

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03820838.5

[51] Int. Cl.  
C07K 16/26 (2006.01)  
C12N 5/12 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)  
C07K 7/06 (2006.01)  
C07K 7/08 (2006.01)  
C07K 16/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年3月11日

[11] 授权公告号 CN 100467489C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/14 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

[22] 申请日 2003.8.7 [21] 申请号 03820838.5

[30] 优先权

[32] 2002.8.7 [33] FR [31] 0210063

[86] 国际申请 PCT/FR2003/002483 2003.8.7

[87] 国际公布 WO2004/014952 法 2004.2.19

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.2

[73] 专利权人 比奥-拉德巴斯德公司

地址 法国马恩科奎特

共同专利权人 国家科研中心

蒙彼利埃第一大学

[72] 发明人 B·波 I·朱利亚尼 F·里尼尔

[56] 参考文献

US 6117644A 2000.9.12

WO 0045176 A 2000.8.3

"Quantification of pro-B-type natriuretic peptide and its products in human plasma by use of an analysis independent of precursor processing. GOETZE JENS PETER ET A. CLINICAL CHEMISTRY, Vol. 48 No. 7. 2002

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 程泳

权利要求书9页 说明书83页 附图16页

[54] 发明名称

诊断心力衰竭的特异性抗体 proBNP(1-108)

[57] 摘要

本发明涉及心力衰竭的体外诊断。更具体而言，本发明涉及一种肽结构域的特异性抗体，该结构域位于 proBNP(1-108) 的铰链区 R<sub>76</sub>S<sub>77</sub> 的任一侧。具体而言，本发明涉及获得上述抗体的一种方法，以及它在检测血液中除 BNP(1-76) 和 BNP(77-108) 以外的 proBNP(1-108) 中的用途。本发明也涉及一种检测血液 proBNP(1-108) 的方法、试剂和试剂盒。

1. 一种抗 proBNP(1-108)抗体,其特征在于:首先,它特异地识别 proBNP(1-108)的序列 R<sub>APR</sub><sub>76</sub>S<sub>77</sub>P (SEQ ID No. 5),并显示与肽 BNP(1-76)或 BNP(77-108)不到 20%的交叉反应,其次,它能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108)。

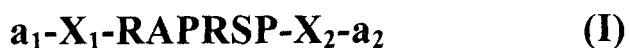
2. 如权利要求 1 所述的抗 proBNP(1-108)抗体,它特异地识别 proBNP(1-108)的序列 Y<sub>70</sub>T<sub>LRAPR</sub><sub>76</sub>S<sub>77</sub>P<sub>KMVQGS</sub><sub>85</sub> (SEQ ID No. 4)。

3. 如权利要求 1 所述的抗 proBNP(1-108)抗体,它特异地识别 proBNP(1-108)的序列 Y<sub>70</sub>T<sub>LRAPR</sub><sub>76</sub>S<sub>77</sub>P<sub>KMVQGS</sub><sub>84</sub> (SEQ ID No. 108)。

4. 获得如权利要求 1、2 和 3 之一所述的抗 proBNP(1-108)抗体的方法,其中用完整的 proBNP(1-108)分子免疫非人动物,然后用 BNP(77-108)肽和/或 BNP(1-76)肽消耗所获得的抗血清。

5. 获得如权利要求 1、2 和 3 之一所述的抗 proBNP(1-108)抗体的方法,其中用肽免疫非人动物,所述肽选自:

- 下列通式的肽



其中, a<sub>1</sub> 是 H, 或者代表如下官能团或化学基团, 其选自: 硫醇、醇、氨基、伯胺或仲胺官能团、氨基羧基、生物素基和乙酰基,

X<sub>1</sub> 代表一种 0-3 个氨基酸的肽序列, 它来源于或者不来源于 proBNP(1-108)的天然序列,

X<sub>2</sub> 代表一种 0-7 个氨基酸的肽序列, 它来源于或者不来源于 proBNP(1-108)的天然序列,

a<sub>2</sub> 代表 OH 基、NH<sub>2</sub> 基或烷氧基;

- 下列通式的肽



其中 X 是 H, 或者代表乙酰基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸, 其中 Z 代表 OH 基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序

列的 1-3 个氨基酸;

- 下列通式的肽



其中 X 是 H, 或者代表乙酰基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸, 其中 Z 代表 OH 基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸;

- 一种肽, 其含有通过氨基酸  $Y_{70}$ 、 $T_{71}$ 、 $L_{72}$ 、 $K_{79}$ 、 $M_{80}$ 、 $V_{81}$ 、 $Q_{82}$ 、 $G_{83}$ 、 $S_{84}$  和  $G_{85}$  中的一个或多个的置换衍生自序列  $X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}-Z$  (II) 或者衍生自序列  $X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}-Z$  (III)的序列, X 是 H 或者代表乙酰基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸, 且其中 Z 是 OH 基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸;

- 具有序列 C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G (C13P30: SEQ ID No. 16)的肽; 和

- 具有序列 C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S (CN32: SEQ ID No. 109)的肽。

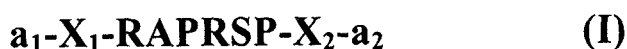
6. 如权利要求 5 的方法, 其还包括用 BNP(77-108)肽和/或 BNP(1-76)肽消耗所获得的抗血清。

7. 如权利要求 5 所述的方法, 其中通式(II)的肽具有序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$  (SEQ ID No. 4)。

8. 如权利要求 5 所述的方法, 其中通式(III)的肽具有序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  (SEQ ID No. 108)。

9. 获得如下杂交瘤的方法, 所述杂交瘤分泌如权利要求 1、2 和 3 之一所述的抗 proBNP(1-108)抗体, 其中用选自如下的肽免疫非人动物, 所述肽选自:

- 下列通式的肽



其中,  $a_1$  是 H, 或者代表如下官能团或化学基团, 其选自: 硫醇、醇、氨基、伯胺或仲胺官能团、氨基羧基、生物素基和乙酰基,

$X_1$  代表一种 0-3 个氨基酸的肽序列，它来源于或者不来源于 proBNP(1-108)的天然序列，

$X_2$  代表一种 0-7 个氨基酸的肽序列，它来源于或者不来源于 proBNP(1-108)的天然序列，

$a_2$  代表 OH 基、 $NH_2$  基或烷氧基；

- 下列通式的肽



其中 X 是 H，或者代表乙酰基，或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸，其中 Z 代表 OH 基，或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸；

- 下列通式的肽



其中 X 是 H，或者代表乙酰基，或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸，其中 Z 代表 OH 基，或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸；

- 一种肽，其含有通过氨基酸  $Y_{70}$ 、 $T_{71}$ 、 $L_{72}$ 、 $K_{79}$ 、 $M_{80}$ 、 $V_{81}$ 、 $Q_{82}$ 、 $G_{83}$ 、 $S_{84}$  和  $G_{85}$  中的一个或多个的置换衍生自序列  $X-Y_{70}TLR APR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}-Z$  (II) 或者衍生自序列  $X-Y_{70}TLR APR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}-Z$  (III) 的一种序列，X 是 H 或者代表乙酰基，或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸，其中 Z 是 OH 基，或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸；

- 具有序列 C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G (C13P30: SEQ ID No. 16)的肽；

- 具有序列 C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S (CN32: SEQ ID No. 109)的肽；

从该动物中采集分泌免疫球蛋白的淋巴细胞，

将该淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，获得至少一种分泌免疫球蛋白的杂交瘤。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中通式(II)的肽具有序列

Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>85</sub> (SEQ ID No. 4).

11. 如权利要求 9 所述的方法，其中通式(III)的肽具有序列 Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> (SEQ ID No. 108)。

12. 利用如权利要求 9、10 和 11 之一所述的方法生产的杂交瘤。

13. 由如权利要求 12 所述的杂交瘤分泌的抗 proBNP(1-108)单克隆抗体。

14. 一种检测来自怀疑经历心力衰竭的人类个体的生物标本中 proBNP(1-108)的方法，包括使生物标本与如权利要求 1、2、3 和 13 之一所述的抗 proBNP(1-108)抗体接触，并检测标本中的 proBNP(1-108)。

15. 一种检测来自怀疑经历心力衰竭的人类个体的生物标本中 proBNP(1-108)的方法，包括：

a) 使生物标本与如权利要求 1、2、3 和 13 之一所述的抗 proBNP(1-108)抗体接触，

b) 在允许形成抗原-抗体复合物的条件下温育该混合物。

16. 如权利要求 15 的方法，其还包括 c) 使用能够与初级复合物中存在的 proBNP(1-108)特异结合的经标记的检测抗体，或者使用能够与针对初级复合物中存在的 proBNP(1-108)的抗体结合的经标记的检测抗原，显示形成的抗原-抗体复合物。

17. 如权利要求 16 所述的方法，它还包括步骤 d) 将显示的抗原-抗体复合物的量与个体的临床状况相关联。

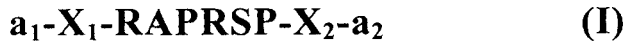
18. 一种检测生物标本中 proBNP(1-108)的试剂盒，其含有至少一种如权利要求 1、2、3 和 13 之一所述的抗体。

19. 如权利要求 18 所述的检测生物标本中 proBNP(1-108)的试剂盒，其

(i) 在一个容器中含有至少一种如权利要求 1、2、3 和 13 之一所述的抗体；

(ii) 在另外一个容器中含有至少一种选自下列的肽：

- 下列通式的肽



其中,  $a_1$  是 H, 或者代表如下官能团或化学基团, 其选自: 硫醇、醇、氨基、伯胺或仲胺官能团、氨基羧基、生物素基和乙酰基,

$X_1$  代表一种 0-3 个氨基酸的肽序列, 它来源于或者不来源于 proBNP(1-108)的天然序列,

$X_2$  代表一种 0-7 个氨基酸的肽序列, 它来源于或者不来源于 proBNP(1-108)的天然序列,

$a_2$  代表 OH 基、 $NH_2$  基或烷氧基;

- 下列通式的肽



其中 X 是 H, 或者代表乙酰基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸, 其中 Z 代表 OH 基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸;

- 下列通式的肽



其中 X 是 H, 或者代表乙酰基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸, 其中 Z 代表 OH 基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸;

- 一种肽, 其含有通过氨基酸  $Y_{70}$ 、 $T_{71}$ 、 $L_{72}$ 、 $K_{79}$ 、 $M_{80}$ 、 $V_{81}$ 、 $Q_{82}$ 、 $G_{83}$ 、 $S_{84}$  和  $G_{85}$  中的一个或多个的置换, 衍生自序列  $X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}-Z$  (II) 或者衍生自序列  $X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}-Z$  (III) 的一种序列, X 是 H 或者代表乙酰基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸, Z 是一个 OH 基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸;

- 具有序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$  (SEQ ID No. 4) 的肽;

- 具有序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  (SEQ ID No. 108) 的肽;

- 具有序列 C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G (C13P30: SEQ ID No. 16) 的肽;

- 具有序列 C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S (CN32: SEQ ID No.

109)的肽。

20. 下列通式的肽:



其中,

$a_1$  是 H, 或者代表如下官能团或化学基团, 其选自: 硫醇、醇、氨基、伯胺或仲胺官能团、氨基羧基、生物素基和乙酰基,

$X_1$  代表一种 0-3 个氨基酸的肽序列, 其来源于或者不来源于 proBNP(1-108)的天然序列,

$X_2$  代表一种 0-7 个氨基酸的肽序列, 其来源于或者不来源于 proBNP(1-108)的天然序列,

$a_2$  代表 OH 基、 $NH_2$  基或烷氧基。

21. 下列通式的肽:



其中 X 是 H, 或者代表乙酰基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸, 其中 Z 代表 OH 基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸。

22. 如权利要求 21 所述的肽, 其具有序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$  (SEQ ID No. 4)。

23. 下列通式的肽:



其中 X 是 H, 或者代表乙酰基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸, 其中 Z 代表 OH 基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸。

24. 如权利要求 23 所述的肽, 其具有序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  (SEQ ID No. 108)。

25. 一种肽, 其含有通过氨基酸  $Y_{70}$ 、 $T_{71}$ 、 $L_{72}$ 、 $K_{79}$ 、 $M_{80}$ 、 $V_{81}$ 、 $Q_{82}$ 、 $G_{83}$ 、 $S_{84}$  和  $G_{85}$  中的一个或多个的置换, 衍生自序列  $X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}-Z$  (II) 或者衍生自序列  $X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}-Z$  (III)的序列, X 是 H 或者代表乙酰

基，或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸，Z 是 OH 基，或者是不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸。

26. 如权利要求 20 所述的肽，其具有选自下列序列的序列：

SEQ ID No. 16: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G (肽 C13P30)

SEQ ID No. 109: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S (肽 CN32)

SEQ ID No. 6: C-G-R-A-P-R-S-P

SEQ ID No. 7: 乙酰基-C-G-R-A-P-R-S-P

SEQ ID No. 8: C-G-R-A-P-R-S-P-K

SEQ ID No. 9: 乙酰基-C-G-R-A-P-R-S-P-K

SEQ ID No. 10: C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V

SEQ ID No. 11: C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

SEQ ID No. 12: R-A-P-R-S-P-G-C

SEQ ID No. 13: 乙酰基-R-A-P-R-S-P-G-C

SEQ ID No. 110: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K

SEQ ID No. 111: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V

SEQ ID No. 112: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q

SEQ ID No. 113: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G

SEQ ID No. 19: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-βA

SEQ ID No. 20: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA

SEQ ID No. 114: 乙酰基-C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q

SEQ ID No. 115: C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G

SEQ ID No. 116: C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S

SEQ ID No. 117: C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

SEQ ID No. 118: C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V

SEQ ID No. 119: C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q

SEQ ID No. 120: L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-C

SEQ ID No. 121: C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S

SEQ ID No. 122: C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G.

27. 一种获得抗 proBNP(1-108)抗体的方法, 该抗体特异地识别 proBNP(1-108) 的序列  $Y_{70}TLR\text{APR}_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$ 、序列  $Y_{70}TLR\text{APR}_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  和/或序列  $R\text{APR}_{76}S_{77}P$ , 并显示与 BNP(1-76)或 BNP(77-108)不到 20%的交叉反应, 并且能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108), 在该方法中, 用如权利要求 20-26 之一所述的肽免疫非人动物。

28. 如权利要求 27 的方法, 其还包括用 BNP(77-108)肽和/或 BNP(1-76)肽消耗所获得的抗血清。

29. 获得如下杂交瘤的方法, 该杂交瘤分泌抗 proBNP(1-108)抗体, 该抗体特异地识别 proBNP(1-108) 的序列  $Y_{70}TLR\text{APR}_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$ 、序列  $Y_{70}TLR\text{APR}_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  和/或序列  $R\text{APR}_{76}S_{77}P$ , 并显示与肽 BNP(1-76)或 BNP(77-108)不到 20%的交叉反应, 并且能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108),

在该方法中, 用如权利要求 20-26 之一所述的肽免疫非人动物, 从该动物中提取分泌免疫球蛋白的淋巴细胞,

将该淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合, 获得至少一种分泌免疫球蛋白的杂交瘤。

30. 一种抗 proBNP(1-108)抗体, 其特征在于它是通过如权利要求 25 所述的方法获得的。

31. 如权利要求 30 所述的抗 proBNP(1-108)抗体, 它特异地识别 proBNP(1-108) 的序列  $Y_{70}TLR\text{APR}_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$  或序列  $Y_{70}TLR\text{APR}_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$ 。

32. 利用如权利要求 29 所述的方法产生的一种杂交瘤。

33. 由如权利要求 32 所述的杂交瘤分泌的一种抗 proBNP(1-108)单克隆抗体。

34. 如权利要求 33 所述的抗 proBNP(1-108)单克隆抗体, 它由保藏于 CNCM 保藏号为 CNCM I-3073 的杂交瘤 3D4 分泌。

35. 一种检测来自怀疑经历心力衰竭的人类个体的生物标本中

proBNP(1-108)的方法，包括使生物标本与如权利要求 30、31、33 和 34 任一项所述的抗 proBNP(1-108)抗体接触，并检测标本中的 proBNP(1-108)。

36. 一种检测来自怀疑经历心力衰竭的人类个体的生物标本中 proBNP(1-108)的方法，包括：

a) 使生物标本与如权利要求 30、31、33 和 34 任一项所述的抗 proBNP(1-108)抗体接触，

b) 在允许形成抗原-抗体复合物的条件下温育该混合物。

37. 如权利要求 36 的方法，其还包括 c) 使用能够与初级复合物中存在的 proBNP(1-108)特异结合的经标记的检测抗体，或者使用能够与针对初级复合物中存在的 proBNP(1-108)的抗体结合的经标记的检测抗原，显示形成的抗原-抗体复合物。

38. 如权利要求 37 所述的方法，它还包括步骤 d) 将显示的抗原-抗体复合物的量与个体的临床状况相关联。

39. 一种检测生物标本中的 proBNP(1-108)的试剂盒，其含有至少一种如权利要求 30、31、33 和 34 之一所述的抗体。

40. 一种检测生物标本中的 proBNP(1-108)的试剂盒，它含有至少一种如权利要求 20-26 之一所述的肽作为标准和/或对照。

41. 一种检测生物标本中的 proBNP(1-108)的试剂盒，其

- 在一个容器中含有至少一种如权利要求 30、31、33 和 34 之一所述的抗体；

- 在另外一个容器中含有至少一种如权利要求 20-26 之一所述的肽。

## 诊断心力衰竭的特异性抗体 proBNP (1-108)

本发明涉及室性心力衰竭的体外诊断领域。

充血性心力衰竭是一种常见的临床综合征，特别是在老年个体中。它通常表现为非特异性症状的潜伏触发，如运动引起的咳嗽、疲劳和周围水肿的出现。诊断通常是根据不同参数的研究，如临床指征(分类为4个阶段：NYHA(即纽约心脏协会)的 I-IV 阶段)、超声心动图显象、闪烁显像、运动试验等。

由于心脏病的严重性，以及高昂的治疗费用，显然该综合征的早期诊断是非常希望的：这将有助于防止该综合征快速发展为重度心力衰竭。因此，确定具有心力衰竭危险的个体是必需的。这也能够适应更快速、更容易、更便宜的治疗监测。遗憾的是，还没有完全满意的并且能够提供全部信息的诊断心力衰竭的方法。

预测心力衰竭的症状发生前标志物已经寻找了很长时间。在这方面，心肌细胞产生并分泌具有促尿钠排泄活性的肽的事实已经得到证实：一种心房来源的肽，ANP(心钠素)，由 Bold 等人, *Life Science* 1981, vol. 28(1):89-94 在大鼠中发现，以及一种房室来源的促尿钠排泄肽，被称为 BNP(脑钠素)，由 Sudoh 等人, *Nature* 1988, vol. 332:78-81 在猪中发现，然后在人类中发现。

BNP 的前体是 preproBNP(1-134)，它是该分子在心肌细胞中的一种贮存形式。该前体被切割后释放信号肽和 proBNP(1-108)。proBNP(1-108)由 108 个氨基酸的多肽组成，其序列为：

```
H1PLGSPGSASDLETSGLQEQRNHLQGKLSLELQVEQTSLEPLQESPRPTGVWKSRE
VATEGIRGHRKVMVLYTLRAPR76S77PKMVQGSGCFGRKMDRISSSSGLGCKVLRRH
108 (SEQ ID No. 1)
```

在分泌之前

和/或分泌过程中，它在氨基酸 Arg<sup>76</sup>与 Ser<sup>77</sup>之间被切割，首先产生 BNP，也被称为 BNP(77-108)或 BNP-32，或者 BNP(1-32)，以及该激素原的 N

端部分，BNP(1-76)，也被称为 proBNP 的 N 端片段或 NT-proBNP。

BNP 或 BNP(77-108)是该分子的一种血管反应性形式，由 32 个氨基酸的肽组成，其序列为：

S<sub>77</sub>PKMVQSGSGCFGRKMDRISSSSSGLGCKVLRH<sub>108</sub> (SEQ ID No. 2).

NT-proBNP 或 BNP(1-76)由 proBNP(1-108)的 76 个 N 端氨基酸组成，构成下列序列：

H<sub>1</sub>PLGSPGSASDLETSGLQEQRNHLQGLSELQVEQTSLEPLQESPRPTGVWKSRE  
VATEGIRGHRKMVLYTLRAPR<sub>76</sub> (SEQ ID No. 3).

