(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0132310
(43) 공개일자 2017년12월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 33/545* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/543 (2013.01)
G01N 33/545 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7031619
(22) 출원일자(국제) 2016년03월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년10월31일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2016/060261
(87) 국제공개번호 WO 2016/159015
국제공개일자 2016년10월06일
(30) 우선권주장
JP-P-2015-074168 2015년03월31일 일본(JP)
JP-P-2015-074173 2015년03월31일 일본(JP)

(71) 출원인
가부시키가이샤 엘에스아이 메디엔스
일본국 도쿄도 치요다구 우치칸다 1초메 13반4고
(72) 발명자
요시다 다쓰야
일본국 1018517 도쿄도 치요다구 우치칸다 1초메 13반 4고 가부시키가이샤 엘에스아이 메디엔스 내
양 위항
일본국 1018517 도쿄도 치요다구 우치칸다 1초메 13반 4고 가부시키가이샤 엘에스아이 메디엔스 내
(74) 대리인
특허법인 대아

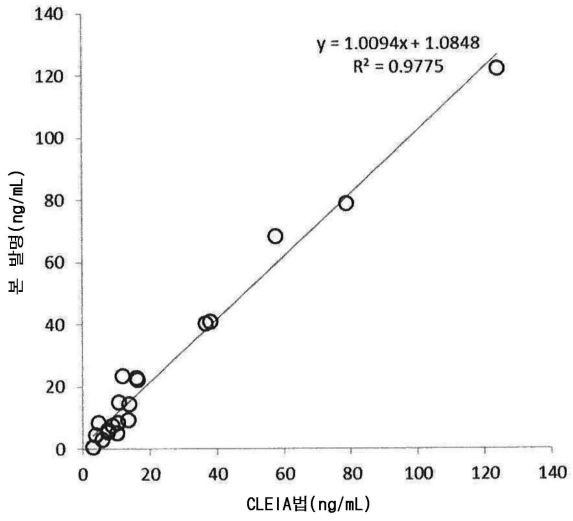
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **트롬빈 안티트롬빈 복합체의 측정 시약 및 측정 방법**

(57) 요 약

라텍스 입자에 결합한, 안티트롬빈 측에 결합하는 항체, 및 라텍스 입자에 결합한, 트롬빈(T) 측에 결합하는 항체를 포함하는, 트롬빈 안티트롬빈 복합체(TAT) 측정 시약으로서, 상기 안티트롬빈 측에 결합하는 항체는, TAT에 대한 반응성이 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 100배 이상이고, 바람직하게는 측정시의 pH가 5.8~6.6이 되도록 구성되어 있는 것을 특징으로 하는, 트롬빈 안티트롬빈 복합체(TAT) 측정 시약.

대 표 도 - 도10



(52) CPC특허분류
G01N 33/6854 (2013.01)
G01N 2333/8128 (2013.01)
G01N 2333/974 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

트롬빈 안티트롬빈 복합체(TAT) 측정 시약으로서,

라텍스 입자에 결합한, 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체, 및

라텍스 입자에 결합한, 트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체를 포함하고,

상기 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체는, TAT에 대한 반응성이 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 100배 이상인 것을 특징으로 하는, TAT 측정 시약.

청구항 2

제1항에 있어서,

측정시의 pH가 5.8~6.6이 되도록 구성되어 있는 것을 특징으로 하는, TAT 측정 시약.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체가 결합한 라텍스 입자 및 상기 트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체가 결합한 라텍스 입자를 포함하는 제2 시약, 및

pH가 5.8~6.6인 완충액을 포함하는 제1 시약을 포함하는, TAT 측정 시약.

청구항 4

생체로부터 분리된 시료 중에 존재하는 TAT를 측정하는 방법으로써, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 TAT 측정 시약을 이용하여 라텍스 응집법을 실시함으로써 TAT를 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

라텍스 응집법에 따라서, 생체로부터 분리된 시료중에 존재하는 TAT를 측정할 때에 사용되는 항체를 스크리닝하는 방법으로써, 항체의 후보 항체를 준비하는 공정, 후보 항체를 일정량의 유리 안티트롬빈과 반응시키는 공정, 상기 공정 후에 얻어진 반응액을 TAT가 고정화된 기재를 이용한 효소 면역 측정법에 제공함으로써 항체의 유리 안티트롬빈에 대한 반응성을 측정하는 공정, 상기 유리 안티트롬빈에 대한 반응성을 항체의 TAT에 대한 반응성과 비교하는 공정, 및 TAT에 대한 반응성이 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 100배 이상인 항체를 선택하는 공정을 포함하는, 항체의 스크리닝 방법.

청구항 6

트롬빈 안티트롬빈 복합체(TAT) 측정 시약으로서,

라텍스 입자에 결합한, 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 제1 항체, 및

라텍스 입자에 결합한, 트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 제2 항체를 포함하고,

측정 시의 pH가 5.8~6.6이 되도록 구성되어 있는 것을 특징으로 하는, TAT 측정 시약.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 제1 항체가 결합한 라텍스 입자 및 상기 제2 항체가 결합한 라텍스 입자를 포함하는 제2 시약, 및

pH가 5.8~6.6의 완충액을 포함하는 제1 시약을 포함하는, TAT 측정 시약.

청구항 8

생체로부터 분리된 시료 중에 존재하는 시료 중의 TAT를 측정하는 방법으로써, 제6항 또는 제7항에 기재된 TAT 측정 시약을 이용하여 라텍스 면역 응집 반응을 pH가 5.8~6.6인 조건에서 실시함으로써 TAT를 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 생체 시료 중의 트롬빈(T) 안티트롬빈(AT) 복합체(TAT)를 측정하는 시약 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 트롬빈 안티트롬빈 복합체(TAT)는 혈액 응고가 진행할 때에 혈액 중에 생성되는 단백질 복합체로서, 혈액 중의 TAT 정량은 파종성 혈관내 응고 증후군(DIC) 등 혈전증의 진단에 유용하다. 그러나, TAT의 존재량은 유리(遊離) 안티트롬빈 존재량의 약 100,000분의 1이기 때문에 측정이 쉽지 않다.

[0003] 현재 주류인 TAT 정량법은, 지멘스사의 Enzygnost(등록상표) TAT micro 등의 효소 면역 측정법(ELISA)을 이용하는 시약 키트, 및 LSI 메디엔스사의 스테이시아(등록상표) CLEIA TAT 등의 화학 발광효소 면역 측정법(CLEIA)을 이용하는 시약 키트가 있지만, 모두 고상·액상 분리(B/F 분리)가 필요한 측정법으로써, 번잡한 세정 작업이 필요하여, 수작업 혹은 전용 기기가 필요하다.

[0004] 특허문헌 1~3 및 5에는, 라텍스 응집법을 이용한 TAT 측정을 위한 시약계가 보고되었지만, 모두 체외에서 합성한 TAT를 완충제로 희석하여 제작한 샘플의 측정으로써, 라텍스 응집법을 이용하여 사람 검체 중의 TAT를 정확하게 농도 측정 가능한 시약의 보고는 없다. 또, 이들 문헌에 기재된 방법은 모두, 항체의 특이성에 의존하여 TAT 측정 시약을 구축하고 있든지, 첨가제로 그 교차 반응성에 의한 영향을 회피하는 것이다. 특허문헌 4는 교차 반응성을 갖지 않는 항체를 사용하는 샌드위치법에 의한 TAT 측정에 대해서 개시하고 있지만, 임상적으로 이용하기 위한 충분한 감도는 아니다. 또, 어느 문헌에서도 실험체 내의 TAT를 정량할 때에 측정 반응시의 pH 측정 결과에 대한 영향에 대해 검토하지 않았고, 지금까지 라텍스 면역 응집법으로 TAT를 측정할 때에, 산성측 pH로 반응을 실시한 예는 없다.

[0005] 이상으로부터, 측정이 간편한 라텍스 응집법에서, 고감도·고정밀도로 생체 시료 중의 TAT를 측정하는 시약 및 방법이 요구되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 일본 공개특허공보 2001-289850호

(특허문헌 0002) 특허문헌 2: 일본 공개특허공보 평7-238099호

(특허문헌 0003) 특허문헌 3: 일본 공개특허공보 2002-316999호

(특허문헌 0004) 특허문헌 4: 일본 공개특허공보 평3-48158호

(특허문헌 0005) 특허문헌 5: 일본 공개특허공보 2001-228153호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은, B/F 분리나 세정 작업을 필수로 하지 않는 라텍스 응집법을 이용한, 생체 시료 중의 TAT 측정 시약 및 측정 방법을 제공하는 것, 및 그에 사용되는 항체를 효율적으로 선택하는 방법을 제공하는 것을 과제로 한다.

[0008] TAT의 측정에 대해서는, DIC 진단 기준의 감도·특이도 향상의 관점에서, 또한 TAT 측정값이 정상이면 DIC는 부정적으로 하는 제외 진단용으로써의 사용 가능성의 관점에서, 그 임상적 유용성이 인정되고 있다. 그러나, 현재는 번잡한 손기술을 필요로 하는 ELISA법이나 전용 기기를 필요로 하는 CLEIA법이 주류인 점이, 측정의 보급이 늦어지는 원인으로 여겨지고 있다.

[0009] 따라서, 측정이 간편한 라텍스 응집법에서, 고감도·고정밀도로 생체 시료 중의 TAT를 측정하는 시약 및 방법이 요구되었다.

[0010] 또, 그 임상적 의의를 고려한 경우, CLEIA법과 동일한 수 나노그램 단위로 측정할 수 있는 검출 감도가 필요하지만, CLEIA법과 동일한 감도를 라텍스 응집법으로 달성하는 것은, 사용하는 입자의 특성 등 그 측정 원리로부터 생각했을 때, 매우 곤란한 과제이다.

[0011] 또, 라텍스 응집법에서는 ELISA법이나 CLEIA법 등과 같이, 세정 등에 의한 B/F 분리 공정을 포함하지 않기 때문에, 유리 안티트롬빈 등 본래 목적으로 하는 측정 대상 물질 외의 물질과의 교차 반응성을 극복하는 것이 시약이나 측정법을 구축할 때의 과제이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자는 상기 과제를 해결하기 위해서 예의 검토를 실시했다. 그 결과, 라텍스 응집법을 이용한 생체 시료 중의 TAT 측정법에서, 교차 반응성을 가지는 항체를 이용하여 그 교차 반응성의 차이를 이용함으로써, 고감도이면서 고정밀도의 TAT 측정 시약을 제작할 수 있다는 것을 발견했다. 즉, 항체 1개에 간접 저해 ELISA법에 의해 선택된, TAT에 대한 반응성과 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 차이가 100배 이상인 항체를 이용함으로써, 생체 시료 중의 TAT를 유리 안티트롬빈의 영향을 최소한으로 억제하여 정확하게 측정할 수 있다는 것을 발견했다. 또, 라텍스 면역 응집법을 이용한 생체 시료 중의 TAT 측정법에서, 응집 반응을 약산성의 조건으로 실시함으로써 생체 시료 중의 TAT를 고감도이면서 특이적으로 측정할 수 있다는 것을 발견하여, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0013] 즉, 본 발명은 이하를 제공한다.

