



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0114623
(43) 공개일자 2022년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/58 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/585 (2013.01)
C12N 15/1093 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7024450
(22) 출원일자(국제) 2020년12월15일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년07월14일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/086171
(87) 국제공개번호 WO 2021/122563
국제공개일자 2021년06월24일
(30) 우선권주장
19216596.7 2019년12월16일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
블링크 아게
독일 07747 예나 브뤼셀러 슈트라쎈 20
(72) 발명자
에어만트라우트, 오이젠
독일 07749 예나 쾰렌하이너 오버벡 54
론카레빅, 이반
독일 07743 예나 카타리넨슈트라쎈 13
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
특허법인필앤은지

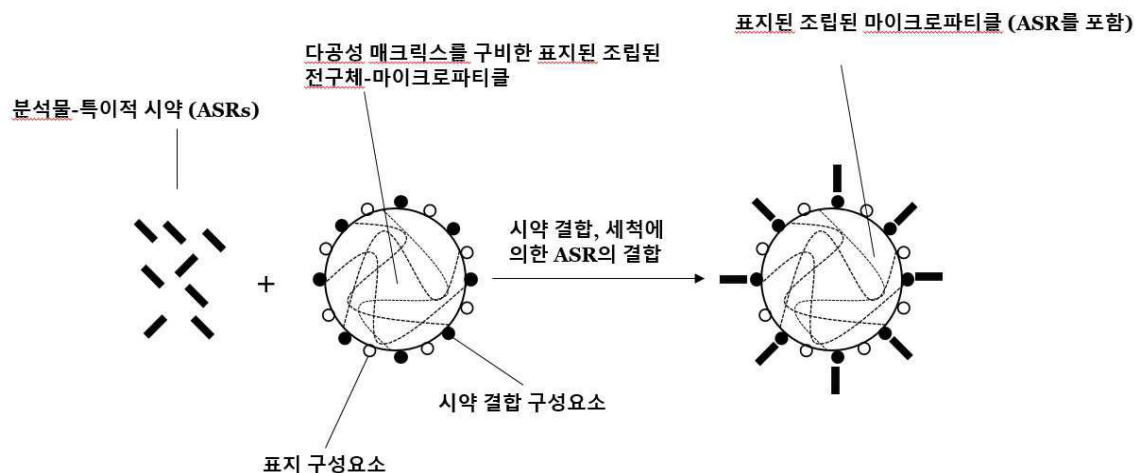
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 조립된 마이크로파티클 및 이의 전구체 라이브러리

(57) 요약

본 발명은 샘플 내 하나 또는 여러 분석물의 특이적 검출을 수행하기 위한 조립된 마이크로파티클, 및 본 명세서에서 때때로 "전구체-마이크로파티클"이라고도 지칭되는 이러한 마이크로파티클의 전구체에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 이러한 조립된 마이크로파티클의 라이브러리 및 이러한 전구체-마이크로파티클의 라이브러리에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 라이브러리를 만들기 위한 키트 및 샘플에서 관심 분석물을 검출하기 위해 이러한 라이브러리를 사용하는 키트에 관한 것이다. 더욱이, 본 발명은 바람직하게는 이러한 키트를 사용하여 수성 샘플에서 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6806 (2018.05)

(72) 발명자

슈타인메트제어, 카트린

독일 07743 예나 리카르다-후흐-벡 23

후볼트, 슈테판

독일 07745 예나 웨스트반호프슈트라쎄 10

엘링어, 토마스

독일 07745 예나 막텔슈티그 159

클링어, 수잔네

독일 07743 예나 오토-립만-링 28

레무트, 올리버

독일 07743 예나 놀렌도르퍼 슈트라쎄 9

카니츠, 레아

독일 07743 예나 캐테-쿨비츠-슈트라쎄 9

명세서

청구범위

청구항 1

조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 제조하기 위한 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리, 여기서 상기 조립된 마이크로파티클은 샘플에서 하나 또는 수개의 관심 분석물의 특이적 검출을 수행하도록 구성되며, 상기 특이적 검출은 적절한 화학적 또는 생화학적 반응에 의해 상기 마이크로파티클 내에서 발생하고, 상기 라이브러리 내에 있는 각각의 상기 조립된 전구체-마이크로파티클은 다음을 포함하는 것임:

- 수성 샘플을 수용하고 분석물의 특이적 검출을 위한 반응 공간을 제공하기 위한 공극 부피를 갖는 다공성 매트릭스, 바람직하게는 다공성 폴리머 매트릭스;
- 전구체-마이크로파티클에 대한 분석물-특이적 시약의 부착, 바람직하게는 가역적 부착을 허용하는 시약 결합 구성요소; 상기 시약 결합 구성요소는 다음 중 하나임:

(i) 상기 다공성 매트릭스를 형성하거나 상기 다공성 매트릭스인 폴리머 또는 폴리머 혼합물;

(ii) 상기 다공성 매트릭스에 부착되는 시약 결합 분자;

(iii) 상기 다공성 매트릭스 상에 고정된 적어도 하나의 이온화가능한 그룹 또는 복수의 이온화가능한 그룹, 상기 이온화가능한 그룹은 상기 전구체-마이크로파티클을 둘러싼 주변 조건에 따라 전하를 변경할 수 있음;

(iv) 상기 다공성 매트릭스 상에 고정된 적어도 하나의 하전된 그룹, 또는 복수의 하전된 그룹;

(v) (i) - (iv) 중 임의의 조합;

- 전구체-마이크로파티클에 부착된 경우, 상기 분석물-특이적 시약을 식별하기 위해 상기 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결된 표지 구성요소.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 라이브러리 내에는 조립된 전구체-마이크로파티클의 적어도 2개의 개별 서브세트, 바람직하게는 조립된 전구체-마이크로파티클의 3개 이상의 개별 서브세트가 있고, 각각의 서브세트는 상기 서브세트 내 상기 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결되는 구별된 표지 구성요소를 가지고, 조립된 전구체-마이크로파티클의 상기 적어도 2개 이상의 개별 서브세트는 각각의 서브세트에 부착되거나, 그 내에 함유되거나 또는 이와 달리 연결된 각각의 표지 구성요소에 의해 구별되는 것인, 라이브러리.

청구항 3

샘플에서 하나 또는 수개의 관심 분석물의 특이적 검출을 수행하기 위한 조립된 마이크로파티클의 라이브러리로서, 상기 특이적 검출은 적절한 화학적 또는 생화학적 반응에 의해 상기 마이크로파티클 내에서 발생하고, 상기 조립된 마이크로파티클 각각은 제1항 내지 제2항 중 어느 한 항에 따른 조립된 전구체-마이크로파티클을 포함하고, 상기 전구체-마이크로파티클에 부착된, 바람직하게는 가역적으로 부착된 분석물-특이적 시약을 추가로 포함하는 것인, 조립된 마이크로파티클의 라이브러리.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 전구체-마이크로파티클 각각에 부착된 상기 분석물-특이적 시약은, 다음에 의하여 상기 시약 결합 구성요소를 통해 부착된 것인, 바람직하게는 가역적으로 부착된 것인 조립된 마이크로파티클의 라이브러리:

- a) 상기 분석물-특이적 시약이 상기 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하거나 상기 다공성 폴리머 매트릭스의 일부인 폴리머 또는 폴리머 혼합물 (i)에 직접적으로 결합됨;
- b) 상기 분석물-특이적 시약이 결합체(binding entity)에 컨쥬게이트되고, 상기 결합체가 순차적으로 상기 시약

결합 분자 (ii)에 결합됨;

c) 상기 분석물-특이적 시약이, 상기 이온화가능한 그룹이 적절한 순 전하(net charge)를 갖는 조건 하에 상기 이온화가능한 그룹 (iii)에 직접 결합됨;

d) 상기 분석물-특이적 시약이 상기 폴리머 상의 상기 하전된 그룹 (iv)에 직접 결합됨, 여기서 상기 분석물-특이적 시약은 적어도 하나의 이온화가능한 그룹 또는 복수 개의 이온화가능한 그룹을 갖고, 상기 이온화가능한 그룹은 상기 분석물-특이적 시약을 둘러싼 주변 조건에 따라 그것의 전하를 변경할 수 있음; 또는

e) (a) - (d) 중 임의의 조합.

청구항 5

제1항 내지 제2항 중 어느 한 항에 따른 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리 또는 제3항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리, 여기서

- 상기 폴리머 (i)은 다음을 포함하는 군으로부터 선택되는 하이드로겔-형성제임: ia) 폴리(메틸)(메트)아크릴레이트, 폴리아미드와 같은 합성 폴리머; ib) 실리콘계 폴리머, 예컨대 폴리디메틸실록산; ic) 다당류, 예컨대 아가로스, 키틴, 키토산, 텍스트란, 알기네이트, 카라기난, 셀룰로오스, 후코이단, 라미나란으로부터 선택되는 자연 발생 폴리머; 잔탄검, 아라비아검, 가티검, 구아검, 로커스트빈검, 트라가칸트검, 카라야검 및 이눌린으로부터 선택되는 검; 폴리펩티드, 예컨대 콜라겐, 젤라틴; 폴리-리신과 같은 폴리-아미노산; 폴리뉴클레오티드; 및 전술한 것 중 임의의 조합인 상기 폴리머 혼합물;

- 상기 시약 결합 분자 (ii)는 다음으로부터 선택되는 것임: 아비딘, 특히 사량체 아비딘; 스트렙타비딘; 단량체성 아비딘; 비오틴 결합 부위 내에 절화 티로신을 갖는 아비딘; 아비딘으로부터 유래되거나 이와 관련되고 아비딘의 결합 기능을 유지하는 기타 단백질; 비오틴; 데스티오비오틴(desthiobiotin); 이미노비오틴; 절단 가능한 스페이서 암을 갖는 비오틴; 셀레노비오틴; 옥시비오틴; 호모비오틴; 노르비오틴; 이미노비오틴; 디아미노비오틴; 비오틴 술폰사이드; 비오틴 술폰; 에피비오틴; 5-하이드록시비오틴; 2-티오비오틴; 아자비오틴; 카보비오틴; 비오틴의 메틸화된 유도체; 케톤 비오틴; 비오틴으로부터 유래되거나 이와 관련되고 비오틴의 결합 기능을 유지하는 기타 분자;

- 상기 적어도 하나의 이온화가능한 그룹 (iii) 또는 청구항 4 d)의 상기 이온화가능한 그룹은 다음으로부터 선택됨:

- N-2-아세트아미도-2-아미노에탄술폰산(ACES);
- N-2-아세트아미도-2-이미노디아세트산(ADA);
- 아미노 메틸 프로판디올(AMP);
- 3-1,1-디메틸-2-하이드록시에틸아미노-2-하이드록시 프로판술폰산(AMPSO);
- N,N-비스-2-하이드록시에틸-2-아미노에탄술폰산(BES);
- N,N-비스-2-하이드록시에틸글리신(BICINE);
- 비스-2-하이드록시에틸이미노트리스하이드록시메틸메탄(비스-트리스);
- 1,3-비스트리스하이드록시메틸메틸아미노프로판(비스-트리스 프로판);
- 4-사이클로헥실아미노-1-부탄 술폰산(CABS);
- 3-사이클로헥실아미노-1-프로판 술폰산(CAPS);
- 3-사이클로헥실아미노-2-하이드록시-1-프로판 술폰산(CAPSO);
- 2-N-사이클로헥실아미노에탄술폰산(CHES);
- 3-N,N-비스-2-하이드록시에틸아미노-2-하이드록시프로판술폰산(DIPSO);
- N-2-하이드록시에틸피페라진-N-3-프로판술폰산(EPPS);
- N-2-하이드록시에틸피파라진-N-4-부탄술폰산(HEPBS);

- N-2-하이드록시에틸피페라진-N-2-에탄술포산(HEPES);
- N-2-하이드록시에틸피페라진-N-2-프로판술포산(HEPPSO);
- 2-N-모르폴리노에탄술포산(MES);
- 4-N-모르폴리노부탄술포산(MOBS);
- 3-N-모르폴리노프로판술포산(MOPS);
- 3-N-모르폴리노-2-하이드록시프로판술포산(MOPSO);
- 피페라진-N-N-비스-2-에탄술포산(PIPES);
- 피페라진-N-N-비스-2-하이드록시프로판술포산(POPSO);
- N-트리스하이드록시메틸-메틸-4-아미노부탄술포산(TABS);
- N-트리스하이드록시메틸-메틸-3-아미노프로판술포산(TAPS);
- 3-N-트리스하이드록시메틸-메틸아미노-2-하이드록시프로판술포산(TAPSO);
- N-트리스하이드록시메틸-메틸-2-아미노에탄술포산(TES);
- N-트리스하이드록시메틸메틸글리신(TRICINE);
- 트리스하이드록시메틸아미노메탄(트리스);
- 폴리하이드록실화 아민;
- 이미다졸 및 이의 유도체(즉, 이미다졸), 특히 히드록실기를 함유하는 유도체;
- 트리에탄올아민 이량체 및 폴리머; 그리고
- 디/트리/올리고/폴리 아미노산, 예를 들어 Ala-Ala; Gly-Gly; Ser-Ser; Gly-Gly-Gly; 또는 Ser-Gly, 올리고-His, 폴리-His, 올리고-Lys, 폴리-Lys.

청구항 6

제1항 내지 제2항, 제5항 중 어느 한 항에 따른 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리 또는 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리,

여기서 상기 다공성 폴리머 매트릭스, 또는 상기 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하거나 그 일부인 상기 폴리머 또는 폴리머 혼합물은 가교되지 않은 폴리머로 구성되고, 여기서 바람직하게는, 상기 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하거나 그 일부인 상기 폴리머 또는 폴리머 혼합물은 아가로스 또는 아가로스 및 젤라틴의 조합으로 구성되며, 여기서 더욱 바람직하게는 상기 아가로스 및 젤라틴의 조합에 있어서 상기 아가로스가 0.1%(w/v) 내지 4%(w/v)의 범위로 존재하고, 그리고 상기 젤라틴은 0.1%(w/v) 내지 20%(w/v), 바람직하게는 0.5%(w/v) 내지 20%(w/v) 범위로 존재함.

청구항 7

제3항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분석물-특이적 시약은 앵타머(aptamers), 스피에겔머(Spiegelmers)를 포함하는 핵산; 항체 또는 항체 단편; 수용체, 수용체 단편 및 친화성 단백질과 같은 분석물 또는 분석물 복합체에 특이적으로 결합할 수 있는 비-항체 단백질로부터 선택되는 것인; 여기서 바람직하게는 상기 분석물-특이적 시약은 핵산, 특히 핵산 올리고머 및 핵산 프라이머로부터 선택되는 것인, 조립된 마이크로파티클의 라이브러리.

청구항 8

제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 마이크로파티클 각각에 대하여, b) 상기 분석물-특이적 시약이 결합체(binding entity)에 컨쥬게이트되고, 상기 결합체가 순차적으로 상기 시약 결합 분자(ii)에 결합되는 것에 의하여 상기 시약 결합 구성요소를 통해 상기 분석물-특이적 시약이 상기 마이크로파티클에 가역적으로 부착되는 것인, 조립된 마이크로파티클의 라이브

러리, 여기서

- 상기 결합체는 비오틴; 테스티오비오틴; 이미노비오틴; 절단 가능한 스페이서 암을 갖는 비오틴; 셀레노비오틴; 옥시비오틴; 호모비오틴; 노르비오틴; 이미노비오틴; 디아미노비오틴; 비오틴 숏폭사이드; 비오틴 숏폰; 에피비오틴; 5-하이드록시비오틴; 2-티오비오틴; 아자비오틴; 카보비오틴; 비오틴의 메틸화된 유도체; 케톤 비오틴; 비오틴으로부터 유도되거나 이와 관련되고 비오틴의 결합 기능을 유지하는 기타 분자로부터 독립적으로 선택되고; 그리고 상기 시약 결합 분자는 아비딘 및 스트렙타비딘으로부터 독립적으로 선택되고; 또는 그 반대이고; 또는

- 상기 결합체는 비오틴이고, 상기 시약 결합 분자는 단량체성 아비딘, 비오틴 결합 부위 내에 니트로화된 티로신을 갖는 아비딘, 및 아비딘으로부터 유래되거나 이와 관련되고 아비딘의 결합 기능을 유지하는 기타 단백질로부터 선택되고; 또는 그 반대임.

청구항 9

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 라이브러리는 여러 샘플에서 단일 관심 분석물의 특이적 검출 수행을 위한 것이고, 여기서 상기 라이브러리 내에, 조립된 마이크로파티클의 적어도 2개의 개별 서브세트, 바람직하게는 조립된 마이크로파티클의 3개 이상의 개별 서브세트가 존재하는 것인, 조립된 마이크로파티클의 라이브러리,

여기서 각각의 서브세트는

- 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결되는 구별된 표지 구성요소를 가지고; 그리고

상기 적어도 2개, 3개 또는 그 이상의 개별 서브세트는 모두

- 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 동일한 분석물-특이적 시약을 가지고, 여기서 상기 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적임;

그 결과 조립된 마이크로파티클의 상기 적어도 2개 이상의 개별 서브세트는 부착된 분석물-특이적 시약의 관점에서는 동일하지만

- 각각의 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결되는 각각의 표지 구성요소에 의해서는 상이함;

여기서 각각의 서브세트는 상기 각각의 표지 구성요소에 의해 명확하게 정의되고 식별될 수 있음.

청구항 10

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 라이브러리는 단일 샘플에서 다중 관심 분석물의 특이적 검출 수행을 위한 것이고, 여기서 상기 라이브러리 내에, 조립된 마이크로파티클의 적어도 2개의 개별 서브세트, 바람직하게는 조립된 마이크로파티클의 3개 이상의 개별 서브세트가 존재하는 것인, 조립된 마이크로파티클 라이브러리,

여기서 각각의 서브세트는

- 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결되는 구별된 표지 구성요소를 가지고; 그리고

- 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 가짐; 여기서 각 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적임;

그 결과 조립된 마이크로파티클의 상기 적어도 2개 이상의 개별 서브세트는

- 각각의 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결되는 각각의 표지 구성요소; 및

- 각각의 서브세트에 부착된 각각의 분석물-특이적 시약;

에 의하여 구별되고,

여기서 각각의 서브세트는 상기 각각의 표지 구성요소 및 상기 각각의 분석물-특이적 시약에 의해 명확하게 정의되고 식별될 수 있음.

청구항 11

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 라이브러리는 여러 샘플에서 관심 있는 다중 분석물의 특정 검출을 수행하기 위한 것이며, 여기서 상기 라이브러리 내, 조립된 마이크로파티클의 상이한 개별 서브세트가 복수 개 존재하는 것인 조립된 마이크로파티클 라이브러리,

여기서 각각의 서브세트는

- 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결된 구별되는 표지 구성요소를 가지고; 그리고

여기서, 조립된 마이크로파티클의 상기 복수 개의 별개의 서브세트 내에, 조립된 마이크로파티클의 별개의 서브세트의 상이한 클래스가 존재하고, 상기 클래스 각각은 수 개의 마이크로파티클 서브세트를 포함하고, 각각의 클래스는 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 가지고, 그리고 하나의 클래스 내의 모든 마이크로파티클 서브세트는 부착된 동일한 분석물-특이적 시약을 가지고; 각 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적임;

그 결과 상기 라이브러리 내, 조립된 마이크로파티클의 상기 복수 개의 상이한 별개의 서브세트는

- 각각의 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결되는 구별된 각각의 표지 구성요소에 의하여 구별되고; 그리고

별개의 마이크로파티클 서브세트 각각은 마이크로파티클 서브세트의 하나의 클래스의 일부를 형성함;

여기서 각각의 서브세트는 상기 각각의 표지 구성요소 및 상기 각각의 분석물-특이적 시약에 의해 명확하게 정의되고 식별 가능하고; 그리고

그 결과 마이크로파티클 서브세트의 상기 상이한 클래스는, 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 각각의 분석물-특이적 시약에 의해 구별되고; 그리고 상기 상이한 클래스 각각은 수 개의 마이크로파티클 서브세트를 포함하고, 하나의 클래스 내의 모든 서브세트는 부착된 동일한 분석물-특이적 시약을 가짐.

청구항 12

제3항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 조립된 마이크로파티클 라이브러리를 제조하기 위한 키트로서, 다음을 포함하는 것인 키트:

- 적어도 두 개의 용기, 즉 첫 번째 및 두 번째 용기, 그리고 임의로 각각 다음을 포함하는 추가 용기:

· 제 1 항 내지 제 2 항, 제 5 항 및 제 6 항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 조립된 전구체-마이크로파티클의 서브세트, 여기서 각 서브세트는 상기 서브세트 내의 상기 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 또는 이와 달리 결합된 구별된 표지 구성요소를 가지며, 그 결과 조립된 전구체-마이크로파티클의 상기 두 개의 서브세트는 각각의 서브세트에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 또는 이와 달리 결합된 각각의 표지 구성요소에 의해 구별됨;

- 다음을 포함하는 추가 용기:

· 다음에 의하여 상기 시약 결합 구성요소를 통해 상기 전구체-마이크로파티클의 상기 서브세트에 대한 분석물-특이적 시약의 부착, 바람직하게는 가역적 부착을 가능하게 하는 컨디셔닝 용액

a) 상기 분석물-특이적 시약이 상기 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하거나 상기 다공성 폴리머 매트릭스의 일부인 폴리머 또는 폴리머 혼합물 (i)에 직접적으로 결합됨;

b) 상기 분석물-특이적 시약이 결합체(binding entity)에 컨쥬게이트되고, 상기 결합체가 순차적으로 상기 시약 결합 분자 (ii)에 결합됨;

c) 상기 분석물-특이적 시약이, 상기 이온화가능한 그룹이 적절한 순 전하(net charge)를 갖는 조건 하에 상

기 이온화가능한 그룹 (iii)에 직접 결합됨;

d) 상기 분석물-특이적 시약이 상기 폴리머 상의 상기 하전된 그룹 (iv)에 직접 결합됨, 여기서 상기 분석물-특이적 시약은 적어도 하나의 이온화가능한 그룹 또는 복수 개의 이온화가능한 그룹을 갖고, 상기 이온화가능한 그룹은 상기 분석물-특이적 시약을 둘러싼 주변 조건에 따라 그것의 전하를 변경할 수 있음; 또는

e) (a) - (d) 중 임의의 조합;

상기 시약 결합 구성요소는 제1항에서 정의된 바와 같고, 상기 시약 결합 분자는 제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같고, 그리고 상기 결합체는 제4항 내지 제5항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같고; 상기 폴리머 또는 폴리머 혼합물은 제1항, 제4항 내지 제5항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같고; 그리고 상기 이온화가능한 그룹은 제1항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같고, 그리고 상기 분석물-특이적 시약은 제3항 내지 제4항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같음.

청구항 13

제3항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 조립된 마이크로파티클 라이브러리를 제조하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 것인 방법:

- 하기를 임의의 순서로 제공하는 단계:

· 제1항 내지 제2항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리;

· 제3항 내지 제4항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 적어도 하나의 분석물-특이적 시약;

- 상기 적어도 하나의 분석물-특이적 시약이 상기 조립된 전구체-마이크로파티클의 일부 또는 전부에 부착, 바람직하게는 가역적으로 부착되는 것을 허용하는 조건 하에서, 조립된 전구체-마이크로파티클의 상기 라이브러리, 또는 이의 선택된 서브세트, 및 적어도 하나의 분석물-특이적 시약을 혼합하고, 이에 의하여 제5항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 생성하는 단계;

- 임의로, 상기 조립된 마이크로파티클을 세척하여 부착되지 않은 분석물-특이적 시약을 그로부터 제거하는 단계.

청구항 14

샘플에서 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 다음을 포함하는 것인 키트:

a)

- 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 일반 검출 조성물을 함유하는 용기, 여기서 분석물의 상기 화학적 또는 생화학적 검출 반응은 핵산 증폭이고, 상기 일반 검출 조성물은 완충액, 모노-뉴클레오타이드-트리포스페이트, 적합한 핵산 폴리머라제와 같은 증폭 효소, 예컨대 택(Taq) 폴리머라제, 및 증폭된 핵산과 같은 증폭 산물의 검출을 위한 핵산 염료, 또는

- 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 제1 검출 조성물을 함유하는 용기, 및 검출 시약을 포함하는 제2 검출 조성물을 함유하는 추가의 용기, 여기서 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응은 면역화학 검출 반응이고, 상기 제1 검출 조성물은 면역화학 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는데, 예컨대 완충액, 및 상기 면역화학 검출 반응에서 분석물-특이적 시약(ASR)으로 사용되는 1차 항체, 항체 단편, 또는 비-항체 단백질과 동일한 분석물에 특이적이고 적절한 리포터 효소에 결합된 2차 항체 또는 2차 항체 단편을 포함함; 그리고 상기 제2 검출 조성물은 검출 시약으로서, 상기 리포터 효소에 의해 반응된 기질이 검출가능하게 되는, 바람직하게는 광학적으로 검출가능하게 되는, 더 바람직하게는 형광에 의해 검출가능하게 되는 상기 리포터 효소에 대한 적합한 기질을 포함함, 또는

- 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 함유하는 제1 검출 조성물을 포함하는 용기, 및 검출 시약을 함유하는 제2 검출 조성물을 포함하는 추가의 용기로서, 여기서 화학적 또는 생화학적 반응은 면역화학 검출 반응이고, 상기 제1 검출 조성물은 면역화학 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는데, 예컨대 완충액, 및 상기 면역화학 검출 반응에서 분석물-특이적 시약(ASR)으로 사용되는 1차 항체와 동일한 분

석물에 대해 특이적이고 적합한 올리고뉴클레오타이드 태그(tag)에 결합된 2차 항체 또는 2차 항체 단편을 포함함; 그리고 상기 제2 검출 조성물은 검출 시약(들)으로서 완충액, 모노-뉴클레오타이드-트리포스페이트, 적합한 핵산 폴리머라제와 같은 증폭 효소, 예컨대 태크(Taq) 폴리머라제, 및 증폭된 핵산과 같은 증폭 산물의 검출을 위한 핵산 염료, 및 2차 항체에 부착된 올리고뉴클레오타이드 태그를 증폭하기에 적합한 프라이머를 포함함; 그리고

b)

- 오일과 같은 비-수상(non-aqueous phase), 예컨대 유화제로 임의로 보충된 플루오로카본 오일을 함유하는 용기;

그리고

c)

- 구성요소들을 혼합하기 위한 혼합 용기, 여기서 바람직하게는 상기 키트는 다음을 추가로 포함함

d)

- 검출 반응을 수행하기 위한 용기; 및 여기서 더 바람직하게는, 상기 키트는 다음을 추가로 포함함

e)

- 제12항에 따른 키트, 또는

- 제3항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리.

청구항 15

수성 샘플에서 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법으로서, 다음 단계들을 포함하는 것인 방법:

- 다음을 임의의 순서로 제공하는 단계:

· 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 수성 샘플;

· 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 일반 검출 조성물;

· 제3항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리, 여기서 상기 마이크로파티클에 부착된 상기 분석물-특이적 시약은 상기 관심 분석물에 특이적으로 결합하거나 또는 이와 반응할 수 있도록 선택됨;

- 임의로, 상기 수성 샘플과 상기 일반 검출 조성물을 혼합하는 단계;

- 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하는 단계, 이에 의하여 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 상기 마이크로파티클의 공극 부피 내에 수성 샘플을 흡수하고, 그리고 임의로 상기 샘플 내에 관심 분석물이 존재하는 경우에는 상기 관심 분석물에 결합하는 것이 허용됨;

- 임의로, 상기 마이크로파티클을 세척하는 단계;

- 상기 수성 샘플이 상기 일반 검출 조성물과 사전에 혼합되지 않은 경우에는, 상기 일반 검출 조성물을 마이크로파티클에 첨가하는 단계;

- 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 비-수상으로 전달하고 개별 조립된 마이크로파티클을 둘러싸는 임의의 수상을 제거하는 단계, 이에 의하여 상기 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피로 제한됨;

- 임의로, 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약을 방출하는 단계;

- 상기 관심 분석물의 검출 반응을 수행하는 단계;

- 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 단계.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 관심 분석물이 핵산인 것인 방법, 여기서

- 상기 분석물-특이적 시약은 핵산 또는 핵산 쌍이며, 혼성화 조건 하에서 상기 관심 분석물에 혼성화할 수 있도록 상기 관심 분석물에 충분히 상보적이고, 여기서, 바람직하게는 상기 분석물-특이적 시약은 상기 관심 분석물의 증폭을 위한 적절한 프라이머 또는 프라이머 쌍이고;
- 상기 일반 검출 조성물은 프라이머를 제외하고 상기 관심 핵산 분석물의 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하고, 여기서 특히 상기 일반 검출 조성물은 완충액, 모노-뉴클레오타이드-트리포스페이트, 적합한 핵산 폴리머라제와 같은 증폭 효소, 예컨대 태크(Taq) 폴리머라제, 및 증폭된 핵산과 같은 증폭 산물의 검출을 위한 핵산 염료를 포함하고;
- 상기 전달하는 단계는 상기 조립된 마이크로파티클을 비-수상으로 전달시키고 현탁시키고, 선택적으로 상기 비-수상으로 반복적으로 세척하는 단계이고, 상기 단계는 보다 선택적으로는 임의의 마이크로파티클의 외부에 남아있는 수성상이 없거나 실질적으로 수성상이 없는 마이크로파티클의 단분산 현탁액의 형성을 보장하기 위해 여과 또는 기계적 교반을 또한 수반하는 것이고;
- 상기 임의로, 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약을 방출하는 단계는, 일시적으로 온도를 증가시키거나, pH를 변경하거나, 또는 염 조건을 변경하는 단계, 바람직하게는 온도를 증가시키는 단계, 더 바람직하게는 온도를 주위(ambient) 온도로부터 >90℃의 온도까지 증가시키는 단계이고;
- 상기 검출 반응을 수행하는 단계는 상기 수성 샘플 내에 분석물이 존재하는 경우라면 상기 분석물의 증폭 반응을 수행하는 단계이고; 그리고
- 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 단계는 상기 증폭된 분석물의 검출 및/또는 정량화 단계임.

청구항 17

수성 샘플에서 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법으로서, 다음 단계들을 포함하는 것인 방법:

- 다음을 임의의 순서로 제공하는 단계:
 - 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 수성 샘플;
 - 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위해 필요한 시약을 포함하는 제1 검출 조성물;
 - 검출 시약을 포함하는 제2 검출 조성물;
 - 제3항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리, 여기서 상기 마이크로파티클에 부착된 상기 분석물-특이적 시약은 상기 관심 분석물에 특이적으로 결합하거나 또는 이와 반응할 수 있도록 선택되는 것임;
- 임의로, 상기 수성 샘플과 상기 제1 검출 조성물을 혼합하는 단계;
- 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하고, 그리고 상기 수성 샘플이 상기 제1 검출 조성물과 미리 혼합되지 않은 경우에는, 상기 제1 검출 조성물과도 배양하는 단계, 이에 의하여 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 수성 샘플 및 상기 제1 검출 조성물을 상기 마이크로파티클의 공극 부피 내에 흡수하고, 그리고 임의로 상기 샘플 내에 관심 분석물이 존재하는 경우에는 상기 관심 분석물에 결합하는 것이 허용됨;
- 임의로, 흡수되지 않거나 반응하지 않은 임의의 제1 검출 조성물을 제거하기 위해 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 세척하는 단계;
- 흡수된 수성 샘플을 포함하는 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양함으로써, 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 상기 제2 검출 조성물을 흡수하도록 하는 단계;
- 임의로, 흡수되지 않거나 반응하지 않은 임의의 제2 검출 조성물을 제거하기 위해 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 추가로 세척하는 단계;
- 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 비-수상으로 전달하고 개별 조립된 마이크로파티클을 둘러싸는 임의의 수상을 제거하는 단계, 이에 의하여 상기 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피로 제한됨; 여기서, 바람직하게는, 상기 비-수상으로 전달하는 단계는 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리가 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양된 직후에 수행됨;

- 임의로, 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약을 방출하는 단계;
- 상기 검출 시약을 검출 및/또는 정량화함으로써 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량화하는 단계.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 관심 분석물이 단백질 또는 기타 비핵산 분자인 것인 방법, 여기서

- 상기 분석물-특이적 시약은 상기 단백질 분석물 또는 기타 비핵산 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 1차 항체, 항체 단편, 또는 비-항체 단백질임;
- 상기 제1 검출 조성물은 면역화학 검출 반응을 수행하기 위해 필요한 시약을 포함하는데, 예컨대 완충액, 및 상기 분석물에 특이적이고 적합한 리포터 효소에 결합된 2차 항체 또는 2차 항체 단편을 포함함;
- 상기 제2 검출 조성물은 검출 시약으로서, 상기 리포터 효소에 의해 반응된 기질이 검출가능하게 되는, 바람직하게는 광학적으로 검출가능하게 되는, 더 바람직하게는 형광에 의해 검출가능하게 되는 상기 적합한 리포터 효소에 대한 적합한 기질을 포함함;
- 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와, 그리고 상기 제1 검출 조성물과 함께 배양하는 단계는, 분석물이 상기 수성 샘플 내에 존재하는 경우 상기 1차 항체, 1차 항체 단편, 또는 비-항체 단백질에 상기 분석물의 결합을 수반하는 면역화학 반응을 수행하는 단계이고, 이에 의하여 분석물과 상기 1차 항체, 1차 항체 단편, 또는 비-항체 단백질과의 복합체가 형성됨; 상기 면역화학 반응은 상기 복합체에 대한 상기 2차 항체의 결합을 추가로 수반하고, 이에 의하여 1차 항체, 항체 단편 또는 비-항체 단백질, 분석물, 및 2차 항체 사이에 샌드위치를 형성함;
- 상기 첫번째 임의로 상기 라이브러리를 세척하는 단계는, 상기 라이브러리로부터 임의의 비-결합된 2차 항체를 제거하는 단계임;
- 흡수된 수성 샘플을 포함하는 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 상기 단계는, 상기 기질이 상기 리포터 효소에 의해 반응되도록 하는 단계임;
- 상기 임의로 라이브러리를 추가로 세척하는 단계는 상기 라이브러리로부터 미-반응 기질을 제거하는 단계임;
- 상기 전달하는 단계는 상기 조립된 마이크로파티클을 비-수상으로 이동시키고 현탁시키고, 그리고 임의로 상기 비-수상으로 반복적으로 세척하는 단계이고, 보다 선택적으로는 임의의 마이크로파티클의 외부에 남아있는 수성상이 없거나 실질적으로 수성상이 없는 마이크로파티클의 단분산 현탁액의 형성을 보장하기 위해 여과 또는 기계적 교반을 또한 수반하는 것임;
- 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약을 방출하는 상기 임의의 단계는, 일시적으로 온도를 증가시키거나, pH를 변경하거나, 염 조건을 변경하는 단계, 바람직하게는 온도를 증가시키는 단계, 더 바람직하게는 온도를 주위(ambient) 온도로부터 >90℃의 온도까지 증가시키는 단계임;
- 상기 관심 분석물의 검출 및/또는 정량화 단계는 상기 반응된 기질을 검출 및/또는 정량화하는 단계임.

청구항 19

수성 샘플에서 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법으로서, 다음 단계들을 포함하는 것인 방법:

- 임의의 순서로 다음을 제공하는 단계:
 - 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 수성 샘플;
 - 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위해 필요한 시약을 포함하는 제1 검출 조성물;
 - 검출 시약을 포함하는 제2 검출 조성물;
 - 제3항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리, 여기서 상기 마이크로파티클에 부착된 상기 분석물-특이적 시약은 상기 관심 분석물에 특이적으로 결합하거나 이와 반응할 수 있도록 선택되는 것임;
- 임의로, 상기 수성 샘플과 상기 제1 검출 조성물을 혼합하는 단계;
- 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하고, 그리고 상기 수성 샘플이 상기

제1 검출 조성물과 미리 혼합되지 않은 경우에는, 상기 제1 검출 조성물과도 함께 배양하는 단계, 이에 의하여 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 수성 샘플 및 상기 제1 검출 조성물을 상기 마이크로파티클의 공극 부피 내에 흡수하고, 그리고 임의로 상기 샘플 내에 관심 분석물이 존재하는 경우에는 상기 관심 분석물에 결합하는 것이 허용됨;

- 임의로, 흡수되지 않거나 반응하지 않은 임의의 제1 검출 조성물을 제거하기 위해 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 세척하는 단계;
- 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양함으로써, 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 상기 제2 검출 조성물을 흡수하도록 하는 단계;
- 임의로, 흡수되지 않거나 반응하지 않은 임의의 제2 검출 조성물을 제거하기 위해 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 추가로 세척하는 단계;
- 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 비-수상으로 전달하고 개별 조립된 마이크로파티클을 둘러싸는 임의의 수상을 제거하는 단계, 이에 의하여 상기 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피로 제한됨;
- 임의로, 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약을 방출하는 단계;
- 상기 관심 분석물의 검출 반응을 수행하는 단계; 그리고
- 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량화하는 단계.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 관심 분석물이 단백질 또는 기타 비-핵산 분자인 것인 방법, 여기서

- 상기 분석물-특이적 시약은 상기 단백질 분석물 또는 기타 비-핵산 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 1차 항체, 항체 단편, 또는 비-항체 단백질임;
- 상기 제1 검출 조성물은 면역화학 검출 반응을 수행하기 위해 필요한 시약을 포함하는데, 예컨대 완충액, 및 상기 1차 항체와 동일한 분석물에 특이적이고 적합한 올리고뉴클레오타이드 태그에 결합된 2차 항체 또는 2차 항체 단편을 포함함;
- 상기 제2 검출 조성물은 검출 시약으로서, 완충액, 모노-뉴클레오타이드-트리포스페이트, 적합한 핵산 폴리머라제와 같은 증폭 효소, 예컨대 Taq(Thermostable DNA Polymerase) 폴리머라제, 증폭된 핵산과 같은 증폭 산물의 검출을 위한 핵산 염료, 및 2차 항체에 부착된 올리고뉴클레오타이드 태그를 증폭하기에 적합한 프라이머를 포함함;
- 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리 및 상기 제1 검출 조성물과 함께 배양하는 단계는, 상기 수성 샘플 내에 분석물이 존재하는 경우 상기 분석물이 상기 1차 항체, 1차 항체 단편 또는 비-항체 단백질에 결합하는 것을 수반하는 면역화학 반응을 수행하는 단계이고, 이에 의하여 분석물과 상기 1차 항체, 1차 항체 단편, 또는 비-항체 단백질과의 복합체가 형성됨; 상기 면역화학 반응은 상기 복합체에 대한 상기 2차 항체의 결합을 추가로 수반하고, 이에 의하여 1차 항체, 항체 단편 또는 비-항체 단백질, 분석물, 및 2차 항체 사이에 샌드위치를 형성함;
- 상기 첫번째 임의로 상기 라이브러리를 세척하는 상기 단계는 상기 라이브러리로부터 결합되지 않은 2차 항체를 제거하는 단계임;
- 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 단계는 상기 제2 검출 조성물 내의 상기 프라이머가 2차 항체에 부착된 올리고뉴클레오타이드 태그에 혼성화되도록 하는 단계임;
- 상기 임의로 라이브러리를 추가로 세척하는 단계는 상기 라이브러리로부터 혼성화되지 않은 임의의 프라이머를 제거하는 단계임;
- 상기 전달하는 단계는 상기 조립된 마이크로파티클을 비-수상으로 전달하고 현탁시키고, 그리고 선택적으로 상기 비-수상으로 반복적으로 세척하는 단계이며, 보다 선택적으로는 임의의 마이크로파티클의 외부에 남아있는 수성상이 없거나 실질적으로 수성상이 없는 마이크로파티클의 단분산 현탁액의 형성을 보장하기 위해 여과 또는 기계적 교반을 또한 수반하는 것임;

- 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약을 방출하는 상기 임의의 단계는, 일시적으로 온도를 증가시키거나, pH를 변경하거나, 또는 염 조건을 변경하는 단계, 바람직하게는 온도를 증가시키는 단계, 더 바람직하게는 온도를 주위(ambient) 온도로부터 >90℃의 온도까지 증가시키는 단계임;
 - 상기 검출 반응을 수행하는 단계는 상기 올리고뉴클레오타이드 태그의 증폭 반응을 수행하는 단계임; 그리고
- 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 상기 단계는 상기 증폭된 올리고뉴클레오타이드 태그를 검출 및/또는 정량하는 단계임.

