

(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2020-507775

(P2020-507775A)

(43) 公表日 令和2年3月12日 (2020.3.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	
GO 1 N 33/535 (2006.01)	GO 1 N 33/535	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 17 頁) 最終頁に続く		

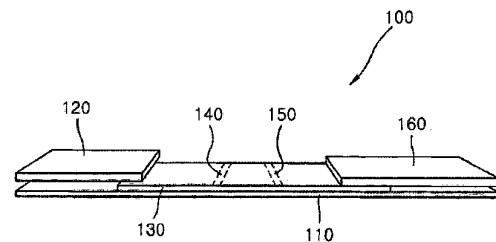
(21) 出願番号	特願2019-543793 (P2019-543793)	(71) 出願人	515054778
(86) (22) 出願日	平成30年2月9日 (2018.2.9)		インジェ ユニバーシティ インダストリー アカデミック コーポレーション ファウンデーション
(85) 翻訳文提出日	令和1年8月26日 (2019.8.26)		大韓民国 キョンサンナムード キムヘーシ インジェーロ 197
(86) 国際出願番号	PCT/KR2018/001757	(74) 代理人	100091683
(87) 国際公開番号	W02018/147679		弁理士 ▲吉▼川 俊雄
(87) 国際公開日	平成30年8月16日 (2018.8.16)	(74) 代理人	100179316
(31) 優先権主張番号	10-2017-0018517		弁理士 市川 寛奈
(32) 優先日	平成29年2月10日 (2017.2.10)	(72) 発明者	キム, チャンクン
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)		大韓民国 O1757 ソウル, ノウォン-グ, ドンイルーロ, 1342, アズマ アレルギー センター, 7エフ
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 喘息またはアレルギー疾患迅速診断用キット

(57) 【要約】

基底部と、前記基底部上に形成される第1反応部と、前記第1反応部と前記基底部との間に形成された展開膜とを含むストリップを含む喘息診断用キットであり、前記第1反応部は、寄託番号KCLRF-BP00389（寄託日：2017年1月9日、寄託機関：韓国細胞株研究財団（KCLRF））のハイブリドーマ細胞株から発現される単クローン抗体を含み、前記第2反応部は、寄託番号KCLRF-BP00389（寄託日：2017年1月9日、寄託機関：韓国細胞株研究財団（KCLRF））のハイブリドーマ細胞株から発現された単クローン抗体を含む、喘息診断用キットが提供される。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基底部と、

前記基底部上に位置し、ハイブリドーマ細胞株（寄託番号 K C L R F - B P - 0 0 3 8 9）から発現される単クローン抗体を含む第 1 反応部と、

前記第 1 反応部と前記基底部との間に位置し、ハイブリドーマ細胞株（寄託番号 K C L R F - B P - 0 0 3 8 9）から発現される単クローン抗体を含む第 2 反応部を含む展開膜と、を含むストリップを含む、喘息診断用キット。

【請求項 2】

前記単クローン抗体は、金、HRP（horseradish peroxidase）、アルカリフォスファターゼ（alkaline phosphatase）、蛍光物質（fluorescein）及び色素からなる群より選択された 1 種以上のマーカーが結合されたものである、請求項 1 に記載の喘息診断用キット。

10

【請求項 3】

前記展開膜は、抗マウス免疫グロブリン（IgG）抗体を含む対照部をさらに含むものである、請求項 1 に記載の喘息診断用キット。

【請求項 4】

前記喘息診断用キットは、第 2 反応部の発色が表れれば喘息として診断するものである、請求項 1 に記載の喘息診断用キット。

【請求項 5】

20

基底部と、

前記基底部上に位置し、ハイブリドーマ細胞株（寄託番号 K C L R F - B P - 0 0 3 8 9）から発現される単クローン抗体を含む第 1 反応部と、

前記第 1 反応部と前記基底部との間に位置し、ハイブリドーマ細胞株（寄託番号 K C L R F - B P - 0 0 3 8 9）から発現される単クローン抗体を含む第 2 反応部を含む展開膜と、を含むストリップを含む、アレルギー疾患診断用キット。

【請求項 6】

前記単クローン抗体は、金、HRP（horseradish peroxidase）、アルカリフォスファターゼ（alkaline phosphatase）、蛍光物質（fluorescein）及び色素からなる群より選択された 1 種以上のマーカーが結合されたものである、請求項 5 に記載のアレルギー疾患診断用キット。

30

【請求項 7】

前記展開膜は、抗マウス免疫グロブリン（IgG）抗体を含む対照部をさらに含むものである、請求項 5 に記載のアレルギー疾患診断用キット。

【請求項 8】

前記アレルギー疾患診断用キットは、第 2 反応部の発色が表れればアレルギーとして診断するものである、請求項 5 に記載のアレルギー疾患診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

40

本発明は、喘息またはアレルギー疾患診断用キットに関する。本発明は、従来、乳幼児または小児で診断が容易でなかった喘息またはアレルギー疾患を外部（病院、外来）または家で免疫クロマトグラフィー方法を利用して 20 分以内に迅速に診断することができるキットに関する。

