



등록특허 10-2433648



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월17일

(11) 등록번호 10-2433648

(24) 등록일자 2022년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/577 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01) G01N 33/553 (2006.01)

G01N 33/72 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/577 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7037157

(22) 출원일자(국제) 2017년05월26일

심사청구일자 2020년02월27일

(85) 번역문제출일자 2018년12월20일

(65) 공개번호 10-2019-0015338

(43) 공개일자 2019년02월13일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2017/019736

(87) 국제공개번호 WO 2017/209001

국제공개일자 2017년12월07일

(30) 우선권주장

JP-P-2016-107343 2016년05월30일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문현

KR1020150036388 A\*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 항인간 헤모글로빈 모노클로날 항체 또는 항체 키트, 항인간 헤모글로빈 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자, 및 이들을 이용한 측정 시약 또는 측정 방법

### (57) 요 약

본 발명은, 검체 중의 헤모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 간편하게 검출, 측정하기 위한 항인간 헤모글로빈 모노클로날 항체 또는 항체 키트, 그 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자, 및 이들을 이용하여 검체 중의 헤모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출, 측정하기 위한 측정 시약 및 측정 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명의 항인간 헤모글로빈 모노클로날 항체는, 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해, 복합체를 형성하고 있지 않은 유리 헤모글로빈 및 유리 합토글로빈과는 반응하지 않고, 헤모글로빈-합토글로빈 복합체와 특이적으로 반응하는 것이다.

(52) CPC특허분류

*G01N 33/545* (2013.01)

*G01N 33/553* (2013.01)

*G01N 33/721* (2013.01)

(72) 발명자

**마키노단 미쓰루**

일본 도치기켄 시모쓰가군 노기마치 노기 143 에이  
겐 가가꾸 가부시끼가이샤 노기 지교쇼 내

**세키 야스히로**

일본 도치기켄 시모쓰가군 노기마치 노기 143 에이  
겐 가가꾸 가부시끼가이샤 노기 지교쇼 내

**사카니시 지사**

일본 도치기켄 시모쓰가군 노기마치 노기 143 에이  
겐 가가꾸 가부시끼가이샤 노기 지교쇼 내

(56) 선행기술조사문헌

KR1020030029860 A

US5552295 A

US20080227208 A1

Takashi Meguro et al, Hokkaido Journal of Medical Science (1994), vol 69, pp 995-1009.

Yasushi Hamaya et al, Journal of Gastroenterological Cancer Screening (2012), vol 50, no 3, pp 345-350.

Chalkias et al, Am J Clin Oncol (2011), vol 34, no 6, pp 561-566.

Ivo R Horin et al, European Journal of Haematology (2003), vol 71, no 4, pp 289-293.

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268) 또는 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269)인, 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체.

#### 청구항 2

5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268), 7C-7B-8E(NPMD 수탁번호 NITE BP-02270), 1-5G-3C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02271), 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269), 79-8G-3F(NPMD 수탁번호 NITE BP-02272) 및 SU112로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 2종류 이상의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체를 포함하는, 항체 키트.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체가 마우스 유래인, 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체.

#### 청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체가 마우스 유래인, 항체 키트.

#### 청구항 5

5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268) 또는 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269)인 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해 얻어진 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자.

#### 청구항 6

5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268), 7C-7B-8E(NPMD 수탁번호 NITE BP-02270), 1-5G-3C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02271), 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269), 79-8G-3F(NPMD 수탁번호 NITE BP-02272) 및 SU112로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 2종류 이상의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해 얻어진 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자.

#### 청구항 7

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서,

상기 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체가 마우스 유래인, 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자.

#### 청구항 8

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서,

상기 모노클로날 항체를 고정화하는 상기 불용성 담체 입자가 라텍스 입자 또는 금속 콜로이드 입자인, 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자.

#### 청구항 9

제 5 항 또는 제 6 항에 기재된 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자를 포함하는, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출하기 위한 면역학적 측정 시약.

#### 청구항 10

제 1 항에 기재된 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체, 제 2 항에 기재된 항체 키트, 또는, 제 5 항 또는 제 6 항에 기재된 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자를 이용한, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로

검출하기 위한 면역 응집 반응 방법.

### 청구항 11

1종류 이상의 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해 얻어진 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자를 이용한, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출하기 위한 면역학적 측정 방법으로서,

상기 1종류 이상의 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체가,

5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268) 또는 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269)의 1종류, 또는,

5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268), 7C-7B-8E(NPMD 수탁번호 NITE BP-02270), 1-5G-3C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02271), 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269), 79-8G-3F(NPMD 수탁번호 NITE BP-02272) 및 SU112로 이루 어지는 군으로부터 선택되는 적어도 2종류 이상인, 면역학적 측정 방법.

### 청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체가 마우스 유래인, 면역학적 측정 방법.

### 청구항 13

제 11 항 또는 제 12 항에 있어서,

상기 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체를 고정화하는 상기 불용성 담체 입자가 라텍스 입자 또는 금속 콜로이드 입자인, 면역학적 측정 방법.

### 청구항 14

삭제

### 청구항 15

삭제

### 청구항 16

삭제

### 청구항 17

삭제

### 청구항 18

삭제

### 청구항 19

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은, 불용성 담체 입자에 고정화된 경우, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 포함하는 피험 시료 중의 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와 특이적으로 응집 반응을 일으키는 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체 또는 항체 키트, 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자, 및 이들을 이용한, 피험 시료 중의 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출, 측정하기 위한 측정 시약 또는 측정 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 출혈을 수반하는 소화기관의 질환으로서, 염증, 종양, 암 등이 알려져 있다. 그리고, 이를 질환의 스크리닝 검사로서, 분변 중의 혈모글로빈의 존재를 조사하는 면적 측정 검사가 행해지고 있다. 그리고, 이 검사는 주로 면역 측정법에 의해서 행해진다(일본 특허공개 소61-137064호 공보).

