



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년05월07일

(11) 등록번호 10-1975178

(24) 등록일자 2019년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)

(21) 출원번호 10-2014-7013716

(22) 출원일자(국제) 2012년11월20일

심사청구일자 2017년10월16일

(85) 번역문제출일자 2014년05월21일

(65) 공개번호 10-2014-0098750

(43) 공개일자 2014년08월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/066108

(87) 국제공개번호 WO 2013/078227

국제공개일자 2013년05월30일

(30) 우선권주장

61/562,302 2011년11월21일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

US20110065088 A1

US20110095636 A1

US20070092978 A1

JP2009516199 A

(73) 특허권자

아박시스, 임크.

미국 캘리포니아 (우편번호 94587) 유니온 시티
휘플 로드 3240

(72) 발명자

쿠에시코 크리스티나

미국 캘리포니아주 94536 프리몬트 알함브라 드라
이브 4587

워커 제레미

미국 캘리포니아주 94546 카스트로 벨리 센터 스
트리트 22120

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

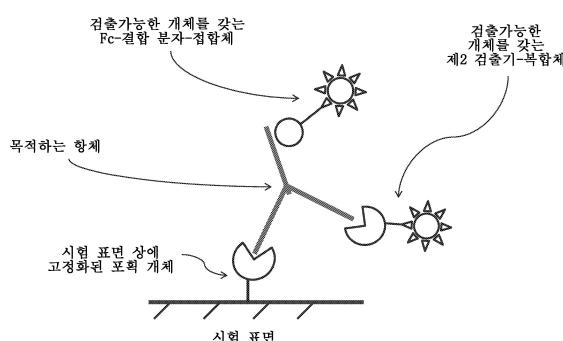
전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 양경식

(54) 발명의 명칭 측방 유동 및 관련된 면역검정에서의 신호 증폭

(57) 요약

본 발명은, 시험 샘플 중의 항체의 검출을 향상시키는데 유용한 방법, 장치, 조성물(예를 들면, 포획 복합체), 및 키트를 제공한다. 당해 방법, 장치, 및 조성물은, 단백질 A, 단백질 G, 및/또는 Fc-특이적 항체와 같은 검출 가능한 Fc-결합 분자를 이용하여 측방 유동 검정과 같은 면역검정에서 검출된 항체의 신호를 증폭시킨다.

대 표 도

(72) 발명자

메라 라제쉬 케이.

미국 캘리포니아주 94544 헤이워드 #109 사우스워
드라이브 25410

아론 케네쓰 피.

미국 캘리포니아주 94110 샌 프란시스코 페어 오크
스 스트리트 201

블레이슬 데니스 엠.

미국 캘리포니아주 94583 샌 라몬 원터사이드 썬클
800

명세서

청구범위

청구항 1

시험 샘플 중의 항체의 존재를 검출하기 위한 방법으로서,

- (a) 상기 시험 샘플을 제1 검출기 및 제2 검출기와 접촉시켜, 상기 제1 검출기, 제2 검출기 및 상기 항체를 포함하는 제1 복합체를 형성시키는 단계로서, 상기 제1 검출기는 제1 검출가능한 개체(entity)에 접합된 Fc-결합분자를 포함하고 이때 상기 Fc-결합 분자는 상기 항체의 Fc 영역에 특이적으로 결합할 수 있으며, 상기 제2 검출기는 제2 검출가능한 개체에 접합된 항원 또는 항원성 웹타이드를 포함하고 이때 상기 항원 또는 항원성 웹타이드는 항체의 가변 영역에 특이적으로 결합할 수 있는 단계;
- (b) 상기 제1 복합체를 표면의 시험 영역 상에 고정화된 포획 개체(capture entity)와 접촉시키는 단계로서, 상기 포획 개체가 상기 항체에 결합하고, 이때 상기 항체는 상기 제1 검출기, 제2 검출기 및 포획 개체와 포획 복합체를 형성하고, 상기 포획 복합체는 상기 시험 영역 상에 고정화되는 단계; 및
- (c) 상기 시험 영역 중의 상기 제1 검출가능한 개체로부터의 신호의 존재를 검출하는 단계로서, 상기 신호의 존재는 상기 시험 샘플 중의 상기 항체의 존재를 나타내는 단계를 포함하는, 시험 샘플 중의 항체의 존재를 검출하기 위한 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 검출기가 상기 표면의 접합 영역(conjugate region)에 고정화되고, 여기서, 상기 접합 영역은 상기 표면의 시험 영역과 중복(overlap)되지 않는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 Fc-결합 분자가 단백질 A 및/또는 단백질 G인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 포획 개체가 항원 또는 항원성 웹타이드인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 항원 또는 항원성 웹타이드가, 심장사상충 (heartworm), 애를리키아 캐니스 (*Ehrlichia canis*), 애를리키아 채펜시스 (*Ehrlichia chaffeensis*), 애를리키아 에윙기 (*Ehrlichia ewingii*), 보렐리아 부르그도르페리 (*Borrelia burgdorferi*), 보렐리아 아프젤리 (*Borrelia afzelii*), 보렐리아 가리니 (*Borrelia garinii*), 아나플라스마 파고사이토필룸 (*Anaplasma phagocytophilum*), 아나플라스마 플라티스 (*Anaplasma platys*), 고양이 백혈병 바이러스, 파르보바이러스, 인플루엔자 A 균주, 인플루엔자 B 균주, 조류 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합(respiratory syncytial) 바이러스, 레지오넬라 (*Legionella*), 아데노바이러스, 로타바이러스, 고양이 면역결핍성 바이러스, 사람 면역결핍성 바이러스, 및 그룹 A 스트렙토코커스 (*Streptococcus*)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유기체 유래인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 제1 검출가능한 개체가 금속 나노입자, 금속 나노쉘(nanoshell), 형광단, 또는 착색된 라텍스 입자인, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 금속 나노입자 또는 상기 금속 나노쉘, 금 입자, 은 입자, 구리 입자, 백금 입자, 카드뮴 입자, 복합재 입자, 금 중공구(gold hollow sphere), 금-피복된 실리카 나노쉘(gold-coated silica nanoshell), 및 실리카-피복된 금 쉘(silica-coated gold shell)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 제1 검출기 및 제2 검출기가 접합 영역 상에 고정화되고, 이때 상기 접합 영역은 상기 표면의 시험 영역과 중복되지 않는, 방법.

청구항 9

제2항 또는 제8항에 있어서, 상기 접합 영역이 제어 검출기를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 제1 검출가능한 개체 및 제2 검출가능한 개체가 동일하고, 임의로, 상기 제1 검출가능한 개체 및 제2 검출가능한 개체가 금 나노입자인고, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 제2 검출기의 상기 항원 또는 항원성 펩타이드가, 심장사상충, 애를리키아 캐니스, 애를리키아 차펜시스, 애를리키아 에왕기, 보렐리아 부르그도르페리, 보렐리아 아프겔리, 보렐리아 가리니, 아나플라스마 파고사이토필룸, 아나플라스마 플라티스, 고양이 백혈병 바이러스, 파르보바이러스, 인플루엔자 A 균주, 인플루엔자 B 균주, 조류 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 레지오넬라, 아데노바이러스, 로타바이러스, 고양이 면역결핍성 바이러스, 사람 면역결핍성 바이러스, 및 그룹 A 스트렙토코커스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유기체 유래인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 제1 검출기 및 제2 검출기가 약 20:1 내지 약 1:1의 비로 존재하는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 제1 검출기가, 상기 제1 검출가능한 개체에 접합된 Fc-결합 분자를 포함하고, 이때 상기 Fc-결합 분자는 단백질 A 및/또는 단백질 G인, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 표면이 측방 유동 검정 장치(lateral flow assay device) 내의 유동 경로(flow path) 또는 분석 회전자(analytical rotor) 내의 유동 경로이거나, 상기 시험 샘플이 체액, 신체 기관의 추출물, 혈액, 혈청 또는 혈장인, 방법.

청구항 15

제2항에 있어서, 상기 시험 샘플을 상기 제2 검출기 및 제1 검출기와 임의의 순서 또는 차례로 혼합하는, 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 제2 검출기가, 제2 검출가능한 개체(entity)에 접합된 애를리키아 (*Ehrlichia*) 항원성 펩타이드 또는 이의 혼합물인, 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 제1 검출기 및 제2 검출기가 상기 혼합물 중에 약 16:1 내지 약 2:1, 임의로 약 4:1의 비율로 존재하는, 방법.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

발명의 설명

기술 분야

관련 출원들의 상호-참조

[0001] 본 출원은, 2011년 11월 21일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61/562,302호의 이익을 주장하고, 이의 전문은 본 원에 인용에 의해 포함된다.

배경 기술

[0002] 면역검정(immunoassay)은, 다른 용도들 중에서도 갑염성 제제를 확인하기 위해 흔히 사용된다. 소정의 면역검정은, 예를 들면, 주어진 갑염성 제제의 하나 이상의 고유의 항원들에 특이적으로 결합하는 숙주 항체들의 존재에 대해 시험함으로써, 당해 갑염성 제제에 대한 숙주 면역학적 반응들에 의존한다. 대형의 자동화된 중앙 실험실 시스템 및 비교적 간단한 오버-더-카운터 시험(over-the-counter test)을 포함하는, 많은 유형들의 면역검정 시스템들이 진단 목적들을 위해 이용가능하다. 이들 면역검정은 응집 검정, 침강 검정, 효소-연결된 면역검정, 직접 형광 검정, 면역조직학적 시험, 보체-고정화 검정(complement-fixation assay), 혈청학적 시험, 면역-전기영동 검정, 및 측방 유동(lateral flow) 및 유동 통과 시험(flow through test)[즉, 신속한 "스트립(strip)" 시험]과 같은 광범위한 시험 양식들을 이용한다. 면역검정은, 다양한 조건에 대해 신속하고, 단순하며, 효과적인 진단을 제공할 수 있다. 그러나, 당해 분야에는 민감성이 증가된 개선된 면역검정에 대한 요구가 남아있다.

발명의 내용

발명의 요약

[0003] 본 발명은 부분적으로, 검출가능한 Fc-결합 분자들(예를 들면, 단백질 A-접합체들, 단백질 G-접합체들, 2차 항체 접합체들)의 첨가가 면역검정들, 예를 들면, 항원-계 포획 또는 샌드위치-유형 검정들에서 항체들의 검출을 사용될 수 있다는 발견을 기본으로 한다. 이들 검출가능한 Fc-결합 분자들은 면역검정들에서 항체들의 검출을 위한 다른 검출가능한 개체들(entities)과 함께 또는 단독으로 사용될 수 있다. 예를 들면, 일단 검출할 항체들이, 항체-특이적 결합 개체들, 예를 들면, 항원들에 의해 포획되면, 이들 Fc-결합 분자들을 사용하여 항체들을 검출할 수 있다. 다른 예에서, 이들 Fc-결합 분자들은 예를 들면, 항원과 같은 다른 표지된 또는 검출가능한 항체 결합 개체와 함께, 검출가능한 신호에 대한 제2 공급원으로서 사용될 수 있다.

[0004] 이러한 발견은 본원에 기술된 바와 같은, 다양한 포획-형 검정들, 관련된 방법들, 조성물들, 및 키트(kit)들에 적용될 수 있다.

[0005] 따라서, 소정 실시형태는, 시험 샘플 중의 항체를 검출하기 위한 방법으로서, a) 상기 시험 샘플을 제1 검출기와 접촉시켜 상기 제1 검출기 및 상기 항체를 포함하는 제1 복합체를 형성시키는 단계(여기서, 상기 제1 검출기는, 제1 검출가능한 개체(entity)에 접합된 Fc-결합 분자를 포함한다); (b) 상기 제1 복합체를, 표면의 시험 영역 상에 고정화된 포획 개체(capture entity)와 접촉시키는 단계(여기서, 상기 포획 개체가 항체에 특이적으로 결합할 수 있다); 및 (c) 상기 시험 영역 내에서 상기 제1 검출가능한 개체로부터의 신호의 존재를 검출하는 단계(여기서, 상기 신호의 존재는 상기 시험 샘플 중의 상기 항체의 존재를 나타낸다)를 포함하는, 시험 샘플 중의 항체를 검출하기 위한 방법을 포함한다. 소정 실시형태에서, 상기 제1 검출기가 상기 표면의 접합 영역

(conjugate region)에 고정화되고, 여기서, 상기 접합 영역은 상기 표면의 시험 영역과 중복(overlap)되지 않는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 Fc-결합 분자는 단백질 A, 단백질 G, 또는 이들 둘 다이다. 소정 실시형태에서, 상기 제1 검출기는, 검출가능한 개체에 각각 접합된 단백질 A 및 단백질 G를 포함한다. 이러한 실시형태에서, 단백질 A 대 단백질 G의 비를 조절하여, 검출될 면역글로불린의 유형에 따라 신호 증폭의 수준을 최적화시킬 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 단백질 A 및 단백질 G는 약 10:1 내지 약 1:10, 보다 바람직하게는 약 5:1 내지 약 1:5의 비로 존재한다.

[0008] 소정 실시형태에서, 상기 포획 개체는 항원 또는 항원성 펩타이드이다. 특정 실시형태에서, 상기 항원 또는 항원성 펩타이드는, 심장사상충 (heartworm), 예를 들면, 개 심장사상충, 에를리키아 캐니스(*Ehrlichia canis*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 보렐리아 아프젤리(*Borrelia afzelii*), 보렐리아 가리니(*Borrelia garinii*), 아나플라스마 파고사이토필룸(*Anaplasma phagocytophylum*), 고양이 백혈병 바이러스, 파르보바이러스, 인플루엔자 A 균주, 인플루엔자 B 균주, 조류 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합(respiratory syncytial) 바이러스, 레지오넬라(*Legionella*), 아데노바이러스, 로타바이러스, 고양이 면역결핍성 바이러스, 사람 면역결핍성 바이러스, 및 그룹 A 스트렙토코커스(*Streptococcus*)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유기체 유래이다.

[0009] 소정 실시형태에서, 상기 제1 검출가능한 개체는 금속 나노입자, 금속 나노쉘(nanoshell), 형광단, 또는 착색된 라텍스 입자이다. 일부 실시형태에서, 금속 나노입자 또는 금속 나노쉘은 금 입자, 은 입자, 구리 입자, 백금 입자, 카드뮴 입자, 복합재 입자, 금 중공구(gold hollow spheres), 금-피복된 실리카 나노쉘(gold-coated silica nanoshell), 및 실리카-피복된 금 쉘(silica-coated gold shell)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0010] 본원에 제공된 소정의 방법은, 상기 시험 샘플을 제2 검출기와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 제2 검출기는 제2 검출가능한 개체에 접합된 항원 또는 항원성 펩타이드를 포함하고, 상기 항원 또는 항원성 펩타이드는 항체에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 제1 검출기 및 제2 검출기는 접합 영역 상에 고정화되며, 여기서, 상기 접합 영역은 표면의 시험 영역과 중복되지 않는다. 소정 실시형태에서, 상기 접합 영역은 제어 검출기(control detector)를 추가로 포함한다. 신호 증폭의 수준은 상기 제2 검출기에 대한 제1 검출기의 비를 조절함으로써 선택할 수 있다. 소정 실시형태에서, 제2 검출기에 대한 제1 검출기의 비는 약 20:1 내지 약 1:20, 보다 바람직하게는 약 20:1 내지 약 1:1이다.

[0011] 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 검출가능한 개체 및 제2 검출가능한 개체들은 동일하다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 검출가능한 개체 및 제2 검출가능한 개체는 둘 다 금 나노입자이다. 다른 실시형태에서, 상기 제1 검출가능한 개체 및 제2 검출가능한 개체들은 상이하다.

[0012] 소정 실시형태에서, 상기 표면은 측방 유동 검정 장치 내의 유동 경로(flow path), 미세역가 플레이트(microtiter plate)의 표면, 또는 분석 회전자(analytical rotor) 내의 유동 경로이다.

