



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월09일

(11) 등록번호 10-1481189

(24) 등록일자 2015년01월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/90 (2006.01) *G01N 31/22* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01) *G01N 21/77* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2009-7012200
- (22) 출원일자(국제) 2007년09월28일
 심사청구일자 2012년09월28일
- (85) 번역문제출일자 2009년06월12일
- (65) 공개번호 10-2009-0100350
- (43) 공개일자 2009년09월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2007/053962
- (87) 국제공개번호 WO 2008/075216
 국제공개일자 2008년06월26일
- (30) 우선권주장
 11/640,100 2006년12월15일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 JP2002122598 A*
 JP2003533678 A*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 김벌리-클라크 월드와이드, 인크.
 미국 위스콘신주 (우편번호: 54957-0349) 니나 노
 쓰 레이크 스트리트 401
- (72) 발명자
 송, 수에동
 미국 30076 조지아주 로스웰 크랩애플 레이크 서
 클 1135
 세이레, 커티스
 미국 30306 조지아주 애틀랜타 인버니스 애비뉴
 1728
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 24 항

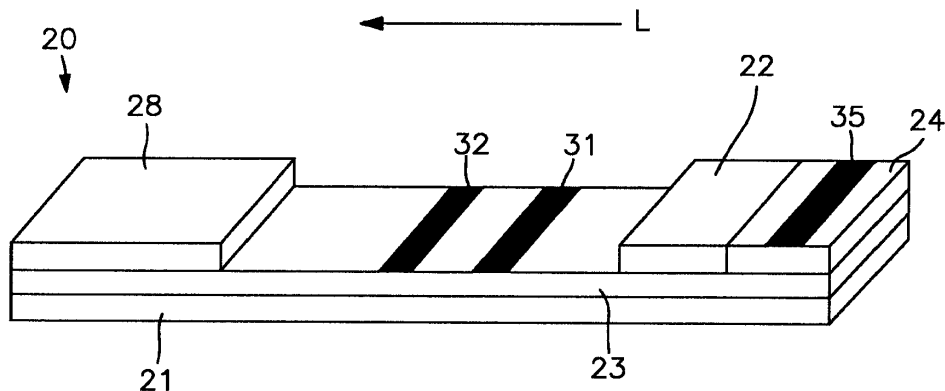
심사관 : 김도현

(54) 발명의 명칭 분석 장치에의 지시약 고정

(57) 요약

본 발명은 시험 샘플 중 분석물의 존재 또는 양을 검출하기 위한 측방향 유동 분석 장치를 제공한다. 장치는 검출 대역을 정의하는 크로마토그래피 매질을 포함하며, 여기서, 가교 네트워크는 비확산적으로 검출 대역 내에 고정된다. 가교 네트워크는 분석물의 존재시 검출 가능한 색상 변화를 수행하도록 구성된 소분자 지시약을 함유한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

피스터, 손, 알.

미국 30097 조지아주 둘루쓰 스테드포드 레인 525

빌라누에바, 줄리

미국 30030 조지아주 데카터 미드 로드 205

특허청구의 범위

청구항 1

검출 대역의 상류에 위치한 접합 패드를 포함하는 크로마토그래피 매질(chromatographic medium)을 포함하며, 가교 네트워크가 비확산적으로 검출 대역 내에 고정화되고, 가교 네트워크가 분석물의 존재시 검출 가능한 색상 변화를 일으키도록 구성된 복수의 소분자 지시약(small molecular indicator)을 함유하고, 가교 네트워크의 소분자 지시약들은 서로 직접 가교되거나 소분자 지시약들을 결합시키는 가교제를 통해 가교되는, 시험 샘플 내 분석물의 존재 또는 양을 검출하기 위한 측방향 유동 분석 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 가교 네트워크가 크로마토그래피 매질 및 소분자 지시약을 연결하는 고정 화합물 (anchoring compound)을 추가로 포함하는 것인 측방향 유동 분석 장치.

청구항 3

제2항에 있어서, 소분자 지시약이 고정 화합물에 공유 결합되는 측방향 유동 분석 장치.

청구항 4

제2항에 있어서, 소분자 지시약이 전하-전하 상호작용을 통해 고정 화합물에 결합되는 측방향 유동 분석 장치.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 고정 화합물이 크로마토그래피 매질에 공유 결합되는 측방향 유동 분석 장치.

청구항 6

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 고정 화합물이 전하-전하 상호작용을 통해 크로마토그래피 매질에 결합되는 측방향 유동 분석 장치.

청구항 7

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 고정 화합물이 거대분자 화합물인 측방향 유동 분석 장치.

청구항 8

제7항에 있어서, 거대분자 고정 화합물이 중합체인 측방향 유동 분석 장치.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 소분자 지시약이 디아조늄 화합물을 포함하는 것인 측방향 유동 분석 장치.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 소분자 지시약들이 벤지딘 화합물, 프탈레인 화합물, 아미노벤즈알데히드 화합물, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 측방향 유동 분석 장치.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 크로마토그래피 매질이 검출 대역의 상류에 위치한 시약 대역을 추가로 포함하는 것인 측방향 유동 분석 장치.

청구항 12

제11항에 있어서, 시약 대역 내에 함유된 효소 기질을 추가로 포함하는 측방향 유동 분석 장치.

청구항 13

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 대조 대역을 추가로 포함하는 측방향 유동 분석 장치.

청구항 14

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 크로마토그래피 매질과 유체 소통하는 검출 가능한 시약을 추가로 포함하는 측방향 유동 분석 장치.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 가교 네트워크가 전자기 방사선에 의해 형성된 것인 측방향 유동 분석 장치.

청구항 16

제15항에 있어서, 방사선이 자외선인 측방향 유동 분석 장치.

청구항 17

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 가교 네트워크가 열 에너지에 의해 형성된 것인 측방향 유동 분석 장치.

청구항 18

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 가교 네트워크가 가교제를 포함하는 것인 측방향 유동 분석 장치.

청구항 19

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 측방향 유동 장치를 시험 샘플과 접촉시키는 단계, 및 지시약의 색상 변화를 검출하는 단계를 포함하는, 시험 샘플 내 분석물의 존재 또는 농도를 검출하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 지시약이 분석물과 직접 반응하여 색상 변화를 나타내는 것인 방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 지시약이 분석물과 결합된 화합물과 반응하여 색상 변화를 나타내는 것인 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 지시약의 색상 변화를 육안으로 검출하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

제19항에 있어서, 시험 샘플 내 분석물의 양이 상기 색상 변화의 강도에 직접 비례하는 것인 방법.

청구항 24

제19항에 있어서, 시험 샘플 내 분석물의 양이 상기 색상 변화의 강도에 간접적으로 비례하는 것인 방법.

명세서

배경 기술

다양한 분석 절차 및 장치가 시험 샘플 중에 존재할 수 있는 분석물의 존재 및/또는 농도를 측정하는데 흔히 사용된다. 일부 경우, 분석물의 단순 존재는 예를 들어 조직 또는 기관 손상의 존재를 나타낼 수 있다. 유사하게, 비정상적인 분석물 농도는 감염, 예를 들어 박테리아 또는 바이러스 감염을 나타낼 수 있다. 효소 분석물의 존재를 검출하기 위한 한 가지 통상적인 기술은 브라아치-막스비티스(Braach-Maksvytis) 등의 미국 특허 제 6,348,319호에 기재되어 있다. 브라아치-막스비티스 등의 방법은 효소에 의한 기질의 소화를 감지함으로써 가능하다. 예를 들어, 브라아치-막스비티스 등의 도 1은 제1 대역(11) 및 제2 대역(12)을 포함하는 장치(10)를 도시한다. 제1 대역(11)에는 프로테아제(16)에 의해 절단 가능한 펩티드 링커(15)를 통해 스트렙타비딘(14)(리

[0001]

포터)에 연결된 중합체 비드(13)(담체)가 제공된다. 프로테아제(16) 첨가시, 스트렙타비딘(14)이 유리되어, 막의 임피던스 변화를 통해 스트렙타비딘의 존재를 검출하는 바이오센서막(17)을 포함하는 제2 대역(12)으로 넘어간다 (제5열 제25~30행). 그러나, 유감스럽게도, 브라아치-막스비티스 등의 개시한 기술은 특정 유형의 적용, 예를 들어 환자에 의한 비교적 신속한 진단(자가 진단 또는 의료진의 도움)을 필요로 하는 적용에 사용하기에는 너무 복잡하고 고가이다.

