(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0131934
(43) 공개일자 2024년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 33/533* (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54388 (2021.08)
G01N 33/533 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0027514
(22) 출원일자 2024년02월26일
심사청구일자 2024년02월26일
(30) 우선권주장
1020230025292 2023년02월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
주식회사 유니크닷
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 ,106동805호(울산과학기술원)
(72) 발명자
박종남
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
박정식
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리앤목특허법인

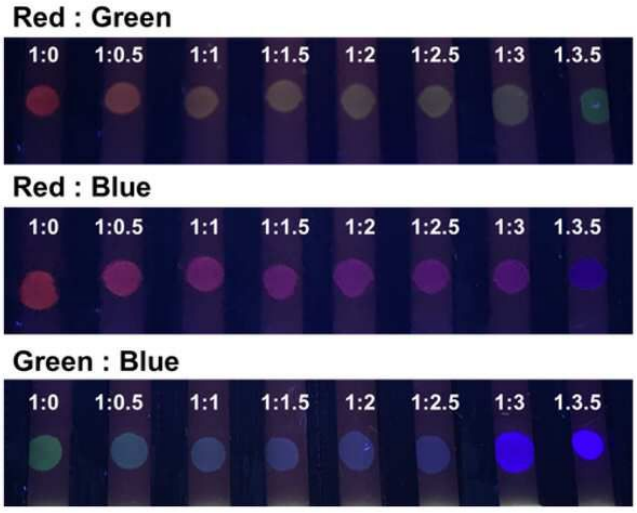
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **생적합성 양자점-폴리머 복합체를 포함하는 다중 진단 키트**

(57) 요 약

본 발명은 양자점-폴리머 복합체; 및 상기 양자점-폴리머 복합체의 표면에 접합되고 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체;를 포함하는, 복수 개의 면역 검출용 접합체를 타겟 검체의 다중 검출용 키트에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 양자점-폴리머 복합체는 인듐 인화물 코어-쉘 구조를 갖는 하나 이상의 양자점, 상기 양자점 표면에 배치된 표면 개질 리간드, 및 하나 이상의 폴리머 리간드로 이루어진 3차원 자기 조립 구조의 양자 비드를 포함하고, 상기 양자 비드의 유체 역학적 직경은 270 nm 내지 300 nm이며, 상기 복수 개의 면역 검출용 복합체는 타겟 검체의 종류에 따라 각각 상이한 발광 파장을 갖는 것인, 타겟 검체의 다중 검출용 키트에 관한 것이다.

대 표 도 - 도10



(52) CPC특허분류
G01N 33/582 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415187345
과제번호	20023097
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술기획평가원
연구사업명	소재부품기술개발
연구과제명	양자 기술을 기반으로 한 PCR 수준의 고민감도 다중 신속진단 키트 개발
과제수행기관명	주식회사 유니크닷
연구기간	2024.01.01 ~ 2024.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711152813
과제번호	2021-0-01033-002
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	정보통신기획평가원
연구사업명	ICTR&D혁신바우처지원사업(예타)
연구과제명	고감도 체외진단기술 및 인공지능 알고리즘을 활용한 질병 예측·제어 시스템 개발
과제수행기관명	두원메디텍(주)
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

양자점-폴리머 복합체; 및 상기 양자점-폴리머 복합체의 표면에 접합되고 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체;를 포함하는, 복수 개의 면역 검출용 접합체를 포함하는 타겟 검체의 다중 검출용 키트로서,

상기 양자점-폴리머 복합체는 코어-쉘 구조를 갖는 하나 이상의 양자점(quantum dot), 상기 양자점 표면에 배치된 표면 개질 리간드, 및 하나 이상의 폴리머 리간드로 이루어진 3차원 자기 조립 구조(3D selfassembly structure)의 양자 비드(quantum bead)를 포함하고,

상기 하나 이상의 양자점이 상기 양자 비드 내에 분산되며,

상기 코어는 인듐 인화물(InP)을 포함하고,

상기 쉘의 두께는 3 nm 내지 9 nm이며,

상기 양자 비드의 유체 역학적 직경(Hydrodynamic Diameter: HD)은 270 nm 내지 300 nm이고,

상기 복수 개의 면역 검출용 복합체는 타겟 검체의 종류에 따라 각각 상이한 발광 파장을 갖는 것인, 타겟 검체의 다중 검출용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 타겟 검체는 자가항체, 리간드, 천연 추출물, 펩타이드, 단백질, 금속 이온, 합성 약물, 천연 약물, 대사체, 유전체, 바이러스 및 바이러스에 의한 생성 물질, 및 박테리아 및 바이러스에 의한 생성 물질 중 하나 이상인, 키트.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 키트는 타겟 검체의 종류에 따라 분류되는 복수 개의 면역 검출용 복합체를 포함하며, 상기 분류된 복수 개의 면역 검출용 복합체는 각각 항체 및 양자점-폴리머 복합체 내 양자점의 크기가 상이한 것인, 키트.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 복수 개의 면역 검출용 복합체는 600 nm 내지 700 nm 범위의 발광 파장을 갖는 제1 면역 검출용 복합체; 500 nm 내지 600 nm 범위의 발광 파장을 갖는 제2 면역 검출용 복합체; 및 400 nm 내지 500 nm 범위의 발광 파장을 갖는 제3 면역 검출용 복합체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 2 이상의 면역 복합체를 포함하는 것인, 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제1 면역 검출용 복합체, 제2 면역 검출용 복합체, 및 제3 면역 검출용 복합체의 혼합 비율은 1 : 1 : 1 내지 1 : 1.5 : 3의 중량비 범위인 것인, 키트.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 면역 검출용 접합체는 양자점-폴리머 복합체 100 중량에 대하여, 20 내지 30 중량부의 항체가 접합된 것인, 키트.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 쉘은 징크텔로리움(ZnTe), 징크설파이드(ZnS), 징크옥사이드(ZnO), 징크셀레나이드(ZnSe), 징크셀레늄설파이드(ZnSeS), 인듐갈륨나이트라이드(InGaN), 인듐갈륨포스파이드(InGaP), 인듐징크포스파이드(InZnP), 카파셀레늄텔로루임(CuSeTe), 카파인듐셀레늄($CuInSe_2$), 카파인듐설파이드($CuInS_2$), 실버인듐설파이드($AgInS_2$), 및 틴텔로리움(SnTe) 중 하나 이상의 무기 입자를 포함하는, 키트.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 표면 개질 리간드는 하나 이상의 티올기를 포함한, 키트.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 폴리머 리간드는 랜덤 코폴리머(random copolymer), 블록 코폴리머(block copolymer), 그라프트 코폴리머(graft copolymer), 또는 이들의 조합 중에서 선택된, 키트.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 폴리머 리간드는 말단부에 아민 그룹, 아미드 그룹, 하이드록시 그룹, 말레이미드 그룹, 티올 그룹, 및 카르복실산 그룹 중 하나 이상을 포함하는, 키트.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 폴리머 리간드는 폴리스티렌, 폴리올레핀, 폴리비닐아세탈, 폴리에스테르, 폴리케톤, 폴리에테르, 폴리비닐피리딘, 폴리카보네이트, 폴리다이엔, 폴리아크릴산, 폴리아마이드, 및 폴리이미드; 이들의 랜덤 코폴리머, 및 블록 코폴리머; 폴리무수말레인산 그룹을 포함하는 폴리머; 및 폴리무수말레인산 그룹과 알킬아민으로 이루어진 그라프트 코폴리머; 중에서 선택된 하나 이상인, 키트.

청구항 12

청구항 1에 있어서,

상기 양자 비드 내에 50 내지 50,000개의 양자점이 포함되는 것인, 키트.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체는 제1 및 제2 펩티드 태그간 이소펩티드 결합(isopeptide bond)을 통해 상기 양자점-폴리머 복합체의 표면에 접합되는 것인, 키트.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 제1 펩티드 태그는 말단 영역에 시스테인(Cys)을 포함하고,

상기 제2 펩티드 태그는 말단 영역에 상기 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체의 FC 영역과 결합하는 분자를 포함하는 것인, 면역 검출용 접합체.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 키트는 측방 유동 분석용 스트립인 것인, 키트.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 측방 유동 분석용 스트립은

제1항에 따른 복수 개의 면역 검출용 접합체를 포함하는 접합 패드; 및 복수 개의 타겟 검체와 각각 특이적으로 결합하는 복수 개의 검출 항체가 고정된 단일의 테스트 영역을 포함하는 검출부;를 포함하는, 키트.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 측방 유동 분석용 스트립은 흡수성 샘플 패드를 추가로 포함하고,

상기 흡수성 샘플 패드, 접합 패드, 및 검출부는 순차적으로 일단부터 타단 방향으로 배치된 것인, 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생적합성 양자점-폴리머 복합체를 포함하는 다중 진단 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 광학적 특성을 보이는 반도체 나노입자는 바이오 이미징에 있어 응용 가능성이 매우 높다. 양자점(Quantum Dots; QDs)은 높은 양자 수득률로 형광을 나타내며, 크기를 조절함으로써 밴드 갭을 조절할 수 있기 때문에 발광되는 빛의 파장대를 용이하게 조절할 수 있는 장점이 있다. 이러한 광학적 특성은 상당히 밝은 이미징을 보이고 안정적이기 때문에 세포의 이미징에 있어 기존에 사용되던 염료(dye)나 단백질 형광단보다 훨씬 효과적인 물질로 기대되고 있다.

[0003] 종래에는 금 나노입자를 질병을 진단하는데 사용하였으나, 금 나노입자의 경우 색 변화가 크지 않기 때문에, 금 나노입자의 색을 통한 진단은 감도를 높이는데 한계가 있었다. 금 나노입자를 반도체 나노입자로 대체하기 위한 다양한 연구가 지속되고 있으며, 체외 진단 키트의 진단 감도를 향상시키기 위해서 CdSe 기반의 독성이 있는 양

자점을 형광 소재로 사용하는 연구가 다수 보고되었다. 하지만, 체외 진단 키트의 경우 사람의 손으로 직접 핸들링 해야되기 때문에 독성 문제가 해결되지 않으면 상용화가 어려웠다.

[0004] 한편, 타겟 물질을 검출하기 위한 키트로서, 측방 유동 분석용 스트립(Lateral flow assay; LFA) 형태의 키트가 널리 사용되고 있다. 상기 측방 유동 분석용 스트립은 샘플 패드, 접합 패드 및 검출부가 길이 방향을 따라 순차적으로 배치된다. 샘플 패드에서는 외부로부터 생체 시료가 공급되고, 공급된 생체 시료는 모세관 현상에 의해 길이 방향을 따라 접합 패드, 검출부, 및 흡착 패드로 순차적으로 유동한다. 접합 패드에서는 생체 시료 중의 타겟 분석체 (항원 등)와 결합할 수 있는 물질이 도포되고, 항원-항체 반응을 통해 면역 복합체가 형성된다. 검출부에서는 생체 시료 중의 타겟 분석체와 결합할 수 있도록 탐지용 반응체가 도포되며, 상기 접합 패드에서 형성된 면역 복합체와 결합하여, 탐지용 결합체가 형성된다. 다만, 기존의 나노입자를 이용한 진단 기술에서, 1회의 검사를 통해 복수의 특정 질환 인자를 동시 검사하기 위하여, 통상적으로 스트립에 형성된 반응 영역, 예를 들어, 접합 패드 및 검출부의 개수를 증가시키는 방식이 제시되고 있다. 다만, 이러한 기존의 기술은 스트립의 길이를 증가시키고, 이에 따라 생체 시료 검체량과 반응 시간이 증가하는 문제가 발생하며, 비특이적 항원-항체 반응이 야기되어 검사의 정확도가 저하될 우려가 존재한다.

[0005] 이러한 기술적 배경 하에서, 생적합성 반도체 나노입자, 예를 들어 양자점을 이용한 다중 진단 키트의 개발에 요구가 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 한 측면은 양자점-폴리머 복합체 및 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체를 포함하며, 우수한 생체 적합성 및 향상된 검출 효능을 갖는 복수 개의 면역 검출용 접합체를 포함하는, 타겟 검체의 다중 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0007] 다른 한 측면은 상기 복수 개의 면역 검출용 접합체와 임의의 타겟 검체를 포함하는 샘플을 접촉시키는 단계를 포함하는, 복수의 타겟 검체를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 측면에서, 본 발명은, 양자점-폴리머 복합체; 및 상기 양자점-폴리머 복합체의 표면에 접합되고 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체;를 포함하는, 복수 개의 면역 검출용 접합체를 포함하는 타겟 검체의 다중 검출용 키트로서,

[0009] 상기 양자점-폴리머 복합체는 코어-쉘 구조를 갖는 하나 이상의 양자점(quantum dot), 상기 양자점 표면에 배치된 표면 개질 리간드, 및 하나 이상의 폴리머 리간드로 이루어진 3차원 자기 조립 구조(3D selfassembly structure)의 양자 비드(quantum bead)를 포함하고, 상기 하나 이상의 양자점이 상기 양자 비드 내에 분산되며, 상기 코어는 인듐 인화물(InP)을 포함하고, 상기 쉘의 두께는 3 nm 내지 9 nm이며, 상기 양자 비드의 유체 역학적 직경(Hydrodynamic Diameter: HD)은 270 nm 내지 300 nm이고, 상기 복수 개의 면역 검출용 복합체는 타겟 검체의 종류에 따라 각각 상이한 발광 파장을 갖는 것인, 타겟 검체의 다중 검출용 키트를 제공한다.