[0013] 상기에 나타낸 바와 같이, 소정 실시형태는, 검출가능한 개체에 접합된 제2 검출기를 사용하며, 여기서, 상기 제2 검출기는 항원 또는 항원성 펩타이드이다. 이들 및 관련된 실시형태 중 일부에서, 상기 항원 또는 항원성 펩타이드는, 심장사상충, 예를 들면, 개 심장사상충, 에를리키아 캐니스, 에를리키아 채페니스(*Ehrlichia chaffeensis*), 에를리키아 에윙기(*Ehrlichia ewingii*), 보렐리아 부르그도르페리, 보렐리아 아프젤리, 보렐리아 가리니, 아나플라스마 파고사이토필룸, 아나플라스마 플라티스(*Anaplasma platys*), 고양이 백혈병 바이러스, 파르보바이러스, 예를 들면, 개 파르보바이러스, 인플루엔자 A 균주, 인플루엔자 B 균주, 조류 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 레지오넬라, 아데노바이러스, 로타바이러스, 고양이 면역결핍성 바이러스, 사람 면역결핍성 바이러스, 및 그룹 A 스트렙토코커스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유기체 유래이다.

[0014] 일부 실시형태에서, 상기 표면은 측방 유동 검정 장치 내의 유동 경로 또는 분석 회전자 내의 유동 경로이다. 특정 실시형태에서, 시험 샘플은 혈액, 혈청, 또는 혈장이다.

[0015] 샘플 로딩 영역; 접합 영역(당해 접합 영역은, 제1 검출가능한 개체에 접합된 Fc-결합 분자를 포함하는 이동가능한 제1 검출기를 포함한다); 및 시험 영역(당해 시험 영역은, 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 고정화된 포획 개체를 포함한다)을 포함하는, 항체 검출 장치로서, 상기 샘플 로딩 영역, 상기 접합 영역, 및 상기 시험 영역은, 작동시, 액체 샘플이, 샘플 로딩 영역 내에 로딩될 때에, 상기 접합 영역 및 상기 시험 영역과 유체 소통(fluid communication)되도록 구성되는, 항체 검출 장치가 포함된다. 소정 실시형태에서, Fc-결합 분자는 단백질 A 및/또는 단백질 G이다.

[0016] 일부 실시형태에서, 상기 포획 개체는 항원 또는 항원성 펩타이드이다. 특정 실시형태에서, 상기 항원 또는 항

원성 웨타이드는, 심장사상충, 예를 들면, 예를 들면, 개 심장사상충, 에를리키아 캐니스, 에를리키아 쟈펜시스, 에를리키아 에윙기, 보렐리아 부르그도르페리, 보렐리아 아프젤리, 보렐리아 가리니, 아나플라스마 파고사이토필룸, 아나플라스마 플라티스, 고양이 백혈병 바이러스, 파르보바이러스, 예를 들면, 개 파르보바이러스, 인플루엔자 A 균주, 인플루엔자 B 균주, 조류 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 레지오넬라, 아데노바이러스, 로타바이러스, 고양이 면역결핍성 바이러스, 사람 면역결핍성 바이러스, 및 그룹 A 스트렙토코커스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유기체 유래이다.

[0017] 특정 실시형태에서, 상기 제1 검출가능한 개체는, 금속 나노입자, 금속 나노쉘, 형광단, 또는 착색된 라텍스 입자이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 금속 나노입자 또는 금속 나노쉘은, 금 입자, 은 입자, 구리 입자, 백금 입자, 카드뮴 입자, 복합재 입자, 금 중공구, 금-피복된 실리카 나노쉘, 및 실리카-피복된 금 쉘로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0018] 일부 실시형태에서, 상기 장치는, 액체 샘플이 샘플 로딩 영역에 로딩되는 경우, 상기 액체 샘플과 유체 소통되는 제어 영역을 추가로 포함한다. 소정 실시형태에서, 상기 제어 영역은, 제어 검출기(control detector)와 특이적으로 결합할 수 있는 고정화된 결합 파트너를 포함한다.

[0019] 특정 실시형태에서, 상기 제1 검출기는, 제1 검출가능한 개체에 접합된 단백질 A 또는 단백질 G를 포함하고, 상기 고정화된 결합 파트너는 항-단백질 A 또는 항-단백질 G 항체이다.

[0020] 일부 장치들은, 상기 시험 영역의 다운스트림에 배치된 흡수성 패드(absorbent pad)를 추가로 포함한다. 소정 장치들에서, 상기 접합 영역은 상기 샘플 로딩 영역의 업스트림에 배치된다. 일부 실시형태에서, 상기 접합 영역은 상기 샘플 로딩 영역의 다운스트림에 배치된다. 일부 실시형태에서, 상기 샘플 로딩 영역은 혈액 분리기 물질을 포함한다. 특정 예들에서, 상기 접합 영역은 이동가능한 제2 검출기를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 제2 검출기는 제2 검출가능한 개체에 접합된 항원 또는 항원성 웨타이드를 포함하고, 상기 항원 또는 항원성 웨타이드는 항체에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 제1 검출기(예를 들면, 제1 검출가능한 개체에 접합된, 단백질 A 및/또는 단백질 G와 같은 Fc-결합 분자) 대 상기 제2 검출기(제2 검출가능한 개체에 접합된 항원/항원성 웨타이드)의 비를 조절하여 바람직한 수준의 신호 증폭을 선택할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 검출기 대 제2 검출기의 비는 약 20:1 내지 약 1:20이다. 다른 실시형태에서, 제1 검출기 대 제2 검출기의 비는 약 20:1 내지 약 1:1이다.

[0021] 특정 실시형태에서, 상기 제1 검출가능한 개체 및 제2 검출가능한 개체는 동일하다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 검출가능한 개체 및 제2 검출가능한 개체는 금 나노입자이다. 다른 실시형태에서, 상기 제1 검출가능한 개체 및 제2 검출가능한 개체는 상이하다.

[0022] 특정 실시형태에서, 예를 들면, 항-미생물 항체들의 검출을 위해, 항원 또는 항원성 웨타이드는 심장사상충, 예를 들면, 개 심장사상충, 에를리키아 캐니스, 에를리키아 쟈펜시스, 에를리키아 에윙기, 보렐리아 부르그도르페리, 보렐리아 아프젤리, 보렐리아 가리니, 아나플라스마 파고사이토필룸, 아나플라스마 플라티스, 고양이 백혈병 바이러스, 파르보바이러스, 예를 들면, 개 파르보바이러스, 인플루엔자 A 균주, 인플루엔자 B 균주, 조류 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 레지오넬라, 아데노바이러스, 로타바이러스, 고양이 면역결핍성 바이러스, 사람 면역결핍성 바이러스, 및 그룹 A 스트렙토코커스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유기체 유래이다.

[0023] 또한, 본원에 기술된 검출 장치들 및 시스템들 중 하나 이상, 및 시험 샘플 중의 항체를 검출하기 위해 당해 장치 또는 시스템을 사용하기 위한 지침서를 포함하는, 키트도 포함된다. 특정의 키트는, 제2 검출기, 및 상기 검출 시스템의 샘플 로딩 영역에 시험 샘플을 적용하기 전에 제2 검출기와 시험 샘플을 결합하기 위한 지침서를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 제2 검출기는, 제2 검출가능한 개체에 접합된 항원 또는 항원성 웨타이드를 포함하고, 상기 항원 또는 항원성 웨타이드는 항체에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 지침서는, 제2 검출기와 시험 샘플을 결합시켜 제2 검출기가 제1 검출기와 특수 비로 존재함으로써 신호 증폭의 바람직한 수준을 달성하도록 제공한다.

[0024] 또한, 시험 샘플을, 본원에 기술된 검출 장치들 또는 시스템들 중 하나 이상의 샘플 로딩 영역에 적용시키는 단계, 및 시험 영역 중의 제1 검출가능한 개체로부터의 신호의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하는, 시험 샘플 중의 항체를 검출하는 방법이 포함된다. 일부 방법들은, 제2 검출기를, 시험 샘플을 검출 시스템의 샘플 로딩 영역에 적용하기 전에, 시험 샘플과 결합시키는 단계를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 제2 검출기는, 제2 검출가능한 개체에 접합된 항원 또는 항원성 웨타이드를 포함하고, 상기 항원 또는 항원성 웨타이드는 항체에

특이적으로 결합할 수 있다.

[0025] 소정 실시형태는, 포획 개체, 시험 샘플 중의 항체, 및 제1 검출기를 포함하는 하나 이상의 포획 복합체로서, 상기 포획 개체는 상기 항체에 결합하고, 여기서, 상기 제1 검출기는 제1 검출가능한 개체에 접합된 Fc-결합 분자를 포함하고, 상기 제1 검출기는 항체의 Fc 영역에 결합하는, 포획 복합체에 관한 것이다. 특정의 이들 및 관련된 실시형태는, 제2 검출기를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 제2 검출기는 항체의 가변 영역에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 상기 포획 복합체는 표면의 시험 영역 상에 고정화된다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은, 시험 표면(예를 들면, 니트로셀룰로스)에 고정화된 포획 개체(예를 들면, BSA에 접합된 항체-특이적 항원)에 의해 포획되는 목적하는 항체, 표적 항체의 Fc 영역에 결합된 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체(예를 들면, 단백질 A- 또는 단백질 G-콜로이드성 금 접합체), 및 임의로 목적하는 항체의 가변 영역에 결합된 제2 검출가능한 접합체(예를 들면, 항원-콜로이드성 금 접합체)를 지닌, 본 발명의 포획 복합체의 한 예를 나타낸다.

도 2는, 본 발명에 따른 측방 유동 장치 및 방법의 한 예를 나타낸다. 목적하는 항체에 대해 특이적인 항원성 웨타이드는, 담체 단백질인 소 혈청 알부민(BSA)에 연결되고, 수득되는 BSA-웨타이드 접합체는 니트로셀룰로스 상의 포획제로서 사용된다. 이러한 동일한 항원성 웨타이드는 콜로이드성 금에 추가로 접합되고, 이는 당해 예시적인 검정에서 표지(label)로서 작용한다. 이어서, 생산된 신호는, 접합체 혼합물에 단백질 A/G-금 접합체(들)를 첨가하여 추가로 증폭시킨다.

도 3은, 도 2에 나타낸 측방 유동 장치를 사용하는 라임병 특이적 측방 유동 검정의 시간에 따른 샘플 유동을 나타낸다. 당해 예시적인 검정에서, 1 방울의 혈액, 혈청, 또는 혈장[전용 피펫(transfer pipette)을 통해 대략 15 내지 20 μ L]을 반응 튜브 중의 4 방울의 콜로이드성 금 접합체 용액[접적병(dropper bottle)으로부터 대략 30 μ L]과 혼합한다. 수득되는 반응 혼합물로부터의 1 방울을 평편한 표면 상에 위치된 시험 카세트의 샘플 포트로 이동시킨다. 혈액 분리 패드는 전혈(whole blood)로부터 혈액 세포를 여과한다(참조: 도 2). 혈장(또는 혈청) 및 비. 부르그도르페리(*B. burgdorferi*) 항체-접합체 복합체들은 시험 및 대조군 영역들을 함유하는 니트로셀룰로스 막으로 이동시킨다. 3 방울들[접적병으로부터 대략 60 μ L]의 체이스 완충액(chase buffer)(샘플 적용 후 1분째)의 적용은 전체 혼합물을 니트로셀룰로스를 통해 액체를 지속적으로 끌어 당기는 상부 흡수성 패드를 향해 이동시킨다. 양성 샘플 중에 존재하는 비. 부르그도르페리에 대해 특이적인 항체는 금-표지된 항원-접합체와 이미 복합체화되어 있다. 표지된 항원-항체 복합체는, 고정화된 항원이, 항체 상의 제2 결합 부위를 통해, 표지된 항원-항체 복합체를 포획하는 시험 라인으로 이동한다. 접합체 혼합물 중에 존재하는 단백질 A/G-금 접합체는 표적 항체의 Fc 영역에 결합하여 시험 신호를 증폭시킨다. 표지된 유리 항원 및 나머지 반응 혼합물은, 단백질 A 금 접합체가 닦 항-단백질 A 항체를 포함하는 대조군 포획에 의해 포획되는 대조군 라인으로 통과한다. 이러한 예에서, 당해 장치는 약 8분째에 판독된다. 시험 구역 내의 적색 라인 및 대조군 구역 내의 제2 적색 라인의 출현은, 비. 부르그도르페리에 대한 항체의 존재를 나타낸다. 대조군 구역 내의 라인의 출현은, 비. 부르그도르페리에 대한 항체들의 부재를 단지 나타낸다. 당해 시험은, (a) 시험 라인이 나타나지만 대조군 라인이 형성되지 않거나, (b) 대조군 라인 또는 시험 라인이 형성되지 않는 경우 무효인 것으로 고려된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본원에 사용된 바와 같은 하기 용어들은 하기 의미들을 가질 수 있다:

[0028] 관사 "하나"("a" 및 "an")는 본원에서 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 나타내기 위해 사용된다. 예로써, "성분"은 하나의 성분 또는 하나 이상의 성분을 의미한다.

[0029] "약"은 참조량, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 함량, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 만큼 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 함량, 중량 또는 길이를 의미한다.

[0030] 본 명세서 전체에 걸쳐, 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 단어 "포함한다(comprise, comprises)" 및 "포함하는"은 언급된 단계 또는 성분 또는 단계들 또는 성분들의 그룹을 포함하는 것을 의미하지만 임의의 다른 단계 또는 성분 또는 단계들 또는 성분들의 그룹은 배제하지 않는 것으로 이해될 것이다.

[0031] "로 이루어진"은 어구 "로 이루어진"에 수반되는 어떠한 것이든지 포함하며, 이에 한정되는 것을 의미한다. 따라서, 어구 "로 이루어진"은, 나열된 성분들이 요구되거나 필수적이며, 다른 성분들이 존재하지 않을 수 있음을

나타낸다. "로 필수적으로 이루어진"은 당해 어구 뒤에 나열된 임의의 성분들을 포함하고, 나열된 성분들에 대한 개시에서 명시된 활성 또는 작용을 방해하지 않거나 이에 기여하는 다른 성분들에 한정됨을 의미한다. 따라서, 어구 "로 필수적으로 이루어진"은, 나열된 성분들이 요구되거나 필수적이지만, 다른 성분들은 임의적이고 이들이 나열된 성분들의 활성 또는 작용에 실질적으로 영향을 미치거나 미치지 않음에 따라 존재하거나 존재하지 않을 수 있음을 나타낸다.

[0032] 용어 "펩타이드" 및 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 본원에 상호교환적으로 사용되어 아미노산 잔기들의 중합체 및 이들의 합성 및 천연 발생 유사체들을 나타낸다. 따라서, 이를 용어는, 하나 이상의 아미노산 잔기들이 상응하는 천연 발생 아미노산의 화학적 유사체와 같은, 합성의 비-천연 발생 아미노산들인 아미노산 중합체들, 및 천연 발생 아미노산 중합체들 및 이의 천연 발생 화학적 유도체들에 적용된다.

[0033] "증가된" 또는 "향상된" 양은, 임의로 "통계적으로 유의한" 양이며, 예를 들면, 검출가능한 Fc-결합 분자의 부재 하에 수행된 항체 시험에 대해 상대적인 약 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 또는 그 이상의 배수들(1과 1 초과 사이의 모든 정수들, 범위들 및 소수점들, 예를 들면, 2.5, 3.6, 3.7, 3.8 등을 포함)의 양 또는 값(예를 들면, 반응성 점수와 같은 신호 또는 값)인 증가를 포함할 수 있다. "증가된" 또는 "향상된" 값 또는 양은, 또한, 예를 들면, 검출가능한 Fc-결합 분자의 부재 하에 수행된 항체 시험에 대해 상대적인 양 또는 값에 있어서 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% 또는 그 이상의 증가를 포함할 수 있다.

[0034] 본원에 인용된 모든 공보들, 특허들 및 특허 출원들은, 이들의 전문이 본원에 인용에 의해 포함된다.

방법

[0035] 한 양상에서, 본 발명은, 시험 샘플 중의 항체를 검출하기 위한 방법을 포함한다. 소정 실시형태에서, 이들 방법들은, 적절한 부분에서, 시험 샘플을 제1 검출가능한 개체(즉, 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체)에 접합된 Fc-결합 분자와 접촉시켜 제1 복합체를 형성시키는 단계, 제1 복합체를 표면의 시험 영역 상에 고정화된, 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 포획 개체와 접촉시키는 단계, 및 시험 영역 중의 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체로부터의 신호의 존재를 검출하는 단계에 관한 것이다. 여기서, 신호의 존재는 시험 샘플 중의 항체의 존재를 나타낸다.

