



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0134796
(43) 공개일자 2016년11월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/72 (2006.01) G01N 33/558 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/723 (2013.01)
G01N 33/558 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7028970
- (22) 출원일자(국제) 2015년03월20일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년10월18일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/021865
- (87) 국제공개번호 WO 2015/143394
국제공개일자 2015년09월24일
- (30) 우선권주장
61/968,297 2014년03월20일 미국(US)

- (71) 출원인
바이오 래드 래버러토리스 인코오포레이티드
미국 캘리포니아 94547 허큘레스 알프레드노벨드
라이브1000
- (72) 발명자
맨너 빅토르
미국 94547 캘리포니아주 허큘레스 알프레드 노벨
드라이브 1000
스바로브스키 세르게이
미국 94547 캘리포니아주 허큘레스 알프레드 노벨
드라이브 1000
프레스티자코모 앤토니
미국 94547 캘리포니아주 허큘레스 알프레드 노벨
드라이브 1000
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

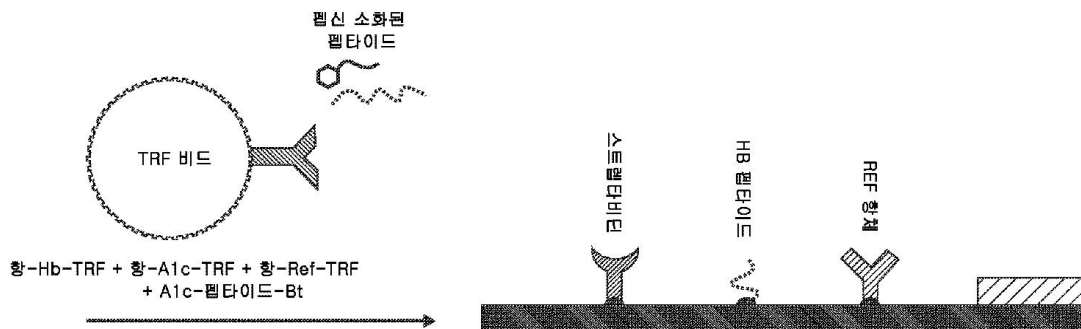
전체 청구항 수 : 총 67 항

(54) 발명의 명칭 **당화 단백질 분석**

(57) 요약

헤모글로빈 A1c, 당화 알부민, 및 다른 당화 단백질에 대한 분석을 수행하기 위한 방법, 장치, 및 시약이 기술되어 있다. 상기 방법은 당화 단백질 및 비-당화 단백질 간의 비 결정을 포함한다. 일부 적용에서, 상기 분석은 신호 발생을 위해 LOCI를 이용한다. 본 발명은 특히 당화 헤모글로빈을 포함하는 당화 단백질의 검출을 위한 분석 및 상응하는 장치 및 시약에 관한 것이다. 일반적으로 이해된 바와 같이, 이러한 검출은 당뇨병 환자에서 혈당 수준을 관리하고 당뇨병 전증 개체의 상태를 모니터링하는데 유용하다.

대표도



(52) CPC특허분류
G01N 33/6842 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

샘플 내 당화 단백질의 비율을 결정하는 방법으로서,

(i) 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드 또는 비-당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 표지된, 특이적 결합 멤버, 및 (ii) 당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 표지된, 특이적 결합 멤버를

a) 당화에 민감한 상기 단백질 또는 상기 단백질의 펩타이드를 함유하는 샘플; 및

b) 상기 단백질 또는 펩타이드의 비-샘플-유래의 당화 형태; 또는

c) 상기 단백질 또는 펩타이드의 비-샘플-유래의 비당화 형태

와 접촉시키는 단계;

당화 단백질의 수준을 나타내는 적어도 제1 신호, 및 총 단백질 또는 비당화 단백질의 수준을 나타내는 적어도 제2 신호를 갖는 복수의 신호를 검출하는 단계; 및

상기 샘플 내에 당화된 상기 단백질의 비율의 표시로서, 당화 단백질 및 비-당화 단백질 간의 비율, 또는 당화 단백질 및 총 단백질 간의 비율을 결정하는 단계

를 포함하고,

상기 접촉은 경쟁적 결합 조건하에서 수행되고, 상기 제1 신호 및 상기 제2 신호는 구별가능한 것인 결정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질이 인간 헤모글로빈인 결정 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 당화 펩타이드가 HbA1C N-말단 펩타이드인 결정 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 또는 펩타이드의 비-샘플 유래의 당화 형태가 바이오티닐화된 HbA1c이고, 상기 검출이 측면 유동 장치에서 수행되며, 상기 바이오티닐화된 HbA1c가 스트렙타비딘을 포함하는 고정화 부위에서 포획되는 것인 결정 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 펩타이드는 길이가 N-말단 펩타이드 5-14 아미노산 잔기인 결정 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 펩타이드가 펩신 또는 엔도렙시다아제 GluC에 의해 절단되는 것인 결정 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 단백질이 인간 혈청 알부민인 결정 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 펩타이드는 길이가 N-말단 펩타이드 4-16 아미노산 잔기인 결정 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 펩타이드가 Lys525, Lys199, Lys439, 및 Lys281 중 적어도 하나를 포함하는 것인 결정 방

법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 펩타이드가 복수의 펩타이드인 결정 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 복수의 펩타이드가 Leu585, Lys525, Lys199, Lys439, 또는 Lys281 중 적어도 둘을 포함하는 펩타이드를 포함하는 것인 결정 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 펩타이드가 내부 펩타이드인 결정 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 펩타이드는 길이가 5 내지 20개 아미노산인 결정 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 펩타이드가 트립신, 엔도펩티다아제 GluC, 펩신, 또는 프롤릴 엔도펩티다아제에 의해 절단되는 것인 결정 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 신호가 형광성 신호 또는 TRF 신호인 결정 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출이 측면 유동 분석 장치에서 수행되고, 상기 장치가 당화 단백질 또는 펩타이드를 위한 고정화 부위 및 상기 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드를 위한 고정화 부위를 포함하는 검출 구간을 포함하며, 당화 단백질 또는 펩타이드에 상응하는 신호 및 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드에 상응하는 신호가 별도로 검출되는 것인 결정 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 당화 단백질 또는 펩타이드를 위한 상기 고정화 부위 및 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드를 위한 상기 고정화 부위가 물리적으로 분리된 것인 결정 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 당화 단백질 또는 펩타이드를 위한 상기 고정화 부위 및 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드를 위한 상기 고정화 부위가 동일하고, 상기 제1 및 제2 신호가 다중화되는 것인 결정 방법.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플이 샘플 내에 없는 표적에 특이적으로 결합하는 대조군 표지된 결합 멤버와 접촉되고 상기 대조군 표지된 결합 멤버가 샘플 내에 없는 표적의 고정화된 형태를 포함하는 고정화 부위에 고정화되고, 상기 고정화 부위에 국제화된 대조군 표지된 결합 멤버 결합의 양이 당화 단백질 또는 총 단백질 또는 둘다의 수준에 대한 신호를 정규화하는데 사용되는 것인 결정 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 샘플 내에 없는 상기 표적이 비-인간 종으로부터의 단백질인 결정 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 샘플 내에 없는 표적에 특이적으로 결합하는 상기 대조군 표지된 결합 멤버가 표지된 항체인 결정 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출이 측면 유동 분석 장치에서 수행되고, 상기 장치가 당화 단백질 또는 펩타이드를 위한 고정화 부위 및 비-당화 단백질 또는 펩타이드를 위한 고정화 부위를 포함하는 검출 구간을 포함하며, 당화 단백질 또는 펩타이드에 상응하는 신호 및 비-당화 단백질 또는 펩타이드에 상응하는 신호가 별도로 검출되는 것인 결정 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 당화 단백질 또는 펩타이드를 위한 상기 고정화 부위 및 비-당화 단백질 또는 펩타이드를 위한 상기 고정화 부위가 물리적으로 분리된 것인 결정 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 당화 단백질 또는 펩타이드를 위한 상기 고정화 부위 및 비-당화 단백질 또는 펩타이드를 위한 상기 고정화 부위가 동일하고, 상기 제1 및 제2 신호가 다중화되는 것인 결정 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 제1 및 제2 신호가 공여체 및 수용체 표지를 포함하는 발광성 산소 채널링 분석(LOCI) 표지로부터 유래된 것인 결정 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 펩타이드의 상기 비당화 형태 및 상기 펩타이드의 상기 당화 형태에 공여체 LOCI 표지가 고정화되고, 비-당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 또는 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드에 특이적인 상기 특이적 결합 멤버, 및 당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 상기 특이적 결합 멤버에 수용체 LOCI 표지가 부착되는 것인 결정 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 공여체 LOCI 표지가 복수의 공여체 LOCI 표지 분자를 포함하는 비드를 포함하고, 복수의 상기 단백질 또는 펩타이드가 상기 비드의 표면 상에 고정화되거나 고정화하는 것인 결정 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 비드가 코팅되는 것인 결정 방법.

청구항 29

제25항에 있어서, 상기 펩타이드의 상기 비당화 형태 및 상기 펩타이드의 상기 당화 형태에 수용체 LOCI 표지가 고정화되고, 비-당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 또는 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드에 특이적인 상기 특이적 결합 멤버, 및 당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 상기 특이적 결합 멤버에 공여체 LOCI 표지가 부착되는 것인 결정 방법.

청구항 30

제25항에 있어서, 상기 분석이 균일 분석으로서 수행되는 것인 결정 방법.

청구항 31

제25항에 있어서, 상기 분석이 액체 반응 혼합물에 균일하게 현탁된 미세입자를 이용하는 것인 결정 방법.

청구항 32

제1항에 있어서, 상기 분석이 적어도 4 자릿수 동적 범위를 제공하고 신호-농도 곡선의 기울기를 조절함으로써 향상된 임상 정밀도를 제공하는 것인 결정 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 임상 변동 계수(CV)가 5% 미만인 결정 방법.

청구항 34

제32항에 있어서, 상기 임상 CV가 3% 미만인 결정 방법.

청구항 35

제32항에 있어서, 상기 임상 CV가 2% 미만인 결정 방법.

청구항 36

제1항에 있어서, 상기 분석이 적어도 4 자릿수의 신호 동적 범위를 갖는 것인 결정 방법.

청구항 37

제1항에 있어서, 상기 분석이 적어도 5 자릿수의 신호 동적 범위를 갖는 것인 결정 방법.

청구항 38

제1항에 있어서, 상기 단백질 또는 이의 펩타이드의 복수의 동형이 구별가능하게 검출되는 것인 결정 방법.

청구항 39

제31항에 있어서, 상기 복수의 동형이 단일 구간에서 검출되는 것인 결정 방법.

청구항 40

제38항에 있어서, 상기 동형이 별개의 구간들에서 검출되는 것인 결정 방법.

청구항 41

제38항에 있어서, 상기 단백질이 헤모글로빈 베타-사슬이고 상기 동형이 HbA, HbC, HbD Punjab, HbE, 및 HbS 중 적어도 둘을 포함하는 것인 결정 방법.

청구항 42

제38항에 있어서, 상기 단백질이 헤모글로빈 베타-사슬이고 상기 동형이 HbC, HbD Punjab, HbE, 및 HbS를 포함하는 것인 결정 방법.

청구항 43

제38항에 있어서, 상기 단백질이 헤모글로빈 베타-사슬이고 상기 동형이 HbE 및 HbS를 포함하는 것인 결정 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 샘플 내에 없는 표적에 특이적으로 결합하는 대조군 표지된 결합 멤버와 접촉되고 상기 대조군 표지된 결합 멤버가 이후에 검출되며, 대조군 표지된 결합 멤버의 검출된 양이 당화 단백질 또는 총 단백질 또는 둘다의 수준에 대한 신호를 정규화하는데 사용되는 것인 결정 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 샘플 내에 없는 상기 표적이 비-인간 종으로부터의 단백질인 결정 방법.

청구항 46

제44항 또는 제45항에 있어서, 샘플 내에 없는 표적에 특이적으로 결합하는 상기 대조군 표지된 결합 멤버가 표지된 항체인 결정 방법.

청구항 47

특정 단백질의 당화 형태 또는 당화 부위에서 당화된 이로부터 유래된 당화 펩타이드;

상기 특정 단백질의 당화 형태에 특이적인 또는 제1 공여체 및 수용체 LOCI 표지 쌍의 제1 멤버와 연결된 이로부터 유래된 당화 펩타이드에 특이적인 특이적 결합제를 포함하는 표지된, 특이적 결합제;

상기 특정 단백질의 비-당화 형태에 특이적인 또는 제2 공여체 및 수용체 LOCI 표지 쌍의 제1 멤버와 연결된 이로부터 유래된 비-당화 펩타이드에 특이적인 특이적 결합제를 포함하는 표지된, 특이적 결합제; 및

상기 특정 단백질의 상기 당화 형태 또는 이로부터 유래된 당화 펩타이드와 연결되거나 연결가능한 상기 제1 공여체 및 수용체 LOCI 표지 쌍의 제2 멤버; 및

상기 특정 단백질의 상기 비-당화 형태 또는 이로부터 유래된 비당화 펩타이드와 연결되거나 연결가능한 상기 제2 공여체 및 수용체 LOCI 표지 쌍의 제2 멤버

를 포함하는, LOCI 분석을 위한 시약 세트로서,

상기 제1 및 제2 공여체 및 수용체 LOCI 표지 쌍은 동일하거나 상이할 수 있는 것인 분석 시약 세트.

청구항 48

제37항에 있어서, 상기 LOCI 공여체 표지가 상기 비-당화 단백질 또는 펩타이드 및 상기 단백질 또는 펩타이드의 상기 당화 형태와 연결되거나 연결가능한 것인 분석 시약 세트.

청구항 49

제37항에 있어서, 상기 LOCI 공여체 표지가 복수의 고정화된 단백질 또는 펩타이드, 또는 단백질 또는 펩타이드의 특이적 결합을 위한 복수의 결합 부위를 포함하는 비드를 포함하는 것인 분석 시약 세트.

청구항 50

제37항에 있어서, 상기 시약 세트가 분석 장치 내에 있는 것인 분석 시약 세트.

청구항 51

제37항에 있어서, 상기 시약 세트의 성분들이 생체내에서 당화될 수 있는 상기 특정 단백질 또는 당화 부위를 포함하는 이로부터 유래된 펩타이드를 함유하는 샘플과 배합되는 것인 분석 시약 세트.

청구항 52

제37항에 있어서, 유효량의 사카라이드-아미노산 접합체를 추가로 포함하는 분석 시약 세트.

청구항 53

제37항에 있어서, 완충 용액을 추가로 포함하는 분석 시약 세트.

청구항 54

제37항에 있어서, 상기 특정 단백질이 인간 헤모글로빈인 분석 시약 세트.

청구항 55

제37항에 있어서, 상기 특정 단백질이 인간 알부민인 분석 시약 세트.

청구항 56

샘플이 액체 매체와 혼합되는 샘플 유입 영역;

희석된 샘플이 엔도렙시다아제와 혼합되고 반응하는 엔도렙시다아제 영역;

반응 혼합물이 엔도렙시다아제 활성을 중단시키는 시약과 혼합되는 중화 영역;

반응 혼합물의 전부 또는 일부가 미세입자의 표면에 결합된 항체 또는 다른 리간드와 혼합되고 반응하는 하나 이상의 시약 혼합 영역;

상기 미세입자가 별개의 반응 구간에 결합하는 하나 이상의 측면 유동 스트립; 및

흡수 패드

를 상기 순서로 흐름 연통하도록 포함하는 측면 유동 장치.

