

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5686593号
(P5686593)

(45) 発行日 平成27年3月18日 (2015. 3. 18)

(24) 登録日 平成27年1月30日 (2015. 1. 30)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006. 01)	GO 1 N 33/53	B
GO 1 N 33/577	(2006. 01)	GO 1 N 33/577	B
CO 7 K 16/18	(2006. 01)	CO 7 K 16/18	Z N A
C 1 2 P 21/08	(2006. 01)	C 1 2 P 21/08	

請求項の数 1 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2010-502538 (P2010-502538)	(73) 特許権者	508347579
(86) (22) 出願日	平成20年4月14日 (2008. 4. 14)		ヒュテスト エルテデー.
(65) 公表番号	特表2010-523994 (P2010-523994A)		HYTEST LTD.
(43) 公表日	平成22年7月15日 (2010. 7. 15)		フィンランド国、エフアイー20520
(86) 国際出願番号	PCT/FI2008/050184		トゥルク、ヨウカハイセンカトゥ 6、イ
(87) 国際公開番号	W02008/125733		ンテッゲート 6階
(87) 国際公開日	平成20年10月23日 (2008. 10. 23)	(74) 代理人	100116838
審査請求日	平成23年2月1日 (2011. 2. 1)		弁理士 渡邊 潤三
(31) 優先権主張番号	20075251	(72) 発明者	タムー、ナタリア、エヌ.
(32) 優先日	平成19年4月13日 (2007. 4. 13)		ロシア国、115035、モスクワ、アー
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		ル、63、コスモミアンスカヤ エヌエ
(31) 優先権主張番号	60/911,603		ービー、エスティー、4/22 ビー
(32) 優先日	平成19年4月13日 (2007. 4. 13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BNPおよびproBNPからなる群より選ばれる不安定な抗原を定量するための免疫アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

BNP、proBNP、およびそれらの断片をサンプルから検出するための免疫アッセイの方法であって、

(a) 抗原を、BNP分子の_{1 1} FGRKMDRISSS_{2 2} (配列番号3)断片に特異的な第1抗体と接触させて、1次免疫複合体を得、

(b) 工程(a)で得た1次免疫複合体を、該1次免疫複合体を認識し、且つ、遊離のBNP、proBNPやそれらの断片、および遊離の第1抗体を全く認識しないか、もしくは該1次免疫複合体を認識する際の親和性の10分の1以下の低い親和性をもって認識する第2抗体と接触させて、2次免疫複合体を得、そして

(c) 2次免疫複合体の形成を検出する

ことを包含し、上記工程(a)~(c)によって検出されたタンパク質は、BNP内またはproBNP内で離れて位置する複数のエピトープのそれぞれに特異的な抗体を用いて検出したタンパク質よりも、見かけ上の安定性が高まっていることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫アッセイに関し、不安定な抗原を検出するための免疫アッセイの方法を提供する。本発明の方法は、BNP、proBNPおよびそれらの断片の検出に特に適している。

【背景技術】

【0002】

BNPとproBNPは、臨床において広く使用されている、心不全(HF)の信頼性の高いマーカーである。BNPまたはproBNP分子由来のBNP断片の異なるエピトープに特異的な2種のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を使用する数種のサンドウィッチ免疫アッセイ(従来のアッセイ)が、文献に記載されている。

【0003】

BNP分子は、水溶液中では急速に免疫学的活性を喪失する非常に不安定な分子として知られている。このような活性の喪失は、通常、ペプチドのタンパク分解と関連している。抗原の定性的または定量的な免疫検出に一般的に用いられているサンドウィッチ免疫アッセイは、2種以上の異なるエピトープのそれぞれに特異的な2種以上の抗体を使用する。エピトープ間の距離が長いほど、抗体に対応する複数のエピトープの間にタンパク分解部位が含まれる確率が上昇するため、抗原のタンパク分解に対するアッセイの感受性が上昇する。それとは逆に、エピトープが互いに近くに位置しているほど、エピトープ間で分子のタンパク分解性開裂が生じる確率も減少する。

【0004】

非常に小さな分子を対象とした免疫アッセイ方法に関する記載もあり、そこには抗メタタイプ抗体と呼ばれる抗体の使用も含まれている。このような方法は、例えばジゴキシンの検出(Self et al, 1994, Clin. Chem. 40:2035-2041)およびアンジオテンシンIIの検出(Towbin et al, 1995, J. Immunol. Meth. 181:167-176)について開示されている。

