



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0011467  
(43) 공개일자 2008년02월04일

(51) Int. Cl.

C07K 16/26 (2006.01) G01N 33/531 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7000782(분할)

(22) 출원일자 2008년01월10일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2005-7021327

원출원일자 2005년11월09일

심사청구일자 2005년11월09일

번역문제출일자 2008년01월10일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2004/005092

국제출원일자 2004년05월12일

(87) 국제공개번호 WO 2004/099253

국제공개일자 2004년11월18일

(30) 우선권주장

03010591.0 2003년05월12일

유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

에프. 호프만-라 로슈 아게

스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124

(72) 발명자

클렘트 폴커

독일 82362 바일하임 프란치스쿠스베크 8

보르기아 아넬리제

독일 82402 제샤우프트 타넨슈트라쎄 1

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

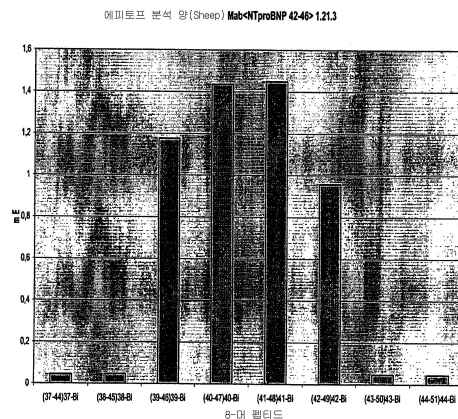
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 아미노산 41-46 에 결합하는 단일클론 항체를 이용한 PROBNP 의 검출 방법

(57) 요약

본 발명은, 천연 proBNP 에 결합하는 항체, 천연 proBNP 의 특이적 검출 방법, 천연 proBNP 수준과 심부전 진단의 연관 방법, 천연 proBNP 검출 키트 및 천연 proBNP 에 대한 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**갈루저 안드레아스**

독일 82377 펜츠베르크 암 페르헨홀츠 10

**그롤 미하엘**

독일 82340 펠다핑 포젠호페너 슈트라쎈 22

**할레르마이어 클라우스**

독일 82340 펠다핑 프쇼르슈트라쎈 1

**자이델 크리스토프**

독일 82362 바일하임 아메르슈트라쎈 39

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

천연 proBNP 의 아미노산 잔기 42-46 에 특이적으로 결합하는 항체로서, 심부전 환자 샘플에서 측정된 proBNP 에 대한 결합 수치 면에서, 기탁번호가 DSM ACC 2650 인 하이브리도마에 의하여 생산되는 천연 proBNP 에 대한 항체인 MAB 1.21.3 과 선형 회귀 분석으로 측정된 r-수치가  $r=0.95$  이상으로 상관관계가 있는, 항체.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 항체가 단일클론 항체인 항체.

### 청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 단일클론 항체가 기탁번호가 DSM ACC 2650 인 하이브리도마 세포주 MAB 1.21.3 에 의해 제조되는 것인 항체.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 항체가 분리된 다클론 항체인 항체.

### 청구항 5

천연 proBNP 의 특이적 검출 방법으로서, proBNP 를 함유하는 것으로 추정되거나 알려진 샘플을, 천연 proBNP 에 대한 항체-천연 proBNP 복합체가 형성될 수 있게 하는 조건하에서, 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 천연 proBNP 에 대한 항체와 접촉시키는 단계 및 형성된 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 방법.

### 청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 검출을 경쟁적 면역측정법(competitive immunoassay)에 의해 수행하는 방법.

### 청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 검출을 샌드위치 면역측정법에 의해 수행하는 방법으로서, 여기서 proBNP 에 대한 제 2 항체가 또한 사용되고, 이 때 proBNP 에 대한 상기 제 2 항체 및 천연 proBNP 에 대한 항체가 모두 천연 proBNP 에 결합하여, 제 2 항-proBNP 항체 - 천연 proBNP - 항-천연 proBNP 항체 복합체를 형성하는 방법.

### 청구항 8

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 항체 및 천연 proBNP 검출을 위한 보조 시약을 포함하는, 천연 proBNP 측정용 키트.

### 청구항 9

DSMZ 에 기탁된, 기탁번호가 DSM ACC 2650 인 하이브리도마 세포주 MAB 1.21.3.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술 분야

<1> 본 발명은, 천연 proBNP 라 불리는 총 proBNP 의 하위 집단(sub-population)에 특이적으로 결합하는 항체, 천연 proBNP 의 특이적 검출 방법, 천연 proBNP 수준과 심부전 진단의 연관 방법, 천연 proBNP 검출 키트 및 천연 proBNP 에 대한 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주에 관한 것이다.

