(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0014559
(43) 공개일자 2025년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) *B01L 3/00* (2023.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54393 (2013.01)
B01L 3/5023 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0094771
(22) 출원일자 2023년07월20일
심사청구일자 2023년07월20일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
신관우
서울특별시 강남구 언주로30길 26 G-1208
마하르디카, 이그나시아 한디프타
서울특별시 마포구 서강로 136 아이비타워 1407호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인에스알비

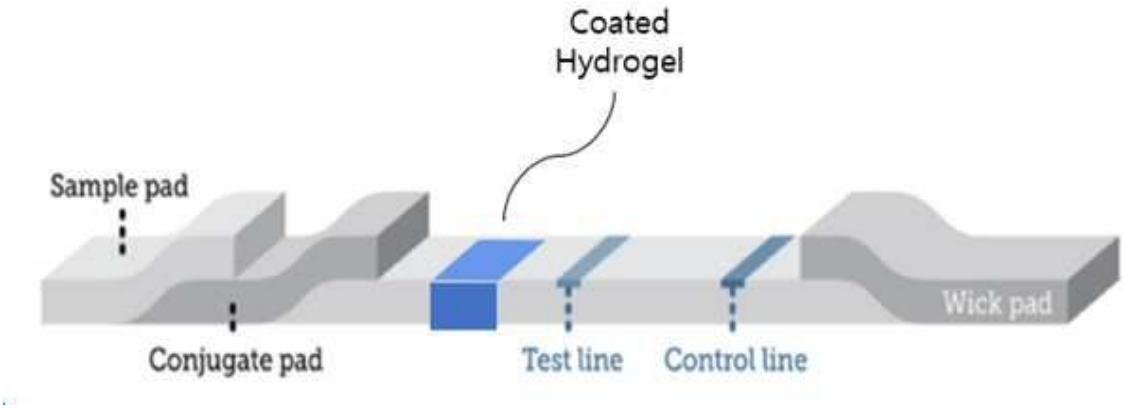
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **하이드로겔 코팅 구간을 활용한 검출 감도가 향상된 진단키트**

(57) 요 약

본 발명은 하이드로겔 코팅 구간을 활용한 검출 감도가 향상된 진단키트에 관한 것으로, 상기 진단키트는 하이드로겔 코팅 구간을 활용하여 검체의 흐름 속도를 조절하고 검체내 타켓 물질과 진단 키트의 표지 물질과의 반응시간을 증가시켜 적은 농도의 검체로도 타겟 물질의 검출이 가능하게 하여 진단 키트의 민감도를 향상시킬 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/54388 (2021.08)
B01L 2300/0825 (2013.01)
B01L 2300/16 (2013.01)

(72) 발명자
편나윤
경기도 의정부시 동일로 397, 202-1104호
김창호
서울특별시 도봉구 삼양로162가길 42-12, 226동 401호
권오선
경기도 용인시 수지구 신봉2로 72 LG자이2차 아파트 221-504호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345364271
과제번호 2018R1A6A1A03024940
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중점연구소지원사업
연구과제명 분자 자가 조립 기반 기능성 인공세포 구현
기 여 율 25/100
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711157366
과제번호 2021K1A4A8A02079222
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 해외우수기관협력허브구축
연구과제명 서강-하버드-SDU BioHybrid 공동 연구센터
기 여 율 25/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711187812
과제번호 2019R1A2C2084638
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 바이오 분자 소재의 다차원 계층 구조 연구
기 여 율 25/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415180675
과제번호 20214000000500
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국에너지기술평가원
연구사업명 에너지인력양성사업(RCMS)
연구과제명 녹색성장을 위한 CCUS 전문인력양성
기 여 율 25/100
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

일측에서 타측 방향으로 하이드로겔(hydrogel) 코팅 구간, 검사선 및 대조선이 순서대로 위치하고 있는 멤브레인;

상기 멤브레인의 일측 상에 중첩되어 구비된 접합 패드(conjugate pad);

상기 접합 패드 상에 중첩되어 구비된, 검체가 가해지는 샘플 패드(sample pad); 및

상기 멤브레인의 타측 상에 중첩되어 구비된, 반응이 종료된 검체를 흡수하는 흡수 패드(absorbent pad)를 포함하는 검출 감도가 향상된 진단키트.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 농도가 3 내지 36 중량%인 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 함량이 0.1 내지 4 uL인 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 입자의 직경이 10 내지 100 ㎛인 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리포스파젠, 폴리포스포에스테르, 폴리글라이콜라이드, 폴리락타이드, 폴리락타이드글리콜라이드, 폴리다이옥사논, 폴리카프로락톤, 폴리트리메틸렌카보네이트, 폴리우레탄, 폴리아크릴산, 폴리비닐알코올, 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드), 폴리사카라이드, 하이드록시에틸메타아크릴레이트, 알지네이트, 콜라겐, 젤라틴, 키토산, 덱스트란, 엘라스틴, 히알루론산, 히알루로난/젤라틴, 보바인세럼알부민, 콜라겐-콘드로이틴설페이트, 아크릴아마이드/이타콘산 코폴리머, 폴리에틸렌옥사이드/폴리프로필렌옥사이드/폴리에틸렌옥사이드(PEO/PPO/PEO) 코폴리머, 및 폴리에틸렌글리콜/폴리락틱에시드/폴리에틸렌글리콜(PEG/PLA/PEG) 코폴리머로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 검출 감도가 향상된 진단 키트의 검체 내 타겟 물질의 검출 한계는 36 내지 42 mIU/mL인 것인, 검출 감도가 향상된 진단 키트.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 멤브레인은 나일론, 폴리에스터, 셀룰로오스, 폴리에테르설폰, 폴리비닐리덴디플루오라이드, 셀룰로오스

아세테이트, 폴리우레탄, 유리섬유 및 니트로셀룰로오스로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 접합 패드는 상기 검체 내 타켓 물질과 반응하는 표지 물질을 포함하고, 상기 표지 물질은 금입자, 은입자, 라텍스 비드(latex bead), 셀룰로오스, 발색 효소 및 형광 입자로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 검체는 개체로부터 분리된 생물학적 샘플로서 조직, 혈청, 혈장, 전혈, 타액, 뇨 및 대변으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트.

청구항 10

(S10) 일측에서 타측 방향으로 검사선 및 대조선이 순서대로 위치하고 있는 멤브레인, 상기 멤브레인의 일측 상에 중첩되어 구비된 접합 패드(conjugate pad), 상기 접합 패드 상에 중첩되어 구비된, 검체가 가해지는 샘플 패드(sample pad) 및 상기 멤브레인의 타측 상에 중첩되어 구비된, 반응이 종료된 검체를 흡수하는 흡수 패드(absorbent pad)를 포함하는 진단키트를 제조하는 단계; 및

(S20) 상기 멤브레인 중, 상기 접합 패드와 상기 검사선 사이에 위치하는 부위에 하이드로겔(hydrogel) 코팅 구간을 형성시키는 단계를 포함하는 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트 제조방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 (S20) 단계는, 하이드로겔을 상기 멤브레인에 코팅시킨 후, 10 내지 14 시간 동안 동결건조 시키는 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트 제조방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 (S20) 단계에서 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 농도가 3 내지 36 중량%인 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트 제조방법.

청구항 13

제 10 항에 있어서,

상기 (S20) 단계에서 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 함량이 0.1 내지 4 uL인 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트 제조방법.

청구항 14

제 10 항에 있어서,

상기 (S20) 단계에서 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 광개시제를 포함하며 UV 조사에 의해 경화된 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트 제조방법.

청구항 15

제 10 항에 있어서,

상기 (S20) 단계에서 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리포스파젠, 폴리포스포에스테르, 폴리글라이콜라이드, 폴리락타이드, 폴리락타

이드글리콜라이드, 폴리다이옥사논, 폴리카프로락톤, 폴리트리메틸렌카보네이트, 폴리우레탄, 폴리아크릴산, 폴리비닐알코올, 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드), 폴리사카라이드, 하이드록시에틸메타아크릴레이트, 알지네이트, 콜라겐, 젤라틴, 키토산, 덱스트란, 히알루로난/젤라틴, 보바인세럼알부민, 콜라겐-콘드로이틴설페이트, 아크릴아마이드/이타콘산 코폴리머, 폴리에틸렌옥사이드/폴리프로필렌옥사이드/폴리에틸렌옥사이드(PEO/PPO/PEO) 코폴리머, 및 폴리에틸렌글리콜/폴리락틱에시드/폴리에틸렌글리콜(PEG/PLA/PEG) 코폴리머로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 검출 감도가 향상된 진단키트 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 하이드로겔 코팅 구간을 활용한 검출 감도가 향상된 진단키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 대유행한 코로나-19는 강력한 전파력과 높은 치사율을 동반한 인한 고위험 호흡기 바이러스로서, 이로 인한 집단 감염이 속출함에 따라 바이러스를 조기 검출가능한 진단키트의 개발이 중요해지고 있으며, 진단키트 수요도 증가하는 추세에 있다.

