



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2011년08월11일  
(11) 등록번호 10-1056150  
(24) 등록일자 2011년08월04일

- (51) Int. Cl.  
*G01N 33/53* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2005-7002524
- (22) 출원일자(국제출원일자) 2003년08월12일  
심사청구일자 2007년12월03일
- (85) 번역문제출일자 2005년02월14일
- (65) 공개번호 10-2005-0062533
- (43) 공개일자 2005년06월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2003/025125
- (87) 국제공개번호 WO 2004/014220  
국제공개일자 2004년02월19일
- (30) 우선권주장  
60/403,407 2002년08월13일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
US5597700 A\*  
US05807690 A1\*  
WO1999046597 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
**엔-디아 인코퍼레이티드**  
미국 뉴욕주 10003 뉴욕 5 플로어 슈트 501 이스  
트 20 스트리트 30
- (72) 발명자  
**페트루닌 디미트리 디.**  
러시아 모스크바 109316 에이퍼티 190 스트로이코  
브스카자 울 6  
**팩스 보리스 비.**  
미국 뉴저지 08859 팔린 에이퍼티 335 쿨라스 레  
인 1  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
**박장원**

전체 청구항 수 : 총 29 항

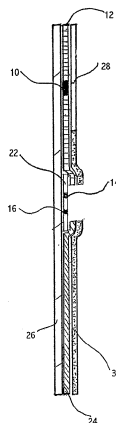
심사관 : 안규정

**(54) 질 분비물 내의 양수를 검출하는 장치 및 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 PAMG-1 항체들을 탐지함으로써 질 내의 소량의 양수를 검출하는 진단 방법 및 장치에 관한 것이다. 본 발명 장치는, 도 1에 도시한 바와 같이, M271 이라는 칭하는 항체 영역(10), 테스트 영역(14), 및 제어 영역(16)을 구비하는 패드(12)를 포함한다.

**대표도 - 도1**



(72) 발명자

**자라이스키 에브게니 아이.**

러시아 모스크바 117454 에이피티 19 울 우달트소  
바 69

**볼토브스카야 마리나 엔.**

러시아 모스크바 121433 에이피티 88 말라야 필레  
브스카야 울 50

**나지모바 스베틀라나 브이.**

러시아 모스크바 113162 에이피티 31 빌딩 1 미트  
나야울 50

**스타로스베츠키야 넬리 에이.**

러시아 모스크바 에이피티 64 그로드넨스카야 울  
10

**콘스탄티노브 알렉산드로 비.**

미국 뉴햄프셔 03062-2915 내슈아 에이피티 19-씨  
스핏브루크 로드 105

**마르쉬스카이야 마가리타 아이.**

러시아 모스크바 117342 에이피티 256 빌딩 2 울  
브베덴스코고 27

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

임신부의 질 분비물 내의 소량의 양수 검출에서의 위양성(false-positive) 또는 위음성(false-negative) 결과의 가능성을 최소화하는 방법에 있어서, 상기 방법은,

(i) 질 분비물 내의 PAMG-1 (Placental Alpha-1-Microglobulin)의 최소 배경 농도(background concentration)의 결정을 위하여 PAMG-1에 고도로 특이적인 항-PAMG-1 단일 클론 항체의 쌍을 선택하는 단계와,

(ii) 임신부의 질 분비물 내의 소량의 양수 검출을 위한 감도의 규정된 경계치를 정확하게 설정하기 위하여 (i)의 항체들의 쌍과 함께 사용되는 하나 이상의 다른 항-PAMG-1 단일 클론 항체를 선택하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, (i)의 단일 클론 항체 쌍 중 하나는 스트립 장치의 패드 영역에 국한되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서, (i)의 단일 클론 항체 쌍 중 하나는 표지(marker)와 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 상기 표지는 염료 입자(dye particle)인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 5**

제1항에 있어서, (i)의 단일 클론 항체 쌍 중 하나는 스트립 장치의 테스트 영역에 국한되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 6**

제1항에 있어서, (ii)의 상기 하나 이상의 다른 항-PAMG-1 단일 클론 항체는 (i)의 단일 클론 항체 쌍 중 하나에 미리 정하여진 비례로 스트립 장치의 테스트 영역에 국한되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 상기 (i)의 항체 쌍과 함께 사용되는 (ii)의 하나 이상의 다른 단일 클론 항-PAMG-1 항체는 상기 상기 스트립 장치 감도의 미리 정하여진 경계치를 설정하기 위하여 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 8**

제1항, 제6항 및 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

질 분비물 내의 소량의 양수 검출에 있어서의 위음성 및 위양성 결과의 가능성을 최소화하기 위하여, 미리 정하여진 비율로 함께 사용되는 (i) 및 (ii)의 상기 항-PAMG-1 단일 클론 항체들이, 질 분비물 내의 0.05 내지 0.2 ng/ml 범위의 상기 PAMG-1의 배경(background) 수준값과 5 내지 10 ng/ml 범위의 스트립 장치의 감도 경계치 사이에서 최적의 간격을 설정하기 위하여 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 9**

임산부의 질 분비물 내의 PAMG-1에 고도로 특이적인 항체들의 쌍의 결합을 탐지하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 질 분비물 내의 양수 누출 탐지 방법.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 상기 항체의 쌍은 배경 이상의 PAMG-1 수준에 민감한 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

제9항에 있어서, 상기 항체들의 쌍 중 하나는 고행 지지대에서 고정되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 상기 고행 지지대는 액체가 모세관 작용에 의하여 통과하여 이동할 수 있는 막인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 13**

제11항에 있어서, 상기 항체들은 단일 클론 항체들이나 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제11항에 있어서, 상기 고행 지지대에 고정된 PAMG-1에 특이적인 제2 항체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 고행 지지대 상에 고정된 항체들의 비는 5 내지 7 ng/ml의 PAMG-1 검출 경계치 수준을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 16**

제13항에 있어서, 단일 클론 항체가,

러시아 국립 산업 미생물 수집원(Russia National Collection of Industrial Microorganism, VKPM) 기탁소에 기탁된 수탁 번호 VKPM-93의 하이브리도마(hybridoma) N271에 의하여 제조된 M271과, 러시아 국립 산업 미생물 수집원(VKPM)에 기탁된 수탁 번호 VKPM-92의 하이브리도마 N52에 의하여 제조된 M52와, 러시아 국립 산업 미생물 수집원(VKPM)에 기탁된 수탁 번호 VKPM-94의 하이브리도마 N42에 의하여 제조된 M42로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

고행 지지대에 고정된 항-PAMG-1 항체와 운동 가능한 항-PAMG-1 항체를 포함하는 장치로서,

유체 샘플에 의한 상기 운동 가능한 항-PAMG-1 항체의 운동으로 인하여 상기 운동 가능한 항-PAMG-1 항체가 샘플 내의 어떠한 PAMG-1과도 결합할 수 있고, 그에 의하여 형성된 상기 운동 가능한 항체-PAMG-1의 복합체(complex)가 상기 고정된 항-PAMG-1 항체와 결합할 수 있으며, 상기 운동 가능한 항-PAMG-1 항체는 표지를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 항-PAMG-1 항체들은 단일 클론 항체들이나 것을 특징으로 하는 장치.

**청구항 19**

제17항에 있어서, 상기 고정된 항-PAMG-1 항체는 막 지지대에 고정되는 것을 특징으로 하는 장치.

**청구항 20**

제17항에 있어서, 상기 표지는 콜로이드 금(colloidal gold)인 것을 특징으로 하는 장치.

**청구항 21**

제17항에 있어서, 상기 고행 지지대에 고정된 제2 항-PAMG-1 항체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

**청구항 22**

21항에 있어서, 상기 고행 지지대에 고정된 항체들의 비는 5 내지 7 ng/ml의 PAMG-1 탐지 경계치 수준을 제공하는 것을 특징으로 하는 장치.

**청구항 23**

제18항에 있어서, 단일 클론 항체들 중 하나 이상은,

러시아 국립 산업 미생물 수집원(Russia National Collection of Industrial Microorganism, VKPM) 기탁소에 기탁된 수탁 번호 VKPM-93의 하이브리도마(hybridoma) N271에 의하여 제조된 M271과, 러시아 국립 산업 미생물 수집원(VKPM)에 기탁된 수탁 번호 VKPM-92의 하이브리도마 N52에 의하여 제조된 M52와, 러시아 국립 산업 미생물 수집원(VKPM)에 기탁된 수탁 번호 VKPM-94의 하이브리도마 N42에 의하여 제조된 M42로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 장치.

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

상류쪽에 고정된 항-PAMG-1 항체를 갖는 포획 (capture) 영역이 있는 운동 가능한 항-PAMG-1 항체를 포함하는 검출 섹션을 포함하는 장치로서, 운동가능한 항-PAMG-1 항체는 러시아 국립 산업 미생물 수집원(Russia National Collection of Industrial Microorganism, VKPM) 기탁소에 기탁된 수탁 번호 VKPM-93의 하이브리도마 (hybridoma) N271에 의하여 제조된 M271과, 러시아 국립 산업 미생물 수집원(VKPM)에 기탁된 수탁 번호 VKPM-92의 하이브리도마 N52에 의하여 제조된 M52와, 러시아 국립 산업 미생물 수집원(VKPM)에 기탁된 수탁 번호 VKPM-94의 하이브리도마 N42에 의하여 제조된 M42로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 운동 가능한 항 PAMG-1항체는 마커를 포함하는 것인 장치.

**청구항 26**

질 분비물 내의 PAMG-1에 대한 항-PAMG-1 항체들의 결합을 검출하기 위하여, 제17항의 장치를 사용하는 것을 포함하여 질 분비물 내의 양수 누출을 검출하는 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 장치의 항-PAMG-1 항체들의 쌍은 배경 레벨보다 PAMG-1의 레벨에 민감한 것인 방법.

**청구항 28**

제26항에 있어서, 상기 장치의 고정 지지대는 모세관 작용에 의하여 이동할 수 있는 액체가 통과하는 막인 것인 방법.

**청구항 29**

제26항에 있어서, 상기 장치의 항PAMG-1 항체들은 단일클론 항체들이고, 상기 단일클론 항체들은 러시아 국립 산업 미생물 수집원(Russia National Collection of Industrial Microorganism, VKPM) 기탁소에 기탁된 수탁 번호 VKPM-93의 하이브리도마(hybridoma) N271에 의하여 제조된 M271과, 러시아 국립 산업 미생물 수집원(VKPM)에 기탁된 수탁 번호 VKPM-92의 하이브리도마 N52에 의하여 제조된 M52와, 러시아 국립 산업 미생물 수집원(VKPM)에 기탁된 수탁 번호 VKPM-94의 하이브리도마 N42에 의하여 제조된 M42로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 30**

임산부의 질 분비물 내의 양수 누출을 검출하는 방법에 있어서, 상기 방법은,

(i) 임산부의 질 분비물 내의 PAMG-1의 최소한의 배경 농도를 검출하기 위하여, PAMG-1에 고도로 특이적인 항체들의 쌍의 결합을 검출하는 단계로, 여기서 PAMG-1에 특이적인 항체들의 쌍은 배경보다 PAMG-1의 농도에 민감한 것인 단계,

(ii) 가장 높은 결합 친화성을 갖는 (i)의 PAMG-1에 특이적인 항체들의 쌍 중 하나 보다 더 낮은 결합 친화성을 나타내는 하나 이상의 다른 PAMG-1에 특이적인 항체의 결합을 검출하고, 임산부의 질 분비물 내의 소량의 양수를 검출하기 위하여 (i)의 항체와 함께 사용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] <우선권 데이터>

[0002] 본 출원은 2002년 8월 13일자로 출원된 미국 특허 가출원 제60/403,407호의 우선권을 주장하는 출원으로서, 상기 미국 특허 가출원은 본 출원에 참고로 포함된다.

[0003] 본 발명은 질의 소량의 양수를 정확하게 검출하는 진단 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 태반  $\alpha_1$ -마이크로글로불린(placental  $\alpha_1$ -microglobulin)을 특정하게 결합시키는 선별된 단일 클론 항체의 사용에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 임신부의 질 분비물에서 PAMG-1의 최소 배경(background) 농도를 검출하기에 충분한 민감도를 제공하는 한 쌍의 항-PAMG-1 항체("기초쌍")의 선택에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 PAMG-1 항체를 포함하는 고상(solid phase) 면역 분석 시스템에 관한 것으로서, 2개 이상의 PAMG-1 항체의 조합물은 장치의 고정 지지부에 고정되어 소정의 민감도 경계치 수준을 정확하게 설정하게 된다.

배경기술

[0004] 조기 양막(양막낭) 파수는 임신부의 약 10%에서 발생되며, 이를 적절하게 처리하지 않는 경우에는 모든 주산기 사망 원인의 약 10%가 된다. 용어 PROM(조기 양막 파수)은 임신 말기 또는 조기 분만의 시작 24시간 이상 전의 자연적 양막 파수에 관한 것이다. PPRM은 조산시 조기 양막 파수에 관한 것이다. 이러한 조기 파수의 대략 30-50%가 임신 37주 이전에 일어난다. 이러한 경우에는, 명확한 파수 진단이 극히 중요한데, 왜냐하면 PROM이 부수적으로 자궁내 감염 위험의 심각한 증가와 태아 폐 시스템의 발달 장애를 야기하기 때문이다. 이러한 감염의 자궁내 침투로 인해, 산모 및 주산기 질병율과 사망율이 약 10%만큼 증가하게 된다. 임신 38주 내지 40주일 때 파수의 즉각적인 진단이 매우 중요한데, 왜냐하면 일단 PROM이 검출되면 분만을 가능한 한 신속하게 유도시켜야 하기 때문이다. 임신 37전의 파수 진단도 중요한데, 왜냐하면 그러한 진단에 의해서 양막내 감염을 방지할 수 있고 태아 폐 발달을 자극할 수 있기 때문이다.

[0005] 양막 파수를 진단하는 데 있어서 "황금 기준"은 없다. PROM은 가변적이기 때문에, 양막 파수와 진단 세척 실행 사이의 간격, "높은(high)" 누출의 존재, 간헐적 누출, 인구 대비 PROM의 빈도 및 시험 결과에 영향을 미칠 수 있는 재료에 대한 고려가 명확하게 지정되지 않았을 때에는 부정확한 리포트의 요인이 된다. 이러한 부정확성으로 인해, PROM의 식별을 위한 최적 방안을 찾고자 하는 연구 결과를 분석하는 데 있어서 오차가 유발될 수 있다.

[0006] 종래에는 PROM의 진단은 질로부터 분비되는 분비액에 대한 환자의 리포트에 기초하여 왔다. 물리적 검사는 명확하게 진단할 수는 있지만, 검사 결과가 내적으로 불일치하거나 모호한 경우가 있다. 이러한 상황으로 인해 확진적인 진단 시험이 필요하게 되었다[씨. 제이. 록우드(Lockwood C. J.) 등이 저술한 1994도 발간 미국 산부인과 학회지(American Journal of Obstetrics and Gynecology) 제171권 제1호 146-150페이지]. 불충분한 몇 가지 방법이 현재 양치상 형성 시험(fern test)[프리드만 엠. 엘.(M. L. Friedman)과 맥엘린 티. 더블유.(T W. McElin)가 저술한 1969년도 발간 미국 산부인과 학회지 제100권 544-550페이지의 "양막 파수의 진단(Diagnosis of Ruptured Fetal Membranes)"]과 같이 질의 양수를 검출하는 데 사용되고 있다. 이 방법은 양수가 슬라이드 상에서 건조될 때 소위 분지(arborization)를 관찰함으로써 양수를 검출하는 것에 기초하고 있다. 하지만, 이러한 방법의 정확도는 충분하지 못하며, 그 이유는 상기 방법이 질의 양수의 변동이 아주 심한 특성에 기초하고 있기 때문이다. 이러한 방법에 의하면 30%의 경우에 잘못된 결과를 나타낼 수 있다.

[0007] 또한, 여러 가지 염료, 즉 나일 블루(nile blue), 아크리딘 오렌지(acridine orange), 브롬티몰 블루(bromthymol blue), 니트라진(nitrazine) 등을 사용하여 양막의 파수를 검출하는 안이 제시되었다(프리드만 엠. 엘.과 맥엘린 티. 더블유.). 이러한 접근 방식은 불편할 뿐만 아니라, 질내 양수의 변동이 심한 화학적 특성과 몇몇의 가능한 혼합물에 관련된 단점을 갖고 있다. 예를 들면, 질 감염은 위에서 언급한 시험들의 결과에 영향을 미칠 수 있다. 현재 주로 사용되고 있는 니트라진 시험 및 양치상 형성 시험에 대한 초기 연구에 따르면, 이러한 시험은 높은 부정확성을 갖고 있으며, 이러한 부정확성은 양막 파수 후 1시간 이상 경과되었을 때 점차 증가되어 24시간 후에는 결정할 수 없는 상태가 된다. 연구 결과에 따르면, 장기간의 PROM의 경우에 상기 시험들은 단순 임상 평가에 의해 획득된 진단 정보보다 우수하지 못한 진단 정보를 제공한다[아이. 지. 고로데스키(Gorodeski I. G.), 엘. 하이모비츠(Haimovitz L.), 씨. 엠. 바하리(Bahari C. M.)가 저술한 1982년도 발간 주

산기 의학 저널(Journal Perinat. Med.) 제10권 제6호 286-292페이지]. 시험의 최신 데이터에 따르면[에스. 트로보(Trovo S.) 등이 저술한 1998년도 발간 미네르바 부인과 학회(Minerva Ginecol.) 제50권 제12호 519-512페이지],

- [0008] 니트라진 시험은 민감도 70%, 특이도 97%, 정확도 90%를 나타내었고,
- [0009] 양치상 형성 시험은 민감도 70%, 정확도 93%를 나타내었다.
- [0010] 근래에는, 양수 단백질의 면역화학적 분석에 기초하여 양막의 파수를 검출하는 안이 제시되었다. 면역화학적 분석에는 양막 파수를 검출하는 데 다음의 양수 단백질을 사용한다. 즉, 알파-페토프로테인(alpha-fetoprotein), 프로락틴(prolactine), 피브로넥틴(fibronectin) 및 인슐린 유사 성장 인자 결합 프로테인 1. 이에 대해서는, 호켈슨 비. 엘.(B. L. Rochelson) 등이 저술한 1983년도 발간 산부인과 학회지 제62권 414-418페이지의 "신속 분석--조기 양막 파수 진단의 적용 가능성(Rapid Assay--Possible Application in the Diagnosis of Premature Rupture of the Membranes)"과, 코닌크스 피. 알.(P. R. Koninckx) 등이 저술한 1981년도 발간 영국 산부인과 학회지 제88권 607-610페이지의 "질 분비액의 프로락틴 농도: 양막 파수 진단의 새로운 방법(Prolactine Concentration in Vaginal Fluid: a New Method for Diagnosing Ruptured Membranes)"과, 헬레만스 피.(P. Hellemans) 등이 저술한 1992년도 발간 유럽 산부인과 생식 생물학 학회지 제43(3)권 173-179페이지의 "양막 파수의 조기 검출시 ROM 검사 면역검정을 이용한 예비 결과(Preliminary Results with the Use of the ROM Check Immunoassay in the Early Detection of Rupture of the Amniotic Membranes)"와, 이. 엠. 루타넨(Rutanen, E M.) 등이 저술한 1993년도 발간 클리니카 키미카 약타(Clin. Chim. Acta.) 제214권 73-81페이지의 "자궁 경부/질 분비물에서 인슐린 유사 성장 인자 결합 프로테인 1의 측정: 양막 파수 진단시 ROM 검사 면역검정과의 비교(Measurement of Insulin-like Growth-Factor binding Protein-1 in Cervical/Vaginal Secretions: Comparison with the ROM Check Membrane Immunoassay in the Diagnosis of Ruptured Fetal Membranes)"를 참조하면 된다. 이에 후속하여 이. 엠. 루타넨 등은 상하로 위치된 크로마토그래픽 막을 사용하는 크로마토그래픽 시험법을 개발하였다[에프아이-84863(FI-84863), 미국 특허 공보 제5,554,504호].
- [0011] 알파-페토프로테인(AFP)과 프로락틴(PRL)의 검출에 기초하는 방법들은 신뢰성이 없는데, 왜냐하면 AFP 및 PRL 단백질의 혈액/양수 비율이 심하게 변동하기 때문이다. 양수의 AFP 및 PRL 농도는 임신의 두 번째 3개월 동안에만 높다. 상기 두 단백질에 대한 양막/혈청 단백질 농도 비율은 임신 말기에는 단지 약 3 내지 4 정도이다.
- [0012] 질 분비물의 태아 피브로넥틴의 검출에 기초한 또 다른 방법도 불만족스러운 것으로 판명되었다. 예를 들면, 양막 파수가 없는 경우에도 태아 피브로넥틴이 존재할 수 있으며[헬레만스 피. 등이 저술한 1992년도 발간 유럽 산부인과 생식 생물학 학회지 제43(3)권 173-179페이지의 "양막 파수의 조기 검출시 ROM 검사 면역검정을 이용한 예비 결과"와, 록우드 등이 저술한 1991년도 발간 뉴잉글랜드 의학 저널(New England Journal of Medicine) 제325권 669-674페이지의 "조기 분만의 징후로서 자궁 경부 및 질 분비물의 태아 피브로넥틴(Fetal Fibronectin in Cervical and Vaginal Secretions as a Predictor of Preterm Delivery)"], 이에 따라 위양성(false-positive) 결과가 산출될 수 있다.
- [0013] 알파-페토프로테인, 프로락틴 및 피브로넥틴에 기초한 상기 양막 파수 검출 방법 모두는, 양수의 상기 단백질의 농도를 조절하고 혈청의 농도에 대한 양수의 상기 단백질의 상대 농도를 조절함에 있어서의 여러 가지 인자로 인해 부정확하다.
- [0014] IGFBP-1 최신 시험에 따르면, 특이도와 정확도에 있어서 반대되는 데이터가 있다. 신속 스트립 시험(rapid strip test)[핀란드 오와이 메딕스 비오케미카(OY Medix Biochemica)에 의한 PROM 시험, 또한 독일 마스트 디아그노스티카(MAST Diagnostica)의 양막 검사로도 칭함]이 질 분비물의 IGFBP-1의 존재를 검출하도록 개발되었다[이. 엠. 루타넨, 티. 에이치. 카르카이넨(Karkkainen T. H.), 제이. 레토비르타(Lehtovirta J.), 제이. 티. 우오틸라(Uotila J. T.), 엠. 케이. 힌쿨라(Hinkula M. K.), 에이. 엘. 하르티카이넨(Hartikainen A. L.)이 저술한 1996년 9월 30일 발간 클리니카 키미카 약타 제253(1-2)권 91-101페이지의 "양막 파수 진단시 인슐린 유사 성장 인자 결합 프로테인-1의 신속 스트립 시험 평가(IGfor insulin-like growth factor binding protein-1 in the diagnosis of ruptured fetal membranes)"]. 루타넨 이.가 공표한 바에 따르면, 자궁 경부 분비물에서 400ng/ml 이하(임신부의 혈청 IGFBP-1 레벨의 95 백분위수 이하)의 IGFBP-1 농도가 음성으로 유지되도록 시험의 검출 한계가 설정되었다. 하지만, 출혈의 경우에는, 태반 베드로부터 나오는 혈액이 자궁 경부 혈관으로부터 나오는 혈액보다 IGFBP-1을 많이 함유할 수 있기 때문에 시험 결과는 신중하게 해석되어야 한다.
- [0015] PROM이 임상적으로 확인된 여성의 모든 샘플(n=55)은 양성 결과를 나타내었고, 징후가 없는 여성으로부터 채취



된 75개의 샘플 중 71개는 시험 결과에 따라 음성으로 나타났다. 이 샘플 세트에 따르면, 시험의 민감도는 100%이고, 특이도는 94.7%이다. 이러한 현상은 시험의 초기 단계시에 단일 클론 항체의 특이도(교차 반응도)가 불충분하였음을 의미한다.