【背景技術】

【0002】

喘息とアレルギー疾患は、全世界的に有病率と重症度が増加している。アメリカでは、7%の小児が喘息を患っており、かつ気管支喘息と類似した気道疾患である慢性副鼻腔炎も 15%が訴えている。このような疾患の診断は容易ではなく、最近まで医者の診断を手伝うか、疾病が悪化しないように予防するための簡単な診断法がない。喘息やアレルギー疾

50

患患者の気道内に慢性気道炎症反応が起きているということは一般的に知られているが、気道炎症反応を測定するような研究目的のいくつかの実験実績免疫測定法の他に簡単な臨床的診断法がないのが実情である。

【0003】

特に、気道炎症が細菌感染のような微生物の感染によるものであるか、それとも喘息のようなアレルギー疾患におけるアレルギー免疫反応によるものであるかは区別し難い。このような理由により、喘息やアレルギー疾患のある患者が長年間抗生剤の投与を受けるなどの誤った治療を受ける場合が多い。

【0004】

現在、気管支喘息の診断に利用される肺機能検査及びメタコリン気道過敏性検査は、様々な利用上の困難を有しているが、正確な結果を得るために、よく管理された装置、熟練の検査者、患者の積極的な呼応が必要であり、このような理由により、患者の呼応が難しい6歳以下の乳幼児または小児、高齢者、障害者、現在喘息が大きく悪化した患者などでは検査が難しいのが事実である。

【0005】

また、大きな体力の消耗が要されるため、患者が検査に対する拒否感を持ち易く、繰り返して検査を進行し難い場合が多い。従って、過去から喘息の診断に役立つ非侵襲的または血液的な検査を開発しようとする試みがあったが、現在喘息患者で補助的に利用されている血中好酸球数、好酸球カチオン性タンパク質 (e o s i n o p h i l c a t i o n i c p r o t e i n ;

E C P) などがこれにあたる。これらは、正常人、その他のアレルギー疾患、喘息などで全て個人的な差が大きいと知られており、診断に利用することはできない。

【0006】

従って、喘息とアレルギー疾患で最も重要な免疫反応である好酸球数炎症反応で測定可能な簡単な診断道具が開発できれば、喘息のような疾患の診断と治療に画期的な寄与ができるはずである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明が解決しようとする課題は、喘息またはアレルギー疾患を、信頼性が高く迅速に診断できるキットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の喘息診断キットは、基底部と、前記基底部上に位置し、ハイブリドーマ細胞株（寄託番号 K C L R F - B P - 0 0 3 8 9）から発現される単クローン抗体を含む第1反応部と、前記第1反応部と前記基底部との間に位置し、ハイブリドーマ細胞株（寄託番号 K C L R F - B P - 0 0 3 8 9）から発現される単クローン抗体を含む第2反応部を含む展開膜とを含むストリップを含むことができる。

【0009】

本発明のアレルギー診断キットは、基底部と、前記基底部上に位置し、ハイブリドーマ細胞株（寄託番号 K C L R F - B P - 0 0 3 8 9）から発現される単クローン抗体を含む第1反応部と、前記第1反応部と前記基底部との間に位置し、ハイブリドーマ細胞株（寄託番号 K C L R F - B P - 0 0 3 8 9）から発現される単クローン抗体を含む第2反応部を含む展開膜とを含むストリップを含むことができる。

【発明の効果】

【0010】

本発明は、喘息またはアレルギー疾患を高信頼性で迅速に診断することができ、喘息またはアレルギー疾患の予後予測及びモニタリングキットを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1】本発明の一実施例による喘息診断キットに含まれるストリップの模式図である。

【図 2】喘息症状点数と E L I S A 法で測定した E D N、E C P、及び総好酸球数を比較した結果である。図 2 の a は E D N、図 2 の b は E C P、図 2 の c は総好酸球数と喘息症状点数の結果である。

【図 3】本発明による喘息診断キットと E L I S A 法による診断時に相関関係を示したものである。

【図 4】本発明による喘息診断キットと M B L による診断の相関関係 ($r = 0.8933$) を示すものである。

【図 5】本発明による喘息診断キットと B F による診断の相関関係 ($r = 0.8748$) を示すものである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

添付の図面を参考して、実施例によって本発明が属する技術分野で通常の知識を持った者が容易に実施できるように詳しく説明する。本発明は、様々な異なる形態で実現されることができ、ここで説明する実施例に限定されない。図面で本発明を明確に説明するために説明と関係ない部分は省略し、明細書全体を通じて同一または類似した構成要素については同一の名称を使用した。

【0013】

本明細書において、「上部」と「下部」は図面を基準として定義したものであり、視点によって「上部」が「下部」に、「下部」が「上部」に変更されることができ、「上 (on)」または「上 (on)」と指称されるものは、直上だけでなく、中間に他の構造を介在した場合も含むことができる。一方、「直接上 (directly on)」または「真上」と指称されるものは、中間に他の構造を介在しないことを表す。

