

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁷ G01N 33/54	(45) 공고일자 2001년03월02일
(21) 출원번호 10-1993-0010394	(11) 등록번호 10-0257985
(22) 출원일자 1993년06월09일	(24) 등록일자 2000년03월07일
(30) 우선권주장 92-177444 1992년06월10일 일본(JP) 92-181708 1992년06월16일 일본(JP)	(65) 공개번호 특 1994-0005957 (43) 공개일자 1994년03월22일
(73) 특허권자 후지레이비오 가부시끼가이사 일본국, 도쿄, 츠-구, 니혼바시-하마쵸 2-쵸메, 62-5 (72) 발명자 스기야마마사미 일본국도쿄도하찌오지시구보야마초2쵸메46-2-1-306 우찌다요시아끼 일본국도쿄도하찌오지시마쓰가야32-1-107 구라노요시히로 일본국도쿄도아끼가와시노베64-7 다나까아이코 일본국도쿄도세따가야꾸지또세다이2쵸메8-5 다니모도데쓰지 일본국도쿄도스기나미꾸아사가야끼따6쵸메7-6-202 (74) 대리인 주성민	

심사관 : 퇴-김호석

(54) 항-글리코헤모글로빈단일클론항체및글리코헤모글로빈의측정방법

요약

본 발명은 시료를 고체 상에 결합되어 있는 항-헤모글로빈 항체와 접촉시키고, 거기에 항-글리코헤모글로빈 항체를 첨가한 후, 글리코헤모글로빈을 통해 고체 상에 결합된 항-글리코헤모글로빈 항체 및 항-헤모글로빈 항체를 측정하는 것으로 이루어지는 글리코헤모글로빈의 측정 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 시료를 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 면역 응집 반응을 야기시키는 입자와 혼합한 후, 면역응집 반응에 의해 형성된 응집물을 측정하는 것으로 이루어지는 글리코헤모글로빈의 측정 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 시료를 글리코헤모글로빈에 특이적인 단일클론 항체를 함유한 용액과 혼합한 후에 얻은 혼합물의 탁도 변화를 측정하는 것으로 이루어지는 글리코헤모글로빈의 측정 방법에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 시료를 비감작 라텍스 입자 및 항-글리코헤모글로빈 항체와 혼합하거나, 또는 비감작 라텍스 입자와 혼합하고 이어서 항-글리코헤모글로빈 항체와 혼합하여 면역응집 반응을 야기시킨 다음, 면역응집 반응에 의해 형성된 응집물을 측정하는 것으로 이루어지는 글리코헤모글로빈의 측정 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 시료를 비감작 라텍스 입자 및 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 입자들과 혼합하거나, 또는 비감작 라텍스 입자와 혼합하고 이어서 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 입자와 혼합하여 면역응집 반응을 야기시킨 다음, 면역응집 반응에 의해 형성된 응집물을 측정하는 것으로 이루어지는 글리코헤모글로빈의 측정 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 인간 글리코헤모글로빈에 대해 고도의 특이성을 갖는 항-글리코헤모글로빈 단일클론 항체에 관한 것이다.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

항-글리코헤모글로빈 단일클론 항체 및 글리코헤모글로빈의 측정 방법

[도면의 간단한 설명]

제1도는 다양한 농도의 인간 글리코헤모글로빈을 함유하는 시료를 측정할 때 실시예 1에서 제조된 항-인간 글리코헤모글로빈 단일클론 항체 및 시판되는 항-인간 글리코헤모글로빈 항체[케미콘 인터내셔널 인크.(Chemicon International Inc., 미합중국 소재) 제품]의 효과를 나타내는 그래프.

제2도는 실시예 1에서 제조된 항-글리코헤모글로빈 단일클론 항체의 글리코헤모글로빈에 대한 특이성을 나타내는 그래프.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 글리코헤모글로빈(glycated hemoglobin)의 측정 방법에 관한 것이다.

당뇨병 환자의 경우에는 혈액내 글리코헤모글로빈(A_{1c})의 농도가 증가한다는 것이 공지되어 있으므로, 글리코헤모글로빈의 농도를 혈당 농도와 함께 측정하는 것은 당뇨병의 진단과 질병의 진전을 조사하는데 유용하다.

선행 기술의 방법에 있어서, 글리코헤모글로빈의 측정은 시료(적혈구 주출물)중의 글리코헤모글로빈을 고체상에 직접 결합시키고, 고체 상을 세척하고, 결합된 헤모글로빈을 표지된 항-글리코헤모글로빈 항체와 반응시키고, 고체 상을 다시 세척한 후, 표지된 수준을 측정함으로써 수행된다. 그러나, 이 방법은 각 시료 중의 글리코헤모글로빈을 고체 상에 직접 결합시키기 위한 시간이 소모되는 예비처리(예를 들면, 4°C에서의 철야 반응)를 필요로 하므로, 다수의 시료를 신속히 측정할 수 없다.

그러므로, 상술된 바에 비추어 볼 때 본 발명의 목적은 글리코헤모글로빈을 간단하고 신속하게 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 발명자들은 집중적인 연구를 수행한 결과, 미리 고체 상에 결합된 항-헤모글로빈 항체를 시료와 반응시키고, 이어서 반응 생성물을 항-글리코헤모글로빈 항체와 반응시킬 경우에, 선행 방법과 관련된 시간-소모성 단계, 즉 각 시료중의 글리코헤모글로빈을 고체 상에 직접 결합시키는 단계가 제거되어, 글리코헤모글로빈을 신속하게 측정할 수 있다는 것을 발견하였다. 본 발명은 이러한 발견에 기초하여 달성되었다.

