



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2007-0105967  
(43) 공개일자 2007년10월31일

(51) Int. Cl.

*C12Q 1/68* (2006.01) *C12Q 1/00* (2006.01)

- (21) 출원번호 10-2007-7012526
- (22) 출원일자 2007년06월01일  
심사청구일자 없음  
번역문제출일자 2007년06월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2005/040133  
국제출원일자 2005년11월03일
- (87) 국제공개번호 WO 2006/137932  
국제공개일자 2006년12월28일
- (30) 우선권주장  
60/624,950 2004년11월03일 미국(US)

(71) 출원인

아이리스 몰레큘라 다이아그노스틱스, 인코오포레이티드

미국 91311 캘리포니아주 챗스워스 이튼 애비뉴 9172

(72) 발명자

아담스, 토마스

미국 92067 캘리포니아주 란쇼 산타 페 엘 부엘로 17645

자블론스키, 에드워드

미국 92029 캘리포니아주 에스콘디도 엘핀 포레스트 로드 20748

(74) 대리인

양영준, 양영환

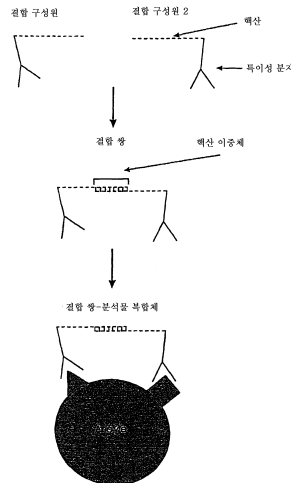
전체 청구항 수 : 총 54 항

**(54) 균질 분석물 탐지**

**(57) 요약**

본 발명은 균질하고 민감한 분석물 탐지에 유용한 핵산 탐지 마커를 포함하는, 한정되고 제한된 안정성의 신규한 결합 쌍 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 분석물, 특히 임상적으로 관련된 분석물을 민감하고도 균질하게 탐지하는 방법을 제공한다. 본 발명의 결합 쌍을 제조하고 본 발명의 방법을 수행하기 위한 키트가 또한 제공된다.

**대표도** - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

제1 핵산과 커플링된 제1 특이성 분자를 포함하는 제1 결합 구성원과,  
제2 핵산과 커플링된 제2 특이성 분자를 포함하는 제2 결합 구성원 (여기서, 제1 핵산과 제2 핵산은 한정되고 제한된 안정성을 지닌 이중체를 형성한다)  
을 포함하는 결합 쌍.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 제1 특이성 분자와 제2 특이성 분자가 각각 독립적으로, 수용체, 리간드, 및 항체로 이루어진 군 중에서 선택되는 결합 쌍.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 제1 특이성 분자가 제1 항체이고, 제2 특이성 분자가 제2 항체인 결합 쌍.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 제1 항체와 제2 항체가 모노클로날 항체인 결합 쌍.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 제1 항체와 제2 항체가 동일한 항원 상의 에피토프와 독립적으로 상호 작용하는 결합 쌍.

### 청구항 6

제4항에 있어서, 제1 항체와 제2 항체가 샌드위치 쌍을 차지하는 결합 쌍.

### 청구항 7

제4항에 있어서, 제1 특이성 분자와 제2 특이성 분자가 상이한 분자와 상호 작용하는 결합 쌍.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 상이한 분자가 단일 세포 상의 2개의 수용체인 결합 쌍.

### 청구항 9

제1항에 있어서, 제1 핵산과 제2 핵산이 단일 가닥 핵산인 결합 쌍.

### 청구항 10

제1항에 있어서, 제1 핵산이 서열 1을 포함하고, 제2 핵산이 서열 2 또는 서열 3을 포함하는 결합 쌍.

### 청구항 11

제1항에 있어서, 제1 핵산과 제2 핵산이 각각 독립적으로, DNA, RNA 및 PNA로 이루어진 군 중에서 선택되는 결합 쌍.

### 청구항 12

제1항에 있어서, 제1 핵산과 제2 핵산 중의 하나 이상이 키메라 DNA/RNA 분자인 결합 쌍.

### 청구항 13

제9항에 있어서, 제1 특이성 분자가 제1 핵산의 5' 말단과 커플링되고, 제2 특이성 분자가 제2 핵산의 5' 말단과 커플링되는 결합 쌍.

### 청구항 14

제13항에 있어서, 이중체가 제1 핵산의 종결 3' 말단과 제2 핵산의 3' 말단 간에 형성되는 결합 쌍.

**청구항 15**

제9항에 있어서, 제1 특이성 분자가 제1 핵산의 5' 말단과 커플링되고, 제2 특이성 분자가 제2 핵산의 3' 말단과 커플링되는 결합 쌍.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 이중체가 제1 핵산의 종결 3' 말단과 제2 핵산의 내부 서열 간에 형성되는 결합 쌍.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 핵산 하이브리드가 PCR, LCR, SDA 또는 TMA에 의한 증폭에 적합한 결합 쌍.

**청구항 18**

(a) 분석물을 제공하는 단계;

(b) (i) 제1 핵산과 커플링된 제1 특이성 분자를 포함하는 제1 결합 구성원과,

(ii) 제2 핵산과 커플링된 제2 특이성 분자를 포함하는 제2 결합 구성원 (여기서, 제1 핵산과 제2 핵산은 한정되고 제한된 안정성을 지닌 이중체를 형성한다)

를 포함하는 결합 쌍을 제공하는 단계;

(c) 이러한 결합 쌍을 분석물과 접촉시킴으로써, 복합체를 형성하는 단계;

(d) 이중체를 해리시키는 단계;

(e) 제1 핵산과 제2 핵산이 재연합될 수 있게 함으로써, 재형성된 이중체를 생성시키는 단계;

(f) 이와 같이 재형성된 이중체의 3' 말단을 연장시키는 단계; 및

(g) 재형성된 이중체를 탐지함으로써 분석물을 탐지하는 단계

를 포함하는, 특정 분석물을 탐지하는 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 단계 (d)가 복합체를 이중체의 용점 보다 높은 온도로 가열하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 20**

제18항에 있어서, 복합체가 염을 포함하는 수성 용액에서 형성되고, 단계 (d)가 이러한 수성 용액의 염 농도를 감소시키는 것을 포함하는 방법.

**청구항 21**

제18항에 있어서, 단계 (d)가 복합체를 희석시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 22**

제18항에 있어서, 단계 (g)가 재형성된 이중체를 포함하는 핵산 분자를 증폭시키고, 이러한 증폭 생성물을 탐지하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 증폭이 PCR, LCR, SDA 또는 TMA에 의해 수행되는 방법.

**청구항 24**

제22항에 있어서, 증폭이, 단계 (f)에서 재형성된 이중체의 3' 말단을 연장시킴으로써 생성된 부위하고만 결합하는 프라이머를 사용하여 PCR함으로써 수행되는 방법.

**청구항 25**

제22항에 있어서, 증폭 생성물이, 에티뎀 브로마이드로의 염색, 은 염색, 자가방사선 촬영술, 도트 블롯팅, 슬롯 블롯팅, 및 서던 블롯팅으로 이루어진 군 중에서 선택된 방법에 의해 탐지되는 방법.

**청구항 26**

제20항에 있어서, 재형성된 이중체를 탐지하는 것이, 탐지 분자를 제1 단일 가닥 핵산, 제2 단일 가닥 핵산, 결합 쌍의 이중체 영역, 및 증폭 생성물 중의 한 가지 이상 내로 혼입함으로써 수행되는 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 탐지 분자가 형광성 분자, 형광 켄처 (quencher) 분자, 화학발광성 화합물, 화학발광성 켄처 분자, 생물발광성 분자, 방사성 분자 및 형광성 뉴클레오티드로 이루어진 군 중에서 선택되는 방법.

**청구항 28**

제18항에 있어서, 제1 핵산과 제2 핵산 중의 하나 이상이 키메라 DNA/RNA 분자이고, 단계 (c)의 복합체가, 단계 (d)에서 복합체를 해리하기에 앞서 RNase로 분해되는 방법.

**청구항 29**

(a) 제1 단일 가닥 핵산과 커플링된 전립선 특이적 항원 상의 제1 에피토프에 대해 유도된 모노클로날 항체를 포함하는 제1 결합 구성원과, 제2 단일 가닥 핵산과 커플링된 전립선 특이적 항원 상의 제2 에피토프에 대해 유도된 모노클로날 항체를 포함하는 제2 결합 구성원을 제공하는 단계 (이러한 제1 단일 가닥 핵산은 제2 단일 가닥 핵산과 혼성화함으로써, 핵산 이중체를 통하여 연결되는 결합 쌍을 형성한다);

(b) 이 결합 쌍을, 용액 중에 PSA를 포함하는 샘플과 접촉시킴으로써, 결합 쌍-PSA 복합체를 형성하는 단계;

(c) 상기 결합 쌍-PSA 복합체를 가열하여 핵산 이중체를 해리시키는 단계;

(d) PSA와 결합된 결합 구성원을 재연합시킬 수는 있지만, 용액 중의 자유로운 과량의 결합 구성원은 실제적으로 재연합시킬 수 없는 조건 하에 상기 결합 쌍-PSA 복합체를 항온 배양하는 단계; 및

(e) 결합 쌍 이중체를 탐지함으로써 PSA를 탐지하는 단계

를 포함하는, PSA를 탐지하는 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 제1 모노클로날 항체와 제2 모노클로날 항체가 함께, PSA에 대한 모노클로날 항체의 샌드위치 쌍을 형성하는 방법.

**청구항 31**

제29항에 있어서, 샘플이 혈액 샘플, 혈청 샘플, 혈장 샘플 또는 조직 샘플로 이루어진 군 중에서 선택되는 방법.

**청구항 32**

제29항에 있어서, 제1 단일 가닥 핵산이 서열 1을 포함하고, 제2 단일 가닥 핵산이 서열 2 또는 3을 포함하는 방법.

**청구항 33**

제29항에 있어서, 단계 (c)가 45°C 하에 수행되고, 단계 (d)가 실온 하에 수행되는 방법.

**청구항 34**

제29항에 있어서, 탐지 단계가 이중체 영역을 증폭시키는 것을 포함하는 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서, 증폭 단계가

- (a) DNA 폴리머라제를 이용하여 이중체의 3' 말단을 연장시키는 단계 (이러한 연장으로 인해 하나 이상의 프라이머 결합 부위가 생성된다); 및
- (b) 단계 (a)의 하나 이상의 프라이머 결합 부위에 대해 상보적인 하나 이상의 프라이머를 사용하여 상기 연장된 이중체 상에서 폴리머라제 연쇄 반응을 수행하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 36**

- (a) 하나 이상의 세포를 포함하는 샘플을 제공하는 단계;
- (b) 제1 단일 가닥 핵산과 커플링된 세포 상의 에피토프에 대해 유도된 항체를 포함하는 제1 결합 구성원과, 제2 단일 가닥 핵산과 커플링된 세포 상의 에피토프에 대해 유도된 항체를 포함하는 제2 결합 구성원을 제공하는 단계 (이러한 제1 단일 가닥 핵산은 제2 단일 가닥 핵산과 혼성화함으로써, 핵산 이중체를 통하여 연결되는 결합 쌍을 형성한다);
- (c) 이 결합 쌍을 상기 샘플과 접촉시킴으로써 결합 쌍-세포 복합체를 형성하는 단계;
- (d) 핵산 이중체를 해리시키는 단계;
- (e) 세포와 결합된 결합 구성원을 재연합시킬 수는 있지만, 자유로운 과량의 결합 구성원은 실제적으로 재연합시킬 수 없는 조건 하에 상기 이중체를 향한 배양함으로써, 재형성된 이중체를 생성시키는 단계; 및
- (f) 이와 같이 재형성된 이중체를 함유하는 핵산을 탐지함으로써 세포를 탐지하는 단계를 포함하는, 세포를 탐지하는 방법.

**청구항 37**

제36항에 있어서, 세포가 세균성 세포, 동물 세포, 식물 세포 및 진균성 세포로 이루어진 군 중에서 선택되는 방법.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 동물 세포가 인간 세포인 방법.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 인간 세포가 병든 세포인 방법.

**청구항 40**

제36항에 있어서, 제1 핵산이 서열 1을 포함하고, 제2 핵산이 서열 2 또는 3을 포함하는 방법.

**청구항 41**

제36항에 있어서, 제1 항체와 제2 항체가 폴리클로날 항체인 방법.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 제1 항체와 제2 항체가 동일한 폴리클로날 항체의 분취액인 방법.

**청구항 43**

제36항에 있어서, 단계 (d)가 용액을 가열하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 가열이 약 45°C 하에 수행되는 방법.

**청구항 45**

제43항에 있어서, 가열이 이중체의 용점 보다 높은 온도에서 수행되는 방법.

**청구항 46**

제36항에 있어서, 단계 (e)가 복합체를 회석시키고; 회석된 복합체를 실온에서 항온 배양하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 47**

제46항에 있어서, 복합체가 10배 이상 회석되는 방법.

**청구항 48**

제46항에 있어서, 복합체가 100배 이상 회석되는 방법.

**청구항 49**

제36항에 있어서, 단계 (f)가, 재형성된 이중체를 포함하는 핵산을 증폭시키는 것을 포함하는 방법.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 증폭 단계가

(a) 폴리머라제를 이용하여 이중체의 3' 말단을 연장시키는 단계 (이러한 연장으로 인해 하나 이상의 프라이머에 대한 결합 부위가 생성된다); 및

(b) 단계 (a)에서 생성된 결합 부위에 대해 상보적인 하나 이상의 프라이머를 사용하여 상기 연장된 이중체 상에서 폴리머라제 연쇄 반응을 수행하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 51**

제50항에 있어서, 하나 이상의 프라이머가 서열 4 또는 5를 포함하는 방법.

**청구항 52**

제36항에 있어서, 제1 핵산이 그의 3' 말단을 통하여 제1 항체와 커플링되고, 제2 핵산이 그의 5' 말단을 통하여 제2 항체와 커플링되는 방법.

**청구항 53**

제52항에 있어서, 제1 핵산과 제2 핵산 중의 하나 이상이 스페이서를 통하여 그의 각각의 항체에 부착되는 방법.

**청구항 54**

(a) 특정 분석물을 포함하는 샘플을 제공하는 단계;

(b) 제1 단일 가닥 핵산과 커플링된 분석물과 상호 작용하는 항체를 포함하는 제1 결합 구성원 (이러한 제1 단일 가닥 핵산은 5' DNA 서열과 3' RNA 서열을 포함하고, 제1 단일 가닥 핵산은 그의 5' 말단을 통하여 결합 구성원과 커플링된다)을 제공하는 단계;

(c) 제2 단일 가닥 핵산과 커플링된 분석물과 상호 작용하는 항체를 포함하는 제2 결합 구성원 (이러한 제2 단일 가닥 핵산은 그의 3' 말단을 통하여 결합 구성원과 커플링된 DNA를 포함하고, 제2 단일 가닥 핵산은 제1 단일 가닥 핵산과 혼성화함으로써, DNA-DNA 하이브리드와 DNA-RNA 하이브리드 둘 다의 영역으로 이루어진 핵산 이중체를 통하여 연결되는 결합 쌍을 형성한다)을 제공하는 단계;

(d) 이 결합 쌍을 상기 샘플과 접촉시킴으로써 결합 쌍-분석물 복합체를 형성하는 단계;

(e) 복합체를 RNase로 분해시키는 단계;

(f) 핵산 이중체를 해리시키는 단계;

(g) 분석물과 결합된 결합 구성원을 재연합시킬 수는 있지만, 자유로운 과량의 결합 구성원은 실제적으로 재연합시킬 수 없는 조건 하에 용액을 향한 배양함으로써, 재형성된 이중체를 생성시키는 단계;

(h) 재형성된 이중체의 3' 말단을 연장시키는 단계 (이러한 연장으로 인해 하나 이상의 PCR 프라이머 결합 부위가 생성된다);

(i) 단계 (h)에서 생성된 하나 이상의 PCR 프라이머 결합 부위와 결합하는 하나 이상의 프라이머를 사용하여 PCR함으로써, 상기 재형성된 이중체를 포함하는 핵산을 증폭시키는 단계; 및

(j) 증폭시킨 단계 (i)의 핵산을 탐지함으로써, 분석물을 탐지하는 단계를 포함하는, 분석물을 탐지하는 방법.

## 명세서

### 기술 분야

<1> 본 발명은 샘플 중에서 특정 분석물의 존재 여부 또는 농도를 결정하기 위한 방법, 조성물 및 키트에 관한 것이다.

### 배경 기술

<2> 임상 화학 분야에서는 질병을 진단하고 모니터링하기 위해 생물학적 유체 중에서 단백질, 약물, 유기체 및 기타 분석물의 농도를 결정하는 것이 요망되었다. 예를 들어, 심근 경색 동안에는 심장으로부터 단백질이 방출된다. 이와 같이 방출된 단백질이 존재하는지의 여부, 방출된 단백질의 농도 및 방출 시간 과정을 탐지하는 것이 심장 발작을 진단하는데 도움을 줄 수 있다.

<3> 임상적으로 가장 관련이 있는 것으로 현재 생물학적 유체 중에서 탐지되고 있는 단백질은 1 피코그램/ml 초과 농도로 존재한다. 예를 들어, 전립선 특이 항원 (PSA)은 전립선 질환을 탐지하는데 유용한 혈청 단백질이며, 이는 정상적으로는 약 0 내지 4 ng/ml의 농도로 남성에게 존재한다. PSA 수준이 4 ng/ml를 초과하면 전립선 질환, 특히 전립선 암에 걸린 것인지 의심된다. 이러한 농도 범위는 통상적인 면역검정 기술에 의해 용이하게 탐지된다. 그러나, 전립선 제거 후에는 PSA 농도가 통상적인 기술에 의해 탐지 가능하지 않은 수준으로 떨어진다. 전립선 제거 수술을 받은 적이 있는 암 환자에서 PSA 수준이 증가하는 것은 병이 재발되었다는 지표이다. 이들 환자를 모니터링하기 위해서는 펨토그램 (femtogram)/ml 민감도를 지닌 검정이 요구된다.

<4> 인간 종에게는 대략 35,000개 유전자와 500,000개 정도로 많은 단백질이 존재하는 것으로 추정된다. 유전자에 비해 단백질이 보다 더 다양한 것은 전사 후 변형 (예: 스플라이싱) 및 해독 후 변형 (예: 인산화, 당화) 때문일 수 있다. 이러한 변형은 단백질 기능을 상당히 변경시킬 수 있다. 따라서, 포착하기 어려운 정도의 차이라도 임상적으로 관련될 수 있다. 2D 겔에서 수 천개의 반점이 관찰된 경우일지라도 인간 혈장에서는 단지 290개의 단백질의 확인 (동정)되었다. 인간 혈장 프로테오 (proteome)은 현 기술로는 탐지할 수 없을 정도로 낮은 농도로 존재하는 단백질을 수 십만개 함유할 수 있다. 이들 단백질의 대부분을 탐지하는 방법은 현재 이용 가능하지 않다.

<5> 저 농도로 존재하는 특성의 분석물을 탐지하는 것의 어려움은 임상 검정에서 활용될 수 있는 비교적 작은 샘플 크기로 인해 더 곤란해진다. 따라서, 단백질 분석물을 알아보기 위한 대부분의 면역검정은 비균질 방법론, 예를 들어 ELISA (효소 결합 면역흡착 검정)에 의존하는데, 여기서는 항체-결합된 분석물을 결합되지 않은 분석물로부터 물리적으로 격리시킨다. 비균질 탐지 방법은 복잡하고, 결합되지 않은 분석물로부터 결합된 분석물을 격리시키는 데에는 여러 가지의 단계 (예를 들어, 고체 상에 결합시키는 단계, 및 반복된 세척 단계)가 필요하다. 이들 단계는 비-특이적 결합을 유발시키고 민감도가 떨어지기 때문에, 비용이 많이 들고 시간 소모적이다. 따라서, 비-특이적 결합을 피하고 고도의 민감도를 수반한 균질 검정이 요망된다.

