



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월10일
(11) 등록번호 10-2076354
(24) 등록일자 2020년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7025748
(22) 출원일자(국제) 2013년02월14일
심사청구일자 2018년02월08일
(85) 번역문제출일자 2014년09월15일
(65) 공개번호 10-2015-0034676
(43) 공개일자 2015년04월03일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2013/051193
(87) 국제공개번호 WO 2013/121368
국제공개일자 2013년08월22일
(30) 우선권주장
566/CHE/2012 2012년02월15일 인도(IN)
(56) 선행기술조사문헌
US04604348 A*
US20020090662 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
바이오콘 리미티드
인도 방갈로어 피.오. 560100 일렉트로닉 시티
제20 케이엠 호수르 로드
밀란 게이메바하
스위스 체하-8050 취리히 투어가우어스트라쎄 40
(72) 발명자
셴굽타, 닐안잔
인도, 560 076 방갈로르, 베너가타 로드, 란카 콜
로니 로드, 에피톨 크라운 샵비004
우디아바르, 아니타, 라오
인도, 560 071 방갈로르, 돔투르, 7 크로스, 란카
헤이트즈 733
(뒤편에 계속)
(74) 대리인
석혜선, 김용인

전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **분석물의 검출 및 선택적인 정량화를 위한 공정**

(57) 요약

본 발명은 분석물의 가용성 표적의 존재 하에 샘플에서 분석물을 검출 및 선택적으로 정량화하는 공정에 관한 것이다. 가용성 표적은 분석물과 복합체를 형성하여, 전체 분석물의 농도 측정을 방해할 수 있다. 본 발명의 공정은, 분석물 및 가용성 표적을 포함하는 샘플을 희석시키는, 즉 분석물-가용성 표적 복합체의 해리에 일조하는 독특한 변형된 시트레이트 완충액을 이용함으로써, 본 발명의 공정을 통해 분석물을 정확하게 검출 및 선택적으로 정량화하여 측정할 수 있게 한다.

(72) 발명자

탄가무투, 셴틸

인도, 638 301 타밀 나두, 에로드(디스트),
바바니, 나타라자프람 214/4

나약, 비벡, 고타

인도, 560 078 방갈로르, 자라가나할리 제이 피 나
가르 포스트, 스리니바사 칼얀 만타파 로드, 스리
두르가 사이클 마트

필라이, 란짓, 라빈드란

인도, 560 029 방갈로르, 타바레키어 메인 로드,
크리쉬나몰티 레이아웃, 1 크로스, 4 플로어,
샵33/1

바시스타, 락스미칸트

인도, 560 043 방갈로르, 에이치알비알 레이아웃,
3 블록 4 크로스, 샵212

라마스와미, 실파, 고빈다

인도, 635 126 크리슈나지리, 호수르 탈룩, 베게팔
리 포스트, 십콧 마하리쉬 나가르 다운 페이즈, 도
어 넘버 268

헤그드, 비쉬카

인도, 560 098 방갈로르, 라자라제쉬와리 나가르,
할게바데라할리, 쉬반나 레이아웃, " 다난자와 ",
샵41

멜라르코드, 라마크리쉬난

인도, 560 035 방갈로르, 사르자퍼르 로드, 레니보
우 드라이브 레이아웃, 8 크로스, 4 메인, 288

명세서

청구범위

청구항 1

생물학적 샘플에서의 분석물의 검출 및 정량화를 위한 공정으로서,

상기 공정은, 생물학적 샘플에서의 분석물의 상기 검출 및 정량화를 위한 분석법(assay)을 수행하기 전에, 희석된 생물학적 샘플을 수득하기 위해 변형된 시트레이트 완충액을 샘플에 제공하는 단계, 및

샘플에서의 분석물을 검출 및 정량화하기 위한 분석법을 수행하는 단계를 포함하며,

여기서 변형된 시트레이트 완충액은 시트레이트-HCl 및 폴리소르베이트-20을 포함하고, 완충액의 pH 범위는 pH 2.5 내지 3.8이며,

생물학적 샘플이 1종 이상의 간섭 물질을 분석물에 대한 표적으로서 포함하며, 상기 간섭 물질 및 상기 분석물은 조합되어 복합체를 형성하고,

분석물은 인간 상피 성장 인자 수용체 2(human epidermal growth factor receptor 2)(HER-2) 항체이며, 간섭 물질은 HER-2의 세포외 도메인(HER-2-ECD)인, 공정.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

복합체의 형성이 생물학적 샘플 내 유리 분석물(free analyte)의 양을 감소시키며, 이로써 상기 분석물의 정확한 검출 및 정량화를 저해하는, 공정.

청구항 5

제1항에 있어서,

변형된 시트레이트 완충액이 형성된 복합체를 해리하여 상기 분석물의 정확한 검출 및 정량화를 가능하게 하는, 공정.

청구항 6

제1항에 있어서,

변형된 시트레이트 완충액이 125 mM 농도의 시트레이트-HCl 및 0.1% w/v 농도의 폴리소르베이트-20을 포함하며, 완충액의 pH 범위가 pH 3.0 내지 3.8인, 공정.

청구항 7

제1항에 있어서,

생물학적 샘플이 혈액, 혈장, 및 혈청 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 공정.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제1항에 있어서,

분석법이 효소 연결 면역흡착 분석법(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA)인, 공정.

청구항 13

제12항에 있어서,

효소 연결 면역흡착 분석법이 샌드위치 효소 연결 면역흡착 분석법이며, 캡처 항체, 검출 항체, 검출 항체와 반응하는 시약, 마이크로타이터 플레이트, 코팅 완충액, 세정액 및 중단액(stopping solution) 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는 구성분의 존재 하에 수행되는, 공정.

