



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월15일
 (11) 등록번호 10-1707292
 (24) 등록일자 2017년02월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/32 (2006.01) *G01N 31/22* (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7027823
- (22) 출원일자(국제) 2013년03월05일
 심사청구일자 2014년10월02일
- (85) 번역문제출일자 2014년10월02일
- (65) 공개번호 10-2014-0132394
- (43) 공개일자 2014년11월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2013/054351
- (87) 국제공개번호 WO 2013/131885
 국제공개일자 2013년09월12일

(30) 우선권주장
 12158286.0 2012년03월06일
 유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌
 US20110143416 A1*
 KR10200000022599 A
*Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol.37:61-65
 (1992).**

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 12 항

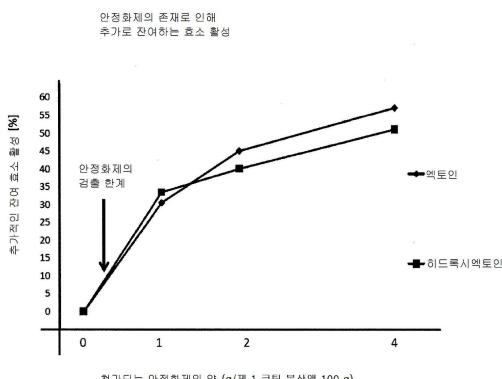
심사관 : 안규정

- (54) 발명의 명칭 **효소 안정화를 위한 상용성 용질 엑토인 및 그의 유도체**

(57) 요약

본 발명은 효소 활성을 유지 및 보존하는 수단 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 디히드로게나아제, 산화환원 보조인자, 산화환원 등가물 존재시 지시약의 광학 특성에서의 하나 이상의 광학적 변화를 이끌어낼 수 있는 시약, 지시약, 및 엑토인 또는 그의 유도체인 하나 이상의 상용성 용질을 함유하는 건(乾) 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 체액 시료 유래의 분석물 결정을 위한 진단 시험 엘리먼트 및 그러한 시험 엘리먼트의 제조 방법에 관한 것이다. 나아가, 본 발명은 건조 조건 하의 조성물에서 하나 이상의 효소의 효소 활성의 감퇴를 줄이기 위한 상기 언급된 하나 이상의 상용성 용질의 용도에 관한 것이다. 추가로, 본 발명에 따른 시험 엘리먼트를 기반으로 한 체액 시료 중 분석물의 존재여부 또는 양 결정 방법이 고려된다.

대 표 도



(72) 발명자
나겔 토마스
독일 68309 만하임 이다-데멜-링 5

레히트 칼
독일 68642 뷔르슈타트 부벤라흘링 61아

명세서

청구범위

청구항 1

하기 구성성분을 함유하는 건(乾) 조성물:

- (a) 디히드로게나아제;
- (b) 산화환원 보조인자;
- (c) 산화환원 등가물 존재시 지시약의 하나 이상의 광학 특성에서의 변화를 이끌어낼 수 있는 시약;
- (d) 지시약; 및
- (e) 엑토인 또는 그의 유도체인 하나 이상의 상용성 용질,

여기서, 상기 디히드로게나아제는 글루코오스 디히드로게나아제이고,

엑토인의 상기 유도체는 하기로부터 선택됨: 히드록시엑토인, 호모엑토인, 히드록시엑토인 에스테르, 히드록시엑토인 에테르, 엑토인의 술포닐 유도체 또는 엑토인의 에스테르화 술포닐 유도체 및 엑토인의 술포닐 유도체의 아미드.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 글루코오스 디히드로게나아제가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물: 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.1.47), 퀴노단백질 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.5.2), 피롤로 퀴놀린 퀴논 (PQQ)-의존성 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.5.2), 글루코오스-6-포스페이트 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.1.49), 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD)-의존성 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.1.119) 및 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 (FAD)-의존성 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.99.10) 또는 이들의 효소적으로 활성인 돌연변이들.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 산화환원 등가물 존재시 지시약의 하나 이상의 광학 특성에서의 변화를 이끌어낼 수 있는 상기 시약이 상기 산화환원 등가물을 산화환원 보조인자로부터 지시약으로 이동시킬 수 있는 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 시약이 (i) 디아포라아제, (ii) 페나진, (iii) 니트로소아닐린, 또는 (iv) 키논인 조성물.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 산화환원 보조인자가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 조성물: 카르바-NAD, NAD, FAD 및 PQQ.

청구항 6

담지체 상에 제 1 항 또는 제 2 항의 조성물을 함유하는, 체액 시료 유래의 분석물의 결정을 위한 진단 시험 엘리먼트.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 담지체가 상기 조성물을 포함하는 검정포 (test field) 를 포함하고, 여기서 검정포에는 체액 시료가 그 위에 적용될 시료 적용층 및 분석물이 조성물과 반응시 시약의 하나 이상의 광학적 특성에서의 변화를 검출하도록 하는 검출층이 있는 시험 엘리먼트.

청구항 8

담지체 상에 제 1 항 또는 제 2 항의 조성물을 생성하는 단계를 포함하는 진단 시험 엘리먼트의 제조 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 생성이 하기 단계를 포함하는 방법:

(i) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a) 내지 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계; 및

(ii) 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

또는

(i) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a), (b), (d) 및 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 중의 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계;

(ii) 제 1 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

(iii) 본 발명의 조성물의 구성성분 (c) 내지 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 위의 제 2 층에 적용하는 단계; 및

(iv) 제 2 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

또는

(i) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a), (b), (d) 및 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 중의 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계;

(ii) 제 1 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

(iii) 본 발명의 조성물의 구성성분 (b) 내지 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 위의 제 2 층에 적용하는 단계; 및

(iv) 제 2 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

또는

(i) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a), (d) 및 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 중의 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계;

(ii) 제 1 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

(iii) 본 발명의 조성물의 구성성분 (b) 내지 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 위의 제 2 층에 적용하는 단계;

(iv) 제 2 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

또는

(i) 본 발명의 조성물의 구성성분 (c) 내지 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 중의 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계;

(ii) 제 1 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

(iii) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a), (b), (d) 및 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 위의 제 2 층에 적용하는 단계; 및

(iv) 제 2 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

또는

- (i) 본 발명의 조성물의 구성 성분 (b) 내지 (e) 를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 중의 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계;
 - (ii) 제 1 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;
 - (iii) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a), (b), (d) 및 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 위의 제 2 층에 적용하는 단계; 및
 - (iv) 제 2 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;
- 또는
- (i) 본 발명의 조성물의 구성 성분 (b) 내지 (e) 를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 중의 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계;
 - (ii) 제 1 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;
 - (iii) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a), (d) 및 (e) 를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 위의 제 2 층에 적용하는 단계; 및
 - (iv) 제 2 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상용성 용질이 건조 조건 하의 조성물에서 하나 이상의 효소의 효소 활성의 감퇴를 줄여주는 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 건조 조건 하의 조성물에서 하나 이상의 효소의 효소 활성의 감퇴를 줄이기 위해 사용되는 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

하기 단계를 포함하는, 체액 시료 중의 분석물의 존재여부 또는 그의 양 결정 방법:

- (a) 하나 이상의 효소를 재구성 상태로 변환시키기에 적합한 조건 하에 제 6 항의 진단 시험 엘리먼트를 분석물을 함유할 것으로 의심되는 체액과 접촉시키는 단계;
- (b) 진단 시험 엘리먼트 상에서 재구성 상태로 하나 이상의 효소를 함유하는 습윤화된 조성물에서 지시약의 하나 이상의 광학 특성 변경을 측정하여, 체액 시료 중의 분석물의 존재여부 또는 양을 결정하는 단계.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 효소 활성 유지 및 보존을 위한 수단 및 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 디히드로게나아제, 산화환원 보조인자, 산화환원 등가물 존재시 지시약의 광학 특성에서의 하나 이상의 광학적 변화를 이끌어낼 수 있는 시약, 지시약, 및 엑토인 또는 그의 유도체인 하나 이상의 상용성 용질을 함유하는 건

(乾) 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 체액 시료 유래의 분석물 결정을 위한 진단 시험 엘리먼트 및 그러한 시험 엘리먼트의 제조 방법에 관한 것이다. 나아가, 본 발명은 건조 조건 하의 조성물에서 하나 이상의 효소의 효소 활성의 감퇴를 줄이기 위한 상기 언급된 하나 이상의 상용성 용질의 용도에 관한 것이다. 추가로, 본 발명에 따른 시험 엘리먼트를 기반으로 한 체액 시료 중 분석물의 존재여부 또는 양 결정 방법이 고려된다.

배경 기술

- [0002] 진단 시험 엘리먼트는 일반적으로 환자에 가까운 자에서의 적용에 사용하기 위해 제조된다. 따라서, 그 엘리먼트는 취급 및 저장과 관련하여 강건해야만 한다. 이는 특히 시험 엘리먼트의 시험 화학에 해당된다 (참고문헌은, Hones 2008, Diabetes Technology & Therapeutics 10: S10)
- [0003] 그러나, 수많은 진단 시험 엘리먼트가 시험 엘리먼트 상에 제시되는 훨씬 복잡한 효소 시험 화학을 기반으로 하고 있다. 특히, 시험 엘리먼트는 담지체 및 검출층을 포함하는데, 여기서 검출층은 일반적으로 효소들을 포함하고 있다. 그러한 효소들이 저장 동안 그리고 처리시 생물학적으로 활성인 채로 남는다는 것은 시험 엘리먼트의 적절한 기능을 위해 결정적이다. 개별 측정에 대한 보정은 일반적으로 가능하지 않기 때문에, 시험 엘리먼트는 일반적으로 뱃치식으로 보정된다. 시험 엘리먼트 뱃치에 대한 보정 정보는 저장되며, 처리 및 저장시 개별 차이와 무관하게 뱃치의 각 엘리먼트에 이용된다.
- [0004] 그러나, 시험 엘리먼트의 예비처리 및 저장 조건은 효소의 활성에 심히 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 시험 엘리먼트의 제작 또는 저장 동안의 열 처리는 효소를 변성시켜, 시험 엘리먼트 상에 제시되는 전반적인 효소 활성이 현저히 감소되고, 그에 따라 그러한 시험 엘리먼트가 사용되었을 때 잘못된 시험 결과를 제공할 수도 있다. 유사하게, 수많은 효소들이 변성 및 비가역적 효소 불활성화를 제공하게 되는 산화 프로세스에 민감하다. 그러나, 시험 엘리먼트 상의 수많은 효소들이 적어도 저장 동안에는 그러한 산화 프로세스조차 촉진시킬 수 있는 무용매 환경에 존재하게 된다. 나아가, 검출층은 산화환원 보조인자 및 여타 산화환원 관련 성분들 등과 같은 산화 프로세스를 더욱더 촉진하는 추가적인 구성성분들을 포함할 수도 있다.
- [0005] 그러나, 그러한 바람직하지 않은 조건 하에 효소 활성을 보존하는 문제는 시험 엘리먼트에 국한되는 것은 아니다. 나아가, 더욱 일반적으로는 수많은 효소 제제들이 예컨대 냉동-건조 제제와 같이 본질적으로 용매가 없는 형태로 제공 및 저장된다.
- [0006] 다양한 소위 상용성 용질들, 즉 상이한 화학 계열의 저분자량 화합물들, 예컨대 당, 폴리올, 유리된 아미노산, 아미노산 유도체, 아민 및 황 유사체, 세페이트 에스테르, 짧은 웹티드 및 고리형 2,3-디포스포글리세레이트가 용액 중 및 건조 상태 하의 단백질에 대한 그들의 보존 특성에 대해 연구된 바 있다 (참고문헌은, Arakawa 1985, Biophys J 47: 411; Lippert 1992, Appl Microbiol Biotechnol 37: 61; Goeller 1999, J Mol Catal B Enzymatic 7:37; Lentzen 2006, Appl Microbiol Biotechnol 72: 623; WO2007/002657, US2010/0255120).
- [0007] 용액 중 글루코오스의 전기화학적 결정을 위한 바이오센서에서의 엑토인 및 히드록시엑토인에 의한 글루코오스 옥시다제의 안정화가 선행기술에서 보고된 바 있다 (WO2007/097653; Loose 2006, Proceedings of the 24th IASTED International Multi-conference Biomedical Engineering, 167-173, Innsbruck, AT). 그러나, 글루코오스 옥시다제는 산화 스트레스 및 열에 대해 훨씬 안정한 효소인 것으로 공지되어 있다. 한편, 히드록시엑토인은 락테이트 디히드로게나아제에 대해 용액 중 단백질 응집을 방지하지는 못하는 것으로 보고되었다 (Andersson 2000, Biotechnol Appl Biochem 32: 145-153). 일반적으로 디히드로게나아제, 특히 글루코오스 디히드로게나아제는 산화 스트레스 및 열 처리에 대해 훨씬 민감한 효소이다. 그러나, 이들은 중요한 진단 수단이다.
- [0008] 엑토인은 또한 효소 활성의 전기화학적 검출을 목적으로 콜레스테롤 디히드로게나아제를 포함하는 콜레스테롤 바이오센서에서의 시약으로 보고된 바 있다 (WO2007/132226 또는 WO2006/067424).
- [0009] 그러나, 진단 적용에 사용되는 저장 및 온도 민감성 효소들의 효소, 특히 디히드로게나아제 계열의 효소, 예컨대 글루코오스 디히드로게나아제의 효소 활성 보존이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 상기 언급된 필요조건들을 만족시키는 수단 및 방법을 제공하는 것이다. 상기 문제는 하기 제공되는 특허청구범위 및 상세한 설명으로 특징지어지는 구현예에 의해 해결된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 따라서, 본 발명은 하기 구성성분을 함유하는 건(乾) 조성물에 관한 것이다:

(a) 디히드로게나아제;

(b) 산화환원 보조인자;

(c) 산화환원 등가물 존재시 지시약의 하나 이상의 광학 특성에서의 변화를 이끌어낼 수 있는 시약;

(d) 지시약; 및

(e) 엑토인 또는 그의 유도체인 하나 이상의 상용성 용질.

[0017] 본원에 사용된 용어 "건(乾)"은 조성물에 용매 또는 용매들의 혼합물이 본질적으로 존재하지 않음을 의미한다.

본원에 사용된 본질적으로 없음이란, 조성물의 용액에 본래 존재했던 용매 또는 용매 혼합물의 85% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상이 조성물로부터 제거되었음을 의미한다. 따라서, 용매 또는 용매 혼합물은 본 발명의 건 조성물 중에 15% 이하, 바람직하게는 10% 이하, 8% 이하, 5% 이하, 2% 이하의 양으로 존재한다. 상기 언급된 백분율 값 및 양을 정의하기 위해 이용된 본원에서 언급된 여타 백분율 값은 중량 백분율 (w/w)을 지칭한다.

[0018] 본 발명의 상기 조성물은 바람직하게는 정상 조건, 즉 실온 및 상압 하에 고체인 조성물이다.

[0019] 본 발명에 따른 용매는 조성물의 구성성분들의 기능, 특히 디히드로게나아제의 효소 활성을 불리하게 악화시키지 않는 조건 하에 본 발명의 조성물의 구성성분을 용해시키는 용매이다. 나아가, 용매는 바람직하게는 표준 압력, 바람직하게는 1 bar +/- 10% 하에, 5 내지 40°C, 더욱 바람직하게는 실온, 바람직하게는 20°C +/- 10°C의 온도 범위에서 구성성분들을 용해시키는 것으로 간주된다. 본 발명에 따라 적합한 용매는, 바람직하게는 물, 수용성 완충액, 예컨대 포스페이트 완충 식염수 또는 Tris 완충액, 알코올, 예컨대 헥산을, 2-메톡시-프로판올, 2-메틸-2-부탄올, 시트레이트 완충액, 글리세린 포스페이트, 또는 Good's 완충액 (바람직하게는 Tris 완충액에 추가됨)을 포함한다. 본 발명에 따르면, 사용되는 용매는 상기 언급된 용매들 중 둘 이상의 혼합물일 수 있음이 이해될 것이다. 그러한 맥락에서 고려되는 바람직한 용매 혼합물은 물 또는 수계 완충액의 알코올과의 혼합물, 및 특히 하기 첨부된 실시예에서 언급되는 용매 혼합물이다.

[0020] 본 발명에 따른 건 조성물은 바람직하게는 본 발명의 조성물의 구성성분들을 먼저 용매 또는 용매들의 혼합물에 용해시킨 후, 후속하여 상기 용매 또는 용매들의 혼합물을 적합한 처리에 의해 제거하여, 남게 되는 조성물이 상기 용매 또는 용매 혼합물이 없도록 하여 본질적으로 제공될 수 있다. 는 것이다. 본 발명에서 바람직하게 고려되는 적합한 처리는 열 처리, 증발 기법, 냉동 건조 등을 포함한다. 바람직하게는, 고려되는 처리는 열 처리 및, 특히 하기 조건 하의 열 처리이다: 열 순환시키면서 약 60°C 이상에서 약 20 내지 45 분, 또는 약 95°C에서 약 1 내지 2 분의 열 처리; 조성물의 두께는 20 내지 200 마이크로미터 이하; 1 bar 또는 0.1 bar의 압력. 나아가, 조성물을 건조 상태로 유지하기 위해서는, 저장을 바람직하게는 건조제의 존재 하에 실시한다. 적합한 건조제는 바람직하게는 실리카 겔, 제올라이트, 칼슘 카르보네이트 또는 마그네슘 설페이트를 포함한다.

[0021] 본원에 사용된 용어 "디히드로게나아제"는 산화환원 등가물로서의 하이드라이드 (H^-)를 수용성 분자에, 바람직하게는 본원의 다른 곳에 언급되는 바와 같은 산화환원 보조인자로 이동시켜 기질의 산화를 촉매할 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 본 발명에서 고려되는 디히드로게나아제는 바람직하게는 산화환원 보조인자 (또는 종종 보조효소로도 지칭됨), 예컨대 피롤로 쿠놀린 쿠논 (PQQ), 니코틴아미드-아데닌-디뉴클레오티드 (NAD) 또는 그의 유도체, 또는 플라빈 보조인자, 예컨대 플라빈-아데닌-디뉴클레오티드 (FAD) 또는 플라빈 모노뉴클레오티드 (FMN)에 좌우되는 것이다. 바람직한 디히드로게나아제는 특히, 락테이트 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.1.27 또는 1.1.1.28), 글루코오스 디히드로게나아제 (하기 참조), 알코올 디히드로게나아제 (EC 번호 EC 번호 1.1.1.1 또는 1.1.1.2), L-아미노산 디히드로게나아제 (EC 번호 1.4.1.5), 글리세린 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.1.6), 말레이트 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.1.37), 3-히드록시부티레이트 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.1.30), 또는 소르비톨 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.1.14)이다.

[0022]

더욱 바람직하게는, 상기 디히드로게나아제는 글루코오스 디히드로게나아제이다. 가장 바람직하게는, 상기 글루코오스 디히드로게나아제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.1.47), 퀴노단백질 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.5.2), 특히 피롤로 퀴놀린 퀴논 (PQQ)-의존성 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.5.2), 글루코오스-6-포스페이트 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.1.49), 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD)-의존성 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.1.119) 및 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 (FAD)-의존성 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 번호 1.1.99.10) 또는 이들의 효소적으로 활성인 돌연변이들. 본 발명에 따르면, 본원에 참고문헌으로 포함되는 WO2011/020856에 개시되어 있는, 적어도 아미노산 위치 96, 170 및/또는 252에 돌연변이를 지닌 글루코오스 디히드로게나아제 (E.C. 1.1.1.47)가 바람직하다. 그러한 아미노산 위치들에서 고려되는 바람직한 돌연변이는 Glu96Gly, Glu170Arg 또는 Lys 및/또는 Lys252Leu의 치환이다.

[0023]

상기 효소 계열의 바람직한 구성원들의 구조 및 특성은 당업계에 널리 공지되어 있다 (참고문헌은, Olsthoorn 1998, Biochemistry 37: 13854-13861; Pauly 1976, Hoppe Seylers Z Physiol Chem 356: 1613-1623; Tsujimura 2006, Biosci Biotechnol Biochem 70: 654-659). 상기 언급된 효소들의 효소적으로 활성인 돌연변이들은 앞서 언급한 선행 기술에서 상기 언급된 야생형 효소에 대해 보고된 아미노산 서열로부터 하나 이상의 아미노산을 치환, 부가 또는 결실시켜 수득될 수 있다. 바람직한 돌연변이들은 US 7,132,270 또는 US 7,547,535에 개시된 바와 같이 그의 야생형 카운터파트에 비해 개선된 기질 특이성을 지닌 PQQ-의존성 글루코오스 디히드로게나아제의 돌연변이들이다. 상기 두 문헌 모두 본원에 돌연변이와 관련하여 참고문헌으로 포함된다. 추가적인 돌연변이가 문헌 [Baik et al (Baik 2005, Appl Environ Microbiol 71: 3285), Vasquez-Figuera et al. (Vasquez-Figuera 2007, Chem BioChem 8: 2295), 및 WO 2005/045016]에 개시되어 있다.

[0024]

본원에 사용된 용어 "산화환원 보조인자"는 효소로 이동되는 산화환원 등가물, 특히 하이드라이드 (H^-)에 대해 수용자로서 제공될 수 있는 분자를 지칭한다. 바람직하게는, 산화환원 보조인자는 PQQ, NAD 또는 FAD이다. 본 발명의 조성물에 포함되는 산화환원 보조인자는 고려되는 디히드로게나아제의 특성에 좌우된다는 것을 이해해야 한다. 예를 들어, PQQ는 본 발명에 따른 조성물에 PQQ의존적 글루코오스 디히드로게나아제와 함께 병용되며, NAD는 본 발명에 따른 조성물에 NAD의존적 글루코오스 디히드로게나아제와 병용되고, FAD는 본 발명에 따른 조성물에 FAD의존적 글루코오스 디히드로게나아제와 병용된다. 본 발명에 따른 산화환원 보조인자는 또한 바람직하게는 PQQ, NAD 또는 FAD의 유도체일 수 있다. NAD의 바람직한 유도체는 개시된 NAD/NADH 및/또는 NADP/NADPH 유도체와 관련하여 본원에 참고문헌으로 포함되는 WO 2007/012494에 개시되어 있다. 더욱 바람직하게는, 본 발명에 따른 산화환원 보조인자는 WO 2007/012494에 개시되어 있는 카르바-NAD이다.

[0025]

엑토인 (CAS 번호: 96702-03-3)은 화학식 $C_6H_{10}N_2O_2$ 을 가진, 박테리아에서 자연적으로 발생하는 널리 공지된 유기 화합물이다. 이는 또한 (*S*)-2-메틸-3,4,5,6-테트라하이드로페리미딘-4-카르복실산으로도 지칭된다. 엑토인은 특히 할로모나다세아 (*Halomonadaceae*) 또는 피르미쿠테스 (*Firmicutes*) 속의 다양한 박테리아로부터 당업계에 널리 공지된 기법에 의해 수득가능하다 (참고문헌은 WO1994/15923).