특히, 본 발명에 따르면, 시료를 고체 상에 결합되어 있는 항-헤모글로빈 항체와 접촉시키고, 거기에 항-글리코헤모글로빈 항체를 첨가한 후, 글리코헤모글로빈을 통해 고체 상에 결합된 항-글리코헤모글로빈 항체 및 항-헤모글로빈 항체를 측정하는 것으로 이루어지는 글리코헤모글로빈의 측정 방법이 제공된다(이 실시태양을 본 발명에 따른 "제1 실시태양"이라고 칭한다).

또한, 본 발명자는 항-헤모글로빈 항체를 입자에 결합시키고, 입자를 시료와 혼합하여 응집물을 형성시킨 후, 응집물에 기초하여 글리코헤모글로빈을 측정함으로써 글리코헤모글로빈을 측정할 수 있다는 것을 발견하였다.

다시 말해서, 본 발명에 따라 시료를 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 면역 응집 반응을 야기시키는 입자와 혼합한 후, 면역응집 반응에 의해 형성된 응집물을 측정하는 것을 포함하는 글리코헤모글로빈의 측정 방법이 제공된다(이 실시태양을 본 발명에 따른 "제2 실시태양"이라고 칭한다).

또한, 본 발명자는 인간 글리코헤모글로빈에 대해 특이적인 단일클론 항체를 함유하는 용액을 시료와 혼합한 후에 얻어진 혼합물의 탁도 변화에 기초하여 글리코헤모글로빈을 측정할 수 있다는 것을 발견하였다.

다시 말해서, 본 발명에 따라 시료를 글리코헤모글로빈에 특이적인 단일 클론 항체를 함유한 용액과 혼합한 후에 얻어진 혼합물의 탁도 변화를 측정하는 것을 포함하는 글리코헤모글로빈의 측정 방법이 제공된다(이 실시태양을 본 발명에 따른 "제3 실시태양"이라고 칭한다).

본 발명의 발명자는 계속해서 집중적인 연구를 수행한 결과, 시료를 비감작 라텍스 입자 및 항-글리코헤모글로빈 항체와 혼합하거나 또는 비감작 라텍스 입자와 혼합한 후 항-글리코헤모글로빈 항체와 혼합할 때, 선행 기술과 관련된 시간-소모성 단계가 제거되어, 글리코헤모글로빈을 신속하게 측정할 수 있다는 것을 발견하였다.

다시 말해서, 본 발명에 따라 시료를 비감작 라텍스 입자 및 항-글리코헤모글로빈 항체와 혼합하거나, 또는 비감작 라텍스 입자와 혼합하고 이어서 항-글리코헤모글로빈 항체와 혼합하여 면역응집 반응을 야기시킨 다음, 면역응집 반응에 의해 형성된 응집물을 측정하는 것을 포함하는 글리코헤모글로빈의 측정 방법이 또한 제공된다(이 실시태양을 본 발명에 따른 "제4 실시태양"이라고 칭한다).

또한, 본 발명자는 시료를 비감작 라텍스 입자 및 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 입자와 혼합하거나 또는 비감작 라텍스 입자와 혼합하고 이어서 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 입자들과 혼합하여 응집물을 형성시킨 후 이 응집물을 측정함으로써 글리코헤모글로빈을 측정할 수 있다는 것을 발견하였다.

다시 말해서, 본 발명에 따라 시료를 비감작 라텍스 입자 및 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 입자들과 혼합하거나, 또는 비감작 라텍스 입자와 혼합하고 이어서 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 입자와 혼합한 후, 면역응집 반응에 의해 형성된 응집물을 측정하는 것을 포함하는 글리코헤모글로빈 측정방법이 또한 제공된다 (이 실시태양을 본 발명에 따른 "제4 실시태양"이라고 칭한다).

또한, 본 발명에 따라 글리코헤모글로빈에 대해 고도의 특이성을 갖는 항-글리코헤모글로빈 단일클론 항체가 제공된다.

본 발명의 또 다른 목적 및 장점은 하기 상세한 설명의 방법으로 명백해질 것이다.

이하에 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

본 발명의 제1 실시태양에 따르면, 글리코헤모글로빈을 함유하거나 함유하지 않는 시료를 고체 상에 결합되어 있는 항-헤모글로빈 항체와 접촉시켜 글리코헤모글로빈을 항-헤모글로빈 항체와 반응시키고, 거기에 항-글리코헤모글로빈 항체를 첨가하여 항-글리코헤모글로빈 항체를 글리코헤모글로빈과 반응시킨 후, 글리코헤모글로빈 및 항-헤모글로빈 항체를 통해 고체 상에 결합되어 있는 항-글리코헤모글로빈 항체를 측정하는 것을 포함하는 글리코헤모글로빈의 측정 방법이 제공된다.

본 발명의 제1 실시태양에 따르면, 항-헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 다량의 고체 상 물질을 미리 제조하는 경우에, 시료와 고체 상에 결합되어 있는 항-헤모글로빈 항체가 항원-항체 반응하도록 해줌으로써, 각 측정시에 시료내 글리코헤모글로빈이 항-헤모글로빈 항체를 통해 고체 상에 결합될 수 있다. 이 방법은 글리코헤모글로빈을 고체 상에 직접 결합시키는 선행 기술의 방법과 비교할 때, 1/10 배 이하의 상당히 단축된 시간내에 완결될 수 있다.