- [0016] 181명의 의사 환자 중에서, 다의성 PROM의 초기 검사시에는 64명의 경우에 양성으로 판정되었고 117명의 경우에는 음성으로 판정되었다. 64명의 양성 환자 중 50명(78.1%)이 임신 37주 전에 분만하였으며, 그 중 42명(65.6%)은 샘플 채취 후 2주 내에 분만하였다. 시험 결과가 음성인 117명의 환자 중 5명은 PROM에 관련되지 않은 이유로 인해 제왕 절개술로 분만하였다. 다른 112명의 환자 중에서, 102명(91.1%)은 임신 말기에 분만하였고, 10명(8.9%)은 37주 전에 분만하였으며, 그 중 7명(6.3%)은 샘플 채취 후 2주 내에 분만하였다(루타넨 이. 등, 1996). 불행하게도, PROM의 명확한 진단에 의해 여성의 PROM 시험의 민감도 및 특이도를 판정한 데이터가 없다.
- [0017] 볼트만 더블유.(W. Woltmann)의 연구에 따르면, 임상적으로 승인되지 않은 PROM을 가지고서 여성 중 150명의 양수 표본과 50명의 질 분비물 샘플의 IGFBP-1을 검출하는 데 양막 검사가 사용되었다. 이 시험 결과에 따르면, 민감도가 97%이고, 특이도는 100%이다[더블유. 볼트만 등이 저술한 1995년도 발간 제트. 케부르쉬. 네오나탈(Z. Gebursh. Neonatal) 제99권 243-244페이지].
- [0018] 라고쉬 브이.(V. Ragosh)가 75개의 질 분비물 샘플의 양막 검사의 진단 정확도를 평가하였다. 이 시험 결과에 따르면, 민감도는 100%이고, 특이도는 83%이다. 연구자들의 보고에 따르면, 위양성 비율은 주로 분만 활동에 기인하고 있다. 자궁 수축이 있는 여성의 경우에, 시험 결과에 따르면 특이도가 59%였다[브이. 라고쉬 등이 저술한 1996년도 발간 케부르쉬 우. 프라우엔하일ilk(Gebursh. U. Frauenheililk) 제56권 291-296페이지].
- [0019] 다지 이.(E. Darj)와 리레나스 에스.(S. Lyrenas)[1998년도 발간 악타 산부인과 스칸드.(Acta Obstet. Gynecol. Scand.) 제77권 295-297페이지]의 연구에 따르면, PROM 시험 결과 진단이 임상적으로 확인된 환자(명백하게 양막이 파수된 여성이나 양막이 손상되지 않은 여성)중에서 민감도는 95.7%이고 특이도는 93.1%였다. 하지만, PROM이 의심되는 환자들에서는 PROM 시험 결과 민감도와 특이도는 각각 단지 70.8%와 88.2%였다. 이러한 차이는 시험의 차단 경계치(400ng/ml)에 의해서 설명될 수 있으며, 이에 따라 다의성 진단을 가지고서는 질 분비물의 소량의 양수를 검출하기가 불가능하다(예를 들어, 작은 파수의 경우에).
- [0020] 따라서, 양수가 손상되지 않은 여성의 질 IGFBP-1의 상당한 배경 레벨과 시험의 높은 차단 경계치는 민감도와 특이도에 악영향을 미쳐, 다의성 진단을 갖는 환자의 시험 정확도에 영향을 미치게 된다. 혈청 및/또는 염증성 삼출물의 혼합물도 또한 시험의 정확도에 영향을 미칠 수 있다(다지 이.와 리레나스 에스.의 데이터 참조). 이 시험의 저자는 그 문제를 연구하지 않았다.
- [0021] 위에서 언급한 단점들 중 일부를 해소하기 위해서,  $\alpha_1$ -마이크로글로불린의 비결합율을 검출하도록 2개의 단일 클론 항체가 인슐린 유사 성장 인자를 위한 두 개의 결합 사이트에 사용되었다(미국 특허 공보 제5,968,758호, 제5,597,700호, 제5,891,722호 및 제5,877,029호).
- [0022] 이들 특허 공보들에서는, 두 단백질의 동일성, 비결합 PAMG-1 및 IGFBP-1이 근거없이 가정되었다. 실제로, 이러한 가정은 이들 단백질의 일차 구조와 유전자의 비교에만 근거할 수 있다.
- [0023] 위에서 언급한 특허 공보들에서는, 가능한 최고의 정확도(99% 이상)를 달성할 수 있도록 시험 민감도의 경계치를 설정하는 것은 불가능하다. 이러한 시험의 공통적인 문제점은 배경 레벨과 검출 물질의 배경 농도의 가변성에 있다. 예를 들어, 임신부의 질 분비물에 있는 다른 단백질 IGFBP-1의 배경 레벨은 0.5 내지 90ng/ml의 넓은 범위로 변화된다(루타넨의 연구 참조). 두 번째로 중요한 점은 질 분비물의 검출 물질에 함유되어 있는 염증성 삼출물 또는 혈청의 혼합물이 존재할 확률이다. 이는 위양성 판정을 초래할 수 있다.
- [0024] 단백질 PAMG-1은 페트루닌 디.(D. Petrunin)에 의해 처음 개시되었다[디. 페트루닌 등이 저술하고 러시아어로 쓰여진 1977년도 발간 아쿠셔스토프 아이 지네콜로지아(Akusherstov i Ginekologia) 제1호 64페이지]. 또한 PMID:65924를 참조하라[메드라인(MEDLINE) 색인 퍼브메드(PubMed): 1977년도 1월 발간 아쿠셔스토프 아이 지네콜로지아(모스크바) 제1권 64페이지의 "유기 특이 인체 태반 알파 글로불린의 면역화학적 동일성과 그의 양수에서의 농도(Immunochemical identification of organ specific human placental alpha-globulin and its concentration in amniotic fluid)". 항체들은 정제 분리 단백질로부터 얻어지며, 면역화학적 방법들은 임신의 각기 다른 단계에서 양수(질로부터 채취된 양수 포함)의 단백질 함량을 측정하는 것을 가능하게 한다. 태아 및 성인의 각기 다른 장기와 혈액의 단백질 농도도 측정되었다.
- [0025] 이 연구 그룹은 1990년도까지 지속적으로 단백질에 대한 새로운 결과를 발표하였다[디. 페트루닌 등이 저술한



1988년도 발간 아쿠셔스토프 아이 지네콜로지아 제1호 50-52페이지의 "임신 중 4가지 태반 단백질의 비교 연구 (Comparative Study of Four Placental Protein During Gestation)"와, 이. 자라이스키(Zaraisky, E.) 등이 저술한 1989년도 발간 보프로시 메드. 케미(Voprosy Med. Khemmi) 제5호 131-132페이지와, 와이. 타타리노프 (Tatarinov, Y.) 등이 저술한 1990년도 발간 우스페크히 소브르. 비오로지(Uspekhi Sovr. Biologii) 제109권 369-373페이지와, 엠. 볼토브스카야(Boltovskaya, M.) 등이 저술한 1991년도 발간 실험 생물학 및 의학 학회지 (Bulletin of Experimental Biology and Medicine) 제7호 397-400페이지와, 에스. 브이. 나시모바(Nasimova, S. V.) 등이 저술한 1993년 9월 발간 실험 생물학 및 의학 학회지 제116권 제9호 302-304페이지](이들 논문은 모두 러시아어로 쓰여져 있으며, 요약문은 영어로 쓰여져 있다). 페트루닌 디.는 PAMG-1의 분리 방법에 대한 발명 등록(Invention Certificate)을 획득하였다(#SU-1614184A1, 우선권 주장 연도는 1988년).

[0026] 1988년부터 1989년 사이에는, 양수, 태반 및 인체 간암으로부터 얻은 유사 단백질, 즉 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질(IGFBP)의 부분 서열 및 완전 서열에 대해 상세히 개시한 몇 개의 논문이 발표되었다[1988년도에 에스 벨(Bell S) 등이 저술한 논문과, 1989년도에 에이치 루스만(Luthman H) 등이 저술한 논문과, 1988년도에 율 쿠넨(Julkunen) 등이 저술한 논문과, 1988년도에 와이.(Y.) 등이 저술한 논문]. 유전자는 7차 인체 염색체의 부분 7p14-7p12으로 한정되었다. 1991년도 이전에는, 연구자들은 이 단백질에 다른 이름, 즉  $\alpha_1$ -PEG, PP-12, IGFBP, BP-25 등을 사용하였다.

[0027] 1980년부터 1982년 사이에는, 본(Bohn)이 태반으로부터 단백질을 분리하여 그를 PP-12로 칭하였다. 그의 논문에 따르면, 그는 PP-12를 이전에 발견된 PAMG-1과 비교하여 그들 사이의 유사점과 차이점을 설명하였다.

[0028]  $\alpha_1$ -PEG 단백질의 N-말단 펩타이드에서, 즉 11차 및 12차 위치에서 다형성을 발견한 벨(1988년) 등에 의한 논문은 다른 연구 논문과는 대조적이며, 실제로 하나가 아닌 2가지 다른 단백질이 있다는 결론을 내리게 되었다.

[0029] 벨은 다시 한 번 더 양수의 2가지 다른 단백질인  $\alpha_1$ -PEG에 관한 그 자신의 논문을 참조하였다. 이 논문은 1990년도 명명 위원회[1990년도 발간 저널 클리니컬 엔도크리. 앤드 메타볼.(Journ. Clin. Endocr. And Metabol.) 70 #3 817페이지의 IGF 결합 단백질의 명명에 관한 보고서]의 결정을 수용하며, 이 결정에 따르면 단백질 AFBP, PP-12,  $\alpha_1$ -PEG, GH-프로테인, 결합 단백질 28,26,25, JB-1은 동일하고 이들 모두를 일반 명칭 hIGFBP-1으로 칭하였다.

[0030] 소위 자유 PAMG-1이 양막 파수를 검출하는 데 사용되었다. 하지만, 위에서 언급한 바와 같이, 높은 정확도 (>99%)를 갖는 시험이 수행되지는 않았다. 이러한 목적은 본 출원에 개시된 새로운 방법과 장치로서 달성된다. 본 발명은 질 분비물에서 아주 낮은 농도의 PAMG-1을 검출하기에 충분한 민감도를 제공하도록 한 쌍의 단일 클론 항체를 선택하는 방법을 사용하고 있으며, 또한 위에서 언급한 2개의 항체를 조합하여 스트립 장치에 대한 민감도의 소정 경계치를 정확하게 설정할 수 있게 하는 몇몇의 다른 항-PAMG-1 항체를 선택하는 방법도 사용하고 있다. 이로써 시험의 위양성 판정 빈도를 최소화시킬 수 있게 된다.

[0031] 본 발명은, 태반-알파-마이크로글로불린을 분리하여 설명하고 양수, 혈액 및 일부 조직에서의 그의 농도를 면역 화학적 방법을 사용하여 면밀히 측정하는 페트루닌 디.의 선두 연구로부터 시작된다. 이 논문은 어떠한 연구자에 의해서도 고려될 수 있는 공유 문헌이다. PAMG-1의 분리 방법은 이전 소련의 특허와 동등한 저자의 공식 등록에 의해 보호되고 있다(#SU-1614184A1, 우선권 주장 연도 1988년).

**발명의 상세한 설명**

[0032] 본 발명은 임신 중에 질 분비물에서 소량의 양수를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0033] 본 발명은 임신부의 질 분비물에서 양막 단백질 PAMG-1의 최소 배경 농도 이상의 PAMG-1을 검출하는 방법에 관한 것으로서, 이는 양수의 존재를 나타낸다.

[0034] 구체적인 일 실시예에 따르면, 본 발명의 PAMG-1 단백질 검출 방법은 질 분비물에서 PAMG-1 단백질의 최소 배경 농도를 검출하도록 선별된 한 쌍의 단일 클론 항체를 사용한다. 이 한 쌍의 항체는 시험의 소정의 민감도 경계치를 정확하게 설정하도록 적어도 하나의 추가 항-PAMG 단일 클론 항체와 조합되어 사용된다.

[0035] 또한, 본 발명은, 질 분비물에서 양막 단백질 PAMG-1을 검출하는 방법에서 민감도의 경계치를 보다 정확하게 설정할 수 있도록 PAMG-1 포착 항체를 하나의 스트립 장치에 조합하여 사용한다. 이러한 문제 해결 방식에 따르면, 민감도를 보다 양호하게 제어할 수 있으며, 선택된 한 쌍의 항체만을 사용하는 경우보다 가변 범위가

넓다.

- [0036] 본 방법의 가장 적절한 민감도 경계치 레벨은 5ng/ml에 근접하는데, 이는 왜냐하면 염증에 의해 발생할 수 있는 질 분비물의 PAMG-1의 상부 레벨은 3ng/ml을 초과하지 않으며 건강한 임신부의 질 분비물에서 정상적인 PAMG-1의 배경 레벨은 약 0.2ng/ml이기 때문이다. 검출된 물질의 한계 농도와 배경 레벨 사이의 상당한 차이로 인해 위음성(false negative) 및 양성 판정이 최소화된다. 일 실시예에 따르면, 양막 PAMG-1을 인식하는 제1 단계는, 선별되어 분류된 항체가 위치되는 스트립 장치의 패드부에서 수행된다. 반응의 제2 단계는, 선택된 쌍의 항체와 바람직하게는 적어도 하나의 추가 항-PAMG-1 항체가 고착되어 있는 덤스틱 장치의 테스트 영역에서 수행된다.
- [0037] 요약하면, 본 명세서에는 임신부의 질에서 소량의 양수를 검출하는 방법 및 장치가 개시된다. 본 방법은 바람직하게는 태반  $\alpha_1$ -마이크로글로불린(PAMG-1)에 대하여 단일 클론 항체의 쌍을 선택하는 것에 근거하고 있다. 선택의 목적은 우선 질 분비물에서 PAMG-1의 최소 배경 농도를 측정하는 것이다. 이러한 정보를 얻기 위해서, 경계치 레벨 이상의 PAMG-1을 검출할 수 있는 임의의 분석 기술이 질 분비물에서 양수를 검출하는 데에 사용될 수 있다. 이러한 정보를 기초로 하면, 장치의 민감도 경계치를 낮추어 정확하게 설정할 수 있도록 동일 쌍의 항체와 추가 항체를 사용하여 장치를 형성할 수 있고, 그에 의하여 위음성 및 위양성 판정이 발생할 확률을 최소화한다.
- [0038] 본 명세서에 개시된 특성과 동일한 특성을 가지도록 하면서 포착 항체(capturing antibodies)와 그의 단편을 여러 가지로 조합하거나 임의의 다른 분자를 여러 가지로 조합하는 것도 가능하다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 방법에는 선택적으로 PAMG-1을 검출하는 선택된 쌍 중 첫 번째 하나인 단일 클론 항체와 PAMG-1 단백질 함유 샘플의 접촉 단계가 포함된다. 또한, 항-PAMG-1 합성물을 형성하는 항체를 포함하고, 쌍 중 다른 표지 단일 클론 항체에 의해 항-PAMG-1 합성물을 검출하는 단계를 포함한다. 마지막으로, 양막이 파수되지 않은 임신부의 질 분비물에서 PAMG-1의 낮은 최소 배경을 정량적으로 측정하는 단계가 포함된다. 이 방법은 종종 ELISA 분류 시험에 사용된다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 장치는 선택적으로 PAMG-1을 검출하는 선택된 쌍 중 첫 번째 하나인 표지 단일 클론 항체와 PAMG-1 단백질 함유 샘플을 접촉시킨다. 또한, 다른 단일 클론 항체 인식 PAMG-1에 의해서 항-PAMG-1 합성물, 이 합성물의 측방향 유동 및 항-PAMG-1 합성물을 검출하는 단계를 형성하는 항체를 포함하고, 이에 따라 PAMG-1 인식 단일 클론 항체의 쌍을 사용하여 얻어질 수 있는 정확도보다 정확도가 높은 추가 항체를 사용하여 장치의 민감도 경계치가 약 5-7ng/ml의 범위로 설정된다.

### 실시예

- [0043] 본 발명은 질 분비물에서 아주 낮은 농도의 태반  $\alpha_1$ -마이크로글로불린을 검출함으로써 질 분비물에서 양수를 정확하게 검출하는 위에서 언급한 문제점들을 해소한다. 이 문제 해결 방식은 PAMG-1 농도의 낮은 배경 레벨(임신부의 질 분비물에서 약 0.2ng/ml)로 인해 바람직했던 것으로 판명되었다. 본 발명의 중요한 점은 낮은 농도의 단백질을 검출하도록 단일 클론 항체를 선택하는 데에 있으며, 이를 통해서 이들 수치의 정량화와 PAMG-1의 레벨 검출에 임의의 분석 기술을 사용할 수 있게 하는 데에 있다. 질 분비물에 낮은 농도의 PAMG-1이 존재하는 것은 예측될 수 있는데, 왜냐하면 혈액 단백질의 모세혈관 벽의 투과율이 단백질의 전사 후 변형과 다른 분자와의 상호 작용에 따르기 때문이다[제이. 에이. 마리나로(Marinaro J. A.) 등이 저술한 2000년 5월 발간 유럽 내분비 저널 142(5) 512의 0-글리코실레이션이 인체 IGF 결합 단백질-6과 순환과의 간극을 지연시킴과, 이. 이. 슈네버거(Schneeberger E E.)가 저술한 1983년 5월 15일 발간 페드 프록(Fed Proc) 42(8) 2419-24의 단백질과 모세혈관 내피의 소낭 수송과, 알디 민샬(Minshall RD) 등이 저술한 2002년 2월 발간 히스토켄 셀 비올(Histochem Cell Biol) 117(2) 105-12의 소포 형성 및 내피 세포의 트래피킹과 내피 배리어 기능의 규칙과, 피제이 델 베치오(Del Vecchio PJ) 등이 저술한 1987년 6월 발간 페드 프록 46(8) 2511-5의 고분자에 대한 내피 단층 투과율과, 에이 시프링어-비른보임(Siflinger-Birnboim A) 등이 저술한 1998년 11월 발간 마이크로바스크 레스(Microvasc Res) 36(3) 216-26의 내피 단층의 선택도 및 투과율 증가에 미치는 영향과, 엔 지니아(Ghinea N) 및 이에이 밀그롬(Milgrom EA)이 저술한 2001년 발간 재생 의학 세미나 19(1) 97-101의 LH/CG 수용기의 새로운 기능 및 목표 장기의 내피 배리어를 가로지르는 호르몬의 트랜스사이토시스]. 전사 후 변형을 겪거나 다른 분자와 비공유 결합을 형성한 PAMG-1 분자는 질 분비물로의 침투가 최소화이다. 이 질 분비물의 분자의 농도는 양막낭에 브리치(breach)가 없다면 낮다. PAMG-1 분자의 이질성은 선택적인 집합의 결과일 수도 있다. 벨 등은 양수의 2가지 밀접하긴 하지만 각기 다른 단백질  $\alpha_1$ -PEG에 관한 데이터를 제출하였다.  $\alpha_1$ -PEG는 PAMG-1에 가깝다. 각기 다른 분자가 질 분비물로 크거나 작게 침투하는 현상은 모세 혈관 벽의 선택적인 투과율과 선택적인 분비과

정 때문에 일어난다. 성공적인 면역분석법이 질 분비물의 PAMG-1 분자의 낮은 배경 농도를 검출하는 데 필요하다.