<6> 소분자, 예를 들어 약물에 대한 균질 면역검정 (결합된 종과 자유 종을 물리적으로 격리시킬 필요가 없는 검정법)이 보고된 바 있다. 이들 검정에는 특히, SYVA's FRAT<sup>®</sup> 검정, EMIT<sup>®</sup> 검정, 효소 채널링 면역검정, 및 형광 에너지 전이 면역검정 (FETI) (공급처: Dade Behring, Deerfield, Illinois); 효소 역체제 면역검정 (공급처: Hoffman LaRoche and Abbott Laboratories); 형광 편광 면역검정 (공급처: Dandlicker)이 포함된다. 이들 방법 모두는 제한된 민감도를 지니며, FETI와 효소 채널링을 포함한 몇 가지 방법 만이 대형 다중-에피토프성 분석물에 적합하다. 따라서, 생물학적 및 임상 샘플 중에 존재하는 대형 및/또는 복합 분석물을 탐지할 수 있는

민감하고도 균질한 방법에 대한 필요성이 대두되고 있다.

**<7> 발명의 요약**

- <8> 본 발명은 제1 핵산과 커플링된 제1 특이성 분자를 포함하는 제1 결합 구성원과, 제2 핵산과 커플링된 제2 특이성 분자를 포함하는 제2 결합 구성원 (여기서, 제1 핵산과 제2 핵산은 한정되고 제한된 안정성을 지닌 이중체를 형성한다)을 갖는 결합 쌍을 제공한다.
- <9> 특정 양태에서는, 제1 특이성 분자와 제2 특이성 분자가 수용체, 리간드 또는 항체일 수 있다. 이들 특이성 분자는 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 한 양태에서는, 본 발명의 특이성 분자가 단일 세포 상의 2개 수용체와 상호 작용한다. 또 다른 양태에서는, 제1 특이성 분자와 제2 특이성 분자 둘 다가 모노클로날 항체인데, 이들은 동일한 항원 상의 상이한 에피토프와 결합함으로써 샌드위치 쌍을 포함할 수 있다.
- <10> 본 발명의 결합 쌍의 제1 핵산과 제2 핵산은 전형적으로, DNA, RNA, 또는 PNA일 수 있는 단일 가닥의 핵산이지만, 부분적으로는 이중 가닥 핵산 또는 그의 유사체일 수 있다. 본 발명의 특정 양태에서는, 이들 핵산 중의 적어도 하나가 키메라 DNA/RNA 분자이다. 본 발명의 핵산은 그들의 5' 말단 또는 3' 말단을 통하여 커플링될 수 있다. 본 발명의 한 국면에서는, 결합 쌍의 하나의 핵산이 그의 5' 말단을 통하여 커플링되고, 다른 핵산은 그의 3' 말단을 통하여 커플링된다. 이들 핵산 간의 이중체는 핵산들의 종결 말단 간에 형성될 수 있거나, 또는 내부 핵산 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 양태에서는, 상기 핵산이 PCR, LCR, SDA, 또는 TMA에 의해 증폭시킴에 적합하다.
- <11> 본 발명은 또한, 결합 구성원들을 사용하여 분석물을 탐지하는 방법을 제공한다. 한 양태에 따르면, 상기 언급된 바와 같은 결합 쌍을 분석물과 접촉시켜 복합체를 형성시킨다. 이어서, 이러한 결합 쌍 핵산을 해리시킨 다음, 재-연합시킨다. 주로 분석물-결합된 결합 쌍에서 발견되는 재형성된 이중체의 3' 말단을 연장시킨 후, 이와 같이 재형성된 이중체를 전형적으로, 이러한 이중체를 포함하는 핵산을 PCR에 의해 증폭시킴으로써 탐지할 수 있다. PCR 프라이머가 재형성된 이중체의 3' 말단을 연장시킴으로써 생성된 부위하고만 결합하고, 결합 구성원 자체의 핵산하고는 결합하지 않는 경우에 배경이 상당히 저하될 수 있다.
- <12> 증폭 생성물은 에티뮴 브로마이드로의 염색, 은 염색, 자가방사선 촬영술, 도트 블롯팅, 슬롯 블롯팅, 서던 블롯팅, 및 형광성 분자, 형광 켄처 (quencher) 분자, 화학발광성 화합물, 화학발광 켄처 분자, 생물발광성 화합물 또는 형광성 뉴클레오티드의 혼입을 포함한 각종 방법들 중의 어느 한 가지 방법에 의해 탐지할 수 있다.
- <13> 본 발명의 한 양태에서는, 결합 쌍 핵산 중의 하나가 키메라 DNA/RNA 분자이고, 다른 하나는 DNA 분자인데, 이들 두 핵산 간에 형성된 이중체는 짧은 DNA/DNA 하이브리드 영역과 보다 긴 DNA/RNA 하이브리드 영역을 갖는다. 이 양태의 본래의 이중체는 안정적이지만, RNase로 분해시킴으로써 탈안정화시킬 수 있는데, 이는 분석물과 결합되지 않는 결합 구성원들로 인해 배경을 추가로 감소시켜 준다.
- <14> 본 발명의 각종 양태를 조합하여 특이적이면서도 고도로 민감한, 임상적으로 관련된 단백질, 바이러스 및 세포를 탐지하기 위한 균질 검정을 창출시킬 수 있다.

**발명의 상세한 설명**

- <23> 진술된 일반적인 기술 내용과 다음의 상세한 설명은 단지 예시적이며, 청구된 바와 같은 본 발명을 제한하지 않는다는 것을 인지해야 한다. 본원에 사용된 바와 같은 단수형에는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 복수형도 포함된다. 본원에 사용된 바와 같은 "또는"은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 추가로, 용어 "포함" 뿐만 아니라 기타 형태, 예를 들어 "포함하는" 및 "포함되는"은 제한적이지 않다.
- <24> 본원에 사용된 섹션 표제는 단지 조직적인 목적일 뿐이며, 이로써 본원에 기재된 주제가 제한되지 않는다. 특허, 특허원, 논문, 책, 매뉴얼, 및 전문 서적을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 본원에 인용된 모든 문헌 또는 문헌의 일부가 어떠한 목적으로든 본원에 참고로 도입된다.
- <25> **정의**
- <26> 본 발명의 구체적 양태들을 추가로 설명하기에 앞서, 수 많은 용어들이 다음과 같이 상세히 정의되고 기재될 것이다.
- <27> 구체적인 정의가 제공되지 않는다면, 본원에 기재된 실험실 과정, 기술 및 방법과 연계해서 활용되는 명칭들과, 이러한 실험실 과정, 기술 및 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 표준 화학 부호와 약어는 이러한 부호로써 나타낸 정식 명칭과 상호 교환적으로 사용된다. 따라서, 예를 들어 용어 "수소"와 "H"는 동일한 의미를 갖는 것

으로 이해된다. 화학적 합성, 화학적 분석, 제약 제조, 제형화, 전달 및 환자 치료에 대한 표준 기술을 사용할 수 있다. 재조합 DNA 방법론, 올리고뉴클레오티드 합성, 조직 배양 등에 대한 표준 기술을 사용할 수 있다. 예를 들어, 당해 분야에 통상적으로 수행되는 바와 같거나 본원에 기재된 바와 같이, 제조업자의 명세서에 따라서 키트를 사용하여 반응 및 정제 기술을 수행할 수 있다. 전술된 기술과 과정들은 일반적으로, 당해 분야에 널리 공지되어 있고 본 명세서 전반에 걸쳐 논의되고 인용된 각종의 일반적이거나 보다 구체적인 참고 문헌에 기재된 바와 같은 통상적인 방법에 따라서 수행할 수 있다 [참고: 예를 들어, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988)) (그들 각각의 전문이 본원에 참고로 도입된다)].

- <28> 본원에 사용된 바와 같은 "결합 구성원"은 특이성 분자와 핵산 간에 형성된 접합체를 지칭한다. 결합 구성원 핵산 간에 형성된 한정되고 제한된 안정성의 이중체에 의해 연결된 2개의 결합 구성원을 함유하는 조성물이 "결합 쌍"으로서 지칭된다. 결합 쌍은 분석물과 합하여 결합 쌍-분석물 복합체를 형성하는데, 이는 본원에서 간단히 "복합체"로서 지칭된다.
- <29> 본원에 사용된 바와 같은 용어 "분석물"은 샘플 중에 존재할 수 있고, 특정 검정에서 탐지하고자 하는 모든 물질을 지칭한다. 이러한 분석물은 어떠한 물질일 수도 있으며, 제한되지 않는다. 본 발명의 바람직한 양태에서는, 분석물이 천연 발생적 항체가 존재하거나 항체를 제조할 수 있는 물질을 포함한다. 이 분석물은, 예를 들어 단백질, 폴리펩티드, 합텐, 탄수화물, 지질, 약물, 세포, 또는 기타 모든 광범위한 생물학적 또는 비-생물학적 분자, 복합체 또는 그의 조합물일 수 있다. 또 다른 양태에서는, 분석물이 핵산이다. 또 다른 양태에서는, 분석물이 항체이다. 또 다른 양태에서는, 분석물이 세포 (동물, 식물, 진균성, 세균성 등) 또는 그의 아성분 또는 세포 소기관 (예: 미토콘드리아)이다.
- <30> 본 발명의 조성물, 방법 및 키트를 사용하여 탐지할 수 있는 다가 리간드 분석물은 통상적으로, 폴리(아미노산), 즉 폴리펩티드, 단백질, 다당류, 핵산 및 그의 조합물일 것이다. 이러한 조합물에는 세포, 조직, 세균, 바이러스, 세포벽, 세포막, 세포성 소기관, 염색체, 유전자, 미토콘드리아, 핵 등의 성분이 포함된다. 본 발명의 한 국면에 따르면, 특정 분석물은 핵산을 함유하지 않는다.
- <31> 본 발명의 방법을 사용하여 광범위한 단백질 분석물을 탐지하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 단백질 분석물은 계열에 따라서 분류할 수 있는데, 각 계열은 유사한 구조적 특징, 생물학적 기능, 특이적 미생물 (특히, 질병 유발 미생물)과의 상관 관계 등을 지니고 있다. 본 발명에 있어 특히 관심있는 단백질 계열에는, 예를 들어 면역글로불린, 사이토킨, 효소, 호르몬, 압 항원, 영양 마커, 조직 특이적 항원, 및 세균전 작용제가 포함된다. 이들 단백질 분석물은 혈액, 혈청, 혈장, 척수액, 활막액, 타액, 뇨, 세포 또는 조직에 존재할 수 있다.
- <32> 다음은 본 발명의 조성물, 방법 및 키트를 사용하여 탐지할 수 있는, 구조적으로 관련이 있는 단백질 분석물 부류의 예이다:
- <33> 프로타민
- <34> 히스톤
- <35> 알부민
- <36> 글로불린
- <37> 경단백질 (scleroprotein)
- <38> 인단백질
- <39> 점성 단백질
- <40> 다음 예는 본 발명의 조성물, 방법 및 키트를 사용하여 탐지할 수 있는, 인간 혈장에서 발견되는 임상적으로 중요한 단백질이다:
- <41>  $\alpha_1$ -지단백질
- <42>  $\alpha_1$ -항트립신
- <43> 트랜스코르틴 (Transcortin)

- <44> 4.6S-포스트알부민
- <45> 트립토판-불량
- <46>  $\alpha_1$ -당단백질
- <47>  $\alpha_{1x}$ -당단백질
- <48> 티록신-결합성 글로불린
- <49>  $\alpha$ -트립신간 억제제
- <50> Gc-글루블린
- <51> (Gc 1-1)
- <52> (Gc 2-1)
- <53> (Gc 2-2)
- <54> 합토클로빈
- <55> (Hp 1-1)
- <56> (Hp 2-1)
- <57> (Hp 2-2)
- <58> 세룰로플라스민 (Ceruloplasmin)
- <59> 콜린에스테라제
- <60>  $\alpha_2$ -지단백질(들)
- <61> 미오글로빈
- <62> C-반응성 단백질
- <63>  $\alpha_2$ -매크로글로불린
- <64>  $\alpha_2$ -HS-당단백질
- <65> Zn-  $\alpha_2$ -당단백질
- <66>  $\alpha_2$ -뉴라미노-당단백질
- <67> 에리트로포이에틴
- <68>  $\beta$ -지단백질
- <69> 트랜스페린
- <70> 헤모펙신
- <71> 피브리노겐
- <72> 플라스미노겐
- <73>  $\beta_2$ -당단백질 I
- <74>  $\beta_2$ -당단백질 II
- <75> 면역글로불린 G
- <76> (IgG) 또는  $\gamma$ G-글로불린
- <77> 분자식:  $\gamma_2\kappa_2$  또는  $\gamma_2\lambda_2$

- <78> 면역글로불린 A (IgA) 또는  $\gamma$ A-글로불린
- <79> 분자식:  $(\alpha_2\kappa_2)^n$  또는  $(\alpha_2\kappa_2)^n$
- <80> 면역글로불린 M (IgM) 또는  $\gamma$ M-글로불린
- <81> 분자식:  $(\mu_2\kappa_2)^5$  또는  $(\mu_2\lambda_2)_5$
- <82> 면역글로불린 D (IgD) 또는  $\gamma$ D-글로불린 ( $\gamma$ D)
- <83> 분자식:  $(\delta_2\kappa_2)$  또는  $(\delta_2\lambda_2)$
- <84> 면역글로불린 E (IgE) 또는  $\gamma$ E-글로불린 ( $\gamma$ E)
- <85> 분자식:  $(\epsilon_2\kappa_2)$  또는  $(\epsilon_2\lambda_2)$

<86> 자유  $\kappa$  및  $\lambda$  경쇄

<87> 보체 인자:

- <88> C'1
- <89> C'1q
- <90> C'1r
- <91> C'1s
- <92> C'2
- <93> C'3
- <94>  $\beta_{1A}$
- <95>  $\alpha_2D$
- <96> C'4
- <97> C'5
- <98> C'6
- <99> C'7
- <100> C'8
- <101> C'9

<102> 본 발명의 조성물, 방법 및 키트를 사용하여 탐지할 수 있는 중요한 혈액 응고 인자에는 다음 표에 열거된 예들이 포함된다:

**표 1**

혈액 응고 인자	
국제 명칭	이름
I	피브리노겐
II	프로트롬빈
IIa	트롬빈
III	조직 트롬보플라스틴
V 및 VI	프로아세렐린, 가속인자 글로불린
VII	프로콘베르틴
VIII	항혈우병 글로불린 (AHG)

IX	크리스마스 인자 혈장 트롬보플라스틴 성분 (PTC)
X	스튜어트-프로버 (Stuart-Prover) 인자, 오토프로트롬빈 III
XI	혈장 트롬보플라스틴
XIII	피브리노겐-안정화 인자

- <104> 본 발명의 조성물, 방법 및 키트를 사용하여 탐지할 수 있는 중요한 단백질 호르몬에는 다음이 포함된다:
- <105> 펩티드 및 단백질 호르몬
- <106> 부갑상선 호르몬 (파라트로몬)
- <107> 티로칼시토닌 (Thyrocalcitonin)
- <108> 인슐린
- <109> 글루카곤
- <110> 렐락신 (Relaxin)
- <111> 에리트로포이에틴 (Erythropoietin)
- <112> 멜라노트로핀 (Melanotropin) [멜라닌세포-자극 호르몬; 인테르메딘 (intermedin)]
- <113> 소마토트로핀 (Somatotropin) (성장 호르몬)
- <114> 코르티코트로핀 (Corticotropin) (부신피질자극 호르몬)
- <115> 티로트로핀 (Thyrotropin)
- <116> 난포-자극 호르몬
- <117> 황체형성 호르몬 (간질성 세포-자극 호르몬)
- <118> 루테오맘모트로픽 (Luteomammotropic) 호르몬 [루테오트로핀 (luteotropin), 프롤락틴 (prolactin)]
- <119> 성선자극호르몬 (Gonadotropin) (융모성 성선자극호르몬)
- <120> 조직 호르몬
- <121> 세크레틴 (Secretin)
- <122> 가스트린 (Gastrin)
- <123> 안지오텐신 (Angiotensin) I 및 II
- <124> 브라디키닌 (Bradykinin)
- <125> 인간 태반 락토겐
- <126> 사이토킨
- <127> IL 1
- <128> IL 2
- <129> IL 4
- <130> IL 6
- <131> IL 8
- <132> IL 10
- <133> EGF
- <134> TNF
- <135> NGF

- <136> 암 항원
- <137> PSA
- <138> CEA
- <139> α-태아단백질
- <140> 산 포스파타제
- <141> CA19.9
- <142> CA125
- <143> 조직 특이적 항원
- <144> 알칼리성 포스파타제
- <145> 미오글로빈
- <146> CPK-MB
- <147> 트로포닌 (Troponin)
- <148> BNP
- <149> 프로-BNP
- <150> 칼시토닌 (Calcitonin)
- <151> 수초 (Myelin) 염기성 단백질
- <152> 신경뇌하수체로부터의 펩티드 호르몬
- <153> 옥시토신 (Oxytocin)
- <154> 바소프레신 (Vasopressin)
- <155> 방출 인자 (RF) CRF, LRF, TRF, 소마토트로핀-RF, GRF, FSH-RF, PIF, MIF
- <156> 리신 (Ricin)
- <157> 디프테리아 독소
- <158> 보툴리누스 중독 (Botulism) 독소
- <159> 스태필로코쿠스 엔테로톡신 (*Staphylococcus enterotoxin*) B
- <160> 세균 및 바이러스가 또한, 본 발명의 조성물, 방법 및 키트를 사용하여 탐지할 수 있는 분석물이다. 이들 생물학적 분석물에 포함되는 것은 특히 다음과 같다:
- <161> 코리네박테리아 (Corynebacteria)
- <162>     코리네박테리움 디프테리아 (*Corynebacterium diphtheria*)
- <163> 뉴모코시 (Pneumococci)
- <164>     디플로코쿠스 뉴모니아 (*Diplococcus pneumoniae*)
- <165> 스트렙토코시 (Streptococci)
- <166>     스트렙토코쿠스 피로게네스 (*Streptococcus pyrogenes*)
- <167>     스트렙토코쿠스 살리바루스 (*Streptococcus salivarius*)
- <168> 스타필로코시 (Staphylococci)
- <169>     스타필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*)
- <170>     스타필로코쿠스 알부스 (*Staphylococcus albus*)

- <171>    네이세리아 (Neisseria)
- <172>        네이세리아 메닝기티디스 (*Weisseria meningitidis*)
- <173>        네이세리아 고노레아 (*Weisseria gonorrhoea*)
- <174>    엔테로박테리아시아 (Enterobacteriaceae)
- <175>        콜리포름 (Coliform)
- <176>        에스케리차 콜라이 (*Escherichia coli*)
- <177>        애로박터 애로게네스 (*Aerobacter aerogenes*)
- <178>        클렙시엘라 뉴모니아 (*Klebsiella pneumoniae*)
- <179>        살모넬라 (Salmonellae)
- <180>        살모넬라 티포사 (*Salmonella typhosa*)
- <181>        살모넬라 콜레라에수이스 (*Salmonella choleraesuis*)
- <182>        살모넬라 티피무름 (*Salmonella typhimurium*)
- <183>        쉬겔라 (Shigellae)
- <184>        쉬겔라 디센테리아 (*Shigella dysenteria*)
- <185>        쉬겔라 쉬미치이 (*Shigella schmitzii*)
- <186>        쉬겔라 아라비노타르드 (*Shigella arabinotard*)
- <187>        쉬겔라 플렉스네리 (*Shigella flexneri*)
- <188>        쉬겔라 보이디이 (*Shigella boydii*)
- <189>        쉬겔라 소네이 (*Shigella sonnei*)
- <190>    기타 장 바실리 (enteric bacilli)
- <191>        프로테우스 불가리스 (*Proteus vulgaris*)
- <192>        프로테우스 미라빌리스 (*Proteus mirabilis*)
- <193>        프로테우스 스페시에스 (*Proteus species*)
- <194>        프로테우스 모르가니 (*Proteus morgani*)
- <195>        슈도모나스 애루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)
- <196>        알칼리케네스 패칼리스 (*Alcaligenes faecalis*)
- <197>        비브리오 콜레라 (*Vibrio cholerae*)
- <198>    헤모필루스-보르데텔라 (Hemophilus-Bordetella) 군
- <199>        헤모필루스 인플루엔자 (*Hemophilus influenza*)
- <200>        헤모필루스 두크리이 (*Hemophilus ducryi*)
- <201>        헤모필루스 헤모필루스 (*Hemophilus hemophilus*)
- <202>        헤모필루스 애집티쿠스 (*Hemophilus aegypticus*)
- <203>        헤모필루스 파라인플루엔자 (*Hemophilus parainfluenza*)
- <204>        보르데탈라 페르투스 (*Bordetella pertussis*)
- <205>    파스테우렐라 (Pasteurellae)
- <206>        파스테우렐라 페스티스 (*Pasteurella pestis*)

