

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-506220
(P2004-506220A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 C	2 GO 4 5
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50 G	
GO 1 N 33/531	GO 1 N 33/531 B	
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 33/577	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-518837 (P2002-518837)
 (86) (22) 出願日 平成13年8月10日 (2001.8.10)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年2月12日 (2003.2.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2001/001365
 (87) 国際公開番号 W02002/013685
 (87) 国際公開日 平成14年2月21日 (2002.2.21)
 (31) 優先権主張番号 2000/46755
 (32) 優先日 平成12年8月12日 (2000.8.12)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

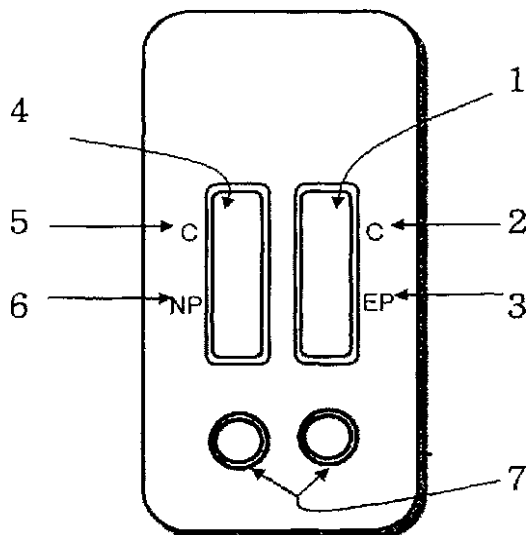
(71) 出願人 503057226
 ヒューマシス シーオー エルティード
 大韓民国 ギエオンギード グンポーシ
 ダンジェオンードン 345-1
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一憲
 (72) 発明者 チャン ジンードン
 大韓民国 ソウル ヤンチェオンーグ
 シンジェオンードン モクドン アパートメ
 ント 1422-102

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 正常妊娠と子宮外妊娠を識別するための診断装置及びこの製造方法

(57) 【要約】

本発明は、正常妊娠と子宮外妊娠を同時に検出し区別できる、ワンステップ妊娠診断装置及びその製造方法を提供する。本発明に従って、妊産婦の体液に分泌されるヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) 及びその変型の形態差異を免疫学的に検出することにより、正常妊娠と子宮外妊娠を初期に迅速かつ正確に判断することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体結合メンブレンと抗体結合着色微粒子パッドを含む免疫クロマトグラフィ法に基づく妊娠診断装置において、抗体が抗 - h C G モノクローナル抗体、抗 - h C G モノクローナル抗体、抗 I - h C G モノクローナル抗体及び抗変型 - h C G モノクローナル抗体を組み合わせる構成される妊娠診断装置。

【請求項 2】

試料受けパッドと試料吸収パッドをさらに含む、請求項 1 記載の妊娠診断装置。

【請求項 3】

抗体は、抗 - マウス免疫グロブリンポリクローナル抗体をさらに含む、請求項 1 記載の妊娠診断装置。 10

【請求項 4】

抗体結合メンブレンは、抗 - h C G モノクローナル抗体及び抗 - h C G モノクローナル抗体を含み、かつ抗体結合着色微粒子パッドは、抗 I - h C G モノクローナル抗体、抗変型 - h C G モノクローナル抗体及び着色微粒子を含む、請求項 1 記載の妊娠診断装置。

【請求項 5】

抗体点滴メンブレンは、抗 I - h C G モノクローナル抗体及び抗変型 - h C G モノクローナル抗体を含み、かつ抗体結合着色微粒子パッドは、抗 - h C G モノクローナル抗体、抗 - h C G モノクローナル抗体及び着色微粒子を含む、請求項 1 記載の妊娠診断装置。

【請求項 6】

上記の着色微粒子は、セレンウム、金、及びポリスチレンから選択される 1 種以上から形成される、請求項 4 または 5 記載の妊娠診断装置。 20

【請求項 7】

抗 I - h C G モノクローナル抗体及び抗変型 - h C G モノクローナル抗体が、濃度比 1 : 2 - 1 0 から構成されたことを特徴とする請求項 4 または 5 記載の妊娠診断装置。

【請求項 8】

子宮外妊娠線、正常妊娠線、及び試験終了線を含み、
非妊娠の女性由来の試料である場合、試験終了線だけが視覚的に観察でき；
正常妊娠の女性由来の試料である場合、試験終了線、子宮外妊娠線、及び正常妊娠線が同等な強度で視覚的に観察でき； 30
子宮外妊娠の女性由来の試料である場合、試験終了線及び子宮外妊娠線だけが視覚的に観察できるか、または試験終了線、子宮外妊娠線及び正常妊娠線が視覚的に観察でき、正常妊娠線の強度が際立って低い、妊娠診断装置。

【請求項 9】

子宮外妊娠線は抗 - h C G モノクローナル抗体から構成され、正常妊娠線は抗 - h C G モノクローナル抗体から構成され、かつ試験終了線は抗 - マウス免疫グロブリンポリクローナル抗体から構成される、請求項 8 記載の妊娠診断装置。

【請求項 10】

子宮外妊娠線は抗 I - h C G モノクローナル抗体から構成され、正常妊娠線は抗変型 - h C G モノクローナル抗体から構成され、かつ試験終了線は抗 - マウス免疫グロブリンポリクローナル抗体から構成される、請求項 8 記載の妊娠診断装置。 40

【請求項 11】

抗 - h C G モノクローナル抗体及び抗 - h C G モノクローナル抗体は 0 . 1 % ~ 2 % スクロース及び 5 m M ~ 5 0 m M リン酸緩衝液を含む固定緩衝液に溶かした後、メンブレン上に 0 . 1 ~ 5 μ g / c m になるように固定する、請求項 9 記載の妊娠診断装置。

【請求項 12】

試料は、尿、血液、及び唾液を含む、請求項 8 記載の妊娠診断装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の属する技術分野

本発明は、正常妊娠と子宮外妊娠を区別するためのワンステップ妊娠診断装置及びこのような装置の製造方法に関する。特に妊産婦の体液中に分泌されるヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)及びその変型の形態上の差異を、免疫学的に検出させることにより、正常妊娠と子宮外妊娠を初期に迅速でかつ正確に判断できる診断装置に関する。

【0002】

従来技術

子宮外妊娠とは、受精卵が正常子宮内膜外に着床している妊娠を指し、着床部位に応じて卵管妊娠、子宮頸管妊娠、卵巣妊娠、腹腔妊娠などに分類される。子宮外妊娠のうち卵管妊娠は95%を超え、卵管妊娠が子宮外妊娠の通称として使用されている。子宮外妊娠の病因には過去の卵管結紮術(避妊法)、PID(骨盤炎)、排卵調節剤の投与、STD(性病)等が含まれ、かつ子宮外妊娠の発生率は妊産婦の約64人~241人当たり1人と非常に高い。

10

【0003】

子宮外妊娠は、産婦人科で最も頻繁な緊急事態であって、その発生頻度は毎年増加している。また、子宮外妊娠による卵管破裂時の観察できる症状には、下腹部痛症、無月経または腔出血、血圧低下によるめまい、胃腸管症状による吐き気と嘔吐が含まれる。子宮外妊娠を放置すると、妊娠初期における妊産婦の最大の死因として現れる腹腔内出血につながる可能性がある。このように子宮外妊娠が初期に発見されない場合には、卵管破裂に続いて出血によるショック状態に進展し、患者の死亡に至る。しかし、未だに子宮外妊娠に特異的に適用されうる特異的な症状と診断法がないため、早期診断は困難に直面してきた。このような状況下で、本発明者等は子宮外妊娠を早期に判断することにより母性死亡率を減少させることができ、正常妊産婦の子宮外妊娠に対する不安感を解消させることができるといふ仮定について、鋭意研究を重ねた結果、子宮外妊娠を早期に診断するための方法及び装置を見出した。

20

【0004】

ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(human chorionic gonadotropin; 以下、hCGと称する)は、胎盤の合胞体栄養細胞層(syncytiotrophoblast)で生成され、妊娠初期にプロゲステロン(progesterone)の常時生産を誘導し、胎盤機能が完成される妊娠10週まで着床を維持する。また、このホルモンは胎児精巣にてテストステロン(testosterone)の生成を促進して、雄性胚の内部生殖器分化に重要な役割を果たし、母体甲状腺の刺激など多様な機能を有する。このホルモンは妊娠(または受精)後、約8日になると、血液及び尿から約25mIU/mlの濃度で検出される。そして、妊娠5週から一定の速度で急速に増加して、妊娠6週には約1IU/ml、そして妊娠10週には約100~120IU/mlまで増加する。この時点から妊娠10~18週の間減少して、妊娠20週では約20IU/mlになり、一定の濃度が維持される。hCGは、この2つのサブユニットから構成された糖タンパク質であって炭水化物が30%であり、分子量は約36,700ダルトンである。α-サブユニットは92個のアミノ酸から構成され、黄体形成ホルモン及び甲状腺刺激ホルモンのβ-サブユニットと同様な構造からなっており、β-サブユニットは145個のアミノ酸から構成(構造的にhCGに特徴的)されている(Lapthorn等、Nature, 1994, Vol. 369: 455~461)。

30

40

【0005】

一般的に、hCGはヒトの体液で多様な形態で存在する完全なhCG(intact-hCG; I-hCG)、ならびにニックが入ったhCG(nicked hCG; N-hCG)、多糖鎖hCG(hyperglycosylated hCG)、遊離hCG(free-hCG)、及び遊離コア断片(free-core fragment)を含む変型されたhCGが公知である。このように、多様な形態のhCGは妊娠、脳下垂体、絨毛性疾患(trophoblast disease)及び絨毛癌(choriocarcinoma)の事象で生成される。正常妊娠の妊産婦体液では完全なhCGが全hCGの約90%程度を構成し、多様な変型hCGは約10%以下の量で検出され

50

る。

【0006】

これに反して子宮外妊娠は、一定比率のニックが入ったhCGと遊離hCGが検出される正常妊娠と対照的に、完全なhCGがほとんどを占め、変型hCGはほとんど存在しない。また、全hCG分泌量と増加幅が正常妊娠より非常に少ない。つまり、hCGの分泌量は妊娠6週には正常妊娠の約1/5に達し、妊娠8週では正常妊娠の約1/50に減少し、すなわち約15IU/mlに減少する。

【0007】

米国特許第5,786,220号には、正常妊娠と異常妊娠を区別するワンステップ診断試薬の製造方法を開示しているが、ヒト女性体液中のプロゲステロン濃度とhCGの濃度を同時に測定することにより、正常妊娠、自然流産、子宮外妊娠、癌などが診断できると開示している。具体的には、血液中のプロゲステロンの濃度が25ng/ml以下である同時にhCGの濃度が25~2,500mIU/mlである場合には、自然流産及び子宮外妊娠を示し、プロゲステロンの濃度が25ng/mlを超え、hCGの濃度が2,500mIU/mlを超える場合には、正常子宮内妊娠を示す方法を開示している。デニール等(Fertility & Sterility, 1999, Vol. 72: 1013~1017)は、遊離hCGの濃度が正常妊娠では30~170IU/mlであり、異常子宮内妊娠は1~70IU/mlであり、子宮外妊娠の場合に0.059~29IU/mlであることを開示し、子宮外妊娠においてhCG分解産物が正常妊娠より非常に低い濃度で分泌されることを示した。

