

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/68

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/58 C07K 16/26

C07K 16/18 C12N 15/06

[21] 申请号 00803234.3

[43] 公开日 2002 年 3 月 6 日

[11] 公开号 CN 1339107A

[22] 申请日 2000.1.27 [21] 申请号 00803234.3

[30] 优先权

[32]1999.1.29 [33]DE [31]19903489.3

[32]1999.3.12 [33]DE [31]19911044.1

[86] 国际申请 PCT/EP00/00602 2000.1.27

[87] 国际公布 WO00/45176 德 2000.8.3

[85] 进入国家阶段日期 2001.7.27

[71] 申请人 罗赫诊断器材股份有限公司

地址 德国曼海姆

[72] 发明人 J·卡尔 H·利尔 P·斯塔尔

K·克吕格尔 A·博格亚

A·加卢塞尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 邵红

权利要求书 4 页 说明书 17 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 鉴定 N-末端前 BNP 的方法

[57] 摘要

本发明涉及到一种方法,该方法用于通过至少两种抗体来鉴定样品中的 N-末端前 BNP,这些抗体检测 N-末端前 BNP 的不同表位。该方法用于对健康个体和 NYHA I 至 IV 级患者的样品进行区分或归类。本发明进一步涉及到重组 N-末端前 BNP,该 N-末端前 BNP 作为标准在鉴定 N-末端前 BNP 的方法中的应用,用于检测重组 N-末端前 BNP 的抗体及它们的生产。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 鉴定样品中的 N-末端前 BNP 的方法，其中至少使用了两种抗体，这些抗体识别该 N-末端前 BNP 的不同表位。

2. 权利要求 1 的方法，其抗体可以对该 N-末端前 BNP 同时结合。

5 3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中该方法为多相进行。

4. 权利要求 3 的方法，其中该方法以三明治模式进行。

5. 上述权利要求之一的方法，其中对 N-末端前 BNP 检测低限低于 1fmol/ml 检测的患者样品。

6. 上述权利要求之一的方法，其中，通过所获得的数值，可以对从健康个体取得的样品同从患有 I 至 IV 级 NYHA 心力衰竭的患者取得的样品进行区分。

7. 权利要求 6 的方法，其中，通过所获得的数值，可以对从健康个体取得的样品同从患有 I 级 NYHA 心力衰竭的患者取得的样品进行区分。

8. 上述权利要求之一的方法在对从健康个体取得的样品同从患有 I 至 IV 级 NYHA 心力衰竭的患者取得的样品进行的区分中的应用。

9. N-末端前 BNP 重组体。

10. 重组 N-末端前 BNP 作为标准物在权利要求 1 至 7 的鉴定 N-末端前 BNP 的方法中的应用。

11. 重组 N-末端前 BNP 在抗 N-末端前 BNP 的抗体生产中的应用。

12. 抗重组 N-末端前 BNP 的抗体。

13. 权利要求 12 的抗体，其中这些抗体同 N-末端前 BNP 的氨基酸 10 到 66 的范围内特异性地结合。

14. 权利要求 12 或 13 的抗体，这些抗体可通过以重组产生的 N-末端前 BNP 对适当的有机体进行免疫化而产生。

15. 权利要求 12 到 14 的抗体，这些抗体可从细胞系 M 10.1.11 或 M 13.4.14 中获得。

16. 权利要求 15 的抗体，这些抗体以 N-末端前 BNP 产生，其产生途径等效于通过细胞系 M 10.1.11 或 M 13.4.14 产生抗体。

17. 在 DSMZ 于 1999 年 1 月 26 日保存的细胞系 M 10.1.11 或 M 13.4.14。

18. 用于产生权利要求 12 到 14 或者权利要求 16 的多克隆抗体的

方法，该方法包括的步骤有，以重组产生的 N-末端前 BNP 对适当的有机体进行的免疫化，抗体的分离，对最具反应性的表位的检测以及通过以适当的肽进行的免疫吸附而对抗体的纯化。

- 5 19. 用于产生权利要求 12 到 16 的单克隆抗体的方法，该方法包括的步骤有，以重组产生的 N-末端前 BNP 对适当的有机体进行的免疫化，克隆的选择，该选择根据抗体同多个患者血清库中的天然 N-末端前 BNP 的反应性而进行。

说明书

鉴定 N-末端前 BNP 的方法

5 本发明涉及到一种方法，该方法用于通过至少两种抗体来鉴定样品中的 N-末端前 BNP (N-terminalem pro BNP)，这些抗体检测 N-末端前 BNP 的不同表位。该方法用于对健康个体和 NYHA I 至 IV 级患者的样品进行区分或归类。本发明进一步涉及到重组 N-末端前 BNP，该 N-末端前 BNP 作为标准在鉴定 N-末端前 BNP 的方法中的应用，用于检测重组 N-末端前 BNP 的抗体及它们的生产。

10 心力衰竭是一种广泛的现象，特别是在西方世界中。根据罗氏 (Roche) 医学字典 (1993, Urban & Schwarzenberg)，心力衰竭是在进行身体运动或甚至在静息时心脏产生代谢所需的血流的能力或确保静脉回流的能力的急性或慢性衰退 (退行性或进行性衰竭)。因此，该心脏的泵血功能是脆弱的。心力衰竭的起因十分复杂。除其它原因之外，15 本文提及心肌的炎症和衰退变性，冠状动脉灌注失调 (coronary perfusion disorder)，冠状动脉硬化和损伤。这导致了外周血流的变性，呼吸紊乱，肾功能紊乱和电解质代谢失调 (水肿)，并且导致骨骼肌系统性能降低。

20 根据纽约心脏联合会 (NYHA)，经过在运动后的身体测试，心力衰竭被分为以下的 NYHA 级别：I 指的是在正常身体运动后完全无痛苦，II 指的是对体质强度有较低的限制，III 指的是对体质强度有较强的限制，IV 指的是随着每一次身体活动机能不足的症状均有所增加，该机能不足的症状在静息时多数时间仍存在。

