



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월11일

(11) 등록번호 10-2486615

(24) 등록일자 2023년01월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/552 (2014.01) **G01N 33/543** (2006.01)
G01N 33/553 (2006.01) **G01N 33/558** (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 21/554 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7025459
(22) 출원일자(국제) 2018년01월30일
심사청구일자 2021년01월29일
(85) 번역문제출일자 2019년08월29일
(65) 공개번호 10-2019-0112783
(43) 공개일자 2019년10월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/015981
(87) 국제공개번호 WO 2018/140953
국제공개일자 2018년08월02일
- (30) 우선권주장
62/451,932 2017년01월30일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2016510126 A
JP2014228385 A
JP2015007652 A
WO2014020293 A1

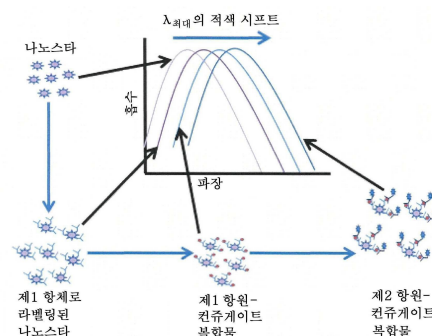
- (73) 특허권자
조에티스 서비스즈 엘엘씨
미국 뉴저지 (우편번호 07054) 파시파니 실반 웨이 10
- (72) 발명자
치앙 빈센트
미국 캘리포니아 94587 유니온 시티 휘플 로드 3240 아박시스, 인크. 내
언서 사라 안
미국 캘리포니아 94587 유니온 시티 휘플 로드 3240 아박시스, 인크. 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 77 항

심사관 : 장일석

(54) 발명의 명칭 **용액-기반 플라스몬 특이적-결합 파트너 검정 및 금속성 나노구조체****(57) 요약**

본 발명은 나노구조체-결합 파트너 컨쥬게이트 뿐만 아니라, 반응 혼합물, 분석물 검출 디바이스, 및 상기 컨쥬게이트의 제조 방법 및 사용 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 샘플을 제1 검출 컨쥬게이트 및 제2 검출 컨쥬게이트와 용액 중에서 혼합하는 단계를 포함하는, 샘플에서 표적 분석물을 검출하는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 제1 및 제2 검출 컨쥬게이트는 상기 제1 검출 컨쥬게이트, 상기 분석물 및 상기 제2 검출 컨쥬게이트 사이의 복합물을 형성하기 위해 상기 샘플에 존재하면 상기 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 파트너에 커플링된 금속성 나노구조체를 포함하고, 복합물 형성시 광학 신호의 변화는 상기 샘플에서 상기 표적 분석물의 존재를 나타낸다.

대표도

(52) CPC특허분류

G01N 33/553 (2013.01)

G01N 33/558 (2021.08)

(72) 발명자

메라 라제쉬 케이.

미국 캘리포니아 94544 헤이워드 사우스익 드라이브
#109 25410

아론 케네쓰 피.

미국 캘리포니아 94110 샌프란시스코 페어 오크스
스트리트 201

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 샘플에서 표적 분석물을 검출하는 방법:

- (a) 샘플을 제1 검출 컨쥬게이트 및 제2 검출 컨쥬게이트와 용액 중에서 혼합하는 단계로서, 여기서, 상기 제1 및 제2 검출 컨쥬게이트는, 상기 샘플에 표적 분석물이 존재할 경우 상기 표적 분석물에 특이적으로 결합하여 상기 제1 검출 컨쥬게이트, 상기 분석물 및 상기 제2 검출 컨쥬게이트 사이의 복합물을 형성할 수 있는 결합 파트너에 커플링된 나노구조체를 포함하고, 여기서, 상기 나노구조체는 복수의 돌출부들을 포함하고, 상기 나노구조체의 돌출부들의 평균 팁간 (tip to tip) 직경이 50 nm 내지 120 nm인, 단계;
- (b) 상기 복합물을 자외선-가시광선-적외선 스펙트럼 내의 파장 범위의 광원에 노출시키는 단계; 및
- (c) 상기 복합물로부터 광학 신호를 측정하는 단계로서, 여기서, 상기 광학 신호의 변화가 상기 샘플 내의 상기 표적 분석물의 존재를 나타내는, 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 나노구조체의 돌출부들의 평균 팁간 직경이 70 nm인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 나노구조체의 돌출부들의 평균 팁간 직경이 90 nm인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 혼합 단계 (a)가 3-((3-콜라미도프로필)디메틸아미노)-1-프로판설포네이트 (CHAPS)의 존재하에 일어나는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 CHAPS가 0.1% w/v 내지 0.5% w/v의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 CHAPS가 0.2% w/v의 농도로 상기 용액 중에 존재하는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 혼합 단계 (a)가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 셀룰로오스 또는 이들의 조합으로부터 선택된 중합체 물질의 존재하에 일어나는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 중합체 물질이 메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리알릴아민, 폴리에틸렌이민, 폴리리신, 폴리아크릴산, 폴리비닐 알코올 및 폴리아스파르트산으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 중합체 물질이 PEG이고, 여기서, PEG가 0.1% 내지 5% w/v의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 용액이 점도 증강제를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 점도 증강제가 트레할로오스, 말토덱스트린, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 폴리비닐

피롤리돈 (PVP), 폴리비닐 알코올 (PVA), 사이클로텍스트린, 메틸셀룰로오스, 텍스트란 및 피콜로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 용액이 $MgCl_2$ 및 NaSCN으로부터 선택된 염을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 $MgCl_2$ 또는 NaSCN이 10 mM 내지 250 mM의 농도로 상기 용액 중에 존재하는, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 $MgCl_2$ 또는 NaSCN이 100 mM의 농도로 상기 용액 중에 존재하는, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 용액이 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) 또는 에틸렌 글리콜-비스(β -아미노에틸 에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA)을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 EDTA 또는 EGTA가 5 mM 내지 100 mM의 농도로 상기 용액 중에 존재하는, 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 용액이 Biolipidure® 시약을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 Biolipidure® 시약이 Biolipidure® 시약 205, 206, 1002, 1201 및 1202로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 광학 신호가 반사율, 흡수 스펙트럼, 산란 스펙트럼 또는 방출 스펙트럼인, 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 광학 신호의 변화가 스펙트럼 피크 파장 시프트 및 총 스펙트럼 프로파일 시프트 중 적어도 하나를 포함하는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 총 스펙트럼 프로파일 시프트가 차이 스펙트럼인, 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 표적 분석물의 나노그램 양의 존재가 검출되는, 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 표적 분석물의 피코그램 양의 존재가 검출되는, 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 표적 분석물의 펩토그램 양의 존재가 검출되는, 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 단계 (a)가 분광 광도계 큐벳, 분석용 로터, 마이크로웰 플레이트, 임상 분석기, 유동 챔버, 광섬유의 팁 또는 투명 젤에서 수행되는, 방법.

청구항 26

제1항에 있어서, 상기 나노구조체가 금 금속성 나노구조체인, 방법.

청구항 27

제1항에 있어서, 상기 결합 파트너가 생물학적 거대분자인, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 생물학적 거대분자가 항체 또는 이의 단편, 항원, 수용체, 리간드, 폴리뉴클레오타이드, 압타머, 폴리펩타이드, 다당류, 지질다당류, 당펩타이드, 지질단백질 또는 핵단백질로부터 선택되는, 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 생물학적 거대분자가 항체인, 방법.

청구항 30

제27항에 있어서, 상기 생물학적 거대분자가 항원인, 방법.

청구항 31

제1항에 있어서, 상기 제1 검출 컨쥬게이트 및 상기 제2 검출 컨쥬게이트가 항체인 결합 파트너를 포함하는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 항체가 상기 표적 분석물 상의 상이한 에피토프에 결합하는, 방법.

청구항 33

제1항에 있어서, 상기 표적 분석물이 단백질, 효소, 항원, 항체, 펩타이드, 핵산, 호르몬, 당단백질, 다당류, 독소, 바이러스, 바이러스 입자, 약물 분자, 합텐 및 화학 물질로부터 선택되는, 방법.

청구항 34

제1항에 있어서, 상기 표적 분석물이 병원성 항원 또는 병원성 항원에 대한 항체인, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 병원성 항원이 바이러스 항원인, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 바이러스 항원이 고양이 백혈병 바이러스, 개 파보바이러스, 구제역 바이러스, 인플루엔자 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, HIV 바이러스, 사람 유두종 바이러스, 엡스타인 바 바이러스 및 광견병 바이러스로부터 선택된 바이러스로부터 유래되는, 방법.

청구항 37

제34항에 있어서, 상기 병원성 항원이 세균 항원인, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 세균 항원이 에를리히아 (*Ehrlichia*), 보렐리아 (*Borrelia*), 아나플라스마 (*Anaplasma*), 살모넬라 (*Salmonella*), 바실러스 (*Bacillus*) 및 리케차 (*Rickettsia*)로부터 선택되는, 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, 상기 세균 항원이 에를리히아 카니스 (*Ehrlichia canis*), 에를리히아 샤펜시스 (*Ehrlichia chaffeensis*), 에를리히아 에윈지 (*Ehrlichia ewingii*), 보렐리아 부르그도르페리 (*Borrelia burgdorferi*), 아

나플라스마 플라티스 (*Anaplasma platys*), 아나플라스마 파고사이토포룸 (*Anaplasma phagocytophilum*), 살모넬라 엔테리카 (*Salmonella enterica*), 바실러스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*) 및 리케차 리케치 (*Rickettsia rickettsii*)로부터 선택되는, 방법.

청구항 40

제34항에 있어서, 상기 병원성 항원이 진균 항원 또는 기생충 항원인, 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 진균 항원 또는 기생충 항원이 개 사상충, 지아르디아 람블리아 (*Giardia lamblia*), 플라스모디움 팔시파룸 (*Plasmodium falciparum*), 아프리카 파동편모충 및 트리파노소마 브루세이 (*Trypanosoma brucei*)로부터 선택되는, 방법.

청구항 42

제1항에 있어서, 혼합 단계 (a)가 차단제의 존재하에 일어나는, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 차단제가 소 혈청 알부민 (BSA), 카제인, 젤라틴, 난백 알부민 및 감마-글로불린으로부터 선택되는, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 차단제가 1% 내지 5% w/v의 농도로 존재하는 BSA인, 방법.

청구항 45

하기 단계를 포함하는, 샘플에서 표적 분석물을 검출하는 방법:

(a) 샘플을 제1 검출 컨쥬게이트, 제2 검출 컨쥬게이트, CHAPS, 소 혈청 알부민 (BSA), 1종 이상의 중합체 물질, 1종 이상의 점도 증강제, 및 염과 용액 중에서 혼합하는 단계로서,

여기서, 상기 제1 및 제2 검출 컨쥬게이트는, 상기 샘플에 표적 분석물이 존재할 경우 상기 표적 분석물에 특이적으로 결합하여 상기 제1 검출 컨쥬게이트, 상기 분석물 및 상기 제2 검출 컨쥬게이트 사이의 복합물을 형성할 수 있는 결합 파트너에 커플링된 나노구조체를 포함하고, 여기서, 상기 나노구조체는 복수의 돌출부들을 포함하고, 상기 나노구조체의 돌출부들의 평균 팁간 직경이 50 nm 내지 120 nm인, 단계;

(b) 상기 복합물을 자외선-가시광선-적외선 스펙트럼 내의 파장 범위의 광원에 노출시키는 단계; 및

(c) 상기 복합물로부터 광학 신호를 측정하는 단계로서, 여기서, 상기 광학 신호의 변화가 상기 샘플에서 상기 표적 분석물의 존재를 나타내는, 단계.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 중합체 물질이 PEG, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리알릴아민, 폴리에틸렌이민, 폴리리신, 폴리아크릴산, 폴리비닐 알코올 및 폴리아스파르트산으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 47

제45항에 있어서, 상기 점도 증강제가 트레할로오스, 말토텍스트린, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 폴리비닐 알코올 (PVA), 사이클로텍스트린, 메틸셀룰로오스, 텍스트란 및 피콜로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 48

제45항에 있어서, 상기 염이 NaCl, MgCl₂, CaCl₂ 및 NaSCN으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 49

제45항에 있어서, 상기 단계 (a)가 상기 샘플을 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) 및 에틸렌 글리콜-비스(β -아미노에틸 에테르)-N,N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 킬레이트화제와 혼합하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 50

제45항에 있어서, 단계 (a)의 상기 용액이 Biolipidure® 시약을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 51

제45항에 있어서, 상기 나노구조체가 구형 나노입자 및 복수의 돌출부를 포함하는 나노입자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 52

적어도 하나의 결합 파트너-나노구조체 컨쥬게이트 및 쌍성 이온성 계면활성제(zwitterionic detergent)를 포함하는 반응 혼합물로서, 여기서, 상기 나노구조체가 복수의 돌출부들을 포함하고, 상기 나노구조체의 돌출부들의 평균 팁간 직경이 50 nm 내지 120 nm인, 반응 혼합물.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 쌍성 이온성 계면활성제가 3-((3-콜라미도프로필)디메틸아미노)-1-프로판설포네이트 (CHAPS) 및 설포베타인 계면활성제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 반응 혼합물.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 CHAPS가 0.1% 내지 1%의 농도로 존재하는, 반응 혼합물.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 CHAPS가 0.5%의 농도로 존재하는, 반응 혼합물.

청구항 56

제52항에 있어서, 상기 나노구조체의 돌출부들의 평균 팁간 직경이 70 nm인, 반응 혼합물.

청구항 57

제52항에 있어서, 상기 나노구조체의 돌출부들의 평균 팁간 직경이 90 nm인, 반응 혼합물.

청구항 58

제52항에 있어서, 표적 분석물을 함유하는 샘플을 추가로 포함하는, 반응 혼합물.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 표적 분석물이 단백질, 효소, 항원, 항체, 펩타이드, 핵산, 호르몬, 당단백질, 다당류, 독소, 바이러스, 바이러스 입자, 약물 분자, 합텐 및 화학 물질로부터 선택되는, 반응 혼합물.

청구항 60

제52항에 있어서, 상기 결합 파트너가 생물학적 거대분자인, 반응 혼합물.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 생물학적 거대분자가 항체 또는 이의 단편, 항원, 수용체, 리간드, 폴리뉴클레오타이드, 압타머, 폴리펩타이드, 다당류, 지질다당류, 당펩타이드, 지질단백질 또는 핵단백질로부터 선택되는, 반응 혼합물.

청구항 62

제60항에 있어서, 상기 생물학적 거대분자가 항체인, 반응 혼합물.

청구항 63

제52항에 있어서, 상기 나노구조체가 금 금속성 나노구조체인, 반응 혼합물.

청구항 64

제52항에 있어서, 상기 반응 혼합물이 제1 검출 컨쥬게이트 및 제2 검출 컨쥬게이트를 포함하고, 여기서, 상기 제1 및 제2 검출 컨쥬게이트가 제1 및 제2 항체인 결합 파트너를 포함하는, 반응 혼합물.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 제1 및 제2 항체가 상기 표적 분석물 상의 상이한 비중첩 에피토프에 결합하는, 반응 혼합물.

청구항 66

표적 분석물의 존재에 기초하여 광학 신호의 변화를 검출하기에 적합한 결합 파트너 및 금속성 나노구조체를 포함하는 컨쥬게이트의 제조 방법으로서, 상기 금속성 나노구조체가 복수의 돌출부들을 포함하고, 상기 금속성 나노구조체의 돌출부들의 평균 팁간 직경이 50 nm 내지 120 nm이고, 상기 방법이 하기 단계를 포함하는, 컨쥬게이트의 제조 방법:

- (a) 금속성 나노구조체를 포함하는 용액을 결합 파트너를 포함하는 용액과 혼합하여 결합 파트너-나노구조체 컨쥬게이트를 형성하는 단계;
- (b) 상기 컨쥬게이트를 BSA, PEG, Biolipidure® 시약 또는 이들의 조합으로 차단하는 단계;
- (c) 상기 컨쥬게이트를 원심 분리하는 단계; 및
- (d) 상기 컨쥬게이트를, PBS, TBS 및 보레이트로 이루어진 그룹으로부터 선택된 완충액; BSA, PEG, Biolipidure® 시약 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 차단제; 및 CHAPS를 포함하는 희석액 중에 재현탁시키는 단계.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 결합 파트너가 항체인, 컨쥬게이트의 제조 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 항체가 소수성 영역을 포함하는 항체인, 컨쥬게이트의 제조 방법.

청구항 69

제66항에 있어서, 상기 용액이 트레할로오스, 말토덱스트린, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 폴리비닐 알코올 (PVA), 사이클로덱스트린, 메틸셀룰로오스, 텍스트란 및 피콜로 이루어진 그룹으로부터 선택된 점도 증강제를 포함하는, 컨쥬게이트의 제조 방법.

청구항 70

제66항에 있어서, 단계 (c)가 2,000g 이상에서의 원심 분리를 포함하는, 컨쥬게이트의 제조 방법.

청구항 71

제66항에 있어서, 상기 나노구조체의 돌출부들의 평균 팁간 직경이 70 nm인, 컨쥬게이트의 제조 방법.

청구항 72

제66항에 있어서, 상기 나노구조체의 돌출부들의 평균 팁간 직경이 90 nm인, 컨쥬게이트의 제조 방법.

청구항 73

제66항에 있어서, 상기 방법이 단계 (d) 이후에 동결 건조 단계를 추가로 포함하는, 컨쥬게이트의 제조 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 동결 건조 단계가 상기 컨쥬게이트를 액체 질소 중에 분배시키고, 진공 및 온도 사이클을 사용하여 동결 건조시키는 것을 포함하는, 컨쥬게이트의 제조 방법.

청구항 75

제66항에 있어서, 상기 용액이 EDTA 또는 EGTA를 추가로 포함하는, 컨쥬게이트의 제조 방법.

청구항 76

제66항에 있어서, 상기 용액이 $MgCl_2$ 또는 $NaSCN$ 을 추가로 포함하는, 컨쥬게이트의 제조 방법.

청구항 77

제66항에 있어서, 상기 용액이 EDTA 및 $MgCl_2$ 를 추가로 포함하는, 컨쥬게이트의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은, 그 전문이 본 출원에 참조로 포함되는, 2017년 1월 30일자로 출원된 미국 가특허출원 62/451,932의 이익을 주장한다.

[0003] 본 발명의 기술분야

[0004] 본 발명은 샘플에서 표적 분석물을 검출하기 위한 시스템 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 샘플에서 극미량의 표적 분석물을 검출할 수 있는 국소 표면 플라스몬 공명-기반의 분석물 검출 시스템을 제공한다.

배경 기술

[0005] 현재 면역 검정 및 생체 분자 결합 검정은 전형적으로 검정을 수행하기 위해 다중 단계 및 정교한 장비를 필요로 한다. 이러한 불균일 검정의 수행에 관련된 민감성 및 복잡성의 부족은 비라벨링된 특이적 결합 파트너로부터 라벨링된 것을 분리하기 위한 구체적인 필요성으로 인해 발생한다.

[0006] 귀금속 나노입자의 국소 표면 플라스몬 공명 (local surface plasmon resonance: LSPR) 특성에 기초한 검정법을 개발하기 위한 시도가 있어 왔다 (문헌 [Tokel *et al.*, Chem Rev., Vol. 114: 5728-5752, 2014]). LSPR은 입사광에 의해 유도된 나노미터-크기의 구조체에서 전자들의 집합 진동이다. 금속성 나노입자는 이의 바로 근처에서 굴절률 변화에 대해 강한 전자기 반응을 나타내므로, 나노입자의 공명 주파수의 시프트는 나노입자 표면에 대한 분자 결합의 지표로서 측정될 수 있다. 비록 금속성 나노입자, 특히 금 나노입자가 결합 현상을 검출하기 위한 진단적 검정에서 이용되고 있지만, 이러한 검정은 일반적으로 낮은 민감성으로 시달리고 있으며, 순차적인 결합 현상의 동력학을 정량적으로 모니터링하는데 사용될 수 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 균일한 형식을 사용하면서 증가된 민감성을 제공하는 개선된 검정 방법이 요구된다. 분광법과 같은 표준 실험실 기술을 이용하는 검정도 또한 바람직할 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 발명의 개요

[0009] 본 출원은 리간드, 수용체, 전사 인자, 결합 DNA 요소, 항원 및 항체를 포함하지만 이들에 한정되지 않는 특정 결합 파트너를 포함하는 검정을 수행하기 위한 국소 표면 플라스몬 공명 (LSPR) 기술의 사용을 기재한다. 보다 구체적으로, 본 출원은 나노구조체-결합 파트너 컨쥬게이트를 사용하여 이러한 검정에서 유의미한 증폭을 달성하기 위한 방법 및 물질에 관한 것이다. 일부 양태에서, 본 개시 내용은 LSPR 기술을 사용하여 분자의 민감성

검출을 달성하고 제공된 검정에서 비특이적 결합 (non-specific binding: NSB) 수준을 최소화하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

- [0010] 본 출원에 기재된 각종 실시형태에서, 본 출원은 나노구조체-결합 파트너 컨주게이트에 관한 것으로서, 여기서, 상기 나노구조체는 복수의 스파이크를 포함하는 금속성 나노구조체이다. 일부 실시형태에서, 나노구조체는 적어도 50 nm의 평균 직경을 갖는 금속성 나노구조체이다. 추가의 실시형태에서, 나노구조체는 약 50 nm 내지 약 120 nm의 평균 직경을 갖는 금속성 나노구조체이다. 일부 실시형태에서, 본 개시 내용은, 정성적 또는 정량적 방식으로 특정 결합 파트너의 결합을 결정하기 위한, 용액 중에서 이러한 금속성 나노구조체-결합 파트너 컨주게이트의 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 개시 내용은 본 출원에 기재된 컨주게이트를 생성하는 방법을 제공한다.
- [0011] 하나의 양태에서, 본 개시 내용은 샘플에서 표적 분석물을 검출하기 위한 방법 및 조성물을 제공하며, 상기 방법은 샘플을 제1 검출 컨주게이트 및 제2 검출 컨주게이트와 용액 중에서 혼합하는 단계를 포함하며, 여기서, 상기 제1 및 제2 검출 컨주게이트는, 상기 샘플에 표적 분석물이 존재할 경우 상기 표적 분석물에 특이적으로 결합하여 상기 제1 검출 컨주게이트, 상기 분석물 및 상기 제2 검출 컨주게이트 사이의 복합물을 형성할 수 있는 결합 파트너에 커플링된 나노구조체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노구조체는 구형 코어 상에 복수의 돌출부를 포함하는 이방성 나노구조체이며, 나노구조체의 평균 팁간 (tip-to-tip) 직경은 적어도 약 50 nm이다. 추가의 실시형태에서, 나노구조체의 평균 직경은 약 70 nm 또는 약 90 nm이다. 일부 실시형태에서, 나노구조체는 구형 나노구조체이다. 추가의 실시형태에서, 상기 방법은 자외선-가시광선-적외선 스펙트럼 내의 파장 범위에서 광원에 복합물을 노출시키는 단계를 추가로 포함한다. 보다 추가의 실시형태에서, 상기 방법은 복합물로부터 광학 신호를 측정하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서, 광학 신호의 변화는 샘플에서 표적 분석물의 존재를 나타낸다.
- [0012] 일부 실시형태에서, 2개 초과 of 검출 컨주게이트가 사용된다. 예를 들어, 제3, 제4, 제5 또는 그 이상의 검출 컨주게이트가 추가된다. 일부 실시형태에서, 각각의 검출 컨주게이트는 동일한 표적 분석물에 결합하여 복합물을 형성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 검출 컨주게이트는 표적 분석물 상의 비중첩 에피토프(들)에 결합한다. 일부 실시형태에서, 컨주게이트의 일부 또는 모두는 이방성이다.
- [0013] 일부 실시형태에서, 혼합 단계는 3-((3-콜라미도프로필)디메틸아미노)-1-프로판설포네이트 (CHAPS)의 존재하에 일어난다. 일부 실시형태에서, CHAPS는 약 0.1% w/v 내지 약 0.5% w/v의 농도로 존재한다. 추가의 실시형태에서, CHAPS는 약 0.2% w/v의 농도로 존재한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 용액은 CHAPS를 포함한다.
- [0014] 일부 실시형태에서, 혼합 단계는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리알릴아민, 폴리에틸렌이민, 폴리리신, 폴리아크릴산, 폴리글루탐산, 폴리비닐 알코올 및 폴리아스파르트산으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 중합체 물질의 존재하에 일어난다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 용액은 PEG, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리알릴아민, 폴리에틸렌이민, 폴리리신, 폴리아크릴산, 폴리글루탐산, 폴리비닐 알코올 및/또는 폴리아스파르트산 중 1종 이상을 포함한다. 일부 실시형태에서, 중합체 물질은 PEG이다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 0.05% 내지 약 5% w/v, 또는 약 0.1% 내지 약 3%의 농도로 존재한다. 일부 실시형태에서, PEG는 1,000 내지 300,000, 또는 2,000 내지 250,000, 또는 3,000 내지 200,000의 분자량을 갖는다.
- [0015] 일부 실시형태에서, 혼합 단계는 점도 증강제의 존재하에 일어난다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 용액은 점도 증강제를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 점도 증강제는 트레할로오스, 말토덱스트린, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 폴리비닐 알코올 (PVA), 사이클로덱스트린, 랜덤하게 알킬화된 사이클로덱스트린, 메틸셀룰로오스, 트레할로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨 및 피콜, 텍스트란 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 혼합 단계는 분자량에 따라 약 0.05% 내지 약 5%의 농도의 텍스트란의 존재하에 일어난다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 텍스트란은 약 0.05%, 약 0.1%, 약 0.5%, 약 1%, 약 1.5%, 약 2%, 약 2.5%, 약 3%, 약 3.5%, 약 4%, 약 4.5% 또는 약 5%의 농도로 존재한다.
- [0016] 일부 실시형태에서, 혼합은 젤라틴의 존재하에 일어난다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 용액은 젤라틴을 포함한다. 일부 실시형태에서, 젤라틴은 약 0.1% 내지 약 3%의 농도로 존재한다.
- [0017] 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 용액 및 반응 혼합물은 적어도 1종의 결합 파트너-나노구조체 컨주게이트, CHAPS 완충액, PEG, 1종 이상의 호프마이스터 (Hofmeister) 시리즈 염, EDTA, 중합체-기본 차단 시약, 예

를 들어, Biolipidure®, BSA, 젤라틴 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 호프마이스터 시리즈 염은 염화 마그네슘이다. 다른 실시형태에서, 호프마이스터 시리즈 염은 염화 칼슘이다. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 호프마이스터 시리즈 염과 같은 다중 염을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 용액 및 반응 혼합물은 $MgCl_2$ 또는 $NaSCN$ 을 약 10 mM 내지 약 250 mM의 농도로 또는 약 100 mM의 농도로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 용액 및 반응 혼합물은 2가 양이온의 시트레이트, 예를 들어, Mg^{2+} 의 시트레이트 또는 Ca^{2+} 의 시트레이트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 용액 및 반응 혼합물은 티오시아네이트, 망간, 코발트, 니켈, 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) 및/또는 에틸렌 글리콜-비스(β -아미노에틸 에테르)-N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA)을 포함한다. 일부 실시형태에서, EDTA 및/또는 EGTA는 약 5 mM 내지 약 100 mM의 농도로 용액 중에 존재한다.

[0018] 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 방법 및 조성물에 사용된 나노구조체는 복수의 돌출부를 포함하며, 여기서, 나노구조체의 평균 팁간 직경은 약 50 nm, 약 60 nm, 약 70 nm, 약 80 nm, 약 90 nm, 약 100 nm, 약 110 nm 또는 약 120 nm이다. 일부 실시형태에서, 나노구조체는 금속성 나노구조체이다. 일부 실시형태에서, 나노구조체는 금 금속성 나노구조체이다. 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 나노구조체는 구형 나노구조체이다. 일부 실시형태에서, 구형 나노구조체의 평균 직경은 약 50 nm, 약 60 nm, 약 70 nm, 약 80 nm, 약 90 nm, 약 100 nm, 약 110 nm 또는 약 120 nm이다.

[0019] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용은 다음 단계를 포함하는, 샘플에서 표적 분석물을 검출하는 방법을 제공한다: (a) 샘플을 제1 검출 컨쥬게이트, 제2 검출 컨쥬게이트, CHAPS, 소 혈청 알부민 (BSA), 1종 이상의 중합체 물질, 1종 이상의 점도 증강제, 염 및 임의로 킬레이트화제와 용액 중에서 혼합하는 단계로서, 여기서, 상기 제1 및 제2 검출 컨쥬게이트는, 상기 샘플에 표적 분석물이 존재할 경우 상기 표적 분석물에 특이적으로 결합하여 상기 제1 검출 컨쥬게이트, 상기 분석물 및 상기 제2 검출 컨쥬게이트 사이의 복합물을 형성할 수 있는 결합 파트너에 커플링된 나노구조체를 포함하는, 단계; (b) 자외선-가시광선-적외선 스펙트럼 내의 파장 범위에서 광원에 상기 복합물을 노출시키는 단계; 및 (c) 상기 복합물로부터 광학 신호를 측정하는 단계로서, 여기서, 상기 광학 신호의 변화가 상기 샘플에서 상기 표적 분석물의 존재를 나타내는, 단계.

[0020] 일부 실시형태에서, 중합체 물질은 PEG, 폴리비닐피롤리돈, 젤라틴, 메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리알릴아민, 폴리에틸렌아민, 폴리리신, 폴리아크릴산, 폴리비닐 알코올 및 폴리아스파르트산으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 점도 증강제는 트레할로오스, 말토텍스트린, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 폴리비닐피롤리돈 (PVP), 폴리비닐 알코올 (PVA), 사이클로텍스트린, 메틸셀룰로오스, 텍스트란 및 피콜로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 염은 $NaCl$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ 및 $NaSCN$ 으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 킬레이트화제는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) 및 에틸렌 글리콜-비스(β -아미노에틸 에테르)-N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0021] 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 용액 및 반응 혼합물은 Biolipidure® 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, Biolipidure® 시약은 Biolipidure® 205, 206, 1002, 1201, 1202 또는 이들의 조합이다. 일부 실시형태에서, 나노구조체는 구형 나노입자 및 복수의 돌출부를 포함하는 나노입자로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 개시 내용은 제1 검출 컨쥬게이트, 제2 검출 컨쥬게이트, CHAPS, BSA, 젤라틴, PEG, EDTA, $MgCl_2$, Biolipidure® 시약 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 방법, 용액 및 반응 혼합물을 제공한다.