[0002] 따라서, 보다 "사용자 친화적"인 분석법이 개발되고 있다. 예를 들어, 분석물의 작용시 시각적 또는 검출 가능한 변화를 일으키기 쉬운 지시약을 이용하는 분석법이 개발되고 있다. 지시약이 검출 가능한 변화, 예를 들어 색상 변화를 일으키면, 사용자는 분석물이 시험 샘플 중에 존재함을 확신할 수 있다. 예를 들어, 앨런(Allen)의 미국 특허 제5,409,664호는 신호 발생 시스템을 포함하는 아민-관능화 흡수성 분석 스트립을 포함하는 분석 장치를 기재한다. 구체적으로, 시약 스트립은 검출 가능한 신호 시약 시스템의 1종 이상의 구성원으로 함침된다. 예를 들어, 샘플 중의 콜레스테롤량을 측정할 경우, 제1 대역에는 콜레스테롤 에스테라제, 제2 대역에는 콜레스테롤 옥시다제, 제3 대역에는 양고추냉이 퍼옥시다제가 있을 수 있다.

[0003] 이러한 개선에도 불구하고, 분석법은 여전히 많은 난점을 제시한다. 예를 들어, 소분자 지시약은 시험 샘플을 시약-함유 용액과 배합하는 습식 화학 적용에서는 통상 잘 기능하지만, 건식 화학 적용에는 예를 들어 사용전 운반 및 취급시 건조 소분자 지시약을 활성 상태로 및 장치 상의 특정 위치에 유지할 수 없기 때문에 그만큼 적합하지 않다. 그러나, 그러한 건식 화학 적용은 상대적 간편성, 검출 속도 및 낮은 비용으로 인해 바람직하다.

[0004] 이와 같이, 개선된 분석 장치, 특히 건식 화학 적용을 위한 분석 장치에 대한 필요가 존재한다.

[0005] **요약**

[0006] 한 실시양태에 따르면, 시험 샘플 중의 분석물의 존재 또는 양을 검출하기 위한 측방향 유동 분석 장치가 개시된다. 장치는 검출 대역을 정의하는 크로마토그래피 매질(chromatographic medium)을 포함하며, 이 때 가교 네트워크가 비확산적으로 검출 대역 내에 고정된다. 가교 네트워크는 분석물의 존재시 검출 가능한 색상 변화를 일으키도록 구성된 소분자 지시약을 함유한다.

발명의 상세한 설명

[0008] **대표적 실시양태에 대한 상세한 설명**

[0009] **정의**

[0010] 본원에 사용되는 "분석물"이라는 용어는 일반적으로 검출하고자 하는 물질을 가리킨다. 예를 들어, 분석물은 항원성 물질, 핵산, 항체, 및 이들의 조합을 포함할 수 있다. 분석물은 독소, 유기 화합물, 단백질, 펩티드, 미생물, 아미노산, 핵산, 호르몬, 스테로이드, 비타민, 약물(치료 목적으로 복용하는 것 뿐 아니라 불법적 목적으로 복용하는 것 포함), 약물 중간물 또는 부산물, 박테리아, 바이러스 입자, 및 이들 물질 중 임의의 것의 대사물 또는 항체를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 일부 분석물의 구체예는 페리틴, 크레아티닌 키나제 MIB (CK-MB), 디옥신, 페니토인, 페노바르비탈, 카르바마제핀, 반코마이신, 젠타마이신, 테오필린, 발프로산, 퀴니딘, 황체형성호르몬(LH), 난포자극호르몬(FSH), 에스트라디올, 프로게스테론, C-반응성 단백질, 리포칼린, IgE 항체, 비타민 B2 마이크로글로불린, 당화 헤모글로빈(Gly. Hb), 코르티솔, 디지톡신, 빌리루빈, 우로빌리노겐, N-아세틸프로카인아미드(NAPA), 프로카인아미드, 루벨라에 대한 항체, 예컨대 루벨라-IgG 및 루벨라 IgM, 독소포자충증에 대한 항체, 예컨대 독소포자충증 IgG(Toxo-IgG) 및 독소포자충증 IgM(Toxo-IgM), 테스토스테론, 살리실레이트, 아세타미노펜, 간염 B 바이러스 표면 항원(HBsAg), 간염 B 코어 항원에 대한 항체, 예컨대 항-간염 B 코어 항원 IgG 및 IgM(항-HBC), 인간 면역 결핍 바이러스 1 및 2(HIV 1 및 2), 인간 T-세포 백혈병 바이러스 1 및 2(HTLV), 간염 B e 항원(HBeAg), 간염 B e 항원에 대한 항체(항-HBe), 인플루엔자 바이러스, 갑상선자극호르몬(TSH), 티록신(T4), 총 트리요오도티로닌(총 T3), 유리 트리요오도티로닌(유리 T3), 암배아항원(CEA), 알파태아 단백질(AFP)을 포함한다. 남용 약물 및 통제 물질은 암페타민, 메타암페타민, 바르비투르염, 예컨대 아모바르비탈, 세코바르비탈, 펜토바르비탈, 페노바르비탈 및 바르비탈, 벤조디아제핀, 예컨대 리브람 및 발륨, 메이나비노이드, 예컨대 인도삼 및 마리화나, 코카인, 펜타닐, LSD, 메타쿠알론, 아편제, 예컨대 헤로인, 모르핀, 코데인, 히드로모르폰, 히드로코돈, 메타돈, 옥시코돈, 옥시모르폰 및 아편, 및 펜시클리딘, 및 프로폭시펜을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 다른 잠재적 분석물은 에버하트(Everhart) 등의 미국 특허 제6,436,651호 및 톰(Tom) 등의 미국 특허 제4,366,241호에 기재되어 있다.

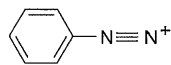
[0011] 본원에 사용된 용어 "시험 샘플"은 일반적으로 분석물을 함유하는 것으로 의심되는 물질을 가리킨다. 시험 샘플은 소스로부터 얻어진 그대로 직접 사용하거나, 또는 샘플의 성질을 바꾸기 위한 전처리 후에 사용할 수 있다. 시험 샘플은 임의의 생물학적 소스, 예를 들어 혈액, 세포간 유체, 타액, 안과 렌즈 유체, 대뇌 척수 유체, 땀, 소변, 젖, 복수(ascites) 유체, 로커스(raucous), 윤활 유체, 복막 유체, 질 유체, 또는 양수 유체 등을 포함하는 생리학적 유체로부터 유도될 수 있다. 시험 샘플은 혈액으로부터 플라즈마 제조, 점성 유체 희석과 같이 사용전 전처리할 수 있다. 처리 방법은 여과, 침전, 희석, 증류, 혼합, 농축, 간섭 성분의 불활성화, 및 시약 첨가를 포함할 수 있다. 생리학적 유체 외에, 환경 또는 식품 생산 분석의 수행을 위해 다른 액체 샘플, 예컨대 물, 식료품 등을 사용할 수도 있다. 또한, 분석물을 함유할 것으로 의심되는 고체 물질을 시험 샘플로 사용할 수도 있다. 일부 경우, 고체 시험 샘플은 액체 매질을 형성하도록 또는 분석물이 유리되도록 개질하는 것이 유리할 수 있다.

[0012] 상세한 설명

[0013] 이제 개시된 주제의 다양한 실시양태에 대한 세부 내용을 참고할 것이며, 그의 하나 이상의 실시예를 아래에 제시하겠다. 각 실시예는 설명을 위해 주어진 것이며 주제를 제한하려 함이 아니다. 사실, 개시된 내용의 범위 및 취지에서 벗어남 없이 다양한 변형 및 변경이 이루어질 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다. 예를 들어, 한 실시양태의 일부로서 예시되거나 기재된 특징은 다른 실시양태에 사용되어 또 다른 실시양태를 나타낼 수 있다. 따라서, 본 개시는 그러한 변경 및 변경을 첨부된 청구항의 범위 및 그의 등가물에 포함되는 것으로 간주하고자 한다.

[0014] 일반적으로 말하자면, 본 발명은 소분자 지시약을 측방향 유동 분석 장치의 크로마토그래피 매질에 단단히 고정화시키는 방법에 관한 것이다. 지시약은 분석물 또는 분석물의 참여를 필요로 하는 과정을 통해 생성된 반응 생성물과 반응하는 반응성 화학 부분(moiety)이다. 분석물(또는 그의 반응 생성물)과 반응시, 지시약은 검출 가능한 색상 변화를 나타낼 수 있다. 지시약은 전형적으로 소분자의 부분이며, 여기서 소분자의 크기는 일반적으로 어떤 유도체화, 예컨대 소분자 지시약에의 반응성 관능기 첨가 이전에 약 3000 달톤(즉, 원자 질량 단위, 1 달톤은 ¹²C 동위원소 질량의 1/12에 해당함) 미만이다. 다른 실시양태에서, 소분자 지시약은 약 2000 달톤 미만, 일부 실시양태에서 약 1000 달톤 미만, 일부 실시양태에서 약 500 달톤 미만일 수 있다. 본원에 사용되는 "지시약"이라는 용어는 분석물 또는 그의 반응 생성물과 반응시 검출 신호를 발생시킬 수 있는 반응성 부분을 가리키거나, 또는 지시약 부분을 포함하는 소분자를 가리킬 수 있다.