#### 배경 기술

<2> 심부전은 특히 서구 사회에 만연된 현상이다. Roche 의학 사전 (Urban & Schwarzenberg, 1993) 에 따르면, 심부전은 운동시 혹은 심지어는 휴식시에 대사에 필요한 혈류를 생성시키지 못하는 심장의 급성 또는 만성 무력

증 또는 정맥 역류 (후방 및 전방 부전증) 를 초래하는 질환이다. 따라서, 심장의 펌프 기능이 약하다. 심부전의 원인은 매우 복잡적이다. 다른 것 중, 심장근육의 염증성 및 퇴행성 변형, 관상동맥 관류 장애 (coronary perfusion disorder), 관상동맥 경색증 및 손상을 여기서 언급한다. 이는, 말초 혈류의 변형, 호흡 시스템, 신기능 및 전해질 대사 (부종) 장애 및 골격의 근계 성능 저하를 초래한다.

- <3> 뉴욕 심장 협회(New York Heart Association: NYHA)에 따르면, 심부전은 육체적 활동 후의 신체 검사에 의해 하기 NYHA 등급으로 분류된다: I 은 일상적 신체 활동 후 전혀 고통이 없음을 의미하고, II 는 신체적 활동에 약간의 제약이 있음을 의미하고, III 은 신체적 활동에 뚜렷한 제약이 있음을 의미하며, IV 는 대부분의 경우 각 신체 활동으로 부전 증상이 증가하며 휴식시에도 증상이 나타남을 의미한다.
- <4> 글리코사이드, 혈관확장제, ACE 저해제 및/또는  $\beta$ -차단제를 이용한 심부전의 효과적인 의약 치료를 위해, 심부전을 정확하고도 올바르게 분석 및 진단하여 가능하다면 그 경중도에 따라 분류하고, 치료 경로를 추가적으로 모니터링하는 것이 무엇보다 필요하다.
- <5> 당 기술분야에서, 혈청 표지가 심부전의 초기 진단을 위한 표지 후보군으로 논의되고 있는 바, 그 예로는 ANP (심방 나트륨이뇨펩티드 호르몬(atrial natriuretic peptide hormone)) 및 proANP, CNP (C-나트륨이뇨펩티드(natriuretic peptide)), 아드레노메둘린(adrenomedullin), 신경 펩티드 Y, 엔도텔린(endotheliline) 및 BNP (뇌 나트륨이뇨펩티드(brain natriuretic peptide)) 등이 있다. ANP 및 proANP 는 이론상 심부전 진단에 적합한 표지를 대표한다; 그러나, 실제로 이는 상당히 불안정하거나 혈액내 반감기가 짧아서 일상적 진단 방법으로서는 심각한 결점을 지니고 있다 (Buckley, M. G., 등, Clin. Sci. 95 (1998) 235-239; Cleland, J. G., 등, Heart 75 (1996) 410-413).
- <6> 자주 인용되는 유의미한 표지는 BNP (뇌 나트륨이뇨펩티드) 이다. 원래, BNP 는 돼지의 뇌에서 확인되었다. 이는 구조 및 기능적으로 ANP (심방 나트륨이뇨펩티드) 를 닮은 심장 호르몬(cardiac hormone)이다 (Sudoh, T., 등, Nature 332 (1988) 78-81). 32 개 아미노산으로 이루어진 인간 BNP 는 심실에서 주로 분비되며 인간 혈장내에서 순환한다. BNP 의 진단용 표지로서의 용도는, 예컨대 EP-A-0 542 255 에 공지되어 있다. BNP 는 분자내 이황 가교(disulfide bridge)를 지니며 그다지 안정적 분석 대상은 아니다. 이는 신속하게 변형되어야 하는 호르몬으로서의 생리적 기능에 기인한 것으로 추측된다. 따라서, 이를 진단 표지로서 사용하기 위해서는 샘플의 수집 및 처리에 있어서 신중하고 특별한 주의가 요구된다 (Masuta, C., 등, Clin. Chem. 44 (1998) 130; Tsuji, T., 등, Clin. Chem. 40 (1994) 672-673).
- <7> BNP 의 전구체 분자, 즉 proBNP 는 108 개 아미노산으로 이루어진다. proBNP 는 BNP 로 불리는 상술한 32 개의 C-말단 아미노산 (77-108) 및 N-말단 proBNP (또는 NT-proBNP) 로 불리는 N-말단 아미노산 1-76 로 절단된다. BNP, N-말단 proBNP (1-76) 및 추가적 분해 산물 (Hunt, P. J., 등, Biochem. Biophys. Res. Com. 214 (1995) 1175-1183) 은 혈액내에서 순환한다. 완전한 전구체 분자 (proBNP 1-108) 또한 혈장내에서 발생하는지 여부는 완벽하게 해명되지 않았다. 그러나, 혈장내의 proBNP (1-108) 의 낮은 방출량이 검출가능 하긴 하나 N-말단에서의 매우 신속한 부분 붕괴로 인해 일부 아미노산이 결핍되어 있다는 것이 공지되어 있다 (Hunt, P. J., 등, Peptides, Vol. 18, No. 10 (1997), 1475-1481).
- <8> 당업계에서 공지된 바와 같이, N-말단 proBNP (1-76) 은 심부전의 표지로 간주된다.
- <9> WO 93/24531 (US 5,786,163) 은 N-말단 proBNP 의 면역학적 동정 방법 및 그에 이용되는 항체를 기재하고 있다. WO 93/24531 에서, N-말단 proBNP 에서 유래된 한 개의 단일 펩티드에 대한 다클론 항체가 제조된다. 상기 제조된 항체는 경쟁 시험 유형(competitive test format)에서 면역화 펩티드 (아미노산 47-64) 에 결합하는 것으로 나타난다.
- <10> WO 93/24531 에서 수행된 경쟁 시험에서, 라벨링(labelled) 형태의 펩티드 47-64 는 래빗 혈청의 다클론 항체와의 결합을 두고 탐침(tracer)으로서 샘플내의 proBNP 또는 비(非)라벨링 표준 펩티드(peptide standard) 47-64 와 경쟁한다. 48 시간 배양 후에 중간 정도의 경쟁에 도달하여, 약 250 fmol/ml 의 검출 하한을 형성한다. 상기 경쟁 시험에서 긴 배양 시간은 자동화 실험실에서의 일상적 샘플 측정에는 적합하지 않다.
- <11> [Hunt, P. J., 등, Clinical Endocrinology 47 (1997) 287-296] 또한 N-말단 proBNP 검출을 위한 경쟁 시험을 기술하고 있다. 상기 시험에서, 측정을 실시하기 전에 혈장 샘플의 복합 추출(complex extraction)이 필요하다; 이는 분석 대상의 파괴 및 측정 오류를 초래할 수 있다. 사용되는 항혈청은 WO 93/24531 과 유사하게 합성 펩티드를 이용한 면역화에 의해 제조된다. Hunt 등은 N-말단 proBNP 아미노산 1-13 을 이용한 면역화에 의해 항혈청을 제조하였고, 아미노산 1-21 로 이루어진 펩티드가 표준으로 사용된다. 이 시험을 위해서

