

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 8월 3일 (03.08.2017)



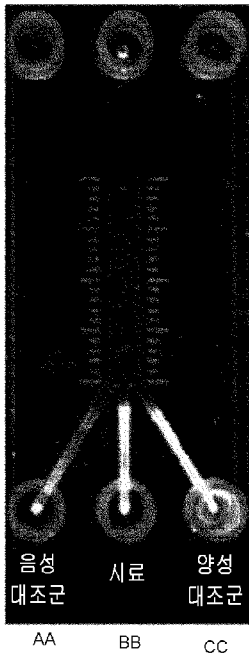
(10) 국제공개번호
WO 2017/131493 A1

- (51) 국제특허분류: **B01L 3/00** (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01) **Boram**; 18132 경기도 오산시 운암로 122, 105 동 1401호, Gyeonggi-do (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/000998 (74) 대리인: **안소영 (AHN, So Young)**; 06632 서울시 서초구 서초대로 344, 4층, Seoul (KR).
- (22) 국제출원일: 2017년 1월 26일 (26.01.2017)
- (25) 출원언어: 한국어 (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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.
- (26) 공개언어: 한국어 (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, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW).
- (30) 우선권정보: 10-2016-0011953 2016년 1월 29일 (29.01.2016) KR
- (71) 출원인: **이화여자대학교 산학협력단 (Ewha University - Industry Collaboration Foundation)** [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: **이혁진 (LEE, Hyukjin)**; 04194 서울시 마포구 백범로 205, 104 동 504호, Seoul (KR). **정일영 (JUNG, Il Young)**; 30130 세종시 나리로 38, 705 동 2202호, Sejong (KR). **김지수 (KIM, Jisu)**; 03759 서울시 서대문구 성산로 24길 41, 405, Seoul (KR). **최보람 (CHOI, Boram)**; 18132 경기도 오산시 운암로 122, 105 동 1401호, Gyeonggi-do (KR).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MICROFLUIDIC DEVICE FOR DETECTING TARGET MUTANT GENE AND METHOD FOR IMPROVING DETECTION EFFICIENCY OF MICROFLUIDIC DEVICE FOR DETECTING TARGET GENE

(54) 발명의 명칭: 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치, 및 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치의 검출 효율을 개선하는 방법



AA ... Negative control
BB ... Sample
CC ... Positive control

(57) Abstract: The present invention relates to a microfluidic device for detecting a target mutant gene. The device of the present invention requires no temperature changes for nucleic acid amplification and can detect a target mutant gene even in the absence of the supply of external power. Accordingly, the device needs not be accompanied by complicated equipment, can be fabricated easily and inexpensively, and is convenient for operation and is easy to carry. In addition, the device can find applications in the detection of a variety of mutant genes and in the simultaneous detection of two or more mutant genes. Further, the present invention relates to a method for improving a detection efficiency of a microfluidic device for detecting a target gene. When utilized, the method of the present invention can greatly reduce the time taken for conventional microfluidic devices for detecting target genes and can increase the accuracy of detection.

(57) 요약서: 본 발명은 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치에 관한 것이다. 본 발명의 장치는 핵산 증폭을 위하여 온도를 변화시킬 필요가 없고, 외부의 동력 공급이 없어도 표적 돌연변이 유전자를 검출할 수 있다. 따라서 복잡한 장비를 수반할 필요가 없으며, 간단하고 저렴하게 제조가 가능하고, 조작이 간편하며, 휴대가 용이하다. 또한 다양한 돌연변이 유전자의 검출에 이용할 수 있고, 2 이상의 돌연변이 유전자를 동시에 검출하는데 이용할 수 있다. 또한 본 발명은 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치의 검출 효율을 개선하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법을 이용하면 기존의 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치의 검출 소요 시간을 크게 단축시키고 검출의 정확성을 높일 수 있다.

WO 2017/131493 A1



TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, **공개:**

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).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치, 및 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치의 검출 효율을 개선하는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치, 및 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치의 검출 효율을 개선하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 미세 유동 장치(microfluidic device)란 기관 상에서 미세유체 유로(microfluidic channel)를 통해 각 구성이 연결되어, 시료 용액을 주입하면 검출 신호를 얻을 때까지 필요한 전 공정이 자동화되어 있는 장치를 말한다. 적은 양의 시료에서도 검출이 가능하며, 시약을 적게 사용하고, 전 공정이 자동화되어 있어 편리하다는 장점이 있다.
- [3] 공개번호 제10-2014-0032094호는 DNA 템플레이트와 결합될 수 있는 미세 유동 장치를 개시하고 있다. 그러나 상기 문헌에 공개된 미세 유동 장치는 2층 구조이고 유로의 각도를 조절하여 시료를 흐르게 하므로 제조 공정과 사용 방법이 복잡하다. 또한 시료를 주입하기 위해 펌프를 이용하므로 외부에서 동력을 공급해야 하고, 한 번에 한 가지 물질만을 검출할 수 있다.
- [4] [선행기술문헌]
- [5] [특허문헌]
- [6] 국내등록특허 제10-1263450호(발명의 명칭: 카나마이신에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머)
- [7] 국내공개특허 제10-2014-0032094호(발명의 명칭: 표적 물질 포획이 용이한 미세유동 장치 및 상기 미세유동 장치를 이용한 표적 물질 분리 방법)
- [8] 국내공개특허 제10-2012-0125164호(발명의 명칭: E G F R 엑손 19 다형 검출 시험용 올리고뉴클레오티드 및 그 용도)

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명은 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치 및 이를 이용한 검출 방법을 제공하고자 한다.
- [10] 본 발명은 또한 검출 효율이 개선된 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치 키트 및 이를 이용한 표적 유전자 검출 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명은
- [12] 기관;
- [13] 상기 기관 상에 형성된 시료용액이 외부로부터 유입되는 유입구;
- [14] 상기 유입구와 연결되어 유입된 시료용액을 수용하는 제 1 유로;

- [15] 상기 제 1 유로와 연결된 제 2 유로;
- [16] 상기 제 2 유로와 연결된 배출구를 포함하는 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치로서,
- [17] 상기 제 2 유로 표면은 코팅되어 있고;
- [18] 상기 코팅 상에 프라이머가 고정되고;
- [19] 상기 고정된 프라이머에는 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트가 결합되어 있으며,
- [20] 상기 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트는 상기 프라이머에 상보적으로 결합하는 프라이머 결합부, 상기 프라이머 결합부의 일 말단에 결합된 제 1 템플레이트 내 상보적인 결합 부위-제 1 표적 돌연변이 유전자 결합 부위, 및 상기 프라이머 결합부의 다른 말단에 결합된 제 2 템플레이트 내 상보적인 결합 부위-제 2 표적 돌연변이 유전자 결합 부위를 포함하는, 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치를 제공한다.
- [21] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 제 2 유로는 1 내지 20개일 수 있다.
- [22] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 제 2 유로는 2 내지 20개이며, 제 1 유로의 말단에서 각각의 제 2 유로가 분지되고, 각각의 제 2 유로 상에 고정된 프라이머에 결합된 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트는 서로 같거나 다른 돌연변이 유전자에 결합하는 것일 수 있다.
- [23] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 코팅은 5-하이드록시도파민 염산, 노르에피네프린, 에피네프린, 파이로갈롤아민, DOPA(3,4-Dihydroxyphenylalanine), 카테킨, 탄닌류, 파이로갈롤, 파이로카테콜, 헤파린-카테콜, 키토산-카테콜, 폴리에틸렌글리콜-카테콜, 폴리에틸렌이민-카테콜, 폴리메틸메타크릴레이트-카테콜, 히알루론산-카테콜, 폴리라이신-카테콜 (polylysine-catechol), 및 폴리라이신 (polylysine)을 포함하는 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [24] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 프라이머는 티올, 아민, 하이드록실, 카복실, 이소티오시아네이트, NHS 에스테르, 알데히드, 에폭시드, 카보네이트, HOBt 에스테르, 글루타르알데히드, 카바메이트, 이미다졸 카바메이트, 말레이미드, 아지리딘, 설펜, 비닐설펜, 하이드라진, 페닐 아자이드, 벤조페논, 안트라퀴논, 및 디엔 기를 포함하는 군으로부터 선택된 1 이상으로 말단이 변형된 것일 수 있다.
- [25] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 코팅은 5-하이드록시도파민 염산이고, 상기 프라이머는 티올 또는 아민 기로 말단이 변형된 것일 수 있다.
- [26] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트의 프라이머 결합부는 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [27] 본 발명의 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치로 검출할 수 있는 돌연변이 유전자의 종류에는 제한이 없다. 당 업계에 알려진 다양한 돌연변이 유전자에 대하여 본 발명을 적용할 수 있다.
- [28] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 돌연변이 유전자는 암에서 나타나는 암

특이적인 돌연변이 유전자가 될 수 있다. 암 특이적인 돌연변이 유전자는 <http://www.mycancergenome.org>와 같은 웹사이트, 그 외 당업계에 알려진 임의의 암 특이적인 돌연변이 유전자가 될 수 있다. 예를 들어, 상기 돌연변이 유전자는 암을 유발하는 유전자인 발암성 돌연변이 유전자가 될 수 있고, 구체적으로 폐암 특이적 돌연변이 유전자일 수 있으며, 보다 구체적으로 EGFR 엑손 19번 결실이 일어난 유전자일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