본 발명의 제2 실시태양에 따르면, 글리코헤모글로빈을 함유하거나 함유하지 않는 시료를 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 입자들과 혼합하여 글리코헤모글로빈과 항-헤모글로빈 항체의 면역응집 반응을 야기시킨 후, 면역응집 반응에 의해 형성된 응집물에 기초하여 글리코헤모글로빈을 측정하는 것을 포함하는 글리코헤모글로빈의 측정 방법이 제공된다.

본 발명에 따른 제3 실시태양에 따르면, 인간 글리코헤모글로빈에 특이적인 단일클론 항체를 함유하는 용액을 인간 글리코헤모글로빈을 함유하거나 함유하지 않는 시료와 혼합한 후에 얻어진 혼합물의 탁도 변화에 기초하여 글리코헤모글로빈을 측정하는 것을 포함하는 글리코헤모글로빈의 측정방법이 제공된다.

본 발명의 제2 및 제3 실시태양에 따른 방법은 입자의 응집도 및 혼합물의 탁도 변화를 각각 글리코헤모글로빈을 검출하기 위한 수단으로서 사용하는 것이며, 선행 기술의 방법과 비교하여 현저히 단축된 기간내에 글리코헤모글로빈을 측정할 수 있다.

본 발명의 제4 실시태양에 따르면, 글리코헤모글로빈을 함유하거나 함유하지 않는 시료를 비감작 라텍스 입자 및 항-글리코헤모글로빈 항체와 혼합하거나 또는 비감작 라텍스 입자와 혼합하고 이어서 항-글리코헤모글로빈 항체와 혼합하여, 항-글리코헤모글로빈 항체를 비감작 라텍스 입자에 결합되어 있는 글리코헤모글로빈과 면역응집 반응을 야기시킨 다음, 면역응집 반응에 의해 형성된 응집물에 기초하여 글리코헤모글로빈을 측정하는 것을 포함하는 글리코헤모글로빈의 측정 방법이 제공된다.

본 발명의 제4 실시태양에 따르면, 시료 중의 글리코헤모글로빈을 비감작 라텍스 입자에 용이하게 결합하며, 따라서 비감작 라텍스 입자에 결합되어 있는 글리코헤모글로빈을 항-글리코헤모글로빈 항체와 간단히 반응시킴으로써 응집 반응을 수행할 수 있다. 이로 인해 비감작 라텍스 입자에 시료 중의 글리코헤모글로빈의 결합, 항-글리코헤모글로빈 항체와의 항원-항체 반응 및 연속적인 응집반응은 매회 측정시에 시료를 항-글리코헤모글로빈 항체와 비감작 라텍스 입자와 간단히 혼합함으로써 수행할 수 있다. 이 방법은 헤모글로빈이 고체 상에 직접 결합되는 선행 기술 방법과 비교하여, 1/10 내지 1/100 만큼 상당히 단축된 기간내에 완료할 수 있다.

본 발명의 제5 실시태양에 따르면, 글리코헤모글로빈을 함유하거나, 함유하지 않는 시료를 비감작 라텍스 입자 및 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 입자와 혼합하거나, 또는 비감작 라텍스 입자와 혼합하고 이어서 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 입자와 혼합하여, 면역응집 반응을 야기시킨 다음, 면역응집 반응에 의해 형성된 응집물에 기초하여 글리코헤모글로빈을 측정하는 것을 포함하는, 글리코헤모글로빈의 측정 방법이 제공된다.

본 발명의 제5 실시태양에 따른 방법에 의해서도 선행 기술 방법과 비교하여 현저히 단축된 시간내에 글리코헤모글로빈을 측정할 수 있다.

본 발명의 제1 실시태양에 사용되는 고체 상은 종래 기술의 면역 분석에 사용되는 임의의 것일 수 있다. 예를 들면, 플라스틱 플레이트 웰을 사용하는 것이 바람직하다.

항-헤모글로빈 항체는 당 분야에 주지되어 있으며, 다가클론 항체 또는 단일클론 항체일 수 있다. 고체상에 대한 항-헤모글로빈 항체의 결합은 고체 상에 약 1 μ g/ml 농도의 항체 용액을 첨가하고, 얻어진 고체상을 4°C에서 철야 방치함으로써 수행할 수 있다. 결합 처리 후에, BSA(우 태아 혈청)와 같은 단백질을 사용한 블로킹을 통상의 방법으로 수행하여 비특이적 단백질 부착 부위를 차단시킨다. 인간 글리코헤모글로빈을 측정하는 경우에는 항 인간 헤모글로빈 항체를 고체 상에 결합시키는 것이 바람직하다.

그 다음은, 이렇게 고체 상에 결합된 항-헤모글로빈 항체를 시료와 접촉시켜 시료 중의 글리코헤모글로빈을 항원-항체 반응에 의해 고체상 결합된 항-헤모글로빈 항체를 통해 고체 상에 결합시킬 수 있다. 시료는 적혈구 추출물 또는 혈액 전체일 수 있다. 항원-항체 반응은 예를 들면 실온에서 약 2시간 동안 수행할 수 있다.