[0015] 다양한 유형의 소분자 지시약을 본 발명에 사용할 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 디아조늄 이온 지시약을 다양한 분석물, 예컨대 빌리루빈 및 우로빌리노겐의 검출에 사용한다. 예를 들어, 분석물은 직접 디아조늄과 커플링되어 출발 물질과 색상이 다른 생성물이 될 수 있다. 디아조늄 이온은 또한 글루코스 및 다양한 단백질과 같은 분석물의 간접 검출에 이용될 수도 있다. 즉, 분석물은 처음에 단백질이나 효소 기질과 같은 시약과 반응하여 반응 생성물을 형성하며, 이것이 다시 디아조늄 이온과 반응하여 검출 가능한 생성물이 된다. 디아조늄 이온은 하기 화학식을 가질 수 있다.

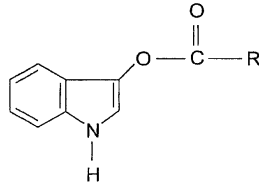


[0016] 디아조늄 이온은 디아조늄 부분의 상대이온이 고리계에 공유 결합되어 있으므로 양성 이온(zwitterionic)일 수 있다. 디아조늄 이온의 고리계는 치환되거나 치환되지 않은 것일 수 있다.

[0018] 디아조늄 지시약에 의한 분석물의 검출을 고려할 때, 분석물 또는 그의 반응 생성물은 디아조늄 이온에 의한 친전자성 공격을 받을 수 있어야 한다. 이 반응은 흔히 "커플링"이라고 하며, 출발 지시약 시약과 상이한 색상을 갖는 생성물을 형성한다. 예를 들어, 디아조늄 이온은 방향족 화합물과 반응하여 화학식 R-N=N-R'(여기에서 R 및 R'은 아릴기임)의 방향족 아조 화합물을 형성할 수 있다. 이론에 얽매이기를 원하지 않으나, 이 반응은 흡수 최대점을 스펙트럼의 적색 말단으로("장파장쪽 이동") 또는 스펙트럼의 청색 말단으로("단파장쪽 이동") 이동시키는 것으로 생각된다. 흡수점 이동의 유형은 생성되는 아조 분자의 속성 및 그것이 전자 수용체(산화제)로서 기능하는지(이 경우, 단파장쪽 이동이 얻어짐) 또는 전자 공여체(환원제)로서 기능하는지(이 경우, 장파장쪽 이동이 얻어짐)에 따라 달라진다. 흡수점 이동은 육안 또는 장비에 의해 검출가능한 색상 차이를 제공하여, 시험 샘플 내에 분석물의 존재를 나타낸다. 예를 들어, 감염된 시험 샘플과 접촉전의 디아조늄 이온은 무색이거나 일정 색상을 가질 수 있다. 그러나, 시험 샘플과 접촉하여 분석물 또는 분석물의 참여를 필요로 하는 과정에서 형성된 반응 생성물과 반응한 후에는, 디아조늄 이온의 초기 색상과 다른 색상을 나타내는 방향족 아조 화합물

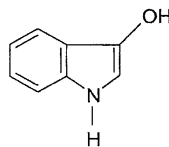
이 형성될 것이다.

[0019] 디아조늄 이온은 또한 효소의 존재를 직접적으로 또는 간접적으로 검출하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 효소 기질이 효소(예: 가수분해 효소, 예를 들어 백혈구 에스테라제)의 검출을 위해 제공될 수 있다. 제공된 기질은 관심 효소에 의해 화학적 작용을 받아(예컨대, 프로테아제의 경우 절단되어) 생성물을 형성할 수 있다. 백혈구 에스테라제의 검출을 예로 들면, 기질은 백혈구 에스테라제의 존재시 촉매적으로 가수분해되어 방향족 화합물을 생성하는 방향족 에스테르일 수 있다. 방향족 에스테르는 예를 들어 하기 화학식을 갖는 인독실 에스테르를 포함할 수 있다.



[0020]

[0021] 상기 화학식에서, R은 치환되거나 치환되지 않을 수 있으며 알킬기, 알킬옥시기, 히드록시알킬기, 알킬렌기, 지방산기 등일 수 있다. 또한, 방향족 고리도 또한 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 구체적으로는 예를 들어 인독실 아세테이트, 인독실 부티레이트, 인독실 라우레이트, 인독실 스테아레이트, N-차단 아미노산 또는 펩티드의 인독실 에스테르 및 이들의 티오인독실 유사체, 및 N-토실-L-알라닌 3-인독실 에스테르가 포함된다. 그러한 인독실 에스테르류는 백혈구 에스테라제에 의해 가수분해되어 하기 구조를 갖는 인독실과 같은 벤조피롤을 형성한다.



[0022]

[0023] 락테이트 에스테르를 효소 검출용 기질로서 사용할 수도 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전문을 본원에 참고로 인용하는 존슨(Johnson) 등의 미국 특허 제5,464,739호 및 노프싱어(Noffsinger) 등의 미국 특허 제 5,663,044호에 기재된 것과 같은 락테이트 에스테르를 사용할 수 있다. 락테이트 에스테르는 일반적으로 백혈구 에스테라제에 의해 가수분해되어 히드록시-피롤 화합물을 제공한다. 다른 적합한 에스테르 기질로는 모든 목적을 위해 그 전문을 본원에 참고로 인용하는 허(Huh) 등의 미국 특허 제5,750,359호, 코리(Corey) 등의 미국 특허 제4,657,855호, 및 가와니시(Kawanishi) 등의 일본 공개 제03210193호에 기재된 것과 같은 티아졸 에스테르, 피롤 에스테르, 티오펜 에스테르, 나프틸 에스테르, 페녹실 에스테르, 퀴놀리닐 에스테르가 포함된다.

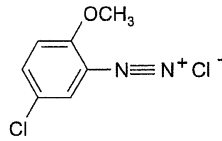
[0024]

또 다른 적합한 가수분해 효소용 기질로는 예를 들어 아미드, 펩티드, 에테르, 또는 효소적으로 가수분해될 수 있는 결합을 갖는 다른 화합물이 포함된다. 기질의 구체적인 종류로는 단백질 또는 당단백질, 펩티드, 핵산(예: DNA 및 RNA), 탄수화물, 지질, 에스테르, 이들의 유도체 등이 포함될 수 있다. 예를 들어, 펩티다제 및/또는 프로테아제의 일부 적합한 기질로는 펩티드, 단백질 및/또는 당단백질, 예컨대 카세인(예: β-카세인, 아조카세인 등), 알부민(예: 소 혈청 알부민), 헤모글로빈, 미오글로빈, 케라틴, 젤라틴, 인슐린, 프로테오글리마이, 피브로넥틴, 라미닌, 콜라겐, 엘라스틴 등이 포함될 수 있다. 또 다른 적합한 기질은 모든 목적을 위해 그 전문을 본원에 참고로 인용하는 사이먼슨(Simonsson) 등의 미국 특허 제4,748,116호, 다이아몬드(Diamond) 등의 미국 특허 제5,786,137호, 라오(Rao) 등의 미국 특허 제6,197,537호, 및 헨더슨(Henderson) 등의 미국 특허 제6,235,464호, 및 네모리(Nemori) 등의 미국 특허 제6,485,926호에 기재되어 있다.

[0025]

반응이 수행되는 방식에 무관하게, 방향족 화합물은 디아조늄 이온의 존재시 커플링 반응을 통해 색상 변화를 유도할 수 있는 기질과 분석물의 반응을 통해 형성될 수 있다. 사용될 수 있는 디아조늄 염의 구체적으로는 디아조늄 클로라이드, 디아조늄 산 술페이트, 디아조늄 알킬 술페이트, 디아조늄 플루오로보레이트, 디아조늄 벤젠 술포네이트, 디아조늄 산 1,5-나프탈렌디술포네이트 등이 포함될 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 디아조늄 염의 구체에는 1-디아조-2-나프틸-4-술포네이트, 1-디아조페닐-3-카르보네이트, 4-디아조-3-히드록시-1-나프틸 술포네이트(DNSA), 4-디아조-3-히드록시-7-니트로-1-나프틸술포네이트(NDNSA), 4-디아조-3-히드록시-1,7-나프틸 디술포네이트, 2-메톡시-4-(N-모르폴리닐)벤젠 디아조늄 클로라이드, 4-디아조-3-히드록시-7-브로모-1-나프틸술포네이트 및 4-디아조-3-히드록시-7-[1,옥소프로필]-1-나프틸술포네이트이다. 한 가지 특히 바람직한 디아조늄

염은 황색 색상을 가지며 "디아조 레드 RC" 또는 "패스트 레드(Fast Red) RC"라는 명칭으로 분류되는 5-클로로-2-메톡시벤젠디아조늄 클로라이드이다. 보다 구체적으로, "패스트 레드 RC"는 하기 구조를 갖는다.