청구항 21

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 외부 트리거를 적용함으로써 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약을 방출하는 상기 단계는 상기 마이크로파티클이 노출되는 온도를 상승시킴으로써 수행되는 것인 방법.

청구항 22

제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 방법, 여기서

- 상기 방법은 예컨대 다양한 환자들로부터 유래한, 복수의 수성 샘플 내에서, 단일 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법임,
 - 상기 방법에서, 관심 분석물을 함유하는 것으로 의심되거나 알려진 복수의 상이한 수성 샘플, 예컨대 다양한 환자들로부터 유래한 샘플이 제공됨,
 - 상기 방법에서 제공되는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리는 제9항에 따른 라이브러리이며, 이러한 라이브러리 내에는, 제공되고 시험될 상이한 수성 샘플만큼 많은 또는 적어도 그만큼 많은 별개의 마이크로파티클 서브세트가 제공되고, 여기서 상기 모든 별개의 서브세트(substeps)는 상기 서브세트의 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 동일한 분석물-특이적 시약을 갖고, 상기 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적임;
 - 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하는 상기 단계에서, 상기 상이한 수성 샘플 각각은 상기 라이브러리의 마이크로파티클의 별개의 서브세트와 별도로 배양됨;
 - 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 상기 라이브러리를 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 상기 단계에서, 상기 라이브러리의 마이크로파티클의 별개의 서브세트 각각은 상기 제2 검출 조성물과 별도로 배양됨;
 - 상기 라이브러리를 비-수상으로 전달하는 상기 단계는 마이크로파티클의 각 서브세트 대해 개별적으로 수행됨, 즉, 마이크로파티클의 별개의 서브세트 각각은 개별적으로 비-수상 속으로 전달되고, 개별 마이크로파티클을 둘러싼 수상은 각 서브세트에 대해 개별적으로 제거되고, 이에 의하여 각 서브세트에 대해 개별적으로 상기 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피로 제한됨,
- 여기서, 상기 방법은 상기 라이브러리를 비-수상으로 전달하는 상기 단계 후에, 상기 관심 분석물의 검출 반응을 후속적으로 수행하기 전에, 그리고 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량화하기 전에, 상기 비-수상 내에 있는 모든 별개의 서브세트의 상기 복수의 격리된 반응 공간을 함께 혼합하는 단계를 더 포함함.

청구항 23

제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 방법, 여기서

- 상기 방법은 단일 수성 샘플 내에서 복수의 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법임,
- 상기 방법에서, 복수의 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 단일 수성 샘플이 제공됨,
- 상기 방법에서 제공되는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리는 제10항에 따른 라이브러리이며, 이러한 라이브러리 내에는 탐지될 상이한 관심 분석물 만큼 많이 또는 더 많이 제공되는 마이크로파티클의 별개의 서브세트가 존재함, 여기서 상기 별개의 서브세트 각각은, 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 갖는 것이고; 각 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적

임;

- 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하는 단계에서, 상기 수성 샘플은 상기 라이브러리의 마이크로파티클의 상기 별개의 서브세트 모두와 함께 배양됨;
- 흡수된 수성 샘플을 포함하는 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 상기 단계에서, 상기 라이브러리의 마이크로파티클의 상기 개별 서브세트 모두가 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양됨;
- 상기 라이브러리를 비-수상 속으로 전달하는 상기 단계는 마이크로파티클의 모든 서브세트에 대해 함께 수행됨, 즉, 마이크로파티클의 모든 서브세트는 비-수상 속으로 전달되고, 그리고 개별 마이크로파티클을 둘러싼 수상은 제거되고, 이에 의하여 상기 복수의 분석물을 검출 및/또는 정량하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피로 제한됨.

청구항 24

제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 따른 방법, 여기서

- 상기 방법은 복수의 수성 샘플에서 다수의 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법임,
- 상기 방법에서, 다수의 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 복수의 상이한 수성 샘플, 예컨대 다양한 환자의 샘플이 제공됨,
- 상기 방법에서 제공되는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리는 제11항에 따른 라이브러리이며, 여기서 이러한 라이브러리 내에는 조립된 마이크로파티클의 별개의 서브세트의 상이한 클래스가 있으며, 여기서 각 클래스는 수개의 마이크로파티클 서브세트를 포함하고 그리고 상기 클래스 각각은 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 갖고, 그리고 하나의 클래스 내의 마이크로파티클 서브세트 모두는 동일한 부착된 분석물-특이적 시약을 갖는 것이고; 각각의 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적임; 여기서, 상기 방법에 있어서 상기 라이브러리를 제공하는 상기 단계 내에 다음이 존재함:

· 검출할 상이한 분석물 만큼 많거나 또는 적어도 그만큼 많은, 제공되는 별개의 마이크로파티클 서브세트의 상이한 클래스,

· 제공되고 시험될 수성 샘플 만큼 많거나 또는 적어도 그만큼 많은, 각 클래스 내에 제공되는 상이한 마이크로파티클 서브세트,

· 시험될 상이한 수성 샘플에 검출할 관심 있는 상이한 분석물의 수를 곱한 만큼 많거나 또는 적어도 그만큼 많은, 라이브러리 내에 제공되는 상이한 마이크로파티클 서브세트,

- 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하는 상기 단계에서, 정확히 하나의 수성 샘플이 각 클래스의 마이크로파티클의 정확히 하나의 서브세트와 함께 배양되고, 각 수성 샘플은 상기 라이브러리 내의 마이크로파티클 클래스만큼 많은 상이한 클래스로부터 유래한 상이한 마이크로파티클 서브세트와 함께 배양됨,

- 흡수된 수성 샘플을 포함하는 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 상기 단계에서, 하나의 개별 수성 샘플이 이전에 배양된 서브세트와 함께 상이한 클래스의 마이크로파티클로부터 조합된 서브세트가 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양됨,

- 상기 라이브러리를 비-수상 속으로 전달하는 상기 단계는 각각의 수성 샘플에 대해 개별적으로 수행됨, 즉 하나의 개별 수성 샘플이 이전에 배양된 마이크로파티클의 조합된 서브세트와 함께 비-수상 속으로 전달되고, 그리고 개별 마이크로파티클을 둘러싸고 있는 수상이 제거되고, 이에 의하여 각각의 수성 샘플에 대해 개별적으로, 상기 다수의 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피로 제한됨,

여기서 상기 방법은 바람직하게는, 상기 라이브러리를 비-수상 속으로 전달하는 상기 단계 후에, 상기 관심 분석물의 검출 반응을 후속적으로 수행하기 전에, 그리고 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하기 전에, 상기 비-수상의 모든 개별 샘플의 상기 복수의 격리된 반응 공간을 함께 혼합하는 단계를 추가적으로 포함함.

청구항 25

제15항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 분석물의 검출 및 정량화 단계에서, 상기 분석물의 정량화가 하기로부터 선택된 방법에 의해 수행되는 것인 방법;

- a) 디지털 핵산 증폭, 특히 디지털 폴리머라제 연쇄 반응(PCR);
 - b) 실시간 정량적 핵산 증폭, 특히 실시간 폴리머라제 연쇄 반응(PCR);
 - c) 면역화학 검출 방법, 특히 디지털 면역분석과 같은 디지털 면역화학 검출 방법, 예컨대 디지털-효소 결합된 면역흡착 분석(ELISA);
 - d) 면역 폴리머라제 연쇄 반응과 같은 핵산 증폭과 결합된 면역화학 검출 방법; 특히 디지털 면역-PCR;
- 여기서 관심 분석물이 핵산인 경우 a) 또는 b) 방법 중 어느 하나, 또는 a)와 b)의 조합을 사용하여 수행되고; 그리고 분석물이 단백질, 펩티드 또는 기타 비-핵산 분석물인 경우에는 방법 c) 또는 d) 중 어느 하나를 사용하여 정량을 수행함.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 샘플에서 하나 또는 여러 분석물의 특이적 검출을 수행하기 위한 조립된(prefabricated) 마이크로파티클, 및 본원에서 때때로 "전구체-마이크로파티클(precursor-microparticles)"이라고도 하는 이러한 마이크로파티클의 전구체에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 이러한 조립된 마이크로파티클의 라이브러리 및 이러한 전구체-마이크로파티클의 라이브러리에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 라이브러리를 만들기 위한 키트 및 샘플에서 관심 분석물을 검출하기 위해 이러한 라이브러리를 사용하는 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 바람직하게는 이러한 키트를 사용하여 수성 샘플에서 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 샘플에서 여러 분석물(analytes)을 민감하게 검출하는 것이 바람직하다. 용액에서 분석물의 동시 검출을 위한 다양한 방법이 개발되었다. 예를 들어, 핵산의 민감한 검출을 위해 템플릿 특이적 증폭에 의해 샘플에서 핵산 서열의 검출을 허용하는 방법이 사용되었다. 이를 위해, 예를 들어 중합효소 연쇄 반응(PCR), 재조합효소 증합 효소 반응(RPA), 전사-매개된 증폭(TMA), 루프-매개된 증폭 반응(LAMP) 및 다른 것들과 같은, 일반적으로 잘 설명된 방법이 이용가능하고 사용된다. 그러나 채택된 시약의 교차 반응성은 다중화의 달성 가능한 수준을 동일한 분석에서 검출할 적은 수의 표적으로 제한했다.
- [0003] 단백질 항원의 민감한 검출을 위해 템플릿 의존적 증폭은 가능하지 않다. 그러나 핵산 증폭 방법은 고전적인 면역분석 형식과 결합되었다. 예를 들어 면역-PCR(Adler, Wacker et al. 2003)에서는 고체상에 고정화된 결합 항체와 핵산 서열 표지가 부착된 검출 항체가 사용된다. 제1항체, 항원 및 제2항체로 구성된 샌드위치가 형성된 후, 제2항체에 부착된 핵산 서열은 증폭 반응에 의해 증폭된다. 또 다른 분석 형식(Todd, Freese et al. 2007)에서는 고체상에 결합된 항체, 항원 및 형광단이 제공된 두 번째 항체 사이에 샌드위치가 형성된다. 형광단은 선택적이고 정량적으로 절단되며 분자 흐름 계수기로 분자 단위로 계수된다. 검출된 형광단의 수는 결합된 분석물의 수와 직접적으로 대응한다.
- [0004] SiMOA(Rissin, Kan et al. 2010)("단일 분자 어레이")로 알려진 방법도 단일 결합 이벤트의 디지털 측정을 기반으로 한다. 항원은 먼저 첫 번째 항체에 의해 고체 입자의 외부로 포획된다. 효소로 표지된 두 번째 항체는 항원에 결합된다. 고체 입자는 효소에 의해 형광 생성물로 전환되는 기질을 포함하는 용액과 접촉된다. 입자들은, 하나의 입자만 하나의 공동(a cavity)과 소량의 용액에 포함되도록, 어레이의 작은 공동들에 배치된다. 반응 공간으로 기능하는 공동은 그 다음 비-수성 용액으로 덮여 개별 공동을 격리한다. 감지 가능한 신호로 개별 공동의 계산을 하고 각 공동의 신호를 정량화하여 항원 농도의 초-고감도 측정이 수행된다.
- [0005] 사용된 마이크로 캐리어의 향상된 처리를 용이하게 하기 위해 자성 입자가 사용되었다(Tekin and Gijs 2013).
- [0006] 문헌(Leng, Zhang et al. 2010)은 프라이머 결합을 위해 변형된 아가로스 폴리머를 사용하여 프라이머 뉴클레오타이드가 공유적으로 부착된 하이드로겔 입자를 설명한다. 그 다음 프라이머로 변형된 아가로스를 증폭 시약 및 표적 함유 용액과 혼합하였고, 미세유체 액적 생성기를 사용하여 하이드로겔 마이크로파티클을 형성한다. 오일

에서 형성된 아가로스 에멀전은 증폭/검출을 위해 적용된다.

[0007] 다음의 요구 사항을 충족하는 샘플에서 다중 분석물의 병렬 검출이 당업계에 필요하다.

[0008] a) 분석물-특이적 반응의 교차-간섭 없음,

[0009] b) 각 분석물에 대한 높은 감도와 특이성, 그리고

[0010] c) 최소한의 장비로 분석물-특이적 시약의 간단한 설정 및 조합.

[0011] 본 발명은 이러한 요건을 제공하고 충족시키는 것을 목적으로 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 이제 다양한 측면 및 구현예를 참조하여 설명된다:

[0013] 첫 번째 측면에서, 본 발명은 다음에 관한 것이다:

[0014] 1. 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 제조하기 위한 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리, 여기서 상기 조립된 마이크로파티클은 샘플에서 하나 또는 수개의 관심 분석물의 특이적 검출을 수행하도록 구성되며, 상기 특이적 검출은 적절한 화학적 또는 생화학적 반응에 의해 상기 마이크로파티클 내에서 발생하고, 상기 라이브러리 내에 있는 각각의 상기 조립된 전구체-마이크로파티클은 다음을 포함하는 것임:

[0015] - 수성 샘플을 수용하고 분석물의 특이적 검출을 위한 반응 공간을 제공하기 위한 공극 부피를 갖는 다공성 매트릭스;

[0016] - 전구체-마이크로파티클에 대한 분석물-특이적 시약의 부착, 바람직하게는 가역적 부착을 허용하는 시약 결합 구성요소; 상기 시약 결합 구성요소는 다음 중 하나임:

[0017] (i) 상기 다공성 매트릭스를 형성하거나 상기 다공성 매트릭스인 폴리머 또는 폴리머 혼합물;

[0018] (ii) 상기 다공성 매트릭스에 부착된 시약 결합 분자;

[0019] (iii) 상기 다공성 매트릭스 상에 고정된 적어도 하나의 이온화가능한 그룹 또는 복수의 이온화가능한 그룹들, 상기 이온화가능한 그룹(들)은 상기 전구체-마이크로파티클을 둘러싼 주변 조건에 따라 그의(그들의) 전하(들)를 변경할 수 있음;

[0020] (iv) 상기 다공성 매트릭스 상에 고정된 적어도 하나의 하전된 그룹, 또는 복수의 하전된 그룹;

[0021] (v) (i) - (iv) 중 임의의 조합;

[0022] - 전구체-마이크로파티클에 부착된 경우, 상기 분석물-특이적 시약을 식별하기 위해 상기 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결된 표지 구성요소.

[0023] 2. 구현예 1에 있어서, 상기 라이브러리 내에는 조립된 전구체-마이크로파티클의 적어도 2개의 개별 서브세트, 바람직하게는 조립된 전구체-마이크로파티클의 3개 이상의 개별 서브세트가 있고, 각각의 서브세트는 상기 서브세트 내 상기 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결되는 구별된 표지 구성요소를 가지고, 조립된 전구체-마이크로파티클의 상기 적어도 2개 이상의 개별 서브세트는 각각의 서브세트에 부착되거나, 그 내에 함유되거나 또는 이와 달리 연결된 각각의 표지 구성요소에 의해 구별되는 것인, 라이브러리.

[0024] 3. 구현예 1 내지 2 중 어느 하나에 있어서, 상기 표지 구성요소는 적어도 2종의 상이한 염료, 바람직하게는 적어도 2종의 형광 염료의 혼합물이고, 여기서 상기 적어도 2종의 상이한 염료, 바람직하게는 상기 적어도 2종의 형광 염료는, 각각의 정의된 비율 및/또는 상기 적어도 2개의 상이한 염료의 정의된 양으로 상기 전구체-마이크로파티클의 각 서브세트 상에 존재하여, 그 결과 전구체-마이크로파티클의 상기 상이한 서브세트가 각각의 비율 및/또는 상기 적어도 2개의 상이한 염료의 함량의 측면에서 서로 상이하고, 이에 의하여 전구체-마이크로파티클의 각각의 서브세트에 부착되거나 내부에 함유된 상기 적어도 2개의 상이한 염료의 각각의 비율 및/또는 함량에 의해 전구체-마이크로파티클의 상이한 서브세트 사이를 구별할 수 있다.

[0025] 4. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 상기 다공성 매트릭스가 다공성 폴리머 매트릭스인 것인 라이브러리

리.

- [0026] 5. 추가의 측면에서, 본 발명은 샘플에서 하나 또는 수개의 관심 분석물의 특이적 검출을 수행하기 위한 조립된 마이크로파티클의 라이브러리에 관한 것인데, 상기 특이적 검출은 적절한 화학적 또는 생화학적 반응에 의해 상기 마이크로파티클 내에서 발생하고, 상기 조립된 마이크로파티클 각각은 구현예 1 내지 4 중 어느 하나에 따른 조립된 전구체-마이크로파티클을 포함하고, 상기 전구체-마이크로파티클에 부착된, 바람직하게는 가역적으로 부착된 분석물-특이적 시약을 추가로 포함하는 것인, 조립된 마이크로파티클의 라이브러리.
- [0027] 6. 구현예 5에 있어서, 상기 전구체-마이크로파티클 각각에 부착된 상기 분석물-특이적 시약은, 다음에 의하여 상기 시약 결합 구성요소를 통해 부착된 것인, 바람직하게는 가역적으로 부착된 것인 조립된 마이크로파티클의 라이브러리:
- [0028] a) 상기 분석물-특이적 시약이 상기 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하거나 상기 다공성 폴리머 매트릭스의 일부인 폴리머 또는 폴리머 혼합물 (i)에 직접적으로 결합됨;
- [0029] b) 상기 분석물-특이적 시약이 결합체(binding entity)에 전주게이트되고, 상기 결합체가 순차적으로 상기 시약 결합 분자 (ii)에 결합됨; 여기서, 바람직하게는 시약 결합 분자 및 결합체는 가역적 방식으로 서로 상호작용, 즉 서로 결합하도록 선택됨;
- [0030] c) 상기 분석물-특이적 시약이, 상기 이온화가능한 그룹(들)이 적절한 순 전하(net charge)를 갖는 조건 하에 상기 이온화가능한 그룹(들) (iii)에 직접 결합됨;
- [0031] d) 상기 분석물-특이적 시약이 상기 폴리머 상의 상기 하전된 그룹(들) (iv)에 직접 결합됨, 여기서 상기 분석물-특이적 시약은 적어도 하나의 이온화가능한 그룹 또는 복수 개의 이온화가능한 그룹을 갖고, 상기 이온화가능한 그룹(들)은 상기 분석물-특이적 시약을 둘러싼 주변 조건에 따라 그것의(그들의) 전하(들)를 변경할 수 있음; 또는
- [0032] e) (a) - (d) 중 임의의 조합.
- [0033] 7. 구현예 1 내지 4 중 어느 하나에 따른 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리 또는 구현예 5 내지 6 중 어느 하나에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리, 여기서
- [0034] - 상기 폴리머 (i)은 다음을 포함하는 군으로부터 선택되는 하이드로겔-형성제임: ia) 폴리(메틸)(메트)아크릴레이트, 폴리아미드와 같은 합성 폴리머; ib) 실리콘계 폴리머, 예컨대 폴리디메틸실록산; ic) 다당류로부터 선택되는 자연 발생 폴리머, 예컨대, 아가로스, 키틴, 키토산, 텍스트란, 알기네이트, 카라기난, 셀룰로오스, 후코이단, 라미나란; 잔탄검, 아라비아검, 가티검, 구아검, 로커스트빈검, 트라카칸트검, 카라야검 및 이눌린으로부터 선택되는 검; 폴리펩티드, 예컨대 콜라겐, 젤라틴; 폴리-리신과 같은 폴리-아미노산; 폴리뉴클레오타이드; 및 전술한 것 중 임의의 조합인 상기 폴리머 혼합물;
- [0035] - 상기 시약 결합 분자 (ii)는 다음으로부터 선택되는 것임: 아비딘, 특히 사량체 아비딘; 스트렙타비딘; 단량체성 아비딘; 비오틴 결합 부위 내에 절화 티로신을 갖는 아비딘; 아비딘으로부터 유래되거나 이와 관련되고 아비딘의 결합 기능을 유지하는 기타 단백질; 비오틴; 데스티오비오틴(desthiobiotin); 이미노비오틴; 절단 가능한 스페이서 암을 갖는 비오틴; 셀레노비오틴; 옥시비오틴; 호모비오틴; 노르비오틴; 이미노비오틴; 디아미노비오틴; 비오틴 술폰사이드; 비오틴 술폰; 에피비오틴; 5-하이드록시비오틴; 2-티오비오틴; 아자비오틴; 카보비오틴; 비오틴의 메틸화된 유도체; 케톤 비오틴; 비오틴으로부터 유도되거나 이와 관련되고 비오틴의 결합 기능을 유지하는 기타 분자; 상기 분석물-특이적 시약의 부착이 가역적인 구현예에서, 시약 결합 분자 및 결합체는 바람직하게는 가역적 방식으로 서로 상호작용, 즉 서로 결합하도록 선택된다는 점에 유의한다;
- [0036] - 상기 적어도 하나의 이온화가능한 그룹 (iii) 또는 구현예 6 d)의 상기 이온화가능한 그룹은 다음으로부터 선택됨:
- [0037] · N-2-아세트아미도-2-아미노에탄술폰산(ACES);
- [0038] · N-2-아세트아미도-2-이미노디아세트산(ADA);
- [0039] · 아미노 메틸 프로판디올(AMP);
- [0040] · 3-1,1-디메틸-2-하이드록시에틸아미노-2-하이드록시 프로판술폰산(AMPSO);
- [0041] · N,N-비스2-하이드록시에틸-2-아미노에탄술폰산(BES);

- [0042] · N,N-비스-2-하이드록시에틸글리신(BICINE);
- [0043] · 비스-2-하이드록시에틸이미노트리스하이드록시메틸메탄(비스-트리스);
- [0044] · 1,3-비스트리스하이드록시메틸메틸아미노프로판(비스-트리스 프로판);
- [0045] · 4-사이클로헥실아미노-1-부탄 술폰산(CABS);
- [0046] · 3-사이클로헥실아미노-1-프로판 술폰산(CAPS);
- [0047] · 3-사이클로헥실아미노-2-하이드록시-1-프로판 술폰산(CAPSO);
- [0048] · 2-N-사이클로헥실아미노에탄술폰산(CHES);
- [0049] · 3-N,N-비스-2-하이드록시에틸아미노-2-하이드록시프로판술폰산(DIPSO);
- [0050] · N-2-하이드록시에틸피페라진-N-3-프로판술폰산(EPPS);
- [0051] · N-2-하이드록시에틸피파라진-N-4-부탄술폰산(HEPBS);
- [0052] · N-2-하이드록시에틸피페라진-N-2-에탄술폰산(HEPES);
- [0053] · N-2-하이드록시에틸피페라진-N-2-프로판술폰산(HEPPSO);
- [0054] · 2-N-모르폴리노에탄술폰산(MES);
- [0055] · 4-N-모르폴리노부탄술폰산(MOBS);
- [0056] · 3-N-모르폴리노프로판술폰산(MOPS);
- [0057] · 3-N-모르폴리노-2-하이드록시프로판술폰산(MOPSO);
- [0058] · 피페라진-N-N-비스-2-에탄술폰산(PIPES);
- [0059] · 피페라진-N-N-비스-2-하이드록시프로판술폰산(POPSO);
- [0060] · N-트리스하이드록시메틸-메틸-4-아미노부탄술폰산(TABS);
- [0061] · N-트리스하이드록시메틸-메틸-3-아미노프로판술폰산(TAPS);
- [0062] · 3-N-트리스하이드록시메틸-메틸아미노-2-하이드록시프로판술폰산(TAPSO);
- [0063] · N-트리스하이드록시메틸-메틸-2-아미노에탄술폰산(TES);
- [0064] · N-트리스하이드록시메틸메틸글리신(TRICINE);
- [0065] · 트리스하이드록시메틸아미노메탄(트리스);
- [0066] · 폴리하이드록실화 아민;
- [0067] · 이미다졸 및 이의 유도체(즉, 이미다졸), 특히 히드록실기를 함유하는 유도체;
- [0068] · 트리에탄올아민 이량체 및 폴리머; 그리고
- [0069] · 디/트리/올리고/폴리 아미노산, 예를 들어 Ala-Ala; Gly-Gly; Ser-Ser; Gly-Gly-Gly; 또는 Ser-Gly, 올리고-His, 폴리-His, 올리고-Lys, 폴리-Lys.
- [0070] 8. 구현예 1-4, 7 중 어느 하나에 따른 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리 또는 구현예 5-7 중 어느 하나에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리,
- [0071] 여기서 상기 다공성 폴리머 매트릭스, 또는 상기 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하거나 그 일부인 상기 폴리머 또는 폴리머 혼합물은 가교되지 않은 폴리머 또는 폴리머 혼합물로 구성되고, 여기서 바람직하게는, 상기 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하거나 그 일부인 상기 폴리머 또는 폴리머 혼합물은 아가로스 또는 아가로스 및 젤라틴의 조합으로 구성되며, 여기서 더욱 바람직하게는 상기 아가로스 및 젤라틴의 조합에 있어서 상기 아가로스가 0.1%(w/v) 내지 4%(w/v)의 범위로 존재하고, 그리고 상기 젤라틴은 0.1%(w/v) 내지 20%(w/v), 바람직하게는 0.5%(w/v) 내지 20%(w/v) 범위로 존재함.
- [0072] 9. 구현예 5-8 중 어느 하나에 있어서, 상기 분석물-특이적 시약은 앵타머(aptamers), 스피에겔머(Spiegelmer

s)를 포함하는 핵산; 항체 또는 항체 단편; 수용체, 수용체 단편 및 친화성 단백질과 같은 분석물 또는 분석물 복합체에 특이적으로 결합할 수 있는 비-항체 단백질로부터 선택되는 것인; 여기서 바람직하게는 상기 분석물-특이적 시약은 핵산, 특히 핵산 올리고머 및 핵산 프라이머로부터 선택되는 것인, 조립된 마이크로파티클의 라이브러리.

- [0073] 10. 구현에 5-9 중 어느 하나에 있어서, 상기 마이크로파티클 각각에 대하여, b) 상기 분석물-특이적 시약이 결합체(binding entity)에 컨주게이트되고, 상기 결합체가 순차적으로 상기 시약 결합 분자(ii)에 결합되는 것에 의하여 상기 시약 결합 구성요소를 통해 상기 분석물-특이적 시약이 상기 마이크로파티클에 가역적으로 부착되는 것인, 조립된 마이크로파티클의 라이브러리, 여기서
- [0074] - 상기 결합체는 비오틴; 테스티오비오틴; 이미노비오틴; 절단 가능한 스페이서 암을 갖는 비오틴; 셀레노비오틴; 옥시비오틴; 호모비오틴; 노르비오틴; 이미노비오틴; 디아미노비오틴; 비오틴 숏폭사이드; 비오틴 숏폰; 에피비오틴; 5-하이드록시비오틴; 2-티오비오틴; 아자비오틴; 카보비오틴; 비오틴의 메틸화된 유도체; 케톤 비오틴; 비오틴으로부터 유래되거나 이와 관련되고 비오틴의 결합 기능을 유지하는 기타 분자로부터 독립적으로 선택되고; 그리고 상기 시약 결합 분자는 아비딘 및 스트렙타비딘으로부터 독립적으로 선택되고; 또는 그 반대이고; 또는
- [0075] - 상기 결합체는 비오틴이고, 상기 시약 결합 분자는 단량체성 아비딘, 비오틴 결합 부위 내에 니트로화된 티로신을 갖는 아비딘, 및 아비딘으로부터 유래되거나 이와 관련되고 아비딘의 결합 기능을 유지하는 기타 단백질로부터 선택되고; 또는 그 반대임; 이 바람직한 구현예에서, 시약 결합 분자 및 결합체는 가역적 방식으로 서로 상호작용, 즉 서로 결합하도록 선택된다는 점에 유의한다.
- [0076] 11. 구현에 5-10 중 어느 하나 항에 있어서, 상기 라이브러리는 여러 샘플에서 단일 관심 분석물의 특이적 검출 수행을 위한 것이고, 여기서 상기 라이브러리 내에, 조립된 마이크로파티클의 적어도 2개의 개별 서브세트, 바람직하게는 조립된 마이크로파티클의 3개 이상의 개별 서브세트가 존재하는 것인, 조립된 마이크로파티클의 라이브러리,
- [0077] 여기서 각각의 서브세트는
- [0078] - 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결되는 구별된 표지 구성요소를 가지고; 그리고
- [0079] 상기 적어도 2개, 3개 또는 그 이상의 개별 서브세트는 모두
- [0080] - 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 동일한 분석물-특이적 시약을 가지고, 여기서 상기 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적임;
- [0081] 그 결과 조립된 마이크로파티클의 상기 적어도 2개 이상의 개별 서브세트는 부착된 분석물-특이적 시약의 관점에서는 동일하지만
- [0082] - 각각의 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결되는 각각의 표지 구성요소에 의해서는 상이함;
- [0083] 여기서 각각의 서브세트는 상기 각각의 표지 구성요소에 의해 명확하게 정의되고 식별될 수 있음.
- [0084] 12. 구현에 5-10 중 어느 하나에 있어서, 상기 라이브러리는 단일 샘플에서 다중 관심 분석물의 특이적 검출 수행을 위한 것이고, 여기서 상기 라이브러리 내에, 조립된 마이크로파티클의 적어도 2개의 개별 서브세트, 바람직하게는 조립된 마이크로파티클의 3개 이상의 개별 서브세트가 존재하는 것인, 다른 조립된 마이크로파티클 라이브러리,
- [0085] 여기서 각각의 서브세트는
- [0086] - 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결되는 구별된 표지 구성요소를 가지고; 그리고
- [0087] - 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 가짐; 여기서 각 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적임;
- [0088] 그 결과 조립된 마이크로파티클의 상기 적어도 2개 이상의 개별 서브세트는
- [0089] - 각각의 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결되는 각각의

표지 구성요소; 및

- [0090] - 각각의 서브세트에 부착된 각각의 분석물-특이적 시약;
- [0091] 에 의하여 구별되고,
- [0092] 여기서 각각의 서브세트는 상기 각각의 표지 구성요소 및 상기 각각의 분석물-특이적 시약에 의해 명확하게 정의되고 식별될 수 있음.
- [0093] 13. 구현예 5-10 중 어느 하나 항에 있어서, 상기 라이브러리는 여러 샘플에서 관심 있는 다중 분석물의 특정 검출을 수행하기 위한 것이며, 여기서 상기 라이브러리 내, 조립된 마이크로파티클의 상이한 개별 서브세트가 복수 개 존재하는 것인 조립된 마이크로파티클 라이브러리,
- [0094] 여기서 각각의 서브세트는
- [0095] - 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결된 구별되는 표지 구성요소를 가지고; 그리고
- [0096] 여기서, 조립된 마이크로파티클의 상기 복수 개의 별개의 서브세트 내에, 조립된 마이크로파티클의 별개의 서브세트의 상이한 클래스가 존재하고, 상기 클래스 각각은 수 개의 마이크로파티클 서브세트를 포함하고, 각각의 클래스는 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 가지고, 그리고 하나의 클래스 내의 모든 마이크로파티클 서브세트는 부착된 동일한 분석물-특이적 시약을 가지고; 각 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적임;
- [0097] 그 결과 상기 라이브러리 내, 조립된 마이크로파티클의 상기 복수 개의 상이한 별개의 서브세트는
- [0098] - 각각의 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결되는 구별된 각각의 표지 구성요소에 의하여 구별되고; 그리고
- [0099] 별개의 마이크로파티클 서브세트 각각은 마이크로파티클 서브세트의 하나의 클래스의 일부를 형성함;
- [0100] 여기서 각각의 서브세트는 상기 각각의 표지 구성요소 및 상기 각각의 분석물-특이적 시약에 의해 명확하게 정의되고 식별 가능하고; 그리고
- [0101] 그 결과 마이크로파티클 서브세트의 상기 상이한 클래스는, 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 각각의 분석물-특이적 시약에 의해 구별되고; 그리고 상기 상이한 클래스 각각은 수 개의 마이크로파티클 서브세트를 포함하고, 하나의 클래스 내의 모든 서브세트는 부착된 동일한 분석물-특이적 시약을 가짐.
- [0102] 14. 구현예 5-13 중 어느 하나에 따른 조립된 마이크로파티클 라이브러리를 제조하기 위한 키트로서, 상기 키트는 다음을 포함함:
- [0103] - 적어도 두 개의 용기, 즉 첫 번째 및 두 번째 용기, 그리고 임의로 각각 다음을 포함하는 추가 용기:
- [0104] · 구현예 1-4, 7 및 8 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 조립된 전구체-마이크로파티클의 서브세트, 여기서 각 서브세트는 상기 서브세트 내의 상기 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 또는 이와 달리 결합된 구별된 표지 구성요소를 가지며, 그 결과 조립된 전구체-마이크로파티클의 상기 두 개의 서브세트는 각각의 서브세트에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 또는 이와 달리 결합된 각각의 표지 구성요소에 의해 구별됨;
- [0105] - 다음을 포함하는 추가 용기:
- [0106] · 다음에 의하여 상기 시약 결합 구성요소를 통해 상기 전구체-마이크로파티클의 상기 서브세트에 대한 분석물-특이적 시약의 부착, 바람직하게는 가역적 부착을 가능하게 하는 컨디셔닝 용액
- [0107] a) 상기 분석물-특이적 시약이 상기 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하거나 상기 다공성 폴리머 매트릭스의 일부인 폴리머 또는 폴리머 혼합물 (i)에 직접적으로 결합됨;
- [0108] b) 상기 분석물-특이적 시약이 결합체(binding entity)에 컨쥬게이트되고, 상기 결합체가 순차적으로 상기 시약 결합 분자 (ii)에 결합됨;
- [0109] c) 상기 분석물-특이적 시약이, 상기 이온화가능한 그룹(들)이 적절한 순 전하(net charge)를 갖는 조건 하에 상기 이온화가능한 그룹(들) (iii)에 직접 결합됨;