[0010] 일 실시예에 따르면, 상기 타겟 검체는 자가항체, 리간드, 천연 추출물, 펩타이드, 단백질, 금속 이온, 합성 약물, 천연 약물, 대사체, 유전체, 바이러스 및 바이러스에 의한 생성 물질, 및 박테리아 및 바이러스에 의한 생성 물질 중 하나 이상일 수 있다.

[0011] 일 실시예에 따르면, 상기 키트는 타겟 검체의 종류에 따라 분류되는 복수 개의 면역 검출용 복합체를 포함하며, 상기 분류된 복수 개의 면역 검출용 복합체는 각각 항체 및 양자점-폴리머 복합체 내 양자점의 크기가 상이한 것일 수 있다.

[0012] 일 실시예에 따르면, 상기 복수 개의 면역 검출용 복합체는 600 nm 내지 700 nm 범위의 발광 파장을 갖는 제1 면역 검출용 복합체; 500 nm 내지 600 nm 범위의 발광 파장을 갖는 제2 면역 검출용 복합체; 400 nm 내지 500 nm 범위의 발광 파장을 갖는 제3 면역 검출용 복합체로부터 선택되는 적어도 2 이상의 면역 복합체를 포함하는 것일 수 있다.

[0013] 예를 들어, 상기 제1 면역 검출용 복합체, 제2 면역 검출용 복합체, 및 제3 면역 검출용 복합체의 혼합 비율은 1: 1: 1 내지 1: 1.5: 3의 범위인 것일 수 있다.

[0014] 일 실시예에 따르면, 상기 면역 검출용 접합체는 양자점-폴리머 복합체 100 중량에 대하여, 20 내지 30 중량부의 항체가 접합된 것일 수 있다.

[0015] 일 실시예에 따르면, 상기 쉘의 두께는 약 3 nm 내지 약 8nm, 약 3 nm 내지 약 7nm, 약 3 nm 내지 약 6nm, 약 3 nm 내지 약 5nm, 또는 약 3 nm 내지 약 4 nm일 수 있다.

[0016] 일 실시예에 따르면, 상기 양자점의 쉘은 징크텔로리움(ZnTe), 징크설파이드(ZnS), 징크옥사이드(ZnO), 징크셀레나이드(ZnSe), 징크셀레늄설파이드(ZnSeS), 인듐갈륨나이트라이드(InGaN), 인듐갈륨포스파이드(InGaP), 인듐징크포스파이드(InZnP), 카파셀레늄텔로루임(CuSeTe), 카파인듐셀레늄($CuInSe_2$), 카파인듐설파이드($CuInS_2$), 실버인듐설파이드($AgInS_2$), 및 틴텔로리움(SnTe) 중 하나 이상의 무기 입자를 포함할 수 있다.

[0017] 예를 들어, 상기 양자점의 쉘은 서로 상이한 2종 이상의 무기 입자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 양자점의 쉘은 징크설파이드(ZnS) 및 징크셀레나이드(ZnSe)를 포함할 수 있다.

[0018] 일 실시예에 따르면, 상기 양자점의 쉘은 제1쉘층 및 제2쉘층을 포함하고, 상기 제1쉘층은 제1 무기 입자를 포함하고, 상기 제2쉘층은 제2 무기 입자를 포함할 수 있다. 상기 제1 무기 입자 및 상기 제2 무기 입자는 전술한 쉘의 예시로 들은 무기 입자들 중에서 선택될 수 있다.

[0019] 예를 들어, 상기 제1쉘층은 상기 양자점의 코어 및 상기 제2쉘층 사이에 개재되고, 상기 제2 무기 입자의 밴드갭은 상기 제1 무기 입자의 밴드갭보다 클 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 무기 입자 및 상기 제2 무기 입자의 밴드갭은 InP의 밴드갭보다 클 수 있다. 이러한 밴드갭 구성으로부터 전자 및 홀이 제2 무기 입자로부터 제1 무기 입자를 거쳐 InP에 집중될 수 있고, 그 결과 광효율이 향상되는 효과를 얻을 수 있다.

[0020] 일 실시예에 따르면, 상기 표면 개질 리간드는 하나 이상의 티올기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 표면 개질 리간드는 하나 이상의 티올기를 관능기로 포함한 직쇄, 분지쇄, 또는 방향족 화합물로부터 유래된 리간드일 수 있다.

[0021] 일 실시예에 따르면, 상기 표면 개질 리간드는 하나 이상의 티올기를 포함한 C1-C20 알킬티올기일 수 있다.

[0022] 일 실시예에 따르면, 상기 폴리머 리간드는 랜덤 코폴리머(random copolymer), 블록 코폴리머(block copolymer), 그라프트 코폴리머(graft copolymer), 또는 이들의 조합 중에서 선택될 수 있다.

[0023] 일 실시예에 따르면, 상기 폴리머 리간드는 친유성(hydrophobic) 부분과, 친수성(hydrophilic) 부분을 포함할 수 있다.

[0024] 예를 들어, 상기 폴리머 리간드의 친유성 부분은 상기 양자 비드의 중심 방향으로 배열되고, 상기 폴리머 리간드의 친수성 부분은 상기 양자 비드의 외부 방향으로 배열될 수 있다.

[0025] 예를 들어, 상기 폴리머 리간드의 친수성 부분은 상기 양자 비드의 외부로 노출될 수 있다.

[0026] 일 실시예에 따르면, 상기 친수성 부분은 침(needle) 형태 또는 브러시(brush) 형태일 수 있다.

[0027] 일 실시예에 따르면, 상기 폴리머 리간드는 말단부에 아민 그룹, 아미드 그룹, 하이드록시 그룹, 말레이미드 그룹, 티올 그룹, 및 카르복실산 그룹 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0028] 일 실시예에 따르면, 상기 폴리머 리간드는 폴리스티렌, 폴리올레핀, 폴리비닐아세탈, 폴리에스테르, 폴리케톤, 폴리에테르, 폴리비닐피리딘, 폴리카보네이트, 폴리다이엔, 폴리아크릴산, 폴리아마이드, 및 폴리이미드; 이들의 랜덤 코폴리머, 및 블록 코폴리머; 폴리무수말레인산 그룹을 포함하는 폴리머; 및 폴리무수말레인산 그룹과 알킬아민으로 이루어진 그라프트 코폴리머; 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0029] 일 실시예에 따르면, 상기 폴리머 리간드가 둘 이상일 경우, 둘 이상의 폴리머 리간드는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0030] 일 실시예에 따르면, 상기 양자점이 둘 이상일 경우, 둘 이상의 양자점은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0031] 예를 들어, 상기 양자 비드 내에 50 내지 50,000개의 양자점이 포함되는 것일 수 있다.

[0032] 일 실시예에 따르면, 상기 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체는 제1 및 제2 펩티드 태그간 이소펩티드 결합(isopeptide bond)을 통해 상기 양자점-폴리머 복합체의 표면에 접합되는 것일 수 있다.

[0033] 예를 들어, 상기 제1 펩티드 태그는 말단 영역에 시스테인(Cys)을 포함하고, 상기 제2 펩티드 태그는 말단 영역

에 상기 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체의 FC 영역과 결합하는 분자를 포함하는 것일 수 있다.

[0034] 일 실시예에 따르면, 상기 키트는 측방 유동 분석용 스트립 형태로 구현될 수 있다.

[0035] 예를 들어, 상기 측방 유동 분석용 스트립은 상기 복수 개의 면역 검출용 접합체를 포함하는 접합 패드; 및 복수 개의 타겟 검체와 각각 특이적으로 결합하는 복수 개의 검출 항체가 고정된 단일의 테스트 영역을 포함하는 검출부;를 포함하는 것일 수 있다.

[0036] 예를 들어, 상기 측방 유동 분석용 스트립은 흡수성 샘플 패드를 추가로 포함하고, 상기 흡수성 샘플 패드, 접합 패드, 및 검출부는 순차적으로 일단부터 타단 방향으로 배치된 것일 수 있다.

발명의 효과

[0037] 일 측면에 따른 다중 검출용 키트는 뛰어난 광 안정성, 고발광 및 양자 효율을 갖는 양자점-폴리머 복합체를 포함하고, 상기 양자점-폴리머 복합체는 독립적인 발광 특성을 지니므로, 복수의 타겟 검체를 동시에 검출할 수 있다.

[0038] 일 측면에 따른 다중 검출용 키트는 독립적인 발광 특성 및 높은 민감도를 발휘할 수 있는 복수 개의 양자점-폴리머 복합체를 포함함으로써, 단일의 테스트 선 내에서 복수 개의 타겟 검체를 유효한 수준으로 검출하고, 이를 통해, 다수의 질환을 동시에 진단하는데 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 측방 유동 분석용 스트립 시스템을 설명하기 위한 모식도이다.

도 2는 일 실시예에 따른 측방 유동 분석용 스트립의 구조를 나타낸 모식도이다.

도 3은 일 실시예에 따른 240 nm의 직경을 갖는 양자 비드가 적용된 측방 유동 분석용 스트립의 검출 효능을 형광 강도를 통해 분석한 결과이다.

도 4는 일 실시예에 따른 270 nm의 직경을 갖는 양자 비드가 적용된 측방 유동 분석용 스트립의 검출 효능을 형광 강도를 통해 분석한 결과이다.

도 5는 일 실시예에 따른 300 nm의 직경을 갖는 양자 비드가 적용된 측방 유동 분석용 스트립의 검출 효능을 형광 강도를 통해 분석한 결과이다.

도 6은 일 실시예에 따른 370 nm의 직경을 갖는 양자 비드가 적용된 측방 유동 분석용 스트립의 검출 효능을 형광 강도를 통해 분석한 결과이다.

도 7은 일 실시예에 따른 양자 비드와 항체간 다양한 접합 비율을 갖는 면역 검출용 복합체가 적용된, 측방 유동 분석용 스트립의 검출 효능을 형광 강도를 통해 분석한 결과이다.

도 8은 일 실시예에 따른 270 nm의 직경을 갖는 양자 비드 100 ㎍과 항체 27.8 ㎍이 접합되어 형성된 면역 검출용 복합체를 포함하는 측방 유동 분석용 스트립의 검출 효능을 형광 강도를 통해 분석한 결과이다.

도 9는 일 실시예에 따른 적색, 녹색, 또는 청색의 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체가 적용된, 측방 유동 분석용 스트립의 검출 민감도를 형광 강도를 통해 분석한 결과이다.

도 10은 일 실시예에 따른 적색, 녹색, 또는 청색의 발광 특성을 갖는 복수 개의 면역 검출용 복합체간 다양한 비율로 혼합된, 측방 유동 분석용 스트립의 다중 검출 효능을 형광 강도를 통해 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 첨부한 도면을 참고로 하여 본 발명의 여러 실시예들에 대하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예들에 한정되지 않는다.

[0041] 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 동일 또는 유사한 구성요소에 대해서는 동일한 참조 부호를 붙이도록 한다.

[0042] 또한, 도면에서 나타난 각 구성의 크기 및 두께는 설명의 편의를 위해 임의로 나타내었으므로, 본 발명이 반드시 도시된 바에 한정되지 않는다.

[0043] 또한, 이하에서 사용되는 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 창의적 사상을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 이하에서, "포함한다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품, 성분, 재료 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 나타내려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품, 성분, 재료 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 이하에서 사용되는 "/"는 상황에 따라 "및"으로 해석될 수도 있고 "또는"으로 해석될 수도 있다.

[0044] 일 측면에 따르면, 양자점-폴리머 복합체; 및 상기 양자점-폴리머 복합체의 표면에 접합되고 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체;를 포함하는, 복수 개의 면역 검출용 접합체를 포함하는 타겟 검체의 다중 검출용 키트로서,

[0045] 상기 양자점-폴리머 복합체는 코어-쉘 구조를 갖는 하나 이상의 양자점(quantum dot), 상기 양자점 표면에 배치된 표면 개질 리간드, 및 하나 이상의 폴리머 리간드로 이루어진 3차원 자기 조립 구조(3D selfassembly structure)의 양자 비드(quantum bead)를 포함하고, 상기 하나 이상의 양자점이 상기 양자 비드 내에 분산되며, 상기 코어는 인듐 인화물(InP)을 포함하고, 상기 쉘의 두께는 3 nm 내지 9 nm이며, 상기 양자 비드의 유체 역학적 직경(Hydrodynamic Diameter: HD)은 270 nm 내지 300 nm이고, 상기 복수 개의 면역 검출용 복합체는 타겟 검체의 종류에 따라 각각 상이한 발광 파장을 갖는 것인, 타겟 검체의 다중 검출용 키트가 제공된다.

