

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2013년 6월 6일 (06.06.2013)



(10) 국제공개번호

WO 2013/081363 A1

(51) 국제특허분류:

G01N 27/30 (2006.01) A61B 5/145 (2006.01)  
G01N 33/49 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2012/010145

(22) 국제출원일:

2012년 11월 28일 (28.11.2012)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2011-0125347 2011년 11월 28일 (28.11.2011) KR

(71) 출원인: 에스디 바이오센서 주식회사 (SD BIO-SENSOR, INC.) [KR/KR]; 443-702 경기도 수원시 영통구 턱영대로 1556 번길 16 디지털엠파이어씨동 4 층 5 층, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 임태규 (LIM, Tae Kyu); 164-0013 도쿄 나카노 구 야요이초 1-34-14, Tokyo (JP). 조영식 (CHO, Young Shik); 446-930 경기도 용인시 기흥구 하갈동 311 노블 힐스 18 호, Gyeonggi-do (KR). 이효근 (LEE, Hyo Keun); 443-472 경기도 수원시 영통구 영통 2동 신나무실신원아파트 644 동 904 호, Gyeonggi-do (KR). 황희영 (HWANG, Hee Young); 443-380 경기도 수원시 영통구 원천동 71-1 번지 아주아파트 다-303 호, Gyeonggi-do (KR). 최형길 (CHOI, Hyoung Gil); 463-030 경기

도 성남시 분당구 분당동 69 장안타운 105 동 104 호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 135-973 서울시 강남구 테헤란로 87길 36, 6층 한얼국제특허사무소 (삼성동, 도심공항타워), Seoul (KR).

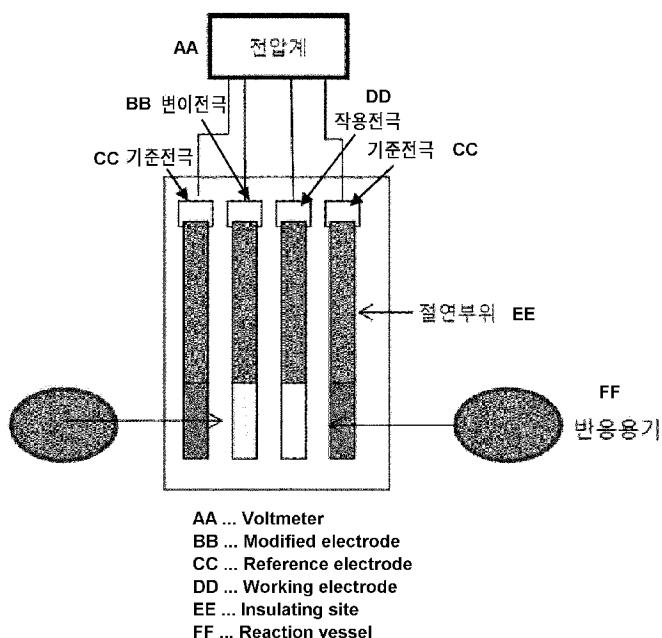
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: BIOSENSOR FOR MEASURING GLYCOSYLATED HAEMOGLOBIN USING POTENTIOMETRY

(54) 발명의 명칭: 전위차분석법을 이용한 당화해모글로빈 측정용 바이오센서



osylated haemoglobin.

(57) 요약서:

(57) Abstract: The biosensor for measuring glycosylated haemoglobin according to the present invention comprises: a measuring unit comprising reference electrodes, and comprising a modified electrode having disposed thereon molecules which comprise a site capable of specific bonding to glycosylated haemoglobin and of which the redox reaction potential changes due to glycosylated haemoglobin bonding without supplying voltage and current from the outside, on a current collector; a potential-difference measuring circuit or potentiometric titration device, for measuring the potential difference between the modified electrode and the reference electrode by means of potentiometry; and a display unit for selectively effecting a display of the value of the potential difference between the modified electrode and the reference electrode or of the result when this value is calculated as either the amount or the concentration of glycosylated haemoglobin within the sample. The biosensor for measuring glycosylated haemoglobin according to the present invention has the effect of making it possible to quickly and accurately measure the concentration of glycosylated haemoglobin in a sample, and makes it possible to determine the ratio of haemoglobin and glycosylated haemoglobin by measuring the concentrations of the two substances at the same time without going through a separating step when measuring the concentration of gly-

[다음 쪽 계속]

**공개:**

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

---

본 발명에 따른 당화해모글로빈 측정용 바이오센서는 기준전극; 및 집전체 상에, 당화해모글로빈에 특이적 결합가능한 부위를 포함하고 외부로부터 전압 및 전류의 공급없이 당화해모글로빈 결합에 의해 산화환원 반응전위가 변하는 분자들이 정렬된 변이전극을 구비한 측정부; 전위차분석법(Potentiometry)에 의해 변이전극과 기준전극 사이의 전위차를 측정하기 위한, 전위차 측정회로 또는 전위차 적정장치; 및 선택적으로 상기 변이전극과 기준전극 사이의 전위차이값 또는 이를 시료내 당화해모글로빈의 량 또는 농도로 환산시켜 표시하는 표시부를 구비한다. 본 발명에 따른 당화해모글로빈 측정용 바이오센서는 시료내의 당화해모글로빈의 농도를 빠르고 정확하게 측정할 수 있는 효과가 있으며, 당화해모글로빈의 농도측정시 해모글로빈과 당화해모글로빈의 분리단계를 거치지 않고 동시에 두 물질의 농도를 측정하여 그 비율을 구할 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 전위차분석법을 이용한 당화해모글로빈 측정용 바이오센서

#### 기술분야

[1] 본 발명은 당화해모글로빈 측정용 바이오센서에 관한 것이다. 보다 상세하게는 기준전극; 및 집전체 상에, 당화해모글로빈에 특이적 결합가능한 부위를 포함하고 외부로부터 전압 및 전류의 공급없이 당화해모글로빈 결합에 의해 산화환원 반응전위가 변하는 분자들이 정렬된 변이전극을 구비한 측정부; 및 전위차분석법(Potentiometry)에 의해 변이전극과 기준전극 사이의 전위차를 측정하기 위한, 전위차 측정회로 또는 전위차 적정장치를 구비한 당화해모글로빈 측정용 바이오센서 및 이를 포함한 당화해모글로빈 측정키트에 관한 것이다.

[2]

#### 배경기술

[3] 당뇨병은 체내에 흡수된 포도당을 제대로 사용하지 못하는 부적절한 탄수화물 대사로 인하여 발생하며, 혈액 내에 과다한 혈당을 가지게 되어 다양한 합병증을 유발할 수 있는 질환이다. 이는 크게 세가지로 분류되며, 제1형 당뇨병은 인슐린 의존성 당뇨병으로, 이자 세포의 자가면역반응에 의하여 인슐린을 합성하거나 분비하는 기능을 상실하는 타입이라 할 수 있다. 다음으로 제2형 당뇨병은 인슐린 비의존성 당뇨병으로, 인슐린에 대한 체내 저항성 또는 부적절한 인슐린 분비 등에 의해 발생한다. 그 외에 임신 중 발생할 수 있는 태아 당뇨병이 있다. 그러나, 제1형 당뇨병과 태아 당뇨 형태의 당뇨병은 흔하지 않으며, 당뇨병 중 대부분은 제2형 당뇨병으로서 선진국 당뇨질환 중 90 내지 95%를 차지하고 있는 것으로 알려져 있다.

[4]

당뇨병을 진단하는 방법은 요당측정, 혈중 포도당 측정 등 여러 가지가 있지만, 요당측정은 신뢰할 수 없으며, 혈중 포도당 측정은 식사, 운동 등 여러 요인의 영향을 받아 부정확하다. 따라서, 당뇨병을 관리하고 치료하기 위해서는, 2개월 간의 평균 혈당치가 중요시 되고 있으므로, 혈액 중 당화해모글로빈(HbA1c)을 측정하는 것이 효과적이다.

[5]

1986년 미국 당뇨 협회에서 모든 형태의 당뇨병을 관리하기 위해 연간 2회씩의 당화해모글로빈 측정을 제안함으로써 비교적 안정한 지표인 당화 해모글로빈의 양을 당뇨병 관리지표로 사용하기 시작하였고, 1993년 DCCT(Direct Control and Complication Trial, 당뇨조절과 합병증 연구)에서 당화해모글로빈의 농도와 당뇨합병증의 관계를 보고하면서 본격적으로 사용하기 시작하였다.

[6]

당화해모글로빈의 참고치 설정과 관련하여 ADA(American Diabetes Association, 미국당뇨병학회)에서는 DCCT 및 UKPDS(United Kingdom

Prospective Diabetes Study, 영국전향적당뇨병연구)의 보고서를 기초로 하여, 당화헤모글로빈수치를 7% 이내로 관리할 것을 권고하고 있으며, 당화헤모글로빈수치가 8% 이상인 경우 당뇨관리의 재평가 및 적극적인 치료를 권고하고 있다. 2001년 미국 내분비학회에서는 6.5%를 참고치로 제시하였는데 이는 6.5% 이상일 때도 당뇨망막증의 발병율이 증가하는 것으로 UKPDS에서 보고한 결과를 참조한 것이다. 1999년 국제당뇨협회(International Diabetes Federation, IDF)에서도 동일하게 당화헤모글로빈 6.5%를 참고치로 제시하고 있다.

- [7] 성인의 헤모글로빈은 97%의 헤모글로빈 A, 2.5%의 헤모글로빈 A<sub>2</sub> 및 0.5%의 헤모글로빈 F의 세종류로 구성되어 있다. 이중 헤모글로빈 A는 141개의 아미노산을 가진 두 개의 알파체인과 146개의 아미노산을 가진 두 개의 베타체인으로 이루어진 네 개의 폴리펩타이드 구조이다. 헤모글로빈 A를 크로마토그래피법으로 분석해 보면 약 95%의 일반적인 헤모글로빈과 약 5 내지 6% 정도의 미량 당화헤모글로빈으로 구성되며, 이를 당화헤모글로빈을 통칭하여 헤모글로빈 A1라고 한다. 이러한, 헤모글로빈 A1의 80%는 베타사슬 N-말단의 발린 잔기에 글루코스가 결합된 형태로 헤모글로빈 A1a, 헤모글로빈 A1b, 헤모글로빈 A1c 등이 알려져 있다.
- [8] 단백질의 아미노기에 당잔기가 비효소적인 반응으로 결합하는 것을 당화과정이라 하며, 이 반응은 매우 점진적인 비가역적인 반응이다. 당화헤모글로빈은 헤모글로빈과 혈중포도당의 결합에 의해 형성되고, 헤모글로빈과 당화헤모글로빈의 비율은 적혈구와 혈중 포도당의 노출 정도에 의해 결정된다. 구체적으로, 당화 과정에서는 헤모글로빈 A의 발린 잔기에 포도당이 결합하여 헤모글로빈 A1c 전구물질을 형성하게 되며, 이는 재배열 반응을 통해 안정적인 케토아민 결합을 가진 헤모글로빈 A1c가 된다. 이때 혈액 내의 포도당 수치가 높아지면 포도당과 헤모글로빈의 접촉빈도가 높아지고, 당화헤모글로빈의 비율도 증가하게 된다. 따라서, 당화헤모글로빈의 비율로써 혈액 내 포도당 수치의 정확한 정량이 가능하다. 또한, 적혈구의 수명은 60 내지 120일 정도이므로 비교적 긴 기간 동안 혈중포도당 농도변화를 모니터링 할 수 있다.
- [9] 혈액 내의 당화헤모글로빈을 측정하기 위한 다양한 측정법이 개발되어 왔다. 현재 상업적으로 응용되고 있는 방법으로는 이온교환 크로마토그래피법, 친화성 크로마토그래피법, 전기영동법, 복합착색법 등이 있다. 이러한 방법들은 사용법이 어렵고 복잡하여 숙련된 기술을 요구한다. 한편 일회성 임상 분석시스템의 기술개발 동향을 살펴보면, 원격, 재택 또는 현장검사를 위한 장비로 매우 유용하고 다양한 정량방법이 제시되고 있으며, 측정방법으로는 육안판독법, 광학판독법, 전기화학측정법 등이 알려져 있다.
- [10] 구체적으로, 이러한 혈당측정방법으로서 당화헤모글로빈에 특이적으로 반응하는 면역항체를 고정시킨 패드를 마련하고 시료가 상기 항체를 고정시킨

패드로 전개하도록 한 후 반사광의 강도로 산출하는 방법이 US 5,541,117에 개시되어 있으나, 비싼 항체를 사용해야 하고 다공성 패드의 불균일성에 의해 일정한 품질의 센서를 생산하는 것이 어렵다는 문제점이 있다.

