



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월14일
 (11) 등록번호 10-1866844
 (24) 등록일자 2018년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/533 (2006.01)
 G01N 33/543 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7004602
 (22) 출원일자(국제) 2013년07월22일
 심사청구일자 2016년04월27일
 (85) 번역문제출일자 2013년02월22일
 (65) 공개번호 10-2013-0090892
 (43) 공개일자 2013년08월14일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2011/045053
 (87) 국제공개번호 WO 2012/012748
 국제공개일자 2012년01월26일
 (30) 우선권주장
 61/367,281 2010년07월23일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 US04812414 A*
 US4357311 A
 US5143825 A
 US20090226939 A1
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 루미넥스 코포레이션
 미합중국 텍사스주 78727-6115 오스틴시 테크놀로지 불리버드가 12212
 (72) 발명자
 베이커, 해롤드
 미합중국, 78727 텍사스, 오스틴, 테크놀로지 불리버드가 12212, 루미넥스 코포레이션 내
 호프메이어, 미카엘라
 미합중국, 78727 텍사스, 오스틴, 테크놀로지 불리버드가 12212, 루미넥스 코포레이션 내
 던바, 웨리
 미합중국, 78727 텍사스, 오스틴, 테크놀로지 불리버드가 12212, 루미넥스 코포레이션 내
 (74) 대리인
 특허법인오리진

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 양경식

(54) 발명의 명칭 **면역분석에서 시약의 반응성을 조절하기 위한 공동 결합**

(57) 요약

본 발명은 면역분석 반응성을 조절하는 방법 및 조성물을 제공한다. 일 구현예로, 면역분석용 기관을 제조하는 방법으로서, 시약과 중성 물질을 함유하는 조성물을 상기 시약과 중성 물질을 기관에 결합시키기에 적합한 조건 하에 기관에 도포하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 다중 면역분석(multiplex immunoassay)에서 시약의 반응성을 조절하는 방법:

- (a) 다중 면역분석용으로 사용가능한 최대 신호 이상인 분석 신호를 산출하는 다중 면역분석에서 제1 분석물질에 대해 고 반응성을 갖는 시약을 확인하는 단계;
- (b) 고 반응성 시약을 항원적 중성 물질과 배합하여 조성물을 획득하는 단계, 상기에서 항원적 중성 물질은 시약과 관련하여 항원적으로 중성인 물질임;
- (c) 고 반응성 시약 및 항원적 중성 물질을 기관에 결합시키기 위해, 상기 조성물을 상기 기관에 도포하는 단계; 및
- (d) 항원적 중성 물질과 함께 기관에 공동 결합된 고 반응성 시약의 분석 신호가 다중 면역분석용으로 사용 가능한 신호 범위 내에 있는지를 확인하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

다중 면역분석에서 고 반응성을 갖는 2종 이상의 시약의 반응성을 조절하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 분석 신호는 화학발광 신호 또는 형광 신호인 것을 특징으로 하는, 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 고 반응성 시약은 항체 또는 항원인 것을 특징으로 하는, 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 항원적 중성 물질은 비연관성 종의 항체 또는 혈청 알부민인 것을 특징으로 하는, 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 기관은 입자 또는 웰의 표면인 것을 특징으로 하는, 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 입자는 미소구인 것을 특징으로 하는, 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물에서 고 반응성 시약 대 항원적 중성 물질의 비가 약 1:120 내지 6:1인 것을 특징으로 하는, 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 고 반응성 시약 및 항원적 중성 물질은 상기 기관에 공유 결합된 것을 특징으로 하는, 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 미소구는 자기 반응성인 것을 특징으로 하는, 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

면역분석 내 제1 분석물질의 농도가 면역분석 내 제2 분석물질의 농도보다 1,000 배 이상 더 높은 것을 특징으로 하는, 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

제1 분석물질은 갑상선 자극 호르몬 (TSH)이고, 제2 분석물질은 황체형성 호르몬(LH) 또는 난포-자극 호르몬(FSH)인 것을 특징으로 하는, 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

제1 분석물질은 인간 융모막 성선자극호르몬(hCG)이고, 제2 분석물질은 알파-태아 단백질(alpha-fetal protein: AFP)인 것을 특징으로 하는, 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2010년 7월 23일에 출원된 미국 가출원 제61/367,281호에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 상기 가출원의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 면역분석에 관련된 방법 및 조성물에 관한 것이다. 구체적인 구현예로, 본 발명은 면역분석에서 반응성을 조절하기 위한 공동 결합 시약에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 면역분석에서 생성된 신호(예컨대, 형광, 화학발광, 방사능)의 양은 검출 장치의 사용 가능한 범위에 속하거나 및/또는 면역분석용 허용가능한 용량 반응 곡선을 생성하는 것이 바람직하다. 분석이 하나의 분석물질(analyte)로 이루어진 단일 분석에서, 생성된 신호의 양은 통상 분석에서 분석물질의 양을 조절함으로써 조절된다. 그러나, 다중 분석에서는 모든 분석물질의 양을 적절히 조절하는 것이 가능하지 않을 수도 있는데, 그것은 최소 사용 가능 레벨 이상으로 그 검출 가능 신호의 양을 상승시키기 위해 하나의 분석물질의 양을 증가시키는 것은 또다른 분석물질에 대한 검출 가능 신호를 최대 사용 가능 레벨 이상으로 상승시키는 결과를 초래할 수 있기 때문이다. 마찬가지로, 최대 사용 가능 레벨 이하로 그 검출 가능한 레벨을 저하시키기 위해 분석물질의 양을 감소시키는 것은 또다른 분석물질에 대한 검출 가능 신호를 최소 사용 가능 레벨 이하로 저하시키는 결과를 초래할 수 있다.

[0005] 다중 분석에서 면역분석 반응성을 조절하는 방법은 종종 분석의 후기 단계에서 사용되는 시약을 조절하는 데에 초점이 집중된다. 이것은 통상 비오틴기 또는 또다른 작용기가 부착된 "검출" 항체이다. 작용기는 ELISA 및 기타 단일 분석에서 공통적으로 사용되는 양고추냉이 피옥시다제(Horse Radish Peroxidase) 또는 알칼리 포스파타제와 같은 효소일 수 있다. 비오틴 또는 R-피코에리트린은 기타 공통적으로 사용된 작용기들의 예이다. 그러나, 분석의 후기 단계에 사용되는 조절 시약은 분석물질의 농도가 높을 때 신뢰할 수 없는 정보를 제공할 위험성을 보유한다. 동일한 생물학적 샘플 중의 상이한 분석물질의 농도는 1,000 배 이상까지 상이할 수 있다. 예컨대, TSH는 통상 pg/ml인 반면, LH 및 FSH는 ng/ml이다. 또다른 예로서, 트리조미(Trisomy) 23에 대해 시험할 때, 다운 증후군, hCG, E3 및 AFP가 측정된다. HCG는 mg/ml로, E3는 ng/ml로, AFP는 pg/ml의 농도로 존재한다. 이것은 농도에서 8 로그차이고, 다중 실험을 만든다. 일부 경우에는 상이한 샘플 전체에 걸쳐 동일한 분석물질에 대한 것보다 1,000배 차보다 더 클 수도 있다(예컨대, hCG는 통상 ng/ml로 존재하고, 임신 중에 mg/ml까지 증가

한다). 따라서, 최고 농도의 분석물질의 존재 하에, 그리고 유의 수준으로 상이한 농도로 분석물질을 함유하는 샘플에서, 조절된 반응성 및 균형있는 측정을 제공할 수 있는 방법 및 조성물에 대한 요구가 존재한다.

