

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	B 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/575		C 0 7 K 14/575	4 B 0 6 4
16/26		16/26	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
15/02		C 1 2 R 1:91	
審査請求 有 予備審査請求 (全 36数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000 - 596377(P2000 - 596377)	(71)出願人	ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムベ-ハー ドイツ連邦共和国 マンハイム デ- 68 298
(86)(22)出願日	平成12年1月27日(2000.1.27)	(72)発明者	カ-ル, ヨハン ドイツ連邦共和国 パイセンベルク デ- - 82380 ベルト - シュラツツルセ-ル - シュトラ-セ 7
(85)翻訳文提出日	平成13年7月27日(2001.7.27)	(72)発明者	リル, ヘルム-ート ドイツ連邦共和国 ヴィ-レンバッハ デ- - 82407 ブルーメンシュトラ-セ 15ア-
(86)国際出願番号	PCT/EP00/00602	(74)代理人	弁理士 細田 芳徳
(87)国際公開番号	W000/045176		最終頁に続く
(87)国際公開日	平成12年8月3日(2000.8.3)		
(31)優先権主張番号	199 03 489.3		
(32)優先日	平成11年1月29日(1999.1.29)		
(33)優先権主張国	ドイツ(DE)		
(31)優先権主張番号	199 11 044.1		
(32)優先日	平成11年3月12日(1999.3.12)		
(33)優先権主張国	ドイツ(DE)		

(54)【発明の名称】 N末端p r o B N Pの同定方法

(57)【要約】

本発明は、N末端p r o B N Pの異なるエピト-プを検出する少なくとも2種の抗体を用いる、試料中におけるN末端p r o B N Pの同定方法に関する。本方法は、健常者の試料及びN Y H AクラスI ~ I Vの患者の試料を識別又は分類するのに使用される。さらに、本発明は、組換えN末端p r o B N P、N末端p r o B N Pの同定方法における標準としての該組換えN末端p r o B N Pの使用、組換えN末端p r o B N Pを検出する抗体、およびそれらの生産に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N末端proBNPの異なるエピトープを検出する少なくとも2種の抗体を用いる、試料中におけるN末端proBNPの同定方法。

【請求項2】 該抗体が、同時にN末端proBNPに結合しうるものである、請求項1記載の方法。

【請求項3】 異種的(heterogenes)に行なわれる、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 サンドウィッチ型式として行なわれる、請求項3記載の方法。

【請求項5】 N末端proBNPの下限検出限界が、1fmol/ml未満である、前記請求項いずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 得られた値により、健常者から得られた試料とNYHA - クラスI ~ IVの心不全患者から得られた試料との識別をなしうる、前記請求項いずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 得られた値により、健常者から得られた試料とNYHA - クラスIの患者から得られた試料との識別をなしうる、請求項6記載の方法。

【請求項8】 健常者から得られた試料とNYHA - クラスI ~ IVの心不全患者から得られた試料との間の識別のための、前記請求項いずれか1項に記載の方法の使用。

【請求項9】 組換えN末端proBNP。

【請求項10】 請求項1 ~ 7記載のN末端proBNPの同定方法における標準としての組換えN末端proBNPの使用。

【請求項11】 N末端proBNPに対する抗体の生産のための組換えN末端proBNPの使用。

【請求項12】 組換えN末端proBNPに対する抗体。

【請求項13】 N末端proBNPのアミノ酸10 - 66において特異的に結合する、請求項12記載の抗体。

【請求項14】 組換えにより生産されたN末端proBNPを用いた適切な生物の免疫により得られうる、請求項12又は13記載の抗体。

【請求項15】 細胞株M10.1.11又はM13.4.14から得られる、請求項12～14記載の抗体。

【請求項16】 細胞株M10.1.11又はM13.4.14から生産された抗体に匹敵し、N末端proBNPを用いて同等の様式で生産されてなる、請求項15記載の抗体。

【請求項17】 1999年1月26日にDSMZに寄託された細胞株M10.1.11又はM13.4.14。

【請求項18】 組換えにより生産されたN末端proBNPを用いて、適切な生物を免疫するステップ、
抗体を単離するステップ、
最も反応性を有するエピトープについてスクリーニングするステップ、
適切なペプチドによる免疫吸着により抗体を精製するステップ
を含む、請求項12～14又は16に記載されたポリクローナル抗体の生産方法。

【請求項19】 組換えにより生産されたN末端proBNPを用いて、適切な生物を免疫するステップ、及び
患者血清の異なるプールにおける天然N末端proBNPとの抗体反応性に関してクローンを選択するステップ
を含む、請求項12～16記載のモノクローナル抗体の生産方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、N末端p r o B N Pの異なるエピトープを検出する少なくとも2種の抗体を用い、試料中におけるN末端p r o B N Pの同定方法に関する。該方法は、健常者試料とN Y H AクラスI ~ I Vの患者試料とを識別または分類するのに使用される。さらに本発明は、組換えN末端p r o B N PおよびそのN末端p r o B N Pの同定方法における標準としての使用、組換えN末端p r o B N Pを検出する抗体およびそれらの生産に関する。

【0002】

心不全は、特に西洋諸国に広く見られる現象である。ロッシュ医学辞典 (Roch e medical dictionary) (1993, Urban & Schwarzenberg) によると、心不全は、心臓が急性または慢性的に、運動中または安静時の代謝に必要とされる血流を生じたり、静脈逆流 (後方心不全および前方心不全) を確実にすることができないことである。したがって心臓のポンプ機能は弱い。心不全の原因は、非常に複雑である。特に、心筋の炎症性変化および変性変化、冠状動脈灌流障害 (coronary perfusion disorder)、冠状動脈の梗塞および損傷がここで挙げられる。これは、末梢の血流の変化、呼吸障害、腎機能不全および電解質代謝不全 (浮腫 (oedeme)) ならびに骨格の筋肉系の能力低下につながる。

【0003】

ニューヨーク心臓協会 (New York Heart Association) (N Y H A) によれば、心不全は、労働(koerperlichen) 後の身体検査を用いて以下のN Y H Aクラスに分類される。I は、通常の肉体労働後に痛みが全くないことを意味し、I I は、肉体的強靱さの制限が低いことを意味し、I I I は、肉体的強靱さの制限が高いことを意味し、I V は、各肉体的活動とともに機能不全症状が増大し、これが多くの場合、安静時にも存在することを意味する。

【0004】

グリコシド、血管拡張薬、A C E インヒビターおよび/ または β 遮断薬による有効な心不全の薬物治療のためには、まず始めに、心不全を正確に診断し、可能であれば、重篤度に応じてそれを分類し、さらに治療の経過を監視することが必

要である。

【0005】

当該技術分野の水準に従って、例えばANP（N末端心房性ナトリウム利尿ペプチドホルモン）およびproANP、CNP（C-ナトリウム利尿ペプチド）、アドレノメジュリン（Adrenomedullin）、神経ペプチドY、エンドセリンおよびBNP（脳ナトリウム利尿ペプチド）などの、心不全の早期診断のためのいくつかの血清マーカーを論じる。ANPおよびproANPは、一般に心不全の診断用マーカーとして好適であるが、それらは、あまり安定でないか、または血中で短い半減期しか有さず、診断測定に対して障害を示す（Clin. Sci. 95(3)(1998), 235-239; Clelandら、Heart 75 (1996), 410-413）。

