



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0005839  
(43) 공개일자 2024년01월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/531 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)  
C12N 15/82 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
G01N 33/531 (2013.01)  
C07K 16/18 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7041539
- (22) 출원일자(국제) 2022년07월26일  
심사청구일자 2023년11월30일
- (85) 번역문제출일자 2023년11월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2022/028698
- (87) 국제공개번호 WO 2023/008404  
국제공개일자 2023년02월02일
- (30) 우선권주장  
JP-P-2021-121812 2021년07월26일 일본(JP)

- (71) 출원인  
덴카 주식회사  
일본국, 도쿄, 추오-구, 니혼바시-무로마치 2  
초메, 1-1
- (72) 발명자  
이시카와 하루토  
일본국 니이가타켄 고센시 키고시 아자 카가미다  
1359-1 덴카 주식회사 고센지교쇼 카가미다코쥬  
나이  
야마모토 키미타카  
일본국 니이가타켄 고센시 키고시 아자 카가미다  
1359-1 덴카 주식회사 고센지교쇼 카가미다코쥬  
나이  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
리엔특허법인

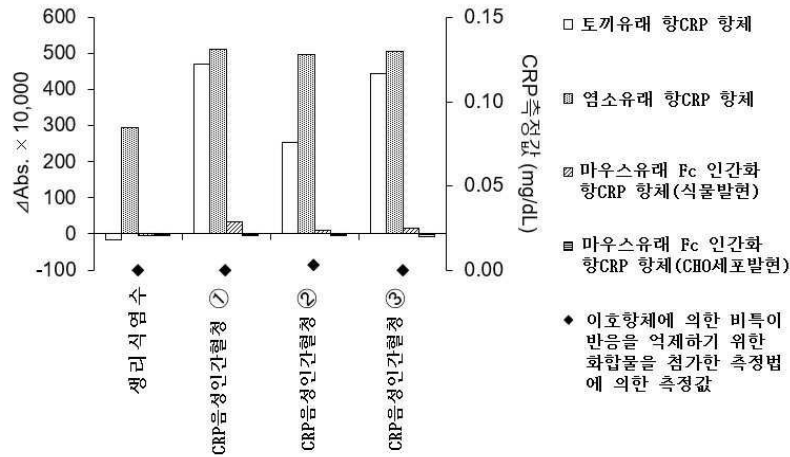
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 인간화 항체를 포함한 시약

(57) 요약

비특이반응을 감소시키는 것이 가능한 항체를 이용한 시약, 항원 측정용 키트 및 항원의 측정 방법의 제공. 피측정물질에 대한 인간화 항체를 포함하는 면역학적 측정용 시약.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 15/82** (2013.01)

**C07K 2317/24** (2013.01)

(72) 발명자

**이즈타니 노리유키**

일본국 도쿄도 마치다시 아사히마치 3쵸메 5-1 덴  
카 주식회사 라이프이노베이션켄큐쇼 나이

**오가사와라 다이스케**

일본국 도쿄도 마치다시 아사히마치 3쵸메 5-1 덴  
카 주식회사 라이프이노베이션켄큐쇼 나이

**와카바야시 유키**

일본국 도쿄도 마치다시 아사히마치 3쵸메 5-1 덴  
카 주식회사 라이프이노베이션켄큐쇼 나이

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

피측정물질에 대한 인간화 항체를 포함하는 면역학적 측정용 시약.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 인간화 항체에 의해 비특이반응이 억제되는 시약.

#### 청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 인간화 항체가 IgG인 시약.

#### 청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 인간화 항체가 식물 발현계를 이용하여 제조되는 시약.

#### 청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서, 진단을 위한 시약.

#### 청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서, 연구를 위한 시약.

#### 청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 기재된 시약을 포함하는 키트.

#### 청구항 8

피측정물질에 대한 인간화 항체를 피측정물질과 접촉시키는 것을 포함하는 면역학적 측정 방법.

#### 청구항 9

청구항 8에 있어서, 인간화 항체에 의해 비특이반응이 억제되는 면역학적 측정 방법.

#### 청구항 10

청구항 8 또는 청구항 9에 있어서, 인간화 항체가 IgG인 면역학적 측정 방법.

#### 청구항 11

청구항 8 또는 청구항 9에 있어서, 인간화 항체가 식물 발현계를 이용하여 제조되는 면역학적 측정 방법.

#### 청구항 12

피측정물질에 대한 인간화 항체를 이용하는 면역학적 측정법에서의 항원 항체 반응의 비특이적 반응을 억제하는 방법.

#### 청구항 13

청구항 12에 있어서, 인간화 항체에 의해 비특이반응이 억제되는 비특이적 반응을 억제하는 방법.

#### 청구항 14

청구항 12 또는 청구항 13에 있어서, 인간화 항체가 IgG인 비특이적 반응을 억제하는 방법.