[0022] 일부 실시형태에서, 광학 신호는 반사율, 흡수 스펙트럼, 산란 스펙트럼 또는 방출 스펙트럼이다. 일부 실시형태에서, 광학 신호의 변화는 스펙트럼 피크 파장 시프트 및/또는 총 스펙트럼 프로파일 시프트를 포함한다. 일부 실시형태에서, 총 스펙트럼 프로파일 시프트는 차이 스펙트럼이다. 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 방법은 표적 분석물의 나노그램, 피코그램 또는 펩토그램 양의 검출을 제공한다.

[0023] 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 방법은 분광 광도계 큐벳, 분석용 로터, 마이크로웰 플레이트, 임상 분석기, 유동 챔버, 광섬유의 팁 또는 투명 겔에서 수행된다.

[0024] 하나의 양태에서, 본 개시 내용은 적어도 1종의 결합 파트너-나노구조체 컨쥬게이트를 포함하는 반응 혼합물을 제공하며, 여기서, 나노구조체는 복수의 돌출부를 포함하고, 나노구조체의 평균 직경은 적어도 약 50 nm 또는 적어도 약 70 nm 또는 적어도 약 90 nm 또는 적어도 약 120 nm이다. 또 다른 양태에서, 본 개시 내용은 적어도 1종의 결합 파트너-나노구조체 컨쥬게이트를 포함하는 반응 혼합물을 제공하며, 여기서, 나노구조체는 구형 나노구조체이다. 실시형태에서, 반응 혼합물은 쌍성 이온성 세제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 쌍성

이온성 세제는 3-((3-콜라미도프로필)디메틸아미노)-1-프로판설포네이트 (CHAPS) 및 설포베타인 세제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, CHAPS는 약 0.1% 내지 약 1%의 농도로 존재한다. 추가의 실시형태에서, CHAPS는 약 0.5%의 농도로 존재한다.

[0025] 일부 실시형태에서, 결합 파트너는 생물학적 거대분자이다. 추가의 실시형태에서, 생물학적 거대분자는 항체 또는 이의 단편, 항원, 수용체, 리간드, 폴리뉴클레오타이드, 압타머, 폴리펩타이드, 다당류, 지질다당류, 당펩타이드, 지질단백질 또는 핵단백질로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 방법 및 조성물은 제1 검출 컨쥬게이트 및 제2 검출 컨쥬게이트를 포함하며, 여기서, 검출 컨쥬게이트의 결합 파트너 중 하나는 항체이다. 추가의 실시형태에서, 제1 및 제2 검출 컨쥬게이트 모두는 항체인 결합 파트너를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 컨쥬게이트에 컨쥬게이트된 항체는 동일한 표적 분석물 상의 상이한 에피토프에 결합한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 항체 또는 제1 및 제2 컨쥬게이트는 표적 분석물 상의 2종의 상이한 비중첩 에피토프에 결합한다. 다른 실시형태에서, 제1 및 제2 항체 또는 제1 및 제2 컨쥬게이트는 2종의 상이한 항원에 결합한다. 일부 실시형태에서, 2종의 상이한 항원은 2종의 상호 작용 분자이다. 일부 실시형태에서, 상호 작용 분자는 수용체 및 이의 리간드 (예를 들어, 단백질 호르몬 및 이의 결합 수용체), DNA 결합 전사 인자 및 또 다른 전사 인자 및/또는 DNA 등을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 2종의 거대분자이다.

[0026] 일부 실시형태에서, 표적 분석물은 단백질, 효소, 항원, 항체, 펩타이드, 핵산, 호르몬, 당단백질, 다당류, 독소, 바이러스, 바이러스 입자, 약물 분자, 합성 및 화학 물질로부터 선택된다. 추가의 실시형태에서, 표적 분석물은 병원성 항원 또는 병원성 항원에 대한 항체이다. 추가의 실시형태에서, 병원성 항원은 바이러스 항원이다. 추가의 실시형태에서, 바이러스 항원은 고양이 백혈병 바이러스, 개 파보바이러스, 구제역 바이러스, 인플루엔자 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, HIV 바이러스, 사람 유두종 바이러스, 엡스타인 바 바이러스 및 광견병 바이러스로부터 선택된 바이러스로부터 유래된다. 다른 실시형태에서, 병원성 항원은 세균 항원이다. 추가의 실시형태에서, 세균 항원은 에를리히아 (*Ehrlichia*), 보렐리아 (*Borrelia*), 아나플라스마 (*Anaplasma*), 살모넬라 (*Salmonella*), 바실러스 (*Bacillus*) 및 리케차 (*Rickettsia*)로부터 선택된다. 추가의 실시형태에서, 세균 항원은 에를리히아 카니스 (*Ehrlichia canis*), 에를리히아 샤펜시스 (*Ehrlichia chaffeensis*), 에를리히아 에윈지 (*Ehrlichia ewingii*), 보렐리아 부르그도르페리 (*Borrelia burgdorferi*), 아나플라스마 플라티스 (*Anaplasma platys*), 아나플라스마 파고사이토포룸 (*Anaplasma phagocytophilum*), 살모넬라 엔테리카 (*Salmonella enterica*), 바실러스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*) 및 리케차 리케치 (*Rickettsia rickettsii*)로부터 선택된다.

[0027] 다른 실시형태에서, 병원성 항원은 진균 항원 또는 기생충 항원이다. 추가의 실시형태에서, 진균 항원 또는 기생충 항원은 개 사상충, 지아르디아 람블리아 (*Giardia lamblia*), 플라소모디움 팔시파룸 (*Plasmodium falciparum*), 아프리카 파동편모충 및 트리파노소마 브루세이 (*Trypanosoma brucei*)로부터 선택된다.

[0028] 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 제1 및 제2 검출 컨쥬게이트와 샘플의 혼합은 차단제의 존재하에 수행된다. 추가의 실시형태에서, 차단제는 소 혈청 알부민 (BSA), 카제인, 젤라틴, 난알부민 및 감마-글로불린으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 차단제는 약 1% 내지 약 5% w/v의 농도로 존재하는 BSA이다.

[0029] 하나의 양태에서, 본 개시 내용은 표적 분석물의 존재에 기초하여 광학 신호의 변화를 검출하기에 적합한 결합 파트너 및 이방성 금속성 나노구조체를 포함하는 컨쥬게이트의 제조 방법을 제공하며, 여기서, 이방성 금속성 나노구조체는 복수의 돌출부 (스파이크)를 포함하고, 금속성 나노구조체의 직경은 적어도 약 50 nm이다. 하나의 양태에서, 본 개시 내용은 표적 분석물의 존재에 기초하여 광학 신호의 변화를 검출하기에 적합한 결합 파트너 및 금속성 나노구조체를 포함하는 컨쥬게이트의 제조 방법을 제공하며, 여기서, 금속성 나노구조체는 구형 나노구조체이다. 실시형태에서, 상기 방법은 (a) 금속성 나노구조체를 포함하는 용액을 결합 파트너를 포함하는 용액과 혼합하여 결합 파트너-나노구조체 컨쥬게이트를 형성하는 단계; (b) 점도 증강제 및/또는 1종 이상의 호프마이스터 시리즈 염 및/또는 EDTA 및/또는 EGTA의 존재 또는 부재하에 상기 컨쥬게이트를 본 출원에서 제공된 차단제 (예를 들어, BSA 및/또는 젤라틴 및/또는 PEG 및/또는 Biolipidure® 시약)로 차단하는 단계; (c) 상기 컨쥬게이트를 원심 분리하는 단계; 및 (d) 상기 컨쥬게이트를, 포스페이트 완충된 식염수 (PBS) 또는 트리스 완충된 식염수 (TBS) 또는 보레이트 완충액과 같은 완충액, 본 출원에서 제공된 차단제 (예를 들어, BSA 및/또는 젤라틴 및/또는 PEG), 및 CHAPS를 포함하는 희석액 중에 재현탁시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 파트너는 항체이다. 추가의 실시형태에서, 항체는 소수성 영역을 포함하는 항체이다.

[0030] 일부 실시형태에서, 금속성 나노구조체 및/또는 결합 파트너를 포함하는 용액은 점도 증강제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 점도 증강제는 트레할로오스, 말토덱스트린, 텍스트란, 수크로오스, 소르비톨,

만니톨, 폴리비닐피롤리돈 (PVP) 및 폴리비닐 알코올 (PVA)로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 점도 증강제는 텍스트란이다. 일부 실시형태에서, 점도 증강제는 메틸셀룰로오스이다.

[0031] 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 컨쥬게이트의 제조 방법의 원심 분리 단계는 약 2000g 이상에서의 원심 분리를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 상기 방법은 약 5000g 이상에서의 원심 분리를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 상기 방법은 약 10,000g 이상에서의 원심 분리를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 상기 방법은 약 75,000g 이상에서의 원심 분리를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 상기 방법은 약 100,000g 이상에서의 원심 분리를 포함한다.

[0032] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용은 컨쥬게이트의 재현탁 이후에 동결 건조 단계를 제공한다. 추가의 실시형태에서, 동결 건조 단계는 컨쥬게이트를 액체 질소 중에 분배시키고, 진공 및 온도 사이클을 사용하여 동결 건조시키는 것을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 출원에 기재된 LSPR 면역 검정의 원리를 예시한 것이다. 복수의 스파이크 자체를 포함하는 금속성 나노입자는 광학 스펙트럼을 나타낸다. 최초 1차 결합 및 후속 2차 결합으로 인한 나노입자 표면에서의 약간의 변화는 나노입자-결합 파트너 컨쥬게이트와 상호 작용하는 광의 특성에서 점진적인 변화를 초래한다. 이러한 변화는 적합한 분광 광도계에 의해 기록될 수 있으며, 정량적 정보 뿐만 아니라 정성적 정보도 제공한다.

도 2는 항체-나노구조체 컨쥬게이트를 형성하기 위해 복수의 돌출부를 포함하는 나노구조체에 대한 항-TSH 항체 C1의 적정을 도시한 것이다.

도 3는 항체-나노구조체 컨쥬게이트를 형성하기 위해 복수의 돌출부를 포함하는 나노구조체에 대한 항-TSH 항체 C6의 적정을 도시한 것이다.

도 4는 C1 항체- 또는 C6 항체-나노구조체 컨쥬게이트를 형성하기 위해 복수의 돌출부를 포함하는 나노구조체에 대한 항체 C1 및 C6의 대규모 (100 ml의 나노구조체) 적정을 도시한 것이다. 삽화는 BSA 차단 유무에 따라 컨쥬게이트 용액 중에 침지된 단백질 A로 스트리핑된 스트립을 도시한 것이다.

도 5는 비컨쥬게이트된 나노구조체 (573.8 nm) 및 C1 나노구조체 (585.3 nm로의 시프트) 또는 C6 나노구조체 (585.9 nm로의 시프트)의 피크 시프트를 도시한 것이다.

도 6은 비컨쥬게이트된 나노구조체, C1 항체-나노구조체 및 C6 항체-나노구조체, 및 BSA 차단 후의 C1 항체-나노구조체 및 C6 항체-나노구조체의 피크 시프트를 도시한 것이다.

도 7은 흡착성 프로토콜을 사용하여 생성된 컨쥬게이트된 나노구조체 또는 흡착성 프로토콜을 사용하여 생성되고 BSA로 차단된 컨쥬게이트된 나노구조체를 함유하는 용액 중에 침지된, 단백질 A (0.5 mg/mL)로 스트리핑된 측면 유동 스트립을 도시한 것이다.

도 8은 (i) 컨쥬게이트화 전 50 nm의 나노구조체; (ii) C1 항체에 컨쥬게이트된 50 nm의 나노구조체; (iii) C6 항체에 컨쥬게이트된 50 nm의 나노구조체; (iv) BSA에 의한 차단 후 C1-컨쥬게이트된 나노구조체; 및 (v) BSA에 의한 차단 후 C6-컨쥬게이트된 나노구조체의, 티올-매개성 컨쥬게이트화 프로토콜을 사용하여 생성된 나노구조체 컨쥬게이트에 대한 스펙트럼 시프트를 도시한 것이다.

도 9는 티올-매개성 프로토콜을 사용하여 생성된 컨쥬게이트된 나노구조체 또는 티올-매개성 프로토콜을 사용하여 생성되고 BSA로 차단된 컨쥬게이트된 나노구조체를 함유하는 용액 중에 침지된, 단백질 A (0.5 mg/mL)로 스트리핑된 측면 유동 스트립을 도시한 것이다.

도 10a는 50 nm의 나노구조체 및 흡착성 프로토콜을 사용하여 생성된 C1 및 C6 컨쥬게이트에 대한 복합 λ 최대의 변화를 도시한 것이다.

도 10b는 50 nm의 나노구조체 및 티올-매개성 컨쥬게이트화 프로토콜을 사용하여 생성된 C1 및 C6 컨쥬게이트에 대한 복합 λ 최대의 변화를 도시한 것이다.

도 11은 흡착성 (좌측 패널; 0.25% PEG) 및 티올-매개성 (우측 패널; 1% PEG) 프로토콜에 의해 제조된 컨쥬게이트의 스펙트럼 시프트에 대한 촉진제의 존재의 효과를 도시한 것이다.

도 12는 0.1% PEG 및 0.5% 메틸셀룰로오스의 존재하에 공유결합된 컨쥬게이트를 사용하여 증가하는 양의 항원

(TSH)의 존재하에 시간에 따른 용량-반응 곡선 및 동력학을 도정한 것이다.

도 13은 컨쥬게이트에서 다양한 비율의 C1 및 C6 항체 (C1 0부/C6 40부, 좌측 상단 패널; C1 40부/ C6 0부, 우측 상단 패널; C1 30부/C6 10부, 중간 좌측 패널; C1 20부/C6 20부, 중간 우측 패널; C1 10부/C6 30부, 하단 패널)에 대해 hTSH의 부재 (0 ng) 또는 존재 (0.25 ng)하에 수득된 반응 곡선을 도정한 것이다.

도 14a는 증가하는 양의 TSH 및 0.5% PEG의 존재하에 컨쥬게이트에 대한 피크 시프트를 도정한 것이다.

도 14b는 증가하는 양의 TSH 및 1.0% PEG의 존재하에 컨쥬게이트에 대한 피크 시프트를 도정한 것이다.

도 15a (상단 패널)는 70 및 90 nm 나노구조체에 대한 항-hTSH 항체 C1 및 C6의 컨쥬게이트화 및 단백질 A 측면 유동 스트림에 의한 이들의 재활성을 도정한 것이다.

도 15b (하단 패널)는 단백질 A가 BSA에 의한 차단 전후에 예상대로 반응한 니트로셀룰로오스 상에서 늘어서 있는 것을 도정한 것이다.

도 16은 약 70 nm 직경의 나노구조체를 포함하는 컨쥬게이트의 스펙트럼 시프트를 도정한 것이다.

도 17은 약 90 nm 직경의 나노구조체를 포함하는 컨쥬게이트의 스펙트럼 시프트를 도정한 것이다.

도 18은 복수의 돌출부를 포함하는 50 nm의 나노구조체 대 나노로드의 피크 시프트에 의해 측정된 TSH의 검출을 도정한 것이다.

도 19는 pH 6.0에서 항체에 컨쥬게이트된, 복수의 돌출부를 갖는 나노구조체를 포함하는 CHAPS-처리된 컨쥬게이트의 순 피크 시프트를 도정한 것이다.

도 20은 극성 하전된 헤드 그룹 및 소수성, 음이온성, 양이온성 및/또는 수소 결합 공여 그룹으로부터의 다양한 특성을 갖는 꼬리를 포함하는 Biolipidure® 중합체 기질의 이미지를 도정한 것이다. 이미지는 Biolipidure® 시약을 시판하는 NOF Corporation 웹사이트로부터 가져온 것이다.

도 21은 다양한 Biolipidure® 시약 및 BSA로 차단된 항-TSH 코팅된 나노입자의 시간에 대한 파장 시프트를 도정한 것이다. BSA 컨쥬게이트와 비교하여, 1002, 1201, 1202, 205 및 206에 의한 차단 모두는 표준 BSA 컨쥬게이트와 비교하여 10분내에 컨쥬게이트의 민감성을 증진시킨다.

도 22a 및 22b는 Biolipidure® 시약 1002, 1003, 1201, 1202, 205, 206 및 BSA로 차단된 컨쥬게이트의 비특이적 흡착을 도정한 것이다 (**도 22a**). 1003으로부터의 큰 파장 시프트로 인해, **도 22b**는 단지 1002, 1201, 1202, 205, 206 및 BSA의 비특이적 흡착만을 도정한 것이다.

도 23은 BSA 차단 시약 대 민감성 개선과 혈청에서의 비특이적 파장 시프트의 감소 둘 다에 대한 최대 효과를 나타낸 4종의 Biolipidure® 차단 시약에 의한 나노입자 컨쥬게이트의 개 혈청에서의 파장 시프트를 도정한 것이다.

도 24는 TBS BSA 완충액에서 50 pg/mL의 cTSH 항원의 최종 농도를 위해 1/20로 희석된 1 ng/mL에 반응하여 파장 시프트의 개선을 도정한 것이다. 당해 도면은 BSA 대 Biolipidure® 1002로 차단된 80 nm의 구체 및 BSA 대 Biolipidure® 1002로 차단된 90 nm의 나노성게형 (nanourchin)의 양성 반응을 비교한 것이다. 둘 다의 경우에서, Biolipidure® 차단 시약은 항원에 대해 반응하여 파장 시프트를 개선한다. 도 24에서 제공된 결과에 대한 분석 조건은 다음을 포함 하였다: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% BSA, pH 7.7.

도 25는 호프마이스터 시리즈 염의 개략도를 제공한 것이다 (문헌 [Zhang Y, Cremer PS, "Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series" *Curr Opin Chem Biol.* 2006 Dec;10(6):658-63]).

도 26은 나노구체 cTSH 컨쥬게이트를 사용하여 검정에서 비특이적 결합의 수준에 대한 $MgCl_2$ 존재의 영향을 도정한 것이다. 킬로 및 미스터는 2종의 정상 개 혈청 샘플이다.

도 27은 비특이적 결합에 대한 $MgCl_2$, NaCl 또는 NaSCN의 존재의 영향을 도정한 것이다.

도 28은 $MgCl_2$, NaCl 또는 NaSCN의 존재를 시험하는 연구로부터 5분 후의 LSPR 피크 시프트 결과를 도정한 것이다.

도 29는 LSPR 검정에서 비특이적 결합에 대한 Mg 존재의 효과를 도정한 것이다.

도 30는 LSPR 검정에서 비특이적 결합에 대한 EDTA 존재의 효과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 본 발명은, 부분적으로, LSPR-기반 검정에서 유의미한 증폭이 이방성 금속성 나노구조체-라벨링된 결합 파트너에 의해 달성될 수 있다는 발견에 기초한다. 따라서, 본 발명은 생체분자에 커플링된 이방성 금속성 나노구조체를 포함하는 복수의 검출 컨쥬게이트를 이용하는 분석물 검출 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 금속성 나노구조체는 표면 상에 복수의 돌출부를 포함하는 다분지형 이방성 나노입자이다. 본 출원에서 제공되는 바와 같이 표면 상에 복수의 돌출부를 포함하는 나노구조체는 또한 적어도 약 50 nm의 직경을 갖는다. 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 금속성 나노구조체는 구형 또는 비-구형 금속성 나노구조체이다.
- [0035] 본 발명은 현재의 면역 검정, 리간드-수용체 결합 검정, 핵산-단백질 결합 검정, 또는 다중 단계 및 이러한 단계를 수행하기 위한 정교한 장비를 일반적으로 필요로 하는 다른 특이적 결합 파트너 검정의 문제점을 극복한다. 이러한 불균일 검정의 수행에 관련된 민감성 및 복잡성의 부족은 비라벨링된 특이적 결합 파트너로부터 라벨링된 것을 분리하기 위한 구체적인 필요성으로 인해 발생한다. 본 발명은 검정에 관련된 모든 단계를 균일한 형식으로 수행함으로써 이러한 한계점을 극복하며, 여기서, 결합 현상이 분광학의 통상의 기술자들에 의해 사용되는 임의의 분광 기술에 의해 실시간으로 측정되는 LSPR 특징을 변화시키기 때문에, 반응 및 미반응 검정 성분의 분리는 불필요하다. 분리가 필요없는 본 발명의 원 포트 검정은 굴절률 감지, 플라스몬 커플링 및 관련 효과를 사용하여 최종 LSPR 변조 신호의 증폭을 제공한다. 더욱이, 제공된 방법 및 금속성 나노구조체는 검출을 개선시킬 수 있다. 놀랍게도, 제공된 방법 및 금속성 나노구조체는 검출을 개선시킬 수 있으며, 비특이적 결합 (본 출원에서 "NSB"로 지칭됨)을 최소화시킬 수 있다. 본 개시 내용은 분석물의 예기치 않게 높은 검출 민감성을 제공하는, 이방성 나노구조체-항체 컨쥬게이트 및 이의 제조 방법을 제공한다. 본 개시 내용은 예기치 않게 낮은 수준의 NSB를 제공하면서 분석물의 예기치 않게 높은 검출 민감성을 제공하는, 이방성 나노구조체-항체 컨쥬게이트 및 이의 제조 방법을 제공한다. 하나의 양태에서, 나노구조체는 복수의 돌출부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 막대형의 금속성 나노입자가 원형, 구형 또는 다른 나노구조체와 비교하여 더 우수한 굴절률 센서인 것으로 당해 분야에 잘 알려져 있었기 때문에, 이러한 별형 나노구조체로 달성되는 민감성 검출은 예기치 못한 것이다. 또한, 문헌 보고서가 본 출원에서 기재된 별형 구조체보다는 오히려 나노로드에 의한 보다 우수한 민감성을 시사한다는 점을 고려하면, 본 출원에서 제공된 구형 코어 및 다중 스파이크를 갖는 이방성 나노구조체의 탁월한 효과는 놀라운 것이다. 다른 실시형태에서, 나노구조체는 별형 또는 구형이며, 본 출원에서 제공된 NSB의 민감성 및 낮은 수준은 본 출원에서 제공된 컨쥬게이트화 방법에 의해 달성된다.
- [0036] 당해 분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 본 발명은 다양한 항원 분석물, 예를 들어, 사람과 동물 모두에서의 감염 질환과 관련된 것들, 예를 들어, 감염 질환과 관련된 항원 및 이에 반응하여 생성된 항체의 검출에 적용될 수 있다. 항원 및 항체의 검출 이외에도, 본 출원에 기재된 기술은 또한 리간드 및 수용체, 전사 인자 및 이의 관련 DNA 결합 요소와 같은 특정 결합 파트너와 관련된 검정을 수행하는데 사용될 수 있다. 또한, RNA-RNA, RNA-DNA, DNA-DNA 또는 단백질-핵산 상호 작용은 특정 결합 파트너와 이방성 금속성 나노입자의 적절한 컨쥬게이트를 사용하여 검출될 수 있다.
- [0037] 본 출원에서 제공되는 바와 같이, 본 발명은, 정성적 또는 정량적 방식으로 특정 결합 파트너의 결합을 결정하기 위한, (화학 또는 물리적 증착을 통해 표면에 부착되는 것과 대조적으로) 용액 중에서 금속성 나노입자의 용도를 기재한다. 금속성 나노입자에 부착된 비결합 및 결합 파트너를 포함하는 영역과 상호 작용하는 광의 특징의 변화가 측정될 수 있어, 특정 결합 파트너들 사이의 정성적 및 정량적 상호 작용 모두가 적합한 검출기에 의해 결정될 수 있도록 한다.
- [0038] 제1 양태에서, 본 출원은 샘플에서 표적 분석물을 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 결합 파트너에 커플링된 이방성 금속성 나노구조체를 포함하는 복수의 검출 컨쥬게이트와 샘플을 혼합하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노구조체는 복수의 돌출부 또는 스파이크를 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노구조체는 돌출부를 포함하여 적어도 50 nm의 직경을 갖는다. 다른 실시형태에서, 나노구조체는 구형이다. 일부 실시형태에서, 나노구조체는 금 나노구조체이다. 하나의 실시형태에서, 상기 방법은 제1 검출 컨쥬게이트 및 제2 검출 컨쥬게이트를 포함하며, 여기서, 제1 및 제2 검출 컨쥬게이트는, 샘플에 표적 분석물이 존재할 경우 표적 분석물에 특이적으로 결합하여 제1 검출 컨쥬게이트, 분석물 및 제2 검출 컨쥬게이트 사이의 복합물을 형성할 수 있는 결합 파트너에 커플링된 나노구조체를 포함한다. 예를 들어, 컨쥬게이트는 각각 동일한 표적 분석물 상의 상이한 에피토프에 결합하는 제1 결합 파트너 및 제2 결합 파트너를 포함한다. 추

가의 실시형태에서, 상기 방법은 자외선-가시광선-적외선 스펙트럼 내의 파장 범위에서 광원에 복합물을 노출시키는 단계; 및 복합물로부터 광학 신호를 측정하는 단계를 포함하며, 여기서, 광학 신호의 변화는 샘플에서 표적 분석물의 존재를 나타낸다. 예시적인 실시형태에서, 제1 검출 컨จู게이트 및/또는 제2 검출 컨จู게이트에서의 금속성 나노구조체는 금 금속성 나노구조체이다. 또 다른 실시형태에서, 혼합 단계는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리비닐피롤리돈, 폴리알릴아민, 폴리에틸렌아민, 폴리리신, 폴리아크릴산, 폴리비닐 알코올, 폴리글루탐산 및 폴리아스파르트산으로부터 선택된 중합체 물질의 존재하에 일어난다. 바람직한 실시형태에서, 중합체 물질은 PEG이다. 더 또 다른 예시적인 실시형태에서, 혼합 단계는 다당류 또는 다른 점도 증강제의 존재하에 일어난다. 일부 실시형태에서, 점도 증강제는 트레할로오스, 말토덱스트린, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 폴리비닐피롤리돈 (PVP) 또는 폴리비닐 알코올 (PVA)로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 다당류는 말토덱스트린, 트레할로오스, 수크로오스, 옥수수 시럽 및 폴리글루코오스로부터 선택된다. 바람직한 실시형태에서, 다당류는 말토덱스트린 또는 트레할로오스이다. 더 또 다른 예시적인 실시형태에서, 혼합 단계는 차단제의 존재하에 일어난다. 일부 실시형태에서, 차단제는 소 혈청 알부민 (BSA), 카제인, 젤라틴, 난알부민 및 감마-글로불린으로부터 선택된다. 바람직한 실시형태에서, 차단제는 BSA이다.

[0039] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용은 측면 유동 검정과 같은 검정에서 이전에 사용되었지만 LSPR 검정에서 사용하기 위해 이전에 사용되거나 고려되지 않은 차단제를 포함하는 방법 및 조성물을 제공한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 본 개시 내용은 본 출원에서 기재된 LSPR 검정을 위한 방법 및 조성물을 제공하며, 여기서, 1종 이상의 Biolipidure® 시약은 차단제로서 사용된다. 놀랍게도, LSPR 검정에서의 파장 시프트에 대한 효과가 비-LSPR 검정 (예를 들어, 측면 유동 검정 등)에서 이러한 제제의 사용에 기초하여 예상될 수 없다는 사실에도 불구하고, 본 발명자들은 Biolipidure® 시약이 본 출원에서 제공된 LSPR 검정에서 탁월한 효과를 제공한다는 것을 밝혀냈다. Biolipidure® 시약은 다음 특징들 중 하나 이상을 나타내는 중합체 제제이다: 민감성 및 검출 정확성 향상; 비특이적 흡착의 억제; 항체 및 효소의 안정화; 및 로트간 (lot-to-lot) 변화의 제거. Biolipidure® 시약은 생물학적 유체 물질 취급을 필요로 하지 않으며, 일부 실시형태에서는 Biolipidure® (예를 들어, 약 0.1 wt%, 약 0.25 wt%, 약 0.5 wt%, 약 0.75wt%, 약 1wt%, 약 1.25 wt%, 약 1.5 wt%, 약 2 wt%, 약 5 wt% 또는 그 이상)을 포함하는 완충 용액을 제조하고 시험하고자 하는 샘플을 완충액에 용해시킴으로써 사용된다. 특정 실시형태에서, Biolipidure® 시약은 1 wt%의 농도로 사용된다.

[0040] 본 출원에서 기재된 다양한 실시형태에서, 본 발명의 방법은 샌드위치 검정 형식, 직접 검정 형식, 검정 형식 뿐만 아니라, 경쟁적 및 이차 라벨링 형식으로 구성될 수 있다.

[0041] 일부 실시형태에서, 검출 방법은 샌드위치 검정이다. 이러한 실시형태에서, 검출 컨จู게이트는 표적 분석물이 샘플에 존재할 경우 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 파트너에 커플링된, 본 출원에서 제공된 이방성 금속성 나노구조체를 포함한다. 예를 들어, 하나의 실시형태에서, 샌드위치 검정 형식의 방법은 제1 검출 컨จู게이트 및 제2 검출 컨จู게이트를 포함하며, 여기서, 제1 및 제2 검출 컨จู게이트는 구형 금속성 나노구조체 및/또는 복수의 돌출부를 갖는 금속성 나노구조체를 포함하고, 나노구조체는 샘플에 표적 분석물이 존재할 경우 표적 분석물에 특이적으로 결합하여 제1 검출 컨จู게이트, 분석물 및 제2 검출 컨จู게이트 사이의 복합물을 형성할 수 있는 결합 파트너에 커플링된다. 예시적인 실시형태에서, 제1 검출 컨จู게이트 및/또는 제2 검출 컨จู게이트 내의 금속성 나노구조체는 이방성 금 금속성 나노구조체이다. 복합물이 광원에 노출되고, 광학 신호가 측정되며, 여기서, 광학 신호의 변화는 샘플에서 분석물의 존재를 나타낸다. 예로써, 표적 분석물을 함유하는 샘플이 제1 및 제2 검출 컨จู게이트와 혼합될 때, 표적 분석물은 검출 컨จู게이트 내의 결합 파트너에 결합하여 제1 검출 컨จู게이트, 분석물 및 제2 검출 컨จู게이트 사이의 복합물을 형성한다. 이러한 복합물 형성은 검출 컨จู게이트 내의 금속성 나노구조체를 서로 근접하게, 즉, 플라스몬-플라스몬 커플링을 초래한다. 금속성 나노구조체에 의해 흡수, 산란 또는 투과되는 광의 양은 복합물 내의 금속성 나노구조체의 근접성에 의해 영향을 받으므로, 샘플에서 표적 분석물의 존재를 나타내는 피크 흡수 파장의 증진된 시프트를 생성한다.