- [11] 또한, US 5,242,842에는 보론산 유도체와 당화해모글로빈을 결합시킨 후 함께 침전시키거나 분리한 후 분광학적 방법을 사용하여 측정하는 방법이 개시되어 있으나 당화해모글로빈과 결합하지 않은 보론산 유도체를 세척하는 과정이 필요하고 시료의 양을 정확하게 맞추어야 옳은 결과를 얻을 수 있어 측정이 까다롭다는 문제점이 있다.
- [12] US 6,162,645와 EP0455225B1 및 US 6,174,734에는 면역항체를 고정한 고체상을 사용하여 시료 중의 단백질을 분리한 후 표식자 화합물을 사용하여 당화해모글로빈의 상대적 양을 결정하는 방법이 제시되어 있으나, 이러한 종래의 전기화학적 당화해모글로빈 결정방법들은 당화해모글로빈 및 당화해모글로빈-표식자들을 전극 표면에 경쟁적으로 모이게 한 후 표식자와 전기화학적반응을 일으키는 기질을 주입하여 신호의 크기를 결정하는 것으로 당화해모글로빈의 농도측정이 복잡하고 반복측정에서 재현성을 확보하기 어렵다는 문제점이 있다.
- [13] 이러한 문제점을 해결하기 위해 전극에 직접 보론산을 고정하여 표식자 없이 당화해모글로빈을 측정하는 기술이 개발되었다. US 2010-0089774에는 4-페닐비닐보론산(4-phenyl-vinyl-boronic acid)을 카본페이스트와 혼합하여 제조한 전극을 통해 변화하는 전압을 측정하여 당화해모글로빈의 비율을 측정하는 기술이 개시되어 있다. 그러나, 보론산을 카본페이스트와 혼합하여 전극을 제조하는 경우 보론산의 첨가량이 많게 되면 카본페이스트 전극을 제조하기 어렵기 때문에 보론산을 소량 첨가해야 하는데, 그러면 당화해모글로빈의 농도를 측정할 때 고농도의 당화해모글로빈 측정시 재현성이 떨어진다는 문제점이 있다. 또한 카본페이스 전극을 가지고 생체시료를 측정할 경우 공존 물질에 영향을 받기 쉽다는 문제점을 갖는다.

[14]

## 발명의 상세한 설명 기술적 과제

- [15] 본 발명은 상기와 같이, 당화해모글로빈의 비율 측정시 재현성이 낮고 제작이 용이하지 않은 문제점을 해결하면서, 간단하고 간편히 측정할 수 있는 point of care 개념의 HbA1c센서를 제안하고자 한다.
- [16] 이에 본 발명자들은 디티오비스-3-부티라미도페닐보론산[Dithiobis-3-butyramidophenylboronic acid; DTB-BAPBA]과 같은 화합물과 반응시켜 상기 문자 내 이황결합을 이용한 결합으로 보론산 함유 문자를 안정적이고 고르게 전극 상에 정렬시킬 수 있고, 이러한 방법을 통해 제조된 변이전극을 사용하여 당화해모글로빈의 결합량에

따른 변이 전극과 기준전극의 전위차 변화를 측정한 결과, 당화해모글로빈의 양을 보다 재현성있게 측정할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[17]

### 과제 해결 수단

[18] 본 발명은 기준전극; 및 집전체 상에, 당화해모글로빈에 특이적 결합가능한 부위를 포함하고 외부로부터 전압 및 전류의 공급없이 당화해모글로빈 결합에 의해 산화환원 반응전위가 변하는 분자들이 정렬된 변이전극을 구비한 측정부; 및 전위차분석법(Potentiometry)에 의해 변이전극과 기준전극사이의 전위차를 측정하기 위한, 전위차 측정회로 또는 전위차 적정장치를 구비한 당화해모글로빈 측정용 바이오센서; 및 상기 바이오센서를 구비한 당화해모글로빈 측정키트를 제공한다.

[19] 또한, 본 발명은 기준전극; 및 집전체 상에, 황원자를 통해 3-(4-머captobutanamido)페닐보론산(3-(4-mercaptopbutanamido)phenylboronic acid)이 정렬된 변이전극을 구비한 당화해모글로빈 측정 바이오센서용 스트립을 제공한다.

[20]

### 발명의 효과

[21] 본 발명에 따르면, 해모글로빈과 당화해모글로빈의 분리단계를 거치지 않고 전위차를 이용하여 총해모글로빈(total Hb)과 HbA1c의 농도를 측정하기 때문에, 소형이면서 미량의 시료라도 시료 중의 총해모글로빈(total Hb)과 HbA1c를 높은 정밀도로 동시에 신속하게 측정할 수 있다.

[22] 또한, 본 발명의 바이오센서용 스트립은 일회용으로 제작하기에 적합하며, 기존의 전기화학적 방법에 사용되는 3전극을 2전극으로 그 수를 줄임으로써, 일정 면적 이상을 유지 해야 하는 대극이 필요 없게 됨으로 제조공정을 단순화하여 제조비용을 낮출 수 있다.

[23]

### 도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 당의 존재 하에서 본 발명에 따른 DTBA-PBA 단분자막 수식 변이 전극의 폐리시안 이온에 대한 응답을 도시한 모식도이다.

[25] 도 2은 본 발명의 제1실시형태에 따른 바이오센서용스트립의 구성을 나타낸 모식도이다.

[26] 도 3은 본 발명의 제2실시형태에 따른 바이오센서용스트립의 구성을 나타낸 모식도이다.

[27] 도 4는 본 발명의 바이오센서를 사용하여 Potentiometry에 의해 측정한 전위차값과 당뇨병 환자의 전혈중의 HbA1c의 농도의 관계를 도시한 그래프이다.

[28] 도 5는 본 발명의 바이오센서를 사용하여 Potentiometry에 의해 측정한

전위차값과 당뇨병 환자의 전혈중의 총 헤모글로빈의 농도의 관계를 도시한 그레프이다.

[29] 도 6은 미리 작성한 총헤모글로빈의 검량선으로부터 얻어진 결과와 HbA1c를 측정해서 %로 환산한 결과를 도시한 그레프이다.

[30] 도 7은 본 발명에 따른 바이오센서와 액체고속크로마토그래피법을 이용한 당화헤모글로빈 양 측정의 정확도를 비교한 그레프이다.

[31]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[32] 본 발명에 따른 당화헤모글로빈 측정용 바이오센서의 측정부는 기준전극; 집전체상에 당화헤모글로빈에 특이적 결합가능한 부위를 포함하고 외부로부터 전압 및 전류의 공급 없이 당화헤모글로빈 결합에 의해 산화환원 반응전위가 변하는 분자들이 정렬된 변이전극; 및 선택적으로 헤모글로빈총량을 측정하기 위한 작용전극; 및/또는 보조전극을 구비한다.

[33] 본 발명자들은 당과 phenylboronic acid와의 관계를 연구하던 중, 합성해서 얻어진

디티오비스-3-부티라미도페닐보론산[Dithiobis-3-butyramidophenylboronic acid; DTB-BAPBA]을 이용해서 전극 표면에 막을 형성시킨 후 페리시안산 이온의 거동(도 1)을 조사한 결과, 디티오비스-3-부티라미도페닐보론산과의 반응으로 도입된 보론산에 당이 결합된 경우와 당이 결합되지 않은 경우와 비교하면 당이 결합된 경우가 페리시안산 이온이 전극에 도달하기가 어렵다는 것을 확인하였다. 또한 전극 상에 정렬시킨 분자 말단의 보론산기에 당이 결합을 하면 pKa가 감소하는 것을 발견하였다.

[34]

표 1

[Table 1]

프락토스(fructose) / mM	단분자막 <sup>1)</sup>	용액 <sup>2)</sup>
0	8.0 ± 0.2	8.6 ± 0.1
50	7.1 ± 0.1	6.0 ± 0.1
100	6.4 ± 0.1	5.7 ± 0.1

[35]

1) Cyclic voltammetry에 의해 결정

[36]

2) 메탄올:물 (1:9) 용액 중에서 자외선 가시흡수 스펙트럼으로 결정

[37]

$$E = E^\circ - \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{\text{Red}}}{a_{\text{Ox}}}$$

[38]

pKa가 작아진다는 것은 산성화된다는 것을 의미하고 결국 네른스트식에 의해 전압이 변화한다는 것을 의미한다.

[39]

$$E = E^\circ - \frac{0.05916}{z} \log \frac{a_{\text{Ox}}}{a_{\text{Red}}}$$

[40]  $E^\circ$ : 표준전극전위[41]  $R$ : 기체상수[42]  $T$ : 온도 (K)[43]  $z$ : 용액이온의 원자가[44]  $a$ : 환원 및 산화체의 활성도[45]  $F$ : 패러데이 상수=96,485 C mol<sup>-1</sup>

[46] 또한 표준상태 (1기압, 25°C)에서는 다음과 같이 계산이 가능하다.

[47]

[48] 따라서, 본 발명은 집전체 상에 당화헤모글로빈에 특이적 결합가능한 부위를 포함하고 외부로부터 전압 및 전류의 공급없이 당화헤모글로빈 결합에 의해 산화환원 반응전위가 변하는 문자들을 정렬시킨 변이전극; 및 기준전극을 준비해서 당화헤모글로빈의 결합 전후의 전압을 측정함으로써, 시료 내 HbA1c의 농도를 측정하는 것이 특징이다.

[49]

본 발명에서 용어 "시료"란 헤모글로빈 및/또는 당화헤모글로빈을 포함하고 있는 분석대상을 의미하고, 포유류, 바람직하게는 인간으로부터 분리된 혈액, 혈구, 혈청, 혈장, 골수액, 땀, 오줌, 눈물, 침, 피부, 점막, 모발 등의 모든 생체시료를 포함하며, 예컨대 혈액일 수 있다. 본 발명의 바이오센서는 혈액을 시료로 하여 당화헤모글로빈 농도를 측정함으로써, 혈당측정용도로 적용될 수 있다.

[50]

변이전극에 사용되는 집전체 재질의 비제한적인 예로는 금, 은, 동과 같은 금속이 있으며, 금, 백금 등의 금속성 기판 뿐만 아니라 GaAs, CdS, In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>과 같은 반도체 등의 도전성 기판이 사용될 수 있다.

[51]

상기 당화헤모글로빈 결합에 의해 산화환원 반응전위가 변하는 문자가 집전체에 용이하게 정렬되기 위해서는 상기 문자는 집전체에 결합할 수 있는 작용기를 포함하는 것이 바람직하다. 금속으로 된 집전체에 문자가 용이하게 정렬되기 위해서는 금속과 결합할 수 있는 티올기, 설피아이드(sulfide)기 또는 디설피아이드(disulfide) 결합을 포함하는 것이 바람직하다.

[52]

집전체 표면상에 정렬시 문자 중 집전체에 결합할 수 있는 부위는 집전체 계면에 당화헤모글로빈에 특이적 결합가능한 부위가 집전체로부터 바깥쪽을 향하도록 배향되는 것이 바람직하다.

[53]

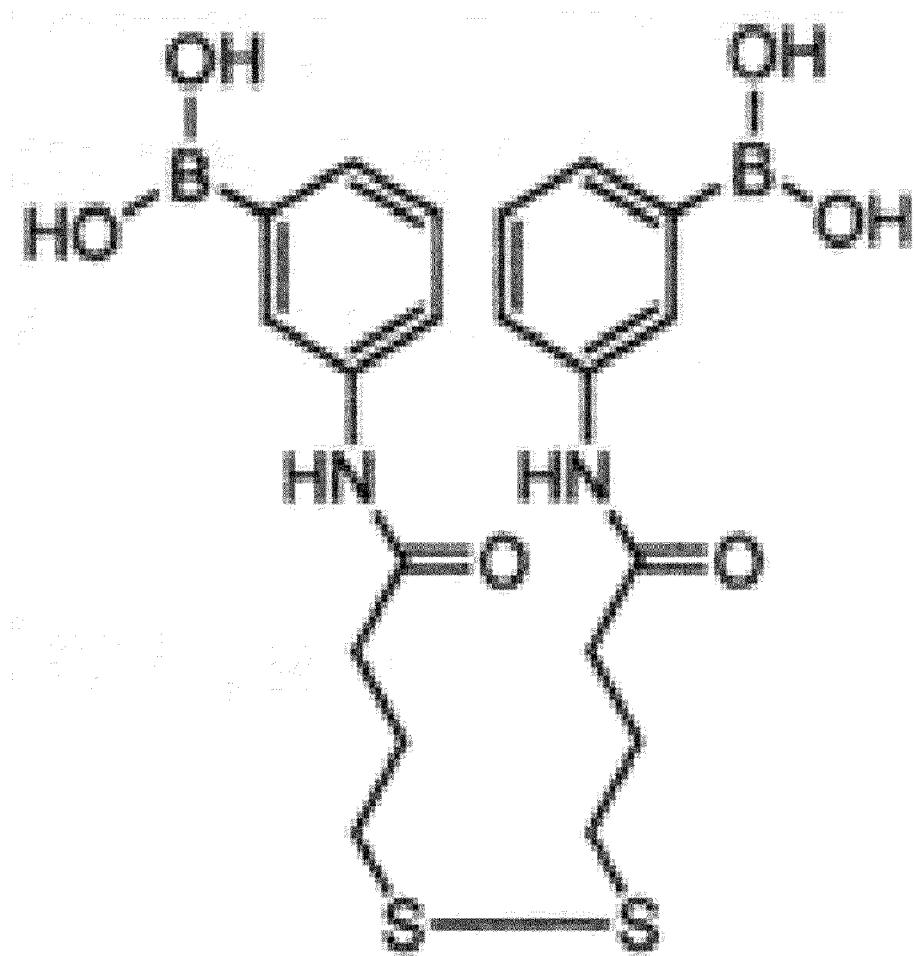
본 발명에서 사용되는 집전체상 정렬된 문자는 당화헤모글로빈의 글리코실기와 결합할 수 있고, 외부로부터 전압, 전류의 공급없이 당화헤모글로빈도입에 의해 산화환원반응전위를 발생하게 하는 물질이다.