[0014] [1] 트롬빈 안티트롬빈 복합체(TAT) 측정 시약으로서,

[0015] 라텍스 입자에 결합한, 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체, 및

[0016] 라텍스 입자에 결합한, 트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체를 포함하고,

[0017] 상기 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체는 TAT에 대한 반응성이 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 100배 이상인 것을 특징으로 하는 TAT 측정 시약.

[0018] [2] 측정시의 pH가 5.8~6.6이 되도록 구성되어 있는 것을 특징으로 하는 [1]에 기재한 TAT 측정 시약.

[0019] [3] 상기 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체가 결합한 라텍스 입자 및 상기 트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체가 결합한 라텍스 입자를 포함하는 제2 시약, 및

[0020] pH가 5.8~6.6인 완충액을 포함하는 제1 시약을 포함하는, [1] 또는 [2]에 기재한 TAT 측정 시약.

[0021] [4] 생체로부터 분리된 시료 중에 존재하는 TAT를 측정하는 방법으로써, [1]~[3] 중 어느 하나에 기재한 TAT 측정 시약을 이용하여 라텍스 응집법을 실시함으로써 TAT를 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

[0022] [5] 라텍스 응집법에 따라서, 생체로부터 분리된 시료 중에 존재하는 TAT를 측정할 때에 사용되는 항체를 스크

리닝 하는 방법으로써, 후보 항체를 준비하는 공정, 후보 항체를 일정량의 유리 안티트롬빈과 반응시키는 공정, 상기 공정 후에 얻어진 반응액을 TAT가 고정화된 기재를 이용한 효소 면역 측정법에 제공함에 따라, 항체의 유리 안티트롬빈에 대한 반응성을 측정하는 공정, 상기 유리 안티트롬빈에 대한 반응성을 항체의 TAT에 대한 반응성과 비교하는 공정, 및 TAT에 대한 반응성이 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 100배 이상인 항체를 선택하는 공정을 포함하는 항체의 스크리닝 방법.

[0023] [6] 트롬빈 안티트롬빈 복합체(TAT) 측정 시약으로서,

[0024] 라텍스 입자에 결합한, 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 제1 항체, 및

[0025] 라텍스 입자에 결합한, 트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 제2 항체를 포함하고,

[0026] 측정시의 pH가 5.8~6.6이 되도록 구성되어 있는 것을 특징으로 하는 TAT 측정 시약.

[0027] [7] 상기 제1 항체가 결합한 라텍스 입자 및 상기 제2 항체가 결합한 라텍스 입자를 포함하는 제2 시약, 및

[0028] pH가 5.8~6.6인 완충액을 포함하는 제1 시약을 포함하는, [6]에 기재한 TAT 측정 시약.

[0029] [8] 생체로부터 분리된 시료 중에 존재하는 시료 중의 TAT를 측정하는 방법으로써, [6] 또는 [7]에 기재한 TAT 측정 시약을 이용하여 라텍스 면역 응집 반응을 pH가 5.8~6.6인 조건에서 실시함으로써 TAT를 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 효과

[0030] 종래, 면역학적 측정법에 사용하는 항체를 선택할 때에는, 경험에 의해서 최적의 조합을 발견하는 방법이 일반적이었다. 즉, 가능한 모든 조합을 시도한 다음 신뢰성, 감도, 특이성에 대해서 양호한 결과를 얻을 수 있는 조합의 방법을 선택한다는 것이다. 그러나, 복수 종류의 항체를 적당하게 조합하면 감도와 특이성에 대해서 반드시 원하는 성능을 가지는 시약이나 측정계를 구축할 수 있는 것은 아니고, 오히려, 전혀 효과적이지 않은 경우도 있다. 따라서, 면역학적 측정법의 구축은, 그 대부분이 항체가 가지는 특이성에 크게 의존하게 되고, 당업자라고 해도 과도한 부담이 요구되는 경우가 적지 않았다. 그 때문에, 신뢰성, 감도, 특이성이 높은 시약의 제조라든지 측정계의 구축이 곤란하게 되었다.

[0031] 본 발명에 의하면, 상기 문제를 해결할 수 있다. 즉, 라텍스 응집법에 사용 가능한 항체를 효율적으로 선택할 수 있게 되어, 신뢰성, 감도, 특이성이 뛰어난 시약을 시기 적절하게 시장에 제공할 수 있게 된다.

[0032] 또, 본 발명이 제공하는 라텍스 응집법의 시약에 의해, 생체 시료 중 미량인 TAT를 혈장 매트릭스 등의 백그라운드의 영향을 회피하면서, 정확하게 측정(정량)할 수 있다. 또, 범용 자동 분석 장치에서의 측정이 가능해지고, 수작업 공정이나 전용 기기에 의한 측정과 같은 제한이 없어진다는 이점이 있다.

[0033] 본 발명에 의하면, 반응시의 pH를 약산성으로 유지함으로써, 감도, 특이성 모두 고성능인 시약의 조제가 가능하다. pH가 높아지면, 생리 식염수 블랭크·혈장 블랭크·TAT 반응성이 pH 의존적으로 내려가는 경향을 발견했다. pH가 중성보다 높으면 반응성이 떨어진다는 것은, 본 발명자들이 발견한 의외의 효과였다. 따라서, 반응시의 pH를 약산성역으로 함으로써, 높은 반응성을 가지고 특이성이 높은 시약의 제공이 가능해졌다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 라텍스 응집법에 의한 TAT 측정 방법의 모식도이다.

도 2는 간접 저해 ELISA법에 의한 반응계의 모식도이다.

도 3은 간접 저해 ELISA법에 의한 클론 TAT-5의 각 항원으로의 결합성을 평가한 결과를 나타내는 도면이다.

도 4는 각 항체를 결합시킨 라텍스 시약에 의한 TAT로의 반응성의 평가 결과를 나타내는 도면이다.

도 5는 각 항체를 결합시킨 라텍스 시약에 의한 유리 안티트롬빈으로의 교차 반응성 평가 결과를 나타내는 도면이다.

도 6은 pH를 6.0~7.2 사이에서 변화시킨 경우의 베이스 흡광도의 변화를 나타내는 도면이다.

도 7은 pH를 6.0~7.2 사이에서 변화시킨 경우의 혈장 베이스를 차감한 TAT 반응성에 대한 영향을 나타내는 도면이다.

도 8은 pH를 5.7~6.2 사이에서 변화시킨 경우의 베이스 흡광도의 변화를 나타내는 도면(제1 시약의 완충액을 Bis-Tris로 한 경우).

도 9는 pH를 5.7~6.2 사이에서 변화시킨 경우의 베이스 흡광도의 변화를 나타내는 도면(제1 시약의 완충액을 MES로 한 경우).

도 10은 본 발명의 시약을 이용하여 임상 검체를 평가한 측정 결과와, CLEIA법을 이용하여 임상 검체를 평가한 측정 결과의 상관을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체를 제1 항체, 트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체를 제2 항체로 구성하는, TAT 측정 시약의 일례를 실시의 한 형태로 기재하지만, 본 발명의 범위는 이것에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 예를 들면, 본 발명의 TAT 측정 시약은, 생체 시료 중의 TAT를 측정하기 위한 2종류의 TAT 항체를 각각 결합시킨 라텍스 입자를 이용한, 샌드위치계의 라텍스 응집법에 따른 면역 측정 시약이다.

[0037] 제1 항체는, 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항TAT 항체이면 좋지만, 혈중 TAT의 존재량이 유리 안티트롬빈의 존재량에 비해서 매우 미량이므로, 유리 안티트롬빈과의 교차 반응성이 작은 항TAT 항체를 이용하는 것이 바람직하다.

[0038] 구체적으로는, 본 발명의 TAT 측정 시약은, 라텍스 입자에 결합한, 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 제1 항체, 및 라텍스 입자에 결합한, 트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 제2 항체를 포함하고, 상기 제1 항체의 TAT에 대한 반응성이 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 100배 이상인 것을 특징으로 하는 TAT 측정 시약인 것이 바람직하다. 라텍스 입자에 결합시키는 항체는, 2종류의 입자에 각각 2종류의 항체를 결합시켜도 좋고, 1종류의 입자에 복수 종류의 항체를 결합시켜도 좋으며, 1종류의 항체를 복수 종류의 입자에 결합시킨 것을 혼합해서 사용할 수도 있다.

[0039] 이하의 실시예에서 나타내듯이, 상기 제1 항체의 TAT에 대한 반응성이 유리 안티트롬빈에 대한 반응성보다 적어도 100배 높기 때문에 충분한 효과를 얻을 수 있었던 것은 뜻밖의 결과였다. 즉, 제1 항체의 TAT에 대한 반응성은 유리 안티트롬빈에 대한 반응성보다 적어도 100배 이상이면 좋고, 1,000배 이상인 것이 바람직하며, 10,000배 이상인 것이 보다 바람직하다. 교차 반응성은 적을 수록 좋기 때문에 특히 상한은 없지만, 예를 들면, 100,000배 미만, 또는 50,000배 미만이어도 좋다.

[0040] 상기 제1 항체를 조제함에 있어서, 사람 이외의 동물에 대해서 유리 안티트롬빈을 면역시킨 것이어도 좋고, TAT를 면역시킨 것이어도 좋으며, 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식할 수 있는 항체이면 본 발명에 사용할 수 있다.

[0041] 여기서, 본원 발명에서 안티트롬빈 측에 결합한다는 것은, 시료 중에 가장 많이 존재하는 유리한 상태의 안티트롬빈이 유리 트롬빈과 결합하여 복합체(TAT)를 형성하는 상태의 안티트롬빈에 결합하는 것을 의미한다. 따라서, 복합체를 형성했을 때의 구조를 가지는 안티트롬빈을 복합체형 구조 안티트롬빈, 복합체를 형성하지 않을 때의 구조를 가지는 안티트롬빈을 유리형 구조 안티트롬빈(유리 안티트롬빈)이라고 칭했을 경우, 안티트롬빈 측에 결합한다는 것은 복합체형 구조 안티트롬빈에 결합하는 것을 의미한다.