도 장시간 배양이 요구된다. 24 시간 배양 후 1.3 fmol/ml 의 검출 하한에 도달한다.

- <12> Ng, L., 등의 WO 00/35951 은 N-말단 proBNP 의 추가적 진단 방법을 기재하고 있다. 이 방법은 인간 proBNP 의 아미노산 65 내지 76 에 해당하는 합성 펩티드에 대하여 생성되는 항체를 사용하는 것을 기초로 한다.
- <13> [Hughes, D., 등, Clin. Sci. 96 (1999) 373-380] 은 N-말단 proBNP 에 대한 두가지 상이한 분석법을 보고하고 있다. 첫 번째 분석에서, proBNP 의 아미노산 65-76 에 해당하는 합성 펩티드를 포함한 면역원을 이용하여 생성된 다클론 항체가 사용되는 반면, 두 번째 분석에서는 다클론 항체가 유사하게 생성되나 아미노산 37-49 에 대하여 생성된다. Hughes, D. 등의 자료에 따르면, proBNP 의 아미노산 37-49 에 해당하는 펩티드와 반응성이며 이를 이용하여 생성된 항체는 내인성 비손상 proBNP 와 반응하지 않는다. 이를 기초로 한 분석법은 좌심실 기능장애를 지닌 환자와 정상 대조군을 구별하지 못한다. proBNP 65-76 을 기초로 한 분석으로는 상기 동일 환자군을 명백하게 구분할 수 있다.
- <14> [Goetze, J. P., 등, Clin. Chem. 48 (2002) 1035-1042] 는 N-말단 proBNP 의 가장 N-말단의 아미노산 (1-21) 의 분석법을 기재하고 있다. 상기 분석법은 proBNP 의 동일한 아미노산 (1-21) 에 해당하는 합성 펩티드에 대하여 생성된 다클론 항체를 기초로 한다.
- <15> 상기 Goetze, J. P. 등의 분석법은 샘플의 완전 분해(complete digestion)를 요하며, 다양한 proBNP 가 거기에 포함된다. 상기 분석법은 비특이적 결합의 감소에도 효과적이었다고 평가된다.
- <16> Karl, J. 등의 WO 00/45176 은 N-말단 proBNP 의 민감하고도 신속한 검출이 샌드위치 면역측정(sandwich immunoassay)에 의해 가능하다는 것을 처음으로 보여주었다. 바람직한 에피토프는, WO 00/45176 에 기재된 바와 같이 N-말단 proBNP 의 아미노산 10-50 이다.
- <17> US 2003/0219734 는 proBNP (1-108), BNP (77-108) 및 N-말단 proBNP (1-76) 에서 유래된 다수의 상이한 BNP-관련 폴리펩티드가 샘플에 존재할 수도 있음을 언급하고 있다.
- <18> [Mair, J., 등, Clin. Chem. Lab. Med. 39 (2001) 571-588] 은 심부전의 진단 및 관리에 있어, 심장 나트륨이뇨펩티드 측정의 효과를 요약하고 있다. 이는 현재 이용가능한 상업적 분석법이 표준화되어 있지 않다는 점, 즉 종래의 표준에 대하여 보정되지 않았음을 강조한다. 일부 분석에서는 혈장 추출도 요구된다. 결과적으로, 서로 다른 제조사들의 분석으로 취득된 결과는 상당히 상이할 수 있다. 따라서, 임상 연구로부터 유도된 참고범위(reference interval) 및 결정한계(decision limit)는 이용된 특정 분석에 대하여만 유효하며, N-말단 proBNP 의 다른 분석법에 대하여 외삽법으로 추정 (extrapolate) 되어서는 안된다.
- <19> 마찬가지로, 상기 Goetze, J. P. 등 및 [Mair, J., Clin. Chem. 48 (2002) 977-978] 은, 수득한 값 및 이의 임상적 의의 둘 다에 관한 N-말단 proBNP 의 상이한 분석법 간의 모순이, 상기 표지 후보의 광범위한 사용에 있어서의 중대한 문제점을 나타낸다고 지적한다.
- <20> N-말단 proBNP 에 관한 개선된 분석법, 예컨대 보다 재현가능하고 더 표준화된, 보다 명확하고/하거나 더욱 임상적으로 연관된 분석법의 제공이 크게 요구된다는 것이 명백하다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