25 对于通过糖苷、血管扩张剂、ACE 抑制剂和/或 β -阻断剂进行的对心力衰竭的有效医疗，对心力衰竭的精确诊断和在可能的情况下根据严重程度进行分类以及进行治疗期间进行额外的监测是最为必要的。

30 根据本领域的现状，一些用于心力衰竭的血清标记已经过研讨，例如 ANP (N-末端心房利尿钠肽激素) 和前 ANP，CNP (C-利尿钠肽)，adrenomedulin，神经肽 Y，endotheline 和 BNP (脑利尿钠肽)。ANP 和前 ANP 一般适用于心力衰竭的诊断用标记；但它们在血液中不稳定或仅有短暂的半寿期，这对诊断测试是一个障碍 (Clin. Sci. 95(3)(1998), 235-239; Clenland et al., Heart 75(1996), 410-

413)。

BNP 是一种经常被引用并很有意义的标记 (脑利尿钠肽)。BNP 最初在猪脑中 5 被鉴定。它是一种心脏激素, 在结构和功能上类似于 ANP (心钠素) (Sudoh et al., Nature 332 (1988), 78-81)。人类 BNP 由 32 个氨基酸组成, 它主要由心室分泌并在人类血浆中进行循环。已知的 BNP 作为诊断标记的应用的例子来自 EP-A-0 542 255。BNP 具有分子内的二硫键并且作为一种分析物不很稳定, 这据估计是因为其作为必须被迅速破坏的激素的生理功能。因此, 它作为一种诊断标记的应用仅仅是有限的 (Masuta et al., Clin. Chem. Vol. 44 No. 6 Supplement 10 A (1998), 130; Tsuji et al., Clin. Chem. 40 (1994), 672)。

BNP 的前体分子, 即前 BNP, 由 108 个氨基酸组成, 该前体分子中的上述 32 个 C-末端氨基酸被称为 BNP, 它产生实际的激素效应。从该前体中释放的 N-末端氨基酸 1-76 被称为 N-末端前 BNP。除 BNP (77-108) 外 N-末端前 BNP 以及进一步裂解的产物 (1-76) 也在血浆 15 中进行循环 (Hunt et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 214 (1995), 1175-1183), 这样 N-末端前 BNP 作为心力衰竭的标记也是相关的。是否该前体分子前 BNP 也在血浆中存在并无确切的解答。然而据描述 (Hunt et al., Peptides, Vol. 18, No. 10 (1997), 1475-1481) 在血浆中可以检测到较低量的前 BNP (1-108) 的释放, 但由于 N-末 20 端的迅速部分降解一些氨基酸是缺少的。在该文献中该分子被称为高分子量 BNP。

WO 93/24531 (US 5, 786, 163) 描述了一种鉴定 N-末端前 BNP 的免疫学方法及该方法所使用的抗体。为获得这些抗体, 本文使用了合成产生的单一一种肽, 该肽来自 N-末端前 BNP 的序列。通过肽免疫化 25 来进行的抗体生产在原则上是可行的, 但对完整分子的亲和性通常很低而达不到测试过程所必需的灵敏度。另外, 当使用该肽时还有这样的危险, 所获得的抗体可以识别该肽的 C-末端并且因此只能结合完整分子的这一片段。根据这一结果, 这些抗体不能结合完整的分子或仅在较低的程度 30 上结合。在 WO 93/24531 中产生了抗单一一种肽的多克隆抗体, 该肽来自 N-末端前 BNP。据显示, 所产生的抗体以竞争测试模式同该免疫化肽 (氨基酸 47-64) 结合。然而没有显示该抗体可以结合样品中作为完整分子的天然 N-末端前 BNP。另外, 在 WO 93/24531

中所描述的样品中的三明治测试无法如其所述进行，这是因为没有适当的标准材料以及没有抗两种不同表位的抗体。

本领域中的一个更进一步的问题是测试的灵敏度。在 WO 93/24531 中进行的竞争性测试中，在标记状态的肽 47-64 作为追踪物同样品或未标记肽标准 47-64 竞争结合来自兔血清的多克隆抗体的情况下，温育 48 小时后仅达到非常温和的竞争，从该竞争仅仅能产生一个较低的检测限制，约 250fmol/ml。这无论对于区分健康个体和患有心力衰竭的患者还是根据心力衰竭的严重程度对患者样本进行分级都是不够的。另外，竞争性测试的长温育时间也是为自动化实验室的样品常规测试所不能接受的。

Hunt 等人 (Clinical Endocrinology 47(1997), 287-296) 还描述了一种用于 N-末端前 BNP 检测的竞争性测试。对于该测试，在测试进行前必须对血浆样品进行复杂的抽提；这可能导致被测试物的破坏和测量误差。所使用的抗血清类似于 WO 93/24531 通过以合成肽进行免疫化来产生。Hunt 等人通过以 N-末端前 BNP 氨基酸 1-13 进行的免疫化产生抗血清，并且氨基酸 1-21 的肽被用作标准。长温育时间也是该测试所必需的。温育 24 小时后达到了一个较低的检测限制，1.3fmol/ml。

因此，本领域中检测 N-末端前 BNP 的方法能在短温育期间对天然 N-末端前 BNP 进行可靠灵敏的检测。

因此，提供一种在样品中鉴定 N-末端前 BNP 的方法是一个目标，该方法尽可能避免上述的本领域的缺点。特别应当达到一个高测试灵敏度以对健康个体和 NYHA I 至 IV 级患者的样品进行区分。

通过一种在样品中鉴定 N-末端前 BNP 的方法该目标已经达到，该方法在权利要求中被更详尽地解释。该方法的特征在于使用了至少两种抗体，这些抗体检测 N-末端前 BNP 的不同表位。

在本发明的方法中，天然的 N-末端前 BNP 在样品中被检测十分重要。这意味着该抗体必须能够鉴定并且特异性地结合样品中的完整的分子和可能产生的未切割前 BNP (1-108)，如果可能还结合样品中的蛋白部分消化片段。对于该方法，至少两种不同的抗体被使用，这些抗体结合该 N-末端前 BNP 的不同表位。该表位可以是线性的或所谓的构象表位。在优选的情况下这些表位的定位方式允许这两种抗体同时结