- [29] 각각의 암에서 나타나는 유전자의 돌연변이에 대해서는 하기와 같은 것들이 보고되어 있다(<http://www.mycancergenome.org> 발췌);
- [30] 급성 림프아세포성 백혈병(Acute Lymphoblastic Leukemia)의 CRLF2 또는 JAK2 유전자의 돌연변이, 급성 골수성 백혈병(Acute Myeloid Leukemia)의 CBFβ-MYH11, DEK-NUP214, DNMT3A, FLT3, IDH1, IDH2, KIT, MLL-MLLT3, PML-RARA, RBM15-MKL1, RPN1-EVI1, 또는 RUNX1-RUNX1T1 유전자의 돌연변이, 역형성대세포림프종(Anaplastic Large Cell Lymphoma)의 ALK 유전자 돌연변이, 기저세포암(Basal Cell Carcinoma)의 SMO 유전자 돌연변이, 방광암(Bladder Cancer)의 TSC1 유전자 돌연변이, 유방암(Breast Cancer)의 AKT1, AR, ERBB2, ESR1, FGFR1, FGFR2, PGR, PIK3CA, 또는 PTEN 유전자 돌연변이, 만성 골수성 백혈병(Molecular Profiling of Chronic Myeloid Leukemia)의 BCR-ABL1 유전자의 돌연변이, 대장암(Colorectal Cancer)의 AKT1, BRAF, KRAS, NRAS, PIK3CA, PTEN, 또는 SMAD4 유전자의 돌연변이, 위장관 기질 종양(Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST))의 BRAF, KIT, 또는 PDGFRA 유전자의 돌연변이, 위암(Gastric Cancer)의 ERBB2 유전자의 돌연변이, 교종(Glioma)의 BRAF, IDH1, 또는 IDH2 유전자의 돌연변이, 염증성 근섬유아세포종(Inflammatory Myofibroblastic Tumor)의 ALK 유전자의 돌연변이, 폐암(Lung Cancer)의 AKT1, ALK, BRAF, DDR2, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR3, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, NTRK1, PIK3CA, PTEN, RET, RICTOR, 또는 ROS1 유전자의 돌연변이, 수모세포종(Medulloblastoma)의 SMO 유전자의 돌연변이, 흑색종(Melanoma)의 BRAF, CTNNB1, GNA11, GNAQ, KIT, MAP2K1, NF1, 또는 NRAS 유전자의 돌연변이, 골수이형성 증후군(Myelodysplastic Syndromes)의 ASXL1, BCOR, DNMT3A, ETV6, EZH2, NF1, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, TET2, TP53, U2AF1 또는 ZRSR2 유전자의 돌연변이, 신경아세포종(Neuroblastoma)의 ALK 유전자의 돌연변이, 난소암(Ovarian Cancer)의 BRAF, KRAS, PIK3CA, 또는 PTEN 유전자의 돌연변이, 횡문근육종(Rhabdomyosarcoma)의 ALK 유전자 돌연변이, 흉선암(Thymic Malignancies)의 KIT 유전자 돌연변이, 및 갑상선암(Thyroid Cancer)의 BRAF, HRAS, KRAS, NRAS, 또는 RET 유전자의 돌연변이.
- [31] 본 발명으로 검출될 수 있는 돌연변이 유전자는 암과 관련된 돌연변이 유전자에 한정되지 않으며, 그 외에 다른 선천적 또는 후천적 질환 또는 기형과 관련된 것도 임의의 돌연변이 유전자가 될 수 있다.

- [32] 본 발명으로 검출될 수 있는 돌연변이 유전자는 정상 유전자와 1개 이상의 염기가 치환, 결실 또는 부가된 것인 임의의 돌연변이 유전자가 될 수 있다.
- [33] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 돌연변이 유전자는 2 이상의 염기가 연속적 또는 불연속적으로 치환, 결실 또는 부가된 돌연변이 유전자일 수 있다.
- [34] 본 발명의 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트의 제 1 표적 돌연변이 유전자 결합 부위 및 제 2 표적 돌연변이 유전자 결합 부위는 돌연변이 유전자에만 상보적으로 결합하고 정상 유전자에는 결합하지 않도록 디자인할 수 있다.
- [35] 본 발명의 돌연변이 유전자는, 예를 들어 EGFR(epidermal growth factor receptor) 유전자의 돌연변이가 될 수 있다. 예컨대 상기 돌연변이 유전자는 EGFR 엑손 19번 결실(이하 'EGFR 19del')이 일어난 유전자가 될 수 있다.
- [36] EGFR 19del은 EGFR 유전자의 엑손 19에 있어서 수 개 내지 십 수개의 염기가 연속해서 결실된 것으로서, 복수의 변이형이 알려져 있다. EGFR 19del의 변이형에 대하여 하기 표 1에 예시적으로 나타내었다. 하기 표에서, '-'는 결실부를 의미하고, 소문자는 변이부를 의미하며, '야생형'은 결실이 일어나지 않은 정상 EGFR 엑손 19 부분의 유전자를 의미한다. 국내공개특허 제10-2012-0125164호에는 EGFR 엑손 19 다형에 대해 다양하게 기재되어 있으며, 그 외 다수의 문헌에 EGFR 엑손 19 다형에 대해 보고되어 있다. 그러나 EGFR 19del은 하기 표 1에 기술한 것에 제한되지 않는다.
- [37] [표 1]

[38]

변이형	염기서열 (5'→3')
야생형(wild) (서열번호 4)	AAATTCCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCG AAAGCCAACAAGG
서열번호 5	AAATTCCCG-----GGAATTAAGAGAAG----- ---CCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAA-----AACATCTCCGAAAGCCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAAG-----ACATCTCCGAAAGCCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAAG-----CAACATCTCCGAAAGCCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAAGGAAT-----CTCCGAAAGCCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAAGGAA-----CATCTCCGAAAGCCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAAGGAA-----CATCTCCGAAAGCCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAAGGAA-----CCGAAAGCCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAAG-----ACATCTCCGAAAGCCAACAAGG
	A A A T T C C C G T C G C T A T C A A G G A A T ----- CATCTCCGAAAGCCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAAGGAA-----CaGAAAGCCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAAGG-----tATCTCCGAAAGCCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAAGGt-----TCCGAAAGCCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAA-----AatTCCGAAAGCCAACAAGG
	AAATTCCCGTCGCTATCAAGGAA-----CAA-----CCGAAAGCCAACAAGG

[39] 상기 EGFR 19del은 비소세포 폐암(Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) 등의 폐암에서 흔하게 일어나는 돌연변이이며, 그 중에서 조직학적으로 선암의 경우에 많이 관찰된다. EGFR 19del이 발생했는지 여부는 폐암을 확인하는데 사용될 수 있다. 또한 EGFR 19del이 발생한 폐암 환자를 치료하는데 사용될 수 있는 표적 항암제로서 이레사(성분명: 게피티닙), 타세마(성분명: 엘로티닙), 지오텐(성분명: 아파티닙) 등이 시판되고 있고, EGFR 19del이 발생한 폐암에 대한 다수의 표적항암제가 현재 개발 또는 임상실험 중에 있다. EGFR 19del이 없는 폐암 환자에게 이러한 표적 항암제를 처방하는 경우, 초기에는 반응이 있지만 점차 항암 효과가 기대만큼 나타나지 않는 경우가 빈번하다. 그렇게 되면 환자의 경제적 부담이 커질 뿐 아니라 다른 적절한 항암제로 치료될 기회를 놓치게 되어 치료 예후가 나빠질 수 있다.

[40] 본 발명의 미세 유동 장치를 이용하면, 다양한 변이형의 EGFR 19del이 발생한 돌연변이 유전자를 신속하고 정확하게 검출할 수 있으므로, 폐암 확인에 이용할 수 있고, 또한 적절한 항암제를 선택할 수 있게 하여 폐암 환자의 치료 계획을 수립하는 데 결정적인 도움이 될 수 있다.

- [41] 본 발명은 다음 단계를 포함하는 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치를 제조하는 방법을 제공한다.
- [42] 1) 기관, 상기 기관 상에 형성된 유입구, 상기 유입구와 연결되어 유입된 시료용액을 수용하는 제 1 유로, 상기 제 1 유로와 연결된 제 2 유로, 상기 제 2 유로와 연결된 배출구를 포함하는 미세 유동 장치를 제공하는 단계;
- [43] 2) 상기 미세 유동 장치의 제 2 유로 표면을 코팅하는 단계;
- [44] 3) 상기 코팅 상에 프라이머를 고정시키는 단계; 및
- [45] 4) 상기 고정된 프라이머에 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트를 결합시키는 단계.
- [46] 또한 본 발명은 다음 단계를 포함하는 상기 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치를 이용하여 표적 돌연변이 유전자를 검출하는 방법을 제공한다.
- [47] a) 상기 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치를 제공하는 단계;
- [48] b) 시료 용액을 상기 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치의 유입구로 주입하는 단계; 및
- [49] c) 상기 미세 유동 장치의 제 2 유로에 리가아제를 첨가하는 단계;
- [50] d) 상기 미세 유동 장치의 제 1 유로에 dNTP 및 등온 핵산 중합효소를 첨가하는 단계.
- [51] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 c) 단계와 d) 단계는 동시에 수행될 수도 있고(즉, 라이게이션과 회전환 증폭 반응이 동시에 일어나도록 함) 또는 c) 단계 후 d) 단계가 수행되도록(즉, 라이게이션 후 회전환 증폭 반응이 일어나도록 함) 할 수도 있다. c) 단계와 d) 단계를 동시 또는 각각 일어나도록 하는 것은 검출하고자 하는 표적 물질의 수 및 종류 등에 따라 결정될 수 있다.
- [52] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 방법은
- [53] e) 상기 미세 유동 장치의 유입구에 염색 시약, 고염 용액 또는 형광 시약을 주입하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [54] 본 발명의 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치는 사람 및 동물에서 발생하는 다양한 돌연변이 유전자의 검출에 이용할 수 있다. 상기 동물은 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 어류 등을 모두 포함한다.
- [55] 본 발명은 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치;
- [56] dNTP;
- [57] 리가아제;
- [58] 등온 핵산 중합효소; 및
- [59] 추가 프라이머를 포함하는, 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치 키트를 제공한다.
- [60] 상기 미세 유동 장치는
- [61] 기관;
- [62] 상기 기관 상에 형성된 시료용액이 외부로부터 유입되는 유입구;
- [63] 상기 유입구와 연결되어 유입된 시료용액을 수용하는 제 1 유로;