- <21> 본 발명의 목적은 N-말단 proBNP 측정, 및/또는 N-말단 proBNP 의 임상적 관련 절편(clinically relevant fragment) 또는 하위 집단을 위한 더욱 특이적인 분석법을 개발하는 것이다.
- <22> 하기에 설명되어 있으며 첨부된 청구항에 청구되어 있는 본 발명은 당업계에 공지된 하나 이상의 문제들을 최소한 부분적으로 해결한다.

### 과제 해결수단

- <23> 놀랍게도, 순환기내에 존재하는 모든 proBNP 종류 (총 proBNP) 의 하위 집단을 특이적으로 검출할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 이 하위 집단을 천연 N-말단 proBNP 또는 간단히 "천연 proBNP" 라고 부른다. 놀랍게도, 천연 proBNP 의 하위 집단이 총 proBNP 에 비해 임상적으로 더 관련있음이 드러났다.
- <24> 제 1 구현예에서, 본 발명은 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 분리된 항체에 관한 것이다.

- <25> 본 발명은 또한, proBNP 를 함유하는 것으로 추정되거나 알려진 샘플을, 천연 proBNP 에 대한 항체-천연 proBNP 복합체가 형성될 수 있게 하는 조건하에 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계 및 형성된 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 천연 proBNP 의 특이적 검출 방법에 관한 것이다.
- <26> 또한, 본 발명은 천연 proBNP 의 검출 및 천연 proBNP 수준과 심부전의 상호연관을 포함하는 심부전 진단 방법을 개시한다. 이로써 천연 proBNP 의 상관수치는 심부전의 부재, 존재 또는 그 상태를 나타내는 지표가 된다.
- <27> 본 발명은 또한, 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 항체 및 천연 proBNP 검출을 위한 보조 시약을 포함하는 천연 proBNP 측정용 키트에 관한 것이다. 또한, DSMZ 에 기탁된 천연 proBNP 에 대한 특이적 단일클론 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주 MAB 1.21.3 에 의해 제조된 단일클론 항체에 대한 권리를 주장한다.
- <28> 본 발명에 이르게 된 실험 과정에서, 인간 혈액내에는 최소한 두 가지 proBNP 집단이 존재한다는 사실이 발견 및 확립되었다. 한 proBNP 집단은 면역학적 방법에 의해 검출가능한 모든 proBNP 분자의 다수를 대표하는 것으로 보인다. 이 집단을 "총" proBNP 로 지칭한다. 총 proBNP 로 요약할 수 있는 proBNP 분자가 proBNP 의 약 10 번 아미노산 내지 약 66 번 아미노산 범위에 이르는 공통적 중심 핵구조(central core structure)를 명백히 가진다는 것이 본 연구로 드러났다. 바람직하게, 본 발명에 따른 방법으로 검출되는 총 proBNP 는 아미노산 10 에서 66 까지를 포함한다. 당업자라면, 경쟁 시험 또는 샌드위치 분석 유형에 의해 면역학적 방법으로 상기 총 proBNP 를 쉽게 검출할 수 있음을 이해할 것이다. 총 proBNP 검출을 위해 바람직하게 샌드위치 분석법이 이용된다. 상기 샌드위치 분석법은 각각 천연 proBNP 에피토프의 C-및 N-말단에 결합하는 항체를 포함하도록 설계될 수 있다. 그러나, 예컨대 샌드위치 형성이 가능하고 둘 다 천연 proBNP 에피토프의 N-말단 에피토프와 반응성인 항체들을 이용한 총 proBNP 검출 또한 가능하다. 명백히, 총 proBNP 의 상기 경쟁적 또는 샌드위치 결정에서 천연 proBNP 에 대한 항체를 사용해서는 안된다.