【0005】

しかしながら、このような方法は非常に特異的なモノクローナル抗体を必要するため、種々の検体に応用することは簡単ではない。

【0006】

発明の詳細な説明

本願明細書に、ヒト血液中のBNPおよびproBNPの定量化のための免疫アッセイについて記載する。このアッセイを「不均等サンドウィッチ法」と命名した。このアッセイは、全ての不安定な抗原の免疫検出に応用可能である。

【0007】

本願で開示する免疫アッセイは2種の異なるモノクローナル抗体を使用する。BNPまたはproBNPの検出において、第1モノクローナル抗体(モノクローナル抗体24C5)は、BNPのアミノ酸残基11番~22番(₁₁FGRKMDRISSSS₂₂)(proBNPのアミノ酸残基87番~98番に対応)を包含する領域(またはこの領域の一部)に特異的である(図1)。第2抗体(即ち、モノクローナル抗体Ab-BNP2とAb-BNP4)はシグナル発生成分によって標識されており、第1抗体と抗原(BNP、proBNPまたはそれらの断片)であって、該断片は、アミノ酸残基₁₁FGRKMDRISSSS₂₂またはこのアミノ酸配列内の少なくとも3個のアミノ酸残基を包含するものである)からなる免疫複合体を認識する。第2抗体は、遊離の抗原やその断片、または遊離のモノクローナル抗体24C5を認識しない(または10分の1以下の低い親和性をもって認識する)。従って、モノクローナル抗体24C5とBNP(またはproBNPやそれらの断片)を包含する1次免疫複合体は、第2抗体(モノクローナル抗体Ab-BNP2とAb-BNP4)の抗原となる。

【0008】

従って、本発明の一般的な目的は、不安定な抗原をサンプルから検出するための、以下の工程を包含する免疫アッセイの方法を提供することである。

(a) 目的の抗原を、この抗原分子の第1エピトープに特異的な第1抗体と接触させて、1次免疫複合体を得、

(b) 工程(a)で得た1次免疫複合体を、1次免疫複合体を認識し、目的の抗原と第1抗体によって形成された第2エピトープに特異的な抗体であって、遊離の抗原やその断片、または遊離の第1抗体を認識することができないか、1次免疫複合体を認識する

10

20

30

40

50

際の親和性の10分の1以下の低い親和性でもって認識する抗体である第2抗体と接触させて、2次免疫複合体を得、そして

(c) 2次免疫複合体の形成を検出する。

【0009】

本発明の詳細な目的は、BNP、proBNP、およびそれらの断片からなる群より選ばれる不安定な抗原をサンプルから検出するための、以下の工程を包含する免疫アッセイの方法を提供することである。

(a) 抗原を、BNP分子の₁₁FGRKMDRISSSS₂₂断片またはそこに含まれる少なくとも3個のアミノ酸残基を包含する部分配列からなるペプチドに特異的な第1抗体と接触させて、1次免疫複合体を得、

(b) 工程(a)で得た1次免疫複合体を、1次免疫複合体を認識する抗体であって、遊離のBNP、proBNPやそれらの断片、または遊離の第1抗体を認識することができないか、1次免疫複合体を認識する際の親和性の10分の1以下の低い親和性でもって認識する抗体である第2抗体と接触させて、2次免疫複合体を得、そして

(c) 2次免疫複合体の形成を検出する。

【0010】

本発明者らは、本発明の方法に適応可能な特異的なモノクローナル抗体の開発に成功した。これら抗体を提供することも本発明の特定の目的である。

【0011】

ここに記載する不均等サンドウィッチ法は、離れて位置する複数のエピトープのそれぞれに特異的な抗体を使用するアッセイと比べて、抗原のタンパク分解に対して並外れた非感受性を発揮する。

【0012】

さらにこのような手法は、他の1種以上の抗原と類似した抗原(即ち、複数の異なるエピトープをその表面に有しているものの、特定の抗原を他の抗原から区別するための独自のエピトープは1つ(または複数であっても非常に限られた数)である抗原)の、免疫検出のために開発したアッセイとしても使用することができる。