[0042] 다른 실시형태에서, 검출 방법은 경쟁적 검정이다. 이러한 실시형태에서, 제1 검출 컨จู게이트는 관심 대상 표적 분석물에 커플링된 금속성 나노구조체를 포함한다. 샌드위치 검정 방법에서와 같이, 제2 검출 컨จู게이트는 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있다. 이러한 유형의 검정에서, 제1 검출 컨จู게이트는 초기에 제2 검출 컨จู게이트에 결합할 것이다. 표적 분석물을 함유하는 샘플이 이러한 초기 복합물과 혼합되면, 샘플 내의 비라벨링된 표적 분석물 또는 자유 표적 분석물은 제2 검출 컨จู게이트에 결합하기 위해 제1 검출 컨จู게이트와 경쟁할 것이다. 이러한 유형의 검정에서 광학 신호의 변화는 제2 검출 컨จู게이트로부터의 제1 검출 컨จู게이트 내의 금속성 나노구조체의 대체로부터 발생하며, 이것은 피크 흡수 파장에서의 파장 시프트를 비례적으로 감소시킬 것이다.

- [0043] 상기에서 언급한 바와 같이, 본 발명의 방법은 복수의 검출 컨쥬게이트를 이용할 수 있다. 검출 컨쥬게이트는 복수의 돌출부를 갖고 검정 입체배치에 따라 표적 분석물 또는 또 다른 검출 컨쥬게이트에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 파트너에 커플링된 구형 금속성 나노구조체 또는 금속성 나노구조체를 포함한다. 예를 들어, 방법이 샌드위치 검정 형식으로 구성된 실시형태에서, 검출 컨쥬게이트는 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 파트너에 커플링 또는 컨쥬게이트된 금속성 나노구조체를 포함한다. 방법이 직접 경쟁적 검정 형식으로 구성된 다른 실시형태에서, 검출 컨쥬게이트 중 적어도 하나는 표적 분석물에 커플링 또는 컨쥬게이트된 금속성 나노구조체를 포함한다.
- [0044] 일부 실시형태에서, 검출 컨쥬게이트는 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 파트너를 포함한다. 본 출원에서 사용되는 "특이적 결합"은 높은 친화도, 예를 들어, 적어도 10^{-6} M의 친화도를 갖는 표적 분자에 대한 결합을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 결합 파트너는 항체 또는 이의 단편 (예를 들어, Fv, Fab, (Fab)₂, 단일쇄, CDR 등), 항원, 수용체, 리간드, 폴리뉴클레오타이드, 압타머, 폴리펩타이드, 다당류, 지질다당류, 당펩타이드, 지질단백질 또는 핵단백질을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 생물학적 거대분자, 합텐 및 다른 소분자, 약물, 호르몬이다. 특정 실시형태에서, 결합 파트너는 항체이다. 다른 실시형태에서, 결합 파트너는 항원이다.
- [0045] 일부 실시형태에서, 검출 컨쥬게이트, 예를 들어, 제1 검출 컨쥬게이트 및 제2 검출 컨쥬게이트는 동일한 유형의 분자이지만, 바람직하게는 서로 상이한 위치에서 표적 분석물에 결합하는 결합 파트너를 포함한다. 예로써, 제1 검출 컨쥬게이트와 제2 검출 컨쥬게이트 둘 다는 표적 분석물을 인식하는 항체일 수 있지만, 제1 검출 컨쥬게이트가 표적 분석물에 결합하는 에피토프는 제2 검출 컨쥬게이트가 표적 분석물에 결합하는 에피토프와 분리되며, 이상적으로는 비중첩한다. 따라서, 특정 실시형태에서, 제1 검출 컨쥬게이트는 표적 분석물의 제1 에피토프를 인식하는 항체를 포함하며, 제2 검출 컨쥬게이트는 표적 분석물의 제2 에피토프를 인식하는 상이한 항체를 포함한다. 본 출원에서 기재된 다양한 실시형태에서, 제1 검출 컨쥬게이트는 표적 분석물의 제1 에피토프를 인식하는 단클론 항체를 포함할 수 있다. 추가의 실시형태에서, 제2 검출 컨쥬게이트는 제1 검출 컨쥬게이트에 의해 인식되는 에피토프와 분리되고 이상적으로는 비중첩되는 표적 분석물의 제2 에피토프를 인식하는 단클론 항체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 제1 검출 컨쥬게이트 및/또는 제2 검출 컨쥬게이트는 다클론 항체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 제1 검출 컨쥬게이트는 다클론 항체를 포함할 수 있는 반면, 제2 검출 컨쥬게이트는 단클론 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 검출 컨쥬게이트는 다클론 항체를 포함하며, 제2 검출 컨쥬게이트는 다클론 항체를 포함한다.
- [0046] 검출 컨쥬게이트 내의 금속성 나노구조체는 귀금속 또는 이의 복합물로 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 컨쥬게이트 내의 금속성 나노구조체는 전이 금속 또는 이의 복합물로 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 컨쥬게이트 내의 금속성 나노구조체는 귀금속 또는 전이 금속과 조합된 알칼리 금속 또는 란타늄 원소를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 검출 컨쥬게이트 내의 금속성 나노구조체는 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 루테튬, 로듐, 오스뮴, 이리듐, 티탄, 크롬, 카드뮴, 아연, 철, 코발트, 니켈 및 이들의 복합물로부터 선택된 금속을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 금속성 나노구조체는 금 나노구조체이다. 또 다른 실시형태에서, 금속성 나노구조체는 은 나노구조체이다. 더 또 다른 실시형태에서, 검출 컨쥬게이트 내의 금속성 나노구조체는 복합 금속성 나노구조체이다. "복합 금속성 나노구조체"는 적어도 2종의 귀금속, 전이 금속, 알칼리 금속 또는 란타늄 원소를 포함하는 나노구조체를 지칭한다. 2종 이상의 금속은 합금으로서 함께 혼합될 수 있거나, 2종 이상의 금속은 나노구조체의 독립된 부분에서 존재할 수 있다. 예를 들어, 하나의 금속은 나노구조체의 코어를 형성할 수 있는 반면, 제2 금속은 나노구조체의 외부 셸 또는 코팅물을 형성한다. 일부 실시형태에서, 복합 금속성 나노구조체는 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 루테튬, 로듐, 오스뮴, 이리듐, 티탄, 크롬, 카드뮴, 아연, 철, 코발트 및 니켈로부터 선택된 적어도 2종의 금속을 포함한다. 다른 실시형태에서, 복합 금속성 나노구조체는 금, 은, 구리, 백금, 팔라듐, 카드뮴, 철, 니켈 및 아연으로부터 선택된 적어도 2종의 금속을 포함한다. 하나의 특정 실시형태에서, 복합 금속성 나노구조체는 금 및 은을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 복합 금속성 나노구조체는 금 및 구리를 포함한다. 더 또 다른 실시형태에서, 복합 금속성 나노구조체는 은 및 구리를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법에서 사용되는 복합 금속성 나노구조체는 제1 금속의 코어 및 제2 금속의 코팅물을 포함한다. 예를 들어, 복합 금속성 나노구조체는 은 코어 및 금 코팅물을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 복합 금속성 나노구조체는 구리 코어 및 금 코팅물을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 코어는 은이고, 코팅물은 구리이다. 일부 실시형태에서, 각각의 복합 금속성 나노구조체는 유전체 코어 (예를 들어, 이산화규소, 금 황화물, 이산화티타늄, 실리카 및 폴리스티렌), 제1 금속의 제1 코팅물 및 제2 금속의 제2 코팅물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 금속을 포함하는 코어는 용해된 다음 제2 금속에

의한 코팅 공정을 거쳐 제2 금속으로 구성된 중공 구조체를 생성한다. 예를 들어, 금 나노입자를 갖는 은 코어의 코팅물은 은 코어 주변에 금 셸을 생성하고, 은 코어는 후속적으로 용해 또는 분해되어 중공 나노금 셸 구조체의 형성을 초래한다.

[0047] 일부 실시형태에서, 본 출원에 개시된 나노구조체는 스파이크 또는 원뿔형 돌출부와 같은 복수의 돌출부를 포함한다. 따라서, 본 출원에서 제공된 나노구조체는 다분지형 나노입자이다. 일부 실시형태에서, 나노구조체의 내부 코어의 표면은 돌출부에 의해 본질적으로 덮여 있다. 본 출원에서 인용되는 바와 같은 나노구조체의 직경은 돌출부를 포함하며, 즉, 인용된 직경은 나노구조체를 덮는 돌출부의 틈간이다.

[0048] 하나의 양태에서, 복수의 돌출부 또는 스파이크를 갖는 본 출원에서 제공된 나노구조체의 평균 직경은 약 50 nm 내지 약 120 nm이다. 나노구조체의 평균 직경은 그 위에 돌출부를 포함한다. 따라서, 평균 직경은 일부 실시형태에서 틈간 직경으로서 본 출원에 기재된다. 일부 실시형태에서, 평균 직경은 약 50 nm, 약 60 nm, 약 70 nm, 약 80 nm, 약 90 nm, 약 100 nm, 약 110 nm, 약 120 nm 또는 그 이상이다. 일부 실시형태에서, 평균 직경은 약 70 nm이다. 다른 실시형태에서, 평균 직경은 약 90 nm이다. 일부 실시형태에서, 나노구조체는 약 50 nm 내지 약 90 nm의 평균 직경의 혼합을 포함한다. 하나의 양태에서, 제공된 구형 나노구조체의 평균 직경은 약 50 nm 내지 약 120 nm이다. 일부 실시형태에서, 구형 나노구조체의 평균 직경은 약 50 nm, 약 60 nm, 약 70 nm, 약 80 nm, 약 90 nm, 약 100 nm, 약 110 nm, 약 120 nm 또는 그 이상이다.

[0049] 또 다른 양태에서, 본 개시 내용은 본 출원에서 개시된 결합 파트너-나노구조체 컨쥬게이트를 포함하는 반응 혼합물을 제공한다. 추가의 실시형태에서, 반응 혼합물은 1종 이상의 캡핑 시약 및/또는 1종 이상의 쌍성 이온성 세제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 캡핑제는 쌍성 이온성 세제이다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 CHAPS를 포함한다. 놀랍게도, 본 발명자들은, CHAPS, 캡핑제 및 쌍성 이온성 세제의 존재로 인해, 복수의 표면 돌출부를 포함하는 본 출원에서 제공된 나노구조체가 항체와 같은 결합 파트너에 효과적으로 컨쥬게이트될 수 있다는 것을 밝혀냈다. 또한, CHAPS의 존재는 보다 신속한 원심 분리 및 원심 분리를 위한 보다 짧은 시간을 가능하게 하였다. 예를 들어, 본 발명자들은, CHAPS의 존재하에, 통상적으로 이방성 나노입자 항체 컨쥬게이트를 붕괴하게 하는 원심 분리 속도 (예를 들어, 15,000g 초과 또는 약 40,000g)가 본 출원에서 제공된 나노구조체를 원심 분리하는데 사용될 수 있다는 것을 밝혀냈다. 따라서, CHAPS의 존재는 보다 효율적인 컨쥬게이트 생성을 가능하게 하였다. 또한, CHAPS의 존재는 원심 분리 후 항체 컨쥬게이트의 용이한 재현탁을 가능하게 하였다. 특히, 달리 원심 분리 후 재현탁될 수 없는 소수성 항체를 포함하는 컨쥬게이트는 CHAPS의 존재하에 용이하게 재현탁된다. 더욱이, CHAPS 세제의 존재는 응집을 초래하는 비특이적 크기/형상 변화를 방지하는데 도움을 준다. 복수의 스파이크를 갖는 본 출원에서 제공된 나노구조체와 같은 입자는 용액으로부터 빠져나올 수 있다. 놀랍게도, 본 발명자들은, 입자가 완전히 용액으로부터 빠져 나오더라도, 입자가 CHAPS를 첨가함으로써 구제될 수 있다는 것을 밝혀냈다. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 결합 파트너-나노구조체 컨쥬게이트를 포함하며, 여기서, 혼합물은 설포베타인 시리즈, 트리톤 시리즈 (x-100) 세제, 트윈 시리즈 (트윈 20) 세제로부터 선택된 1종 이상의 캡핑제 또는 쌍성 이온성 세제, CTAB와 같은 양이온성 세제 시리즈, 및 SDS와 같은 음이온성 세제를 포함한다.

[0050] 본 출원에서 개시된 금속성 나노구조체에 분자를 컨쥬게이트시키는 방법이 또한 제공된다. 이러한 방법은 컨쥬게이트화 화학, 예를 들어, 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카보디이미드 하이드로클로라이드 (EDC), 설포-NHS 커플링, 소수성 결합 또는 티오에테르 화학을 포함하는 것들을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 파트너 또는 표적 분석물은 티올, 아민, 디티올, 아크릴 포스포르아미다이트, 아자이드 또는 알킨을 비롯한 각종 화학 작용기를 통해 금속성 나노구조체에 커플링될 수 있다. 일부 실시형태에서, 분자는 더 큰 담체 분자 또는 단백질을 통해 금속성 나노구조체에 간접적으로 커플링될 수 있다. 이러한 간접 커플링은, 분자가 작을 때, 예를 들어, 호르몬, 약물 및 10 kD 미만의 다른 소분자에 특히 유용하다. 바람직하게는, 담체 단백질은 표적 분석물과 특이적으로 상호 작용할 수 없다. 일부 실시형태에서, 단백질 A 또는 단백질 G 또는 단백질 A/G는 나노입자에 컨쥬게이트화되거나 커플링될 수 있다.

[0051] 일부 실시형태에서, 본 출원에서 제공된 금속성 나노구조체에 대한 분자의 컨쥬게이트화 방법은, (a) 금속성 나노구조체를 포함하는 용액을 결합 파트너를 포함하는 용액과 혼합하여 결합 파트너-나노구조체 컨쥬게이트를 형성하는 단계; (b) 컨쥬게이트를 BSA로 차단하는 단계; (c) 컨쥬게이트를 원심 분리하는 단계; 및 (d) 컨쥬게이트를, PBS와 같은 완충액, BSA와 같은 차단제 및 CHAPS를 포함하는 희석액 중에 재현탁시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 파트너는 항체이다. 추가의 실시형태에서, 항체는 소수성 영역을 포함하는 항체이다. 일부 실시형태에서, 금속성 나노구조체는 나노구조체에 대한 항체의 적정 전에 염기성 pH로 조정된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 나노구조체의 pH는 약 8, 약 8.5, 약 8.8 또는 약 9.2의 pH로 조정된다. 그러나, 일부

실시형태에서, 본 발명자들은 놀랍게도 나노구조체를 포함하는 용액의 pH가 중성 또는 산성 pH (예를 들어, 약 5.5, 약 6, 약 6.5 또는 약 7)로 조정되어 민감성 항원을 검출할 수 있는 컨쥬게이트를 성공적으로 형성할 수 있다는 것을 밝혀냈다. 일부 실시형태에서, 중성 또는 산성 pH는 BSA 및 포스페이트 완충액을 포함하는 표준 컨쥬게이트 희석액 중에 재현타시키기 어려운 컨쥬게이트를 초래하였다. 놀랍게도, 이러한 불용성 컨쥬게이트는 CHAPS를 포함하는 완충액 중에 신속하게 용해되었다.

[0052] 일부 실시형태에서, 제1 검출 컨쥬게이트에서 사용된 금속 또는 금속들은, 제2 검출 컨쥬게이트에서의 금속성 나노구조체가 제작되는 금속 또는 금속들과 동일할 수 있다. 예를 들어, 하나의 실시형태에서, 제1 검출 컨쥬게이트는 금 나노구조체를 포함하며, 제2 검출 컨쥬게이트는 금 나노구조체를 포함한다. 다른 실시형태에서, 제1 검출 컨쥬게이트에서 사용된 금속은, 제2 검출 컨쥬게이트에서 금속성 나노구조체를 생성하는데 사용된 금속 또는 금속들과 상이하다.

[0053] 일부 실시형태에서, 반응 환경은 적절한 완충액, 이온 강도 및 다른 촉진제로 조정될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 반응 환경은 본 출원에서 기재된 바와 같이 LSPR 신호의 강도 및 신호가 발생하는 속도를 증진시킬 수 있는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 폴리비닐피롤리돈, 폴리알릴아민, 폴리에틸렌이민, 폴리리신, 폴리아크릴산, 폴리비닐 알코올 및 폴리아스파르트산을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 다른 유사한 중합체 물질도 또한 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명은 또한 본 출원에서 기재된 방법을 이용하여 샘플에서 표적 분석물을 검출하기 위한 분석물 검출 장치를 제공한다. 적합한 분석물 검출 장치로는 분광 광도계 큐벳, 분석용 로터, 마이크로웰 플레이트 또는 유동 챔버가 포함될 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 광섬유의 팁 또는 투명 젤도 또한 본 출원에서 개시된 검출 방법을 수행하기 위해 사용될 수 있다.

[0055] 특정 실시형태에서, 본 출원에서 기재된 분석물 검출 장치의 모든 성분은 원심 로터 또는 디스크 내에 포함된다. 예를 들어, 로터 또는 디스크는 복수의 검출 컨쥬게이트가 위치되는 하나 이상의 반응 챔버를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 컨쥬게이트는 동결건조된 조성물의 형태, 예를 들어, 동결건조된 비드 또는 펠릿으로 존재한다. 일부 실시형태에서, 분석물 검출 장치는 1개 이상의 반응 챔버를 갖는 로터 또는 디스크를 포함하며, 여기서, 각 반응 챔버는 복수의 검출 컨쥬게이트 (예를 들어, 제1 검출 컨쥬게이트 및 제2 검출 컨쥬게이트)를 포함하고, 검출 컨쥬게이트는 금속성 나노입자에 커플링된 제1 및 제2 특정 결합 파트너이다. 이러한 장치는, 시험 샘플이 로터 또는 디스크와 접촉되고, 로터 또는 디스크에 대한 원심력의 적용이 샘플과 제1 검출 컨쥬게이트 및 제2 검출 컨쥬게이트를 혼합하는 반응 챔버에 시험 샘플을 전달함으로써, 1단계 분석물 검출 검정을 제공한다. 로터 또는 디스크가 1개 초과인 반응 챔버를 포함하는 실시형태에서, 검출 컨쥬게이트는 상이한 분석물이 각 반응 챔버에서 검출될 수 있도록 선택될 수 있다. 로터가 복수의 반응 챔버를 포함하는 경우, 이러한 로터 형식 검출 장치는 샌드위치 검정 형식, 직접 경쟁적 형식, 또는 둘 다로 구성될 수 있다.

[0056] 일부 실시형태에서, 직접 경쟁적 검정 또는 샌드위치 검정은 원심 로터, 예를 들어, 미국 특허 5,061,381, 5,122,284, 5,186,844, 5,304,348, 5,457,053 및 5,693,233에 기재된 로터에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시 내용은 복합 분석을 가능하게 하는 디스크 또는 로터가, 예를 들어, 다중 큐벳을 통해 개별 검출을 가능하게 하는 복합 분석을 제공한다.

[0057] 일부 실시형태에서, 1개 초과인 에피토프에 결합하는 2쌍의 단클론 항체 또는 다클론 항체 혼합물의 나노입자 컨쥬게이트는 동결 건조 비드로서 첨가된다. 용액상 LSPR 검정은 단클론 및 다클론 항체 모두와 함께 작동한다. 일부 실시형태에서, 본 개시 내용은 LSPR 검정에서 고도의 민감성 검출을 가능하게 하는 항체 쌍을 제공한다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 항체 쌍은 항-TSH 항체 클론 C1 및 C6이며, 이들은 각각 TSH의 상이한 에피토프에 결합한다. 다른 실시형태에서, 항체 쌍은 항-TSH 항체 클론 C1 및 5409이다. 일부 실시형태에서, 최상의 신호 대 잡음 비는 항-TSH 클론 5405 및 5409로부터 제조된 금 컨쥬게이트에 의해 획득된다.

[0058] 본 발명은 또한 본 출원에서 개시된 바와 같은 본 발명의 분석물 검출 장치를 포함하는 키트를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 키트는 복수의 검출 컨쥬게이트 (예를 들어, 제1 검출 컨쥬게이트 및 제2 검출 컨쥬게이트)를 포함하며, 여기서, 검출 컨쥬게이트는 본 출원에서 제공된 금속성 나노구조체에 연결된 특정 결합 파트너이다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 검출 컨쥬게이트는, 예를 들어, 펠릿 또는 비드 형태로 동결 건조될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 모든 검출 컨쥬게이트는 동결 건조된다. 추가의 실시형태에서, 키트는 1종 이상의 추가 시약을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 1종 이상의 추가 시약은 동결 건조 형태로 제공된다. 일부 실시형태에서, 키트는 차단제, 당류, 중합체성 촉진제 물질, 염화 나트륨 및/또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. "차단제"는 샘플에 존재하는 단백질과 검출가능한 제제 및/또는 분석물의 결합을 방지하는 제제이다. 차단제는

전형적으로 단백질 자체이며, 소 혈청 알부민 (BSA), 카제인, 젤라틴, 난알부민, 감마-글로불린 및 비면역화 동물 유래의 IgG를 포함할 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 당류는 다당류이다. 하나의 실시형태에서, 다당류는 말토덱스트린, 옥수수 시럽 및 폴리글루코오스로부터 선택된다. 바람직한 실시형태에서, 다당류는 말토덱스트린이다. 또 다른 실시형태에서, 당류는 트레할로오스이다. 일부 실시형태에서, 시약 키트는 말토덱스트린 및 트레할로오스를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 중합체성 촉진제 물질은 PEG이다.

[0059] 본 발명의 키트는 시험 샘플에서 분석물을 검출하는 장치를 사용하기 위한 설명서, 생물학적 샘플을 수집하기 위한 장치 또는 도구, 및/또는 고체 물질, 예를 들어, 토양, 음식 및 생물학적 조직으로부터 샘플을 수득하기 위한 추출 완충액을 또한 포함할 수 있다.

[0060] 본 출원에서 기재된 시험 샘플은 환경적 샘플 또는 음식 샘플로부터 제조된 추출물 또는 생물학적 샘플을 비롯한 임의의 유형의 액체 샘플일 수 있다. 하나의 특정 실시형태에서, 시험 샘플은 생물학적 샘플이다. 생물학적 샘플로는 전혈, 혈장, 혈청, 타액, 소변, 흉수, 땀, 담즙, 뇌척수액, 배설 물질, 질액, 정액, 수정체 분비물 (ocular lens fluid), 점액, 윤활액, 복막액, 양수, 생검 조직, 타액, 및 세포 용해물이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 생물학적 샘플은 암, 감염 질환 (예를 들어, 바이러스, 세균, 기생충 또는 진균 감염), 심혈관 질환, 대사성 질환, 자가면역 질환 등과 같은 질환 병태가 있는 것으로 의심되는 사람 대상체 또는 동물 대상체로부터 수득될 수 있다. 생물학적 샘플은 또한 일상적인 의료 검진을 경험하는 건강한 대상체 (예를 들어, 사람 또는 동물)로부터 수득될 수 있다.

[0061] 본 방법의 일부 실시형태에서, 시험 샘플은 제1 검출 컨จู게이트와 혼합되고, 이어서 혼합물은 제2 검출 컨จู게이트와 접촉된다. 특정 실시형태에서, 샘플, 제1 검출 컨จู게이트 및 제2 검출 컨จู게이트는 동시에 접촉된다. 예를 들어, 동시에 2개의 시약과 샘플의 접촉은 본 출원에서 기재된 로터 형식 검출 장치에서 일어날 수 있다.

[0062] 상기에서 언급한 바와 같이, 일부 실시 양태에서, 본 출원은 결합 파트너에 컨จู게이트된 금속성 나노구조체의 용도에 관한 것이며, 여기서, 나노구조체는 스파이크 또는 원뿔형 돌출부와 같은 복수의 돌출부를 갖고, 나노구조체는 약 50 nm 이상의 평균 직경을 갖는다. 놀랍게도, 본 발명자들은, 나노로드가 더 우수한 굴절률 변화 센서로 알려져 있기 때문에 탁월한 결과를 제공할 것으로 예상되지만, 용액-기반 검정의 민감성이 나노로드 (평활한 막형 표면을 가짐)의 사용과 비교하여 돌출부가 가득한 나노구조체에 의해 유의하게 증진된다는 것을 밝혀냈다. 실제로, 본 발명자들은 놀랍게도 본 출원에서 개시된 용액-기반 검정에서, 복수의 돌출부를 갖는 나노구조체를 포함하는 금속성 나노구조체 컨จู게이트가 강력한 항원 검출을 나타낸 반면, 나노로드-컨จู게이트가 강력한 항원 검출을 할 수 없었다는 것을 밝혀냈다. 본 발명자들은 돌출부를 포함하는 더 큰 나노구조체가 동일한 돌출부 특징을 갖는 더 작은 나노구조체에 비해 더 우수한 검출 민감성을 나타낸다는 것을 추가로 밝혀냈다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 검정에 사용된 나노구조체의 평균 직경이 약 50 nm에서 약 70 nm로 증가할 때, 검출의 민감성은 증가한다. 추가의 실시형태에서, 검정에 사용된 나노구조체의 평균 직경이 약 70 nm에서 약 90 nm로 증가할 때에도, 검출의 민감성은 증가한다.

[0063] 하나의 실시형태에서, 용액은 다당류를 약 2% 내지 약 20% w/v의 최종 농도로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 용액은 다당류를 약 4% 내지 약 15% w/v의 최종 농도로 포함한다. 더 또 다른 실시형태에서, 용액은 다당류를 약 5% 내지 약 10% w/v의 최종 농도로 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 용액은 다당류를 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% 또는 그 이상이고 이들 사이의 모든 값을 포함하는 최종 농도로 포함한다. 특정 실시형태에서, 분석용 로터에서 검출 컨จู게이트의 침강을 방지하기 위해 트레할로오스를 사용할 수 있다. 특정 실시형태에서, 트레할로오스 농도는 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% 또는 그 이상이고 이들 사이의 모든 값을 포함한다. 본 출원에서 기재된 다양한 실시형태에서, 다당류가 대체 당류, 예를 들어, 수크로오스, 트레할로오스, 말토덱스트린, 소르비톨, 만니톨 또는 피콜을 포함하는 용액 중에서 수행되는 검정과 비교하여 용액에 첨가될 때, 검정의 민감성은 개선될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 다당류는 말토덱스트린이다. 또 다른 예시적인 실시형태에서, 다당류는 트레할로오스이다. 더 또 다른 예시적인 실시형태에서, 다당류는 텍스트란이다.

[0064] 하나의 실시형태에서, 용액은 차단제를 약 0.1% 내지 약 20% w/v의 최종 농도로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 용액은 차단제를 약 0.5% 내지 약 10% w/v의 최종 농도로 포함한다. 더 또 다른 실시형태에서, 용액은 차단제를 약 1% 내지 약 5% w/v의 최종 농도로 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 용액은 차단제를 약 1%, 2%, 3%, 4% 또는 5%이고 이들 사이의 모든 값을 포함하는 최종 농도로 포함한다. 본 출원에서 기재된 다양한 실시형태에서, 차단제가 차단제의 부재하에 수행되는 검정과 비교하여 용액에 첨가될 때, 검정의 민감성은 개선될

수 있다. 일부 실시형태에서, 차단제는 소 혈청 알부민, 카제인, 젤라틴, 난알부민 및 감마-글로불린으로부터 선택된다. 예시적인 실시형태에서, 차단제는 소 혈청 알부민 (BSA)이다.

[0065] 일부 실시형태에서, 용액은 말토덱스트린, 트레할로오스, PEG, 차단제 (예를 들어, BSA) 및/또는 염화 나트륨 중 1종 이상을 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 1종 이상의 용액 성분, 예를 들어, 말토덱스트린은 액체, 예를 들어, 물, 식염수 용액 또는 액체 생물학적 샘플의 첨가시 현탁되는 동결 건조 비드 또는 펠릿으로서 제공될 수 있다. 예를 들어, 1종 이상의 용액 성분이 액체의 첨가 후 용액 중에 현탁되는 비드로서 분광 광도계 큐벳 또는 분석용 로터의 반응 챔버에 제공될 수 있다.

[0066] 추가의 실시형태에서, LSPR 신호는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 폴리알릴아민, 폴리에틸렌아민, 폴리리신, 폴리아크릴산, 폴리비닐 알코올 및 폴리아스파르트산으로부터 선택된 중합체성 촉진제 물질의 존재하에 제1 및 제2 검출 컨จู게이트를 분석물과 혼합함으로써 실질적으로 증가될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 중합체 물질은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이다. 하나의 실시형태에서, 반응 혼합물은 중합체 물질, 예를 들어, PEG를 약 0.1 mg/mL 내지 약 200 mg/mL의 최종 농도로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 중합체 물질, 예를 들어, PEG를 약 0.2 mg/mL 내지 약 100 mg/mL의 최종 농도로 포함한다. 더 또 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 중합체 물질, 예를 들어, PEG를 약 0.5 mg/mL 내지 약 10 mg/mL의 최종 농도로 포함한다. 더 또 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 중합체 물질, 예를 들어, PEG를 약 2 mg/mL 내지 약 8 mg/mL의 최종 농도로 포함한다. 예시적인 실시형태에서, 반응 혼합물은 중합체 물질, 예를 들어, PEG를 약 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 mg/mL이고 이들 사이의 모든 값을 포함하는 최종 농도로 포함한다. 일부 실시형태에서, 상이한 분자량의 PEG가 사용될 수 있으며, 예를 들어, 소량의 더 높은 분자량의 PEG가 실질적인 효과를 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 검정 향상에 필요한 PEG 농도는 중합체의 분자량에 따라 달라진다.