[0036] 이들 방법의 반응물은 임의의 순서 또는 차례로 접촉될 수 있다. 예를 들면, 시험 샘플은, 표면에 적용하기 전에, 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체와 혼합할 수 있거나, 이들 2개의 반응물들을 표면에 별도로, 순차적으로 또는 동시에, 표면 상의 동일하거나 상이한 위치에 별도로 적용시킬 수 있다. 별도로 가하는 경우, 반응물들은, 이들이, 예를 들면, 모세관 또는 다른 작용에 의해, 시험 표면을 통해 확산되거나 유동하면서 서로 접촉할 것이다. 특정 실시형태에서, 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체는 표면의 시험 영역과 중복되지 않는, 표면의 접합 영역에 사전에 고정화된다. 소정의 이들 실시형태에서, 시험 샘플은 표면에 적용될 수 있으며, 여기서, 이는 접합 영역과 시험 영역을 통과하여 모세관 작용 또는 다른 작용을 통해 유동함으로써, Fc-결합 분자 및 포획 개체와 접촉한다. 목적하는 항체가 샘플 중에 존재하는 경우, 이는 이어서 검출가능한 Fc-결합 분자 및 포획 개체와 함께 검출가능한 복합체를 형성할 것이다. 구체적인 실시형태에서, Fc-결합 분자는 단백질 A, 단백질 G, 단백질 A/G, 단백질 L, 또는 예를 들면, 혼합물 또는 이의 융합 단백질로서의, 이들의 임의의 조합이다.

[0037] 본원에 제공된 소정 방법은, 시험 샘플을 제2 검출기 분자와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 이들 실시형태에서, 제2 검출기는 임의의 적합한 항체 결합 개체, 예를 들면, 제2 검출가능한 개체에 접합되고 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 또는 항원성 펩타이드일 수 있다. 제2 검출기 및 제2 검출가능한 개체의 조합, 예를 들면, 접합체는 때때로 "검출가능한 항체-특이적 항원-접합체" 또는 "검출가능한 항원-접합체"로서 나타내고, 이는 펩타이드 항원들 및 비-펩타이드 항원들을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 검출가능한 개체 및 제2 검출가능한 개체는 동일하고, 즉, Fc-결합 분자-접합체 및 검출가능한-항원-접합체는 금 입자와 같은, 동일한 유형의 검출가능한 개체에 접합된다. 다른 실시형태에서, 제1 검출가능한 개체 및 제2 검출가능한 개체는 상이하다. 구체적인 실시형태에서, 제1 검출가능한 개체 및 제2 검출가능한 개체는 둘 다 금 나노입자들이어서, 콜로이드성 금 접합체(CGC)를 생성한다. 이들 및 관련된 실시형태에서, 검출가능한 Fc-결합 분자는 "Fc-결합 분자-CGC"로서 나타낼 수 있으며; 구체적인 예로는 단백질 A-CGC, 단백질 G-CGC, 단백질 A/G-CGC, 및 단백질 L-CGC가 포함된다. 일부 실시형태에서, Fc-결합 분자는 시험 샘플 중의 항체의 Fc 영역에 결합할 수 있는 2차 항체 또는 이의 단편이고, 한편, 제2 검출기는 임의의 적합한 항체 결합 개체, 예를 들면, 항원 또는 항원성

펩타이드 등일 수 있다.

[0039] 상기와 유사하게, 이들 방법에서의 반응물들은 임의의 순서 또는 차례로 접촉될 수 있다. 한 예로서, 시험 샘플을, 표면에 적용하기 전에, 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체, 검출가능한 항원-접합체, 또는 둘 다와 혼합할 수 있거나, 이들 3개의 반응물들을 표면에 별도로, 순차적으로 또는 동시에, 표면 상의 동일하거나 상이한 위치에 적용할 수 있다. 별도로 가하는 경우, 반응물들은, 이들이, 예를 들면, 모세관 작용 또는 다른 작용에 의해, 시험 표면을 통과하여 확산되거나 유동하면서 서로 접촉할 것이다.

[0040] 일부 실시형태에서, Fc-결합 분자-접합체는 표면의 접합 영역에 고정화되며, 이는 시험 영역과 중복되지 않고, 시험 샘플 및 검출가능한 항원-접합체는 별도로 또는 함께 표면에 적용된다. 다른 실시형태에서, 검출가능한 항원-접합체는 표면의 접합 영역에 고정화되며, 이는 시험 영역과 중복되지 않고, 시험 샘플 및 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체는 별도로 또는 함께 표면에 적용된다. 소정 실시형태에서, 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체 및 검출가능한 항원-접합체는 둘 다 표면의 접합 영역에 고정화되며, 이는 표면의 시험 영역과 중복되지 않으며, 시험 샘플은 시험 표면에 적용된다. 표면에 적용 후, 시험 샘플(단독으로 또는 다른 반응물과 함께)은 모세관 또는 다른 작용을 통해, 접합 영역(존재하는 경우) 및 시험 영역을 통해 표면 전체에 유동하거나 확산함으로써 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체, 검출가능한 항원-접합체, 및 포획 개체와 접촉할 수 있다. 목적하는 항체가 샘플 중에 존재하는 경우, 이는 이들 반응물과 하나 이상의 검출가능한 복합체를 형성함으로써 샘플 중의 항체의 존재를 나타낼 것이다. 당해 분야의 숙련가들은, 이들 예시적인 조합들이 비-제한적이며, 다른 가능성들도 가능함을 인지할 것이다.

[0041] 소정 실시형태에서, 접합 영역은 제어 검출기, 예를 들면, Fc-결합 분자에 특이적으로 결합하는 항체를 추가로 포함한다. 제어 영역의 다른 유형은 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다.

[0042] 시험 샘플은 일반적으로 감염성 제제에 대해 특이적인 항체와 같이, 목적하는 항체를 갖거나 갖는 것으로 예측되는 대상체로부터 수득된 생물학적 샘플이다. 생물학적 샘플은 바람직하게는 수득하기 용이하고, 정맥 혈액 샘플로부터 또는 심지어 손가락 채혈(finger prick)로부터 유도된 혈액, 혈청 또는 혈장을 포함할 수 있다. 다른 신체 부분, 또는 뇌척수액(cerebro-spinal fluid: CSF), 타액, 위장 분비액들, 점액, 뇨, 대변 등과 같은 다른 체액으로부터의 조직은, 항체들을 함유하는 것으로 알려져 있으며 시험 샘플의 공급원으로서 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 당해 샘플은 조직(예를 들면, 조직 균질물), 신체 기관으로부터의 추출물, 또는 세포 분해물이다. 소정 실시형태에서, 대상체는 야생 동물(wild animal)(예를 들면, 사슴 또는 설치류, 예를 들면, 마우스, 열룩다람쥐(chipmunk), 다람쥐 등)이다. 다른 실시형태에서, 대상체는 실험실 동물(예를 들면, 마우스, 랙트, 기니아 피그, 토끼, 원숭이, 영장류 등)이다. 다른 실시형태에서, 대상체는 사육된 동물 또는 야생 동물(feral animal)(예를 들면, 개, 고양이, 팔)이다. 또 다른 실시형태에서, 대상체는 사람이다.

[0043] 면역글로불린으로서도 나타내는 항체는, 세균, 효모, 기생충, 및 바이러스와 같은 외부 대상체들 또는 항원들을 구체적으로 확인하는 면역계의 Y-형태 단백질이다. 항체의 'Y'의 각각의 끝은 항원 상의 특정 에피토프(epitope)에 대해 특이적인 항원-결합 부위를 함유하여, 이들 2개의 구조들이 정밀하게 함께 결합하도록 한다. 주어진 항체의 생산은, 당해 항체와 특이적으로 상호작용하는 항원(예를 들면, 미생물 항원)에 대한 노출시 증가된다. 따라서, 대상체로부터 샘플 중의 항원-특이적인 항체의 검출은, 대상체가 바이러스, 세균, 진균, 또는 기생충과 같은 주어진 미생물에 현재 노출되어 있거나, 이미 노출되었는지 여부를 알려줄 수 있다.

[0044] 단편 결정화가능한 영역(fragment crystallizable region: Fc 영역)은 세포 표면 Fc 수용체들 및 상보체 시스템의 특정 단백질들과 상호작용하는 항체의 테일 영역(tail region)이다. IgG, IgA 및 IgD 항체 이소형들에서, Fc 영역은 항체의 2개의 중쇄들의 제2 불변 도메인 및 제3 불변 도메인으로부터 유도된, 2개의 동일한 단백질 단편들로 구성된다. IgM 및 IgE Fc 영역들은 각각의 폴리펩타이드 쇄 내에 3개의 중쇄 불변 도메인들(C_H 도메인들 2-4)을 함유한다. IgG 항체들의 Fc 영역들은 고도로 보존된 N-글리코실화 부위를 지닌다. 당해 부위에 부착된 N-글리칸들은 복합체 유형의 주로 코어(core)-푸코실화된 이중 촉각 구조들(diantennary structures)이다. 또한, 소량의 이들 N-글리칸들은 또한 양분성(bisecting) GlcNAc 및 α -2,6 연결된 시알산 잔기들을 지닌다. 항체의 Fab 영역은 항체의 표적-특이성을 정의하는 가변 부분들을 함유하며, 대조적으로 부류내 모든 항체들의 Fc 영역은 각각의 종에 대해 동일하고; 이들은 가변성이라기 보다는 불변성이다.

[0045] 항체의 "항원-결합 부위", 또는 "결합 부위"는, 항원 결합에 참여하는 면역글로불린 분자의 부분을 말한다. 항원 결합 부위는 중쇄("H") 및 경쇄("L")의 N-말단 가변("V") 영역들의 아미노산 잔기들에 의해 형성된다. 중쇄 및 경쇄의 V 영역들 내의 3개의 매우 다양한 구간들(stretches)은, "골격 영역" 또는 "FR"로 공지되어 있는 보다 보존된 플랭킹(flanking) 구간들 사이에 개재된 "고가변성(hypervariable) 영역들"로 언급된다. 따라서, 용

어 "FR"은, 면역글로불린들 내의 고가변성 영역들 사이에 및 이에 인접하여 천연적으로 발견되는 아미노산 서열들을 말한다. 항체 분자에 있어서, 경쇄의 3개의 고가변성 영역들 및 중쇄의 3개의 고가변성 영역들은 3차원 공간 내에서 서로에 대해 상대적으로 배치되어 항원-결합 표면을 형성한다. 항원-결합 표면은, 결합된 항원의 3-차원 표면에 대해 상보성이며, 중쇄 및 경쇄들 각각의 3개의 고가변성 영역들은 "상보성-결정 영역", 또는 "CDR"로 언급된다.

[0046] 항체는 Fc 영역의 전부 또는 일부를 전형적으로 포함하여 Fc-결합 분자에 의한 검출을 용이하게 하고, 또한, 하나 이상의 항원-결합 부위들도 포함하여 항원 또는 항원성 웨타이드와 같은 항체-특이적 결합제에 의한 검출을 용이하게 할 수 있다. 항체들은, 예를 들면, IgG, IgE, IgD, IgM, 또는 IgA 유형일 수 있다. 일반적으로, IgM 및/또는 IgA 항체들은, 예를 들면, 감염의 초기 단계들에서의 검출에 대해 검출된다.

[0047] Fc-결합 분자는, 항체의 Fc 영역 또는 항체의 가변 영역 외부에 존재하는 임의의 영역에도 특이적으로 결합하는 임의의 결합제를 포함한다. 소정 실시형태에서, Fc-결합 분자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 아니다. 다른 실시형태에서, Fc-결합 분자는 Fc-특이적인 2차 항체, 예를 들면, 토끼 항-개 항체, 염소 항-개 항체이다. 소정 실시형태에서, Fc-결합 분자는, 시험 샘플 중에서 검출되는 항체에 대한 2차 항체이다. Fc-결합 분자들의 일반적인 예로는, 면역글로불린의 Fc-영역에 특이적으로 결합하는, 폴리펩타이드들, 가용성 수용체들, 아드네틴들(adnectins), 소 웨타이드들, 웨타이드 모사체들(peptide mimetics), 소 분자들, 아프타머들(aptamers) 등이 포함된다. Fc-결합 분자들의 구체적인 예로는 항체의 Fc 영역에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 단백질 A, 단백질 G, 단백질 A/G 융합 단백질들, 단백질 L, 및 이의 단편 및 변이체가 포함된다.

[0048] 단백질 A는 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 세포 벽에서 발견된 40 내지 60kDa의 MSCRAMM(부착성 매트릭스 분자들을 인식하는 미생물 표면 성분들)이고, *spa* 유전자에 의해 암호화된다. 야생형 단백질 A는 3개의 나선형 다발(helix bundle)로 폴딩(folding)되고, 항체의 Fc 영역들에 개별적으로 결합할 수 있는 5개의 동종 Ig-결합 도메인들로 구성된다. 단백질 A는 사람 IgG1 및 IgG2에 대해 고 친화성으로, 그리고 사람 IgM, IgA 및 IgE에 대해 중간 친화성으로 결합한다.

[0049] 단백질 G는, 그룹 C 및 그룹 G의 스트렙토코커스 세균에서 발현된 면역글로불린-결합 단백질이다(참조: 예를 들면, Sjobring et al., *J Biol Chem.* 266: 399-405, 1991). 단백질 G의 NMR 솔루션 구조(solution structure)(참조: Lian et al., *Journal of Mol. Biol.* 228: 1219-1234, 1992) 및 결정 구조(참조: Derrick and Wigley, *Journal of Mol. Biol.* 243:906-918, 1994)는 1 옹스트롬(Å)까지 해결해 왔다. 단백질 A 및 단백질 G는 당해 분야에 익히 공지되어 있으며 다양한 접합 형태 및 비접합 형태들로 시판된다.

[0050] 또한, 단백질 A 및 단백질 G의 전장 또는 야생형 베타들의 기능성 변이체들 및 단편들도 포함된다. 소정 실시형태에서, 변이체 폴리펩타이드는 단백질 A 및/또는 단백질 G의 야생형 서열에 대해 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 이상의 서열 동일성(sequence identity) 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 이의 기능성 단편은 야생형 단백질 A 및/또는 단백질 G의 예를 들면, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 450, 500 또는 그 이상의 인접 또는 비인접 잔기들인 폴리펩타이드 단편일 수 있다. 단백질 A 및 단백질 G의 변이체들 및 단편들은 하나 이상의 면역글로불린 이소형들의 Fc 영역에 대해 특이적인 결합을 보유한다.

[0051] 서열 동일성 퍼센트는 당해 분야에서 인식된 의미를 가지며 2개의 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열들 사이에 동일성을 측정하기 위한 다수의 방법들이 존재한다. 예를 들면, 문헌[Lesk, Ed., *Computational Molecular Biology*, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, Ed., *Biocomputing: Informatics And Genome Projects*, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., *Computer Analysis Of Sequence Data, Part I*, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, *Sequence Analysis In Molecular Biology*, Academic Press, (1987); 및 Gribskov & Devereux, Eds., *Sequence Analysis Primer*, M Stockton Press, New York, (1991)]을 참조한다. 폴리뉴클레오타이드들 또는 폴리펩타이드들을 정렬하기 위한 방법들은 GCG 프로그램 패키지[참조: Devereux et al., *Nuc. Acids Res.* 12:387 (1984)], BLASTP, BLASTN, FASTA[참조: Atschul et al., *J Molec. Biol.* 215:403 (1990)], 및 스미쓰(Smith) 및 워터만(Waterman)의 국소 상동성 알고리즘(local homology algorithm)[참조: Adv. App. Math., 2:482-489 (1981)]을 사용하는 베스트핏 프로그램(Bestfit program)[참조: Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711]을 포함하는 컴퓨터 프로그램들

내에 암호화되어 있다. 예를 들면, FASTA 알고리즘을 사용하는 컴퓨터 프로그램 ALIGN을, 갭 개방 패널티(gap open penalty)가 -12이고 갭 연장 패널티(gap extension penalty)가 -2인 아핀 갭 서치(affine gap search)와 함께 사용할 수 있다.

