



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0096280
(43) 공개일자 2014년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/92 (2006.01) C12Q 1/60 (2006.01)
C12Q 1/61 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7012554
(22) 출원일자(국제) 2012년11월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년05월09일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/072336
(87) 국제공개번호 WO 2013/068572
국제공개일자 2013년05월16일
(30) 우선권주장
1119515.3 2011년11월11일 영국(GB)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
엑시스-시일드 에이에스
노르웨이 엔-0504 오슬로 로텔피카 쉘소스베인
161 피오 박스 6863
(72) 발명자
파렌, 아르네, 루드빅
노르웨이 엔-0504 오슬로 로텔피카 피오 박스 686
엑시스-시일드 에이에스에이
프란첸, 프랑크
노르웨이 엔-0504 오슬로 로텔피카 피오 박스 686
엑시스-시일드 에이에스에이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **혈액 샘플 분석 방법**

(57) 요약

본 발명은 제1 성분 및 제2 성분을 함유하는, 혈액 유래의 샘플의 혈장 부분에서 하나 이상의 분석물질들의 농도를 측정하는 효소적 방법을 제공하며, 여기서 상기 제2 성분은 상기 제1 성분의 측정을 방해한다. 방법은 i) 샘플을 시약 혼합물로 희석시키는 단계; ii) 실질적으로 혈액 세포를 제거하는 단계; iii) 차단된 제2 성분을 발생시키기 위하여 제2 성분의 반응을 일시적으로 억제하는 시약을 사용하는 단계; iv) 각각의 분석물질의 구성요소의 선택적인 반응을 유발하여 검출할 수 있는 반응 생성물들을 직접적으로 또는 간접적으로 발생시키는 단계로서, 분석물질들 중 하나는 제1 성분인 단계; v) 검출할 수 있는 반응 생성물 또는 생성물들을 모니터링하는 단계; vi) 검출할 수 있는 생성물 또는 생성물들의 양 및/또는 검출할 수 있는 생성물 또는 생성물들의 형성 속도를 각각의 분석물질의 농도와 관련짓는 단계로서, 여기서 적어도 제1 성분의 농도는, 측정할 수 없는 (가상의) 종말점을 추정하여, 검출할 수 있는 상응하는 반응 생성물과 관련지어지는 단계를 포함한다. iii) 단계는 iv) 단계까지 및 iv) 단계를 포함하는, 그러나 v) 또는 vi) 단계 전의 임의의 단계에서 수행될 수 있다. iii) 단계의 시약은 별도로 샘플에 적용될 수 있거나, i) 또는 iv) 단계 도중 시약 혼합물에 포함될 수 있다. 상응하는 키트 또한 제공된다.

(72) 발명자

누르하이, 아르네, 크리스티안

노르웨이 엔-0504 오슬로 로텔뢰카 피오 박스 686
엑시스-시일드 에이에스에이

순드레하겐, 예를링

노르웨이 엔-0504 오슬로 로텔뢰카 피오 박스 686
엑시스-시일드 에이에스에이

외르닝, 라르스

노르웨이 엔-0504 오슬로 로텔뢰카 피오 박스 686
엑시스-시일드 에이에스에이

(30) 우선권주장

1201154.0 2012년01월24일 영국(GB)

1201245.6 2012년01월25일 영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

혈액-세포를 함유하는 샘플의 혈장 부분의 적어도 하나의 분석물질의 농도를 측정하는 효소적 방법으로, 이때, 샘플은 제1 성분과 제2 성분을 함유하고 있으며, 여기서 상기 제2 성분은 상기 제2 성분이 존재하고 차단되지 않은 경우, 상기 제1 성분의 측정을 방해하며, 상기 방법은

- i) 상기 혈액 세포 함유 샘플을, 샘플을 희석시키는 시약 혼합물과 접촉시키는 단계;
- ii) 실질적으로 세포가 없는 샘플을 제공하도록 혈액 세포들을 실질적으로 제거하는 단계;
- iii) 상기 샘플을 상기 제2 성분의 반응을 일시적으로 억제하는 적어도 하나의 시약과 접촉시켜 차단된 제2 성분을 발생시키는 단계;
- iv) 상기 샘플을 상기 적어도 하나의 분석물질 중 각 분석물질의 적어도 하나의 구성요소에 대해 적어도 하나의 전환 효소를 포함하는 적어도 하나의 시약 혼합물과 접촉시켜 직접적으로 또는 간접적으로 검출할 수 있는 반응 생성물을 발생시키도록 이러한 분석물질 또는 각각의 분석물질의 구성요소의 선택적인 반응을 유발하게 하는 단계로, 이때, 상기 분석물질들, 또는 상기 분석물질들 중 하나는 상기 제1 성분인 단계;
- v) 상기 검출할 수 있는 반응 생성물 또는 생성물들을 모니터링하는 단계;
- vi) 상기 검출할 수 있는 생성물 또는 생성물들의 양 및/또는 상기 검출할 수 있는 생성물 또는 생성물들의 생성 속도를 상기 혈액 샘플 내의 상기 적어도 하나의 분석물질 또는 각각의 상기 적어도 하나의 분석물질의 농도와 관련짓는 단계로서, 이때, 적어도 상기 제1 성분의 농도는, 측정할 수 없는 (가상의) 종말점을 추정함으로써, 상응하는 검출할 수 있는 반응 생성물과 관련지어지는 단계;를 포함하며,

이때, iii) 단계는 iv) 단계까지 및 iv) 단계를 포함하는, 그러나 v) 또는 vi) 단계 전의 임의의 단계에서 수행될 수 있고, iii) 단계의 시약은 별도로 샘플에 적용될 수 있거나, i) 또는 iv) 단계의 적어도 하나의 시약 혼합물에 포함될 수 있는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 성분과 상기 제2 성분은 공통으로 지질 구성요소를 가지고 있으나, 상이한 단백질 구성요소들을 가지고 있는 지질단백질 성분들인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 적어도 하나의 구성요소에 대한 상기 전환 효소는 콜레스테롤, 트리글리세라이드 또는 인지질에 대한 전환 효소와 같은, 상기 적어도 하나의 분석물질의 지질 구성요소에 대한 전환 효소인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 분석물질(들)은 전체로서 및/또는 VLDL, IDL, LDL, HDL 및 비HDL로 이루어지는 군으로부터의 특정 지질단백질과 관련이 있는, 콜레스테롤, 트리글리세라이드 또는 인지질의 군으로부터 나오는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제1 성분은 HDL과 관련된 콜레스테롤과 같은, VLDL, IDL, LDL, HDL 및 비 HDL로부터 선택된 적어도 하나의 지질단백질 구성요소와 관련된 콜레스테롤, 트리글리세라이드 또는 인지질로부터 선택된 지질 구성요소를 가지고 있는 하나의 분석물질인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 제1 성분은 비 HDL 콜레스테롤인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 혈액 세포 함유 샘플은 전혈 샘플인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, i) 단계 및 iii) 단계는 ii) 단계 전에 수행되는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, i) 단계 및 iii) 단계는 동시에 수행되는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, i) 단계에서 샘플을 희석시키는 상기 시약 혼합물은, iii) 단계의 상기 제2 성분의 반응을 일시적으로 억제하는 상기 적어도 하나의 시약을 포함하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 혈액 세포 함유 샘플의 혈장 부분에서 적어도 세 가지 상이한 분석물질들의 농도를 측정하는 효소적 방법을 포함하며, 이때, 샘플은 제1 성분과 제2 성분을 함유하고, 여기서 상기 제2 성분은 상기 제2 성분이 존재하고 차단되지 않은 경우, 상기 제1 성분의 측정을 방해하며, 상기 방법은

- i) 상기 혈액 세포 함유 샘플을, 샘플을 희석시키는 시약 혼합물과 접촉시키는 단계;
 - ii) 실질적으로 세포가 없는 샘플을 제공하도록 혈액 세포들을 실질적으로 제거하는 단계;
 - iii) 상기 샘플을 상기 제2 성분의 반응을 일시적으로 억제하는 적어도 하나의 시약과 접촉시켜 차단된 제2 성분을 발생시키는 단계;
 - iv) 상기 세포가 없는 샘플을 적어도 세 개의 부분으로 나누고, 각각의 부분을 지질 전환 효소를 포함하는 적어도 세 가지 시약 혼합물들 중 적어도 하나와 접촉시켜, 적어도 세 가지 상이한 분석물질들 중 각각의 선택적인 반응을 유발하여 (직접적으로 또는 간접적으로) 각각의 검출할 수 있는 반응 생성물들을 생성시키는 단계로서, 이때 상기 분석물질들 중 하나는 상기 제1 성분인 단계;
 - v) 상기 검출할 수 있는 반응 생성물들을 모니터링하는 단계;
 - vi) 상기 검출할 수 있는 생성물들의 양 및/또는 상기 검출할 수 있는 생성물들의 생성(또는 소비) 속도를 상기 혈액 샘플 내의 상기 적어도 세 가지 상이한 분석물질들의 농도와 관련짓는 단계로서, 이때, 적어도 상기 제1 성분의 농도는, 측정할 수 없는 (가상의) 종말점을 추정함으로써, 상응하는 검출할 수 있는 반응 생성물과 관련지어지는 단계;를 포함하며,
- 이때, iii) 단계는 iv) 단계까지 및 iv) 단계를 포함하는, 그러나 v) 또는 vi) 단계 전의 임의의 단계에서 수행될 수 있고, iii) 단계의 시약은 별도로 샘플에 적용될 수 있거나, i) 또는 iv) 단계의 적어도 하나의 시약 혼합물에 포함될 수 있는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혈액 세포 함유 샘플의 혈장 부분 내의, 상기 제1 성분 및 제1 분석물질로서 적어도 하나의 특정 지질단백질과 관련된 콜레스테롤; 제2 분석물질로서 총 콜레스테롤; 및 제3 분석물질로서 총 트리글리세라이드의 농도를 포함하는 지질 프로파일을 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, iv) 단계는

iv) 상기 세포가 없는 샘플 또는 이의 부분을 지질 전환 효소들을 포함하는 적어도 하나의 시약 혼합물과 접촉시키는 단계로서, 이때, 상기 적어도 하나의 시약 혼합물은 상기 차단된 제2 성분의 존재 하에 반응하여 HDL 또는 비 HDL과 같은, 특정 지질단백질 또는 지질단백질들로 이루어진 특정 군과 관련된 콜레스테롤의 적어도 부분적으로 선택적인 반응을 유발시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, iv) 단계는

iv) 상기 세포가 없는 샘플의 제1 부분을 지질 전환 효소들을 포함하는 적어도 하나의 시약 혼합물과 접촉시키는 단계로서, 이때, 상기 적어도 하나의 반응 혼합물은 상기 차단된 제2 성분의 존재 하에 반응하여 HDL 또는 비 HDL과 같은, 특정 지질단백질 또는 지질단백질들로 이루어진 특정 군과 관련된 콜레스테롤의 적어도 부분적으로 선택적인 반응을 유발시키는 단계;

상기 세포가 없는 샘플의 제2 부분을 지질 전환 효소들을 포함하는 적어도 하나의 시약 혼합물과 접촉시키는 단계로서, 이때, 상기 적어도 하나의 반응 혼합물은 상기 제2 부분 내의 총 콜레스테롤과 반응하는 단계; 및

상기 세포가 없는 샘플의 제3 부분을 지질 전환 효소들을 포함하는 적어도 하나의 시약 혼합물과 접촉시키는 단계로서, 이때, 상기 적어도 하나의 반응 혼합물은 상기 제3 부분 내의 총 트리글리세라이드와 반응하는 단계;

및 (HDL 콜레스테롤과 같은) 상기 제1 성분, 총 콜레스테롤 및 총 트리글리세라이드 각각에 해당하는 검출할 수 있는 반응 생성물들을 동시에 발생시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 성분은 지질 구성요소(예컨대, 콜레스테롤) 및 단백질 구성요소를 가지고 있는 지질단백질이고, 상기 제2 성분은 상기 제1 성분의 상기 단백질 구성요소 이외의 단백질들과 관련된 동일한 지질 구성요소를 포함하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, iii) 단계의 상기 차단된 제2 성분의 존재 또는 발생은 iv) 단계의 임의의 상기 분석물질들 또는 분석물질 구성요소들의 반응을 방해하지 않는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검출할 수 있는 생성물들은 광도 측정식으로 검출할 수 있는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 혈액 샘플의 희석은 적어도 10배인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 실질적으로 세포가 없는 샘플은 5% 미만의 혈액 세포를 함유하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, ii) 단계는 여과에 의해 수행되는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, ii) 단계는 5% 이하의 혈액 세포의 용해를 유발하는 것과 같이, 실질적으로 세포 용해를 유발하지 않고 수행되는 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, ii) 단계는 5% 이하로 임의의 혈장 지질 성분들을 감소시키는 것과 같이, 실질적으로 혈장 지질 성분들에 영향을 미치지 않고 수행되는 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 성분의 반응을 일시적으로 억제하는 상기 적어도 하나의 시약은 상기 제1 성분보다 상기 제2 성분에 대해 특이적인 적어도 하나의 항체를 포함하는 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 성분의 반응을 일시적으로 억제하는 상기 적어도 하나의 시약은 적어도 하나의 항체와 같은 적어도 하나의 특이적인 바인더를 포함하며, 이는 상기 제2 성분의 지질단백질 구성요소에 대해 특이적인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 20 μ L 이하의 혈액을 필요로 하는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 적합한 알고리즘이 적어도 상기 제1 성분의 측정할 수 없는 종말점을 결정하는 데 이용되는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 알고리즘은 1차 속도식 또는 로지스틱 함수인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 측정할 수 없는 종말점은 상기 차단된 제2 성분의 실제 또는 잠재적인 차단 풀림 때문에 측정될 수 없는 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 분석물질들을 측정하기 위한 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 각각의 분석물질의 농도는 상응하는 종말점의 추정에 의하여 검출할 수 있는 생성물의 생성 또는 소모와 관련이 있으며, 이때, 적어도 하나의 종말점은 측정할 수 없는 (가상의) 종말점인 방법.

청구항 31

혈액-세포 함유 샘플의 혈장 부분 내의 적어도 세 가지 상이한 분석물질들의 농도를 결정하는 데 이용하기 위한 키트로서, 이때, 샘플은 제1 성분과 제2 성분을 함유하고, 여기서 상기 제2 성분은 상기 제2 성분이 존재하고 차단되지 않은 경우 상기 제1 성분의 측정을 방해하며, 상기 키트는,

- a) 상기 샘플을 희석하고자 제조된 제1 시약 혼합물;
- b) 세포 분리 유닛;
- c) 상기 제2 성분의 (차단) 반응을 일시적으로 및/또는 경쟁적으로 억제하여, 차단된 제2 성분을 발생시키는 제2 시약;
- d) 상기 적어도 세 가지 상이한 분석물질들의 선택적인 전환을 유발하도록 제조되어, 각각의 분석물질에 해당하는 검출할 수 있는 간접적인 생성물들을 발생시키는 적어도 세 가지의 추가적인 시약 혼합물들을 포함하는 키트.

청구항 32

제31항에 있어서, 시약 c)는 시약 혼합물 a) 내에 포함되는 키트.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 상기 적어도 세 가지의 분석물질들은 총 콜레스테롤, 총 트리글리세라이드 및 HDL 관련 콜레스테롤을 포함하는 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 전혈 샘플과 같은 세포를 함유하는 혈액 샘플 내의 지질 성분과 같은 성분들의 측정에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 특히 효소적 분석법에 의해, 특정 부류의 지질단백질과 관련된 콜레스테롤 및 트리글리세라이드와 같은 혈장 지질 성분들의 측정에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 "현장 진단" 기기에서 수행되는 자동화된 방법에 이용하기 위한 진단, 예후 및 위험 결정 분석법과 같은 분석법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신체 샘플 내 성분들의 측정은 임상 평가의 공통적인 특징이다. 신체 샘플 내의 특정 분석물질의 농도로부터, 또는 몇몇 성분들의 농도의 프로파일로부터, 여러 가지 진단이 이루어지거나 확인될 수 있고, 질병의 상태 또는 진행이 설명될 수 있거나, 여러 가지 병태의 위험이 평가될 수 있다. 점점 더 많은 수의, 질병 상태와 하나 이상의 분석물질의 농도 사이에서 알려져 있는 관련성 덕분에 단일한 분석물질 및 여러 복합물질들의 샘플 분석은 점점 더 가치 있는 도구가 되었다. 따라서, 이에 상응하여 더 많은 수의 샘플들을 점점 더 신속하게 분석하여야 한다는 임상 실험실에 대한 압력이 더 늘고 있다. 이를 만족시키기 위해서는, 더욱 신속하고, 더 높은 처리량을 나타내며, 더 간단하고/하거나 더 완전히 자동화된 분석법이 필요하다.

