



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월25일
(11) 등록번호 10-1168292
(24) 등록일자 2012년07월18일

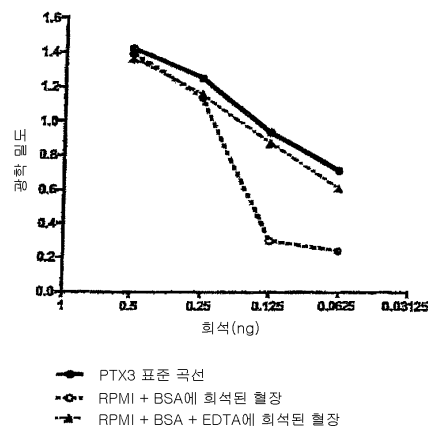
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2006-7024272
(22) 출원일자(국제) 2005년04월27일
심사청구일자 2010년02월19일
- (85) 번역문제출일자 2006년11월20일
(65) 공개번호 10-2007-0006914
(43) 공개일자 2007년01월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2005/004637
(87) 국제공개번호 WO 2005/106494
국제공개일자 2005년11월10일
- (30) 우선권주장
MI2004A 000858 2004년04월29일 이탈리아(IT)
- (56) 선행기술조사문헌
W02003072603 A2
ARTHRITIS RAEUM, vol.44, no.12, December
2001, pages 2841-2850
- 전체 청구항 수 : 총 23 항
- (73) 특허권자
파르마 디벨로프먼트 에스 알 엘
이탈리아 아이-00144 로마 132 비아 암스테르담
- (72) 발명자
만토바니 알베르토
이탈리아 아이-20146 밀라노 4 라르고 브라질리아
- (74) 대리인
김용인, 석혜선
- 심사관 : 조현경

(54) 발명의 명칭 단클론 항체, 하이브리도마, 단백질 PTX3 측정을 위한 개량 방법 및 상기 측정용 키트

(57) 요약

본 발명은 생체액의 샘플에서 PTX3 단백질의 레벨을 측정하는 방법에 관한 것이다. 쥐 안티-PTX3 단클론 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마는 MNB10 및 Pen-3을 포함하는 그룹으로부터 선택된다. 특이적 안티-PTX3 쥐 단클론 항체는 하이브리도마 MNB10 및 Pen-3에 의해 생산된 단클론 항체들로부터 선택된다. 생체액의 샘플에서 PTX3 단백질이 레벨을 측정하는 키트는 쥐 안티-PTX3 단클론 항체를 포함한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

- i) 96-웰 ELISA 플레이트를 쥐 단클론 항체를 함유하는 용액 100 μ l로 코팅하고 4℃에서 하룻밤 동안 배양하는 단계;
 - ii) 그 후에 플레이트를 버퍼 용액과 비특이적 결합 부위를 차단할 수 있는 용액으로 세척하는 단계;
 - iii) 주위 온도에서 2시간 배양한 후, 플레이트를 세척 버퍼로 다시 세척하는 단계;
 - iv) 적절한 배지에서 50 μ l의 희석된 표준 재조합 인간 PTX3 또는 검사 대상인 생체액의 샘플을 2벌로(in duplicate) 각 웰에 놓고, 플레이트를 37℃에서 2시간 동안 배양하는 단계;
 - v) 플레이트를 세척 버퍼로 반복해서 세척하고, 100 μ l의 세척 버퍼 중의 25ng/ml 바이오틴화된 안티-PTX3 토끼 IgG를 각 웰에 첨가하는 단계;
 - vi) 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 배양한 후, 세척 버퍼로 반복해서 세척하는 단계;
 - vii) 100 μ l의 희석된 스트렙타비딘-퍼옥시다제를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 주위 온도에서 1시간 동안 배양하는 단계;
 - viii) 플레이트를 세척 버퍼로 반복해서 세척한 후, 100 μ l의 색소성 기질을 각 웰에 첨가하는 단계;
 - ix) 플레이트를 주위 온도에서 일시적으로 배양하고, 정지 용액을 첨가하고, 플레이트를 자동 판독기로 405nm에서 읽는 단계를 포함하며, 개선점은
- 단계 (i)에서 사용된 쥐 단클론 항체는 하이브리도마 MNB10(허가번호. ABC/PD04001)로부터 수득되고;
- 단계 (vii)에서 사용된 스트렙타비딘-퍼옥시다제는 1:8000으로 희석되며; 및
- 단계 (viii)에서 사용된 색소성 기질은 테트라메틸벤지딘(TMB)인 것을 특징으로 하는 생체액의 샘플에서 PTX3 단백질의 레벨 측정 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