세척 후에, 항-헤모글로빈 항체를 통해 고체 상에 결합된 글리코헤모글로빈은 항-글리코헤모글로빈 항체와의 항원-항체 반응을 진행 할 수 있다. 항-글리코헤모글로빈 항체는 다가클론 항체 또는 단일클론 항체일 수 있지만, 높은 측정 정확성의 관점에서 볼 때 단일클론 항체가 바람직하다. 본 발명자들은 글리코헤모글로빈과는 특이적인 반응을 할 수 있지만 정상 헤모글로빈과는 실질적으로 반응을 하지 않는 단일클론 항체(단일클론 항체 3F10; 일본국 이바라기젠크 쓰꾸바시 히가시 1쪽에 1방 3고 (우편번호 305)에 소재하는 통상산업성 공업기술원 생명공학 공업기술연구소에 1002년 6월 10일자로 수탁번호 FERM P-12998(부다페스트 조약하에 FERM BP-4311)로 기탁되어 있는, 단일클론 항체 3F10을 생산할 수 있는 하이브리도마)를 이하 실시예에서 보다 상세히 설명되는 방법에 따라 생산하는데 성공하였다. 이 단일클론 항체를 본 발명의 방법에 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이 경우에 항원-항체 반응은 상술된 바와 동일한 조건하에 수행할 수 있다.

연속해서 세척한 후에 항-헤모글로빈 항체 및 글리코헤모글로빈을 통해 고체상에 결합되어 있는 항-글리코헤모글로빈 항체를 면역 분석 분야에 공지된 다양한 선행 기술의 기법에 따라 측정한다. 예를 들면, 측정은 항-글리코헤모글로빈 항체를 효소, 형광염료, 방사성 물질 등으로 표지시킨 후 표지를 측정함으로써 수행할 수 있다. 또한 비오틴을 항-글리코헤모글로빈 항체에 결합시키고, 결합된 비오틴을 표지된 아비딘과 반응시킨 다음, 표지를 측정함으로써 수행할 수 있다. 또한 항-글리코헤모글로빈 항체를 항-글리코헤모글로빈 항체와 특이적인 반응을 진행할 수 있는 표지된 항체와 반응시키고 표지를 측정함으로써 수행할 수 있다.

본 발명의 제2 실시태양에 따른 방법 및 본 발명에 따른 제5 실시태양에 따른 방법에 사용되는 입자의 바람직한 예로는 0.05 내지 5 μ m의 입도를 갖는 라텍스 입자, 0.5 내지 10 μ m의 입도를 갖는 젤라틴 입자

및 동물 적혈구가 포함된다.

라텍스의 구체적인 예로는 스티렌 중합체, 스티렌-아크릴산 공중합체, 스티렌-부타디엔 공중합체, 스티렌-디비닐벤젠 공중합체가 포함된다. 젤라틴 입자의 구체적인 예로는 본 명세서에 참고로 인용되어 있는 미합중국 특허 제4,416,813호에 기재되어 있는 것이 포함된다. 동물 적혈구의 구체적인 예로는 가금, 오리, 염소, 양, 소 및 말과 같은 동물 유래의 것이 포함된다.

항체를 입자에 결합시키는 방법은 당분야에 공지되어 있으며, 하기 실시예에 설명되는 바와 같이, 예를 들면 입자를 항체 용액 중에 분산시킴으로써 용이하게 수행할 수 있다.

본 발명의 제2 실시태양에 있어서, 항-글리코헤모글로빈 항체를 단일 항체원으로서 입자에 결합시킬 수 있지만, 항-헤모글로빈 항체와 조합하여 항원과의 항원항체 반응에 의해 강한 응집물의 얻는 것이 바람직하다. 이러한 경우에는, 항-글리코헤모글로빈 항체 및 항-헤모글로빈 항체가 입자에 약 1:1의 몰비로 결합되는 것이 바람직하다. 이에 관해서는, 헤모글로빈 단독으로는 응집을 일으키지 않는 항-헤모글로빈 항체를 선택하여 사용할 필요가 있다.

항-글리코헤모글로빈 항체만이 입자에 결합되는 경우에, 시료를 예를 들면 블랙 슬라이드 유리 상의 입자와 혼합한 다음 응집 입자 및 침전 입자가 존재하는 것을 관찰함으로써 시료 중의 글리코헤모글로빈을 검출할 수 있다. 또한, 글리코헤모글로빈은 흡광도 측정으로 정량적으로 측정될 수 있다. 항-글리코헤모글로빈 항체 및 항-헤모글로빈 항체를 모두 입자에 결합시키는 경우에, 시료가 글리코헤모글로빈을 함유한다면 강한 응집물 상이 형성되어서, 응집물 상을 육안으로 관찰함으로써 시료 중의 글리코헤모글로빈을 검출할 수 있다.

또한, 본 발명의 제2 실시태양에 있어서, 하기 실시예에 상세히 설명된 바와 같이, 고감작성 단일클론 항체 3F10을 항-글리코헤모글로빈 항체로서 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 제3 실시태양에 따른 방법에 있어서, 인간 글리코헤모글로빈에 특이적인 단일클론 항체를 함유하는 용액을 시료와 혼합한다. 시료가 글리코헤모글로빈을 함유하는 경우에 혼합물의 탁도가 증가하므로, 혼합물의 탁도 변화를 측정함으로써 시료 중의 글리코헤모글로빈을 측정할 수 있다. 또한, 이 경우에, 하기 실시예에 상세히 기재되어 있는 바와 같이, 고감수성 단일클론 항체 3F10을 인간 글리코헤모글로빈에 특이적인 단일클론 항체로서 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 제4 및 제5 실시태양에 따른 방법에 사용되는 비감작 라텍스 입자로서 상술된 것을 포함하는 임의의 시판되는 라텍스 입자를 자체로 사용하거나 또는 바람직하게는 트리스-숙신산, 포스페이트 또는 아세테이트 완충액으로 여러차례 세척한 후에 사용할 수 있다.