청구항 57

제56항에 있어서, 적어도 하나의 시약 혼합 영역이

(i) 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드 또는 비-당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 표지된, 특이적 결합 멤버,

(ii) 당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 표지된, 특이적 결합 멤버, 및

(iii) 상기 단백질 또는 펩타이드의 비-샘플-유래의 당화 형태

를 포함하는 것인 측면 유동 장치.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 상기 단백질이 인간 헤모글로빈인 측면 유동 장치.

청구항 59

제56항 또는 제57항에 있어서, 상기 당화 단백질이 HbA1C인 측면 유동 장치.

청구항 60

제56항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질 또는 펩타이드의 비-샘플-유래의 당화 형태가 바이오 티널화되고, 하나 이상의 측면 유동 스트립 중 적어도 하나가 스트랩타비딘을 포함하는 고정화 구간을 포함하는 것인 측면 유동 장치.

청구항 61

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 측면 유동 스트립 중 적어도 하나는 하기와 같이 별개의 고정화 구간:

총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드를 포함하는 고정화 구간;

당화 단백질 또는 당화 펩타이드를 포함하는 고정화 구간

을 포함하는 것인 측면 유동 장치.

청구항 62

제61항에 있어서, 동일하거나 상이한 측면 유동 스트립이 하나 이상의 단백질 동형을 포함하는 고정화 구간을 포함하는 것인 측면 유동 장치.

청구항 63

제62항에 있어서, 단백질 동형이 HbC, HbD Punjab, HbE, 또는 HbS 중 적어도 하나를 포함하는 것인 측면 유동 장치.

청구항 64

제56항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서,

하나의 측면 스트립이 하기와 같이 별개의 고정화 구간:

총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드를 포함하는 고정화 구간;

당화 단백질 또는 당화 펩타이드를 포함하는 고정화 구간

을 포함하고,

제2 측면 유동 스트립이 하나 이상의 단백질 동형을 포함하는 고정화 구간을 포함하는 것인 측면 유동 장치.

청구항 65

제56항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 당화 단백질이 인간 단백질이고;

측면 유동 스트림이 비-인간 표적을 포함하며;

시약 혼합 영역이 비-인간 표적에 특이적으로 결합하는 대조군 표지된 결합 멤버를 포함하는 것인 측면 유동 장치.

청구항 66

제56항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표지가 형광성 또는 시간 분해 형광(TRF) 표지인 측면 유동 장치.

청구항 67

제56항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 멤버들의 표지가 동일한 표지인 측면 유동 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련된 특허 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2014년 3월 20일에 출원된 미국 가출원 제61/968,297호에 대해 우선권의 이익을 주장하며, 이는 참고로 통합되어 있다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 당화 단백질 분석에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 하기 논의는 단지 독자의 이해를 돕기 위해 제공되며, 논의된 정보 또는 인용된 참조문헌 중 어느 것이 본 발명의 선행기술이 된다는 것을 인정하는 것은 아니다.

[0006] 당뇨(병) 환자에서 혈당 농도의 조절은 상기 질환의 장기 미세혈관성 및 신경학적 합병증의 빈도 및 중증도를 감소시키는 것으로 나타났다. 당화 헤모글로빈의 형성 속도가 혈중 글루코오스 농도와 직접적으로 관련되는 것으로 밝혀졌다. 그 결과, 글루코오스 수준의 관리에서, 혈당 농도가 장기간에 걸쳐 얼마나 잘 관리되어 왔는지 결정하기 위해 당화 헤모글로빈이 사용된다.

[0007] 전형적으로, 적혈구의 평균 수명은 약 90-120 일이다. 따라서, 헤모글로빈의 퍼센트 당화의 결정은 상기 기간 동안, 및 특히 이전 2-3개월 동안의 평균 글루코오스 농도와 상관관계가 있다. 따라서, 퍼센트 당화 헤모글로빈은 상기 기간 동안의 혈당 조절의 지표이다.

[0008] 헤모글로빈 변이체, 예컨대 HbS, HbC, HbD, HbE는 더 짧은 평균 수명 및 상이한 당화 속도를 가질 수 있고 평균 글루코오스 농도에 대한 %HbA1C의 상관관계에 영향을 미칠 수 있으므로, HbA1C 결과의 임상적 가치를 야기한다.

[0009] 일반적인 변이체가 존재하는지 여부를 아는 것은, 특히 스크리닝 환경에서 혈당 조절을 평가할 때 중요한 인자이다.

[0010] 글루코오스는 혈액 내의 비-헤모글로빈 단백질, 예를 들면 풍부한 단백질인 알부민에 부착하는 것으로 또한 확인되었다. 알부민의 순환 반감기는 약 20일이므로, 당화 알부민의 농도(또는 비율)는 이전 2-3주 동안의 평균 글루코오스 농도의 척도이다.

[0011] 당화 단백질의 농도 또는 퍼센트를 결정하는 일부 방법들은 이들을 비-당화 단백질과 분리하기 위하여 당화 단백질의 탄수화물의 1,2 시스 디올에 결합하는 디하이드록시보릴 화합물을 이용해왔다. 상기 방법은 미국 특허 제4,269,605호, 제5,284,777호, 제5,110,745호, 제4,861,728호 PCT 출원 제WO 96/03657호), 및 PCT 출원 제WO 9840750호에 기재된 것을 포함하며, 이들은 그 전체가 참고로 본원에 통합되어 있다.

발명의 내용

- [0012] 본 발명은, 특히 당화 헤모글로빈을 포함한, 당화 단백질의 검출을 위한 분석 및 상응하는 장치 및 시약에 관한 것이다. 일반적으로 이해되는 바와 같이, 상기 검출은 당뇨 환자에서 혈당 수준의 관리에서 그리고 당뇨병 전증(pre-diabetic) 개체의 상태를 모니터링하는데 유용하다. 현장진단(point-of-care) 환경을 포함하는, 다양한 환경에서 사용될 수 있는 신속한, 고정밀 분석을 제공하는 분석법이 본원에 기술되어 있다.
- [0013] 본 발명은 퍼센트 헤모글로빈 A1C(즉, 당화 헤모글로빈)의 정확하고 정밀한 정량을 위한 분석 방식을 기술한다. 또한, 일부 구현예에서 이러한 다중 분석(multiplexed assay)은 시험되는 샘플 내에 일반적인 변이체가 존재하는지 여부를 검출할 것이다. 일부 구현예에서, 상기 분석은 헤모글로빈 A1C 및 총 헤모글로빈 모두를 별도로 측정하는 다음 상기 두 결과들의 비율을 구함으로써, 퍼센트 헤모글로빈 A1C에 대한 정량적 결과를 제공한다. 일반적인 헤모글로빈 변이체 HbS, HbC, HbD, 및 HbE는 정량적으로, 반-정량적으로, 또는 정성적으로 측정될 수 있다. 필요에 따라, 헤모글로빈 변이체 결과들은 조합되거나 별도로 표현되어, 각각의 변이체의 존재 또는 양이 제공된다. 그러한 검출은 당뇨 환자의 스크리닝에서 그리고 당뇨병 개체의 상태를 모니터링하는데 유용하다. 현장진단 환경을 포함하는, 다양한 환경에서 사용될 수 있는 신속한, 고정밀 분석을 제공하는 분석법이 본원에 기술되어 있다.
- [0014] 본 발명의 첫 번째 양태는 샘플 내 당화 단백질의 비율(fraction)을 결정하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 (i) 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드(즉, 당화된 또는 비당화된 형태, 예컨대, 당화된 또는 비당화된 헤모글로빈인지 여부에 관계없이 특정 단백질의 총량) 또는 비-당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인, 표지된 특이적 결합 멤버, 및 (ii) 당화 단백질(예컨대, 헤모글로빈 A1c) 또는 펩타이드에 특이적인, 표지된 특이적 결합 멤버를
- [0015] a. 당화에 민감한 상기 단백질 또는 상기 단백질의 펩타이드를 함유하는 샘플; 및
- [0016] b. 상기 단백질 또는 펩타이드 또는 상기 단백질 또는 펩타이드의 비당화 형태(version)로서, 이들 중 어느 것은 경쟁자 단백질이고 샘플로부터 유래되지 않으며, 일부 구현예에서 바이오티닐화된 형태; 및/또는
- [0017] c. 상기 단백질 또는 펩타이드의 당화 형태로서, 이들 중 어느 하나는 경쟁자 단백질이고 샘플로부터 유래되지 않으며, 일부 구현예에서 바이오티닐화된 형태
- [0018] 와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0019] 그리고 나서, 상기 방법은 당화 단백질(예를 들면, A1c)의 수준을 나타내는 적어도 제1 신호, 및 비당화 단백질 또는 총 단백질의 수준(예를 들면, 헤모글로빈(당화 및 비당화) 및 선택적으로 헤모글로빈 변이체의 총량)을 나타내는 제2 신호를 갖는 복수의 신호를 검출하는 것; 및 상기 샘플에서 당화된 상기 단백질의 비율의 표시로서, 당화 단백질 및 비-당화 단백질 간의 비율, 또는 당화 단백질 및 총 단백질 간의 비율을 결정하는 것을 포함한다. 상기 분석에서, 접촉은 경쟁적 결합 조건 하에서 수행되고, 제1 신호 및 제2 신호는 구별가능하며, 예를 들면, 공간적으로 또는 구별가능하게 상이한 신호(예를 들면, 상이한 파장의 발광된 빛 및/또는 상이한 시간적 방출 특성)이다.
- [0020] 일 양태에서, 상기 방법은:
- [0021] 1. a. 비당화 단백질(예를 들면, 헤모글로빈) 또는
- [0022] b. 상기 비당화 단백질을 특이적으로 나타내는 이의(a)의 펩타이드 단편;
- [0023] c. 또는 총(당화 및 비당화) 단백질(예를 들면, 당화 및 비당화 헤모글로빈);
- [0024] d. 또는 총(당화 및 비당화) 단백질을 나타내는 이의(c)의 펩타이드 단편
- [0025] 에 특이적인 제1 표지된 결합 멤버; 및
- [0026] 2. 상기 단백질 또는 펩타이드 단편의 당화 형태(예를 들면, 당화 헤모글로빈(HbA1c) 또는 당화 아미노산을 포함하는 이의 펩타이드)에 특이적인 제2 표지된 특이적 결합 멤버
- [0027] 를 제공하는 것을 포함한다.
- [0028] 상기 제1 및 제2 결합 멤버는 관심있는 단백질(예를 들면, 환자 혈액 샘플로부터 수득된 헤모글로빈)을 포함하는 혼합물에 접촉된다. 헤모글로빈 예에서, 인간은 일반적으로 어느 정도의 당화 헤모글로빈과 어느 정도의 비당화 헤모글로빈을 갖는다. 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 상기 단백질(관심있는 단백질)은 엔도펩티다아제로 전처리되어 단백질의 펩타이드 단편을 생성할 수 있다. 이 경우, 제1 및 제2 결합 멤버는 상기 펩타이드

단편을 포함하는 혼합물에 접촉된다.

- [0029] 이후, (i) 당화 및 (ii) 총 단백질 및 비당화의 상대적인 양이 검출될 수 있다. 경쟁적 분석에서, 결합 멤버 및 단백질 또는 펩타이드의 수득된 혼합물은 (1) 단백질 또는 펩타이드에 결합된 결합 멤버 및 (2) 미결합된 과잉의 결합 멤버로 구성된다. 이후, 과잉의 결합 멤버의 양이 검출된다. 미결합된 결합 멤버의 양은 혼합물 내의 표적 단백질 또는 펩타이드의 양에 반비례한다. 일부 구현예에서, 총 헤모글로빈 단백질에 특이적인, 표지된 특이적 결합 멤버는 ⁸KSAVTALWGKVV²⁰, ¹¹VTALW¹⁵, ⁴⁵FGDLSTP⁵¹, ⁷⁶AHLDNLKGTFFAT⁸⁷, ⁴⁹STPDAVMGNPKVKAHGKKVLGA⁷⁰, 및 ¹²²FTPPVQ¹²⁷로 이루어진 군으로부터 선택된 펩타이드에 특이적으로 결합한다.
- [0030] 분석 방식은 필요에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 결합 멤버(예를 들면, 항체)가 고정 지지체에 연결되며, 상기 고정 지지체는 임의로 표지될 수 있는 비드 또는 입자를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 결합 멤버 및 샘플로부터의 단백질 또는 이의 펩타이드의 혼합물에 측면 유동(lateral flow)이 적용되어 상기 혼합물을 미결합된 결합 멤버를 위한 포획 구간(capture zone)으로 이동시킨다. 예를 들면, 측면 유동 경로에서 제1 포획 구간은 제1 결합 멤버에 의해 인식되는 펩타이드를 포함할 수 있고, 이에 의해 미결합된 제1 결합 멤버를 고정화시킨다. 유동 경로에서 제2 포획 구간은 제2 결합 멤버에 의해 인식되는 펩타이드를 포함하여 제2 결합 멤버를 고정화시킬 수 있다. 제1 및 제2 포획 구간은 유동 경로 내에 동일하거나 상이한 위치에 있을 수 있다.
- [0031] 추가 구현예에서, 상기 혼합물은 단백질(예를 들면, 헤모글로빈 변이체)에 특이적인 부가적인 결합 멤버를 추가로 포함할 수 있다. 한 가지 예로서, 상기 혼합물은 HbS에 특이적인 제3 결합 멤버 및 HbC에 특이적인 제4 결합 멤버를 추가로 포함할 수 있다. 이들 결합 멤버 역시 고정 지지체에 연결될 수 있고 선택적으로 표지된다. 더욱이, 제3 및 제4 결합 멤버는 각 결합 멤버가 특이적으로 결합하는 펩타이드를 이용하여 측면 유동에서 고정화될 수 있다. 이것은 사용자가 샘플이 변이체 단백질을 갖는 공여자로부터 유래된 것인지 여부를 추가로 결정하게 해 줄 것이다.
- [0032] 일부 구현예에서, 상기 방법은 세포를 용해시켜 단백질(예를 들면, 헤모글로빈을 함유하는 적혈구)을 방출시키는 것 및/또는 단백질(예를 들면, 헤모글로빈 또는 알부민)을 적어도 부분적으로 변성시키는 것 및/또는 엔도펩티다아제(예를 들면, 펩신 또는 엔도프로테아나제 GluC(S. 아우레우스)) 소화를 이용하여 단백질의 N- 말단 펩타이드 또는 단백질의 관련된 폴리펩타이드를 방출시키는 것을 포함한다.
- [0033] 특정 구현예에서, 상기 단백질은 인간 헤모글로빈, 예를 들면, 헤모글로빈 A1c이다. 일부 구현예에서, 펩타이드는 인간 헤모글로빈 베타 사슬의 N-말단 펩타이드, 예를 들면, 5-14, 5-11, 5-8, 5-7, 5, 6, 7, 또는 8 아미노산 잔기 길이이다. 일부 구현예에서, 상기 단백질은 인간 혈청 알부민이고; 펩타이드는 인간 혈청 알부민의 N-말단 펩타이드, 예를 들면, 펩타이드 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-10, 4-8, 6-17, 6-16, 6-15, 6-14, 6-10, 6-8 아미노산 잔기 길이이다. 일부 구현예에서, 펩타이드는 인간 혈청 알부민 Lue585, Lys525, Lys199, Lys439, 또는 Lys281을 포함하고; 각각의 가능한 조합을 포함하여, 알부민 N- 말단 아미노산, Leu585, Lys525, Lys199, Lys439, 및 Lys281 펩타이드 중 2, 3, 4 또는 5개를 별도로 포함하는 펩타이드를 포함하는 복수의 펩타이드가 사용된다. 일부 구현예에서, 펩타이드는 엔도펩티다아제, 예를 들면, 펩신 또는 엔도펩티다아제 GluC를 이용하여 절단되고(예를 들면, 샘플에서 헤모글로빈 또는 알부민으로부터); 상기 펩타이드는 복수의 펩타이드, 예를 들면, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 상이한 펩타이드이다.
- [0034] 특이적 결합 멤버에 연결된 표지는, 예를 들면, 형광성, 시간 분해 형광(TRF; Time Resolve Fluorescence), 화학발광, 비색/흡광도 또는 성질상 전기적/산화환원일 수 있다. 전술한 바와 같이, 별개의 검출 구간들이 측면 유동 분석 장치 상에서 수행될 수 있고, 상기 장치는 헤모글로빈 A1C 또는 상응하는 펩타이드 서열을 위한 고정화 부위 및 비-당화 헤모글로빈 또는 상응하는 펩타이드를 위한 고정화 부위를 갖는 검출 구간을 포함하고, 신호는 별개의 구간들에서 검출된다. 변이체 검출을 위해 추가의 검출 구간이 포함될 수 있다. 이것은 4개의 모든 변이체를 위한 하나의 구간이거나 또는 각각의 특이적 변이체를 위한 별개의 구간일 수 있다. 일부 구현예에서, 각각의 특이적 결합 멤버는 동일한 표지(예를 들면, TRF)의 상이한 카피에 연결되고 측면 유동 장치(lateral flow device) 내의 상이한 포획 구간에서 상이한 결합 멤버를 포획함으로써 별도로 검출된다. 일부 구현예에서, 상기 표지로부터 검출된 신호는 인광이다.
- [0035] 일부 구현예의 경우, 분석 시약 세트는 또한 완충 용액을 포함하고; 분석 시약 세트는 또한 엔도펩티다아제, 예를 들면, 트립신, 펩신, 엔도펩티다아제 GluC, 파파인, 또는 프로틸 엔도펩티다아제를 포함한다.
- [0036] 특정 구현예에서, 제1 및 제2 결합 멤버 신호는 형광성 신호 또는 시간 분해 형광(TRF) 신호이다. 일부 구현예