단계 (i)에서 용액 중의 쥐 단클론 항체의 농도는 약 700 ng/ml인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

단계 (i)에서 용액은 코팅 버퍼 용액인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 버퍼 용액은 15mM의 탄산염 버퍼를 함유하고, pH는 9.6인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

단계 (ii)에서 사용된 버퍼 용액은 PBS(인산염 버퍼 식염수) + 0.05%의 트윈 20으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 용액은 약 300 μ l/웰의 양으로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

단계 (ii)에 사용된 비특이적 결합 부위를 차단할 수 있는 용액은 PBS + 0.05%의 트윈 20으로 이루어진 버퍼 용액 중의 분유 5% 용액으로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 비특이적 결합 부위를 차단할 수 있는 용액은 약 $300\mu\text{l}$ /웰의 양으로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

단계 (iii)에서 명시한 세척은 3회 반복이 바람직하며, 각 회는 각 웰당 약 $300\mu\text{l}$ 의 용액을 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

단계 (iv)에서 사용된 표준 재조합 인간 PTX3는 75 pg/ml 내지 1.2ng의 증가하는 양으로 웰에 놓이는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

검사 혈장 샘플을 희석하는데 사용된 배지는 PBS + 2%의 BSA(소 혈청 알부민) + 0.18%의 EDTA로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

MNB10[04.04.16에 이탈리아, 제노바의 고급 생물학 센터(ABC)에서의 부다페스트 조약에 따라 기탁, 허가번호 PD04001]인, 안티-PTX3 쥐 단클론 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마.

청구항 13

하이브리도마 MNB10에 의해 생산된 단클론 항체들의 그룹으로부터 선택된 안티-PTX3 특이적 쥐 단클론 항체.

청구항 14

하이브리도마 MNB10에 의해 생산된 쥐 안티-PTX3 단클론 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 생체액에서 PTX3 단백질의 레벨 측정 키트.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

토끼 안티-PTX3 다클론 항체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 16

제 14 항에 있어서,

정제된 재조합 PTX3 단백질을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 17

제 14 항에 있어서,

호오스레디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase)와 접합된 스트렙타비딘(streptavidin)을 더 포함하는 것을

특징으로 하는 키트.

청구항 18

제 14 항에 있어서,
세척 버퍼 용액을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 19

제 14 항에 있어서,
분석되는 생체액의 샘플을 위한 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 20

제 19 항에 있어서,
상기 희석제는 EDTA를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 21

제 14 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서,
색원체(chromogen)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 22

제 21 항에 있어서,
색원체는 테트라메틸벤지딘(TMB, tetramethylbenzidine)의 용액으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 23

제 14 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서,
정지 용액을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 쥐 안티-PTX3 단클론 항체, 상기 항체를 생산하기 위한 하이브리도마, 생체액에서 단백질 PTX3를 측정하기 위한 개량 방법 및 상기 측정을 수행하기 위한 키트에 관한 것이다.

[0002] 더욱 구체적으로, 상기 방법, 상기 쥐 안티-PTX3 단클론 항체 및 상기 키트는 심혈관 질환 및/또는 뇌혈관 질환을 앓고 있는 사람의 사망 위험을 초기에 진단하는데 유용하다.

배경기술

[0003] 소위 펜타머 구조에 기초하는 펜트락신(pentraxin)은, 염증 매개체에 반응하여 간에 의해 생성된, C-반응성 단백질(CRP, C-reactive protein)과 혈청 아밀로이드 P(SAP, serum amyloid P)를 포함하는 단백질의 그룹이다. 혈청에서 펜트락신의 레벨은 다양한 자극에 의해 증가하며 감염, 염증 질환 및 조직 손상을 관찰하는데 사용되고 있다.

[0004] PTX3는 인터루킨-1(IL-1)에 의해 자극된 혈관내피세포에서 발견된 상기 과의 새로운 일원이다. 전형적으로 긴 사슬 펜트락신인 PTX3는 통상적인 펜트락신과 상동 관계를 나타내는 203개의 아미노산의 C-말단 영역과 상동 관계가 없는 178개의 아미노산의 N-말단 영역을 특징으로 한다. CRP 및 SAP와는 반대로, PTX3는 IL-1과 종양 괴사 인자(TNF)에 반응하여 다양한 형태의 세포, 주로 혈관내피세포 및 단핵식세포에서 생산되나, 인터루킨-6(IL-6)에는 반응하지 않는다. 또한, PTX3는 미코박테리아 세포의 성분들에 반응하여 단핵구에 의해 생산되고 류마티스 관절염 환자에서 비자극성 윤활세포에 의해 생산된다.