청구항 14

제13항에 있어서,

캡처 항체가 생물학적 샘플 내 분석물에 대한 항체인, 공정.

청구항 15

제13항에 있어서,

검출 항체가 호스레디쉬 퍼옥시다제 및 알칼리 포스파타제 및 루테늄으로 이루어진 균으로부터 선택되는 효소로 표시되는, 공정.

청구항 16

제13항에 있어서,

표지된 항체와 반응하는 시약이 ABTS(2,2'-아지노비스[3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산]-다이암모늄염, TMB(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘) 및 전기 화학발광(electro chemiluminescent) 기질로부터 선택되는 발색(chromogenic) 기질인, 공정.

청구항 17

제13항에 있어서,

코팅 완충액이 인산염 완충 식염수인, 공정.

청구항 18

제13항에 있어서,

세정액이 인산염 완충 식염수 및 폴리소르베이트-20을 포함하는, 공정.

청구항 19

제13항에 있어서,

중단액이 0.1 N 황산인, 공정.

청구항 20

제12항에 있어서,

효소 연결 면역흡착 분석법(ELISA)이,

- a. 고체 표면을 분석물에 대한 캡처 항체로 코팅하는 단계;
- b. 변형된 시트레이트 완충액을 생물학적 샘플에 제공하여, 희석된 생물학적 샘플을 수득하는 단계;
- c. 희석된 샘플을 단계 (a)의 항체 코팅된 지지체에 첨가하는 단계;
- d. 지지체를 인큐베이션 및 세정하여, 임의의 미결합(unbound) 분석물을 제거하는 단계;
- e. 분석물에 대한 표지된 검출 항체를 첨가하고, 지지체를 세정하여, 임의의 미결합 검출 항체를 제거하는 단계; 및
- f. 표지된 항체와 반응하는 시약을 첨가하여, 샘플에서 분석물을 검출 및 정량화하는 단계를 포함하는, 공정.

청구항 21

삭제

청구항 22

생물학적 샘플에서 분석물을 검출 및 정량화하기 위한 효소 연결 면역흡착 분석법(ELISA) 키트로서,

상기 키트는, 변형된 시트레이트 완충액과, 캡처 항체, 검출 항체, 검출 항체와 반응하는 시약, 마이크로타이터 플레이트, 코팅 완충액, 세정액, 및 중단액 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는 구성분으로 이루어지며,

여기서 변형된 시트레이트 완충액은 시트레이트-HCl 및 폴리소르베이트-20을 포함하고, 완충액의 pH 범위는 pH 2.5 내지 3.8이며,

생물학적 샘플이 1종 이상의 간섭 물질을 분석물에 대한 표적으로서 포함하며, 상기 간섭 물질 및 상기 분석물은 조합되어 복합체를 형성하고,

분석물은 인간 상피 성장 인자 수용체 2(human epidermal growth factor receptor 2)(HER-2) 항체이며, 간섭 물질은 HER-2의 세포외 도메인(HER-2-ECD)인, 키트.

청구항 23

생물학적 샘플에서 분석물의 존재를 검출 및 정량화하기 위한, 변형된 시트레이트 완충액으로,

여기서 변형된 시트레이트 완충액은 시트레이트-HCl 및 폴리소르베이트-20을 포함하고, 완충액의 pH 범위는 pH 2.5 내지 3.8이며,

생물학적 샘플이 1종 이상의 간섭 물질을 분석물에 대한 표적으로서 포함하며, 상기 간섭 물질 및 상기 분석물은 조합되어 복합체를 형성하고,

분석물은 인간 상피 성장 인자 수용체 2(human epidermal growth factor receptor 2)(HER-2) 항체이며, 간섭 물질은 HER-2의 세포외 도메인(HER-2-ECD)인, 변형된 시트레이트 완충액.

청구항 24

제23항에 있어서,

변형된 시트레이트 완충액이 125 mM 농도의 시트레이트-HCl 및 0.1% w/v 농도의 폴리소르베이트-20을 포함하며, 완충액의 pH 범위가 pH 3.0 내지 3.8인, 변형된 시트레이트 완충액.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 분석물의 가용성 표적을 포함하는 생물학적 기질(biological matrix)에 존재하는 상기 분석물의 총량을 정량화하기 위한 단일 단계 리간드 결합 분석법에서 독특한 산성 해리 완충액을 사용하는 공정에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 이 독특한 완충액을 사용하여 전체 분석물을 신뢰할 만하게 정량화하기 위해 ELISA 포맷을 이용하는 면역분석법의 개발을 위한 공정에 관한 것이다. 본 발명은 과량의 유리 분석물(free analyte)의 존재 하에 항-분석물 항체를 검출하기 위한 면역원성(immunogenicity) 분석법으로 확장될 수 있다.

배경 기술

[0002] 면역분석법은 주로, 생물학적 샘플에서의 호르몬, 중앙 항원, 박테리아 항원 또는 바이러스 항원, 단백질 치료제 등과 같은 매우 다양한 분석물의 검출 및 정량화에 사용된다. 정량적 면역분석법은, 효능 및 안전성 연구를 지지하는 치료학적 단백질의 약동학적 프로파일을 이해하는 데 중요하다. 또한, 면역분석법은 치료학적 단백질의 가용성 표적 및 항-치료학적 단백질 항체를 정량화하는 데에도 사용된다. 분석물의 가용성 단백질 표적 또는 shed 수용체(shed receptor) 표적에 대해, 2가지 서로 다른 형태의 분석물인 유리 분석물과, 가용성 표적과 복합체를 이루는 분석물이 생물학적 기질에 존재한다. 분석물의 정확한 약동학적 프로파일을 얻기 위해서는, 유리 분석물 농도만 정량화하는 대신, 전체 분석물 농도를 정량화하는 것을 목적으로 하는 리간드 결합 분석 방법을 개발하는 것이 이상적이다.

