

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-181304
(P2005-181304A)

(43) 公開日 平成17年7月7日(2005.7.7)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/53
// GO 1 N 33/543

F I

GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/543 5 2 1

テーマコード (参考)

審査請求 有 請求項の数 7 O L 外国語出願 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2004-339760 (P2004-339760)
(22) 出願日 平成16年11月25日 (2004.11.25)
(31) 優先権主張番号 10355731.8
(32) 優先日 平成15年11月28日 (2003.11.28)
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(71) 出願人 591003013
エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
F. HOFFMANN-LA ROCH
E AKTIENGESELLSCHAFT
スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
グレンツアーヘルストラツセ124
(74) 代理人 100091096
弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人 100096183
弁理士 石井 貞次
(74) 代理人 100118773
弁理士 藤田 節

最終頁に続く

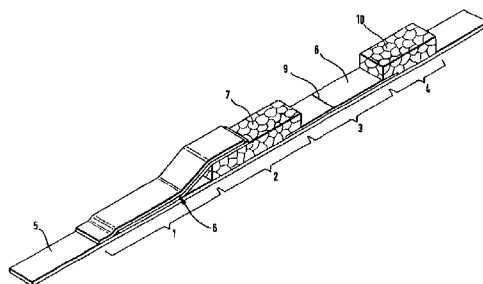
(54) 【発明の名称】 NT-proBNPを測定するためのサンドイッチ分析試験

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 心不全の診断および管理のマーカであるN末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド (NT-proBNP) を免疫学的に迅速に測定する方法を提供する。

【解決手段】 NT-proBNPに対する2つの抗体を用いて免疫学的サンドイッチ法を行う。抗体のうちの一つはモノクローナル抗体 (MAB) を用いる。抗体の組み合わせはNT-proBNPのアミノ酸配列の異なる2箇所のエピトープを認識する2抗体を用いる。種々のエピトープの組み合わせが可能である。方法として免疫クロマトグラフィーで測定を行う。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項1】

NT-proBNPを測定するための免疫学的サンドイッチ試験であって、
少なくとも1つがMABである、NT-proBNPに対する少なくとも2つの抗体を使用し、

これらの抗体の1つは、少なくともNT-proBNPのアミノ酸38～50を含むエピトープの部分に対するものであり、

これらの抗体の1つは、少なくともNT-proBNPのアミノ酸1～37又は43～76を含むエピトープの部分に対するものであり、

上記抗体により認識されるエピトープはわずかに重複していてもよい、
ことを特徴とする、NT-proBNPを測定するための免疫学的サンドイッチ試験。

10

【請求項2】

以下の抗体の組み合わせ：

AB(39-50)と、AB(1-21)又はAB(13-16)又はAB(22-38)又はAB(27-31)又はAB(51-76)又はAB(64-67)との組み合わせ；あるいは

AB(38-42)と、AB(1-21)又はAB(22-37)又はAB(43-76)との組み合わせ；あるいは

AB(44-50)と、AB(1-21)又はAB(22-43)又はAB(51-76)との組み合わせ

20

の1つを使用することを特徴とする、請求項1記載の免疫学的試験。

【請求項3】

以下のPAB/MABの組み合わせ：

PAB(39-50)と、MAB(1-21)又はMAB(13-16)又はMAB(22-38)又はMAB(27-31)又はMAB(51-76)又はMAB(64-67)との組み合わせ；あるいは

