

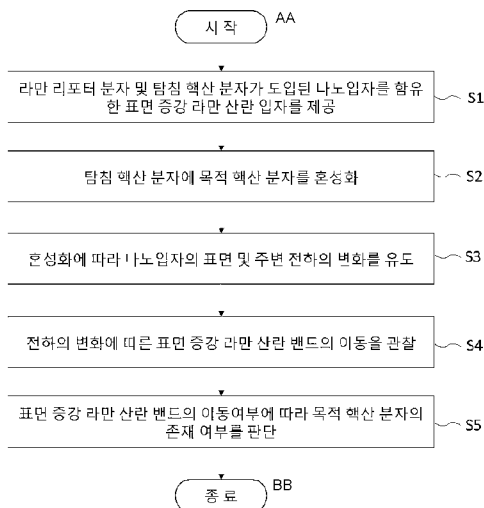


- (51) 국제특허분류: C12Q 1/68 (2006.01) G01N 21/65 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/007511
- (22) 국제출원일: 2016년 7월 11일 (11.07.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2015-0097534 2015년 7월 9일 (09.07.2015) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 정대홍 (JEONG, Dae Hong); 06090 서울시 강남구 학동로 68길 29, 114동 102호, Seoul (KR). 이윤식 (LEE, Yoon Sik); 13932 경기도 안양시 동안구 관평로 333, 10동 104호, Gyeonggi-do (KR). 이호영 (LEE, Ho Young); 06762 서울시 서초구 바우뫼로 7길 51, 104동 1201호, Seoul (KR). 이민우 (LEE, Min Woo); 08748 서울시 관악구 봉천로 41길 22-3, 501호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 광현규 (KWAK, Hyun Kyu) 등; 06236 서울시 강남구 테헤란로 22길 15 A&C 빌딩 4층, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING NUCLEIC ACID MOLECULE USING SURFACE ENHANCEMENT RAMAN SCATTERING PARTICLES

(54) 발명의 명칭 : 표면 증강 라만 산란 입자를 이용한 핵산 분자 검출 방법



(57) Abstract: Provided is a method for detecting a nucleic acid molecule, the method comprising the steps of: providing surface enhancement Raman scattering particles containing nanoparticles having a Raman reporter molecule and a probe nucleic acid molecule introduced thereto; hybridizing a target nucleic acid molecule with the probe nucleic acid molecule; inducing a change in charges on a surface of the nanoparticles and around the nanoparticles according to the hybridization; observing a shift of a surface enhancement Raman scattering band of the Raman reporter molecule according to the change in charges; and determining the presence of the target nucleic acid molecule according to whether the surface enhancement Raman scattering band is shifted.

(57) 요약서: 라만 리포터 분자 및 탐침 핵산 분자가 도입된 나노입자를 함유한 표면 증강 라만 산란 입자를 제공하는 단계; 상기 탐침 핵산 분자에 목적 핵산 분자를 혼성화하는 단계; 상기 혼성화에 따라 상기 나노입자의 표면 및 주변 전하의 변화가 유도되는 단계; 상기 전하의 변화에 따른 상기 라만 리포터 분자의 표면 증강 라만 산란 밴드의 이동을 관찰하는 단계; 및 상기 표면 증강 라만 산란 밴드의 이동 여부에 따라 목적 핵산 분자의 존재 여부를 판단하는 단계를 포함하는 핵산 분자의 검출방법이 제공된다.

- S1 ... Provide surface enhancement Raman scattering particles containing nanoparticles having Raman reporter molecule and probe nucleic acid molecule introduced thereto
- S2 ... Hybridize target nucleic acid molecule with probe nucleic acid molecule
- S3 ... Induce change in charges on surface of nanoparticles and around nanoparticles according to the hybridization
- S4 ... Observe shift of surface enhancement Raman scattering band according to change in charges
- S5 ... Determine presence of target nucleic acid molecule according to whether surface enhancement Raman scattering band is shifted
- AA ... Start
- BB ... End

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 표면 증강 라만 산란 입자를 이용한 핵산 분자 검출 방법

기술분야

- [1] 본 명세서에 개시된 기술은 핵산 분자 검출 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 표지 물질의 도입이 없이 간편하고 정확하게 핵산 분자를 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] DNA 검출 방법은 유전병 진단, 약물 스크리닝 및 유전자 프로파일링 분야에 있어 중요한 기술이다. 다양한 DNA 검출 방법 중 가장 보편적인 방법은 PCR 증폭 방법으로 많은 경우 가장 경쟁력있는 기술이지만 노이즈 신호가 함께 증폭되므로 극미량의 DNA 분석에 한계가 있다. 이에 대한 대안 기술로 사용되는 광학적 방법은 탐침 DNA에 표적 DNA가 상보적으로 결합하고 이를 확인하게 하는 형광 표지된 DNA를 사용하는 표지화 탐지(labeled detection) 방식을 사용한다. 광학 기반의 DNA 검출법은 타겟 DNA 혹은 상보결합을 할 수 있는 제3의 DNA에 특정 신호를 내는 물질을 도입하여 DNA 결합 유무를 확인하는 방식에 해당하는 것으로, 별도의 광신호 물질을 반드시 필요로 하는 단점이 있다. 광학 기반의 RNA 검출법 또한 동일한 단점을 갖는다.
- [3] 이에 보다 간편하고 효율적으로 DNA 또는 RNA와 같은 핵산을 검출할 수 있는 기술 개발이 요구된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 명세서에 개시된 기술은 유전병 진단, 약물 스크리닝 및 유전자 검사와 같은 응용분야에서 별도의 표지 물질 없이 DNA 또는 RNA와 같은 목적 핵산 분자를 용이하게 검출하는 방법을 제공하는 데 그 목적이 있다.

과제 해결 수단

- [5] 본 발명의 일 측면에 의하면, 라만 리포터 분자 및 탐침 핵산 분자가 도입된 나노입자를 함유한 표면 증강 라만 산란 입자를 제공하는 단계; 상기 탐침 핵산 분자에 목적 핵산 분자를 혼성화하는 단계; 상기 혼성화에 따라 상기 나노입자의 표면 및 주변 전하의 변화가 유도되는 단계; 상기 전하의 변화에 따른 상기 라만 리포터 분자의 표면 증강 라만 산란 밴드의 이동을 관찰하는 단계; 및 상기 표면 증강 라만 산란 밴드의 이동 여부에 따라 목적 핵산 분자의 존재 여부를 판단하는 단계를 포함하는 핵산 분자의 검출방법이 제공된다.
- [6] 일 구현예에서, 상기 라만 리포터 분자는 이소시아나이드 (-NC) 관능기 또는 시아나이드 (-CN) 관능기를 갖는 화합물을 적어도 포함할 수 있다.
- [7] 일 구현예에서, 상기 나노입자의 표면 및 주변 전하의 변화시 상기 나노입자의

제타전위가 높아질수록 상기 라만 리포터 분자의 라만 밴드가 낮은 에너지 방향으로 이동하고 상기 나노입자의 제타전위가 낮아질수록 상기 라만 리포터 분자의 라만 밴드가 높은 에너지 방향으로 이동할 수 있다.

[8] 일 구현예에서, 상기 탐침 핵산 분자에 상기 목적 핵산 분자가 혼성화될 경우, 상기 라만 리포터 분자의 라만 밴드가 높은 에너지 방향으로 이동할 수 있다.

[9] 일 구현예에서, 상기 나노입자가 지지체 비드 위에 탑재된 것일 수 있다. 상기 지지체 비드는 고분자 비드, 실리카 비드 또는 자성 물질이 포함된 실리카 비드인

발명의 효과

[10] 본 명세서에 개시된 기술은 목적 DNA (target DNA) 또는 목적 RNA (target RNA)의 결합을 나타내는 추가적인 광 표지 물질을 사용하지 않고 표면 증강 라만 산란(surface enhanced Raman spectroscopy, 이하 SERS라 한다.) 기반으로 핵산 분자를 검출할 수 있다.

[11] 그 결과 간편하면서 고감도의 라만 기반의 비표지 핵산 검출 방법을 제공할 뿐 아니라, 이를 통해 손쉬운 유전체 진단 시스템을 구축할 수 있으며 다양한 유전체 검출 분야에 신속하고 경제적인 방법으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[12] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 핵산 분자의 검출방법을 나타낸 공정흐름도이다.

[13] 도 2는 금 나노입자(AuNP)와 탐침자 DNA 간의 결합형태의 두 가지 구현예를 나타낸다.

[14] 도 3은 NC 관능기를 갖는 라만 리포터 분자가 도입에 따른 SERS 스펙트럼의 변화를 나타낸 도면이다.