【0014】

本明細書において、用語「ハイブリドーマ」は、2 個の異なる種類の細胞を人工的に融合して作った細胞を意味する。ハイブリドーマ細胞は、ポリエチレングリコールなどの細胞融合を起こす物質や特定種のウイルスを使用して二つ以上の同種細胞や異種細胞を融合させることで製造されるが、ハイブリドーマ細胞を形成させることで、それぞれ異なる細胞が持つ異なる機能を一つの細胞に統合させることができるようになる。本発明の目的上、寄託番号 K C L R F - B P - 00389 (寄託日: 2017 年 1 月 9 日、寄託機関: 韓国細胞株研究財団 (K C L R F)) のハイブリドーマ細胞株から製造された単一クローン抗体を利用することができる。試料に含まれた好酸球由来ニューロトキシン (E D N: e o s i n o p h i l - d e r i v e d n e u r o t o x i n) が第 1 反応部 120 で単一クローン抗体と結合した後、展開膜 130 を通じて移動しながら第 2 反応部 140 に到達すれば、第 2 反応部 140 で単一クローン抗体と結合して検出することができる。

【0015】

本発明で使用される用語である「単一クローン抗体」とは、当該分野に公知された用語であり、単一抗原性部位 (エピトープ (e p i t o p e)) に対して指示される高度の特異的な抗体を意味する。通常、異なるエピトープに対して指示される異なる抗体を含む多クローン抗体とは違って、単一クローン抗体は、抗原上の単一エピトープに対して指示される。単一クローン抗体は、抗原-抗体結合を利用する診断及び分析学的分析法の選択性と特異性を改善させる長所があり、また融合細胞株 (ハイブリドーマ (h y b r i d o m a)) の培養またはファージディスプレイ (p h a g e d i s p l a y) 方法によって生産されることができ、他の免疫グロブリンによって汚染しないという長所を持つ。

【0016】

本発明の単一クローン抗体は、精製しない状態で使用されることができ、当業界で通常使用される方法によって必要に応じて精製して使用されることができ。このような精製方法の例としては、透析、塩沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィーなどがあるが、上記例によって本発明の抗体精製方法が制限されるものではない。

10

20

30

40

50

【0017】

また、本発明の単クローン抗体は、抗原の特定エピトープを認識して抗原－抗体複合体の結合特性を持つ限り、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有する形態だけでなく、抗体分子の機能的な断片を含む。上記抗体分子の機能的な断片とは、少なくとも抗原結合機能を保有している断片を意味し、Fab、F(ab')、F(ab')₂及びFvなどであることができる。

【0018】

本発明の単クローン抗体は、軽鎖可変部位及び重鎖可変部位を全て含む単クローン抗体であることができる。本発明の単クローン抗体の軽鎖及び重鎖の可変部位は、「相補性決定領域 (complementarity-determining region、CDR)」と知られた3個の多変可能な領域及び4個の「構造領域 (framework region、FR)」を含む。

【0019】

上記CDRは、主に抗原のエピトープ (epitope) に結合する役割をする。それぞれの鎖のCDRは、典型的にN－末端から順次にCDR1、CDR2、CDR3と呼ばれ、また特定CDRが位置している鎖によって識別される。一方、本発明の単クローン抗体は、相補性決定領域 (CDR) に公知の治療用抗体の構造領域 (FR) を接合させて製造することができる。本発明では、上記単クローン抗体の重鎖及び軽鎖の可変部位に対するCDRsの塩基配列を提供する。

【0020】

抗原の特定エピトープを認識して抗原－抗体複合体を形成する抗体の主要部位である重鎖と軽鎖の可変部位、特にCDR (complementarity determining region) が複合体の親和力を決めるので、既単クローン抗体遺伝子をクローニングして抗体重鎖と軽鎖の可変部位に対する遺伝子塩基配列を分析することができる。塩基配列を分析するために、融合細胞株からRNAを抽出してMouse Ig-Primer set (Novagen、CA、USA) などを利用してRT-PCRを行うことができる。

【0021】

本明細書において、用語「キット」は、分析方法に適合した一種類またはそれ以上の他の構成成分組成物、溶液または装置が含まれることができる。

【0022】

本発明の目的上、寄託番号KCLRF-BP-00389 (寄託日：2017年1月9日、寄託機関：韓国細胞株研究財団 (KCLRF)) のハイブリドーマ細胞株から製造された単クローン抗体を利用することができる。試料に含まれた好酸球由来ニューロトキシン (EDN: eosinophil-derived neurotoxin) が第1反応部120で単クローン抗体と結合した後、展開膜130を通じて移動しながら第2反応部140に到達すれば、第2反応部140で単クローン抗体と結合して検出することができる。上記単クローン抗体は、マーカー、例えば、金、HRP (horseradish peroxidase)、アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase)、蛍光物質 (fluorescein) 及び色素からなる群より選択された1種以上のマーカーを含むので、第2反応部の発色が表れれば喘息またはアレルギー疾患として検出することができる。