[0067] 본 발명의 검출 방법은 표적 분석물의 정성적 또는 정량적 양을 측정하는데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 샘플에서 표적 분석물의 근사량을 측정하는데 특히 유용하며, 특정한 의학적 병태를 진단하거나 약물 요법의 효능을 평가하기 위해 특히 사용될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 표적 분석물의 양은 공지된 양의 표적 분석물을 갖는 샘플에 대해 본 출원에서 기재된 바와 같은 금속성 나노입자로부터 광학 신호의 변화를 측정하여 특정 분석물에 대해 표준 곡선을 확립하고; 시험 샘플에 대해 광학 신호 변화를 결정하고; 표준 곡선에 대해 수득된 값과 시험 샘플에 대해 광학 신호 변화를 비교함으로써 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 시약과 제2 시약 사이의 복합물의 양에 대한 측정은 공지된 양의 복합물을 갖는 한 샘플로부터의 흡광도 비 및/또는 반응 속도와 시험 샘플로부터의 흡광도 비 및/또는 반응 속도를 비교하고, 이로 인해 시험 샘플에서 복합물의 양을 결정하는 것을 포함한다. 시험 샘플로부터 수득된 정량 값은 예정 역치 값과 비교될 수 있으며, 여기서, 예정 역치 값은 표적 분석물의 비정상 또는 정상 수준을 나타낸다.

[0068] 본 발명의 검출 방법은 샘플에서 극미량의 표적 분석물을 검출하기 위한 고도의 민감성 기술을 제공한다. 일부 실시형태에서, 표면 플라스몬 공명-기반 신호의 증폭은 표적 분석물의 나노그램 양이 샘플에서 검출될 수 있도록 금 나노구조체 컨จู게이트에 의해 달성될 수 있다. 따라서, 상기 방법의 하나의 실시형태에서, 표적 분석물의 나노그램 양의 존재가 검출된다. 일부 실시형태에서, 금 나노입자를 포함하는 검출 컨จู게이트로부터의 플라스몬 공명-기반 신호는 복합 금속성 나노구조체 검출 컨จู게이트를 사용하여 증폭될 수 있다. 분석물-특이적 항체에 컨จู게이트된 금-코팅된 은 나노구조체의 사용은 표적 분석물의 피크그램 양의 검출을 가능하게 할 수 있다. 따라서, 상기 방법의 일부 실시형태에서, 표적 분석물의 피크그램 양의 존재가 검출된다. 상기 방법의 다른 실시형태에서, 표적 분석물의 펩토그램 양의 존재가 검출된다. 더 큰 민감성은 조성물 및/또는 복합 금속성 나노구조체의 형상을 변경시킴으로써 수득될 수 있다.

[0069] 입사광이 금속성 나노구조체에 적용되는 경우, 금속내 전도 대역 전자는 입사 전자기파의 동일한 주파수에서 집합적으로 진동한다. 이러한 공명 진동의 결과로서, 나노구조체는 특정 파장 범위에서 광을 강하게 흡수하고 산란시킨다. 귀금속 또는 전이 금속을 포함하는 금속성 나노구조체의 경우, 이러한 파장 범위는 나노구조체의 특정 조성물에 따라 자외선-가시광선-적외선 스펙트럼 내이다. 따라서, 본 발명의 방법에서 사용하기에 적합한 전자기 에너지를 적용하기 위한 광원은, 아크 램프 및 레이저를 비롯하여, 자외선-가시광선 스펙트럼 또는 자외선-가시광선-적외선 스펙트럼 내의 파장 범위를 적용할 수 있는 임의의 공급원을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 광원은 특정 파장의 광이 적용될 수 있도록 단색화 장치를 구비할 수 있다.

[0070] 금속성 나노구조체의 광학 특성은 이의 크기, 형상 및 조성에 좌우된다. 예를 들어, 고체 금 나노입자는 입자 크기에 따라 약 515 nm 내지 약 560 nm의 흡수 피크 파장 ($\lambda_{최대}$)을 갖는다. 30 nm의 직경을 갖는 금 구형 나노입자는 약 520 nm에서 최대로 흡수하며, 입자 직경이 증가함에 따라 $\lambda_{최대}$ 는 더 긴 파장으로 시프트한다. 은

및 구리 입자는 자외선/청색 또는 적색 영역 (예를 들어, 약 350 nm 내지 약 500 nm)에서 $\lambda_{\text{최대}}$ 를 가지며, 증가하는 입자 직경은 더 긴 파장으로 $\lambda_{\text{최대}}$ 의 시프트를 초래한다. 금속성 나노로드는 횡 방향 $\lambda_{\text{최대1}}$ 및 종 방향 $\lambda_{\text{최대2}}$ 를 갖는다. 상이한 금속의 합금은 전형적으로 포함 금속의 흡수 피크 사이의 중간 범위에서 흡수 피크를 나타낸다. 예를 들어, 금 및 은의 50/50 합금을 포함하는 나노구조체는 약 480 nm의 $\lambda_{\text{최대}}$ 를 나타내며, 증가하는 양의 금은 더 긴 파장으로 흡수 피크의 시프트를 초래한다. 국소 중간 굴절률의 변화에 대한 LSPR 신호의 민감성은 나노구조체의 형상 또는 기하학적 구조의 변화를 변화시켜 변형될 수 있다. 예를 들어, 비구형 입자 (예를 들어, 나노프리즘, 나노로드, 나노셸 등)는 구체와 비교하여 굴절률의 변화에 대한 증가된 LSPR 민감성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 광학 특성 (예를 들어, 특정 파장에서의 흡수/산란)은 검출 컨จู게이트에서 이용된 금속성 나노구조체의 크기, 형상 또는 조성을 변화시켜 특정한 적용에 맞추어진다.

[0071] 입사광과 금속성 나노구조체 사이의 상호작용은 반사광 또는 투과광으로서 모니터링될 수 있다. 흡수 또는 산란되는 입사광의 양은 반사 방식에서 흡수 스펙트럼으로서 또는 투과 방식에서 흡수 스펙트럼으로서 측정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 금속성 나노구조체로부터 측정된 광학 신호는 광반사, 흡수 스펙트럼, 산란 스펙트럼 및/또는 방출 스펙트럼일 수 있다.

[0072] 결합 파트너와 표적 분석물 사이의 복합물 형성으로부터 생성되는 검출 컨จู게이트에서 금속성 나노구조체 사이의 플라즈몬 커플링은 금속성 나노구조체의 국소화된 표면 플라즈몬 공명 스펙트럼에서의 변화를 초래한다. 예를 들어, 이러한 변화는 증가된 광소멸, 증가된 광반사 및/또는 증가된 산란 및/또는 방출 신호를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플에서 표적 분석물의 존재를 나타내는 광학 신호의 변화는 시프트, 광산란의 증가 또는 감소 또는 이들 특징들의 조합을 포함한다. 특정 실시형태에서, 샘플에서 표적 분석물의 존재를 나타내는 광학 신호의 변화는 스펙트럼 피크 파장 시프트이다. 다른 특정 실시형태에서, 샘플에서 표적 분석물의 존재를 나타내는 광학 신호의 변화는 피크 이외의 위치에서의 파장 시프트이다. 예를 들어, 샘플에서 표적 분석물의 존재를 나타내는 광학 신호의 변화는 중간점 스펙트럼 파장 시프트, 파장 베이스에서의 스펙트럼 파장 시프트, 또는 차이 스펙트럼과 같은 총 스펙트럼 파장 시프트일 수 있다. 하나의 실시형태에서, 광학 스펙트럼 피크의 파장 시프트는 200 nm 내지 1200 nm의 스펙트럼 윈도우 내의 적색 시프트 (예를 들어, 더 긴 파장으로의 시프트)일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 광학 스펙트럼 피크의 파장 시프트는 200 nm 내지 1200 nm의 스펙트럼 윈도우 내의 청색 시프트 (예를 들어, 더 짧은 파장으로의 시프트)일 수 있다. 광학 신호의 변화는 세트 반응 기간 이후 특정 시점에서 측정될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 반응 기간에 걸친 광학 신호의 변화 (예를 들어, 속도 결정)가 측정될 수 있다. 2가지 유형의 측정은 표적 분석물의 정성적 또는 정량적 분석에 사용될 수 있다.

[0073] 상이한 파장에서 광학 신호를 측정하고 소멸, 산란 또는 방출 스펙트럼을 획득하기 위한 각종 수단은 당해 분야에 공지되어 있다. 임의의 분광 광도 측정 또는 광도 측정 기기는 개시된 방법에서 사용하기에 적합하다. 비제한적인 일부 예로는 플레이트 판독기, Cobas Fara 분석기, 및 Piccolo xpress[®] 및 Vetscan 분석기 (Abaxis, Inc., Union City, CA), 광섬유 판독기 (예를 들어, LightPath[™] S4 (LamdaGen, Menlo Park, CA)), SPR 기기 (예를 들어, GE Healthcare로부터 이용가능한 Biacore 기기), Olympus, Hitachi 등으로부터의 원심 분석기가 포함된다.

[0074] 본 발명은 또한 (i) 결합 파트너에 커플링된, 복수의 돌출부를 갖는 본 출원에서 제공된 금속성 나노구조체를 포함하는 제1 검출 컨จู게이트, (ii) 표적 분석물, 및 (iii) 결합 파트너에 커플링된, 본 개시 내용에 따른 금속성 나노구조체를 포함하는 제2 검출 컨จู게이트를 포함하는 검정 복합물을 포함하며, 여기서, 제1 검출 컨จู게이트 내의 결합 파트너는 표적 분석물 상의 제1 에피토프에 결합하고, 제2 검출 컨จู게이트 내의 결합 파트너는 표적 분석물 상의 제2 에피토프에 결합하여 제1 검출 컨จู게이트, 표적 분석물 및 제2 검출 컨จู게이트를 포함하는 복합물을 형성한다. 일부 실시형태에서, 검정 복합물은 원심 로터와 함께 사용을 위해 개조된 큐벳 내에 함유된다. 다른 실시형태에서, 검정 복합물은 원심 로터 또는 디스크의 반응 챔버 내에 함유된다.

[0075] 임의의 유형의 표적 분석물은 본 발명의 방법, 장치 및 검정 복합물, 특히 질환의 진단에서 유의미한 것들을 사용하여 검출될 수 있다. 표적 분석물로는 단백질, 효소, 항원, 항체, 펩타이드, 핵산 (RNA, DNA, mRNA, miRNA), 호르몬, 당단백질, 다당류, 독소, 바이러스, 바이러스 입자, 약물 분자, 합텐, 또는 화학 물질이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 일부 실시형태에서, 표적 분석물은 사람 및/또는 동물에서 감염 질환과 관련된 마커 또는 항원이다. 다른 실시형태에서, 표적 분석물은 특정한 생리학적 상태 또는 병리학적 병태와 관련된 마커 또는 항원이다.

- [0076] 특정 실시형태에서, 표적 분석물은 병원성 항원 또는 병원성 항원에 대한 항체이다. 예를 들어, 병원성 항원은 바이러스 항원 (예를 들어, 고양이 백혈병 바이러스, 개 파보바이러스, 구제역 바이러스, 인플루엔자 바이러스, A형, B형, C형 간염 바이러스, HIV 바이러스, 사람 유두종 바이러스, 엡스타인 바 바이러스, 광견병 바이러스 등), 세균 항원 (예를 들어, 에를리히아, 보렐리아, 아나플라스마, 살모넬라, 바실러스 및 리케차 등), 진균 항원 또는 기생충 항원 (예를 들어, 개 사상충, 지아르디아 람블리아, 플라소모디움 팔시파룸, 아프리카 파동편모충 및 트리파노소마 브루세이 등)일 수 있다. 특정 실시형태에서, 세균 항원은 에를리히아 카니스, 에를리히아 사펜시스, 에를리히아 에원지, 보렐리아 부르그도르페리, 아나플라스마 플라티스, 아나플라스마 파고사이토피룸, 살모넬라 엔테리카, 바실러스 안트라시스 및 리케차 리케치로부터 유래될 수 있다. 다른 실시형태에서, 표적 분석물은 질병-관련 항원 또는 질병-관련 항원에 대한 항체이다. 질환-관련 항원으로는 암-관련 항원 또는 마커 (예를 들어, PSA, AFP, CA125, CA15-3, CA19-9, CEA, NY-ESO-1, MUC1, GM3, GD2, ERBB2 등), 심혈관 질환-관련 항원 또는 마커 (예를 들어, 트로포닌, C-반응성 단백질, 뇌 나트륨이노 펩타이드, CKMB, 지방산 결합 단백질 등), 대사-관련 항원 또는 마커 (예를 들어, 갑상선 자극 호르몬, 티록신, 랩틴, 인슐린), 또는 자가면역 질환-관련 항원 또는 마커 (예를 들어, 자가-항체)가 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 특정 실시형태에서, 표적 분석물은 염증성 항원 또는 마커 (예를 들어, C-반응성 단백질, MRP14, MRP8, 25F9 등)이다. 다른 실시형태에서, 표적 분석물은 임신-관련 항원 또는 마커 (예를 들어, 태아 항원, 사람 융모성 생식선 자극 호르몬)이다.
- [0077] 일부 실시형태에서, 본 개시 내용은 본 출원에서 제공된 나노구조체를 합성하는 방법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 은/금 나노입자는 예정량의 다음 시약을 연속적으로 첨가하고 철저히 혼합하여 단일 용기에서 합성된다: (1) 계면활성제 (예를 들어, 이온성 [음이온성, 양이온성 또는 쌍성 이온성] 또는 비이온성) 또는 캡핑제, 예를 들어, 3-((3-콜라미도프로필)디메틸아미노)-1-프로판설포네이트 (CHAPS), SDS, 트윈, 트리톤 또는 임의의 설포베타인 세제, (2) 염화 금, (3) 물, (4) 질산 은, (5) 시트르산 삼나트륨, 및 최종적으로 (6) 나노입자의 형성을 개시하기 위해 첨가되는 아스코르브산. 다른 실시형태에서, 나노입자는 다음의 순서로 예정량의 다음 시약을 첨가하여 단일 용기에서 합성된다: (1) 계면활성제 또는 캡핑제, 예를 들어, CHAPS, SDS, 트윈, 트리톤, CTAB 또는 임의의 설포베타인 세제, (2) 염화 은, (3) 질산 은, (4) 시트르산 삼나트륨, (5) 물, 및 (6) 환원제. 일부 실시형태에서, 환원제는 CHAPS, 아스코르브산, 시트르산 삼나트륨 및 물로 구성된다. 추가의 실시형태에서, 환원제는 CHAPS 약 200 mg, 아스코르브산 약 4 g, 시트르산 삼나트륨 약 117.6 mg 및 물 약 15.68 g으로 구성된다. 일부 실시형태에서, 약 1 mL의 수성 1% (w/w) CHAPS는 0.1 M 염화 금 약 0.25 mL, 0.02 M 질산 은 약 0.5 mL, 1 M 시트르산 삼나트륨 약 0.05 mL, 물 약 6.2 mL 및 환원제 약 2 mL와 순차적으로 혼합된다. 금속성 염, 캡핑제, 환원제와 같은 각종 활성 성분의 농도 및 용액의 pH를 변화시키면, 상이한 입자 유형 (예를 들어, 나노구체, 나노스타 또는 나노로드) 및 상이한 나노입자 조성이 초래된다.
- [0078] 일부 실시형태에서, 나노스타는 물, 세틸트리메틸암모늄 브로마이드 (CTAB), 염화 금, 아스코르브산 및 미리형성된 금 나노구체 씨드를 순서대로 혼합하여 형성된다. 추가의 실시형태에서, 물 약 0.825 mL, 20% CTAB 약 0.1 mL, 0.1 M 염화 금 약 0.025 mL, 1 M 아스코르브산 약 0.05 mL 및 금 나노구체 씨드 약 0.05 mL를 당해 순서대로 혼합한다. 씨드의 수명 및 씨드 대 금속성 이온의 비는 나노입자의 기하학적 구조 및 이로 인해 광학 스펙트럼에 영향을 미친다. 금 단독의 나노스타는 CHAPS 약 200 mg, 아스코르브산 약 4 g, 시트르산 삼나트륨 약 117.6 mg 및 물 약 15.68 g으로 구성되는 환원제를 사용하여 염화 금을 환원시킴으로써 제조된다. 형성된 나노스타의 크기는 염화 금 농도에 의해 결정된다. 이러한 방법에 의해 제조된 금 나노스타는 원심 분리에 의해 정제되고, 2~8°C에서 물에 저장될 수 있다.
- [0079] 본 출원에서 제공된 방법을 사용하는 나노물질의 형성은 본질적으로 수분내에 완료되지만 밤새 평형에 도달하도록 허용될 수 있다. 나노입자의 합성은 분광법에 의해 모니터링될 수 있으며, 주사 또는 투과 전자 현미경에 의해 확인될 수 있다.
- [0080] 일부 실시형태에서, 크기 및 이로 인한 광학 특성은 계면활성제 또는 캡핑제, 아스코르브산, 시트르산 삼나트륨, 염화 금 및/또는 질산 은의 농도를 변경함으로써 변화될 수 있다. 합성된 나노스타의 크기는 은 함량이 특정 지점까지 증가함에 따라 증가하고, 이어서 감소한다. 이러한 변화는, 은/금 비율이 증가함에 따라 피크가 적색 시프트이지만 이어서 금:은::5:2의 몰비에서 청색 시프트를 시작하기 때문에, 합성된 나노스타의 LSPR 피크에 반영되어 있다. 반응 혼합물 중 선택된 세제의 최종 농도는 더 작은 입자가 더 높은 농도의 세제에서 우세함에 따라 0.05~5%에서 달라질 수 있다. 아스코르브산의 농도를 증가시키면, 아스코르브산의 최종 농도가 0.05 M에서 0.2 M까지 달라짐에 따라 더 작은 나노스타가 생성된다. 유사하게, 시트르산 삼나트륨의 농도를 10 mM에서 100 mM로 증가시키면, 나노스타 크기가 감소한다.

- [0081] 일부 실시형태에서, 금-은 나노합금은 CTAB (예를 들어, 알콜 중에 용해된 CTAB)를 염화 금 및 질산 은과 혼합함으로써 알칼리 환원 조건하에 합성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 나노합금 형성은 물, CTAB, 염화 금 (0.5 mM 내지 5 mM), 질산 은 (금의 20% 내지 80%), 아스코르브산 (10 mM 내지 200 mM), 또는 아스코르브산, 시트르산 삼나트륨 및 CHAPS를 함유하는 환원제, 및 NaOH (아스코르브산의 50% 내지 200%)를 순서대로 혼합함으로써 유도될 수 있다. 추가의 실시형태에서, 나노합금은 물 약 0.825 ml, 이소프로판올 중에서 제조된 20% CTAB 약 0.1 ml, 0.1 M 염화 금 약 0.025 ml, 0.1 M 질산 은 약 0.005~0.025 ml, 1 M 아스코르브산 약 0.05 ml 및 1 M NaOH 약 0.05 ml를 혼합함으로써 형성된다. CTAB의 농도는 더 낮은 농도가 더 높은 함량의 나노스타 합성에 유리함에 따라 0.05 M 내지 0.2 M에서 달라질 수 있다. 산성 pH는 나노로드의 형성에 유리하며, 더 높은 종횡비는 pH가 감소함에 따라 수득된다.
- [0082] 본 발명은 제한으로서 해석되지 말아야 하는 하기 추가의 실시예에 의해 추가로 설명된다. 당해 분야의 통상의 기술자들이라면, 본 개시 내용을 고려하여, 다수의 변화가 개시되는 특정 실시형태에 대해 이루어질 수 있으며, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고도 여전히 비슷하거나 유사한 결과를 수득할 수 있다는 것을 인식해야 한다.
- [0083] 본 개시 내용 전반에 걸쳐 참조된 모든 특허 및 비특허 문헌들은 그 전문이 모든 목적을 위해 본 출원에 참조로 포함된다.
- [0084] 실시예
- [0085] **실시예 1. 나노구조체에 컨쥬게이트화하기 위한 항체 클론의 적정**
- [0086] 복수의 스파이크를 갖는 나노구조체를 예시적인 항체에 컨쥬게이트화하기 위한 프로토콜을 확인하기 위한 연구를 수행하였다. 먼저, 최적 컨쥬게이트화에 필요한 항체의 양을 결정하기 위해 항-TSH 클론 C1을 나노구조체에 적정하기 위한 적정 실험을 수행하였다.
- [0087] Lambda950 분광 광도계에 놓인 1 ml 큐벳에 반응물을 설치하였다. 10 마이크로리터의 0.5 M 보레이트 (pH 9.2)에 의해 pH를 9.2로 조정된 후 1 ml의 나노구조체를 큐벳 내에 넣었다. 573.8 nm에서 $\lambda_{\text{최대}}$ 를 나타내는 스펙트럼을 기록하였다. 2 μ g의 항체의 연속적 첨가시 피크 시프트를 관찰함으로써 항체 C1의 결합을 결정하였다. 당량점은 OD 단위 당 약 6~8 마이크로그램의 항체에 도달하였다. 최종적으로, 비특이적 결합 현상을 차단하기 위해 10 마이크로리터의 20% BSA를 첨가하였다. 이로 인해 $\lambda_{\text{최대}}$ 에서 2 nm의 추가 시프트가 발생하였다. 그 결과는 도 2에 제공되어 있다.
- [0088] 유사하게, C6 (TSH의 상이한 에피토프에 특이적임)의 컨쥬게이트화에 필요한 항체의 양을 결정하기 위해 적정 실험을 수행하였다. C1 항체에 관하여, Lambda950 분광 광도계에 놓인 1 ml 큐벳에 반응물을 설치하였다. 10 마이크로리터의 0.5 M 보레이트 (pH 9.2)에 의해 pH를 9.2로 조정된 후 복수의 스파이크를 갖는 나노구조체 1 ml를 큐벳 내에 넣었다. 573.7 nm에서 $\lambda_{\text{최대}}$ ($\lambda_{\text{최대}}$)를 나타내는 스펙트럼을 기록하였다. 2 μ g의 항체의 연속적 첨가시 피크 시프트를 관찰함으로써 항체 C6의 결합을 결정하였다. 당량점은 OD 단위 당 약 6 마이크로그램의 항체에 도달하였다. 최종적으로, 10 마이크로리터의 20% BSA를 첨가하였다. 이로 인해 $\lambda_{\text{최대}}$ 에서 1.4 nm의 추가 시프트가 발생하였다. 그 결과는 도 3에 제공되어 있다.
- [0089] 다음으로, 컨쥬게이트화의 확장성을 결정하기 위해, 나노구조체에 대한 C1 및 C6 항체의 대규모 (100 ml) 컨쥬게이트화를 수행하였다. 그 결과는 도 4에 제공되어 있다. 본 제조에서, 신속하게 교반하면서 pH 9.2로 사전 조정된 100 ml의 나노구조체 용액을 각각 함유하는 2개의 용기에 약 0.5 mg의 C1 및 C6을 개별적으로 첨가하였다. 이렇게 생성된 컨쥬게이트 용액을 BSA에 의한 차단 전후에 항체 결합에 대해 시험하였다. 0.5 mg/ml의 단백질 A로 스트리핑된 스트립을, 포스페이트 완충된 BSA 및 트윈 용액으로 희석된 컨쥬 게이트 용액에 침지시켰다. 생성된 라인 (1 및 6)은 C1 또는 C6이 나노구조체에 결합하고 이들 항체가 BSA 차단 (1B 및 6B) 후에 결합된 상태를 유지하였다는 것을 나타냈다.
- [0090] C1 및 C6 컨쥬게이트를 원심 분리에 의해 회수하고, 컨쥬게이트 회석액으로 1회 세척하고, 다시 원심 분리하였다. 컨쥬게이트를 함유하는 침전물은 PBS/BSA/CHAPS를 함유하는 컨쥬게이트 저장 용액 중에 용이하게 용해되었다. 최종 컨쥬게이트의 회석액을 물 중에서 제조하고 비교하였다. 원래의 비컨쥬게이트된 나노구조체는 차단된 컨쥬게이트에서 585~586 nm로 적색-시프트된 573.8 nm에서 피크를 나타냈다. 시프트는 도 5에 도시되어 있다. 최종 컨쥬게이트 용액은 사용할 때까지 2~8°C에서 저장될 수 있다.

[0091] **실시예 2. 흡착성 컨쥬게이트화 프로토콜을 통한 항체에 대한 나노구조체의 컨쥬게이트화**

[0092] 나노구조체 컨쥬게이트를 생성하기 위해, 복수의 돌출부 및 50 nm의 평균 직경을 갖는 나노구조체 (575 nm에서 $\lambda_{\text{최대}}$ - 1.0 OD/mL)를 0.1 M 보레이트에 의해 pH 8.8로 조정하였다. C1 또는 C6 항체 (나노구조체 OD 당 약 33 피코몰)를 적정하고 15분 동안 잘 혼합하였다. 2 mg/ml의 BSA를 첨가하고 15분 동안 추가로 혼합하였다. 나노구조체/C1 또는 나노구조체/C6 혼합물을 15,000g에서 10분 동안 원심 분리하고, 상청액을 제거하고, PBS/BSA 및 CHAPS를 포함하는 컨쥬게이트 희석액 CG-1P 중에 컨쥬게이트를 재현탁시켰다. CHAPS는 소수성인 C6 항체의 재현탁에 특히 중요하였다. 더욱이, CHAPS 세제는 응집을 초래하는 비특이적 크기/형상 변화를 방지하는데 도움을 주었다.

[0093] 도 6은 (i) 컨쥬게이트화 전 50 nm의 나노구조체; (ii) C1 항체에 컨쥬게이트된 50 nm의 나노구조체; (iii) C6 항체에 컨쥬게이트된 50 nm의 나노구조체; (iv) BSA에 의한 차단 후 C1-컨쥬게이트된 나노구조체; 및 (v) BSA에 의한 차단 후 C6-컨쥬게이트된 나노구조체의, 흡착성 컨쥬게이트화 프로토콜을 사용하여 생성된 나노구조체 컨쥬게이트에 대한 스펙트럼 시프트를 도시한 것이다. 본 연구는 항체 결합이 4-5 nm의 적색-시프트를 초래하였고, 1 nm의 추가 시프트가 BSA에 의한 컨쥬게이트의 차단시 유도되었다는 것을 보여준다.

[0094] 항체 분자가 나노구조체에 결합되었다는 것을 확인하기 위해, 단백질 A (0.5 mg/mL)로 스트리핑된 측면 유동 스트림을, 컨쥬게이트된 나노구조체 또는 BSA로 차단된 컨쥬게이트된 나노구조체를 함유하는 용액 중에 침지하였다. 도 7은 컨쥬게이트가 형성되었고 BSA 차단이 컨쥬게이트를 파괴하지 않았다는 것을 도시한 것이다.

[0095] **실시예 3. 티올-매개성 컨쥬게이트화 프로토콜을 통한 항체에 대한 나노구조체의 컨쥬게이트화**

[0096] 티올-매개성 컨쥬게이트화 프로토콜을 사용하여 나노구조체 컨쥬게이트를 생성하기 위해, 복수의 돌출부 및 50 nm의 평균 직경을 갖는 나노구조체 (575 nm에서 $\lambda_{\text{최대}}$ - 1.0 OD/mL)를 0.1 M 보레이트에 의해 pH 8.8로 조정하였다. TCEP-감소된 C1 또는 C6 항체 (나노구조체 OD 당 약 33 피코몰)를 적정하고 15분 동안 잘 혼합하였다. 2 mg/ml의 BSA를 첨가하고 15분 동안 추가로 혼합하였다. 나노구조체/C1 또는 나노구조체/C6 혼합물을 15,000g에서 10분 동안 원심 분리하고, 상청액을 제거하고, PBS/BSA 및 CHAPS를 포함하는 컨쥬게이트 희석액 CG-1P 중에 컨쥬게이트를 재현탁시켰다. CHAPS는 소수성인 C6 항체의 재현탁에 특히 중요하였다. 더욱이, CHAPS 세제는 응집을 초래하는 비특이적 크기/형상 변화를 방지하는데 도움을 주었다.

[0097] 도 8은 (i) 컨쥬게이트화 전 50 nm의 나노구조체; (ii) C1 항체에 컨쥬게이트된 50 nm의 나노구조체; (iii) C6 항체에 컨쥬게이트된 50 nm의 나노구조체; (iv) BSA에 의한 차단 후 C1-컨쥬게이트된 나노구조체; 및 (v) BSA에 의한 차단 후 C6-컨쥬게이트된 나노구조체의, 티올-매개성 컨쥬게이트화 프로토콜을 사용하여 생성된 나노구조체 컨쥬게이트에 대한 스펙트럼 시프트를 도시한 것이다. 본 연구는 항체 결합이 4-5 nm의 적색-시프트를 초래하였고, 1 nm의 추가 시프트가 BSA에 의한 컨쥬게이트의 차단시 유도되었다는 것을 보여준다.

[0098] 항체 분자가 나노구조체에 결합되었다는 것을 확인하기 위해, 단백질 A (0.5 mg/mL)로 스트리핑된 측면 유동 스트림을, 컨쥬게이트된 나노구조체 또는 BSA로 차단된 컨쥬게이트된 나노구조체를 함유하는 용액 중에 침지하였다. 도 9는 컨쥬게이트가 형성되었고 BSA 차단이 컨쥬게이트를 파괴하지 않았다는 것을 도시한 것이다.

[0099] **실시예 4. 항체-컨쥬게이트된 나노구조체를 사용하는 민감성 항원 검출**

[0100] 항체의 존재를 검출하는 컨쥬게이트의 능력을 시험하였다. TSH의 부재 및 존재하의 C1 및 C6 흡착성 컨쥬게이트의 복합 $\lambda_{\text{최대}}$ 의 변화. 항-TSH 클론 C1 및 C6은 Arista Biologicals에서 구입하였다. 이들 항체는 TSH의 베타 단편을 표적화한다. 50 nm의 나노구조체에 컨쥬게이트된 클론 C1 및 C6을 PBS/BSA 완충액 중에서 함께 혼합하고, 250초 동안 $\lambda_{\text{최대}}$ 의 변화에 대해 스캔하여 Nicoya™ lifesciences의 OpenSPR 분광 광도계 상에서 기준선을 수득하였다. 이어서, TSH를 5 ng/ml에 첨가하고, 450초 동안 $\lambda_{\text{최대}}$ 를 추가로 모니터링하였다. 도 10a는 50 nm의 나노구조체 및 흡착성 프로토콜을 사용하여 생성된 C1 및 C6 컨쥬게이트에 대한 복합 $\lambda_{\text{최대}}$ 의 변화를 도시한 것이다. 도 10b는 50 nm의 나노구조체 및 티올-매개성 컨쥬게이트화 프로토콜을 사용하여 생성된 C1 및 C6 컨쥬게이트에 대한 복합 $\lambda_{\text{최대}}$ 의 변화를 도시한 것이다.