[0042] 유리형 구조 안티트롬빈은 복합체형 구조 안티트롬빈과 다른 구조를 가진다. 유리형 구조 안티트롬빈은 유리 트롬빈과 결합해서 복합체를 형성함으로써 그 구조가 변화한 상태로 존재하기 때문이다.

[0043] 제2 항체로서는, 트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식할 수 있는 항체이면 좋고, 트롬빈에 대해서 특이적으로 반응하는 항체를 사용할 수 있다. 시료 중에 유리 트롬빈은 거의 존재하지 않기 때문에, 유리 트롬빈에 대해서 교차 반응성을 가지는 항체여도 이용할 수 있는 것이 많다. 당업자라면 적절히 선택해서 사용할 수 있다.

[0044] 상기 항체를 조제함에 있어서, 사람 이외의 동물에 대해서 유리 트롬빈을 면역시킨 것이어도 좋고, TAT를 면역시킨 것이어도 좋으며, 트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식할 수 있는 항체이면, 본 발명에 사용할 수 있다.

[0045] 여기서, 본 발명에서 트롬빈 측에 결합한다는 것은, 시료 중에 존재하는 유리한 상태의 트롬빈이 안티트롬빈에 결합해서 복합체(TAT)를 형성하고 있는 상태의 트롬빈에 결합하는 것을 의미한다. 따라서, 복합체를 형성했을 때의 구조를 가지는 트롬빈을 복합체형 구조 트롬빈, 복합체를 형성하지 않을 때의 구조를 가지는 트롬빈을 유

리형 구조 트롬빈이라고 칭했을 경우, 트롬빈 측에 결합한다는 것은 복합체형 구조 트롬빈에 결합하는 것을 의미한다.

[0046] 유리형 구조 트롬빈은 복합체형 구조 트롬빈과 다른 구조를 가질 가능성을 생각할 수 있다. 유리형 구조 트롬빈은 안티트롬빈과 결합하여 복합체를 형성함으로써 그 구조가 변화한 상태로 존재함에 따른 것이다.

[0047] 상기 제1 항체 및 제2 항체는, 다중 클론 항체 또는 단일 클론 항체 모두 사용할 수 있다. 이들 항체는 당업자이면 공지의 방법에 따라서 취득할 수 있다.

[0048] 항체 제작용으로 면역원을 면역하는 동물로는, 양, 말, 염소, 토끼, 마우스, 랫 등을 사용할 수 있고, 특히 다중 클론 항체의 제작에는 토끼, 염소 등이 바람직하다. 또, 혼성 세포를 제작하는 공지의 방법에 의해 단일 클론 항체를 얻을 수도 있고, 이 경우에는 마우스, 랫 혹은 토끼 등이 바람직하다.

[0049] 면역원으로서는, 상술한 것처럼, TAT를 사용해도 좋고, 비트로넥틴이 결합한 VTAT를 면역원으로서 제작한 항체를 본원 발명에 사용할 수도 있다. 또, 제1 항체의 경우에는 안티트롬빈을, 제2 항체의 경우에는 트롬빈을 사용해도 좋다.

[0050] 이들 면역원은 생체로부터 채취된 시료를 원료로 하여 정제된 TAT를 사용해도 좋고, 유리 트롬빈과 유리 안티트롬빈을 혼합하여 인비트로(invitro) 합성한 TAT를 사용해도 좋다. 합성 TAT로서는, 예를 들면, 생물 제제로 입수 가능한 트롬빈과 안티트롬빈을 시험관 내에서 배양해서 얻어지는 TAT여도 좋고, 대장균이나 포유동물세포, 바큐로 바이러스를 감염시킨 곤충 세포 등, 기존의 번역 발현계를 사용해서 발현시킨 것을 회수하여 정제한 것을 면역원으로 사용해도 좋다.

[0051] 또, 입체 구조의 차이를 부분적인 펩티드만으로 면역 시키는 것이 가능한 경우, 구체적으로 항체의 결합 부위를 특정해서 항체를 제작하고 싶은 경우에는, 제1 항체의 경우에는 안티트롬빈, 제2 항체의 경우에는 트롬빈의 부분 펩티드를 이용해서 제작할 수도 있다. 그 경우의 항원으로서의 펩티드 배열의 선택이나 펩티드 단편의 합성 방법, 면역 방법은 기존의 방법을 사용할 수 있다.

[0052] 도 1을 참조하여, 라텍스 응집법에 따른 측정 방법을 설명한다. 도 1에 나타내듯이, TAT의 안티트롬빈 측에 제1 항체가 결합하고, TAT의 트롬빈 측에 제2 항체가 결합한 경우, 라텍스 응집이 일어나고 그 때의 흡광도 수치에 근거해서 TAT 농도를 측정할 수 있다.

[0053] 생체 내에서 TAT와 TAT를 형성하지 않는 유리 안티트롬빈의 존재 비율은 정상인의 측정값 폭을 참고로 하여 1 : 60,000~1 : 110,000 사이라고 생각할 수 있지만, 일반적으로는 약 1 : 100,000으로 존재한다고 생각된다. 또, 패혈증이나 간질환 환자에게서 그 존재 비율이 변화하는 경우가 알려져 있지만, 유리 안티트롬빈의 양이 적어지는 경우에서도 1 : 50,000 정도라고 되어 있다. 따라서, 제1 항체가 유리 안티트롬빈에도 반응성을 나타내면 TAT의 정량이 곤란해진다. 거기서, TAT를 정량 하려면, 유리 안티트롬빈으로의 반응성이 낮은 항체를 사용할 필요가 있고, TAT에 대한 반응성은, 계산상 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 50,000~100,000배 이상일 필요가 있다고 생각되는 바, 이하의 실시예에서 나타내듯이, 본 발명에서는 TAT에 대한 반응성이 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 100배 이상이면, 그 항체를 제1 항체로 이용함으로써 TAT의 정량이 충분히 가능하다는 점을 발견했다.

[0054] 본 발명에서 「TAT에 대한 반응성이 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 100배 이상」이란, 각 항원에 대한 친화성의 비가 100배 이상인 경우나, 후술하는 간접 저해 ELISA로 평가했을 때의 일정 비율의 저해율을 나타내는데 필요한 항원량의 비가 100배 이상인 경우 등을 들 수 있다.

[0055] TAT에 대한 반응성이 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 100배 이상인 항체를 간접 저해 ELISA로 평가 또는 스크리닝 하는 경우에 대해서 설명한다.

[0056] 우선, 안티트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체(제1 항체의 후보 항체)를 준비한다. 이러한 항체는, 후술하는 혼성 세포에 의한 단일 클론 항체 생성법 등에 의해 항체를 얻은 후, 결합 부위가 안티트롬빈 측인 TAT를 인식하는 항체를 선택하면 좋다. 물론, 결합 부위가 안티트롬빈 측인 TAT를 미리 인식하는 항체가 존재하는 경우에는 그것을 이하의 평가계에 제공하면 좋다.

[0057] 즉, 후보 항체와 일정량(예를 들면, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50㎍/mL)의 TAT, 또는 TAT의 반응을 저해할 수 있는 항원을 포함하는 용액을 충분한 시간(예를 들면, 12시간) 반응시킨다. 그 다음, 상기 반응액을 TAT를 고정화한 기재와 일정 시간 반응시킨다. 그 후, 세정 조작을 실시한 후, 표지 2차 항체를 이용하여 기재상의 TAT에 결합한 항체의 양(항체 잔존률)을 측정한다.

[0058] 예를 들면, 우선, 상기 항체의 반응을 저해하는 항원이 존재하지 않는 조건에서, 일정량의 TAT를 플레이트 등의 기재에 고상(固相)한다. 기재에 고상하는 항원(TAT)의 양은, 당업자라면 사용하는 항원의 분주량(分注量)과 평가 대상 항체의 종류와의 관계를 고려하여 적당히 설정할 수 있다.

[0059] 상기 항체의 반응을 저해하는 항원이 존재하지 않는 조건에서, 각 농도(예를 들면 0.04~1μg/mL)의 상기 제1 항체의 후보 항체를 상기 TAT를 고정화한 기재와 일정 시간 반응시킨다. 그 후, 세정 조작을 실시한 후, 표지 2차 항체(항마우스 IgG-HRP)를 이용하여, 기재상의 TAT에 결합한 항체의 양을 측정한다. 흡광도가 1.0 부근(표 1의 기재 방법이면 1000)이 되는 항체 농도를 결정한다. 이 항체 농도를 항원에 의한 저해시의 항체 농도로 할 수 있다(표 3 ; 반응시 농도(μg/mL)).

[0060] 그 다음, 상기 방법으로 결정한 농도의 후보 항체와 일정량(예를 들면, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50μg/mL)의 TAT 또는 유리 안티트롬빈을 포함하는 용액을 충분한 시간(예를 들면, 12시간) 반응시킨다. 그 다음, 상기 반응액을 TAT를 고정화한 기재와 일정 시간 반응시킨다. 그 후, 세정 조작을 실시한 후, 표지 2차 항체(항마우스 IgG-HRP)를 이용하여 기재 상의 TAT에 결합한 항체의 양(항체 잔존률)을 측정한다.

[0061] 또한, 항체 잔존률은 항원에 의한 흡수를 하지 않았을 때에 얻어지는 검출값을 100%로 산출할 수 있다.

[0062] 항체의 유리 안티트롬빈에 대한 반응성이 높은 경우는 TAT에 결합할 수 있는 항체의 양이 줄어들기 때문에, 표지 2차 항체에 의해 검출되는 항체의 양이 적어지고(항체 잔존률이 낮아진다), 한편, 항체가 유리 안티트롬빈에 대한 반응성이 낮은 경우는 TAT에 결합할 수 있는 항체가 많이 남기 때문에, 표지 2차 항체에 의해 검출되는 항체의 양이 많아진다(항체 잔존률이 높아진다).

[0063] 이 항체 잔존률을 처음에 TAT와 항체를 반응시킨(저해 반응을 TAT로 실시함) 후에, 반응액을 고체화 TAT와 반응시켰을 때의 항체 잔존률과 비교한다.

[0064] 그리고, 예를 들면, 유리 안티트롬빈을 50μg/mL 더해서 저해 반응 시켰을 때의 항체 잔존률이 50%인 경우, 같은 항체 잔존률을 나타내는데 필요한 TAT의 양을 상기 TAT로 저해했을 때의 결과로부터 산출한다. TAT로 저해했을 때에, 항체 잔존률 50%를 달성하는데 필요한 TAT 저해 항원의 양이 0.50μg/mL 미만이면, TAT에 대한 반응성이 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 100배 이상으로 할 수 있다.

