

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 11월 12일 (12.11.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/170844 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/573 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/004014
- (22) 국제출원일: 2015년 4월 22일 (22.04.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0055649 2014년 5월 9일 (09.05.2014) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 바이오뱅크 주식회사 (BIOBANK INC.) [KR/KR]; 373-803 충청북도 옥천군 옥천읍 대학길 15, Chungcheongbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 박성식 (PARK, Sung Sik); 302-802 대전시 서구 가수원로 5 은아아파트 505-904, Daejeon (KR). 이상래 (LEE, Sang-Rae); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 장규태 (CHANG, Kyu Tae); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, 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, 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.

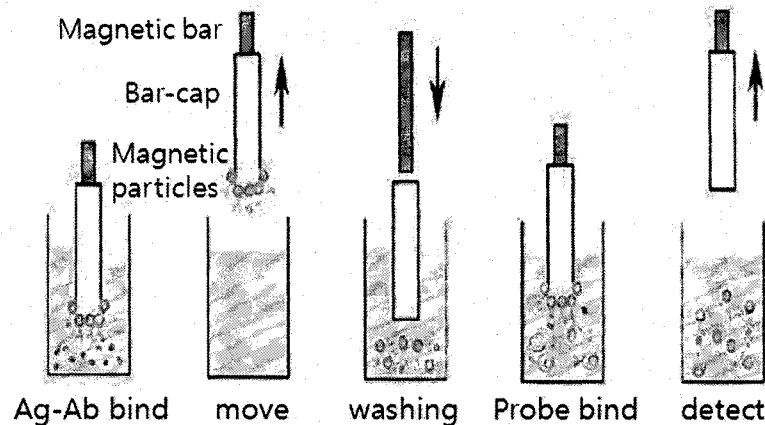
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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 제 21 조(3))

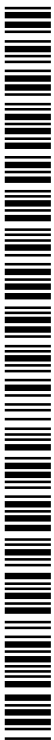
(54) Title: MULTI-FLUORESCENCE IMMUNE-ASSAY USING MAGNETISM

(54) 발명의 명칭 : 마그네틱(magnetic)을 이용한 형광다중면역검사



(57) Abstract: The present invention relates to an immunodiagnostic method using magnetism. Specifically, the present invention can be usually used in an immunodiagnostic method and an immunodiagnostic apparatus since an antigen of interest within a specimen bound to a magnetic assembly, according to the present invention, directly moves by means of a magnet, resulting in an effect of shortening the time taken for assay.

(57) 요약서: 본 발명은 마그네틱(magnetic)을 이용한 면역진단방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명의 마그네틱 결합체에 결합한 검체 내 목적 항원이 자석에 의해 직접 이동하기 때문에 검사에 소요되는 시간을 단축시키는 효과가 있어, 면역진단방법 및 면역진단 기기에 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2015/170844 A1

【명세서】

【발명의 명칭】

마그네틱(magnetic)을 이용한 형광다중면역검사

5 【기술분야】

본 발명은 마그네틱(magnetic)을 이용한 형광다중면역검사법(multi-fluorescence immune-assay)에 관한 것이다.

【배경기술】

10 임상검사 분야에서, 생체 시료(혈액, 뇨 등)를 이용하여 각종 질환들의 진단을 수행하고 있는데, 이러한 진단방법으로서, 각종 측정법이 개발되어 이용되고 있다. 이러한 측정방법의 대표적인 방법으로서, 효소반응을 이용한 생화학적 측정법 또는 항원-항체반응을 이용한 면역측정법을 들 수 있다. 최근에는 생체 시료중의 성분을 정밀하게 측정하는 것이 요구되고, 특이성이
15 높은 항원-항체반응을 이용한 면역측정방법이 폭넓게 이용되고 있다.

면역측정법으로는 그 검출 원리 및 방법에 따라 방사성 동위원소를 사용하여 신호를 검출하는 방사면역분석법(RIA: radioimmunoassay), 효소에 의한 신호증폭을 사용하는 효소면역측정법(ELISA: enzyme-linked immunosorbent
20 assay, 혹은 EIA: enzyme immunoassay), 형광을 이용하여 검출하는 형광항체법(FA: fluorescence antibody technique), 화학발광을 사용하는 화학발광면역측정법(CLIA: chemiluminescence immunoassay) 등으로 나눌 수 있으며, 그 밖에도 표지물질의 사용 방법이나 기질의 종류에 따라 다양한 분류가 가능하다.

25

여러 가지 면역분석법 중 효소면역측정법은 반응의 민감도, 특이성, 신속성 및 재현성이 매우 뛰어나고 항원이나 항체를 달리할 경우 동일 조작으로 다양한 종류의 항원, 항체 검출에 이용될 수 있는 범용성의 장점이

있어 가장 많이 사용되고 있다. 효소면역측정법은 항체의 활용 방법에 따라 직접효소면역측정법(Direct ELISA), 간접효소면역측정법(Indirect ELISA) 및 샌드위치효소면역측정법(Sandwich ELISA)의 3가지로 세분할 수 있다.

5 구체적으로, 직접효소면역측정법은 고체표면에 고정된 항원에 효소와 연결된 항체(Enzyme-linked Antibody)가 결합하면 효소가 기질의 반응을 촉매 함으로써 신호를 생성하게 된다. 간접효소면역측정법은 1차로 주항체(primary antibody)가 항원에 특이적인 결합을 하고, 2차로 효소가 연결된 보조항체(secondary antibody)가 주항체를 인식하여 결합한다. 이상태에서
10 보조항체에 연결되어 있는 효소가 기질의 반응을 촉매 하여 신호를 내게 된다. 마지막으로, 가장 널리 사용되는 형태인 샌드위치효소면역측정법은 검출하려는 하나의 항원에 대하여, 인식부위(epitope)가 다른 2종의 항체를 사용하는 것이며, 검출하고자 하는 항원에 대한 높은 선택성을 나타내어 진단용으로도 많이 사용이 되고 있다.

15 다만, 효소면역측정법은 항원-항체간 반응시간 및 항원-항체 반응을 시킨후 결합되지 않은 물질을 제거하기 위한 세척시간이 최소 2 시간 이상 요구되는 단점이 있다. 또한, 검사하고자 하는 물질의 검출을 위해 마커 등의 흡광도를 측정하는데, 흡광도 측정은 극미량의 검출이 불가능한 단점이 있다.

20 이에, 본 발명자들은 엘라이자 방법(ELISA)이 갖는 장점을 유지하면서, 실험에 소요되는 시간을 단축하고, 극미량의 목적 항원의 검출을 하기 위해 노력한 결과, 마그네틱 결합체를 자석에 의해 직접 이동시켜 항원을 검출하고, 광전자증배관 형광검출기를 이용하여 항원과 결합한 표지자를 검출함으로써 본 발명을 완성하였다.