[0026]

본 발명에서 언급되는 엑토인의 "유도체"는 용액 중에서 뿐만 아니라 건조 상태에서 본원에 언급되는 하나 이상의 효소의 효소 활성 감퇴를 방지할 수 있는 구조적으로 관련있는 유기 분자이다. 바람직하게는, 상기 언급된 효소 활성의 감퇴는 엑토인에 대해 발견되는 바와 같이 유사하거나 또는 동일한 방식 및/또는 유사하거나 또는 동일한 정도로 방지된다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 조성물에 존재한다면, 엑토인의 유도체는 제조 및/또는 저장 동안, 특히 실온 또는 심지어 더 높은 온도, 예컨대 45°C 또는 50°C 또는 심지어 60°C 까지의 온도에서의 저장 동안 통계적으로 유의한 정도까지 일어나는 효소 활성의 감퇴를 방지할 수 있을 것이다. 바람직하게는, 유도체는, 조성물에 존재하는 경우, 상기 엑토인 유도체가 없는 대조군 조성물에서 발견되는 효소 활성에 비해 조성물에서 하나 이상의 효소의 효소 활성을 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상을 유지할 수 있을 것이다. 건조 상태 하의 효소 활성 감퇴의 방지는 본원, 예를 들어 첨부된 실시예에 기재된 바와 같이 결정될 수 있다. 바람직하게는, 상기 엑토인 유도체는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 히드록시엑토인, 호모엑토인, 히드록시엑토인 에스테르, 히드록시엑토인 에테르, 엑토인의 술포닐 유도체, 엑토인의 에스테르화 술포닐 유도체 및 엑토인의 술포닐 유도체의 아미드. 엑토인에 대해, 히드록시엑토인은 다양한 박테리아, 특히 할로모나다세아 (*Halomonadaceae*) 또는 피르미쿠테스 (*Firmicutes*) 속의 박테리아로부터 당업계에 널리 공지된 기법에 의해 수득가능하다 (참고문헌은, WO1994/15923). 여타 상기 언급된 엑토인 유도체는 예를 들어 시험관내에서의 히드록시엑토인의 화학적 유도체화에 의해 수득될 수 있다.

- [0027] 본원에서 언급되는 하나 이상의 상용성 용질이란, 둘 이상의 상용성 용질이 본 발명의 조성물에 함께 사용될 수 있음을 의미한다. 바람직하게는, 엑토인 및 그의 하나 이상의 유도체가 본 발명의 조성물에 적용될 수 있다. 그러한 맥락에서, 히드록시엑토인이 바람직한 유도체이다. 나아가, 히드록시엑토인 및 호모엑토인과 같은 엑토인 유도체의 조합물이 또한 적용될 수 있다.
- [0028] 본원에 사용된 용어 "산화환원 등가물"은 디히드로게나아제의 기질로부터 산화환원 보조인자로 이동된 하이드라이드 (H^-) 또는 지시약으로부터 산화환원 보조인자로 이동된 전자를 지칭한다.
- [0029] 용어 "산화환원 등가물 존재시 지시약에 하나 이상의 광학 특성에서의 변화를 이끌어낼 수 있는 시약"은 산화환원 등가물의 존재시 지시약에서 하나 이상의 광학적 특성에서의 변화를 유도할 수 있는 분자를 지칭한다. 본 발명에 따르면, 그 시약은 또한 후속하여 검출될 수 있는 지시약의 한가지를 초과하는 광학적 특성에서의 변화를 이끌어낼 수 있다. 본원에서 언급되는 광학 특성은 흡광 또는 발광, 완화, 굴절 또는 편광 및 그에 관련된 특성들과 같은 광학적으로 검출될 수 있는 지시약의 특성을 지칭한다. 본원에 사용되는 바와 같은 하나 이상의 광학 특성의 그러한 변화는 이전에는 검출불가했던 특성의 검출, 이전에 검출된 바 있던 특성 부재의 검출 및 특성의 정량적 변화 검출, 즉 하나 이상의 광학 특성의 변화 정도와 상관있는 신호 강도 변화의 검출을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 본 발명에서 고려되는 바람직한 광학 특성은 색상, 형광, 발광 또는 굴절률측정이다. 본 발명에 따라 고려되는 시약에 의해 변화되는 광학 특성은 지시약의 유형에 좌우된다. 검출할 원하는 광학 특성 및 조성물에 사용되는 시약에 따라, 당업자는 특히 본원에 언급된 것들 중에 번잡한 과정없이 적합한 지시약을 선택할 수 있을 것이다.
- [0030] 상기 언급된 시약은 바람직하게는 산화환원 보조인자로부터 지시약으로 산화환원 등가물을 직접적으로 또는 간접적으로, 즉 추가 매개자를 통해 이동시킬 수 있다. 산화환원 등가물의 상기 이동 결과로서, 지시약은 하나 이상의 광학 특성에서 변화가 일어나도록 개질된다. 예를 들어, 산화 상태에서는 무색 또는 무형광인 것이 환원 상태에서 시약에 의해 매개되는 산화환원 등가물의 이동에 의해 유색 또는 형광 지시약으로 변환될 수 있다. 산화환원 등가물의 이동은 산화환원 등가물이 시약에 의해 지시약으로 직접 이동될 수 있거나, 또는 간접인 것이 될 수 있다. 후자의 경우, 산화환원 등가물은 시약으로부터, 후속하여 산화환원 등가물을 지시약으로 이동시킬 중간 매개자로 이동된다. 바람직하게는 하나 초과의 매개자를 이용할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 시약은 산화환원 등가물을, 후속하여 산화환원 등가물을 제 2 매개자로 이동시키는 제 1 매개자로 이동시킬 수 있고, 상기 제 2 매개자는 산화환원 등가물을 지시약으로 이동시킨다. 그러한 매개자 캐스케이드에서 둘 초과의 매개자가 이용될 수 있음을 이해할 것이다. 산화환원 등가물의 지시약으로의 이동을 위해 하나 이상의 매개자를 이용하는 것의 장점은 광학 검출 타이밍이 개선될 수 있다는 점이다.
- [0031] 본 발명의 맥락에서 적용될 수 있는 매개자는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 칼륨 폐리시아나이드, 퀴논 유도체, 나일 블루 (Nile blue) (CAS 번호: 3625-57-8), Meldola blue (CAS 번호: 7057-57-0), 본원에 참고문헌으로 포함되는 EP 1 457 572 B1에 개시되어 있는 오스뮴 복합체, 또는 전이 금속 촉물, 예컨대 루테늄 헥사민 클로라이드를 포함한다.
- [0032] 바람직하게 고려되는 본 발명에 따른 시약은 폐나진이다. 더욱 바람직하게는, 상기 폐나진은 폐나진에토설페이트, 폐나진메토설페이트, 1-(3-카르복시프로포시)-5-에틸폐나진지늄트리플루오로메탄술포네이트 또는 1-메톡시페나진메토설페이트이다. 그러한 폐나진은 지시약의 하나 이상의 광학 특성에서의 변화를 이끌어내기 위해 적용될 수 있다. 검출 및 그러한 폐나진이 적용되는 방법에 대한 상세한 사항은 본원에 참고문헌으로 포함되는 EP 0 654 079 A1에서 찾을 수 있다.
- [0033] 또한, 본원의 맥락에서 고려되는 시약은 바람직하게는 키논이다. 더욱 바람직하게는, 상기 키논은 폐난트렌 키논, 폐난트롤린키논 또는 벤조[h]-키놀린키논이다.
- [0034] 본원의 맥락에서 고려되는 또 다른 시약은 니트로소아닐린이다. 더욱 바람직하게는, 상기 니트로소아닐린이 [(4-니트로소페닐)이미노]디메탄올-히드로클로라이드이다.
- [0035] 본 발명에서 고려되는 또 다른 바람직한 것은 산화환원 등가물 존재시 지시약의 하나 이상의 광학 특성에서의 변화를 이끌어낼 수 있는 시약이며, 상기 시약은 산화환원 등가물의 산화환원 보조인자로부터 지시약으로의 이동을 촉매할 수 있는 효소이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명에 따라 본원의 맥락에서 고려되는 효소는 디아포라아제 (EC 번호 1.6.99.2), 바람직하게는 리포아미드 디히드로게나아제 또는 NADH 디히드로게나아제 또는 그의 효소적으로 활성인 돌연변이이다. 바람직한 디아포라아제는 폐지 심장, 클로스트리듐 클루이베리이 (*Clostridium kluyverii*) 또는 바실러스 스테아로테르모필러스 (*Bacillus stearothermophilus*) 유래의 것이다.

상기 효소의 구조는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 DE 2 061 984 에 기재되어 있다. 효소 활성 돌연변이는 본원의 다른 부분에 기재된 바와 같이 제공될 수 있다. 본 발명에 따라 고려되는 특히 바람직한 디아포라아제는 개시된 해당 내용과 관련하여 본원에 참고문헌으로 포함되는 US2007/196899 에 개시된 바와 같은 개선된 열안정성 및 촉매 특성을 가진 것이다.

[0036] 바람직하게는, 상용성 용질은 건조 상태 하의 조성물 중의 하나 이상의 효소의 효소 활성 감퇴를 감소시킨다. 더욱 바람직하게는, 상기 하나 이상의 효소는 디히드로게나아제이다. 그러나, 더욱 바람직하게는, 하나 이상의 효소가 디히드로게나아제 뿐만 아니라, 바람직하게는 상기 기재된 바와 같이 디아포라아제의 두가지 모두일 수 있으며, 이는 지시약 산화환원 등가물 존재시 하나 이상의 광학 활성에서의 변화를 이끌어낼 수 있는 시약으로서 본 발명의 조성물에 적용된다. 더욱 바람직하게는, 효소 활성 감퇴는, 효소 중 하나 또는 두가지 모두의 효소 활성의 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상이 유지되도록 상기 상용성 용질이 없는 대조군 조성물에 비해 하나 이상의 상용성 용질에 의해 상기 언급된 바와 같은 실온 또는 심지어 더 높은 온도에서 제조 및/또는 저장하는 동안 본 발명의 조성물에서 방지되거나 또는 적어도 현저히 줄어든다.

[0037] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "지시약 시약" 은 산화환원 등가물의 이동 결과로서 하나 이상의 광학 특성에서의 변화가 일어나도록 개질된 분자 또는 분자 본체를 지칭한다.

[0038] 본 발명의 조성물에 적용되는 바람직한 지시약은 헤테로폴리 산, 바람직하게는 2,18-포스포로몰리브덴산, 키논, 바람직하게는 레사주린, 디클로로페놀린도페놀, 및/또는 테트라졸륨 염, 바람직하게는 시판하여 입수 가능한 WST-3, WST-4 및 WST-5 염 (Dojindo, Inc. US) 을 포함한다. 그러한 지시약은 산화환원 등가물의 이동시 환원되며, 그러한 환원은 하나 이상의 광학 특성 및 특히 색상에서의 변화를 동반한다.

[0039] 본 발명에 따라 고려되는 추가의 바람직한 지시약은 시약들, 예컨대 형광단으로서, 산화환원 등가물의 이동시 변화되는 형광물질이다. 적합한 형광단은, 다른 것들 보다 특히, 산화환원 보조인자의 맥락에서 본원에서 언급된 바 있는 플라빈 뉴클레오티드 및 니코틴-아데닌-디뉴클레오티드을 포함한다. 카르바-NAD 또는 NAD 와 같은 산화환원 보조인자가 본 발명의 조성물에 지시약으로 적용되는 경우, 본 발명의 조성물의 구성성분 (b), (c) 및 (d) 는 모두 동일한 문자, 즉 카르바-NAD 또는 NAD 로 나타내어질 수 있다. 따라서, 구성성분 (b), (c) 및 (d) 는 본 발명의 조성물에서 동일한 화학 본체로 나타내어질 수 있다. 나아가, 각각 그 내용이 본원에 참고문헌으로 포함되는 EP 0 620 283 B1 또는 EP 0 831 327 B1 에 개시된 개질된 니트로소아닐린은 바람직하게는 구성성분 (c) 및 구성성분 (d) 로서 사용될 수 있다. 따라서, 구성성분 (c) 및 (d) 는 동일한 본 발명의 조성물에서 화학 본체에 의해 나타내어질 수 있다.