10

20

【0008】

上記のように、hCGは妊娠の診断に最も重要なホルモンであって、妊娠初期のhCG濃度は超音波所見と共に考慮して、妊娠、流産、及び子宮外妊娠の識別に使用されている。妊娠診断においてhCGは、初期に妊娠を確認するために使用できる。低い濃度のhCGと倍加時間(doubling time)は、妊娠5~9週の間hCGの血中濃度が1.4~2日毎に倍加されることを指し、流産及び子宮外妊娠を示す。正常より高い数値のhCG濃度は、多胎妊娠及び胎状奇胎を示すと解釈される。子宮外妊娠は、妊産婦血清及び尿のhCG濃度の測定に加えて、超音波撮影、診断的腹腔鏡などによっても診断される。特に、超音波検査はhCG濃度測定と組み合わせた診断のために行う、超音波検査の所見で胎囊が見えながらhCG濃度が1,000mIU/mlを下回る場合には、妊娠の可能性が希薄であることを示す。48時間毎にhCG濃度が定量的に少なくとも65%増加しないと、その妊娠の予後は非常に不良であると判断される。

30

【0009】

hCG濃度の倍加時間を測定する公知の方法と妊産婦体液中の遊離hCG濃度を測定する方法のような診断法は、採血が繰り返し必要という短所を有する。米国特許第5,786,220号に開示される妊娠診断法は、hCG濃度測定と並行してプロゲステロンの濃度測定を行う点で、本発明とは異なる診断原理に基づく。また正常妊娠と異常妊娠の区別は可能であるが、妊産婦に非常に危険な事象である子宮外妊娠と一般的な自然流産を初期段階で効果的に区別するのは困難である。

【0010】

このために、本発明者等は早期妊娠診断において、正常妊娠診断および子宮外妊娠を同時に診断できる、ワンステップ同時診断キットの製造方法に関して鋭意研究を重ねた。その結果、正常妊娠を25mIU/mlのhCG濃度の検出によって判断することができ、子宮外妊娠はI-hCGと変型-hCGの濃度比較により判断できる、ワンステップ同時診断キットを提供する。

40

【0011】

発明の開示

本発明は、正常妊娠と子宮外妊娠をワンステップで妊娠初期に同時診断できる診断装置及びこのような装置の製造方法を提供することを目的とする。

【0012】

50

また本発明は、妊産婦の体液（血液、尿、唾液等）中に存在する I - h C G と変型 - h C G を各々検出するために、抗 I - h C G モノクローナル抗体を抗 - h C G モノクローナル抗体と組合せて使用し、抗変型 - h C G モノクローナル抗体を抗 - h C G モノクローナル抗体と組合せて使用することを特徴とする。

【0013】

発明を実施するための最良の形態

本発明は、サンドイッチ (s a n d w i c h) 方法と呼ばれる免疫学的分析方法に基づく。このような分析方法に使用される抗体は、分析しようとする試料の感受性及び特異性を決定するため、抗体の選別が非常に重要である。サンドイッチ分析法には主に2種のモノクローナル抗体を使用するが、この2種の抗体の結合位置は、分析の感受性を維持するために、関連する抗原の違う所に存在する。例えば、妊婦の体液（血液、尿、唾液等）中に分泌される h C G を調べるためには、2種のモノクローナル抗体が必要であり、この2種の抗体の抗原 (h C G) 上の結合部位は明確に離れて位置するべきである。もし、使用される2つの抗体の抗原 (h C G) 上の結合部位が同じであったり近接した所があれば、構造的妨害 (s t e r i c h i n d r a n c e) により分析の感受性が低下する。本発明は、免疫学的分析方法のうちサンドイッチ分析法を基本とした免疫クロマトグラフィ法を利用したものである。特に、以前に特徴付けたモノクローナル抗体を、有色の微細な粒子（着色微粒子）に共有または非共有結合で結合させ、生じた微粒子を移動相で使用する。次に以前に特徴付けたモノクローナル抗体をニトロセルロースメンブレンに分配して固定させ、固定相として使用する。分析しようとする試料を移動相と混合して、固定相であるメンブレンを通じて、毛細管現象により展開させる。この際、試料中に関連抗原が含まれていると抗原を媒介として固定相と移動相が結合して、固定相部位に着色微粒子線が観察される。このような観察できる線の出現有無により試料中の関連抗原の存在有無を視覚的に判断する。本発明に使用されるモノクローナル抗体は、商品化されているモノクローナル抗体として購入するか、または公知の細胞融合プロトコールに従って製造することができる。実施例で使用される抗体は、公知のモノクローナル抗体の製造方法に従って製造し、その製造過程で I - h C G に反応を示す抗体及び変型 - h C G に反応を示す抗体を選別する。抗 - h C G 抗体及び抗 - h C G 抗体に関して、標準 h C G で調べた時に、感受性が良好に維持されるモノクローナル抗体を選別して使用した。

10

20

30

【0014】

上述したように、妊娠初期では正常妊娠及び子宮外妊娠の女性の尿には、h C G が多様な形態で存在する。特に子宮外妊娠の場合に発見される h C G のほとんどは完全な h C G (I - h C G) であり、変型 - h C G はほとんど存在しない。正常妊娠時には I - h C G が存在する全 h C G の約 90% を構成し、多様な変型 - h C G が約 10% を構成する。本発明は、このような差異を利用して、I - h C G と変型 - h C G を別個に検出して視覚的に比較することにより、正常妊娠と子宮外妊娠の区別と同時に妊娠を確認することができる。本発明の診断装置の構造は、試料中に I - h C G が存在する時に有色の線が出現する子宮外妊娠 (E P) 部位と、試料中に変型 - h C G が存在する時に有色の線が出現する正常妊娠 (N P) 部位を用いる診断装置を、別々に提供することによって完成した。子宮外妊娠である場合に、ほとんどの h C G は I - h C G 型として存在する。したがって I - h C G の反応により E P 部位のみで有色の線が出現するか、または N P 線が現れてもよりはるかに強い E P 線が出現する。正常妊娠である場合、体液中には I - h C G だけでなく 10% 程度の変型 - h C G が存在する。従って、本発明の診断装置では変型 - h C G に反応性のある抗体を結合させた着色微粒子の濃度を 2 ~ 10 倍増大させるか、または変形 h C G による反応感受性を高めるように結合抗体の濃度をそれに応じて増大させる。2つの部位 (E P 、 N P) に出現する有色線の強度を同様にして、正常妊娠の診断を補助する。

40

【0015】

以下、本発明による妊娠診断装置の構成をさらに詳細に説明する。

【0016】

子宮外妊娠の際過剰過発現される、I - h C G に対するモノクローナル抗体を公知の方法

50

で製造した後、着色微粒子と結合させる。この微粒子をガラス繊維パッドに組み込んだ後、乾燥させて着色微粒子パッドを製造した。もう一方で、変型 - hCG に対するモノクローナル抗体を公知の方法で製造し、着色微粒子と結合させる。この微粒子をガラス繊維パッドに組み込んだ後、乾燥させて着色微粒子パッドを製造した。ポリスチレン粒子、コロイド金等を含む様々な着色微粒子を本発明に使用できる。これらの中ではコロイド金が好ましく、20 ~ 60 nm の大きさのコロイド金がさらに好ましい。

【0017】

診断装置の感受性を維持するために、着色微粒子に固定された抗体の結合部位とは異なる抗原 (hCG) 上の結合部位に結合するモノクローナル抗体を、メンブレンの固定相で使用した。この目的で使用されたモノクローナル抗体は抗 - hCG モノクローナル抗体と抗 - hCG モノクローナル抗体である。この2種の抗体をそれぞれ異なるニトロセルロースメンブレンに直線になるように分配することによって固定するか (図1)、または1つのメンブレン内に交差線または2つの別々の線になるように分配することによって固定した (図2)。そして、モノクローナル抗体結合部位下方のメンブレン末端には、試験の終了線が現れるように抗 - マウス免疫グロブリンポリクローナル抗体を分配した。

10

【0018】

上記のように製造された抗体固定化メンブレンは、接着剤が塗布されているポリエステル支持盤に接合させて、その上に縦にモノクローナル抗体 - 着色微粒子パッドを接合させた。そして、妊産婦の体液が直接点滴される試料受けパッド及び余分の体液が吸収される試料吸収パッドを、互いに重なるように縦に接合させて、正常妊娠及び子宮外妊娠の同時診断キットの内部ストリップを提供した (図3)。

20

【0019】

上記のように製造された同時診断装置を使用して、正常妊娠及び子宮外妊娠を早期診断する方法は、次の通りである。

【0020】

試料受けパッドに妊産婦の体液 (血液、尿、唾液など) を加えると、試料が吸収され毛細管現象によって移動して、着色微粒子パッドに組み込まれているモノクローナル抗体結合着色微粒子と反応する。正常妊娠である場合には、試料中に存在する I - hCG 及び変型 - hCG が各々着色微粒子に結合したモノクローナル抗体と結合して、ニトロセルロースメンブレン相を移動する。メンブレン上に2種類のモノクローナル抗体が固定されている部位で、抗原 - 抗体複合体は各々サンドイッチ形態で結合して、メンブレン上に同様の強度で出現している着色微粒子により2つの結果線 (NP / EP) が現れる。

30

【0021】

子宮外妊娠である場合、体液に存在する hCG のほとんどは I - hCG からなる。従って、I - hCG と着色微粒子の複合体は、メンブレン相に沿って移動して抗 - hCG モノクローナル抗体と結合し、強い EP バンドを生じる。対照的に、変型 - hCG に対するモノクローナル抗体が結合された着色微粒子は、試料中の I - hCG と反応せず、従ってメンブレン上に固定された抗 - hCG モノクローナル抗体に結合せずに移動する。微粒子はまた、試料中に存在するごく少量の変型 - hCG と反応して、非常に弱い強度の NP バンドを生じうる。結局、子宮外妊娠である場合には、1つの EP バンドが現れるか、または2つのバンドが異なる線強度で (NP バンドより EP バンドが強く) 現れる。

40

【0022】

被験者の女性が妊娠していない場合は、試料中に hCG が存在しないので、モノクローナル抗体 - 着色微粒子複合体が、メンブレンの結果線 (NP、EP) に固定された抗 hCG モノクローナル抗体と結合せず移動する。従って抗マウス - 免疫グロブリンポリクローナル抗体が固定された試験終了線 (C) のみに、着色微粒子バンドが現れる。

【0023】

本発明の正常妊娠及び子宮外妊娠の同時診断装置の形態及び構造例は、図1a から図2b に示す。

【0024】

50

同様の結果は、着色微粒子パッドとメンブレンに結合した抗体を相互交換して使用しても得られる。抗 - h C G モノクローナル抗体と抗 - h C G モノクローナル抗体を各々着色微粒子に結合させ、抗 I - h C G モノクローナル抗体、抗変型 - h C G モノクローナル抗体及び抗マウス - 免疫グロブリンポリクローナル抗体を、上記のようにニトロセルロースメンブレンに固定させて、診断キットを提供する。妊産婦の体液を試料受けパッドに添加した場合、1) 正常妊娠である場合には、試料中に存在する I - h C G 及びその他の変型 - h C G が、着色微粒子に固定された抗 - h C G モノクローナル抗体及び抗 - h C G モノクローナル抗体にそれぞれ結合し、ニトロセルロースメンブレンに沿って移動し、メンブレン上に固定されている抗 I - h C G モノクローナル抗体及び抗変型 - h C G モノクローナル抗体に各々サンドイッチ形態で結合して、メンブレン上には類似の感受性を持った2つの結果線 (N P 、 E P) が現れ; 2) 子宮外妊娠である場合には、体液に存在する I - h C G が着色微粒子パッドに結合している抗 - h C G と結合してメンブレン相を移動して、メンブレン上の抗 I - h C G モノクローナル抗体と結合して強い E P バンドのみ生じたり、試料中に存在するごく少量の変型 - h C G により、非常に弱い強度の N P バンドが現れ; 3) 被験者の女性が妊娠していない場合は、試料中に h C G が存在しないので、モノクローナル抗体 - 着色微粒子複合体が、メンブレンの結果線 (N P 、 E P) に固定された抗 h C G モノクローナル抗体と結合せずに移動する。従って抗マウス - 免疫グロブリンポリクローナル抗体が固定された終了線 (C) のみに、着色微粒子バンドが現れる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

