

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-511720

(P2013-511720A)

(43) 公表日 平成25年4月4日(2013.4.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 B	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 D	
CO 7 K 16/26 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 B	
	CO 7 K 16/26 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁)

(21) 出願番号 特願2012-539984 (P2012-539984)
 (86) (22) 出願日 平成22年11月17日 (2010.11.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年7月17日 (2012.7.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/056932
 (87) 国際公開番号 W02011/062931
 (87) 国際公開日 平成23年5月26日 (2011.5.26)
 (31) 優先権主張番号 12/623,405
 (32) 優先日 平成21年11月21日 (2009.11.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

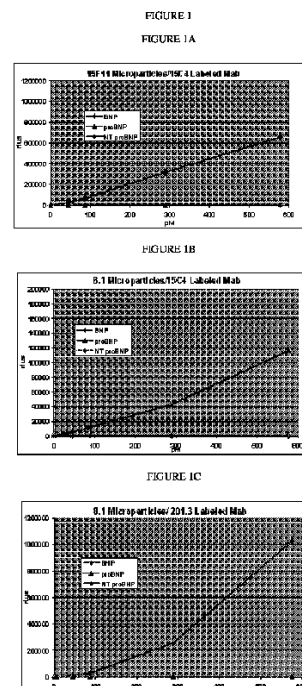
(71) 出願人 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 100
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 コンラス, ジョン・ジー
 アメリカ合衆国、イリノイ・60046、
 レイク・ビラ、シーダー・バレー・ドライ
 ブ・38813

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド、ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチドおよびヒトB型ナトリウム利尿ペプチドのためのアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、試験試料中のヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド、ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチドおよびヒトB型ナトリウム利尿ペプチドの量を検出および/または定量するためのアッセイに関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNPおよびhBNPについて試験する試験試料またはこれらを含む疑いのある試験試料中に存在するヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド(「ヒトNT-プロBNP」)、ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチド(「ヒトプロBNP」)およびヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド(「hBNP」)の量を定量するための免疫アッセイであって、該方法が：

(a) 試験試料を、(i) ヒトNT-プロBNPと結合し、第1の固定化抗体を生成するために固相上に固定化されている第1の捕捉抗体と接触させ、第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP複合体を含む第1の混合物を形成し；(ii) ヒトプロBNPと結合し、第2の固定化抗体を生成するために固相上に固定化されている第2の捕捉抗体と接触させ、第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP複合体を含む第2の混合物を形成し；(iii) ヒトプロBNPと結合することに加え、hBNPにも結合し、第3の固定化抗体を生成するために固相上で固定化されている該第2の捕捉抗体と接触させ、第2の捕捉抗体-hBNP複合体を含む第3の混合物を形成する工程(前記第1の捕捉抗体は抗体15F11を含み、該第2の捕捉抗体は抗体8.1を含む。)；

(b) ヒトNT-プロBNPと結合し、検出可能標識にコンジュゲートされている第1の検出抗体と、該第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP複合体を含む前記第1の混合物を、接触させて、第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP-第1の検出抗体複合体を含む第3の混合物を形成する工程(該第1の検出抗体は15C4である。)；

(c) ヒトNT-プロBNPと結合することに加え、ヒトプロBNPにも結合し、検出可能標識にコンジュゲートされている該第1の検出抗体と、該第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP複合体を含む該第2の混合物を、接触させて、第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP-第1の検出抗体複合体を含む第5の混合物を形成する工程(該第1の検出抗体は15C4である。)；

(d) hBNPと結合し、検出可能標識にコンジュゲートされている第2の検出抗体と、該第2の捕捉抗体-hBNP複合体を含む該第3の混合物を、接触させて、第2の捕捉抗体-hBNP-第2の検出抗体複合体を含む第6の混合物を形成する工程(該第2の検出抗体は抗体201.3である。)；

(e) (i) 該試験試料中に含有されるヒトNT-プロBNPの量の尺度として該検出可能標識を検出することにより、工程(b)において形成された第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP-第1の検出抗体複合体の量を測定し；(ii) 該試験試料中に含有されるヒトプロBNPの量の尺度として該検出可能標識を検出することにより、工程(c)において形成された該第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP-第1の検出抗体複合体の量を測定し；(iii) 該試験試料中に含有されるhBNPの量の尺度として該検出可能標識を検出することにより、工程(d)において形成された該第2の捕捉抗体-hBNP-第2の検出抗体複合体の量を測定する工程

を含む免疫アッセイ。

【請求項 2】

固相が、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、フィルム、ろ紙、ディスク、およびチップからなる群から選択される、請求項1に記載の免疫アッセイ。

【請求項 3】

第1の検出抗体の該検出可能標識が、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識、温度測定標識、および免疫ポリメラーゼ連鎖反応標識からなる群から選択される、請求項1に記載の免疫アッセイ。

【請求項 4】

第2の検出抗体の該検出可能標識が、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識、温度測定標識、および免疫ポリメラーゼ連鎖反応標識からなる群から選択される、請求項1に記載の免疫アッセイ。

10

20

30

40

50

【請求項 5】

ヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNPおよびhBNPについて試験する試験試料またはこれらを含む疑いのある試験試料中に存在するヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド(「ヒトNT-プロBNP」)、ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチド(「ヒトプロBNP」)およびヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド(「hBNP」)の量を定量するための免疫アッセイであって、該方法が：

(a) 試験試料を(i)ヒトNT-プロBNPと結合し、検出可能標識にコンジュゲートされている第1の検出抗体と接触させてヒトNT-プロBNP-第1の検出抗体複合体を含む第1の混合物を形成し；(ii)ヒトNT-プロBNPと結合することに加え、ヒトプロBNPにも結合し、検出可能標識にコンジュゲートされている該第1の検出抗体と接触させてヒトプロBNP-第1の検出複合体を含む第2の混合物を形成し；(iii)hBNPと結合し、検出可能標識にコンジュゲートされている第2の検出抗体と接触させてhBNP-第2の検出抗体複合体を含む第3の混合物をさらに形成する工程(該第1の検出抗体は抗体15C4であり、該第2の検出抗体は抗体201.3である。)；

(b) 該ヒトNT-プロBNP-第1の検出抗体複合体を含む前記第1の混合物を、ヒトNT-プロBNPと結合し、第1の固定化抗体を生成するために固相上で固定化されている第1の捕捉抗体と接触させて第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP-第1の検出抗体複合体を含む第4の混合物を形成する工程(該第1の捕捉抗体は15F11である。)；

(c) 該ヒトプロBNP-第1の検出抗体複合体を含む前記第2の混合物を、ヒトプロBNPと結合し、第2の固定化抗体を生成するために固相上で固定化されている第2の捕捉抗体と接触させて第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP-第1の検出抗体複合体を含む第5の混合物を形成する工程(該第2の捕捉抗体は8.1である。)；

(d) 該hBNP-第2の検出抗体複合体を含む該第3の混合物を、ヒトプロBNPと結合することに加え、hBNPにも結合し、第2の固定化抗体を生成するために固相上で固定化されている該第2の捕捉抗体と接触させて第2の捕捉抗体-ヒトBNP-第2の検出抗体複合体を含む第6の混合物を形成する工程(該第2の捕捉抗体は8.1である。)；

(d)(i) 該試験試料中に含有されるヒトNT-プロBNPの量の尺度として該検出可能標識を検出することにより、工程(b)において形成された第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP-第1の検出抗体複合体の量を測定し；(ii) 該試験試料中に含有されるヒトプロBNPの量の尺度として該検出可能標識を検出することにより、工程(c)において形成された該第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP-第1の検出抗体複合体の量を測定し；(iii) 該試験試料中に含有されるhBNPの量の尺度として該検出可能標識を検出することにより、工程(d)において形成された該第2の捕捉抗体-hBNP-第2の検出抗体複合体の量を測定する工程

を含む免疫アッセイ。

【請求項 6】

固相が、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、フィルム、ろ紙、ディスク、およびチップからなる群から選択される、請求項5に記載の免疫アッセイ。

【請求項 7】

第1の検出抗体の検出可能標識が、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識、温度測定標識、および免疫ポリマーゼ連鎖反応標識からなる群から選択される、請求項5に記載の免疫アッセイ。

【請求項 8】

第2の検出抗体の検出可能標識が、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識、温度測定標識、および免疫ポリマーゼ連鎖反応標識からなる群から選択される、請求項5に記載の免疫アッセイ。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

免疫診断試薬であって、

(a) ヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド(「ヒトNT-プロBNP」)に特異的な第1の捕捉抗体と；

(b) ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチド(「ヒトプロBNP」)およびヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド(「hBNP」)にそれぞれ特異的な第2の捕捉抗体と；

(c) ヒトNT-プロBNPおよびヒトプロBNPにそれぞれ特異的な第1の検出抗体と；

(d) hBNPに特異的な第2の検出抗体を含む前記免疫診断試薬。

【請求項10】

第1の捕捉抗体が抗体15F11である、請求項9に記載の免疫診断試薬。

【請求項11】

第2の捕捉抗体が抗体8.1である、請求項9に記載の免疫診断試薬。

【請求項12】

第1の検出抗体が抗体15C4である、請求項9に記載の免疫診断試薬。

【請求項13】

第2の検出抗体が抗体201.3である、請求項9に記載の免疫診断試薬。

【請求項14】

試験試料中のヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド(「ヒトNT-プロBNP」)、ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチド(「ヒトプロBNP」)およびヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド(「hBNP」)の量を検出するためのキットであって；

(a) 該試験試料のアッセイを実施するための取扱説明書と；

(b) (i) ヒトNT-プロBNPに特異的な第1の捕捉抗体；

(ii) ヒトプロBNPおよびhBNPにそれぞれ特異的な第2の捕捉抗体；

(iii) ヒトNT-プロBNPおよびヒトプロBNPにそれぞれ特異的な第1の検出抗体；

(iv) hBNPに特異的な第2の検出抗体を含む免疫診断試薬

を含むキット。

【請求項15】

第1の捕捉抗体が抗体15F11である、請求項14に記載のキット。

【請求項16】

第2の捕捉抗体が抗体8.1である、請求項14に記載のキット。

【請求項17】

第1の検出抗体が抗体15C4である、請求項14に記載のキット。

【請求項18】

第2の検出抗体が抗体201.3である、請求項14に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

一態様において、本発明は、試験試料から得られたアリコート中のヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド、ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチドおよびヒトB型ナトリウム利尿ペプチドの量を検出および/または定量するためのアッセイに関する。別の態様において、本発明は、試験試料中のヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド、ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチドおよびヒトB型ナトリウム利尿ペプチドの量を検出および/または定量するためのアッセイに使用される免疫診断試薬に関する。さらに別の態様において、本発明は、試験試料中のヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド、ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチドおよびヒトB型ナトリウム利尿ペプチドの量を検出および/または定量するためのアッセイの実施に使用されるキットに関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