【0013】

実施例

注: 安定Eu-キレートで標識した抗体を、全ての実験において検出用抗体として使用した。実験で使用したモノクローナル抗体24C5、Ab-BNP2、Ab-BNP4、57H3および50E1は、フィンランド国、トゥルク、ヒュテスト アエルテーデー(Hytest Ltd)より入手可能である。

【実施例1】

【0014】

抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、モノクローナル抗体24C5と複合体を形成していないBNPやproBNPを認識しない(図2)

図2Aおよび図2Bに示した実験においては、抗原(それぞれBNPおよびproBNP)をプレートの被覆に使用し、直接免疫アッセイによってEu-標識抗体を抗原で試験した。抗体24C5は両方の形態の抗原を認識したが、モノクローナル抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、2種の抗原のいずれに対しても応答を示さなかった(シグナルはバックグラウンド値と同等)。

【0015】

図2Cに示した実験においては、BNP分子上の種々のエピトープに対して特異的なポリクローナル抗体でプレートを被覆した。第2工程では、プレートをまずBNPと共にインキュベートし、次にEu-標識抗体とインキュベートした。このような手法は、プレート表面に対している異なる配向で抗原を結合する助けとなり、プレート表面上の分子の配向が実験結果に影響しないことを保証する。この実験においては、上述と同じ結果が得られた。即ち、モノクローナル抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、モノクローナル抗体24C5と複合体を形成していない抗原を認識することはできなかった。

10

20

30

40

50

【実施例 2】

【0016】

抗体 Ab - BNP 2 と Ab - BNP 4 は、モノクローナル抗体 24C5 と免疫複合体を形成している BNP およびペプチド 11 - 22 を認識することができる (図 3)

モノクローナル抗体 24C5 は、BNP 分子の 11 番 ~ 22 番断片または proBNP の対応する 87 番 ~ 98 番領域に特異的である。免疫複合体である 24C5 - BNP および 24C5 - ペプチド 11 - 22 がモノクローナル抗体である Ab - BNP 2 と Ab - BNP 4 によって認識され得ることを示すために、モノクローナル抗体 24C5 を用いてプレートを被覆し、その後、プレートを BNP、または BNP 配列のアミノ酸 11 番 ~ 22 番に対応する合成ペプチド (ペプチド 11 - 22) と共にインキュベートした。モノクローナル抗体 24C5 と抗原との間に免疫複合体が形成された後、プレートを Eu - 標識抗体である Ab - BNP 2、Ab - BNP 4、または BNP 分子の 26 番 ~ 32 番領域に特異的な 57H3 と共にインキュベートした。

10

【0017】

不均等サンドウィッチ法は BNP とペプチドをほぼ同じ効率で認識する。抗体 24C5 (被覆) - 57H3 - Eu を使用するアッセイは、ペプチド 11 - 22 を認識しなかった (シグナルはバックグラウンド値と同等)。

【実施例 3】

【0018】

抗体 Ab - BNP 2 と Ab - BNP 4 は、モノクローナル抗体 24C5 と免疫複合体を形成する proBNP を認識することができる (図 4)

20

不均等サンドウィッチ法は、従来のアッセイと同じ効率で proBNP を認識する。本発明者らはモノクローナル抗体 24C5 を用いてプレートを被覆し、その後プレートを、初めに組み換え proBNP (5 ng/ml)、続いて Eu - 標識抗体である Ab - BNP 2、Ab - BNP 4、または BNP 分子の 26 番 ~ 32 番領域に特異的な 57H3 と共にインキュベートした。不均等サンドウィッチ法と従来の免疫アッセイのそれぞれで得られたシグナルは同等であった。そこで、新規なアッセイは proBNP の定量的免疫検出に使用可能であると結論付けた。

【実施例 4】

【0019】

抗原の見かけ上の安定性 (図 5)

30

合成 BNP (Bachem 製) をプールした正常ヒト血漿に加え (2 ng/ml)、+4 で種々の時間インキュベートし、免疫活性を 3 種の異なるアッセイ、即ち、1 種の従来法と 2 種の不均等サンドウィッチ法で試験した。