[0026]

[0027]

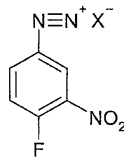
다른 적합한 디아조늄 염은 "패스트 레드 B" 및 "패스트 블루 B"라는 일반명으로 분류된다. 또 다른 적합한 디아조늄 염은 모든 목적을 위해 그 전문을 본원에 참고로 인용하는 스킵올드(Skjold) 등의 미국 특허 제 4,637,979호, 휴(Hugh) 등의 미국 특허 제4,806,423호 및 허글(Hugl) 등의 미국 특허 제4,814,271호에 기재된 것일 수 있다.

[0028]

디아조늄 염은 또한 디아조늄 이온이 특정 분석물에 직접 결합하는 직접 검출 기법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 개시된 장치는 빌리루빈 및/또는 우로빌리노겐과 같은 분석물의 검출에 활용될 수 있다. 빌리루빈 및 빌리루빈의 환원 생성물, 예컨대 우로빌리노겐 수준의 증가는 예를 들어 말라리아, 겸상 적혈구 빈혈, 간염 B, 간염 C, 간독성, 알콜 중독, 경화증, 질베르 증후군, 담석, 및 췌장 마이서(pancreatic maycer)를 비롯한 마이서(maycer), 관상 압중 및 전이 압중을 일반적으로 포함하는 몇몇 질병 상태의 표시일 수 있다. 빌리루빈의 직접 검출에 사용하기 적합한 디아조늄 화합물의 비제한적 목록은 p-아미노벤젠술폰산, 2,6-디클로로벤젠 디아조늄 테트라플루오로보레이트, 2-트리플루오로메틸벤젠 디아조늄 등을 포함할 수 있다.

[0029]

우로빌리노겐에 선택적으로 커플링되는 디아조늄 이온은 하기 구조를 갖는 것을 포함할 수 있다.



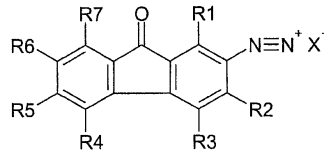
[0030]

상기 화학식에서, X⁻은 안정화 음이온을 나타낸다.

[0031]

[0032]

다른 실시양태에서, 하기 구조를 갖는 디아조늄 이온이 우로빌리노겐의 선택적 검출에 사용될 수 있다.



[0033]

상기 화학식에서, R1 내지 R7은 독립적으로 수소 원자, 할로젠 원자, 저급 알킬기, 또는 저급 알콕시기이고, X⁻는 안정화 음이온이다. 우로빌리노겐에 선택적으로 직접 커플링하기 위해 사용될 수 있는 디아조늄 화합물의 비제한적 목록에는 4-플루오로-3-니트로벤젠디아조늄 염, 4-메톡시벤젠-디아조늄-테트라플루오로보레이트, 3,3'-디메톡시비페닐-4,4'-디아조늄 염 등이 포함될 수 있다.

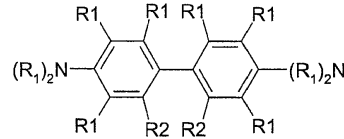
[0034]

[0035]

본 발명은 디아조늄형 소분자 지시약으로 제한되지 않는다. 많은 다른 소분자 지시약이 당업자에게 널리 알려져 있으며 본 발명에 포함된다. 예를 들어, 에를리히 시약(Erlich reagent)은 시험 샘플 내 우로빌리노겐의 검출에 사용될 수 있는 소분자 지시약이다. 에를리히 시약은 선택적으로 우로빌리노겐에 결합할 수 있는 p-아미노벤즈알데히드 분자이다. 우로빌리노겐 검출을 위한 에를리히 시약은 디알킬아미노벤즈알데히드, 예컨대 디메틸아미노벤즈알데히드 및 디에틸아미노벤즈알데히드를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[0036]

본 발명에 따른 크로마토그래피 매질에 고정될 수 있는 소분자 지시약의 또 다른 예시적인 부류는 벤지딘형 지시약을 포함할 수 있다. 벤지딘형 지시약은 퍼옥시드 존재시에 색상의 변화를 일으킬 수 있으므로, 예를 들어 글루코스, 잠혈, 전해질, 콜레스테롤, 및 당업계에 일반적으로 알려진 다양한 단백질과 같은 퍼옥시드 활성 물질의 검출에 흔히 사용된다. 벤지딘형 지시약은 하기 구조를 갖는다.



[0037]

[0038]

상기 화학식에서, R1 및 R2 치환기는 독립적으로 수소, 저급 알킬(즉, 탄소 원자 1 내지 약 6개를 갖는 알킬), 저급 알킬옥시(즉, 탄소 원자 1 내지 약 6개를 갖는 알킬옥시), 아릴 또는 아릴옥시로부터 선택될 수 있다. R1 및 R2는 독립적으로 히드록시, 할로젠, 시아노 등으로 치환될 수 있다. 또한, R2 치환기는 함께 (CH₂)_n(여기에서, n은 1 또는 2임)을 형성할 수 있다. "벤지딘형" 지시약이라는 용어에 포함되는 전형적인 화합물은 벤지딘, o-톨리딘, o-디아니시딘, 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(테트라메틸벤지딘(TMB)), 3,3',5,5'-테트라(알킬)벤지딘, 다양한 N- 및 N'-치환 벤지딘 등을 포함한다.

[0039]

본 발명에 포함되는 소분자 지시약의 또 다른 예시적 부류는 프탈레인류이다. 페놀프탈레인(HIn), 디브로모티몰술포프탈레인(브로모티몰 블루, BTB), 옥타브로모페놀술포프탈레인(테트라브로모페놀 블루), 옥타클로로페놀-술포프탈레인(테트라클로로페놀 블루) 및 혼합 할로겐화 유사체, 예를 들어 3',3',5',5'-테트라브로모페놀-3,4,5,6-테트라클로로술포프탈레인, 3',3',5',5'-테트라클로로페놀-3,4,5,6-테트라브로모술포프탈레인 및 3',3'-디클로로-5',5'-디브로모페놀-3,4,5,6-테트라클로로술포프탈레인과 같은 프탈레인류는 예를 들어 단백질의 존재와 같은 시험 샘플 내 분석물의 존재를 나타낼 수 있는 pH 측정에 사용될 수 있는 소분자 지시약이다.

[0040]

본 발명에 따르면, 지시약을 함유하는 가교 네트워크를 측방향 유동 장치의 크로마토그래피 매질 상에 형성한다. 이론에 얽매이지 않으나, 가교 네트워크는 지시약을 항구적으로 고정시키는 것을 보조하여, 사용자가 사용시 그의 색상 변화를 보다 쉽게 감지할 수 있도록 할 수 있다. 가교 네트워크는 "내부(intra) 가교 결합"(즉, 단일 분자의 관능기들간 공유 결합) 및/또는 "상호(inter) 가교 결합"(즉, 다른 분자들간, 예컨대 두 지시약 분자들간 또는 지시약 분자와 기질 표면간 공유 결합)을 함유할 수 있다. 가교는 지시약의 자체 가교 및/또는 별도 가교제의 투입을 통해 실시할 수 있다. 적합한 가교제로는 예를 들어 폴리글리시딜 에테르, 예컨대 에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르 및 폴리에틸렌 글리콜 디글리시딜 에테르, 아크릴아미드, 하나 이상의 가수분해성 기, 예컨대 알콕시기(예: 메톡시, 에톡시 및 프로톡시), 알콕시알콕시기(예: 메톡시에톡시, 에톡시에톡시 및 메톡시프로톡시), 아실옥시기(예: 아세톡시 및 옥타노일옥시), 케톡심기(예: 디메틸케톡심, 메틸케톡심 및 메틸에틸케톡심), 알케닐옥시기(예: 비닐옥시, 이소프로페닐옥시 및 1-에틸-2-메틸비닐옥시), 아미노기(예: 디메틸아미노, 디에틸아미노 및 부틸아미노), 아미노시기(예: 디메틸아미노 및 디에틸아미노), 및 아미드기(예: N-메틸아세트아미드 및 N-에틸아세트아미드)를 함유하는 화합물이 포함될 수 있다.