【0023】

また、上記キットは、抗体生産細胞株の選別に必要な全ての生物学的または化学的試薬、案内書を含むことができる。案内書は、キットの使い方、例えば、提示される反応条件などを説明する印刷物である。案内書は、パンフレットまたはチラシ形態の案内ブック、キットに付着したラベル、及びキットを含むパッケージの表面上に説明を含むことができる。また、案内書は、インターネットのように電気媒体を通じて公開されるか提供される情報を含むことができる。

【0024】

本明細書において、用語「喘息」は、呼吸困難、咳、荒い息の音などの症状が繰り返し、発作的に表れる疾患であり、「アレルギー」は、ある外来性物質と接した生体がその物質に対して正常とは異なる反応を表す現象を意味する。上記アレルギーは、I型、II型、III型及びIV型に分類される。本発明の目的上、寄託番号KCLRF-BP-00389（寄託日：2017年1月9日、寄託機関：韓国細胞株研究財団（KCLRF））のハイブリドーマ細胞株から製造された単クローン抗体を利用することができる。試料に含まれた好酸球由来ニューロトキシン（EDN）が第1反応部120で単クローン抗体と結合した後、展開膜130を通じて移動しながら第2反応部140に到達すれば、第2反応部140で単クローン抗体と結合して、喘息及びアレルギー、喘鳴（wheezing）を診断及び検出することができる。

10

【0025】

本発明の一実施例による喘息診断キットを図1を参考して説明する。図1は、本発明の一実施例による喘息診断キットに含まれるストリップの模式図である。

【0026】

図1を参考すると、本実施例による喘息診断のためのストリップ100は、基底部110、基底部110上に形成され、単クローン抗体を含む第1反応部120、及び第1反応部120と基底部110との間に形成された展開膜130を含むことができる。展開膜130は、第1反応部120と接している。展開膜130は、単クローン抗体を含む第2反応部140及び第2反応部140と所定の間隔で離隔した対照部150を含む。

【0027】

本実施例による喘息診断キットは、試料に含まれた好酸球由来ニューロトキシン（EDN：eosinophil-derived neurotoxin）が第1反応部120で単クローン抗体と結合した後、展開膜130を通じて移動しながら第2反応部140に到達すれば、第2反応部140で単クローン抗体と結合して検出される。第2反応部140でEDNと結合した第1反応部由来の単クローン抗体と第2反応部由来の単クローン抗体との結合を確認することで、試料中にEDNがあることが確認できるため、試料が採取された患者に喘息があることを判断することができる。本実施例による喘息診断キットは、抗原EDNと単クローン抗体間の免疫反応を利用した免疫クロマトグラフィーによって喘息またはアレルギー疾患を診断することができる。EDNは、喘息とアレルギー疾患のある患者の方が正常人に比べて高い。

20

30

【0028】

前記試料は、被検体から採取されるもので、例えば、全血、血清、血漿、鼻腔洗浄液、気管支肺胞洗浄液、喀痰、リンパまたは細胞間液を含むことができる。被検体、即ち検査対象は特に制限されないが、乳幼児または小児になることができる。

【0029】

本実施例による診断キットは、EDNに結合する第1反応部由来の単クローン抗体と第2反応部由来の単クローン抗体を通じて2段階で喘息を診断することで、喘息をより正確かつ迅速に診断することができる。

【0030】

第1反応部由来の単クローン抗体は、EDN中のepitope部位が相補性決定領域[complement determining region (CDR)]のidiotypicに付く。単クローン抗体として、寄託番号KCLRF-BP-00389（寄託日：2017年1月9日、寄託機関：韓国細胞株研究財団（KCLRF））のハイブリドーマ細胞株から製造されることができる。ハイブリドーマ細胞株は、当業者に知られた通常の方法で製造されることができる。例えば、EDN抗原を接種させたマウスの脾臓細胞とマウス由来の骨髓種細胞を融合して製造されることができるが、これに制限されない。ハイブリドーマ細胞株から単クローン抗体を得る方法は、当業者に知られた通常の方法による。

40

【0031】

第2反応部由来の単クローン抗体は、EDN中のepitope部位が相補性決定領域

50

[complement determining region (CDR)] の id i o t y p e に付く。単一クローン抗体として、寄託番号 K C L R F - B P - 0 0 3 8 9 (寄託日：2017年1月9日、寄託機関：韓国細胞株研究財団 (K C L R F)) のハイブリドーマ細胞株から発現されることができる。第2反応部由来の単一クローン抗体は、単一クローン抗体に酵素を結合させて製造されることができる。前記酵素は、H R P (h o r s e r a d i s h p e r o x i d a s e)、アルカリフォスファターゼ (a l k a l i n e p h o s p h a t a s e) などになることができる。抗体に酵素を結合させる方法は、当業者に知られた通常の方法による。

【0032】

本発明による免疫クロマトグラフィー方法を利用した喘息またはアレルギー疾患応急診断用ストリップを利用すれば、喘息とアレルギー疾患患者で高い数値で表れる E D N を手軽くて経済的に検査して、従来乳幼児または小児で診断が容易でなかった喘息またはアレルギー疾患を迅速に外部や家で診断することができる。