合并且相去不远。

由于本发明的方法不能区分 N-末端前 BNP，前 BNP 和亲本 (nahe verwandten) 肽 (裂解产物)，NT-前 BNP 指的是以下所有在测试过程中被鉴定的肽，特别是已知的 N-末端前 BNP (1-76)。

5 根据本发明，术语“表位”指的是在一个免疫结合配偶体，如抗原上的结合位点，一种抗体对其特异性地结合。通常一种表位 6-8 个氨基酸被清晰地定义。根据本发明，该结合配偶体对应于 N-末端前 BNP 或其部分序列。抗体结合在表位上，表位构成了结合配偶体的部分区域该表位可以是线性形式或构象表位。

10 通过具有不同的特异性的两种抗体的方法对被分析物进行一种较快速的鉴定方法是可行的，该方法无需目前本领域的长时间竞争性测试过程。本发明的检测方法可通过均相或多相的测试过程的手段进行。在优选的情况下使用了多相的测试过程，在特别优选的情况下使用了专家所知的三明治过程。

15 在优选的情况下，这样的确定 N-末端前 BNP 的方法根据以下步骤进行：

a) 将样品同 N-末端前 BNP 特异性第一抗体相混合，该抗体携带有适于同固相结合基团，通过该基团，可以结合在固相上，或者将样品同 N-末端前 BNP 特异性第一抗体混合，该抗体已经结合于一种固相

20 b) 将该溶液同第二种抗体相混合，该抗体识别 NT-前 BNP 的一种表位并携带一种标记，该表位不同于第一种抗体所识别的表位

c) 使该免疫混合物同一种固相相结合，该固相可以在步骤 a) 中便已存在

25 d) 将固相同液相分离

e) 在一种或两种相内检测标记。

在一种定量检测中，以一定量的 N-末端前 BNP 作为标准物进行了相同的测量，并且在确定样品后进行了步骤 e)，即，将标准物测量值同样品测量值相比较，随后进行定量化。

30 术语“抗体”意指——根据本发明——单克隆或多克隆，嵌合或人源化或其它可通过遗传工程修饰获得的抗体以及为专家所知的所有片段，例如，F(ab')₂，Fab' 或 Fab 片段。必须保证的只有对 N-末端

前 BNP 的免疫特异结合能力。

对 N-末端前 BNP 特异的第一抗体可以直接结合于固相或通过一种特异的结合系统结合于固相。该抗体同固相的直接结合根据专家所知的方法进行，例如通过吸附。如果该结合为通过一种特异的结合系统的间接结合，该第一种抗体为一种偶联物，该偶联物由 N-末端前 BNP 的抗体和一种特异性结合系统的配偶体组成。一种特异性结合系统在此处指的是两种可以互相特异性反应的配偶体。该结合能力可以基于一种免疫反应或一种不同的特异反应。在优选的情况下，生物素和亲合素或生物素与链亲合素的组合被用作特异性结合系统。进一步优选的组合为生物素和抗生物素，半抗原和抗半抗原，一种 Fc-片段和抗该 Fc 片段的抗体，或者糖类与外源凝集素。该特异性结合系统的反应配偶体的一种为该偶联物的一部分。

在该特异性结合系统的第一种结合配偶体的另一种反应配偶体为固相的一层。链亲合素或亲合素被优选使用。该特异性结合系统的另一种反应配偶体同可溶载体材料的结合可以根据专家所知的通常方法来进行。在此一种共价结合以及一种吸附结合是适合的。

试管或微滴度板适于作为固相，该微滴度板由聚苯乙烯或类似的合成材料制成，该固相在其内表面覆盖有该特异结合系统的一种反应配偶体。适合并且特别优选的进一步物质为颗粒材料，如乳胶颗粒，磁性颗粒，分子筛材料，玻璃珠，塑料管或其它。多孔层状载体如纸或纤维素也可以被用作载体。覆盖有上述特异性结合系统的相关结合配偶体的磁珠被特别地优选使用。测试反应完成之后，这些微粒可以从液相中被分离以用于检测反应过程，分离手段如过滤，离心或在使用磁珠的情况下通过一磁体。

第二种特异性抗体识别 N-末端前 BNP 的一个表型，与第一种抗体所识别表型的相比该表型与之不同。这两个表型在分子上的距离必须足够远以使 N-末端前 BNP 的两种抗体可以无保留地同时结合；否则不能形成三明治复合物。

在 N-末端前 BNP 抗体同 N-末端前 BNP 之间的特异结合反应的检测可以通过不同的方法进行。在通常情况下，第二种抗体被标记。通常的标记为生色原，荧光基团，适于化学或电化学发光的物质，放射性同位素，半抗原，酶标记或能够形成特异结合组合的物质如生物素/链

亲合素。该免疫复合物随即通过该标记所发射的信号来检测。例如，该第二种抗体可被半抗原洋地黄毒苷所标记。该半抗原再同一个洋地黄毒苷特异性抗体相结合。该洋地黄毒苷特异性抗体本身被一种酶所标记，例如过氧化物酶。随后通过加入该过氧化物酶的一种特异性底物所产生的颜色或消光来进行最后的检测。

专家已知的所有生物液体可以被用作用于鉴定 N-末端前 BNP 的方法过程的样品。优选的样品为体液如全血，血清，血浆，尿或唾液。使用血清和血浆是特别优选的。

除使用在液相中的测试试剂进行的所谓的湿测试外，还可使用所有适于检测抗原、半抗原、肽、蛋白、抗体等等的常见的干测试模式。如在 EP-A-0 186 799 中所描述，这些干测试或测试条将所有的测试组分合并入一个单一载体——待分析样品除外。当测试条与该液体样品接触时测试反应开始。