[0003] 진단키트란, 혈액, 타액 및 뇨 등의 개체로부터 분리된 액체샘플에서 존재하는 물질을 검사 또는 조사하는 장치이다.

[0004] 이러한 진단키트로 대표되는 체외진단의료기기는 제품의 개인 및 공중위해성 판단 기준에 따라 4등급 체계로 분류되며, 위해성이 가장 낮은 1등급은 유전자 추출 시약 등이며, 2등급은 임신진단, 헬리코박터 파이로리 검사 등이고, 위해성이 중등인 3등급은 인플루엔자 감염진단 및 종양검사 등이며, 마지막으로 위해성이 가장 높은 4등급은 HIV, HBV, HCV, 선별 시약 및 혈액형 판정 시약 등이 있다.

[0005] 특히, 현대의 진단 검사는 신속진단을 위해 현장검사(Point-Of-Care Testing: POCT)로 통합되고 있다. 현장검사(POCT)는 중앙화된 검사실 이외에서 이루어지는 검사로 전문지식이 없는 일반인도 사용 가능한 장비이다. 코로나-19로 인하여 신속진단의 필요성이 더욱 높아져, 최근에는 진단 영역에 있어서 전문가가 주도하는 병원에서 현장 및 개인으로 그 영역이 확장되고 있는 추세이다.

[0006] 신속진단이란, 건조된 멤브레인에 검체를 떨어뜨려 검체가 흡수되면서 발생하는 측면유동(Lateral flow)을 이용해 표적분자(예, 항원, 항체)를 검출할 수 있는 진단기술을 의미하며, 통상 검체 채취 후 15분 내외의 짧은 시간에 육안으로 손쉽게 검사 결과를 확인할 수 있는 직관적인 진단법이다.

[0007] 이러한 신속진단은 간편하고 빠른 진단을 위해 면역크로마토그래피 분석법을 이용하여 보건의료분야에서 질병을 확인하기위해 사용되며, 생물 공정 분야 및 환경 분야 등의 다양한 분야에서 미량의 분석 물질 정성 및 정량을 위해 개발되고 있다. 특히, 신속진단은 보건 의료 분야에서 임신, 배란, 질병, 약물 남용 및 암 등의 응용 범위가 점점 확대되고 있다.

[0008] 면역크로마토그래피 분석 기술에서 검체 내 타켓 물질을 특징적으로 인식하는 포획자인 항체나 항원이 타겟 물질을 인식하는 항원-항체 반응을 통해 검체를 분석하며, 특히 샌드위치형 면역분석법은 타겟 물질에 특이적 결합하는 제 1 항체가 결합되고, 여기서 다시 타겟 물질에 특이적 결합하는 제 2 항체를 이용하게 된다.

[0009] 측방유동분석법(Lateral flow assay)으로 대표되는 진단키트의 경우, 위와 같은 샌드위치형 면역분석법이 모세관 현상에서 발생하는 유체 흐름에 따른 이동 상태에서 일어나게 된다. 진단키트는 형태를 유지하기 위한 지지체 위에 차례대로 샘플 패드(sample pad), 접합 패드(conjugate pad), 멤브레인, 흡수 패드(absorbent pad)가 연결된 형태를 주로 사용하여, 검체가 상기 샘플 패드에 가해지면 상기 샘플 패드는 검체를 흡수하고 균일한 유동을 보장하며, 샘플 패드와 연결된 상기 접합 패드에서 검체 내 타겟 물질과 특이적인 항체가 부착된 표지 물질이 고정되어 있어, 검체와 항원-항체 결합체가 형성되어 모세관 현상에 의해 다공질 섬유체인 멤브레인을 통해 이동하고, 멤브레인에는 타켓 물질과 선택적으로 결합하는 고정화된 항체 및 표지 물질에 고정화된 항체와 결합할 수 있는 물질이 각각 다른 위치에 고정화되어 각각 검사선과 대조선을 형성한다. 상기 타겟 물질과 선택적으로 결합할 수 있는 멤브레인에 고정화된 항체와 표지 물질에 고정화된 항체는 타겟 물질에 대해 샌드위치 형태로 결합되며, 상기 흡수 패드는 검체를 흡수할 수 있는 물질로 구성된다.

[0010] 따라서, 검체 내 타겟 물질이 존재하는 경우 항체-표지 물질과 멤브레인에 고정된 항체가 샌드위치 형태로 결합

되어 상기 항체가 고정화된 멤브레인 위치에 육안으로 확인할 수 있는 밴드가 형성된다.

[0011] 그러나, 종래의 측방유동분석법(Lateral flow assay)은 ELISA와 같은 다른 면역분석법에 비해 측정할 수 있는 감도가 낮아 더 높은 감도와 낮은 검출 한계(Limit of detection, LoD)가 필요한 검체에 적용되는데 문제가 있다. 특히, 일반적인 진단 키트의 경우 검출 감도는 1^{-11}M(Giljohann, D. A.; Mirkin, C. A. *Nature* 2009, 462, 461-464)정도로 타겟 물질의 검출여부가 컷오프(cut-off) 값 근처에서 이루어질 경우 정확한 진단이 어려운 문제가 존재한다.

[0012] 나아가 검체 내 타겟 물질 이외의 물질들로 인해 모세관 현상으로 이동하는 검체의 유체 흐름을 방해하고, 검사선의 감도를 떨어뜨리는 문제가 있다.

[0013] 상기와 같은 검체 민감도 및 유체 흐름 향상을 위해 많은 연구들이 있었고, 효율적인 항원-항체 반응을 위한 바이오마커의 개발 및 진단 키트의 구조적 변화 등이 시도되었다.

[0014] 한편, 왁스프린팅(wax-printing)을 통해 하이드로포빅 장벽을 형성하여, 다양한 왁스필러(wax pillars) 패턴이 니트로셀룰로오스 멤브레인 위에서 유사 난류(pseudo turbulences) 및 유체 지연 현상을 발생시켜 측방유동분석법의 감도를 향상시킨 연구가 있었다.(Rivas, L., Medina-Sanchez, M., de la Escosura-Muniz, A., & Merkoci, A. (2014). Improving sensitivity of gold nanoparticle-based lateral flow assays by using wax-printed pillars as delay barriers of microfluidics. *Lab Chip, 14(22), 4406-4414.* doi:10.1039/c4lc00972j)

[0015] 또한, 생물학적 샘플 내의 이온을 전기장에서 농도에 따라 분리하여 분석하는 전기영동 분리 기술인 등속전기영동(Isotachophoresis)을 이용하여, 멤브레인 표면 반응속도를 크게 증가시켜 측방유동분석법의 검출 한계(LoD)를 향상시킨 연구도 있었다.(Moghadam, B. Y., Connelly, K. T., & Posner, J. D. (2015). Two Orders of Magnitude Improvement in Detection Limit of Lateral Flow Assays Using Isotachophoresis. *Analytical Chemistry*, 87(2), 1009-1017. doi:10.1021/ac504552r)

[0016] 그러나, 멤브레인 위에 직접 하이드로겔(hydrogel)을 코팅하여, 하이드로겔 코팅 구간을 통해 검체의 흐름 속도 조절 및 진단 키트의 민감도를 향상시킨 기술적 사상에 대해서는 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명은 하이드로겔 코팅 구간을 활용한 검출 감도가 향상된 진단키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0018] 구체적으로, 본 발명은 멤브레인에 위치한 하이드로겔 코딩 구간이 검체의 흐름 속도를 조절하고 검체내 타겟 물질과 진단 키트의 표지 물질과의 반응시간을 증가시켜 적은 농도의 검체로도 타겟 물질의 검출이 가능하게 하여, 진단 키트의 민감도를 향상시킨 하이드로겔 코팅 구간을 활용한 검출 감도가 향상된 진단키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0019] 또한, 본 발명은 접합 패드와 검사선 사이에 위치하는 멤브레인 부위에 하이드로겔(hydrogel) 코팅 구간을 형성시키는 단계를 포함하는 검출 감도가 향상된 진단키트 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 일측에서 타측 방향으로 하이드로겔(hydrogel) 코팅 구간, 검사선 및 대조선이 순서대로 위치하고 있는 멤브레인;

[0021] 상기 멤브레인의 일측 상에 중첩되어 구비된 접합 패드(conjugate pad);

[0022] 상기 접합 패드 상에 중첩되어 구비된, 검체가 가해지는 샘플 패드(sample pad); 및

[0023] 상기 멤브레인의 타측 상에 중첩되어 구비된, 반응이 종료된 검체를 흡수하는 흡수 패드(absorbent pad)를 포함하는 검출 감도가 향상된 진단키트를 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 검출 감도가 향상된 진단키트 제조방법을 제공한다:

[0025] (S10) 일측에서 타측 방향으로 검사선 및 대조선이 순서대로 위치하고 있는 멤브레인, 상기 멤브레인의 일측 상에 중첩되어 구비된 접합 패드(conjugate pad), 상기 접합 패드 상에 중첩되어 구비된, 검체가 가해지는 샘플 패드(sample pad) 및 상기 멤브레인의 타측 상에 중첩되어 구비된, 반응이 종료된 검체를 흡수하는 흡수 패드

(absorbent pad)를 포함하는 진단키트를 제조하는 단계; 및

[0026] (S20) 상기 멤브레인 중, 상기 접합 패드와 상기 검사선 사이에 위치하는 부위에 하이드로겔(hydrogel) 코팅 구간을 형성시키는 단계.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 검출 감도가 향상된 진단키트는 하이드로겔 코팅 구간을 활용하여 검체의 흐름 속도를 조절하고 검체 내 타켓 물질과 진단 키트의 표지 물질과의 반응시간을 증가시켜 적은 농도의 검체로도 타겟 물질의 검출이 가능하게 하여 진단 키트의 민감도를 향상시키는 효과를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본 발명에 따른 하이드로겔 코팅 구간이 포함된 진단 키트를 나타낸 것이다.