25

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은

1) 마그네틱 비드(magnetic bead) 및 제 1 항체를 포함하는 마그네틱 결합체를 자석을 이용하여 검체가 담긴 제 1 웰(well)로 이동시키는 제 1 이동단계;

2) 상기 마그네틱 결합체와 검체 내의 타겟 항원이 결합하여 마그네틱 결합체-항원 복합체를 형성하는 제 1 결합단계;

3) 상기 마그네틱 결합체-항원 복합체를 자석을 이용하여 표지자가 담긴 제 2 웰(well)로 이동시키는 제 2 이동단계;

4) 상기 마그네틱 결합체-항원 복합체와 상기 표지자가 결합하여 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 형성하는 제 2 결합단계; 및

5) 상기 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 검출하는 검출단계를 포함하는 면역검사방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은

시료가 분주되는 웰(well)을 포함하는 웰부;

마그네틱 바(magnetic bar) 및 이를 덮을 수 있는 마그네틱 바-캡(cap)로 구성되는 자석부;

상기 시료내 검체와 결합한 표지자의 형광을 검출할 수 있는 형광검출부; 및

상기 웰을 상기 형광검출부로 이동시킬 수 있는 이동부를 포함하는 형광다중면역검사기기를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 단일 또는 다중면역검사를 수행하기 위하여,

자석부 및 형광 검출부를 하나의 자동화된 기기로 구현하는 마그네틱을 이용하는 것을 특징으로 하는 형광다중면역검사기기

【기술적 해결방법】

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1) 마그네틱 비드(magnetic bead) 및 제 1 항체를 포함하는 마그네틱 결합체를 자석을 이용하여 검체가

담긴 제 1 웰(well)로 이동시키는 제 1 이동단계;

2) 상기 마그네틱 결합체와 검체 내의 타겟 항원이 결합하여 마그네틱 결합체-항원 복합체를 형성하는 제 1 결합단계;

3) 상기 마그네틱 결합체-항원 복합체를 자석을 이용하여 표지자가 담긴
5 제 2 웰(well)로 이동시키는 제 2 이동단계;

4) 상기 마그네틱 결합체-항원 복합체와 상기 표지자가 결합하여
마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 형성하는 제 2 결합단계; 및

5) 상기 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 검출하는 검출단계를
포함하는 면역검사방법을 제공한다.

10

또한 본 발명은 시료가 분주되는 웰(well)을 포함하는 웰부; 마그네틱
바(magnetic bar) 및 이를 덮을 수 있는 마그네틱 바-캡(cap)으로 구성되는
자석부; 상기 시료내 검체와 결합한 표지자의 형광을 검출할 수 있는
형광검출부; 및 상기 웰을 상기 형광검출부로 이동시킬 수 있는 이동부를
15 포함하는 형광다중면역검사기기를 제공한다.

【유리한 효과】

본 발명은 마그네틱(magnetic) 결합체를 이용하는 면역검사방법을
제공함으로써, 상기 마그네틱 결합체에 결합한 검체 내 목적 항원이
20 마그네틱에 의해 직접 이동하기 때문에 검사에 소요되는 시간을 단축할 수
있다. 또한, 검체가 이동하는 방식이므로 다수의 목적 항원에 대한 각각의
항체 및 표지자를 사용함으로써 다중검사에 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

25 도 1은 일반적인 효소면역검사법의 실험방법(ELISA)을 도식화한 도이고,
도 2는 마그네틱(magnetic)을 이용한 형광다중면역검사법의 실험을
도식화한 도이고,

도 3은 본 발명을 수동으로 구현한 검사흐름을 도식화한 도이고,

도 4는 마그네틱 형광다중면역검사기의 기기도이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명에서 사용된 용어를 설명한다.

5

본 발명에 사용된 용어 “마그네틱 비드(magnetic bead)”란, 내부에 자성입자가 있고 외부에 실리카 및 다양한 관능기를 코팅한 소입자를 의미한다.

또한, 본 발명에 사용된 용어 “항체”란, 면역학적으로 특정 항원과
10 반응성인 면역글로불린 분자를 의미한다. 유전 공학에 의해 생산된 형태, 항원결합 능력을 가지는 항체 단편을 포함할 수 있으나 본 발명의 목적상 단일클론 항체를 의미한다.

또한, 본 발명에 사용된 용어 “제 1 항체”란, 목적 항원과 특이적으로 결합하며, 상기 마그네틱 비드와 결합하는 항체를 의미한다.

15 또한, 본 발명에 사용된 용어 “제 2 항체”란, 목적 항원과 특이적으로 결합하며, 표지자와 결합하는 항체를 의미한다.

또한, 본 발명에 사용된 용어 “마그네틱 결합체”란, 상기 마그네틱 비드와 목적 항원에 특이적으로 결합하는 제 1 항체가 결합한 결합체를 의미한다.

20 또한, 본 발명에 사용된 용어 “마그네틱 결합체-항원 복합체”란, 상기 마그네틱 결합체와 항원이 결합한 복합체를 의미한다.

또한, 본 발명에 사용된 용어 “마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체”란, 상기 마그네틱 결합체-항원 복합체와 표지자가 결합한 복합체를 의미한다.

25 또한, 본 발명에 사용된 용어 “표지자”란, 제 2 항체 및 제 2 항체와 결합하는 마커를 포함하는 복합체를 의미한다.

또한, 본 발명에 사용된 용어 “EDC[N-ethyl- N' -(dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride' 이하 EDC 라 한다] 커플링”이란, EDC 용액을

반응시킴으로써, 마그네틱 비드 등의 표면에 카르복실기를 작용기로 형성시키는 것을 의미한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

5

본 발명은

1) 마그네틱 비드 및 제 1 항체를 포함하는 마그네틱 결합체를 자석을 이용하여 검체가 담긴 제 1 웰(well)로 이동시키는 제 1 이동단계;

10 2) 상기 마그네틱 결합체와 검체 내의 타겟 항원이 결합하여 마그네틱 결합체-항원 복합체를 형성하는 제 1 결합단계;

3) 상기 마그네틱 결합체-항원 복합체를 자석을 이용하여 표지자가 담긴 제 2 웰(well)로 이동시키는 제 2 이동단계;

4) 상기 마그네틱 결합체-항원 복합체와 상기 표지자가 결합하여 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 형성하는 제 2 결합단계; 및

15 5) 상기 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 검출하는 검출단계를 포함하는 면역검사방법을 제공한다.

일반적으로 가장 많이 사용되는 엘라이자 방법(ELISA)은 도 1과 같이 1차로 표면에 고정된 제 1항체(주항체)에 목적 항원이 특이적인 결합을 하고, 20 2차로 표지자가 결합된 제 2항체가 제 1항체-항원 결합체를 인지하여 결합한 후, 마지막으로 표지자의 형광을 검출하여, 목적항원을 검출하게 된다.

