(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019 년 6 월 27 일 (27.06.2019)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2019/124878 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/6834 (2018.01) *G01N 33/543* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/015898

(22) 국제출원일: 2018 년 12 월 14 일 (14.12.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0173911 2017 년 12 월 18 일 (18.12.2017) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

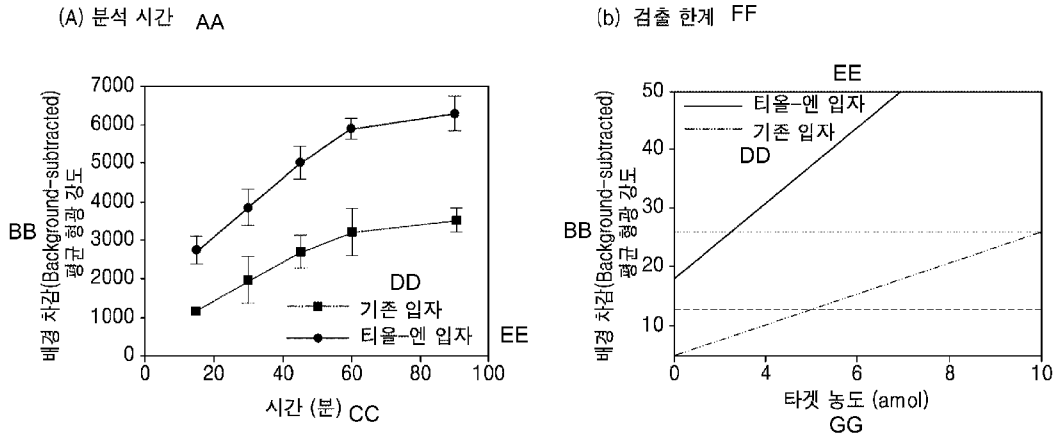
(72) 발명자: **봉기완 (BONG, Ki Wan)**; 07054 서울시 동작구 보라매로 70, 102동 701호, Seoul (KR). **노윤호 (ROH, Yoon Ho)**; 13836 경기도 과천시 별양로 111, 503동 303호, Gyeonggi-do (KR). **문현준 (MOON, Hyun June)**; 16615 경기도 수원시 권선구 서호서로33번길 37-3, Gyeonggi-do (KR). **이현지 (LEE, Hyun Jee)**; 16817 경기도 용인시 수지구 신봉2로 26, 110동 1603호, Gyeonggi-do (KR). **김현웅 (KIM, Hyeon Ung)**; 02857 서울시 성북구 안암로9가길 55, Seoul (KR). **문석준 (MUN, Seok Joon)**; 13645 경기도 성남시 수정구 위례동로 15, 5703동 1104호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: **정은열 (JUNG, Eun Youl)**; 06173 서울시 강남구 테헤란로103길 9, 제일빌딩 2층 (정앤김 특허법률사무소), 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,

(54) Title: METHOD FOR PREPARING ENCODED HYDROGEL PARTICLES, AND ENCODED HYDROGEL PARTICLES PREPARED THEREBY

(54) 발명의 명칭: 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자



AA ... Analysis time
BB ... Background-subtracted average fluorescence intensity
CC ... Time (minute)
DD ... Conventional particles
EE ... Thiol-ene particles
FF ... Detection limit
GG ... Target concentration

(57) Abstract: The present invention relates to a method for preparing encoded hydrogel particles for high-sensitivity detection of a target biomolecule with high accuracy, and encoded hydrogel particles prepared thereby and, specifically, to a method for preparing encoded hydrogel particles, comprising a step of synthesizing hydrogel particles, and then binding a probe thereto, and encoded hydrogel particles prepared thereby. According to the present invention, probes can be loaded with remarkably improved high efficiency, loaded probes can be uniformly distributed, and the potential problem of biomolecule detection inhibition caused by an unreacted end can be resolved. In addition, the present invention can improve detection sensitivity, can be applied to the diagnosis of diseases or screening of drugs through multiplex detection, with high sensitivity, of a target biomolecule such as a nucleic acid and a protein, and can be widely

WO 2019/124878 A1

[다음 쪽 계속]

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, 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))

used in the field of medical diagnosis such as molecular diagnosis.

(57) 요약서: 본 발명은 표적 생체 분자를 높은 정확도로 고감도 검출하기 위한, 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 관한 것으로, 구체적으로 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 단계를 포함하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 관한 것으로서, 본 발명에 따르면, 현저히 향상된 높은 효율로 프로브를 탑재할 수 있고, 탑재된 프로브를 균일하게 분포시킬 수 있으며, 미반응 말단에 의한 생체분자의 검출 저해라는 잠재적인 문제를 해결할 수 있다. 또한 검출 감도를 향상시킬 수 있고, 높은 감도로 핵산, 단백질 등의 표적 생체 분자를 다중 검출하여 질병을 진단하거나 약물을 선별하는데 활용될 수 있는바, 분자진단 등 의료진단 분야에 있어서, 널리 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자

기술분야

[1] 본 발명은 표적 생체 분자를 높은 정확도로 고감도 검출하기 위한, 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 관한 것으로, 구체적으로 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 단계를 포함하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 관한 것이다.

배경기술

[2] 진단 의학, 약물 선별, 분자 생화학 분야에서 핵산, 단백질 등의 생체 분자를 정확하게 고감도 검출 하는 기술의 필요성이 대두되고 있다.

[3] 부호화된 수화겔 입자(encoded hydrogel particle)는 생체 분자의 고감도 다중 검출이 가능하여 많은 주목을 받고 있다. 부호화된 수화겔 입자는 생체분자를 검출하는 프로브를 탑재하며 탑재된 프로브 식별을 위한 코드를 포함하고 있다. 부호화된 입자를 활용하면 한 번의 검출 과정에서 다수의 생체 분자를 동시에 포획하는 다중 검출이 가능하며, 3차원의 입자 공간에서 프로브와 표적 생체 분자가 상호작용하며 고감도 검출이 이루어진다.

[4] 부호화된 수화겔 입자를 합성하는 방법 중 하나인 유체 리소그라피(flow lithography)는 다양한 기능과 형태를 가진 파티클을 합성하는 기술로 많은 주목을 받고 있다. 유체 리소그라피는 미세 유체 흐름의 패터닝과 포토마스크를 투과하는 자외선을 이용하여 다기능성 비대칭 입자를 합성하는 공정이다. 미세 채널 내부에서 유체는 낮은 레이놀즈 수(*Re*)를 가져 인접한 서로 다른 흐름이 혼합되지 않고 흐르며 다종의 평행 흐름으로 구조화될 수 있다. 또한 전구체 유체에 포토마스크를 투과하며 패터닝된 UV를 조사하여 선택적인 중합반응을 일으켜 포토마스크 모양과 동일한 파티클을 합성할 수 있다. 중합될 전구체 유체에 항체나 핵산과 같이 생체 분자와 결합하는 물질을 포함시키면 생체분자를 검출에 사용할 수 있는 파티클을 합성할 수 있다.

[5] 기존의 부호화된 수화겔 입자의 합성은 전구체 유체에 직접 생체분자 검출용 프로브를 혼합하고 합성 과정에서 가교시키는 방법으로 이루어진다. 하지만 이 방법은 다음과 같은 문제점을 야기한다. 유체 리소그라피 공정의 경우 합성 시간이 매우 짧기 때문에 전구체에 포함된 단량체 중 약 10% 정도만 고분자로 중합되어, 넣어준 프로브의 10% 정도만 입자에 가교된다. 이는 프로브 탑재의 낮은 수율을 야기하며, 검출 성능의 한계를 초래한다. 또한, (대부분의 프로브는 전구체에 쉽게 분산되지 않는 문제를 갖는다. 특히, 전구체와 상용성이 낮은 프로브(예를 들어, 항체)의 경우 장시간 혼합해 주어야 하며, 혼합 과정 후에도

응집된 상태로 입자에 가교될 수 있다. 프로브가 응집된(비균일한) 상태로 존재할 경우, 생체 분자를 포획하는 부분이 노출되지 않기 때문에 검출 능력이 저하된다. 고감도의 검출을 위해서는 다수의 프로브가 균일하게 탑재되어야 하는데, 앞서 언급한 문제로 인해 검출 성능이 저하된다.

[6] 기존의 입자의 합성은 액상 고분자가 가교되어 네트워크를 형성하며 이루어지는데, 상기 언급한바와 같이, 액상 고분자의 가교 반응의 수율은 대략 10%로 낮으며, 낮은 수율에서 네트워크 상에 일종의 결함이 존재한다. 이 결함은 두 개 이상의 반응기를 갖는 단량체의 반응기 중 하나 이상이 미반응된 상태로 네트워크에 남는 경우를 포함한다. 합성된 입자에는 상당량의 미반응된 반응기(미반응 말단)가 남는데, 이는 생체 분자의 검출 성능을 저해하는 또 다른 요인이다. 미반응 말단은 반응성이 높기 때문에 표적 생체분자의 비특이적 결합(false-positive signal)을 초래할 수 있으며, 이 외에도 검출 과정에서 사용될 핵심 물질(예: 표적 생체 분자, 형광 물질, reporter, 세포 등)이 미반응 말단과 반응하여 고정화(immobilization)되어 생체분자의 검출을 저해하는 요인으로 작용할 수 있다.

[7] 이에, 본 발명자들은 상술한 바와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하고자 예의 노력한 결과, 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형으로 디자인된 부호화된 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 탑재함으로써, 높은 정확도 및 검출 감도로 표적 생체 분자를 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명의 목적은 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 단계를 포함하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자를 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

[9] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 단계를 포함하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자를 제공한다.

[10] 본 발명은, 또한 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형 디자인으로 구성된 것을 특징으로 하는 부호화된 수화겔 입자를 제공한다.