在显示心室营养不良的患者中，血液中激素 BNP、BNP(77-108)的水平较高。而且也已经描述了血浆中 BNP(77-108)的测定，用它作为预测室性心力衰竭的一种标志物。然而，众所周知，激素 BNP(77-108)相对不稳定。因此，它的测定需要特别注意 (Davidson, N.C. 等人. *Circulation* 1995;91:1276) (Gobinet-Georges 等人. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2000;38:519-23)。另外，BNP 的半衰期极短，其血浆浓度不是很高。因此，在具有心力衰竭危险的个体中得到一定数量的假阴性结果。因此，对 BNP(77-108)的测定不能准确地区别处于 NYHA 分类阶段 I 的患者与正常个体 (Clerico A. 等人. *J. Endocrinol. Invest.* 1998;21:170-9) (Del Ry S. 等人. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2000;60:81-90)。

为了避免这一困难，专利申请 WO 93/24531 描述了一种体外诊断心力衰竭的方法，该方法以 BNP(1-76) (proBNP 的 N 端片段)的检测为基础，BNP(1-76)是一种富含的化合物，其半衰期比 BNP(77-108)激素更长。然而，申请 WO 93/24531 描述的方法似乎不能简单地对血样中的 BNP(1-76)进行。实际上，所述的实施例不能对真正的血清进行，而是对利用合成肽 BNP(47-64)——BNP(1-76)的子序列——获得的标准范围进行。为了克服这一缺点，证明非常复杂的自动化系统是必要的。

文章 Hunt 等人. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 214(3), 1995, 1175-1183 描述了一种测定 BNP 的

竞争性 RIA 测定，该方法对心力衰竭患者的血浆进行，涉及一种抗 proBNP(1-13) N 端片段的抗血清。该文章准确地证实，在心力衰竭患者中，与 BNP(77-108)水平有极佳相关性的 BNP(1-76)水平大大高于对照个体中观察到的水平。然而，描述的仅仅特异提取血浆 BNP(1-76)的方案很复杂，因为它需要用 Sep-pak C18™ 柱(Millipore-Waters)随后通过 HPLC 层析提取血浆。而且，该文章强调，在这样使用的 RIA 测定中，proBNP(1-108)似乎不被识别。这提示 proBNP(1-108)能够从心脏组织分泌到循环中，但是然后可能通过 N 端酸的切割被快速降解为较小的肽。此外，根据该文章所述，proBNP(1-108)也可能以抗 proBNP(1-108)抗血清不能与之结合的方式存在。最后，他们也提出，BNP(1-76) (proBNP 的 N 端片段)甚至可能是比 BNP(77-108)或者比 proANP 的 N 端片段更特异的一种心脏功能障碍标志物。

文章 Karl 等人. (Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1999;59(suppl 230):177-181)描述了一种检测 BNP(1-76)的方法，该方法类似于专利申请 WO 93/24531，但是未提供对患者标本获得的任何结果。

文章 Schulz 等人. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 2001, vol. 61, pp. 33-42 也描述了一种 BNP(1-76) (proBNP 的 N 端片段)特异的放射免疫测定，该方法不需要提取，使用抗该片段的氨基酸 1-21 的抗血清。作者证实了 BNP(1-76)测定在诊断室性心力衰竭中的优点，以及它与 BNP(77-108)测定的良好相关性。在 proBNP(1-108)的多种循环形式的研究中，他们提出了如下假说：proBNP(1-108)将以完整激素原的形式和切割产物 BNP(1-76) (proBNP 的 N 端片段)和 BNP(77-108)的形式在血液中循环。然而，该文章未提及或者建议 proBNP(1-108)的任何可能的生理活性，或者 proBNP(1-108)作为室性心力衰竭的预测或诊断标志物的任何诊断价值。

文章 Shimizu 等人. Clinica Chimica Acta, 2002, vol. 316, pp. 129-135 描述了对血液中人 BNP 的降解和心力衰竭患者血浆中免疫反应性 BNP 的循环分子形式的一项研究。在后者的血浆中发现存在两种免疫反应性 BNP 形式：一种高分子量 BNP (36 KD，可能对应于

proBNP(1-108)的三聚体),和一种低分子量BNP。后者对应于同时存在BNP-32的一种形式的降解产物,其丢失了BNP-32的激素形式的N端丝氨酸和脯氨酸(即脱-SerPro-BNP(BNP3-32))(在此被称为BNP(1-32))。因此心脏分泌proBNP(1-108)和激素BNP(BNP-32、BNP(1-32)或BNP(77-108))到血液中。然而,作者似乎提出,寡聚形式(三聚体)的proBNP(1-108)以类似于循环BNP(77-108)的浓度存在,但是他们没有进行测定。因此没有研究proBNP(1-108)浓度与患者的临床状况之间的关系。同时其中也没有证明血清proBNP(1-108)的诊断或预后价值;也没有提出能够常规测定后者。

而且,已经知道proBNP(1-108)上存在一定数量的表位。因此,在BNP(77-108)的检测中,对应于BNP(77-108)的10个N端氨基酸(AA 1-10)的序列S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>86</sub>(SEQ ID No. 105)的表位在申请WO 97/32900中描述。类似地,在BNP(1-76)(proBNP的N端片段)的检测中,对应于BNP(1-76)(proBNP的N端片段)的12个C端氨基酸的序列R<sub>65</sub>KMVL<sub>Y</sub>TLR<sub>APR</sub><sub>76</sub>(SEQ ID No. 106)的表位在申请WO 00/35951中描述,一个类似的序列H<sub>64</sub>RKMVL<sub>Y</sub>TLR<sub>APR</sub><sub>76</sub>(SEQ ID No. 107)在申请WO 00/45176中描述。然而,这些专利申请均未描述或者提出存在一种表位,它是这些序列的一种中间物或杂合物。

因此,在心力衰竭的早期诊断方面仍然需要一种能够避免现有技术的缺点的方法。具体而言,需要一种简单的方法,它能够常规使用并且可靠,能够避免检测BNP(77-108)的缺点,因为BNP(77-108)是一种不是非常富含并且相对不稳定的分子,而同时可避免复杂的提取,复杂的提取是测定BNP的其它分子形式所致的,可能需要复杂的自动化才能进行。

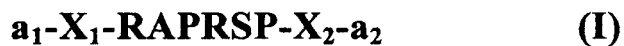
因此,本发明的作者努力发展了一种备选方法来解决提出的问题。本发明的中心是发明人意外地发现,在proBNP(1-108)的铰链序列Y<sub>70</sub>TLR<sub>APR</sub><sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>85</sub>(SEQ ID No. 4)或序列Y<sub>70</sub>TLR<sub>APR</sub><sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>(SEQ ID No. 108)的结构域中存在一种具有独特性质的表位,并且至少含有序列RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P(SEQ ID No. 5)。

实际上,当用序列为  $CY_{70}TLR\text{APR}_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$  (SEQ ID No. 16) 的 proBNP(1-108) 铰链区的肽免疫兔子, 或者用序列为  $CY_{70}TLR\text{APR}_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  (SEQ ID No. 109) 的肽免疫兔子时, 他们惊讶地发现, 获得的抗血清不仅含有特异地识别该铰链区的肽而基本上不识别 BNP(1-76) 和 BNP(77-108) 形式的抗体, 而且还具有识别循环 proBNP(1-108) 的能力。

本申请的作者也第一次证实, 循环 proBNP(1-108) 是预测心力衰竭的一种有效的标志物, 它在心力衰竭患者中的浓度显著高于正常对照个体。

作者也发现, 获得这类抗体的另外一种方法是用完整的 proBNP(1-108) 分子免疫动物。实际上, 作者发现, 用完整的 proBNP(1-108) 分子免疫能够诱导产生可特异地识别铰链区的序列的抗体。

另外, 本发明的作者也证明, 可被根据本发明的抗体识别的最小表位含有下列序列:  $R\text{APR}_{76}S_{77}P$ 。他们也证明, 获得作为本发明的主题的抗体的一种成功方法是用下列通式的一种肽免疫动物:



其中,

$a_1$  可以是 H, 或者可以代表如下官能团或化学基团, 其选自: 硫醇、醇、氨基基、伯胺或仲胺官能团、氨基羧基、生物素基和乙酰基,

$X_1$  代表一种 0-3 个氨基酸的肽序列, 它可能来源于或者可能不来源于 proBNP(1-108) 的天然序列,

$X_2$  代表一种 0-8 个氨基酸的肽序列, 优选地 7 个氨基酸的肽序列, 它可能来源于或者可能不来源于 proBNP(1-108) 的天然序列,

$a_2$  可以代表 OH 基、 $\text{NH}_2$  基或烷氧基。

类似地, 本发明的作者证明, 用含有序列  $R\text{APR}_{76}S_{77}P$  的肽或者用下列通式的肽免疫动物能够获得相同的特异性抗体:



其中 X 可以是 H, 或者可以代表乙酰基, 或者不属于 proBNP(1-108)

的序列的 1-3 个氨基酸，其中 Z 可以代表 OH 基，或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸。

另外，本发明的作者也证明，用下列通式的肽免疫动物能够获得相同的特异性抗体：



其中 X 可以是 H，或者可以代表乙酰基，或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸，其中 Z 可以代表 OH 基，或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸。

本发明的作者也发展了一种简单、可靠的早期诊断心力衰竭的方法，该方法以血液中循环 proBNP(1-108)的检测为基础，并且研制了一种进行这种循环 proBNP(1-108)检测的试剂盒。

因此本发明的一个主题是一种抗 proBNP(1-108)抗体，其特征在于：首先，它特异地识别 proBNP(1-108)的序列  $\text{Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGS}_{85}$ ，并且基本上不识别 BNP(1-76)或 BNP(77-108)，其次，它能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108)。

本发明的一个主题也是一种抗-proBNP(1-108)抗体，其特征在于：首先，它特异地识别 proBNP(1-108)的序列  $\text{Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGS}_{84}$ ，并且基本上不识别 BNP(1-76)或 BNP(77-108)，其次，它能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108)。

具体而言，本发明的一个主题是一种抗-proBNP(1-108)抗体，其特征在于：首先，它特异地识别 proBNP(1-108)的序列  $\text{RAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$ ，并且基本上不识别 BNP(1-76)或 BNP(77-108)，其次，它能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108)。

本发明的一个主题也是一种获得抗-proBNP(1-108)抗体的方法，这些抗体特异地识别 proBNP(1-108)的序列  $\text{Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGS}_{85}$ 、序列  $\text{Y}_{70}\text{TLRAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{PKMVQGS}_{84}$  和/或序列  $\text{RAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$ ，基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)，并且

能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108)，该方法的特征在于用完整的 proBNP(1-108)分子免疫动物，然后用 BNP(77-108)肽和/或 BNP(1-76)肽消耗所获得的抗血清。

表述获得的针对特定抗原(免疫抗原)的“抗血清的消耗”是指除去该抗血清中可能存在的非特异性抗体，方法包括：使该抗血清与“非特异性抗原”，即与免疫抗原不同的抗原接触并温育，然后免疫学分离并除去可与该“非特异性抗原”反应的抗体，回收这样消耗的(即消耗非特异性抗体的)抗血清。消耗通常用来使针对指定抗原的抗血清具有特异性。

在这种情况下，识别 proBNP(1-108)的序列  $Y_{70}TLR\text{APR}_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$  和 / 或序列  $Y_{70}TLR\text{APR}_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  或序列  $R\text{APR}_{76}S_{77}P$  的抗血清能够被消耗，即通过将其与上述 BNP(77-108)和/或 BNP(1-76)接触使之具有特异性，例如，对于后者能够固定在一个固相中，并且按照本领域技术人员公知的常规技术通过免疫吸附作为层析的支持体。在此，消耗的抗血清中最后存在的抗体是一种单特异性多克隆抗体。

本发明的一个主题也是下列通式的一种肽：



其中

$a_1$  可以是 H，或者可以代表如下官能团或化学基团，其选自：硫醇、醇、氨基基、伯胺或仲胺官能团、氨基羧基、生物素基和乙酰基，

$X_1$  代表一种 0-3 个氨基酸的肽序列，其可能来源于或者可能不来源于 proBNP(1-108)的天然序列，

$X_2$  代表一种 0-8 个氨基酸的肽序列，优选地 7 个氨基酸的肽序列，其可能来源于或者可能不来源于 proBNP(1-108)的天然序列，

$a_2$  可以代表 OH 基、 $\text{NH}_2$  基或烷氧基。

本发明的一个主题也是下列通式的一种肽：



其中 X 可以是 H，或者可以代表乙酰基，或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸，其中 Z 可以代表 OH 基，或者不属于

proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸。

本发明的一个主题也是下列通式的一种肽：



其中 X 可以是 H, 或者可以代表乙酰基, 或者不属于 proBNP(1-108) 的序列的 1-3 个氨基酸, 其中 Z 可以代表 OH 基, 或者不属于 proBNP(1-108) 的序列的 1-3 个氨基酸。

应当指出, 在上述通式(II)和(III)中, 氨基酸编号(Y<sub>70</sub>、R<sub>76</sub>、S<sub>77</sub>、S<sub>84</sub> 或 G<sub>85</sub>)只是用来帮助理解本发明, 以及确定该序列相对于 proBNP(1-108)序列的位置。对于本申请中给出编号的其它序列同样如此。

本发明也涉及含有下列序列的任何肽：序列 X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>85</sub>-Z (II), 或者序列 X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III), 或者分别在氨基酸位点 70-85 或 84 之一处保守或非保守置换的上述序列(II)或(III)之一, 只要使 RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P 部分保持完整(特别是未置换)。

因此是指一种肽, 其含有通过氨基酸 Y<sub>70</sub>、T<sub>71</sub>、L<sub>72</sub>、K<sub>79</sub>、M<sub>80</sub>、V<sub>81</sub>、Q<sub>82</sub>、G<sub>83</sub>、S<sub>84</sub> 和 G<sub>85</sub> 中的一个或多个的置换, 衍生自序列 X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>85</sub>-Z (II) 或者衍生自序列 X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III)的一种序列, X 可以缺失或者代表 NH<sub>2</sub> 基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸, Z 可以缺失, 或者代表 OH 基, 或者不属于 proBNP(1-108)的序列的 1-3 个氨基酸。

最后, 本发明涉及序列 Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>85</sub> 的肽, 以及序列 Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> 的肽。

本发明的一个主题也是一种获得抗-proBNP(1-108)抗体的方法, 该抗体特异地识别 proBNP(1-108) 的序列 Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>85</sub>、Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> 和/或序列 RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P, 基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)的序列, 并且能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108), 该方法的

特征在于用下列通式的肽免疫动物:



其中,  $a_1$ 、 $X_1$ 、 $X_2$  和  $a_2$  的含义与上述相同, 任选地, 用 BNP(77-108) 肽和/或 BNP(1-76) 肽消耗所获得的抗血清。这样获得的抗体是一种单特异性抗体。

本发明的主题也是一种获得抗-proBNP(1-108) 抗体的方法, 该抗体特异地识别 proBNP(1-108) 的序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$ 、 $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  和/或序列  $RAPR_{76}S_{77}P$ , 基本上不识别 BNP(1-76) 和 BNP(77-108), 并且能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108), 该方法的特征在于用通式  $X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}-Z$  (II) 的肽或者用通式  $X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}-Z$  (III) 的肽免疫动物, 其中 X 和 Z 如上所述定义, 任选地, 用 BNP(77-108) 肽和/或 BNP(1-76) 肽消耗所获得的抗血清。

本发明的一个主题也是获得一种杂交瘤的一种方法, 该杂交瘤分泌抗-proBNP(1-108) 抗体, 该抗体特异地识别 proBNP(1-108) 的序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$ 、 $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  和/或序列  $RAPR_{76}S_{77}P$ , 基本上不识别 BNP(1-76) 和 BNP(77-108), 并且能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108), 该方法的特征在于用通式  $X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}-Z$  (II) 的肽或者用通式  $X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}-Z$  (III) 的肽免疫动物, 所述肽是保守或非保守置换的形式, 只要使得  $RAPR_{76}S_{77}P$  部分保持完整(特别是未置换), 其中 X 和 Z 如上所述定义, 任选地, 用 BNP(77-108) 肽和/或 BNP(1-76) 肽消耗所获得的抗血清。

本发明的主题也是一种获得抗-proBNP(1-108) 抗体的方法, 该抗体特异地识别 proBNP(1-108) 的序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$ 、 $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  和/或序列  $RAPR_{76}S_{77}P$ , 基本上不识别 BNP(1-76) 和 BNP(77-108), 并且能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108), 该方法的特征在于用序列

$Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$  的肽或者用序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  的肽免疫一种动物，任选地，用 BNP(77-108)肽和/或 BNP(1-76)肽消耗所获得的抗血清。

本发明的一个主题也是获得一种杂交瘤的方法，该杂交瘤分泌抗-proBNP(1-108)抗体，该抗体特异地识别 proBNP(1-108)的序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$ 、 $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  和/或序列  $RAPR_{76}S_{77}P$ ，基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)，并且能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108)，该方法的特征在于：

- 用如下肽免疫动物，所述肽选自下列通式的肽：

$a_1-X_1-RAPRSP-X_2-a_2$  (I)

其中， $a_1$ 、 $X_1$ 、 $X_2$  和  $a_2$  的含义与上述相同，

$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}-Z$  (II)

其中 X 和 Z 的含义与上述相同，

$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}-Z$  (III)

其中 X 和 Z 的含义与上述相同，

$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}-Z$  (II)

其为保守或非保守置换的形式，只要使  $RAPR_{76}S_{77}P$  部分保持完整(特别是未置换)，其中 X 和 Z 的含义与上述相同，

$X-Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}-Z$  (III)

其为保守或非保守置换的形式，只要使  $RAPR_{76}S_{77}P$  部分保持完整(特别是未置换)，其中 X 和 Z 的含义与上述相同，

$Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$  和

$Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$ ;

- 从该动物中提取分泌免疫球蛋白的淋巴细胞，并且  
- 使该淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，获得至少一种分泌免疫球蛋白的杂交瘤。

这相当于获得杂交瘤的常规技术，其原理在 Köhler 和 Milstein, (1975) Nature (London), 256:495-497 中描述。

本发明的一个主题也是这样一种杂交瘤和该杂交瘤分泌的抗-proBNP(1-108)单克隆抗体。

本发明的一个主题也是人类心力衰竭的一种体外诊断方法，包括使生物标本，优选地血液、血浆或血清，与一种抗-proBNP(1-108)抗体接触，该抗体特异地识别 proBNP(1-108)的序列 Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>85</sub>、序列 Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>和/或序列 RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P，基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)，并且能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108)，以及检测标本中的 proBNP(1-108)。

本发明通常提供人类心力衰竭的一种体外诊断方法，包括：

a) 使生物标本，优选地血液、血浆或血清，与一种抗-proBNP(1-108)抗体接触，该抗体特异地识别 proBNP(1-108)的序列 Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>85</sub>、序列 Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>和/或序列 RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P，基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)，并且能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108)，

b) 在允许形成抗原-抗体复合物的条件下温育该混合物，和

c) 任选地使用能够与初级(primary)复合物中存在的 proBNP(1-108)特异结合的经标记的检测抗体，或者使用能够与针对初级复合物中存在的 proBNP(1-108)的抗体结合的经标记的检测抗原，显示形成的抗原-抗体复合物。

具体而言，本发明提供一种诊断心力衰竭的方法，除了上述步骤 a、b、c 之外，还包括步骤 d) 将显示的抗原-抗体复合物的量与个体的临床症状相关联。

本发明的一个主题也是一种试剂盒，其用于检测生物标本，特别是血液、血浆或血清标本中的 proBNP(1-108)，该试剂盒含有至少一种抗-proBNP(1-108)抗体，该抗体特异地识别 proBNP(1-108)的序列 Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>85</sub>、序列 Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>和/或序列 RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P，基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)，并且能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108)。

最后,本发明涉及一种试剂盒,其用于检测生物标本,特别是血液、血浆或血清标本中的 proBNP(1-108),该试剂盒含有一种化合物作为标准和/或对照,该化合物含有至少一种肽,该肽选自下列通式的肽:



其中,  $a_1$ 、 $X_1$ 、 $X_2$  和  $a_2$  的含义与上述相同,



其中 X 和 Z 的含义与上述相同,



其为保守或非保守置换的形式,只要使  $RAPR_{76}S_{77}P$  部分保持完整(特别是未置换),其中 X 和 Z 的含义与上述相同,



其中 X 和 Z 的含义与上述相同,



其为保守或非保守置换的形式,只要使  $RAPR_{76}S_{77}P$  部分保持完整(特别是未置换),其中 X 和 Z 的含义与上述相同,



### 定义

在本发明上下文中,“生物标本”或者“生物液体标本”优选地包括生物液体,如血液、血浆、血清、尿、脑脊液、唾液等。

术语“心力衰竭”是指病理状态,其中心脏功能异常致使心脏不能充分地泵送血液,以满足生物的代谢需要,和/或心脏满足这种需要,但是充盈压特别高。具体而言,这可能是右心室和/或左心室衰竭。

术语“抗体”是指任何完整的抗体或一种抗体的功能片段(可能通过或者可能不通过遗传工程获得),其含有或者由至少一个抗原结合位点组成,使得该抗体能够与抗原化合物的至少一个抗原决定簇结合。作为抗体片段的例子,可能提到 Fab、Fab'和  $F(ab')_2$  片段以及单链可变片段(scFv 链)。

根据本发明的抗-proBNP(1-108)抗体可以是多克隆或单克隆类型。根据本发明的一种多克隆抗-proBNP(1-108)抗体尤其可以如下获得：用完整的 proBNP(1-108)免疫一种动物，如兔、小鼠等，分离获得的抗血清，然后利用本领域技术人员公知的方法，例如用含有 BNP(77-108)和/或 BNP(1-76)的免疫吸附剂对其进行消耗。根据本发明的一种单克隆抗-proBNP(1-108)抗体尤其可以用 Köhler 和 Milstein (Nature (London), 256:495-497(1975))的常规方法获得。