[54]

당화헤모글로빈에 특이적 결합가능한 부위의 예로는 보론산(boronic acid)

작용기(-B(OH)<sub>2</sub>)가 있다.

- [55] 시료 내에 당화해모글로빈이 존재하면 당화해모글로빈과 보론산 작용기와의 결합을 통해 변이 전극 표면에 정렬된 분자-당화해모글로빈 결합체가 형성된다.
- [56] 상기 정렬된 분자는 전기전도성을 갖는 문자인 것이 바람직하며, 예컨대, 폴리아마이드, 폴리아닐린, 폴리페놀, 폴리티오펜, 폴리아세틸렌, 폴리(p-페닐비닐렌), 폴리(p-페닐렌술피드) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 분자는 우수한 전기전도도를 갖고 다양한 응용이 가능하며, 열적 안정성과 화학적 안정성이 우수하므로, 적용시 바이오센서의 성능 및 수명을 향상시킬 수 있는 장점이 있다.
- [57] 한편, 보론산 작용기를 갖는 전도성 물질의 예로는 디티오비스-3-부티라미도페닐보론산(dithiobis-3-butyramidophenylboronic acid), 3-(4-머캅토부탄아미도)페닐보론산(3-(4-mercaptobutanamido)phenylboronic acid), 디티오비스-4-아미노페닐보론산(dithiobis-4-aminophenyl boronic acid), 4-아미노페닐보론산(4-aminophenylboronic acid), 3-티오펜보론산(3-thiopheneboronic acid), 3-포르밀-4-티오펜보론산(3-formyl-4-thiopheneboronic acid) 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 디티오비스-3-부티라미도페닐보론산 또는 3-(4-머캅토부탄아미도)페닐보론산이다.
- [58] <디티오비스-3-부티라미도페닐보론산>
- [59]



- [60] 티오펜보론산은 물에 녹지 않고 에탄올 등에 녹기 때문에, 직접 혈액 샘플과 반응시키기 어려운 물질이고, 이를 사용하기 위해서는 카본페이스트 등에 섞어서 사용한다.
- [61] 변이전극의 집전체 상에 정렬된 분자가 산(acid)일 경우, 분자의 화학적 변화가 야기되어 변이전극 표면에 정렬되어 있는 분자의 pKa값이 달라져 전위변화가 야기된다.
- [62] 변이전극의 집전체 상에 정렬된 분자의 pKa를 변이전극으로 측정하기 위해서는, 집전체 위에 페닐보론산과 같은 당화헤모글로빈에 특이적으로 결합하는 분자가 많이 분포되어 있는 것이 적게 분포되어 있는 것보다 당화헤모글로빈의 농도차이에 대한 전압변화폭(예, pKa 민감도)을 높일 수 있으며, 분자가 집전체 상에 정렬되는 것이 무작위로 배향된 것에 의한 pKa에 영향을 주는 인자를 감소시켜 정확한 pKa 변화를 측정할 수 있다.
- [63] 본 발명에 따라, 당화헤모글로빈의 당과 특이적으로 결합가능한 분자는 집전체 표면 상에서 자가조립할 수 있는 것이 바람직하며, 자가조립 단일층을 형성하는 것이 더욱 바람직하다.
- [64] 금전극에 티올기에 의한 자가조립 단일층을 형성하였을 때 STM 관찰에 의해 티올기 간의 거리는 5 옹스트롬인 것을 확인했다. 또한, 수식 전극의

표면분자밀도는  $5.1 \times 10^{-10}$  mM/cm<sup>2</sup>가 계산되어 변이전극에 수식된 단분자막은 최대로 밀집될 수 있음을 확인하였다.

- [65] 이에 반해, 보론산 함유 분자를 전도성 페이스트와 혼합하여 스크린 코팅하는 경우는 페이스트의 특성상 도입되는 보론산량이 정해져 있어 고농도의 당화해모글로빈 측정에 높은 재현성을 얻을 수 없다.
- [66] 한편, 상기 분자를 집전체 상에 정렬시켜 변이전극을 형성하는 방법의 일 구체예로, 금전극을 0.5 M 황산 중에 0.2 내지 1.5 V, scan rate 100 mV/s로 20분간 연속 scan해서 청결화한 다음, tetrahydofuran:methanol=9:1용액으로 조제한 0.5 mg/ml 디티오비스-3-부티라미도페닐보론산 용액에 8시간 동안 담가 두어 단일막 수식전극을 제조할 수 있다.
- [67] 집전체 상에 분자를 정렬시키기 위해 사용되는 용매의 비제한적인 예로는 테트라하이드로퓨란, 메탄올, 이소프로필알코올, 에탄올, 프로판올, 아세톤, 또는 이의 혼합물 등이 있다.
- [68] 한편, 변이전극의 정렬된 분자와 산화환원반응하는 산화-환원물질은 페리시안산(ferricyanic acid), 페로센(ferrocene), 페로센유도체, 퀴논(quinones), 퀴논유도체, 유기전도성염(organic conducting salt), 비오로겐(viologen), 헥사아민루세늄(III) 클로라이드(hexaammineruthenium(III) chloride), 디메틸페로센(dimethylferrocene; DMF), 페리시니움(ferricinium), 페로센모노카르복실산(ferocene monocarboxylic acid; FCOOH), 7,7,8,8,-테트라시아노퀴노디메탄(7,7,8,8-tetracyanoquino-dimethane; TCNQ), 테트라티아풀발렌(tetrathiafulvalene; TTF), 니켈로센(nickelocene; Nc), N-메틸아시디니움(N-methyl acidinium; NMA+), 테트라티아테트라센(tetrathiatetracene; TTT), N-메틸페나지니움(N-methylphenazinium; NMP+), 히드로퀴논(hydroquinone), 3-디메틸아미노벤조산(3-dimethylaminobenzoic acid; MBTHDMAB), 3-메틸-2-벤조티오조리논하드라존(3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone), 2-메톡시-4-아릴페놀(2-methoxy-4-allylphenol), 4-아미노안티피린(4-aminoantipyrin; AAP), 디메틸아닐린(dimethylaniline), 4-아미노안티피렌(4-aminoantipyrene), 4-메톡시나프톨(4-methoxynaphthol), 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine; TMB), 2,2-아지노-디-[3-에틸-벤즈티아졸린술포네이트](2,2-azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline sulfonate]), o-디아니시딘(o-dianisidine), o-톨루이딘(o-toluidine), 2,4-디클로로페놀(2,4-dichlorophenol), 4-아미노페나논(4-aminophenazone), 벤지딘(benzidine) 등이 있다.
- [69]
- [70] 이와 같이 본 발명에 따라 준비된 변이전극과 시료의 계면(界面)에서, 변이전극의 집전체 상에 정렬된 분자들과 시료 중 산화환원가능물질 사이에 전자의 수수(授受)가 이루어지면, 즉 산화환원반응이 이루어지면 변이전극과

기준전극 사이에는 전위(電位)가 발생한다.

- [71] 이러한 계면반응(界面反應)이 화학평형(化學平衡) 상태가 되었을 때, 변이전극의 전극전위(電極電位)는 안정되며, 본 발명에서는 변이전극의 이러한 평형전극(平衡電極)을 측정하는 것이다.
- [72] 한편, 변이전극상 정렬된 문자들은 당화해모글로빈에 특이적 결합가능한 부위를 갖고 있어서, 당화해모글로빈이 상기 정렬된 문자에 결합하면, 상기 정렬된 문자의 화학적 변화를 야기하여 변이전극표면의 평형전극전위가 변한다.
- [73] 상기 정렬된 문자들이 시료 중에 있는 당화해모글로빈의 당과 얼마나 결합되었는지에 따라 변이전극의 평형전극전위가 달라지므로, 시료 중의 변이전극의 평형전극전위를 측정하여 변이전극 상의 정렬된 문자들이 당과 결합된 정도를 산출하고 이로부터 시료상의 당화해모글로빈의 농도를 분석할 수 있다.
- [74] 이에 반해, 당 결합 여부에 따른 전극의 임피던스를 측정하는 경우는 변이전극과 기준전극 간에 전압 혹은 전류를 인가하여 그때의 변화량을 측정하는 것이다. 본 발명은 외부에서 전압 혹은 전류의 공급없이 변이전극 내 물질의 산화환원전위와 기준전극과의 전위의 차이에 의해 전압이 발생되고, 변이전극 내 물질이 당과 결합함에 따라 산화환원전위(예, pKa)가 변함에 따라 변이전극과 기준전극 사이의 전압이 변하게 되고 이를 측정하는 것으로, 특별한 외부 전원 공급이 필요없다는 잇점이 있다.
- [75]
- [76] 이와 같은 변이전극의 전위차 변화는, 전위차분석법(Potentiometry)에 의해 변이전극과 기준전극 사이의 전위차를 측정하여 얻을 수 있으며, 이를 위해 전위차 측정회로 또는 전위차 적정장치가 사용될 수 있다.
- [77] 전위의 기준으로 표준 수소전극의 전위를 편의상 0 V라 하고, 일반적으로 칼로멜(calomel) 전극, 은-염화은 전극 등의 단극전위가 기준전극으로 사용된다. 기준전극은 일정전위를 유지할 수 있는 은/염화은 또는 유사 기준전극으로 사용할 수 있는 전극들이 바람직하다. 본 발명의 실시양태에서, 기준전극은 시료와 접촉하는 부분에 은/염화은을 코팅하여 제조할 수 있다.
- [78]
- [79] 한편, 당화해모글로빈은 혈액 중 총해모글로빈의 양에 대한 상대적인 당화해모글로빈의 양으로 나타낸다. 따라서 당화해모글로빈의 수치를 구하려면 총해모글로빈의 양을 함께 측정하는 것이 바람직하다.
- [80] 따라서, 본 발명에 따른 측정부는 해모글로빈의 양 또한 상기 시료 내에 포함된 해모글로빈의 산화-환원반응을 통해 전위차법으로 측정할 수 있는 것이 바람직하다. 따라서, 당화해모글로빈을 측정하거나, 총해모글로빈을 측정하기 위해서는 두가지 전극, 즉, 변이전극과 기준전극만 있으면 된다.
- [81] 특히, 해모글로빈의 산화-환원반응을 통한 전위차를 측정하기 위한

변이전극을 이하 작용전극이라 지칭한다.

- [82] 당화헤모글로빈의 측정은 디티오비스-3-부티라미도페닐보론산과 같이 당화헤모글로빈에 특이적 결합가능한 문자를 수식한 변이전극에 당화헤모글로빈이 결합함으로써 기준전극과 전압차가 발생하기 때문에 측정이 가능한 것이다.
- [83] 총헤모글로빈의 경우는 아무것도 수식하지 않은 변이 전극(즉, 작용전극)과 기준전극을 사용하고, 햄(HEME)기에 포함된  $\text{Fe}^{2+}$ 와 완충용액에 혼합된  $\text{Fe}^{3+}$ 와의 가역적 산화, 환원 반응에 의해 두 전극 사이에 전위차가 발생하기 때문에 총헤모글로빈을 측정할 수 있다.
- [84] 작용전극의 재료는 예를 들면, 동, 백금, 은, 금, 팔라듐, 루테늄, 로듐, 및 이리듐 등의 금속, 카본, 또는 각각의 재료에 표면처리를 한 재료를 들 수 있다. 가장 좋은 것은 금전극이다. 또한 시료 중의 단백질 등의 흡착을 방지할 목적으로 표면 친수성처리를 해도 좋다. 기준전극으로는  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ 전극을 사용할 수 있다.
- [85]
- [86] 종래에는 헤모글로빈과 당화헤모글로빈을 분리하는 단계를 거쳐 측정하는 방법이 사용되었다. 이에 반해 본 발명에서 제시하는 당화헤모글로빈 측정용 바이오센서는  $\text{Fe}^{2+}$ 를 헤모글로빈과 당화헤모글로빈의 반응지표물질로 사용하여 분리과정 없이 동시에 측정할 수 있다.
- [87] 따라서, 본 발명의 경우 기존의 당화단백질의 측정방법과는 달리 헤모글로빈과 당화단백질의 분리과정 없이 전압 측정만으로도, 헤모글로빈 및 당화헤모글로빈 양을 동시에 측정할 수 있다.
- [88] 또한, 종래에는 헤모글로빈의 환원성을 이용하여 산화환원방식에 의해 발생한 전류를 전극으로 검지해서 전류치로부터 헤모글로빈 농도를 정량하는 방식을 제시하였다. 전류계측에 의한 측정방식은 크로마토그래피나 흡광광도계를 사용하는 방법에 비교해서 소형화된 장치로 간편하게 헤모글로빈의 측정이 가능하나, 측정결과 나타내는 전류치는 전극의 면적이나 시료량에 비례하기 때문에 고정밀도로 측정을 하기 위해서는 전극의 면적을 넓게 하거나, 시료량을 많이 사용해야 문제점을 가지고 있기 때문에 point-of-care 의미의 소형화 측정장치나 시료량의 미량화에는 어려운 부분이 있다. 그러나, 본 발명은 두 전극 사이에 전위차를 통해 총헤모글로빈을 측정하기 때문에 상기 문제점을 해결할 수 있다.
- [89] 헤모글로빈 총량을 정확히 측정하기 위해 헤모글로빈으로부터 햄을 분리하는 것이 바람직하고, 이를 위해 시료에 계면활성제(surfactant) 용액을 처리할 수 있다.
- [90] 총헤모글로빈을 측정하기 위해서는 혈액에 계면활성제와 폐리시안화칼륨을 섞어 처리한 시료를 상기 두 전극에 첨가하는 것이 바람직하다. 본 발명의 일구체예에서는, 혈액에 계면활성제와 폐리시안화칼륨을 따로 처리하는 것을 피하기 위해 두 전극 사이에 부직포를 설치하고 미리 계면활성제와

페리시안화칼륨을 동결건조시켜 설치해 놓으면 단지 전혈을 전극 위에 첨가하게 되면 동결건조된 시약이 전혈을 용혈시켜서 산화환원반응을 발생케 해서 두 전극의 전위차를 측정할 수 있다.