발명의 효과

[11] 본 발명의 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 따르면, 현저히 향상된 높은 효율로 프로브를 탑재할 수 있고, 탑재된 프로브를 균일하게 분포시킬 수 있으며, 미반응 말단에 의한 생체분자의 검출 저해라는 잠재적인 문제를 해결할 수 있다. 또한 검출 감도를 향상시킬 수 있고, 높은 감도로 핵산, 단백질 등의 표적 생체 분자를 다중 검출하여 질병을 진단하거나 약물을

선별하는데 활용될 수 있는바, 분자진단 등 의료진단 분야에 있어서, 널리 활용될 수 있다.

[12] 구체적으로, 본 발명의 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법 및 그에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 따르면, 기존 방법에 비해 8.2배 이상 더 많은 프로브를 수화겔 입자에 결합시킬 수 있고, 미반응 말단으로 인해 초래될 수 있는 표적 생체 분자의 비특이적 결합(false-positive signal)을 방지하며 검출에 사용될 핵심 물질의 고정화로 인한 검출 성능의 저하 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라, 표적 생체 분자의 검출 감도를 증가시키고, 검출 시간은 단축시킬 수 있으며, 특이도를 향상시킬 수 있고, 표적 생체 분자의 포획 성능을 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[13] 도 1은 본 발명의 수화겔 입자의 합성 과정 및 합성 후 입자 내부에 남아있는 미반응 말단을 도식화하여 나타낸 것이다.

[14] 도 2는 replica molding으로 수화겔 입자를 합성하는 방법에 대한 모식도이다.

[15] 도 3은 본 발명의 수화겔 입자의 합성 후 남아있는 미반응 말단을 이용한 프로브의 결합 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.

[16] 도 4는 본 발명의 수화겔 입자의 치수 및 코드 영역의 개요도이다.

[17] 도 5의 a는 시간에 따라 티올-엔 반응을 통해 프로브가 붙는 키네틱스(kinetics)를 나타내고, 도 5의 b는 기존 입자와 티올-엔 입자의 형광 신호를 비교하여 나타낸 것이다.

[18] 도 6의 A는 염(NaCl) 농도에 따른 기존의 입자와 티올-엔 입자의 형광 신호를 비교하여 나타낸 것이고, 도 6의 B는 특이도 시험 결과이다.

[19] 도 7의 A는 반응 시간에 따른 기존의 입자와 티올-엔 입자의 형광 신호를 비교하여 나타낸 것이고, 도 7의 b는 검출 감도 시험 결과로, 가로축과 평행한 그래프는 각각의 대조군(control) 입자에서 나오는 신호의 표준 편차를 3배한 값이다.

[20] 도 8은 기존의 입자와 티올-엔 입자의 항체 응집 정도를 비교하여 나타낸 것이다.

[21] 도 9의 a는 VEGF 단백질의 농도에 따른 티올-엔 입자의 형광 신호와 ELISA의 optical density 값을 비교하여 나타낸 것이고, 도 9의 b는 반응 시간에 따른 ELISA와 티올-엔 입자의 normalized 검출 신호를 나타낸 것이다.

[22] 도 10은 VEGF, PIGF, CG beta 단백질의 검출 감도 시험 결과로, 가로축과 평행한 그래프는 각각의 대조군(control) 입자에서 나오는 신호의 표준 편차를 3배한 값이다.

[23] 도 11은 단백질 3종류의 다중 검출 시험 결과로 총 8종류의 case에 대한 티올-엔 입자의 형광 신호를 비교하여 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[24] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[25]

[26] 본 발명은 일 관점에서 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 단계를 포함하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법에 관한 것이다. 프로브의 원활한 탑재, 표적 생체 분자의 자유로운 물질 전달이 가능하도록 수화겔 입자의 공극 크기를 결정하여, 가용 범위의 공극이 구성된 수화겔 입자를 사용한다.

[27] 본 발명에 있어서, 합성된 수화겔 입자에 잔존하는 미반응 말단을 이용하여 프로브를 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다. 구체적으로, 미반응 말단의 탄소-탄소 이중결합(C=C)과 프로브의 작용기 사이의 공유 결합에 의해, 합성된 수화겔 입자에 프로브가 결합한다(도 1 내지 도3).

[28] 본 발명에 있어서, 프로브가 라디칼 반응 또는 자발적으로 이루어지는 용액 상 전자의 이동을 통해 합성된 수화겔 입자에 가교되는 것을 특징으로 할 수 있고, 프로브가 라디칼 반응을 통해 합성된 수화겔 입자에 가교되는 경우, UV 조사를 통한 광개시제의 개시 또는 열에너지를 이용한 온도개시제의 개시를 통해 공유결합이 이루어지고, 프로브가 용액 상 전자의 이동을 통해 합성된 수화겔 입자에 가교되는 경우, 수용액 또는 극성 용매의 전자가 친핵체로 작용하여 공유결합이 이루어지는 것을 특징으로 할 수 있다. 아울러, 바람직하게는 탑재할 프로브가 가장 안정적으로 보존될 수 있는 적합한 온도인, 0 내지 90 ℃에서 가교가 이루어지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[29] 본 발명에서, 용어 "프로브"란 시료 내의 검출하고자 하는 표적 물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미하며, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 물질의 존재를 확인할 수 있는 물질을 의미한다.

[30] 본 발명에 있어서, 프로브는 DNA, RNA, 단백질 또는 차후 프로브를 결합하기 위한 화학적 반응기를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[31] 본 발명에 있어서, 수화겔 입자 합성은 정지 유체 리소그래피(stop flow lithography, SFL)(도 1), 레플리카 몰딩(replica molding)(도 2) 등 다양한 입자 합성법을 이용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 전구체 유체를 채널 안으로 흘려준 뒤, 마스크를 이용하여 채널 안 유체에 UV를 조사시키는 정지 유체 리소그래피(stop flow lithography, SFL)를 통해 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합시켜 본 발명의 수화겔 입자를 제조한다.

[32] 본 발명에 있어서, 전구체 유체는 메타아크릴레이트기(methacrylate group) 또는 아크릴레이트기(acrylate group)를 함유하는 광경화성 모노머 및 광개시제를 포함할 수 있다. 광경화성 모노머는 일례로, 폴리에틸렌글리콜 모노머, MPC(2-methacryloyloxtethyl phosphoryl choline) 모노머, 또는 그 혼합물일 수 있다. 이때, 전구체 유체는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)과 같은 공극제

(Porogen) 및 탈이온수(DI water)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 한편, 전구체 안의 광경화성 모노머는 서로 다른 종류로, 복수 개가 포함될 수도 있다.

[33] 본 발명에 있어서, 수화겔 입자는 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형 디자인으로 구성된 것을 특징으로 할 수 있고, 코드는 기하학적 코드를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 기하학적 코드는 여러 종류의 도형의 조합을 이용하여 구성하는 것을 특징으로 할 수 있다. 미반응 말단은 수화겔 입자에 걸쳐 분포하므로, 종래와 같이 코드 영역과 프로브 영역을 나누어 설계할 경우 코드 영역의 신호가 검출 신호와 중첩될 수 있는 문제가 있으나, 본 발명은 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형으로 디자인된바 상기와 같은 문제를 해결할 수 있다.

[34] 본 발명에 있어서, 수화겔 입자가 기능성 나노 입자를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[35] 본 발명은 또 다른 관점에 있어서, 상기 방법에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자에 관한 것이다.

[36] 본 발명은 다른 관점에 있어서, 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형 디자인으로 구성된 것을 특징으로 하는 부호화된 수화겔 입자에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[37] [실시예]

[38] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[39]

[40] **실시예** 1: 엔코드 수화겔 입자의 합성, DNA 프로브 탑재 및 표적 microRNA 검출

[41] 1-1: 미세유체 장치의 제작

[42] 수화겔 입자 합성을 위한 미세유체 장치를 오토캐드(AutoCAD, Autodesk, 미국)를 이용하여 설계하고, 포토마스크 필름(Han&All Technology, 한국)에 프린트하였다. 입자는 검출 신호가 밝게 나오면서 코드 구현을 위해 9개의 영역으로 나눌 수 있는 크기인, 가로와 세로 50um, 높이 20um으로 설계되었다(도 4). 음성 포토레지스트 SU-8 25(Microchem, 미국)로 코팅된 실리콘 웨이퍼를 이용하여 일반적인 포토리소그래피 공정으로 SU-8 마스터 몰드를 제작하였다. 미세유체 장치의 패턴을 포함하는 SU-8 마스터의 두께를 24μm로 설계하였다. 10:1의 비율로 경화제와 혼합된 PDMS(Polydimethylsiloxane, Sylgard 184, Corning, 미국)를 SU-8 마스터 몰드에 부어, 70℃에서 8시간 동안 경화시켰다. 경화 공정

후에, 생검 펀치(직경 1 mm)로 구멍이 뚫린 패널로의 유체의 주입을 위하여 PDMS 슬랩(slab)을 SU-8 마스터 및 구멍으로부터 제거하였다. 그러고 나서, PDMS 슬랩을 부분적으로 경화된 PDMS-코팅된 슬라이드(20분, 70℃)와 결합시켰다. 최종적으로, 완전한 경화를 위하여 PDMS 장치를 밤새 굳혔다.

[43]

[44] 1-2: 수화겔 입자의 합성

[45] 정지 유체 리소그래피(Stop Flow Lithography, SFL)를 통해 수화겔 입자를 합성하였다(K. W. Bong et al., Lab Chip, 2011, 11, 743-747). 간략하게, SFL을 수행하기 위하여, 미세유체 장치 내 유체의 흐름을 제어하기 위한 광원 및 압력 조절기(ITV0031-3BL, SMC pneumatics, 일본)로서 UV 발광 다이오드(Thorlabs, 영국)을 사용하였다. 동기화된 방식으로 UV LED 및 압력 조절기를 제어하기 위하여 자체 제작된 회로 보드 및 랩뷰(LabView, National Instrument, 미국) 코드를 사용하였다. 역전 현미경(Axiovert 200, Zeiss, 독일)에 탑재된 필름 포토마스크(Hanall Technolgy, 한국)를 통해 UV LED에 의해 수화겔 입자를 합성하였다. SFL 동안, 전구체 용액이 채널 안에 정지할 때, UV(4 mW/cm^2)의 주기적 방출(50 ms)에 의해 입자를 합성하였다.