本发明的方法的特征在于其对于 N-末端前 BNP 的低检测限制，该限制低于 1fmol/ml (对应于 1pmol/l)。根据本发明的 $<1\text{fmol/ml}$ 的高灵敏度无需长的温育期间便可达到。一次微滴度测试的总时间低于 2 小时，在优选的情况下，以诸如电化学发光这样的更灵敏的方法该时间约为 15 分钟。对于该检测方法，待测浓度所造成的的上限几乎并不存在。该技术上限通常是所用的测量手段所造成的。该方法原则上还能检测非常高浓度的 N-末端前 BNP。

本发明的方法的一个进一步的优点是通过所获得的测量数值对患有和未患有心力衰竭的患者样品的良好分辨力。该检测手段十分灵敏以至于可以将没有冠状动脉疾病的个体同患有程度轻微的或仅仅处于慢性发病的 NYHA I 和 II 级心力衰竭患者进行区分。初期心力衰竭的这样的早期确定可以影响开始以药物进行一种早期治疗的决定，并且因此比较容易延长该患者的存活几率。

本发明的另一个内容是重组产生的 N-末端前 BNP。N-末端前 BNP 为 N-末端部分，该部分由氨基酸 1-76 组成并从由 108 个氨基酸组成的前体分子 N-末端前 BNP 中释放。N-末端前 BNP 还包括其本身的一部分，该部分可能由于该分子的切断反应而在血液中出现。

迄今为止本领域没有已知的重组 N-末端前 BNP，这是由于氨基酸序列较短导致其生产比较困难。就多于 30 个氨基酸的较大肽而言，其

化学合成无法作为宿主有机体的重组生产的替代方法，这是由于所产生的错误序列和每个合成循环中强烈减少的产量的缘故。

然而，对于一种诊断检测，一种标准物或参比材料经常是必需的。如果需要定量化，必须使用一个标准物系列进行一个确定的定量校准。但是，只有在被用作标准物的材料在免疫测试中与该被分析物性能相同或相似的情况下，这样的校准才是有用的。该标准物与被分析物具有充分的结构相似性以及特别具有免疫相似性是十分重要的，这样可使标准物同检测抗体的结合类似于样品中天然分子与检测抗体的结合。

用于检测 N-末端前 BNP 的方法的这种标准并不能由本领域来给出。被描述的只有短的合成肽。根据本发明，在遗传合成的帮助下，现在首次可以产生编码 N-末端前 BNP 的 DNA 序列并且可以在 E. coli 中获得该 N-末端前 BNP 的重组表达。实施例 1 描述了实验过程。

因此，本发明的一个进一步的内容是重组 N-末端前 BNP 在鉴定样品中的 N-末端前 BNP 的方法中作为标准物的使用，该检测通过至少两种识别 N-末端前 BNP 的不同表位的抗体进行。

出于免疫化的原因，本领域只使用了来自 N-末端前 BNP 的合成短肽。肽免疫化的缺点是多数时间只能获得非常低亲和力的抗体或者所获得的抗体只与线性表位反应，该缺点还在于样品中的天然折叠的抗原不能被发现见实施例 3。

因此，免疫化以制备一种免疫原的抗体并使用之是十分重要的，这种免疫原与待测的分析物有足够的一致性。只有这样才能保证，抗体与样品中的天然分析物有高度的亲和力。

因此，本发明的一个内容是重组 N-末端前 BNP 在抗 N-末端前 BNP 抗体的生产中作为免疫原的使用。

本发明的一个进一步的内容是抗 N-末端前 BNP 的抗体。该术语抗体的定义对应于关于测试过程的段落中所给出的定义。在优选情况下，本发明的抗体特异地识别 76 氨基酸的大 N-末端前 BNP 的 N-末端部分，优选情况下在氨基酸区域 10-66，特别优选的情况下在氨基酸区域 10-50 或 10-38。当甚至在样品中末端经蛋白酶消化的 N-末端前 BNP 仍含有该表位时，该被抗体识别的表位的定位是有效的。这样该被分析物的稳定性就或多或少地成为次要的。在 N-末端前 BNP 的优选区域中

的表位可以是线性形式或构象表位。

因此，本发明的一个优选的内容为由细胞系 MAK M 10.1.1 和 MAK M 13.4.14 所产生的单克隆抗体，该细胞系由 DSMZ 于 1999 年 1 月 26 日收到并保存，Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und
5 Zellkulturen, GmbH, Brunschweig, Germany。这两个细胞系产生的抗体为 IgG 型抗体。细胞系 M 10.1.1 和 13.4.14 也是本发明的一个内容。

本发明的一个进一步内容为与细胞系 M 10.1.1 和 M 13.4.14 所产生的抗体等效的方式产生，并且适于同 N-末端前 BNP 结合的抗体。措
10 辞“以等效方式产生的抗体”的意思是该抗体通过以重组 N-末端前 BNP 进行免疫化来产生。

本发明的内容还有用于产生特异结合 N-末端前 BNP 的抗体的方法。

在优选情况下，多克隆抗体的产生根据以下步骤进行：以重组产
15 生的 N-末端前 BNP 对一种适当的生物，如绵羊进行免疫，分离抗体，检出最具反应性的表位并且经过适当的肽的免疫吸附对抗体进行纯化。该方法在实施例 2 中有描述。

在优选情况下，单克隆抗体的产生根据以下步骤进行：以重组产
20 生的 N-末端前 BNP 对一种适当的生物，如小鼠进行免疫化，根据抗体对不同患者血清库中的天然 N-末端前 BNP 反应性选择克隆。该方法在实施例 3 中有描述。

本发明在下列实施例中更有详细的描述：

实施例 1

重组 N-末端前 BNP (1-76) 的生产方法

25 1. 重组 N-末端前 BNP 的克隆

N-末端前 BNP (氨基酸序列 1-76) 的核苷酸序列通过遗传合成手段来产生。为获得该基因在大肠杆菌中的最佳表达，该序列被适配以在大肠杆菌中最常用的密码子。用于产生该基因的寡核苷酸序列如下：

Pro5' (SEQ ID NO 1)
5'CCGGATCCCACCCGCTG3'