본 발명의 제5 실시태양에 따른 방법에서 항-글리코헤모글로빈 항체를 입자에 결합시키는 것은 일반적으로 물리적 흡착법에 의해 수행할 수 있다. 다시 말해서, 입자를 1 내지 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석된 항체와 혼합하여 0.1 내지 10%(w/v)의 입자 농도를 제공하고, 혼합물을 4°C 내지 실온의 온도에서 교반한다. 원심분리에 의해 완전히 세척한 후에 얻어진 생성물을 사용하기 전까지 1 중량% BSA 용액중에 저장한다.

본 발명의 방법에 사용되는 비감작 라텍스 입자는 0.05 내지 5 μm , 바람직하게는 0.1 내지 2 μm 의 입도를 갖고 통상적으로 사용되는 완충 용액 중에 분산시킴으로써 사용한다.

비감작 라텍스 입자, 시료 및 항-글리코헤모글로빈 항체를 4°C 내지 40°C의 온도에서 혼합하고, 혼합한 직후에 응집물이 형성된다.

시료를 항-글리코헤모글로빈 항체 및 예를 들면, 블랙 슬라이드 유리 상의 입자와 혼합한 후, 응집 입자 및 침전 입자의 존재를 관찰함으로써, 시료 중의 글리코헤모글로빈을 검출할 수 있다. 글리코헤모글로빈은 흡광도 측정에 의해 정량적으로 측정될 수 있다. 이 경우에, 입자는 작은 입도를 갖는 것이 바람직하지만, 흡광도 변화는 블랭크가 제거될 수 있다면, 약 1 μm 의 입도를 갖는 입자에서도 측정할 수 있다. 게다가, 시료중의 글리코헤모글로빈은 비감작 라텍스 입자 및 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 라텍스 입자를 사용함으로써 보다 신속하고 보다 정확하게 검출될 수 있다.

라텍스 입자의 응집은 다음과 같은 방법에 의해 확인될 수 있다. 0.05 내지 5 μm 의 큰 입도를 갖는 라텍스 입자를 사용하는 경우에, 응집을 육안으로 관찰할 수 있다. 0.05 내지 1.0 μm 의 보다 작은 입도를 갖는 라텍스 입자를 사용하는 경우, 응집은 400 내지 800 nm 파장의 산란광을 분광분석적으로 측정하거나 적외선을 사용함으로써 확인될 수 있다. 이러한 방식으로 시료 중의 글리코헤모글로빈을 검출할 수 있다. 또한, 이 경우에는 하기 실시예에 기재된 고감수성 단일클론 항체 3F10을 인간 글리코헤모글로빈에 특이적인 단일클론 항체로서 사용하는 것이 바람직하다.

하기 실시예는 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나, 실시예는 설명을 목적으로 한 것으로서 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아님을 이해해야 한다.

[실시예 1]

(1) 글리코헤모글로빈에 특이적인 단일클론 항체의 제조:

글리코헤모글로빈을 프로인트 완전 보조제중에 완전히 분산시키고, 생쥐 Balb/c 주를 100 μl 의 혼탁액을 사용하여 2주 간격으로 4회 면역화시켰다. 각각의 면역화된 생쥐로부터 비장을 절제하여 10^6 비장 세포를 얻고, 이어서 PEG 존재하에 생쥐 골수종 세포와 융합시켰다. 융합된 세포를 배양한 후에 얻어진 배양 상징액에 대해 ELISA법에 의해 항-인간 글리코헤모글로빈 항체의 존재를 조사하였다. 그 후, 항체에 대해 양성인 세포를 한정 희석법으로 조사하여 항-인간 글리코헤모글로빈 항체 생산 세포를 단리하였다.

이렇게 얻어진 세포를 항-인간 글리코헤모글로빈 생쥐 단일클론 항체 생산 세포(하이브리도마 세포)로서 사용하고, 대규모로 배양하고, 배양 세포를 복강내 주입으로 생쥐에게 투여하였다. 투여한 지 2주 후에 3월 간격으로 복수를 수거하여 목적하는 항-인간 글리코헤모글로빈 단일클론 항체를 얻었다. 이렇게 얻은 항-인간 글리코헤모글로빈 단일클론 항체를 3F10으로 명명하고, 일본국의 통상산업성공업기술원생명공학

공업기술연구소에 수탁번호 FERM P-12998(부다페스트 조약하에 FERM BP-4311)로 단일클론 항체 3F10을 생산할 수 있는 하이브리도마를 기탁하였다.

단일클론 항체 3F10의 IgG임을 확인하였다.

(1) ELISA 법에 의한 인간 글리코헤모글로빈의 측정

항-인간 헤모글로빈 항체(토끼 항체)의 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 용액을 ELISA 용 96 웰 플레이트(Nunc 제품) 웰에 $50 \mu\text{l}$ 씩 분배하고, 4°C 에서 첼아 방치하였다. 그 결과의 플레이트를 2 중량% BSA 및 0.02 중량 Tween 20을 함유하는 인산염 완충 생리식염수로 5회 세척한 다음, 동일 완충액을 $200 \mu\text{l}$ 씩 분배시킨 후 4°C 에서 저장하였다. 상징액을 제거한 후, 글리코헤모글로빈을 함유하는 시료 $150 \mu\text{l}$ 를 플레이트의 각 웰에 적가하고, 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 이어서, 이렇게 처리된 플레이트를 0.02 중량 Tween 20을 함유하는 생리식염수로 4회 세척하였다.