에서, 검출은 측면 유동 분석 장치 상에서 수행되고, 상기 장치는 당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 결합 멤버를 위한 고정화 부위 및 총 단백질 또는 펩타이드(또는 비-당화 단백질 또는 펩타이드)에 특이적인 결합 멤버를 위한 고정화 부위를 갖는 검출 구간을 포함하고, 당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 결합 멤버에 상응하는 신호 및 총 단백질 또는 펩타이드(또는 비-당화 단백질 또는 펩타이드)에 특이적인 결합 멤버에 상응하는 신호는 별도로 검출된다. 일부 구현예에서, 분석 장치는 명시한 바와 같고, 당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 결합 멤버를 위한 고정화 부위 및 비-당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 결합 멤버를 위한 고정화 부위는 물리적으로 분리된다. 일부 구현예에서, 분석 장치는 상기에 명시된 바와 같으며, 당화 단백질 또는 펩타이드를 위한 고정화 부위 및 총 단백질 또는 펩타이드(또는 비-당화 단백질 또는 펩타이드)를 위한 고정화 부위는 동일하고, 제1 및 제2 신호는 상이하며 따라서 별도로 검출된다.

- [0037] 특정 구현예에서, 제1 및 제2 신호는 공여체 및 수용체 표지를 포함하는 발광성 산소 채널링 분석(Luminescent Oxygen Channeling assay; LOCI) 표지로부터 유래된다.
- [0038] LOCI를 이용하는 일부 구현예에서, 총 단백질 또는 펩타이드(또는 단백질 또는 펩타이드의 비당화 형태) 및 펩타이드의 당화 형태에 공여체 LOCI 표지가 고정화되거나 연결되며, 총 단백질 또는 펩타이드(또는 비-당화 단백질 또는 펩타이드)에 특이적인 특이적 결합 멤버 및 당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 특이적 결합 멤버에 수용체 LOCI 표지가 부착되고, 예를 들면, 공여체 LOCI 표지는 복수의 공여체 LOCI 표지 분자를 포함하는 비드(코팅될 수 있음)이거나 이를 포함하며, 복수의 단백질 또는 펩타이드가 상기 비드의 표면 상에 고정화되거나 고정화한다(예를 들면, 비드에 공유 결합으로 또는 바이오틴/스트렙타비딘 결합과 같은 특이적 결합으로).
- [0039] LOCI를 이용한 다른 구현예에서, 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드(또는 펩타이드의 비당화 형태) 및 펩타이드의 당화 형태에 수용체 LOCI 표지가 고정화되고, 총 단백질 또는 펩타이드(또는 비-당화 단백질 또는 펩타이드)에 특이적인 특이적 결합 멤버, 및 당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인 특이적 결합 멤버에 공여체 LOCI 표지가 부착된다.
- [0040] LOCI를 이용한 특정 구현예에서, 상기 분석은 균일 분석(homogeneous assay)으로서 수행되거나 또는 상기 분석은 미세 입자(또는 교환 면역분석) 분석의 균일한 현탁액을 이용하여 수행된다.
- [0041] 특정 구현예에서, 분석 시스템의 유효 범위 내에서 샘플 수준에 대해 계산된 당화 단백질 또는 펩타이드(예를 들면, HbA1c)의 변동 계수(coefficient of variation)는, 최소 20 반복 측정을 기준으로, 3.0, 2.7, 2.5, 2.3, 2.1, 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 1.5, 1.4, 1.3, 또는 1.2% 미만이다.
- [0042] 관련된 양태는 LOCI 분석을 위한 시약 세트에 관한 것이며, 이는 특정 단백질의 당화 형태 또는 당화 부위에서 당화된 이로부터 유래된 당화 펩타이드; 특정 단백질의 당화 형태에 특이적이거나 또는 제1 공여체 및 수용체 LOCI 표지 쌍의 제1 멤버와 연결된 이로부터 유래된 당화 펩타이드에 특이적인 특이적 결합체를 포함하는, 표지된, 특이적 결합체; 특정 단백질의 비-당화 형태에 특이적이거나 또는 제2 공여체 및 수용체 LOCI 표지 쌍의 제1 멤버와 연결된 이로부터 유래된 비-당화 펩타이드에 특이적인 특이적 결합체를 포함하는, 표지된, 특이적 결합체; 및 특정 단백질의 당화 형태 또는 이로부터 유래된 당화 펩타이드와 연결되거나 연결가능한 제1 공여체 및 수용체 LOCI 표지 쌍의 제2 멤버; 및 특정 단백질의 비-당화 형태 또는 이로부터 유래된 비당화 펩타이드와 연결되거나 연결가능한 제2 공여체 및 수용체 LOCI 표지 쌍의 제2 멤버를 포함한다. 제1 및 제2 공여체 및 수용체 LOCI 표지 쌍은 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0043] 일부 구현예에서, LOCI 공여체 표지는 비-당화 단백질 또는 펩타이드 및 상기 단백질 또는 펩타이드의 당화 형태와 연결되거나 연결가능하며, 예를 들면, 상기 LOCI 공여체 표지는 복수의 고정화된 단백질 또는 펩타이드, 또는 단백질 또는 펩타이드의 특이적 결합을 위한 복수의 결합 부위를 갖는 비드를 포함한다.
- [0044] 특정 구현예에서, 시약 세트 또는 이의 성분들은 분석 장치 내에 있으며; 상기 시약 세트의 성분들은 생체내에서 당화될 수 있는 특정 단백질 또는 당화 부위를 포함하는 이로부터 유래된 펩타이드를 함유하는 샘플과 조합된다.
- [0045] 일부 구현예의 경우, 분석 시약 세트는 또한 완충 용액을 포함하고; 상기 분석 시약 세트는 또한 엔도펩티다아제, 예를 들면, 트립신, 펩신, 엔도펩티다아제 GluC, 파파인, 또는 프로릴 엔도펩티다아제를 포함한다.
- [0046] 일부 구현예에서, 상기 특정 단백질은 인간 헤모글로빈이고; 상기 분석 시약 세트는 Hb A1c 펩타이드를 포함하며; 상기 시약 세트는 인간 헤모글로빈 베타 사슬의 N-말단 펩타이드, 예를 들면, 5-14, 5-11, 5-8, 5-7, 5, 6, 7, 또는 8 아미노산 잔기 길이를 포함하고; 상기 특정 단백질은 인간 혈청 알부민이며; 시약 세트 내의 펩타이드는 인간 혈청 알부민의 N-말단 펩타이드, 예를 들면, 펩타이드 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-10, 4-8, 6-17,

6-16, 6-15, 6-14, 6-10, 6-8 아미노산 잔기 길이이고; 시약 세트 내의 펩타이드는 인간 혈청 알부민 Lue585, Lys525, Lys199, Lys439, 또는 Lys281을 포함하며; 상기 시약 세트는 복수의 펩타이드를 포함하고; 상기 시약 세트는 각각의 가능한 조합을 포함하여, 알부민 N-말단 아미노산, Leu585, Lys525, Lys199, Lys439, 및 Lys281 펩타이드 중 적어도 2, 3, 4, 또는 5개를 별도로 포함하는 복수의 펩타이드를 포함하며; 상기 시약 키트는 첫 번째 양태에 대해 명시된 바와 같은 또는 본 발명에 대해 본원에서 달리 기술된 바와 같은 하나 이상의 시약을 포함한다.

[0047] 일부 양태에서 측면 유동 장치가 제공된다(예를 들면, 본원에 기재된 바와 같음). 일부 구현예에서, 측면 유동 장치는 하기 순서로 흐름 연동하도록 포함한다: 샘플 유입(intake) 영역; 엔도펩시다아제 영역(본원에 기재된 바와 같이 엔도펩시다아제를 포함하는 영역); 임의로, 중화 영역(예를 들면, 필요한 경우 산성 엔도펩시다아제 영역으로부터 나오는 용액을 중화시키는 시약을 포함하거나, 또는 임의로 엔도펩시다아제에 결합하거나 그렇지 않으면 이를 불활성화시키는 시약을 포함하는 영역); 하나 이상의 시약 혼합 영역; 하나 이상의 측면 유동 스트립(strip); 및 흡수 패드. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 시약 혼합 영역은: (i) 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드 또는 비-당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인, 표지된 특이적 결합 멤버, (ii) 당화 단백질 또는 펩타이드에 특이적인, 표지된 특이적 결합 멤버, 및 (iii) 상기 단백질 또는 펩타이드의 비-샘플-유래의 당화 형태를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 단백질은 인간 헤모글로빈이다. 일부 구현예에서, 상기 당화 단백질은 HbA1C이다. 일부 구현예에서, 총 단백질에 특이적인 표지된, 특이적 결합 멤버는 ⁸ KSAVTALWGKVV²⁰, ¹¹ VTALW¹⁵, ⁴⁵ FGDLS⁵¹, ⁷⁶ AHLNLTGTFAT⁸⁷, ⁴⁹ STPDVAVMGNPKVKAHGKLVGA⁷⁰, 및 ¹²² FTTPVQ¹²⁷로 이루어진 군으로부터 선택되는 펩타이드에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 상기 단백질 또는 펩타이드의 비-샘플-유래의 당화 형태는 바이오티닐화되며 하나 이상의 측면 유동 스트립 중 적어도 하나는 스트렙타비딘을 포함하는 고정화 구간을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 측면 유동 스트립 중 적어도 하나는 하기와 같은 별개의 고정화 구간을 포함한다: 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드를 포함하는 고정화 구간; 당화 단백질 또는 당화 펩타이드를 포함하는 고정화 구간. 일부 구현예에서, 동일하거나 상이한 측면 유동 스트립은 하나 이상의 단백질 동형(isoform)을 포함하는 고정화 구간을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 단백질 동형은 HbC, HbD Punjab, HbE, 또는 HbS 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나의 측면 스트립은 하기와 같은 별개의 고정화 구간, 즉 총 단백질 또는 총 단백질에 상응하는 펩타이드를 포함하는 고정화 구간; 당화 단백질 또는 당화 펩타이드를 포함하는 고정화 구간을 포함하고; 제2 측면 유동 스트립은 하나 이상의 단백질 동형을 포함하는 고정화 구간을 포함한다. 일부 구현예에서, 당화 단백질은 인간 단백질이고; 측면 유동 스트립은 비-인간 표적을 포함하며; 시약 혼합 영역은 비-인간 표적에 특이적으로 결합하는 대조군 표지된 결합 멤버를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 표지는 형광성 또는 시간 분해 형광(TRF) 표지이다. 일부 구현예에서, 결합 멤버의 표지는 동일한 표지이다.

[0048] 추가적인 구현예는 상세한 설명 및 청구항으로부터 명확해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 비율측정식(ratiometric) A1c 분석 셋업의 도식적 묘사이다. TRF-기능화된 항-Hb, 항-A1c 및 참조(대조군 표지된 결합 멤버) 비드의 혼합물이 펩신-소화된 혈액 샘플 및 바이오티닐화된 합성 A1c 펩타이드와 혼합된다. 상기 반응 혼합물은 모세관 작용에 의해 스트렙타비딘(A1c 검출을 위해), 합성 Hb 펩타이드(Hb 검출을 위해) 및 참조 항체로 스트립된 니트로셀룰로오스 막으로 이동된다. 방출된 Hb 및 A1c 펩타이드는 적절한 구간 동안 경쟁하여 펩타이드의 농도가 증가함에 따라 신호 감소를 야기한다. 참조 구간은 유동 불규칙성, 막 결합, 및 시약 농도에서의 변화를 정규화하는 신호를 제공한다. 표준 곡선에 따라, 분석물 구간(Hb, A1c) 신호 중 어느 것을 참조 구간 신호로 나누거나 또는 분석물 구간을 서로 나눔으로써 분석 신호가 획득될 수 있다.

도 2는 이 특정한 구성(configuration)에서 검출된 4개의 변이체에 대해 본원에서 "SCDE"로 지칭된, 헤모글로빈 변이체 검출 분석 셋업의 도식적 묘사이다. TRF-기능화된 항-HbS, 항-HbC, 항-HbD, 및 항-HbE 비드의 혼합물이 펩신-소화된 혈액 샘플과 혼합된다. 상기 반응 혼합물은 모세관 작용에 의해 합성 SCDE 펩타이드 접합체로 스트립된 니트로셀룰로오스 막으로 이동된다. 만약 SCDE 펩타이드 중 하나가 샘플 내에 존재하면, 적절한 구간에서 경쟁이 일어나 감소된 결합을 야기할 것이다. 각각의 동형의 존재/부재는 신호 수준에서의 어떠한 감소에 의해 결정된다.