PAB(38-42)と、MAB(1-21)又はMAB(22-37)又はMAB(43-76)との組み合わせ；あるいは

PAB(44-50)と、MAB(1-21)又はMAB(22-43)又はMAB(51-76)との組み合わせ

30

の1つを使用することを特徴とする、請求項1又は2記載の免疫学的試験。

【請求項4】

以下の抗体の組み合わせ：

MAB 18.4.34(27-31)と、PAB(39-50)又はPAB(38-42)又はPAB(44-50)との組み合わせ；あるいは

MAB 17.3.1(13-16)と、PAB(39-50)又はPAB(38-42)又はPAB(44-50)との組み合わせ

を使用することを特徴とする、請求項1記載の免疫学的試験。

【請求項5】

以下の抗体の組み合わせ：

MAB 18.4.34(27-31)とMAB(38-42)との組み合わせ；あるいは

MAB 18.9.8(27-31)とMAB(38-42)との組み合わせ

を使用することを特徴とする、請求項1記載の免疫学的試験。

40

【請求項6】

MAB(38-42)がMAB 16.1.39(38-42)であることを特徴とする、請求項5記載の免疫学的試験。

【請求項7】

免疫学的迅速試験であることを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項に記載の免疫学的試験。

50

【請求項 8】

抗体の1つが抗体-金結合体として存在することを特徴とする、請求項7記載の免疫学的迅速試験。

【請求項 9】

抗体がビオチニル化抗体として存在することを特徴とする、請求項7記載の免疫学的迅速試験。

【請求項 10】

請求項1～9のいずれか1項に記載の免疫学的試験を用いることを特徴とする、NT-proBNPの検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、N末端プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド(NT-proBNP)を測定するための、サンドイッチ分析試験、特に試験成分、及び特にサンドイッチ法の原理を利用した免疫クロマトグラフィー試験ストリップの形態に関する。

【背景技術】

【0002】

NT-proBNPは、心不全の診断及び管理のための非常に有望なマーカーである。心不全及びこの疾患のためのマーカー物質としてのNT-proBNPの重要性に関する概説は、例えばWO00/45176号の第1～4頁(該参考文献は本明細書に明示的に組み込まれる)に記載されている。さらに、米国特許第5,786,163号、同第6,461,828号、同第6,117,644号、EP1151304号、WO02/083913号及びEP特許出願第03010591.0号(2003年5月12日、Klementら)の文献は、NT-proBNP、これに対する抗体、及び測定方法に関する。

【0003】

現在、診断市場ではin-vitroでのNT-proBNP試験しか入手可能ではなく、Roche Diagnostics製の完全自動化Electsys(登録商標)NT-proBNP試験であり、これは、電気化学発光検出を用いたサンドイッチ反応に基づいている。この試験は、巨大な中央研究所において使用する目的で設計されており、また、正確に計量した液体試薬を使用するため、液体を計量し、また試験を行うためには発光シグナルを検出するための比較的複雑な機械が必要である。必要であれば評価装置を使用することなく可視的に評価することのできる、取扱いが簡便なNT-proBNPの迅速試験は現在市場にはない。

【0004】

物質を免疫学的に検出するための迅速試験は、長い間、例えばWO97/06439号、EP0291194号、米国特許第5,591,645号、同第4,861,711号、同第5,141,850号、同第6,506,612号、同第5,458,852号、同第5,073,484号に記載されるように、多くの種々のパラメーターについて知られている。これらの場合、免疫学的検出試薬(本質的には、標識及び未標識の抗体又は抗原)は、通常、支持体上又は支持体中に存在する液体サンプル(特に、血液、血清、血漿、尿、唾液などの体液)の移動が可能となるよう支持体上に乾燥形態で提供される。この目的のため、支持体は、好ましくは毛管作用を有するもの、例えばキャピラリー溝を備えた膜又はプラスチック製支持体である。当業者においては、これらは免疫クロマトグラフィー試験ストリップ又は試験装置と呼ばれることが多い。

【0005】

急性呼吸窮迫症の患者においては、NT-proBNPの測定をできる限り迅速に行って、呼吸困難が原因で生じる心不全を排除又は診断し、適切な処置を開始することが好ましい。Electsys(登録商標)NT-proBNP試験は中央研究所においてのみ実施できるものであるため、日常の時間外でNT-proBNPを迅速に測定することは困難

10

20

30

40

50

である。従って、日常の時間外に救急病棟内で直接実施することができる迅速試験が利用可能であれば、救急病棟に特に利益がもたらされるだろう。しかしながら、この迅速試験は、実際に行われる試験の種類とは無関係に結果が良好な適合性を満たすように、中央研究所の基準方法（E l e c s y s（登録商標）NT - p r o B N P）と同じ基準範囲及びカットオフ値を保証する必要がある。

【0006】

E l e c s y s（登録商標）NT - p r o B N P試験で使用されるポリクローナル抗体（P A B）は、NT - p r o B N Pの非常に特別な分画を認識するものである（「ネイティブ」NT - p r o B N P；E P特許出願第03 010 591.0号（2003年5月12日、K l e m t ら）、この試験では、NT - p r o B N Pのアミノ酸1 - 21（A A 1 - 21）及び39 - 50（A A 39 - 50）を含むエピトープを認識する）。しかしながら、これらのポリクローナル抗体は、標識としてコロイド金などの粒状標識を使用するNT - p r o B N P迅速試験には不適切であることが判明した。その理由は、これらの標識が、迅速試験の成分（例えば、支持部材、マトリックスなど）との物理 - 化学的相互作用によりシグナル発生において高い変動を示すが、これは好ましくないためである。このため、バッチ間で試験の質に顕著な変動が生じる。