以下、本発明を実施例によってさらに具体的に説明する。これら実施例は本発明を具体的に説明するだけであり、これら実施例により本発明の範囲が制限されないことは、当業者にとって認識されるべきである。

【 0 0 2 6 】

実施例 1 : 抗 I - h C G モノクローナル抗体及び抗 - h C G モノクローナル抗体の製造及び精製

A . 免疫及び細胞融合

I - h C G に対するモノクローナル抗体を製造するために、公知の細胞融合 (c e l l f u s i o n) 方法 (G a l f r e , G 等 1 9 8 1 , M e t h o d s E n z y m o l . 7 3 : 3 - 4 6) を使用した。まず、8週齢の B a l b / C マウスに、I - h C G (Z y m e d 、 米 国) 2 0 μ g / 1 0 0 μ l をフロインドの完全アジュバント 1 0 0 μ l を完全に乳化させて腹腔内注射した。3週後、フロインドの不完全アジュバント 1 0 0 μ l を乳化に用いた以外は同様な方法で2次腹腔内注射した。1週間後、マウスから採血して抗体形成を E L I S A 法で確認した後、2 0 μ g の h C G を尾に静脈注射した。3日後、マウスの脾臓細胞を回収して、予め培養した S p 2 / O 細胞と P E G を利用して細胞融合させた。融合細胞を H A T 培地を添加した 9 6 ウェルで培養した。次に、I - h C G と反応する抗体を分泌する細胞、および - h C G と反応する抗体を分泌する細胞を選別して、大量培養に供した。

【 0 0 2 7 】

B . モノクローナル抗体の精製

大量培養された培養液を遠心分離して、沈澱物を除去した。上層液を集めてプロテイン A - セファロース (F F) カラムにのせ、リン酸緩衝液で洗浄した後、0 . 1 M グリシン緩衝液で溶出させた。溶出液は、リン酸緩衝液に対して透析して濃度を調整し、診断キットの製造に使用した。

【 0 0 2 8 】

実施例 2 : 抗変型 - h C G モノクローナル抗体及び抗 - h C G モノクローナル抗体の製造及び精製

実施例 1 の A と同様な方法で、ザイメッド (Z y m e d) から購入した - h C G 抗原で3回免疫させたマウスから、脾臓細胞を得た。S p 2 / O 細胞と混合して、P E G を利用して細胞融合を実施した。融合した細胞を H A T 培地を添加した 9 6 ウェルで培養した。

- hCGと反応する抗体を分泌する細胞、及び完全なhCGとは反応性がなく、変型-hCGと反応性のある抗体を分泌する細胞を選別して、大量培養を実施した。続いて大量培養された培養液から、実施例1のBと同様な精製方法でモノクローナル抗体を精製し、リン酸緩衝液に対して透析した後、濃度を調整し、次に診断キットの製造に使用した。

【0029】

実施例3：コロイド金（着色微粒子）の製造

着色微粒子は、20～60nmの大きさのコロイド金（Colloidal gold）を使用した。コロイド金を製造するために、500ml丸底フラスコに二重蒸留水220mlを添加した。その後、フラスコをホットプレート（Corning社、米国）に位置させ、水蒸気の蒸発を防ぐために還流装置（Pyrex社、米国）を設置した。ホットプレートを作動させ懸濁させながら、フラスコを100℃に加熱した。蒸留水の温度が100℃を超えた時に、2%塩化金（Sigma社、米国）1.0mlを加えて完全に混合した後、1%クエン酸ナトリウム（Sigma社、米国）2.0mlを加えた。その後、30分間続けて加熱してコロイド金の生成を誘導した。このように製造されたコロイド金は不純物及び凝集体を除去するために、0.45μmろ紙でろ過して診断装置製造に使用した。

10

【0030】

実施例4：モノクローナル抗体が結合した着色微粒子が組み込まれた着色微粒子パッドの製造

モノクローナル抗体が結合した着色微粒子を製造するために、実施例3で製造された着色微粒子50mlずつをそれぞれビーカーに入れた。実施例1及び2で製造されたモノクローナル抗体を、それぞれ着色微粒子1ml当り1μg～15μgになるように、攪拌しながらフラスコに添加して、2分～30分間反応させた。反応が終わった後、1%～10%ウシ血清アルブミンを含む遮断（blocking）溶液を、最終濃度0.1～1%のアルブミン濃度になるよう各ビーカーに添加して、2分～30分間反応させた。

20

【0031】

この反応液を50mlの遠心分離チューブ（Corning社、米国）に入れて、超遠心分離機（Beckman社、米国）で10,000rpmで15分間遠心分離した。遠心分離後、上清を除去して沈澱物を回収し、安定化緩衝液（0.5%～2%ウシ血清アルブミン、1%～5%スクロース、50mM～100mMトリスHCl緩衝液（pH7.5～9.0））に再懸濁した。このような懸濁液を適切な濃度に調整して、着色微粒子パッドを懸濁液に浸漬して乾燥させた。実施例2で獲得した抗変型-hCGモノクローナル抗体を結合させた着色微粒子は、実施例1で獲得した抗I-hCGモノクローナル抗体を結合させた着色微粒子の濃度より2～10倍高くなるよう添加して製造した。抗変型-hCGモノクローナル抗体を2～10倍高い濃度で使用することにより、検査試料に相対的に少量（10%）含まれる変型-hCGを確実に検出できるようにした。

30

【0032】

実施例2で獲得した抗-hCGモノクローナル抗体及び実施例1で獲得した抗-hCGモノクローナル抗体を着色微粒子パッドで製造する場合には、メンブレンに結合される抗変型-hCGモノクローナル抗体の濃度を、抗I-hCGモノクローナル抗体の濃度より2～10倍高く調節して、変型-hCGを確実に検出できるようにした。

40

【0033】

実施例5：抗体固定メンブレンの製造（読出し板）

抗体が固定された部位で正常妊娠及び子宮外妊娠に反応する結果線を作るために、-hCGを認識して結合するモノクローナル抗体及び-hCGを認識して結合するモノクローナル抗体を、ニトロセルロースメンブレンに各々一直線になるように点滴した。抗体は1～4.0mg/mlの濃度で調製し、最終濃度が0.1μg-5μg/cmになるようにメンブレン上に点滴して固定し、0.1%～2%のスクロースを含んだ5mM～50mMリン酸緩衝液を固定化溶液として使用した。モノクローナル抗体の点滴部位の下方には0.5～2mg/ml濃度のウサギ抗-マウス免疫グロブリン（IgG）ポリクローナル

50

抗体を使用して反応終了線（図1 a及び図2 aのC）を提供したが、0.1%～2%のスクロースを含んだ5 mM～50 mMリン酸緩衝液を固定化溶液として使用した。抗体固定が完了したメンブレンを、室温で2時間乾燥させた。示そうとする結果線の形態に応じて、固定化する抗体と点滴パターンを変更することができる。図1に示した診断キットは、それぞれ異なるメンブレンに抗-hCGモノクローナル抗体と抗-hCGモノクローナル抗体を点滴し固定させて製造した。図2に示した診断キットは、結果線が1つのメンブレンに表示されるようにするために、2つの抗体を2つの直線状に1つのメンブレンに点滴し固定させて製造した。特に、図1のような診断キットの場合、望ましい結果を得るためには、メンブレンに固定された抗体と着色微粒子に結合された抗体の選別が非常に重要である。つまり、抗-hCGモノクローナル抗体が固定されたメンブレンを使用する場合には、抗I-hCGモノクローナル抗体が結合された着色微粒子パッドを使用することが好ましい。抗-hCGモノクローナル抗体が固定されたメンブレンを使用する場合には、変型-hCGを検出できるように、抗変型-hCGモノクローナル抗体が結合された着色微粒子パッドを使用することが好ましい。抗変型-hCGモノクローナル抗体が固定されたメンブレンを使用する場合には、抗-hCGモノクローナル抗体が結合された着色微粒子パッドを使用し、抗I-hCGモノクローナル抗体が固定されたメンブレンを使用する場合には、抗-hCGモノクローナル抗体が結合された着色微粒子パッドを使用することが好ましい。

10

【0034】

実施例6：試料受けパッド及び試料吸収パッド

20

試料受けパッドには、ガラス繊維（Millipore社、米国）またはセルロース紙（Whatman社、英国）を使用した。試料吸収パッドにはセルロース紙（Whatman社、英国）を使用した。

【0035】

実施例7：妊娠及び子宮外妊娠の同時診断ストリップの製造

図3のように、実施例5で製造された抗体固定化メンブレンを接着性ポリエステル支持盤に接着させた後、その上に実施例4で製造した抗体結合着色微粒子パッドを1～3 mm重なるように接着させた。その後、試料受けパッドを縦に1 mm～10 mm重なるように接着させ、試料吸収パッドを1～5 mm重なるように接着させて同時診断ストリップを製造した。このように製造された同時診断ストリップは、図1 a及び図2 aに示されるようなプラスチックハウジング（plastic housing）に組立て、正常妊娠及び子宮外妊娠の同時診断キットを製造した。

30

【0036】

試験的実施例1：hCG標準液を利用した同時診断キットの評価

上記の実施例にしたがって製造された診断キットの特異性を評価するために、ザイメッドで市販しているI-hCG（カタログ番号14-1401）および超音波所見で正常妊娠と判定された初期妊産婦の尿から、hCG標準溶液を製造した。評価するキットの着色微粒子パッドは、I-hCGに対するモノクローナル抗体及び変型-hCGに対するモノクローナル抗体を、各々実施例4のような着色微粒子に結合させて製造した。抗-hCGモノクローナル抗体及び抗-hCGモノクローナル抗体を、各々実施例5のようにニトロセルロースメンブレンに点滴することによって、抗体固定メンブレンを製造した。このように製造された2種の抗体固定メンブレン、および2種の着色微粒子パッドを組立て、メンブレンとパッドのそれぞれ可能な組み合わせを提供する。試料受けパッド及び試料吸収パッドを各々接着させて組立て、同時診断ストリップを製造した。

40

【0037】

標準溶液としては、陰性標準液と陽性標準液を調製し、試験に使用した。

陰性標準液：50 mMリン酸緩衝液（pH 7.2）

陽性標準液1：I-hCG 50 mIU/mlリン酸緩衝液（pH 7.2）

陽性標準液2：超音波所見で正常子宮内胎嚢が確認され、胎児の心拍が検出された、初期妊産婦の尿

50

【0038】

上記の標準溶液をキットの試料受け口に約500 μ lを投入した後、3分間観察した。結果線の出現有無により、「陰性」と「陽性」の結果を判定した。

【0039】

試験結果は、下記表1に示す。。

【0040】

【表1】同時診断キットに使用されたモノクローナル抗体の認識特性比較(1)

標準液	メンブレン結合抗体	着色微粒子に結合した抗体	
		抗変型-hCG モノクローナル抗体	抗 I-hCG モノクローナル 抗体
陰性標準液	抗 β -hCG 抗体	-	-
	抗 α -hCG 抗体	-	-
陽性標準液 1	抗 β -hCG 抗体	+	+
	抗 α -hCG 抗体	+	++
陽性標準液 2	抗 β -hCG 抗体	+++	+
	抗 α -hCG 抗体	+	+++