【0006】

頻繁に言及される重要なマーカーはBNP（脳ナトリウム利尿ペプチド）である。BNPは、最初にブタの脳で同定された。これは、構造的および機能的にANP（心房性ナトリウム利尿ペプチド）に類似する心臓ホルモンである（Sudohら、Nature 332 (1988), 78-81）。32個のアミノ酸からなるヒトBNPは、主に心臓の心室から分泌され、ヒト血漿中で循環する。診断用マーカーとしてのBNPの使用は、例えばEP-A-0 542 255で知られている。BNPは、分子内ジスルフィド結合を有し、おそらく、速やかに分解されなければならないというホルモンとしてのその生理的機能のため、分析物としてあまり安定でない。したがって、その診断用マーカーとしての使用は、ごく限られている（Masutaら、Clin. Chem. Vol. 44 No.6 Supplement A (1998), 130; Tsujiら、Clin. Chem. 40 (1994), 672）。

【0007】

BNPの前駆体分子、すなわちproBNPは、108個のアミノ酸からなり、そのうちBNPと称する前記32個のC末端アミノ酸（77-108）が実際のホルモン性効果を発揮する。該前駆体から放出されるN末端アミノ酸1-76をN末端proBNPと称する。BNP（77-108）に加えて、N末端proBNP（1-76）もまた血漿中で循環し、さらに産物を分解するため（Huntら、Biochem. Biophys. Res. Com. 214 (1995), 1175-1183）、N末端proB

NPもまた心不全のマーカーとして関連性がある。前駆体分子proBNPもまた血漿中に存在するか否かは、完全に解明されていない。しかしながら、血漿中のproBNP(1-108)の少量の放出が検出可能であるが、N末端で非常に早く部分分解するために、いくつかのアミノ酸が存在しないことが記載されている(Huntら、Peptides, Vol. 18, No. 10 (1997), 1475-1481)。この分子を、本明細書において高分子量BNPと称する。

【0008】

国際公開第93/24531パンフレット(米国特許第5,786,163号明細書)には、N末端proBNPを同定する免疫学的方法およびそれに使用される抗体が記載されている。これらの抗体を得るため、N末端proBNPの配列に由来する、合成により作製した一本鎖ペプチドがここで使用されている。ペプチド免疫感作による抗体の生産は、原理的には可能であるが、分子全体の親和性が低すぎるため試験手順において必要な感度に達しない。また、ペプチドを用いた場合、得られる抗体は、例えば該ペプチドのC末端を同定し得、したがって分子全体のこの断片にのみ結合するという危険がある。この結果から、これらの抗体は、分子全体に結合することができないか、または低い程度までしか結合できない。国際公開第93/24531パンフレットでは、N末端proBNPに由来する単一の一本鎖ペプチドに対するポリクローナル抗体が産生される。産生された抗体は、競合試験形式において免疫感作ペプチド(アミノ酸47-64)に結合することが示されている。しかしながら、該抗体が、試料中において分子全体として天然のN末端proBNPに結合しうるとは示されていない。また、試料中において、国際公開第93/24531パンフレットに記載されたサンドイッチ試験は、適切な標準物質がなく、2種の異なるエピトープに対する抗体もないため、記載のようには行い得ない。

【0009】

当該技術分野の水準におけるさらなる問題は、試験の感度である。ウサギ血清由来のポリクローナル抗体への結合について、トレーサーとしての標識された形態のペプチド47-64が試料または非標識標準ペプチド47-64と競合する、国際公開第93/24531パンフレットにおいて行われた競合試験では、イ

ンキュベーションの48時間後でごく普通の競合しか達成されず、これからは、約250 fmol/mlの低い検出限界しか誘導されえない。これは、健康な個体と心不全を患う患者とを識別するのに不十分であり、患者試料を心不全の重篤度で識別分類するのにも不十分である。また、長時間のインキュベーションの競合試験は、自動化された研究所での試料の日常的な測定には許容されえない。

【0010】

Huntら (Clinical Endocrinology 47 (1997), 287-296) にはまた、N末端proBNPの検出のための競合試験が記載されている。このためには、測定の前に血漿試料の複雑な抽出が必要であり、これは分析物の破壊および測定誤差につながりうる。使用された抗血清は、国際公開第93/24531パンフレットと同様にして、合成ペプチドでの免疫感作により産生される。Huntらは、N末端proBNPアミノ酸1-13による免疫感作により抗血清を産生させ、アミノ酸1-21からなるペプチドを標準として使用する。この試験でも、長時間のインキュベーションが必要である。24時間のインキュベーション後、1.3 fmol/mlの下限検出限界が達成される。

【0011】

したがって、当該技術分野の水準では、短時間のインキュベーションで、信頼性のある感度の高い天然N末端proBNPの検出を可能にするN末端proBNPの検出方法がない。

【0012】

したがって、当該技術分野の現状における上記欠点を可能な限り回避しつつ、試料中のN末端proBNPを同定する方法を提供することが目的であった。特に、健常者の患者試料とNYHAクラスI～IVの患者の試料とを識別(Differenzierung)するために、高い試験感度を達成すべきである。

【0013】

この目的は、特許請求の範囲により詳細に説明された試料中のN末端proBNPの同定方法を用いて達成されるこの方法は、N末端proBNPの異なるエピトープを検出する少なくとも2種の抗体を使用することを特徴とする。

【0014】

本発明の方法において重要なことは、天然N末端proBNPが試料中で検出されることである。これは、抗体が、試料中において、インタクトな分子とおそらく存在する未切断のproBNP(1-108)、および可能であれば部分的にタンパク質分解により消化された断片をも同定し、特異的に結合することができなければならないことを意味する。本方法では、N末端proBNPの異なるエピトープに結合する少なくとも2種の異なる抗体が使用される。エピトープは、直鎖状または所謂コンホメーションエピトープであってもよい。好ましくは、エピトープは、両方の抗体を同時に且つ互いに離れ過ぎないように結合させるように配置されている。

【0015】

本発明の方法は、N末端proBNP、proBNPおよび親ペプチド(分解生成物)間の識別しないので、以下、NT-proBNPは、試験手順で同定された全てのペプチド、特に公知のN末端proBNP(1-76)を意味する。

【0016】

本発明によれば、「エピトープ」という用語は、抗体が特異的に結合する抗原等の免疫学的な結合パートナー上の結合部位を意味する。通常、エピトープは、6-8アミノ酸によって明確に定義される。本発明によれば、結合パートナーとは、N末端proBNPまたはその部分配列に相当する。抗体が結合するエピトープは、結合パートナーの部分領域を構成する。エピトープは、直鎖型またはコンホメーションエピトープとして存在しうる。

【0017】

異なる特異性を有する2種の抗体を用いて、当該技術分野の現状の長い競合試験手順の代わりに、より迅速に分析対象物(analyten)を同定する方法を実行することが可能である。本発明の検出方法は、同質(homogener)もしくは異質(heterogener)試験手順を用いて実施することができる。好ましくは、同質試験手順が用いられ、特に好ましくは当業者に公知であるサンドイッチ手法が用いられる。