在本发明中有用的单克隆抗体或单特异性多克隆血清，或者通过筛查基因组文库获得的抗体，利用下文详细描述的技术产生。

术语“捕获抗体”是指一种抗体或一种抗体的一部分，其优选地附着于固相上，通过亲和结合能够保留生物标本中的 proBNP(1-108)抗原。

生物标本中抗原的存在通过“检测工具(单元)”显示。关于抗原的检测，本发明具体涉及使用至少一种“检测抗体”的检测。通过识别与捕获抗体所识别的位点不同的表位位点，标记的这种检测抗体能够通过亲和结合与捕获的抗原结合。

术语“经标记的”是指直接标记(利用酶、放射性同位素、荧光染料、发光化合物等)和间接标记(例如利用直接标记的抗体或者使用标记的“亲和对”的试剂，例如，但是不排除标记的抗生物素蛋白-生物素对，等等)。

术语“抗原片段”是指 proBNP(1-108)的任一部分，其能够在免疫的动物中诱导合成仅对 proBNP(1-108)特异的抗体。

根据本发明，一个“抗原片段”至少含有“表位位点”或表位 R<sub>APR</sub><sub>76</sub>S<sub>77</sub>P。“表位位点”或“表位”是一种氨基酸序列，它能够被至少一种抗体识别，并且允许其特异结合。

术语“单特异性多克隆抗体”是指具有单表位特异性的任何多克隆抗体。是指一种抗体，它能够结合序列 proBNP(1-108)的含有含表位的氨基酸的氨基酸序列，但是不能结合序列 proBNP(1-108)的不含含表位的氨基酸的氨基酸序列。

当指抗体对抗原的识别或特异性结合时，术语“特异地”是指该抗体

与该抗原相互作用，而基本上不与其它抗原相互作用，或者如果指与一种表位的“特异性”识别，实际上只识别该表位。缔合常数大于  $10^8 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$  是优选的。

术语“保守置换”具体地是指一类氨基酸被同一类氨基酸置换，相对于来源肽，这种置换不会显著改变获得的肽的免疫反应性。在多个氨基酸类别中，含有一个极性侧链的氨基酸(如天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸)，含有一个非极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸和半胱氨酸)，含有一个碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸和组氨酸)，和含有一个酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸和谷氨酸)通常可以区别。

术语“非保守置换”是指其它任何类型的置换，相对于来源肽，它不会显著改变获得的肽的免疫反应性。

表述“基本上不识别 BNP(1-76)或 BNP(77-108)”是指本发明所述的抗体显示与 BNP(1-76)或 BNP(77-108)有不到 20%，特别是不到 10%，优选地不到 5%的交叉反应。百分交叉反应按照本领域技术人员公知的方法测定，如实施例 5 所述。

“基本上”不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)肽优选地对应于本发明的抗体与这些肽的反应的缺乏，或者实际上的缺乏。

表述“基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)”是指抗体“基本上不识别 BNP(1-76)或 BNP(77-108)”，含义如上。

### 特异性抗体的产生

本发明使用的抗体是抗原特异性抗体，因此，是单克隆抗体或单特异性多克隆抗体，即它们只特异地识别一种表位。

单克隆抗体能够利用 Köhler 和 Milstein, Nature, 1975,256:495-497 所述的常规淋巴细胞融合和杂交瘤培养方法获得。制备单克隆抗体的其它方法也已知(Harlow 等人编著, 1988 《抗体: 实验室手册》)。单克隆抗体能够如下制备: 免疫一种哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔或人等), 利用淋巴细胞融合技术产生杂交瘤(Köhler 和 Milstein, 1975)。

这种常用技术具有备选技术。例如，通过表达从一种杂交瘤中克隆的核酸，能够产生单克隆抗体。通过噬菌体展示技术，通过将抗体 cDNA 导入载体中，也能够产生抗体，这种载体一般是丝状噬菌体，它在噬菌体表面呈现 V 基因文库(例如，对于大肠杆菌为 fUSE5, J.K. Scott 和 G.P. Smith, Science, 1990,249:386-390)。Marks 等人, 1991, J. Mol. Biol, 222:581-597 描述了构建这些抗体文库的方案。

按照常用的程序，用一种性质为肽的抗原免疫动物，能够从该动物的血清中获得多克隆抗体。如果需要，可以利用本领域技术人员公知的技术，例如柱免疫吸附，通过用 BNP(77-108)和 BNP(1-76)消耗，使这样获得的多克隆抗体对序列 Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>85</sub>、对序列 Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> 和/或对含有序列 RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P 的肽具有单特异性，从而确保对于 proBNP(1-108)的特异性，基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)。

#### 捕获和/或检测抗体

在夹心技术中，选择捕获抗体，使其特异地识别患者自然抗原上的一种表位，而且选择检测抗体，优选地但不是必要地，使其特异地识别患者自然抗原上的另外一种表位。

生物标本能够任选地在前一个步骤中处理，或者在促使待检测表位暴露的条件下，直接将其与至少一种捕获抗体置于一一起。

根据本发明的诊断方法能够按照本领域技术人员公知的多种形式进行：在固相或均相中；一步或者两步；以夹心法或者竞争法，作为非限制性实例。

根据一个优选实施方案，捕获抗体固定于一个固相上。作为固相的非限制性实例，可以使用微孔板，特别是聚苯乙烯微孔板，如丹麦 Nunc 公司所售。也可以使用固体颗粒或珠、磁珠，如 Dynal 或 Merck-Eurolab (法国)提供的(商标为 Estapor<sup>TM</sup>)，或者聚苯乙烯或丙烯试管，等等。

一种免疫测定形式，如两种抗体(捕获和检测抗体)的夹心法，特别有利于检测生物标本中存在的抗原。

通过竞争检测抗原的一种免疫测定形式也是可用的。另外一些免疫测定模式也能够涉及，且本领域技术人员公知。

ELISA 测定、放射免疫测定或其它任何检测技术都能够用来显示形成的抗原-抗体复合物的存在。

### 试剂盒

用来根据本发明的方法检测生物液体标本中的 proBNP(1-108)的试剂盒和试剂，能够用来实施本发明，它容易进行且适用于多种生物标本。

用于检测生物标本中的 proBNP(1-108)的试剂盒能够含有至少一种如上所述定义的抗体。含有至少一种通式(I)或(II)的肽或如上所述定义的一种置换肽作为标准和/或对照的另外一些试剂盒也可以用来实施本发明。

因此，本发明的另外一个具体主题是一种检测生物液体标本中的 proBNP(1-108)的试剂盒，其含有：

- 至少一种抗-proBNP(1-108)抗体，其特异地识别 proBNP(1-108)的序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$ 、序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  和/或序列  $RAPR_{76}S_{77}P$ ，基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)，并且能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环 proBNP(1-108)，优选地是一种用于捕获该生物标本中存在的 proBNP(1-108)的抗体，和

- 一种经标记的偶联物，它能够与形成的抗原-抗体复合物特异结合。

如上所述，捕获抗体有利地可以是固定在一个固相(例如，但不只是，微孔板)上的形式。

一种优选的试剂盒至少含有：

- 一种抗-proBNP(1-108)捕获抗体，其特异地识别 proBNP(1-108)的序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{85}$ 、序列  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  和/或序列  $RAPR_{76}S_{77}P$ ，基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)，并且能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环

proBNP(1-108), 该捕获抗体固定于一个固相上; 和

- 一种经标记的检测抗体, 它针对 proBNP(1-108)的另外一种完整的表位, 或者任选地,
- 一种经标记的检测抗原, 它是 proBNP(1-108)的一种肽或者是 proBNP(1-108)本身。

根据一个具体实施方案, 用于检测生物标本中的 proBNP(1-108)的一种试剂盒可以:

- 在一个容器中含有至少一种如上所述定义的抗体;
- 在另外一个容器中含有至少一种如上所述定义的肽, 该肽具体可以用作标准和/或对照。

下列附图和实施例说明本发明, 而非限制其范围。

### 图例

图 1 显示用蛋白 A-sepharose 纯化的来自兔# 046 805 的多克隆抗体与吸附于微孔板上的 0.25  $\mu\text{g/ml}$  proBNP(1-108)、BNP(1-76)片段、BNP(77-108)或 GST (谷胱甘肽-S-转移酶, 用作对照蛋白质)的反应性。

图 2 显示在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗后获得的, 兔# 046 805 的滤过物的多克隆抗体的反应性。这些多克隆抗体以 2-20  $\mu\text{g/ml}$  的稀释范围制备, 然后在包被吸附的 0.25  $\mu\text{g/ml}$  proBNP(1-108)、BNP(1-76)或 BNP(77-108)多肽的孔(cupule)上检测。

图 3 显示在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗后获得的, 兔# 046 832 的滤过物的多克隆抗体的反应性。这些多克隆抗体以 5-20  $\mu\text{g/ml}$  的稀释范围制备, 然后在包被了吸附的 0.25  $\mu\text{g/ml}$  proBNP(1-108)、BNP(1-76)或 BNP(77-108)多肽的孔上检测。

图 4 显示在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗后获得的, 兔# 046 805 的多克隆血清的洗脱物的反应性。这些该多克隆抗体以 2-20  $\mu\text{g/ml}$  的稀释范围制备, 然后在包被吸附的 0.25  $\mu\text{g/ml}$  proBNP(1-108)、BNP(1-76)或 BNP(77-108)多肽的孔上检测。

图 5 显示在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗后获得的, 兔# 046

832 的多克隆血清的洗脱物的反应性。这些多克隆抗体以 5-20  $\mu\text{g/ml}$  的稀释范围制备,然后在包被吸附的 0.25  $\mu\text{g/ml}$  proBNP(1-108)、BNP(1-76)或 BNP(77-108)多肽的孔上检测。

图 6 显示利用斑点技术,对来自兔# 046 805 的消耗之前的多克隆血清的表位分析(对于该实施例,背景噪音为  $30.4\pm 5.93$  相对强度单位)。

图 7 显示利用斑点技术,对来自兔# 046 805 的在 BNP- $\text{K}_3$ -NHS-sepharose 树脂上消耗之后的多克隆血清的表位分析(对于该实施例,背景噪音为  $31.3\pm 6.31$  相对强度单位)。

图 8 显示稀释为 1/2 的杂交瘤 3D4 的培养上清液的反应性,在包被吸附的 1  $\mu\text{g/ml}$  proBNP(1-108)或 BNP(1-76)或 BNP(77-108)或肽 YTLRAPRSPKMVQGSG (C13P30)的孔上检测。

图 9 显示 16%丙烯酰胺凝胶的一张照片,其中每种蛋白质都迁移(每道 1  $\mu\text{g}$  蛋白质)。1 道:分子量标准;2 道: proBNP(1-108)-GST;3 道: GST (阴性对照蛋白质);4 道: BNP(1-76)-GST;5 道: BNP(77-108)。

图 10 显示使用 3D4 杂交瘤产生的抗体对下列样品进行的 Western 印迹测定的结果: proBNP(1-108)-GST (2 道)、GST (阴性对照蛋白质) (3 道)、BNP(1-76)-GST (4 道)、BNP(77-108) (5 道),它们加样到凝胶上(每块凝胶 1  $\mu\text{g}$  蛋白质),然后转移到硝酸纤维素膜上。

图 11 显示用于 proBNP(1-108) IRMA 测定的一条标准曲线。

图 12 显示对标本中的 proBNP(1-108)进行的 IRMA 测定的结果,单位为 cpm (每分钟的放射性计数),标本来自 14 名正常个体和 15 名心力衰竭患者。

图 13 给出了利用根据本发明的免疫放射测定法测定的 proBNP(1-108)浓度 ( $\text{pg/ml}$ )与利用 Elecsys<sup>®</sup>自动装置(Hoffmann La Roche 公司的商标)测定的 BNP(1-76)浓度 ( $\text{pg/ml}$ )之间的相关性,标本来自 14 名心力衰竭患者。

图 14 显示根据本发明的 proBNP(1-108) ELISA 测定的一条标准曲线。

图 15 显示兔# 046 805 的多克隆抗体对于 BNP(1-76)和 BNP(77-108)

的交叉反应的评价,该抗体未经消耗,与生物素偶联,在 proBNP(1-108) ELISA 测定中与抗 BNP(77-108)多克隆抗体一起夹心使用。

图 16 显示来自兔# 046 805 的多克隆抗体对于 BNP(1-76)和 BNP(77-108)的交叉反应的评价,该抗体未经消耗,与生物素偶联,在 proBNP(1-108) ELISA 测定中与抗-NT-proBNP(1-29)多克隆抗体一起夹心使用。

## 实施例

### 实施例 1: 用于免疫的肽的合成

合成的肽通过本领域技术人员公知的标准技术生产。例如,可以提到 Merrifield 类型的合成,该方法易于进行,因此是有利的(Merrifield, (1963); R. C. Sheppard (1971); Atherton 等人. (1989))。自动化合成仪可以使用 Millipore "9050 Plus Pep Synthesizer"、"Pioneer"合成仪或 ABI "433A"合成仪。这些肽也能够通过均相合成法获得。

下文中的合成使用“Fmoc”(9-芴基甲氧基羰基)化学在 Pioneer 合成仪上进行: 每一步都过量加入试剂(即被保护的氨基酸和偶联激活剂(TBTU (2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基-脲 四氟硼酸)/HOBt(N-羟基苯并三唑)) (“树脂上试剂摩尔数可取代基摩尔数”之比=5)。在合成结束时,利用基于三氟乙酸的溶液(试剂 K)从树脂上分离肽。然后在冷却的醚溶液中沉淀该肽,然后通过 HPLC 纯化。

本发明人合成了下列含有铰链区氨基酸序列 R<sub>76</sub>S<sub>77</sub> 的肽:

- SEQ ID No. 6: C-G-R-A-P-R-S-P
- SEQ ID No. 7: 乙酰基-C-G-R-A-P-R-S-P
- SEQ ID No. 8: C-G-R-A-P-R-S-P-K
- SEQ ID No. 9: 乙酰基-C-G-R-A-P-R-S-P-K
- SEQ ID No. 10: C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V
- SEQ ID No. 11: C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
- SEQ ID No. 12: R-A-P-R-S-P-G-C
- SEQ ID No. 13: 乙酰基-R-A-P-R-S-P-G-C
- SEQ ID No. 14: 乙酰基-C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K
- SEQ ID No. 15: C-H-R-K-M-V-L-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K
- SEQ ID No. 16: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

## ( 肽 C13P30)

SEQ ID No. 17: C-F-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G  
 SEQ ID No. 18: C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G  
 SEQ ID No. 19: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-βA  
 SEQ ID No. 20: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA  
 SEQ ID No. 21: C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA  
 SEQ ID No. 22: C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-A-L-A-S-G-T-A

以及

SEQ ID No. 109: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S

## ( 肽 CN32)

SEQ ID No. 110: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K  
 SEQ ID No. 111: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V  
 SEQ ID No. 112: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q  
 SEQ ID No. 113: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G  
 SEQ ID No. 114: 乙酰基-C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q  
 SEQ ID No. 115: C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G  
 SEQ ID No. 116: C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S  
 SEQ ID No. 117: C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G  
 SEQ ID No. 118: C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V  
 SEQ ID No. 119: C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q  
 SEQ ID No. 120: L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-C  
 SEQ ID No. 121: C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S  
 SEQ ID No. 122: C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

**NB: βA 表示β-丙氨酸。**

因此本发明的主题也包括选自上述序列的任何一种肽。

**实施例 2: 用于免疫的肽与载体蛋白的偶联**

肽与一种载体蛋白 KLH (匙孔 血蓝蛋白)、甲状腺球蛋白、BSA(牛血清白蛋白)通过不同的官能团(硫醇、胺、醛等)偶联,以使该肽更具免疫原性。用于键合肽与蛋白质的偶联剂可以是异双功能剂或同双功能剂。最常用的试剂是 BS3、sSMCC、SPDP、戊二醛等。采用的偶联技术之一是利用戊二醛作为化学偶联剂,利用 KLH 作为载体蛋白。KLH 与肽的偶联利用肽的胺官能团(主要由赖氨酸携带的 N 端基团和胺基团)进行。

序列 YTLRAPRSPKMOVQSG-NH<sub>2</sub> (SEQ ID No. 16)的肽 C13P30 或序列 YTLRAPRSPKMOVQGS-NH<sub>2</sub> (SEQ ID No. 109)的肽 CN32 的 5 mg/ml 溶液用含有 0.15 M NaCl 的 pH 7.4 的 Dulbecco PBS 缓冲液制备。对于注射制剂,一瓶在 PBS 缓冲液(Pierce # 77600)中冻干的 20mg KLH 吸收 2ml 水,获得溶于 PBS 缓冲液的 10 mg/ml KLH 溶液。

1 ml 肽溶液(即 5 mg)与 1.25 ml KLH 溶液(即 12.5 mg)混合。在抽风罩下,向混合物中加入(由 25%戊二醛, Sigma # G-5882)即时制备的 2.25 ml 2%戊二醛溶液。为了避免形成 KLH 复合物,逐滴加入 2%戊二醛溶液,同时搅拌混合液。偶联反应在室温下进行 2 小时 30 分钟。加入 100 mg/ml 硼氢化钠溶液达到 10 mg/ml 的终浓度,终止偶联反应。混合物在 4℃ 下温育过夜。最后,该溶液在 4℃ 下对 pH 7.4 的 Dulbecco PBS 缓冲液透析过夜。最后等分该溶液,贮存于 -80℃。

### 实施例 3: 用肽免疫

为了生产多克隆抗体,兔(雌性,新西兰株)用根据实施例 2 与 KLH 偶联的肽 Cys-YTLRAPRSPKMOVQSG-NH<sub>2</sub> 免疫。对于第一次注射,制备 1.5 ml KLH 偶联的肽与 1.5 ml 弗氏完全佐剂(Sigma # F-5881)的乳液,对每只兔皮内注射 1 ml 这种乳液(即 200 μg 肽)。通过皮内注射 1 ml KLH 偶联的肽(即 200 μg 肽)与弗氏不完全佐剂(Sigma # F-5506)的乳液,给予两次加强,间隔 20 天。在第二次加强 20 天后,以与前几次加强基本相同的方法给予第三次加强,不同之处是采用皮下注射。后一次加强 20 天后,并且在评价获得的抗体滴度后,对兔采血。更具体而言,

剩余的研究使用以下多克隆抗体：它们来自用编号# 046 805 和 046 832 区别的兔，通过用与 KLH 偶联的肽 C-YTLRAPRSPKMVQGS-NH<sub>2</sub> (SEQ ID No. 16)免疫获得，以及来自用# L01235 区别的兔，通过用与 KLH 偶联的肽 C-YTLRAPRSPKMVQGS-NH<sub>2</sub> (SEQ ID No. 109)免疫获得。

#### 实施例 4：获得及纯化抗体

纯化后，兔血清在 4°C 下以 4500 转/分离心 30 分钟。通过沉淀分离后，血清用含有 1 M NaCl 的 1.5 M 甘氨酸缓冲液 pH 8.0 对半稀释。

##### 实施例 4.a：使用蛋白 A-sepharose 的 IgG 纯化

多克隆抗体的纯化在蛋白 A-sepharose 凝胶(Amersham Biosciences #17.1279.02)上通过亲和层析进行。从金黄色葡萄球菌中提取的蛋白 A 与 IgG 分子的 Fc 片段特异结合。然后，在 pH 3.0 下洗脱包括所有亚类的 IgG。

为了防止气泡形成，使用的所有缓冲液在上柱之前均在超声波浴中脱气 15 分钟。

层析柱用 12 ml 蛋白 A-sepharose 制备。该凝胶柱用蒸馏水和脱气的水平衡 40 分钟，然后用含有 0.5 M NaCl 的 pH 7.4 的 Dulbecco PBS 缓冲液平衡 40 分钟，最后用含有 1M NaCl 的 pH 8.0 的 1.5 M 甘氨酸缓冲液平衡，直到获得正确的基线。

然后，用含有 1M NaCl 的 pH 8.0 的 1.5 M 甘氨酸缓冲液对半稀释的 10 ml 兔血清以 0.5 ml/min 的流速通过该柱。在出现白蛋白峰后，利用以 0.1 M tris-柠檬酸钠缓冲液调节至 pH 3.0 的 0.1 M 柠檬酸溶液洗脱血清 IgG。回收 IgG 洗脱峰，在 4°C 下在 pH 7.4 的 Dulbecco PBS 缓冲液中快速透析过夜。对 PBS 缓冲液透析后通过读取 280 nm 的光密度测定 IgG 的浓度。

利用蛋白 A 纯化后，在包被吸附的 0.25 µg/ml proBNP(1-108)或 BNP(1-76)或 BNP(77-108)的孔上通过 ELISA 检测多克隆抗体的反应

性。图 1 列出了来自兔# 046 805 的多克隆抗体获得的结果。来自兔# 046 832 的多克隆抗体获得相同的结果。来自兔# 046 805 和# 046 832 的多克隆抗体对于 proBNP(1-108)是相对特异的。然而，我们能够注意到高浓度下弱抗-BNP(77-108)反应性的存在，我们按照实施例 4.b 所述的方法，通过在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗，使来自这些兔的多克隆抗体具有单特异性，能够消除这种反应性。

#### 实施例 4.b: IgG 在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上的消耗

该操作的目的在于消除观察到的对于 BNP(77-108)的交叉反应性。

由于获得的多克隆抗体的交叉反应性位于 BNP(77-108)分子的 N 端位置，因此将 BNP(77-108)的该区正确地呈递给将要消除的免疫球蛋白至关重要。为此，利用 C 末端位置(BNP-K<sub>3</sub>)中 3 个赖氨酸残基的延伸合成 BNP(77-108)，以促进它通过 C 末端与 NHS-sepharose 树脂的偶联。