心房性ナトリウム利尿ペプチド（以下、「ANP」）、B型ナトリウム利尿ペプチド（以下、「BNP」と言う）、C型ナトリウム利尿ペプチド（以下、「CNP」）およびマンバ（*Dendroaspis*）ナトリウム利尿ペプチド（以下、「DNP」）は、それぞれ「ナトリウム利尿ペプチド」と呼ばれるホルモンファミリーのメンバーである。ANPとBNPは広範な生物学的性質を共有し、心臓由来ナトリウム利尿系に属する。ANPとBNPは両方とも心筋細胞に由来し、CNPは内皮細胞に由来する。DNPはグリーンマンバヘビの毒から単離され、ANP、BNPおよびCNPと構造的類似性を有する。

【0003】

ANPは心臓により心房内で分泌される。ANPは2個のシステイン残基間のジスルフィド結合により閉環した17アミノ酸環を有する。環内の17個のアミノ酸のうち11個は、ANP、BNP、CNPおよびDNP間で保存されている。17アミノ酸環構造に加え、ANPは6アミノ酸のアミノ末端尾部および5アミノ酸のカルボキシ末端尾部を有する。ANPは、ANPの主要保存形態である126アミノ酸プロANP形態として産生される。アミノ酸98および99間のタンパク質分解開裂後、冠静脈洞血漿中に成熟28アミノ酸ペプチドANPが見出される（Yandle, J. *Internal Med.*, 235: 561-576 (1994) 参照。）。

10

【0004】

BNPは、最初にブタの脳から単離されたことから命名され、従って、当初は「BNP」は「脳性ナトリウム利尿ペプチド」を意味した。しかしながら、BNPは心臓由来ナトリウム利尿系に属することが見出されたため、「脳（brain）」という単語は「B型」に変更された。従って、「BNP」は現在では「B型ナトリウム利尿ペプチド」を指す。ヒトにおいて、BNPは心臓により冠静脈洞を通して主に心室から分泌される。ヒトBNPのプレプロペプチド前駆体（以下、「ヒトプレプロBNP」）は134アミノ酸長（配列番号1）であり、酵素により開裂されて108アミノ酸長（配列番号2）のBNPのヒトプロペプチド（以下、「ヒトプロBNP」）を遊離させる短いシグナルペプチドを含む。ヒトプロBNPはさらに開裂され、76アミノ酸長（配列番号3）のヒトBNPのN末端プロペプチド（以下、「ヒトNT-プロBNP」）および32アミノ酸長（配列番号4）の活性ホルモン、ヒトBNP（以下、「hBNP」または「hBNP-32」）となる。ヒトNT-プロBNP、hBNP-32、およびヒトプロBNPはそれぞれ、ヒト血漿中で循環し得ることが示唆されている（Tateyama et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 185: 760-7 (1992); Hunt et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214: 1175-83 (1995) 参照。）。

20

30

【0005】

CNPは最初に脳内で見出されたが、この大半は内皮細胞および腎細胞に由来する。CNPは、脈管構造、脳、骨および内皮に広く分布している。CNPは、心臓内に存在するとしても僅かである。プロCNPは103アミノ酸ペプチドであり、活性ペプチドであるCNP-53（アミノ酸51から103）またはCNP-22（アミノ酸82から103）にプロセシングされる。ANPと同様に、CNPはシステイン残基間のジスルフィド結合により閉環した17アミノ酸環を有する。この17アミノ酸環構造に加え、CNP-22は5アミノ酸のアミノ末端尾部を有し、カルボキシ末端尾部を含有しない。CNP-53はアミノ末端の31アミノ酸延長部を除いてCNP-22と同一である。

40

【0006】

上記のとおり、DNPはグリーンマンバヘビの毒から単離された。DNPの成熟形態は38アミノ酸から構成される。ヒト血漿中でDNP様免疫反応性（DNP-LI）が報告されており、鬱血性心不全患者ではDNP-LIの血漿濃度が上昇していることが見出されている（Cataliotti, et al., *Mayo Clin. Proc.*, 76: 111-1119 (2001) 参照。）。さらに、合成DNPの注入が、血漿および尿中の環状グアノシンーリン酸の増加に伴う顕著なナトリウム利尿および利尿をもたらす

50

ことが知られている。同上参照。

【0007】

ヒトにおいて、心疾患がANPおよびBNPの分泌を刺激し得る。実際に、ヒトにおけるANPおよびBNPの分泌は、典型的には心機能の変化を反映する。具体的には、ANPの分泌は典型的には心房に負荷がかかっているときに加速され、BNPの生合成および分泌は心室に負荷がかかっているときに刺激される。従って、ANPとBNPは両方とも心疾患の診断における指標として有用である。しかしながら、このことにかかわらず、徐々に、BNPはANPよりも心疾患の診断における有用な指標として認識されるようになっていく。例えば、BNPの血中濃度は正常対象においてはANPの1/6にすぎないが、心不全の患者においてはANPよりも高くなる。さらに、心不全の症例においてはBNPの血中濃度はANPと同様に増加し、BNPの血漿濃度はANPを超過することが多く、こうして心機能不全の重篤度をより正確に反映する。さらに、心不全患者のBNPレベルは健常対象の数十倍から数百倍まで増加することもある。

10

【0008】

ヒトプロBNP、ヒトNT-プロBNPおよびhBNPは循環し得、心血管疾患、特に心不全の患者の試験試料中で検出することができることが知られている。hBNPとヒトNT-プロBNPは両方とも心不全を検出し、患者におけるその危険を評価するためのマーカーとして多用されている。しかしながら、循環する個々の型のBNP（即ちヒトプロBNP、ヒトNT-プロBNPおよびヒトBNP）のそれぞれの実際の量はこれらの種々の型の現行市販アッセイの交差反応性に起因して不明である（Liang F., et al., J. American College of Cardiology, 49 (10): 1071 - 1078 (2007) 参照。）。

20

【0009】

さらに、ヒトプロBNPおよびヒトNT-プロBNPは糖鎖付加され得ることが公知であり（Schellenberger, U. et al., Archives of Biochemistry and Biophysics, 451: 160 - 166 (2006) 参照。）、これらの糖鎖付加体はヒト試料から単離されている（Hammerer-Lercher A., et al., Clinical Chemistry, 54 (5): 858 - 865 (2008)；およびSeferian, K. et al., Clinical Chemistry, 54 (5): 866 - 873 (2008) 参照。）。ペプチドのN末端部分内の36アミノ酸領域（アミノ酸36から71）に限られた7個の考えられる糖鎖付加部位が存在する。この領域に対して生成された抗体は1) 抗体を産生するために使用する免疫原；および2) 分析物の糖鎖付加の有無に応じて、分析物ヒトプロBNPまたはNTプロBNPを含有する試料と結合する場合と結合しない場合がある。ヒトプロBNPおよびNTプロBNPのための任意選択アッセイはこれらの領域を避ける抗体を使用すべきである。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Yandle, J. Internal Med., 235: 561 - 576 (1994)

40

【非特許文献2】Tateyama et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 185: 760 - 7 (1992)

【非特許文献3】Hunt et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 214: 1175 - 83 (1995)

【非特許文献4】Cataliotti, et al., Mayo Clin. Proc., 76: 111 - 1119 (2001)

【非特許文献5】Liang F., et al., J. American College of Cardiology, 49 (10): 1071 - 1078 (2007)

【非特許文献6】Schellenberger, U. et al., Archives

50

of Biochemistry and Biophysics, 451:160-166 (2006)

【非特許文献7】Hammerer-Lercher A., et al., Clinical Chemistry, 54(5):858-865 (2008)

【非特許文献8】Seferian, K. et al., Clinical Chemistry, 54(5):866-873 (2008)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

上記に鑑み、試験試料中のヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNPおよびヒトBNPの量を同時に定量することができる新規アッセイが当分野において必要とされている。本発明は、新規アッセイおよび方法を提供することを目的とする。本発明はまた、このようなアッセイおよび方法に使用されるキットを提供することを目的とする。本方法およびキットは、ヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNPおよびヒトBNPのための定性または定量アッセイにおいて使用することができる。これらおよび他の目的および利点、並びに他の追加的な特徴は本明細書に提供される詳細な説明から明らかとなる。

10

【課題を解決するための手段】

【0012】

一態様において、本発明は、ヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNPおよびhBNPについて試験する試験試料またはこれらを含む疑いのある試験試料中に存在するヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド(「ヒトNT-プロBNP」)、ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチド(「ヒトプロBNP」)およびヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド(hBNP)の量を定量するための免疫アッセイに関する。本方法は：

20

(a) 試験試料(例えば、試験試料に由来するまたは試験試料から得られたアリコートなど)を、(i)ヒトNT-プロBNPと結合し、第1の固定化抗体を生成するために固相上に固定化されている第1の捕捉抗体と接触させ、第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP複合体を含む第1の混合物を形成し；(ii)ヒトプロBNPと結合し、第2の固定化抗体を生成するために固相上に固定化されている第2の捕捉抗体と接触させ、第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP複合体を含む第2の混合物を形成し；(iii)ヒトプロBNPと結合することに加え、hBNPにも結合し、第3の固定化抗体を生成するために固相上で固定化されている該第2の捕捉抗体と接触させ、第2の捕捉抗体-ヒトhBNP複合体を含む第3の混合物を形成する工程(前記第1の捕捉抗体は抗体15F11を含み、該第2の捕捉抗体は抗体8.1を含む。)；

30

(b) ヒトNT-プロBNPと結合し、検出可能標識にコンジュゲートされている第1の検出抗体と、該第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP複合体を含む前記第1の混合物を、接触させて、第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP-第1の検出抗体複合体を含む第4の混合物を形成する工程(該第1の検出抗体は15C4である。)；

(c) ヒトNT-プロBNPと結合することに加え、ヒトプロBNPにも結合し検出可能標識にコンジュゲートされている該第1の検出抗体と、該第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP複合体を含む前記第2の混合物を、接触させて、第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP-第1の検出抗体複合体を含む第5の混合物を形成する工程(該第1の検出抗体は15C4である。)；

40

(d) hBNPと結合し、検出可能標識にコンジュゲートされている第2の検出抗体と、該第2の捕捉抗体-ヒトhBNP複合体を含む前記第3の混合物を、接触させて、第2の捕捉抗体-hBNP-第2の検出抗体複合体を含む第6の混合物を形成する工程(該第2の検出抗体は抗体201.3である。)；

(e) (i) 該試験試料中に含有されるヒトNT-プロBNPの量の尺度として該検出可能標識を検出することにより、工程(b)において形成された第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP-第1の検出抗体複合体の量を測定し；(ii) 該試験試料中に含有されるヒトプロBNPの量の尺度として該検出可能標識を検出することにより、工程(c)に

50

において形成された該第2の捕捉抗体 - ヒトプロBNP - 第1の検出抗体複合体の量を測定し；(iii)該試験試料中に含有されるhBNPの量の尺度として該検出可能標識を検出することにより、工程(d)において形成された該第2の捕捉抗体 - hBNP - 第2の検出抗体複合体の量を測定する工程を含む。