【0018】

好ましくは、このようなN末端proBNPの測定方法は、以下のステップに沿って行われる：

- a) 固相に結合するのに適した基を有する第1のN末端p r o B N P特異的抗体と試料とを混合するステップ、または、固相に既に結合させている第1のN末端p r o B N P特異的抗体と試料とを混合するステップ、
- b) この溶液を、該第1の抗体(erste Antikoeper)のものとは異なるN T - p r o B N Pのエピトープを同定し標識を有する第2の抗体(zweiten Antikoeper)と混合するステップ、
- c) ステップa) で既に存在し得る、固相に、免疫複合体を結合させるステップ、
- d) 該液相から該固相を分離するステップ、
- e) 片方または両方の相において標識を検出するステップ。

【0019】

定量測定において、規定量のN末端p r o B N Pを標準物として用いて同じ測定法を実行し、試料の測定の後、ステップf)、すなわち標準物の測定値と試料の測定値との比較が行われ、ついで定量化が行われる。

【0020】

本発明によれば、「抗体」という用語は、遺伝子操作による修飾によって得られるモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体等、ならびに当業者に公知である $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ または $F a b$ フラグメントなどの全てのフラグメントを意味する。N末端p r o B N Pへの免疫特異的結合能だけは保証されなければならない。

【0021】

N末端p r o B N Pに特異的な第1の抗体は、固相に直接結合されうるか、または特異的結合系を介して間接的に結合されうる。固相へのこの抗体の直接的な結合は、当業者に公知の方法、例えば、吸着法に従って行う。結合が特異的結合系を介する間接的なものである場合、第1の抗体は、N末端p r o B N Pに対する抗体と特異的結合系の反応パートナーとからなるコンジュゲートである。本明細書において、特異的結合系とは、互いに特異的に反応し合うことができる2種のパートナー(相手)を意味する。この結合能は、免疫学的反応または異なる特異的反応に基づきうる。好ましくは、ビオチンとアビジンとの組合せまたはビオ

チンとストレプトアビジンとの組合せが特異的結合系として用いられる。さらに好適な組合せは、ビオチンと抗ビオチン；ハプテンと抗ハプテン；抗体のFcフラグメントとこのFcフラグメントに対する抗体；または炭水化物とレクチンである。それにまた、特異的結合系の反応パートナーの一方は、そのコンジュゲートの一部である。

【0022】

特異的結合系における第1の結合パートナーの他方の反応パートナーは、該固相の層である。好ましくはストレプトアビジンまたはアビジンが使用される。不溶性担体物質への特異的結合系の他方の反応パートナーの結合は、当業者に公知の通常の方法に従って実行することができる。ここでは、共有結合および吸着(adsorptive)結合が好適である。

【0023】

固相としては、その内側表面が特異的結合系の反応パートナーでコーティングされた試験管であって、ポリスチレンまたは同様のプラスチックでできた試験管またはマイクロタイタープレートが適している。さらに、適切且つ特に好適な物質は、ラテックス粒子、磁性粒子、分子篩物質、ガラス小体、およびプラスチックチューブ等の粒子状物質等である。例えば、紙やニトロセルロースなどの多孔性の層状担体も、担体として使用することができる。特に好ましくは、上記特異的結合系の対応する結合パートナーでコーティングされた磁性ビーズが使用される。試験反応が完了した後、これらの微粒子を液相から分離して、例えば、濾過、遠心分離、または磁性粒子の場合は磁石により、検出反応過程にかけることができる。

【0024】

第2の特異的抗体は、第1の抗体のものとは異なるN末端proBNPのエピトープを同定する。その分子上の2種のエピトープの距離は、無条件に、これらの抗体がN末端proBNPに同時に結合できる程の大きさでなければならない。そうでなければ、サンドイッチ複合体は構築されることができない。

【0025】

N末端proBNPに対する抗体とN末端proBNPとの間の特異的結合反

応の検出は、様々な方法で行うことができる。一般に、第2の抗体は標識される。一般的な標識は、色素団、蛍光団、化学発光もしくは電気化学発光に適した物質、放射性同位元素、ハプテン、酵素マーカー、または特異的結合カップル（例えばビオチン/ストレプトアビジン）を構築しうる物質である。ついで、標識から発せられるシグナルによって免疫複合体を検出する。第2の抗体は、例えば、ハプテンジゴキシゲニンで標識されうる。このハプテンは、さらなるジゴキシゲニン特異的抗体によって再び結合される。ジゴキシゲニンに特異的なこの抗体自体は、ペルオキシダーゼ等の酵素によって標識される。次に、特定の物質がこのペルオキシダーゼに加えられたときに生じる色の变化または吸光度によって最終的な検出が行われる。

【0026】

当業者に公知の全ての生物学的液体は、N末端p r o B N Pの同定方法の手順において、試料として使用することができる。好適な試料は、全血、血清、血漿、尿または唾液などの体液である。血清および血漿の使用が特に好ましい。

【0027】

液相中の試験試薬を使用する所謂湿式試験のほかに、抗原、ハプテン、ペプチド、タンパク質、抗体等の検出に適した全ての通常の乾式試験形式を用いることもできる。例えば、E P - A - 0 1 8 6 7 9 9号に記載された、これらの乾式試験または試験片は、1つの担体上に、分析対象の試料以外の全ての試験成分を組み合わせる。検出反応は、試験片を液体試料に接触した場合に開始する。

【0028】

本発明の方法は、N末端p r o B N Pについての下限検出限界が、 $1 \text{ fmol} / \text{ml}$ ($1 \text{ pmol} / \text{l}$ に相当する)未満であることを特徴とする。本発明による $1 \text{ fmol} / \text{ml}$ 未満の高い感度は、長時間インキュベートを行うことなく達成される。マイクロタイター試験の総時間は、2時間未満、好ましくは電気化学発光等のより感度の高い検出方法では約15分間である。検出される濃度の上限は、本検出方法の場合は実際には特に存在しない。技術的な上限は、一般には、使用する測定法によって決まる。この方法は主に、非常に高い濃度のN末端p r o B N Pも検出する。

【0029】

本発明の方法のさらなる利点は、得られた測定値による、心不全に罹った患者または患っていない患者の試料の良好な識別である。本検出方法は、非常に感度が高いため、冠状動脈疾患を患っていない個体と、NYHAクラスIおよびIIの心疾患を軽度にも患うまたはゆっくりと発症している患者との識別も可能である。初期の心不全のこのような早期確立は、薬物による早期治療を始めることの決定に影響を及ぼし得、したがって、患者の生存率を長めることができることは明白である。

【0030】

本発明の他の主題は、組換え法により生産されたN末端proBNPである。N末端proBNPは、1-76アミノ酸からなるN末端部分であり、108アミノ酸からなる前駆体分子であるproBNPから放出される。

【0031】

また、N末端proBNPは、この分子の分解反応によって血液中で生じるその一部も含む。

【0032】

これまでのところ、当該技術分野では組換えN末端proBNPは知られていなかった。なぜなら、その生産は、アミノ酸配列が短いため、容易に可能とはならないからである。30個を超えるアミノ酸からなるペプチドの化学合成は、生じるエラー配列および1回の合成サイクルあたりの収量が非常に少ないことにより、宿主生物の組換え生産に匹敵する方法ではない。