[0052]

또한, 단백질 A 융합체들 및 단백질 G 융합체들을 포함하는, Fc-결합 폴리펩타이드들을 포함하는 융합 단백질들도 고려된다. Fc-결합 분자들은 다른 Fc-결합 분자의 전부 또는 일부에, 또는 하나 이상의 이종 폴리펩타이드들에 융합시킬 수 있다. 단백질 A/G 융합 단백질의 구체예는 단백질 A로부터의 4개의 Fc-결합 도메인들과 단백질 G로부터의 2개를 결합시키지만(참조: 예를 들면, Sikkema, J.W.D., Amer. Biotech. Lab, 7:42, 1989; 및 Eliasson et al., J. Biol. Chem. 263, 4323-4327, 1988); 다른 조합들도 사용할 수 있다. 융합 파트너들(예를 들면, 웨브타이드 또는 다른 모이어티)을 사용하여 정제를 개선시키고, 용해도를 개선시키고, 숙주 세포 내에서 폴리펩타이드의 발현을 향상시키고, 검출을 보조하며, 폴리펩타이드 등을 안정화시킬 수 있다. 융합 파트너들의 예로는 담체 단백질들(예를 들면, 소 혈청 알부민과 같은 혈청 알부민), 베타-갈락토시다제, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, 히스티딘 태그(들) 등)이 포함된다.

[0053]

포획 개체는, 본원에 기술된 방법들 및 장치들에 의해 검출될, 미생물-특이적인 항체와 같은, 표적 항체인, 목적하는 항체에 특이적으로 결합하는 임의의 결합체일 수 있다. 전형적으로, 포획 개체는 항체의 가변 영역에 특이적으로 결합하므로, 항체의 항원-결합 부위(들)에 대해 특이적인 하나 이상의 에피토프들을 함유한다. 소정 실시형태에서, 포획 개체는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이 아니다. 특정 실시형태에서, 포획 개체는, 목적하는 항체에 특이적으로 결합하는 항원 또는 항원성 웨브타이드이다. 예시적인 항원들 및 항원성 웨브타이드들은 하기에 기술되어 있다. 또한, 본원에 제공된 방법들에 따라 검출될 항체인, 목적하는 항체에 특이적으로 결합하는 가용성 수용체들, 아드네틴들, 웨브타이드 모사체들, 소 분자들, 아프타머들 등도 포함된다.

[0054]

위에서 나타낸 바와 같이, 포획 개체는 일반적으로 고체 또는 반-고체 지지체와 같은 시험 표면 또는 기질 상에 일반적으로 부착되거나 고정화된다. 부착은 공유결합성 또는 비-공유결합성일 수 있으며, 담체, 지지체 또는 표면에 부착된 성분에 대해 친화성이 높은 모이어티와 같이, 공유결합 또는 비-공유결합할 수 있는 포획 개체와 연관된 모이어티에 의해 촉진될 수 있다. 예를 들면, 포획 개체는 비오틴과 같은 리간드와 연관될 수 있으며, 표면과 연관된 성분은 아비딘과 같은 상응하는 리간드 수용체일 수 있다. 대안으로는, 포획 개체는 아비딘과 같은 리간드 수용체와 연관될 수 있으며, 표면과 연관된 성분은 비오틴과 같은 상응하는 리간드일 수 있다. 포획 개체는, 면역검정 동안 항체를 함유하는 샘플의 첨가 전에 또는 후에 시험 표면에 또는 기질 상에 부착되거나 고정화될 수 있다.

[0055]

특정 실시형태에서, 시험 표면은 비드(bead), 도트 블롯(dot blot), 측방 유동 검정 장치 내의 유동 경로, 또는 분석 회전자 내의 유동 경로이다. 예를 들면, 포획 개체는 PVDF 막(예를 들면, Immobilon™ 막), 니트로셀룰로스 막, 폴리에틸렌 막, 나일론 막, 또는 유사한 유형의 막과 같은 다공성 막 상에 부착되거나 고정화될 수 있다. 다른 실시형태에서, 시험 표면 또는 기판은 ELISA 또는 다른 샌드위치-유형 검정에서 사용하기에 적합한 플레이트(예를 들면, 미세역가 플레이트)와 같은 웰 또는 튜브이다. 일부 실시형태에서, 시험 표면 또는 기판은 전기화학적, 광학적, 또는 광전지 센서(opto-electronic sensor)와 같은 센서이다.

[0056]

이러한 시험 표면들 또는 기판들은 유리, 셀룰로스-계 물질들, 열가소성 중합체들, 예를 들면, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 또는 폴리에스테르, 미립자 물질들(유리 또는 다양한 열가소성 중합체들)로 구성된 소결된 구조물들, 또는 니트로셀룰로스, 나일론, 또는 폴리설폰 등으로 구성된 캐스트 막 필름(cast membrane film)을 포함할 수 있다. 시험 표면 또는 기판은, 다공성 폴리에틸렌으로 일반적으로 공지되어 있는, 폴리에틸렌, 예를 들면, 크로멕스 코포레이션(Chromex Corporation)(뉴 멕시코주 알부querque 소재)으로부터의 0.2 내지 15 마이크론의 다공성 폴리에틸렌, Porex™ 등의 소결된, 미세 입자일 수 있다. 이들 시험 표면 또는 기판 재료들의 전부는 필름들, 시트(sheet)들, 또는 플레이트들과 같은 적합한 형태들로 사용될 수 있거나, 이들은 제지, 유리, 플라스틱 필름들, 또는 직물들과 같은 적절한 불활성 담체 상에 피복되거나 이에 결합하거나 적층될 수 있다.

[0057]

고체 페이즈들 상의 웨브타이드들과 같은 포획 개체들을 고정화시키기에 적합한 방법들은 이온성, 소수성, 공유결합성 상호작용들 등을 포함한다. 고체 또는 반-고체 담체, 지지체 또는 표면에 대해 특이적이거나 반-특이적인 결합은, 이와 관련된, 고체 또는 반-고체 담체, 지지체 또는 표면에 대한 이의 공유결합성 또는 비-공유결합성 결합이 가능한 모이어티를 갖는 포획 개체에 의해 달성될 수 있다. 예를 들면, 모이어티는 담체, 지지체 또는 표면에 부착된 성분에 대해 친화성을 가질 수 있다. 당해 경우에, 모이어티는 웨브타이드의 아미노산 그룹에 결합된 예를 들면, 비오틴 또는 비오티닐 그룹 또는 이의 유사체, 예를 들면, 6-아미노헥사노산일 수 있고, 이어서, 당해 성분은 아비딘, 스트렙트아비딘, 뉴트라비딘, 또는 이의 유사체이다. 대안은, 당해 모이어티가 6개의

연속된 히스티딘 잔기들(예를 들면, 6x-His 태그)의 아미노산 서열을 갖고, 담체가 Ni^{++} 또는 Co^{++} 이온들로 하전된 니트릴로트리아세트산(NTA) 유도체를 포함하는 상황이다. 상기에 대해 추가로, 적합한 담체들, 지지체들, 및 표면들로는 비드들(예를 들면, 콜로이드성 금, 또는 실리카, 라텍스, 폴리스티렌, 폴리카보네이트, 또는 PVDF를 포함하는 나노입자와 같은 자기 비드들, 콜로이드성 입자 또는 나노입자), 스티렌-디비닐 벤젠, 하이드록실화된 스티렌-디비닐 벤젠, 폴리스티렌, 카복실화된 폴리스티렌과 같은 공-중합체들의 라텍스, 카본 블랙의 비드들, 불활성화되거나 폴리스티렌 또는 폴리비닐 클로라이드 활성화된 유리, 에폭시-활성화된 다공성 자기 유리, 젤라틴 또는 다당류 입자 또는 다른 단백질 입자가 포함되지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0058] 상기에 나타낸 바와 같이, 항원들 및 항원성 웨타이드들은 포획 개체들 및/또는 항체-특이적 검출기들로서 사용될 수 있다. 선택된 항원 또는 항원성 웨타이드는 가장 흔히 항체의 항원 결합 부위들 중 하나 또는 둘 다를 경유해서 표적 항체에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항원"은, 항체의 하나 이상의 항원-결합 부위를 경유해서 항체가 특이적으로 결합할 수 있는 문자를 말한다. 항원은 항체의 항원-결합 부위에 특이적으로 결합하는 항원의 특정 인접 또는 비인접 영역(들)인, 하나 이상의 에피토프들을 포함할 수 있다. 에피토프는 선형 에피토프, 순차적 에피토프, 또는 입체구조적 에피토프일 수 있다.

[0059] 항원은, 예를 들면, 웨타이드 또는 이의 변형된 형태, 또는 소 분자와 같은 비-웨타이드 항원일 수 있다. 상기에 나타낸 바와 같이, 항원들은 또한 목적하는 항체에 특이적으로 결합하는 가용성 수용체들, 아드네틴들, 웨타이드 모사체들, 소 분자들, 아프타미들 등을 포함할 수 있다.

[0060] 포획 개체들, 또는 "포획 항원들"로서 사용되는 경우, 항원들 또는 항원성 웨타이드들은 일반적으로 표지되지 않으며 시험 표면에 고정화되거나 대안으로는 부착된다. 소정 실시형태의 경우, 포획 항원들은 소 혈청 알부민 또는 다중 항원 웨타이드들(MAPS)과 같은 하나 이상의 이종 단백질들과 융합되거나 접합되거나 복합체화되어 시험 표면에 대한 부착 또는 다른 목적을 가능하게 한다.

[0061] 항체-특이적 검출기들로서 사용하기 위해, 항원들 또는 항원성 웨타이드들은 검출가능한 개체에 일반적으로 접합시킴으로써 "검출가능한 항원-접합체"를 형성한다. 소정 실시형태에서, 이들 검출가능한 항원-접합체들은 또한 소 혈청 알부민 또는 MAPS와 같은 하나 이상의 이종 단백질들에 융합시키거나 접합시키거나 또는 복합체화시킨다. 검출가능한 항원-접합체들은 하기 기술한 바와 같이, 직접적인 또는 간접적인 검출을 위해 설계될 수 있다.

[0062] 또한, 항원성 웨타이드들을 포함하는 융합 단백질들도 고려된다. 항원성 웨타이드들은 동일하거나 상이한 결합 특이성을 갖거나(예를 들면, 동일하거나 상이한 에피토프들 중 하나 이상을 갖거나), 하나 이상의 이종 폴리웨타이드들을 갖는 하나 이상의 항원성 웨타이드들의 전부 또는 일부에 융합될 수 있다. 융합 파트너들(예를 들면, 웨타이드 또는 다른 모이어티)을 사용하여 숙주 세포내에서 웨타이드의 정체를 개선시키고, 용해도를 개선시키며, 웨타이드의 발현을 향상시키고, 검출을 보조하고, 항원성 웨타이드를 안정화시키고, 시험 표면 상에의 고정화 등을 용이하게 할 수 있다. 융합 파트너들의 예로는 담체 단백질들(예를 들면, 소 혈청 알부민과 같은 혈청 알부민), 베타-갈락토시다제, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, 히스티딘 태그(들) 등이 포함된다.

[0063] 항원들 및 항원성 웨타이드들 및 다른 항체-특이적 결합체들은 다양한 공급원들로부터 유도될 수 있다. 특정 실시형태는, 바이러스들, 세균들, 진균들, 및 기생충들을 포함하는 미생물 공급원들로부터 유도된 것들을 포함한다. 구체적인 예로는 심장사상충, 예를 들면, 개 심장사상충, 예를리키아 캐니스, 보렐리아 부르그도르페리, 보렐리아 아프젤리, 보렐리아 가리니, 아나플라스마 파고사이토필룸, 고양이 백혈병 바이러스, 파르보바이러스, 예를 들면, 개 파르보바이러스, 인플루엔자 A 균주, 인플루엔자 B 균주, 조류 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 사람 면역결핍성 바이러스(HIV), 레지오넬라(*Legionella*), 아데노바이러스, 그룹 A 스트렙토코커스, 고양이 면역결핍성 바이러스(FIV), 루타바이러스 등 중 임의의 하나 이상으로부터 유도된 항원들이 포함된다. 라임병 항체들을 검출하기 위한 보렐리아 항원들의 예들은 미국 특허 출원 제13/667,909호, 미국 특허 공보 제US 2011/0136155호, 및 제WO 2011/063003호(이들의 문헌의 각각은, 이의 전문이 본원에 인용에 의해 포함된다)에서 찾을 수 있다. 예를리키아 항체들의 검출을 위한 예를리키아 항원들의 예들은 미국 특허 출원 제61/712,578호, 미국 특허 공보 제2011/0124125호, 및 제WO2011/063235호(이들 각각은, 이의 전문이 본원에 참조로 흔입되어 있다)에서 찾을 수 있다.

[0064] 본원에 기술된 방법들에 따라 사용하기 위한 항원성 웨타이드들은 합성 화학(즉, "합성 웨타이드")에 의해 제조할 수 있다. 다른 실시형태에서, 항원성 웨타이드들은 생물학적으로[즉, 세포 기관(cellular machinery), 예를 들면, 리보솜에 의해] 생산될 수 있다. 소정 실시형태에서, 항원성 웨타이드들이 분리된다. 본원에 사용된 것으로서, "분리된" 웨타이드는 합성적으로 또는 생물학적으로 생산된 후 웨타이드를 생산하는데 사용된 화학물질

들 및/또는 세포 기관으로부터 적어도 부분적으로 정제되는, 웹타이드이다. 소정 실시형태에서, 분리된 웹타이드는 실질적으로 정제된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "실질적으로 정제된"은 세포 물질(단백질들, 지질들, 탄수화물들, 핵산들 등), 배양 배지, 화학 전구체들, 웹타이드의 합성에 사용된 화학물질들, 또는 이들의 조합물들을 실질적으로 포함하지 않는, 웹타이드와 같은 분자를 말한다. 실질적으로 정제된 웹타이드는, 웹타이드의 합성시 사용된 세포 물질, 배양 배지, 다른 폴리웹타이드들, 화학 전구체들 및/또는 화학물질들의 약 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2%, 1% 미만을 갖는다. 따라서, 웹타이드와 같은 실질적으로 순수한 분자는, 목적하는 문자가 건조 중량당 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%로 존재할 수 있다. 분리된 웹타이드는 물, 완충제, 또는 예를 들면, 키트의 부분으로서, 재구성을 기다리는 무수 형태일 수 있다. 분리된 웹타이드는 약제학적으로 허용되는 염의 형태일 수 있다. 본 발명의 웹타이드들과 염들을 형성할 수 있는 적합한 산들 및 염기들은 당해 분야의 숙련가에게 익히 공지되어 있으며, 무기산 및 유기산 및 염기를 포함한다.

[0065] 목적하는 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은, 이것이 포획 개체 또는 항체-특이적 검출기와 검출가능한 수준(예를 들면, 측방 유동 검정, 웨스턴 블롯, 또는 ELISA 검정 내에서)으로 반응하고, 유사한 조건 하에 관련되지 않는 폴리웹타이드들 또는 제제들과 통계적으로 유의한 방식으로 검출가능하게 반응하지 않는 경우, 포획 개체 또는 항체-특이적 검출기(예를 들면, 항원 또는 항원성 웹타이드)와 "특이적으로 결합하고/하거나", "면역학적으로 결합하고/하거나", "면역학적으로 반응성"이다라고 한다. 또한, 용어 "특이적으로 결합하다"는 포획 개체 또는 항체-특이적 검출기가 샘플 중의 다른 항체에 대해서보다 목적 항체에 대해서 더욱 높은 친화성(예를 들면, 더 높은 정도의 선택성)을 가짐을 의미할 수 있다.