10

【特許文献1】W O 0 0 / 4 5 1 7 6 号

【特許文献2】米国特許第5, 786, 163号

【特許文献3】米国特許第6, 461, 828号

【特許文献4】米国特許第6, 117, 644号

20

【特許文献5】E P 1 1 5 1 3 0 4 号

【特許文献6】W O 0 2 / 0 8 3 9 1 3 号

【特許文献7】E P特許出願第03 010 591.0号（2003年5月12日、K l e m t ら）

【特許文献8】W O 9 7 / 0 6 4 3 9 号

【特許文献9】E P 0 2 9 1 1 9 4 号

【特許文献10】米国特許第5, 591, 645号

【特許文献11】米国特許第4, 861, 711号

【特許文献12】米国特許第5, 141, 850号

【特許文献13】米国特許第6, 506, 612号

30

【特許文献14】米国特許第5, 458, 852号

【特許文献15】米国特許第5, 073, 484号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

以上のように、本発明の目的は、従来技術の不都合点を解消することである。特に、再現性をもって実施され、かつ研究室で用いられる方法と良好な相関を示す、NT - p r o B N Pを測定するための迅速試験を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

40

上記課題は、本発明により達成される。

【0009】

本発明は、免疫学的試験、特に、特許請求の範囲の独立項に記載されるような分析試験用成分などの迅速試験の形態に関する。従属項に記載される実施形態が好ましい。

【0010】

サンドイッチ形式の免疫学的試験、特にE l e c s y s（登録商標）の基準方法と十分に相関する迅速試験を実施するための本発明の解決手段は、少なくとも1つの抗体はモノクローナル抗体（M A B）である、NT - p r o B N Pに対する少なくとも2つの抗体を含む特定の抗体の組み合わせを使用するものである。本発明に係るサンドイッチ試験の別の抗体は、M A Bであってもよいし又はポリクローナル抗体（P A B）であってもよい。こ

50

の点に関し、これらの抗体（A Bと略す）の1つは、少なくともNT - p r o B N Pのアミノ酸38～50を含むエピトープの部分に対して作製されたものである（以下、A B（38 - 50）又はM A B（38 - 50）又はP A B（38 - 50）と略す）。別の少なくとも1つの抗体は、少なくともNT - p r o B N Pのアミノ酸1～37又は43～76を含むエピトープの部分に対して作製されたものである（以下、A B（1 - 37）若しくはA B（43 - 76）又はM A B（1 - 37）若しくはM A B（43 - 76）又はP A B（1 - 37）若しくはP A B（43 - 76））。上記抗体により認識されるエピトープは、わずかに重複していてもよく、好ましくは5アミノ酸未満、特に好ましくは2アミノ酸未満が重複していてもよい。

【0011】

抗体の組み合わせは、NT - p r o B N Pに対する少なくとも1つのポリクローナル抗体（P A B）と1つのモノクローナル抗体（M A B）を含む（いわゆるP A B / M A B組み合わせ）ことが好ましい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本特許出願において使用するP A B（X - Y）という用語は、NT - p r o B N Pのアミノ酸X～Yを含むエピトープに対して作製されたポリクローナル抗体を意味する。M A B（X - Y）は対応するモノクローナル抗体である。A B（X - Y）は、一般的にはNT - p r o B N Pのアミノ酸X～Yを含むエピトープに対して作製された抗体（例えばP A B又はM A B）を意味する。

【0013】

M A B a . b . c .（X - Y）は、寄託細胞系a . b . cから得られる、NT - p r o B N Pのアミノ酸X～Yを含むエピトープに対して作製されたモノクローナル抗体である。

【0014】

抗体と標識との結合体の品質の再現性を保証するために、M A Bを、粒状標識、特に金標識上に固定化することが好ましい。他の好適な粒状標識としては、例えば、着色ラテックス、他の金属ゾル標識、ポリマー標識又は半導体ナノ結晶（いわゆる量子ドット）などがある。M A B - 標識結合体は、例えば、好適な支持部材（フリース、膜など）を浸漬することにより、サンプル液体により迅速分析装置から分離できるように迅速試験装置に提供することが好ましい。しかしながら、M A B - 標識結合体は、溶液として迅速試験に添加することも可能である。

【0015】

哺乳動物、特にヒツジ、ヤギ又はウサギを免疫することにより好ましく得られるP A Bは、ピオチン誘導体として迅速試験に提供することが好ましく、アビジン又はストレプトアビジン検出系に結合させてもよい。しかしながら、迅速試験装置においてP A Bを直接固定化することも可能であり、例えば適当なクロマトグラフィー膜上の検出系の形態で固定化することが可能である。