[0003] 분석물과의 결합에 대해 면역분석법 시약과 경쟁하는 간섭 물질(interfering substance)(가용성 표적)의 존재 하에, 전체 분석물 농도를 정확히 추정하는 정량적 면역분석법의 경우 빈번한 문제가 종종 발생하기도 한다. 이로써 분석물은 과소추정되며, 분석물의 약동학적 프로파일의 참된 평가(true assessment)가 방해받는다. 간섭 물질은 샘플의 전처리에 의해 제거될 수 있다. 그러나, 이 단계는 샘플의 손실을 야기하며 추가적인 가변성을 이끈다.

발명의 내용

[0004] 따라서, 본 발명은 생물학적 샘플에서의 분석물의 검출 및 선택적인 정량화를 하는 공정에 관한 것이며, 상기 공정은, 생물학적 샘플 내 분석물의 상기 검출 및 선택적인 정량화 분석법을 수행하기 전에, 변형된 시트레이트 완충액을 샘플에 제공하는 단계를 포함하며; 분석물과, 생물학적 샘플에서 상기 분석물의 표적인 1종 이상의 간섭 물질의 상호작용에 의해 형성되는 복합체를 해리하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 복합체의 해리를 위해, 변형된 시트레이트 완충액을 생물학적 샘플에 제공하는 단계를 포함하며; 생물학적 샘플에서 분석물을 검출하고 선택적으로 정량화하기 위한 효소 연결 면역흡착 분석법(ELISA) 키트에 관한 것이며, 상기 키트는 변형된 시트레이트 완충액, 캡처 항체, 검출 항체, 검출 항체와 반응하는 시약, 마이크로타이터 플레이트, 코팅 완충액, 세정액, 및 중단액(stopping solution) 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는 구성분을 포함하며; 및 생물학적 샘플에서 분석물의 존재를 검출 및 선택적으로 정량화하기 위한 변형된 시트레이트 완충액에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0005] 본 개시내용을 쉽게 이해하고 실행에 옮길 수 있게 하기 위해, 첨부하는 도면을 참조로 하여 예시된 실례의 구현예를 참조한다. 도면은 하기 상세한 설명과 함께 명세서에 포함되어 그 일부를 이루며, 본 개시내용에 따라 구현예를 추가로 예시하고 다양한 원리 및 이점을 설명하는 기능을 한다:

도 1은 트라스투주마브(Trastuzumab) 보정 곡선에서 재조합 HER2-ECD의 간섭을 도시한 그래프이다.

도 1a는, HER2-ECD의 스파이킹(spiking)이, 인산염 완충 식염수 Tween20 (PBST)에서 희석 시, 트라스투주마브

보정 곡선의 투약량-의존성 위치 이동(locational shift)을 초래하는 것을 도시한 그래프이다.

도 1b는, 변형된 시트레이트 완충액 희석제가 트라스투주마브 보정 곡선에서 HER2-ECD의 투약량-의존성 간섭을 무효화하는 것을 도시한 그래프이다.

도 2는, 트라스투주마브 보정 곡선에서 재조합 HER2-ECD의 간섭을 무효화하기 위해 pH 3.5에서 서로 다른 산성 완충액의 비교를 도시한 것이다. 특히, **도 2**는, 변형된 시트레이트 완충액 희석을 사용함으로써, 혈청 내 1 µg/mL HER2-ECD 스파이킹에 의해 유도되는 위치 이동을 최소화한다는 것을 도시한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0006] 본 발명은 생물학적 샘플에서의 분석물의 검출 및 선택적인 정량화를 위한 공정에 관한 것이며, 상기 공정은, 생물학적 샘플 내 분석물의 상기 검출 및 선택적인 정량화 분석법을 수행하기 전에, 변형된 시트레이트 완충액을 샘플에 제공하는 단계를 포함한다.
- [0007] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 공정은,
- [0008] (a) 변형된 시트레이트 완충액을 생물학적 샘플에 제공하여, 희석된 생물학적 샘플을 수득하는 단계; 및
- [0009] (b) 샘플에서의 분석물의 검출 및 선택적인 정량화를 위한 통상적인 분석법을 수행하는 단계를 포함한다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 생물학적 샘플은 1종 이상의 간섭 물질을 분석물에 대한 표적으로서 포함하며, 상기 간섭 물질 및 상기 분석물은 조합되어, 복합체를 형성한다.
- [0011] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 복합체의 형성은 생물학적 샘플 내 유리 분석물의 양을 감소시키며, 이로써 상기 분석물의 정확한 검출 및 정량화를 저해한다.
- [0012] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 변형된 시트레이트 완충액은 복합체를 해리하며, 샘플 내에 유리 분석물을 복구시켜, 상기 분석물의 정확한 검출 및 정량화를 가능하게 한다.
- [0013] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 변형된 시트레이트 완충액은 약 125 mM 농도의 시트레이트-HCl 및 약 0.1% w/v 농도의 Tween-20을 포함하며, 완충액의 pH 범위는 pH 2.5 내지 3.8, 바람직하게는 pH 3.5이다.
- [0014] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 및 혈청 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0015] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 분석물은 호르몬, 중앙 항원, 박테리아 항원, 바이러스 항원, 단백질 치료제 및 항체 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0016] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 분석물은 항체이다.
- [0017] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 항체는 인간 상피 성장 인자 수용체 2 (HER-2)에 대한 것이다.
- [0018] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 간섭 물질은 HER-2의 세포외 도메인(HER-2-ECD)이다.
- [0019] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 분석법은 효소 연결 면역흡착 분석법 (ELISA)이다.
- [0020] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 효소 연결 면역흡착 분석법은 샌드위치 효소 연결 면역흡착 분석법이며, 캡처 항체, 검출 항체, 검출 항체와 반응하는 시약, 마이크로타이터 플레이트, 코팅 완충액, 세정액 및 중단액 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 구성분의 존재 하에 수행된다.
- [0021] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 캡처 항체는 생물학적 샘플 내 분석물에 대한 항체이다.
- [0022] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 검출 항체는 호스래디쉬 퍼옥시다제 및 알칼리 포스파타제 및 루테늄으로 이루어진 군으로부터 선택되는 효소로 표시된다.
- [0023] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 표시된 항체와 반응하는 시약은 ABTS (2,2'-아지노비스[3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산]-다이암모늄염, TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘) 및 전기 화학발광(electro chemiluminescent) 용화성 기질로부터 선택되는 발색(chromogenic) 기질이다.
- [0024] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 코팅 완충액은 인산염 완충 식염수이다.
- [0025] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 세정액은 인산염 완충 식염수 및 Tween-20을 포함한다.

