	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0042203 (43) 공개일자 2009년04월29일
<hr/>		
(51) Int. Cl. <i>G01N 21/76</i> (2006.01) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/00</i> (2006.01)	(71) 출원인 베크만 컬터, 인코포레이티드 미국, 캘리포니아 92834-3100, 플러튼, 우편사서함 3100, 엔. 하버볼트바드 4300	
(21) 출원번호 10-2008-7027327	(72) 발명자 아크하반-타프티, 하웁 미국 48843 미시간주 하웰 바인즈 로드 4545	
(22) 출원일자 2008년11월07일 심사청구일자 없음 번역문제출일자 2008년11월07일	(74) 대리인 김영, 양영준	
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/068327 국제출원일자 2007년05월07일		
(87) 국제공개번호 WO 2007/133988 국제공개일자 2007년11월22일		
(30) 우선권주장 11/799,895 2007년05월03일 미국(US) 60/798,839 2006년05월09일 미국(US)		

전체 청구항 수 : 총 39 항

#### (54) 비분리 검정 방법

#### (57) 요약

공지된 방법과 비교하여 단순화된, 특이적 결합 반응을 포함하는 검정 방법이 개시되어 있다. 화학발광을 생성할 수 있는 화합물은 샘플로부터 분석물질을 포획하기 위한 특이적 결합 쌍의 구성원으로서 고체 지지체 상에 고정화된다. 화학발광성 화합물을 활성화하고 특이적 결합 쌍 구성원에 접합되는 활성인자 화합물은 샘플과 함께 과량으로 고체 지지체에 첨가된다. 촉발인자 용액의 첨가는 활성인자 접합체가 특이적으로 결합된 부위에서 화학발광 반응을 야기한다. 상기 검정 방법은 검출 단계 전에 과량의 검출 표지 (활성인자 접합체)의 제거 또는 분리를 필요로 하지 않기 때문에 비분리 검정법이라고 한다. 상기 방법은 면역검정법, 수용체-리간드 검정법 및 핵산 혼성화 검정법을 비롯한 다양한 유형의 검정법에 이용가능하다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

a) 분석물질을 함유하거나 또는 함유하는 것으로 추측되는 샘플, 및

1) 화학발광성 화합물, 및

2) 분석물질에 대한 제1 특이적 결합 파트너

가 고정화된 고체 지지체를 제공하는 단계;

b) 분석물질이 상기 분석물질에 대한 고정화 특이적 결합 파트너에 결합하도록, 샘플 및 고체 지지체를 접촉시키는 단계;

c) 분석물질에 대한 제2 특이적 결합 파트너 또는 분석물질에 결합된 활성인자 화합물을 포함하는 과량의 활성인자 화합물 집합체를 제공하는 단계;

d) 활성인자 화합물 집합체가 특이적 결합 쌍 반응을 일으키도록 하여, 이에 의해 활성인자 화합물 집합체의 제1 부분을 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 하며, 여기서 활성인자 화합물 집합체의 제2 부분은 특이적 결합 쌍 반응을 일으키지 않고 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 되지 않으며, 고정화 화학발광성 화합물에 인접한 활성인자 화합물 집합체의 부분은 고정화 화학발광성 화합물의 부분을 활성화하는 것인 단계;

e) 화학발광성 화합물의 활성화된 부분으로부터 화학발광을 생성시키기 위해 촉발인자 용액을 제공하는 단계;

f) 생성된 화학발광을 검출하는 단계; 및

g) 생성된 화학발광을 샘플 중 분석물질의 존재, 위치 또는 양과 관련시키는 단계

를 포함하는, 검정법 절차에서 샘플 중 분석물질의 검출 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 되지 않은 활성인자 화합물 집합체의 제2 부분을, 화학발광을 생성하기 위한 촉발인자 용액의 첨가 전에 제거하지 않는 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 되지 않은 활성인자 화합물 집합체의 제2 부분을, 화학발광을 생성하기 위한 촉발인자 용액의 첨가 전에 제거하는 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 활성인자 화합물이 1종 이상의 전이 금속 염 및 착물, 퍼옥시다제 효소, 및 전이 금속-함유 효소에서 선택되고, 여기서 전이 금속이 1종 이상의 철, 구리, 코발트, 아연, 망간 및 크롬에서 선택된 것인 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 촉발인자 용액이 퍼옥시드 화합물을 포함하는 수용액인 방법.

### 청구항 6

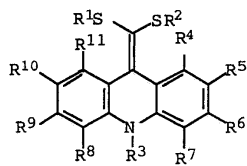
제1항에 있어서, 고체 지지체가 마이크로웰 플레이트, 시험 튜브, 샘플 컵, 플라스틱 구, 셀룰로스 시험 스트립, 종이 시험 스트립, 플라스틱 시험 스트립, 라텍스 입자, 중합체 입자, 실리카 입자 및 자성 입자에서 선택된 것인 방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서, 화학발광성 화합물이 활성인자 및 촉발인자 용액의 존재하에 화학발광을 생성하도록 산화될 수 있으며, 화학발광성 잔기, 및 화학발광성 잔기를 고체 지지체에 연결시키는 연결 잔기를 포함하며, 여기서 화학발광성 잔기가 루미놀, 이소루미놀, 아미노부틸에틸이소루미놀, 아미노헥실에틸이소루미놀, 7-디메틸아미노나프

탈렌-1,2-디카르복실산 히드라이드, 안트라센-2,3-디카르복실산 히드라이드, 페나트렌-1,2-디카르복실산 히드라이드, 피렌디카르복실산 히드라이드, 5-히드록시프탈히드라이드, 6-히드록시프탈히드라이드, 아크리단 에스테르, 아크리단 티오에스테르, 아크리단 술폰아미드 및 하기 화학식 I의 기에서 선택된 것인 방법.

<화학식 I>



여기서,  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 1 내지 50개의 비-수소 원자를 함유하는 유기기이고,  $R^4$  내지  $R^{11}$ 은 각각 수소 또는 비간섭 치환체이고, 여기서 기  $R^1$  내지  $R^{11}$  중 하나 이상은 연결 잔기를 포함한다.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 화학발광성 화합물이 고체 지지체에 공유결합으로 부착된 것인 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 화학발광성 화합물이 고체 지지체 상에 고정화된 보조 물질에 공유결합으로 부착된 것인 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 화학발광성 화합물이 고체 지지체 상에 고정화된 특이적 결합 쌍 구성원에 공유결합으로 부착된 것인 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 검정법이 면역검정법인 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 면역검정법이 샌드위치 면역검정법인 방법.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 검정법이 핵산 혼성화 검정법이고, 여기서 분석물질이 표적 핵산이고, 제1 특이적 결합 파트너가 표적의 제1 영역에 상보적인 핵산이고, 활성인자 화합물 접합체가 표적의 제2 영역에 상보적인 핵산에 접합된 활성인자 화합물인 방법.

#### 청구항 14

a) 분석물질을 함유하거나 또는 함유하는 것으로 추측되는 샘플, 및

1) 하기 화학식 I의 화학발광성 잔기, 및 화학발광성 잔기를 고체 지지체에 연결시키는 연결 잔기를 포함하는 화학발광성 화합물, 및

2) 분석물질에 대한 제1 특이적 결합 파트너

가 고정화된 고체 지지체를 제공하는 단계;

b) 분석물질이 상기 분석물질에 대한 고정화 특이적 결합 파트너에 결합하도록, 샘플 및 고체 지지체를 접촉시키는 단계;

c) 분석물질에 대한 제2 특이적 결합 파트너 또는 분석물질에 접합된 퍼옥시다제 효소인 활성인자 화합물을 포함하는 과량의 활성인자 화합물 접합체를 제공하는 단계;

d) 활성인자 화합물 접합체가 특이적 결합 쌍 반응을 일으키도록 하여, 이에 의해 활성인자 화합물 접합체의 제 1 부분을 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 하며, 여기서 활성인자 화합물 접합체의 제2 부분은 특이적 결합 쌍 반응을 일으키지 않고 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 되지 않으며, 고정화 화학발광성 화합물에

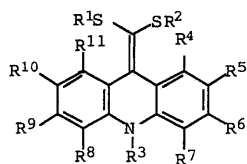
인접한 활성인자 화합물 접합체의 부분은 고정화 화학발광성 화합물의 부분을 활성화하는 것인 단계;

e) 활성인자 화합물 접합체의 제2 부분을 제거하지 않고, 화학발광성 화합물의 활성화된 부분으로부터 화학발광을 생성시키기 위해 퍼옥시드 화합물을 포함하는 수용액인 촉발인자 용액을 제공하는 단계;

f) 생성된 화학발광을 검출하는 단계; 및

g) 생성된 화학발광을 샘플 중 분석물질의 존재, 위치 또는 양과 관련시키는 단계를 포함하는, 검정법 절차에서 샘플 중 분석물질의 검출 방법.

<화학식 I>



여기서,  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 1 내지 50개의 비-수소 원자를 함유하는 유기기이고,  $R^4$  내지  $R^{11}$ 은 각각 수소 또는 비간섭 치환체이고, 여기서 기  $R^1$  내지  $R^{11}$  중 하나 이상은 연결 잔기를 포함한다.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 되지 않은 활성인자 화합물 접합체의 제2 부분을, 화학발광을 생성하기 위한 촉발인자 용액의 첨가 전에 제거하지 않는 방법.

#### 청구항 16

제14항에 있어서, 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 되지 않은 활성인자 화합물 접합체의 제2 부분을, 화학발광을 생성하기 위한 촉발인자 용액의 첨가 전에 제거하는 방법.

#### 청구항 17

제14항에 있어서, 활성인자 화합물이 1종 이상의 전이 금속 염 및 착물, 퍼옥시다제 효소, 및 전이 금속-함유 효소에서 선택되고, 여기서 전이 금속이 1종 이상의 철, 구리, 코발트, 아연, 망간 및 크롬에서 선택된 것인 방법.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 촉발인자 용액이 퍼옥시드 화합물을 포함하는 수용액인 방법.

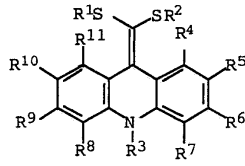
#### 청구항 19

제14항에 있어서, 고체 지지체가 마이크로웰 플레이트, 시험 튜브, 샘플 컵, 플라스틱 구, 셀룰로스 시험 스트립, 종이 시험 스트립, 플라스틱 시험 스트립, 라텍스 입자, 중합체 입자, 실리카 입자 및 자성 입자에서 선택된 것인 방법.

#### 청구항 20

제14항에 있어서, 화학발광성 화합물이 활성인자 및 촉발인자 용액의 존재하에 화학발광을 생성하도록 산화될 수 있으며, 화학발광성 잔기, 및 화학발광성 잔기를 고체 지지체에 연결시키는 연결 잔기를 포함하며, 여기서 화학발광성 잔기가 루미놀, 이소루미놀, 아미노부틸에틸이소루미놀, 아미노헥실에틸이소루미놀, 7-디메틸아미노 나프탈렌-1,2-디카르복실산 히드라이드, 안트라센-2,3-디카르복실산 히드라이드, 페나트렌-1,2-디카르복실산 히드라이드, 피렌디카르복실산 히드라이드, 5-히드록시프탈히드라이드, 6-히드록시프탈히드라이드, 아크리단 에스테르, 아크리단 티오에스테르, 아크리단 술폰아미드 및 하기 화학식 I의 기에서 선택된 것인 방법.

<화학식 I>



여기서,  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 1 내지 50개의 비-수소 원자를 함유하는 유기기이고,  $R^4$  내지  $R^{11}$ 은 각각 수소 또는 비간섭 치환체이고, 여기서 기  $R^1$  내지  $R^{11}$  중 하나 이상은 연결 잔기를 포함한다.

**청구항 21**

제14항에 있어서, 화학발광성 화합물이 고체 지지체에 공유결합으로 부착된 것인 방법.

**청구항 22**

제14항에 있어서, 화학발광성 화합물이 고체 지지체 상에 고정화된 보조 물질에 공유결합으로 부착된 것인 방법.

**청구항 23**

제14항에 있어서, 화학발광성 화합물이 고체 지지체 상에 고정화된 특이적 결합 쌍 구성원에 공유결합으로 부착된 것인 방법.

**청구항 24**

제14항에 있어서, 검정법이 면역검정법인 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 면역검정법이 샌드위치 면역검정법인 방법.

**청구항 26**

제14항에 있어서, 검정법이 핵산 혼성화 검정법이고, 여기서 분석물질이 표적 핵산이고, 제1 특이적 결합 파트너가 표적의 제1 영역에 상보적인 핵산이고, 활성인자 화합물 집합체가 표적의 제2 영역에 상보적인 핵산에 결합된 활성인자 화합물인 방법.

**청구항 27**

a) 분석물질을 함유하거나 또는 함유하는 것으로 추측되는 샘플, 및

1) 화학발광성 화합물, 및

2) 분석물질에 대한 제1 특이적 결합 파트너

가 고정화된 화학발광 표지된 고체 지지체를 제공하며, 여기서 화학발광 표지된 고체 지지체는 고체 지지체를 하기 화학식 II의 화합물과 반응시킴으로써 제조되는 것인 단계;

b) 분석물질이 상기 분석물질에 대한 고정화 특이적 결합 파트너에 결합하도록, 샘플 및 화학발광 표지된 고체 지지체를 접촉시키는 단계;

c) 분석물질에 대한 제2 특이적 결합 파트너 또는 분석물질에 결합된 퍼옥시다제를 포함하는 과량의 활성인자 화합물 집합체를 제공하는 단계;

d) 활성인자 화합물 집합체가 특이적 결합 쌍 반응을 일으키도록 하여, 이에 의해 활성인자 화합물 집합체의 제1 부분을 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 하며, 여기서 활성인자 화합물 집합체의 제2 부분은 특이적 결합 쌍 반응을 일으키지 않고 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 되지 않으며, 고정화 화학발광성 화합물에 인접한 활성인자 화합물 집합체의 부분은 고정화 화학발광성 화합물의 부분을 활성화하는 것인 단계;

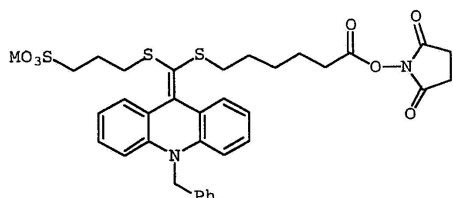
e) 활성인자 화합물 집합체의 제2 부분을 제거하지 않고, 화학발광성 화합물의 활성화된 부분으로부터 화학발광

을 생성시키기 위해 퍼옥시드 화합물을 포함하는 수용액인 촉발인자 용액을 제공하는 단계;

f) 생성된 화학발광을 검출하는 단계; 및

g) 생성된 화학발광을 샘플 중 분석물질의 존재, 위치 또는 양과 관련시키는 단계를 포함하는, 검정법 절차에서 샘플 중 분석물질의 검출 방법.