[0040] 본원에서 앞서 언급된 조성물로부터 용매를 제거하는 과정, 특히 열 처리는 효소 활성, 특히 디히드로게나아제와 같이 민감한 효소의 효소 활성에 영향을 주는 것으로 공지되어 있다. 나아가, 건조 조건 하에서는 디히드로게나아제와 같은 효소들이 산화 프로세스 및 동반되는 효소 변성에 대해 더욱 민감하게 된다 (Andersson 2000, Biotechnol. Appl. Biochem 32: 145-153). 따라서, 효소검출 검정을 위한 복합적인 건조성물의 제조 및 그의 저장은 종종 변성, 응집 또는 여타 프로세스에 의한 효소의 불활성화 증가를 동반한다. 용매-포함 주변환경에서의 효소의 재구성시, 효소 활성 감소가 종종 관찰된다. 유리하게는, 본 발명의 근간이 될 연구에서 본 발명의 복합체 건조 조성물의 제조 및/또는 저장 동안 일어나는 상기 효소 활성의 감퇴는 본원에서 더욱 상세하게 설명되고 있는 하나 이상의 상용성 용질의 첨가에 의해 유의하게 방지될 수 있다는 점을 발견하게 되었다. 그러한 사실은, 엑토인 및 그의 유도체가 예를 들어, 효소 활성 감퇴를 결과로서 제공하는 락테이트 디히드로게나아제의 응집을 방지하는데 불충분한 것으로 보고된 바 있기 때문에 놀라운 것이다 (Andersson 2000, 앞서 인용한 문헌). 나아가, 본 발명의 훨씬 복잡하고, 용매가 없는 조성물에 존재하는 산화환원 민감성 조건 하에서 조차 보존 유효성이 있다는 사실이 또한 놀랍다. 흥미롭게도, 그리고 놀랍게도, 엑토인의 보존 유효성은 조사한 디히드로게나아제에 대해 용액에서는 관찰되지 않았다. 특히, 하나 이상의 상용성 용질을 제외하고는 본 발명의 조성물의 구성성분을 지닌 건조성물에 존재하는 효소 활성이 본 발명의 근간이 되는 연구에서 건조 상태 및 건조 조건 및 4°C 를 상회하는 온도 하의 저장 동안 감소하는 것으로 나타났다. 특히, 45°C 에서 3 주 저장 후에는 예를 들어 글루코오스 디히드로게나아제의 효소 활성의 오직 약 50% 만 존재하며, 상기 조건에서 예를 들어 디아포라아제의 효소 활성은 오직 약 55% 만 존재하는 것으로 나타났다. 그러나, 본 발명의 근간이 되는 연구에서 엑토인 또는 그의 유도체인 하나 이상의 상용성 용질이 조성물에 존재할 때 현저히 더 높은 효소 활성이 유지될 수 있는 것으로 나타났다. 본 발명의 조성물의 추가적인 장점은 조성물 중에 적용된 상용성 용질이 광학 검출 시스템과 상충하지 않는다는 점이다. 특히, 이는 생성된 광학 신호를 방해하지 않으며, 또한 지시약, 산화환원 보조인자 또는 하나 이상의 광학적 변화를 이끌어낼 수 있는 시약의 안정성 또는 기능을 악화시키지 않는다. 더욱이 효소적 변환 및 변환 속도가 바람직하게도 상용성

시약에 의해 약화되지 않는다.

- [0041] 본 발명의 조성물의 바람직한 구현예에서, 상용성 용질은 3 (w/w)% 이상, 4 (w/w)% 이상, 5 (w/w)% 이상, 6 (w/w)% 이상, 7 (w/w)% 이상 또는 8 (w/w)% 이상의 양으로 존재한다.
- [0042] 본 발명의 조성물의 바람직한 구현예에서, 상기 조성물은 추가로 하나 이상의 안정화제, 계면활성제, 팽윤제, 막 형성제 및/또는 고체 입자를 함유한다. 본 발명의 조성물에 사용되는 적합한 안정화제, 계면활성제, 팽윤제, 막 형성제, 산화제 및/또는 고체 입자들은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0043] 바람직하게는, 상기 하나 이상의 안정화제가 폴리비닐피롤리돈, 더욱 구체적으로는 PVP K25 이다.
- [0044] 바람직하게는, 상기 하나 이상의 계면활성제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 나트륨-N-메틸-N-올레오일타우레이트, N-옥타노일-N-메틸-글루카미드, Mega 8 (N-메틸-N-옥타노닐글루카미드), 디옥틸나트륨 솔포숙시네이트 (DONS), Rhodapex® (바람직하게는 CO-433 또는 CO-436) 이다.
- [0045] 바람직하게는, 상기 하나 이상의 팽윤제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 메틸 비닐 에테르 말레산 무수물 공중합체, 잔탄 겸 및 메틸 비닐 에테르 말레산 공중합체.
- [0046] 바람직하게는, 상기 하나 이상의 막 형성제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 폴리비닐프로피오네이트 분산액, 폴리비닐 에스테르, 폴리비닐 아세테이트, 폴리아크릴 에스테르, 폴리메타크릴산, 폴리비닐 아미드, 폴리아미드, 폴리스티렌 및 부타디엔, 스티렌 또는 말레산 에스테르와 같은 혼합된 중합반응 생성물이 또한 적합하다.
- [0047] 바람직하게는, 상기 하나 이상의 고체 입자는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: 실리카 입자, 특히 이산화규소, 나트륨 실리케이트 또는 알루미늄 실리케이트, 규조토, 금속 산화물, 특히 티탄 산화물 및/또는 알루미늄 산화물, 합성 산화물 재료, 특히 산화물 재료의 나노입자, 예컨대 이산화규소, 알루미늄 산화물 또는 티탄 산화물의 나노입자, 카울린, 분말 유리, 무정형 실리카, 칼슘 설페이트 및 바륨 설페이트.
- [0048] 본 발명의 조성물의 특히 바람직한 구현예에서, 상기 조성물은 첨부된 실시예에서의 표 1에 수록된 구성성분을 함유하며, 더욱 바람직하게는 그들로 이루어진다.
- [0049] 본원에 사용된 용어에 관한 모든 정의 및 설명은 하기 기재된 구현예들에도 준용되어 적용된다. 하기에 추가로 제공되는 추가적인 정의 및 설명이 또한 본 명세서에 기재된 모든 구현예에 준용되어 적용된다.
- [0050] 본 발명은 본 발명의 조성물 및 담지체를 함유하는 체액 시료 유래의 분석물을 결정을 위한 진단 시험 엘리먼트에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명의 맥락에서 사용되는 용어 "담지체"는 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 고체 지지체를 지칭한다. 바람직하게는, 조성물은 담지체 상에 고정된다. 나아가, 조성물은 담지체 상에서 공간적으로 배치될 수 있음이 고려된다. 담지체는 지시약의 하나 이상의 광학 특성의 변화 검출이 가능하도록 배치되어야만 하는데, 즉 바람직하게는 하나 이상의 광학 특성의 검출을 방해할 구성성분 또는 공간 배치를 포함하지 않는다. 적합한 담지체는 본 발명의 조성을 포함하는 바이알, 예를 들어 웰-플레이트 포맷으로 배치된 바이알을 포함할 수 있다. 여타 검정은 광학 도파관 또는 반도체 플레이트를 적용할 수 있다. 그러나, 바람직한 담지체는 시험 스트립에 사용되는 것이다. 상기 시험 스트립은 일반적으로 하나 이상의 층을 포함해 고체 담지체를 형성한다.
- [0052] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "체액"은 결정될 분석물을 포함하는 것으로 공지되어 있거나 그럴 것으로 의심되는 모든 체액을 지칭한다. 여러 진단 관련 분석물을 포함할 것으로 공지된 바람직한 체액은 전혈, 혈청 및 혈장을 포함하는 혈액, 뇨, 타액, 액 (liquor), 활액 (synovial liquid) 및 땀 (sudor) 이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명에 따른 체액 시료는 전혈 시료이다.
- [0053] 본원에 사용되는 용어 "분석물"은 체액 시료에 존재하는 생물학적 분자로서, 그의 존재, 부재 또는 양이 본 발명에 따라 결정될 것을 지칭한다. 본원에 기재된 결정은 디히드로게나아제의 효소 활성을 근간으로 하기 때문에, 상기 분석물은 조성물에 포함되는 디히드로게나아제의 기질임을 이해해야 한다. 본 발명에 따라 결정되는, 예를 들어 상기 언급된 진단 시험 엘리먼트에 의해 결정되는 것으로 간주되는 바람직한 분석물은 글루코오스, 말토오스, 만노오스, 갈락토오스, 글루타메이트, 글루코오스-6-포스페이트, 에탄올 또는 락토오스 및, 더욱 바람직하게는 글루코오스이다.
- [0054] 바람직하게는, 본 발명의 진단 시험 엘리먼트는 상기 조성물을 포함하는 검정포를 포함하는데, 여기서 검정포는

그 위에 체액 시료를 적용하는 적용층 및 분석물이 조성물과 반응할 때 광학 특성에서의 변화를 검출하도록 하는 검출층을 포함한다. 시료는 시료 적용층에 적용되는데, 바람직하게는 혈액 시료에 존재하는 혈구세포와 같은 세포들이 검출층에는 이르지 않는 것으로 간주된다.

[0055] 그러한 시험 엘리먼트 및 그의 제조에 대한 상세한 사항은 본원에 참고문헌으로 포함되는 EP 0 821 234 B1에서 찾을 수 있다. 추가로, 본 발명에 따라 고려되는 시험 엘리먼트는 각각 그 내용이 본원에 참고문헌으로 포함되는 EP 1 035 919 B1 또는 EP 1 035 920 B1에 개시된 것이다.

[0056] 구체적으로, 본 발명의 진단 시험 엘리먼트의 검정포는 바람직하게는 그 위에 제 1 및 제 2 막층이 그 순서로 서로 위에 포개져 적용되어 있는 투명 포일을 포함한다. 투명 포일 상에 위치된 제 1 층은 겹쳐져 있는 제 2 층에 비해 광을 훨씬 덜 산란시킨다는 점이 중요하다. 투명 포일의 코팅되지 않은 측면은 검출층으로 지정되며, 제 1 층 위에 제 2 층이 있는 측면과 반대편에 있는 제 2 층의 측면은 시료 적용층으로 지정된다.

[0057] 본 발명에 따른 진단 시험 엘리먼트의 막 층들은 중합체 막 형성제의 분산액 또는 에멀전으로부터 제조된다. 분산액 막 형성제는 담지체 액체 (일반적으로, 물)에 불용성이며, 담지체 액체에 미세하게 분산되어 있는 현미경 수준의 중합체 입자들을 포함한다. 액체가 막 형성 동안 증발에 의해 제거된다면, 입자들은 서로 더욱 가깝고 미세하게 접해 있게 된다. 그러한 프로세스에서 발생하는 큰 장력 및 막 형성을 동반하는 표면 에너지 증가는 실질적으로 폐쇄되어 있는 막 층으로의 입자 성장을 야기한다. 대안적으로, 용매에 용해되어 있는 막 형성제의 에멀전을 사용하는 것도 가능하다. 용해되어 있는 중합체는 용매와 비혼화성인 담지체 액체 중에 에멀전화되어 있다. 폴리비닐 에스테르, 폴리비닐 아세테이트, 폴리아크릴 에스테르, 폴리메타크릴산, 폴리비닐 아미드, 폴리아미드 및 폴리스티렌이 그러한 막 형성제를 위한 중합체로서 특히 적합하다. 단독중합체에 추가하여, 부타디엔, 스티렌 또는 말레산 에스테르와 같은 혼합된 중합체반응 생성물이 또한 적합하다.

[0058] 2 개의 소위 막 층들은 본 발명에 따른 진단 시험 담지체의 검정포의 투명 포일 상에 위치한다. 이를 위해, 액체에 불투성인 플라스틱 포일이 고려된다. 폴리카르보네이트 포일이 특히 적합한 것으로 나타났다.

[0059] 2 개의 막 층은 동일한 중합체 막 형성제를 포함하는 코팅 화합물로부터 제조될 수 있거나, 또는 상이한 중합체 막 형성제를 포함하는 코팅 화합물로부터 제조될 수 있다.

[0060] 제 1 층이 팽윤제 및 임의로는 약한 광산란 필러를 함유하는 반면, 제 2 층은 팽윤제를 필요로 하며, 임의의 경우 광을 강력히 산란하는 하나 이상의 안료를 필요로 한다. 추가로, 제 2 층은 또한 비-다공성 필러 뿐만 아니라 다공성 필러도 포함할 수 있다.