[0065] 이와 같이 하여 선택된 항체를 제1 항체로 선택할 수 있다. 또, 제1 항체는 단일 클론 항체인 경우에 TAT에 대한 친화성(Kd)이 10^{-8} 이하인 것이 바람직하지만, 당업자라면 TAT에 대한 친화성의 수치를 참고로 하여 라텍스 시약에 적합한 항체를 적절히 선택할 수 있다.

[0066] 본 발명에서 사용되는 항체에는 항체 조각이 포함된다. 상기 항체 조각은 원하는 항체의 조각이고, 게다가 원래의 항체와 같은 반응성을 가지는 항체 조각이다. 본 발명에서 이용할 수 있는 항체 조각에는, 예를 들면, Fab, Fab', $F(ab')_2$, 또는 Fv 등이 포함된다. 이들 조각은 예를 들면, 항체를 상법에 의해 단백질 분해 효소에 의해 소화하고, 계속해서, 단백질의 분리·정제의 상법에 따라서 얻을 수 있다. 이것들은, 그대로 라텍스 입자에 고상하여 사용할 수 있지만, Fab' 조각이나 $F(ab')_2$ 조각으로 조제한 것을 라텍스 입자로 고상할 수 있다. 항체의 Fc 조각에 대한 비특이반응을 회피하는 관점에서, Fab'나 $F(ab')_2$가 보다 바람직하다.

[0067] 본 발명에서 사용하는 항체는, 우선, 혼성 세포에 의한 단일 클론 항체 생성법 등에 의해 TAT 항체(후보 항체)를 얻고, 그 후 TAT 항체(후보 항체) 중에서 상기와 같은 방법 및 기준에서, 유리 안티트롬빈과의 교차 반응성이 낮은 항체, 구체적으로는 TAT에 대한 반응성이 유리 안티트롬빈에 대한 반응성의 100배 이상인 항체를 선택함으로써 얻을 수 있다.

[0068] 후보가 되는 항체는, 예를 들면, 공지의 세포 융합법으로 제작된 혼성 세포에 의한 단일 클론 항체 생성법으로 얻을 수 있다. 항체 생성 세포로는, 사람을 제외한 동물, 예를 들면 마우스·랫·모르모트 등으로부터 선택할 수 있다. 혼성 세포 및 단일 클론 항체의 조제는 정법, 예를 들면, 생화학 실험 강좌 속편(일본 생화학회편) 또는 면역 생화학 연구법(일본 생화학회편)에 기재된 방법에 따라 실시할 수 있다.

[0069] 제2 항체로서는, 트롬빈 측에 결합하여 TAT를 인식하는 항체이면 특히 제한되지 않는다. 단일 클론 항체의 경우, TAT에 대한 친화성(Kd)이 10^{-8} 이하인 것이 바람직하지만, 당업자이면 TAT에 대한 친화성 수치를 참고로 하여 라텍스 시약에 적합한 항체를 적절히 선택할 수 있다. 항체를 선택하는 방법에 대해서는, 제1 항체와 동일하게 제작한 항체를 사용할 수 있다.

[0070] 제1 항체와 제2 항체의 조합은 라텍스 응집법에서 TAT의 측정이 가능하면 특히 제한되지 않지만, 혈장 등의 생체 시료 중에 포함되는 매트릭스(백그라운드)의 영향이 최소인 항체 조합을 선출하는 것이 바람직하다.

[0071] TAT 측정 시약에 요구되는 감도는, 정상인과 환자를 명확하게 구별할 수 있는 기준값, 혹은 그 2배의 농도가 측정 가능할 필요가 있기 때문에, 본 발명의 시약은 생체 시료 중의 10~15ng/mL의 TAT를 정량할 수 있는 시약인 것이 바람직하고, 3~4ng/mL의 TAT를 정량할 수 있는 시약인 것이 보다 바람직하며, 1ng/mL 정도의 농도에서도 정량할 수 있는 시약인 것이 더욱 바람직하다.

[0072] 상기 제1 항체 및 제2 항체를 결합시키는 라텍스 입자는 라텍스 응집 반응에 사용할 수 있는 것이면 특히 제한되지 않지만, 평균 입자 지름이 0.05㎛~0.5㎛인 것이 바람직하고, 0.2~0.4㎛인 것이 보다 바람직하다.

[0073] 사용하는 라텍스 입자의 종류는, 1종류의 라텍스 입자만을 사용해도 좋고, 복수 종류의 라텍스 입자를 사용해도 좋다. 예를 들면, 입자 지름이 다른 라텍스 입자를 조합해서 사용할 수 있다. 라텍스 입자는 단일 입자 지름으로 제조하는 것이 실질적으로 곤란한 점에서, 입자 전체의 평균 입자 지름으로 규정된다. 따라서, 평균 입자 지름 0.05㎛~0.5㎛라고 하는 경우, 그 범위에 포함되지 않는 라텍스 입자를 포함하는 경우라도, 본 발명에 해당하는 경우가 있다. 당업자에게 있어서, 입자 지름이 다른 라텍스 입자가 포함되는 것은 상식 범위 내이며, 당업자라면 그 입자 지름의 분포에 크게 치우침이 없는 입자군을 포함하는 용액을 사용해서 라텍스 시약을 구축하는 것이 가능하다.

[0074] 또한, 이 평균 입자 지름은 공지의 방법으로 측정할 수 있고, 예를 들면 투과형 전자현미경 장치를 이용한 화상해석에 의해 산출된다.

[0075] 본 발명과 관련되는 라텍스 입자로서는, 통상 이 분야에서 이용되고 있는 것이면 특히 한정되지 않지만, 예를 들면, 스티렌, 염화 비닐, 아크릴로니트릴, 초산비닐, 아크릴산 에스테르, 메타크릴산 에스테르 등의 비닐계 모노머를 중합시켜서 이루어지는 단일 중합체(예를 들면, 폴리스티렌, 메타크릴산 중합체, 아크릴산 중합체 등)로 이루어지는 입자, 부타디엔계 공중합체(예를 들면, 스티렌-부타디엔 공중합체, 메틸메타크릴레이트-부타디엔 공중합체, 아크릴로니트릴-부타디엔 공중합체 등)로 이루어지는 입자, 그 외의 공중합체(예를 들면, 스티렌-스티렌 설폰산염 공중합체, 메타크릴산 에스테르 공중합체, 아크릴산 에스테르 공중합체, 염화 비닐-아크릴산 에스테르 공중합체 등)로 이루어지는 입자를 들 수 있다. 관능기로서 카르복실기, 1급 아미노기, 카르바모일기(-$CONH_2$), 수산기, 알데히드기 등을 가지고, 또한, 기체가 상기 유기계 미립자로 이루어지는 입자를 들 수 있다.

[0076] 라텍스 입자에 항체를 고상하는 방법으로는, 공지의 방법에 준해서 실시하면 좋고, 예를 들면, 항체와 라텍스 입자를 완충액 중에서 현탁시켜서, 25℃에서 1시간 반응시킨 후, 원심분리, 블로킹 처리 등, 통상 이 분야에서 이루어지는 처리에 의해 얻을 수 있다. 또, 항체와 라텍스 입자를 화학 결합에 의해 고상하는 방법이나, 비오틴-아비딘 반응에 의해 항체를 고상하는 방법도 선택할 수 있다.

[0077] 라텍스 입자에 항체를 결합시킬 때에는, 항체가 상기 TAT에 대한 반응성 및 특이성을 유지할 수 있는 조건으로 실시한다.

[0078] 바람직한 시약을 조제하기 쉬운 점에서, 제1 항체를 고상(固相)한 제1 라텍스 입자, 제2 항체를 고상한 제2 라텍스 입자로 하여, 항체의 종류별로 고상 라텍스액을 조제할 수도 있고, 1종류의 라텍스 입자에 제1 항체와 제2 항체를 고상시켜서 시약을 조제할 수도 있다. 항체와 라텍스 입자를 어떻게 고상시켜서 시약을 조제할 것인지는, 당업자라면 적절히 설계할 수 있다.

[0079] 본 발명의 시약은, 1시약계일 수도 있고, 2시약계일 수도 있다. 본 발명의 시약이 1시약계인 경우, 생체 시료에 상기 항체를 고상한 라텍스 입자 현탁액을 첨가하여 항원 항체 반응을 일으키게 함으로써, 생체 시료 중의 TAT를 측정할 수 있다. 본 발명의 시약이 2시약계인 경우, 완충액 성분을 주체로 한 제1 시약을 생체 시료에 첨가한 후, 다시 상기 항체를 고상한 라텍스 입자를 포함하는 제2 시약을 첨가함으로써, 항원 항체 반응을 일으키게 하여 생체 시료 중의 TAT를 측정할 수 있다.

[0080] 라텍스 입자의 응집 정도는, 예를 들면 흡광도를 이용해서 측정하고, 미리 구한 표준품의 검량선으로부터 그 농도를 구하여, 검체 중의 TAT 농도를 정량할 수 있다. 또한, 흡광도의 측정 파장은, 통상은 340nm~1000nm, 바람직하게는 500nm~900nm로 측정하면 좋다. 라텍스 응집 반응을 측광하는 시간은, 라텍스 응집 반응이 발생하는 시간을 시간당 변화 속도, 혹은 일정 시간의 변화량에 의해 측광할 수 있다. 예를 들면, 흡광도를 측정하는 경우, 라텍스 응집 반응이 시작되고 나서 30초 후부터 5분 후의 시간당 흡광도 변화 속도, 혹은 일정 시간의 흡광도 변화량에 의해 측광할 수 있다. 반응 온도는 10~50℃인 것이 바람직하고, 20~40℃인 것이 보다 바람직하다. 반

응 시간은 적절히 결정할 수 있는데, 예를 들면 범용 자동 분석기에서는 10~15분간 반응 시간으로 측정할 수 있다. 또한, 당업자라면 광학 기기 혹은 범용 자동 분석기를 이용한 분석에서, 공지의 방법에 따라서 반응 온도, 반응 시간, 측정 파장, 측정 시간, 시약 구성, 라텍스 농도, 라텍스 고정화하는 항체 농도, 각종 첨가제 농도를 적절히 결정할 수 있다.

[0081] 본 발명에 이용되는 라텍스 입자의 농도는 라텍스 응집법에 의한 면역학적 측정 시약에 적용할 수 있는 농도이면 특히 한정되는 것은 아니지만, TAT를 측정하기 위해 필요한 반응시의 라텍스 입자의 농도는 0.005w/v~0.2w/v가 바람직하고, 0.01w/v~0.1w/v인 것이 보다 바람직하다.