如以上实施例 1 所述，利用“Fmoc”(9-芴基甲氧基羰基)化学，在 Pioneer 合成仪上合成 BNP-K<sub>3</sub>: S-P-K-M-V-Q-G-S-G-C-F-G-R-K-M-D-R-I-S-S-S-G-L-G-C-K-V-L-R-R-H-K-K-K (SEQ ID No. 104)。

5 mg BNP-K<sub>3</sub> 用 100 mM pH 8.3 的 NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液溶解，以 10mg/ml 的浓度加入 0.5M NaCl。2ml NHS-sepharose 树脂(NHS-活化的 Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences # 17.0906.01)在 4℃下以 1000 转/分离心 30 秒钟。树脂用 15 ml 1mM 冷 HCl 溶液洗涤。离心并除去 HCl 溶液后，树脂与 10 mg/ml 的 BNP-K<sub>3</sub> 配体混合。混合物在室温和缓慢搅拌下温育 1 小时。离心并除去配体溶液后，树脂的非反应性基团用 5 ml pH 8.0 的 0.1M 甘氨酸缓冲液封闭。该混合物在室温和缓慢搅拌下温育 1 小时。离心并除去封闭缓冲液后，树脂吸收 5 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液 pH 8.3，加入 0.5M NaCl。用该缓冲液洗涤 4 次。最后一次洗涤后，将该混合物上样层析柱上。

在制备层析柱后，将 10 mg 来自兔# 046 805 或来自兔# 046 832 的 IgG 上样到柱上。与该柱相连的蠕动泵使得兔血清 IgG 能够在 4℃下循环过夜。次日，回收 IgG 溶液(=滤过物)。用含有 5 M 尿素的 20mM Tris

缓冲液 pH 8.0 洗脱与 BNP-K<sub>3</sub> 结合的 IgG 级分(=洗脱物)。然后检测洗脱物与滤过物,以证实消耗的效果。图 2 和图 3 分别显示用来自兔# 046 805 和# 046 832 的多克隆血清的滤过物进行的 ELISA 检测的结果。图 4 和图 5 分别显示用来自兔# 046 805 和# 046 832 的多克隆血清的洗脱物进行的 ELISA 检测的结果。

如预期的一样,来自兔# 046 805 和# 046 832 的多克隆血清的滤过物对于 proBNP(1-108)是特异的:对 BNP(1-76)和 BNP(77-108)均未见反应性。洗脱物保留相当大的对 proBNP(1-108)的反应性,以及对 BNP(77-108)的反应性。这些结果证实了在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗兔多克隆血清的效果。

BNP(77-108)来自 Sigma (# B-5900),而 proBNP(1-108)和 BNP(1-76)按照本领域技术人员公知的常规技术,在克隆到载体 pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech)内,并转染大肠杆菌后,以表达的重组蛋白的形式产生。原始载体由 Berlex Biosciences 公司(Richmond, CA, USA)提供,它的制备如 Yan 等人(PNAS, 2000, vol. 97, pp. 8525-8529)所述。proBNP(1-108)和 BNP(1-76)的浓度通过 Bradford 法测定,用于蛋白质比色测定(M. Bradford Anal. Biochem. 1976;72:248-54)。

**实施例 5: 来自兔# 046 805 和# L01235 的抗-proBNP(1-108)抗体对于 BNP(1-76)和 BNP(77-108)的百分交叉反应性的测定**

**材料:**

- 1) 固相: 平底 Maxisorp 微孔板, Nunc (丹麦)。
- 2) BNP(77-108)来自 Sigma (# B-5900), 而 proBNP(1-108)和 BNP(1-76)以重组蛋白的形式产生。这些蛋白质溶液的浓度通过 Bradford 法测定,用于蛋白质比色测定(M. Bradford Anal. Biochem. 1976;72:248-54)。
- 3) 使用的偶联物是一种过氧化物酶偶联的抗兔 IgG 多克隆抗体 (Sigma # A-9169)。
- 4) 饱和缓冲液: Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 含有 1%牛血清白

蛋白(BSA, Sigma # A-7888)。

5) 稀释缓冲液: Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 含有 0.1% BSA 和 0.1 % Tween 20。

6) 洗涤溶液: Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 含有 0.1% Tween 20。

7) 显色溶液: 显色溶液由下列成分组成:

7a) 底物缓冲液: 0.01M 柠檬酸和 0.04M 柠檬酸三钠的溶液, 含有 0.33%  $H_2O_2$ , 终 pH 为 5.6, 和

7b) 发色团: OPD (邻苯二胺)片。1 片 OPD 溶解于 10 ml 底物缓冲液中。

8) 终止溶液: 4N  $H_2SO_4$ 。

方案:

该测定在于评价多克隆抗体直接对固定于微孔板的孔中的不同蛋白质的免疫反应性。

✓ 首先用 Dulbecco PBS 缓冲液 pH 7.4 制备几种包被溶液: 第一种含有 0.25  $\mu\text{g/ml}$  BNP(77-108), 第二种含有 0.25  $\mu\text{g/ml}$  proBNP(1-108), 第三种含有 0.25  $\mu\text{g/ml}$  BNP(1-76), 第四种含有 0.25  $\mu\text{g/ml}$  GST (背景噪音控制蛋白)。

✓ 分别向微孔板的孔中加入各 100  $\mu\text{l}$  这些溶液。

✓ 微孔板在 4°C 下温育过夜。

✓ 除去包被溶液后, 微孔板用含有 0.1% Tween 20 的 300  $\mu\text{l}$  Dulbecco PBS 缓冲液 pH 7.4 洗涤, 然后加入含有 1% BSA 的 250  $\mu\text{l}$  Dulbecco PBS 缓冲液 pH 7.4 饱和。

✓ 微孔板然后在 37°C 下温育 1 小时。

✓ 然后用洗涤溶液洗涤微孔板(3 次)。

✓ 向每孔中加入 100  $\mu\text{l}$  多克隆抗体溶液, 对于来自兔# 046 805 的多克隆血清, 预先稀释为 2 和 1  $\mu\text{g/ml}$ , 对于来自兔# L01235 的多克隆血清, 1/2500 和 1/5000 稀释。

✓ 反应介质在室温下温育 2 小时。

✓ 微孔板然后用 300  $\mu\text{l}$  洗涤溶液洗涤 3 次。

- ✓ 向微孔板的每个孔中加入 100  $\mu\text{l}$  在稀释缓冲液中 1/8000 稀释的过氧化物酶偶联的抗兔 IgG 多克隆抗体偶联物。
- ✓ 反应介质在室温下温育 1 小时。
- ✓ 微孔板然后用 300  $\mu\text{l}$  洗涤溶液洗涤(5 次)。向每孔中加入 100  $\mu\text{l}$  显色溶液。反应体系在室温下(18-24 $^{\circ}\text{C}$ )在暗处显色 20 分钟。
- ✓ 然后向每孔中加入 50  $\mu\text{l}$  终止溶液。
- ✓ 反应终止后, 利用分光光度计读取 490/620 nm 的光密度。

表 I: 兔# 046 805 和# L01235 的多克隆抗体对于 BNP(1-76)和 BNP(77-108)的百分交叉反应的测定结果

对于一种指定的抗-proBNP(1-108)抗体, 它对吸附的 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BNP(77-108)、对吸附的 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  proBNP(1-108)以及对吸附的 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GST 检测, 该抗体与 BNP(77-108)的百分交叉反应用下列公式计算:

$$\% = \frac{\text{OD}_{(\text{BNP}77-108)} - \text{OD}_{(\text{GST})}}{\text{OD}_{(\text{proBNP}1-108)} - \text{OD}_{(\text{GST})}} \times 100$$

对于一种指定的抗-proBNP(1-108)抗体, 它对吸附的 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BNP(1-76)、对吸附的 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  proBNP(1-108)以及对吸附的 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  GST 检测, 该抗体与 BNP(1-76)的百分交叉反应用下列公式计算:

$$\% = \frac{\text{OD}_{(\text{BNP}1-76)} - \text{OD}_{(\text{GST})}}{\text{OD}_{(\text{proBNP}1-108)} - \text{OD}_{(\text{GST})}} \times 100$$

	%交叉反应			
	多克隆血清 # 046 805 1 µg/ml	多克隆血清 # 046 805 2 µg/ml	多克隆血清 #L01235 1/5000	多克隆血清 #L01235 1/2500
BNP(77-108) 至 0.25 µg/ml	1.44%	2.13%	3.55%	4.3%
BNP(1-76) 至 0.25 µg/ml	1.00%	1.29%	0.21%	0.00%

结论：这些血清的多克隆抗体对 BNP(1-76)的交叉反应不到 2%，对 BNP(77-108)的不到 5%。利用实施例 4.b 所述的消耗方法能够消除与 BNP(77-108)的交叉反应性。然而，如实施例 19 和 20 所述，在对于 proBNP(1-108)的免疫酶促测定条件下，以及在患者中常见的 BNP(77-108)和 BNP(1-76)的浓度下，这些多克隆抗体能够以未消耗的形式使用，而不会出现交叉反应。

实施例 6：在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗之前及之后，来自兔# 046 805 和# 046 832 的多克隆血清可以识别的表位的鉴定

在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗之前及之后，来自兔# 046 805 和# 046 832 的多克隆血清用斑点法检测，以鉴定可被这些多克隆血清识别的表位。该方法由 Frank (Tetrahedron, 1992;48:9217-32)描述，能够在硝酸纤维素膜上快速合成大量序列预定的肽。使用的方案如 Molina 等人(Pept. Res., 1996;9:151-5)所述。在一张纸上产生直径约为 5 mm、含有胺化官能团的斑点，这些斑点作为合成肽的 C 端氨基酸的锚定点。通过连续添加活化的 Fmoc-氨基酸延伸肽链。氨基酸侧链用适当的化学基团封闭。所有肽都用 N-乙酰化的 N 端残基合成。在合成结束时，侧链通过三氟乙酸的作用脱保护。这种处理不会影响肽与纤维素支持体的结合，肽的反应性能够用比色测定评价。

在膜上合成的肽系列包括 32 种十五肽，这些肽含有一个 3 氨基酸残基的移位，代表 proBNP(1-108)的完整序列。

表 II: 包含 32 种十五肽的斑点膜，这些肽含有一个 3 氨基酸残基的移位，代表 proBNP(1-108)的完整序列。

序列	斑点数	序列	斑点数
HPLGSPGSASDLETS (SEQ ID No.23)	1	GVWKSREVATEGIRG (SEQ ID No.39)	17
GSPGSASDLETSGLQ (SEQ ID No.24)	2	KSREVATEGIRGHRK (SEQ ID No.40)	18
GSASDLETSGLQEQR (SEQ ID No.25)	3	EVATEGIRGHRKMVL (SEQ ID No.41)	19
SDLETSGLQEQRNHL (SEQ ID No.26)	4	TEGIRGHRKMVLYTL (SEQ ID No.42)	20
ETSGLQEQRNHLQGK (SEQ ID No.27)	5	IRGHRKMVLYTLRAP (SEQ ID No.43)	21
GLQEQRNHLQGKLSE (SEQ ID No.28)	6	HRKMVLYTLRAPRSP (SEQ ID No.44)	22
EQRNHLQGKLSELQV (SEQ ID No.29)	7	MVLYTLRAPRSPKMV (SEQ ID No.45)	23
NHLQGKLSELQVEQT (SEQ ID No.30)	8	YTLRAPRSPKMVQGS (SEQ ID No.46)	24
QGKLSELQVEQTSLE (SEQ ID No.31)	9	RAPRSPKMVQSGCF (SEQ ID No.47)	25
LSELQVEQTSLEPLQ (SEQ ID No.32)	10	RSPKMVQSGCFGRK (SEQ ID No.48)	26
LQVEQTSLEPLQESP (SEQ ID No.33)	11	KMVQSGCFGRKMDR (SEQ ID No.49)	27
EQTSLEPLQESPRPT (SEQ ID No.34)	12	QSGCFGRKMDRISS (SEQ ID No.50)	28
SLEPLQESPRPTGVW (SEQ ID No.35)	13	GCFGRKMDRISSSSG (SEQ ID No.51)	29
PLQESPRPTGVWKS (SEQ ID No.36)	14	GRKMDRISSSSGLGC (SEQ ID No.52)	30
ESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID No.37)	15	MDRISSSSGLGCKVL (SEQ ID No.53)	31
RPTGVWKSREVATEG (SEQ ID No.38)	16	ISSSSGLGCKVLRH (SEQ ID No.54)	32

在膜用添加 0.1% Tween 20、5% 封闭缓冲液 (Euromedex # SU-07-250) 和 5% 蔗糖的 30 ml TBS (Tris 缓冲盐溶液) 缓冲液 pH 7.0 饱和后, 检测稀释为 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 20 ml 兔多克隆血清的反应性 (在 37°C 和搅拌下温育 1 小时 30 分钟)。用添加 0.1% Tween 20 的 TBS 缓冲液 pH 7.0 洗涤后, 20 ml 碱性磷酸酶偶联的抗兔 IgG 偶联物 (Sigma # A-8025) 在室温和搅拌下温育 1 小时。最后, 用 30 ml 洗涤缓冲液进行最后一系列洗涤之后, 加入 30 ml 底物溶液 (30ml CBS (柠檬酸) 缓冲液, pH 7.0, 含有 120  $\mu\text{l}$  0.15M BCIP (5-溴-4-氟-3-吡啶基磷酸), 150  $\mu\text{l}$  1M  $\text{MgCl}_2$  和 180  $\mu\text{l}$  0.1M MTT (溴化噻唑基蓝四唑)), 使斑点显色。扫描该膜, 之后利用图像加工软件评价膜上斑点的强度 (相对强度单位)。背景噪音根据抗血清检测不到的斑点计算。对于消耗之前的来自兔 # 046 805 的多克隆血清, 其表位分析结果在图 6 中给出。多克隆血清检测到 5 种肽 (斑点 22-26), 这 5 种肽共同的序列是  $\text{R}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$ 。然而, 当在  $\text{R}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$  单位的 N 端位点处添加 RAP 单位时, 反应性显然提高。对于在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗之后的, 来自兔 # 046 805 的多克隆血清, 其表位分析结果在图 7 中给出。多克隆血清检测到 4 种肽 (斑点 22-25), 这 4 种肽的共同序列是  $\text{RAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$ 。与消耗之前的多克隆血清所见不同, 未见对单独的  $\text{R}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$  单位的反应性 (斑点 26)。这解释了在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗后, 多克隆血清不再检测 BNP(77-108) [提示  $\text{S}_{77}\text{P}$  单位对应于 BNP(77-108) 序列的前两个氨基酸]。结论是, 可被来自兔 # 046 805 的单特异性多克隆血清识别的表位是  $\text{RAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$ 。

使用来自兔 # 046 832 的多克隆血清获得完全相同的结果: 可被来自该兔的单特异性多克隆血清识别的表位也是  $\text{RAPR}_{76}\text{S}_{77}\text{P}$ 。

实施例 7: 通过 Ala-扫描法, 消耗之前及之后, 来自兔 # 046 805 和 # 046 832 的多克隆血清的最小表位的鉴定

在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗之前和之后, 来自兔 # 046 805 和 # 046 832 的多克隆血清用斑点法检测 (如实施例 6 所述), 以鉴定铰链区中的最小表位, 该表位使得多克隆血清只能特异地识别

**proBNP(1-108)**。合成一张膜，其含有 16 种十五肽，它们重复铰链肽的序列 **YTLRAPRSPKMVQGS**，并且含有一个氨基酸被丙氨酸残基(丙氨酸-扫描或“Ala-扫描”)或甘氨酸残基的邻居-邻居置换，该置换每次向右移位一个氨基酸残基(表 III)。在 **BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose** 树脂上消耗之前和之后，来自兔# 046 805 和# 046 832 的多克隆血清的 Ala-扫描分析结果在表 III 中列出。

表 III: 含有 16 种十五肽 YTLRAPRSPKMOVQGS 的斑点膜, 这些肽含有每种氨基酸被丙氨酸或甘氨酸残基的邻居-邻居置换。在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗之前和之后, 来自兔# 046 805 和# 046 832 的多克隆血清的反应性

SEQ ID	序列	斑点数	未消耗的兔 # 046 805 多克隆血清 的反应性 (相对强 度单位)	消耗的兔 # 046 805 多克隆血清 的反应性 (相对强 度单位)	未消耗的兔 # 046 832 多克隆血清 的反应性 (相对强 度单位)	消耗的兔 # 046 832 多克隆血清 的反应性 (相对强 度单位)
SEQ ID No. 46	YTLRAPRS PKMOVQGS	716	84	69	151	132
SEQ ID No. 55	ATLRAPRSP KMVQGS	717	90	68	148	130
SEQ ID No. 56	YALRAPRSP KMVQGS	718	101	71	154	130
SEQ ID No. 57	YTARAPRSP KMVQGS	719	108	77	152	133
SEQ ID No. 58	YTLAAPRSP KMVQGS	720	101	<u>39</u>	148	<u>106</u>
SEQ ID No. 59	YTLRGPRSP KMVQGS	721	93	<u>39</u>	156	132
SEQ ID No. 60	YTLRAARSP KMVQGS	722	103	96	137	<u>48</u>
SEQ ID No. 61	YTLRAPASP KMVQGS	723	<u>50</u>	<u>23</u>	150	<u>116</u>
SEQ ID No. 62	YTLRAPRAP KMVQGS	724	<u>58</u>	<u>44</u>	148	<u>113</u>
SEQ ID No. 63	YTLRAPRSA KMVQGS	725	<u>74</u>	<u>41</u>	<u>85</u>	<u>67</u>
SEQ ID No. 64	YTLRAPRSP AMVQGS	726	138	118	157	148
SEQ ID No. 65	YTLRAPRSP KAVQGS	727	98	77	150	130

SEQ ID No. 66	YTLRAPRSP KMAQGS	728	100	68	138	130
SEQ ID No. 67	YTLRAPRSP KMOVGS	729	95	71	142	133
SEQ ID No. 68	YTLRAPRSP KMOVAS	730	107	78	143	134
SEQ ID No. 69	YTLRAPRSP KMOVGA	731	112	68	153	132

**NB:** 置换初始氨基酸的丙氨酸或甘氨酸残基用下划线标出(A和G)。

在消耗之前的来自兔# 046 805 的多克隆血清对表位的识别中必需的氨基酸是 R<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P，而来自兔# 046 805 的多克隆血清在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗之后，除了 R<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P 单位之外，RA 单位也有贡献。对于消耗前的来自兔# 046 832 的多克隆血清，只有脯氨酸 P<sub>78</sub> 有贡献，而来自兔# 046 832 的多克隆血清在 BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sepharose 树脂上消耗之后，有贡献的单位是 R-PR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P。因此这些结果表明，在来自兔# 046 805 和# 046 832 的多克隆抗体对 proBNP(1-108)的特异识别中，必需的最小表位是 RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P。

**实施例 8:** 通过 Ala-扫描法，来自兔#L01235 的多克隆血清的最小表位的鉴定

从开始(不需要消耗)即对 proBNP(1-108)特异的来自兔#L01235 的多克隆血清用斑点法检测(如实施例 6 所述)，以鉴定铰链肽中的最小表位，该表位使多克隆血清只特异地识别 proBNP(1-108)。使用的膜如实施例 7 所述。来自兔#L01235 的多克隆血清的 Ala-扫描分析结果在表 IV 中给出。

表 IV: 含有 16 种十五肽 YTLRAPRSPKMOVQS 的斑点膜, 这些肽含有每种氨基酸被丙氨酸或甘氨酸残基的邻居-邻居置换。来自兔 #L01235 的多克隆血清的反应性。

SEQ ID	序列	来自兔#L01235 的多克隆血清的反应性 (相对强度单位)
SEQ ID No.46	YTLRAPRSPKMOVQS	94
SEQ ID No.55	ATLRAPRSPKMOVQS	91
SEQ ID No.56	YALRAPRSPKMOVQS	84
SEQ ID No.57	YTARAPRSPKMOVQS	92
SEQ ID No.58	YTLAAPRSPKMOVQS	<u>66</u>
SEQ ID No.59	YTLRGPRSPKMOVQS	71
SEQ ID No.60	YTLRAARSPKMOVQS	<u>67</u>
SEQ ID No.61	YTLRAPASPKMOVQS	71
SEQ ID No.62	YTLRAPRAPKMOVQS	<u>47</u>
SEQ ID No.63	YTLRAPRSAKMOVQS	<u>53</u>
SEQ ID No.64	YTLRAPRSPAMVQS	102
SEQ ID No.65	YTLRAPRSPKAVQS	73
SEQ ID No.66	YTLRAPRSPKMAQS	70
SEQ ID No.67	YTLRAPRSPKMVAGS	70
SEQ ID No.68	YTLRAPRSPKMOVQS	83
SEQ ID No.69	YTLRAPRSPKMOVQA	80

NB: 置换初始氨基酸的丙氨酸或甘氨酸残基用下划线标出(A和G)。

对于来自兔# 046 805 和# 046 832 的多克隆血清(实施例 7), 这些结果表明, 在来自兔#L01235 的多克隆抗体对 proBNP(1-108)的特异识别中, 必需的最小表位是 RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P。