- <207> 파스테우렐라 툴라레우시스 (*Pasteurella tularensis*)
- <208> 브루셀라 (Brucellae)
- <209> 브루셀라 멜리텐시스 (*Brucella melitensis*)
- <210> 브루셀라 아보르투스 (*Brucella abortus*)
- <211> 브루셀라 수이스 (*Brucella suis*)
- <212> 호기성 포자-형성 바실리 (Bacilli)
- <213> 바실루스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*)
- <214> 바실루스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)
- <215> 바실루스 메가테륨 (*Bacillus megaterium*)
- <216> 바실루스 세레우스 (*Bacillus cereus*)
- <217> 혐기성 포자-형성 바실리
- <218> 클로스트리듐 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*)
- <219> 클로스트리듐 테타니 (*Clostridium tetani*)
- <220> 클로스트리듐 페르프린젠스 (*Clostridium perfringens*)
- <221> 클로스트리듐 노비이 (*Clostridium novyi*)
- <222> 클로스트리듐 셉티쿰 (*Clostridium septicum*)
- <223> 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (*Clostridium histolyticum*)
- <224> 클로스트리듐 테르툼 (*Clostridium tertium*)
- <225> 클로스트리듐 비페르멘탄스 (*Clostridium bifermentans*)
- <226> 클로스트리듐 스포로게네스 (*Clostridium sporogenes*)
- <227> 미코박테리아 (Mycobacteria)
- <228> 미코박테륨 투베르쿨로시스 호미니스 (*Mycobacterium tuberculosis hominis*)
- <229> 미코박테륨 보비스 (*Mycobacterium bovis*)
- <230> 미코박테륨 아븀 (*Mycobacterium avium*)
- <231> 미코박테륨 레프래 (*Mycobacterium leprae*)
- <232> 미코박테륨 파라투베르쿨로시스 (*Mycobacterium paratuberculosis*)
- <233> 악티노마이세테스 (Actinomycetes) (진균-유사 세균)
- <234> 악티노마이세스 이젤리 (*Actinomyces Isaeli*)
- <235> 악티노마이세스 보비스 (*Actinomyces bovis*)
- <236> 악티노마이세스 내슬룬디이 (*Actinomyces naeslundii*)
- <237> 노카르디아 아스테로이데스 (*Nocardia asteroides*)
- <238> 노카르디아 브라실리엔시스 (*Nocardia brasiliensis*)
- <239> 스피로케테스 (Spirochetes)
- <240> 트레포네마 팔리둠 (*Treponema pallidum*)
- <241> 트레포네마 페르테누에 (*Treponema pertenue*)
- <242> 트레포네마 카라테움 (*Treponema carateum*)

- <243> 보렐리아 레쿠렌티스 (*Borrelia recurrentis*)
- <244> 렙토스피라 익테로헤모라기애 (*Leptospira icterohemorrhagiae*)
- <245> 렙토스피라 카니콜라 (*Leptospira canicola*)
- <246> 트리파나소메스 (*Trypanosomes*)
- <247> 미코플라스마스 (Mycoplasmas)
- <248> 미코플라스마 뉴모니아 (*Mycoplasma pneumoniae*)
- <249> 기타 병원체
- <250> 리케트시아 (Rickettsiae) (세균-유사 기생충)
- <251> 리케트시아 프로와제키이 (*Rickettsia prowazekii*)
- <252> 리케트시아 모오세리 (*Rickettsia mooseri*)
- <253> 리케트시아 리케트시이 (*Rickettsia rickettsii*)
- <254> 리케트시아 코노리 (*Rickettsia conori*)
- <255> 리케트시아 아우스트랄리스 (*Rickettsia australis*)
- <256> 리케트시아 시비리쿠스 (*Rickettsia sibiricus*)
- <257> 리케트시아 아카리 (*Rickettsia akari*)
- <258> 리케트시아 추추가무쉬 (*Rickettsia tsutsugamushi*)
- <259> 클라미디아 (Chlamydia) (분류 불가능한 기생충세균/바이러스)
- <260> 클라미디아 작용제 (명칭 미확인)
- <261> 진균 (Fungi)
- <262> 크립토코쿠스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*)
- <263> 블라스토마이세스 데르마티디스 (*Blastomyces dermatidis*)
- <264> 히소플라스마 캡슐라툼 (*Hisoplasma capsulatum*)
- <265> 코시디오이테스 임미티스 (*Coccidioides immitis*)
- <266> 파라코시디오이테스 브라실리엔시스 (*Paracoccidioides brasiliensis*)
- <267> 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*)
- <268> 아스페르길루스 푸미가투스 (*Aspergillus fumigatus*)
- <269> 무코르 코림비페르 (*Mucor corymbifer*) [압시디아 코림비페라 (*Absidia corymbifera*)]
- <270> 리조푸스 오리제 (*Rhizopus oryzae*)
- <271> 리조푸스 아리주아 (*Rhizopus arrhizua*)
- <272> 피코마이세테스 (*Phycomycetes*)
- <273> 리조푸스 니그리칸스 (*Rhizopus nigricans*)
- <274> 스포로트리쿰 쉐нки이 (*Sporotrichum schenkii*)
- <275> 플론세카이 페드로소이 (*Flonsecaea pedrosoi*)
- <276> 폰세카세아 콤팩트 (*Fonsecaea compact*)
- <277> 폰세카세아 데르마티디스 (*Fonsecaea dermatidis*)
- <278> 클라도스포룸 카리오니이 (*Cladosporium carrionii*)

- <279> 피알로포라 베루코사 (*Phialophora verrucosa*)
- <280> 아스페르길루스 니둘란스 (*Aspergillus nidulans*)
- <281> 마두렐라 미세토미 (*Madurella mycetomi*)
- <282> 마두렐라 그리세아 (*Madurella grisea*)
- <283> 알레셰리아 보이디이 (*Allescheria boydii*)
- <284> 피알로포라 제안셀메이 (*Phialophora jeanselmei*)
- <285> 마이크로스포룸 김세움 (*Microsporium gypseum*)
- <286> 트리코피톤 멘타그로피테스 (*Trichophyton mentagrophytes*)
- <287> 케라티노마이세스 아젤로이 (*Keratinomyces ajelloi*)
- <288> 마이크로스포룸 칸니스 (*Microsporium canis*)
- <289> 마이크로스포룸 아도우이니 (*Microsporium adouini*)
- <290> 트리코피톤 루브룸 (*Trichophyton rubrum*)
- <291> 바이러스
- <292> 아데노바이러스 (Adenoviruses)
- <293> 헤르페스 바이러스 (Herpes Viruses)
- <294> 헤르페스 심플렉스 (*Herpes simplex*)
- <295> 바리셀라 (*Varicella*) [치킨 폭스 (*Chicken pox*)]
- <296> 헤르페스 조스터 (*Herpes Zoster*) [췌글레스 (*Shingles*)]
- <297> 바이러스 B
- <298> 시토메갈로바이러스 (*Cytomegalovirus*)
- <299> 폭스 바이러스 (Pox Viruses)
- <300> 바리올라 (*Variola*) [스몰폭스 (*smallpox*)]
- <301> 백신니아 (*Vaccinia*)
- <302> 폭스바이러스 보비스 (*Poxvirus bovis*)
- <303> 파라백신니아 (*Paravaccinia*)
- <304> 몰루스쿰 콘타기오숨 (*Molluscum contagiosum*)
- <305> 피코르나바이러스 (Picornaviruses)
- <306> 폴리오바이러스 (*Poliovirus*)
- <307> 콕사키에바이러스 (*Coxsackievirus*)
- <308> 에코바이러스 (*Echoviruses*)
- <309> 리노바이러스 (*Rhinoviruses*)
- <310> 믹소바이러스 (Myxoviruses)
- <311> 파라인플루엔자 (*Parainfluenza*) (1-4)
- <312> 유행성 이하선염 바이러스 (*Mumps Virus*)
- <313> 뉴캐슬병 바이러스 (*Newcastle Disease Virus*)
- <314> 홍역 바이러스 (*Measles Virus*)

- <315> 린데르페스트 바이러스 (*Rinderpest Virus*)
- <316> 캐닌 디스토펜 바이러스 (*Canine Distemper Virus*)
- <317> 호흡기 합포체 바이러스 (*Respiratory Syncytial Virus*)
- <318> 풍진 바이러스 (*Rubella Virus*)
- <319> 아르보바이러스 (*Arboviruses*)
- <320> 북미동부말 뇌염 바이러스 (*Eastern Equine Encephalitis Virus*)
- <321> 북미서부말 뇌염 바이러스 (*Western Equine Encephalitis Virus*)
- <322> 신드비스 바이러스 (*Sindbis Virus*)
- <323> 치쿠군야 바이러스 (*Chikugunya Virus*)
- <324> 셴리키 산림열 바이러스 (*Semliki Forest Virus*)
- <325> 마이오라 바이러스 (*Mayora Virus*)
- <326> 세인트 루이스 뇌염 바이러스 (*St. Louis Encephalitis Virus*)
- <327> 리케트시아 프로와제키이 (*Rickettsia prowazekii*)
- <328> 캘리포니아 뇌염 바이러스 (*California Encephalitis Virus*)
- <329> 콜로라도 진드기열 바이러스 (*Colorado Tick Fever Virus*)
- <330> 황열 바이러스 (*Yellow Fever Virus*)
- <331> 뎅기 바이러스 (*Dengue Virus*)
- <332> 레오바이러스 (*Reoviruses*)
- <333> 레오바이러스 유형 1-3
- <334> 레트로바이러스 (*Retroviruses*)
- <335> 인간 면역결핍증 바이러스 I 및 II [*Human Immunodeficiency Viruses I and II (HIV)*]
- <336> 인간 T-세포 림프 영양성 바이러스 I & II [*Human T-cell Lymphotropic Virus I & II (HTLV)*]
- <337> 간염 (*Hepatitis*)
- <338> A형 간염 바이러스 (*Hepatitis A Virus*)
- <339> B형 간염 바이러스 (*Hepatitis B Virus*)
- <340> C형 간염 바이러스 (*Hepatitis C Virus*)
- <341> 종양 바이러스 (*Tumor Viruses*)
- <342> 라우체 백혈병 바이러스 (*Rauscher Leukemia Virus*)
- <343> 그로스 바이러스 (*Gross Virus*)
- <344> 말로니 백혈병 바이러스 (*Maloney Leukemia Virus*)
- <345> 인간 유두종 바이러스 (*Human Papilloma Virus*)
- <346> 또한, 정상 또는 병든 조직이나 환자의 세포를 탐지하는 것이 요망될 수 있다. 예를 들어, 특정의 순환성 암 또는 기타 세포의 존재 또는 부재 여부가 질병에 대한 진단일 수 있다. 따라서, 인간 환자의 내인성 세포가, 본 발명의 조성물, 방법 및 키트를 사용하여 유리하게 탐지할 수 있는 분석물이다.
- <347> 본원에 사용된 바와 같은 용어 "샘플"은 물질 분취액, 종종 생물학적 물질로부터 유래된 수성 용액 또는 수성 현탁액을 지칭한다. 본 발명의 방법에 의해 분석물의 존재 여부를 검정하고자 하는 샘플에는, 예를 들어 세포, 조직, 균질액, 용해물, 추출물, 정제되거나 부분적으로 정제된 단백질 및 기타 생물학적 분자, 및 그들의 혼합

물이 포함된다. 본 발명의 방법에 전형적으로 사용된 샘플의 비제한적 예에는 인간 및 동물 체액, 예를 들어 전혈, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 담 (가래), 기관지 세척액, 기관지 흡인물, 뇨, 림프액, 및 기도, 장관 및 비노생 식관의 각종 외부 분비물, 눈물, 타액, 젖, 백혈구, 골수종 등; 생물학적 유체, 예를 들어 세포 배양 상등액; 고정되거나 고정되지 않을 수 있는 조직 표본; 및 고정되거나 고정되지 않을 수 있는 세포 표본이 포함된다.

<348> 본 발명의 방법에 사용되는 샘플은 검정 포맷과, 검정하고자 하는 조직, 세포, 추출물 또는 기타 물질, 특히 생물학적 물질의 특성에 근거하여 다양할 것이다. 세포 또는 기타 샘플로부터 균질액 및 추출물, 예를 들어 단백질 추출물을 제조하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 본 발명의 방법과 화합성인 샘플을 수득하기 위해 용이하게 적응시킬 수 있다.

<349> 본원에 사용된 바와 같은 용어 "**접촉하는**"이란 일반적으로, 한 가지 성분, 시약, 분석물 또는 샘플이 또 다른 성분, 시약, 분석물 또는 샘플에 접근하도록 하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 접촉하는 것에는 결합 쌍을 포함하는 용액을, 분석물을 포함하는 샘플과 혼합하는 것이 포함될 수 있다. 한 가지 성분, 시약, 분석물 또는 샘플을 포함하는 용액은 또 다른 성분이나 시약, 예를 들어 디메틸 설폭시드 (DMSO) 또는 세정제를 포함할 수도 있는데, 이는 혼합, 상호 작용, 흡수, 또는 성분들, 시약들, 분석물들 및/또는 샘플들 간의 접촉에 유리한 기타 물리적 또는 화학적 현상을 촉진시켜 준다. 본 발명의 한 양태에서, 접촉하는 것에는 결합 쌍을 포함하는 용액을, 전달 장치, 예를 들어 피펫-이용 장치 또는 주사기-이용 장치를 활용하여 분석물을 포함하는 샘플에 추가하는 것이 포함된다.

<350> 본원에 사용된 바와 같은 용어 "**탐지하는**"이란, 소정의 분자의 존재를 확인하는 모든 방법을 지칭한다. 이를 달성하기 위해 사용되는 기술에는 PCR, 뉴클레오티드 서열 분석, PCR 서열 분석, 분자상 비콘 (molecular beacon) 기술, 혼성화, 혼성화에 이은 PCR, 형광, 방사성 표지화, 인광 및 흡광이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 탐지를 위해 사용될 수 있는 시약의 예에는 방사성 표지, 효소 표지 (예: 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제), 형광, 인광, 생물발광, 화학발광, 친화성 표지 (예: 바이오틴, 아비딘 또는 스트렙타비딘) 및 당업자에게 널리 공지되어 있는 기타 시약이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

<351> 본원에 사용된 바와 같은 용어 "**구별 가능한**"이란 상이한 마커, 종 또는 분석물들 간을 실험적으로 구별할 수 있는 능력을 지칭한다. 본 발명의 특정 양태에서는, 본 발명의 결합 쌍 또는 검정을 사용하여 다중 분석물을 탐지할 수 있다. 이들의 특정 양태에서, 길이와 서열 둘 다가 동일한 서열들로 이루어진 핵산 마커는 전혀 없을 것이다. 두 마커는 동일한 코어 서열을 포함할 수도 있지만, 이들 마커는 크기 및/또는 상이한 서열을 기준으로 하여 구별 가능할 것이다. 바람직한 양태에서는, 탐지 생성물이 길이 면에서 상이할 것이다. 기타 양태에서는, 마커가 상이한 서열-특이적 프로브와 결합하는 서열을 가질 것이다. 이들 양태는 제한적이지 않고, 기타 양태들이 본 발명에 사용되는 것으로 고려될 수 있다.

<352> 용어 "**폴리뉴클레오티드**" 및 "**핵산 (분자)**"는 모든 길이의 중합체성 형태의 뉴클레오티드를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용된다. 폴리뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드 및/또는 그들의 유사체를 함유할 수 있다. 뉴클레오티드는 어떠한 3차원적 구조를 지닐 수도 있고, 공지되어 있거나 공지되지 않은 어떠한 기능도 수행할 수 있다. 용어 "**폴리뉴클레오티드**"에는 단일 가닥, 이중 가닥 및 삼중 나선 분자가 포함된다. "**올리고뉴클레오티드**"는 일반적으로, 단일 가닥 또는 이중 가닥 핵산, 전형적으로 DNA의 5개 내지 약 100개 뉴클레오티드의 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 올리고뉴클레오티드는 또한 올리고머 또는 올리고로서 공지되어 있고, 유전자로부터 분리할 수 있거나 당해 분야에 공지된 방법에 의해 (예를 들어, 화학적 또는 효소적으로) 합성할 수 있다. "**프라이머**"는 효소-매개된 핵산 합성을 개시하기 위해 3'-히드록실 말단을 제공해주는, 통상적으로 단일 가닥의 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 다음은 폴리뉴클레오티드의 비-제한적 양태이다: 유전자, 유전자 단편, 엑손, 인트론, mRNA, tRNA, rRNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 모든 서열의 분리된 DNA, 모든 서열의 분리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 핵산 분자는 또한, 변형된 핵산 분자, 예를 들어 메틸화 핵산 분자 및 핵산 분자 유사체를 포함할 수 있다. 퓨린 및 피리미딘 유사체는 당해 분야에 공지되어 있고, 이에는 아지리디니시토신, 4-아세틸시토신, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-카복시메틸아미노메틸-2-티오우라실, 5-카복시메틸-아미노메틸우라실, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸아데닌, 1-메틸슈도우라실, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, 슈도우라실, 5-벤틸닐우라실 및 2,6-디아미노퓨린이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 데옥시리보핵산에서 티민에 대한 대체물로서 우라실을 사용하는 것이 또한 유사 형태의 피리미딘으로 간주된다.

<353> 당 변형물 (예를 들어, 2'-o-메틸, 2-플루오르 등) 및 인산염 주쇄 변형물 (예: 모르폴리노, PNA', 티오에이트,

디티오에이트 등)을 단독으로 또는 조합하여, 본 발명의 핵산 분자 내로 혼입할 수 있다. 한 양태에서는, 예를 들어 본 발명의 핵산이 변형된 당과 변형된 인산염 주쇄를 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서는, 본 발명의 핵산이 당, 염기 및 인산염 주쇄에 대한 변형물을 포함할 수 있다.