[0005] 단백질 PTX3는 1992년에 동정되었다(브레비아리오 에프 등. "Cloning of a new gene related to C-reactive

protein and serum amyloid P component", *J. Biol. Chem.* 1992, 267:22190-22197).

- [0006] 박테리아에서 PTX3의 생산은 논문 ["Inducible expression of PTX, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes", *Blood* 1994, 84:3483-3493]에서 비달 엘레스 브이. 등에 의해 기술되고, 진핵세포(CHO)에서 PTX3의 생산은 보타지 비. 등의 논문 ["Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3 - Similarities and differences with the short pentraxin C-reactive protein and serum amyloid component." *J. Biol. Chem.* 1997, 272:32817-32823]에 기술되었다.
- [0007] 그럼에도 불구하고, 단백질 PTX3의 생물학적 기능은 아직 완전히 이해되지 않았다.
- [0008] 최근 연구들은 PTX3 단백질의 레벨은 패혈증(sepsis) 또는 심근경색증 (myocardial infarction)과 같은 급성 또는 만성 염증 질환을 앓고 있는 환자들에게서 증가하였다는 것을 증명하였다. 특히, 페리 등은 PTX3의 레벨은 관상질환 치료병동에 입원 7.5 시간 후 경색 환자에서 6.94 ± 11.26 ng/ml의 최대량에 도달한다고 보고하였다(*Circulation* 2000, 102:636-641).
- [0009] 또한, 더욱 최근에는, 경색 환자에서 PTX3 단백질의 레벨은 일련의 사건 후 3개월 후에 사망 위험의 징후가 된다는 것이 관찰되었다(라티니 알 등., "Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction: comparison with C-reactive protein, NT-proBNP and troponin T." abstract 3091, Supplement IV, 페이지 680, *Circulation* 2003, 108(17)). 더욱 구체적으로, 저자들은 심근경색증을 가진 환자들의 예시적 숫자에서 ST 절편의 상승과 함께 급성 PTX3 단백질의 레벨은 사망의 위험을 예측하는 독립적인 정보를 제공하는 것으로 보고하였다. C-반응성 단백질(짧은 사슬 펜트락신) 또는 NT-proBNP 또는 트로포닌-T와 같은 다른 생체심장 마커의 레벨을 기초로 하여 동일한 예측을 할 수는 없다.
- [0010] 또한, 본 발명자들은 뇌졸중을 앓고 있는 환자에서, PTX3 단백질의 레벨은 중추 신경 시스템에 의해 쥐고 있는 손상에 비례한다는 것을 나타내는 실험 데이터를 알고 있다.
- [0011] 문헌 [페리 등., 상술한 인용 문헌; 물러 등., "Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients" *Crit. Care Med.* 2001, 29(7): 1404-1407; 파찌니 에프 등., "PTX3 in small-vessel vasculitides - An independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation" *Arthritis and Rheumatism* 2001, 44(12): 2841-2850]에 보고된 PTX3의 측정은 PTX3 단백질에 특이적인 단클론 항체 및 PTX3 단백질에 특이적인 비오틴화된 다클론 토끼 IgG를 기초로 한 ELISA 방법에 의해 수행되었다. 상기 단클론 항체는 문헌에서 MNB4로 확인되나 상응하는 하이브리도마는 일반인이 구할 수 없다.
- [0012] 특히, 상기 방법은 물러 비. 등의 상술한 인용 문헌에 의해 상세하게 기술되며 다음 단계를 포함한다:
- [0013] a) 96-웰 ELISA 플레이트(덴마크, 닝크 로스킬드)를 쥐 단클론 항체 MNB4(코팅을 위해 사용된 버퍼에서 1:5000으로 희석된 복수) 100 μ l로 코팅하였고 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다;
- [0014] b) 그 후 플레이트를 0.05% 트윈 20(세척 버퍼)과 5% 분유 200 μ l를 함유하는 돌베코 인산염 버퍼 식염수로 완전히 세척하여 비특이적 결합 부위를 차단한다;
- [0015] c) 주위 온도에서 2시간 동안 배양한 후, 플레이트를 세척 버퍼로 3회 다시 세척한다;
- [0016] d) RPMI 1640 배지(독일, 베를린, 세로메드)에 희석된 표준 재조합 인간 PTX3(100pg/ml로부터 10ng/ml까지) 50 μ l 및 2% 소 혈청 알부민(MO, 세인트루이스, 시그마 케미컬) 또는 검사 혈장의 샘플을 각 웰에 3벌로(in triplicate) 넣고(하나의 샘플당 웰 3개 할애), 플레이트를 37℃에서 2시간 동안 배양한다;
- [0017] e) 플레이트를 세척 버퍼로 3회 세척하고, 세척 버퍼에서 1:2000으로 희석되고, 바이오틴과 접합된 안티-PTX3 쥐 혈청 100 μ l를 첨가한다;
- [0018] f) 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 배양하고, 그 후에 세척 버퍼 200 μ l로 3회 세척한다;
- [0019] g) 1:4000으로 희석된, 텍스트란 기질(덴마크, 코펜하겐, 암텍스)과 접합된 스트렙타비딘-퍼옥시다제 100 μ l를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 주위 온도에서 1시간 동안 배양한다;
- [0020] h) 플레이트를 4회 세척한 후에, 100 μ l의 색소성 기질 ABTS 마이크로웰 퍼옥시다제 기질 시스템(MD, 게티스버그, 커키가드 및 페리 연구소)을 첨가한다;
- [0021] i) 자동 판독기로 405nm에서 플레이트를 읽는다.