#### 实施例 9: 用 proBNP(1-108)重组蛋白对小鼠的免疫

利用本领域技术人员公知的常规技术, 用实施例 4.b 所述的重组 proBNP(1-108)免疫 BALB/c 小鼠(6 周龄, 雌性)。在第一次注射时, 制备 1 ml proBNP(1-108)与 1 ml 弗氏完全佐剂(Sigma #F-5881)的乳液, 对每只小鼠皮下注射 300  $\mu$ l 这种乳液(即 100  $\mu$ g 蛋白质)。间隔 15 天, 通过腹膜内注射 300  $\mu$ l proBNP(1-108) (即 100  $\mu$ g 蛋白质)与弗氏不完全佐剂(Sigma #F-5506)的乳液, 给予两次加强。第二次加强 15 天后, 与以前相同地给予第三次加强, 但是采用皮下注射。最后, 在最后一次加强 15 天后, 采集小鼠的血样, 通过斑点技术分析免疫应答。小鼠 12 的免疫应答证明特别有利于进行剩余的研究。

#### 实施例 10: proBNP(1-108)序列上可被来自小鼠 12 的多克隆抗体识别的表位的鉴定

用来鉴定 proBNP(1-108)序列上可被来自小鼠 12 的多克隆抗体识别的表位的斑点法在实施例 6 中描述。

在膜上合成的肽系列包括 94 种十五肽, 每一种均改变一个氨基酸残基, 代表 proBNP(1-108)的完整序列。如实施例 6 所述, 在该膜上检测 1/500 稀释的来自小鼠 12 的多克隆血清的反应性。在扫描该膜后, 利用图像加工软件评价膜上斑点的强度(相对强度单位)。背景噪音根据抗血清不能检测到的斑点计算, 为 30 个相对强度单位。

位于 proBNP(1-108)序列 N 端位置的三个区因此可被来自小鼠 12 的抗血清的抗体特别好地检测: 序列 H<sub>1</sub>PLGSPGSASDLETS<sub>15</sub> (SEQ ID No. 23) (斑点 1-12), 序列 L<sub>17</sub>QEQRNHLQGK<sub>27</sub> (SEQ ID No. 123) (斑点 17-27)和序列 L<sub>38</sub>EPLQESPRPTG<sub>49</sub> (SEQ ID No. 124) (斑点 38-49)。

令人吃惊的是, 来自小鼠 12 的抗血清也含有能够识别其中肽序列

含有 R<sub>APR</sub><sub>76</sub>S<sub>77</sub>P 单位的斑点的抗体：斑点 64-68。这些斑点的肽序列在表 V 中描述。

表 V：利用斑点技术，可被来自小鼠 12 的抗血清识别的铰链区的表位

斑点数	检测到的斑点的肽序列	反应性，相对强度单位	斑点数	检测到的斑点的肽序列	反应性，相对强度单位
1	HPLGSPGSASDLETS (SEQ ID No.23)	177.0	38	LEPLQESPRPTGVWK (SEQ ID No.88)	177.0
2	PLGSPGSASDLETSG (SEQ ID No.70)	170.0	39	EPLQESPRPTGVWKS (SEQ ID No.89)	188.0
3	LGSPGSASDLETSGL (SEQ ID No.71)	145.7	40	PLQESPRPTGVWKS (SEQ ID No.90)	109.0
4	GSPGSASDLETSGLQ (SEQ ID No.24)	166.3	41	LQESPRPTGVWKSRE (SEQ ID No.91)	166.0
5	SPGSASDLETSGLQE (SEQ ID No.72)	185.0	42	QESPRPTGVWKSREV (SEQ ID No.92)	164.0
6	PGSASDLETSGLQEQ (SEQ ID No.73)	169.3	43	ESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID No.93)	147.0
7	GSASDLETSGLQEQR (SEQ ID No.25)	155.2	44	ESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID No.93)	149.0
8	SASDLETSGLQEQRN (SEQ ID No.74)	176.5	45	SPRPTGVWKSREVAT (SEQ ID No.94)	175.0
9	ASDLETSGLQEQRNH (SEQ ID No.75)	108.0	46	PRPTGVWKSREVATE (SEQ ID No.95)	186.0
10	SDLETSGLQEQRNHL (SEQ ID No.76)	118.3	47	RPTGVWKSREVATEG (SEQ ID No.16)	171.0
11	DLETSGLQEQRNHLQ (SEQ ID No.77)	121.0	48	PTGVWKSREVATEGI (SEQ ID No.96)	148.0
12	LETSGLQEQRNHLQG (SEQ ID No.78)	101.0	49	TGVWKSREVATEGIR (SEQ ID No.97)	72.0
17	LQEQRNHLQGLSEL (SEQ ID No.79)	99.0	61	IRGHRKMVLYTLRAP (SEQ ID No.98)	105.8

18	QEQRNHLQGKLSLEQ (SEQ ID No.80)	179.8	62	RGHRKMVLYTLRAPR (SEQ ID No.99)	97.7
19	EQRNHLQGKLSLEQV (SEQ ID No.29)	189.6	63	GHRKMVLYTLRAPRS (SEQ ID No.100)	95.9
20	QRNHLQGKLSLEQVE (SEQ ID No.81)	211.8	64	HRKMVLYTLRAPRSP (SEQ ID No.53)	92.8
21	RNHLQGKLSLEQVEQ (SEQ ID No.82)	219.0	65	RKMVLYTLRAPRSPK (SEQ ID No.101)	48.0
22	NHLQGKLSLEQVEQT (SEQ ID No.30)	213.3	66	KMVLYTLRAPRSPKM (SEQ ID No.102)	48.0
23	HLQGKLSLEQVEQTS (SEQ ID No.83)	202.6	67	MVLYTLRAPRSPKMOV (SEQ ID No.45)	42.1
24	LQGKLSLEQVEQTSL (SEQ ID No.84)	189.5	68	VLYTLRAPRSPKMOVQ (SEQ ID No.103)	38.4
25	QGKLSLEQVEQTSLE (SEQ ID No.85)	187.3			
26	GKLSLEQVEQTSLEP (SEQ ID No.86)	36.6			
27	KLSELQVEQTSLEPL (SEQ ID No.87)	69.9			

### 实施例 11: 特异识别 proBNP(1-108), 基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)的单克隆抗体的产生

为了生产单克隆抗体而选择的小鼠(5周龄 BALB/c, 雌性)按照下列方案用与 KLH (匙孔 血蓝蛋白)偶联的肽 SEQ ID No. 16 C-YTLRAPRSPKMOVQSG-NH<sub>2</sub> (C13P30)免疫: 皮下注射用弗氏完全佐剂体积-体积稀释的 100 μg KLH 偶联的肽。以三周的间隔, 通过皮下注射用弗氏不完全佐剂体积-体积稀释的 100 μg KLH-偶联的肽, 给予四次加强。

在进行淋巴细胞融合三天前, 按照下列方案对小鼠进行超免疫: 免疫原的总剂量, 在此情况下, 为 100 μg 与 KLH 偶联的肽

C-YTLRAPRSPKMVQGS-NH<sub>2</sub>，在无菌 PBS 缓冲液中，分成四次注射。第一次和第二次注射均相当于总剂量的 1/10。以 45 分钟的间隔，在不同部位皮下注射。第三次注射相当于总剂量的 2/10，在第二次注射 45 分钟后皮下进行。在第三次注射 30 分钟后，腹膜内注射 100 μl 1mg/ml 异丙嗪在无菌 PBS 中的溶液(2.5% 非那根，Laboratoires Medeva Parma)，以预防任何过敏性休克。最后，在 15 分钟后，腹膜内给予最后一次注射，相当于总剂量的 6/10。

淋巴细胞杂交按照 Köhler 和 Milstein (Nature,1975;256:495-97)所述的方法进行。其中使用从小鼠脾脏中提取的淋巴细胞，和预先置于 RPMI 1640 培养基(Bio-Whittaker #BE12-167F)中培养的骨髓瘤细胞(P3-X63-Ag8.653)，该培养基中补充了 L-谷氨酰胺、青霉素和链霉素的混合物(Sigma # G-6784)，添加了预先去补体的 10% 胎牛血清(Bio-Whittaker # BE02701 E)和 8-氮杂鸟嘌呤(Sigma # A-8526)。预先置于 RPMI-1640 培养基(Bio-Whittaker # BE12-167F)中的淋巴细胞和骨髓瘤细胞以每个骨髓瘤细胞 5 个淋巴细胞的比例混合，该培养基中添加 L-谷氨酰胺、青霉素和链霉素的混合物(Sigma # G-6784)，而不添加胎牛血清。该混合物在室温下以 900 转/分离心 7 分钟后，加入细胞沉淀的重悬液，1ml Hybri-Max<sup>®</sup>聚乙二醇(Sigma # P-7777)。在 37℃ 水浴中温育 1 分钟后，细胞在室温下以 1000 转/分离心 1 分 30 秒。最后，在 37℃ 水浴中温育 2 分钟后，重悬浮沉淀，以每 5 秒钟 100 μl 的速度加入 6 ml 预先置于 37℃ 的添加了 L-谷氨酰胺、青霉素和链霉素的混合物(Sigma # G-6784)的 RPMI 1640 培养基(Bio-Whittaker # BE12-167F)，同时加入 9 ml 相同的培养基。在室温下以 900 转/分离心 10 分钟，并除去上清液后，沉淀吸收 RPMI 1640 培养基(Bio-Whittaker # BE12-167F)，其中添加 L-谷氨酰胺、青霉素和链霉素的混合物(Sigma # G-6784)，添加 15% 预先去补体的胎牛血清(Bio-Whittaker # BE02701E)，以及 HAT (次黄嘌呤，氨基喋呤，胸苷，Sigma # H-0262)，以便每孔分配 100 μl，120 000 个细胞。在向预先加入鼠巨噬细胞的 96 孔培养板的孔中各分配 100 μl 溶液。然后将培养板置于 CO<sub>2</sub> 孵箱中。在淋巴细胞杂交 15 天后，

估计融合板中存在的克隆数，表示为杂交瘤发展的百分数。

通过 ELISA，在 proBNP(1-108)、BNP(1-76)、BNP(77-108)和含有序列 R<sub>APR</sub><sub>76</sub>S<sub>77</sub>P 的一种肽(C13P30)上进行杂交瘤的筛选。只选择分泌能够检测 proBNP(1-108)和含有序列 R<sub>APR</sub><sub>76</sub>S<sub>77</sub>P 的 C13P30 肽而基本上不识别 BNP(1-76)或 BNP(77-108)的抗体的杂交瘤。选择的杂交瘤保持培养，通过有限稀释克隆。这样克隆的杂交瘤然后能够用来在腹水中生产单克隆抗体。

这样，本发明人生产了一种鼠杂交瘤，克隆 3D4，它分泌一种同型 IgG<sub>1</sub>κ 免疫球蛋白，它具有根据本发明的抗体的特征。该杂交瘤在 2003 年 7 月 31 日保藏于 CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes [国立微生物保藏中心]，巴斯德研究所，25 rue du Docteur Roux, 75 724 Paris, Cedex 15, 法国)，注册号为 CNCM I-3073。

因此，本发明的主题也包括保藏于 CNCM 的保藏号为 CNCM I-3073 的杂交瘤 3D4，以及它分泌的单克隆抗体。

**实施例 12: 通过 ELISA 证实杂交瘤 3D4 产生的抗体的特异性**

**材料:**

1) 固相: 平底 Maxisorp 微孔板, Nunc (丹麦)。

2) BNP(77-108)来自 Sigma (# B-5900), 而 proBNP(1-108)和 BNP(1-76)以重组蛋白的形式产生。这些蛋白质溶液的浓度通过 Bradford 法测定, 用于蛋白质比色测定(M. Bradford Anal. Biochem. 1976;72:248-54)。

3) 使用的偶联物是一种过氧化物酶偶联的驴抗小鼠 IgG 多克隆抗体(Jackson Immunoresearch # 715-035-150)。

4) 饱和缓冲液: Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 含有 1%牛血清白蛋白(BSA, Sigma # A-7888)。

5) 稀释缓冲液: Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 含有 0.1% BSA 和 0.1 % Tween 20。

6) 洗涤溶液: Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 含有 0.1% Tween 20。

7) 显色溶液: 显色溶液由下列成分组成:

7a) 底物缓冲液: 0.01M 柠檬酸和 0.04M 柠檬酸三钠的溶液, 含有 0.33%  $H_2O_2$ , 终 pH 为 5.6, 和

7b) 发色团: OPD (邻苯二胺)片。1 片 OPD 溶解于 10 ml 底物缓冲液中。

8) 终止溶液: 4N  $H_2SO_4$ 。

方案:

该测定在于评价杂交瘤 3D4 的培养上清液直接对固定于微量滴定板的孔中的不同蛋白质的免疫反应性。

✓ 首先用 Dulbecco PBS 缓冲液 pH 7.4 制备几种包被溶液: 第一种含有 1  $\mu\text{g/ml}$  BNP(77-108), 第二种含有 1  $\mu\text{g/ml}$  proBNP(1-108), 第三种含有 1  $\mu\text{g/ml}$  BNP(1-76)。

✓ 分别向微孔板的孔中加入各 100  $\mu\text{l}$  这些溶液。

✓ 微孔板在 4 $^{\circ}\text{C}$  下温育过夜。

✓ 除去包被溶液后, 微孔板用含有 0.1% Tween 20 的 Dulbecco PBS 缓冲液 pH 7.4 洗涤, 然后加入含有 1% BSA 的 250  $\mu\text{l}$  Dulbecco PBS 缓冲液 pH 7.4 饱和。

✓ 微孔板然后在 37 $^{\circ}\text{C}$  下温育 1 小时。

✓ 然后用 300  $\mu\text{l}$  洗涤溶液洗涤微孔板(3 次)。

✓ 向每孔中加入 100  $\mu\text{l}$  预先 1/2 稀释的杂交瘤 3D4 上清液。

✓ 反应介质在室温下温育 2 小时。

✓ 微孔板然后用 300  $\mu\text{l}$  洗涤溶液洗涤 3 次。

✓ 向微孔板的每个孔中加入 100  $\mu\text{l}$  偶联物, 用稀释缓冲液 1/2000 稀释的过氧化物酶偶联的抗小鼠 IgG 多克隆抗体

✓ 反应介质在室温下温育 1 小时。

✓ 微孔板然后用 300  $\mu\text{l}$  洗涤溶液洗涤(5 次)。向每孔中加入 100  $\mu\text{l}$  显色溶液。反应体系在室温下(18-24 $^{\circ}\text{C}$ )在暗处显色 20 分钟。

✓ 然后向每孔中加入 50  $\mu\text{l}$  终止溶液。

✓ 反应终止后, 用分光光度计读取 490/620 nm 的光密度。

图 8 显示该测定的结果: 杂交瘤 3D4 上清液产生的抗体只能够检测 proBNP(1-108)和 C13P30 免疫肽, 未获得对 BNP(1-76)或者对 BNP(77-108)的反应性。这些结果证实了杂交瘤 3D4 产生的抗体对 proBNP(1-108)的特异性, 不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)。

因此, 来源于杂交瘤 3D4 的根据本发明的抗体显然是一种特异地识别 proBNP(1-108)的抗体, 基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)。

**实施例 13: 通过 Western 印迹证实杂交瘤 3D4 产生的抗体的特异性**

材料:

- 1) 常规 SDS-PAGE 电泳装置
- 2) 积层胶: 5%丙烯酰胺
- 3) 分离胶: 16%丙烯酰胺
- 4) 阳极缓冲液: 0.2M Tris, pH 8.9
- 5) 阴极缓冲液: 0.1 M Tris-tricine; 0.1% SDS
- 6) 样品缓冲液: 0.5M Tris, pH 6.8; 25%甘油; 2% SDS; 14.4 mM  $\beta$ -巯基乙醇; 0.1%溴酚蓝。
- 7) 电泳转移装置。
- 8) 转移缓冲液: 25 mM Tris 碱; 190 mM 甘氨酸; 20%甲醇; 0.05% SDS。
- 9) BNP(77-108)来自 Sigma (# B-5900), 而 proBNP(1-108)-GST、BNP(1-76)-GST 和 GST (作为阴性对照)以重组蛋白的形式产生。这些蛋白质溶液的浓度通过 Bradford 法测定, 用于蛋白质比色测定(M. Bradford Anal. Biochem. 1976;72:248-54)。
- 10) 使用的偶联物是一种过氧化物酶-偶联的驴抗小鼠 IgG 多克隆抗体(Jackson Immunoresearch # 715-035-150)。
- 11) ECL 试剂盒用于通过 Western-blotting 检测 (Amersham Biosciences # RPN2106)。

方案:

该测定的实施包括三个主要步骤: 不同蛋白质在 16%丙烯酰胺凝胶

中电泳迁移, 然后这些蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 最后 Western 印迹。

✓ 用样品缓冲液制备多种溶液, 终体积为 35  $\mu$ l: 第一种含有 1  $\mu$ g proBNP(1-108)-GST, 第二种含有 1  $\mu$ g GST, 第三种含有 1  $\mu$ g BNP(1-76)-GST, 第四种含有 1  $\mu$ g BNP(77-108)。

✓ 每种溶液都在 100 $^{\circ}$ C 水浴中温育 5 分钟, 然后加到凝胶的孔中。在 120V 恒定电压下通过丙烯酰胺凝胶迁移 1 小时 30 分。图 9 是获得的丙烯酰胺凝胶的一张照片。加样的蛋白质用考马斯蓝染色。

✓ 迁移后, 在 120 mA 下将凝胶中的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上 1 小时。

✓ 硝酸纤维素膜然后用 PBS + 0.1% Tween 洗涤, 在室温下在 PBS 缓冲液 + 0.1% Tween + 2% 脱脂奶中饱和 30 分钟。

✓ 用 PBS 缓冲液 + 0.1% Tween 洗涤 3 次后, 在搅拌下, 膜与 5 ml 杂交瘤 3D4 上清液 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。

✓ 用 PBS 缓冲液 + 0.1% Tween 洗涤 3 次后, 在搅拌下, 膜与 10 ml 用 PBS 缓冲液 + 0.1% Tween + 2% 脱脂奶 1/2000 稀释的过氧化物酶偶联的抗小鼠 IgG 偶联物室温温育 1 小时。

✓ 用 PBS 缓冲液 + 0.1% Tween 洗涤 3 次后, 膜浸泡于 ECL 显色试剂中, 之后暴露于胶片 4 分钟。

图 10 是获得的照片的扫描图像, 如该图所示, 杂交瘤 3D4 上清液产生的抗体只能够检测对应于 proBNP(1-108)的带。杂交瘤 3D4 的抗体不能检测 BNP(1-76)、BNP(77-108)以及 GST。这些结果也证实了杂交瘤 3D4 产生的抗体对 proBNP(1-108)的特异性。

因此, 来源于杂交瘤 3D4 的根据本发明的抗体显然是一种特异地识别 proBNP(1-108)的抗体, 基本上不识别 BNP(1-76)和 BNP(77-108)。

**实施例 14: 通过斑点法, 可被杂交瘤 3D4 产生的抗体识别的表位的鉴定**

为了鉴定可被杂交瘤 3D4 抗体识别的表位, 通过斑点法(如实施例

6 所述)检测杂交瘤 3D4 的上清液。获得的结果表明, 3D4 抗体可有效识别含有 R<sub>APR</sub><sub>76</sub>S<sub>77</sub>P 单位的肽序列。

这些结果与 ELISA (实施例 12)和 Western 印迹(实施例 13)获得的结果一致, 证实了 3D4 抗体对于 proBNP(1-108)的特异性。

#### 实施例 15: proBNP(1-108)的免疫放射测定

材料:

- 1) 固相: 可拆孔的平底 Maxisorp 微孔板, Nunc (丹麦)。
- 2) 使用的捕获抗体是从未消耗的兔# 046 805 血清中获得的多克隆抗体。
- 3) 使用的偶联物是用 I<sup>125</sup> 标记的一种抗 BNP(77-108)抗体(抗-BN: -I<sup>125</sup>)。它是 Shionogi 公司所售的 Shionoria BNP 试剂盒的一种示踪抗体。
- 4) 饱和缓冲液: Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 含有 1%牛血清白蛋白(BSA, Sigma # A-7888)。
- 5) 稀释缓冲液: Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 含有 0.1% BSA 和 0.1 % Tween 20 (Sigma, # P-1379),
- 6) 洗涤缓冲液: Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 含有 0.1% Tween 20。
- 7) proBNP(1-108)标准: 形式为重组蛋白的产物。

方案:

采用的测定的原理基于夹心放射免疫测定法, 在可拆孔的平底微孔板中进行。这是一种一步测定法, 其中依次加入样品(或 proBNP(1-108)标准溶液)和示踪剂, 中间不必洗涤。

✓ 来自兔# 046 805 的多克隆抗体用 Dulbecco PBS pH 7.4 缓冲液稀释为 40 µg/ml, 首先用该抗体制备一种包被溶液。向微孔板的每个孔中加入 300 µl 该溶液。

✓ 微孔板在 4°C 下温育过夜。

✓ 除去包被溶液后, 微孔板用 300 µl 含有 0.1% Tween 20 的

Dulbecco PBS 缓冲液 pH 7.4 洗涤, 然后加入 300  $\mu$ l 含有 1% BSA 的 Dulbecco PBS 缓冲液 pH 7.4 饱和。