- [0044] 이러한 검출을 수행할 수 있는 한 쌍의 단일 클론 항체가 성공적으로 선택되었다. 검출된 PAMG-1 분자의 정확한 특성은 본 발명의 목적에 중요하지 않은 것으로 나타나며, 한 가지 예외로는 질 분비물에서 농도가 낮아야 한다는 점이다. 이 변수는 민감도 경계치를 낮은 레벨로 설정하는 데 충분하며, 이에 따라 시험 경계치와 질 분비물에서 PAMG-1 농도의 배경 레벨 사이의 상당한 갭을 유지시킬 수 있게 된다. 이렇게 최적 경계치를 선택함으로써, 잠재적인 위음성 및 양성 시험 판정을 하지 않게 된다.
- [0045] 특히, 태반  $\alpha_1$ -마이크로글로불린에 대한 단일 클론 항체(MAb)는 본 발명의 다른 MAb의 시스템 MAb-PAMG1쌍의 반응에 기초하여 연구되었다. 최고 역가(titer)는 특히 쌍 M271-M52를 사용하여 형성되었다. 하지만, 쌍 MAb271-MAb52와 루틴 ELISA 기술을 사용하여서는 본 출원인은 질 분비물에서 어떠한 PAMG-1의 농도 검출도 실패하였다. 고감도 ELISA 기술은 쌍 MAb271-MAb52에 대해 개발되었고 (예 5, 표 7), 질 샘플의 PAMG-1의 낮은 농도(피코그램 범위)를 측정하도록 사용되었으며(예 6, 표 8), 이어서 임신부의 자궁 경부 및 질 분비물의 PAMG-1의 낮은 농도(피코그램 범위)를 측정하도록 사용되었다(예 7, 표 9). ELISA에서, 제1 층은 고감도 MAb M271로 형성되었다. MAb M52를 함유한 양고추냉이 페록시다아제 쌍은 어떠한 억제제도 함유하지 않은 버퍼로 희석된다.
- [0046] 예 7, 표 9에 따르면, 임신 중 합병증이 없는 임신부의 자궁 경부 및 질 분비물에서 PAMG-1의 농도는 0.05 내지 0.22 ng/ml 범위이다. 이 데이터에 따르면,
- [0047] - PAMG-1의 정상 농도(8가지 경우)는 어떤 안정 레벨 주위로 국한된다. 질과 자궁 경부에서 PAMG-1의 상대 안정성은 본 방법의 변수의 안정성과 샘플을 채취하는 표준 방식을 나타내는 역할을 할 수 있다.
- [0048] - PAMG-1의 정상 농도 평균 레벨은 자궁 경부 분비물에서는 약 151ng/ml이고, 질 분비물에서는 약 110ng/ml이다.
- [0049] - 혈관 장애에 관련되지 않은 임신 병리학의 경우에, PAMG-1의 정상 레벨에 근접한 레벨이 관찰되었다.
- [0050] - 혈액 혼합에는 자궁 경부에서 PAMG-1의 농도 증가가 수반되며, 이 때 레벨은 151pg/ml의 정상 농도와는 대조적으로 290pg/ml로 관찰되었다.
- [0051] - PAMG-1 레벨은 조기 분만과 임신 중독증 징후가 있을 때 증가하며, 이는 단백질에 대한 양막의 투과율을 증가시키게 된다.
- [0052] - 양수 누출 부위에서, PAMG-1 레벨은 급격하게 증가한다(10-50의 배율만큼).
- [0053] 이하의 실시예에 개시된 바와 같이, 본 방법, 장치 및 시험 키트의 또 다른 개발을 위해 한 쌍의 단일 클론 항체 M271과 M52가 선택되었다.
- [0054] 따라서, 본 발명은 특히, PAMG-1의 결합 친화력을 갖는 선택된 한 쌍의 단일 클론 항체와, PAMG-1의 결합 친화력을 갖는 항체를 포함한 생물학적 조성물과, 본 발명의 항체를 사용하여 PAMG-1을 검출하는 키트와, 본 발명의 항체를 형성하는 세포주에 관한 것이다. 본 발명은 또한 질 분비물에서 PAMG-1의 존재에 의해 지시되는 바와 같이 질에 양수가 존재함을 근거로 하여 PAMG-1과 양막 파수를 검출하는 장치 및 방법에 관한 것이다.
- [0055] 본 명세서에서 상세히 설명하는 바와 같이, 본 발명은 부분적으로는 임신부의 질 분비물에서 최소 배경 농도의 PAMG-1을 검출할 수 있게 하는 한 쌍의 단일 클론 항체에 대한 연구로부터 시작된다. 질 분비물에서 PAMG-1의 최소 배경 농도와 그의 양수에서의 고농도에 의하면, 우선 장치의 민감도 경계치를 낮은 레벨로 설정하여 질 분비물에서 극히 소량의 양수를 검출할 수 있게 되며, 둘째로 장치의 민감도 경계치를 최적 방식으로, 즉 양막이 파수되지 않은 임신부의 질 분비물에서 PAMG-1의 낮은 최소 배경 농도의 통상 레벨과 양수에서 PAMG-1의 높은 통상 레벨 사이로 위치시킬 수 있게 된다. PAMG-1에 단일 클론 항체나 항체들을 추가하게 되면, 예를 들어 준정량적 분석을 위해 장치의 민감도 경계치를 소정의 레벨로 보다 정확하게 설정할 수 있게 된다. 또한, 질 분비물에 양수가 존재하는 것은 양막이 파수되었음을 나타내기 때문에, 질 분비물에서 PAMG-1을 검출함으로써 양막 파수를 검출할 수 있게 된다. 이러한 상황을 모두 조합하게 되면, PROM과 PPRM을 검출하는 시험의 잘못된 판정을 최소화시킬 수 있게 된다.
- [0056] 본 발명에 따르면, PAMG-1 전용 항체를 PAMG-1의 검출에 사용되는 물질, 키트, 장치 및 방법 내에 통합시킬 수 있어, 질 분비물에 PAMG-1이 존재하는 것에 기초하여 양막 파수의 발생을 검출할 수 있게 된다.

[0057]

**단백질 PAMG-1**

[0058]

PAMG-1은 임신부의 혈청, 양수 및 질 분비물과 모든 사람의 혈청에 존재하는 단백질이다. PAMG-1은 비임신부(0-60ng/ml)와 임신부(5-120ng/ml)의 혈청에 존재하며, 여기서 측정 농도는 검출에 사용된 단일 클론 항체의 쌍에 따른다(예1, 표 1, 2). 동일 단백질에 다른 쌍의 항체를 사용하여 그 단백질의 다른 측정 농도를 산출하는 것은 공지되어 있다. 따라서, 에이. 다이아만디(Diamandi A.) 등의 유사 연구에 따르면[에이. 다이아만디 등이 저술한 2000년 6월 발간 임상 내분비 대사 저널(Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism) 제85권 제6호 2327-2333페이지의 "인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질-3의 면역분석(Immunoassay of the Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3)" 참조], ELISA의 3가지 변수는 3가지 다른 IGFBP-3의 농도를 나타내었으며, 이를 에이. 다이아만디는 단백질 분자의 특정 전사 후 변형을 탐지하는 각 항체 쌍의 능력에 기인하는 것으로 설명하였다. PAMG-1은 혈청보다 양수에서 상당히 높은 농도(2000-75000ng/ml)로 존재한다.

[0059]

PAMG-1은 1977년도에 페트루닌 디.에 의해 양수로부터 분리되었으며, 초기에는 태반의 특이 알파-1 글로불린으로 불리어졌다[페트루닌 디. 등이 저술한 1977년도 발간 소련 모스크바 아쿠서스트보 아이 지네콜로지아 제1호 64-65페이지의 "인체 태반의 장기 특이 알파-1 글로불린과 그의 양수에서의 함량에 대한 면역 확인(Immunological Identification of Organ Specific alpha-1 Globulin of Human Placenta and Its Content in the Amniotic Fluid)"(예 2 참조)].

[0060]

이어서, 동일하지는 않지만 유사한 단백질인 PP-12가 본 등에 의해 태반과 양막으로부터 분리되어 정제되었다[1980년도 발간 아크. 지네콜.(Arch. Gynecol.) 제229권 279-291페이지의 "새로운 태반 단백질의 분리 및 특징(PP12)(Isolierung und Charakterisierung eines Neuen Placentaspezifischen Proteins(PP12))"]. 벨 에스. 등은 15 아미노산의 N-말단 펩타이드의 두 아니모산 물질(아미노산 N11, 12)과는 다른 자궁내막 PEG-1을 분리하는 것을 보고하였다[벨 에스. 등이 저술한 1989년도 발간 미국 생식 면역학 저널(American Journal of Reproductive Immunology) 제20권 87-96페이지].

[0061]

양수로부터 확인된 단백질을 특성화시키기 위해서, PAMG-1의 분자량을 결정하기 위해 일련의 측정 작업이 수행되었다. PAMG-1의 분자량을 결정하기 위해 면역반응법이 사용되었으며, 32kD(kilodalton: 킬로달톤, kD는 원자량 단위이다)로 판명되었다[엠. 엔. 볼토브스카야 등이 저술한 1991년도 발간 실험 생물학 및 의학 학회지 제10호 397-400페이지의 "단일 클론 항체를 사용한 태반 알파-마이크로글로불린의 조직 화학 및 임상 진단 연구(Histochemical and Clinico-Diagnostic Study of the Placental Alpha-Microglobulin[PAMG-1] Using Monoclonal Antibodies)"]. 이어서 본 출원인은 PAMG-1이 IGFBP 단백질 패밀리에 관련된 것으로 가정하였다(미국 특허 공보 제5,968,758호 참조).

[0062]

PAMG-1은 각기 다른 이소폼(isoform)으로 존재할 수 있으며, 다시 말하면 각기 다른 전사 후 변형 과정을 겪게 된다. 항체들은 다른 이소폼에 대하여 하나의 이소폼에 대해 다른 특이도를 가질 수 있으며, 이는 본 발명의 분석에 바람직하게 사용될 수 있다.

[0063]

**PAMG-1에 대한 항체**

[0064]

초기에는, PAMG-1에 대한 단백질성 항체들을 사용하였다[예를 들어, 와이. 타타리노프(Tatarinov Y.) 등이 저술한 1990년도 발간 우스페크히 소브르. 비올로지 제109권 369-373페이지 참조]. 그 후에, IGF-1과 IGF-2가 없는 PAMG-1만을 인식할 수 있는 항체들이 얻어졌다(미국 특허 공보 제5,891,722호).

[0065]

여가서, 용어 "항체"는 단백질을 얻는 데 사용되는 방법과는 무관하게 본 출원에 특정된 바와 같이 결합 친화력을 갖는 임의의 단백질을 말한다. 예를 들어, 단백질은 단일 클론 항체와 그의 단편일 수도 있고, 본 출원에 특정된 바와 같이 결합 친화력을 갖는 임의의 분자일 수도 있다.

[0066]

본 발명에 따르면, 재조합 또는 화학 합성에 의해 형성된 체액으로부터 분리된 PAMG-1 폴리펩타이드와 융합 단백질을 포함한 그의 단편 또는 유도체 또는 상사체가 PAMG-1 폴리펩타이드를 인식할 수 있는 항체를 생성시키기 위한 면역원으로서 사용될 수 있다. 이러한 항체들에는, 다클론 항체, 단백질성 항체, 단일 클론 항체, 키메라(chimeric) 항체, 단체인(single chain) 항체, 패브 단편(Fab fragment) 항체 및 패브 표현식 항체가 포함되나, 이에 국한되는 것은 아니다. 본 발명의 항-PAMG-1 항체는 교차 반응성일 수 있으며, 예를 들어 각기 다른 표본에서 PAMG-1을 인식할 수 있다. 다클론 항체는 교차 반응성이 더욱 크다. 선택적으로, 본 발명의 항체는 단일 형태의 PAMG-1 전용일 수 있다. 이러한 항체는 바람직하게는 인체 PAMG-1 전용이다.

[0067]

본 기술 분야에 공지된 여러 가지 절차가 PAMG-1 폴리펩타이드의 다클론 항체나 그의 유도체 또는 상사체를 생



성시키는 데 사용될 수 있다. 항체를 형성시키기 위해서, 여러 가지 숙주 동물에 PAMG-1 폴리펩타이드나 그의 유도체(예를 들어 단편 또는 융합 단백질)를 주입함으로써 면역시킬 수 있으며, 그 숙주 동물로는 토끼, 생쥐, 쥐, 양, 염소 등이 포함되지만 그에 국한되는 것은 아니다. 일 실시예에 따르면, PAMG-1 폴리펩타이드나 그의 단편은 면역원 운반체, 예를 들어 소 혈청 알부민[bovine serum albumin(BSA)]이나 키홀 림펩 헤모시아닌[keyhole limpet hemocyanin(KLH)]에 결합될 수 있다. 여러 가지 면역 반응 항진제가 숙주에 따라 면역 반응을 증대시키는 데 사용될 수 있고, 그 면역 반응 항진제로는 프로인드(완전 및 불완전) 면역 반응 항진제가 포함되긴 하지만 그에 국한되지는 않으며, 그 프로인드 면역 반응 항진제로는 수산화 알루미늄과 같은 미네랄 겔과, 라이소레시틴, 플루로닉 폴리올, 폴리아니온, 펩타이드, 오일 유제, 키홀 림펩 헤모시아닌, 디니트로페놀과 같은 계면 활성 물질과, BCG(결핵 예방 접종, bacille Calmette-Guerin)와 코리네박테륨 파븀(Corynebacterium parvum)과 같은 잠재적으로 인체에 유용한 면역 반응 항진제가 있다.

[0068] PAMG-1 폴리펩티드, 또는 그 조각, 유사체 또는 유도체에 대한 단일 클론 항체의 준비를 위해, 배양 중인 연속 세포주(cell line)에 의한 항체 분자의 생산을 제공하는 임의의 기법이 사용된다. 상기 기법은 콜러(kohler)와 밀스타인(milstein)[네이처(Nature), 1975년, 제256권, 495-497쪽]에 의해 최초로 개발된 하이드로도마(hybridoma) 기법과, 트라이오마(trioma) 기법, 인체 B-세포 하이드로도마 기법[코즈보(Kozbor) 등, 임뮤놀로지 투데이(Immunology Today), 1983년, 제4권, 72쪽; 코트(Cote) 등, 프로시딩즈 오브 아카데미 사이언스(Proc. Natl. Acad. Sci.), 미국, 1983년, 제80권, 2026-2030쪽], 인체의 단일 클론 항체를 생산하는 EBV-하이드로도마 기법[코올(Cole) 등, 단일 클론 항체와 암치료(in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy), 알란 알. 리스 인코포레이티드(Alan R. Liss, Inc.), 1985년, 77-96쪽]을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 본 발명의 부가적인 실시예에서, 단일 클론 항체는 무균 동물에서 생산될 수 있다(1989년 12월 28일 출원된 국제 특허 출원 번호 제 WO 89/12690호). 사실, 본 발명에 따르면, PAMG-1 폴리펩티드에 특정한 생쥐 항체 분자로부터의 유전자를 적절한 생물학적 활성이 있는 인체의 항체 분자로부터의 유전자와 함께 스플라이싱(splicing)함으로써 키메라 항체의 생산을 위해 개발된 기법[모리슨(Morrison) 등, 저널 오브 박테리얼(J. Bacteriol), 1984년, 제159권, 870쪽; 노이버거(Neuberger) 등, 네이처지, 1984년, 제312권, 604-608쪽; 다케다(Takeda) 등, 네이처지, 1985년, 제314권, 452-454쪽]이 사용될 수 있고, 이러한 항체는 본 발명의 범주 내에 있다. 이와 같은 인체의 또는 인체에 적용된 키메라 항체는 이종 항체보다 면역 반응 특히 알레르기 반응을 훨씬 덜 유도하기 때문에 인간의 질병 또는 장애 치료에 사용하기에 바람직하다(뒤에 기술함).

[0069] 본 발명에 따르면, 단일 사슬 항체의 생산을 위해 기술된 기법[미국 특허 번호 제 5,476,786호 및 제 5,132,405호, 휴스턴(Huston); 미국 특허 번호 제 4,946,778]이 PAMG-1 폴리펩티드인 단일 사슬 항체를 생산하도록 변경될 수 있다. 사실, 이러한 유전자는 생체 내의 발현을 위해 전달될 수 있다. 본 발명의 부가적인 실시예는 패브 발현 라이브러리(Fab expression libraries)의 건립을 위해 기술된 기법을 활용하여 PAMG-1 폴리펩티드 또는 그 유도체나 유사체의 소정 특이성을 가지는 단일 클론 패브 단편의 신속하고 용인한 확인을 가능하게 한다.

[0070] 개별특이형(idiotype) 항체 분자를 포함하는 항체 단편은 공지의 기법으로 생성될 수 있다. 예를 들어, 이러한 단편들은, 항체 분자의 펩신 소화에 의해 생산될 수 있는 패브2 단편, 패브2 단편의 이황화물 교상결합(disulfide bridge)을 환원시켜 생산될 수 있는 패브 단편, 항체 분자를 파파인(papain) 효소와 환원제로 처리하여 생산될 수 있는 패브 단편을 포함하지만 이들만 한정되지는 않는다.

[0071] 항체의 생산에 있어서, 소정 항체의 선별은 종래의 공지 기술, 예를 들어, 방사선 면역분석(radioimmunoassay), 엘리사[ELISA(enzyme-linked immunosorbant assay)], 겔효소 면역분석("sandwich" immunoassays), 면역방사선 측정 분석(immunoradiometric assays), 겔 확산 침전 반응(gel diffusion precipitin reactions), 면역확산 분석, 체자리 면역분석(in situ immunoassays)[예를 들어, 콜로이드 금(colloidal gold), 효소 또는 방사성 동위원소 표지를 사용함], 웨스턴 블롯(western blots), 침전 반응, 응집 분석(예를 들어, 겔 응집반응 분석, 혈구 응집 분석), 보체 결합 분석, 면역형광 분석, 프로테인 A 분석, 면역전기영동 분석 등에 의해 이루어질 수 있다. 일 실시예에서, 항체 결합은 일차 항체의 표지를 검출함으로써 검출된다. 다른 실시예에서, 일차 항체는 이차 항체의 결합 또는 일차 항체에 대한 시약을 검출함으로써 검출된다. 또 다른 실시예에서는, 이차 항체가 표지된다. 면역분석에서 결합을 검출하는 많은 수단이 공지되어 있으며, 이러한 수단들은 본 발명의 범주 내에 있다. 예를 들어, PAMG-1 폴리펩티드의 특정 항원결정인자를 인식하는 항체를 선택하기 위하여, 그러한 항원결정인자를 포함하는 PAMG-1 폴리펩티드 단편에 결합하는 생산물을 위해 발생된 하이드로도마를 분석한다. 특정 종의 동물로부터 PAMG-1 폴리펩티드 단편에 대한 특이 항체를 선택하기 위하여, 상기 특정 종의 동물 세포에 의해 발형되거나 그로부터 분리된 PAMG-1 폴리펩티드와의 양성 결합(positive binding)에 기초하여 선택할 수 있다.

[0072] **본 발명에 따른 특이 항체**

[0073] 본 발명에 따른 하이드로도마 세포주는 다음 과정에 의해 생성된다. 우선, 비장 및 림프절 B-세포를 구비한 생쥐에 PAMG-1으로 면역성을 준다. 이 때에 하이드로도마가 생성되어 B-세포를 불멸화시킨다. B-세포는 비장 및/또는 림프절 B-세포이다. 상기 하이브리도마는, PAMG-1에 결합 친화력을 가지는 단일 클론 항체를 생성하고, 그 다음, 제 1 층이 PAMG-1, 제 2 층이 하이브리도마 상청액, 제 3 층이 홍당무과산화효소(horseradish peroxidase)로 표지된 토끼 항-생쥐 항체의 접합체인 ELISA에서 인식된다. 이와 같이 인식된 하이브리도마는 시험관 내에서 또는 복수 내에서 배양되고, 하이브리도마가 생성한 단일 클론 항체는 분리된다. 특정의 실시예에서, 항체는 러시아 국립 산업 미생물 수집원 기탁소(Russia National Collection of Industrial Microorganism Depository) 기탁소에 수탁 번호 VKPM H-92, VKPM H-93, VKPM H-94로 각각 기탁된 N52, N271, N42로부터 만들어진다.