- [91] 온도나 참조전극의 노후 등, 조건의 변화에 따라 측정전위가 시료에 의해 발생하는 전압으로부터 약간 변화한다. 따라서, 미리 산화환원전위를 알고 있는 기준용액을 측정함으로 조건변화에 따른 측정오차를 보정할 수 있다.
- [92] 본 발명의 측정부는 측정시료 이외의 요인에 의한 전위변화에 따른 오차보정을 위하여 보조전극을 더 구비할 수 있으며, 이로부터 당화해모글로빈 또는 총해모글로빈 측정에 방해되는 요인들의 영향을 제거할 수 있다.
- [93] 보조전극은 총해모글로빈측정용 변위전극 또는 작용전극과 같은 재질을 사용할 수 있다.
- [94] 또한, 보조전극은 작용전극과 같은 공정, 조성으로 제작되어 작용전극과 같은 전기적 응답을 나타낸다. 기준용액으로는 일정의 조건하에서 산화환원전위가 알려진 것으로 안정한 전위가 얻어지는 시료라면 문제가 없다. 예를들면 금속염, 금속착체, 카논계화합물, 벤조페논과 이러한 물질과의 혼합용액이 사용가능하다.
- [95]
- [96] 한편, 본 발명에 따라 기준전극; 변이전극; 선택적으로 작용전극; 및 선택적으로 보조전극을 구비한 측정부는 교체가능한 스트립형태일 수 있다(도 2 및 3 참조).
- [97] 본 발명의 측정부는 변이전극, 기준전극, 선택적으로 작용전극 및 선택적으로 보조전극과 각 전극을 측정장비와 연결하는 전기 연결선으로 구성되어 있다. 상기 전극을 제외한 나머지 부분은 절연물질을 이용해 절연층을 형성한다.
- [98] 도 2 및 3에 도시된 바와 같이 본 발명에 따른 바이오센서용 스트립은 비전도절연물질로 이루어진 지지체상에 각각의 전극들이 구성되어지는 것이 바람직하다. 이러한 지지체는 20 내지 60 마이크론의 두께를 갖도록 제조되는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 30 마이크론의 두께를 갖는 것이다.
- [99] 상기 비전도 절연물질로 이루어진 지지체의 재료로는 어떠한 절연체도 사용할 수 있지만, 동시에 대량으로 제조하기 위해서는 어느 정도의 유연성과 지지체로서의 강성을 지닌 것이 적합하다. 일반적으로 지지체의 표면은 매우 고르게 형성되어 있어야 한다. 왜냐하면, 고르지않은 표면은 대량생산시 각 센서 스트립간의 전극표면적의 불균일성의 원인이 되고 결과적으로 센서 출력신호의 불균일성을 초래하기 때문이다.
- [100] 가장 고른 표면을 갖는 물질은 반도체제조에 사용되는 실리콘웨이퍼를 들 수 있다. 다음으로는 투명하고 가공성이 용이한 석영 유리기판이나 일반 유리기판을 사용할 수 있다. 한편, 일반적인 음악용 컴팩트 디스크는 그용도의 특성상 표면이 매우 고르게 형성되고 평탄도도 우수하며, 원형으로 반도체 웨이퍼와 비슷한 형상을 하고 있어, 별도의 장비를 제작하지 않고 반도체

제조공정장비를 그대로 사용할 수 있으면서도, 가격이 저렴하고 손쉽게 구할 수 있는 장점이 있다. 이외에도, 일반적인 플라스틱필름을 사용할 수 있다.

- [101] 캠팩트디스크 또는 플라스틱 필름 재료의 예로서, 폴리에스테르(poly ester), 폴리카보네이트(poly carbonate), 폴리스틸렌(poly styrene), 폴리이미드(poly imide), 폴리비닐클로라이드(poly vinyl chloride), 폴리에틸렌(poly ethylene), 폴리에틸렌테레프탈레이트(poly ethylene telephthalate) 등이 사용될 수 있다.
- [102] 작용전극은 14 mm 내지 19 mm의 길이, 0.5 mm 내지 2 mm의 너비 및 20 내지 150 마이크론의 두께로 이루어지는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 14 mm 길이, 1 mm 너비 및 60 마이크론의 두께로 이루어진 것이다.
- [103] 변이전극, 기준전극 및 보조전극은 각각 독립적으로 15 mm 내지 20 mm의 길이, 0.5 mm 내지 2 mm의 너비 및 20 내지 150 마이크론의 두께로 이루어지는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 15 mm 길이, 1 mm 너비 및 60 마이크론의 두께로 이루어진 것이다.
- [104] 본 발명의 전극들은 시료에 직접 접촉하는 부분과 검출기에 신호를 전달하는 부분 사이를 절연회복을 통해 구획하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [105]
- [106] 한편, 바이오센서는 상기 변이전극과 기준전극 사이의 전위차 값 또는 이를 시료 내 당화해모글로빈의 양 또는 농도로 환산시켜 표시하는 표시부를 더 구비할 수 있다.
- [107]
- [108] 나아가, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 바이오센서를 구비한 당화해모글로빈 측정 키트를 제공한다.
- [109] 당화해모글로빈 측정키트는 용해용액(lysis solution), 계면활성제용액, 또는 둘 다를 더 포함할 수 있다.
- [110] 두 전극 사이의 전위차를 측정하기 위한 전압계는 높은 임피던스를 가지는 것이 좋다.
- [111] 검출되는 전압은 해모글로빈과의 반응에 의해 환원되는 메디에타의 양에 의존하기 때문에 미리 검량선을 작성하여 검량선을 이용하여 해모글로빈농도를 정량할 수도 있다.
- [112] 예로서, 해모글로빈 농도를 측정하는 경우 적혈구를 포함한 시료가 반응용기내에 도입되면 용혈제에 의해 적혈구 중의 해모글로빈이 방출되어 메디에타와 산화환원반응을 일으켜 메디에타가 환원된다. 결과적으로 생긴 산화형/환원형의 농도 비에 대해 작용 전극에 전압이 발생, 그 전압으로부터 미리 작성한 검량선을 이용하여 전혈 중의 해모글로빈의 농도를 산출한다.
- [113] 측정시료는 항응고제나 용혈시약에 의해 처리된 전혈일 수 있다. 반응용기에 도입되는 시료의 부피는 1 마이크로리터 이상이 적당하다. 바람직한 부피는 5 마이크로리터 이상이다.
- [114] 반응용기는 측정시료 등이 전극의 변이전극/작용전극과 이의 각 기준전극이

접촉되도록 구성되어 있어, 액체시료가 도입되면 2개의 전극이 통전되어 회로가 형성된다. 측정시료가 액체가 아닐 경우에는 물 등의 용매에 용해한 후에 반응용기에 도입할 수 있다.

- [115] 반응용기의 형태는 시료 및 측정시약을 유지하고, 시료 도입 후에 2개의 전극 사이를 통전시키는 것이 가능한 구조로서 변이전극/작용전극과 이의 각 기준전극을 수용할 수 있는 크기의 용기이면 된다. 반응용기의 재료는 여과지 등의 섬유집합체, 부직포, 다공질재료, 젤 등, 전기적으로 불활성 및/또는 시료나 전극에 대해서도 불활성인 한 제한없이 사용될 수 있다. 그 중에서도 폴리염화비닐, 폴리이미도, 젤라틴, 유리섬유 등을 들 수 있다.
- [116] 반응용기에는 측정시약으로서 용혈제와 메디에타(redox mediator), pH 완충시약이 포함될 수 있다. 또한, 반응용기 안에 전기화학적 측정을 방해하는 방해성분을 제거하기 위해 방해제거시약을 포함시킬 수도 있다.
- [117] 용혈제로서는, 이온성 또는 비이온성의 계면활성제, 유기용매, 염, 효소 등을 사용할 수 있다. 계면활성제로는 폴리옥시에틸렌옥틸페닐에테르(polyoxyethyleneoctylphenyl ether), 라우릴유산나트륨, 사포닌 등을 사용할 수 있다. 유기용매로는 포름알데이드, 핵산, 아세톤 등이 사용가능하다. 염으로는 염화암모늄, 염화알루미늄 등이 사용가능하다. 바람직한 예로는 폴리옥시에틸렌옥틸페닐에테르(polyoxyethyleneoctylphenyl ether)가 있다. 이 경우 농도는 1 내지 20%(v/v)가 사용가능하다. 또한, 중류수에 의해 희석되어 염농도의 변화에 의한 용혈을 유도할 수도 있다.
- [118] 메디에타(redox mediator)로서는 헤모글로빈과 산화환원반응을 일으키는 것이라면 사용가능하다. 비제한적인 예로는 금속염, 금속착제, 키논계 화합물이나 벤조페논 등이 있다. 가장 안정된 메디에타로는 페리시안화물이 있으며, 사용 농도는 예상되는 헤모글로빈농도의 2배 이상의 농도로 사용하는 것이 안정된 결과를 얻을 수 있고 10 내지 500 mM 범위이다.
- [119] pH 완충액으로서는 시료 첨가 후에 pH 4 내지 8을 유지하면서 반응용기나 전극이나 시료에 반응하지 않는 것이라면 제한없이 사용가능하다. 최종적인 사용농도는 5 내지 500 mM이고, 보다 좋은 조건은 50 내지 200 mM이다. 예를 들면 pH 6.5 내지 7.0의 인산완충액을 사용할 수 있다.
- [120]
- [121] 이하, 첨부된 도 2 및 3을 참조하여 본 발명의 바이오센서를 상세히 설명한다.
- [122] 본 발명의 제1실시형태에 대해서 헤모글로빈 및 HbA1c을 측정하기 위한 장치의 개략도인 도 2를 참조하여 설명한다.
- [123] 전극은 HbA1c 측정용 변이전극과 제1기준전극; 그리고 총헤모글로빈 측정용 작용전극과 제2기준전극으로 구성되어 있다. 기준전극은 Ag/AgCl 페이스트가 도포되어 고정화되어 있다.
- [124] 변이전극과 제1기준전극은 근접하여 배치되어 있고, 변이전극과 제1기준전극 모두와 접촉할 수 있는 형상으로 반응용기가 배치되어 있다. 반응용기에 시료를

도입하면 변이전극과 제1기준전극은 시료를 통해 통전할 수 있다.