- [0026] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 중단액은 0.1 N 황산이다.
- [0027] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 효소 연결 면역흡착 분석법 (ELISA)은,
- [0028] a. 고체 표면을 분석물에 대한 캡처 항체로 코팅하여; 변형된 시트레이트 완충액을 생물학적 샘플에 제공하여, 희석된 생물학적 샘플을 수득하는 단계;
- [0029] b. 희석된 샘플을 단계 (a)의 항체 코팅된 고체 표면 또는 지지체에 첨가하는 단계;
- [0030] c. 지지체를 인큐베이션 및 세정하여, 임의의 미결합(unbound) 분석물을 제거하는 단계;
- [0031] d. 분석물에 대한 표지된 검출 항체를 첨가하고, 지지체를 세정하여, 임의의 미결합 검출 항체를 제거하는 단계; 및
- [0032] e. 표지된 항체와 반응하는 시약을 첨가하여, 샘플에서 분석물을 검출 및 선택적으로 정량화하는 단계를 포함한다.
- [0033] 본 발명은 추가로, 분석물과, 생물학적 샘플에서 상기 분석물에 대한 표적인 1종 이상의 간접 물질의 상호작용에 의해 형성되는 복합체를 해리하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 변형된 시트레이트 완충액을 생물학적 샘플에 제공하여 복합체를 해리하는 단계를 포함한다.
- [0034] 본 발명은 추가로, 생물학적 샘플에서 분석물을 검출 및 선택적으로 정량화하기 위한 효소 연결 면역흡착 분석법(ELISA) 키트에 관한 것으로서, 상기 키트는, 변형된 시트레이트 완충액, 캡처 항체, 검출 항체, 검출 항체와 반응하는 시약, 마이크로타이타 플레이트, 코팅 완충액, 세정액, 및 중단액 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는 구성분을 포함한다.
- [0035] 본 발명은 추가로, 생물학적 샘플에서 분석물의 존재를 검출 및 선택적으로 정량화하기 위한, 변형된 시트레이트 완충액에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명의 일 구현예에서, 변형된 시트레이트 완충액은 약 125 mM 농도의 시트레이트-HCl 및 약 0.1% w/v 농도의 폴리소르베이트-20을 포함하며, 상기 완충액의 pH 범위는 pH 2.5 내지 3.8, 바람직하게는 pH 3.5이다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 생물학적 샘플은 1종 이상의 간접 물질을 분석물에 대한 표적으로서 포함하며, 상기 간접 물질 및 상기 분석물은 상호작용하여 복합체를 형성한다.
- [0038] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 분석물은 인간 상피 성장 인자 수용체 2 (HER-2) 항체이다.
- [0039] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 간접 물질은 HER-2의 세포외 도메인 (HER-2-ECD)이다.
- [0040] **용어의 정의**
- [0041] **변형된 시트레이트 완충액**- 본 발명에 따른 변형된 시트레이트 완충액은 소듐 시트레이트 및 시트르산 뿐만 아니라 폴리소르베이트 20 및 HCl을 포함하는 시트레이트 완충액이다. HCl은 완충액의 pH를 원하는 pH 범위인 2.5 내지 3.8로 낮추기 위해 첨가된다.
- [0042] 본 발명은, 분석물의 가용성 표적(본원에서, 간접 물질이라고도 함)을 포함하는 생물학적 분석에 존재하는 분석물의 총량을 정확하게 정량화하기 위해 단일 단계 리간드 결합 분석법/분석적인 분석법에서 독특한 산성 해리 완충액을 사용하는 공정에 관한 것이다. 이 완충액을 사용함으로써 샘플을 임의로 전처리하지 않고도, 간접 물질의 존재로 인한 분석물의 과소추정 문제점을 해결하며, 면역분석법의 단순성과 용이성을 유지한다. 본 공정은 하기의 단계를 포함한다:
- [0043] a) 마이크로타이타 플레이트와 같은 고체 표면을 분석물에 특이적인 항체로 코팅하는 단계;
- [0044] b) 분석물 및 간접 물질을 포함하는 생물학적 샘플을 변형된 시트레이트 완충액에 희석하고, 희석된 샘플을 이전 단계에서 코팅된 고체 표면에 첨가하는 단계;
- [0045] c) 분석물에 대한 표지 항체를 첨가함으로써 캡처 항체-분석물 복합체를 검출하는 단계.
- [0046] d) 표지된 항체와 반응할 수 있는 시약을 첨가하고 신호를 정량화하는 단계.
- [0047] 본 발명의 일 구현예에서 변형된 시트레이트 완충액은 강산의 첨가에 의해 시트레이트 완충액을 변형함으로써 제조되는데, 즉, 본 발명의 변형된 시트레이트 완충액은 pH 2.5 내지 3.8의 필요한 pH를 수득하기 위해 강산의 첨가를 이용하는 약산의 염 (소듐 시트레이트)과 약산 (시트르산)의 조합이다.