【0020】

本願明細書に記載した不均等サンドウィッチ法によって決定した抗原の見かけ上の安定性は、BNP 分子の異なる部位に特異的な 2 種のモノクローナル抗体を使用する従来の BNP アッセイによって決定した安定性と比べて有意に高かった。従来のアッセイの一例として、BNP 分子の領域 26 番 ~ 32 番に特異的なモノクローナル抗体 50E1 と BNP 分子の領域 11 番 ~ 22 番に特異的なモノクローナル抗体 24C5 を用いるアッセイを使用した。不均等サンドウィッチ法を免疫活性の決定に使用した場合には、免疫活性の約 70% (Ab - BNP 2 を用いたアッセイと Ab - BNP 4 を用いたアッセイがそれぞれ 69.8% と 68%) が +4 において 24 時間インキュベートした後に観察され、従来のアッセイの場合は 28% しか観察されなかった。インキュベーション開始から 6 日後には、従来のアッセイ法では免疫活性が見られなかったが、不均等サンドウィッチ法の場合には、初期免疫活性の約 1/4 が観察された。

40

【実施例 5】

【0021】

心不全患者 (HF 患者) 血液および健常ドナー血液における BNP / proBNP の測定 (図 6)

50

従来のBNPアッセイのみならず、不均等サンドウィッチ法も“BNP免疫活性”を示す抗原の2つの形態、即ち、BNPとproBNP、をヒト血液中から検出することができる。数人のHF患者および健常ドナーから得た血液サンプルについて、以下の3種のアッセイで試験した：BNP分子の26番～32番断片に特異的な捕捉モノクローナル抗体50E1と検出モノクローナル抗体24C5-Euを用いた1種の従来法、および2種の不均等サンドウィッチ法。全てのアッセイにおいて、合成BNPを検量に用いた。図6から明らかなように、3種のアッセイによる試験結果は非常に類似していた。いくつかのサンプルにおいては、従来のアッセイによる試験結果は不均等サンドウィッチ法よりも低かった。この観察結果は、このようなサンプルにおいてはBNPが部分的に分解されていたものの、不均等サンドウィッチ法において抗原はより高い見かけ上の安定性を提示するため、これらアッセイで決定した抗原値は従来のアッセイよりも高くなったと説明することができる。

10

【実施例6】

【0022】

検量曲線(図7)

合成BNPを抗原として使用した2種の不均等サンドウィッチ法および1種の従来アッセイのための検量曲線を、図7(A、BとC)に示した。両方の不均等サンドウィッチ法が、従来のアッセイと同等の高感受性を示し、ヒト血液中のBNP免疫活性およびproBNP免疫活性の厳密な検出にも使用可能である。

【図面の簡単な説明】

20

【0023】

【図1】BNPとproBNPの構造およびモノクローナル抗体24C5のエピトープ特異性。モノクローナル抗体24C5は、BNP分子のアミノ酸残基11番～22番を包含する断片およびproBNPのアミノ酸残基87番～98番からなる断片(灰色で示した)を認識する。

【図2A】抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、モノクローナル抗体24C5と複合体を形成していないBNPやproBNPを認識しない。Eu-標識モノクローナル抗体24C5、Ab-BNP2、Ab-BNP4(200ng/ウェル)を、50ng/ウェルのBNPで被覆したプレート内でインキュベートした。

【図2B】抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、モノクローナル抗体24C5と複合体を形成していないBNPやproBNPを認識しない。Eu-標識モノクローナル抗体24C5、Ab-BNP2、Ab-BNP4(200ng/ウェル)を、100ng/ウェルのproBNPで被覆したプレート内でインキュベートした。

30

【図2C】抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、モノクローナル抗体24C5と複合体を形成していないBNPやproBNPを認識しない。Eu-標識モノクローナル抗体24C5、Ab-BNP2、Ab-BNP4(200ng/ウェル)を、BNP(0.5ng/ウェル)とプレインキュベートしたポリクローナル抗BNP抗体(2μg/ウェル)で被覆したプレート内でインキュベートした。

【図3】抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、モノクローナル抗体24C5とBNP(またはペプチド11-22)との免疫複合体を認識することができる。3つの工程からなるアッセイのプロトコルは次の通りである。第1工程：プレートを捕捉モノクローナル抗体24C5でプレコートし、第2工程：プレートを洗浄した後、抗原(BNPまたはペプチド11-22)と共にインキュベートし、第3工程：プレートを洗浄した後、検出用(Eu³⁺標識)抗体(Ab-BNP2、Ab-BNP4または57H3)と共にインキュベートした。洗浄後、増幅溶液を添加し、シグナルを測定した。