도 3은 A1C 수준 및 환자가 헤모글로빈 변이체를 갖는지 여부를 검출하기 위한 검출 분석 구성의 도식적 묘사이다. 희석 완충제 저장소는 혈액 샘플과 혼합되는 희석제를 제공한다. 상기 혼합물은(예를 들면, 진공 또는 모세관 작용에 의해) 한 채널에서 엔도펩시다아제("펩신"으로 묘사됨)를 함유하는 챔버로 이동되고, 여기서 혈액 단

백질이 펩타이드가 된다. 수득한 펩타이드 혼합물은 중화 영역(중화 엔도펩시다아제 활성, 예를 들면, 펩신과 같은 산-활성 엔도펩시다아제를 불활성화시키기 위해 용액 pH를 변화시키는 중화 엔도펩시다아제 활성)으로 이동된 다음, 액상에서 결합 멤버(예를 들면, TRF-기능화된 항-Hb, 항-A1c 및 참조(대조군 표지된 결합 멤버) 비드) 및 경쟁자 A1c(예를 들면, 바이오티닐화된 합성 A1c 펩타이드)과 혼합된다. 상기 혼합물은 임의로 상이한 측면 유동 스트립으로 분할될 수 있고(또는 분할되지 않을 수 있음), 이들 중 하나는 헤모글로빈 및 A1c 및 참조 수준을 검출하고 이들 중 하나는 헤모글로빈 변이체 단백질이 존재하는 경우 이를 검출한다. 말단 패드(end pad)는 상기 반응으로부터 액체를 흡수함으로써 상기 액체를 스트립(들)을 가로질러 끌어당긴다.

도 4는 헤모글로빈 및 A1c의 비율측정식 측정의 이점을 입증하는 데이터의 선택을 제공한다. 상이한 그래프는 분석 내 변화를 감소시키는 다양한 정규화의 이점을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 본 발명은 특정 당화 단백질의 수준을 검출하는 분석 방법에 관한 것이다. 상기 방법은, 예를 들면, 개체(일반적으로 인간, 하지만 상기 방법은 다른 동물, 특히 다른 포유동물에게도 적용가능함) 내의 혈당의 평균 수준을 모니터링하는데 유용하다. 많은 방법들이 특정 시점에서의 글루코오스 수준을 결정하는데 이용될 수 있긴 하지만, 평균 수준을 경시적으로 모니터링할 수 있는 것이 또한 유용하다. 어떤 단백질, 특히 헤모글로빈 및 혈청 알부민의 당화 수준이 체내에서 특정 단백질의 평균 수명에 상응하는 이전 기간 동안의 평균 글루코오스 수준과 강한 상관관계가 있는 것으로 확인되었다. 혈액에서 헤모글로빈의 약 90-120일 수명 때문에, 당화 헤모글로빈은 이전 2-3 개월 동안(이전 1개월이 더 큰 가중치를 가짐)의 평균 글루코오스 수준의 지표로서 유용한 반면, 알부민은 이전 1-3주 동안의 글루코오스 수준의 지표로서 사용될 수 있다. 헤모글로빈 변이체는 혈액에서 상이한 수명을 가질 수 있기 때문에, 시험된 환자가 하나 이상의 헤모글로빈 변이체 형태를 갖는지 여부를 표시하는 것이 분석 해석에 유용할 수 있다. 헤모글로빈 동형의 양에 관한 정량적 또는 반-정량적 정보는 환자가 특정 변이체에 대해 이종접합성(heterozygous) 또는 동종접합성(homozygous)이라는 것을 나타낼 수 있고, 의사는 분석 결과를 평가할 때 이를 고려할 수 있다.

[0051] 따라서, 본 방법은, 예를 들면, 당화 헤모글로빈의 수준을 정량화하는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 당화 비-헤모글로빈 단백질, 예를 들면, 알부민의 수준을 정량화하는데도 사용될 수 있다. 대부분의 경우, 본 분석은 관심있는 특정 단백질에 대해, 비-당화 단백질에 대한 당화 단백질의 상대적인 양을 제공하도록 구성된다.

[0052] 하기 설명은 당화 헤모글로빈의 결정에 초점을 맞추고 있지만, 상기 방법은 다른 상응하는 물질 및 실험적으로 선택된 공정 조건과 더불어, 헤모글로빈에 특이적인 결합 분자를 다른 원하는 단백질에 특이적인 결합 분자로 대체하여 다른 당화 단백질의 검출에도 적용되는 것으로 인식되어야 한다. 상기 분석에서, 전장 단백질 또는 폴리펩타이드가 사용될 수 있음에도 불구하고, 많은 경우 종종 약 4-20 아미노산 잔기 길이의 짧은 펩타이드를 사용하는 것이 유용하다. 그러한 펩타이드는 적합한 절단 부위 특이성을 갖는 엔도펩시다아제를 이용하여 전장 폴리펩타이드로부터 절단될 수 있다.

[0053] 일부 양태에서, 헤모글로빈 변이체 검출과 더불어 퍼센트 당화 헤모글로빈(%HbA1C)의 결정이 제공된다. 상기 분석에서, 전장 단백질 또는 폴리펩타이드가 사용될 수 있음에도 불구하고, 일부 경우에는 종종 약 4-20 아미노산 잔기 길이의 짧은 펩타이드를 사용하는 것이 유용하다. 그러한 펩타이드는 적합한 절단 부위 특이성을 갖는 엔도펩시다아제를 이용하여 전장 폴리펩타이드로부터 절단될 수 있다. 펩타이드(폴리펩타이드 단편)의 검출은 분석의 정밀도 및 정확도를 개선할 수 있다.

[0054] A. 헤모글로빈 분석 구성

[0055] 본원에 기재된 분석 방식은 비제한적으로 하기를 포함하는 계획된 다양한 표지 및 검출을 사용하는데 적합하다: 형광성, 시간 분해 형광(TRF) 화학발광, 비색/흡광도 또는 전기화학적. 다중 결과(하나의 시험에서 다수의 결과)를 달성하기 위해, 이 분석 구성은 비-당화 Hb(또는 총 Hb) 및 당화 Hb(HbA1C)를 위한 별개의 결합/검출 구간을 갖는, 측면 유동 구성을 이용하여 수행될 수 있다.

[0056] 당화 헤모글로빈 분석의 2가지 상이한 구성이 개발되어 왔고, 이는 다른 당화 단백질 분석에 맞춰 조정될 수 있다. 첫 번째는 형광성, 인광, 또는 시간 분해 형광(TRF) 표지와 같은 발광성 표지를 이용한다. 이 분석 구성은, 다중화(multiplexing)가 사용될 수 있음에도 불구하고, 예를 들면, 일반적으로 Hb 및 당화 Hb(HbA1C)를 위한 별개의 결합/검출 구간을 갖는, 측면 유동 구성을 이용하여 수행될 수 있다. TRF 신호는 인광을 검출함으로써 검출될 수 있다. 일부 구현예에서, TRF 신호가 검출되고, 이로써 형광 또는 자가-형광이 최소화된다. 인광의 측정은 하나의 파장(예를 들면 자외선 영역 내)에서의 간헐적인 광학적 여기 및 또 다른 파장(일반적으로 가시적인

영역 내)에서 감쇠하는 발광 신호의 차후의 측정에 의해 달성될 수 있다. 이러한 방식으로, 상대적으로 긴 감쇠 시간(전형적으로 몇 마이크로초 내지 몇 초의 영역 내의 어디에서)을 갖는 인광이 상대적으로 짧은 감쇠 시간(예를 들면 전형적으로 1 마이크로초 미만)을 갖는 형광과 구별될 수 있다. TRF 신호의 검출의 예는, 예를 들면, 제PCT/GB2012/051645호에 기재되어 있다. 예를 들면, 제PCT/GB2012/051645호는 샘플의 발광 특성을 측정하는데 사용하기 위한 장치를 기술하며, 상기 장치는: 대조군 신호의 제어 하에, 샘플을 여기하는 방사선을 방출하는 여기 광 공급원; 상기 방출된 방사선의 세기를 조절하기 위해 상기 대조군 신호를 생성하는 신호 공급원(상기 대조군 신호는 상기 발광 특성의 기대된 특징적 시간 상수보다 적은 기간, 또는 동위의 기간을 갖는 제1 빈도에서의 제1 성분, 및 상기 발광 특성의 기대된 특징적 시간 상수보다 더 큰 기간을 갖는 제2 빈도에서의 제2 성분을 가짐); 상기 여기의 결과로서 상기 샘플로부터 방출된 방사선을 수신하고 상기 수신된 방사선의 세기를 나타내는 검출 신호를 생성하는 광검출기; 및 상기 검출 신호를 복조하여 상기 샘플의 상기 발광 특성을 나타내는 신호를 생산하는 복조기(demodulator)를 포함한다.

[0057] 다른 구성이 또한 사용될 수 있다. 두 번째는 근접 표지 방법, 일반적으로 발광성 산소 채널링 분석(LOCI)을 이용하여, 이는, 예를 들면, 분할 샘플 배열을 이용하여 또는 다중화를 이용하여 수행될 수 있다. 이들 구성 각각은 하기에 더 상세히 기재되어 있다.

[0058] **1. 샘플 처리**

[0059] 당화 헤모글로빈의 수준을 결정하기 위하여, 대부분의 경우, (인간) 혈액 샘플이 사용된다. 혈액 샘플 또는 재현된 세포는 적혈구 용혈제(예를 들면, 적합한 용혈 세제 또는 세제 조합)와 접촉되어 적혈구로부터 헤모글로빈을 방출한다. 많은 경우에, 샘플은, 예를 들면, 샘플 전처리로서, 분석 장치에 부가되기 전에 적혈구 용혈제와 접촉된다. 그러나, 그 대신에 용혈제가 분석 장치 내에 포함될 수 있다. 많은 상기 적혈구 용혈제는 공지되어 있으며, 예를 들면, 다양한 세제-함유 조성물이 사용될 수 있다. 적합한 적혈구 용혈제는, 예를 들면, 트리톤 X-100 및 Igepal CA-630을 포함하고, 그 외의 것들은 당해분야의 숙련자에게 공지되어 있으며 사용될 수 있다.

[0060] 적혈구의 용혈 외에도, 샘플 처리는 본래의 헤모글로빈을 변성시키는, 예를 들면, 헤모글로빈 사량체(tetramer)를 해리시키는 처리를 포함할 수 있고, 이는 베타 사슬을 추가로 변성시킬 수 있다. 예를 들면, 베타-사슬 N-말단 펩타이드를 상기 N-말단 펩타이드를 방출하는 절단에 더 잘 노출시키기 위해, 헤모글로빈을 낮은 pH(예를 들면, 약 pH 4 또는 1-3)에서 처리하는 것이 유익할 수 있다. 펩신 절단의 경우, 그러한 산성 조건(또는 더 심한 산성 조건)이 또한 펩신 활성화에 적절하다.

[0061] 또한, 상기 처리는 검출을 위한 Hb의 적절한 감소된 농도를 제공하기 위해 샘플의 희석을 포함할 수 있다. 상기 희석은 사용될 분석의 민감성 및 동적 범위와 양립가능하도록 선택된다.

[0062] 다른 단백질의 경우, 샘플 처리는 관심있는 단백질에 좌우될 것이다. 헤모글로빈은 적혈구의 내부 성분인 반면, 다른 당화가능한 단백질은 혈액 내에서 세포외이거나(예를 들면, 인간 혈청 알부민), 세포벽에 포매 또는 부착되거나, 또는 다른 유형의 세포에서 세포내이다. 예를 들면, 세포의 단백질의 경우, 예컨대 여과 또는 다른 세포 제거 방법에 의해, 샘플로부터 세포 성분을 제거하는 것이 종종 바람직할 것이다. 마찬가지로, 막에 포매 또는 부착된 세포막 단백질의 경우, 예를 들면, 적합한 세제를 이용하여 막으로부터 단백질을 방출하는 것이 종종 유용하다.

[0063] 헤모글로빈과 마찬가지로, 다중-성분 단백질을 변성시키고/거나 단백질 2차 및/또는 3차 구조를 적어도 부분적으로 변성시켜 결합 또는 절단 부위를 더 접근가능하게 만드는 것이 유용할 수 있다. 그러한 변성의 필요성은 각각의 특정 단백질, 및 적절한 변성제 및/또는 선택된 조건에 대해 쉽게 결정될 수 있다.

[0064] **2. 헤모글로빈 펩타이드 절단**

[0065] 상기에 명시된 바와 같이, 본 분석은 온전한 단백질 또는 폴리펩타이드 중 하나를 이용하여, 또는 단백질로부터 유래한 짧은 펩타이드를 이용하여 수행될 수 있다. 상기 분석이 온전한 헤모글로빈(서브유닛을 해리시키기 위해 일반적으로 변성됨)을 이용하여 수행될 수 있음에도 불구하고, 온전한 단백질 대신에 당화 펩타이드 단편의 검출이 본 방법에서 일반적으로 사용된다.

[0066] 헤모글로빈은 N-말단 베타-사슬 발린 잔기 상에서(일반적으로 본래의 사량체 구조에서 2개의 베타-사슬 중 단지 하나에) 주로 당화된다. 따라서, 샘플 처리는 또한 N-말단 발린을 포함하는 펩타이드 단편을 제공하기 위한 헤모글로빈의 절단을 포함할 수 있다. 이것은 적합한 펩티다아제(들), 예를 들면, 엔도펩티다아제, 예를 들면, 펩신 또는 엔도프로테이나제 GluC, 소화를 이용하여 달성될 수 있다. 선택된 펩티다아제(들) 및 소화 조건에

따라, 일부 구현예에서, 수득한 N-말단 베타 사슬 펩타이드는 약 5-11 잔기 길이일 것이다.

[0067] 절단을 위해 펩신을 사용할 때, 일반적으로 상기 용액은, 예를 들면, 약 pH 1.1 - 4.5(종종 약 pH 1.2 - 2.0)로 산성이 되며, 상기 절단은 실험적으로 결정된 적합한 시간 동안 진행된다. 펩신의 경우, 통상적으로 적합한 소화 시간은 37°C에서 약 0.1 내지 60분이며 특정 구현예에서 0.3-3.0분일 것이다. 펩신은 이후 pH를 약 pH 8.0으로 상승시킴으로써 변성을 통해 불활성화될 수 있다.

[0068] 엔도펩티다아제는 액체 또는 고형 제형으로서 샘플에 접촉될 수 있다. 예를 들면, 엔도펩티다아제는 액체 샘플에 의해 접촉될 때 쉽게 용해되는, 동결건조된 조성물 또는 그렇지 않은 경우 건조 조성물로서 제형화될 수 있다. 엔도펩티다아제 소화 후, 수득한 용액은 용액의 pH를, 예를 들면, pH 6-8, 예를 들면, 7.2-7.8, 예를 들면, 7.4로 상승시키기 위해 완충제와 접촉될 수 있다.

[0069] **3. 헤모글로빈 동형 검출**

[0070] 본 방법은 온전한 단백질(또는 온전한 서브-유닛)로서 다중 헤모글로빈 동형의 다중 검출 및 측정을 제공함으로써 또는 특징적인 동형 펩타이드(각 돌연변이된 잔기를 포함하는 구별가능한 펩타이드)를 검출함으로써 상당한 진전을 가능하게 하는 것으로 확인되었다. 일부 구현예에서, 특징적인 동형 펩타이드는 각각의 돌연변이된 잔기: HbC(E6K), HbS(E6V), HbE(E26K), 및 HbD Punjab(E121Q)를 포함한다. 헤모글로빈의 이들 동형에 대한 언급은 본 기술분야에서 표준이다. 추가 다형성 확인 없이 본원에서 HbD에 대한 언급은 HbD Punjab(HbD Los Angeles)를 의미할 것이다.