Pro1hum (SEQ ID NO 2).
5'CGGGATCCCACCCGCTGGGTTCCCCGGGTTCCGCTTCCGACCTGGAAACCT
CCGGTCTGCAGGAACAGCGTAACCACCT3'

Pro2hum (SEQ ID NO 3).
5'CGGTTCCAGGGAGGTCTGTTCAACCTGCAGTTCGGACAGTTTACCCTGCAG
GTGGTTACGCTGTTCCCTGC3'

Pro3hum (SEQ ID NO 4)
5'CAGACCTCCCTGGAACCGCTGCAGGAATCCCCGCGTCCGACCGGTGTTTGG
AAATCCCGTGAAGTTGCTAC 3'

Pro4hum (SEQ ID NO 5):
5'CCCAAGCTTAACGCGGAGCACGCAGGGTGTACAGAACCATTTTACGGTGA
CCACGGATACCTTCGGTAGCAACTTCACGGGATTTCC3'

Pro3' (SEQ ID NO 6):
5'CCCAAGCTTAACGCGGAGC3'

该基因的产生是通过以这些引物使用 PCR (聚合酶链反应) 来进行的。被扩增的基因被克隆入诸如 pUC19 这样的适当载体并随后测序。
5 为将该基因克隆入表达载体 pQE8, 该基因通过限制性酶切位点 BamHI 和 HindIII 从载体 pUC19 上被切下并且连接入载体 pQE8 并转化入 E. coli M15 [pREP4], 该载体 pQE8 可以表达具有 N-末端组氨酸标记的蛋白。

2. N-末端前 BNP 在 E. coli 中的表达

10 为进行该基因在 E. coli 中的表达, 将一个重组 E. coli 克隆的过夜培养物以 1/60 转入 Luria-Broth (含 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 50 μ g/ml 卡那霉素) 并且在 OD550 为 1 时以 IPTG (异丙基硫代- β -D-半

乳糖苷；终浓度 1mM) 进行诱导。诱导后培养物在 37℃ 下继续培养 4 小时。随后对该培养物进行离心，收集细胞沉淀于 pH 8.0 含 300mMNaCl 的 50mM 磷酸钠缓冲液中。经超声裂解该细胞悬浮物后，将悬浮物进行离心并将上清加入 Ni-NTA(三乙酸次氮酯)柱。以含 300mMNaCl 和 20mM 咪唑的 pH 8.0 50mM 磷酸钠缓冲液进行洗涤后，组氨酸标记的 N-末端前 BNP 以 pH 8.0 含 300mMNaCl 和 300mM 咪唑的 50mM 磷酸钠缓冲液进行洗脱。收集该洗脱流分并以 50mM pH8.0 的 NaCl 进行透析。透析产物被加至 Q-sepharose 以分离杂质。通过 MALDI-TOF 确定主要的纯化 N-末端前 BNP。

实施例 2

抗 N-末端前 BNP 的多克隆抗体的产生

1. 免疫化

以完全弗氏佐剂中的重组 N-末端前 BNP (1-76) 对绵羊进行免疫化。该剂量为 0.1mg 每只动物。在 10 个月的期间内以 4 周为间隔重复进行免疫化。在第一次免疫化后 6 周开始，每一个月取一次血清并且测定其灵敏度和滴度。

2. 多克隆抗体从绵羊血清中的纯化

从以 N-末端前 BNP 免疫化的绵羊的粗制血清开始，脂成分通过以气溶胶进行去脂过程而除去。随后以硫酸铵 (2M) 分离免疫球蛋白。以 pH 7.0 的 15mM 的 KPO_4 , 50mM NaCl 对经过溶解的沉淀进行透析并经 DEAE sepharose 层析。IgG 流分, PAK<rec. NT-前 BNP>S-IgG(DE) 存在于洗脱组分中。

3. 用于产生 NT-前 BNP 特异性多克隆抗体的连续亲和层析

为纯化针对氨基酸 1-21, PAK<rec. NT-前 BNP>M-IgG (IS, 1-21) 的 NT-前 BNP 特异性多克隆抗体而使用了 C-末端生物素化的肽 HPLGSPGSASDLETSGLQEQR-Bi (1-21-Bi, 序列号 NO 7)。亲和基质通过向 10ml 链亲和素覆层的丙烯酸脂聚合物颗粒加入 1mg 肽 (1-21-Bi) 而产生。

以 10ml 亲和基质填充成一根柱子，以 50mMKPO₄, 150mMNaCl, pH7.5 (PBS) 进行平衡。为进行连续亲和层析的第一步，将 850mg PAK<NT-前 - BNP>S-IgG(DE) 与柱结合。保留该洗脱物以用于第二步 (见后)。以 PBS 和 20mMKPO₄, 500mMNaCl, 0.1% Triton X-100, 0.5% 脱氧胆酸

钠, pH7.5 对柱进行洗涤。与该亲和基质特异结合的 IgG 被 ImmunoPure® Gentle Ag/Ab 洗脱缓冲液 (Pierce 产品号 21013) 洗脱。以 1M 丙酸再生该柱并在 PBS/NaN₃ 中保存。

通过与上述相同的途径, 肽 Bi-ELQVEQTSL (Bi-30-38 序列号 8) 被用于产生一种亲和基质以用于纯化抗氨基酸 30-38 的 NT-前 BNP 特异免疫球蛋白。从第一次亲和纯化的洗脱液中收集 PAK<rec. NT-前-BNP>M-IgG (IS, 30-38)。

4. PAK<NT-前 BNP>S-IgG (IS, 1-21) 的生物素化

以生物素化缓冲液 (100mM KPO₄, 70mM NaCl pH 8.0) 对亲和纯化的抗体进行透析并且随后该溶液被调至蛋白浓度 1mg/ml。将溶于 DMSO 的 D-生物素基-氨基己酸-N-羟基丁二酰亚胺酯以摩尔比为 1:7.5 加至抗体溶液中。通过加入 L-细胞溶素终止该反应, 通过透析除去多余的标记试剂。