**청구항 15**

청구항 12 또는 청구항 13에 있어서, 인간화 항체가 식물 발현계를 이용하여 제조되는 비특이적 반응을 억제하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 인간화 항체, 그 프래그먼트(예를 들면 가변 영역 및 scFv 등), 이러한 인간화 항체 또는 프래그먼트를 포함한 컨쥬게이트(융합 단백질 등)와 진단 및 치료적 프리타겟팅 방법 및 조성물에서의 이러한 인간화 항체 또는 프래그먼트의 이용에 관한 것이다. 본 발명은 나아가 예를 들면 질병의 처치 및 이미징을 위한 관용의 면역 치료 및 면역 진단 방법 및 조성물에서의 이러한 인간화 항체의 이용에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 비인간 동물 유래의 모노클로날 항체는 인간 검체에 포함되는 면역세포나 항체에 대해 면역원성이 있기 때문에 이를 원인으로 한 비특이반응이 발생한다는 문제가 있었다.

[0003] 여기서, 인간 혈액 중에 존재하는 비인간 동물 항체에 대한 항체를 이호항체(이호성 항체)(Heterophilic antibodies)라고 부른다. 면역학적 측정법에서 마우스 유래의 모노클로날 항체를 이용하는 경우가 많으므로, 인간 항마우스 항체(human anti-mouse antibodies: HAMA)에 의한 비특이반응이 많이 인정된다. 인간 검체의 10% 정도가 HAMA를 포함하고 있다.

[0004] 종래에는 어세이계에 이호항체에 의한 비특이반응을 억제하기 위한 화합물을 첨가하였다(특허문헌 1을 참조).

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0005] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 일본 공개특허 2008-249738호 공보

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0006] 상기 사정을 감안하여 본 발명은 비특이반응을 감소시키는 것이 가능한 항체를 이용한 시약, 항원 측정용 키트 및 항원의 측정 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0007] 본 발명자들은 인간화 항체를 이용함으로써 항원 항체 반응에서의 비특이반응이 감소하는 것을 발견하여 본 발명을 완성시키기에 이르렀다.

[0008] 즉, 본 발명은 이하와 같다.

[0009] [1] 피측정물질에 대한 인간화 항체를 포함하는, 면역학적 측정용 시약.

[0010] [2] 인간화 항체에 의해 비특이반응이 억제되는, [1]의 시약.

[0011] [3] 인간화 항체가 IgG인, [1] 또는 [2]의 시약.

[0012] [4] 인간화 항체가 식물 발현계를 이용하여 제조되는, [1] 또는 [2]의 시약.

[0013] [5] 진단을 위한, [1]~[4] 중 어느 하나의 시약.

[0014] [6] 연구를 위한, [1]~[5] 중 어느 하나의 시약.

[0015] [7] [1]~[6] 중 어느 하나의 시약을 포함하는, 키트.

- [0016] [8] 피측정물질에 대한 인간화 항체를 피측정물질과 접촉시키는 것을 포함하는, 면역학적 측정 방법.
- [0017] [9] 인간화 항체에 의해 비특이반응이 억제되는, [8]의 면역학적 측정 방법.
- [0018] [10] 인간화 항체가 IgG인, [8] 또는 [9]의 면역학적 측정 방법.
- [0019] [11] 인간화 항체가 식물 발현계를 이용하여 제조되는, [8] 또는 [9]의 면역학적 측정 방법.
- [0020] [12] 피측정물질에 대한 인간화 항체를 이용하는, 면역학적 측정법에서의 항원 항체 반응의 비특이적 반응을 억제하는 방법.
- [0021] [13] 인간화 항체에 의해 비특이반응이 억제되는, [12]의 비특이적 반응을 억제하는 방법.
- [0022] [14] 인간화 항체가 IgG인, [12] 또는 [13]의 비특이적 반응을 억제하는 방법.
- [0023] [15] 인간화 항체가 식물 발현계를 이용하여 제조되는, [12] 또는 [13]의 비특이적 반응을 억제하는 방법.
- [0024] 본 명세서는 본원의 우선권의 기초가 되는 일본특허출원번호 2021-121812호의 개시 내용을 포함한다.

**발명의 효과**

- [0025] 본 발명에 의하면 인간화 항체를 이용함으로써 비특이반응의 억제가 가능한 시약을 제공하는 것이 가능해진다.