- [0110] d) 상기 분석물-특이적 시약이 상기 폴리머 상의 상기 하전된 그룹(들) (iv)에 직접 결합됨, 여기서 상기 분석물-특이적 시약은 적어도 하나의 이온화가능한 그룹 또는 복수 개의 이온화가능한 그룹을 갖고, 상기 이온화가능한 그룹(들)은 상기 분석물-특이적 시약을 둘러싼 주변 조건에 따라 그것의(그들의) 전하(들)를 변경할 수 있음; 또는
- [0111] e) (a) - (d) 중 임의의 조합;
- [0112] 상기 시약 결합 구성요소는 구현예 1에서 정의된 바와 같고, 상기 시약 결합 분자는 구현예 1, 6 및 7 중 어느 하나에서 정의된 바와 같고, 그리고 상기 결합체는 구현예 6-7 중 어느 하나에서 정의된 바와 같고; 상기 폴리머 또는 폴리머 혼합물은 구현예 1, 6-8 중 어느 하나에서 정의된 바와 같고; 그리고 상기 이온화가능한 그룹은 구현예 1, 6 및 7 중 어느 하나에서 정의된 바와 같고, 그리고 상기 분석물-특이적 시약은 구현예 5-6, 9 및 10 중 어느 하나 항에서 정의된 바와 같음.
- [0113] 15. 구현예 14에 있어서, 하기를 추가로 포함하는 키트:
- [0114] - 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 제거하지 않고, 마이크로파티클로부터 유리된, 즉 부착되지 않은 분석물-특이적 시약(들)을 제거하기 위한 세척 완충액을 포함하는 추가 용기.
- [0115] 16. 구현예 14 및 15 중 어느 하나에 있어서, 하기를 추가로 포함하는 키트:
- [0116] - 구성요소들을 함께 혼합하기 위한 적어도 하나의 혼합 용기, 바람직하게는 수개의 혼합 용기, 더 바람직하게는 각각 전구체-마이크로파티클의 서브세트를 함유하는 용기가 있는 만큼 많은 혼합 용기.
- [0117] 17. 추가의 측면에서 본 발명은 구현예 5-13 중 어느 하나에 따른 조립된 마이크로파티클 라이브러리를 제조하는 방법에 관한 것인데, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는 것임:
- [0118] - 하기를 임의의 순서로 제공하는 단계:
- [0119] · 구현예 1-4, 7 및 8 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리;
- [0120] · 구현예 5-6, 9 및 10 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 적어도 하나의 분석물-특이적 시약;
- [0121] - 상기 적어도 하나의 분석물-특이적 시약이 상기 조립된 전구체-마이크로파티클의 일부 또는 전부에 부착, 바람직하게는 가역적으로 부착되는 것을 허용하는 조건 하에서, 조립된 전구체-마이크로파티클의 상기 라이브러리, 또는 이의 선택된 서브세트, 및 적어도 하나의 분석물-특이적 시약을 혼합하고, 이에 의하여 구현예 5-13 중 어느 하나에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 생성하는 단계;
- [0122] - 임의로, 상기 조립된 마이크로파티클을 세척하여 부착되지 않은 분석물-특이적 시약을 그로부터 제거하는 단계.
- [0123] 18. 구현예 17에 있어서, 상기 방법은 구현예 14 내지 16 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 키트를 사용하여 수행되고, 여기서 상기 라이브러리는 상기 키트의 상기 적어도 2개의 용기의 형태로 제공되고, 각각의 용기는 다음을 포함함:
- [0124] · 구현예 1 내지 4, 7 및 8 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 조립된 전구체-마이크로파티클의 서브세트로서, 각각의 서브세트는 상기 서브세트 내의 상기 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 또는 이와 달리 연결된 구별되는 표지 구성요소를 가지어, 그 결과 조립된 전구체-마이크로파티클의 상기 적어도 2개의 서브세트는 각각의 서브세트에 부착되거나, 그 내에 포함되거나 또는 다른 방식으로 이와 연결되는 각각의 표지 구성요소에 의해 구별됨;
- [0125] 상기 조립된 전구체-마이크로파티클의 일부 또는 전부에 대한 상기 적어도 하나의 분석물-특이적 시약의 부착, 바람직하게는 가역적 부착을 허용하는 상기 조건은, 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리 또는 이의 선택된 서브세트를 구현예 14에 정의된 바와 같은 컨디셔닝 용액의 존재 하에 적어도 하나의 분석물-특이적 시약과 혼합함으로써 생성되고, 여기서 바람직하게는 상기 컨디셔닝 용액은 완충액이다.
- [0126] 19. 샘플에서 분석물을 검출하기 위한 키트로서, 다음을 포함하는 것인 키트:
- [0127] a)
- [0128] - 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 일반 검출 조성물을 함유하는 용기, 여기서 분석물의 상기 화학적 또는 생화학적 검출 반응은 핵산 증폭이고, 상기 일반 검출 조성물은 완충액,

모노-뉴클레오타이드-트리포스페이트, 적합한 핵산 폴리머라제와 같은 증폭 효소, 예컨대 태크(Taq) 폴리머라제, 및 증폭된 핵산과 같은 증폭 산물의 검출을 위한 핵산 염료, 또는

- [0129] - 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 제1 검출 조성물을 함유하는 용기, 및 검출 시약을 포함하는 제2 검출 조성물을 함유하는 추가의 용기, 여기서 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응은 면역화학 검출 반응이고, 상기 제1 검출 조성물은 면역화학 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는데, 예컨대 완충액, 및 상기 면역화학 검출 반응에서 분석물-특이적 시약(ASR)으로 사용되는 1차 항체, 항체 단편, 또는 비-항체 단백질과 동일한 분석물에 특이적이고 적절한 리포터 효소에 결합된 2차 항체 또는 2차 항체 단편을 포함함; 그리고 상기 제2 검출 조성물은 검출 시약으로서, 상기 리포터 효소에 의해 반응된 기질이 검출가능하게 되는, 바람직하게는 광학적으로 검출가능하게 되는, 더 바람직하게는 형광에 의해 검출가능하게 되는 상기 리포터 효소에 대한 적합한 기질을 포함함, 또는
- [0130] - 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 함유하는 제1 검출 조성물을 포함하는 용기, 및 검출 시약을 함유하는 제2 검출 조성물을 포함하는 추가의 용기로서, 여기서 화학적 또는 생화학적 반응은 면역화학 검출 반응이고, 상기 제1 검출 조성물은 면역화학 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는데, 예컨대 완충액, 및 상기 면역화학 검출 반응에서 분석물-특이적 시약(ASR)으로 사용되는 1차 항체와 동일한 분석물에 대해 특이적이고 적합한 올리고뉴클레오타이드 태그(tag)에 결합된 2차 항체 또는 2차 항체 단편을 포함함; 그리고 상기 제2 검출 조성물은 검출 시약(들)으로서 완충액, 모노-뉴클레오타이드-트리포스페이트, 적합한 핵산 폴리머라제와 같은 증폭 효소, 예컨대 태크(Taq) 폴리머라제, 및 증폭된 핵산과 같은 증폭 산물의 검출을 위한 핵산 염료, 및 2차 항체에 부착된 올리고뉴클레오타이드 태그를 증폭하기에 적합한 프라이머를 포함함;
- [0131] 그리고
- [0132] b)
- [0133] - 오일과 같은 비-수상(non-aqueous phase), 예컨대 유화제로 임의로 보충된 플루오로카본 오일을 함유하는 용기;
- [0134] 그리고
- [0135] c)
- [0136] - 구성요소들을 혼합하기 위한 혼합 용기.
- [0137] 20. 구현예 19에 있어서, 다음을 추가로 포함하는 키트:
- [0138] d)
- [0139] - 검출 반응을 수행하기 위한 용기.
- [0140] 21. 구현예 19-20 중 어느 하나에 있어서, 다음을 추가로 포함하는 키트:
- [0141] e)
- [0142] - 구현예 14-16 중 어느 하나에 따른 키트, 또는
- [0143] - 구현예 5-13 중 어느 하나에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리.
- [0144] 22. 추가의 측면에서, 본 발명은 또한 수성 샘플 내에서 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법에 관한 것인데, 상기 방법은 다음 단계를 포함하는 것이다:
- [0145] - 다음을 임의의 순서로 제공하는 단계:
- [0146] · 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 수성 샘플;
- [0147] · 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 일반 검출 조성물;
- [0148] · 구현예 5-13 중 어느 하나에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리, 여기서 상기 마이크로파티클에 부착된 상기 분석물-특이적 시약(들)은 상기 관심 분석물에 특이적으로 결합하거나 또는 이와 반응할 수 있도록 선택됨;
- [0149] - 임의로, 상기 수성 샘플과 상기 일반 검출 조성물을 혼합하는 단계;
- [0150] - 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하는 단계, 이에 의하여 상기 마이크

로파티클의 라이브러리가 상기 마이크로파티클의 공극 부피 내에 수성 샘플을 흡수하고, 그리고 임의로 상기 샘플 내에 관심 분석물이 존재하는 경우에는 상기 관심 분석물에 결합하는 것이 허용됨;

[0151] - 임의로, 상기 마이크로파티클을 세척하는 단계;

[0152] - 상기 수성 샘플이 상기 일반 검출 조성물과 사전에 혼합되지 않은 경우에는, 상기 일반 검출 조성물을 마이크로파티클에 첨가하는 단계;

[0153] - 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 비-수상으로 전달하고 개별 조립된 마이크로파티클(들)을 둘러싸는 임의의 수상을 제거하는 단계, 이에 의하여 상기 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피(들)로 제한됨;

[0154] - 임의로, 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 방출하는 단계;

[0155] - 상기 관심 분석물의 검출 반응을 수행하는 단계;

[0156] - 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 단계.

[0157] 23. 구현예 22에 있어서, 상기 관심 분석물이 핵산인 것인 방법, 여기서

[0158] - 상기 분석물-특이적 시약은 핵산 또는 핵산 쌍이며, 혼성화 조건 하에서 상기 관심 분석물에 혼성화할 수 있도록 상기 관심 분석물에 충분히 상보적이고, 여기서, 바람직하게는 상기 분석물-특이적 시약은 상기 관심 분석물의 증폭을 위한 적절한 프라이머 또는 프라이머 쌍이고;

[0159] - 상기 일반 검출 조성물은 프라이머를 제외하고 상기 관심 핵산 분석물의 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하고, 여기서 특히 상기 일반 검출 조성물은 완충액, 모노-뉴클레오타이드-트리포스페이트, 적합한 핵산 폴리머라제와 같은 증폭 효소, 예컨대 태크(Taq) 폴리머라제, 및 증폭된 핵산과 같은 증폭 산물의 검출을 위한 핵산 염료를 포함하고;

[0160] - 상기 전달하는 단계는 상기 조립된 마이크로파티클을 비-수상으로 전달시키고 현탁시키고, 선택적으로 상기 비-수상으로 반복적으로 세척하는 단계이고, 상기 단계는 보다 선택적으로는 임의의 마이크로파티클의 외부에 남아있는 수성상이 없거나 실질적으로 수성상이 없는 마이크로파티클의 단분산 현탁액의 형성을 보장하기 위해 여과 또는 기계적 교반을 또한 수반하는 것이고;

[0161] - 상기 임의로, 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 방출하는 단계는, 일시적으로 온도를 증가시키거나, pH를 변경하거나, 또는 염 조건을 변경하는 단계, 바람직하게는 온도를 증가시키는 단계, 더 바람직하게는 온도를 주위(ambient) 온도로부터 >90℃의 온도까지 증가시키는 단계이고;

[0162] - 상기 검출 반응을 수행하는 단계는 상기 수성 샘플 내에 분석물이 존재하는 경우라면 상기 분석물의 증폭 반응을 수행하는 단계이고; 그리고

[0163] - 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 단계는 상기 증폭된 분석물의 검출 및/또는 정량화 단계임.

[0164] 24. 추가의 측면에서, 본 발명은 또한 수성 샘플 내에서 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법에 관한 것인데, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:

[0165] - 다음을 임의의 순서로 제공하는 단계:

[0166] · 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 수성 샘플;

[0167] · 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위해 필요한 시약을 포함하는 제1 검출 조성물;

[0168] · 검출 시약을 포함하는 제2 검출 조성물;

[0169] · 구현예 5-13 중 어느 하나에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리, 여기서 상기 마이크로파티클에 부착된 상기 분석물-특이적 시약(들)은 상기 관심 분석물에 특이적으로 결합하거나 또는 이와 반응할 수 있도록 선택되는 것임;

[0170] - 임의로, 상기 수성 샘플과 상기 제1 검출 조성물을 혼합하는 단계;

[0171] - 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하고, 그리고 상기 수성 샘플이 상기 제1 검출 조성물과 미리 혼합되지 않은 경우에는, 상기 제1 검출 조성물과도 배양하는 단계, 이에 의하여 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 수성 샘플 및 상기 제1 검출 조성물을 상기 마이크로파티클의 공극 부피 내에

흡수하고, 그리고 임의로 상기 샘플 내에 관심 분석물이 존재하는 경우에는 상기 관심 분석물에 결합하는 것이 허용됨;

- [0172] - 임의로, 흡수되지 않거나 반응하지 않은 임의의 제1 검출 조성물을 제거하기 위해 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 세척하는 단계;
- [0173] - 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양함으로써, 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 상기 제2 검출 조성물을 흡수하도록 하는 단계;
- [0174] - 임의로, 흡수되지 않거나 반응하지 않은 임의의 제2 검출 조성물을 제거하기 위해 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 추가로 세척하는 단계;
- [0175] - 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 비-수상으로 전달하고 개별 조립된 마이크로파티클(들)을 둘러싸는 임의의 수상을 제거하는 단계, 이에 의하여 상기 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피(들)로 제한됨; 여기서, 바람직하게는, 상기 비-수상으로 전달하는 단계는 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리가 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양된 직후에 수행됨;
- [0176] - 임의로, 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 방출하는 단계;
- [0177] - 상기 검출 시약을 검출 및/또는 정량화함으로써 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량화하는 단계.
- [0178] 25. 구현에 24에 있어서, 상기 관심 분석물이 단백질 또는 기타 비핵산 분자인 것인 방법, 여기서
- [0179] - 상기 분석물-특이적 시약은 상기 단백질 분석물 또는 기타 비핵산 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 1차 항체, 항체 단편, 또는 비-항체 단백질임;
- [0180] - 상기 제1 검출 조성물은 면역화학 검출 반응을 수행하기 위해 필요한 시약을 포함하는데, 예컨대 완충액, 및 상기 분석물에 특이적이고 적합한 리포터 효소에 결합된 2차 항체 또는 2차 항체 단편을 포함함;
- [0181] - 상기 제2 검출 조성물은 검출 시약으로서, 상기 리포터 효소에 의해 반응된 기질이 검출가능하게 되는, 바람직하게는 광학적으로 검출가능하게 되는, 더 바람직하게는 형광에 의해 검출가능하게 되는 상기 적합한 리포터 효소에 대한 적합한 기질을 포함함;
- [0182] - 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와, 그리고 상기 제1 검출 조성물과 함께 배양하는 단계는, 분석물이 상기 수성 샘플 내에 존재하는 경우 상기 1차 항체, 1차 항체 단편, 또는 비-항체 단백질에 상기 분석물의 결합을 수반하는 면역화학 반응을 수행하는 단계이고, 이에 의하여 분석물과 상기 1차 항체, 1차 항체 단편, 또는 비-항체 단백질과의 복합체가 형성됨; 상기 면역화학 반응은 상기 복합체에 대한 상기 2차 항체의 결합을 추가로 수반하고, 이에 의하여 1차 항체, 항체 단편 또는 비-항체 단백질, 분석물, 및 2차 항체 사이에 샌드위치를 형성함;
- [0183] - 상기 첫번째 임의로 상기 라이브러리를 세척하는 단계는, 상기 라이브러리로부터 임의의 비-결합된 2차 항체를 제거하는 단계임;
- [0184] - 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 상기 단계는, 상기 기질이 상기 리포터 효소에 의해 반응되도록 하는 단계임;
- [0185] - 상기 임의로 라이브러리를 추가로 세척하는 단계는 상기 라이브러리로부터 미-반응 기질을 제거하는 단계임;
- [0186] - 상기 전달하는 단계는 상기 조립된 마이크로파티클을 비-수상으로 이동시키고 현탁시키고, 그리고 임의로 상기 비-수상으로 반복적으로 세척하는 단계이고, 보다 선택적으로는 임의의 마이크로파티클의 외부에 남아있는 수성상이 없거나 실질적으로 수성상이 없는 마이크로파티클의 단분산 현탁액의 형성을 보장하기 위해 여과 또는 기계적 교반을 또한 수반하는 것임;
- [0187] - 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 방출하는 상기 임의의 단계는, 일시적으로 온도를 증가시키거나, pH를 변경하거나, 염 조건을 변경하는 단계, 바람직하게는 온도를 증가시키는 단계, 더 바람직하게는 온도를 주위(ambient) 온도로부터 >90℃의 온도까지 증가시키는 단계임;
- [0188] - 상기 관심 분석물의 검출 및/또는 정량화 단계는 상기 반응된 기질을 검출 및/또는 정량화하는 단계임.
- [0189] 26. 추가의 측면에서, 본 발명은 또한 수성 샘플 내에서 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법에 관한 것

인데, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:

- [0190] - 임의의 순서로 다음을 제공하는 단계:
- [0191] · 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 수성 샘플;
- [0192] · 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위해 필요한 시약을 포함하는 제1 검출 조성물;
- [0193] · 검출 시약을 포함하는 제2 검출 조성물;
- [0194] · 구현예 5-13 중 어느 하나에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리, 여기서 상기 마이크로파티클에 부착된 상기 분석물-특이적 시약(들)은 상기 관심 분석물에 특이적으로 결합하거나 이와 반응할 수 있도록 선택되는 것임;
- [0195] - 임의로, 상기 수성 샘플과 상기 제1 검출 조성물을 혼합하는 단계;
- [0196] - 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하고, 그리고 상기 수성 샘플이 상기 제1 검출 조성물과 미리 혼합되지 않은 경우에는, 상기 제1 검출 조성물과도 함께 배양하는 단계, 이에 의하여 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 수성 샘플 및 상기 제1 검출 조성물을 상기 마이크로파티클의 공극 부피 내에 흡수하고, 그리고 임의로 상기 샘플 내에 관심 분석물이 존재하는 경우에는 상기 관심 분석물에 결합하는 것이 허용됨;
- [0197] - 임의로, 흡수되지 않거나 반응하지 않은 임의의 제1 검출 조성물을 제거하기 위해 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 세척하는 단계;
- [0198] - 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양함으로써, 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 상기 제2 검출 조성물을 흡수하도록 하는 단계;
- [0199] - 임의로, 흡수되지 않거나 반응하지 않은 임의의 제2 검출 조성물을 제거하기 위해 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 추가로 세척하는 단계;
- [0200] - 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 비-수상으로 전달하고 개별 조립된 마이크로파티클(들)을 둘러싸는 임의의 수상을 제거하는 단계, 이에 의하여 상기 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피(들)로 제한됨;
- [0201] - 임의로, 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 방출하는 단계;
- [0202] - 상기 관심 분석물의 검출 반응을 수행하는 단계; 그리고
- [0203] - 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량화하는 단계.
- [0204] 27. 구현예 26에 있어서, 상기 관심 분석물이 단백질 또는 기타 비-핵산 분자인 것인 방법, 여기서
- [0205] - 상기 분석물-특이적 시약은 상기 단백질 분석물 또는 기타 비-핵산 분석물에 특이적으로 결합할 수 있는 1차 항체, 항체 단편, 또는 비-항체 단백질임;
- [0206] - 상기 제1 검출 조성물은 면역화학 검출 반응을 수행하기 위해 필요한 시약을 포함하는데, 예컨대 완충액, 및 상기 1차 항체와 동일한 분석물에 특이적이고 적합한 올리고뉴클레오타이드 태그에 결합된 2차 항체 또는 2차 항체 단편을 포함함;
- [0207] - 상기 제2 검출 조성물은 검출 시약(들)로서, 완충액, 모노-뉴클레오타이드-트리포스페이트, 적합한 핵산 폴리머라제와 같은 증폭 효소, 예컨대 Taq 폴리머라제, 증폭된 핵산과 같은 증폭 산물의 검출을 위한 핵산 염료, 및 2차 항체에 부착된 올리고뉴클레오타이드 태그를 증폭하기에 적합한 프라이머를 포함함;
- [0208] - 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리 및 상기 제1 검출 조성물과 함께 배양하는 단계는, 상기 수성 샘플 내에 분석물이 존재하는 경우 상기 분석물이 상기 1차 항체, 1차 항체 단편 또는 비-항체 단백질에 결합하는 것을 수반하는 면역화학 반응을 수행하는 단계이고, 이에 의하여 분석물과 상기 1차 항체, 1차 항체 단편, 또는 비-항체 단백질과의 복합체가 형성됨; 상기 면역화학 반응은 상기 복합체에 대한 상기 2차 항체의 결합을 추가로 수반하고, 이에 의하여 1차 항체, 항체 단편 또는 비-항체 단백질, 분석물, 및 2차 항체 사이에 샌드위치를 형성함;
- [0209] - 상기 첫번째 임의로 라이브러리를 세척하는 상기 단계는 상기 라이브러리로부터 결합되지 않은 2차 항체를 제

거하는 단계임;

- [0210] - 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 단계는 상기 제2 검출 조성물 내의 상기 프라이머가 2차 항체에 부착된 올리고뉴클레오타이드 태그에 혼성화되도록 하는 단계임;
- [0211] - 상기 임의로 라이브러리를 추가로 세척하는 단계는 상기 라이브러리로부터 혼성화되지 않은 임의의 프라이머를 제거하는 단계임;
- [0212] - 상기 전달하는 단계는 상기 조립된 마이크로파티클을 비-수상으로 전달하고 현탁시키고, 그리고 선택적으로 상기 비-수상으로 반복적으로 세척하는 단계이며, 보다 선택적으로는 임의의 마이크로파티클의 외부에 남아있는 수성상이 없거나 실질적으로 수성상이 없는 마이크로파티클의 단분산 현탁액의 형성을 보장하기 위해 여과 또는 기계적 교반을 또한 수반하는 것임;
- [0213] - 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 방출하는 상기 임의의 단계는, 일시적으로 온도를 증가시키거나, pH를 변경하거나, 또는 염 조건을 변경하는 단계, 바람직하게는 온도를 증가시키는 단계, 더 바람직하게는 온도를 주위(ambient) 온도로부터 >90℃의 온도까지 증가시키는 단계임;
- [0214] - 상기 검출 반응을 수행하는 단계는 상기 올리고뉴클레오타이드 태그의 증폭 반응을 수행하는 단계임; 그리고
- [0215] 상기 관심 분석물(들)을 검출 및/또는 정량하는 상기 단계는 상기 증폭된 올리고뉴클레오타이드 태그(들)을 검출 및/또는 정량하는 단계임.
- [0216] 28. 구현예 22-27 중 어느 하나에 있어서, 외부 트리거를 적용함으로써 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 방출하는 상기 단계는 상기 마이크로파티클이 노출되는 온도를 상승시킴으로써 수행되는 것인 방법.
- [0217] 29. 구현예 22-28 중 어느 하나에 있어서, 여기서
- [0218] - 이 방법은 예컨대 다양한 환자들로부터 유래한, 복수의 수성 샘플 내에서, 단일 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법임,
- [0219] - 상기 방법에서, 관심 분석물을 함유하는 것으로 의심되거나 알려진 복수의 상이한 수성 샘플, 예컨대 다양한 환자들로부터 유래한 샘플이 제공됨,
- [0220] - 상기 방법에서 제공되는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리는 구현예 11에 따른 라이브러리이며, 이러한 라이브러리 내에는, 제공되고 시험될 상이한 수성 샘플만큼 많은 또는 더 많은 별개의 마이크로파티클 서브세트가 제공되고, 여기서 상기 모든 별개의 서브세트(substeps)는 상기 서브세트의 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 동일한 분석물-특이적 시약을 갖고, 상기 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적임;
- [0221] - 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하는 상기 단계에서, 상기 상이한 수성 샘플 각각은 상기 라이브러리의 마이크로파티클의 별개의 서브세트와 별도로 배양됨;
- [0222] - 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 상기 라이브러리를 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 상기 단계에서, 상기 라이브러리의 마이크로파티클의 별개의 서브세트 각각은 상기 제2 검출 조성물과 별도로 배양됨;
- [0223] - 상기 라이브러리를 비-수상으로 전달하는 상기 단계는 마이크로파티클의 각 서브세트 대해 개별적으로 수행됨, 즉, 마이크로파티클의 별개의 서브세트 각각은 개별적으로 비-수상 속으로 전달되고, 개별 마이크로파티클을 둘러싼 수상은 각 서브세트에 대해 개별적으로 제거되고, 이에 의하여 각 서브세트에 대해 개별적으로 상기 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피(들)로 제한됨,
- [0224] 여기서, 상기 방법은 상기 라이브러리를 비-수상으로 전달하는 상기 단계 후에, 상기 분석물의 검출 반응을 후속적으로 수행하기 전에, 그리고 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량화하기 전에, 상기 비-수상 내에 있는 모든 별개의 서브세트의 상기 복수의 격리된 반응 공간을 함께 혼합하는 단계를 더 포함함.
- [0225] 30. 구현예 22-28 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 여기서

- [0226] - 이 방법은 단일 수성 샘플 내에서 복수의 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법임,
- [0227] - 상기 방법에서, 복수의 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 단일 수성 샘플이 제공됨,
- [0228] - 상기 방법에서 제공되는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리는 구현예 12에 따른 라이브러리이며, 이러한 라이브러리 내에는 탐지될 상이한 관심 분석물 만큼 많이 또는 더 많이 제공되는 마이크로파티클의 별개의 서브세트가 존재함, 여기서 상기 별개의 서브세트 각각은, 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 갖는 것이고; 각 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적임;
- [0229] - 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하는 단계에서, 상기 수성 샘플은 상기 라이브러리의 마이크로파티클의 상기 별개의 서브세트 모두와 함께 배양됨;
- [0230] - 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 단계에서, 상기 라이브러리의 마이크로파티클의 상기 개별 서브세트 모두가 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양됨;
- [0231] - 상기 라이브러리를 비-수상 속으로 전달하는 상기 단계는 마이크로파티클의 모든 서브세트에 대해 함께 수행됨, 즉, 마이크로파티클의 모든 서브세트는 비-수상 속으로 전달되고, 그리고 개별 마이크로파티클을 둘러싼 수상은 제거되고, 이에 의하여 상기 복수의 분석물을 검출 및/또는 정량하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피(들)로 제한됨.
- [0232] 31. 구현예 22-28 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 여기서
- [0233] - 이 방법은 복수의 수성 샘플에서 다수의 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법임,
- [0234] - 상기 방법에서, 다수의 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 복수의 상이한 수성 샘플, 예컨대 다양한 환자의 샘플이 제공됨,
- [0235] - 상기 방법에서 제공되는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리는 구현예 13에 따른 라이브러리이며, 여기서 이러한 라이브러리 내에는 조립된 마이크로파티클의 별개의 서브세트의 상이한 클래스가 있으며, 여기서 각 클래스는 수개의 마이크로파티클 서브세트를 포함하고 그리고 상기 클래스 각각은 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 갖고, 그리고 하나의 클래스 내의 마이크로파티클 서브세트 모두는 동일한 부착된 분석물-특이적 시약을 갖는 것이고; 각각의 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적임; 여기서, 상기 방법에 있어서 상기 라이브러리를 제공하는 상기 단계 내에 다음이 존재함:
- [0236] · 검출할 상이한 분석물 만큼 많거나 또는 더 많은, 제공되는 별개의 마이크로파티클 서브세트의 상이한 클래스,
- [0237] · 제공되고 시험될 수성 샘플 만큼 많거나 또는 더 많은, 각 클래스 내에 제공되는 상이한 마이크로파티클 서브세트,
- [0238] · 시험될 상이한 수성 샘플에 검출할 관심 있는 상이한 분석물의 수를 곱한 만큼 많거나 또는 더 많은, 라이브러리 내에 제공되는 상이한 마이크로파티클 서브세트,
- [0239] - 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하는 상기 단계에서, 정확히 하나의 수성 샘플이 각 클래스의 마이크로파티클의 정확히 하나의 서브세트와 함께 배양되고, 각 수성 샘플은 상기 라이브러리 내의 마이크로파티클 클래스만큼 많은 상이한 클래스로부터 유래한 상이한 마이크로파티클 서브세트와 함께 배양됨,
- [0240] - 흡수된 수성 샘플을 포함하는 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 상기 단계에서, 하나의 개별 수성 샘플이 이전에 배양된 서브세트와 함께 상이한 클래스의 마이크로파티클로부터 조합된 서브세트가 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양됨,
- [0241] - 상기 라이브러리를 비-수상 속으로 전달하는 상기 단계는 각각의 수성 샘플에 대해 개별적으로 수행됨, 즉 하나의 개별 수성 샘플이 이전에 배양된 마이크로파티클의 조합된 서브세트와 함께 비-수상 속으로 전달되고, 그리고 개별 마이크로파티클을 둘러싸고 있는 수상이 제거되고, 이에 의하여 각각의 수성 샘플에 대해 개별적으로, 상기 다수의 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피(들)로 제한됨,
- [0242] 여기서 상기 방법은 바람직하게는, 상기 라이브러리를 비-수상 속으로 전달하는 상기 단계 후에, 상기 관심 분

석물의 검출 반응을 후속적으로 수행하기 전에, 그리고 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하기 전에, 상기 비-수상의 모든 개별 샘플의 상기 복수의 격리된 반응 공간을 함께 혼합하는 단계를 추가적으로 포함함.

[0243] 32. 구현예 22-31 중 어느 하나에 따른 방법으로서, 여기서 상기 관심 분석물의 검출 및 정량화 단계에서, 상기 분석물의 정량화가 하기로부터 선택된 방법에 의해 수행되는 것인 방법:

[0244] a) 디지털 핵산 증폭, 특히 디지털 폴리머라제 연쇄 반응(PCR);

[0245] b) 실시간 정량적 핵산 증폭, 특히 실시간 폴리머라제 연쇄 반응(PCR);

[0246] c) 면역화학 검출 방법, 특히 디지털 면역분석과 같은 디지털 면역화학 검출 방법, 예컨대 디지털-효소 결합된 면역흡착 분석(ELISA);

[0247] d) 면역 폴리머라제 연쇄 반응과 같은 핵산 증폭과 결합된 면역화학 검출 방법; 특히 디지털 면역-PCR;

[0248] 여기서 관심 분석물이 핵산인 경우 a) 또는 b) 방법 중 어느 하나, 또는 a)와 b)의 조합을 사용하여 수행되고; 그리고 분석물이 단백질, 펩티드 또는 기타 비-핵산 분석물인 경우에는 방법 c) 또는 d) 중 어느 하나를 사용하여 정량을 수행함.

과제의 해결 수단

[0249] 본 발명자들은 조립된 마이크로파티클의 사용될 준비가 된(ready-to-use) 및/또는 "채울 준비가 된(ready-to-fill)" 라이브러리를 만들기 위한 출발점 역할을 하는 조립된 전구체-마이크로파티클 라이브러리를 고안했다. 조립된 마이크로파티클의 이러한 라이브러리는 사용자 요구에 따라 샘플에서 하나 또는 수개, 바람직하게는 다수의 관심 분석물의 특정 검출을 수행하도록 의도되고 구성된다. 이러한 조립된 마이크로파티클 라이브러리는 매우 다양하며 샘플에서 검출할 특정 분석물(들)을 선택하는 최종 사용자에게 의하여 맞춤형 방식으로 만들어질 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "조립된 마이크로파티클의 라이브러리"를 만들기 위한 출발점으로 작용하는 "조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리"는 각각의 조립된 전구체-마이크로파티클이 부착된 하나의 분석물-특이적 시약(본 명세서에서 때때로 "ASR"로 약칭됨), 또는 수개의 이러한 분석물-특이적 시약("ASRs")을 아직 포함하지 않다는 점에서만 그러한 "조립된 마이크로파티클의 라이브러리"와 상이하다. 그러나, 이러한 전구체-마이크로파티클은 이러한 전구체-마이크로파티클에 분석물-특이적 시약을 부착함으로써 즉시 사용가능한 마이크로파티클로 쉽게 전환될 수 있다. 전구체-마이크로파티클은 부착된 분석물-특이적 시약(들)에서만 각각의 마이크로파티클과 다르기 때문에, 각각의 조립된 마이크로파티클의 품질 및 세부사항은 이들이 유래하는 각각의 전구체-마이크로파티클에 대해 설명된 바와 같이 동일하다. 따라서, 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리에서, 라이브러리의 상기 조립된 전구체-마이크로파티클 각각은 다공성 매트릭스, 바람직하게는 다공성 폴리머 매트릭스를 포함하며, 수성 샘플을 수용하고 분석물의 특이적 검출을 위한 반응 공간을 제공하기 위한 공극 부피를 갖는다. 각각의 생성된 마이크로파티클에도 동일하게 적용된다. 이러한 마이크로파티클을 이용한 분석물의 특이적 검출은 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 의해 제공되는 전술한 반응 공간 내에서 화학적 또는 생화학적 반응에 의해 수행된다. 전형적으로, 이러한 화학적 또는 생화학적 반응은 표적(분석물) 증폭 반응 또는 신호 증폭 반응이다. 표적 증폭 반응의 전형적인 예는 PCR과 같은 핵산 증폭 반응이다. 신호 증폭 반응의 전형적인 예는 면역분석과 같은 면역화학 반응이다.

[0250] 또한, 라이브러리 내의 상기 조립된 전구체-마이크로파티클 각각(그리고 라이브러리 내의 상기 조립된 마이크로파티클 각각)은, 전구체-마이크로파티클에 대한 분석물-특이적 시약의 부착, 바람직하게는 가역적 부착을 허용하는 시약 결합 구성요소를 포함한다. 바람직한 구현예는 분석물-특이적 시약이 전구체-마이크로파티클에 가역적으로 부착된 구현예이다. 위에서 설명한 대로 이러한 시약 결합 구성요소는 다음 중 하나이다:

[0251] (i) 상기 다공성 매트릭스를 형성하거나 또는 상기 폴리머 매트릭스인 폴리머 또는 폴리머 혼합물;

[0252] (ii) 상기 다공성 매트릭스에 부착되는 시약 결합 분자;

[0253] (iii) 상기 다공성 폴리머 매트릭스 상에 고정된 적어도 하나의 이온화가능한 그룹 또는 복수의 이온화가능한 그룹, 상기 이온화가능한 그룹(들)은 상기 전구체-마이크로파티클을 둘러싼 주변 조건에 따라 그것(그들)의 전하(들)을 변경할 수 있음;

[0254] (iv) 상기 다공성 매트릭스 상에 고정된 적어도 하나의 하전된 그룹, 또는 복수의 하전된 그룹들;

[0255] (v) (i) - (iv) 중 임의의 조합;

- [0256] 더욱이, 라이브러리 내의 상기 조립된 전구체-마이크로파티클 각각은 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 다르게 결합된 표지 구성요소를 포함하고, 이는 또한 그와 같은 조립된 전구체-마이크로파티클로부터 생성되는 각각의 조립된 마이크로파티클에 동일하게 적용된다. 전구체-마이크로파티클 또는 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 이와 달리 결합된 표지 구성요소는 전구체-마이크로파티클에 부착될 때 분석물-특이적 시약을 식별("고유하게 표지" 또는 "고유하게 표지"한다는 의미에서)하는 목적으로 사용된다. 이러한 표지의 예는 문헌(Mandecki, Ardelt et al. 2006, Wilson, Cossins et al. 2006, Birtwell and Morgan 2009) 등에 나와 있다. 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 또는 이와 달리 결합되는 표지 구성요소는, 조립된 전구체-마이크로파티클의 전체 라이브러리(또는 조립된 마이크로파티클의 전체 라이브러리)에 속하는 고려사항에 관해서 특히 관련이 있다: 본 명세서에서 사용되는 "라이브러리"라는 용어는 마이크로파티클의 복수 또는 집합을 의미하며, 여기서 이러한 마이크로파티클의 복수 또는 집합 또는 라이브러리에는, 적어도 2개의 상이한 유형의 이러한 마이크로파티클이 있으며, 본 명세서에서는 때때로 "서브세트(subsets)"로도 지칭된다. 바람직한 구현예에서, 조립된 전구체-마이크로파티클(또는 마이크로파티클)의 적어도 2개의 서브세트, 바람직하게는 조립된 전구체-마이크로파티클(또는 마이크로파티클)의 3개 이상의 서브세트가 있고, 각각의 서브세트는 상기 서브세트 내의 상기 전구체-마이크로파티클(또는 마이크로파티클)에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 또는 이와 달리 연결된 구별되는 표지 구성요소를 가지어, 그 결과 조립된 전구체-마이크로파티클(또는 마이크로파티클)의 상기 적어도 2개 또는 그 이상의 서브세트가, 각각의 서브세트에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 연결된 각각의 표지 구성요소에 의하여 구별된다. 상이한 서브세트의 이러한 라이브러리에서, 각각의 서브세트는 전형적으로 그리고 바람직하게는 서로로부터 분리되어, 예컨대 다른 용기 내에 저장된다. 이것은 본 명세서에 사용된 용어 "별개의 서브세트(separate subset)"가 다른 서브세트로부터 물리적으로 분리된 전구체-마이크로파티클 또는 마이크로파티클의 집합 또는 서브세트를 지칭함을 의미한다. 그러한 물리적 분리는 그러한 서브세트를 둘러싸는 장벽에 의해 달성될 수 있다. 간단한 구현예에서, 이러한 별개의 서브세트는 자체 컨테이너 또는 구획 내에 위치할 수 있다. 일반적으로 복수의 서브세트는 조합되어 상이한 분석물/표적을 타겟팅하는 라이브러리를 형성할 수 있으며(상이한 분석물을 표적으로 하는 상이한 서브세트를 가짐), 이 라이브러리는 라이브러리 내의 복수의 서브세트를 나타내는 마이크로파티클들에 걸쳐, 샘플 내에서 검출될/정량될 분석물/표적의 분포로 이끄는 분석을 수행하는 데 사용될 수 있다.
- [0257] 바람직한 구현예에서, 전구체-마이크로파티클(및 그로부터 생성되는 마이크로파티클)의 각각의 서브세트를 식별하는 표지 구성요소는 적어도 2종의 상이한 염료, 바람직하게는 적어도 2종의 형광 염료의 혼합물이며, 이는 상기 적어도 2개의 상이한 염료의 각각의 정의된 비율 및/또는 정의된 함량으로 상기 전구체-마이크로파티클(및 그로부터 생성된 극마이크로파티클)의 각각의 서브세트 상에 존재, 바람직하게는 부착된다. 결과적으로, 이러한 구현예에서, 전구체-마이크로파티클의 상이한 서브세트는 적어도 2개의 상이한 염료의 각각의 비율 및/또는 함량의 측면에서 서로 상이하어, 전구체-마이크로파티클의 각각의 서브세트에 부착된 적어도 상이한 염료의 각각의 비율 및/또는 함량에 의하여 전구체-마이크로파티클의 상이한 서브세트 사이의 구별을 허용한다.
- [0258] 다른 구현예에서, 표지 구성요소는 전구체-마이크로파티클 내에 포함될 수 있다. 다시, 그러한 표지 구성요소는 전구체-마이크로파티클 내에 함유된 적어도 2개의 상이한 염료의 혼합물일 수 있고, 전구체-마이크로파티클의 각각의 상이한 서브세트는 상기 적어도 2개의 상이한 염료의 각각의 비율 및/또는 함량의 측면에서 서로 상이하어, 그 결과 전구체-마이크로파티클의 상이한 서브세트가 마이크로파티클 내에 함유된 적어도 2개의 상이한 염료의 각각의 비율 및/또는 함량의 측면에서 서로 상이하어, 이에 의하여 전구체-마이크로파티클의 각각의 서브세트 내에 함유된 상기 적어도 2개의 상이한 염료의 각각의 비율 및/또는 함량에 의하여 전구체-마이크로파티클의 상이한 서브세트 사이의 구별을 허용한다.
- [0259] 서브세트 특이적 표지(또는 인코딩)은 이전에 확립된 대로 달성될 수 있다(Fulton, McDade et al. 1997).
- [0260] 또 다른 구현예에서, 각각의 전구체-마이크로파티클(및 상응하는 마이크로파티클)의 표지는 또한 각각의 마이크로파티클의 상이한 형상을 통해 달성될 수 있다. 이것은 표지 구성요소가 전구체-마이크로파티클에 부착되거나 그 안에 포함되지 않지만, 전구체-마이크로파티클과 "다른 방식으로 연결(otherwise associated)"되어 있는 전구체-마이크로파티클(및 상응하는 마이크로파티클)의 구현예에 대한 예일 것이다. 이러한 구현예는 적어도 2개의 상이한 표지 구성요소, 즉 이 경우에 그렇게 표지된 각각의 전구체-마이크로파티클이 구별될 수 있는 전구체-마이크로파티클의 형태의 부수적인 존재를 전제로 한다. 이 예에서 상이한 형태는 상이한 외부 형상, 상이한 내부 구조, 다공성 매트릭스 내의 상이한 내부 체적 등을 의미할 수 있다.
- [0261] 바람직하게는, 상기 전구체-마이크로파티클(및 상기 마이크로파티클)의 다공성 매트릭스는 다공성 폴리머 매트릭스이며, 이는 각각의 전구체-마이크로파티클(및 그로부터 생성되는 상기 마이크로파티클)이 폴리머 또는 폴리

머 혼합물로 제조되거나 이를 포함함을 의미한다.