<화학식 II>



여기서, M은 알칼리 금속 이온이다.

#### 청구항 28

제27항에 있어서, 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 되지 않은 활성인자 화합물 접합체의 제2 부분을, 화학발광을 생성하기 위한 촉발인자 용액의 첨가 전에 제거하지 않는 방법.

#### 청구항 29

제27항에 있어서, 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 되지 않은 활성인자 화합물 접합체의 제2 부분을, 화학발광을 생성하기 위한 촉발인자 용액의 첨가 전에 제거하는 방법.

#### 청구항 30

제27항에 있어서, 활성인자 화합물이 1종 이상의 전이 금속 염 및 착물, 퍼옥시다제 효소, 및 전이 금속-함유 효소에서 선택되고, 여기서 전이 금속이 1종 이상의 철, 구리, 코발트, 아연, 망간 및 크롬에서 선택된 것인 방법.

#### 청구항 31

제30항에 있어서, 촉발인자 용액이 퍼옥시드 화합물을 포함하는 수용액인 방법.

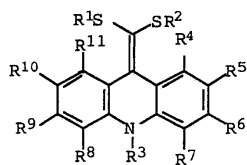
#### 청구항 32

제27항에 있어서, 고체 지지체가 마이크로웰 플레이트, 시험 튜브, 샘플 컵, 플라스틱 구, 셀룰로스 시험 스트립, 종이 시험 스트립, 플라스틱 시험 스트립, 라텍스 입자, 중합체 입자, 실리카 입자 및 자성 입자에서 선택된 것인 방법.

#### 청구항 33

제27항에 있어서, 화학발광성 화합물이 활성인자 및 촉발인자 용액의 존재하에 화학발광을 생성하도록 산화될 수 있으며, 화학발광성 잔기, 및 화학발광성 잔기를 고체 지지체에 연결시키는 연결 잔기를 포함하며, 여기서 화학발광성 잔기가 루미놀, 이소루미놀, 아미노부틸에틸이소루미놀, 아미노헥실에틸이소루미놀, 7-디메틸아미노 나프탈렌-1,2-디카르복실산 히드라이드, 안트라센-2,3-디카르복실산 히드라이드, 페나트렌-1,2-디카르복실산 히드라이드, 피렌디카르복실산 히드라이드, 5-히드록시프탈히드라이드, 6-히드록시프탈히드라이드, 아크리단 에스테르, 아크리단 티오에스테르, 아크리단 술폰아미드 및 하기 화학식 I의 기에서 선택된 것인 방법.

<화학식 I>



여기서,  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 1 내지 50개의 비-수소 원자를 함유하는 유기기이고,  $R^4$  내지  $R^{11}$ 은 각각 수소 또는 비간섭 치환체이고, 여기서 기  $R^1$  내지  $R^{11}$  중 하나 이상은 연결 잔기를 포함한다.

#### 청구항 34

제27항에 있어서, 화학발광성 화합물이 고체 지지체에 공유결합으로 부착된 것인 방법.

#### 청구항 35

제27항에 있어서, 화학발광성 화합물이 고체 지지체 상에 고정화된 보조 물질에 공유결합으로 부착된 것인 방법.

#### 청구항 36

제27항에 있어서, 화학발광성 화합물이 고체 지지체 상에 고정화된 특이적 결합 쌍 구성원에 공유결합으로 부착된 것인 방법.

#### 청구항 37

제27항에 있어서, 검정법이 면역검정법인 방법.

#### 청구항 38

제37항에 있어서, 면역검정법이 샌드위치 면역검정법인 방법.

#### 청구항 39

제27항에 있어서, 검정법이 핵산 혼성화 검정법이고, 여기서 분석물질이 표적 핵산이고, 제1 특이적 결합 파트너가 표적의 제1 영역에 상보적인 핵산이고, 활성인자 화합물 집합체가 표적의 제2 영역에 상보적인 핵산에 결합된 활성인자 화합물인 방법.

### 명세서

<1> <관련 출원에 대한 교차 참조>

<2> 본 출원은 2006년 5월 9일자로 출원된, 출원인의 공동계류중 가출원 제60/798,839호를 우선권으로 청구한다.

### 기술분야

<3> 본 발명은 공지된 방법과 비교하여 단순화된, 특이적 결합 반응을 포함하는 신규 검정 방법에 관한 것이다. 상기 검정 방법은 검출 단계 전에 과량의 검출 표지의 제거 또는 분리를 필요로 하지 않기 때문에 비분리 검정법이라고 한다. 상기 방법은 면역검정법, 수용체-리간드 검정법 및 핵산 혼성화 검정법을 비롯한 다양한 유형의 검정법에 이용가능하다.

### 배경기술

<4> 검정법 개발 분야, 특히 검정법의 설계를 단순화하나 감수성, 동적 범위, 강건함, 광범위한 응용성, 및 자동화에 대한 적합성의 필수적인 이점을 보존하는 면역검정법 개발에 많은 노력을 들여왔다. 한 접근법은 첨가된 검출가능하게 표지된 특이적 결합 파트너의 분리가 사용되지 않는 소위 균일한 검정법 형식을 설계하는 것이었다. 이 유형의 방법은 결합 반응의 결과로서 커지거나 또는 꺼지는 검출 원리의 설계에 의존한다. 대조적으로, 불균일한 검정법 형식은 정량 전에 결합된 및 유리 검출가능하게 표지된 특이적 결합 파트너의 물리적 분리에 의존한다.

<5> 수많은 미국 특허가 균일한 효소 면역검정법의 분야에서 허여되었다. 많은 특허는 표지 효소를 활성화하거나 또는 억제하는 항체-항원 결합 반응을 활용한다: 미국 특허 제3,817,837호; 제3,852,157호; 제3,875,011호; 제3,966,556호; 제3,905,871호; 제4,065,354호; 제4,043,872호; 제4,040,907호; 제4,039,385호; 제4,046,636호; 제4,067,774호; 제4,191,613호; 및 제4,171,244호, 제4,785,080호. 다른 균일한 면역검정법은 항체 또는 다른 형광 켄처(quencher)를 통해 형광을 켜는 다양한 방법을 포함한다: 미국 특허 제3,998,943호; 제3,996,345호; 제4,174,384호; 제4,161,515호; 제4,208,479호 및 제4,160,016호. 면역검정법의 분류된 유형의 이 분야의

또다른 미국 특허에는 미국 특허 제3,935,074호; 제4,130,462호 및 제4,193,983호가 포함된다. 미국 특허 제4,160,645호에는 표지로서 전자 이동 촉매를 사용하는 검정 방법이 개시되어 있다. 촉매 (표지)는 항체로의 결합에 의해 비활성화된다.

<6> 문헌 [Campbell et al., (Biochem. J., 216, 185-194 (1983))]에는 경쟁 검정법 형식에서 항원에 커플링된 화학발광 공여체 (Ag-L) 및 항체에 커플링된 형광 수광체 (Ab-F) 간의 에너지 이동을 사용하는 검출 방법이 개시되어 있다. 복합체를 형성한 항원은 궁극적으로 형광체의 파장으로 방출하는 반면, 유리 항원은 화학발광 표지의 특징적인 파장으로 방출한다. 후속적으로, 빛 강도는 2개의 파장에서 측정되며, 2개의 신호의 비율은 샘플 중 분석물질의 양과 관련된다.

<7> 다양한 다른 균일한 면역검정법은 루벤스타인(Rubenstein) 등의 미국 특허 제3,817,837호 (균일한 효소 면역검정법), 울만(Ullman)의 미국 특허 제3,996,345호 (형광 켄칭 균일한 면역검정법), 맥기오(Maggio)의 미국 특허 제4,233,402호 (효소 채널링 균일한 효소 면역검정법), 및 보구슬라스키(Boguslaski) 등의 캐나다 특허 제1,082,577호 (합텐-보조인자 균일한 효소 면역검정법)에 공지되어 있다.

<8> 울만(Ullman)의 미국 특허 제6,406,913호에는 분석물질이 감광제 및 화학발광성 화합물이 매우 인접하도록 유발하는 조건하에, 분석물질을 함유하는 것으로 추측되는 매질을 처리하는 것을 포함하는 검정 방법이 개시되어 있다. 감광제는 일중항 산소를 생성하며, 이는 용액을 통해 확산하고, 매우 인접하게 되는 경우 화학발광성 화합물을 활성화한다. 활성화된 화학발광성 화합물은 후속적으로 빛을 생성한다. 생성된 빛의 양은 매질 중 분석물질의 양과 관련된다. 한 실시양태에서, 감광제 및 화학발광성 화합물 중 하나 이상은 현탁성 입자와 회합되며, 특이적 결합 쌍 구성원이 이에 결합된다.

<9> 맥카프라(McCapra)의 미국 특허 제5,516,636호에는 표지로서 증감제를 사용하는 특이적 결합 검정법을 포함하는 검정 방법이 개시되어 있다. 증감제는 방사선조사, 전자 이동, 전기분해, 전기발광 또는 에너지 이동에 의해 자극되는 경우, 여기 상태를 성취하며, 이는 (a) 분자 산소와 상호작용시 일중항 산소를 생성하거나, 또는 (b) 백색염료와 상호작용시 산소에 의해 환원되어 과산화수소를 생성한다. 다른 시약의 첨가에 의한 여기된 증감제와의 상호작용은 검출가능한 신호를 생성한다.

<10> 균일한 또는 비분리 검정법 형식의 설계에 들인 상당한 노력에도 불구하고, 광범위한 상업적인 채용을 아직 경험하지 못하였다. 불균일한 검정법은 작동이 더 복잡함에도 불구하고 대량 생산 및 개발을 단순하게 하는 것으로서 간주된다. 특히, 큰 부피의 임상적 면역진단학의 분야 및 임상적 핵산 진단학의 더 적은 분야는 불균일한 검정법 형식에 의해 지배되고 있다. 이 분야 내에서, 시험 형식은 불필요한 단계의 제거에 의해 프로토콜을 단순하게 하고, 복잡성을 감소시키고, 자동화와의 상용성을 개선할 수 있는 분야에 이로울 것이다.

<11> <발명의 요약>

<12> 한 측면에서, 본 발명은 공지된 방법과 비교하여 단순화된, 특이적 결합 반응을 포함하는 신규 검정 방법, 특히 면역검정법을 제공한다. 검정법은 검출 단계전 분리 및 세척 단계의 제거에 의해 단순화되며, 그러므로 비분리 검정법이라고 간주된다. 상기 방법은 화학발광 반응의 유도를 위해 고정화 화학발광성 화합물 및 특이적 결합 파트너에 접합된 활성인자 화합물의 사용을 특징으로 한다. 화학발광 표지 화합물 및 활성인자 접합체의 분석물질-매개 공동-국소화는 후속적 화학발광 반응이 결합된 분석물질 분자의 부위에서만 일어나도록 야기한다. 비결합된 과량의 활성인자 접합체의 존재는 화학발광 반응에 기여하거나 또는 방해하지 않는다. 결과로서, 방출된 화학발광의 강도는 분석물질의 양에 비례한다.

## 발명의 상세한 설명

<20> 정의

<21> 알킬 - H 이외의 1종 이상의 치환체에 의해 치환될 수 있는, 1 내지 20개의 탄소를 함유하는, 분지쇄, 직쇄 또는 시클릭 탄화수소기. 본원에서 사용되는 저급 알킬은 8개 이하의 탄소를 함유하는 알킬기를 지칭한다.

<22> 분석물질 - 검정법에서 검출되는 샘플 중의 물질. 분석물질에 대해 특이적 결합 친화성을 갖는 1종 이상의 물질이 분석물질의 검출에 사용될 것이다. 분석물질은 단백질, 항체, 또는 결합하는 항체를 구성할 수 있는 합텐일 수 있다. 분석물질은 상보적 핵산에 의해 결합된 핵산일 수 있다. 분석물질은 특이적 결합 쌍의 구성원을 형성하는 임의의 다른 물질일 수 있다.

<23> 아르알킬 - 아릴기로 치환된 알킬기.