[0071] 가장 빈번하게 존재하는 헤모글로빈은 HbA(정상 성인 Hb)이며, 변이체 동형 HbC, HbD, HbE, 및 HbS가 인간 집단에서 다양한 빈도로 존재한다. 이러한 열거된 변이체 동형들 모두는 베타 사슬 내에 돌연변이를 포함한다. 관심 있는 동형은 복합체를 형성하는(예를 들면, TRF 검출을 위한 검출가능한 복합체를 형성하는 포획 및 표지화를 위해) 각 동형에 대해 우수한 특이성을 갖는(또는 더 유익하게는 특징적인 동형 펩타이드에 대해 우수한 특이성을 갖는) 항체를 이용하여 본 당화 헤모글로빈 분석에서 검출될 수 있다. 다양한 동형은 하나의 다중화된(multiplexed) 구간에서 또는 상이한 구간에서 검출될 수 있다. 항체 특이성 및 헤모글로빈 변이체는, 예를 들면, 미국 특허 제8,603,828 B2호에 기재되어 있다. 총 헤모글로빈을 검출하는 단클론성 항체는 HbA 및 헤모글로빈 변이체에 공통적인 에피토프에 결합하도록 선택될 수 있다. 비당화 헤모글로빈을 특이적으로 검출하는 단클론성 항체는 당화되지 않은 잠재적인 당화 부위를 갖는 헤모글로빈 펩타이드에 결합하도록 선택될 수 있다. 총 헤모글로빈 단백질을 정확하게 검출할 수 있는 항체를 형성하는데 유용한 예시적인 펩타이드는, 예를 들면, ⁸KSAVTALWGKVV²⁰, ¹¹VTALW¹⁵, ⁴⁵FGDLSTP⁵¹, ⁷⁶AHLDNLKGTFAI⁸⁷, ⁴⁹STPDAVMGNPKVKAHGKKVLGA⁷⁰, ¹²²F¹²⁷TPPVQ¹²⁷을 포함한다.

[0072] 상기 기재된 동형 검출은 HbF(α₂γ₂)에 의한 간섭이 없는 검출을 제공하는데, 각각의 베타-사슬(베타 사슬 펩타이드)이 HbF 내에 존재하지 않고 적절하게 동형-특이적인 베타 사슬이 HbF 단백질 또는 펩타이드에 결합하지 않을 것이기 때문이다.

[0073] A1c 펩타이드의 방출을 위해 사용된 바와 같은 펩신 소화가 또한 HbC, HbD Punjab, HbE, 및 HbS를 위한 적합한 특징적인 동형 펩타이드를 방출한다는 것이 또한 발견되었다. 그 결과, HbA1c, HbC, HbD, HbD, 및 HbS 중 어느 것 또는 모두에게 적합한 단일 소화가 단일 펩신 소화 반응에서 수행될 수 있다. 이것은, 특징적인 동형 펩타이드와의 특이적 결합에 기반한 차후의 동형 검출과 함께, 장치 내에서 수행될 수 있다.

[0074] A1c에 대한 소화는 또한 다른 동형으로부터 상응하는 N-말단 펩타이드를 방출할 것이다. 그 결과, A1c/비-당화 펩타이드 비율 결정은 상기 비율 결정에서 다른 Hb 동형을 포함할 것이다.

[0075] 특정 펩티다아제가 적합한 펩타이드(들)를 방출하는 것으로 확인되면, 다른 엔도펩티다아제가 또한 사용될 수 있다. 그러한 다른 펩티다아제를 이용할 때, 어떤 시점에 소화 반응을 종료시키는 것이 일반적으로 바람직할 것이다. 그러한 종료는 관심 있는 엔도펩티다아제에 적절한 상응하는 억제제 또는 다른 방법을 이용하여 달성될 수 있다. 일부 경우에, 2개 이상의 상이한 엔도펩티다아제를, 일반적으로 별도로, 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0076] **4. 측면 유동 HbA1c 분석**

[0077] 상기에서 명시된 바와 같이, 분석은 소화되지 않은 Hb 또는 베타 사슬로부터의 하나 이상의 펩타이드를 갖는, 측면 유동 구성을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 방법은, 비-경쟁적 분석을 구축하는 것이 또한 가능함에도 불구하고, 총 Hb 및 당화 Hb의 결정을 포함하는 경쟁적 분석으로서 수행될 수 있고, 이에 의해 HbA1C 대 총 Hb의

비율(백분율로서 표현될 수 있음)을 제공한다. 따라서, 상기 분석은 적어도 2가지 검출을 포함한다: 1) 총 Hb (또는 대안적으로 비-당화 Hb)의 결정; 및 2) 당화 Hb의 결정. 따라서, 일부 경우에, 상기 분석이 비-당화 Hb 및 당화 Hb의 수준을 결정한다 다음, 비-당화 Hb 및 당화 Hb의 합으로써 총 Hb가 결정된다. 이것은 비-당화 Hb 및 당화 Hb 값 모두가 동일한 유형의 분석을 이용하여 생성될 때 정밀도를 개선하는데 특히 유용할 수 있고, 이로써, 예를 들면 하기와 같은 비율을 이용할 때, 하나의 측정에서 발생하는 부정확성이 다른 측정에서의 유사한 오차를 "상쇄하거나" 또는 감소시킬 수 있다.

[0078] 이후, %HbA1C는 하기와 같이 계산될 수 있다:

[0079] $\%HbA1C = [HbA1C] / ([HbA1C + \text{비-당화 Hb}] \times 100$

[0080] $= [HbA1C] / [\text{총 Hb}] \times 100$

[0081] 이 부분의 설명은 경쟁자 펩타이드를 이용한 경쟁적 분석에 초점을 맞춘다. 일부 구현예에서, 총 Hb 결정을 위해, 샘플 Hb로부터 절단된 펩타이드(샘플) 및 비-당화 N-말단 펩타이드 경쟁자(샘플로부터 유래되지 않은 외인성 펩타이드, 종종 합성)는 비-당화 Hb 펩타이드, 예를 들면, 항-Hb 펩타이드 항체를 위한 표지된 특이적 결합제와의 결합에 대해 경쟁한다. 일부 구현예에서, 상기 펩타이드는 Hb의 아미노산 49-70으로 구성되거나 이를 포함하지만, 어떤 경우에 비-당화 Hb를 위한 결합제에 의해 인식된 에피토프의 전부 또는 일부를 포함하는 펩타이드이다. 상기 결합제는 표지될 수 있거나, 비드 또는 입자에 연결될 수 있거나, 또는 그 둘 모두일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 결합제는 고정화되거나 검출 구간에서 포획될 수 있다(예를 들면, 바이오틴-스트렙타비딘 결합을 이용하여 또는 결합 멤버가 고정화된 펩타이드에 특이적 결합함으로써). 상기 두 펩타이드(하나는 샘플로부터 유래되고, 하나는 경쟁자 펩타이드임)는 특이적 결합제와의 결합에 대해 경쟁하고 특이적 결합제에 대한 샘플 펩타이드 또는 경쟁자 펩타이드의 결합량이 검출된다. 이의 양태가 도 1에 예시되어 있다.

[0082] 예를 들면, 일부 구현예에서, 엔도펩티다아제로 처리되고 중화된 샘플은 총 단백질을 대표하는 펩타이드에 특이적인 표지된 특이적 결합 멤버와 접촉되고, 수득한 혼합물은 차후에 상기 특이적 결합 멤버와의 결합에 대해 경쟁하는 고정화된 펩타이드에 접촉된다. 상기 고정화된 펩타이드와의 결합은 샘플 내의 표적 펩타이드의 양에 반비례한다. 검출된 신호는 샘플 내의 총 Hb의 수준에 반비례 관계에 있다.

[0083] 유사하게, 동일한 반응에서, HbA1C 결정을 위해, 샘플 HbA1C로부터 절단된 N-말단 펩타이드(샘플) 및 당화 N-말단 펩타이드(샘플로부터 유래되지 않음, 보통 합성)가 HbA1C N-말단 펩타이드를 위한 표지된 특이적 결합제(예를 들면, 항체)와의 결합에 대해 경쟁한다. 상기 결합제는 고정화될 수 있거나 검출 구간에서 포획될 수 있다(예를 들면, 바이오틴-스트렙타비딘 결합을 이용하여). 상기 2개의 펩타이드는 특이적 결합제와의 결합에 대해 경쟁한다. 검출된 신호는 샘플 내의 비-당화 Hb의 수준에 반비례 관계에 있다.

[0084] 예를 들면, 일부 구현예에서, 엔도펩티다아제-처리되고 중화된 샘플이 당화 Hb를 대표하는 펩타이드(예를 들면, A1c)에 특이적인 표지된 특이적 결합 멤버와 접촉되고 수득한 혼합물이 차후에 상기 특이적 결합 멤버와의 결합에 대해 경쟁하는 A1c 펩타이드에 접촉된다. 상기 A1c 펩타이드는 초기에 고정화될 수 있거나 또는 또 다른 구현예에서, A1c 펩타이드는 바이오티닐화될 수 있다. 후자의 경우에, 샘플 내의 A1c는 결합 멤버와의 결합에 대해 경쟁자 A1c 펩타이드와 경쟁하고 차후에 경쟁자 바이오티닐화된 A1c 펩타이드가 고정화된 스트렙타비딘을 포함하는 구간에서 포획되고, 이로써 바이오티닐화된 경쟁자 A1c 및 바이오티닐화된 경쟁자 A1c에 결합된 임의의 특이적 결합 멤버를 포획한다. 상기 고정화된 펩타이드와의 결합은 샘플 내의 표적 펩타이드의 양에 반비례한다. 검출된 신호는 샘플 내의 A1c의 수준에 반비례 관계에 있다.

[0085] 비-당화 Hb 및 HbA1C를 위한 검출 구간은 두 가지 검출을 위해 동일한 표지가 사용되는 분석에서는 상이하지만, 상기 검출 구간은 구별가능한 신호를 제공하는 상이한 표지가 사용되는 분석에서는 동일할 수 있다.

[0086] Hb 변이체가 검출되는 양태에서, 샘플은 변이체에 특이적인 표지된 결합 멤버(예를 들면, 검출될 각각의 변이체를 위한 상이한 특이적 결합 멤버)와 접촉된 다음, 검출될 각각의 변이체를 위한 경쟁자 펩타이드에 접촉될 수 있다. 상기 논의된 분석과 마찬가지로, 일부 구현예에서, 각각의 변이체를 위한 경쟁자 펩타이드는 고정화될 수 있고, 경쟁자 펩타이드에 대한 표지된 특이적 결합 멤버의 결합은 샘플 내의 변이체의 양에 반비례한다. 변이체에 특이적인 표지된 결합 멤버는 총 및 당화 단백질이 검출되는 곳과 동일한 측면 유동 스트립에서 포획될 수 있거나, 또는 대안적으로 별개의 측면 유동 스트립에서 검출될 수 있다. 예를 들면, 도 2 및 3을 참고한다.

[0087] 일부 구현예에서, 혼합은 액상에서(예를 들면, 측면 유동 스트립 또는 패드가 아닌 미세유체 채널에서) 일어나고, 액상으로부터 측면 유동 스트립으로 직접 전달된다. 이러한 양태는 패드와 막 사이의 접합부가 입자 운동을 방해하여 일부 추가적인 부정확도를 야기할 수 있는, "건조 상"에서(즉, 패드 또는 막에서) 혼합이 일어나는,

표준 측면 유동 분석에서 일어날 수 있는 일부 문제를 피한다.

[0088] 일부 구현예에서, 대조군 결합 반응이 또한 수행될 수 있고, 상기 기재된 결합 반응으로부터의 신호를 정규화하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 결합 멤버 혼합물은 샘플 내에 존재할 것 같지 않은 표적에 특이적으로 결합하는 대조군 표지된 결합 멤버를 추가로 포함할 수 있다. 한 가지 예로서, 대조군 표지된 결합 멤버(예를 들면, 항체)는 상이한 종으로부터 단백질(예를 들면, 염소 IgG)에 대해 결합 특이성을 가질 수 있다. 대조군 표지된 결합 멤버는 용액의 나머지를 갖는 측면 유동에 전달될 수 있고, 그 다음 대조군 표지된 결합 멤버에 특이적으로 결합하는 단백질(예를 들면, 항-염소 IgG)을 포함하는 구간 내에서 포획될 수 있다. 결합량은 상당히 일정하게 유지되어야 하지만 특이적 결합 친화도 이외에 상기 분석에서의 변수에 따라 달라질 것이다. 상기 대조군으로부터 발생된 신호는 이후에 다른 표적 신호를 정규화하는데 사용될 수 있고, 이로써 분석에서의 변화를 감소시킨다.

[0089] **5. LOCI HbA1c 분석**

[0090] HbA1c 분석이 발광성 산소 채널링 분석(LOCI)를 이용하여 효과적으로 설계될 수 있음이 발견되어 왔다. 효과적인 구성은 경쟁적 분석 방식이다. 많은 경우에, 특이적 결합체가 절단 펩타이드와 먼저 접촉된 다음 합성 펩타이드와 접촉되지만, 그 순서는 뒤바뀔 수 있거나 상기 접촉은 동시일 수 있다.

[0091] 따라서, 경쟁적 LOCI 분석에서, 성분은 LOCI 공여체 또는 수용체 표지와 연결된(예를 들면, 스트렙타비딘/바이오틴 쌍을 이용하여, 표지에 결합되거나 또는 표지에 결합될 수 있는) 합성 또는 정제된 Hb 펩타이드, 및 유사한 합성 또는 정제된 A1c 펩타이드를 포함할 수 있다. 또한 각각 LOCI 공여체 또는 수용체 표지 쌍 중 다른 것과 연결된, 항-Hb 펩타이드 및 항-HbA1C 펩타이드 항체(또는 다른 특이적 결합체)가 존재한다.

[0092] 하나의 구성에서, 샘플은 샘플 처리 후 분할되어, Hb 펩타이드 및 HbA1C 펩타이드의 수준이 각각 별개의 공간 또는 위치에서, 예를 들면, 별개의 용액 부피에서 결정된다. 한 가지 예로서, 샘플은 별개의 웰에 놓여질 수 있거나, 또는 별개의 유동 채널 내로 유동할 수 있다.

[0093] 샘플을 분할하는 대안으로서, 상기 분석은, 예를 들면, 구별가능하게 상이한 과정에서 및/또는 구별가능하게 상이한 시간에 발광하는 LOCI 수용체 표지의 사용에 의해 다중화될 수 있다. 그러한 다수의 수용체가 공지되어 있으며 사용될 수 있다.