[0003] 그러나, 분변 중에 포함되는 혈모글로빈은 피험 시료인 분변 중에 포함되는 세균을 비롯한 여러 가지의 요인에 의해, 또한 소화관 내를 이동할 때에도 분해되어, 검출, 측정을 할 수 없게 된다. 그러므로, 분변 중의 혈모글로빈의 검출, 측정은 하행 결정이나 직장의 출혈의 검사에는 유효하지만, 상부 소화관의 출혈을 검사하는 것은 곤란하다.

[0004] 그래서, 분변 중에 포함되는 세균을 비롯한 여러 가지의 요인에 의해 분해를 받지 않는 혈모글로빈-합토글로빈 복합체를 측정하는 것이 제안되어, 실시되고 있다. 그러나, 이 측정 원리는 혈모글로빈에 특이적으로 결합하는 항체와 합토글로빈에 특이적으로 결합하는 항체를 조합한 샌드위치 면역 측정법이다(일본 특허공개 평2-193071호 공보).

[0005] ELISA로 대표되는 샌드위치 면역 측정법은, 측정의 과정에 있어서 피험 시료에 포함되는 피측정물 이외의 단백 성분 등을 제거하는 세정 공정을 포함하기 때문에, 측정에 필요로 하는 시간이 길어진다. 그 때문에, 단시간에 다수의 피험 시료를 검출, 측정할 필요가 있는 검출, 측정에는 적합하지 않다.

[0006] 또한, 혈모글로빈 및 합토글로빈의 기본 구조는 사량체를 형성하고 있고, 통상적 방법으로 얻어진 혈모글로빈에 특이적으로 결합하는 항체와 합토글로빈에 특이적으로 결합하는 항체를 조합하여, 단시간에 다수의 피험 시료를 검출, 측정하는 것이 가능한 응집법에 의한 면역 측정법에 적용하면, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체뿐만 아니라, 복합체를 형성하고 있지 않은 유리 혈모글로빈이나 유리 합토글로빈에서도 응집 반응을 일으키기 때문에, 정확한 측정은 곤란하다.

[0007] 그래서, 응집법에 의한 면역 측정법에 적용하는 것이 가능하고, 복합체를 형성하고 있지 않은 유리 혈모글로빈이나 유리 합토글로빈을 검출, 측정하지 않고, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체만 검출, 측정할 수 있는 항체의 제작 및 그 항체를 이용한 응집법에 의한 면역 측정법으로 혈모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출, 측정하는 면역 측정법의 확립이 기대되고 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 출혈을 수반하는 소화기관 질환의 스크리닝 검사를 행하는 것은 중독(重篤)화되는 염증, 종양, 암 등을 조기에 발견하기 위해서 중요한 과제가 되고 있다. 그래서, 소화관 내에서 분해를 받지 않는 혈모글로빈-합토글로빈 복합체를 단시간에 다수 검체를 검출, 측정할 수 있는 시약이 요구되고 있다.

[0009] 그러므로, 본 발명은, 복합체를 형성하고 있지 않은 유리 혈모글로빈 및 유리 합토글로빈은 검출, 측정하지 않고, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로, 단시간에 다검체의 검출, 측정을 할 수 있는 응집법에 의한 면역 측정법에 사용하는 것이 가능한 항체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은, 상기 과제를 해결하기 위해 예의 검토한 결과, 불용성 담체 입자에 결합시키는 것에 의해, 복합체를 형성하고 있지 않은 유리 혈모글로빈 및 유리 합토글로빈과는 반응하지 않고, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체와 특이적으로 반응하는 항체를 발견하여, 본 발명을 완성시키기에 이르렀다.

[0011] 즉, 본 발명은 이하의 구성으로 이루어진다.

[0012] (1) 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체로서, 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해 얻어진 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자가, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체와 응집 반응하는 반면, 혈모글로빈과 응집 반응하지 않는, 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체.

[0013] (2) 5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268) 또는 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269)인, (1)의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체.

[0014] (3) 2종류 이상의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해 얻어진 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자가, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체와 응집 반응하는 반면, 혈모글로빈과

응집 반응하지 않는, 2종류 이상의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체를 포함하는, 항체 키트.