40

【図4】抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、モノクローナル抗体24C5と免疫複合体を形成するproBNPを認識することができる。3つの工程からなるアッセイのプロトコルは次の通りである。第1工程：プレートを捕捉モノクローナル抗体24C5でプレコートし、第2工程：プレートを洗浄した後、proBNP(5ng/ml)と共にインキュベートし、第3工程：プレートを洗浄した後、検出用抗体(Ab-BNP2

50

、Ab - BNP 4 または 57H3) と共にインキュベートした。洗浄後、増幅溶液を添加し、シグナルを測定した。

【図5】正常ヒト血漿中のBNPの安定性。合成BNPをプールした正常ヒト血漿に加え(2ng/ml)、+4で種々の時間インキュベートした。免疫活性を3種の異なるアッセイ、即ち、1種の従来法と2種の不均等サンドウィッチ法で試験した。

【図6】HF患者および健常ドナーの血液におけるBNP/proBNP測定。心不全患者6人の血漿サンプル(HF1~HF6)および健常ドナーの血漿サンプル(NP1~NP4)を3種のアッセイで試験した。合成BNP(Bachem製)を全てのアッセイの検量に使用した。

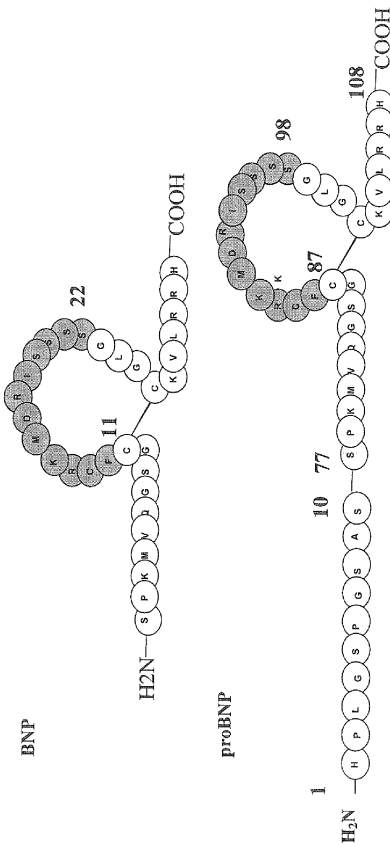
【図7A】従来のアッセイ(50E1 - 24C5 - Eu)のための検量曲線。抗原：合成BNP(Bachem製)。

【図7B】不均等サンドウィッチ法(24C5 - Ab - BNP2)のための検量曲線。抗原：合成BNP(Bachem製)。

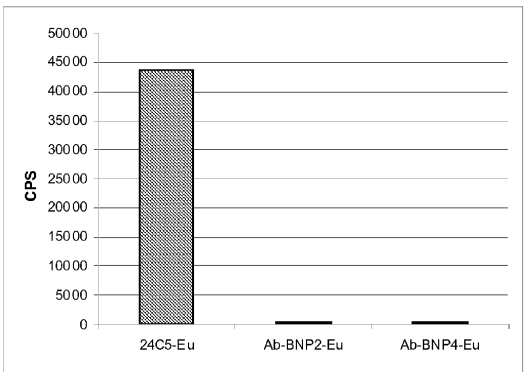
【図7C】不均等サンドウィッチ法(24C5 - Ab - BNP4)のための検量曲線。抗原：合成BNP(Bachem製)。