[0003] "현장 진단"에서 수행되는 분석법에 대한 수요는 점점 늘고 있다. 만성 질환의 1차 진료로의 이전이 계속 진행됨에 따라, 수요가 증가하고 있다. 이것은 즉각적인 조언을 받아 불확실함을 더 적게 느끼는 환자에게 유익하다. "환자 옆" 검사(near patient testing)가 환자의 협조도, 치료 순응도 및 치료적 조절을 향상시킨다는 사실도 밝혀진 바 있다(Price. (2001) BMJ 332:1285-8). 그것은 또한 의사에게 유익한데, 잠재적으로 여러 차례의 예약을 피할 수 있고, 자신의 판단을 더욱 확신할 수 있다.

[0004] 현장 진단 분석법은 특히 간단한 조작 및 신속한 결과가 필요하다는 면에서 부담이 크다. 분석법이 수 분 이상 소요되는 경우, 현장 진단 시 분석법을 수행하는 것의 많은 장점이 손실된다. 나아가, 그러한 분석법을 수행하는 직원은 의료 전문가일 가능성이 높지만, 그들은 분석 전문가가 아니어서, 여러 기구에 접근하지 못할 것이다. 따라서, 그러한 분석법은 최소한의 샘플 취급에 의존하도록 설계될 필요가 있다. 이러한 이유에서, 그리고, 시간, 인적 자원 및 비용 때문에, 단일한 분석 기구 및 단일한 시험 장치에 단일한 샘플을 이용하여, 단일한 조작으로 여러 가지 상이한 분석물질의 수준을 결정하는 것이 종종 매우 유리하다. 이로 인해, 확장된 샘플 조작, 여러 가지 시험 장치 및 여러 가지 분석 기구에 비용 및 시간을 소모할 필요가 없다.

[0005] 현장 진단 방법의 한 가지 특정한 문제점은 그것들이 좀처럼 보정(calibration)에 적응할 수 없다는 점이다. 이것은 특히, 효소를 기초로 한 분석 방법에서 우려가 되는데, 효소들은 그 속성상 보관하는 동안 불활성화에 민감하기 때문이다.

[0006] 미지의 효소 활성의 문제를 피하는 흔한 방법은 효소 반응의 종말점을 결정하는 것이다. 모든 분석물질을 생성물로 전환시키는 충분한 시약이 있고, 완전히 전환되도록 충분한 시간이 제공된다면, 생성된 최종 생성물의 양은 반응 시작 시에 존재하는 분석물질의 양에만 달려 있을 것이다. 반응을 촉진하는 충분한 활성 효소가 있는 한, 그러한 효소의 활성은 반응의 속도만을 결정할 것이고, 종말점을 결정하지 않을 것이다. 그러나, 이러한 접근법은 과량의 효소를 필요로 하며, 이는 비용을 증가시키고, 그리고/또는 충분히 긴 분석 시간을 필요로 하는데, 이는 전체 분석 시간을 늘린다. 이것은 현장 진단 분석법에서 특히 문제가 되는데, 현장 진단 분석법은 전형적으로 5-10분 내에 완료되어야 하기 때문이다.

[0007] 측정할 수 있는 종말점을 생성하지 않는 효소 반응이 특히 문제가 된다. 그러한 상황으로는, 이전 반응이 종말점에 도달하기 전에 다음 반응이 개시되거나, 병행하는 반응이 일어나는 경우의 연속적인 반응들을 포함한다. 이와 마찬가지로, 하나의 성분이 "차단" 부재 시 반응하는 차단된 제2의 성분의 존재 하에 반응하는 경우, 그러한 차단이 공유 반응에 의한 것과 같이, "영구적"인 경우에만 종말점에 도달할 수 있다. 그러나, 많은 차단 시약은 일시적인 효과만을 나타내므로, 종말점에 도달하기까지의 기간 동안 제2의 성분이 어느 정도 "차단되지 않는다" 경우에는 제1 성분의 반응의 종말점에 도달할 수 없다. 전형적인 예는 특정 지질단백질의 지질 성분, 예컨대, 고밀도 지질단백질과 관련된 콜레스테롤의 측정이다. 지질단백질 성분들의 차단은 일반적으로 일시적이며 운동에 의한 종류의 차단이다. 이것은 전형적인 종말점 분석법을 어렵게 하거나 불가능하게 하고, 고정점 측정을 기초로 한 분석법과 같은 기타 방법들이 이용되어야 한다. 이러한 사례들은 속도 의존적이어서, 장기간의 시약 부패에 대해 보상할 수 있으려면 완전히 안정적인 시약(전형적으로 건조 시약), 또는 교정기를 포함시킬 것을 요한다. 건조된 시약은 재구성 시 오차에 취약하고, 자주 긴 재구성 시간을 요하며, 건조 처리하는 동안 활성 손실을 겪는다는 단점이 있고, 특히, 장치 내 건조된 시약의 경우, 생산비용이 추가된다. 교정기는 흔히 현장 진단 분석법에 맞지 않는다.

- [0008] 지질단백질의 구조는 전형적으로 단백질 구성요소가 있는 접근 불가능한 덩어리에 단단히 결합된 지질 구성요소를 가지고 있다. 따라서, 효소 반응은 일반적으로, 지질단백질에 단단히 결합된 지질에 영향을 미치지 않을 것이고, 또는 매우 느린 속도로 영향을 미칠 것이다. 따라서, 지질단백질 내부로부터 지질의 효소 반응을 위한 시약 혼합물은 지질단백질을 "차단 해제(unlock)"하여, 지질 구성요소들을 효소(들)의 작용에 노출시키는 것을 돕는, 계면활성제와 같은 시약도 전형적으로 함유한다. 따라서, 지질단백질 성분의 "차단"은 종종 그러한 계면활성제의 작용에 대한 그 구성성분의 안정화로, 그 결과, "차단된" 성분이 효소 반응에 이용될 수 없게 된다. 그러나, 시간이 흐르면서, 반응 혼합물 내의 효소 및/또는 계면활성제는 일반적으로 차단된 지질단백질 성분에도 일부 분해를 유발하기 시작한다. 그러면, 시약의 작용이 지질단백질 구조를 열기 시작하는 경우, 지질단백질 구조는 더욱 반응성을 나타내고, 따라서 더 많이 개방되는 등 치명적인 영향을 초래한다. 따라서, 신속하게, 그리고 점점 더 많이 "차단"을 손실하여 상당한 분해를 유발하기 전에, (수 백 초와 같은) 소정 길이의 시간 동안 전혀 측정할 수 없을 만큼 반응에 참여하기 위하여, "차단된" 지질 성분에 의존할 수 있다. 그러한 일시적인 차단은 종말점 반응에 이용될 수 없는데, 종말점에 도달할 수 있기 전에 그러한 차단이 붕괴되고, 그 결과, 원하는 성분을 나타내지 않을 것이기 때문이다.
- [0009] 측정하기에 바람직한 성분이 전체량 중에서 상대적으로 소량의 특별한 유형의 지질을 함유하는 경우(예컨대, 전형적인 건강한 환자에서 전체의 30% 미만)도 중요한데, 그러면 나머지가 "차단"될 때, 이러한 차단이 상당히 풀릴(차단 해제될) 수 있기 전에 분석을 수행하는 것이 특별히 중요하다. 이는 큰 성분의 상대적으로 적은 풀림이 더 작은 성분이 분석될 때의 결과에 상당한 영향을 미칠 것이기 때문이다.
- [0010] 위의 관점에서, 현재의 현장 진단 기구는 교정기를 포함할 수 없기 때문에 액체 시약을 이용할 수 없고, 종말점이 도달할 수 없거나 측정할 수 없기 때문에 종말점 분석을 이용할 수 없다. 따라서, 그러한 기구들의 제조자들이 이용할 수 있었던 유일한 해결책은 전형적으로 건조된 형태의, 안정화된 시약을 이용하는 것이었다. 그러나 이것은 그 자체의 단점이 있다. 건조된 시약은 더 비쌌 뿐만 아니라, 그 재구성은 시간 소모적이기도 하고, 잠재적으로 믿을 수 없기도 하다. 따라서, 그러한 건조된 시약을 이용하는 기계는 아마도 효소 시약이 가끔 완전히 재구성되는 데 실패하기 때문에 예상보다 이례적인 결과를 높은 비율로 나타내는 경향이 있다. 따라서, 측정 가능한 종말점이 없는 반응을 교정기 없이 용액 시약과 믿을 수 있게 이용할 수 있도록 하는 방법은 상당히 가치가 있을 것이다.
- [0011] 분석용으로 채취되는 가장 흔한 임상 샘플은 유체, 특히 혈액과 소변인데, 그 이유는 채취 및 조작이 상대적으로 용이하기 때문이다. 혈액에서는, 전형적으로 유체 혈장의 함량이 분석된다. 혈액 유래 샘플에 대해 이루어지는 가장 일반적이고도 임상적으로 중요한 측정 일부는 혈장 지질 함량과 관련이 있다. 혈장에 존재하는 주된 지질은 인지질(PL), 트리글리세라이드(TG) 및 콜레스테롤(CH)이다. 이들 가운데 TG와 CH는 결국 선진국에서 가장 널리 퍼져있는 질병 가운데 하나인 심혈관 질환과의 관련성 때문에 특히 진단상의 관심의 대상이다.
- [0012] 지질은 본래 물에 용해되지 않으며, 혈액 내에서는 지질을 용해될 수 있게 만드는 아포지질단백질과 복합체를 이루어 수송된다. 이들 복합체인 지질단백질은 크기와 지질 대 단백질 비율을 기초로 하여 카일로마이크론, 초저밀도 지질단백질(VLDL), 중간밀도 지질단백질(IDL), 저밀도 지질단백질(LDL) 및 고밀도 지질단백질(HDL)의 5개 군으로 분류된다. 카일로마이크론은 기본적으로 지방 방울이며, 약 90%까지 TG로 이루어져 있다. 카일로마이크론은 회장으로부터 지방 조직 및 간으로 식이 지질을 수송하는 전달 매체로 기능하며, 식사 후 짧은 기간 동안만 일반 순환 내에 존재한다.
- [0013] 나머지 네 가지 부류의 지질단백질은 간에서 생산된다. VLDL, IDL 및 LDL은 간에서 조직으로 지질을 전달하는 일을 담당하지만, 다섯 번째 부류인 HDL은 말초 조직으로부터 추가적인 간담즙성 분비를 위해 다시 간으로 여분의 지질을 역수송하는 데 관여한다. VLDL과 IDL은 반감기가 짧고, 주로 TG를 조직으로 전달한다. LDL과 HDL은 반감기가 길며, 혈액 콜레스테롤 항상성의 주된 참여자이다. 평균적으로, LDL과 HDL은 혈액에 존재하는 콜레스테롤의 약 95%를 전달하는데, LDL은 약 70%를, HDL은 약 25%를 전달한다.
- [0014] 지질단백질에는 아포지질단백질(Apo) A, B, C, D 및 E의 다섯 가지 상이한 유형의 단백질이 존재하며, 각 유형은 추가로 세분될 수 있다. 아포지질단백질은 말초 조직에서 지질단백질에 작용하는 효소 활성화뿐만 아니라, 지질단백질의 형성, 분비 및 수송에 중요하다. 아포지질단백질 B(ApoB)는 VLDL, IDL 및 LDL의 주요 단백질이다. LDL에서는 아포지질단백질 B가 유일한 단백질이다. HDL은 apoB가 없고, 그 주요 단백질은 apo-A1이다.
- [0015] 높은 농도의 TG는 당뇨, 심혈관 질환, 고지혈증, 고글리세라이드혈증 I형 및 IV형 및 신증후군과 같은 상이한 병리생리학적 장애와 관련이 있다. 간 감염 및 영양불량에서 낮은 농도가 발견된다.

- [0016] 여러 역학 연구로부터, 카일로마이크론, VLDL, IDL 및 LDL과 관련된 CH가 심혈관 질환(CVD)의 주요 위험인자이며, 농도 증가가 CVD의 위험 증가와 관련이 있다는 점은 잘 확립된 사실이다. LDL 입자와 관련된 CH는 주요 위험인자로 간주되고 있으며, 이들 성분들 중 단연코 가장 크다. 반면, HDL과 관련된 CH는 심혈관 질환의 위험과는 역비례하여 관련이 있다. HDL 농도가 낮을수록, 심혈관 질환의 위험은 더 높다. 따라서, 잠재적으로 다른 인자들과 조합하여 CVD의 위험을 공식화하는 데 있어서뿐만 아니라, 심혈관 질환을 진단하고 예측하기 위하여, 전형적으로 총 CH와 함께, LDL 및/또는 HDL과 연관이 있는 CH를 결정하는 것은 통례이다.
- [0017] CH의 정량을 위해 현재 두 가지 방법이 일상적으로 이용된다. 두 가지 방법 모두 효소적이다. 첫 번째 방법에서는 과산화수소 발생에 의한 착색 또는 형광 신호를 발생시키기 위하여 콜레스테롤 에스테르 가수분해효소 및 콜레스테롤 산화효소로 시작하는 효소 사슬이 이용된다. 나머지 방법은 콜레스테롤 산화효소 대신 콜레스테롤 탈수소효소로 대체하고, 생성된 NADH 또는 NADPH의 양을 기초로 하여 샘플 내의 CH의 양을 결정한다. 이들 방법은 반응이 효과적으로 진행될 수 있기 전에 지질단백질 담체로부터의 적어도 부분적인 콜레스테롤의 방출에 의존한다. 계면활성제가 이러한 기능을 위해 일반적으로 이용되고, 당해 기술 분야에서 잘 알려져 있다.
- [0018] HDL과 관련된 CH는 비 HDL 지질단백질로부터 이러한 부류의 지질단백질을 물리적으로 또는 차단에 의해 분리함으로써 결정할 수 있다. 비 HDL을 이용할 수 없게 만든 후에, 총 CH의 효소적 방법을 이용하여 HDL과 관련된 CH를 측정한다. 그러나, 공지된 차단 방법은 일시적이고, 종말점에 도달하기 전에 차단이 풀리게 되므로, 이런 반응은 그 종말점까지 이어질 수 없다. 이에 대한 예외는 비 HDL이 물리적으로 분리될 수 있는 경우인데, 이는 현장 진단 기구에는 이용할 수 없는 원심분리와 같은 기법을 요한다.
- [0019] 원래 이용되었고, 여전히 많이 이용되는 방법은 다음 중 하나를 이용하는 비 HDL의 침전법이였다:
- [0020] (i) 헤파린/Mg²⁺ (Hainline A et al (1982) Manual of laboratory operations, lipid and lipoprotein analysis, 2nd ed. Bethesda, MD: US department of Health and Human Services, 1982:151 pp),
- [0021] (ii) 포스포텅스테이트-Mg²⁺ (Lopes-Virella MF et al (1977) Clin Chem 23:882-4),
- [0022] (iii) 폴리에틸렌 글리콜(PEG) (Viikari J, (1976) Scan J Clin Lab Invest 35:265-8) 및
- [0023] (iv) 텍스트란 황산-Mg²⁺ (Finley et al (1978) Clin Chem 24:931-3).
- [0024] 그런 다음, 침전된 비 HDL은 원심분리에 의해 제거된다. 후자의 방법은 여전히 콜레스테롤 표준법 실험실 네트워크(Cholesterol Reference Method Laboratory Network)에 의해 HDL과 관련된 CH 측정을 위한 참조 방법으로 권고된다(Kimberly et al (1999) Clin Chem 45:1803-12).
- [0025] 다른 방법들은 전기영동(Conlin D et al (1979) 25:1965-9) 또는 크로마토그래피(Usui et al (2000) Clin Chem 46:63-72)에 의한 분리법을 이용했다.
- [0026] 위의 방법들은 효과적이지만, 긴 분리 단계들과 수많은 실험실 기구를 필요로 한다. 수고스러운 샘플 전처리를 없애기 위해, 두 가지 상이한 경로가 취해져 왔다. HDL의 분리 및 정량을 시험 장치로 통합하는 현장 진단 기구가 개발되었는데, 이들은 콜레스테크(Cholestech) HDL 분석 장치 및 방법(US5213965)과 같은 카세트 또는 시약이 주입된 스트림입 수 있다.
- [0027] 자동 임상 기구를 위해, HDL과 관련된 CH 분획을 측정하기 위해 비 HDL 지질단백질을 물리적으로 분리할 필요가 없는 균일한 방법이 개발되었다. 비 HDL 입자들은 상이한 방법들에 의해 차단되어, CH 대사 효소에 접근할 수 없게 되었다. 가장 최근에 개발된 것은 선택적으로 HDL을 용해시키는 매우 특이적인 계면활성제였다. 그러한 상황에서, 비 HDL 지질을 지질단백질 형태로 남겨두어 효소 작용에 대부분 접근 불가능하게 하는 계면활성제만을 포함시킴으로써 비 HDL을 효과적으로 "차단"하는 것은, HDL을 위한 반응 혼합물이다.
- [0028] LDL과 관련된 콜레스테롤은 일반적으로 프리드왈드 식(Friedewald WT et al (1972) Clin Chem 18:499-501)을 이용하여 계산식으로 결정된다:
- [0029] $LDL = \text{총 CH} - (HDL + TG/2)$
- [0030] 이 방법은 편리하고, 대부분의 경우에서 충분히 정확하지만, 잘 알려져 있는 한계, 특히, 환자가 채혈 전에 금식해야 한다는 점(금식은 혈액에서 카일로마이크론을 대폭 감소시킴)과 TG 수준이 4g/L 미만이어야 하는 요건이 문제가 된다. 따라서, NIH가 후원한 미국 콜레스테롤 교육 프로그램(National Cholesterol Education Program, NCEP) 성인 치료 패널 III(Adult Treatment Panel III, ATPIII) 지침은 총 CH, HDL과 관련된 CH 및 TG로부터 계산하기보다는 LDL 관련된 CH를 직접적으로 측정할 것을 권고하였다. 그러나, 최근 보고는 계산된 수준에 비해

직접적으로 측정된 LDL 수준의 임상적 우수성에 의문을 표시하고 있다(Mora et al (2009) Clin Chem 55:888-94).