- [0022] 본 발명의 한 양태는 본 발명자들이 상기 공지된 방법은 여러 단점을 제공한다는 것을 발견하였다는 사실을 기초로 한다.
- [0023] 공지된 방법의 첫 번째 단점은 일부 환자들의 혈장의 경우에, 검사 혈장 샘플의 다른 회석에서 측정된 PTX3의 레벨은 실시한 회석에 비례하지 않는다는 사실이다. 이제 본 발명자들은 이런 단점은 검사 혈장 샘플에 EDTA를 첨가함으로써 놀랍게 극복된다는 것을 발견하였다. 이에 대한 원인은 아직 완전히 해명되지 않았다는 사실에도 불구하고, 본 발명자들은 발명의 범위를 제한하는 것을 원치 않으면서, 관찰된 효과는 EDTA의 착물 Mg^{++} 과 Ca^{++} 이온에 대한 능력 때문이라고 주장하였고, 그 결과 동일한 결과를 다른 착화제에 의해 얻어야 한다.
- [0024] 두 번째 단점은 공지된 방법의 민감도(ca. 200pg/ml)는 약 5%의 정상 피험자에서 PTX3 단백질을 측정하는데 불충분하다는 사실이다. 이제 본 발명자들은 상기 방법의 민감도는 새로운 단클론 항체를 사용하고(단계 a), 스트렙타비딘-퍼옥시다제의 농도를 변화시키고(단계 g) 다른 색원체(chromogen)를 사용하여(단계 h) 75pg/ml 까지 증가될 수 있다는 것을 발견하였다.
- 발명의 상세한 설명**
- [0025] 한 양태에서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 생체액의 샘플에서 PTX3 단백질의 레벨을 측정하기 위한 방법에 관한 것이다:
- [0026] i) 96-웰 ELISA 플레이트를 쥐 단클론 항체를 함유하는 용액 100 μ l로 코팅하고, 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 배양한다;
- [0027] ii) 그 후에 플레이트를 버퍼 용액과 비특이적 결합 부위를 차단할 수 있는 용액으로 세척한다;
- [0028] iii) 주위 온도에서 2시간 배양한 후, 플레이트를 세척 버퍼로 다시 세척한다;
- [0029] iv) 적절한 배지에서 회석된 표준 제조함 인간 PTX3 50 μ l 또는 검사 대상인 생체액의 샘플을 2별로 각 웰에 넣고(하나의 샘플 당 2개의 웰 사용), 플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 배양한다;
- [0030] v) 플레이트를 세척 버퍼로 반복해서 세척하고, 세척 버퍼 중의 25ng/ml 비오틴화된 안티-PTX3 토끼 IgG 100 μ l를 각 웰에 첨가한다;
- [0031] vi) 플레이트를 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하고, 세척 버퍼로 반복해서 세척한다;
- [0032] vii) 회석된 스트렙타비딘-퍼옥시다제 100 μ l를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 주위 온도에서 1시간 동안 배양한다;
- [0033] viii) 플레이트를 세척 버퍼로 반복해서 세척한 후, 색소성 기질 100 μ l를 각 웰에 첨가한다;
- [0034] ix) 플레이트를 주위 온도에서 일시적으로 배양하고, 정지 용액을 첨가하고 자동 판독기로 405nm에서 플레이트를 읽는다;
- [0035] 여기서 개선점은 다음과 같은 사실이다:
- [0036] - 단계(i)에서 사용된 쥐 단클론 항체는 하이브리도마 MNB10(허가번호. ABC/PD04001) 또는 하이브리도마 Pen-3(허가번호. ABC/PD01004)로부터 얻는다;
- [0037] - 단계(vii)에서 사용된 스트렙타비딘-퍼옥시다제는 1:8000으로 회석된다; 및
- [0038] - 단계(viii)에서 사용된 색소성 기질은 테트라메틸벤지딘(TMB)이다.
- [0039] 바람직하게는, 단계(i)에서, 용액 속의 쥐 단클론 항체의 농도는 약 700ng/ml이다. 또한, 단계(i)에서 사용된 용액은 코팅 버퍼 용액으로 이루어지는 것이 유익하다. 바람직하게는 상기 버퍼 용액은 15mM의 탄산염 버퍼를 함유하며, pH는 9.6이다.
- [0040] 통상적으로, 단계(ii)에서 사용된 버퍼 용액은 PBS(인산염 버퍼 식염수) + 0.05%의 트윈 20으로 이루어진다. 유익하게는, 상기 용액은 약 300 μ l/웰의 양으로 사용된다.
- [0041] 바람직하게는, 단계(ii)에서 사용된 비특이적 결합 부위를 차단할 수 있는 용액은 PBS + 0.05%의 트윈 20으로 이루어진 버퍼 용액에 우유 분말의 5% 용액으로 이루어진다. 유익하게는, 상기 비특이적 결합 부위를 차단할 수 있는 용액은 약 300 μ l/웰의 양으로 사용된다.