[15] 도 4는 SERS 비드에 NC-SERS 나노입자를 탑재한 표면 증강 라만 산란 입자를 이용하여 목적 핵산 분자를 검출하는 과정의 일 구현예를 나타낸다.

[16] 도 5는 NC-SERS 입자에 사용된 범피형(bumpy) 금 나노입자의 합성과정의 개략도이다.

[17] 도 6은 합성한 범피형 금 나노입자의 투과전자현미경(TEM) 이미지 및 전자주사현미경(SEM) 이미지이다.

[18] 도 7은 합성한 범피형 금 나노입자의 UV/Vis 흡수 스펙트럼이다.

[19] 도 8은 범피형 금 나노입자(AuBP)와 구형 금 나노입자(AuNP)의 라만 스펙트럼 결과이다.

[20] 도 9는 표면 개질에 따른 범피형 금 나노입자의 제타 전위의 변화를 나타낸 결과이다.

[21] 도 10은 표면개질에 따른 범피형 금 나노입자 기반의 NC-SERS 탐침자의 SERS 신호의 이동을 나타낸 결과이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [22] 이하, 첨부 도면을 활용하여 본 명세서에 개시된 기술을 상세히 설명하고자 한다.
- [23] 본 명세서의 일 구현예에 따르면 핵산 분자의 검출방법이 제공된다. 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 핵산 분자의 검출방법을 나타낸 공정흐름도이다. 도 1을 참조하면, 단계 S1에서 라만 리포터 분자 및 탐침 핵산 분자가 도입된 나노입자를 함유한 표면 증강 라만 산란 입자를 제공한다. 단계 S2에서 상기 탐침 핵산 분자에 목적 핵산 분자를 혼성화한다. 단계 S3에서 상기 혼성화에 따라 상기 나노입자의 표면 및 주변 전하의 변화가 유도된다. 단계 S4에서 상기 전하의 변화에 따른 상기 라만 표지물질의 표면 증강 라만 산란 밴드의 이동을 관찰한다. 단계 S5에서 상기 표면 증강 라만 산란 밴드의 이동 여부에 따라 목적 핵산 분자의 존재 여부를 판단한다.
- [24] 통상적인 표면 증강 라만 산란 입자의 제조방법은 대한민국 공개특허 10-2009-0030775, 대한민국 공개특허 10-2008-0111950, 10-2009-0017434 등에 상세히 기술되어 있다. 탐침자로 사용되는 나노입자는 그 형상이 특별히 제한되지 않으며, 구형 입자, 표면에 다양한 형태의 나노입자가 올라간 딸기형 또는 성게형의 구형 입자, 이방성 입자, 중공 입자, 비대칭형 입자 및 모서리가 있는 입자로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 상기 나노입자는 예를 들어 나노 구체, 나노 로드, 나노 큐브 및 다수의 기하학적 및 비기하학적 형태를 가질 수 있다. 특히 막대형, 삼각형, 프리즘, 정육면체와 같은 형태의 이방성 입자나 모서리가 있는 입자의 경우 라만 산란에 있어서 구형 입자와 비교하여 보다 강화된 신호를 제공할 수 있다. 표면 플라즈몬의 극대화를 위해 상기 나노입자의 모양뿐 아니라 크기도 적절히 제어될 수 있다. 상술한 다양한 형태의 나노입자들의 제조방법은 다수의 문헌에 공지되어 있다.
- [25] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 광학 검출 신호로서 라만 산란광을 이용할 경우 나노입자는 금, 은, 팔라듐, 백금, 알루미늄, 구리와 같은 금속이나, 산화물 또는 반도체의 나노입자들이 될 수 있다. 이중 라만 산란 강도가 크고 표면 개질이 용이하며 생체적합성이 뛰어난 점에서 바람직하게는 상기 나노입자는 금 나노입자 또는 은 나노입자일 수 있다.
- [26] 한편 상기 나노입자에는 목적 핵산 분자(target nucleic acid molecule)를 검출하기 위한 탐침 핵산 분자(probe nucleic acid molecule)가 고정되어 있다. 상기 탐침 핵산 분자는 예를 들어 단일 가닥 DNA 형태를 가져, 이와 상보적인 또 다른 단일 가닥 DNA 형태의 목적 핵산 분자와 혼성화될 수 있다.
- [27] 본 명세서에서 핵산 분자는 DNA(deoxyribonucleic acid), RNA(ribonucleic acid), PNA(peptide nucleic acid) 또는 LNA(locked nucleic acid)일 수 있다. 여기서 DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, RNA는 게놈 RNA, mRNA, 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [28] 상기 탐침 핵산 분자가 상기 나노입자 표면에 고정될 수 있도록 상기 나노입자 표면 및/또는 상기 탐침 핵산 분자는 특정 관능기로 개질될 수 있다. 일

구현예에서, 상기 탐침 핵산 분자의 고정은 상기 탐침 핵산 분자에 아민기, 티올기, 알데히드기, 카르복실기, 알킨기, 고리형 알켄기, 아지드 등을 도입하고, 상기 나노입자의 표면에 카르복실기나 아민기, 말레이미드기, 알킨기, 고리형 알켄기, 아지드기 등을 도입하여 이들 사이에 화학적 결합시키는 방식일 수 있다. 또는 다른 구현예에서, 상기 탐침 핵산 분자의 고정은 상기 나노입자 표면과의 정전기적 인력에 의하여 결합시키는 방식일 수 있다. 예를 들어 상기 나노입자 표면에 폴리(알릴아민)하이드로클로라이드(PAH)와 같은 활성화된 아민을 도입하여 양전하를 갖게 함으로써, 음전하로 대전되어 있는 DNA가 상기 나노입자에 정전기적 인력에 의해 고정될 수 있다.

- [29] 도 2는 금 나노입자(AuNP)와 탐침자 DNA 간의 결합형태의 두 가지 구현예를 나타낸다. 이 중 (a)는 금 나노입자와 탐침자 DNA 간의 정전기력에 의한 결합을 나타내고, (b)는 금 나노입자와 탐침자 DNA 간의 화학적 결합을 나타낸다. 도 2를 참조하면, 탈이온수(DI) 조건에서 PAH로 금 나노입자를 코팅하여 아민 개질한 후 탐침자 DNA와 타겟 DNA를 결합시키는 과정을 나타낸다. 이 중 (a)는 DNA의 음전하와 PAH의 양전하 간의 정전기적인 결합 후 타겟 DNA를 결합시키는 과정을 나타낸다. 그리고 (b)는 알데히드 개질된 탐침자 DNA를 NaCNBH_3 환원제로 아세테이트 버퍼 (pH 5.2) 조건에서 반응시켜 탐침자 DNA를 금 나노입자에 화학적으로 결합시킨 후 타겟 DNA를 결합시키는 과정을 나타낸다.

- [30] 한편, 상기 나노입자의 도입에 의해 표면 증강 라만 산란(Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS) 현상에 의해 나노입자에 부착된 라만 리포터 분자로부터의 라만 신호가 크게 증가될 수 있다. 상기 라만 리포터 분자의 종류는 특별히 제한되지 않지만, 말단에 나노입자와 친화력이 강한 기능기가 있는 화합물이 바람직하다. 상기 라만 리포터 분자는 예를 들어 4,4'-디피리딜(DP), 크리스탈 바이올렛(CV), 4-머캅토 톨루엔(4-MT), 3,5-디메틸 벤젠티올(3,5-DMT), 티오페놀(TP), 4-아미노 티오페놀(4-ATP), 벤젠티올(BT), 4-브로모 벤젠티올(4-BBT), 2-브로모벤젠티올(2-BBT), 4-이소프로필 벤젠티올(4-IBT), 2-나프탈렌 티올(2-NT), 3,4-디클로로 벤젠티올(3,4-DCT), 3,5-디클로로 벤젠티올(3,5-DCT), 4-클로로 벤젠티올(4-CBT), 2-클로로 벤젠티올(2-CBT), 2-플루오로 벤젠티올(2-FBT), 4-플루오로 벤젠티올(4-FBT), 4-메톡시 벤젠티올(4-MOBT), 3,4-디메톡시 벤젠티올(3,4-DMOBT), 2-머캅토 피리미딘(2-MPY), 2-머캅토-1-메틸 이미다졸(2-MMI), 2-머캅토-5-메틸 벤즈이미다졸(2-MBI), 2-아미노-4-(트리플루오로메틸) 벤젠티올(2-ATFT), 벤질 머캅탄(BZMT), 벤질 디설파이드(BZDSF), 2-아미노-4-클로로 벤젠티올(2-ACBT), 3-머캅토 벤조산(3-MBA), 1-페닐테트라졸-5-티올(1-PTET), 5-페닐-1,2,3-트리아졸-3-티올(5-PTRT), 2-아이오도아닐린(2-IAN), 페닐 이소티오시아네이트(PITC), 4-니트로페닐 디설파이드(4-NPDSF) 및 4-아지도-2-브로모아세토페논(ABAPN)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종

이상일 수 있다. 그 외 다양한 티올기, 아지드기, 시아노기, 이소시아노기, 티오이소시아노기 등을 포함하는 방향족 화합물이면 나노입자와 강한 친화력이 있고 라만 분광법에 의한 분석이 용이하므로 상기 라만 리포터 분자로 사용될 수 있다.