- [0262] 위에서 약술한 바와 같이, 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리는 분석물-특이적 시약을 부착함으로써, 바람직하게는 이러한 시약을 시약 결합 구성요소를 통해 상기 전구체-마이크로파티클에 가역적으로 부착함으로써 조립된 마이크로파티클의 라이브러리로 전환될 수 있다. 마이크로파티클의 상이한 서브세트는 동일한 부착된 분석물-특이적 시약을 가지거나 또는 그들은 상이한 부착된 분석물-특이적 시약을 가질 수 있다.
- [0263] 본 명세서에 사용된 용어 "분석물-특이적 시약(analyte-specific reagent)"("ASR")은 관심 분석물을 특이적으로 표적화하거나 인식할 수 있는 시약을 의미한다. 그러한 특이적 표적화 또는 그러한 특이적 인식은 그러한 관심 분석물에 특이적으로 결합하거나 이와 특이적으로 반응하는 그러한 분석물-특이적 시약의 능력에서 그 자체로 나타난다. 한 구현예에서, 분석물-특이적 시약은 압타머, 스피에겔머, 핵산 올리고머 및 핵산 프라이머를 포함하는 핵산; 항체 또는 항체 단편; 분석물 또는 분석물 복합체에 특이적으로 결합할 수 있는 비-항체 단백질, 및 친화성 단백질로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, 분석물-특이적 시약은 핵산, 특히 핵산 올리고머 및 핵산 프라이머로부터 선택된다. 핵산 프라이머는 핵산 증폭을 수행하는 데 특히 적합하다. 한 구현예에서, 분석물-특이적 시약이 핵산 프라이머인 경우, 이러한 분석물-특이적 시약은 실제로, 후속적으로 증폭(및 검출)될 관심 분석물 내의 영역에 인접하는 한 쌍의 프라이머이다. 선택적으로, 이러한 구현예(한 쌍의 프라이머가 분석물-특이적 시약인 경우)에서, 이러한 분석물-특이적 시약은 프라이머(들)와 함께 제공되고 각각의 프라이머(들) 및 생성된 증폭 산물(들)의 검출을 가능하게 하는 검출 가능한 프로브를 추가로 포함할 수 있다.
- [0264] 본 명세서에 사용된 용어 "관심 분석물(analyte of interest)"은 샘플 내에서 검출 및/또는 정량이 바람직할 수 있는 임의의 분자 엔티티를 지칭하는 것을 의미한다. 때때로 이러한 용어 "분석물"은 본 명세서에서 용어 "표적(target)"과 동의적으로 사용된다. 일 구현예에서, 관심 분석물은 핵산일 수 있으며; 또 다른 구현예에서, 관심 분석물은 단백질, 펩티드, 또는 기타 비-핵산 엔티티일 수 있다.
- [0265] 본 발명에 따른 라이브러리 및 각각의 마이크로파티클 또는 전구체 마이크로파티클은 건조, 예컨대 동결-건조될 수 있다. 본 발명의 구현예들에 따르면, 겔 형성제는 조립된 전구체 마이크로파티클(및 그로부터 생성되는 각각의 마이크로파티클)을 형성하기 위해 사용될 수 있으며, 이러한 겔-형성제는 위에서 추가로 정의된 바와 같다. 일 구현예에서, 이러한 겔 형성제는 후속적으로 건조, 바람직하게는 동결-건조될 수 있는 전구체-마이크로파티클(및 이로부터 생성되는 각각의 마이크로파티클)을 형성하는 데 사용된다. 건조 후 입자는 분말로 저장될 수 있다. 겔-형성제 수반하는 일부 구현예에서, 이러한 겔-형성제는 추가로 졸-상태로의 전이를 겪을 수 있는 겔을 형성한다. 특히 이러한 전환은 온도, pH 또는 염 조건의 변화와 같은 외부 트리거의 적용 시 발생할 수 있다.
- [0266] 본 발명자들은 놀랍게도 본 발명에 따라 조립된 마이크로파티클 또는 이의 전구체의 전체 라이브러리를 제공함으로써, 예를 들어 샘플 내 분석물의 디지털 검출을 수행하기 위한, 검출 반응을 위해 매우 다양한 방식으로 사용될 수 있는 정의된 반응 공간으로 작용할 수 있고, 그리고 현장 진료(point-of care) 환경에서 사용될 수 있는 소형화되고 다양한 도구를 제공할 수 있다는 것을 발견했다. 마이크로파티클은 제한된 반응 공간을 제공하거나 또는 그러한 역할을 수행하기 때문에, 본 명세서에서는 때때로 "나노반응기(nanoreactors)"로도 지칭된다. 본 발명의 구현예에 따른 조립된 마이크로파티클(또는 "나노반응기")는 부착될 적절한 분석물-특이적 시약을 선택함으로써 맞춤 제작될 수 있다. 이러한 맞춤-제작된 생산은 분석물-특이적 시약의 부착이 가역적인 바람직한 구현예에서 특히 촉진된다. 라이브러리 내의 다른 마이크로파티클의 상이한 서브세트와 관련하여, 부착된 동일하거나 상이한 분석물-특이적 시약이 존재할 수 있다.
- [0267] 본 명세서에 사용된 용어 "동일한 분석물-특이적 시약" 및 "상이한 분석물-특이적 시약"은, 2개의 분석물-특이적 시약이 동일한 경우, 그들이 동일한 관심 분석물을 표적화 및/또는 인식하는 반면에, 그들이 상이하면, 그들이 상이한 관심 분석물을 표적화 및/또는 인식한다는 것을 의미한다. 따라서, 조립된 마이크로파티클의 라이브러리 내, 여기에서 마이크로파티클의 상이한 서브세트는 부착되거나 또는 내부에 포함되는 각각의 분석물-특이적 시약에 의하여 서로 상이한데, 이는 이들의 상이한 서브세트가 상이한 관심 분석물을 표적화 및/또는 인식할 것임을 의미한다. 반면에 상이한 서브세트가 동일한 부착되거나 또는 내부에 포함되는 분석물-특이적 시약을 갖는다면, 이는 그들이 동일한 관심 분석물을 인식 및/또는 표적화한다는 것을 의미한다.
- [0268] 본 명세서에 사용된 용어 "마이크로파티클"은 평균 치수가 마이크로미터 범위 내인 입자를 의미한다. 일 구현예에서, 본 발명에 따른 마이크로파티클은 대략 1 μm 내지 200 μm , 바람직하게는 5 μm 내지 150 μm , 더 바람직하게는 10 μm 내지 100 μm 의 평균 크기 또는 평균 치수 또는 평균 직경을 갖는다. 일 구현예에서, 본 발명에 따른 마이크로파티클은 구형(spherical) 또는 타원형(oval) 또는 타원체형(ellipsoidal), 바람직하게는 구형이고, 상기 언급된 치수는 이러한 구형, 타원형 또는 타원체형 마이크로파티클의 평균 직경을 지칭한다. 일 구현예에서,

마이크로파티클은 (구형) 액적(droplet)의 형상을 갖는다. 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 마이크로파티클은 구형체(spherical body) 또는 준구형체(quasi-spherical body)이고, 즉 구의 형태를 가지고(또는 거의 그것에 접근), 이러한 구는 전술한 치수의 평균 직경을 가진다. 전형적으로, 본 발명에 따른 마이크로파티클은 다공성이고 수성 샘플을 수용하고 분석물의 특이적 검출을 위한 반응 공간을 제공하기 위한 공극 부피를 갖는 다공성 폴리머 매트릭스를 갖는다.

[0269] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 전구체-마이크로파티클은 분석물-특이적 시약을 부착함으로써 마이크로파티클로 전환된다. 따라서, 조립된 전구체-마이크로파티클 라이브러리는 조립된 마이크로파티클 라이브러리를 만드는 목적으로 사용된다. 각각의 그리고 생성된 마이크로파티클은 얼마나 많은 상이한 분석물-특이적 시약이 마이크로파티클에 부착되어 있는지에 따라(예컨대 사용자에 의해 정의된 바에 따라), 샘플에서 하나 또는 여러 개의 관심 분석물의 특정 검출 및/또는 정량을 수행하기 위한 목적을 제공한다. 단 하나의 분석물-특이적 시약(또는 단일 분석물을 검출하는 데 필요한 여러 구성요소를 포함하는 단 하나의 분석물-특이적 "시약 세트", 예를 들어 표적 핵산에 대한 증폭 프라이머(들) 및 선택적으로 검출 프로브)만이 부착된 경우, 비록 부착된 각각의 표지 구성요소로 인해 구별될 수 있는 복수의 샘플에 대해서라도, 이러한 라이브러리는 오직 단일 관심 분석물을 검출하는 데에만 사용할 수 있다; 만일 상이한 분석물-특이적 시약이 조립된 마이크로파티클의 그러한 라이브러리 내에서 상이한 마이크로파티클에 부착된 경우라면, 이러한 라이브러리는 하나 또는 여러 샘플에서 관심 있는 상이한 분석물을 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0270] 바람직한 구현예에서, 분석물-특이적 시약(들)은 각각의 전구체-마이크로파티클에 가역적으로 부착된다. 한 개체가 다른 개체에 "가역적으로 부착되는" 문맥에 있어서 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, "가역적인" 또는 "가역적으로 부착되는"은, 적절한 조건 하에서 개체 간의 부착이 "이루어지지 않음"일 수 있지만, 또한 적절한 조건 하에서는 개체들이 서로 간에 다시 부착되는 것이 허용되는 형태의 부착을 바람직하게 지칭하는 것으로 의도된다. 이러한 가역적 부착의 해체는 전형적으로 개체들을 그대로, 특히 그들의 구조와 결합 능력을 변경하지 않은채로 두고, 그리고 두 개체의 서로 간의 부착(즉, 결합) 및 서로로부터의 해체의 반복된 주기를 허용하는 방식으로 발생하고 달성될 수 있다. 이러한 가역적 부착의 전형적인 예는 적절한 조건, 예컨대 혼성화 조건 하에서 핵산의 두 상보적 가닥의 혼성화인데, 이러한 혼성화는 생성된 이중 가닥이 상이한 조건 세트에 노출되는 경우, 예를 들어 온도가 상승하는 경우, 역전되어 이중 가닥이 다시 단일 가닥으로 녹는 것을 야기할 수 있다. 만약이면 두 가닥이 다시 어닐링되어 관련된 부착물의 가역적 특성을 보여줄 수 있다. 앞서 언급한 의미에서 "가역적"이 아닌 부착의 예는 알려진 가장 강력한 비-공유 결합 이벤트 중 하나인 야생형 비오틴과 야생형 스트렙타비딘 사이의 결합이며, 이는 하나 또는 둘 다 구조적으로 변경되지 않는 한, 예컨대 변성에 의하여 심지어 파괴되지 않는 한 되돌릴 수 없다.

[0271] 본 발명의 구현예에 따른 각각의 전구체-마이크로파티클에 대한 분석물-특이적 시약의 부착의 가역적 특성은 사용자의 요구에 따라 마이크로파티클의 맞춤형 제조를 용이하게 하고 또한 매우 다양한 상이한 방법들을 위한 마이크로파티클의 개별 라이브러리의 적응을 가능하게 한다. 따라서 각각의 현장 진료 환경 및 그의 필요에 따라 개별화 및/또는 맞춤형된 라이브러리를 쉽게 제작할 수 있다. 더욱이, 분석물-특이적 시약의 가역적 부착은 이것이 요구될 수 있는 상황, 예를 들어 그러한 분석물-특이적 시약이 후속 반응을 위해 이용 가능해야 하는 경우(그리고 자유롭게 확산될 수 있어야 함), 예를 들어, (자유롭게 확산 가능한) 분석물-특이적 시약의 자유로운 이용가능성을 요구하는 방법 프로토콜에서, 그와 같은 분석물-특이적 시약을 분리하는 것을 가능하게 한다. 바람직하게는, 이러한 가역적 부착은 전구체-마이크로파티클에 대한 분석물-특이적 시약의 가역적 부착을 허용하는 시약 결합 구성요소를 갖는 전구체-마이크로파티클(들)의 덕분에 발생한다. 바람직한 구현예에서, 이러한 시약 결합 구성요소는 전구체-마이크로파티클의 다공성 폴리머 매트릭스에 부착된 시약 결합 분자이다. 이러한 시약 결합 분자는 분석물-특이적 시약에 순차적으로 컨쥬게이트되는 결합체(binding entity)에 결합하도록 설계되고 의도된다. 따라서 이러한 바람직한 구현예에서, 한편으로는 전구체-마이크로파티클(들)의 다공성 폴리머 매트릭스에 부착된 시약 결합 분자와 그리고 다른 한편으로는 분석물-특이적 시약이 컨쥬게이트되는 결합체 사이의 상호작용이 존재한다. 이 바람직한 구현예에서, 시약 결합 분자 및 결합체는 가역적 방식으로 서로 상호작용, 즉 서로 결합하도록 선택된다. 예를 들어, 두 개체(entities) 사이의 결합은 가역적이고, 결합은 다시 되돌릴 수 있는 한, 다공성 폴리머 매트릭스에 부착된 시약 결합 분자는 스트렙타비딘 또는 이의 유도체일 수 있으며, 분석물-특이적 시약이 접합되는 컨쥬게이트되는 결합체는 비오틴 또는 데스티오비오틴과 같은 비오틴 유도체이거나, 그 반대일 수 있다(즉, 시약 결합 분자가 비오틴 또는 데스티오비오틴과 같은 비오틴 유도체이고 결합체가 스트렙타비딘 또는 이의 유도체임). 만일, 예를 들어, 분석물-특이적 시약이 핵산 프라이머(또는 한 쌍의 핵산 프라이머, 그리고 선택적으로 검출 프로브)인 경우, 이러한 프라이머(들)은 예를 들어 데스티오비오틴에 쉽게 접합될 수 있거나 심지어 상업적으로 이러한 데스티오비오틴화된(desthiobiotinylated) 형태로 제

공된다. 다른 측면에서, 다공성 폴리머 매트릭스는 스트렙타비딘일 수 있는 시약 결합 분자가 부착되어 있을 수 있다. 주변 조건 하에서, 최종 사용자가 관심 있는 분석물에 특이적인 한 쌍의 테스티오비오틴-프라이머를 선택하고, 스트렙타비딘이 다공성 폴리머 매트릭스에 부착된 전구체-마이크로파티클에 이것을 가역적으로 부착하는 것은 매우 간단하고 쉽다. 주변 조건 하에서, 비오틴 유도체와 스트렙타비딘 사이의 결합 이벤트는 전구체-마이크로파티클을 적절한 조건 하에서 이러한 비오틴-유도체-표지된 프라이머의 용액에 단순히 노출시킴으로써 쉽게 달성할 수 있습니다. 결합을 촉진하는 조건을 생성하는 "컨디셔닝 용액"이 사용될 수 있다. 이러한 컨디셔닝 용액은 예를 들어 적절한 pH 및 염 환경을 제공하는 완충액일 수 있습니다. 다른 한편으로, 만일 후속적으로 예를 들어 핵산 증폭 동안 온도가 상승하면, 시약 결합 분자와 결합체 사이 결합(들)의 가역적인 특징으로 인하여, 분석-특이적 시약은 마이크로파티클로부터 다시 쉽게 분리될 수 있는데, 이는 한편으로는 전구체-마이크로파티클(들)의 다공성 폴리머 매트릭스에 부착된 시약 결합 분자(예: 스트렙타비딘)와 다른 한편으로는 분석물-특이적 시약상의 결합체(예: 프라이머(들) 상의 테스티오비오틴) 사이의 결합이 고온 조건에서 더 이상 가능하지 않기 때문이다. 이러한 분리 후에, 분석물-특이적 시약(들)은 발생하는 모든 증폭 반응에 완전히 사용될 수 있다.

[0272] 본 명세서에 사용된 용어 "아비딘으로부터 유래되거나 이와 관련된 단백질"은 구조 또는 서열 면에서 아비딘과 유사하고 아비딘의 결합 기능을 갖거나 보유하는 임의의 단백질을 지칭하는 것을 의미한다.

[0273] 본 명세서에 사용된 용어 "비오틴으로부터 유래되거나 이와 관련된 분자"는 구조 면에서 비오틴과 유사하고 비오틴의 결합 기능을 갖거나 유지하는 임의의 분자를 지칭하는 것을 의미한다.

[0274] 각각의 라이브러리의 한 구현예에서, 라이브러리 내의 각각의 조립된 전구체 마이크로파티클 또는 마이크로파티클은 수성 샘플을 수용하고 분석물의 특이적 검출을 위한 반응 공간을 제공하기 위한 공극 부피를 갖는 다공성 폴리머 매트릭스를 포함한다. 이러한 다공성 폴리머 매트릭스는 폴리머 또는 폴리머 혼합물에 의해 형성되고, 보다 바람직하게는 하이드로겔-형성제 또는 이러한 하이드로겔-형성제들의 혼합물이거나 또는 이들에 의해 형성된다. 바람직한 구현예에서, 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하는 폴리머 또는 폴리머 혼합물은 겔-상태와 졸-상태 사이를 전환하는 능력을 갖는다. 한 구현예에서, 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하거나 그의 일부인 폴리머 또는 폴리머 혼합물은 가교 폴리머가 아니다. 폴리머 또는 폴리머 혼합물이 가교되지 않은 구현예는 특히 우수하고 상이한 상태, 예컨대 겔- 및 졸- 상태 사이를 전환하는 데 다재다능하다. 특히 바람직한 구현예에서, 폴리머는 아가로스, 보다 바람직하게는 아가로스 및 젤라틴의 조합이다. 아가로스와 젤라틴을 혼합하여 사용하는 경우, 아가로스는 0.1%(w/v) 내지 4%(w/v)의 범위로 존재하는 것이 바람직하고, 젤라틴은 0.1%(w/v) 내지 20%(w/v)의 범위, 바람직하게는 0.5%(w/v) 내지 20%(w/v)의 범위로 존재하는 것이 바람직하다. 한 특정 구현예에서, 상기 다공성 폴리머 매트릭스 중 아가로스의 농도는 0.5%(w/v)이고, 젤라틴의 농도는 1%(w/v) 내지 2%(w/v) 범위이다.

[0275] 본 발명자들에 의해 고안된 기술은 샘플에서 검출될 분석물이 존재하는 만큼 많은 상이한 부착된 분석물-특이적 시약을 갖는 조립된 마이크로파티클 라이브러리를 사용함으로써, 샘플 내에서 다중 분석물을 검출하는 것을 허용한다는 점에서 매우 다용도이다. 따라서, 일 구현예에 따르면, 조립된 마이크로파티클의 라이브러리에는 조립된 마이크로파티클의 적어도 2개의 서브세트, 바람직하게는 조립된 마이크로파티클의 3개 또는 그 이상의 서브세트가 있으며, 여기서 각각의 서브세트는 상기 서브세트의 마이크로파티클에 부착되거나, 내부에 포함되거나 또는 이와 달리 연결된 별개의 표지 구성요소를 갖고; 그리고 각각의 서브세트는, 서브세트의 마이크로파티클에 부착된 구별되는 분석물-특이적 시약을 가지고; 그 결과 조립된 마이크로파티클의 상기 적어도 2개 또는 그 이상의 서브세트가, 그 안에 부착되거나 포함된 각각의 표지 구성요소에 의해, 그리고 각 서브세트에 부착된 각각의 분석물-특이적 시약에 의해 구별되고; 따라서 각 서브세트는 각각의 표지 구성요소와 각각의 분석물-특이적 시약에 의해 명확하게 정의되고 식별 가능하다. 이러한 라이브러리에는 검출할 상이한 관심 분석물이 존재하는 만큼 많은, 또는 적어도 그 만큼 많은 개별 서브세트가 제공되며, 각각의 상기 개별 서브세트는 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 가지고; 각 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적이다. 이러한 라이브러리는 그 중에서도, 구현예 12에서 설명되고 청구항 10에서 청구되며, 그것의 용도는 그 중에서도 구현예 30에서 설명되고 청구항 23에서 청구되며, 그 예시가 도 10B), 10C) 및 10E)를 참조하여 도시되고 추가로 설명된다.

[0276] 검출할 관심 분석물이 단 하나뿐인 경우, 그러나 가능하게는 상이한 샘플에서, 본 발명은 한 구현예에서 또한 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 제공하며, 여기서 상기 라이브러리에는 조립된 마이크로파티클의 적어도 2개의 서브세트, 바람직하게는 조립된 마이크로파티클의 3개 이상의 서브세트가 존재하고, 여기서 각각의 서브세트는 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 내부에 포함되거나 그와 달리 연결된 그의 구별되는 표지 구성요소를 가지고; 그리고 상기 적어도 2개, 3개 또는 그 이상의 서브세트 모두는 상기 서브세트의 상

기 마이크로파티클에 부착된 동일한 분석물-특이적 시약을 갖고; 그 결과 조립된 마이크로파티클의 상기 적어도 2개 또는 그 이상의 서브세트는 부착된 분석물-특이적 시약의 관점에서 동일하지만, 각 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 내부에 함유되거나 그와 달리 연결된 각각의 표지 구성요소에 의해서는 상이하다. 이 특정 라이브러리는 다수의 샘플, 즉 바람직하게는 라이브러리 내에 서브세트가 있는 만큼 많은 샘플에서 단일 분석물의 검출에 특히 유용하다. 다르게 말하면, 그러한 라이브러리 내에, 제공되고 테스트 될 상이한 수성 샘플이 존재하는 만큼 많거나 또는 적어도 그 만큼 많은 제공되는 마이크로파티클의 개별 서브세트가 존재하고, 여기서 상기 개별 서브세트 모두는 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착되는 동일한 분석물-특이적 시약을 가지고, 상기 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적이다. 이러한 라이브러리는 그 중에서도 구현예 11에서 설명되고 청구항 9에서 청구되며, 그의 용도는 그 중에서도 구현예 29에서 설명되고 청구항 22에서 청구되며, 그 예는 도 10A)를 참조하여 도시되고 추가로 설명된다.

[0277] 본 발명자들에 의해 고안된 기술은 게다가 샘플 내 검출될 분석물이 있는 만큼 많은 상이한 부착된 분석물-특이 시약을 가지는 조립된 마이크로파티클 라이브러리를 사용함으로써, 샘플 내 다중 분석물을 검출할 수 있게 하고, 그리고 상기 라이브러리 내에, 복수 개의 상이한 개별 마이크로파티클 서브세트가 함께 존재하는데, 이들의 총 수는 테스트할 샘플의 수에 검출 및/또는 정량화할 분석물의 수를 곱한 것과 동일하다. 따라서, 이러한 일 구현예에 따르면, 이러한 조립된 마이크로파티클 라이브러리에는 마이크로파티클의 서로 다른 개별 서브세트가 있으며, 각각의 서브세트는 그것에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 이와 달리 연관된 별개의 표지 구성요소를 갖는다. 더욱이 이러한 라이브러리 내에는 조립된 마이크로파티클의 개별 서브세트의 상이한 클래스가 있으며, 상기 클래스 각각은 이러한 클래스 내에서 그것에 부착된 동일한 분석물-특이적 시약을 갖는 마이크로파티클의 수 개의 서브세트를 포함하며; 여기서 상이한 클래스에 속하는 마이크로파티클의 서브세트는 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 갖는다. 다시 말해서, 한 클래스 내의 마이크로파티클의 모든 서브세트는 동일한 부착된 분석물-특이적 시약을 가지고 (따라서 동일한 분석물을 검출하고 정량화하는 데 사용하도록 의도되고, 그러나 한 클래스 내의 상이한 서브세트는 상이한 샘플과 함께 사용되도록 의도된 것이다. 이러한 라이브러리가 복수의 샘플에서 다중 분석물을 검출 및/또는 정량하기 위한 방법에 사용되는 경우, 이러한 라이브러리 내에는 다음이 존재한다:

[0278] · 검출할 상이한 분석물이 존재하는 만큼 많은, 또는 적어도 그만큼 많은, 제공되는 마이크로파티클의 개별 서브세트의 상이한 클래스,

[0279] · 제공되고 테스트될 수성 샘플이 존재하는 만큼, 또는 적어도 그만큼 많은, 각 클래스 내에서 제공되는 마이크로파티클의 상이한 서브세트,

[0280] · 시험될 상이한 수성 샘플에 검출할 관심 있는 상이한 분석물의 수를 곱한 만큼 많거나 또는 적어도 그 만큼 많은, 라이브러리 내에 제공되는 상이한 마이크로파티클 서브세트,

[0281] 이러한 라이브러리는 그 중에서도 구현예 13에서 설명되고 청구항 11에서 청구되고, 그 용도는 그 중에서도 구현예 31에서 설명되고 청구항 24에서 청구되며, 그 예는 도 10d), 11A) 및 11B)를 참조하여 도시되고 추가로 설명된다.

[0282] 본 발명의 다양성은 또한 본 발명에 따른 라이브러리가 어떤 분석물이 관심 대상이고 따라서 검출되어야 하고 얼마나 많은 샘플이 조사되어야 하는지를 결정하는 최종 사용자가 사용할 수 있는 적절한 키트에 의해 매우 쉽게 제조될 수 있다는 사실에 반영된다.

[0283] 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 제조하기 위한 키트에 관한 것으로, 여기서 키트는 다음을 포함한다:

[0284] - 적어도 두 개의 용기, 즉 첫 번째 및 두 번째 용기, 그리고 임의로 각각 다음을 포함하는 추가 용기:

[0285] · 상기 추가로 정의된 바와 같은 조립된 전구체-마이크로파티클의 서브세트, 여기서 각 서브세트는 상기 서브세트 내의 상기 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 또는 이와 달리 결합된 구별된 표지 구성요소를 가지며, 그 결과 상기 적어도 두 개의 용기 내에 포함된 조립된 전구체-마이크로파티클의 상기 두 개의 서브세트는, 이에 부착되거나, 안에 포함되거나 또는 이와 달리 결합된 각각의 표지 구성요소에 의해 구별된다;

[0286] - 다음을 포함하는 추가 용기:

[0287] · 다음에 의하여 앞서 추가로 정의된 바와 같은 상기 전구체-마이크로파티클의 상기 시약 결합 구성요소를

통해 상기 전구체-마이크로파티클의 상기 서브세트에 대한 분석물-특이적 시약의 가역적 부착을 가능하게 하는 컨디셔닝 용액

- [0288] a) 상기 분석물-특이적 시약이 상기 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하거나 또는 상기 다공성 폴리머 매트릭스의 일부인 상기 폴리머 혼합물 (i)에 직접적으로 결합됨;
- [0289] b) 앞서 추가로 정의된 바와 같이, 상기 분석물-특이적 시약이 결합체(binding entity)에 컨주게이트되고, 상기 결합체가 순차적으로 상기 시약 결합 분자 (ii)에 결합됨;
- [0290] c) 상기 분석물-특이적 시약이, 상기 이온화가능한 그룹(들)이 적절한 순 전하(net charge)를 갖는 조건 하에서, 앞서 정의된 바와 같이, 상기 이온화가능한 그룹(들) (iii)에 직접 결합됨;
- [0291] d) 상기 분석물-특이적 시약이 상기 폴리머 상의, 앞서 정의된 바와 같이, 상기 하전된 그룹(들) (iv)에 직접 결합됨, 여기서 상기 분석물-특이적 시약은 적어도 하나의 이온화가능한 그룹 또는 복수 개의 이온화가능한 그룹을 갖고, 상기 이온화가능한 그룹(들)은 상기 분석물-특이적 시약을 둘러싼 주변 조건에 따라 그것(들)의 전하(들)을 변경할 수 있음; 또는
- [0292] e) (a) - (d) 중 임의의 조합; 여기서 시약 결합 구성요소, 시약 결합 분자, 결합체, 폴리머 또는 폴리머 혼합물, 이온화가능한 그룹, 및 분석물-특이적 시약은 앞서 추가로 정의된 바와 같다.
- [0293] 이러한 구현예를 사용하여, 최종 사용자는 선택된 수 및 유형의 관심 분석물에 대해 특이적이고 선택된 수의 샘플과 함께 사용될 수 있는 그 자신의 조립된 마이크로파티클 라이브러리를 생성할 수 있다. 각각의 그리고 원하는 분석물-특이적 시약, 예컨대 프라이머 또는 항체의 부착은, 바람직하게는 완충액과 같은 전술한 컨디셔닝 용액에 의해 확립되거나 생성된 적절한 조건 하에서, 상기 조립된 전구체-마이크로파티클을 상기 분석물-특이적 시약(들)에 노출시킴으로써 간단히 발생한다.
- [0294] 한 구현예에서, 다수의 관심 분석물이 단일 샘플에서 검출되어야 하는 경우, 조립된 마이크로파티클의 상응하는 라이브러리는 본 발명에 따른 키트를 사용하여 생성될 것이며, 여기서 마이크로파티클의 상이한 서브세트가 있고, 각각의 서브세트는 특정 관심 분석물에 대해 특이적이고, 그리고 각각의 서브세트는 각 서브세트에 부착되거나, 그 안에 포함되거나, 이와 달리 결합된 각각의 표지 구성요소 측면에서 상이하다. 이러한 라이브러리는 그 중에서도 구현예 12에서 설명되고 청구항 10에서 청구되며, 그것의 용도는 그 중에서도 구현예 30에서 설명되고 청구항 23에서 청구되며, 그 예가 도 10b), 10C) 및 10E)를 참조하여 도시되고 추가로 설명된다.
- [0295] 만일, 반면에, 단일 분석물의 검출이 그러나 예를 들어 상이한 환자로부터의 복수의 샘플 내에서 원하고 의도되는 경우, 조립된 마이크로파티클의 상이한 서브세트가 있는 상응하는 라이브러리가 생성될 것이고, 여기서 모든 마이크로파티클은 동일한 분석물-특이적 시약이 부착되어 있지만, 각 서브세트에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 이와 달리 결합된 각 표지 구성요소의 관점에서 여전히 상이하다. 이러한 라이브러리는 그 중에서도 구현예 11에서 설명되고 청구항 9에서 청구되며, 그것의 용도는 그 중에서도 구현예 29에서 설명되고 청구항 22에서 청구되며, 그 예는 도 10A)를 참조하여 도시되고 추가로 설명된다. 기존의 "풀링(pooling)" 접근 방식에서는, 예를 들어 상이한 환자들로부터 얻은 상이한 샘플들은 함께 풀링되고(pooled), 그 후 그러한 풀이 특정 분석물의 존재에 대해 시험된다는 점에 주목해야 한다. 만일, 풀이 그러한 종래의 접근에서, 풀을 생성하는 데 원래 사용되는 샘플 중 적어도 하나에서 분석물의 존재를 나타내는 양성(positive) 신호를 나타내는 것으로 밝혀지면, 어떤 개별 샘플이 양성인지 궁극적으로 감지하기 위하여, 샘플당 기준으로, 전체 샘플 세트를 개별적으로 다시 테스트해야 할 것이다. 이와 대조적으로, 본 발명에 따른 라이브러리는 양성 신호(들)가 검출되는 경우, 개별 샘플의 이러한 반복 테스트를 필요로 하지 않는다. 이는 본 발명에 따른 라이브러리에서, 이러한 양성 마이크로파티클이 어느 샘플에 속하는지를 개별 마이크로파티클(양성 신호를 나타내는)의 수준에서 결정할 수 있기 때문이다. 이는 심지어, 이러한 개별 (양성) 마이크로파티클이 상이한 (환자) 샘플들을 조사하는 데 사용되는 다른 마이크로파티클과 혼합(즉, 이들의 "풀" 내로)되는 경우에도 가능한데, "혼합물"(또는 "풀")은 전형적으로 라이브러리의 모든 마이크로파티클 상에서 검출 반응이 수행될 때 발생할 것이다.
- [0296] 세 번째 가능성으로, 하나 이상의 관심 분석물, 예를 들어 2개의 관심 분석물을 그리고 복수의 샘플 내에서 검출하는 데 유용한 라이브러리가 제공될 수도 있다. 이러한 라이브러리에서 마이크로파티클의 각 서브세트는 각 서브세트에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 또는 그와 다르게 결합된 각 표지 구성요소에 따라 다르지만, 동일한 부착된 분석물-특이적 시약을 가지는 쌍, 삼중 또는 사중 또는 n-중(n-tuples)의 서브세트가 있다(2, 3, 4 또는 n개의 샘플이 특정 관심 분석물에 대해 테스트되어야 하는 경우). 더욱이 이러한 라이브러리에는 상이한 분석물-특이적 시약이 부착된 그러한 쌍, ... n-중 내에 각각의 서브세트를 갖는 마이크로파티클의 쌍, 또는 삼

중, 사중 또는 n-중(n-tuples)의 서브세트가 있다(2, 3, 4 또는 n개의 상이한 관심 분석물이 검출되어야 하는 경우). 이러한 라이브러리는 그 중에서 구현예 13에서 설명되고 청구항 11에서 청구되고, 그것의 용도는 그 중에서 구현예 31에서 설명되고 청구항 24에서 청구되며, 그 예는 도 10D), 11A) 및 11B)를 참조하여 도시되고 추가로 설명된다. 다시 말하지만, 위에서 설명한 이유 때문에 풀(pool)이 양성으로 판명되는 경우, 전체 풀 및 개별 샘플을 반복적으로 시험하는 것이 요구되는 종전의 풀링 접근 방식과 상이하다.