✓ 微孔板然后在 37°C 下温育 1 小时。

✓ 微孔板然后用 300  $\mu$ l 洗涤溶液(Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 添加 0.1% Tween 20)洗涤(3 次)。

✓ 向每孔中加入 100  $\mu$ l 标准 proBNP(1-108)溶液、血清或血浆。如果存在 proBNP(1-108), 它将结合固相上保留的捕获抗体。

✓ 向每孔中加入 200  $\mu$ l 即用的抗-BNP-I<sup>125</sup> 示踪溶液(来自 Shionogi Shionoria BNP 试剂盒)。

✓ 反应介质在 4°C 下温育过夜(18-22 小时)。

✓ 次日, 微孔板用 300  $\mu$ l 洗涤溶液洗涤(3 次)。在最后一次洗涤时, 并且在吸出洗涤溶液后, 将每个孔的内容物转移到一个预先确定的试管中。

✓ 用  $\gamma$ 计数器测量每孔中存在的放射性, 该放射性与结合的示踪剂的含量成比例, 因此与标本中存在的 proBNP(1-108)的含量成比例。

图 11 显示使用 proBNP(1-108)标准范围获得的结果。

#### 实施例 16: 人标本的测定结果

14 个来自正常个体的标本和 15 个来自心力衰竭患者的标本利用实施例 15 所述的根据本发明的 proBNP(1-108) IRMA 测定法和 Roche 公司所售的 BNP(1-76)测定法检测, 并且在 Elecsys<sup>®</sup>自动化装置上进行。血样均采集到含有 EDTA 的试管中。图 12 显示利用根据本发明的 proBNP(1-108) IRMA 测定法对这些标本进行的检测的结果, 单位为 cpm (每分钟的计数)。对心力衰竭患者的标本获得的结果显著高于正常个体标本的结果。这些结果证明心力衰竭患者的标本中存在循环 proBNP(1-108), 并且第一次证明了血清 proBNP(1-108)是预测心力衰竭的一种标志物。图 13 显示对来自 14 名心力衰竭患者的标本利用根据本发明的 proBNP(1-108) IRMA 测定法测定的 proBNP(1-108)浓度(pg/ml)与在 Elecsys<sup>®</sup>自动装置上通过 Roche 测定获得的 BNP(1-76)浓度(pg/ml)

之间的相关性。观察到的相关性是显著的，系数  $R^2 = 0.85$ 。

**实施例 17: 来自兔# 046 805 的多克隆抗体与生物素的偶联**

该偶联方法使用生物素的一种 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)衍生物，它可以与 IgG 的伯胺反应，形成一个酰胺键。

通过将生物素溶解于二甲基甲酰胺中制备(+)-生物素 N-琥珀酰亚胺酯(Fluka # 14405)的 100 mM 溶液。生物素化在玻璃摇瓶中进行。预先纯化但是未消耗的 500  $\mu$ g 来自兔# 046 805 的多克隆抗体置于含有 17  $\mu$ l 100 mM 生物素溶液的摇瓶中(生物素/抗体摩尔比为 500)。反应在 Dulbecco PBS 缓冲液 pH 7.4 中进行。反应混合物在缓慢搅拌下室温温育 1 小时 30 分钟。偶联后，加入一定体积的 2M 甘氨酸缓冲液灭活生物素。混合物在缓慢搅拌下室温温育 10 分钟。最后，混合物在 4°C 下对 Dulbecco PBS 缓冲液 pH 7.4 透析过夜。次日，以 0.02% 的终浓度加入叠氮钠溶液。将偶联物贮存于 4°C 下。

**实施例 18: proBNP(1-108)的免疫酶测定**

也建立一种根据本发明的免疫酶测定。

材料:

- 1) 固相: 平底 Maxisorp 微孔板, Nunc (丹麦)。
- 2) 使用的捕获抗体是 Strategic Biosolution 公司所售的一种多克隆抗 BNP(77-108)抗体(# B9105RA00-A0)。
- 3) 使用的偶联物是按照实施例 17 所述的方法与生物素偶联的未消耗的来自兔# 046 805 的多克隆抗体。
- 4) 链霉抗生物素-过氧化物酶偶联物(Amersham Pharmacia Biotech # RPN1231V)。
- 5) 饱和缓冲液: Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 含有 1% 牛血清白蛋白(BSA, Sigma # A-7888)。
- 6) 稀释缓冲液: Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 含有 0.1% BSA 和 0.1 % Tween 20。

7) 洗涤溶液: Dulbecco PBS 缓冲液, pH 7.4, 含有 0.1% Tween 20.

8) proBNP(1-108)标准: 重组蛋白。

9) 显色溶液: 显色溶液由下列成分组成:

9a) 底物缓冲液: 0.01M 柠檬酸和 0.04M 柠檬酸三钠的溶液, 含有 0.33%  $H_2O_2$ , 终 pH 为 5.6, 和

9b) 发色团: OPD (邻苯二胺)片。1 片 OPD 溶解于 10 ml 底物缓冲液中。

10) 终止溶液: 4N  $H_2SO_4$ 。

方案:

该测定的原理基于在平底微孔板中进行的夹心型免疫酶测定法。这是一种两步测定法, 其中标本(或标准溶液)首先与捕获抗体温育, 然后在温育和洗涤后加入检测抗体。

✓ 首先用在 Dulbecco PBS pH 7.4 缓冲液中稀释为 10  $\mu\text{g/ml}$  的抗 BNP(77-108)多克隆抗体制备一种包被溶液。向微孔板的每个孔中加入 100  $\mu\text{l}$  该溶液。

✓ 微孔板在 4 $^{\circ}\text{C}$  下温育过夜。

✓ 除去包被溶液后, 微孔板用 300  $\mu\text{l}$  含有 0.1% Tween 20 的 Dulbecco PBS 缓冲液 pH 7.4 洗涤, 然后加入 250  $\mu\text{l}$  含有 1% BSA 的 Dulbecco PBS 缓冲液 pH 7.4 饱和。

✓ 微孔板然后在 37 $^{\circ}\text{C}$  下温育 1 小时。

✓ 微孔板然后用洗涤溶液洗涤(3 次)。

✓ 向每孔中加入 100  $\mu\text{l}$  标准 proBNP(1-108)溶液、血清或血浆。

如果存在 proBNP(1-108), 它将结合固相上保留的捕获抗体。

✓ 反应介质在室温下温育 2 小时。

✓ 微孔板然后用 300  $\mu\text{l}$  洗涤溶液洗涤(5 次)。

✓ 向微孔板的每孔中加入 100  $\mu\text{l}$  生物素化的来自兔# 046 805 的多克隆抗体(浓缩为 6  $\mu\text{g/ml}$ )。

✓ 反应介质在室温下温育 2 小时。

✓ 微孔板然后用 300  $\mu\text{l}$  洗涤溶液洗涤(5 次)。

✓ 最后，向微孔板的每孔中加入 1/1000 稀释的 100  $\mu\text{l}$  链霉抗生物素-POD 偶联物。

✓ 反应介质在室温下温育 1 小时 30 分钟。

✓ 微孔板然后用 300  $\mu\text{l}$  洗涤溶液洗涤(5次)。向每孔中加入 100  $\mu\text{l}$  显色溶液。反应体系在室温下(18-24 $^{\circ}\text{C}$ )在暗处显色 20 分钟。

✓ 然后向每孔中加入 50  $\mu\text{l}$  终止溶液。

✓ 反应终止后，用分光光度计读取 490/620 nm 的光密度。

图 14 显示使用标准 proBNP(1-108)范围获得的结果。

**实施例 19:** 未消耗的、生物素偶联的、来自# 046 805 的多克隆抗体对于 BNP(1-76)和 BNP(77-108)的交叉反应的评价，该抗体在 proBNP (1-108) ELISA 测定中与抗 BNP(77-108)多克隆抗体一起夹心使用。

未消耗的、生物素化的根据本发明的抗-proBNP(1-108)抗体(兔# 046 805)对于 BNP(1-76)和 BNP(77-108)的交叉反应，通过实施例 18 所述的 proBNP(1-108) ELISA 测定评价。5ng/ml-100ng/ml 的浓度范围用 proBNP(1-108)、BNP(1-76)和 BNP(77-108)制备，通过实施例 18 所述的 proBNP(1-108) ELISA 测定法测定。图 15 给出了每种蛋白质随浓度变化的 490nm 光密度变化的结果。未见对于 BNP(1-76)或 BNP(77-108)的交叉反应：获得的信号相当于背景噪音，无论测定的浓度如何。在患者中常见的 BNP(1-76)和 BNP(77-108)浓度下(最高浓度的数量级为 1 ng/ml)，来自兔# 046 805 的多克隆抗体能够以未消耗的形式使用，而不导致产生交叉反应。

**实施例 20:** 未消耗的、生物素偶联的、来自兔# 046 805 的多克隆抗体对于 BNP(1-76)和 BNP(77-108)的交叉反应的评价，该抗体在 proBNP (1-108) ELISA 测定中与抗 NT-proBNP(1-29)多克隆抗体一起夹心使用。

未消耗的、生物素化的、来自兔# 046 805 的多克隆抗体对于 BNP(1-76)和 BNP(77-108)的交叉反应，通过一种 proBNP(1-108) ELISA 测定评价，该测定使用实施例 18 所述的方案和试剂，不同之处是在这

种情况下，用一种抗-NT-proBNP(1-29)多克隆抗体代替抗BNP(77-108)多克隆抗体。

抗-NT-proBNP(1-29)多克隆抗体根据实施例3所述的方案生产，不同之处在于用作免疫原的肽是与KLH偶联的肽NT-proBNP(1-29)。5 ng/ml-100 ng/ml的浓度范围用proBNP(1-108)、BNP(1-76)和BNP(77-108)制备，通过proBNP(1-108) ELISA测定法测定。图16给出了每种蛋白质随浓度变化的490nm光密度变化的结果。根据本发明的来自兔#046805的多克隆抗体未见对于BNP(1-76)或BNP(77-108)的交叉反应；获得的信号相当于背景噪音，无论测定的浓度如何。在患者中常见的BNP(1-76)和BNP(77-108)浓度下(数量级为1 ng/ml)，来自兔#046805的多克隆抗体能够以未消耗的形式使用，而不会产生交叉反应。

总之，根据以上公开的整个公开内容显然获知，本发明能够发现一种位于人proBNP(108)铰链区的新表位R<sub>APR</sub><sub>76</sub>S<sub>77</sub>P，由它能够产生含有它的免疫原性肽，并且能够获得proBNP(108)特异性抗体，这些抗体基本上不识别BNP(1-76)或BNP(77-108)，其中一些能够特异地识别人血清或血浆标本中的循环proBNP(1-108)。

显然，本发明也能够发展一种对循环proBNP(1-108)的测定法，从而能够简单、常规、可靠地诊断心力衰竭。

## 序列表

<110> BIO-RAD PASTEUR  
CNRS  
University of Montpellier

<120> 用于诊断心力衰竭的特异性抗体

<130> BET 03P0750

<150> FR 0210063

<151> 2002-08-07

<160> 124

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> 人 : proBNP(1-108)

<400> 1

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly  
1 5 10 15

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln  
20 25 30

Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr  
35 40 45

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His  
50 55 60

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met  
65 70 75 80

Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser  
85 90 95

Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His  
100 105

<210> 2

<211> 32

<212> PRT

<213> 人 : proBNP(77-108)

<400> 2

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp  
1 5 10 15

Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His  
20 25 30

<210> 3

<211> 76

<212> PRT

<213> 人 : proBNP(1-76)

<400> 3

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly  
1 5 10 15

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln  
20 25 30

Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr  
35 40 45

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His  
50 55 60

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg



<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<400> 7

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 8

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys  
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<400> 9

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys  
1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 10

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val  
1 5 10

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 11

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly  
1 5 10 15

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 12

Arg Ala Pro Arg Ser Pro Gly Cys  
1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<400> 13

Arg Ala Pro Arg Ser Pro Gly Cys  
1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<400> 14

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys  
1 5 10

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 15

Cys His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro  
1 5 10 15

Lys

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 16

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gly

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 17

Cys Phe Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gly

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 18

Cys Phe Ser Ile Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

Gly

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17)..(17)

<223> bAla

<400> 19

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

Ala

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17)..(17)

<223> bAla

<400> 20

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Ala Thr  
1 5 10 15

Ala

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17)..(17)

<223> bAla

<400> 21

Cys Phe Ser Ile Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Ala Thr  
1                   5                   10                   15

Ala

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 22

Cys Phe Ser Ile Arg Ala Pro Arg Ser Pro Ala Leu Ala Ser Gly Thr  
1                   5                   10                   15

Ala

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 23

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 24

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 24

Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln  
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 25

Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg  
1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 26

Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu  
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 27

Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys  
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 28

Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu  
1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 29

Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val  
1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 30

Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr  
1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 31



<400> 35

Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp  
1                   5                   10                   15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 36

Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg  
1                   5                   10                   15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 37

Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala  
1                   5                   10                   15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 38

Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly  
1                   5                   10                   15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 39

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly  
1                   5                   10                   15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 40

Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys  
1                   5                   10                   15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 41

Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu  
1                   5                   10                   15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 42

Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu  
1                   5                   10                   15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 43

Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro  
1                   5                   10                   15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 44

His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro  
1                   5                   10                   15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 45

Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val  
1                   5                   10                   15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 46

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 47

Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe  
1                   5                   10                   15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 48

Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys  
1                   5                   10                   15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 49

Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg  
1                   5                   10                   15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 50

Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser

1	5	10	15
---	---	----	----

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 51

Gly	Cys	Phe	Gly	Arg	Lys	Met	Asp	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly
1				5					10					15

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 52

Gly	Arg	Lys	Met	Asp	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys
1				5					10					15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 53

Met	Asp	Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Lys	Val	Leu
1				5					10					15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 54

Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His  
1                   5                   10                   15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 55

Ala Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 56

Tyr Ala Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 57

Tyr Thr Ala Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 58

Tyr Thr Leu Ala Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 59

Tyr Thr Leu Arg Gly Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 60

Tyr Thr Leu Arg Ala Ala Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 61

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Ala Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 62

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ala Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 63

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Ala Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 64

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Ala Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 65

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Ala Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 66

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Ala Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 67

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Ala Gly Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 68

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Ala Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 69

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ala  
1                   5                   10                   15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 70

Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly  
1 5 10 15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 71

Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu  
1 5 10 15

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 72

Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu  
1 5 10 15

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 73



<400> 77

Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln  
1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 78

Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 79

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu  
1 5 10 15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 80

Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln  
1 5 10 15

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 81

Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu  
1                   5                   10                   15

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 82

Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln  
1                   5                   10                   15

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 83

His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 84

Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu  
1                   5                   10                   15

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 85

Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu  
1                   5                   10                   15

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 86

Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro  
1                   5                   10                   15

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 87

Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu  
1                   5                   10                   15

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 88

Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys  
1                   5                   10                   15

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 89

Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 90

Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg  
1 5 10 15

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 91

Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu  
1 5 10 15

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 92

Glu<sup>1</sup> Glu<sup>5</sup> Ser<sup>10</sup> Pro<sup>15</sup> Arg<sup>20</sup> Pro<sup>25</sup> Thr<sup>30</sup> Gly<sup>35</sup> Val<sup>40</sup> Trp<sup>45</sup> Lys<sup>50</sup> Ser<sup>55</sup> Arg<sup>60</sup> Glu<sup>65</sup> Val<sup>70</sup>  
 1 5 10 15

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 93

Glu<sup>1</sup> Ser<sup>5</sup> Pro<sup>10</sup> Arg<sup>15</sup> Pro<sup>20</sup> Thr<sup>25</sup> Gly<sup>30</sup> Val<sup>35</sup> Trp<sup>40</sup> Lys<sup>45</sup> Ser<sup>50</sup> Arg<sup>55</sup> Glu<sup>60</sup> Val<sup>65</sup> Ala<sup>70</sup>  
 1 5 10 15

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 94

Ser<sup>1</sup> Pro<sup>5</sup> Arg<sup>10</sup> Pro<sup>15</sup> Thr<sup>20</sup> Gly<sup>25</sup> Val<sup>30</sup> Trp<sup>35</sup> Lys<sup>40</sup> Ser<sup>45</sup> Arg<sup>50</sup> Glu<sup>55</sup> Val<sup>60</sup> Ala<sup>65</sup> Thr<sup>70</sup>  
 1 5 10 15

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 95

Pro<sup>1</sup> Arg<sup>5</sup> Pro<sup>10</sup> Thr<sup>15</sup> Gly<sup>20</sup> Val<sup>25</sup> Trp<sup>30</sup> Lys<sup>35</sup> Ser<sup>40</sup> Arg<sup>45</sup> Glu<sup>50</sup> Val<sup>55</sup> Ala<sup>60</sup> Thr<sup>65</sup> Glu<sup>70</sup>  
 1 5 10 15

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 96

Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile  
1                   5                   10                   15

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 97

Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg  
1                   5                   10                   15

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 98

Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro  
1                   5                   10                   15

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 99

Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg  
1                   5                   10                   15

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 100

Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 101

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys  
1                   5                   10                   15

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 102

Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met  
1                   5                   10                   15

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 103

Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln  
1                   5                   10                   15

<210> 104

<211> 35

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 104

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp  
1                   5                   10                   15

Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His  
                  20                   25                   30

Lys Lys Lys  
          35

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 105

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys  
1                   5                   10

<210> 106

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 106

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg  
1                   5                   10

<210> 107

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 107

His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg  
1                   5                   10

<210> 108

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 108

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 109

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 109

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1                   5                   10                   15

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 110

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys  
1                   5                   10

<210> 111

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 111

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val  
1                   5                   10

<210> 112

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 112

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln  
1                   5                   10

<210> 113

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 113

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly  
1                   5                   10                   15