- [64] 상기 제 1 유로와 연결된 제 2 유로;
- [65] 상기 제 2 유로와 연결된 배출구를 포함하는 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치로서,
- [66] 상기 제 2 유로 표면은 코팅되어 있고;
- [67] 상기 코팅 상에 프라이머가 고정되고;
- [68] 상기 고정된 프라이머에는 표적 유전자 검출용 템플레이트가 결합되어 있으며,
- [69] 상기 표적 유전자 검출용 템플레이트는 상기 프라이머에 상보적으로 결합하는 프라이머 결합부, 상기 프라이머 결합부의 일 말단에 결합된 제 1 템플레이트 내 상보적인 결합 부위-제 1 표적 유전자 결합 부위, 및 상기 프라이머 결합부의 다른 말단에 결합된 제 2 템플레이트 내 상보적인 결합 부위-제 2 표적 유전자 결합 부위를 포함하는, 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치이며, 상기 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치의 구체적인 구성 및 특징은 출원번호 제10-2015-0151941호(발명의 명칭: 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치, 이의 제조방법 및 이를 이용한 검출 방법)에 기재된 바와 같다.
- [70] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 추가 프라이머(additional primer)는 상기 표적 유전자 검출용 템플레이트의 프라이머 결합부의 전체 서열, 또는 일부 서열일 수 있고, 예를 들어 5 내지 50개, 바람직하게는 10 내지 25개, 보다 바람직하게는 15 내지 22개 염기 길이의 일부 서열일 수 있다.
- [71] 예컨대 본 발명의 표적 유전자 검출용 템플레이트의 프라이머 결합부가 서열번호 2(5'-TA GCA TGC TAG TAT CGA CGT-3')인 경우, 추가 프라이머 서열은 상기 서열과 동일한 서열, 또는 상기 서열의 일부에 해당하는 서열이 될 수 있으며, 상기 서열의 일부에 해당하는 서열인 경우 바람직하게는 10 내지 25개 염기로 이루어진 서열, 예컨대 서열번호 3(5' TGC TAG TAT C 3')이 될 수 있다.
- [72] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 리가아제는 DNA 리가아제, 예컨대 T7 리가아제, 또는 써클리가아제™(CircLigase™)일 수 있다. 또한 상기 등은 핵산 중합효소는 phi 29 폴리머라제일 수 있다.
- [73] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 키트는 디티오프레이톨(DTT) 또는 파이로포스파타제(phyrophosphatase)를 더 포함할 수 있다.
- [74] 또한 상기 키트는 염색 시약, 고염 용액(high salt solution), 또는 형광 시약을 더 포함할 수 있다.
- [75] 또한 본 발명은 a) 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치를 제공하는 단계;
- [76] b) 시료 용액을 상기 미세 유동 장치의 유입구로 주입하는 단계; 및
- [77] c) 상기 미세 유동 장치의 제 2 유로에 dNTP, 리가아제, 등은 핵산 중합효소, 및 추가 프라이머를 첨가하는 단계를 포함하는, 미세 유동 장치를 이용하여 표적 유전자를 검출하는 방법을 제공한다.
- [78] 상기 표적 유전자 검출방법은 추가 프라이머를 첨가하여 회전환 증폭되는 서열 중간 중간에 추가 프라이머가 결합되어 2차 증폭이 일어남으로써 더욱 빠르게

많은 양으로 템플레이트의 증폭이 일어난다. 즉, 추가 프라이머를 첨가함으로써 핵산 덩어리가 증폭되는 시간이 크게 단축되어 훨씬 더 빨리 검출될 수 있고, 또한 적은 양의 표적 유전자가 시료에 포함되어 있는 경우, 또는 시료의 양 자체가 적은 경우에도 추가 프라이머에 의한 2차 증폭을 통해 증폭 사이트를 증가시킴으로써 템플레이트 증폭이 많이 일어나 큰 핵산 덩어리를 형성할 수 있으므로 검출의 정확도가 높아진다.

- [79] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 표적 유전자 검출 방법은 추가 프라이머를 첨가함으로써 2차 증폭(추가 증폭)을 통해 생성된 딸가닥(daughter strand)이 1차 증폭을 통해 생성된 모가닥(mother strand)과 상보적인 결합을 하여 더욱 빠르고 견고하게 DNA 하이드로젤을 형성하여 기존의 검출 방법에 비해 검출 효율이 개선되었다.
- [80] 상기 추가 프라이머를 포함하는 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치 키트를 이용하여 표적 유전자를 검출하는 방법은 동물, 식물, 세균, 바이러스, 진균, 환경 등 모든 기원(origin)에서 유래될 수 있는 유전자의 검출에 적용할 수 있다.
- [81] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 검출하고자 하는 표적 유전자는 병원균 유전자 일 수 있다. 상기 표적 유전자로는 핵산 서열을 아는 모든 병원균을 대상으로 할 수 있다. 구체적으로, 상기 병원균은 조류독감, 사스(SARS), 대장균 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7), 결핵(*Mycobacterium tuberculosis*), 탄저병(*Bacillus anthracis*), 폐렴(*Streptococcus pneumonia*), 말라리아(*Plasmodium*), 살모넬라(*Salmonella*), 간염(Hepatitis A,B,C,D 및 E virus), 야토병균(*Francisella tularensis*), 페스트균(*Yersinia pestis*), 에르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 및 출혈열(*Ebola virus*), 메르스 코로나 바이러스(MERS-Cov virus)의 검출에 유용하다. 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 병원균은 폐렴상구균, 장내구균, 포도상구균, 열대열원충 및 제 3세계에서의 결핵 또는 말라리아 박테리아와 같은 항생제 저항을 갖는 병원균의 검출에도 유용하다.
- [82] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 상기 검출하고자 하는 표적 유전자는 돌연변이 유전자 일 수 있다. 구체적으로, 상기 돌연변이 유전자는 암에서 나타나는 암 특이적인 돌연변이 유전자가 될 수 있다. 암 특이적인 돌연변이 유전자는 당업계에서 알려진 임의의 암 특이적인 돌연변이 유전자 일 수 있으며, 구체적인 암 특이적 돌연변이 유전자는 상기 기재한 바와 같다. 보다 구체적으로, 폐암 특이적 돌연변이 유전자 일 수 있고, 예컨대 EGFR 엑손 19번 결실이 일어난 유전자일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [83] 본 발명은 핵산 증폭을 위하여 온도를 변화시킬 필요가 없고, 외부의 동력 공급이 없어도 표적 돌연변이 유전자를 검출할 수 있다. 따라서 복잡한 장비를 수반할 필요가 없으며, 간단하고 저렴하게 제조가 가능하고, 조작이 간편하며, 휴대가 용이하다. 또한 다양한 돌연변이 유전자의 검출에 이용할 수 있고, 2

이상의 돌연변이 유전자를 동시에 검출하는데 이용할 수 있다.

- [84] 또한 본 발명의 추가 프라이머를 포함하는 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치 키트; 및 이를 이용한 검출 방법을 이용하면 기존의 표적 물질 검출용 미세 유동 장치의 검출 소요 시간을 크게 단축시키고 검출의 정확성을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [85] 도 1은 본 발명의 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치를 이용하여 서열번호 5의 EGFR 엑손 19 결실 돌연변이가 발생한 유전자를 검출한 결과를 형광으로 확인한 도이다.
- [86] 도 2는 추가 프라이머가 첨가됨으로써 2차 회전환 증폭이 일어나 템플레이트의 증폭이 더욱 빠르고 많이 될 수 있음을 보여주는 모식도이다.
- [87] 도 3은 동일한 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치를 사용하여, 본 발명자들이 기존에 개발한 방법(DhITACT(DNA Hydrogel Formation by Isothermal Amplification of Complementary Target in Fluidic Channels)로 명명)에 의해 표적 유전자를 검출한 결과((a) 및 (c))와 이번에 개발한 추가 프라이머를 첨가한 방법(DhITACT-TR)에 의해 표적 유전자를 검출한 결과((b) 및 (d))를 각각 보여주는 도이다.
- [88] 도 4는 DhITACT를 통해 형성된 표적 메르스 코로나바이러스 유전자 하이드로겔의 원자간력현미경(Atomic Force Microscope; AFM) 이미지를 나타낸 도이다.
- [89] 도 5는 DhITACT-TR를 통해 형성된 표적 메르스 코로나바이러스 유전자 하이드로겔의 원자간력현미경(Atomic Force Microscope; AFM) 이미지를 나타낸 도이다.
- [90] 도 6은 DhITACT 및 DhITACT-TR를 통해 형성된 표적 메르스 코로나바이러스 유전자 하이드로겔의 리올로지 측정 결과를 나타낸 도이다.
- [91] 도 7은 추가 프라이머를 첨가한 본 발명의 표적 유전자 검출 방법에 의해 서열번호 5의 EGFR 엑손 19 결실 돌연변이가 발생한 유전자를 검출한 결과를 형광으로 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [92] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 도면을 참조하여 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 설명은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 설명에 한정되는 것은 아니며 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 또한, 도면들에 있어서, 구성요소의 폭, 길이, 두께 등은 편의를 위하여 과장되어 표현될 수도 있다. 명세서 전체에 걸쳐서 동일한 참조번호들은 동일한 구성요소들을 나타낸다. 또한, 일 구성요소가 다른 구성요소 위에 있다고 할 때, 이는 다른 구성요소 바로 위에 있는 경우 뿐 아니라, 그 중간에 또 다른 구성요소가 있는 경우도 포함한다.
- [93] 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치