【0016】

本発明においては、それほど好ましくはないが、標識A B、特に標識M A Bと、第二抗体、特に迅速試験のための溶液（1種又は複数）中の第二M A B又はP A Bを使用することも可能である。適当に標識されたA Bを捕捉することができる結合パートナーを試験装置の検出ゾーンに配置して、それにより第一抗体、分析対象物及び第二抗体を含むサンドイッチ複合体を迅速試験の固相に結合させることもできる。

【0017】

本発明において使用されるM A Bは、基準系（E l e c s y s（登録商標）試験）と良好な相関を満たすために、該基準系において検出されるエピトープ（A A 1 - 21）を認識する必要は必ずしもない。請求項1に示される抗体の組み合わせ、特にM A B 17 . 3 . 1（13 - 16）/ P A B（39 - 50）及びM A B 18 . 4 . 34（27 - 31）/ P A B（39 - 50）のM A B / P A B組み合わせは、NT - p r o B N PのエピトープA

10

20

30

40

50

A 1 - 2 1 及び A A 3 9 - 5 0 に対するポリクローナル抗体 ((P A B (1 - 2 1) 及び P A B (3 9 - 5 0)) を使用する E l e c s y s (登録商標) 基準系と十分に相関する。

【 0 0 1 8 】

P A B (1 - 2 1) 及び P A B (3 9 - 5 0) などのポリクローナル抗体は、当業者に公知の方法、特に W O 0 0 / 4 5 1 7 6 号の実施例 2 と類似の方法により取得し、特性決定し、同定することができる。

【 0 0 1 9 】

M A B (3 8 - 4 2) 及び M A B (4 4 - 5 0) などのモノクローナル抗体は、当業者に公知の方法、特に W O 0 0 / 4 5 1 7 6 号の実施例 3、又は E P 特許出願第 0 3 0 1 0 5 9 1 . 0 号 (K l e m t ら、2 0 0 3 年 5 月 1 2 日) の実施例 3 と類似の方法により取得し、特性決定し、同定することができる。

10

【 0 0 2 0 】

抗体は、当業者に公知の方法により、例えば金又は他の標識、ビオチンなどで標識する (W O 0 0 / 4 5 1 7 6 号の実施例 2、E P 特許出願第 0 3 0 1 0 5 9 1 . 0 号 (K l e m t ら、2 0 0 3 年 5 月 1 2 日) の実施例 2 を参照)。金を用いた標識は、例えば E P - A 0 8 9 8 1 7 0 号に詳細に記載されている。

【 0 0 2 1 】

特に、好ましいモノクローナル抗体 M A B 1 7 . 3 . 1 (1 3 - 1 6)、M A B 1 6 . 1 . 3 9 (3 8 - 4 2)、M A B 1 8 . 2 9 . 2 3 (6 4 - 6 7) 及び M A B 1 8 . 4 . 3 4 (2 7 - 3 1) は、E P 特許出願第 0 3 0 1 0 5 9 1 . 0 号 (K l e m t ら、2 0 0 3 年 5 月 1 2 日出願) の実施例 3 に従って取得することができる。対応する細胞系は、「D e u t s c h e S a m m l u n g v o n M i k r o o r g a n i s m e n u n d Z e l l k u l t u r e n G m b H (D S Z M)」に以下の受託番号及び受託日で寄託されている：M A B 1 7 . 3 . 1 (1 3 - 1 6) については D S M A C C 2 5 9 1 (2 0 0 3 年 5 月 7 日)；M A B 1 6 . 1 . 3 9 (3 8 - 4 2) については D S M A C C 2 5 9 0 (2 0 0 3 年 5 月 7 日)；M A B 1 8 . 2 9 . 2 3 (6 4 - 6 7) については D S M A C C 2 5 9 3 (2 0 0 3 年 5 月 7 日)；及び M A B 1 8 . 4 . 3 4 (2 7 - 3 1) については D S M A C C 2 5 9 2 (2 0 0 3 年 5 月 7 日)。

20

【 0 0 2 2 】

M A B 1 8 . 4 . 3 4 (2 7 - 3 1) / P A B (3 9 - 5 0) の組み合わせは、M A B 1 7 . 3 . 1 (1 3 - 1 6) / P A B (3 9 - 5 0) の組み合わせを用いる基準試験と比較的良好な相関を示す (実施例 2 も参照)。