[0066] 당해 내용에서 사용된 바와 같은 면역학적 결합은, 일반적으로, 면역글로불린 분자와 이에 대해 당해 면역글로불린이 특이적인 항원 사이에 발생하는 유형의 비-공유 상호작용들을 말한다. 면역학적 결합 상호작용들과 같은 결합의 친화성, 또는 강도는, 상호작용의 해리 상수(K_d)의 측면에서 표현될 수 있으며, 여기서, K_d 가 작을수록 친화성은 더 크다. 선택된 폴리웹타이드들의 면역학적 결합 특성들은 당해 분야에 익히 공지되어 있는 방법들을 사용하여 정량화할 수 있다(참조: 예를 들면, Davies et al., Annual Rev. Biochem. 59:439-473, 1990). 소정의 예시적인 실시형태에서, 항체는 적어도 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 또는 50nM의 포획 개체 또는 항체-특이적 검출기(예를 들면, 항원 또는 항원성 웹타이드)에 대한 친화성을 갖는다. 다른 예로서, 포획 개체 또는 항체-특이적 검출기는 샘플 중의 다른 항체들보다 적어도 약 1.5 배, 2 배, 2.5 배, 3 배, 또는 이보다 더 높은 친화성을 가질 수 있다.

[0067] 유사하게, Fc-결합 분자는, 이것이 Fc 영역과 검출가능한 수준에서 반응하고, 유사한 조건 하에 관련되지 않는 폴리웹타이드들 또는 제제들과 통계적으로 유의한 방식으로 검출가능하게 반응하지 않는 경우 면역글로불린의 Fc 영역에 "특이적으로 결합한다"라고 한다. 일부의 나열적인 실시형태에서, Fc-결합 분자는 선택된 면역글로불린 이소형의 Fc-영역에 대해 적어도 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 또는 50nM의 친화성을 갖는다. 소정의 Fc-결합 분자들은 다른 것들에 비해 하나 이상의 면역글로불린 이소형들에 대해 더 강력하거나 더 약한 친화성을 갖는다.

[0068] 이러한 친화성 또는 특이성의 정도는 예를 들면, 경쟁적 결합 연구들을 포함하는, 각종의 통상적인 과정에 의해 측정할 수 있다. ELISA 검정에서, 양성 반응은 대조군 또는 대조군들의 그룹의 평균 값보다 큰 2 또는 3의 표준 편차로서 정의된다.

[0069] 상기에 나타낸 바와 같이, Fc-결합 분자들, 항원들, 및/또는 항원성 웹타이드들과 같은 소정의 검출기 분자들은 검출가능한 개체에 접합된다. 접합은 공유 부착에 의해 전형적으로 달성된다. 검출가능한 개체들로는, 금속 나노입자, 금속 나노쉘, 착색된 라텍스 입자, 방사성 동위원소, 및 형광단과 같은 "직접적으로 검출가능한 개체들", 및 흔히 리간드-수용체 상호작용들에 의존하여 신호전달을 달성하는 "간접적으로 검출가능한 개체들"이 포함된다. 전자의 경우, 검출기 분자(예를 들면, 항원성 웹타이드, 단백질 A/G와 같은 Fc-결합 분자)는 직접적으로 검출가능한 개체에 접합된다. 후자의 경우, 검출기 분자는 리간드에 접합되며, 이어서, 이는 리간드-수용체와 상호작용하고, 리간드-수용체는 직접적으로 검출가능한 개체에 접합되거나 또는 역으로 접합될 수 있다. 리간드들의 예로는 비오틴(예를 들면, 시스테인 또는 라이신 잔기를 통해), 지질 분자들(예를 들면, 시스테인 잔기를 통해), 및 담체 단백질들(예를 들면, 혈청 알부민)이 포함된다. 비오틴과 같은 리간드들에 대한 부착은 검출기와 아비딘, 스트렙트아비딘, 또는 뉴트라비딘과 같은 리간드 수용체들을 연합시키는데 유용할 수 있다.

최종적으로, 아비딘, 스트렙트아비딘, 뉴트라비딘은 직접적으로 검출가능한 개체(예를 들면, 콜로이드성 금, 형광성 잔기, 또는 서양고추냉이 퍼옥시다제 또는 알칼리성 포스파타제와 같은 효소와 같이, 가시화될 수 있는 신호전달 잔기)에 연결시킬 수 있다. 대안으로는, 검출기 분자들은 아비딘, 스트렙트아비딘, 또는 뉴트라비딘과 같은 리간드 수용체에 융합시키거나 연결시킴으로써, 상응하는 리간드와의 연합을 용이하게 할 수 있으며, 이는 궁극적으로 직접적으로 검출가능한 개체에 연결된다. 다른 리간드-수용체 쌍들의 예들은 당해 분야에 익히 공지되어 있으며 유사하게 사용될 수 있다.

[0070] 직접적으로 검출가능한 개체들(또는 신호전달 모이어티들)의 예로는 방사성 동위원소들, 형광단들, 염료들, 효소들, 나노입자, 착색된 라텍스 입자, 화학발광성 마커들, 발광 염료, 및 본원에 기술되고 당해 분야에 공지되어 있는 다른 것들이 포함된다.

[0071] 직접적으로 검출가능한 개체들로서 사용될 수 있는 방사성 동위원소들의 예로는 ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H , 및 ^{125}I 가 포함된다. 이들 방사성 동위원소들은 상이한 반감기들, 붕괴 유형들, 및 조정되어 특정 프로토콜의 요구를 일치시킬 수 있는 에너지 수준들을 갖는다. 예를 들면, ^3H 는 낮은 배경 수준들을 초래하는 낮은 에너지 방출체이지만, 이러한 낮은 에너지는, 또한 방사선자동사진법 및 다른 측정들에 대해 긴 기간을 초래한다.

[0072] 직접적으로 검출가능한 개체들로서 사용될 수 있는 형광단들 또는 형광색소들의 예로는 플루오레세인, 테트라메틸로다민, 텍사스 레드(Texas Red), 및 다수의 다른 것들이 포함된다(참조: 예를 들면, Haugland, Handbook of Fluorescent Probes - 9th Ed., 2002, Molec. Probes, Inc., Eugene OR; Haugland, The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies-10th Ed., 2005, Invitrogen, Carlsbad, CA). 또한, 발광 또는 대안으로는 검출가능한 염료들을 포함한다. 염료들에 의해 방사된 광은 자외선 또는 적외선과 같은 가시광 또는 비가시광일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 염료는 형광성 공명 에너지 전이(FRET) 염료; 크산텐 염료, 예를 들면, 플루오레세인 및 로다민; 알파 또는 베타 위치에서 아미노 그룹을 갖는 염료(예를 들면, 나프틸아민 염료, 1-디메틸아미노나프틸-5-설포네이트, 1-아닐리노-8-나프탈렌 설포네이트 및 2-p-톨루이디닐-6-나프탈렌 설포네이트); 3-페닐-7-이소시아네이토쿠마린을 갖는 염료; 9-이소티오시아네이토아크리딘 및 아크리딘 오렌지와 같은 아크리딘; 피렌, 벤즈옥사디아졸 및 스틸벤; 3-(ε -카복시펜틸)-3'-에틸-5,5'-디메틸옥사카보시아닌(CYA)을 갖는 염료; 6-카복시 플루오레세인(FAM); 5&6-카복시로다민-110(R110); 6-카복시로다민-6G(R6G); N,N,N',N'-테트라메틸-6-카복시로다민(TAMRA); 6-카복시-X-로다민(ROX); 6-카복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레세인(JOE); ALEXA FLUORTM; Cy2; 텍사스 레드(Texas Red) 및 로다민 레드(Rhodamine Red); 6-카복시-2',4,7,7'-테트라클로로플루오레세인(TET); 6-카복시-2',4,4',5',7,7'-헥사클로로플루오레세인(HEX); 5-카복시-2',4',5',7'-테트라클로로플루오레세인(ZOE); NAN; NED; Cy3; Cy3.5; Cy5; Cy5.5; Cy7; 및 Cy7.5; IR800CW, ICG, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 350; 알렉사 플루오르 488; 알렉사 플루오르 532; 알렉사 플루오르 546; 알렉사 플루오르 568; 알렉사 플루오르 594; 알렉사 플루오르 647; 알렉사 플루오르 680, 또는 알렉사 플루오르 750일 수 있다.

[0073] 나노입자로서 명명되는 매우 작은 입자를 또한 직접적으로 검출가능한 개체들로서 사용할 수 있다. 이들 입자는, 크기가 일반적으로 1 내지 1000nm의 범위이고, 금 및 은 입자 및 양자점들과 같은 다양한 화학적 구조들을 포함한다. 입사되는 백색광(angled incident white light)으로 조사(irradiating)하는 경우, 약 40 내지 120nm 범위의 은 또는 금 나노입자는 단색광을 고 강도로 산란시킬 것이다. 산란된 광의 파장은 입자의 크기에 의존한다. 근접한 4 내지 5개의 상이한 입자들은 각각 단색광을 산란시킬 것이며, 이는 겹쳐지는 경우 특이적이고, 독특한 색상을 제공할 것이다. 은 또는 금 입자와 같은 유도체화된 나노입자는 단백질들, 항체들, 소 분자들, 수용체 리간드들, 및 핵산들을 포함하는 분자들의 광범위한 배열에 부착될 수 있다. 나노입자의 구체예로는 금속 나노입자 및 금속 나노쉘, 예를 들면, 금 입자, 은 입자, 구리 입자, 백금 입자, 카드뮴 입자, 복합재 입자, 금 중공구(gold hollow sphere), 금-피복된 실리카 나노쉘, 및 실리카-피복된 금 쉘이 포함된다. 실리카, 라텍스, 폴리스티렌, 폴리카보네이트, 폴리아크릴레이트, PVDF 나노입자, 및 이들 물질 중 어느 것의 착색된 입자를 또한 포함한다.

[0074] 양자점들을 또한 직접적으로 검출가능한 개체들로서 사용할 수 있다. 양자점들은, 광범위한 파장들에 걸쳐 광에 의해 여기될 수 있는, 직경이 1 내지 5nm인 형광성 결정들이다. 적절한 파장을 갖는 광에 의한 여기시, 이들 결정들은 이들의 화학적 조성 및 크기에 좌우되는 파장을 갖는 단색광과 같은 광을 방사한다. CdSe, ZnSe, InP, 또는 InAs와 같은 양자점들은 고유한 광학 특성들을 지니며; 이들 및 유사한 양자점들은 다수의 시판 공급원들[예를 들면, 아칸소주 파예트빌 소재의 엔엔-랩스(NN-Labs), 아칸소주 파예트빌 소재의 오션 나노테크(Ocean Nanotech), 영국 맨체스터 소재의 나노코 테크놀로지스(Nanoco Technologies); 미주리주 세인트 루이스

소재의 시그마-알드리히(Sigma-Aldrich)]로부터 입수 가능하다.

[0075] 신호의 존재를 검출하는 것은, 당해 검정에 의해 사용되는 표지 또는 검출 가능한 개체에 대해 적절한 임의의 수 단들에 의해 달성할 수 있다. 예를 들면, 검출 단계는 색상 변화에 대해 포획 복합체를 가시적으로 점검하는 것, 또는 물리적-화학적 변화에 대해 포획 복합체를 점검하는 것을 포함할 수 있다. 물리적-화학적 변화들은 산화 반응들 또는 다른 화학 반응들과 함께 발생할 수 있다. 이들은 분광광도계 등을 사용하여 육안으로 검출할 수 있다.

[0076] 신호는, 음성 대조군의 신호보다 더 강력한 경우 목적하는 항체의 존재의 전형적인 지표이지만; 모든 시험들이 음성 대조군을 필요로 하는 것은 아니다. 일부 예들에서, 필수적이지는 않지만, 양성 신호의 강도는 수치적으로 정량화될 수 있으며 강도가 대조군에 비해 통계적으로 유의한 경우 항체의 존재의 지표이다. 일부 예들에서, 특정 시험 유형을 사용한 통상의 실험 및 지식은, 신호가 양성 또는 음성인 경우를 확립하므로, 목적하는 항체의 존재 또는 부재를 나타낸다.

[0077] 한 예로서, 소정의 측방 유동 검정 장치들로부터의 신호는 0 내지 5(이들 사이의 소수점들을 포함)의 반응성 점수에 따라 측정될 수 있으며, 여기서, 보다 강력하고 보다 양성인 신호는 보다 높은 수의 점수를 제공한다. 음성 대조군은 전형적으로 0에 더 가까운 점수, 예를 들면, 약 0.25 이하인 점수를 가질 것이다.

[0078] 검출 신호는, 예를 들면, 개별의 반응물들의 비를 조절함으로써 최적화될 수 있다. 한 예로는 (i) 검출 가능한 Fc-결합 분자 접합체(들) 및 (ii) 검출 가능한 항원/항원성 웨타이드 접합체(들)의 비를 다음과 같이 조절하는 것을 포함한다: 약 1:200, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 또는 200:1(이들 사이의 모든 비들 및 비들의 범위들 포함)의 (i):(ii)의 비(예를 들면, 몰비). 일부 실시형태에서, 검출 가능한 Fc-결합 분자 접합체 대 검출 가능한 항원/항원성 웨타이드 접합체의 비는 약 20:1 내지 약 1:20, 바람직하게는 약 20:1 내지 약 1:1, 및 보다 바람직하게는 약 16:1 내지 약 2:1이다. 소정 실시형태에서, 검출 가능한 접합체 내의 Fc-결합 분자는 단백질 A, 단백질 G, 단백질 A/G 융합 단백질들, 단백질 L, 또는 항체의 Fc 영역에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한 이의 단편들 및 변이체들이다.

[0079] 일부 실시형태에서, 단백질 A와 단백질 G의 혼합물은 Fc-결합 분자-접합체들로서 사용되며, 여기서, 각각의 단백질 A 및 단백질 G 분자는 검출 가능한 개체에 접합된다. 단백질 A 및 단백질 G가 검출 가능한 Fc-결합 분자 접합체로서 둘 다 사용되는 이러한 실시형태에서, 검출 신호는, 단백질 A 대 단백질 G의 비를 검출될 면역글로불린 부류의 유형에 따라 변경시킴으로써 최적화시킬 수 있다. 상기에 설명한 바와 같이, 단백질 A 및 단백질 G는 상이한 면역글로불린 부류들(예를 들면, IgG, IgE, IgD, IgM, 또는 IgA)의 Fc 영역들에 대해 상이한 결합 친화성들을 갖는다. 따라서, 단백질 A 대 단백질 G의 비는 검출하기를 원하는 면역글로불린 부류를 기준으로 하여 조절할 수 있다. 예로써, 주로 IgM 면역글로불린들을 검출하기를 원하는 경우, 보다 높은 비의 단백질 A 대 단백질 G(즉, 단백질 A 접합체에 대해 보다 많은 양의 단백질 G 접합체)를 사용할 수 있다. 반면, 주로 IgG 면역글로불린들을 검출하기를 원하는 경우, 보다 높은 비의 단백질 A 대 단백질 G(즉, 단백질 G 접합체에 대해 보다 많은 양의 단백질 A 접합체)를 사용할 수 있다. 단백질 A 대 단백질 G 접합체들의 예시적인 비들(예를 들면, 몰비)로는 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 및 20:1이 포함되지만, 이들에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 단백질 A 접합체 대 단백질 G 접합체의 비는 약 10:1 내지 약 1:10, 바람직하게는 약 5:1 내지 약 1:5, 및 보다 바람직하게는 약 2:1 내지 약 1:2이다. 한 실시형태에서, 단백질 A 접합체 대 단백질 G 접합체의 비는 약 1:1이다.

[0080] 소정 실시형태에서, 검출 신호는, 단백질 A 대 단백질 G 비들을, 검출 가능한 항원/항원성 웨타이드 접합체(들)의 양에 대해 조절함으로써 추가로 최적화시킬 수 있다. 예를 들면, 일부 실시형태에서, 단백질 A 접합체 대 단백질 G 접합체 대 검출 가능한 항원/항원성 웨타이드 접합체의 비(예를 들면, 몰비)는 약 20:20:1 내지 약 1:1:20, 약 10:10:1 내지 약 2:2:1, 또는 약 4:2:1 내지 약 1:2:1일 수 있다.