[0082] 본 발명의 시약에 적용할 수 있는 피검 시료는, TAT를 함유할 가능성이 있는 피검 시료이면 특히 한정되지는 않지만, 생체 시료인 것이 바람직하고, 배양 세포여도 좋지만, 혈청, 혈장의 측정에 특히 바람직하게 사용할 수 있다. 포유동물 유래의 시료인 것이 바람직하고, 사람 유래의 시료인 것이 보다 바람직하다.

[0083] 본 발명의 시약은, 항체를 고정화한 라텍스 입자 이외에도, 라텍스 응집법에 따른 면역학적 측정 시약에 첨가 가능한 첨가제, 예를 들면, 완충액, 응집 촉진제, 비특이반응 억제제, 증감제 등을 더욱 함유할 수 있다. 본 발명의 시약에 첨가 가능한 증감제로서는, 알긴산 나트륨과 알긴산 프로필렌 글리콜 등을 들 수 있다. 또, 본 발명의 시약에 첨가 가능한 응집 촉진제로서는, 수용성 고분자나 단백질이 바람직하게 이용된다. 예를 들면, 덱스트란이나 덱스트란 황산, 폴리비닐 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈 등의 수용성 고분자나, 소혈청알부민 등의 알부민류, γ－글로불린 등의 글로불린류를 들 수 있다.

[0084] 또, 제3 항체를 첨가하여 사용할 수도 있다. 제3 항체의 사용은, 예를 들면 TAT 측정 시약의 측정 가능 범위를 저농도부터 고농도까지 널리 측정하고 싶은 경우, 반응 속도가 다른 항체를 제3 항체로서 사용하는 것이 바람직하게 이용된다.

[0085] 상기 완충액으로서는, pH 5.8~6.6에 완충능을 가지는 완충액이 바람직하고, 6.0~6.4인 것이 보다 바람직하며, 6.1~6.3인 것이 더욱 바람직하고, 6.15~6.25인 것이 특히 바람직하며, 약 6.2인 것이 가장 바람직하다. 1시약계이면 시약의 pH가 5.8~6.6에 조정되면 좋고, 2시약계이면 혼합했을 때에 pH가 5.8~6.6이 되도록 구성되어 있으면 좋다. 예를 들면, 완충액 성분을 주체로 한 제1 시약과, 항체를 고상한 라텍스 입자를 포함하는 제2 시약으로 구성되는 경우, 제1 시약의 pH가 5.8~6.6으로 조정되어 있어서, 양 시약을 혼합했을 때에 혼합액의 pH가 5.8~6.6이 되도록 하는 형태를 들 수 있다.

[0086] pH는 pH 조절제에 의해서 조절되어도 좋지만, 완충액에 의해 조정되는 것이 바람직하다. 트리스 완충액, 비스-트리스 완충액, 인산 완충액, 또는 구드 완충액 등이 적합하게 사용되고, 반응시의 완충액 농도는 10~500mmol/L인 것이 바람직하며, 20~200mmol/L인 것이 보다 바람직하다.

[0087] 또한, 혈액 시료를 시약과 혼합했을 때의 pH가 5.8~6.6에서 벗어나는 경우는, 별도로 pH 조정제 등으로 조정되어도 좋다.

[0088] 본 발명의 시약에 첨가할 수 있는 비특이반응 억제제로서는, 비특이반응의 원인 물질에 대한 항체나 수용체, 트리스 완충액, 인산 완충액, 글리신 완충액, 붕산 완충액, 구연산 완충액, 초산 완충액 또는 구드 완충액 등의 완충액류, EDTA, CyDTA, DTPA, EGTA, NTA, NTP 등의 킬레이트제, 염화 나트륨, 염화 칼륨, 황산 나트륨, 황산 칼슘, 황산 마그네슘, 탄산 칼슘, 탄산 나트륨 등의 염류, 지방산 디에탄올 아미드, 폴리옥시 에틸렌 알킬 에테르, 폴리옥시 에틸렌 알킬 페닐 에테르, 지방산 소르비탄 에스테르, 알킬 폴리 글루코시드, 알킬 모노 글리세릴 에테르, 폴리옥시 에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 지방산 알카놀 아미드, 알킬 글리코시드 등의 비이온성 계면활성제를 들 수 있다.

[0089] 본 발명의 시약은, 표준 물질로서 사용할 수 있는 TAT를 포함해도 좋다. TAT는 생체로부터 정제된 TAT여도 좋고, 유전자 재조합 등으로 합성된 TAT여도 좋다. 합성 TAT로서는, 예를 들면, 생물 제제로서 입수 가능한 트롬빈과 안티트롬빈을 시험관 내에서 배양하여 얻을 수 있다. 또, 대장균이나 포유동물 세포, 바큐로 바이러스를 감염시킨 곤충 세포 등에서, 기존의 번역 발현계를 사용하여 발현시킨 것을 회수해서 정제한 것을 혼합하여 TAT를 합성할 수도 있다.

[0090] [실시예]

[0091] 실시예 1　합성 TAT의 조제

[0092] 시판하는 히트 트롬빈 제제(일본 혈액제제기구제)와 안티트롬빈 제제(일본 혈액제제기구제)를 PBS(다르벡코 PBS(－) 분말 「닛스이(닛스이제약 주식회사제)」을 9.6g/L에서 용해)로 희석하여, 1：3의 몰비로 혼합한 후,

37℃에서 30분간 반응시켰다. 30분후, DFP(플루오르 인산 디이소프로필, 와코쥰야꾸사제)를 0.75mM이 되도록 첨가하여 반응을 정지시켰다.

[0093] 얻어진 반응물에는 미반응의 트롬빈, 안티트롬빈이 포함되기 때문에, 미리 500mM의 NaCl을 포함하는 50mM Tris-HCl 완충액(pH7.4)으로 평형화한 Hiload 26/60 Superdex 200 HR(GE 헬스케어사제)로 정제했다.

[0094] TAT 획분은 SDS-PAGE로 확인한 후에 회수했다. 얻어진 TAT는 0.5%의 BSA를 포함하는 생리 식염수로 희석하고, CLEIA 시약(스테이시아(등록상표) CLEIA TAT, LSI 메디엔스사제)를 이용하여 가격을 정했다. 이것을 합성 TAT로서 사용했다.

[0095] 실시예 2 항TAT 항체의 조제

[0096] 세포 융합법은, 안도 다미에·이와사키 다쓰오/저서 「단일 클론 항체/혼성 세포와 ELISA」(고단샤)에 따라서 실시했다.

[0097] 실시예 1에서 조제한 합성 TAT 50μg을 프로인트 완전 아쥬반트(DIFCO사제)와 혼합하여, 투여 항원으로 했다.

[0098] BALB/c 마우스(암컷, 4주령)에게 2주 간격으로 3회 투여하고, 4회째 투여는 절반량인 25μg를 정주(靜注)했다.

[0099] 1주일 후, 비장으로부터 림파구를 분리하여, 골수종 세포 P3x63-Ag.8과 혼합한 후, 폴리에틸렌 글리콜(PEG4000, 머크사제)을 이용하여 세포 융합을 실시했다.

[0100] HAT 선택 배지에 의해 혼성 세포를 선택하여, 1주일 후 목적으로 하는 항체를 생성하고 있는 혼성 세포를 합성 TAT에 대한 결합 활성을 지표로 스크리닝했다. 즉, 0.05M 탄산 완충액(pH9.5)으로 합성 TAT를 각각 0.2μg/mL로 희석하고, 이뮤노 플레이트(Maxisorp, NUNC사제)에 50μL/웰 첨가했다. 4℃, Over Night로 반응시킨 후, 0.05% Tween-20을 포함하는 PBS로 3회 세정하여, 1.0% BSA를 포함하는 PBS를 각 웰에 100μL 첨가하여 블로킹했다.

[0101] 그 다음, 배양 상청 각 웰에 50μL 첨가하고, 37℃에서 1시간 반응시킨 후, 0.05% Tween-20을 포함하는 PBS로 3회 세정했다. 퍼옥시다제 표지 항마우스 이뮤노 글로불린 항체(Dako사제)를 0.05% Tween-20을 포함하는 PBS로 1000배로 희석하여, 각 웰에 50μL 첨가했다.

[0102] 37℃, 1시간 반응시킨 후, 마찬가지로 5회 세정하여 o-페닐렌 디아민 용액(와코쥰야꾸사제)을 각 웰에 50μL 첨가했다. 실온에서 5~10분간 반응 후, 2N 황산 용액으로 반응을 정지했다.

[0103] 플레이트 분광 광도계(EL312e, BIO-TEK INSTRUMENTS사제)로 492nm의 흡광도를 측정했다. 합성 TAT와의 반응이 양호한 항체를 생성하고 있는 세포를 선택하여, 한계 희석법으로 복제하였다. 10일 후, 스크리닝을 실시하여, 합성 TAT와 반응하는 항체를 생성하는 혼성 세포를 취득했다.

[0104] 실시예 3 항트롬빈 항체의 조제

[0105] 실시예 2와 같은 방법으로 면역 항원을 트롬빈으로 하여 항트롬빈 항체를 얻었다. 트롬빈에 대해서 특이적으로 반응하는 항체를 선택하고, 이 중 1클론을 항트롬빈 항체(T-1)로 사용했다.

[0106] 실시예 4 간접 저해 ELISA에 의한 항체 특이성 평가

[0107] 간접 저해 ELISA법에 따라서, 각 항체의 반응성을 평가했다. 간접 저해 ELISA법에 의한 반응계의 모식도를 도 2에 나타낸다.

[0108] 평가하고자 하는 0.04~0.4μg/mL 농도의 TAT를 인식하는 항체(항TAT 항체) 후보를 저해 항원(프로트롬빈(엔자임 리서치사제), 트롬빈, 안티트롬빈, 합성 TAT)과 혼합하고 배양했다. 일부 저해된 상기 항체 후보를 1차 항체로 하여 96 웰 플레이트에 고상화한 합성 TAT와 결합시켰다. 다시 퍼옥시다제 표지 항마우스 이뮤노 글로불린 항체(Dako사제)를 2차 항체로서 결합시키고, 발색 기질을 첨가하여 흡광도를 측정했다. 또, 발색의 변화율로부터 항체의 잔존률을 계산했다.

[0109] 특정 항체(TAT-5)에 대해서, 각 저해 항원을 이용했을 때의 흡광도를 표 1에, 흡광도로부터 계산된 항체의 잔존률을 표 2에 나타냈다.