- <24> 아틸 - H 이외의 1종 이상의 치환체로 치환될 수 있는, 1 내지 5개의 카르보시클릭 방향족 고리를 함유하는 방향족 고리-함유 기.
- <25> 생물학적 물질 - 전혈, 항응고화된 전혈, 혈장, 혈청, 조직, 세포, 세포 내용물 및 바이러스를 포함한다.
- <26> 화학발광성 화합물 - 전기적 여기 상태로 형성된 다른 화합물로 전환되는 것을 유발하는 반응을 일으키는 화합물. 여기 상태는 일중항 또는 삼중항 여기 상태일 수 있다. 여기 상태는 바닥 상태로 완하시 빛을 직접 방출하거나, 또는 여기 에너지를 방출성 에너지 수령체로 이동시킬 수 있으며, 이에 의해 바닥 상태로 되돌아 간다. 에너지 수령체는 공정 중에 여기 상태로 상승되고, 빛을 방출한다.
- <27> 샘플 - 핵산을 함유하거나 또는 함유하는 것으로 추측되는 유체. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 전형적인 샘플에는 수집된 혈액 표본, 혈장, 혈청, 소변, 정액, 침, 세포 배양물, 조직 추출물 등에서 통상적으로 발견되는 체액, 예컨대 혈액 (항응고화된 혈액일 수 있음)이 포함된다. 다른 유형의 샘플에는 용매, 해수, 공업수 샘플, 음식 샘플 및 환경적인 샘플, 예컨대 토양 또는 물, 식물 물질, 진핵생물, 박테리아, 플라스미드 및 바이러스, 진균, 및 원핵생물로부터 기원된 세포가 포함된다.
- <28> 고체 상 물질 - 검정 구성성분이 고정화시 표면을 갖는 물질. 상기 물질은 입자, 마이크로입자, 나노입자, 섬유, 비드, 막, 필터 및 다른 지지체, 예컨대 시험 튜브 및 마이크로웰의 형태일 수 있다.
- <29> 특이적 결합 쌍, 특이적 결합 파트너 - DNA, RNA, 올리고뉴클레오타이드, 항체, 항체 단편, 항체-DNA 키메라, 항원, 합텐, 단백질, 렉틴, 아비딘, 스트렙타아비딘 및 비오틴을 비롯한, 다른 물질에 대해 특이적 결합 친화성을 갖는 생물학적 분자를 포함하는 분자. 특이적 결합 파트너는 활성인자 또는 화학발광성 화합물의 하나 이상의 분자에 접합될 수 있다.
- <30> 치환된 - 비-수소 기에 의한 기 상에 하나 이상의 수소 원자의 대체를 지칭한다. 치환된 기에 대해 언급시 달리 명확히 지시되지 않는 한 다수의 치환점이 존재할 수 있다는 것이 의도된다는 것을 주목해야 한다.
- <31> 본 발명은 특이적 결합 쌍 반응에 의해 물질을 검출하는, 급속하고 단순한 검정 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 고정화 화학발광성 화합물, 화학발광 반응을 유도하기 위한 특이적 결합 파트너에 접합된 활성인자 화합물, 및 촉발인자 용액의 사용을 필요로 한다. 상기 방법은 분석물질의 검출을 위한 하나 이상의 특이적 결합 쌍 반응을 포함한다. 표지된 특이적 결합 파트너의 분석물질로의 결합의 결과로서, 활성인자는 고정화 화학발광성 화합물에 인접하게 되어, 촉발인자 용액의 첨가시 화학발광을 생성하는 반응을 활성화하는데 효과적이다. 활성인자-표지된 특이적 결합 파트너는 모든 분석물질에 결합하는데 필요한 양보다 과량으로 시스템에 제공된다. 과량의 비결합된 활성인자 접합체는 촉발인자 용액의 첨가 및 검출 전에 제거되지 않으며, 이는 반응에 참여할 수 없기 때문이다.
- <32> 그러므로, 본 방법은 분석물질과 특이적으로 관련된 양보다 매우 과량으로 존재하는 비결합된 활성인자 접합체의 제거를 필요로 하지 않는다는 점에서 통상적인 시험 방법과 상이하다. 분석물질을 함유하는 샘플, 활성인자 접합체, 및 촉발인자 용액을 세척 또는 분리없이 순서대로 시험 용기에 첨가하고, 발광을 판독할 수 있다. 별 방법으로, 샘플 및 활성인자 접합체를 예비혼합하고, 촉발인자 용액의 도입전에 분석물질의 포획을 위한 특이적 결합 파트너를 함유하고 고정화 화학발광 표지를 함유하는 시험 용기에 첨가할 수 있다. 과량의 비결합된 활성인자 접합체의 세척 또는 분리는 필요하지 않다. 당분야에 공지된 통상적인 화학발광 검정법과 상이한 다른 점은 빛 생성에 참여하는 화학발광성 화합물 및 활성인자 (예를 들어, 퍼옥시다제) 중 어떠한 것도 용액에서 확산하는데 유리상태가 아니라는 사실에 있다. 둘 모두는 공간적으로 구속되어 있다. 이의 결과로서 부분적으로, 신호 생성은 단시간 지속되는 경향이 있다.
- <33> 화학발광성 기질 및 효소 표지된 접합체를 사용하는 통상적인 검정법은 표지 효소의 양보다 매우 과량으로 기질을 제공한다. 종종, 기질/효소의 몰 비율은  $10^9$  배, 즉 십억배 과량을 초과할 수 있다. 연속적인 효소 턴오버를 위한 기질의 적절한 공급을 확실하게 위해 화학발광성 화합물의 막대한 과량의 공급이 필수적이며, 이 공정은 검정 방법에서 적절한 검출 감수성을 보증하는 것으로 여겨진다. 본 출원인은 이 비율을 10의 수 자승배만큼 감소시키는 고감수성 검정 방법을 설계하는 것이 가능하다는 것을 밝혀내었다. 이와 관련하여, 상기 방법은 공지된 방법과 기본적으로 상이하다.
- <34> 상기 기재된 바와 같은 및 하기 기재된 예시적인 검정법에서 나타난 바와 같은, 세척 및 분리 단계의 제거는 검정 프로토콜의 설계를 단순하게 하는 기회를 제공한다. 감소된 수의 작동 단계는 검정 시간, 불완전한 세척으로부터의 검정간 다양성, 및 비용을 감소시킨다. 동시에, 이는 자동화 및 소형화에 부수적인 고유의 장점 모두

와 함께 검정 수행의 자동화 및 소형화 능력을 향상시킨다.

<35> 본 방법에 따라 수행되는 검정법은 4개의 단계를 포함한다. 제1 단계에서, 고체 상은 관심있는 분석물질을 특이적으로 포획하기 위한 시험 장치에 제공된다. 고체 상에는 검출되는 분석물질에 대한 고정화 특이적 결합 파트너가 제공된다. 고체 상에는 이에 고정화된 화학발광 표지 화합물이 추가로 제공된다. 화학발광 표지는 하기 보다 상세히 기재된 수많은 다른 방법으로 제공될 수 있다. 변형법 각각에서, 화학발광 표지는 이를 고정화시키는 방법으로 물질 또는 재료에 비가역적으로 부착된다. 제2 단계에서, 분석물질-함유 샘플 및 활성인자 접합체가 분석물질에 대한 고체 상 고정화 특이적 결합 파트너를 갖는 시험 장치에 도입되고, 특이적 결합 복합체를 형성하도록 수행된다. 샘플 및 활성인자 접합체는 순서대로 개별적으로, 또는 동시에 첨가될 수 있거나, 또는 조합물로서 예비혼합되어 첨가될 수 있다. 결합 반응이 유발되도록 하는 임의의 지연 시간이 이점에 삽입될 수 있다. 제3 단계에서, 촉발인자 용액이 분석물질의 검출을 위한 화학발광을 생성하기 위해 첨가된다. 마지막으로, 화학발광이 검출된다. 바람직하게는 피크 빛 강도 수준 또는 총 통합된 빛 강도가 측정된다. 빛의 양은 일반적으로 공지된 방법에 따라 교정 곡선을 구축함으로써 분석물질의 양과 관련될 수 있다. 빛 방출이 촉발인자 용액의 첨가후 급속하게 후속적으로 일어나는 경우, 적합한 주사기(injector)에 의한 첨가에 대한 측정의 개시를 기계적으로 시간을 조절하거나, 또는 검출기에 이미 노출된 시험 장치로 첨가를 수행하는 것이 바람직하다.

#### <36> 검정법 형식 및 고체 지지체

<37> 본 발명의 방법에서, 화학발광 표지 화합물은 시험 시스템의 구성성분에 고정화된다. 이는 임의의 여러 방법으로 성취될 수 있다. 한 실시양태에서, 화학발광 표지는 분석물질에 대한 고정화 특이적 결합 파트너에 공유결합으로 연결된다. 예는 마이크로플레이트의 웰 상에 고정화된 포획 항체일 것이다. 특이적 결합 파트너의 고정화는 공유결합 연결에 의해 또는 흡착 공정에 의해 수행될 수 있다. 도 1에 나타난 이 형식에서, 화학발광 표지는 "샌드위치" 형식으로 분석물질에 결합하는 2개의 특이적 결합 파트너에 의해 활성인자와 회합된다. 도 2에 나타난 다른 실시양태에서, 화학발광 표지는 무작위 방식으로 고체 지지체 상에 고정화된 보조 물질에 공유결합으로 연결된다. 보조 물질의 고정화는 공유결합 연결에 의해 또는 흡착 공정에 의해 수행될 수 있다. 표지는 이에 의해 고체 지지체의 표면에 대해 더 균일하게 또는 덜 균일하게 분포된다. 수단은 예를 들어 분석물질에 대한 비표지된 특이적 결합 파트너에 의해, 분석물질을 표면으로 유인하기 위해 제공된다. 화학발광 표지는 지지체의 표면 상에 수동적으로 코팅된 보조 물질에 부착된 화학발광 표지에 인접하게 활성인자를 가져오는, 특이적 결합 반응에 의해 활성인자와 회합하게 된다. 다른 실시양태에서, 화학발광 표지는 고체 지지체의 표면에 공유결합으로 연결된다. 도 3에 나타내는 바와 같이, 표지는 이에 의해 고체 지지체의 표면에 대해 더 균일하게 또는 덜 균일하게 분포된다. 수단은 예를 들어 분석물질에 대한 비표지된 특이적 결합 파트너에 의해, 분석물질을 표면으로 유인하기 위해 제공된다. 화학발광 표지는 지지체의 표면에 직접 부착된 화학발광 표지에 인접하게 활성인자를 가져오는, 특이적 결합 반응에 의해 활성인자와 회합하게 된다. 그 후, 세척 또는 분리없이, 촉발인자 용액을 첨가하고, 화학발광을 측정한다.

<38> 다른 실시양태는 활성인자-분석물질 접합체를 포함하는, 분석물질의 유사체가 사용되는 변형을 포함한다. 분석물질 유사체 및 분석물질은 분석물질에 대한 특이적 결합 파트너와 경쟁적으로 결합할 것이다. 이 유형의 검정 방법에서 샘플 중 분석물질의 양 및 화학발광의 강도 간의 음성 상관관계가 얻어질 것이 명백할 것이다 (도 7).

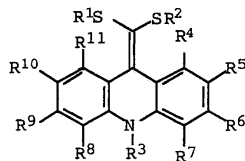
<39> 면역검정법을 통한 항원 또는 다른 단백질에 결합하는 항체 또는 다른 항체를 통한 화학발광 표지의 부착 이외에, 본 방법은 상보적 핵산의 결합을 통한 핵산의 검출을 위한 화학발광-표지 핵산을 사용할 수 있다. 이와 관련된 용도는 핵산의 크기와 관련하여 특히 제한되지 않으며, 그 기준은 상보적 파트너가 안정한 혼성화를 허용하기에 충분한 길이이다. 본원에서 사용되는 핵산에는 유전자 길이 핵산, 핵산의 더 짧은 단편, 폴리뉴클레오타이드 및 올리고뉴클레오타이드가 포함되며, 이중 임의의 것은 단일 또는 이중 가닥일 수 있다. 특이적 결합 파트너로서 핵산을 사용하는 본 발명의 실시에서, 핵산은 분석물질 핵산을 포획하기 위해 고체 지지체의 표면에 공유결합으로 부착되거나 또는 물리적으로 고정화된다. 화학발광 표지는 도 6에 개략적으로 나타난 바와 같이, 포획 핵산에 부착될 수 있거나, 또는 표지는 상기 설명된 바와 같이 직접 고체 상에 회합될 수 있다. 포획 핵산은 분석물질 핵산의 서열 영역에 대해 완전한 또는 실질적으로 완전한 서열 상보성을 가질 것이다. 실질적으로 상보적인 경우, 포획 핵산은 분석물질에 대해 상보적이지 아닌, 말단 오버행 부분, 말단 루프 부분 또는 내부 루프 부분을 보유할 수 있으며, 단 이는 분석물질과의 혼성화를 방해하거나 방지하지 않는다. 오버행 또는 루프가 분석물질 핵산내에 존재하는 경우 반대의 상황이 또한 야기될 수 있다. 포획 핵산, 분석물질 핵산, 및 활성인자 및 제3 핵산의 접합체는 혼성화될 수 있다. 제3 핵산은 포획 핵산에 대해 상보적인 영역과 상이한 분석물질 핵산의 서열 영역에 대해 실질적으로 상보적이다. 분석물질과의 포획 핵산 및 활성인자 접합체 핵산의 혼

성화는 연속하여 순서대로 또는 동시에 수행될 수 있다. 이 프로세스의 결과로서, 화학발광 표지는 지지체의 표면에 직접 부착된 화학발광 표지에 인접하게 활성인자를 가져오는 특이적 혼성화 반응에 의해 활성인자와 회합된다. 촉발인자 용액을 제공하고, 화학발광을 상기 기재된 바와 같이 검출한다.