[0006] **참고 문헌**

[0007] 하기의 참고 문헌들은 예시적이고 절차적인 또는 본 명세서에 제시된 것들에 보충적인 기타 상세한 사항을 제시하는 정도로 참고로 본 명세서에 구체적으로 포함된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 미국 특허 제3,817,837호
- (특허문헌 0002) 미국 특허 제3,850,752호
- (특허문헌 0003) 미국 특허 제3,939,350호
- (특허문헌 0004) 미국 특허 제3,996,345호
- (특허문헌 0005) 미국 특허 제4,275,149호
- (특허문헌 0006) 미국 특허 제4,277,437호
- (특허문헌 0007) 미국 특허 제4,366,241호

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Bangham et al., J. Mol. Biol., 13(1):238-252; 253-259, 1965.
- (비특허문헌 0002) De Jager et al., Semin. Nucl. Med., 23(2): 165- 179, 1993.
- (비특허문헌 0003) Deamer and Uster, In: Liposome Preparation: Methods and Mechanisms, Ostro (Ed.), Liposomes, 1983.
- (비특허문헌 0004) Doolittle and Ben-Zeev, Methods Mol. Biol., 109:215-237, 1999.
- (비특허문헌 0005) Freifelder, In: Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology, 2nd Ed. Wm. Freeman and Co., NY, 1982.
- (비특허문헌 0006) Ghosh and Bachhawat, In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands, Wu et al. (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- (비특허문헌 0007) Gregoriadis, In: Drug Carriers in Biology and Medicine, Gregoriadis (Ed.), 287-341, 1979.
- (비특허문헌 0008) Gulbis and Galand, Hum. Pathol., 24(12):1271-1285, 1993.
- (비특허문헌 0009) MacBeath and Schreiber, Science, 289(5485):1760-1763, 2000.
- (비특허문헌 0010) Nakamura et al., In: Handbook of Experimental Immunology (4th Ed.), Weir et al., (Eds). 1:27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.
- (비특허문헌 0011) Pandey and Mann, Nature, 405(6788):837-846, 2000.
- (비특허문헌 0012) Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:4194-4198, 1978.

발명의 내용

[0010] 일 구현예로, 본 발명은 면역분석용 기관을 제조하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (a) 시약 및 중성 물질을 포함하는 조성물을 획득하는 단계; 및 (b) 이 조성물을 시약과 중성 물질을 기관에 결합시키거나 코팅하기에 적합한 조건 하에 기관에 도포하는 단계를 포함한다. 또다른 구현예로, 본 발명은 시약과 중성 물질이 결합되거나

코팅되어 있는 기판을 제공한다. 본 발명의 특정 측면에서, 상기 시약과 중성 물질은 기판에 공유 결합된다. 추가의 구현예로, 본 발명은 기판, 시약 및 중성 물질을 포함하는 키트를 제공한다. 기판, 시약 및 중성 물질은 키트에 따로 따로 포장되거나, 시약과 중성 물질은 조성물로 함께 제공되거나, 또는 시약과 중성 물질은 기판에 결합되거나 코팅된 상태로 제공될 수 있다.

[0011] 일 구현예로, 본 발명은 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (a) 고 반응성 시약을 중성 물질과 배합하여 조성물을 획득하는 단계; 및 상기 조성물을 고 반응성 시약과 중성 물질을 기판에 결합시키기에 적합한 조건하에 기판에 도포하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 기판에 중성 시약과 함께 공동 결합된 고 반응성 시약의 분석 신호가 다중 면역분석용으로 사용 가능한 신호 범위 내에 있는지를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[0012] 또다른 구현예로, 본 발명은 다중 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 (a) 다중 면역분석용으로 사용 가능한 최대 신호 이상인 분석 신호를 산출하는 다중 면역분석에서 고 반응성을 갖는 시약을 확인하는 단계; (b) 고 반응성 시약을 중성 물질과 배합하여 조성물을 획득하는 단계; (c) 상기 조성물을 고 반응성 시약과 중성 물질을 기판에 결합시키기에 적합한 조건하에 기판에 도포하는 단계; 및 (d) 기판에 중성 시약과 함께 공동 결합된 고 반응성 시약의 분석 신호가 다중 면역분석용으로 사용 가능한 신호 범위 내에 있는지를 확인하는 단계를 포함한다.

[0013] 본 발명의 특정 측면에서, 상기 방법은 다중 면역분석에서 고 반응성을 갖는 2중 이상의 시약의 반응성을 조절하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 다중 분석은 상기 시약들의 부분 세트가 다중 면역분석에서 고 반응성을 갖는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000개 이상의 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 다중 분석은 상기 시약들의 부분 세트가 다중 면역분석에서 고 반응성을 갖는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 또는 임의의 바람직한 범위를 갖는 시약들을 포함한다. 본 발명의 특정 측면에서, 상기 방법은 다중 면역분석에서 고 반응성을 갖는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100개 이상의 시약의 반응성을 조절하는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 상기 방법은 다중 면역분석에서 고 반응성을 갖는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 또는 임의의 바람직한 범위를 갖는 시약들의 반응성을 조절하는 단계를 포함한다. 다양한 검출 기법들이 당해 분야에 알려져 있으며, 분석 신호를 생성시키는데 이를 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 분석 신호는 화학발광 신호 또는 형광 신호이다. 다른 구현예에서, 상기 신호는 색 측정 신호 또는 방사성 신호이다. 사용 가능한 범위는 결과 또는 신호가 신뢰가능하도록 지정된 범위 내에 착오가 존재하는 값들의 세트를 의미한다.

[0014] 본 명세서에서 "다중(multiplex)"이란 표현 또는 문법적 동등 표현은 샘플 당 하나 이상의 관심대상인 표적 분석물질의 동시적인 검출, 분석 또는 증폭을 의미한다. 다중의 상이한 분석물질(다중)의 분석은 동시에 수행될 수 있다. 검출은 웰 플레이트 및 비드 배열을 포함하는(이에 국한되지 않음) 다양한 플랫폼(platform)들에서 수행될 수 있다.

[0015] 기판은 면역 검출법에 사용될 수 있는 임의의 기판일 수 있다. 그러한 기판의 비한정적인 예로는 폴리스티렌 미세적정 플레이트(microtiter plate) 또는 미소구(microsphere) 내의 웰이 있다. 기판은 예컨대, 니트로셀룰로스, 나일론막, 유리, 활성 석영, 활성 유리, 실리카, 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 막, 폴리스티렌 기판, 폴리아크릴아미드계 기판, 기타 중합체, 공중합체 또는 가교 중합체, 예컨대, 폴리염화비닐, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(디메틸 실록산), 광중합체(표적 분자와 공유 결합을 형성할 수 있는 광 반응성 중, 예컨대 니트렌, 카르벤 및 케틸 라디칼을 보유함)로 이루어질 수 있다. 평면 고체 지지체 상에 고정된 분자는 지지체 상의 그 공간적 위치에 의해 통상적으로 확인된다. 미소구("비드")와 같은 비평면 고체 지지체 상에 고정된 분자들은 종종 후술하는 바와 같이 지지체를 부호화할 수 있는 일정 형태에 의해 확인된다.