[0101] 다음으로, 흡착성 및 티올-매개성 프로토콜에 의해 제조된 컨쥬게이트의 스펙트럼 시프트에 대한 촉진제의 존재의 효과를 평가하였다. 연구 결과는 상이한 농도의 촉진제가 흡착 프로토콜 컨쥬게이트 대 티올-매개성 공유 결합 컨쥬게이트에서 상이한 반응을 제공한다는 것을 보여주었다. 예를 들어, 저분자량 및 저농도의 PEG는 흡

작성 대 공유 결합된 컨쥬게이트에서 유사한 반응을 나타냈다 (도 11).

[0102] 도 12는 0.1% PEG 및 0.5% 메틸셀룰로오스의 존재하에 공유결합된 컨쥬게이트를 사용하여 증가하는 양의 항원 (TSH)의 존재하에 시간에 따른 용량-반응 곡선 및 동력학을 도시한 것이다. 도 12는 0.1% 폴리에틸렌 글리콜 및 0.5% 메틸셀룰로오스의 존재하에 항-TSH C1 및 C6의 공유 결합된 컨쥬게이트의 피크 시프트 용량 반응을 도시한 것이다.

[0103] 다음으로, 사용된 컨쥬게이트 (예를 들어, C1-나노구조체 및 C6-나노구조체)의 비율에 대한 효과를 결정하기 위한 연구를 수행하였다. 도 13은 C1 또는 C6 단독 또는 다양한 비율의 이들 두 항체로부터 수득된 결과를 도시한 것이다. 0.25 ng의 hTSH의 부재 (0 ng) 또는 존재하에 반응 곡선을 수득하였다. 이러한 특정 검정에서, 클론 C1은 본질적으로 그 자체로 비반응성이지만, C6이 도입되면 상당한 기여를 하였다. 특정 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 일부 실시형태에서의 검정은 3D 나노입자 앙상블의 형성에 의존하며, 이온 강도, pH 및 세제의 적절한 변화는 민감성에서 향상을 추가로 제공할 수 있다.

[0104] 또 다른 연구에서, 2종의 컨쥬게이트 (15 μ l의 C1 및 25 μ l의 C6)를, 0~2 ng의 TSH를 함유하는 PBS/BSA/PEG 8K 용액과 혼합하였다. 반응 혼합물 중 PEG의 최종 농도는 0.5% (도 14a) 또는 1.0% (도 14b)이었다. Nicoya의 OpenSPR™ 분광 광도계를 사용하여 측정되는 $\lambda_{\text{최대}}$ 의 변화를 기록하기 위한 일회용 큐벳에 반응 혼합물의 성분들 (0.8 ml)을 넣었다. 이어서, 회귀 분석을 사용하여 본 실험에서 수득된 곡선을 적합화하였다. 회귀 분석으로부터 $\lambda_{\text{최대}}$ 변화를 10분 동안 계산하고, 도 14a 및 14b에 도시된 바와 같이 곡선을 생성하도록 플롯팅하였다. PEG 농도가 0.5% (도 14a)에서 1% (도 14b)로 증가하면, 민감성은 거의 2배 증가하였다.

[0105] **실시예 5. 복수의 스파이크 및 70 또는 90 nm의 평균 직경을 갖는 더 큰 나노구조체**

[0106] 복수의 스파이크 및 70 또는 90 nm (스�파이크 포함)의 평균 직경을 갖는 나노구조체를 사용하여 컨쥬게이트화 및 검출을 시험하였다. 도 15a (상단 패널)는 70 및 90 nm 나노구조체에 대한 항-hTSH 항체 C1 및 C6의 컨쥬게이트화 및 단백질 A 측면 유동 스트립에 의한 이들의 재활성을 도시한 것이다. 도 15b (하단 패널)는 단백질 A가 BSA에 의한 차단 전후에 예상대로 반응한 니트로셀룰로오스 상에서 늘어서 있는 것을 도시한 것이다. 비컨쥬게이트된 70 및 90 nm 나노구조체는 각각 609.5 및 641.9의 $\lambda_{\text{최대}}$ 를 나타냈다. C1 및 C6의 부착 후 BSA에 의한 차단은 $\lambda_{\text{최대}}$ 의 8 nm 시프트를 초래하였다. 하기 표는 도 15a로부터 정량화된 데이터를 나타낸다.

[0107] [표 1]

[0108] **BSA 차단의 존재 또는 부재하의 70 및 90nm C1 및 C6 컨쥬게이트의 $\lambda_{\text{최대}}$**

	nm	커서
70nm 비컨쥬게이트된	609.5	1.034
70-C1 컨쥬게이트	614.3	1.05
70nm 비컨쥬게이트된	609.6	1.034
70-C6 컨쥬게이트	615.1	1.057
90nm 비컨쥬게이트된	641.9	1.063
90-C1 컨쥬게이트	647.3	1.055
90nm 비컨쥬게이트된	641.9	1.041
90-C6 컨쥬게이트	647.6	1.068
70-C1-BSA	617	1.074
70-C6-BSA	617.7	1.089
90-C1-BSA	650.2	1.131
90-C6-BSA	650.1	1.107

[0109]

[0110] 상이한 직경의 나노구조체들 사이의 민감성을 비교하였다. 약 70 nm 직경의 나노구조체를 포함하는 컨쥬게이트의 스펙트럼 시프트는 약 90 nm의 직경을 갖는 컨쥬게이트의 스펙트럼 시프트와 비교하여 개선되었다. 놀랍게도, 나노구조체의 직경을 약 90 nm로 추가로 증가시키면 민감성은 추가로 증가하였는데, 이는 직경이 90 nm로 증가함에 따라 15 nm 초과인 순 스펙트럼 시프트를 생성할 수 있는 나노구조체-컨쥬게이트가 생성되었기 때문이

다 (도 16 및 도 17). 종합해 보면, 본 연구는 복수의 스파이크를 갖는 나노구조체의 직경의 증가가 검출 민감성을 증가시켰다는 것을 보여주었다. 또한, PEG의 증가는 특정 PEG 농도까지 민감성을 향상시키지만, 매우 높은 농도는 비생산적인 것으로 관찰되었다.

[0111] **실시예 6. 용액-기반 검정에서 복수의 돌출부를 갖는 나노구조체 대 나노로드의 활성**

[0112] 동일한 항체를 포함하는 나노로드 컨쥬게이트와 복수의 돌출부를 포함하는 본 출원에서 제공된 나노구조체 컨쥬게이트의 검출 민감성을 비교하기 위한 연구를 수행하였다.

[0113] Nanocomposix로부터 나노로드 (길이 45.5 ± 6.3 nm 및 너비 17.4 ± 1.2 nm)를 수득하고, 흡착성 컨쥬게이트화 프로토콜을 통해 항체 클론 1 및 6에 컨쥬게이트화하였다. 복수의 돌출부를 포함하는 50 nm의 나노구조체는 또한 상기에서 기재된 바와 같은 보레이트 완충액 (pH 9.2)에서의 수동 흡착을 사용하여 항체 클론 1 및 6에 컨쥬게이트화하였다. 연구 결과는 도 18에 제공되어 있다. TSH를 검출하는 나노로드 컨쥬게이트의 능력은 10 ng의 TSH의 첨가 유무에 따라 PBS, BSA 및 1% PEG 20000을 포함하는 완충액에서 시험하였다. 도 18은 TSH가 없는 것으로부터 TSH에 의해 수득된 값을 빼서 계산된 $\lambda_{\text{최대}}$ 의 순 변화가 없었다는 것을 보여주며, $\lambda_{\text{최대}}$ 변화는 Nicoya Lifesciences의 OpenSPR™을 사용하여 기록되었다. 다수의 돌출부를 갖는 나노구조체를 유사하게 시험하였지만, 10 ng/ml의 TSH 농도에서는 속도가 너무 빠르기 때문에, TSH의 양은 0.5 ng이었다. 놀랍게도, 복수의 돌출부를 포함하는 나노구조체는 피크 시프트 분석에 의해 측정될 때 강력한 TSH 검출을 나타낸 반면, 나노로드는 TSH를 검출하지 못하였다. 이러한 결과는 적어도 나노로드가 굴절률 변화의 탁월한 센서인 것으로 여겨졌기 때문에 예상치 못한 것이었다. 그러나, 본 용액-기반 검정에서, 나노로드가 아니라 복수의 돌출부를 갖는 나노구조체는 우수한 효과를 나타낸다.

[0114] **실시예 7. 낮은 pH 컨쥬게이션화 프로토콜은 민감성 검출을 나타내는 컨쥬게이트를 생성한다.**

[0115] 더 낮은 pH에서 항체에 컨쥬게이트된 복수의 돌출부를 포함하는 나노구조체를 사용하여 형성된 컨쥬게이트의 능력을 평가하기 위한 연구를 수행하였다.

[0116] 단일 용기 씨드 무함유 방법에 의해 제조된 금 나노스타에 항-TSH 항체 클론 C1 및 C6을 컨쥬게이트화하였다. 나노스타를 증류수에 의해 OD = 1로 희석하였다. pH는 대략 6.0이었다. 나노스타 용액에 클론 1 및 6을 개별적으로 첨가하여 나노스타 용액의 OD 당 5 μ g의 항체를 수득하였다. 인큐베이션 15분 후, 컨쥬게이트의 ml 당 2 mg의 BSA로 컨쥬게이트를 차단하였다. 이어서, 25000g에서 15분 동안 원심 분리하여 컨쥬게이트를 반응물로부터 분리하였다. 10 mM 포스페이트 완충된 BSA (1%)를 첨가하여 펠렛이 느슨해지면, 원심 분리를 반복할 수 있다. 최종 침전물은 다음의 CHAPS 함유 완충액에 용해된다: PBS(1x), BSA (1%) 및 CHAPS (2%). 30초 이하 동안 초음파 처리하여 용해를 보조한다.

[0117] TSH를 검출하는 이들 컨쥬게이트의 능력은, PBS/BSA (PBS 중의 1% BSA)를 함유하는 최종 C1 (3 부) 및 C6 (1 부) 컨쥬게이트를 약 0.5의 OD로 희석하고, OpenSPR™ 분광 광도계 상에서 1 ng/ml TSH의 존재 또는 부재하에 시간에 따라 피크 시프트를 기록함으로써, 시험하였다. 그 결과는 반응 시간에 대해 플롯팅된 순 시프트 (이러한 순 시프트는 1 ng/ml의 TSH에 기인하는 것으로부터 임의의 TSH의 부재하에 나타나는 시프트를 빼서 계산된다)를 나타내는 도 19에 도시되어 있다. 본 연구는 컨쥬게이트가 강력한 검출 활성을 나타낸다는 것을 나타냈다.

[0118] **실시예 8. 혈청 단백질의 비특이적 흡착의 동시 감소 및 면역 검정 민감성의 증가**

[0119] Biolipidure® 시약은, 포스포릴콜린 (phosphorylcholine: PC) 극성기와, 소수성, 음이온성, 양이온성 및/또는 수소 결합 공여기를 포함하는 중합체 꼬리를 포함하는 합성 중합체 시약이다 (도 20). 이들 시약은 또한 비특이적 단백질 흡착, 세포 유착 및 혈액 응고에 저항하는 이의 특성으로 인해 중합체성 생체 재료에 혼입된 2-메타크릴로일옥시에틸 포스포릴콜린 중합체 (MPC)로도 공지되어 있다. 이들 시약의 일부 특징은 민감성 및 정확성의 증진, 비특이적 흡착의 억제, 항체 및 효소의 안정화, 생물학적 유해 물질 취급의 번거로움이 없는 로트간 변화의 감소를 포함한다.

[0120] 많은 적용의 경우, 제품의 목적하는 결과를 달성하기 위해 Biolipidure® 시약을 최종 작업 용액에 첨가한다. 면역 검정에서 비특이적 흡착을 방지하기 위해, 마이크로플레이트 코팅, 자성 비드 코팅에 의해, 용액 중에 존재하는 항체에 Biolipidure® 시약을 첨가하여 적용할 수 있다. 일부 실시형태에서, Biolipidure® 시약을 사용하여, 1 wt %의 Biolipidure® 시약을 함유하는 완충 용액을 제조하고, 완충액 중에 샘플 (예를 들어, 점막)을 용해시키고, 면역 크로마토그래프의 샘플 패드 상에 희석된 샘플을 부하할 수 있다.

- [0121] 놀랍게도, 수동 IgG 흡착의 차단 단계 동안 금 나노입자의 표면에 첨가될 때, Biolipidure® 시약은 혈청 단백질의 비특이적 흡착을 감소시키고 검정의 민감성을 증진시킬 수 있다. 간단히 말하자면, 금 나노구체를 마우스 IgG로 15분 동안 코팅한 후, Biolipidure® 차단제 205, 206, 1002, 1003, 1201, 1202, 또는 BSA 중 1종으로 15분 동안 코팅하였다. 항체-금 컨쥬게이트를 3회 세척하고, 시험 전에 저장용 컨쥬게이트 희석액 중에 현탁시켰다. BSA 컨쥬게이트와 비교하여 항원에 대한 Biolipidure® 컨쥬게이트의 민감성을 시험하기 위해, 컨쥬게이트를 완충액, 트리스 완충 식염수/소 혈청 알부민 (TBS BSA) 중에서 10분의 경과에 따라 500 pg/mL의 항원으로 시험하였다. 놀랍게도, 5/6의 Biolipidure® 차단된 컨쥬게이트는 표준 BSA 차단된 컨쥬게이트에 비해 2~3배 증진을 나타낸다. 그 결과는 도 21에 도시되어 있다.
- [0122] 보다 더 놀랍게도, 혈청 시료에서 비특이적 단백질 흡착에 대해 시험할 때, Biolipidure®에 의한 차단은 표준 BSA 컨쥬게이트와 비교하여 NSB를 감소시키는 능력을 나타낸다. 낮은/정상 TSH 수준을 갖는 것으로 증명된 동일한 개 혈청 샘플로 모든 Biolipidure® 컨쥬게이트를 시험하였다. 혈청 샘플을 TBS/BSA 중에 1/20으로 희석하고, 이의 파장 변화를 시간에 따라 모니터링하였다. Biolipidure® 시약 1003은, 도 22a에 도시된 바와 같이, 나노입자 컨쥬게이트에 대한 혈청의 첨가에 반응하여 10 nm의 큰 파장 시프트를 나타냈다. 이러한 시프트는 다른 모든 컨쥬게이트보다 약 3~4배 더 크기 때문에, 다른 모든 컨쥬게이트의 파장 시프트를 명확하게 관찰하기 위해 이러한 시프트를 제거하였다 (도 22b). 개 혈청의 첨가에 반응하는 10분의 시간 경과에 따른 BSA 차단된 IgG 컨쥬게이트의 파장 시프트는 약 3.5 nm이었다. Biolipidure® 컨쥬게이트 1202는 BSA 차단된 컨쥬게이트와 유사한 파장 시프트를 나타냈다. 205, 206, 1002 및 1201에 의해 차단된 컨쥬게이트 모두는 개 혈청의 존재하에 파장 시프트의 감소를 나타냈다.
- [0123] Biolipidure® 시약의 다양한 특성으로 인해, 이들은 개 혈청에 대해 상이한 반응을 나타내며, 샌드위치 면역검정의 민감성을 증진시킨다. Biolipidure® 시약 205, 206, 1002 및 1201 모두는 개 혈청에 의해 파장 시프트를 감소시키고 이러한 균일한 샌드위치 면역검정에서 항원에 반응하여 LSPR 시프트를 향상시키는 능력을 나타낸다. Biolipidure® 시약 1202는 항원에 대한 반응을 증진시킬 수 있었지만, 샘플에 대한 개 혈청의 첨가에 반응하는 파장 시프트는 BSA 컨쥬게이트의 것과 동등하였다.
- [0124] 항원 검출 민감성의 증가 및 개 혈청에 의한 비특이적 파장 시프트의 감소는 구형 나노입자에 한정되지 않았다. Biolipidure® 시약을 IgG 컨쥬게이트의 표면에 첨가할 때, 항원에 대한 항체 컨쥬게이트의 민감성은 증가하였으며, 혈청의 첨가에 반응하는 파장 시프트는 BSA 차단된 컨쥬게이트와 비교하여 유의하게 감소하였다 (도 23). 50 pg/mL의 개 항원에 대해 20배 희석된 1 ng/mL의 항원에 대해, Biolipidure® 시약 1002, 2x로 차단된 90 nm의 나노성게형 (즉, 표면 상에 복수의 돌출부를 포함하는 이방성 나노입자) 컨쥬게이트의 현저한 반응 증가가 있었다 (도 24). 이러한 컨쥬게이트는 또한 Biolipidure® 1002로 차단된 구형 금 컨쥬게이트보다 훨씬 더 민감하다.
- [0125] 본 연구 결과는 검정에서 비특이적 결합을 감소시키면서 민감성을 증가시키는 놀라운 방법을 제공하였다. 금 나노입자-항체 수동 컨쥬 게이트화 절차 동안 BSA에서 일부 Biolipidure® 시약까지 차단제의 변경은 완충액 조건에서 항원에 대한 파장 시프트의 유의한 증가를 초래하였으며, 컨쥬게이트에 대한 혈청의 첨가에 반응하는 파장 시프트의 감소가 있었는데, 이는 혈청 성분으로부터의 비특이적 흡착의 감소 가능성을 나타낸다.
- [0126] **실시예 9. 염 조합 및 EDTA는 비특이적 결합을 감소시킨다.**
- [0127] LSPR 검정에서 비특이적 결합의 이유 및 비특이적 결합을 감소시키는 방안을 결정하기 위한 연구를 수행하였다. 비특이적 결합은 금 컨쥬게이트와 거대 혈청 단백질 사이의 정전기적 또는 소수성 상호 작용에 기인할 수 있다. 초기 연구는 NaCl에 중점을 두었다. 호프마이스터 이론에 기초하여, $MgCl_2$ 또는 $NaSCN$ 이 단백질 응집을 방지하는데 유리할 수 있는지를 결정하기 위한 실험을 수행하였다. 또한, 카오트로픽 (chaotropic) 염은 금 컨쥬게이트 콜로이드 안정성에 영향을 미칠 수 있다. 호프마이스터 시리즈 염의 개략도는 도 25에 제공되어 있다.
- [0128] 카오트로픽 염 $MgCl_2$ 를 사용한 초기 연구는 유망한 결과를 나타냈다. 염이 없으면, 정상 개 혈청 샘플은 유의한 비특이적 결합을 생성하였다. 50~100 mM $MgCl_2$ 의 경우, 비특이적 결합 신호는 대폭 감소하였다 (도 26). 5분 후의 LSPR 피크 시프트 결과는 하기 표 2에 나타나 있다. 비특이적 결합 및 5 ng/ml LSPR 신호는 $MgCl_2$ 의 존재에 의해 불균형적으로 감소하였다.
- [0129] [표 2]

[0130] $MgCl_2$ 의 존재 또는 부재하의 LSPR 피크 시프트

완충액	2.5 ng/ml	5 ng/ml	킬로	미스터
PBS-BSA	.	0.980	3.888	.
PBS-BSA 100 mM $MgCl_2$	.	0.552	0.285	.
PBS-BSA 50 mM $MgCl_2$	0.448	0.875	0.334	0.322
PBS-BSA REP2	.	1.035	3.070	.

[0131]

[0132] 또 다른 연구에서, 80 nm의 나노구체 cTSH 컨쥬게이트에 대한 다른 카오트로픽 염의 영향을 평가하였다. $MgCl_2$, NaCl 및 NaSCN을 시험하였다. $MgCl_2$ 와 NaSCN은 비특이적 결합의 감소를 나타냈다 (도 27). 5분 후의 LSPR 피크 시프트 결과는 도 28 및 하기 표 3에 제공되어 있다.

[0133] [표 3]

[0134] NaCl, $MgCl_2$ 또는 NaSCN하의 LSPR 피크 시프트

농도 mM	NaCl			$MgCl_2$			NaSCN		
	5ng/ml	킬로	S/B	5ng/ml	킬로	S/B	5ng/ml	킬로	S/B
0	0.940	4.085		0.940	4.085		0.940	4.085	
50	0.975	1.561	0.625	0.565	0.190	2.981	0.726	0.263	2.755
100	0.674	0.454	1.486	0.303	0.199	1.525	0.404	0.184	2.196
200	0.599	0.304	1.970	0.117	-0.010		0.172	0.168	1.021

[0135]

[0136] 또 다른 연구에서, LSPR에 기반한 개 TSH 검정에서 비특이적 결합에 대한 Mg (II)의 존재의 유리한 효과를 확인 하기 위해, 매우 낮은 풀링된 샘플 (< TBS 완충액 중의 cTSH 100 pg/ml) 및 높은 샘플 (TBS 완충액 중의 10 ng/ml)을 사용하였다. 0 mM $MgCl_2$ 의 존재하에, 매우 낮은 cTSH 샘플과 높은 cTSH 샘플의 파장 시프트는 동일하였다 (도 29, 좌측 상단 패널). $MgCl_2$ 의 농도가 증가함에 따라 (도 29의 우측 상단, 좌측 하단 및 우측 하단 패널에서 각각 1 mM, 10 mM 또는 100 mM), 매우 낮은 샘플의 파장 시프트는 감소하였다. 따라서, 본 연구는 Mg (II)가 100 mM에서 존재할 때 비특이적 결합을 실질적으로 감소시켰다는 것을 확인하였다 (도 29). LSPR 신호에 대한 Mg (II) 효과의 메커니즘을 이해하기 위해, EDTA (킬레이트화제)가 사용된 두 번째 실험을 수행하였다. 놀랍게도, EDTA는 Mg (II)와 유사한 효과를 나타냈다 (도 30). 보다 더 놀랍게도, EDTA와 Mg (II)는 함께 서로에 대해 대항하는 것으로 보이지 않았다. 이것은 EDTA가 Mg (II)를 킬레이트화하여 Mg (II)의 효과를 잃게 할 것으로 예상되기 때문에 특히 놀라운 것이었다. 따라서, 본 연구는 Mg (II)와, 임의로 다른 호프마이스터 시리즈 염과 EDTA 또는 에틸렌 글리콜-비스(β -아미노에틸 에테르)-N,N',N'-테트라아세트산 (EGTA)의 조합이 LSPR 기반 검정에서 비특이적 결합을 완전히 한다는 것을 부여주었다. 이러한 놀라운 결과는 표면 상에 복수의 돌출부를 포함하는 구형 나노구조체 또는 나노입자를 사용한 연구에서 달성되었다.

[0137] 개시된 발명은 기재된 특정 방법, 프로토콜 및 물질에 한정되지 않는데 이는 이들이 달라질 수 있기 때문인 것으로 이해된다. 본 출원에서 사용된 용어는 단지 특정한 실시형태들을 설명하기 위한 목적일 뿐이며, 첨부된 청구범위에 의해서만 한정되는 본 발명의 범위에 한정되도록 의도되는 것으로 또한 이해된다.

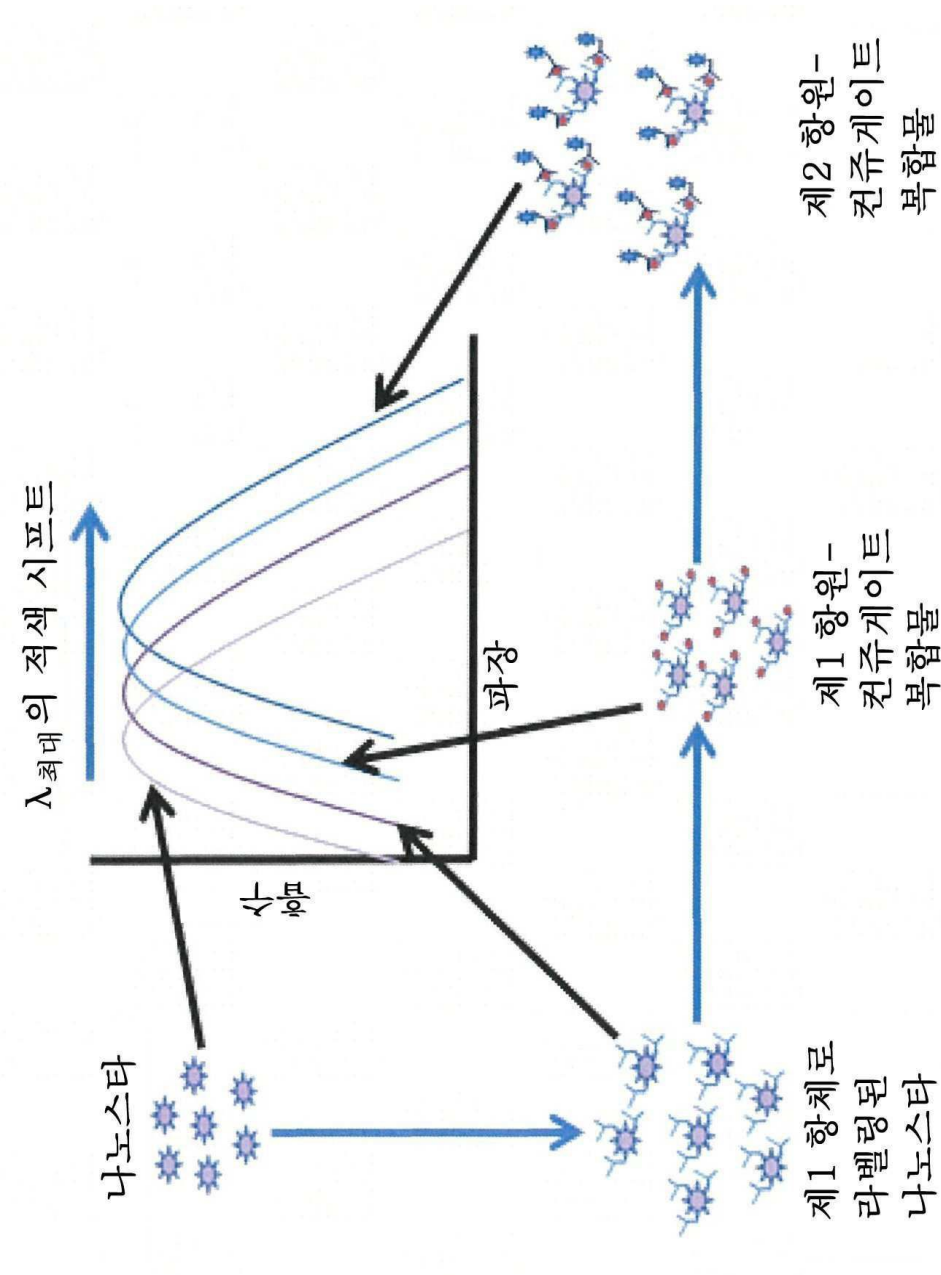
[0138] 당해 분야의 통상의 기술자라면 단지 본 출원에서 기재된 발명의 특정 실시형태에 대한 다수의 등가물 일상적인 실험,을 인식하거나, 이들을 사용하여 확인할 수 있다. 이러한 등가물은 하기 특허청구범위에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

[0139] 달리 정의되지 않는다면, 본 출원에서의 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상적인 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 출원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법들 및 물질들을 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용할 수 있지만, 바람직한 방법들, 장치들 및 재료들은 본 출원에 기재되어 있다. 인용된 모든 간행물들, 특허들 및 특허 공보들은 그 전문이 모든 목적을 위해 본 출원에 참조로 포함된다.

[0140] 본 출원에서 논의된 간행물들은 본 출원의 출원일 전에 이들의 개시를 위해서만 제공된다. 본 출원에서의 어떠한 것도 본 발명이 선행 발명에 의해 이러한 공개에 선행할 자격이 없다고 인정하는 것으로 해석해서는 안된다.