【0013】

または、上記方法において、試験試料から得られたまたは試験試料に由来する第1のアリコート第1の捕捉抗体と接触させて第1の捕捉抗体 - ヒトNT - プロBNP複合体を形成することができる。試験試料から得られたまたは試験試料に由来する第2のアリコートを第2の捕捉抗体と接触させて第2の捕捉抗体 - ヒトプロBNP複合体を形成することができる。試験試料から得られたまたは試験試料に由来する第3のアリコートを第2の捕捉抗体と接触させて第2の抗体 - hBNP複合体を形成することができる。

10

【0014】

上記免疫アッセイにおいて、固相は磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、フィルム、ろ紙、ディスク、およびチップからなる群から選択される。

【0015】

上記免疫アッセイにおいて、第1の検出抗体の検出可能標識は、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識、温度測定標識(thermometric label)、および免疫ポリマーゼ連鎖反応標識からなる群から選択される。第2の検出抗体の検出可能標識は、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識、温度測定標識、および免疫ポリマーゼ連鎖反応標識からなる群から選択される。

20

【0016】

別の態様において、本発明の免疫アッセイは、ヒトNT - プロBNP、ヒトプロBNPおよびhBNPについて試験する試験試料またはこれらを含む疑いのある試験試料中に存在するヒトNT - プロBNP、ヒトプロBNPおよびhBNPの量を定量する方法に関する。本方法は：

(a)試験試料を(i)ヒトNT - プロBNPと結合し、検出可能標識にコンジュゲートされている第1の検出抗体と接触させてヒトNT - プロBNP - 第1の検出抗体複合体を含む第1の混合物を形成し；(ii)ヒトNT - プロBNPと結合することに加え、ヒトプロBNPにも結合し、検出可能標識にコンジュゲートされている該第1の検出抗体と接触させてヒトプロBNP - 第1の検出抗体複合体を含む第2の混合物を形成し；(iii)hBNPと結合し、検出可能標識にコンジュゲートされている第2の検出抗体と接触させてhBNP - 第2の検出抗体複合体を含む第3の混合物をさらに形成する工程(該第1の検出抗体は抗体15C4であり、該第2の検出抗体は抗体201.3である。)；

30

(b)ヒトNT - プロBNP - 第1の検出抗体複合体を含む前記第1の混合物を、ヒトNT - プロBNPと結合し、第1の固定化抗体を生成するために固相上で固定化されている第1の捕捉抗体と接触させて第1の捕捉抗体 - ヒトNT - プロBNP - 第1の検出抗体複合体を含む第4の混合物を形成する工程(前記第1の捕捉抗体は抗体15F11を含む。)；

40

(c)ヒトプロBNP - 第1の検出抗体複合体を含む該第2の混合物を、ヒトプロBNPと結合し、第2の固定化抗体を生成するために固相上で固定化されている第2の捕捉抗体と接触させて第2の捕捉抗体 - ヒトプロBNP - 第1の検出抗体複合体を含む第5の混合物を形成する工程(前記第2の捕捉抗体は抗体8.1を含む。)；

(d)hBNP - 第2の検出抗体複合体を含む該第3の混合物を、ヒトプロBNPと結合することに加え、hBNPにも結合し、第3の固定化抗体を生成するために固相上に固定化されている第2の捕捉抗体と接触させて第2の捕捉抗体 - hBNP - 第2の検出抗体複合体を含む第6の混合物を形成する工程(前記第2の捕捉抗体は抗体8.1を含む。)；および

(e)(i)該試験試料中に含有されるヒトNT - プロBNPの量の尺度として該検出

50

可能標識を検出することにより、工程（b）において形成された第1の捕捉抗体 - ヒトNT - プロBNP - 第1の検出抗体複合体の量を測定し；（ii）該試験試料中に含有されるヒトプロBNPの量の尺度として該検出可能標識を検出することにより、工程（c）において形成された該第2の捕捉抗体 - ヒトプロBNP - 第1の検出抗体複合体の量を測定し；（iii）該試験試料中に含有されるhBNPの量の尺度として該検出可能標識を検出することにより、工程（d）において形成された該第2の捕捉抗体 - hBNP - 第2の検出抗体複合体の量を測定する工程

を含む。

【0017】

または、上記方法において、試験試料から得られたまたは試験試料に由来する第1のアリコート第1の検出抗体と接触させてヒトNT - プロBNP - 第1の検出抗体複合体を形成することができる。試験試料から得られたまたは試験試料に由来する第2のアリコート第1の検出抗体と接触させてヒトプロBNP - 第1の検出抗体複合体を形成することができる。試験試料から得られたまたは試験試料に由来する第3のアリコート第2の検出抗体と接触させてhBNP - 第2の検出抗体複合体を形成することができる。

10

【0018】

上記免疫アッセイにおいて、固相は磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、フィルム、ろ紙、ディスク、およびチップからなる群から選択される。

【0019】

上記免疫アッセイにおいて、第1の検出抗体の検出可能標識は、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識、温度測定標識、および免疫ポリメラーゼ連鎖反応標識からなる群から選択される。第2の検出抗体の検出可能標識は、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識、温度測定標識、および免疫ポリメラーゼ連鎖反応標識からなる群から選択される。

20

【0020】

さらに別の態様において、本発明は免疫診断試薬に関する。具体的には、本発明の免疫診断試薬は：

（a）ヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド（「ヒトNT - プロBNP」）に特異的な第1の捕捉抗体；

30

（b）ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチド（「ヒトプロBNP」）およびヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド（「hBNP」）にそれぞれ特異的な第2の捕捉抗体；

（c）ヒトNT - プロBNPおよびヒトプロBNPにそれぞれ特異的な第1の検出抗体；

（d）hBNPに特異的な第2の検出抗体

を含む。

【0021】

上記キットにおける免疫診断試薬として使用することができる第1の捕捉抗体の例は、抗体15F11である。上記キットにおける免疫診断試薬として使用することができる第2の捕捉抗体の例は、抗体8.1である。

40

【0022】

上記キットにおける免疫診断試薬として使用することができる第1の検出抗体は、抗体15C4である。上記キットにおける免疫診断試薬として使用することができる第2の検出抗体の例は、抗体201.3である。

【0023】

さらに別の態様において、本発明は、試験試料中のヒトNT - プロBNP、ヒトプロBNPおよびhBNPの量を定量または検出するためのアッセイにおいて使用されるキットであって、前記キットは：

（a）該試験試料の該アッセイを実施するための取扱説明書と；

（b）（i）ヒトNT - プロBNPに特異的な第1の捕捉抗体；

50

(i i) ヒトプロBNPおよびhBNPにそれぞれ特異的な第2の捕捉抗体；

(i i i) ヒトNT-プロBNPおよびヒトプロBNPにそれぞれ特異的な第1の検出抗体；

(i v) hBNPに特異的な第2の検出抗体

を含む免疫診断試薬

を含むキットに関する。

【0024】

上記キットにおいて免疫診断試薬として使用することができる第1の捕捉抗体の例は、抗体15F11である。上記キットにおいて免疫診断試薬として使用することができる第2の捕捉抗体の例は、抗体8.1である。

10

【0025】

上記キットにおいて免疫診断試薬として使用することができる第1の検出抗体は、抗体15C4である。上記キットにおいて免疫診断試薬として使用することができる第2の検出抗体の例は、抗体201.3である。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1A】実施例1に記載の本発明の免疫アッセイの結果を示す図である。

【図1B】実施例1に記載の本発明の免疫アッセイの結果を示す図である。

【図1C】実施例1に記載の本発明の免疫アッセイの結果を示す図である。

【図2A】実施例1に記載の本発明の免疫アッセイを使用して検出されたエピトープを示す図である。

20

【図2B】実施例1に記載の本発明の免疫アッセイを使用して検出されたエピトープを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明は、ヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNPおよびhBNPについて試験する試験試料またはこれらを含む疑いのある試験試料中に存在する(1)ヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド(「ヒトNT-プロBNP」)；(2)ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチド(「ヒトプロBNP」)；および(3)ヒトB型ナトリウム利尿ペプチド(「hBNP」)の量を同時に検出または定量するための免疫アッセイに関する。さらに別の実施形態において、本発明は、ヒトNT-プロBNPに特異的な少なくとも1種の第1の捕捉抗体；ヒトプロBNPおよびhBNPにそれぞれ特異的な少なくとも1種の第2の捕捉物、ヒトNT-プロBNPおよびヒトプロBNPにそれぞれ特異的な少なくとも1種の第1の検出抗体並びにhBNPに特異的な少なくとも1種の第2の検出抗体を含む免疫診断試薬に関する。さらに別の実施形態において、本発明は免疫アッセイを実施するためのキットに関する。このようなキットは、このような免疫アッセイを実施するための取扱説明書および上記免疫診断試薬を含むことができる。

30

【0028】

A. 定義

本明細書において使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」はそうではないことが内容から明白である場合を除き、複数形の対象が含まれる。本明細書における数値範囲の記述については、同程度の精度でこの範囲内の各数値を明確に想定する。例えば、6から9の範囲については、6および9に加えて数値7および8を想定し、6.0から7.0の範囲については、数値6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9および7.0が明確に想定する。

40

【0029】

a) 抗体

本明細書において使用される場合、用語「抗体(antibody)」および「抗体(antibodies)」は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体(完全または部分ヒト化)、動物抗体(一態様において、トリ(例えば、アヒルまた

50

はガチョウ)、別の態様において、サメまたはクジラ、さらに別の態様において、非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウスなど)および非ヒト霊長類(例えば、カニクイザル、チンパンジーなどのサル)を含む哺乳動物)、組換え抗体、キメラ抗体、単鎖Fv(s c F v)、単鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(a b')断片、Fab''断片、ジスルフィド結合Fv(s d F v)、および抗イデオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む。)、並びに上記のいずれかの機能的に活性なエピトープ結合断片を指す。特に、抗体には、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的活性断片、即ち、抗原結合部位を含有する分子が含まれる。免疫グロブリン分子は、任意の型(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁およびIgA₂)またはサブクラスとすることができる。

10

【0030】

b) 15C4

本明細書において使用される場合、用語「15C4」は、HyTest(Turku, Finland)(カタログ番号4NT1)から入手可能な、配列番号3のアミノ酸残基63から71と結合するIgG1モノクローナル抗体を指す。

【0031】

c) 15F11

本明細書において使用される場合、用語「15F11」は、HyTest(Turku, Finland)(カタログ番号4NT1)から入手可能な、配列番号3のアミノ酸残基13から24と結合するIgG2bモノクローナル抗体を指す。

20

【0032】

d) 24E11

本明細書において使用される場合、用語「24E11」は、HyTest(Turku, Finland)(カタログ番号4NT1)から入手可能な、配列番号3のアミノ酸残基67から76と結合するIgG2aモノクローナル抗体を指す。

【0033】

e) 8.1

本明細書において使用される場合、「8.1」は、1996年2月21日にAmerican Type Culture Collection(A.T.C.C.)に寄託され、A.T.C.C.アクセッション番号HB-12056を付与されたハイブリドーマ細胞系8.1により産生されるモノクローナル抗体またはこの誘導体を指す。8.1および8.1の作製方法は、内容が参照により本明細書に組み込まれるU.S. Patent No. 6,162,902に記載されている。8.1は、hBNP上のアミノ酸残基26から32を含むエピトープと結合する。