- [0031] 본래, LDL 관련된 CH는 초원심분리를 이용하여 측정하였다(Havel RJ et al, J Clin Invest 1955;34:1345-53). 이것은 여전히 가장 많이 이용되는 참조 방법이지만, 분명히 샘플 전처리를 필요로 한다. LDL CH 분획을 측정하기 위하여 비 LDL 지질단백질을 물리적으로 분리할 필요가 없는 균일한 방법이 나중에 개발되었다(US5888827, US5925534).
- [0032] VLDL과 관련된 CH는 본래 초원심분리를 이용하여 측정하였다. 이것은 바람직한 참조 방법으로 남아있으나, 최근 수 년 동안, VLDL과 관련된 CH를 결정하는 균일한 방법이 개발된 바 있다. 이는 US6986998 및 US7208287의 방법들을 포함한다.
- [0033] IDL과 관련이 있는 CH("VLDL 잔유물" 또는 "잔유물 유사 입자"이라고도 불림)는 일반적으로 초원심분리, 고성능 액체 크로마토그래피 또는 전기영동을 이용하여 결정된다. IDL 관련 콜레스테롤의 추가적인 선택적 효소적 분해를 위해 특이적인 계면활성제를 이용하는 두 가지 균일한 방법이 최근 개발되었다(US7272047 및 US2007/0161068).
- [0034] 최근 수 년간, 비 HDL의 측정이 LDL 측정보다 더 심장 사건을 예방할 수 있다는 몇몇 보고가 제안된 바 있다 (van Deventer et al Clin Chem (2011) 57:490-501; Sniderman et al (2011) Circ Cardiovasc Outcomes 4:337-45). 특히, 비 HDL은 상승된 TG 수준에서 우세할 수 있다(Sniderman et al (2010) J Clin Lipidol 4:152-5). 비 HDL은 현재 임의의 공지된 선행 분석 방법으로 직접적으로 측정되지 않고, 총 CH와 HDL 관련 콜레스테롤 사이의 차이로 계산된다(비 HDL = 총 CH - HDL). 그러나, 본 발명은 비 HDL 성분들의 직접적인 또는 간접적인 (계산된) 측정을 가능하게 한다. 본 발명의 일 양태에서, 적어도 하나의 분석물질이 비 HDL 지질단백질 집단에 결합된다. 특히, 비 HDL 콜레스테롤이 매우 바람직한 분석물질이다. 비 HDL 콜레스테롤은 예를 들어, 총 TG 및 총 CH와 함께, 지질 패널 분석법에서 측정될 수 있다.
- [0035] 스크리닝의 목적을 위해, 비 HDL을 위한 직접적인 분석법은 총 CH와 HDL에 대해 두 가지 분석을 수행하고, 그 차이로 비 HDL을 계산하는 것에 비해 분석 시간과 비용을 줄이는 장점이 있을 것이다(실시예 10). 따라서, 본 발명의 추가적인 양태에서, 하나의 분석물질이 (비 HDL 콜레스테롤과 같은) 비 HD 지질단백질에 결합되어, 직접적으로 측정될 것이다(즉, 두 가지 다른 측정치의 차이를 취함으로써가 아님). 이러한 분석물질은 임의의 다른 분석물질들과 함께 또는 그것들 없이 측정될 수 있다. 나아가, 비 HDL(즉 비 HDL CH)을 직접적으로 측정하는 것의 장점은 종말점 추정(즉, 본원에 기술된 바와 같이 가상 종말점의 계산)을 이용한 분석법과 종래의 기법들을 이용하는 분석법에도 확장된다. 따라서, 추가적인 양태에서 본 발명은 비 HD 콜레스테롤과 같은 비 HD 지질단백질에 결합된 지질 성분의 직접적인 측정을 위한 분석법을 제공한다. 그러한 값을 건강한 개체들의 집단 및/또는 고위험 또는 고경향성의 CVD를 겪고 있는 개체 집단으로부터 유래된 역치와 같이, 적당한 역치와 비교함으로써, CVD의 위험 또는 경향성을 정하는, 그에 상응하는 방법이 제공된다.
- [0036] TG는 일상적으로 4단계 효소적 반응으로 결정되는데, 이때, 지질단백질 리파아제는 TG를 비에스테르화 글리세롤과 유리 지방산으로 가수분해한다. 그런 다음, 글리세롤은 인산화되고(글리세로키나아제) 디하이드록시아세톤포스페이트와 과산화수소로 산화되며(글리세롤-3-포스페이트 산화효소), 이는 착색, 형광 또는 화학발광 신호를 생성하는 데 이용된다.
- [0037] 상이한 지질단백질 부류의 CH 측정과 함께, 특정 지질단백질 부류의 TG 측정은, 상이한 지질단백질 부류의 상이한 화학적 및 물리적 특징들을 이용하는 여러 가지 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0038] 위에 논의된 바와 같이, 특정 지질단백질 부류의 지질 성분의 측정, 예컨대, HDL에서 콜레스테롤은 현장 진단 분석법에서 특별한 문제를 이룬다. 현재의 방법은 특정 지질단백질 부류 이외의 지질단백질들에 존재하는 특별한 지질 성분을 일시적으로 차단한 다음, 특정 지질단백질 부류와 관련이 있는 특별한 지질 성분을 측정하는 것에 의존한다. 그러한 방법은 원치 않는 지질단백질들을 합성 고분자 또는 다가 음이온(US5773304, US6811994) 또는 항체(US4828986, US6162607) 또는 폴리에틸렌 글리콜로 개질된 효소와 결합된 시클로텍스트린(US5691159)으로 차단하는 것에 의존하거나, 특정 계면활성제를 이용한다(US7208287, US7272047).
- [0039] 차단이 일시적이어서 이들 반응에 대한 진정한 종말점을 측정하는 것이 불가능하므로, 유일한 진정한 종말점은 네 가지 부류의 지질단백질 모두에 존재하는 특정 지질 성분의 종말점이다. 따라서, 특정 지질단백질의 특별한 지질 성분은 특정 지질단백질 이외의 지질단백질들에 존재하는 특별한 지질 성분이 별로 방해가 되지 않도록 선택된 고정된 시점(대개 5분)에서, 또는 반응의 처음 몇 분 동안 활동적으로, 측정된다. 두 가지 경우 모두, 장

기간의 시약 부패를 보상하기 위하여, 완전히 안정적인 시약, 즉, 건조 시약이나 교정기의 포함을 필요로 한다.

[0040] 상이한 접근법은, 검출할 수 있는 생성물을 제공하지 않는 효소적 반응에서, 분석되는 특정 지질단백질 부류 이외의 지질단백질들과 관련된 특별한 지질 성분을 선택적으로 제거하는 것이다. 그런 다음, 특정 단백질 부류의 특별한 지질 성분을 검출 가능한 생성물로 전환시킨다. 특정 지질단백질 부류들과 선택적으로 반응하는 계면활성제를 이용하는 여러 가지 방법들이 기술된 바 있다(EP 1164376, US5925534, US6194164, US6818414, US6893832).

[0041] 그러나, 완전한 제거를 달성하기 위해서는, 반응이 종말점에 도달하도록 해야 하고, 그것은 시간이 걸린다. 이에 필요한 시간은 현장 진단 분석법에는, 특히 다수의 분석물질을 측정하는 현장 진단 분석법("패널" 분석법이라고 알려짐)에는 너무 긴 시간이다. 또한, 이러한 접근법은 분석되는 특정 지질단백질 이외의 지질단백질들 내의 특별한 지질 구성요소의 불완전한 제거 또는 특정 지질단백질 내의 특별한 지질 구성요소의 비 특이적 제거에 의해 유발되는 부정확성의 문제가 있다. 실제로는, 그 때, 이러한 유형의 분석법들은 고정된 지점의 측정도 요구하며, 따라서, 장기간의 시약 부패를 보상하기 위하여, 완전히 안정적인 시약, 즉, 건조 시약이나 교정기 포함에 의존한다.

[0042] 위의 관점에서, (지질 성분과 같은) 하나 또는 다수의 혈장 성분들을 측정하는 개선된 현장 진단 분석법, 그리고 특히, 특정 지질단백질 부류의 지질 성분들을 포함시키는 분석법이 명백히 필요하다. 그러한 분석법이 액체 시약을 허용하고, 교정기를 필요로 하지 않으며/않거나 총 분석시간이 짧다면, 유리할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0043] 이제 본 발명자들은 (전혈과 같은) 혈액-세포 함유 샘플을 이용하고, 액체 시약을 이용하며, 총 분석시간이 짧고, 교정기를 필요로 하지 않는, 현장 진단 기구에 적합한, 분석 방법을 구축하는 것이 가능하다는 점을 확립하였다.

[0044] 본 발명자들은 놀랍게도 종말점에 이론상으로 도달할 수 없고/없거나 실제로 측정할 수 없는 효소 반응의 종말점을 결정하는 것이 가능하다는 점을 발견했다. 덕분에, 종말점이 이전에는 고려되지 않았던 상황에서 적용되는 종말점 분석법의 여러 가지 장점들이 가능하게 되었다. 예를 들어, 여러 가지 효소들이 관여하는 순서에서, 생성물은 소모될 것이므로, 종말점에는 도달할 수 없다. 또한, 이전 반응이 종말점에 도달하기 전에 다음 단계가 시작되는 연속적인 효소 반응에서, 또는 반응들의 초기 진행에 충분한 차이가 있는, 병행 효소 반응에서와 같이, 종말점이 직접적으로 측정될 수 없는 사례에서도 마찬가지이다.

[0045] 종말점이 측정될 수 없거나 측정되지 않는 상황에서는, 종말점은 직접적으로 측정되기 보다는 적합한 알고리즘을 이용하여 직접적인 측정으로 달성되는 것과 유사한 정확도와 CV로 계산될 수 있다. 필요한 것은 반응이 충분한 길이의 시간 동안 모니터링되어야 한다는 것, 그리고 그 후 적합한 알고리즘을 이용하여 종말점을 정확하게 예측하는 것이다. 정확한 알고리즘과 식은 곡선 맞춤의 목적을 위해 당해 기술 분야에서 통상적으로 이용되었으며 따라서 잘 알려져 있지만, 측정될 수 없는 종말점을 예측하기 위하여 이전에는 이러한 방식으로 응용되지는 않았다. 전형적으로, 반응은 표적 분석물질의 적어도 50%가 전환될 때까지 모니터링되어야 하지만, 이는 진행 곡선의 작은 부분만을 구성할 수 있다. 표적 분석물질의 적어도 40%, 바람직하게는 적어도 50% 및 선택적으로는 적어도 60%가 소모될 때까지 반응을 모니터링하는 것이 여러 구현예에서 적절하다.

[0046] 일 구현예에서, (임의의 차단된 성분들의 차단 풀림 및 반응하기와 같은) 임의의 병행 반응이 상당하지 않도록 측정 간격이 선택되는 것이 바람직하다.

[0047] 대안적인 구현예에서는, 임의의 차단된 성분들의 차단 풀림 및 반응하기와 같은 병행 반응이 측정할 수 있는 정도로 발생할 수 있으나, 그러한 병행 반응의 영향은 샘플로부터 둘 이상의 분석물질이 측정되는 측정 후 분석법에 의해 보정되는 일정한 정도까지일 수 있다. 예를 들어, 지질 패널 분석에서와 같이, 복수의 지질 분석물질들이 측정될 때, HDL 측정 시 (비 HDL 성분의 부분적인 차단 풀림 및 반응에 의한 것과 같이) 비 HDL의 방해는

[0048] 총 콜레스테롤 = HDL + 비 HDL

[0049] 에 따라, HDL과 총 콜레스테롤에 대한 관독치와 HDL 분석법에 미치는 비 HDL의 영향에 대한 소정의 표준 곡선이 관여되는 반복적인 절차에서 부분적으로 보정될 수 있다(실시예 6).