[0094] 일부 구현예에서, A1c 펩타이드를 이용하는 기본적인 분석은 비-당화 N-말단 펩타이드 및 당화 N-말단 펩타이드의 사용을 포함한다. 비-당화 N-말단 펩타이드 및 당화 N-말단 펩타이드는 별개의 경쟁적 결합 반응에서 사용될 수 있거나, 또는 다중화와 함께 단일 결합 반응에서 사용될 수 있다. 당화 펩타이드를 위한 반응이 기술될 것이고; 비-당화 펩타이드를 위한 반응은, 그것이 비당화 펩타이드에 특이적인 항체를 포함하는 것을 제외하고, 실질적으로 동일하다. 일부 구현예에서, 상기 펩타이드는 바이오틴과 연결되지만, 그 대신에 LOCI 공여체 비드에 직접 연결될 수 있다. 결합 혼합물은 또한 LOCI 수용체 표지와 연결된 항-HbA1C 펩타이드를 포함한다. (다른 반응은 항-Hb N-말단 펩타이드를 포함할 것임에 유의한다.) 이러한 시약과 절단된 당화 N-말단 펩타이드(HbA1C 펩타이드)를 함유하는 샘플이 합쳐지고, 절단된 N-말단 펩타이드 및 LOCI 공여체 표지와 연결가능하거나 연결된 펩타이드의 경쟁적 결합이 일어난다. 상기 결과는 항체-수용체 표지 접합체가 결합 반응 혼합물에서 이들의 각각의 수에 상응하는 상대적인 비율로 절단된 펩타이드 및 공여체 표지에 연결되거나 연결가능한 펩타이드에 결합될 것이라는 것이다.

[0095] LOCI 공여체 표지가 상기 표지에 적절한 파장의 빛과 접촉되는 경우, 상기 공여체 표지는 일중항 산소를 생성한다. 일중항 산소는 수성 매질에서 매우 짧은 수명을 가지기 때문에, 만약 공여체 및 수용체 표지 간의 거리가 짧으면, 즉, 만약 공여체 표지와 연결된 펩타이드가 항체-수용체 표지 접합체에 결합하면, 그것은 단지 수용체 표지로부터 발광을 유발할 것이다. 샘플로부터의 펩타이드와 결합된 항체-수용체 표지 접합체의 경우, 발광이 일어나지 않을 것인데, 왜냐하면 근접하게 연결된 LOCI 공여체 표지(즉, 일중항 산소 발생제)가 존재하지 않기 때문이다.

[0096] 그 결과, 상기 완료된 경쟁적 결합 혼합물이 LOCI 공여체 표지로부터 일중항 산소를 생성하는데 적합한 파장의 빛에 방사되는 경우, 발광된 광 신호의 세기는 상기 결합 반응 혼합물 내의 절단된 펩타이드의 농도와 반비례할 것이다. 따라서, 절단된 N-말단 펩타이드가 더 높을수록, 수득되는 신호는 더 작을 것이고, 반대로, 절단된 N-말단 펩타이드의 농도가 더 낮을수록, 수득되는 신호는 더 클 것이다. 당화 펩타이드에 상응하는 신호 및 비-당화 펩타이드에 상응하는 신호는 각각의 상대적 펩타이드 농도와 상관관계가 있다. 이후, 당화된 펩타이드의 비율은 하기와 같이 총 펩타이드에 대한 당화 펩타이드의 비율로서 계산될 수 있다:

- [0097] 당화된 비율 = $[gHb]/([gHb + Hb]) = [gHb]/([총 Hb])$
- [0098] 일부 경우에서, LOCI를 이용한 분석은 높은 정밀도를 제공하여, 최소 20 반복을 기준으로, 3.0, 2.7, 2.5, 2.3, 2.1, 2.0, 1.9, 1.8, 1.7, 1.6, 또는 1.5 % 미만의 CV를 갖는 계산된 HbA1c 백분율에 대한 결과를 제공한다.
- [0099] **6. HbA1c 분석 예**
- [0100] 분석은 측면 유동 방식으로 TRF 표지를 이용하여, 그리고 경쟁적 LOCI를 이용하여 수행되어 왔다.
- [0101] **펩신 소화 및 분석 준비**
- [0102] 펩티다아제 소화를 위한 조건은 상당히 달라질 수 있다. 펩신 조건의 예는 문헌[Thomas *et al.*, *Reg. Toxicol Pharmacol* 39 (2004) 87-98]에서 확인될 수 있다. 잠재적인 변형을 고려하여, Hb N-말단 펩타이드를 방출하기 위해 하기를 포함하는 다양한 조건이 시험되었다:
- [0103] 1. Hb(A1c 및 비당화 Hb 모두)는 5mg/mL(3x)로 희석된다.
- [0104] 2. 1mg/ml 펩신은 pH 1.3에서 84mM HCl, 35mM NaCl(모사 위액- SGF)에서 제조된다.
- [0105] 3. 100uL의 SGF는 12개의 튜브로 분배되고 37°C로 가열된다.
- [0106] 4. 6개의 튜브에 5uL의 총 Hb(5mg/mL)를 부가하였고, 마지막 튜브는 펩신이 없다.
- [0107] 5. 또 다른 6개 튜브에 5uL의 A1c(5mg/mL)를 부가하였고, 마지막 튜브는 펩신이 없다.
- [0108] 6. Hb 및 A1c 튜브 모두를 5, 10, 20, 30, 및 60분에 꺼내어 35uL의 0.2M NaHCO3 pH11로 켄칭한 다음 85°C에서 10분간 가열한다.
- [0109] **TRF 분석 예**
- [0110] 시험 분석을 위해, SGF를 이용한 소규모 소화를 사용한다. 이 소화 프로토콜에서, 2 μ l의 소화 샘플([Hb] = 180 μ g/ml)을 37°C에서 149 μ l SGF(펩신을 함유함), pH 1.3에 부가한다. 소화를 1분간 진행한 다음, 50 μ l 0.2M NaHCO3 pH11(또한 5 mg/ml의 프럭토실발린을 함유함)을 부가하여 최종 [Hb] = 1.8 μ g/ml를 제공함으로써 켄칭한다.
- [0111] 실제 분석을 위해, 16 μ l의 상기 소화물을 2 μ l의 TRF-항펩타이드 항체(5 μ g/ml) 및 2 μ l의 바이오티닐화된 펩타이드(20 μ g/ml)와 조합한다.
- [0112] 상기 혼합물을 스트랩타비딘 스트립을 갖는 분석 스트립에 적용한다. 항체는 상기 소화물로부터의 펩타이드 및 바이오티닐화된 펩타이드 모두에 경쟁적으로 결합하지만, 바이오티닐화된 펩타이드-Ab 복합체가 스트랩타비딘 스트립(분석 스트립의 포획 구간)에서 고정화될 것이다. 상기 분석은 정량적 당화 펩타이드 결과를 제공하기 위해 작동될 수 있거나, 또는 비율(예를 들면, 백분율) 결과를 낳기 위해 당화 및 비당화 펩타이드 모두를 이용하여 작동될 수 있다. 당화 및 비당화 펩타이드 모두가 분석되는 경우, 이들은 별도로(예를 들면, 단일 샘플 및 2 개의 상이한 스트립을 이용하여) 또는 다중화와 함께(예를 들면, 구별가능하게 상이한 과장에서 방출되는 표지를 이용하여 및/또는 구별가능하게 상이한 시간적 특성을 갖는 표지를 이용하여 또는 분석 스트립의 상이한 위치에서 포획함으로써) 작동될 수 있다.
- [0113] **감소된 분석 변화에서 비율측정식 측정 및 정규화 결과**
- [0114] 하나의 레인이 A1c 경쟁적 분석을 위해 준비되고 또 다른 레인은 변형된 항-A1c Ab와 혼합된 염소 항체-변형된 TRF 입자가 결합하여 참조 라인을 형성할 항-염소 항체를 포함한 비율측정식 분석이 설계되었다. 이 분석에서 사용된 스트립은 2개의 라인을 함유하였다: 스트랩타비딘 및 항-염소 항체. 항-A1c-TRF 비드를 바이오티닐화된 A1c 펩타이드와 혼합하고 스트랩타비딘 라인 상에서 소화된 A1c 캘리브레이터와의 결합을 억제함으로써 A1c 분석을 수행하였다. 항-염소 Ab를 제2 라인 위로 스트립하고, 지속적인 참조로서 제공하였다. 항-A1c-TRF 및 염소-TRF 비드를 혼합하고, 이들의 상대 농도를 조정하여 제로 억제에서 거의 동일한 신호를 야기하였다.
- [0115] 도 4는 상기 기술된 분석으로부터의 데이터를 제공한다. 총 Hb 및 Ref 신호를 독립적으로 측정한 경우, 변화가 각각 17 및 19% CV에서 측정되었다(도 4, A 및 B). Hb 신호를 참조 신호로 나눈 결과 CV가 7%로 감소하였다(도 4, C 및 D). A1c 및 Ref 신호를 독립적으로 측정한 경우, 변화가 각각 20 및 17% CV에서 측정되었다. Hb 신호를 참조 신호로 나눈 결과 CV가 8%로 감소하였다; (도 4, E 및 F). A1c 및 Hb 신호를 독립적으로 측정한 경우, 변화가 각각 20 및 19% CV에서 측정되었다. Hb 신호를 참조 신호로 나눈 결과 CV가 6%로 감소하였다.

[0116] Hb 변이체(동형)의 검출

[0117] Hb 동형을 함유하는 것으로 공지된 환자 샘플을 37°C의 모사 위액(SGF)에서 펩신으로 소화시켰다. 상기 소화된 샘플을 분석 희석제를 이용하여 총 500x로 희석하였다. 18 마이크로리터의 상기 샘플을 4개의 SCED 비드 유형을 함유하는 동결건조된 펠렛에 추가하였다. 상기 반응 혼합물을 HbS, HbC, HbD, 및 HbE 펩타이드로 스트립된 면역 크로마토그래피 막에 올렸다(도 2). 그리고 나서, 상기 스트립을 TRF 판독기에서 직접 판독하였다. 표 1은 평균 신호 HbAA 비-동형 음성 대조군 대비 스트립의 각 구간에 남아있는 퍼센트 신호를 보여주며, 이는 상이한 동형이 상기 분석에 의해 검출될 수 있음을 입증한다.

표 1

샘플	% 변이체	[Hb] g/dL	평균 HbE의 %	평균 HbD의 %	평균 HbC의 %	평균 HbS의 %
HbAA	NA	24	93%	111%	107%	91%
HbD	40%	12.8	97%	6%	100%	92%
HbD	41%	14.3	104%	6%	103%	85%
HbD	41%	15	85%	5%	90%	78%
HbD	41%	15.2	89%	5%	95%	81%
HbD	40%	14.3	87%	4%	95%	77%
HbD	26%	6.5	115%	9%	100%	81%
HbS	39%	16.7	115%	103%	101%	22%
HbS	39%	10.8	102%	106%	100%	21%
HbS	39%	14.1	75%	83%	90%	28%
HbS	36%	11.5	89%	93%	97%	21%
HbS	41%	11.6	96%	106%	99%	18%
HbC	36%	14.9	125%	121%	0%	92%
HbC	35%	14.4	93%	100%	8%	106%
HbE	25%	10.7	20%	86%	82%	93%
HbE	25%	13.1	30%	106%	102%	118%

[0118]

[0119] LOCI 분석 예

[0120] 상기 분석을 Hb A1c 펩타이드를 이용하는 LOCI 분석으로서 수행한 결과, 높은 정확성 결과가 획득되었다. 하기에서 "수용체"는 LOCI 수용체 표지를 지칭하고, "공여체"는 LOCI 공여체 표지를 지칭한다. LOCI 분석 예는 TRF 예와 동일한 소화를 사용하였다. 상기 분석을 수행하기 위해, 14 µl의 소화물을 2 µl의 수용체-항펩타이드 항체 복합체 용액(200 µg/ml), 2 µl의 바이오티닐화된 펩타이드 용액(2 µg/ml), 및 2 µl의 스트렙타비딘-공여체 접합체와 조합하였다. 상기 혼합물을 암실에서 1시간 동안 유지시킨 다음, 신호를 판독하였다. TRF 예와 마찬가지로, 당화 펩타이드 및 비-당화 펩타이드를 위한 분석이 수행될 수 있어서 신호는 별개의 위치에 있거나 신호는 다중화될 수 있다.

[0121] 7. 대안적인 분석 구성

[0122] 기술한 일반적인 분석 구성 외에도, 본 분석 일부는 다른 방식으로 구성될 수 있다.

[0123] 일부 양태에서, 상기 구성이 다른 당화 단백질에도 적용가능함에도 불구하고, HbA1C를 갖는 구성을 다시 예시할 때, 측면 유동 분석 또는 LOCI 방식의 분석은 관심있는 펩타이드, 예를 들면, 환자 샘플로부터의 HbA1C 펩타이드, 및 합성 경쟁자 A1c 펩타이드에 대한 제1 항체를 이용하여 수행될 수 있다. 측면 유동의 경우, 합성 A1c 펩타이드는 분석 스트립 상의 제1 위치에 고정되거나 또는 자유롭지만 고정가능하다(예를 들어, 합성 A1c 펩타이드가 바이오틴에 연결되고 스트렙타비딘에의 결합을 통해 위치에 고정될 수 있는, 스트렙타비딘-바이오틴 쌍

을 이용하여). 그 결과, 합성 A1c 펩타이드는 상기 제1 항체와 결합하고 상기 제1 위치에 고정화되거나 고정화 가능하다. 따라서, 합성 A1c 펩타이드 및 환자 샘플로부터의 절단된 A1c 펩타이드 간의 경쟁적 결합을 이용하여, 환자 샘플로부터의 절단된 펩타이드와 결합하지 않은 항-펩타이드 항체-표지된 접합체는 상기 고정화되거나 고정화가능한 합성 A1c 펩타이드에 결합할 것이다. 상기 합성 펩타이드에 고정화된 표지는 샘플 내의 A1c 펩타이드의 농도와 반비례하는 신호를 제공한다. 환자 샘플로부터의 절단된 펩타이드와 결합된 항체-표지 접합체는, 결합 모이어티(예컨대 바이오틴)를 갖지 않기 때문에, 제1 위치에서 결합하지 않을 것이다.

[0124] 일부 구현예에서, HbA1C에 특이적인 제2 항체가 또한 제공된다. 이 구현예에서, 환자 샘플로부터의 절단된 펩타이드에 결합된 제2 항체는 제2 위치에서 결합할 것이다. 만약 본질적으로 모든 제2 항체가 환자 샘플로부터의 절단된 펩타이드와 결합하도록 제2 항체의 농도가 적정되면, 제2 위치에서의 신호는 샘플 내의 절단된 펩타이드의 농도와 관련될 것이고, 따라서 이것은 최초 샘플 내의 HbA1C의 농도와 상관관계가 있을 수 있다. 이러한 방식으로, 제2 위치는 경쟁적 결합 및 제1 위치에서의 신호에 대한 검사 기준(check)으로서 작용한다.

[0125] 또 다른 대안은 항-당화 펩타이드 항체 및 전체 단백질 또는 전체 단백질과 상관된 펩타이드에 대한 항체의 사용을 포함한다. 그것은 또한 특정한 당화 펩타이드, 예를 들면, N-말단 펩타이드를 방출하는 단백질의 소화를 포함한다. 만약 전체 단백질에 대한 항체가 사용되는 경우, 일부 구현예에서 소화는 단지 부분적인 반면, 항-단백질 항체가 인식하기 위한 중요한 에피토프 구조는 유지된다. 만약 부가적인 소화가 사용되는 경우, 총 단백질과 상관된 제2 펩타이드에 대한 항체가 적합하다. 측면 유동 방식의 경우, 절단된 당화 펩타이드 및 부분적으로 소화된 단백질(또는 총 단백질과 상관된 다른 펩타이드)을 함유하는 소화 용액이 제1 위치에 고정화된 합성 펩타이드(또는 스트렙타비딘 또는 합성 펩타이드를 고정시키기 위한 다른 결합 멤버)를 갖는 스트립에 적용된다. 환자 샘플로부터의 절단된 당화 펩타이드는 고정가능한(예를 들면, 스트렙타비딘/바이오틴 쌍을 이용하여) 또는 고정화된 합성 펩타이드와 결합에 대해 경쟁한다. 그 결과, 제1 위치에서의 결합이 샘플 내의 절단된 펩타이드 농도에 반비례하는 신호를 야기한다. 제2 위치는 항체-단백질(또는 항체-제2 펩타이드) 접합체를 위한 고정화제를 함유한다.