- [0015] (4) 2종류 이상의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체가 5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268), 7C-7B-8E(NPMD 수탁번호 NITE BP-02270), 1-5G-3C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02271), 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269), 79-8G-3F(NPMD 수탁번호 NITE BP-02272) 및 SU112로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 2종류 이상인, (3)의 항체 키트.
- [0016] (5) 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체가 마우스 유래인, (1)~(4) 중 어느 하나의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체 또는 항체 키트.
- [0017] (6) 1종류 이상의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해 얻어진 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자로서, 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자가, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체와 응집 반응하는 반면, 혈모글로빈과 응집 반응하지 않는, 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자.
- [0018] (7) 1종류 이상의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체가, 5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268) 또는 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269)의 1종류인, (6)의 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자.
- [0019] (8) 1종류 이상의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체가, 5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268), 7C-7B-8E(NPMD 수탁번호 NITE BP-02270), 1-5G-3C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02271), 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269), 79-8G-3F(NPMD 수탁번호 NITE BP-02272) 및 SU112로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 2종류 이상인, (7)의 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자.
- [0020] (9) 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체가 마우스 유래인, (6)~(8) 중 어느 하나의 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자.
- [0021] (10) 모노클로날 항체를 고정화하는 불용성 담체 입자가 라텍스 입자 또는 금속 콜로이드 입자인, (6)~(9) 중 어느 하나의 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자.
- [0022] (11) (6)~(10) 중 어느 하나의 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자를 포함하는, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출하기 위한 면역학적 측정 시약.
- [0023] (12) 5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268), 7C-7B-8E(NPMD 수탁번호 NITE BP-02270), 1-5G-3C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02271), 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269) 또는 79-8G-3F(NPMD 수탁번호 NITE BP-02272)인, 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체.
- [0024] (13) (1)~(5) 중 어느 하나의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체 또는 항체 키트, (6)~(10) 중 어느 하나의 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자, (11)의 면역학적 측정 시약, 혹은 (12)의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체를 이용한, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출하기 위한 면역학적 측정 방법.
- [0025] (14) 1종류 이상의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해 얻어진 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자를 이용한, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출하기 위한 면역학적 측정 방법으로서, 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자가, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체와 응집 반응하는 반면, 혈모글로빈과 응집 반응하지 않는, 면역학적 측정 방법.
- [0026] (15) 1종류 이상의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체가 5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268) 또는 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269)의 1종류인, (14)의 면역학적 측정 방법.
- [0027] (16) 1종류 이상의 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체가 5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268), 7C-7B-8E(NPMD 수탁번호 NITE BP-02270), 1-5G-3C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02271), 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269), 79-8G-3F(NPMD 수탁번호 NITE BP-02272) 및 SU112로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 2종류 이상인, (14)의 면역학적 측정 방법.
- [0028] (17) 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체가 마우스 유래인, (14)~(16) 중 어느 하나의 면역학적 측정 방법.
- [0029] (18) 항인간 혈모글로빈 모노클로날 항체를 고정화하는 불용성 담체 입자가 라텍스 입자 또는 금속 콜로이드 입자인, (14)~(17) 중 어느 하나의 면역학적 측정 방법.

### 발명의 효과

[0030] 본 발명은, 상기 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화해서 제작한 면역학적 측정 시약을 이용하는 것에 의해, 피험 시료 중에 포함되는, 복합체를 형성하고 있지 않은 유리 혜모글로빈 및/또는 유리 합토글로빈의 영향을 받는 일 없이, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 측정하는 것이 가능해진다.

[0031] 그리고, 이것에 의해, 혜모글로빈과 비교하여 검체 중에서의 안정성이 우수한 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 피험 물질로 해서, 출혈을 수반하는 소화기관 질환의 스크리닝 검사를 간편하고 또한 단시간에 행하는 것이 가능해진다.

### 도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 ELISA법과 라텍스 응집법으로 검체를 측정했을 때의 상관도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명의 일 실시형태의 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체는, 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해 얻어진 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자가, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와 응집 반응하는 반면, 혜모글로빈과 응집 반응하지 않는, 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체이다.

[0034] 본 발명의 다른 실시형태의 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체는, 항체 키트이고, 구체적으로는 2종류 이상의 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해 얻어진 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자가, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와 응집 반응하는 반면, 혜모글로빈과 응집 반응하지 않는, 2종류 이상의 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체를 포함하는, 항체 키트이다.

[0035] 본 발명에 있어서의 혜모글로빈-합토글로빈 복합체는, 혜모글로빈과 합토글로빈에 의해 형성된, 유리 혜모글로빈보다도 안정된 복합체이다. 혈관 중에 있어서 어떠한 이유에 의해 적혈구가 파괴되어, 혜모글로빈이 혈중에 유리되면, 유리된 혜모글로빈이 산화되는 것에 의해 산화적 혈관 장애 독성이 생긴다. 그래서, 합토글로빈이 유리된 혜모글로빈과 신속하게 복합체를 형성하는 것에 의해, 그 독성을 중화시키는 것이 알려져 있다. 그 후, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체는 세망내피계 세포의 수용체를 개재해서 신속하게 도입되고 분해 처리되지만, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체 자체는 혜모글로빈에 비해서 안정적인 것이 알려져 있다.

[0036] 혜모글로빈-합토글로빈 복합체가 안정된 구조물인 성질에 주목하여, 분변 중에 포함되는 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출, 측정하는 것에 의해, 소화관에 있어서의 출혈을 파악하는 것이 가능해진다.

[0037] 혜모글로빈-합토글로빈 복합체의 검출, 측정을 행하는 방법으로서는, 면역학적 측정 방법이 바람직하고, 스크리닝 검사로서 다수의 검체를 단시간에 행하는 방법으로서는, 면역 응집 반응 방법이 더 바람직하다. 면역 응집 반응 방법으로서는, 담체 입자, 예를 들어, 고감도 측정이 가능한 호모지니어스한 계의 입자 담체를 이용한 방법이 바람직하다.

[0038] 또한, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출, 측정한다는 관점에서, 면역학적 측정 방법에 이용하는 항체로서는, 모노클로날 항체가 적합하다. 본 발명은, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 면역 응집 반응 방법에 이용하여 검출, 측정하는 것이 가능한 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출, 측정하는 방법을 구축한다.

[0039] 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출, 측정하는 방법을 구축하기 위한 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체로서, 그 유래는 특별히 한정되지 않지만, 마우스 유래의 항인간 혜모글로빈 마우스 모노클로날 항체가 바람직하다.

[0040] 항인간 혜모글로빈 마우스 모노클로날 항체는 통상의 모노클로날 항체의 제작 방법에 의해 제작할 수 있다. 예를 들어, 마우스를 사용한 이하의 방법을 들 수 있다. 구체적으로는, 마우스에 인간 혜모글로빈으로 면역한 후, 비대화된 비장을 적출하고, 비장 유래의 B 세포를 조제하여, 따로 증식시킨 마우스 골수종 세포와 전기 융합법에 의해 세포 융합시키고, B 세포와 골수종 세포가 융합해서 생긴 세포를 선택 배지를 이용하여 증식 및 클로닝을 행한다. 그 결과 발육한 콜로니가 인간 혜모글로빈에 대한 항체를 산생하고 있는지 여부를 확인한다. 인간 혜모글로빈에 대한 항체를 산생하고 있다고 확인된 세포를 클로닝하여, 항인간 혜모글로빈 마우스 모노클로날 항체 산생 세포주를 얻는다. 얻어진 항인간 혜모글로빈 마우스 모노클로날 항체 산생 세포주를 배양하고, 그 배양 상청 또는 배양 세포를 마우스의 복강내에서 증식시켜 얻어진 복수로부터 항체를 정제하여, 항인간 혜모글로빈 마우스 모노클로날 항체로 한다.