구체적으로 본 발명은, 도 2와 같이 외부의 자석을 이용하여 마그네틱 결합체를 검체가 담긴 제 1 웰로 이동한 후, 상기 자석에 부착되어 있는 25 마그네틱 결합체로 목적 항원을 검출한 후, 다시 상기 자석에 부착되어 있는 마그네틱 결합체-항원 복합체를 세척액이 담긴 플레이트로 이동시켜 세척을 통해 마그네틱 결합체 표면의 미반응 잔기를 보호(blocking)한다. 그 후, 상기 자석에 부착된 상태의 마그네틱 결합체-항원 복합체를 표지자가 담겨있는 제 2

웰로 옮겨, 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 형성한다.

또한, 본 발명은 상기 단계 3) 전에 마그네틱 결합체-항원 복합체를 자석을 이용하여 세척액이 담긴 플레이트로 이동시켜 세척하는 세척단계를 더 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

10

또한, 본 발명은 상기 단계 5) 전에 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 자석을 이용하여 세척액이 담긴 플레이트로 이동시켜 세척하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 세척단계는 Tris-HCL, TBE(Tris borate EDTA), TBS(Tris-buffered saline), PBS(Phosphate buffered saline), BSA(Bovine serum albumin) 등의 완충용액을 사용할 수 있으며, 3회 내지 5회 반복할 수 있으나, 마그네틱 비드에 잔존하는 미반응 카르복실기(-COOH) 등을 보호할 수 있다면 이에 한정되지 않고 당업자에게 알려진 모든 공지의 완충용액에 의해 이루어질 수 있다.

15

또한, 본 발명의 상기 표지자는 상기 마그네틱 결합체-항원 복합체와 결합하는 제2 항체를 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

20

또한, 본 발명의 상기 검출단계는 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체의 형광값을 측정하는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

25

상기 형광값 측정은 형광광도계, 분광광도계, 형광분광광도계, 자외-가시선 분광광도계, 마이크로플레이트 리더(microplate reader) 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

또한, 본 발명의 상기 마그네틱 비드는 마그네틱 비드의 표면에 중성 카르복시기($-\text{COOH}$), 에스테르기($-\text{COO}^-$), 중성 아민기($-\text{NH}_2$), 중성 아민기의 이온($-\text{NH}^+$ 또는 NH_3^+), 중성 티올기($-\text{SH}$) 및 중성 티올기의 이온($-\text{S}^-$)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 작용기를 포함할 수 있으나, 이에
5 한정되는 것은 아니다.

또한, 본 발명의 상기 마그네틱 비드 결합체는 상기 마그네틱 비드는 항체와 스트렙타비딘-바이오틴 결합, 아비딘-바이오틴 결합, EDC 커플링, 설프하이드릴아민 커플링, Ni-NTA-히스티딘 결합, 아마이드 바인딩을 하는 것을
10 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

또한, 본 발명의 상기 표지자는 제 2 항체와 결합하는 형광물질 또는 자외선(uv) 표지자일 수 있다. 구체적으로, 상기 형광물질 또는 자외선(uv) 표지자는 FITC(Fluorescein isothiocyanate), PE(phycoerythrin),
15 TRITC(tetramethyl-rhodamine isothiocyanate), Cy3(Cyanine 3), Cy5(Cyanine 5) 및 로다민(Rhodamine)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

또한, 본 발명은 시료가 분주되는 웰(well)을 포함하는 웰부;
20 마그네틱 바(magnetic bar) 및 이를 덮을 수 있는 마그네틱 바-캡(cap)으로 구성되는 자석부;

상기 시료내 검체와 결합한 표지자의 형광을 검출할 수 있는 형광검출부; 및

상기 웰을 상기 형광검출부로 이동시킬 수 있는 이동부를 포함하는
25 형광다중면역검사기기를 제공한다.

또한, 본 발명의 상기 웰부는 6웰 플레이트, 12웰 플레이트, 18웰 플레이트, 24웰 플레이트, 36웰 플레이트, 48웰 플레이트, 96웰 플레이트, 128웰

플레이트, 256웰 플레이트, 384웰 플레이트로 구성되는 군으로부터 선택되는 웰플레이트를 포함하는 것을 특징으로 하나 이에 한정되는 것은 아니다.

또한, 본 발명의 상기 웰은 1열에는 시료를 분주하고, 2열에는 마그네틱 결합체를 분주하고, 3열 및 5열에는 세척액을 분주하고, 4열에는 표지자 복합체를 분주하며, 6열에는 버퍼용액을 분주하는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

또한, 본 발명은 상기 자석부 및 상기 형광 검출부를 하나의 자동화된 기기로 구현하는 마그네틱을 이용하는 것을 특징으로 하는 형광다중면역검사기기를 제공하나 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, 본 발명자들은 마그네틱 결합체를 제조하기 위하여 $10\ \mu\text{l}$ 마그네틱 비드($7-12\ \times\ 10^9$ 비드/ml)를 EDC[N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride, EDC] 커플링법에 의해 마그네틱 비드의 표면에 카르복실기(-COOH)를 작용기로서 구비한 후, 제 1 트롬빈결합 항체의 아민기(-NH₂)와 상기 카르복실기를 아마이드 바인딩(amide binding)에 의해 결합시킨후, 분광계로 260 nm 에서 흡광도를 측정한 결과, 마그네틱 결합체의 결합을 확인할 수 있었다.

또한, 본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, 상기 EDC 용액처리 후 마그네틱 비드 표면에 형성된 미반응 작용기를 보호(blocking)하기 위하여, 마그네틱 결합체의 제조 후, 마그네틱 결합체-항원 복합체의 제조 후 및 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체 제조 후 각 단계마다 $1000\ \mu\text{l}$ 의 완충용액(0.1% BSA[bovine serum albumin] 및 0.05% Tween 20)을 첨가하고, 실온에서 교반(200 rpm)하며 배양한 결과, 자석비드 표면의 카르복실기를 보호할 수 있었다.

또한, 본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, 본 발명자들은 표지자를 제조하기 위하여 제 2 트롬빈 단일클론 항체를 0.5 ml의 붕산염 완충용액(borate buffer, pH 8.5, 0.1 M)에 15 μ l FITC(BD Biosciences, USA)을
 5 첨가한 용액에 첨가한 후, 실온의 암실 조건에서 2시간 동안 반응시킨 후, 상기 용액을 탈염(desalting) 컬럼으로 정제한 후, 280 nm와 496 nm에서 흡광도를 측정하여 상기 제 2 트롬빈 단일클론 항체와 FITC의 결합여부를 확인한 결과, 표지자를 수득할 수 있었다.

10 또한, 본 발명의 구체적인 실험예에 있어서, 본 발명자들은 상기 마그네틱 결합체-항원 복합체를 검출하기 위하여, 목적 항원인 1 ng/ml 내지 1 μ g/ml 의 트롬빈(Abcam (ab48626), USA)을 함유한 PBS 용액에 상기 마그네틱 결합체(10 μ l, $7-12 \times 10^9$ 비드/ml)를 섞은 후, 상기 용액을 37°C에서 10분간 교반(200 rpm)하면서 결합반응 시키고, 자석에 1분동안 노출시킨 결과,
 15 마그네틱 결합체-항원 복합체를 얻을 수 있었다.