[0046] 본 명세서에서 용어, "타겟 검체의 다중 검출용 키트"는, 타겟 검체의 기능 및 용도에 따라, 용어, " 다중 진단 키트", "다중 판별 키트", "다중 검정 키트"와 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 상기 타겟 검체의 다중 검출용 키트는, 타겟 검체의 검출 및 이의 표지로서 상기 복수 개의 면역 검출용 접합체를 일 구성 요소로 포함한다면, 당업계 공지의 기술적 구성을 채용하여 그 형태를 변형하여 사용할 수 있다.

[0047] 일 구체예에서, 상기 타겟 검체의 다중 검출용 키트는 복수 개의 타겟 검체를 동시에 검출하거나, 복수 개의 타겟 검체에 대한 존재 유무를 동시에 판별하거나, 또는 복수 개의 타겟 검체로부터 비롯된 단일/복수의 질병 유무를 동시에 진단하기 위한 것일 수 있다. 이를 위하여, 상기 키트는 타겟 검체의 종류에 따라 분류되는 복수 개의 면역 검출용 복합체를 포함하며, 상기 분류된 복수 개의 면역 검출용 복합체는 각각 항체 및 양자점-폴리머 복합체 내 양자점의 크기가 상이한 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 복수 개의 면역 검출용 복합체는 타겟 검체의 종류에 따라 복수 개의 군(group)으로 분류될 수 있고, 상기 복수 개의 군 각각은 타겟 검체를 기준으로 하여, 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체 및 양자점-폴리머 복합체 내 양자점, 즉 코어의 크기가 상이하도록 마련될 수 있다. 여기서, 상기 양자점의 크기에 대한 조절은 예를 들어, 양자점 합성 과정에서 양자점 생성을 위한 전구체 물질들간 열 반응 시간의 변경을 통해 달성할 수 있으며, 상기 양자점의 크기에 대한 조절을 위한 당업계 공지의 기술이 비제한적으로 확장 적용 가능하다.

[0048] 일 구체예에서, 상기 복수 개의 면역 검출용 복합체 각각은 양자점-폴리머 복합체 내 양자점, 즉, 코어의 크기가 상이하며, 예를 들어, 적색(red), 녹색(green), 또는 청색(blue) 발광 특성을 갖는 양자점-폴리머 복합체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 복수 개의 면역 검출용 복합체는 600 nm 내지 700 nm 범위의 발광 파장을 갖는 제1 면역 검출용 복합체; 500 nm 내지 600 nm 범위의 발광 파장을 갖는 제2 면역 검출용 복합체; 및 400 nm 내지 500 nm 범위의 발광 파장을 갖는 제3 면역 검출용 복합체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 2 이상의 면역 복합체를 포함하는 것일 수 있다.

[0049] 일 구체예에서, 상기 복수 개의 면역 검출용 복합체는 적색 발광 특성을 갖는 600 nm 내지 700 nm 범위의 발광 파장을 갖는 제1 면역 검출용 복합체; 녹색 발광 특성을 갖는 500 nm 내지 600 nm 범위의 발광 파장을 갖는 제2 면역 검출용 복합체; 및/또는 청색 발광 특성을 갖는 400 nm 내지 500 nm 범위의 발광 파장을 갖는 제3 면역 검출용 복합체를 포함할 수 있다. 여기서, 상기 복수 개의 면역 검출용 복합체는 각각의 독립적인 발광 특성으로 비롯된 효과로서, 단일의 테스트 선에서 복수 개의 타겟 검체를 동시에 검출할 수 있다. 예를 들어, 타겟 검체 1종의 검출을 나타내는 적색, 녹색, 또는 청색 발광 특성, 타겟 검체 2 종의 검출을 나타내는 노란색, 보라색, 또는 청록색 발광 특성, 및 타겟 검체 3종의 검출을 나타내는 흰색의 발광 특성은 단일의 테스트 선에서 선택적으로 확인할 수 있다.

[0050] 타겟 검체에 대한 다중 검출의 유효성을 확보하기 위하여, 상기 제1 면역 검출용 복합체는 상대적으로 가장 낮은 수준의 민감도를 갖는 항체와 접합될 수 있고, 상기 제2 면역 검출용 복합체는 상대적으로 중간 수준의 민감도를 갖는 항체와 접합될 수 있고, 상기 제3 면역 검출용 복합체는 상대적으로 가장 높은 수준의 민감도를 갖는 항체와 접합될 수 있다. 또한, 타겟 검체에 대한 다중 검출의 유효성을 확보하기 위하여, 상기 제1 면역 검출용

복합체, 제2 면역 검출용 복합체, 및 제3 면역 검출용 복합체의 혼합 비율은 1 : 1 : 1 내지 1 : 1.5 : 3의 중량비 범위일 수 있다. 예를 들어, 상기 혼합 비율은 1 : 1 : 1 내지 1 : 1 : 1.5의 중량비 범위, 1 : 1 : 1 내지 1 : 1 : 2의 중량비 범위, 1 : 1 : 1 내지 1 : 1.2 : 1.8의 중량비 범위, 1 : 1 : 1 내지 1 : 1.2 : 2.4의 중량비 범위, 1 : 1 : 1 내지 1 : 1.4 : 2.1의 중량비 범위, 1 : 1 : 1 내지 1 : 1.4 : 2.8의 중량비 범위, 1 : 1 : 1 내지 1 : 1.5 : 2.3의 중량비 범위, 1 : 1 : 1 내지 1 : 1.5 : 3의 중량비 범위일 수 있다.

[0051] 보다 구체적으로, 제1 면역 검출용 복합체 및 제2 면역 검출용 복합체의 혼합 비율은 1 : 1 내지 1 : 3, 예를 들어, 1 : 1 내지 1 : 1.5; 1 : 1 내지 1 : 2.0; 1 : 1 내지 1 : 2.5; 또는 1 : 1 내지 1 : 3의 중량비 범위일 수 있거나, 제1 면역 검출용 복합체 및 제3 면역 검출용 복합체의 혼합 비율은 1 : 1 내지 1 : 3, 예를 들어, 1 : 1 내지 1 : 1.5; 1 : 1 내지 1 : 2.0; 1 : 1 내지 1 : 2.5; 또는 1 : 1 내지 1 : 3의 중량비 범위일 수 있거나, 제2 면역 검출용 복합체 및 제3 면역 검출용 복합체의 혼합 비율은 1 : 1 내지 1 : 2, 예를 들어, 1 : 1 내지 1 : 1.5 ; 또는 1 : 1 내지 1 : 2일 수 있다. 전술한 혼합 비율을 벗어나는 경우, 다중 검출의 유효성이 저하될 우려가 있다. 따라서, 상기 2종 또는 3종의 면역 검출용 복합체를 적용하여 다중 검출을 수행할 경우, 전술한 혼합 비율의 범위 하에서 혼합될 수 있다.

[0052] 본 명세서에서 용어, “타겟 검체”는 검출될 샘플 내 분자 또는 기타 물질을 의미할 수 있다. 예를 들어, 상기 타겟 검체는 항원성 물질, 리간드(모노- 또는 폴리에피토프), 합텐(haptens), 항체 및 이들의 조합을 포함할 수도 있다. 또한, 상기 타겟 검체는 독소, 유기 화합물, 단백질, 펩티드, 미생물, 아미노산, 핵산, 호르몬, 스테로이드, 비타민, 약물, 약물 중간체 또는 부산물, 세균, 바이러스 입자, 효모, 진균, 원생 동물 및 상기 물질들의 대사물 또는 그에 대한 항체를 포함할 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게, 상기 타겟 검체는 예를 들어, 페리틴; 크레아티닌키나아제 MB(CK-MB); 디곡신; 페니토인; 페노바르비톨; 카르바마제핀; 반코마이신; 젠타마이신; 테오필린; 발프로산; 퀴니딘; 황체화 호르몬(LH); 소포 자극 호르몬(FSH); 에스트라디올, 프로게스테론; C-반응성 단백질(C-reactive protein; CRP); 리포 칼린; IgE 항체; 사이토카인; 비타민 B2 마이크로-글로블린; 당화 헤모글로빈(Gly.Hb); 코르티졸; 디지톡신; N-아세틸프로카인아미드(NAPA); 프로카인아미드; 풍진-IgG 및 풍진 IgM과 같은 풍진에 대한 항체, 예를 들면 톡(톡소-IgG) 및 톡소포자충증 IgM과 같은 톡소포자충증에 대한 항체; 테스토스테론; 살리실레이트; 아세트아미노펜; 간염 B 바이러스 표면 항원(HBsAgs); 간염 B 코어 항원에 대한 항체, 예를 들면 항-간염 B 코어 항원 IgG 및 IgM(항-HBC); 인간 면역 결핍 바이러스 1 및 2(HIV 1 및 2); 인간 T-세포 백혈병 바이러스 1 및 2(HTLV); 간염 Be 항원(HBeAg); 간염 B e 항원에 대한 항체(항-HBe); 코로나바이러스; 인플루엔자 바이러스; 갑상선 자극 호르몬(TSH);티록신(T4); 총 트리요오도티로닌(총 T3); 자유 트리요오도티로닌(자유 T3); 암종배아 항원(CEA); 지질 단백질,콜레스테롤, 및 트리글리세리드; 및 알파 페토단백질(AFP)을 예시할 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 용어, "면역 검출용 접합체"는 광의로는 특정 물질 및 이에 접합된 표지(label)를 의미할 수 있다. 본 발명에서, 상기 특정 물질은 특이적인 결합을 통해 샘플 내 검체를 검출할 수 있는 물질로서 면역 검출용 접합체 내 항체를 지칭하며, 상기 표지는 면역 검출용 접합체 내 양자점-폴리머 복합체를 지칭하는 것일 수 있다. 여기서, "특이적인 결합"은 항체로부터 비롯된 특이성을 의미하는 것으로, 정의된 타겟 검체 또는 타겟 물질에 우선적으로 결합하는 것을 의미할 수 있다.

[0054] 본 명세서에서 용어, "항체"는 완전한 다클론(또는 폴리클론) 또는 단클론(모노클론) 항체 뿐만 아니라, 이의 단편(예를 들면, Fab, Fab', F(ab')2, Fv), 단일사슬 (ScFv), 다이아바디, 나노바디, 항체 단편들로 형성된 다중특이적 항체, 그의 돌연변이, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 요망되는 특이성의 항체 인식 부위를 포함하는 면역 글로불린 분자의 임의의 기타 변형 배열을 의미할 수 있다. 항체로는 임의의 범주에 해당되는 항체, 예를 들면 IgG, IgA, 또는 IgM (또는 그의 서브클래스), 및 특정 클래스에 속하지 않는 항체를 포함할 수 있다.

[0055] 일 구체예에서, 타겟 검체에 대한 다중 검출의 유효성을 확보하기 위하여,

[0056] 상기 면역 검출용 접합체는 양자점-폴리머 복합체 100 중량에 대하여, 20 내지 30 중량부의 항체가 접합된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 면역 검출용 접합체는 양자점-폴리머 복합체 100 중량에 대하여, 20 내지 30 중량부, 22 내지 30 중량부, 24 내지 30 중량부, 26 내지 30 중량부, 28 내지 30 중량부, 20 내지 28 중량부, 22 내지 28 중량부, 24 내지 28 중량부, 26 내지 28 중량부, 20 내지 26 중량부, 22 내지 26 중량부, 24 내지 26 중량부, 20 내지 24 중량부, 22 내지 24 중량부, 또는 22 내지 24 중량부의 항체가 접합된 것 일 수 있다.

[0057] 전술한 바와 같이, 종래 체외 진단 키트용 물질로 주로 사용하였던 금 나노입자의 경우, 진단 감도가 떨어져서 질병의 초기 진단이 어려운 문제점이 있었다. 이에, 다양한 유형의 양자점 복합체를 진단 키트용 물질로 사용하려는 시도가 이루어졌으나, 수분에 민감한 양자점의 고유의 속성 및 무기 입자의 독성으로 인한 인체 적용의 한

계점이 존재하였다. 또한, 1회의 검사를 통해 복수의 특정 질환 인자를 동시 검사하기 위하여, 통상적으로 스트립에 형성된 반응 영역, 예를 들어, 접합 패드 및 검출부의 개수를 증가시키는 방식이 제시되고 있으나, 이는 스트립의 길이를 증가시키고, 이에 따라 생체 시료 검체량과 반응 시간이 증가하고, 비특이적 항원-항체 반응이 야기되는 문제점이 존재한다.