도 2는 코팅된 하이드로겔의 농도에 따른 니트로셀룰로오스(NC) 멤브레인의 기공의 변화를 주사전자현미경(SEM)을 통해 촬영한 사진이다.

도 3은 코팅된 하이드로겔의 농도에 따른 유속 및 색 강도를 측정한 그래프이다.

도 4는 하이드로겔이 코팅된 경우 용액의 흐름이 지연되는 것을 적색 염료를 사용하여 나타낸 사진이다.

도 5는 코팅된 하이드로겔 농도에 따른 시간에 따른 검체의 이동 거리를 측정한 그래프이다.

도 6a은 본 발명의 일 실시예에 따른 hCG 단백질을 이용한 진단 키트 제작 및 원리를 나타낸 것이다.

도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 hCG 단백질을 이용한 진단 키트에서 코팅된 하이드로겔의 농도에 따른 검사선(T)/대조선(C)의 강도 값을 나타낸 그래프이다.

도 7는 검출한계(LoD)를 결정하기 위해 0 및 9 중량% 하이드로겔 강도값의 선형회귀 분석을 나타낸 것이다.

도 8a는 본 발명의 일 실시예에 따른 상용 진단 키트를 이용한 코팅된 하이드로겔의 농도에 따른 검사선(T)/대조선(C)의 강도 값을 나타낸 그래프이다.

도 8b는 본 발명의 일 실시예에 따른 상용 진단 키트를 이용한 코팅된 하이드로겔의 농도에 따른 검사선(T)/대조선(C)의 강도 값을 나타낸 그래프이다.

도 8c는 본 발명의 일 실시예에 따른 상용 진단 키트를 이용한 코팅된 하이드로겔의 농도에 따른 검사선(T)/대조선(C)의 강도 값을 나타낸 그래프이다.

도 8d는 본 발명의 일 실시예에 따른 상용 진단 키트를 이용한 코팅된 하이드로겔의 농도에 따른 검사선(T)/대조선(C)의 강도 값을 나타낸 그래프이다.

도 8e는 본 발명의 일 실시예에 따른 상용 진단 키트를 이용한 코팅된 하이드로겔의 농도에 따른 검사선(T)/대조선(C)의 강도 값을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0030] 본 발명은 일측에서 타측 방향으로 하이드로겔(hydrogel) 코팅 구간, 검사선 및 대조선이 순서대로 위치하고 있는 멤브레인;

[0031] 상기 멤브레인의 일측 상에 중첩되어 구비된 접합 패드(conjugate pad);

[0032] 상기 접합 패드 상에 중첩되어 구비된, 검체가 가해지는 샘플 패드(sample pad); 및

[0033] 상기 멤브레인의 타측 상에 중첩되어 구비된, 반응이 종료된 검체를 흡수하는 흡수 패드(absorbent pad)를 포함하는 검출 감도가 향상된 진단키트에 관한 것이다.

[0034] 이와 관련하여, 도 1은 본 발명에 따른 하이드로겔 코팅 구간이 포함된 진단 키트를 도시하며, 상기 진단 키트는 면역크로마토그래피 기술을 이용한 진단 키트이다.

[0035] 도시된 바와 같이, 면역크로마토그래피 기술을 이용한 진단 키트의 일측에서 타측 방향으로 (i) 샘플 패드,

(ii) 접합 패드, (iii) 하이드로겔 코팅 구간, (iv) 검사선, (v) 대조선 및 (vi) 흡수 패드가 순차적으로 배열되어 있다. 각각의 패드는 상호 간에 접촉되거나 중첩된 형태로 배치될 수 있다. 중첩된 형태에서, 중첩된 영역의 폭은 0.1 내지 5 mm, 0.1 내지 4 mm, 0.1 내지 3 mm, 0.1 내지 2 mm, 0.5 내지 5 mm, 0.5 내지 4 mm, 0.5 내지 3 mm, 0.5 내지 2 mm, 1 내지 5 mm, 1 내지 4 mm, 1 내지 3 mm, 1 내지 2 mm인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 도시된 바에 따라, 검체 또는 검체를 포함하는 용액은 샘플 패드를 거쳐 접합 패드를 통과하고, 멤브레인 위의 하이드로겔 코팅 구간을 거치면서 검사선 및 대조선을 차례대로 통과하여 흡수 패드에 도달하게 된다.

[0037] 본 발명에서 사용되는 용어, "면역크로마토그래피"는 항원-항체반응에 기초한 면역 반응 원리, 리간드와 리셉터의 결합 원리 등과 검체가 이동상에 의해 매질을 따라 이동하는 크로마토그래피 원리를 결합시킨 분석 방법이다. 다공성 멤브레인에 분석하고자 하는 항원 또는 항체를 미리 분주시켜 고정하고, 멤브레인의 일 말단으로부터 상기 고정시켜 놓은 항원 또는 항체를 향해 검체를 포함한 용액을 전개시켜 검체 내 타겟물질과의 반응을 확인하는 것이다.

[0038] 본 발명에서 사용되는 용어, "샘플 패드(sample pad)"는 타겟 물질을 포함하는 검체가 가해지며 처음 흡수되는 부분으로, 멤브레인의 한쪽 끝단을 그대로 사용하거나 별도의 부재로 구성될 수 있고 타겟 물질을 포함하는 검체를 흡수하여 검체를 균일하게 분포시키고, 모세관 현상에 의해 검체를 접합 패드로 이동시킨다. 상기 샘플 패드는 유리섬유, 셀룰로오스 등과 같은 재질로 이루어질 수 있다.

[0039] 본 발명에서 사용되는 용어, "접합 패드(conjugate pad)"는 검체내 타겟 물질과 선택적으로 결합할 수 있는 항체가 부착된 접합체(conjugate)가 건조되어 있으며, 상기 접합체가 건조된 상태로 존재하다가 검체가 흡수되는 경우 유동성을 획득하여 멤브레인으로 이동한다. 상기 접합 패드는 유리섬유, 셀룰로오스 등과 같은 재질로 이루어질 수 있다.

[0040] 본 발명에서 사용되는 용어, "접합체(conjugate)"는 항체와 같은 특이적인 부착 성분에 결합된 검출 가능한 표지 물질 및 상기 특정 부착 성분을 포함한다.

[0041] 본 발명에서 사용되는 용어, "타겟 물질"은 검출의 목적인 검체 내 분자 등의 물질을 통칭하며, 항원성 물질, 리간드, 합텐(hapten), 항체 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 구체적으로는, 단백질, 펩타이드, 미생물, 독소, 아미노산, 핵산, 호르몬, 스테로이드, 비타민, 약물, 세균, 바이러스 입자, 진균, 효모, 원생 동물 및 상기 물질들의 대사물 또는 그에 대한 항체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예시적인 타겟 물질로 항원 또는 항체에는, 디곡신; 페니토인; 페노바비탈; 카바마제핀; 반코마이신; 젠타마이신; 테오필린; 발프로산; 황체 호르몬(LH); 여포 자극 호르몬(FSH); hCG 단백질; 에스트라디올; 프로게스테론; C-반응성 단백질; 리포칼린; IgE 항체; 사이토카인; 코르티졸; 디지톡신; N-아세틸프로카인아미드(NAPA); 프로카인아미드; 풍진 항체(풍진-IgG 또는 풍진-IgM); 인간 면역 결핍 바이러스 1 및 2(HIV 1 및 2); 인간 T-세포 백혈병 바이러스 1 및 2(HTLV); B형 간염 바이러스 표면 항원(HBsAg); 인플루엔자 바이러스; COVID(코로나 바이러스) 뉴클리오캡사이드 단백질; 갑상선 자극 호르몬; 티록신(T4); 트리요오드티로닌(T3); 지질 단백질; 및 콜레스테롤을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예시적인 타겟 물질로 약물에는 오용 및 제어 물질의 약물로서, 암페타민; 메쓰암페타민; 코카인; 펜타닐; LSD; 아편류; 바비탈류; 및 벤조디아제핀류를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명에서 사용되는 용어, "표지 물질"은 육안 또는 센서를 이용하여 감지할 수 있는 신호를 발생시키는 물질을 의미하며, 상기 항원-항체를 포함하는 여러 특이 결합 반응을 육안 또는 센서를 이용하여 용이하게 확인할 수 있도록 표지 물질을 이용할 수 있다. 상기 신호는 발광 등과 같이 표지 물질의 내재적 특성에 의해 자체적으로 발생할 수 있거나, 형광 등과 같이 외부의 자극에 의해 발생하는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명에서 사용되는 용어, "흡수 패드(absorbent pad)"는 모세관 현상에 의해 반응이 종료된 검체를 흡수하는 부분으로, 상기 반응이 종료된 검체를 흡수할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를들어 셀룰로오스, 친수다공성 폴리머 등과 같은 재질로 이루어질 수 있다.