또한, 본 발명의 구체적인 실험예에 있어서, 본 발명자들은 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 검출하기 위하여, 상기 마그네틱 결합체-항원(트롬빈)복합체와 상기 실시예 2의 표지자를 PBS용액에서 37°C로
 20 10분간 인큐베이션을 하여에서 결합시킨 후 488 nm의 가시광선을 조사하여, 520 nm의 가시광선을 측정한 결과, 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 검출함으로써 목적 항원(트롬빈)을 검출할 수 있었다.

또한, 본 발명의 구체적인 실험예에 있어서, 본 발명자들은
 25 형광다중면역검사를 수행하기 위하여 3가지의 항원인 A형 간염바이러스(HAV), B형 간염바이러스(HBV) 및 C형 간염바이러스(HCV) 대하여 각각의 마그네틱 결합체-항원 복합체를 제조한 후, 각각의 항원에 대하여 각각의 형광물질을 결합시킨 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 제조하여(구체적으로 HAV에

대한 형광물질은 'Cy3', HBV에 대한 형광물질은 'FAM', HCV에 대한 형광물질은 'Fluo-4'를 사용하였다), 각 표지자 형광물질에 특이적인 가시광선(Cy3는 544 nm, FAM은 492 nm, Fluo-4는 492 nm)을 조사한 후 방사된 가시광선을 측정(Cy3는 590 nm, FAM은 518 nm, Fluo-4는 518 nm)한 결과 3가지 항원에 대한
5 형광다중면역을 실시하여 목적 항원을 검출할 수 있었다.

또한, 본 발명의 구체적인 실험예에 있어서, 본 발명자들은 형광다중면역검사를 자동화 기기에서 구현하기 위하여 버퍼가 분주된 제 6열의 웰을 X-Y stepper를 이용하여 전자동 형광다중면역검사 기기의 후면으로
10 이동시킨 후, 상기 기기의 후면에 장착되어 있는 형광광학장치를 이용하여 검체와 결합한 표지자의 발광값을 측정한 결과 자동화된 형광다중면역검사 기기를 이용하여 목적 항원을 검출할 수 있었다.

따라서, 본 발명의 상기 면역진단방법은, 마그네틱의 이동에 의해 검체
15 내 목적 항원을 직접 포집할 수 있는바 실험 시간을 크게 단축할 수 있어, 면역진단방법에 유용하게 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일뿐, 본 발명의 내용이 하기
20 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 마그네틱 결합체의 제조

본 발명자들은, 마그네틱을 이용하여 항원을 검출하기 위해, 마그네틱
비드에 제 1 트롬빈 단일클론 항체를
25 EDC[N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride, 이하 EDC] 커플링법을 이용하여 '마그네틱 결합체'를 제조하였다.

우선, 10 μ l 마그네틱 비드($7-12 \times 10^9$ 비드/ml)를 0.01 M의 NaOH 수용액 및 탈이온수로 세척하여 준비하였다. 세척 후, 상기 세척 용액을 마그네틱 위에

1분 동안 노출시켜서 상기 마그네틱 비드를 분리하였다.

이어서, 마그네틱 비드의 표면에 카르복실기를 형성시킬 수 있도록 마그네틱 비드에 EDC 용액 500 μ l (20 mg/ml)을 첨가하고, 4°C에서 30분 동안 교반기(shaking incubator, 200 rpm)에서 배양하였다.

5 배양 후, 미반응된 EDC 용액을 제거하고 남은 마그네틱 비드를 1000 μ l PBS(phosphate buffered saline)에 재현탁시키고, 제 1 트롬빈 단일클론 항체(Abcam(ab8926), 영국)와 혼합한 다음 실온에서 1시간 동안 교반(200 rpm)하며 배양하였다.

상기 결합 후, 상기 마그네틱 비드 및 제 1 트롬빈 단일클론 항체의
10 혼합액을 마그네틱 위에 1분 동안 노출시켜 미결합 항체를 제거하였다. (결합한 항체의 양은 분광계로 260 nm 에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.) 이후, 항체가 결합된 마그네틱 비드를 1000 μ l 의 PBS(10 mM, pH 7.4)로 3회 세척하였다.

세척 후, 마그네틱 비드 표면의 미반응 카르복실기를 보호하기 위해,
15 1000 μ l 의 완충용액(0.1% BSA[bovine serum albumin] 및 0.05% Tween 20)을 첨가하고, 실온에서 교반(200 rpm)하며 배양하였다. 이후 상기 용액을 자석에 노출시켜 마그네틱 결합체-항원 복합체를 분리하였다

배양 후, 1000 μ l 의 PBS(10 mM, pH 7.4) 용액에 재현탁하여, 항원과 결합할 수 있는 마그네틱 결합체를 제조할 수 있었다.

20

<실시예 2> 표지자의 제조

본 발명자들은, 상기 <실험예 1>에서 검출한 마그네틱 결합체-항원 복합체를 검출하기 위한 '표지자'를 하기의 방법으로 제조하였다.

제 2 트롬빈 단일클론 항체([5G9](ab7199))를 형광물질인 Fluorescein
25 isothiocyanate(이하, FITC)와 결합시켜서 '표지자'를 제조하였다.

구체적으로, 제 2 트롬빈 단일클론 항체를 0.5 ml 의 붕산염 완충용액(borate buffer, pH 8.5, 0.1 M)에 15 μ l FITC(BD Biosciences, USA)을 첨가한 용액에 첨가한 후, 실온의 암실 조건에서 2시간 동안 반응하였다.

그 후, 상기 용액을 탈염(desalting) 컬럼으로 정제한 후, 280 nm와 496 nm에서 흡광도를 측정하여 상기 제 2 트롬빈 단일클론 항체와 FITC의 결합여부를 확인한 결과, 표지자를 수득할 수 있었다.

5 <실험예 1> 마그네틱 결합체-항원 복합체의 검출

본 발명자들은, 상기 <실시예 1>에서 제조한 마그네틱 결합체를 이용하여 하기의 실험과 같이 항원(트롬빈)을 포집하였다.

구체적으로, 1 ng/ml 내지 1 ug/ml 의 트롬빈(Abcam (ab48626),USA)을 함유한 PBS 용액에 상기 <실시예 1>의 마그네틱 결합체(10 μ l, 7-12 $\times 10^9$ 비드/ml)를 섞었다. 타겟 항원인 트롬빈의 검출을 위해, 상기 용액을 37℃에서 10분간 교반(200 rpm)하면서 결합반응 시켰다.

상기 결합 반응 후, 상온에서 상기 마그네틱 결합체 및 항원(트롬빈)을 함유한 PBS용액을 마그네틱에 노출시켜 마그네틱 결합체-항원 복합체를 분리하였다.

15 포집된 트롬빈의 양을 측정하기 위해 상기 용액의 상층액(supernatant)을 별도의 튜브로 옮겼다.