- [0048] 일 측면에서, 변형된 시트레이트 완충액은 폴리소르베이트를 포함한다. 또 다른 측면에서, 변형된 시트레이트 완충액은 폴리소르베이트-20을 포함한다.
- [0049] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 캡처 항체 및 검출 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날 기원일 수 있다. 검출 항체에 의해 인지되는 분석물의 에피토프는 캡처 항체에 의해 인지되는 에피토프와 상이하다. 검출 항체와 공역되는 표지(label)는 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제 또는 기타 효소와 같은 효소일 수 있다. 검출 항체와 공역되는 효소에 대한 기질은 지표물질(indicator)로서 사용된다. 사용되는 보편적인 기질은 ABTS(2,2'-아지노비스[3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산]-다이암모늄염 및 TMB(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘)로부터 선택된다.
- [0050] 보다 다른 구현예에서, 본 발명은, 간섭 물질을 포함하는 혈청 매트릭스에 존재하는 분석물의 총량을 정량화하기 위해 단일 단계 리간드 결합 분석법에서 독특한 산성 해리 완충액을 사용하는 공정에 관한 것이다.
- [0051] 보다 다른 구현예에서, 본 발명은, 간섭 물질인 HER2 수용체의 세포의 도메인(ECD)의 존재 하에 항-HER2 항체의 수준을 정확하게 결정하는 방법을 개시한다. 항-HER2 항체의 수준의 정확한 결정이 요구되는 생물학적 샘플은 항-HER2 치료법을 받는 암 환자의 혈청 또는 혈장일 수 있다.
- [0052] 본 발명의 보다 다른 구현예에서, 내인성 HER2-ECD를 포함하는 전이성 유방암 혈청에서 만들어지는 트라스투주마브 QC의 정확도(분석적 복구(analytical recovery))는, 변형된 시트레이트 완충액이 희석제로서 사용되는 경우 최대이다.
- [0053] 본 발명은, 트라스투주마브의 가용성 표적인 재조합 HER2-ECD가 스파이킹되어 있는 혈청에서 트라스투주마브의 정확한 분석적 복구에 적용함으로써 예시된다. 인간 상피 성장 인자 수용체 2(HER-2/neu)의 과발현은 인간 유방암 중 25%에서 발생하며, 불량한 예후와 관련이 있다. 트라스투주마브는 HER-2/neu 수용체의 세포의 도메인(ECD)에 대한 인간화된 모노클로날 항체이며, 결합으로 인해 암세포 증식이 저해된다. 트라스투주마브는 HER-2/neu 과발현 전이성 유방암의 치료에 승인을 받았다. 혈청 트라스투주마브의 농도는 치료 동안 10 µg/mL보다 높게 유지되어, HER-2/neu 과발현 유방암 세포의 성장을 효과적으로 저해해야 한다. 따라서, 혈청 트라스투주마브 농도의 정확한 정량화는 치료 동안 중요하다.
- [0054] 본 발명의 일 구현예에서, 전장 HER-2/neu 단백질은 세포질 도메인, 막관통 도메인, 및 세포 표면으로부터 쉼(shed)되는 세포의 도메인(ECD)으로 이루어진다. ECD는 정상 개체의 혈액으로부터 쉼되며, 종종 전이성 유방암 환자에서 상승되어 있다. 이들 환자의 치료를 위해 투여되는 트라스투주마브는 매트릭스에서 2가지 서로 다른 형태인, 유리(free) 약물과, ECD와 복합체를 이룬 약물로 존재한다. 순환중인 내인성 ECD의 수준의 상승은 복합체화된 트라스투주마브의 수준을 증가시킨다. 트라스투주마브의 정량화를 위한 표준 면역분석법은 단지 유리(free) 트라스투주마브만을 측정하므로, 순환중인 전체 트라스투주마브 수준을 과소추정한다. 본원에서 개시되는 분석법은, 트라스투주마브-ECD 복합체를 해리하는 독특한 산-해리 완충액을 단일 단계에서 이용함으로써, ECD 간섭 및 그로 인한 과소추정의 문제점을 없앤다.
- [0055] 본 발명은 추가로, 하기의 실시예 및 관련 도면을 참조로 설명된다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 간주되어서는 안 된다.
- [0056] **실시예**
- [0057] **실시예 1:**
- [0058] 변형된 시트레이트 완충액의 제조
- [0059] 본 발명에서, 시트르산 모노하이드레이트 13.04 g 및 소듐 시트레이트 다이하이드레이트 18.48 g을 Milli Q 워터 950 mL에 첨가하고, 용해시킨다. 진한 HCl (~ 4 mL)을 첨가함으로써 용액의 pH를 pH 3.5로 조정한다. 용액의 부피를 1000 mL로 만들고, 용액을 0.22 마이크론 필터 유닛을 이용해 여과하여, 변형된 시트레이트 완충액을 수득한다.
- [0060] **실시예 2:**
- [0061] 간섭 HER2-ECD의 존재 하에 트라스투주마브를 정확하게 정량화하기 위한 단일 단계 ELISA
- [0062] 본 발명에서, 트라스투주마브 상보성 결정 영역 (Complementary Determining region; CDR)에 대한 모노클로날 항체 100 µL를 약 1 µg/mL의 최종 농도로 PBS 완충액에서 96웰 마이크로타이터 플레이트 상에 코팅하고, 약 4°C에서 밤새 인큐베이션한다. 보정물질(Calibrator) 및 품질 관리 (Quality Control; QC)는, 재조합 HER2-ECD의