- [31] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 라만 리포터 분자는 이소시아나이드 (-NC) 관능기 또는 시아나이드 (-CN) 관능기를 갖는 화합물일 수 있다. 본 명세서에서 이소시아나이드 관능기 또는 시아나이드 관능기를 통칭하여 "NC 관능기"로 명명하기로 한다. 또한 NC 관능기를 갖는 라만 리포터 분자와 탐침 핵산 분자가 함께 도입된 나노입자 형태를 갖는 표면 증강 라만 산란 입자를 "NC-SERS 입자"라고 명명하기로 한다.
- [32] NC 관능기를 갖는 라만 리포터 분자가 금 또는 은과 같은 금속 나노입자에 결합시 금속 나노입자의 표면 및 주변의 전하 변화에 따라 라만 리포터 분자의 라만 신호 위치가 이동할 수 있다. 이와 같은 성질을 이용하면, 음전하를 띄는 DNA나 RNA 등의 핵산 분자를 검출하기 위한 플랫폼이 구현할 수 있다. 즉 목적 핵산 분자를 검출하기 위하여 탐침 핵산 분자를 금속 나노입자에 결합시키고 목적 핵산 분자를 도입하여 혼성화시키면, 상기 혼성화에 따라 상기 금속 나노입자의 표면 및 주변 전하의 변화가 유도될 수 있다. 핵산 분자가 통상 음전하를 가지므로 금속 나노입자의 표면전하는 혼성화 이전보다 절대값이 더 큰 음전하를 띄게 되며, 이에 따라 상기 이소시아나이드 관능기를 갖는 라만 리포터 분자의 라만 밴드가 청색 전이(blue shift)하게 된다. 혼성화가 일어나지 않을 경우에는 이러한 라만 밴드 위치의 변화가 없게 된다.
- [33] 따라서 상기 전하의 변화에 따른 상기 라만 리포터 분자의 표면 증강 라만 산란 밴드의 이동을 관찰함으로써, 상기 표면 증강 라만 산란 밴드의 이동 여부에 따라 목적 핵산 분자의 존재 여부를 판단할 수 있다.
- [34] 도 3은 NC 관능기를 갖는 라만 리포터 분자가 도입에 따른 SERS 스펙트럼의 변화를 나타낸 도면이다. 도 3을 참조하면, 탐침자 DNA가 결합된 금 나노입자에 타겟 DNA가 결합됨에 따라 금 나노입자 표면 전하의 변화에 따라 NC 관능기를 갖는 라만 리포터 분자의 표면 증강 라만 밴드가 전이됨을 나타낸다.
- [35] 특정 이론에 구속되는 것은 아니지만, 이러한 라만 밴드의 이동은 NC 관능기와 금속 원자 사이의 결합에서 금속의 전하 분포가 달라지면서 리간드 π -백본딩(π -back bonding) 전자 밀도가 변하고 이에 따라 결합세기와 진동 주파수가 달라지기 때문이라고 볼 수 있다. 좀더 구체적으로 금속 나노입자와 결합한 이소시아나이드 분자를 예로 들어 설명하면, 이소시아나이드 분자는 $\text{---N}\equiv\text{C:}$ 작용기를 갖는 물질을 의미한다. 이때 C 원자에 존재하는 비공유 전자쌍을 금속 나노입자에 제공하면서 나타나는 배위결합을 통해 이소시아나이드 분자와 금속 나노입자가 화학 결합하게 된다. 이에 따라 금속 나노입자 주변의 전하가 더 양전하를 가지게 되고, C 원자에서 금속에 전달하는

결합인 σ 결합에서 C 원자에 의한 기여(donation)가 점차 증가한다. 이로 인해 NC 결합에서 전자 밀도가 N 원자에서 C 원자쪽으로 이동하게 되고 그 결과 NC 작용기에 의한 진동수가 증가하게 된다.

- [36] 한편 다른 상황에서 금속 나노입자의 표면 전하가 음전하로 되는 경우에는 금속에서 NC 결합 쪽으로 역 기여(back donation)를 하게 되고 이로 인해 NC π^* 오비탈의 전자 밀도가 증가하게 된다. 이로 인해 양전하가 증가하는 경우와는 반대로 NC 작용기에 의한 진동수가 감소하게 된다.
- [37] 바람직하게는 경험적으로 상기 라만 리포터 분자는 이소시아나이드 관능기를 갖는 방향족 화합물이다. 상기 라만 리포터 분자의 구체적인 예는 1,3-페닐렌 디이소시아나이드(1,3-phenylene diisocyanide), 1,4-페닐렌 디이소시아나이드(1,4-phenylene diisocyanide) 2,6-디메틸페닐 이소시아나이드(2,6-dimethylphenyl isocyanide), 4-메톡시페닐 이소시아나이드(4-methoxyphenyl isocyanide), *p*-톨루엔술폰메틸 이소시아나이드(*p*-toluenesulfonylmethyl isocyanide), 2-나프틸이소시아나이드(2-naphthyl isocyanide), 2-클로로-6-메틸페닐 이소시아나이드(2-chloro-6-methylphenyl isocyanide), 2-클로로-6-메틸페닐 이소시아나이드(2-chloro-6-methylphenyl isocyanide), 벤질 이소시아나이드(benzyl isocyanide), 4-니트로페닐 이소시아나이드(4-nitrophenyl isocyanide) 및 4-메톡시페닐 이소시아나이드(4-methoxyphenyl isocyanide)로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 상기 라만 리포터 분자는 단일 라만 리포터 분자 내에 복수의 이소시아나이드 관능기를 갖는 덴드리머 구조를 가지는 화합물일 수도 있다.
- [38] 예를 들어 이들 분자의 NC 스트레칭 밴드는 $2100 - 2200 \text{ cm}^{-1}$ 사이에서 관찰되며, 이들을 금속 나노입자에 고정된 경우, 특정 화학물질로 표면을 개질하거나, 또는 핵산 분자를 도입한 경우 등과 같이 금속 나노입자 주위 환경의 변화에 따라 금속 나노입자의 표면 전위(surface potential)에 변화가 생기면 원래의 밴드가 수 내지 수십 cm^{-1} 만큼 이동할 수 있다.
- [39] 일 구현예에서, 핵산검출을 위해 SERS 입자에 사용되는 상기 라만 리포터 분자는 NC 관능기를 갖는 화합물을 적어도 포함한다. 또한 바람직한 구현예에서, 다중검출(multiplexing)이 가능한 SERS 입자가 제공된다. 이때 상기 라만 리포터 분자는 상기 목적 핵산분자의 혼성화 여부 탐지를 위한 NC 관능기를 갖는 화합물 및 상기 목적 핵산분자의 종류 판별을 위한 다른 종류의 화합물을 동시에 포함하는 것일 수 있다. 이 경우 타겟 DNA의 혼성화(hybridization) 여부는 NC 관능기의 밴드 이동으로 확인할 수 있고, 어떤 종류의 DNA인지는 다른 라만 밴드로 읽을 수 있다.
- [40] 상술한 바와 같이 NC-SERS 입자를 이용한 핵산 분자의 검출방법에 따르면, 기존의 다른 라만 기반의 핵산 검출 시스템과는 달리, 별개의 표지 물질을 사용하지 않고 핵산 결합에 따른 물리적인 특성 변화를 직접적으로

검출함으로써 비표지(label free) 방식의 핵산 검출을 가능하게 한다.