[0058] 본 발명에 따른 양자점-폴리머 복합체는 생체 적합성을 갖는 인듐 인화물(InP)을 코어로 포함하고, 카드뮴(Cd), Pb(납) 등과 같이 독성을 갖는 것으로 알려진 원소를 포함하지 않는 생체적합성 양자점을 사용함으로써, 인체의 질병을 진단하기 위한 진단 키트로의 적용이 가능할 뿐만 아니라, 특유의 구조를 가짐으로써, 뛰어난 광안정성 및 양자 효율을 발휘할 수 있으며, 이를 통해 발광 세기 및 항원-항체 결합력이 극대화되는 효과를 발휘할 수 있다.

[0059] 본 발명의 양자점-폴리머 복합체의 구조를 구체적으로 설명하면, 상기 양자점-폴리머 복합체는 하나 이상의 양자점 및 하나 이상의 폴리머 리간드로 이루어진 3차원 자기 조립 구조(3D self-assembly structure)의 양자 비드를 포함하며, 상기 양자점-폴리머 복합체 구조와 관련하여, 국내 출원 제10-2022-0016432호의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0060] 구체적으로, 상기 양자 비드는 양자점과 폴리머 리간드의 친유성 부분에 의해 형성된 양자 비드의 코어부와 후술되는 폴리머 리간드의 친수성 부분을 포함한다.

[0061] 예를 들어, 상기 양자 비드는 양자점과 폴리머 리간드의 친유성 부분에 의해 형성된 양자 비드의 코어부와 폴리머 리간드의 친수성 부분을 포함하는 쉘부를 포함하는 코어-쉘 구조일 수 있다.

[0062] 예를 들어, 상기 양자점은 코어로서 인듐 인화물(InP)의 나노입자를 사용하고, 쉘은 징크텔로리움(ZnTe), 징크설파이드(ZnS), 징크옥사이드(ZnO), 징크셀레나이드(ZnSe), 징크셀레늄설파이드(ZnSeS), 인듐갈륨나이트라이드(InGaN), 인듐갈륨포스파이드(InGaP), 인듐징크포스파이드(InZnP), 카파셀레늄텔로루임(CuSeTe), 카파인듐셀레늄($CuInSe_2$), 카파인듐설파이드($CuInS_2$), 실버인듐설파이드($AgInS_2$), 및 틴텔로리움(SnTe) 중 하나 이상의 무기입자를 포함할 수 있다. 상기 양자점은 카드뮴(Cd), 납(Pb)와 같이 독성을 갖는 것으로 알려진 원소를 포함하지 않음으로써, 생체 적합성을 가지므로 인체 질병 진단 키트의 재료로서 사용가능하다.

[0063] 인듐 인화물(InP)은 본질적으로 수분, 산소 등의 외부환경에 쉽게 열화되는 문제점이 있을 뿐만 아니라, 이러한 InP의 불안정성을 보완하기 위한 표면처리 과정에서 광특성이 저하되는 한계점이 존재하였다. 따라서, 인듐 인화물계 양자점의 활용에 여러가지 제약이 따른다.

[0064] InP의 불안정성을 보완하기 위한 노력으로 InP 코어 입자 표면에 쉘을 적용한 코어-쉘 양자점이 알려져 있다. 이러한 InP 양자점은 쉘에 의한 InP의 저하가 억제되나, 쉘의 두께가 증가하는 경우 격자 결함의 생성, 층간 결정 구조의 부정합에 따른 결함의 발생량 증가, 또는 코어 입자로부터 전환되어 방출된 광이 광 방출 경로에 존재하는 쉘의 결정에 의한 광 산란 또는 광 차단 효과로 인해 광 효율 감소를 유발할 수 있으므로, 양자점의 제조에서 쉘의 두께를 적절히 조절하는 것은 매우 중요한 작업이며, 일반적으로 쉘의 두께가 증가하는 경우 광 효율이 감소한다고 알려져 있다.

[0065] 이와 관련하여 통상적으로 입수가능한 InP 코어-쉘 양자점의 쉘 두께는 약 2 nm ± 0.5 nm이고, 이 정도의 쉘 두께를 갖는 InP 양자점은 다른 양자점과 대등한 정도의 광 효율을 갖는 것으로 알려져 있다.

[0066] 이러한 통상적인 InP 양자점은 본 발명에 따른 양자 비드를 형성하는 과정에서 본질적 불안정성에 기인한 결함이 발생될 뿐만 아니라, 폴리머 리간드와의 상호작용이 충분하지 못하여 양자점이 비드 내로 충분히 분산되지 못하여, 양자-비드의 광효율이 저하되는 문제점이 존재했다. 이에, 본 발명은 이러한 문제점을 해결하기 위한 다양한 방법을 모색하는 과정에서, InP 양자점 쉘의 두께를 3 nm 내지 9 nm로 구성하며, 양자점의 표면을 표면 개질 리간드, 예를 들어 하나 이상의 티올기를 포함하는 티올계 화합물 유래 리간드로 개질하는 경우, 인듐 인화물계 양자점이 양자 비드 내에 충분히 포함되고 분산되어, 면역 검출용 접합체 및 이를 포함하는 진단 키트에 적용하기에 충분한 발광 효율을 갖을 수 있다.

[0067] 일 실시예에 따르면, 상기 양자 비드는 하나 이상의 양자점을 포함하는데, 이때 상기 양자점이 둘 이상일 경우, 둘 이상의 양자점은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0068] 또한, 상기 폴리머 리간드는 양자점과 상호작용하여 양자 비드의 중심부를 형성하는 친유성 부분과 수계 분산성에 도움을 주며, 진단 키트에 적용하기 위하여 사용되는 항체와의 결합에 사용되는 친수성 부분을 포함할 수 있다.

[0069] 이때, 상기 폴리머 리간드는 랜덤 코폴리머 (random copolymer), 블록 코폴리머(block copolymer), 그라프트 코폴리머(graft copolymer), 또는 이들의 조합일 수 있다. 여기서, 랜덤 코폴리머란 서로 다른 두 종류 이상의 단위체가 랜덤하게 나열되어 있는 형태의 코폴리머를 의미한다. 또한, 블록 코폴리머란 서로 다른 두 종류 이상의 고분자 사슬이 화학 결합을 통해 연결되어 있는 형태의 코폴리머를 의미한다.

[0070] 상기 블록 코폴리머는 친수성 단위체끼리 결합된 고분자 사슬과 친유성 단위체끼리 결합된 고분자 사슬이 연결된 형태이고, 상기 랜덤 코폴리머는 친수성 단위체와 친유성 단위체가 랜덤하게 배치되어 중합된 형태이다.

[0071] 상기 양자 비드는 양자점과 폴리머 리간드의 친유성 부분과의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의해서 형성될 수 있으며, 양자점과 폴리머 리간드의 친유성 부분에 의해 형성된 양자 비드의 코어부 표면으로 뻗어있는 폴리머 리간드의 친수성(hydrophilic) 부분에 의해서 수계 분산 및 항체와의 결합력이 확보된다.

[0072] 일 구현예에 따르면, 상기 폴리머 리간드의 친유성 부분은 상기 양자 비드의 중심 방향으로 배열되고, 상기 폴리머 리간드의 친수성 부분은 상기 양자 비드의 외부 방향으로 배열될 수 있다.

[0073] 일 구현예에 따르면, 상기 폴리머 리간드의 친수성 부분은 침(needle) 형태 또는 브러시(brush) 형태 일 수 있다.

[0074] 여기서, "침 형태"는, 폴리머 리간드의 친수성 부분이 대체적으로 짧고 단일 기능기 (functional group) 을 가진 형태를 의미하며, "브러시 형태"는 폴리머 리간드의 친수성 부분이 대체적으로 길고, 수 개 이상의 기능기를 가진 형태를 의미한다.

[0075] 예를 들어, 상기 폴리머 리간드의 친수성 부분은 특별히 한정되지는 않으나, 브러시 형태일 수 있다. 상기와 같이 폴리머 리간드의 친수성 부분이 브러시 형태일 경우, 침 형태일 때와 비교하여, 후술되는 바와 같이 항체가 결합할 때, 폴리머 리간드의 친수성 부분과 항체가 결합할 수 있는 표면적이 넓어지기 때문에 더 많은 양의 항체와 결합할 수 있다.

[0076] 예를 들어, 상기 폴리머 리간드는 특별히 한정되지는 않으나, 블록 코폴리머일 경우 브러시 형태일 수 있고, 랜덤 코폴리머와 그라프트 코폴리머일 경우, 침 형태일 수 있다.

[0077] 항체의 함량을 증가시킬 때, 각각의 양자점-폴리머 복합체 중의 항체의 결합 형태를 확인할 수 있다. 브러시 형태의 폴리머 리간드의 친수성 부분을 포함하는 양자점-폴리머 복합체의 경우, 항체의 함량을 늘리더라도, 전술한 바와 같이 폴리머 리간드의 친수성 부분과 항체가 결합할 수 있는 표면적이 넓기 때문에, 항체들이 폴리머 리간드의 친수성 부분의 표면에 잘 결합한다.

[0078] 반면에, 침 형태의 폴리머 리간드의 친수성 부분을 포함하는 양자점-폴리머 복합체의 경우, 항체의 함량을 늘릴 경우, 폴리머 리간드의 친수성 부분과 항체가 결합할 수 있는 표면적이 충분하지 않기 때문에, 항체들이 폴리머 리간드의 친수성 부분의 표면이 아닌, 항체들끼리 응집하기 때문에, 항체 결합 효율이 브러시 형태의 폴리머 리간드의 친수성 부분에 비해 다소 떨어질 수 있다.

[0079] 또한, LFA 시스템에 본 발명의 양자점-폴리머 리간드 복합체를 적용할 경우, 폴리머 리간드의 친수성 부분이 브러시 형태인 경우가 폴리머 리간드의 친수성 부분이 침 형태인 경우에 비해, 항원이 항체에 보다 많이 결합함을 확인할 수 있다.

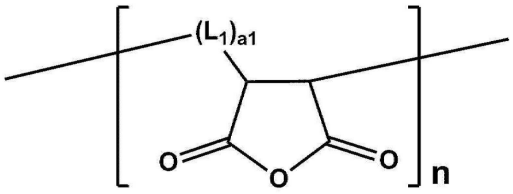
[0080] 예를 들어, 상기 폴리머 리간드는 말단부에 아민 그룹, 아미드 그룹, 하이드록시 그룹, 말레이미드 그룹, 티올 그룹, 및 카르복실산 그룹 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0081] 예를 들어, 상기 폴리머 리간드는 폴리스티렌, 폴리올레핀, 폴리비닐아세탈, 폴리에스테르, 폴리케톤, 폴리에테르, 폴리비닐피리딘, 폴리카보네이트, 폴리다이엔, 폴리아크릴산, 폴리아마이드, 및 폴리이미드; 이들의 랜덤 코폴리머, 및 블록 코폴리머; 폴리무수말레인산 그룹을 포함하는 폴리머; 및 폴리무수말레인산 그룹과 알킬아민으로 이루어진 그라프트 코폴리머 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

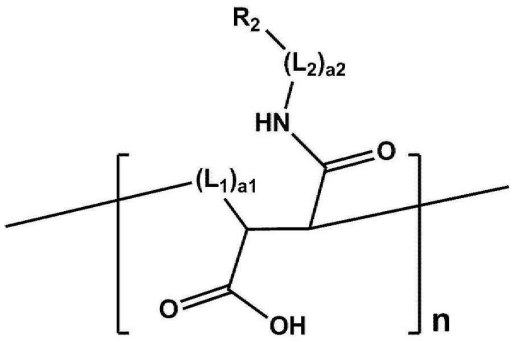
[0082] 예를 들어, 상기 폴리무수말레인산 그룹을 포함하는 폴리머는 및 블록 코폴리머; 폴리무수말레인산 그룹을 포함하는 폴리머; 및 폴리무수말레인산 그룹과 알킬아민으로 이루어진 그라프트 코폴리머 중에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0083] 예를 들어, 상기 폴리무수말레인산 그룹을 포함하는 폴리머는 하기 화학식 1로 표시되고, 상기 폴리무수말레인산 그룹과 알킬아민으로 이루어진 그라프트 코폴리머는 하기 화학식 1A 또는 1B로 표시될 수 있다:

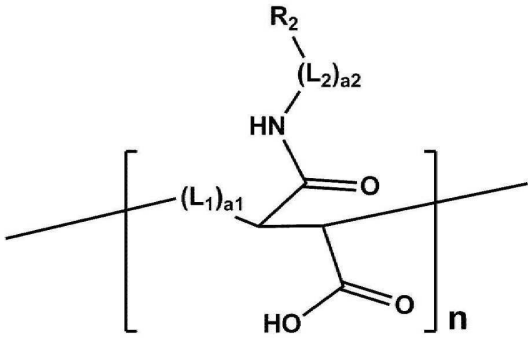
[0084] <화학식 1>

[0085] 

[0086] <화학식 1A>

[0087] 

[0088] <화학식 1B>

[0089] 

[0090] 화학식 1, 1A 및 1B 중,

[0091] L_1 및 L_2는 서로 독립적으로, C_1-C_{20} 알킬렌기; 및 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 시아노기, 니트로기, C_1-C_{10} 알킬기, C_6-C_{20} 아릴기, 및 C_1-C_{10} 알콕시기 중 선택된 하나 이상으로 치환된 C_1-C_{20} 알킬렌기 중에서 선택되고,

[0092] a1은 1 내지 5 중에서 선택된 정수이고,

[0093] a2는 0 내지 5 중에서 선택된 정수이고,

[0094] R_2는 C_1-C_{20} 알킬기; 및 중수소, -F, -Cl, -Br, -I, 시아노기, 니트로기, C_1-C_{10} 알킬기, C_6-C_{20} 아릴기, 및 C_1-C_{10} 알콕시기 중 선택된 하나 이상으로 치환된 C_1-C_{20} 알킬기 중에서 선택되고,

[0095] n은 1 이상 1000 이하이다.