<354>

용어 "**핵산 마커**"는 핵산 증폭 반응, 예를 들어 PCR 반응에서 적당히 고안된 올리고뉴클레오티드 프라이머와 함께 사용되는 경우에 예정된 크기 또는 기타 선택된 특징을 지닌 탐지 생성물을 생성시키는 핵산 분자를 지칭한다. 당업자는 PCR에 적합한 올리고뉴클레오티드 프라이머 고안에 관해 잘 알고 있을 것이며, 프로그램은 시판되고 있고 인터넷 상에서 입수 가능하기 때문에 이러한 본 발명의 국면이 촉진된다 [참고: 예를 들어, [http site: bibiserv.techfak.unibielefeld.de/genefisher](http://site:bibiserv.techfak.unibielefeld.de/genefisher)]. 핵산 마커는 선형이거나 환상일 수 있다. 바람직한 양태에서는, 핵산 마커가 각 말단에 위치하거나 각 말단 근처에 위치하는 선택된 프라이머에 대한 결합 부위를 지닌 예정된 선형 핵산 서열을 포함할 것이다. 환상 DNA 핵산 분자에서는, 프라이머가 말단에 위치하는 것이 아니라 내부에 존재할 것이며, 예를 들어 롤링 서클 증폭 (Rolling Circle Amplification)에 대해서는 단일 프라이머를 사용할 수도 있다. 증폭된 DNA는 이용 가능한 어떠한 방법, 예를 들어 실시간 PCR, SYBR<sup>®</sup> 그린 염색, 또는 에티뎀 브로마이드 염색 등의 기술을 이용하여 탐지할 수 있다. 본 발명의 기타 양태에서는, 증폭 프라이머에 대한 결합 부위가 한정된 길이의 불확정 DNA 서열, 또는 불확정 서열 이외에 또 다른 확인 가능한 특징, 예를 들어 탐지 가능한 서열을 포함하는 DNA 서열과 플랭킹한다. 몇몇 양태에서는, 핵산 마커가 크기나 질량 면에서 증폭된 서열과 구별되므로; 프라이머들 간의 DNA 서열이 바로 염기 수에 관해서처럼 정확한 서열에 관계 규정될 필요는 없다. 또 다른 한편으로, 분자상 비콘 (하기 참고)에 대한 결합 부위가 제공되는 한은 전체 핵산 마커의 크기 및/또는 서열이 규정 (한정)될 필요는 없다. 추가의 양태에서, 프라이머 결합 부위 사이에 위치한 DNA 서열은 PCR 반응 동안 탐지될 수 있는 "**특징적 식별 서열**"을 포함한다. 형광성 신호 발생은, 예를 들어 서열-특이적이거나 [분자상 비콘, TaqMan<sup>®</sup>, 형광발생 프라이머, 예를 들어 LUX<sup>™</sup> 프라이머 (공급처: Invitrogen (Carlsbad, CA.))] 또는 질량-의존적일 수 있다 [예를 들어, SYBR<sup>®</sup> 그린, 에티뎀 브로마이드]. 제공된 예들은 가능한 핵산 탐지 도식을 전부 열거한 것이 아닌데, 당업자는 본 발명의 방법에 사용하기 적합한 또 다른 마커를 인지하고 있기 때문이다.

<355>

본원에 사용된 바와 같은 용어 "**특이성 분자**"는 또 다른 분자와 특이적으로 결합할 수 있는 모든 분자를 지칭한다. 한 양태에서는, 특이성 분자가 항체이다. 본 발명의 기타 양태에서, 특이성 분자에는 다음이 포함될 수 있지만, 그에 제한되지 않는다: 생물학적 수용체 분자, 예를 들어 인슐린 수용체; 수용체에 대한 리간드 (예를 들어, 인슐린 수용체에 대한 인슐린); 항원 (예를 들어, 항체와 결합하기 위한 항원), 및 또 다른 분자, 예를 들어 바이오틴 및 아비딘에 대한 친화성을 지닌 생물학적, 화학적 또는 기타 분자. 본 발명의 특이성 분자는 완전한 천연 발생적 분자를 반드시 포함할 필요는 없고, 천연 발생적 분자의 일부, 단편 또는 소단위체, 예를 들어 항체의 Fab 단편 만으로 이루어질 수도 있다. 특이성 분자는 당해 분야에 공지된 어떠한 방법에 의해서도 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 항체는 항혈청에 존재할 수 있거나, 하이브리도마 조직 배양 상등액 또는 복수액으로부터 제조할 수 있거나, 또는 당해 분야에 널리 공지된 있는 바와 같이 재조합 발현 시스템으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 항체, 수용체 또는 기타 종의 단편, 일부 또는 소단위체는, 예를 들어 널리 공지되거나 (예: Fab, Fab') 또는 신규한 분자를 산출시키는 화학적, 효소적 또는 기타 수단에 의해 생성시킬 수 있다. 본 발명은 또한, 특이성 분자에 재조합, 키메라 및 하이브리드 분자, 예를 들어 인간화 및 영장류화 항체, 및 기타 비-천연 발생적 항체 형태가 포함될 수 있다는 것을 고려한다. 당업자는 각종 형태의 항체에 관해 기재한 상기 비-제한적 예들을 기타 특이성 분자에도 연장 적용하여, 재조합, 키메라, 하이브리드, 및 절단된 형태의 비-항체 분자가 본 발명의 방법에 사용할 수 있도록 하는 것을 인지할 것이다.

<356>

본원에 사용된 바와 같은 용어 "**특이적으로 결합하는**" 및 "**특이적 결합**"이란, 항체 또는 기타 분자, 특히 본 발명의 특이성 분자가 본 발명의 명시된 조건 하에 기타 분자와 결합하는 것 보다 높은 친화도로 항원, 리간드 또는 기타 분석물과 같은 표적과 결합하는 것을 의미한다. 당해 분야에 공지된 바와 같은 항체 또는 항체 단편은 기타 분자와 같은 표적과 결합할 수 있는 영역을 함유하는 폴리펩티드 분자이다. 본 발명의 각종 양태에서, "특이적으로 결합하는"이란 항체 또는 기타 특이성 분자가, 표적 분석물 분자와 무관한 분자와 결합하는 것 보다 약 10<sup>6</sup>배 이상 큰 친화도, 바람직하게는 약 10<sup>7</sup>배 이상 큰 친화도, 보다 바람직하게는 약 10<sup>8</sup>배 이상 큰 친화도, 가장 바람직하게는 약 10<sup>9</sup>배 이상 큰 친화도로 표적 분석물 분자와 결합하는 것을 의미할 수 있다. 전형적으로, 특이적 결합은 비-특이적 결합 보다 약 10<sup>6</sup>배 내지 약 10<sup>9</sup>배 이상 큰 친화도를 지칭한다. 몇몇 양태에서는, 특이적 결합이 비-특이적 결합에 비해 10<sup>9</sup>배 초과 친화도를 특징으로 할 수 있다. "1 내지

10" 내에서와 같이 본원의 범위 내에 있는 경우에는 언제든지, 상기 범위가 소정의 범위 내의 각 정수 또는 측정 단위를 제한없이 지칭한다. 따라서, 1 내지 10이란, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 각각과, 이들 사이의 모든 소단위를 의미한다.

- <357> "폴리클로날 항체" 또는 "PAbs"는 항원, 또는 그의 항원 기능성 유도체로 면역시킨 동물의 혈청으로부터 유래된 이중 항체 분자 집단이다. 폴리클로날 항체를 생성시키기 위해서는, 숙주 동물, 예를 들어 토끼, 마우스 및 염소에, 아주반트를 임의로 보충시킨 항원 또는 합텐-캐리어 접합체를 주사함으로써 이들 동물을 면역시킬 수 있다. 폴리클로날 항체는 항혈청 중의 기타 종으로부터 정제되지 않거나, 정제되거나 또는 부분적으로 정제될 수 있다. 폴리클로날 항체의 제조 및 정제 기술은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 다음과 같은 일반적인 각종 참고 문헌과 보다 구체적인 참고 문헌에 기재되어 있다 [참고: Kabat & Mayer, *Experimental Immunochemistry*, 2d ed., (Thomas, Springfield, IL (1961)); Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988)); and Weir, *Handbook of Experimental Immunology*, 5th ed. (Blackwell Science, Cambridge, MA (1996))].
- <358> 특별한 항원에 대한 동종 항체 집단인 "모노클로날 항체" 또는 "MAbs"는 항체 분자를 생성시켜 주는 모든 기술, 예를 들어 세포주를 연속 배양함으로써 수득할 수 있다. 이들 기술에는 문헌 [참고: Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-7 (1975); 및 미국 특허 제4,376,110호]의 하이브리도마 기술, 인간 B-세포 하이브리도마 기술 [참고: Kosbor, et al., *Immunology Today*, 4:72 (1983); Cote, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2026-30 (1983)], 및 EBV-하이브리도마 기술 [참고: Cole, et al., in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 77-96 (1985)]이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 항체는 모든 면역글로불린 부류, 예를 들어 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD 및 그의 아부류일 수 있다. 본 발명의 MAb를 생산하는 하이브리도마를 시험관내 또는 생체 내에서 배양할 수 있다. 생체 내에서 고 역가의 MAbs를 생성시키는 것이 현재 바람직한 생성 방법이다.
- <359> 또한, 적당한 항원 특이성의 마우스 항체 분자로부터의 유전자를, 적당한 생물학적 활성의 인간 항체 분자로부터의 유전자와 함께 스플라이싱함으로써 "키메라 항체"를 생성하기 위해 개발된 기술 [참고: Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:6851-6855 (1984); Takeda, et al., *Nature*, 314:452-54 (1985)]을 사용할 수 있다. 키메라 항체는 상이한 부분은 상이한 동물 종으로부터 유래되는 분자, 예를 들어 뮤린 MAb로부터 유래된 가변 영역과 인간 면역글로불린 불변 영역을 갖는 것일 수 있다.
- <360> 또 다른 한편으로, 단일 쇠 항체를 생성하는 것으로 보고된 기술 [참고: 미국 특허 제4,946,778호; Bird, *Science* 242:423-26 (1988); Huston, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-83 (1988); and Ward, et al., *Nature*, 334:544-46 (1989)]을 적응시켜 본 발명에 사용하기 적합한 유전자-단일 쇠 항체를 생성시킬 수 있다. 단일 쇠 항체는 전형적으로, Fv 영역의 중쇄와 경쇄 단편을 아미노산 브릿지를 통하여 연결시켜 단일 쇠 폴리펩티드를 생성시킴으로써 형성된다.
- <361> 특이적 에피토프를 인식하는 항체 단편은 공지된 기술에 의해 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 이러한 단편에는 항체 분자를 펩신 분해함으로써 생성시킬 수 있는 F(ab')<sub>2</sub> 단편, 및 이러한 F(ab')<sub>2</sub> 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 생성될 수 있는 Fab 단편이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 또 다른 한편, Fab 발현 라이브리리를 구축하여 [참고: Huse, et al., *Science*, 246:1275-81 (1989)] 목적하는 특이성을 지닌 모노클로날 Fab 단편을 신속하고도 용이하게 식별할 수 있다.
- <362> 본원에 사용된 바와 같은 용어 "합텐"은 항체에 의해 인식될 수 있는 소형 단백질성 또는 비-단백질 항원 결정기를 지칭한다. 전형적으로, 합텐이 보다 큰 종의 일부가 아니라면, 이는 동물에서 항체 형성을 유도시키지 않는다. 예를 들어, 소형 펩티드 합텐을 종종 캐리어 단백질, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin)과 커플링시켜 항-합텐 항체 반응을 생성시킨다. "항원"은 동물에서 항체 반응을 유도시킬 수 있고, 이로써 생성된 항체에 의해 인식될 수 있는 거대분자이다. 항원과 합텐 둘 다는 적어도 하나의 항원 결정기 또는 "에피토프"를 포함하는데, 이는 항체와 결합하는 항원 또는 합텐의 영역이다. 전형적으로는, 합텐 상의 에피토프가 완전한 분자이다.
- <363> 본원에 사용된 바와 같은 용어 "샌드위치 쌍 항체" 또는 "샌드위치 항체 쌍"은 샌드위치 포맷 면역검정에 사용하기 적합한, 전형적으로 단일-특이적 항체, 예를 들어 모노클로날 항체 쌍을 지칭한다. 이러한 쌍의 각 항체는 동일한 분자 상의 상이한 에피토프와 결합하고, 상기 쌍의 양 항체는 항원과 동시에 결합할 수 있다. 샌드위치 검정에 적합한 항체 쌍을 확인하는 방법은 당해 분야에 널리 공지되어 있을 것이다. 당업자는 기타 각종 분자를 샌드위치 쌍으로서 사용할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 수용체 분석물은 리간드 결합에

관여하지 않은 수용체 상의 에피토프와 결합하는 항체와, 이러한 수용체에 대한 리간드 사이에 샌드위치될 수 있다. 따라서, 항체와 리간드가 수용체 분석물에 대한 샌드위치 쌍으로서 사용될 수 있다.

<364> "수용체" 또는 "생물학적 수용체"는 전형적으로, 특이적 물질 (예: "리간드")와 선택적으로 결합하여, 이러한 결합에 따른 특이적 생리적 효과를 가져다 주는 것을 특징으로 하는 세포가 표면 내에 또는 표면 상에 존재하는 분자상 구조를 지칭한다. 수용체의 예에는 펩티드 호르몬, 신경전달 물질, 항원, 보체 단편, 면역글로불린에 대한 세포 표면 수용체, 및 스테로이드 호르몬에 대한 세포질성 수용체가 포함된다. 그러나, 본원에 사용된 바와 같은 수용체는 전형적으로, 분리 및 정제할 것이므로, 생리적 또는 기타 생물학적 효과를 발휘할 필요가 없거나 이러한 효과를 발휘할 수 없다. 본 발명의 방법은 수용체가 특이적 물질과 선택적으로 결합하는 것을 이용하고 있다.

<365> 용어 "리간드"는 일반적으로, 수용체와 결합하는 분자를 지칭한다. 전형적으로, 리간드는 가용성 소분자, 예를 들어 호르몬 또는 신경전달 물질이다.

<366> 용어 "고체 지지체"는, 예를 들어 분석물, 항체 또는 복합체를 고정화시키기 위해 사용될 수 있는 모든 고체 상을 지칭한다. 적합한 고체 지지체는 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 이에에는 반응 트레이 웰의 벽, 예를 들어 미세역가 판, 시험 튜브 벽, 폴리스티렌 비드, 상자성 또는 비-자성 비드, 니트로셀룰로스 막, 나일론 막, 미세입자, 예를 들어 라텍스 입자, 및 양 (sheep) (또는 기타 동물) 적혈구가 포함된다. 전형적인 고체 지지체용 물질에는 폴리비닐 클로라이드 (PVC), 폴리스티렌, 셀룰로스, 나일론, 라텍스 및 그의 유도체가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 추가로, 고체 지지체는 피복, 유도체화 또는 변형시켜 목적하는 분자 (예: 분석물)의 부착을 증진시키고/시키거나 비-특이적 결합 또는 기타 바람직하지 못한 상호 작용을 못하게 막을 수 있다. 특이적 "고체 상"의 선택은 통상적으로 중요하지 않으며, 이용되는 검정에 따라서 당업자에 의해 선택될 수 있다. 따라서, 라텍스 입자, 미세입자, 상자성 또는 비-자성 비드, 막, 플라스틱 튜브, 미세역가 웰의 벽, 유리 또는 실리콘 칩, 및 적혈구 모두가 적합한 고체 지지체이다. 편리하게는, 각종 탐지 방법을 도모할 수 있는 고체 지지체를 선택할 수 있다. 예를 들어, 96 또는 384 웰 판을, 예를 들어 로봇을 이용한 워크스테이션 (workstation)에 의해 자동화 처리될 검정 및/또는 예를 들어, 판 판독기를 사용하여 탐지할 검정에 사용할 수 있다. 필름에 의거한 가시화를 활용하는 자가방사선 촬영이나 화학발광성 탐지 단계를 포함할 수 있는 본 발명의 방법에 대해서는, 고체 지지체가 박막, 예를 들어 니트로셀룰로스 또는 나일론 막일 수 있다. 샌드위치 면역검정을 수행하는 본 발명의 한 가지 양태에 따르면, 반응 트레이 웰의 벽이 전형적으로 이용된다. 본 발명의 또 다른 양태에서는, 상자성 비드가 고체 지지체로서 사용될 수 있다. 분자를 고체 상에 고정화시키는데 적합한 방법에는 이온성, 소수성, 공유 상호 작용 등, 및 그의 조합 방법이 포함된다. 그러나, 이러한 고정화 방법은 전형적으로 중요하지 않으며, 미확인 흡착 기전을 포함할 수도 있다. 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 고체 지지체는 불용성이거나 또는 후속 반응에 의해 불용성으로 될 수 있는 모든 물질을 지칭할 수 있다. 고체 지지체는 포획 시약을 유인하여 고정화시킬 수 있는 그의 고유 능력에 근거하여 선택할 수 있다. 또 다른 한편으로, 고체 상이 포획 시약을 유인하여 고정화시킬 수 있는 능력을 지닌 부가의 수용체를 보유할 수 있다. 이러한 부가의 수용체에는 포획 시약 그 자체 또는 포획 시약과 접합되어 전하를 띤 물질과 관련하여 반대 전하를 띤 물질이 포함될 수 있다. 본 발명의 또 다른 양태에서는, 부가의 수용체 분자가, 고체 상에 고정화되고 (부착되고) 특이적 결합 반응을 통하여 포획 시약을 고정화시킬 수 있는 능력을 지닌 모든 특이적 결합 구성원일 수 있다. 부가의 수용체 분자는 검정을 수행하기 전에 또는 수행하는 동안에 포획 시약이 고체 상에 간접적으로 고정화될 수 있게 해준다. 따라서, 고체 상은 플라스틱, 유도체화 플라스틱, 상자성 또는 비-자성 금속, 시험 튜브의 유리 또는 실리콘 표면, 미세역가 웰, 시트, 비드, 미세입자, 칩, 또는 당업자에게 공지된 기타 입체 배치물일 수 있다.

<367> "펩티드"는 일반적으로, 펩티드 결합에 의해 연결된 아미노산 단쇄를 지칭한다. 전형적으로, 펩티드는 약 2 내지 100개, 보다 전형적으로는 약 4 내지 50개, 가장 통상적으로는 약 6 내지 20개 아미노산의 아미노산 쇠를 포함한다. "폴리펩티드"는 일반적으로, 전형적으로는 펩티드 보다 긴 개개의 직쇄 또는 측쇄 아미노산 서열을 지칭한다. 폴리펩티드는 통상적으로, 약 100 내지 1000개 이상 아미노산 길이, 보다 전형적으로는 약 150 내지 600개 이상 아미노산 길이, 종종 약 200 내지 약 500개 이상 아미노산 길이를 포함한다. "단백질"에는 단일 폴리펩티드 뿐만 아니라 다중 폴리펩티드 쇠의 복합체가 포함되는데, 이는 동일하거나 상이할 수 있다. 단백질 내의 다중 쇠는 일차 아미노산 서열 구조 뿐만 아니라 2차, 3차 및 4차 구조를 특징으로 할 수 있고; 이는, 예를 들어 디설파이드 결합에 의해 함께 묶어 놓을 수 있으며; 합성 후 변형, 예를 들어 당화, 인산화, 절단 또는 기타 프로세싱이 포함될 수 있다. 항체, 예를 들어 IgG 단백질은 전형적으로, 디설파이드 결합에 의해 함께 묶어 놓은 4개의 폴리펩티드 쇠 (즉, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄)로 구성된다. 더우기, 단백질에는 부가의 성분,

예를 들어 연합 금속 (예를 들면, 철, 구리 및 황), 또는 기타 부분이 포함될 수 있다. 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질의 정의에는 생물학적 활성 및 불활성 형태; 변성 및 본래의 형태; 뿐만 아니라 그의 변이체, 변형, 절단, 하이브리드 및 키메라 형태가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 펩티드, 폴리펩티드 및 단백질은 어떠한 공급원이나 어떠한 방법에 의해서도 유래될 수 있는데, 예를 들어 천연 발생적 조직이나 기타 물질로부터 추출하거나; 숙주 유기체, 예를 들어 세균, 진균, 식물, 곤충 또는 동물 세포에서 재조합 생성하거나; 당업자에게 널리 공지되는 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

<368> 본원에 사용된 바와 같은 용어 "**접합체**"는 공유적으로 부착시켰거나 함께 연결시킨 2개의 분자를 지칭한다. 한 양태에서는, 핵산을 단백질, 폴리펩티드 또는 기타 특이성 분자와 공유적으로 연결시킴으로써 핵산 접합체를 생성시킨다. 본 발명의 바람직한 양태에서는, 단백질, 폴리펩티드 또는 기타 특이성 분자를 연결기를 통하여 핵산에 공유적으로 부착시켜 접합체를 형성시킨다.