**도면의 간단한 설명**

- [0026] 도 1은 이호항체에 의한 비특이반응을 억제하기 위한 화합물을 첨가한 측정법 및 이호항체에 의한 비특이반응을 억제하기 위한 화합물을 첨가하지 않은 측정법을 이용하여 토끼 유래 항CRP 항체, 염소 유래 항CRP 항체 혹은 마우스 유래 인간화 항CRP 항체를 이용한 시약으로 생리식염수와 CRP 음성 혈청을 측정한 결과를 나타내는 도면이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0027] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0028] 본 발명에서 항원 항체 반응을 이용한 면역학적 측정법에서 피측정물질에 결합하는 항체로서 인간화 항체를 이용한다. 그 결과, 비인간 동물 유래의 항체를 이용함으로써 생산되는 비인간 동물 항체에 대한 항체에 의한 비특이반응을 억제할 수 있다.
- [0029] (시약)
- [0030] 제1 실시형태에서 본 발명은 인간화 항체를 포함한 시약을 제공한다.
- [0031] 항체는 2개의 동일 중쇄와 2개의 동일 경쇄로 이루어진 합계 4개의 폴리펩티드쇄가 디설피드 결합에 의해 결합하여 Y자형으로 배치된 구조를 가진다.
- [0032] 본 발명에서 사용하는 경우, 「항체」는 표적 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않고, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD 중 어떤 아이소타입이어도 된다. 인간의 면역글로블린으로서 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM의 9종 4류의 클래스(아이소타입)가 알려져 있다. 본 명세서에서의 IgG 항체의 정의는 넓고, 라마나 알파카 등의 낙타과 동물에서 보이는, 중쇄로만 이루어진 중쇄 항체(HCAb)를 포함한다.
- [0033] IgG는 2개의 중쇄(H쇄) 및 2개의 경쇄(L쇄)로 구성된다. 중쇄는 N말단으로부터 차례대로 가변 영역(VH), 제1 정상 영역(CH1), 제2 정상 영역(CH2) 및 제3 정상 영역(CH3)으로 구성되어 있다. 경쇄는 N말단으로부터 차례대로 가변 영역(VL) 및 정상 영역(CL)으로 구성되어 있다. CH2 및 CH3으로 구성되는 부분이 Fc 영역이다. 1개의 중쇄와 1개의 경쇄는 CH1에 존재하는 시스테인 잔기 및 CL에 존재하는 시스테인 잔기의 디설피드 결합에 의해 결합되어 있다. 또한, 중쇄끼리는 CH1과 CH2의 사이에 위치하는 힌지 영역에 존재하는 시스테인 잔기끼리의 디설피드 결합에 의해 결합되어 있다.
- [0034] 항체는 중쇄가 존재하는 IgG의 단편이어도 되고, 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄로 구성되는 rIgG(환원형 IgG)이어도 되고, 2개의 중쇄로 구성되는 단편이어도 되고, 1개의 중쇄로 구성되는 단편이어도 된다. 2개의 중쇄가 존재하는 항체에서 적어도 한쪽의 중쇄에 당쇄가 결합되어 있으면 되고, 양쪽의 중쇄에 당쇄가 결합되어 있지 않아도 된다. 또한, IgG의 단편은 Fab, F(ab')<sub>2</sub>, scFv, Fab', 1분쇄 면역글로블린 등을 포함한다. IgG의 단편은 표적

항원인 피검출물질에 결합하는 단편으로, IgG의 기능적 단편이라고 부른다.

