10/2010
		AU 2010-221813 B2	02/05/2013
		AU 4177897 A	26/03/1998
		AU 741461 B2	29/11/2001
		AU 761842 B2	12/06/2003
		CA 2264193 A1	12/03/1998
		CA 2264193 C	25/03/2008
		CA 2348266 A1	11/05/2000
		CA 2438141 A1	06/09/2002
		CA 2438141 C	09/06/2009
		CA 2617004 A1	06/09/2002
		CA 2617312 A1	06/09/2002
		CA 2617312 C	11/02/2014
		CA 2661960 A1	06/09/2002
		CA 2661960 C	03/07/2012
		CN 100525631 C	12/08/2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/010680

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		CN 101653354 A	24/02/2010
		CN 101653354 B	23/07/2014
		CN 1200637 C	11/05/2005
		CN 1229345 A	22/09/1999
		CN 1328432 A	26/12/2001
		CN 1492735 A	28/04/2004
		DK 1818008 T3	20/02/2012
		EP 0926979 A1	09/07/2003
		EP 1126781 A1	29/08/2001
		EP 1126781 B1	21/12/2016
		EP 1370144 A1	17/12/2003
		EP 1818008 A1	15/08/2007
		EP 1818008 B1	02/11/2011
		EP 1820442 A1	22/08/2007
		EP 1941829 A2	09/07/2008
		EP 1941829 A3	21/01/2009
		JP 2000-517231 A	26/12/2000
		JP 2002-528212 A	03/09/2002
		JP 2005-502389 A	27/01/2005
		JP 2011-005261 A	13/01/2011
		JP 4754770 B2	24/08/2011
		JP 5207490 B2	12/06/2013
		KR 10-0411363 B1	18/12/2003
		KR 10-2000-0068457 A	25/11/2000
		US 2002-0049374 A1	25/04/2002
		US 2002-0049389 A1	25/04/2002
		US 2003-0069489 A1	10/04/2003
		US 2003-0139687 A1	24/07/2003
		US 2004-0039297 A1	26/02/2004
		US 2004-0039298 A1	26/02/2004
		US 2007-0142718 A1	21/06/2007
		US 2008-0000037 A1	03/01/2008
		US 2009-0036761 A1	05/02/2009
		US 2010-0145180 A1	10/06/2010
		US 2011-0028807 A1	03/02/2011
		US 2011-0040161 A1	17/02/2011
		US 2015-0065837 A1	05/03/2015
		US 2015-0085249 A1	26/03/2015
		US 2017-0258320 A1	14/09/2017
		US 5830139 A	03/11/1998
		US 6120460 A	19/09/2000
		US 6123668 A	26/09/2000
		US 6213943 B1	10/04/2001
		US 6312393 B1	06/11/2001
		US 6423001 B1	23/07/2002
		US 6544193 B2	08/04/2003
		US 7041063 B2	09/05/2006
		US 7403805 B2	22/07/2008
		US 7654957 B2	02/02/2010
		US 7756559 B2	13/07/2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/010680

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 7809417 B2	05/10/2010
		US 7837801 B2	23/11/2010
		US 8774885 B2	08/07/2014
		US 8914089 B2	16/12/2014
		WO 00-25662 A1	11/05/2000
		WO 02-067688 A1	06/09/2002
		WO 02-067688 A8	23/10/2003
		WO 98-09564 A1	12/03/1998

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/64(2006.01)i, C12Q 1/00(2006.01)i, C12Q 1/54(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/64; A61M 31/00; C12Q 1/60; C12Q 1/54; A61B 5/1455; A61B 6/00; B29D 11/00; A61B 5/00; C12Q 1/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:포도당 검출, 산화세륨 나노입자, 포도당 산화효소, 생체적합성 고분자, 콘택트렌즈형 센서

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2014-0220608 A1 (ANDREESCU, E. S. 등) 2014.08.07 단락 [0039], [0041], [0045], [0056], [0058], [0069], [0085]; 및 도면 3-4B 참조.	1-10
A	US 2010-0113901 A1 (ZHANG, J. 등) 2010.05.06 전문 참조.	1-10
A	US 2012-0259188 A1 (BESLING, W. F. A.) 2012.10.11 전문 참조.	1-10
A	US 2012-0245444 A1 (OTIS, B. 등) 2012.09.27 전문 참조.	1-10
A	US 2007-0016074 A1 (ABREU, M. M.) 2007.01.18 전문 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 01월 16일 (16.01.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 01월 16일 (16.01.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