- [94] 본 발명의 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치의 기본 구조, 제조 방법, 및 이를 이용한 표적 돌연변이 유전자 검출 방법은 출원번호 제10-2015-0151941호(발명의 명칭: 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치, 이의 제조방법 및 이를 이용한 검출 방법)에 기재된 바와 같다.
- [95] 본 발명의 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치에 의해 검출될 수 있는 표적 돌연변이 유전자의 종류에는 제한이 없으며, 정상 유전자와 1개 이상의 염기 차이가 있는 임의의 돌연변이 유전자가 될 수 있다. 본 발명으로 검출될 수 있는 돌연변이 유전자는 선천적 또는 후천적 질환 또는 기형과 관련된 임의의 돌연변이 유전자가 될 수 있다.
- [96] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 돌연변이 유전자는 2 이상의 유전자가 연속적 또는 불연속적으로 치환 또는 결실된 돌연변이 유전자일 수 있다.
- [97] 예를 들어, 상기 돌연변이 유전자는 EGFR 19del의 일종인 서열번호 5로 기재되는 유전자가 될 수 있다. 상기 돌연변이 유전자를 정상 유전자와 비교하면 하기 표 2와 같다.

[98] **[표 2]**

변이형	염기서열 (5'→3')
야생형(wild) (서열번호 4)	AAATTC CCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCG AAAGCCAACAAGG
서열번호 5	AAATTC CCCG -----GGAATTAAAGAGAAG----- ---CCAACAAGG

- [100] 이 경우 본 발명의 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트를 하기와 같이 디자인할 수 있다(서열번호 6).
- [101] 5'- / 5Phos/ **TCC CGG GAA TTT A ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG G TA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATT CCT TGT TGG CTT CTC TTA AT -3'**
- [102] 상기 서열에서, 진한 글씨로 표시한 제 1 표적 돌연변이 유전자 결합 부위 및 제 2 표적 돌연변이 유전자 결합 부위는 각각 서열번호 5의 돌연변이 유전자에서 'AAATTC~~CCCGGGA~~' 및 'ATTAAGAGAAGCCAACAAGG'에 상보적으로 결합한다. 즉, 표적 돌연변이 유전자 결합 부위가 돌연변이 유전자에만 상보적으로 결합하도록 템플레이트를 디자인할 수 있다.
- [103] 상기 진한 회색으로 표시한 부분은 '프라이머 결합부'로서, 서열번호 1(5'-Thiol-AAA AAA AAA GGG ACG TCG ATA CTA GCA TGC TA-3')로 표시되는 프라이머와 상보적으로 결합하도록 제조되었다(서열번호 2). 또한 상기 연한 회색으로 표시한 부분은 템플레이트 내 서로 상보적으로 결합하는 부분(제 1 템플레이트 내 상보적인 결합 부위 및 제 2 템플레이트 내 상보적인 결합 부위)이다.
- [104] 표적 물질 검출용 미세 유동 장치의 검출 효율을 개선하는 방법
- [105] 본 발명자들이 발명한 표적 물질 검출용 미세 유동 장치, 즉 표적 유전자 검출용

미세 유동 장치를 이용하여 표적 유전자를 검출하는 방법은, 출원번호 제10-2015-0151941호(발명의 명칭: 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치, 이의 제조방법 및 이를 이용한 검출 방법)에 기재된 바와 기본적으로 동일하나, 회전환 증폭을 위해 dNTP, 리가아제, 등은 핵산 중합효소 등을 첨가할 때 추가 프라이머(additional primer)도 첨가한다는 차이점이 있다.

[106] 상기 추가 프라이머(additional primer)는 미세 유동 장치에 사용되는 표적 유전자 검출용 템플레이트의 프라이머 결합부의 전체 서열 또는 일부 서열이 될 수 있으며, 예컨대 10 내지 25개 염기 길이의 일부 서열일 수 있다.

[107] 도 2의 보식도에서 상단의 2개 도는 기존 출원의 방법에서 회전환 증폭이 일어나는 과정을 나타낸 것이며, 하단의 도는 추가 프라이머를 첨가한 경우에 회전환 증폭되는 서열 중간 중간에 추가 프라이머가 결합되어 2차 증폭이 일어남으로써 더욱 빠르게 많은 양으로 템플레이트의 증폭이 일어나는 과정을 나타낸 것이다. 즉, 추가 프라이머를 첨가함으로써 핵산 덩어리가 증폭되는 시간이 크게 단축되어 훨씬 더 빨리 검출될 수 있고, 또한 적은 양의 표적 물질이 시료에 포함되어 있는 경우, 또는 시료의 양 자체가 적은 경우에도 템플레이트 증폭이 많이 일어나 큰 핵산 덩어리를 형성할 수 있으므로 검출의 정확도가 높아진다.

[108] 실시예

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

[110] 실시예 1. 표적 유전자(암 돌연변이 유전자) 검출용 미세 유동장치를 이용한 EGFR 19del 검출

[111] **1-1. EGFR 19del 검출용 미세 유동 장치의 제조**

[112] ibidi사에서 제조한 1 μ -Slide III ³ⁱⁿ¹uncoated Microscopy Chamber 제품을 구입하여 준비하였다.

[113] 제 2 유로의 코팅물질로서 5-하이드록시도파민 염산(5-hydroxydopamine HCl)을 사용하였다. 구체적으로, 5-하이드록시도파민 염산(Sigma Aldrich)을 1 mg/ml 농도로 10 mM Tris 완충액(1M UltraPure 1M Tris-HCl pH 8.0 / Invitrogen)에 녹였다. 그 후 pH를 8로 맞추어 코팅용 조성물을 제조하였다. 상기 코팅용 조성물로 상기 1 μ -Slide III ³ⁱⁿ¹uncoated Microscopy Chamber 제품의 각 제 2 유로를 채웠다. 2시간 후 DDW(Water Purification System / LABOGENE)로 세척(washing)하였다.

[114] 또한 상기 제 2 유로의 코팅 상에 부착시킬 프라이머를 준비하였다. 프라이머는 하기 서열을 갖는 Primer-5SS-polyA9 (BIONEER)를 구입하여 사용하였다. 하기 프라이머 서열의 5' 말단은 티올기가 결합되어 있다.

[115] 5'-Thiol-AAA AAA AAA GGG ACG TCG ATA CTA GCA TGC TA-3' (서열번호 1)