- [0041] 다음으로, 항인간 혜모글로빈 마우스 모노클로날 항체를 면역 응집 반응 방법에 적용하기 위해, 해당 항체를 불용성 담체 입자에 고정화한다. 모노클로날 항체를 고정화하기 위한 불용성 담체 입자로서는, 일반적으로 사용되는 라텍스 입자, 실리카 입자, 금속 콜로이드 입자, 자성 입자, 형광 입자, 적혈구 등을 들 수 있지만, 이들로 한정되는 경우는 없다.
- [0042] 또한, 해당 불용성 담체 입자의 입자경으로서는, 50~500nm가 바람직하고, 75~350nm가 더 바람직하지만, 특별히 이 범위에 구애되는 일 없이, 사용하는 것이 가능하다.
- [0043] 또, 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 방법으로서는, 공지의 기술인, 항체와 불용성 담체 입자를 혼합해서 불용성 담체 입자의 표면에 항체를 물리적 흡착을 행하는 것에 의해 불용성 담체 입자에의 항체의 고정화가 가능하다.
- [0044] 또한, 표면에 아미노기나 카복실기를 도입한 불용성 담체 입자를 이용하는 경우에는, 글루타르알데하이드나 카복시이미드 시약을 이용한 화학 결합에 의해 불용성 담체 입자의 표면에의 항체의 고정화가 가능하다.
- [0045] 이들 방법에 의해 얻어진 1 이상의 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체가 고정화된 불용성 담체 입자는, 복합체를 형성하고 있지 않은 유리 혜모글로빈 및 유리 합토글로빈, 및 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 포함하는 혼합물에 부여하여, 유리 혜모글로빈 및 유리 합토글로빈과는 응집 반응은 확인되지 않고, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와는 응집 반응을 일으키는 것을 확인하여, 본원 발명의 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체 및 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자를 얻는다.
- [0046] 즉, 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와 특이적으로 응집 반응을 일으키는 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체가 얻어지고, 해당 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의한 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자가 얻어진다. 그에 의해, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 반응시키는, 해당 항체 또는 해당 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자를 포함하는 측정 시약, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출, 측정하는, 해당 항체 또는 해당 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자를 이용한 측정 방법도 얻어진다.
- [0047] 본 발명의 일 실시형태의 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체로서 바람직하게는, 불용성 담체 입자에 고정화한 경우 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와 특이적으로 응집 반응을 일으키는, NPMD에 수탁번호 NITE BP-02268로서 기탁된 5C-2A, 또는 NPMD에 수탁번호 NITE BP-02269로서 기탁된 12-9G-C이다.
- [0048] 또한, 본 발명의 다른 실시형태의 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체 키트로서 바람직하게는, 2종류 이상의 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화한 경우 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와 특이적으로 응집 반응을 일으키는, NPMD에 수탁번호 NITE BP-02268로서 기탁된 5C-2A, NPMD에 수탁번호 NITE BP-02270으로서 기탁된 7C-7B-8E, NPMD에 수탁번호 NITE BP-02271로서 기탁된 1-5G-3C, NPMD에 수탁번호 NITE BP-02269로서 기탁된 12-9G-C, NPMD에 수탁번호 NITE BP-02272로서 기탁된 79-8G-3F, 및 SU112(닛폰바이오테스트연구소)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 2종류 이상이다.
- [0049] 본 발명의 측정 시약은, 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체 또는 항체 키트, 혹은 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자를 포함하고, 그 밖에, 예를 들면, 각종 전해질, 완충제, 안정화제, 계면활성제 또는 증감제 등의 성분을 포함해도 된다.
- [0050] 본 발명의 측정 방법은, 1종류 이상의 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체를 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해 얻어진 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자를 이용한, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출하기 위한 면역학적 측정 방법이고, 해당 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자가, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와 응집 반응하는 반면, 혜모글로빈과 응집 반응하지 않기 때문에, 복합체를 형성하고 있지 않은 유리 혜모글로빈 및 유리 합토글로빈, 및 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 포함하는 혼합물로부터, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체만 특이적으로 검출, 측정할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 측정 방법은, 상기 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자와 검체(피험 시료)를 혼합해서, 응집 반응의 유무에 의해, 검체 중의 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출, 측정한다. 검체는 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 포함할 수 있는 시료이면 특별히 한정되지 않지만, 혈액, 변, 소변, 땀 등인 것이 바람직하고, 변인 것이 특히 바람직하다. 응집 반응의 검출, 측정 방법은 일반적인 방법이면 되고, 예를 들어, 흡광도의 측정, 산란광 강도의 측정, 육안에 의한 측정(슬라이드 응집법) 등을 들 수 있다.
- [0052] 이하, 실시예를 들어 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

## [0053] 실시예

[0054] (실시예 1 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체의 제작)

[0055] (1) 마우스에의 면역

[0056] 7주령의 암컷 Balb/c 및 ddY의 마우스 각 5마리에 대해서 혜모글로빈으로 면역했다. 면역 프로토콜로서는, 초회 면역으로서 아쥬반트와 혼화한 혜모글로빈 용액을 배부 피하에 50 µg/마우스의 용량으로 행했다.