포집된 트롬빈의 양은 Micro BCA법에 의해 측정하였다.

이어서, 마그네틱 결합체-트롬빈(항원) 복합체를 1000 μ l 의 PBS(10 mM, pH 7.4) 용액으로 5회 세척하였다.

20 세척 후, 마그네틱 비드 표면의 미반응 카르복실기를 보호하기 위해, 1000 μ l 의 완충용액(0.1% BSA[bovine serum albumin] 및 0.05% Tween 20)을 첨가하고, 실온에서 교반(200 rpm)하며 배양하였다. 배양 후, 상기 용액을 자석에 1분 동안 노출하여 상기 완충용액을 제거하였다.

이후, 1000 μ l 의 PBS(10 mM, pH 7.4) 용액에서 재현탁한 후, 자석을 이용하여 마그네틱 결합체-항원 복합체를 수득하였다.

<실험예 2> 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체의 검출

본 발명자들은, 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 검출하기 위해

하기의 실험을 수행하였다.

구체적으로, 상기 상기 마그네틱 결합체-항원(트롬빈)복합체와 상기 <실시에 2>의 표지자를 PBS용액에서 37℃에서 10분간 인큐베이션을 하여 결합시킨 후 488 nm의 가시광선을 조사하여, 520 nm의 가시광선을 측정하였다

5 그 결과, 상기 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 검출함으로써 목적 항원(트롬빈)을 검출할 수 있었다.

<실험예 3> 형광다중면역검사 수행

본 발명자들은, 형광다중면역검사를 수행하기 위하여, 하기의
10 형광다중면역검사를 수행하였다.

3가지의 항원인 A형 간염바이러스(HAV), B형 간염바이러스(HBV) 및 C형 간염바이러스(HCV)를 동시에 검출하기 위하여 상기 실시예 1 및 2와 같은 방법으로 각 항원에 대하여 마그네틱 결합체-항원 복합체를 제조하였다.

구체적으로, A형 간염(HAV) 항체 1(이하, HAV Ab1) 및 항체 2(이하, HAV Ab2), B형 간염(HBV) 항체 1(이하, HBV Ab1) 및 항체 2(이하, HBV Ab2), C형 간염(HCV) 항체 1(이하, HCV Ab1) 및 항체 2(이하, HCV Ab2)를 준비하고, HAV Ab1, HBV Ab1, HCV Ab1는 각각 마그네틱 비드와 결합시켜 마그네틱 결합체를 제조하였으며, HAV Ab2, HBV Ab2, HCV Ab2 는 각각의 형광물질인 Cy3(HAV Ab2), FAM(HBV Ab2), Fluo-4(HCV Ab2)와 결합시켜 표지자를 제조하였다.

20 형광다중면역 검사를 위해, 96 웰플레이트(well plate) 1열에 검체인 혈액을 분주하였고, 2열에는 상기의 각각의 마그네틱 결합체를 각각 0.1 mg/ml씩 동량으로 분주하였고, 3열에는 1000 μ l 의 PBS(10 mM, pH 7.4) 세척액을 분주하였으며, 4열에는 상기 표지자(Cy3-HAV Ab2, FAM-HBV Ab2, Fluo-4-HCV Ab2)를 각각 0.1 mg/ml씩 동량으로 분주하였으며, 5열에는 상기 3열과 같은
25 세척액을 분주하였다. 6열에는 버퍼를 분주하였다.

구체적으로, 자석을 이용하여 2열의 마그네틱 결합체를 검체가 분주된 1열로 이동시킨후, 10분간 반응시켜서 마그네틱 결합체와 항원을 결합시켰다. 이때 항원-항체 반응을 촉진하기 위하여 37℃로 하부에 장착된 알루미늄

블록을 통하여 가열(heating)하였고, 마그네틱 바를 상부에 두고 플라스틱 바깥을 상하운동을 하여 결합반응을 촉진시켰다. 그 후, 자석을 이용하여 1열의 마그네틱 결합체-항원 복합체를 3열로 이동시켜서 세척액에서 2분동안 세척하여 마그네틱 비드 표면의 카르복실 잔기를 보호(blocking)하였다. 그 후, 5 자석을 이용하여 마그네틱 비드-항원 복합체를 4열로 옮겨 10분간 반응 시킨 결과 마그네틱 결합체-항원 복합체와 표지자를 결합시켰다. 그 후, 자석을 이용하여 마그네틱 결합체-항원-표지자 결합체를 5열로 옮긴후, 세척액에서 2분간 세척한 결과 불순물을 제거할 수 있었다.

상기 세척이 완료된 제 5열의 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 10 다시 자석을 이용하여 6열의 버퍼에 넣었다. 상기 6열에 포함된 시료를 마이크로플레이트 형광검출기에 넣고 형광 값을 측정하였다. 구체적으로 A형 간염에 대하여는, 544 nm의 가시광선을 조사하고 590 nm를 측정하였고, B형 간염에 대하여는 492 nm의 가시광선을 조사하고 518 nm를 측정하였으며, C형 간염에 대하여는 485 nm의 가시광선을 조사하고 518 nm를 측정하였다.

15 그 결과, 3가지의 항원(A형, B형, C형 간염)에 대한 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 검출함으로써 형광다중면역을 실시하여 목적항원을 검출할 수 있었다.

<실험예 4> 전자동 형광다중면역검사기기를 통한 항원의 검출

20 본 발명자들은, 형광다중면역검사를 자동화 기기에서 구현하기 위하여 하기와 같은 실험을 하였다.

구체적으로, 상기 <실험예 3>의 제 6열의 웰을 X-Y stepper motor를 이용하여 전자동 형광다중면역검사 기기의 후면으로 이동시킨 후, 상기 기기의 후면에 장착되어 있는 형광광학장치를 이용하여 검체와 결합한 표지자의 25 형광값을 측정하였다.

그 결과, 자동화된 형광다중면역검사 기기를 이용하여 목적 항원을 검출할 수 있었다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

1) 마그네틱 비드(magnetic bead) 및 제 1 항체를 포함하는 마그네틱 결합체를 자석을 이용하여 검체가 담긴 제 1 웰(well)로 이동시키는 제1 이동단계;

2) 상기 마그네틱 결합체와 검체 내의 타겟 항원이 결합하여 마그네틱 결합체-항원 복합체를 형성하는 제 1 결합단계;

3) 상기 마그네틱 결합체-항원 복합체를 자석을 이용하여 표지자가 담긴 제 2 웰(well)로 이동시키는 제 2 이동단계;

4) 상기 마그네틱 결합체-항원 복합체와 상기 표지자가 결합하여 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 형성하는 제 2 결합단계; 및

5) 상기 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 검출하는 검출단계를 포함하는 면역검사방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 단계 3) 전에 마그네틱 결합체-항원 복합체를 자석을 이용하여 세척액이 담긴 플레이트로 이동시켜 세척하는 단계를 더 포함하는 면역검사방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 단계 5) 전에 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체를 자석을 이용하여 세척액이 담긴 플레이트로 이동시켜 세척하는 단계를 더 포함하는 면역검사방법.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 표지자는 상기 마그네틱 결합체-항원 복합체와 결합하는 제 2 항체를 포함하는 면역검사방법.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 검출단계는 마그네틱 결합체-항원-표지자 복합체의 형광 값을 측정하는 것을 특징으로 하는 면역검사방법.