[0110] 예를 들면, TAT의 저해 항원 농도가 10μg/mL일 때의 잔존률은 285/1066×100=26.7(%)이 된다. 각 항체의 각 항원 농도에 대해서 잔존률을 산출했다. 또한, 표 중에서, Pro-T는 프로트롬빈을, T는 트롬빈을, AT는 안티트롬빈을 나타낸다.

[0111] [표 1]

표 1 간접 저해 ELISA의 측정 결과

저해 항원	Ｐｒｏ－Ｔ	Ｔ	ＡＴ	ＴＡＴ
0	１０６６	１０６６	１０６６	１０６６
0．０１６	１０７４	１０５９	１０５９	１０６３
0．０８	１０６２	１０６２	１０５９	１０４５
0．４	１０８５	１０６７	１０６５	９６５
２	１０６４	１０４９	１０３３	６６１
１０	１０７１	１０５７	１００１	２８５
５０	１０７２	１０５６	７８９	１１２

（저해 항원 농도；μｇ／ｍＬ，흡광도（４９２ｎｍ × １０００），각 N=2측정 (평균치)）

[0112]

[0113] [표 2]

표 2 항체 잔존률 (%)

저해 항원	Ｐｒｏ－Ｔ	Ｔ	ＡＴ	ＴＡＴ
0	１００．０％	１００．０％	１００．０％	１００．０％
0．０１６	１００．８％	９９．３％	９９．３％	９９．７％
0．０８	９９．６％	９９．６％	９９．３％	９８．１％
0．４	１０１．８％	１００．１％	９９．９％	９０．５％
２	９９．８％	９８．４％	９６．９％	６２．０％
１０	１００．５％	９９．２％	９３．９％	２６．７％
５０	１００．６％	９９．１％	７４．０％	１０．５％

（저해 항원 농도；μｇ／ｍＬ）

[0114]

[0115] 또, 안티트롬빈 50μg/mL로 저해를 가했을 때의 잔존률과 동등한 저해율이 되는 TAT 항원량을 산출하여 비교함으로써, 안티트롬빈에 대한 TAT 반응성 차이(배율)를 구했다. 이 차이가 크면, 안티트롬빈에 비해서 TAT에 대한 특이성이 강한 것을 의미한다. 계산은 TAT의 저해 곡선(저해항원 첨가 농도 대비 수-잔존률%)을 그려서 스플라인 함수를 이용하였다.

[0116] 예를 들면, TAT－5의 경우, 안티트롬빈 50μg/mL의 잔존률은 74.0%이고 그 잔존률로 같게 되는 TAT 항원량은 1.144μg/mL이다. 즉, 반응성의 차이는 50/1.144=44배이다(도 3).

[0117] 그 외, 항체 클론 27종류에 대해서 상기 배율을 계산했다. 첨가 TAT와 안티트롬빈 양의 차이(배율)가 100배 이상이 되는 항체는 13종류, 1000배 이상이 되는 항체는 7종류, 10000배 이상이 되는 항체는 2종류 존재했다. 5종류의 항체에 대해서, 표 3에 나타낸다.

[0118] [표 3]

복제	반응시 농도 (μg/ml)	50 μg/ml AT 저해 (잔존%)	AT 50 μg/ml 와 동등한 저해 TAT (μg/ml)	배율 (배)
ＴＡＴ－１	０．０４	８８．２	０．００１	４９８９２
ＴＡＴ－２	０．０８	９２．３	０．０２９	１７００
ＴＡＴ－３	０．０８	８９．４	０．２３０	２１８
ＴＡＴ－４	０．０８	１８．０	０．７２０	６９
ＴＡＴ－５	０．４０	７４．０	１．１４４	４４

[0119]

[0120] 실시예 5 라텍스 응집법 시약에 의한 TAT 반응성 평가

[0121] 실시예 4의 간접 저해 ELISA로 평가한 안티트롬빈측 항체(TAT－1, TAT－2, TAT－3, TAT－4, TAT－5) 및 실시예 3에서 얻은 트롬빈측 항체(T－1)를 라텍스 입자에 감작(感作)하여 그 반응성을 평가했다.

[0122] 항체의 라텍스 입자로의 감작은 각각의 항체를 0.32㎛의 폴리스티렌 라텍스 입자에 흡착시켜서, 0.3% BSA 용액으로 블로킹 처리를 한 후, 원심 처리로 0.05% 아지드화 나트륨(키시다 화학사제) 용액으로 세정한 후, 다시 0.05% 아지드화 나트륨 용액에 분산시켰다.

[0123] 상기에서 제작한 항체를 감작한 라텍스 입자를 포함하는 시약을 조제하여, TAT에 대한 반응성을 평가했다. 사용한 시약의 조성은 이하와 같다. 제1 시약에는, 100mM Bis－tris(도진가가쿠샤제) pH 6.0, 500mM NaCl, 0.15% BSA를 사용했다. 제2 시약에는, 각 항체 감작 입자가 파장 700nm에서의 흡광도가 1.0이 되도록 0.05% 아지드화 나트륨 용액으로 희석해서 혼합한 것을 사용했다.

[0124] 혈청 중에는 다량의 TAT가 포함되기 때문에, 이것을 0.5%의 BSA를 포함하는 생리 식염수로 희석하여 CLEIA 시약으로 가격이 정해진 것을 혈청 TAT로서 사용했다. 측정용 시료로서는, 가격이 정해진 혈청 TAT를 합동혈장(VITRO LOGIC사제)에서 TAT 농도가 1000ng/mL가 되도록 희석한 것을 사용했다.

[0125] 측정 기기로는 7170S(히타치 하이테크놀러지스사제)를 사용했다. 측정용 파라미터는, 샘플량 12㎕, 제1 시약 90㎕, 제2 시약 90㎕, 주파장 570nm, 부파장 800nm로 설정하고, 측광 포인트 34포인트째의 흡광도로부터 20포인트째의 흡광도를 차감하여 10000배가 된 것을 ΔAbs로 하여 측정을 실시했다.

[0126] 결과를 도 4에 나타낸다. 표 3에 나타낸 5종류의 항체는 모두 TAT 무첨가에 대해서 TAT 1000ng/mL의 반응성이 ΔAbs로 100 이상이었다.

[0127] 표 3에서의 TAT－1, TAT－2, TAT－3은, 라텍스 응집법으로 높은 반응성을 확인할 수 있었다. 또, TAT－4, TAT－5의 항체에 대해서도, 상기 TAT－1, TAT－2, TAT－3보다 작은 반응성이 확인되었다.

[0128] 실시예 6 라텍스 응집법 시약에 의한 안티트롬빈과의 교차 반응성 평가

[0129] 조제한 시약의 안티트롬빈과의 교차 반응성을 실시예 5에 기재한 사람 혈청을 0.5% BSA를 포함하는 생리 식염수로 1000 ng/mL로 희석한 샘플 중에 추가로 안티트롬빈을 250, 500㎍/mL가 되도록 첨가한 샘플을 이용해서 평가했다.

[0130] 안티트롬빈 무첨가일 때의 반응성과 각 농도의 안티트롬빈을 첨가했을 때의 반응성을 비교했다.

[0131] 측정용 시약, 측정 기기, 측정 파라미터는 모두 실시예 4와 동일하게 실시했다. 평가에 사용한 항TAT 항체의 종류는 TAT－1, TAT－2, TAT－3, TAT－4, TAT－5이다.

[0132] 라텍스 시약에 의한 안티트롬빈으로의 교차 반응성 평가 결과를 도 5에 나타낸다. 실시예 4의 간접 저해 ELISA로 100배 이상의 특이성을 얻은 항체(TAT－1, TAT－2, TAT－3)는 안티트롬빈 농도 500㎍/mL의 첨가에도 70% 이상의 반응성을 유지하고 있었다. 한편, 100배 이하의 항체(TAT－4, TAT－5)에 대해서는 안티트롬빈 농도의 증가에 따라서, 모두 극단적인 반응성 저하가 인정되었다(도 5).

[0133] 실시예 5의 라텍스 응집 반응계에서 반응성이 확인된 각 항체에 대해서, ELISA법에 따라 교차 반응성을 확인한 결과, TAT－1, TAT－2, TAT－3의 각 항체에서는 라텍스 응집의 양 반응계에서 높은 특이성을 보인 데 반해서, TAT－4, TAT－5의 각 항체는 라텍스 응집법으로 반응성은 볼 수 있지만, 특이성이 충분하지 않다는 점이 분명해졌다.

[0134] 따라서, 실시예 4의 간접 저해 ELISA에 의해 확인한 항체의 반응성의 차이가 100배 이상일 때에, 그 항체는 시약으로 사용하기에 매우 유용하다는 점이 인정되었다.

[0135] 실시예 7 제1 시약 pH의 영향

[0136] 라텍스 시약의 pH에 의한 반응성에 대한 영향을 pH 5.7~7.2 사이에서 바꾸어 평가했다.

[0137] 시약 조성으로는, 제1 시약으로서 100mM Bis－tris 또는 MES(도진가가쿠샤제), 700mM NaCl, 0.15% BSA, 0.20% 알긴산나트륨(와코쥰야꾸사제), 0.05% 에마르겐 150(가오사제), 제2 시약으로서 안티트롬빈측 항체에는 TAT－1, 트롬빈측 항체에는 T－1을 사용하고, 각 항체 감작 입자가 700nm에서의 흡광도가 1.0이 되도록 0.05% 아지드화 나트륨 용액으로 희석해서 혼합했다. 라텍스 입자로의 항체 감작은 입경 0.20㎛의 입자를 이용한 것 외에는 실시예 5와 동일하게 실시했다.

[0138] 측정 대상 샘플의 조제는, 0.5% BSA를 포함하는 생리 식염수(Saline으로 표기), 사람 합동혈장(Plasma로 표기)을 사용했다. 또, CLEIA 시약에 의해 가격이 정해진 사람 혈청을, 상기 합동혈장으로 각 농도(10, 50, 100ng/mL)로 희석한 것을, TAT 샘플로 했다. 측정 기기, 파라미터는 실시예 4와 동일하게 하여 실시했다.

[0139] 제1 시약의 완충액으로서 Bis-tris를 사용하고, pH를 6.0~7.2 사이에서 변화시켰을 경우의 반응성에 대한 영향은 이하와 같은 경향을 볼 수 있었다. 우선, pH 6.7에서 Saline Base가 0 이하가 되었다(도 6). 혈장 베이스를 차감한 TAT 반응성에 대한 영향은 pH가 높아지면 서서히 반응성이 내려가는 경향을 볼 수 있었다(도 7).