<369> 본 발명의 방법에 의해 샘플 중에서 특정 분석물의 존재를 탐지하기 위한 "**키트**"는, 예를 들어 선택된 분석물에 대해 특이적인 결합 쌍이 내부에 배치된 1개 이상의 용기 수단을 포함할 수 있다. 이 키트는 다음 중의 한 가지 이상을 포함하는 기타 용기 수단을 추가로 포함할 수 있다: 분석물 탐지를 수행하는데 필요한 완충제, 용액 또는 기타 시약 및 물질; 결합 쌍의 핵산 프로브 성분을 증폭시킬 수 있는 시약; 및 증폭 후 핵산 성분의 존재를 탐지할 수 있는 시약. 바람직하게는, 상기 키트가 사용에 관한 지시 사항을 추가로 포함한다. 키트를 진단 용으로 사용하고자 하는 경우에는, FDA 사용 승인에 관한 고시와 이에 대한 지시 사항을 포함할 수도 있다.

<370> 구체적으로 언급하면, 구체화된 키트에는 시약이 별개의 용기 내에 함유되어 있는 키트가 포함된다. 이러한 용기에는 소형 유리 용기, 플라스틱 용기, 또는 플라스틱 또는 종이 스트립이 포함된다. 상기 용기는 시약을 한 구체으로부터 또 다른 구체로 효율적으로 전달시켜 주어 샘플과 시약이 교차-오염되지 않도록 해주고 각 용기의 작용제 또는 용액이 한 구체으로부터 또 다른 구체로 정량적 방식으로 부가될 수 있도록 해준다. 이러한 용기에는 시험 샘플을 수용해 줄 용기, 검정에 사용된 프로브 또는 프라이머를 함유하는 용기, 완충제와 시약 (예를 들어, 인산염 완충 식염수, 트리스-완충제 등)을 함유하는 용기, 및 마커 핵산, 증폭 생성물 등을 탐지하는데 사용되는 시약을 함유하는 용기가 포함될 수 있다. 당업자는 수행된 결합 쌍 및/또는 물질, 결합 쌍을 제조하는데 필요한 공급물 및 시약을 당해 분야에 널리 공지되어 있는 확립된 키트 포맷들 중의 하나에 용이하게 혼입시킬 수 있다는 것을 용이하게 인지할 것이다.

<371> DNA를 본 발명의 방법에 의해 항체 또는 기타 특이성 분자와 커플링시키기 위한 키트는 동결건조된 활성화 DNA가 내부에 배치된 1개 이상의 용기 수단을 포함할 수 있다. 이 키트는 다음 중의 한 가지 이상을 포함하는 기타 용기를 추가로 포함할 수 있다: 반응 후에 핵산의 존재를 탐지할 수 있는 작용제, 시약 및 완충제. 바람직하게는, 상기 키트가 사용에 관한 지시 사항을 추가로 포함한다. 당업자는 본 발명에 기재된 활성화 핵산을 당해 분야에 널리 공지되어 있는 확립된 키트 포맷들 중의 하나에 용이하게 혼입시킬 수 있다는 것을 용이하게 인지할 것이다.

<372> **균질 분석물 탐지 검정**

<373> 본 발명은 일반적으로, 분석물 탐지를 위한, 특히 균질한 민감성 분석물 탐지를 위한 한정 조건 하에 한정되고 제한된 안정성을 지닌 신규한 핵산 표지된-결합 쌍을 사용하기 위한 조성물, 방법 및 키트를 제공한다.

<374> **결합 쌍**

<375> 한 양태에서, 본 발명은 분석물을 탐지하는데 유용한 결합 쌍을 제공한다. 본 발명의 결합 쌍은 도 1에 도시된 바와 같은 2개의 결합 구성원들 간에 형성되는데, 이들 구성원 각각은 핵산과 커플링된 특이성 분자를 갖는다. 결합 구성원의 핵산 성분은 그들의 길이의 적어도 일부에 걸쳐 상보적이고, 결합 쌍의 2개 구성원의 연결을 통하여 이중체를 형성할 수 있다 (도 1 참고).

<376> **결합 쌍의 특이성 분자 성분**

<377> 각 결합 쌍의 특이성 분자는 이러한 쌍이 목적하는 분석물과 상호 작용하도록 지시한다. 상기 언급된 바와 같은 본 발명의 특이성 분자는 또 다른 분자, 예를 들어 분석물과 상호 작용할 수 있는 모든 분자일 수 있다. 바람직한 양태에서는, 특이성 분자가 분석물과 고도의 특이성 및 친화도로 상호 작용한다.

<378> 본 발명의 한 국면에서는, 특이성 분자가 수용체이다. 또 다른 국면에서는, 특이성 분자가 리간드이다. 본 발명의 또 다른 국면에서는, 특이성 분자가 항체이다.

<379> 결합 쌍의 개개의 특이성 분자는 둘 다 동일한 유형의 분자이거나 상이한 유형의 분자일 수 있다. 한 양태에서

는, 결합 쌍 중의 특이성 분자 둘 다가 수용체이다. 또 다른 양태에서는, 결합 쌍 중의 특이성 분자 둘 다가 리간드이다. 또 다른 양태에서는, 특이성 분자 둘 다가 항체이다. 또 다른 양태에서는, 특이성 분자 둘 다가 항원이다. 또 다른 양태에서는, 하나의 특이성 분자가 리간드이고, 다른 특이성 분자는 수용체이다. 또 다른 양태에서는, 결합 쌍 중의 특이성 분자 중의 하나 또는 둘 다가 핵산이다. 이 양태의 한 국면에서는, 표적 분석물이 상보적 핵산이다. 상기 양태의 또 다른 국면에서는, 표적 분석물이 DNA, RNA 또는 단백질, 또는 그의 복합체의 특정 성분이다. 상기 양태의 또 다른 국면에서는, 표적 분석물이 핵산과 단백질을 포함하는 복합체이고, 결합 쌍의 특이성 분자 중의 하나가 표적 분석물의 핵산 성분에 대해 상보적인 핵산이며, 결합 쌍의 다른 특이성 분자는 표적 분석물의 단백질 성분과 특이적으로 결합하는 단백질 (즉, 항체, 항원, 리간드, 수용체 등)이다. 바람직한 양태에서는, 결합 쌍의 하나 이상의 특이성 분자가 항체이다.

<380> 특이성 분자로서 특히 항체가 유용하다. 상기 언급된 모든 유형의 항체가 결합 쌍에 특이성을 부여하는데 유용한데, 이에 는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라 항체, 하이브리드 항체, 재조합 항체, 인간화 항체, 영장류화 항체, 절단된 항체, 단일 쇄 항체 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

<381> 2개 항체를 사용하여 결합 쌍을 형성시키는 경우에는, 이러한 2개 항체가 동일하거나 상이한 특이성을 지닐 수 있다. 본 발명의 한 양태에서는, 상기 2개 항체가 동일한 에피토프를 인식하고, 이 에피토프가 단일 분석물 상에 여러 번 존재한다. 예를 들어, 결합 쌍 중의 항체 둘 다는 세포 분석물 표면 상의 다중 카피에 존재하는 수용체를 인식할 수 있다. 또 다른 양태에서는, 이들 항체가 단일 분석물 분자 상의 상이한 에피토프를 인식한다. 이 양태의 특정 국면에서는, 항체 둘 다가 단일 분석물 분자와 동시에 결합할 수 있다. 이러한 본 발명의 국면의 소위 "샌드위치 쌍" 항체는 당업자에게 널리 공지될 것이다.

<382> **결합 쌍의 핵산 성분**

<383> 결합 쌍 중의 각 특이성 분자를 핵산 분자 (즉, 핵산 마커)와 커플링시키거나 이러한 분자로 "표지"시킨다. 본 발명의 한 국면에 따르면, 핵산이 단일 가닥이다. 또 다른 국면에서는, 핵산이 부분적으로 단일 가닥이다. 또 다른 양태에서는, 핵산이 모든 DNA, 모든 RNA, 또는 DNA와 RNA의 혼합물이다. 기타 양태에서는, 뉴클레오티드 유사체 또는 유도체를 사용할 수 있다. 또 다른 양태에서는 PNA를 핵산의 일부 또는 전부로서 사용한다. 특이성 분자를 핵산의 3' 또는 5' 말단과 커플링시킬 수도 있다. 본 발명의 한 양태에서는, 결합 쌍 중의 두 핵산의 종결 자유 말단이 상보적이므로, 이들을 혼성화시켜 제한되고 한정된 안정성의 이중체 핵산 영역을 형성시킬 수 있다. 상기 양태의 한 국면에서는, 이중체를 형성하는 종결 자유 말단이 핵산의 3' 말단이다. 또 다른 양태에서는, 결합 쌍의 핵산들 중의 하나의 종결 자유 말단이 이러한 핵산들 중의 하나의 종결 말단 이외의 지점에서 해당 결합 쌍의 다른 핵산 서열과 상보적이다. 본 발명의 한 국면에서는, 제1 핵산의 3' 말단이 제2 핵산의 내부 서열과 이중체를 형성한다. 특정 양태에서는, 핵산이 하나 이상의 링커 또는 스페이서를 통하여 특이성 분자와 커플링된다.

<384> 본 발명의 핵산의 뉴클레오티드 서열은 이들을 수행시키는데 요구되는 기능적 역할 보다는 덜 중요하다. 따라서, 결합 쌍의 핵산 성분의 길이 뿐만 아니라 핵산 서열도 상당히 다양할 수 있는데, 단 이러한 결합 쌍의 핵산 성분은 이들을 수행하는데 요구되는 기능적 역할을 여전히 수행할 수 있어야 한다. 중요하게는, 결합 쌍의 핵산 서열과 길이가 본원에 기재되고 예시된 결합 쌍의 정확한 서열과 길이로만 제한되지 않는다. 따라서, 결합 쌍의 핵산은 상이한 길이 및/또는 서열일 수 있다. 본 발명의 결합 쌍의 핵산 성분의 중요한 기능은 분석물 탐지를 위해 고도로 민감한 표지를 제공하는 것이다. 한 양태에서는, 핵산을 분석물 농도 측정치로서 증폭 및 탐지한다. 널리 확립된 방법을 사용하여 핵산을 증폭시킬 수 있다. 예시되는 증폭 방법에는 각종 미국 특허 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재된 방법이 포함된다: PCR [참고: 예를 들어, 미국 특허 제4,683,202호], TMA [참고: 예를 들어, 미국 특허 제5,399,491호]; SDA [참고: 예를 들어, 미국 특허 제5,270,184호], 및 LCR [참고: 예를 들어, 미국 특허 제5,427,930호].

<385> 광범위한 뉴클레오티드 서열을 증폭에 사용할 수 있다. 유사하게는, 핵산 길이를 상당히 변화시킬 수 있다. 한 양태에서, 본 발명의 핵산은 이들을 증폭시킬 수 있는 효율을 증가시키기 위해 분자내 헤어핀 형성을 피하도록 고안한다. 본 발명의 특정 국면에서는, 비특이적 삽입 형광성 염료, 예를 들어 SYBR<sup>®</sup> 그린을 사용하여 핵산을 탐지한다. 이 양태에 따르면, 탐지 신호 세기는 탐지된 핵산 길이의 함수일 것이다.

<386> 핵산 이중체의 안정성은 이러한 이중체 내의 핵산 가닥들 간의 상보성 영역 길이에 부분적으로 의존적이란 사실이 널리 공지되어 있다. 핵산들 간의 보다 긴 상보성 영역 또는 "중복물"은 형성되는 이중체의 안정성을 증가시켜 준다. 역으로 말하면, 보다 짧은 중복물은 덜 안정한 이중체를 생성시켜 준다. 본 발명의 핵산은 길이, 온도, 용매 및 기타 조건을 변경시킴으로써 조작될 수 있는 한정된 안정성을 지니도록 고안한다. 하이브리드의

안정성에 영향을 미치는 요인에는 핵산-표지된 결합 쌍의 농도, 염 농도, 온도, 유기 용매, 예를 들어 에탄올, DMSO, 테트라메틸암모늄 이온 (TMA<sup>+</sup>), 염기 쌍 미스매치 등이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

- <387> 본 발명의 한 국면에서는, 결합 쌍 내에 이중체를 형성하도록 핵산을 고안한다. 본 발명의 또 다른 국면에서는, 결합 쌍의 핵산 이중체를 한정 조건 하에 해리시킴으로써, 특정 조건 하에 제한된 안정성을 지니게 할 수 있다.
- <388> 본 발명의 한 양태에서는, 표적 분석물과 결합되지 않은 결합 쌍의 구성원들 간에 이중체가 형성되는 것은 최소화시키면서, 그들 각각의 표적 분석물과 결합된 결합 쌍의 구성원들 간에 이중체가 형성되는 것을 최대화하도록 반응 조건을 계획한다. 또 다른 양태에서는, 이러한 이중체가 분석물과의 결합 동안에도 여전히 안정적이지만, 검정 작동인자에 의해 선택적으로 해리 또는 용융될 수 있다.
- <389> 이들 조건 하에서는 열역학적 조건으로 인해, 결합되지 않은 쌍은 거의 혼성화되지 못한다. 본 발명의 특정 양태에서는, 결합 쌍의 약 1% 미만이 분석물과 결합하지 않는다. 기타 양태에서는, 결합 쌍의 약 0.1%, 0.01%, 또는 0.001% 미만이 분석물과 결합하지 않는다. 기타 양태에서는, 경쟁인자 핵산 (예를 들어, 결합 쌍 핵산들 간의 이중체 형성 영역에 대해 상보적이다)을 사용하여 자유 결합 구성원이 재연합되지 못하게 할 수 있다. 결합 쌍 내의 핵산들 중의 하나가 그의 결합 파트너 핵산과 혼성화되지 못하는 경우에 소형 헤어핀을 형성하도록 고안함으로써 유사한 효과를 획득할 수 있다.
- <390> 일단 형성되면, 결합 쌍과 표적 분석물 간에 형성된 복합체의 안정성은 미국 특허 제5,635,602호 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재된 바와 같은 핵산 이중체의 3' 말단을 연장시키는 폴리머라제 효소를 사용함으로써 증강시킬 수 있다.
- <391> 본 발명의 핵산 마커는 수 많은 표지들 중의 어느 하나를 결합 쌍 핵산 중의 하나 또는 둘 다 내로 혼입시킴으로써 탐지할 수 있다. 본 발명에 사용하기 적합한 마커의 예에는 삽입 형광성 분자, 예를 들어 SYBR<sup>®</sup> 그린 및 에티뮴 브로마이드; FRET 형광성 공명 에너지 전이 쌍, 예를 들어 플루오레세인 및 로다민; 방사성 화합물, 생물발광성 화합물, 화학발광성 화합물, 예를 들어 아크리디늄 에스테르; 화학발광성 켄처 쌍; 및 서열-특이적 방식으로 핵산과 혼성화하는 시약, 예를 들어 분자상 비콘 (공급처: Kramer), TaqMan<sup>®</sup>, 및 형광발생 프라이머 [예: LUX<sup>™</sup> 프라이머; 공급처: Invitrogen, Carlsbad, CA]가 포함된다. 또한, 이중체 형성된 핵산 쌍의 3' 말단이 연장되는 동안 형광성 핵산 삼인산염 (NTPs 및 dNTPs)을 혼입시킬 수 있다. 더우기, 닉 (nick) 해독 및 기타 수단에 의해 표지를 혼입시키는 것이 가능하다.
- <392> **핵산 결합 쌍 분석물 검정**
- <393> 본 발명은 또한 결합 쌍을 사용하여 분석물을 탐지하는 방법을 제공한다. 한 양태에서는, 상기 언급된 바와 같은 분석물-특이적 결합 쌍을 그의 분석물과 접촉시켜 복합체를 형성시킨다. 결합 쌍의 구성원들은 2개 핵산 간에 형성된 한정되고 제한된 안정성의 분자간 이중체에 의해 연결된다. 더우기, 결합 구성원은 아주 근접한 위치에서 맞붙어 있으므로, 이들이 분석물과의 연합을 통하여 높은 국소 농도로 존재한다. 이어서, 핵산 이중체를 해리시킨 다음 재연합시킬 수 있다.
- <394> 당해 분야에 공지된 모든 방법을 사용하여 이중체를 해리시킬 수 있다. 본 발명의 한 양태에서는, 복합체를 핵산 이중체의 용점 보다 높은 온도에서 가열함으로써 해리를 수행할 수 있다. 본 발명의 또 다른 국면에서는, 염 농도 또는 이온 강도를 감소시킬 수 있다. 본 발명의 또 다른 국면에서는, 화학물질 또는 생물학적 작용제를 복합체에 가하여 이중체를 해리시킬 수 있다.
- <395> 본 발명의 또 다른 국면에서는, 분석물과 복합체를 형성하지 않은 결합 쌍 구성원의 핵산이 재연합되는 것은 회색시킴으로써 방지시키거나 없앨 수 있다. 또 다른 국면에서는, 회색이나 기타 반응 조건을 이용하여, 과량의 자유 결합 구성원이 실제적으로 재연합되지 못하게 한다. 일반적으로, 실제적인 재연합이 이루어질 수 없게 하는 조건은 과량의 자유 결합 구성원의 5% 미만, 전형적으로는 1% 미만, 종종 0.1% 미만, 가장 종종은 0.01% 미만이 재연합되는 것을 포함한다. 이러한 양태에 따르면, 결합 쌍을 분석물과 접촉시켜 결합 쌍과 분석물 간에 복합체가 형성되도록 한다. 이어서 이 복합체를 회색시키면, 근접하게 결합된 핵산 마커의 혼성화는 촉진되지만, 벌크 용액 중에서의 혼성화는 쉽게 이루어지지 않는다. 이들 조건 하에서는 마커 핵산의 3' 말단 연장이 주로 복합체를 형성하고 혼성화된 마커 핵산에서 일어나는 반면, 복합체를 형성하지 않은 핵산은 혼성화되지 않으므로, 3' 말단으로부터의 연장이 일어나지 않는다.
- <396> 이러한 본 발명의 방법에 따르면, 이때 연장된 이중체를 분석물 탐지용 수단으로서 탐지한다. 본 발명의 한 양

태에서는, 이중체를 포함하는 핵산을 증폭시켜 탐지를 촉진시킨다. 증폭은 당해 분야에 공지된 어떠한 방법에도 해서도 수행할 수 있다. 적합한 방법에는 PCR, LCR, SDA, 및 TMA가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

<397> 전형적으로, 핵산 증폭 방법은 프라임된 효소적 DNA 합성에 좌우된다. 이러한 방법에 따르면, 자유 3' OH를 수반한 프라이머를 단일 가닥 DNA 또는 RNA 주형과 혼성화한다. 이어서, 이러한 3' OH는 폴리머라제를 이용하여 연장을 위한 개시점을 형성할 수 있는데, 이러한 폴리머라제의 예는 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 이에는 Taq DNA 폴리머라제, DNA 폴리머라제 I, DNA 폴리머라제의 클레노우 (Klenow) 단편, T4 DNA 폴리머라제, T7 DNA 폴리머라제, 역전사효소, phi29 DNA 폴리머라제, Bst DNA 폴리머라제, AccuPrime™ (공급처: Invitrogen), Pfx DNA 폴리머라제 (공급처: Invitrogen), Fidelity™ DNA 폴리머라제 (공급처: Amersham Biosciences), 시퀀나제 (Sequenase™), 더모 시퀀나제 (Thermo Sequenase™) DNA, 열 Tub™ DNA 폴리머라제 (공급처: Amersham Biosciences), Vent® 폴리머라제 (공급처: New England Biolabs), 및 9° N<sub>m</sub> DNA 폴리머라제가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

<398> 본 발명의 한 국면에서, PCR에 대한 주형은 그들 각각의 특이성 분자를 통하여 분석물과 복합체를 형성한 핵산 두 가닥의 이중체 영역을 포함하는 핵산 분자이다. 당업자가 잘 이해하고 있는 바와 같이, PCR에 대한 주형은 목적하는 PCR 생성물 보다 더 길 수도 있다. 2개 개개의 PCR 프라이머를 내부적으로 혼성화시켜 DNA 합성을 개시할 수 있는데, 각각은 핵산 주형의 한 가닥 상의 특별한 위치에 존재한다. 이로써 생성된 PCR 생성물은 전형적으로, 하나의 프라이머에 의해 한정된 5' 말단을 지니고 있고, 다른 프라이머에 의해 한정된 3' 말단을 지니고 있다.