[46] 전구체 용액은 20% (v/v) PEG700DA(polyethylene glycol diacrylate, Sigma Aldrich, 미국), 공극제(porogen)로서 40% (v/v) PEG200(Polyethylene glycol, Sigma Aldrich), 광개시제로서 5% Darocur 1173(Sigma Aldrich), 35% 탈이온수(DI water)로 구성되었다. 합성된 수화겔 입자를 5x PBS 완충용액(Sigma Aldrich) 및 0.05% (v/v) 트윈-20(Sigma Aldrich)으로 구성된 200 μL의 혼합물(5x PBST 완충용액)로 미리 채워진 마이크로튜브관에 수집하였다. 수집된 입자를 약 1분 동안 볼텍싱하고 원심분리하였다. 그 후 150 μL의 상청 완충용액을 제거하고, 같은 부피의 새로운 5x PBST에 재부유하여 입자를 헹구었다. 헹구는 단계를 5번 반복하였다. 최종적으로, 사용 전에, 140 μL의 5x PBST에 수화겔 입자를 저장하였다.

[47] miRNA 검출을 위하여, 종래의 방법을 이용하여 miRNA 검출용 수화겔 입자를 합성하였다(Y. H. Roh et al., Analyst, 2016, 141, 4578-4586). 20% (v/v) PEG700DA, 40% (v/v) PEG200, 5% (v/v) 광개시제 및 35% (v/v) 3x Tris EDTA (TE) 완충용액(Sigma aldrich)으로 구성된 전구체 용액을 9:1의 부피비로 아크리다이트-개질된 ssDNA 올리고머(Integrated DNA technologies)와 혼합하였다. 그 후 상기와 같이 동일한 UV 강도 및 노출 시간 조건으로 수화겔 입자를 제조하였다.

[48]

[49] 1-3: DNA 프로브 탑재

[50] 수화겔 입자에 ssDNA 프로브를 고정시키기 위하여, 티올-엔 마이클 첨가 반응을 이용하였다. 활성 메르캅토기(sulfhydryl group)를 형성하기 위하여, 티올-변형 ssDNA 올리고머(Integrated DNA technologies, 미국)를 0.5M

트리스[2-카르복시에틸] 포스파인(Tris[2-carboxyethyl] phosphine, Thermo Fisher Scientific, 미국)에서 환원시켰다. 그 후, 환원된 올리고머를 ~7 입자/μL의 농도로 140 μL 완충용액에 부유된 수화겔 입자과 혼합시켰다. 최종 혼합 용액을 열 교반기(thermo shaker, Hangzhou Allsheng Instruments Co. Ltd, 중국)에서 37℃의 일정한 온도에서 1,500 rpm으로 교반하면서 배양하였다. 모든 잠재적인 오염을 방지하기 위하여, 뉴클레아제가 존재하지 않는 물, 오토클레이브된 피펫 팁 및 마이크로튜브를 사용하였다.

[51]

[52] 1-4: miRNA 검출 분석(miRNA detection assay)

[53] miRNA 검출은 총 부피 50 μL에 대해서 수행하였다. 먼저, 1x TE 완충용액(Sigma Aldrich) 및 0.05% (v/v) 트윈-20으로 구성된 40 μL 1xTET 완충용액을 각각의 마이크로튜브에 가하고, 5 μL의 타겟 miRNA를 첨가해 주었다. miRNA 분석방법의 검출 감도는 miRNA, NaCl의 농도 및 혼성화 시간을 달리하여 평가하였다. 혼합물을 열 교반기에서 95℃로 5분 동안 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 이후에, 프로브가 탑재된 수화겔 입자 및 기존 수화겔 입자(타겟 당 ~50 입자)을 마이크로튜브에 첨가하였다. 타겟 miRNA가 수화겔 입자 중 프로브와 혼성화되도록, 분석 마이크로튜브를 열 교반기에서 15분 내지 90분 동안 55℃에서 1500 rpm으로 교반하면서 배양하였다.

[54] NaCl 농도에 따른 효과를 관찰하기 위하여, 혼성화 완충용액 내 NaCl의 최종 농도를 50 mM 내지 350 mM으로 조정하였다. 55℃에서 90분 동안 분석을 진행하였다. 혼성화 후에, 수화겔 입자를 50 mM NaCl을 함유하는 350 μL의 1x TET로 3회 세척하고, 그 다음 245 μL의 라이게이션 혼합물을 첨가하였다. 라이게이션 혼합물은 1350 μL 1x TET, 150 μL 10x NE 완충용액 2 (New England Biolabs, 미국), 250 nM ATP (New England Biolabs), 40 nM 유니버설 어댑터(Integrated DNA technologies), 및 800 U ml-1 T4 DNA 리가아제(Thermo Fisher Scientific)로 구성되었다. 그러고 나서, 혼합물을 1500 rpm으로 교반하면서 열 교반기에서 45분 동안 21.5℃에서 혼성화하였다. 또 다른 세척 단계 후에, 1xTE에 10배 희석된 스트렙타비딘-피코에리쓰린(streptavidin-phycoerythrin, SA-PE; Life Technologies, 미국)을 첨가하였다. 최종 배양 단계는 21.5℃에서 45분 동안 수행하였다. 세척 단계 후, 1xTET에 부유된 50 μL의 수화겔 입자를 이미지 분석을 위해 사용하였다.

[55]

[56] 1-5: 이미지 분석(image analysis)

[57] 디지털 일안 반사식 (DSLR) 카메라(Eos 6D, Canon, 일본)를 이용하여 수화겔 입자의 RGB 형광 이미지를 얻었다. 프로프 영역으로부터 타겟 신호의 강도를 평가하기 위한 모노크롬 형광 이미지를 위하여, 과학 상보형 금속-산화-반도체(scientific complementary metal-oxide-semiconductor, sCMOS) 카메라(Prime, Photometrics, 미국)를 사용하였다. 두 카메라 모두 역전

현미경(Axiovert 200, Zeiss)에 연결하였다. 입자를 이미징하기 위하여 큐브 세트를 통해 LED 램프(HXP 120 V, Zeiss)를 필터링하였다. 다양한 분석 시간 및 NaCl 농도의 신호를 얻기 위하여, 1000 ms 노출 시간으로 4.5 mW/cm^2 LED 강도를 이용하였다. 분석 민감도 측정을 위하여, 300 ms 노출 시간으로 11 mW/cm^2 LED 강도를 이용하였다. 이미지 J 소프트웨어(National Institute of Health, 미국)를 이용하여 모노크롬 형광 이미지를 분석하였다.

[58]

[59] 1-6: 분석 결과

[60] 프로브를 전구체에 포함시켜 수화겔 입자를 제조하는 종래의 방법을 이용하여 제조된 수화겔 입자(이하, "기존의 입자"이라 함)에 비해, 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 탑재하여 제조된 수화겔 입자(이하, "티올-엔 입자"이라 함)의 경우, 프로브(single strand DNA)가 8.2배 이상 더 많이 결합한 것을 확인할 수 있었다(도 5).

[61] 또한, 핵산 검출에 있어서, NaCl의 농도를 50 mM 내지 350 mM로 달리하여 분석한 결과, NaCl 농도가 높아질수록 검출 감도는 증가하지만 검출 특이도는 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 기존의 입자과 달리, 낮은 NaCl 농도(200 mM)에서 최적의 신호를 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다(도 6의 A).

[62] 아울러, 처음에 들어가는 1XTET의 양이 25μL로 4 종류의 마이크로RNA(let-7a, let-7b, let-7c 및 let-7d)가 1000 amol씩 첨가되고, 이 때 NaCl의 농도는 200 mM인 것을 제외하고는 miRNA 검출과 동일한 방법으로 특이도 시험을 수행한 결과, 최대 교차 반응성이 25%에서 15%로 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 6의 B).

[63] 또한, 핵산 검출에 있어서, 분석 시간을 달리하여 분석한 결과, 티올-엔 입자는 동일한 형광 신호를 기존의 입자 보다 3배 이상 빠르게 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다(도 7의 A).

[64] 아울러, 처음에 들어가는 1XTET의 양이 40μL로, 기존 입자는 350 mM, 티올-엔 입자는 200 mM의 NaCl 농도로 각각 50, 100, 500, 1000 및 5000 amol을 스파이크-인(spike-in)하여 신호를 검출한 뒤, 타겟 농도에 따른 형광신호 그래프를 외삽(extrapolation)하여 검출 감도를 확인한 결과, 티올-엔 입자(3.4 amol)의 경우, 검출 감도(limit of detection)가 기존의 입자(4.9 amol) 보다 향상된 것을 확인할 수 있었다(도 7의 b).

[65] 또한, 단백질 검출에 있어서, 기존의 입자는 항체가 전구체와 상용성이 좋지 않아 응집하는 현상이 발생하였으나, 티올-엔 입자의 경우 응집현상이 해결되어 이에 따라 검출 감도도 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 8).

[66]

[67] **실시예 2: 엔코드 수화겔 입자의 합성, 항체 프로브 탑재 및 표적 단백질 검출**

[68] 2-1: 미세유체 장치의 제작

[69] 수화겔 입자 합성을 위한 미세유체 장치는 실시예 1의 방법과 동일하다.