【0033】

以下では、本発明の一実施例による喘息診断キットについてさらに詳しく説明する。

【0034】

基底部 1 1 0 は、第1反応部、展開膜を支持するもので、当業者に通常知られた材質で製造されることができる。例えば、基底部 1 1 0 は、プラスチック、金属材料、ニトロセルロース膜で形成されることができる。

【0035】

第1反応部 1 2 0 は、単一クローン抗体を含むことができる。第1反応部 1 2 0 は、単一クローン抗体自体を含むこともできるが、単一クローン抗体に金が結合することで、展開膜中で発色効果を得ることもできる。金が結合した単一クローン抗体は、ピンク色を表すことができる。単一クローン抗体に金を結合させる方法は、単一クローン抗体と金イオン含有化合物 (例：コロイドゴールド) を混合した後、金イオンを還元させることで、金粒子が単一クローン抗体に結合するようにできる。金粒子の平均粒径は、1 0 n m ~ 1 0 0 n m になることができる。上記範囲において、さらに優れた検出効果があることができる。

【0036】

第1反応部 1 2 0 は、試料注入部と連結されて患者から採取された試料を受けることができる。図 1 に示していないが、第1反応部 1 2 0 には、フィルターパッドが連結され、患者から採取された試料が第1反応部 1 2 0 に注入される前にフィルターパッドを経ることで不純物などを除去して注入されるようにして、喘息診断の信頼性をさらに高めることができる。

【0037】

第1反応部 1 2 0 は、ポリエステル繊維、ガラス繊維または植物繊維で形成された結合パッドに形成されることで、第1単一クローン抗体を安定して含ませることができる。例えば、結合パッドは、セルロースパッドであることができる。

【0038】

展開膜 1 3 0 は、第1反応部 1 2 0 と接しており、第1反応部 1 2 0 から毛細管現象を通じて移動した試料中の E D N と単一クローン抗体の結合物が第2反応部 1 4 0 及び対照部 1 5 0 を通じて移動するようにできる。

【0039】

第2反応部 1 4 0 には、単一クローン抗体が含まれており、E D N と結合することができる。E D N と第1反応部由来の単一クローン抗体及び第2反応部由来の単一クローン抗体の結合結果は、発色を通じて確認することができる。発色の結果、第2反応部はピンク色になることができる。発色は上述したように、第1反応部由来の単一クローン抗体に金粒子を付着させることもできるが、その他に通常の方法で H R P (h o r s e r a d i s h p e r o x i d a s e)、アルカリフォスファターゼ (a l k a l i n e p h o s p h a t a s e)、蛍光物質 (f l u o r e s c e i n)、及び色素などのマーカーが使用さ

10

20

30

40

50

ることができる。発色を誘導するための発色基質は、発色反応をするマーカーによって使用することが好ましく、TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethyl benzidine)、ABTS [2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 及びOPD (o-phenylenediamine) などを使用することができる。

【0040】

展開膜130には対照部150が形成され、診断キットが正常に作動して診断検査が完了したか否かを判別できるようにする。

【0041】

対照部150は、試料がEDNを含むか否かに関係なく、試料が第1反応部と第2反応部を移動して検査が完了したことを知らせる。対照部150には、ウサギ由来の抗マウス免疫グロブリン (IgG) 抗体が含まれており、第1反応部に含まれた単クローン抗体中のEDNと結合しないものが展開膜を通じて移動しながら対照部に到達すれば、抗マウス免疫グロブリン抗体と反応して検査終了が分かる。ウサギ由来の抗マウス免疫グロブリン結合した単クローン抗体はピンク色を表し、対照部にピンク色が表れれば診断が完了したことを意味する。

【0042】

展開膜130は、多孔性の薄膜型フィルムであり、試料が第2反応部140と対照部150に展開されるようにナイロン、ポリエステル、セルロース、ポリスルホン、ポリビニリデンフルオライド、セルロースアセテート、ポリウレタン、ガラス繊維、ニトロセルロースのいずれか一つ以上を含むことができる。展開試薬は、リン酸塩緩衝液、食塩水、トリス-HCl、水などを利用することが好ましい。

【0043】

図1に示すように、ストリップ100は、吸収パッド160を含むことができる。吸収パッドは、対照部150を通過した試料、抗体残余物が吸収されるようにできる。

【0044】

図1に示していないが、本実施例による喘息診断キットは、ストリップ100を固定し、第1反応部、第2反応部及び対照部の外部接触と汚染を防止するためにハウジング (housing) をストリップ上に含むことができる。ハウジングは、如何なる試薬とも反応しない素材で形成されるが、例えば、ガラスやプラスチックで形成されることができる。

【0045】

また、本発明の診断キットは、単クローン抗体によってEDNを定量化することもでき、従来使用されたTECやECPにと比べて優れて喘息またはアレルギー疾患を診断することができ、重症度別差異を反映することができる。