- <29> "천연 proBNP" 라는 용어는 MAB 1.21.3 에 의해 인지되는 에피토프가 존재하는 임의의 proBNP 분자를 나타낸다. 하기에 후술할 연구에 따르면, 이 에피토프는 모든 proBNP 분자의 하위 집단 (즉, "총"proBNP 의 하위 집단) 상에만 존재한다. 우리는 "천연 proBNP" 로 불리는 총 proBNP 의 상기 하위 집단이 특이적 결합 파트너, 바람직하게는 다클론 및/또는 단일클론 항체에 의해 검출가능하다는 사실을 발견 및 확인할 수 있었다.
- <30> 천연 proBNP 로 불리는 하위 집단은 반드시 균일한 폴리펩티드 절편일 필요는 없다. 천연 proBNP 폴리펩티드(들)의 길이는 가변적이다. 천연 proBNP 의 샌드위치 면역측정에서 인지되는 대부분의 분자들은 N-말단 proBNP (1-76) 또는 그 절편을 나타내는 것으로 추정된다. 천연 proBNP 분석은 바람직하게, 아미노산 10 - 66 을 포함하는 NT-proBNP 절편의 측정에 적합한 방식으로 설정된다. 천연 proBNP 의 독특한 특징은, MAB 1.21.3. 에 의해 인지되는 천연 proBNP 에피토프의 존재이다.
- <31> 일 구현예에서, 본 발명은 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것으로서, 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 상기 항체는, 환자 샘플로 측정된 proBNP 에 대한 수치 면에서 MAB 1.21.3 과 r-수치 r=0.95 이 상인 상관관계가 있는 항체이다.
- <32> 당업자라면, 상기 본 발명의 발견, 개시 및 기탁을 토대로, 항체가 천연 proBNP 에 혹은 총 proBNP 에 특이적으로 결합하는지 여부를 측정하는 데에 어려움이 없을 것이다. MAB 1.21.3 은 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 항체의 전형예로 간주되는 반면, MAB 18.4.34 는 총 proBNP 에 대한 항체의 전형예로 간주된다. 현재 proBNP 에 대한 임의의 어떠한 결합제라도 천연 또는 총 proBNP 각각에 대한 그 결합 특이성을 측정할 수 있다.
- <33> 천연 proBNP 에 "특이적으로 결합"하는 항체는, 환자 샘플로 측정한 proBNP 에 대한 수치 면에서 MAB 1.21.3 과 r=0.95 이상인 r-수치의 상관관계가 있는 항체이다. 천연 proBNP 에 대한 결합 특이성은 관련 임상 샘플을 이용하여 MAB 1.21.3 의 결합 특성과 관련하여 평가된다. NT-proBNP-수준이 10 ng/ml 내지 150ng/ml 인 천연 proBNP 의 혈청 샘플 15 개 이상 및 25 개 이하를 사용한다. proBNP 에 대한 결합을 Biacore® 3000 시스템으로 측정한다. 측정된 값을 MAB 1.21.3 를 이용하여 측정된 천연 proBNP-수치와 상관시키고 선형 회귀 분석으로 통계 평가를 수행한다. 바람직하게  $y = ax + b$  타입의 선형 회귀를 MS-Excel 을 이용하여 수행하고 상관계수 r 및 기울기를 계산한다. 더욱 바람직하게, 상기 항체는 MAB 1.21.3 에 결합된 총 proBNP 의 본질적으로 동일한 천연 proBNP 하위집단을 검출하며, 본질적으로 상기 동일한 하위집단과의 결합은 상기 방법에 따르면 r=0.98 이상의 상관관계를 이룬다.
- <34> MAB 18.4.34 는 총 proBNP 측정을 위한 전형적 항체로 간주된다. 천연 proBNP 에 특이적으로 결합되는 임의

의 항체의 경우 (상술한 바와 동일한 샘플 및 절차를 이용함), MAB 18.4.34, 즉 총 proBNP 와의 상관관계는 MAB 1.21.3 와의 상관관계에 비해 통상 더 낮을 것이다. 바람직하게, proBNP 의 하위분획인 천연 proBNP 와 특이적으로 결합하는 항체에 있어서 MAB 18.4.34 와의 상관관계는  $r=0.94$  이하일 것이다. 더 바람직하게, 이는 0.9 이하 또는  $r=0.8$  이하로 낮다.