[70]

[71] 2-2: 수화겔 입자의 합성 및 항체 프로브 탑재

[72] 입자 합성과 프로브 탑재는 분리된 두 방법으로 진행되었다. 전구체 용액은 20% (v/v) PEG700DA(polyethylene glycol diacrylate, Sigma Aldrich, 미국), 공극제(porogen)로서 40% (v/v) PEG600(Polyethylene glycol, Sigma Aldrich), 광개시제로서 5% Darocur 1173(Sigma Aldrich), 35% 탈이온수(DI water)로 구성되었다. 정지 유체 리소그라피를 통한 입자 합성은 400 ms의 flow time, 200 ms의 stop time, 75 ms의 UV exposure time, 200 ms의 hold time의 조건으로 진행되었다. 각각의 단백질 검출을 위해서, 1시간동안 약 4000개의 입자를 1-D 포토마스크를 이용하여 합성하였다. 다른 종류의 포토마스크를 이용해서 다른 단백질을 검출하기 위한 입자를 합성하였다. 합성된 입자는 1xPBST를 이용하여 3번 세척하였다. 입자에 항체를 부착하기 위해 16.5μL의 입자와 (55 개의 입자/μL) 재구성된 항체 12 μL (IL-6의 경우 6μg/μL, VEGF의 경우 3μg/μL, PIGF의 경우 12μg/μL, CG beta의 경우 3μg/μL), 그리고 1.5μL의 heterobifunctional PEG linker(Thiol-PEG2000-NHS, Nanocs)를 넣고 1500 rpm, 25℃의 온도 조건에서 48시간 동안 반응하였다. 실험 결과에 따르면, 각각의 단계를 분리하는 것에 대한 이점이 없기 때문에 항체의 기능화와 입자에 고정화 시키는 단계를 통합하여 준비 시간과 단계의 수를 줄였다. 항체 부착 반응이 끝난 뒤 입자는 1xPBST에서 3번 세척하였다.

[73]

[74] 2-3: 단백질 검출 방법 (Protein detection)

[75] 단백질 검출을 위해 마이크로튜브에 50개의 입자가 들어있는 25μL의 1xPBST, 2x 표적 단백질과 2% BSA가 들어있는 1xPBS 25μL를 넣고 25℃ 1500rpm에서 두 시간 동안 반응을 진행하였다. 1x PBST로 3회 세척 후, 반응이 끝난 입자가 들어있는 40μL의 1xPBST에 10μL의 재구성된 2차 항체 (IL-6의 경우 12.5ng/μL, VEGF의 경우 25ng/μL, PIGF의 경우 15ng/μL, CG beta의 경우 125ng/μL)를 넣고 25℃ 1500rpm에서 1시간 동안 반응을 진행하였다. 1x PBST로 3회 세척 후, 반응이 끝난 입자가 들어있는 40μL의 1xPBST에 10μL의 1/50으로 희석된 streptavidin-phycoerythrin (SA-PE, Life technologies), 5% BSA가 들어있는 1xPBST를 넣고 반응시켜 형광 라벨링을 진행하였다. 입자는 이미지 촬영 전 1xPBST로 5회 린싱되었다.

[76]

[77] 2-4: 이미지 분석(image analysis)

[78] 이미지 분석을 위해 사용한 장비는 실시예 1의 내용과 동일하다. 이미지는 1100 mW/cm^2 의 광원세기, 50ms의 노출 시간 조건을 사용하여 촬영하였다. TIFF로 저장된 이미지의 형광 세기는 ImageJ 프로그램을 통해 측정하였다.

[79]

[80] 2-5: ELISA

[81] ELISA는 생산자의 프로토콜에 따라 진행하였다. 96-well microplate(R&D

systems)의 각 well마다 100μL의 희석된 VEGF capture antibody(1μg/ml)를 넣고 25℃에서 overnight하여 코팅 반응을 진행하였다. 각 well은 400μL의 1xPBST로 3회 린싱되었다. 빈 공간을 막기위해 plate는 1% BSA가 들어있는 300μL의 1x PBS로 1시간 반응시켰다. 두 번의 세척 뒤, 표적 단백질과 1%의 BSA가 들어있는 1x PBS 100μL를 plate에 넣고 2시간 동안 반응하였다. 3번의 세척 뒤, detection antibody(100ng/ml) 100μL를 넣고 2시간동안 25℃에서 반응하였다. 3번의 세척 뒤 1/40으로 희석된 streptavidin-HRP(R&D systems) 100μL를 각각의 well에 넣고 20분동안 반응시켰다. 3번의 세척 뒤 100 μL의 substrate 용액(R&D systems, cat. no. DY999)을 넣고 25℃에서 20분 반응시켰다. 50μL의 정지용액(R&D systems, cat. no. DY994)을 넣은 뒤 450 nm에서 570 nm로 맞춰진 microplate reader(SpectraMax iD5, Molecular Devices)를 이용하여 optical density값을 측정하였다. 570 nm 파장의 reading에서 450 nm 파장의 reading값을 제거하여 plate의 불완전성을 없앴다.

[82]

[83] 2-6: 다중검출 (Multiplex Detection)

[84] 총 8종류의 다중검출을 위해, 각각의 경우마다 100μL 1xPBST에 들어있는 150개의 입자 (단백질당 50개)와 100μL의 2x 표적 단백질, 2% BSA가 포함된 1xPBS를 섞어주었다. Pre-mixture는 25μL의 2% BSA가 들어있는 1xPBS, 25μL의 2% BSA와 8x 표적 단백질이 들어있는 1xPBS (표적 단백질이 없는 경우는 25μL의 2% BSA가 들어있는 1xPBS)로 준비하였다. 8종류의 서로 다른 조합에서, 입자는 1500 rpm, 25℃에서 2시간동안 반응하였다. 1xPBST로 3번 세척 후 입자가 들어있는 20μL의 1xPBST에 세 종류의 2차 항체(VEGF의 경우 25ng/μL, PlGF의 경우 15ng/μL, CG beta의 경우 125ng/μL)를 10μL 씩 넣었다. 혼합물은 1500 rpm, 25℃에서 1시간동안 반응하였다. 1xPBST로 3번 세척 후 입자가 들어있는 120μL의 1xPBST에 30μL의 1/50으로 희석된 streptavidin-phycoerythrin, 5% BSA가 들어있는 1xPBST를 넣고 반응시켜 형광 라벨링을 진행하였다. 입자는 이미지 촬영 전 1xPBST로 5번 세척하였다.

[85]

[86] 2-7: 분석결과

[87] 프로브를 전구체에 포함시켜 수화겔 입자를 제조하는 종래의 방법에서는 hydrophobic한 개시제 때문에 항체의 응집현상이 발생하였으나, 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 탑재함으로써 항체의 응집현상을 막고 균일하게 프로브를 입자에 결합할 수 있었다 (도 8).

[88] 또한, 단백질 검출에 있어서 통상적으로 사용되는 ELISA와의 비교실험에서 31.2-2000 pg/mL 의 검출범위로 1.8 log 범위를 나타낸 ELISA에 비해서 티올-엔 입자는 17.7-60000 pg/mL 의 검출범위로 3.5 log 범위를 나타냈으며, 17.7 pg/ml의 limit of detection을 보여 ELISA보다 크게 향상된 성능을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (도 9a).

[89] 또한, 반응 시간에 따른 ELISA와 티올-엔 입자의 normalized된 형광 신호를 관찰하였는데, 티올-엔 입자가 더 높은 속도로 반응을 진행하여 ELISA로 2시간 반응해서 얻는 신호를 티올-엔 입자로는 1시간 만에 얻을 수 있었다 (도 9b).

[90] 또한, 세 종류의 단백질 (VEGF, PIGF, CG beta)의 calibration curve를 얻기 위해 여러 농도로 각각의 단백질을 스파이크-인하여 신호를 검출한 뒤, 단백질 농도에 따른 형광신호 그래프를 외삽하여 limit of detection을 확인한 결과 LOD는 VEGF, PIGF, CG beta에서 각각 17.7, 17.5, 4.2 pg/ml로 나타났다 (도 10).

[91] 또한, 세 종류의 단백질의 다중검출이 가능한지 확인하기 위해 단백질의 존재 유무로 총 8종류의 case를 나누었으며, 모든 case에서 다중검출이 성공적으로 진행되는 것을 확인하였다 (도 11).

[92]

[93] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

산업상 이용가능성

[94] 본 발명에 따르면, 현저히 향상된 높은 효율로 프로브를 탑재할 수 있고, 탑재된 프로브를 균일하게 분포시킬 수 있으며, 미반응 말단에 의한 생체분자의 검출 저해라는 잠재적인 문제를 해결할 수 있다. 또한 검출 감도를 향상시킬 수 있고, 높은 감도로 핵산, 단백질 등의 표적 생체 분자를 다중 검출하여 질병을 진단하거나 약물을 선별하는데 활용될 수 있는바, 분자진단 등 의료진단 분야에서 널리 활용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 수화겔 입자를 합성한 후 프로브를 결합하는 단계를 포함하는 부호화된 수화겔 입자의 제조 방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 합성된 수화겔 입자에 잔존하는 미반응 말단을 이용하여 프로브를 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 프로브가 라디칼 반응 또는 용액 상 전자의 이동을 통해 합성된 수화겔 입자에 가교되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 프로브가 라디칼 반응을 통해 합성된 수화겔 입자에 가교되는 경우, UV 조사를 통한 광개시제의 개시 또는 열에너지를 이용한 온도개시제의 개시를 통해 공유결합이 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 5] 제3항에 있어서, 프로브가 용액 상 전자의 이동을 통해 합성된 수화겔 입자에 가교되는 경우, 수용액 또는 극성 용매의 전자가 친핵체로 작용하여 공유결합이 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 6] 제3항에 있어서, 0 내지 90 ℃에서 가교가 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 프로브는 DNA, RNA 또는 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 수화겔 입자는 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형 디자인으로 구성된 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 코드는 기하학적 코드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