- [41] 일 구현예에서, 상기 NC-SERS 입자가 지지체 비드 위에 탑재된 것일 수 있다. 상기 지지체 비드는 고분자 비드, 실리카 비드 또는 자성 물질이 포함된 실리카 비드일 수 있다.
- [42] 도 4는 SERS 비드에 NC-SERS 나노입자를 탑재한 표면 증강 라만 산란 입자를 이용하여 목적 핵산 분자를 검출하는 과정의 일 구현예를 나타낸다. 도 4를 참조하면, 다양한 SERS 표지자로 코딩된 자성 또는 비자성의 SERS 비드 위에 NC-SERS 탐침자를 탑재한 후, NC-SERS 밴드의 이동을 관찰하면 DNA 또는 RNA 등의 결합 유무를 확인할 수 있으며, 동시에 (자성) SERS 비드에 도입된 SERS 표지자의 SERS 밴드를 이용하여 멀티플렉싱(multiplexing)하는 것이 가능하다. 여기서 사용된 용어 "(자성) SERS 비드"는 앞서 살펴본 자성 물질이 포함되지 않은 SERS 비드뿐 아니라 자성 물질이 포함된 SERS 비드를 포함하는 의미이다. 이때 자성 비드를 사용하면 자성을 이용하여 입자를 용이하게 분리할 수 있다.
- [43] 상술한 핵산 분자 검출방법은 손쉬운 유전체 진단 시스템 및 다양한 유전체 검출 분야에 활용이 가능하다.
- [44] 이하 본 발명을 다양한 실시예들을 통해 보다 상세히 설명하고자 하나, 본 발명의 기술적 사상이 하기 실시예들에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [45]
- [46] [실시예]
- [47] 1. NC-SERS 입자의 합성
- [48] 범피 모양의 금 나노입자 (이하 AuBP) 합성
- [49] NaOH 1 M 용액을 이용하여 pH 7.4로 조절한 100 mM HEPES 용액 0.8 mL 와 증류수 19.2 mL를 섞은 용액에 20 mM 농도의 HAuCl₄ 용액 0.2 mL를 넣었다. 섞은 용액을 25 °C 온도로 인큐베이터 속에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 용액을 원심분리기를 이용하여 5000 rpm에 15분간 3회 원심분리하였다. 마지막으로 얻어진 금 나노입자를 증류수 20 mL에 다시 분산시켰다.
- [50] 도 5는 NC-SERS 입자에 사용된 범피형(bumpy) 금 나노입자의 합성과정의 개략도이고, 도 6은 합성한 범피형 금 나노입자의 투과전자현미경(TEM) 이미지 및 전자주사현미경(SEM) 이미지이며, 도 7은 합성한 범피형 금 나노입자의 UV/Vis 흡수 스펙트럼이다. 반응의 결과물로 범피 모양의 금 나노입자가 만들어진 것을 확인할 수 있었다.
- [51]
- [52] 라만 리포터 분자의 도입
- [53] 위에서 만든 AuBP 용액 1 mL 와 증류수 9 mL를 둥근바닥 플라스크에 넣은 뒤에 NC 관능기 함유 분자(2,6-Dimethylphenyl isocyanide, 4-Methoxyphenyl isocyanide, 2-Chloro-6-methylphenyl isocaynide 등)를 증류수에 1 μ M 농도로 만든 뒤 10 mL를 앞의 용액에 섞어주었다. 이때 교반장치를 이용하여 500 rpm으로

교반해주었다. 3시간 반응시킨 후에 마찬가지로 원심분리기를 이용하여 5000 rpm에 15분간 3회 원심분리하였다. 마지막으로 얻어진 입자를 증류수 10 mL에 분산시켰다.

- [54] 도 8은 범피형 금 나노입자(AuBP)와 구형 금 나노입자(AuNP)의 라만 스펙트럼 결과이다. 도 8을 참조하면, 범피형 금 나노입자 기반의 NC-SERS 입자의 라만 스펙트럼으로 범피 모양의 금 나노입자 기반의 NC-SERS 입자가 구형 금 나노입자 기반의 NC-SERS 입자보다 신호가 월등히 높음을 나타낸다. 신호 대비를 위해 사용한 구형의 금 나노입자(AuNP)는 시그마 알드리치에서 입수한 Gold(III) chloride trihydrate (제품번호 520918)와 Sodium citrate tribasic dihydrate (제품번호 S4641)을 사용하여 합성하였다. 0.01 % Gold(III) chloride trihydrate 용액 50 mL를 100 °C로 가열하다 1 % Sodium citrate tribasic dihydrate 용액 0.2 mL를 추가하였다. 그 후에 30 분간 추가로 가열한 후 상온에서 서서히 식혀주었다. 이후 AuBP와 SERS 신호 비교를 위해 라만 리포터 표지화는 AuBP와 동일한 방식으로 수행하였다.

[55]

[56] 양 전하를 띠는 중합체 PAH 도입

- [57] 라만 리포터 도입이 끝난 AuBP 용액 10 mL에 PAH (polyallylamine hydrochloride, 평균분자량 45000 g/mol)를 10 mg/mL 농도로 1 mL 추가하였다. 그리고 500 rpm으로 교반해주고 12 시간가량 교반한 뒤 원심분리기를 이용하여 5000 rpm에서 15분간 3회 원심분리하였다. 최종적으로 증류수 1 mL를 넣어 AuBP를 다시 분산시켰다.

[58]

[59] 탐침 핵산 분자의 결합

- [60] 탐침 핵산 분자 결합 (Surf DNA): PAH까지 도입된 AuBP 용액 1 mL를 염화나트륨의 농도가 0.3 M인 용액에 다시 분산시킨 뒤 탐침 핵산 분자를 (100 μ M, 10 μ L) 추가한 후 셰이커에 12 시간 반응시켰다. 그 후 반응이 끝난 용액을 원심분리기를 이용하여 5000 rpm에서 15분간 3회 원심분리한 후 얻어진 입자를 증류수에 다시 분산시켰다.
- [61] 탐침 핵산 분자 결합 (Bind DNA): PAH 까지 도입된 AuNP 용액 또는 AuBP 용액 1 mL를 염화나트륨의 농도가 0.3 M인 pH 5.2, 100 mM 농도의 아세테이트 버퍼에 다시 분산시킨 뒤 알데히드 개질된 탐침 핵산 분자 (100 μ M, 10 μ L) 추가한 후 아민과 알데히드 사이의 결합을 위해 100 mM 농도의 NaCNBH3를 100 μ L를 추가하였다. 그리고 셰이커를 이용해 12 시간 반응시킨 후 원심분리기를 이용하여 5000 rpm에서 15분간 3회 원심분리한 후 증류수에 다시 분산시켰다.

[62]

[63] 2. NC-SERS 입자의 특성

- [64] 도 9는 표면 개질에 따른 범피형 금 나노입자의 제타 전위의 변화를 나타낸 결과이다. 도 9의 (a) 및 (b)는 각각 NC-SERS 탐침자(Surf DNA) 및 NC-SERS

탐침자(Bind DNA) 제타 전위의 변화를 나타낸다. 도 9를 참조하면, 표면에 아무 처리도 하지 않은 범피형 나노입자의 제타 전위는 -18.05 mV이고, NC 작용기를 가지는 라만 리포터를 처리하였을 때의 제타 전위는 -11.0 mV이며, 양 전하를 띠고 있는 PAH를 도입하였을 때의 제타 전위는 9.43 mV였다. 한편 탐침자 DNA를 도입한 후의 제타 전위는 -13.2 mV (Surf DNA) 및 -16.9 mV (Bind DNA)였다.

- [65] 도 10은 표면개질에 따른 범피형 금 나노입자 기반의 NC-SERS 탐침자의 SERS 신호의 이동을 나타낸 결과이다. 표면개질 전의 NC-SERS 탐침자의 최대 신호를 내는 라만 이동(shift)은 2180.5 cm^{-1} 에서 나타나고 표면에 양전하를 띠는 PAH를 처리하면 처리 전에 비해 낮은 에너지 방향으로 라만 밴드가 이동하고 음전하를 띠는 DNA를 결합하면 DNA 결합 전에 비해 높은 에너지 방향으로 라만 밴드가 대폭 이동하는 것을 관찰할 수 있다.