- <35> 상기 비교 방법들에서 측정된 절대량을 비교할 경우, 총 proBNP 를 검출하는 분석은 MAB 1.21.3 와 비교하여, 일관되게 약 2 내지 20 배, 대부분의 경우 약 2 내지 5 배 높은 수치의 proBNP 를 산출한다. 상기 상관관계에 더하여, 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 바람직한 항체는 또한 상기 비교 방법에서 1.5 미만의 기울기를 나타내게 된다. 가장 바람직하게, 기울기는 0.7 내지 1.5 이다.
- <36> 특이적 결합은 바람직하게  $10^7$  L/mol 이상의 결합 친화도로 발생한다. 특이적 결합체는 천연 proBNP 에 대하여 더욱 바람직하게  $10^8$  L/mol 의 친화도, 더더욱 바람직하게는  $10^9$  L/mol 의 친화도를 가진다.
- <37> 상술한 바와 같이, MAB 1.21.3 의 매우 중요하고 바람직한 특성은, 통상의 임상 샘플에 포함된 총 proBNP 의 약 5% 내지 약 50% 의 가변적 분획만이 상기 항체에 의해 결합된다는 사실이다.
- <38> 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 항체의 전형예는 DSMZ 에 기탁된 MAB 1.21.3 클론에 의해 생성된 단일클론 항체이다. MAB 1.21.3 은 양의 단일클론 항체로서 실시예에 기재된 바와 같이 제조되었다. 이들 및 다른 항체에 의해 인지되는 proBNP 상의 에피토프는, 잘 정의된 proBNP 서열에 대응하는 짧은 합성 펩티드를 사용하여 동정, 특성화 및 매핑(mapping)되었다. 이 방법은 공지되었으며 PepScan 분석이라 불린다.
- <39> 간단히 말해, proBNP 의 8 개 연속 아미노산을 함유한 69 개 합성 펩티드를 N-말단 시스테인, 스페이서 분자 및 비오틴을 포함하여 합성하였다. 이들 펩티드 각각을 N-말단으로부터 C-말단 쪽으로 아미노산 한 개씩 시프팅(shifting)시켰다. 따라서, 펩티드 1 은 아미노산 1 - 8, 펩티드 2 는 아미노산 2 - 9 등 및 펩티드 69 는 아미노산 69 - 76 을 포함한다.
- <40> MAB 1.21.3 은 펩티드 39 번 (아미노산 38-46) 내지 42 번 (아미노산 42-49) (이들은 proBNP 의 아미노산 위치 42-46 을 공유함) 과 상당히 반응성이 좋은 것으로 드러났다. 따라서, MAB 1.21.3 이 본질적으로 proBNP 의 아미노산 42-46 으로 이루어진 에피토프와 반응한다고 결론내릴 수 있다.
- <41> 에피토프의 존재 또는 부재는 3차 구조, 2차 변형, 복합체 형성, 접근성 등에 의해 좌우될 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다. 명백히, 천연 proBNP 에 대한 MAB 1.21.3 및 기타 항체는 이와 관련하여 매우 특이적 부분을 요구하며, 통상의 샘플에 존재하는 대다수의 proBNP 분자와는 반응하지 않는다. 짧은 합성 PepScan 펩티드는 3 차 구조 또는 2 차 변형을 가질 가능성이 낮으므로, MAB 1.21.3 에 의해 인지되는 에피토프는 변형되지 않아야 하며, 그런 의미에서 "천연" 이란 용어는 적절한 것으로 여겨진다.
- <42> 천연 proBNP 에 대한 항체를 기초로 한 분석 및 총 proBNP 측정 분석은, 인간 혈청과 같은 임상 샘플에 함유된 proBNP 및 합성 proBNP (1-76) 각각을 측정 및 비교할 경우 반응 강도에 있어서 상당한 차이를 나타낸다. 합성 proBNP (1-76) 를 이용하여 검출 절차를 쉽게 설정 및 표준화할 수 있다. 상기 분석을 이용하여, 합성 매트릭스 내 또는 인간 혈청과 같은 천연 샘플에 첨가된 합성 proBNP (1-76) 은 두 분석 모두에서 동일 수준으로 측정된다. 그러나, 놀랍게도 인간 혈청과 같은 천연 샘플에 함유된 proBNP 를 이들 두 분석으로 측정하면 상당한 차이가 발견된다.
- <43> 각 단일클론 항체 MAB 17.3.1, 18.4.34, 또는 18.29.23 과 같은 총 proBNP 에 대해 반응성인 항체(또는 각 항체들)를 이용한 분석으로, 혈청 샘플내에 존재하는 모든 proBNP 분자, 즉 총 proBNP 가 검출되는 것으로 나타난다. 반대로, MAB 1.21.3 와 같은 천연 proBNP 에 대해 반응성인 항체를 기초로 한 분석은 상기 총 proBNP 의 분획만을 검출한다.
- <44> 본 발명에 의해, 총 proBNP 의 천연 proBNP 하위 집단이 생물학적 활성 BNP 와 임상적으로 매우 우수한 상관관계를 보인다는 것이 입증된다. 물론, BNP 측정에 있어서 올바른 BNP 수치를 얻기 위해 샘플링 및 핸들링에 있어서 모든 유의 사항을 준수하였다. 천연 proBNP 측정의 경우, 특별한 주의를 기울이지 않은 일반적 샘플 처리도 만족스러운 것으로 나타났다.
- <45> 본 발명에서 입증된 모든 자료는, 본 발명에서 확인된, 특히 MAB 1.21.3 와 결합하는 에피토프가 천연 proBNP 에 대한 적절한 항체를 위한 주된 에피토프임을 명백히 가리킨다. 분명히, MAB 1.21.3 에 의해 인지되는 상기 천연 proBNP 에피토프는 자연적 변형을 겪거나 또는 MAB 1.21.3 가 그러한 변형 또는 복합 proBNP 에 낮은

정도로 결합하거나 전혀 결합하지 않도록 에피토프에 변화를 가져오는 단백질 복합체의 일부가 될 수 있다.  
그러한 변형된 "비(非)천연" proBNP 에피토프를 가지는 proBNP 는 총 proBNP 분석에서만 유의미하게 측정된다.