[0016] 비드(bead)는 그것의 하나의 세부 군집이 또다른 세부 군집과 구별될 수 있도록 부호화할 수 있다. 부호화(encoding)는 다양한 기법으로 이루어질 수 있다. 예컨대, 비드는 상이한 방출 스펙트럼 및/또는 상이한 신호 강도를 갖는 형광성 염료로 표지할 수 있다. 특정 구현예에서, 비드는 루미넥스 매그플렉스 미소구(Luminex MagPlex® Microspheres), 루미넥스 엑스태그 미소구(Luminex xTAG® Microspheres), 루미넥스 세로맵 미소구(Luminex SeroMap™ Microspheres) 또는 루미넥스 마이크로플렉스 미소구(Luminex MicroPlex® Microspheres)이다. 또다른 부호화 기법은 홀로그래픽 코드 또는 바코드 비드를 사용한다. 세부 군집에서 비드의 크기는 하나의 세부 군집을 다른 것과 구별되게 하는데 사용될 수도 있다. 비드를 변형하는 또다른 방법은 Fe₃O₄와 같은 자기 반응성 물질을 구조 내로 도입하는 것이다. 상자성(paramagnetic) 및 초상자성(superparamagnetic) 미소구는 자기장의 부재시에 무시할만한 자성(magnetism)을 나타내지만, 자기장의 도입은 미소구 내 자기 도메인의 정렬

을 유도하여 미소구의 자기장 공급원로서의 인력을 초래한다. 형광성 염료, 비드 크기 및/또는 자기 반응성 물질을 비드에 조합함으로써, 생성될 수 있는 비드의 상이한 세부 군집의 수를 추가로 증가시킬 수 있다.

[0017] 시약(reagent)은 다른 물질을 시험하거나 다른 물질과 반응시키는 데 사용되는 물질을 의미한다. 시약이 반응하는 물질은 분석물질(analyte)로 정의할 수 있다. 분석물질은 검출되고/되거나 정량될 수 있는 임의의 물질일 수 있다. 분석물질은 체액(전혈, 혈청, 타액, 뇨, 정액을 포함하지만 이에 국한하지 않음)과 같은 샘플에, 또는 환경 샘플(물 또는 토양을 포함하지만 이에 국한하지 않음)에 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, 분석물질은 항원 또는 항체이다. 분석물질은 예컨대, 단백질, 지질, 탄수화물 또는 핵산일 수 있다. 일부 구현예에서, 시약은 항원, 항체, 앵타머(aptamer) 또는 올리고뉴클레오티드이다. 본 발명의 일 측면에서, 시약은 소형 분자 표적이 부착된 단백질로 면역분석에 사용되어 소형 분자를 측정할 수 있다. 예컨대, 스테로이드, 소형 분자 호르몬 또는 기타 소형 분자가 BSA에 부착되거나 기관에 결합될 수 있다. 이들의 예로는 프로게스틴 분자, 에스트로겐 분자 및 갑상선 호르몬 분자가 있다. 이들 단백질, 가장 통상적으로는 소형 분자가 결합된 BSA는 스스로 미소구에 그대로 결합되거나, 또는 상기 분자들의 다수가 결합되지 않은 BSA에서와 같이 중성 물질과 공동 결합될 수 있다.

[0018] 본 명세서에 사용된 용어 "항체"는 광범위하게 IgY, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE와 같은 임의의 면역학적 결합체와 그 항원 결합 단편을 의미한다. 일 구현예에서, 항체는 예컨대, 헤모필리스 인플루엔자 b형(Hib) 다당류에 대한 항체 및 클로스트리듐 테타니(Tet) 및 코리네박테리움 디프테리아(Dip), 스트렙토코커스 뉴모니아, 메넵고커스, 소아마비, 디프테리아, 파상풍, HIV, HBV, HCV의 독소이드(toxoid)에 대한 항체일 수 있다.

[0019] 일 구현예에서, 시약은 닭 IgY를 인지하도록 개발된 토끼의 다클론 항체이다. 특정 측면에서, 토끼 항-닭 항체는 그것에 결합되어 그것이 검출 시약 R-피코에리트린에 결합된 스트렙타비딘 분자와 반응할 수 있게 하는 비오틴을 보유한다. 어떤 측면에서는, 토끼 다클론 항체가 미소구에 결합된다.

[0020] 또다른 구현예에서, 시약은 갑상선 자극 호르몬(TSH)을 인지하도록 개발된 마우스 단클론 항체이다.

[0021] 일부 구현예에서, 시약 또는 분석물질은 단백질일 수 있다. 일부 구현예에서, 단백질은 예컨대, IgY, 인슐린, TSH, 파상풍 독소 또는 독소이드, 디프테리아 독소 또는 독소이드, 뇌하수체 호르몬, 트립신 또는 트립시노겐일 수 있다. 특정 측면에서, IgY는 동물을 감염시킨 또는 감염시킨 것으로 의심되는, 질병 유발 유기체(예컨대, 바이러스 또는 박테리아)에 대해 반응한다. 감염된 동물은 포유류, 설치류 및 조류를 포함하는 척추동물일 수 있다. 동물은 인간일 수도 있다. 본 발명의 다양한 구현예에서, 분석물질은 감염에 대한 항체, 감염 원인체(예컨대, 바이러스, 박테리아, 곰팡이) 또는 프리온이다.

[0022] 중성 물질은 분석에서 시약 및 샘플과 관련하여 항원적으로 중성인 물질이다. 특정 구현예에서, 중성 물질은 혈청 알부민(예컨대, 소 혈청 알부민(BSA)), 카제인 또는 비연관성 종(non-relevant species)의 항체와 같은 비특이적 단백질이다. 시약 및 중성 물질은 이들을 기관에 결합 또는 코팅하기 전에 배합되기 때문에, 시약 및 중성 물질은 동일한 기관 또는 기관의 영역에 공동 결합 또는 공동 코팅된다. 예컨대, 기관이 비드인 경우, 시약 및 중성 물질의 혼합물을 동일한 비드에 결합시킨다. 기관이 웰인 경우, 시약 및 중성 물질의 혼합물을 동일 웰의 표면 상에 결합 또는 코팅시킨다. 시약/중성 물질 혼합물의 초기 결합 또는 코팅 이후, 추가의 중성 물질을 기관의 임의의 잔존하는 이용 가능한 표면을 "코팅하기" 위해 첨가할 수 있다. 상기 코팅은 고정화 표면 상의 비특이적 흡착 부위를 차단하게 하며, 따라서 비특이적 결합에 의해 야기되는 배경 흡착을 감소시킨다.

[0023] 샘플은 관심대상인 상이한 분석물질들의 다양한 농도들을 함유할 수 있다. 그러므로, 다중 분석에서는 그 분석을 위해 사용 가능한 신호 범위 내에 있는 각각의 분석물질로부터 분석 신호를 얻기 위해서는 문제가 있을 수 있다. 예컨대, 제1 분석물질용 분석 신호가 분석을 위해 최대 사용 가능한 신호를 초과하는 경우, 샘플을 희석함으로써 이것을 보정하는 것이 가능하지 않을 수도 있는데, 왜냐하면 그것은 분석을 위해 사용 가능한 최소 신호 이하인 제2 분석물질용 분석 신호를 생성시킬 것이기 때문이다. 본 출원에 개시된 방법 및 조성물은 시약 및 중성 물질을 공동 결합시킴으로써 분석의 시약쪽에서의 이 문제를 다룬다. 결합에 사용되는 조성물에서 시약 대 중성 물질의 비는 목적하는 분석 신호를 획득하는 데 필요한 대로 조정할 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물의 시약 대 중성 물질의 비는 약 1:1,000, 1:500, 1:200, 1:100, 1:120, 1:100, 1:80, 1:60, 1:40, 1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1 또는 20:1, 또는 이 범위 내에서 나올 수 있는 임의의 범위이다. 예컨대, 상기 범위는 약 1:120 내지 6:1, 1:120 내지 1:60, 또는 1:60 내지 6:1의 범위 내에 있을 수 있다. 기관에 결합된 시약 대 중성 물질의 비는 목적하는 분석 신호를 획득하는 데 필요한 대로 조정할 수 있다. 특정 구현예에서, 기관에 결합된 시약 대 중성 물질의 비는 약 1:1,000, 1:500, 1:200, 1:100, 1:120, 1:100, 1:80, 1:60, 1:40, 1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1 또는 20:1, 이 범위 내에서 나올 수 있는 임의의 범위이다. 예컨대, 상기 범위는 약 1:120 내지 6:1, 1:120 내지 1:60, 또는 1:60 내지 6:1의 범위 내에

있을 수 있다.