[0140] 고감도로 TAT를 측정할 수 있는 시약 성능을 목표로 하여, TAT 농도가 50ng/mL일 때의 시그널(ΔAbs) 100 이상을 1개의 지표로 하고, 그 경우, 반응액 중의 pH는 6.6 이하가 바람직하다는 것을 알았다(도 7).

[0141] 또한, 블랭크의 억제와 반응성의 양립을 목표로 하여, pH 5.7~6.2에서의 블랭크 수치에 대한 영향을 조사했다. 그 결과, 블랭크의 흡광도는 Bis-tris, MES 어떤 완충액을 이용한 경우에도 pH가 상승하면 낮아지는 경향을 볼 수 있었다. 특히, pH 5.7에서 5.8 사이에서의 저하가 크고, pH 6.0으로부터 pH 6.2의 사이에서 흡광도가 100 이하가 되는 점이 판명되었다(도 8, 9).

[0142] pH가 높아지면, Saline 블랭크·Plasma 블랭크·TAT 반응성이 pH 의존적으로 내려가는 경향을 발견했다. pH가 중성보다 높으면 반응성이 떨어진다는 것은, 본 발명자들이 발견한 뜻밖의 효과였다.

[0143] 이상으로부터, 블랭크 억제의 관점에서는 pH의 하한이 5.8이고, pH 6.2가 특히 바람직하며, 반응성 유지의 관점에서 pH의 상한이 6.6이고, 6.2가 특히 바람직한 것을 알았다.

[0144] 실시예 8 임상 검체를 이용한 상관 시험

[0145] 임상 검체를 사용하여, 본 발명의 TAT 측정 라텍스 시약이 혈중 TAT 농도 측정에 사용할 수 있는지 검증했다.

[0146] 시약 조성은 이하와 같이 조제한 것을 사용했다. 100mM Bis-tris pH 6.2, 700mM NaCl, 0.05% 에마르겐 150, 0.20% 알긴산 나트륨, 0.15% BSA를 제1 시약으로 했다. 제2 시약에는 실시예 7와 같은 것을 사용했다.

[0147] 대조 시약에는, CLEIA 시약을 이용하여 측정했다. 표준품에는 TAT 교정기(LSI 메디엔스사제)를 라텍스 시약, CLEIA 시약 모두 사용했다.

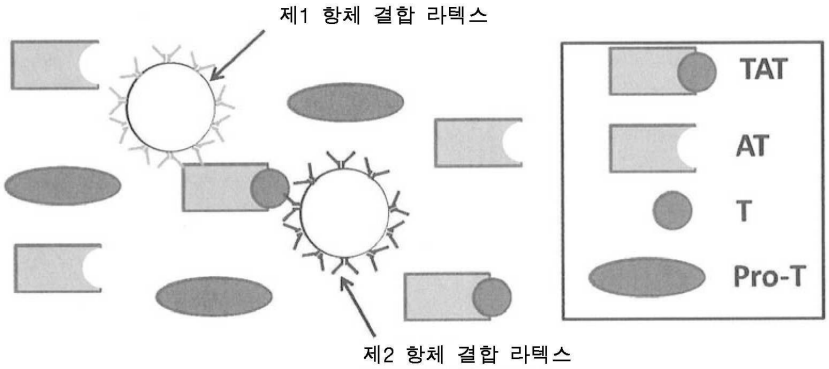
[0148] 사용 검체는 구연산 혈장 20 검체를 사용했다. 측정 기기, 파라미터는 모두 실시예 4와 동일하게 하여 측정했다. CLEIA 시약의 측정 기기는 STACIA(LSI 메디엔스사제)를 사용하고, 첨부 문서에 기재의 파라미터에 준해서 측정을 실시했다.

[0149] 양 시약에 의해 측정된 결과에 대해서 도 10에 나타냈다.

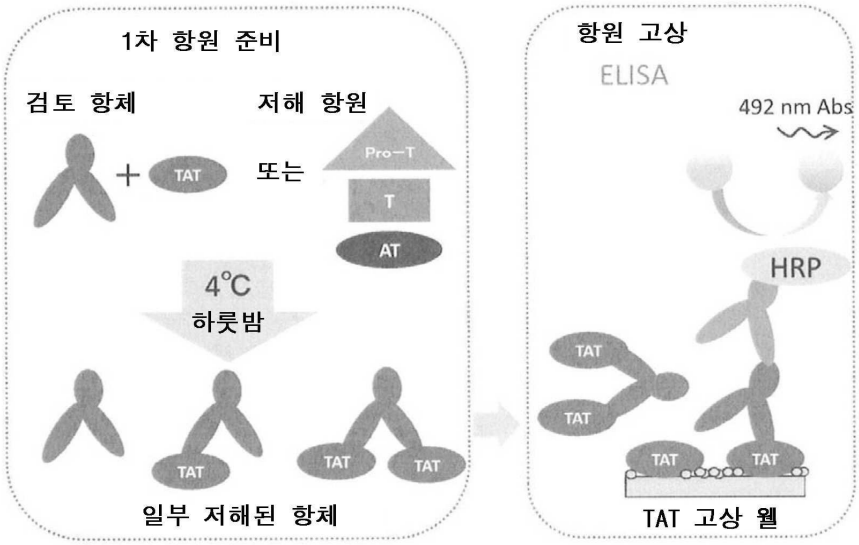
[0150] 본 발명에 의한 라텍스 시약은, 3ng/mL~120ng/mL 범위에서, 임상 검체에서도 종래의 CLEIA 시약에 의한 측정 시약과 양호한 상관성을 나타냈다. 본 발명을 이용하면 B/F 분리 등 처리를 하지 않고, 고감도로 임상 검체에서의 측정이 가능하다.

도면

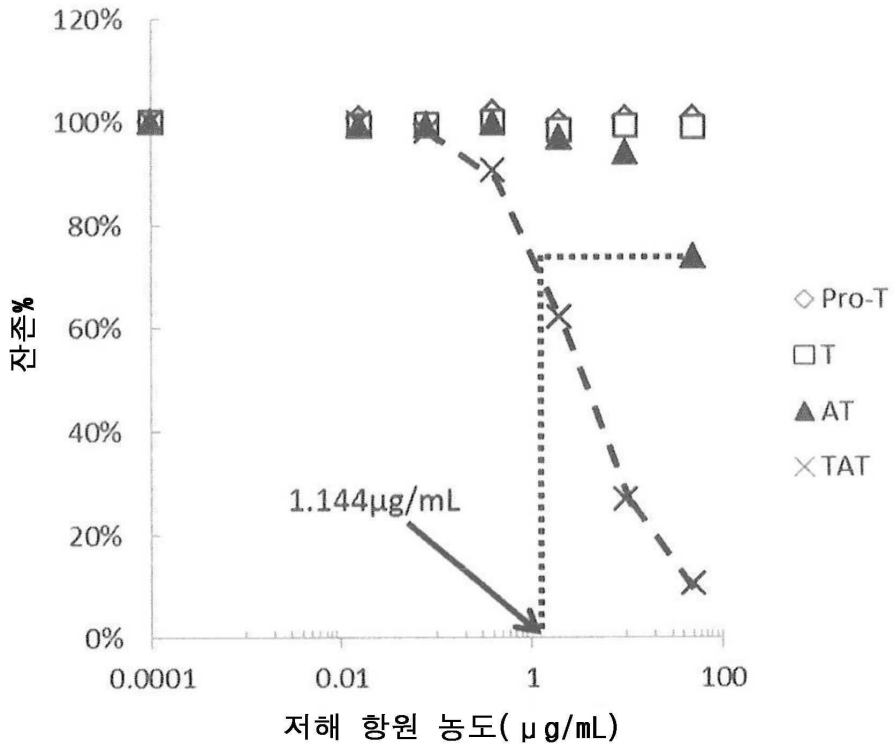
도면1



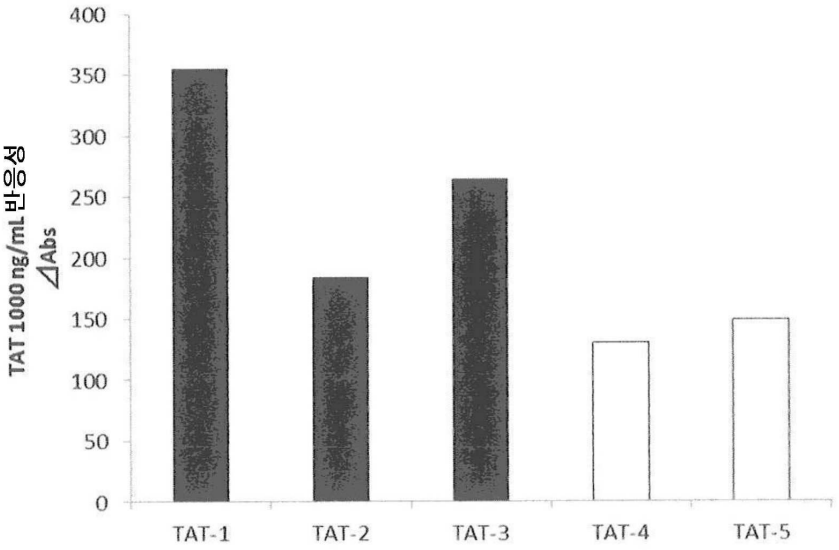
도면2


1차 항원 준비
검토 항체
저해 항원
TAT
또는
Pro-T
T
AT
4°C
하룻밤
TAT
TAT
TAT
일부 저해된 항체
항원 고상
ELISA
492 nm Abs
HRP
TAT
TAT
TAT
TAT
TAT 고상 웰

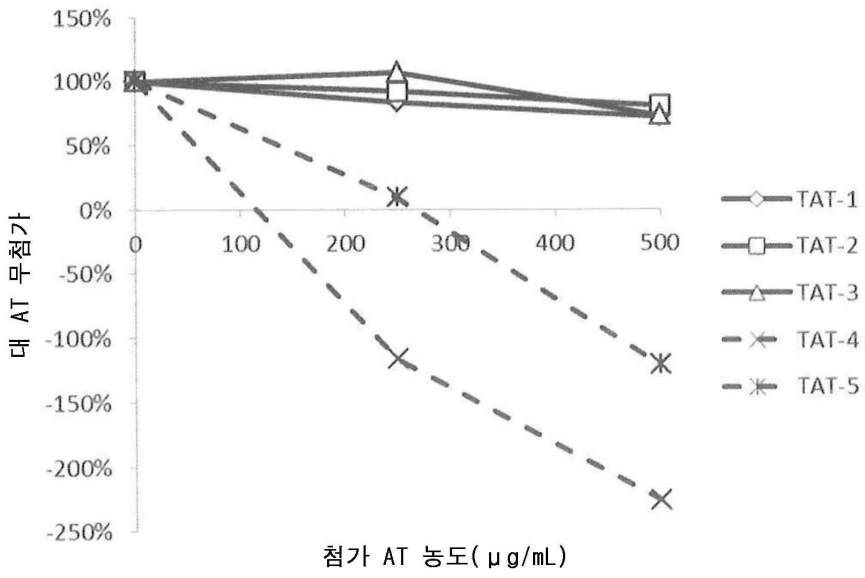
도면3


120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
잔존율%
1.144μg/mL
0.0001
0.01
1
100
저해 항원 농도(μg/mL)
Pro-T
T
AT
TAT