- [0297] 한 구현예에서, 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 제조하기 위한 키트는, 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 제거하지 않고, 마이크로파티클로부터 유리된(free), 즉, 부착되지 않은 분석물-특이적 시약(들)의 제거를 위한 세척 완충액 또는 세척 용액을 함유하는 추가 용기를 추가로 포함할 수 있다. 추가 구현예에서, 조립된 마이크로파티클을 제조하기 위한 키트는 구성요소들을 함께 혼합하기 위한 적어도 하나의 혼합 용기, 바람직하게는 여러 혼합 용기, 보다 바람직하게는 전구체-마이크로파티클의 서브세트를 함유하는 용기가 있는 만큼의 많은 혼합 용기를 추가로 포함한다.
- [0298] 한 구현예에서, 구성요소들을 함께 혼합하는 것은 조립된 전구체-마이크로파티클의 각각의 서브세트를 함유(함유)하는 동일한 용기(들) 내에서 일어날 수 있다. 그러나 다른 구현예에서는 특별히 지정된 혼합 용기의 하나 또는 여러 개를 별도로 제공하는 것이 현명할 수 있다. 이것은 마이크로파티클의 서브세트가 상이한 분석물-특이적 시약과 별도로 제공된 후 풀링될 때 특히 유용할 수 있다.
- [0299] 추가 측면에서, 본 발명은 또한 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 제조하는 방법에 관한 것이며, 여기서 이러한 방법에서 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리 및 적어도 하나의 분석물-특이적 시약은, 둘 다 상기 정의된 바와 같은데, 임의의 순서로 제공된다. 이러한 방법에서, 조립된 전구체-마이크로파티클의 상기 라이브러리, 또는 이의 선택된 서브세트, 및 적어도 하나의 분석물-특이적 시약은, 상기 조립된 전구체-마이크로파티클의 일부 또는 전부에 대한 상기 적어도 하나의 분석물-특이적 시약의 부착, 바람직하게는 가역적 부착을 허용하는 조건 하에 혼합되는데, 이에 의하여 본 발명에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 생성한다.
- [0300] 선택적으로, 상기 방법은 상기 조립된 마이크로파티클을 세척하여 부착되지 않은 임의의 분석물-특이적 시약을 그로부터 제거하는 단계를 추가로 포함한다
- [0301] 한 구현예에서, 이러한 방법은 상기 정의된 바와 같은 라이브러리를 제조하기 위한 키트를 사용함으로써 수행될 수 있으며, 여기서 상기 라이브러리는 상기 키트의 상기 적어도 2개의 용기의 형태로 제공되며, 각 용기는 상기 추가로 정의된 바와 같은 조립된 전구체-마이크로파티클의 서브세트를 함유하고, 각각의 서브세트는 상기 서브세트 내의 상기 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 내부에 포함되거나 또는 이와 달리 연관된 구별되는 표지 구성요소를 갖고, 따라서 조립된 전구체-마이크로파티클의 상기 적어도 2개의 서브세트는 각 서브세트 내에 부착되거나, 내부에 포함되거나 또는 다른 방식으로 연결된 각각의 표지 구성요소에 의해 구별된다;
- [0302] 여기서 상기 조립된 전구체-마이크로파티클의 일부 또는 전부에 대한 상기 적어도 하나의 분석물-특이적 시약의 부착, 바람직하게는 가역적 부착을 허용하는 상기 조건은, 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리 또는 이의 선택된 서브세트, 및 상기 정의된 바와 같은 컨디셔닝 용액의 존재 하에 적어도 하나의 분석물-특이적 시약을 혼합함으로써 생성되고, 여기서 바람직하게는 상기 컨디셔닝 용액은 완충액이다.
- [0303] 상기 추가로 정의된 바와 같이, 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 제조하는 방법의 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 다음을 포함한다:
- [0304] - 다음을 임의의 순서로 제공:
- [0305] · 상기 추가로 정의된 바와 같은 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리, 별개의 용기 내에 제공되는 각각의 서브세트, 또는 별개의 용기 내에 조립된 전구체-마이크로파티클의 수개의 서브세트가 함께 제공된다;
- [0306] · 상기 추가로 정의된 바와 같은 적어도 하나의 분석물-특이적 시약;
- [0307] · 조립된 전구체-마이크로파티클 라이브러리의 서브세트를 하나 이상의 분석물-특이 시약과 별도로 혼합하거나, 또는 상기 조립된 전구체-마이크로파티클 라이브러리의 선택된 조합된 서브세트, 및 적어도 하나의 분석물-특이적 시약을, 상기 조립된 전구체-마이크로파티클의 일부 또는 전부에 대한 상기 적어도 하나의 분석물-특이적 시약의 부착, 바람직하게는 가역적 부착을 허용하는 조건 하에서 혼합하는 단계, 이에 따라 상기 추가로 정의된 바와 같은 조립된 마이크로파티클의 라이브러리가 생성된다;
- [0308] · 선택적으로, 상기 조립된 마이크로파티클을 세척하여 임의의 부착되지 않은 분석물-특이적 시약을 제거한다;

- [0309] · (선택적으로) 개별 또는 혼합된 서브세트를 라이브러리의 정의된 서브세트에 선택적으로 부착된 분석물-특이적 시약을 사용하여 상이한 서브세트가 있는 하나의 마이크로파티클 라이브러리 속으로 통합한다.
- [0310] 추가 측면에서, 본 명세서에서 때때로 "제조 키트(manufacturing kit)"로도 지칭되는, 상기 정의된 바와 같은 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 제조하기 위한 키트는, 분석물을 검출하기 위한 키트를 제공하기 위한 플랫폼 역할을 할 수 있다. 후자의 키트는 본 명세서에서 때때로 "검출 키트(detection kit)"라고도 지칭되는데, 이는 조립된 마이크로파티클 라이브러리를 만들기 위한 키트인 "제조 키트(manufacturing kit)"와는 대조적이다.
- [0311] 추가 측면에서, 본 발명은 또한 샘플에서 분석물을 검출하기 위한 키트("검출 키트")에 관한 것으로, 상기 검출 키트는 다음을 포함한다:
- [0312] a)
- [0313] - 핵산 증폭을 위한 일반 검출 조성물을 함유하는 용기, 상기 일반 검출 조성물은 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하고, 여기서 분석물의 상기 화학적 또는 생화학적 검출 반응은 핵산 증폭이고, 상기 일반 검출 조성물은 완충액, 모노-뉴클레오타이드-트리포스페이트, 적합한 핵산 폴리머라제와 같은 증폭 효소, 예컨대 태크(Taq) 폴리머라제, 및 증폭된 핵산과 같은 증폭 산물의 검출을 위한 핵산 염료,
- [0314] 또는
- [0315] - 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 제1 검출 조성물을 함유하는 용기, 여기서 분석물의 상기 화학적 또는 생화학적 검출 반응은 면역화학 검출 반응임, 그리고 검출 시약을 포함하는 제2 검출 조성물을 함유하는 추가의 용기, 여기서 상기 제1 검출 조성물은 면역화학 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는데, 예컨대 완충액, 및 상기 면역화학 검출 반응에서 분석물-특이적 시약(ASR)으로 사용되는 1차 항체, 항체 단편, 또는 비-항체 단백질과 동일한 분석물에 특이적이고 적절한 리포터 효소에 결합된 2차 항체 또는 2차 항체 단편을 포함함; 그리고 상기 제2 검출 조성물은 검출 시약으로서, 상기 리포터 효소에 의해 반응된 기질이 검출가능하게 되는, 바람직하게는 광학적으로 검출가능하게 되는, 더 바람직하게는 형광에 의해 검출가능하게 되는 상기 리포터 효소에 대한 적합한 기질을 포함한다,
- [0316] 또는
- [0317] - 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 함유하는 제1 검출 조성물을 포함하는 용기, 여기서 화학적 또는 생화학적 반응은 면역화학 검출 반응임, 그리고 검출 시약을 함유하는 제2 검출 조성물을 포함하는 추가의 용기, 상기 제1 검출 조성물은 면역화학 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는데, 예컨대 완충액, 및 상기 면역화학 검출 반응에서 분석물-특이적 시약(ASR)으로 사용되는 1차 항체와 동일한 분석물에 대해 특이적이고 적합한 올리고뉴클레오타이드 태그(tag)에 결합된 2차 항체 또는 2차 항체 단편을 포함함; 그리고 상기 제2 검출 조성물은 검출 시약(들)으로서 완충액, 모노-뉴클레오타이드-트리포스페이트, 적합한 핵산 폴리머라제와 같은 증폭 효소, 예컨대 태크(Taq) 폴리머라제, 및 증폭된 핵산과 같은 증폭 산물의 검출을 위한 핵산 염료, 및 2차 항체에 부착된 올리고뉴클레오타이드 태그를 증폭하기에 적합한 프라이머를 포함함;
- [0318] 그리고
- [0319] b)
- [0320] - 오일과 같은 비-수상(non-aqueous phase), 예컨대 유화제로 임의로 보충된 플루오로카본 오일을 함유하는 용기;
- [0321] 그리고
- [0322] c)
- [0323] - 구성요소들을 혼합하기 위한 혼합 용기.
- [0324] 일 구현예에서, 검출 키트는 d) 검출 반응을 수행하기 위한 추가의 용기를 포함할 수 있다.
- [0325] 본 발명에 따르면, 검출 키트는 본 명세서 및 상기 추가로 정의된 바와 같은 마이크로파티클 라이브러리와 함께 사용되어야 한다.
- [0326] 따라서, 일부 구현예에서, 검출 키트는 또한 위에서 추가로 정의된 바와 같이 조립된 마이크로파티클의 라이브

리리를 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 이러한 마이크로파티클 라이브러리에서, 마이크로파티클은 또한 상기 정의된 바와 같은 분석물-특이적 시약을 포함한다. 이것은 화학적 또는 생화학적 반응을 통해 검출을 수행하기 위해 정의된 반응 공간으로 작용하는 분석물-특이적 시약을 포함하는 이러한 마이크로파티클이다. 각각의 분석물-특이적 시약은 관심 분석물을 특이적으로 표적화하거나 인식한다.

[0327] 다른 구현예에서, 상기 정의된 바와 같은 조립된 마이크로파티클의 라이브러리는 키트와 별도로 제공되며 그 일부를 형성하지 않는다.

[0328] 본 발명의 구현예에 따른 검출 키트에서, 성분 a)는 효과적으로, 사용되는 검출 유형에 대한 결정 구성요소이다. 따라서 구성요소 a)에 대한 다양한 가능성이 있다: 어떤 검출이 수행되도록 의도되었는지에 따라서, 그리고 그렇게 검출될 분석물에 따라서 이러한 구성요소 a)는 핵산 증폭의 맥락에서 검출을 수행하도록, 또는 면역화학 검출의 맥락에서 검출을 수행하도록, 또는 예컨대 면역-PCR과 같은 면역-증폭 반응의 맥락에서 검출을 수행하도록 구성되어 질 수 있다.

[0329] 따라서, 그러한 구성요소 a)는 핵산 증폭의 맥락에서 사용되는 일반적인 검출 조성물을 함유하는 용기일 수 있다. 핵산 증폭의 맥락에서 사용되는 이러한 일반적인 검출 조성물은 완충제, 모노-뉴클레오타이드-트리포스페이트, 증폭 효소, 예를 들어 적합한 핵산 폴리머라제, 예를 들어, Taq(Taq) 폴리머라제, 및 증폭된 핵산과 같은 증폭 산물의 검출을 위한 핵산 염료를 포함한다.

[0330] 또는, 면역화학 검출의 맥락에서, 구성요소 a)는 2개의 별개의 용기의 조합일 수 있는데, 여기서 그러한 조합의 첫 번째 용기는 면역화학 검출을 수행하기 위한 시약, 예컨대 완충액, 및 면역화학 반응에서 분석물-특이적 시약으로 사용되는 1차 항체, 항체 단편, 또는 비-항체 단백질과 동일한 분석물에 특이적이고 적절한 리포터 효소에 결합된 2차 항체 또는 2차 항체 단편을 포함하는 제1 검출 조성물을 포함한다. 이러한 맥락에서, 용어 "분석물에 특이적인(specific for the/an analyte)"은, 2차 항체의 맥락에서 사용될 때, 면역화학 검출 반응에서 분석물-특이적 시약으로 사용되는 1차 항체, 단편 ... 등에 그와 같은 분석물이 이미 결합되어 있거나 또는 유리된 것인지 여부와 관계없이, 2차 항체는 분석물-특이적 시약으로 사용되는 1차 항체, 항체 단편 또는 비-항체 단백질과 동일한 분석물을 특이적으로 인식하거나 표적화할 수 있을 것이라는 것을 의미하기 위해 의도된다. 분석물-특이적 시약으로 사용되는 1차 항체, 항체 단편 또는 비-항체 단백질은 위에서 정의한 마이크로파티클의 일부이며, 위에서 정의한 이러한 마이크로파티클의 라이브러리는 검출 키트의 일부를 형성할 수 있거나, 또는 그러한 키트와 별도로 제공될 수 있다.

[0331] 구성요소 a)에 대한 세 번째 옵션은 예컨대 면역-PCR과 같은 면역 증폭 반응의 맥락에서 검출을 위한 옵션이다. 이 구현예에서, 구성요소 a)는 2개의 별개의 용기의 조합인데, 여기서 제1 용기는 면역화학 검출 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 제1 검출 조성물을 포함하는데, 시약은 예컨대 완충액, 및 분석물-특이적 시약으로 사용되는 1차 항체, 항체 단편 또는 비-항체 단백질과 동일한 분석물에 대해 특이적이고 적절한 올리고뉴클레오타이드 태그에 커플링된 2차 항체 또는 2차 항체 단편임; 그리고 제2 용기는 제2 검출 조성물을 포함하고, 그리고 상기 제2 검출 조성물은 검출 시약(들)으로서 완충액, 모노-뉴클레오타이드-트리포스페이트, 증폭 효소, 예를 들어 적합한 핵산 폴리머라제, 예를 들어 Taq(Taq) 폴리머라제, 및 증폭된 핵산과 같은 증폭 산물의 검출을 위한 핵산 염료, 및 이차 항체에 부착된 올리고뉴클레오타이드 태그를 증폭시키기에 적합한 프라이머를 포함한다.

[0332] 본 발명에 따른 라이브러리는 제작이 매우 쉽고 매우 다양한 분석 또는 진단 응용 분야에서 사용하기에 매우 다양하다:

[0333] 예를 들어, 이미 위에서 추가로 설명된 바와 같이, 본 발명의 한 구현예에 따른 라이브러리는 복수의 상이한 샘플에서 단일 분석물을 검출하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 각각의 서브세트는 일반적으로 개별 샘플로 서브세트를 조사할 수 있도록 별도의 용기 내에 제공된다. 이러한 구현예에서, 상기 라이브러리에 존재하는 마이크로파티클의 개별 서브세트의 수는, 상기 복수의 상이한 샘플 내의 샘플의 수와 적어도 동일(또는 때때로 더 많음)이다. 상기 라이브러리에 존재하는 마이크로파티클의 개별 서브세트의 수가 상기 복수의 상이한 샘플 내의 샘플의 수보다 더 많은 경우, 전체 라이브러리(모든 서브세트를 포함하는)를 사용할 필요는 없다. 이러한 라이브러리는 구현예 11에 설명되어 있다.

[0334] 또 다른 예로서, 그리고 또한 위에서 이미 추가로 설명된 바와 같이, 본 발명의 한 구현예에 따른 라이브러리는 단일 샘플에서 다중 분석물을 검출하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 라이브러리의 서브세트는, 단일 용기 내에 조합되어 제공되거나 또는, 초기에 별도의 용기에 제공되고 샘플과 동시에 조사된 후에 단일 용기 속으로 조합될 수 있다. 이러한 구현예에서, 상기 라이브러리에 존재하는 마이크로파티클의 개별 서브세트의 수는 상기 단

일 샘플에서 검출될 분석물의 수와 적어도 동일(또는 때때로 더 많음)이다. 상기 라이브러리에 존재하는 마이크로파티클의 개별 서브세트의 수가 상기 단일 샘플에서 검출될 분석물의 수보다 더 많은 경우, 전체 라이브러리(모든 서브세트 포함)를 사용할 필요는 없다. 이러한 라이브러리는 구현에 12에 설명되어 있습니다.

[0335] 다른 예로서, 본 발명의 일 구현예에 따른 라이브러리는 복수의 상이한 샘플에서 복수의 분석물을 검출하는 방법에 사용될 수 있다. 이 경우 라이브러리는 서로 다른 서브세트의 하위-라이브러리를 포함하며, 각 서브세트는 서로 다른 클래스의 분석물-특이적 시약을 나타내며, 각 하위-라이브러리는 서로 다른 샘플을 조사하는 데 사용된다. 이러한 라이브러리는 구현에 13에 설명되어 있다.

[0336] 본 명세서에서 사용되는 "하위 라이브러리(sublibrary)" 및 "클래스(class)"라는 용어는 다음을 지칭하는 것을 의미한다:

[0337] 본 명세서에 사용된 용어 "클래스"는 동일한 분석물-특이적 시약(ASR)을 갖는 라이브러리 내의 모든 마이크로파티클 서브세트 전체를 지칭하는 것을 의미한다. 한 클래스 내의 모든 서브세트는 하나의 관심 분석 대상에 대해 특이적이다. 한 클래스 내에서 서로 다른 서브세트는 각각의 표지 구성요소에 의하여 서로 상이하다. 한 클래스 내에서 서로 다른 서브세트는 별도의 컨테이너에 보관되는데, 왜냐하면 상기 서로 다른 서브세트 각각은 서로 다른 샘플을 조사하는 데 사용되기 때문이다.

[0338] 본 명세서에 사용된 용어 "하위 라이브러리(sublibrary)"는, 복수의 상이한 샘플에서 다중 분석물을 검출하는 방법의 맥락에서 사용되는 것인데, 하나의 특정 시간에 하나의 특정 샘플을 조사하기 위하여 사용되는 라이브러리 내의 마이크로파티클의 모든 서브세트 전체를 지칭하는 것으로 의도된다. 다수의 상이한 샘플이 있을 것이기 때문에, 라이브러리는 따라서 조립된 마이크로파티클의 개별 서브세트의 상이한 하위 라이브러리를 포함하고, 상기 하위 라이브러리 각각은 상이한 샘플을 조사하는데 사용된다. 각 하위 라이브러리 내에서, 하나의 하위 라이브러리 내에서 조립된 마이크로파티클의 각 서브세트에는 서로 다른 분석물-특이적 시약이 부착되어 있다; 각 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적이다.

[0339] 효과적으로, 그리하여 각 하위 라이브러리는 각 클래스로부터 유래한 마이크로파티클의 하나의 서브세트를 포함하고, 그 결과 각 하위 라이브러리 내에, 각 마이크로파티클의 각 서브세트는 서로 다른 부착된 분석물-특이적 시약을 갖는다.

[0340] 용어 "샘플을 조사(interrogate a sample)"는, 샘플을 "조사(interrogate)"하는데 사용되는 서브세트의 맥락에서 본 명세서에서 사용되는 것인데, 그러한 서브세트가 특정 샘플에 노출되거나 그와 함께 인큐베이션되어, 마이크로파티클의 서브세트가 마이크로파티클의 빈 부피로 샘플을 가져가는 것을 허용하는 시나리오를 지칭하는 것으로 의도된다.

[0341] 용어 "배양하다(incubate)", "조사하다(interrogate)" 및 "노출하다(expose to)"는, 마이크로파티클 라이브러리와 함께 배양되거나 또는 조사되는 샘플의 맥락에서, 또는 샘플에 노출되는 마이크로라이브러리의 맥락에서 사용될 때, 샘플과 라이브러리가 마이크로파티클이 샘플을 그들의 빈 부피로 흡수할 수 있도록 하기에 충분한 시간 동안 서로 접촉하는 시나리오를 지칭하기 위하여 의도된 것이다.

[0342] 본 명세서에 사용된 용어 "샘플(sample)" 또는 "수성 샘플(aqueous sample)"은 환경으로부터 격리된 임의의 적합한 유체, 예컨대 체액, 또는 하나 또는 여러 분석물의 존재 여부 및/또는 그(그들) 각각의 양(양들)에 대해 분석할 성분들을 지칭하는 것을 의미한다. 예를 들어, 샘플은 예컨대 환자, 특히 환자 조직 또는 환자 유체와 같은 특정 환경에서 얻은 분석할 수용액일 수 있다. 이러한 샘플은 체액 또는 그 구성요소일 수 있습니다. 혈액, 혈장, 혈청, 타액, 소변, 눈물, 땀, 림프, 정액 및 뇌척수액이 그 예이다. 이 용어는 또한 핵산 추출, 세포 고갈, 분석물 농축 등과 같은 일부 처리 단계를 거쳤고 분석물을 포함하는 액체를 나타내고 본 발명에 설명된 시약 및 단계에 적용될 샘플을 지칭할 수 있다. 한 구현예에서, 본 명세서에 사용된 용어 "샘플(sample)" 또는 "수성 샘플(aqueous sample)"은, 예컨대 관심 분석물을 접근 가능하거나 추가 분석이 가능하도록 하기 위하여, 추가로 처리되거나 처리되지 않았을 수 있는 유기체의 몸체로부터 수득된 액체 샘플을 지칭한다. 바람직하게는 이러한 "샘플" 또는 "수성 샘플"은 혈액(blood), 혈장(plasma), 혈청(serum), 소변(urine), 땀(sweat), 눈물(tears), 가래(sputum), 림프(lymph), 정액(semen), 복수(ascites), 양수(amniotic fluid), 담즙(bile), 모유(breast milk), 활액(synovial fluid), 복막액(peritoneal fluid), 심낭액(pericardial fluid), 뇌척수액(cerebrospinal fluid), 유미(chyle) 및 소변(urine)으로부터 선택되며, 여기서 보다 바람직하게는 상기 샘플은 혈장이다. 바람직하게는 이러한 수성 샘플은 추가로 처리되는데, 예컨대 이는 본 발명에 따른 방법에 적용되기 전에 용해되거나 소화되거나 달리 처리될 수 있다. 예를 들어, 수성 샘플이 혈장인 경우 이러한 혈장은 후속

검출 반응을 방해할 수 있는 성분을 제거하기 위해 추가로 용해 및/또는 소화되었을 수 있다. 예를 들어, 관심 분석 대상이 특정 핵산인 경우 수성 샘플, 예를 들어 혈장은 본 발명에 따른 방법에 적용되기 전에 먼저 프로테아제 및 기타 적합한 효소로 분해되어 임의의 원치 않는 단백질 또는 펩티드뿐만 아니라 지질 또는 기타 원치 않는 성분을 제거할 수 있다. 따라서 본 명세서에 사용된 "수성 샘플"은 또한 전술한 체액 중 임의의 것에서 얻은 추출물을 의미할 수도 있다; 예를 들어, 적절한 추출 방법에 의하여 전술한 임의의 체액으로부터 얻은 핵산 추출물일 수 있는데, 예컨대 세포 파괴(필요한 경우), 지질, 단백질 및 원치 않는 핵산의 제거(필요한 경우), 및 핵산의 정제 및/또는 특정 핵산의 농축을 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 추출물은 에탄올 또는 다른 적합한 알코올을 사용하여 생성될 수 있다.

[0343] 본 발명의 구현예에 따르면, 복수의 상이한 샘플에서 복수의 분석물을 검출하기 위한 방법에 사용되는 상기 라이브러리에서, 조립된 마이크로파티클의 복수의 상이한 개별 서브세트가 존재하고,

[0344] 각 서브세트는

[0345] - 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 포함되거나, 이와 달리 결합된 별개의 표지 성분을 가진다; 그리고

[0346] 여기서, 조립된 마이크로파티클의 상기 복수의 개별 서브세트에서, 조립된 마이크로파티클의 개별 서브세트의 상이한 클래스가 있고, 상기 클래스 각각은 마이크로파티클의 여러 서브세트를 포함하고, 각 클래스는 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약 및 동일한 분석물-특이 시약이 부착된 한 클래스 내의 마이크로파티클의 모든 서브세트를 갖고; 각 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적이다; 그리고

[0347] 그 결과 상기 라이브러리에서, 조립된 마이크로파티클의 상기 복수의 상이한 개별 서브세트는

[0348] - 각각의 서브세트의 상기 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 포함되거나 이와 달리 연관된 각각의 표지 성분에 의하여 구별되고; 그리고

[0349] 마이크로파티클의 각각의 개별 서브세트는 마이크로파티클 서브세트의 한 클래스의 일부를 형성하고;

[0350] 각각의 서브세트는 상기 각각의 표지 구성요소 및 상기 각각의 분석물-특이적 시약에 의해 명확하게 정의되고 식별 가능하며; 그리고

[0351] 그 결과 마이크로파티클 서브세트의 상기 상이한 클래스는, 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 각각의 분석물-특이적 시약에 의해 상이하고; 그리고 상기 상이한 클래스 각각은 마이크로파티클의 수개의 서브세트를 포함하는데, 하나의 클래스 내의 이들 모든 서브세트들은 동일한 분석물-특이적 시약이 부착된 것이다.

[0352] 그러한 라이브러리가 복수의 상이한 샘플에서 복수의 분석물을 검출하기 위한 방법에 사용되는 경우, 그러한 라이브러리 내에는 조립된 마이크로파티클의 복수의 개별 서브세트가 존재한다는 점에 주목해야 하는데, 여기서 조립된 마이크로파티클의 상기 복수의 개별 서브세트 내에, 조립된 마이크로파티클의 개별 서브세트의 서로 다른 하위 라이브러리가 있으며, 상기 하위 라이브러리 각각은 다른 샘플을 조사하는 데 사용된다. 상기 하위 라이브러리 각각은 조립된 마이크로파티클의 여러 서브세트를 포함하고 하위 라이브러리 내의 각 서브세트는 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 갖는다.

[0353] 이러한 라이브러리는 구현예 13에 설명되어 있다.

[0354] 본 발명의 일부 구현예에 따른 마이크로파티클의 특히 유용한 하나의 특징은, 이들이 또한 분석물(들)이 다음에 결합하는 것에 의하여 샘플로부터의 분석물(들)의 농축을 촉진할 수 있다는 것이다:

[0355] (i) 마이크로파티클에 결합된 분석물-특이적 시약;

[0356] (ii) 상기 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하거나 상기 폴리머 매트릭스인 것인 폴리머 또는 폴리머 혼합물;

[0357] (iii) 상기 다공성 폴리머 매트릭스에 고정된 하나 이상의 이온화가능한 그룹 또는 복수의 이온화가능한 그룹, 상기 이온화가능한 그룹(들)은 상기 전구체-마이크로파티클 또는 마이크로파티클을 둘러싼 주변 조건에 따라 그(들)의 전하(들)를 변경할 수 있음;

[0358] (iv) 상기 다공성 폴리머 매트릭스 상에 고정된 하나 이상의 하전된 그룹, 또는 복수의 하전된 그룹;

[0359] (v) (i) - (iv) 중 어느 하나의 조합.

- [0360] 그리고 따라서 샘플에서 분석물/표적의 농축, 정리 및 검출/정량을 위한 수단으로서 사용될 수 있다.
- [0361] 샘플로부터 분석물의 농축을 촉진하기 위해 실제로 사용될 수 있는 마이크로파티클에 결합된 분석물-특이적 시약의 전형적인 예(즉, 위의 옵션 (i))는 항체 또는 항체 단편; 수용체, 수용체 단편 및 친화성 단백질과 같이 분석물 또는 분석물 복합체에 특이적으로 결합할 수 있는 비항체 단백질이다.
- [0362] 추가 측면에서, 본 발명은 수성 샘플에서 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0363] - 다음을 임의의 순서로 제공하는 단계:
- [0364] · 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 수성 샘플;
- [0365] · 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위해 필수적인 시약을 포함하는 일반 검출 조성물;
- [0366] · 본 발명의 상기 정의된 구현예들에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리, 여기서 상기 마이크로파티클에 부착된 상기 분석물-특이적 시약(들)은 그것이(그들이) 상기 관심 분석물에 특이적으로 결합하거나 또는 이와 반응할 수 있도록 선택됨;
- [0367] - 임의로, 상기 수성 샘플과 상기 일반 검출 조성물을 혼합하는 단계;
- [0368] - 상기 수성 샘플을 조립된 마이크로파티클의 상기 라이브러리와 함께 배양하는 단계, 이에 의하여 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 상기 마이크로파티클의 공극 부피 내에 수성 샘플을 흡수하고, 그리고 임의로 상기 샘플 내에 관심 분석물이 존재하는 경우에는 이에 결합하는 것이 허용된다;
- [0369] - 임의로, 상기 마이크로파티클의 라이브러리를 세척하는 단계;
- [0370] - 마이크로파티클에 상기 일반 검출 조성물을 가하는 단계, 만일 상기 수성 샘플이 상기 일반 검출 조성물과 사전에 혼합되지 않은 경우에는
- [0371] - 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 비-수상으로 이전시키고, 개별 조립된 마이크로파티클(들)을 둘러싸는 임의의 수상을 제거하고, 이에 의하여 상기 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간을 생성하고, 이 반응 공간들은 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피(들) 내로 제한된다;
- [0372] -임의로, 외부 트리거를 적용함으로써 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 방출하고;
- [0373] -상기 관심 분석물의 검출 반응을 수행하고;
- [0374] - 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량한다.
- [0375] 그러한 방법은 특히, 관심 분석물(들)이 핵산(핵산들)이고, 검출 반응이 핵산 증폭 반응일 때 유용하다.
- [0376] 추가의 측면에서, 본 발명은 수성 샘플 내 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 다음 단계들을 포함한다:
- [0377] - 다음을 임의의 순서로 제공하는 단계:
- [0378] · 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 수성 샘플;
- [0379] · 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위해 필수적인 시약을 포함하는 제1 검출 조성물;
- [0380] · 검출 시약을 포함하는 제2 검출 조성물
- [0381] · 본 발명의 상기 정의된 구현예들에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리, 여기서 상기 마이크로파티클에 부착된 상기 분석물-특이적 시약(들)은 그것이(그들이) 상기 관심 분석물에 특이적으로 결합하거나 또는 이와 반응할 수 있도록 선택됨;
- [0382] - 임의로, 상기 수성 샘플과 상기 제1 검출 조성물을 혼합하는 단계;
- [0383] - 상기 수성 샘플을 조립된 마이크로파티클의 상기 라이브러리와 함께 배양하는 단계, 그리고 만일 상기 수성 샘플이 상기 제1 검출 조성물과 사전에 혼합되지 않은 경우에는, 상기 제1 검출 조성물과도 배양하고, 이에 의하여 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 상기 마이크로파티클의 공극 부피 내에 상기 수성 샘플 및 상기 제1 검출 조성물을 흡수하고, 그리고 임의로 상기 샘플 내에 관심 분석물이 존재하는 경우에는 이에 결합하는 것이 허용된다;

- [0384] - 임의로, 흡수되지 않거나 반응하지 않은 임의의 제1 검출 조성물을 제거하기 위해 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 추가로 세척하는 단계;
- [0385] - 흡수된 수성 샘플을 함유하는 조립된 마이크로파티클의 상기 라이브러리를 상기 제2 검출 조성물과 배양하는 단계, 이에 의하여 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 상기 제2 검출 조성물을 흡수하는 것을 허용함;
- [0386] - 임의로, 흡수되지 않거나 반응하지 않은 제2 검출물을 제거하기 위해 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 추가로 세척하는 단계;
- [0387] - 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 비-수상으로 전달하고 개별 조립된 마이크로파티클(들)을 둘러싸는 임의의 수상을 제거하는 단계, 이에 의하여 상기 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피로 제한됨; 여기서, 바람직하게는, 상기 비-수상으로 전달하는 단계는 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리가 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양된 직후에 수행된다;
- [0388] - 임의로, 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 방출하는 단계;
- [0389] 상기 검출 시약을 검출 및/또는 정량화함으로써 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량화하는 단계.
- [0390] 이러한 방법은 관심 있는 분석물(들)이 단백질(단백질들) 또는 기타 비핵산(들)이고 검출 반응이 면역화학 검출일 때 특히 유용하다.
- [0391] 추가의 측면에서, 본 발명은 또한 수성 샘플에서 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 다음 단계를 포함하는 것이다:
- [0392] - 다음을 임의의 순서로 제공하는 단계:
 - [0393] · 관심 분석물을 포함하는 것으로 의심되거나 알려진 수성 샘플;
 - [0394] · 분석물의 화학적 또는 생화학적 검출 반응을 수행하기 위해 필요한 시약을 포함하는 제1 검출 조성물;
 - [0395] · 검출 시약을 포함하는 제2 검출 조성물;
 - [0396] · 본 발명의 상기 정의된 구현에 들 중 어느 하나에 따른 조립된 마이크로파티클의 라이브러리, 여기서 상기 마이크로파티클에 부착된 상기 분석물-특이적 시약(들)은, 그것이(그들이) 상기 관심 분석물에 특이적으로 결합하거나 또는 이와 반응할 수 있도록 선택되는 것임;
- [0397] - 임의로, 상기 수성 샘플과 상기 제1 검출 조성물을 혼합하는 단계;
- [0398] - 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하고, 그리고 상기 수성 샘플이 상기 제1 검출 조성물과 미리 혼합되지 않은 경우에는, 상기 제1 검출 조성물과도 배양하는 단계, 이에 의하여 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 수성 샘플 및 상기 제1 검출 조성물을 상기 마이크로파티클의 공극 부피 내에 흡수하고, 그리고 임의로 상기 샘플 내에 관심 분석물이 존재하는 경우에는 이에 결합하는 것이 허용됨;
- [0399] - 임의로, 흡수되지 않거나 반응하지 않은 임의의 제1 검출 조성물을 제거하기 위해 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 세척하는 단계;
- [0400] - 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양함으로써, 상기 마이크로파티클의 라이브러리가 상기 제2 검출 조성물을 흡수하도록 하는 단계;
- [0401] - 임의로, 흡수되지 않거나 반응하지 않은 임의의 제2 검출 조성물을 제거하기 위해 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 추가로 세척하는 단계;
- [0402] - 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 비-수상으로 전달하고 개별 조립된 마이크로파티클(들)을 둘러싸는 임의의 수상을 제거하는 단계, 이에 의하여 상기 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피(들)로 제한됨;
- [0403] - 임의로, 외부 트리거를 적용하여 상기 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 방출하는 단계;
- [0404] - 상기 관심 분석물을 검출 반응을 수행하는 단계; 및
- [0405] - 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량화하는 단계.

- [0406] 이러한 방법은 관심 있는 분석물(들)이 단백질(단백질들) 또는 기타 비-핵산(들)이고 분석물(들)의 검출이 증폭 반응과 결합된 면역화학 검출에 의해 발생하는 경우에 특히 유용하다. 이러한 반응의 전형적인 예는 면역-PCR-반응이다.
- [0407] 본 발명에 따른 마이크로파티클 라이브러리는 사용자의 필요에 따라 맞춤 제작될 수 있고 매우 다양한 상이한 방법으로 사용될 수 있다:
- [0408] 일 구현예에 따르면,
- [0409] - 이 방법은 예컨대 다양한 환자들로부터 유래한, 다수의 수성 샘플에서 단일 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법이다,
- [0410] - 상기 방법에서, 관심 있는 분석물을 함유하는 것으로 알려지거나 의심되는 다수의 상이한 수성 샘플, 예컨대 다양한 환자들로부터 유래한 샘플이 제공된다,
- [0411] - 상기 방법에서 제공되는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리는 구현예 11에 따른 라이브러리이며, 여기서 이러한 라이브러리에는, 제공되고 시험될 상이한 수성 샘플만큼 많은 또는 적어도 그만큼 많은, 제공되는 마이크로파티클의 개별 서브세트가 존재하고, 여서 상기 개별 서브세트 모두는 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 동일한 분석물-특이적 시약을 갖는 것이고, 상기 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적이다;
- [0412] - 상기 조립된 마이크로파티클 라이브러리와 함께 상기 수성 샘플을 배양하는 상기 단계에서, 상기 상이한 수성 샘플 각각은 상기 라이브러리의 마이크로파티클의 개별 서브세트와 별도로 배양된다;
- [0413] - 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 상기 라이브러리를 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 상기 단계에서, 상기 라이브러리의 마이크로파티클의 상기 별개의 서브세트 각각은 상기 제2 검출 조성물과 별도로 배양된다;
- [0414] - 상기 라이브러리를 비-수상으로 전달하는 상기 단계는 마이크로파티클의 각 서브세트에 대해 개별적으로 수행되고, 즉 마이크로파티클의 별개의 서브세트 각각은 비-수상 속으로 별개로 전달되고, 상기 개별 마이크로파티클을 둘러싸는 수상은 각각의 서브세트에 대해 별개로 제거되고, 이에 의하여, 각각의 서브세트에 대하여 별개로, 상기 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피(들)로 제한된다,
- [0415] 여기서, 상기 방법은 상기 라이브러리를 비-수상 속으로 전달하는 단계 이후에, 상기 분석물의 검출 반응을 후속적으로 수행하기 전에, 그리고 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량화하기 전에, 상기 비-수상 내의 모든 개별 서브세트의 상기 복수의 격리된 반응 공간들을 함께 혼합하는 단계를 더 포함한다.
- [0416] 다른 구현예에서,
- [0417] - 이 방법은 단일 수성 샘플에서 여러 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법이다.
- [0418] - 상기 방법에서, 다수의 관심 분석물을 함유하는 것으로 알려지거나 의심되는 단일 수성 샘플이 제공되며,
- [0419] - 상기 방법에서 제공되는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리는 구현예 12에 따른 라이브러리이고, 여기서 이러한 라이브러리에는, 검출될 상이한 관심 분석물만큼 많은 또는 적어도 그만큼 많은 제공되는 마이크로파티클의 별개의 서브세트가 존재하고, 상기 별개의 서브세트는, 상기 서브세트의 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 갖는 것이고; 각 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적이다;
- [0420] - 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클 라이브러리와 함께 배양하는 상기 단계에서, 상기 수성 샘플은 상기 라이브러리의 마이크로파티클의 상기 개별 서브세트 모두와 함께 배양된다;
- [0421] - 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 상기 라이브러리를 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 상기 단계에서, 상기 라이브러리의 마이크로파티클의 상기 개별 서브세트 모두가 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양된다;
- [0422] - 상기 라이브러리를 비-수상 속으로 전달하는 상기 단계는 마이크로파티클의 모든 서브세트에 대해 함께 수행되고, 즉 마이크로파티클의 모든 서브세트가 함께 비-수상 속으로 전달되고, 개별 마이크로파티클을 둘러싸는 수상이 제거되어, 이에 의하여 상기 다수의 분석물을 검출 및/또는 정량화하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이

생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피(들)로 제한된다.