[0050] 또한, 본 발명자들은 측정할 수 있는 종말점을 생성하는 반응들을 이용하는 종말점 추정법 이용 시, 액체 시약

을 이용하는 현장 진단 분석법에 상당한 장점을 제공할 수 있음을 발견했다. 종말점 측정은 보관기간에 따른 시약 활성 손실이 분석 시간에 미치는 영향을 고려해야 하며, 추정된 종말점을 이용하면 이를 막을 수 있고, 결과적으로 이용되는 측정 시간을 더 짧게 할 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0051] 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 혈액-세포 함유 샘플의 혈장 부분 내의 적어도 하나의 분석물질의 농도를 측정하는 효소적 방법을 제공하며, 이때, 샘플은 제1 성분 및 제2 성분을 함유하고, 여기서 상기 제2 성분이 존재하고 차단이 풀릴 경우, 상기 제2 성분이 상기 제1 성분의 측정을 방해하고, 상기 방법은
- [0052] i) 상기 혈액 세포 함유 샘플을, 샘플을 희석시키는 시약 혼합물과 접촉시키는 단계;
- [0053] ii) 실질적으로 세포가 없는 샘플을 제공하도록 혈액 세포를 실질적으로 제거하는 단계;
- [0054] iii) 상기 샘플을 상기 제2 성분의 반응을 일시적으로 및/또는 경쟁적으로 억제하는 적어도 하나의 시약과 접촉시켜, 차단된 제2 성분을 발생시키는 단계;
- [0055] iv) 상기 샘플을 상기 적어도 하나의 분석물질 중 각 분석물질의 적어도 하나의 구성요소에 대해 적어도 하나의 전환 효소를 포함하는 적어도 하나의 시약 혼합물과 접촉시켜, 직접적으로 또는 간접적으로 검출할 수 있는 반응 생성물을 발생시키도록 이러한 분석물질 또는 각각의 분석물질의 선택적인 반응을 유발하게 하는 단계로, 이때, 상기 분석물질들, 또는 상기 분석물질들 중 하나는 상기 제1 성분인 단계;
- [0056] v) 상기 검출할 수 있는 반응 생성물 또는 생성물들을 모니터링하는 단계;
- [0057] vi) 상기 검출할 수 있는 생성물 또는 생성물들의 양 및/또는 상기 검출할 수 있는 생성물 또는 생성물들의 생성 속도를 상기 혈액 샘플 내의 상기 적어도 하나의 분석물질 또는 각각의 상기 적어도 하나의 분석물질의 농도와 관련짓는 단계로서, 이때, 적어도 상기 제1 성분의 농도는 측정할 수 없는 (가상의) 종말점을 추정하여 상응하는 검출할 수 있는 반응 생성물과 관련이 있는 단계;를 포함하며, 이때, iii) 단계는 iv) 단계까지 및 iv) 단계를 포함하는, 그러나 v) 내지 vi) 단계 전의 임의의 단계에서 수행될 수 있고, iii) 단계의 시약은 별도로 샘플에 적용될 수 있거나, i) 또는 iv) 단계의 시약 혼합물에 포함될 수 있다.
- [0058] 바람직한 양태에서, 방법은 상기 세포를 함유하는 샘플에서 둘, 셋 또는 그 이상의 분석물질들과 같이, 복수의 분석물질들을 수반하여(예컨대, 동시에) 측정하기 위한 것이다.
- [0059] 검출할 수 있는 "생성물"의 검출이 나타나는 본 발명의 모든 양태에서, 이는 맥락이 허용하는 경우, 검출할 수 있는 반응물질 또는 출발물질의 검출도 명백히 가능하게 할 것이다. 대부분의 사례에서 이루어질 필요가 있는 유일한 변경은 반응물질 또는 출발물질이 소모되어, 농도가 감소할 것이라는 점이다. 생성물과 출발물질은 전형적으로 공지된 화학량론에 의해 관련이 있으므로, 따라서, 반응물질의 감소는 생성물을 검출하는 간접적인 방법이다. 따라서, 모든 적합한 생성물 검출은 하나 이상의 반응물질의 소모를 관찰하는 것에 의해 이루어질 수 있다.
- [0060] 추가적인 양태에서, 본 발명은 추가적으로 혈액-세포 함유 샘플의 혈장 부분의 적어도 세 가지 상이한 분석물질들의 농도를 결정하는 용도의 키트를 제공하며, 이때 이러한 샘플은 제1 성분과 제2 성분을 함유하고, 여기서 상기 제2 성분은 상기 제2 성분이 존재하고 차단이 풀릴 경우, 상기 제1 성분의 측정을 방해하며, 상기 키트는
- [0061] a) 상기 샘플을 희석하고자 제조된 제1 시약 혼합물;
- [0062] b) 세포 분리 유닛;
- [0063] c) 상기 제2 성분의 (차단) 반응을 일시적으로 및/또는 경쟁적으로 억제하여, 차단된 제2 성분을 발생시키는 제2 시약;
- [0064] d) 상기 적어도 세 가지 상이한 분석물질들의 선택적인 전환을 유발하도록 제조되어, 각각의 분석물질에 해당하는 검출할 수 있는 간접적인 생성물들을 발생시키는 적어도 세 가지의 추가적인 시약 혼합물들을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0065] 이에, 본 발명은 다음과 같은 비 제한적인 실시예 및 첨부된 도면에 의해 추가로 설명된다.
도 1은 비 HDL과 관련된 콜레스테롤의 존재 하에 HDL 관련 콜레스테롤의 추정된, 측정할 수 없는 종말점이 비

HDL과 관련된 콜레스테롤 부재 시의 동량의 HDL 관련 콜레스테롤의 측정할 수 있는 종말점과 일치함을 보여준다.

도 2는 로슈(Roche) TG 분석에서 종말점, 고정점 및 추정된 종말점 측정치를 비교한 것으로, 고정점 측정치가 시약 저장 시간에 강하게 의존적인 반면, 종말점과 추정된 종말점 측정치는 그렇지 않음을 보여준다.

도 3은 상업적인 HDL 시약을 이용하는 HDL 측정에서 종말점 추정의 유용함을 보여준다. 추정된 종말점은 결정된 HDL 수준과 우수하게 관련성을 나타내었다.

도 4는 임상 실험실 방법에 의해 얻어진 HDL 수준을 아피니온(Afinion) 현장 진단 기구에서 추정된 종말점 방법에 의해 얻어진 HDL 수준과 비교한 것이다. 도면은 각각 "1차" 및 "로지스틱" 맞춤 알고리즘을 이용하여 아피니온 방법과 실험실 방법으로 결정한 HDL 수준을 비교한 것이다.

도 5는 상업적인 현장 진단 방법에 의해 얻어진 HDL 수준을 아피니온 현장 진단 기구에서 추정된 종말점 방법에 의해 얻어진 HDL 수준과 비교한 것이다. 도면은 아피니온 방법 및 비교되는 상업적 현장 진단 방법에 의해 결정된 HDL 수준을 비교한 결과를 보여준다. 맞춤이 본 발명의 구현예(도 4)에 비해 눈에 띄게 형편없다.

도 6은 HDL 분석법에 필요한 비 HDL 차단 완충액이 일반적인 희석 완충액으로 이용될 수 있음을 보여준다. 차단 완충액을 희석 완충액으로 이용하여, 아피니온 현장 진단 기구에서 얻어진 TG 수준을 임상 실험실 방법으로 얻어진 결과와 비슷하다.

도 7은 아피니온 현장 진단 기구에서 추정된 종말점 방법으로 얻어진 비 HDL 수준을 CRMLN 인증 실험실에서 얻어진 비 HDL 수준과 비교한 것이다.

도 8은 아피니온 현장 진단 분석장치로 결정한 전혈 및 혈장 지질 프로파일을 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0066] 본 발명은 혈액-세포 함유 샘플의 적어도 하나의 분석물질의 농도가 측정되는 분석 방법을 제공한다.
- [0067] 본원에 사용된 용어 "분석물질"은 측정을 원하는 성분 또는 성분들 집단을 나타내는 데 사용된다. 따라서, 분석물질은 HDL 콜레스테롤과 같은 단일한 성분일 수 있거나, 성분들 세트일 수 있다. 전형적으로 그러한 세트는 콜레스테롤을 함유하는 모든 지질단백질 세트와 같이, 공통적인 특징이 있을 수 있다.
- [0068] 본 발명에 이용하기에 가장 바람직한 분석물질은 지질 성분으로, 말하자면 샘플의 혈장 부분의 특별한 유형의 지질(예컨대, TG 또는 CH), 특별한 지질단백질로 존재하는 특별한 유형의 지질의 일부분(예컨대, HDL CH) 또는 특별한 지질단백질 세트(예컨대, 비 HDL CH)의 총량이다.
- [0069] 종말점 추정의 이용은 단일 성분의 분석법에 유용하며, 여기서 그 성분의 특별한 구성요소의 전환(예컨대, HDL의 지질 구성요소의 전환)의 종말점은 본원에 나타난 방법에 의해 추정될 것이다. 그러나 이러한 기법은 여러 분석물질들을 위한 병행 분석법(종종 "패널 분석법"이라 함)에서도 매우 가치가 있다. 이것은 특히 현장 진단에서 적용된다. 그러한 경우, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 그 이상의 분석물질들이 이러한 분석법에서 측정될 수 있다. 나아가, 기기는 측정된 데이터로부터 다른 분석물질들의 수준을 계산할 수 있을 것이며, 따라서 직접적으로 측정되는 더 많은 성분들에 대해 보고할 수 있을 것이다(예를 들어, 본원의 논의 참조). 본 발명의 패널 분석법 구현예에서, 적어도 세 가지의 분석물질들이 측정되는 것이 바람직하다.
- [0070] 적어도 두 가지(예컨대, 적어도 세 가지) 분석물질들이 측정되는 경우, 종말점 추정 방법은 하나 이상의 그러한 분석물질들의 분석에 이용될 것이다. 적어도 하나의 분석물질이 다른 성분의 차단 없이 편리하게/믿을 수 있게 측정될 수 없는 제1 성분인 경우, 이러한 제1 성분은 측정할 수 없는 (가상의) 종말점을 추정하여 분석될 것이다. 그러나, 이러한 방법과 조합하여, 총 분석에 필요한 시간을 줄이기 위하여 종말점 방법에 의해 측정될 수 있는 다른 성분들도 종말점 추정에 의해서 측정될 수 있다. 따라서, 일 구현예에서는 모든 분석물질들은, 적어도 하나의 분석물질이 측정할 수 없는 (가상의) 종말점을 추정하여 측정되는 종말점 추정 방법에 의해 측정된다.
- [0071] 위에 나타낸 바와 같이, 바람직한 분석물질들은 혈액 샘플의 지질 성분들이다. 따라서, 전형적인 분석물질은 전체로서 및/또는 VLDL, IDL, LDL 및 HDL로 이루어지는 군으로부터의 특정 지질단백질과 관련이 있는, 콜레스테롤, 트리글리세라이드 또는 인지질이다. 지질단백질들의 집단과 관련된 콜레스테롤, 트리글리세라이드 및/또는 인지질(예컨대, 비 HDL CH) 또한 측정될 수 있으며, 추가로 바람직한 분석물질을 형성할 수 있다.

- [0072] 본원의 "제1 성분"은 전형적으로 HDL-CH 또는 비 HDL-CH과 같은 특별한 지질단백질 (또는 지질단백질들의 집단)과 관련된 특별한 지질일 것이다. 따라서, 전형적으로 상기 제1 성분은 HDL과 관련된 콜레스테롤과 같은, VLDL, IDL, LDL 및 HDL로부터 선택된 적어도 하나의 지질단백질 구성요소와 관련된 콜레스테롤, 트리글리세라이드 또는 인지질로부터 선택된 지질 구성요소를 가지고 있는 하나의 분석물질이다.
- [0073] 본원에 표현된 바와 같은 "제1 성분"의 측정과 "제2 성분" 사이에 유발된 방해는 일반적으로 제2 성분으로부터 제1 성분의 지질 구성요소의 반응을 구별할 필요로부터 기인할 것이다. 따라서, 전형적으로, 제1 성분과 제2 성분은 동일한 지질 구성요소(들)를 포함할 것이다. 전형적인 예에서, 비 HDL-CH(제2 성분)의 존재 하에 HDL-CH(제1 성분)이 분석물질을 측정하는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 제2 성분의 "차단"없이 용이하게 이루어질 수 없는데, 지질 구성요소들이 둘 다 CH이어서, 양자가 반응할 수 있게 되면, 그것들을 구별하는 것이 불가능하기 때문이다. 그러한 상황에서 제2 성분은 "차단"되며, 그 결과 오로지 또는 주로 제1 성분만 반응에 이용 가능하다.
- [0074] 성분들(특히 본원에 논의된 바와 같이 "제2 성분")이 "차단"될 수 있는 방법들이 많이 있다. 이들 방법 중 여러 가지가 본원에서 논의되며, 나머지 방법들은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 알려져 있다. 그러한 차단이 영구적이거나 영구적으로 이루어질 수 있다면(예컨대, 차단 모이어티의 일부 공유적 부작에 의해), (그것은 분석 방법의 속도를 높이기 위해서 여전히 장점이 될 수 있지만) 종말점 추정은 불필요하다. 그러나, 현재 알려져 있고/있거나 널리 사용되는 기법들은 "일시적인" 차단 방법으로, 말하자면 제2 성분은 완전히 또는 대체로 생산성이 없게 되지만, 독립적으로 또는 본원에 기술된 공정의 iv) 단계에 사용된 효소적 전환 시약 및/또는 계면활성제의 존재 하에 이러한 반응성을 다시 획득한다. 본원에 이용된 바와 같이, 성분의 반응을 "일시적으로" 억제하는 시약은 적어도 60초 동안, 바람직하게는 적어도 240초 동안, 그리고 가장 바람직하게는 적어도 360초 동안 적당한 조건(예컨대, iv) 단계의 조건) 하에서 그러한 성분의 상당한 반응을 억제할 것이다. 상당한 반응이란 그러한 성분의 임의의 구성요소(예컨대, 지질 부분)의 10%를 초과하는, 바람직하게는 5%를 초과하는, 그리고 가장 바람직하게는 3%를 초과하는 반응을 의미한다.
- [0075] 상대적으로, "차단된" 성분은 본원의 임의의 구현예에 기술된 바와 같이 iv) 단계의 조건과 같은 반응 조건에 처하게 되었을 때, 적어도 60초, 바람직하게는 적어도 240초, 더욱 바람직하게는 적어도 360초의 기간에 걸쳐, 10%를 초과하는, 바람직하게는 5%를 초과하는, 더욱 바람직하게는 3%를 초과하는 정도까지 그 지질 구성요소의 반응을 겪지 않을 것이다.
- [0076] 바람직한 구현예에서, i), ii) 및/또는 iii) 단계의 조건들은 혈액 샘플의 세포들이 온전한 상태로 남아있거나, 실질적으로 온전하게 남아있도록 선택된다(예컨대, 세포들의 10% 미만, 바람직하게는 5% 미만, 그리고 가장 바람직하게는 3% 미만(예컨대, 0.1 내지 3%)이 i)~iii)의 단계 도중에 용해를 겪는다). 이 점에 있어서, 이온 강도 및 계면활성제 유형/농도를 포함하는 인자들이 특히 중요하다.
- [0077] 선택적으로, US6818414에 개시된 바와 같은 반응 촉진제들이 시약 용액에, 특히 iv) 단계에서 반응 속도를 증가시켜 분석 시간을 줄이기 위해 포함될 수 있다.
- [0078] 본 발명에서, 이러한 방법 및 다른 양태들은 적어도 하나의 분석물질의 측정에 관한 것이다. 그러한 분석물질들은 전형적으로는 지질 분석물질들일 것이고, 각각은 독립적으로 트리글리세라이드, 콜레스테롤 등과 같은 일부 지질 성분의 총량일 수 있고, 또는 특정 지질단백질 또는 특정 지질단백질들의 집단과 관련된 지질 성분일 수 있다. 이들의 불완전한 예로는 지질 성분들인 콜레스테롤, 트리글리세라이드 또는 인지질과, 임의의 지질단백질 VLDL, IDL, LDL 및 HDL과의 모든 조합뿐만 아니라, 그러한 인지질과 관련되지 않은 각각의 총 지질 성분의 상응하는 부분들을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 분석물질은 HDL 콜레스테롤과 비 HDL 콜레스테롤을 포함하며, 비 HDL 콜레스테롤은 총 콜레스테롤 중에서 HDL 지질단백질에 결합되지 않은 부분이다. 특별히 바람직한 분석물질로는 총 TG, 총 CH, 비 HDL, LDL, 작은 밀도의 LDL 및 HDL 콜레스테롤을 포함한다.
- [0079] 특정 지질단백질들과 관련된 일부 지질 성분들의 일부분을 측정하기 위하여, 그러한 성분 또는 동일한 지질 성분을 가지고 있는 모든 다른 지질단백질들을 "차단"하거나 생산성이 없도록 만드는 것이 필수적이다. 이는 보통 방해가 되는 다른 성분의 존재 하에 하나의 성분을 측정할 수 있게 한다.
- [0080] 이러한 차단은 그 자체로 알려져 있으며, 많은 예들이 본원에서 아래에 기술되어 있지만, 이를 달성하기 위한 공지된 방법들은 영구적인 차단을 가져오지 않거나, 지질 성분을 영구적으로 유지하지 않는다. 오히려, 소정의 기간 후에 및/또는 샘플 어딘가에서의 지질 성분의 농도가 너무 낮게 떨어지면, 차단이 실패하기 시작할 것이고, 지질 성분이 반응성을 나타낼 것이다. 따라서, 그러한 상황에서, 차단된 성분을 이루고 있는 동일한 지

질 구성요소를 소모하는 반응은 그 종말점까지 진행될 수 없는데, 이는 종말점에 도달하기 전에 차단이 효과가 없어질 것이기 때문이다. 그러한 종말점은 실제로 결코 도달될 수 없음을 반영하기 위하여 본원에서 "도달할 수 없는", "측정할 수 없는" 또는 "가상의"이라고 기술된다.

[0081] 위의 관점에서, 종말점 유형 분석법들은 당해 기술 분야에서 종말점이 "측정할 수 없는" 것이기 때문에 이러한 유형의 차단된 지질 성분들과 함께 이용될 수 없다고 여겨졌다. 그 결과, (당해 기술 분야에서 공지된 바와 같이, 그리고 본원에 기술된 바와 같이) 그것들과 관련된 단점들 전부를 가지고 있는 그러한 분석법에 교정 또는 더욱 일반적으로는 건조 시약을 이용할 필요를 초래했다.