5 【청구항 6】

제 1항에 있어서, 상기 마그네틱 비드는

상기 마그네틱 비드 표면에 중성카르복시기($-\text{COOH}$), 에스테르기($-\text{COO}^-$), 중성아민기($-\text{NH}_2$), 중성 아민기의 이온($-\text{NH}^+$ 또는 NH_3^+), 중성 티올기($-\text{SH}$), 중성 티올기의 이온($-\text{S}^-$) 으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 작용기를
10 포함하는 것을 특징으로 하는 면역검사방법.

【청구항 7】

제 1항에 있어서, 상기 마그네틱 결합체는

상기 마그네틱 비드는 항체와 스트렙타비딘-바이오틴 결합,
15 아비딘-바이오틴 결합, EDC 커플링, 설프하이드릴아민 커플링, Ni-NTA-히스티딘 결합, 아마이드 바인딩을 하는 것을 특징으로 하는 면역검사방법.

【청구항 8】

제 4항에 있어서, 상기 표지자는 제 2항체와 결합하는 형광물질 또는
20 자외선(uv) 표지자인 면역검사방법.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 상기 형광물질 또는 자외선(uv) 표지자는
FITC(Fluorescein isothiocyanate), PE(phycoerythrin),
25 TRITC(tetramethyl-rhodamine isothiocyanate), Cy3(Cyanine 3), Cy5(Cyanine 5)
및 로다민(Rhodamine)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 면역검사방법.

【청구항 10】

시료가 분주되는 웰(well)을 포함하는 웰부;

마그네틱 바(magnetic bar) 및 이를 덮을 수 있는 마그네틱 바-캡(cap)으로 구성되는 자석부;

상기 시료내 검체와 결합한 표지자의 형광을 검출할 수 있는

5 형광검출부; 및

상기 웰을 상기 형광검출부로 이동시킬 수 있는 이동부를 포함하는 형광다중면역검사기기.

【청구항 11】

10 제 10항에 있어서, 상기 웰부는 6웰 플레이트, 12웰 플레이트, 18웰 플레이트, 24웰 플레이트, 36웰 플레이트, 48웰 플레이트, 96웰 플레이트, 128웰 플레이트, 256웰 플레이트, 384웰 플레이트로 구성되는 군으로부터 선택되는 웰플레이트를 포함하는 것을 특징으로 하는 형광다중면역검사기기.

15

【청구항 12】

제 11항에 있어서, 상기 웰의 1열에는 시료를 분주하고, 2열에는 마그네틱 결합체를 분주하고, 3열 및 5열에는 세척액을 분주하고, 4열에는 표지자 복합체를 분주하며, 6열에는 버퍼용액을 분주하는 것을 특징으로 하는
20 형광다중면역검사기기.

【청구항 13】

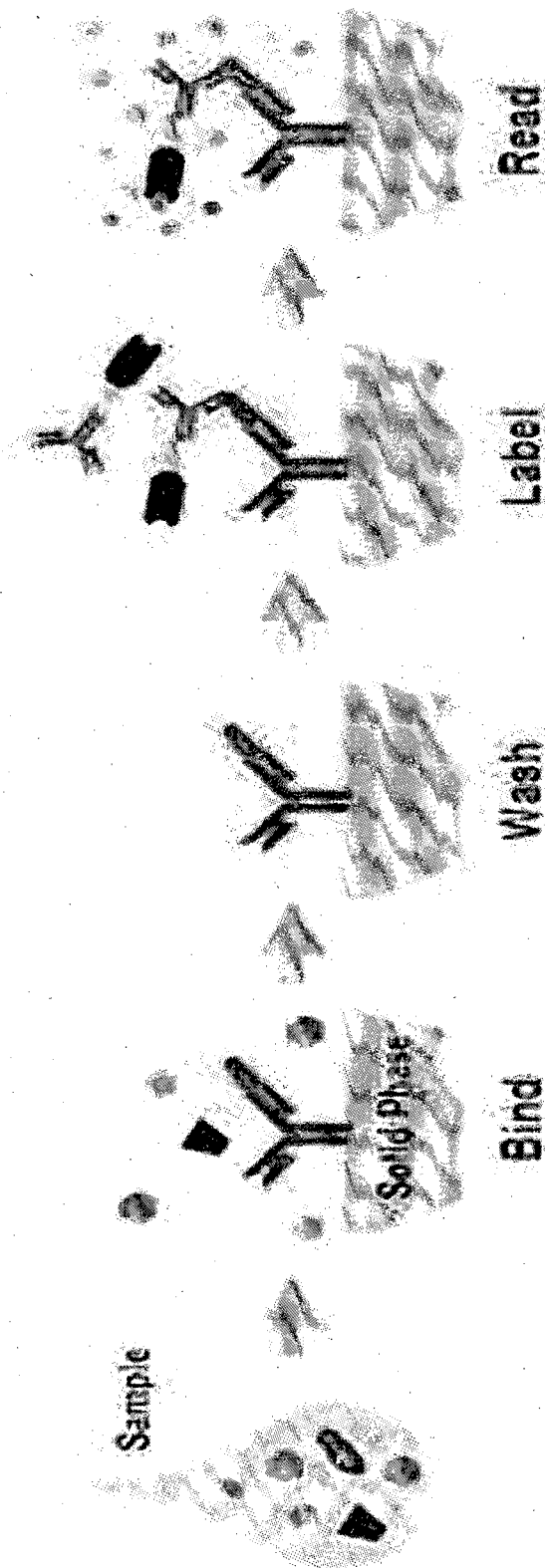
제 10항에 있어서, 상기 형광다중면역검사기기는

자석부 및 형광 검출부를 하나의 자동화된 기기로 구현하는 마그네틱을

25 이용하는 것을 특징으로 하는 형광다중면역검사기기.