- [116] 상기 프라이머 100 pmol과 5 M DTT(DL-Dithiothreitol/Sigma Aldrich)를 준비한 후, 100 pmol의 프라이머에 5 M DTT 5 μ l를 첨가하고, 여기에 총 50 μ l가 되게 DDW(Water Purification System/LABOGENE)를 첨가하여 프라이머 조성물을 제조하였다. DTT에 의해 프라이머 내에 생성되었을 수 있는 이황화 결합이 끊어지도록 4시간 동안 방치한 후, 3K 아미콘 튜브(amicon tube)(Amicon Ultra Centrifugal Filters 3K / MILLIPORE)를 이용하여 132,000 rpm, 4 °C, 25분에서 1차 원심분리하고, 40 μ l DDW를 첨가하고 2차 원심분리하여 반응 후 남아있는 DTT를 완전히 제거하였다. 상기 DTT가 제거된 프라이머 조성물을 제 2 유로마다 5 μ l씩 넣고 2시간 동안 방치하여 프라이머가 제 2 유로의 코팅 상에 부착되도록 한 후, DDW(Water Purification System / LABOGENE)로 세척(washing) 하였다.
- [117] 또한 서열번호 5로 기재되는 EGFR 19del 검출용 템플레이트(서열번호 6)을 하기와 같이 제조하였다.
- [118] 100 μ M의 상기 EGFR 19del 검출용 템플레이트 0.2 μ l(=20 pmole)에 1X PBS(life technologies사의 gibco牌)를 첨가하여 5 μ l의 EGFR 19del 검출용 템플레이트 조성물을 제조하여 미세 유동 장치의 2개의 제 2 유로(중앙 및 위에서 보았을 때 좌측)에 각각 넣었다. 상기 EGFR 19del 검출용 템플레이트의 프라이머 결합부와 제 2 유로에 고정된 프라이머 간에 상보적 결합이 일어나도록 2시간 동안 방치한 후 DDW(Water Purification System / LABOGENE) 세척하였다. 한편 우측 유로에는 Nick(nick) 부분에 라이게이션이 이미 일어난 EGFR 19del 검출용 템플레이트를 넣었다(양성 대조군).
- [119] **1-2. EGFR 19del 검출**
- [120] 서열번호 5의 EGFR 19del 유전자를 포함하는 용액을 시료 용액으로서 준비하였다. 음성 대조군 용액으로는 서열번호 4의 EGFR 정상 유전자를 포함하는 용액을 준비하였다. 상기 시료용액을 중앙의 제2유로에, 음성 대조군 용액을 가장 왼쪽의 제2유로에 3.5 μ l씩 각각 유입시켰다. T7 리가아제 30 μ l, 100 mM DTT 0.2 μ l, DDW(Water Purification System/LABOGENE) 24.8 μ l로 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치의 제 2 유로를 채웠다. 제 2 유로 내 안의 수분이 날아가는 것을 방지하기 위해 파라 필름으로 밀봉한 플라스틱 용기 안에 넣었다. 플라스틱 안은 물에 적신 휴지와 30 °C 물로 채웠다. 그 후 무교반(non-shaking), 30 °C, 3시간 조건에 방치하여 EGFR 19del 검출용 템플레이트의 Nick(nick)의 라이게이션이 일어나도록 하였다.
- [121] 그 다음 25 mM dNTP 2 μ l, phi 29 폴리머라제(10 unit/ μ l) 50 μ l, 파이로포스파타제(pyrophosphatase) 1 μ l, 각 효소의 반응 완충액, 및 DDW의 혼합물 약 60 μ l를 주입하였다(유입구를 통하여 주입하여 제 1 유로를 따라 제 2 유로로 흘러들어가도록 하거나, 각각의 제 2 유로에 주입할 수도 있음). 제 2 유로 내 안의 수분이 날아가는 것을 방지하기 위해 파라 필름으로 밀봉한 플라스틱 용기 안에 넣었다. 플라스틱 안은 물에 적신 휴지와 30 °C 물로 채웠다. 그 후

무교반(non-shaking), 30 °C, 2시간 조건에 방치하여 EGFR 19del 검출용 템플레이트의 회전환 증폭 반응이 일어나도록 하였다.

- [122] 형광으로 확인한 결과, 도 1의 중앙 유로에서, EGFR 19del 검출용 템플레이트가 증폭되어 제 2 유로를 코팅한 하이드록시도파민 염산과 함께 엉겨 큰 하이드로겔 덩어리를 형성하여 제 2 유로의 배출구를 막음을 알 수 있었다. 양성 대조군인 우측 유로에서도 마찬가지로 제 2 유로의 배출구를 막음을 확인하였다. 반면 음성 대조군인 좌측 유로에서는 형광이 확인되지 않았다.

[123] 실시예 2. 미세 유동 장치의 검출 효율을 더욱 증가시키는 방법

- [124] 본 발명자들은 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치를 발명한 바 있다. 본 발명자들은 상기 미세유동장치의 검출 시간을 단축하고 정확도를 높이는 방법을 하기와 같이 발명하였다.

[125] **2-1. 표적 메르스(MERS) 유전자 검출**

- [126] 출원번호 제10-2015-0151941호의 실험예 5에 기재된 바와 같이 표적 메르스(MERS) 유전자 검출용 미세 유동 장치를 제조하였다. 상기 장치의 기본 구조는 상기 1-1에서 기재한 바와 같으며, 템플레이트 서열은 하기와 같다.

- [127] 5'- / 5Phos/ AGG GCA CAT CTC CGA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT ATA CCC -3'

- [128] 상기 템플레이트 메르스(MERS) 서열에서, 표적 메르스 코로나바이러스 유전자에 상보적인 부분을 굵은 글씨로, 템플레이트 내 서로 상보적인 부분을 연한 회색 바탕으로, 프라이머에 상보적으로 결합하는 부분을 진한 회색으로 표시하였다.

- [129] 또한 상기 템플레이트 서열의 제 1 표적 유전자 결합 부위 및 제 2 표적 유전자 결합 부위가 상보적으로 결합하는 표적 메르스 코로나바이러스 유전자 서열은 하기와 같다.

- [130] 5'-/CG GAG AUG UGC CCU GGG UAU/3Phos/-3' (서열번호 7)

- [131] 제조된 표적 메르스(MERS) 유전자 검출용 미세 유동 장치에, 1-2의 방법과 동일하게 상기 시료용액을 중앙의 제2유로에, 음성 대조군 용액을 가장 왼쪽의 제2유로에 3.5 μ l씩 각각 유입시켰다. T7 리가아제 30 μ l, 100 mM DTT 0.2 μ l, DDW(Water Purification System/LABOGENE) 24.8 μ l로 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치의 제 2 유로를 채웠다. 제 2 유로 내 안의 수분이 날아가는 것을 방지하기 위해 파라 필름으로 밀봉한 플라스틱 용기 안에 넣었다. 플라스틱 안은 물에 적신 휴지와 30 °C 물로 채웠다. 그 후 무교반(non-shaking), 30 °C, 3시간 조건에 방치하여 템플레이트의 닉(nick)의 라이게이션이 일어나도록 하였다.

- [132] 그 다음 25 mM dNTP 2 μ l, phi 29 폴리머라제(10 unit/ μ l) 50 μ l, 파이로포스파타제(pyrophosphatase) 1 μ l, 각 효소의 반응 완충액, 및 DDW의 혼합물 약 60 μ l를 주입하였다(유입구를 통하여 주입하여 제 1 유로를 따라 제 2 유로로 흘러들어가도록 하거나, 각각의 제 2 유로에 주입할 수도 있음). 제 2 유로

내 안의 수분이 날아가는 것을 방지하기 위해 파라 필름으로 밀봉한 플라스틱 용기 안에 넣었다. 플라스틱 안은 물에 적신 휴지와 30 °C 물로 채웠다. 그 후 무교반(non-shaking), 30 °C, 2시간 조건에 방치하여 템플레이트의 회전환 증폭 반응이 일어나도록 하였다. 30분 경과 후에 형광으로 관찰하였을 때 템플레이트가 증폭된 것을 관찰할 수 없었다(도 3의 (a)). 약 2시간 후에 템플레이트가 증폭되어 하이드로겔 덩어리를 형성되었다.

[133] 그런데 이와 동일하게 표적 메르스(MERS) 유전자 검출용 미세 유동 장치를 준비하고 MERS 바이러스 유전자가 포함된 시료 용액을 주입하고 라이게이션 반응 및 회전환 증폭 반응이 차례로 일어나도록 하였다. 이 때 회전환 증폭 반응 시 '추가 프라이머'(additional primer, 짧은 DNA 서열로 이루어짐)를 더 첨가하였다. 첨가된 추가 프라이머 서열은 하기와 같다.

[134] 5' TGC TAG TAT C 3'(서열번호 3)

[135] 30분 후 형광으로 관찰하였을 때, 템플레이트가 증폭되어 하이드로겔 덩어리를 형성하는 것을 관찰할 수 있었다(도 3의 (b)). 즉, 추가 프라이머가 첨가된 경우 증폭에 소요되는 시간이 크게 단축되었다.

[136] 또한 추가 프라이머를 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우 각각 4시간 후에 염색약을 주입하여 육안으로 확인한 결과, 추가 프라이머를 첨가하지 않은 경우에는 템플레이트 증폭이 일어난 경우(중앙 유로)를 음성 대조군(좌측 유로)과 구별할 수 없었으나, 추가 프라이머를 첨가한 경우에는 음성 대조군에서만 제 2 유로가 막히지 않고 나머지 2개 유로에서는 유로가 막힌 것을 명확히 확인할 수 있어, 템플레이트 증폭이 일어난 경우와 음성 대조군을 구별할 수 있었다(도 3의 (c) 및 (d)). 즉, 추가 프라이머가 첨가된 경우 적은 양의 표적 메르스 바이러스 유전자가 시료 용액 내에 존재하는 경우에도 높은 감도로 검출이 가능하여 정확도가 증가하였다.

[137] **2-2. 추가 프라이머 첨가에 의한 검출 효율 증가 확인**

[138] 본 발명자들은 또한 추가 프라이머를 첨가함으로써 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치의 개선된 검출효율을 확인하기 위하여, 추가적으로 원자간력현미경(Atomic Force Microscope; AFM)을 이용한 하이드로겔의 공극 크기(pore size) 및 리올로지(Rheology)를 측정하였다.

[139] 원자간현미경(NX10, Park Systems, 대한민국)를 이용하여 기존 장치로 형성된 상기 실시예 1의 표적 메르스 유전자 하이드로겔 및 추가 프라이머를 첨가하여 증폭시킨 상기 실시예 2-1의 표적 메르스 유전자 하이드로겔 덩어리의 공극 크기를 측정하였으며, 그 결과를 도 4 및 도 5에 나타내었다.

[140] 도 4 및 도 5에서 확인되는 바와 같이, 기존 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치(DhITACT)를 이용하여 증폭된 하이드로겔의 평균 공극 크기는 56 nm이었으나(도 4), 추가 프라이머를 첨가한 경우(DhITACT-TR) 평균 공극 크기는 16 nm 로(도 5), 그 밀도가 약 3.5배 증가한 것을 확인하였다. 즉, 추가 프라이머를 첨가함으로써 보다 견고한 DNA 하이드로겔 덩어리를 형성하여

검출 효율이 개선되었음을 확인하였다.