[0082] 그러나, 이제 본 발명자들은 종말점 추정 기법이 그러한 측정할 수 없는 종말점에도 효과적으로 이용될 수 있으며, 그 결과, 도달할 수 없는 또는 측정할 수 없는 ("가상의") 종말점에 실제로 결코 도달할 수 없다 하더라도 이를 여전히 계산할 수 있다는 점을 확립했다.

[0083] 특정 부류의 지질 또는 특정 부류의 지질단백질의 선택적인 반응, 그리고 지질단백질의 지질 구성요소를 검출 가능한 제2 분석물질로 전환하는 것과 관련하여, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 방법들이 다수 있으며, 이들 중 임의의 것들은 본 발명에 사용하기에 적합하다. 위에 기술된 균일한 방법들 전부가 적합하며, 본 발명의 범위 내에 포함된다. 추가적인 세부 사항은 아래에 그리고 참조된 인용문헌에 제공된다.

[0084] 두 가지 방법이 현재 일상적으로 CH의 정량에 이용된다. 두 방법은 모두 효소적이며, 본 발명의 방법에 이용하기에 적합하다. 제1 방법에서는, 콜레스테롤 에스테르 가수분해효소가 콜레스테롤 에스테르를 CH로 전환한다. 그 다음, 콜레스테롤 산화효소가 CH를 콜레스테-4-엔-3-온 및 과산화수소로 전환한다. 마지막으로 하이드로젠 퍼옥시다제는 형성된 과산화수소를 이용하여 페놀 존재 하에 4-아미노안티피린을 전환시켜, 착색된 퀴논이민 화합물을 발생시킨다. 퀴논이민은 500-600nm 파장에서 광도측정법으로 모니터링된다. 기타 잘 알려진 색을 생성하는 기질(예컨대, 생성물이 청색이고 650nm에서 모니터링되는 TMB) 또는 형광 또는 화학발광 기질들이 4-아미노안티피린/페놀을 대체할 수 있다.

[0085] 또 다른 방법은 콜레스테롤 산화효소 대신 콜레스테롤 탈수소효소를 이용하고, 생성된 NADH 또는 NADPH의 양을 기초로 하여 샘플 내의 CH 양을 결정한다.

[0086] TG의 검출과 관련하여, 이는 통상적으로 4단계의 효소적 반응으로 결정되는데, 이때, 지질단백질 리파아제는 TG를 비에스테르화 글리세롤과 유리 지방산으로 가수분해한다. 그런 다음, 글리세롤은 글리세로키나아제에 의해 인산화되고 글리세롤-3-포스페이트 산화효소에 의해 디-하이드록시-아세톤-포스페이트와 과산화수소로 산화된다. 마지막 색 형성 단계에서, 하이드로젠 퍼옥시다제는 형성된 과산화수소를 이용하여, 페놀 존재 하에 4-아미노안티피린을 착색된 퀴논이민으로 전환시킨다. 퀴논이민은 500nm 파장에서 분광분석적으로 모니터링된다. 적당한 기질과 페놀을 선택함으로써, 형성된 착색 생성물은 450 내지 850nm의 파장에서 모니터링될 수 있다. 마찬가지로, 형광 또는 화학발광 기질들이 4-아미노안티피린을 대체할 수 있다. 명백하게, 과산화물을 기초로 한 두 방법들에서 마지막 단계는 동등하고, 서로 교체 가능하다.

[0087] 따라서, 특정 혈장 지질 성분을 검출할 수 있는 화학적 생성물로 전환하는 효소 반응들은 바람직하게는 위에 기술된 효소 시스템을 이용하여 수행될 수 있다.

[0088] CH의 경우:

[0089] (i) 콜레스테롤 에스테르 가수분해효소 + 콜레스테롤 산화효소 + 퍼옥시다제, 또는

[0090] (ii) 콜레스테롤 에스테르 가수분해효소 + 콜레스테롤 탈수소효소.

[0091] TG의 경우:

[0092] (iii) 리파아제 + 글리세롤 키나아제 + 글리세롤-3-포스페이트 산화효소 + 퍼옥시다제.

[0093] 효소로는 동물, 미생물 또는 식물로부터 유래된 상업적으로 이용 가능한 효소들이 이용될 수 있다. 특정 공급원으로부터의 효소들은 지질단백질 부류 VLDL과 우선적으로 반응하는 크로모박테리움 비스코숨 또는 슈도모나스로부터의 지질단백질 리파아제와 콜레스테롤 에스테르 가수분해효소와 같이, 일부 지질단백질 부류들에 대해 선택성을 나타낼 수 있다. 그러한 효소들은, 분리하여 또는 본원에 기술된 나머지 선택 방법들과 조합하여, 특정 성분을 위한 분석법에 이용될 수 있다. 이러한 효소들은 그들의 특이성 및 안정성을 바꾸기 위하여 화학적으로 개질될 수 있다. 예컨대, 효소들이 LDL과 관련된 CH에 반응성을 덜 나타내도록 하기 위하여 콜레스테롤 산화효소와 콜레스테롤 에스테르 가수분해효소를 PEG와 접합시킨다(US5807696). 효소들은 전형적으로 100 ~ 100,000U/L

의 농도로 이용된다.

- [0094] 특정 지질단백질 부류들의 지질 성분들의 측정은 상이한 지질단백질 부류들의 상이한 화학적 및 물리적 특징들을 이용하는 여러 가지 방법들에 의해 수행될 수 있다. 일반적으로, 이들 방법들은 효소의 특이성에 의존하고, 그리고/또는 방해될 수 있는 다른 성분들을 분리, 전환 또는 불활성화시킨 후, 원하는 성분을 반응시킨다.
- [0095] 비 이온성, 음이온성, 양이온성 및 쌍성 이온성 계면활성제가 효소적 반응의 선택성을 증가시키거나 반응 속도를 증가시키기 위하여 포함될 수 있다. 반응 과정 동안 세포들의 온전한 상태를 유지시킬 수 있는 임의의 적합한 계면활성제가 이용될 수 있다. 세포의 상태에 특별히 중요한 비 이온성 계면활성제의 한 가지 성질은 친수-친지 균형(HLB)이다. 10 미만 및 13 초과의 HLB 값을 나타내는 계면활성제가 온전한 세포들이 존재할 때 특별히 이용하기 적합하다. 그러나, 사용된 농도에 따라, 그리고 사용된 반응 시간 및 온도, 이온 강도, pH 및 분석 혼합물에 사용된 염의 유형, 및 혈청 알부민과 같은 안정화 물질의 존재 여부와 같이, 분석법의 구성 및 제형에 따라, 10 내지 13 사이의 HLB 값을 나타내는 계면활성제 또한 온전한 세포들과 양립될 수 있다. 적합한 계면활성제의 예는 폴리옥시에틸렌 알킬 에테르(Brij 35 및 78), 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 에테르(Triton X45 및 X305, Igepal 210 및 272), 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트 모노라우레이트(Tween 80), 폴리옥시에틸렌-코옥시프로필렌 블록 공중합체(Pluronic F68 및 L64), 폴리에틸렌 글리콜과의 텔로미어 B 모노에테르(Zonyl FSN 100), 에틸렌디아민 알콕살레이트 블록 공중합체(Tetronic 1307), 2,4,7,9-테트라메틸-5-데신-4,7-디올 에톡실레이트(Surfonyl 465 및 485), 폴리디메틸실록산 메틸에톡실레이트(Silwet L7600), 폴리에톡실화 올레일 알코올(Rhodasurf ON-870), 폴리에톡실화 피마자유(Cremophor EL), p-이소노닐페녹시-폴리(글리시딜)(계면활성제 10G) 및 폴리에테르 설포네이트(Triton X200)이다. 계면활성제는 이러한 목적을 위해 전형적으로 0.001~10%, 바람직하게는 0.01 내지 1%의 농도로 사용된다.
- [0096] 다음과 같은 방법들은 기술된 바와 같은 특별한 지질단백질 성분들을 선택적으로 반응시키기에 적합한 것들이다. 모든 경우에서, 참조된 간행물은 본원에 참조로 통합된다.
- [0097] HDL과 관련된 CH 분획을 측정하는 균일한 방법에서, 비 HDL 입자들은 상이한 방법들에 의해 반응으로부터 차단되었고, CH 대사 효소에 접근할 수 없게 되었다. 가장 최근에 개발된 것은 선택적으로 HDL을 용해시키는 특정 계면활성제였다. 이들은 다음을 포함한다:
- [0098] (i) PEG/시클로텍스트린 방법(US5691159)에서, Mg^{2+} 의 존재 하에 황산화 알파-시클로텍스트린은 비 HDL과 가용성 복합체를 형성하며, 그에 의해 PEG로 개질된 효소에 의한 분해가 어렵게 된다.
- [0099] (ii) 다가 음이온 방법(US5773304)은 비 HDL을 차단하고, 특정 세제를 이용한 가용화 및 효소적 측정을 어렵게 하기 위하여 다가 음이온과 함께 합성 고분자를, 또는 계면활성제를 이용한다(US7851174).
- [0100] (iii) 면역적 방법(US6162607)은 모든 비 HDL에서 아포지질단백질 B의 존재 및 HDL에서의 그 부재를 이용한다. apoB에 대한 항체들은 콜레스테롤 효소들과의 반응에 대해 비 HDL을 차단한다.
- [0101] (iv) 제거법(US6479249)에서는 색을 발생시키지 않는 반응에서 비 HDL이 가장 먼저 소모된다. 그런 다음, 특정 세제가 첨가되어, 색을 발생시키는 반응에서 효소들이 HDL과 반응하도록 한다.
- [0102] (v) 촉진제/세제 방법(US6818414)은 반응의 속도를 높이기 위해 촉진제를 이용하여 HDL의 비에스테르화 콜레스테롤을 분해하고, 색을 발생시키지 않는 공정에서 형성된 H2O2를 제거한다. 제2 단계에서, HDL 콜레스테롤은 색을 형성하는 공정에서 HDL 특이적 세제를 이용하여 분해된다.
- [0103] 이러한 방법들 중 임의의 방법은 개별적으로 또는 조합하여 본 발명의 방법에서 HDL과 관련된 CH의 측정에 적용될 수 있다.
- [0104] LDL이 관련된 CH는 LDL CH 분획을 측정하기 위하여 비 LDL 지질단백질들의 물리적인 분리를 필요로 하지 않는 균일한 방법들에 의해 측정되었다. 그러한 방법들은 다음을 포함한다:
- [0105] (i) US5888827은 비 LDL이 Mg^{2+} 의 존재 하에 계면활성제와 시클로텍스트린에 의해 마스킹되어 PEG로 개질된 효소들에 의한 분해가 어려워지는 방법을 기술하고 있다.
- [0106] (ii) US5925534는 샘플에서 LDL을 보호하고 비 LDL이 효소적으로 제거될 수 있도록 다가 음이온과 계면활성제를 이용하는 방법을 기술하고 있으며, 그때, 탈보호 시약의 첨가가 LDL과 관련된 CH의 효소적 결정을 가능하게 한다.

- [0107] (iii) US6057118 및 US6194164는 LDL이 관련된 CH를 결정하기 전에 효소적 반응에서 비 LDL이 관련된 CH를 선택적으로 제거하기 위하여 특이적인 계면활성제를 이용하는 두 가지 상이한 방법들을 기술하고 있다.
- [0108] 최근 수 년 동안, VLDL과 관련된 CH를 결정하는 균일한 방법들이 개발되었다. 이는 다음을 포함한다:
- [0109] (i) US6986998은 HDL과 LDL을 각각 차단하기 위하여 알부민과 칼릭사렌을 이용하여, 크로모박테리움 비스코숨으로부터 VLDL 선택적인 효소들을 이용하는 효소적 반응에서 VLDL의 선택적인 분해를 가능하게 하는 방법을 기술하고 있다.
- [0110] (ii) US7208287은 효소적 반응에서 VLDL을 선택적으로 분해하기 위하여 특이적인 계면활성제를 이용하는 방법을 기술하고 있다.
- [0111] IDL과 관련된 콜레스테롤("VLDL 잔유물" 또는 "잔유물 유사 입자"이라고도 함)은 보통 초원심분리, 고성능 액체 크로마토그래피 또는 전기영동을 이용하여 결정된다. IDL이 관련된 콜레스테롤의 선택적인 효소적 분해를 위하여 특이적인 계면활성제를 이용하는 두 가지의 균일한 방법들이 최근에 개발되었다(US7272047 및 US 2007/0161068)
- [0112] 이러한 방법들 중 임의의 방법은 개별적으로 또는 조합하여 본 발명의 방법에서 LDL과 관련된 CH의 측정에 적용될 수 있다.
- [0113] 특정 지질단백질 부류들 중 TG의 측정은 상이한 지질단백질 부류들의 상이한 화학적 및 물리적 특징들을 이용하는 방법에 의해 수행될 수 있다. 따라서, 이들 방법은 콜레스테롤에 대하여 위에서 기술한 것들과 유사하나, 본원에서 위에 기술된 방법들에 의한 것과 같이, TG의 효소적 검출을 이용한다. 그러한 방법은 다음을 포함한다:
- [0114] (i) US6811994는 특별한 지질단백질 이외의 지질단백질들을 차단하기 위하여 선택적인 계면활성제와 폴리에틸렌 글리콜로 개질된 효소들을 이용하는 것을 기술하고 있다.
- [0115] (ii) WO2004/087945와 US2009/0226944는 검출할 수 있는 생성물을 생성하지 않는 반응에서 비 LDL로부터 TG를 제거하기 위하여 선택적인 계면활성제를 이용한 다음, LDL과 관련된 TG를 검출할 수 있는 생성물로 전환시키는 것을 기술하고 있다.
- [0116] (iii) WO2000/06112는 검출할 수 있는 생성물을 생성하지 않는 반응에서 VLDL 및/또는 IDL 이외의 지질단백질로부터 TG를 제거하기 위하여 선택적인 계면활성제를 이용한 다음, VLDL 및/또는 IDL과 관련된 TG를 검출할 수 있는 생성물로 전환시키는 것을 기술하고 있다.
- [0117] 이러한 방법들 중 임의의 방법은 개별적으로 또는 조합하여 본 발명의 방법에서 특정 지질단백질들과 관련된 TG의 측정에 적용될 수 있다.
- [0118] 본 발명의 분석 방법에 이용되는 검출 방법은 전형적으로 광도를 측정하는 것이고, 간접적인 생성물은 일반적으로 (예컨대, 하나 이상의 미리 확인된 파장에서 흡광도, 형광 또는 화학발광에 의하여) 광도 측정식으로 검출할 수 있도록 선택된다.
- [0119] 신호 생성을 위한 매우 바람직한 방법은 과산화수소를 통해서인데, 과산화수소는 색을 생성하는 물질의 효소적 산화를 위한 기질로 작용한다. 검출할 수 있는 화학적 생성물을 생산하기 위하여 형성된 과산화수소와 반응하는, 산화 가능한 색을 생성하는 시약 또는 시약들은, 당해 기술 분야에 공지된 임의의 분자일 수 있으며, 그것의 산화된 생성물은 자외선, 가시광선 또는 적외선 분광법에 의해, 또는 형광 또는 발광에 의해 측정될 수 있다.
- [0120] 적합한 발색시약의 예는 트린더 시약으로, 이 시약은 H₂O₂의 존재 하에 커플러와 반응하여 착색 생성물을 형성한다. 커플러의 바람직한 예는 4-아미노안티피린(4AA), 3-메틸-2-벤졸리논 하이드라존(MBTH), N-메틸-N-페닐-4-아미노아닐린(NCP-04), N-메틸-N-(3-메틸페닐)-4-아미노아닐린(NCP-05), N-메틸-N-(3-메톡시페닐)-4-아미노아닐린(NCP-06), N-메틸-N-(3-메톡시페닐)-3-메톡시-4-아미노아닐린(NCP-07)이다. 트린더 시약의 바람직한 예는 600nm 이상의 파장에서 비색 분석에 의해 결정될 수 있는 생성물을 형성하는 것들로, N-에틸-N-(2-하이드록시-3-설포프로필)-3,5-디메틸옥시아닐린(DAOS), N-에틸-N-(2-하이드록시-3-설포프로필)-3,5-디메톡시-4-플루오로아닐린(FDAOS), N-(2-하이드록시-3-설포프로필)-3,5-디메톡시아닐린(HDAOS), N,N-비스(4-설포부틸)-3,5-디메틸아닐린(MADB), N-에틸-N-(2-하이드록시-3-설포프로필)-3,5-디메틸아닐린(MAOS)이다. 트린더 시약이 아닌 바람직한 예는 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB), N-(3-설포프로필)-3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMBZ-PS), N,N-비스(2-하이드록시-3-설포프로필)톨리딘(SAT Blue), N-(카르복시메틸-아미노카르보닐)-4,4-비스(디메틸아미노)-비페닐 아

민(DA64), 10-(카르복시메틸아미노카르보닐)-3,7-비스(디메틸아미노)페노티아진(DA67)이다. 색소원의 농도는 바람직하게는 0.01~10g/L이고, 용해도에 의해 제한된다.