- <46> 내재적인 고 재현가능성으로 인하여, 단일클론 항체는 천연 proBNP 검출을 위한 바람직한 툴이다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 본 발명은 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체에 관한 것이다.
- <47> 당업자라면, MAB 1.21.3 에 비하여 PepScan 펩티드 번호 39 - 42 에 대한 반응성에 있어서 약간 상이한 패턴을 보이는 다른 단일클론 항체가 발견될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 총 proBNP 집단에 포함되고 MAB 1.21.3 에 의해 결합되는 천연 proBNP 하위 집단과  $r=0.95$  이상의  $r$ -수치로 상호연관되는 총 proBNP 의 하위 집단만이 검출되는 한, 천연 proBNP 에 대한 단일클론 항체는 본 발명의 요지를 벗어나지 않는다. 상기 상관관계는 Biacore® 시스템 및 상술한 통계 평가법을 이용하여 측정한다. 상기 단일클론 항체가, MAB 1.21.3 에 의해 결합된, 총 proBNP 의 본질적으로 동일한 천연 proBNP 하위 집단을 검출하고, 상기 본질적으로 동일한 하위 집단이 상기 절차에 따라  $r=0.98$  이상의 상관관계를 갖는 것이 더욱 바람직하다.
- <48> 바람직한 구현예에서, 본 발명은 또한, 적절한 비인간 동물, 바람직하게는 마우스, 래트 또는 양을 proBNP 로 면역화하는 단계, 거기서 항체를 생성하는 B-세포를 수득하는 단계, 상기 B-세포를 적절한 용합 파트너와 융합하는 단계 및 이렇게 수득된 하이브리도마에 의해 제조된 항체의 천연 proBNP 에 대한 반응성 시험 단계를 포함하는 단일클론 항체의 제조 방법에 관한 것이다. 바람직하게, 상기 단일클론 항체만을 선별하여 면역측정에 사용하며, 이는 적절한 환자 샘플에서 MAB 1.21.3 과  $r$ -수치 0.95 이상으로 상관관계가 있다. 상기 상관관계는 상술한 바와 같이 측정된다. 바람직하게, 모두 최소한 proBNP 아미노산 41 - 44 를 함유하는 합성 proBNP 또는 원핵 세포에서 제조된 proBNP 또는 proBNP 의 합성 펩티드 또는 절편으로 면역화를 수행한다. 천연 proBNP 에 대한 친화도가  $10^9$  L/mol 이상인 양(sheep) 단일클론 항체가 본 발명에 따른 바람직한 구현예를 대표한다.
- <49> 이제 MAB 1.21.3 이 이용가능하므로, 천연 proBNP 의 특이적 검출에 사용할 수 있는 다클론 항체를 생산, 정제 및 동정하는 것 또한 당연히 가능하다. 예를 들어, 이제 MAB 1.21.3 와의 상관관계에 의해 천연 proBNP 에 대한 다클론 항체 (PAB) 를 생성, 정제 및 분석할 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- <50> 당업자는 천연 proBNP 에 결합하는 PAB 를 제조하는 다양한 방법이 있다는 것을 이해할 수 있다. 예컨대 성공적인 여러 면역정제 경로에서 하나 이상의 펩티드를 면역 흡착제로 사용하는 것이 가능하다는 것은 명백하다.
- <51> 총 proBNP 집단에 포함되고 MAB 1.21.3 에 의해 결합되는 천연 proBNP 하위 집단과  $r=0.95$  이상의  $r$ -수치로 상호연관되는 총 proBNP 의 하위 집단만이 검출되는 한, 천연 proBNP 에 대한 다클론 항체는 본 발명의 요지를 벗어나지 않는다. 상기 상관관계는 Biacore® 시스템 및 상술한 통계 평가법을 이용하여 측정한다. 상기 다클론 항체가, MAB 1.21.3 에 의해 결합된, 총 proBNP 의 본질적으로 동일한 천연 proBNP 하위 집단을 검출하고, 이 때 본질적으로 동일한 하위 집단의 상기 결합이 상기 절차에 의해  $r=0.98$  이상의 상관관계를 갖는 것이 더욱 바람직하다.
- <52> 천연 proBNP 에 대한 상기 PAB 를 수득하는 한 가지 방법은, 제조합 또는 합성에 의해 제조된 proBNP 로 면역화하고, 어피니티 정제법에 의해 그로부터 천연 proBNP-특이적 항체를 정제하고, 이렇게 수득된 다클론 항체를 상술한 바와 같이 환자 샘플을 통해 평가하는 것이다.
- <53> 따라서, 바람직한 구현예에서, 본 발명은 적절한 비인간 동물을 proBNP 로 면역화하는 단계, 거기서 다클론 항체를 수득하는 단계 및 이렇게 수득된 항체의 천연 proBNP 에 대한 반응성 시험 단계를 포함하는 다클론 항체의 제조 방법에 관한 것이다. 바람직하게, 상기 다클론 항체만을 선별하여 면역측정에 사용하며, 이는 적절한 환자 샘플에서 MAB 1.21.3 과  $r$ -수치 0.95 이상으로 상관관계가 있다. 상기 상관관계는 상술한 바와 같이 측정된다.
- <54> 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 임의의 다클론 항체의 경우 (동일 샘플 및 절차를 이용) MAB 18.4.34, 즉 총 proBNP 에 대한 상관관계는 MAB 1.21.3 에 대한 상관관계에 비해 상당히 낮을 것이다. 다클론 항체 표본이 항상 상이한 특성을 지닌 개별적 항체를 함유할 수 있으므로, 바람직하게는, 총 proBNP 의 천연 proBNP 하위 분획에 특이적으로 결합하는 다클론 항체의 MAB 18.4.34 와의 상관관계는  $r=0.94$  이하이다. 더욱 바람직하게는 0.9 이하이다. 바람직하게, 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 다클론 항체 표본은 MAB 1.21.3 과  $r=0.98$  이상, MAB 18.4.34 와  $r=0.94$  이하, 더욱 바람직하게는 MAB 18.4.34 와  $r=0.9$  이하의 상관관계를 지닌다.