존재 또는 부재 하에 스파이킹된 혈청 샘플에서 트라스투주마브를 사용해 제조한다. 샘플은, 125 mM 시트레이트-HCl 및 0.1% Tween-20 (폴리소르베이트 20)을 포함하며 pH 2.8 내지 3.5의 변형된 시트레이트 완충액에서 약 50배로 희석 (최소 요구 희석(minimum required dilution), MRD)시키고, 블라킹된(blocked) 항체 코팅된 마이크로타이터 플레이트에 첨가한다. 플레이트를 22°C에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음, PBST로 5회 세정한다. 세정 후, 트라스투주마브 CDR에 대한 퍼옥시다제 공역된 폴리클로날 검출 항체(PBST에서 1:2500)의 약 100 μ l를 각 웰에 첨가하고, 22°C에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 PBST로 7회 세정하고, 발색 기질 TMB의 약 100 μ l를 각 웰에 첨가한다. 15분간 인큐베이션한 후, 0.1 N 황산을 첨가하여 반응을 중단시키고, 플레이트를 450 nm에서 판독하되, 630 nm에서의 배경은 감한다.

[0063] 실시예 3:

[0064] 트라스투주마브의 혈청 보정 곡선에 대한 HER2-ECD의 간섭 조사, 및 이에 대한 변형된 시트레이트 완충액의 효과 연구

[0065] 본 발명에서, 트라스투주마브의 혈청 보정 곡선에 대한 HER2-ECD의 간섭을 조사하기 위해, 0 ng/mL, 250 ng/mL 및 500 ng/mL의 스파이킹된 재조합 HER2-ECD를 포함하는 건강한 여성의 풀링된(pooled) 혈청에서 트라스투주마브 보정 곡선을 만든다. 샘플을 적절한 희석제에서 50배 MRD한다 - 도 1. 트라스투주마브 보정 곡선을 전술한 바와 같은 ELISA 분석법을 이용해 만들었다.

[0066] 도 (1a)는, 스파이킹된 재조합 HER2-ECD의 양을 증가시키면 PBST 희석제에서 트라스투주마브 보정 곡선을 위치 이동시켰음을 보여준다. 도 (1b)는, 폴리소르베이트 20을 포함하는 변형된 시트레이트 완충액 (pH 3.5) 희석제에서 혈청 샘플에 MRD를 수행한 경우, 스파이킹된 HER2-ECD의 간섭이 극복된다는 것을 보여준다. 폴리소르베이트 20을 포함하는 변형된 시트레이트 완충액에서의, 스파이킹된 HER2-ECD 및 트라스투주마브를 포함하는 샘플의 희석은 분석물 (트라스투주마브)과 표적 (HER2-ECD) 간에 형성된 면역 복합체를 해리하였다.

[0067] 실시예 4:

[0068] 트라스투주마브-HER2-ECD 복합체의 해리를 위한, 완충액의 최적 산성 pH의 결정

[0069] 본 발명에서, 트라스투주마브-HER2-ECD 복합체를 해리하는 데 필요한 최적의 산성 pH를 결정하기 위해, 산성 완충액인 시트레이트를 MRD를 위한 분석법 희석제로서 3가지 서로 다른 pH에서 시험한다. PBST 희석제는 또한, 대조군으로 사용한다. 트라스투주마브 보정 곡선은 스파이킹된 HER2-ECD를 포함하지 않는 혈청에서 만들고, 트라스투주마브 QC 샘플 (순수한 혈청에서 500 ng/mL)을 500 ng/mL의 재조합 HER2-ECD 스파이킹된 혈청에서 제조한다. 보정 표준 및 QC는 4종의 희석제 각각에서 MRD를 수행한다. 각각의 희석제에서의 QC 샘플의 분석적 복구는 상응하는 희석제에서 만들어지는 보정 곡선으로부터 역산한다. 트라스투주마브 QC 복구의 상대 오차 백분율(percentage relative error)이 낮을수록, 완충액은 보다 양호해진다. 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, HER2-ECD 스파이킹된 혈청에서 만들어지는 트라스투주마브 QC 샘플의 최대 복구를 획득하기 위해서는 pH 2.5 내지 3.8이 필요하며, pH 3.5에서 최상의 결과가 나타난다. 트라스투주마브 보정 곡선은 전술한 바와 같은 ELISA 분석법을 이용해 만들었다.

표 1

[0070]

트라스투주마브 LLOQ-QC의 최대 분석적 복구를 위한 분석법 희석제의 최적 pH (정량화 품질 관리의 하한(lower limit))				
S. No	완충액	pH	500 ng/ml HER2 ECD 스파이킹된 혈청에서 트라스투주마브 QC (500 ng/ml)의 분석적 복구%	500 ng/ml HER2 ECD 스파이킹된 혈청에서 트라스투주마브 QC (500 ng/ml)의 상대 오차%
1	PBST	7.4	32.4	67.6
2	시트레이트 완충액 + 0.1% 폴리소르베이트-20	4.5	46.5	53.5
3	변형된 시트레이트 + 0.1% 폴리소르베이트-20	4.0	74.78	25.22
4	변형된 시트레이트 + 0.1% 폴리소르베이트-20	3.8	90.29	9.71
5	변형된 시트레이트 + 0.1% 폴리소르베이트-20	3.5	104.67	4.67
6	변형된 시트레이트 + 0.1% 폴리소르베이트-20	3.0	108.41	8.41

7	변형된 시트레이트 + 0.1% 폴리소르베이트-20	2.5	88.77	11.23
8	변형된 시트레이트 + 0.1% 폴리소르베이트-20	2.0	ND	ND