[0061] 잘 팽윤하는 팽윤제 (즉, 물 흡수시 그의 부피가 증가하는 물질)를 첨가함으로써, 시료 액체에 의해 상대적으로 신속하게 침투될 수 있는 층을 수득할 수 있을 뿐만 아니라, 팽윤제의 그러한 개방 효과에도 불구하고 양호한 세포, 예를 들어 혈구세포 및 추가적으로 혈액 색소, 분리 특성을 얻게 된다. 그러한 팽윤 특성은 하나 이상의 광학 특성의 변화가 주로 그 층을 통한 시료 액체의 침투에 의존하며, 광학 특성의 변화가 최대 1 분 후에 측정가능한 시험에 대해 더욱 그러하다. 특히 적합한 팽윤제는 메틸 비닐 에테르 말레산 무수물 공중합체, 잔탄 겸 및 메틸 비닐 에테르 말레산 공중합체인 것으로 나타났다.

[0062] 제 2 층에서의 강력 광산란 안료의 양은 검정포의 건조 측석 사용 이중층에 대해 25 중량% 이상이다. 약한 광산란 필러 및 강력 광산란 안료는 막 층의 광학 특성에 핵심적이기 때문에, 제 1 및 제 2 막 층은 상이한 필러 및 안료를 지닌다.

[0063] 제 1 막 층은 필러를 전혀 함유하지 않거나 또는 물의 굴절율에 가까운 굴절율을 가진 필러를 함유해야 한다. 이산화규소, 실리케이트 및 알루미늄 실리케이트가 특히 이에 적합한 것으로 나타났다. 상품명 Transpafill.RTM® 인 나트륨 알루미늄 실리케이트가 특히 바람직하다. 이는 66 중량%의 SiO_2 , 26 중량%의 Al_2O_3 , 7 중량%의 Na_2O 및 1 중량%의 SO_3 의 평균적인 조성을 갖고 있다. 특히 바람직한 1 차 입자의 평균 과립 크기는 약 $0.06 \mu\text{m}$ 이다.

[0064] 본 발명에 따르면, 제 2 층은 광을 매우 강력하게 산란시킨다. 이상적으로는, 제 1 막 층의 안료의 굴절율은 2.5 이상이 되어야 한다. 이에 따라, 바람직하게는 이산화티탄이 사용된다. 평균 직경이 0.2 내지 0.8 μm 인 입자들이 특히 유리한 것으로 나타났다. 아나타나제 개량 (anatase modification)에서 용이하게 가공가능한 이산화티탄이 매우 특히 바람직하다.

[0065] 본 발명의 조성물이 1 개의 막 층, 바람직하게는 제 1 막 층에 포함되는 것이 가능하다. 그러나, 또한 본

발명의 조성물이 두 막 층 모두에 존재하는 것도 가능하다.

[0066] 본 발명에 따른 진단 시험 담지체에서 검정포를 최적화하기 위해, 두 막 층이 비용절약 습윤제를 포함할 때 특히 유리한 것으로 나타났다. 천연의 즉, 비하전 습윤제가 그에 특히 바람직하다. N-옥타노일-N-메틸 글루카마이드가 가장 특별히 바람직하다.

[0067] 본 발명에 따라 진단 시험 엘리먼트의 검정포를 제조하기 위해서는, 각각의 막 층이 각각 상기 구성성분들의 균질 분산액으로부터 순차적으로 제조된다. 이를 위해, 투명 포일을 제 1 막 층을 위한 코팅 화합물을 형성을 위한 베이스로 이용한다. 제 1 막 층을 위한 코팅 화합물을 특별한 막 두께로 적용한 후, 그 층을 건조시킨다. 이후, 제 1 층을 위한 코팅 화합물을 또한 얇은 막 두께로 상기 층에 적용하고 건조시킨다. 건조 후, 제 1 및 제 2 막의 두께는 합해 0.20 mm, 바람직하게는 0.12 mm, 특히 바람직하게는 0.08 mm 를 초과하지 않도록 한다.

[0068] 그러한 방식으로 제조된 검정포는, 시험할 액체를 흡수하지 않는 점을 고려하여 선택된 재료로 된 담지용 층에, 더 낮은 취급을 위해 마운팅될 수 있다. 이들은 소위, 예를 들어 가장 바람직하게는 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드, 폴리에스테르, 폴리카르보네이트 또는 폴리아미드로 제조된 비흡착성 재료인 플라스틱 포일이다. 추가 담지 재료로서는 금속 포일 또는 유리가 적합하다.

[0069] 본 발명에 따른 시험 엘리먼트의 바람직한 구현예에서, 지시약의 하나 이상의 광학 특성에서의 변화에 대해 관찰 및 측정되는 검정포의 검출측은 체액 시료에서 검출될 분석물 결정을 위해서는 담지 층을 통해 보이는 것이어야 한다. 이는 투명 담지 층에 의해 달성될 수 있다. 그러나, 담지 층이 검정포의 검출측에 의해 덮어지는 천공을 지니는 것이 가능하다. 그러면, 검출측은 천공을 통해 보이게 된다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 진단 시험 엘리먼트에서 검정포의 검출측 아래의 담지 층에 구멍이 존재하여, 그것을 통해 검정포의 검출측이 관찰될 수 있다. 그 구멍은 검정포의 가장 작은 선의 치수보다 약간 더 작아서, 구멍 밖의 검정포는 담지 층에 있게 되며, 그곳에 부착되어 있을 수 있다.

[0070] 나아가, 본 발명은 고체 담지체 상에 본 발명에 따른 조성물을 생성하는 단계를 포함하는, 진단 시험 엘리먼트의 제조 방법에 관한 것이다.

[0071] 본 발명의 상기 방법의 바람직한 구현예에서, 상기 생성은 하기 단계를 포함한다:

[0072] (i) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a) 내지 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계; 및

[0073] (ii) 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

[0074] 또는

[0075] (i) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a), (b), (d) 및 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 중의 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계;

[0076] (ii) 제 1 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

[0077] (iii) 본 발명의 조성물의 구성성분 (c) 내지 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 위의 제 2 층에 적용하는 단계; 및

[0078] (iv) 제 2 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

[0079] 또는

[0080] (i) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a), (b), (d) 및 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 중의 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계;

[0081] (ii) 제 1 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

[0082] (iii) 본 발명의 조성물의 구성성분 (b) 내지 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 위의 제 2 층에 적용하는 단계; 및

[0083] (iv) 제 2 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;

- [0084] 또는
- [0085] (i) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a), (d) 및 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 중의 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계;
- [0086] (ii) 제 1 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;
- [0087] (iii) 본 발명의 조성물의 구성성분 (b) 내지 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 위의 제 2 층에 적용하는 단계;
- [0088] (iv) 제 2 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;
- [0089] 또는
- [0090] (i) 본 발명의 조성물의 구성성분 (c) 내지 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 중의 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계;
- [0091] (ii) 제 1 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;
- [0092] (iii) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a), (b), (d) 및 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 위의 제 2 층에 적용하는 단계; 및
- [0093] (iv) 제 2 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;
- [0094] 또는
- [0095] (i) 본 발명의 조성물의 구성 성분 (b) 내지 (e) 를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 중의 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계;
- [0096] (ii) 제 1 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;
- [0097] (iii) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a), (b), (d) 및 (e) 및 용매를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 위의 제 2 층에 적용하는 단계; 및
- [0098] (iv) 제 2 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;
- [0099] 또는
- [0100] (i) 본 발명의 조성물의 구성 성분 (b) 내지 (e) 를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 중의 담지체 상의 검정포에 적용하는 단계;
- [0101] (ii) 제 1 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계;
- [0102] (iii) 본 발명의 조성물의 구성성분 (a), (d) 및 (e) 를 함유하는 조성물 (즉, 건조한 상태라기 보다는 용해되어 있는 상태인 구성성분을 함유하는 조성물) 을 제 1 층 위의 제 2 층에 적용하는 단계; 및
- [0103] (iv) 제 2 층의 조성물로부터 상기 용매를 제거하는 단계.
- [0104] 바람직하게는, 조성물이 검정포의 검출층에 적용된다. 검출층은 특히 하나 이상의 습식 화학 프로세스를 수단으로 하여, 더욱 특별하게는 본 발명의 조성물의 하나 이상의 분산액, 바람직하게는 수성 분산액으로부터 생성될 수 있다. 하나 이상의 분산액으로부터의 그러한 층-형성 프로세스는 원래 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어 상기 언급된 선행 기술, 더욱 특별하게는 EP 0 821 234 B1 에 예시된 것을 참조할 수 있다.
- [0105] 가열 처리, 증발 또는 냉동-건조를 포함하는, 용매 제거를 위해 공지된 모든 기법에 의해 시험 엘리먼트의 검정 포에 대한 상기 조성물의 적용 후 조성물로부터 용매가 제거될 수 있다. 바람직하게는, 단계 (b) 에서의 상기 용매는 실질적으로 가열 처리에 의해 제거된다.
- [0106] 또한 바람직하게는, 상기 상용성 용질은 특히 예를 들어 가열 처리에 의해 달성되는 단계 (b) 에서의 용매의 실질적인 제거 동안 그리고 시험 엘리먼트 상에서 건조 조건 하에 조성물의 유지 동안 조성물 중의 하나 이상의 효소의 효소 활성 감퇴를 줄여준다.
- [0107] 본 발명은 또한 본래 건조 조건 하에 조성물 중의 하나 이상의 효소의 효소 활성 감퇴를 방지하기 위한 엑토인 또는 그의 유도체인 하나 이상의 상용성 용질의 용도에 관한 것으로, 여기서 상기 조성물은 디히드로게나아제,

산화환원 보조인자, 산화환원 등가물 또는 지시약 존재시 하나 이상의 광학 특성에서의 변화를 이끌어낼 수 있는 시약 및 지시약을 함유한다.

[0108] 바람직하게는, 건조 조건 하에 조성물 중의 상기 하나 이상의 상용성 용질은 진단 시험 엘리먼트, 바람직하게는 상기에서 상세히 설명한 진단 시험 엘리먼트에 포함된다.

[0109] 본 발명은 또한 하기 단계를 포함하는 체액 시료 중의 분석물의 존재 또는 그의 양을 결정하는 방법에 관한 것이다:

[0110] (a) 본 발명의 진단 시험 엘리먼트를, 하나 이상의 효소를 재구성 상태로 변환시키기에 적합한 조건 하에 분석물을 함유할 것으로 의심되는 체액과 접촉시키는 단계;

[0111] (b) 진단 시험 엘리먼트 상에서 재구성 상태로 하나 이상의 효소를 함유하는 습윤화된 조성물에서 지시약의 하나 이상의 광학 특성 변경을 측정하여, 체액 시료 중의 분석물의 존재여부 또는 양을 결정하는 단계.

[0112] 본원의 다른 부분에서 이미 제시된 바와 같이, 진단 시험 엘리먼트 상의 조성물에 사용되는 디히드로게나아제의 기질 특이성에 따라, 상이한 분석물이 본 발명의 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0113] 본원에 사용된 접촉은, 담지체 및 체액 시료에 함유되는 본 발명의 조성물의 물리적 접촉을 허용하도록 체액 시료를 담지체에 적용하는 것을 의미한다. 특히, 접촉은 디히드로게나아제가 재구성되도록, 즉 습윤화되어 용해되며, 그에 따라 생물학적으로 활성이 되기에 적합한 조건 하에 그에 충분한 시간 동안 실시된다. 적합한 조건은 진단 담지체에 좌우되며, 당업계에 공지되어 있다. 시험 엘리먼트에 적용되는 체액 시료는 바람직하게는 2 마이크로미터 미만, 더욱 특별하게는 1 마이크로리터 미만의 부피를 갖고 있다.