【0046】

以上、本発明の一実施例による喘息診断キットを説明したが、EDNがアレルギー疾患でも有効な抗原であるだけに、アレルギー疾患の診断にも使用されることができる。

【0047】

以下では、本発明の好ましい実施例を通じて本発明の構成及び作用をさらに詳しく説明する。但し、これは本発明の好ましい例示として提示されたものであり、如何なる意味でもこれにより本発明が制限されると解釈されてはならない。

【0048】

実施例1：ハイブリドーマ細胞株の製造

フロイントの完全アジュバント (Freund's complete adjuvant) に溶解させた天然EDN抗原50~100マイクログラムを雌BALB/cマウス (6~8週齢) に静脈注射した。PBSまたは不完全アジュバントに溶解させたEDN抗原50~100マイクログラムを2週~3週間隔で注射した。EDN抗原を最終注射した後、抗体形成をマウス目における出血で確認した。抗体形成が一旦確認されれば、100~200マイクログラムの抗体を3日~4日連続的に注入した。マウスを切開し、70%アルコールに入れて滅菌した。脾臓を除去し、脾臓細胞を洗浄した後、円心分離して得て無

10

20

30

40

50

血清培地に懸濁させた。

【0049】

脾臓細胞をP3X63Ag8.653マウス細胞株から得た骨髓種細胞と1.5:1.1の割合で融合した。これからハイブリドーマ細胞株を選択した。製造したハイブリドーマ細胞株を韓国細胞株研究財団(KCLRF)に2017年1月9日付で寄託して、寄託番号KCLRF-BP-00389を受けた。

【0050】

実施例2:単クローン抗体の製造

実施例のハイブリドーマ細胞株を組織培養フラスコで培養して単クローン抗体を生産した。具体的に、75cm²組織培養フラスコでDMEM(Gibco BRL、U.S.A.)25mlに5×10⁶個の細胞を添加した後、37細胞培養機で4~5日間過剰増殖させた後、細胞培養液を収去した。収去された細胞培養液は、1500rpmで15分間円心分離を実施して細胞成分を除去し、細胞上層液のみを回収することで単クローン抗体生産を完了した。生産された単クローン抗体は、試験に使うまで4℃または-20℃で保管した。

【0051】

単クローン抗体に金コロイドを結合させた。即ち、塩化金をクエン酸ナトリウム溶液で還元させてプレーンゴールド(plain gold)を製造した後、製造した単クローン抗体を添加しながら、40nmの大きさの抗体が結合された金粒子を波長532nmで吸光度が1.0±1になるように製造した。金粒子に結合された抗体を安定化するために、ポリエチレングリコール(PEG)溶液で処理した。これを通じて単クローン抗体を製造した。

【0052】

実施例3:単クローン抗体の製造

前記単クローン抗体の製造時に金コロイドを結合させないことを除いては、同一の方法で製造した。

【0053】

実施例4:診断キットの製造

上記実施例2で製造した金粒子と単クローン抗体が結合された金接合体をストリップ1個当たり8.3マイクロリットル/ストリップを混合し、ポリエステル繊維またはガラス繊維に濡らして乾燥させ、第1反応部を含む結合パッドを製造した。

【0054】

上記実施例3で製造した単クローン抗体をストリップ1個当たり0.75マイクログラム/ストリップの濃度でPBSで希釈し、ニトロセルロース展開膜上で第2反応部の位置にコーティングさせて第2反応部を形成した。展開膜の中で対照部の位置には、ウサギ抗マウス抗体を0.75マイクログラム/ストリップの濃度でコーティングさせて対照部を形成した。

【0055】

上記製造した展開膜に上記製造した結合パッドを重畳しておいた後、4.45mm/ストリップの大きさで切断した後、プラスチックハウジングに装着して、喘息またはアレルギー疾患診断キットを製造した。

【0056】

実験例1:喘息またはアレルギー疾患迅速診断用のバイオマーカーの選別

喘息またはアレルギー診断のために既存に使用された総好酸球数(total eosinophil count、TEC)やECP(eosinophil cationic protein)に比べて本発明で喘息またはアレルギー診断に使用するEDNが優れることを立証するために、喘息またはアレルギー症状点数とELISA法で測定したEDN、ECP、及び総好酸球数を比べた。その結果、図2のように、EDNがTECやECPに比べて、各喘息またはアレルギー症状点数の重症度別差異を最もよく反映した。従って、EDNが喘息またはアレルギー診断時に有用な抗原として使用可能なことを確認

10

20

30

40

50

した。

【0057】

実験例2：ELISAとの診断結果の比較

喘息またはアレルギーとして診断された5歳の幼児でEDN濃度が 0.62 ng/ml 以上の血清80個検体、そして同一年齢で喘息またはアレルギーのない正常の血清50個検体を求め、本発明の診断キットとELISA法で検査した。図3のように、本発明の診断キットとELISA法による検査時に相関関係が $r = 0.603$ 、 $P < 0.001$ と優れて表れたことで、本発明の診断キットが迅速診断キットとして使用するのに十分な結果を表した。