- [0024] 본 명세서에 기재된 임의의 방법 및 조성물은 본 명세서에 기재된 임의의 다른 방법 및 조성물과 관련하여 실행할 수 있다는 점도 고려되어야 한다.
- [0025] 특허청구범위에 "또는"이란 용어는 개시 내용이 대체물만 그리고 "및/또는"을 의미하는 정의를 지지하지만, 대체물만을 의미하거나 대체물이 상호 배타적이라고 명확하게 언급하지 않는 한 "및/또는"을 의미하는 것으로 사용된다.
- [0026] 본 출원의 전반에 걸쳐, "약"이란 용어는 어떤 값이 그 값을 결정하는 데 이용되는 장치 또는 방법에 대한 오차의 표준편차를 포함한다는 것을 나타내기 위해 사용된다.
- [0027] 오랜 특허법에 따라, 특허청구범위 또는 명세서에서 "포함하는(comprising)"이란 단어와 함께 사용할 때 "a" 및 "an"이란 용어는 특허 언급하지 않는 한 하나 이상을 의미한다.
- [0028] 용어 "포함하다(comprise)" (및 "comprises" 및 "comprising"과 같은 모든 형태의 포함하다), "가지다(have)" (및 "has" 및 "having"과 같은 모든 형태의 가지다), "함유하다(contain)" (및 "contains" 및 "containing"과 같은 모든 형태의 함유하다) 및 "포함하다(include)" (및 "includes" 및 "including"과 같은 모든 형태의 포함하다)는 제약이 없는 관련 동사이다. 결과적으로, 하나 이상의 언급된 단계 또는 요소를 "포함하는(comprises)," "갖는(has)," "함유하는(contains)" 또는 "포함하는(includes)" 방법, 조성물, 키트 또는 시스템은 그 언급된 단계 또는 요소들을 보유하지만, 단지 그 단계 또는 요소들만을 보유하는 것에 국한되는 것은 아니다; 그것은 언급되지 않은 요소 또는 단계들을 보유할(즉, 커버할) 수 있다. 마찬가지로, 하나 이상의 언급된 특징을 "포함하는(comprises)," "갖는(has)," "함유하는(contains)" 또는 "포함하는(includes)" 방법, 조성물, 키트 또는 시스템의 요소는 그 특징들을 보유하지만, 단지 그 특징들만을 보유하는 것에 국한되는 것은 아니다; 그것은 언급되지 않은 특징들을 보유할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 방법, 조성물, 키트 및 시스템의 임의의 구현에는 기재된 단계 및/또는 특징을 포함한다/포함한다/함유한다/가지다(comprise/include/contain/ have) 라기보다는 구성되다 또는 본질적으로 구성되다 라고 할 수 있다. 따라서, 특허청구범위 중에서 "구성되는(consisting of) 또는 "본질적으로 구성되는(consisting essentially of)"이란 용어는 제약이 없는 관련 동사를 사용할 주어진 청구항의 범위를 변화시키기 위해 상기 언급한 제약 없는 관련 동사 중의 어느 것을 대체할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 장점은 하기 상세한 설명으로부터 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명의 사상 및 범위 내에서 다양한 변경 및 수정은 상기 상세한 설명으로부터 당해 분야의 숙련자에게는 명확해질 것이기 때문에, 상세한 설명 및 특정 실시예는 본 발명의 특정 구현예를 나타내면서 예시용으로만 제시된다는 것을 이해하여야 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명의 구현에는 분석의 초기에 면역분석 반응성을 조절함으로써 분석물질의 최고 농도로 반응성을 조절하면서 모든 측정 레벨에 대해 균형있는 조절을 제공하는 방법 및 조성물을 제공한다. 상기 논의한 바와 같이, 분석의 후기 단계에 사용되는 시약의 조절에 초점을 맞추는 면역분석 반응성을 조절하는 통상의 방법은 분석물질의 농도가 높을 때는 신뢰할 수 없는 정보를 제공하기 쉽다. 또한, 고체상 물질에는 더 적은 시약을 간단히 결합시킬 수 있지만, 후술하는 연구는 이러한 방법이 결합/코팅된 표면에 균일성과 반응성 조절을 둘다 제공하기 때문에, 이러한 방법이 본원에 개시된 공동 결합 또는 공동 코팅 방법에 의해 제조된 것들보다 반응성을 조절함에 있어서 덜 효율적인 불균일하게 결합된/코팅된 표면을 산출한다는 것을 나타낸다.
- [0032] **I. 면역분석(Immunoassays)**
- [0033] 본 명세서에 기재된 방법과 조성물은 면역분석에서 시약의 반응성을 조절하는 데 사용될 수 있다. 당해 분야의 숙련자라면 후술하는 것들을 포함하여(이에 국한하지 않음) 면역분석을 수행하기 위한 다양한 방법이 존재하는 것을 이해할 것이다.
- [0034] 일부 면역 검출 방법으로는 몇 가지만 들어보면 효소 결합 면역 흡착 분석법(ELISA), 방사성 면역분석법(RIA), 면역 방사 측정법, 형광 면역분석법, 화학발광 분석법, 생물 발광 분석법 및 웨스턴 블롯이 있다. 다양한 유용한 면역 검출법의 단계는 과학 문헌, 예컨대 [Doolittle and Ben-Zeev, 1999; Gulbis and Galand, 1993; De Jager *et al.*, 1993]; 및 [Nakamura *et al.*, 1987]에 기재되어 있으며, 이들 문헌은 각각 본원에 참고로 인용

되었다.