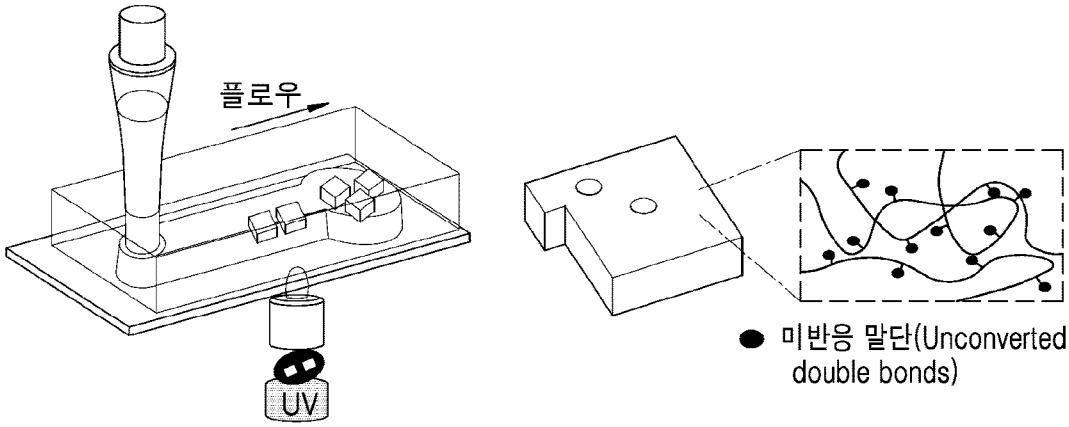
[청구항 10] 제9항에 있어서, 기하학적 코드는 여러 종류의 도형의 조합을 이용하여 구성하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 11] 제1항에 있어서, 수화겔 입자가 기능성 나노 입자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

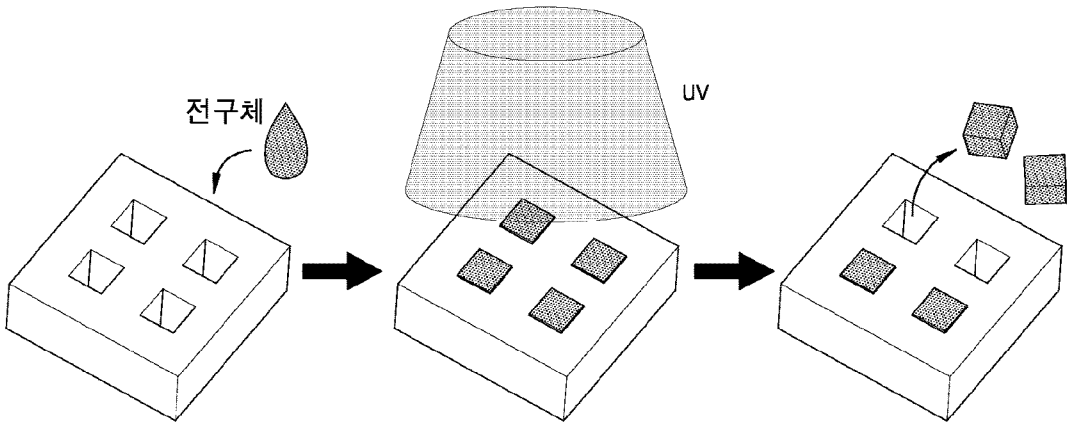
[청구항 12] 제1항의 방법에 따라 제조된 부호화된 수화겔 입자.

[청구항 13] 코드 영역과 프로브 영역이 통합된 일체형 디자인으로 구성된 것을 특징으로 하는 부호화된 수화겔 입자.

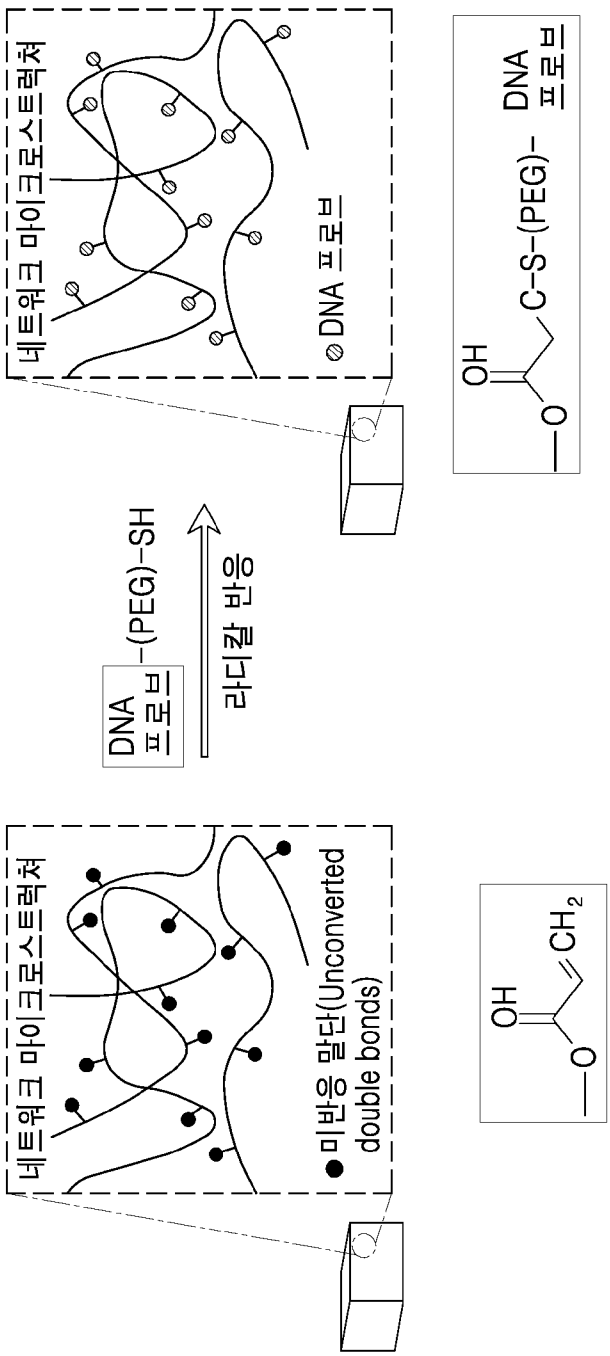
[도1]



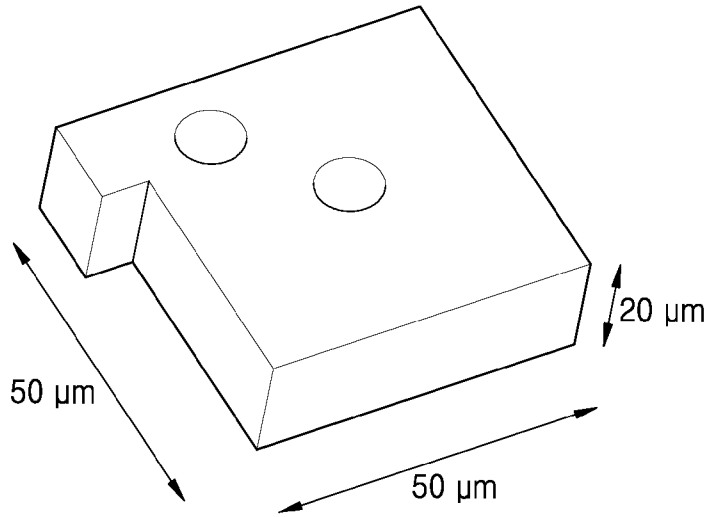
[도2]

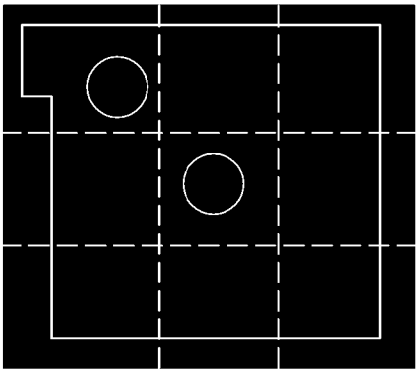


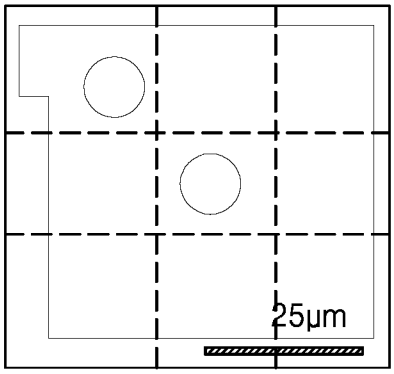
[도3]


네트워크 마이크로스트럭쳐
● 미반응 말단(Unconverted double bonds)
DNA 프로브-(PEG)-SH
라디칼 반응
네트워크 마이크로스트럭쳐
⊘ DNA 프로브
OH
C-S-(PEG)-
DNA 프로브
O
OH
CH2
O

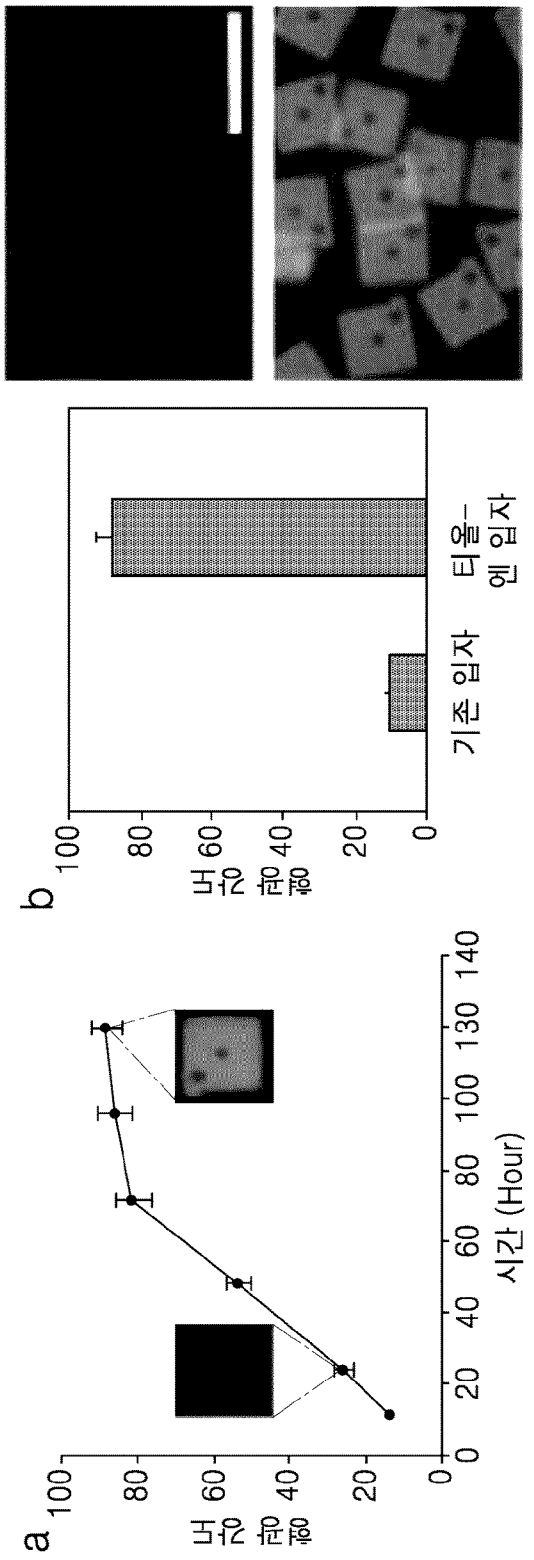
[도4]