10

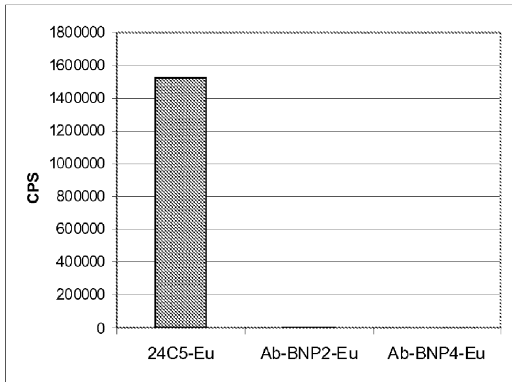
【図1】



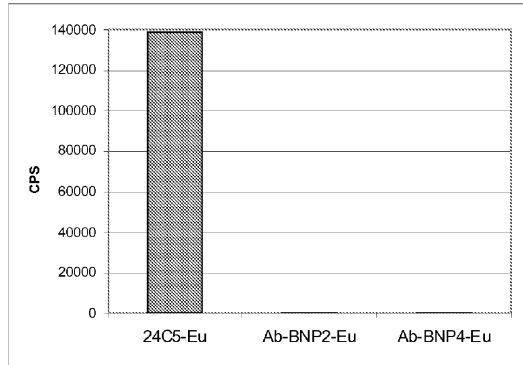
【図2A】



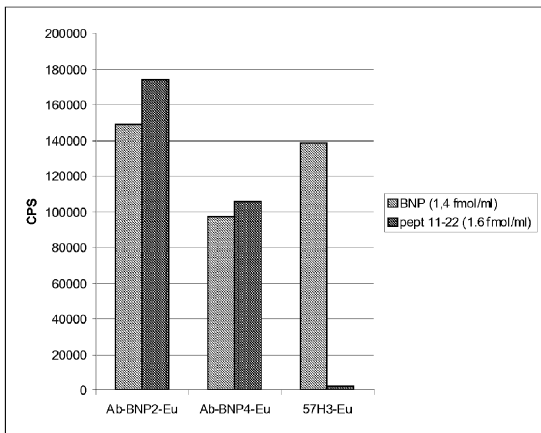
【 図 2 B 】



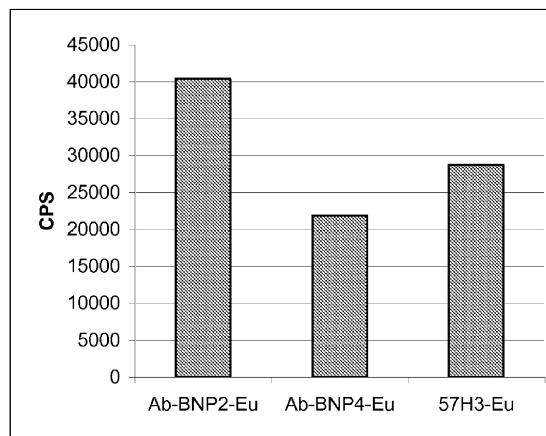
【 図 2 C 】



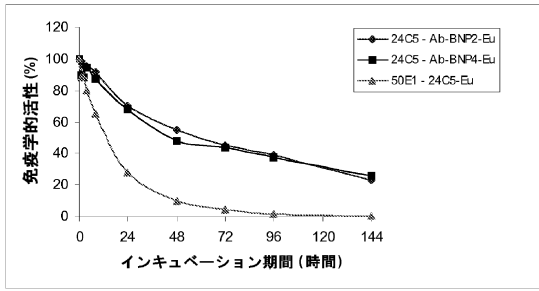
【 図 3 】



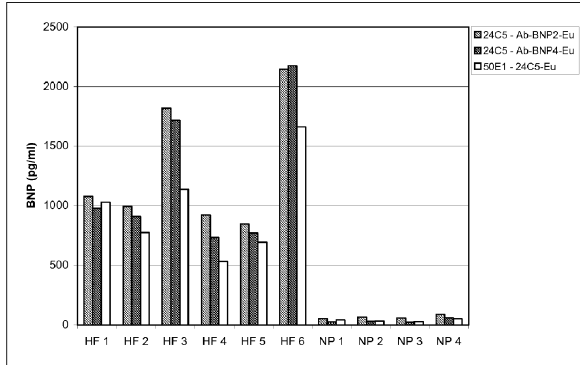
【 図 4 】



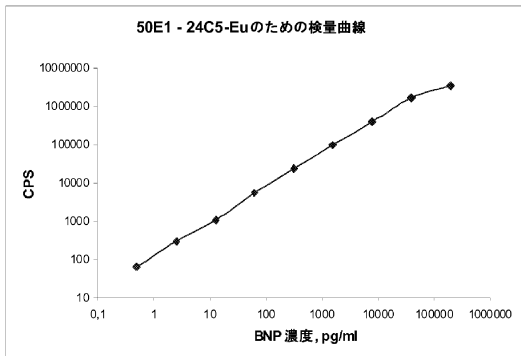
【 図 5 】



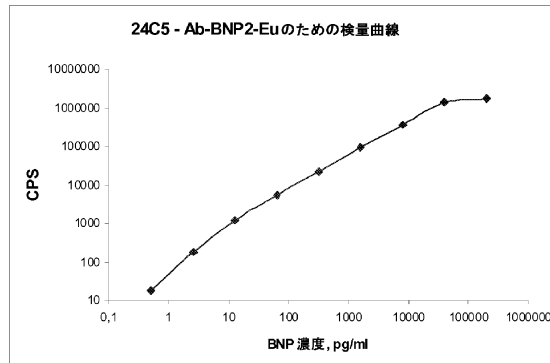
【 図 6 】



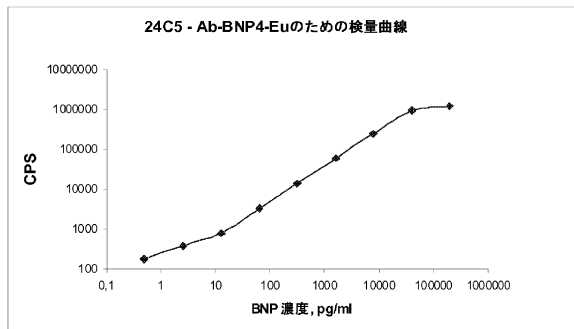
【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



【 図 7 C 】



【 配列表 】

0005686593000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 カトゥルーカ, アレクセイ, ジー.
フィンランド国、エフアイ - 20610 トゥルク、ナパトゥルンカトゥ 3 イー 32
- (72)発明者 フィラトフ, ブラディミール, エル.
ロシア国、117647、モスクワ、アール. 121、アカデミカ カピッシ エステイー. 30
- (72)発明者 コロソヴァ, オルガ, ブイ.
ロシア国、117198、モスクワ、エーピーピー. 355、オストロビチアノヴァ 9 / 4

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 国際公開第2006/004318 (WO, A1)
特許第3516655 (JP, B2)
Karl J, Borgya A, Gallusser A, Huber E, Krueger K, Rollinger W, Schenk J. , Development of a novel, N-terminal-proBNP (NT-proBNP) assay with a low detection limit. , Scand J Clin Lab Invest Suppl , 1999年, Vol.230 , Page.177-181