[0071] **실시예 5:**

[0072] 트라스투주마브 QC의 최대 분석적 복구를 수득하기 위한 완충액의 비교

[0073] 본 발명에서, pH 3.5에서 다양한 산성 완충액을 샘플의 MRD에 대해 비교하여, HER2-ECD에 의한 간섭을 무효화하고 QC 샘플의 분석적 복구를 최대화하기 위한 염과 약산의 가장 적합한 조합을 평가한다. 트라스투주마브 보정 곡선, 트라스투주마브 QC (순수한 혈청에서 500 ng/mL 및 1500 ng/mL)를 1 µg/mL HER2-ECD 스파이킹된 혈청에서 만들고, 4가지 서로 다른 희석제에서 50배 MRD한다. ELISA 분석법은 또한, 스파이킹된 HER2-ECD를 포함하지 않으며 PBST에서 50배 희석된, 대조군 트라스투주마브 보정 곡선을 포함한다. 각각의 희석제에서의 QC 샘플의 분석적 복구는, 스파이킹된 HER2-ECD를 포함하지 않으며 PBST에서 50배 희석된 혈청에서 만들어진 대조군 트라스투주마브 보정 곡선으로부터 역산한다.

[0074] 도 2는, 변형된 시트레이트 완충액 희석제를 사용하면, PBST에서 희석된 대조군 업-스파이킹된 혈청 보정 곡선과 비교 시, 1 µg/mL HER2-ECD 스파이크에 의해 유도되는 보정 곡선 이동을 최소화한다는 것을 보여준다.

[0075] 본 발명에서, 동일한 pH의 다른 산성 완충액 (HCl 및 글리신-HCl을 첨가하지 않는 통상적인 시트레이트 완충액)에서 샘플을 희석하는 경우, 하기 표 2에 나타내는 바와 같이 HER2-ECD 유도성 보정 곡선의 이동을 무효화하지 못하였다. 트라스투주마브 QC 샘플 (순수한 혈청에서 500 ng/mL 및 1500 ng/mL)의 최대 복구는, 변형된 시트레이트 완충액 희석제가 사용되는 경우 관찰된다.

표 2

[0076] 트라스투주마브 QC의 최대 분석적 복구의 수득을 위한, 다양한 완충액의 비교

S. No.	완충액	1 µg/mL HER2-ECD 스파이킹된 혈청에서 트라스투주마브 QC의 분석적 복구%	
		LLOQ QC (500 ng/ml)	LOW QC (1500 ng/ml)
1	PBST	10.28	40.97
2	글리신 HCl, pH 3.5	범위를 벗어남	9.82
3	시트레이트 완충액 + 0.1% 폴리소르베이트 20 pH 3.5	72.56	75.16
4	변형된 시트레이트 + 0.1% 폴리소르베이트 20 pH 3.5	86.06	86.82

[0077] 이는, HER2-ECD의 존재 하에 트라스투주마브 QC 복구에 대한 변형된 시트레이트 완충액 조성물의 중요성을 강조한다.

[0078] **실시예 6:**

[0079] 변형된 시트레이트 완충액 희석제를 사용하는 변형된 면역분석법의 HER2-ECD 관용성 결정(Tolerance Determination)

[0080] 본 발명에서, 폴리소르베이트 20을 포함하는 변형된 시트레이트 완충액 희석제를 사용하는 개선된 면역분석법에 의해 관용될 수 있는 웨드 HER2-ECD의 최대 농도를 결정하기 위해, 트라스투주마브 QC (375 ng/mL, 1125 ng/mL 및 7500 ng/mL)를, 증가량의 재조합 HER2-ECD를 포함하는 혈청 샘플에서 만든다. 보정 표준 및 QC 샘플을, 폴리소르베이트 20을 포함하는 변형된 시트레이트 완충액에서 50배 MRD한다. QC의 분석적 복구는, 업-스파이킹된 혈청에서 만들어지는 트라스투주마브 보정 곡선으로부터 역산한다. 트라스투주마브 QC는 하기 표 3에 나타내는 바와 같이 HER2-ECD를 2 µg/mL 이하로 포함하는 샘플로부터 신뢰할 만하게 복구될 수 있는 것으로 보인다. 이 실험에 사용되는 분석법은 ELISA이다.

표 3

[0081]

변형된 시트레이트 완충액 희석제를 사용하는 변형된 면역분석법의 HER2-ECD 관용성 결정				
S. No.	스파이킹된 HER2-ECD 수준 (ng/ml)	재조합 HER2-ECD 스파이킹된 샘플에서 트라스투주마브 QC의 분석적 복구%		
		375 ng/ml	1125 ng/ml	7500 ng/ml
1	50	106.11	100.37	93.11
2	500	97.11	98.27	95.04
3	1000	96.45	94.49	94.64
4	2000	98.01	92.09	95.30

[0082]

실시예 7:

[0083]

쉐드 HER2-ECD의 수준이 다양한 전이성 유방암 환자 샘플에서 트라스투주마브 QC의 분석적 복구

[0084]

본 발명에서, 다양한 수준의 내인성 쉐드 HER2-ECD를 포함하는 전이성 유방암 (MBC) 혈청 샘플에서의 트라스투주마브 QC의 분석적 복구를 하기 표 4에 나타낸다. 건강한 여성의 업-스파이킹된 폴링된 혈청에서 만들어지는 트라스투주마브 보정 곡선 및 MBC 혈청 샘플에서 만들어지는 트라스투주마브 QC를, PBST, 또는 폴리소르베이트 20을 포함하는 변형된 시트레이트 완충액을 사용해 50배 희석시킨다. QC의 분석적 복구를 상응하는 희석 보정 곡선으로부터 역산한다. 하기 표 4에 나타내는 바와 같이, 변형된 시트레이트 완충액 희석제를 사용하면, PBST 희석제와 비교 시, 최적의 트라스투주마브 QC 복구를 유도한다. 수행되는 분석법은 ELISA이다. 내인성 쉐드 HER2-ECD의 농도는 시중적으로 입수가 가능한 ELISA 키트에 의해 MBC 환자의 샘플에서 평가한다.