[0081] 특이적인 항체들의 검출을 위한 항원들을 사용한 면역검정들에 대한 프로토콜들은 당해 분야에 익히 공지되어 있다. 예를 들면, 통상의 샌드위치 검정을 사용할 수 있거나, 통상의 경쟁적 검정 양식을 사용할 수 있다. 검정들의 일부 적합한 유형들의 논의에 대해서는 문헌[참조: Current Protocols in Immunology (Coligan et al., editors, John Wiley & Sons, Inc)]을 참조한다. 일부 실시형태에서, 검출 단계는 측방 유동 면역검정을 수행함

을 포함한다. 소정 실시형태에서, 검출 단계는 ELISA 검정을 수행함을 포함한다. 다른 실시형태에서, 검출 단계는 분석 회전자 내에서 샘플을 회전시킴을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 검출 단계는 샘플을 전기화학 센서, 광학 센서, 또는 광-전자 센서로 분석함을 포함한다.

[0082] 특히 유용한 검정 양식은 측방 유동 면역검정 양식이다. 한 비-제한적 예로서, Fc-결합 분자(예를 들면, 단백질 A 및/또는 G) 및 임의로 항체 특이적인 항원을 포함하는 리포터(reporter) 또는 검출기 분자들을 검출가능한 개체(예를 들면, 콜로이드성 금)로 표지한 후 건조시키고 유리 섬유 패드(샘플 적용 패드 또는 접합체 패드) 상에 둔다. 비표지 항원 또는 항원성 웨타이드(즉, 포획 개체)는 니트로셀룰로스 또는 PVDF(폴리비닐리덴 플루오라이드) 막(예를 들면, Immobilon™ 막)과 같은 막 상에 고정화시킨다. 샘플(혈액, 혈청 등)의 용액을 샘플 적용 패드(또는 접합체 패드를 통과한 유동물)에 적용시키는 경우, 이는 표지된 검출기(들)를 용해하고, 이어서, 존재하는 경우, 샘플 중의 항체들과 결합한다. 이어서, 수득되는 복합체들을 다음 막(PVDF 또는 포획 개체를 함유하는 니트로셀룰로스) 내로 모세관 작용에 의해 수송한다. 이어서, 포획 개체에 대한 항체들이 존재하는 경우, 이들을 막 상에서 검출기(들) 및 진단 포획 개체와 복합체화시킴으로써 신호(예를 들면, 관찰될 수 있거나 가시화될 수 있는 밴드)를 생성시킨다.

[0083] 다른 비-제한적 예로서, 샘플 패드를 검출기 분자들(즉, 검출가능한 Fc-결합 분자들, 검출가능한 항원-접합체들)로 스트라이프(stripe)하지 않고, 즉, 샘플 패드는 예비-고정화된 검출기 분자들의 접합 영역을 함유하지 않는다. 모든 다른 성분들은 상기에 기술한 바와 필수적으로 동일하며, 여기서, 비표지 항원 또는 항원성 웨타이드(즉, 포획 개체)는 니트로셀룰로스 또는 PVDF(폴리비닐리덴 플루오라이드) 막(예를 들면, Immobilon™ 막) 상에 고정화된다. 시험 샘플(혈액, 혈청 등)은 하나 또는 둘 다의 검출기 분자들과 예비-혼합된 후 샘플 패드에 적용된다. 대안으로는, 시험 샘플 및 검출기 분자들은 샘플 패드에 별도로, 동시에 또는 순차적으로 적용된다. 다른 조합들은 당해 분야의 숙련가들에게 명백할 것이다. 이들이 혼합되거나 적용되는 순서와 상관없이, 샘플 및 검출기 분자(들) 중의 항체들의 수득되는 복합체들은 이후에 다음 막(포획 개체를 함유하는 PVDF 또는 니트로셀룰로스)로 모세관 작용에 의해 수송된다. 이어서, 포획 개체에 대한 항체들이 존재하는 경우, 이들은 검출기들 및 진단 포획 개체와 막 상에서 복합체화됨으로써, 신호(예를 들면, 관찰될 수 있거나 가시화될 수 있는 밴드)를 생성한다.

[0084] 구체적인 실시형태에서, 당해 방법들은 시험 샘플을 단백질 A 및/또는 단백질 G-콜로이드성 금 접합체(CGC)와 접촉시켜 제1 복합체를 형성시키는 단계, 제1 복합체를 니트로셀룰로스 또는 PVDF 막의 시험 영역 상에 고정화된 웨타이드 항원과 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서, 웨타이드 항원은 미생물 공급원으로부터 유도되며 목적하는 항체(예를 들면, 항-세균, 항-바이러스, 항-기생충, 항-진균 항체)에 특이적으로 결합한다. 웨타이드 항원은 BSA에 접합될 수 있거나 MAPS로 합성될 수 있다. 시험 영역내에서 단백질 A-CGC 및/또는 단백질 G-CGC의 존재는 시험 샘플 중의 항체의 존재의 지표이다.

[0085] 소정 방법들은 시험 샘플을 상기에 기술한 바와 동일한 웨타이드 항원을 포함하는, 웨타이드 항원-CGC 접합체와 접촉시킴을 포함한다. 소정 실시형태에서, 단백질 A/G-CGC 또는 2차 항체-CGC 또는 이의 조합물 및 웨타이드 항원-CGC는 시험 영역과 중복되지 않는 방식으로 막의 접합 영역(또는 별도이지만 연결된 막) 상에 고정화된다. 다른 실시형태에서, 단백질 A/G-CGC 또는 2차 항체-CGC 또는 이의 조합물 및 웨타이드 항원-CGC는 막 상에 고정화되지 않지만, 오히려 시험 샘플과 함께 표면에 동시에 또는 순차적으로 적용된다. 단백질 A/G-CGC 및/또는 2차 항체-CGC와 웨타이드 항원-CGC로부터의 조합된 신호는 시험 샘플 중의 항체의 존재를 나타내며, 웨타이드 항원-CGC 단독으로, 즉, 단백질 A-CGC, 단백질 G-CGC, 또는 2차 항체-CGC의 부재 하에 수행된 시험으로부터의 신호보다 통상적으로 더 강하다. 구체적인 실시형태에서, 웨타이드 항원은 보렐리아 항원(천연적으로 존재하거나 합성된, 예를 들면, 천연 발생 항원과 동일하거나 모사된)이며, 시험 샘플은 라임병을 지닌 것으로 추정되는 대상체로부터 유도된다. 양성 신호는 샘플 중에서 라임병-특이적인 항체들의 존재를 확인한다. 다른 실시형태에서, 웨타이드 항원은 에를리키아 항원(천연적으로 존재하거나 합성된, 예를 들면, 천연 발생 항원과 동일하거나 모사됨)이고, 대상체는 에를리키아증(Ehrlichiosis), 아나플라스마타케아에(Anaplasmataceae) 과, 에를리키아 및 아나플라스마 속의 세균에 의해 유발된 진드기-유도된 세균 감염을 가진 것으로 추정된다.

[0086] 혈액 생성물들 또는 다른 생리학적 또는 생물학적 유액들을 스크리닝하기 위한 다른 검정은 효소 연결된 면역흡착성 검정, 즉, ELISA이다. 전형적으로, ELISA에서, 포획 개체들(예를 들면, 항체-특이적 항원들)은 미세역가웰(microtiter well)의 표면에 직접 또는 포획 매트릭스(예를 들면, 항체)를 통해 흡착된다. 이어서, 표면 상의 잔여 비-특이적 단백질-결합 부위들은 소 혈청 알부민(BSA), 가열-불활성화된 정상의 염소 혈청(NGS), 또는 BLOTO(보존제, 염, 및 발포제도 함유하는 탈지 분유의 완충된 용액)과 같은 적절한 제제로 차단시킨다. 이어

서, 웰은 목적하는 항체를 함유하는 것으로 추정되는 생물학적 샘플과 함께 항온배양한다. 샘플은 자체로 적용되거나, 보다 흔히, 이는 일반적으로 BSA, NGS, 또는 BLOTO와 같은 소량(0.1 내지 5.0중량%)의 단백질을 함유하는 완충 용액 중에 희석시킬 수 있다. 충분한 길이의 시간 동안 항온배양하여 특이적인 결합이 발생하도록 한 후, 웰을 세척하여 미결합 단백질을 제거한 후 효소 또는 다른 표지에 표준 과정들로 접합시키는 Fc-결합 분자(예를 들면, 단백질 A 및/또는 단백질 G) 및 임의로 다른 항체-특이적 항원(포획 개체와 일반적으로 동일함)을 포함하는 하나 이상의 검출기 문자들과 함께 항온배양하며 차단 완충액 중에 용해시킨다. 표지는 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP), 베타-갈락토시다제, 알칼리성 포스파타제, 글루코스 옥시다제 등을 포함하는, 각종 효소들로부터 선택될 수 있다. 특이적인 결합이 다시 일어나도록 충분한 시간을 허용한 후, 웰을 다시 세척하여 결합하지 않는 접합체를 제거하고, 효소에 적합한 기질을 가한다. 색상이 발색되도록 하고 웰의 내용물들의 광학밀도를 육안으로 또는 장치로(적절한 과장에서 측정됨) 측정한다. 컷오프(cutoff) OD 값은, 라임병이 풍토병이 아닌 지역으로부터, 또는 다른 이러한 통상의 정의들에 의해 개인들로부터 수집한 적어도 50개의 혈청 샘플들의 평균 OD+3의 표준 편차(SD)로 정의할 수 있다. 매우 특이적인 검정의 경우, OD+2 SD를 컷오프 값으로 사용할 수 있다. ELISA 검정들을 수행하기 위한 조건들은 당해 분야에 익히 공지되어 있다.

[0087]

임의의 수의 통상의 단백질 검정 양식들, 특히 면역검정 양식들을 설계하여 본원에 기술된 각종 실시형태를 이용할 수 있음이 당해 분야의 숙련가에 의해 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명은 특수 검정 양식의 선택에 의해 제한되지 않으며, 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 검정 양식들을 포함하는 것으로 여겨진다.

[0088]

"항체를 함유하는 샘플" 또는 샘플 중의 항체를 검출하는"과 같은 어구들은, 항체가 함유되지 않거나 검출되지 않는 샘플들 또는 측정들(예를 들면, 검출 시도들)을 배제함을 의미하지 않는다. 일반적인 의미에서, 본 발명은 감염성 미생물에 의한 감염에 대한 반응시 생산된 항체가, 검출되는지의 여부에 상관없이, 샘플에 존재하는지를 측정하기 위한 검정들을 포함한다.

[0089]

항원들/펩타이드들 및 항체들을 반응시켜 이들이 특이적으로 반응하도록 하는 조건들은 당해 분야의 숙련가들에게 익히 공지되어 있다[참조: 예를 들면, Current Protocols in Immunology (Coligan et al., editors, John Wiley & Sons, Inc)].

[0090]

장치 및 조성물

[0091]

다른 양상에서, 본 발명은 샘플속의 항체를 검출하기 위한 장치들을 포함한다. 소정 실시형태는 샘플 로딩 영역, 접합 영역, 및 시험 영역을 포함하는, 항체 검출 장치들 또는 항체 검출 시스템들을 포함한다. 접합 영역은 시험 영역과 전형적으로 중복되지 않지만; 샘플 영역과 이를 2개의 영역들은, 작동시, 샘플 로딩 영역 내로 로딩되는 때의 액체 샘플이 접합 영역 및 시험 영역과 유체 소통하도록 배열된다. 일반적으로, 시험 샘플은 모세관 작용을 통하여 접합 및 시험 영역들을 통해 유동하거나 이들과 유체 소통한다. 접합 영역은 제1 검출가능한 개체(즉, 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체, 예를 들면, 단백질 A 및/또는 단백질 G-접합체, 또는 Fc-특이적인 2차 항체-접합체)에 접합된 이동가능한 Fc-결합 분자를 포함하며, 시험 영역은 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 고정화된 포획 개체를 포함한다. 이들 특징들 각각은 본원 어딘가에 기술되어 있다.

[0092]

일부 실시형태에서, 당해 장치는, 액체 샘플이 샘플 로딩 영역에 로딩되는 경우, 상기 액체 샘플과 유체 소통 상태인 제어 영역을 추가로 포함한다. 다시, 액체 샘플은 모세관 작용을 통하여 제어 영역을 통해 유동하거나 이와 유체 소통될 수 있다. 소정 실시형태에서, 제어 영역은 제어 검출기와 특이적으로 결합할 수 있는 고정화된 결합 파트너를 포함한다. 한 예로서, 제어 영역은 항-단백질 A 항체, 항-단백질 G 항체, 또는 단백질 A 또는 단백질 G와 반응성인 포유동물 IgG들 중 어느 것을 포함한다.

[0093]

일부 장치들은 시험 영역의 다운스트림에 배치된 흡착성 패드를 추가로 포함한다. 특정 장치들에서, 접합 영역은 샘플 로딩 영역의 업스트림에 배치된다. 일부 실시형태에서, 접합 영역은 샘플 로딩 영역의 다운스트림에 배치된다. 일부 실시형태에서, 샘플 로딩 영역은 혈액 분리기 물질을 포함한다.

[0094]

특정 예들에서, 접합 영역은 이동가능한 제2 검출기를 추가로 포함하며, 여기서, 제2 검출기는 제2 검출가능한 개체에 접합된 항원 또는 항원성 펩타이드를 포함하며, 당해 항원 또는 항원성 펩타이드는 항체에 특이적으로 결합할 수 있다. 소정 실시형태에서, 제1(예를 들면, 검출가능한 Fc-결합 분자) 및 제2(예를 들면, 검출가능한 항원-접합체)의 검출기들은 동일한 유형의 검출가능한 개체를 갖는다. 다른 실시형태에서, 제1 및 제2 검출기들은 상이한 유형들의 검출가능한 개체들을 갖는다. 특정 실시형태에서, 제2 검출기에 대한 제1 검출기의 비(예를 들면, 몰 비)는 바람직한 수준의 신호 증폭을 달성하도록 조절된다. 예를 들면, 제1 검출기(예를 들면, 검출가능한 Fc-결합 분자, 예를 들면 단백질 A/단백질 G) 대 제2 검출기(예를 들면, 검출가능한 항원-접합체)의

비는 이들 사이의 모든 비들 및 비들의 범위들을 포함하여, 약 1:200, 1:100, 1:90, 1:80, 1:70, 1:60, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, 또는 200:1일 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출가능한 Fc-결합 분자 접합체 대 검출가능한 항원/항원성 웹타이드 접합체의 비는 약 20:1 내지 약 1:20, 바람직하게는 약 20:1 내지 약 1:1, 및 보다 바람직하게는 약 16:1 내지 약 2:1이다. 단백질 A 및 단백질 G 접합체들 둘 다가 검출가능한 Fc-결합 분자들로서 사용되는 실시형태에서, 단백질 A 접합체 대 단백질 G 접합체의 비는 위에서 기술한 바와 같이 검출된 면역글로불린 부류를 기본으로 하여 검출 신호를 최적화하기 위해 조절될 수 있다. 단백질 A 접합체 대 단백질 G 접합체의 적합한 비들(예를 들면, 몰 비들)은 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 및 20:1을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일부 실시형태에서, 단백질 A 접합체 대 단백질 G 접합체의 비는 약 10:1 내지 약 1:10, 바람직하게는 약 5:1 내지 약 1:5, 및 보다 바람직하게는 약 2:1 내지 약 1:2이다. 한 실시형태에서, 단백질 A 접합체 대 단백질 G 접합체의 비는 약 1:1이다.

[0095]

특이적인 결합 검정들, 특히 면역검정들을 수행하기 위한 장치들은 공지되어 있으며 본 방법들에서 사용하기 위해 용이하게 조정될 수 있다. 일반적으로, 고체 페이즈 검정들은, 시약들의 분리가 더 신속하고 더 간단하기 때문에, 침전, 원심분리, 여과, 크로마토그래피, 또는 마그네슘과 같은 분리 단계를 필요로 하는 이종 검정 방법들보다 수행하기 더 용이하다. 고체 페이즈 검정 장치들은 미세역가 플레이트들, 유동-통과 검정 장치들(flow-through assay devices)(예를 들면, 측방 유동 면역검정 장치들), 딥스틱들(dipsticks), 및 면역모세관(immunocapillary) 또는 면역크로마토그래피 면역검정 장치들을 포함한다.