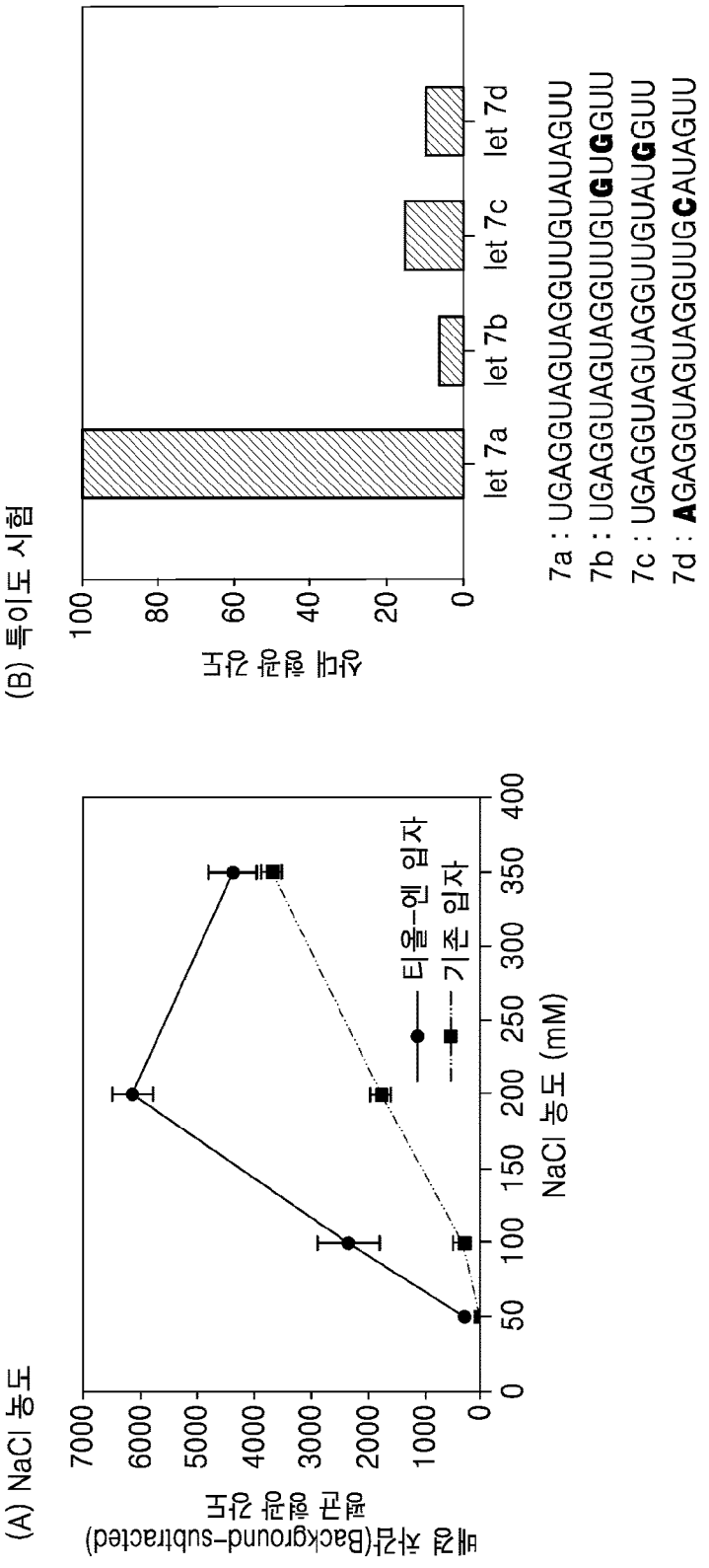




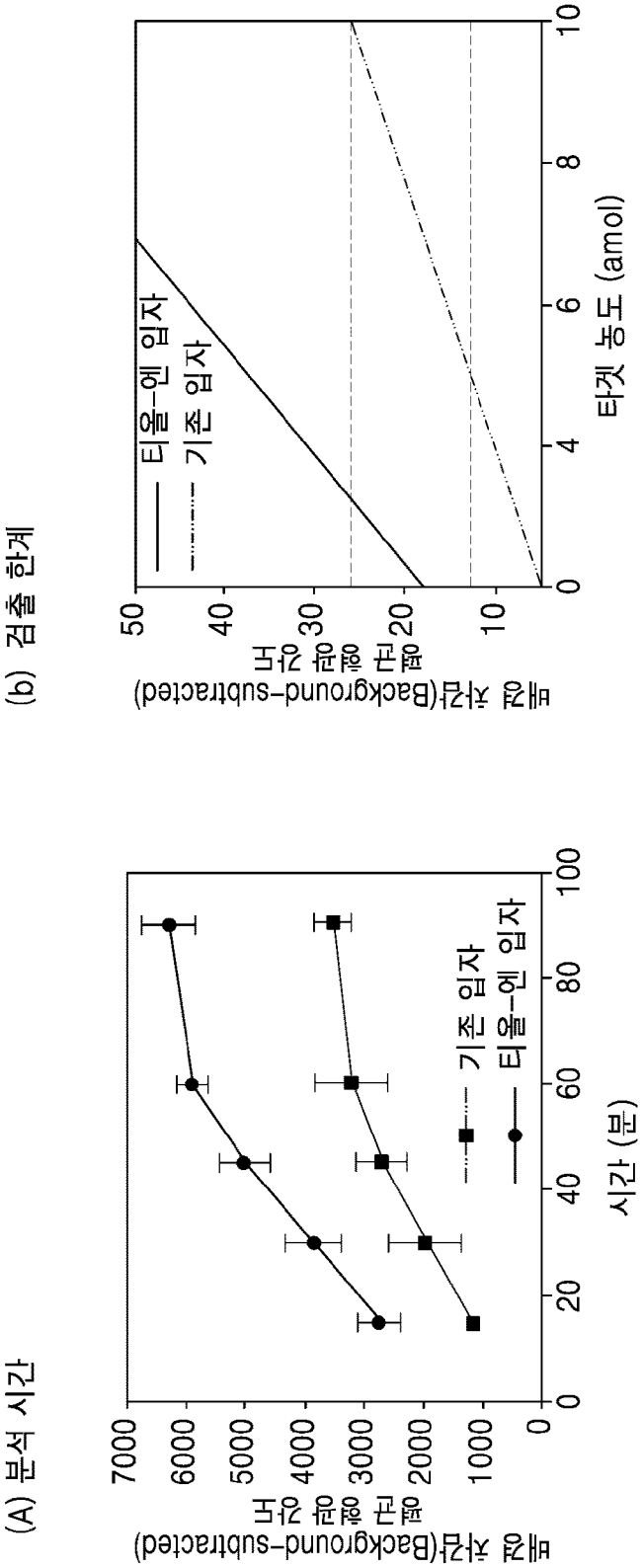
[도5]



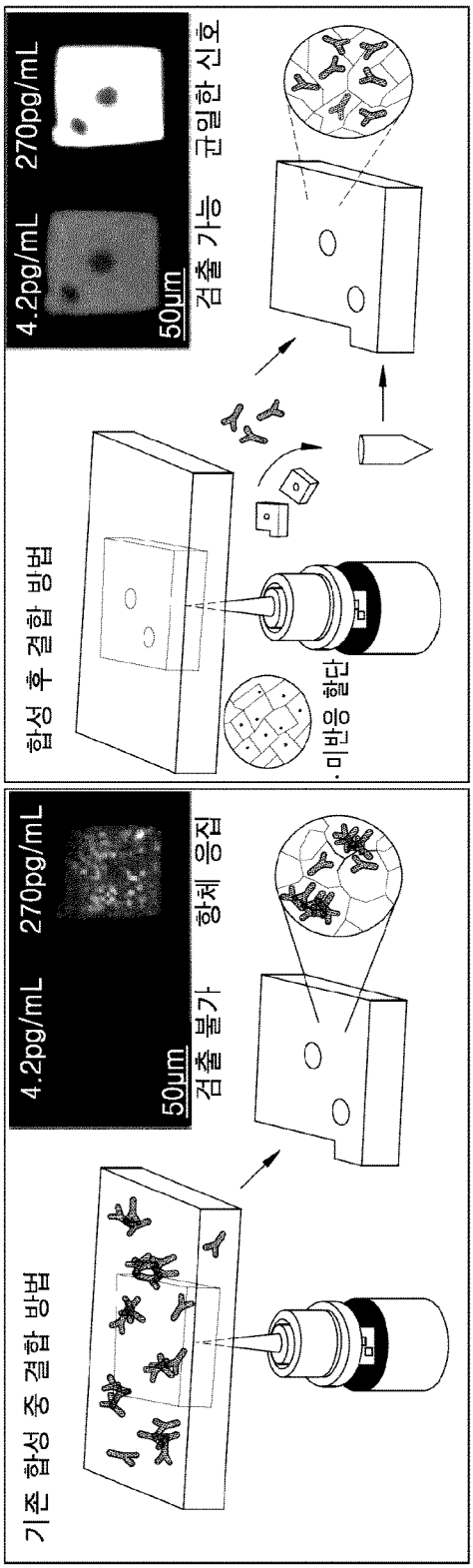
[도6]