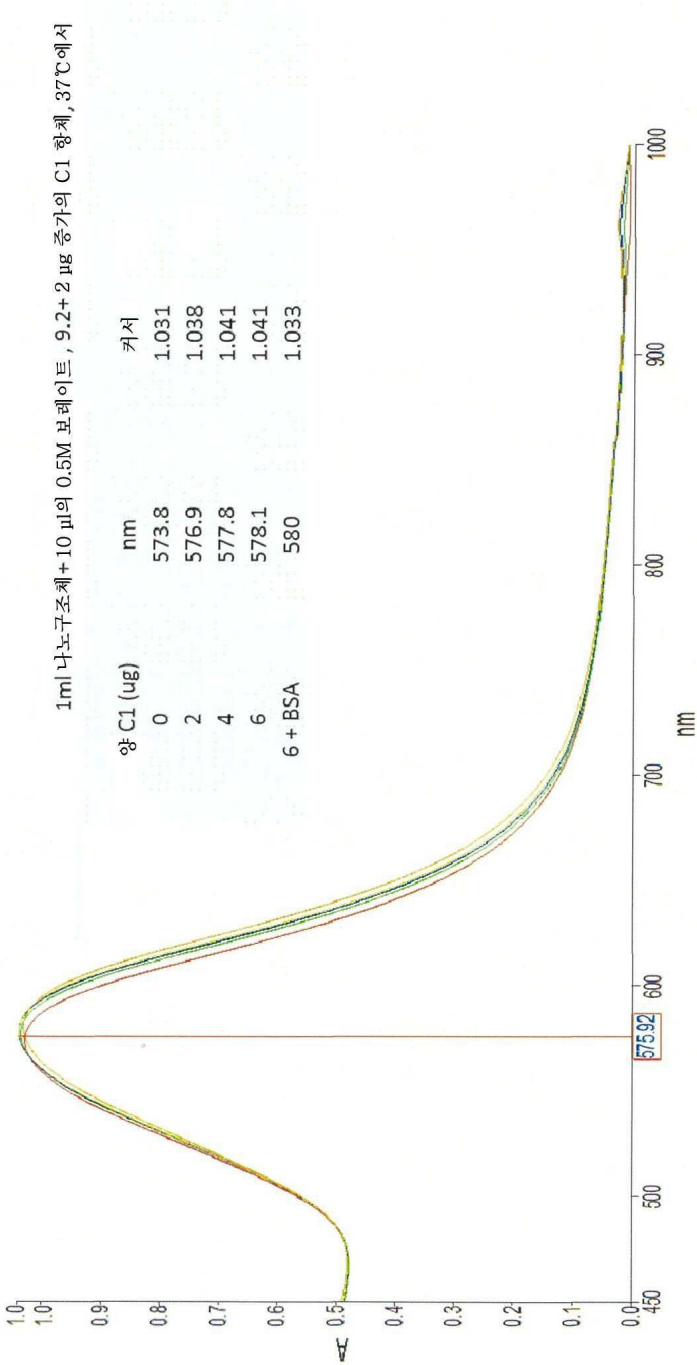
도면

도면1



도면2

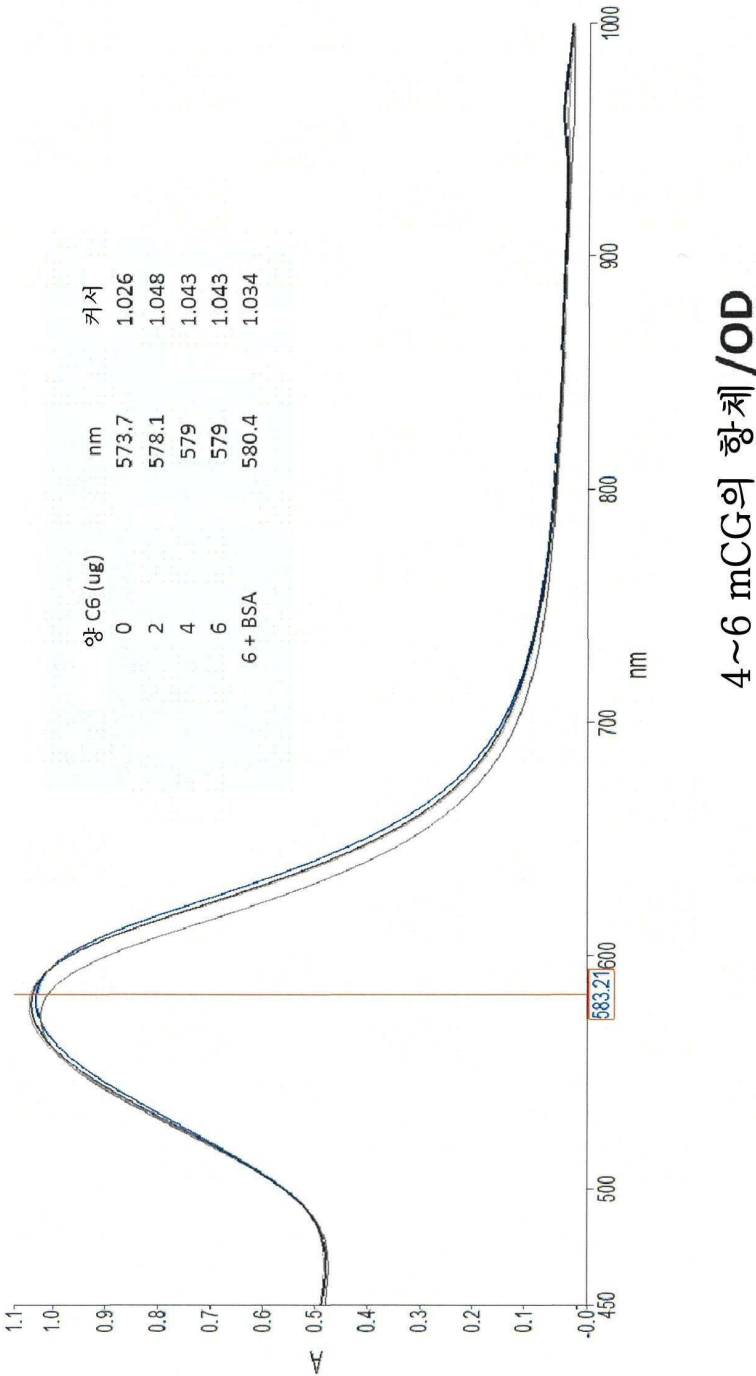
나노구조체에 대한 C1의 적정



4~6 mCG의 항체 /OD

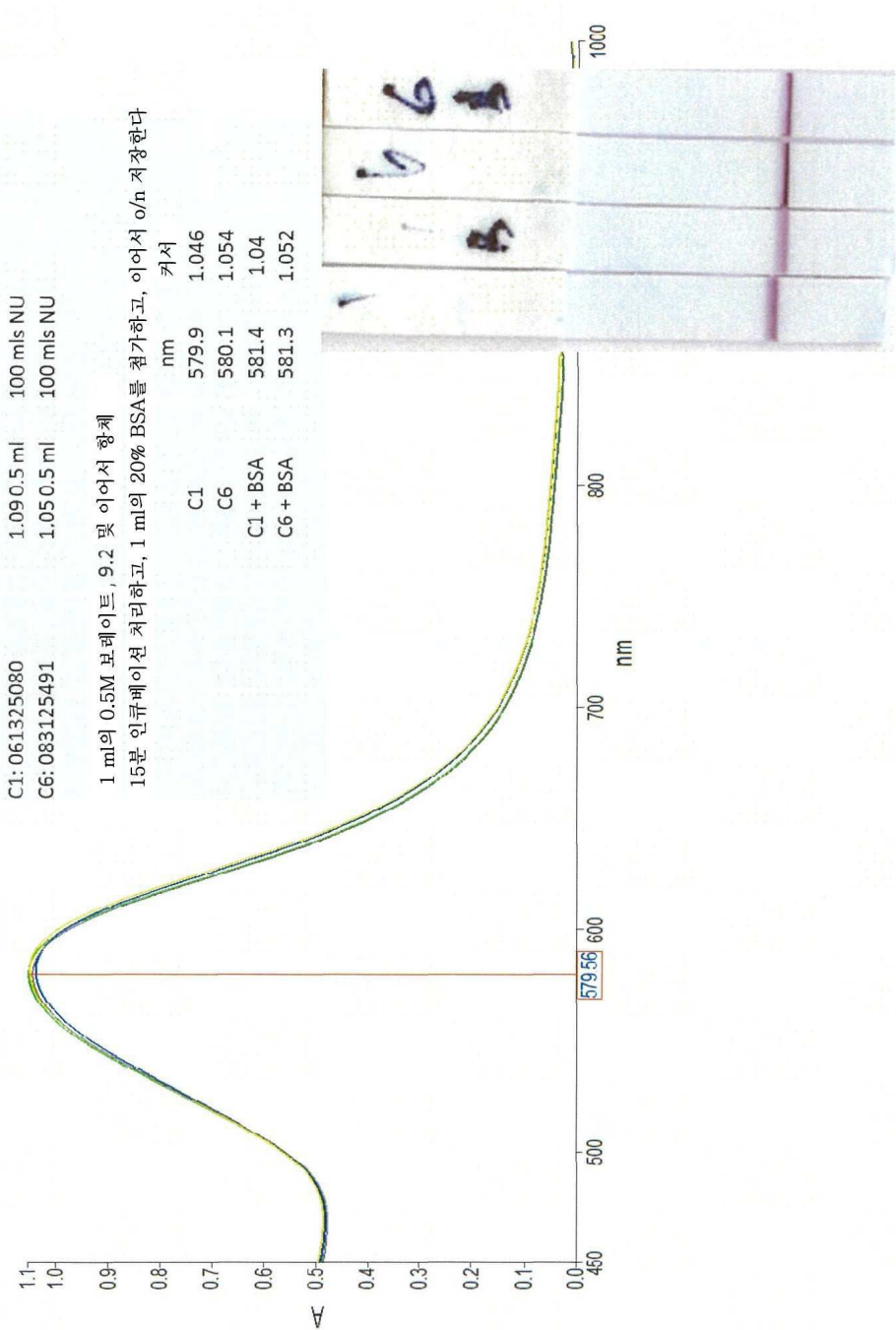
도면3

나노구조체에 대한 C6의 적정

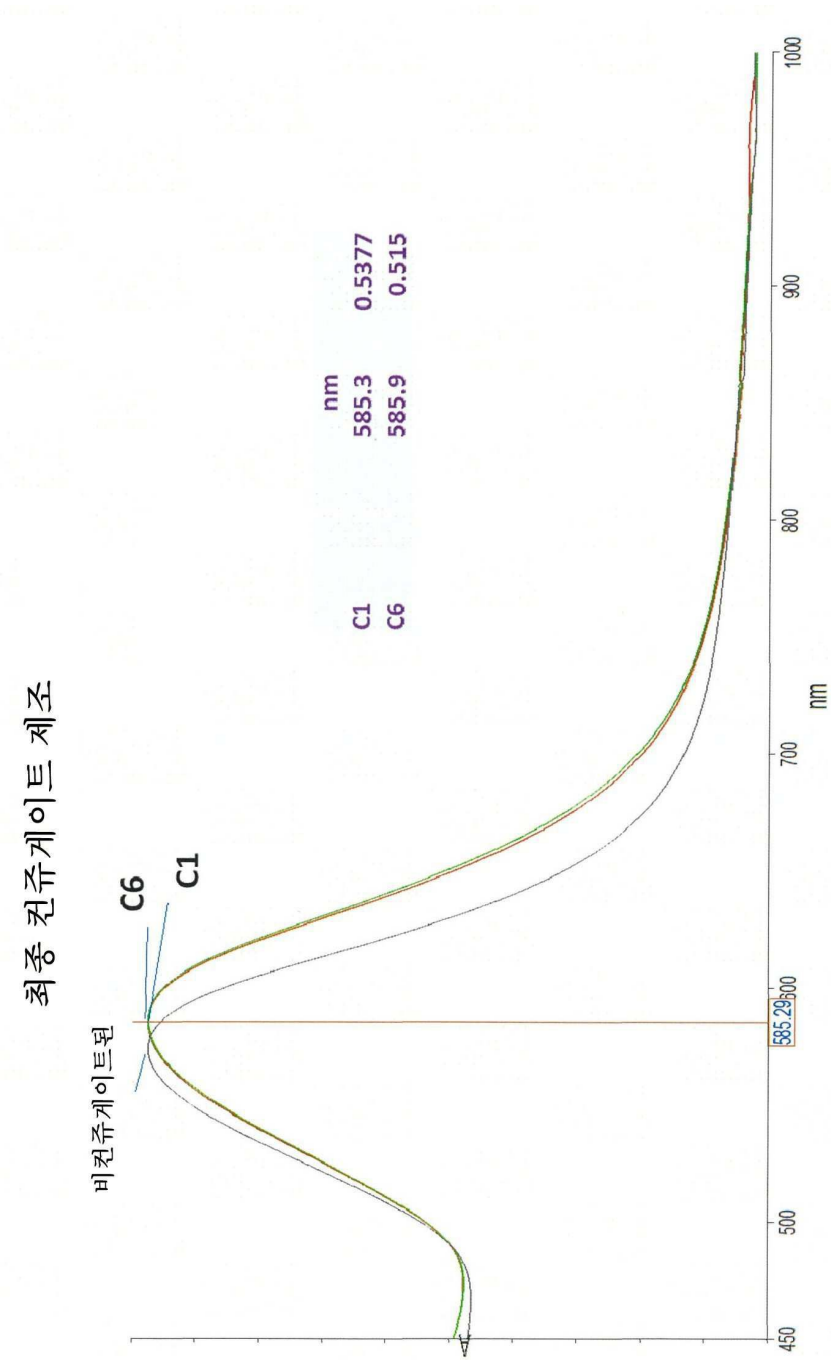


도면4

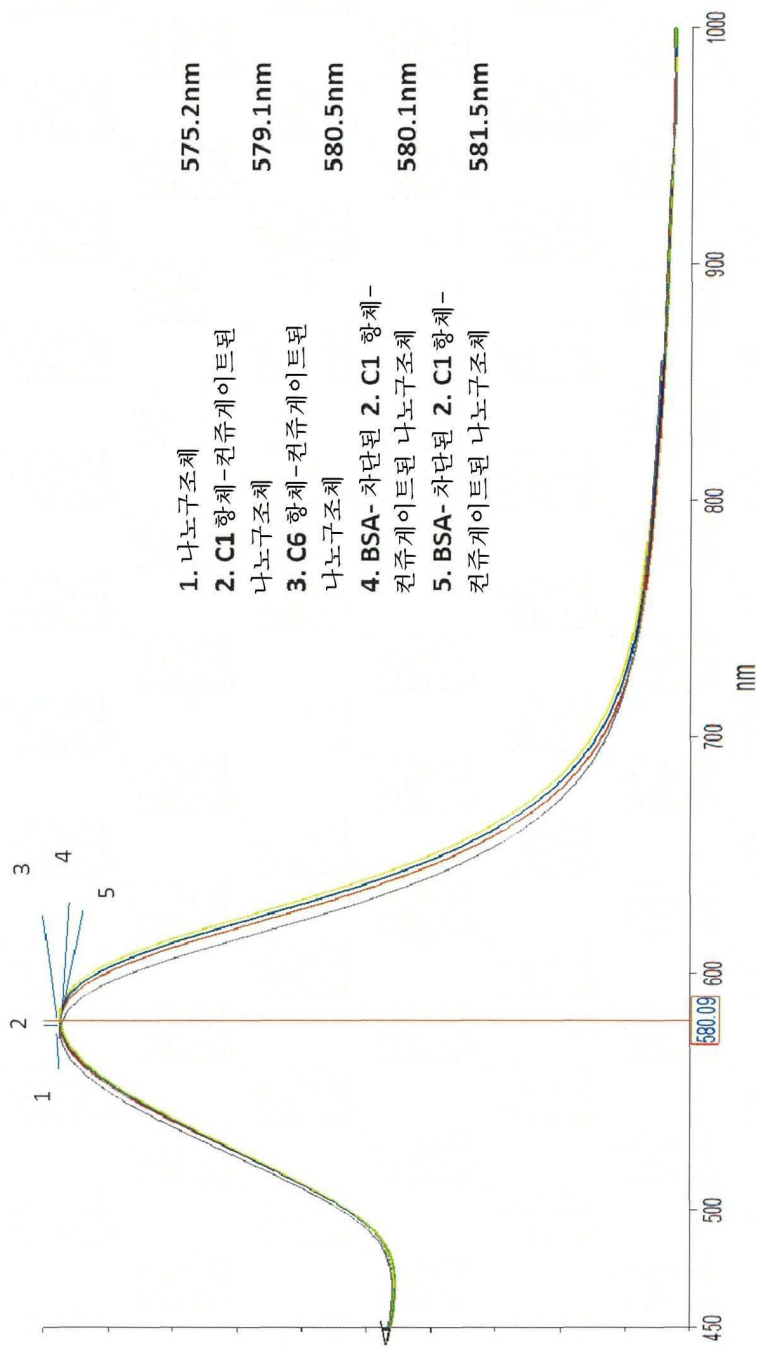
대규모 켈주게이트화



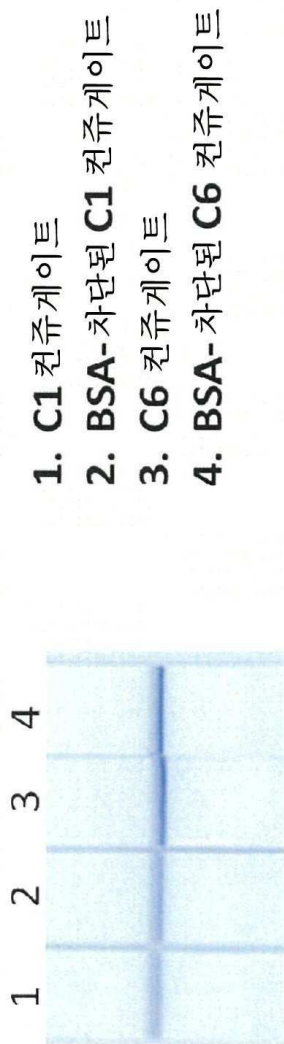
도면5



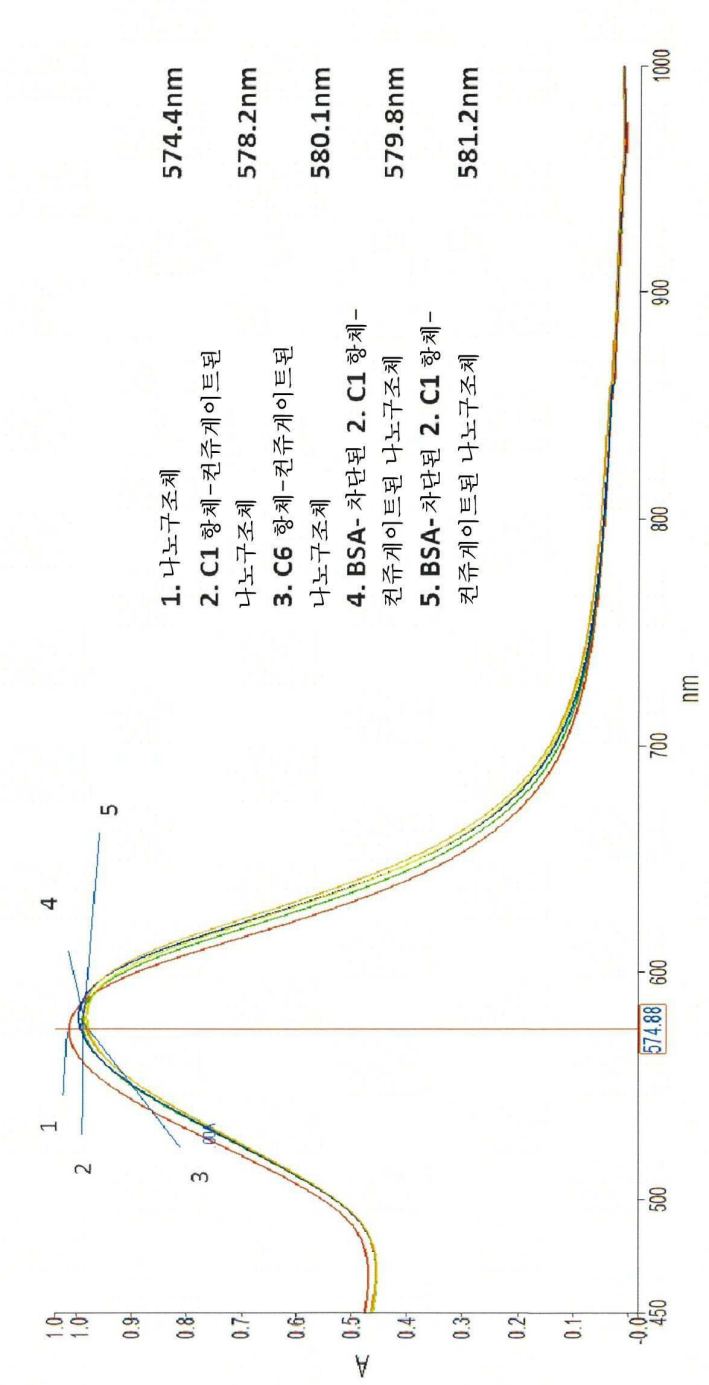
도면6



도면7

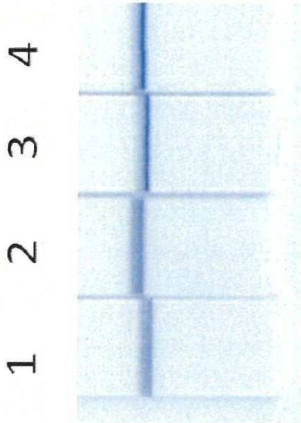


도면8

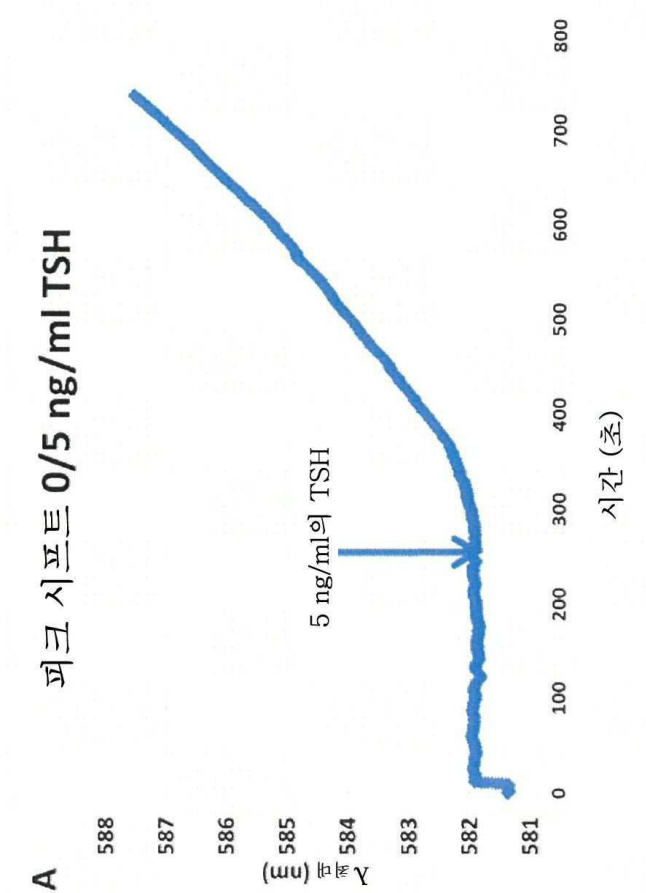


도면9

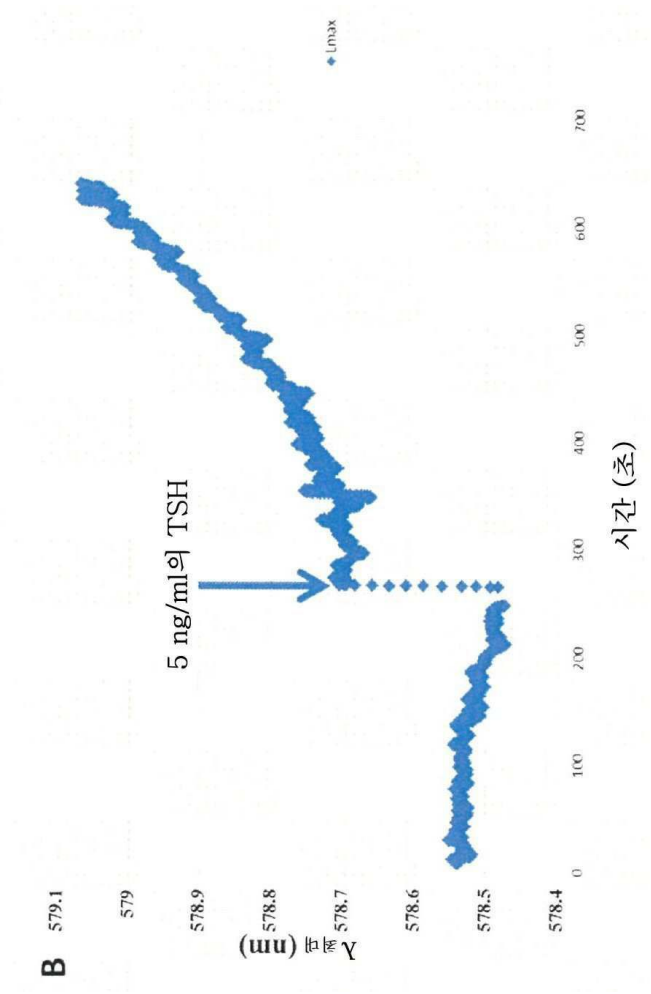
- 1. C1 컨쥬게이트
- 2. BSA- 차단된 C1 컨쥬게이트
- 3. C6 컨쥬게이트
- 4. BSA- 차단된 C6 컨쥬게이트