30

【 0 0 2 3 】

さらに、M A B 1 8 . 4 . 3 4 (2 7 - 3 1) / P A B (3 9 - 5 0) の組み合わせが本発明に係る試験に特に有利であると証明された。この組み合わせによって、迅速試験に特に好適な機能曲線を使用し得る (実施例 3 参照)。相対的に、M A B 1 7 . 3 . 1 (1 3 - 1 6) / P A B (3 9 - 5 0) の組み合わせは試験感度が良好ではないことが示された。

【 0 0 2 4 】

本発明を、以下の実施例及び図面に基づいてさらに説明する。

40

【 実施例 1 】

【 0 0 2 5 】

全血から N T - p r o B N P を測定するための試験装置の準備 (図 1 参照)

試験装置 (図 1) は、サンプル導入ゾーン (1)、赤血球分離ゾーン (2)、検出ゾーン (3)、及び吸引ゾーン (4) が備え付けられた支持部材 (5) から構成される。赤血球分離ゾーン (7) と部分的に重複するサンプル導入マトリックス (6) は、サンプル導入ゾーン (1) に配置されている。次に、赤血球分離マトリックス (7) は、線状に固定化物質が塗布されている (9) 検出マトリックス (8) (検出ゾーン) と若干重複している。吸引マトリックス (1 0) は検出マトリックス (8) と若干重複している。検出しようとする分析対象物との複合体を形成するために必要なすべての試薬は、サンプル導入マ

50

トリックス(6)に供給する。この場合、サンプル導入ゾーンは、重なり合う2つのフリースからなり、第1フリース(金フリース)はNT-proBNP(MAB18.4.34(27-31))に対する金標識抗体を含浸させたものであり、第2フリース(ビオチンフリース)はNT-proBNP(PAB(39-50))に対するビオチニル化抗体を含有する。ストレプトアビジンで作製された線(9)は検出ゾーン(3)内に設ける。

【0026】

350 μ m厚のプラスチック薄片(Putz)を支持層(5)として使用する。360 μ m厚のポリエステルフリース(Roche Diagnostics)をサンプル導入マトリックス(6)の「金フリース」及び「ビオチンフリース」として使用する。1.8mm厚のガラスファイバーフリース(Roche Diagnostics)を赤血球分離マトリックス(7)として使用する。140 μ m厚のニトロセルロース膜(Sartorius)を検出マトリックス(8)として使用する。1.8mm厚のガラスファイバーフリース(Roche Diagnostics)を吸引マトリックス(10)として使用する。個々の構成要素(6、7、8、10)を、図1に示すように、若干重複させて熱溶解接着剤で支持層(5)上に接着する。

【0027】

「金及びビオチンフリース」の含浸製剤は、以下のとおりである：

「ビオチンフリース」：100mM Hepes pH7.4、0.1% Tween(登録商標)、20 μ g/mlビオチニル化PAB(39-50)

「金フリース」：100mM Hepes pH7.4、OD4 MAB18.4.34(27-31)金結合体

【実施例2】

【0028】

Electsysis(登録商標)形式におけるエピトープ/抗体の組み合わせMAB17.3.1(13-16)/PAB(39-50)及びMAB18.4.34(27-31)/PAB(39-50)と、Electsysis(登録商標)NT-proBNP試験キットの相関(図2及び3参照)

MAB17.3.1(13-16)/PAB(39-50)とMAB18.4.34(27-31)/PAB(39-50)のMAB/PAB組み合わせとElectsysis(登録商標)試験キット(PAB(1-21)/PAB(30-50))との相関を、Electsysis(登録商標)2010(Roche Diagnostics)を用いて電気化学発光イムノアッセイにおいて調べた。このため、PAB(39-50)をビオチニル化捕捉試薬として使用し、MABのルテニウム付加F(ab')₂フラグメントを検出試薬として使用した。20 μ lのサンプル又は標準物質をそれぞれ、75 μ lの2つの抗体試薬と共に、37 $^{\circ}$ Cにて9分間インキュベートした。その後、35 μ lのストレプトアビジン被覆磁性ポリスチレン粒子を添加し、さらに室温にて9分間インキュベートした。インキュベーション溶液のアリコートで電気発光シグナルを慣用法に従ってElectsysis(登録商標)2010で測定し、標準曲線を用いて濃度シグナルに変換した。

【0029】

この時点で、心不全患者由来の臨床サンプルを2つのMAB/PAB改変試験とElectsysis(登録商標)キットを用いて測定した。結果を図2及び3に示す。両方のMAB/PAB改変試験を用いて、Electsysis(登録商標)キットに対する非常に良好な相関($r = 0.978$ 及び $r = 0.957$)が達成された。