- [0423] 또 다른 구현예에서,
- [0424] - 이 방법은 복수의 수성 샘플에서 다중 분석물을 검출 및/또는 정량하는 방법이다,
- [0425] - 상기 방법에서, 다수의 관심 분석물을 함유하는 것으로 알려지거나 의심되는 다수의 상이한 수성 샘플, 예컨대 다양한 환자로부터 유래한 샘플이 제공된다,
- [0426] - 상기 방법에서 제공되는 조립된 마이크로파티클의 라이브러리는 구현예 13에 따른 라이브러리이고, 여기서 이러한 라이브러리 내에는 조립된 마이크로파티클의 별개의 서브세트의 서로 다른 클래스가 존재하고, 상기 각각의 클래스는 마이크로파티클의 여러 서브세트를 포함하고, 상기 클래스 각각은 상기 마이크로파티클의 다공성 매트릭스에 부착된 상이한 분석물-특이적 시약을 갖고, 그리고 하나의 클래스 내의 마이크로파티클의 모든 서브세트는 부착된 동일한 분석물-특이적 시약을 갖고; 각 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적이고, 여기서, 상기 방법에서, 상기 라이브러리를 제공하는 단계에서, 다음이 존재한다:
- [0427] · 검출해야 할 상이한 분석물 만큼 많거나 또는 적어도 그만큼 많은 제공되는 마이크로파티클의 별개의 서브세트의 상이한 클래스,
- [0428] · 제공되고 시험될 수성 샘플이 있는 만큼 많거나 또는 적어도 그만큼 많은 각각의 클래스 내에서 제공되는 상이한 마이크로파티클 서브세트
- [0429] · 시험될 상이한 수성 샘플에 검출할 관심 있는 상이한 분석물의 수를 곱한 만큼 많거나 또는 적어도 그만큼 많은, 라이브러리 내에 제공되는 상이한 마이크로파티클 서브세트,
- [0430] - 상기 수성 샘플을 상기 조립된 마이크로파티클의 라이브러리와 함께 배양하는 상기 단계에서, 정확히 하나의 수성 샘플이 각 클래스로부터 유래한 마이크로파티클의 정확히 하나의 서브세트와 함께 배양되고, 각 수성 샘플은 상기 라이브러리 내의 마이크로파티클 클래스만큼 많은 상이한 클래스로부터 유래한 상이한 마이크로파티클 서브세트와 함께 배양됨,
- [0431] - 흡수된 수성 샘플을 포함하는 조립된 마이크로파티클의 상기 라이브러리를 제2 검출 조성물과 함께 배양하는 상기 단계에서, 하나의 개별 수성 샘플이 이전에 함께 배양되었던 마이크로파티클의 상이한 클래스로부터 유래한 조합된 서브세트가 상기 제2 검출 조성물과 함께 배양된다,
- [0432] - 상기 라이브러리를 비-수상 속으로 전달하는 상기 단계는 각각의 수성 샘플에 대해 개별적으로 수행된다, 즉 하나의 개별 수성 샘플이 이전에 배양된 마이크로파티클의 조합된 서브세트와 함께 비-수상 속으로 전달되고, 그리고 개별 마이크로파티클을 둘러싸고 있는 수상이 제거되고, 이에 의하여 각각의 수성 샘플에 대해 개별적으로, 상기 다수의 분석물을 검출하기 위한 복수의 격리된 반응 공간이 생성되며, 이 반응 공간은 수상을 포함하고 상기 마이크로파티클의 상기 공극 부피로 제한됨,
- [0433] 여기서 상기 방법은, 상기 라이브러리를 비-수상 속으로 전달하는 상기 단계 후에, 상기 관심 분석물의 검출 반응을 후속적으로 수행하기 전에, 그리고 상기 관심 분석물을 검출 및/또는 정량하기 전에, 상기 비-수상의 모든 개별 샘플의 상기 복수의 격리된 반응 공간들을 함께 혼합하는 단계를 추가적으로 바람직하게 포함한다.
- [0434] 상기 언급된 방법에서의 정량화와 관련하여, 일부 구현예에서, 상기 관심 분석물을 검출하고 정량하는 상기 단계에서, 상기 분석물의 정량은 하기로부터 선택된 방법에 의해 수행된다:
- [0435] a) 디지털 핵산 증폭, 특히 디지털 중합효소 연쇄 반응(PCR);
- [0436] b) 실시간 정량적 핵산 증폭, 특히 실시간 중합효소 연쇄 반응(PCR);
- [0437] c) 면역화학 검출 방법, 특히 디지털 면역분석과 같은 디지털 면역화학 검출 방법, 예를 들어 디지털 효소-결합된 면역흡착 분석(ELISAs);
- [0438] d) 면역 중합효소 연쇄 반응과 같은 핵산 증폭과 결합된 면역화학 검출 방법; 특히 디지털 면역-PCR;
- [0439] 여기서 정량은 관심 분석물이 핵산인 경우 방법 a) 또는 b), 또는 a)와 b)의 조합을 사용하여 수행된다; 분석물이 단백질, 펩티드 또는 기타 비-핵산 분석물인 경우, 방법 c) 또는 d) 중 어느 하나를 사용하여 정량을 수행한다.
- [0440] 특히 분석물(들)의 정량화와 관련하여, 본 발명의 다양성은 또한 본 발명에 따른 마이크로파티클 라이브러리의

구현예가 하나의 샘플 내에서 다중 분석물의 병렬(다중화된) 초-고감도 검출을 허용한다는 사실에 의해 반영된다. 특히 이것은 구현예 12 내지 13 중 어느 하나에 따른 라이브러리와 함께 작동한다. 보다 구체적으로, 이것은 특히 구현예 12에 따른 라이브러리와 함께 작동한다(이는 샘플 내에서 다중 분석물을 검출 및/또는 정량하기 위한 라이브러리임). 각 마이크로파티클은 확립된 디지털 검출 기술과 유사한 단일 분자 검출을 허용하는 개별 신호 증폭 공간 또는 표적 증폭 공간을 나타내는 반면에, 마이크로파티클은 단일 샘플 내 동시에 다중의 상이한 검출물들(즉, 다중 분석물 종들)(>1)을 검출 및 심지어 정량하기 위하여 사용될 수 있는데, 이에 의하여 각각의 상이한 분석물에 대한 도달 가능한 이론적 검출 한계는 다음 공식에 의하여 결정될 수 있다:

$$N = \log\left(\frac{B-1}{B}\right)(1-P) \quad \text{또는} \quad P(B, N) = 1 - \left(1 - \frac{1}{B}\right)^N$$

[0441]

[0442]

여기서,

[0443]

B = 각각의 유형(또는 "서브세트")이 하나의 개별 분석물의 검출에 특이적인 다양한 유형의 마이크로파티클의 수

[0444]

N = 샘플 내 하나의 특정 분석물 종(species)의 분석물 분자 수

[0445]

P = 확률, 만일 B(=수)의 상이한 유형의 마이크로파티클이 사용되고 그리고 샘플에 존재하는 상이한 분석물 종의 수가 $\leq B$ 인 경우, 그러한 분석물에 대해 특정한 분석물 종이 각각의 마이크로파티클 유형 내에 실제로 존재하는 확률.

[0446]

공식은 샘플로 조사한 모든 마이크로파티클에 걸쳐서 분석물 분자의 이항(binomial) 분포로부터 비롯된다. 검출 한계는 N으로 표시되며, 여기서 P는 95%로 설정된다. 명확성을 위해 공식은 분석물의 존재 및 양에 대해 분석할 때 샘플내의 분석물의 분포를 고려하지 않는다.

[0447]

또한, 본 발명에 따른 마이크로파티클 라이브러리의 구현예는 정량적 디지털 및 정량적 실시간 분석 접근법을 연결함으로써 분석물 정량화를 위한 우아한 접근법을 가능하게 한다. 이 진술은 마이크로파티클에 채택되는 임의의 종류의 신호 또는 표적 증폭 분석에 대해 사실이지만, PCR 증폭은 본 발명에 따른 방법의 구현예를 사용하여 표적의 정량화에 대한 접근을 설명하기 위한 예로서 역할을 할 수 있다. 표적 분자의 정량은 디지털 PCR(dPCR)로 수행하는 것이 바람직한데, 왜냐하면 이 방법은 실-시간 정량적 PCR(qPCR)보다 더 민감하고 정확한 정량을 허용하기 때문이다. 디지털 PCR의 단점은 하나의 샘플/분석물에 특이적인 마이크로파티클의 수에 따라 달라지는 측정 범위의 고유한 한계이다. 이러한 한계를 극복하기 위해, 본 발명은 디지털 PCR 측정 범위를 상회하는 표적 농도에 대한 실-시간 정량적 PCR로 디지털 PCR의 분석을 보완한다. 이 접근 방식을 구현하려면 PCR 종료 시와 실-시간 PCR의 모든 주기 동안 형광 이미지를 수집해야 한다. 반응기 챔버의 각 마이크로파티클의 형광 수준을 정량화하기 위하여, 획득된 모든 이미지는 이미지 분석 알고리즘에 의해 분석된다. 분할 알고리즘은 밝은 디스크 모양의 마이크로파티클 개체를 어두운 배경에서 분리한다. 이 분할 정보를 기반으로, 최종적으로 원이 마이크로파티클 개체 윤곽에 맞춰져 평균 마이크로파티클 형광 및 마이크로파티클 부피를 추정할 수 있다. 실-시간 PCR 이미지의 분석에는 각각의 개별 마이크로파티클 내에서 반응 과정 동안 형광을 모니터링할 수 있도록 연속 이미지에서 마이크로파티클 위치 추적이 포함된다.

[0448]

적용된 정량화 접근 방식의 선택은 증폭 반응 후 음성으로 남아 있는 마이크로파티클의 수/비율을 기반으로 하는데, 즉 증폭을 표시하지 않는다. 이 정보는 디지털 PCR 데이터로부터 가져온다. 음성 마이크로파티클의 수/비율에 대한 사전 정의된 하한이 초과되는 경우(즉, 음성 마이크로파티클의 수/비율이 사전 정의된 하한보다 높은 경우), 종말점 푸아송(Poisson) 분석이 적용될 수 있다. 그렇지 않으면, 즉 음성 마이크로파티클의 수/비율이 미리 정의된 하한보다 낮은 경우에는, 모든 주기 동안 수집된 실-시간 정량적 PCR 데이터를 사용하여 실-시간 분석이 수행된다. 푸아송(Poisson)으로 여전히 강력한 정량화를 허용하는 음의 마이크로파티클 비율에 대한 합리적인 하한은 0.5%이다. 마이크로파티클당 표적의 해당 평균 수는 5.3이다. 형광 이미지 상에서 가능한 인공물(artefacts)을 고려하기 위해 추가 요구 사항은, 예컨대 50의 총 음의 마이크로파티클 수에 대한 하한이 될 수 있다.

[0449]

종말점 푸아송 분석은 음의 마이크로파티클의 비율을 결정하고 양의 마이크로파티클이 하나 이상의 표적 분자를 포함할 수 있다는 사실을 설명하기 위해 푸아송 보정을 적용하는 것에 의하여 수행된다. 양성 마이크로파티클과 음성 마이크로파티클을 구별하는 임계값은 음성으로 알려진 마이크로파티클의 형광 신호 강도로부터 직접 추정된다. 가능한 마이크로파티클 부피 변화는 마이크로파티클 부피 특정 푸아송 보정을 수행하는 것에 의하여 정량

화에 고려된다. 측정 사이의 총 마이크로파티클 부피의 가능한 변화 또한 알고리즘에 의해 수정된다.

[0450]

목표 농도가 디지털 PCR의 측정 범위를 초과하는 경우, 실-시간 분석은 각 단일 마이크로파티클의 형광 신호 과정에 비선형 함수를 맞춘다. 맞춰진 비선형 모델은 시그모이드 구성요소가 증폭 역학을 나타내고 선형 구성요소가 신호의 기준선을 나타내는 선형 함수와 시그모이드를 결합한다. 사이클 임계값(Ct)은 시그모이드 함수의 정의 값에서 접선과 최대 2차 미분 및 기준선의 교차점으로부터 계산된다. 마이크로파티클당 각각의 표적 수는 보정 데이터 세트를 사용하여 계산된다.

도면의 간단한 설명

[0451]

이러한 정량화 원리는 도 12 및 13과 실시예 3에도 설명되어 있다.

또한, 여기서 도면에 대한 참조가 있다.

도 1은 조립된 전구체-마이크로파티클 라이브러리(도면의 왼쪽 부분)를 생성하고, 후속적으로 조립된 마이크로파티클 라이브러리(도면의 오른쪽 부분)를 생성하는 프로세스의 구현예를 보여준다. 도면의 왼쪽 부분에서, 조립된 전구체-마이크로파티클이 생성되는데, 이들 각각은 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 결합된 각각의 표지 구성요소를 갖는다; 그리고 그도면의 왼쪽 부분에 있는 이 프로세스는 다른 표지 구성요소를 사용하여 상이한 조립된 전구체-마이크로파티클에 대해 반복되어, 조립된 전구체-마이크로파티클의 상이한 서브세트를 생성한다. 그 결과는 조립된 전구체-마이크로파티클의 라이브러리이며, 여기서 상기 라이브러리 내에는 조립된 마이크로파티클의 적어도 2개의 개별 서브세트, 또는 가능하게는 또한 조립된 마이크로파티클의 3개 또는 그 이상의 개별 서브세트가 있으며, 각각의 서브세트는 상기 서브세트 내 상기 전구체 마이크로파티클에 부착되거나, 그 안에 함유되거나 또는 이와 달리 결합된 그것의 구별되는 표지 구성요소를 갖고, 그 결과 조립된 전구체-마이크로파티클의 상기 적어도 2개 또는 그 이상의 개별 서브세트는 각각의 서브세트에 부착되거나 또는 그 안에 함유된 각각의 표지 구성요소에 의하여 구별된다. 도면의 오른쪽 부분에는 조립된 전구체-마이크로파티클의 각 서브세트에 분석물 특이적 시약(Analyte-Specific Reagent; ASR)이 장착되어 있다. 만일 마이크로파티클 라이브러리가 상이한 분석물들을 검출하는 데 사용되는 경우, 마이크로파티클들의 각 서브세트에 부착된 각각의 분석물-특이적 시약은 상이하다. 만일 라이브러리가 동일한 분석물의 검출에 사용되지만 복수의 샘플이 있는 경우 마이크로파티클들의 상이한 서브세트들에 부착된 각각의 분석물-특이적 시약은 동일하다. 조립된 마이크로파티클들의 얻어진 라이브러리는 매우 다재다능하며 따라서 다양한 요구에 따라 준비되고 사용될 수 있다. 그것은 단일 샘플에서 여러 분석물들을 검출하는 데 사용될 수도 있고, 복수의 샘플들에서 단일 분석물을 검출하는 데 사용할 수도 있다.

도 1에 도시된 구현예에서, 분석물-특이적 시약(ASR)의 결합은 시약 결합 구성요소를 통해 발생하며, 이는 위에 추가로 열거된 가능성 (i)-(v) 중 하나일 수 있다. 예로서, 가장 단순한 형태에서, 시약 결합 구성요소는 마이크로파티클의 다공성 폴리머 매트릭스를 형성하거나 폴리머 매트릭스인 폴리머 또는 폴리머 혼합물일 수 있다. 다른 구현예에서, 이는 다공성 폴리머 매트릭스에 부착된 특정 시약 결합 분자일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 이는 이온화가능한 그룹 또는 다수의 이온화가능한 그룹들일 수 있거나, 또는 이는 다공성 폴리머 매트릭스 상에 고정된 하전된 그룹 또는 다수의 하전된 그룹들일 수 있거나, 또는 앞의 것 임의의 조합일 수도 있다. 바람직한 구현예에서, 시약-결합 구성요소는 분석물-특이적 시약이 전구체이 되는 결합체(a binding entity) 물질과 순차적으로 상호작용하는 다공성 폴리머 매트릭스에 부착된 시약 결합 분자이다. 이 구현예의 예는 하기에 추가로 제시되며, 여기서 예로서 다공성 폴리머 매트릭스에 부착된 시약 결합 분자는 스트렙타비딘-분자 또는 스트렙타비딘 관련 분자이다. 분석물-특이적 시약의 대응물, 즉 시약 결합 분자에 결합하는 결합체는 스트렙타비딘 또는 아비딘에 대한 가역적 부착을 허용하는 데스티오비오틴(desthiobiotin) 또는 유사한 분자이다. 결합체(분석물-특이적 시약(ASR) 상의)과 시약 결합 분자(다공성 폴리머 매트릭스 상의) 사이의 결합이 외부 트리거의 적용, 예를 들어 마이크로파티클이 노출되는 온도의 변화를 통하여 해제되는 것에서 가역성이 달성될 수 있다. 이러한 구현예의 많은 상이한 변형이 가능하고 상상할 수 있다는 것은 당업자에게 명백하다.

도 2는 전구체-마이크로파티클과 분석물-특이적 시약의 결합에 의하여 그로부터 생성되는 조립된 마이크로파티클 사이의 관계를 개략적으로 설명하는 도식의 구현예를 나타낸다. 다공성 폴리머 매트릭스를 갖는 조립된 전구체-마이크로파티클이 제공된다. 다공성 고분자 매트릭스는 수성 샘플을 수용하고 분석물의 특정 검출을 위한 반응 공간을 제공하기 위한 빈 공간을 갖는다. 조립된 전구체-마이크로파티클은 전구체-마이크로파티클에 대한 분석물-특이적 시약의 부착, 바람직하게는 가역적 부착을 허용하는 시약 결합 성분을 추가로 포함한다. 또한, 전구체-마이크로파티클은 표지 구성요소가 전구체-마이크로파티클(및 후속적으로 생성된 조립된 전구체-마이크로파티클 뿐만 아니라 전구체-마이크로파티클에 부착되는 분석물-특이적 시약)을 식별할 수 있도록 하는 부착된

표지 구성요소를 갖는다. 또한 조립된 전구체-마이크로파티클에 부착되는 분석물-특이적 시약(ASR)이 표시된다. 예를 들어, 이러한 분석물-특이적 시약은 한 쌍의 핵산 프라이머 및 선택적으로 프로브일 수 있는데, 만일 각각의 마이크로파티클이 후속적으로 노출되는 샘플에 존재하는 경우에는, 이들은 특정 (핵산) 분석물에 특이적이고 이러한 분석물의 증폭 및 검출을 허용한다. 도면에는 모든 ASR이 유사하게 표시되어 있지만, 이러한 프라이머 쌍과 선택적으로 프로브는 하나의 분석물-특이적 시약으로서 자격이 있는 것으로 간주됩니다. 분석물-특이적 시약에 대한 다른 예는 특정 분석물에 특이적인 (일차) 항체일 수 있다.

도 3A는 본 발명의 구현예에 따라 마이크로파티클 라이브러리가 제공되고 이러한 수성 샘플에 노출되는, 수성 샘플에서 관심 분석물을 검출하는 방법에 대한 예시적인 도식의 구현예를 나타낸다. 라이브러리는 샘플 및 증폭/검출 시약을 포함하는 검출 조성물에 노출(또는 "배양")된다. 이러한 노출의 결과로, 마이크로파티클 라이브러리는 마이크로파티클의 공극 부피 내에 수성 샘플 및 검출 조성물을 흡수하고, 선택적으로 샘플에 관심 있는 분석물(들)이 존재하는 경우에는, 이에 결합하거나 풍부하게 하는 것이 허용된다. 라이브러리 내의 마이크로파티클에 부착된 다양한 분석물-특이적 시약의 유형 및 수에 따라 하나 또는 여러 개의 다른 분석물이 검출될 수 있다. 일단 라이브러리가 샘플 및 검출 조성물에 노출되면, 라이브러리는 비-수성 상으로 이동되고, 예를 들어 마이크로파티클에 기계적 힘(들)을 가함으로써 개별 조립된 마이크로파티클을 둘러싼 수상이 제거된다. 그러나 각 마이크로파티클은 여전히 각각의 공극 부피 내부에 수성상을 가지고 있다. 비-수성상으로의 이러한 이동 및 임의의 주변 수상의 제거의 결과로, 반응 공간이 분석물(들)을 검출할 수 있도록 하는 "반응기"로 작용하는 복수의 절연된 반응 공간이 생성되고, 그리고 반응 공간은 수상을 포함하고 각각의 마이크로파티클의 공극 부피(들)로 제한된다. 각각의 마이크로파티클의 정확한 성질에 따라, 이러한 마이크로파티클이 겔-졸 전이(즉, 고체 또는 준-고체 겔 상태에서부터 액체 가용성 상태로)와 같은 상 전이를 거치도록 하는 것이 바람직할 수 있으며, 이는 마이크로파티클에 부착된 각각의 분석물-특이적 시약(들)의 방출을 촉발할 것이다. 이것은 온도 변화, pH 변화, 특정 화학 물질의 첨가 등과 같은 외부 트리거를 적용함으로써 발생할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 이러한 외부 트리거는 온도 상승이다. 겔-졸 전이는 또한 전형적으로 마이크로파티클 현탁액(액체 중 고체)을 액상(액체 중 액체) 내의 미세 액적(이전에는 고체 마이크로파티클)의 적절한 에멀전으로 변형시키는 결과를 야기할 것이다. 일단 비-수상으로 이동되고, 그리고 선택적으로 분석물-특이적 시약(들)이 방출된 각각의 마이크로파티클은, 관심 분석물(들)의 검출 반응을 겪는다. 각각의 마이크로파티클은 비수성상 내에서 격리되기 때문에, 이러한 마이크로파티클에 의해 제공되는 상이한 마이크로파티클/반응 공간 사이에는 혼선이 없다. 관심 분석물의 유형 및 분석물-특이적 시약(들)에 따라, 그와 같은 검출 반응은 증폭 반응(관심 분석물(들)이 핵산(들)인 경우)이거나 또는 면역화학 반응일 수 있다(예컨대 관심 있는 분석물(들)이 단백질인 경우). 그 후, 관심 분석물은 개별 마이크로파티클 내에서 검출될 수 있다. 대안적으로, 검출 반응은 또한 면역-증폭 반응일 수 있는데, 여기서 첫 번째 단계에서는 1차 항체가 분석물에 결합하는 데 사용되고, 그리고 두 번째 단계에서 적절한 프라이머를 사용하여 증폭될 수 있는 올리고-뉴클레오타이드 태그에 부착된 것인 2차 항체를 사용하여 샌드위치가 형성될 수 있다. 각각의 마이크로파티클은 특정 표지 성분을 가지고 있기 때문에, 특정 분석물의 존재 및 그와 관련된(또는 생성된) 신호를 신호가 검출된 각각의 마이크로파티클의 표지 구성요소에 할당하는 것이 가능하다.

도 3B는 본 발명의 구현예에 따라 마이크로파티클 라이브러리가 제공되고 마이크로파티클에 대한 분석물의 결합을 선호하는 조건 하에서 이러한 수성 샘플에 노출되는, 수성 샘플 내에서 관심 분석물을 검출 및/또는 정량화하는 방법에 대한 예시적인 도식의 구현예를 보여준다. 결합된 분석물이 있는 마이크로파티클은 원치 않는 물질을 제거하기 위해 적절한 완충제로 세척할 수 있다. 이어서 라이브러리를 증폭/검출 시약을 포함하는 검출 조성물에 노출시킨다. 필요한 증폭/검출 시약을 포함하는 검출 조성물에 노출된 후, 라이브러리는 비-수상으로 전달되어 각 마이크로파티클 내에 절연된 반응 공간을 효과적으로 생성하고, 따라서 효과적으로 복수의 절연된 반응 공간을 생성한다. 각 마이크로파티클은 샘플과 필요한 증폭/검출 시약을 포함하는 수상을 포함하며 주변의 비-수상에 의해 다른 마이크로파티클과 분리된다. 이어서 증폭/검출 반응을 수행하고, 관심 분석물(분석물들)을 마이크로파티클 마다의 단위로 검출할 수 있다. 각각의 마이크로파티클은 그것의 고유한 표지 구성요소를 가지고 있기 때문에, 분석물이 각각의 마이크로파티클에 존재하는 경우에 생성되는 각각의 분석물-특이적 신호, 이러한 신호 및 분석물의 상응하는 존재는 개별 마이크로파티클의 각각의 표지 구성요소 및 그에 따른 개별 마이크로파티클에 할당될 수 있다.

도 4는 실시예 1에 상세히 기재된 바와 같이 코딩된 전구체-마이크로파티클 합성의 구현예를 나타낸다. 다르게 표지된 젤라틴 및 아가로스를 사용하여, 상이한 표지 구성요소를 갖는 아가로스/젤라틴 마이크로파티클이 생성된다. 왼쪽에 표시된 것은 젤라틴의 각각의 상이한 표지된 유형이다. 중간 사진에는 이렇게 생성된 서로 다르게 표지된 마이크로파티클의 이미지가 표시되고, 오른쪽에는 두 개의 개별 형광 채널에서 개별 마이크로파티클에 대해 얻은 형광 신호의 산점도 및 상이한 마이크로전구체-마이크로파티클의 가색(false color) 이미지가 표시되

는데, 그들은 그것들의 각각의 형광에 의해 검출될 것이다. 9가지 다른 유형의 전구체-마이크로파티클은 그들의 형광에 따라 별도의 입자 집단으로 명확하게 구별될 수 있다.

도 5는 프라이머 올리고뉴클레오타이드(올리고뉴클레오타이드가 분석물-특이적 시약으로 작용함)에 대한 적절한 결합체를 선택함으로써 이들이 본 발명의 구현예에 따라 제조된 스트랩타비딘 코팅된 마이크로파티클에 가역적으로 부착될 수 있음을 보여준다. 이 예에서, 마이크로파티클 상의 시약 결합 분자는 스트랩타비딘이고, 분석물-특이적 시약 상의 결합체는 비오틴 또는 데스티오비오틴이다. 데스티오비오틴(Desthiobiotin)은 가역적 부착을 허용하지만 비오틴은 그렇지 않다. 데스티오비오틴의 경우 부착의 가역적 특성을 입증하기 위해, 가교된 마이크로파티클을 바이오틴 태그된 형광 표지된 올리고뉴클레오타이드(패널 A) 또는 데스티오비오틴 태그된 형광 표지된 올리고뉴클레오타이드(패널 C)와 함께 배양했다("로딩" 단계). 배양("로딩")을 실온에서 수행하였다. 마이크로파티클을 세척하고 형광 이미지를 촬영했다. 두 이미지(왼쪽 및 중앙 상단 이미지, 패널 A 및 C)에서 마이크로파티클이 명확하게 보인다. 그 후 온도를 95°C까지로 높이고("변성" 단계) 마이크로파티클을 다시 세척한다. 비오틴 표지된 올리고뉴클레오타이드가 마이크로파티클에 결합된 상태로 남아 있는 반면(패널 B 내의 나머지 형광에 의하여 볼 수 있음), 데스티오비오틴 표지된 올리고뉴클레오타이드(및 이와 관련된 형광)는 분명히 처리에 의해 제거되었다(패널 D 내에서 형광 없음). 오른쪽의 막대 그래프(패널 E)는 가열 전후에 마이크로파티클로부터 얻은 신호를 정량적으로 나타낸 것이다.

따라서 이러한 가역적으로 결합하는 개체(예: 데스티오비오틴)를 사용함으로써 프라이머 올리고뉴클레오타이드가 마이크로파티클 매트릭스로부터 방출될 수 있음이 보여졌다. 이것은 비-수성 환경 내에서 마이크로파티클에 의해 생성된 액적 공간 내에서 고효율 증폭 반응에 바람직한 특징이다. 프라이머가 부착된 경우에도 어느 정도 증폭이 가능할 수 있지만, 최적의 증폭 반응 조건을 위해, 프라이머 올리고뉴클레오타이드는 이상적으로는 그 어느 매트릭스에도 결합되지 않아야 하고, 따라서 증폭 반응 전에 의도적으로 방출된다.

도 6은 본 발명의 구현예에 따라 제조된 마이크로파티클을 갖는 현미경-이미지를 나타낸다. 마이크로파티클은 항-CD45 항체로 코팅되었고 형광 염료 아크리딘 오렌지(Acridine Orange)로 염색된 전혈과 함께 배양되었다. 샘플을 PBS 버퍼로 조심스럽게 세척한 후, 마이크로파티클이 이미지화되었다. 본 발명의 구현예에 따라 제조된 35-50 μ m 사이의 가변 직경을 갖는 마이크로파티클은 마이크로파티클에 부착된 단일 세포를 운반하는 마이크로파티클의 일부를 갖는 배경으로부터 구별될 수 있다. CD45는 백혈구에 대한 표면 항원 특성이기 때문에 결합된 세포는 백혈구일 가능성이 높다. 이 구현예는 이러한 마이크로파티클이 또한 세포 집단을 선택적으로 결합하고 도 3A 및 도 3B에 개략된 공정에 따라 본 발명에 따라 후속적으로 처리될 수 있는 개별 입자 상의 세포를 선별하는데 사용될 수 있음을 명백히 보여준다.

도 7은 본 발명에 따라 4개의 상이하게 표지된 마이크로파티클("나노반응기")의 라이브러리를 사용하여 단일 샘플 내에서 여러 분석물을 검출하는 방법("분석물 다중화")의 실시예를 보여준다. 이 도 7은 실시예 3에서 수행된 실험을 예시한다. 4개의 상이한 유형의 마이크로파티클(도면에서 그리고 본 명세서의 다른 부분에서 또한 때때로 동의적으로 "나노반응기"로서 언급되는 것)(각각의 마이크로파티클에 대한 표적 특이적 프라이머 및 프로브(분석물-특이적 시약으로서)의 부착에 의한 4개의 상이한 분자 표적 rpoB, IS6110, IS1081 및 atpD에 대해 특이적으로 만들어진 것)은 그들의 각각의 표지 구성요소에 따라 구별될 수 있도록 사용된다. 도 7A에서는 아가로스-젤라틴-하이브리드 마이크로파티클로 표시된 색상을 마이크로이미징하는 데 사용된 3개의 형광 채널을 나타내는 3개의 그레이스케일 이미지가 표시된다. 산점도에 의해 예시된 바와 같이 검출된 마이크로파티클에 대해 채널 1 및 채널 2에서 얻은 형광 신호에 따라 4개의 상이한 표지를 할당할 수 있다. 추가 채널인 채널 3은 핵산 증폭 신호(예컨대, PCR 신호)를 모니터링하는 데 사용된다. 각 표지 구성요소는 존재하는 경우 특정 대상(분석물)에 해당한다. 마이크로파티클의 각 유형(또는 "서브세트")에 대한 도 7B의 1D 플롯은 샘플 부피당 검출된 사본 수의 사양으로 변환되는 양수 및 음수 신호를 보여준다. 도 7B는 상이한 나노반응기(또는 마이크로파티클) 유형(즉, 또한 상이한 분석물에 대한 것)에 대한 신호 강도를 나타낸다; 증폭 후 여기에서 테스트된 샘플에서 각각 rpoB 및 atpD에 대해 특이적인 마이크로파티클 유형("서브세트") 0 및 마이크로파티클 유형("서브세트") 3이 긍정적인 신호를 나타냄을 볼 수 있는데, 이는 원래 샘플 내에 그러한 분석 물질의 존재를 지시한다. 또한 그래프는 양성 및 음성 마이크로파티클의 존재를 나타낸다. 양성 및 음성 마이크로파티클을 세고 푸아송 분석을 적용하는 것에 의하여 샘플 내의 표적 수를 매우 정확하게 결정할 수 있다. 따라서 이것은 또한 매우 정밀한 정량화를 가능하게 한다. 그와 대조적으로, 분석물 IS6110 및 IS1081 각각에 대해 특이적인 마이크로파티클 유형("서브세트") 1 및 마이크로파티클 유형("서브세트") 2는 각각 원래 샘플로부터 그러한 분석물이 존재하지 않음을 지시하는 양성 신호를 제공하지 않는다.

도 8은 조립된 마이크로파티클 라이브러리를 만들기 위한 키트("제조 키트")의 구현예를 보여준다. 이러한 키트

의 이러한 구현예는 상기 추가로 정의된 바와 같이 각각이 조립된 전구체-마이크로파티클의 서브세트를 함유하는 적어도 2개 또는 그 이상의 용기를 포함한다. 조립된 전구체-마이크로파티클의 각각의 서브세트는 상기 전구체-마이크로파티클에 부착되거나, 내부에 포함되거나 또는 이와 달리 결합된 그것의 구별되는 표지 구성요소를 가지고, 그 결과 조립된 전구체-마이크로파티클의 상이한 서브세트는 그것에 부착되거나, 내부에 포함되거나 또는 이와 달리 결합된 각각의 표지 구성요소에 의하여 구별된다. 키트는 또한 컨디셔닝 용액(예컨대, PBS 버퍼와 같은 완충액 또는 물)을 포함하는 추가 용기를 포함하는데, 컨디셔닝 용액은 상기 전구체-마이크로파티클의 서브세트(들)에 대한 분석물-특이적 시약의 부착, 바람직하게는 가역적 부착을 가능하게 한다. 바람직한 구현예에서, 이러한 키트는, 마이크로파티클에 부착된 분석물-특이적 시약(들)을 제거하지 않으면서, 유리, 즉 비-부착된, 분석물-특이적 시약(들)을 마이크로파티클로부터 제거하기 위한 세척 완충액을 포함하는 추가의 용기를 포함한다. 또한, 바람직한 구현예에서, 이러한 키트는 또한 구성요소들을 함께 혼합하기 위한 하나 이상의 혼합 용기(들)를 포함한다. 또한 이러한 키트의 사용자에게 의해 선택되고 제공되는 다양한 분석물-특이적 시약이 나타나 있어, 이러한 사용자가 사용자의 필요에 따라 마이크로 조립된 마이크로파티클의 라이브러리를 생성하는 것을 가능하게 한다. 키트에 포함된 컨디셔닝 용액을 사용하는 것에 의하여 각각의 분석물-특이적 시약(들)의 부착이 촉진된다.

도 9는 본 발명의 실시예에 따른 샘플에서 분석물을 검출하기 위한 키트("검출 키트")의 구현예를 보여준다. 이 예시적인 도면에서, 키트는 일반 검출 조성물(검출 반응을 수행하는 데 필요한 시약을 포함하지만 그 어떠한 분석물-특이적 시약(들)(ASRs)도 포함하지 않음)을 포함하는 용기, 선택적으로 적합한 유화제와 함께 오일과 같은 비-수상을 포함하는 용기를 포함한다. 게다가 이러한 키트는 선택적으로 하나 또는 여러 개의 혼합 용기를 포함할 수 있다. 게다가, 또한 선택적으로, 이러한 키트는 반응기로서 기능하는 추가 용기를 포함할 수 있다. 이 구현예에서, 조립된 마이크로파티클의 라이브러리는 샘플 뿐만 아니라 별도로 제공될 수 있으며, 이러한 라이브러리는 샘플 및 키트의 혼합 용기 내의 검출 시약에 노출된다. 그 후, "반응기"-컨테이너를 사용하여 상 전이를 수행한 후 그 다음 후속 검출 반응도 수행한다.

도 10A-D는 본 발명의 구현예에 따른 상이한 예시적인 라이브러리를 도시한다. **도 10A**는 여러 샘플 내에서 단일 분석물의 검출을 위한 예시 라이브러리를 보여준다. 도 10A에 표시된 라이브러리는 두 개의 서로 다른 샘플에서 단일 분석물을 검출하기 위한 가장 간단한 라이브러리이다. 보여지는 바와 같이, 이러한 라이브러리 내에는 동일한 분석물-특이적 시약이 부착되어 있지만 각각의 표지 구성요소("1" 및 "2")에 의해 서로 상이한 두 개의 마이크로파티클 서브세트가 존재한다. 이러한 라이브러리 내의 각 서브세트는 동일한 분석 물질의 검출에 사용되지만 다른 샘플에서 사용된다. **도 10B**는 단일 샘플 내에서 여러 분석물의 검출을 위한 간단한 예시 라이브러리를 보여준다. 이 경우 검출될 수 있는 분석물은 두 개의 다른 분석물인데, 이는 라이브러리 내에 두 개의 서로 다른 서브세트가 있으며, 각 서브세트에는 서로 다른 분석물-특이적 시약이 부착되어 있기 때문이다. 게다가 서브세트는 각각의 표지 구성요소("1" 및 "2")에 의하여 구별된다. 두 개의 서로 다른 서브세트는 처음에는 용기 내에 보관할 수 있지만, 샘플에 노출되면 궁극적으로 단일 용기 속으로 옮길 수 있다. **도 10C**는 단일 샘플에서 여러 분석물의 검출을 위한 다른 예시 라이브러리이다. 이 예시적인 라이브러리에는 4개의 서로 다른 마이크로파티클 서브세트가 제공되며, 각각의 서브세트에는 그것 자신의 구별되는 분석물-특이적 시약이 부착되어 있다. 게다가, 각각의 서브세트는 표지 구성요소("1", "2", "3" 및 "4")에 의해 서로 구별된다. 처음에는 서로 다른 서브세트가 별도의 용기에 보관될 수 있지만 최종적으로는 4가지 다른 분석물이 존재하는 것으로 의심되는 샘플에 노출될 때 함께 가져올 수 있다. **도 10D**는 여러 샘플 내에서 여러 분석물의 검출을 위한 예시 라이브러리이다. 보여지는 바와 같이, 8개의 서로 다른 마이크로파티클 서브세트가 존재한다. 마이크로파티클의 각 서브세트는 각각 그들의 구별되는 표지 구성요소("1" ~ "8")를 갖지만, 각 쌍에는 서로 다른 분석물-특이적 시약이 부착된 4쌍의 마이크로파티클 서브세트가 존재하며, 각 쌍 내의 두 서브세트는 동일한 부착된 분석물-특이적 시약을 갖는다. 때때로 이 적용에서 동일한 분석물-특이적 시약이 부착되어 있지만 그럼에도 불구하고 그들의 각각의 표지 구성요소에 따라 상이한 마이크로파티클의 서브세트는 또한 본 명세서에서 때때로 하나의 "클래스"의 일부로 지칭된다. 도 10D에 표시된 예제 라이브러리는 2개의 샘플내에서 4개의 분석물의 존재를 감지하는 데 사용할 수 있다. 따라서, 각 샘플은 마이크로파티클의 4개의 서브세트를 사용하여 탐지되거나 조사되거나 또는 이에 노출되는데, 이의 각각의 서브세트는 상이한 분석물-특이적 시약이 부착된 것이다. 동일한 단일 샘플(복수의 여러 샘플 중에서)을 조사하는 데 사용되는 상이한 마이크로파티클의 그와 같은 서브세트는, 또한 때때로 본 명세서에서 마이크로파티클의 서브세트의 "하위 라이브러리(sublibrary)"로 지칭된다. "클래스"와 "하위-라이브러리"의 개념은 도 11에 추가로 개괄되고 설명되어 있다.