10

20

記号：-（反応なし）、+（非常に小さな反応）、++（有意な反応）、+++（強い反応）

【0041】

表1に示されたように、hCGが含まれていない陰性標準液では抗体1と2が固定されているメンブレン上の部位に線が現れないため、「陰性」と判断する。I-hCGを含む陽性標準液1では、抗I-hCGモノクローナル抗体が結合された着色微粒子及び抗-hCGモノクローナル抗体が固定された部位で強い相互作用を示し、その他のモノクローナル抗体を利用したキットでは弱い反応性を示した。正常妊娠の尿を使用した陽性標準液2では、抗I-hCGモノクローナル抗体が結合された着色微粒子及び抗-hCGモノクローナル抗体が固定された部位で強い相互作用を示した。また抗変型-hCGモノクローナル抗体が結合した着色微粒子および抗-hCGモノクローナル抗体が固定された部位で、強い相互作用を示した。このような結果から、抗I-hCGモノクローナル抗体を抗-hCGモノクローナル抗体と組合せることにより、I-hCGを検出することができる一方、変型-hCGの検出は抗変型-hCGモノクローナル抗体と抗-hCGモノクローナル抗体を利用することによってなし得ることが分かる。

30

【0042】

同様の結果は、着色微粒子とメンブレンに結合される抗体を相互に交換しても得られ、分析に使用する抗体の組合せの重要性を明確に示す。表2は、抗-hCGモノクローナル抗体と抗-hCGモノクローナル抗体を着色微粒子に結合させ、抗I-hCGモノクローナル抗体及び抗変型-hCGモノクローナル抗体をメンブレンに固定させて、同時診断キットを製造する。標準hCG溶液を用いる試験の結果を表す。

40

【0043】

【表2】同時診断キットに使用されたモノクローナル抗体の認識特性比較(2)

標準液	メンブレン結合抗体	着色微粒子に結合した抗体	
		抗 β -hCG モノクローナル抗体	抗 α -hCG モノクローナル 抗体
陰性標準液	抗変型-hCG抗体	-	-
	抗 I-hCG抗体	-	-
陽性標準液 1	抗変型-hCG抗体	+	+
	抗 I-hCG抗体	+	++
陽性標準液 2	抗変型-hCG抗体	+++	+
	抗 I-hCG抗体	+	+++

10

記号： -（反応なし）、+（非常に小さな反応）、++（有意な反応）、+++（強い反応）

【0044】

上記の試験例にみられるように、結局、試料中に含まれているhCGの形態に応じて、出現する線の位置と強度が異なったため、正常妊娠と子宮外妊娠の結果を肉眼で判定することができた。

20

【0045】

試験例2：正常妊娠及び子宮外妊娠の同時診断キットを使用した妊産婦尿の分析 正常妊娠及び子宮外妊娠で特異的に発見される変型-hCG及びI-hCGを分析するために、非妊婦尿、正常妊婦尿、および子宮外妊婦尿を各々本発明の同時診断キットに適用した結果を、表3に示す。正常妊婦の尿試料は、超音波所見で子宮内で胎嚢が確認され胎児の心拍が検出された妊産婦から得られた。子宮外妊婦の尿試料は、子宮外妊娠所見が外科的手術を通じて確認された妊産婦の尿から得られた。この実施例に使用された診断キットは、図1aに示された形態であった。

30

【0046】

表3にみられるように、非妊婦の尿試料ではNP及びEPの結果線に何の線も出現しなかった。正常妊婦の尿試料ではNP及びEPの結果線が類似の強度で出現した。特に、子宮外妊婦の尿試料では、NPよりEPの結果線ではるかに強い線が出現して、正常妊娠と子宮外妊娠を讀出しにより明確にできることを意味する。

【0047】

【表3】同時診断キットの臨床正確度測定

試験数		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
尿 (非妊娠)	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P										
	EP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
尿 (正常妊娠)	N	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	P										
	EP	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
尿 (子宮外妊娠)	N	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
	P										
	EP	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

記号： - (反応なし)、+ (非常に小さな反応)、++ (有意な反応)、+++ (強い反応)

【0048】

産業上の利用可能性

本発明は、正常妊娠と子宮外妊娠を同時に検出できる、ワンステップ妊娠診断装置及びそのような装置の製造方法を提供する。妊産婦の体液は、妊娠の形態に応じて異なる形態のhCGを含み、本発明は体液中に存在するhCGの形態を免疫学的に検出することにより、正常妊娠と子宮外妊娠を妊娠初期に、迅速かつ正確に判断することを可能にする。特に本発明は、妊産婦の体液(尿、血液、唾液など)中に存在するI-hCGと変型-hCGを個別に検出するために、抗I-hCGモノクローナル抗体は抗-hCGモノクローナル抗体と組み合わせ、抗変型-hCGモノクローナル抗体は抗-hCGモノクローナル抗体と組み合わせる。従って、本発明は子宮外妊娠を早期に発見することにより母性死亡率が減少させるのに有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1A】本発明による正常妊娠及び子宮外妊娠に関する同時診断装置の模型図である。1と4は診断キットの判読窓を表し、2と5は試験の終了を表す指標(C)である。また、3は子宮外妊娠線(Ectopic Pregnancy; 以下、EP)を表わし、6は正常妊娠線(Normal Pregnancy; 以下、NP)を表す。そして、7は妊産婦の体液を投入する試料受け口を表す。

【図1B】図1(a)の内部ストリップに使用された抗体固定化メンブレン上の結果線(NP、EP)と終了線(C)を示す模式図である。11はニトロセルロースメンブレンであり、8と12はウサギ抗-マウス免疫グロブリンポリクローナル抗体が固定された試験終了線を表す。9は抗-hCGモノクローナル抗体が固定された試験結果線を表し、13は抗-hCGモノクローナル抗体が固定された試験結果線を表す。10は抗変型-hCGモノクローナル抗体が結合した着色微粒子パッドを表し、14は抗I-hCGモノクローナル抗体が結合した着色微粒子パッドを表示している。

【図2A】本発明による正常妊娠及び子宮外妊娠に関する同時診断装置の別の模型図である。15は試験の終了を表す指標(C)であり、16は子宮外妊娠線(EP)を、17は正常妊娠線(NP)を表す。18は診断装置の判読窓を表わし、19は妊産婦の体液を投入する試料受け口を表示している。

【図2B】図2(a)の内部ストリップに使用される抗体固定メンブレンの結果線(NP、EP)と終了線(C)を示す模式図である。20はニトロセルロースメンブレンであり、21はウサギ抗-マウス免疫グロブリンポリクローナル抗体が固定された試験終了線を表す。そして、22は抗-hCGモノクローナル抗体を固定した子宮外妊娠(EP)線

10

20

30

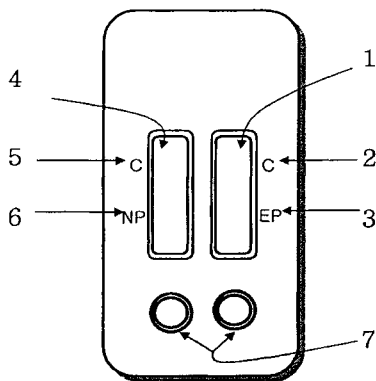
40

50

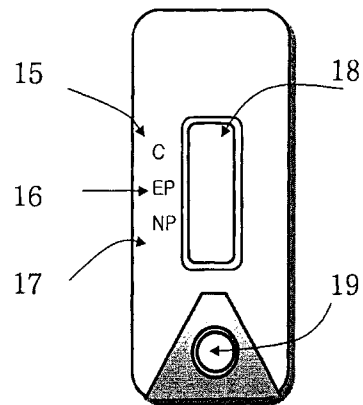
を表し、23は抗 - hCGモノクローナル抗体を固定した正常妊娠(NP)線である。24は抗変型 - hCGモノクローナル抗体と、抗I - hCGモノクローナル抗体が結合した着色微粒子を混合したパッドを表す。

【図3】本発明の正常妊娠及び子宮外妊娠に関する同時診断装置の内部ストリップの構成を表す。25は体液吸収パッドを表し、26は抗体点滴ニトロセルロースメンブレンを、27は着色微粒子パッドを表し、28は試料受けパッドを表し、これらパッドは一部重なるように順に組み合わされる。

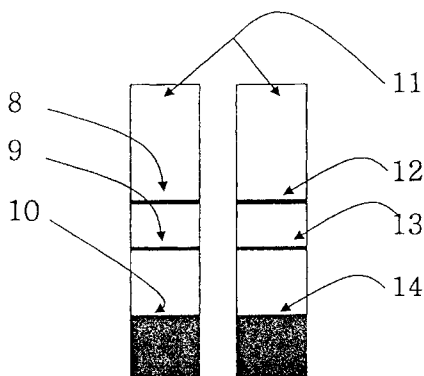
【図1A】



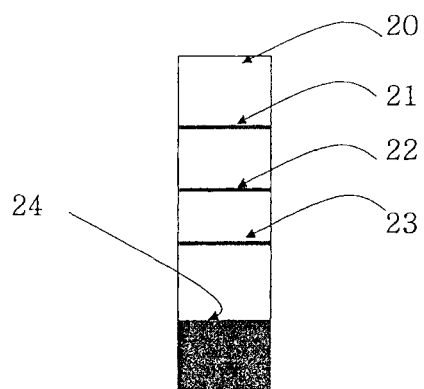
【図2A】



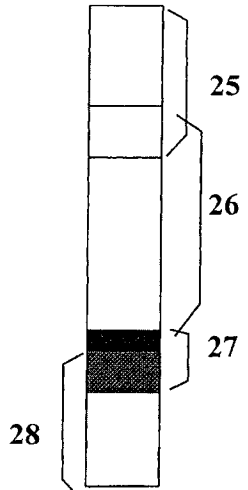
【図1B】



【図2B】



【 図 3 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 February 2002 (21.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/13685 A1

(51) International Patent Classification: A61B 5/00,
G01N 33/53

Yangcheon-gu, Seoul 158-770 (KR), CHA, Jung-Hak
[KR/KR]; 342-2001 yullog Apt., 876 Geumjeong-dong,
Gampo-si, Gyeonggi-do 435-757 (KR), NAM, Jung-Hyun
[KR/KR]; 2-404 Samsin 9cha Apt., 149-3 Ojeon-dong,
Uiwang-si, Gyeonggi-do 437-731 (KR).

(21) International Application Number: PCT/KR01/01365

(22) International Filing Date: 10 August 2001 (10.08.2001)

(74) Agents: KIM, Dong-Jin et al.; 3rd Fl. Seonggok Building,
823-22 Yeoksam-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-080 (KR).

(25) Filing Language: Korean

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 2000/46755 12 August 2000 (12.08.2000) KR

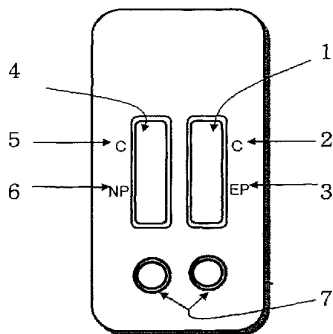
(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) Applicant (for all designated States except US): HU-
MASIS CO., LTD. [KR/KR]; 345-1 Dangjeong-dong,
Gampo-si, Gyeonggi-do 435-030 (KR).

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
[Continued on next page]

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): CHANG, Jin-Dong
[KR/KR]; 1422-102 Mokdong Apt., Sinjeong-dong,

(54) Title: DIAGNOSTIC DEVICE FOR DISTINGUISHING BETWEEN NORMAL AND ECTOPIC PREGNANCY AND
METHOD FOR PREPARING THE SAME



(57) Abstract: The present invention provides one-step pregnancy diagnosis devices which can simultaneously detect and distin-
guish between normal pregnancy and ectopic pregnancy and methods of preparing the devices. According to the present invention,
normal pregnancy and ectopic pregnancy can be rapidly and accurately determined at an early stage by immunologically detecting
the morphological differences between human chorionic gonadotropin (hCG) and modified forms thereof which are secreted into
the body fluid of a pregnant female.