30

【0034】

f) 201.3

本明細書において使用される場合、「201.3」は、1996年2月14日にA.T.C.C.に寄託され、A.T.C.C.アクセッション番号HB-12045を付与されたハイブリドーマ細胞系201.3により産生されるモノクローナル抗体またはこの誘導体を指す。201.3および201.3の作製方法は、内容が参照により本明細書に組み込まれるU.S. Patent No. 6,162,902に記載されている。201.3は、hBNP上のアミノ酸残基1から10を含むエピトープと結合する。

40

【0035】

g) エピトープ

本明細書において使用される場合、用語「エピトープ(epitope)」または「エピトープ(epitopes)」は、対象において抗原活性または免疫原生活性を有するポリペプチドまたはタンパク質の部位または断片を指す。免疫原生活性を有するエピトープは、動物において抗体応答を誘発するポリペプチドまたはタンパク質の部位または断片

50

である。抗原活性を有するエピトープは、当業者に周知の任意の方法、例えば、免疫アッセイにより判定した場合に、抗体が免疫特異的と結合するポリペプチドまたはタンパク質の部位または断片である。

【0036】

h) ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド

本明細書において使用される場合、用語「ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド」、「ヒトBNP」、「hBNP」、「hBNP-32」、「hBNPペプチド」、「hBNPポリペプチド」、または「B型ナトリウム利尿ペプチド」は、本明細書において同じ意味で使用され、配列番号4に示されるアミノ酸配列を有する32アミノ酸分子を指す。配列番号4に示されるアミノ酸配列は、ヒトプロBNPの108アミノ酸配列(配列番号2)のアミノ酸残基77から108により表される。

10

【0037】

i) 免疫診断試薬

本明細書において使用される場合、用語「免疫診断試薬」は、ヒトNT-プロBNP、(2)ヒトプロBNP、(3)ヒトBNP、または(4)(1)、(2)若しくは(3)の任意の組合せのある領域(例えばエピトープ)に特異的と結合する1種以上の抗体を指す。

【0038】

j) ヒトBNPのプレプロペプチド前駆体

本明細書において使用される場合、用語「ヒトBNPのプレプロペプチド前駆体」または「ヒトプレプロBNP」は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する134アミノ酸分子を指す。

20

【0039】

k) ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチド

本明細書において使用される場合、語句「ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチド」または「ヒトプロBNP」は、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する108アミノ酸分子を指す。ヒトプロBNPは、ヒトプレプロBNPから誘導される。

【0040】

l) ヒトN末端プロB型ナトリウム利尿ペプチド

本明細書において使用される場合、語句「ヒトN末端プロB型ナトリウム利尿ペプチド」または「ヒトNT-プロBNP」は、配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する76アミノ酸分子を指す。ヒトNT-プロBNPは、ヒトプロBNP(配列番号2)から誘導される。

30

【0041】

m) 対象

本明細書において使用される場合、用語「対象」および「患者」は、同じ意味で使用されるが、本発明の対象は、必ずしも免疫アッセイ時に医療治療を受けているかまたは受けたことがある必要はない。本明細書において使用される場合、用語「対象(subject)および「対象(subjects)」は、動物を意味し、一態様において、トリ(例えばアヒルまたはガチョウ)、別の態様において、サメまたはクジラ、さらに別の態様において、非霊長類(例えばウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、およびマウス)および霊長類(例えばカニクイザル、チンパンジーなどのサル、およびヒト)を含む哺乳動物を指す。対象はヒトが好ましい。

40

【0042】

n) 試験試料

本明細書において使用される場合、用語「試験試料」は、ヒトNT-プロBNP、プロBNPおよびhBNPについて試験する対象およびまたはこれらを含む疑いのある対象の、組織、血清、血漿、全血、リンパ、CNS液、尿または他の体液に由来する生物学的試料を指す。試験試料は、当業者に公知の日常的技術を使用して調製することがで

50

きる。

【0043】

B. 免疫アッセイおよび免疫診断試薬

本明細書に簡潔に記載されているとおり、一実施形態において、本発明は、試験試料中の(1)ヒトNT-プロBNP；(2)ヒトプロBNP；および(3)hBNPの同時定性検出および/または定量のための免疫アッセイに関する。本発明の免疫アッセイは、多数の利益を提供する。第1に、本発明の免疫アッセイにより、試験試料中の(1)ヒトNT-プロBNP；(2)ヒトプロBNP；および(3)hBNPの同時および特異的検出が可能となる。第2に、本発明の免疫アッセイにより、(1)ヒトNT-プロBNP；(2)ヒトプロBNP；および(3)hBNPを、同一(または単一)試験試料(単一試験試料に由来するまたは単一試験試料から得られたアリコートの本発明の方法において使用することができる。)中で個々におよび別の1種と関連づけて評価が可能となる。第3に、本発明の免疫アッセイは、試験試料中の3種の異なる分析物(即ち(1)ヒトNT-プロBNP；(2)ヒトプロBNP；および(3)hBNP)を検出するために2種の捕捉抗体および2種の検出抗体のみを要求するにすぎず、こうしてこのような免疫アッセイの実施に伴うコストが低減される。

10

【0044】

本発明の免疫アッセイは、当分野において公知の任意のフォーマット、例えば限定されるものではないがサンドイッチフォーマットを使用して実施することができる。さらに、本発明の免疫アッセイは、複数の反応器中で実施される。例示的フォーマットにおいて、本発明の免疫アッセイは、3個の別個の反応器中で実施される。換言すると、ヒトNT-プロBNPのための免疫アッセイが1個の反応器中で実施され、ヒトプロBNPのための免疫アッセイが1個の反応器(第2の反応器である。)中で実施され、hBNPのための免疫アッセイが1個の反応器(第3の反応器である。)中で実施される。

20

【0045】

本発明のある実施形態において、2種の捕捉抗体および2種の検出抗体は、試験試料中のヒト(1)NTプロBNP；(2)ヒトプロBNP；および(3)hBNPを分離および定量するために用いられる。より具体的には、2種の捕捉抗体および2種の検出抗体は、(1)ヒトNT-プロBNP；(2)ヒトプロBNP；および(3)hBNPのあるエピトープと結合し、「サンドイッチ」と称される免疫複合体を形成する。一般に、免疫アッセイにおいて、2種の抗体が試験試料中の(1)ヒトNT-プロBNP；(2)ヒトプロBNP；および(3)hBNPを捕捉するために使用され(これらの抗体は、「捕捉」抗体(antibody)または「捕捉」抗体(antibodies)と称されることも多い。)、2種の抗体が検出可能(即ち定量可能)標識をサンドイッチと結合させるために使用される(これらの抗体は、「検出抗体(detection antibody)」、「検出抗体(detection antibodies)」、「コンジュゲート(conjugate)」または「コンジュゲート(conjugates)」と称されることも多い。)

30

【0046】

本発明者らは、抗体のある組合せを捕捉および検出抗体として使用して優れた免疫アッセイ、特にサンドイッチアッセイを実施することができることを発見した。より具体的には、ヒトNT-プロBNPと結合する第1の捕捉抗体が使用される。第1の捕捉抗体として使用することができるこのような抗体の例は、抗体15F11である。さらに、(1)ヒトプロBNP；および(2)hBNPにそれぞれ結合する第2の捕捉抗体も使用される。使用することができる第2の捕捉抗体の例は、抗体8.1である。

40

【0047】

本明細書において既に記載されているとおり、2種の検出抗体が本発明において使用される。第1の検出抗体は、(1)ヒトNT-プロBNP；および(2)ヒトプロBNPにそれぞれ結合する。使用することができる第1の検出抗体の例は、抗体15C4である。さらに、第2の検出抗体は、hBNPと結合する抗体である。使用することができる第2

50

の検出抗体の例は、抗体 201.3 である。

【0048】

(1) ヒト NT - プロ BNP ; (2) ヒトプロ BNP ; および (3) hBNP について試験する (例えば、これらを含んでいる疑いのある) 試験試料は、2種の捕捉抗体および2種の検出抗体と同時にまたは連続的に任意の順序で接触させることができる。または、試験試料に由来する任意数のアリコート (例えば、限定されるものではないが、試験試料に由来する少なくとも3個のアリコート) を試験することができる。例えば、試験試料を、最初に少なくとも1種の捕捉抗体と接触させ、次いで (連続的に) 少なくとも1種の検出抗体と接触させることができる。または、試験試料を最初に少なくとも1種の検出抗体と接触させ、次いで (連続的に) 少なくとも1種の捕捉抗体と接触させることができる。さらに別の代替例において、試験試料を捕捉抗体および検出抗体と同時に接触させることができる。

10

【0049】

サンドイッチアッセイフォーマットにおいて、(1) ヒト NT - プロ BNP ; (2) ヒトプロ BNP および (3) hBNP を含有すると考えられる試験試料を最初に上記2種の捕捉抗体と、以下の複合体の形成を可能とする条件下で接触させる: (a) 第1の捕捉抗体 - ヒト NT - プロ BNP 複合体 (例えば第1の混合物); (b) 第2の捕捉抗体 - ヒトプロ BNP 複合体 (例えば第2の混合物); および (c) 第2の捕捉抗体 - hBNP 複合体 (例えば第3の混合物)。試験試料の別個のアリコート (例えば少なくとも3個のアリコート) を使用して第1の捕捉抗体 - ヒト NT - プロ BNP 複合体、第2の捕捉抗体 - ヒトプロ BNP 複合体および第2の捕捉抗体 - hBNP 複合体を形成することができる。本明細書において既に記載されているとおり、ヒト NT - プロ BNP と結合する少なくとも1種の第1の捕捉抗体が使用される。このような第1の捕捉抗体の例は、15F11 である。第2の捕捉抗体は、(1) ヒトプロ BNP ; および (2) hBNP にそれぞれ結合する。このような第2の捕捉抗体の例は、抗体 8.1 である。上記複合体を形成するために捕捉抗体を試験試料と接触させる順序は重要ではない。または、試験試料は、(別個の反応器中で) 捕捉抗体のそれぞれと同時に接触させることができる。サンドイッチアッセイにおいて、抗体、好ましくは2種の捕捉抗体は、試験試料中で予測される (1) ヒト NT - プロ BNP ; (2) ヒトプロ BNP および (3) hBNP の最大量のモル過剰量で使用される。例えば、約 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から約 1 mg/mL の 1 mL 緩衝液 (例えば微粒子被覆緩衝液) 当たりの抗体を使用することができる。