- <40> 다른 실시양태는 활성인자와의 분석물질의 접합체를 사용하는 변형을 포함한다. 분석물질 핵산-활성인자 접합체 및 분석물질 핵산은 분석물질 핵산에 대한 특이적 결합 파트너와 경쟁적으로 결합할 것이다. 이 유형의 검정 방법에서 샘플 중 분석물질의 양, 및 화학발광의 강도 간의 음성 상관관계가 야기될 것이라는 것은 명백할 것이다.
- <41> 항체-기재 및 핵산-기재 시스템 이외에, 결합 검정법의 분야의 업자에게 일반적으로 공지된 바와 같은 다른 특이적 결합 쌍이 본 발명에 따른 시험 방법에 대한 기초로서 작용할 수 있다. 플루오레세인/항-플루오레세인, 디곡시게닌/항-디곡시게닌, 및 니트로페닐/항-니트로페닐 쌍이 예이다. 추가 예로서, 익히 공지된 (스트렙트)아비딘/비오틴 결합 쌍이 사용될 수 있다. 이 결합 쌍이 사용될 수 있는 한 방법을 예시하기 위해, 스트렙트아비딘-화학발광 표지 접합체가 고체 지지체 상에 공유결합으로 연결되거나 흡착될 수 있다. 그 후, 비오틴-표지된 분석물질 및 활성인자 접합체가 첨가되고, 여기서 접합체는 항-비오틴 항체 또는 항-분석물질 항체에 부착된다. 복합체가 형성된 후, 촉발인자 용액을 첨가하고, 검출을 상기와 같이 수행한다. 야기될 이들 및 다른 예는 당업자에게 본 발명의 방법의 범위내에 포함되는 것으로 간주된다.
- <42> 본 발명의 실시예에 유용한 고체 지지체는 다양한 물질, 형상 및 크기일 수 있다. 96-웰, 384-웰 또는 더 큰 수의 변형물의 마이크로웰 플레이트, 시험 튜브, 샘플 컵, 플라스틱 구, 셀룰로스, 종이 또는 플라스틱 시험 스트립, 라텍스 입자, 중합체 입자, 실리카 입자, 자성 입자, 특히 0.1 내지 10  $\mu\text{m}$ 의 평균 직경을 갖는 입자, 및 다양한 물질의 나노입자를 비롯한, 결합 검정에서 이미 사용되고 있는 물질은 모두 화학발광 표지의 부착 및 특이적 결합 파트너의 고정화에 유용한 고체 지지체를 제공할 수 있다. 본원은 본 검정 방법에서 사용하기 위한 상기 물질의 기능화 방법을 교시한다. 특히, 화학발광 표지 화합물 및 항체와 같은 특이적 결합 파트너를 동일한 표면, 특히 마이크로입자에 부착시키기 위한 방법이 개시되어 있다.
- <43> **화학발광 표지 화합물**
- <44> 본 발명의 실시에서 화학발광 표지로서 사용되는 화합물은 화학식 CL-L-RG (여기서, CL은 화학발광성 잔기를 나타내고, L은 화학발광성 잔기 및 반응성기를 연결시키는 연결 잔기를 나타내고, RG는 다른 물질로의 커플링을 위한 반응성기 잔기를 나타냄)를 갖는다. 화학발광성 잔기 CL이 포함된다. CL 기, 활성인자 및 촉발인자 용액의 화학발광 반응이 급속하고, 바람직하게는 매우 짧은 시간 주기에 걸쳐 일어나는 것이 필수적이지는 않으나 바람직하다.
- <45> 바람직한 화학발광성 화합물은 활성인자 및 촉발인자 용액의 존재하에 화학발광을 생성하기 위해 산화될 수 있다. 링커 및 반응성기의 도입에 의해 화학발광 표지로서 작용할 수 있는 예시적인 부류의 화합물에는 마수야(Masuya) 등의 미국 특허 제5,420,275호 및 야마구치(Yamaguchi)의 미국 특허 제5,324,835호에 개시된, 루미놀, 및 구조적으로 관련된 시클릭 히드라지드, 예를 들어 이소루미놀, 아미노부틸에틸이소루미놀 (ABEI), 아미노헥실에틸이소루미놀 (AHEI), 7-디메틸아미노나프탈렌-1,2-디카르복실산 히드라지드, 고리-치환된 아미노프탈히드라지드, 안트라센-2,3-디카르복실산 히드라지드, 페나트렌-1,2-디카르복실산 히드라지드, 피렌디카르복실산 히드라지드, 5-히드록시-프탈히드라지드, 6-히드록시프탈히드라지드, 뿐만 아니라 다른 프탈라진디온 유사체가 포함된다.
- <46> 다른 부류의 화학발광성 잔기에는 미국 특허 제5,491,072호, 제5,523,212호, 제5,593,845호 및 제6,030,803호에 개시된, 아크리단 에스테르, 티오에스테르 및 술폰아미드가 포함된다.
- <47> 다른 부류의 화학발광성 잔기에는 미국 특허 제5,922,558호, 제6,696,569호 및 제6,891,057호에 개시된 헤테로시클릭 화합물이 포함된다. 이들 화합물은 바람직하게는 헤테로시클릭 고리, 바람직하게는 질소, 산소 또는 황-함유 5원 또는 6원 고리 또는 다중 고리 기를 포함하고, 엑소시클릭 이중 결합으로 결합되고, 말단 탄소가 산소 및 황 원자에서 선택된 2개의 원자로 치환된, 헤테로시클릭 고리를 포함한다.
- <48> 과산화수소 및 퍼옥시다제의 작용에 의해 화학발광을 생성하는 것으로 공지된 임의의 화합물은 본 발명에서 사용되는 화학발광 표지 화합물의 화학발광성 잔기로서 기능할 것으로 고려된다. 크산텐 염료, 방향족 아민 및 헤테로시클릭 아민을 비롯한, 다양한 구조적 부류의 수많은 이러한 화합물이 이들 조건하에 화학발광을 생성하는 것으로 당분야에 공지되어 있다.
- <49> 본 발명의 방법에 유용한 화학발광 표지 화합물의 바람직한 군은 하기 화학식 I을 갖는 아크리단 화합물을 포함

한다.

## 화학식 I



<50>

<51>

여기서,  $R^1$  내지  $R^{11}$  중 하나 이상은 화학식 -L-RG (여기서, L은 결합, 또는 다른 이가 또는 다가 기일 수 있는 연결기이고, RG는 화학발광 표지 화합물이 다른 화합물에 결합할 수 있게 하는 반응성기임)의 표지 치환체이고,  $R^1$ ,  $R^2$  및  $R^3$ 은 1 내지 50개의 비-수소 원자를 함유하는 유기기이고,  $R^4$  내지  $R^{11}$ 은 각각 수소 또는 비간접 치환체이다. 표지 치환체 -L-RG는 바람직하게는  $R^1$  또는  $R^2$  중 하나 상에 존재하나,  $R^3$  또는  $R^4$  내지  $R^{11}$  중 하나 상에 치환체로서 존재할 수도 있다.

<52>

화학식 I의 화합물에서 기  $R^1$  및  $R^2$ 는 빛을 생성하는, C, N, O, S, P, Si 및 할로젠 원자에서 선택된 1 내지 약 50개의 비-수소 원자를 함유하는 임의의 유기기일 수 있다. 후자는 화학식 I의 화합물이 본 발명의 반응을 일으키는 경우, 여기 상태 생성물 화합물이 생성된다는 것을 의미하며, 하나 이상의 화학발광성 중간체의 생성을 포함할 수 있다. 여기 상태 생성물은 빛을 직접 방출할 수 있거나, 또는 빛이 형광 수명체로부터 방출되도록 야기하는 에너지 이동을 통해 여기 에너지를 형광 수명체로 이동시킬 수 있다.  $R^1$  및  $R^2$ 는 바람직하게는 1 내지 20개의 탄소 원자의 치환된 또는 비치환된 알킬, 치환된 또는 비치환된 알케닐, 치환된 또는 비치환된 알킬닐, 치환된 또는 비치환된 아릴, 치환된 또는 비치환된 아르알킬기에서 선택된다.  $R^1$  또는  $R^2$ 가 치환된 기인 경우, 카르보닐기, 카르복실기, 트리(C1-C8 알킬)실릴기, SO3- 기, OSO3-2 기, 글리코실기, PO3- 기, OPO3-2 기, 할로젠 원자, 히드록실기, 티올기, 아미노기, 4급 암모늄기, 4급 포스포늄기에서 선택된 1 내지 3개의 기 또는 원자로 치환된다. 바람직한 실시양태에서,  $R^1$  또는  $R^2$ 는 바람직하게는 화학식 -L-RG (여기서, L은 연결기이고, RG는 반응성기임)의 표지 치환체로 치환된다.

<53>

기  $R^3$ 은 기에서 원자의 원자수를 충족시키는데 필요한 필요수의 H 원자 이외에, C, N, O, S, P, Si 및 할로젠 원자에서 선택된 1 내지 50개의 비-수소 원자를 함유하는 유기기이다. 보다 바람직하게는,  $R^3$ 은 1 내지 20개의 비-수소 원자를 함유한다. 유기기는 바람직하게는 1 내지 20개의 탄소 원자의 알킬, 치환된 알킬, 치환된 또는 비치환된 알케닐, 치환된 또는 비치환된 알킬닐, 치환된 또는 비치환된 아릴, 치환된 또는 비치환된 아르알킬기로 구성된 군에서 선택된다.  $R^3$ 에 대한 보다 바람직한 기에는 치환된 또는 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬기, 페닐, 치환된 또는 비치환된 벤질기, 알콕시알킬, 카르복시알킬 및 알킬술폰산 기가 포함된다. 기  $R^3$ 은  $R^7$  또는  $R^8$ 에 연결되어 5 또는 6원 고리를 형성할 수 있다. 한 실시양태에서,  $R^3$ 은 화학식 -L-RG의 표지 치환체로 치환된다.

<54>

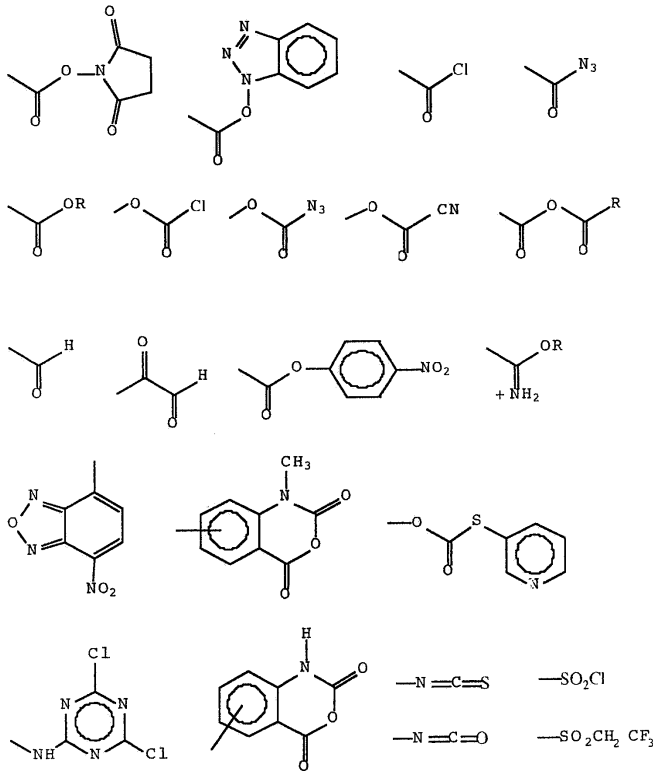
화학식 I의 화합물에서, 기  $R^4$  내지  $R^{11}$ 은 각각 독립적으로 H, 또는 여기 상태 생성물이 생성되도록 하는 치환체 기이며, 일반적으로 C, N, O, S, P, Si 및 할로젠 원자에서 선택된 1 내지 50개의 원자를 함유한다. 존재할 수 있는 대표적인 치환체 기에는 알킬, 치환된 알킬, 아릴, 치환된 아릴, 아르알킬, 알케닐, 알킬닐, 알콕시, 아릴옥시, 할로젠, 아미노, 치환된 아미노, 카르복실, 카르보알콕시, 카르복스아미드, 시아노 및 술포네이트 기가 포함되나 이에 제한되지 않는다. 인접 기의 쌍, 예를 들어  $R^4 - R^5$  또는  $R^5 - R^6$ 은 함께 연결되어, 2개의 기가 부착된 고리에 융합된 하나 이상의 5 또는 6원 고리를 포함하는, 카르보시클릭 또는 헤테로시클릭 고리 시스템을 형성할 수 있다. 이러한 융합된 헤테로시클릭 고리는 N, O 또는 S 원자를 함유할 수 있으며, 상기 기재된 바와 같은 H 이외의 고리 치환체를 함유할 수 있다. 기  $R^4$  내지  $R^{11}$  중 하나 이상은 화학식 -L-RG의 표지 치환체일 수 있다.  $R^4$  내지  $R^{11}$ 은 수소, 할로젠 및 알콕시기, 예컨대 메톡시, 에톡시, t-부톡시 등에서 선택되는 것이 바람직하다. 화합물의 바람직한 기는  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$  또는  $R^{10}$  중 하나는 할로젠이고,  $R^4$  내지  $R^{11}$  중 다른 하나는 수소 원자이다.