[0074] **본 발명에 따른 조성물**

[0075] 본 발명은 본 발명에 따른 둘 이상의 항체를 포함하는 일련의 조성물에 대한 것이다. 일 실시예에서, 조성물은 한 쌍의 항체와 그 한 쌍의 항체 중 하나에 부착된 검출 가능한 표지를 포함한다. 착색 입자, 효소, 형광 염료 및 방사성 동위원소를 포함하는 다양한 검출 가능한 표지가 사용될 수 있지만 이에 한정되지는 않는다. 검출 가능한 특유의 실시예는 20 내지 30nm 범위의 평균 치수를 가지는 금 착색 입자이다. 검출 가능한 다른 실시예는 홍당무 과산화효소이다. 예를 들어, 검출 가능한 표지를 항체에 부착하는 방법은, 할로우 이.(Harlow, E.)와 레인 디.(레인, 디.)가 저자인 메소드 인 엔지몰로지(Methods in Enzymology), 1981년, 제73권, 3-46쪽; 콜드 스프링 하아버 레보러터리Cold Spring Harbor Laboratory)의 "항체 연구실 매뉴얼(Antibodies a Laboratory Manual)" 1988년, 322, 323, 343쪽; 피어스(Pierce) 카탈로그, T9-T19쪽(1996년)에 개시된다. 적절한 효소는 알칼리 인산분해효소와 홍당무과산화효소를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 다른 표지는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 비드(latex bead), 마그네틱 비드, 형광 표지[예를 들어, 형광발색단 (fluorophore)이라 명명된, 형광 이소티오시안산염(FITC), 피코에리트린(PE), 텍사스 레드(TR), 로다민, 자유 또는 킬레이트티드 란탄 계열 염, Eu3+], 화학발광 분자, 방사성 동위원소(125I, 32P, 35S, 킬레이트티드 Tc 등) 또는 자기공명영상 표지를 포함한다. 또 다른 표지로는 예를 들어 고체상 분석뿐만 아니라 동일상 분석에서 사용되는 형광 약화 및 형광 전이 표지가 포함된다. 또한, 본 발명에 따르면, 표지는 비오틴-스트렙타비딘 (biotin-streptavidin), 글루타티온-GST, 헥사히스타딘-니켈 등의 다른 분자와 상호작용하기 위한 "핸들(handle)", 항원결정인자 또는 결합 파트너일 수 있다. 본 발명은 또한 그 자체가 표지로서 검출될 수 있는 2차 항체의 사용을 고려한다(예를 들어, 항-PAMG-1 항체 쌍이 Fc 부위를 구비한 항체를 사용하는 상황).

[0076] 또 다른 실시예에서, 조성물은 본 발명의 스트립 장치(strip device)의 테스트 영역에 국한된 둘 이상의 단일 클론 항체를 또한 포함한다.

[0077] **본 발명에 따른 키트**

[0078] 본 발명은 또한 PAMG-1을 검출하는 키트(kit)에 관한 것이다. 일 실시예에서, 상기 키트는 본 발명에 따른 한 쌍의 항체를 포함하고, 항체 중의 하나는 PAMG-1에 높은 특이성을 가진다. 키트의 변형예에서, 하나의 또는 다른 하나의 항체는 항체에 부착된 검출 가능한 표지를 포함한다. 다른 변형예에서, 선택된 쌍 중 하나의 또는 다른 하나의 항체는 고체 지지대에 부착된다. 이 변형예에서, 선택된 쌍 중 이동 가능한 항체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 다른 실시예에서, 조성물은 세 개 이상의 단일 클론 항체를 포함하고, 이러한 조합에 의해 면역크로마토그래피 분석 감도의 역치가 조절될 수 있기 때문에, 단일 클론 항체들 중 하나는 이동 및 검출 가능하다.

[0079] 특정 실시예에서, 항-PAAMG-1 항체에 대한 최고의 결합 친화도는 초기 샘플 접촉을 위한 장치의 패드 영역에 위치되고 이동 가능하다. 또 다른 항체는 장치의 테스트 영역에 위치한다. 선택적으로, PAMG-1에 대한 높은 결합 친화도를 가지는 다른 단일 클론 항체는 다른 조합에서 준비될 수 있어서 장치의 테스트 영역에서 본 발명의 장치에 대한 감도의 소정 역치를 설정 또는 조정하도록 불멸화시킨다. 이러한 것은 예 11에 도시된 일상적인 실험을 통하여 실행될 수 있다. 항체의 다른 조성물은 소정 레벨에서 본 발명의 장치를 위한 신호 검출의 역치를 설정한다.

[0080] **PAMG-1을 검출하기 위한 방법 및 장치**

[0081] 본 발명은 PAMG-1, 특히 정상적인 질액에서보다 더 많은 양의 양수에 존재하는 PAMG-1이 결과적으로 양수의 질내 누출로 되는 태아막 파열을 검출하는 데 유용한 분석대상물(analytes)이 되도록 확립한다. 다시 말해, 본 발명은 막, 즉 양막 주머니의 조기 파열을 검출할 수 있도록 한다. 또한, 본 발명은 정상 상태에서의 PAMG-1, 다

양한 질염 증상 및 실제 태아막 파열을 검출하는 기준을 확립한다. 막 파열을 나타내는 분석대상물 및 상대적 레벨을 식별한 다음에는, 바람직하게는 종래의 통상적인 기법 중의 하나인 단백질 검출을 위해 공지된 분석 기법을 적용하여 환자에게 막 파열 상태가 발생했는지 여부를 결정할 수 있다.

[0082] 면역 분석, 특히 면역크로마토그래피 분석은 본 발명에서 선호되는 기법으로서, 아래에서 상세하게 개시된다. 이러한 분석법은 특이성, 정확성, 속도, 경제성에서 이점이 있다.

[0083] 본 발명은 또한 PAMG-1을 검출하고 양을 평가하기 위해 다른 방법을 적용할 수 있지만, 이러한 방법들은 고가의 장비를 필요로 하고 분석을 연구실 수준으로 제한한다. 이러한 기법 중의 하나는, 예를 들어, 지연된 추출(delayed extraction)이 있는 매트릭스 보조 레이저 탈착(MALDI: matrix-assisted laser-desorption) 비행시간(TOF: time of flight) 질량 분광법(MS: mass spectrometry)과 비행시간 챔버(chamber)에서 리플렉트론법(reflectron)을 사용한 질량 분광법이다. 바람직하게, MALDI 분석은 실리콘 분석에 대해 실행된다. MALDI를 위한 배열의 예로는 산화 실리콘 상에서 350 $\mu$ m 중심에 200 $\mu$ m의 원형 겔 패드이다. 겔 패드들 사이의 소수성 표면(방수 표면)은 또한 더욱 초점이 맞춰진 매트릭스/단백질 스폿(spot)을 MALDI에 제공하여 정량(quantitation)을 위한 신호를 개선한다. 예를 들어, 팩커드 바이오사이언스(Packard Bioscience) 시스템을 사용하여 만들어진 스폿은 직경 200 $\mu$ m 미만일 수 있다. 피에조 시스템은 약 300 $\mu$ L의 MALDI 매트릭스[예를 들면, DHB, 스나피닉산(sanpinic acid)]를 친화성 포획제-펩티드 스폿의 정확한 위치에 전달하여 균일한 펩티드/매트릭스 결정체를 생성할 수 있다. MALDI-MS[예를 들어, 퍼스펙티브 보야저(Perspective Voyager)] 내의 상기 결정체로부터의 탈착/이온화[카라스(Karas) 등, 이온 프로세스(Ion Process), 1987년, 제78권, 53-68쪽; 또는 제노비(Zenobi) 등, 매스 스펙트럼(Mass Spectrum), 1998년, 제17권, 337-366쪽]는 펩티드 피크(peak)의 높이가 그 펩티드를 포함하는 단백질 양에 상대적인 질량 스펙트럼을 만들어낸다.

[0084] 본 발명에서의 사용을 위한 다른 기법으로는, 소량의 샘플 내에 존재하는 분석대상물의 정량을 가능하게 하는 모세관 전기영동 크로마토그래피가 있다.

[0085] 더욱이, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 정량적인 생화학 기법이 개별적으로 또는 조합하여 적용되어 샘플 내의 PAMG-1의 양을 검출하고 정량화한다.

[0086] **PAMG-1을 검출하기 위한 면역학적 방법 및 장치**

[0087] 항원에 대한 항체의 면역특이 결합을 검출하기 위해 종래에 공지된 다양한 수단이 본 발명에 따른 결합을 검출하는 데 사용될 수 있다. 항원과 항체간의 상호작용을 검출하는 초기 방법은, 그 복합체의 해석과 관련되는 것으로, 겔 내의 침전에 의한 것이다. 분석대상물-검출기 항체 결합쌍을 검출하는 다른 방법은 단백질 A와 같은 IgG와 반응하는 방사성요오드화 검출기 항체 또는 방사성요오드화 단백질을 사용하는 것을 포함한다. 이러한 초기 방법들은, 메소즈 인 엔자이몰로지, 1980년, 제70권, 166-198쪽에서 검토된 것처럼 당해 분야의 당업자에게 잘 공지되어 있다. 본 명세서에 개시된 PROM에 대한 역치 위에서 명확한 결과를 산출해내는 항체와 상태를 선택함으로써, 상기 기법은 본 발명을 실행하는 데 적용할 수 있다.

[0088] 단지 하나의 항체를 사용한 샘플 내에 있는 분석대상물의 존재를 결정하는 후자의 방법은 경쟁적 결합 분석을 포함하였다. 이러한 기법에서, 상당히 빈번하게 고체 지지대 상으로 불멸화되는 항체는 알려진 양의 표지된 분석대상물과 함께 분석대상물을 포함하는 것으로 생각되는 샘플에 노출된다. 그 다음, 샘플 내의 분석대상물과 표지된 분석대상물인 두 분석대상물은 항체 상의 결합 자리에 대해 경쟁한다. 자유로운 표지 분석대상물 또는 결합된 표지 분석대상물이 측정되고, 이러한 측정에 의해 샘플 내의 경쟁 분석대상물의 양을 알게 된다. 상기 방법의 더욱 완전한 기재가 엘빈 에이. 라바트(Elvin A. Lavat)의 "항원-항체 반응의 기본 원리(Basic Principles of Antigen-Antibody Reaction)," 메소즈 인 엔자이몰로지, 1980년, 제70권, 3-70쪽에 개시되어 있다. 이 예시에서, 표지된 분석대상물은 방사성 동위원소 또는 효소 표지로 표지될 수 있다.

[0089] 더욱 최근의 면역분석들은 분석대상물의 존재를 검출하는 데에 이중 항체 방법을 이용한다. 이러한 기법들은 또한 위에서 인용된 메소즈 인 엔자이몰로지의 동일한 권수에서 검토된다. 그러므로 본 발명의 일 실시예에 따르면, 독립적인 표지의 존재는 한 쌍의 항체를 이용하여 각각의 표지가 검출되도록 결정된다. 여기에서, 상기 한 쌍의 항체들 중 하나는 "검출기 항체(detector antibody)"로 명명되고, 상기 한 쌍의 항체들 중 다른 하나는 "포획 항체(capture antibody)"라고 명명된다. 이와 같이, 본 발명의 일 실시예는 질액 내의 PAMG-1을 검출하기 위해 이중 항체 샌드위치 방법을 사용한다. 상기 방법에서, 검출기 항체와 포획 항체 사이에 분석대상물이 샌드위치되고, 포획 항체는 고체 지지대 상에 비가역적으로 불멸화된다. 검출기 항체는, 항체-물질 샌드위치의 존재



를 확인함으로써 분석대상물의 존재를 확인하기 위하여, 검출 가능한 표지를 포함한다.

- [0090] 고체 지지대의 공통적인 초기 형태는 폴리스티렌으로 된 평판, 튜브 또는 비드를 포함하며, 이러한 것들 모두는 방사성면역분석과 효소면역분석 분야에서 잘 공지되어 있다. 더욱 최근에는, 나일론, 니트로셀룰로즈, 셀룰로즈 아세테이트, 유리 섬유, 기타 다공성 폴리머와 같은 많은 다공성 재료들이 고체 지지대로서 적용된다.
- [0091] 이와 같이, 특정의 실시예에서, 본 발명의 장치는 면역크로마토그래피 분석을 수행하기 위한 수단["면역크로마토그래피 분석 장치(immunochromatographic assay device)"]을 포함한다. 이러한 장치는 액체 안내용 고체상의 수단을 포함한다. 여기에서 사용된 "액체 안내용 고체상의 수단(solid phase means for conducting a liquid)"이라는 용어는 이를 통하여 액체의 이동, 즉 모세관 작용을 허용하는 고체 지지대를 의미한다. 이러한 성질을 가지는 전형적인 생성물은 당해 분야의 당업자에게 공지된 방법에 의해 준비될 수 있는 니트로셀룰로즈 막이다.
- [0092] 많은 면역크로마토그래피 분석 수단 및 포맷은 종래에 공지되어 있으며 본 발명을 실행하는 데에 사용될 수 있다. 디프스틱(dipstick) 또는 액-관통 장치 내에 고체 지지대로서 막을 사용하는 면역크로마토그래피 분석은 임상 연구실에서의 사용 및 선택적으로 비연구실에서의 시험을 위해 잘 확립되어 있다. 면역크로마토그래피 분석 장치를 위한 통상적인 형태는 플라스틱 홀더(holder) 내에 넣어진 (셀룰로즈 또는 비셀룰로즈의) 막이다. 플라스틱 홀더는 막을 적절한 형상으로 유지시켜 장치 전체가 정확한 기능을 하도록 보장한다. 분석 장치의 기본 구조에는 많은 변형들이 존재한다. 예를 들어, 리트만(Litman) 등은 미국 특허 번호 제 5,156,952호 및 제 5,030,558호에서 샘플 내의 최소량의 분석대상물의 존재를 측정하는 분석 방법 및 장치를 개시한다. 울만(Ullman) 등은 미국 특허 번호 제 5,137,807호 및 제 4,857,453호에서 샘플 유동을 보조하기 위하여 자급식의 액체 시약(self contained liquid reagents)을 포함하는 분석 막을 수용하는 장치를 개시한다. 다폰(Dafforn) 등은 미국 특허 번호 제 4,981,768호에서 샘플 및 여분의 액체를 가하기 위한 포트(ports)를 구비한 장치를 개시한다. 코티(Corti) 등은 유럽 특허 출원 번호 제 89118378.2호에서, 그린퀴스트(Greenquist) 등은 미국 특허 번호 제 4,806,312호에서, 그리고 버거(Berger) 등은 미국 특허 번호 제 5,114,673호에서 또한 분석 장치를 개시한다.
- [0093] 바람직하게, 면역크로마토그래피 분석 수단은 분석이 정확하게 진행하였다는 것을 표시하는 제어부를 포함한다. 제어부는 분석대상물의 존재 또는 부존재 상태에서 표시된 시약에 결합하는 검출 영역보다 고체상의 지지대 상의 샘플 적용 지점으로부터 더 떨어진 장소에 있는 특이 결합 반응물질일 수 있고, 이에 따라 이동 가능한 리셉터가 액체 샘플에 의해 의미있는 결과를 부여하기에 충분한 거리를 이동한다.
- [0094] 면역크로마토그래피 분석에서 사용하기에 적절한 표지는 효소, 형광발색단, 크롬발색단(chromophores), 방사성 동위원소, 염료, 콜로이드 금, 콜로이드 탄소, 라텍스 입자 및 화학발광 시약을 포함한다. 제어용 표시가 적용될 경우, 동일 또는 상이한 표지가 리셉터와 제어용 표시를 위해 사용될 수 있다.
- [0095] 본 발명의 일 실시예는 유동 관통형(flow-through type) 면역분석 장치를 사용한다. 발커스(Valkirs) 등은 미국 특허 번호 제 4,632,901에서, 항원체에 특이성이 있고 액체 샘플에 부가된 다공성 막 또는 필터에 결합되는 항체를 개시한다. 액체가 막을 통과해 유동함에 따라, 목적 분석대상물은 항체에 결합한다. 표시된 항체를 부가한 뒤에 샘플을 부가한다. 표시된 항체를 시각적으로 검출함으로써 샘플 내에 목적 분석대상물의 존재를 알 수 있다.
- [0096] 유동 관통 장치의 또 다른 예시로서, 크로머(Kromer) 등은, 유럽 특허 출원 공보 제 0 229 359호에서, 매트릭스 아래에 위치한 반응 매트릭스로 전달용 시약의 용해율을 제어하기 위한 수용성 폴리머 내에 분산된 시약 또는 시약 성분으로 포화된 매트릭스를 포함하는 시약 전달 시스템을 개시한다.
- [0097] 이동형(migration type) 분석에서, 막과 같은 고체상의 지지대는 분석을 수행하는 데 필요한 시약으로 포화된다. 표시된 분석대상물이 결합되고 분석 결과가 읽혀지는 분석대상물 분석 영역이 제공된다. 예를 들어, 톰(Tom) 등의 미국 특허 번호 제 4,366,241호, 주크(Zuk)의 유럽 특허 출원 공보 제 0 143 574호를 참조하라. 이동 분석 장치는 콜로이드 금 또는 탄소와 같은 착색된 표지에 부착된 시약을 그 장치 내에 포함하고, 이에 따라 추가적인 물질을 부가하지 않고도 분석 결과를 시각적으로 검출할 수 있게 한다. 예를 들어, 베른슈타인(Bernstein)의 미국 특허 번호 제 4,770,853호, 메이(May) 등의 국제 특허 공보 제 WO 88/08534호 및 칭(Ching) 등의 유럽 특허 출원 공보 제 0 299 428호를 참조하라. 이러한 공지된 유동-관통형 장치 모두는 본 발명에서 사용될 수 있다.
- [0098] 직접 표지는 본 발명에 따른 면역크로마토그래피 분석에서 사용될 수 있는 표지의 일례이다. 직접 표지는 자연 상태에서 육안으로 또는 광학 필터 및/또는 형광을 촉진하기 위해 가하는 자외선 등의 자극의 도움으로 용이하

게 볼 수 있는 실재물(entity)로 규정된다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 착색된 표지의 예로는, 예를 들어, 뤼버린(Leuvering) 등의 미국 특허 번호 제 4,313,734호에 개시된 금 줄 입자, 그리브노(Gribnau) 등의 미국 특허 번호 제 4,373,932호와 메이(May) 등의 국제 특허 공보 제 WO 88/08534호에 개시된 색소 줄 입자, 그리고 메이 수프라(May, supra), 신더(Synder)의 유럽 특허 출원 공보 제 0 280 559호 및 제 0 281 327호에 개시된 염색된 라텍스와 같은 금속성 줄(sol) 입자들이 포함된다. 다른 직접 표지로는 방사성 동위원소, 형광 모이어티(moiety) 또는 발광 모이어티가 포함된다. 상기의 직접 표지 장치 외에도, 효소를 포함하는 간접 표지가 본 발명에 따라 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 알칼리성 인산분해효소와 홍당무과산화효소, 리소자임, 글루코스-6-인산 탈수소효소, 젖산 탈수소효소, 우레아제와 같은 다양한 종류의 효소 면역분석법이 종래에 공지되어 있고, 이러한 것들에 대해서는, 메소즈 인 엔자이몰로지, 1980년, 제70권, 419-439쪽 및 미국 특허 번호 제 4,857,453호에 개시된 에바 앵그발(Eva Engvall)의 ELISA 및 EMIT에 의한 효소 면역분석법(Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT)에서 상세하게 개시되었다.

[0099] 특정 실시예에서, 본 발명의 진단 장치는 샘플의 도입부에 인접한 검출 섹션과 그보다 하류에 포획 구간을 구비한 막 조립체를 포함한다. 검출기 섹션은 샘플 내에 존재하는 본 발명의 임의의 분석대상물과 반응할 항체(검출기 항체)를 포함한다. 검출기 항체는 막 위에 가역적으로 불멸화되고 사용 중에 샘플과 함께 이동한다. 검출기 항체는, 예를 들어 종래 기술로 개시되고 전술한 것과 같은, 방사성핵종(radionuclide), 효소, 형광 모이어티, 발광 모이어티 또는 염색된 표지에 의해 표지되는 것이 필수적인 것은 아니지만 바람직하다. 특히, 예를 들어, 항체가 항원을 포획하기 전에는 황금색을 띠다가 포획 후에는 자주색으로 변하는, 반응성 표지가 적용될 수 있다.

[0100] 전술한 바와 같이 검출기 섹션의 하류에 있는 포획 구간은 고체 지지대 상에 가역적으로 불멸화되는 포획 항체를 포함하고, 각 항체는 포획 구간 내의 상이한 위치에서 불멸화된다. 항체와 필수 시약은 전술한 유동 관통형 면역분석 장치에서 기술된 바와 같은 표준 기법으로 인식된 기법을 사용하여 고체 지지대 상으로 불멸화된다. 일반적으로, 항체는 비극성 단백질 하부구조(substructures)와 비극성 지지 매트릭스 재료 사이의 소수성 상호작용의 결과로서 고체 지지대 상에 흡수된다.

[0101] 본 발명의 면역크로마토그래피 분석 기법의 특별한 이점은 이러한 분석법이 정량적인 데이터를 제공하지 못하는 것을 극복한다는 점이다. 이와 같이, 포획 구간은 PAMG-1에 특이한 불멸화된 항체의 혼합물을 포함할 수 있어서, 샘플 내의 PAMG-1 양이 소정의 검출 경계치를 초과할 때에만 신호가 발생된다.