【0033】

しかしながら、診断検出方法では、標準物質または対照物質は、一方では分析物の定量測定を行うために、他方ではその試験の機能的能力をチェックするために、常に必要である。定量化が望ましい場合、標準物のシリーズを用いて規定の定量較正を行わなければならない。しかし、このような較正は、標準物として使用する物質がその免疫学的試験において分析物と同じまたは同様の動きを示す場合にのみ有用である。検出抗体への標準物の結合が、試料中の天然分子のそれに似ているように、その標準物が分析物に構造的、特に免疫学的に十分に類似して

いることが重要である。

【0034】

N末端proBNPの検出方法のためのこのような標準物質は、当該技術分野の現状によっては提供されていない。短い合成ペプチドのみが記載されている。本発明によれば、遺伝的合成法によってN末端proBNPをコードするDNA配列を生産すること、および大腸菌中でN末端proBNPの組換え発現を行うことが、今回始めて可能となった。実施例1は、続く1つ1つのステップを説明する。

【0035】

したがって、本発明のさらなる主題は、N末端proBNPの異なるエピトープを認識する少なくとも2種の抗体を用いる、試料中のN末端proBNPの同定方法における標準物としての、組換えN末端proBNPの使用である。

【0036】

免疫化の理由で、N-末端proBNPから合成した短いペプチドのみが当該技術分野において使用されていた。ペプチド免疫化の欠点は、大抵の場合は非常に親和性の低い抗体のみが得られるか、または得られる抗体が試料中で直鎖状エピトープとのみ反応し、天然の折畳み状抗原(nativ gefaltete Antigen)には結合することができないことである(実施例3を参照されたい)。

【0037】

したがって、抗体の産生のためには、検出対象の分析物との十分な類似性を有する免疫原を使用することが重要である。こうすることによってのみ、試料中の天然分析物に抗体が高い親和性で結合するよう保証することができる。

【0038】

したがって、本発明の主題は、N末端proBNPに対する抗体を産生するための免疫原としての組換えN末端proBNPの使用も含む。

【0039】

本発明のさらなる主題は、組換えN末端proBNPに対する抗体である。抗体という用語の定義は、試験手順に関するパラグラフに記載した定義と一致する。好ましくは、本発明の抗体は、76アミノ酸長のN末端proBNPのN末端

部分（好ましくは10-66アミノ酸領域、特に好ましくは10-50もしくは10-38アミノ酸領域）の中のエピトープを特異的に同定する。前記抗体によって同定されるエピトープの有用な配置は、試料中でタンパク質分解によりその末端が予め消化されたN末端proBNPでもこれらのエピトープを含むときに、達成される。このように、試料中の分析物の安定性は、多かれ少なかれ、2番目に重要である。N末端proBNPの該好適な領域の中のエピトープは、直鎖状で存在するか、またはコンホメーションエピトープとして存在し得る。

【0040】

したがって、本発明の好適な主題は、1999年1月26日にDSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig Deutschland) に寄託され、受理された、細胞株MAB M10.1.1およびMAB M13.4.14によって生産されるモノクローナル抗体である。これらの2つの細胞株によって生産された抗体は、IgG - タイプの抗体である。細胞株M10.1.1およびM13.4.14も、本発明の主題である。

【0041】

本発明のさらなる主題は、同等の様式で生産され、N末端proBNPへの特異的結合に適した細胞株M10.1.1およびM13.4.14の抗体と同様の抗体である。「同等の様式で生産された抗体」という表現は、それらの抗体が組換えN末端proBNPを用いた免疫化によって得られることを意味する。

【0042】

また、本発明の主題は、N末端proBNPに特異的に結合する抗体の生産方法も含む。

【0043】

ポリクローナル抗体の産生は、好ましくは以下のステップに従って行われる：適切な生物の免疫化、例えば、組換えにより産生されたN末端proBNPを用いたヒツジの免疫化；抗体の単離；最も反応性の高いエピトープのスクリーニング；および適切なペプチドでの免疫吸着による抗体の精製。このような方法は、実施例2に記載されている。

【0044】

モノクローナル抗体の産生は、好ましくは以下のステップに従って行われる：適切な生物の免疫化、例えば、組換えにより産生されたN末端proBNPを用いたマウスの免疫化；および患者の血清の種々のプールの中の天然N末端proBNPとの該抗体の反応性に関してクローンを選択すること。このような方法は、実施例3に記載されている。

【0045】

以下の実施例において、本発明をさらに詳しく記載する。

【0046】

実施例1

組換えN末端proBNP(1-76)の産生方法

1. 組換えN末端proBNPのクローニング

N末端proBNPのヌクレオチド配列(アミノ酸配列1-76)を、遺伝的合成手段によって産生した。大腸菌中で該遺伝子の最適な発現を得るために、そのDNA配列を大腸菌中で最も良く使用されるコドンに合わせた。該遺伝子の産生に使用されるオリゴヌクレオチドの配列は以下の通りである。

【0047】

Pro5' (配列番号 1).

5'CCGGATCCCACCCGCTG3'

Pro1hum (配列番号 2):

5'CGGGATCCCACCCGCTGGGTTCCCCGGGTTCCGCTTCCGACCTGGAAACCT
CCGGTCTGCAGGAACAGCGTAACCACCT3'

Pro2hum (配列番号 3):

5'CGGTTCCAGGGAGGTCTGTTCAACCTGCAGTTCGGACAGTTTACCCTGCAG
GTGGTTACGCTGTTCTGC3'

Pro3hum (配列番号 4):

5'CAGACCTCCCTGGAACCGCTGCAGGAATCCCCGCGTCCGACCGGTGTTTGG
AAATCCCGTGAAGTTGCTAC 3'

Pro4hum (配列番号 5):

5'CCCAAGCTTAACGCGGAGCACGCAGGGTGTACAGAACCATTTTACGGTGA
CCACGGATACCTTCGGTAGCAACTTCACGGGATTTCC3'

Pro3' (配列番号 6):

5'CCCAAGCTTAACGCGGAGC3'

【 0 0 4 8 】

遺伝子の産生は、これらのプライマーを用いたPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）で行う。増幅した遺伝子を、例えばベクターpUC19等の適当なベクター中でクローニングしてから配列決定する。発現ベクターpQE8中で該遺伝子をクローニングするために、該遺伝子を、制限酵素切断部位Bam HiおよびHind IIIでベクターpUC19から切り出し、N末端がヒスチジンでタグ付けされたタンパク質を発現させるベクターpQE8の中で連結させ、大腸菌M15 [pREP4] 中に形質転換させる。

【 0 0 4 9 】

2. 大腸菌中でのN末端proBNPの発現

大腸菌中で該遺伝子を発現させるため、組換え大腸菌クローンの一晩培養物を

ルリア液 (100 μ g/ml アンピシリンおよび50 μ g/ml カナマイシン) 中で1/60にトランスフェクトし、IPTG (イソプロピルチオガラクトシド; 最終濃度1 mM) と共にOD550 of 1にて誘導した。誘導後、この培養物を37℃にて4時間さらにインキュベートした。次に培養物を遠心分離にかけ、細胞ペレットを50 mM Na-ホスフェート緩衝液 (pH 8.0; 300 mM NaCl) 中に集めた。超音波で細胞懸濁液を分解した後、この懸濁液を遠心分離にかけ、上清をNi-NTA (ニトリロ3酢酸) カラムに加えた。50 mM Naホスフェート緩衝液 (pH 8.0; 300 mM NaCl; 20 mM イミダゾール) を用いた洗浄ステップの後、ヒスチジンでタグ付けされたN末端proBNPを50 mM Na-ホスフェート緩衝液 (pH 8.0; 300 mM NaCl; 300 mM イミダゾール) で溶出した。溶出した画分を集め、50 mM Tris pH 8.0に対して透析した。不純物を分離するために、透析物をQ-セファロースカラムに加えた。精製したN末端proBNPの塊を、MALDI-TOFによって測定した。