다음은, 퍼옥시다제-표지된 항-인간 글리코헤모글로빈 특이성 생쥐 단일클론항체 용액($500 \text{ ng}/\text{ml}$)을 상기 플레이트의 웰에 $150 \mu\text{l}$ 씩 분배하고, 실온에서 2시간 동안 방치하였다. 플레이트를 0.02 중량% Tween 20을 함유하는 생리식염수로 4회 세척한 후 세척한 플레이트의 웰에 0.1 중량% ABTS (2,2'-아조비스(3-에틸벤조티아졸린-6-슬픈산))을 함유하는 $0.05 \text{ 중량% } \text{H}_2\text{O}_2$ 용액을 $200 \mu\text{l}$ 씩 분배하고, 실온에서 30분간 방치시켜 색상을 전개시켰다. 그 후, 전개된 색상을 415 nm 및 492 nm 에서의 흡광도를 측정함으로써 비색적으로 측정하였다. 결과를 표 1에 나타내었다.

[표 1]

총 헤모글로빈에 대한 글리코헤모글로빈의 비율(%)	492 nm에서의 흡광도에 대한 415 nm 에서의 흡광도의 비율
0	0.06
1	0.10
3	0.18
6	0.29
9	0.47
12	0.61
15	0.80
18	1.00

[실시예 2 및 비교예 1]

실시예 1에서 제조된 항-인간 글리코헤모글로빈 단일클론 항체 및 시판되는 항-인간 글리코헤모글로빈 단일클론 항체를 사용하여, 다양한 양의 시료 중에 함유된 인간 글리코헤모글로빈을 하기 방법으로 정량적으로 측정하였다.

실시예 1에서 제조된 항-인간 글리코헤모글로빈 단일클론 항체 및 시판된 항-인간 글리코헤모글로빈 단일클론 항체 [케미콘 인터내셔널 임크.(Chemicon International Inc., 미합중국 소재)]를 96 웰マイ크로플레이트상에서 감작시켰다. 얻어진マイ크로플레이트에 첨가량(농도)을 달리하면서 퍼옥시다제(POD)-표지된 글리코헤모글로빈 항원을 첨가하였다. 실온에서 2시간 동안 면역 반응을 수행한 후에 플레이트를 PBS-Tween으로 세척하였다. 그 후, 이렇게 처리한 플레이트의 웰에 ABTS/ H_2O_2 (기질)를 $100 \mu\text{l}$ 씩 분배시키고, 반응을 실온에서 1시간 동안 수행하였다. 반응 종료 용액 $50 \mu\text{l}$ 를 첨가한 후, 415 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 제1도에 나타내었다.

제1도로부터 명백하듯이, 시판되는 항-인간 글리코헤모글로빈 항체는 항원의 증가량에 거의 반응하지 않는 한편 (비교예 1), 실시예 1에서 제조된 항-인간 글리코헤모글로빈 단일클론 항체를 사용하는 경우 흡광도는 항원량에 비례하여 증가하였다(실시예 2). 결론적으로, 글리코헤모글로빈은 실시예 1에서 제조된 항-인간 글리코헤모글로빈 단일클론 항체를 사용함으로써 광범위한 농도에 걸쳐 측정될 수 있다는 사실을 확인하였다.

[실시예 3]

$0.254 \mu\text{m}$ 의 비감자 플라스틱 라텍스 입자(니ਊ 고오세이 고무 가부시끼가이샤 제품) 0.025% 를 함유하는 트리스-숙신산 완충액($\text{pH } 5.5$) 2 ml 을 37°C 의 온도로 조절된 셀에 첨가하였다. 거기에, 이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제된 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 헤모글로빈을 함유하는 항원 용액을 첨가하고, 얻어진 혼합물을 37°C 에서 2시간 동안 방치하였다.

°C에서 5분간 교반하였다. 교반을 완결한 후에, 실시예 1에서 제조된 항-글리코헤모글로빈 단일클론 항체 8mg/ml를 함유하는 항체 용액 2μl을 첨가하여 항체의 최종 농도를 8mg/ml로 하였다. 그 직후, 시간의 경과에 따른 흡광도의 변화를 히다찌 220 분광광도계에 의해 750 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 관찰하였다. 흡광도를 측정하는 동안에, 시판되는 항-인간 헤모글로빈 항체(케미콘 인터내쇼날 잉크.(미합중국 소재) 제품)를 셀에 추가로 첨가하여 앞서 첨가된 항체의 농도(8 μg/ml)와 동일한 최종농도를 제공하였다.

시간의 경과에 따른 흡광도의 변화를 관찰하기 위하여, 헤모글로빈 대신에 글리코헤모글로빈을 사용하고, 항-글리코헤모글로빈 단일클론 항체를 항-헤모글로빈 항체 대신에 사용하고, 항-헤모글로빈 항체를 항-글리코헤모글로빈 단일클론 항체 대신에 사용한 것을 제외하고는 동일한 절차를 반복하였다.

그 결과를 제2도에 나타내었다.

제2도에 나타낸 결과와 같이, 실시예 1에서 제조된 항-글리코헤모글로빈 단일클론 항체(항-A_{1c})는 헤모글로빈-결합된 라텍스 입자(A₀-결합된 라텍스)와 실질적으로 반응하지 않지만, 항-헤모글로빈 항체(항-A₀)가 첨가되는 경우, 응집 반응이 시작됨으로서 흡광도가 증가하였다. 한편, 글리코헤모글로빈-결합된 라텍스 입자(A_{1c}-결합된 라텍스)를 사용하는 경우, 항-글리코헤모글로빈 단일클론 항체 및 항-인간 헤모글로빈 항체는 동일한 반응성을 나타냈다.