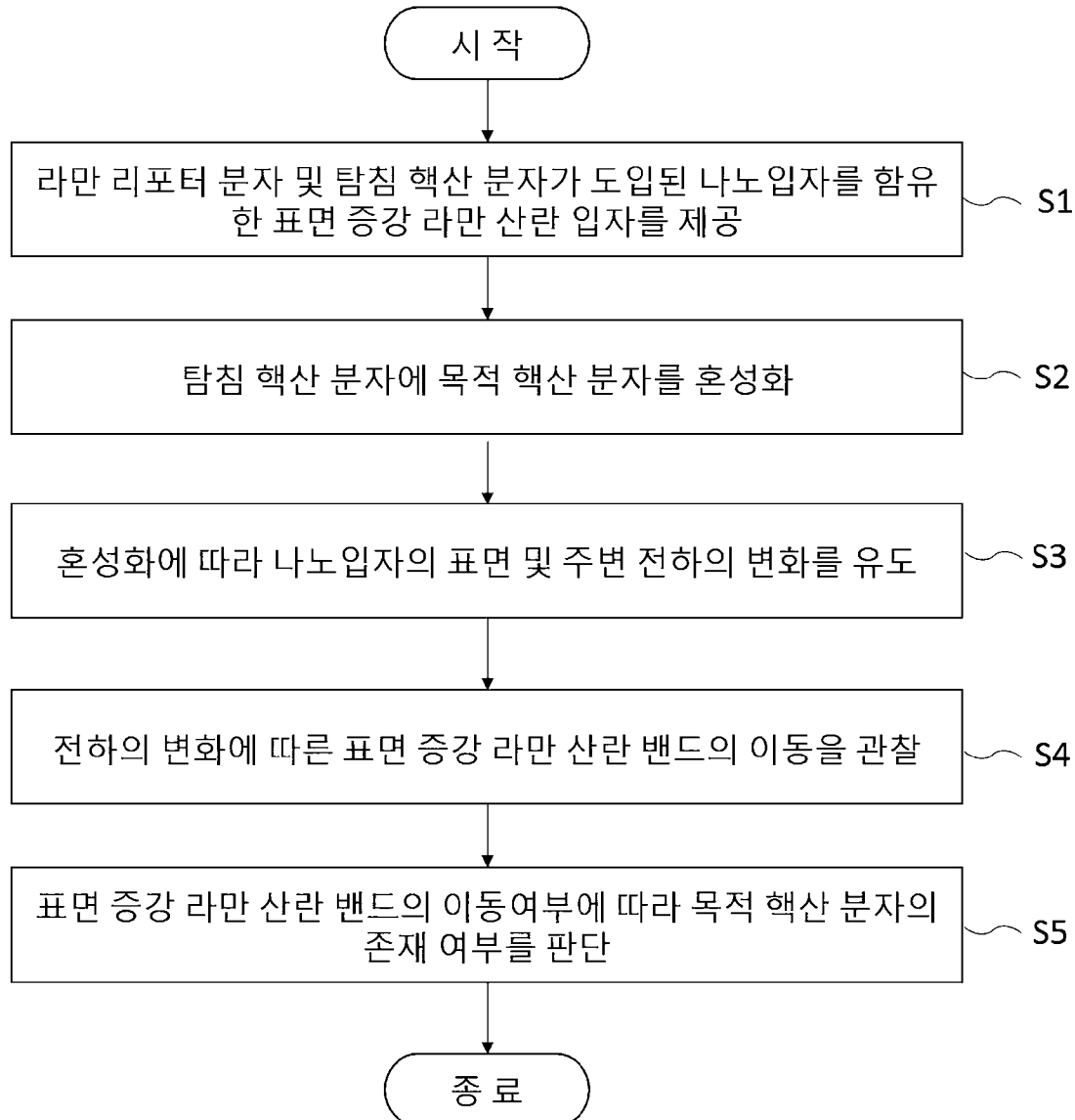
[66]

청구범위

- [청구항 1] 라만 리포터 분자 및 탐침 핵산 분자가 도입된 나노입자를 함유한 표면 증강 라만 산란 입자를 제공하는 단계;
 상기 탐침 핵산 분자에 목적 핵산 분자를 혼성화하는 단계; 및
 상기 혼성화에 따라 상기 나노입자의 표면 및 주변 전하의 변화가 유도되는 단계; 및
 상기 전하의 변화에 따른 상기 라만 리포터 분자의 표면 증강 라만 산란 밴드의 이동을 관찰하는 단계; 및
 상기 표면 증강 라만 산란 밴드의 이동 여부에 따라 목적 핵산 분자의 존재 여부를 판단하는 단계를 포함하는 핵산 분자의 검출방법.
- [청구항 2] 제1 항에 있어서,
 상기 라만 리포터 분자는 티올기, 아지드기, 시아노기, 이소시아노기 또는 티오이소시아노기를 포함하는 방향족 화합물인 핵산 분자의 검출방법.
- [청구항 3] 제1 항에 있어서,
 상기 라만 리포터 분자는 이소시아나이드 (-NC) 관능기 또는 시아나이드 (-CN) 관능기를 갖는 화합물을 적어도 포함하는 핵산 분자의 검출방법.
- [청구항 4] 제1 항에 있어서,
 상기 나노입자는 금 나노입자 또는 은 나노입자인 핵산 분자의 검출방법.
- [청구항 5] 제1 항에 있어서,
 상기 나노입자의 표면 및 주변 전하의 변화시 상기 나노입자의 제타전위가 높아질수록 상기 라만 리포터 분자의 라만 밴드가 낮은 에너지 방향으로 이동하고 상기 나노입자의 제타전위가 낮아질수록 상기 라만 리포터 분자의 라만 밴드가 높은 에너지 방향으로 이동하는 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 6] 제1 항에 있어서,
 상기 탐침 핵산 분자에 상기 목적 핵산 분자가 혼성화될 경우, 상기 라만 리포터 분자의 라만 밴드가 높은 에너지 방향으로 이동하는 핵산 분자의 검출 방법.
- [청구항 7] 제1 항에 있어서,
 상기 라만 리포터 분자는 이소시아나이드 관능기를 갖는 방향족 화합물을 포함하거나 단일 라만 리포터 분자 내에 복수의 이소시아나이드 관능기를 갖는 덴드리머 구조를 갖는 화합물을 포함하는 것인 핵산 분자의 검출방법.
- [청구항 8] 제1 항에 있어서,
 상기 라만 리포터 분자는 상기 목적 핵산분자의 혼성화 여부 탐지를 위한 NC 관능기를 갖는 화합물 및 상기 목적 핵산분자의 종류 판별을 위한 다른 종류의 화합물을 동시에 포함하는 것인 핵산 분자의 검출방법.

- [청구항 9] 제1 항에 있어서,
상기 나노입자가 지지체 비드 위에 탑재된 것인 헥산 분자의 검출방법.
- [청구항 10] 제9 항에 있어서,
상기 지지체 비드는 고분자 비드, 실리카 비드 또는 자성 물질이 포함된 실리카 비드인 것인 헥산 분자의 검출방법.

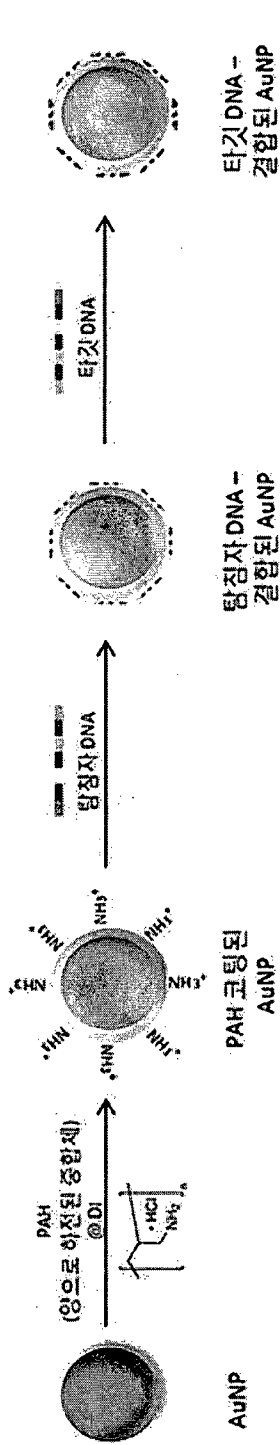
[도1]



[1-2]

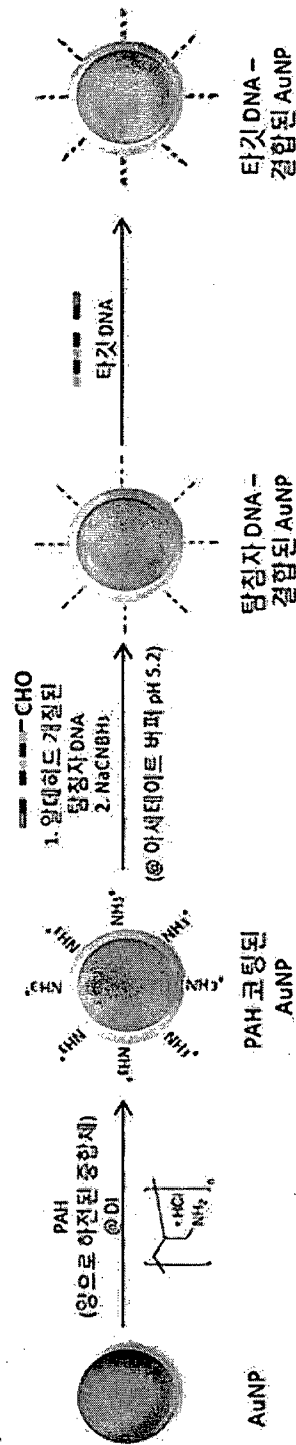
(a) 정전기적 결합 (약어. Surf DNA)