- [141] 또한, DhITACT 및 DhITACT-TR을 통해 형성된 표적 메르스 유전자 하이드로겔의 점탄성을 점탄성 측정기(parallel rheometer, Kinexus, Malvern, 영국)를 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [142] 도 6에서 확인되는 바와 같이, DhITACT-TR을 통해 형성된 메르스 유전자 하이드로겔(TR)이 DhITACT을 통해 형성된 하이드로겔(D)에 비해 더욱 점탄성이 높은 겔을 형성하였으며, 저장 탄성율(G') 또한 높았다. 즉, 추가 프라이머를 첨가함으로써 더욱 강한 탄성을 갖는 하이드로겔을 형성하여 미세 유동 장치의 검출 효율이 증가되었음을 확인하였다.
- [143] **2-3. 표적 EGFR 19del 돌연변이 유전자 검출**
- [144] 본 발명자들은 또한 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치를 이용하여 추가 프라이머를 첨가함으로써 증가된 검출 효율을 확인하였다. 상기 1-1에 기재한 바와 같이, EGFR 19del 검출용 미세 유동 장치를 제조하였다. 구체적인 템플레이트 서열(서열번호 6)은 하기와 같으며, 서열에 표시한 의미는 상기 메르스 템플레이트와 같다.
- [145] 5'- / 5Phos/ **TCC CGG GAA TTT A ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG G TA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATT CCT TGT TGG CTT CTC TTA AT -3'**
- [146] 또한 상기 템플레이트 서열의 제 1 표적 유전자 결합 부위 및 제 2 표적 유전자 결합 부위가 상보적으로 결합하는 표적 EGFR 19del 유전자 서열은 하기와 같다.
- [147] 5'-/AAA TTC CCG GGA ATT AAG AGA AGC CAA CAA GG /3Phos/-3' (서열번호 4)
- [148] 제조된 표적 EGFR 19del 유전자 검출용 미세 유동 장치를 이용하여, 상기 메르스 검출용 미세 유동 장치를 이용한 방법과 동일하게 EGFR 19del 유전자의 증폭을 수행하였으며, 상기 서열번호 3의 추가 프라이머를 첨가하였다.
- [149] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 템플레이트가 증폭되어 반응 후 30분만에 하이드로겔 덩어리가 형성되는 것을 육안으로 관찰할 수 있었으며, 추가 프라이머가 첨가됨으로써 증폭에 소요되는 시간이 크게 단축되었다. 즉, 추가 프라이머를 첨가하지 않은 상기 실시예 1-2의 표적 EGFR 19del 유전자의 검출은 회전환 증폭 반응 후 2시간이 경과하여 하이드로겔을 육안으로 확인할 수 있었으나(도 1), 추가 프라이머를 첨가한 경우, EGFR 19del 돌연변이 유전자의 증폭에 소요되는 시간이 크게 단축되었다. 따라서, 추가 프라이머가 첨가된 경우 적은 양의 표적 EGFR 19del 돌연변이 유전자가 시료 용액 내에 존재하는 경우에도 높은 감도로 검출이 가능하여 정확도가 증가함을 확인하였다.

청구범위

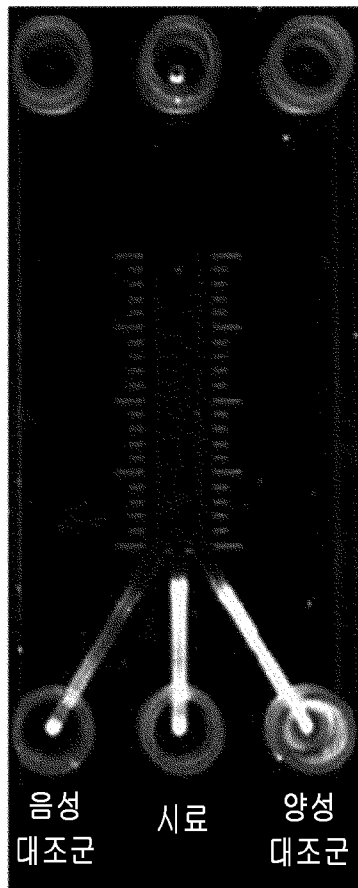
- [청구항 1] 기관;
 상기 기관 상에 형성된 시료용액이 외부로부터 유입되는 유입구;
 상기 유입구와 연결되어 유입된 시료용액을 수용하는 제 1 유로;
 상기 제 1 유로와 연결된 제 2 유로;
 상기 제 2 유로와 연결된 배출구를 포함하는 표적 돌연변이 유전자
 검출용 미세 유동 장치로서,
 상기 제 2 유로 표면은 코팅되어 있고;
 상기 코팅 상에 프라이머가 고정되고;
 상기 고정된 프라이머에는 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트가
 결합되어 있으며,
 상기 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트는 상기 프라이머에
 상보적으로 결합하는 프라이머 결합부, 상기 프라이머 결합부의 일
 말단에 결합된 제 1 템플레이트 내 상보적인 결합 부위-제 1 표적
 돌연변이 유전자 결합 부위, 및 상기 프라이머 결합부의 다른 말단에
 결합된 제 2 템플레이트 내 상보적인 결합 부위-제 2 표적 돌연변이
 유전자 결합 부위를 포함하는,
 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제 2 유로는 1 내지 20개인 표적 돌연변이 유전자
 검출용 미세 유동 장치.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 제 2 유로는 2 내지 20개이며, 제 1 유로의 말단에서
 각각의 제 2 유로가 분지되고,
 각각의 제 2 유로 상에 고정된 프라이머에 결합된 표적 돌연변이 유전자
 검출용 템플레이트는 서로 같거나 다른 돌연변이 유전자에 결합하는,
 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 돌연변이 유전자는 암 특이적인 돌연변이
 유전자인, 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 암 특이적인 돌연변이 유전자는 EGFR(epidermal
 growth factor receptor) 19번 엑손 결실이 일어난 유전자인, 돌연변이
 유전자 검출용 미세 유동 장치.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 EGFR 19번 엑손 결실이 일어난 유전자는 서열번호
 5로 기재되는 유전자인, 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트의 제 1
 표적 돌연변이 유전자 결합 부위 및 제 2 표적 돌연변이 유전자 결합
 부위는 돌연변이 유전자에만 상보적으로 결합하고 정상 유전자에는
 결합하지 않는, 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 돌연변이 유전자는 정상 유전자와 비교하여 1

이상의 염기가 치환, 결실 또는 부가된 것인, 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치.

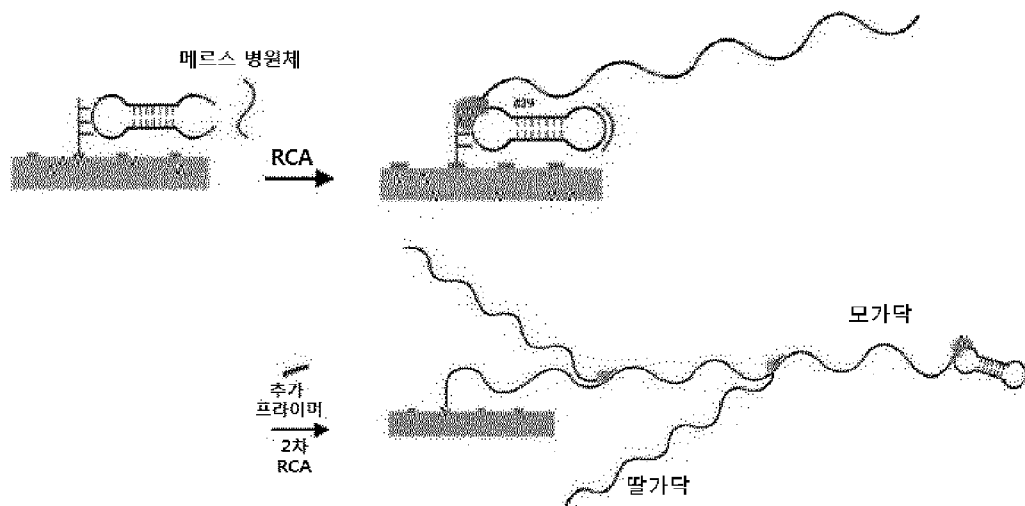
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 표적 돌연변이 유전자는 점 돌연변이를 포함하는 유전자이고, 상기 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트의 제 1 표적 돌연변이 유전자 결합 부위 또는 제 2 표적 돌연변이 유전자 결합 부위의 말단 염기가 상기 점 돌연변이가 일어난 염기에 상보적으로 결합하는 것인, 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치.
- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트는 서열번호 6으로 기재되는 것인, 표적 돌연변이 유전자 검출용 미세 유동 장치.
- [청구항 11] 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치;
dNTP;
리가아제;
등온 핵산 중합효소; 및
추가 프라이머를 포함하는, 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치 키트.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치는
기판;
상기 기판 상에 형성된 시료용액이 외부로부터 유입되는 유입구;
상기 유입구와 연결되어 유입된 시료용액을 수용하는 제 1 유로;
상기 제 1 유로와 연결된 제 2 유로;
상기 제 2 유로와 연결된 배출구를 포함하고;
상기 제 2 유로 표면은 코팅되어 있고;
상기 코팅 상에 프라이머가 고정되고;
상기 고정된 프라이머에는 표적 유전자 검출용 템플레이트가 결합되어 있으며,
상기 표적 유전자 검출용 템플레이트는 상기 프라이머에 상보적으로 결합하는 프라이머 결합부, 상기 프라이머 결합부의 일 말단에 결합된 제 1 템플레이트 내 상보적인 결합 부위-제 1 표적 유전자 결합 부위, 및 상기 프라이머 결합부의 다른 말단에 결합된 제 2 템플레이트 내 상보적인 결합 부위-제 2 표적 유전자 결합 부위를 포함하는 것인, 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치 키트.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 추가 프라이머는 상기 표적 물질 검출용 템플레이트의 프라이머 결합부의 전체 서열, 또는 10~25개 염기 길이의 일부 서열인, 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치 키트.
- [청구항 14] 제11항에 있어서,
상기 리가아제는 T7 리가아제 또는 씨클리가아제™(CircLigase™)인, 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치 키트.