따라서, 실시예 1에서 제조된 항-글리코헤모글로빈 단일클론 항체가 글리코헤모글로빈에 대해 우수한 특이성을 갖는다는 것을 확인하였다.

[실시예 4]

항-글리코헤모글로빈 생쥐 단일클론 항체-결합된 라텍스 입자의 제조:

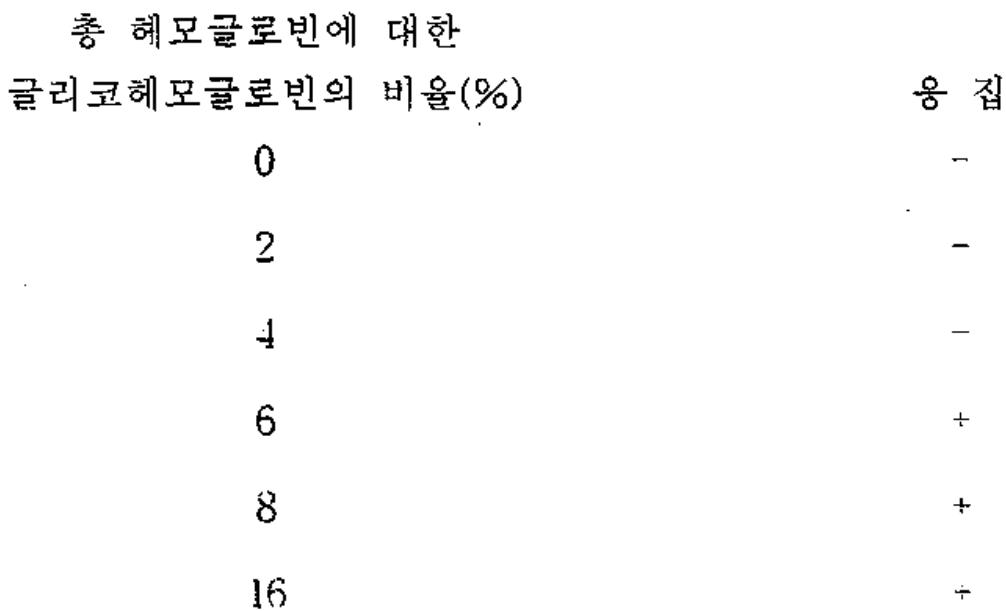
실시예 3에서 사용된 것과 동일한 0.254 μm 입도의 10 % w/v 라텍스 입자를 함유하는 용액 100 μl를 실시예 1에서 얻어진 40 μg/ml의 항-인간 글리코헤모글로빈 단일클론 항체 3F10을 함유하는 20 mM 아세테이트 완충액(pH 6.0) 900 μl에 첨가하였다. 혼합물을 전도형 믹서를 사용하여 교반한 후, 항체-결합된 라텍스 입자를 원심분리(5,000 g x 15분)에 의해 회수하고, 생리식염수로 4회 세척한 다음, 1 종량% BSA를 함유하는 20 mM 아세테이트 완충액(pH 5.0) 중에 혼탁시켜 0.5 종량%농도를 만든 후 저장하였다.

[실시예 5]

라텍스 응집에 의한 인간 글리코헤모글로빈의 측정

인간 적혈구 추출물(pH 5.0) 5 μl를 블랙 슬라이드 유리상에서 실시예 3에서 제조된 라텍스 혼탁액 50 μl와 혼합하고, 혼합물을 수차례 서서히 흔들어 주었다. 1분후에, 결과의 응집물이 존재하는지를 육안으로 관찰하였다. 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[표 2]



[실시예 6]

라텍스 응집에 의한 흡광도 변화의 측정

실시예 3에서와 동일한 방법으로 제조된 0.254 μm의 입도를 갖는 항-글리코헤모글로빈 생쥐 단일클론 항체 3F10-결합된 라텍스 입자의 0.025 종량% 혼탁액 2ml를 셀중에서 각각 5 μl의 3가지 용혈성 시료(시료 A, B 및 C)와 혼합하고, 750nm 파장에서의 주기적인 흡광도 변화를 조사하였다. 측정 결과를 표 3에 나타내었다.

[표 3]

시간(초)	흡광도		
	시료 A	시료 B	시료 C
0	0.700	0.711	0.731
30	0.721	0.762	0.842
60	0.740	0.812	0.955
90	0.760	0.863	1.051
120	0.770	0.912	-

[실시예 7]

0.254 μm의 입도를 갖는 0.025 중량%의 비감작 폴리스티렌 라텍스 입자를 함유하는 용액 2 ml를 용혈성 시료 5 μl와 혼합하였다. 5분간 혼합한 후, 혼합물에 실시예 1에서 얻은 항-글리코헤모글로빈 생쥐 단일 클론 항체 3F10 50 μg을 첨가하고, 그 즉시 하다찌 220 분광도계에 적용시켜 37°C 교반하에 750 nm 파장에서의 흡광도 변화를 측정하였다. 5가지 시료를 측정한 결과를 표 4에서 나타내었다.