<210> 114

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 乙酰化

<400> 114

Cys Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln  
1 5 10

<210> 115

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 115

Cys Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly  
1 5 10

<210> 116

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 116

Cys Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 117

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 117

Cys Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly  
1 5 10 15

<210> 118

<211> 11

<212> PRT



<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 122

Cys Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly  
1 5 10 15

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 123

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys  
1 5 10

<210> 124

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列: 肽

<400> 124

Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly  
1 5 10

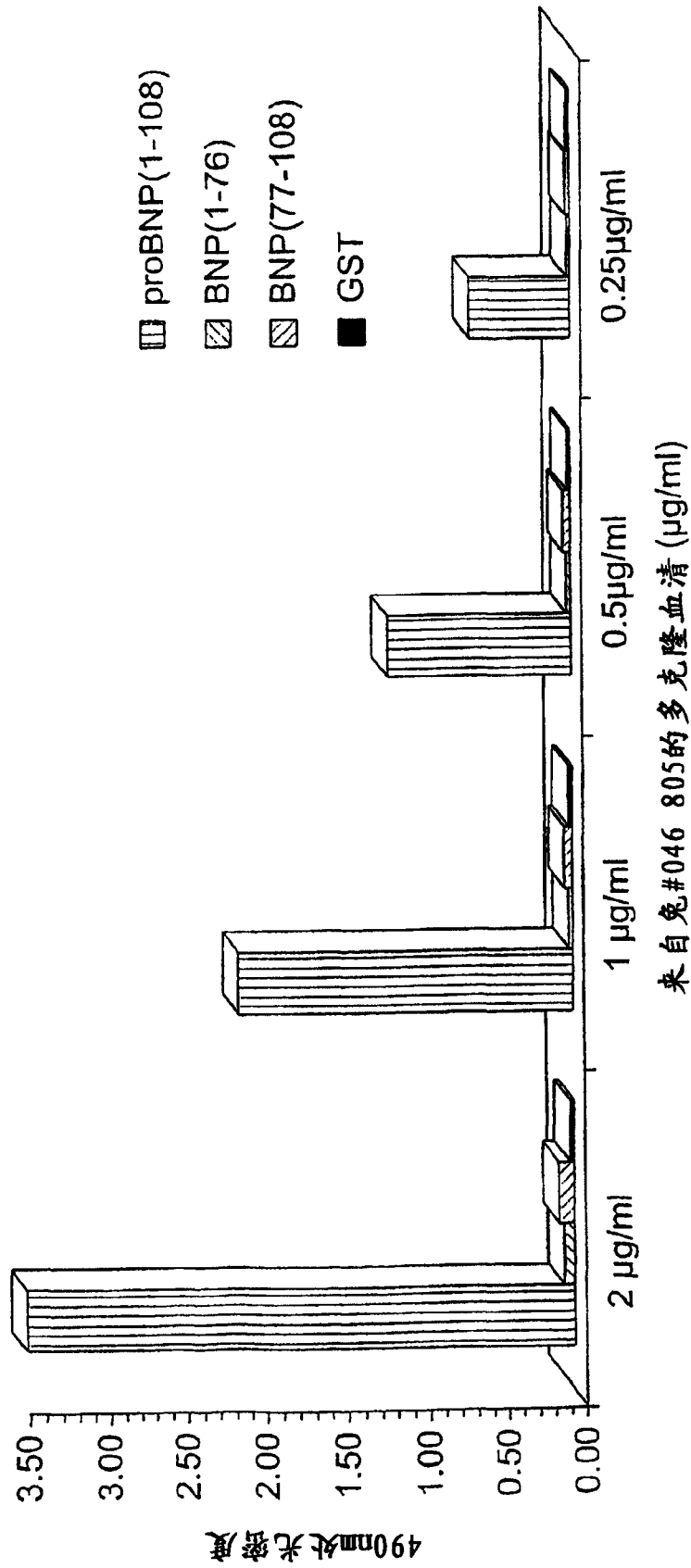
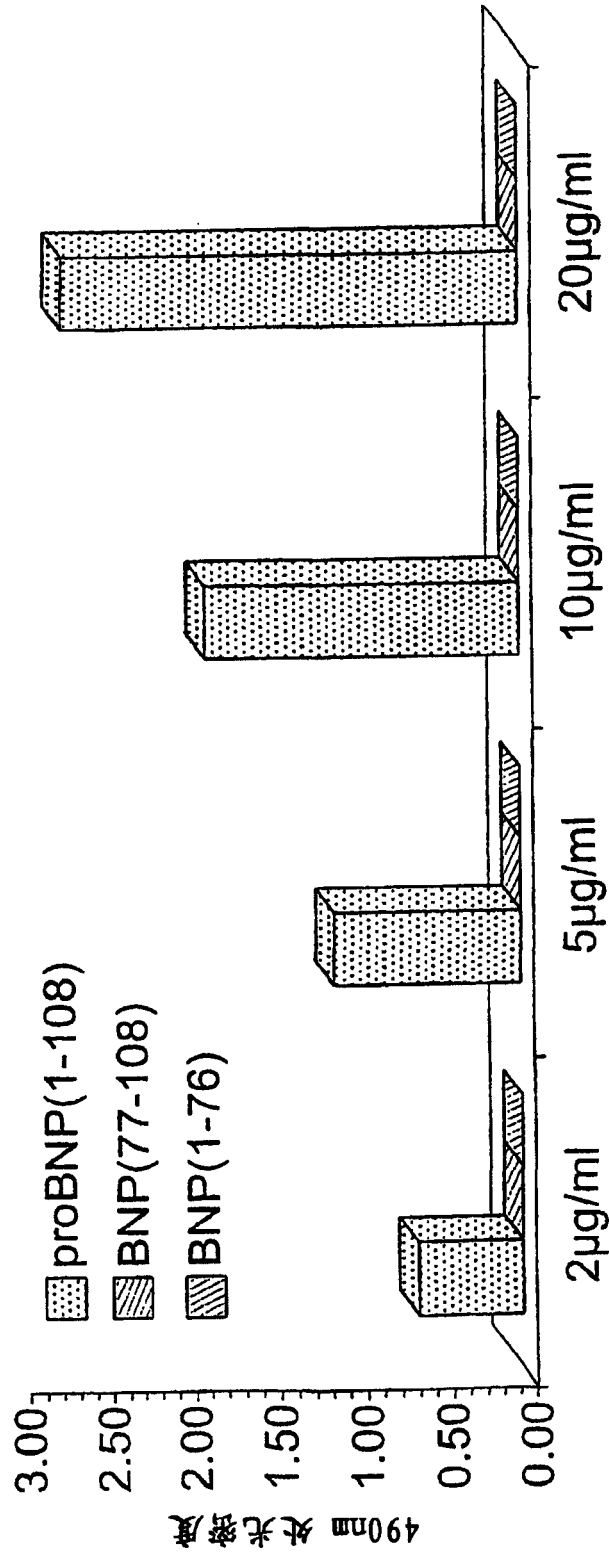
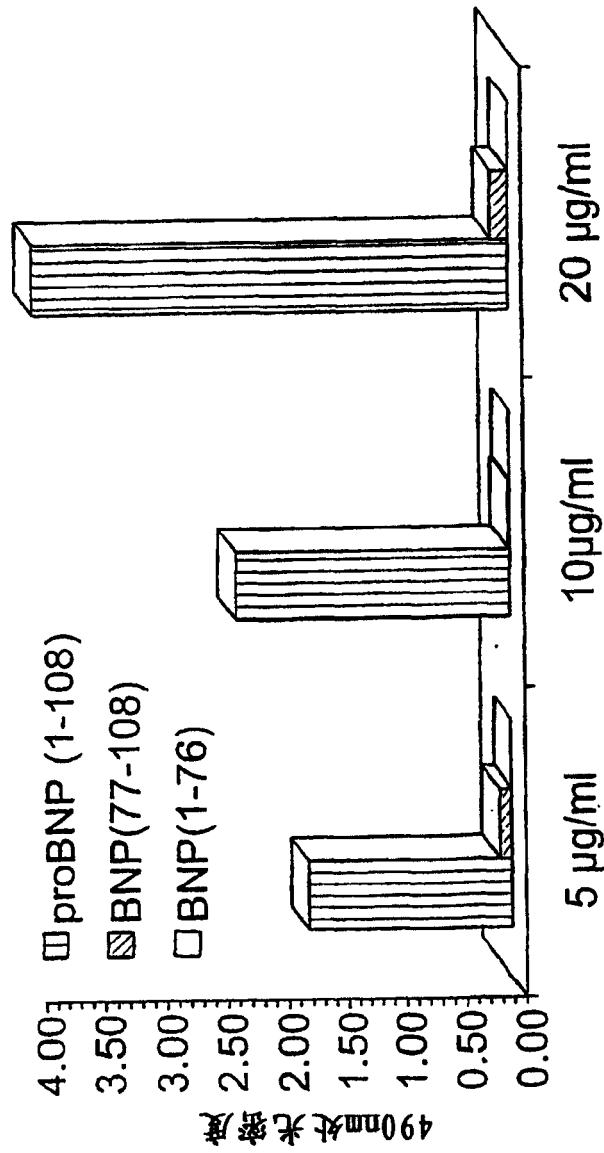


图1



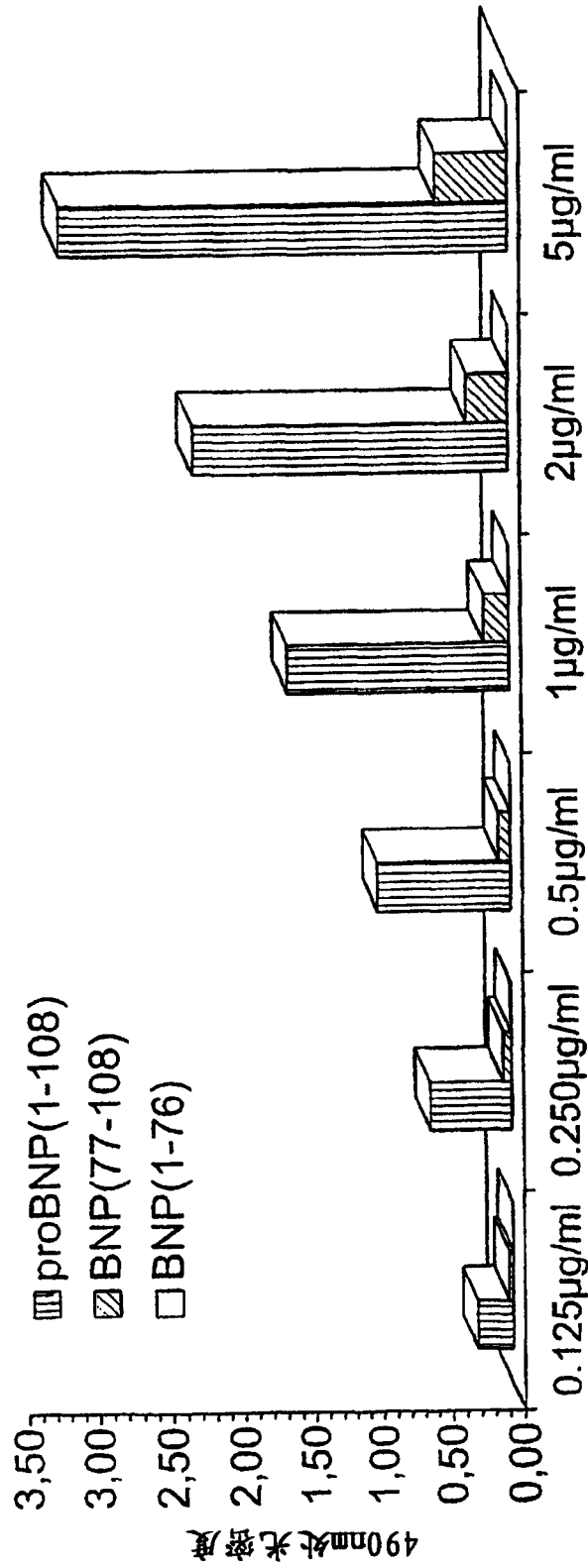
来自兔#046 805的多克隆血清的滤过物 (µg/ml)

图2



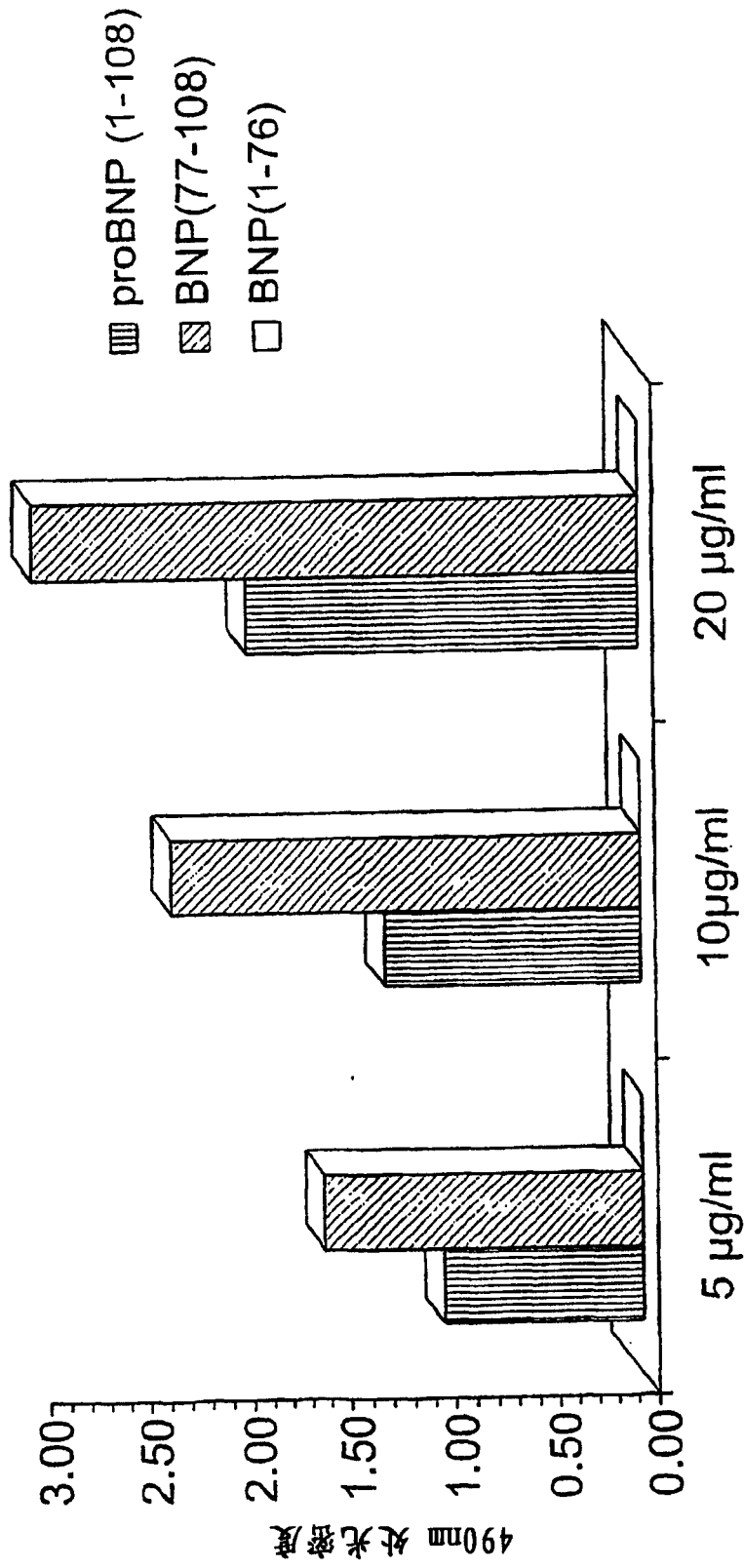
来自兔#046 832的多克隆血清的滤过物(µg/ml)

图 3



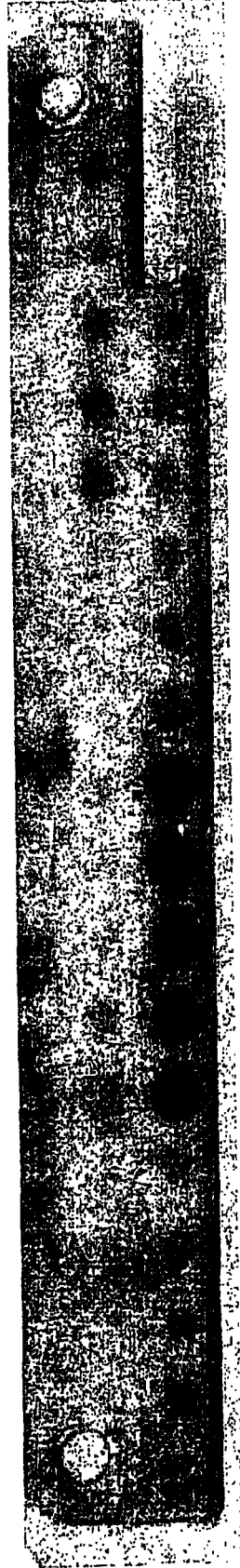
来自兔#046 805的多克隆血清的洗脱物 (µg/ml)

图 4



来自兔#046 832的多克隆血清的洗脱物(µg/ml)

图 5

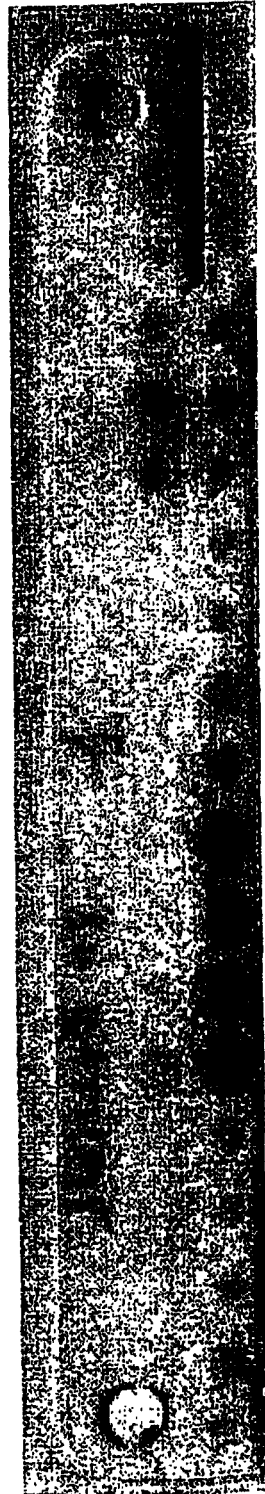


反应性 (以相对强度单位)

21	IRGHRKMVLYTLRAP	32.8
22	HRKMVLYTLRAPRSP	104.8
23	MVLYTLRAPRSPKMV	99.2
24	YTLRAPRSPKMVQGS	117.5
25	RAPRSPKMVQSGGCF	119.0
26	RSPKMVQSGGCFGRK	84.5
27	KMVQSGGCFGRKMDR	33.0

检测的斑点

图6



反应性 (以相对强度单位)

21	IRGHRKMLVLYTLRAP	32,0	} 检测的斑点
22	HRKMLVLYTLRAPRSP	125,9	
23	MVLYTLRAPRSPKMY	104,2	
24	YTLRAPRSPKMYQGS	121,1	
25	RAPRSPKMYQSGGCF	113,7	
26	RSPKMYQSGGCFGRK	35,0	

图7

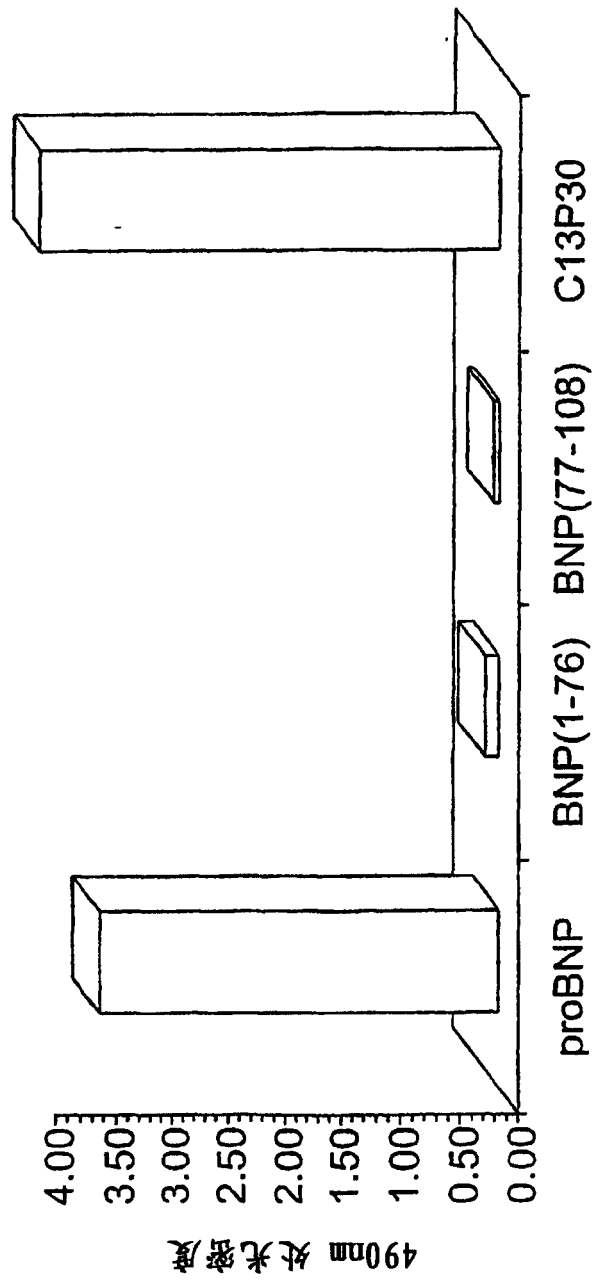
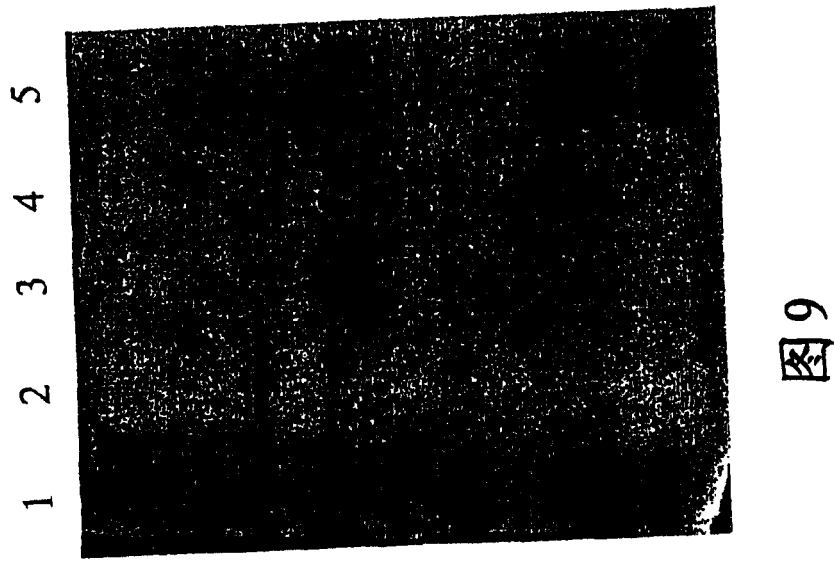
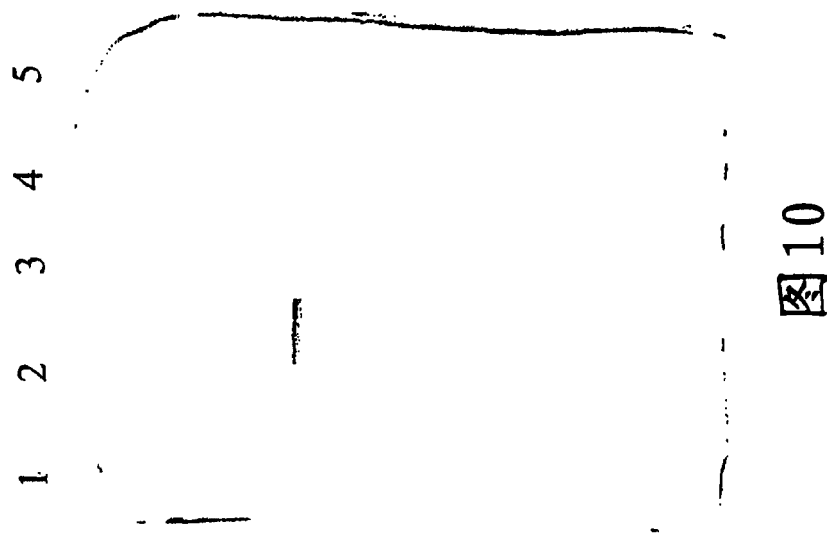