<399> 이어서, 예를 들어 에티뮴 브로마이드로의 염색, 은 염색, 자가방사선 촬영술, 도트 블롯팅, 슬롯 블롯팅, 또는 서던 블롯팅에 의해 증폭 생성물을 탐지할 수 있다. 또 다른 한편으로, 탐지 분자를 핵산 중의 하나 또는 둘 다, 증폭 생성물 또는 복합체의 이중체 영역 내로 혼입함으로써 탐지를 달성할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용하기 적합한 탐지 분자에는 형광성 분자, 형광 켄처 분자, 화학발광성 화합물, 화학발광성 켄처 분자, 형광성 뉴클레오티드, 효소적 표지, 및 방사성 표지가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

<400> 본 발명의 특정 양태에서는, 아크리디늄 에스테르를 복합체의 이중체 영역 내로 혼입하고, 핵산 이중체를 형성하지 않은 제1 및 제2 결합 쌍 구성원 중의 표지를 선택적으로 가수분해시킴으로써 이중체 탐지를 촉진시킬 수 있다.

<401> **이중체로부터의 3' 연장 및 프라이머 결합 쌍 생성**

<402> 본 발명은 1개 또는 2개의 프라이머 결합 부위가 핵산 마커 서열로부터 부재하는 결합 쌍 핵산 이중체의 증폭을 통하여 분석물을 탐지하는 방법을 제공한다. 이러한 양태에 따르면, 결합 쌍이 분석물과 결합한 후에 하나 이상의 프라이머 결합 부위가 생성된다. 예를 들어, 핵산 마커 서열 중의 하나 또는 둘 다를 이중체 영역 외부에 있는 목적하는 프라이머 서열과 동일한 서열에 혼입시킬 수 있다. 달리 말하면, 증폭시키기 위한 프라이머 결합 부위가 결합 쌍 핵산 내에는 존재하지 않지만, 핵산 이중체의 3' 말단이 연장된 후에만 형성된다.

<403> 이 양태에서는, 프라이머에 상보적인 영역이 마커 핵산에 존재하지 않는다 (즉, 프라이머 부위가 없다). 그러나, 혼성화 후에는 마커 중의 하나 또는 둘 다의 3' 말단을, 적합한 폴리머라제를 사용하여 연장시킬 수 있다. 이 연장물에는 목적하는 프라이머 서열과 동일한 서열이 포괄됨으로써, 프라이머와 결합하기 위한 후속 증폭 단계에 사용될 수 있는 상보적 프라이머 결합 부위가 생성된다 (도 2 및 3). 이 양태의 한 국면에서, 제1 핵산 마커와 제2 핵산 마커 간에 이중체 영역이 형성되고 연속해서 연장되지 않는다면, 증폭 프라이머는 혼성화되지 않거나 핵산 합성/증폭을 개시시키지 않을 것이다. 본 발명의 또 다른 국면에서는, 혼성화된 분자만이 탐지되기 때문에, 배경 비-특이적 탐지가 저하된다.

<404> 다음 뉴클레오티드 서열을 수반하고 5' 아미노 C<sub>12</sub> 스페이서 암을 갖는 60개 염기 길이의 올리고뉴클레오티드 (스페이서 C<sub>12</sub> CE 포스포라미다이트; 12-(4,4'-디메톡시트리틸옥시)도데실-1-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포라미다이트)가 상기 본 발명의 국면에 사용하기 적합한 것으로 밝혀졌다:

<405> (1) 5' NH<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-GCTACGGCTAGATCGTGTCCATGCGCTTACGACT

<406> TCGATGCTCGGCTCGCTAGCTAGATG 3' [서열 1]

<407> (2) 5' NH<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>-TCTCCAACCTCTCAACGCCATGTTCTTATGATAC

- <408> GAGAGATTCAGCGGAGGCATCTAGCT 3' [서열 2]
- <409> (3) 5' NH<sub>3</sub>-C12-TCTCCAACCTCTCAACGCCATGTTCTTATGATAC
- <410> GAGAG ATTCATCATCTAGCTAGCGAG-3' [서열 3]
- <411> 올리고뉴클레오티드 (1) [서열 1]는 3' 말단에서 각각 마지막 9개 염기 및 15개 염기에 대해 올리고뉴클레오티드 (2) [서열 2]와 올리고뉴클레오티드 (3) [서열 3] 둘 다에 상보적이다. 이들 올리고들 간에 형성된 이중체의 길이는 특이적 깃스 자유 에너지 (Gibbs Free Energy:  $\Delta G$ )를 갖는데, 이는 가장 가까운데 위치한 염기 서열에 의해 제어된다 [참고: Breslauer, et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 3746-3750 (1986)]. 상기 9개 및 15개 염기-쌍 중복물은 다음 식에 따라서 50 mM NaCl 중에서의 용점 ( $T_m$ )이 각각 26°C 및 42°C이다:
- <412>  $T_m = 64.9 + 41 * (yG + zC - 16.4) / (wA + xT + yG + zC)$
- <413> 상기에서, w, x, y, z는 서열 중의 염기 A, T, G, C 각각의 수이다 [참고: 예를 들어, <http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>]. 이러한 중복 가닥들은 25°C, 50 mM NaCl에서 50 nM 초과 농도로 용액 중에 존재하는 경우에 혼성화된다 (>50% 이중체). 이들 가닥은 평형시 100 pM 미만 농도에서는 단량체로서 주로 존재한다 (<50% 하이브리드). 열역학 원리에 따르면, 이들과 같은 상보적 DNA 가닥은 온도, DNA 농도 및 염 효과의 함수로서 단일 가닥 형태와 이중 가닥 형태 간에 전이될 수 있다. 혼성화되면, 각 가닥의 3' 말단이 다른 가닥에 상보적인 핵산을 합성하기 위한 개시점으로서 제공될 수 있다. 각 가닥을 적당한 DNA 폴리머라제 및 뉴클레오티드 삼인산염의 존재 하에 연장시키면, 111개 (도 2) 또는 105개 (도 3) 염기 쌍 DNA 이중체가 생성될 수 있다. 새로이 형성된 이중체는 부분적으로 중복된 구조 내에서는 초기에 존재하지 않았던 서열을 함유하고 있다. 이들 새로운 서열은 다음 하단 프라이머의 존재 하에 PCR에 의해 기하급수적으로 복제될 수 있다:
- <414> 5' GCTACGGCTAGATCGTGCCA 3' [서열 4] 및
- <415> 5' TCTCCAACCTCTCAACGCCATGTC 3' [서열 5]
- <416> 제1쇄 연장 생성물을 형성하지 않으면서 이들 프라이머의 존재 하에서는 개개의 가닥들이 복제할 수 없다.
- <417> 도 4는 9개 염기 쌍 중복 올리고뉴클레오티드 가닥과 15개 염기 쌍 중복 올리고뉴클레오티드 가닥 둘 다의 실시간 PCR 증폭 (핫 스타트)을 도시한 것이다. 이 도면으로부터 알 수 있는 바와 같이, 하나의 가닥이 혼성화 및 제1쇄 연장을 위해 상보적 가닥과 충분히 밀접하게 위치할 수 있도록 하기 위해 충분한 농도의 가닥들이 존재할 때까지는 증폭이 일어나지 않는다. 중복 가닥의 농도를 증가시키면, 실시간 PCR 역치 주기에 의해 측정된 바와 같이 주형 발생이 기하급수적으로 증가한다. 역으로 말하면, 예를 들어 지지체를 세척함으로써 상기 농도를 희석시키면 신호가 기하급수적으로 감소된다. 정상적인 60량체 주형의 증폭이 비교를 위해 제시된다.
- <418> **결합 쌍-분석물 복합체에서의 근접 효과**
- <419> 중복 올리고뉴클레오티드 표지를 이용하는 샌드위치 면역검정은 NADIA™ (핵산 탐지 면역검정)으로 명명되었다. NADIA의 균질 포맷과 불균질 포맷 둘 다가 증명되었다. 균질 포맷의 NADIA를 도식적으로 나타낸 것이 도 5에 제시된다.
- <420> 중복 올리고뉴클레오티드로 표지시킨 항체 결합 구성원은 도 4에 도시된 PCR 증폭 효과를 나타내기도 한다. 이러한 DNA-Ab 접합체가 동일한 항원 또는 항원 피복된 표면과 결합하면, 중복 올리고뉴클레오티드 가닥들이 서로 근접하여 고정된다. 이는 양 가닥의 상대 농도와 주형 형성 가능성을 효과적으로 증가시켜 준다. 주형이 일단 형성되면, 이는 농도와 실시간 PCR 역치 신호 간의 선형 상관 관계를 나타낸다.
- <421> 이러한 근접 효과는 포획 지지체를 사용하는 경우에 (즉, 불균질 검정에서) 주형 DNA-Ab 접합체의 비-특이적 결합으로부터 비롯되는 배경 신호를 상당히 저하시키는데 밀접한 영향을 끼친다. 개개의 중복 올리고뉴클레오티드 서열은 증폭을 위한 주형 분자가 아니고, 앞서 기재된 DNA-Ab 접합체와는 달리, 선별된 프라이머 세트를 이용하여 자체적으로 증폭될 수 없다. 중복 접합체가 여전히 비특이적으로 결합될 것이긴 하지만, 이러한 결합은 무작위이다. 비교적 소수의 접합체 카피가 무작위로 비특이적 결합되는 것은 근위 상호 작용과 제1쇄 연장 기회를 상당히 저하시킨다.
- <422> 근접 효과는 본 발명의 균질 샌드위치 검정 포맷에 근거할 수도 있는데, 여기서는 포획 고체 지지체가 불필요하다. 본 발명의 방법에 따르면, 근위적으로 결합된 중복 접합체의 혼성화와 제1쇄 연장은 촉진되지만, 벌크 용

액 중에서의 혼성화는 쉽게 이루어지지 않는 조건을 사용해야만 한다. 접합체 쌍을 용액 중에서 비특이적으로 혼성화시키면, 도 4에 도시된 바와 같이 신호가 유발될 것이다. 따라서, 본 발명의 한 양태는 허용 가능한 면역 복합체 형성 비율을 유지하는데 가능한 가장 낮은 접합체 농도를 이용하는 것을 수반한다. 중복물 길이, 염 조건 및 온도 효과를 조정하는 것 또한, 벌크 용액 중에서 중복 서열의 무작위 혼성화를 최소화하는데 이용 가능하다.

<423> **세포성 분석물의 면역탐지**

<424> 이. 콜라이 (*E. coli*) 0157에 대한 친화성 정제된 폴리클로날 항체를 중복 올리고뉴클레오티드 가닥과 접합시켜 본래의 미생물을 탐지하기 위한 불균질 NADIA 포맷을 입증하였다. 자기 입자에 부착된 항체 (공급처: Dynal, Lake Success, NY)를 사용하여 수 샘플과 고기 균질액으로부터 이. 콜라이 0157 세포를 분리 및 증균시켰다. 세포 표면은 탐지된 수 천개의 특이적 항원 카피를 나타내는 것으로 추정된다. 계산 결과, 무작위로 분포된 부위들 간의 거리가 항-이. 콜라이 0157과 접합된 중복 올리고뉴클레오티드의 관통 거리 내에 속하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 경우, 근접 결합은 단일 단백질 항원 상의 별개의 에피토프와는 달리 개개의 항원 간격에 기인한다.

<425> 본 발명의 방법 (다음 실시예에 기재됨)에 따르면, 폴리클로날 항-이. 콜라이 0157 (KPL, Gaithersburg, MD)을, 서열 (1), (2) 및 (3)을 이용한 3가지 별개의 반응에서 표지시키고, 이를 개개의 접합체로서 유지시켰다. 이. 콜라이 0157:H7는 ATCC (700728)로부터 수득하고 37°C 하에 성장시켰다. 액상 배양물로부터의 세포를 신선한 배지에서 희석시키고, 10 nM 중복 올리고뉴클레오티드-Ab 접합체와 함께 실온에서 1시간 동안 항은 배양하였다. 이로써 생성된 세포-항체 복합체를 원심분리시키고 냉 트리스-완충 식염수에서 재현탁시키며, 중복 항체 시약을 1.0 pM 아래로 효과적으로 희석시킴으로써 결합되지 않은 과량의 접합체가 제거되도록 세척하였다. 이와 같이 세척한 세포를 동시에 판 위에 스트리킹하고, 33°C에서 10분 동안 PCR 시약 혼합물에서 항은 배양한 다음, 하단 프라이머의 존재 하에 실시간 PCR 40주기를 수행함으로써 검정하였다. 37°C 하에 밤새 배양하는 동안 집락 형성으로써 결정된 바와 같이 10 내지 50개 세포가 존재하는 것이, 배양 없이 2 내지 3시간 검정하는 동안 배경보다 높은 신호를 유도시키기에 충분하였다.

<426> **세포성 분석물에 대한 균질 검정**

<427> 본 발명은 세포 표면 상에 결합 쌍 시약과의 복합체를 형성함으로써 본래의 세포 또는 바이러스를 탐지하는 방법을 제공한다. 본래의 세포, 예를 들어 세균성 세포를 탐지하기 위해 사용된 결합 쌍 시약은 2개 이상의 MAbs에 대한 2개의 결합 부위를 갖는 단백질 분석물을 탐지하기 위해 사용된 것과 유사하다. 이러한 경우, 결합 부위는 세포 표면 내에 매립된 동일한 단백질을 포함할 수 있다. 결합 쌍 시약은 개개 단백질 단위들 간의 거리 전반에 걸쳐 있다.

<428> 이러한 방법에 따라서 탐지될 수 있는 세포에는 세균성, 동물, 식물, 곤충 및 진균성 세포가 포함된다. 한 양태에서는, 동물 세포가 병들거나 건강할 수 있는 인간 세포이다. 예를 들어, 상기 방법을 사용하여, 세포 표면 중양 항원에 대한 항체를 포함하는 결합 쌍을 이용함으로써 순환성 암 세포를 탐지할 수 있다.

<429> **중복 DNA 마커의 3'-5' 접합을 지닌 결합 쌍을 이용한 분석물 탐지**

<430> 5' 말단에 제1 특이성 분자 (예를 들어, 샌드위치 쌍의 제1 Mab)와 접합된 중복 쌍의 제1 핵산을 포함하는 하나의 결합 쌍 구성원 (5' 접합체)와, 도 6에 예시된 바와 같은 3' 말단을 통하여 제2 특이성 분자 (예를 들어, 제2 Mab)와 접합된 중복 쌍의 상보적 제2 핵산 가닥을 포함하는 다른 결합 쌍 구성원 (3' 접합체)을 포함하는 결합 쌍 시약을 사용함으로써, 상당히 증강된 검정 민감도를 달성할 수 있다. 이 방법에 따르면, 5' 접합체의 3' 말단이 3' 접합체의 내부 서열과 혼성화하여, 3' 말단이 형성된 복합체 덩어리 중앙으로부터 벗어나서 자유로이 회전하는 말단 (3' 복합체의 5' 말단) 쪽으로 연장되는 결합 쌍이 생성된다. 이러한 배향으로 인해, 3'-3' 중복 결합 쌍과 비교해서 왜 연장 효율이 개선됨으로써, 폴리머라제의 보다 큰 입체적 접근과 초기 중합 동안의 회선성 응력 (torsional stress) 소산이 가능해진다.

<431> **효소적 분해를 이용하는 균질 검정**

<432> 분석물을 균질적으로 탐지하기 위한 개선된 민감도는 5' 말단에 테옥시리보스 염기를 갖고 3' 말단에 리보스 염기를 갖는 단일 가닥 핵산과 접합된 특이성 분자 (예: 항체)를 포함하는 결합 구성원을 사용함으로써 달성할 수 있다. 이 방법에 따르면, DNA/RNA 표지가 RNA 서열의 전체 연장물과 DNA 서열의 짧은 연장물에 대해 3' 말단 상에서 상보적이다. 특정 양태에서는, RNA 서열이 약 20개 이상 염기 길이이다. 기타 양태에서는, RNA 서열이 약 30, 40, 50 또는 60개 이상 염기 길이이다. 본 발명의 한 국면에 따르면, RNA 서열이 26개 염기 길이이다.

DNA-DNA 이중체 영역은 짧은데, 이의 길이는 전형적으로 15개 미만 염기 쌍, 종종 약 12개 미만 염기 쌍, 바람직하게는 약 10개 미만 염기 쌍이다. 본 발명의 각종 국면에서는, DNA-DNA 이중체의 길이가 12, 11, 10, 9, 8 또는 7개 염기 쌍이다.

<433> 이러한 방법에 따르면, 분석물-결합 쌍 복합체의 핵산 이중체 영역, 특히 DNA/RNA 이중-이중체 영역은 승온에서 안정적이기 때문에, 결합 쌍 복합체 내에서 서로로부터 특이적 배향과 간격으로 맞붙은 결합 구성원을 함유하는 복합체를 형성할 수 있다. 복합체 형성 후, 복합체를 형성한 결합 쌍과 과량의 결합 쌍 둘 다의 RNA 성분을, RNase를 부가함으로써 분해시켜 잔류 DNA/DNA 이중체에 의해 연결된 비교적 불안정하고 짧은 결합 쌍이 남도록 할 수 있다. 한 양태에서는, RNase가 RNase H이다. RNase 처리 후, 온도를 상승시키면 불안정한 결합 쌍이 그 의 각각의 결합 구성원으로 해리된다. 온도를 강하시키면 복합체 상의 위치에 고정된 결합 구성원 만이 신속하게 재연합된다. 분석물에 의해 아주 근접하여 유지되지 않은 채로 해리된 결합 구성원은 짧은 DNA/DNA 이중체의 제한된 안정성과 저 농도로 인해 결합 쌍으로 재형성될 수 없다. 이러한 방법의 한 국면에서, 단축된 3' DNA 증복물의 핵산 성분을 수반한 결합 구성원은 복합체 형성 반응물을 희석시켜야 하는 필요성을 저하시켜 주므로, 민감도를 추가로 개선시켜 준다.

<434> 테옥시리보스와 리보스 뉴클레오티드 단량체 둘 다를 포함하고 5' 아미노 관능기를 지닌 핵산 가닥은 표준 포스포르아미다이트 화학에 의해 합성할 수 있다. 또 다른 한편, 짧은 3' DNA/DNA 증복물은 RNA 폴리머라제를 사용하여 효소적으로 메울 수 있다.

<435> **분석물에 대한 민감성 균질 검정**

<436> 상기 언급된 특징들을 합함으로써, 핵산 탐지를 위해 획득한 민감도에 가까운 균질 검정을 단백질 항원 및 미생물과 같은 분석물에 대하여 고안하였다. 이러한 본 발명의 방법에 따르면, 제1 특이성 분자 (예를 들어, 샌드위치 쌍의 제1 Mab 또는 폴리클로날 항체의 제1 부분)를 키메라 DNA/RNA 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 접합시킨다. 이 방법의 한 국면에서는, DNA/RNA 올리고의 RNA 부분이 3' 말단에 30개 염기를 포함한다. 전형적으로는, 독특한 프라이머 부위가 DNA/RNA 올리고의 5' DNA 말단에 위치한다. 제2 특이성 분자 (예를 들어, 제2 Mab 또는 폴리클로날 항체의 제2 부분)를, 전반적인 길이를 증가시키기 위해 하나 이상의 3' 포스포르아미다이트 스페이서를 사용하여 임의로 합성시킨 DNA 올리고뉴클레오티드의 3' 말단과 접합시킨다. 이 방법의 한 국면에서는, DNA 올리고가 60개 이상 염기 길이이다. 전형적으로는, 독특한 프라이머 결합 부위가 DNA 올리고의 5' 말단에 위치한다. 이러한 방법에 따르면, 상기 올리고뉴클레오티드가, 전형적으로 길이가 20 내지 40개 염기 쌍인 비교적 긴 RNA-DNA 하이브리드의 이중체에 이어, 대략 7 내지 15개 염기 쌍의 짧은 DNA-DNA 하이브리드 연장물을 형성한다 (도 7).