【0050】

実施例2

N-末端proBNPに対するポリクローナル抗体の生産

1. 免疫化

ヒツジを完全フロイントアジュバント中の組換えN-末端proBNP (1-76) で免疫した。用量は動物当たり0.1 mgとした。免疫化は10カ月の期間で4週ごとに繰り返した。最初の免疫化から6週目以降、1カ月に1回、血清試料を採取し、それらの感度と力価を試験した。

【0051】

2. ヒツジ血清からのポリクローナル抗体の精製

組換えN-末端proBNPで免疫したヒツジの生血清から開始し、脂質成分をアエロシル (Aerosil) (1.5%) で脱脂して除去した。その後、免疫グロブリンを硫酸アンモニウム (2 M) で分離した。溶解した沈澱を15 mM KPO₄、50 mM NaCl pH 7.0に対し透析し、DEAEセファロースを介してクロマトグラフィーを行った。IgG画分、PAB<rec>.NT-pro

- BNP > S - IgG (DE) は溶出液に存在した。

【0052】

3. NT - pro - BNP特異的ポリクローナル抗体の生産のための連続アフィニティークロマトグラフィー

アミノ酸1 - 21、PAB < rec . NT - pro - BNP > M - IgG (IS、1 - 21) に対するNT - pro BNP 特異的ポリクローナル抗体の精製のために、C - 末端ビオチニル化ペプチドHPLGSPGSASDLETSGEQR-Bi (1 - 21 - Bi、配列番号：7) を用いた。1 mg のペプチド (1 - 21 - Bi) と共に10 ml のストレプトアビジンでコートしたメタクリレートポリマー粒子 (Boehringer Mannheim, Ref. 1529188) をロードしてアフィニティマトリックスを作製した。

【0053】

10 ml のアフィニティマトリックスをカラムに充填し、50 mM KPO₄、150 mM NaCl pH 7.5 (PBS) で平衡化した。連続アフィニティークロマトグラフィーの第1ステップのために、850 mg のPAB < NT - pro - BNP > S - IgG (DE) をカラムに結合させた。溶出液を第2ステップのために保存した (以下参照)。カラムを、PBSおよび20 mM KPO₄、500 mM NaCl、0.1% Triton X-100、0.5% デオキシコール酸Na pH 7.5 で洗浄した。アフィニティマトリックスに特異的に結合したIgGをImmunoPure (登録商標) Gentle Ag / Abエリューションバッファー (Pierce、製品N° 21013) で溶出した。アフィニティマトリックスを1 Mプロピオン酸で再生し、PBS / NaN₃ 中で保存した。

【0054】

上記と同様にして、ペプチドBi-ELQVEQTSL (Bi - 30 - 38 配列番号：8) をアミノ酸30 - 38に対するNT - pro - BNP - 特異的免疫グロブリンの精製のためのアフィニティマトリックスの作製に用いた。PAB < rec . NT - pro - BNP > M - IgG (IS、30 - 38) を第1アフィニティ精製の溶出液から集めた。

【0055】

4. PAB<NT-pro-BNP>S-IgG (IS、1-21) のビオチニル化

アフィニティー精製した抗体をビオチニル化緩衝液 (100mM KPO_4 、70mM NaCl pH8.0) に対して透析し、その後、溶液を1mg/mlのタンパク質濃度に調整する。D-ビオチノイル-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルをDMSOに溶解し、1:7.5のモル関係で抗体溶液に添加する。反応をL-リジンを添加して停止し、過剰の標識試薬を透析により除去する。

【0056】

5. PAB<NT-pro-BNP>S-IgG (IS、30-38) のジゴキシゲニル化

アフィニティー精製抗体をジゴキシゲニル化緩衝液 (100mM KPO_4 、70mM NaCl pH7.6) に対し透析し、次いで溶液を1mg/mlのタンパク質濃度に調整する。ジゴキシゲニン-3-CME-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルをDMSOに溶解し、1:5のモル関係で抗体溶液に添加する。反応をL-リジンを添加して停止し、過剰の標識試薬を透析により除去する。

【0057】

実施例3

N-末端proBNP (1-76) に対するモノクローナル抗体の生産とスクリーニング

1. NT-proBNP (1-76) に対するモノクローナル抗体の取得

8~12週齢のBalb/cマウスを完全フロイントアジュバントと共に100 μg の組換えN-末端proBNP抗原を用いて腹腔内免疫に供する。6週間後、3回のさらなる免疫化を4週ごとに実施する。最終の免疫化から1週間後、血液を採取し、抗体価を試験動物の血清において測定した。陽性反応を示したマウスの脾臓からBリンパ球を得、永久骨髓腫細胞株との融合に供する。融合はケーラー (Koehler) とミルシュタイン (Milstein) (Nature 256, 1975, p.495-

497)の周知の方法に従って行う。ここで構築されたハイブリッド細胞の一次培養物を慣用の方法、たとえば、市販のセルソーターを用いて、または「限界希釈法」によりクローニングする。適切な試験法においては、組換えN - 末端p r o B N Pと陽性反応を示し、患者血清で天然のN - 末端p r o B N Pを同定するクローン培養物のみを処理する(ポイント2参照)。このようにして、本発明のモノクローナル抗体を産生するいくつかのハイブリドーマ細胞株を集める。

【0058】

腹水の調製のために、 5×10^6 個のハイブリドーマ細胞を、予め0.5 mlのプリスタン(Pristan)で1~2回処理したB a l b / cマウスにおいて腹腔内に注射する。2~3週間後、腹水液をマウスの腹部領域から得ることができる。これから、慣用の方法で抗体を単離することができる。これらのモノクローナル抗体はヒトN - 末端p r o B N Pに対し特異的である。以下において、それらを、M A B M 10.1.11またはM A B M 13.4.14と呼ぶ。両モノクローナル抗体はサブクラスI g G 1、カッパに属する。

【0059】

この方法により、上記のようにD S M Zに寄託されたハイブリドーマ細胞株クローンM 10.1.11およびM 13.4.14の両方を単離することができた。

【0060】

2. p r o B N Pペプチドおよび組換えNT - p r o B N Pに対する抗体のスクリーニング試験

免疫化マウスの血清中におけるNT - p r o B N Pに対する抗体の存在および特異性を同定するため、ハイブリッド細胞の培養液上清または腹水液において、以下の試験方針に従ってクローンを評価した：

【0061】

a) 組換えN - 末端p r o B N Pとの反応性

攪拌下、室温で1時間、 $100 \mu\text{l}$ / ウェルのロード用緩衝液(Boehringer、0.2 M 炭酸ナトリウム / 重炭酸ナトリウム、pH 9.3~9.5、C a t . No. 726 559)中で抗原として $2.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の組換えNT - p r o