[0114] 상기 생물학적 활성 디히드로게나아제의 재구성시, 효소는 그의 기질, 즉 체액 시료 중에 포함되는 분석물에 결합하며, 그것을 각각의 생성물 및 산화환원 등가물로 변환시킨다. 디히드로게나아제에 의해 생성된 산화환원 등가물은, 지시약에 함유된 조성물 중의 산화환원 등가물 존재시 지시약의 하나 이상의 광학 특성에서의 변화를 이끌어낼 수 있는 시약에 의해 이동되기 때문에, 디히드로게나아제 활성을 결정하도록 해 준다. 이어서, 지시약의 하나 이상의 광학 특성에서의 변화가 측정될 수 있다. 진단 시험 엘리먼트에 따라서는, 광학 특성에서의 변화의 측정이 본원의 다른 부분에서 더욱 상세히 설명한 상이한 기법에 의해 달성될 수 있다. 광학 특성, 예컨대 색상 변화 검출을 위해, 공간 분할 광학 검출기가 이용될 수 있다. 공간 분할 광학 검출기 (spatially resolving optical detector) 는 완전히 일치하지 않는 검출 층의 검출층 영역을 기록할 수 있는 여러개의 광학 센서를 가진 광학 검출기를 의미한다. 더욱 특별하게는, 공간 분할 광학 검출기는 하나 이상의 이미지 센서, 즉 1 차원 또는 2 차원일 수 있는 광학 검출기의 어레이를 포함할 수 있다. 이에 따라, 더욱 특별하게는, 광학 검출기는 CCD 칩 및/또는 CMOS 칩을 포함할 수 있다. 추가로, 공간 분할 광학 검출기는 공간 분할 광학 검출기의 이미지-감수성 표면 상에 검출층 및/또는 검출층을 영상화하기 위한 하나 이상의 광학 엘리먼트를 포함할 수 있다.

[0115] 상기 기재된 방법에 의해 측정되는 하나 이상의 광학 특성에서의 변화는 분석물 존재의 표시가 될 수 있다. 당업자라면 분석물의 양을 결정하기 위해서는, 광학 특성의 변화 정도를 비교할 필요가 있다는 점을 이해할 것이다. 나아가, 그러한 목적을 위해, 광학적 변화를 동반한 검출 신호를 공지된 양의 분석물에 의해 나오는 광학적 변화를 동반한 신호, 즉 보정 신호와 비교할 필요가 있다. 그러한 보정이 확립될 수 있는 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0116] 본원에 사용된 용어 "양" 은 진단 시험 엘리먼트에 적용된 시료 중에 존재하는 분석물의 절대적 또는 상대적 양을 지칭한다. 본 발명에 따라 바람직한 상대적 양은 농도, 즉 부피에 대한 양이다.

[0117] 본 명세서에서 언급되는 모든 참고문헌들은 그의 전체 개시된 내용 및 그와 관련하여 언급되는 구체적인 개시된 내용과 관련하여 본원에 참고문헌으로 포함된다.

도면

[0119] 도 1: 활성에 대한 평균 값을 안정화제 (상용성 용질) 의 양과 비교해 표시했다. 안정화제 없이 시험 엘리먼트에서 결정된 활성을 차감했다.

[0120] 도 2: 글루코오스 디히드로게나아제 및 디아포라아제에 대한 엑토인 및 히드록시엑토인의 안정화 효과의 그래프 도시.

[0121] 도 3: 효소 활성에 대한 표식자로서 측정된 글루코오스 수준과 비교한 저장 온도의 그래프 도시. A) 안정화

제 부재; B) 엑토인, 1 g/100 g 조성물; C) 히드록시엑토인, 1 g/100 g 조성물.

[0122] **도 4:** 코팅 조성물에 사용된 상이한 완충액의 영향. A) PO4-완충액 pH 6,8, 안정화제 부재함; 45 일 후; 45 °C 내지 4°C; B) PO4-완충액 pH 6,8, 100 g RF 마다 2 g 엑토인; 45 일 후; 45°C 내지 4°C; C) HEPES pH 7,1, 안정화제 부재함; 45 일 후; 45°C 내지 4°C; D) HEPES pH 7,1, 100 g RF 당 2 g 엑토인; 45 일 후; 45°C 내지 4°C

[0123] **도 5:** Gluc-DOR 및 Gluc-DOR 31 돌연변이에 대한 엑토인의 안정화 효과가 이미 3 주 후 45°C에서 관찰가능하다.

실시예

실시예 1: 시험 스트립의 생성

[0126] 글루코오스 수준 결정을 위해 네가지 상이한 반응막들을 생성시키고, 본질적으로 EP 0 821 234 실시예 1에 기재된 바와 같이 포일 상에 코팅시켰다. 조성물의 제형물은 하기 표 1에 제시되었다.

표 1: 건조 전 제 1 코팅막 100 g 당 구성요소

바실러스 서브틸리스 유래의 글루코오스디히드로게나아제	1,09 g	1,09 g	1,09 g	1,09 g
바실러스 서브틸리스 유래의 디아포라아제	0,77 g	0,77 g	0,77 g	0,77 g
NAD	0,58 g	0,58 g	0,58 g	0,58 g
Na/K 포스페이트 완충액 또는 HEPES	0,35g	0,35g	0,35g	0,35g
엑토인 또는 히드록시엑토인	0,00 g	1,00 g	2,00 g	4,00 g
잔탄 검	0,29 g	0,29 g	0,29 g	0,29 g
실리카 FK 320DS	5,80 g	5,80 g	5,80 g	5,80 g
나트륨-N-메틸-N-올레일-타우레이트	0,03 g	0,03 g	0,03 g	0,03 g
N-옥타노일-N-메틸-글루카마이드	0,17 g	0,17 g	0,17 g	0,17 g
폴리비닐피롤리돈	0,86 g	0,86 g	0,86 g	0,86 g
테트라에틸암모늄클로라이드	0,07 g	0,07 g	0,07 g	0,07 g
2,18-포스포르몰리브덴산 혼사나트륨 염	0,33 g	0,33 g	0,33 g	0,33 g
폴리비닐프로피오네이트-분산액 (수중 50 Gew.-%)	5,00 g	5,00 g	5,00 g	5,00 g
K3[Fe(CN)6]	0,01 g	0,01 g	0,01 g	0,01 g
2-메틸-2 부탄올	1,00 g	1,00 g	1,00 g	1,00 g
100g 이 될 때까지 물 첨가				

[0128]

[0129] pH 6.8로 조정하고, 조성물을 폴리카르보네이트 포일 (125 마이크로미터) 상의 막 (약 120 마이크로미터)로 코팅했다. 후속하여, 코팅된 조성물을 50°C에서 건조시켰다.

[0130] 제 2 코팅을 하기와 같이 제 1 코팅에 적용했다:

[0131]

표 2: 제 2 코팅막의 구성요소

Gantrez	1,47 g
나트륨-N-메틸-N-올레일-타우레이트	0,03 g
PVP K25	2,01 g
Mega 8	0,37 g
테트라에틸암모늄클로라이드	0,45 g
실리카 FK 320DS	2,00 g
티탄디옥시드 E171	22,00 g
폴리비닐프로피오네이트-분산액 (수중 50 Gew.-%)	6,25 g
비스-(2-히드록시에틸)-(4-히드록시이미노시클로헥사-2,5-디에닐리딘)-암모늄클로라이드	0,48 g
2,18-포스포르몰리브덴산 혼화나트륨 염	1,41 g
K3[Fe(CN)6]	0,01 g
2-메틸-2 부탄올	1,00 g
100g 까지 물 첨가	

[0132]

pH 6.8 로 조정하고, 조성물을 포일상에 코팅된 제 1 막 상에 제 2 막으로서 코팅했다 (약 25 마이크로미터). 후속하여, 코팅된 조성물을 50°C 에서 건조시켰다. 글루코오스 결정을 위한 시험 스트립을 EP 0 821 234, 섹션 ([0063 내지 0067]) 에 기재된 바와 같이 생성시켰다.

[0134]

실시예 2: 시험 엘리먼트에서의 효소 활성의 결정

[0135]

시험 엘리먼트를 6 주간 45°C 에서 건조제의 존재 하에 플라스틱 바이알에 저장했다. 후속 단계에서, 시험 엘리먼트의 검정포를 용리 완충액을 이용해 초음파에 의해 용리시켰다. 상청액에서, 효소 활성을 결정했다.

[0136]

표 3: 용리 완충액 및 상이한 효소 활성에 대한 검출 기법

	용리 완충액	검출 기법
글루코오스디히드로게나아제	Tris/HCl, NaCl, NAD; pH 8,5	340 nm 에서 UV-검출
디아포라아제	Tris/HCl, NaCl, Triton; pH 8,8	INT → 테트라졸륨 alsz; 492 nm 에서 검출

[0137]

결과는 도 1 에 제시되었다. 도면은 100 g 코팅 조성물마다 0.3 g 를 초과하는 엑토인 농도에 대해 현저한 안정화 효과 (10% 초과) 가 있음을 보여준다. 동일한 효과가 도 2 에 제시된 바와 같이 히드록시액토인에 대해 관찰될 수 있다. 나아가, 도면은 디히드로게나아제 뿐만 아니라 디아포라아제도 안정화된다는 것을 보여준다.

[0139]

실시예 3: 시험 엘리먼트에서의 효소 활성의 결정

[0140]

시험 엘리먼트를 63 일간 4°C (KS), 24°C (RT), 35°C (DT), 및 45°C (HT) 에서 건조제의 존재 하에 플라스틱 바이알에 저장했다. 시험 엘리먼트는 여러 정맥혈 시료에서의 혈당 수준 결정에 이용했다. 시료를 병렬 식으로 표준 방법 (Hitachi) 으로 측정했다. 결과는 KS 저장된 시험 엘리먼트에 대해 정규화했다.

[0141]

도 3 에서, 저장 온도를 표시했을 뿐만 아니라, 효소 활성에 대한 표식자로서 글루코오스 수준도 표시되어 있다. 명시된 바와 같이, 엑토인 및 히드록시액토인이 안정화제로서 작용하여, 효소 활성을 보존시킨다.

[0142]

실시예 4: 상이한 완충액을 이용한 시험 엘리먼트에서의 효소 활성의 결정

[0143]

시험 엘리먼트는 실시예 3 에 기재된 바와 같이 저장 및 처리했다. 상이한 완충액, 즉 안정화제 부재 하의 포스페이트-완충액 pH 6.8, 100 g 의 제 1 코팅막 마다 2 g 엑토인이 있는 포스페이트-완충액 pH 6.8, 안정화제 부재 하의 HEPES 완충액 pH 7.1, 및 100 g 의 제 1 코팅막 마다 2 g 엑토인이 있는 HEPES 완충액 pH 7.1 을 표 4 에 제시된 코팅 조성물에 사용했다. 도면으로부터 알 수 있는 바와 같이, 엑토인의 안정화 활성은 완충액 시스템과는 독립적인 것으로 판찰되었다.

[0144] 실시예 5: 용액에서의 글루코오스 디히드로게나아제 돌연변이 2 의 효소 활성 및 엑토인 또는 히드록시엑토인에 대한 의존성의 결정

[0145] WO2011/020856 에 개시되어 있는 바와 같은 글루코오스 디히드로게나아제 돌연변이 2 를 함유하는 용액의 분취액을 표 4 에 제시된 바와 같은 상이한 양의 엑토인 또는 히드록시엑토인과 조합했다.

표 4: 안정화 용액

실시예 번호	내용물	안정화제 및 농도
1	글루코오스디히드로게나아제 Mut.2 3000 U/ml, NAD 10 mg/ml; K-Na 포스페이트 15 mM, pH 6.8.	0 (기준)
2	dto	엑토인 4% (w/v)
3	dto	엑토인 2% (w/v)
4	dto	엑토인 1% (w/v)
5	dto	히드록시엑토인 4% (w/v)
6	dto	히드록시엑토인 2% (w/v)
7	dto	히드록시엑토인 1% (w/v)

[0147]

[0148] 분취액을 상이한 저장 조건 (8 일, 4°C; 8 일 35°C, 4 일 4°C 에 이어 4 일 45°C) 하에 저장하고, 저장 후 효소 활성을 결정했다. 결과는 표 5 에 제시한다. 용액에서는 엑토인 또는 히드록시엑토인의 안정화 효과가 결정될 수 없었다.