- [0042] 단계(iii)에서 명시한 세척은 3회 반복이 바람직하며, 1회당 각 웰에 대해 300 μ l의 용액을 사용한다.
- [0043] 바람직하게는, 단계(iv)에 사용된 표준 제조합 인간 PTX3는 75 pg/ml부터 1.2ng으로 증가하는 양으로 웰에 놓인다. 유익하게는, 검사 혈장 샘플을 희석하는데 사용된 배지는 PBS + 2%의 BSA(소 혈청 알부민) + 0.18%의 K₃-EDTA로 이루어진다. 이 용액에서 EDTA의 존재는 매우 중요한데, 이는 상기한 대로, 본 발명자들은 EDTA의 존재가 실시된 희석에 비례하는 PTX3 측정값을 얻게 한다는 것을 발견하였기 때문이다.
- [0044] 단계(v)에 사용된 비오틴화된 안티-PTX3 토끼 IgG는 플러 비 등의 상술한 인용 문헌에 따라 얻는 것이 바람직하다.
- [0045] 또한, 단계(vii)에서 사용된 스트렙타비딘-퍼옥시다제는 호오스레디쉬 퍼옥시다제-접합 스트렙타비딘 암텍스(덴마크, 코펜하겐, RPN 4401 아머삼)가 바람직하다.
- [0046] 통상적으로, 단계(ix)에서 사용된 정지 용액은 1M의 H₂SO₄이다.
- [0047] 유익하게는, 단계(xii)에 사용된 TMB 기질 용액은 파밍겐의 카달로그 번호 2642KK에 해당한다.
- [0048] 다른 양태에서, 본 발명은 안티-PTX3 쥐 단클론 항체를 생산할 수 있는 하이브리도마에 관한 것으로, 이 하이브리도마는 MNB10[04.04.16에 이탈리아, 제노바의 고급 생물학 센터(ABC)에서의 부다페스트 조약에 따라 기탁, 허가번호 PD04001] 및 Pen-3[2001.02.08에 이탈리아, 제노바의 고급 생물학 센터(ABC)에서의 부다페스트 조약에 따라 기탁, 허가번호 PD01004]을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0049] 본 발명에 따라 안티-PTX3 쥐 단클론 항체를 생산하는 상기 하이브리도마의 선택은 아래 실시예 1에 기술된 것과 같은 통상적인 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0050] 다른 양태에서, 본 발명은 상기 하이브리도마 MNB10과 Pen-3에 의해 생산된 단클론 항체를 포함하는 그룹으로부터 선택된 특이적 안티-PTX3 쥐 단클론 항체에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명의 하이브리도마로부터 특이적 안티-PTX3 쥐 단클론 항체의 제조는 특정한 제약을 받지 않으며, 아래 실시예 2에 기술된 것과 같은 통상적인 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0052] 또 다른 양태에서, 본 발명은 생체액에서 PTX3 단백질의 레벨을 측정하기 위한 키트에 관한 것이며, 이 키트는 안티-PTX3 쥐 단클론 항체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0053] 바람직한 실시예에서, PTX3 단백질의 레벨의 측정은 사망의 위험을 초기 진단하기 위해 심혈관 및/또는 뇌혈관 질환을 앓고 있는 인간의 혈청에 대해 수행된다.
- [0054] 바람직하게는, 상기 키트는 안티-PTX3 토끼 다클론 항체를 포함한다.
- [0055] 유익하게는, 상기 키트는 정제된 제조합 PTX3 단백질을 포함한다.
- [0056] 바람직한 실시예에서, 상기 키트는 호오스레디쉬 퍼옥시다제로 접합된 스트렙타비딘을 포함한다.
- [0057] 유익하게는, 상기 키트는 세척 버퍼 용액을 포함한다.
- [0058] 바람직하게는, 상기 키트는 분석될 생체액의 샘플을 위한 희석제를 포함한다.
- [0059] 통상적으로, 상기 키트는 색원체로서, 테트라메틸벤지딘(TMB) 용액을 포함한다.
- [0060] 마지막으로, 정지 용액이 상기 키트에 포함될 수 있다.
- [0061] 아래의 도 1과 실시예들은 본 발명을 제한하지 않고 더욱 설명하는 역할을 한다.
- [0062] 도 1은 전체 혈장의 희석(1:2, 1:4, 1:8 및 1:16)이 x-축에 도시된다. 광학 밀도는 y-축에 도시된다.
- [0063] 약 1:4(0.25) 내지 약 1:16(0.0625)의 전체 혈장 희석 간격에서 심대상부전을 가진 환자의 혈청에서 탐지할 수 있는 PTX3 단백질의 레벨은, EDTA의 부존재하에서, 실제 존재하는 단백질의 레벨의 3배 이하이다. 그러나, EDTA의 첨가는 표준 곡선의 것과 필수적으로 상응하는 레벨을 얻게 할 수 있다.