- [청구항 15] 제11항에 있어서,
상기 등은 핵산 중합효소는 phi 29 폴리머라제인, 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치 키트.
- [청구항 16] 제11항에 있어서,
상기 키트는 디티오프레이톨(DTT) 또는
파이로포스파타제(phyrophosphatase)를 더 포함하는 것인, 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치 키트.
- [청구항 17] 제11항에 있어서,
상기 키트는 염색 시약, 고염 용액(high salt solution), 또는 형광 시약을 더 포함하는 것인, 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치 키트.
- [청구항 18] a) 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치를 제공하는 단계;
b) 시료 용액을 상기 미세 유동 장치의 유입구로 주입하는 단계; 및
c) 상기 미세 유동 장치의 제 2 유로에 dNTP, 리가아제, 등은 핵산 중합효소, 및 추가 프라이머를 첨가하는 단계를 포함하는, 표적 유전자 검출용 미세 유동 장치를 이용하여 표적 유전자를 검출하는 방법.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
상기 표적 유전자 검출방법은 추가 프라이머를 첨가함으로써 2차 증폭이 일어나는 것인, 표적 유전자를 검출하는 방법.
- [청구항 20] 제18항에 있어서,
상기 표적 유전자는 동물, 동물, 식물, 세균, 바이러스, 진균, 환경에서 유래된 것인, 표적 유전자를 검출하는 방법.
- [청구항 21] 제18항에 있어서,
상기 표적 유전자는 조류독감, 사스(SARS), 대장균 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7), 결핵(*Mycobacterium tuberculosis*), 탄저병(*Bacillus anthracis*), 폐렴(*Streptococcus pneumonia*), 말라리아(*Plasmodium*), 살모넬라(*Salmonella*), 간염(Hepatitis A, B, C, D 또는 E virus), 야토병균(*Francisella tularensis*), 페스트균(*Yersinia pestis*), 에르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 및 출혈열(*Ebola virus*), 및 메르스 코로나 바이러스(MERS-Cov virus)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상으로부터 유래된 표적 유전자인, 표적 유전자를 검출하는 방법.
- [청구항 22] 제18항에 있어서,
상기 표적 유전자는 돌연변이 유전자인, 표적 유전자를 검출하는 방법.
- [청구항 23] 제22항에 있어서,
상기 돌연변이 유전자는 EGFR 엑손 19번 결실이 일어난 유전자인, 표적 유전자를 검출하는 방법.

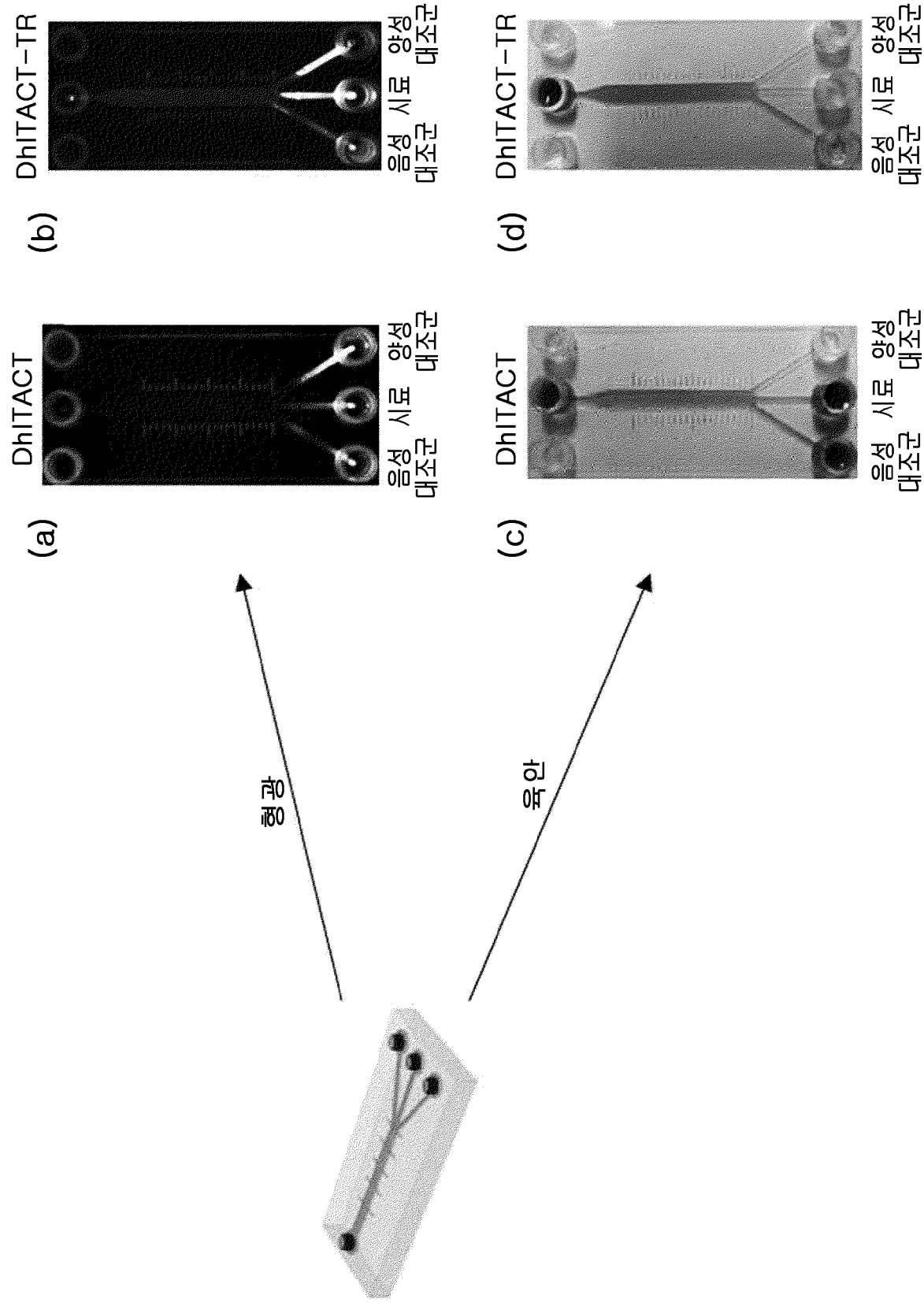
[도1]



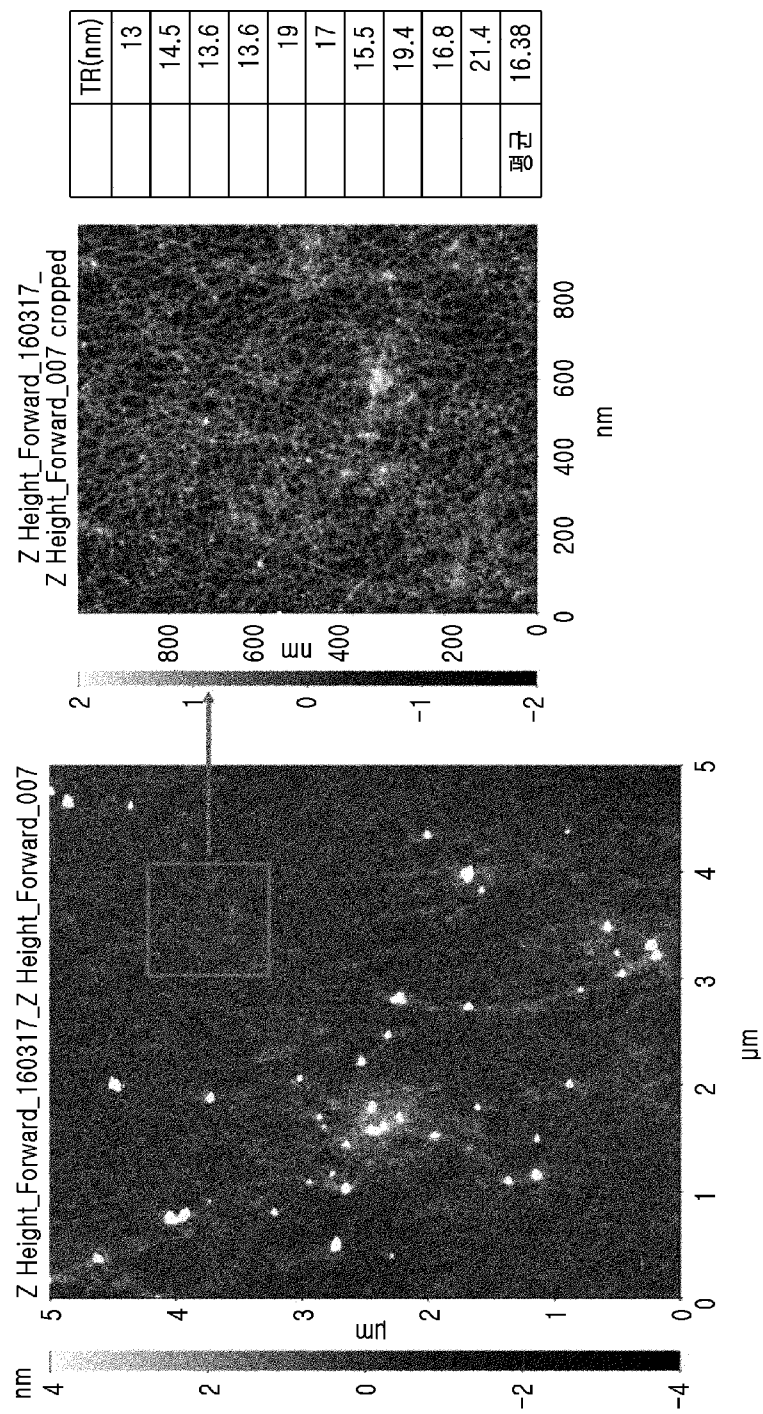
[도2]