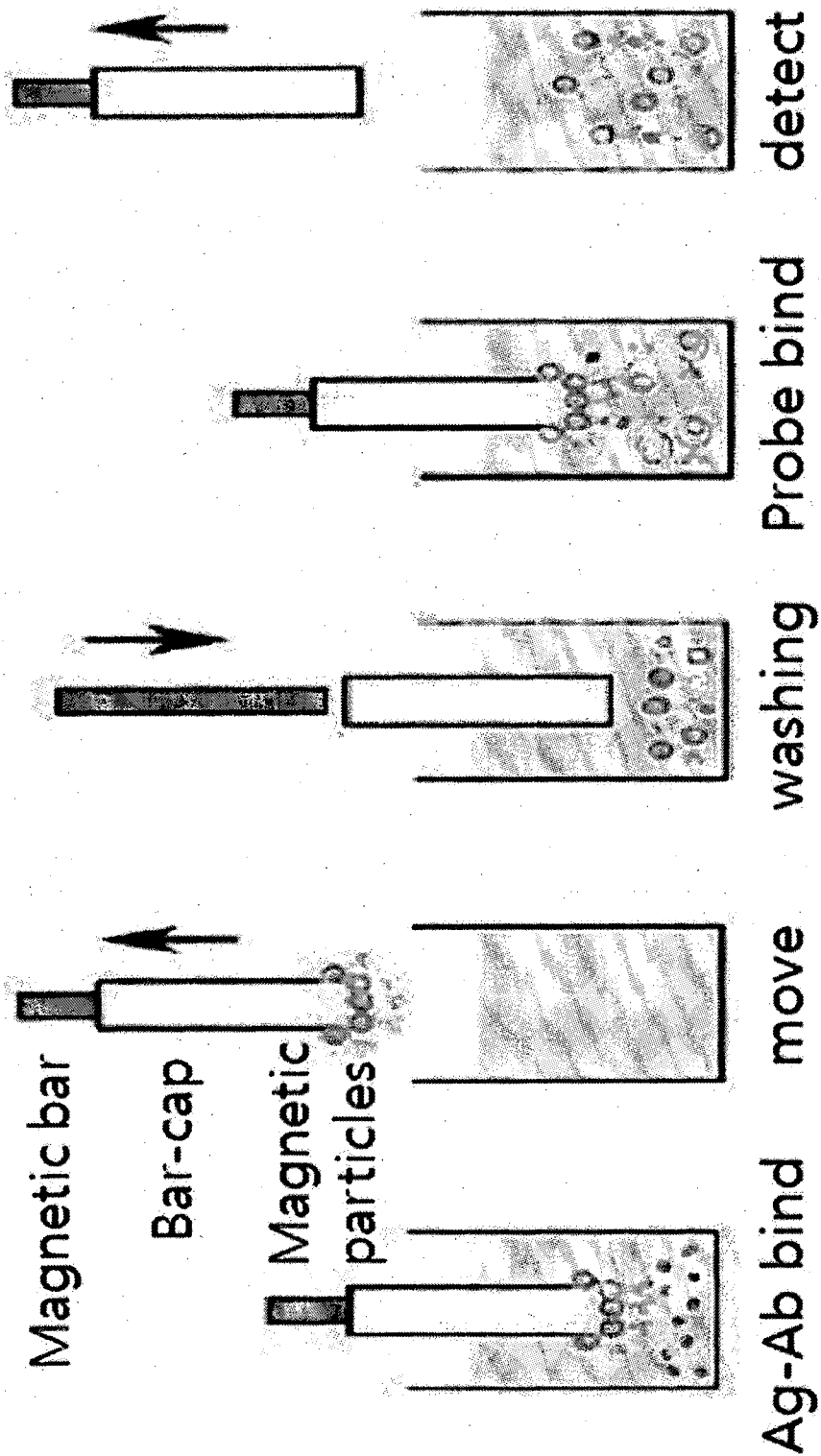
1/4

[도 1]



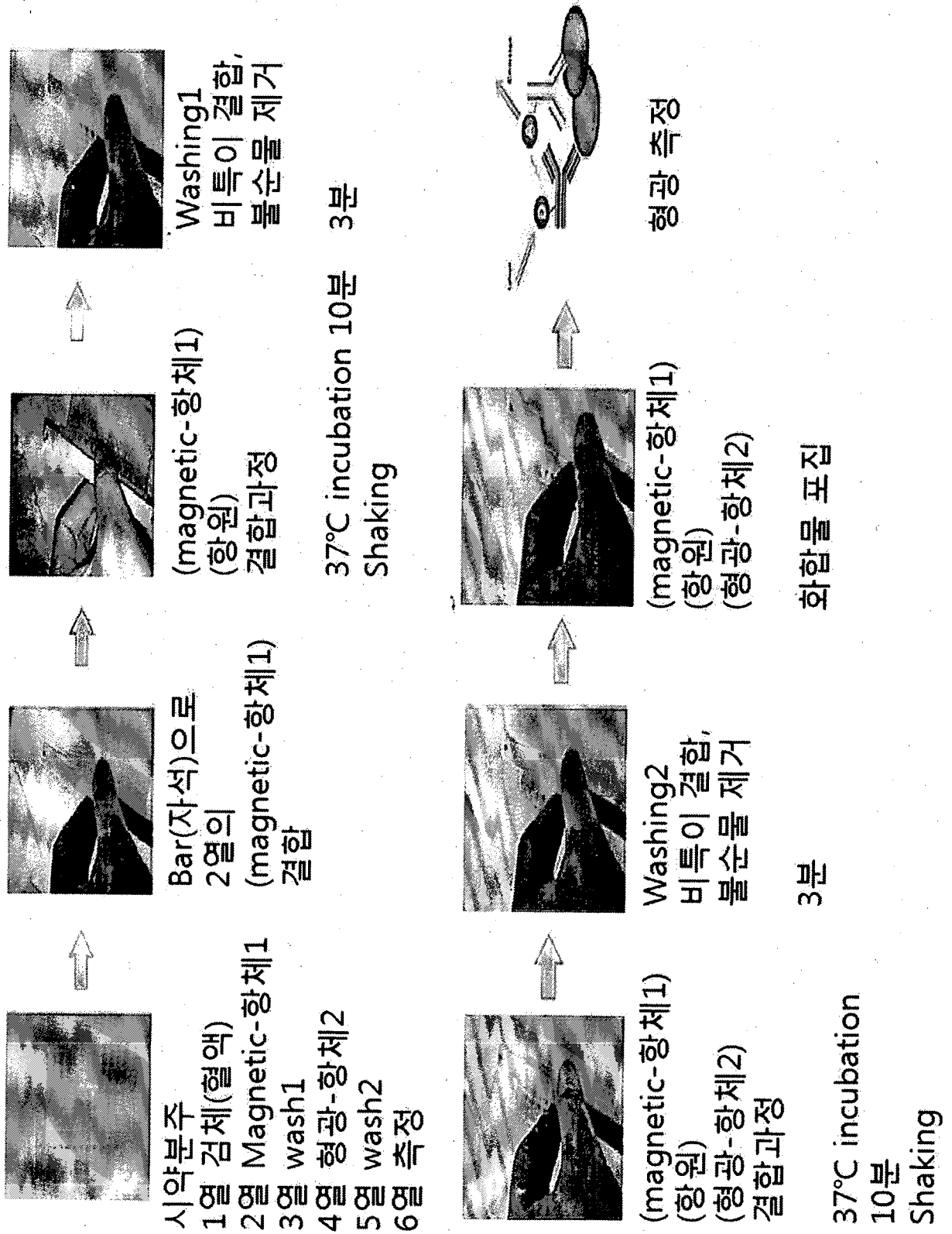
2/4

[도 2]