도 10E는 단일 샘플 내에서 여러 분석물을 검출하기 위한 방법의 예시적인 개략도를 나타내며, 여기서 라이브러리의 생성은 그러한 라이브러리 내에서 4개의 상이한 분석물-특이적 시약(ASRs)을 사용하여 4개의 상이한 분석

물의 검출을 허용하는 것으로 나타난다. 각각의 마이크로파티클은 서로 다른 표지 구성요소("1" 내지 "4")를 사용하여 다르게 표지되고, 그리하여 구별될 수 있다. 얻어진 라이브러리는 도 10C의 예시적인 라이브러리이다. 단일 샘플은 라이브러리뿐만 아니라 필요한 검출 조성물에 노출되며, 여기서 마이크로파티클은 비-수상 속으로 전달된다. 그 후, 검출 반응이 수행되고 결과 신호(들)가 검출 및 분석된다

도 11A 및 도 11B는 여러 샘플에서 여러 분석물의 검출을 위한 예시적인 라이브러리를 보여준다. 여기에 표시된 이 특별한 경우에는 4개의 서로 다른 분석물의 존재에 대해 테스트 중인 3개의 서로 다른 샘플이 있다. 도 11A에서 볼 수 있듯이 테스트할 샘플당 4개의 서로 다른 마이크로파티클 서브세트가 있다. 그러나 동시에 또한 동일한 분석물-특이적 시약이 부착된 3개의 마이크로파티클 서브세트가 있어서, 동일한 분석물-특이적 시약이 부착된 마이크로파티클 서브세트의 삼중(또는 N-중)을 형성한다. 이러한 N-중(동일한 부착된 분석물-특이적 시약을 갖는 것)에는 테스트할 샘플이 존재하는 만큼 많은 상이한 서브세트(N-중의 모든 서브세트가 최종적으로 실험에 사용되는 것은 아닐지라도, 때때로 "적어도 그만큼 많은" 상이한 서브세트)가 존재한다. 따라서 효과적으로 N은 테스트할 샘플의 수를 지정한다. 이러한 N-중(N-tuple)은 또한 동일한 분석물-특이적 시약이 부착된 라이브러리 내의 마이크로파티클의 모든 서브세트 전체를 지칭하는 "클래스"로 본 명세서에서 때때로 지칭된다. 한 클래스 내의 모든 서브세트는 하나의 관심 분석물에 대해 특이적이다. 이와 대조적으로, "하위-라이브러리"라는 용어는 한 번에 하나의 특정 샘플을 조사하는 데 사용되는 라이브러리 내의 마이크로파티클의 모든 서브세트 전체를 의미합니다. 각 하위-라이브러리 내에서 조립된 마이크로파티클의 각 서브세트에는 서로 다른 분석물-특이적 시약이 부착되어 있다; 각 분석물-특이적 시약은 하나의 관심 분석물에 대해 특이적이다. 도 11A에서, 하위-라이브러리 1, 2 및 3은 각각 4개의 마이크로파티클 서브세트를 포함하고, 각 하위-라이브러리 내의 이러한 4개의 마이크로파티클 서브세트는 초기에 별도의 용기 내에 저장될 수 있다. 그러나, 각각의 하위 라이브러리가 각각의 샘플과 접촉하게 되면, 각 하위 라이브러리 내의 마이크로파티클의 대응하는 서브세트가 조합될 수 있다. 그 후, 각각의 샘플에 노출된 마이크로파티클은 선택적으로 세척될 수 있고, 그 다음 증폭/검출 반응을 수행하는 데 필수적인 시약들을 포함하는 적합한 검출 조성물에 노출될 것이다. 그 후, 상-전이를 수행하고, 각각의 마이크로파티클을 비-수상으로 전달하여 현탁액으로서 각 샘플에 대해 복수의 절연된 반응 공간을 효과적으로 생성한다. 일단 각각의 마이크로파티클이 비-수상으로 이동되면, 그들을 단일 용기 내에 모으고 적절한 증폭/검출 반응을 수행할 수 있다.

도 12는 마이크로파티클 내의 표적 정량을 위한 디지털 및 실-시간 정량 PCR의 조합을 기술한다. 여기에 제시된 정량 접근 방식은 목표 농도가 측정 범위의 상한을 초과하지 않는 경우 디지털 PCR을 활용한다. 디지털 PCR은 훨씬 더 정확하고 PCR 억제제에 대한 내성이 더 높다. 통계적 효과로 인한 디지털 PCR의 신뢰구간("CI")이 표시된다. 이들은 측정 범위의 하단에서 샘플 수집의 푸아송 분포와 측정 범위의 상단에서 마이크로파티클에 대한 표적의 이항(binomial) 분포에 의해 결정된다. 샘플 채취의 푸아송 분포 또한 실-시간(Real-Time) PCR의 부정확성에 기여한다. 그러나 실-시간 PCR은 추가적으로 PCR 과정의 가변적인 특성을 최대한 활용한다. 증폭 반응 중 정량적 형광 판독은 PCR 완료 시 바이너리 형광 판독보다 반응 효율의 변화에 의해 훨씬 더 많은 영향을 받을 가능성이 있다. 실-시간 정량적 PCR을 기반으로 하는 상업적 테스트 분석의 전형적인 재현성은 매우 낮은 목표 농도에서 대략 $0.30 \log \text{ cp/mL}$ (mL당 복사 수)로부터 높은 목표 농도에서 $0.10 \log \text{ cp/mL}$ 까지의 범위이다. 제안된 정량화 접근 방식의 장점은 실-시간 정량적 PCR이 더 높은 목표 농도에만 적용되는 것이 바람직하며, 여기서 이 방법은 더 낮은 농도보다 더 정확한 결과를 가능하게 한다. 전반적으로 이 접근 방식은 qPCR(quantitative PCR)의 넓은 동적 범위와 측정 범위의 하단에서 디지털 PCR의 정교한 감도 및 정량 정밀도를 허용한다. 일 구현 예에서, 일단 본 발명에 따른 검출 방법이 수행되면, 다음 예시적인 지침을 사용하여 정량화가 달성될 수 있다: 시험 분석에 사용할 수 있는 모든 마이크로파티클의 >0.5%인 음성(어두운) 마이크로파티클 수에 대하여, 푸아송 분석(디지털)이 적용된다. 그 이하의 임의의 값에는 실시간 분석이 적용된다. 이것은 마이크로파티클 당 5.3개 표적의 대략적인 평균 농도(람다)에 해당한다. 형광 이미지 상의 가능한 인공물(artefacts)은, 분석 당 예컨대 50개의, 음성 마이크로파티클의 총 수에 대한 최소 요구 사항을 도입하는 것에 의하여 고려될 수 있다.

보다 일반적으로 말하면, 일단 본 발명에 따른 검출 방법이 수행되면 다음 예시적인 지침을 사용하여 정량을 달성할 수 있다: 만일 음성 마이크로파티클(즉, 신호가 검출될 수 없는 마이크로파티클)의 수가 0.1 - 1.0%, 바람직하게는 0.5 - 1.0%, 더 바람직하게는 0.5 - 0.8% 범위 내의 백분율을 초과하면, 푸아송 분석이 적용된다. 만일 음성 마이크로파티클(즉, 신호가 검출될 수 없는 마이크로파티클)의 수가 0.1 - 1.0%의 범위 내 백분율 미만, 바람직하게는 0.5 - 1.0% 범위 내의 백분율 미만, 더 바람직하게는 0.5 - 0.8% 범위 내의 백분율 미만인 경우에는, 정량적 실시간 분석이 적용되는데, 예컨대 주기 임계값의 결정을 수반한다(예컨대 $2^{-\Delta \Delta C_T}$ 방법이라고도 지칭되는 비교 C_T 방법을 사용하는 것(예를 들어 Schmittgen et al., 2008, Nature Protocols, 3, pp.

1101-1108 참조)

자세한 내용은 실시예 3에 설명되어 있다.

도 13은 PCR 증폭 동안 오일 내 마이크로파티클 상에서 수집된 이미지 시리즈로부터 얻은 실시간 형광 데이터를 보여준다. 증폭에 특이적인 하나의 형광 채널에서 종말점 형광 신호가 있는 검출 챔버의 이미지가 왼쪽에 표시된다. 중앙의 그래프는 왼쪽의 형광 이미지로부터 선택된 12개의 대표적인 개별 마이크로파티클에 대한 형광 강도를 보여준다. 형광 이미지에서 검출된 모든 마이크로파티클에 대해 계산된 ct-값의 분포가 오른쪽 히스토그램에 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0452] 또한, 본 발명을 제한하지 않고 설명하기 위해 제공된 하기 실시예를 참조한다.

[0453] 실시예

[0454] 실시예 1

[0455] 암호화된 전구체 마이크로파티클의 합성

[0456] 분석물-특이적 시약 식별을 위한 형광 염료로 젤라틴 표지링

[0457] 소 피부 유형 A 또는 돼지 피부 유형 B로부터 젤라틴의 아세톤 불용성 분획은 NHS 커플링 화학의 이점을 이용하여 두 가지 형광 염료의 독특한 혼합물로 표시된다. Cy®3 모노 NHS 에스테르 및 Cy®5 모노 NHS 에스테르(GE 헬스케어)를 DMSO에 용해시켜 인산칼륨 완충액(pH 8.0, 멸균 여과된 것) 중 1%(w/v)의 최종 용액을 만들었다. 유리 젤라틴 아미노 그룹에 대한 각 염료의 8배 몰 과량은 두 젤라틴 유형의 0.25%(w/v) 25mL를 표지하는 데 사용된다. 표지 용액은 수직 모드에서 멀티-로테이터 PTR-60(그랜트-바이오)을 사용하여 4℃에서 밤새 배양된다. 형광 표지된 젤라틴의 정제는 포화된 (NH₄)₂SO₄ 용액을 사용하여 황산 암모늄 침전을 반복함으로써 수행된다. 또는 초원심분리, 이소프로판올, 아세톤 또는 메탄올을 사용한 용매 추출, 세파로스 컬럼을 사용한 겔 여과 또는 투석을 수행할 수 있다. 어느 경우든 유출물(effluent)이 투명해지고 형광이 나타나지 않을 때까지 정제를 반복한다. 정제된 형광 표지된 젤라틴 샘플은 최종적으로 진공 건조된다.

[0458] 젤라틴/아가로스 하이브리드 용액의 제조

[0459] 나노-반응기 제작을 위해 4가지 구성요소로 구성된 하이브리드 하이드로겔 용액을 준비한다.

[0460] 구성요소 1: 소 피부 유형 A G1890(시그마) 또는 돼지 피부 유형 B G9391(시그마)로부터 유래한 아세톤-불용성 젤라틴

[0461] 구성요소 2: 저-겔화 2-하이드록시에틸 아가로스(A4018, 시그마)

[0462] 구성요소 3: Cy3-표지된 젤라틴(A형 또는 B형)

[0463] 구성요소 4: Cy5-표지된 젤라틴(A형 또는 B형)

[0464] 구성요소 1의 균일한 4%(w/v) 용액을 생성하기 위해, 구성요소 1 40mg을 1mL의 뉴클레아제가 없는 물(Carl Roth)에 용해시키고 부드러운 교반(750rpm) 하에 50℃에서 배양한다. 마찬가지로, 20mg의 구성요소 2를 1mL의 뉴클레아제가 없는 물에 용해 및 녹이고 부드러운 교반 하 80℃에서 배양하여 균일한 2%(w/v) 아가로스 용액을 제조한다. 각각의 표지된 젤라틴의 4%(w/v) 용액을 제조하기 위해, 구성요소 3 및 4의 건조된 펠릿을 각각의 부피의 뉴클레아제가 없는 물에 넣고 젤라틴이 녹을 때까지 55℃에서 인큐베이션한다. 네 가지 구성요소 모두를 혼합하고 뉴클레아제가 없는 물로 채워 젤라틴의 경우 최종 농도가 1%(w/v)이고 아가로스 A4018의 경우 0.5%(w/v)인 각각의 하이브리드 하이드로겔 용액을 생성한다. 다양한 부피의 구성요소 3과 구성요소 4가 혼합되어 n개의 뚜렷한 색상의 마이크로스피어 세트가 생성된다. 이 구현예에서, 재현탁된 구성요소 3 및 구성요소 4는 총 젤라틴 분획의 최대 3% (v/v)로 1:0, 3:1, 1:3, 0:1의 비율로 혼합되어 분석물-특이적 시약을 식별하고 4-플렉스 반응 분석을 허용하기 위한 4개의 개별 표지 구성요소(각각 표지 구성요소 1-4)를 달성한다. 모든 용액은 나중에 사용할 때까지 55℃에서 보관된다.

[0465] 비-가교된 젤라틴/아가로스 마이크로파티클의 생성

[0466] 단분산 색상 코딩된 아가로스-젤라틴 하이브리드 마이크로파티클은 QX100/QX200 드랍플렛 디지털(ddPCR™) 시스템

템(BioRad) 또는 수정된 μ 인캡슐레이터 시스템(Dolomite microfluidics)의 일부를 사용하여 제조된다. 바이오라드(BioRad) 시스템의 경우 DG8 카트리지를 써머믹서 상에 보관하여 용액을 55°C로 유지한다. 50 μ L의 젤라틴/아가로스 하이브리드 용액을 로딩한 후, 2-5% 피고서프 2(Sphere Fluidics)를 포함하는 에멀전 시약 HFE-7500 100 μ L를 카트리지의 바닥 웰 속으로 적용한다. 웰에 연결된 주사기를 부드럽게 당겨 수집 웰 내에 진공을 적용한다. 또는 QX200™/QX100™ 액적 생성기를 액적 생성에 사용할 수 있다. 웰당 직경 100 μ m의 약 80,000개의 하이드로겔 액적(droplets)이 생성된다.

[0467] 돌로마이트(Dolomite) 미세유체 시스템의 경우, 단일 분산 하이브리드 마이크로파티클은 간단한 흐름-초점 장치를 사용하여 현탁액 형성의 한 단계 프로세스로 제작할 수 있다. 구체적으로, 4-웨이 선형 커넥터 및 칩 인터페이스 H와 함께 불소성 성질의 표준 액적 접합 칩(100 μ m)을 사용하여 튜브와 칩 사이의 유체 연결을 인터페이스한다. 두 개의 미토스(Mitos) P-펌프가 하이드로겔 용액과 캐리어 오일을 전달한다. 이 시스템은 핫 플레이트 상단에 배치된 가열 장치(rig)의 통합에 의하여 수정되며, 젤라틴/아가로스 하이브리드 용액을 액체 상태로 유지하고 구동 유체를 가열하는 것을 허용하여 오일과 젤라틴/아가로스 하이브리드 용액이 칩 접합부(junction)에 접촉될 때 일관된 온도를 보장한다. HFE-7500/피코서프(Picosurf) 2 및 하이브리드 하이드로겔 용액은, 액적 시스템의 가열 장치 내의 P-펌프(Mitos) 및 하이드로겔 저장소 속으로 각각 배치되기 전에, 둘 모두 0.22 μ m 필터로 사전-여과된다. 가열 장치의 온도는 55°C로 설정된다. 유체 라인은 1분 동안 2000mbar에서 프라이밍된다. 안정적인 액적 형성을 위해 15-17 μ l/분의 유속을 조정한다. 매개변수는 돌로마이트 플로우 콘트롤 어드밴스드 소프트웨어(Dolomite Flow Control Advanced Software)로 모니터링된다.

[0468] 두 경우 모두, 색상으로 코딩된 아가로스-젤라틴 하이브리드 마이크로파티클은 하이브리드 하이드로겔의 응고를 시작하기 위해 2mL 마이크로원심분리 튜브 또는 15mL 팔콘(falcon) 튜브 내에서 얼음 위에 수집된다. 오일-공기 경계에서 마이크로파티클의 수상 손실을 방지하기 위해, 마이크로파티클을 포함하는 에멀전 오일 500 μ L에 뉴클레아제가 없는 물 500 μ L를 중첩시킨다. 그 다음, 마이크로파티클은 안정한 하이브리드 스캐폴드를 형성하기 위해 적어도 1시간 동안(우선적으로 밤새) 4°C에서 저장된다.

[0469] 연속상으로부터 하이브리드 마이크로파티클의 회수

[0470] 응고된 하이브리드 마이크로파티클은 에멀전 오일의 상단 위에 축적된다. 에멀전 오일은 입자가 제거되지 않도록 주의하면서 피펫으로 조심스럽게 제거한다. 그 후, 500 μ L 1H, 1H, 2H, 2H-퍼플루오로옥탄올(PFO; 시그마)을 튜브에 첨가하여 현탁액을 파괴한다. 하이브리드 하이드로겔 입자를 오일 상으로 옮기기 위해, 튜브를 5초 동안 볼텍스시키고 2,500 x g에서 5초 동안 원심분리한다. 하이브리드 하이드로겔 마이크로파티클을 신선한 1.5mL 미세원심분리 튜브로 옮긴다. 선택 사항: 이 절차를 반복하여 잔류 탄화불소 오일과 계면활성제를 제거할 수 있다. PFO 세척 후, 회수된 마이크로파티클을 1mL의 뉴클레아제가 없는 물로 1회 세척한다. 마이크로파티클의 품질과 크기는 현미경을 사용하여 육안으로 검사한다. 예시적인 9개의 마이크로파티클 제제가 도 4에 도시되어 있다(좌측은 미세튜브 내의 개별 마이크로파티클 제제의 착색된 침전물로, 중앙 이미지는 9개의 상이한 마이크로파티클의 혼합된 세트가 표시됨).

[0471] 하이브리드 전구체 마이크로파티클의 기능화

[0472] 하이브리드 전구체 마이크로파티클에 분석물-특이적 구성요소를 장착할 수 있도록 유연한 결합 화학이 설정된다. 스트렙타비딘(Streptavidin)은 다음 3-단계 프로토콜을 사용하여 마이크로파티클의 하이브리드 매트릭스의 아민-함유 분획에 공유적으로 부착된다. 먼저 SPDP 시약(NHS) 에스테르의 아민-반응성 부분을 사용하여 설포히드릴 그룹을 스트렙타비딘에 추가하고 후속 환원 단계를 수행한다. 두 번째 단계에서, 전구체 마이크로파티클의 아미노기의 일부는 술포(Sulfo)-SMCC 가교제를 사용하여 말레이미드-활성화된다. 마지막으로, 활성화된 스트렙타비딘과 말레이미드-활성화된 하이브리드 마이크로파티클이 접합되어 다공성 폴리머 매트릭스 및 시약 결합 구성요소가 있는 나노반응기 전구체를 생성한다.

[0473] 프로토콜 1: SPDP 가교

[0474] 3-(2-페리딜디티오)프로피온산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르(N-숙신이미딜 3-(2-페리딜디티오)프로피오네이트; SPDP; P3415, 시그마) 가교제의 바이알은 응축을 방지하기 위해 개봉 전에 주변 온도와 평형을 이루도록 한다. 스트렙타비딘의 SPDP 수정을 위해, 스트렙타비딘에 비해 2배 몰 과량의 SPDP가 사용된다. SPDP는 50 μ L DMF에 용해되어 0.23몰 SPDP 용액을 제공한다. 또한 15.8 U/mg 스트렙타비딘(SA10; Prozyme) 300mg을 20mM NaCl(pH 7.5)이 포함된 100mM 인산칼륨 완충액 10mL 내에 녹여 30mg/mL 용액을 만든다. 용액을 3000rpm에서 원심분리하고 상층액을 추가 실험을 위해 얼음 상에 보관한다. SPDP 용액의 전체 부피(50 μ L)를 스트렙타비딘 용

액 30mL에 첨가하고 반응을 4℃에서 밤새 진행되도록 한다. 트리스(Tris)를 100mM의 최종 농도로 첨가하여 반응을 켜고 실온에서 30분 동안 추가로 인큐베이션한다. 후속 단계에서, 비바론 500 한외여과 컬럼(100kDa MWCO)(Sartorius Stedim Biotech)을 사용하여 8000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 미반응 SPDP를 스트랩타비딘 용액으로부터 제거한다. 통과액(flow-through)을 버리고 20mM NaCl을 포함하는 100mM 인산칼륨 완충액을 이용한 세척을 5회 반복한다. 활성화된 스트랩타비딘은 주변 온도에서 30분 동안 2mM DTT와 함께 인큐베이션하여 감소된다. 따라서, 피리딘-2-티온(thione) 기는 변형된 스트랩타비딘으로부터 제거된다.

[0475] **프로토콜 2: 젤라틴 분획의 말레이미드-활성화(술포-SMCC의 커플링)**

[0476] 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실산 3-술포-N-하이드록시숙신이미드 에스테르 나트륨 염 (Sulfo-SMCC; M6035, 시그마)의 신선한 바이알은 개봉 전에 주위 온도와 완전히 평형을 이루도록 한다. 아민-함유 하이브리드 마이크로파티클은 비-아민 함유 접합 완충액(인산칼륨, 20mM NaCl pH 7.2) 내에서 3회 세척된다. 사용 직전에, 10mg/mL의 술포-SMCC 스톱 용액이 접합을 위해 준비된다. 사용 가능한 아미노 그룹(젤라틴 유형 B의 경우 젤라틴 아미노산의 10%가 유리 아미노 그룹을 운반할 것으로 예상됨)에 대해 10몰 과량의 가교제를 얻기 위해 충분한 술포-SMCC 스톱 용액을 마이크로파티클 용액에 첨가한다. 50% (v/v) 하이드로겔 마이크로파티클 슬러리를 10mM 술포-SMCC와 함께 인큐베이션하고 즉시 얼음 위에 올려놓는다. 반응은 수직 모드로 멀티-로테이터 PTR-60(Grant-bio)을 사용하여 4℃에서 100rpm으로 밤새 진행되도록 한다. 반응은 트리스(Tris)를 100mM의 최종 농도로 첨가한 후 실온에서 30분 동안 인큐베이션하여 켜진다. 말레이미드 활성화된 입자는 접합 완충액에서 반복 세척하고 1000rcf에서 원심분리하여 정제한다.

[0477] **프로토콜 3: 활성화된 단백질의 접합**

[0478] 말레이미드-활성화된 마이크로파티클과 설프히드릴-변형된 스트랩타비딘은 접합되어 있다. 말레이미드 그룹은 pH 6.5-7.5에서 설프히드릴 그룹과 반응하여 안정한 절단 불가능한 티오에테르 결합을 형성한다.

[0479] 켜는 2mM의 최종 농도로 2-메르캅토에탄올(Sigma)을 첨가하고 셰이커 인큐베이터 내에서 1000rpm에서 30분 동안 실온에서 인큐베이션함으로써 수행된다. N-(2-하이드록시에틸)말레이미드(Sigma)로 두 번째 켜 단계를 수행하여 최종 농도가 6mM이 되도록 하고, 실온에서 혼합하면서 인큐베이션한다. 결합 능력은 바이오틴화된 염료-접합체를 사용하여 결정되었다.

[0480] **실시예 2**

[0481] **라이브리 준비**

[0482] 전구체 마이크로파티클에 대한 분석물-특이적 시약으로서 표적-특이적 프라이머의 가역적 부착

[0483] 형광색으로 표지된 각 하이브리드 하이드로겔 마이크로파티클은 다른 관심 표적을 특이적으로 감지할 수 있다. 마이크로파티클의 각 클래스에 표적과 호환되는 프라이머 세트를 장착하기 위해, 기능화된 젤라틴/아가로스 하이브리드 마이크로파티클 분취량(aliquots)을 개별 2.0 mL 미세원심분리기 튜브에서 데스티오-비오틴레이티드(desthio-biotinylated) 프라이머와 함께 배양한다. 올리고뉴클레오타이드의 데스티오비오틴(desthiobiotin) 모 이어티는 온도가 상승할 때 마이크로파티클로부터 올리고뉴클레오타이드의 방출을 촉진하고, 후속 신호 증폭 단계에서 에멀전이 형성된다. 이것은 올리고뉴클레오타이드를 검출 반응에 즉시 사용할 수 있게 한다.

[0484] 따라서, 전구체 마이크로파티클을 뉴클레아제가 없는 물로 한 번 세척하고, 그 다음 동일한 양의 뉴클레아제가 없는 물에 마이크로파티클 펠릿을 재현탁하여 50% 마이크로파티클 슬러리를 만든다. 50% 마이크로파티클 슬러리의 분취량이 펠릿화된다는 점에서 다르게 표지된 슬러리 분취량이 준비된다. 동일한 부피의 각 표적-특이적 데스티오비오틴-표지된 프라이머 쌍(구성요소 5-8)을 하나의 마이크로스피어 펠릿에 첨가하여 각 프라이머의 최종 농도 200nM에서 50% 비드 슬러리를 수득함으로써 특정 분석물-특이적 시약을 할당한다. 프라이머가 하이브리드 하이드로겔 매트릭스에 효율적으로 결합되는 것을 보장하기 위해, 두 구성요소 모두 1000rpm으로 흔들어 주면서 20℃에서 15분 동안 인큐베이션한다. 마이크로스피어는 5배 더 많은 양의 뉴클레아제가 없는 물로 3번 세척하여 부착되지 않은 프라이머를 제거한다.

[0485] **구성요소 5: rpoB 프라이머 쌍 (분석물-특이적 시약 1)**

[0486] - 0.2 μM 데스티오비오틴 표지된 rpoB 센스 프라이머 (5'-ATCAACATCCGGCCGGTGGTCGCC -3') 서열 번호 1 (Metabion International AG)

[0487] - 0.2 μM 데스티오비오틴-표지된 rpoB 안티센스 프라이머 (5'- TCACGTGACAGACCGCCCGGGC -3') 서열 번호 2

(Metabion International AG)

[0488] 구성요소 6: *IS6110* 프라이머 쌍 (분석물-특이적 시약 2)

[0489] - 0.2 μ M 데스티오비오틴-표지된 *IS6110* 센스 프라이머 (5'-CGCCGCTTCGGACCAACAGCAC-3') 서열 번호 3 (Metabion International AG)

[0490] - 0.2 μ M 데스티오비오틴-표지된 *IS6110* 안티센스 프라이머 (5'-GTGACAAAGGCCACGTAGGCGAACC-3') 서열 번호 4 (Metabion International AG)

[0491] 구성요소 7: *IS1081* 프라이머 쌍 (분석물-특이적 시약 3)

[0492] - 0.2 μ M 데스티오비오틴-표지된 *IS1081* 센스 프라이머 (5'-GCGCGGCAAGATCATCAATGTGGAG-3') 서열 번호 5 (Metabion International AG)

[0493] - 0.2 μ M 데스티오비오틴-표지된 *IS1081* 안티센스 프라이머 (5'-GCCACCGCGGGGAGTTTGTTCG-3') 서열 번호 6 (Metabion International AG)

[0494] 구성요소 8: *atpD* (내부 대조군) 프라이머 쌍 (분석물-특이적 시약 4)

[0495] - 0.2 μ M 데스티오비오틴-표지된 내부 대조군 (*Bac. globigii*) 센스 프라이머 (5'-GCGCGGCAAGATCATCAATGTGGAG-3') 서열 번호 7 (Metabion International AG)

[0496] - 0.2 μ M 데스티오비오틴-표지된 내부 대조군 (*Bac. globigii*) 안티센스 프라이머 (5'-GCCACCGCGGGGAGTTTGTTCG-3') 서열 번호 8 (Metabion International AG)

[0497] 마이크로파티클 라이브러리의 동결건조

[0498] 선택적으로, 마이크로스피어 라이브러리는 동결건조되어 장기 보관을 위한 건조 분석물/표적-특이적 마이크로파티클 펠릿을 제공한다. 따라서 동일한 양의 원하는 표적-특이적 마이크로파티클을 함께 피켓팅하고 볼텍서 (vortexer)를 사용하여 충분히 혼합한다. 마이크로파티클 라이브러리는 동일한 부피의 600mg/mL 트레할로스 용액으로 보충되어 마이크로파티클 라이브러리 슬러리를 포함하는 30%(w/v) 트레할로스를 생성한다. 그 다음, 100 μ l의 라이브러리 분취량이 동결건조 준비가 된 RNase/DNase가 없는 PCR 스트립 튜브 내에서 준비된다. 부형제의 유형(예: 트레할로스)과 동결건조 제제 내의 그것의 농도는 공정 후반부에 용출액에 노출될 때 동결-건조된 마이크로파티클의 팽창 정도에 영향을 미친다.

[0499] 라이브러리 분취량은 2시간 동안 드라이 아이스 상에서 동결한 후 알파(Alpha) 2-4 LSC플러스 동결 건조기 (Christ)를 사용하여 진공(-25°C 및 0.1mbar)에서 동결 건조되었다. 샘플을 총 200분 동안 동결 건조기에 두었다. 주요 건조 단계는 -25°C로부터 25°C까지 온도가 단계적으로 증가하면서 0.01mbar에서 3시간 동안 유지되었다. 최종 건조 단계는 25°C 및 0.05mbar에서 20분 동안 수행되었다. 최종 제품은 다음과 같다.

[0500] 구성요소 9: 동결건조된 나노반응기 라이브러리

[0501] - 하나의 샘플에서 *rpoB*, *IS6110*, *IS1081* 및 내부 대조군의 병렬 검출에 필요한 표적-특이적 시약 포함

[0502] **실시예 3**

[0503] **나노 반응기를 사용한 분석물 다중화**

[0504] 다음 구현예에서, 샘플(용출액)은 나노-반응기 라이브러리의 표적-특이적 마이크로파티클을 사용하여 단분산 현탁액에 캡슐화된다.

[0505] 나노반응기 라이브러리에 분석물 및 일반 검출 시약 로딩

[0506] 나노-반응기 내 분석물 검출을 위한 일반 시약은 상류 샘플 준비 공정에서 파생된 분석물-함유 용출액(eluate)으로 재현탁된 동결-건조된 펠릿으로서 공급된다. 이 예에서는, 뉴클레아제가 없는 물 내에서 증폭할 표적 서열(원래 H37Rv DNA에서 유래됨)과 함께 *rpoB*, *IS6110*, *IS1081* 및 *atpD*에 대해 정의된 농도의 정제된 PCR 산물을 사용하여 실제 샘플을 모방했다.

[0507] 템플릿 분자가 없거나 정의된 양의 표적 분자를 포함하는 샘플(100 μ l)의 전체 부피를 MTB(=결핵균 *Mycobacterium tuberculosis*) 음성 환자 가래 용출액 내에 희석하고 동결건조된 일반 시약 펠릿(구성요소 10)에 추가한다. 시약은 짧은 볼텍싱 단계에 의하여 조심스럽게 재현탁된다. 마찬가지로, 템플릿 분자를 포함하는 일

반 시약 믹스의 전체 부피가 나노-반응기 라이브러리 펠릿(구성요소 9)에 추가된다. 다공성 마이크로파티클은 1000rpm에서 혼드는 동안 주위 온도에서 15분 동안 모든 검출 시약 및 템플릿 분자를 포함하는 전체 액체를 흡수하도록 허용된다. 이 과정에서 4개의 템플릿은 4가지 유형의 시약 특이적 나노반응기에 무작위로 분포된다. 후속 디지털 증폭 단계에서는 나노반응기의 특정 시약 세트와 일치하는 템플릿만 증폭 및 감지할 수 있다. 결과적으로, 디지털 증폭에서 긍정적인 사건의 수는 인자 n 만큼 감소되며, 여기서 n 은 나노반응기 라이브러리의 나노반응기 유형의 수에 해당한다.

[0508] 구성요소 10은 다음과 같은 최종 농도로 구성된다.

[0509] - PCR 완충액: 20mM Tris HCl, 22mM KCl, 22mM NH₄Cl, 3mM MgCl₂

[0510] - 0.2 U/ μ l 핫 스타트 택(Hot Start Taq) DNA 중합효소(biotechrabbit GmbH)

[0511] - 0.4mM dNTP(biotechrabbit GmbH)

[0512] - 1 μ M 에바그린(EvaGreen)® 형광 DNA 스테인(JenaBioscience GmbH) 또는 0.4 μ M 택맨(TaqMan) 프로브

[0513] - 0.1%(w/v) 낮은 바이오버든, 프로테아제 프리, 분자생물학 BSA용(Sigma)

[0514] 로딩된 마이크로파티클의 상전이

[0515] 나노-반응기 라이브러리는 표적-특이적 반응 사이의 혼선(crosstalk)을 방지하기 위해 구성요소 11 내에 마이크로파티클을 분산시켜 비-수성상으로 이전된다. 완전한 수상(100 μ L)은 1.5mL 미세원심분리 튜브를 사용하여 과량의 구성요소 11(500 μ L)과 접촉하게 된다. 높은 전단력은 플루오로카본 오일 내 수성 마이크로파티클을 단일 나노-반응기 속으로 응집해제 및 유화시키기 위해 적용된다. 소니파이어(Sonifier)TM S-450 및 울트라소닉스 소니파이어(Ultrasonics Sonifier)TM 컵 호른(Cup Horn; Branson)을 사용하여 초음파를 적용하거나, 랙 표면에 대해 튜브를 누르는 동안 대략 20/s의 빈도로 미세원심분리기 튜브 랙의 구멍 위로 튜브를 20회 단순히 미는 것에 의하여 혼합물을 교반한다. 이것은 기계적 응력을 가하고, 수성 마이크로파티클 사이의 인력을 끊고, 현탁액/현탁액을 형성하는 표면 장력을 생성한다. 하이드로겔 마이크로파티클과 과잉 수성상은 둘 모두 오일상 내에 유화된다. 부산물로 생성되는 서브마이크론-크기의 액적은 현탁액을 3회 온화한 원심분리(400rcf)로 세척하여 제거된다. 동일한 오일(구성요소 11)로 반복적인 세척은 본질적으로 모든 바람직하지 않은 액체 방울을 제거한다. 구성요소 11은 또한 후속 디지털 에멀전/현탁액 PCR을 위한 현탁액의 효율적인 열안정성을 제공한다.

[0516] 구성요소 11: 위상 전이 및 신호 증폭 오일

[0517] - HFE-7500 탄화플루오르 오일(3M Deutschland GmbH), 다음으로 보충됨

[0518] - 2-5% (v/v) 피코서프(Dolomite Microfluidics) 또는 2-5% (v/v) 플루오서프(FluoSurf)(Emulseo)

[0519] 마이크로파티클-템플레이티드된(microparticle-templated) 반응 공간 내 병렬 디지털 PCR 증폭 반응

[0520] 캡슐화된 샘플이 있는 단분산 현탁액은 약 2.5cm²의 면적과 100 μ m의 층 두께를 갖는 검출 챔버 속으로 이전된다. 챔버 감지 창은 0.8mm 폴리카보네이트(Makrolon 6555; Covestro AG)로 만들어지고 챔버의 반대쪽은 광택 처리되고 수정되지 않은 투명 125-마이크론 폴리카보네이트(Lexan 8010) 필름(Koenig Kunststoffe GmbH)으로 구성되어 개별 나노리터 반응에 필요한 효율적인 열 전달을 촉진한다. 플루오로카본 오일 내에 부유하는 나노반응기는 반응 챔버의 크기(dimension)로 인해 강제로 단층을 형성한다. 따라서, 마이크로캡슐은 후속 병렬 신호 증폭 반응을 위해 약 20000-30000 나노-반응기(5000-7500/타겟)의 균일한 간격 어레이를 제공한다.

[0521] 마이크로파티클은 수정된 펠티에르(PELTIER) 요소 30x30x4.7mm, 19.3W (Quick-Ohm, Kupper & Co. GmbH, #QC-71-1.4-3.7M) 및 확립된 챔버-특이적 PCR 제어 모드를 사용하여 초-고속 온도 사이클링을 받는다. 적용된 열 조건은 다음과 같다: 95°C에서 30초 동안 초기 변성하고, 그 다음 95°C에서 1초 동안 변성 및 64°C에서 4초 동안 어닐링/신율(elongation)로 구성된 2-단계 PCR의 30-45 사이클. 줄-겔 전환 기능으로 인해, 현탁액은 개별 액체 나노리터 방울이 있는 에멀전이 된다. 또한, 마이크로파티클은 처음에 95°C까지 가열될 때 젤라틴 매트릭스로부터 데스티오비오틴(desthiobiotin) 결합된 표적-특이적 올리고뉴클레오타이드를 방출하여 그것을 PCR에 사용할 수 있게 한다. 개별 표적의 다중 증폭은 생성된 나노 반응 구획에서 발생한다.

[0522] 자동화된 이미지 수집은 블링크(BLINK) 도구 상자 소프트웨어에 의해 트리거되고 5x 대물렌즈(시야 4.416mm x 2.774mm) 및 pE-4000(CoolLED Ltd.) 광원이 장착된 형광 현미경(Zeiss AxioObserver)으로 수행된다. 현미경에

는 3개의 형광 필터 세트(Cy5 ET, Cy3 ET, FITC/FAM HC, AHF Analysentechnik)와 반응 챔버가 있는 열순환 장치가 장착된 자동화된 x-y 스테이지가 추가로 장착되었다.

[0523] 이미지 수집 설정은 다음과 같다: 100-1000ms 및 1-10x의 이득(gain). 표지 식별에는 두 개의 이미지가 필요하고($\lambda_{exc} 1 = 550nm$, $\lambda_{exc} 2 = 650nm$), 특정 PCR 신호에는 한 개의 이미지가 필요하다($\lambda_{exc} 3 = 470nm$). 선택적 나노반응기 특이적 실시간 분석의 경우, 챔버의 한 위치에서 열 프로토콜의 각 어닐링 단계가 끝날 때 3개의 형광 채널에 해당하는 3개의 이미지를 가져올 수 있다.

[0524] 열 프로토콜이 완료되면, 위에서 언급한 설정에서 동일한 장비를 사용하여 전체 감지 챔버를 스캔한다. 전에 설명한 설정으로 증폭/검출 챔버의 크기(dimension)를 커버하려면 총 30개의 이미지가 필요하다. 도 7A는 3개의 형광 채널에 대한 동일한 영역의 이미지를 보여주며, 이에 의하여 채널 1 및 2는 마이크로파티클과 함께 제공된 각각의 분석물-특이적 시약을 인코딩하는 표지 비율을 나타내고, 채널 3은 음(어두움) 및 양(밝음) 증폭 신호가 있는 마이크로파티클을 나타낸다. 오른쪽 그래프는 채널 1과 2의 각 마이크로파티클에 대해 얻은 형광 신호의 산점도(a scatter plot)를 보여준다. 4개의 서로 다른 마이크로파티클 종(species)을 명확하게 식별할 수 있다. 선택적으로, 특이성 정도를 결정하거나 또는 예를 들어 SNPs를 식별하기 위하여 증폭된 산물의 DNA 용융 거동을 분석하기 위해, 나노반응기는 50°C - 90°C에서 단계적 상승(2°C/단계)을 거친다. DNA 스트레인 변성 및 관련된 형광 신호 감쇠는 각 온도 단계에서 형광 이미지를 획득하는 것에 의하여 모니터링된다.