5. PAK<NT-前 BNP>S-IgG (IS, 30-38) 的洋地黄毒苷化

以洋地黄毒苷缓冲液 (100mM KPO₄, 70mM NaCl pH 7.6) 对亲和纯化的抗体进行透析, 随后该溶液被调至蛋白浓度 1mg/ml。将溶于 DMSO 的洋地黄毒苷-3-CME-N-羟基丁二酰亚胺酯以摩尔比为 1:5 加至抗体溶液中。通过加入 L-细胞溶素终止该反应, 通过透析除去多余的标记试剂。

20 实施例 3

抗 N-末端前 BNP (1-76) 的单克隆抗体的产生和检测

1. 获得抗 NT-前 BNP (1-76) 的单克隆抗体

以 100µg 重组 N-末端前 BNP 抗原同弗氏佐剂对 8-12 周大的 Balb/c 小鼠给药以进行腹膜内免疫化。6 周后, 以 4 周为间隔进行 3 次进一步的免疫化。最后一次免疫化后一周取血并测定测试动物的血清中的抗体滴度。从阳性反应小鼠的脾脏中获得 B-淋巴细胞并将其同永生的骨髓瘤进行融合。该融合根据 Köhler 和 Millstein (Nature 256, 1975, p. 495-497) 的已知方法进行。此处构建的杂交细胞原代培养物通过常用途径进行克隆, 例如, 通过使用可购得的细胞分选仪或通过“限制性稀释”。只有这些克隆, 在适当的测试过程中, 如酶免分析 (ELISA - 方法) 同重组 N-末端前 BNP 发生阳性反应并且识别患者血清中的天然 N-末端前 BNP 的克隆, 接受加工 (见第 2 点)。通过这一途径收集了

产生本发明的单克隆抗体的几个杂交瘤细胞系。

为产生腹水， 5×10^6 的杂交瘤细胞经腹膜内注射入 Bal/c 小鼠，该小鼠在此之前已经过 Pristan 处理 1 至 2 次。2-3 周后在小鼠的腹部内获得腹水。该抗体从该腹水内通过常用途径分离。这些单克隆抗体特
5 异地抗人类 N-末端前 BNP。此后它们被称为 MAK M 10.1.11 或 MAK M 13.4.14。这些抗体均属于 IgG1, κ 亚类。

通过这一方法可以分离杂交瘤细胞系克隆 M 10.1.11 和 M 13.4.14，它们如上所述保存于 DSMZ 中。

2. 抗前 BNP 肽和重组 NT-前 BNP 的抗体的检测测试

10 为在被免疫化的小鼠血清，杂交瘤细胞的培养物上清或腹水中鉴定抗 NT-前 BNP 的抗体的存在及其特异性，该克隆根据下列测试原则进行估测：

a) 对重组 N-末端前 BNP 的反应

以 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 作为抗原的重组 NT-前 BNP 按 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 在室温下同微
15 滴度板 (Nunc, Maxisorb) 搅拌结合 1 小时，该重组 NT-前 BNP 处于加样缓冲液中 (Boehringer, 0.2M 碳酸钠/重碳酸钠, pH 9.3-9.5, 产品序列号 No. 726 559)。随后的加样在 PBS 缓冲液 (磷酸盐缓冲液, Oxid, Code-BR 14a) 和 1% Byco C 中进行 30 分钟。随后以洗涤缓冲液 (0.9 氯化钠溶液, 0.05% 吐温 20) 进行洗涤。抗体样品的温育以
20 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 在室温搅拌下进行 1 小时。随后以洗涤溶液进行两次进一步的洗涤。随后，以检测抗体 PAK<M-Fcy>S-Fab-过氧化物酶偶联物 (Boehringer Mannheim, 产品序列号 No. 1500 686) $100\text{mU}/\text{ml}$, $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 在室温搅拌下进行进一步的温育。以洗涤缓冲液进行进一步洗涤后，通过通常的途径 (例如，以 ABTS[®], 在室温下进行 30 分钟，以 ELISA
25 酶标仪在 405nm 测出以 mE 为单位的消光差异) 测定该过氧化物酶的活性。

b) 对 N-末端前 BNP 肽的反应性：

在该过程中，经链生物素处理的微滴度板同作为抗原的序列中 1
- 10, 8-18, 1-21, 16-30, 30-38, 39-50, 50-63 或 64-76
30 位的 NT-前 BNP-肽生物素偶联物结合，该偶联物以 $250\text{ng}/\text{ml}$ 溶于含 0.5% Byco C 的 PBS 缓冲液 (磷酸盐缓冲液, Oxid, Code-BR 14a), 结合以 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 在室温下搅拌进行 1 小时。随后，以洗涤缓冲液 (0.9

氯化钠溶液, 0.05%吐温 20) 进行洗涤。该抗体样品的温育和检测反应如 a) 所描述进行。根据同特定的 NT-前 BNP 肽的反应性可以确定表位的位置。

c) 对患者样品中的天然 N-末端前 BNP 的反应性:

5 以 5 μ g/ml 的 PAK<人类前 BNP>S-IgG (IS, (1-21) 或 (30-38) S-IgG 按 100 μ l/孔在室温下同微滴度板 (Nunc, Maxisorb) 搅拌结合 1 小时, 该重组 NT-前 BNP 处于加样缓冲液中 (Boehringer, 0.2M 碳酸钠/重碳酸钠, pH 9.3-9.5, 产品序列号 No. 726 559)。随后的加样在 PBS 缓冲液 (磷酸盐缓冲液, Oxid, Code-BR 14a) 和 1% Byco C 中
10 进行 30 分钟。随后以洗涤缓冲液 (0.9 氯化钠溶液, 0.05%吐温 20) 进行洗涤。以 100 μ l/孔在室温下同稀释于 PBS 缓冲液的患者血浆天然抗原在搅拌下进行温育 1 小时。随后以洗涤溶液进行两次进一步的洗涤并且以检测抗体 PAK<M-Fcy>S-Fab-过氧化物酶偶联物 (Boehringer Mannheim, 序列号 No. 1500 686) 100mU/ml, 100 μ l/孔在室温搅拌下
15 进行进一步的温育。以洗涤缓冲液进行进一步洗涤后, 通过通常的途径 (例如, 以 ABTS[®], 在室温下进行 30 分钟, 以 ELISA 酶标仪在 405nm 测出以 mE 为单位的消光差异) 测定该过氧化物酶的活性。