- <55> 치환체 기는 화합물의 특성을 변형하거나 또는 합성의 편리성을 제공하기 위해 다양한 양으로 및 아크리단 고리에서 선택된 고리 또는쇄 위치에서 혼입될 수 있다. 이러한 특성에는 예를 들어 화학발광성 양자 수율, 효소에 의한 반응 속도, 최대 빛 강도, 빛 방출의 지속시간, 빛 방출의 파장, 및 반응 매질 중 용해도가 포함된다. 특정 치환체 및 그의 효과는 하기 특정 실시예에 예시되어 있으나, 이는 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 고려되어서는 안된다. 합성의 편의를 위해, 화학식 I의 화합물은 바람직하게는  $R^4$  내지  $R^{11}$  각각이 수소 원자이다.
- <56> **연결기 (L).** 연결기는 결합, 원자, 이가 기 및 다가 기, 또는 몇몇은 고리 구조의 부분일 수 있는 원자의 직쇄 또는 분지쇄일 수 있다. 치환체는 통상적으로 1 내지 약 50개의 비-수소 원자, 보다 통상적으로 1 내지 약 30개의 비-수소 원자를 함유한다.쇄를 구성하는 원자는 C, O, N, S, P, Si, B 및 Se 원자, 바람직하게는 C, O, N, P 및 S 원자에서 선택된다. 할로젠 원자는쇄 또는 고리 상에 치환체로서 존재할 수 있다. 연결 치환체를 구성하는 전형적인 관능기에는 알킬렌, 아릴렌, 알케닐렌, 에테르, 피옥시드, 케톤으로서 카르보닐, 에스테르, 카르보네이트 에스테르, 티오에스테르, 또는 아마이드 기, 아민, 아마이드, 카르바메이트, 우레아, 이민, 이미드, 이미데이트, 카르보디이미드, 히드라진, 디아조, 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 포스포네이트 에스테르, 티오에테르, 디설피드, 설폭시드, 술폰, 설포네이트 에스테르, 설페이트 에스테르 및 티오우레아 기가 포함된다.
- <57> **반응성기.** 반응성기 RG는 그 존재가 공유결합 부착 또는 물리적 힘에 의해 다른 분자에 결합하는 것을 촉진하는 원자 또는 기이다. 몇몇 실시양태에서, 예를 들어 반응성기가 할로젠 원자 또는 토실레이트기와 같은 이탈기이고, 화학발광 표지 화합물이 친핵성 치환 반응에 의해 다른 화합물에 공유결합으로 부착된 경우, 본 발명의 화학발광 표지 화합물의 다른 화합물로의 부착은 반응성기로부터 하나 이상의 원자의 손실을 포함할 것이다. 다른 실시양태에서, 공유결합 결합 형성에 의한 화학발광 표지 화합물의 다른 화합물로의 부착은 첨가 반응, 예컨대 마이클(Michael) 첨가에서 또는 반응성기가 이소시아네이트 또는 이소티오시아네이트 기인 경우 일어나는 반응성기 내의 결합의 재조직화를 포함할 것이다. 또다른 실시양태에서, 부착은 공유결합 결합 형성을 포함하지 않으나, 반응성기가 비변형된 상태로 유지되는 경우 물리적 힘을 포함할 것이다. 물리적 힘은 인력, 예컨대 수소 결합, 정전기 또는 이온성 인력, 소수성 인력, 예컨대 염기 적재(stack), 및 특이적 친화성 상호작용, 예컨대 비오틴-스트렙타비딘, 항원-항체 및 뉴클레오티드-뉴클레오티드 상호작용을 의미한다.
- <58> [표 1]
- <59> 유기 및 생물학적 분자로의 표지의 화학적 결합을 위한 반응성기

<60>

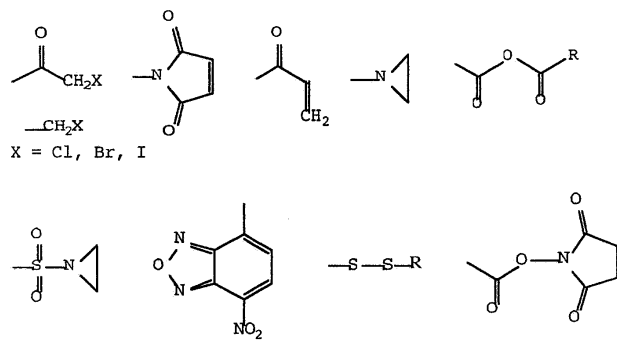
a.) 아민 반응성기.



<61>

<62>

b.) 티올 반응성기.



<63>

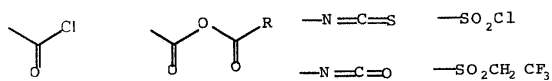
<64>

3) 카르복실산 반응성기.

<65>

<66>

4) 히드록실 반응성기.



<67>

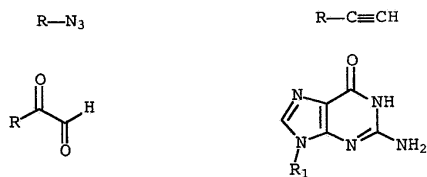
<68>

5) 알데히드/케톤 반응성기.

<69>

-NH<sub>2</sub>    -ONH<sub>2</sub>    -NHNH<sub>2</sub>

<70> 6) 다른 반응성기 쌍.



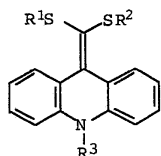
<71>

<72> 바람직한 반응성기에는 OH, NH<sub>2</sub>, ONH<sub>2</sub>, NHNH<sub>2</sub>, COOH, SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, N-히드록시숙신이미드 에스테르, N-히드록시숙신이미드 에테르 및 말레이미드 기가 포함된다.

<73> 이관능성 커플링제는 또한 유기 및 생물학적 분자에 대한 표지를 중간의 반응성기와 커플링시키는데 사용될 수 있다 (문헌 [L. J. Kricka, Ligand-Binder Assays, Marcel Dekker, Inc., New York, 1985, pp. 18-20, Table 2.2] 및 [T. H Ji, "Bifunctional Reagents," Methods in Enzymology, 91, 580-609 (1983)] 참조). 두가지 유형의 이관능성 시약이 있다: 최종 구조로 혼입되는 시약, 및 2종의 반응물을 커플링하는 데만 작용하는 시약.

<74> 화합물의 바람직한 군은 R<sup>4</sup> 내지 R<sup>11</sup>이 수소인 하기 화학식 II를 갖는다.

### 화학식 II

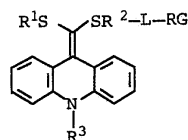


<75>

<76> 여기서, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup>은 상기 정의된 바와 같다.

<77> 화학식 I의 바람직한 표지 화합물은 기 R<sup>1</sup> 또는 R<sup>2</sup> 상에 치환체로서 기 -L-RG를 갖는다. 바람직한 표지 화합물은 하기 화학식 III을 갖는다.

### 화학식 III



<78>

<79> 대표적인 바람직한 표지 화합물, 및 다른 분자 및 고체 표면으로의 부착에서의 그의 용도는 하기 특정 실시예에 기재되어 있다.

### <80> 활성인자 접합체

<81> 활성인자 화합물은 활성인자-특이적 결합 파트너 접합체의 부분을 형성한다. 접합체는 이중 기능을 제공한다: 1) 특이적 결합 파트너 부분을 통해 직접적으로, 또는 중개자 특이적 결합 파트너를 통해 검정법에서 분석물질에 특이적으로 결합함, 및 2) 활성인자 부분을 통해 화학발광성 화합물을 활성화함. 접합체의 활성인자 부분은 촉발인자 용액의 존재하에 화학발광을 생성하기 위해 화학발광성 화합물의 활성화를 수행하는 화합물이다. 활성인자로서 작용할 수 있는 화합물에는 전이 금속 염 및 복합체 및 효소, 특히 전이 금속-함유 효소, 가장 특히 퍼옥시다제 효소가 포함된다. 활성인자 화합물에 유용한 전이 금속에는 주기율표의 3 내지 12족, 특히 철, 구리, 코발트, 아연, 망간 및 크롬이 포함된다. 신호 생성에 원인이 되는 활성인자 분자가 물리적으로 격리된 환경 내에서 작동하고, 한정된 공급의 화학발광성 화합물과 접촉할 수만 있다는 것에 주목해야 한다. 활성인자가 상기 잠재성을 보유하는 경우 큰 촉매 턴오버를 제외시키는 것으로 보인다.

<82> 화학발광 반응을 일으킬 수 있는 퍼옥시다제에는 락토퍼옥시다제, 마이크로퍼옥시다제, 마이엘로퍼옥시다제, 할로퍼옥시다제, 예를 들어 바나듐 브로모퍼옥시다제, 양고추냉이 퍼옥시다제, 진균 퍼옥시다제, 예컨대 리그닌 퍼옥시다제 및 아르트로마이세스 라모수스(*Arthromyces ramosus*)로부터의 퍼옥시다제 및 백색 부후균에서 생성

된 Mn-의존성 퍼옥시다제, 및 대두 퍼옥시다제가 포함된다. 기질의 화학발광성 산화를 촉매하는, 철 복합체, 예컨대 헵, 및 Mn-TPPS<sub>4</sub> (문헌 [Y.-X. Ci, et al., Mikrochem. J., 52, 257-62 (1995)])를 비롯한, 효소는 아니지만 퍼옥시다제-유사 활성을 보유하는 다른 퍼옥시다제 모방 화합물이 공지되어 있으며, 이는 본원에서 사용되는 퍼옥시다제의 의미의 범위내에 명백하게 포함되는 것으로 간주된다.

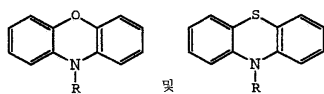
<83> 퍼옥시다제 및 생물학적 분자의 접합체 또는 복합체는 또한 접합체가 퍼옥시다제 활성을 나타내는 경우 화학발광 생성 방법에서 사용될 수 있다. 퍼옥시다제의 하나 이상의 분자에 접합될 수 있는 생물학적 분자에는 DNA, RNA, 올리고뉴클레오타이드, 항체, 항체 단편, 항체-DNA 키메라, 항원, 합텐, 단백질, 렉틴, 아비딘, 스트렙타아비딘 및 비오틴이 포함된다. 생물학적 분자로의 부착을 위해 기능화된, 리포솜, 미셀, 소포 및 중합체와 같은, 퍼옥시다제를 포함하거나 또는 혼입하는 복합체가 또한 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다.

#### <84> 촉발인자 용액

<85> 촉발인자 용액은 화학발광에 필요한 여기 상태 화합물의 생성에 필요한 반응물을 제공한다. 반응물은 화학발광 표지와 직접 반응함으로써 화학발광 반응을 수행하는데 필요한 것일 수 있다. 이는 활성인자 화합물의 작용을 촉진하는 상기 기능 대신에 또는 상기 기능 이외의 기능을 할 수 있다. 이는 예를 들어 활성인자가 퍼옥시다제 효소인 경우일 것이다. 바람직한 실시양태에서, 촉발인자 용액은 퍼옥시드 화합물을 포함한다. 퍼옥시드 구성 성분은 퍼옥시다제와 반응할 수 있는 임의의 퍼옥시드 또는 알킬 히드로퍼옥시드이다. 바람직한 퍼옥시드에는 과산화수소, 우레아 퍼옥시드 및 퍼보레이트 염이 포함된다. 대표적인 실시양태는 활성인자로서 퍼옥시다제 접합체, 분석물질의 아크리단 표지 (여기서, 아크리단 표지는 상기 화학식 III의 화합물과 특이적 결합 파트너를 반응시킴으로써 제공됨), 및 과산화수소를 포함하는 촉발인자 용액을 사용한다. 퍼옥시드는 효소의 활성 부위에서 철의 산화 상태를 상이한 산화 상태로 추측가능하게 변화시키는 퍼옥시다제와 반응한다. 효소의 이 변경된 상태는 효소에 인접하게 유지되는 아크리단 표지와 반응한다. 화학발광 반응은 궁극의 반응 생성물 및 빛을 생성하는, 퍼옥시드와 화학발광성 화합물로부터 형성된 중간체의 추가 반응을 포함한다.

<86> 촉발인자 용액으로의 특정 증진제(enhancer) 화합물의 혼입은 효소의 반응성을 촉진시킨다. 이들 증진제 중에서 미국 특허 제5,171,668호 및 제5,206,149호에 기재된 바와 같은, 다른 퍼옥시다제 반응을 증진시키는 것으로 공지된 페놀성 화합물 및 방향족 아민이 포함된다 (상기 특허들은 본원에 참고로 도입됨). 본원에 참고로 도입된 미국 특허 제5,512,451호에 개시된 바와 같은, 치환된 및 비치환된 아릴보론산 화합물 및 그의 에스테르 및 무수물 유도체는 또한 본 발명에 유용한 증진제의 범위 내에 포함되는 것으로 간주된다. 바람직한 증진제에는 p-페닐페놀, p-요오도페놀, p-브로모페놀, p-히드록시신남산, p-이미다졸릴페놀, 아세트아미노펜, 2,4-디클로로페놀, 2-나프톨 및 6-브로모-2-나프톨이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 상기 언급된 부류 이외의 하나 이상의 증진제의 혼합물이 또한 사용될 수 있다.

<87> 본 발명의 화합물로부터의 화학발광의 생성의 증진에 효과적인 것으로 밝혀진 추가 증진제는 하기 화학식을 갖는 페녹사진 및 페노티아진의 유도체이다.



<88> 페녹사진 및 페노티아진 증진제의 질소 원자 상의 치환된 R 기에는 1 내지 8개의 탄소 원자의 알킬, 및 술포네이트 염 또는 카르복실레이트 염 기로 치환된 1 내지 8개의 탄소 원자의 알킬이 포함된다. 바람직한 증진제에는 3-(N-페노티아지닐)-프로판술포산 염, 3-(N-페녹사지닐)프로판술포산 염, 4-(N-페녹사지닐)부탄술포산 염, 5-(N-페녹사지닐)-펜탄산 염 및 N-메틸페녹사진 및 관련된 상동체가 포함된다.

<90> 본 발명의 검출 반응은 전형적으로 수성 완충제에 존재하는 촉발인자 용액으로 수행된다. 적합한 완충제에는 화학발광 반응이 진행할 수 있는 환경을 유지할 수 있는, 임의의 통상적으로 사용되는 완충제가 포함된다. 전형적으로, 촉발인자 용액은 약 5 내지 약 10.5의 범위의 pH를 가질 것이다. 예시적인 완충제로는 포스페이트, 보레이트, 아세테이트, 카르보네이트, 트리스(히드록시-메틸아미노)메탄 [트리스], 글리신, 트리신, 2-아미노-2-메틸-1-프로판올, 디에탄올아민 MOPS, HEPES, MES 등이 포함된다.

<91> 촉발인자 용액은 또한 빛-생성 반응의 발광 효율을 증진시키거나 또는 검정법의 신호/잡음 비율을 개선시키는, 하나 이상의 세제 또는 중합체성 계면활성제를 함유할 수 있다. 본 발명의 실시예에 유용한 비이온성 계면활성제에는 예를 들어 폴리옥시에틸렌화된 알킬페놀, 폴리옥시에틸렌화된 알콜, 폴리옥시에틸렌화된 에테르 및 폴리옥시에틸렌화된 소르비톨 에스테르가 포함된다. CTAB 및 4급 포스포늄 염 화합물과 같은 4급 암모늄 염 화합물을



비롯한 단량체성 양이온성 계면활성제가 사용될 수 있다. 4급 암모늄 및 포스포늄 염 기를 포함하는 계면활성제를 비롯한 중합체성 양이온성 계면활성제가 또한 이 목적을 위해 사용될 수 있다.