Teramura Y, Arima Y, Iwata H. , Surface plasmon resonance-based highly sensitive immuno sensing for brain natriuretic peptide using nanobeads for signal amplification. , Anal Biochem , 2006年10月, Vol.357, No.2 , Page.208-215
- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	用于定量选自BNP和proBNP的不稳定抗原的免疫测定法		
公开(公告)号	JP5686593B2	公开(公告)日	2015-03-18
申请号	JP2010502538	申请日	2008-04-14
[标]申请(专利权)人(译)	西特斯特有限公司		
申请(专利权)人(译)	Hyutesuto Aerutede.		
当前申请(专利权)人(译)	Hyutesuto Aerutede.		
[标]发明人	タムーナタリアエヌ カトゥルーカアレクセイジー フィラトフブラディミールエル コロソヴァオルガブイ		
发明人	タムー,ナタリア,エヌ. カトゥルーカ,アレクセイ,ジー. フィラトフ,ブラディミール,エル. コロソヴァ,オルガ,ブイ.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 C07K16/18 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/26 C07K2317/32 C07K2317/34 G01N33/6887 G01N33/6893 G01N33/74 G01N2333/58		
FI分类号	G01N33/53.B G01N33/577.B C07K16/18.ZNA C12P21/08		
优先权	2007005251 2007-04-13 FI 60/911603 2007-04-13 US		
其他公开文献	JP2010523994A5 JP2010523994A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于检测BNP, proBNP及其片段的免疫测定。该测定基本上包括以下步骤: a) 将抗原与对应于BNP分子的氨基酸11-22的片段或包含其中包含的至少3个氨基酸残基的部分序列一起温育。 B) 使步骤(a)中获得的初级免疫复合物与识别初级免疫复合物的抗体接触, 其中通过使初级免疫复合物与对肽特异的第一抗体接触获得初级免疫缀合物, 与游离BNP, proBNP或不能识别游离一抗以获得二级免疫复合物的第二抗体接触, 和c) 检测二级免疫复合物。