3. 结果: 单克隆和多克隆抗体对 N-末端前 BNP 的反应模式

20 a) 来自以 N-末端前 BNP 进行的免疫化的 MAKs (c=5 μ g/ml) 的反应性

表 1:

MAK	免疫原	对前BNP肽的反应性								重组前 BNP	天然 BNP
		1-10	8-18	1-21	16-30	30-38	39-50	50-63	64-76		
5.2.27	1-10	1.42	0.04	1.48	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	1.16	0.30
2.1.4	16-30	0.04	0.04	0.04	1.86	0.04	0.04	0.04	0.04	0.1	0.02
1.2.6	39-50	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	1.23	0.03	0.04	0.44	0.06

25 通过以不同的肽进行免疫化而获得的这些单克隆抗体同相对应的肽反映强烈。只有 2 个单克隆抗体被发现对重组 N-末端前 BNP 的反应性, 没有发生对患者库中的天然 N-末端前 BNP 的反应 (见表 1)。

b) 来自以重组 N-末端前 BNP 进行的免疫化的单克隆抗体 (MAKs)

的反应性

表 2:

MAK	对前BNP肽的反应性								重组前 BNP	天然 BNP
	1-10	8-18	1-21	16-30	30-38	39-50	50-63	64-76		
10.1.11	0.04	0.97	1.03	0.04	0.04	0.06	0.04	0.04	1.61	1.70
10.3.19	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.03	1.24	0.91
10.3.30	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.06	0.04	0.03	1.43	0.79
13.4.14	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.03	0.04	1.65	1.83
13.1.18	0.04	0.04	0.03	0.04	1.14	0.03	0.04	0.04	1.47	0.56
13.2.22	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	1.82	1.61

5

通过以重组的 N-末端前 BNP 进行免疫化而获得的这些单克隆抗体只同肽零星地进行反应，但同重组 N-末端前 BNP 或患者库中的天然 N-末端前 BNP 反应强烈。单个单克隆抗体同肽不反应表明了其对所谓的构象表位的识别（见表 2）。

10 c) 来自以重组 N-末端前 BNP 进行的免疫化的 PAKs 的反应性:

表 3:

PAK	免疫 吸附	对前BNP肽的反应性								重组前 BNP	天然 BNP
		1-10	8-18	1-21	16-30	30-38	39-50	50-63	64-76		
S-9212	无	0.13	1.81	1.98	1.16	2.99	0.83	1.22	0.06	0.89	-
S-9212	1-21	0.99	2.99	2.99	1.00	0.20	0.13	0.20	0.15	1.98	1.41
S-9212	30-38	0.08	0.07	0.07	0.07	2.99	0.06	0.17	0.06	2.99	1.41

15 所获得的 PAK 对肽 1-21 和 30-38 表现出最强的反应。出于该原因选择了这些表位并且在这些肽的辅助下对该 PAK 进行了正性免疫吸附。以肽 1-21 免疫吸附的 PAK 对区域 8-20 表现出了最强的反应，而以 N-末端序列 1-10 免疫吸附的 PAK 的反应明显降低。该方法免疫吸附的 PAKs 同重组 N-末端前 BNP 反应十分强烈，而以 PAK/PAK 三明治模式的 PAK
20 同天然样品反应强烈（见表 3）。

实施例 4

NT-前 BNP 测定的高灵敏免疫分析

通过使用实施例 2 和 3 产生的抗体可以建立一种高灵敏的免疫分析。在一般情况下，应用具不同表位识别的两种抗体是适当的。作为例子描述了所谓的三明治-ELISA。

一种经链亲合素覆层的微滴度板 (MTP) 被用作固相。10 μ l 未处理样品或校准物同 100 μ l 含两种表位特异性抗体的缓冲液一起被加入 MTP 孔，随即在室温下温育 1 小时。1 μ g/ml 生物素化的 PAK<rec.NT-前 BNP>S-IgG (IS, 1-21) 和 0.5 μ g/ml 的洋地黄毒苷化 PAK<rec.NT-前 BNP>S-IgG (IS, 30-38) 作为抗体被使用。随后吸出该溶液并以 350 μ l 洗涤缓冲液洗涤 3 次。随后以微量取液器加入 100 μ l 偶联溶液并在室温下再温育 1 小时。一种抗地高辛抗体-POD 偶联物作为偶联物被使用，其浓度为 100mIU/ml。随后吸出该偶联溶液并以 350 μ l 洗涤缓冲液洗涤 3 次。最后向孔内加入 ABTS[®]底物溶液在室温下测量 30 分钟。底物反应达到 30 分钟后在 MTP 酶标仪中在 405nm 的波长下以 495nm 为参照直接测量该微滴度板。

为测定灵敏度而建立了一条校准曲线并且测定了零标准的精度 (n=21)。人类 EDTA 血浆被用作校准物，该校准物随即通过在要求浓度下的重组 N-末端前 BNP 而建立。牛血浆被用作零标准。该结果见表 4。

表 4:

	消光值 (平均)	标准偏差 (n = 21)
校准物 a: 0 fmol/ml	131 mU	5.7 mU
校准物 b :5.04 fmol/ml	268 mU	
校准物 c: 19.9 fmol/ml	746 mU	
校准物 d: 50.5 fmol/ml	1500 mU	
校准物 e: 100.9 fmol/ml	2401 mU	

在 22.5mU x ml/fmol 的校准曲线梯度和 SD5.7mU 的基础上，根据 Kaiser 公式给出了较低检测限制:

$$UNG = 3 \text{ SD 零标准} / E_k \text{ 梯度} = 3 \times 5.7 / 22.5 = 0.76 \text{ fmol/ml.}$$