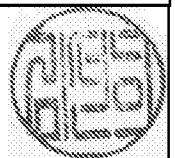
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 11
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제11항은 사람의 처치방법을 포함하고 있으므로, PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2014-0220608 A1	2014/08/07	CA 2838591 A1 EP 2718711 A2 US 2012-0315659 A1 US 2014-0162368 A1 US 8691520 B2 US 8969085 B2 WO 2012-170851 A2 WO 2012-170851 A3 WO 2014-031633 A1	2012/12/13 2014/04/16 2012/12/13 2014/06/12 2014/04/08 2015/03/03 2012/12/13 2013/02/28 2014/02/27
US 2010-0113901 A1	2010/05/06	CA 2683467 A1 CA 2683467 C US 8385998 B2	2010/04/24 2016/01/26 2013/02/26
US 2012-0259188 A1	2012/10/11	CN 102727218 A EP 2508935 A1 US 9737245 B2	2012/10/17 2012/10/10 2017/08/22
US 2012-0245444 A1	2012/09/27	US 2011-0012217 A1 US 2012-0038881 A1 US 2013-0270664 A1 US 2015-0145095 A1 US 8394660 B2 US 8579434 B2 US 8608310 B2 US 8963268 B2 WO 2009-062055 A1	2011/01/20 2012/02/16 2013/10/17 2015/05/28 2013/03/12 2013/11/12 2013/12/17 2015/02/24 2009/05/14
US 2007-0016074 A1	2007/01/18	AT 531315 T AU 1904900 A AU 2001-284656 B2 AU 2008-229673 A1 AU 2008-229673 B2 AU 2010-221813 A1 AU 2010-221813 B2 AU 4177897 A AU 741461 B2 AU 761842 B2 CA 2264193 A1 CA 2264193 C CA 2348266 A1 CA 2438141 A1 CA 2438141 C CA 2617004 A1 CA 2617312 A1 CA 2617312 C CA 2661960 A1 CA 2661960 C CN 100525631 C	2011/11/15 2000/05/22 2008/07/10 2008/10/30 2010/06/17 2010/10/07 2013/05/02 1998/03/26 2001/11/29 2003/06/12 1998/03/12 2008/03/25 2000/05/11 2002/09/06 2009/06/09 2002/09/06 2002/09/06 2014/02/11 2002/09/06 2012/07/03 2009/08/12

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

CN 101653354 A	2010/02/24
CN 101653354 B	2014/07/23
CN 1200637 C	2005/05/11
CN 1229345 A	1999/09/22
CN 1328432 A	2001/12/26
CN 1492735 A	2004/04/28
DK 1818008 T3	2012/02/20
EP 0926979 A1	2003/07/09
EP 1126781 A1	2001/08/29
EP 1126781 B1	2016/12/21
EP 1370144 A1	2003/12/17
EP 1818008 A1	2007/08/15
EP 1818008 B1	2011/11/02
EP 1820442 A1	2007/08/22
EP 1941829 A2	2008/07/09
EP 1941829 A3	2009/01/21
JP 2000-517231 A	2000/12/26
JP 2002-528212 A	2002/09/03
JP 2005-502389 A	2005/01/27
JP 2011-005261 A	2011/01/13
JP 4754770 B2	2011/08/24
JP 5207490 B2	2013/06/12
KR 10-0411363 B1	2003/12/18
KR 10-2000-0068457 A	2000/11/25
US 2002-0049374 A1	2002/04/25
US 2002-0049389 A1	2002/04/25
US 2003-0069489 A1	2003/04/10
US 2003-0139687 A1	2003/07/24
US 2004-0039297 A1	2004/02/26
US 2004-0039298 A1	2004/02/26
US 2007-0142718 A1	2007/06/21
US 2008-0000037 A1	2008/01/03
US 2009-0036761 A1	2009/02/05
US 2010-0145180 A1	2010/06/10
US 2011-0028807 A1	2011/02/03
US 2011-0040161 A1	2011/02/17
US 2015-0065837 A1	2015/03/05
US 2015-0085249 A1	2015/03/26
US 2017-0258320 A1	2017/09/14
US 5830139 A	1998/11/03
US 6120460 A	2000/09/19
US 6123668 A	2000/09/26
US 6213943 B1	2001/04/10
US 6312393 B1	2001/11/06
US 6423001 B1	2002/07/23
US 6544193 B2	2003/04/08
US 7041063 B2	2006/05/09
US 7403805 B2	2008/07/22
US 7654957 B2	2010/02/02
US 7756559 B2	2010/07/13

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 7809417 B2	2010/10/05
US 7837801 B2	2010/11/23
US 8774885 B2	2014/07/08
US 8914089 B2	2014/12/16
WO 00-25662 A1	2000/05/11
WO 02-067688 A1	2002/09/06
WO 02-067688 A8	2003/10/23
WO 98-09564 A1	1998/03/12