BNPをマイクロタイタープレート（Nunc, Maxisorb）に結合する。ポストローディング（Nachbeladung）をPBS緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水、Oxid、Code-BR 14a）および1% B y c o C中で30分間実施する。次いで、洗浄を洗浄用緩衝液（0.9塩化ナトリウム溶液、0.05% Tween 20）で行う。抗体試料のインキュベーションを攪拌下、室温で1時間、100μl/ウェルで実施する。次いで、洗浄用溶液を用いるさらなる洗浄ステップを2回行う。その後、攪拌下、室温で1時間、100mU/ml、100μl/ウェルの検出用抗体PAB<M-Fcy>S-Fab-ペルオキシダーゼコンジュゲート（Boehringer Mannheim、cat. No. 1500 686）との、さらなるインキュベーションを実施する。洗浄用緩衝液を用いるさらなる洗浄ステップの後、ペルオキシダーゼ活性を慣用の方法で顕現させる（たとえば、ABTS（登録商標）と共に室温で30分間、吸光度差をELISAリーダーにより405nmでmU単位で読む。

【0062】

b) N-末端proBNPペプチドとの反応性：

この場合、攪拌下、室温で1時間、0.5% B y c o Cを含むPBS緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水、Oxid、Code-BR 14a）100μl/ウェル中で抗原として250ng/mlの、配列1-10、8-18、1-21、16-30、30-38、39-50、50-63または64-76のNT-proBNP-ペプチド ビオチンコンジュゲートをストレプトアビジンをロードしたマイクロタイタープレートに結合する。次いで、洗浄を洗浄用緩衝液（0.9塩化ナトリウム溶液、0.05% Tween 20）を用いて行う。抗体試料のインキュベーションと検出反応をa)に記載のようにして実施する。特定のNT-proBNPペプチドとの反応性により、エピトープの位置を決定できる。

【0063】

c) 患者試料中の天然のN-末端proBNPとの反応性

攪拌下、室温で1時間、100μl/ウェルのロード用緩衝液（Boehringer、0.2M 炭酸ナトリウム/重炭酸ナトリウム、pH9.3~9.5、Cat. No. 728 559）中で5μg/mlのPAB<ヒトproBNP>S-I

g G (I S、 (1 - 2 1) または (3 0 - 3 8) S - I g G をマイクロタイタープレート (Nunc, Maxisorb) に結合させる。ポストローディングを P B S 緩衝液 (リン酸緩衝生理食塩水、Oxid、Code-BR 14a) および 1 % B y c o C 中で 3 0 分間実施する。次いで、洗浄を洗浄用緩衝液 (0 . 9 塩化ナトリウム溶液、0 . 0 5 % T w e e n 2 0) で行う。P B S 緩衝液で希釈した患者血漿中の天然の抗原とのインキュベーションを、攪拌下、室温で 1 時間、1 0 0 μ l / ウェルで実施する。さらなる洗浄ステップの後、抗体試料のインキュベーションを、攪拌下、室温で 1 時間、1 0 0 μ l / ウェルで実施する。次いで、洗浄用液を用いて 2 回洗浄を行い、攪拌下、室温で 1 時間、1 0 0 m U / m l、1 0 0 μ l / ウェルの検出用抗体 P A B < M - F c y > S - F a b - ペルオキシダーゼコンジュゲート (Boehringer Mannheim GmbH、cat. No. 1 5 0 0 6 8 6) との、さらなるインキュベーションを実施する。洗浄用緩衝液を用いるさらなる洗浄ステップの後、ペルオキシダーゼ活性を慣用の方法で顕現させる (たとえば、A B T S (登録商標) と共に室温で 3 0 分間、吸光度差を E L I S A リーダーにより 4 0 5 n m で m U 単位で読む)。

【0064】

3. 結果：N - 末端 p r o B N P に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の反応パターン

a) N - 末端 p r o B N P ペプチドによる免疫化由来の M A B (c = 5 μ g / m l) の反応性：

【0065】

【表1】

表1：

MAK	免疫原	pro-BNPペプチドとの反応性								Rec. pro-BNP	天然 pro-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

【0066】

異なるペプチドによる免疫化で得られたモノクローナル抗体は対応するペプチドと非常に強力に反応する。組換えN - 末端proBNPとの反応性は2種のモノクローナル抗体でのみ認めることができるが、患者プールの天然のN - 末端proBNPとの反応は生じない(表1参照)。

【0067】

b) 組換えN - 末端proBNPによる免疫化由来のモノクローナル抗体(MAB)の反応性:

【0068】

【表2】

表2:

MAK	pro-BNPペプチドとの反応性								Rec. pro-BNP	天然 pro-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

【0069】

組換えN - 末端proBNPによる免疫化で得られたモノクローナル抗体はペプチドと部分的にのみ反応するが、組換えN - 末端proBNPまたは患者プールの天然のN - 末端proBNPと非常に強力に反応する。ペプチドと単一のモノクローナル抗体との無反応はいわゆるコンホメーションエピトープの同定を示す(表2参照)。

【0070】

c) 組換えN - 末端proBNPによる免疫化由来のPABの反応性:

【0071】

【表3】

表3:

PAK	免疫吸着	pro-BNPペプチドとの反応性								Rec. pro-BNP	天然 pro-BNP
		1-10	8-18	1-21	16-30	30-38	39-50	50-63	64-76		
S-9212	なし	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

【0072】

得られたPABはペプチド1-21および30-38と最も強力な反応を示した。この理由のため、これらのエピトープを選択し、PABをこれらのペプチドの補助により積極的に免疫吸着させた。ペプチド1-21で免疫吸着させたPABは領域8-20と最も強い反応を示し、N-末端配列1-10との反応は明白な低下を示す。このようにして免疫吸着させたPABは組換えN-末端proBNPと非常に強く反応し、PAB/PABサンドイッチ型で天然の試料と反応する(表3参照)。

【0073】

実施例4

NT-proBNPの測定のための高感度イムノアッセイ

実施例2と3で生産した抗体を用い、高感度イムノアッセイを構築しうる。一般に、全ての試験形式では異なるエピトープ認識を有する2種の抗体を適用するのが好適である。例として、いわゆるサンドイッチELISAを記載する。

【0074】

固相として、ストレプトアビジンでコートしたマイクロタイタープレート(MTP)を用いた。10 μ lの未処理試料またはキャリブレーターを、両エピトープ特異的抗体を含む100 μ lの緩衝液と共にMTPカップにピペティングし、次いで、室温で1時間インキュベートする。抗体として、1 μ g/mlのビオチニル化PAB<rec. NT-proBNP>S-IgG(IS、1-21)および0.5 μ g/mlのジゴキシゲニル化PAB<rec. NT-proBNP>S-IgG(IS、30-38)を用いた。その後、溶液を吸引除去し、3

50 μ l の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。次いで、100 μ l のコンジュゲート溶液をピペットで添加し、室温で1時間再度インキュベートする。コンジュゲートとして、100 mIU/ml の濃度で抗ジゴキシン抗体 - POD コンジュゲートを用いる。次いで、コンジュゲート溶液を吸引除去し、350 μ l の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。最後に、ABTS（登録商標）基質溶液をウェルにピペティングし、室温で30分間測定する。基質反応を30分間行った後、マイクロタイタープレートで波長405 nmでMTPLリーダーにおいて直接測定し、参照に対し波長495 nmで測定する。