- [0035] 선택된 생물학적 샘플을 효과적인 조건 하에 면역 복합체(1차 면역 복합체)의 형성을 허용하기에 충분한 시간 동안 접촉시키는 것은 일반적으로 항체 조성물을 샘플에 간단히 첨가하고, 항체가 존재하는 임의의 항원과 면역 복합체를 형성하기에, 즉 그 항원에 결합하기에 충분한 시간 동안 혼합물을 인큐베이션하는 문제이다. 그 후, 조직 단면, ELISA 플레이트, 도트 블롯 또는 웨스턴 블롯과 같은 샘플-항체 조성물은 일반적으로 임의의 비특이적으로 결합된 항체 종을 제거하기 위해 세척함으로써 이들 항체들만이 검출하고자 하는 1차 면역 복합체 내에 특이적으로 결합되도록 한다.
- [0036] 일반적으로, 면역 복합체 형성의 검출은 당해 분야에 널리 알려져 있으며, 다수의 방법을 적용하여 달성할 수 있다. 이들 방법은 일반적으로 상기 방사성, 형광성, 생물학적 및 효소적 태그 중 어느 것과 같이 표지 또는 마커를 검출하는 것을 기본으로 한다. 그러한 표지의 사용과 관련된 특허로는 미국 특허 제3,817,837호, 제 3,850,752호, 제3,939,350호, 제3,996,345호, 제4,277,437호, 제4,275,149 및 4,366,241호가 있으며, 본원에 참고로 포함되었다. 물론, 당해 분야에 알려진 대로 2차 항체 및/또는 비오틴/아비딘 리간드 결합 배열과 같은 2차 결합 리간드의 사용을 통해 추가적인 장점을 찾을 수 있다. 고농도의 분석물질의 존재 하에, 면역 복합체에 의해 생성된 검출 가능 신호의 양은 검출 장치에 사용 가능한 최대 범위를 초과할 수 있다. 따라서, 본 발명의 구현에는 면역분석 반응성을 조절함으로써 최고 농도의 분석물질에서 반응성을 조절하여 면역 복합체에 의해 생성된 검출 가능 신호가 검출 장치에 사용 가능한 신호 범위 내에 및 규제 기관에 의해 결정되는 허용가능한 범위 내에 존재하도록 하는 방법 및 조성물을 제공한다.
- [0037] 검출에 이용되는 선택적 항체는 검출 가능 표지에 스스로 결합될 수 있는데, 이 표지를 간단히 검출함으로써 조성물의 1차 면역 복합체의 양이 측정될 수 있게 한다. 한편, 1차 면역 복합체 내에 결합되는 1차 항체는 항체에 대한 결합 친화성을 갖는 2차 결합 리간드에 의해 검출될 수 있다. 이들 경우에, 2차 결합 리간드는 검출 가능 표지에 결합될 수 있다. 2차 결합 리간드는 종종 항체 자체인데, 따라서 "2차" 항체로 명명될 수 있다. 1차 면역 복합체는 효과적인 조건 하에 2차 면역 복합체의 형성을 허용하기에 충분한 시간 동안 표지된 2차 결합 리간드 또는 항체와 접촉된다. 2차 면역 복합체는 일반적으로 세척하여 임의의 비특이적으로 결합된 표지된 2차 항체 또는 리간드를 제거하며, 2차 면역 복합체에 남아 있는 표지가 검출된다.
- [0038] 또다른 방법은 2 단계 방법에 의해 1차 면역 복합체를 검출하는 것을 포함한다. 상기한 바와 같이 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 항체와 같은 2차 결합 리간드를 사용하여 2차 면역 복합체를 형성한다. 세척 후, 2차 면역 복합체는 효과적인 조건하에 면역 복합체(3차 면역 복합체)의 형성을 허용하기에 충분한 기간 동안 2차 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 3차 결합 리간드 또는 항체와 접촉시킬 수 있다. 3차 리간드 또는 항체는 통상 검출 가능 표지에 결합되어 이렇게 형성된 3차 면역 복합체를 검출하게 한다. 이 시스템은 이것이 요망되는 경우 신호 증폭을 제공할 수 있다.
- [0039] 상기 상술한 바와 같이, 가장 간단하고/하거나 상이한 의미에서 면역분석은 항체 결합 분석이다. 특정의 바람직한 면역분석은 당해 분야에 알려진 다양한 유형의 효소 결합 면역 흡착 분석(ELISA) 및/또는 방사 면역분석(RIA)이다.
- [0040] 일례의 ELISA에서, 선택적 항체는 폴리스티렌 미세적정 플레이트 중의 웰과 같이 단백질 친화도를 나타내는 선택된 표면 상에 고정된다. 그 다음, 임상 샘플과 같은 항원을 함유하는 것으로 의심되는 시험 조성물을 웰에 첨가한다. 비특이적으로 결합된 면역 복합체를 제거하기 위한 결합 및/또는 세척 후에, 결합된 항원을 검출할 수 있다. 검출은 일반적으로 검출 가능 표지에 결합된 또다른 항체의 첨가에 의해 이루어진다. 이러한 유형의 ELISA는 간단한 "샌드위치 ELISA"이다. 검출은 2차 선택적 항체를 첨가한 다음, 2차 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 3차 항체를 첨가하여 3차 항체가 검출 가능 표지에 결합되게 함으로써 이루어진다.
- [0041] 항원이 고정되는 또다른 ELISA는 검출에서 항체 경쟁을 사용한다. 이 ELISA에서, 항원에 대한 표지된 항체를 웰에 첨가하여 그 표지에 의해 결합되고/되거나 검출되게 한다. 미지의 샘플 중의 항원의 양은 코팅된 웰과 인큐베이션하는 동안 항원에 대해 표지된 항체와 샘플을 혼합함으로써 측정된다. 샘플 중의 항원의 존재는 웰에 결합하는 데 이용되는 항원에 대한 항체의 양을 감소시키고, 따라서, 최종 신호를 감소시키는 작용을 한다. 이것 또한 미지의 샘플 중의 항원에 대한 항체를 검출하는 데 적합한데, 여기서 미표지된 항체들은 항원 코팅된 웰에 결합하고, 표지된 항체들을 결합하는 데 이용되는 항원의 양을 감소시키기도 한다.
- [0042] 이용되는 형식과 무관하게, ELISA는 코팅, 인큐베이션 및 결합, 비특이적 결합종을 제거하기 위한 세척 및 결합된 면역 복합체의 검출과 같이 공통의 특성을 가진다. 이에 대해 후술한다.

[0043] 항원 또는 항체를 보유한 플레이트를 코팅할 때는, 일반적으로 플레이트의 웰을 항원 또는 항체의 용액과 하룻밤 또는 지정된 시간 동안 인큐베이션한다. 항원 또는 항체가 중성 물질과 공동 결합되는 경우에, 항원 또는 항체 및 중성 물질을 플레이트를 코팅하기 위해 함께 인큐베이션한다. 그 후, 플레이트의 웰을 세척하여 불완전하게 흡착된 물질을 제거한다. 웰의 임의의 잔존하는 이용 가능한 표면을 시험 항원형과 관련하여 항원성이 중성인 비특이적 단백질과 "코팅할" 수 있다. 이것의 예로는 소 혈청 알부민(BSA), 카제인 또는 우유 분말의 용액이 있다. 코팅은 고정화 표면 상에서 비특이적 흡착 부위의 차단을 허용하고, 따라서 항원형의 표면 상의 비특이적 결합에 의해 야기된 배경 흡착을 감소시킨다. 공동 결합 공정을 실행하는 경우, 동일한 중성 물질은 "차단(blocking)" 단계에서 사용하거나, 상이한 중성 물질을 사용할 수 있다.

[0044] ELISA에서는, 아마도 직접 과정보다는 2차 또는 3차 검출 수단을 사용하는 것이 더 관습적이다. 따라서, 웰에 단백질 또는 항체를 결합시키고, 배경 검출을 감소시키기 위해 비반응성 물질로 코팅하고, 비결합된 물질을 제거하기 위해 세척한 후에, 고정화 표면은 면역 복합체(항원/항체)를 형성하기에 효과적인 조건 하에 시험될 생물학적 샘플과 접촉시킨다. 그 후 면역 복합체의 검출은 표지된 2차 결합 리간드 또는 항체와, 표지된 3차 항체 또는 3차 결합 리간드와 함께 2차 결합 리간드 또는 항체를 필요로 한다.