【実施例3】

【0030】

2つの異なるMAB/PAB組み合わせを用いたNT-proBNP試験ストリップの機能曲線

NT-proBNP試験ストリップを実施例1と同様にして準備した。試薬フリースのために以下の含浸製剤を使用した：

「ビオチンフリース」：100mM Hepes pH7.4、0.1% Tween(登録

10

20

30

40

50

商標)、

20 μ g/ml ビオチニル化 PAB (39 - 50)

「金フリース」: 100 mM Hepes pH 7.4、OD4 MAB 18.4.34 (27 - 31) 又は MAB 17.3.1 (13 - 16) 金結合体

【0031】

健常ドナーからのヘパリン添加血液サンプルに心不全患者の NT-proBNP 含有血清を混合し、等分した。150 μ l の混合血液サンプルを試験ストリップにピペットで導入し、標準法に従って CARDIAC Reader (登録商標) (Roche Diagnostics) で測定した。サンプル検出後の反応時間は12分とした。サンプルの NT-proBNP 濃度を測定するために、1つのアリコートから血漿を遠心分離し、Electsysis (登録商標) NT-proBNP キット (Roche Diagnostics) を用いて測定した。2つの改変試験ストリップ MAB 17.3.1 (13 - 16) / PAB (39 - 50) 及び MAB 18.4.34 (27 - 31) / PAB (39 - 50) を用いて得られた機能曲線を図4に示す。MAB 18.4.34 (27 - 31) / PAB (39 - 50) 改変試験は顕著に急勾配の標準曲線を示し、より高感度な試験といえる。

10

【実施例4】

【0032】

Electsysis (登録商標) NT-proBNP 試験キットに対する NT-proBNP 試験ストリップと AB 組み合わせ (Au-MAB 18.4.34 (27 - 31) / Bi-PAB (39 - 50)) の相関

20

心不全患者からの NT-proBNP 含有血清を健常ドナー由来のヘパリン添加血液サンプルに添加し、等分した。150 μ l のこれらの「混合 (spiked)」血液サンプルを試験ストリップにピペットで導入し、CARDIAC Reader (登録商標) (Roche Diagnostics) で標準的な方法に従って測定した。同じサンプルに由来する血漿を遠心分離し、Electsysis (登録商標) NT-proBNP キットを用いて Electsysis (登録商標) 1010 分析システム (Roche Diagnostics) で測定した。60 サンプルをこのようにして調製し、両方のシステムで測定した。図5は、両方のシステムで測定した値を示す。相関は $r = 0.95$ で非常に良好であった。

【図面の簡単な説明】

【0033】

30

【図1】本発明に係る迅速試験装置の免疫クロマトグラフィー試験ストリップの形態の好ましい実施形態の概略を示す。

【図2】Electsysis (登録商標) 湿潤試験形式における抗体の組み合わせ MAB 17.3.1 (13 - 16) / PAB (39 - 50) と Electsysis (登録商標) 基準法 PAB (1 - 21) / PAB (39 - 50) との相関を示す。

【図3】Electsysis (登録商標) 湿潤試験形式における抗体の組み合わせ MAB 18.4.34 (27 - 31) / PAB (39 - 50) と Electsysis (登録商標) 基準法 PAB (1 - 21) / PAB (39 - 50) との相関を示す。

【図4】実施例1に記載した、種々の抗体組み合わせを用いた NT-proBNP 試験ストリップの機能曲線を示す。

40

【図5】Electsysis (登録商標) NT-proBNP 試験キットに対する、Au-MAB 18.4.34 (27 - 31) / Bi-PAB (39 - 50) の抗体の組み合わせを用いた NT-proBNP 試験ストリップの相関を示す。