- [125] 작용전극과 제2기준전극도 근접하여 배치되어 있고, 작용전극과 제2기준전극 모두와 접촉할 수 있는 형상으로 반응용기가 배치되어 있다. 반응용기에 시료를 도입하면 작용전극과 제2기준전극은 시료를 통해 통전할 수 있다.
- [126] 반응용기는 시료를 그 내부에 흡수해서 보지(保持)할 수 있고 한번 사용후 버릴 수 있도록 설치되어 있다. 반응용기 안에는 부직포가 들어있는 것이 바람직하다.
- [127] HbA1c 측정을 위한 반응용기에는 인산완충액, Triton X-10, 디티오비스-3-부티라미도페닐보론산 또는 페닐보론산 류가 건조상태로 보지되어 있고 총헤모글로빈 측정을 위한 반응용기에는 측정시약으로 인산완충액, Triton X-100, potassium ferricyanide가 건조상태로 보지되어 있어서 10마이크로 리터 정도의 전혈시료의 도입으로 시료 중의 수분이 용해되고 외부로부터 특별한 전압, 전류의 공급이 없어도 산화환원전위가 발생한다.
- [128] 변이전극과 제1기준전극, 그리고 작용전극과 제2기준전극은 각각 전압계에 접속되어 이들 두 전극 쌍 사이에 발생하는 전압을 측정할 수 있다. 따라서, 전압계에서 계측된 전압을 바탕으로 시료 중의 총헤모글로빈 농도와 HbA1c 농도의 산출이 가능하다.
- [129] 전술한 바와 같이, 2개의 전극에 시료를 접촉시켜 산화환원반응에 의해 두 전극 간에 발생한 산화환원전위를 계측하여 측정한 전위를 바탕으로 시료 중의 헤모글로빈과 HbA1c 농도를 산출할 수 있도록 구성하였기 때문에 2개의 전극 간에 전력을 공급하기 위한 전원이 불필요하고 미량의 시료라도 측정가능하기 때문에 소형으로 미량의 시료라도 고정밀도의 헤모글로빈과 HbA1c 농도가 측정가능하다.
- [130]
- [131] 본 발명의 제2실시형태에는 대해서 또 다른 헤모글로빈 및 HbA1c을 측정하기 위한 장치의 개략도인 도 3을 참조하여 설명한다.
- [132] 본 발명의 제2실시형태는 측정시료 이외의 요인에 의한 전위변화에 따른 오차보정을 위하여 보조전극이 설치되어 있다. 온도나 기준전극의 노후 등, 조건의 변화에 따라 측정전위가 시료에 의해 발생하는 전압으로부터 약간 변화한다. 따라서, 미리 산화환원전위를 알고 있는 기준용액을 측정함으로 조건변화에 따른 측정오차를 보정할 수 있다.
- [133] 도 3에 대해 전극2는 전극1과 전극3 사이에 배치되어, 반응용기는 전극1과 전극2, 전극2와 전극3에 접촉하도록 배치한다.
- [134] 전압계는 전극1과 전극2 사이에 발생한 전압을 측정함과 동시에 전극2와 전극3 사이에 발생한 전압을 기준전압으로 측정한다.
- [135] 반응용기<sup>a</sup>는 제1실시형태에서 반응용기와 같은 측정시료 및 측정시약이 수용되어 있고, 반응용기<sup>b</sup>는 기준용액이 수용되어 있다. 기준용액이 반응용기<sup>b</sup>에 도입되어, 전극2와 전극3의 양전극에 접촉되면 전극2와 전극3 사이의 기준이 되는 전압이 발생한다. 또한 기준용액은 반응용기<sup>b</sup>에 측정

개시할 때 도입해도 좋고, 미리 도입해 두어도 좋다. 전극1과 전극2 간에 발생하는 전압과 전극2와 전극3 사이에 발생하는 전압을 전압계로 측정해서 표시하고 전극1과 전극2 간에 발생한 전압을 전극2와 전극3 사이에 발생한 전압으로 보정한다. 측정시료 이외의 요인으로 전압이 변동하는 것도 생각되어질 수 있지만, 전극2와 전극3 간의 발생하는 전압을 이용하여 상기 요인에 의한 오차를 감소시키는 것이 가능하다.

- [136] 예를들어 전극1과 전극2 간에 발생한 전압으로부터 전극2와 전극3 사이에 발생한 전압을 감산해서 얻어진 전압을 이용해서 측정시료 중의 헤모글로빈농도나 HbA1c 농도를 산출할 수 있다.
- [137] 본 발명의 제2실시형태에 의하면 제1실시형태와 같은 효과를 얻을 수 있을 뿐만아니라 보조전극을 추가함으로 측정시료 이외의 요인에 의한 전압변화를 제외하는 것이 가능하게 되어 측정정밀도를 향상시킬 수 있다.
- [138]
 

### 발명의 실시를 위한 형태
- [139] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [140]
- [141] <실시예 1>
- [142] 도 3에 도시된 바와 같은 바이오센서용 스트립을 제조하였다.
- [143] 당화헤모글로빈 선택적인 변이전극(1)을 제조하기 위해 15 mm 길이, 1 mm 너비 및 60 마이크론 두께의 금전극을 5분간 초음파로 2회 세정한 후, 0.5 M의 황산 용액 내에서 0.2 내지 0.5 V 사이의 전압을 조사하는 전기화학적 방법으로 표면을 처리하여 준비하였다. 준비된 금 전극을 0.5 mg/ml 농도로 디티오비스-3-부티라미도페닐보론산(Dithiobis-3-butyramidophenyl boronic acid)이 함유된 9 : 1 비율의 테트라하이드로퓨란과 메탄올 혼합 용액에 8시간 반응시켜 금 전극 표면에  $5.1 \times 10^{-10}$  mM/cm<sup>2</sup> 밀도의 페닐보론산 단분자막을 분자 내 이황화결합을 이용하여 고정시켜 변이전극(1)을 제조하였다.
- [144]
- [145] 당뇨병환자의 전혈을 샘플로 사용했다. Lysis buffer(1% KCl) 중에 전혈 100 μl(마이크로리터)를 첨가한 후 단분자막을 고정시킨 변이전극과 기준전극을 이용해 전압을 측정했다.
- [146] 바이오센서를 이용한 헤모글로빈 및 당화헤모글로빈 양 측정의 정확성을 확인하기 위해 4%, 7%, 10%, 14%의 표준 당화헤모글로빈(HbA1c) 용액을 이용하여 상기 제조된 스트립을 측정부로 갖는 바이오센서와 액체고속크로마토그래피법으로 측정하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [147] 도 7에 나타난 바와 같이 기존에 당화헤모글로빈 양의 측정방법들 중에서 높은

정확도를 갖는 액체고속크로마토그래피법으로 측정한 결과와의 상관관계를 나타내는  $R^2$  값이 0.9856으로 확인되었다.

[148] 이러한 결과는 본 발명에 따른 바이오센서를 이용한 당화해모글로빈 양의 측정방법이 실제 적용되기에 충분한 정확도를 가짐을 나타낸다.

[149]

[150] [부호의 설명]

[151] 1: 변이전극

[152] 2, 5: 보조전극

[153] 3, 4: 기준전극

[154] 6: 작용전극

[155]

## 청구범위

[청구항 1]

기준전극; 및 집전체 상에, 당화해모글로빈에 특이적 결합가능한 부위를 포함하고 외부로부터 전압 및 전류의 공급없이 당화해모글로빈 결합에 의해 산화환원 반응전위가 변하는 문자들이 정렬된 변이전극을 구비한 측정부; 및 전위차분석법(Potentiometry)에 의해 변이전극과 기준전극 사이의 전위차를 측정하기 위한, 전위차 측정회로 또는 전위차 적정장치를 구비한 당화해모글로빈 측정용 바이오센서.

[청구항 2]

제1항에 있어서,  
상기 변이전극과 기준전극 사이의 전위차 값 또는 이를 시료 내 당화해모글로빈의 양 또는 농도로 환산시켜 표시하는 표시부를 더 구비하는 것인 바이오센서.

[청구항 3]

제1항에 있어서,  
상기 정렬된 문자는 집전체에 결합할 수 있는 작용기를 포함하는 것이 특징인 바이오센서.

[청구항 4]

제1항에 있어서,  
상기 정렬된 문자는 당화해모글로빈에 특이적 결합가능한 부위로 보론산 작용기를 포함하는 것이 특징인 바이오센서.

[청구항 5]

제1항에 있어서,  
상기 정렬된 문자는 집전체에 결합할 수 있는 작용기로 티올(-SH)기, 설파이드(sulfide)기 또는 디설파이드(disulfide) 결합을 포함하는 것이 특징인 바이오센서.

[청구항 6]

제1항에 있어서,  
상기 정렬된 문자는  
3-(4-메captobutanamido)페닐보론산(3-(4-mercaptopbutanamido)phenylboronic acid)인 것이 특징인 바이오센서.

[청구항 7]

제1항에 있어서,  
정렬된 문자와 산화환원반응하는 물질은 페리시안산(ferricyanic acid), 페로센(ferrocene), 페로센유도체, 퀴논(quinones), 퀴논유도체, 유기전도성염(organic conducting salt), 비오토겐(viologen), 헥사아민루세늄(III)클로라이드(hexaammineruthenium(III) chloride), 디메틸페로센(dimethylferrocene; DMF), 페리시니움(ferricinium), 페로센모노카르복실산(ferocene monocarboxylic acid; FCOOH), 7,7,8,8,-테트라시아노퀴노디메탄(7,7,8,8-tetracyanoquino-dimethane ; TCNQ), 테트라티아풀발렌(tetrathiafulvalene; TTF),

니켈로센(nickelocene; Nc), N-메틸아시디니움(N-methyl acidinium; NMA+), 테트라티아테트라센(tetrathiatetracene; TTT), N-메틸페나지니움(N-methylphenazinium; NMP+), 히드로퀴논(hydroquinone), 3-디메틸아미노벤조산(3-dimethylaminobenzoic acid; MBTHDMAB), 3-메틸-2-벤조티오조리논히드라존(3-methyl-2-benzothiozolinone hydrazone), 2-메톡시-4-아릴페놀(2-methoxy-4-allylphenol), 4-아미노안티피린(4-aminoantipyrin; AAP), 디메틸아닐린(dimethylaniline), 4-아미노안티피렌(4-aminoantipyrene), 4-메톡시나프톨(4-methoxynaphthol), 3,3',5,5'-테트라메틸벤자딘(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine; TMB), 2,2-아지노-디-[3-에틸-벤즈티아졸린술포네이트](2,2-azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline sulfonate]), o-디아니지딘(o-dianisidine), o-톨루이딘(o-toluidine), 2,4-디클로로페놀(2,4-dichlorophenol), 4-아미노페나논(4-aminophenazole), 벤자딘(benzidine)으로 구성된 군에서 선택된 것이 특징인 바이오센서.

## [청구항 8]

제1항에 있어서,  
측정부는 헤모글로빈 총량을 측정하기 위한 작용전극 및 기준전극을 더 구비하고, 상기 작용전극과 기준전극 사이의 전위차를 측정하여, 시료 내 포함된 헤모글로빈 및 당화헤모글로빈을 동시에 측정하는 것이 특징인 바이오센서.

## [청구항 9]

제8항에 있어서,  
헤모글로빈의 햄(HEME)기에 포함된  $\text{Fe}^{2+}$ 의 가역적 산화환원 반응에 의해 형성된 작용전극과 기준전극 사이의 전위차를 통해 헤모글로빈 총량을 측정하는 것이 특징인 바이오센서.

## [청구항 10]

제1항에 있어서,  
측정부는 보조전극을 추가로 포함하는 바이오센서.

## [청구항 11]

기준전극; 및 집전체 상에, 황원자를 통해 3-(4-며캅토부탄아미도)페닐보론산이 정렬된 변이전극을 구비한 당화헤모글로빈 측정바이오센서용 스트립.

## [청구항 12]

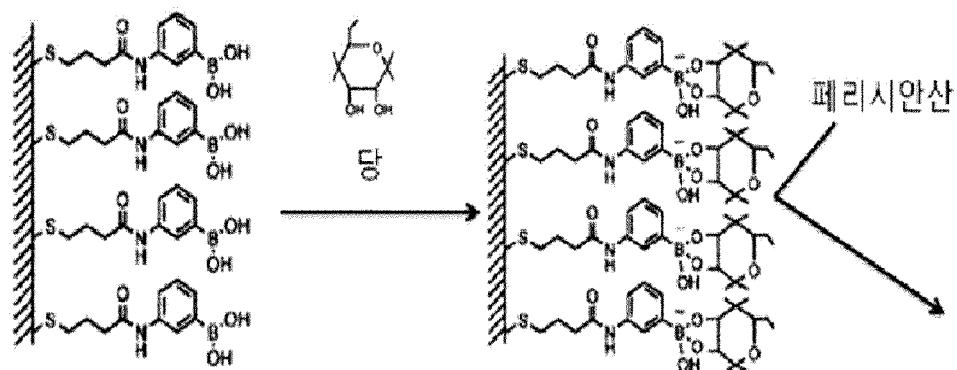
제11항에 있어서,  
작용전극과 기준전극 사이의 전위차를 측정하여 헤모글로빈 총량을 측정하기 위한 작용전극 및 기준전극을 더 구비하여, 시료내 포함된 헤모글로빈 및 당화헤모글로빈을 동시에 측정하게 하는 바이오센서용 스트립.