[0096]

일부 실시형태에서, 당해 장치는 측방 유동 면역검정이다. 소정 실시형태에서, 당해 장치는 ELISA 검정에 적합한 미세역가 플레이트이다. 다른 실시형태에서, 장치는 분석 회전자에서 사용하기에 적합한다. 또 다른 실시형태에서, 당해 장치는 전기화학적, 광학적, 또는 광-전자 센서를 포함한다.

[0097]

소정 실시형태에서, 측방 유동 장치는 샘플/혈액 분리 패드, 니트로셀룰로스 막, 및 하우징(housing)내에 배치된 상부 위크(upper wick)를 사용하여 구성되어 있다(참조: 예를 들면, 도 2). 니트로셀룰로스 막은 비표지 항체-특이적 항원(예를 들면, 웹타이드 항원 또는 비-웹타이드 항원)과 같은, 포획 개체를 포함하는 시험 라인 또는 영역, 및 임의로 Fc-결합 분자(하기 나타냄)에 대해 반응성인 항체를 함유하는 조절 라인 또는 영역으로 스트라이프되어 있다. 목적하는 항체를 함유하는 것으로 추측되는 샘플은 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체와 예비-혼합된 후, 측방 유동 검정 장치에 적용된다. 또는 예비-혼입하기 보다는, 샘플과 Fc-결합 분자를 검정 장치에 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 적용할 수 있다.

[0098]

대안으로는, 니트로셀룰로스 막은 상기와 같이 제조하여 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체를 포함하는 접합 라인 또는 영역으로 추가로 스트라이프하며, 여기서, 접합 및 시험 영역들은 중복되지 않는다. 일부 실시형태에서, 목적하는 항체를 함유하는 것으로 추측되는 샘플을 이후에 측방 유동 검정 장치에 적용할 수 있다. 다른 실시형태에서, 목적하는 항체를 함유하는 것으로 추측되는 샘플은 항체(전형적으로 포획 개체와 동일한 결합 특이성을 가짐)에 특이적으로 결합하는, 검출가능한 항원-접합체와 예비 혼합시킨 후, 측방 유동 검정 장치에 적용할 수 있다. 상기와 유사하게, 예비-혼합보다는 오히려, 샘플과 검출가능한 항원-접합체를 검정 장치에 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 적용할 수 있다.

[0099]

일부 실시형태에서, 측방 유동 장치는 샘플/혈액 분리 패드, 니트로셀룰로스 막, 및 하우징 내에 배치된 상부 위크를 사용하여 구성된다(참조: 예를 들면, 도 2). 니트로셀룰로스 막은, 비표지 항체-특이적 항원(예를 들면, 웹타이드 항원 또는 비-웹타이드 항원)과 같은 포획 개체를 포함하는 시험 라인 또는 영역, 임의로 Fc-결합 분자(하기 나타냄)에 대해 반응성인 항체를 함유하는 조절 라인 또는 영역, 및 항체(전형적으로 포획 개체와 동일한 결합 특이성을 갖는)에 특이적으로 결합하는, 검출가능한 항원-접합체를 포함하는 접합 라인 또는 영역으로 스트라이프된다. 접합 및 시험 영역들은 일반적으로 중복되지 않는다. 목적하는 항체를 함유하는 것으로 추측된 샘플은 검출가능한 Fc-결합 분자-접합체와 예비-혼합시킨 후, 측방 유동 검정 장치에 적용할 수 있다. 또한, 예비-혼합보다는 오히려, 샘플과 Fc-결합 분자를 검정 장치에 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 적용할 수 있다. 한 예시적인 실시형태에서, 2개-포트 장치들(two-port devices)을 또한 시험 샘플, 접합체 및 추적 완충액(chase buffer)의 순차적인 적용을 위해 사용할 수 있다.

[0100]

특정의 측방 유동 장치들에서, 니트로셀룰로스 막은, 비표지 항체-특이적 항원(예를 들면, 웹타이드 항원 또는

비-펩타이드 항원)과 같은 포획 개체를 포함하는 시험 라인 또는 영역과, 임의로 Fc-결합 분자(하기 나타냄)에 대해 반응성인 항체를 함유하는 조절 라인 또는 영역, 및 검출가능한 Fc-결합 분자 및 항체(전형적으로 포획 개체와 동일한 결합 특이성을 가짐)에 특이적으로 결합하는 검출가능한 항원-접합체를 포함하는 접합 라인 또는 영역으로 스트라이프된다. 목적하는 항체를 함유하는 것으로 추측되는 샘플은 이후에 측방 유동 검정 장치에 적용시킬 수 있다.

[0101] 라임-특이적인 항체들의 검출을 위한 예시적인 장치에서, 측방 유동 장치는 샘플/혈액 분리 패드, 니트로셀룰로스 막, 및 하우징 내에 배치된 상부 위크를 사용하여 구성된다(참조: 예를 들면, 도 2). 니트로셀룰로스 막은 보렐리아 항원들(참조: 예를 들면, 미국 특허원 제12/948,209호)을 모사하거나 모의하는 펩타이드들의 혼합물을 포함하는 시험 라인 또는 영역 및 임의의 단백질 A- 또는 단백질 G-반응성 면역글로불린(예를 들면, 항-단백질 A IgG, 마우스, 사람 또는 다른 단백질 A-반응성 IgG 등)을 포함하는 조절 라인 또는 영역으로 스트라이프된다. 보렐리아 부르그도르페리에 대한 항체들을 함유하는 것으로 추측된 샘플은 단백질 A 및/또는 G (단백질 A/G-CGC)의 콜로이드성 금 접합체들, 또는 (ii) 단백질 A/G-CGC 및 보렐리아 항원들(보렐리아 항원-CGC)의 콜로이드성 금 접합체들의 혼합물과 혼합할 수 있다. 당해 샘플 접합체 혼합물은 이후에 측방 유동 검정 장치에 적용할 수 있다.

[0102] 대안으로는, 측방 유동 장치는 상기와 같이 구성되지만, 니트로셀룰로스 패드가 하나 이상이 접합 영역들로 스트라이프되는 경우, 시험 영역으로부터 분리된다. 접합 영역들은 예를 들면, (i) 단백질 A/G-CGC 단독, (ii) 보렐리아 항원-CGC 단독, 또는 (iii) 단백질 A/G-CGC와 보렐리아 항원-CGC의 조합물을 포함할 수 있다. 본원에 또는 본 출원의 어느 곳에서도 사용된 것으로서, 보렐리아 항원, 에를리키아 항원, 또는 임의의 항원 또는 항원성 펩타이드도 천연의 보렐리아 항원, 천연의 에를리키아 항원 또는 임의의 천연의 항원 각각을 모사하거나 모의하는 합성 펩타이드들의 혼합물을 포함한다. 소정 실시형태에서, 예를 들면, (i) 또는 (iii)에서, 시험 샘플은 임의의 예비-혼합없이 측방 유동 장치에 자체로 적용된다. 다른 실시형태에서, 예를 들면, (i)에서, 샘플은 보렐리아 항원-CGC와 예비-혼합된 후 측방 유동 장치에 적용된다. 일부 실시형태에서, 예를 들면, (ii)에서, 샘플은 단백질 A/G-CGC와 혼합된 후 측방 유동 장치에 적용된다. 그러나, 이들 예시적인 조합들은 비-제한적이며, 다른 가능성들도 당해 분야의 숙련가들에게 명백할 것이다.

[0103] 단백질 A/G-CGC, 샘플 중의 항체, 및 임의의 보렐리아 항원-CGC를 포함하는 포획 복합체들은 샘플/혈액 분리 패드를 통한 수송 및 임의의 접합 라인(들) 및 시험 라인(들)을 통한 이후 동안 형성된다. 당해 환경들(예를 들면, 보렐리아 항원-CGC의 임의의 사용)에 의존하여, 고정화되고 표지되지 않은 보렐리아 항원, 항체, 및 표지된 단백질 A/G-CGC의 복합체 또는 샌드위치가 형성된다. 보렐리아 항원-CGC의 존재하에서, 비표지 보렐리아 항원, 항체, 표지된 보렐리아 항원-CGC, 및 표지된 단백질 A/G-CGC의 복합체 또는 샌드위치가 형성된다. 후자의 복합체에 단백질 A/G-CGC를 첨가하면 표지된 보렐리아 항원-CGC로부터 신호를 증폭시킨다. 소정 실시형태에서, 증가된 증폭은 본원에 기술되고 당해 분야에 공지된 바와 같이, 모든 반응물들의 비들을 조절함으로써 달성을 할 수 있다.

[0104] 에를리히증-특이적인 항체들(Ehrlichiosis-specific antibodies)에 대한 예시적인 장치에서, 측방 유동 장치는 샘플/혈액 분리 패드, 니트로셀룰로스 막, 및 하우징내에 배치된 상부 위크를 사용하여 구성된다. 니트로셀룰로스 막은 에를리키아 항원을 포함하는 시험 라인 또는 영역 및 임의의 단백질 A- 또는 단백질 G-반응성 면역글로불린(예를 들면, 항-단백질 A IgG)도 포함하는 조절 라인 또는 영역으로 스트라이프된다. 에를리키아[예를 들면, 이. 카니스(*E. canis*), 이. 차펜시스(*E. chaffeensis*), 이. 에윙기(*E. ewingii*)]에 대한 항체들을 함유하는 것으로 추측된 샘플은 단백질 A 및/또는 G(단백질 A/G-CGC)의 콜로이드성 금 접합체들, 또는 (ii) 단백질 A/G-CGC와, 에를리키아 항원(보렐리아 항원-CGC)의 콜로이드성 금 접합체들의 혼합물 중 어느 것과 혼합될 수 있다. 당해 샘플 접합체 혼합물은 이후에 측방 유동 검정 장치에 적용될 수 있다.

[0105] 대안으로는, 측방 유동 장치는 상기와 같이 구성되지만, 니트로셀룰로스 패드가 하나 이상의 접합 영역들로 스트라이프되어 있는 경우, 시험 영역으로부터 분리된다. 접합 영역들은 예를 들면, (i) 단백질 A/G-CGC 단독, (ii) 에를리키아 항원-CGC 단독, 또는 (iii) 단백질 A/G-CGC와 에를리키아 항원-CGC의 조합물을 포함할 수 있다. 소정 실시형태에서, 예를 들면, (i) 또는 (iii)에서, 시험 샘플은 임의의 예비-혼합없이 측방 유동 장치에 자체로 적용된다. 다른 실시형태에서, 예를 들면 (i)에서, 샘플은 에를리키아 항원-CGC와 예비 혼합된 후 측방 유동 장치에 적용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들면 (ii)에서, 샘플은 단백질 A/G-CGC와 예비-혼합된 후 측방 유동 장치에 적용될 수 있다. 그러나, 이들 예시적인 조합들은 비-제한적이며, 다른 가능성들도 당해 분야의 숙련가들에게 명백할 것이다.

- [0106] 단백질 A/G-CGC, 샘플 중의 항체, 및 임의의 에를리키아 항원-CGC를 포함하는 포획 복합체들은 샘플/혈액 분리 패드을 통한 수송 및 임의의 접합 라인(들) 및 시험 라인(들)을 통한 아주 동일 형성된다. 당해 환경들(예를 들면, 에를리키아 항원-CGC의 임의의 사용)에 따라, 고정화되고 표지되지 않은 에를리키아 항원, 항체, 및 표지된 단백질 A/G-CGC의 복합체 또는 샌드위치가 형성된다. 에를리키아 항원-CGC의 존재 하에, 비표지 에를리키아 항원, 항체, 표지된 에를리키아 항원-CGC, 및 표지된 단백질 A/G-CGC의 복합체 또는 샌드위치가 형성된다. 후자의 복합체에 단백질 A/G-CGC를 첨가하는 것은 표지된 에를리키아 항원-CGC로부터의 신호를 추가로 증폭시킨다. 소정 실시형태에서, 증가된 증폭은 본원에 기술되고 당해 분야에 공지된 모든 반응물들의 비들을 조절하여 달성할 수 있다.
- [0107] ELISA에 적합한 미세역가 플레이트의 한 실시형태에서, 포획 개체는 스트렙트아비딘 또는, 아비딘 또는 뉴트라비딘과 같은 동등한 비오틴-결합 화합물로 피복된, 96-웰 ELISA 플레이트 또는 동등한 고체 페이즈와 같은 표면 상에 알칼리성 피복 완충액 중의 최적 농도로 고정화되고 4°C에서 밤새 항온배양된다. 표준 세척 완충액들을 사용한 적합한 수의 세척 후, 포획 개체로서 사용된 Fc-결합 분자의 비오티닐화된 형태들 및 임의로 동일한 항원의 최적 농도를 통상의 차단 완충액 중에 용해시키고, 각각의 웰에 적용한다. 이후에, 샘플을 가하고, 검정을 본원에 기술된 바와 같이 및 당해 분야에 공지된 바와 같이 진행한다.
- [0108] 또 다른 양상에서, 본 발명은 샘플 중의 항체의 검출과 관련된 조성물들을 제공한다. 소정 실시형태는 포획 개체, 시험 샘플 중의 항체, 및 제1 검출기를 포함하는 하나 이상의 포획 복합체들에 관한 것이며, 여기서, 포획 개체는 상기 항체에 결합하며, 여기서, 상기 제1 검출기는 제1 검출가능한 개체에 접합된 Fc-결합 분자를 포함하고, 상기 제1 검출기는 항체의 Fc 영역에 결합한다. 소정 실시형태는 제2 검출기를 추가로 포함하며, 여기서, 제2 검출기는 항체의 가변 영역에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 포획 복합체는 고체 또는 반-고체 지지체와 같은, 표면의 시험 영역 상에 고정화된다. 예를 들면, 소정 실시형태에서, 고체 지지체는 비드(예를 들면, 콜로이드성 입자 또는 나노입자), 측방 유동 검정 장치 내의 유동 경로(flow path), 분석 회전자, 투브 또는 웰(예를 들면, 플레이트 내) 내의 유동 경로이다. 임의의 제2 검출기 접합체 및 임의의 시험 표면을 포함하는, 이들 및 관련 실시형태의 설명에 대해서는 도 1을 참조한다.
- [0109] 특정 실시형태에서, 복합체는 목적하는 항체(예를 들면, 항-미생물 항체, 예를 들면, 항-바이러스, 항-세균, 항-진균, 또는 항-기생충 항체), 단백질 A- 및/또는 단백질 G-접합체, 고정화된, 항체-특이적 항원, 및 임의로 항원-접합체를 포함한다. 소정 실시형태에서, 단백질 A- 및/또는 단백질-G 접합체는 금 나노입자(예를 들면, 단백질 A-CGC 또는 단백질 G-CGC- "콜로이드성 금 접합체")를 포함하고, 항원-접합체는 금 나노입자(예를 들면, 항원-CGC)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원-접합체 또는 항원-CGC는 본원에 기술된 바와 같고 당해 분야에 공지된 바이러스, 세균, 진균, 또는 기생충 항원과 같은 미생물 항원을 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 항원-접합체 또는 항원-CGC는 라임병-특이적인 항원, 예를 들면, 보렐리아 항원(상기 참조)을 포함한다. 다른 실시형태에서, 항원-접합체 또는 항원-CGC는 엘리히아증 병-특이적인 항원, 예를 들면, 에를리키아 항원을 포함한다.
- [0110] 키트
- [0111] 또 다른 양상에서, 본 발명은 키트들을 제공한다. 소정 실시형태에서, 당해 키트들은 본원에 기술된 바와 같은, 본 발명의 장치 또는 시스템을 포함한다. 소정 실시형태에서, 키트들은 본 발명의 2개, 3개, 4개 이상의 장치들 또는 시스템들을 포함한다.
- [0112] 특수 유형들의 검정들을 위한 시약들이 또한 본 발명의 키트들에서 제공될 수 있다. 따라서, 당해 키트들은 나노입자, 비드(예를 들면, 응집 검정 또는 측방 유동 검정에 적합함), 또는 플레이트(예를 들면, ELISA 검정에 적합한 플레이트)의 집단을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 키트들은 측방 유동 면역검정 장치, 분석 회전자, 또는 전기화학, 광학, 또는 광-전자 센서와 같은 장치를 포함한다. 나노입자의 집단, 비드, 플레이트, 및 장치들은 면역검정을 수행하는데 유용하다. 예를 들면, 이들은 샘플로부터의 항체, 항원성 웹타이드(표지되고/되거나 표지되지 않음), 및 Fc-결합 분자로부터의 항체를 포함하는 항체-웹타이드 복합체의 형성을 검출하는데 유용할 수 있다.
- [0113] 소정 실시형태에서, 항원(또는 상이한 항원들의 혼합물)은 금 나노입자와 같은 검출가능한 개체에 접합되며, 이러한 동일한 항원(또는 항원들의 혼합물)은 또한 플레이트, 니트로셀룰로스 시험 표면, 또는 다른 시험 표면 또는 장치에 부착되거나 고정화되고, Fc-결합 분자는 금 나노입자와 같은 검출가능한 개체에 접합된다. 구체적인 키트들에서, 항원성 웹타이드는 금 나노입자에 접합되며 BSA에 임의로 접합되고, 이러한 동일한 항원(금 입자의 부재 하에 그러나 BSA에 임의로 접합된다)은 니트로셀룰로스 표면의 정의된 시험 영역 또는 스트립 상에 고정화

되고, 단백질 A 및/또는 단백질 G는 금 나노입자에, 임의로 측방 유동 검정 장치를 함유하는 키트의 부분으로서 접합된다. 일부 실시형태에서, 단백질 A-및/또는 단백질 G-금 입자 접합체는 시험 영역과 중복되지 않는, 니트로셀룰로스 표면, 즉, 접합 영역의 별개의 영역 상에 고정화된다.