[0057] 초회 면역의 4주간 후에 아쥬반트와 혼화한 혜모글로빈 용액을 배부 피하에 50 µg/마우스의 용량으로 면역하고, 추가로 그 4주간 후에 아쥬반트와 혼화한 혜모글로빈 용액을 배부 피하에 50 µg/마우스의 용량으로 면역했다.

[0058] 각각의 면역 후에, <sup>125</sup>I로 표지한 혜모글로빈을 이용한 2항체법의 RIA법으로 항혈청가를 측정했다. 그 결과, ddY의 마우스 중 1마리에서 높은 항혈청가가 얻어져, 세포 융합에 제공했다. 한편, 2회째의 면역 후 및 3회째의 면역 후의 항혈청가에 변동은 확인되지 않았다.

[0059] (2) 세포 융합

[0060] 세포 융합을 행하기 3일 전에 혜모글로빈 용액을 복강내에 50 µg/마우스의 용량으로 최종 면역을 행했다. 세포 융합은 초회 면역으로부터 16주간 경과한 마우스로부터 비장을 적출하여, 비(脾)세포를 조제했다.

[0061] 조제한 비세포와 마우스 골수종 NS-1 세포를 전기 융합법으로 세포 융합을 행하고, 융합 세포 선택 배지에 혼탁하여 96웰 마이크로플레이트에 파종했다.

[0062] (3) 모노클로날 항체 산생 세포주의 스크리닝

[0063] 세포 융합의 10일 후에 <sup>125</sup>I로 표지한 혜모글로빈 및 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 이용한 2항체법의 RIA법으로, 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체 산생 세포를 스크리닝했다.

[0064] (실시예 2 모노클로날 항체의 결합 특이성)

[0065] (1) 모노클로날 항체의 선정

[0066] 세포 융합에 의해 얻어진 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체 45클론 및 시판 중인 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체 SU112(낫폰바이오테스트연구소)의 합계 46클론을 선정하고, 혜모글로빈 및 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와의 결합 특이성을 평가했다.

[0067] 평가의 방법으로서는, 각각의 항인간 혜모글로빈 모노클로날 항체를 폴리스타이렌 라텍스 입자에 고정화하고, 혜모글로빈 및 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 포함하는 시료와 반응시켰을 때의 응집의 정도를 비교했다.

[0068] (2) 모노클로날 항체의 폴리스타이렌 라텍스 입자에의 고정화

[0069] 각각의 모노클로날 항체를 입경 211nm의 폴리스타이렌 라텍스 입자에 고정화했다.

[0070] 상기의 폴리스타이렌 라텍스 입자에의 항체의 고정화는 공지의 기술을 이용하여 실시했다. 즉, 폴리스타이렌 라텍스 입자와 항체를 혼합해서 소수성인 폴리스타이렌 라텍스 입자의 표면에 항체를 물리적 흡착을 행하는 것에 의해, 폴리스타이렌 라텍스 입자에의 항체의 고정화를 행했다.

[0071] (3) 시료의 조제

[0072] 혜모글로빈-합토글로빈 복합체의 시료는 32.3pmol/mL의 혜모글로빈 및 그것과 등물의 합토글로빈을 등액량으로 혼화해서 제작했다. 혜모글로빈만의 시료는 16.1pmol/mL의 혜모글로빈을 포함하는 것을 사용했다.

[0073] (4) 라텍스 응집의 측정 방법

[0074] 96웰 평저 마이크로플레이트의 웰을 이용하여 응집 반응을 행했다. 구체적인 방법은, 50mM HEPES 완충액(pH 7.4)을 마이크로플레이트의 각 웰에 100 µL 분주(分注)하고, 각각의 항체를 고정화한 폴리스타이렌 라텍스 입자 용액을 50 µL 첨가한 후에 시료를 30 µL 첨가했다.

[0075] 선라이즈 레인보우(테칸재팬사)를 이용하여 시료의 첨가 10초 후 및 5분 10초 후에 파장 660nm에서 흡광도를 측정하고, 그 차를 응집의 지표로 했다.

[0076] 혜모글로빈과 반응시켰을 때의 응집의 정도와 비교하여, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와 반응시켰을 때의 응집

의 정도가 높았던 항체 또는 그의 조합을 표 1에 나타낸다. 이들 항체를 특허미생물기탁센터(NPMD)에 기탁했다. 표 1에 나타난 모노클로날 항체 또는 그의 조합을 이용하는 것에 의해, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 측정할 수 있는 시약이 기대된다. 5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268) 및 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269)의 모노클로날 항체는, 단독으로 사용하더라도 거의 혜모글로빈의 영향을 받는 일 없이, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와 응집하는 것이 확인되었다. 또한, 1-5G-3C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02271)와 SU112(낫폰바이오테스트연구소)의 조합, 5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268)와 79-8G-3F(NPMD 수탁번호 NITE BP-02272)의 조합, 5C-2A(NPMD 수탁번호 NITE BP-02268)와 79-8G-3F의 조합, 12-9G-C(NPMD 수탁번호 NITE BP-02269)와 79-8G-3F(NPMD 수탁번호 NITE BP-02272)의 조합도, 거의 혜모글로빈의 영향을 받는 일 없이, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와 응집하는 것이 확인되었다.

## 표 1

모노클로날 항체의 조합	혜모글로빈 ( $\Delta$ Abs. $\times 10000$ )	혜모글로빈- 합토글로빈 복합체 ( $\Delta$ Abs. $\times 10000$ )
1-5G-3C      SU112	0	710
5C-2A      단독	290	1100
5C-2A      79-8G-3F	0	670
5C-2A      7C-7B-8E	390	940
7C-7B-8E      79-8G-3F	0	520
12-9G-C      단독	280	1040
12-9G-C      79-8G-3F	0	550

[0077]

[0078] (실시예 3 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와의 특이적 반응(1))

[0079] (1) 모노클로날 항체 고정화 라텍스 용액의 조제

[0080] 5C-2A의 모노클로날 항체를 실시예 2와 마찬가지의 방법으로 라텍스 입자에 고정화해서 라텍스 용액으로 했다.