## [청구항 13]

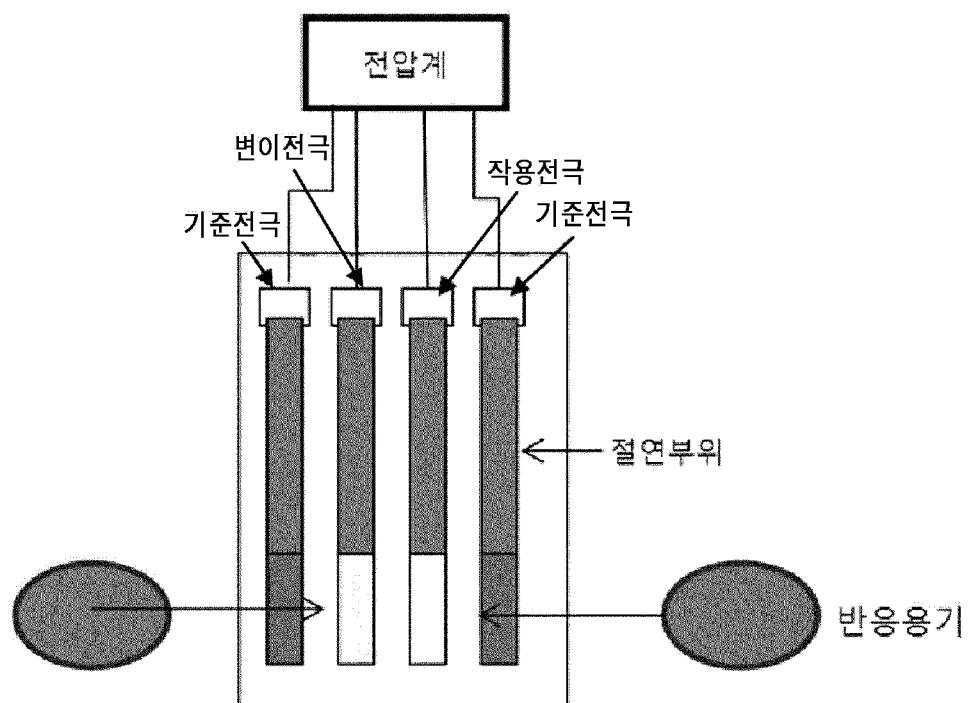
제11항에 있어서,

- 상기 스트립은 분리교환될 수 있어 일회 또는 복수의 사용이 가능한 것이 특징인 바이오센서용 스트립.
- [청구항 14] 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 바이오센서를 구비한 당화해모글로빈 측정 키트.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,  
용해용액(lysis solution), 계면활성제용액, 또는 둘다를 더 포함하는 것이 특징인 키트.
- [청구항 16] 제14항에 있어서,  
상기 바이오센서의 측정부는 분리교환될 수 있는 스트립형태인 것이 특징인 키트.
- [청구항 17] 제14항에 있어서,  
변이전극과 기준전극 모두와 접촉할 수 있는 반응용기 또는,  
추가로 작용전극과 기준전극 모두와 접촉할 수 반응용기를 더 구비하는 키트.

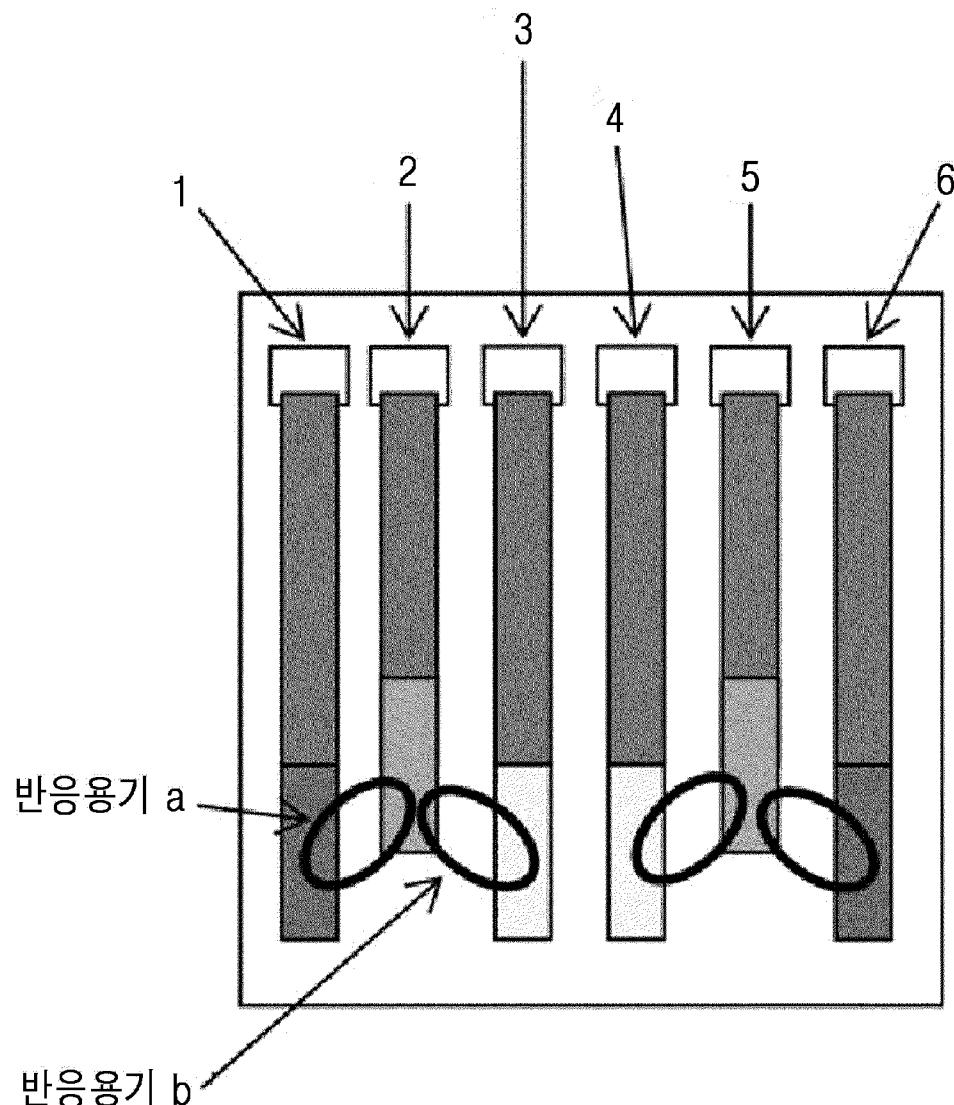
[Fig. 1]



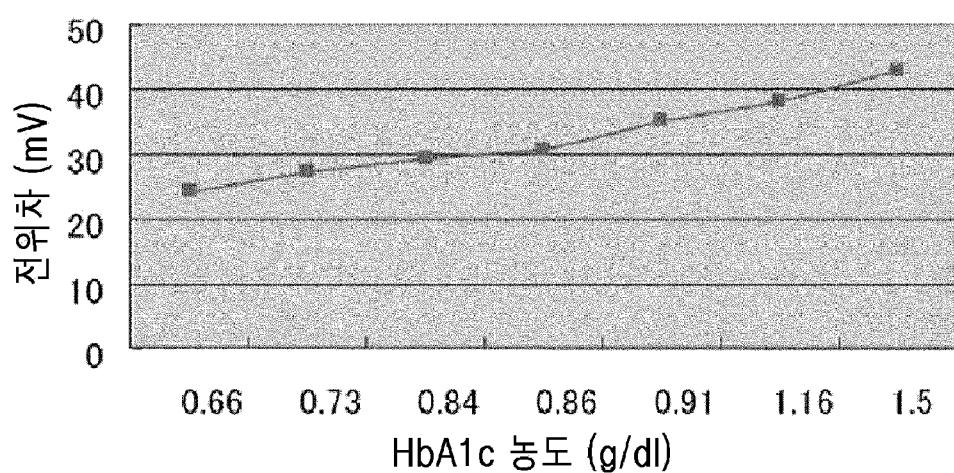
[Fig. 2]



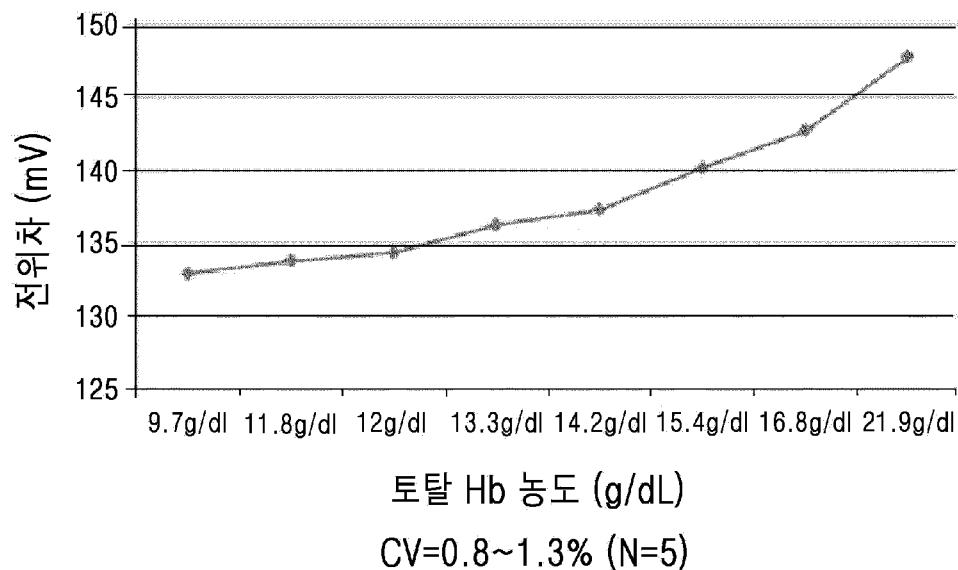
[Fig. 3]



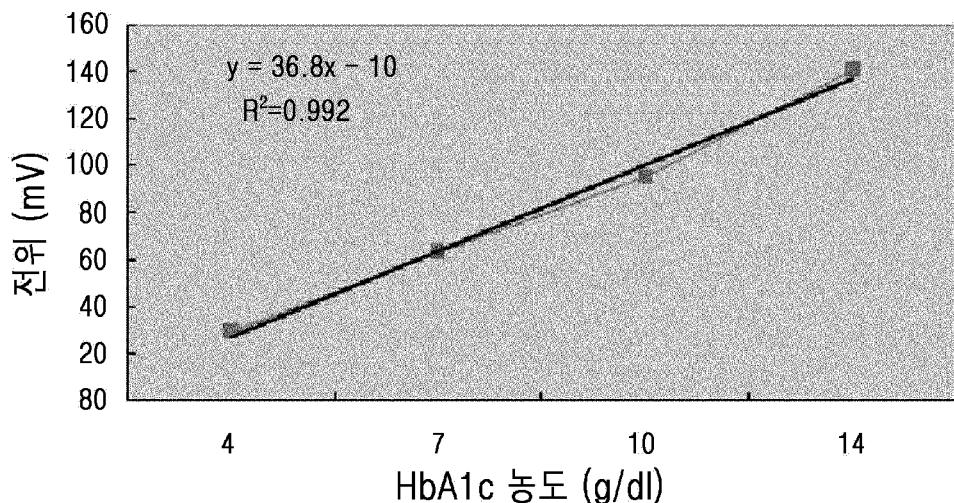
[Fig. 4]



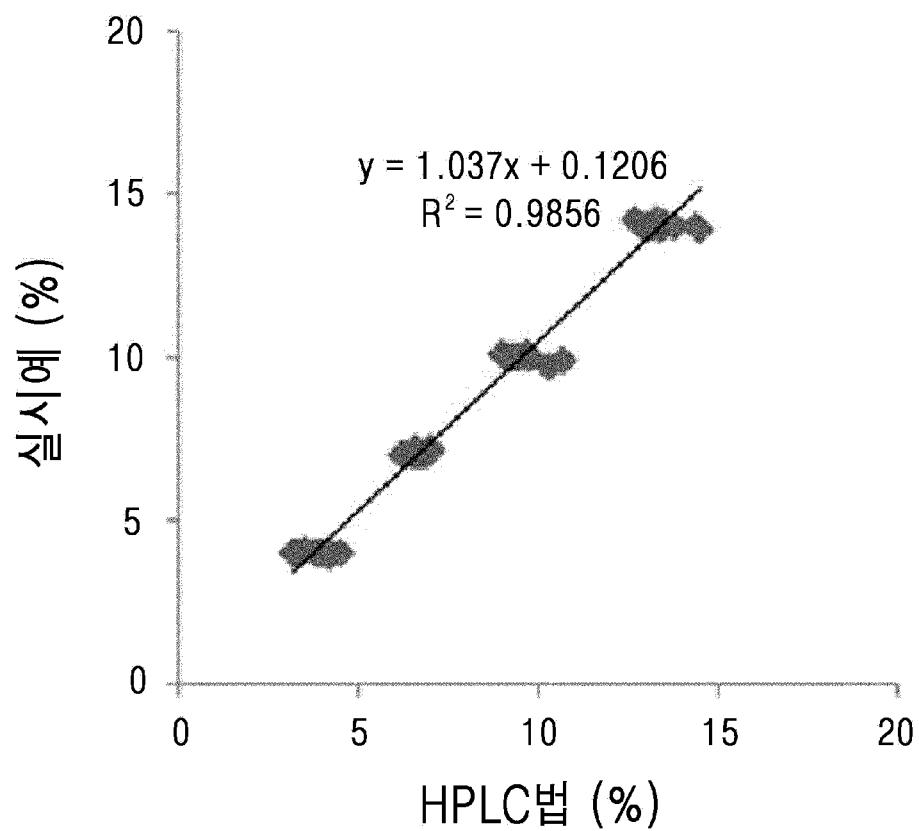
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2012/010145****A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****G01N 27/30(2006.01)i, G01N 33/49(2006.01)i, A61B 5/145(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 27/30; G01N 15/06; G01N 27/403; G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 33/50; A61B 5/00

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: biosensor, glycosylated hemoglobin, potentiometry, phenylboronic acid, electrode, ferrocene, total protein, sensor strip, potentiometer.