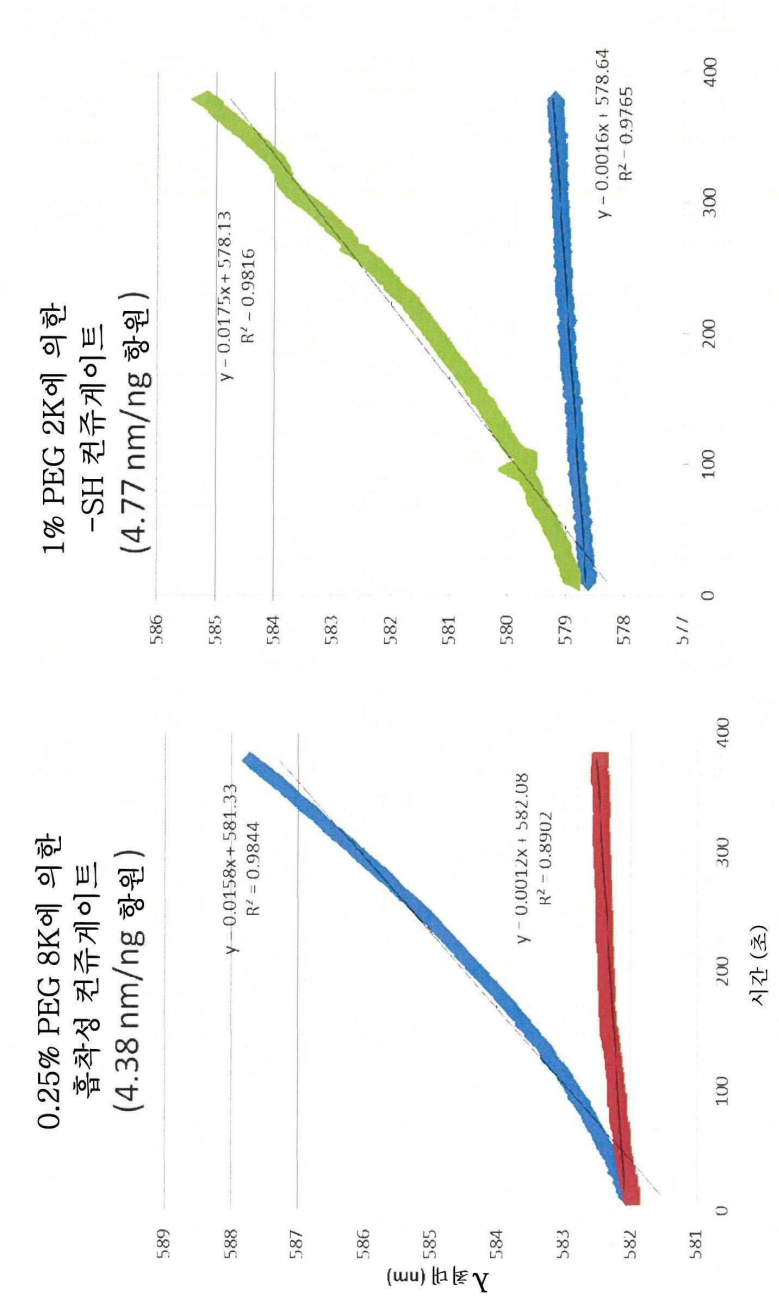
도면10a



도면10b

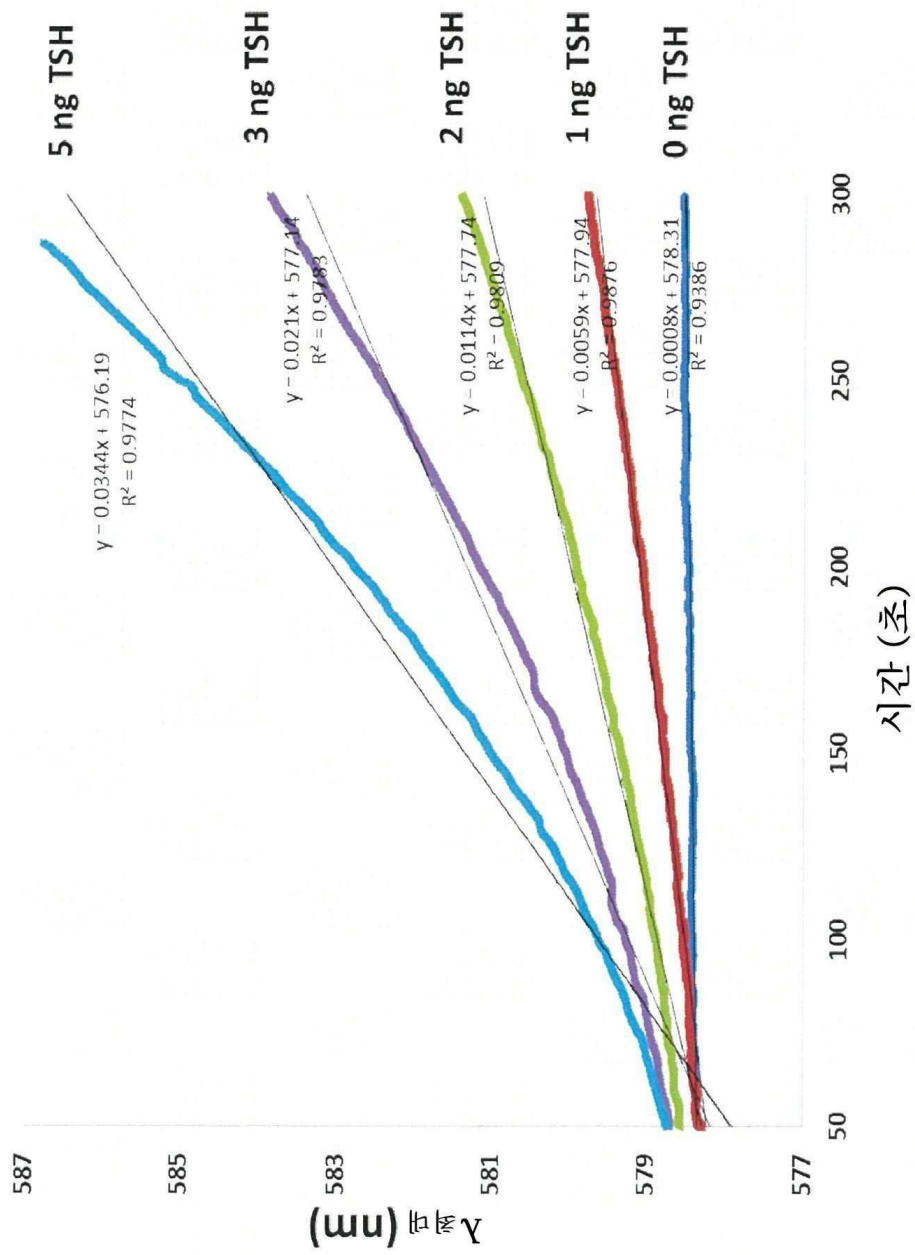


도면11

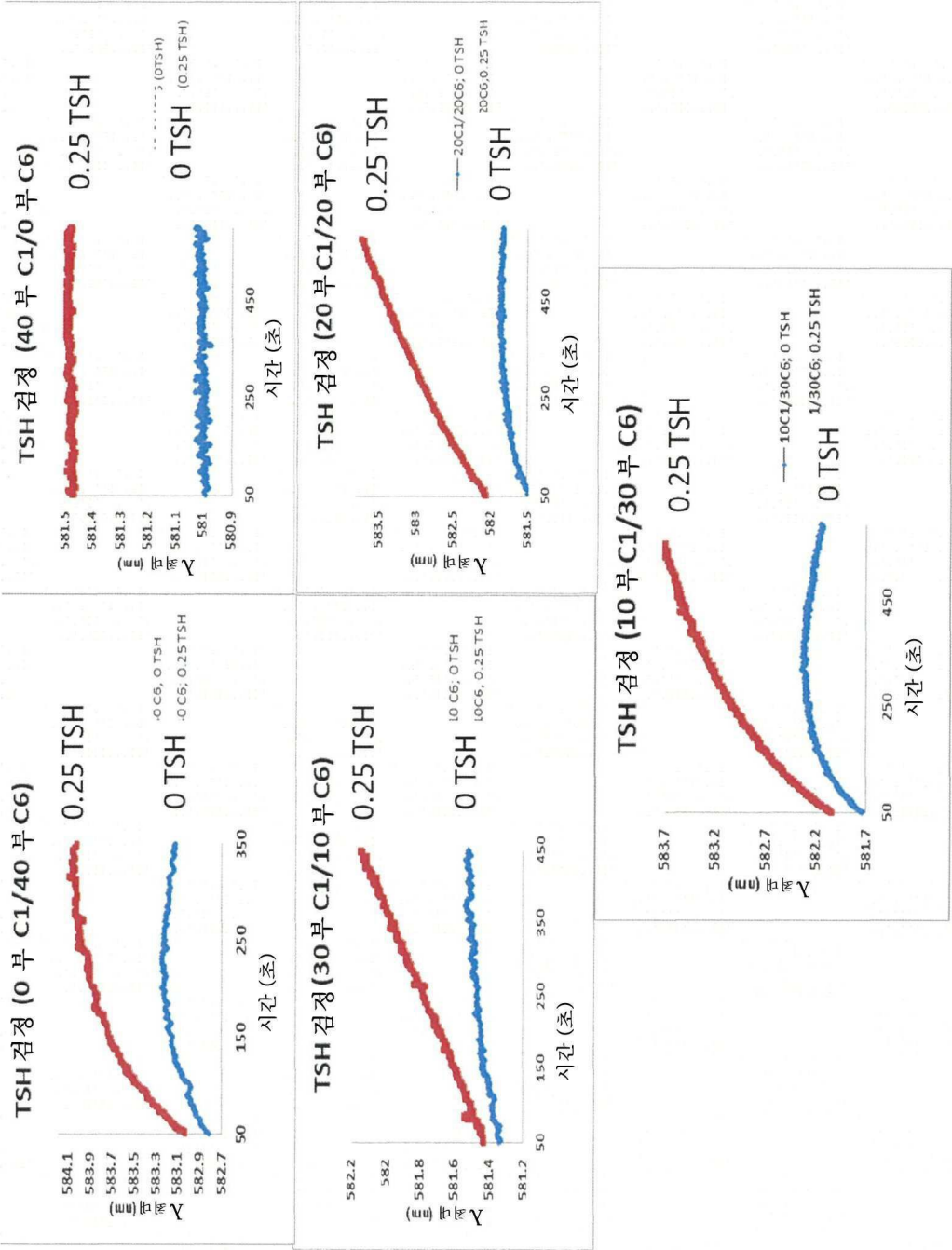


도면12

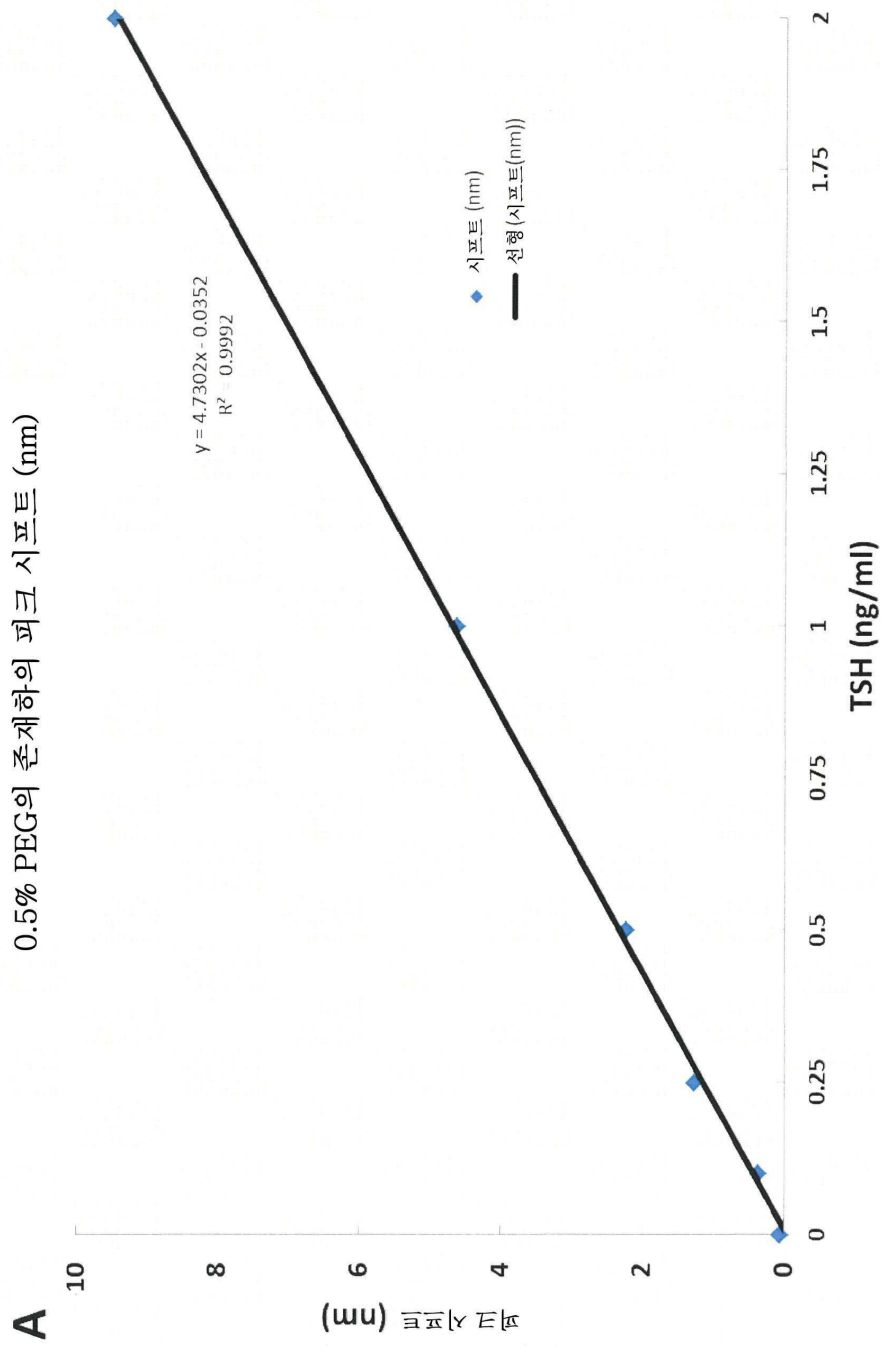
공유 결합된 나노성계형 키크게이트의 용량-반응/동력학



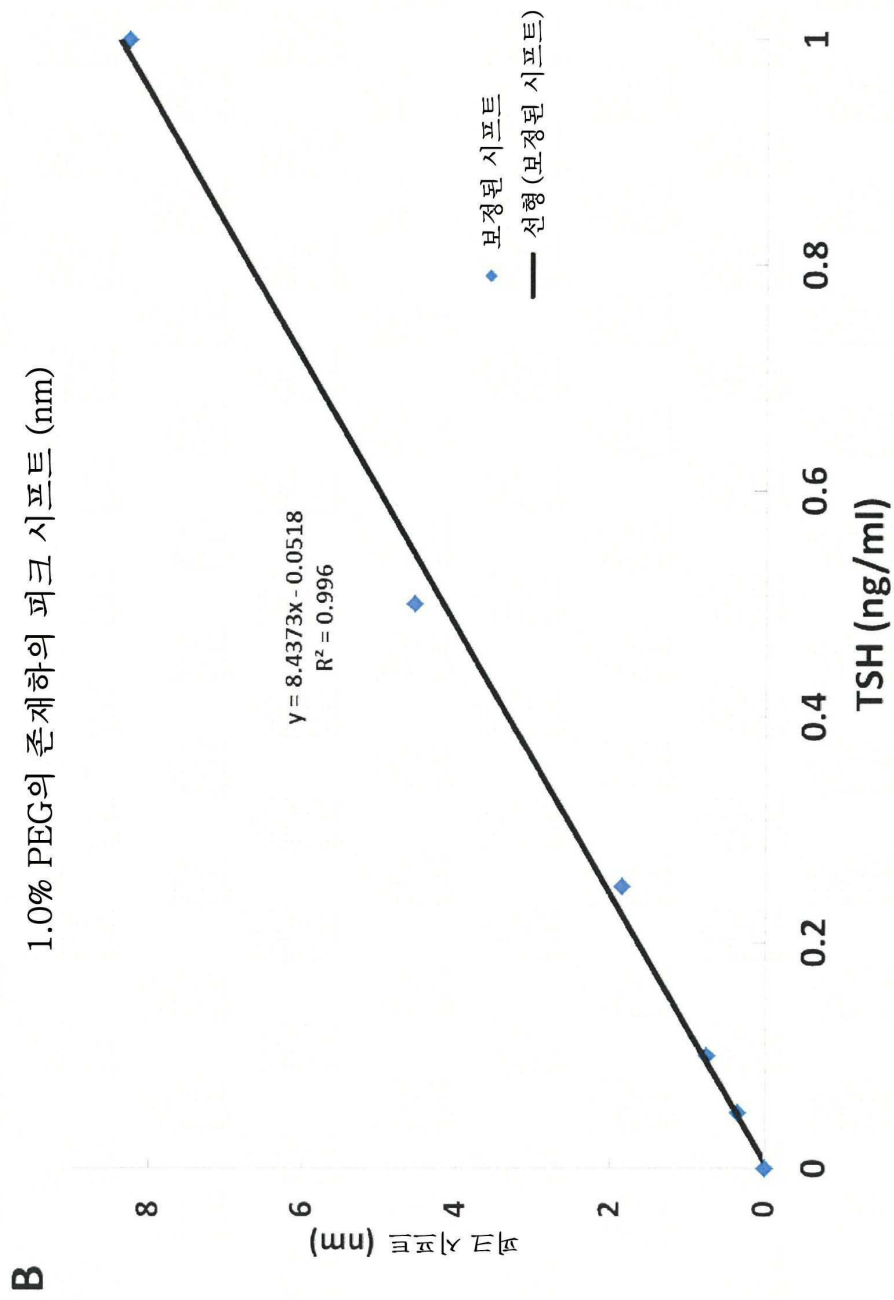
도면13



도면14a

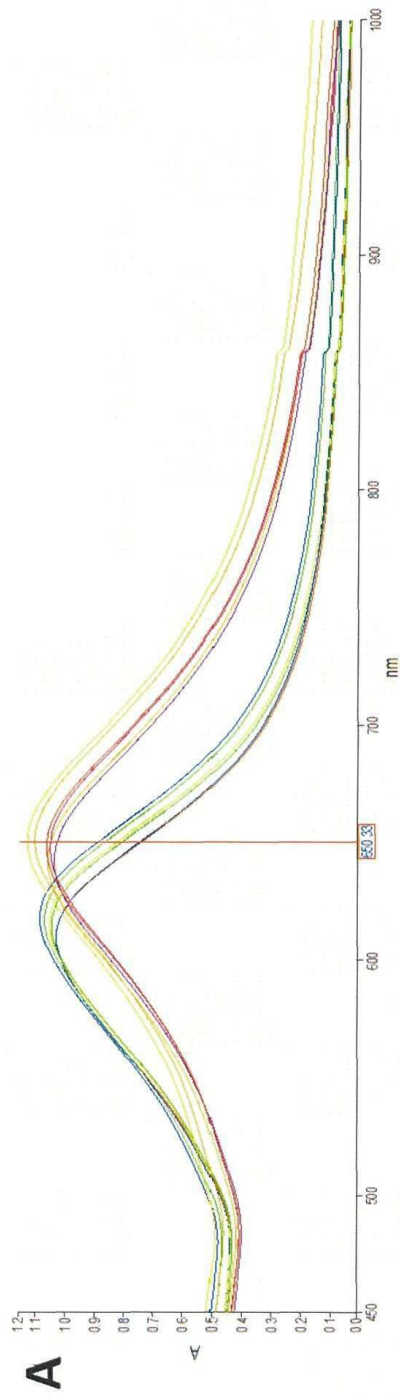


도면14b

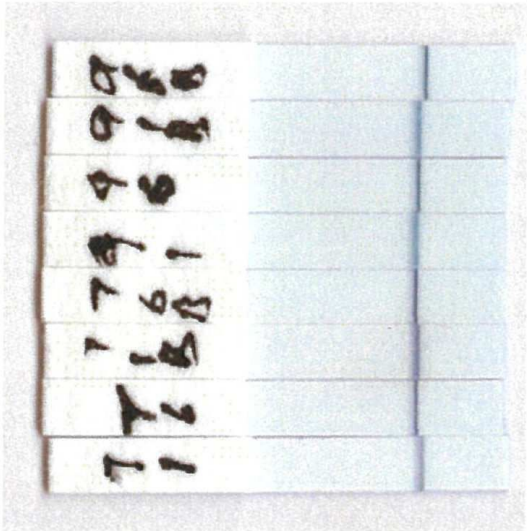


도면15a

70 및 90 nm의 나노구조체

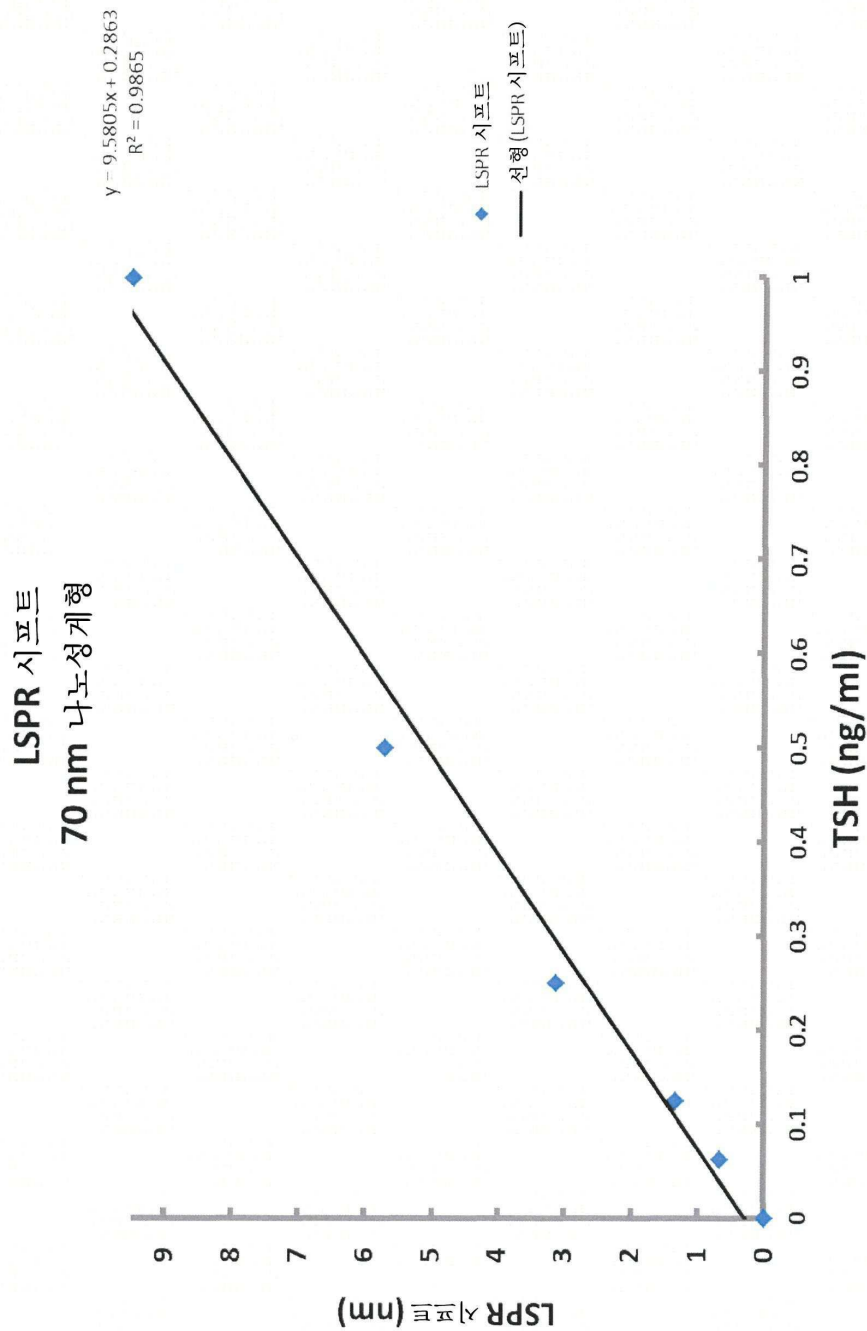


도면15b



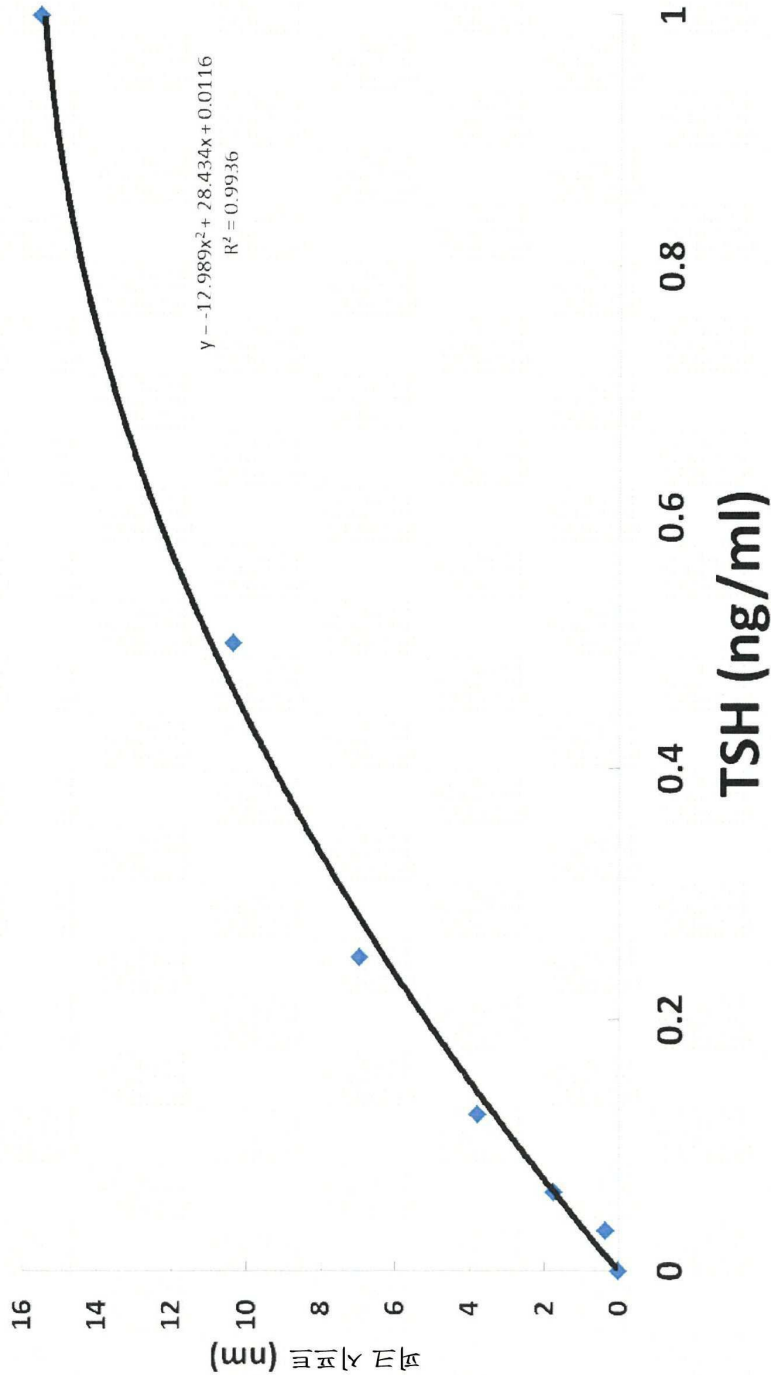
B

도면16



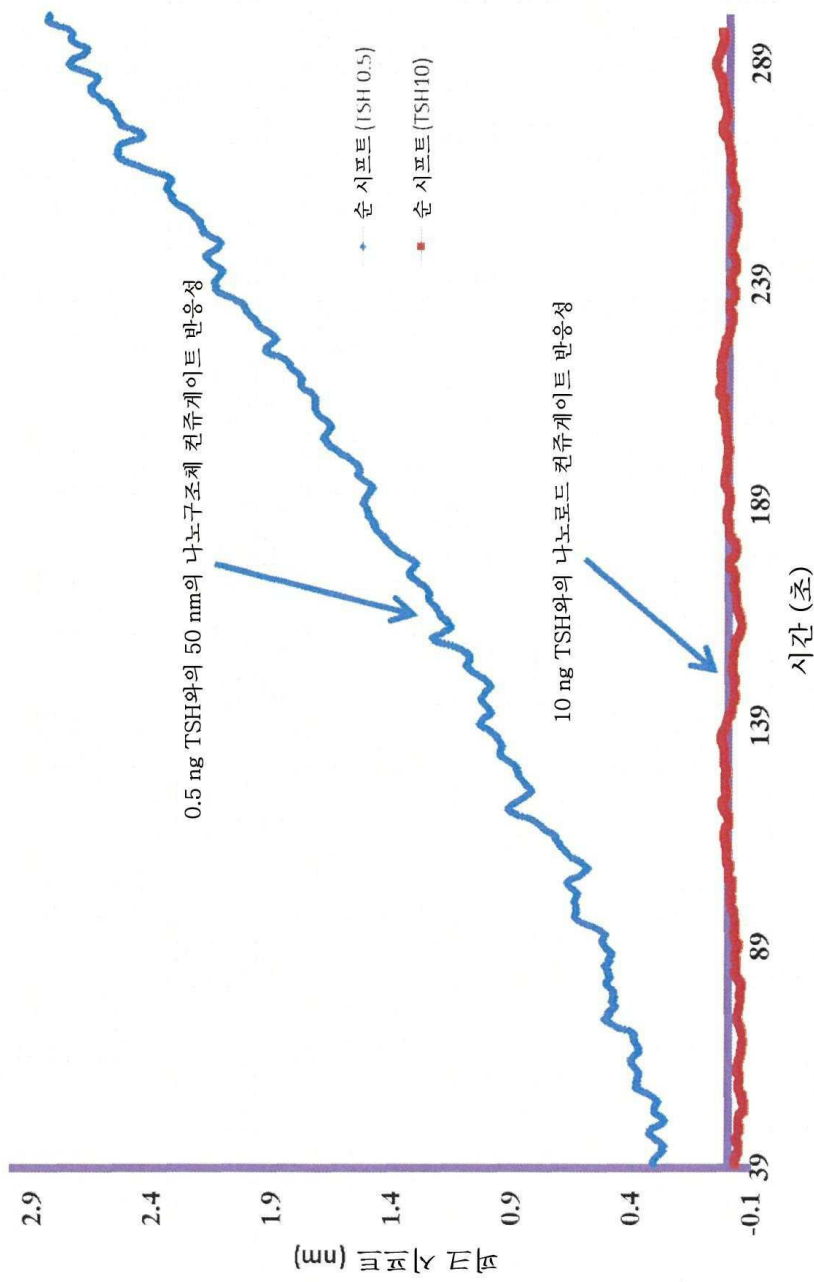
도면17

보정된 피크 시프트
90 nm의 나노성게형 권유게이트에 의한 TSH 검정



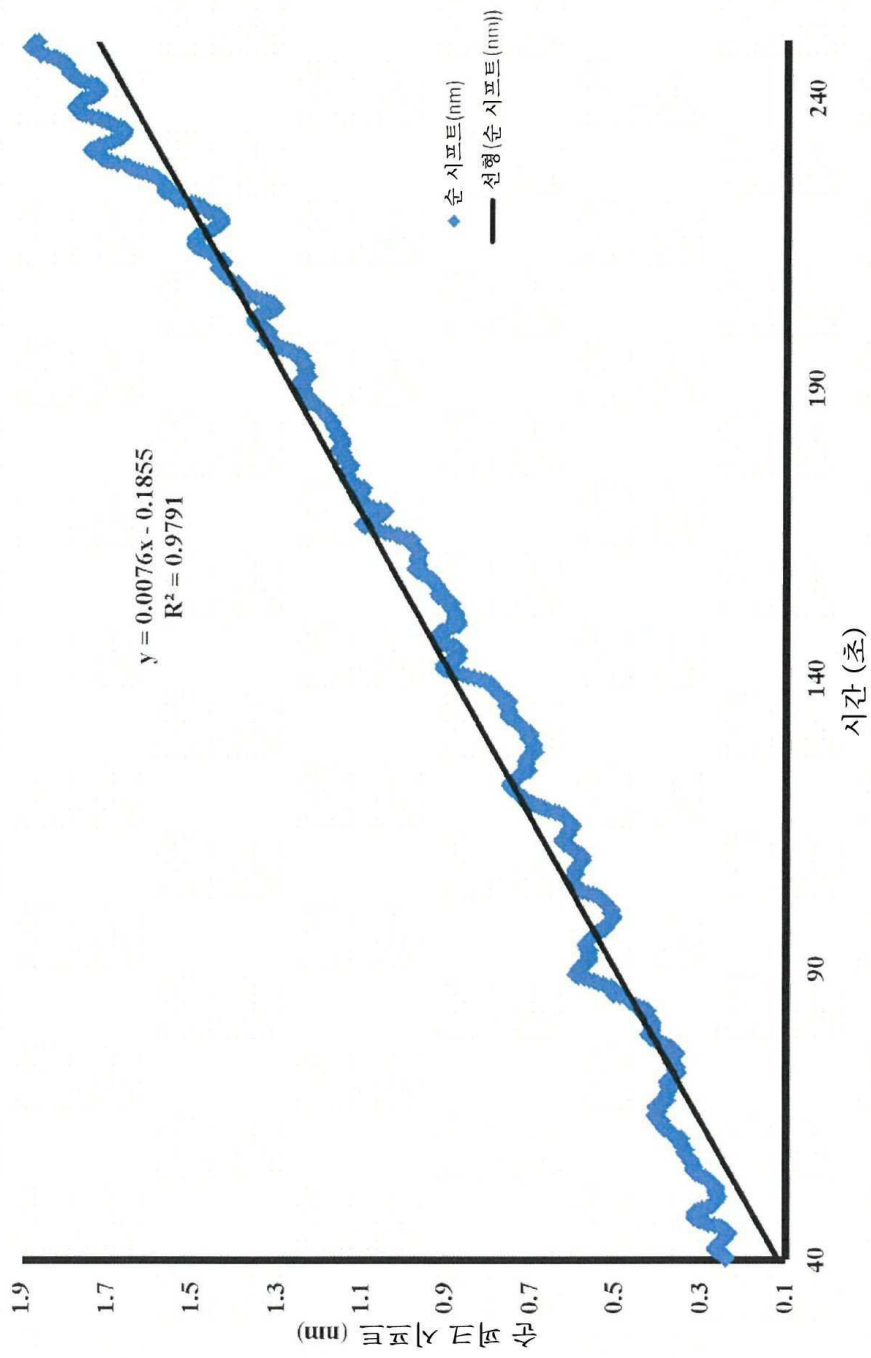
도면18

피크 시프트 분석에 의한 TSH 검출

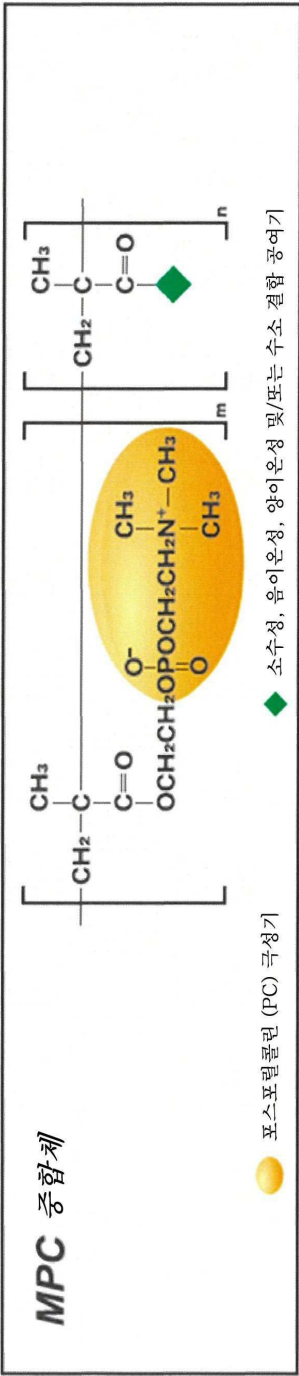


도면19

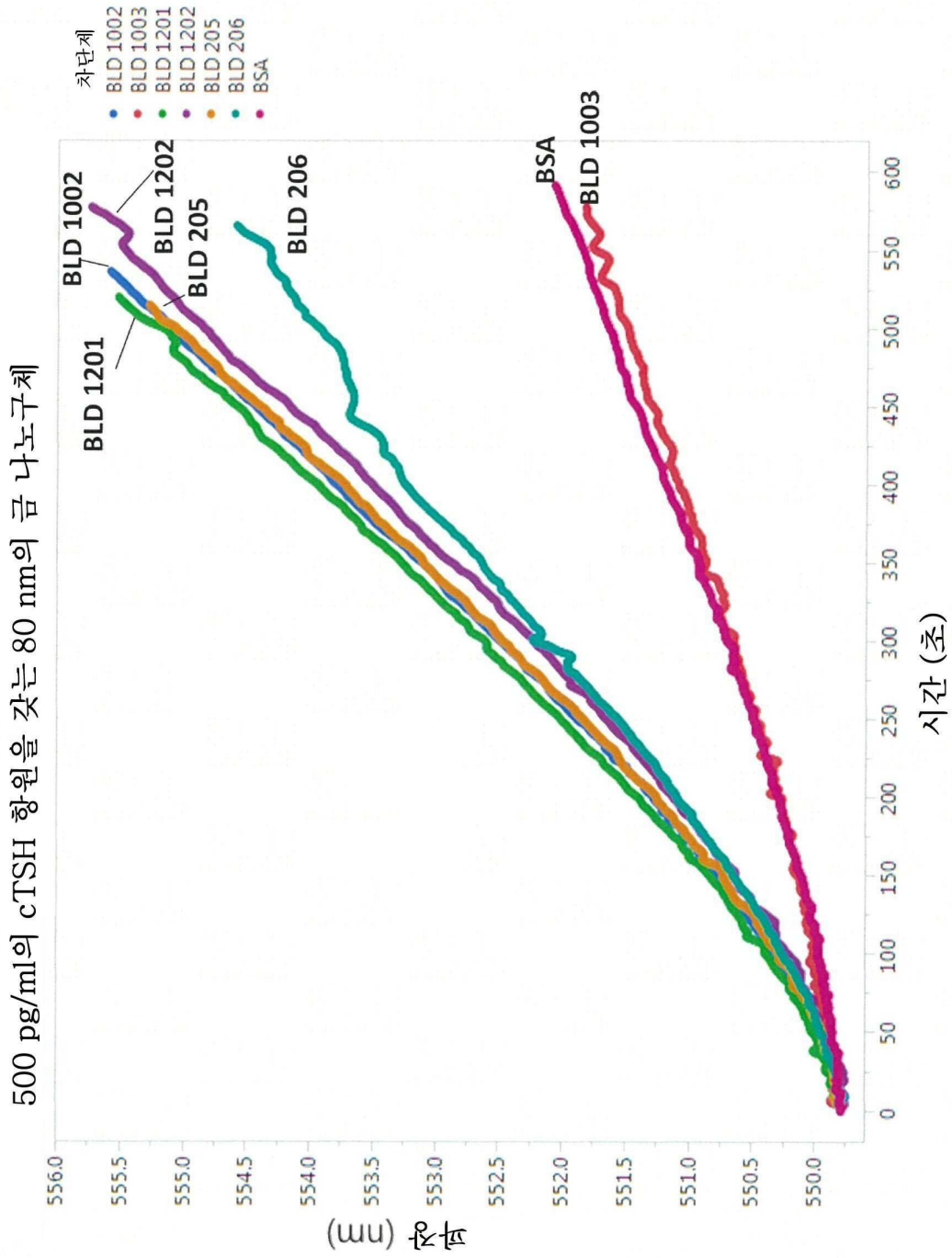
순 펄크 시프트 (nm)