【0075】

感度を測定するため、キャリブレーションカーブを作成し、0標準（n=21）の精度を測定した。キャリブレーターとして、ヒトEDTA血漿を用い、それは、次いで必要な濃度で組換えN-末端proBNPを用いて強化（aufgestockt）した。ウシ血漿を0標準として用いた。結果を表4に示す。

【0076】

【表4】

表4:

	吸光度（平均）	標準偏差 (n=21)
キャリブレーター a:0 fmol/ml	131 mU	5.7mU
キャリブレーター b:5.04 fmol/ml	268 mU	
キャリブレーター c:19.9 fmol/ml	746 mU	
キャリブレーター d:50.5 fmol/ml	1500mU	
キャリブレーター e:100.9fmol/ml	2401mU	

【0077】

22.5 mU $\times$ ml / fmol のキャリブレーションカーブの勾配および5.7 mUのSDに基づき、以下のような下限検出限界がカイザー式に従って与えられる:

$$LDL = 3SD \text{ 0標準} / Cc \text{ 勾配} = 3 \times 5.7 / 22.5 = 0.76 \text{ fmol/ml}.$$

【0078】

実施例5

N - 末端 p r o B N P の試料安定性の測定

実施例 4 に記載のサンドイッチ E L I S A を用い、N - 末端 p r o B N P の解析物安定性を測定した。このために、N Y H A - クラス I I - I I I の 4 人の患者から血液を E D T A 含有コレクター試験管に採取し、3 日間、室温で保存した。日毎に試料を採取し、N - 末端 p r o B N P の濃度を測定した。参照試料ならびに E D T A 血漿における安定性の測定のための試料を直接 4 ～ 8 にまで冷却し、15 分間内で遠心分離した。E D T A 血漿を 4 および室温で保存し、次いで 24 時間の付加継続時間内で異なる時間に測定した。結果を表 5 に示す。

【 0 0 7 9 】

【表 5】

表5：

ストレス時間	収率 (%)
EDTA-全血、室温	24 h
	98.8
	48 h
	98.0
	72 h
	100.5
EDTA-血漿、4℃	2 h
	97.5
	4 h
	98.5
	6 h
	102.0
	24 h
	103.0
EDTA-血漿、室温	2 h
	103.0
	4 h
	104.8
	6 h
	102.0
	24 h
	96.0

【 0 0 8 0 】

これらのデータは、N - 末端 p r o B N P が試験した時間内で完全に安定であり、それゆえ、通常のパラメータとして使用し得ることを証明する。この結果は文献〔Huntら, Clinical Endocrinology, 47, 287 (1997)〕とは一致せず、エピトープが外部末端にない解析物の安定性は 2 種の特異的抗体を用いるこの試験形式の選択と設計により影響を受け得る、という仮定を確認するものである。

【 0 0 8 1 】

実施例 6

N - 末端 p r o B N P アッセイの診断の感度の測定

診断の感度の測定のために、実施例4に記載の試験を再度用いた。このために、114人の健常者および1～IVのNYHAクラスの235人の患者を調べた。通常、NYHAクラスIの患者と健常者とを区別することは特に重要である。

【0082】

この高感度アッセイを用い、メジアン値が 6.6 fmol/ml NT - p r o B N P (標準偏差が 7.3 fmol/ml)であることを110人の健常血液ドナーにおいて測定した。測定した最低濃度は 0.2 fmol/ml であった。これは、 $< 1.0 \text{ fmol/ml}$ の感度が正確に参照領域を検出するのに必要であることを明確に示す。この分布を用い、上限正常値領域(97.5パーセンタイル)は 26.6 fmol/ml であると決定した。

【0083】

参照領域が $0 \sim 26.6 \text{ fmol/ml}$ であると仮定すると、NYHAクラスI～IVの233人の患者の内、16人の患者のみが標準領域の値を示した。これは臨床上の感度93.3%に相当する。NYHAクラスIの患者のみを考慮すると、37人の患者の内、30人が陽性として検出され、それは81.1%の感度に相当する。

【0084】

この結果は、高感度N - 末端 p r o B N P アッセイにより、NYHAクラスI心不全を患う患者と健常者との間の明確な識別が可能であることを示す。これまでに利用可能であった従来のアッセイ(Dagubatti ら、Cardiovascular Research 36 (1997), 246)では、これは達成することはできなかった。

【配列表】

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> Verfahren zum Nachweis von N-terminalem proBNP

<130> 51810AWO-SZ

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 1

ccggatccca cccgctg

17

<210> 2

<211> 79

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 2

ccggatccca cccgctgggt tccccgggtt ccgcttcga cctggaaacc tccggtctgc 60
aggaacagcg taaccacct 79

<210> 3

<211> 70

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 3

cgggtccagg gaggtctgtt caacctgcag ttggacagt ttacctgca ggtggttacg 60
ctgttcctgc 70

<210> 4

<211> 71

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 4

cagacctccc tggaaccggt gcaggaatcc ccgcgtcga ccggtgttgg gaaatcccg 60

gaagttgcta c

71

<210> 5

<211> 87

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 5

cccaagctta acgcggagca cgcaggtgt acagaacctat ttacgggga ccacggatac 60
cttcggtagc aacttcacgg gatttcc 87

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> E. coli

<400> 6

cccaagctta acgcggagc

19

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年1月3日(2001.1.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N末端proBNPの異なるエピトープを検出する少なくとも2種の抗体を用いる、試料中におけるN末端proBNPの同定方法。

【請求項2】 該抗体が、同時にN末端proBNPに結合しうるものである、請求項1記載の方法。

【請求項3】 異種的(heterogeneous)に行なわれる、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 サンドウィッチ型式として行なわれる、請求項3記載の方法。

【請求項5】 N末端proBNPの下限検出限界が、1fmol/ml未満である、前記請求項いずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 得られた値により、健常者から得られた試料とNYHA - クラスI ~ IVの心不全患者から得られた試料との識別をなしうる、前記請求項いずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 得られた値により、健常者から得られた試料とNYHA - クラスIの患者から得られた試料との識別をなしうる、請求項6記載の方法。

【請求項8】 健常者から得られた試料とNYHA - クラスI ~ IVの心不全患者から得られた試料との間の識別のための、前記請求項いずれか1項に記載の方法の使用。

【請求項9】 組換えN末端proBNP。

【請求項10】 請求項1 ~ 7記載のN末端proBNPの同定方法における標準としての組換えN末端proBNPの使用。

【請求項11】 N末端p r o B N Pに対する抗体の生産のための組換えN末端p r o B N Pの使用。

【請求項12】 組換えN末端p r o B N Pに対する抗体。

【請求項13】 N末端p r o B N Pのアミノ酸10～66に特異的に結合する、請求項12記載の抗体。

【請求項14】 組換えにより生産されたN末端p r o B N Pを用いた適切な生物の免疫により得られうる、請求項12又は13記載の抗体。

【請求項15】 1999年1月26日にDSMZに寄託された細胞株M10.1.11(DSM ACC 2386)又はM13.4.14(DSM ACC 2387)から得られうる、請求項12～14記載の抗体。