WO 02/13685 A1

WO 02/13685 A1 

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, — *entirely in electronic form (except for this front page) and available upon request from the International Bureau*

Published:
— *with international search report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

**DIAGNOSTIC DEVICE FOR DISTINGUISHING BETWEEN NORMAL AND
ECTOPIC PREGNANCY AND METHOD FOR PREPARING THE SAME**

Technical Field

5 The present invention relates to one-step pregnancy diagnostic devices for distinguishing between a normal pregnancy and an ectopic pregnancy and methods for preparing such devices. More particularly, the present invention relates to diagnostic devices allowing rapid and accurate determination of a normal pregnancy and an ectopic pregnancy at an early stage by immunologically detecting morphological differences
10 between the human chorionic gonadotropin (hCG) and modified forms thereof, which are secreted into the body fluid of a pregnant female, and methods for preparing such devices.

Background Art

An ectopic pregnancy refers to a pregnancy in which the fertilized egg is implanted
15 outside of a normal uterine endometrial lining, and classified as a tubal pregnancy, a cervical pregnancy, an ovarian pregnancy, a peritoneal pregnancy and the like, depending on the site of implantation. More than 95% of ectopic pregnancy events are tubal pregnancy, which is thus being used as general designation for the ectopic pregnancy. The etiology of the ectopic pregnancy includes previous tubal ligation (contraception),
20 PID(Pelvic Inflammatory Disease), administration of ovulation controlling formulations and STD(Sexually Transmitted Disease), and the incidence of the ectopic pregnancy is quite high as one per about 64 ~ 241 pregnant females.

The ectopic pregnancy is one of the most frequent obstetric and gynecologic emergencies, and its incidence is increasing year by year. Observable symptoms of tubal
25 rupture due to the ectopic pregnancy include lower abdominal pain, amenorrhea or vaginal bleeding, dizziness due to blood pressure drop, nausea and vomiting due to gastrointestinal symptoms. Untreated tubal rupture may lead to intraperitoneal bleeding, which is emerging as the biggest cause of the death of pregnant females at early stages of pregnancy. Thus, if the ectopic pregnancy is not discovered in the early stages, tubal rupture and
30 subsequent development to shock from bleeding may lead to death of the patient.

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

However, early diagnosis of the ectopic pregnancy has faced with difficulties because there has not been found specific symptoms and diagnostic methods that can be applied specifically to the ectopic pregnancy. Under these circumstances, the present inventors have conducted an extensive study on the assumption that early determination of the ectopic pregnancy can reduce the maternity mortality and resolve the anxiety of females with normal pregnancy about ectopic pregnancy, and have now found methods and devices for an early diagnosis of the ectopic pregnancy.

Human chorionic gonadotropin (hereinafter, referred to as "hCG") is produced in syncytiotrophoblast of the placenta and induces a constant production of progesterone in the early stage of pregnancy to maintain the implantation until the 10th week of pregnancy, when the placenta becomes completely functional. It also stimulates the production of testosterone in the fetal testis, plays an important role in the differentiation of internal genitalia in a male embryo, and has other various functions including the stimulation of maternal thyroid. It is detected in the blood and urine at a level of about 25mIU/ml at about 8 days after conception (or fertilization). Then, its concentration rises rapidly at a constant speed from the 5th week of pregnancy such that the concentration reaches about 1 IU/ml at the 6th week of pregnancy, and about 100~120 IU/ml at the 10th week of pregnancy. From that point, the concentration decreases over the 10th to the 18th week of pregnancy to reach about 20 IU/ml at the 20th week of pregnancy, after which the concentration is maintained constant. The hCG is a glycoprotein comprised of two subunits, α and β , contains 30 % of carbohydrates, and has a molecular weight of about 36,700 daltons. The α -subunit is comprised of 92 amino acid residues, having the same structure as the α -subunit of luteinizing hormone and thyroid stimulating hormone. The β -subunit is comprised of 145 amino acid residues (structurally characteristic of hCG) (Laphorn et al., Nature. 1994. Vol 369:455~461).

In general, the hCG is found to exist in various forms in the human body fluid. There is known intact-hCG (I-hCG), as well as modified hCGs including nicked hCG(N-hCG), hyperglycosylated hCG, free β -hCG and free β -core fragment. These various forms of hCGs are produced in the event of pregnancy, pituitary gland, trophoblast disease and choriocarcinoma. In the body fluid of a woman with a normal pregnancy, intact hCG

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

comprises about 90 % of the total hCGs present and various modified hCGs are detected in an amount of about 10 % or less.

On the other hand, ectopic pregnancy is characterized in that almost entire hCGs are present in the form of intact hCG and there is very little amount of modified hCGs in contrast to normal pregnancy where certain ratios of nicked hCG and free β -hCG are detected. In addition, the total amount of hCG secretion and the range of increase are very small as compared with those in the normal pregnancy. Thus, the amount of hCG secretion reaches about 1/5 of that for the normal pregnancy at the 6th week of pregnancy and decreases to about 1/50 of that for the normal pregnancy at the 8th week of pregnancy, i.e., about 15 IU/ml.

U.S. Patent No. 5,786,220 discloses a process for the preparation of a one-step diagnostic reagent system that distinguishes between normal pregnancy and abnormal pregnancy. In this patent, it is disclosed that normal pregnancy, spontaneous abortion, ectopic pregnancy, cancers, etc. can be diagnosed by simultaneously determining the concentration of progesterone and the hCG level in the body fluid of a human female. Specifically, a method of diagnosis is disclosed wherein a progesterone concentration of 25 ng/ml or lower in blood together with an hCG concentration of 25~2,500 mIU/ml is indicative of a spontaneous abortion or an ectopic pregnancy, and a progesterone concentration exceeding 25 ng/ml together with an hCG concentration exceeding 2,500 mIU/ml is indicative of a normal intrauterine pregnancy. Denil et al. (Fertility & Sterility, 1999, Vol. 72:1013~1017) disclosed that the free β -hCG level is 30~170 IU/ml in normal pregnancy, 1~70 IU/ml in abnormal intrauterine pregnancy, and 0.059~29 IU/ml in ectopic pregnancy, indicating that hCG degradation products are secreted to a much lower concentration in the ectopic pregnancy than in the normal pregnancy.

As described above, the hCG is the most important hormone in the diagnosis of pregnancy, and the hCG level in an early stage of pregnancy is utilized, in combination with ultrasound findings, for distinguishing between a pregnancy, an abortion, and an ectopic pregnancy. In the diagnosis of pregnancy, the hCG can be used for confirming a pregnancy at an early stage. A low level of hCG together with doubling time, which refers to the doubling of hCG in blood by every 1.4-2 days during the 5th to the 9th weeks from

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

conception, indicates an abortion or an ectopic pregnancy. An hCG level higher than the normal value is interpreted as being indicative of multiple pregnancy or hydatidiform mole. The ectopic pregnancy is also diagnosed via ultrasonography, diagnostic laparoscopy and the like in addition to the measurement of serum and urine hCG level in a pregnant female. 5 Particularly, the ultrasonography is conducted for diagnosis in combination with the hCG level measurement, wherein the presence of gestational sac in the ultrasound findings together with an hCG level below 1,000 mIU/ml indicates a sparse viability of the pregnancy. If the hCG level does not rise quantitatively by at least 65% per 48 hour, the prognosis of the pregnancy is determined to be very poor.

10 Such diagnostic methods for the ectopic pregnancy as the known methods of measuring the doubling time of the hCG level and the method of measuring the free β -hCG level in the body fluid of a pregnant female have the disadvantage in that repeated blood sampling is needed. The method for pregnancy diagnosis disclosed in U.S. Patent No. 5,786,220 is based on diagnostic principles different than those of the present invention in 15 that the measurement of progesterone concentration should be conducted in parallel with the measurement of the hCG level. There is also another problem in that even though the distinction between a normal pregnancy and an abnormal pregnancy can be made, an effective early distinction between an ordinary spontaneous abortion and an ectopic pregnancy which are very hazardous events for a pregnant female is difficult to be achieved.

20 Accordingly, the present inventors have conducted extensive studies on the process for the preparation of a one-step simultaneous diagnosis kit by which the diagnosis of a normal pregnancy and an ectopic pregnancy can be achieved simultaneously in an early pregnancy diagnosis. As a result, the present inventors have now provided a one-step simultaneous diagnosis kit by which a normal pregnancy can be determined by detecting an hCG level of 25 25mIU/ml, and an ectopic pregnancy can be determined through comparison between the concentrations of I-hCG and modified hCGs.

Disclosure of Invention

30 An object of the present invention is to provide a diagnostic device for a one-step simultaneous diagnosis of normal pregnancy and ectopic pregnancy at an early stage of

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

pregnancy, and a method for preparing such a device.

The present invention is characterized in that an anti-I-hCG monoclonal antibody is used in combination with an anti- α -hCG monoclonal antibody and an anti-modified hCG monoclonal antibody is used in combination with an anti- β -hCG monoclonal antibody in order to respectively detect the I-hCG and modified hCGs present in the body fluid (blood, urine, saliva, etc.) of a pregnant female.

Brief Description of Drawings

Fig. 1a shows a schematic view of a simultaneous diagnosis device for normal pregnancy and ectopic pregnancy according to the present invention. Reference numerals 1 and 4 designate reading windows of the diagnosis kit, and reference numerals 2 and 5 designate index (C) indicating the completion of the test. Reference numeral 3 designates an ectopic pregnancy line (hereinafter, referred to as "EP"), and reference numeral 6 designates a normal pregnancy line (hereinafter, referred to as "NP"). Reference numeral 7 designates a specimen receiving aperture to which a body fluid of a pregnant female is applied.

Fig. 1b schematically shows the result lines (NP, EP) and the completion line (C) on the antibody-immobilized membrane used for the inner strip in Fig. 1a. Reference numeral 11 designates a nitrocellulose membrane. Reference numerals 8 and 12 designate completion lines where a rabbit anti-mouse immunoglobulin polyclonal antibody has been immobilized. Reference numeral 9 designates a test result line where an anti- β -hCG monoclonal antibody has been immobilized, and reference numeral 13 designates a test result line where an anti- α -hCG monoclonal antibody has been immobilized. Reference numeral 10 designates a pad of colored particulates having an anti-modified hCG monoclonal antibody bound thereon, and reference numeral 14 designates a pad of colored particulates having an anti-I-hCG monoclonal antibody bound thereon.

Fig. 2a shows another schematic view of a simultaneous diagnosis device for normal pregnancy and ectopic pregnancy according to the present invention. Reference numeral 15 designates an index (C) indicating the completion of the test. Reference numeral 16 designates an ectopic pregnancy line (EP) and reference numeral 14 designates a normal

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

pregnancy line (NP). Reference numeral 18 designates a reading window of the diagnostic device, and reference numeral 19 designates a specimen receiving aperture to which a body fluid specimen of a pregnant female is applied.

Fig. 2b schematically shows the result lines (NP, EP) and the completion line (C) on the antibody-immobilized membrane used for the inner strip in Fig. 2a. Reference numeral 20 designates a nitrocellulose membrane. Reference numeral 21 designates a completion line where a rabbit anti-mouse immunoglobulin polyclonal antibody has been immobilized. Reference numeral 22 designates an ectopic pregnancy (EP) line where an anti- α -hCG monoclonal antibody has been immobilized, and reference numeral 23 designates a normal pregnancy (NP) line where an anti- β -hCG monoclonal antibody has been immobilized. Reference numeral 24 designates a pad of mixed colored particulates having an anti-modified hCG monoclonal antibody and an anti-I-hCG monoclonal antibody bound thereon.