실시예

[0065] 실시예 1

[0066] 하이브리도마

- [0067] 예방접종
- [0068] 루이스 쥐를 15일 간격으로 3회 200 μ g의 PTX3로 피하로 예방접종한다. ELISA 분석법에 의해 항체 반응을 평가한 후, 최고의 항체 역가를 가진 동물들과 융합을 수행한다.
- [0069] 융합 프로토콜
- [0070] 방법
- [0071] a) 비장림프구의 제조
- [0072] - 이미 예방접종된 쥐의 비장을 멸균 상태에서 회수하고, 10ml의 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)으로 3회 세척하고, 3ml의 DMEM 배지를 함유하는 플라스틱 페트리 접시에 옮기고 바늘로 분해 및/또는 주사기 피스톤으로 분쇄한다;
- [0073] - 세포 현탁액을 검사 튜브에 옮기고, DMEM 배지로 50ml를 만들고, 70 μ m 체로 여과하여 세포 집합체를 제거한다;
- [0074] - 비장림프구를 50ml의 DMEM 배지로 2회 세척한다;
- [0075] - 터크를 센다(count in Turk).
- [0076] b) 골수종 "SP2/0"의 제조
- [0077] - 골수종은 지수 성장 단계에 있어야 하고 정체기에 있어서는 안 된다.
- [0078] - 세포를 50ml의 DMEM 배지로 2회 세척한다.
- [0079] - 세포를 센다.
- [0080] c) 융합
- [0081] - 비장림프구와 골수종 사이의 비율(5:1)이 되도록 SP2/0의 세포를 비장림프구에 첨가한다;
- [0082] - DMEM으로 50ml를 만들고, 7분 동안 1700rpm에서 원심분리한다;
- [0083] - 모두를 제거하도록 주의를 기울여 파스퇴르 피펫으로 상청액을 빼낸다;
- [0084] - 침전된 세포들을 교반하고, 손으로 검사 튜브를 흔들며 37 $^{\circ}$ C에서 유지된 DMEM 중의 37% PEG 0.6ml를 첨가한다
- [0085] - 파스퇴르 피펫으로, 매우 천천히 세포들을 재현탁하고, PEG를 첨가하고 2분을 기다리고, 6분 동안 800rpm에서 원심분리한다;
- [0086] - 파스퇴르 피펫으로 상청액을 제거한다. 세포들을 재현탁하고, 검사 튜브를 손가락으로 부드럽게 흔들고 37 $^{\circ}$ C로 유지된 DMEM을 적하하여 20ml 부피까지 첨가한다;
- [0087] - 10분 동안 1300rpm에서 원심분리한다;
- [0088] - 상청액을 제거하고, 파스퇴르 피펫을 사용하여 HAT-DMEM으로 매우 부드럽게 세포들의 펠렛을 재현탁한다;
- [0089] - 세포들의 펠렛을 1.25×10^6 x ml의 농도로 희석하고 평평한 바닥의 96-웰 플레이트에서 웰 당 세포들의 펠렛의 0.2ml의 시드(seed)를 첨가하여 웰 당 2.5×10^5 세포가 되게 한다;
- [0090] - 플레이트를 잘 가습된 배양기에서 37 $^{\circ}$ C로 배양하고, 일주일 후 콜로니의 존재를 점검한다;
- [0091] - 융합 7일 후, 배지를 빼내고, 새로운 HAT-DMEM 200 μ l을 첨가한다;
- [0092] - 융합 후 10일 내지 15일 사이에 스크리닝을 수행한다;
- [0093] - 그 후 HT-DMEM 배지에서 양성 하이브리도마를 복제한다;
- [0094] - 두 번째 복제 후, HT-DMEM 배지를 하이브리도마용 DMEM으로 교환한다.
- [0095] 재료
- [0096] DMEM 배지