[0081] (2) 혜모글로빈-합토글로빈 복합체 시료의 조제

[0082] 50mM 인산 완충액(pH 6.6) 중에, 11.4pmol/mL의 혜모글로빈 및 0.0, 3.8, 7.5 또는 11.3pmol/mL의 합토글로빈을 포함하는 용액을 조제했다. 즉, 혜모글로빈 및 합토글로빈이 강고하게 결합하는 성질을 가지는 것으로부터, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체 및 혜모글로빈이, 이론상은, 각각 0.0 및 11.4pmol/mL, 3.8 및 7.6pmol/mL, 7.5 및 3.9pmol/mL, 및 11.3 및 0.1pmol/mL 포함하는 용액을 조제했다.

[0083] (3) 모노클로날 항체 고정화 라텍스 입자와 혜모글로빈-합토글로빈 복합체의 반응

[0084] 모노클로날 항체 고정화 라텍스 입자와 혜모글로빈-합토글로빈 복합체의 반응을 7170S형 자동 분석 장치(히타치 하이테크놀로지사제)를 이용하여 확인했다. 측정 방법은, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체 함유 용액 15  $\mu$ L를 H7170S의 반응 셀에 가한 후에 50mM HEPES 완충액(pH 7.4) 100  $\mu$ L를 가하고, 그 후 모노클로날 항체 고정화 라텍스 용액 25  $\mu$ L를 가한 후의 440초간의 파장 660nm에서의 탁도 변화량을 구했다.

[0085] 0pmol/mL가 되도록 합토글로빈을 첨가했을 때의 탁도 변화량을 0으로 보정하고, 합토글로빈이 11.3pmol/mL 포함되도록 첨가한 용액의 탁도 변화량을 100%로 했을 때의 탁도 변화율을 표 2에 나타낸다.

[0086] 합토글로빈의 첨가 농도, 즉 혜모글로빈-합토글로빈 복합체의 농도의 증가에 수반하여, 라텍스 입자에 고정화한 모노클로날 항체와의 항원 항체 반응에 의해 생기는 라텍스 응집에 의한 탁도 변화가 증가한다. 또한, 합토글로빈의 첨가 농도가 낮을 때에는 라텍스 응집에 의한 탁도 변화가 낮기 때문에, 합토글로빈과 결합하고 있지 않은 혜모글로빈과의 반응이 확인되지 않는다고 추측되었다. 이들로부터, 5C-2A의 모노클로날 항체를 이용하는 것에 의해, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출하는 것이 가능해진다.

표 2

헤모글로빈 (pmol/mL)	합토글로빈 (pmol/mL)	탁도 변화량(%)
11.4	0.0	0.0
11.4	3.8	10.2
11.4	7.5	53.7
11.4	11.3	100.0

[0087]

(실시예 4 헤모글로빈-합토글로빈 복합체와의 특이적 반응(2))

(1) 모노클로날 항체 고정화 라텍스 용액의 조제

[0089] 1-5G-3C, 7C-7B-8E, SU112 및 79-8G-3F의 모노클로날 항체를 실시예 2와 마찬가지의 방법으로 라텍스 입자에 고정화해서 라텍스 용액으로 했다. 그리고, 1-5G-3C와 SU112 및 7C-7B-8E와 79-8G-3F의 조합의 라텍스 용액을 제작하여, 시험에 제공했다.

(2) 헤모글로빈-합토글로빈 복합체 시료의 조제

[0091] 13.0pmol/mL의 헤모글로빈 및 0.0, 9.4, 11.3 또는 13.0pmol/mL의 합토글로빈을 포함하는 것 외에는 실시예 3과 마찬가지의 방법으로 조제했다. 즉, 헤모글로빈-합토글로빈 복합체 및 헤모글로빈이, 이론상은, 각각 0.0 및 13.0pmol/mL, 9.4 및 3.6pmol/mL, 11.3 및 1.7pmol/mL, 및 13.0 및 0.0pmol/mL 포함하는 용액을 조제했다.

(3) 모노클로날 항체 고정화 라텍스 입자와 헤모글로빈-합토글로빈 복합체의 반응

[0093] 실시예 3과 마찬가지의 방법으로 탁도 변화량을 구했다.

[0094] 0pmol/mL가 되도록 합토글로빈을 첨가했을 때의 탁도 변화량을 0으로 보정하고, 헤모글로빈과 합토글로빈을 등량으로 조제한, 합토글로빈이 13.0pmol/mL 포함되도록 첨가한 용액의 탁도 변화량을 100%로 했을 때의 탁도 변화율을 표 3에 나타낸다.

[0095] 실시예 3과 마찬가지의 결과가 얻어졌다. 즉, 합토글로빈의 첨가 농도, 즉 헤모글로빈-합토글로빈 복합체의 농도의 증가에 수반하여, 라텍스 입자에 고정화한 모노클로날 항체와의 항원 항체 반응에 의해 생기는 라텍스 응집에 의한 탁도 변화가 증가했다. 이로부터, 1-5G-3C와 SU112의 조합, 및 7C-7B-8E와 79-8G-3F의 조합을 이용하는 것에 의해, 헤모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출하는 것이 가능해진다.