CHAPS-처리된 퀴즈게이트



도면20

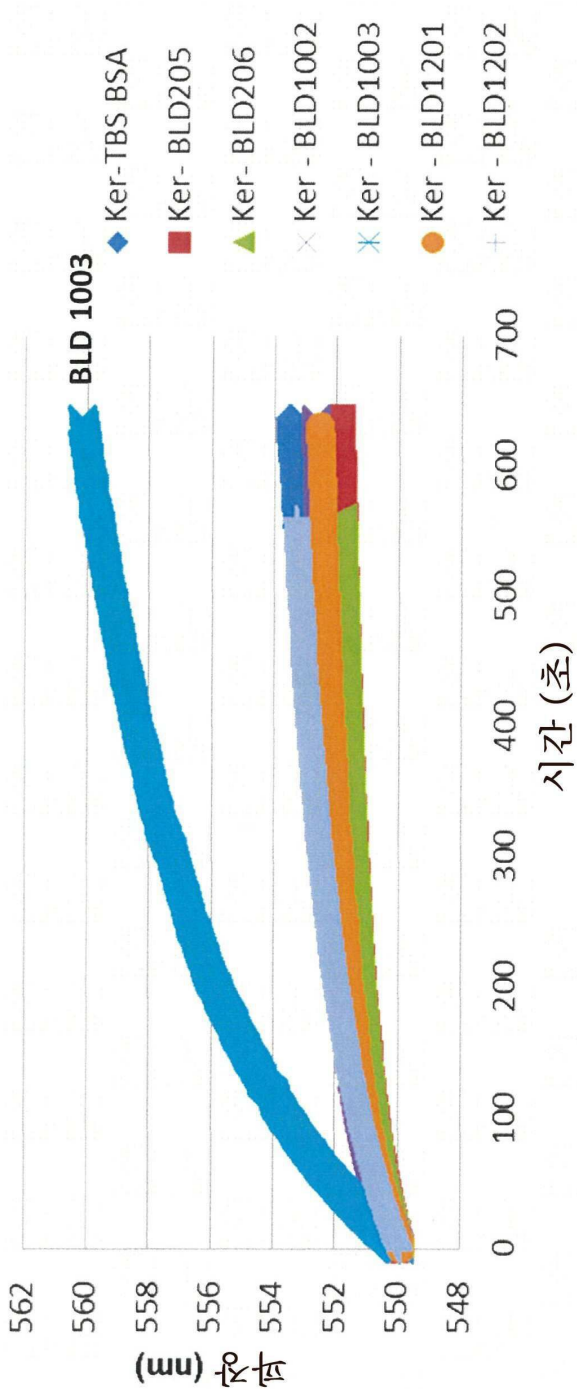


도면21



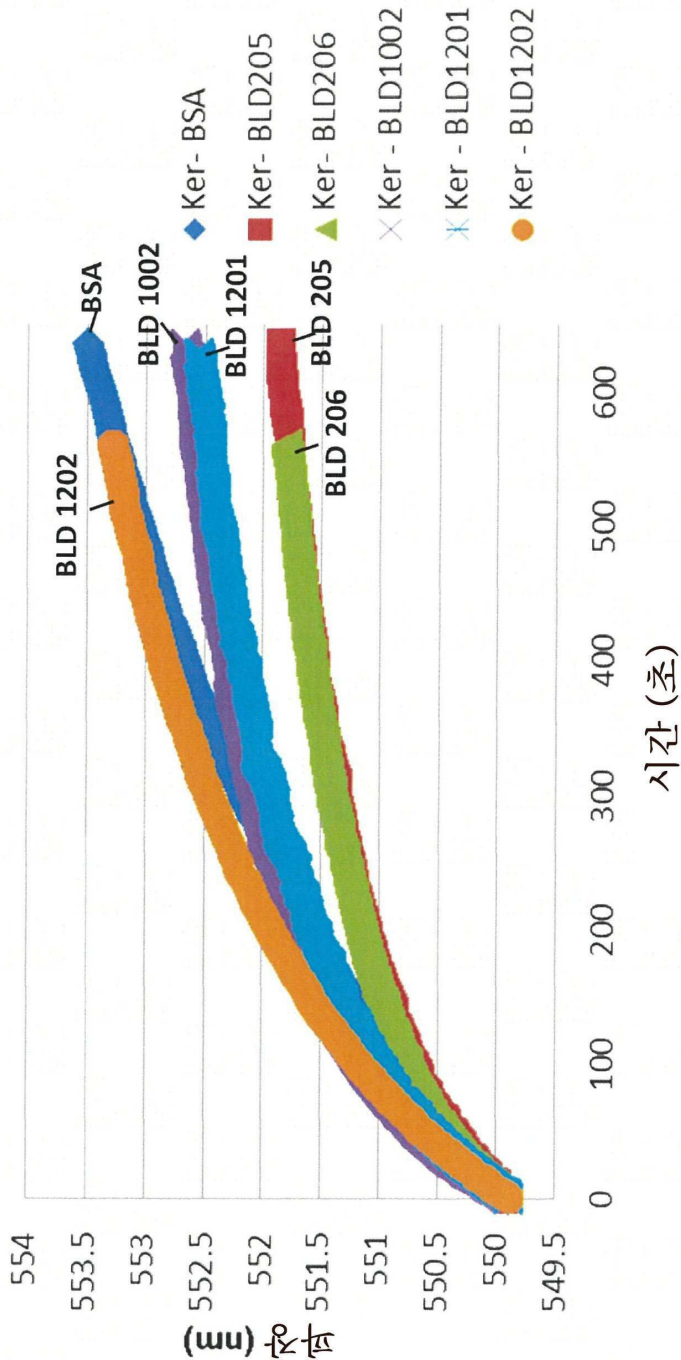
도면22a

Biolipidure 시약으로 차단된 5405/5409에 의한 80 nm의 NuNP

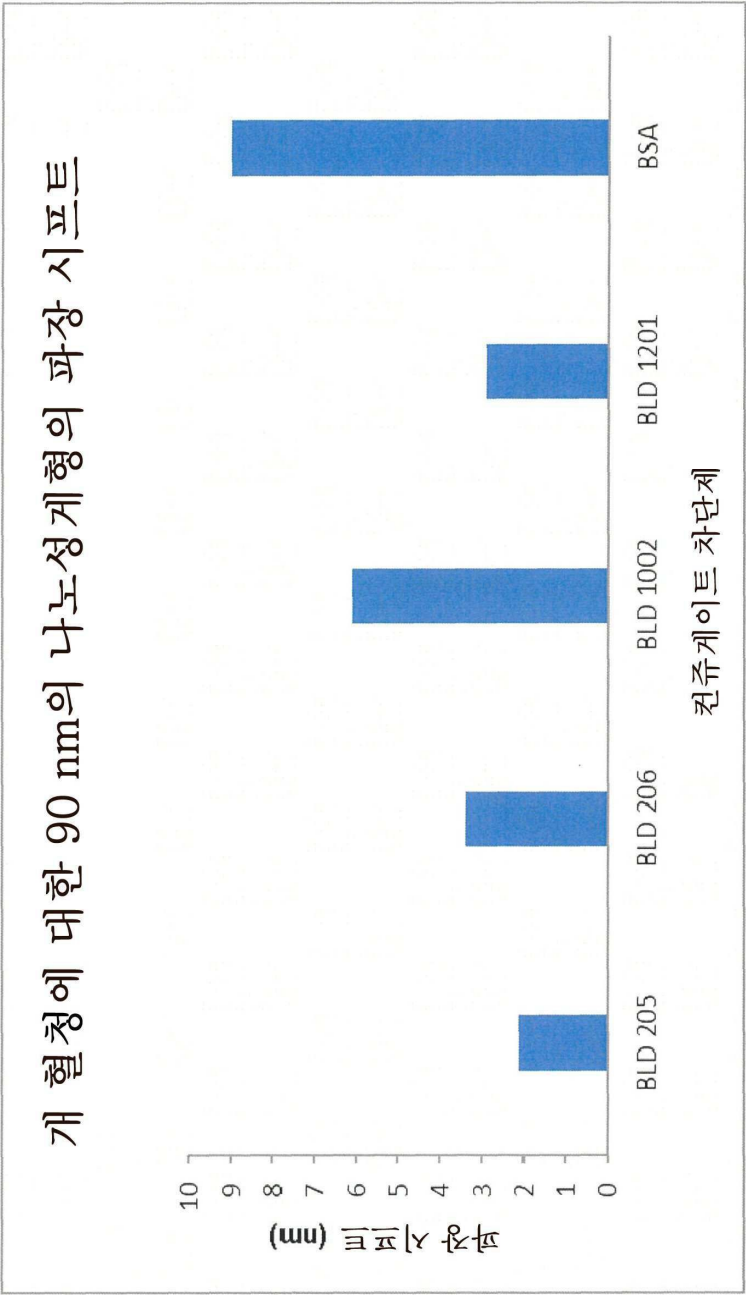


도면22b

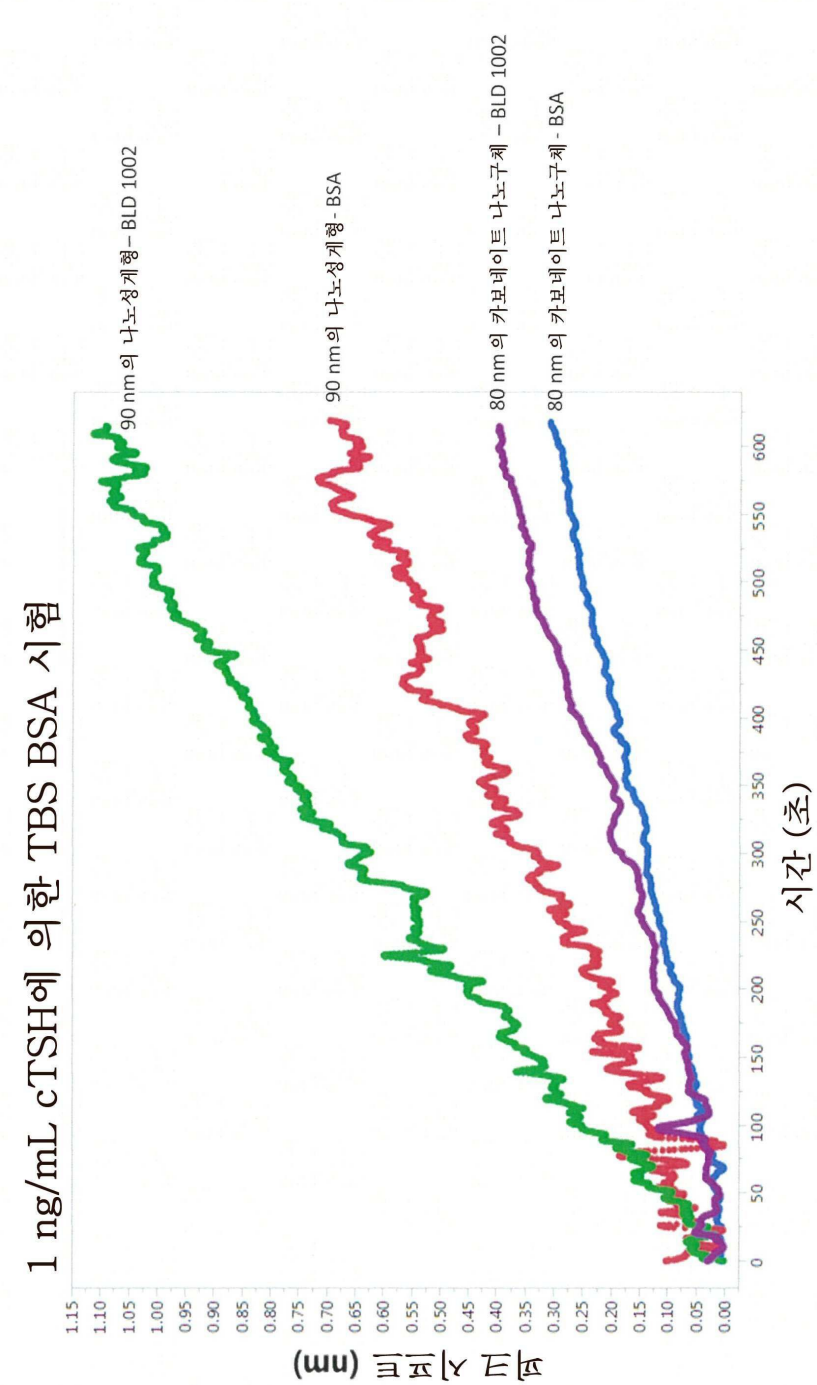
Biolipidure에 의한 코팅



도면23



도면24



호프마이스터 시리즈

양이온

NH_4^+ K^+ Na^+ Li^+ Mg^{2+} Ca^{2+} 구아니디늄⁺



SO_4^{2-} HPO_4^{2-} 아세테이트⁻ 시트레이트⁻ Cl^- NO_3^- ClO_3^- I^- ClO_4^- SCN^-

표면 장력 ↑

공동을 만들기 어려움

탄화수소 용해도 ↓

염석 (응집화)

단백질 변성 ↓

단백질 안정성 ↑

음이온



표면 장력 ↓

공동을 만들기 용이함

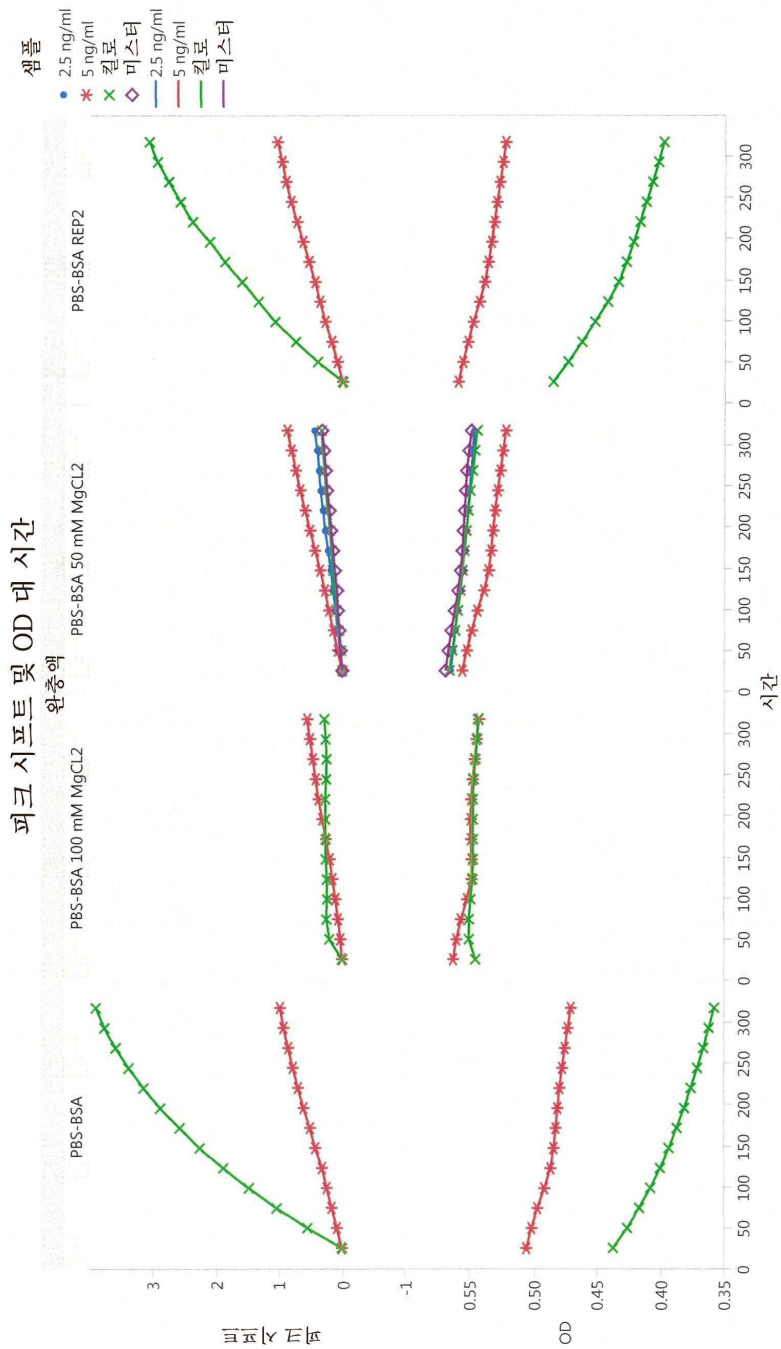
탄화수소 용해도 ↑

염용 (가용화)

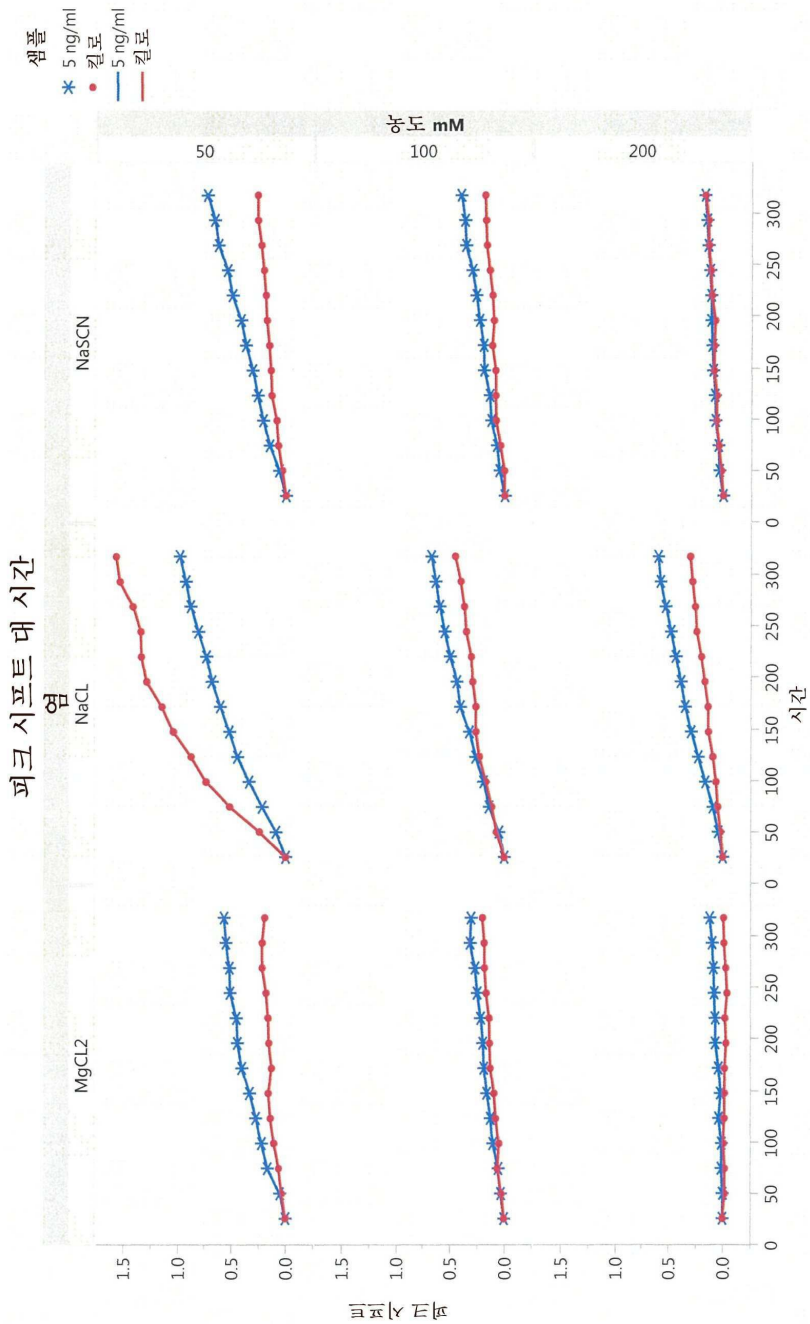
단백질 변성 ↑

단백질 안정성 ↓

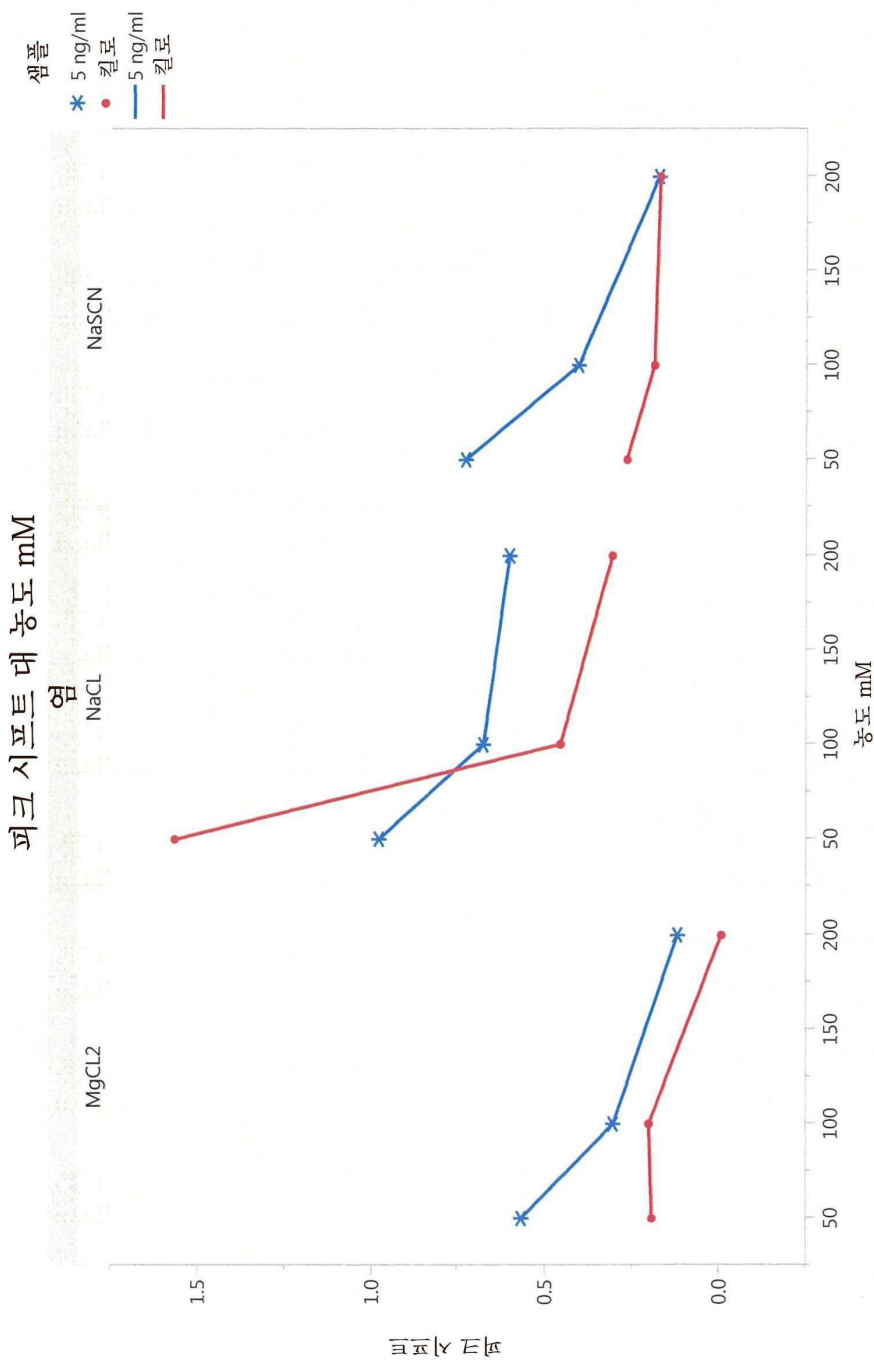
도면26



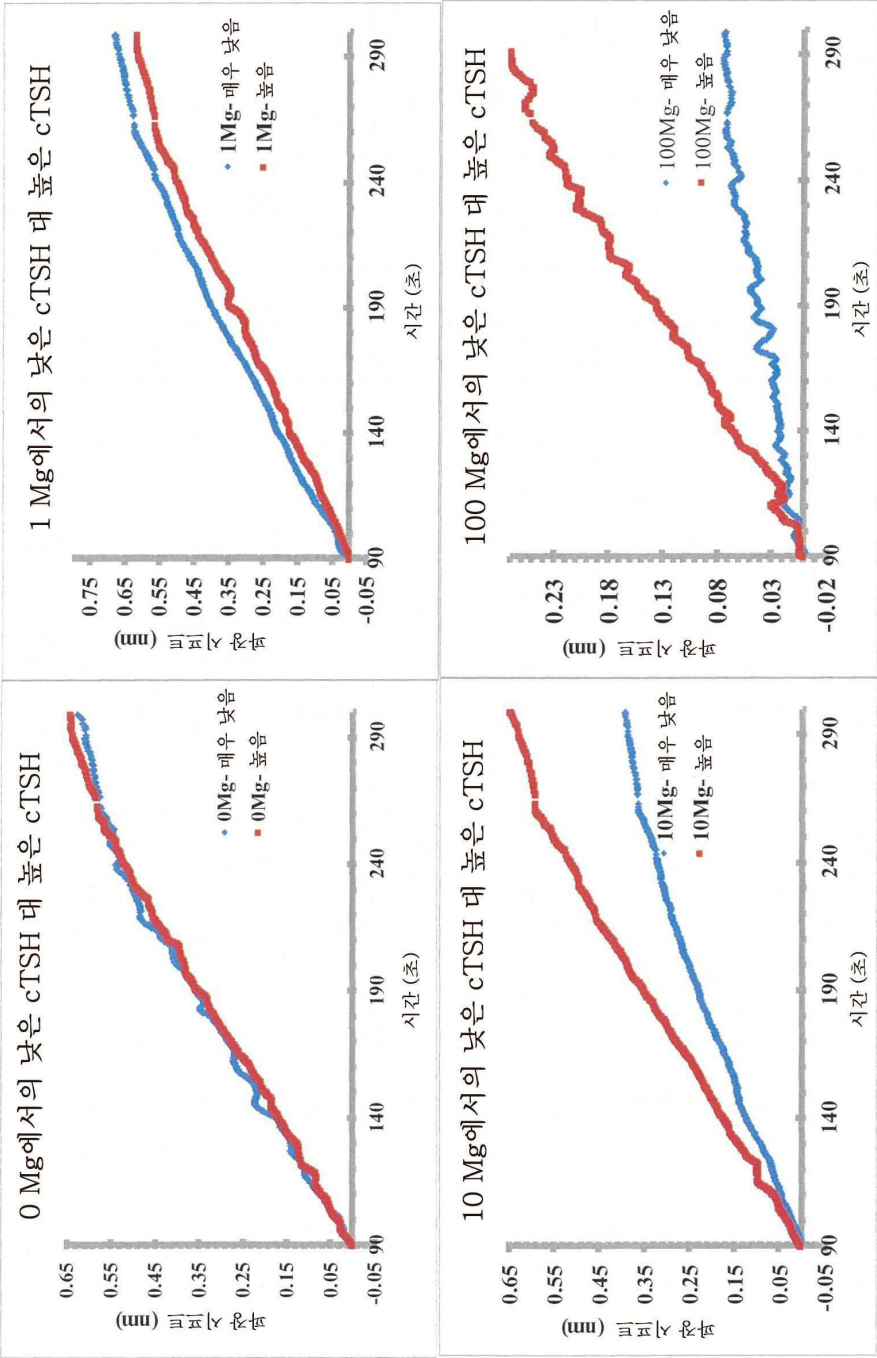
도면27



도면28



도면29



도면30