【符号の説明】

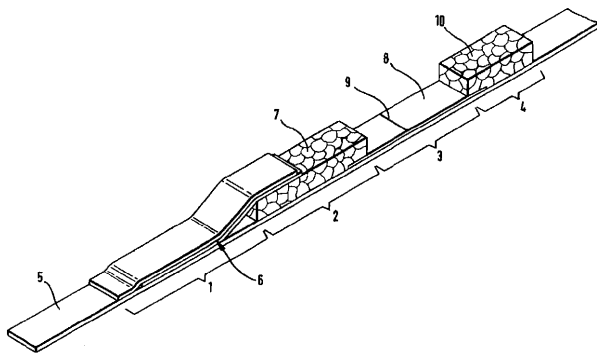
【0034】

- 1 サンプル導入ゾーン
- 2 赤血球分離ゾーン
- 3 検出ゾーン
- 4 吸引ゾーン
- 5 支持部材

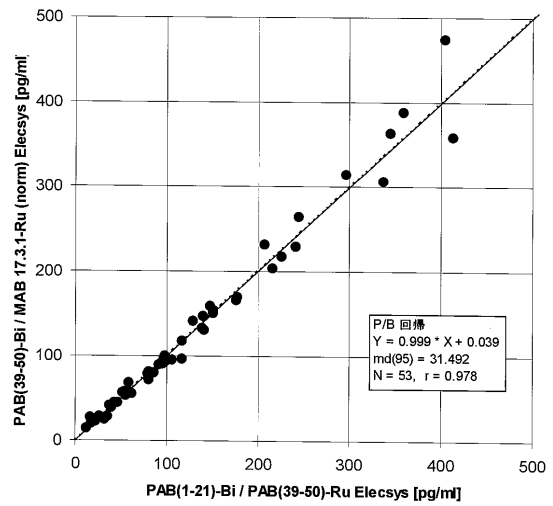
50

- 6 サンプル導入マトリックス (ビオチンフリース及び金フリース)
- 7 赤血球分離マトリックス
- 8 検出マトリックス
- 9 線形固定ゾーン
- 10 吸引マトリックス

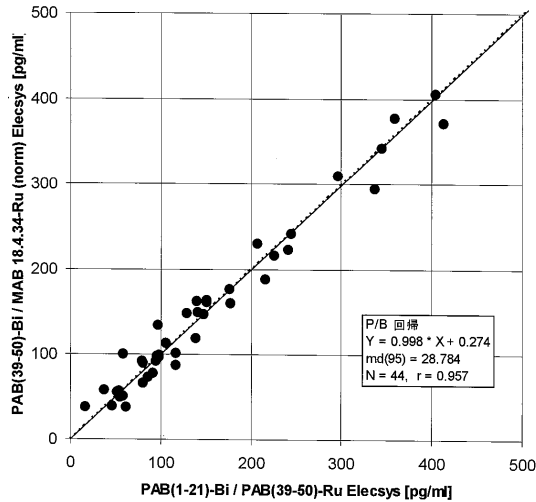
【 図 1 】



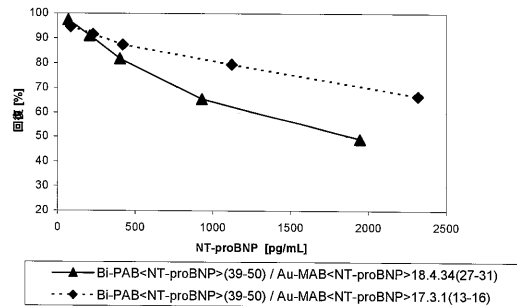
【 図 2 】



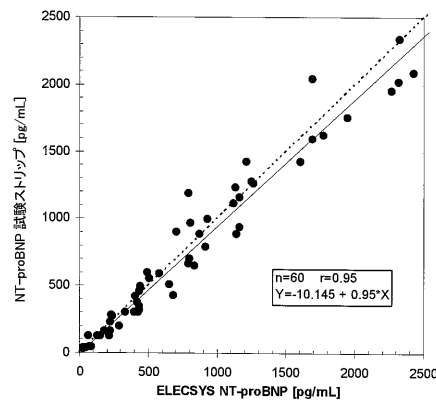
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成16年11月26日 (2004.11.26)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

NT - proBNPを測定するための免疫学的サンドイッチ試験であって、
少なくとも1つがMABである、NT - proBNPに対する少なくとも2つの抗体を使用し、

これらの抗体の1つは、少なくともNT - proBNPのアミノ酸38～50を含むエピープの部分に対するものであり、

これらの抗体の1つは、少なくともNT - proBNPのアミノ酸1～37又は43～76を含むエピープの部分に対するものであり、

上記抗体により認識されるエピープはわずかに重複していてもよい、
ことを特徴とする、NT - proBNPを測定するための免疫学的サンドイッチ試験。

【 請求項 2 】

以下の抗体の組み合わせ：

AB (39 - 50) と、AB (1 - 21) 又は AB (13 - 16) 又は AB (22 - 38) 又は AB (27 - 31) 又は AB (51 - 76) 又は AB (64 - 67) との組み合わせ；あるいは

AB (38 - 42) と、AB (1 - 21) 又は AB (22 - 37) 又は AB (43 - 76) との組み合わせ；あるいは

AB (4 4 - 5 0) と、AB (1 - 2 1) 又は AB (2 2 - 4 3) 又は AB (5 1 - 7 6) との組み合わせ

の 1 つを使用することを特徴とする、請求項 1 記載の免疫学的試験。

【請求項 3】

以下の PAB / MAB の組み合わせ：

PAB (3 9 - 5 0) と、MAB (1 - 2 1) 又は MAB (1 3 - 1 6) 又は MAB (2 2 - 3 8) 又は MAB (2 7 - 3 1) 又は MAB (5 1 - 7 6) 又は MAB (6 4 - 6 7) との組み合わせ；あるいは