[0041]

임의의 다양한 상이한 가교 메커니즘이 본 발명에 이용될 수 있으며, 예를 들어 열 개시(예: 축합 반응, 부가 반응 등), 전자기 방사선 등이 있다. 본 발명에 사용할 수 있는 전자기 방사선의 일부 적합한 예로는 전자 빔 방사선, 천연 및 인공 방사선 동위원소(예: α, β 및 γ 선), x-선, 중성자 빔, 양전자 빔, 레이저 빔, 자외선 등이 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 전자 빔 방사선은 예를 들어 전자 빔 장치에 의한 가속 전자의 생성을 포함한다. 전자 빔 장치는 당업계에 널리 알려져 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 전자 빔 장치는 미국 매사추세츠주 워번 소재의 에너지 사이언시즈, 인크.(Energy Sciences, Inc.)에서 "마이크로빔(Microbeam) LV"라는 명칭으로 입수 가능한 것을 사용할 수 있다. 적합한 전자 빔 장치의 다른 예는 모든 목적을 위해 그 전문에 본원에 참고로 인용하는 리브세이(Livesay)의 미국 특허 제5,003,178호, 에브너리(Avnerly)의 미국 특허 제5,962,995호, 에브너리 등의 미국 특허 제6,407,492호에 기재되어 있다. 방사선의 파장 λ는 전자기 방사선 스펙트럼의 상이한 방사선 유형에 따라 약 10⁻¹⁴ 미터 내지 약 10⁻⁵ 미터 등으로 변할 수 있다. 전자 빔 방사선은 예를 들어 약 10⁻¹³ 미터 내지 약 10⁻⁹ 미터의 파장 λ를 갖는다. 전자기 방사선의 특정 파장 λ의 선택 외에, 가교 정도를 조절하기 위해 다른 매개변수를 선택할 수도 있다. 예를 들어, 선량은 약 0.1 메가라드(Mrads) 내지 약 10 Mrads, 및 일부 실시양태에서 약 1 Mrads 내지 약 5 Mrads 범위일 수 있다.

[0042]

전자기 방사선원은 당업자에게 공지된 임의의 방사선원일 수 있다. 예를 들어, D-별브를 갖는 수은 램프 또는 엑시머 램프를 사용할 수 있다. 상당히 좁은 방출 피크의 방사선을 방출하는 다른 특수 도핑 램프를 동일한 최대 흡수점을 갖는 광개시제와 함께 사용할 수도 있다. 예를 들어, 퓨전 시스템즈(Fusion Systems)에서 입수 가능한 V-별브가 사용하기 적합한 또 다른 램프이다. 또한, 특정 방출 밴드를 갖는 특수 램프를 하나 이상의 특정 광개시제의 사용을 위해 제조할 수 있다.

[0043]

개시제는 일부 실시양태에서, 선택된 가교 기법의 기능성을 향상시키는 것을 사용할 수 있다. 예를 들어, 열 개시제를 특정 실시양태에서 사용할 수 있으며, 예를 들어 아조, 퍼옥시드, 퍼솔페이트 및 리독스 개시제가 있다. 적합한 열 개시제의 대표적인 예로는 2,2'-아조비스(2,4-디메틸발레로니트릴), 2,2'-아조비스(이소부티로니트릴), 2,2'-아조비스-2-메틸부티로니트릴, 1,1'-아조비스(1-시클로헥산카르보니트릴), 2,2'-아조비스(메틸 이소부티레이트), 2,2'-아조비스(2-아미디노프로판) 디히드로클로라이드 및 2,2'-아조비스(4-메톡시-2,4-디메틸 발레로니트릴)과 같은 아조 개시제, 벤조일 퍼옥시드, 아세틸 퍼옥시드, 라우릴 퍼옥시드, 테카노일 퍼옥시드, 디세틸 퍼옥시디카르보네이트, 디(4-t-부틸시클로헥실) 퍼옥시디카르보네이트, 디(2-에틸헥실)퍼옥시디카르보네이트, t-부틸퍼옥시피발레이트, t-부틸퍼옥시-2-에틸헥사노에이트 및 디쿠밀 퍼옥시드와 같은 퍼옥시드 개시제, 칼륨 퍼솔페이트, 나트륨 퍼솔페이트 및 암모늄 퍼솔페이트와 같은 퍼솔페이트 개시제, 상기 퍼솔페이트 개시제와 나트륨 메타비술파이트 및 나트륨 비술파이트와 같은 환원제의 조합, 유기 퍼옥시드와 3급 아민에 기초한 시스템 및 유기 히드로퍼옥시드와 전이 금속에 기초한 시스템과 같은 리독스(산화-환원) 개시제, 피나콜과 같은 다른 개시제 등(및 이들의 혼합물)이 포함된다. 아조 화합물 및 퍼옥시드가 일반적으로 바람직하다. 광개시제를 마찬가지로 사용할 수 있으며, 예를 들어 치환된 아세토페논, 예컨대 벤질 디메틸 케탈 및 1-히드록시시클로헥실 페닐 케톤, 치환된 알파-케톤, 예컨대 2-메틸-2-히드록시프로피오페논, 벤조인 에테르, 예컨대 벤조인 메틸 에테르 및 벤조인 이소프로필 에테르, 치환 벤조인 에테르, 예컨대 아니소인 메틸 에테르, 방향족 술폰일 클로라이드, 광활성 옥심 등(및 이들의 혼합물)이 있다. 다른 적합한 광개시제는 모두 본원에 참고로 인용하는 노어(Nohr) 등의 미국 특허 제6,486,227호 및 맥도널드(MacDonald) 등의 미국 특허 제6,780,896호에 기재되어 있다.

[0044]

필수적인 것은 아니지만, 지시약의 고정을 용이하게 하기 위해 가교 네트워크 내에 추가적인 성분을 사용할 수도 있다. 예를 들어, 고정 화합물(anchoring compound)을 사용하여 지시약을 크로마토그래피 매질의 표면과 연결하고 측방향 유동 장치 상에서의 지시약의 내구성을 보다 향상시킬 수 있다. 전형적으로, 고정 화합물은 지시약보다 크기가 더 크며, 이로 인해 사용시에 크로마토그래피 매질의 표면에 잔류할 가능성이 높아진다. 예를 들어, 고정 화합물은 거대분자 화합물, 예컨대 중합체, 올리고머, 덴드리머(dendrimer), 입자 등을 포함할 수 있다. 중합체 고정 화합물은 천연, 합성 또는 이들의 조합일 수 있다. 천연 중합체 고정 화합물의 예로는 예를 들어 폴리펩티드, 단백질, DNA/RNA 및 다당류(예: 글루코스계 중합체)가 포함된다. 합성 중합체 고정 화합물의 예로는 예를 들어 폴리아크릴산 및 폴리비닐알콜이 포함된다. 다당류 고정 화합물의 한 특정 예는 활성화된 텍스트린이다. 일부 실시양태에서, 고정 화합물은 입자(때로는 "비드" 또는 "마이크로비드"라고 함)일 수 있다. 자연 발생 입자, 예컨대 핵, 미코플라스마, 플라스미드, 플라스틱드, 포유류 세포(예: 적혈구허깨비), 단세포 미생물(예: 박테리아), 다당류(예: 아가로스) 등을 사용할 수도 있다. 또한, 합성 입자를 사용할 수도 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 라텍스 미세입자를 사용한다. 입자의 합성 입자를 사용할 수 있으나, 입자는 전형적으로 폴리스티렌, 부타디엔 스티렌, 스티렌-아크릴-비닐 삼원공중합체, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리에틸메타크릴레이트, 스티렌-말레산 무수물 공중합체, 폴리비닐 아세테이트, 폴리비닐피리딘, 폴리디비닐벤젠, 폴리부틸렌테레프탈레이트, 아크릴로니트릴, 비닐클로라이드-아크릴레이트 등 또는 이들의 알데히드, 카르복실, 아미노, 히드록실 또는 히드라지드 유도체로부터 형성된다. 사용될 경우, 입자의 형상은 일반적으로 다양하다. 한 특정 실시양태에서, 예를 들어 입자는 구 형상이다. 그러나, 판, 봉, 원반, 막대, 관, 불규칙 형상 등과 같은 다른 형상도 생각할 수 있음을 알아야 한다. 또한, 입자의 크기도 변할 수 있다. 예를 들어, 입자의 평균 크기(예, 직경)는 약 0.1 나노미터 내지 약 1,000 마이크로미터, 일부 실시양태에서 약 0.1 나노미터 내지 약 100 마이크로미터, 일부 실시양태에서 약 1 나노미터 내지 약 10 마이크로미터 범위일 수 있다.