- [0121] 적합한 형광 기질의 예는 디하이드로칼세인, 디하이드로에티딤, 디하이드로플루오레세인, 디하이드로페녹사진 (Amplex red; 10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진) 및 디하이드로로다민이다.
- [0122] 적합한 화학발광 기질의 예는 루미놀(3-아미노트리페닐렌 복합체), 루미젠(Lumigen) PS-2 및 루미젠 PS-atto이다.
- [0123] 비이온성, 음이온성, 양이온성 및 쌍성 이온성 계면활성제가 착색된 간접적인 분석물질의 측정 전에 세포 용해의 목적을 위해 이용될 수 있다. 전형적으로 0.01~10%, 그러나 바람직하게는 0.1~2%의 농도에서 측정에 영향을 미치지 않는 임의의 적합한 계면활성제가 이용될 수 있다.
- [0124] 적합한 계면활성제의 예는 음이온성 계면활성제인 아민 아크릴벤젠 설포네이트(Ninate 411), 나트륨 디옥틸설포석시네이트(Aerosol OT), 나트륨 N-올레일-N-메틸타우레이트(Geropon T-77), 나트륨 올레핀 설포네이트(Bioterge AS-40), 나트륨 폴리옥시에틸렌 라우릴 설페이트(Standapol ES-1) 및 비이온성 계면활성제인 폴리옥시에틸렌 알킬 아릴 에테르(Triton X100 및 X114)와 폴리옥시에틸렌 라우릴 알코올(Cheal LA-9)이다.
- [0125] 세포 용해가 일어난 경우, 명백히 그에 상응하는 헤모글로빈 및 기타 세포 생성물의 반응 매체로의 방출이 있을 것이다. 따라서, 용해로부터 최대의 장점을 얻고 배경 신호를 가능한 한 감소시키기 위해서는, 이러한 방출된 생성물에 의해 검출이 억제되지 않는 생성물(2차 분석물질)을 선택하는 것이 그러한 경우에 바람직하다. 따라서, 세포 용해가 이용되는 경우, 450nm를 초과하는, 바람직하게는 500nm를 초과하는, 그리고 가장 바람직하게는 600nm 이상의 파장(예컨대, 500 내지 1400nm 또는 600 내지 1200nm)에서 검출할 수 있는 2차 분석물질들이 바람직하다.
- [0126] 샘플에서 혈액 세포의 물리적인 분리는 전체 세포에 대한 특이적인 바인더를 지나는 흐름을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 수행될 수 있지만, 가장 일반적으로는 여과에 의한 것이다. 반응 단계 (i) 이후에 세포를 제거하기 위한 여과가 본래의 혈액 샘플의 여과에 비해 상당한 장점을 가지고 있다는 점은 주목할 만하다. 특히, 반응 단계는 손가락 천자(finger-stick)로부터 적은 부피의 혈액 샘플로 이루어질 수 있다. 하나 이상의 시약이 첨가된 후에, 반응 혼합물의 부피는 훨씬 커지며, 불용 부피가 상당하지 않아도 세포들의 분리가 이루어질 수 있다. 세포들은 또한 더욱 희석되어, 여과 시 세포들이 필터 표면 상에 더 골고루 퍼질 것이며, 여과는 더욱 효과적으로 된다.
- [0127] 따라서, 본원에 기술된 여과는 본 발명의 방법의 ii) 단계에 사용하기에 바람직한 기법이며, 상응하는 필터 등은 본 발명의 키트와 함께 공급하기에 적합하다. 그러한 여과의 일부 바람직한 구현에는 아래에 제공되며, 이때, 이들 중 임의의 것은 개별적으로 또는 본 발명의 방법 및 키트와 조합하여 적용될 수 있다.
- [0128] 여과에서, 샘플은 작은 공극 크기의 다공성 계면(필터, 막 또는 체) 사이로 통과되며, 이때, 세포들이 갇힌다. 다공성 계면은 고체(예컨대, 소결 유리) 또는 섬유질(예컨대, 셀룰로오스 또는 유리로 만들어짐)일 수 있고, 흐름은 가로로 횡단하여 또는 측면으로 이루어질 수 있다. 샘플은 중력, 원심분리, 모세관력, 압력 또는 흡입에 의해 필터 사이로 통과될 수 있다. 여과 물질은 혈액 세포들을 포획하는 시약들(예컨대, 렉틴, 항체)을 추가적으로 함유할 수 있다. 다른 방법들은 정전기 인력을 이용한다.
- [0129] 횡단 여과에 적합한 물질을 표 2에 제공하였다. 측면 유동 여과에 적합한 물질은 Hemasep® L(Pall Corp) 및 LF1과 MF1(Whatman)이다.

[0130] <표 2>

지질 및 착색 생성물의 여과 회수율

필터 유형	TG (%)	CH (%)	HDL (%)
여과 없음	100	100	100
PAD 901	99	95	97
PAD Whatman	98	92	94
QA Pa11	102	96	97
Whatman 등급 CF/CM30	103	99	97
Gelman ITLC SG	103	96	99
Gelman A/E	103	98	98
Munktell 여과지	101	97	98

[0131]

[0132]

효소 활성을 계산하기 위하여 흡광도 판독치를 기초로 효소 진행 곡선을 수학적으로 처리하는 것은 잘 알려져 있다. 그러한 수학적 절차인 알고리즘은 통합 미카엘리스-멘텐 식(Michaelis-Menten equation)을 기초로 한다 (London JW (1977) Analytical Chemistry 48:1716-9). 그러나, 그러한 알고리즘의 목적은 속도를 영점 시간까지 외삽함으로써 효소 활성을 결정하는 데 있으며, 생성물 종말점을 결정하는 데 적용될 수 없다.

[0133]

최근에, 한 집단은 고정된 시간과 동적인 측정의 조합을 이용 시, 진행 곡선의 판독을 끝까지 따라가기보다는 예상된 종말점의 90~95%에 도달했을 때, 진행 곡선의 판독이 완료될 수 있었다고 보고하였다. 이는 분석 시간을 상당히 단축하였다(Kvam (2009) Point of Care 8:16-20).

[0134]

현재 놀랍게도 본 발명자들이 발견한 사실은 측정할 수 있는 종말점이 없는 반응에서 진정한, 측정할 수 없는 종말점을 직접적으로 대표하는 가상의 종말점을 추정하는 것이 여전히 가능하다는 점이다(도 1). 이는 고정점 측정의 문제점과 고정점 측정에 교정기 및/또는 건조 시약이 필요하다는 점을 면할 수 있게 할 것이다. 필요한 것은 적합한 알고리즘과 적어도 50%(예컨대, 적어도 60% 또는 적어도 70%)의 진행 곡선이다.

[0135]

본 발명의 다양한 양태에서 측정할 수 없는 종말점 또는 가상의 종말점을 예측하는 데 사용되는 알고리즘은 반응 진행을 적절히 기술하는 임의의 수학적일 수 있고, 그러한 진행이 좌표로 표시될 때 형성된 곡선을 기술하는 데 이용될 수 있다. 여러 가지 그러한 식들이 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공지되어 있을 것이다. 대개 그러한 알고리즘은 1차 속도식(예컨대, $Y=Y_0 * e^{-kX}$) 또는 로지스틱 함수(예컨대, $Y=1/(1+e^{-X})$)를 기초로 한 것일 것이다(표 3). 어떤 알고리즘이 특별한 상황에 가장 바람직할 것인가는 어떻게 측정이 이루어지는가(투과도 또는 흡광도), 반응 조건(예컨대, 반응 온도)뿐만 아니라 측정 간격 및 기타 인자들과 같은 여러 인자들에 달려있을 것이다. 그러나, 각각의 적합한 식으로부터 실험 데이터에 곡선을 맞추고, 그에 의해 각각의 경우에 가장 근접한 맞춤을 결정하는 것은 정례적인 문제일 것이다. 따라서, 상이한 기구 플랫폼은 상이한 곡선 맞춤 알고리즘을 선호할 것이나, 각각의 경우에서 적합한 알고리즘이 신속하게 확립될 것이다. 여러 사례에서, 둘 이상의 알고리즘이 받아들일 수 있는 결과를 제공할 것이다.

[0136] <표 3>

반응 곡선 맞춤 알고리즘의 일부 예

유형	식
1차 (지수적 결합/해리)	$Y = Y_{\max} + (Y_0 - Y_{\max}) * e^{(-kX)}$
1차 - 2	$Y = Y_{\max} - Y_{\max} * e^{(-k(X-X_0))}$
1차 - 3	$Y = Y_{\max} + (Y_0 - Y_{\max}) * e^{(-kX)} + X * C$
로지스틱 - 1 (S자형)	$Y = Y_0 + (Y_{\max} - Y_0) / (1 + 10^{(\log X_{50} - \log X) * B})$
로지스틱 - 2 (4개 매개변수 로지스틱)	$Y = Y_{\max} + (Y_0 - Y_{\max}) / (1 + (X/X_{50})^B)$
로지스틱 - 3	$Y = Y_0 + (Y_{\max} - Y_0) / (1 + (X/X_{50})^B)$
로지스틱 - 4	$Y = Y_{\max} + (Y_0 - Y_{\max}) / (1 + (X/X_{50})^B) + X * C$

Y₀, X=0에서의 Y; Y_{max}, X=무한대에서의 Y; k, 속도 상수; X₅₀, 최대 절반 Y에서의 X; B, 기울기 인자, 기울기의 가파름; C, 병행하는 반응의 기울기 인자.

[0137]

[0138]

측정할 수 없는 종말점을 추정할 때, 측정 간격은 바람직하게는, 병행하는 반응의 최소값이 발생하도록 선택되어야 한다. 그러나, 병행하는 반응이 존재할 수 없음은 엄격한 요건이 아니다. 그러한 병행하는 반응의 영향은 측정 후 분석에서 보정될 수 있다. 이는 특히, 적어도 두 가지 분석물질들이 샘플에서 측정되며, 적어도 두 가지의 상기 분석물질들 사이에 공지된 (절대적인 또는 근사치의) 관계가 존재하는 경우에 사실이다.

[0139]

예를 들어, HDL 분석법에서 추정된 측정 불가능한 종말점은 또한 비 HDL이 (i) 측정 간격, (ii) 반응 온도, (iii) HDL/비 HDL 비율과 같은 상이한 인자들에 따라 차단 시약에 의해 일시적으로 비반응성이 되었을 때에도 부수적인 비 HDL의 전환에 의해 영향받을 수 있다. 지질 패널 분석법에서 이것은 HDL, 동시에 측정된 총 콜레스테롤 및 HDL 교정 곡선으로 이루어진 것과 동일한 방식으로 미리 결정되어 시약을 위해 공급된 정보(예컨대, 바코드)에 배치된 비 HDL에 대한 교정 곡선을 포함하는 반복적인 공정으로 보정될 수 있다. 어떻게 분석 후 보정이 이루어질 수 있는지의 예는 실시예 6에 기술되어 있다.

[0140]

측정할 수 없는 종말점을 추정하는 데 사용되는 알고리즘에서 일어나는 병행하는 반응들을 고려하는 것 또한 가능하다. 예를 들어 반응 조건들은 병행하는 반응들이 측정 간격 중에 필수적으로 선행이 되도록 조성될 수 있고, 알고리즘에서 1차 항에 의해 표현될 수 있다(표 3).

[0141]

본 분석 방법의 상당한 장점들 가운데 하나는 결과적인 분석 시간의 감소이다. 따라서, i) 단계의 시약을 첨가하는 것으로부터 v) 단계의 검출할 수 있는 반응 생성물의 모니터링 종료까지의 시간은 10분 이내, 바람직하게는 8분 이내, 그리고 가장 바람직하게는 5 내지 7분 범위인 것이 바람직하다.

[0142]

최소한의 부피의 혈액으로 수행될 수 있다는 점은 본 발명의 추가적인 장점이다. 따라서, 분석 방법의 i) 단계에서 전혈 샘플의 부피는 40 μL 이하, 더욱 바람직하게는 20 μL 이하, 그리고 가장 바람직하게는 10 내지 15 μL 범위인 것이 바람직하다.

[0143]

본 발명자들은 추가적으로, 샘플을 "차단 시약"(상기 제2 성분의 반응을 일시적으로 억제하는 시약)과 조기에 접촉하여 추가적인 반응 시간이 절약될 수 있음을 확립하였다. 이러한 차단 시약(여러 가지 차단 시약이 본원에 기술되어 있다)은 전형적으로 제2 성분과 반응하는 데 일정 시간(수 분)이 소요된다. 따라서, 이러한 차단 시약이 방법의 iv) 단계에서 또는 그 주변에서 첨가되는 전형적인 현장 진단 분석은 이러한 차단 시약의 반응을 허용하기 위하여 수 분 지연될 것이다.

[0144]

본 발명자들은 현재 세포를 함유하는 혈액 샘플(예컨대, 전혈 샘플)에, 세포들을 상당히 용해시키지 않고 적절한 차단 시약을 첨가하여, 이러한 시약이 세포 분리 단계(들) 도중에 샘플의 제2 성분과 반응할 수 있도록 하는 것이 가능하다는 것을 확립하였다. 명백하게, 이것은 차단 반응을 기다릴 필요를 줄여주고, 약 30초, 바람직하게는 약 1분까지 분석 시간을 감소시킬 수 있다. 이러한 구현예에서, 차단 시약은 전형적으로 i) 단계에서 첨가되는 희석 혼합물에 포함될 것이거나, 대안적으로 희석 후, 세포 분리 전 또는 그러한 세포 분리 공정 후에, 첨가될 수 있다. 임의의 경우, 차단 시약이 이전보다 더 일찍 첨가될 수 있다면, 분석 시간이 절약될 수 있다.

[0145] 샘플이 특정 반응을 위해 부분들로 나뉘어지기 전에 차단 시약이 첨가되는 경우, 차단 시약이 다양한 분석물질들의 검출을 방해하지 말아야 한다는 점은 다분석물질 (패널) 분석법에서 중요하다. 예를 들어, 분석물질이 HDL-CH, 총 CH 및 총 TG인 경우, 차단 시약은 방해 없이 i) 단계 내지 iii) 단계 중 임의의 단계에서 첨가될 수 있는데, 이 시약은 비 HDL-CH(제2 성분)의 차단을 유발하여, HDL-CH의 특이적인 반응을 가능하게 하기 때문이다. 총 CH와 총 TG와 관련하여, 차단 시약은 존재할 것이나, 이들의 특이적인 반응을 위한 시약 혼합물은 오로지 차단에도 불구하고 총 CH 또는 총 TG를 방출시키기 위한 적합한 계면활성제만을 필요로 한다. 그러한 계면활성제는 알려져 있을 것이고, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 용이하게 선택될 것이어서, 총 CH 또는 총 TG의 방해는 일어날 필요가 없다.

[0146] 본 발명의 키트에서, 제1 시약 혼합물은 바람직하게는 HDL 반응의 제1 시약 혼합물과 함께 단일한 시약 혼합물로 제형화된다. 이것은 단계의 수를 줄여주어, 분석 시간을 줄이고, 나아가 분석 장비에 대한 시약 보관 및 취급 부담을 줄여, 이러한 방법이 덜 복잡한 자동 분석기로 실행될 수 있게 한다.

[0147] 이러한 키트는 추가적으로 세포 용해를 유발하여 헤마토크리트를 결정하고자 용해제를 함유할 수 있다.

[0148] 실시예

[0149] 실시예 1.