[0102] 추가적으로, 본 발명은 동질 면역분석 포맷의 사용을 고려한다. 이러한 경쟁적인 동질 방법(homogeneous method)의 일례는 루벤슈타인(Rubenstein)과 울만(Ullman)에 의한 미국 특허 번호 제 3,817,837호에 개시된 항체의 결합 자리에 리간드와 효소 결합 리간드가 경쟁하는 기법에서 발견된다. 항체가 효소 결합 리간드에 결합하면 효소 활동이 변경되기 때문에, 리간드의 존재 농도비는 혼합물이 기질을 생성물로 변환시키는 비율을 측정함으로써 계산될 수 있다. 이와 같이, 동질 방법에서는, 표지의 검출 가능한 성질이 결합 또는 비결합인지 여부에 따라 본질적으로 상이하다. 결합 상태에서, 표지는 더 크거나 또는 더 작은 신호 강도를 가지게 된다. 통상적으로, 표지된 리간드에 항체가 결합하면, 예를 들어 표지가 효소인 때에, 신호 강도가 감소한다. 이러한 범주에서의 전형적인 생성물에는 시바 컴퍼니(Syva Company)의 효소 면역분석인 EMIT 라인(line)과 아보트 다이아그노스틱스(Abbott Diagnostics)의 형광 극성 면역분석인 TDX 라인이 포함된다. 특정의 동질 분석에서는 비드 상에 모든 분석대상물의 배열이 준비될 수 있고, 이 경우에는 샘플이 도입된 다음에 비드가 아래로 회전되어 검출된다.

[0103] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 생물학적 진단 장치의 다른 예로는, 다이아그노스틱스 시스템 인코포레이티드(Diagnostics System Inc.)의 쥐. 그레너 피.비.(G. Grenner, P.B.)에 의해 미국 특허 번호 제 4,906,439호와 제 4,918,025호에 개시된 장치가 포함된다. 그레너 '439 장치는 샘플을 시험 요소에 전달하기 위한 복수 개의 홈을 가지는 층을 구비한 것을 특징으로 하는 유체 전달 요소를 구비한 샘플 적용 유닛과 진단 시험 요소를 포함한다. 그레너 '025는, 고정된 시약을 포함하는 모세관과 액체 폐기 용기에 인접하여 위치하는, 막과 같은 샘플 도입 수단을 포함하는 장치이다. 고정된 시약을 모세관으로부터 떼어놓으면 샘플이 공급된 뒤에 반응이 완료되고, 여분의 액체는 폐기 용기에 유지되므로, 상기 장치는 자급적(self-contained)이다.

[0104] 막에 의한 측정이 바람직하지만, 다른 기법 및 상응하는 센서 장치가 전술한 것과 유사한 형태에서 마찬가지로 사용될 수 있다는 점을 이해하여야 한다. 동시에 다수의 샘플에 대한 분석을 수행할 수 있는 여러 형태의 자동화된 분석 장비가 현재 이용 가능하다. 이러한 자동화된 분석 장비는 연속적인/무작위의 접근 분석 장비를 포함한다. 이러한 시스템의 예로는, 피비 다이아그노스틱 시스템(PB Diagnostic System)의 오푸스(OPUS<sup>TM</sup>)와 1988년

일리노이즈 노스 시카고(North Chicago, Ill)의 아보트 연구실에 의해 도입된 아이엠엑스(IMX™)가 포함된다. 일반적으로, 시험 유체 샘플은 전형적으로 샘플 컵에 제공되고, 분석 시험 요소 내에 샘플을 피펫으로 옮기는 단계, 배양 단계 및 획득한 신호를 읽는 단계를 포함하는 모든 공정 단계는 자동적으로 수행된다. 자동화된 분석 시스템은 일련의 워크스테이션(workstation)들을 포함하며, 워크스테이션 각각은 시험 과정의 여러 단계 중 하나를 수행한다. 분석 요소는 회전 컨베이어(carousel) 또는 이동 가능한 랙(rack)과 같은 다양한 수단에 의해 한 워크스테이션에서 다음 워크스테이션으로 이동되어 시험 단계들이 순차적으로 이루어질 수 있도록 한다. 분석 요소는 또는 시약, 혼합용 유체, 희석용 샘플 등을 저장하기 위한 용기를 포함한다. 분석 요소는 또한 소정량의 샘플 유체 그리고 필요한 경우에는 다공성 부재로 요구되는 시약을 관리할 수 있게 하는 개구(opening)를 포함한다. 샘플 요소는 또한 공정 단계의 결과로서 얻어지는 신호, 전형적으로는 다공성 부재 상에 존재하는 시약의 형광 또는 색소 변화를 분석 시스템 내에 포함된 분광기 또는 형광계 등에 의해 읽을 수 있도록 하는 창을 포함한다. 피비 다이아그노스틱 시스템사의 자동화된 분석기기에 대해서는 미국 특허 번호 제 5,051,237호, 제 5,138,868호, 제 5,141,871호 및 제 5,147,609호에 개시되어 있다.

[0105] 본 발명에 사용될 수 있는 또 다른 부류의 면역화학 분석 시스템으로는 바이오센서 또는 광학 면역센서(optical immunosensor) 시스템이 있다. 일반적으로, 광학 바이오센서는 광학 원리를 이용하여 관심있는 화학적이거나 생물학적인 농도 또는 활성도를 전기적 신호로 정량적으로 변환하는 장치이다. 이러한 시스템은 네 개의 주요 카테고리, 즉 반사(reflection) 기법, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance), 광섬유 기법 및 집적 광학 장치로 분류될 수 있다. 반사 기법은 엘립소메트리(Ellipsometry), 다중 통합 반사 분광기(multiple integral reflection spectroscopy) 및 형광 모세관 필(fill) 장치를 포함한다. 광섬유 기법은 감쇄파(evanescent field) 형광, 광섬유 모세관 튜브 및 광섬유 형광 센서를 포함한다. 집적 광학 장치는 플레인너(planer) 소산파 형광, 인풋 그레이딩 커플러(input grading coupler), 면역센서, 마흐-젠더(Mach-Zehnder) 간섭계, 하트만(Hartman) 간섭계 및 차이(difference) 간섭계 센서를 포함한다. 결합 반응의 홀로그래픽 검출은 결합 쌍 중 하나의 반응물이 그 결합 쌍 중 불멸화된 제 2 반응물에 결합할 때에 소정의 이미지 위치에서 생성되는 홀로그래픽 이미지의 존재를 검출함으로써 이루어진다[리히텐발터(Lichtenwalter) 등의 1994년 10월 4일 공고된 미국 특허 번호 제 5,352,582호를 참조할 것]. 광학 면역센서의 예로는, 어드밴스즈 인 바이오센서즈(Advances in Biosensors), 1991년, 제1권, 229-256쪽, 로빈스 쥐.에이.(G. A. Robins)의 검토 논문에서 일반적으로 개시된다. 이러한 장치들의 더욱 특정한 기재는, 예를 들어 미국 특허 번호 제 4,810,658호 및 제 5,186,897호, 브래디 알.에이.(R. A. Brady) 등[필리핀 트랜잭션 로얄 소사이어티 랜드(Phil. Trans. R. Soc. Land), 1987년, 비(B) 316, 143-160쪽], 로빈스 쥐.에이 등[인 센서즈 앤드 액츄에이터즈(in Sensors and Actuators), 엘서비어(Elsevier), 1992년]에서 발견된다.

[0106] 본 발명에 따른 방법과 상응하는 키트는 다양한 광학 측정 시스템 범위 내에서 결합되어 실행될 수 있다. 특히, 본 발명의 키트와 재료는 면역분석 포맷으로 실행되고, 이러한 포맷 자체는 다양한 광전자 검출(optoelectronic detection) 시스템에 구체화될 수 있다. 더욱 구체적으로, 본 발명의 실행에서 이용되고 구체화되는 다양한 광학 면역센서 기법들은 이미 공지되어 있다. 이 때에, 예를 들어, 반사 기법, 표면 플라즈몬 공명, 광학 도파관(waveguide) 기법 및 집적 광학 장치는 모두 본 발명의 방법에 따라 환자의 생물학적 샘플 검사 결과를 디스플레이한다. 리플렉터메트리 및 엘립소메트리와 같은 특별한 반사 기법과 광섬유, 광도파관, 형광 모세관 필 장치 및 집적 광바이오센서의 특정 사용하는 경우에는 단지 몇 개의 기법과 장비만이 적용된다. 이러한 장치의 일반적인 검토는 어드밴스즈 인 바이오센서즈, 1991년, 제1권, 229-256쪽에 있는 로빈스 쥐.에이.의 광학 면역센서: 개관(Optical Immunosensors: An Overview)에 개시된다.

[0107] 더욱 특별하게는, 엘립소메트리는 우선 기준 표면 (표준)에 대하여 그리고 그 다음에는 샘플 표면에 대하여 편광된 광선의 방향에 의존하고, 후속하여 이에 따른 반사의 성질과 범위가 비교될 수 있다. 특히, 리셉터 분자에 대한 분석대상물의 결합이 기준 표면에 상대적인 표면 두께의 연속으로써 측정된다.

[0108] 다중 내부 반사 분광기의 경우에, 예를 들어 리간드와 그 리셉터는 평면의 용해된 수정 도파관의 광학 표면 상에서 공유결합적으로 불멸화되고, 그 다음에 광선은 도파관 내에서 내부적으로 반사되고 도파관에 인접한 용액 내로 침투하고, 이에 따라 표준과 샘플간의 굴절률 차이에 의해 측정이 이루어질 수 있다. 상기 특별한 포맷에서, 형광 표지가 관련되어 결합이 존재하는 범위를 결정하기 위해 결과적으로 형광 측정이 취해진다.

[0109] 부가적인 기법으로는 형광 모세관 필 장치로 알려진 기법이 이용된다. 상기 특별한 기법에서, 모세관 치수의 틈에 의해 이격되어 지지되는 두 개의 유리 평판이 이용된다. 리셉터 분자는 광도파관으로도 작용하는 베이스(base) 평판 상에 불멸화된다. FITC 표지법을 이용하는 경쟁적 또는 샌드위치 분석이 실행되고, 도입된 형광은



비결합 소오스(source)에 대항하는 결합 소오스로부터의 신호와 함께 도파관 내로 결합된다. 이러한 신호는 도파관을 나갈 때의 각 발산도(angular divergence)에 의해 구별된다. 표면 플라즈몬 공명(SPR) 장치가 또한 제공되며, SPR 장치는 얇은 금속 필름 상에 입사한 광선을 금속 필름 내부에서의 집단적인 전자 오실레이션과 관련된 표면 모드에 결합시킨 것에 응답하여 작동한다. 공명 조건은 금속 필름의 광학 특성, 그 두께, 그 양쪽 면에서 유전체의 굴절률과 광선의 입사각에 의존한다. 리셉터 분자는 금속 필름의 상부면에 결합되고, 광선은 프리즘df 관통하는 것처럼 필름의 하부면을 향한다. 목적 분석대상물은, 상기 리셉터에 결합하는 경우, 국부적으로 굴절률의 변화를 야기하기 때문에 공진 조건을 변위시킨다. 금속 필름 표면상에서 광선의 입사각이 변함에 따라 반사광의 강도를 모니터함으로써 공진을 관찰한다. 공진각의 변화는 결합된 분석대상물의 양과 직접적으로 상관관계가 있다.

[0110] 광섬유 시스템을 포함하는 기법은 감쇄파 형광을 포함한다. 이 경우, 광섬유 단부로부터 덮개를 제거하고, 이에 따라 주변 매체와 감쇄적으로 상호작용하는 센서 요소가 생성된다. 리셉터 분자는 노출된 섬유 표면에 결합되고, 리셉터와 접합체 단백질의 자연 형광을 이용하여 직접 분석이 실행된다. 더 높은 감도를 이루기 위해, 경쟁적 또는 샌드위치 분석이 FITC 표지법을 이용하여 실행된다. 공정 중에, 광파는 섬유에 결합되고, 감쇄적으로 생성되는 형광 부위는 섬유에 다시 결합되어 검출기로 다시 전파된다.

[0111] 광섬유를 이용하는 또 다른 기법은 광섬유 모세관 튜브를 포함하고, 광섬유 모세관 튜브에는 하나의 노출된 광섬유가 원통형 필 채임버(fill chamber) 내에 놓여져 있어서 광섬유를 둘러싸는 필 채적 부위와 감쇄적으로 상호작용하는 센서 요소를 만들어낸다. 리셉터 분자는 노출된 광섬유 표면에 결합되고, 샌드위치 또는 경쟁적 변위 분석이 실행된다. 광파는 광섬유와 결합하고, 감쇄적으로 도입된 형광 부위는 광섬유에 다시 결합되어 검출기로 다시 전파된다. 배경 소스에 대한 목적대상물로부터의 신호는 광섬유를 나가는 각 발산도에 의해 구분된다. 광섬유 형광과 같은 다른 광섬유 기법이 전술한 바와 동일한 원리를 이용하여 본 발명에 구체화될 수 있다.

[0112] 또한, 간섭 기법과 같은 광자 기법이, 예를 들어 하나의 경로에서 리셉터 분자가 불멸화되고 다른 경로는 은폐(shield)되어 기준 채널을 제공하는, 두 개의 경로를 구비한 필름 도파관의 배열을 포함한다. 예를 들어 레이저 광은 도파관에 결합되어 두 개의 경로로 분리되어서, 굴절률 및 덮개층(covering letter) 두께의 변화가 광선의 위상 변위의 결과에 의해 검출되고, 이러한 변화는 결합된 분석대상물의 양과 상호 관련된다. 이러한 접근법에 대한 변형예는, 단일 경로 다중모드 필름 평면 도파관(single path multimode thin film planar waveguide)이 제공되는, 하트만 간섭계에서 확인된다. 리셉터 분자는 상기 경로에서 불멸화되고, 레이저에서 나온 광선은 두 개로 모두가 경로를 따라 전파해 내려가도록 도파관에 결합된다. 다중모드 배열의 광학에서는, 고차원 모드는 큰 감쇄파를 구비하여 신호 메커니즘을 제공하고, 저차원 모드는 실질적으로 감쇄파를 구비하지 않아 기준 메커니즘을 제공한다. 목적 분석대상물과 결합함으로써 고차원 모드의 감쇄파에 의해 검출되는 경로에 대한 굴절률 및 덮개층(covering layer)에서의 관련된 변화가 발생하여, 해당 모드에서의 위상 변위가 발생한다. 저차원 또는 기준 모드는 이러한 변화에 무감각하기 때문에, 어떠한 위상 변위도 발생하지 않고, 신호와 기준 광선간의 측정 차이는 결합된 분석대상물의 양을 결정할 수 있는 상관관계를 가지게 된다.

[0113] 전술한 논의는 일반적인 용어와 어느 정도 상세한 내용에 대하여 주어진 것이지만, 광학 센서 기술에서 이용 가능한 다양한 기법은 본 발명을 실행하는 데에 적용될 수 있다. 전술한 내용은, 결합에서의 차이를 측정하여 결과적으로 관심있는 각각의 표지 또는 분석대상물의 존재 및 양을 성공적으로 측정할 수 있는 전술한 외의 많은 기술들을 채택할 수 있기 때문에, 결코 모든 것을 기술하였다거나 이에 제한되는 것이 아니다. 물론, 위에서 강조한 대로, 어떠한 기술이 적용되던 간에, 본 발명을 실행하는 데에는 적어도 세 개의 분석대상물의 동시 검출 및 측정이 포함된다.

[0114] **PAMG-1을 검출하는 면역크로마토그래피 방법**

[0115] 본 발명에 따른 PAMG-1을 검출하는 방법의 실시예가 이하에 기술된다.

[0116] 본 방법의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 면역분석 시스템과 PAMG-1을 포함하는 샘플의 접촉을 통해, 항체-PAMG-1 복합체를 형성하는 PAMG-1을 샘플 내에서 검출한다. 이와 같이, 항체-PAMG-1 복합체가 검출된다. 본 실시예의 일 변형예에서, 항체는 검출 가능한 표지를 포함하고, 검출 가능한 표지를 포함하는 항체-PAMG-1 복합체를 검출하는 단계를 포함한다.

[0117] 본 발명에 따른 또 다른 실시예에서, PAMG-1에 대한 특정 결합 친화성이 높은 (이하에서 예시하는 M271과 같은) 항체와 샘플을 접촉시키고 따라서 항체 M271-PAMG-1 복합체를 형성시킴으로써 샘플 내에서 PAMG-1을 검출한다.

그 후 복합체를 (예를 들면 M52와 같은) 고정된 제2 항체와 접촉시킨다. 제2 항체는 면역학적으로 제1 항체와 구별되며 제1 항체와 상호 반응하지 않으므로, 그와 같은 항체들은 동시에 PAMG-1 분자에 결합될 수 있다. 고정 항체는 유동성 항체 PAMG-1 복합체에 결합되어 고정 항체 PAMG-1 항체 복합체를 형성한다. 이러한 헤테로트라이머(heterotrimer) 복합체를 검출함으로써 PAMG-1을 검출한다. 전술한 바와 같이, PAMG-1를 초기에 인식하기 위해서는 PAMG-1에 대한 특이성이 높은 항체를 사용하는 것이 바람직하다.

[0118] 전술한 방법은 검출 가능한 표식체(marker)로 표시된 선택된 한 쌍의 항체들의 사용을 포함하지만, 상기 방법의 변형에는 샘플을 제1 표지 항체와 접촉시킨 후에 제2 고정 항체와 접촉시키는 것을 포함한다. 이러한 변형예에서 표지 항체는 샘플 내의 PAMG-1과 결합하는 역할을 한다. 본 발명에 따른 방법의 또 다른 실시예는, 항체와 단백질의 이동시킬 수 있는 다공성 재료의 고정된 표지 항체 영역에 PAMG-1을 함유하는 유체 샘플을 첨가하고, 상기 항체 영역은 PAMG-1에 대한 높은 특이성을 갖는 유동성 항체를 포함하므로 항체가 PAMG-1에 부착되어 항체 PAMG-1 복합체를 형성하는 단계, 고정된 제2 항체를 함유하는 테스트 영역으로 상기 복합체가 이동하고, 상기 제2 항체는 PAMG-1에 대한 결합 친화성이 있으므로 제2 항체가 표지 항체 PAMG-1 복합체에 결합되어 고정 복합체를 형성하는 단계, 및 테스트 영역에서 고정 복합체를 검출하는 단계를 포함한다.

[0119] 본 발명의 방법의 또 다른 실시예는, 비표지 항체가 표면에 고정되는 표준 샌드위치 분석 방법이다. PAMG-1을 함유하는 유체 샘플을 첨가하면, 고정 항체에 의한 PAMG-1의 결합이 발생하여 항체 PAMG-1 복합체가 형성된다. 표지 항체의 첨가에 의하여, 고정 항체 PAMG-1-표지 항체로 구성된 고정 복합체가 형성되고 이 복합체가 검출된다.

[0120] 전술한 방법에 따라, 항체는 검출 가능한 표식체 또는 표지체를 포함할 수도 있고, 항체 PAMG-1 또는 PAMG-1-항체 복합체를 검출하는 단계는 검출 가능한 표식체 또는 표지체의 검출을 포함한다. 사용될 수 있는 검출 가능한 표식체의 예는 오염된 입자, 효소, 염료 및 방사성 동위원소를 포함한다. 특정 실시예에서, 검출 가능한 표식체는, 예를 들면 크기가 약 20nm 내지 30nm인 오염된 금 입자이다. 또 다른 실시예에서, 검출 가능한 표식체는 양 고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase)이다.

[0121] **PAMG-1을 검출하기 위한 대표적 장치**

[0122] 샘플 내의 단백질 PAMG-1을 검출하기 위한 다양한 장치가 가능하다. PAMG-1을 검출하기 위한 본 발명의 장치의 특정 실시예가 도 1과 도 2에 도시되어 있다. 본 발명에 따른 장치는 바람직하게는 PAMG-1의 농도가 5ng/ml 내지 50 µg/ml인 샘플 내의 PAMG를 검출할 수 있다. 상기 장치는 검출 임계치가 약 5ng/ml 내지 7ng/ml인 것이 또한 바람직하다. PAMG-1의 배경 농도와 검출 장치의 민감도의 임계치 사이의 차이가 클수록, 부정확한 양의 결과가 발생할 가능성이 줄어든다. 본 절에서, 본 발명에 따른 장치의 여러 가능한 실시예가 도 1과 도 2에 도시된 장치의 범주 내에서 구현된다. 이러한 장치는 질 분비물 샘플 내의 PAMG-1의 존재를 간단히 검출하도록 구성될 수 있다는 점에 주목하여야 한다.

[0123] 본 명세서에서 사용된 용어 "약(about)"은 당업자에 의해 결정된 특징치에 대한 허용 가능한 오차 범위 내라는 점을 의미하며, 이는 부분적으로는 값이 측정 방법 또는 결정 방법, 즉 측정 시스템의 제한에 따라 달라진다. 예를 들면 "약"은, 당해 분야의 실시에 있어서 1 또는 1 이상의 표준 편차의 범위 내를 의미할 수 있다. 또는, "약"은 소정 값의 20%까지의 범위, 바람직하게는 10%까지의 범위, 보다 바람직하게는 5%까지의 범위, 보다 바람직하게는 1%까지의 범위를 의미할 수 있다. 또는, 특히 생물학적 시스템 또는 공정에 있어서는, 상기 용어는 소정 값의 크기의 오더 범위 이내, 바람직하게는 5배 이내, 보다 바람직하게는 2배 이내를 의미할 수 있다. 명세서 및 특허청구범위에 특정치가 기재되어 있는 경우에, 별도의 설명이 없다면 용어 "약"은 특징치에 대한 허용 가능한 오차 범위 내를 의미하는 것으로 추정되어야 한다.