[0045]

고정 화합물이 지시약과 크로마토그래피 매질의 연결에 사용되는 방식도 다양할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 고정 화합물을 지시약에 부착시킨 후, 이 둘을 크로마토그래피 매질에 적용한다. 다른 실시양태에서, 고정 화합물을 크로마토그래피 매질에 결합시킨 후 지시약을 적용한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 물질들을 별도의 성분으로서 크로마토그래피 매질에 적용하고, 부착 반응이 계내(in-situ) 발생할 수 있고, 임의로는 이와 동시에 네트워크의 가교가 발생할 수 있다. 예를 들어, 소분자 지시약은 고정 화합물에 결합될 수 있고, 고정 화합물은 매질에 결합될 수 있으며, 이와 동시에 가교 반응이 고정 화합물들간, 지시약들간 또는 이들 둘간에 발생할 수 있다. 그러한 한 실시양태에서, 이렇게 형성된 가교 네트워크는 크로마토그래피 매질의 다공성 막 상에 물리적으로 고정될 수 있으며, 다공성 막과 시스템의 다른 성분간의 결합이 필요없다. 특히, 가교 네트워크는 그의 일부가 다공성 막의 공극 내부 및 사이로 연장될 수 있어, 막과 가교 네트워크의 성분들간에 특정 결합이 형성되지 않더라도 막 상에 물리적으로 억류될 수 있다.

- [0046] 시스템 성분들간의 결합이 형성되는 경우, 고정 화합물의 크로마토그래피 매질에의 부착 뿐 아니라 고정 화합물의 지시약에의 부착은 카르복실, 아미노, 알데히드, 브로모아세틸, 요오도아세틸, 티올, 에폭시 또는 다른 반응성 관능기 및 잔류 자유 라디칼 및 라디칼 양이온을 사용하여 수행할 수 있으며, 이 과정에서 임의의 적합한 방법, 예컨대 열 공정, 광개시 공정, 촉매화 반응 등에 따라 결합 반응을 실시할 수 있다. 예를 들어, 크로마토그래피 매질을 아민-함유 화합물, 예컨대 3-아미노프로필트리에톡시 실란과의 접촉을 통해 아민-관능화시킴으로써 표면의 아민 관능도를 증가시키고 고정 화합물을 예를 들어 고정 화합물의 알데히드 관능기를 통해 표면에 결합시킬 수 있다. 표면 관능성 기는, 예를 들어 입자 표면이 비교적 높은 표면 농도의 극성기를 함유하는 경우, 입자형 고정 화합물상에 반응성 관능기로서 도입될 수도 있다. 특정 경우, 입자는 추가로 개질할 필요가 없이 크로마토그래피 매질 및/또는 지시약에 직접 결합할 수 있다.
- [0047] 공유 결합 외에 다른 부착 기법, 예컨대 전하-전하 상호작용을 사용하여 고정 화합물을 크로마토그래피 매질에 부착하고/거나 지시약을 고정 화합물에 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 하전된 고정 화합물, 예컨대 양으로 하전된 고분자 전해질 고정 화합물을 음으로 하전된 크로마토그래피 매질, 예컨대 음으로 하전된 다공성 니트로셀룰로오스 막상에 전하-전하 상호작용을 통해 고정화시킬 수 있다. 유사하게, 음으로 하전된 지시약, 예컨대 디아조늄 이온은 양으로 하전된 고정 화합물상에 고정화될 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은 하나의 지시약을 고정 화합물에 부착시키는 것으로 제한되지 않음을 알아야 한다. 예를 들어, 다관능성 고정 화합물을 이용할 경우, 검출 대역의 지시약 밀도는 복수의 지시약이 단일 고정 화합물 분자에 결합됨으로써 증가될 수 있다. 예를 들어, 다관능성 덴드리머 고정 화합물, 예컨대 64-캐스케이드:1,4-디아미노부탄[4]:1-아자부틸렌]60-프로필아민 (DSM으로부터 아스트라몰(Astramol)(AM)64 덴드리머로 입수가 가능)은 복수의 지시약(예: N-(1-나프틸)에틸렌디아민 디히드로클로라이드)에 당업계에 널리 알려진 임의의 적합한 방법으로 결합할 수 있다. 예를 들어, 한 방법에 따르면, 복수의 지시약을 고정 화합물에 결합시키면서 소분자 지시약의 지시약 부분을 보호하는데 사용할 수 있는 반응성 부분으로 지시약을 관능화시킬 수 있다. 예를 들어, 약 11 mg의 N-(1-나프틸)에틸렌디아민 디히드로클로라이드 지시약 및 적합한 용매(예: DMSO)를 포함하고 결합을 촉진하는 임의의 부가적인 시약들(예: 18 mg의 나트륨 디카르보네이트)을 포함하는 용액을 형성할 수 있다. 이어서, 지시약을 용액내에서 고정 화합물에 결합하는 반응성 부분으로 관능화시킬 수 있다. 예를 들어, 약 9 mg의 N-히드록시숙신이미딜-4-아지도살리실산(NHS-ASA; 피어스 바이오텍.(Pierce Biotech.))을 용액에 첨가하고 (암실에서) 진탕하여 지시약을 광반응성 부분으로 관능화시킬 수 있다. 덴드리머 고정 화합물의 첨가 및 적합한 반응 조건(예: UV 램프로 365 nm에서 20분간 조사)의 확립시, 고정 화합물을 복수의 지시약에 결합할 수 있다. 이어서, 이렇게 형성된 고정 화합물/지시약 복합체를 함유하는 용액을 필요할 경우 추가로 처리한 후 크로마토그래피 매질에 적용할 수 있다. 예를 들어, 이렇게 형성된 용액을 산성 물에서 막(예: 피어스 바이오텍의 3,500 컷-오프 막)을 사용하여 투석할 수 있다. 이어서, 투석된 용액을 크로마토그래피 매질(예: 니트로셀룰로오스 막)에 적용하고 가교시켜 검출 대역, 예컨대 니트라이트를 위한 검출 대역을 형성할 수 있다.
- [0049] 일단 적용되면, 가교 반응이 발생하여 가교 네트워크를 형성할 수 있다. 임의의 특정 실시양태의 물질의 특성에 따라, 가교 반응은 크로마토그래피 매질 표면, 고정 화합물 및 지시약 중의 둘 사이 뿐만 아니라 임의의 동일한 성분 2개 사이 (예를 들어, 2개의 고정 화합물들 사이 또는 2개의 소분자 지시약들 사이)에서 상호 가교로서 또는 단일 성분 내 (예를 들어, 단일 중합체 고정 화합물 상의 2개의 관능성 부분 사이)에서 내부 가교로서 발생할 수 있다. 예를 들어, 다관능성 고정 화합물은 지시약과 가교할 수 있고/거나 인접 고정 화합물과 가교(상호-가교결합)할 수 있고/있거나 그 자체 내에서 가교할 수 있다 (내부-가교결합). 유사하게, 다관능성 지시약은 서로 및/또는 인접 고정 화합물과 가교되어 가교된 지시약 네트워크 내에서 가교를 형성할 수 있다. 예를 들어, 다관능성 고정 화합물 및 지시약은 혼합물로서 임의로는 적합한 가교제 및/또는 가교 개시제와 함께 검출 대역에 적용될 수 있다. 결합 반응의 개시시 (예: 광 개시), 안정되게 고정된 지시약을 포함하는 가교 네트워크를 형성할 수 있다.
- [0050] 임의의 적합한 결합 메커니즘을 사용하여 가교결합을 용이하게 할 수 있다. 오로지 예시로서, 광 개시 가교 방법을 통해 경화될 수 있는 고정 화합물의 예는 불포화 단량체 또는 올리고머기를 포함하는 것들, 예를 들어, 제한 없이 에틸렌, 프로필렌, 비닐 클로라이드, 이소부틸렌, 스티렌, 이소프렌, 아크릴로니트릴, 아크릴산, 메타크릴산, 에틸 아크릴레이트, 메틸 메타크릴레이트, 비닐 아크릴레이트, 알릴 메타크릴레이트, 트리프로필렌 글리콜 디아크릴레이트, 트리메틸올 프로판 에톡실레이트 아크릴레이트, 에폭시 아크릴레이트, 예를 들어 비스페놀 A 에폭시드와 아크릴산의 반응 생성물, 폴리에테르 아크릴레이트, 예를 들어 아크릴산과 아디프산/헥산디올계 폴리에테르의 반응 생성물, 우레탄 아크릴레이트, 예를 들어 히드록시프로필 아크릴레이트와 디페닐메탄-4,4'-디이소시아네이트의 반응 생성물 및 폴리부타디엔 디아크릴레이트 올리고머를 포함할 수 있다.