[0045] "면역 복합체(항원/항체) 형성에 효과적인 조건"이란 조건들이 바람직하게는 시약을 BSA, 소 감마 글로불린(BGG) 또는 포스페이트 완충 염수(PBS)/트윈(Tween)과 같은 용액으로 희석하는 것을 포함하는 것을 의미한다. 이들 추가된 작용제는 또한 비특이적 배경을 감소시키는 데 도움이 되는 경향이 있다. 또한, "적합한(suitable)" 조건이란 효과적인 결합을 허용하기에 충분한 시간 동안 또는 온도에서 인큐베이션되는 것을 의미한다. 인큐베이션(incubation) 단계는 통상 바람직하게는 약 25℃ 내지 27℃의 온도로 약 1 내지 2 시간에서 4 시간 정도까지 수행하거나, 또는 약 4℃ 정도로 하룻밤 동안 수행할 수 있다.

[0046] ELISA에서 모든 인큐베이션 단계 후에, 접촉된 표면은 비결합 물질을 제거하기 위해 세척한다. 바람직한 세척 절차로는 PBS/트윈 같은 용액 또는 보레이트 완충제로 세척하는 것을 포함한다. 시험 샘플과 원래 결합된 물질 사이의 특이적 면역 복합체의 형성 및 후속 세척 이후, 일정한 미량의 면역 복합체의 발생을 측정할 수 있다.

[0047] 검출 수단을 제공하기 위해, 2차 또는 3차 항체는 검출을 위해 연합된 표지를 가질 것이다. 이것은 적합한 발색성 기관과 인큐베이션 시에 색을 전개할 효소들이 바람직하다. 따라서, 예컨대, 1차 및 2차 면역 복합체를 우레아제, 글루코스 옥시다제, 알칼리 포스파타제 또는 수소 퍼옥시다제-결합된 항체와 추가 면역 복합체를 형성하기에 좋은 시간과 조건하에(예컨대, PBS-트윈과 같은 PBS-함유 용액에서 실온으로 2 시간 동안 인큐베이션) 접촉시키거나 인큐베이션할 수 있다.

[0048] 표지된 항체와 인큐베이션 및 이어서 비결합 물질을 제거하기 위한 세척 단계 이후에, 표지의 양은 예컨대, 효소 표지로서 퍼옥시다제의 경우에 우레아, 브로모크레올 퍼플 또는 2,2'-아지노-디-(3-에틸-벤즈티아졸린-6-술폰산(ABTS) 또는 H₂O₂와 같은 발색성 기관과 인큐베이션함으로써 정량 분석된다. 정량 분석은 예컨대, 가시 스펙트럼 분광계를 사용하여 생성된 색상의 정도를 측정하고, 그 값을 기지량의 분석물질을 사용하여 생성된 유사값과 관련시킴으로써 이루어진다.

[0049] **II. 다중 분석(Multiplex Assays)**

[0050] **A. 배열(Arrays)**

[0051] 본 발명은 배열의 사용을 포함할 수 있다. 배열 기술은 유전자 발현 및 분자 상호작용에 대한 고처리량 스크리닝을 허용한다. 단백질 배열 기술은 본 명세서에 참고로 구체적으로 포함된 문헌 [Pandey and Mann(2000)] 및 [MacBeath and Schreiber(2000)]에 상세히 언급되어 있다. 이들 배열은 통상 유리 슬라이드상에 점적을 이루거나 작은 웰에 고정된 수천의 상이한 단백질 또는 항체를 함유하는 데, 이들이 다수의 단백질의 생화학적 활성 및 결합 프로파일을 즉시 검사할 수 있게 한다. 그러한 배열과의 단백질 상호작용을 검사하기 위해, 표지된 단백질은 그 배열상에 고정된 표적 단백질의 각각과 인큐베이션될 수 있다. 상기 배열은 표지된 분자가 결합하는 것이 다수의 단백질 중 어느 것인지, 단백질의 양 또는 농도, 또는 단백질의 기타 특성을 측정하기 위해 분석된다. 당해 분야의 숙련자라면 상기 배열을 분석하는 데 이용되는 다양한 방법들을 알고 있을 것이다.

[0052] **1. 단백질 바이오칩 분석**

[0053] 바이오칩은 일반적으로 포획 분자("시약")의 배열이 부착된 기관을 포함하는데, 여기서 포획 분자들은 각각 선택하는 검출 방법에 의해 처리될 수 있는 방식으로 기관 표면 상의 별개의 및 확인 가능한 위치에 존재한다. 중성 물질은 기관상의 이들 특정 위치에서 반응성을 감소시키기 위해 기관상의 하나 이상의 포획 분자와 공동 결

합(co-couple)시킬 수 있다. 포획 분자가 분석 샘플에 노출될 때, 샘플의 분석물질은 그것이 친화성을 갖는 표면상의 포획 분자에 결합할 수 있다. 분석물질 분자와 포획 분자 사이의 포획 또는 상호작용은 다양한 수단 중의 어느 하나에 의해 검출되거나 특성 분석된다. 그러한 검출 또는 특성화 방법은 당해 분야의 숙련자에게는 알려져 있으며, 그 예로는 형광, 발광, 흡광도, 반사도, 투과도 또는 굴절지수의 검출(예컨대, 표면 플라즈몬 공명, 편광 해석법(ellipsometry), 공명 거울법, 회절 격자 결합기 도파관법 또는 간섭법), 면역분석(예컨대, ELISA), 가스상 이온 분광법, 원자력 현미경 관찰 또는 질량 분광법, 및 특히 SELDI가 있는데, 이에 국한되는 것은 아니다. 샘플의 분석물질의 정량 분석은 적합한 검출 방법을 선택함으로써 수행될 수 있다.

[0054] **2. 비드 배열**

[0055] 미소구체 분석은 유동 시스템에 또는 비드 배열 단상에서 분석될 수도 있다. 일반적으로, 비드 배열단은 배열상에 분포된 비드 및 분석물질을 이미지화한다. 이러한 방식으로, 비드 배열의 이미지화는 상기 논의한 칩과 유사하다. 그러나, 분석물질이 배열 상의 그 공간의 위치에 의해 확인되는 경우의 칩과 대조적으로, 비드 배열은 통상 분석물질을 그것이 결합된 부호화된 미소구에 의해 확인한다.

[0056] 예컨대, 루미넥스(텍사스 오스틴)는 본원에 참고로 포함된 문헌 [Fulton et al, 1997, Clin. Chem. 43:1749-1756] 및 미국특허 제5,736,330호에 교시된 대로 그 형광성에 따라 미소구를 부호화하는 방법을 기재한다. 방법은 특정 형광 프로파일을 가진 형광 미소구(비드)는 상이한 분석물질 특이적 결합체에 고정되고, 각각의 비드 유형이 특정 분석물질에 대해 특이성이 있는 경우에 분석물질 특이적 비드의 형광계 배열을 생성시키는 데 사용될 수 있다는 원리를 근거로 한다. 이 기술은 각각의 비드가 독립적으로 확인될 수 있게 하는 형광 염료의 조합을 이용한다. 분석물질 특이적 미소구는 함께 혼합하고, 상이한 형광색으로 표지된 프로브(들)와 접촉시킨다. 상기 프로브는 표지된 미소구상의 리간드 또는 수용체에 결합하고, 각각의 비드 표면에 특이적 분자 상호작용을 측정하는 데 사용된다. 샘플들은 각각의 미소구가 개별적으로 확인되고, 상응하는 프로브 결합 신호가 관측되게 하는 유세포 분석(flow cytometer)에서 관측될 수 있다.