<437> 분석물 복합체 형성, RNA 분해, 용융 및 제어닐링 후, 상기 양태의 결합 쌍이, 노출된 3' DNA 말단으로부터 단지 한 방향으로 폴리머라제에 의해 연장될 수 있다 (도 7). 상기 언급된 바와 같은, 3' 증복물에 의해 부여된 입체적 및 회선성 저해요인이 제거된다. 결합 쌍을 효소적으로 분해시키면 짧은 DNA-DNA 이중체가 생성되는데, 이는 비교적 불안정하기 때문에 결합 쌍이 벌크 용액 중에서 자유 결합 구성원들로부터 재형성되는 것을 최소화시켜 준다.

<438> 본 발명의 교시를 특정의 문제점이나 상황에 적용하는 것은 본원에 함유된 교시 측면에서 당업자의 능력 내에 있다는 것을 인지해야 할 것이다. 본 발명은 다음 비-제한적 실시예를 참고로 하여 추가로 예시될 것이다. 실험과 이로써 획득한 결과를 포함한 다음 실시예는 단지 예시 목적으로 제시된 것이며, 이로써 본 발명의 범위가 제한되지 않는다.

**실시예**

<439> **실시예 1: 5' 아미노 DNA 주형의 활성화**

<440> 12-탄소 스페이서 암 (Glen Research, Sterling, VA)을 통하여 5' 말단에 부착된 단일 1급 아민기를 함유하는 2개의 60-염기 단일 가닥 DNA 서열 (서열 1 및 3)을 합성하였다. 이들 서열은 3' 말단 상의 마지막 15개 염기에 대해 서로 상보적이었다. 이들을 동일하게 처리하였다. 5' 아미노-DNA (350 µg)를 25 µl 0.05 M 인산나트륨 완충액 (pH 7.0)에 용해시켰다. 디석신이미딜 수베레이트를 무수 DMSO에 10 mg/ml 농도로 용해시키고, 50 µl 분취액을 DNA 용액에 즉시 가한 다음, 온화하게 재피펫팅함으로써 혼합하였다. 실온에서 1분 후에, 반응 혼합물을 파마시아 (Pharmacia) FPLC 시스템에 수직으로 세운 0.5 x 20 cm G-25 (미세) 칼럼 상으로 주사하였다. 이 칼럼을, 5 mM 시트르산에서 평형시키고, 0.1 M 수산화나트륨을 이용하여 pH 5.4로 조정된 다음, 실온 하에

0.5 ml/min의 유속으로 전개하였다. 용출된 제1 피크를, 얼음에 매립시킨 마이크로콘 (Microcon<sup>®</sup>) YM-10 원심성 한외여과 장치 (공급처: Millipore, Billerica, Mass.) 내로 직접 수집하였다. 상기 수베레이트-활성화 주형 DNA를 4°C에서 30분 동안 5000 x g 하에 농축시켜 200 내지 300  $\mu$ l이 되도록 하였다. 260 nm 하에서의 흡광도를 측정함으로써 DNA 농도를 신속하게 평가하였다. 1.0 A<sub>260</sub> 단위 (대략 30  $\mu$ l)를 함유하는 분취액을, 5  $\mu$ l의 10% 만니톨을 함유하는 미세원심분리용 튜브 내로 분배하고, 드라이 아이스/아세톤 욕에서 즉시 동결시켰다. 이와 같이 동결시킨 분취액을 동결건조시키고, 무수 아르곤 하에 밀봉한 다음, -20°C 하에 저장하였다.

<441> 이와 같이 동결건조시키고 활성화된 DNA의 활성은, 이를 아민 함유 소분자와 접합시킴으로써 평가하였다. 0.1 M 인산나트륨 (pH 8.0) 중의 글루타치온 (50 mg/ml)을 화학량적 양의 N-에틸 말레이미드 (NEM)과 반응시켰다. 수산화나트륨을 사용하여 pH를 8.0으로 재조정하였다. 1 A<sub>260</sub> 단위의 수베레이트-활성화 DNA를 10  $\mu$ l의 NEM-처리된 글루타치온에 용해시킨 다음, 물을 이용하여 25배 희석시켜 4.0 A<sub>260</sub> 단위/ml가 되도록 하였다. 알킬화 글루타치온과 접합시키면, 15% 폴리아크릴아미드 TBE-우레아 겔 상에서 전기영동시킨 경우의 5' 아미노 DNA와 비교해서 밴드가 보다 느리게 이동하였다. 상기 언급된 조건 하에서 정제 및 동결건조시킨 수베레이트-활성화 DNA는 전형적으로, NEM-처리된 글루타치온과 거의 100% 접합을 나타냈는데, 이는 완전한 수베레이트 활성화가 이루어졌고 아민 반응성이 유지되었다는 지표이다.

<442> **실시예 2: 수베레이트-활성화 DNA에 대한 샌드위치-쌍 형성된 항-PSA Mab의 접합**

<443> 샌드위치-쌍 형성된 항-PSA 모노클로날 항체 (cMab 및 rMab)를 표지화하는 것이 기존에 보고된 바 있다 [참고: 미국 특허원 제10/701,347호]. 특정 실험에서는 cMab를, 서열 1을 포함하는 단일 가닥 DNA 올리고뉴클레오타이드로 표지시키고, rMab를 미국 특허원 제10/701,347호 (그의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재된 방법을 사용하여 서열 2 또는 서열 3과 접합시켰다.

<444> 본 발명의 실험을 위해, PSA 상의 상이한 에피토프에 대항하여 유도된 샌드위치-쌍 형성된 MAbs를 공급처 [BiosPacific, Inc. (Emeryville, CA)]로부터 취득하고, 각각을 활성화 중폭 DNA 서열 중의 하나와 접합시켰다. 100 마이크로리터 Mab (1 mg/ml)를 완충제 교환시키고, 실온 하에 미세 원심분리기에서 10,000 xg 하에 마이크로콘 50 원심성 한외여과 장치 (공급처: Millipore, Billerica, Mass.) 내로 2회 통과시킴으로써 0.1 M 인산나트륨, 0.15 M 염화나트륨 (pH 8.25) 내로 농축시켰다. 미세 원심분리용 튜브 내로 원심분리시킴으로써 25 내지 50  $\mu$ l의 최종 용적을 수집하고, 이를 활성화 DNA (상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조됨)의 동결건조된 펠릿에 가하였다. 접합 반응을 실온에서 수 시간 동안 진행시켰다.

<445> DNA를 이용한 항체 표지화 정도는 SDS 및/또는 본래의 단백질 겔 전기영동에 의해 평가하였다. DNA의 하나 이상 가닥을 항체 구조 내로 혼입하면 분자량과 전기음성도 둘 다 증가하였다. DNA로 표지시킨 항체는 4% 폴리아크릴아미드-SDS 겔 상에서 전기영동할 경우에 보다 느리게 이동하는 별개의 밴드로서 나타났는데, 전기영동 이동 속도는 DNA 혼입 정도에 상응하였다. 접합된 동일한 분자는 4 내지 12% 본래의 단백질 겔 전기영동 상에서 유도체화되지 않은 상응하는 항체 보다 더 신속하게 이동하였다. 격리는 보다 극적이었지만, 본래 겔 상의 보다 고차수의 접합체에 대해서는 덜 한정적이었다.

<446> DNA 접합 정도는 각 항체 구조 내에서의 리신 아민기의 노출과 상대 반응도에 따라서 50 내지 100%로 다양하였다. 이러한 접합체는 평균 표지화 밀도가 2.5인 것으로 밝혀졌다. 몇몇 실험에서는, 항체-DNA 접합체를 함유하는 반응 혼합물을 활성화 DNA의 제2 동결건조된 펠릿에 가하여 DNA를 이용한 항체 표지화 정도를 증가시켰다.

<447> 0.4 mL/min의 유속으로 TBS로 평형시킨 세파크릴 (Sephacryl<sup>TM</sup>) S-200 칼럼 (공급처: Amersham Biosciences)을 사용하여 FPLC 겔 여과 크로마토그래피함으로써, 반응되지 않은 DNA를 접합체로부터 제거하였다. 용출된 제1 피크는 접합된 Mab와 접합되지 않은 Mab로 이루어진다. 20 mM 트리스 완충액 (pH 7.4)에서 평형시키고 0.5 ml/min의 유속 하에 NaCl 염 구배 (0.0-1.0 M)로 용출시킨 모노 (Mono) Q<sup>TM</sup> 칼럼 (공급처: Amersham Biosciences)을 사용하여 FPLC 음이온 교환 크로마토그래피함으로써 순수한 접합체를 취득하였다. Mab-DNA 접합체가 60 내지 70% 염에서 용출되었다.

<448> Mab-DNA 접합체를 원심성 한외여과시킴으로써 개별적으로 농축시키고, BCA 단백질 검정 (공급처: Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL)을 이용하여 단백질에 대해 검정하였다. 등량의 양 접합체를 합하여 결합 쌍을 형성하였고, 이를 혼성화하여 단일 분자를 형성시켰다. 나트륨 아지드를 0.1%의 최종 농도로 가하고, 결합 쌍 시약을 4°C 하에 저장하였다.

<449> **실시예 3: 전립선 특이적 항원에 대한 균질 검정**

<450> 실시예 2의 결합 쌍을 20 pM이 되도록 희석시키고, 이를 0 내지 1 ng/ml PSA를 함유하는 등 용적의 일련의 항원 희석물과 합하였다. 항원-결합 쌍 혼합물을 37°C 하에 2시간 동안 항온 배양하였다. 이러한 항온 배양으로 인해, 하나의 항원 분자와 하나의 결합 쌍 분자를 포함하는 결합 복합체가 형성되었는데, 결합 쌍의 각 구성원의 항체 영역이 PSA 항원 상의 별개의 에피토프와 결합하였다. 모든 염을 집중적으로 빼어 내어 반응 용액 중의 중복 올리고뉴클레오티드 표지가 혼성화되는 것을 감소시켰다. 항온 배양 후, 항온 배양 혼합물의 일정 분취액을 꺼내어, 이를 10 mM 트리스 (Tris), 0.1% BSA (pH 8.0) 중에서 1:100으로 희석시켜 결합체 농도를 1 pM 아래로 감소시킨 다음, 45°C 하에 3분 동안 가온시켰다. 이러한 가온 단계로 인해, 용액 중에서 자유로운 복합체 형성하지 않은 결합 구성원과 항원-복합체 형성한 결합 쌍 둘 다의 중복 이중체 영역을 해리시킴으로써 결합 쌍 구성원들이 서로 효과적으로 격리되었다. 400 μM의 각 프라이머 (서열 4 및 5)를 함유하는 등 용적의 2X PCR 혼합물 [20 mM 트리스-HCl, pH 8.3; 100 mM KCl; 7 mM MgCl<sub>2</sub>; 400 μM 각 dNTP; 50 U/ml AmpliTaq® (공급처: Applied Biosystems, Foster City, CA)]을 가하였다. 온도를 23°C로 강하시켜 분석물-결합 쌍 복합체와 연합된 DNA 가닥을 우선적으로 재어닐링시키고 제1 쇠 연장을 개시하였으며, 반응 혼합물을 실온에서 3분 동안 항온 배양하였다. 이들 조건 하에서는, 복합체 형성한 결합 쌍 구성원의 상보적 DNA 영역이 재어닐링되어 결합 쌍 시약의 중복 하이브리드가 신속하게 재형성되었는데, 이는 그들이 아주 근접하게 배향되었기 때문이다. 이로써, 복합체 형성한 결합 쌍의 DNA 영역을 Taq 폴리머라제에 의해 연장시킬 수 있기 때문에 PCR에 대한 주형이 형성되었다. 그러나, 복합체를 형성하지 않은 자유 결합 쌍 구성원은 증폭 반응 이전 또는 반응 동안에 상당한 정도로 재어닐링되지 못하는데, 이는 이들이 너무 묽기 때문이다. 반응 용액 (50 μl)을 미세역가 관 웰에 옮기고, 밀봉한 다음 실시간 PCR 더모사이클링을 수행하였다. 온도를 3분에 걸쳐 50°C에서 85°C로 서서히 상승시킨 다음, 95°C에서 2분 동안 유지시켰다. 이어서, 95°C에서 15초 및 62°C에서 1분 간을 45주기 수행하였다. 전형적인 실험 결과가 도 8에 도시되었다. 이 도면에 도시된 바와 같이, 100 fg/ml PSA를 함유하는 샘플이 배경과 비교해서 (즉, PSA를 함유하지 않는 대조군 샘플과 비교해서) 탐지 가능하였다.

<451> **실시예 4: 이. 콜라이 0157에 대한 균질 검정**

<452> 이. 콜라이 세포를 ATCC (Manassas, VA)로부터 취득하고, 이를 액상 배양물에서 성장시켰다. 37°C 하에 밤새 성장시킨 한천 배지 상에서 집락의 외관에 의해 세포 농도를 결정하였다.

<453> 이. 콜라이 0157에 대항한 폴리클로날 항체를 공급처 [KPL, Inc. (Gaithersburg, Maryland)]로부터 취득하고, 이를 실시예 1 및 2에 기재된 과정에 따라서 상보적 중복 서열을 갖는 핵산 마커 올리고와 접합시켰다. 동일한 폴리클로날 항체 제제 분취액을 각각 2개의 중복 올리고뉴클레오티드 중의 하나로 개별적으로 표지시키고, 정제된 다음 화학량적으로 합하여 결합 쌍 시약을 생성시켰다.

<454> 세균성 세포를 중성 완충액 (10 mM Tris, pH 7.5)에 현탁시켜 활발한 성장을 중지시키고 실온에서 2시간 동안 등 용적의 20 내지 200 pM 결합 쌍 시약으로 처리하였다. 결합 쌍의 하나의 항체 구성원이 세포 표면 단백질과 결합하면 제2 구성원의 결합이 증강되어, 세포 상의 2개의 인접한 결합 부위를 연결해주는 분자상 브릿지가 형성되었다. 이어서, 세포 현탁액을 10 mM 트리스, pH 7.5에서 1:100으로 희석시키고 45 내지 50°C로 가온시켜 과량의 결합 쌍 시약을 해리시켜 독립적인 결합 쌍 구성원이 되도록 하였다. 400 μM 프라이머를 함유하는 등 용적의 2X PCR 혼합물을 가하고, 혼합물을 실온에서 3분 동안 항온 배양하였다. 반응물 (50 μl)을 미세역가 관 웰에 옮기고, 밀봉한 다음, 상기 실시예 3에 기재된 바와 같은 조건 하에 실시간 PCR을 수행하였다. PCR에 앞서, 일부 샘플을 꺼내어 고형 배지 상으로 도말함으로써 세균성 세포 수를 결정하였다. 45 증폭 주기 후, 상기 방법을 사용하여 10 내지 50개 본래 세포 하한치를 탐지하였다.

<455> **실시예 5: 접합된 DNA 표지의 3'-3' 및 3'-5' 중복물을 이용한 PSA 트로포닌 T에 대한 균질 검정**

<456> 실시예 1에 기재된 바와 같이 5' 말단에서 샌드위치 쌍의 하나의 Mab와 접합된 중복 쌍의 하나의 DNA 가닥과, 3' 말단을 통하여 다른 Mab와 접합된 제2 DNA 가닥으로 구성된 하나의 결합 쌍 구성원을 포함하는 결합 쌍 시약을 사용함으로써 증강된 검정 민감도를 획득할 수 있다. 5' 접합체의 3' 말단이 3' 접합체의 내부 서열과 혼성화하여, 자유 3' 말단이 형성된 복합체 덩어리 중앙으로부터 벗어나서 자유로이 회전하는 말단 쪽으로 연장되는 결합 쌍이 생성된다. 이러한 배향으로 인해, 기존에 보고된 3'-3' 중복 결합 쌍과 비교해서 쇠 연장 효율이 개선됨으로써, 폴리머라제의 보다 큰 입체적 접근과 초기 중합 동안의 회선성 응력 소산이 가능해진다.

<457> 본 실시예의 결합 구성원은 공급처 [Roche Diagnostics, Indianapolis, IN]로부터 취득한 모노클로날 항체 샌드위치 쌍을 사용하여 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이 형성하고 정제하였다. 5' DNA 표지 [서열 6 및 서열 7]는 9개 염기에 대해 상보적인 3' 말단을 갖는 60개 염기로 구성되었다. 또한, 서열 6은 75개 염기의 3' DNA

표지 (서열 8)의 내부 9개 염기 서열과 상보적이었다. 내재화 혼성화에 의해 창출된 결합 쌍 길이 손실을 보충하기 위해 3' 말단 상에 1개 또는 수 개의 스페이서 포스포르아미다이트 (공급처: Glenn Research)를 함유하도록 3' DNA 표지를 합성할 수도 있다. 서열 6을 MAK<TNT>M-7로 명명된 모노클로날 항체와 임의로 접합시켰다. 서열 7과 8을 MAK<TN-T>M-11-7로 명명된 모노클로날 항체와 접합시켰다. 접합 화학과 정제는 동일하게 유지되었다.

<458> 안정한 내부 중복 하이브리드 절편을 포함하는 결합 쌍을 실시예 3에 기재된 바와 같이 희석시키고, 트로포닌-T와 반응시킨 다음, 하단 프라이머 (서열 9 및 10)의 존재 하에 증폭시켰다. 자유 결합 쌍과 복합체를 형성한 결합 쌍은 동일한 서열의 3'-3' 중복 결합 쌍과 유사한 용융 특성과 재연합 특성을 지니고 있다. 3'-5'-중복물의 초기 중합 배향이 외부로 향함으로써, 샌드위치 복합체 벌크가 Taq 폴리머라제의 진행을 방해할 수 있는 경우에 주형 서열의 생성 효율이 개선되었다. 보다 다수의 초기 주형 분자를 증폭시키면 실시간 PCR에서 보다 신속한 신호 역치와 보다 큰 검정 민감도가 발생한다. 3'-3' 중복 결합 쌍 시약을 이용하는 트로포닌-T에 대한 균질 검정 결과, PSA (실시예 3)와 유사한 탐지 민감도가 나타났다. 3'-5' 중복물 배향을 이용한 트로포닌-T에 대한 상응하는 균질 검정에 의해서는, 2 내지 4배 개선된 탐지 민감도가 산출되었다.

<459> **실시예 6: 3'-3' 및 3'-5' 바이오틴-표지된 중복 DNA를 이용한 스트렙타비딘에 대한 균질 검정**

<460> 균질 번역-PCR 포맷으로 달성될 수 있는 극도의 민감도 예가 스트렙타비딘의 탐지에 의해 증명되었다. 스트렙타비딘은 이러한 모델 시스템에서 분자 직경이 대략 60 옹스트롬인 "항원"으로서 제공되었다. 서열 6, 7 및 8의 말단 아미노 관능기를 설포석신이미딜 2-(바이오틴아미도) 에틸-1,3'-디티오프로피오네이트 (공급처: Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL)로 표지시키고, FPLC 겔 여과 크로마토그래피함으로써 정제하였다. 각 DNA 표지는 완전히 연장시킨 경우에 길이가 200 옹스트롬 이상이었고, 중복 혼성화를 달성하는데 요구되는 거리를 관통할 수 있는 능력을 보장해 주었다.

<461> 스트렙타비딘 (공급처: Prozyme, San Leandro, CA)을, 0.05% 트윈-20 및 0.05% 나트륨 아지드, pH 8.0을 함유하는 10 mM 트리스에 용해시키고; 10 내지 100 pM의 최종 농도로 존재하는, 바이오틴으로 표지시킨 3'-3' 및 3'-5' 중복 DNA 둘 다와 복합체를 형성시켰다. 이 복합체는 15분 동안 2X PCR 혼합물을 부가함으로써 처리하여 탐지하였고, 37°C 하에 가온시킨 다음, 하단 프라이머 (서열 9 및 10)의 존재 하에 실시간 PCR 사이클링을 적용하였다. 스트렙타비딘은 3'-5' 중복 입체 배치로 검정할 경우에는 대략 500개 분자 [50 아토그램 (attogram)] 유입에서 탐지되었고, 3'-3' 배향에서는 2000개 분자 유입에서 탐지되었다.