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	KR 10-0945571 B1 (I-SENS, INC.) 08 March 2010 See abstract, paragraphs [20]-[29], [33]-[45], figures 2, 4, 5.	1-5,7-10,14-17 6,11-13
Y A	KR 10-0771711 B1 (M-BIOTECH, INC.) 30 October 2007 See abstract, paragraph [7].	1-5,7-10,14-17 6,11-13
A	KR 10-2010-0008260 A (I-SENS, INC.) 25 January 2010 See the entire document.	1-17
A	US 2006-0200044 A1 (DOMINIQUE M FREEMAN et al.) 07 September 2006 See the entire document.	1-17
A	KR 10-2009-0008798 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY et al.) 22 January 2009 See the entire document.	1-17



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	Date of mailing of the international search report
<b>26 MARCH 2013 (26.03.2013)</b>	<b>26 MARCH 2013 (26.03.2013)</b>

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. 82-42-472-7140	Authorized officer  Telephone No.
---	---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2012/010145**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0945571 B1	08.03.2010	NONE	
KR 10-0771711 B1	30.10.2007	AU 2000-69315 A1 EP 1212601 A1 JP 2003-517588 A WO 01-16575 A1	26.03.2001 12.06.2002 27.05.2003 08.03.2001
KR 10-2010-0008260 A	25.01.2010	US 2011-0123399 A1 WO 2010-008137 A2	26.05.2011 21.01.2010
US 2006-0200044 A1	07.09.2006	AU 2002-312521 A8 AU 2002-315177 A8 AU 2002-315180 A8 AU 2002-320094 A8 AU 2002-330855 A8 AU 2002-344767 A1 AU 2002-344825 A8 AU 2002-348683 A8 AU 2002-367876 A1 AU 2003-231749 A1 AU 2003-234167 A1 AU 2003-239160 A1 AU 2003-268547 A1 AU 2003-290589 A1 AU 2003-297205 A1 CA 2448681 A1 CA 2448790 A1 CA 2448790 C CA 2448902 A1 CA 2448902 C CA 2448905 A1 CA 2448905 C CN 1662174 C0 CN 1735370 A CN 1735370 C0 EP 1395185 A2 EP 1395185 B1 EP 1404218 A2 EP 1404218 A4 EP 1404232 A2 EP 1404232 B1 EP 1404233 A2 EP 1404233 A4 EP 1404233 B1 EP 1404234 A2 EP 1404234 A4 EP 1404234 B1 EP 1404235 A2 EP 1406537 A2	23.12.2002 23.12.2002 23.12.2002 23.12.2002 23.12.2002 11.11.2003 23.12.2002 23.12.2002 03.11.2003 03.11.2003 03.11.2003 29.03.2004 07.06.2004 09.07.2004 19.12.2002 19.12.2002 07.09.2010 19.12.2002 07.09.2010 19.12.2002 07.09.2010 31.08.2005 15.02.2006 16.01.2008 10.03.2004 27.10.2010 07.04.2004 19.11.2008 07.04.2004 02.12.2009 07.04.2004 30.05.2007 02.12.2009 07.04.2004 16.07.2008 09.02.2011 07.04.2004 14.04.2004

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2012/010145**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
	EP 1406537 B1	12.01.2011	
	EP 1499247 A1	26.01.2005	
	EP 1501402 A2	02.02.2005	
	EP 1501409 A1	02.02.2005	
	EP 1501410 A2	02.02.2005	
	EP 1501427 A1	02.02.2005	
	EP 1562470 A1	17.08.2005	
	EP 1578286 A1	28.09.2005	
	EP 1578286 A4	14.01.2009	
	EP 1585558 A2	19.10.2005	
	EP 1638454 A2	29.03.2006	
	EP 1945093 A2	23.07.2008	
	EP 1968461 A2	17.09.2008	
	EP 1978865 A2	15.10.2008	
	EP 2301438 A2	30.03.2011	
	EP 2301438 A3	20.07.2011	
	JP 04-149911 B2	17.09.2008	
	JP 04-157471 B2	01.10.2008	
	JP 04-209767 B2	14.01.2009	
	JP 04-272051 B2	06.03.2009	
	JP 04-522364 B2	04.06.2010	
	JP 04-996811 B2	18.05.2012	
	JP 05-134475 B2	16.11.2012	
	JP 2004-528936 A	24.09.2004	
	JP 2005-504564 A	17.02.2005	
	JP 2005-506857 A	10.03.2005	
	JP 2005-517463 A	16.06.2005	
	JP 2005-523065 A	04.08.2005	
	JP 2006-504506 A	09.02.2006	
	JP 2008-289939 A	04.12.2008	
	JP 2009-106784 A	21.05.2009	
	JP 2012-161627 A	30.08.2012	
	US 2003-083685 A1	01.05.2003	
	US 2003-083686 A1	01.05.2003	
	US 2003-199789 A1	23.10.2003	
	US 2003-199790 A1	23.10.2003	
	US 2003-199791 A1	23.10.2003	
	US 2003-199893 A1	23.10.2003	
	US 2003-199894 A1	23.10.2003	
	US 2003-199895 A1	23.10.2003	
	US 2003-199896 A1	23.10.2003	
	US 2003-199897 A1	23.10.2003	
	US 2003-199898 A1	23.10.2003	
	US 2003-199899 A1	23.10.2003	
	US 2003-199900 A1	23.10.2003	
	US 2003-199901 A1	23.10.2003	
	US 2003-199902 A1	23.10.2003	
	US 2003-199903 A1	23.10.2003	
	US 2003-199904 A1	23.10.2003	
	US 2003-199905 A1	23.10.2003	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2012/010145**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2003-199906 A1	23.10.2003
		US 2003-199907 A1	23.10.2003
		US 2003-199908 A1	23.10.2003
		US 2003-199909 A1	23.10.2003
		US 2003-199910 A1	23.10.2003
		US 2003-199911 A1	23.10.2003
		US 2003-212424 A1	13.11.2003
		US 2003-233112 A1	18.12.2003
		US 2003-233113 A1	18.12.2003
		US 2004-010279 A1	15.01.2004
		US 2004-049219 A1	11.03.2004
		US 2004-049220 A1	11.03.2004
		US 2004-067481 A1	08.04.2004
		US 2004-087990 A1	06.05.2004
		US 2004-092842 A1	13.05.2004
		US 2004-092994 A1	13.05.2004
		US 2004-092995 A1	13.05.2004
		US 2004-098009 A1	20.05.2004
		US 2004-102803 A1	27.05.2004
		US 2005-101981 A1	12.05.2005
		US 2005-256534 A1	17.11.2005
		US 2006-052810 A1	09.03.2006
		US 2006-085020 A1	20.04.2006
		US 2006-175216 A1	10.08.2006
		US 2006-178687 A1	10.08.2006
		US 2006-178688 A1	10.08.2006
		US 2006-178689 A1	10.08.2006
		US 2006-178690 A1	10.08.2006
		US 2006-195047 A1	31.08.2006
		US 2006-195129 A1	31.08.2006
		US 2006-195130 A1	31.08.2006
		US 2006-195131 A1	31.08.2006
		US 2006-195132 A1	31.08.2006
		US 2006-195133 A1	31.08.2006
		US 2006-241667 A1	26.10.2006
		US 2006-271083 A1	30.11.2006
		US 2007-038235 A1	15.02.2007
		US 2007-043305 A1	22.02.2007
		US 2007-043386 A1	22.02.2007
		US 2007-055174 A1	08.03.2007
		US 2007-064516 A1	22.03.2007
		US 2007-073188 A1	29.03.2007
		US 2007-073189 A1	29.03.2007
		US 2007-100255 A1	03.05.2007
		US 2007-123802 A1	31.05.2007
		US 2007-142747 A1	21.06.2007
		US 2007-142748 A1	21.06.2007
		US 2007-167870 A1	19.07.2007
		US 2007-167871 A1	19.07.2007
		US 2007-167872 A1	19.07.2007

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2012/010145**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2007-167873 A1	19.07.2007
		US 2007-167874 A1	19.07.2007
		US 2007-167875 A1	19.07.2007
		US 2007-173741 A1	26.07.2007
		US 2007-173742 A1	26.07.2007
		US 2007-173743 A1	26.07.2007
		US 2007-185412 A1	09.08.2007
		US 2007-191736 A1	16.08.2007
		US 2007-191737 A1	16.08.2007
		US 2007-213601 A1	13.09.2007
		US 2007-213756 A1	13.09.2007
		US 2007-219462 A1	20.09.2007
		US 2007-219463 A1	20.09.2007
		US 2007-219573 A1	20.09.2007
		US 2007-219574 A1	20.09.2007
		US 2007-239189 A1	11.10.2007
		US 2007-239190 A1	11.10.2007
		US 2007-244499 A1	18.10.2007
		US 2007-249962 A1	25.10.2007
		US 2007-249963 A1	25.10.2007
		US 2007-255301 A1	01.11.2007
		US 2007-260271 A1	08.11.2007
		US 2007-276290 A1	29.11.2007
		US 2008-009892 A1	10.01.2008
		US 2008-021491 A1	24.01.2008
		US 2008-021492 A1	24.01.2008
		US 2008-027385 A1	31.01.2008
		US 2008-119761 A1	22.05.2008
		US 2008-188771 A1	07.08.2008
		US 2008-194989 A1	14.08.2008
		US 2008-214956 A1	04.09.2008
		US 2008-249554 A1	09.10.2008
		US 2008-287831 A1	20.11.2008
		US 2008-294068 A1	27.11.2008
		US 2009-054813 A1	26.02.2009
		US 2009-124932 A1	14.05.2009
		US 2009-131829 A1	21.05.2009
		US 2009-131830 A1	21.05.2009
		US 2009-131964 A1	21.05.2009
		US 2009-131965 A1	21.05.2009
		US 2009-137930 A1	28.05.2009
		US 2009-138032 A1	28.05.2009
		US 2009-192411 A1	30.07.2009
		US 2010-324452 A1	23.12.2010
		US 2011-034829 A9	10.02.2011
		US 2011-077478 A1	31.03.2011
		US 2011-092856 A1	21.04.2011
		US 2011-098541 A1	28.04.2011
		US 7025774 B2	11.04.2006
		US 7033371 B2	25.04.2006

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2012/010145**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 7041068 B2	09.05.2006
		US 7141058 B2	28.11.2006
		US 7175642 B2	13.02.2007
		US 7198606 B2	03.04.2007
		US 7226461 B2	05.06.2007
		US 7229458 B2	12.06.2007
		US 7232451 B2	19.06.2007
		US 7244265 B2	17.07.2007
		US 7258693 B2	21.08.2007
		US 7291117 B2	06.11.2007
		US 7297122 B2	20.11.2007
		US 7297151 B2	20.11.2007
		US 7316700 B2	08.01.2008
		US 7331931 B2	19.02.2008
		US 7344507 B2	18.03.2008
		US 7371247 B2	13.05.2008
		US 7374544 B2	20.05.2008
		US 7410468 B2	12.08.2008
		US 7481776 B2	27.01.2009
		US 7485128 B2	03.02.2009
		US 7491178 B2	17.02.2009
		US 7524293 B2	28.04.2009
		US 7537571 B2	26.05.2009
		US 7547287 B2	16.06.2009
		US 7563232 B2	21.07.2009
		US 7582099 B2	01.09.2009
		US 7648468 B2	19.01.2010
		US 7648469 B2	19.01.2010
		US 7674232 B2	09.03.2010
		US 7708701 B2	04.05.2010
		US 7713214 B2	11.05.2010
		US 7717863 B2	18.05.2010
		US 7731729 B2	08.06.2010
		US 7798979 B2	21.09.2010
		US 7833171 B2	16.11.2010
		US 7841992 B2	30.11.2010
		US 7850622 B2	14.12.2010
		US 7874994 B2	25.01.2011
		US 7875047 B2	25.01.2011
		US 7892183 B2	22.02.2011
		US 7892185 B2	22.02.2011
		US 7901362 B2	08.03.2011
		US 7901365 B2	08.03.2011
		US 7909774 B2	22.03.2011
		US 7909775 B2	22.03.2011
		US 7909777 B2	22.03.2011
		US 7909778 B2	22.03.2011
		US 7914465 B2	29.03.2011
		US 7938787 B2	10.05.2011
		US 7959582 B2	14.06.2011

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2012/010145**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 7976476 B2	12.07.2011
		US 7981055 B2	19.07.2011
		US 7981056 B2	19.07.2011
		US 7988644 B2	02.08.2011
		US 7988645 B2	02.08.2011
		US 8007446 B2	30.08.2011
		US 8016774 B2	13.09.2011
		US 8062231 B2	22.11.2011
		US 8079960 B2	20.12.2011
		US 8123700 B2	28.02.2012
KR 10-2009-0008798 A	22.01.2009	NONE	

## A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

*G01N 27/30(2006.01)i, G01N 33/49(2006.01)i, A61B 5/145(2006.01)i*

## B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 27/30; G01N 15/06; G01N 27/403; G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 33/50; A61B 5/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) &amp; 키워드: 바이오센서, 당화헤모글로빈, 전위차분석법, 페닐보론산, 전극, 페로센, 총단백, 센서 스트립, 전위차계.