[0124] **본 발명의 장치에 대한 설명**

[0125] 예시를 위한 목적으로, 본 설명은 이하에서 예시하는 바와 같은 단일클론 항체에 관한 것이다. 그러나, 이러한 특정 단일 클론을 반드시 사용하여야 하는 것은 아니다. 도 1과 도 2에 도시되어 있는 바와 같이, 장치는 순차적으로 상호 연결된 여러 요소들로 구성된 관형 본체를 포함한다. 보다 구체적으로, 장치의 부재(12)는 M271 항체 영역(10)을 수용하는 패드를 포함하며, M271 항체는 상기 영역 내에서 예를 들면 오염 입자 SP(도면에는 미도시)에 의하여 표시되어 있다. 패드(12)는 다공성이고 샘플의 여러 입자들 및 물질을 이동시킬 수 있는 샘플의 섬유유리 조직 또는 기타 물질로 이루어질 수 있다. 오염 입자는 평균 크기가 20nm 내지 30nm의 범위 내인 금 입자를 포함할 수 있다. M271 항체 영역은 동일 오염 입자에 의해 표시된 마우스(mouse) IgG 면역글로불린을 또한 함유할 수 있다. 패드(12)에 표시 M271 항체와 표지 마우스 IgG의 용액이 스며들게 함으로써, 패드(12)의 벤

드부(10)에 표지 M271 항체와 마우스 IgG 면역글로불린이 도입된다. M271 항체와 마우스 IgG 면역글로불린 용액은 드로잉 펜 또는 미세 액적 형성 장치를 이용하여 니트로셀룰로스 막(22)에 도입될 수 있다. 패드(12)의 길이 방향의 일단부에 테스트 영역(14)과 제어 영역(16)을 포함하는 니트로셀룰로스 막(22)이 연결된다. 테스트 영역(14)과 제어 영역(16) 모두는 장치의 횡방향으로 전폭에 걸쳐서 배치된다. 테스트 영역(10)은 니트로셀룰로스 막(22)의 밴드부이다. 테스트 영역(14)은 니트로셀룰로스 막(22)에 부착된 M52 항체를 함유한다. 제어 영역(16)은 니트로셀룰로스 막(22)에 부착된 항-마우스(anti-mouse) 항면역글로불린(anti immunoglobuline) 항체를 함유한다. 제어 영역(16)은 스트립(22)의 전폭을 가로지른다. 필터 종이 막(24)은, 패드(12)에 연결된 니트로셀룰로스 막(22)의 단부의 반대측인 니트로셀룰로스 막(22)의 단부에 연결된다. 필터 종이 막(24)은 니트로셀룰로스 스트립(22)의 길이 방향으로의 단부에 연결된다. 장치의 표면은 특별한 보호 필름(28, 30), 예를 들면 스트립 장치를 위해 특별히 설계된 얇은 점착 테이프로 코팅된다. 패드(12)의 샘플 도포 단부를 나타내기 위하여 필름(28)의 표면에 화살표(18)가 도시되어 있다. 패드(12), 니트로셀룰로스 막(22) 및 필터 종이 스트립(24)은 점착 강성 플라스틱 기부(26)에 부착된다.

[0126] 도 1과 도 2의 도면부호

[0127] 10 - M271 항체 영역

[0128] 12 - 패드

[0129] 14 - 테스트 영역

[0130] 16 - 제어 영역

[0131] 18 - 화살표

[0132] 22 - 니트로셀룰로스 막

[0133] 24 - 필터 종이 막

[0134] 26 - 점착 강성 플라스틱 기부

[0135] 28 - 화살표가 표시되어 있는 반투명 보호 필름

[0136] 30 - 불투명 보호 필름

[0137] **본 발명의 장치의 바람직한 실시예**

[0138] 본 절에서 설명하는 실시예에 있어서, 장치는 항체와 단백질을 통과시키는 다공성 샘플 도포 모재로 이루어진 M271 항체 패드 영역(10)을 포함한다. M271 항체 영역(10)은 PAMG-1과의 매우 특이한 결합 능력이 있는 M271 항체를 포함한다. PAMG-1을 함유하는 유체 샘플을 M271 항체 영역 내로 도입하면, M271 항체가 PAMG-1에 부착되어 항체 M271-PAMG-1 복합체가 형성된다. 장치는, 항체와 단백질을 통과시키는 다공성 재료로 이루어진 M271 항체 영역(10)과 유체 연결된 테스트 영역(14)을 또한 포함한다. 테스트 영역(14)은, PAMG-1과의 결합 능력이 있고 테스트 영역(14)에서 고정되는 M52 항체를 포함한다. M52 항체는 면역학적으로 M271 항체와는 다르므로 M271 및 M52 항체들은 동시에 PAMG-1과 결합할 수 있다. 유체 샘플을 M271 항체 영역(10)에 도입하면, 항체 M271-PAMG-1 복합체의 테스트 영역(14)으로의 이동이 일어나며, 테스트 영역에서 항체 M271-PAMG-1 복합체는 M52 항체와 결합하고 M52 항체에 의하여 테스트 영역 내에서 고정된다. 장치는 테스트 영역(14)에서 고정된 M52 항체의 존재에 기초하여 샘플 내의 PAMG-1을 검출한다. 이러한 실시예에 따르면, 두 항체들은 본 발명에 따른 항체들이다. 전술한 한 쌍의 항체들을 선택하는 과정은 당해 분야의 경험자에 의하여 재현될 수 있다. 그 결과, PAMG-1만이 테스트 영역(14)에서 고정된 항체 M271-PAMG-1-M52 항체 복합체를 형성한다. 따라서, 테스트 영역(14)에서 고정된 M52 항체의 존재는 샘플 내의 PAMG-1의 존재를 나타낸다.

[0139] 장치의 이러한 실시예에서, M271 항체는 테스트 영역(14)에서 고정된 PAMG-1을 검출하는 데 사용되는 검출 가능 표식체에 부착된다. 사용될 수 있는 검출 가능 표식체의 예는 오염 입자, 효소, 염료, 형광 염료, 방사성 동위원소를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 실시예에서, 검출 가능 표식체는 평균 크기가 20nm 내지 30nm인 금 입자이다. 일 실시예에서, M271 항체는 동결 건조 상태에서의 표지 항체이다.

[0140] M271 항체 패드 영역 내의 M271 항체가 검출 가능 표식체로 표지된 변형 실시예에 있어서, 장치는 M52 항체를 포함하는 테스트 영역을 또한 포함한다. 패드 영역과 테스트 영역은 유체 연결되어 있다.

[0141] 도 1과 도 2에 도시되어 있는 장치의 범주 내에서 또한 구현되는 장치의 또 다른 실시예에서, 장치는 근단부와

말단부를 갖는 스트립형 본체를 구비한다. 스트립형 본체의 M271 항체 영역(10)은 항체와 단백질을 이동시킬 수 있는 재료로 이루어진다. 스트립형 본체의 M271 항체 영역(10)은 PAMG-1에 대한 특정 결합 친화성이 큰 M271 항체를 포함하며, PAMG-1을 함유하는 유체 샘플을 M271 항체 패드 영역에 도입하면 M271 항체가 PAMG-1에 부착되어 항체 M271-PAMG-1 복합체가 형성된다.

[0142] 스트립형 본체는, M271 항체 영역(10)의 근방에 위치하고 M271 항체 영역(10)과 유체 연결 상태인 테스트 영역(14)을 또한 포함한다. 테스트 영역(14)은 항체와 단백질을 이동시킬 수 있는 재료로 형성된다. 테스트 영역(14)은, PAMG-1에 대한 결합 친화성이 있고 테스트 영역(14)에서 고정된 M52 항체를 포함하며, 유체 샘플을 M271 항체 영역(10)에 도입하면, 항체 M271-PAMG-1 복합체가 테스트 영역(14)으로 이동하고, 테스트 영역에서 항체 M271-PAMG-1 복합체가 M52 항체와 결합하고 M52 항체에 의하여 테스트 영역에서 고정된다. 테스트 영역은, 테스트 영역(14) 내에서 고정된 M42 항체와 M52 항체를 또한 포함한다. 비표지 M52 및 M42 항체들의 조합은 본 발명의 스트립 장치(실시예 11)의 민감도 임계치의 미세 조절을 가능하게 한다. 장치는 테스트 영역(14) 내의 표지 항체 M271-PAMG-1의 복합체의 고정에 기초하여 샘플 내의 PAMG-1을 검출한다.

[0143] **제어 영역.** 본 발명의 장치는 하나의 표준 제어 영역(16)(도 1과 도 2)을 포함한다. 이 제어 영역은 장치가 적절하게 작동될 수 있도록 하는 역할을 한다. 그러나, 본 발명의 장치에 있어서 다른 제어 영역의 구성도 사용될 수 있다는 점에 유의하여야 한다.

[0144] 제어 영역이 하나인 장치는, 항체와 단백질을 통과시킬 수 있는 재료로 이루어진 M271 항체 영역(10)을 포함하며, M271 항체 영역(10)은 그 안에서 고정되고 PAMG-1에 대한 특이성이 높은 표지 M271 항체를 포함한다. PAMG-1을 함유하는 유체 샘플을 M271 항체 패드 영역(10)에 도입하면, M271 항체가 PAMG-1과 결합하여 항체 M271-PAMG-1 복합체가 형성된다. 장치는 항체와 단백질을 통과시킬 수 있는 재료로 형성된 M271 항체 영역(10)과 유체 연결된 테스트 영역(14)을 포함한다. 테스트 영역(14)은 테스트 영역(14) 내에서 고정되고 PAMG-1에 대한 결합 친화성이 있는 M52 항체를 또한 포함한다. M52 항체는 M271 항체와는 면역학적으로 다르므로 M271 및 M52 항체들은 동시에 PAMG-1과 결합할 수 있다. 유체 샘플을 M271 항체 영역(10)에 도입하면, 항체 M271-PAMG-1 복합체가 테스트 영역(14)으로 이동하며, 테스트 영역(14)에서 항체 M271-PAMG-1 복합체가 M52 항체와 결합하고 M52 항체에 의하여 테스트 영역(14) 내에서 고정된다. 장치는 테스트 영역(14) 내의 표지 M271 항체의 고정에 기초하여 샘플 내의 PAMG-1을 검출한다. 샘플 내의 PAMG-1의 농도가 낮을 경우에, 적어도 표지 M271 항체들의 일부가 M271 항체 영역(10)으로부터 테스트 영역(14)을 통해 제어 영역(16)으로 이동한다. 샘플 내의 PAMG-1의 농도가 높을 경우에, 표지 M271 항체의 소량만이 제어 영역(16)에 접근할 수 있고 제어 영역의 착색(coloration)의 정도가 너무 약하므로 육안으로 관찰할 수는 없다. 그러한 가능성을 방지하기 위하여, 표지 마우스 IgG 면역글로불린을 M271 항체 영역(10)에 첨가한다. 이 면역글로불린은 PAMG-1과 결합하지 않고 M52 항체 테스트 영역(14)을 통해 제어 영역(16)으로 자유로이 이동하며, 제어 영역(16)의 항-마우스 항글로불린 항체와 오염물에 의하여 결합된다. 제어 영역은, 샘플 내의 PAMG-1의 농도와 무관하게, 장치가 적절하게 작동할 수 있도록 보증한다.

[0145] 본 발명의 장치의 또 다른 구성요소는 테스트 영역의 재료와 다공성의 상태로 밀접하게 연결된 다공성 재료이다. 본 발명의 장치의 이 부분은 액체, 단백질 및 항체의 이동을 돕는 펌프로서 작동한다. 마우스 항체 및 IgG 면역글로불린의 표지를 위해 사용될 수 있는 검출 가능 표식체의 예는, 입자, 효소, 염료, 방사성 동위원소를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 실시예에서 검출 가능 표식체는 형광 염료이다. 또 다른 실시예에서, 검출 가능 표식체는 오염 입자이다. 일 실시예에서, 표지 항체인 M271 항체와 표지 마우스 면역글로불린 IgG는 동결 건조 상태이다.

[0146] 전술한 장치의 여러 영역에 사용되는 재료는 항체와 단백질을 통과시킬 수 있는 재료들의 조합일 수 있다. 적절한 재료의 예는 섬유유리, 다공성 플라스틱, 니트로셀룰로스 및 필터 종이를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0147] 본 발명의 장치의 실시예에 있어서, 임신부의 질 분비물 내의 PAMG-1의 최소 배경 농도를 검출하는 한 쌍의 항체들이 선정되면, 장치의 부재들은 기능적으로 조합되어 배치될 수 있다.

[0148] 본 발명의 장치는 장치의 적어도 일부를 덮는 보호 필름을 선택 사양으로서 포함할 수 있다. 보호 필름은 투명하거나 투명하지 않을 수 있으며, 필요한 상표, 정보 표시/기호 또는 화살표를 보호 필름 표면에 표시할 수 있다.

[0149] **태아막 파열 검출**



- [0150] 양수 내에 존재하는 PAMG-1의 농도는, 임신부의 혈청 내의 농도의 100배 이상이고 태아막이 파열되지 않은 임신부의 질 분비물 내의 농도의 3000배 이상이다. 따라서, 소량(질 분비물 1ml 당 액적 하나의 약 1/100)의 양수가 질 분비물 샘플 내에 용해되었을지라도, 질 분비물 샘플 내에 충분한 양의 PAMG-1이 존재하여 태아막이 파열되었음을 나타낸다. 또한, 혈청 내의 PAMG-1의 농도가 낮기 때문에, 소량의 혈청이 샘플 내에 혼합(10% ~ 15%)되어도 본 발명에 따른 장치 및 방법에 의해 얻은 결과에 영향을 미치지 않는다.
- [0151] 질 분비물 내의 양수의 존재는 태아막 파열을 나타내므로, 질 분비물 내의 PAMG-1의 검출은 태아막 파열의 검출에 사용될 수 있다.
- [0152] 본 발명에 따른 양수 내의 PAMG-1을 검출하는 방법은 감도가 높다. 예를 들면, 0.05ng/ml 농도의 PAMG-1을 검출할 수 있다(실시예 6, 실시예 7). 양수 내의 PAMG-1의 최소 농도가 약 1680ng/ml인 것에 비하여, 혈청내의 PAMG-1의 최대 농도가 약 25ng/ml이고, 질 분비물 내의 PAMG-1의 배경 농도가 약 0.2ng/ml로 매우 낮기 때문에, 질 내의 양수의 존재를 검출하기 위한 본 발명의 방법에서는 PAMG-1에 대한 낮은 임계 레벨을 사용할 수 있다. 본 발명의 경우에 낮은 검출 임계치를 사용함으로써, 결과에 오류가 생기는 것을 대부분 방지할 수 있다.
- [0153] 본 발명의 장치 및 방법은, 감도가 높고 PAMG-1에 대하여 특이성이 있는 한 쌍의 항체들을 사용함으로써 부정확한 결과를 얻는 것을 방지하도록 구성되어 있다. 또한, 본 발명의 장치의 감도의 임계치는 5ng/ml 내지 7ng/ml에 근접한 소정 레벨로 정확하게 설정될 수 있다.
- [0154] 그 결과, 본 발명에 따른 장치 및 방법은, 태아막 파열을 검출하기 위한 전술한 방법의 정확도에 부정적인 영향을 미치는 질염 또는 다른 변수의 존재에 의하여 영향을 받지 않는다. 염증 누출물 내의 PAMG-1의 최대 농도는 3ng/ml이다(실시예 8, 표 10, 표 11). 혈청이 질 분비물에 혼합된 양이 10% 내지 15%를 초과하지 않으며, 동일한 PAMG-1의 농도가 발생할 수 있다. 또한, 혈청과 양수의 PAMG-1의 비가 크면, PAMG-1 검출 임계치가 작을 경우일지라도, 질 분비물 내의 혈청의 존재로 인하여 본 발명의 장치 및 방법은 잘못된 긍정적인 결과를 생성할 가능성이 상당히 작다. 본 명세서에 개시되어 있는 바와 같이, 본 발명의 장치와 방법은 신속하고 간단한 방법으로 용이하게 개량될 수 있고, 따라서 장치와 방법은 외래 환자에게도 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 방법은, 환자가 장치에 대하여 경험이 적거나 전혀 없는 경우에도 조작 가능하고 사용하기 용이한 장치에 포함될 수 있다. 장치를 사용하기 위하여 측정 전에 특별히 시간을 요하는 조작, 샘플 농도의 회석 또는 매칭(matching)을 필요로 하지 않는다. 이로 인하여 본 발명의 방법과 장치는 신뢰성이 높고 작업자의 실수에 민감하지 않다. 본 발명의 방법은 샘플 내의 PAMG-1의 존재 및 질 내의 양수의 존재의 간단한 예/아니오 결정을 가능하게 하도록 구성되어 있다.
- [0155] 본 발명은 임신부의 질 분비물 내의 PAMG-1의 존재에 기초하여 태아막의 파열을 검출하는 방법 및 장치를 제공한다. 결과적으로 태아막 파열을 검출하기 위한 본 발명의 방법은 질 분비물 내의 PAMG-1을 검출하는 단계를 포함하며, 질 분비물 내의 PAMG-1의 존재는 태아막이 파열되었음을 나타낸다. 본 발명의 핵심적인 구성은, 임신부의 질 분비물 내의 단백질 PAMG-1의 매우 낮은 배경 농도를 검출하는 한 쌍의 항체들의 단계별 선정이다. 혈단백에 대한 모세관 벽의 침투성은 단백질의 해독후의 변형(posttranslation modification) 및 다른 분자들과의 상호작용에 의존하기 때문에, 질 분비물 내의 저농도의 PAMG-1의 존재가 예상될 수 있다(마리나로 J. A. 등, "O-포도당화에 의한 순환으로부터 인체 IGF-결합 단백질-6의 제거 지연(O-glycosylation delays the clearance of human IGF-binding protein-6 from the circulation)", 유로피언 저널 오브 엔도크리놀로지, 200년 5월, 142(5)권, 512페이지; 슈니베르거 E. E., "모세관 내벽 조직 내의 단백질 및 소포 이송(Proteins and vesicular transport in capillary endothelium)", 페드. 프로시딩, 1983년 5월, 42(8)권, 2419페이지~2424페이지; 민살 R. D. 등, "내피 세포 내의 소포 형성과 운송 및 소포 배리어 기능의 조절(Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function)", 히스토케미스트리 셀 바이올로지, 2002년 2월, 117(2)권, 105페이지~112페이지; 델 베치오 P. J. 등, "고분자에 대한 소포 단층 침투성(Endothelial monolayer permeability to macromolecules)", 페드 프로시딩, 1987년 6월, 46(8)권, 2511페이지~2515페이지; 스플링거-비른보임 A 등, "소포 단층의 선택성: 침투성 향상에 미치는 영향>Selectivity of the endothelial monolayer: effects on increase permeability)", 마이크로베스클러 리서치, 1998년 11월, 36(3)권, 216페이지~227페이지; 기니아 N., 밀그롭 E. A., "LH/CG 수용기에 대한 새로운 기능: 목표 기관의 소포 배리어를 가로지르는 호르몬의 트랜스사이토시스(New function for LH/CG receptor: transcytosis of hormone across the endothelial barrier in target organs)", 세미나 리프로덕트. 메드., 2001년 19(1)권, 97페이지~101페이지). PAMG-1 분자들 중에서, 해독후의 변형을 겪거나 다른 분자들과 비공유 결합을 형성하는 분자들은 질 분비물 내로의 침투가 최소이어야 한다. 여러 분자들의 침투성이 높거나 낮은 이유는 모세관 벽의 선택적 투과성 및 선택적인 분비 과정 때문이다. 임신부의 질 분비물 내의 양수의 존재가 태아막 파열을 나타낸다는 점은

공지되어 있기 때문에, 질 분비물 내의 PAMG-1의 검출은 태아막이 파열되었다는 것을 검출하는 데에 또한 사용된다. 질 분비물 내의 PAMG-1을 검출하기 위한 방법 및 장치의 예는 본 명세서에 보다 상세히 개시되어 있는 방법 및 장치를 포함한다. 상기 방법은 본 명세서에 보다 상세히 개시되어 있는 질 분비물 샘플 내의 PAMG-1의 검출에 기초하여 태아막 파열을 검출하는 단계를 또한 포함한다.

[0156] 진술한 바와 같이, 태아막 파열을 검출하기 위한 본 발명에 따른 방법은 특이성, 감도 및 정확도가 높다. 임신부의 질 분비물 내의 PAMG-1의 낮은 배경 농도와 본 발명의 장치의 감도의 보다 높은 설정 임계치 사이의 큰 차이에 의하여 감도와 정확도가 달성되며, 임계치는 태아막 파열 시의 질 분비물 내의 PAMG-1의 전형적인 농도보다 낮으며, 따라서 질 내로의 양수의 누설을 검출할 수 있다. 임계치를 정확하게 설정하기 위해서는, 테스트 영역(14)에서 PAMG-1에 대한 하나 이상의 추가 항체를 사용하여 본 발명의 장치의 감도의 소정 임계치를 정확하게 설정한다(실시예 9). 결과적으로, 본 발명의 방법 및 장치는, 특이성이 큰 한 쌍의 단일 클론 항체 M271과 M52를 사용하고 항체 M42를 추가로 사용함으로써, 부정확한 부정적인 결과 및 부정확한 긍정적인 결과를 생성하는 것을 방지하도록 구성되어 있다. 그 결과, 본 발명의 방법 및 장치의 정확도는, 태아막 파열을 검출하기 위한 종래 기술에 따른 방법의 정확도를 감소시키는 질 감염 또는 다른 특정 변수들의 존재에 의하여 악영향을 받지 않는다. 임신부의 질 분비물 내의 PAMG-1을 검출하기 위한 본 발명의 바람직한 장치 및 방법은 사용하기 용이하고, 편리하고 신속하도록 구성되어 있으며, 따라서 본 발명의 장치를 외래 환자에게 사용하는 것이 가능해진다. 예를 들면, 본 발명에 따른 방법은, 장치에 대한 경험이 적거나 거의 없는 환자라도 조직이 가능하고 용이하게 사용할 수 있는 장치에 포함될 수 있다. 장치를 사용하기 위하여 측정 전에 특별한 시간을 요하는 조작, 샘플 농도의 희석 또는 매칭을 필요로 하지 않는다. 이로 인하여 본 발명에 따른 태아막 파열 검출 방법 및 장치는 신뢰성이 높고 작업자의 실수에 대해 민감하지 않다. 본 발명의 장치의 임상 시험 결과가 실시예 10에 나타나 있다. 질염에 걸린 경우에 질 분비물 내의 PAMG-1의 농도 측정은 실시예 8에 나타나 있다. 실시예 8로부터, 염증 누설물 내에서 관찰되는 PAMG-1의 최대 농도는 3ng/ml에 가깝다는 점을 알 수 있다.