결합력: DNA (음 전하) - 아민 (양 전하), 정전기적으로 결합됨

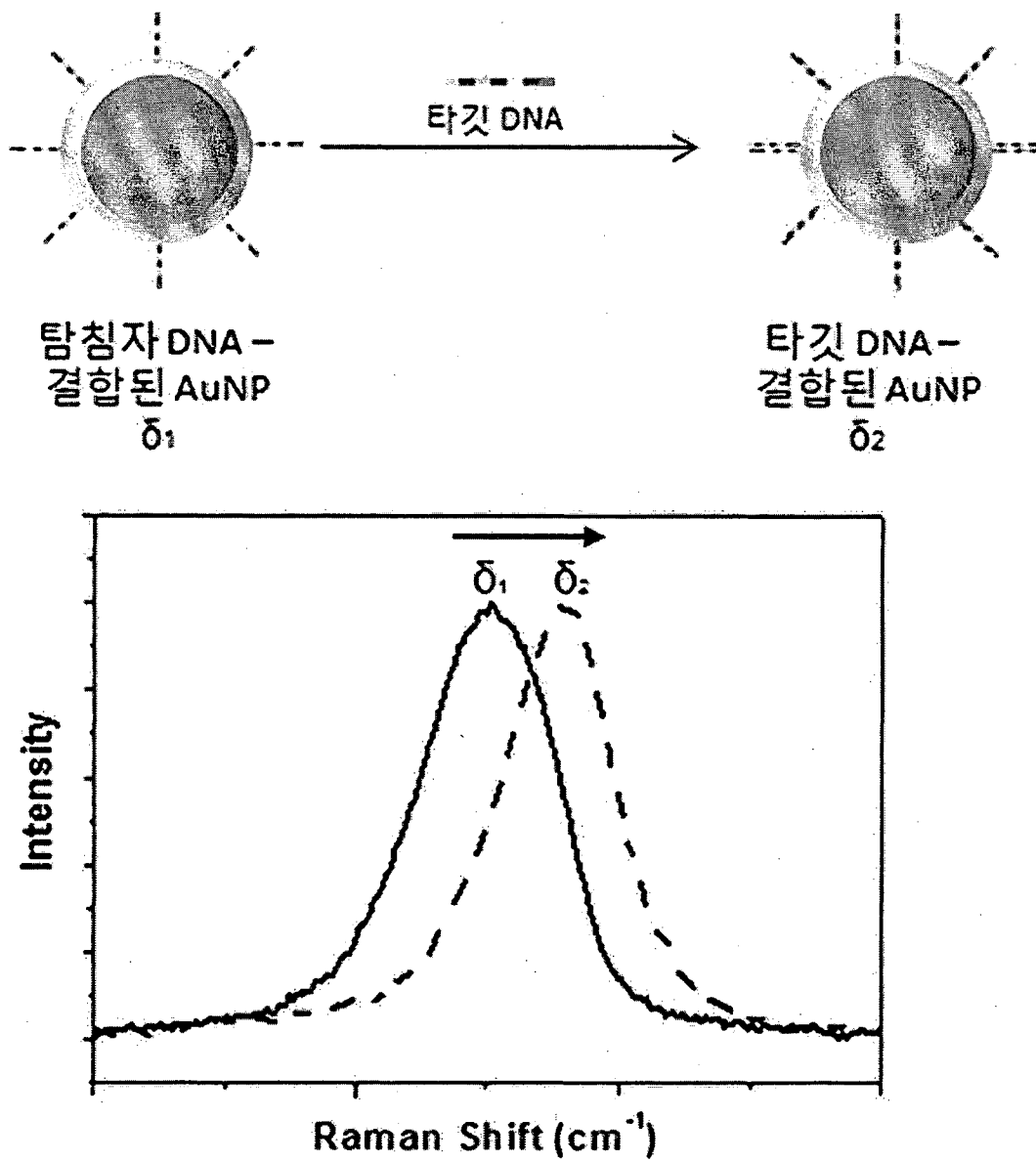


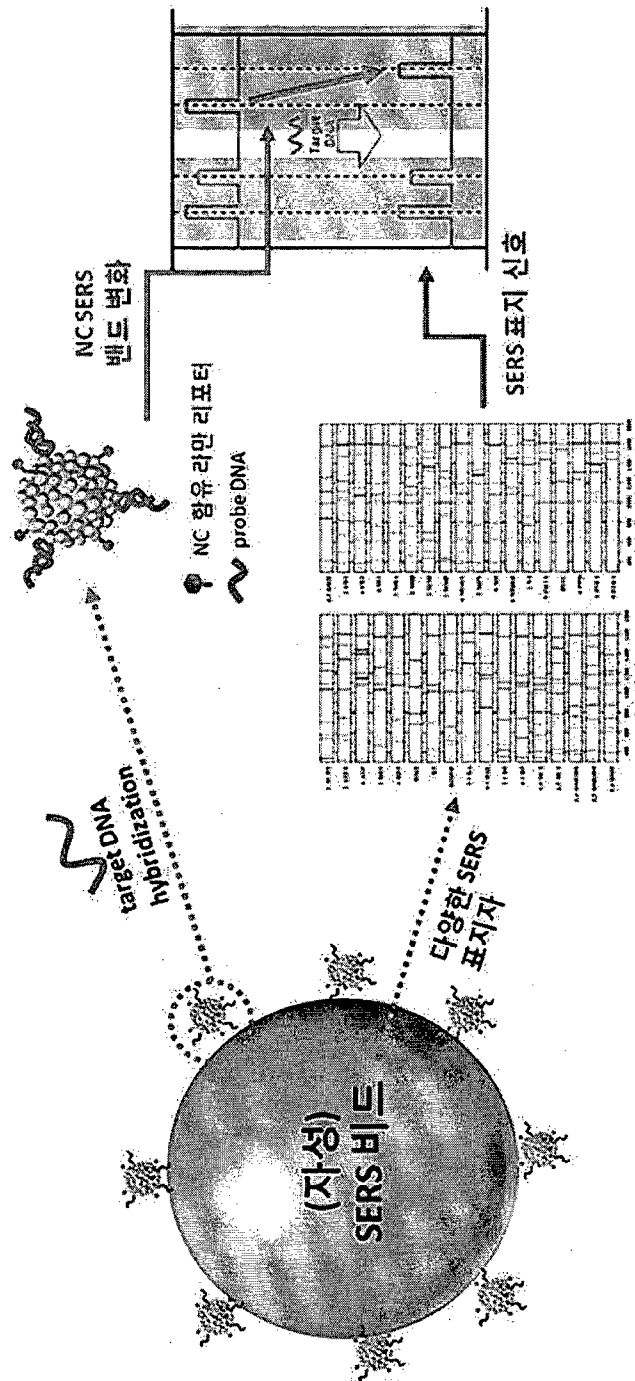
(b) 화학적 결합 (약어. Bind DNA)

결합력: DNA (알데하이드기) - 아민 (@ AuNP 표면), 화학적으로 결합됨

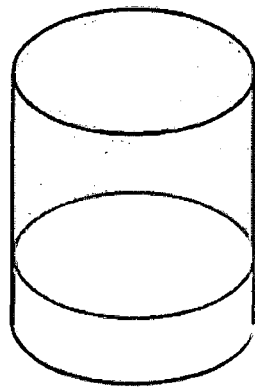


[Fig. 3]



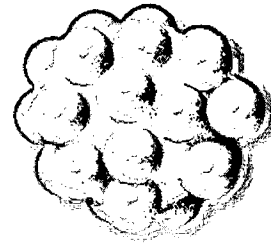


[도5]