[0150] 비 HDL과 관련된 콜레스테롤 존재 하의 HDL 관련 콜레스테롤의 가상의 종말점 측정치 추정

[0151] 66mg/dL HDL, 255mg/dL LDL 및 300mg/dL TG를 함유하는 샘플을 와코(Wako) HDL-C L형 시약과 프로토콜(표 4)을 이용하여 Cobas Mira plus 기기(ABX Diagnostics)로 분석하였다. 흡광도를 600nm에서 모니터링하였다(도 1, 검은색 점). 64mg/dL HDL을 함유하나, 상당한 양의 LDL은 함유하지 않은 교정기 또한 동일한 방식으로 분석하였다(도 1, 흰색 점). 샘플의 진행 곡선은 처음 200~300초 동안 거의 동일하였으나, 샘플 내의 비 HDL의 콜레스테롤이 차단이 풀리게 되어 전환되면서 나뉘었다. 따라서, 다른 비 HDL과 관련된 콜레스테롤의 존재 하에 HDL 관련 콜레스테롤의 전환은 측정할 수 있는 종말점이 없다. 유일하게 측정할 수 있는 종말점은 HDL + 비 HDL에 존재하는 콜레스테롤(즉, 총 콜레스테롤)의 종말점일 것이다. 그러나, 샘플의 진행 곡선의 초기 200초(굵은 선)로부터, HDL 관련 콜레스테롤의 가상의 종말점을 1차 알고리즘

[0152]
$$Y=Y_{max}(1-e^{-k(x-x_0)})$$

[0153] 을 이용하여 계산할 수 있었으며(점선), 이는 66mg/dL에 비해 거의 동일한 농도인 64mg/dL의 HDL만을 함유하는 교정기의 실제 종말점과 일치하였다. 다음과 같은 효소 반응의 동역학에 대한 기타 잘 알려진 알고리즘이 유사한 방식으로 이용될 수 있다.

[0154] <표 4>

와코 HDL-C L형 시약 및 프로토콜.

R1	전처리	5분 37°C
R2	항온배양	5분 37°C
R1 전처리	균 완충액, pH 7.0	30mmol/L
	4-아미노안티피린	0.9mmol/L
	퍼옥시다제	2400U/L
	아스코르브산 산화효소	2700U/L
	항-인간 β-지질단백질 항체	
R2 효소 시약	균 완충액, pH 7.0	30mmol/L
	콜레스테롤 에스테르 가수분해효소	4000U/L
	콜레스테롤 산화효소	20000U/L
	F-DAOS	0.8mmol/L

[0155]

[0156] **실시예 2.**

[0157] TG 분석법에서 종말점, 고정점 및 추정된 종말점 측정치 비교

[0158] 로슈(Roche) TG 시약(표 5)을 25℃에 보관하고, 샘플들을 상이한 시점에서 취해 186mg/dL 트리글리세라이드를 함유하는 혈장 샘플을 측정하는 데 이용하였다. 혈장 샘플은 소량씩 -40℃에 동결하여 보관하고, 측정에 앞서 해동하였다. 주위 온도(20~22℃)에서 LabSystems Multiscan RC 플레이트 리더로 측정을 수행하였다. 반응 완료 시까지 진행 곡선을 추적하였으며, 종말점을 결정하였다. 또한, 4개 매개변수 로지스틱 함수를 이용하여 진행 곡선의 처음 300초 동안을 기초로 하여 종말점을 추정하였다. 얻어진 추정 종말점을 실제 종말점 및 추정에 사용된 시간 간격의 종기인 300초에서의 흡광도와 비교하였다. 도 2에서 보는 바와 같이, 추정된 종말점은 실제 종말점을 따라갔으나, 고정점 측정치는 5개월 정도의 짧은 보관 후에도 실제 종말점과 비교하여 이미 극적으로 하락하는 중이었다. 따라서, 종말점 추정 및 고정점 방법이 모두 겨우 300초의 시험 시간을 허용하는 동안, 고정점 측정은 시약의 임의의 타당한 수명에 걸쳐 샘플에 대해 올바른 값을 제공하기 위하여 교정기를 포함시킬 필요가 있다. 이와 대조적으로, 추정된 종말점 계산은 교정기를 포함하지 않아도 정확성을 유지한다.

[0159] <표 5>

로슈 트리글리세라이드 GPO-PAP 시약

완충액	40mmol/L Mg2+, 나트륨 콜레이트 0.20mmol/L, 및 1μmol/L 헥사시아노철(II)산 칼륨을 함유하는 Pipes 50mmol/L, pH 6.8
ATP	1.4mmol/L
4-아미노안티피린	0.13mmol/L
4-클로로페놀	4.7mmol/L
지방 알코올 폴리글리콜 에테르	0.65%
지질단백질 리파아제	5000U/L (슈도모나스 종 유래)
글리세로키나아제	190U/L (바실루스 스테아르서무hil루스 유래)
글리세롤 포스페이트 산화효소	2500U/L (대장균 유래)
퍼옥시다제	100U/L (고추냉이 유래)

[0160]

[0161] **실시예 3.**

[0162] 로슈 HDL 분석법의 종말점 추정

[0163] 로슈(Roche)의 HDLC3 시약(표 6)을 이용하여 ABX technologies의 'Cobas Mira plus' 기구로 8개의 상이한 혈청 샘플들의 HDL 수준을 결정하였다. 진행 곡선의 초기 100초를 이용하여, 가상의 종말점을 4개 매개변수 로지스틱 함수를 이용하여 추정하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 추정된 종말점(흡광도 단위로 표시)은 결정된 HDL 수준과 우수하게 관련성을 나타내었다.

[0164] <표 6>

로슈 디렉트 HDLC3 시약.

R1	전처리	5분 37℃
R2	항온배양	5분 37℃
R1 전처리	Hepes, pH 7.4	10mmol/L
	CHES, pH 7.4	97mmol/L
	텍스트란 황산	1.5g/L
	마그네슘 질산 옥수화물	12mmol/L
	HSDA	1mmol/L
	아스코르브산 산화효소 (유페니실리움(Eupenicillium) 종)	16.7μkat/L
R2 효소 시약	Hepes, pH 7.0	10mmol/L
	PEG-콜레스테롤 에스테르 가수분해효소 (슈도모나스 종)	3.33μkact/L
	PEG-콜레스테롤 산화효소 (스트렙토미세스 종)	127μkat/L
	퍼옥시다제 (고추냉이)	333μkat/L
	4-아미노안티피린	2.5mmol/L

[0165]

[0166] 실시예 4.

[0167] 실시예 4.

[0168] 아피니온(Afinion) HDL 분석법(현장 진단) - 대규모 임상 기구 분석법과의 비교

[0169] 49개의 혈청 샘플들의 HDL 수준을 시에멘스(Siemens)의 Advia 기구 및 시약, 참조 방법으로 결정하였다. 또한, 샘플들을 아피니온 현장 진단 장치로 워크 HDL-C L형 시약(표 4)을 이용하여 추정된 종말점 방법으로 측정하였다. 진행 곡선을 160초 동안 모니터링하였고, 1차 방정식(표 3, 1형)과 로지스틱 방정식(표 3, 로그 변환된 유형)의 두 가지 상이한 알고리즘을 이용하여 종말점을 추정하였다. 추정된 종말점을 Trina Bionostics의 교정기를 이용하는 별도의 실험에서 아피니온으로 확립된 교정 곡선을 이용하여 농도로 전환하였으며, 이때, HDL 수준은 ABX Pentra의 HDL 디렉트 CP 시약(표 7)을 이용하여 Cobas Mira plus로 결정하였다. 도 4는 44개 혈청 샘플에 대해 참조 방법과 아피니온 방법의 상관관계를 보여준다(1차 예측 - 검은색 원, 로지스틱 맞춤 - 흰색 원). 아피니온 방법으로 측정된 평균 HDL 수준은 참조 방법에 비해 0.4%(0.4mg/dL) 및 1.1%(0.6mg/dL) 더 낮았으며, 1차 및 로지스틱 곡선 맞춤을 이용한 기울기 인자는 각각 0.96과 1.06이었다.

[0170] <표 7>

ABX HDL 디렉트 CP 시약.

R1	전처리	5분 37℃
R2	항온배양	5분 37℃
R1 전처리	균 완충액, pH 7.0	
	콜레스테롤 산화효소	1000U/L
	퍼옥시다제	1300ppg U/L
	DSBmt	1 mmol/L
	촉진제	1 mmol/L
R2 효소 시약	균 완충액, pH 7.0	
	콜레스테롤 에스테르 가수분해효소	1500 U/L
	4-아미노안티피린	1 mmol/L
	아스코르브산 산화효소	3000 U/L
	세제	2%
	억제제	0.15%

[0171]

[0172] **실시예 5.**

[0173] 아피니온 HDL 분석법 - 현장 진단 분석 방법과의 비교

[0174] 42개 혈청 샘플들의 HDL 수준을 Cholestech의 현장 진단 분석 시스템인 LDX 시스템 지질 프로파일 Glu로 결정하였다. 또한, 샘플들을 측정하고, HDL 값을 근본적으로는 실시예 4에 기술된 바와 같이 아피니온 HDL 방법에 의해 계산하였다. 도 5는 42개 혈청 샘플에 대한 아피니온 및 LDX 방법의 상관관계를 보여준다. LDX 방법이 15mg/dL 미만의 HDL 값을 <15mg/dL로, 100mg/dL를 초과하는 값을 >100mg/dL로 보고함에 따라, 이들 값(흰색 원)은 선형 회귀(n=10)에서 생략되었다. 아피니온에 의해 측정된 평균 HDL 수준은 LDX 방법과 비교하여 1%(0.5mg/dL) 더 높았으며, 기울기 인자는 1.03이었다.

[0175] **실시예 6.**

[0176] 병행하는 비 HDL 전환의 영향에 대한 다성분 분석 방법에서의 HDL의 추정된 종말점 교정

[0177] 샘플 안의 총 CH를 동시에 측정한 것을 기초로 한 분석 후 계산에 의해, 동시에 전환된 비 HDL의 영향에 대해 HDL 분석법을 교정할 수 있는 가능성을 제시하기 위하여, 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0178] (i) Cobas Mira plus 기기와 와코 HDL-C L형 시약 및 프로토콜(표 4)을 이용하여 순수한 HDL(Wako High Unit HDL-C) 제제로부터 HDL에 대한 교정 곡선을 구축하였다. 진행 곡선의 처음 300초와 1차 함수를 이용한 곡선 맞춤으로부터 추정된 종말점 흡광도를 교정 곡선의 구축에 이용하였다:

[0179] $HDL = 1.2 + 136.3ABS (1)$

[0180] (ii) 두 가지 상이한 농도의 HDL 및 네 가지 상이한 농도의 LDL의, 순수한 HDL 및 순수한 LDL(Wako High Unit LDL-C)의 혼합물로부터 비 HDL의 병행하는 전환에 의한 측정된 HDL 값에 미치는 영향에 대한 교정 곡선을 구축하였다. 측정된 HDL의 증가를 비 HDL 농도의 함수로 그래프로 나타내었다. 이러한 증가는 비 HDL 농도에 대해 지수적으로 상관관계가 있었다:

[0181] $HDL \text{ 증가} = 2.433 \exp^{0.008499 \text{비 HDL}} (2)$

[0182] 비 HDL의 농도는 CH(측정된 총 콜레스테롤)와 HDL 사이의 차이로부터 계산되었다:

[0183] $\text{비 HDL} = CH - HDL (3).$

[0184] 111mg/dL HDL을 함유하는 혈청 샘플을 두 가지 상이한 농도로 상이한 양의 순수한 LDL과 혼합하였다. CH 및 HDL 수준을 각각 ABX Pentra Cholesterol CP 및 와코 HDL-C L형 시약과 프로토콜과 함께, Cobas Mira plus 기기로

측정하였다.

[0185] 측정된 값은 평균적으로 48% 과대평가되었다. 위의 식 (1) 내지 (3)을 이용하여 반복적으로 보정한 후, 평균적인 과대평가는 5%로 감소하였다(표 8).

[0186] <표 8>

HDL 측정에 미치는 비 HDL 및 이의 보정의 영향

샘플	CH	실제 HDL	측정된 HDL	분석 후 보정된 HDL
36-1	117	36	41	36
36-2	231	36	52	40
36-3	336	36	68	38
62-1	204	62	70	62
62-2	314	62	84	64
62-3	428	62	120	69
전체 평균		49	72.5	51.5

[0187]

[0188] 샘플들은 2~3회 반복 검증하였다.

[0189] **실시예 7** - 차단 시약에 의한 세포 용해의 제거

[0190] 2 μL의 전혈을 0, 60, 90 또는 120mmol/L의 NaCl이 첨가된 HDL-C L형 R1(와코) 400 μL에 첨가하였다. 혼합 후, 샘플의 흡광도를 660nm에서 측정하였다. 이 과정에서 헤모글로빈으로부터의 흡광은 없으나, 온전한 세포들로부터 (빛의 산란을 통한) 강력한 방해가 있었다. NaCl이 첨가되지 않은 R1은 거의 완전한 용해를 유발하였으나, 120mmol/L NaCl이 첨가된 R1은 미미한 세포 용해를 유발했다.

첨가된 NaCl (mmol/L)	660nm에서의 흡광도 (AU)	용혈 (%)
0	0.062	100
60	1.306	23
90	1.569	7
120	1.615	4

[0191]

[0192] 보는 바와 같이, 5% 미만으로의 세포 용해의 감소는 시약 R1의 이온 강도를 적당히 선택하여 달성할 수 있다.

[0193] **실시예 8** - 비 용해성 희석 완충액 내에 포함된 차단 시약의 이용

[0194] 트리글리세라이드 측정에 일반 희석 완충액으로서의 HDL 시약 R1 사용이 미치는 영향

[0195] 46개 혈청 샘플들의 TG 수준을 일반 희석 완충액으로서 HDL 시약 R1(표) 및 로슈 TG 시약(표 5)을 이용하여 아피니온 현장 진단 기기로 결정하였다.

[0196] 15 μL 샘플을 280 μL의 HDL 시약 R1에 희석하고, 58 μL를 100 μL의 TG 시약으로 옮겼다. 반응 종말점을 결정하고, CRMLN 실험실(미국, 시애틀)에서 이전에 정량했던 교정기를 이용하는 별도의 실험에서 아피니온으로 확립한 교정 곡선을 이용하여 농도로 전환하였다. 병행하는 실험에서 동일한 샘플들을 Advia 기기 및 시에멘스 시약을 이용하여 별도의 실험실(Fuerst Medical Laboratory, 노르웨이 오슬로)에서 결정하였다. 샘플들은 두 가지 방법

사이에서 매우 비슷하였고, 아피니온 TG 결과에 대한 HDL R1 희석 완충액으로부터의 상당한 방해가 나타나지 않았다(도 6).

[0197]

<표> 희석 완충액

[0198]

희석 완충액 균 완충액, pH 7.0

[0199]

NaCl 175 mmol/L

[0200]

4-아미노안티피린 0.9 mmol/L

[0201]

퍼옥시다제 2400 U/L

[0202]

아스코르브산 산화효소 2700 U/L

[0203]

항-인간 아포-β-지질단백질 항체

[0204]

실시예 9 - 근본적으로 세포가 없는 여과액을 얻기 위한 등장성 HDL R1에의 전혈 희석 및 여과

[0205]

2번 웰의 바닥에 필터 패드를 위치시켜 여과 능력이 구비된 아피니온 기기로부터 전혈에 대한 일반 희석 및 여과 완충액으로서 HDL R1(비 HDL 차단) 시약의 적용가능성을 조사하였다. 희석/여과 완충액은 NaCl을 175mM로 첨가하여 비 용해성으로 만든 HDL-C L형 시약 1(R1)(표 4)이었다.