PAB (3 8 - 4 2) と、MAB (1 - 2 1) 又は MAB (2 2 - 3 7) 又は MAB (4 3 - 7 6) との組み合わせ；あるいは

PAB (4 4 - 5 0) と、MAB (1 - 2 1) 又は MAB (2 2 - 4 3) 又は MAB (5 1 - 7 6) との組み合わせ

の 1 つを使用することを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の免疫学的試験。

【請求項 4】

以下の抗体の組み合わせ：

MAB 1 8 . 4 . 3 4 (2 7 - 3 1) と、PAB (3 9 - 5 0) 又は PAB (3 8 - 4 2) 又は PAB (4 4 - 5 0) との組み合わせ；あるいは

MAB 1 7 . 3 . 1 (1 3 - 1 6) と、PAB (3 9 - 5 0) 又は PAB (3 8 - 4 2) 又は PAB (4 4 - 5 0) との組み合わせ

を使用することを特徴とする、請求項 1 記載の免疫学的試験。

【請求項 5】

以下の抗体の組み合わせ：

MAB 1 8 . 4 . 3 4 (2 7 - 3 1) と MAB (3 8 - 4 2) との組み合わせ；あるいは

MAB 1 8 . 9 . 8 (2 7 - 3 1) と MAB (3 8 - 4 2) との組み合わせ

を使用することを特徴とする、請求項 1 記載の免疫学的試験。

【請求項 6】

MAB (3 8 - 4 2) が MAB 1 6 . 1 . 3 9 (3 8 - 4 2) であることを特徴とする、請求項 5 記載の免疫学的試験。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の免疫学的試験を用いることを特徴とする、NT - p r o B N P の検出方法。

フロントページの続き

- (72)発明者 ユールゲン スピンケ
ドイツ連邦共和国 6 4 6 5 3 ローシュ, マグノリーンシュトラッセ 2 9
- (72)発明者 アルフォンス ニヒトル
ドイツ連邦共和国 8 2 3 8 3 ホーヘンパイッセンベルク, ムーレンヴェーク 1 1
- (72)発明者 フォルカー クレムト
ドイツ連邦共和国 8 2 3 6 2 ヴァイルハイム, フランツィスクスヴェーク 8
- (72)発明者 クラウス ハルラーマイヤー
ドイツ連邦共和国 8 2 3 4 0 フェルダフィング, プショールシュトラッセ 1
- (72)発明者 ミカエル グロル
ドイツ連邦共和国 8 2 3 4 0 フェルダフィング, ポッセンホフェナー シュトラッセ 2 2
- (72)発明者 アンネリーゼ ボーグヤ
ドイツ連邦共和国 8 2 4 0 2 ゼーエスハウプト, タンネンシュトラッセ 1
- (72)発明者 アンドレアス ガルラッサー
ドイツ連邦共和国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, アム ファーヘンホルツ 1 0

【外国語明細書】

2005181304000001.pdf

专利名称(译)	夹心分析法测定nt-probnp		
公开(公告)号	JP2005181304A	公开(公告)日	2005-07-07
申请号	JP2004339760	申请日	2004-11-25
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ユールゲンスピンケ アルフォンスニヒトル フォルカークレムト クラウスハルラーマイヤー ミカエルグロル アンネリーゼボーグヤ アンドレアスガルラッサー		
发明人	ユールゲン スピンケ アルフォンス ニヒトル フォルカー クレムト クラウス ハルラーマイヤー ミカエル グロル アンネリーゼ ボーグヤ アンドレアス ガルラッサー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/74 C07K16/26 C07K2317/34 G01N33/5302 G01N33/543 G01N33/558 G01N2333/58 Y10S436/811 Y10S530/80		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.521		
优先权	10355731 2003-11-28 DE		
其他公开文献	JP4236629B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫学上快速测定N端脑钠肽（NT-proBNP）的方法，N-proBNP是诊断和管理心力衰竭的标志物。使用两种针对NT-proBNP的抗体进行免疫夹心法。抗体之一使用单克隆抗体（MAB）。作为抗体的组合，使用了识别具有NT-proBNP的氨基酸序列不同的两个表位的两种抗体。不同表位的组合是可能的。作为一种方法，通过免疫色谱法进行测量。[选型图]图1