표 3

헤모글로빈 (pmol/mL)	합토글로빈 (pmol/mL)	탁도 변화량(%)	
		1-5G-3C + SU112	7-7B-8E + 79-8G-3F
13.0	0.0	0	0
13.0	9.4	49	69
13.0	11.3	68	73
13.0	13.1	100	100

[0097]

(비)교예 1 ELISA법에 의한 헤모글로빈 및 헤모글로빈-합토글로빈 복합체의 측정)

[0098] 실시예 2에 있어서, 헤모글로빈과 반응시켰을 때에는 응집 반응이 보이지 않고, 헤모글로빈-합토글로빈 복합체와의 특이적인 반응이 확인된, 5C-2A와 79-8G-3F의 조합에 대하여, ELISA법에서의 헤모글로빈 및 헤모글로빈-합토글로빈 복합체와의 결합의 특이성을 평가했다.

(1) 모노클로날 항체 고정화 라텍스 용액의 조제

- [0101] 5C-2A를 96웰 마이크로플레이트에 고상화해서 고상화 플레이트로 하고, 79-8G-3F에 호스래디시 폐록시다아제를 표지화해서 효소 표지화물로 했다. 상기의 96웰 마이크로플레이트에의 항체의 고상화는 공지의 기술을 이용하여 실시했다. 즉, 96웰 마이크로플레이트에 항체 첨가해서 소수성인 96웰 마이크로플레이트의 표면에 항체를 물리적 흡착을 행하는 것에 의해, 96웰 마이크로플레이트에의 고상화를 행했다.
- [0102] (2) 혈모글로빈-합토글로빈 복합체 시료의 조제
- [0103] 50mM 인산 완충액(pH 6.6) 중에 12.6pmol/mL의 혈모글로빈 및 12.6pmol/mL의 합토글로빈을 포함하는 용액을 조제하고, 이 용액을 50mM 인산 완충액(pH 6.6)으로 배배(加倍) 희석하여, 1.6, 3.2, 6.3 또는 12.6pmol/mL의 혈모글로빈-합토글로빈 복합체를 포함하는 시료를 조제했다.
- [0104] (3) ELISA의 측정 방법
- [0105] 96웰 마이크로플레이트에 표준액 또는 검체 10µL를 가하고, 3분간 교반한 후에, 25°C에서 60분간 정치했다. 정치 후, 계면활성제 함유 50mM 인산 완충액(pH 7.4)을 이용하여 3회 세정했다.
- [0106] 세정 후, 96웰 마이크로플레이트에 효소 표지를 100µL를 가하고, 3분간 교반한 후에, 25°C에서 60분간 정치했다. 정치 후, 계면활성제 함유 50mM 인산 완충액(pH 7.4)을 이용하여 3회 세정했다.
- [0107] 세정 후, 96웰 마이크로플레이트에 0.4mg/mL o-페닐렌다이아민 함유 기질 용해액 100µL를 가하고, 25°C에서 14분간 정치했다. 정치 후, 3N 황산을 반응 정지액으로서 100µL 첨가했다.
- [0108] 측정은 선라이즈 레인보우(테칸재팬사)를 이용하여 측정 파장 492/650nm에서 행했다. 라텍스 등의 불용성 담체에 고정화하는 것에 의해, 혈모글로빈과 반응시켰을 때에는 응집 반응이 보이지 않고, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체와의 특이적인 반응이 확인된, 5C-2A와 79-8G-3F의 조합을 이용한 ELISA법에서의 측정 결과를 표 4에 나타낸다. 5C-2A와 79-8G-3F의 조합을 이용한 ELISA법에서는, 혈모글로빈 및 혈모글로빈-합토글로빈 복합체 쌍방과 반응하고 있어, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출할 수는 없었다.

표 4

농도*	혈모글로빈 ( $\Delta$ Abs. × 10000)	혈모글로빈- 합토글로빈 복합체 ( $\Delta$ Abs. × 10000)
1. 6	6672	11165
3. 2	9632	16668
6. 3	12282	21758
12. 6	14382	24458

\*: 혈모글로빈 또는 혈모글로빈-합토글로빈 복합체의 농도

- [0109]
- [0110] (실시예 5 혈모글로빈-합토글로빈 복합체와의 특이적 반응(3))
- [0111] 실시예 2에 있어서, 혈모글로빈과 반응시켰을 때에는 응집 반응이 보이지 않고, 혈모글로빈-합토글로빈 복합체와의 특이적인 반응이 확인된, 5C-2A와 79-8G-3F의 조합에 대하여, 라텍스 응집법에서의 혈모글로빈 및 혈모글로빈-합토글로빈 복합체와의 결합의 특이성을 평가했다.
- [0112] (1) 모노클로날 항체 고정화 라텍스 용액의 조제
- [0113] 5C-2A 및 79-8G-3F의 모노클로날 항체를, 실시예 2와 마찬가지의 방법으로 라텍스 입자에 고정화해서 라텍스 용액으로 했다. 5C-2A 및 79-8G-3F의 모노클로날 항체를 고정화한 라텍스 용액을 혼합하여, 시험에 제공했다.
- [0114] (2) 혈모글로빈-합토글로빈 복합체 시료의 조제
- [0115] 50mM 인산 완충액(pH 6.6) 중에 12.6pmol/mL의 혈모글로빈 및 12.6pmol/mL의 합토글로빈을 포함하는 용액을 조제하고, 이 용액을 50mM 인산 완충액(pH 6.6)으로 배배 희석하여, 1.6, 3.2, 6.3 또는 12.6pmol/mL의 혈모글로빈-합토글로빈 복합체를 포함하는 시료를 조제했다.

[0116] (3) 라텍스 응집법의 측정 방법

R1로서 50mM HEPES 완충액(pH 7.4)을 이용하고, R2로서 상기의 모노클로날 항체 고정화 라텍스 용액을 이용했다. 측정은 히타치 7170S형 자동 분석 장치(히타치하이테크놀로지사제)를 이용하여 행했다. 측정 방법은, 표준액 또는 검체 15  $\mu$ L를 반응 셀에 가한 후에 50mM HEPES 완충액(pH 7.4)을 100  $\mu$ L 가하고, 그 후 모노클로날 항체 고정화 라텍스 용액을 25  $\mu$ L 가한 후의 440초간의 파장 660nm에서의 탁도 변화량을 측정했다.