[0149]

표 5: 결과

실시예 번호	주	단위	4 °C에서 8 일	35°C에서 8 일	4°C에서 4 일, 45°C에서 4 일
1	기준	kU/g	213	126	50
2	엑토인 약 4%	kU/g	207	137	57
3	엑토인 약 2%	kU/g	222	149	59
4	엑토인 약 1%	kU/g	222	144	60
5	히드록시엑토인 약 4%	kU/g	207	131	56
6	히드록시엑토인 약 2%	kU/g	221	141	60
7	히드록시엑토인 약 1%	kU/g	208	122	52

[0150]

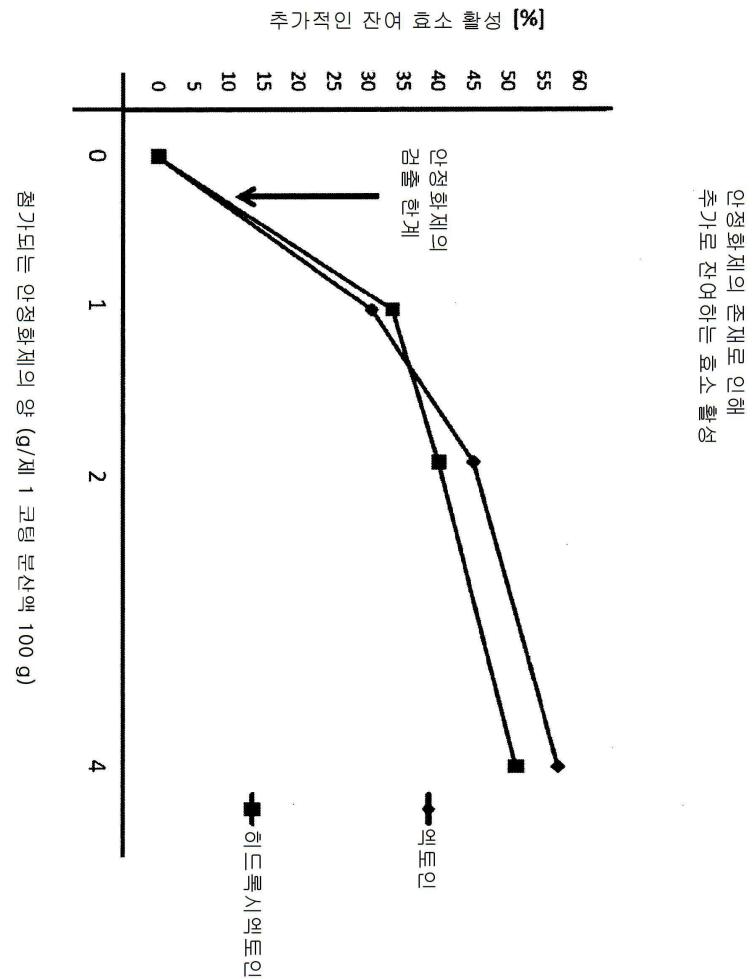
실시예 6: Gluc-DOR (=PQQ-의존성 글루코오스 디히드로게나아제) 를 이용한 시험 엘리먼트의 평가

[0151]

Gluc-DOR 및 그의 돌연변이 (Gluc-DOR 31) 가 있는 시험 엘리먼트를 상기 실시예 1 에 기재된 바와 같이 만들었다. 시험 엘리먼트를 상기 실시예 2 에 기재된 바와 같이 분석했다. 효소 활성의 결정은 EP 0 620 283 B1 에 기재되어 있는 니트로소 아닐린을 이용해 실시했다. 도 5 에서 알 수 있는 바와 같이, 안정화 효과는 3 주 후에 이미 45°C 에서 관찰가능했다.

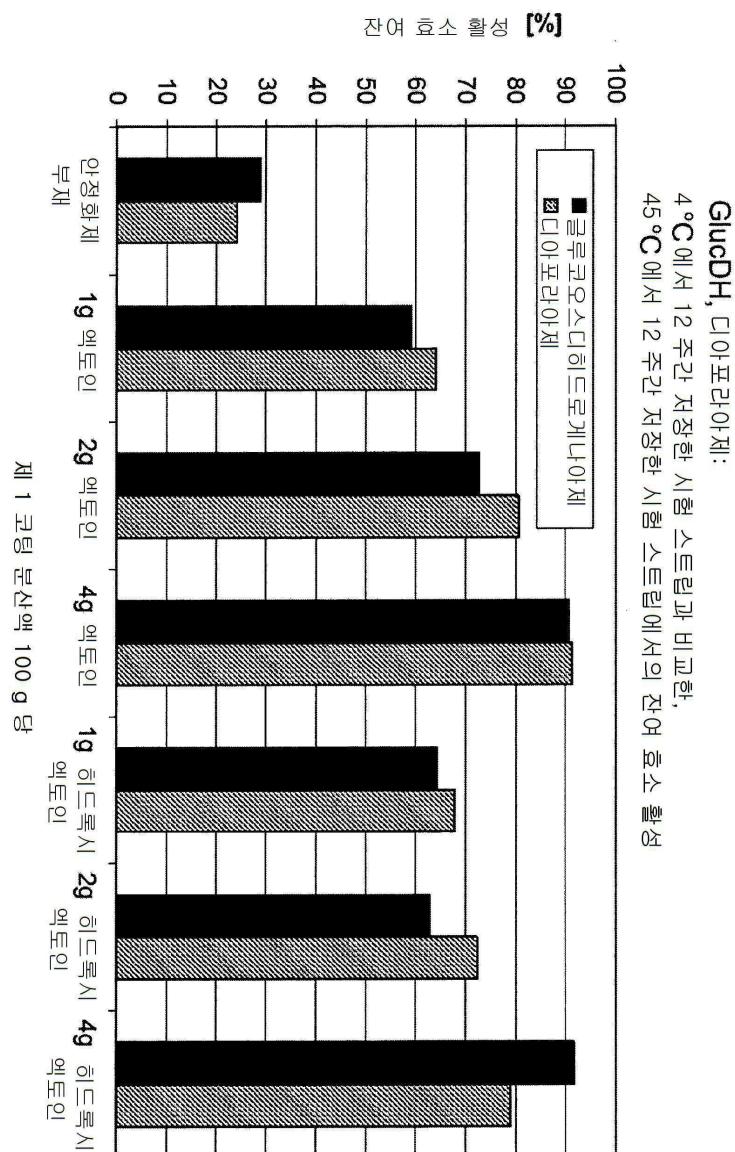
도면

도면1

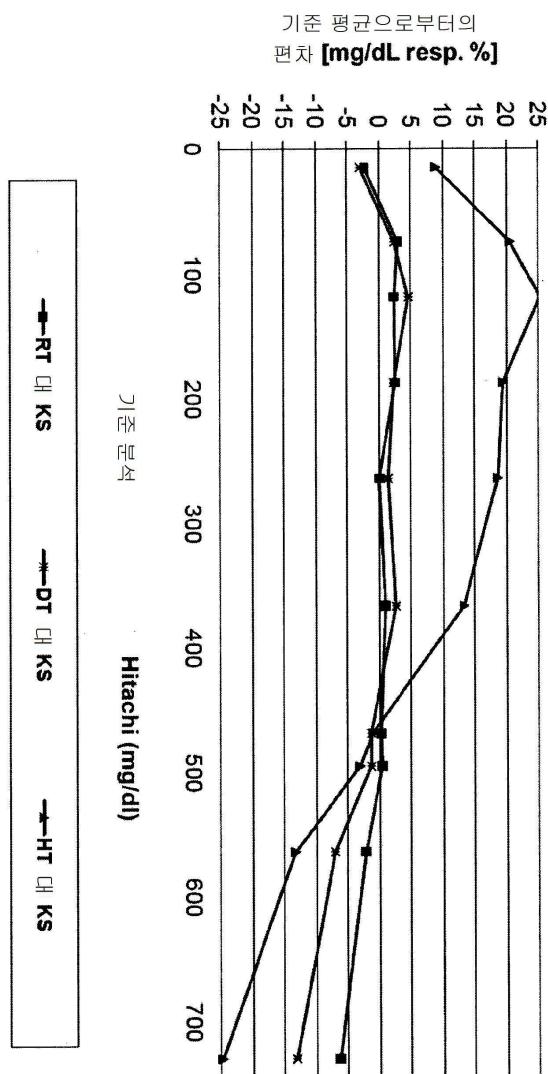


첨가되는 안정화제의 양 (g/제 1 코팅 분산액 100 g)