[0051] 한 실시양태에서, 고정 화합물은 소분자 지시약 (예: 시클로텍스트린 부분) 및 다당류 크로마토그래피 매질 (예: 셀룰로오스)의 반응성 부분들 사이에서 적합한 pH 및 온도 조건의 존재하에 에스테르 결합을 형성할 수 있는 폴리카르복실산 또는 시클릭 무수물기를 포함할 수 있다. 고정 화합물은 또한 생물학적 거대분자, 예를 들어 단백질 또는 다중핵산일 수 있다. 단백질, 예를 들어 항체 및 알부민은 니트로셀룰로오스와 같은 크로마토그래피 매질 상에 고정화될 수 있다고 공지되어 있다. 지시약은 기존의 또는 변형된 화학기를 통해 생물학적 고정 화합물에 공유결합으로 부착될 수 있다. 예를 들어, 지시약은 단백질의 리신기 또는 카르복실기를 통해 알부민 고정 화합물에 결합될 수 있다. 이러한 부착 화학은 당업계에 널리 공지되어 있다. 유사하게, 폴리뉴클레오티드 고정 화합물에 존재할 수 있는 것과 같은 염기를 관능성 반응기를 포함하는 소분자 지시약에 공유결합하는 방법은 당업계에 일반적으로 공지되어 있다. 이어서, 고정 화합물은 상호- 및 내부-가교로 가교되어 지시약을 함유하는 가교 네트워크를 형성할 수 있다.

[0052] 소분자 지시약의 지시약 부분은 네트워크 형성 과정 동안 보호될 수 있다. 예를 들어, 고정 화합물 및/또는 크로마토그래피 매질은 형성 동안 지시약 부분과 반응하지 않는 반응성 관능기를 포함할 수 있다. 임의로는, 다른 시스템 성분이 네트워크 형성 조건 하에서 소분자 지시약의 지시약 그 자체 이외의 부분과 선택적으로 반응하는 반응성 관능기를 포함할 수 있다. 따라서, 반응 조건은 지시약 부분을 보호하면서 선택적으로 목적하는 결합을 형성하도록 제어할 수 있다. 다른 실시양태에서, 소분자 지시약은 다수의 유사한 반응성 부분을 포함할 수 있고, 예를 들어 폴리아민 디아조늄 화합물의 경우 소분자 지시약은 소분자 지시약을 고정 화합물에 결합시키는데 활용될 수 있는 다수의 반응성 아민을 포함할 수 있다. 고정 화합물과 지시약의 반응성, 아민기의 일부는 지시약을 고정 화합물에 결합시키는데 및 임의로는 네트워크 가교에 사용될 수 있고, 지시약의 반응성이 유지될 수 있다.

실시예

[0053] 분석물의 검출을 용이하게 하는데 사용될 수 있는 분석 장치를 형성하는 다양한 실시양태를 이제 보다 상세하게 기술할 것이다. 도 1을 참조하면, 예를 들어 막 기재 유동 통과 분석 장치(20)의 한 실시양태를 도시하였다. 나타난 바와 같이, 장치(20)는 임의로 강성 재료(21)에 의해 지지되는 크로마토그래피 매질(23)을 함유한다. 크로마토그래피 매질(23)은 시험 샘플이 통과할 수 있는 임의의 다양한 물질로부터 형성될 수 있다. 예를 들어, 매질을 형성하는데 사용되는 물질은 천연, 합성 또는 합성적으로 개질되는 자연 발생 물질, 예를 들어 다당류 (예를 들어, 셀룰로오스 물질, 예컨대 종이 및 셀룰로오스 유도체, 예컨대 셀룰로오스 아세테이트 및 니트로셀룰로오스), 실리카, 무기 물질, 예를 들어 불활성화된 알루미늄, 규조토, MgSO₄, 또는 중합체, 예를 들어 비닐 클로라이드, 비닐 클로라이드-프로필렌 공중합체, 및 비닐 클로라이드-비닐 아세테이트 공중합체와 함께 다공성 중합체 매트릭스 중에 균일하게 분산된 다른 미분된 무기 물질, 자연 발생 천연 (예를 들어, 면) 및 합성 천연 (예를 들어 나일론 또는 레이온), 다공성 겔, 예컨대 실리카 겔, 아가로스(agarose), 텍스트란, 및 젤라틴, 중합체 필름, 예컨대 폴리아크릴아미드 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 하나의 특정 실시양태에서, 크로마토그래피 매질은 니트로셀룰로오스 및/또는 폴리에스테르 술폰 물질로부터 형성된다. "니트로셀룰로오스"라는 용어는 셀룰로오스의 질산 에스테르를 나타내고, 니트로셀룰로오스 단독 또는 질산 및 다른 산, 예를 들어 1개 내지 7개의 탄소 원자를 갖는 지방족 카르복실산의 혼합 에스테르일 수 있다는 점을 이해해야 한다.

[0054] 크로마토그래피 매질(23)은 지시약을 함유하는 가교 네트워크(도시하지 않음)가 그 안에 함유되는 검출 대역(31)을 정의한다. 가교 네트워크는 크로마토그래피 매질(23)의 매트릭스를 통해 확산되지 않도록 크로마토그래피 매질(23)의 표면에 고정된다. 검출 대역(31)은 일반적으로 하나의 실시양태에서 사용자가 시험 샘플 내에 특정 분석물의 농도를 측정할 수 있도록 임의의 수의 별개의 검출 영역을 제공할 수 있다. 각 영역은 동일한 지시약을 함유할 수 있거나 또는 다수의 분석물을 포집하기 위한 상이한 지시약들을 함유할 수 있는 가교 네트워크를 포함할 수 있다. 예를 들어, 검출 대역(31)은 2개 이상의 별개의 검출 영역 (예를 들어, 선, 점 등)을 포함할 수 있다. 검출 영역은 분석 장치(20)를 통한 시험 샘플의 유동에 실질적으로 수직 방향의 선 형태일 수 있는 불연속 층으로서 배치될 수 있다. 마찬가지로, 일부 실시양태에서 검출 영역은 분석 장치를 통한 시험 샘플의 유동에 실질적으로 평행인 방향의 선 형태로 배치될 수 있다.

[0055] 장치(20)는 또한 흡수 패드(28)를 함유할 수 있다. 흡수 패드(28)는 일반적으로 전체 크로마토그래피 매질(23)을 통해 이동하는 유체를 수용한다. 당업계에 널리 공지된 바와 같이, 흡수 패드(28)는 모세관 작용 및 막(23)을 통한 유체 유동을 촉진하는데 도움을 줄 수 있다. 시험 샘플 내에 분석물의 검출을 개시하기 위해, 사용자는 크로마토그래피 매질(23)과 유체 소통되는 크로마토그래피 매질(23)의 적용 패드(24)에 시험 샘플을 직

접 적용할 수 있다. 적용 패드(24)를 형성하는데 사용할 수 있는 일부 적합한 물질은 니트로셀룰로오스, 셀룰로오스, 다공성 폴리에틸렌 패드 및 유리섬유 여과지를 포함하되 이에 제한되지 않는다. 바람직하다면, 적용 패드(24)는 또한 그에 확산적으로 또는 비확산적으로 부착된 1종 이상의 분석 전처리 시약을 함유할 수 있다.

[0056] 예시된 실시양태에서, 시험 샘플은 적용 패드(24)로부터 적용 패드(24)의 한 말단과 소통하게 배치된 집합 패드(22)로 이동한다. 집합 패드(22)는 시험 샘플이 통과할 수 있는 물질로부터 형성된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 집합 패드(22)는 유리 섬유로부터 형성된다. 오로지 하나의 집합 패드(22)를 나타내었지만, 다른 집합 패드도 또한 사용될 수 있다는 점을 이해해야 한다.

[0057] 시험 샘플 내에 분석물의 존재 또는 부재의 검출을 용이하게 하기 위해, 다양한 시약을 집합 패드(22)에 고정시킬 수 있다. 예를 들어, 글루코스와 같은 분석물을 포함하는 시험 샘플을 집합 패드(22)로 이동시키고, 여기서 분석물을 글루코스 옥시다제, 퍼옥시다제 및 적합한 완충액을 포함하는 시약과 함께 혼합한다. 샘플과 시약의 혼합시, 글루코스 옥시다제는 글루코스의 산화를 촉매화하여, 퍼옥시다제 수소 퍼옥시드를 생성한다. 집합 패드(22)가 크로마토그래피 매질(23)과 유체 소통하기 때문에, 물질은 집합 패드(22)로부터 지시약, 예를 들어 벤지딘형 지시약(예: TMB)을 포함하는 가교 네트워크가 있는 검출 대역(31)으로 이동할 수 있다. 퍼옥시다제의 존재하에서, 수소 퍼옥시드는 지시약의 색상 변화를 유발시킨다. 명백하게, 임의의 또는 모든 시약의 특정 위치는 검출 대역의 위치에 대해 최적화될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 검출 대역(31) 내에 확산적으로 고정화된 완충액을 포함하는 것이 바람직할 수 있다.