Fig. 3 shows a construction of the inner strip in the simultaneous diagnosis device for normal pregnancy and ectopic pregnancy of the present invention. Reference numeral 25 designates a specimen absorbing pad, reference numeral 26 designates an antibody-immobilized nitrocellulose membrane, reference numeral 27 designates a colored particulate pad, and reference numeral 28 designates a specimen receiving pad, wherein these pads are combined sequentially in a partially overlapping manner.

Best Mode for Carrying Out the Invention

The present invention is based on an immunological assay method called sandwich assay. In such an assay, the selection of the antibodies used in the assay is very important because the antibodies dictate the sensitivity and the specificity for a specimen to be assayed. In a sandwich assay, two kinds of monoclonal antibodies are primarily used, where the binding sites for the antibodies should be present on different regions of the relevant antigen in order to maintain the assay sensitivity. For example, in order to examine the hCG which is secreted into the body fluid (blood, urine, saliva, etc.) of a pregnant female using the sandwich assay, two kinds of monoclonal antibodies are needed and the binding sites on the antigen (hCG) for the two antibodies should be located distinctively apart. If the binding

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

sites on the antigen (hCG) for the two antibodies used are located in similar or close regions, steric hindrance may lead to a decrease in the assay sensitivity. The present invention utilizes an immuno-chromatographic method based on the sandwich assay among immunological assay methods. Particularly, a previously characterized monoclonal antibody is bound to colored fine particles (colored particulates) by covalent or non-covalent bonding, the resulting particulates being used as the mobile phase. A second, previously characterized monoclonal antibody is dispensed into and immobilized onto a nitrocellulose membrane to be used as the solid phase. The specimen to be assayed is mixed with the mobile phase and run, by the capillary action, through the membrane as the solid phase. Here, if a relevant antigen is contained in the specimen, the mobile phase and the solid phase are conjugated via the antigen, resulting in an observable line of the colored particulates appearing on the solid phase. From the appearance or absence of such an observable line, the presence or absence of the relevant antigen in the specimen is determined visually. Monoclonal antibodies to be used in the present invention may be purchased as commercially available monoclonal antibody or prepared according to known cell fusion protocols. The antibodies used in the Examples were prepared according to a known process for preparing monoclonal antibody, where antibodies reactive to I-hCG and antibodies reactive to modified hCG were selected. For the anti- α -hCG antibody and anti- β -hCG antibody, monoclonal antibodies were selected and used, which showed a good maintenance of sensitivity when examined using standard hCG.

As described above, the hCG is present in various forms in the urine of a female with normal pregnancy or ectopic pregnancy at an early stage of pregnancy. In particular, most of the hCG found in the case of the ectopic pregnancy is in the intact form (I-hCG), with very little amount of modified hCG present. In the case of the normal pregnancy, I-hCG comprises about 90% of the total hCGs present, and various modified hCGs comprise about 10%. Utilizing the above difference, the present invention allows the confirmation of a pregnancy simultaneously with the distinction between normal pregnancy and ectopic pregnancy by separately detecting and visually comparing I-hCG and modified hCGs. The construction of the diagnostic device of the present invention is completed by separately providing a diagnosis kit with an ectopic pregnancy (EP) region where a colored line

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

appears when the I-hCG is present in the specimen and with a normal pregnancy (NP) region where a colored line appears when modified-hCGs are present in the specimen. In the case of an ectopic pregnancy, most of the hCG is present in the form of the I-hCG. Consequently, a colored line will appear only in the EP region due to the reaction of I-hCG, or, even if an NP line appears, a much more intensive EP line will appear. In a normal pregnancy, about 10 % of modified hCGs are present in the body fluid in addition to the I-hCG. Accordingly, in the diagnostic device of the present invention, the concentration of colored particulates having an antibody reactive to modified hCGs bound thereon is increased 2~10-fold, or the concentration of the antibody to be bound is correspondingly increased so as to enhance the reaction sensitivity with the modified hCGs. It would render the intensities of the colored lines appearing in the two regions (EP, NP) to be similar to assist in diagnosing a normal pregnancy.

Hereinafter, the construction of the pregnancy diagnosis device according to the present invention will now be described in more detail.

Monoclonal antibody against I-hCG, which is overexpressed in an ectopic pregnancy, is prepared according to a well-known method and then bound to colored particulates. The resulting particulates are incorporated into a glass fiber pad and dried to produce a colored particulate pad. On the other hand, monoclonal antibody against modified hCGs is prepared according to a well-known method and then bound to colored particulates. The resulting particulates are incorporated into a glass fiber pad and dried to produce a colored particulate pad. Various colored particulates can be used in the present invention including polystyrene particles, colloidal gold, and the like. Among such particles, the colloidal gold is preferable and the colloidal gold of 20 to 60 nm in size is more preferable.

In order to maintain the sensitivity of the diagnostic device, monoclonal antibodies that bind to binding sites on the antigen (hCG) which is different than the binding sites for the antibodies bound to the colored particulates were used for the solid phase membrane. The monoclonal antibodies used for this purpose are an anti- β -hCG monoclonal antibody and an anti- α -hCG monoclonal antibody. The two antibodies are immobilized on separate nitrocellulose membranes by dispensing the antibody into the membrane to respectively form a straight line (Fig. 1), or immobilized on one membrane by dispensing the antibodies

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

into the membranes to form two crossing lines or two separate lines (Fig. 2). At an end of the membrane downstream of the monoclonal antibody-bound zone, an anti-mouse immunoglobulin polyclonal antibody is dispensed into the membrane so that a test completion line will appear.

5 The antibody-immobilized membrane prepared as described above may be attached to a polyester support having an adhesive applied thereon, and then the monoclonal antibody-colored particulate pad is applied thereover in the longitudinal direction. Subsequently, a specimen receiving pad on which the body fluid of a pregnant female is to be directly dropped, and a specimen absorbing pad for absorbing excess body fluid are applied in the
10 longitudinal direction in a manner that the pads overlaps with each other, providing the inner strip of the simultaneous diagnosis kit for normal pregnancy and ectopic pregnancy (Fig. 3).

Methods for an early diagnosis of normal pregnancy and ectopic pregnancy using a simultaneous diagnosis device prepared as describe above will now be illustrated.

15 When the body fluid (blood, urine, saliva, etc.) specimen of a pregnant female is applied to the specimen receiving pad, the specimen is absorbed and transported by the capillary action, and then reacts with the monoclonal antibody-bound colored particulates which are incorporated in the colored particulate pad. In the case of normal pregnancy, I-hCG and modified hCGs present in the specimen will respectively bind to monoclonal antibodies
20 bound on the colored particulates and move along the nitrocellulose membrane phase. In those regions where two kinds of monoclonal antibodies are immobilized on the membrane, the antigen-antibody complexes will respectively bind in a sandwich form, resulting in two result lines (NP, EP) formed by colored particulates appearing on the membrane with similar intensities.

25 In ectopic pregnancy, I-hCG comprises most of the hCGs present in the body fluid. Accordingly, the complex of the I-hCG-bound monoclonal antibody and colored particulates will move along the membrane and bind to the anti- α -hCG monoclonal antibody to produce a strong EP band. In contrast, colored particulates having monoclonal antibody against modified hCG bound thereon will not react with I-hCG in the specimen,
30 and consequently will move on without binding to the anti- β -hCG monoclonal antibody

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

immobilized on the membrane. The particulates may also react with the extremely small amount of modified hCGs present in the specimen, producing an NP band with a very weak intensity. Thus, in the case of ectopic pregnancy, either one EP band only or two bands with different line intensities (EP band stronger than NP band) will appear.

5 If the tested female is not pregnant, the monoclonal antibody-colored particulate complex will move on without binding to the anti-hCG monoclonal antibody immobilized on the result lines (NP, EP) in the membrane because hCG is not present in the specimen. Consequently, the colored particulate band will appear only on the test completion line (C) where the anti-mouse immunoglobulin polyclonal antibody has been immobilized.

10 Examples depicting the shapes and structures of the simultaneous diagnosis device of the present invention for normal pregnancy and ectopic pregnancy are shown in Figs. 1a to 2b.

The same results may be obtained if the antibodies bound to the colored particulate pad and the antibodies bound to the membrane are interchanged. An anti- α -hCG monoclonal antibody and an anti- β -hCG monoclonal antibody are respectively bound to colored particulates, and an anti-I-hCG monoclonal antibody, an anti-modified hCG monoclonal antibody and an anti-mouse immunoglobulin polyclonal antibody are immobilized on nitrocellulose membranes as described above to provide a diagnosis kit. When a body fluid from a pregnant female is applied to the specimen receiving pad, 1) in normal pregnancy, I-hCG and other modified hCGs present in the specimen bind to the anti- α -hCG monoclonal antibody and the anti- β -hCG monoclonal antibody respectively bound to colored particulates and move along the nitrocellulose membrane, and then respectively bind in a sandwich manner to the anti-I-hCG monoclonal antibody and the anti-modified hCG monoclonal antibody immobilized on the membrane, resulting in two result lines (NP, EP) appearing on the membrane with similar intensity; 2) in ectopic pregnancy, I-hCG present in the body fluid binds to the anti- α -hCG monoclonal antibody bound to colored particulates and moves along the membrane, and then binds to the anti-I-hCG monoclonal antibody on the membrane, giving a strong EP band only, or the extremely small amount of modified hCG present in the specimen produces an NP band with a very weak intensity; 3) if the tested female is not pregnant, the monoclonal antibody-colored particulate complex

15
20
25
30

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

will move on without binding to the anti-hCG monoclonal antibody immobilized on the result lines (NP, EP) in the membrane because hCG is not present in the specimen. Consequently, the colored particulate band will appear only on the test completion line (C) where the anti-mouse immunoglobulin polyclonal antibody has been immobilized.

5 The present invention will now be described in more detail with reference to the following examples. It should be appreciated by a person skilled in the art that these examples are presented for the purpose of illustration only and that the examples should in no way be interpreted to limit the scope of the present invention.

10 Example 1: Preparation and purification of an anti-I-hCG monoclonal antibody and an anti- α -hCG monoclonal antibody

A. Immunization and cell fusion

A known cell-fusion procedure (Galfre, G. et al. 1981, *Methods Enzymol.* 73:3-46) was used to prepare a monoclonal antibody against I-hCG. First, 20 μ g/100 μ l of I-hCG (Zymed, USA) was fully emulsified with 100 μ l of Freund's complete adjuvant and injected into a Balb/C mouse (8 weeks) i.p. After 3 weeks, a second i.p. injection was conducted under the same protocol as the first injection except that 100 μ l of Freund's incomplete adjuvant was used for the emulsification. After 1 week, blood samples were collected from the mouse and the antibody formation was determined by an ELISA, after which 20 μ g of hCG was injected i.v. in the tail. Three days later, spleen cells were recovered from the mouse and cell fusion was performed using pre-cultured Sp2/O cells and PEG. The fused cells were cultured in a 96-well plate with the addition of HAT medium. Then, cells secreting antibodies reactive to I-hCG and cells secreting antibodies reactive to α -hCG were selected and subjected to large-scale culture.

25 B. Purification of monoclonal antibody

Large-scale cultures were centrifuged to remove precipitates. The supernatants were pulled and loaded onto a protein A-sepharose(FF) column, rinsed with a phosphate buffer and eluted with 0.1M glycine buffer. The eluate was dialysed against a phosphate buffer to adjust the concentration and used for the preparation of diagnosis kits.

30

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

Example 2: Preparation and purification of an anti-modified hCG monoclonal antibody and an anti- β -hCG monoclonal antibody

Spleen cells were obtained from a mouse which had been immunized three times with a β -hCG antigen purchased from Zymed according to the same procedure as in Example 1, A. The cells were admixed with Sp2/O cells and cell fusion was conducted using PEG. The fused cells were cultured in a 96-well plate with the addition of HAT medium. Then, cells secreting antibodies reactive to β -hCG and cells secreting antibodies reactive to modified hCGs without reactivity to intact hCG were selected and subjected to large-scale culture. Subsequently, monoclonal antibodies were purified from large-scale cultures according to the same purification procedures as in Example 1, B, adjusted the concentration after dialyzing against a phosphate buffer, and then used for the preparation of diagnosis kits.