<462> 서열 6

<463> 5'(C6) NH2 ATATACCCCC GCTGCCATGA TATCACTCTG TATAAATTTG TATGCTATTCACGATTGGGA 3'

<464> 서열 7

<465> 5'(C6) NH2 ACTCTTCGCA ACAGATCCAC ACGTACACAT CCAAAGTAGC TTCCACCACC ATCCCAATCG 3'

<466> 서열 8

<467> 5' ACTCTTCGCA ACAGATCCAC ACGTACGTCC CAATCGAAAG TAAACAGTTT AACATATGT AGCGCGTCTC CTCAT NH2 (C6) 3'

<468> 서열 9

<469> 5' ATATACCCCC GCTGCCATGA TATC 3'

<470> 서열 10

<471> 5' ACTCTTCGCA ACAGATCCAC ACGT 3'

<472> **실시예 7: 중복 DNA 표지의 3'-5' 접합을 이용한 PSA에 대한 균질 검정**

<473> 본 방법의 결합 구성원을, 핵산 중의 하나를 그의 3' 말단을 통하여 커플링시키는 것을 제외하고는 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이 형성 및 정제할 수 있다. 5' DNA 표지는 3' DNA 표지의 내부 서열의 15개 염기에 대해 상보적인 3' 말단을 수반한 60개 염기 올리고뉴클레오티드이다. 내재화 혼성화에 의해 창출된 결합 쌍 길이 손실을 보충하기 위해 3' 말단 상에 스페이서 포스포르아미다이트 (공급처: Glenn Research)를 함유하도록 3' DNA 표지를 합성하였다. 접합 화학과 정제를 상기 언급된 바와 같이 수행하였다.

<474> 안정한 내부 중복 하이브리드 절편을 포함하는 결합 쌍을 실시예 3에 기재된 바와 같이 희석시키고, PSA와 반응시킨 다음 증폭시켰다. 자유 결합 쌍과 복합체를 형성한 결합 쌍은 DNA 염기 쌍 형성의 열역학 특성에 의해 지

시되는, 3'-3' 중복된 결합 쌍과 유사한 용융 특성과 재연합 특성을 지니고 있다. 초기 중합 배향이 외부로 향함으로써, 주형 서열의 생성 효율이 개선되었다. 보다 다수의 초기 주형 분자를 증폭시키면 실시간 PCR에서 보다 신속한 신호 역치와 보다 큰 검정 민감도가 발생한다.

**<475> 실시예 8: 효소적 분해를 이용한 PSA의 균질 검정**

**<476>** 5' 말단에 데옥시리보스 염기를 수반하고 3' 말단에 리보스 염기를 수반한 단일 가닥 핵산과 접합된 항체를 포함하는 결합 구성원을 사용함으로써, 단백질 항원과 미생물을 균질 탐지하기 위한 개선된 민감도를 획득할 수 있다. 데옥시리보스와 리보스 뉴클레오티드 단량체 둘 다로 구성되고 5' 아미노 관능기를 함유하는 핵산 가닥은 표준 포스포라미다이트 화학에 의해 합성하였다. 또 다른 한편, 짧은 3' DNA/DNA 중복물은 RNA 폴리머라제를 사용하여 효소적으로 메울 수 있다. 처음 26개 염기에 대해 RNA 포스포라미다이트로 출발하여, DNA와 RNA 둘 다로 구성된 중복 핵산 표지를 합성하였다. 나머지 59개 염기는 DNA 포스포라미다이트를 사용하여 합성하였는데, (C<sub>12</sub>) 아미노 관능기에서 종결하였다. 5' 말단으로부터의 처음 25개 염기는 독특한 프라이머 서열을 나타낸다. 그 다음 26개 DNA 염기는 중복 가닥의 26개 RNA 염기에 상보적이다.

**<477>** 그 다음 9개 DNA 염기는 중복 가닥의 그 다음 9개 DNA 염기에 상보적이므로, DNA/RNA 표지는 RNA 서열 전체 연장물에 대해 그리고 DNA 서열의 약 9개 염기에 대한 3' 말단 상에서 상보적이다. 결합 쌍은 비교적 긴 DNA/RNA 이중체 연장물과 비교적 짧은 DNA/DNA 이중체 연장물을 통하여 부착된 2개의 결합 구성원으로 이루어진다. 실시예 2 & 3에 기재된 바와 같이, PSA에 대한 샌드위치 MAb와 접합되고 화학량적으로 합해지는 경우에는, 이로써 생성되는 결합 쌍이, 내부 60개 염기가 쌍을 형성한 110개 염기 뉴클레오티드 브릿지를 함유하고 있다.

**<478>** 이 시약을 실시예 3에서와 같이 사용하여 PSA를 탐지하였다. 결합 쌍은 이러한 쌍의 2개의 항체 구성원에 의해 2개의 PSA 에피토프를 인식함으로써 분석물과 복합체를 형성하였다. 항원-결합 쌍 복합체의 핵산 이중체 영역, 특히 DNA/RNA 이중-이중체 영역은 승온에서 안정적이고, 결합 쌍 복합체 내에서 서로로부터 특이적 배향과 간격으로 맞붙은 결합 구성원을 함유하는 복합체를 형성할 수 있게 해준다. 항원-결합 쌍 복합체 형성시, 반응물을 단지 10배로 희석시키고, 실온에서 30분 동안 RNase H (공급처: Promega Corp., Madison, WI)로 처리하여, 복합체를 형성한 결합 쌍과 과량의 결합 쌍 둘 다의 RNA 가닥을 분해시켜 잔류 DNA/DNA 이중체에 의해 연결된 비교적 불안정하고 짧은 결합 쌍이 남도록 할 수 있다. 이로써 생성된 결합 쌍을 3분 동안 45℃로 가온시킴으로써 열적으로 해리시킨 다음, 실온으로 냉각시켰다. 나머지 짧은 DNA/DNA 중복물은 단지 일시적인 경우에, 면역 복합체에서 신속하게 재연합되었다. 복합체 상의 위치에 고정된 결합 구성원 만이 온도 강하시 신속하게 재연합되었다. 해리된 결합 구성원은 불안정하여 결합 쌍을 재형성하였는데, 이는 짧은 DNA/DNA 중복물의 안정성이 제한되고 이들이 저 농도로 존재하기 때문이다. 단축된 3' 중복물의 DNA 표지를 수반한 결합 구성원은 복합체 형성 반응물을 희석시켜야 하는 필요성을 저하시켜 주므로, 상기 실시예 3의 검정과 비교해서 검정 민감도를 개선시켜 준다. PCR 혼합물 및 프라이머를 부가하고, 실시간 PCR 증폭을 상기 언급된 바와 같이 수행하였다.

**<479> 실시예 9: 효소적 분해와 3'-5' 접합을 이용한 PSA에 대한 균질 검정**

**<480>** 상기 언급된 특징들을 함함으로써, 핵산 탐지를 위해 획득한 민감도에 가까운 균질 검정을 단백질 항원 및 미생물에 대하여 고안하였다. 샌드위치 쌍의 제1 Mab를 키메라 DNA/RNA 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 접합시켰다. 폴리클로날 항체의 제1 부분을 Mab 대신 사용할 수 있다는 것을 인지해야 할 것이다. DNA/RNA 올리고의 RNA 부분은 3' 말단에 30개 염기를 포함한다. 독특한 프라이머 부위가 DNA/RNA 올리고의 5' DNA 말단에 위치한다. 제2 Mab (이는 폴리클로날 항체의 제2 부분에 의해 치환될 수 있다)를, 전반적인 길이를 증가시키기 위해 여러 개의 3' 포스포라미다이트 스페이서를 사용하여 합성시킨 64량체 DNA 올리고뉴클레오티드의 3' 말단과 접합시켰다. 상기 64량체의 5' 말단으로부터의 5' 말단 25개 염기는 독특한 프라이머 부위를 나타낸다. 그 다음 30개 염기는 DNA/RNA 올리고의 30개 RNA 염기에 대해 상보적이다. 마지막 9개 염기는 RNA 절편에 인접한 DNA 절편에 대해 상보적이다 (도 7).

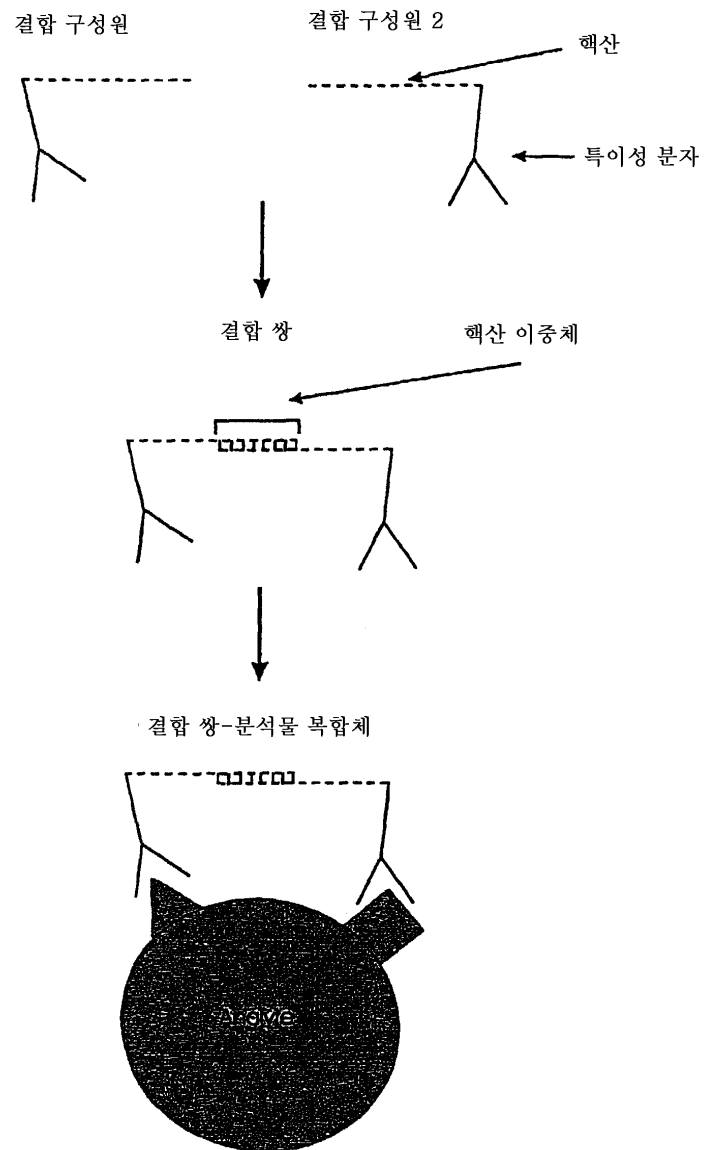
**<481>** 양 결합 구성원을 합하면, 도 7에 예시된 바와 같이 30개 염기 쌍 DNA/DNA 하이브리드에 인접한 내부 9개 염기 쌍 DNA/DNA 하이브리드를 수반한 결합 쌍이 생성된다. 면역 복합체 형성, RNA 분해, 용융 및 재어닐링 후, 상기 결합 쌍이, 노출된 3' DNA 말단으로부터 단지 한 방향으로 폴리머라제에 의해 연장될 수 있다 (도 7). 실시예 5에서와 같이, 3' 중복물에 의해 부여된 입체적 및 회선성 저해요인이 제거되었다. 결합 쌍을 효소적으로 분해시키면 짧은 9개 염기 쌍 중복물이 생성되었는데, 이는 비교적 불안정하기 때문에 결합 쌍이 벌크 용액 중에서 재형성되는 것을 최소화시켜 준다. PCR 증폭을 상기 언급된 바와 같이 수행하였다.

**도면의 간단한 설명**

- <15> 도 1은 결합 쌍에 대한 내용물, 입체 형태 및 일반적인 결합 도식을 예시한 것이다.
- <16> 도 2는 서열 1 및 서열 2를 포함하는 핵산 쌍의 이중체 형성, 3' 연장 및 PCR 증폭에 대한 일반적인 도식을 제공한 것이다.
- <17> 도 3은 서열 1 및 서열 3을 포함하는 핵산 쌍의 이중체 형성, 3' 연장 및 PCR 증폭에 대한 일반적인 도식을 제공한 것이다.
- <18> 도 4는 9개 염기 쌍 중복 올리고뉴클레오티드 가닥과 15개 염기 쌍 중복 올리고뉴클레오티드 가닥 둘 다의 실시간 PCR 증폭 (핫 스타트: hot start)을 도시한 것이다.
- <19> 도 5는 균질 NADIA™을 도식적으로 나타낸 것이다.
- <20> 도 6은 핵산 쌍의 배향 및 이중체 형성을 도시한 것인데, 여기서는 올리고뉴클레오티드 중의 하나 (서열 1)가 그의 3' 말단에 부착된 스페이서를 통하여 부착되고, 다른 올리고뉴클레오티드 (서열 3)는 그의 5' 말단을 통하여 직접 부착된다.
- <21> 도 7은 분석물 탐지에 있어 키메라 RNA/DNA 올리고뉴클레오티드의 사용 과정을 예시한 것이다. "R"은 리보뉴클레오티드 염기의 위치를 나타내고, "D"는 데옥시리보뉴클레오티드 염기의 위치를 나타내며, "S"는 스페이서 분자의 위치를 나타낸다.
- <22> 도 8은 균질 NADIA™에 의한 PSA의 탐지 그래프를 도시한 것이다.

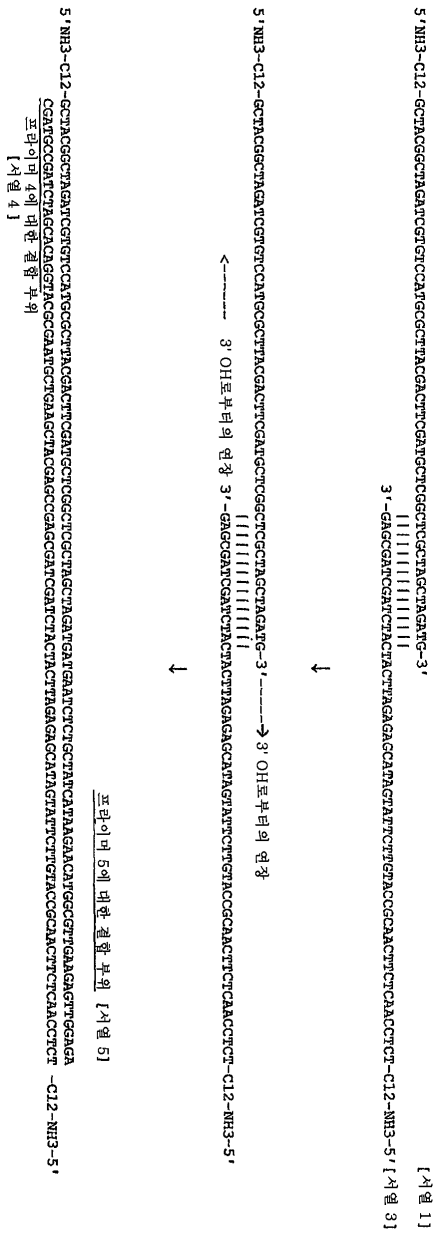
도면

도면1

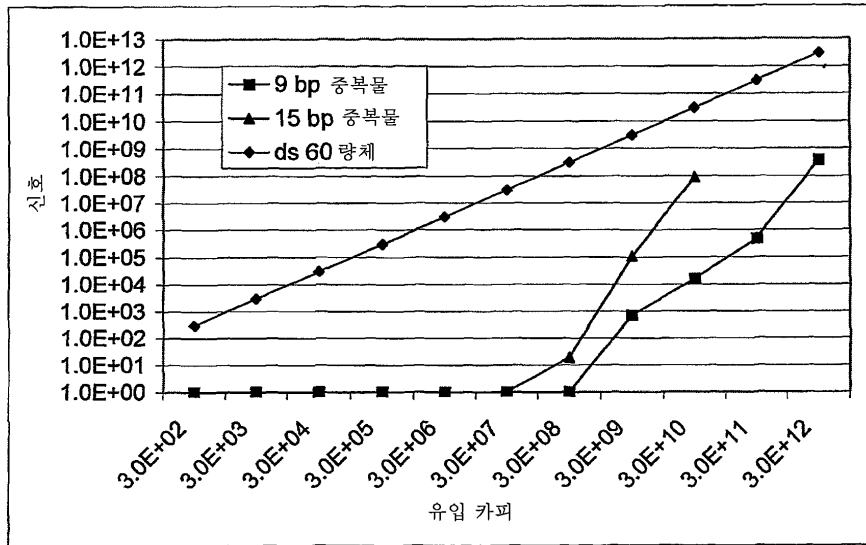




도면3

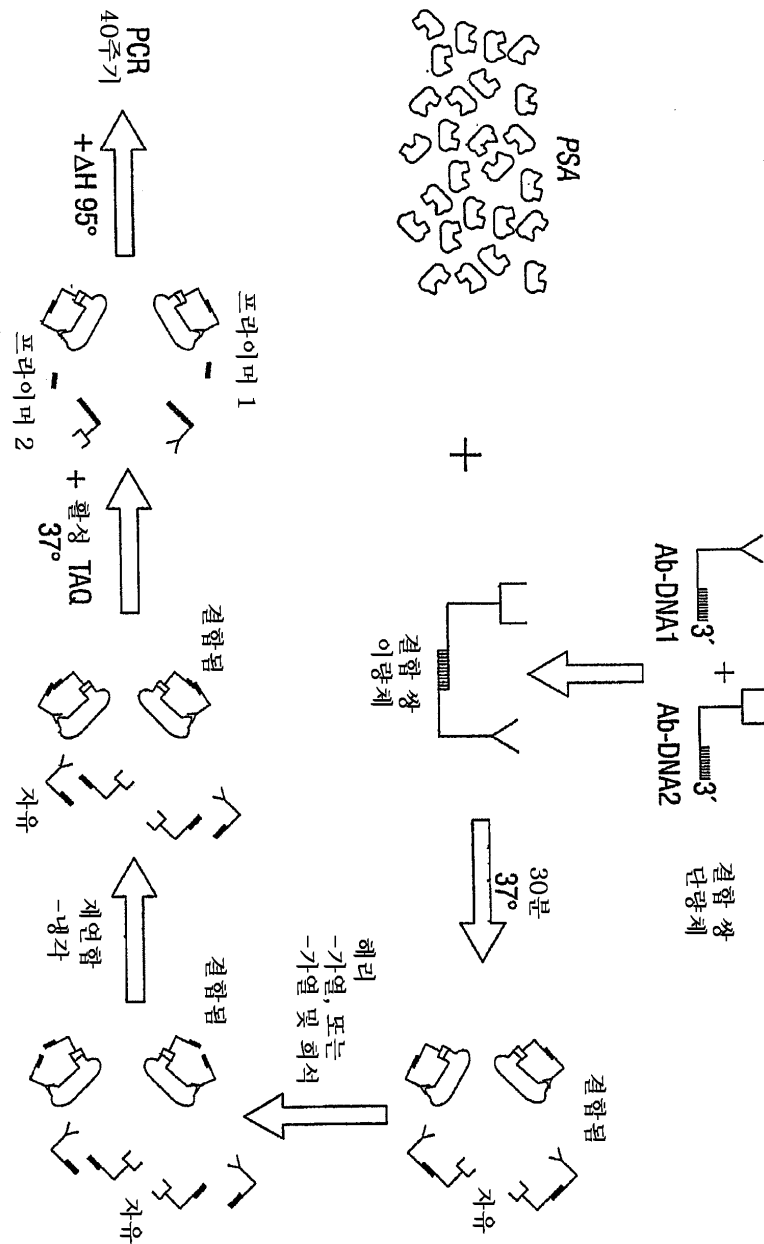


도면4



9개 염기 쌍 증복 DNA 가닥과 15개 염기 쌍 증복 DNA 가닥의 실시간 PCR

도면5







도면8