[0044] 본 발명에서 사용되는 용어, "하이드로겔(hydrogel)"은 다량의 수분을 함유할 수 있는 삼차원의 친수성 및 단백질 친화적 가교-고분자 망상 구조(3D cross-linked polymer network)를 가진 물질을 의미하며, 수용액상에서 팽윤된 후에 열역학적으로 안정하게 존재하여 액체와 고체의 중간 형태에 해당하는 기계적, 물리화학적 특성을 지닌다.

[0045] 구체적으로 본 발명의 하이드로겔은, 상기 망상 구조 및 상기 기계적, 물리화학적 특성을 가지고 있어 멤브레인

에 코팅될 때 다공성 매트릭스를 생성한다. 생성된 상기 다공성 매트릭스는 유체 흐름 조절 및 수분을 유지하는 역할을 하며, 하이드로겔의 수분 유지 기능을 통해 모세관 현상으로 이동하는 검체의 움직임을 제한하고 제어된 유속을 제공하고 검체의 검체 내 타겟 물질과 멤브레인의 표지 물질 사이의 충분한 접촉 시간을 보장하여 분석의 감도와 정확도를 향상시켜 검체 내 타겟 물질의 검출 한계(limit of detection, LoD)를 향상시키며, 하이드로겔에 의해 보유된 수분은 저장소 기능을 통해 검체를 점진적으로 방출하고 분석 성능을 최적화할 수 있어 하이드로겔은 측방유동분석에 있어 전체 효율을 향상시키는 역할을 한다.

[0046] 일 실시예에 있어서, 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔 농도는 3 내지 36 중량%, 3 내지 27 중량%, 3 내지 18 중량%, 3 내지 12 중량%, 3 내지 9 중량%, 6 내지 36 중량%, 6 내지 27 중량%, 6 내지 18 중량%, 6 내지 12 중량%, 6 내지 9 중량%, 9 내지 36 중량%, 9 내지 27 중량%, 9 내지 18 중량%, 9 내지 12 중량%인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 범위 내에서, 멤브레인상의 검체의 흐름 속도가 조절되어 접합 패드의 표지 물질과의 반응속도가 증가하게 된다.

[0047] 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔 농도가 3 중량% 미만으로 사용될 경우, 검체의 흐름에 영향을 주지 못하여 검사선에서의 강도 변화가 크지 않는 문제점이 있을 수 있고, 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔 농도가 36 중량%를 초과할 경우에는, 유체의 저항이 증가하여 검체의 유속이 느려져 진단에 걸리는 시간이 길어지는 문제점이 있을 수 있다.

[0048] 일 실시예에 있어서, 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔 함량은 0.1 내지 4 uL, 0.1 내지 3 uL, 0.1 내지 2 uL, 0.5 내지 4 uL, 0.5 내지 3 uL, 0.5 내지 2 uL, 1 내지 4 uL, 1 내지 3 uL, 1 내지 2 uL인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 범위 내에서, 하이드로겔이 멤브레인의 작은 구멍을 차지하여 멤브레인상의 검체의 흐름 속도가 조절된다.

[0049] 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔 함량이 0.1 uL 미만일 경우, 점도가 묽어져 하이드로겔이 고착되지 않고 유동성이 생겨 멤브레인에 코팅이 되지 않는 문제점이 있을 수 있고, 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔 함량이 4 uL 초과할 경우, 점도가 커져서 하이드로겔 입자가 균일하지 못하고 뭉치게 되어 검체의 유속이 느려지는 문제가 있을 수 있다.

[0050] 일 실시예에 있어서, 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 입자의 직경이 10 내지 100 ㎛, 10 내지 80 ㎛, 10 내지 50 ㎛, 10 내지 20 ㎛, 20 내지 100 ㎛, 20 내지 80 ㎛, 20 내지 50 ㎛, 50 내지 100 ㎛, 50 내지 80 ㎛인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 하이드로겔 입자의 직경은 하이드로겔의 농도의 변화에 따라 변화되고, 하이드로겔 농도에 의해 다공성 매트릭스가 영향을 받아 하이드로겔의 농도가 증가할수록 하이드로겔 입자의 직경이 커지면서 멤브레인의 기공을 막는 역할을 하며, 상기 직경 범위 내에서 니트로셀룰로오스 막 기공이 채워져 유체의 흐름을 늦추는 것일 수 있다.

[0052] 일 실시예에 있어서, 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리포스파젠, 폴리포스포에스테르, 폴리글라이콜라이드, 폴리락타이드, 폴리락타이드글리콜라이드, 폴리다이옥사논, 폴리카프로락톤, 폴리트리메틸렌카보네이트, 폴리우레탄, 폴리아크릴산, 폴리비닐알코올, 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드), 폴리사카라이드, 하이드록시에틸메타아크릴레이트, 알지네이트, 콜라겐, 젤라틴, 키토산, 덱스트란, 엘라스틴, 히알루론산, 히알루로난/젤라틴, 보바인세럼알부민, 콜라겐-콘드로이틴설페이트, 아크릴아마이드/이타콘산 코폴리머, 폴리에틸렌옥사이드/폴리프로필렌옥사이드/폴리에틸렌옥사이드(PEO/PPO/PEO) 코폴리머, 및 폴리에틸렌글리콜/폴리락틱에시드/폴리에틸렌글리콜(PEG/PLA/PEG) 코폴리머로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 일 실시예에 있어서, 상기 검출 감도가 향상된 진단 키트의 검체 내 타겟 물질의 검출 한계는 36 내지 42 mIU/mL, 36 내지 41.88 mIU/mL, 36 내지 41.44 mIU/mL, 36 내지 41.22 mIU/mL, 36 내지 40.88 mIU/mL, 36 내지 40.44 mIU/mL, 36 내지 40.22 mIU/mL, 36 내지 39.88 mIU/mL, 36 내지 39.44 mIU/mL, 37.44 내지 41.88 mIU/mL, 37.44 내지 41.44 mIU/mL, 37.44 내지 41.22 mIU/mL, 37.44 내지 40.88 mIU/mL, 37.44 내지 40.44 mIU/mL, 37.44 내지 40.22 mIU/mL, 37.44 내지 39.88 mIU/mL, 37.44 내지 39.44 mIU/mL, 38.44 내지 41.88 mIU/mL, 38.44 내지 41.44 mIU/mL, 38.44 내지 41.22 mIU/mL, 38.44 내지 40.88 mIU/mL, 38.44 내지 40.44 mIU/mL, 38.44 내지 40.22 mIU/mL, 38.44 내지 39.88 mIU/mL, 38.44 내지 39.44 mIU/mL, 39.44 내지 41.88 mIU/mL, 39.44 내지 41.44 mIU/mL, 39.44 내지 41.22 mIU/mL, 39.44 내지 40.88 mIU/mL, 39.44 내지 40.44 mIU/mL, 39.44 내지 40.22 mIU/mL, 39.44 내지 39.88 mIU/mL, 예를 들어, 39.44 mIU/mL인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 일 실시예에 있어서, 상기 멤브레인은 액체인 검체의 유동성을 확보할 수 있는 재질이라면 제한되지 아니하며, 다공성 막으로 이루어지는 것이 바람직하다. 상세하게는 일정한 미세 구성 크기의 조절이 가능한 소수성 다공성 막을 사용할 수 있으며, 천연 또는 합성의 재료로서 나일론, 폴리에스터, 셀룰로오스, 폴리에테르설폰(PES), 폴리비닐리덴디플루오라이드(PVDF), 셀룰로오스 아세테이트, 폴리우레탄, 유리섬유 및 니트로셀룰로오스로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 일 실시예에 있어서, 상기 접합 패드는 상기 검체 내 타켓 물질과 반응하는 표지 물질을 포함하고, 상기 표지 물질은 금입자, 은입자, 라텍스 비드(latex bead), 셀룰로오스, 발색 효소 및 형광 입자로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 일 실시예에 있어서, 상기 검체는 개체로부터 분리된 생물학적 샘플로서 조직, 혈청, 혈장, 전혈, 타액, 뇨 및 대변으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 검출 감도가 향상된 진단키트 제조방법에 관한 것이다:

[0058] (S10) 일측에서 타측 방향으로 검사선 및 대조선이 순서대로 위치하고 있는 멤브레인, 상기 멤브레인의 일측 상에 중첩되어 구비된 접합 패드(conjugate pad), 상기 접합 패드 상에 중첩되어 구비된, 검체가 가해지는 샘플 패드(sample pad) 및 상기 멤브레인의 타측 상에 중첩되어 구비된, 반응이 종료된 검체를 흡수하는 흡수 패드(absorbent pad)를 포함하는 진단키트를 제조하는 단계; 및

[0059] (S20) 상기 멤브레인 중, 상기 접합 패드와 상기 검사선 사이에 위치하는 부위에 하이드로겔(hydrogel) 코팅 구간을 형성시키는 단계.