<92> 본 방법에 의해 방출된 빛은 임의의 적합한 공지된 수단, 예컨대 발광측정기, X선 필름, 고속 사진 필름, CCD 카메라, 섬광 계수기, 화학적 광량계에 의해 또는 시각적으로 검출될 수 있다. 검출 수단 각각은 상이한 스펙트럼 감수성을 갖는다. 인간 눈은 녹색 빛에 최적으로 감수성이고, CCD 카메라는 적색 빛에 대해 최대 감수성을 나타내며, UV 내지 청색 빛 또는 녹색 빛에 대한 최대 반응을 갖는 X선 필름이 이용가능하다. 검출 장치의 선택은 비용, 편의, 및 영구적 기록의 생성이 필요한가를 고려하여 실용성에 의해 좌우될 것이다. 빛 방출의 시간 과정이 급속한 실시양태에서, 검출 장치의 존재하에 화학발광을 생성하는 촉발인자 반응을 수행하는 것이 유리하다. 예로서, 검출 반응은 발광측정기에 존재하거나 또는 시험 튜브 또는 마이크로웰 플레이트를 수용하도록 개질된 하우징 내의 CCD 카메라의 앞에 위치된 시험 튜브 또는 마이크로웰 플레이트에서 수행될 수 있다.

<93> 용도

<94> 본 검정 방법은 많은 유형의 특이적 결합 쌍 검정법에서 응용성이 있다. 이들 중 화학발광성 효소결합 면역검정법, 예컨대 ELISA가 중요하다. 면역화학적 단계를 수행하기 위한 다양한 검정법 형식 및 프로토콜은 당분야에 익히 공지되어 있으며, 경쟁 검정법 및 샌드위치 검정법 둘 모두가 포함된다. 본 발명에 따른 면역검정법에 의해 검정될 수 있는 물질의 유형에는 단백질, 항체, 합텐, 약물, 스테로이드, 및 면역검정법의 분야에 일반적으로 공지된 다른 물질이 포함된다.

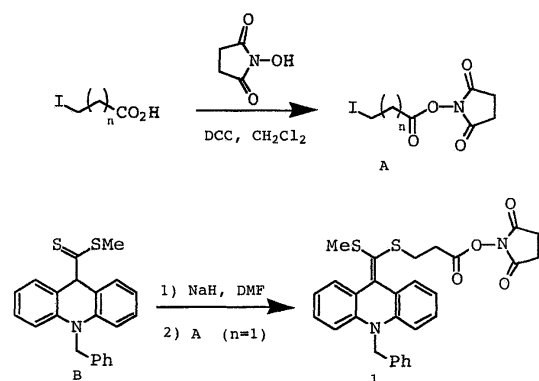
<95> 본 발명의 방법은 또한 효소-표지된 핵산 프로브의 사용에 의한 핵산의 검출에 유용하다. 예시적인 방법에는 용액 혼성화 검정법, 써던 블러팅에 의한 DNA 검출, 노던 블러팅에 의한 RNA 검출, DNA 서열분석, DNA 지문술, 콜로니 혼성화법 및 플라크 리프트, 당업자에게 익히 공지된 방법의 수행이 포함된다.

<96> 상기 언급된 항원-항체 이외에, 합텐-항체 또는 항체-항체 쌍, 특이적 결합 쌍으로는 또한 상보적 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드, 아비딘-비오틴, 스트렙타아비딘-비오틴, 호르몬-수용체, 렉틴-탄수화물, IgG 단백질 A, 핵산-핵산 결합 단백질 및 핵산-항-핵산 항체를 들 수 있다. 약물 후보물질의 스크리닝에 사용되는 수용체 검정법은 본 방법을 위한 다른 분야의 용도이다. 임의의 이들 결합 쌍은 상기 기재된 3-구성성분 샌드위치 기술 또는 2-구성성분 경쟁 기술에 의해 본 방법에서의 용도에 맞게 개질될 수 있다.

<97> 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따른 검정법을 수행하기 위한 키트를 제공하는 것을 고려한다. 키트는 포장된 조합물에 유리 표지 화합물로서 화학발광 표지, 화학발광 표지된 특이적 결합 파트너, 화학발광성 유도체화된 고체 지지체, 예컨대 입자 또는 마이크로플레이트, 또는 화학발광 표지된 보조 물질, 예컨대 차단 단백질을 촉발인자 용액 및 사용에 대한 지시사항과 함께 포함할 수 있다. 키트는 화학발광 표지가 사용자에게 의해 수행되는 경우 활성인자 접합체, 분석물질 교정기, 희석제 및 반응 완충제를 임의로 포함할 수도 있다.

## 실시예

<98> 실시예 1. 화합물 1의 합성



<99>

<100> 커플링제로서 DCC를 사용하여 요오도카르복실산을 N-히드록시 숙신이미드와 반응시킴으로써 요오도카르복실레이트 NHS 에스테르를 합성하였다.

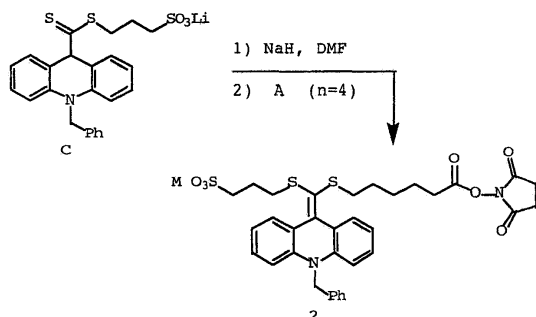
<101> 무수 DMF (50 mL) 중 디티오에스테르 B (1.808 g, 5.00 mmol)의 용액에 NaH (광유 중 60%, 0.200 g, 5.00 mmol)를 아르곤 분위기하에 첨가하였다. 4시간 후 실온에서 NHS 3-요오도프로피오네이트 A (1.485 g, 5.00

mmol)를 첨가하고, 얻어진 혼합물을 밤새 교반하였다. DMF를 진공에서 제거하였다.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$  (40:1)으로 컬럼 크로마토그래피하여, 황색 고체로서 화합물 1 1.770 g을 수득하였다 (수율 67%).

$^1\text{H}$  NMR (300

MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.30 (s, 3H), 2.74 (t, 2H), 2.83 (s, 4H), 3.01 (t, 2H), 5.31 (s, 2H), 6.88 (t, 2H), 7.07 (m, 2H), 7.11-7.18 (m, 3H), 7.27 (m, 4H), 7.82 (dd, 1H), 7.89 (dd, 1H) ppm.

## 실시예 2. 화합물 2의 합성

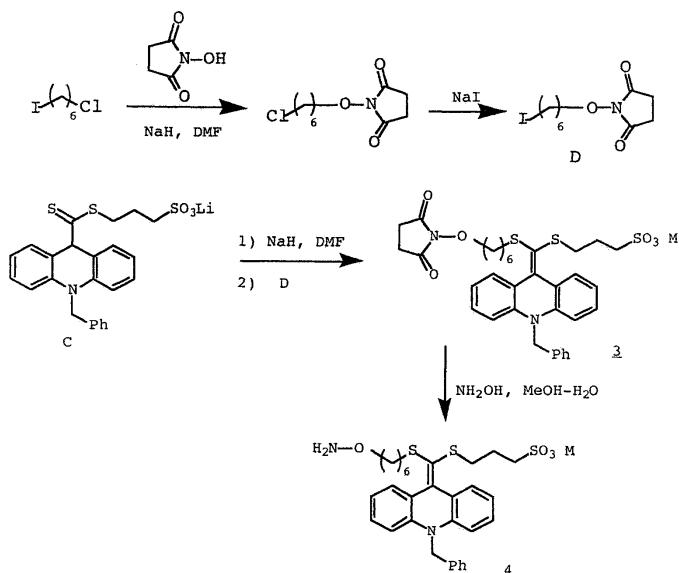


무수 DMF (20 mL) 중 디티오에스테르 C (0.692 g, 1.50 mmol) 및 NaH (광유 중 60%, 0.060 g, 1.50 mmol)의 혼합물을 아르곤 분위기하에 실온에서 4시간 동안 교반하여, 약간 혼탁한 용액을 얻었다. 그 후, NHS 6 요오도헥사사노에이트 A (0.661 g, 1.95 mmol)를 DMF (5 mL)에 첨가하였다. 16시간 후, DMF를 진공에서 제거하였다. 잔류물에 아세톤 10 mL를 첨가한 후, 에테르 20 mL를 첨가하였다. 상등액을 기울여 따라냈다. 동일한 절차에 따라 침전물을 3회 세척하였다. 진공하에 건조시킨 후, 화합물 2 1.200 g을 황색 고체로서 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.15

(m, 2H), 1.33-1.47 (m, 4H), 2.01 (p, 2H), 2.38 (t, 2H), 2.67 (t, 2H), 2.75 (t, 2H), 2.82 (s, 4H), 2.88 (t, 2H), 5.32 (s, 2H), 6.88 6.93 (m, 2H), 7.00 (t, 2H), 7.08-7.28 (m, 7H), 7.83 (d, 1H), 7.92 (d, 1H) ppm.

## 실시예 3. 화합물 3 및 4의 합성



무수 DMF (20 mL) 중 디티오에스테르 C (1.00 g, 2.10 mmol) 및 NaH (광유 중 60%, 0.087 g, 2.16 mmol)의 혼합물을 아르곤 분위기하에 실온에서 4시간 동안 교반하여, 약간 혼탁한 용액을 얻었다. 그 후, N-6 요오도헥사시숙신이미드 D (0.82 g, 2.52 mmol)를 DMF (5 mL)에 첨가하였다. 혼합물을 밤새 교반한 후, DMF를 진공에서 제거하였다. 잔류물을 에테르 30 mL로 4회 세척하여, 화합물 3 1.35 g을 수득하였다.

화합물 3 (0.25 g)을 메탄올 5 mL에 용해하고, 여기에 50% aq.  $\text{NH}_2\text{OH}$  5.0 mL를 첨가하였다. 용액을 2일 동안 교반한 후, 용매를 진공하에 증발시켰다. 잔류물을 에테르 20 mL로 6회 세척하여, 화합물 4 0.21 g을 수득하였다.

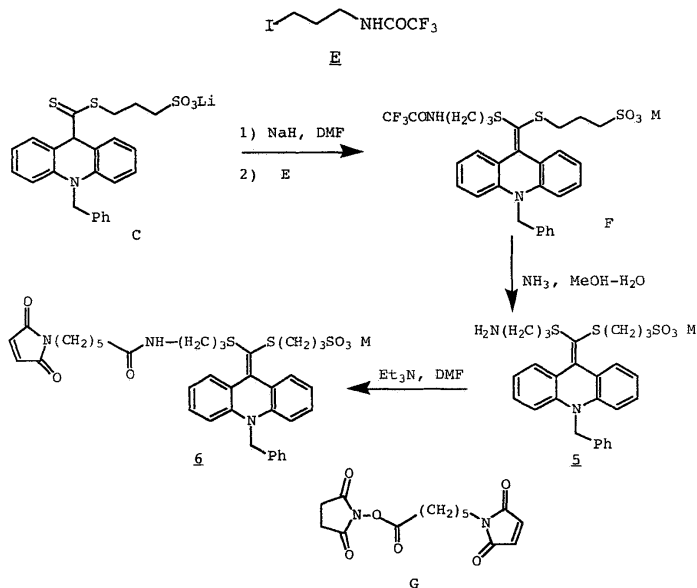
$^1\text{H}$  NMR (300

MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.14 (m, 4H), 1.40 (m, 4H), 1.94 (p, 2H), 2.65-2.71 (m, 4H), 2.84 (t, 2H),

3.55 (t, 2H), 5.31 (s, 2H), 6.88 (d, 2H), 6.98 (q, 2H), 7.10 (m, 4H), 7.12-7.27 (m, 3H), 7.85 (t,

2H) ppm.

#### 실시예 4. 화합물 5 및 6의 합성



무수 DMF 30 mL 중 디티오에스테르 C (1.32 g, 2.78 mmol) 및 NaH (광유 중 60%, 0.114 g, 2.86 mmol)의 혼합물을 아르곤 분위기하에 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 그 후, 화합물 E (1.014 g, 3.61 mmol)를 DMF 10 mL에 첨가하였다. 혼합물을 밤새 교반한 후, DMF를 진공에서 제거하였다. 잔류물을 에테르 20 mL로 3회 세척하여, 화합물 F 2.10 g을 수득하였다.

화합물 F (2.25 g)를 MeOH 중 7 N  $\text{NH}_3$  15 mL 및 28% 수성 암모니아 용액 10 mL의 혼합물에 용해하였다. 교반 3일 후, 용매를 진공하에 제거하였다. 잔류물을 에테르 (3 x 50 mL)로 세척하고,  $\text{H}_2\text{O}$ /2-프로판올로 재결정화하여, 화합물 5 1.20 g을 얻었다.