[0096] 예를 들어, 상기 화학식 1A 및 1B 중,

[0097] L_1 및 L_2는 서로 독립적으로, 메틸렌기, 에틸렌기, 프로필렌기, 이소프로필렌기, 부틸렌기, 이소부틸렌기, 펜틸렌기, 헥실렌기, 헵틸렌기, 옥틸렌기, 노닐렌, 및 데실렌; 및 메틸기, 에틸기, 프로필기, 부틸기, 펜틸기, 헥실기, 페닐기, 메톡시기, 및 에톡시기 중에서 선택된 하나 이상으로 치환된, 메틸렌기, 에틸렌기, 프로필렌기, 이소프로필렌기, 부틸렌기, 이소부틸렌기, 펜틸렌기, 헥실렌기, 헵틸렌기, 옥틸렌기, 노닐렌, 및 데실렌 중에서 선택될 수 있다.

[0098] 예를 들어, 상기 화학식 1A 및 1B 중,

[0099] R_2는 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, 부틸기, 이소부틸기, 펜틸기, 헥실기, 헵틸기, 옥틸기, 노닐기, 및 데실기 중에서 선택될 수 있다.

[0100] 예를 들어, 상기 폴리머 리간드는 알킬렌무수말레인산 모노머와 알킬아민 모노머의 랜덤 코폴리머일 수 있다.

[0101] 예를 들어, 상기 폴리머 리간드는 폴리알킬렌무수말레인산 폴리머와 알킬아민 모노머의 그라프트 코폴리머일 수 있다.

[0102] 예를 들어, 상기 폴리머 리간드는 폴리이소부티렌무수말레인산 (poly(isobutylene-alt-maleic anhydride)-헥사데실아민 그라프트 코폴리머일 수 있다.

[0103] 이때, 상기 폴리머 리간드가 둘 이상일 경우, 둘 이상의 폴리머 리간드는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0104] 일 구현예에 따르면, 상기 양자 비드의 유체 역학적 직경(Hydrodynamic Diameter: HD)은 270 nm 내지 300 nm일 수 있다. 예들 들어, 상기 양자 비드의 유체 역학적 직경은 270 nm 내지 300 nm, 275 nm 내지 300 nm, 280 nm 내지 300 nm, 285 nm 내지 300 nm, 290 nm 내지 300 nm, 295 nm 내지 300 nm, 270 nm 내지 295 nm, 275 nm 내지 295 nm, 280 nm 내지 295 nm, 285 nm 내지 295 nm, 290 nm 내지 295 nm, 270 nm 내지 290 nm, 275 nm 내지 290 nm, 280 nm 내지 290 nm, 285 nm 내지 290 nm, 270 nm 내지 285 nm, 275 nm 내지 285 nm, 280 nm 내지 285 nm, 270 nm 내지 280 nm, 275 nm 내지 280 nm, 또는 270 nm 내지 275 nm일 수 있다. 여기서, 상기 양자 비드의 유체 역학적 직경에 대한 조절은 예를 들어, 양자점 합성 과정에서 폴리머 리간드의 함량의 변경을 통해 달성할 수 있으며, 상기 양자 비드의 유체 역학적 직경에 대한 조절을 위한 당업계 공지의 기술이 비제한적으로 확장 적용 가능하다.

[0105] 이때, 상기 범위를 벗어나, 상기 양자 비드의 유체 역학적 직경이 270 nm 미만일 경우에는, 내부에 포함된 양자점의 개수가 적어 발광 세기가 약하여 복수의 타겟 검체에 대한 검출 감도가 미약하다는 문제점이 있다. 반면, 상기 양자 비드의 유체 역학적 직경이 300 nm를 초과할 경우에는, 균일한 크기로 합성하기 어렵고, 항체의 접합 과정에서 뭉침 현상이 야기되어, 면역 검출용 복합체가 멤브레인에 걸려 background signal을 생성한다는 문제점이 있다.

[0106] 예를 들어, 상기 양자 비드의 코어부를 이루는 양자점의 개수는 양자 비드의 크기에 따라 적절히 조절될 수 있고, 특별히 한정되지는 않으나, 예를 들어, 50,000 이하일 수 있고, 예를 들어 50 내지 50,000일 수 있다. 예를 들어, 상기 양자점의 개수는 40,000 이하일 수 있고, 예를 들어 30,000 이하일 수 있고, 예를 들어, 20,000 이하일 수 있고, 예를 들어, 10,000 이하일 수 있고, 예를 들어, 5,000 이하일 수 있고, 예를 들어, 4,000 이하일 수 있고, 예를 들어, 3,000 이하일 수 있고, 예를 들어, 1500 이하일 수 있으며, 예를 들어 50 내지 1500일 수 있고, 예를 들어 50 내지 1450일 수 있고, 예를 들어 60 내지 1450일 수 있고, 예를 들어 60 내지 1400일 수 있고, 예를 들어 70 내지 1400일 수 있고, 예를 들어 70 내지 1350일 수 있고, 예를 들어 80 내지 1350일 수 있다.

[0107] 이때, 상기 범위를 벗어나, 상기 양자 비드의 코어부를 이루는 양자점의 개수가 1500을 초과할 경우에는, 인근에 위치한 양자점끼리의 형광 소광 (emission quenching) 현상이 발생할 수 있으며, 반면에 상기 양자점의 개수가 50 미만일 경우에는, 발광 세기가 약한 문제점이 있다.

[0108] 상기 양자 비드의 발광 파장은 400~700nm인 것이 바람직하지만, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0109] 일 구체예에서, 상기 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체는 제1 및 제2 펩티드 태그간 이소펩티드 결합(isopeptide bond)을 통해 상기 양자점-폴리머 복합체의 표면에 접합되는 것일 수 있다.

[0110] 예를 들어, 상기 제1 및 제2 펩티드 태그는 SpyTag 및 SpyCatcher 쌍; SnoopTag 또는 SnoopTagJr 및 SnoopCatcher 쌍; RrgATag, RrgATag2 또는 DogTag 및 RrgACatcher 쌍, IsopepTag Pilin-C 쌍; IsopepTag-N 및 Pilin-N 쌍; PsCsTag 및 PsCsCatcher 쌍; 및 SnoopLigase에 의해 매개된 SnoopTagJr 및 DogTag 쌍 중 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게, 제1 및 제2 펩티드 태그는 SpyTag 및 SpyCatcher 쌍일 수 있다.

[0111] 구체적으로, 상기 제1 태그는 양자점-폴리머 복합체의 표면에 접합되고, 상기 제2 태그는 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체와 접합되는 것일 수 있다. 이를 위하여, 상기 제1 태그는 말단 영역에 적어도 1 이상의 시스테인 (Cys)을 포함할 수 있고 (SC-Cys), 상기 제2 태그는 말단 영역에 상기 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체의 FC 영역과 결합하는 분자를 포함할 수 있다 (ST-Nb). 상기 항체의 FC 영역과 결합하는 분자는, 타겟 검체와는 결합을 형성하지 않되, 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 항체의 FC 영역에 특이적인 결합을 형성함으로

서, 항체의 Fab 영역이 외부로 노출되도록 하는 기능성을 부여할 수 있다. 상기 분자로는 예를 들어, 전술한 특이적인 결합을 갖는 또 다른 항체 또는 이의 단편들이 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0112] 여기서, 상기 제1 펩티드 태그의 말단 영역은 제2 태그와 결합을 형성하는 영역을 제외한 영역으로서, 양자점-폴리머 복합체 내 표면 개질 리간드와 접합, 구체적으로, 표면 개질 리간드의 티올기와 이황화 결합을 형성하는 것일 수 있다. 또한, 상기 제2 펩티드 태그의 말단 영역은 제1 태그와 결합을 형성하는 영역을 제외한 영역으로서, 항체의 FC 영역과 결합하는 분자를 포함함으로써, Y 자형 구조를 갖는 항체를 양자점-폴리머 복합체 표면에 보다 조밀하게 접합시킬 수 있을 뿐만 아니라, Fab 영역이 외부로 노출되도록 항체의 배향을 조절할 수 있다. 이러한 양자점-폴리머 복합체와 항체간 접합 구조는 궁극적으로 타겟 검체에 대한 검출 감도를 향상시키는데 기여할 수 있다.

[0113] 일 구체예에서, 상기 타겟 검체의 검출용 키트는 항원-항체 시스템에 적용 가능한 항원을 검출하기 위한 것으로서, 상기 항원에 기반한 체외 진단용 키트일 수 있다. 예를 들어, 상기 체외 진단용 키트는 다양한 질병 (암, 심장병, COVID-19, 말라리아 등 감염병)의 조기 진단을 위한 것일 수 있다. 또한, 상기 타겟 검체의 검출용 키트 (220)는 측방 유동 분석용(Lateral flow assay, LFA) 스트립의 형태로 구현될 수 있다.

[0114] 예를 들어, 도 1 및 2를 참조하면, 상기 측방 유동 분석용 스트립(220)은 상기 복수 개의 면역 검출용 접합체를 포함하는 접합 패드(222); 및 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 복수 개의 검출 항체가 고정된 단일의 테스트 영역(231), 및 상기 타겟 검체에는 특이적으로 결합하지 않으나 상기 면역 검출용 접합체 내 타겟 검체와 특이적으로 결합하는 상기 검출 항체와 결합하는 대조군 항체가 고정된 대조 영역(232)을 포함하는 검출부(230); 를 포함할 수 있다,

[0115] 예를 들어, 도 2를 참조하면, 상기 측방 유동 분석용 스트립 (220)은 흡수성 샘플 패드(221), 접합 패드(222), 및 검출부(230)를 포함할 수 있다. 상기 흡수성 샘플 패드(221)는 시료(검액)가 흡수될 수 있는 것으로, 상기 흡수성 샘플 패드(221)는 시료가 잘 흡수될 수 있도록 건조하여 제조될 수 있다. 상기 접합 패드(222)는 상기 흡수성 샘플 패드(221) 하단 또는 인접한 면에 위치하는 것으로, 전술한 바와 같이, 타겟 검체와 반응하는 복수 개의 면역 검출용 접합체를 포함할 수 있다. 상기 흡수성 샘플 패드(221)에서 흡수된 시료는 상기 접합 패드(222)로 이동되며, 상기 시료에 복수 개의 타겟 검체가 있으면, 상기 접합 패드(222) 내 각각의 면역 검출용 접합체의 반응, 구체적으로 항원-항체 반응을 통해 면역 복합체를 형성하게 된다. 상기 검출부(230)는 상기 형성된 면역 복합체와 결합할 수 있는 물질이 코팅되어 있는 테스트 영역 또는 테스트 선(231)과 대조군에 사용되는 원료 물질이 코팅되어 있는 대조 영역 또는 대조 선(232)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 대조선(232)은 가시성(눈에 보이는) 밴드로 이루어질 수 있으며, 상기 테스트 선(231)은 반응에 의해 가시성(눈에 보이는) 밴드로 변화될 수 있는 것일 수 있다. 상기 검출부(230)는 맴브레인으로도 지칭될 수 있으며, 재질은 나이트로 셀룰로오스로 이루어지는 것 일 수 있으나, 필요에 따라 다른 재질이 사용될 수도 있다.

[0116] 예를 들어, 상기 검출부(230)의 테스트 선(231)에서, 테스트 선에 고정된 검출 항체는 [타겟 검체(항원)-제1 항체를 포함하는 면역 검출용 접합체]와 결합을 형성할 있으며, 이는 타겟 검체 및 이에 상응하는 면역 검출용 접합체의 조합에 따라 복수 개로 존재할 수 있으며, 본 발명의 목적상 상기 테스트 선은 단일의 영역일 수 있다. 또한, 상기 검출부(230)의 대조 선(231)에서, 대조선에 고정된 대조군 항체는 상기 접합 패드(222)에서 면역 복합체를 형성하지 못한 잔여 면역 검출용 접합체와 결합을 형성할 수 있다. 따라서, 전술한 면역 검출용 접합체 기반의 항원-항체 반응을 통해 타겟 검체의 유무를 확인할 수 있을 뿐만 아니라, 필요에 따라, 타겟 검체의 수준을 정량적으로 평가할 수 있다.