표 4

[0085]

쉐드 HER2-ECD의 수준이 다양한 전이성 유방암 환자 샘플에서 트라스투주마브 QC의 분석적 복구, 변형된 시트레이트 완충액 희석제를 사용하면, PBST 희석제와 비교 시, 최적의 트라스투주마브 QC 복구를 유도함.			
*ND: 수행하지 않음; BQL: 정량화 한계 미만.			
환자 번호	쉐드 HER2-ECD 수준 (ng/ml)	LLOQ QC (500 ng/ml)에서 전이성 유방암 환자에서 트라스투주마브 QC의 분석적 복구%	
		PBST 희석제	폴리소르베이트 20을 포함하는 변형된 시트레이트 완충액 희석제
1	33.7	95.02	99.93
2	56.8	87.37	97.02
3	77.5	86.23	100
4	170	83.02	103.32
5	211.6	74.22	95.3
6	580	67.06	106.17
7	716.9	ND	104.48
8	833.6	ND	95.09
9	4761.8	BQL	87.29

[0086]

따라서, 상기 실시예에서, 변형된 시트레이트 완충액을 사용하는 본 발명의 방법으로, 분석물에 대한 가용성 표적, 예컨대 HER-2 ECD를 포함하는 생물학적 샘플에서 HER-2 항체와 같은 분석물을 정확하게 결정 및 정량화할 수 있는 것이 분명하다. 트라스투주마브 QC는 상기 표 4에서 나타낸 바와 같이, HER2-ECD를 4.7 µg/mL 이하로 포함하는 샘플로부터 신뢰할 만하게 복구될 수 있는 것으로 보인다.

[0087]

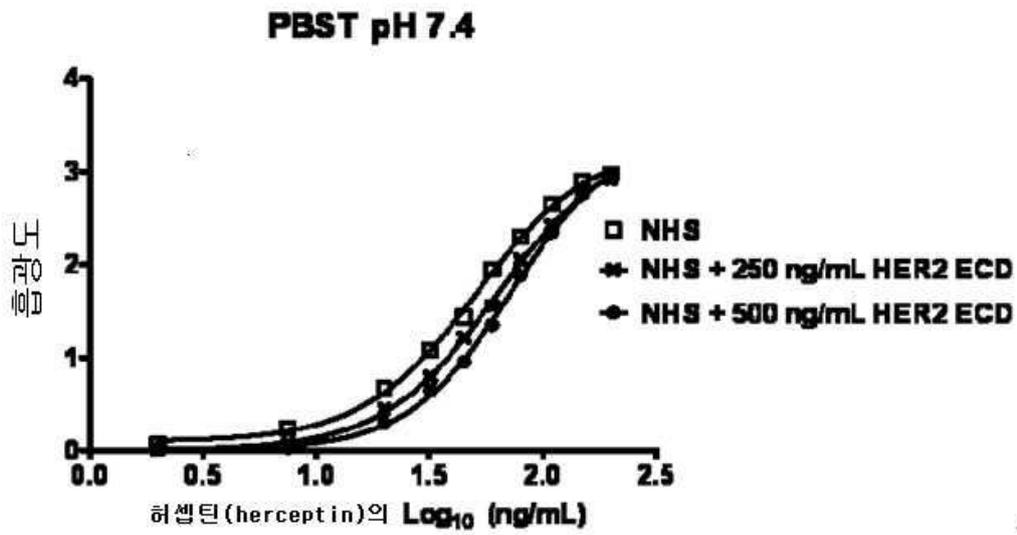
기타 구현예

[0088]

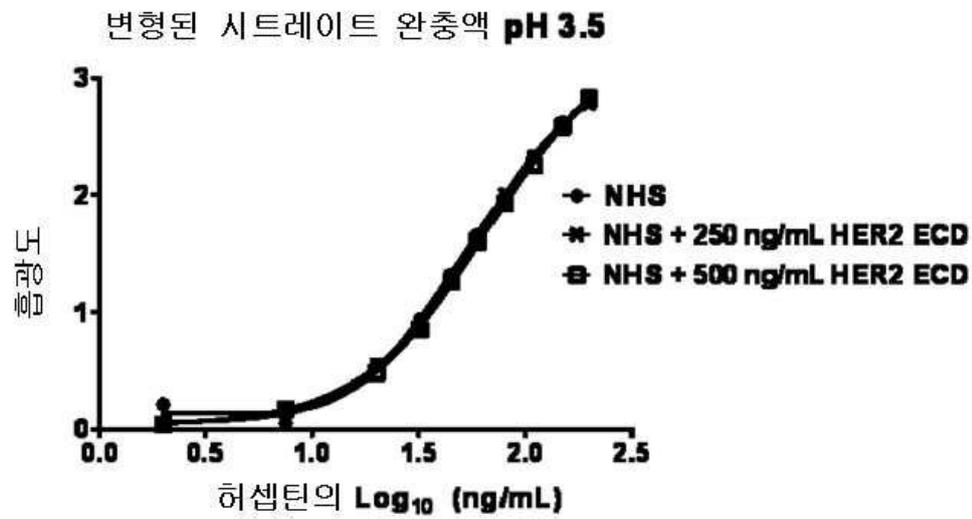
본 발명의 다수의 구현예 및 실시예가 본원에 기술되어 있지만, 이들 구현예 및 실시예는 본 발명의 방법을 이용하는 추가적인 구현예 및 실시예를 제공하도록 변형될 수 있음이 명백하다. 따라서, 본 발명의 범주는 상기 예로 나타낸 구체적인 구현예보다는 첨부되는 청구항에 의해 한정되는 것으로 이해해야 할 것이다.

도면

도면1a



도면1b



도면2

완충액 비교