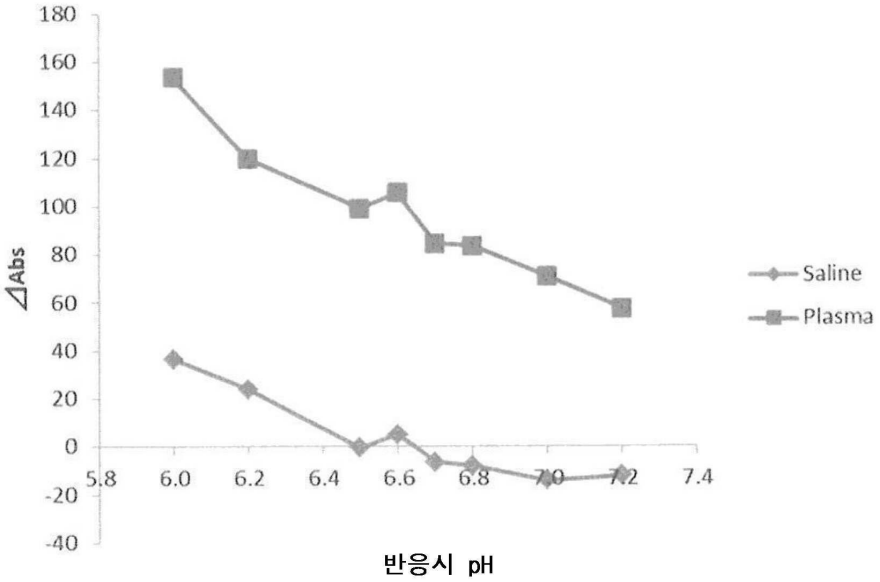
도면4


400
350
300
250
200
150
100
50
0
TAT 1000 ng/mL 반응성
ΔAbs
TAT-1
TAT-2
TAT-3
TAT-4
TAT-5

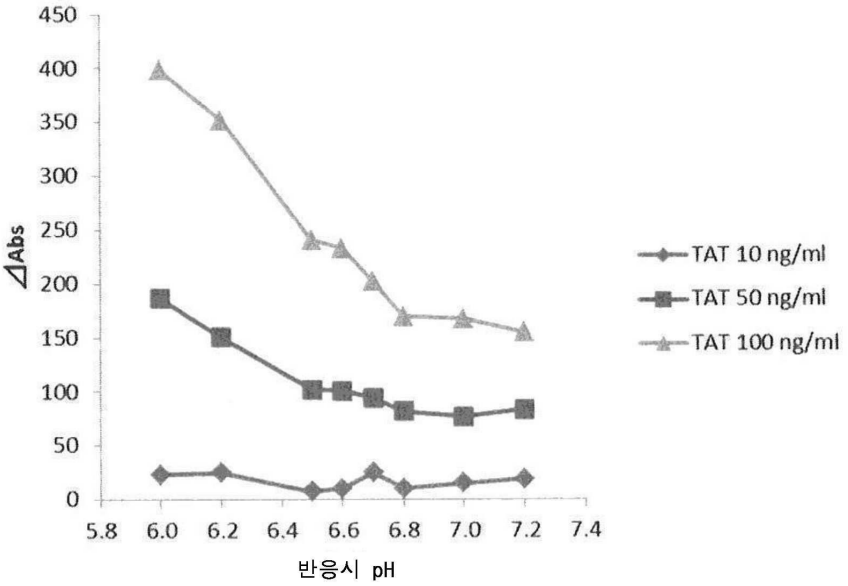
도면5


150%
100%
50%
0%
-50%
-100%
-150%
-200%
-250%
0
100
200
300
400
500
대 AT 무첨가
첨가 AT 농도(μg/mL)
TAT-1
TAT-2
TAT-3
TAT-4
TAT-5

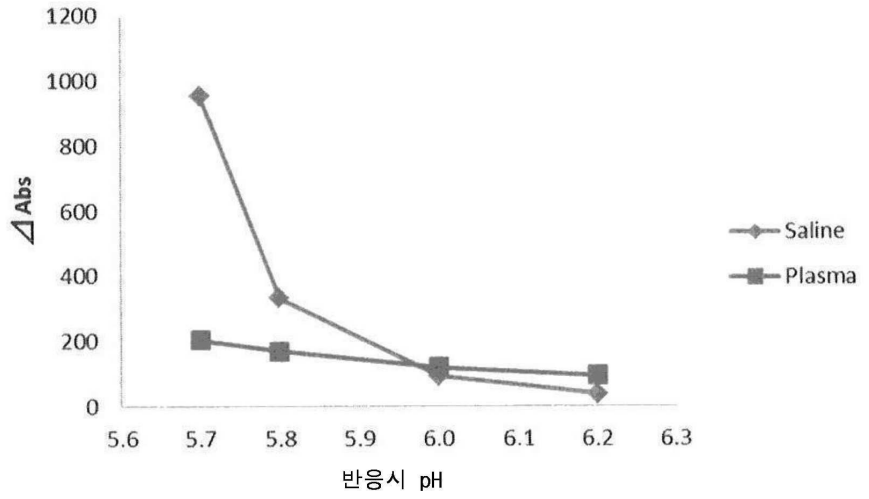
도면6


180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
-40
ΔAbs
5.8
6.0
6.2
6.4
6.6
6.8
7.0
7.2
7.4
반응시 pH
Saline
Plasma

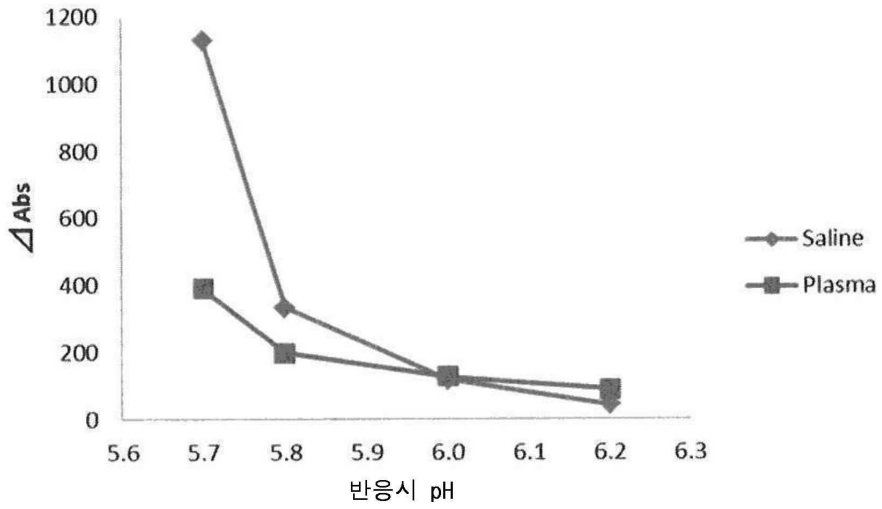
도면7


450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
ΔAbs
5.8
6.0
6.2
6.4
6.6
6.8
7.0
7.2
7.4
반응시 pH
TAT 10 ng/ml
TAT 50 ng/ml
TAT 100 ng/ml

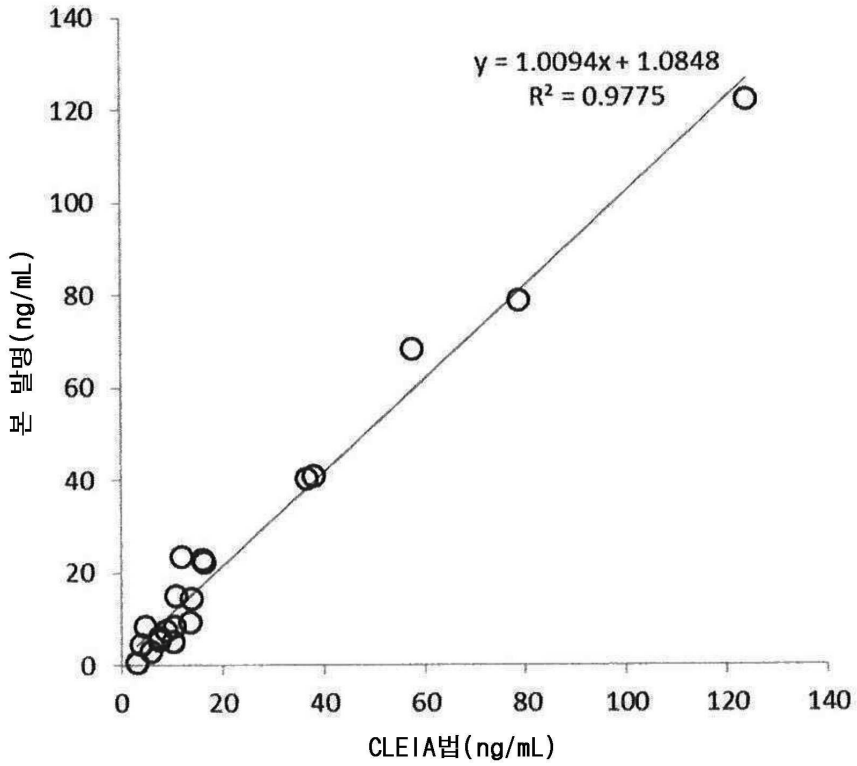
도면8


1200
1000
800
600
400
200
0
Δ Abs
5.6
5.7
5.8
5.9
6.0
6.1
6.2
6.3
반응시 pH
Saline
Plasma

도면9


1200
1000
800
600
400
200
0
Δ Abs
5.6
5.7
5.8
5.9
6.0
6.1
6.2
6.3
반응시 pH
Saline
Plasma

도면10


y = 1.0094x + 1.0848
R² = 0.9775
140
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
140
본 발명(ng/mL)
CLEIA법(ng/mL)