건조 DMF 9.0 mL 중 화합물 5 (0.300 g, 0.563 mmol)의 현탁액에 트리에틸아민 1.20 mL를 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 교반하여, 약간 혼탁한 용액을 얻었다. 여기에 6-말레이미도헥산산 NHS 에스테르 (G 0.260 g, 0.843 mmol)를 첨가하였다. 5분내에 투명한 용액을 얻었다. 16시간 후, DMF를 진공하에 제거하였다. 잔류물을 에테르 (4 x 30 mL)로 세척한 후, MeOH (2 mL)에 용해하고, 에테르 (50 mL)로 침전시켰다. 화합물 6 0.400 g을 황색 발포체형 고체로서 수득하였다.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,

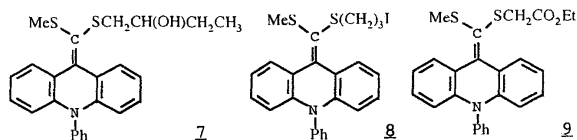
$\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.26 (t, 11H), 1.49-1.58 (m, 6H), 1.90 (p, 2H), 2.08 (t, 2H), 2.68 (m, 4H), 2.80 (t,

2H), 3.00 (t, 2H), 3.15 (q, 6H), 3.42 (t, 2H), 5.28 (s, 2H), 6.73 (s, 2H), 6.85 (d, 2H), 6.96 (m,

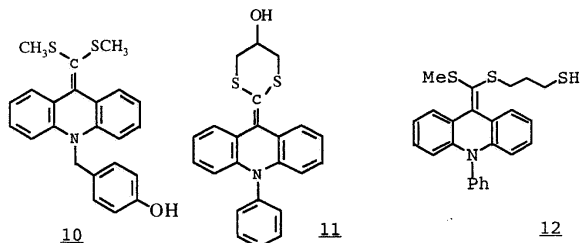
2H), 7.07 (m, 4H), 7.18-7.25 (m, 3H), 7.83 (m, 2H) ppm.

#### 실시예 5. 추가의 표지 화합물 7 내지 12

<119> 하기 나열된 다른 예시적인 표지 화합물의 제조는 미국 특허 제6,858,733호에 개시된 바와 같이 수행하였다.



<120>



<121>

<122> **실시예 6. 아크리단-표지된 항체의 제조.** 양 항-마우스 IgG (H + L) (잭슨 이뮤노리써치(Jackson ImmunoResearch))를 표지하는데 실시예 3의 아크리단 표지 화합물 3을 사용하였다. 0.1 M 보레이트 완충액 (pH 8.25) 중 항체 0.24 mg 및 DMF 중 화합물 3의 용액 (10:1 몰 비율 화합물 3:항체)을 500  $\mu$ l의 부피로 15분 동안 실온에서 및 이어서 4℃에서 밤새 반응시켰다. 용액을 PBS 완충액으로 용리되는 탈염 컬럼 (바이오라드 (BioRad))을 통해 통과시켜, 비결합된 표지를 제거하였다. 분획 500  $\mu$ l를 수집함으로써 임의의 비반응된 항체와 함께 표지된 항체를 수득하였다.

<123> 화학발광 검정법에 의해 표지된 항체의 양에 대해 분획을 시험하였다. 분취액 1 또는 10  $\mu$ l를 0.4 M HCL+3.6% 우레아 퍼옥시드 50  $\mu$ l와 혼합한 후, 터너 디자인즈(Turner Designs) TD-20e 발광측정기에서 튜브에 0.5 M NaOH 50  $\mu$ l를 주사하였다. 발광의 집단방출(burst)로부터의 총 통합된 강도를 주사 시점으로부터 측정하였다. 화학발광을 나타내는 분획을 보유하였다. 분획 8이 생성물의 최대량을 함유하였다.

<124> **실시예 7. 아크리단-표지된 BSA의 제조.** 실시예 3의 아크리단 표지 화합물 3을 소 혈청 알부민 (BSA)의 표지에 사용하였다. 0.1 M 보레이트 완충액 (pH 8.25) 500  $\mu$ l 중 BSA 0.1 g 및 화합물 3 23.4 mg/DMF 100  $\mu$ l의 42  $\mu$ l의 용액 (10:1 몰 비율 화합물 3:BSA)을 15분 동안 실온에서 및 이어서 4℃에서 밤새 반응시켰다. 용액을 PBS 완충액으로 용리되는 탈염 컬럼 (바이오라드)을 통해 통과시켜, 비결합된 표지를 제거하였다. 분획 500  $\mu$ l를 수집함으로써 임의의 비반응된 BSA와 함께 표지된 BSA를 수득하였다.

<125> 실시예 6에서 화학발광 검정법에 의해 표지된 BSA의 양에 대해 분획을 시험하였다. 화학발광을 나타내는 분획을 보유하였다. 분획 7이 생성물의 최대량을 함유하였다.

<126> **실시예 8. 아크리단 관능화된 마이크로웰의 제조.** 카르복실산기로 관능화된 백색 폴리스티렌 96-웰 마이크로플레이트 (바이오시스템즈(Biosystems))를, 커플링제로서 EDC를 사용하여 화합물 5와 커플링하였다. DMF 및 0.1 M MES 완충액 (pH 4)의 70:30 (v/v) 용액 중 화합물 5의 스톡 용액을 제조하였다. MES 완충액으로 미리 세척된 플레이트의 웰 각각에 분취액 0.2 mL를 첨가하였다. MES 완충액 중 EDC를 첨가하고, 혼합물을 밤새 반응시켰다. 상등액을 제거하고, 웰을 순서대로 물로 2회 및 메탄올로 6회 세척하였다.

<127> **실시예 9. 아크리단-표지된 폴리(메타크릴레이트) 마이크로입자의 제조.** 앰버라이트(Amberlite) 수지 (IRP-64, 100-400 메쉬, 2.50 g)를 SOCl<sub>2</sub>와 환류에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응물을 냉각하고, 휘발성물질을 진공하에 제거하였다. 그 후, 비드를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50 mL에 현탁시키고, 여기에 트리에틸아민 17.0 mL를 첨가한 후, 에틸렌디아민 15.0 mL를 첨가하였다. 혼합물을 아르곤 분위기하에 밤새 교반하였다. MeOH 100 mL를 첨가함으로써 입자를 분산시킨 후 여과하였다. 여과된 입자를 MeOH 및 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 세척한 후, 공기 건조시켰다. 얻어진 입자는 2.86 mmol/g의 계산된 NH<sub>2</sub> 함량에 대해 2.80 g의 중량이었다.

<128> 무수 DMF 10 mL 중 에틸렌디아민-변형 입자 (100 mg)를 화합물 2 10 mg과 함께 아르곤 분위기하에 실온에서 밤새 교반하였다. 혼합물을 여과하고, 입자를 MeOH로 세척하였다. 공기 건조시킨 후, 회수된 관능화된 입자는 102 mg의 중량이었다.

<129> 별법에서, 앰버라이트 수지 2.50 g을 상기와 같이 SOCl<sub>2</sub>와의 반응에 의해 산 클로라이드 형태로 전환시킨 후, THF 50 mL 및 트리에틸아민 6.8 mL 중 N-히드록시숙신이미드 4.32 g과 반응시켜, NHS 에스테르-관능화된 입자를

제조하였다. 이들을 유리 말단  $\text{NH}_2$  기를 함유하는 화합물 5와 반응시켜 커플링을 수행하였다.

- <130> **실시예 10. 아크리단-표지된 마이크로입자의 항체와의 접합.** 비반응된 말단  $\text{NH}_2$  기를 함유하는 아크리단-표지된 앰버라이트 입자의 20 mg 양을 무수 DMF 100 mL 중 디숙신이미딜 옥탄디오에이트 102 mg (약 5 eq.)와 15분 동안 실온에서 추가로 반응시켰다. 입자를 원심분리에 의해 분리하고, DMF 1 mL로 10회 세척하였다. 얻어진 유리 NHS 에스테르를 밤새 4°C에서 0.1 M 보레이트 완충액 (pH 8.5), 2 mM EDTA 중 양 항-마우스 IgG (스톡 1.8 mg/mL 용액 0.5 mL)에 커플링하였다. 반응 혼합물을 13k rpm에서 원심분리하고, 상등액을 제거하였다. 입자를 스핀 컬럼 상에서 PBS + 0.05% 트윈(Tween)-20으로 수회 세척하였다.
- <131> 차단 완충액 (1X PBS 중 1% BSA, 1% 수크로스) 1.0 mL에서 인큐베이션함으로써 얻어진 항체-표지된 입자를 37°C에서 1시간 동안 BSA로 차단하였다. 입자를 트윈-PBS 세척 완충액으로 세척하고, 1X PBS 1.0 mL에 저장하였다.
- <132> **실시예 11. 아크리단-표지된 자성 마이크로입자의 제조.** DMF 0.7 mL 및 0.1 M MES 완충액 (pH 4) 0.3 mL의 용액 중 화합물 5 4 mg의 스톡 용액을 제조하였다. 0.1 mL 분취액을 카르복실화 폴리스티렌 입자 (디날 디나비즈 (Dyna! Dynabeads) M-270 카르복실산) 50 mg에 첨가하고, 이를 MES 완충액에서 세척하였다. 혼합물을 MES 완충액 0.67 mL 및 DMF 0.23 mL로 희석하였다. EDC (23 mg)를 첨가하고, 혼합물을 밤새 진탕하였다. 상등액을 제거하고, 입자를 순서대로 물 1 mL로 2회 및 MeOH 1 mL로 6회 세척하고, MeOH 1 mL에 재현탁하였다.
- <133> 입자를 표지 혼입에 대해 시험하였다. 분취액 10  $\mu\text{L}$  (약 0.5 mg 함유)를 물 0.5 mL에 첨가하여, 1 mg/mL 스톡을 제조하였다. 분취액 100  $\mu\text{L}$ 를 과량의 HRP와 5분 동안 반응시켰다. 입자를 물 1 mL로 4회 세척한 후, 물 1 mL에 현탁하였다. 25 mM 트리스 (pH 8.0), 8 mM p-히드록시신남산, 1 mM EDTA, 0.2% 트윈-20 및 0.1 M 우레아 퍼옥시드를 함유하는 촉발인자 용액 (10  $\mu\text{L}$ )을 주사하고, 화학발광의 플래시를 발광측정기에서 기록하였다. 6040 RLU의 신호를 18 RLU의 블랭크와 비교하여 관찰하였다.
- <134> 입자의 5 mg 부분을 0.1 M MES 완충액 (pH 4) 200  $\mu\text{L}$ 로 2회 세척한 후, MES 완충액 117  $\mu\text{L}$ 에 재현탁하였다. 양 항-마우스 IgG (스톡 1.8 mg/mL 용액으로부터 0.15 mg)를 입자에 첨가하고, 혼합물을 30분 동안 진탕하였다. EDC 5 mg을 첨가하고, 혼합물을 4시간 동안 진탕하였다. 상등액을 제거하고, 비드를 세척 완충제 (PBS + 0.05% 트윈-20) 500  $\mu\text{L}$ 로 3회 세척하였다. 입자를 차단 완충제 (PBS + 1% BSA + 1% 수크로스) 500  $\mu\text{L}$  및 EDC 5 mg에 세척하고, 15분 동안 실온에서 교반하고, 4°C에서 밤새 교반하였다. 상등액을 제거하고, 입자를 세척 완충제 500  $\mu\text{L}$ 로 2회 세척하고, PBS 1 mL에 재현탁하였다.
- <135> **실시예 12. 표지된 포획 항체를 사용하는 마이크로플레이트 면역검정법.** 실시예 6에서 표지된 항체의 제조로부터 생성물-함유 분획을 PBS 완충액에서 1:100 희석하였다. 분취액 50  $\mu\text{L}$ 를 백색 폴리스티렌 96 웰 플레이트의 26개 웰 각각에 첨가하였다. 플레이트를 5분 동안 실온에서 케도 진탕기에서 진탕하였다. 용액을 제거하고, 웰을 1X PBS+0.05% 트윈-20으로 3회 세척하고, 각 단계후 세척 완충액을 모두 제거하였다.
- <136> 양 항-마우스 IgG F(ab')<sub>2</sub>-HRP 접합체 (잭슨 이뮤노리써치)를, 1X PBS 중 2.5% BSA 및 1% 수크로스를 포함하는 접합체 완충액에서 1:1.2 x 10<sup>6</sup> 개로 희석하였다. 별법으로, 접합체를 FBS와 같은 다른 매트릭스에 희석시킬 수도 있다. 희석된 접합체의 분취액을 26개 웰로 분배하였다. 항-IgG F(ab')<sub>2</sub>-HRP 접합체 용액 중 0 ng/mL 용액과 함께 100 ng/mL 내지 0.048 ng/mL를 함유하는 IgG 표준을 2배 희석에 의해 제조하였다. 표준 및 0을 웰에 분배하여, 최종 부피 50  $\mu\text{L}$ /웰을 성취하였다. 플레이트를 1시간 동안 실온에서 플레이트 진탕기 상에서 인큐베이션하였다.
- <137> 25 mM 트리스 (pH 8.0), 8 mM p-히드록시-신남산, 1 mM EDTA, 0.2% 트윈-20 및 0.1 M 우레아 퍼옥시드를 함유하는 촉발인자 용액을 제조하였다.
- <138> 플레이트를 루미노스칸(Luminoskan) 플레이트 발광측정기로 이동시켰다. 접합체 용액을 제거하지 않고, 순서대로 촉발인자 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 주사하고, 5초 동안 웰 각각에서 통합된 강도를 판독함으로써 발광을 생성하였다. 얻어진 검정의 플롯을 도 1에 나타내었다. 검정은 0 + 0의 2 표준 편차의 신호를 초과하는 최저 교정기로 시험된 전체 범위에 대해 정량하였다.
- <139> **실시예 13. 마이크로플레이트 면역검정법 비표지된 포획 항체 및 표지된 BSA.** 1X PBS의 비표지된 양 항-마우스 IgG (H + L) 40  $\mu\text{g}$ /mL의 분취액 50  $\mu\text{L}$ 를 백색 폴리스티렌 96 웰 플레이트의 26개 웰 각각에 첨가하여 코팅하였다. 플레이트를 5분 동안 실온에서 케도 진탕기 상에서 진탕하였다. 용액을 제거하고, 웰을 1X PBS+0.05% 트윈-20으로 3회 세척하고, 각 단계후 세척 완충액을 모두 제거하였다.