- [0035] (본 발명의 인간화 항체)
- [0036] 이는 비인간 동물 항체(전형적으로는 마우스)에 유래하거나 또는 키메라 항체에 유래하는 항체로서, 모항체의 항원 결합 특성을 유지 또는 실질적으로 유지하고 있지만, 인간에서의 면역원성이 약한 항체를 의미한다. 여기서, 키메라 항체란 비인간 동물 항체 유래의 가변 영역과 인간 항체의 정상 영역으로 이루어진 항체를 말한다. 본 발명에서 「인간화 항체」는 「키메라 항체」를 포함한다. 본 발명의 인간화 항체에서 중쇄 정상 영역은 CH1, CH2 및 CH3으로 구성되고, 경쇄 정상 영역은  $\kappa$  또는  $\lambda$  정상 영역이다.
- [0037] 예를 들면 인간화 항체는: (a) 비인간 CDR만을 인간 프레임워크 및 정상 영역에 그래프트시킴으로써(Jones 등, Nature 321: 522-25(1986); Verhoeyen 등, Science 239: 1534-1536(1988)); 또는 (b) 비인간 가변 도메인 전체를 이식하고(리간드 결합 특성을 남기기 위해), 게다가 면역원성을 억제하기 위해 노출 잔기의 치환에 의해 이들에 인간 유사(様) 표층을 「덮어씌움」으로써(「베니어 접부」 항체(veneered antibodies)라고도 불림)(Padlan, Molec.Immun. 28: 489-498(1991); Padlan, Molec.Immun. 31(3): 169-217(1994)), 잠재적으로 제조될 수 있다. (a)의 방법으로 제조되는 항체를 CDR 이식 항체라고 부른다.
- [0038] 본 발명의 추가적인 특징으로서 항체의 Fc 부분을 인간화하여 제조하는 것에 있다. Fc 부분을 구성하는 중쇄 정상 영역의 예시적인 서열은 이하와 같다.
- [0039] ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTEPAAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK(서열번호 1)
- [0040] 본 발명의 인간화 항체는 피측정물질과 결합하는 한 CDR 이외의 아미노산 서열, 예를 들면 상기 중쇄 정상 영역의 아미노산 서열에서 복수의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있어도 되고, 예를 들면 1개, 2개 이하, 3개 이하, 4개 이하, 5개 이하, 6개 이하, 7개 이하, 8개 이하, 9개 이하, 10개 이하, 15개 이하, 20개 이하의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입되어 있어도 된다. 이러한 인간화 항체의 아미노산 서열은 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입이 없는 원래의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 가진다.
- [0041] 본 발명의 인간화 항체의 유래는 불문하고 임의의 포유류, 예를 들면 인간이나 마우스, 토끼, 래트, 모르모트, 햄스터, 염소, 양, 낙타 등의 비인간 동물이어도 된다. 인간 항체뿐만 아니라 인간화 항체, 키메라 항체 등의 제조항체를 사용할 수도 있다. 항체는 폴리클로날 항체이어도 되고, 모노클로날 항체이어도 된다.
- [0042] 본 발명의 인간화 항체는 예를 들면 중쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA, 중쇄 정상 영역을 코딩하는 DNA, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 DNA 및/또는 경쇄 정상 영역을 코딩하는 DNA를 발현 벡터에 도입하고 이 벡터를 이용하여 숙주 세포를 형질 전환하여 숙주 세포를 배양함으로써 리콤비넨트 항체로서 제조할 수 있다. 상기의 중쇄를 코딩하는 DNA 및 경쇄를 코딩하는 DNA를 동일 발현 벡터에 도입하고 이 벡터를 이용하여 숙주 세포를 형질 전환해도 되고, 중쇄를 코딩하는 DNA와 경쇄를 코딩하는 DNA를 각각의 벡터에 삽입하고 2개의 벡터를 이용하여 숙주 세포를 형질 전환해도 된다. 이 때, 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 시그널 등의 엘리먼트와 기능적으로 연결해도 된다. 여기서 기능적으로 연결이란 엘리먼트가 그 기능을 하도록 연결하는 것을 말한다. 상기 벡터는 숙주 세포로부터의 항체의 분비를 촉진하는 시그널 펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하고 있어도 되고, 항체 생산 후에 시그널 펩티드를 절단하고 제거하여 성숙 단백질로서 제조할 수 있다. 숙주 세포로서는 동물세포, 세균, 효모 등을 이용할 수 있고, 발현 벡터는 각 숙주 세포용의 공지의 발현 벡터를 이용할 수 있다.
- [0043] 또한, 인간화 항체는 식물 발현계를 이용함으로써 제작할 수 있고, 유전자 재조합 식물을 이용함으로써 제작할 수도 있다. 식물 일과성 발현계로서는 공지의 방법에 의해 수행할 수 있다. 이러한 방법으로서의 예를 들면 아그로인필트레이션법, 식물바이러스 벡터법, magnICON(등록상표) 시스템 및 파터클건법을 들 수 있고, 특별히 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 아그로인필트레이션법을 사용하는 경우, 상기 벡터에서 아그로박테리움을 형질 전환하고, 그 아그로박테리움을 식물체에 감염시킴으로써 상기 단백질을 발현하는 식물체를 얻을 수 있다.
- [0045] 식물 발현계를 이용하는 경우, 다음과 같이 하여 인간화 항체를 발현하는 식물체를 얻을 수 있다. 우선, 인간화 항체를 코딩하는 DNA를 삽입한 식물바이러스 계놈의 cDNA로부터 RNA를 얻는다. 다음으로, 이 RNA를 벡터로서 식

물체에 접종하여 감염시킨다. 이러한 바이러스 벡터로서는 예를 들면 담배모자이크 바이러스(TMV) 벡터, 플럼포스 바이러스(PPV) 벡터, 감자 X바이러스(PVX) 벡터, 알팔파모자이크 바이러스(AIMV) 벡터, 오이모자이크 바이러스(CMV) 벡터, 카우피모자이크 바이러스(CPMV) 벡터 및 주키니황화모자이크 바이러스(ZYMV) 벡터 등을 들 수 있다.