[0114] 또한, 당해 키트들은 특이적으로 결합된 항원들 또는 항체들, 및 다른 신호-생성 시약들, 예를 들면, 효소 기질들, 보조인자들 및 색원체들과 같은 다른 신호-생성 시약들을 검출하기 위한 다른 제제들, 표지된 접합체들 또는 각종 회석제들 및 완충제들을 포함할 수 있다. 키트의 다른 성분들은 당해 분야의 숙련가에 의해 용이하게 측정될 수 있다. 이러한 성분들은 피복 시약들, 단백질 A 및/또는 단백질 G와 같은 Fc-결합 분자에 대해 특이적인 폴리클로날 또는 모노클로날 포획 항체들, 또는 2개 이상의 항체들의 콕테일(cocktail), 표준물들로서 항원들 또는 항체들의 정제되거나 반-정제된 추출물들, 모노클로날 항체 검출기 항체들, 항-마우스, 항-개, 항-닭, 또는 항-사람 항체와 이에 부착된 지시체 분자, 비색 비교들을 위한 지시체 쳐트들(indicator charts), 일회용 장갑들, 오염제거 지시들, 적용기 스틱들 또는 용기들, 샘플 제조 컵 등을 포함할 수 있다. 한 실시형태에서, 키트는 웨بت아이드-항체 복합체가 형성되도록 하는 반응 매질을 구성하기에 적절한 완충제들 또는 다른 시약들을 포함한다.

[0115] 이러한 키트들은, 임상 실험실에 본원의 어딘가에 기술되고 당해 분야에 공지된 것으로서, 미생물 제제, 특히 병원성 미생물 제제들에 의한 감염을 진단하기 위한 편리하고, 효율적인 방법을 제공한다. 이러한 키트들은 또한 임상 실험실에 임의의 목적하는 항체의 존재와 관련된 다른 상태들을 진단하기에 편리하고 효율적인 방법을 또한 제공할 수 있다. 예를 들면, 특정의 자가-면역 질환들은 특정한 유형들의 항체들과 연합될 수 있다. 따라서, 질병-관련된 항체/항원 조합들이 공지되어 있는 정도까지, 본 발명은 이러한 질병들의 민감하고 정밀한 진단들을 제공할 수 있다. 특정의 키트들은 비. 부르그도르페리와 같은 보렐리아의 검출을 제공하므로, 라임병의 진단을 보조한다.

[0116] 소정 실시형태에서, 키트들은 지시를 추가로 포함한다. 예를 들면, 소정 실시형태에서, 키트들은, 당해 키트가 미생물 항원(예를 들면, 보렐리아 항원, 애를리키아 항원)에 대한 항체와 같은 항체를 검출하거나, 미생물-관련된 질병(예를 들면, 라임병, 애를리히증)과 같은 질병을 진단하기 위한 키트의 사용 방법을 나타내는 지시를 포함한다. 소정 실시형태에서, 키트들은 보렐리아 항원 또는 애를리키아와 같은 미생물 항원에 대한 항체를 검출하기 위한 비드들의 집단, 플레이트 또는 장치(예: 측방 유동 장치)를 사용하거나, 또는 라임병(보렐리오시스) 또는 애를리히증과 같은 미생물-관련 질병을 진단하는 방법을 나타내는 지시를 포함한다. 소정 실시형태에서, 키트들은 검출가능한 Fc-결합 분자, 항체-특이적 검출가능한 항원-접합체 또는 항원성 웨بت아이드-접합체, 및 시험 샘플을 검출 시스템(예를 들면, 측방 유동 검정 장치, 미세역가 플레이트, 분석 회전자)의 샘플 로딩 영역에 적용하기 전에 임의의 순서로 조합하기 위한 지시들을 제공한다. 일부 실시형태에서, 키트들은 검출가능한 항원-접합체 또는 항원성 웨بت아이드-접합체와 시험 샘플을 조합함으로써 검출가능한 항원-접합체 또는 항원성 웨بت아이드-접합체가 검출가능한 Fc-결합 분자와 특정 비로 존재하도록 하여 목적하는 수준의 신호 증폭을 달성하기 위한 지시들을 포함한다. 키트들은 또한 완충액들을 최적화하고, 각종 성분들(예를 들면, Fc-결합 분자, 항원 또는 항원성 웨بت아이드, 시험 샘플)의 비들을 최적화하며, 혼합물 및 적용 단계들(예를 들면, 적용 전 모든 성분들의 혼합, 단지 특정 성분들의 혼합 및 다른 것들을 별도로 적용)의 순서를 최적화하기 위한 지시들을 제공할 수 있다.

[0117] 본 발명의 웨بت아이드를, 키트들 및 방법들을 포함하는 웨بت아이드들, 조성물들 및 장치들은 다수의 장점들을 제공한다. 예를 들면, 이들은 목적하는 항체들의 단순하고, 저렴하며, 신속하고, 민감하며 정밀한 검출, 및 유의한 잘못된 양성 또는 배경신호들없이 관련된 상태들의 진단을 허용한다. 이는 매우 낮은, 및 심지어 대안으로는 검출될 수 없는 수준들의 항체들을 함유하는 샘플들 조차 정밀하고 민감한 진단을 허용한다.

실시예

[0119] 실시예 1: 단백질 A는 라임병-특이적인 측방 유동 검정에서 항체의 특이적인 검출을 향상시킨다.

[0120] 시험들을 수행하여 단백질 A-CGC(콜로이드성 금 접합체)를 라임병-특이적인 측방 유동 검정에 첨가하는 것의 영향을 측정하면서, 음성 샘플, 라임-양성 샘플, 및 낮은 수준의 라임-양성 샘플을 시험하였다. 당해 목적은, 검정의 적당한 민감성을 유지하면서 잠재적인 거짓 신호(들)에 대한 단백질 A-CGC의 효과를 관찰하고 분류하기 위한 것이었다. 각종의 단백질 A-CGC 농도들을 단백질 A-CGC 음성 대조군과 관련하여 시험하였다. 당해 시험에서 수행한 측방 유동 검정은 도 2 및 도 3에 나열된 것과 유사하다. 결과들은 반응성 점수(0 내지 5의 범위, 여기서, 점수가 높을수록 양성 결과를 나타낸다)에 의해 나타낸 것으로서, 하기 표 1에 나타낸다.

표 1

시험 결과들(반응성 점수)의 요약

시험 조건:	저 양성 WB 1:8 희석 CB25 예비- 혼합	저 양성 WB 1:8 희석 CB25 예비-혼합	돌리 양성 (Dolly Pos) WB 1:8 희석 CB25 예비-혼합	돌리 양성 WB 1:8 희석 CB25 예비-혼합	음성_345 혈장 1:8 희석 CB25 예비-혼합	음성_345 혈장 1:8 희석 CB25 예비-혼합
대조군: 단백질 A 없음	0	0.25	1.5	1.5	0.25	0.25
1X 단백질 A	3.5	3.5	3.5	3.5	0.5	0.5
1:2 희석 단백질 A	3.5	3.5	3.75	3.75	0.25	0.25
1:4 희석 단백질 A	1.25	1.25	2.25	2.25	0.25	0.25
1:8 희석 단백질 A	0.5	0.75	2	2	0.25	0.25

[0122] 표 1에 나타낸 바와 같이, 단백질 A-CGC의 첨가는, 시험한 모든 라임-양성 샘플들의 신호를 증폭시켰고, 특히 '낮은' 양성 샘플들의 검출을 가능하게 하였다. 단백질 A-CGC의 부재 하에, 낮은 양성 샘플들은 검출 불가능하였으며, 음성 샘플들과 비교가능한 반응성 점수를 나타낸다(약 0.25 이하). 대조적으로, 1X 농도 및 1:2 희석에서 단백질 A-CGC의 첨가는 신호를 유의하게 증폭시켰으며, 이는 약 3.5의 반응성 점수를 나타낸다. 따라서, 단백질 A-CGC는 이러한 라임-병 특이적인 측방 유동 검정에서 표적 항체들의 검출을 유의하게 개선시킨다.

[0123] 실시예 2: 단백질 A는 스트레스 받은 생물학적 샘플에서 수행한 측방 유동 검정에서 항체의 특이적인 검출을 향상시킨다.

[0124] 시험들을 수행하여, 단백질 A-CGC(콜로이드성 금 접합체)를 앞서 스트레스 받은 48BSA(소 혈청 알부민)/DAG IgG 접합체 혼합물에 첨가하는 것의 영향을 측정하였다. 접합체 혼합물을 15일 동안 항온배양기 내에서 35°C로 예비-스트레스를 가하였다. 당해 시험은 단백질 A-CGC의 존재 또는 부재 하에 스트레스 받은 및 스트레스받지 않은 샘플들 둘 다를 시험하였다. 당해 시험에서 수행된 측방 유동 검정은 도 2 및 도 3에서 나열된 것과 유사하다. 결과들은 반응성 점수(0 내지 5의 범위, 여기서, 점수가 높을수록 양성 결과를 나타낸다)에 의해 나타난 것으로서, 하기 표 2에 나타낸다.

표 2

스트레스 받은 샘플 대 스트레스 받지 않은 샘플에 대한 시험 결과들의 요약

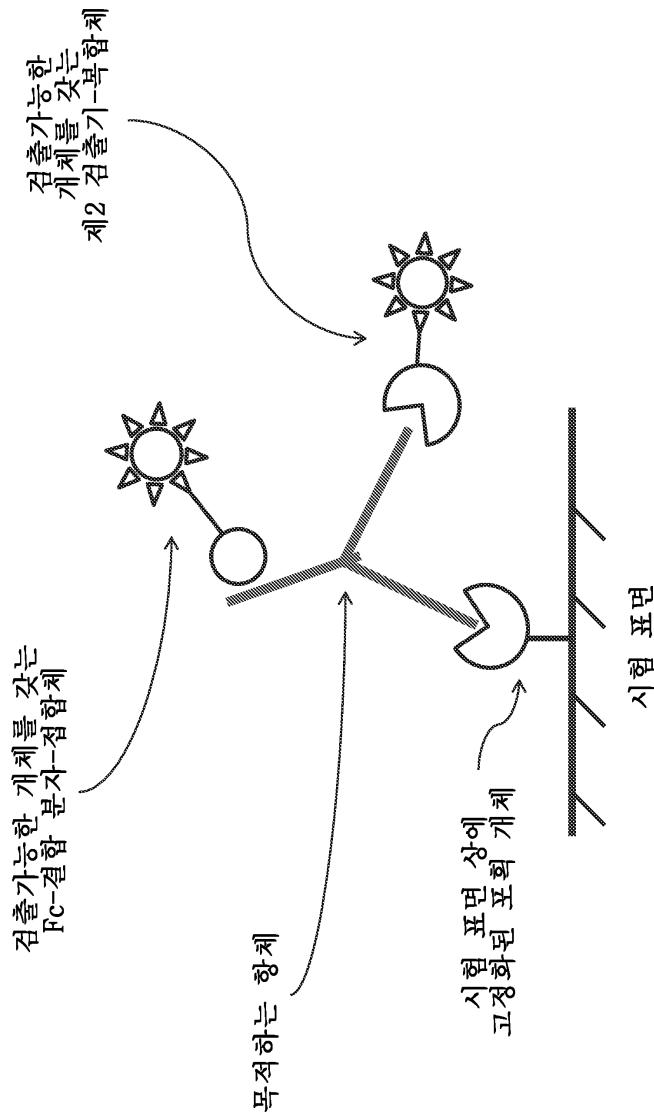
샘플	양성_11-0483	양성_11-0483	음성_SCA30-2235HI	음성_SCA30-2235HI
온도	2 내지 8°C	35°C	2 내지 8°C	35°C
1일째	2.25	2.0	0	0
15일째	2.5	0.75	0	0
15일째 + PA	2.75	1.25	0	0

[0126] 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 단백질 A-CGC를 측방 유동 검정 혼합물에 첨가하는 것은 0.75 내지 1.75의 증가된 반응성 점수에 의해 나타난 바와 같이, 단백질 A-CGC의 부재와 비교하여 15일째에 스트레스 받은(35°C) 생물학적 샘플의 신호를 증폭시켰다. 15일째의 스트레스 받지 않은 샘플(2 내지 8°C)은 또한 2.25 내지 2.75의 증가된 반응성 점수에 의해 나타나는 바와 같이 단백질 A-CGC의 첨가에 의해 약간 영향을 받았다. 또한, 음성 샘플들은 단백질 A-CGC의 첨가로 변경되지 않았다.

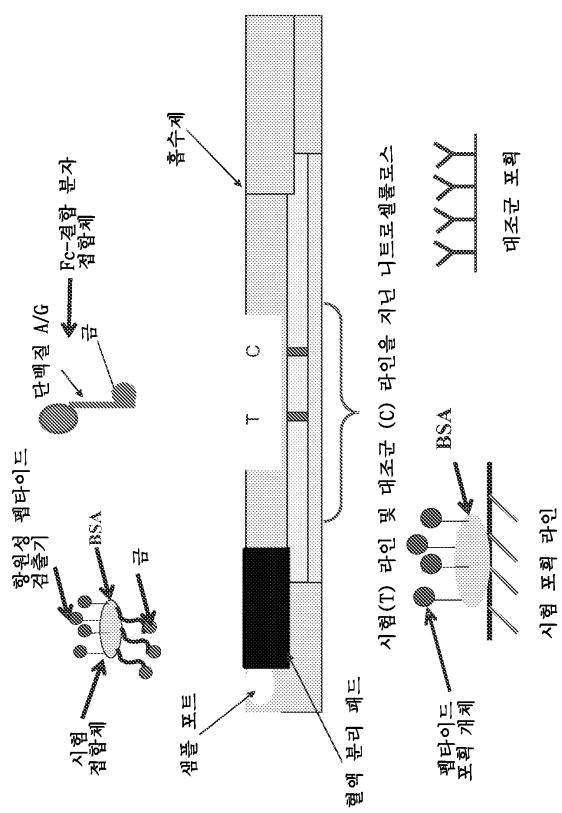
[0127] 인용에 의해 포함된 문헌들 내의 임의의 정의들이 본원에서 제공된 정의들과 일치하지 않는 경우에는, 본원에 제공된 정의들이 지배한다. 본 발명을, 현재 바람직한 실시형태들을 언급하여 기술했지만, 당해 분야의 숙련가에게 명백할 수 있는 바와 같은, 각종 변화들 및 변형들이 본 발명의 취지를 벗어나지 않고 이루어질 수 있음을 이해될 수 있다. 따라서, 본 발명은 다음의 특허청구범위에 의해서만 한정된다.

도면

도면1



도면2



도면3