【請求項16】 細胞株M10.1.11(DSM ACC 2386)又はM13.4.14(DSM ACC 2387)から生産された抗体に匹敵し、N末端p r o B N Pを用いて同等の様式で得られてなる、請求項15記載の抗体。

【請求項17】 1999年1月26日にDSMZに寄託された細胞株M10.1.11(DSM ACC 2386)又はM13.4.14(DSM ACC 2387)。

【請求項18】 組換えにより生産されたN末端p r o B N Pを用いて、適切な生物を免疫するステップ、
抗体を単離するステップ、
最も反応性を有するエピトープについてスクリーニングするステップ、
適切なペプチドによる免疫吸着により抗体を精製するステップ
を含む、請求項12～14又は16に記載されたポリクローナル抗体の生産方法。

【請求項19】 組換えにより生産されたN末端p r o B N Pを用いて、適切な生物を免疫するステップ、及び
患者血清の異なるプールにおける天然N末端p r o B N Pとの抗体反応性に関してクローンを選択するステップ
を含む、請求項12～16記載のポリクローナル抗体の生産方法。

【手続補正書】

【提出日】平成13年8月10日(2001.8.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N末端proBNPの異なるエピトープを検出する少なくとも2種の抗体を用いる、試料中におけるN末端proBNPの同定方法。

【請求項2】 健常者から得られた試料とNYHA - クラスI ~ IVの心不全患者から得られた試料との間の識別のための、請求項1記載の方法の使用。

【請求項3】 組換えN末端proBNP。

【請求項4】 請求項1記載のN末端proBNPの同定方法における標準としての組換えN末端proBNPの使用。

【請求項5】 組換えN末端proBNPに対する抗体。

【請求項6】 1999年1月26日にDSMZに寄託された細胞株M10.1.11(DSM ACC 2386)又はM13.4.14(DSM ACC 2387)。

【請求項7】 組換えにより生産されたN末端proBNPを用いて、適切な生物を免疫するステップ、
抗体を単離するステップ、
最も反応性を有するエピトープについてスクリーニングするステップ、
適切なペプチドによる免疫吸着により抗体を精製するステップ
を含む、請求項5記載のポリクローナル抗体の生産方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/00602

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	G01N33/68	C07K14/58 C07K16/26 C07K16/18 C12N15/06
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)		
IPC 7 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)		
WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 24531 A (DZIEGLEWSKA HANNA EVA ;MEDINNOVA SF (NO); HALL CHRISTIAN (NO)) 9 December 1993 (1993-12-09) cited in the application	1-4, 9-14, 18
Y	claims 1,9	1,5-8
Y	HUNT P J ET AL: "IMMUNOREACTIVE AMINO-TERMINAL PRO-BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE (NT-PROBNP): A NEW MARKER OF CARDIAC IMPAIRMENT" CLINICAL ENDOCRINOLOGY, GB, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, vol. 47, 1997, pages 287-296, XP000913471 ISSN: 0300-0664	1,5-8
X	page 287, column 2, line 15 - line 20 -- --	9-14, 18
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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		Date of mailing of the international search report
10 August 2000		21/08/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/00602

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAGGUBATI, S. ET AL.: "Adrenomedullin, endothelin, neuropeptide Y, atrial, brain, and C-natriuretic prohormone peptides compared as early heart failure indicators" CARDIOVASCULAR RESEARCH, vol. 36, 1997, pages 246-255, XP000913576	1,5-8
X	page 253, column 2, paragraph 1	9-14,18
X	HUNT P J ET AL: "THE AMINO-TERMINAL PORTION OF PRO-BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE (PRO-BNP) CIRCULATES IN HUMAN PLASMA" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS,US,ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, vol. 214, no. 3, 1995, pages 1175-1183, XP000907386 ISSN: 0006-291X cited in the application	9-14,18
A	the whole document	1-8, 15-17,19
X	HUNT P J ET AL: "THE ROLE OF THE CIRCULARION IN PROCESSING PRO-BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE (PROBNP) TO AMINO-TERMINAL BNP AND BNP-32" PEPTIDES,US,ELMSFORD, vol. 18, no. 10, 1997, pages 1475-1481, XP000913698 ISSN: 0196-9781	9-14,18
A	the whole document	1-8, 15-17,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/00602

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9324531 A	09-12-1993	AT 172989 T	15-11-1998
		AU 667223 B	14-03-1996
		AU 4340593 A	30-12-1993
		CA 2136961 A	09-12-1993
		DE 69321955 D	10-12-1998
		DE 69321955 T	10-06-1999
		EP 0648228 A	19-04-1995
		ES 2123056 T	01-01-1999
		JP 7507210 T	10-08-1995
		US 5786163 A	28-07-1998

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 P 21/08			C
//(C 1 2 N 5/10		5/00	B
C 1 2 R 1:91)			
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , A U , C A , C N , H U , I L , J P , K R , M X , N O , N Z , P L , R U , U S , Z A		
(72)発明者	シュタール , ペーター ドイツ連邦共和国 ベルンリート デー - 82347 ヒルテンシュトラッセ 12		
(72)発明者	クルーガー , ケルシュティン ドイツ連邦共和国 ミュンヘン デー - 81377 ヴァルデスルスト 4		
(72)発明者	バルギヤ , アンネリーゼ ドイツ連邦共和国 トゥーツィンク デー - - 82327 バイゼーレシュトラッセ 18		
(72)発明者	ガルサー , アンドレアス ドイツ連邦共和国 ペンツベルク デー - 82377 アム フェルヒェンホルツ 10		
F タ-ム(参考)	4B024 AA11 BA04 BA55 CA04 DA02 DA05 EA04 GA03 GA11 HA01 HA15 4B064 AG26 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13 4B065 AA91X AB05 BA08 CA25 CA46 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA32 DA75 DA76 EA50 FA72 FA74		

专利名称(译)	鉴定N-末端proBNP的方法		
公开(公告)号	JP2003508724A	公开(公告)日	2003-03-04
申请号	JP2000596377	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)	罗氏诊断有限公司		
[标]发明人	カールヨハン リルヘルムート シュタールペーター クルーガーケルシュティン ボルギャアンネリーゼ ガルサーアンドレアス		
发明人	カール,ヨハン リル,ヘルムート シュタール,ペーター クルーガー,ケルシュティン ボルギャ,アンネリーゼ ガルサー,アンドレアス		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/575 C07K16/26 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08 C12R1/91 G01N G01N33/68		
CPC分类号	C07K16/26 C07K2317/34 G01N33/6887		
FI分类号	G01N33/53.B C07K14/575 C07K16/26 C12P21/08 C12R1/91 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.C C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA04 4B024/BA55 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA32 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	19903489 1999-01-29 DE 19911044 1999-03-12 DE		
其他公开文献	JP3987284B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用至少两种检测N末端proBNP的不同表位的抗体鉴定样品中N末端proBNP的方法。该方法用于鉴定或分类健康受试者样品和NYHA I-IV级患者样品。此外，本发明涉及重组N-末端proBNP，所述重组N-末端proBNP作为标准物在鉴定N-末端proBNP的方法中的用途，用于检测重组N-末端proBNP的抗体及其生产。

MAK	免疫原	pro-BNPペプチドとの反応性								Rec. pro-BNP	天然 pro-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