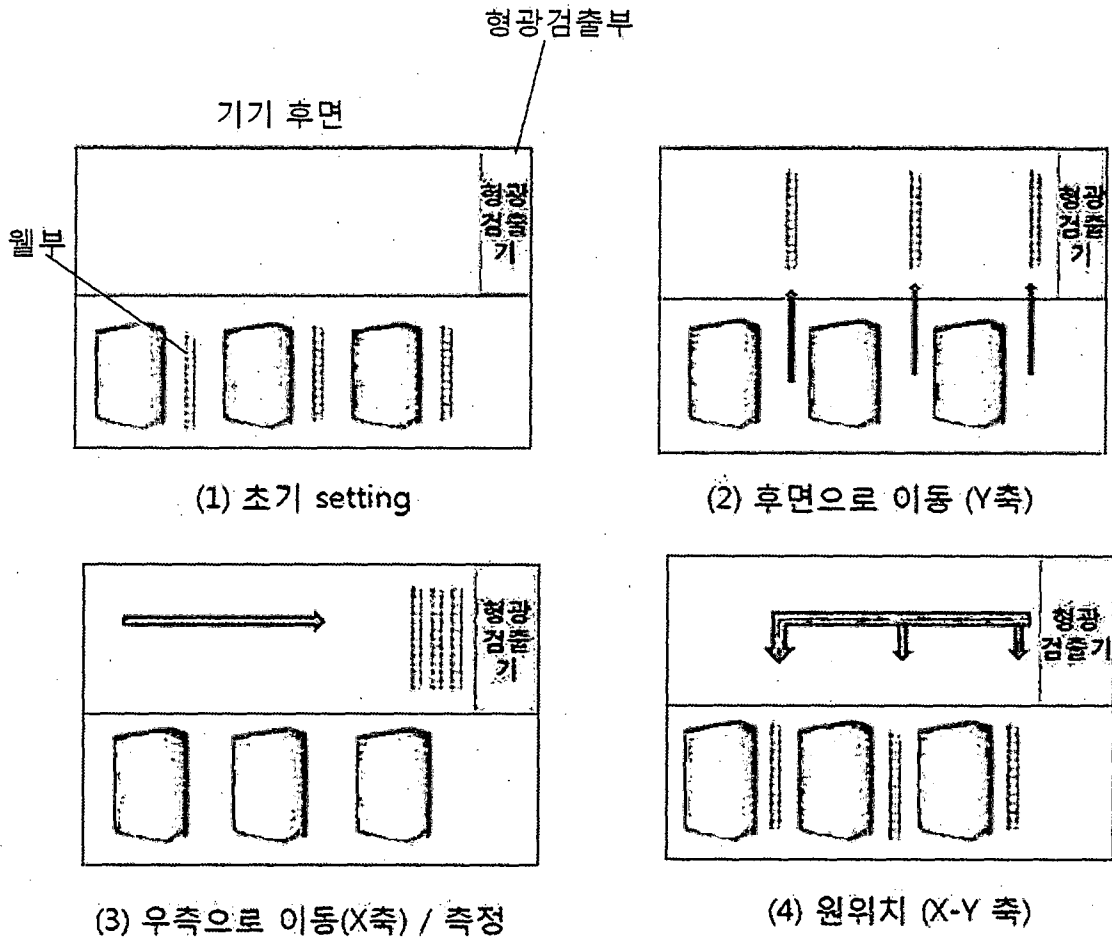
3/4

[도 3]



4/4

[도 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/004014**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/573(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/53; G01N 33/52; G01N 33/547; G01N 33/68; C12Q 1/06; C12N 15/115; G01N 33/58; G01N 33/573

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: magnetic field, magnet, magnetic field, magnet, magnetic, particle, particle, bead, ELISA, ELISA, immunoassay, immunofluorescence, cover, marker

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2011-0130384 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 05 December 2011 See abstract; claims 1-29; figure 1.	1-13
A	KR 10-2009-0033694 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 06 April 2009 See abstract; claims 1-8; figures 1 and 2.	1-13
A	KR 10-2012-0130731 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 03 December 2012 See abstract; claims 1-12; figure 1.	1-13
A	KR 10-2010-0107648 A (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) 06 October 2010 See abstract; claims 1-14.	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

09 JULY 2015 (09.07.2015)

Date of mailing of the international search report

09 JULY 2015 (09.07.2015)

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/KR2015/004014

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0130384 A	05/12/2011	WO 2011-145908 A2	24/11/2011
		WO 2011-145908 A3	31/05/2012
		WO 2011-145908 A9	24/11/2011
KR 10-2009-0033694 A	06/04/2009	EP 2193372 A1	09/06/2010
		EP 2193372 B1	21/11/2012
		JP 05-171958B2	27/03/2013
		JP 2010-540925A	24/12/2010
		US 2010-0196937 A1	05/08/2010
		US 8642356 B2	04/02/2014
		WO 2009-044985 A1	09/04/2009
KR 10-2012-0130731 A	03/12/2012	NONE	
KR 10-2010-0107648 A	06/10/2010	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/573(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/53; G01N 33/52; G01N 33/547; G01N 33/68; C12Q 1/06; C12N 15/115; G01N 33/58; G01N 33/573

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: 자기장, 마그넷, 자장, 자석, 마그네틱, 입자, 파티클, 비드, 엘리사, ELISA, 면역분석, 형광면역, 표지, 마커

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2011-0130384 A (고려대학교 산학협력단) 2011.12.05 요약; 청구항 1-29; 도 1 참조.	1-13
A	KR 10-2009-0033694 A (한국생명공학연구원) 2009.04.06 요약; 청구항 1-8; 도 1 및 2 참조.	1-13
A	KR 10-2012-0130731 A (고려대학교 산학협력단) 2012.12.03 요약; 청구항 1-12; 도 1 참조.	1-13
A	KR 10-2010-0107648 A (한양대학교 산학협력단) 2010.10.06 요약; 청구항 1-14 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

“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

2015년 07월 09일 (09.07.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 07월 09일 (09.07.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



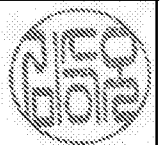
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김승오

전화번호 +82-42-481-5472



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0130384 A	2011/12/05	WO 2011-145908 A2 WO 2011-145908 A3 WO 2011-145908 A9	2011/11/24 2012/05/31 2011/11/24
KR 10-2009-0033694 A	2009/04/06	EP 2193372 A1 EP 2193372 B1 JP 05-171958B2 JP 2010-540925A US 2010-0196937 A1 US 8642356 B2 WO 2009-044985 A1	2010/06/09 2012/11/21 2013/03/27 2010/12/24 2010/08/05 2014/02/04 2009/04/09
KR 10-2012-0130731 A	2012/12/03	없음	
KR 10-2010-0107648 A	2010/10/06	없음	