Example 3: Preparation of colloidal gold (colored particulates)

Colloidal gold of 20-60 nm in size was used as colored particulates. To prepare the colloidal gold, 220 ml of double distilled water was put into a 500 ml round-bottomed flask. The flask was then placed over a hot plate (Corning, USA) and a reflux apparatus (Pyrex, USA) was equipped to prevent the evaporation of water. The hot plate was turned on to heat the flask to 100°C with suspension. When the temperature of the distilled water exceeds 100°C, 1.0 ml of 2% gold chloride (Sigma, USA) was added with intimate mixing followed by 2.0ml of 1% sodium citrate (Sigma, USA). Heating was continued for further 30 minutes to produce colloidal gold. The colloidal gold thus produced was filtered on a 0.45 μ m filter paper to remove impurities and aggregates, and then used for the preparation of diagnostic device.

Example 4: Preparation of colored particulate pads in which colored particulates having a monoclonal antibody bound thereto are incorporated

To prepare colored particulates having a monoclonal antibody bound thereto, 50 ml aliquots of the colored particulates prepared in Example 3 were placed individually in beakers. Monoclonal antibodies prepared in Examples 1 and 2 were respectively added into the flasks in an amount of 1~15 μ g per 1 ml of colored particulates with stirring, and

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

reacted for 2 to 30 min. After completion of the reaction, a blocking solution containing 1~10% bovine serum albumin was added into each beaker to a final albumin concentration of 0.1~1% and reacted for 2 to 30 min.

The reaction mixture was put into 50ml centrifuge tubes (Corning, USA) and
5 centrifuged in an ultracentrifuge (Beckman, USA) at 10,000 rpm for 15 min. After centrifuge, the supernatants were discarded, and the precipitates were removed and resuspended in a stabilizing buffer (0.5~2% bovine serum albumin, 1~5% sucrose, 50~100mM Tris-HCl buffer (pH 7.5~9.0)). The resulting suspensions were adjusted for an adequate concentration, and colored particulate pads were soaked in the suspensions and
10 then dried. Colored particulates having the anti-modified hCG monoclonal antibody obtained in Example 2 bound thereto were added to a concentration as high as 2 to 10 times the concentration of colored particulates having the anti-I-hCG monoclonal antibody obtained in Example 1 bound thereto. Alternatively, a 2 to 10 fold higher concentration of the anti-modified hCG monoclonal antibody was used for the binding reaction, such that
15 modified hCGs, which are contained in the test specimen in a relatively small amount (10%), can be clearly detected.

When the anti- β -hCG monoclonal antibody obtained in Example 2 and the anti- α -hCG monoclonal antibody obtained in Example 1 were formulated into colored particulate pads, the concentration of the anti-modified hCG monoclonal antibody which was bound to the
20 membrane was adjusted to be 2 to 10 times higher than the concentration of the anti-I-hCG monoclonal antibody so that modified hCGs can be clearly detected.

Example 5: Preparation of antibody-immobilized membranes (Readout panel)

To make result lines reacting in response to normal pregnancy and ectopic pregnancy
25 within zones where an antibody is immobilized, monoclonal antibody recognizing and binding α -hCG and monoclonal antibody recognizing and binding β -hCG were dropped onto a nitrocellulose membrane to respectively form straight lines. The antibodies were prepared at a concentration of 1 to 4.0 mg/ml and dropped and immobilized on the membrane to a final concentration of 0.1 μ g to 5 μ g/cm, where a 5~50mM phosphate buffer
30 containing 0.1 to 2 % sucrose was used as the immobilization solution. Downstream to the

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

monoclonal antibody-dropped zone, reaction completion line (C in Fig. 1a and Fig. 2b) was provided using a rabbit anti-mouse immunoglobulin (IgG) polyclonal antibody at a concentration of 0.5~2 mg/ml, wherein a 5~50mM phosphate buffer containing 0.1 to 2 % sucrose was used as the immobilization solution. Membranes where the antibody immobilization had been completed were dried at room temperature for 2 hours. The antibody to be immobilized and the drop pattern can be varied according to the shape of the result lines to be displayed. The diagnosis kit shown in Fig. 1 was prepared by dropping and immobilizing an anti- α -hCG monoclonal antibody and an anti- β -hCG monoclonal antibody on different membranes. In the diagnosis kit shown in Fig. 2, the two antibodies were dropped and immobilized on one membrane in the form of two straight lines spaced apart in order to make the result lines appear on one membrane. Particularly for a diagnosis kit as shown in Fig. 1, the selection of the antibody to be immobilized on the membrane and the antibody to be bound to the colored particulates is very important for obtaining the desired results. Thus, when a membrane having an anti- α -hCG monoclonal antibody immobilized thereon is used, a colored particulate pad having an anti-hCG monoclonal antibody bound thereto is desirably used. When a membrane having an anti- β -hCG monoclonal antibody immobilized thereon is used, a colored particulate pad having an anti-modified hCG monoclonal antibody bound thereto is desirably used so that modified hCG can be detected. When a membrane having an anti-modified hCG monoclonal antibody immobilized thereon is used, a colored particulate pad having an anti- β -hCG monoclonal antibody bound thereto is used. If a membrane having an anti-hCG monoclonal antibody immobilized thereon is used, a colored particulate pad having an anti- α -hCG monoclonal antibody bound thereto is desirably used.

25 Example 6: Specimen receiving pad and specimen absorbing pad

Glass fiber (Millipore, USA) or cellulose paper (Whatman, England) was used in the specimen receiving pad and cellulose paper (Whatman, England) was used in the specimen absorbing pad.

30 Example 7: Preparation of a strip for simultaneous diagnosis of pregnancy and ectopic

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

pregnancy

As depicted in Fig. 3, the antibody-immobilized membrane prepared in Example 5 was attached to an adhesive polyester support, and the antibody-bound colored particulate pad prepared in Example 4 was applied thereover with an overlap of 1~3mm. The specimen receiving pad was then applied with an overlap of 1~10mm in the longitudinal direction followed by the specimen absorbing pad with an overlap of 1~5mm to give a simultaneous diagnosis strip. The resulting simultaneous diagnosis strip was assembled into a plastic housing such as those shown in Figs. 1a and 2a to produce a simultaneous diagnosis kit for normal pregnancy and ectopic pregnancy.

Experimental Example 1: Evaluation of the simultaneous diagnosis kit using an hCG standard solution.

To evaluate the specificity of the diagnosis kit prepared according to the above Examples, an hCG standard solution was prepared from I-hCG commercially available from Zymed (Cat. No. 14-1401) and the urine of a pregnant female at her early stage of pregnancy who had been determined to have a normal pregnancy on the basis of ultrasound findings. Colored particulate pads for the kit to be evaluated were prepared by binding a monoclonal antibody against I-hCG and a monoclonal antibody against modified hCGs respectively to colored particulates as in Example 4. Antibody bound membranes were prepared by dropping an anti- α -hCG monoclonal antibody and an anti- β -hCG monoclonal antibody respectively on nitrocellulose membranes as in Example 5. The resulting two kinds of antibody-fixed membranes and two kinds of colored particulate pads were assembled to provide every possible combination of membrane and pad. Then, specimen receiving pads and specimen absorbing pads were respectively attached to the assemblies to produce simultaneous diagnosis strips.

As standard solutions, negative and positive standards were prepared and used in the tests.

Negative standard: 50mM phosphate buffer (pH 7.2)

Positive standard 1: I-hCG 50mIU/ml phosphate buffer (pH 7.2)

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

Positive standard 2: Urine from a female of an early stage pregnancy wherein ultrasound findings confirmed the normal intrauterine gestational sac and the heart beat of the fetus had been detected.

The above standard solutions were applied to the specimen receiving zones at an amount of about 500 μ l and observed for 3 minutes. The appearance or absence of a result line indicated "positive" and "negative" for the result.

The test results are listed in Table 1 below.

Table 1. Comparison of recognition properties for the monoclonal antibodies used for the simultaneous diagnosis kits (1)

Standard	Antibody bound on membrane	Antibody bound to colored particulates	
		anti-modified hCG monoclonal antibody	anti-I-hCG monoclonal antibody
Negative standard	anti- β -hCG antibody	-	-
	anti- α -hCG antibody	-	-
Positive standard 1	anti- β -hCG antibody	+	+
	anti- α -hCG antibody	+	++
Positive standard 2	anti- β -hCG antibody	+++	+
	anti- α -hCG antibody	+	+++

Notes: - (no reaction), + (very little reaction), ++(significant reaction), +++ (strong reaction)

As can be seen from Table 1, in the case of the negative standard which does not contain hCG, the result is determined to be "negative" because there appear no lines within those zones on the membrane where antibody 1 and 2 are immobilized. For the positive standard 1 containing I-hCG, colored particulates having an anti-I-hCG monoclonal antibody bound thereto and the zone where an anti- α -hCG monoclonal antibody is immobilized showed a strong interaction and kits with other monoclonal antibodies showed

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

weak interactions. For the positive standard 2 utilizing urine from a female with a normal pregnancy, colored particulates having an anti-I-hCG monoclonal antibody bound thereto and the zone where an anti- α -hCG monoclonal antibody is immobilized showed a strong interaction. Colored particulates having an anti-modified hCG monoclonal antibody
5 bound thereto and the zone where an anti- β -hCG monoclonal antibody is immobilized also showed a strong interaction. From these results, it could be recognized that an anti-I-hCG monoclonal antibody in combination with an anti- α -hCG monoclonal antibody can detect I-hCG, while the detection of modified hCGs can be achieved by using an anti-modified hCG monoclonal antibody and an anti- β -hCG monoclonal antibody.

10 Similar results were obtained when the antibodies bound to colored particulates and the membrane were interchanged, clearly indicating the importance of the combination of the antibodies used in the assay. Table 2 shows the results from a test with a standard hCG solution, wherein an anti- α -hCG monoclonal antibody and an anti- β -hCG monoclonal antibody are bound to colored particulates and an anti-I-hCG monoclonal antibody and an
15 anti-modified hCG monoclonal antibody were immobilized on the membrane to prepare a simultaneous diagnosis kit.

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

Table 2. Comparison of recognition properties for the monoclonal antibodies used for the simultaneous diagnosis kits (2)

Standard	Antibody bound on membrane	Antibody bound to colored particulates	
		anti- β -hCG monoclonal antibody	anti- α -hCG monoclonal antibody
Negative standard	anti-modified hCG antibody	-	-
	anti-I-hCG antibody	-	-
Positive standard 1	anti-modified hCG antibody	+	+
	anti-I-hCG antibody	+	++
Positive standard 2	anti-modified hCG antibody	+++	+
	anti-I-hCG antibody	+	+++

Notes: - (no reaction), + (very little reaction), ++(significant reaction), +++ (strong reaction)

5

As seen in the above experimental example, normal pregnancy and ectopic pregnancy could be determined with naked eyes because the location and intensity of the appearing lines varied depending on the form of the hCG contained in the specimen.

Experimental Example 2: Assay on the urine of a pregnant female using a kit for the simultaneous diagnosis of normal pregnancy and ectopic pregnancy

Table 3 shows the results from a test where urine samples obtained from a non-pregnant female, a female with normal pregnancy, and a female with ectopic pregnancy were applied respectively to simultaneous diagnosis kits of the present invention for assaying modified-hCGs and I-hCG which are specifically found in normal pregnancy and ectopic pregnancy.