합성방법

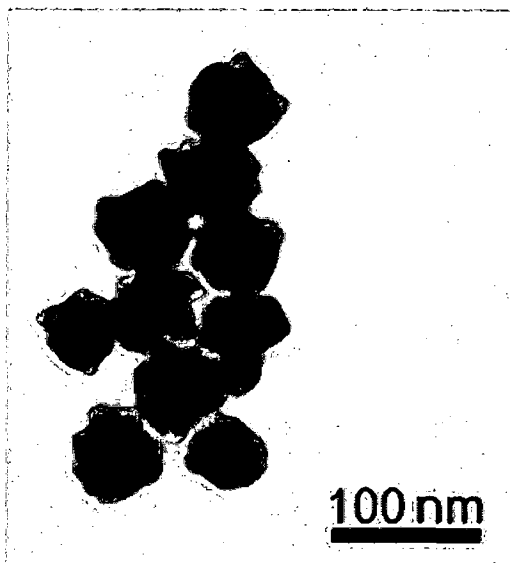
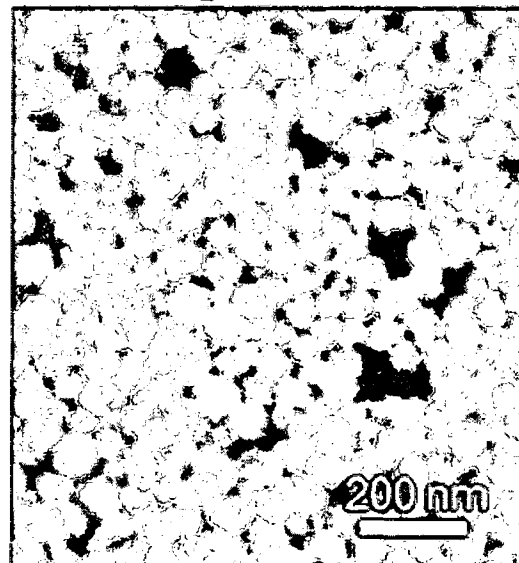
HAuCl₄
용액

pH 7.4 HEPES
100 mM 첨가

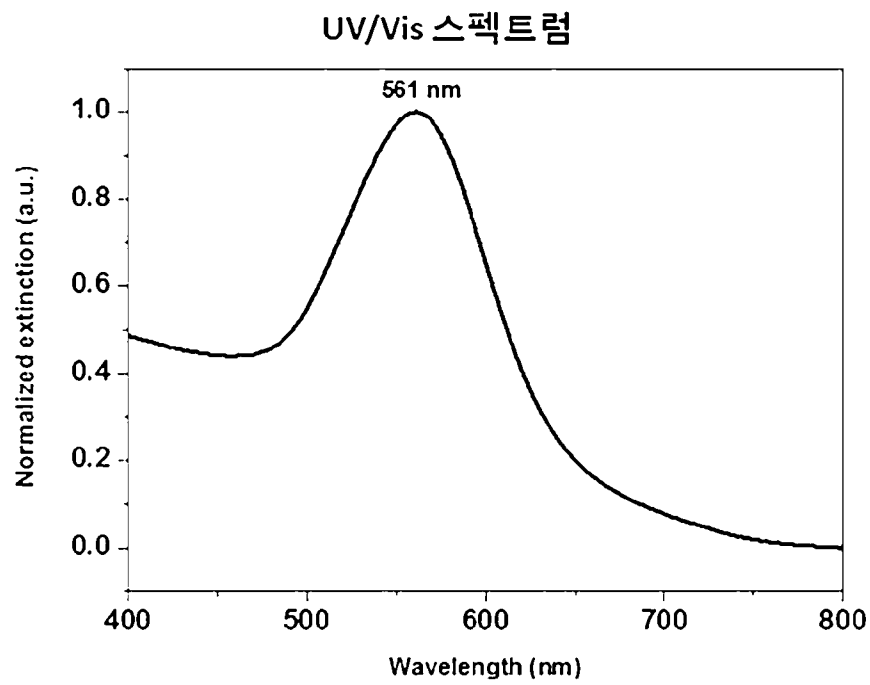


범피 금 나노입자 (AuBP)
용액

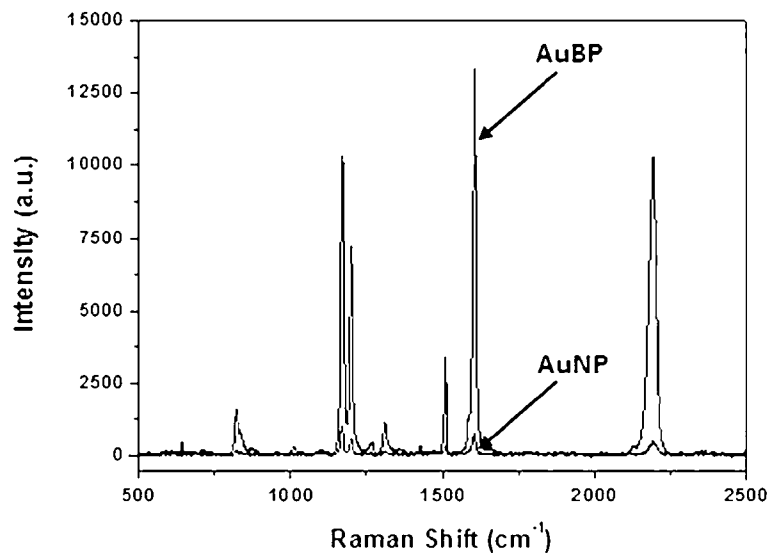
[도6]

TEM image**SEM image**

[도7]

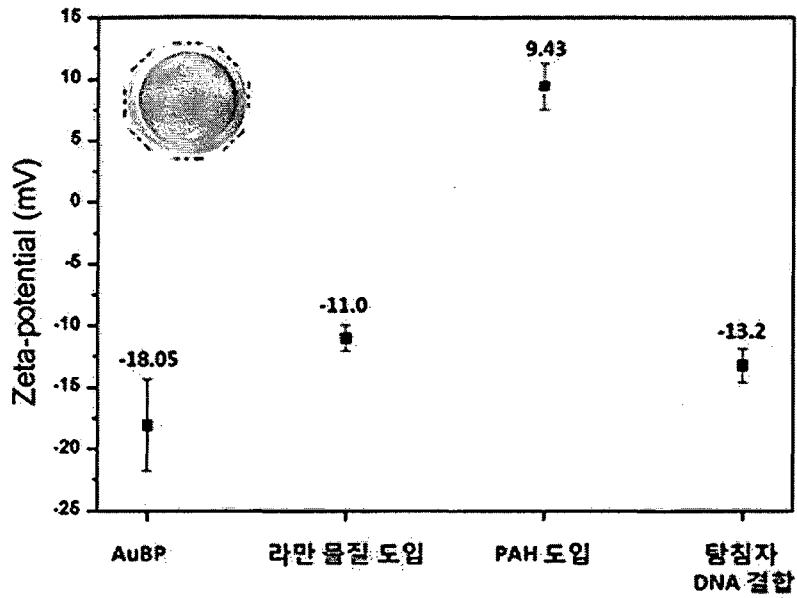


[도8]

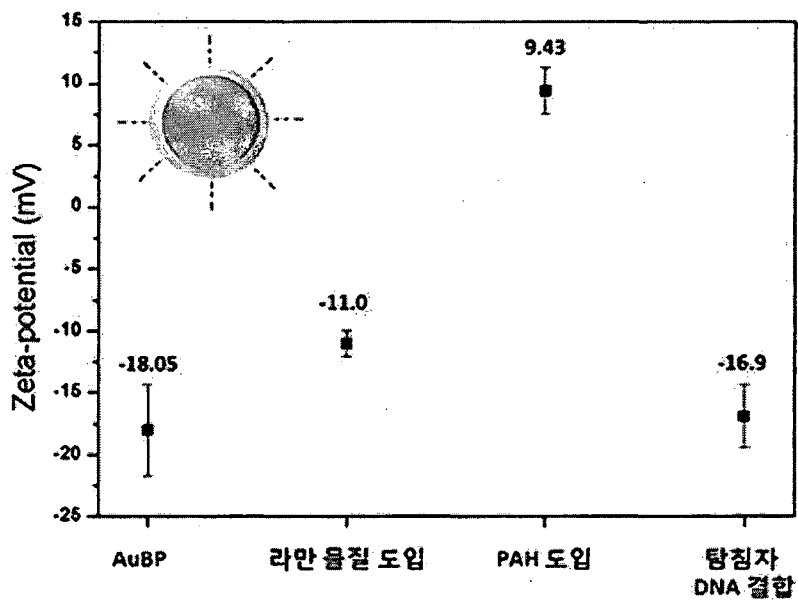


[Fig. 9]