## C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y A	KR 10-0945571 B1 (주식회사 아이센스) 2010.03.08 요약, 식별번호 [20]-[29], [33]-[45], 도면 2, 4, 5 참조.	1-5, 7-10, 14-17 6, 11-13
Y A	KR 10-0771711 B1 (엠-바이오테크, 인코포레이티드) 2007.10.30 요약, 식별번호 [7] 참조.	1-5, 7-10, 14-17 6, 11-13
A	KR 10-2010-0008260 A (주식회사 아이센스) 2010.01.25 문서 전체 참조.	1-17
A	US 2006-0200044 A1 (DOMINIQUE M FREEMAN 외 1명) 2006.09.07 문서 전체 참조.	1-17
A	KR 10-2009-0008798 A (한국화학연구원 외 1명) 2009.01.22 문서 전체 참조.	1-17

 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

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

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

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

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

“&amp;” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 03월 26일 (26.03.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 03월 26일 (26.03.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청

(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동(둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

김상우

전화번호 82-42-481-8384



국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-0945571 B1	2010.03.08	없음	
KR 10-0771711 B1	2007.10.30	AU 2000-69315 A1 EP 1212601 A1 JP 2003-517588 A WO 01-16575 A1	2001.03.26 2002.06.12 2003.05.27 2001.03.08
KR 10-2010-0008260 A	2010.01.25	US 2011-0123399 A1 WO 2010-008137 A2	2011.05.26 2010.01.21
US 2006-0200044 A1	2006.09.07	AU 2002-312521 A8 AU 2002-315177 A8 AU 2002-315180 A8 AU 2002-320094 A8 AU 2002-330855 A8 AU 2002-344767 A1 AU 2002-344825 A8 AU 2002-348683 A8 AU 2002-367876 A1 AU 2003-231749 A1 AU 2003-234167 A1 AU 2003-239160 A1 AU 2003-268547 A1 AU 2003-290589 A1 AU 2003-297205 A1 CA 2448681 A1 CA 2448790 A1 CA 2448790 C CA 2448902 A1 CA 2448902 C CA 2448905 A1 CA 2448905 C CN 1662174 C0 CN 1735370 A CN 1735370 C0 EP 1395185 A2 EP 1395185 B1 EP 1404218 A2 EP 1404218 A4 EP 1404232 A2 EP 1404232 B1 EP 1404233 A2 EP 1404233 A4 EP 1404233 B1 EP 1404234 A2 EP 1404234 A4 EP 1404234 B1 EP 1404235 A2 EP 1406537 A2	2002.12.23 2002.12.23 2002.12.23 2002.12.23 2002.12.23 2003.11.11 2002.12.23 2002.12.23 2003.11.03 2003.11.03 2003.11.03 2004.03.29 2004.06.07 2004.07.09 2002.12.19 2002.12.19 2010.09.07 2002.12.19 2010.09.07 2002.12.19 2005.08.31 2006.02.15 2008.01.16 2004.03.10 2010.10.27 2004.04.07 2008.11.19 2004.04.07 2009.12.02 2004.04.07 2007.05.30 2009.12.02 2004.04.07 2008.07.16 2011.02.09 2004.04.07 2004.04.14

국제조사보고서에서  
인용된 특허문현

공개일

대응특허문현

공개일

EP 1406537 B1	2011.01.12
EP 1499247 A1	2005.01.26
EP 1501402 A2	2005.02.02
EP 1501409 A1	2005.02.02
EP 1501410 A2	2005.02.02
EP 1501427 A1	2005.02.02
EP 1562470 A1	2005.08.17
EP 1578286 A1	2005.09.28
EP 1578286 A4	2009.01.14
EP 1585558 A2	2005.10.19
EP 1638454 A2	2006.03.29
EP 1945093 A2	2008.07.23
EP 1968461 A2	2008.09.17
EP 1978865 A2	2008.10.15
EP 2301438 A2	2011.03.30
EP 2301438 A3	2011.07.20
JP 04-149911 B2	2008.09.17
JP 04-157471 B2	2008.10.01
JP 04-209767 B2	2009.01.14
JP 04-272051 B2	2009.03.06
JP 04-522364 B2	2010.06.04
JP 04-996811 B2	2012.05.18
JP 05-134475 B2	2012.11.16
JP 2004-528936 A	2004.09.24
JP 2005-504564 A	2005.02.17
JP 2005-506857 A	2005.03.10
JP 2005-517463 A	2005.06.16
JP 2005-523065 A	2005.08.04
JP 2006-504506 A	2006.02.09
JP 2008-289939 A	2008.12.04
JP 2009-106784 A	2009.05.21
JP 2012-161627 A	2012.08.30
US 2003-083685 A1	2003.05.01
US 2003-083686 A1	2003.05.01
US 2003-199789 A1	2003.10.23
US 2003-199790 A1	2003.10.23
US 2003-199791 A1	2003.10.23
US 2003-199893 A1	2003.10.23
US 2003-199894 A1	2003.10.23
US 2003-199895 A1	2003.10.23
US 2003-199896 A1	2003.10.23
US 2003-199897 A1	2003.10.23
US 2003-199898 A1	2003.10.23
US 2003-199899 A1	2003.10.23
US 2003-199900 A1	2003.10.23
US 2003-199901 A1	2003.10.23
US 2003-199902 A1	2003.10.23
US 2003-199903 A1	2003.10.23
US 2003-199904 A1	2003.10.23
US 2003-199905 A1	2003.10.23

국제조사보고서에서  
인용된 특허문현

공개일

대응특허문현

공개일

US 2003-199906 A1	2003.10.23
US 2003-199907 A1	2003.10.23
US 2003-199908 A1	2003.10.23
US 2003-199909 A1	2003.10.23
US 2003-199910 A1	2003.10.23
US 2003-199911 A1	2003.10.23
US 2003-212424 A1	2003.11.13
US 2003-233112 A1	2003.12.18
US 2003-233113 A1	2003.12.18
US 2004-010279 A1	2004.01.15
US 2004-049219 A1	2004.03.11
US 2004-049220 A1	2004.03.11
US 2004-067481 A1	2004.04.08
US 2004-087990 A1	2004.05.06
US 2004-092842 A1	2004.05.13
US 2004-092994 A1	2004.05.13
US 2004-092995 A1	2004.05.13
US 2004-098009 A1	2004.05.20
US 2004-102803 A1	2004.05.27
US 2005-101981 A1	2005.05.12
US 2005-256534 A1	2005.11.17
US 2006-052810 A1	2006.03.09
US 2006-085020 A1	2006.04.20
US 2006-175216 A1	2006.08.10
US 2006-178687 A1	2006.08.10
US 2006-178688 A1	2006.08.10
US 2006-178689 A1	2006.08.10
US 2006-178690 A1	2006.08.10
US 2006-195047 A1	2006.08.31
US 2006-195129 A1	2006.08.31
US 2006-195130 A1	2006.08.31
US 2006-195131 A1	2006.08.31
US 2006-195132 A1	2006.08.31
US 2006-195133 A1	2006.08.31
US 2006-241667 A1	2006.10.26
US 2006-271083 A1	2006.11.30
US 2007-038235 A1	2007.02.15
US 2007-043305 A1	2007.02.22
US 2007-043386 A1	2007.02.22
US 2007-055174 A1	2007.03.08
US 2007-064516 A1	2007.03.22
US 2007-073188 A1	2007.03.29
US 2007-073189 A1	2007.03.29
US 2007-100255 A1	2007.05.03
US 2007-123802 A1	2007.05.31
US 2007-142747 A1	2007.06.21
US 2007-142748 A1	2007.06.21
US 2007-167870 A1	2007.07.19
US 2007-167871 A1	2007.07.19
US 2007-167872 A1	2007.07.19

국제조사보고서에서  
인용된 특허문현

공개일

대응특허문현

공개일

US 2007-167873 A1	2007.07.19
US 2007-167874 A1	2007.07.19
US 2007-167875 A1	2007.07.19
US 2007-173741 A1	2007.07.26
US 2007-173742 A1	2007.07.26
US 2007-173743 A1	2007.07.26
US 2007-185412 A1	2007.08.09
US 2007-191736 A1	2007.08.16
US 2007-191737 A1	2007.08.16
US 2007-213601 A1	2007.09.13
US 2007-213756 A1	2007.09.13
US 2007-219462 A1	2007.09.20
US 2007-219463 A1	2007.09.20
US 2007-219573 A1	2007.09.20
US 2007-219574 A1	2007.09.20
US 2007-239189 A1	2007.10.11
US 2007-239190 A1	2007.10.11
US 2007-244499 A1	2007.10.18
US 2007-249962 A1	2007.10.25
US 2007-249963 A1	2007.10.25
US 2007-255301 A1	2007.11.01
US 2007-260271 A1	2007.11.08
US 2007-276290 A1	2007.11.29
US 2008-009892 A1	2008.01.10
US 2008-021491 A1	2008.01.24
US 2008-021492 A1	2008.01.24
US 2008-027385 A1	2008.01.31
US 2008-119761 A1	2008.05.22
US 2008-188771 A1	2008.08.07
US 2008-194989 A1	2008.08.14
US 2008-214956 A1	2008.09.04
US 2008-249554 A1	2008.10.09
US 2008-287831 A1	2008.11.20
US 2008-294068 A1	2008.11.27
US 2009-054813 A1	2009.02.26
US 2009-124932 A1	2009.05.14
US 2009-131829 A1	2009.05.21
US 2009-131830 A1	2009.05.21
US 2009-131964 A1	2009.05.21
US 2009-131965 A1	2009.05.21
US 2009-137930 A1	2009.05.28
US 2009-138032 A1	2009.05.28
US 2009-192411 A1	2009.07.30
US 2010-324452 A1	2010.12.23
US 2011-034829 A9	2011.02.10
US 2011-077478 A1	2011.03.31
US 2011-092856 A1	2011.04.21
US 2011-098541 A1	2011.04.28
US 7025774 B2	2006.04.11
US 7033371 B2	2006.04.25

국제조사보고서에서  
인용된 특허문현

공개일

대응특허문현

공개일

US 7041068 B2	2006.05.09
US 7141058 B2	2006.11.28
US 7175642 B2	2007.02.13
US 7198606 B2	2007.04.03
US 7226461 B2	2007.06.05
US 7229458 B2	2007.06.12
US 7232451 B2	2007.06.19
US 7244265 B2	2007.07.17
US 7258693 B2	2007.08.21
US 7291117 B2	2007.11.06
US 7297122 B2	2007.11.20
US 7297151 B2	2007.11.20
US 7316700 B2	2008.01.08
US 7331931 B2	2008.02.19
US 7344507 B2	2008.03.18
US 7371247 B2	2008.05.13
US 7374544 B2	2008.05.20
US 7410468 B2	2008.08.12
US 7481776 B2	2009.01.27
US 7485128 B2	2009.02.03
US 7491178 B2	2009.02.17
US 7524293 B2	2009.04.28
US 7537571 B2	2009.05.26
US 7547287 B2	2009.06.16
US 7563232 B2	2009.07.21
US 7582099 B2	2009.09.01
US 7648468 B2	2010.01.19
US 7648469 B2	2010.01.19
US 7674232 B2	2010.03.09
US 7708701 B2	2010.05.04
US 7713214 B2	2010.05.11
US 7717863 B2	2010.05.18
US 7731729 B2	2010.06.08
US 7798979 B2	2010.09.21
US 7833171 B2	2010.11.16
US 7841992 B2	2010.11.30
US 7850622 B2	2010.12.14
US 7874994 B2	2011.01.25
US 7875047 B2	2011.01.25
US 7892183 B2	2011.02.22
US 7892185 B2	2011.02.22
US 7901362 B2	2011.03.08
US 7901365 B2	2011.03.08
US 7909774 B2	2011.03.22
US 7909775 B2	2011.03.22
US 7909777 B2	2011.03.22
US 7909778 B2	2011.03.22
US 7914465 B2	2011.03.29
US 7938787 B2	2011.05.10
US 7959582 B2	2011.06.14

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 7976476 B2	2011.07.12
US 7981055 B2	2011.07.19
US 7981056 B2	2011.07.19
US 7988644 B2	2011.08.02
US 7988645 B2	2011.08.02
US 8007446 B2	2011.08.30
US 8016774 B2	2011.09.13
US 8062231 B2	2011.11.22
US 8079960 B2	2011.12.20
US 8123700 B2	2012.02.28

KR 10-2009-0008798 A

2009.01.22

없음