[0060] 일 실시예에 있어서, 상기 (S20) 단계는, 하이드로겔을 상기 멤브레인에 코팅시킨 후, 10 내지 14 시간, 10 내지 13 시간, 10 내지 12 시간, 11 내지 14 시간, 11 내지 13 시간, 11 내지 12 시간, 12 내지 14 시간 동안 동결건조 시키는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 동결건조는 수분을 함유한 재료를 동결시키고 수증기압 이하로 감압하여 얼음을 승화시켜 수분이 제거된 건조물을 얻는 방법이다. 상기 시간동안 상기 동결건조를 통해, 동결된 하이드로겔에 존재하는 얼음결정체가 기체 상태로 승화되고, 상기 얼음결정체가 승화되어 빈 자리에 기공이 형성된 하이드로겔이 얻어진다.

[0061] 일 실시예에 있어서, 상기 (S20) 단계에서 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔 농도는 3 내지 36 중량%, 3 내지 27 중량%, 3 내지 18 중량%, 3 내지 12 중량%, 3 내지 9 중량%, 6 내지 36 중량%, 6 내지 27 중량%, 6 내지 18 중량%, 6 내지 12 중량%, 6 내지 9 중량%, 9 내지 36 중량%, 9 내지 27 중량%, 9 내지 18 중량%, 9 내지 12 중량%인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 범위 내에서, 멤브레인상의 검체의 흐름 속도가 조절되어 접합 패드의 표지 물질과의 반응속도가 증가하게 된다.

[0062] 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔 농도가 3 중량% 미만으로 사용될 경우, 검체의 흐름에 영향을 주지 못하여 검사선에서의 강도 변화가 크지 않는 문제점이 있을 수 있고, 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔 농도가 36 중량%를 초과할 경우에는, 유체의 저항이 증가하여 검체의 유속이 느려져 진단에 걸리는 시간이 길어지는 문제점이 있을 수 있다.

[0063] 일 실시예에 있어서, (S20) 단계에서 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔 함량은 0.1 내지 4 uL, 0.1 내지 3 uL, 0.1 내지 2 uL, 0.5 내지 4 uL, 0.5 내지 3 uL, 0.5 내지 2 uL, 1 내지 4 uL, 1 내지 3 uL, 1 내지 2 uL인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 범위 내에서, 하이드로겔이 멤브레인의 작은 구멍을 차지하여 멤브레인상의 검체의 흐름 속도가 조절된다.

[0064] 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔 함량이 0.1 uL 미만일 경우, 점도가 묽어져 하이드로겔이 고착되지 않고 유동성이 생겨 멤브레인에 코팅이 되지 않는 문제점이 있을 수 있고, 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔 함량이 4 uL 초과할 경우, 점도가 커져서 하이드로겔 입자가 균일하지 못하고 뭉치게 되어 검체의 유속이 느려지는 문제가 있을 수 있다.

[0065] 일 실시예에 있어서, (S20) 단계에서 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 광개시제를 포함하며 UV 조사에 의해 경화된 것일 수 있다.

[0066] 일 실시예에 있어서, (S20) 단계에서 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 상기 광개시제를 0.1 내지 5 중량% 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어 0.5 내지 2 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0067] 일 실시예에 있어서, 상기 광개시제는 2-하이드록시-2-메틸프로피오페논인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0068] 일 실시예에 있어서, (S20) 단계에서 상기 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리포스파젠, 폴리포스포에스테르, 폴리글라이콜라이드, 폴리락타이드, 폴리락타이드글리콜라이드, 폴리다이옥사논, 폴리카프로락톤, 폴리트리메틸렌카보네이트, 폴리우레탄, 폴리아크릴산, 폴리비닐알코올, 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드), 폴리사카라이드, 하이드록시에틸메타아크릴레이트, 알지네이트, 콜라겐, 젤라틴, 키토산, 덱스트란, 엘라스틴, 히알루론산, 히알루로난/젤라틴, 보바인 세럼알부민, 콜라겐-콘드로이틴설페이트, 아크릴아마이드/이타콘산 코폴리머, 폴리에틸렌옥사이드/폴리프로필렌옥사이드/폴리에틸렌옥사이드(PEO/PPO/PEO) 코폴리머, 및 폴리에틸렌글리콜/폴리락틱에시드/폴리에틸렌글리콜(PEG/PLA/PEG) 코폴리머로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0069] 전술한 진단키트에 관한 내용은 상기의 제조방법에 그대로 적용될 수 있고, 다른 중복되는 내용은 생략한다.

[0070] 이하, 실시예들을 들어 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 하기의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다. 하기의 실시예는 본 발명의 범위 내에서 적절히 수정, 변경될 수 있다.

[0071] **실시예 1: 하이드로겔 코팅된 키트의 제작 및 검출 감도 평가**

[0072] 가. 키트의 제작

[0073] 본 실시예에서 사용된 물질은 다음과 같다.

[0074] - 니트로셀룰로오스(type CNPF-SN12, Advanced Micro Devices, Ambala Cantt, India)

[0075] - 폴리에틸렌글리콜디아크릴레이트(Poly(ethylene glycol) diacrylate; PEGDA, Mn 700 및 Mn20,000, Sigma Aldrich)

[0076] - 1 % 2-하이드록시-2-메틸프로피오페논 (2-Hydroxy-2-methylpropiophenone; HMPP, Sigma Aldrich)

[0077] - 진단 패드용 유리 섬유 스트립(GFDX103000, Millipore, Billerica, MA, USA)

[0078] - 흡수 패드(CFSP203000, Millipore, Billerica, MA, USA)

[0079] - 백킹 카드(Backing card, Advanced Micro Devices, Ambala Cantt, India)

[0080] - 0.15 % BSA(bovine serum albumin, lyophilized powder, Sigma Aldrich)

[0081] - 0.05 % TWEEN® 20(Polyethylene glycol sorbitan monolaurate, Sigma Aldrich)

[0082] - PBS(pH 7.4, Gibco™, ThermoFisher Scientific)

[0083] 하기 실시예에 따라 제작된 진단 키트의 전체적인 구성을 도 1에 나타내었다.

[0084] 먼저, PBS 완충용액(pH 7.4)에 BSA와 TWEEN® 20을 혼합하여 혼합 용액을 만들고, 진단 패드용 유리 섬유 스트립 2개(각각 샘플 패드용 및 접합 패드용)를 상기 혼합 용액에 10분간 담가둔 후에, 상기 진단 패드용 유리섬유 2개를 실온(RT)에서 밤새 건조시킨다.

[0085] 이후, 백킹 카드 중앙에 니트로셀룰로오스(NC) 멤브레인을 부착하고, 백킹 카드 하단(상단보다 폭이 더 짧음)에 건조된 상기 진단 패드용 유리 섬유 스트립중 1개를 NC 멤브레인 상단과 2mm 영역으로 중첩되도록 부착하고, 나머지 1개의 상기 진단 패드용 유리 섬유 스트립을 먼저 부착된 진단 패드용 유리 섬유위에 폭이 2mm 영역으로 중첩되도록 부착한 후, 백킹 카드 상단에 NC 멤브레인과 폭이 2mm 영역으로 중첩되게 흡수 패드인 셀룰로오스 섬유를 부착하고, 스트립을 자른다.

[0086] 하이드로겔 코팅 구간의 하이드로겔은 PEGDA를 사용하였고, PEGDA, 광개시제 1 % HMPP 및 멸균 DIW(DeIonized Water)를 균일하게 혼합될 때까지 30분동안 교반하여, 3 중량%, 6 중량%, 9 중량%, 12 중량%, 18 중량%, 27 중량% 및 36 중량%의 농도가 되도록 준비한다. 각 농도별로 교반된 PEGDA를 스트립(NC 멤브레인)위에 2 uL를 떨어뜨린 후, UV 365 mm 조건에서 1분동안 반응하여 하이드로겔을 가교(Cross-linking)시키고, 동결건조 전 사전 건조 단계로서 스트립을 급속냉동고(-80 ° C)에서 건조시킨 다음, 스트립을 밤새(12시간) 동결건조 시킨다.