[0097]	(1x) DMEM	500ml
[0098]	L-글루타민	5ml
[0099]	겐타마이신	0.5ml
[0100]	<u>하이드리도마용 배지(DMEM)</u>	
[0101]	(1x) DMEM	500ml
[0102]	*FCS(태아 소 혈청, fetal calf serum)	50ml
[0103]	비필수 AAs(아미노산)	5ml
[0104]	피루브산염 나트륨	5ml
[0105]	L-글루타민	5ml
[0106]	겐타마이신	0.5ml
[0107]	<u>HAT-DMEM</u>	
[0108]	골수종 배지 + 하이포잔틴 + 아미놉테린 + 티미딘	
[0109]	<u>HT-DMEM</u>	
[0110]	골수종 배지 + 하이포잔틴 + 티미딘	
[0111]	PEG 1550(폴리에틸렌 글리콜 1550) 37%	
[0112]	파이렉스 병종의 7.4g의 PEG(Serva code 33132)를 오토클레이브로 소독한다. 단단해지기 전에(ca.55℃) FCS 없이 12.6ml의 DMEM을 첨가하고 잘 혼합한다. 0.2 μ m 필터로 여과하고, 검사 튜브당 1ml 분취하고, 냉장고에 저장한다.	

[0113] 실시예 2

[0114] 세파로스-결합 단백질 G를 사용하는 단클론 항체의 정제

재료

- [0115] - Ca 및 Mg를 가진 PBS: 450ml의 증류수 + 50ml의 PBS(10x) + 3ml의 1M NaOH;
- [0116] - 세파로스 단백질 G 4 패스트 플로우(파마시아 카다로그, 17-0618-01): 레진을 디캔테이션 또는 가벼운 원심 분리에 의해 PBS로 4회 세척하고, 그 후에 PBS + 0.1%의 소듐 아자이드로 10%로 희석하고 냉장고에 저장한다;
- [0117] - 글리시딘 - 0.1M HCl 버퍼 pH 2.8: 100ml의 증류수에 750mg의 글리신을 용해하고 280 μ l의 37% HCl로 pH 2.8로 조절한다;
- [0118] - 1.5M TRIS-HCl 버퍼 pH 8.8: 100ml의 증류수에 18.17g의 TRIS를 용해하고 37% HCl로 pH 8.8로 조절한다;
- [0119] - 하나의 7ml 플라스틱 미니컬럼.

[0120] 방법

- [0121] - 레진 세파로스 단백질 G 4 패스트 플로우로 3ml 부피까지 컬럼을 채운다;
- [0122] - 레진이 마르지 않도록 주의하면서 20ml의 PBS로 세척한다;
- [0123] - 복수(ascites) 또는 혈청을 PBS로 1:3으로 희석하고 0.2 μ m 필터로 여과하다;
- [0124] - 레진을 4회 통과시키고 말단부에서 레진의 레벨에서 플로우를 정지시킨다;
- [0125] - 30ml의 PBS로 세척한다;
- [0126] - 9ml의 pH 2.8 글리신 - HCl 버퍼(1회에 3ml)를 첨가하고, 3개의 검사 튜브에서 용출액을 수집한다;
- [0127] - 100 내지 150 μ l의 pH 8.8 TRIS-HCl 버퍼를 첨가하여 pH 7로 즉시 조절한다;
- [0128] - 전체 단백질을 측정하고, 필요하다면 센트리플러스 50 또는 100으로 농축한다;

[0129] - PBS를 투석하여 걸러내고, 분취하고 냉동시킨다.