[0206]

전혈을 모세관력에 의해 15μL 샘플 장치로 뽑아 기기 내에 위치시킨 멀티웰 카트리지가 안에 삽입하였다. 샘플을 비우고, 250μL의 개질된 HDL R1 내로 혼합하고, 전체 부피를 필터 패드를 함유하는 웰로 옮겼다. 그런 다음, 멀티웰 카트리지의 막 튜브를 필터 패드 위에 단단히 위치시켰다. 주위 압력 미만의 압력이 막 튜브의 열린 말단에 적용될 때, 희석된 전혈이 필터 패드로 흘러들어가고, 혈액 세포들을 필터에 갇히는 반면, 희석된 혈장은 필터 사이를 흘러 막 튜브 안으로 들어갔다. 압력이 상승하기 시작할 때(공기 흡입) 막 튜브를 필터로부터 제거하고, 빈 웰로 낮추어, 주위 압력을 초과하는 압력을 가하여 여과된 혈장이 방출되도록 하였다. NaNO₂를 이용하여 오염 헤모글로빈을 메트헤모글로빈으로 전환시키고, 410nm의 파장에서 흡광도를 측정 후, 혈액 오염을 측정하였다. 공지된 농도의 메트헤모글로빈으로부터 구축된 교정 곡선으로부터의 내삽에 의해 흡광도를 %Hb으로 전환하였다. 표 9에 제공된 결과는 R1 시약으로 희석에 의한 용혈, 여과에 의한 용혈 및 필터 패드에 갇히지 않은 혈액 세포에 의한 오염의 복합적인 결과이다.

[0207]

<표 9>

R1으로 희석 및 여과한 후의 총 헤모글로빈 오염.

필터유형	전혈 % 헤마토크리트	여과액 % Hb 오염
와트만(Whatman)	37	0.9
와트만	61	1.2
밀리포어(Millipore) AP25	37	0.5
밀리포어 AP25	61	1.5
밀리포어 2	37	0.8
밀리포어 2	61	1.2

[0208]

5-6차례 반복 검증의 평균

[0209]

실시예 10

[0210]

HDL과 관련된 콜레스테롤 존재 하의 비 HDL 관련 콜레스테롤의 가상의 종말점 측정치 추정. 인증 실험실 방법과의 비교.

[0211] 비 HDL의 직접적인 결정 방법을 HDL을 보호하나, 모든 다른 지질단백질들(비 HDL)과 관련된 콜레스테롤은 검출할 수 있는 생성물로 전환시키는 HDL 특이적인 블록 중합체를 이용하여 구축하였다(HDL-X; Wako, 일본). HDL 특이적인 블록 중합체의 공급원으로 와코 HDL-C L-M/2-PM 시약(Wako, 일본)의 시약 1을 이용하였다. 시약 1의 정확한 조성은 이용할 수 없으나, 균 완충액 pH 7.0, 콜레스테롤 에스테르 가수분해효소, 콜레스테롤 산화효소, HMMPs, 카탈라아제, 아스코르브산 산화효소 및 HDL 블록 중합체를 함유하는 것으로 개시되어 있다. 시약 1을 퍼옥시다제(6000U/L), 4-아미노안티피린(0.8mmol/L) 및 아지드화 나트륨(0.025%)로 보충하여, 비 HDL을 검출할 수 있는 생성물로 전환시키고, HDL은 일시적으로 보호되는 시약을 제조하였다.

[0212] 2 μL의 교정기 또는 혈장 샘플을 150 μL의 보충된 시약 1과 혼합하였다. 반응을 Cobas Mira plus 기기를 이용하여 37°C에서 수행하고 600nm에서 모니터링하였다. 종말점 흡광도를 4개 매개변수 로지스틱 함수(표 3)를 이용하여 진행 곡선의 최초 300초로부터 추정하였다.

[0213] 교정기와 샘플들을 CH, HDL 및 TG와 관련하여, CRMLN 실험실(미국 시애틀)에서 이전에 정량하였다. 이러한 값으로부터 비 HDL 값을

[0214] 비 HDL = CH - HDL

[0215] 에 따라 계산하였다. 본 발명의 방법에 의해 결정된 9개 혈청 샘플들의 비 HDL 값은 CRMLN 값으로부터 계산된 비 HDL 값과 매우 상관관계가 있었다(도 7).

[0216] **실시예 11.**

[0217] 아피니온 현장 진단 분석장치로 결정한 전혈 및 혈장 지질 프로파일

[0218] CH, TG 및 HDL의 혈장 수준을 아피니온 분석장치를 이용하여, 60명의 건강한 지원자들로부터 획득한 15 μL의 신선한 전혈에 대해 결정하였다. 이러한 데이터로부터 LDL 수준을 프리드왈드 식 $LDL=CH-(HDL+TG/5)$ 을 이용하여 mg/dL로 계산하였다. 또한, 동일한 샘플들의 혈장 분획을 (1000g에서 10분 동안 원심분리하여) 획득하고, 동일한 분석물질들에 대해 아피니온으로 측정하였다. 이용된 시약은 표 4(HDL), 표 5(TG) 및 표 10(CH)에 기술된 것들이었다. TG와 CH에 대해 반응 종말점을 결정하였다. 1차 함수를 이용한 진행 곡선의 최초 100초 및 곡선 맞춤(표 3)을 이용하여 HDL 반응의 측정할 수 없는 종말점을 추정하였다. 전혈 헤마토크리트를 실시예 9에 기술된 바와 같이 결정하였고, 각각의 특이적인 전혈 샘플에 대해 얻어진 헤마토크리트 값을 이용하여 (1-헤마토크리트)로 각각의 결과를 나누어, 전혈 결과를 혈장 결과로 전환하였다. 도 8은 60개의 샘플에 대해 전혈 및 혈장에서 얻어진 혈장 수준들 사이의 상관관계를 나타낸다.

[0219] <표 10>

로슈 Chol2 시약	
완충액	10mmol/L Mg2+를 함유하는 Pipes 225 mmol/L, pH 6.8
나트륨 콜레이트	0.6mmol/L
4-아미노안티피린	0.45mmol/L
페놀	12.6mmol/L
지방 알코올 폴리글리콜 에테르	3%
콜레스테롤 에스테르 가수분해효소	1500U/L(슈도모나스 종)
콜레스테롤 산화효소	450U/L(대장균)
퍼옥시다제	750U/L(코추냉이)

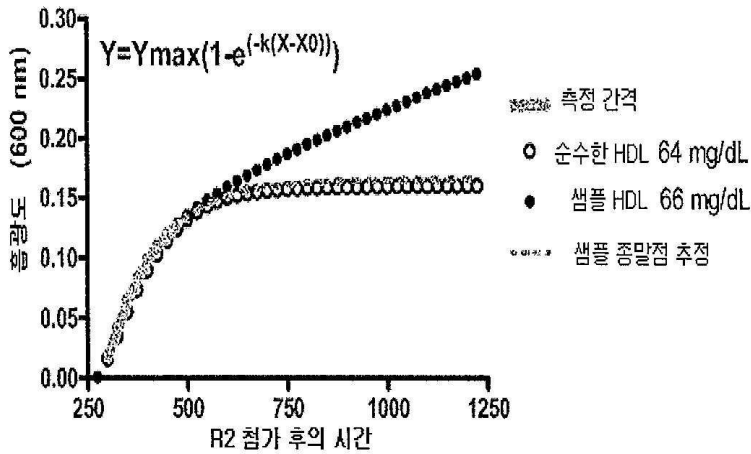
[0220]

도면

도면1

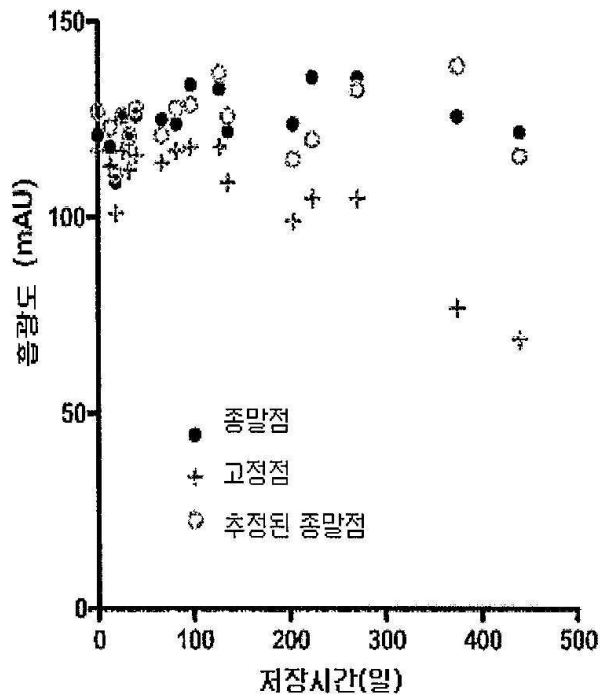
비 HDL과 관련된 콜레스테롤의 존재 하에 HDL 관련 콜레스테롤의 가상의 종말점 측정치의 추정

비 HDL 콜레스테롤 존재 하의 샘플 HDL 콜레스테롤의 종말점 추정
순수한 HDL과의 비교



도면2

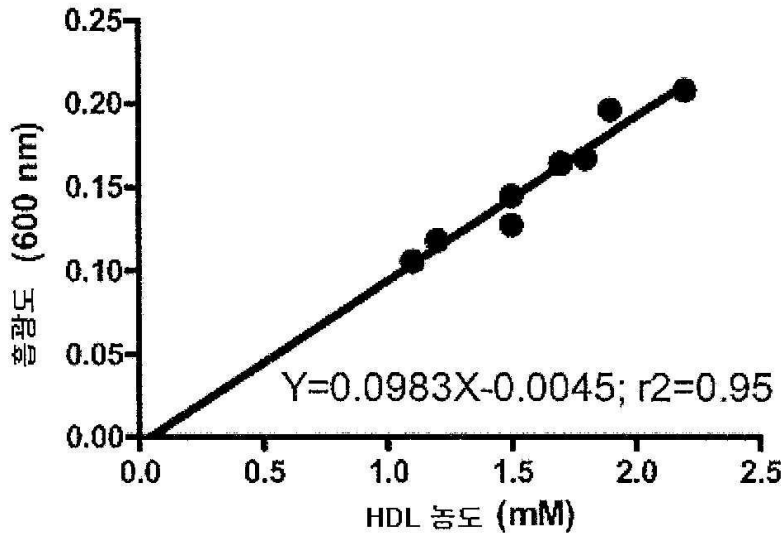
로슈 트리글리세라이드 분석법에서 종말점, 고정점 및 추정된 종말점 측정치의 비교
25°C에서의 장기간 안정성



도면3

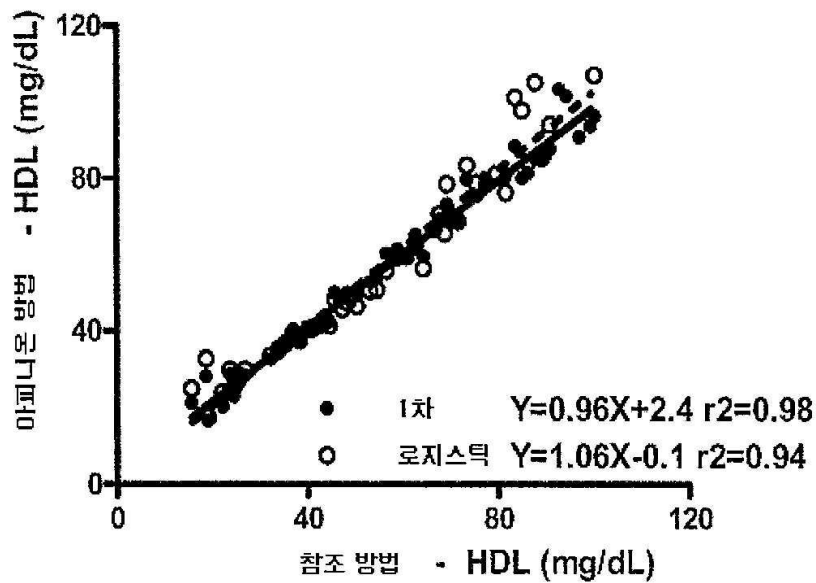
로슈 HDL 분석법의 종말점 추정

추정된 종말점 대 HDL 농도



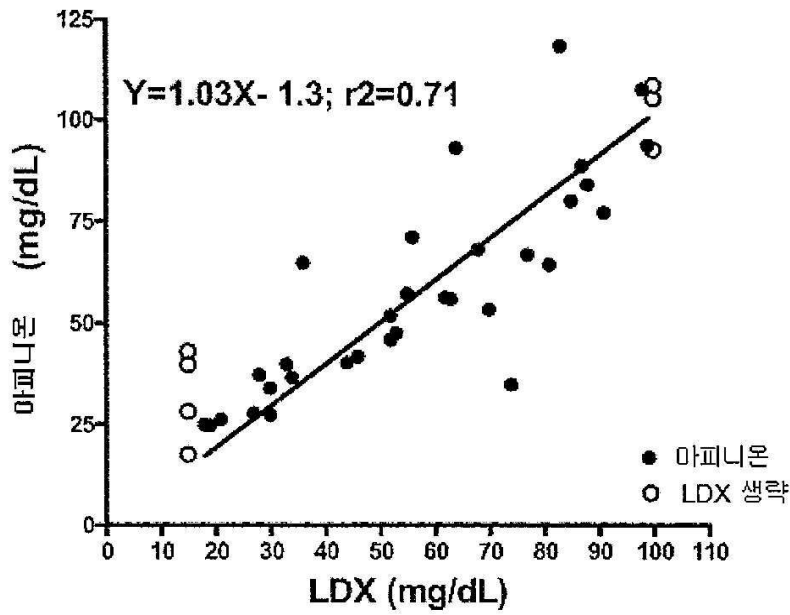
도면4

종말점 추정을 이용한 마피니온 “현장 진단” 방법과 임상 실험실 방법의 비교



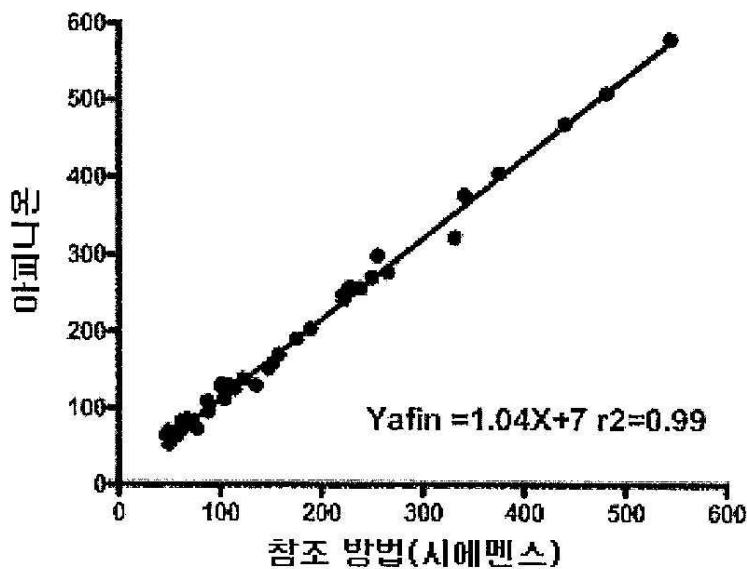
도면5

아피니온 HDL 분석법 - 현장 진단 방법과의 비교



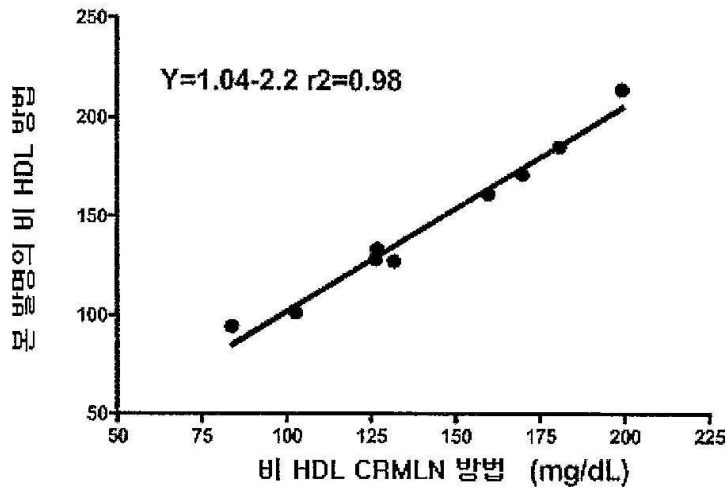
도면6

비 HDL 차단 시약을 함유하는 희석 완충액의 이용
HDL R1을 희석 완충액으로 이용하여 TG 측정
참조 방법과의 비교



도면7

이해 발명의 방법으로 결정된 비 HDL 수준과 인증된 실험실 방법에 의해 결정된 비 HDL 수준의 비교



도면8

혈장으로부터의 프로파일과 전혈로부터의 프로파일 비교