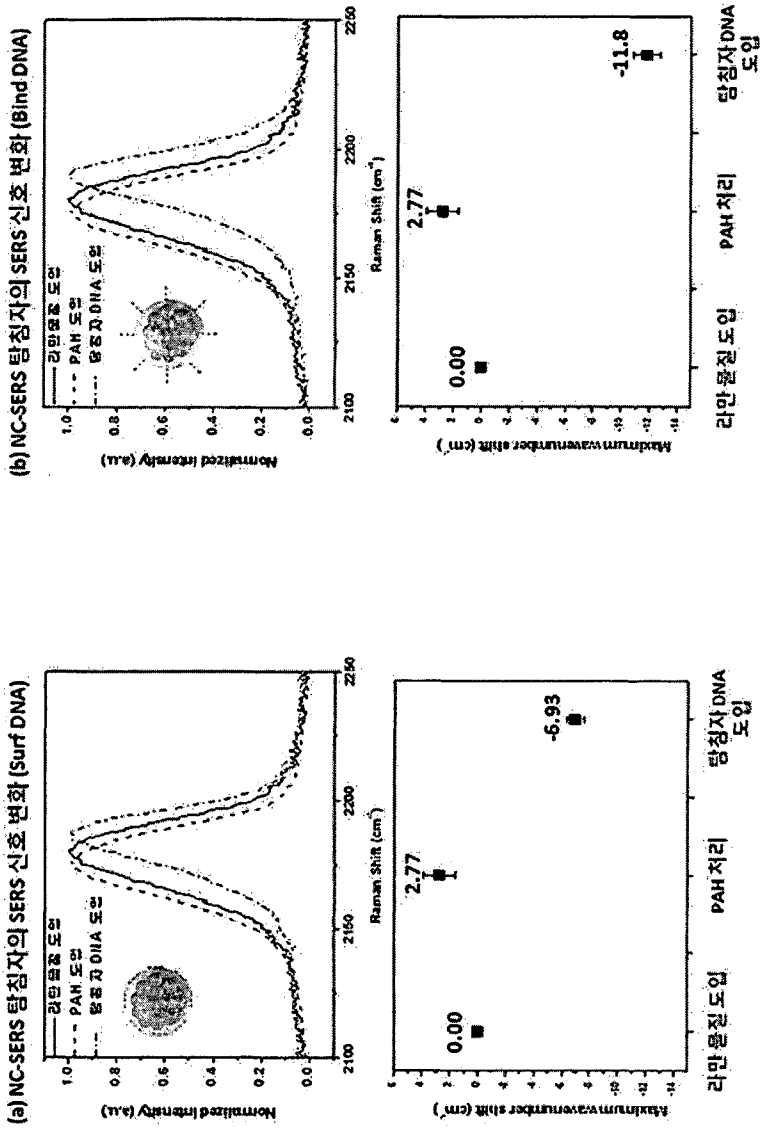
(a) NC-SERS 탐침자의 제타 전위 (Surf DNA)



(b) NC-SERS 탐침자의 제타 전위 (Bind DNA)



[Figure 10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/007511**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 21/65(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 1/68; B82B 1/00; B82B 3/00; G01N 33/53; G01N 21/00; G01N 21/63; G01N 33/555; G01N 21/65

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: Raman reporter polymer, nucleic acid polymer detection, nano particle, surface-enhanced Raman scattering particle

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011-0070662 A1 (PORTER, Marc D. et al.) 24 March 2011 See paragraphs [0045], [0050], [0059], [0064], [0070]; and claims 1-8.	1-10
A	WO 2011-071343 A2 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY et al.) 16 June 2011 See abstract; claims 1-18; and figure 1.	1-10
A	WO 2012-070893 A2 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY et al.) 31 May 2012 See abstract; and claims 1, 19-20.	1-10
A	US 2008-0003576 A1 (ZHANG, Jingwu et al.) 03 January 2008 See abstract; and claims 1-12.	1-10
A	KIM, Kwan et al., "Surface Enrichment of Ag Atoms in Au/Ag Alloy Nanoparticles Revealed by Surface-enhanced Raman Scattering of 2,6-dimethylphenyl Isocyanide", The Journal of Physical Chemistry C, 05 February 2010 (Online), vol. 114, pages 3448-3453 See abstract; and figures 2-3.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 OCTOBER 2016 (07.10.2016)

Date of mailing of the international search report

10 OCTOBER 2016 (10.10.2016)

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/KR2016/007511

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2011-0070662 A1	24/03/2011	US 2005-0089901 A1	28/04/2005
		US 2011-0070661 A1	24/03/2011
		US 7824926 B1	02/11/2010
		US 7829348 B2	09/11/2010
WO 2011-071343 A2	16/06/2011	AU 2010-328768 A1	02/08/2012
		AU 2010-328768 B2	16/01/2014
		BR 112012013999 A2	12/04/2016
		CA 2783788 A1	16/06/2011
		CA 2783788 C	10/02/2015
		CN 102811943 A	05/12/2012
		CN 102811943 B	19/08/2015
		EP 2511231 A2	17/10/2012
		EP 2511231 A4	22/05/2013
		EP 2511231 B1	11/03/2015
		IL 220294 D0	31/07/2012
		JP 2013-513796 A	22/04/2013
		JP 5701896 B2	15/04/2015
		KR 10-1247610 B1	26/03/2013
		KR 10-2011-0066881 A	17/06/2011
		RU 2012129158 A	20/01/2014
		RU 2542386 C2	20/02/2015
		US 2013-0029360 A1	31/01/2013
		WO 2011-071343 A3	13/10/2011
WO 2012-070893 A2	31/05/2012	CA 2819052 A1	31/05/2012
		CN 103403546 A	20/11/2013
		CN 103403546 B	08/07/2015
		EP 2645104 A2	02/10/2013
		JP 2014-508916 A	10/04/2014
		JP 5813128 B2	17/11/2015
		KR 10-1352342 B1	17/02/2014
		KR 10-2012-0056024 A	01/06/2012
		US 2013-0330839 A1	12/12/2013
		WO 2012-070893 A3	27/09/2012
US 2008-0003576 A1	03/01/2008	WO 2008-085538 A2	17/07/2008
		WO 2008-085538 A3	20/11/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 21/65(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; B82B 1/00; B82B 3/00; G01N 33/53; G01N 21/00; G01N 21/63; G01N 33/555; G01N 21/65

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: 라만 리포터 분자, 핵산 분자 검출, 나노 입자, 표면 증강 라만 산란 입자

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2011-0070662 A1 (PORTER, MARC D. 등) 2011.03.24 단락 [0045], [0050], [0059], [0064], [0070]; 및 청구항 1-8 참조.	1-10
A	WO 2011-071343 A2 (한국화학연구원 등) 2011.06.16 요약; 청구항 1-18; 및 도면 1 참조.	1-10
A	WO 2012-070893 A2 (한국화학연구원 등) 2012.05.31 요약; 및 청구항 1, 19-20 참조.	1-10
A	US 2008-0003576 A1 (ZHANG, JINGWU 등) 2008.01.03 요약; 및 청구항 1-12 참조.	1-10
A	KIM, KWAN 등, 'Surface enrichment of Ag atoms in Au/Ag alloy nanoparticles revealed by surface-enhanced Raman scattering of 2,6-dimethylphenyl isocyanide', The Journal of Physical Chemistry C, 2010.02.05 (online), 114권, 페이지 3448-3453 요약; 및 도면 2-3 참조.	1-10

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

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 10월 07일 (07.10.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 10월 10일 (10.10.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2011-0070662 A1	2011/03/24	US 2005-0089901 A1 US 2011-0070661 A1 US 7824926 B1 US 7829348 B2	2005/04/28 2011/03/24 2010/11/02 2010/11/09
WO 2011-071343 A2	2011/06/16	AU 2010-328768 A1 AU 2010-328768 B2 BR 112012013999 A2 CA 2783788 A1 CA 2783788 C CN 102811943 A CN 102811943 B EP 2511231 A2 EP 2511231 A4 EP 2511231 B1 IL 220294 D0 JP 2013-513796 A JP 5701896 B2 KR 10-1247610 B1 KR 10-2011-0066881 A RU 2012129158 A RU 2542386 C2 US 2013-0029360 A1 WO 2011-071343 A3	2012/08/02 2014/01/16 2016/04/12 2011/06/16 2015/02/10 2012/12/05 2015/08/19 2012/10/17 2013/05/22 2015/03/11 2012/07/31 2013/04/22 2015/04/15 2013/03/26 2011/06/17 2014/01/20 2015/02/20 2013/01/31 2011/10/13
WO 2012-070893 A2	2012/05/31	CA 2819052 A1 CN 103403546 A CN 103403546 B EP 2645104 A2 JP 2014-508916 A JP 5813128 B2 KR 10-1352342 B1 KR 10-2012-0056024 A US 2013-0330839 A1 WO 2012-070893 A3	2012/05/31 2013/11/20 2015/07/08 2013/10/02 2014/04/10 2015/11/17 2014/02/17 2012/06/01 2013/12/12 2012/09/27
US 2008-0003576 A1	2008/01/03	WO 2008-085538 A2 WO 2008-085538 A3	2008/07/17 2008/11/20