[0117] 예를 들어, 상기 측방 유동 분석용 스트립(220)에서, 상기 흡수성 샘플 패드(221), 접합 패드(222), 및 검출부(230)은 순차적으로 일단부터 타단 방향으로 배치되는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 흡수성 샘플 패드(221), 상기 접합 패드(222), 및 상기 검출부(230)는, 일측에서부터 상기 흡수성 샘플 패드(221), 상기 접합 패드(222), 상기 검출부(230)가 중첩 또는 근접하도록 결합되도록 배치할 수 있다.

[0118] 예를 들어, 상기 측방 유동 분석용 스트립(220)은 상기 접합 패드(222)와 상기 검출부(230)에서 반응하지 않은 시료를 흡수할 수 있는 흡습 패드(223)를 더 포함할 수 있다. 상기 흡습 패드(223)는 상기 검출부(230)에 구비된 대조선과 근접한 영역에서 접촉되면서 상기 접합 패드(222)와 상기 검출부(230)에서 반응하지 않은 시료를 흡수할 수 있다. 상기 흡습 패드(223)는 셀룰로오스 소재로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 흡습 패드(223)는 시료가 잘 흡수될 수 있도록 건조하여 제조될 수 있다.

[0119] 다른 한 측면에 따르면, 상기 복수 개의 면역 검출용 접합체와 임의의 타겟 검체를 포함하는 샘플을 접촉시키는

단계를 포함하는, 복수의 타겟 검체를 검출하는 방법이 제공된다.

[0120] 타겟 검체를 검출하는 방법에 언급된 용어 또는 요소 중 타겟 검체의 다중 검출용 키트에 대한 설명에서 언급된 것과 동일한 것은, 상기한 바와 같다.

[0121] 본 명세서에서 용어, “샘플"은 검출하고자 하는 타겟 검체를 함유할 수 있는 한, 특별히 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 샘플은 생물학적 샘플, 예를 들면 생물학적 유체(fluid) 또는 생물학적 조직일 수 있다. 생물학적 유체의 예로서, 뇨, 혈액(전혈), 혈장, 혈청, 타액, 정액, 대변, 가래, 뇌척수액, 눈물, 점액, 양수 등을 들 수 있다. 생물학적 조직은 세포의 집괴로서, 대체적으로 인간, 동물, 식물, 세균, 진균 또는 바이러스 구조물의 구조적 물질의 하나를 형성하는 세포 내 물질들과 특정 종류의 집합으로서 연결 조직, 상피 조직, 근육 조직 및 신경 조직 등이 이에 해당될 수 있다. 또한, 생물학적 조직의 예에는 장기, 종양, 림프절, 동맥 및 개별적인 세포(들)도 포함될 수 있다.

[0122] 본 명세서에서 용어, "접촉"은 2개의 물질간의 직접적인 접촉을 의미하기는 하나, 광의로는 구성 요소와 액체 흐름 간의 접촉이 이루어지는 한, 임의의 추가 구성 요소가 개재될 수 있는 것으로 이해될 수 있다.

[0123] 이하의 합성예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단, 합성예는 본 발명을 예시하기 위한 것이지 이들만으로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0124] **(합성예)**

[0125] **합성예 1: InP QD의 합성**

[0126] InP 0.8 mmol 및 1.6 ml의 트리옥틸포스핀(Trioctylphosphine)과 3.6 mmol의 아연(Zinc oleate가 트리옥틸아민에 용해된 용액 5.97 ml), 0.5 mmol의 셀레늄(셀레늄이 트리옥틸포스핀에 용해된 용액 0.25 ml)을 3-neck flask에 넣고 진공 펌프를 통해 탈기(Degassing)을 진행하였다.

[0127] 이후, 아르곤으로 퍼징한 후 아르곤 가스 분위기에서 180℃로 승온 하였으며, 부피 비 1:1의 불화수소산-트리옥틸아민 (Hydrofluoric acid-Trioctylamine) 혼합 용액 0.15 ml를 주입하여 30분간 반응을 진행하였다.

[0128] 이후 340℃로 승온하여 1.4 mmol의 아연(Zinc oleate가 트리옥틸아민에 용해된 용액 2.33 ml)을 1회, 0.5 mmol의 셀레늄(셀레늄이 트리옥틸포스핀에 용해된 용액 0.25 ml)을 2회 주입하여 두꺼운 ZnSe 쉘을 형성하고, ZnS 쉘 형성을 위해 320 ℃로 온도를 낮춰 1.2 mmol의 아연(Zinc oleate가 트리옥틸아민에 용해된 용액 2.0 ml) 과 0.25 mmol의 황(황이 트리옥틸포스핀에 용해된 용액 0.125 ml)을 번갈아 가며 각각 두 번과 여덟 번 주입하였다.

[0129] 이후 0.5 mmol의 황(황이 트리옥틸포스핀에 용해된 용액 0.25 ml)을 한 번 더 주입하고 260℃에서 반응을 1시간 유지하였으며, 온도를 180℃로 낮춰 1-도데칸티올(1-Dodecanethiol) 0.15 ml를 주입하여 양자점 표면에 리간드를 추가하고 합성을 종료하였다.

[0130] 상기 양자점의 크기에서 InP 나노입자의 직경(3nm)을 고려하여 쉘 두께를 계산하였으며, 쉘의 두께는 약 3.75 nm 임을 확인했다.

[0131] 이후, 상기 합성된 양자점 (0.6 mg)과 폴리스티렌-폴리아크릴산 블록 코폴리머 (4 mg) (폴리머 리간드)를 테트라하이드로퓨렌(tetrahydrofuran) (1 ml)에 분산시킨 뒤 교반한 상태에서 물 (1 ml)을 첨가해준 뒤 이를 정제하여, 양자 비드를 제조하였다.

[0132] **합성예 1-1. 유체 역학적 직경이 상이한 InP QD의 합성**

[0133] **(1)240 nm 직경을 갖는 InP QD**

[0134] 상기 합성된 양자점 (0.6 mg)과 폴리스티렌-폴리아크릴산 블록 코폴리머 (3 mg) (폴리머 리간드)를 테트라하이드로퓨렌(tetrahydrofuran) (1 ml)에 분산시킨 뒤 교반한 상태에서 물 (1 ml)을 첨가해준 뒤 이를 정제하여, 240 nm 직경을 갖는 양자 비드를 제조하였다.

[0135] **(2) 270 nm 직경을 갖는 InP QD**

[0136] 상기 합성된 양자점 (0.6 mg)과 폴리스티렌-폴리아크릴산 블록 코폴리머 (3.5 mg) (폴리머 리간드)를 테트라하이드로퓨렌(tetrahydrofuran) (1 ml)에 분산시킨 뒤 교반한 상태에서 물 (1 ml)을 첨가해준 뒤 이를 정제하여, 270 nm 직경을 갖는 양자 비드를 제조하였다.

[0137] (3) 300 nm 직경을 갖는 InP QD

[0138] 상기 합성된 양자점 (0.6 mg)과 폴리스티렌-폴리아크릴산 블록 코폴리머 (4.0 mg) (폴리머 리간드)를 테트라하이드로퓨렌(tetrahydrofuran) (1 ml)에 분산시킨 뒤 교반한 상태에서 물 (1 ml)을 첨가해준 뒤 이를 정제하여, 300 nm 직경을 갖는 양자 비드를 제조하였다.

[0139] (4) 370 nm 직경을 갖는 InP QD

[0140] 상기 합성된 양자점 (0.6 mg)과 폴리스티렌-폴리아크릴산 블록 코폴리머 (4.5 mg) (폴리머 리간드)를 테트라하이드로퓨렌(tetrahydrofuran) (1 ml)에 분산시킨 뒤 교반한 상태에서 물 (1 ml)을 첨가해준 뒤 이를 정제하여, 370 nm 직경을 갖는 양자 비드를 제조하였다.

[0141] 합성예 1-2: 발광 특성이 상이한 InP QD의 합성

[0142] (1) 적색 발광 특성을 갖는 InP QD

[0143] InP 0.8 mmol 및 1.6 ml의 트리옥틸포스핀(Trioctylphosphine)과 3.6 mmol의 아연(Zinc oleate가 트리옥틸아민에 용해된 용액 5.97 ml), 0.5 mmol의 셀레늄(셀레늄이 트리옥틸포스핀에 용해된 용액 0.25 ml)을 3-neck flask에 넣고 진공 펌프를 통해 탈기(Degassing)을 진행하였다. 이후, 아르곤으로 퍼징한 후 아르곤 가스 분위기에서 180℃로 승온 하였으며, 부피 비 1:1의 불화수소산-트리옥틸아민 (Hydrofluoric acid-Trioctylamine) 혼합 용액 0.15 ml를 주입하여 약 30 분간 반응을 진행하여, 4nm 직경의 InP 코어를 합성하였다. 이후, 상기 합성예 1의 과정을 수행하여, 적색 발광 특성을 갖는 InP QD를 합성하였다.

[0144] (2) 녹색 발광 특성을 갖는 InP QD

[0145] InP 0.8 mmol 및 1.6 ml의 트리옥틸포스핀(Trioctylphosphine)과 3.6 mmol의 아연(Zinc oleate가 트리옥틸아민에 용해된 용액 5.97 ml), 0.5 mmol의 셀레늄(셀레늄이 트리옥틸포스핀에 용해된 용액 0.25 ml)을 3-neck flask에 넣고 진공 펌프를 통해 탈기(Degassing)을 진행하였다. 이후, 아르곤으로 퍼징한 후 아르곤 가스 분위기에서 180℃로 승온 하였으며, 부피 비 1:1의 불화수소산-트리옥틸아민 (Hydrofluoric acid-Trioctylamine) 혼합 용액 0.15 ml를 주입하여 약 20 분간 반응을 진행하여, 3nm 직경의 InP 코어를 합성하였다. 이후, 상기 합성예 1의 과정을 수행하여, 녹색 발광 특성을 갖는 InP QD를 합성하였다.

[0146] (3) 청색 발광 특성을 갖는 InP QD

[0147] InP 0.8 mmol 및 1.6 ml의 트리옥틸포스핀(Trioctylphosphine)과 3.6 mmol의 아연(Zinc oleate가 트리옥틸아민에 용해된 용액 5.97 ml), 0.5 mmol의 셀레늄(셀레늄이 트리옥틸포스핀에 용해된 용액 0.25 ml)을 3-neck flask에 넣고 진공 펌프를 통해 탈기(Degassing)을 진행하였다. 이후, 아르곤으로 퍼징한 후 아르곤 가스 분위기에서 180℃로 승온 하였으며, 부피 비 1:1의 불화수소산-트리옥틸아민 (Hydrofluoric acid-Trioctylamine) 혼합 용액 0.15 ml를 주입하여 약 15 분간 반응을 진행하여, 2nm 직경의 InP 코어를 합성하였다. 이후, 상기 합성예 1의 과정을 수행하여, 청색 발광 특성을 갖는 InP QD를 합성하였다.

[0148] 합성예 2. 면역 검출용 접합체의 제조

[0149] 타겟 물질의 검출에 사용되는 항체는 공유 결합 커플링 방법에 의해 상기 양자 비드의 표면에 접합되었다. 구체적으로, 수용성 양자-비드 (0.1 mg), EDC (59.94 μg) 및 sulfo-NHS (135.80 μg)를 200 μL의 MES 완충액 (0.01M, pH 6.0)에 혼합하였으며, 이때, EDC와 sulfo-NHS의 몰비는 1: 2로 조절하였다. 뒤이어, 상기 혼합물을 열혼합기 (25 ℃, 300 rpm)에서 30분 동안 활성화시킨 후, 상기 양자 비드를 원심분리로 분리하고, 200 μL의 PBS(0.01M, pH 8.0)에 재분산시켰다. 이후, 상기 양자-비드에 항체 (25 μg)를 첨가하고, 3시간 동안 혼합하였다. 합성된 면역 검출용 접합체를 원심분리 (13,000 rpm, 10 분)로 정제하고 200μL의 차단 완충액(0.1 %(w/v) Tween-20 및 3 %(w/v) BSA을 함유하는 1x PBS)을 첨가한 뒤, 30분 동안 반응시켜, 양자-비드 표면에서의 추가적인 반응을 차단하였다. 반응이 차단된 면역 검출용 접합체를 원심분리하고 (13,000 rpm, 10분), 상층액을 버린 후, 펠릿화된 면역 검출용 접합체를 100 μL의 상기 차단 완충액에 재현탁시켰다. 본 합성예에서, 상기 항체는 anti-COVID-19 항체 (Fapon 사), anti-Influenza A 항체(Sino biological 사), anti-Influenza B 항체(Sino biological 사)를 사용하였다.