(A) NaCl 농도
평균 형광 강도
(Background-subtracted)
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
0
50
100
150
200
250
300
350
400
NaCl 농도 (mM)
티올-엔 입자
기존 입자
(B) 특이도 시험
상대 형광 강도
0
20
40
60
80
100
let 7a
let 7b
let 7c
let 7d
7a : UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
7b : UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
7c : UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
7d : AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU

[도7]

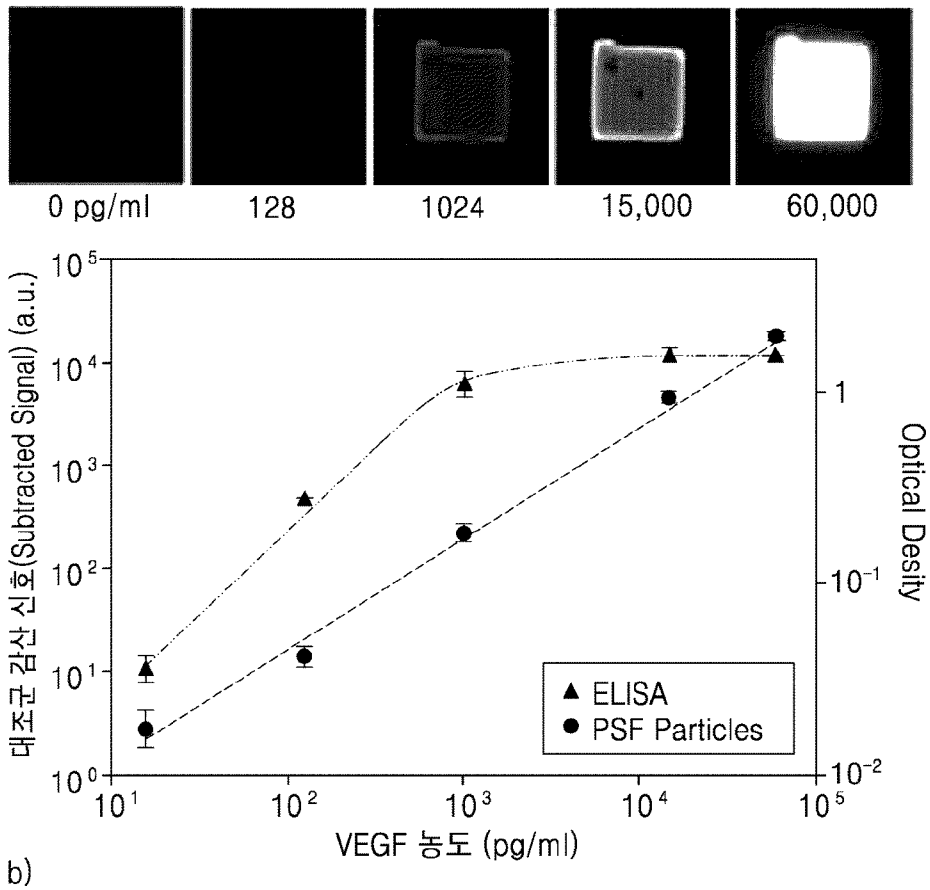

(A) 분석 시간
배경 차감(Background-subtracted)
평균 형광 강도
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
100
시간 (분)
기존 입자
티올-엔 입자
(b) 검출 한계
배경 차감(Background-subtracted)
평균 형광 강도
50
40
30
20
10
0
2
4
6
8
10
타겟 농도 (amol)
티올-엔 입자
기존 입자

[도8]

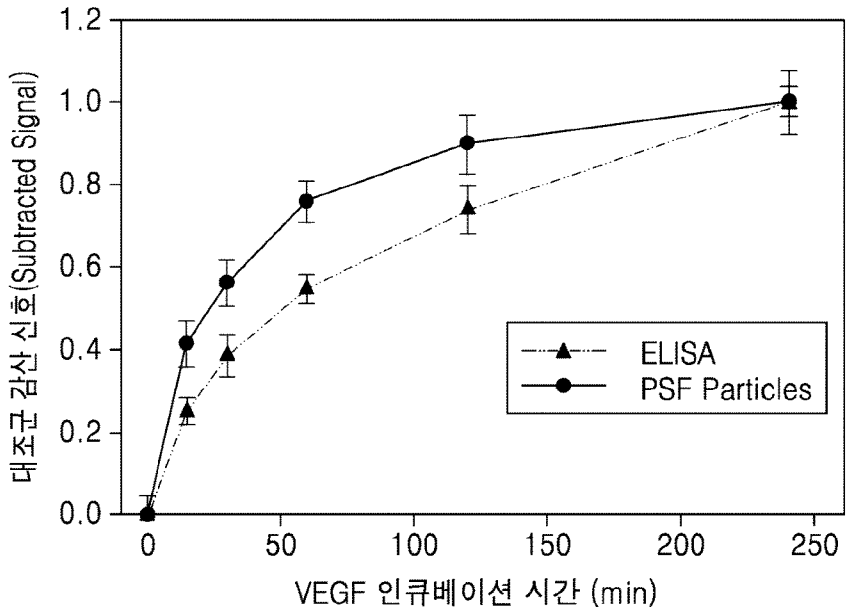

합성 후 결합 방법
4.2pg/mL
270pg/mL
50um
검출 가능 균일한 신호
미반응 항단
기존 합성 중 결합 방법
4.2pg/mL
270pg/mL
50um
검출 불가 항체 응집

[도9]

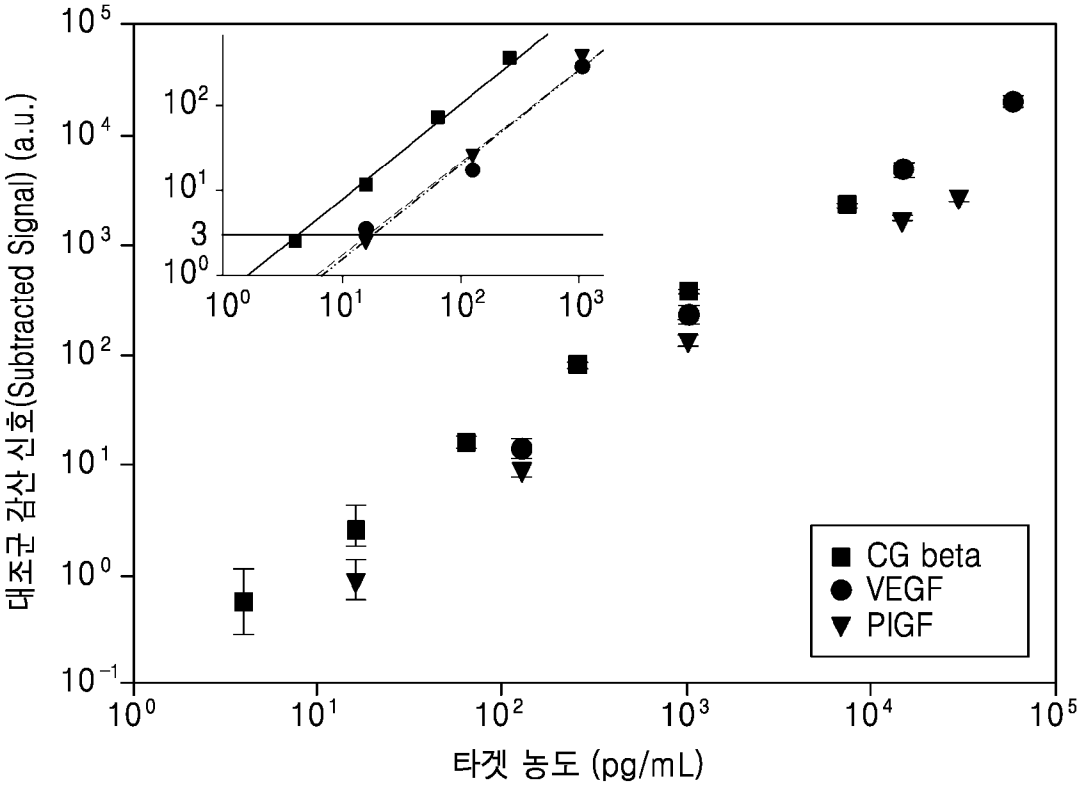
a)


0 pg/ml
128
1024
15,000
60,000
대조군 감산 신호(Subtracted Signal) (a.u.)
Optical Desity
ELISA
PSF Particles
VEGF 농도 (pg/ml)