[0157] **실시예**

[0158] 이하의 실시예는, 양수로부터 PAMG-1의 격리, PAMG-1에 대한 한 쌍의 항체 선정, 상기 항체의 특이성에 대한 연구 및 질염의 염증 누설물 내의 PAMG-1의 농도에 대한 보다 상세한 설명에 관한 것이다. 이 실시예들은 본 발명의 특정 태양을 예시하기 위하여 제공되며, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니다.

[0159] 실시예 1: 혈액 및 양수 내의 PAMG-1의 농도

[0160] 실시예 3에 기재되어 있는 바와 같이 생성된 한 쌍의 단일클론 항체를 사용한 ELISA에 의하여, 임신하지 않은 여성과 임신부(임신후 37주~40주)의 혈청 및 양수(임신후 39주~40주) 내의 PAMG-1 농도를 측정하였다.

[0161] 항체 M1, M271, M152 및 M392를 pH9.5의 0.05M 탄산염-중탄산염 완충액에서 6°C에서 18시간 동안 폴리스티렌에 흡착시켰다.(각 웰(well) 내에 100 μl의 항체 용액). pH7.0이고 200 μl인 각 웰의 인산염 완충 살린(PBS)의 보빈 혈청 알부민(BSA)의 1% 용액을 사용하여 폴리스티렌에 대한 비-특이성 흡착을 제거하였고, 37°C에서 1시간 동안 배양하였다.

[0162] 100 μl의 PAMG-1 항원을 50, 25, 12, 6, 3, 15, 및 0.7ng/ml의 농도로 각 웰에 첨가하였다. 혈청 또는 양수 샘플들을 0.01% BSA 및 PBS의 0.05% 트윈(Twin) 20의 완충액 내에서 희석하였다. 희석된 샘플을 웰에 첨가하고, 웰을 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 0.05M 구연산염-인산염 완충액(pH 4.7) 내의 오소페닐레네디아민의 용액에 의하여 반응을 촉진시켰고, 37°C에서 20분 동안 배양하였다. 광학 밀도는 파장 492nm에서 판독하였다.

[0163] 제1층의 항체의 농도 및 접합체(conjugate)의 농도를 구한 결과, PAMG-1에 대한 표준 광학 밀도 곡선은 최대 기울기가 약 45도(1 광학 단위의 증가는 샘플 내의 PAMG-1의 1ng/ml의 증가에 상응)이고, (PAMG-1 농도 50ng/ml에 대한) 상한치가 1.5 광학 단위이며, 농도 0점은 0.1 광학 단위를 초과하지 않았다. 조사용 샘플(혈청, 양수, 질 분비물 및 자궁 분비물)을 약 -40°C에서 동결시켰다. 각 샘플에 대해 시험을 3회 실시하였다. 혈청은 원래 농도의 1/5로 희석시켰다. 양수 샘플은 원래 농도의 1/2000로 희석시켰다. 샘플들의 광학 밀도가 1.5 단위를 상회하는 경우에, 샘플을 더욱 희석시켜 재시험하였다.

[0164] 얻어진 데이터를 아래의 표 1 내지 표 3에 요약하였다.

**표 1**

[0165] 임신하지 않은 여성의 혈청 내의 PAMG-1의 농도(ng/ml).

N	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
1	20	0	15	12
2	20	0	15	13
3	60	5	50	46
4	50	7	48	50
5	40	4	30	34
6	64	15	50	56
7	20	7	15	14
8	48	8	35	30
9	15	0	10	14
10	40	5	20	35

**표 2**

[0166] 임신부(임신후 37주~40주)의 혈청 내의 PAMG-1의 농도(ng/ml).

N	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
1	90	8	70	50
2	100	15	90	75
3	105	16	95	75
4	120	22	100	94
5	100	12	98	90
6	98	14	95	80
7	104	20	90	80
8	98	25	75	60
9	64	5	55	40
10	70	10	60	40

**표 3**

[0167] 양수(임신후 39주~40주) 내의 PAMG의 농도(ng/ml).

N	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
1	8000	1680	6400	5000
2	12000	8000	6000	5000
3	10000	6000	7000	6000
4	6000	2000	5000	4500
5	8000	12000	5800	5000
6	7000	20000	5000	5000
7	6000	2000	4000	3000
8	75000	8000	5000	4700
9	2000	3000	1440	1500
10	40000	13000	36000	25000

[0168] 실시예 2: PAMG-1의 격리

[0169] D. 페트루닌(Petrinin)은 1980년(페트루닌 D. D., 코즐라예바 G. A., 유 S., 웨브첸코 O. P., 불리틴 오브 익스페리멘탈 바이올로지 앤드 메디슨, 5호, 558페이지, 1980년, 러시아)에 PAMG-1 격리의 변형된 방법을 제안하였다. 이 방법의 단계를 아래 표 4에 요약하였다.

**표 4**

[0170] PAMG-1의 격리 단계

격리 단계	순도 %	수율 %
임신후 16주~25주의 양수	4	100
0.5% 염화탄산에 의한 석출	25	90
50% 포화에서의 황화암모늄에 의한 석출	35	70
60% 포화에서의 황화리튬에 의한 석출	60	60
역상 크로마토그래피 분리	90	30

[0171] 임신후 16주~25주의 양수로부터 PAMG-1을 분리하였다. 의학적인 이유에 의하여 임신을 마친 영성으로부터 양수를 얻었다. 염화탄산의 10% 용액을 부피비 20:1로 양수에 첨가(따라서 최종 농도는 0.5%)하였고, 4°C에서 18시간 동안 유지하였다. 석출물을 형성시켜, 8000rpm으로 30분 동안 원심분리하였다. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 포화 용액 내에서 석출물을 용해하였고, 8000rpm으로 30분 동안 원심 분리하는 공정에 의해 생성된 불용성 란탄염의 석출물을 분리하였다. 4°C에서 18시간 동안 배양하여 50% 포화 황화암모늄의 용액을 제조하였고, 두 경우 모두에 있어서 양수의 초기 부피에 대한 용해된 석출물 분율의 부피를 회복하도록 얻어진 석출물을 증류수에 용해하였다. 그 후, 60% 포화 황화리튬에 의해 용액을 석출시키고 소량의 증류수에 석출물을 용해하였다. 투석 후에, 단백질 용액에 동일 양의 수분 흡착제를 첨가하고 혼합하고 10분~15분 동안 배양함으로써, 혼합물을 칼슘 파이로인산염으로 흡착시켰고, 원심 분리에 의하여 흡착제를 분리하였다.

[0172] 실시예 3: 본 발명의 안정 하이브리드 라인의 제조

[0173] 하이브리도마 실험 1.

[0174] 5마리의 BALB/C 생쥐의 오금 림프절(popliteal lymph node)로부터의 림프구를 사용하였다. 생쥐는 풋 패드(foot pad) 내의 PAMG-1의 5회 주입에 의하여 면역되었다. 각 주입물은 1:1 비율의 100 µg의 PAMG-1과 프로인트 완전 면역 보강제(Freund's Complete Adjuvant)로 이루어졌다. 세포 융합 후에, 세포들은 1152개의 웰에서 접종되었다. 총 363개의 1차 하이브리도마스를 시험하였으며, 그 중 38개는 PAMG-1에 양성이었다. 그 후, 단일 클론 항체의 특이성을 시험하기 위하여, 가임성 단백질-알파-2-마이크로글로불린, 인간 융모막성 생식선 자극 호르몬(chorionic gonadotropin), 융모성 베타-1-당단백질(trophoblastic beta-1-glycoprotein), 인간 태반 유선 자극 호르몬(human placental lactogen), 알파-태아단백(alpha-fetoprotein), 및 인간 혈청 알부민과의 상호 반응 결합을 조사하였다. 단일클론 항체가 다른 단백질과 상호 반응하지 않는 14개의 1차 하이브리도마스를 선정하였다. 그 후, 제한 희석 방법을 사용하여 1차 PAMG-1-특이성 하이브리도마스를 2배로 복제하였다. 마지막으로, 가장 안정적이고 생산력이 있는 단일 항체 M1, M38, M42, M52, M91의 생산자인 5개의 클론을 선정하였다.

[0175] 하이브리도마 실험 2.

[0176] 5마리의 생쥐의 비장으로부터의 림프구를 사용하였다. 생쥐들은 100 µg의 PAMG-1을 복강내에 5회 주입함으로써 면역되었다. 각 주입물은 1:1 비율의 PAMG-1과 프로인트 완전 면역 보강제로 이루어졌다. 1344개이 웰이 사용되었고 562개의 하이브리도마스가 시험되어 있다. 이 중에서, 45개는 PAMG-1에 양성이었고, 19개는 다른 단백질과 상호 반응성, 예를 들면 PAMG-1에 특이성이 없었다. 상호 반응성이 없는 하이브리도마스를 2배로 복제하였고, 가장 안정적이고 단일 항체 M1, M38, M42, M52, M91의 강력한 생산자인 것으로 판명된 6개의 클론을 선정하여 사용하였다.

[0177] 따라서, PAMG-1에 대한 11개의 단일클론 항체가 생성되었고, 실시예 4에 개시되어 있는 바와 같이 임신부의 질 분비물 내의 PAMG-1의 최소 배경 농도를 검출한 한 쌍의 항체들을 선정하였다.

[0178] 본 발명에 따른 특이 세포 라인

[0179] 하이브리도마 세포 라인 M271과 M52 각각에 의하여 항체 M271과 M52를 생성하였다. 단일클론 항체를 생성하는 세포 라인을 본 명세서에서는 M271과 M52로 칭하며, M42는 이하에 설명된 바와 같이 장치의 민감도의 임계치를 설정하고 조정하는 데 사용되는 단일클론 항체를 생성한다.

[0180] 표 5는 2회의 시험으로부터 하이브리도마를 생성한 결과를 나타낸다.

**표 5**

[0181]

	합계	1차 하이브리도마	2차 하이브리도마
셀, 합계	2496	1152	1344
1차 하이브리도마의 수	952	363	562
PAMG-1-양성 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마의 수	83	38	45
PAMG-1-특이성 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마의 수	33	14	19
단일클론 항체를 생성하는 안정적 하이브리도마 라인의 수 (추가 조사를 위해 선정)	11	5	6

[0182]

실시에 4: 임신부의 질 분비물 내의 PAMG1의 최소 농도를 검출하는 한 쌍의 단일클론 항체의 선정

[0183]

pH 9.5의 0.05M 탄산염-중탄산염 완충액 내의 1 µg/ml 농도의 PAMG-1을 4°C에서 18시간 동안 배양하여 폴리스티렌 판에 흡착시켰다. 아래의 표 6에 예시된 항체들을 3mg/ml부터 시작하여 차례로 웰에 첨가하여 희석하였다. 그 후 판을 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 양고추냉이 과산화효소에 의해 표지된 래빗 항-마우스 항-IgG 항체의 항체 접합체를 웰에 첨가하였다. 0.05M 구연산염-인산염 완충액(pH 4.7)의 오소페닐레네디아민 용액에 의하여 반응을 촉진시켰고, 37°C에서 20분 동안 배양하였다. 단일클론 항체역가(antibody titer)를 정량화하였다.

**표 6**

[0184]

본 발명의 단일 클론 항체에 의한 농도 1 µg/ml에서 PAMG-1의 결합 친화도. 용액 내의 PAMG-1의 농도가 1 µg/ml 이라면,

MAb	PAMG-1의 1 µg/ml 농도에서의 적정농도
M1	1:900,000
M42	1:1,000,000
M52	1:1,000,000
M91	1:1,000,000
M122	1:2,000,000
M152	1:1,000,000
M392	1:1,000,000
M371	1:400,000
M271	1:3,000,000
M38	1:50,000
M211	1:50,000

[0185]

표 6에 표시된 단일 클론 항체의 농도가 항체가 PAMG-1을 결합하는 최소 농도이다. 농도가 낮을수록 항체가 PAMG-1의 최소 농도를 탐지하는 능력은 높아진다. PAMG-1을 위한 고감도 ELISA를 개발하기 위하여 단일 클론 항체 M271과 M52가 선택되었다.

[0186]

단일 클론 항체 M271은 다음과 같은 양수의 개별 단백질과는 ELISA에 있어서 교차반응성을 나타내지 않았다: 퍼틸러티 알파-투-마이크로글로불린(fertility alpha-2-microglobulin); 융모생식샘자극호르몬; 태반 젖샘자극호르몬; 영양막 베타-1-당단백질; 알파태아단백; 혈청알부민.

[0187]

게다가, 기둥(column)을 사용한 시험에서 M271 항체는 세파로스(sepharose)에 고정되었고 희석되지 않은 양수가 기둥을 통과하도록 하였다. 전기영동 후에 기둥으로부터 얻어진 용출물(eluate)은 PAMG-1의 분자량(28-30 kDa)에 걸맞는 분자량에 상당하는 밴드를 보여준다. 매우 특정한 단일 클론 항체 M271이 본 발명의 측방 유동 스트립 장치의 패드에 설치되었다.

[0188]

항체 M271과 달리, 항체 M52는 혈청과 양수에 풍부한 IGFBP-3 단백질과 ELISA에 있어서 교차반응성이 있었다. 질 분비물에서 측정된 비당화 IGFBP-3의 농도는 약 600ng/ml이었다(예 9). 본 발명의 스트립 장치를 이용한 실험



험에서, 이러한 농도의 IGFBP-3는 5ng/ml 농도의 PAMG-1의 인지를 억제하지는 않았다.

[0189] 실시예 5: 태반 1-마이크로글로불린에 대한 고감도 ELISA 테스트

[0190] PAMG-1은 표준 ELISA 및 M271-M52 항체 쌍을 이용하여서는 질 분비물에서 탐지될 수 없었다. 탐지가 가능하도록 하기 위하여, 탐지에 필요한 PAMG-1의 농도를 0.05 ng/ml로 감소시킴으로써 ELISA의 감도를 증가시켰다.

[0191] 리터 당 50 피코그램(0.05 ng/ml)의 감도를 나타낸, 항체 M271-M52를 이용한 샌드위치 면역분석 시스템이 개발되었다:

[0192] 제1층: 단일 클론 항체 M271, 농도 6 µg/ml, 탄산염-중탄산염 완충액, pH 9.5.

[0193] 제2층: PAMG-1, 농도 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50 pg/ml, 경부 및 질 분비물은 1/2 농도로 희석됨, pH=7.0의 완충액.

[0194] 제3층: 희석 1/1000에서 완충액 상의 접합체 M52.

[0195] 제1층 및 제3층을 바꿈으로써 감도의 증가를 얻었다. 고감도 시스템과는 달리, 감도 1ng/ml의 보통의 시스템에서 제1층은 M271의 농도가 10 내지 20 µg/ml로 형성되었고, 접합체(홍당무 과산화효소(horseradish peroxidase)로 라벨링된 M52)의 희석도는 1/40,000이었다.

[0196] 표준 교정(calibration) 곡선이 얻어졌다. 아래의 표 7에서는 PAMG-1 농도가 밀리미터 당 피코그램(pg/ml)의 단위로 주어지고 450 nm 파장에서 관찰된 착색 E의 광 밀도는 표준적인 무차원 단위로 나타낸다.

**표 7**

[0197] 고감도 ELISA의 교정 곡선

PAMG-1 pg/ml	3200	1600	800	400	200	100	50	0
E 450 nm	2.000	1.725	1.432	1.130	0.851	0.600	0.304	0.051

[0198] 실시예 6: 임신부의 질 분비물 내의 PAMG-1

**표 8**

[0199] 임신부의 질 분비물 내의 PAMG-1의 농도(ng/ml). 측정은 PAMG-1에 대하여 서로 다른 단일 클론 항체 쌍을 이용하여 수행됨(임신 29-41주).

N	임신 주	M1-M91	M271-M52	M152-M91	M392-M371
1	29	25	0.15	5	6
2	34	50	0.1	10	8
3	37-38	70	0.22	30	15
4	37-38	60	0.06	25	10
5	33-34	30	0.05	13	5
6	29-30	45	0.05	13	5
7	33	50	0.16	14	10
8	30	60	0.09	15	12
9	39-40	84	0.21	28	18
10	35-36	90	0.13	30	19
11	38-39	90	0.13	30	20
12	38	65	0.15	25	15
13	31	95	0.35	45	30
14	39	44	0.05	10	5
15	29-30	80	0.2	28	12
16	40-41	58	0.078	24	10
17	37	90	0.15	40	30
18	29-30	70	0.4	15	12
19	29	65	0.64	15	12
20	30	80	0.1	22	20

[0200] 최소 농도 측정값을 따라서, 각 항체는 홍당무 과산화효소(horseradish peroxidase)라고 불리어진다. ELISA 테스트에서, 농도 10 µg/ml에서의 비-표지 항체들이 판의 골(well) 부분에 도입되었다. 그래서 농도 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 pg/ml에서의 PAMG-1이 플라스틱의 제2층에 도입되었다. 결국, 다른 항체들 중 하나의 접합체가 판의 각각의 골 부분에 도입되었다. 접합체으로 작용하는 다음의 항체들이 선택되었다(여기서는 항체-접합체으로서 표시됨): M1-M91; M271-M52; M152-M91; M392-M371.

[0201] 이러한 항체의 쌍이 임신부의 질 분비물의 PAMG-1 농도를 측정하는 데에 사용되었다. 최종적으로, M271-M52쌍이 선택되었고, 이에 대하여 질 분비물의 PAMG-1 농도의 측정값은 가장 낮았다. M271-M52 쌍에 대한 PAMG-1의 농도는 감도가 높은 ELISA를 이용하여 측정되었다. 선택된 M271-M52 쌍과 몇 개의 다른 쌍이 비-임신부와 임신부의 양수와 혈청의 PAMG-1의 농도를 측정하는 데에 사용되었다(예 1, 상기 참조)

[0202] 실시예 7: 임신부의 질 및 경부 분비물 내의 PAMG-1

**표 9**

[0203] 임신부의 경부 및 질 분비물에서 밀리미터 당 피코그램(pg/ml) 단위의 PAMG-1의 농도. 아래 표의 정상 임신은 정상적인 임신 과정에서 어떠한 진단된 이상도 없는 경우를 가리킴. PAMG-1 농도가 M271-M52 항체 쌍을 이용하여 고감도의 ELISA에 의하여 측정되었다.

No.	경부 분비물의 PAMG-1 (pg/ml)	질 분비물의 PAMG-1 (pg/ml)	임신 주	비고
1	230	150	29	정상 임신
2	220	100	34	정상 임신
3	340	150	38	경부미란, 경부 분비물 내 혈액
4	110	220	37-38	정상 임신
5	100	60	37-38	정상 임신
6	350	78	40-41	경부 분비물 내 혈액
7	60	400	29-30	절박 유산
8	50	50	33-34	정상 임신
9	180	50	29-30	정상 임신
10	470	150	37	경부 분비물 내 혈액
11	600	640	29	절박 유산
12	150	160	33	정상 임신
13	170	90	30	정상 임신
14	122	210	39-40	양수과소증, 임신중독증
15	300	50	39	임신중독증, 질염
16	56	130	35-36	태반뒤 혈액공급장애
17	120	130	38-39	빈혈
18	1000	5000	30-31	양수 누출
19	400	200	29-30	절박 유산
20	800	350	31	임신중독증

[0204] 실시예 8: 질염을 가진 임신부의 질 분비물의 PAMG-1

**표 10**

[0205] 질염을 가진 임신부의 질 분비물 내의 태반 알파-1-마이크로글로불린의 농도. 비-고감도 ELISA를 이용하여 측정된.

환자수	PAMG-1(ng/ml)
1	1.2
2	2.0
3	0
4	2.5
5	1.5



6	1.9
7	1.5
8	2.0
9	1.4
10	1.2
11	1.0
12	0
13	0
14	3.0
15	1.5

표 11

질염을 가진 임신부의 질 분비물 내의 태반 알파-1-마이크로글로불린의 농도.