15 The urine sample for normal pregnancy was obtained from a pregnant female for whom ultrasound findings confirmed intrauterine gestational sac and the heart beat of the fetus had been detected. The urine sample for ectopic pregnancy was obtained from a female for whom the ectopic pregnancy findings were confirmed through a surgical operation. The diagnosis kits used in this example were in the form shown in Fig. 1a.

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

As is seen from Table 3, no lines appeared at the result lines for NP and EP in the case of the urine sample from a non-pregnant female. In the case of the urine sample from a female with normal pregnancy, the result lines for NP and EP appeared with similar intensity. In particular, for the urine sample from a female with ectopic pregnancy, a much stronger line appeared at the result line for EP than that for NP, which means that the
5 readout allows a sharp distinction between normal pregnancy and ectopic pregnancy.

Table 3. Determination of clinical accuracy of the simultaneous diagnosis kit

Specimen		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Type											
Urine (non- pregnant)	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urine (normal pregnancy)	N	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	P	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	EP	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Urine (ectopic pregnancy)	N	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
	P	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	EP	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

10 Notes: - (no reaction), + (very little reaction), +++ (strong reaction)

Industrial Applicability

The present invention provides one-step pregnancy diagnosis devices that can simultaneously detect normal pregnancy and ectopic pregnancy and methods for the
15 preparation of such devices. Since the body fluid of a pregnant female contains different forms of hCG depending on the form of the pregnancy, the present invention allows a rapid and accurate detection of normal pregnancy and ectopic pregnancy at an early pregnancy stage, by immunologically detecting the forms of hCG present in the body fluid. In the present invention, an anti-I-hCG monoclonal antibody is combined with an anti- α -hCG

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

monoclonal antibody and an anti-modified hCG monoclonal antibody is combined with an anti- β -hCG monoclonal antibody in order to individually detect I-hCG and modified hCGs present in the body fluid of a pregnant female. Consequently, the present invention will be useful in reducing the maternity mortality by finding ectopic pregnancy at an early stage.

5

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

CLAIMS

1. A pregnancy diagnosis device based on the immuno-chromatography, comprising an antibody-bound membrane and an antibody-bound colored particulate pad, wherein an antibody is comprised of a combination of an anti- α -hCG monoclonal antibody, an anti- β -hCG monoclonal antibody, an anti-I-hCG monoclonal antibody and an anti-modified hCG monoclonal antibody.
2. The pregnancy diagnosis device according to claim 1, further comprising a specimen receiving pad and a specimen absorbing pad.
3. The pregnancy diagnosis device according to claim 1, wherein the antibody further comprises an anti-mouse immunoglobulin polyclonal antibody.
4. The pregnancy diagnosis device according to claim 1, wherein the antibody-bound membrane comprises the anti- α -hCG monoclonal antibody and the anti- β -hCG monoclonal antibody and the antibody-bound colored particulate pad comprises the anti-I-hCG monoclonal antibody, the anti-modified hCG monoclonal antibody and colored particulates.
5. The pregnancy diagnosis device according to claim 1, wherein the antibody-bound membrane comprises the anti-I-hCG monoclonal antibody and the anti-modified hCG monoclonal antibody, and the antibody-bound colored particulate pad comprises the anti- α -hCG monoclonal antibody, the anti- β -hCG monoclonal antibody and colored particulates.
6. The pregnancy diagnosis device according to claim 4 or 5, wherein the colored particulates are formed from one or more selected from selenium, gold and polystyrene.
7. The pregnancy diagnosis device according to claim 4 or 5, wherein the anti-I-hCG monoclonal antibody and the anti-modified hCG monoclonal antibody are used at a concentration ratio of 1: 2-10.

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

8. A pregnancy diagnosis device comprising an ectopic pregnancy line, a normal pregnancy line, and a test completion line, wherein

when a specimen from a non-pregnant female is tested, only the test completion line is turned visually observable;

5 when a specimen from a female with a normal pregnancy is tested, the test completion line, the ectopic pregnancy line and the normal pregnancy line are turned visually observable with equal intensities; and

when a specimen from a female with an ectopic pregnancy is tested, only the test completion line and the ectopic pregnancy line are turned visually observable, or
10 alternatively the test completion line, the ectopic pregnancy line, and the normal pregnancy line are turned visually observable with the intensity of the normal pregnancy line being distinctively low.

9. The pregnancy diagnosis device according to claim 8, wherein the ectopic pregnancy
15 line is comprised of an anti- α -hCG monoclonal antibody, the normal pregnancy line is comprised of an anti- β -hCG monoclonal antibody, and the test completion line is comprised of an anti-mouse immunoglobulin polyclonal antibody.

10. The pregnancy diagnosis device according to claim 8, wherein the ectopic pregnancy
20 line is comprised of an anti-l-hCG monoclonal antibody, the normal pregnancy line is comprised of an anti-modified hCG monoclonal antibody, and the test completion line is comprised of an anti-mouse immunoglobulin polyclonal antibody.

11. The pregnancy diagnosis device according to claim 9, wherein the anti- α -hCG
25 monoclonal antibody and the anti- β -hCG monoclonal antibody has been dissolved in an immobilization buffer containing 0.1%-2% sucrose and 5-50 mM phosphate buffer and then immobilized onto the membrane to 0.1-5 $\mu\text{g}/\text{cm}$.

12. The pregnancy diagnosis device according to claim 8, wherein the specimen is selected
30 from urine, blood and saliva.

1/5

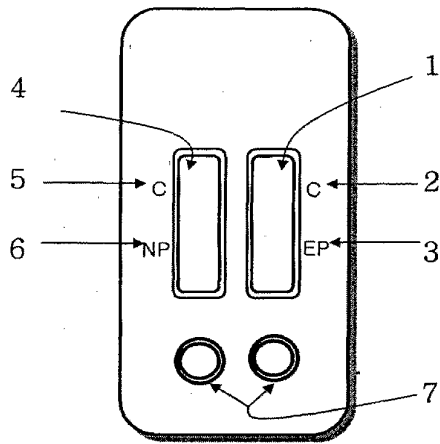


Fig. 1a

WO 02/13685

PCT/KR01/01365

2/5

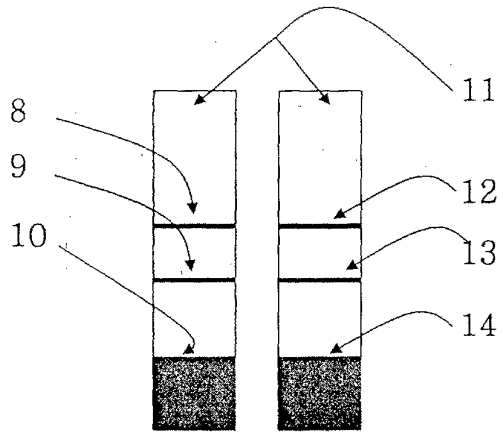


Fig. 1b

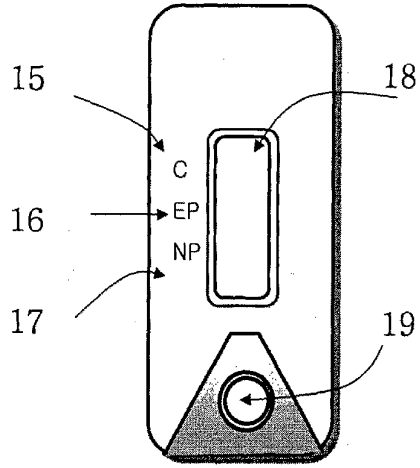


Fig. 2a

4/5

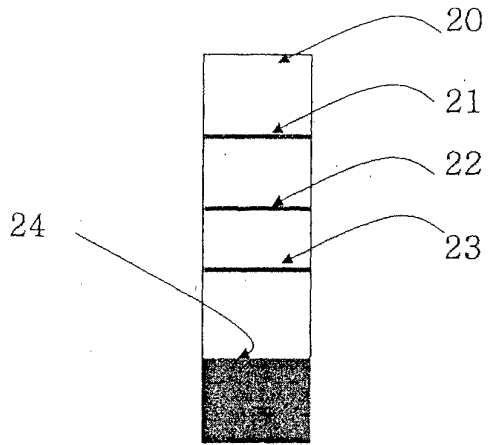


Fig. 2b

5/5

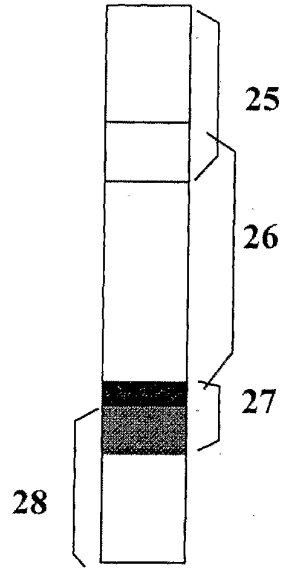


Fig. 3

【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR01/01365
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC7 A61B 5/00, G01N 33/53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC7 A61B, G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Patents and applications for inventions since 1975 Korean Utility models and applications for Utility models since 1975 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,786,220 A (Quidel Corporation) 28 July 1998 See whole documents	1-6, 9-10
A	US 5,185,270 A (Adeza Biomedical Corporation) 9 Feb. 1993 See whole documents	1-6, 9-10
A	US 5,236,846 A (Adeza Biomedical Corporation) 17 Aug. 1993 See whole documents	1-6, 9-10
A	US 4,016,250 A (Cornell Research Foundation, Inc.) 5 Apr. 1977 See whole documents	1-2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 NOVEMBER 2001 (20.11.2001)		Date of mailing of the international search report 21 NOVEMBER 2001 (21.11.2001)
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer SHIN, Un Chool Telephone No. 82-42-481-5585

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR01/01363
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 8, 12 because they relate to part of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: The claims are too broad and indefinite to make any meaningful search possible.
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Search Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be established without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		
	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/577

B

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 チャ ジュン - ハク

大韓民国 ギエオンギ - ド グンポ - シ ゲウムジェオン - ドン 8 7 6 ユルコン アパートメント 3 4 2 - 2 0 0 1

(72)発明者 ナム ジュン - ヒュン

大韓民国 ギエオンギ - ド ウイワン - シ オジェオン - ドン 1 4 9 - 3 サンシン 9チャ アpartment 2 - 4 0 4

Fターム(参考) 2G045 BB51 CA25 CB03 CB07 DA55 FB03 FB15 GC12

专利名称(译)	用于区分正常妊娠和异位妊娠的诊断装置及其制造方法		
公开(公告)号	JP2004506220A	公开(公告)日	2004-02-26
申请号	JP2002518837	申请日	2001-08-10
申请(专利权)人(译)	人性化顺SHIO.厄尔尼诺茶迪.		
[标]发明人	チャンジンドン チャジュンハク ナムジュンヒユン		
发明人	チャン ジン-ドン チャ ジュン-ハク ナム ジュン-ヒユン		
IPC分类号	G01N33/53 A61B5/00 A61B8/08 A61B10/00 G01N33/50 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/76		
CPC分类号	G01N33/76 A61B8/0866 A61B10/0012 G01N33/558 G01N33/689 G01N2800/368 Y10S436/818		
FI分类号	G01N33/53.C G01N33/50.G G01N33/531.B G01N33/543.521 G01N33/543.541.Z G01N33/577.B		
F-TERM分类号	2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/DA55 2G045/FB03 2G045/FB15 2G045/GC12		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	1020000046755 2000-08-12 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供一种一步妊娠诊断装置及其制造方法，其能够同时检测和区分正常妊娠和宫外孕。根据本发明，通过免疫学检测分泌到母亲母体及其变体的体液中的绒毛膜促性腺激素 (hCG) 的形态差异，可以在早期快速准确地确定正常妊娠和宫外孕。你可以做到。