[0087] 상기 방식으로 제작된 키트를 주사전자현미경(Scanning electron microscope; SEM, JSM-7800F, JEOL Ltd)을 이용하여 4 조리개(aperture), 렌즈와 물체사이 거리는 WD(Working distance), 박막 10 nm의 1회 백금(Pt) 코팅으로 전도처리하여 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0088] 본 발명의 도 2에서 확인할 수 있듯이, 하이드로겔의 농도가 3 및 6 중량%인 경우에는 하이드로겔이 NC 멤브레인을 얇게 덮어 NC 멤브레인의 기공에 영향을 주지 못하였으나, 하이드로겔의 농도가 9 및 18 중량% 인 경우, 하이드로겔이 NC 멤브레인을 코팅하여 NC 멤브레인의 기공을 일부 덮었으며, 하이드로겔의 농도가 27 및 36 중량%인 경우, NC 멤브레인의 더 많은 기공이 덮여 작은 기공은 하이드로겔로 채워지고, 더 큰 기공들만이 비어있음을 확인하여, 하이드로겔의 농도에 따라 NC 멤브레인의 기공이 채워져 하이드로겔은 멤브레인의 다공성에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

[0089] 나. 키트의 검출 감도 평가

[0090] 상기 제조 방법으로 제조된 각 키트의 검출 감도 측정을 위해 각 PEGDA의 농도별로 유속(flow rate) 및 색 강도(color intensity)를 측정하여 키트의 검출 감도를 평가하였다.

[0091] 유속은 스트립의 샘플 패드에서 흡수 패드까지의 거리(20 mm)를 적색 염료 용액이 흡수 패드에 도달하는 시간(초)로 나눈 값으로 유속을 계산하였고, 색 강도는 Image J 소프트웨어를 사용하였고, 그레이 스케일(grayscale)로 변환하여 그 결과를 도 3에 나타내었고, PEGDA이 코팅된 스트랩에 적색 염료를 사용하여 유체 흐름이 감소한 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[0092] 본 발명의 도 3에서 확인할 수 있듯이, 하이드로겔이 코팅된 농도가 증가할수록 유속은 지수적으로 감소하였고, 하이드로겔 코팅 구간의 색 강도(color intensity)는 하이드로겔 농도가 증가할수록 그레이 스케일의 강도 값이 낮아져 증가됨을 확인할 수 있어, 하이드로겔이 코팅된 농도가 증가할수록 적색 염료가 하이드로겔 코팅 구간에 머무르는 시간이 증가하여 하이드로겔의 코팅 구간이 NC멤브레인의 검체의 속도를 늦춘다는 것을 볼 수 있었다.

[0093] 또한, 본 발명의 도 4 및 5에서 확인할 수 있듯이, 하이드로겔이 코팅된 경우, 하이드로겔이 코팅되지 않은 경우에 비해 유체 흐름이 늦춰졌으며, 하이드로겔의 농도가 증가함에 따라 같은 거리를 도달하는데 더 많은 시간이 소요됨을 보여주어, 도 3과 마찬가지로 하이드로겔 농도가 증가할수록 검체의 속도가 감소됨을 알 수 있었다.

[0094] 다. 최적의 하이드로겔 농도 탐색

[0095] 본 실시예에서 사용된 물질은 다음과 같다.

[0096] - Chorionic gonadotropin human(hCG) (2,500 IU 바이알, Sigma Aldrich)

[0097] - 항-CGA/hCG α 항체 ([INN-hFSH-132], #ab11232, Abcam, Cambridge, MA, USA)

[0098] - Goat Anti-Mouse IgG 항체 (H&L, #ab6708, Abcam, Cambridge, MA, USA)

[0099] - Gold label Anti-hCG β 항체 ([M705159], #ab31206, Abcam, Cambridge, MA, USA)

[0100] - Block-Ace (KAC Co., Ltd., Kyoto, Japan)

[0101] PEGDA의 각 농도 중 진단 키트의 검출 강도가 가장 높은 최적의 농도를 확인하기 위해, 도 6a의 스트립을 이용하여 hCG 단백질을 이용한 임신 진단 테스트 원리를 사용하여 검사선(T)과 대조선(C)의 비(ratio)의 상대적인 강도를 통해 검출 감도를 평가하였다.

[0102] 구체적으로, 도 6a의 실험은 검사선에 항-CGA/hCG α 항체 및 대조선에 Goat Anti-Mouse IgG 항체를 현미경 유리를 이용한 수동 스탬핑(stamp)를 통해 각 1 uL씩 넣어 37 ° C에서 3시간 배양 후, 1% Block-Ace 30 uL로 스트립을 차단하여 PBS 및 0.05% TWEEN® (PBST) 50 uL를 이용하여 세척하고 다시 37 ° C에서 3시간 배양 후 hCG 단백질과 Gold label Anti-hCG β 항체를 9 : 1의 비율로 섞어 50 uL를 만들고 이를 스트립에 떨어뜨려 검출 감도를 평가하였다.

[0103] 강도 측정은 Image J 소프트웨어를 사용하여 검사선과 대조선의 밀도의 비율(T/C)을 측정하여 그 결과를 도 6b에 나타내었다.

[0104] 본 발명의 도 6b에서 확인할 수 있듯이, PEGDA의 농도가 9 중량%인 경우가, T/C 비율의 강도가 가장 높음을 확인할 수 있었으나, 12 중량%, 15 중량% 및 18 중량%의 경우 PEGDA가 코팅되지 않은 경우(0%)에 비해 더 낮은

T/C 비율을 확인할 수 있었다.

[0105] 상기 결과를 바탕으로, T/C 비율의 강도에서 가장 우수한 결과를 나타낸 PEGDA 9 중량%를 이용하여, 하이드로겔이 코팅되지 않은(0%) NC 멤브레인과 대비한 검체의 농도에 따른 검출 강도를 평가하였다. 구체적으로 하이드로겔이 포함되지 않은 대조군(0 중량%)의 LFA 강도를 9 중량%의 하이드로겔의 LFA와 비교하여 농도가 다른 4가지의 hCG 단백질(10, 20, 50 및 100 mIU/mL)에 따른 검출 강도를 평가하였으며, 하기 계산식에 따라 검출 한계(LoD)를 계산하여 선형회귀 분석을 통해 도 7에 나타내었다.

[0106] $$LOD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

[0107] σ: 표준편차

[0108] S : 기울기

[0109] 본 발명의 도 7에서 확인할 수 있듯이, PEGDA 9 중량%의 검출 한계(LoD) 값은 39.44 mIU/mL 인 반면, 하이드로겔이 포함되지 않은 경우(PEGDA 0 중량%)의 검출 한계(LoD) 값은 45.22 mIU/mL을 나타내어, 하이드로겔이 포함된 경우 검출 한계값이 낮아져 하이드로겔이 코팅된 경우 검출 감도가 증가하며, 검체 내 타겟 물질의 농도가 낮아도 검출이 가능함을 나타낸다.

[0111] **실시예 2: 상용화된 키트에 대한 적용**

[0112] 본 실시예에서 사용된 진단 키트는 다음과 같다.

[0113] - 굿뉴스 임신 테스트기 (동아제약, 한국)

[0114] - 원포 임신 테스트기 (WONDFO Biotech, 중국)

[0115] - 스마일 임테기 더블체크 (Runbio Biotech, 중국)

[0116] - BIOCREDIT COVID-19 Ag Home Test Nasal (RapiGEN Inc., 한국)

[0117] - 휴마시스 코비드-19 홈 테스트 (휴마시스㈜, 한국)

[0118] 상용화된 측방유동분석법(LFA)이 적용된 진단 키트에서 하이드로겔 코팅 구간의 영향을 평가하기 위해, 상기 5가지의 시중에서 판매되는 진단 키트를 준비하고 각 키트의 검사선 앞쪽에 PEGDA를 6 중량%, 12 중량% 및 18 중량% 코팅하여 각 농도별 검사선(T)/대조선(C)의 비율을 측정하였다.

[0119] 구체적으로, 각 진단 키트의 하이드로겔 코팅 구간의 평가에 있어서, PEGDA의 함량의 경우 원포 임신 테스트기는 1 uL, 나머지 키트는 2 uL가 사용되었고, 각 키트에서 사용된 검체의 함량, 농도 및 검체 내 타겟 물질의 종류는 하기 표 1과 같다.