[0057] 상기 미소구는 표면 카르복실레이트기를 통해 실제로 임의의 아민-함유 분자에 공유결합시킬 수 있다. 한편, 아비딘 결합 미소구는 비오틴화된 분자들을 고정하는 데 이용될 수 있다(Fulton et al, 1997, Clin. Chem. 43:1749-1756).

[0058] 시판되는 비드 배열의 기타 예로는 일루미나의 비드엑스프레스™ 리더 및 비드스테이션 500™이 있다.

[0059] **3. 항체 미세배열**

[0060] 항체 미세배열(microarray)은 단백질 미세배열의 특이적 형태이다. 항체 미세배열은 종종 셀 용해물로부터 단백질 발현을 검출하기 위한 일반 연구에서 사용되며, 진단 용도로, 예컨대 혈청 또는 뇨로부터 특정 바이오마커를 검출하기 위한 용도로 사용될 수 있다.

[0061] **III. 실시예**

[0062] 다음 실시예들은 본 발명의 바람직한 구현예를 증명하기 위해 포함된다. 후술하는 실시예에 개시된 기술은 본 발명의 실시예에 있어 잘 기능하는 것으로 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내며, 따라서 그 실시예 바람직한 방식을 구성하는 것으로 간주될 수 있다는 것을 당해 분야의 숙련자들은 이해할 것이다. 그러나, 당해 분야의 숙련자들은 본 개시 내용에 비추어 다수의 변형이 개시된 특정 구현예에서 이루어질 수 있고, 본 발명의 사상 및 범위를 이탈하지 않고 유사한 결과를 여전히 얻을 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0063] **실시예 1 - 공동 결합(co-coupling) 절차**

[0064] **루미넥스 미소구의 농도:**

[0065] 루미넥스 미소구에 결합시키기 위해 활성 시약과 중성 물질을 혼합하는 장점에 대한 평가는 5,000만 루미넥스 매그플렉스® 미소구를 사용하여 행해졌다. 매그플렉스® 미소구는 자기 분리 장치가 있는 1.5ml의 미세원심분리관에서 0.5ml로 농축되었다. 이 세척 절차 후에, 매그플렉스 미소구는 미세원심분리관으로부터 상층액의 효율적인 제거를 허용하는 자기 표면에 의해 미세원심분리관쪽으로 당겨졌다. 미세원심분리관 중의 매그플렉스® 미소구는 활성화 완충제(0.1M 2-(N-모폴리노)에탄술폰산 헤미소듐염, (MES) 완충제, pH 6.2)로 2회 세척하였다.

[0066] **루미넥스 미소구의 활성화:**

[0067] 0.4ml 부피의 활성화 완충제를 활성화용의 각 미세원심분리관에 첨가하였다. 설포-NHS(N-히드록시설포석신이미드) 및 EDC(1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카르보디이미드 히드로클로라이드)를 50mg/ml의 농도로

제조하였다. 미소구는 0.05mℓ 부피의 설폰-NHS 및 EDC(각각 2.5mg을 제공)를 활성화를 위해 5,000만 매그플렉스® 미소구를 함유하는 각각의 미세원심분리관에 첨가하기 전에 초음파 처리 및 와류 처리로 현탁시켰다. 미소구를 다시 현탁시키고, 미세원심분리관을 활성화 반응 중에 회전자상에 배치하여 미소구를 혼합하였다. 20분 후에, 미세원심분리관을 제거하였다.

[0068] 활성화 후에, 활성화된 미소구는 결합 완충제(0.1M 2-(N-모폴리노)에탄술폰산 헤미소듐염, (MES) 완충제, pH 5.0)로 2회 세척하여 과량의 설폰-NHS 및 EDC를 제거하였다. 1.0mℓ 부피의 결합 완충제를 5,000만 미소구를 함유하는 각각의 미세원심분리관에 첨가하였다.

[0069] **루미넥스 미소구에의 단백질의 결합:**

[0070] 단백질을 결합 완충제 중의 세척된 매그플렉스® 미소구에 첨가하였다. 하기 실시예에서 더 상세히 논의하는 바와 같이, 활성 시약 단백질(가금류 혈청 분석용으로 토끼 다클론 항-닭 IgY 항체 또는 정제된 닭 IgY; 신생 분석용으로 마우스 단클론 항갑상선 자극 호르몬 항체)의 상이한 양을 중성 물질(정제된 토끼 IgG 또는 정제된 소 IgG)과 배합하여 활성화된 매그플렉스® 미소구에 결합시켰다.

[0071] **실시예 2 - 토끼 IgG를 닭 IgY와 또는 토끼 항-닭 IgY와 공동 결합시키면 가금류 혈청 분석에서 내부 대조군 (internal control)의 기능을 향상시킨다.**

[0072] **재료:**

[0073] 다양한 영역들에 대한 루미넥스 매그플렉스® 미소구

[0074] 토끼 항-닭 IgY 2.4mg/ml - 매그플렉스® 미소구에 결합된 시약

[0075] 닭 IgY 5.7mg/ml - 매그플렉스® 미소구에 결합된 시약

[0076] 정제된 토끼 IgG 5.0mg/ml - 매그플렉스® 미소구에 결합된 중성 물질

[0077] 비오틴화 토끼 항-닭 IgY 분석 시약

[0078] 스트렙타비딘-R-피코에리트린 분석 시약

[0079] PBS-BSA 완충제

[0080] PBS-트윈, BSA 완충제

[0081] **절차 및 관찰:**

[0082] **가금류 혈청 분석 내부 대조군용 초기 시약 결합 요건:**

[0083] 토끼 항-닭 IgY 및 닭 IgY 단백질을 매그플렉스 미소구에 결합시켜, 가금류 혈청 분석에서 내부 대조군을 만들었다. 토끼 항-닭 IgY와 결합된 미소구를 사용하여 IgY를 함유하는 닭 혈청 샘플이 분석물 내로 첨가되었음을 나타냈다. 닭 IgY와 결합된 미소구를 사용하여 검출 항체, 비오틴화 토끼 항-닭 IgY가 분석물 내로 첨가되었음을 나타냈다.

[0084] 10 μg의 토끼 항-닭 IgY and 5 μg의 닭 IgY를 5,000만 매그플렉스® 미소구에 결합시켰다. 샘플 희석제(방부제로서 프로클린®(2-메틸-4-이소티아졸린-3-온, 5-클로로-2-메틸-4-이소티아졸린-3-온 및 1,2-벤즈이소티아졸린-3-온)을 가진 소 및 돼지의 단백질)로 1:500으로 희석된 닭 혈청 샘플을 포획 시약(상기 논의한 바와 같이 미소구에 결합된 토끼 항-닭 IgY 또는 닭 IgY 단백질)을 함유하는 미세적정 플레이트의 웰에 첨가하였다. 샘플과 포획 시약의 인큐베이션 이후에, 포획 시약을 웰에 보유하면서 미세적정 플레이트를 세척하여 미반응 샘플을 제거하였다. 그 후, 검출 시약(비오틴화 토끼 항-닭 IgY)을 첨가하였다. 상기 검출 시약과의 인큐베이션 이후에, 미세적정 플레이트를 세척하여 미반응 검출 시약을 제거하였다. 그후 리포터 시약을 첨가하였다. 상기 리포터 시약(스트렙타비딘-R-피코에리트린)과의 인큐베이션 이후에, 미세적정 플레이트를 세척하여 미반응 리포터 시약을 제거하였다. 완충제를 웰에 첨가하고 루미넥스 LX200™ 인스트루먼트를 사용하여 내용물을 측정하였다. 생성된 신호는 루미넥스 LX200™ 인스트루먼트에 대한 23,000 내지 44,000 MFI 등가물의 범위에 있는 것으로 측정되었다. 이것은 약 20,000 MFI의 최대 사용 가능한 신호를 갖는 LX200™ 인스트루먼트에 대한 사용 가능한 범위 이상의 웰이었다.