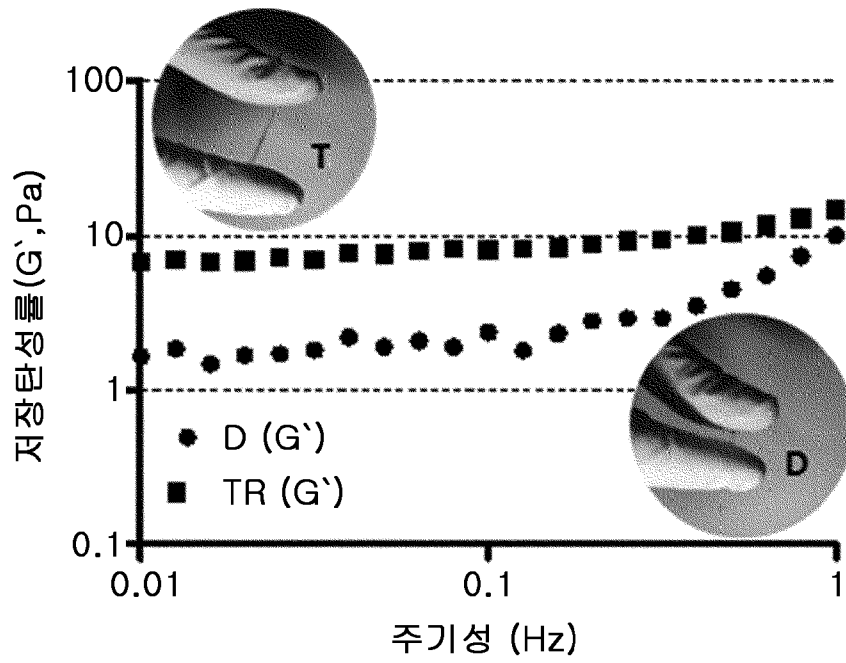
[도3]



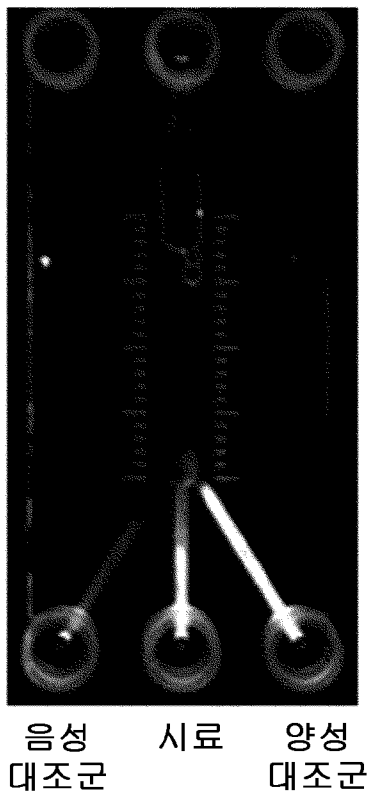
[도 5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000998

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

B01L 3/00(2006.01)i, C12Q 1/68(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)

B01L 3/00; C12N 1/18; C12P 19/34; C12N 15/10; C12N 15/11; C12Q 1/68

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: template for target mutant detection, rolling circle amplification, EGFR, dNTP, ligase, isothermal nucleic acid polymerase, primer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUHNEMUND, Malte et al., "Circle-to-circle Amplification on a Digital Microfluidic Chip for Amplified Single Molecule Detection", Lab on a Chip, 2014, vol. 14, pages 2983-2992 See abstract; page 2984, left column, paragraph [2]; page 2985, right column, paragraph [1]; page 2989, left column, paragraph [4]; page 2990, right column; page 2991, right column, paragraph [4]; and figure 1.	11,14-22
Y		23
A		1-10,12,13
Y	KR 10-2011-0098440 A (PANAGENE INC.) 01 September 2011 See abstract; and claims 1-3.	23
A	KR 10-2013-0135111 A (NANOBIOSYS INC.) 10 December 2013 See claims 1-12; paragraphs [0027], [0070]; and figures 1, 2.	1-23
A	ZHOU, Yuntao et al., "A Dumbbell Probe-mediated Rolling Circle Amplification Strategy for Highly Sensitive MicroRNA Detection", Nucleic Acids Research, 2010, vol. 38, no. 15, e156 (inner pages 1-5) See the entire document.	1-23
A	US 2001-0041340 A1 (KINGSMORE, Stephen et al.) 15 November 2001 See claims 1-3; and figure 1a.	1-23



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 04 MAY 2017 (04.05.2017)	Date of mailing of the international search report 04 MAY 2017 (04.05.2017)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000998

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	<p>KR 10-2016-0052400 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION et al.) 12 May 2016</p> <p>See claims 1-7; paragraphs [0023], [0024]; and figures 1-3.</p>	1-4, 7-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/000998

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0098440 A	01/09/2011	WO 2011-105732 A2 WO 2011-105732 A3	01/09/2011 12/01/2012
KR 10-2013-0135111 A	10/12/2013	WO 2013-180494 A1	05/12/2013
US 2001-0041340 A1	15/11/2001	AU 5332800 A JP 2004-520004 A US 6291187 B1 US 6670126 B2 WO 01-88190 A2 WO 2001-088190 A3	26/11/2001 08/07/2004 18/09/2001 30/12/2003 22/11/2001 19/02/2004
KR 10-2016-0052400 A	12/05/2016	WO 2016-068663 A1	06/05/2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**B01L 3/00(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i****B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

B01L 3/00; C12N 1/18; C12P 19/34; C12N 15/10; C12N 15/11; C12Q 1/68

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: 표적 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트, 회전환 증폭, EGFR, dNTP, 리가아제, 등은 핵산 중합효소, 프라이머

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KUHNEMUND, MALTE 등, "Circle-to-circle amplification on a digital microfluidic chip for amplified single molecule detection." Lab on a Chip, 2014, 제14권, 페이지 2983-2992 초록; 페이지 2984, 좌컬럼, 단락 2; 페이지 2985, 우컬럼, 단락 1; 페이지 2989, 좌컬럼, 단락 4; 페이지 2990, 우컬럼; 페이지 2991, 우컬럼, 단락 4; 및 도면 1 참조.	11,14-22
Y A		23 1-10,12,13
Y	KR 10-2011-0098440 A (주식회사 파나진) 2011.09.01 요약; 및 청구항 1-3 참조.	23
A	KR 10-2013-0135111 A (나노바이오시스 주식회사) 2013.12.10 청구항 1-12; 단락 [0027], [0070]; 및 도면 1, 2 참조.	1-23
A	ZHOU, YUNTAO 등, "A dumbbell probe-mediated rolling circle amplification strategy for highly sensitive microRNA detection." Nucleic Acids Research, 2010, 제38권, 제15호, e156 (내부 페이지 1-5) 전체 문헌 참조.	1-23
A	US 2001-0041340 A1 (KINGSMORE, STEPHEN 등) 2001.11.15 청구항 1-3; 및 도면 1a 참조.	1-23

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 05월 04일 (04.05.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 05월 04일 (04.05.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

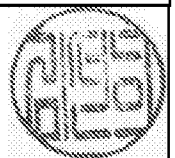
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김선희

전화번호 +82-42-481-5405



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KR 10-2016-0052400 A (이화여자대학교 산학협력단 등) 2016.05.12 청구항 1-7; 단락 [0023], [0024]; 및 도면 1-3 참조.	1-4, 7-9

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0098440 A	2011/09/01	WO 2011-105732 A2 WO 2011-105732 A3	2011/09/01 2012/01/12
KR 10-2013-0135111 A	2013/12/10	WO 2013-180494 A1	2013/12/05
US 2001-0041340 A1	2001/11/15	AU 5332800 A JP 2004-520004 A US 6291187 B1 US 6670126 B2 WO 01-88190 A2 WO 2001-088190 A3	2001/11/26 2004/07/08 2001/09/18 2003/12/30 2001/11/22 2004/02/19
KR 10-2016-0052400 A	2016/05/12	WO 2016-068663 A1	2016/05/06