표 1

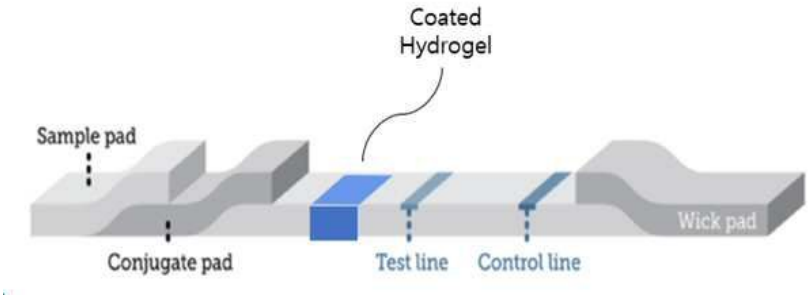
[0120]

진단키트	검체		
	함량	농도	타겟 물질
굿뉴스 임신 테스트기	100 uL	1 IU/mL	hCG 단백질
원포 임신 테스트키	50 uL	25 mIU/mL	hCG 단백질
스마일 임테기 더블체크	100 uL	500 mIU/mL	hCG 단백질
BIOCREDIT COVID-19 Ag Home Test Nasal	80 uL	5 ㎍/mL	COVID 뉴클리오캡사이드 단백질
휴마시스 코비드-19 홈 테스트	80 uL	10 ㎍/mL	COVID 뉴클리오캡사이드 단백질

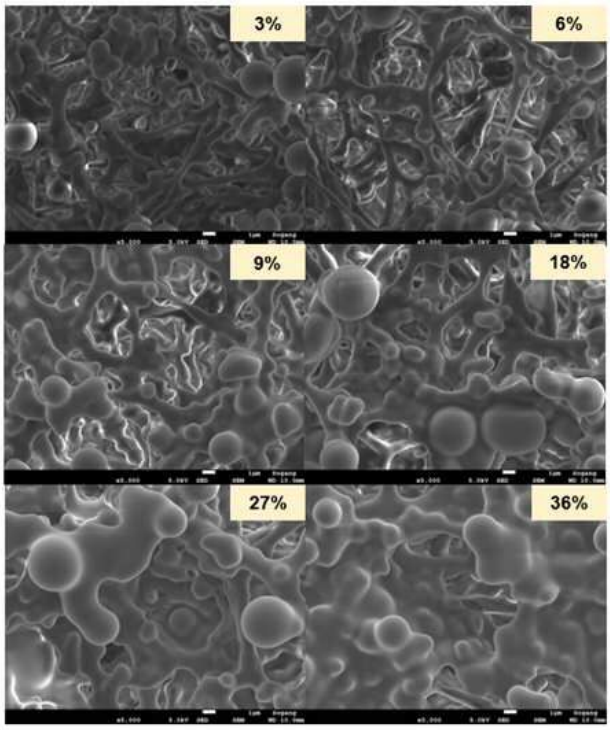
[0121] 본 발명의 도 8a 내지 8e에서 확인할 수 있듯이, PEGDA가 코팅된 상용화된 진단 키트에 있어서도 T/C 비율이 PEGDA가 코팅되지 않은 상용화된 진단 키트에 비해 높게 나타나 검출 감도가 향상됨을 알 수 있어, 하이드로겔은 검출 감도 향상을 위해, 상용화된 모든 유형의 LFA에 적용할 수 있음을 확인하였다.

도면

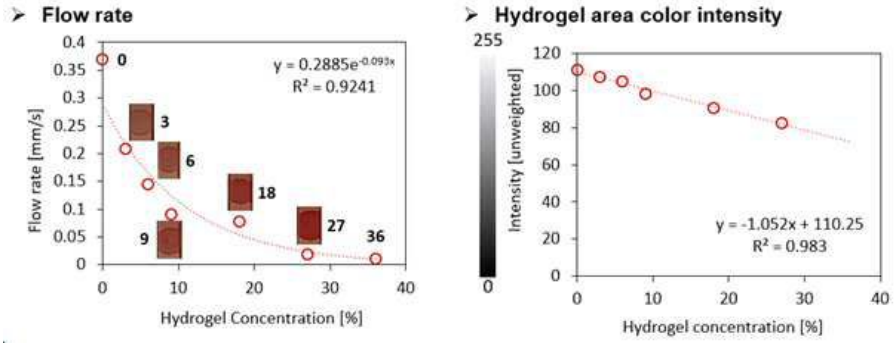
도면1



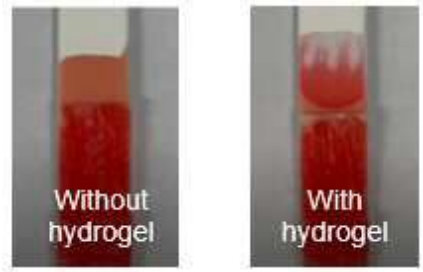
도면2



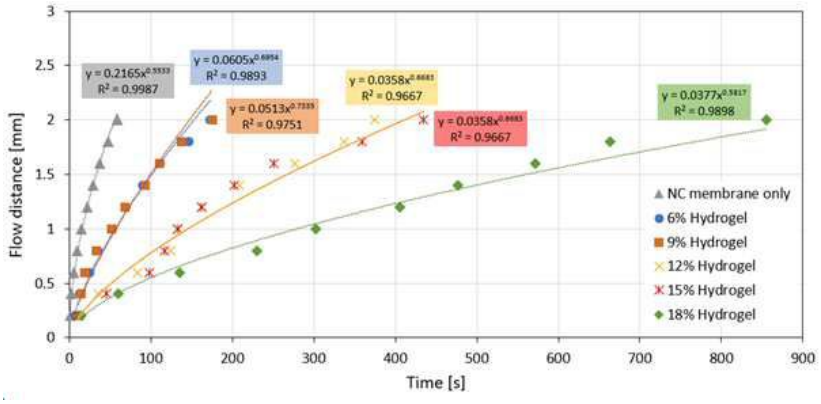
도면3



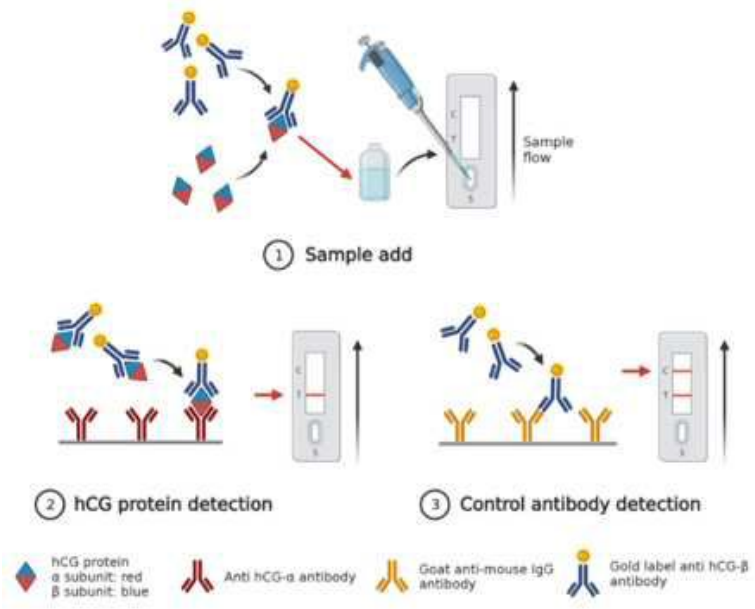
도면4


Without hydrogel
With hydrogel

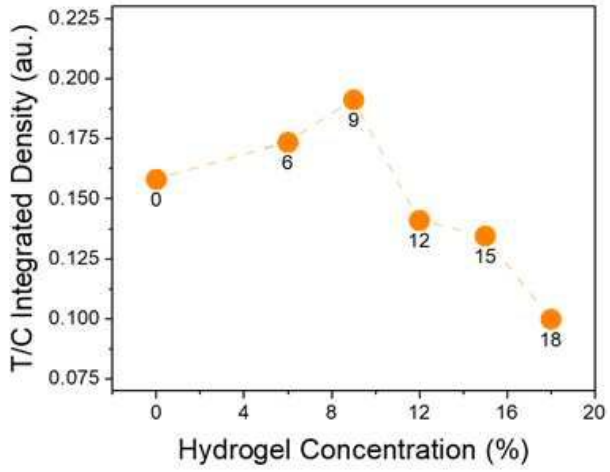
도면5


Flow distance [mm]
Time [s]
NC membrane only
6% Hydrogel
9% Hydrogel
12% Hydrogel
15% Hydrogel
18% Hydrogel