- [0046] magnICON(등록상표) 시스템을 사용하는 경우, 다음과 같이 하여 인간화 항체를 발현하는 식물체를 얻을 수 있다. 우선, 인간화 항체를 코딩하는 DNA를 삽입한 TMV 또는 PVX 계놈의 cDNA를 T-DNA 벡터 내에 도입한다. 다음으로, 얻어진 T-DNA 벡터로 형질 전환한 아그로박테리움을 식물체에 감염시킨다.
- [0047] 생산된 항체는 통상의 단백질에서 사용되고 있는 분리, 정제 방법에 의해 정제할 수 있다. 이러한 방법으로서 어피타이 · 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피나 그 밖의 크로마토그래피, 한외 여과, 염석, 투석 등을 들 수 있다.
- [0048] 본 발명은 면역학적 측정법에서 사용하는 시약으로서, 체외 진단용 의약품과 같은 진단약이나 검사약을 포함한다. 시약은 항체를 안정적으로 유지하기 위한 버퍼 등을 포함해도 된다. 그 밖의 성분은 사용하는 면역학적 측정법에 따라 당업자가 적절히 결정할 수 있다.
- [0049] 면역학적 측정법으로서의 예를 들면 면역 염색법(형광항체법, 효소항체법, 중금속 표지 항체법, 방사성 동위 원소 표지 항체법을 포함함), 전기영동법에 의한 분리와 형광, 효소, 방사성 동위 원소 등에 의한 검출 방법을 조합한 방법(웨스턴 블롯법, 형광 이차원 전기영동법을 포함함), 효소 면역 측정 흡착법(ELISA), 도트 · 블로팅법, 라텍스 응집법(LA: Latex Agglutination-TurbidimetricImmunoassay), 면역크로마토법 등을 들 수 있다.
- [0050] 시약으로 검출 · 정량되는 피측정물질로서는 단백질이나 다당 등의 항원이나 단당, 올리고당, 아미노산, 펩티드, 스테로이드 골격을 갖는 물질 등의 저분자 생리활성물질을 포함한 합텐에 추가하여 이들로 구성되는 세균, 바이러스, 기생충 등의 병원균 등 Fc 결합 항체가 결합하는 물질이면 전혀 한정되지 않는다. 예를 들면 피측정물질이 항원인 경우, 예를 들면 CRP(C-반응성 단백질), 전립선 특이 항원, 페리틴,  $\beta$ -2마이크로글로블린, 미오글로빈, 헤모글로빈, 알부민, 크레아티닌 등의 단백질 마커, IgG, IgA, IgM 등의 면역글로블린, 각종 종양 마커, LDL, HDL, TG 등의 리포단백, A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스, RS 바이러스(RSV), 라이노바이러스, 로타바이러스, 노로바이러스, 아데노바이러스, 아스트로바이러스, HAV, HBs, HCV, HIV, EBV 등의 바이러스 항원, 클라미디아 · 트라코마티스, 용원균, 백일해균, 헬리코박터 · 필로리, 랩토스피라, 트레포네마 · 팔리듐, 톡소플라즈마 · 곤디, 보렐리아, 레지오넬라속균, 탄저균, MRSA 등의 세균 항원, 세균 등이 생산하는 독소, 마이코플라즈마 지질 항원, 인간 융모제 고나도트로핀 등의 펩티드 호르몬, 스테로이드 호르몬 등의 스테로이드, 에피네프린이나 모르핀 등의 생리활성 아민류, 비타민류, 프로스타그란딘류, 테트라사이클린 등의 항생 물질, 농약, 환경 호르몬 등을 들 수 있지만 이들에 한정되는 것은 아니다. 바람직한 예로서 CRP, 전립선 특이 항원, 페리틴,  $\beta$ -2마이크로글로블린 및 헤모글로빈 등의 항원을 들 수 있다.
- [0051] 또한, 피측정물질로서 상기 단백질 마커, 각종 종양 마커, 리포단백, 바이러스 항원, 세균 항원, 세균 등이 생산하는 독소, 펩티드 호르몬, 스테로이드, 생리활성 아민류, 비타민류, 항생 물질, 농약, 환경 호르몬 등의 항원과 특이적으로 반응하는 항체 등을 들 수 있다. 또한, 피측정물질로서 생체 내에 존재하는 IgE 항체 등도 들 수 있다. 이 경우, 인간화 항체로서 상기의 항체에 대한 항체를 이용하면 된다.
- [0052] 시약은 피측정물질의 유무 등을 확인하는 것이 필요한 피험자 유래의 검체에 첨가된다. 검체는 피측정물질을 포함하는 것이면 특별히 한정되지 않지만, 혈액, 혈청, 혈장, 뇨, 변, 타액, 조직액, 골수액, 면봉액 등의 체액 등 또는 그 희석물을 들 수 있고, 혈액, 혈청, 혈장, 뇨, 변, 골수액 또는 이들의 희석물이 바람직하다.
- [0053] (키트)
- [0054] 제2 실시형태에서 본 발명은 상기 시약을 포함한 키트를 제공한다.
- [0055] 키트는 진단, 연구 등을 위해 사용될 수 있다. 키트는 그 사용 목적에 따라 시약으로서의 항체뿐만 아니라 인간화 항체를 고정화하기 위한 담체나 2차 항체를 포함해도 된다. 이러한 담체로서는 불용성 담체가 바람직하고, 예를 들면 폴리에틸렌이나 폴리스티렌 등의 라텍스 입자, 알루미늄 입자, 실리카 입자, 금 콜로이드, 자성 입자 등의 입자를 그 예로서 들 수 있다. 보다 구체적으로는 ELISA법(직접법, 간접법, 샌드위치법 등)이면 마이크로플레이트, 라텍스 응집법이면 라텍스 등이 불용성 담체로서 사용될 수 있다. 항체와 항원의 비특이반응을 막는 관점에서 블로킹제를 키트에 포함하는 것이 바람직하다.
- [0056] 인간화 항체는 담체에 물리 흡착 등에 의해 직접 고정화되어 있어도 되고, 화학 가교, 예를 들면 링커 등을 통

해 간접적으로 고정화되어 있어도 된다.