[0058] 도 1에 나타난 실시양태에서는, 시험 샘플의 분석물 농도가 증가함에 따라, 보다 많은 분석물(또는 그의 반응 생성물)이 검출 대역(31) 내의 지시약과 반응할 수 있다. 검출 대역(31)에서 반응량의 증가는 신호 강도를 증가시킨다. 이러한 신호 강도의 증가로부터, 분석물의 존재 또는 농도가 쉽게 측정될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 분석물의 양은 검출 대역(31)에서의 신호 강도(I_1)에 직접 비례한다. 바람직하다면, 신호 강도(I_1)를 알려진 농도의 범위에 대해 분석물의 농도에 대해 플롯팅하여 강도 곡선을 생성할 수 있다. 알 수 없는 시험 샘플 중 분석물의 양을 측정하기 위해, 신호 강도를 강도 곡선에 따라 분석물 농도로 전환시킬 수 있다.

[0059] 검출 대역(31)의 하나 이상의 개별 영역이 신호 강도와 분석물 농도 사이의 상기 기술된 관계를 나타낼 수 있지만, 각각 및 모든 개별 영역이 이러한 관계를 나타낼 필요는 없다는 점을 이해해야 한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 다수의 개별 영역 중 단지 하나만이 분석물의 농도에 직접 비례하는 신호 강도를 나타낼 수 있다. 다른 개별 영역, 예를 들어 거짓 양성(false positive)을 줄이는데 사용되는 지역의 신호 강도는 일정하게 유지될 수 있거나, 신호 강도의 증가 및/또는 감소를 나타낼 수 있다. 검출 대역(31)의 하나 이상의 개별 영역이 직접 관계를 만족시키는 한, 검출 대역(31)에 의해 나타낸 신호 강도는 효소 농도에 직접 비례하는 것으로 간주된다.

[0060] 도 1을 참조하면, 분석 장치(20)는 또한 대조 대역(32)을 포함할 수 있다. 대조 대역(32)은 장치가 적절하게 작동하는지를 결정하는데 이용될 수 있다. 대조 대역(32)은 대조 대역(32)의 상류의 크로마토그래피 매질(23) 상에 확산적으로 분산될 수 있는 시약에 결합될 수 있는 수용 물질을 제공할 수 있다. 보다 구체적으로, 충분한 부피의 시험 샘플과 접촉시 크로마토그래피 매질(23)을 통해 흐르는 검출 시약을 사용할 수 있다. 이어서, 이들 검출 가능한 시약을 시각적으로 또는 장치를 사용하여 대조 대역(32) 내에서 관찰할 수 있다. 제어 시약은 일반적으로 검출 가능한 물질, 예를 들어 발광 화합물 (예를 들어, 형광물질, 인광 물질 등), 방사성 화합물, 가시 화합물 (예를 들어, 착색 염료 또는 금속 물질, 예컨대 금), 리포솜 또는 신호 생성 물질을 함유하는 다른 소포, 효소 및/또는 기질 등을 함유한다. 다른 적합한 검출 가능한 물질은 모든 목적을 위해 그 전문을 본원에 참고로 인용하는 조우(Jou) 등의 미국 특허 제5,670,381호 및 타차(Tarcha) 등의 미국 특허 제5,252,459호에 기술되어 있다. 바람직하다면, 검출 물질은 상기 기술된 것과 같은 입자 상에 배치될 수 있다.

[0061] 대조 대역(32)의 위치는 수행되는 시험의 특성에 따라 바뀔 수 있다. 예시된 실시양태에서, 예를 들어 대조 대역(32)은 크로마토그래피 매질(23)에 의해 정의되고, 검출 대역(31)로부터 하류에 위치된다. 대조 대역(32)은 비확산적으로 고정화되고 검출 시약과 화학적 및/또는 물리적 결합을 형성하는 물질을 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 결합체는 생물학적 수용 물질을 함유할 수 있다. 예를 들어, 수용 물질이 생물학적 수용 물질일 수 있다. 이러한 생물학적 수용 물질은 당업계에 널리 알려져 있고, 항원, 랩텐, 항체, 단백질 A 또는 G, 아비딘, 스트렙타비딘, 2차 항체, 및 이들의 복합체를 포함하되 이에 제한되지 않는다. 일부 경우에서, 이 생물학적 수용 물질은 검출 가능한 시약 상에 존재하는 특정 결합 구성원 (예를 들어, 항체)에 결합할 수 있는 것이 바람직하다. 별법으로, 다양한 비생물학적 물질이 검출 가능한 시약 수용 물질로 이용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 수용 물질은 검출 가능한 시약에 결합할 수 있는 중합체 전해질을 포함

할 수 있다. 다양한 중합체 전해질 결합 시스템은 예를 들어 모든 목적을 위해 그 전문을 본원에 참고로 인용하는 송(Song) 등의 미국 출원 공개 제2003/0124739호에 기술되어 있다. 그러나 별법의 실시양태에서, 대조 대역(32)은 단순히 검출 가능한 시약이 크로마토그래피 매질(23)을 통해 통과한 후 흐르는 흡수 물질(28)의 영역에 의해 정의될 수 있다.

[0062] 선택된 특정 기술에도 무관하게, 장치(20)에 대한 충분한 부피의 시험 샘플의 적용은 분석물이 존재하는 존재하지 않든 대조 대역(32) 내에 신호를 발생시킬 것이다. 이러한 대조 대역에 의해 제공되는 이점은 주의깊은 측정 또는 계산이 필요없이 충분한 부피의 시험 샘플이 첨가되었다는 점을 사용자에게 알려준다는 점이다. 이는 반응 시간, 시험 샘플 부피 등을 외부적으로 제어할 필요 없이 측방향 유동 장치(20)를 사용하는 능력을 제공한다.

[0063] 개시된 측방향 유동 장치의 하나의 이점은 분석물 검출을 용이하게 하는 하나 이상의 추가 대역을 쉽게 도입하는 능력이다. 예를 들어, 도 1을 다시 살펴보면, 이러한 하나의 대역은 켄칭 대역(35)이다. 켄칭 대역(35)은 검출 시스템의 정확도를 저해하는 시험 샘플로부터 화합물을 제거하도록 구성된다. 예를 들어, 시험 샘플 내의 오염물질(예를 들어, 페놀, 빌리루빈, 우로빌리노겐 등)이 검출 대역(31) 내에서 지시약과 반응하고 검출 화합물을 형성함으로써 "거짓 음성(false negative)" 결과를 생성할 수 있다. 따라서, 켄칭 대역(35)은 반응 오염물질과 반응할 수 있는 켄칭제, 예를 들어 디아조늄 이온을 함유할 수 있다. 켄칭제는 검출 대역(31) 내에서 사용되는 지시약과 동일하거나 상이할 수 있다. 켄칭제는 매질(23)을 통해 유동하지 않거나 시험을 간섭하지 않도록 상기 기술된 방식으로 켄칭 대역(35) 내에 비확산적으로 고정될 수 있다. 켄칭 대역(35)의 위치는 변할 수 있지만, 전형적으로 검출 저해를 회피하기 위해 검출 대역(31) 및 샘플이 적용되는 위치로부터 상류에 위치한다. 예를 들어, 예시된 실시양태에서, 켄칭 대역(35)은 샘플 적용 대역(24)과 시약 대역(22) 사이에 위치한다.

[0064] 상기 특정된 대역에 추가로, 측방향 유동 장치(20)는 또한 다른 임의의 대역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 측방향 유동 장치(20)는 효소-촉매화 기질 반응을 위한 가속제가 함유된 가속 대역 (도시하지 않음)을 포함할 수 있다. 전형적으로, 가속제는 시험 샘플과 접촉시 매질(23)을 통해 유동할 수 있도록 상기 기술된 방식으로 가속 대역 내에 확산적으로 고정된다. 가속 대역의 위치는 일반적으로 검출 대역(31)로부터 상류에 위치하는 한 변할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 가속 대역은 시약 대역(22)로부터 상류인 위치(예를 들어, 샘플 적용 대역(24))에 위치할 수 있다. 시약 대역(22)에 제공된 기질과 가속제 사이에 제공된 분리로 인해, 이들 사이의 임의의 조기 반응 가능성은 감소한다. 그러나, 가속제는 그럼에도 불구하고 일부 적용에서 기질과 결합될 수 있음을 이해해야 한다.

[0065] 개시된 주제를 그의 특정 실시양태에 대해 상세하게 기술하였지만, 당업자는 이상을 이해한 후 이들 실시양태의 변형, 변경 및 등가물을 쉽게 도출해낼 수 있다는 점을 이해할 것이다. 따라서, 본원의 범위는 첨부된 청구항 및 이들의 임의의 등가물의 범위로서 평가되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0007] 당업자를 위한 최선의 양태를 포함하는 완전하고 실시가능한 개시가 본 명세서의 나머지 부분에서 보다 구체적으로 첨부 도면을 참조로 하여 제시되며, 도면에서 도 1은 본원에 기재된 유동-통과 분석 장치의 한 실시양태의 투시도이다.

도면

도면1