- <140> 실시예 7에서 표지된 BSA의 제조로부터 생성물-함유 분획을 PBS 완충액 + 1% 수크로스 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ 로 희석하였다. 분취액 100  $\mu\text{L}$ 를 백색 폴리스티렌 96 웰 플레이트의 26개 웰 각각에 첨가하였다. 플레이트를 1시간 동안 37°C에서 유지하였다. 용액을 제거하고, 웰을 PBS+0.05% 트윈-20으로 3회 세척하고, 각 단계후 세척 완충액을 모두 제거하였다.
- <141> 양 항-마우스 IgG F(ab')<sub>2</sub>-HRP 접합체를, 1X PBS 중 1% BSA 및 1% 수크로스를 포함하는 접합체 완충액에서 1:1.2 x 10<sup>6</sup>개로 희석하였다. 희석된 접합체의 분취액을 26개 웰에 분배하였다. 항-IgG F(ab')<sub>2</sub>-HRP 접합체 용액 중 0 ng/mL 용액과 함께 100 ng/mL 내지 0.048 ng/mL를 함유하는 IgG 표준을 2배 희석에 의해 제조하였다. 표준 및 0을 웰에 분배하여, 최종 부피 50  $\mu\text{L}$ /웰을 성취하였다. 플레이트를 1시간 동안 실온에서 플레이트 진탕기 상에서 인큐베이션하였다.
- <142> 플레이트를 루미노스캔 플레이트 발광측정기로 이동시켰다. 접합체 용액을 제거하지 않고, 순서대로 촉발인자 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 주사하고, 5초 동안 웰 각각에서 통합된 강도를 판독함으로써 발광을 생성하였다. 얻어진 검정의 플롯을 도 2에 나타내었다. 검정은 0 + 0의 2 표준 편차의 신호를 초과하는 최저 교정기로 시험된 전체 범위에 대해 정량하였다.
- <143> **실시예 14. 표지된 자성 마이크로입자를 사용하는 마이크로입자 면역검정법.** 실시예 11의 아크리단 및 항체 공동-표지된 자성 마이크로입자의 50  $\mu\text{g}$ /반응을 취하였다. 입자를 1X PBS+0.05% 트윈-20으로 3회 세척하고, 1% BSA 및 1% 수크로스를 함유하는 1X PBS 완충액에 1:1.2 x 10<sup>6</sup>개로 희석된 양 항-마우스 IgG F(ab')<sub>2</sub>-HRP 접합체에 재현탁하였다. 입자 현탁액을 백색 폴리스티렌 96 웰 플레이트의 26개 웰에 분배하였다. 2배 희석에 의해 양 항-마우스 IgG F(ab')<sub>2</sub>-HRP 접합체 용액 중 IgG 표준을 제조하여, 웰 중 100 ng/mL - 0.048 ng/mL 또는 0 ng/mL의 최종 농도를 얻었다. 각 표준 및 0을 웰에 분배하여, 50  $\mu\text{L}$ /웰의 최종 반응 부피를 제조하였다. 플레이트를 1시간 동안 실온에서 플레이트 진탕기 상에서 인큐베이션하였다.
- <144> 플레이트를 루미노스캔 플레이트 발광측정기로 이동시켰다. 접합체 용액을 제거하지 않고, 순서대로 촉발인자 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 주사하고, 5초 동안 웰 각각에서 통합된 강도를 판독함으로써 발광을 생성하였다. 얻어진 검정의 플롯으로 IgG를 정량하였다.
- <145> **실시예 15. 표지된 엠버라이트 마이크로입자를 사용하는 마이크로입자 면역검정법.** 실시예 10의 아크리단 및 항체 공동-표지된 엠버라이트 마이크로입자의 100  $\mu\text{g}$ /반응을 취하였다. 입자를 1X PBS+0.05% 트윈-20으로 3회 세척하고, 1% BSA 및 1% 수크로스를 함유하는 1X PBS 완충액에 1:1.2 x 10<sup>6</sup>개로 희석된 양 항-마우스 IgG F(ab')<sub>2</sub>-HRP 접합체에 재현탁하였다. 입자 현탁액을 백색 폴리스티렌 96 웰 플레이트의 26개 웰에 분배하였다. 2배 희석에 의해 양 항-마우스 IgG F(ab')<sub>2</sub>-HRP 접합체 용액 중 IgG 표준을 제조하여, 웰 중 100 ng/mL - 0.048 ng/mL 또는 0 ng/mL의 최종 농도를 얻었다. 각 표준 및 0을 웰에 분배하여, 50  $\mu\text{L}$ /웰의 최종 반응 부피를 제조하였다. 플레이트를 1시간 동안 실온에서 플레이트 진탕기 상에서 인큐베이션하였다.
- <146> 플레이트를 루미노스캔 플레이트 발광측정기로 이동시켰다. 접합체 용액을 제거하지 않고, 순서대로 촉발인자 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 주사하고, 5초 동안 웰 각각에서 통합된 강도를 판독함으로써 발광을 생성하였다. 얻어진 검정의 플롯으로 IgG를 정량하였다.
- <147> **실시예 16. 아크리단-표지된 카르복실-변형 마이크로입자의 제조.** 0.0282 meq/g의 카르복실 로딩을 갖는 카르복실산-변형 폴리스티렌 1  $\mu\text{m}$  마이크로입자 (세라딘(Seradyn))를, 실시예 11에 기재된 절차에 따라 EDC 커플링에 의해 화합물 5에 접합하였다. 입자 (1.48  $\mu\text{mol}$  COOH)의 52.5 mg 부분을 화합물 5 0.39 mg (0.74  $\mu\text{mol}$ )로 처리하여, 비반응된 COOH 기가 남아있음을 확인하였다. 유리 COOH 기를 pH 4 MES 완충액 중 EDC 커플링에 의해 양 항-마우스 IgG (1.48  $\mu\text{mol}$ )에 커플링하였다. 스핀 컬럼을 사용하여 트윈-PBS 완충액으로 세척함으로써 비반응된 항체를 제거하였다.

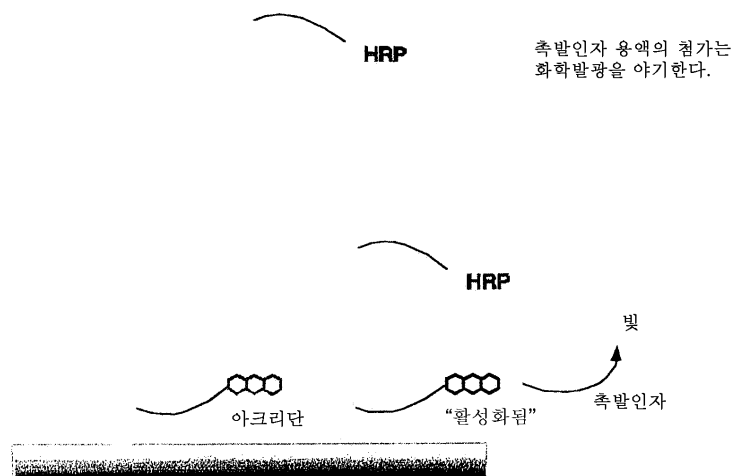
### 도면의 간단한 설명

- <13> 도 1은 표지된 포획 항체를 사용하는, 본 발명에 따라 수행된 면역검정법의 검출 단계의 개략도이다.
- <14> 도 2는 표지된 차단 단백질 및 비표지된 포획 항체를 사용하는, 본 발명에 따라 수행된 다른 면역검정법의 검출 단계의 개략도이다.

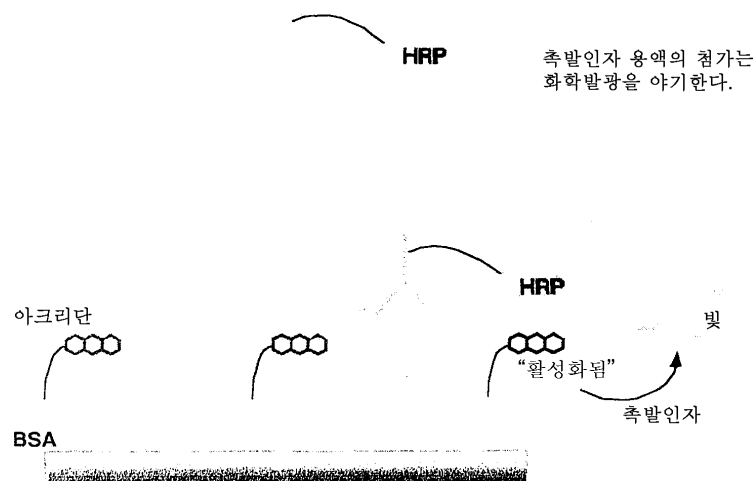
- <15> 도 3은 표지된 고체 표면 및 비표지된 포획 항체를 사용하는, 본 발명에 따라 수행된 다른 면역검정법의 검출 단계의 개략도이다.
- <16> 도 4는 마이크로플레이트의 웰에 고정화된 표지된 포획 항체, 및 검출을 위한 과량의 항-IgG-HRP 접합체를 사용하는, 비분리 면역검정법에서 IgG 항원의 검출을 나타내는 그래프이다.
- <17> 도 5는 마이크로플레이트의 웰에 고정화된 표지된 차단 단백질 및 비표지된 포획 항체, 및 검출을 위한 과량의 항-IgG-HRP 접합체를 사용하는, 비분리 면역검정법에서 IgG 항원의 검출을 나타내는 그래프이다.
- <18> 도 6은 표지된 포획 핵산을 사용하는, 본 발명에 따라 수행된 핵산 혼성화 검정법의 검출 단계의 개략도이다.
- <19> 도 7은 표지된 고체 상, 고정화 포획 항체 및 표지된 분석물질 유사체를 사용하는, 본 발명에 따라 수행된 경쟁 면역검정법의 검출 단계의 개략도이다.

## 도면

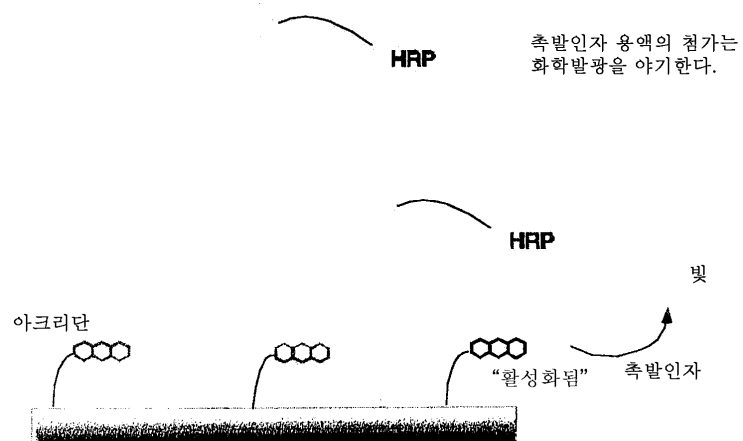
도면1



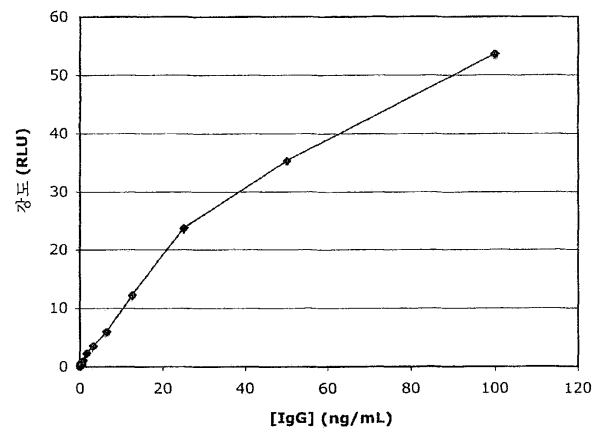
도면2



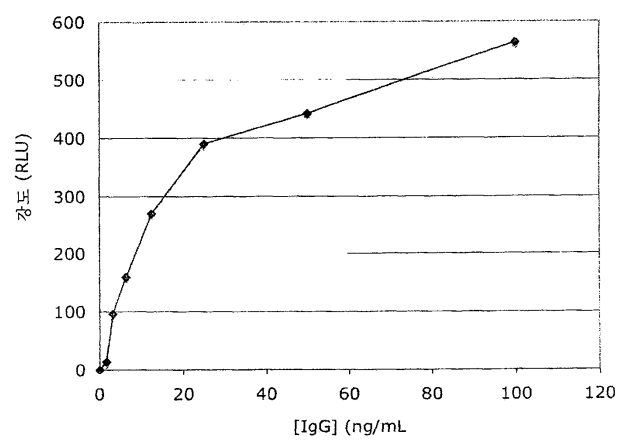
도면3



도면4

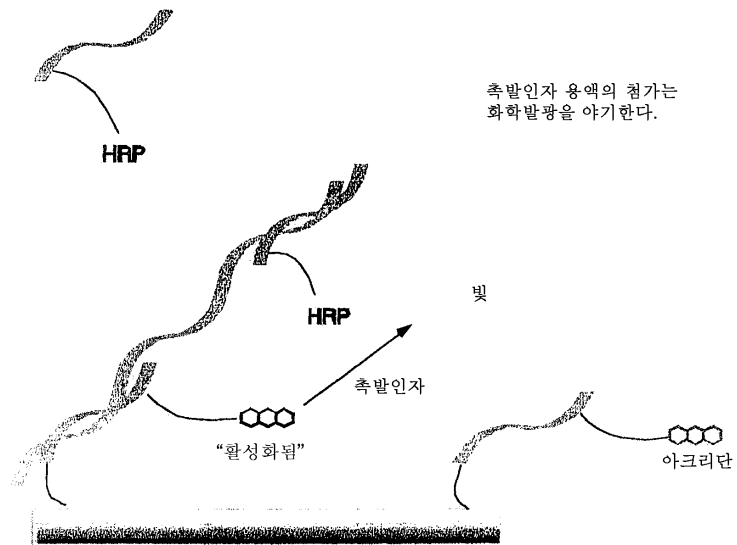


도면5





도면6



도면7