[0085] 두 시약을 분석에서 총 MFI 반응을 감소시키기 위한 시도로 감소된 양의 5,000만 매그플렉스® 미소구에 결합시켰다. 결합된 닭 IgY의 양은 1.68, 1.24 및 0.84 μg의 닭 IgY 및 2.4, 1.2, 0.6 μg의 토끼 항-닭 IgY였다. MFI

반응은 대부분의 결합에 대해 25,000 MFI 이상으로 잔존하였다. 일부 경우에 감소된 신호(일 사례에서는 15,000 MFI)가 달성되었으나, 이 최저 신호는 최저량의 시약에 결합된 미소구에 상응하지 않았다. 또다른 사례에서는, 감소가 관찰되었으나, 그 결과는 16,000 내지 23,000 MFI로 매우 가변적이었다. 반복된 실험은 8회 반복하는 동안 36%까지의 변동 계수를 가진 다양한 결과를 산출하였다. 따라서, 결합 반응에서 시약의 양을 단순히 감소시키는 것은 신뢰성 있는 데이터를 제공하지 못했으며, 시약의 고반응성을 감소시키는 데 효과적이지 않다는 것으로 결론지어졌다.

[0086] 감소된 반응 범위를 가진 가금류 혈청 분석 내부 대조군을 제조하기 위한 공동 결합:

[0087] 시약 및 중성 물질을 하기 1 내지 4 그룹에 기재한 대로 혼합하고 상기 실시예 1에 기재한 대로 5,000만 미소구들에 결합시켰다.

[0088] 1 그룹 - 2.5 µg의 토끼 항-닭 IgY 항체 및 147.5 µg의 정제된 토끼 IgG의 혼합물을 활성화된 매그플렉스® 미소구에 결합시켰다.

[0089] 2 그룹 - 1.25 µg의 토끼 항-닭 IgY 항체 및 148.75 µg의 정제된 토끼 IgG의 혼합물을 활성화된 매그플렉스® 미소구에 결합시켰다.

[0090] 3 그룹 - 2.5 µg의 닭 IgY 및 147.5 µg의 정제된 토끼 IgG의 혼합물을 활성화된 매그플렉스® 미소구에 결합시켰다.

[0091] 4 그룹 - 1.25 µg의 닭 IgY 및 148.75 µg의 정제된 토끼 IgG의 혼합물을 활성화된 매그플렉스® 미소구에 결합시켰다.

[0092] 샘플 희석제로 1:500으로 희석된 닭 혈청 샘플을 1 내지 4 그룹에 기재한 포획 시약을 함유하는 미세적정 플레이트의 웰에 첨가하였다. 샘플과 포획 시약의 인큐베이션 이후에, 포획 시약을 웰에 보유하면서 미세적정 플레이트를 세척하여 미반응 샘플을 제거하였다. 그 후, 검출 시약(비오틴화 토끼 항-닭 IgY)을 첨가하였다. 상기 검출 시약과의 인큐베이션 이후에, 미세적정 플레이트를 세척하여 미반응 검출 시약을 제거하였다. 그 후 리포터 시약(스트렙타비딘-R-피코에리트린)을 첨가하였다. 상기 리포터 시약과의 인큐베이션 이후에, 미세적정 플레이트를 세척하여 미반응 리포터 시약을 제거하였다. 완충제를 웰에 첨가하고 루미넥스 LX200™ 인스트루먼트를 사용하여 내용물을 측정하였다.

[0093] 전술한 혼합물을 사용하는 목적은 루미넥스 LX200™ 인스트루먼트를 사용하여 면역분석 반응을 20,000 MFI 미만의 값으로 감소시키는 것이었다. 이것은 4개 그룹 모두에서 달성되었다.

[0094] 1 그룹 - 분석 반응은 17,000 MFI였다.

[0095] 2 그룹 - 분석 반응은 12,000 MFI였다.

[0096] 3 그룹 - 분석 반응은 19,400 MFI였다.

[0097] 4 그룹 - 분석 반응은 13,900 MFI였다.

[0098] 따라서, 중성 물질(예컨대, 토끼 IgG)를 활성 시약(토끼 다클론 항-닭 IgY 또는 정제된 닭 IgY)과 함께 기관에 공동 결합시키는 것은 분석에서 활성 시약의 반응성의 신뢰성 있는 감소를 초래하였다는 것으로 결론지어졌다.

[0099] 실시예 3 - 신생 4중 분석에서 시약의 공동 결합

[0100] 300 µg의 마우스 단클론 항갑상선 자극 호르몬 항체와 50 µg의 정제된 소 IgG의 혼합물을 상기 실시예 1에 기재한 대로 활성화된 매그플렉스® 미소구에 결합시켰다. 임의 부피의 추출된 혈액 샘플을 포획 시약(마우스 단클론 항갑상선 자극 호르몬 항체로서, 이것은 전술한 바와 같이 정제된 소 IgG와 함께 매그플렉스® 미소구에 공동 결합됨)을 함유하는 미세적정 플레이트의 웰에 첨가하였다. 검출 시약(비오틴화 마우스 단클론 항갑상선 자극 호르몬 항체)도 상기 웰에 첨가하였다. 샘플, 포획 시약 및 검출 시약의 인큐베이션 이후에, 포획 시약을 웰에 보유하면서 미세적정 플레이트를 세척하여 미반응 샘플 및 검출 시약을 제거하였다. 그 후 리포터 시약(스트렙타비딘-R-피코에리트린)을 첨가하였다. 상기 리포터 시약과의 인큐베이션 이후에, 미세적정 플레이트를 세척하여 미반응 리포터 시약을 제거하였다. 완충제를 웰에 첨가하고 루미넥스 LX200™ 인스트루먼트를 사용하여 내용물을 측정하였다. 이것은 14,000 MFI의 분석 반응을 산출하였으며, 이것은 TSH 분석용 표준 곡선을 생성시키는 데 사용하기에 허용가능한 범위 이내이다.

[0101] 본원에 개시되고 특허 청구된 조성물 및 방법 모두는 본 개시 내용에 비추어 과도한 실험 없이도 제조 및 구현

할 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 구현예의 관점에서 설명하였지만, 당해 분야의 숙련자에게는 본 발명의 개념, 사상 및 범위로 부터 이탈하지 않고 그 조성물 및 방법에 그리고 본원에 기재한 방법의 단계들 또는 단계들의 연속에 변형예를 적용할 수 있다는 것이 명확할 것이다. 더 구체적으로는, 화학적으로 및 생리학적으로 관련된 특정 작용제가 동일 또는 유사한 결과를 얻으면서 본원에 기재한 작용제를 대체할 수도 있음이 명확할 것이다. 당해 분야의 숙련자에게 명확한 그러한 모든 유사 치환예 및 변형예는 첨부되는 특허청구의 범위 위에 의해 정의되는 본 발명의 사상, 범위 및 개념에 포함되는 것으로 간주된다.