【0058】

実験例3：MBL、BFキットとの診断結果の比較

実験例2と同一検体に対して、本発明の診断キット（Rapid）と、従来の喘息及びアレルギー診断キットとして知られたMBL（MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD）キット、BFキットについて比較検査した。図4及び図5のように、本発明の診断キットとMBLキット、BFキットによる検査時に相関関係がそれぞれ $r = 0.8933$ 、 $r = 0.8748$ と優れて表れることで、本発明の診断キットが迅速診断キットとして使用するのに十分な結果を表した。

【0059】

本発明の単純な変形または変更は、この分野の通常の知識を持った者によって容易に実施されることができ、このような変形や変更は、いずれも本発明の領域に含まれるといえる。

【0060】

[寄託番号]

寄託機関名：韓国細胞株研究財団（KCLRF）

寄託番号：KCLRF-BP-00389

寄託日付：2017年1月9日

【0061】

10

20

特許手続き上微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約

国際様式(国文)

原寄託の受領証

(規則 7.1 により発給される)

受信：キム・チャングン

10

01757, 大韓民国ソウル市蘆原区同一路 1342 仁済大学上溪白病院

喘息アレルギーセンター

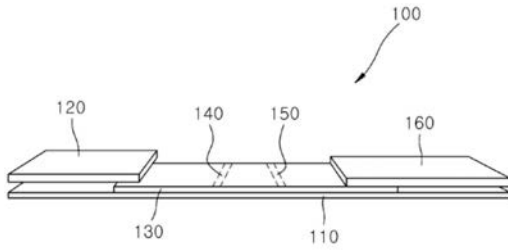
I. 微細物の識別	
寄託者により付与された識別番号： 14C10	国際寄託機関により付与された受託番号： KCLRF-EP-00389
II. 科学的記載及び/または提案された分類学的指定	
上記 I に記載された微細物(CELL LINE)は下記事項が伴われる： [x]科学的記載 [x]提案された分類学的指定 (該当部分に X で表示)	
III. 受領及び受理	
本国際寄託機関は 2017 年 01 月 09 日に受領された上記 I に記載された微細物(Cell Line)を受理する。	
IV. 国際寄託機関	
名称：韓国細胞株銀行、韓国細胞株研究財団 住所：03129, ソウル市鍾路区大学路 103 ソウル大学医科大学癌研究所 7 階	署名：韓国細胞株銀行 代表 韓国細胞株研究財団 理事長 パク・ジェガブ 日付：2017.01.18