[0525] 마이크로파티클 디코딩 및 다중 분석

[0526] 획득한 모든 이미지는 자동화된 다면적 이미지 처리 알고리즘에 적용된다. 이 방법은 MSER(Maximally Stable Extremal Regions)을 활용하는 이미지 분할을 사용하여 MSER-기반 이미지 분할 결과로부터 인접 액적을 감지한다. 구체적으로, 이미지는 먼저 중앙값 필터를 수반하는 전처리를 거친다. 둘째, MSER 알고리즘은 배경 윤곽선의 불룩한 전환점을 측정하기 위해 이미지 배경 및 액적/마이크로파티클 사이의 적절한 절단을 식별하기 위해 그들의 델로네(Delaunay) 삼각측량에 적용된다. 또한, 액적/마이크로파티클은 MSER 알고리즘을 사용하여 분할된다. 마지막으로 액적/마이크로파티클 윤곽에 대한 타당성 검사가 수행된다(대비, 형태, 불룩함). 모든 분할된 액적/마이크로파티클의 각 채널, 위치, 직경/부피 등의 형광 신호를 포함한 특징들이 후속적으로 수집된다. 실험 데이터는 개별 표지(형광 염료 Cy3 및 Cy5의 조합)와 그들 각각의 특이적 증폭 및 용융 곡선 신호를 식별하는 주피터(Jupyter) 스크립트에 적용된다.

[0527] 다음의 데이터 판독이 가능하다:

[0528] a) 종말점 분석(디지털 판독)

[0529] PCR은 끝점까지 증폭되고 따라서 각 개별 표지에 대해 형광 양성 및 음성 방울의 총 수가 결정된다. 양성 액적은 특이적 표적의 최소 1개 카피를 포함하고 따라서 정의된 강도 임계값을 상회하는 증가 형광 신호를 보여준다. 임계값은 템플릿 없이 이전에 수행된 증폭 반응으로부터 파생된다. 각각의 표지된 표적에 대한 액적 디지털 PCR 데이터는 1-D 또는 2-D 플롯으로 표시된다. 소프트웨어는 먼저 각 나노반응기 부피에 대한 음수 및 양수 부분을 클러스터링하고 그 다음 양성 방울의 부분을 푸아송(Poisson) 알고리즘에 맞춰 카피(copies)/mL 입력 단위로 표적 DNA 분자의 초기 농도를 결정한다. 위에서 설명한 분석은 4-플렉스 반응이기 때문에 액적은 추가된 템플릿의 농도에 의존하여 다양한 그룹으로 클러스터된다:

[0530] a) 표지 구성요소 1 (1:0 비율 Cy3 & Cy5), 검출 신호(EvaGreen/probe) 음성

[0531] b) 표지 구성요소 1 (1:0 비율 Cy3 & Cy5), 검출 신호(EvaGreen/probe) 양성

[0532] c) 표지 구성요소 2 (3:1 비율 Cy3 & Cy5), 검출 신호(EvaGreen/probe) 음성

[0533] d) 표지 구성요소 2 (3:1 비율 Cy3 & Cy5), 검출 신호(EvaGreen/probe) 양성

[0534] e) 표지 구성요소 3 (1:3 비율 Cy3 & Cy5), 검출 신호(EvaGreen/probe) 음성

[0535] f) 표지 구성요소 3 (1:3 비율 Cy3 & Cy5), 검출 신호(EvaGreen/probe) 양성

[0536] g) 표지 구성요소 4 (0:1 비율 Cy3 & Cy5), 검출 신호(EvaGreen/probe) 음성

[0537] h) 표지 구성요소 4 (0:1 비율 Cy3 & Cy5), 검출 신호(EvaGreen/probe) 양성

[0538] 이러한 1-D 플롯은 도 7B에 그것의 각각의 표지 구성요소와 함께 각 마이크로파티클에 대해 표시된다. 양성 마이크로파티클은 유형 0 및 3에 대한 음성 마이크로파티클과 명확하게 구별되는 반면, 유형 2 및 3은 음성 마이크로파티클과 유사하다.

크로파티클만 보여준다. 샘플 내 계산된 표적 농도는 도 7B의 표에 나와 있다.

[0539] b) 실시간 분석

[0540] 단일 나노반응기에 대한 실-시간 형광 곡선을 생성하는 PCR의 모든 주기를 통해 각 표적-특이적 나노반응기의 평균 픽셀 강도를 추적했다. 이들은 마이크로리터-규모 반응에서 관찰된 것과 유사한, PCR의 전형적인 지수, 선형 및 안정기(plateau) 단계를 나타낸다. 시그모이드(Sigmoid) 및 선형 피팅은 레벤버그 마퀴트(Levenberg-Marquardt) 알고리즘을 사용하여 모든 나노반응기에서 수행된다. 타당하지 않은 곡선을 제거하기 위해 리프트(PCR 후 형광 변화 대 prePCR) 기준이 적용된다. 음과 양의 실-시간 곡선이 생성되고 양수이면 사이클 임계값이 결정된다. 가양성(false positives)(나노반응기 증발, 인공물)이 식별되고 분석에서 제외된다.

[0541] 문헌:

[0542] Adler, M., R. Wacker and C. M. Niemeyer (2003). "A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins." *Biochem Biophys Res Commun* **308**(2): 240-250.

[0543] Birtwell, S. and H. Morgan (2009). "microparticle encoding technologies for high-throughput multiplexed suspension assays." *Integr Biol (Camb)* **1**(5-6): 345-362.

[0544] Fulton, R. J., R. L. McDade, P. L. Smith, L. J. Kienker and J. R. Kettman, Jr. (1997). "Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system." *Clin Chem* **43**(9): 1749-1756.

[0545] Leng, X., W. Zhang, C. Wang, L. Cui and C. J. Yang (2010). "Agarose droplet microfluidics for highly parallel and efficient single molecule emulsion PCR." *Lab Chip* **10**(21): 2841-2843.

[0546] Mandecki, W., B. Ardelet, T. Coradetti, H. Davidowitz, J. A. Flint, Z. Huang, W. M. Kopacka, X. Lin, Z. Wang and Z. Darzynkiewicz (2006). "Microtransponders, the miniature RFID electronic chips, as platforms for cell growth in cytotoxicity assays." *Cytometry Part A* **69A**(11): 1097-1105.

[0547] Rissin, D. M., C. W. Kan, T. G. Campbell, S. C. Howes, D. R. Fournier, L. Song, T. Piech, P. P. Patel, L. Chang, A. J. Rivnak, E. P. Ferrell, J. D. Randall, G. K. Provuncher, D. R. Walt and D. C. Duffy (2010). "Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations." *Nature Biotechnology* **28**: 595-599.

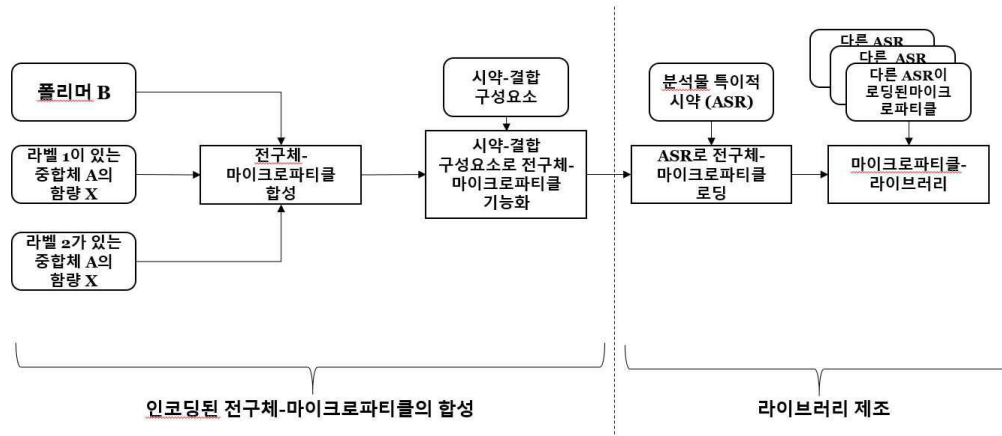
[0548] Tekin, H. C. and M. A. Gijs (2013). "Ultrasensitive protein detection: a case for microfluidic magnetic bead-based assays." *Lab Chip* **13**(24): 4711-4739.

[0549] Todd, J., B. Freese, A. Lu, D. Held, J. Morey, R. Livingston and P. Goix (2007). "Ultrasensitive Flow-based Immunoassays Using Single-Molecule Counting."

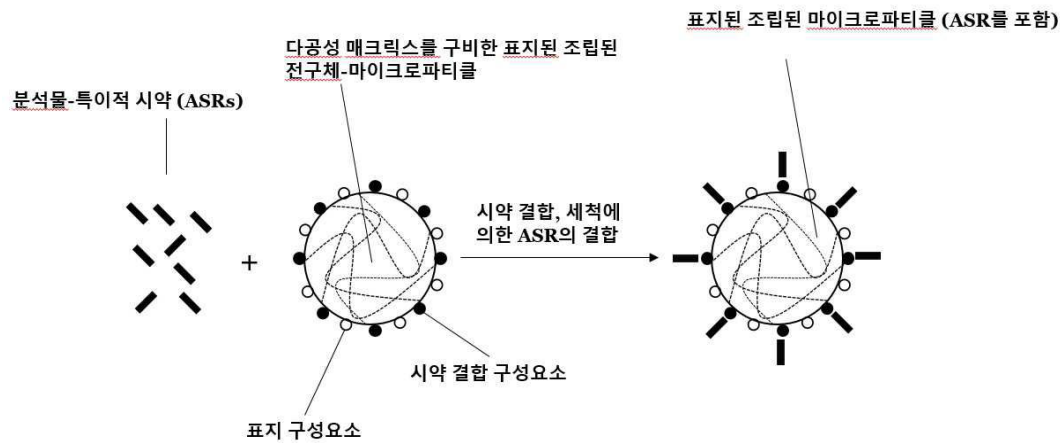
[0550] Wilson, R., A. R. Cossins and D. G. Spiller (2006). "Encoded microcarriers for high-throughput multiplexed detection." *Angew Chem Int Ed Engl* **45**(37): 6104-6117.

도면

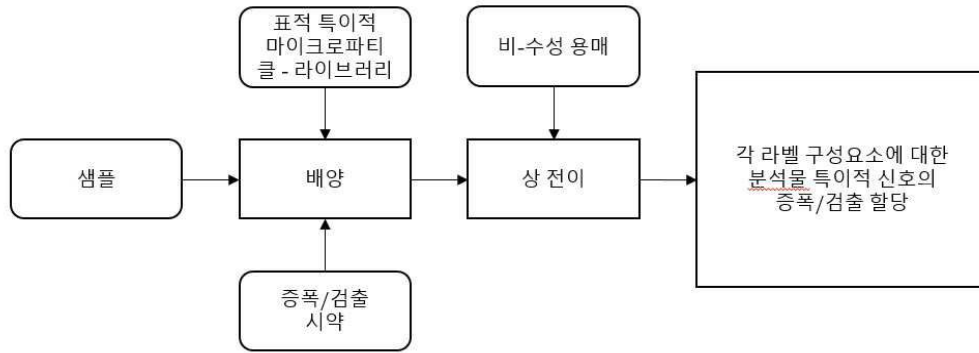
도면1



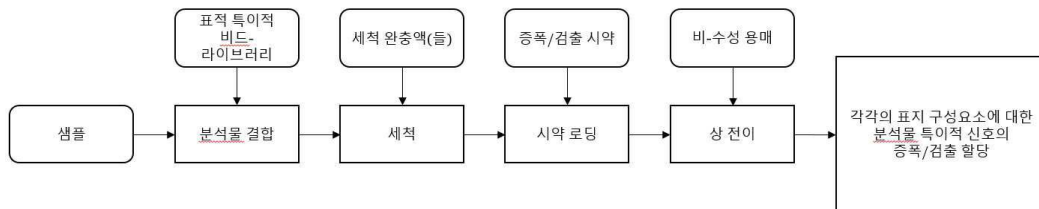
도면2



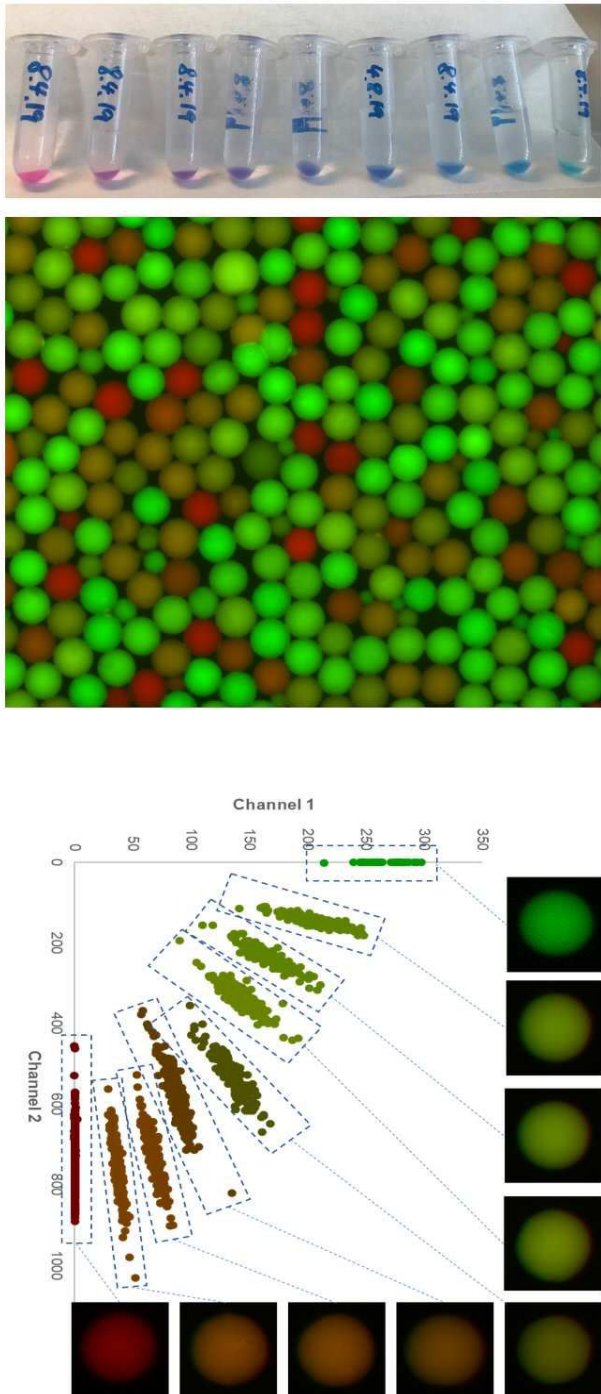
도면3a



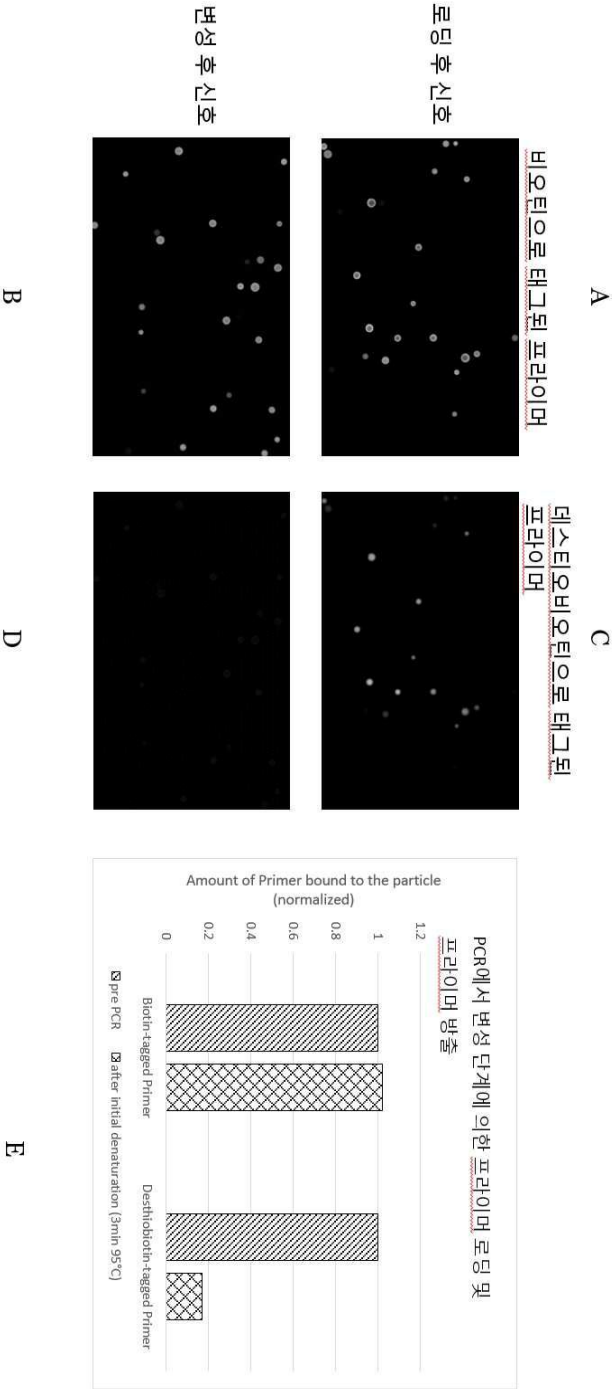
도면3b



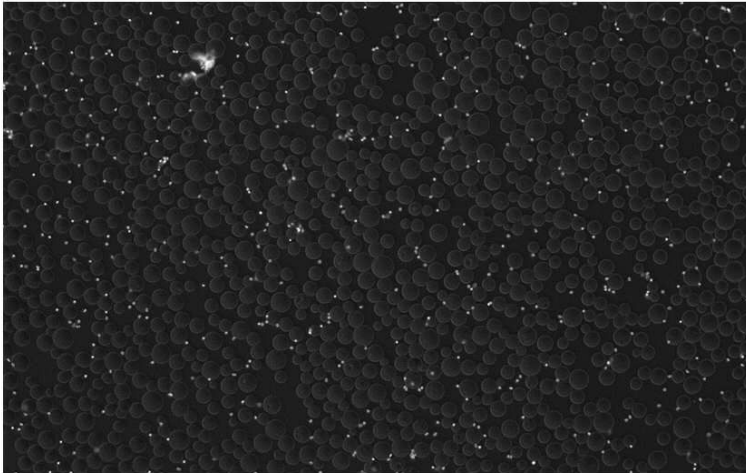
도면4



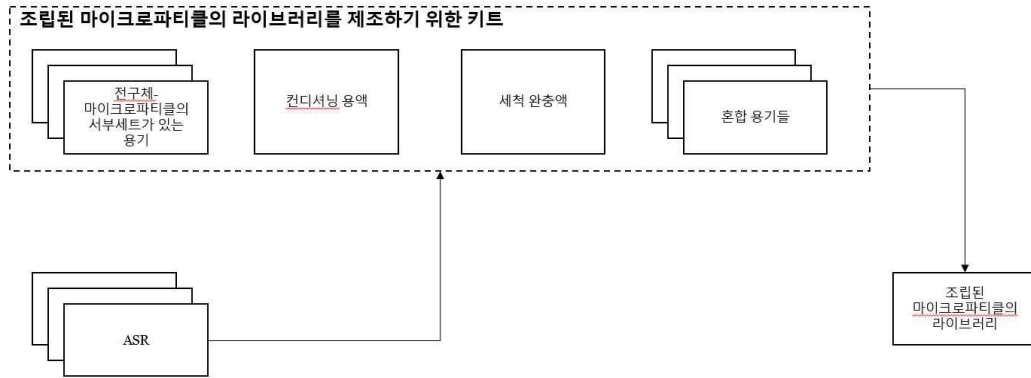
도면5



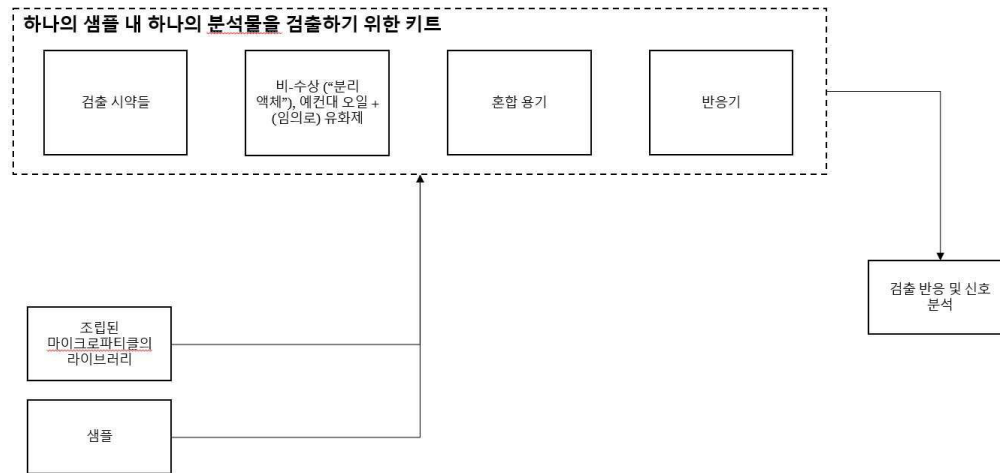
도면6



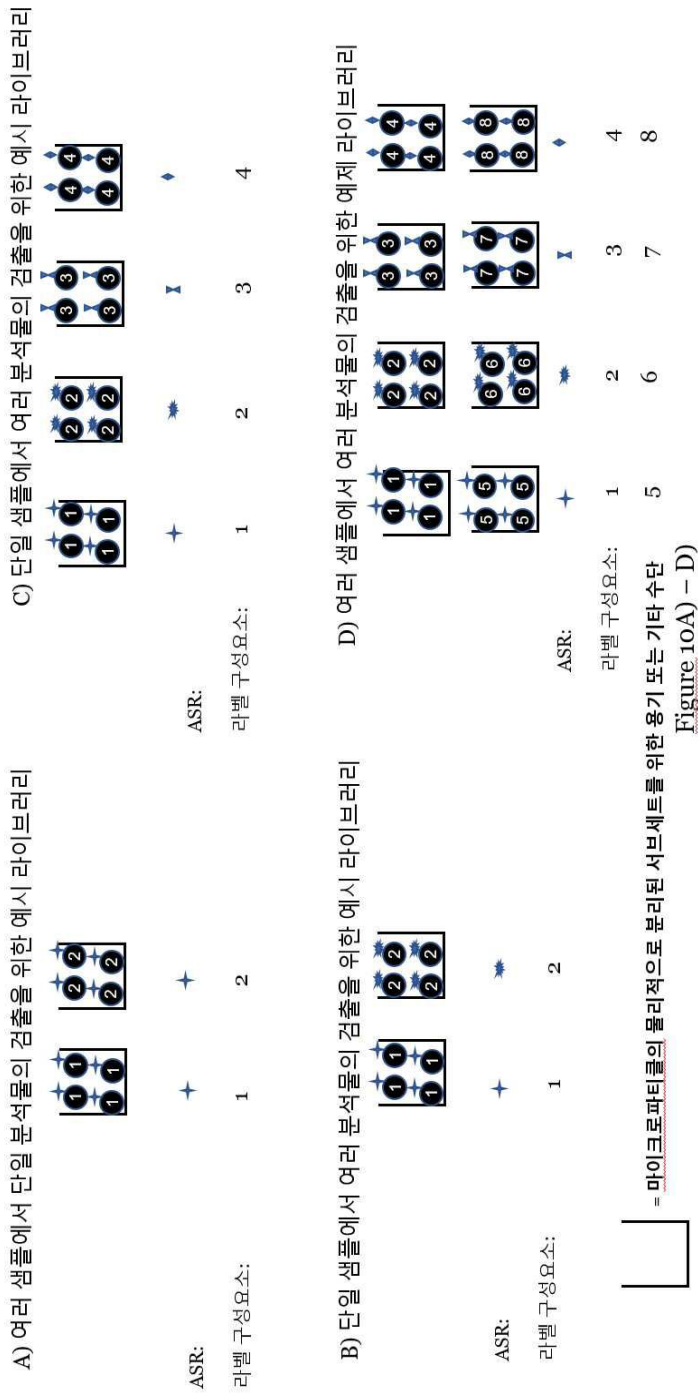
도면8



도면9



도면10a



도면10b

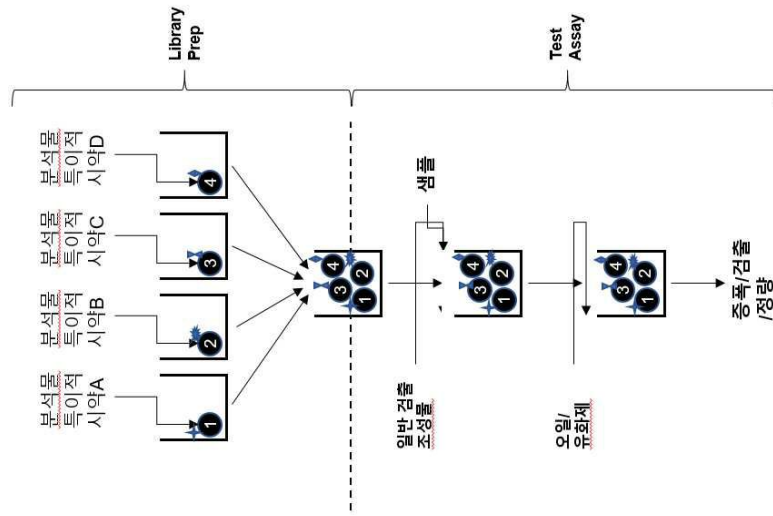
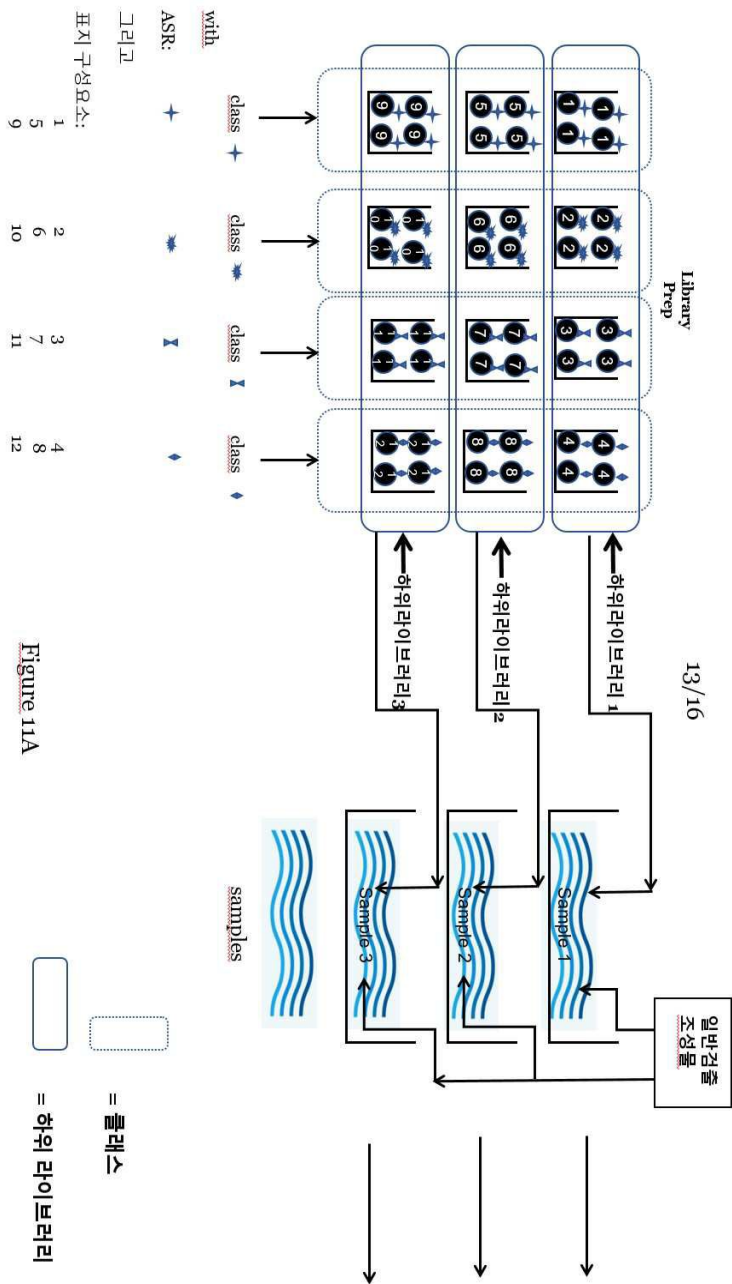


Figure 10 E)

도 10C)의 단일 샘플에서 여러 표지물을 검출하기 위한 예시 라이브러리
단일 샘플 내 여러 표지물을 검출/정량하는 방법에 사용

ASR:	+	I	◆	
표지 구성요소:	1	2	3	4

도면 11a



Continued in Figure 11B

도면11b

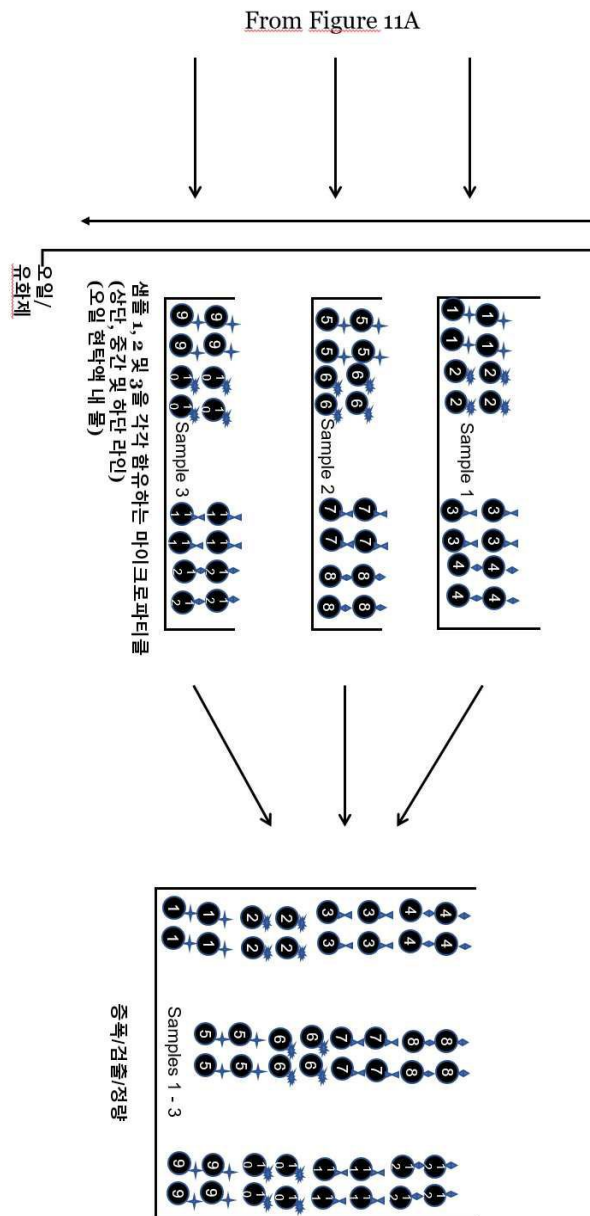
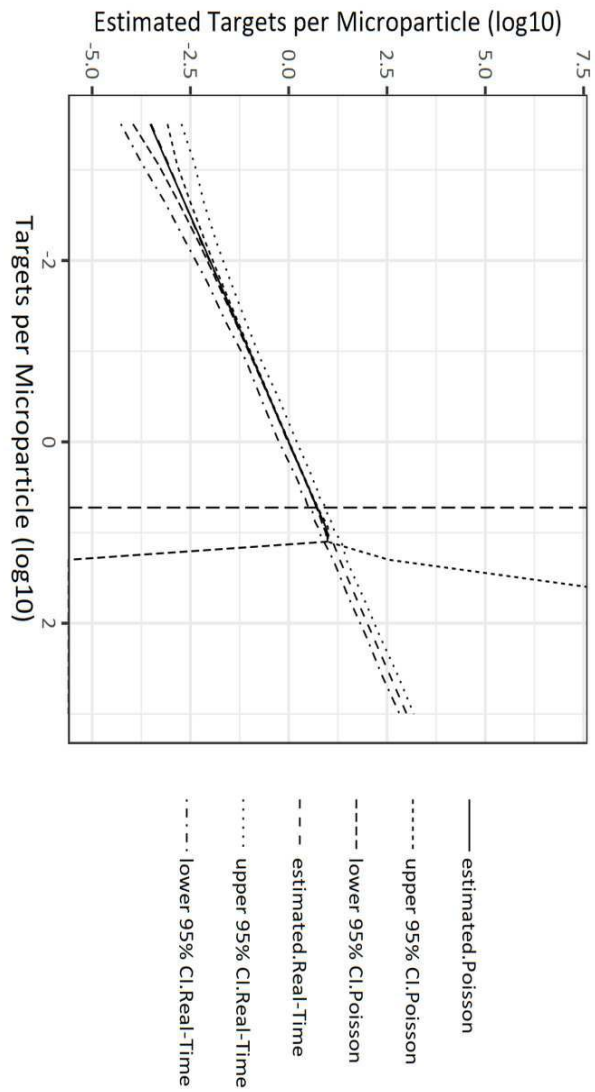
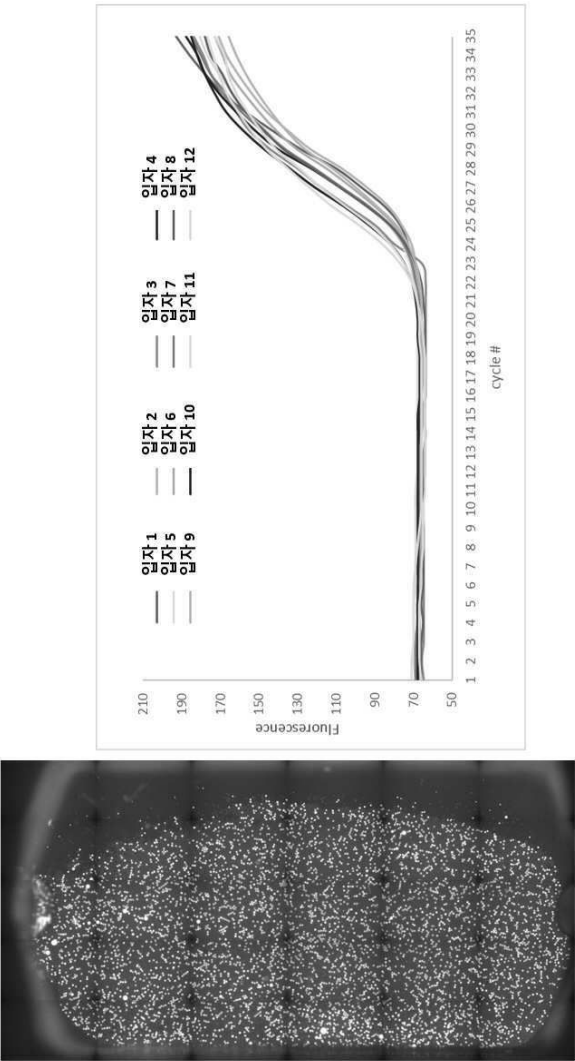


Figure 11B

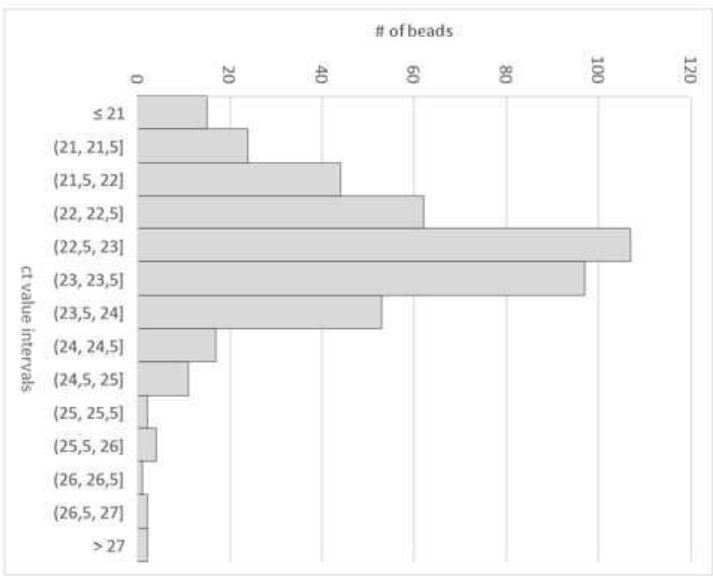
도면12



도면13a



도면13b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Blink AG

<120> A library of prefabricated microparticles and precursors thereof

<130> B33016WO

<150> EP19216596.7

<151> 2019-12-16

<160> 8

<170> BiSSAP 1.3.2

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> "desthiobiotin-labeled rpoB sense primer "

<220>

<223> desthiobiotin-labeled rpoB sense primer

<400> 1

atcaacatcc ggccggtggt cgcc 24

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> "desthiobiotin-labeled rpoB antisense primer "

<220>

<223> desthiobiotin-labeled rpoB antisense primer

<400> 2

tcacgtgaca gaccgccggg c 21

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> "desthiobiotin-labeled IS6110 sense primer "

<220>

<223> desthiobiotin-labeled IS6110 sense primer

<400> 3	
cgccgcttcg gaccaccagc ac	22
<210> 4	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> "desthiobiotin-labeled IS6110 antisense primer "	
<220>	
<223> desthiobiotin-labeled IS6110 antisense primer	
<400> 4	
gtgacaaagg ccacgtaggc gaacc	25
<210> 5	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> "desthiobiotin-labeled IS1081 sense primer "	
<220>	
<223> desthiobiotin-labeled IS1081 sense primer	
<400> 5	
gcgcggcaag atcatcaatg tggag	25
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<223> "desthiobiotin-labeled IS1081 antisense primer "	
<220>	
<223> desthiobiotin-labeled IS1081 antisense primer	
<400> 6	
gccaccgcgg ggagtttgc g	21
<210> 7	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<223> "desthiobiotin-labeled internal control (Bac. globigii) sense primer"

<220>

<223> desthiobiotin-labeled internal control (Bac. globigii) sense

primer

<400> 7

gcgcggcaag atcatcaatg tggag

25

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> "desthiobiotin-labeled internal control (Bac. globigii) antisense primer "

<220>

<223> desthiobiotin-labeled internal control (Bac. globigii) antisense

primer

<400> 8

gccaccgcgg ggagtttgtc g

21