20

30

【0050】

場合により、試験試料を2種の捕捉抗体と接触させる前に、捕捉抗体の少なくとも1種を、上記複合体 (即ち、(a) 第1の捕捉抗体 - ヒト NT - プロ BNP 複合体; (b) 第2の捕捉抗体 - ヒトプロ BNP 複合体; および (c) 第2の捕捉抗体 - hBNP 複合体) の試験試料からの分離を促進する固体担体と結合させることができる。さらに、場合により、試験試料を2種の捕捉抗体と接触させる前に、捕捉抗体の全てを、上記複合体 (即ち、(a) 第1の捕捉抗体 - ヒト NT - プロ BNP 複合体; (b) 第2の捕捉抗体 - ヒトプロ BNP 複合体; および (c) 第2の捕捉抗体 - hBNP 複合体) の試験試料からの分離を促進する固体担体と結合させることができる。限定されるものではないが、ウェル、チューブまたはビーズの形態のポリマー材料製の固体担体を含む当分野において公知の任意の固体担体を使用することができる。抗体は、吸着により、化学カップリング剤を使用する共有結合により、または当分野において公知の他の手段により固体担体と結合させることができるが、このような結合が、抗体の (1) ヒト NT - プロ BNP ; (2) ヒトプロ BNP ; および (3) hBNP への結合能を妨害しないことを条件とする。または、抗体は、ストレプトアビジンにより事前に被覆された微粒子により結合させることができる (例えば、Seradyn, Indianapolis, Indiana から入手可能な Power-Bind (商標) - SA-MP ストレプトアビジン被覆微粒子を使用)。または、抗体は、抗種特異的モノクローナル抗体により事前に被覆された微粒子を使用して結合させることができる。さらに、必要な場合、固体担体を誘導体化して抗体上の種々の官

40

50

能基との反応性を可能とすることができる。このような誘導体化は、あるカップリング剤、例えば限定されるものではないが、無水マレイン酸、N-ヒドロキシスクシンイミドおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドの使用を要求する。

【0051】

(1) ヒトNT-プロBNP；(2) ヒトプロBNP；および(3) hBNPについて試験する試験試料および/またはこれらを含む疑いのある試験試料に存在する2種の捕捉抗体と接触させた後、混合物をインキュベートして少なくとも以下の複合体を含む混合物の形成を可能とする：(a) 第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP複合体(第1の混合物)；(b) 第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP複合体(第2の混合物)；および(c) 第2の捕捉抗体-hBNP複合体(第3の混合物)。インキュベーションは、約4.5から約10.0のpHにおいて、約2から約45の温度において、少なくとも約1分から約18時間、好ましくは約1から20分間、最も好ましくは約2から4分間の期間実施することができる。本明細書に記載の免疫アッセイは、1工程(試験試料、少なくとも3種の捕捉抗体および少なくとも3種の検出抗体を反応器に全て連続的にまたは同時に添加することを意味する。)または1つ超の工程、例えば2工程、3工程などにおいて実施することができる。

【0052】

第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP複合体、第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP複合体および第2の捕捉抗体-hBNP複合体を含む混合物の形成後、次いで複合体を2種の検出抗体と、第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP第1の検出抗体複合体(こうして第4の混合物を形成する。)、第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP第1の検出抗体複合体(こうして第5の混合物を形成する。)および第2の捕捉抗体-hBNP第2の検出抗体複合体(こうして第6の混合物を形成する。)の形成を可能とする条件下で接触させる。第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP複合体および第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP複合体を検出するために使用される検出抗体は、互いに同一である。捕捉抗体(例えば第1の捕捉抗体)に関して、第1の検出抗体を捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP複合体と接触させ、第1の検出抗体を第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP複合体と接触させ、第1の検出抗体を第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP複合体と接触させ、第2の検出抗体を捕捉抗体-hBNP複合体と接触させる場合、上記のものと同様の条件下のインキュベーション期間が、第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP-第1の検出抗体複合体、第2の捕捉抗体-ヒトプロBNP-第1の検出複合体、第2の捕捉抗体-hBNP-第2の検出抗体複合体またはこれらの組合せの形成に要求される。好ましくは、2種の検出抗体の少なくとも1種は検出可能標識を含む。最も好ましくは、検出抗体は両方とも検出可能標識を含む。検出可能標識は、第1の捕捉抗体-ヒトNT-プロBNP-第1の検出抗体複体の形成前に、形成と同時にまたは形成後に少なくとも1種の検出抗体(例えば第1の検出抗体)と結合させることができる。当分野において公知の任意の検出可能標識を使用することができる。例えば、検出可能標識は、放射性標識、例えば³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、³²P、³³P、酵素標識、例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース6リン酸デヒドロゲナーゼなど、化学発光標識、例えばアクリジニウムエステル、ルミノール、イソルミノール、チオエステル、スルホンアミド、フェナントリジニウムエステルなど、蛍光標識、例えばフルオレセイン(5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'-6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロ-フルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネートなど)、ローダミン、フィコピリタンバク質、R-フィコエリスリン、量子ドット(硫化亜鉛によりキャップされたセレン化カドニウム)、温度測定標識または免疫-ポリメラーゼ連鎖反応標識であり得る。標識、標識手順および標識の検出の概論は、Polak and Van Noorden, Introduction to Immunocytochemistry, 2nd ed., Springer Verlag, N.Y. (1997) および Haugland, Han

10

20

30

40

50

book of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1996) (モレキュラー・プローブズ社、ユージーン、オレゴン (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon) により出版されているハンドブック兼カタログである。)に見出される。さらに、1種超の標識を使用することができる。例えば、それぞれが異なる標識を含有する二重コンジュゲートを使用することができる。例えば、1種のコンジュゲート抗体はビオチンを含有することができ、第2のコンジュゲートはアクリジニウムにより標識されている抗ビオチン抗体であり得る。他のバリエーションは、当業者により容易に認識される。

【0053】

検出可能標識は、抗体に直接またはカップリング剤を介して結合させることができる。使用することができるカップリング剤の例は、Sigma-Aldrich, St. Louis, MOから市販されているEDAC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)である。使用することができる他のカップリング剤は、当分野において知られている。検出可能標識を抗体と結合させる方法は、当分野において知られている。さらに、検出可能標識の抗体へのカップリングを促進する末端基、例えば別名CPS P - アクリジニウムエステルとして公知のN10-(3-スルホプロピル)-N-(3-カルボキシプロピル)-アクリジニウム-9-カルボキサミド活性エステルまたは別名SPSP - アクリジニウムエステルとして公知のN10-(3-スルホプロピル)-N-(3-スルホプロピル)-アクリジニウム-9-カルボキサミド活性エステルを既に含有する多くの検出可能標識を購入または合成することができる。

10

20

【0054】

第1の捕捉抗体 - ヒトNT - プロBNP - 第1の検出抗体複合体、第2の捕捉抗体 - ヒトプロBNP - 第1の検出複合体、第2の捕捉抗体 - hBNP - 第2の検出抗体複合体のいずれかまたは全てを、必須ではないが、標識の定量前に試験試料の残部から分離することができる。例えば、少なくとも1種の捕捉抗体 (例えば第1の捕捉抗体) を固体担体、例えばウェルまたはビーズと結合させる場合、分離は (試験試料の) 液を固体担体との接触から除去することにより達成することができる。または、第1の捕捉抗体を固体担体と結合させる場合、第1の捕捉抗体をヒトNT - プロBNP含有試料および第1の検出抗体と同時に接触させて第1の捕捉抗体 - ヒトNT - プロBNP - 第1の抗体複合体を形成し、次いで液 (試験試料) を固体担体との接触から除去することができる。第1の捕捉抗体を固体担体と結合させない場合、第1の捕捉抗体 - ヒトNT - プロBNP - 第1の検出抗体複合体は、標識の量の定量のために試験試料から除去しなくてよい。または、第2の捕捉抗体を固体担体と結合させる場合、第2の捕捉抗体をヒト捕捉プロBNP含有試料および第1の検出抗体と同時に接触させて第2の捕捉抗体 - ヒトプロBNP - 第2の抗体複合体を形成し、次いで液 (試験試料) を固体担体との接触から除去することができる。第2の捕捉抗体を固体担体と結合させない場合、第2の捕捉抗体 - ヒトプロBNP - 第1の検出抗体複合体は標識の量の定量のために試験試料から除去しなくてよい。または、第2の捕捉抗体を固体担体と結合させる場合、第2の捕捉抗体をhBNP含有試料および第2の検出抗体と同時に接触させて第2の捕捉抗体 - hBNP - 第2の抗体複合体を形成し、次いで液 (試験試料) を固体担体との接触から除去することができる。少なくとも1種の第2の捕捉抗体を固体担体と結合させない場合、第2の捕捉抗体 - hBNP - 第2の検出抗体複合体は、標識の量の定量のために試験試料から除去しなくてよい。

30

40

【0055】

標識された第1の捕捉抗体 - ヒトNT - プロBNP第1の検出抗体複合体、標識された第2の捕捉抗体 - ヒトプロBNP第1の検出抗体複合体および標識された第2の捕捉抗体 - hBNP第2の検出抗体複合体の形成後、複合体のそれぞれの標識の量 (従って、第4、第5および第6の混合物のそれぞれ) を当分野において公知の技術を使用して定量する。例えば、酵素標識を使用する場合、標識された複合体を、定量可能反応、例えば発色を付与する標識用基質と反応させる。標識が放射性標識である場合、標識はシンチレーションカウンターを使用して定量する。標識が蛍光標識である場合、標識をある色 (「励起波

50

長」として公知)の光により刺激し、刺激に应答して標識により発せられる別の色(「発光波長として公知」)を検出することにより定量する。標識が化学発光標識である場合、目視またはルミノメーター、X線フィルム、高速写真フィルム、CCDカメラなどを使用して発光を検出することにより標識を定量する。複合体中の標識の量を定量したら、既知濃度のヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNPおよびhBNPの希釈系列を使用して作成した標準曲線の使用により試験試料中のヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNPおよびhBNPの濃度を測定する。ヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNPおよびhBNPの希釈系列の使用以外に、重量測定、質量分析法および当分野において公知の他の技術により標準曲線を作成することができる。

【0056】

別の実施形態において、本発明は免疫診断試薬に関する。具体的には、本明細書に記載の少なくとも1種の捕捉抗体(即ち、配列番号3のアミノ酸残基13から24を含むまたはこれからなるエピトープと結合する抗体)および少なくとも1種の検出抗体(即ち、配列番号3のアミノ酸残基63から71または配列番号3のアミノ酸残基67から76を含むまたはこれからなるエピトープと結合する抗体)を個々にまたは組合せにおいて1種以上の免疫診断試薬として1種以上の免疫アッセイ、例えば上記のものにおいて使用することができる。本明細書に記載の少なくとも1種の捕捉抗体および少なくとも1種の検出抗体を免疫アッセイ(例えば、本明細書において既に記載されているもの)において一緒に使用する場合、免疫アッセイは、試験試料中のあらゆるヒトプロBNPについて約1.0%未満の交差反応性を示す。より具体的には、免疫アッセイは、試験試料中に存在し得るあらゆるヒトプロBNPについて約0.9%未満、約0.8%未満、約0.7%未満、約0.6%未満、約0.5%未満、約0.4%未満、約0.3%未満、約0.2%未満、約0.1%未満または約0.001%未満を示す。

【0057】

または、本明細書に記載の少なくとも1種の捕捉抗体(即ち、配列番号2のアミノ酸残基103から108を含むまたはこれからなる1種のエピトープと結合する抗体)および少なくとも1種の検出抗体(即ち、配列番号2の63から71を含むまたはこれからなるエピトープと結合する抗体)を個々にまたは組合せにおいて1種以上の免疫診断試薬として1種以上の免疫アッセイ、例えば上記のものにおいて使用することができる。