[0150] 한편, 선택적으로, Fab 영역이 외부로 노출되도록 항체의 배향이 조절된 면역 검출용 접합체는 전술한 면역 검출용 접합체의 합성 과정을 채용하되, Fc 영역-특이적으로 결합하는 나노바디 (Nb)를 도입하는 단계를 추가하는 방식으로 제조되었다. 상기 Fc 영역-특이적으로 결합하는 나노바디로서, IgG1 항체의 FC 영역을 특이적으로 포

획/결합하도록 설계된, 낙타과-유래 단일의 단량체 가변적인 항체 도메인 (a single monomeric variable Ab domain)을 사용하였다. 구체적으로, 합성예 1로부터 제조된 양자-비드 (QB), EDC (59.94㎍), suflo-NHS (135.80 ㎍) 및 AEM (276.11 ㎍)를 200 ㎕의 1x PBS(0.01M, pH 7.4)에 혼합하였다. 활성화 1시간 후, 혼합물을 원심분리 (13,000 rpm, 10분)하여 잔여 반응 시약을 제거 하였다. 펠렛화된 양자-비드에 나노 바디의 코팅을 수행하기 위하여 SC-Cys (SpyCatcher-Cys, 43.48 ㎍) 및 ST-Nb (SpyTag-Nb, 52.21 ㎍)를 순차적으로 첨가하였다. 12시간 동안 반응시킨 후, 상기 Nb로 코팅된 양자-비드를 원심분리 (13,000 rpm, 10분)하고 세척한 뒤, 200 ㎕의 1x PBS (pH 7.4)에 재분산시켰다. 이후, 최종적인 접합을 위해 타겟 항체를 첨가하였다.

[0151]

[0152] **2-1. 양자 비드와 항체가 접합 비율이 상이한 면역 검출용 접합체의 제조**

[0153] 상기 합성예 2와 동일한 방식으로, 면역 검출용 접합체를 제조하되, 접합/첨가되는 항체의 함량을 각각 36 ㎍, 27 ㎍, 18 ㎍, 또는 9 ㎍로 조절하여, 상이한 항체 접합 비율을 갖는 면역 검출용 접합체를 제조하였다.

[0154] **(실험예)**

[0155] **실험예 1. 양자 비드의 크기에 따른 민감도 평가**

[0156] 본 실험예에서는 합성예 1-1의 상이한 직경을 갖는 양자 비드를 포함하는 면역 검출용 접합체를 사용하여, 타겟 검체로서 SARS-coV-2 NP를 검출하는 측방 유동 분석용 스트립을 제조하였다. 이를 위하여, 멤브레인(Nupore), 샘플 패드(Milipore), 접합 패드(Boreda biotech), 흡수 패드(Boreda biotech), 라미네이트 카드(Boreda biotech)를 각각 입수하였다. 이후, 30 cm 길이의 라미네이트 카드에 멤브레인을 부착시키고, 테스트 선(농도 1.5 mg/mL), 대조 선(농도 0.5 mg/mL)을 멤브레인 상에 형성시킨 후, 이를 37℃ 에서 2시간 동안 건조시켰다. 이후, 건조된 멤브레인을 블록킹 버퍼 (2% BSA 를 함유하는 1XPBS)에 20분간 침지시킨 뒤, 상기 블록킹된 멤브레인을 세척액 (0.05 % 소듐 도데실 설페이트를 함유하는 1XPBS)에 다시 30 분 동안 침지시켰다. 세척된 멤브레인은 37℃의 오븐에서 2시간 동안 건조시킨 후, 여기에 미리 준비된 샘플 패드, 접합 패드, 흡수 패드을 부착시킨 뒤, 이들을 각각 4 mm 크기로 잘라주었다. 한편, 상기 접합 패드는 1.2 ㎕의 상기 면역 검출용 접합체와 10.8㎕의 희석 완충액(0.1% Tween-20, 1% BSA 및 10% 수크로스를 함유하는 1x PBS)의 혼합물을 접합 패드에 분주한 뒤, 실온의 진공 오븐에서 30분 동안 건조시키는 방식으로 제조하였다.

[0157] 이후, SARS-CoV-2 NP 저장용 용액을 1X PBS로 희석하여 제조한 80㎕의 샘플 용액을 제작된 측방 유동 분석용 스트립의 샘플 패드에 떨어뜨리고, 모세관 작용에 의해 멤브레인을 통과하도록 하였다. 상기 샘플 용액 내 SARS-CoV-2 NP의 농도는 각각 200 ng/ml, 20 ng/ml, 2 ng/ml, 200 pg/ml, 100 pg/ml, 50 pg/ml, 및 20 pg/ml으로 조정하였다. 모든 용액은 20분 이내에 흡수 패드에 흡수되었으며, 그 결과는 휴대용 UV 램프 (UVITec LF-206. LS) 및 Samsung Galaxy S20 스마트폰을 사용하여 측정 및 기록하였다. 이후, 이미지를 스캔하고 AXIO ZOOM 실체 현미경 (Zeiss)으로 형광 강도를 측정하여 정량적인 분석을 실시하였다.

[0158] 그 결과, 도 3 내지 도 6에 나타낸 바와 같이, 양자 비드의 크기가 커질수록 접합되는 항체가 증가됨에 따라, 50 pg/mL 수준의 타겟 검체를 포함하는 샘플에서도 유효한 검출 효능이 발휘될 수 있음을 확인하였다. 다만, 300 nm 이상의 양자 비드를 사용한 군에서는 항체 접합 과정에서 일부 뭉침 현상이 발생되었을 뿐만 아니라, 검출 과정에서 테스트 선이 아닌, 멤브레인에 걸려 background signal을 형성하여 검출 효능이 감소함을 확인하였다.

[0159] **실험예 2. 양자 비드와 항체간 접합 비율에 따른 민감도 평가**

[0160] 본 실험예에서는 270 nm의 직경을 갖는 양자 비드를 포함하고 합성예 2-1의 상이한 항체 접합 비율로 이루어지는 면역 검출용 접합체를 사용하여, 일 실시예에 따른 측방 유동 분석용 스트립에서의 민감도를 평가하였다. 구체적으로, 실험예 1와 동일한 방식으로, 20 ng/ml 농도의 SARS-CoV-2 NP가 포함된 샘플 용액에 대한 검출을 수행하였다. 이후, 최적의 검출 효능을 발휘한 27 ㎍의 항체가 접합된 270nm의 직경을 갖는 양자 비드를 포함하는 면역 검출용 접합체를 사용하여, 200ng/ml, 20 ng/ml, 2 ng/ml, 200 pg/ml, 100 pg/ml, 50 pg/ml, 및 20 pg/ml 농도의 SARS-CoV-2 NP가 포함된 샘플 용액을 대상으로, 측방 유동 분석용 스트립에서의 민감도를 재차 평가하였다.

[0161] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 18 ㎍ 또는 27 ㎍의 항체가 접합된 면역 검출용 복합체 (middle, normal)는 유효한 검출 효능을 나타낸 반면, 9 ㎍의 항체가 접합된 면역 검출용 복합체 (Low)는 검출을 위한 항체의 수준이 미약하여 항원 검출에 문제가 있었으며, 36 ㎍의 항체가 접합된 면역 검출용 복합체 (high)는 접합 패

드에서 응집 현상이 발생하여 항원 검출 수준이 급격하게 낮아짐을 확인하였다.

[0162] 또한, 도 8에 나타낸 바와 같이, 27 μg의 항체가 접합된 270 nm의 직경을 갖는 양자 비드를 포함하는 면역 검출용 접합체는 50 pg/mL 수준의 타겟 검체를 포함하는 샘플에서도 유효한 검출 효능이 발휘될 수 있음을 확인하였다.

[0163] **실험예 3. 복수의 양자 비드 혼합에 따른 다중 검출 효능 평가**

[0164] 본 실험예에서는 동일한 항원 검출 및 항체 조건에서, 합성예 1-2의 상이한 발광 특성, 즉, 적색, 녹색 또는 청색을 나타내는 면역 검출용 복합체를 사용하여, 일 실시예에 따른 측방 유동 분석용 스트립에서의 민감도를 평가하였다. 구체적으로, 3 종의 항원 (Influenza A, Influenza B, 또는 SARS-CoV-2 항원)이 50 ng/mL, 20 ng/mL, 5 ng/mL, 2 ng/mL, 500 pg/mL, 200 pg/mL, 50 pg/mL, 20 pg/mL 농도로 포함되거나 또는 항원이 비포함된 용액을 개별적으로 준비한 뒤, 동일한 농도의 항원을 포함하는 3 종의 용액을 희석하여, 농도별 샘플 용액을 준비하였다. 이후, 실험예 1와 동일한 방식으로, 적색 (anti-Influenza A 항체와 접합), 녹색 (anti-COVID-19 항체와 접합) 또는 청색 (anti-Influenza B 항체와 접합)을 나타내는 면역 검출용 복합체를 사용하여 각각의 항원 대한 검출을 수행하였다.

[0165] 이어서, 타겟 검체(항원)에 대한 항체의 반응성과 상기 양자 비드의 발광 특성에 따른 검출/판독 민감도 수준을 반영하여, 상대적으로 가장 낮은 민감도를 지닌 anti-Influenza A 항체와 접합된 적색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체, 상대적으로 중간 수준의 민감도를 지닌 anti-COVID-19 항체와 접합된 녹색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체, 및 상대적으로 가장 높은 수준의 민감도를 지닌 anti-Influenza B 항체와 접합된 청색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체를 사용하여, 20 ng/mL 농도의 항원이 포함된 샘플 용액을 대상으로, 다양한 중량비로 혼합된 2 종 이상의 면역 검출용 복합체의 다중 검출시, 유효한 다중 검출이 가능한 면역 검출용 복합체들간 혼합 비율을 도출하고자 하였다.

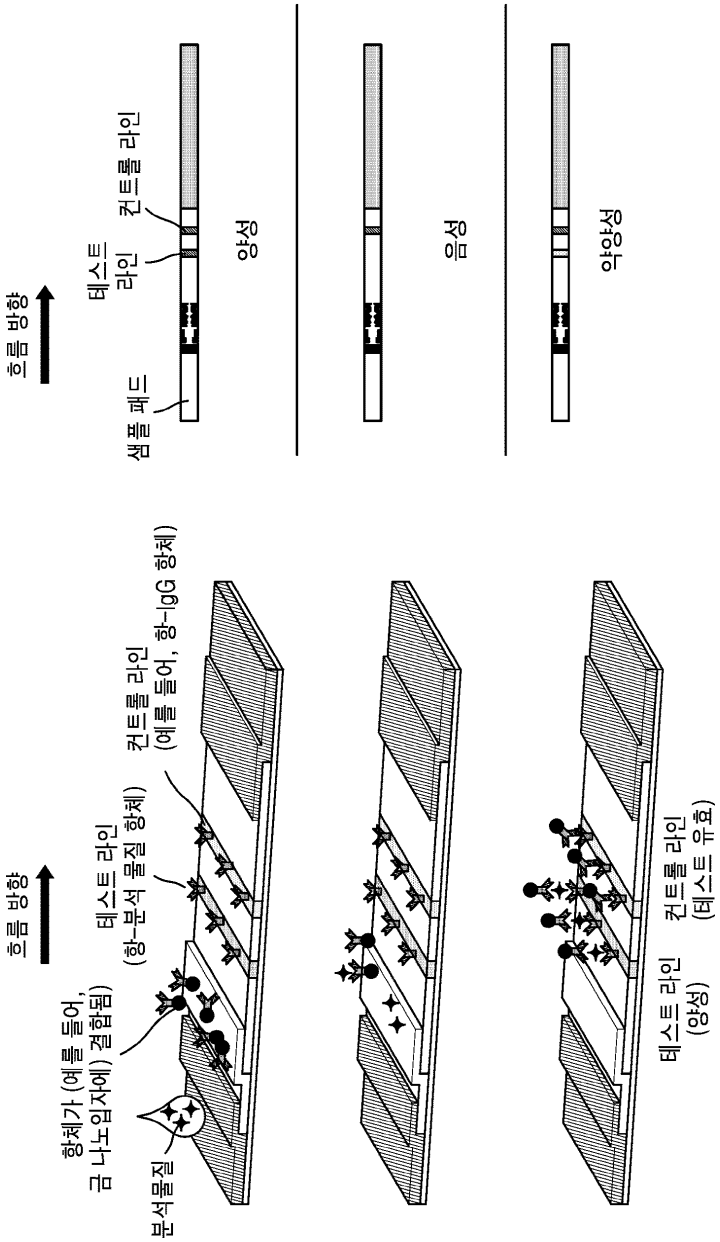
[0166] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 적색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체는 가장 민감한 결과 판독이 가능하였으며, 뒤이어, 녹색 및 청색 순으로 민감도가 상대적으로 낮아짐을 확인하였다.