- [0057] 직접법에 사용하는 키트에는 예를 들면 인간화 항체를 포함한 시약으로서의, 항원에 결합하는 효소 표지용 항체, 효소 반응을 위한 기질, 검량선 작성 또는 컨트롤 실험에 사용하기 위한 표준 항원 등이 포함된다.
- [0058] 간접법에 사용하는 키트에는 예를 들면 인간화 항체를 포함한 시약으로서의, 항원에 결합하는 1차 항체, 1차 항체에 결합하는 2차 항체, 효소 반응을 위한 기질, 검량선 작성 또는 컨트롤 실험에 사용하기 위한 표준 항원 등이 포함된다. 2차 항체는 검출을 위해 표지되어 있어도 된다.
- [0059] 샌드위치법에 사용하는 키트에는 예를 들면 인간화 항체를 포함한 시약으로서의, 고상에 결합한 항체, 효소 표지용 항체, 효소 반응을 위한 기질, 검량선 작성 또는 컨트롤 실험에 사용하기 위한 표준 항원 등이 포함된다. 효소 표지용 항체는 인간화 항체이어도 된다.
- [0060] 라텍스 응집법에 사용하는 키트에는 예를 들면 인간화 항체를 포함한 시약으로서의, 결합할 검출용 항체, 검량선 작성 또는 컨트롤 실험에 사용하기 위한 표준 항원, 항체와 항원의 비특이적 반응을 막기 위한 블로킹제 등이 포함된다.
- [0061] (측정 방법)
- [0062] 제3 실시형태에서 본 발명은 인간화 항체를 이용하는 항원 항체 반응을 이용한 피측정물질의 측정 방법을 제공한다.
- [0063] 이 방법은 상기 시약 또는 키트를 이용하여 수행할 수 있고, 상기 면역학적 방법에 의한 측정 방법이다.
- [0064] (비특이적 반응 억제 방법)
- [0065] 제4 실시형태에서 본 발명은 인간화 항체를 이용하는, 항원 항체 반응의 비특이적 반응을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0066] 인간화 항체를 이용함으로써 보체(C1q), Fc 수용체, 류마티스 인자, 이호항체 등의 비특이반응 인자에 의한 비특이반응을 억제할 수 있다. Fc 수용체에 의한 비특이반응은 검체 중에 항체의 Fc 부위에 대한 수용체가 포함되어 있는 경우에 나타나는 비특이반응이고, 류마티스 인자에 의한 비특이반응은 항체의 Fc 부위에 대해 출현하는 항체에 의한 비특이반응이며, 이호항체에 의한 비특이반응은 인간 혈액 중에 존재하는 비인간 동물 항체에 대한 항체에 의한 비특이반응이다. 비특이반응은 그 밖에도 원하는 항원 항체 반응과는 무관계한 물질이 항원 항체 반응물을 형성하거나 교차 반응을 나타냄으로써 발생할 수도 있기 때문에 당업자의 공지의 비특이반응 억제 방법과의 병용이 바람직하다.
- [0067] 비특이적 반응 억제 방법은 인간화 항체와 검체를 접촉시키는 공정을 포함한다. 접촉 공정 전후에 임의의 공정을 포함해도 된다.
- [0068] 인간화 항체를 이용함으로써 항원 항체 반응의 비특이반응을 억제할 수 있고 피측정물질을 정확하게 측정할 수 있다.
- [0069] **실시예**
- [0070] 본 발명을 이하의 실시예에 의해 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0071] <항CRP(C-reactive protein) 인간화 항체(식물 발현)의 제작>
- [0072] 1. 벡터 제작 및 단백 발현
- [0073] Fc 영역을 인간화한 항체로서 마우스 유래 인간화 항CRP 모노클로날 항체(IgG)를 선택하였다.
- [0074] IgG의 중쇄는 담배모자이크 바이러스(TMV) 벡터(Icon Genetics사 제품)에 클로닝하고, 경쇄는 감자 바이러스 X(PVX) 벡터(Icon Genetics사 제품)에 클로닝하였다. 이들 벡터를 각각 별개의 아그로박테리움에 도입하여 형질 전환하여 배양한 후, 배양액의 혼합액을 니코티아나 벤타미아나의 잎에 인필트레이션하고 1주일 후에 수확하였다. 수확한 잎(감염엽)을 동결하였다.
- [0075] 2. 정제
- [0076] 동결한 감염엽을 커터 믹서로 파쇄하고, 중량비 등량의 완충액(100mM Tris, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 40mM 아스코르빈산 나트륨)을 첨가하여 더욱 파쇄하였다. 커터 믹서로부터 감염엽 파쇄액을 회수하고 원심분리(5℃,

15,000×g, 30분간)하여 상청을 회수하였다. 이 상청을 0.45 μm 필터로 여과하고, 프로테인 A 컬럼 크로마토그래피(글로벌 라이프사이언스 테크놀로지사 제품, MabSelect, SuRe pcc)에 걸어 식물 유래 불순물과 항체 유래 불순물을 분리 제거하였다.

[0077]

3. 발현 시험

[0078]

감염염에 3배량의 추출 버퍼(100mM Tris, 250mM NaCl, 5mM EDTA)를 더하여 비즈밀로 파쇄하고, 빙상에서 30min 방치한 후 원심분리(8,000×g, 4℃, 10분간)하여 상청을 회수하여 SDS-PAGE로 분석하였다. 그 결과, Fc 영역을 인간화한 항체로서 마우스 유래 항CRP 항체의 발현이 확인되었다.