【0058】

または、本明細書に記載の少なくとも1種の捕捉抗体(即ち、配列番号4のアミノ酸残基28から32を含むまたはこれからなる1種のエピトープと結合する抗体)および少なくとも1種の検出抗体(即ち、配列番号4の1から10を含むまたはこれからなるエピトープと結合する抗体)を、個々にまたは組合せにおいて1種以上の免疫診断試薬として1種以上の免疫アッセイ、例えば上記のものにおいて使用することができる。

【0059】

C. 方法の応用

本発明はまた、例えばU.S. Patent Nos. 5,089,424 and 5,006,309に記載され、例えばAbbott Laboratories(Abbott Park, IL)から市販されているような種々の自動および半自動システム(固相が微粒子を含む。)における使用のために応用させることができ、このようなシステムとしては限定されるものではないが、Abbott社のARCHITECT(登録商標)、AxSYM(登録商標)、IMx(登録商標)、PRISM(登録商標)、およびQuantum(商標)II機器、並びに他のプラットフォームが挙げられる。さらに、本発明は場合により、サンドイッチ免疫アッセイを実施するためのAbbott Laboratories社の市販ポイントオブケア(i-STAT(商標))電気化学免疫アッセイシステムに適用可能である。免疫センサ、およびこの製造方法並びに使い捨て試験装置における操作方法は、例えばU.S. Patent No. 5,063,081、U.S. Patent Application 2003/0170881、U.S. Patent Application 2004/0018577、U.S. Paten

10

20

30

40

50

t Application 2005/0054078、およびU.S. Patent Application 2006/0160164に記載されており、これらは同一物に関するこの教示について全体として参照により組み込まれる。

【0060】

D. 典型的キット

本発明はまた、例えばAbbott Laboratories (Abbott Park, IL) から市販されている自動および半自動システム並びにプラットフォームに使用される種々のキットにおける使用に応用させることができ、このようなシステムおよびプラットフォームとしては限定されるものではないが、Abbott Laboratories社のARCHITECT (登録商標)、AxSYM (登録商標)、IMx (登録商標)、PRISM (登録商標)、およびQuantum (商標) II 機器、サンドイッチ免疫アッセイを実施するためのAbbott Laboratories社の市販ポイントオブケア (i-STAT (商標)) 電気化学免疫アッセイシステム、並びに他のプラットフォームが挙げられる。

10

【0061】

このようなキットは、本明細書に記載の免疫診断試薬 (例えば、捕捉および検出抗体) の1種以上を含むことができる。より具体的には、キットが免疫アッセイを実施するためのキットである場合、キットは、(1) ヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNPおよびヒトBNPと結合する少なくとも2種の捕捉抗体および2種の検出抗体; 並びに(2) 免疫アッセイを実施するための1種以上の取扱説明書の場合により含有することができる。本発明の免疫診断試薬は、このような試験キットに捕捉抗体として、検出抗体として、または捕捉抗体と検出抗体の両方として含めることができる。例えば、抗体15F11はキット中に捕捉抗体として含めることができ、抗体15C4はキット中に検出抗体として含めることができる。または、抗体15F11は、キット中に捕捉抗体として含めることができ、抗体24E11はキット中に検出抗体として含めることができる。場合により、キットは少なくとも1種の較正物質または対照を含有することもできる。任意の較正物質または対照をキット中に含めることができる。しかしながら好ましくは、較正物質または対照は本明細書に既に記載されているヒトNT-プロBNP、特に配列番号3、ヒトプロBNP、特に配列番号4、hBNP、特に配列番号2またはこれらの組合せである。従って、キットは少なくとも1種の較正物質、若しくは少なくとも1種の対照、または少なくとも1種の較正物質および少なくとも1種の対照の組合せを含むことができる。

20

30

【0062】

場合により、キットは品質管理試薬 (例えば感度パネル、較正物質、および陽性対照) を含むこともできる。品質管理試薬は当分野において周知であり、例えば種々の免疫診断製品挿入シートに記載されている。ヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNP、hBNPまたはこれらの組合せの感度パネルメンバーは、例えば既知量のヒトNT-プロBNP抗原、ヒトプロBNP、hBNPまたはこれらの組合せを適切なアッセイ緩衝液 (例えばリン酸緩衝液) 中にスパイクすることにより、例えば「低い」から「高い」範囲の既知量のヒトNT-プロBNP抗原、ヒトプロBNP抗原、hBNP抗原またはこれらの組合せを含有する変動量で場合により調製することができる。これらの感度パネルメンバーは、アッセイ実施特性を確立するために場合により使用され、さらに場合により免疫アッセイキット試薬の統合性、およびアッセイの標準化の有用な指標である。ヒトNT-プロBNP抗原、ヒトプロBNP抗原、hBNP抗原またはこれらの組合せは、較正物質として用いることもできる。

40

【0063】

キット中で提供される抗体は、例えばフルオロフォア、放射性部分、酵素、ビオチン/アビジン標識、発色団、化学発光標識などの検出可能標識を取り込むことができ、またはキットは抗体を標識するための試薬若しくは抗体 (例えば検出抗体) を検出するための、および/または抗原を標識するための試薬、または抗原を検出するための試薬を含むことができる。抗体、較正物質および/または対照は、別個の容器中で提供することができ、

50

または適切なアッセイフォーマット、例えばマイクロタイタープレート中に事前に分注することができる。

【0064】

さらに別の実施形態において、キットは、15F11、15C4、8.1、201.3および24E11からなる群から選択される1種以上の抗体を含む免疫診断剤を単独、取扱説明書とともに、または他の態様のキットおよびキット構成成分とともに、含むことができる。

【0065】

キットは、診断アッセイを実施するまたは品質管理評価を促進するために必要な他の試薬、例えば緩衝液、塩、酵素、酵素補因子、基質、検出試薬などを場合により含むことができる。他の構成成分、例えば試験試料の単離および/または処理のための緩衝液および溶液（例えば前処理試薬）をキット中に含めることもできる。キットは、1種以上の他の対照をさらに含むことができる。キットの構成成分の1種以上は凍結乾燥させることができ、キットは凍結乾燥された構成成分の再構築に好適な試薬をさらに含むことができる。

【0066】

キットの種々の構成成分は、場合により好適な容器中で提供される。上記のとおり、容器の1種以上はマイクロタイタープレートであり得る。キットは、試料を保持または貯蔵するための容器（例えば血液または尿試料のための容器またはカートリッジ）をさらに含むことができる。必要に応じて、キットは、反応器、混合器および試薬または試験試料の調製を促進する他の構成成分を場合により含有することもできる。キットは、試験試料の採取補助用の1種以上の器具、例えばシリンジ、ピペット、鉗子、計量スプーンなどを含むこともできる。

【0067】

キットは、紙形態で、または、例えばディスク、CD、DVDなどのコンピュータ読み込み可能な形式で提供することができる、使用説明書をさらに場合により含むことができる。

【0068】

非限定的な例示として本発明の実施例を以下に挙げる。

【実施例】

【0069】

[実施例1]

ヒトNTプロB型ナトリウム利尿ペプチド、ヒトプロB型ナトリウム利尿ペプチドおよびヒトB型ナトリウム利尿ペプチドの同時検出および定量

材料、方法および結果

本実施例において、自動ARCHITECT（登録商標）システム（Abbott Laboratories, Park, IL）を使用してヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNPおよびヒトBNPを定量する免疫アッセイを実施した。これらの3種の分析物の検出を、2種のタイプのモノクローナル抗体被覆磁気微粒子および2種のタイプの標識モノクローナル抗体を使用して達成する。

【0070】

ヒトNT-プロBNP（0.0 pM - 577.4 pM）を10 mMのNaOAc、10 mMのDTPA、2%のBSA、0.1%のProClin300、0.1%のNaN₃、pH 5.6（Abbott Laboratories, Abbott Park, IL）中に含有するヒトNT-プロBNP（HyTest, Turku, Finland；カタログ番号8NT1）の希釈物を試験した。試験は、自動ARCHITECT（登録商標）システムにおいて個々の試験に使用される反応器（Abbott Laboratories, Abbott Park, IL）中で実施した。記載の工程は全て、ARCHITECT（登録商標）機器中で行った。

【0071】

ヒトプロBNP（0.0 pM - 577.4 pM）を10 mMのNaOAc、10 mMの

10

20

30

40

50

DTPA、2%のBSA、0.1%のProClin300、0.1%のNaN₃、pH 5.6 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)中に含有するヒトプロBNP (HyTest, Turku, Finland; カタログ番号8PRO8)の希釈物を試験した。試験は、自動ARCHITECT (登録商標)システムにおいて個々の試験に使用される反応器 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)中で実施した。記載の工程は全て、ARCHITECT (登録商標)機器中で行った。

【0072】

ヒトBNP Architect BNP較正物質 (リスト8K2802, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) (0.0pM - 577.4pM)を試験した。試験は、自動Abbott ARCHITECT (登録商標)システムにおいて個々の試験に使用される反応器 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)中で実施した。記載の工程は全て、ARCHITECT (登録商標)機器中で行った。

10

【0073】

これらの試料は、記載されている慣用の2工程免疫アッセイフォーマットを使用して試験した。2工程アッセイフォーマットは単一反応器中で行う。2工程アッセイフォーマットは、試料を添加する工程、抗体被覆磁気微粒子を添加する工程、分析物を結合させる工程、磁気微粒子-分析物複合体を洗浄する工程、標識コンジュゲート抗体を添加する工程、標識コンジュゲートを磁気微粒子-分析物複合体と結合させる工程、得られた磁気微粒子-分析物-標識コンジュゲート抗体複合体を洗浄する工程、および反応器中に残留する複合体化標識により生成されたシグナルを読み取る工程を含む。

20

【0074】

ヒトBNP検出

各試料希釈物を個々の反応器中に100μLの量で分注した。同時に、抗ヒトBNP/ヒトプロBNPモノクローナル抗体8.1 (Scios, Sunnyvale, CA; A.T.C.C.アクセッション番号HB-12056)により被覆された0.10%EDAC-被覆磁気微粒子 (50μL) (Polymer Laboratories Ltd, 目下Varian, Inc.の部門, Shropshire, UK)を同一の反応器中に50μLの量で分注した。次いで、反応器をボルテックスにかけて試料および磁気微粒子を混合した。各反応混合物を37°Cにおいて18分間インキュベートした。

30

【0075】

このインキュベーションの間、試料中のあらゆるヒトBNPを磁気微粒子上に被覆されたモノクローナル抗体8.1により捕捉した。

【0076】

18分間のインキュベーションを完了したら、モノクローナル抗体8.1被覆磁気微粒子およびモノクローナル抗体8.1/BNP複合体を磁氣的に捕捉し、反応器の側部上でペレット中に固定化した。次いで、固定化された磁気微粒子およびモノクローナル抗体8.1/BNP複合体ペレットを、液体を容器から交互に吸引し、次いでアッセイキット洗浄緩衝液 (ARCHITECT (登録商標)洗浄緩衝液、Abbott Laboratories, Abbott Park, ILから入手可能である。)を反応器中に添加することにより洗浄した (1mLの洗浄緩衝液、繰り返し4回)。この工程は、あらゆる未結合ヒトBNPを反応混合物から除去した。18分間のインキュベーションの間に形成された磁氣的に捕捉された微粒子、ヒトBNPモノクローナル抗体8.1/BNP複合体が反応器中で残留した。次いで、磁気微粒子モノクローナル抗体8.1/ヒトBNP複合体ペレットを遊離させた。

40

【0077】

4分間の第2のインキュベーションの間、抗ヒトBNP/抗ヒトプロBNP、アクリジニウム (Abbott Laboratories, Abbott Park) 標識モノクローナル抗体201.3 (Scios, Sunnyvale, CA; A.T.C.C.