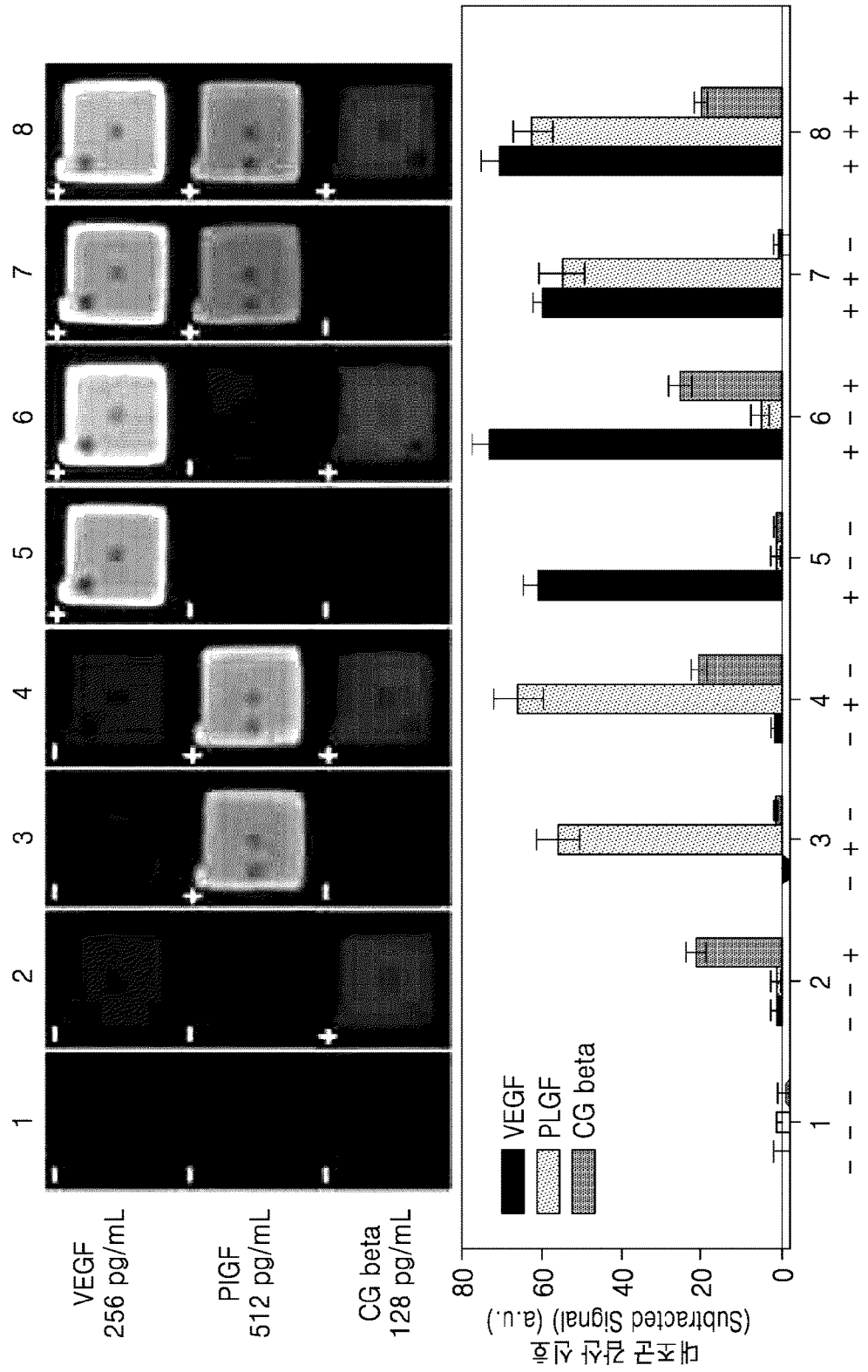
b)


대조군 감산 신호(Subtracted Signal)
ELISA
PSF Particles
VEGF 인큐베이션 시간 (min)

[도10]



[도11]


VEGF
256 pg/mL
PIGF
512 pg/mL
CG beta
128 pg/mL
1
2
3
4
5
6
7
8
VEGF
PLGF
CG beta
대조군 감산 신호
(Subtracted Signal) (a.u.)
0
20
40
60
80

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/015898

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6834(2018.01)i, G01N 33/543(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)

C12Q 1/6834; A61F 2/02; C12M 1/34; C12Q 1/68; G01N 21/64; G01N 33/543

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: hydrogel, probe, code, lithography, biosensor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016-0333398 A1 (FIREFLY BIOWORKS, INC.) 17 November 2016 See paragraphs [0017], [0082], [0123], [0144], [0147], [0149], [0157]-[0160], [0239]; and figure 2.	13
Y		1-12
Y	LE GOFF, Gaelle C. et al., "Hydrogel Microparticles for Biosensing", European Polymer Journal, 2015, vol. 72, pages 386-412 See abstract; pages 390, 393, 397; figures 2, 4; and table 2.	1-12
A	APPLEYARD, David C et al., "Bar-coded Hydrogel Microparticles for Protein Detection: Synthesis, Assay and Scanning", Nature Protocols, 2011, vol. 6, no. 11, pages 1761-1774 See the entire document.	1-13
A	US 9528145 B2 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 27 December 2016 See the entire document.	1-13
A	US 2007-0082019 A1 (HUANG, Wenxi et al.) 12 April 2007 See the entire document.	1-13

☐ 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
08 APRIL 2019 (08.04.2019)	**08 APRIL 2019 (08.04.2019)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/015898

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2016-0333398 A1	17/11/2016	CA 2802049 A1	15/12/2011
		CA 2802049 C	10/07/2018
		CA 2802059 A1	15/12/2011
		EP 2576839 A2	10/04/2013
		EP 2576839 A4	06/11/2013
		EP 2576839 B1	10/05/2017
		EP 2577300 A2	10/04/2013
		EP 2577300 A4	18/12/2013
		EP 2577300 B1	28/09/2016
		KR 10-1932628 B1	27/12/2018
		KR 10-1947801 B1	13/02/2019
		KR 10-2013-0082495 A	19/07/2013
		KR 10-2013-0118288 A	29/10/2013
		US 2012-0309651 A1	06/12/2012
		US 2012-0316082 A1	13/12/2012
		US 2013-0210653 A1	15/08/2013
		US 2015-0005198 A1	01/01/2015
		US 8609337 B2	17/12/2013
		US 9290816 B2	22/03/2016
		US 9476101 B2	25/10/2016
		WO 2011-156432 A2	15/12/2011
		WO 2011-156432 A3	26/04/2012
		WO 2011-156434 A2	15/12/2011
		WO 2011-156434 A3	12/04/2012
US 9528145 B2	27/12/2016	AU 2014-228412 A1	03/09/2015
		AU 2014-228412 B2	15/03/2018
		CA 2901004 A1	18/09/2014
		CN 105189697 A	23/12/2015
		CN 105189697 B	02/01/2018
		EP 2970767 A1	20/01/2016
		EP 2970767 B1	28/06/2017
		EP 3315582 A1	02/05/2018
		ES 2641512 T3	10/11/2017
		HK 1218134 A1	03/02/2017
		KR 10-2015-0132863 A	26/11/2015
		SG 11201507384U A	29/10/2015
		US 2014-0273246 A1	18/09/2014
		US 2014-0273255 A1	18/09/2014
		US 2017-0226416 A1	10/08/2017
		US 2017-0226417 A1	10/08/2017
		US 9528144 B2	27/12/2016
		WO 2014-144892 A1	18/09/2014
		WO 2014-144924 A2	18/09/2014
		WO 2014-144924 A3	20/11/2014
US 2007-0082019 A1	12/04/2007	WO 2004-076511 A2	10/09/2004
		WO 2004-076511 A3	16/12/2004

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/015898

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6834(2018.01)i, G01N 33/543(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/6834; A61F 2/02; C12M 1/34; C12Q 1/68; G01N 21/64; G01N 33/543

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: 수화겔, 프로브, 코드, 리소그래피, 바이오센서

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2016-0333398 A1 (FIREFLY BIOWORKS, INC.) 2016.11.17 단락 [0017], [0082], [0123], [0144], [0147], [0149], [0157]-[0160], [0239]; 및 도면 2 참조.	13
Y		1-12
Y	LE GOFF, GAELLE C. 등, 'Hydrogel microparticles for biosensing', European Polymer Journal, 2015, 72권, 페이지 386-412 요약; 페이지 390, 393, 397; 도면 2, 4; 및 표 2 참조.	1-12
A	APPLEYARD, DAVID C 등, 'Bar-coded hydrogel microparticles for protein detection: synthesis, assay and scanning', Nature Protocols, 2011, 6권, 11호, 페이지 1761-1774 전체 문헌 참조.	1-13
A	US 9528145 B2 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 2016.12.27 전체 문헌 참조.	1-13
A	US 2007-0082019 A1 (HUANG, WENXI 등) 2007.04.12 전체 문헌 참조.	1-13

☐ 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 않으며 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.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2019년 04월 08일 (08.04.2019)	2019년 04월 08일 (08.04.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
감유림
전화번호 +82-42-481-3516

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/015898

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2016-0333398 A1	2016/11/17	CA 2802049 A1	2011/12/15
		CA 2802049 C	2018/07/10
		CA 2802059 A1	2011/12/15
		EP 2576839 A2	2013/04/10
		EP 2576839 A4	2013/11/06
		EP 2576839 B1	2017/05/10
		EP 2577300 A2	2013/04/10
		EP 2577300 A4	2013/12/18
		EP 2577300 B1	2016/09/28
		KR 10-1932628 B1	2018/12/27
		KR 10-1947801 B1	2019/02/13
		KR 10-2013-0082495 A	2013/07/19
		KR 10-2013-0118288 A	2013/10/29
		US 2012-0309651 A1	2012/12/06
		US 2012-0316082 A1	2012/12/13
		US 2013-0210653 A1	2013/08/15
		US 2015-0005198 A1	2015/01/01
		US 8609337 B2	2013/12/17
		US 9290816 B2	2016/03/22
		US 9476101 B2	2016/10/25
		WO 2011-156432 A2	2011/12/15
		WO 2011-156432 A3	2012/04/26
		WO 2011-156434 A2	2011/12/15
		WO 2011-156434 A3	2012/04/12
US 9528145 B2	2016/12/27	AU 2014-228412 A1	2015/09/03
		AU 2014-228412 B2	2018/03/15
		CA 2901004 A1	2014/09/18
		CN 105189697 A	2015/12/23
		CN 105189697 B	2018/01/02
		EP 2970767 A1	2016/01/20
		EP 2970767 B1	2017/06/28
		EP 3315582 A1	2018/05/02
		ES 2641512 T3	2017/11/10
		HK 1218134 A1	2017/02/03
		KR 10-2015-0132863 A	2015/11/26
		SG 11201507384U A	2015/10/29
		US 2014-0273246 A1	2014/09/18
		US 2014-0273255 A1	2014/09/18
		US 2017-0226416 A1	2017/08/10
		US 2017-0226417 A1	2017/08/10
		US 9528144 B2	2016/12/27
		WO 2014-144892 A1	2014/09/18
		WO 2014-144924 A2	2014/09/18
		WO 2014-144924 A3	2014/11/20
US 2007-0082019 A1	2007/04/12	WO 2004-076511 A2	2004/09/10
		WO 2004-076511 A3	2004/12/16