[0079]

<항CRP(C-reactive protein) 인간화 항체(CHO 세포 발현)의 제작>

[0080]

1. 벡터 제작 및 단백질 발현

[0081]

Fc 영역을 인간화한 항체로서 마우스 유래 인간화 항CRP 모노클로날 항체(IgG)를 선택하였다.

[0082]

IgG의 중쇄 및 경쇄를 pCHO1.0vector(서모피셔사이언티픽주식회사 제품)에 클로닝하였다. 이 벡터를 제한 효소에 의해 리니어화한 후, Freedom™ CHO-S™(서모피셔사이언티픽주식회사 제품)에 트랜스펙션하였다. 그 후, Freedom™ CHO-S™ Kit USER GUIDE(서모피셔사이언티픽주식회사 제품)에 따라 마우스 유래 인간화 항CRP 모노클로날 항체 생산 CHO 안정 발현 클론을 취득하였다. 이 클론을 이용하여 Fed-batch 배양으로 14일간 배양하고, 그 배양액으로부터 세포를 제거한 액을 회수하였다.

[0083]

2. 정제

[0084]

세포를 제거한 액을 원심분리(4℃, 15,000×g, 10분간)하여 상청을 회수하였다. 이 상청을 0.22 μm 필터로 여과하고, 프로테인 A 컬럼 크로마토그래피(글로벌 라이프사이언스 테크놀로지사 제품, HiTrap™ MabSelect SuRe™)에 걸어 CHO 세포 유래 불순물을 분리 제거하였다.

[0085]

3. 발현 시험

[0086]

세포를 제거한 액을 0.22 μm 필터로 여과하여 SDS-PAGE로 분석하였다.

[0087]

그 결과, Fc 영역을 인간화한 항체로서 마우스 유래 인간화 항CRP 항체의 발현이 확인되었다.

[0088]

<이호항체에 의한 비특이반응을 억제하기 위한 화합물을 첨가한 측정법에 의한 CRP 음성 인간 혈청의 측정>

[0089]

(1) 시약의 조제

[0090]

CRP에 대한 항체를 이용하여 이하와 같이 면역 응집법에 의한 측정 시약을 조제하였다.

[0091]

i) 토끼 유래 항CRP 폴리클로날 항체를 폴리스티렌 라텍스 부유액 1mL에 대해 0.26mg 담지시켜 이루어진 감각 입자를 완충액(글리신, pH 7.3)에 0.18(w/v)%가 되도록 현탁하여 라텍스 부유액을 조제하였다.

[0092]

ii) 완충액(글리신, pH 7.0)을 준비하였다.

[0093]

(2) 표준액의 조제

[0094]

CRP를 이용하여 검량선 작성에 사용하는 표준액을 조제하였다.

[0095]

(3) 자동 분석 장치에 의한 측정

[0096]

자동 분석 장치는 히타치사 7180형 자동 분석 장치에 의해 엔드포인트법으로 자동 측정을 수행하였다.

[0097]

진술한 시약을 이용하여 생리식염수와 CRP 음성 인간 혈청(Golden West Biologicals로부터 시판) 3검체의 측정을 수행하였다. 검체 용액 2.5 μL에 완충액(글리신, pH 7.0) 125 μL를 첨가하고, 이 혼합액을 37℃에서 교반 혼합하였다. 5분간 방치 후 라텍스 부유액 125 μL를 첨가하고, 추가로 37℃에서 교반 혼합하였다. 약 3분간의 응집 반응을 흡광도 변화량으로서 측정하고, 표준액을 이용하여 작성한 검량선으로부터 각 검체의 CRP 농도를 산출하였다(표 1, 도 1).

표 1

검체	CRP 농도 (mg/mL)
생리식염수	0.00
CRP 음성인간혈청①	0.00
CRP 음성인간혈청②	0.00
CRP 음성인간혈청③	0.00

[0098]

[0099]

<이호항체에 의한 비특이반응을 억제하기 위한 화합물을 첨가하지 않은 측정법에 의한 CRP 음성 인간 혈청의 측정>

[0100]

(1) 시약의 조제

[0101]

CRP에 대한 항체를 이용하여 이하와 같이 면역 응집법에 의한 측정 시약을 조제하였다.

[0102]

i) 토끼 유래 항CRP 폴리클로날 항체를 폴리스티렌 라텍스 부유액 1mL에 대해 0.26mg 담지시켜 이루어진 감각 입자를 완충액(글리신, pH 7.3)에 0.18(w/v)%가 되도록 현탁하여 라텍스 부유액을 조제하였다.

[0103]

ii) 염소 유래 항CRP 폴리클로날 항체를 사용한 「N-어세이 LA CRP-T 닛토보」(닛토보메디컬주식회사)의 라텍스 시액(항인간 CRP 염소 폴리클로날 항체 감각 라텍스 입자)을 준비하였다.

[0104]

iii) 마우스 유래 인간화 항CRP 항체(식물 발현)를 폴리스티렌 라텍스 부유액 1mL에 대해 0.11mg 담지시켜 이루어진 감각 입자를 완충액(글리신, pH 7.3)에 0.15(w/v)%가 되도록 현탁하여 라텍스 부유액을 조제하였다.