[0206]

N	성명(성의 약자, 이름의 약자)	진단	본 발명 장치의 결과 ("-"는 "음성")	ELISA (ng/ml)
1	Ch., G. A.	임신 40주. 질염	-	1.2
2	To., E. N.	임신 38주. 태아 무활력증. 질염	-	2.0
3	Ne., N. N.	임신 33주. 신우신장염. 질염.	-	0
4	St., A. G.	임신 40주. 협착골반. 질염.	-	2.5
5	So., T. N	임신 40주. 질염	-	1.5
6	Ch., O. G.	임신 29-30주. 조산의 위험. 질염.	-	1.9
7	Ry., V. V.	임신 29주. 진통 신호. 질염.	-	1.5
8	Ma., K. S.	임신 38주. 자궁경부미란. 질염.	-	2.0
9	St., L. E.	임신 38-39주. 협착골반. 자궁경부미란. 질염.	-	1.4
10	La., V. S.	임신 36-37주. 조산의 위험. 질염.	-	1.2
11	Si., M. A.	임신 39주. 신장병증. 빈혈. 질염.	-	1.0
12	Sh., S. V.	임신 37-38주. 신장병증. 질염.	-	0
13	Ab., R. V.	임신 36-37주. 조산의 위험. 질염.	-	0
14	Gu., E. K.	임신 36주. 조산의 위험. 질염.	-	3.0
15	Ro., N. V.	임신 35주. 질염.	-	1.5
16	De., S. V.	임신 32주. 자궁경부미란. 질염.	-	0
17	Zd., I. V.	임신 35주. 조산의 위험. 자궁경부미란. 질염.	-	1.0
18	Ko., T. V.	임신 24주. 조산의 위험. 질염.	-	0
19	Ma., I. V.	임신 36주. 조산의 위험. 질염.	-	0
20	Io., I. V.	임신 40주. 자궁경부미란. 질염.	-	0
21	Ma., S.	임신 39주.	-	0
22	Ve., E. L.	임신 38주. 자궁경부미란. 질염.	-	0
23	St., I. N.	임신 36주. 신장병증. 질염.	-	0
24	Ro., V. A.	임신 39-40주. 빈혈. 질염.	-	0
25	Pu., T. A.	임신 38-39주.	-	0
26	Tu., Y. A.	임신 21주. 의사 조기양막파수.	-	0
27	No., G. V.	임신 22주. 터미네이션(termination)의 위험	-	0
28	Ma., E. V.	임신 31-32주. 신우신장염. 질염.	-	0
29	St., I. V.	임신 36주. 터미네이션의 위험.	-	0
30	Ka., K. P.	임신 32주. 신장병증.	-	0

[0207]

실시예 9: 스트립 장치 특성의 변경

[0208]

제1 실험에서, M52 MAb 용액이 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 및 1/32 mg/ml의 농도로 준비되었다. 각 용액은 하나의 스트립 장치에 위치되었다. 세 개의 MAb(M52, M271, M42)의 혼합물이 처음의 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 및 1/32 농도로 희석되었고, 각 희석된 용액은 별도의 스트립 장치에 넣어졌다. 그 다음에, 50 ng/ml 농도의 용액을 함

유하는 PAMG-1이 12개의 스트립 장치의 각각에 첨가되었다. 순수 M52 항체의 용액이 테스트 영역의 착색된 밴드를 1/8의 농도에서 보이게 하였고, MAb 혼합물에서는 착색된 밴드는 1/2의 농도에서 보이게 되었다. 그러므로, MAb 혼합물은 PAMG-1 분자의 부착을 억제하고, 그에 따라서 밴드의 가시도를 조절한다.

[0209] M52: 0.8 mg/ml, M271: 0.1 mg/ml, 및 M42: 0.1 mg/ml의 농도별 단일 클론 항체들이 다수의 스트립 장치의 테스트 영역에 배치되었다. 그 다음에, 12800 ng/ml 내지 7 ng/ml 그리고 1 ng/ml에서 농도의 넓은 범위 중 하나의 PAMG-1이 본 발명 스트립 장치 각각의 테스트 영역에 첨가되었다. 테스트 밴드는 12800 ng/ml 내지 7 ng/ml 범위의 PAMG-1 농도에서 육안에 의하여 관찰할 수 있었고, 1 ng/ml의 농도에서는 관찰할 수 없었다. 동시에, 동일한 농도에서 순수 M52 용액이 사용되었을 경우에는, 1 ng/ml에서의 명암도는 낮았지만, 1 ng/ml을 포함하여 PAMG-1의 전체 농도 범위에서 테스트 스트립을 관찰할 수 있었다. 이는 염증과 같은 일정한 의료 상태를 가진 환자에 있어서 위양성 결과의 가능성을 크게 증가시켰다.

[0210] 1. 테스트 영역에서의 두 개의 항체의 조합을 이용한 본 발명 스트립 장치의 감도의 조정

[0211] 제1 조사에서는 단지 M52 항체(농도 0.4 mg/ml)만이 테스트 영역으로 투입되었다. 제2 조사에서는 M52 항체(농도 0.4 mg/ml)와 M271 항체(농도 0.4 mg/ml)가 테스트 영역에 투입되었다. 금 입자와 결합된 M271 항체가, 510 nm의 파장에서 광 밀도(optical density)가 10이 되도록 선택된 농도에서 패드 영역으로 투입되었다. 이러한 조합체는 수크로스(saccharose) 10%와 카세인 2%로 된 용액 상태로 패드에 투입되었다. PAMG-1은 20, 10, 5 및 1 ng/ml의 농도로 설정되었다.

[0212] 아래의 표에서, 숫자는 스캐너 상의 시그마 스캔(Sigma Scan) 프로그램에 의하여 측정된 상대 광 밀도 지수이다. M271 항체는 패드에 있고 M271+M52 조합은 테스트 영역에 있다. "+"는 테스트 스트립이 보이는 상태를 나타내고(육안으로 탐지될 수 있을 정도로 착색됨), "-"는 테스트 밴드가 육안으로 탐지되지 못하는 상태를 나타낸다.

[0213]

PAMG-1의 농도 (ng/ml)	20	10	5	1
MAb M52 보임	62	58	39	2
	+	+	+	-
MAb M52+M271 보임	82	8	2	4
	+	-	-	-

[0214] 테스트의 감도는 제1 조사의 5 ng/ml에서 제2 조사의 20 ng/ml로 변화하였다. MAb M271을 테스트 영역에 첨가함으로써 네 배의 감도 억제를 얻었다고 결론지을 수 있다.

[0215] 2. 두 개의 항체의 조합을 이용한 스트립 장치의 테스트 밴드의 색 명암도의 조정

[0216] 제1 조사에서는 단지 M52 항체(농도 0.8 mg/ml)만이 테스트 영역으로 투입되었다. 제2 조사에서는 M52 항체(농도 0.8 mg/ml)와 M271 항체(농도 0.7 mg/ml)와 M42 항체(농도 0.8 mg/ml)가 테스트 영역에 투입되었다. 테스트 영역에 대한 항체의 혼합물은 다음과 같이 준비되었다: 농도 8.6 mg/ml의 M52 항체 용액 14 µl(마이크로리터)가 농도 13.9 mg/ml의 M42 용액 7 µl 및 농도 10.9 mg/ml의 M271 용액 3 µl와 혼합되었다. 그런 다음, 완충액이 총 체적 150 µl까지 첨가되었고 용액이 스트립 장치로 투입되었다.

[0217] 아래의 표에서 상대 광 밀도가 표시된다.

[0218]

PAMG-1의 농도 (ng/ml)	50	25	12	6	3	1.5
MAb M52 보임	17	13	9	5	2	0
	+	+	+	+	-	-
MAb M271+M52+M42 보임	25	18	13	3	0	0
	+	+	+	-	-	-

[0219] 광 밀도 곡선의 경사(구배)는 제1 조사와 제2 조사에서 달랐다. 12 ng/ml의 PAMG-1 농도에서, 제2 조사에서의 스트립의 착색 라인인 제1 조사에서보다 밝았다. 6 ng/ml의 PAMG-1 농도에서, 제1 조사에서는 스트립의 착색 라인이 보였지만 제2 조사에서는 보이지 않았다.

[0220] 항체들을 조합함으로써 시각적으로 더 밝은 밴드가 관찰되었다. 따라서, 거의 동일한 감도에도 불구하고 육안에 의하여 관찰되는 착색의 명암도는 서로 달랐다.

[0221] 3. 네 개의 항체의 조합을 이용한 본 발명 장치의 착색 명암도 곡선의 경사와 감도의 조정

[0222] 아래의 표에서 "+"는 관찰가능한 테스트 밴드를 나타내고, "-"는 테스트 밴드가 육안에 의하여 탐지될 수 없음을 나타낸다.

[0223]

PAMG-1의 농도 (ng/ml)	0	1	2.5	5	10	25	50
MAb M52+M42+M172	-	-	-	-	+	+	+
MAb M271+M52+M42+M122	-	-	-	+	+	+	+

[0224] 그러므로, 항체를 조합함으로써 테스트의 감도를 조정할 수 있다.

[0225] 실시예 10: 임상시험 결과

[0226] 연구 계획안

[0227] 환자들은 "임상 평가"-조절과 본 발명 장치에 의하여 평가되었다.

[0228] 포함된 범주

[0229] 1) 임신기간 20.0-41.0 주

[0230] 2) 조기양막파수(PROM) 또는 만삭전 양막파수(PPROM)의 증세 또는 징후가 나타나는 환자

[0231] 3) 조기양막파수 또는 만삭전 양막파수의 환자를 평가하기 위하여 표본을 얻을 때까지는 손가락 질 검사(digital vaginal examination)는 실시하지 않음.

[0232] 4) 환자는 표준 임상 평가(풀링(pooling), 니트라진(nitrazine), 퍼닝(ferning))의 수집을 위한 무균 자궁경 검사와 PMAG-1 분석을 위한 무균 면봉 검사(sterile swab)에 동의함.

[0233] 제외된 범주

[0234] 1) 어떠한 근원으로부터의 능동적 질 출혈

[0235] 2) 전치 태반

[0236] 2000년 12월 15일 현재 샤프 메모리얼 메리 벌취 여성 병원(Sharp Memorial Mary Birch Hospital for Women) (샌디에고)와 서밋 메디컬 센터(Summit Medical Center)(오클랜드)의 환자 192명에 대하여 통계 분석을 실시하였다.

[0237] 192명 중 2명의 환자에 있어서는, 보통의 임상 평가로는 조기양막파수의 어떠한 증거도 나오지 않았지만 본 발명 장치는 양성 반응을 나타내었다. 따라서, 이러한 두 케이스는 처음에는 본 발명 장치의 위양성 결과로 생각되었다(아래의 "정정되지 않음" 데이터 참조). 그러나, 두 환자에 있어서 테스트 후 수시간 내에 조기양막파수의 증상이 급속하게 전개되었다. 제2 임상 평가에서 조기양막파수의 진단이 확인되었고, 본 발명 장치의 두 개의 결과는 진정 양성인 것으로 판단되었다(아래의 "정정" 칼럼이 최종 시험 데이터를 나타냄).

[0238] 결합 데이터(정정되지 않음)

[0239] Dx PROM

[0240] a= 84, b=5, c=2, d=101

[0241] 감도=a/(a+c)=84/(84+2)=97.7%

[0242] 특이성=d/(b+d)=101/(5+101)=95.3%

[0243] PPV=a/(a+b)=84/(84+5)=94.4%

[0244] NPV=d/(d+c)=101/(101+2)=98.1%

[0245] 여기서, a는 관찰된 진정 양성 케이스의 숫자;

[0246] b는 관찰된 위음성 케이스의 숫자;

[0247] c는 관찰된 위양성 케이스의 숫자;

[0248] d는 관찰된 진정 음성 케이스의 숫자;

[0249] 감도=  $a/(a+c)$ ; 특이성=  $d/(b+d)$ ;

[0250] 양성 예측값:  $PPV= a/(a+b)$

[0251] 음성 예측값:  $NPV= d/(d+c)$

[0252] **결합 데이터(정정됨)**

[0253] **Dx PROM**

[0254]  $a= 88, b=1, c=0, d=103$

[0255] 감도= $84/(84+0)=100\%$

[0256] 특이성= $103/(1+103)=99\%$

[0257]  $PPV=88/(88+1)=99\%$

[0258]  $NPV=103/(103+0)=100\%$

[0259] 진정 양성은 본 발명 장치에 의한 양성 반응의 숫자이고 조기양막파수는 뒤따르는 임상 평가에 의하여 확인된다.

[0260] 진정 음성은 뒤따르는 임상 평가에 의하여 확인된 음성 반응의 숫자이다.

[0261] 위양성은 양성 반응의 숫자이나 조기양막파수는 뒤따르는 임상 평가에 의하여 확인되지 않는다.

[0262] 위음성은 음성 반응의 숫자이나 조기양막파수는 뒤따르는 임상 평가에 의하여 확인된다.

**표 12**

[0263] 러시아 연방 모스크바 제3 산과 병원에서의 본 발명 장치(Lot C 98-0007)의 시험, 산부인과 No. 2.

N	성명(성의 약자, 이름의 약자)	진단	아미니슈어 (Amnisure) 결과	비고
1	Ser., L. B.	임신 17주. 절박유산. 질염.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
2	Ga., L. A.	임신 17주. 절박유산.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
3	Kuz., M. B.	임신 23주. pH-네가티브.혈액.	음성	누출 없음.
4	Bul., M. V.	임신 39주. 의사 누출. 질염	양성	임상 관찰: 질 배출 증가. 추가 관찰: 양성 테스트 확인(더 많은 배출, 진통 시작)
5	Kra., E. U.	임신 40주. 임신중독증. 양막파열.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
6	Mel., N. V.	임신 39주. 임신중독증. 요로결석 질환	음성	임상 관찰: 누출 없음.
7	Buh., S. N.	임신 29주. 고혈압	음성	임상 관찰: 누출 없음.
8	Niv., I. P.	임신 27-28주. 절박유산.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
9	Aik., A.	임신 35주. 절박유산. 질염.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
10	Yak., L. A.	임신 40주.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
11	Kis., G. V.	임신 33주. 절박유산. 질염.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
12	Koch., L. A.	임신 34주. 누출 의심.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
13	Bai., S. A.	임신 32주. 절박유산. 임신중독증.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
14	Mor., I. S.	임신 32주. 절박유산. 질염.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
15	Ugr., T. I.	임신 32-33주. 임신중독증. 저양수.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
16	Pav., N. A.	임신 22-23주. 임신중독증. 질염.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
17	Bog., T. I.	임신 29주. 절박유산.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
18	Var., T. I.	임신 32주. 임신중독증.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
19	Dal., O. V.	임신 35주. 임신중독증. 질염.	음성	임상 관찰: 누출 없음.

20	Koz., O. A.	임신 40주.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
21	Sen., S. G.	임신 12-13주. 절박유산.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
22	Pol., E. A.	임신 21주. 절박유산.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
23	Ber., L. M.	임신 24주. 절박유산.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
24	Ard., V. M.	임신 39주. 급성 임신중독증. 태반기능부전.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
25	Aki., A.	임신 8주. 임신중독증. 질염.	음성	임상 관찰: 누출 없음.

표 13

[0264] 러시아 연방 모스크바 제3 산과 병원에서의 본 발명 장치(Lot C 98-0007)의 시험

N	이름	진단	암니슈어(Amni sure) 결과	비고
1	Fan., E. A.	임신 38주. 부종.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
2	Sem., Z. D.	임신 36주. 임신중독증.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
3	Tab., N. V.	임신 36-37주. 절박유산.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
4	Zah., O. P.	임신 35주. 부종. 질염.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
5	Dem., O. V.	임신 38-39주. 부종.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
6	Vul., D. V.	임신 32주. 절박유산. 질염.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
7	Klo., V. V.	임신 38-39주. 부종. 신우신장염. 자궁경부미란.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
8	Bor., E. A.	임신 35-36주. 태반순환장애.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
9	Jer., E. A.	임신 40-41주.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
10	Vik., N. P.	임신 41-42주. 신우신장염. 부종. 질염.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
11	Tul., O. S.	임신 35-36주. 임신중독증. 비만증.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
12	Med., T. E.	임신 38-39주. 정맥류증.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
13	Kuz., T. A.	임신 39-40주.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
14	Kab., E. M.	임신 39-40주. 부종. 양수과다증.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
15	Che., E. V.	임신 39-40주. 부종. 빈혈.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
16	Tih., T. Y.	임신 40주. 자간전증.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
17	Bah., N. I.	임신 39-40주. 분만예후(prognostic of delivery). 의사 누출.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
18	Gol., N. V.	임신 38-39주. 태아저산소증.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인
19	Gri., O. V.	임신 25주. 절박유산.	음성	임상 관찰로 테스트결과 확인

표 14

[0265] 러시아 연방 모스크바 제3 산과 병원에서의 본 발명 장치(Lot C 98-0007)의 시험

N	진단	암니슈어 결과	비고
1	임신 40주. 거대태아. 의사 누출.	양성	산통, 분만이 4시간에 걸쳐 진행됨. 명백한 누출 관찰
2	임신 34주. 절박유산.	음성	6시간 동안 임상관찰: 누출 없음
3	임신 39주.	음성	임상 관찰: 누출 없음
4	임신 40주.	음성	임상 관찰: 누출 없음
5	임신 39-40주.	음성	임상 관찰: 누출 없음
6	임신 39-40주.	음성	임상 관찰: 누출 없음
7	임신 39-40주. 자궁경부미란.	음성	임상 관찰: 누출 없음
8	임신 40주. 분만 징후. 양수 누출.	양성	임상 관찰: 양수 누출
9	임신 39주.	음성	임상 관찰: 누출 없음
10	임신 39-40주.	음성	임상 관찰: 누출 없음
11	임신 39주.	음성	임상 관찰: 누출 없음

**표 15**

[0266] 러시아 연방 모스크바 제3 산과 병원에서의 본 발명 장치(Lot C 98-0007)의 시험, 러시아의 스테이트 모스크바 대학(the State Moscow University of Russia) 산부인과 강좌(Obstetrics and Gynecology Chair).

N	진단	암니슈어 결과	비고
1	임신 39주. 신장병증. 양수과다증.	음성	산통, 분만이 4시간에 걸쳐 진행됨. 명백한 누출 관찰
2	임신 41주. 부종.	음성	6시간 동안 임상관찰: 누출 없음.
3	임신 39-40주. 거대태아. 분만 징후. 신장병증.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
4	임신 39-40주.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
5	임신 37-38주. 혈액혼합. 고혈압.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
6	임신 36주. 신장병증.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
7	임신 40주. 의사 누출	양성	임상 관찰: 누출. 분만은 30분 동안 진행됨.
8	임신 39-40주.	음성	임상 관찰: 양수 누출 없음.
9	임신 38-39주.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
10	임신 38주.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
11	임신 39주. 10대 분만.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
12	임신 32주. 태아무활력.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
13	임신 39-40주. 임신중독증.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
14	임신 24주. 절박유산.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
15	임신 34-35주. 임신중독증.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
16	임신 33주. 부종.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
17	임신 34-35주. 임신중독증.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
18	임신 35-36주. 태아무활력.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
19	임신 32주. 절박유산.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
20	임신 38-39주. 의사 누출. 질 배출물에 혈액혼합	음성	임상 관찰: 누출 없음. 10시간 후에 양수가 터져 분만이 시작 됨.
21	임신 40-41주. 분만 징후.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
22	임신 25주. 절박유산.	음성	임상 관찰: 누출 없음.
23	임신 28주. 임신중독증.	음성	임상 관찰: 누출 없음.

[0267] 비고: 표 13, 14, 15의 양수 누출은 질 배출물의 양과 초음파진단 검사에 의하여 임상적으로 평가되었다.

[0268] 음성 테스트 결과에 대한 연장된 임상 관찰은 환자가 부수 질환의 치료를 위해서 입원치료를 받았기 때문에 가능하였다.

[0269] 본 발명은 본 명세서에 기재된 특정 실시예에 의하여 범위가 한정되지 않는다. 본 명세서에 기술된 것들에 부가되는 본 발명의 다양한 변경은 전술한 설명과 첨부된 도면으로부터 해당 기술분야의 당업자들이 명백히 알 수 있을 것이다. 그러한 변경은 첨부된 특허청구범위의 범주에 속하게 된다.

[0270] 모든 수치들은 대략적인 것이고 설명을 위해 제공된다는 사실을 또한 이해해야 한다.

[0271] 특허, 특허 출원, 간행물, 제품 설명, 및 시험계획안이 본 출원서에 인용되며, 이러한 개시 내용은 여러 가지 목적으로 온전히 본 명세서에 참고로 포함된다.

**표 16**

[0272] 러시아 국립 산업 미생물 수집원(Russia National Collection of Industrial Microorganism, VKPM) 기탁소(러시아 모스크바 117545 1 도로즈니 프로젝트 1)에 기탁된 미생물.

명칭	기탁 일자	수탁 번호
하이브리도마 셀 (Hybridoma Cell) Lines N52	2003년 5월 22일	VKPM H-92
하이브리도마 셀 (Hybridoma Cell) Lines N271	2003년 5월 22일	VKPM H-93
하이브리도마 셀 (Hybridoma Cell) Lines N42	2003년 5월 22일	VKPM H-94

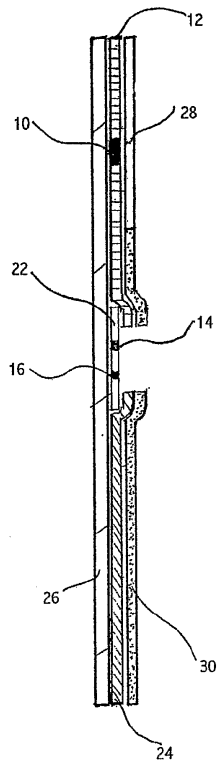
**도면의 간단한 설명**

[0041] 도 1은 양막의 파수를 진단하기 위해 PAMG-1을 검출하는 데에 사용될 수 있는 본 발명의 장치를 개략적으로 도시한 종단면도이다.

[0042] 도 2는 도 1에 따른 장치의 평면도이다.

**도면**

**도면1**





도면2