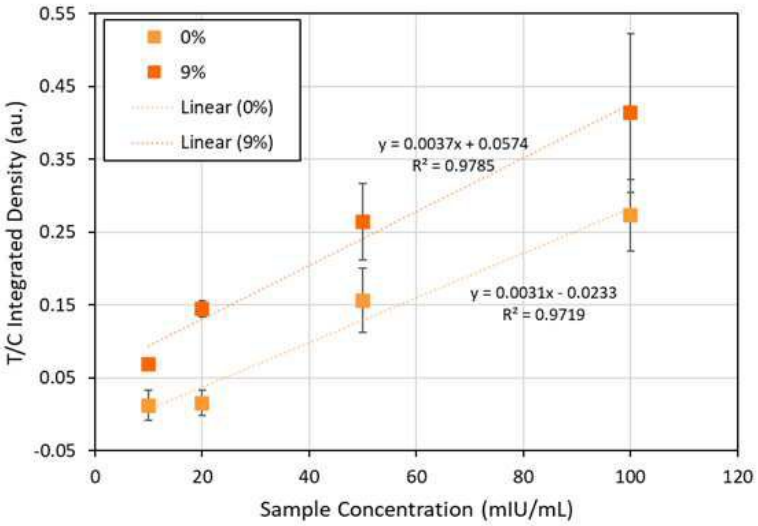
도면6a


Sample flow
① Sample add
② hCG protein detection
③ Control antibody detection
hCG protein
α subunit: red
β subunit: blue
Anti hCG-α antibody
Goat anti-mouse IgG antibody
Gold label anti hCG-β antibody

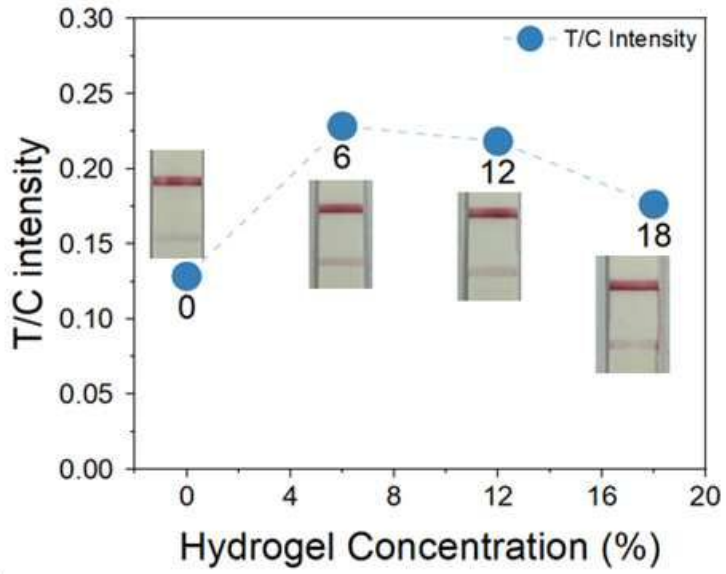
도면6b


T/C Integrated Density (au.)
0.225
0.200
0.175
0.150
0.125
0.100
0.075
0
6
9
12
15
18
0
4
8
12
16
20
Hydrogel Concentration (%)

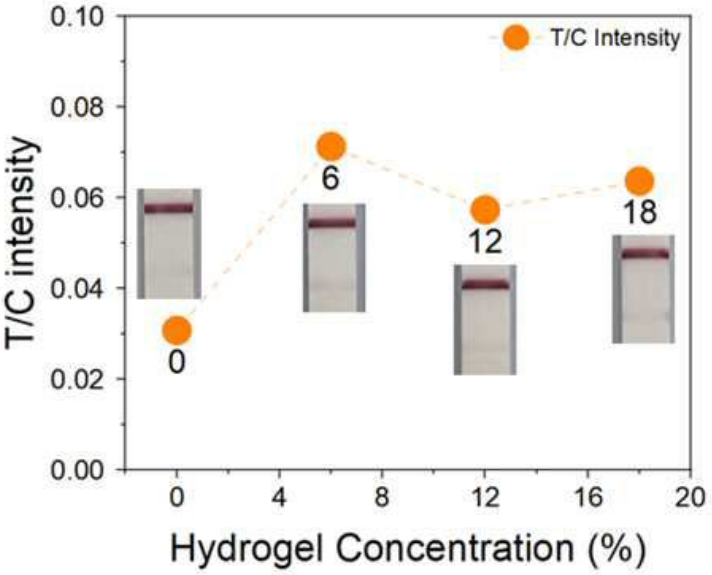
도면7


0%
9%
Linear (0%)
Linear (9%)
y = 0.0037x + 0.0574
R² = 0.9785
y = 0.0031x - 0.0233
R² = 0.9719
T/C Integrated Density (au.)
0.55
0.45
0.35
0.25
0.15
0.05
-0.05
0
20
40
60
80
100
120
Sample Concentration (mIU/mL)

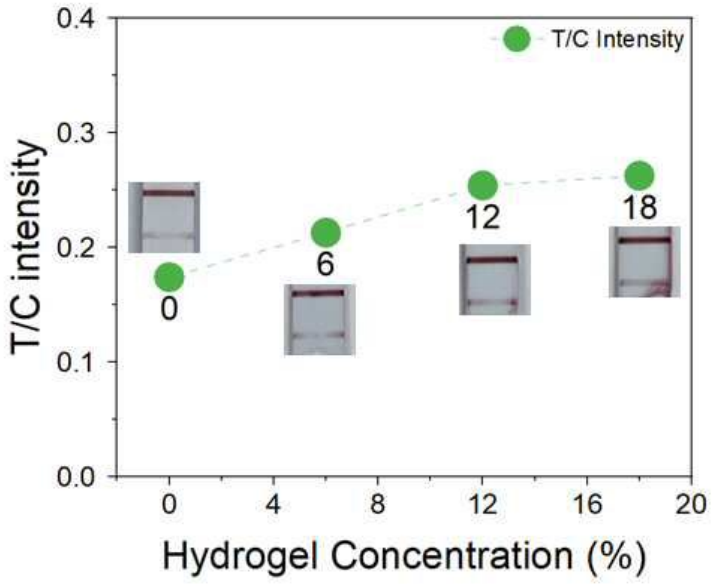
도면8a


T/C Intensity
T/C intensity
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
6
12
18
0
4
8
12
16
20
Hydrogel Concentration (%)

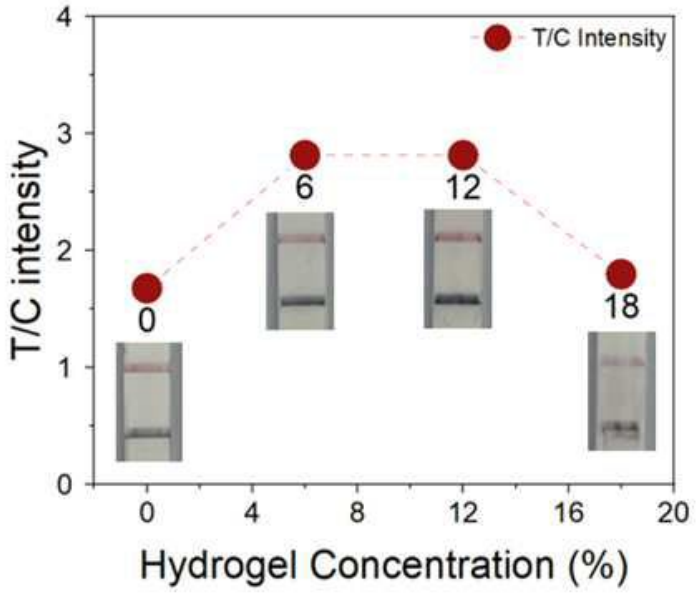
도면8b


T/C Intensity
T/C intensity
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0
6
12
18
0
4
8
12
16
20
Hydrogel Concentration (%)

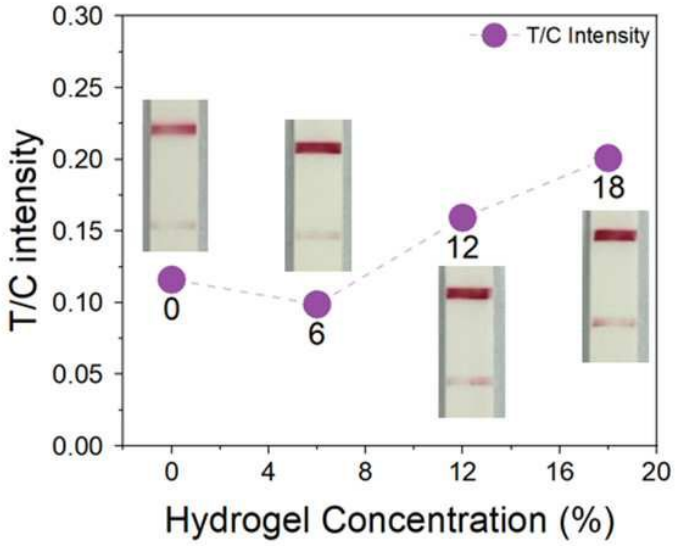
도면8c


T/C Intensity
T/C intensity
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
6
12
18
0
4
8
12
16
20
Hydrogel Concentration (%)

도면8d


T/C Intensity
T/C intensity
4
3
2
1
0
0
6
12
18
0
4
8
12
16
20
Hydrogel Concentration (%)

도면8e


T/C Intensity
T/C intensity
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0
4
8
12
16
20
Hydrogel Concentration (%)
0
6
12
18