实施例 5

N-末端前 BNP 稳定性的测定

在实施例 4 中所描述的三明治 ELISA 的帮助下测量了 N-末端前 BNP 的分析物稳定性。为此目的，对 4 名 II-III 级 NYHA 患者进行取血并加入含 EDTA 的收集容器在室温下保存 3 天。每天取出一个样品测量其 N-末端前 BNP 含量。用于测定稳定性的 EDTA 血浆中的样品及参照直接在 4-8℃ 下冰冷并且在 15 分钟内进行离心。在 4℃ 和室温下保存该 EDTA 血浆并随即在 24 小时胁迫期间在不同时间点进行测量。结果见表 5。

10

表 5:

胁迫时间	收率 (%)	
EDTA-全血, 室温	24h	98.8
	48h	98.0
	72h	100.5
EDTA-血浆, 4℃	2 h	97.5
	4 h	98.5
	6 h	102.0
	24 h	103.0
EDTA-血浆, 室温	2 h	103.0
	4 h	104.8
	6 h	102.0
	24 h	96.0

15 这些数据证明 N-末端前 BNP 在被测试期间完全稳定，因此可以被用作常规参量。该结果与文献不一致 (Hunter et al., Clinical Endocrinology, 47, 287(1997)) 并且证实了通过以两种特异抗体进行的测试模式的选择和设计可以影响被分析物的稳定性的设想，该特异性抗体的表位并不位于该被分析物的远末端。

实施例 6

20 该 N-末端前 BNP 分析的诊断灵敏度的测定

在实施例 4 中所描述的测试被再次使用以测定诊断灵敏度。为此目的，114 个健康个体和 235 个 I 到 IV 级 NYHA 患者接受了测量。通常地，将健康个体同 I 级 NYHA 患者区分通常特别重要。

5 通过这一高灵敏度的分析在 110 个健康个体中测得平均值为 6.6 fmol/ml，其标准偏差为 7.3 fmol/ml。测得的最低值为 0.2 fmol/ml。这清楚地表明 <1.0 fmol/ml 的灵敏度对于精确检测参考区域是必要的。对于这一分布，所测定的上限正常值区域（97.5%）为 26.6 fmol/ml。

10 假定指标区域（Referenzwertbereiches）为 0-26.6 fmol/ml，233 名 I 到 IV 级 NYHA 患者中只有 16 名所表现的数值在该正常区域内。这对应的临床灵敏度为 93.3%。如果只考虑 I 级 NYHA 患者，37 名患者中有 30 名被测为阳性，其对应的灵敏度为 81.1%。

15 该结果证实通过高灵敏的 N-末端前 BNP 分析，对患有 I 级 NYHA 心力衰竭的患者同健康正常的群体进行清晰地区分是可能的。在此之前，本技术领域的分析（Dagubatti et al., Cardiovascular Research 36(1997), 246）不能达到这一点。

序列表

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> 鉴定N-末端前BNP的方法

<130> 51810AWO-S2

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> E. coli

<214> 大肠杆菌

<400> 1

ccggatccca cccgctg

17

<210> 2

<211> 79

<212> DNA

<213> E. coli

<214> 大肠杆菌

<400> 2

cgggatccca cccgctgggt tcccggggtt ccgcttccga cctggaaacc tccgggtctgc 60
aggaacagcg taaccacct 79

<210> 3

<211> 70

<212> DNA

<213> E. coli

<214> 大肠杆菌

<400> 3

cggttccagg gaggtctggt caacctgcag ttcggacagt ttacctgca ggtggttacg 60
ctgttccctgc 70

<210> 4

<211> 71

<212> DNA

<213> E. coli

<214> 大肠杆菌

<400> 4

cagacctccc tggaaaccgt gcaggaatcc ccgctccga ccggtgcttg gaaatcccggt 60

gaagttgcta c

71

<210> 5

<211> 87

<212> DNA

<213> E. coli

<214> 大肠杆菌

<400> 5

cccaagctta acgCGGagca cgcaggggtgt acagaaccat ttacgggga ccacggatac 60

cttcggtagc aacttcacgg gatttcc 87

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> E. coli

<214> 大肠杆菌

<400> 6

cccaagctta acgCGGagc

19

专利名称(译)	鉴定N - 末端前BNP的方法		
公开(公告)号	CN1339107A	公开(公告)日	2002-03-06
申请号	CN00803234.3	申请日	2000-01-27
[标]申请(专利权)人(译)	罗氏诊断公司		
申请(专利权)人(译)	罗赫诊断器材股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	罗赫诊断器材股份有限公司		
[标]发明人	J卡尔 H利尔 P斯塔尔 K克吕格尔 A博格亚 A加卢塞尔		
发明人	J·卡尔 H·利尔 P·斯塔尔 K·克吕格尔 A·博格亚 A·加卢塞尔		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/575 C07K16/26 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12R1/91 G01N G01N33/68 C07K14/58 C07K16/18 C12N15/06		
CPC分类号	C07K2317/34 C07K16/26 G01N33/6887		
代理人(译)	罗宏		
优先权	19903489 1999-01-29 DE 19911044 1999-03-12 DE		
其他公开文献	CN1327228C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及到一种方法,该方法用于通过至少两种抗体来鉴定样品中的N - 末端前BNP,这些抗体检测N - 末端前BNP的不同表位。该方法用于对健康个体和NYHA I至IV级患者的样品进行区分或归类。本发明进一步涉及到重组N - 末端前BNP,该N - 末端前BNP作为标准在鉴定N - 末端前BNP的方法中的应用,用于检测重组N - 末端前BNP的抗体及它们的生产。

MAK	免疫原	对前BNP肽的反应性								重组前 BNP	天然 BNP
		1-10	8-18	1-21	16-30	30-38	39-50	50-63	64-76		
5.2.27	1-10	1.42	0.04	1.48	0.05	0.03	0.04	0.04	0.04	1.16	0.30
2.1.4	16-30	0.04	0.04	0.04	1.86	0.04	0.04	0.04	0.04	0.1	0.02
1.2.6	39-50	0.04	0.04	0.03	0.04	0.03	1.23	0.03	0.04	0.44	0.06