[0167] 아울러, 도 10에 나타낸 바와 같이, 2 이상의 색상 혼합을 통해 최적의 비율을 확인한 결과, 적색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체 및 녹색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체가 1 : 1 내지 1 : 3의 중량비로 혼합, 적색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체 및 청색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체가 1 : 1 내지 1 : 3의 중량비로 혼합, 녹색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체 및 청색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체가 1 : 1 내지 1 : 2의 중량비로 혼합될 경우, 유효한 다중 검출이 가능함을 확인하였다. 즉, 상기 적색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체, 녹색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체, 및 청색 발광 특성을 갖는 면역 검출용 복합체가 1 : 1 : 1 내지 1 : 1.5 : 3의 비율로 혼합될 경우, 유효한 다중 검출이 가능함을 확인하였다.

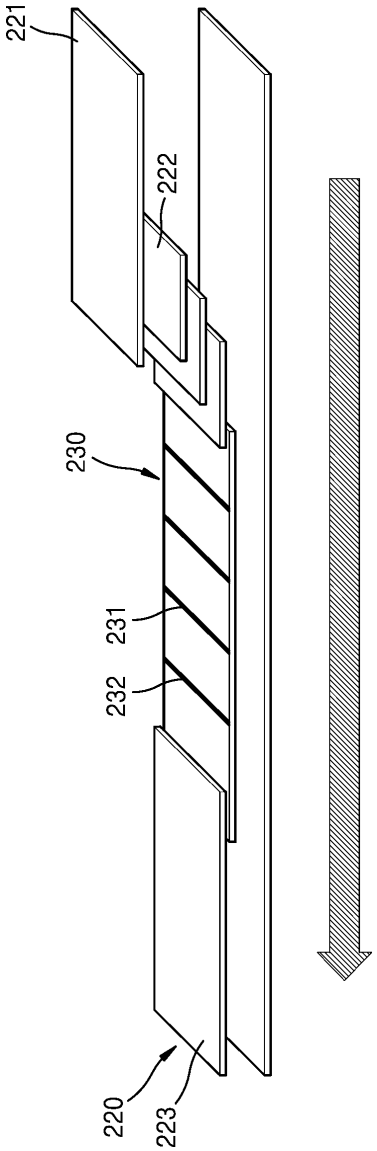
[0168] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

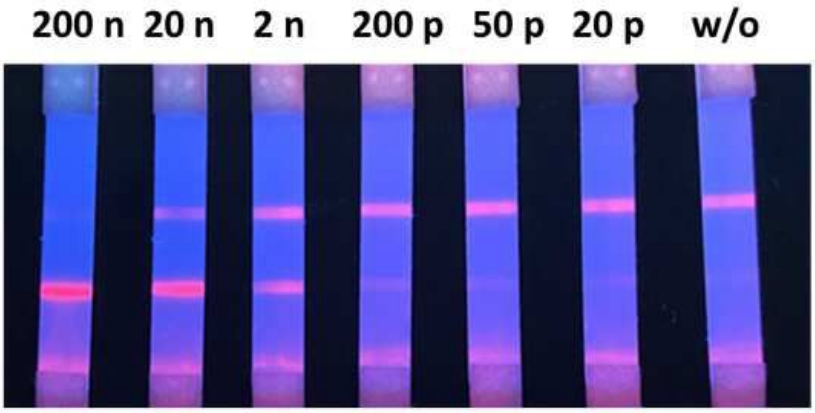
도면1


흐름 방향
항체가 (예를 들어, 금 나노입자에) 결합됨)
분석물질
테스트 라인 (항-분석 물질 항체)
컨트롤 라인 (예를 들어, 항-IgG 항체)
테스트 라인 (양성)
컨트롤 라인 (테스트 유효)
흐름 방향
샘플 패드
테스트 라인
컨트롤 라인
양성
음성
약양성

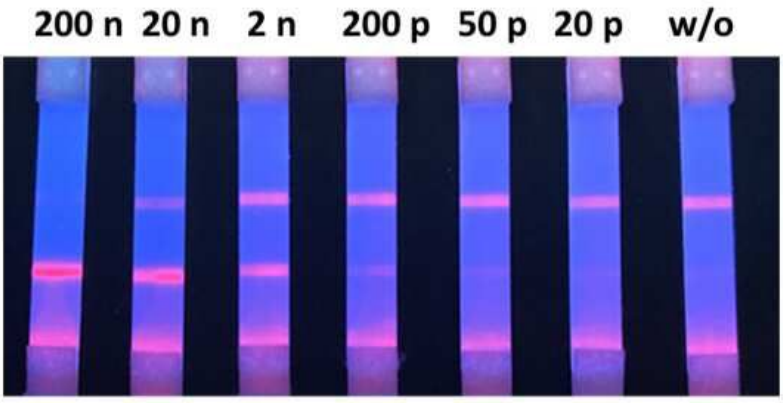
도면2



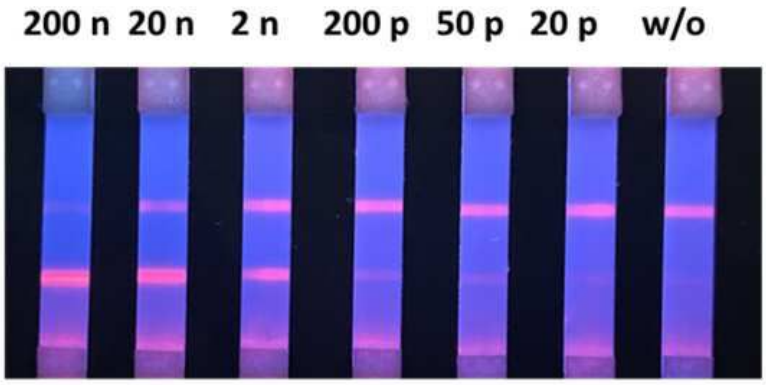
도면3



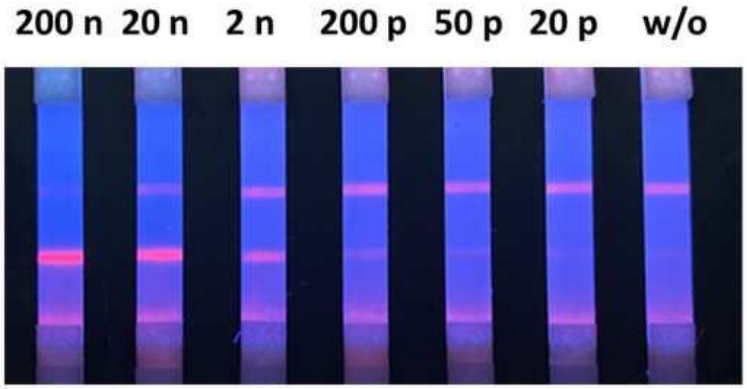
도면4


200 n 20 n 2 n 200 p 50 p 20 p w/o

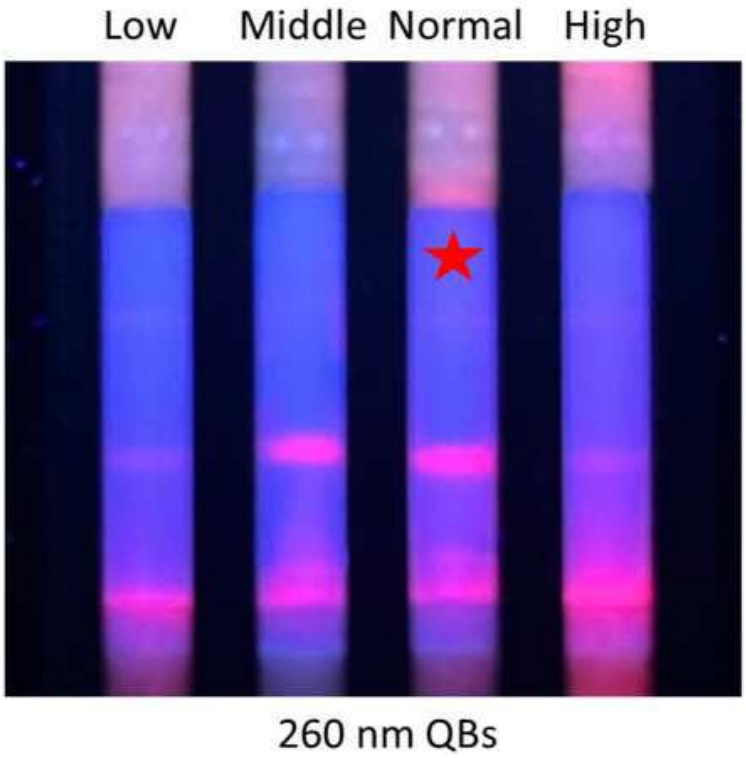
도면5


200 n 20 n 2 n 200 p 50 p 20 p w/o

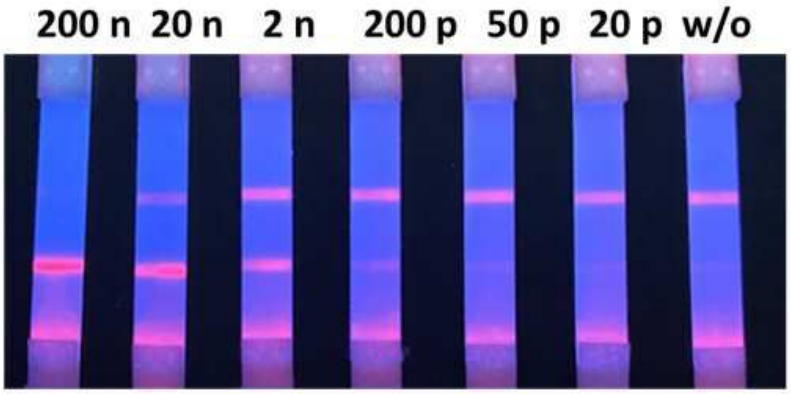
도면6


200 n 20 n 2 n 200 p 50 p 20 p w/o

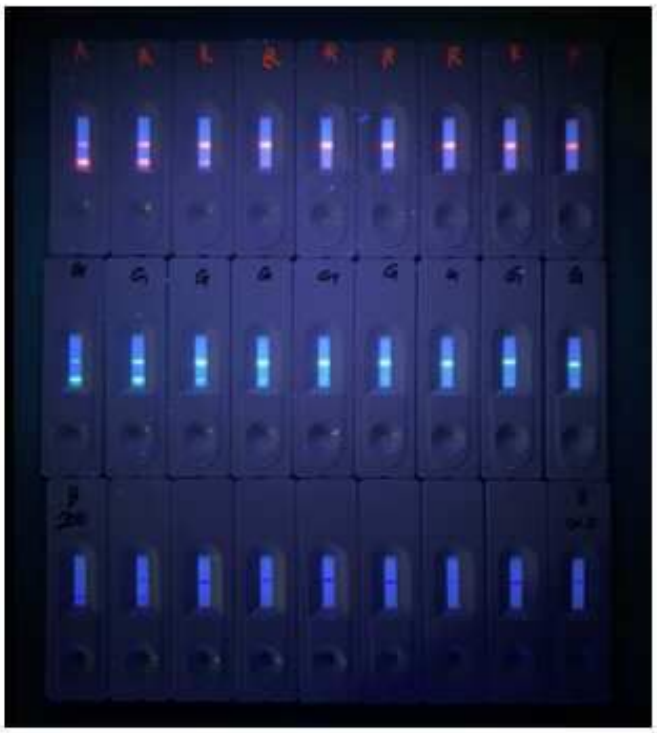
도면7



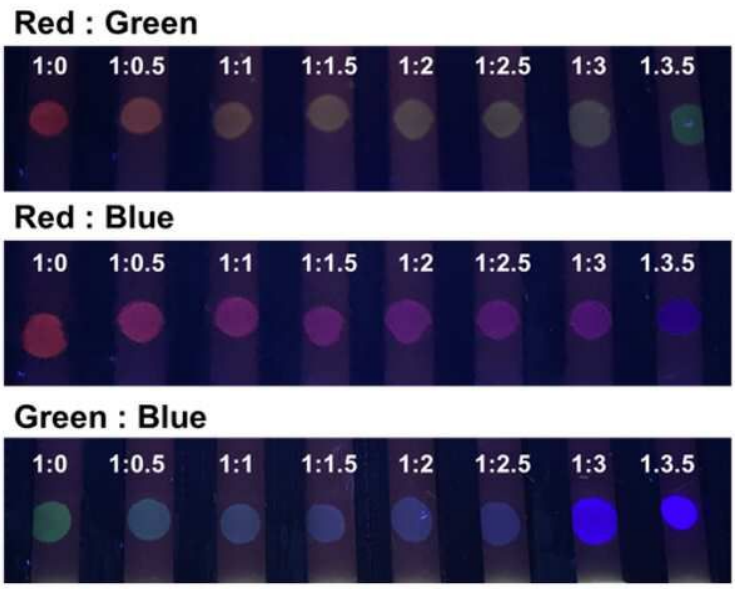
도면8



도면9



도면10


Red : Green
1:0
1:0.5
1:1
1:1.5
1:2
1:2.5
1:3
1.3.5
Red : Blue
1:0
1:0.5
1:1
1:1.5
1:2
1:2.5
1:3
1.3.5
Green : Blue
1:0
1:0.5
1:1
1:1.5
1:2
1:2.5
1:3
1.3.5