[0118] (4) 모노클로날 항체 고정화 라텍스 입자와 혜모글로빈-합토글로빈 복합체의 반응

ELISA법에서는, 혜모글로빈 및 혜모글로빈-합토글로빈 복합체 쌍방과의 반응이 확인된, 5C-2A와 79-8G-3F의 조합을 이용한 라텍스 응집법에서의 측정 결과를 표 5에 나타낸다. 5C-2A와 79-8G-3F의 조합은, 라텍스 등의 불용성 담체에 고정화하는 것에 의해, 혜모글로빈과 반응시켰을 때에는 응집 반응이 보이지 않고, 혜모글로빈-합토글로빈 복합체와 특이적으로 반응하는 것이 확인되었다.

## 표 5

농도*	혜모글로빈 ( $\Delta$ Abs. $\times$ 10000)	혜모글로빈- 합토글로빈 복합체 ( $\Delta$ Abs. $\times$ 10000)
1. 6	-15	-2
3. 2	-15	53
6. 3	-1	199
12. 6	11	652

\*: 혜모글로빈 또는 혜모글로빈-합토글로빈 복합체의 농도

[0120]

[0121] (실시예 6 검체의 측정(1))

[0122] 종래법 중 하나인 ELISA법 및 본 발명의 방법을 이용하여 혜모글로빈-합토글로빈 복합체의 측정을 행했다.

[0123] (1) ELISA법에 의한 혜모글로빈-합토글로빈 복합체의 측정

[0124] 항인간 합토글로빈 모노클로날 항체를 96웰 마이크로플레이트에 고상화해서 고상화 플레이트로 하고, 항인간 혜모글로빈 폴리클로날 항체에 호스래디시 폐록시다아제를 표지화해서 효소 표지물로 했다.

[0125] 96웰 마이크로플레이트에 50mM 인산 완충액(pH 7.2) 100  $\mu$ L와 표준액 또는 검체 10  $\mu$ L를 가하고, 5분간 교반한 후에, 25°C에서 120분간 정치했다. 정치 후, 계면활성제 함유 50mM 인산 완충액(pH 7.5)을 이용하여 3회 세정 했다.

[0126] 세정 후, 96웰 마이크로플레이트에 효소 표지물 100  $\mu$ L를 가하고, 5분간 교반한 후에, 25°C에서 55분간 정치했다. 정치 후, 계면활성제 함유 50mM 인산 완충액(pH 7.5)을 이용하여 3회 세정했다.

[0127] 세정 후, 96웰 마이크로플레이트에 0.4mg/mL o-페닐렌다이아민 함유 기질 용해액 100  $\mu$ L를 가하고, 25°C에서 15분간 정치했다. 정치 후, 2N 황산을 반응 정지액으로서 100  $\mu$ L 침가했다.

[0128] 측정은 선라이즈 레인보우(테칸재팬사)를 이용하여 측정 파장 492/650nm에서 행하고, 표준의 측정 결과로부터 얻어진 검량선을 토대로 검체의 측정값을 구했다.

[0129] (2) 라텍스 응집법에 의한 혜모글로빈-합토글로빈 복합체의 측정

[0130] R1로서 50mM HEPES 완충액(pH 7.4)을 이용하고, R2로서 실시예 3의 모노클로날 항체 고정화 라텍스 용액을 이용했다.

[0131] 측정은 JCA-BM2250(니혼전자사)을 이용하여 행했다. 측정 방법은, 표준액 또는 검체 8  $\mu$ L를 반응 셀에 가한 후에 R1을 50  $\mu$ L 가하고, 그 후 R2를 16.7  $\mu$ L 가한 후의 471초간의 파장 658nm에서의 탁도 변화량을 측정하고, 표준의 측정 결과로부터 얻어진 검량선을 토대로 검체의 측정값을 구했다.

[0132] (3) 측정 결과

- [0133] 5검체를 ELISA 및 라텍스 응집법으로 측정한 결과를 표 6에, 측정간의 상관도를 도 1에 나타낸다.
- [0134] 라텍스 응집법에 의한 검체의 측정 결과는 ELISA에 의한 검체의 측정 결과와 동등하고, 상관계수는 0.998로 양호했다. 한편, 도 1의 수치 1은 헤모글로빈으로서의 농도가 12.9pmol/mL를 나타내고 있다.

## 표 6

검체	ELISA법	라텍스 응집법
A	0. 09	0. 12
B	0. 28	0. 31
C	0. 48	0. 49
D	0. 67	0. 72
E	0. 89	0. 91

[0135]

- [0136] 이들 결과로부터, 본 발명을 이용하는 것에 의해, 검체 중의 헤모글로빈-합토글로빈 복합체를 정확하게 측정하는 것이 가능해져, 병의 진단에 기여한다는 것을 알 수 있었다.

### 산업상 이용가능성

- [0137] 본 발명은, 불용성 담체 입자에 고정화하는 것에 의해 헤모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출, 측정할 수 있는 모노클로날 항체 또는 항체 키트, 그 모노클로날 항체 고정화 불용성 담체 입자, 및 이를 이용하여 검체 중의 헤모글로빈-합토글로빈 복합체를 특이적으로 검출, 측정하기 위한 측정 시약 및 측정 방법을 제공하는 것이다. 이 발명을 분변 검체에 적용하는 것에 의해, 소화기관에서의 출혈의 유무를 단시간에 정밀도 좋게 조사하는 것이 가능해진다.

### 도면

#### 도면1