20

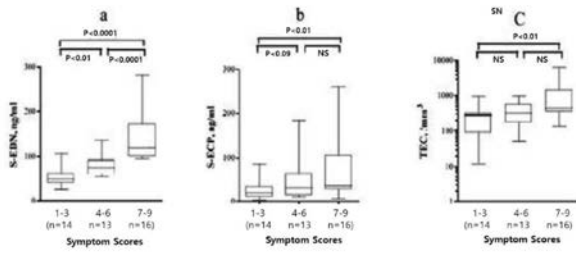
30

40

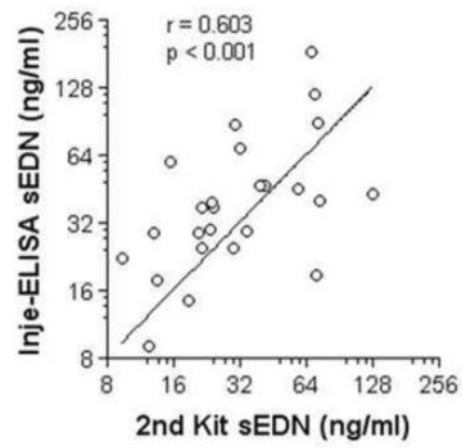
【図 1】



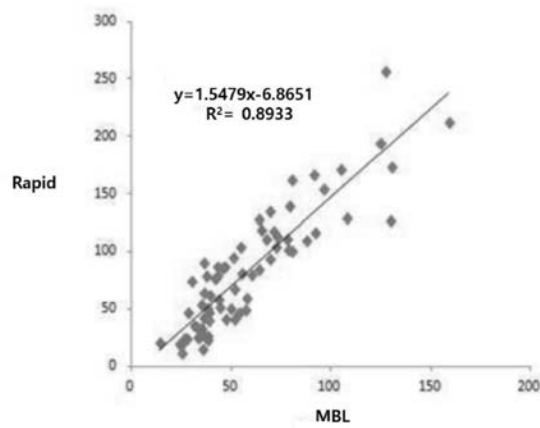
【図 2】



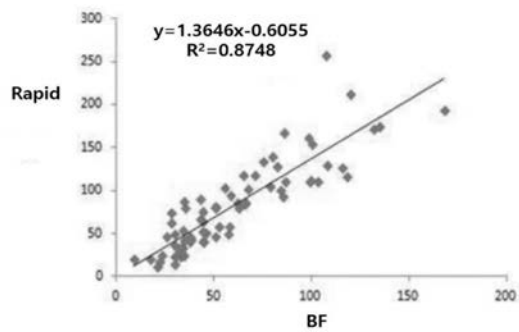
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/001757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>G01N 33/558(2006.01)i, G01N 33/564(2006.01)i, G01N 33/577(2006.01)i, G01N 33/553(2006.01)i</i> 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) G01N 33/558; G01N 33/538; G01N 33/53; G01N 33/569; C12Q 1/68; G01N 33/564; G01N 33/577; G01N 33/553 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: asthma, allergy, diagnosis, kit, eosinophil-derived neurotoxin, antibody, hybridoma		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORIOKA, Junichiro et al., "Development of a Novel Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Blood and Urinary Eosinophil-derived Neurotoxin: a Preliminary Study in Patients with Bronchial Asthma", International Archives of Allergy and Immunology, 2000, vol. 122, pages 49-57 See abstract; and Methods.	1-8
X	KIM, Chang-Keun et al., "Utility of Serum Eosinophil-derived Neurotoxin (EDN) Measurement by ELISA in Young Children with Asthma", Allergy International, 18 June 2016 (Online publication date), vol. 66, pages 70-74 See the entire document.	1-8
A	KR 10-1611743 B1 (INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 11 April 2016 See the entire document.	1-8
A	KIM, Chang-Keun, "Eosinophil-derived Neurotoxin: a Novel Biomarker for Diagnosis and Monitoring of Asthma", Korean Journal of Pediatrics, 2013, vol. 56, no. 1, pages 8-12 See the entire document.	1-8
A	KR 10-2015-0145986 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 31 December 2015 See the entire document.	1-8
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 JUNE 2018 (18.06.2018)		Date of mailing of the international search report 19 JUNE 2018 (19.06.2018)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/001757

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1611743 B1	11/04/2016	CN 107109476 A JP 2017-533431 A WO 2016-068584 A1	29/08/2017 09/11/2017 06/05/2016
KR 10-2015-0145986 A	31/12/2015	NONE	

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2018/001757
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/558(2006.01)i, G01N 33/564(2006.01)i, G01N 33/577(2006.01)i, G01N 33/553(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류틀 기재) G01N 33/558; G01N 33/538; G01N 33/53; G01N 33/569; C12Q 1/68; G01N 33/564; G01N 33/577; G01N 33/553 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 천식, 알레르기, 진단, 키트, 호산구-유래 신경독, 항체, 하이브리도마		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	MORIOKA, JUNICHIRO 등, 'Development of a novel enzyme-linked immunosorbent assay for blood and urinary eosinophil-derived neurotoxin: a preliminary study in patients with bronchial asthma', International Archives of Allergy and Immunology, 2000, 122권, 페이지 49-57 요약; 및 실험방법 참조.	1-8
X	KIM, CHANG-KEUN 등, 'Utility of serum eosinophil-derived neurotoxin (EDN) measurement by ELISA in young children with asthma', Allergology International, 2016.06.18(온라인 공개일), 66권, 페이지 70-74 전체문헌 참조.	1-8
A	KR 10-1611743 B1 (인제대학교 산학협력단) 2016.04.11 전체문헌 참조.	1-8
A	KIM, CHANG-KEUN, 'Eosinophil-derived neurotoxin: a novel biomarker for diagnosis and monitoring of asthma', Korean Journal of Pediatrics, 2013, 56권, 1호, 페이지 8-12 전체문헌 참조.	1-8
A	KR 10-2015-0145986 A (연세대학교 산학협력단) 2015.12.31 전체문헌 참조.	1-8
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "I" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2018년 06월 18일 (18.06.2018)		국제조사보고서 발송일 2018년 06월 19일 (19.06.2018)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 이명진 전화번호 +82-42-481-8474

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2018/001757

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1611743 B1	2016/04/11	CN 107109476 A JP 2017-533431 A WO 2016-068584 A1	2017/08/29 2017/11/09 2016/05/06
KR 10-2015-0145986 A	2015/12/31	없음	

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

G 0 1 N 33/53

Q

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

专利名称(译)	哮喘或过敏性疾病快速诊断试剂盒		
公开(公告)号	JP2020507775A	公开(公告)日	2020-03-12
申请号	JP2019543793	申请日	2018-02-09
[标]申请(专利权)人(译)	仁济大学校产学协力团		
申请(专利权)人(译)	因斯大学工业学合作基金会		
发明人	キム,チャン-クン		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/558 G01N2333/922 G01N2800/122 G01N33/553 G01N33/564 G01N33/577		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/53.D G01N33/533 G01N33/535 G01N33/543.541.Z G01N33/53.Q		
优先权	1020170018517 2017-02-10 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种哮喘诊断用试剂盒，其包括：带，其包括基部；形成在基部上的第一反应部；以及形成在第一反应部和基部之间的显影膜，其中，第一反应部包括单克隆抗体。从登录号为KCLRF-BP-00389的杂交瘤细胞系（登录日期：2017年1月9日，加入研究所：韩国细胞系研究基金会（KCLRF））表达的第二反应部分包括从杂交瘤细胞表达的单克隆抗体登记号为KCLRF-BP-00389（登记日期：2017年1月9日，登记所：韩国细胞系研究基金会（KCLRF））。