50

アクセッション番号HB-12045)を、モノクローナル抗体8.1被覆磁気微粒子およびモノクローナル抗体8.1/BNP複合体のみを含有する個々の反応器中に50μLの量で分注した。次いで、この反応混合物をボルテックスにかけて微粒子ペレットを分散させた。

【0078】

磁気微粒子およびモノクローナル抗体8.1/BNP複合体を、アクリジニウム(Abbott Laboratories, Abbott Park, コード88333)標識抗ヒトBNP201.3モノクローナル抗体と、緩衝液中で37°Cにおいて4分間インキュベートした。このインキュベーションの間、抗ヒトBNP201.3アクリジニウム標識抗体は磁気微粒子/モノクローナル抗体8.1/BNP複合体と結合した。

10

【0079】

4分間のインキュベーションが完了したら、磁気微粒子/モノクローナル抗体8.1/ヒトBNP/標識モノクローナル抗体201.3およびモノクローナル抗体8.1/BNP複合体をペレット中に磁氣的に再度捕捉した。次いで、再捕捉されたペレットを緩衝液(1mL)により、繰り返し4回繰り返し洗浄した。次いで、磁氣的に捕捉されたモノクローナル抗体8.1被覆磁気微粒子、ヒトBNPおよび標識モノクローナル抗体201.3)およびモノクローナル抗体8.1/BNP複合体ペレットを遊離させた。

【0080】

次いで、アクリジニウム標識(Abbott Laboratories, Abbott Park, コード61444)に発光を誘発させた。このことは、H₂O₂(1.32%)を含有する低pH(pH1)緩衝液(リスト6E23-65, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)を添加することにより達成した。これを、微粒子複合体を含有する個々の反応器中に(100μL)の量で分注し、次いでボルテックスにかけた。この工程は、微粒子により捕捉されたヒトBNPと結合したアクリジニウム標識抗ヒトBNP(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)モノクローナル抗体201.3(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)を遊離させた。

20

【0081】

次いで、磁気微粒子を磁氣的に捕捉し、遊離させたアクリジニウム標識抗BNP抗体(モノクローナル抗体201.3)を反応混合物溶液中に残した。その後、溶液中に遊離させたアクリジニウムからの産物である光、相対発光単位(RLU)を「誘発」するpH1.3緩衝液(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)を添加した(300μL)。生成された光の量を使用して試料中で検出されるヒトBNPの量を測定した。

30

【0082】

ヒトプロBNP検出

各試料希釈物を、個々の反応器中に100μLの量で分注した。同時に、抗ヒトBNP/ヒトプロBNPモノクローナル抗体8.1(Scios, Sunnyvale, CA; A.T.C.C.アクセッション番号HB-12056)により被覆された0.10%EDAC被覆磁気微粒子(50μL)(Polymer Laboratories Ltd, 目下Varian, Inc.の部門, Shropshire, UK)を同一の反応器中に50μLの量で分注した。次いで、反応器をボルテックスにかけて試料および磁気微粒子を混合した。各反応混合物を37°Cにおいて18分間インキュベートした。

40

【0083】

このインキュベーションの間、試料中のあらゆるヒトプロBNPを磁気微粒子上に被覆されたモノクローナル抗体8.1により捕捉した。

【0084】

18分間のインキュベーションを完了したら、モノクローナル抗体8.1被覆磁気微粒子およびモノクローナル抗体8.1/プロBNP複合体を磁氣的に捕捉し、反応器の側部上でペレット中に固定化した。次いで、固定化された磁気微粒子およびモノクローナル抗

50

体 8 . 1 / ヒトプロBNP 複合体ペレットを、液体を容器から交互に吸引し、次いでアッセイキット洗浄緩衝液 (ARCHITECT (登録商標) 洗浄緩衝液、Abbott Laboratories, Abbott Park, IL から入手可能である。) を反応器 (1 mL の洗浄緩衝液、繰り返し 4 回) 中に添加することにより洗浄した。この工程は、あらゆる未結合ヒトプロBNP を反応混合物から除去した。18 分間のインキュベーションの間に形成された磁氣的に捕捉された微粒子ヒトプロBNP モノクローナル抗体 8 . 1 / プロBNP 複合体が反応器中で残留した。次いで、磁気微粒子モノクローナル抗体 8 . 1 / ヒトプロBNP 複合体ペレットを磁気物から遊離させた。

【0085】

4 分間の第 2 のインキュベーションの間、抗ヒトNT - プロBNP / 抗ヒトプロBNP アクリジニウム (Abbott Laboratories, Abbott Park) 標識モノクローナル抗体 15C4 (HyTest, Turku, Finland; カタログ番号 4TN1) を、モノクローナル抗体 8 . 1 被覆磁気微粒子モノクローナル抗体 8 . 1 / ヒトプロBNP 複合体のみを含有する個々の反応器中に 50 μ L の量で分注した。次いで、この反応混合物をボルテックスにかけて微粒子ペレットを分散させた。

【0086】

磁気微粒子およびモノクローナル抗体 8 . 1 / プロBNP 複合体を、アクリジニウム (Abbott Laboratories, Abbott Park, コード 88333) 標識抗ヒトプロBNP 15C4 モノクローナル抗体と、緩衝液中で 37 $^{\circ}$ C において 4 分間インキュベートした。このインキュベーションの間、抗ヒトプロBNP 15C4 アクリジニウム標識抗体はモノクローナル抗体 8 . 1 / プロBNP 複合体を有する磁気微粒子と結合した。

【0087】

4 分間のインキュベーションが完了したら、磁気微粒子、モノクローナル抗体 8 . 1 / ヒトプロBNP / 標識モノクローナル抗体 15C4 複合体をペレット中に磁氣的に再度捕捉した。次いで、再捕捉されたペレットを緩衝液 (1 mL) により、繰り返し 4 回繰り返し洗浄した。次いで、磁氣的に捕捉されたモノクローナル抗体 8 . 1 被覆磁気微粒子、ヒトプロBNP および標識抗体モノクローナル抗体 15C4 およびモノクローナル抗体 8 . 1 / プロBNP 複合体ペレットを遊離させた。

【0088】

次いで、アクリジニウム標識 (Abbott Laboratories, Abbott Park) に発光を誘発させた。このことは、 H_2O_2 (1.32%) を含有する低 pH (pH 1) 緩衝液 (リスト 6E23 - 65, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) を添加することにより達成した。これを、微粒子複合体を含有する個々の反応器中に (100 μ L) の量で分注し、次いでボルテックスにかけた。この工程は、微粒子により捕捉されたヒトプロBNP と結合したアクリジニウム標識抗ヒトプロBNP (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) モノクローナル抗体 15C4 を遊離させた。

【0089】

次いで、磁気微粒子を磁氣的に捕捉し、遊離させたアクリジニウム標識抗プロBNP 抗体 (モノクローナル抗体 15C4) を反応混合物溶液中に残した。この後、溶液中に遊離させたアクリジニウムからの産物である光、相対発光単位 (RLU) を「誘発」する pH 13 緩衝液 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) を添加した (300 μ L)。生成された光の量を使用して試料中で検出されるヒトプロBNP の量を測定した。

【0090】

ヒトNT - プロBNP 検出

各試料希釈物を、個々の反応器中に 100 μ L の量で分注した。同時に、抗ヒトNT - プロBNP / 抗ヒトプロBNP モノクローナル抗体 15F11 (HyTest, Turku, Finland; カタログ番号 4TN1) により被覆された 0.10% EDA C 被覆

10

20

30

40

50

磁気微粒子 (50 μ L) (Polymer Laboratories Ltd, 目下 Varian, Inc. の部門, Shropshire, UK) を同一の反応器中に 50 μ L の量で分注した。次いで、反応器をボルテックスにかけて試料および磁気微粒子を混合した。各反応混合物を 37 °C において 18 分間インキュベートした。

【0091】

このインキュベーションの間、試料中のあらゆるヒト NT-プロ BNP を磁気微粒子上に被覆されたモノクローナル抗体 15F11 により捕捉した。

【0092】

18 分間のインキュベーションを完了したら、15F11 被覆磁気微粒子およびモノクローナル抗体 15F11 / NTプロ BNP 複合体を磁氣的に捕捉し、反応器の側部上でペレット中に固定化した。次いで、固定化された磁気微粒子およびモノクローナル抗体 15F11 / NTプロ BNP 複合体ペレットを、液体を容器から交互に吸引し、次いでアッセイキット洗浄緩衝液 (ARCHITECT (登録商標) 洗浄緩衝液、Abbott Laboratories, Abbott Park, IL から入手可能である。) を反応器 (1 mL の洗浄緩衝液、繰り返し 4 回) 中に添加することにより洗浄した。この工程は、あらゆる未結合ヒト NT-プロ BNP を反応混合物から除去した。18 分間のインキュベーションの間に形成された磁氣的に捕捉された被覆磁気微粒子ヒト NT-プロ BNP モノクローナル抗体 15F11 / NTプロ BNP 複合体ペレットが反応器中で残留した。次いで、磁気微粒子モノクローナル抗体 15F11 / ヒト NT-プロ BNP 複合体ペレットを磁気物から遊離させた。

10

20

【0093】

4 分間の第 2 のインキュベーションの間、抗ヒト NT-プロ BNP / 抗ヒトプロ BNP アクリジニウム (Abbott Laboratories, Abbott Park) 標識モノクローナル抗体 15C4 (HyTest, Turku, Finland; カタログ番号 4TN1) を、15F11 被覆磁気微粒子およびモノクローナル抗体 15F11 / NTプロ BNP 複合体のみを含有する個々の反応器中に 50 μ L の量で分注した。次いで、この反応混合物をボルテックスにかけて微粒子ペレットを分散させた。

【0094】

4 分間のインキュベーションが完了したら、磁気微粒子モノクローナル抗体 15F11 / NTプロ BNP / 標識モノクローナル抗体 15C4 複合体をペレット中に磁氣的に再度捕捉した。次いで、再捕捉されたペレットを緩衝液 (1 mL) により、繰り返し 4 回繰り返し洗浄した。次いで、磁氣的に捕捉された被覆磁気微粒子、抗ヒト NT-プロ BNP / 抗ヒトプロ BNP 標識モノクローナル抗体 15C4 およびモノクローナル抗体 15F11 / ヒト NT-プロ BNP 複合体ペレットを磁気物から遊離させた。