[0105]

iv) 마우스 유래 인간화 항CRP 항체(CHO 세포 발현)를 폴리스티렌 라텍스 부유액 1mL에 대해 0.11mg 담지시켜 이루어진 감각 입자를 완충액(글리신, pH 7.3)에 0.16(w/v)%가 되도록 현탁하여 라텍스 부유액을 조제하였다.

[0106]

v) 완충액(인산, pH 7.4)을 준비하였다.

[0107]

(2) 자동 분석 장치에 의한 측정

[0108]

자동 분석 장치는 히타치사 7180형 자동 분석 장치에 의해 엔드포인트법으로 자동 측정을 행하였다.

[0109]

전술한 시약을 이용하여 생리식염수와 CRP 음성 인간 혈청(Golden West Biologicals로부터 시판) 3검체의 측정을 행하였다. 검체 용액 3.0 μL에 완충액(인산, pH 7.4) 240 μL를 첨가하고, 이 혼합액을 37°C에서 교반 혼합하였다. 5분간 방치 후 라텍스 부유액 36 μL를 첨가하고, 추가로 37°C에서 교반 혼합하였다. 약 90초간의 응집 반응을 흡광도 변화량으로서 측정하였다(도 1).

[0110]

도 1에 도시된 바와 같이, 이호항체에 의한 비특이반응을 억제하기 위한 화합물을 첨가한 측정법으로 측정하였을 때에 CRP 측정값이 0.00mg/mL이었던 검체를 이호항체에 의한 비특이반응을 억제하기 위한 화합물을 첨가하지 않은 측정법으로 측정하면, 토끼 유래 항CRP 항체 및 염소 유래 항CRP 항체를 이용한 시약으로 생리식염수에 대해 큰 흡광도 변화량을 얻었다. 한편, 마우스 유래 인간화 항CRP 항체에서는 생리식염수에 가까운 흡광도 변화량을 얻었다. CRP 측정값이 0.00mg/mL이면 흡광도 변화량은 생리식염수에 가까운 값을 취하는 것을 생각할 수 있기 때문에 토끼 유래 항CRP 항체를 이용한 시약에서는 검체 측정시에 비특이 응집을 발생하였다고 판단된다. 이에 반해, 마우스 유래 인간화 항CRP 항체에서는 생리식염수에 가까운 흡광도 변화량을 얻었기 때문에 마우스 유래 인간화 항CRP 항체 및 염소 유래 항CRP 항체를 이용한 시약에서는 이호항체에 의한 비특이반응을 억제하기 위한 화합물을 첨가하지 않은 측정법으로의 검체 측정시에 비특이 응집이 발생하기 어렵다고 생각된다.

산업상 이용가능성

[0111]

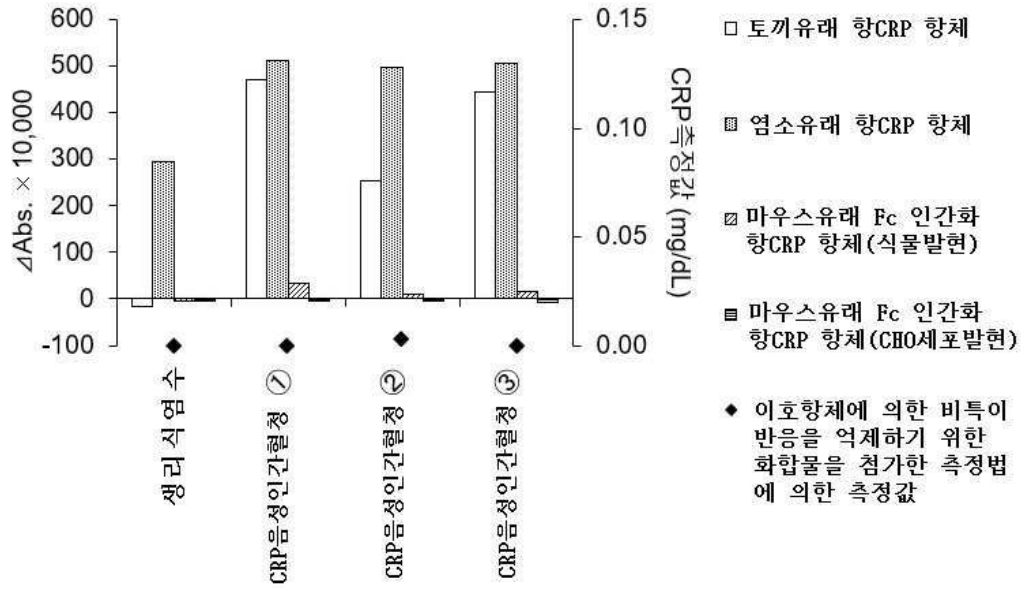
본 발명의 방법에 의해 인간 혈액 중의 피측정물질을 정확하게 측정할 수 있다.

[0112]

본 명세서에서 인용한 모든 간행물, 특허 및 특허출원은 그대로 인용에 의해 본 명세서에 도입되는 것으로 한다.

도면

도면1



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.