[표 4]

시간(초)	750 nm에서의 흡광도 변화				
	시료 D	시료 E	시료 F	시료 G	시료 H
0	0.721	0.741	0.736	0.730	0.751
30	0.752	0.705	0.784	0.725	0.861
60	0.780	0.701	0.833	0.730	0.970
90	0.805	0.720	0.880	0.740	1.070
120	0.829	0.733	0.933	0.751	1.170
180	0.855	0.745	0.991	0.763	-

[실시예 8]

항-글리코헤모글로빈 생쥐 단일클론 항체-결합된 라텍스 입자의 제조 :

2 μm의 입도를 갖는 10 %(w/v) 라텍스 입자를 함유하는 용액 100 μl를 실시예 1에서 얻은 40 μg/ml의 항-인간 글리코헤모글로빈 단일클론 항체 3F10을 함유하는 20 mM 아세테이트 완충액(pH 6.0) 900 μl에 첨가하였다. 혼합물을 전도형 막서를 사용하여 교반한 후, 항체-결합된 라텍스 입자를 원심분리(5,000 g x 15 분)에 의해 회수하고, 생리식염수로 4회 세척한 다음, 1 중량% BSA를 함유하는 20 mM 아세테이트 완충액(pH 5.0) 중에 혼탁시켜 0.5 중량% 농도로 만든 후 저장하였다.

시료 5 μl를 0.05 μm의 입도를 갖는 0.025의 중량%의 비감작 폴리스티렌 라텍스 입자를 함유하는 용액 100 μl와 혼합한 후, 이렇게 제조된 항-글리코헤모글로빈 생쥐 단일클론 항체-결합된 라텍스 입자 분산액 1 ml과 혼합하고, 혼합물에 대해 교반하에 800 nm 파장에서 흡광도가 증가하는지를 즉시 조사하였다. 표 5는 시료중의 총 혜모글로빈에 대한 글리코헤모글로빈의 비율과 매분당 흡광도 변화 사이의 관계를 나타낸다.

[표 5]

총 혜모글로빈에 대한 글리코헤모글로빈의 비율		매분당의 흡광도 변화
0		0.01
2		0.12
4		0.24
6		0.35
8		0.42

따라서, 본 발명에 따르면 글리코헤모글로빈을 신속하고 간단히 측정하는 방법이 제공된다는 것이 명백해졌다.

본 발명은 구체적인 실시예를 참고로 상세하게 설명되어 있으며, 당업자는 본 발명의 정신과 범주에서 이

탈하지 않으면서 다양하게 변화 및 변형시킬 수 있다는 것을 이해할 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

시료를 비감작 라텍스 입자 및 항-글리코헤모글로빈 항체와 혼합하거나, 또는 비감작 라텍스 입자와 혼합하고 이어서 항-글리코헤모글로빈 항체와 혼합시켜, 면역응집 반응을 일으키고, 면역응집 반응에 의해 형성된 응집물을 측정하는 것을 포함하는 글리코헤모글로빈의 측정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 비감작 라텍스 입자가 0.05 내지 5 μm 의 입도를 갖는 방법.

청구항 3

시료를 비감작 라텍스 입자 및 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 입자와 혼합하거나, 또는 비감작 라텍스 입자와 혼합하고, 이어서 항-글리코헤모글로빈 항체가 결합되어 있는 입자와 혼합하여 면역응집 반응을 야기시킨 후, 면역응집 반응에 의해 형성된 응집물을 측정하는 것을 포함하는 글리코헤모글로빈의 측정 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 비감작 라텍스 입자가 0.05 내지 5 μm 의 입도를 갖는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 입자가 0.05 내지 5 μm 의 입도를 갖는 라텍스 입자, 0.5 내지 10 μm 의 입도를 갖는 젤라틴 입자 및 동물 적혈구로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 6

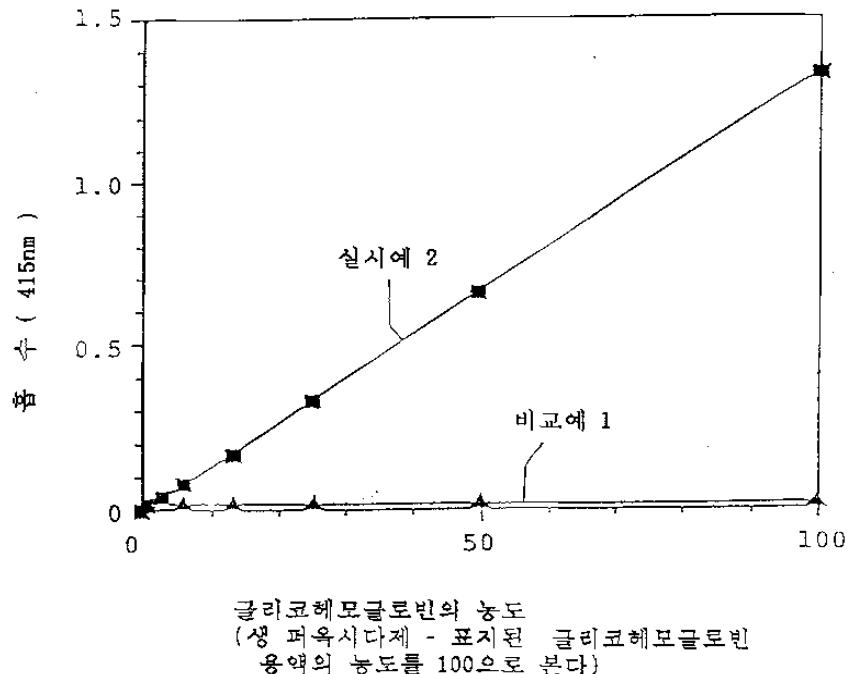
제1항에 있어서, 상기 항-글리코헤모글로빈 항체가 FERM BP-4311로 동정되어 있는 특성을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항-글리코헤모글로빈 단일클론 항체인 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 항-글리코헤모글로빈 항체가 FERM BP-4311로 동정되어 있는 특성을 갖는 하이브리도마에 의해 생산된 항-글리코헤모글로빈 단일클론 항체인 방법.

도면

도면1



도면2