30

【0095】

次いで、アクリジニウム標識 (Abbott Laboratories, Abbott Park) に発光を誘発させた。このことは、 H_2O_2 (1.32%) を含有する低 pH (pH 1) 緩衝液 (リスト 6E23-65, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) を添加することにより達成した。これを、微粒子複合体を含有する個々の反応器中に (100 μ L) の量で分注し、次いでボルテックスにかけた。この工程は、微粒子により捕捉されたヒト NT-プロ BNP と結合したアクリジニウム標識抗ヒト NT-プロ BNP (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) モノクローナル抗体 15C4 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) を遊離させた。

40

【0096】

次いで、磁気微粒子を磁氣的に捕捉し、遊離させたアクリジニウム標識 NTプロ BNP 抗体 (モノクローナル抗体 15C4) を反応混合物溶液中に残した。この後、溶液中に遊離させたアクリジニウムからの産物である光、相対発光単位 (RLU) を「誘発」する pH 13 緩衝液 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) を添加した (300 μ L)。生成された光の量を使用して試料中で検出されるヒト N

50

T - プロBNPの量を測定した。

【0097】

結果を以下に表1並びに図1A、図1Bおよび図1Cに示す。

【0098】

【表1】

表1

捕捉モノクローナル抗体		15F11	8.1	8.1
標識モノクローナル抗体		15C4	15C4	201.3
試料	pM	平均rlus	平均rlus	平均rlus
BNP	0	1195	745	212
	43.8	1038	567	11033
	86.6	1082	713	29955
	288.7	1127	732	257748
	577.4	1145	701	1029195
プロBNP	0	1135	659	283
	43.8	1302	5478	276
	86.6	1488	12015	262
	288.7	2214	42997	255
	577.4	3591	116479	276
NT-プロBNP	0	1135	659	283
	43.8	22439	643	251
	86.6	62653	606	269
	288.7	316876	637	264
	577.4	657865	687	265

10

20

【0099】

【表2】

表2

キット試薬		分析物検出		
捕捉Mab	標識Mab	ヒトBNP	ヒトプロBNP	ヒトNTプロBNP
15F11	15C4	-	-	+
8.1	15C4	-	+	-
8.1	201.3	+	-	-

30

40

【0100】

結果の考察

2工程サンドイッチ免疫アッセイを使用してヒトNT-プロBNP、ヒトプロBNPおよびヒトBNPを定量した。3種の分析物は、2種の免疫アッセイキットのみを使用して検出した。本明細書において使用される場合、「免疫アッセイキット」により意味されるものは、分析物捕捉試薬（即ち、意図された分析物に特異的なモノクローナル抗体により被覆された磁気微粒子）および検出試薬（即ち、意図された分析物に特異的な、アクリジニウムにより標識されたモノクローナル抗体）から構成されるキットである。2種の典型的な免疫アッセイキットの代表例を以下に表3に示す。

【0101】

50

【表 3】

表3

	キットA	キットB
検出試薬	A	B
捕捉試薬	A	B
検出された分析物	A	B

ある免疫アッセイキット（例えばキットA）からの捕捉試薬および別の免疫アッセイキット（例えばキットB）からの検出試薬を使用することにより、エピトープAおよびBを共有する第3の分析物を検出することができる（AB）。この代表例を以下に表4に示す（図2Aおよび2B参照。）。

10

【0102】

【表4】

表4

キット試薬		検出された分析物		
検出	捕捉			
A	A	A	-	-
A	B	-	AB	-
B	B	-	-	B

20

本発明は、異なる捕捉モノクローナル抗体によりそれぞれ被覆された2種のタイプの磁気粒子のみ、および2種の異なる標識モノクローナル抗体のみを使用して3種の分析物であるヒトBNP、ヒトプロBNPおよびヒトNT-プロBNPを特異的に検出する。

【0103】

ヒトBNPは、ヒトBNP上に見出された2種の別個のBNPエピトープに特異的なモノクローナル抗体を使用して「サンドイッチ」を作出することにより検出した。

30

【0104】

ヒトNT-プロBNPは、ヒトNT-プロBNP上に見出された2種の別個のヒトNT-プロBNPエピトープに特異的なモノクローナル抗体を使用して「サンドイッチ」を作出することにより検出した。

【0105】

ヒトプロBNPは、一方がヒトBNPエピトープに特異的であり、他方がヒトNT-プロBNPエピトープに特異的なモノクローナル抗体である2種のモノクローナル抗体を使用して検出した。ヒトプロBNPは、ヒトBNPおよびヒトNT-プロBNP中に見出されたエピトープを含有する。BNP捕捉モノクローナル抗体はヒトプロBNP標識検出モノクローナル抗体とサンドイッチを形成し、ヒトプロBNPの検出を可能とする。

40

【0106】

1種の分析物の捕捉モノクローナル抗体を第2の分析物の標識検出抗体とともに使用することは、2種のキットのみを使用する3種の分析物（ヒトBNP、ヒトプロBNPおよびヒトNT-プロBNP）の検出の基盤である。

【0107】

当業者に容易に理解されるように、本発明は目的を実施し、記載した結果と利点を得ると共に、それらに内在する結果と利点を得るために好適である。本明細書に記載する分子複合体と方法、手順、処理、分子、特定化合物は好ましい態様の現在の代表例であり、例示であり、本発明の範囲を限定するものではない。当業者に容易に理解されるように、発明

50

の範囲と精神から逸脱せず本発明に種々の置換及び変更を加えることができる。

【0108】

本明細書に引用した全ての特許および刊行物は、本発明が属する分野の当業者の技術水準を示すものである。全ての特許および刊行物は、各個々の刊行物が具体的および個別的に参照により組み込まれることが示されるかのごとく、同じ程度に参照により本明細書に組み込まれる。

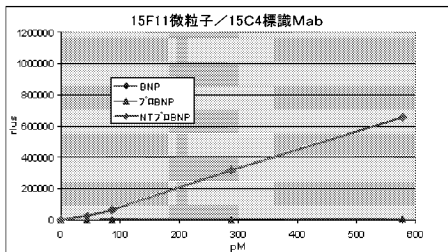
【0109】

本明細書に具体的に記載する発明は本明細書に具体的に開示しない要素、限定の不在で適切に実施することができる。従って、例えば、本明細書の各箇所で「～を含む」、「～から本質的に構成される」及び「～から構成される」なる用語はいずれも相互に置き換えることができる。利用した用語及び表現は説明として使用するものであり、限定ではなく、このような用語及び表現の使用において表示及び記載する特徴又はその部分の等価物を排除する意図はなく、請求する発明の範囲内で種々の変更が可能であるとみなされる。従って、好ましい態様と非必須の特徴により本発明を具体的に開示したが、当然のことながら、当業者は本明細書に開示する概念の変更及び変形も採用することができ、このような変更及び変形も特許請求の範囲に定義するような本発明の範囲に含むものとみなす。

10

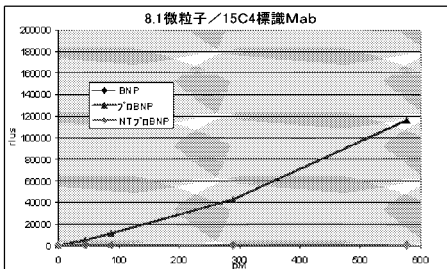
【図1A】

FIGURE 1A



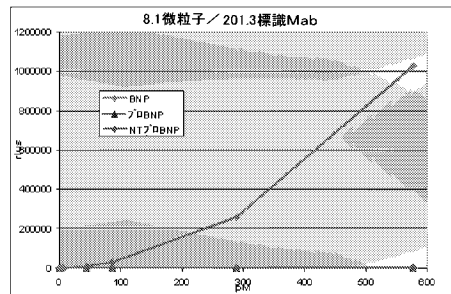
【図1B】

FIGURE 1B



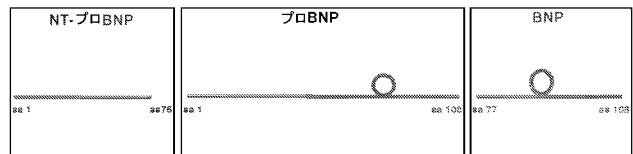
【図1C】

FIGURE 1C



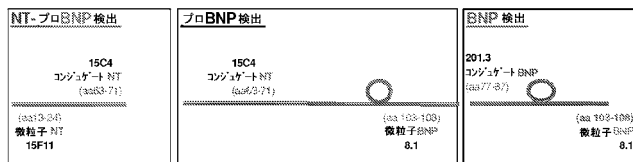
【図2A】

Figure 2A



【図2B】

Figure 2B



【配列表】

2013511720000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2010/056932

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50 G01N33/53 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	"ProBNP and proBNP derived peptides BNP and NT-proBNP", INTERNET CITATION, June 2007 (2007-06), pages 1-12, XP002589188, [retrieved on 2010-06-28] the whole document ----- -/--	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 January 2011	Date of mailing of the international search report 01/02/2011	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Moreno de Vega, C	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/056932

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEFERIAN KARINA R ET AL: "The brain natriuretic peptide (BNP) precursor is the major immunoreactive form of BNP in patients with heart failure.", CLINICAL CHEMISTRY MAY 2007 LNKD-PUBMED:17384012, vol. 53, no. 5, May 2007 (2007-05), pages 866-873, XP002617093, ISSN: 0009-9147 page 868 - page 869	9
Y A	-----	10-18 1-8
X	SEFERIAN K R ET AL: "Immunodetection of glycosylated NT-proBNP circulating in human blood", CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WASHINGTON, DC, vol. 54, no. 5, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 866-873, XP003024966, ISSN: 0009-9147, DOI: DOI:10.1373/CLINCHEM.2007.100040 page 867	9
Y	-----	10-18
X	WO 2009/066010 A1 (HYTEST LTD [F1]; KATRUKHA ALEXEI G [F1]; SEFERIAN KARINA R [RU]; SEMEN) 28 May 2009 (2009-05-28) claims 1-9	9
Y A	-----	10-18 1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/056932

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009066010	A1	NONE	28-05-2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2010/056932

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

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

(72)発明者 ムーア, ジェフ・エイ

アメリカ合衆国、イリノイ・60031、ガーニー、バインヤード・ドライブ・1578

Fターム(参考) 4H045 AA11 CA40 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	人NT pro B型利尿钠肽，人pro B型利尿钠肽和人B型利钠肽的检测		
公开(公告)号	JP2013511720A	公开(公告)日	2013-04-04
申请号	JP2012539984	申请日	2010-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	コンラスジョンジー ムーアジエフエイ		
发明人	コンラス, ジョン・ジー ムーア, ジエフ・エイ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K16/26		
CPC分类号	G01N33/6887 G01N33/74 G01N2333/58		
FI分类号	G01N33/53.B G01N33/543.501.D G01N33/543.541.B C07K16/26.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	12/623405 2009-11-21 US		
其他公开文献	JP5689474B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于检测和/或定量测试样品中人NT pro B型利尿钠肽，人pro B型利尿钠肽和人B型利尿钠肽的量的测定法。