[0126] LOCI를 이용한 분석은 또한 당화 펩타이드 및 총 단백질 또는 총 단백질과 상관된 펩타이드(특정 단백질에 대한)를 포함하는 이중 결정을 위해 설계될 수 있다. 그러한 분석에서, 성분들은 합성 당화 펩타이드와 연결되거나 연결가능한 LOCI 표지 쌍 중 하나 및 상기 펩타이드에 대한 항체와 연결된 LOCI 표지 쌍 중 다른 하나를 포함한다. 절단된 펩타이드는 표지된 항체에 대한 결합에 대해 합성 펩타이드와 경쟁한다. 전술한 바와 같이, 상기 신호는 절단된(샘플) 펩타이드 농도와 반비례한다. 당화 펩타이드의 검출은 총 단백질과 상관된 단백질 또는 펩타이드의 검출과 병행된다. 각각의 검출은 별개의 부피에서 수행될 수 있거나, 구별가능한 신호를 제공하는 다중화로 단일 부피에서 수행될 수 있다.

[0127] B. 알부민 분석 구성

[0128] 생체내에서 비-효소적으로 당화되는 또 다른 단백질은 인간 혈청 알부민이며, 이는 약 20일의 혈청 반감기를 갖는다. 알부민의 당화 수준의 결정은 당뇨병 관리에 유용한 방법으로서 제안되어 왔다.

[0129] 헤모글로빈 A1c 분석을 위해 기재된 상이한 구성들이 당화 알부민을 위해 사용될 수 있음에도 불구하고, LOCI 방법은 이 적용에 유익하다. 이전과 같이, 이 방법은 LOCI를 이용하며, 예를 들면, 분할된 샘플 구성을 이용하여 또는 다중화를 이용하여 수행될 수 있다. 알부민은 주로 4개의 부위에서 천연적으로 당화되고, N-말단이 우세한 것으로 보고되었다.

[0130] 상기 분석은 천연 당화 부위 중 하나 이상을 이용하도록 구조화될 수 있고, 천연 당화 부위, 예를 들면, 당화를 위해 접근가능한 라이신 잔기를 갖는 온전한 알부민 또는 펩타이드 단편을 이용할 수 있다. 일부 경우에, 선택된 당화 부위는 N-말단 및/또는 Lys525, Lys199, Lys439, 및 Lys281 중 하나 이상을 포함할 것이다. 나타낸 바와 같이, 이들 당화 부위 중 하나 이상 및/또는 다른 당화 부위를 포함하는 펩타이드 또는 펩타이드들이 선택되고 사용될 수 있다. 다른 당화 부위는, 예를 들면, 접근가능한 아르기닌 잔기 및 다른 접근가능한 라이신 잔기를 포함한다. 당화의 절대적 수준을 결정하는 대신에 하나 이상의 잔기에서 당화된 알부민의 비율을 결정하는 것이 유용하다. 당화된 비율을 이용하는 것은 많은 환자-대-환자 및 샘플 처리 가변성을 포함하는, 가변성의 일부 근원을 제거하는 것을 돕는다.

[0131] 다양한 당화 부위들은 상이한 속도로 당화될 수 있고 따라서 평균 혈당 농도에 따라 상이한 정도로 당화될 수 있다. 그 결과, 당화 패턴 및/또는 당화의 정도를 결정하기 위해 다수의 당화 부위들이 조합되어 사용될 수 있다. 단일 당화 부위 분석과 유사하게, 각각의 부위에 대해 당화 비율을 결정하는 것이 유용하다. 즉, 각각의 부

위에서 당화 잔기 대 비-당화 잔기의 비율이 결정된다. 낮은 혈당 수준에서는, 더 민감한 잔기 또는 잔기들, 예컨대 5-말단 잔기만이 당화될 것이다. 더 높은 혈당 수준에서는, 점차 더 큰 비율의 상기 더 민감한 잔기들이 당화될 것이고, 중간 정도의 민감한 잔기들이 당화되기 시작할 것이다. 훨씬 더 높은 혈당 수준에서는, 가장 민감한 잔기들이 훨씬 더 큰 정도까지 당화될 것이고, 점진적으로 더 큰 비율의 중간 정도의 민감한 잔기들이 당화될 것이고, 약하게 민감한 잔기들이 당화되기 시작할 것이다. 그 결과, 당화되는 잔기의 세트 각각의 당화 패턴 및/또는 정도가 평균 혈당 수준에 관한 확증적이고/거나 부가적인 정보를 제공하는데 사용될 수 있다. 이것은, 예를 들면, 상이한 의학적 또는 생활방식 개입 전략의 효능 및/또는 환자에 대한 위험을 모니터링하는데 유용할 수 있다.

[0132] C. 분석 정밀도 제어

[0133] 샘플 처리는 검출을 위한 분석물의 적절한 감소된 농도를 제공하는 샘플의 희석을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 희석은 사용될 분석의 민감성 및 동적 범위(dynamic range)와 양립가능하도록 선택된다. 신호의 적어도 4, 4.5, 또는 5 자릿수(orders of magnitude) 동적 범위, 또는 더욱더 큰 범위를 제공하는 분석을 이용하는 것이 유용하다.

[0134] 더 일반적으로, 적절한 샘플 희석, 표지 로딩, 및 넓은 동적 범위 검출 시스템에서 적절한 표지를 갖는 검출 구간 구축을 이용함으로써, 관련된(예를 들면, 임상적으로 관련된) 분석물 농도 범위가 검출가능한 신호 동적 범위 이상으로 확장되어, 향상된 임상 정밀도를 야기할 수 있다. 이러한 이점은, 큰 범위에서 상기 분석 및 검출 시스템으로 인한 부정확성이 상대적으로 일정하기 때문에, 수득될 수 있다. 따라서, 이를 수행함에 있어서, 시스템 노이즈가 유의미하게 더 높아지는 신호-농도 곡선 상의 구간을 피하는 것이 바람직하다. 이 접근법은, 예를 들면, 농도 범위의 관련 규모가 검출 시스템의 동적 범위보다 실질적으로 더 작은, 많은 분석 적용에서 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 만약 관련된 농도 범위가 1 또는 2 자릿수 넘게 확장하는 반면, 시스템의 신호 동적 범위가 5 자릿수이면, 1 또는 2 자릿수에 상응하는 신호가 상기 신호 범위의 5자리 넘게 확장될 수 있다.

[0135] 상기 신호-농도 곡선 기울기는 몇 가지 상이한 파라미터 중 어느 것을 조절함으로써 조정될 수 있다. 많은 경우에, 관심있는 최고 농도에 상응하는 신호가 검출 시스템의 동적 범위의 최상부에 또는 최상부 부근에 있도록(이것은 일반적으로 경쟁적-유형 분석의 경우에는 역전될 것임), 신호-농도의 기울기 및 위치는 조정된다. 이 방식으로, 상기 시스템의 전체 동적 범위가 이용될 수 있거나, 또는 적어도 관심있는 분석물 농도 범위에 상응하는 신호 범위를 낮은 신호 레짐(regime)으로부터 멀어지게 한다. 이것의 결과는 고유 시스템 노이즈의 상대적 효과를 감소시킬 것이다.

[0136] 높은 신호 지점은 다양한 방식으로 조정될 수 있다. 이들은, 예를 들면, 샘플 희석 및/또는 샘플 크기를 포함하고, 이는 샘플 내의 분석물의 양 및 이에 따라 검출을 위해 표지될 샘플의 양(분석 시스템이 분석물로 과부하되지 않는다고 가정함)을 조절한다.

[0137] 대안적으로 또는 부가적으로, 분석물 당 신호는, 예를 들면, 검출가능한 표지(즉, 표지 모이어티 당 상이한 신호 세기)의 선택, 신호 증폭, 포획 부위의 수의 조정, 및/또는 분석물 당 신호 생성 모이어티의 수의 조정의 해 조정될 수 있다.

[0138] 정의

[0139] "총 단백질"은 단백질이 당화되거나 당화되지 않는지 여부에 관계없이 샘플 내의 특정한(예를 들면, 헤모글로빈) 단백질의 총량을 지칭한다. "총 단백질에 상응하는 펩타이드"는 검출될 때 샘플 내의 단백질의 양을 대표하는 관심있는 단백질(예를 들면, 헤모글로빈)의 펩타이드 부분을 지칭한다. 그러한 펩타이드는 일반적으로 단백질의 당화를 위한 잠재적인 부위를 포함하지 않는 단백질의 일부일 것이다.

[0140] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "분석 장치"("분석 카트리지" 또는 간단히 "카트리지"로도 지칭됨)는 분석을 수행하는데 사용되는 장치를 지칭하며, 이는 샘플의 적용, 반응, 및 신호 관독을 위한 장치 상의 및/또는 장치 내의 위치(location)를 포함한다. 모든 분석 장치는 아니더라도 많은 분석 장치에는, 예를 들면, 대부분의 측면 유동 분석 장치 내에, 분석물이 고정화되는 위치 구간이 존재할 것이다.

[0141] 용어 "표지"는 생물학적 또는 생화학적 분석을 위해 일반적인 방식으로 사용되며, 존재하는 표지의 존재 또는 양의 검출을 제공하는 방식으로 직접적으로 또는 간접적으로 검출가능한 분자 또는 복합체의 모이어티를 지칭한다. 예는 형광단, 화학발광 모이어티, 흡광 모이어티, 공명 광 산란 입자, 효소, 등, 뿐만 아니라 특이적 결합 모이어티, 예컨대 검출을 위해 또 다른 모이어티를 연결하는데 사용될 수 있는 바이오틴을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "검출가능한 표지"는 용어 "표지"와 동등하다. 표지가 "직접적으로 검출가능하다"는 표

시는 상기 표지가 신호 생성에 직접 관여한다는 것을 의미한다(예를 들면, 특징적인 흡광, 반사, 또는 산란 특성을 갖는 형광단 또는 모이어티, 또는 방사성 모이어티). 그에 반해서, "간접적으로 검출가능한" 표지는 생성될 검출가능한 신호를 위한 적어도 하나의 추가적인 물질의 존재를 필요로 한다. 간접적으로 검출가능한 표지의 예는 착색성, 형광성, 또는 화학발광성 종을 생산하는 기질과 반응하는 효소, 및 특이적 결합 쌍 중 다른 것과 특이적으로 결합함으로써 신호를 생성하는 물질 또는 모이어티를 상기 비간접적 표지와 연결하는 특이적 결합 모이어티를 포함한다.

[0142] 용어 "완전-코팅된 표지"는 검출가능한 모이어티를 갖거나 포함하는 작제물, 종종 입자를 지칭하며, 이는 하기에 정의된 바와 같은 층상 표지이거나 또는 하기 표면, 예를 들면, 입자 표면에 실질적으로 완전하게 연결된 적어도 하나의 단백질 코팅을 갖는다(즉, "완전히 연결된 코팅 표지"). 대부분의 경우, 상기 단백질은 아민을 통해 완전히 연결될 것이고, 예를 들면, 이로써, 접근가능한 아민이 실질적으로 고갈된다. 대부분의 경우, 그와 같은 완전-코팅된 표지는 코팅된 입자 또는 고상 입자 코어를 갖지 않는 층상 작제물의 내부 부분을 본질적으로 완전히 덮는 하나 이상의 코팅물을 갖는다.

[0143] 용어 "층상(layered) 표지"는 검출가능한 모이어티를 갖거나 포함하는 작제물, 일반적으로 입자를 지칭하고, 이는 적어도 2층의 폴리머 물질 또는 물질들을 갖는다. 많은 경우에, 상기 층들 사이에 공유 연결이 존재한다. 대부분의 경우, 상기 층은 친수성일 것이다. 상기 층상 표지는 코어 입자, 예를 들면, 폴리스티렌 입자를 가질 수 있거나, 또는 코어 없이 형성될 수 있다. 검출가능한 모이어티는, 예를 들면, 상기 층에 의해 덮일 수 있고/거나, 층 내에 또는 사이에 분배될 수 있다. 상기 층에 의해 덮인 코어 입자 및 검출가능한 모이어티를 갖는 층상 표지의 경우, 검출가능한 모이어티는 코어 입자 내에 및/또는 코어 입자의 표면 상에 포매될 수 있다.

[0144] 용어 "단계적(staged) 표지"는 공유 결합된 단백질로 단백질 코팅된 작제물, 종종 입자를 지칭한다. 상기 단백질은 본질적으로 단백질 내의 적어도 하나의 유형의 작용기를 고갈시키는 방식으로 부착된다.

[0145] 그리고 나서, 추가의 작용기가, 예를 들면, 디설파이드 결합의 환원에 의해, 상기 단백질 내에 생성된다. 그러한 작제물, 예를 들면, 입자는 검출가능한 모이어티를 갖거나 포함한다. 상기 단백질 코팅은 디설파이드 결합의 환원으로부터 야기되는 -SH 그룹을 통해 또는 상기 환원된 디설파이드 결합으로부터 유래된 작용기를 통해 연결된 하나 이상의 추가의 모이어티를 갖는다. 그러한 추가의 모이어티는 다양한 유형, 예를 들면, 특이적 결합 쌍의 멤버(예를 들면, 항원-항체 쌍에 대한 항원, 또는 스트렙타비딘 쌍에 대한 바이오틴), 검출가능한 모이어티, 또는 추가의 코팅 중일 수 있고, 이는 동일하거나 상이한 단백질일 수 있거나 또는 상이한 유형, 예를 들면, 당류 또는 합성 폴리머일 수 있다.

[0146] 용어들 "측면 유동 분석" 및 "스트립 분석"은 시험 샘플이 모세관 작용을 통해 샘플 적용 구간으로부터 유체 싱크(sink) 내로 고상 기재(일반적으로 분석에서 사용된 액체에 불침투성인 지지 물질에 부착될 수 있는 막, 예컨대 니트로셀룰로오스)를 따라 유동하는, 분석 방식, 일반적으로 면역분석을 지칭하기 위해 동등하게 본원에서 사용한다. 상기 샘플은 통상적으로 검출 시약(통상적으로 샘플 적용 구간의 하류에 있는 시약 패드에서 건조됨; 통상적으로 유색 시약)과 접촉하며, 이는 샘플을 혼합하고 상기 고상 기재를 이송시켜 적절한 특이적 결합 모이어티(전형적으로 항체 또는 항원)로 전처리된 하나 이상의 라인 또는 구간을 만나게 한다.

[0147] 샘플에 존재하는 분석물에 따라, 상기 검출 시약은 시험 라인 또는 구간에 결합될 수 있다. 검출 라인 또는 구간을 통과한 후, 유체는 유체 싱크(통상적으로 흡수제) 내로 들어간다.

[0148] 용어 "분석물"은 시험관내 생물학적 분석을 위해 일반적인 방식으로 본원에서 사용되며, 분석에서 검출되고/거나 정량화되거나 또는 적어도 검출되고/거나 정량화되고자 하는 물질, 예를 들면, 이온, 분자, 또는 복합체를 지칭한다.