[0130] 실시예 3

[0131] 환자의 혈장에서 PTX3의 레벨 측정 방법

[0132] - 96-웰 ELISA 플레이트(Nunc MaxiSorp 446612)를 정제된 MNB10 항체(700ng/ml)를 함유하는 100 μ l의 코팅 버퍼 용액(15mM 탄산염 버퍼, pH 9.6)으로 코팅하고, 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다;

[0133] - 플레이트를 300 μ l/웰의 세척 버퍼 용액(PBS + 0.05% 트윈 20)으로 3회 세척하고, 5%의 분유를 가진 300 μ l의 세척 버퍼를 첨가하여 비특이적 결합 부위를 차단하였다;

[0134] - 주위 온도에서 2시간 동안 배양한 후, 플레이트를 세척 버퍼로 3회 세척하였다;

[0135] - 50 μ l의 표준 재조합 인간 PTX3(75 pg/ml부터 1.2 ng/ml까지) 및 PBS + 2% BSA + 0.19% K₃-EDTA 중에 희석된 검사 대상인 혈장의 샘플을 2벌로(in duplicate) 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 37℃에서 2시간 동안 배양하였다.

[0136] - 플레이트를 세척 버퍼로 5회 세척하였고, 세척 버퍼 중의 25ng/ml 비오틴화된 토끼 anti-PTX3 IgG 100 μ l를 각 웰에 첨가하였다;

[0137] - 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 배양하였고, 300 μ l의 세척 버퍼로 5회 세척하였다;

[0138] - 1:8000으로 희석된 100 μ l의 호오스레디쉬 퍼옥시다제-접합 스트렙타비딘 암텍스(덴마크, 코펜하겐, RPN 4401 아머삼)를 각 웰에 첨가하였고, 플레이트를 주위 온도에서 1시간 동안 배양하였다;

[0139] - 플레이트를 세척 버퍼로 5회 세척한 후, 100 μ l의 TMB(테트라메틸벤지딘)의 기질 용액을 각 웰에 첨가하였다;

[0140] - 플레이트를 주위 온도에서 5분 동안 배양하였다;

[0141] - 50 μ l의 정지 용액(H₂SO₄, 1M)을 각 웰에 첨가시킨다;

[0142] - 반응이 종료된 후 30분 이내에 405nm에서 흡광도를 읽었다.

[0143] 실시예 4

[0144] 키트

[0145] 인간 생체액에서 PTX3의 레벨을 측정하기 위한 키트는 다음을 포함한다:

[0146] 1. 마이크로플레이트: 쥐 anti-PTX3 항체 MNB10으로 코팅된 12 x 8 웰.

[0147] 2. 인산염 버퍼 용액 중의 비오틴화된 토끼 anti-PTX3 IgG.

[0148] 3. 인산염 버퍼 용액 중의 호오스레디쉬 퍼옥시다제-접합 스트렙타비딘.

[0149] 4. 표준: 버퍼 용액 중의 2.4, 1, 0.5, 0.2 및 0.05 ng/ml의 정제 재조합 PTX3.

[0150] 5. 세척 버퍼 용액: 인산염 버퍼 식염수(PBS, phosphate buffer saline) 용액.

[0151] 6. (검사 하에서 인간 생체액을 희석하기 위한) 희석제: 인산염 버퍼 식염수 용액 속의 1% 소 혈청 알부민 및 0.19% K₃-EDTA.

[0152] 7. 기질: 0.05 mol/l 시트르산염 버퍼(pH 3.8) 중에 안정화된 0.26 mg/ml 테트라메틸벤지딘 및 0.01% H₂O₂.

[0153] 8. 정지 용액: 1M H₂SO₄.

산업상 이용 가능성

[0154] 본 발명의 내용 중에 있음

도면의 간단한 설명

[0064] 도 1은 심대상부전을 가진 환자의 혈장에 대한 EDTA의 효과를 나타내는 그래프이다.

도면

도면1