图 8





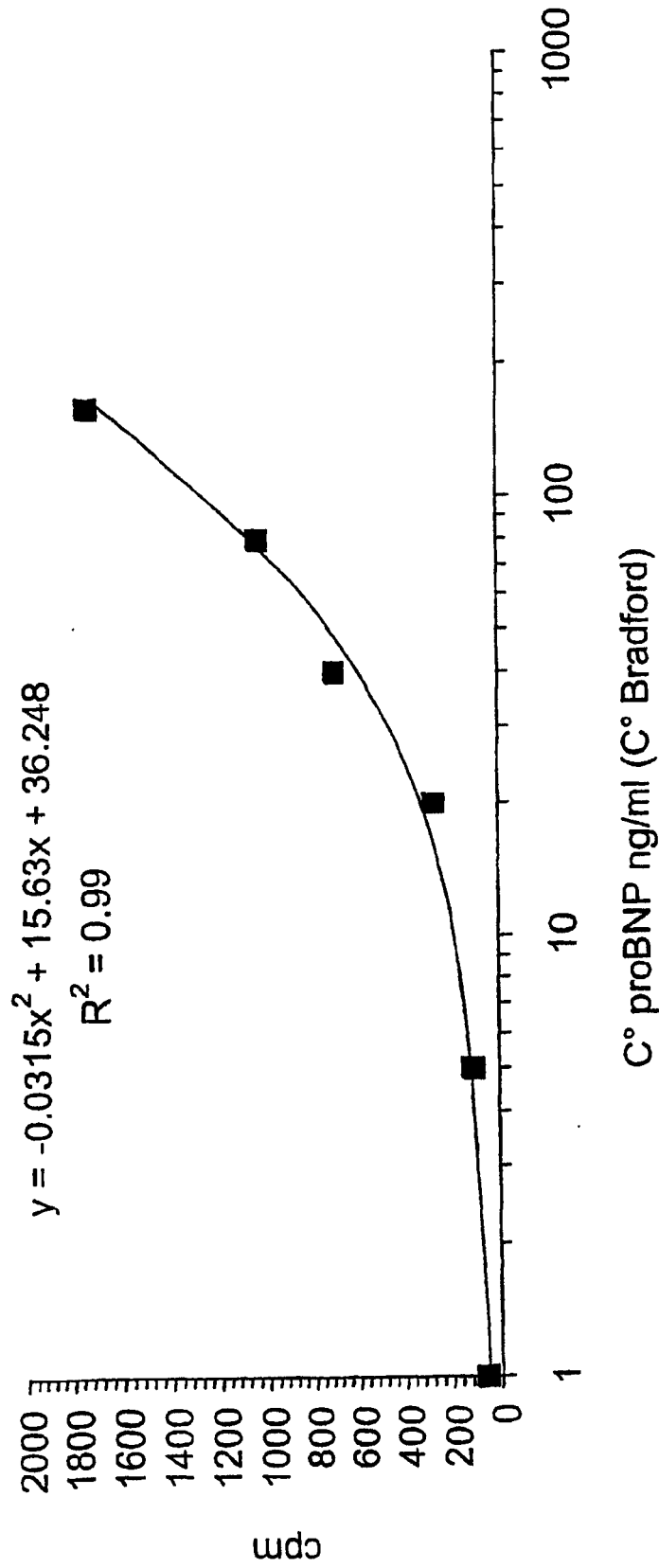
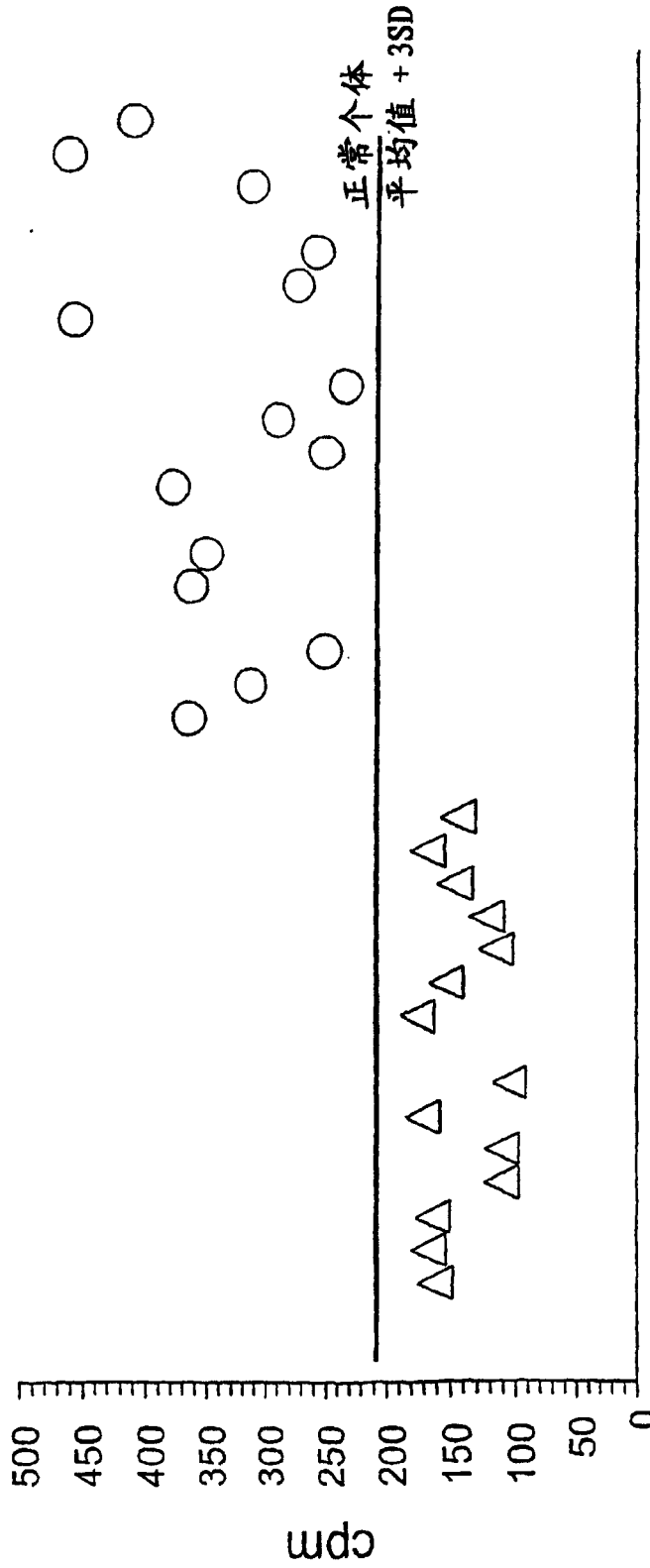


图11



患有心力衰竭的患者

正常个体

图12

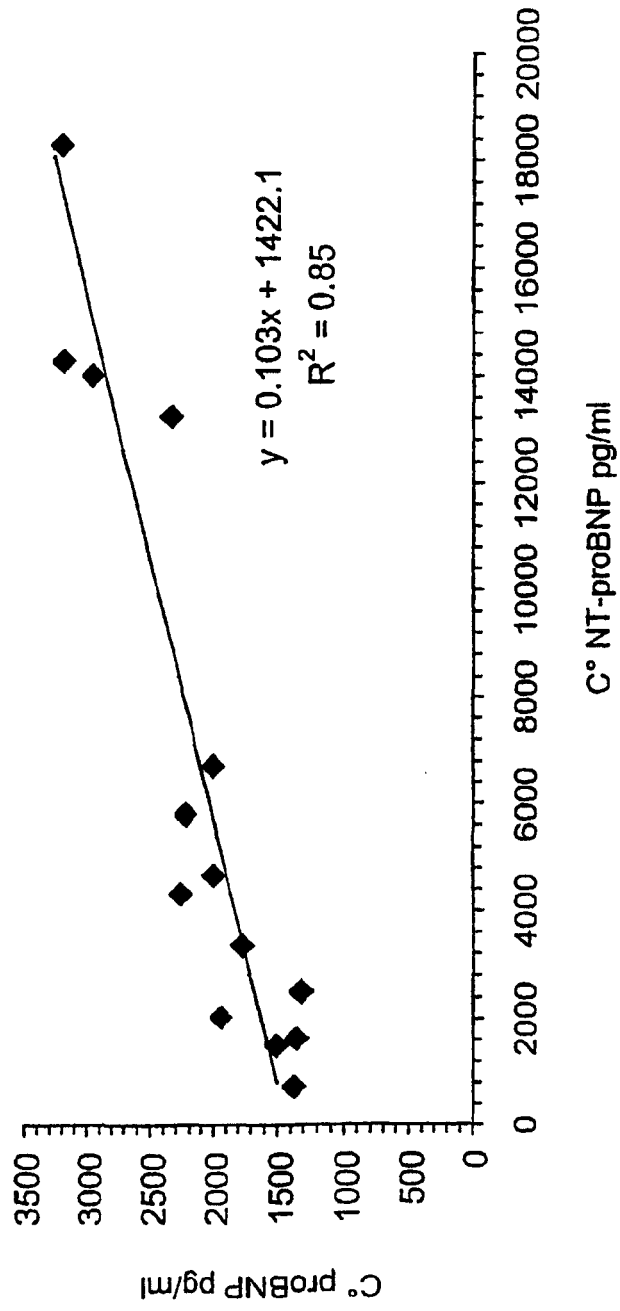


图 13

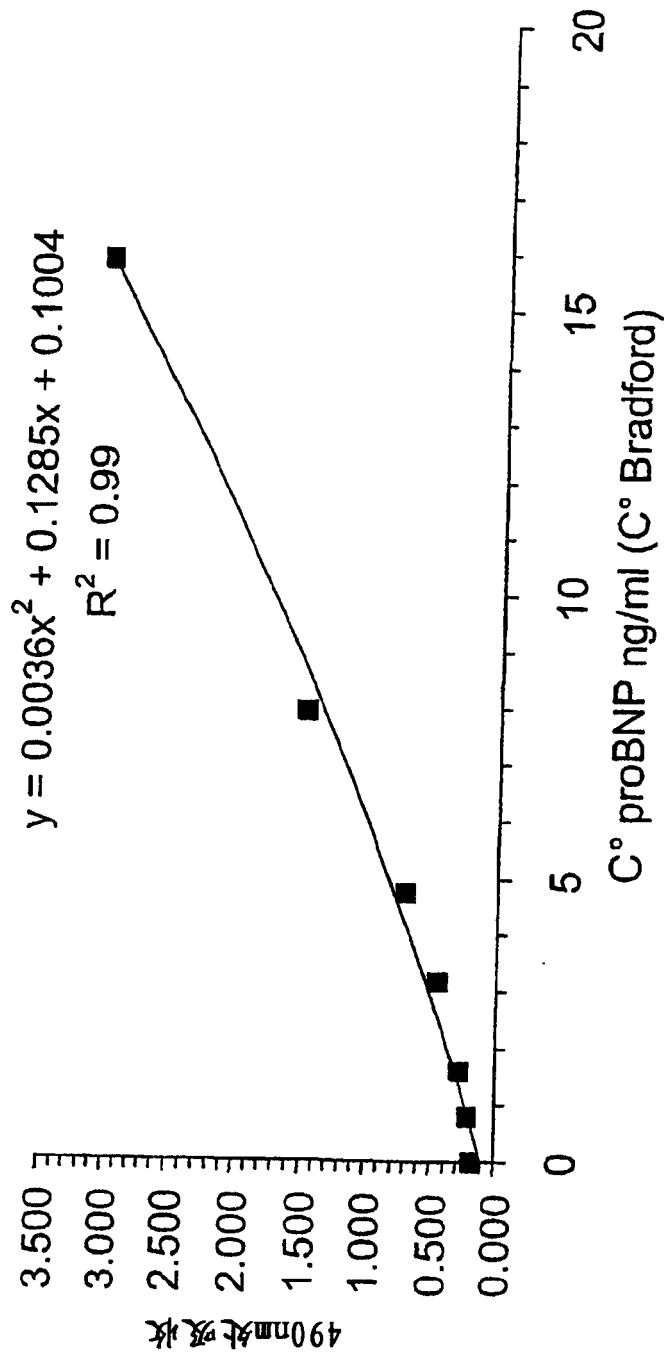


图14

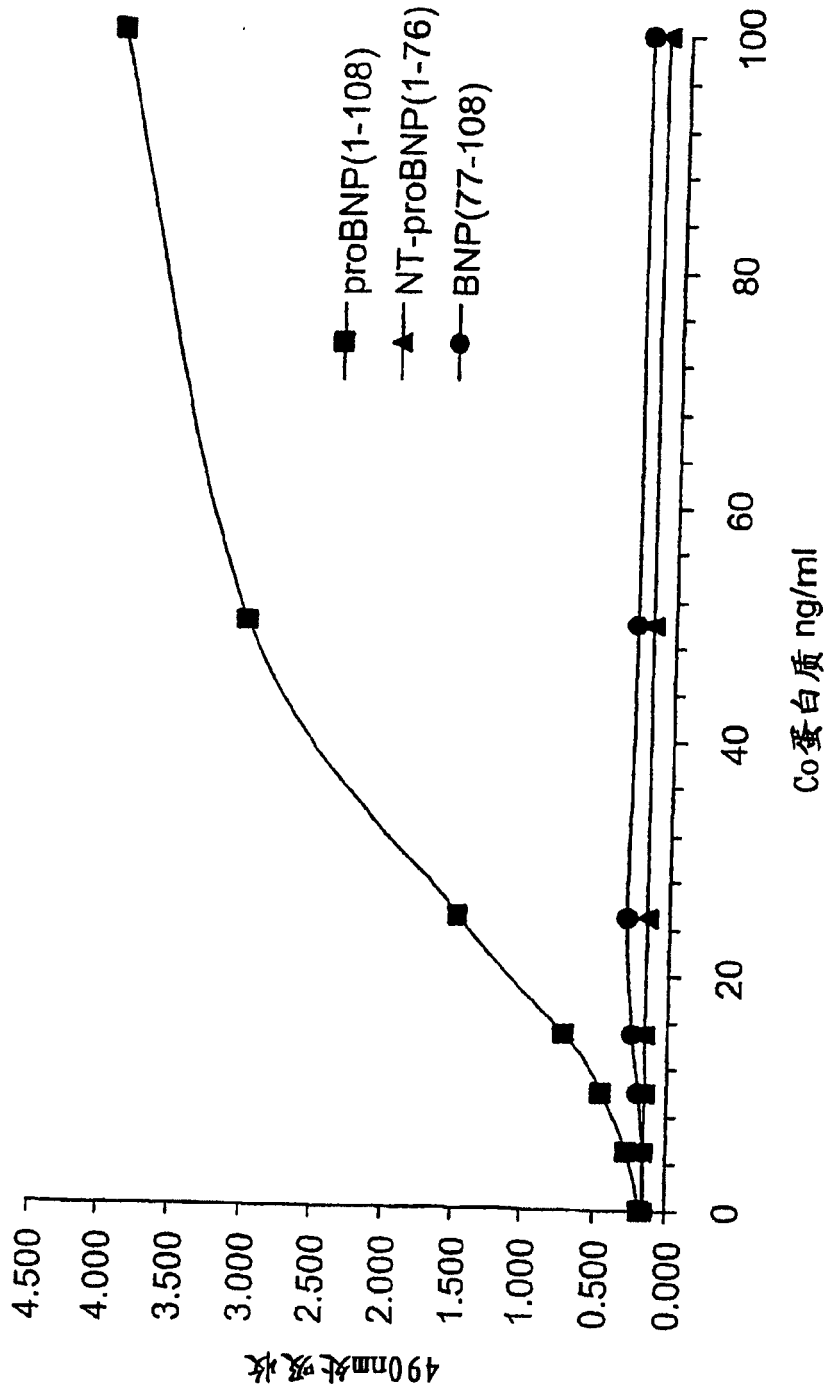


图15

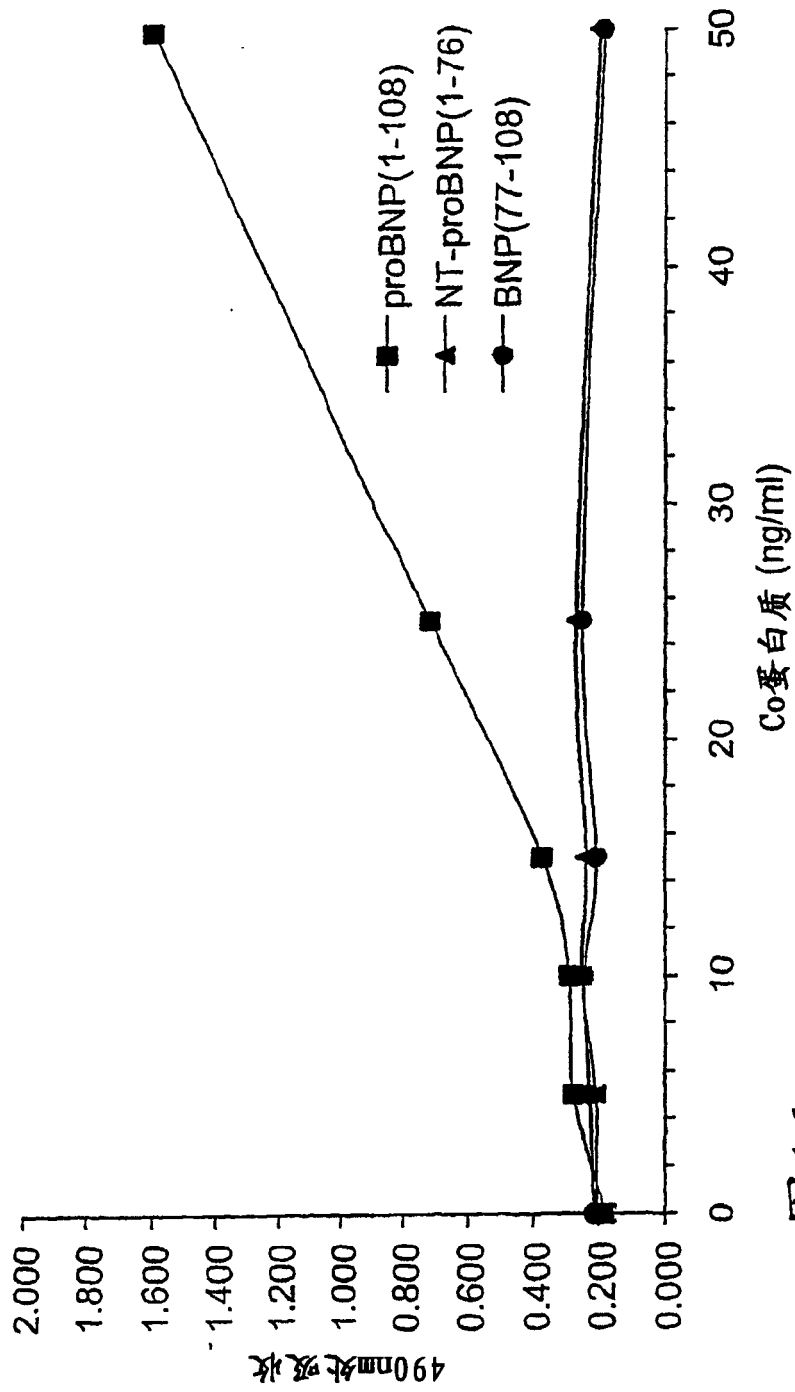


图16

专利名称(译)	诊断心力衰竭的特异性抗体proBNP(1-108)		
公开(公告)号	<a href="#">CN100467489C</a>	公开(公告)日	2009-03-11
申请号	CN03820838.5	申请日	2003-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-拉德巴斯德公司 国家研究中心 蒙彼利埃第一大学		
申请(专利权)人(译)	比奥-拉德巴斯德公司 国家研究中心 蒙彼利埃第一大学		
当前申请(专利权)人(译)	比奥-拉德巴斯德公司 国家研究中心 蒙彼利埃第一大学		
[标]发明人	B波 I朱利亚尼 F里尼尔		
发明人	B·波 I·朱利亚尼 F·里尼尔		
IPC分类号	C07K16/26 C12N5/12 G01N33/53 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/06 G01N33/14 C12N5/20 C07K16/18 C07K14/58		
CPC分类号	C07K2317/34 C07K14/58 C07K16/26 A61P43/00		
代理人(译)	程泳		
审查员(译)	杨振宇		
优先权	2002010063 2002-08-07 FR		
其他公开文献	CN1678635A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及心力衰竭的体外诊断。更具体而言，本发明涉及一种肽结构域的特异性抗体，该结构域位于proBNP(1-108)的铰链区R76S77的任一侧。具体而言，本发明涉及获得上述抗体的一种方法，以及它在检测血液中除BNP(1-76)和BNP(77-108)以外的proBNP(1-108)中的用途。本发明也涉及一种检测血液proBNP(1-108)的方法、试剂和试剂盒。

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{OD}_{(\text{BNP}77-108)} - \text{OD}_{(\text{GST})} \\ \text{OD}_{(\text{proBNP}1-108)} - \text{OD}_{(\text{GST})} \end{array} \right\} = \frac{\text{OD}_{(\text{BNP}77-108)} - \text{OD}_{(\text{GST})}}{\text{OD}_{(\text{proBNP}1-108)} - \text{OD}_{(\text{GST})}} \times 100$$