[0149] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "분석물-특이적 결합 시약" 및 "분석물-결합제"는 원하는 분석물에 특이적으로 결합하는 분자 또는 복합체를 지칭하고, 이는 다른 기능을 갖는, 예컨대 분자 또는 복합체를 표지시키는, 모이어티를 포함할 수 있다. 모든 구현에는 아니지만 일부 구현예에서, 상기 분석물-결합제는 분석물에 결합시 검출가능한 구조적 변화(예를 들면, 알로스테릭 구조적 변화)를 겪는다.

[0150] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 본원에서 사용되며, 원하는 결합 활성을 나타내는 한 온전한 단클론성 항체 및 다클론성 항체, 뿐만 아니라 유도체, 변이체, 단편 및/또는 이의 임의의 다른 변형을 포함하는 것으로 의도된다. 항체는 면역글로불린 분자 및 면역글로불린(Ig) 분자, 즉, 항원에 특이적으로 결합하는(항원과 면역 반응하는) 항원 결합 부위를 함유하는 분자의 면역학적으로 활성 부분을 포함한다. 이들은 비제한적으로, 다클론성, 단클론성, 키메라성, 단일 사슬, Fc, Fab, Fab', 및 Fab2 단편, 및 Fab 발현 라이브러리를 포함한다. 항

체 분자는 분자 내에 존재하는 중쇄의 특성이 서로 상이한 클래스 IgG, IgM, IgA, IgE, 및 IgD 중 어느 것에 관한 것이다. 이들은 IgG1, IgG2 등과 같은 서브클래스도 포함한다. 경쇄는 카파 사슬 또는 람다 사슬일 수 있다. 항체에 관한 본원에서의 언급은 모든 클래스, 서브클래스, 및 유형에 대한 언급을 포함한다.

- [0151] 항체는 다양한 공급원, 예를 들면, 그 중에서도 인간, 염소, 마우스, 토끼, 랫트, 양, 낙타과, 및 상어로부터 유래될 수 있다. 또한 키메라 항체, 예를 들면 하나를 초과하는 공급원, 예컨대, 마우스 또는 인간 서열에 특이적인 단클론성 항체 또는 이의 변형이 포함된다. 또한 낙타과 항체 또는 나노바디가 포함된다. 항체는 또한 다중-특이적, 예를 들면, 이중특이적(예를 들면, 다가, 또는 다량체) 항체 및 이의 기능적 단편을 포함한다. "항체" 또는 어떤 유사 용어에 관한 각각의 언급은, 본원에서 온전한 항체, 뿐만 아니라 이의 임의의 변형을 포함하는 것으로 이해될 것이다.
- [0152] 본 발명과 관련하여 사용된 바와 같이, 용어들 "당화" 및 "당화된" 등은 비-효소적 글리코실화를 지칭한다.
- [0153] "샘플에서 당화 단백질의 비율" 및 유사 용어에 관한 언급은, 특정한 확인된 단백질에 대하여, 당화 단백질의 수준 대 총 단백질의 수준의 비율, 또는 대안적으로 당화 단백질 대 비-당화 단백질의 비율을 의미한다. 상기 비율은 다양한 방식으로, 예를 들면, 전통적인 분수, 소수로서, 또는 백분율로서 표현될 수 있다. 많은 경우에, 당화 단백질, 비-당화 단백질, 및/또는 총 단백질의 수준의 결정은 상기 단백질의 펩타이드 단편을 이용하여 수행된다.
- [0154] 본 분석과 관련하여, 용어 "총 단백질"은 상기 단백질이 당화되거나 당화되는지 여부에 관계없이 특정 단백질의 수준을 지칭하며, 샘플 내의 또는 샘플이 얻어진 유기체(들) 내의 모든 단백질의 조합된 수준을 지칭하지 않는다.
- [0155] 단백질 또는 펩타이드가 "당화에 민감하다"는 표시는 상기 단백질 또는 펩타이드가 높은 혈당, 바람직하게는 임상적으로 유의미한 범위의 혈당의 조건 하에 생체내에서 당화될 수 있는 적어도 하나의 부위 또는 잔기를 함유한다는 것을 의미한다. 그러한 당화 부위의 비제한적인 예는 헤모글로빈 베타-사슬의 N-말단 아미노산이다. 많은 경우에, 노출된 라이신 잔기의 아민 측면 변화는 생체내에서 당화될 수 있다.
- [0156] 본 발명의 문맥에서, 샘플 단백질로부터 절단된 펩타이드("샘플 펩타이드"로 불릴 수 있음)가 언급되고 상기 샘플 펩타이드와 결합에 대해 경쟁하는데 사용된 펩타이드("경쟁적 펩타이드"로 불릴 수 있음)가 언급된다. 특정한 샘플 펩타이드의 경우, 경쟁적 펩타이드는 동일할 필요는 없지만(예를 들면, 그것은 상이한 길이일 수 있음), 대신에 그것은 분석에 중요한 특성, 예컨대, 항체 결합에 대해 실질적으로 동일하게 행동한다. 예를 들면, 샘플 단백질로부터 절단된 N-말단 펩타이드는 상응하는 경쟁적 펩타이드보다 더 길거나 더 짧을 수 있고/거나 상기 경쟁적 펩타이드는 바이오틴화되고 상기 샘플 펩타이드는 바이오틴화되지 않을 수 있지만, 둘은 상응하는 항체에 실질적으로 동등하게 결합할 수 있다.
- [0157] 상이한 동형을 갖는 단백질 또는 폴리펩타이드의 경우, "특징적인 동형 펩타이드"는 돌연변이된 잔기의 하나 또는 두 측면에 상기 폴리펩타이드에 상응하는 부가적인 아미노산 잔기와 함께 특정한 동형의 특징인 돌연변이된 잔기를 갖는 폴리펩타이드의 서열에 상응하는 서열을 포함하는 펩타이드이다. 예를 들면, HbS의 경우, 특징적인 HbS 동형 펩타이드는 발린 잔기의 하나 또는 두 측면 상에 인접한 Hb aa 서열과 함께 E6V 잔기를 포함할 것이다. 상기 용어는 전장 폴리펩타이드 및 합성 펩타이드로부터 소화된 두 펩타이드에 적용된다.
- [0158] 단백질 또는 펩타이드의 "비당화 형태" 및 상기 단백질 또는 펩타이드의 "당화 형태"가 본원에서 언급된다. "당화 형태"는 당화된 특정 단백질 또는 펩타이드를 의미하는 반면, "비-당화 형태"는 당화되지 않거나, 또는 적어도 관련된 분석에서 검출될 부위에서 당화되지 않은 동일한 단백질 또는 펩타이드를 지칭한다.
- [0159] 본 발명의 문맥에서, 용어 "경쟁적 결합 조건"은 특이적 결합 쌍의 멤버가 용액 또는 현탁액에서 접촉되는 분석 조건, 및 특이적 결합 쌍의 2개의 구별할 수 있는 멤버가 존재하여, 이들이 상기 특이적 결합 쌍의 동족 멤버에의 결합에 대해 서로 효과적으로 경쟁하는 분석 조건을 지칭한다. 예를 들면, Hb A1c 펩타이드 경쟁적 분석에서, 상기 조건은 샘플로부터의 N-말단 펩타이드가 상응하는 표지된 항체에의 결합에 대해 고정화된 또는 고정화가능한 N-말단 펩타이드와 효과적으로 경쟁하는 조건이다.
- [0160] 명세서에 인용된 모든 특허들 및 다른 참조문헌은 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련가의 기술 수준을 나타내며, 각각의 참조가 개별적으로 그 전체가 참고로 통합된 것과 마찬가지로 동일한 정도로, 임의의 표 및 도면을 포함하여, 그것의 전체가 참고로 통합된다.
- [0161] 당해분야의 숙련가는 본 발명이 언급된 목적 및 이점뿐만 아니라 그 안에 내재된 것을 얻는데 적합하다는 것을

쉽게 인식할 것이다. 현재 바람직한 구현예를 대표하는 것으로서 본원에 기재된 방법, 차이, 및 조성물은 예시적인 것이며 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다. 그 안의 변화 및 다른 사용이 당해분야의 숙련가에게 일어날 것이며, 이는 본 발명의 사상에 속하며, 청구항의 범위에 의해 정의된다.

[0162] 본 발명의 범위 및 사상을 벗어나지 않으면서 본원에 개시된 본 발명이 다양하게 치환 및 변형될 수 있음이 당해분야의 숙련가에게 쉽게 자명할 것이다. 예를 들면, 사용된 특정한 표지가 변형될 수 있다. 따라서, 그러한 추가의 구현예는 본 발명의 범위 및 하기 청구항의 범위에 속한다.

[0163] 본원에 예시적으로 기재된 본 발명은 본원에 명시적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재하에 적합하게 실행될 수 있다. 따라서, 예를 들면, 본원에서의 각각의 경우에, 용어들 "포함하는", "본질적으로 이루어지는" 및 "이루어지는"은 다른 2개의 용어들 중 하나로 대체될 수 있다. 이용된 용어들 및 표현들은 설명하는 용어로서 사용되며 제한하는 용어가 아니고, 상기 용어들 및 표현들의 사용시에 나타내고 기재된 특징 또는 이의 부분의 어떤 등가물을 배제하고자 하는 것이 아니며, 청구된 발명의 범위 내에서 다양한 변형이 가능한 것으로 인식된다. 따라서, 본 발명이 바람직한 구현예 및 선택적인 특징에 의해 명시적으로 개시되었음에도 불구하고, 본원에 개시된 개념의 변형 및 변화가 당해분야의 숙련가는 본원에 개시된 개념의 변형 및 변화에 의지할 수 있으며, 상기 변형 및 변화는 첨부된 청구항들에 의해 정의된 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 간주되는 것으로 이해되어야 한다.

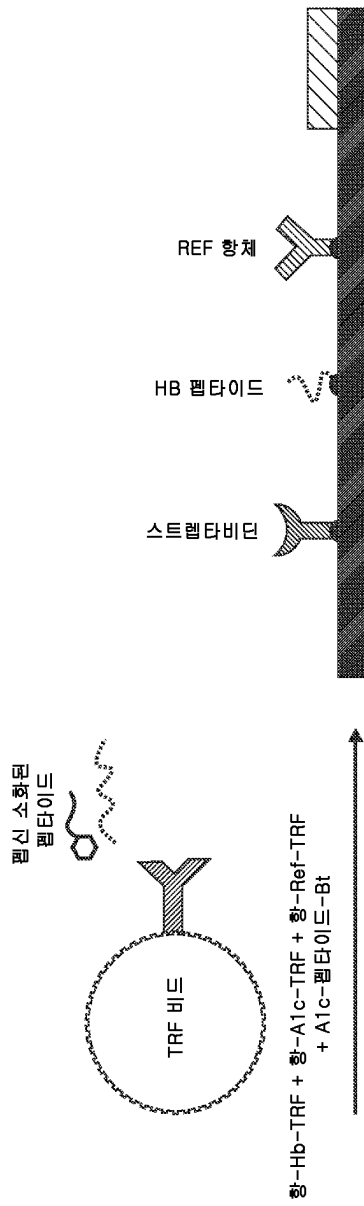
[0164] 또한, 본 발명의 특징 또는 양태가 마쿠쉬 그룹 또는 다른 대안적인 그룹화 측면에서 기술되는 경우, 당해분야의 숙련가는 본 발명이 또한 마쿠쉬 그룹 또는 다른 그룹의 어떤 개별적인 멤버 또는 멤버들의 하위그룹의 측면에서 기술된다는 것을 인식할 것이다.

[0165] 또한, 달리 명시되지 않는 한, 다양한 수치 또는 수치 범위 종료점이 구현예를 위해 제공되는 경우, 추가의 구현예는 임의의 2개의 상이한 값을 범위의 종료점으로서 취하거나 또는 명시된 범위로부터의 2개의 상이한 범위 종료점을 추가적인 범위의 종료점으로서 취함으로써 기술된다. 그러한 범위는 또한 기재된 발명의 범위 내에 속한다. 또한, 1을 초과하는 수치를 포함하는 수치 범위의 명시는 상기 범위 내의 각각의 정수 값의 명시적 설명을 포함한다.

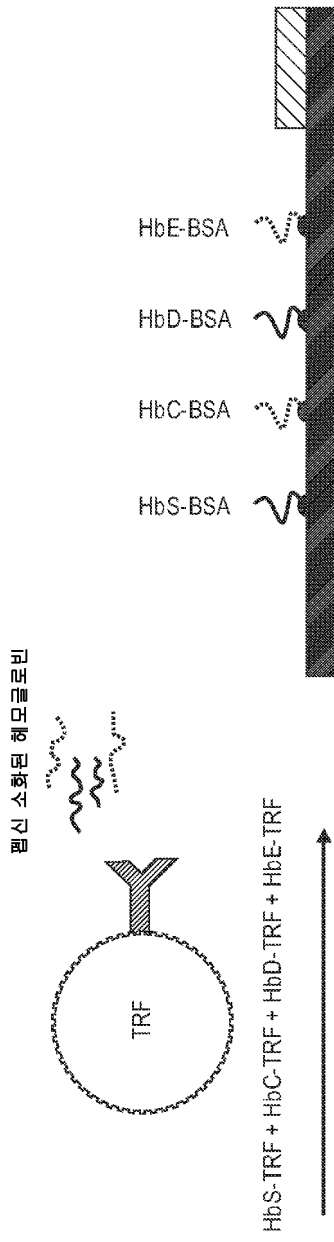
[0166] 따라서, 추가의 구현예는 본 발명의 범위 내에 속하며 하기 청구범위 내에 속한다.

도면

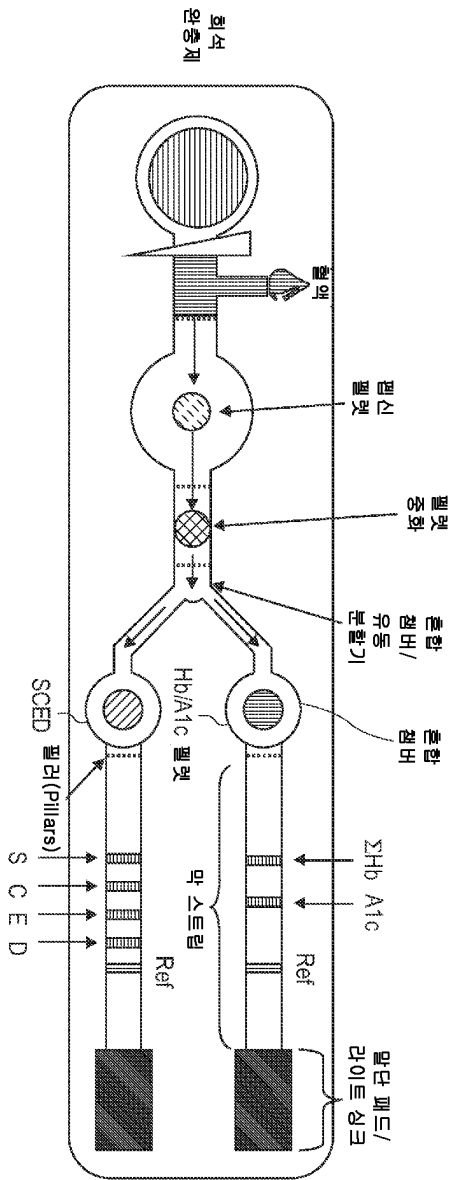
도면1



도면2



도면3



도면4