도면2

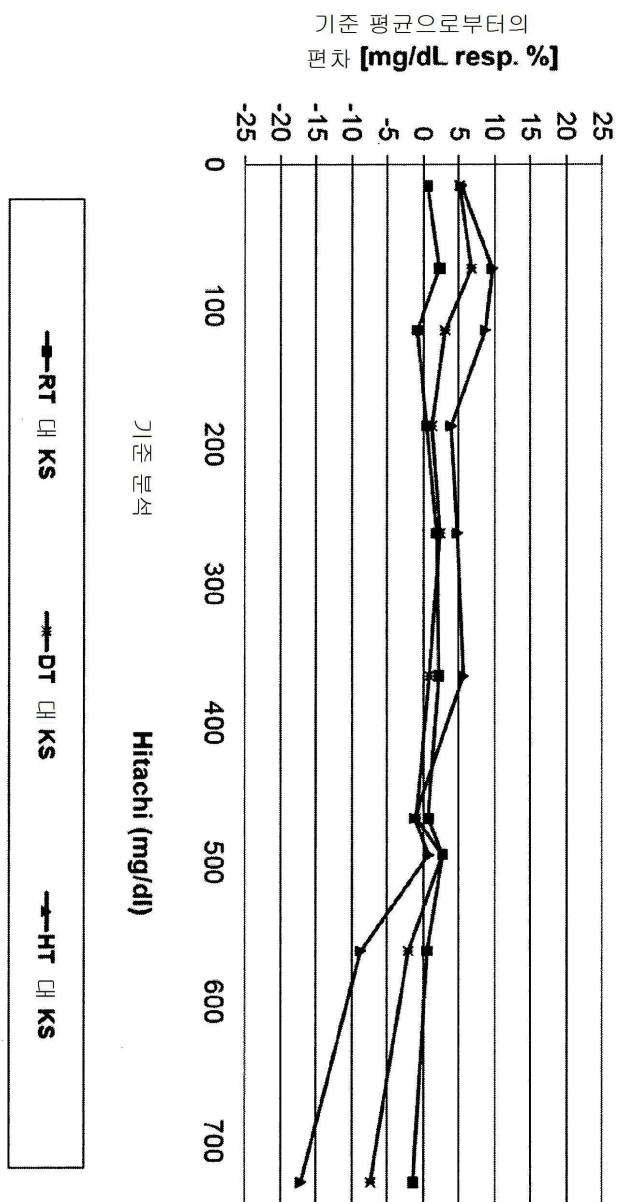


도면3a



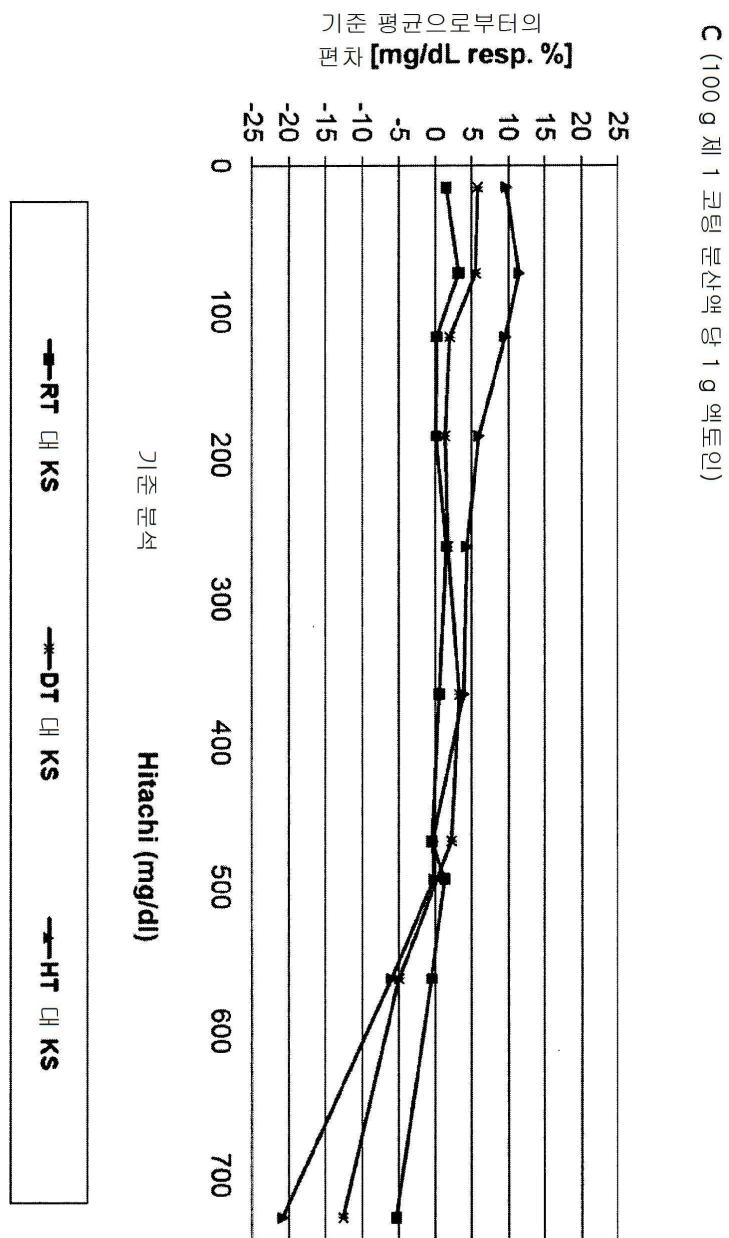
시험 스트림의 안정성 – 저장 63 일
–안정화 유효성
A (안정화제가 없는 제 1 코팅 분산액)

도면3b

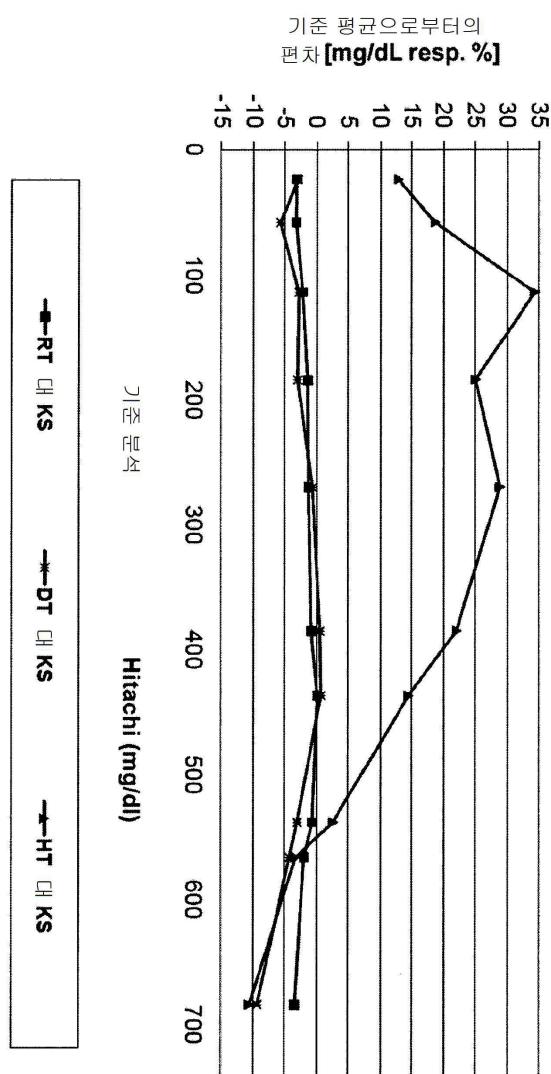


B (100 g 의 제 1 코팅 분산액 당 1 g 헤이드록시액토인)

도면3c



도면4a

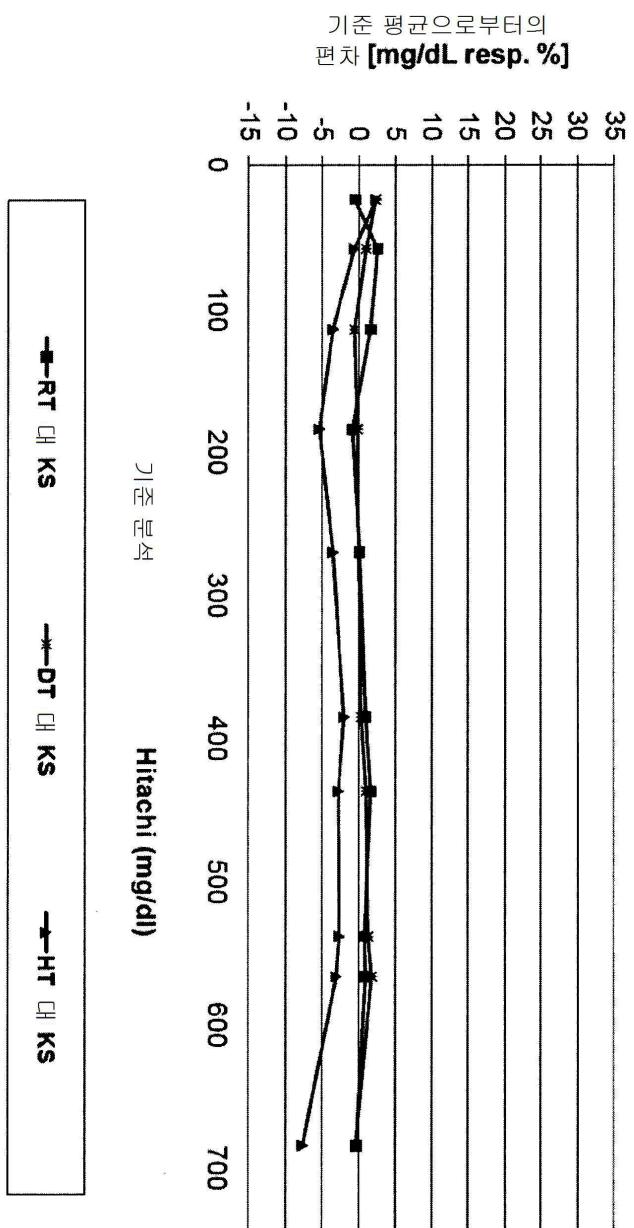


시험 스트립의 안정성 시험 – 저장 9 주

– 상이한 원종액에서의 안정화 유효성 –

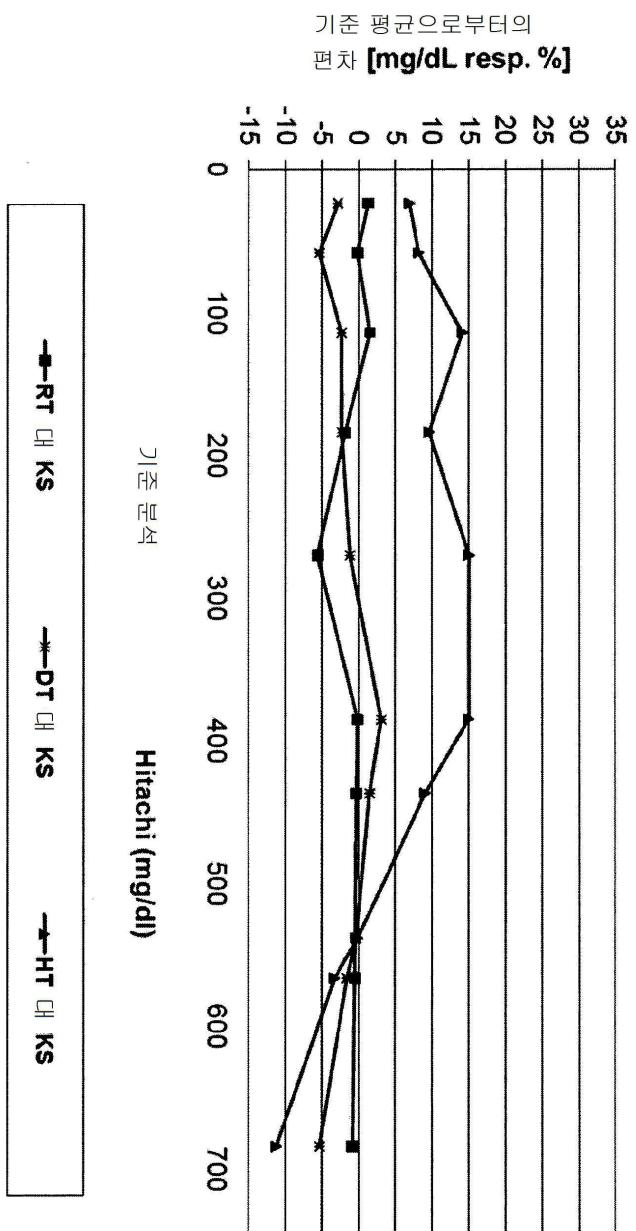
A) 안정화제 부재 하의 포스페이트 원종액 pH 6.8

도면4b

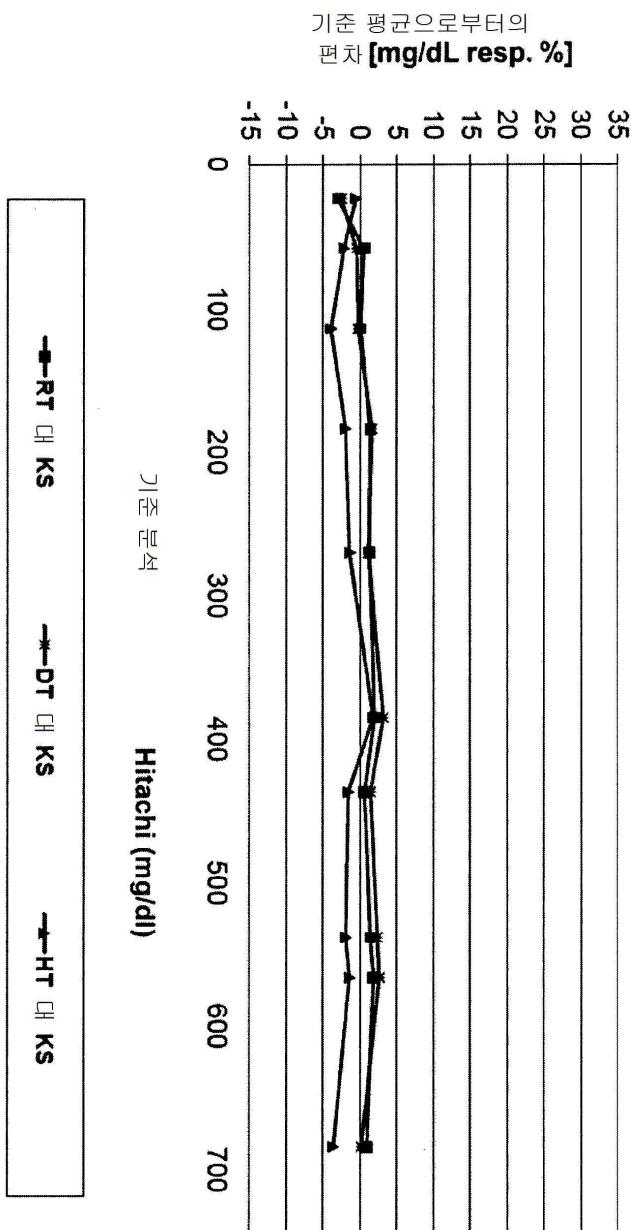


B) 포스페이트 완충액 pH 6.8, + 100 g 의 제 1 코팅 분산액 당 2 g 엑토인

도면4c



도면4d



도면5

Gluc-DOR:

4°C에서 3 주간 저장한 시험 스트립과 비교한
45°C에서 3 주간 저장한 시험 스트립에서의 잔여 효소 활성