- <55> 바람직하게, 천연 proBNP 에 대한 다클론 항체의 수득을 위한 면역화는, 모두 최소한 proBNP 아미노산 41 - 44 를 함유하는 합성 proBNP 또는 원핵 세포에서 제조된 proBNP 또는 proBNP 의 합성 펩티드 또는 절편으로 수행한다.
- <56> 우리의 실험 과정에서, 매우 다양한 면역학적 시약이 여러 샌드위치 분석 유형에서 제조, 분석, 배합되어 proBNP 의 검출에 사용되었다. 이들 면역학적 시약의 다양한 배합으로, 다수의 분석들에 의해 총 proBNP 가 측정되는 것으로 드러났다.
- <57> 조사된 총 proBNP 분석은 BNP 와 논리적인 상관관계를 나타내는 것으로 밝혀졌고, 이는 심부전의 진단에서의 합당한 진단 정확성과 일치한다 (예를 들어, 상기 Mair, J. 참고).
- <58> 그러나, 천연 proBNP 만을 검출하는 분석법이, 총 proBNP 를 검출하는 분석법에 비하여 각각 NYHA 등급 0 또는 I 의 환자와 NYHA 등급 II, III, 또는 IV 의 환자를 더 잘 구별한다는 사실을 이제 확인할 수 있다.
- <59> 따라서, 바람직한 구현예에서 본 발명은 proBNP 를 함유하는 것으로 추정되거나 알려진 샘플을, 천연 proBNP 에 대한 항체-천연 proBNP 복합체가 형성될 수 있게 하는 조건하에 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계 및 형성된 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 천연 proBNP 의 특이적 검출 방법에 관한 것이다. 바람직하게, 상기 천연 proBNP 의 특이적 검출 방법은 NYHA 등급 0 및 I 과 NYHA 등급 II, III, 또는 IV 를 구별하기 위해 사용된다.
- <60> 상기 "천연 proBNP 에 대한 항체-천연 proBNP 복합체"는 또한 간단히 "항체-천연 proBNP 복합체"라고 부를 수도 있다.
- <61> 상기 "항체"라는 용어는 유전 공학에 의해 수득가능한 단일- 또는 다클론 항체, 키메라성 또는 인간화 또는 또는 기타 항체뿐만 아니라, 당업자에 공지된 모든 항체 절편, 예컨대 F(ab')<sub>2</sub>, Fab' 또는 Fab 절편에 관한 것이다. 천연 proBNP 에 대한 적절한 특이성을 지닌 다른 결합제도 항체 또는 항체 절편을 대신하여 사용될 수 있다. 단, MAB 1.21.3 과 유사하게, 천연 proBNP 에 대한 특이적 결합력은 보장되어야 한다.
- <62> 당업자에 자명한 바, 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 천연 proBNP 의 검출 방법은 다수 존재하며, 이는 모두 관련 교재에 자세히 기재되어 있다 (예컨대, Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11 (1990) Elsevier, Amsterdam, 또는 Diamandis, 등, eds. (1996) Immunoassay, Academic Press, Boston 참조).
- <63> 본 발명의 내용에서, 총 proBNP 또는 천연 proBNP 의 검출을 위한 다수의 시약 및 시약 배합물은 Biacore® 시스템에 의해 분석하였으며, 이 중 일부 결과는 실시예 부분에 기재하였다.
- <64> 일상적인 임상 진단에 있어, 이중 면역측정 유형을 바탕으로 한 방법이 자주 이용된다. 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 천연 proBNP 의 검출 방법은 경쟁적 면역측정법이다.
- <65> 샌드위치 분석 원리에 따른 면역측정이 더욱 바람직한데, 여기서 항체-항원-항체 복합체 (샌드위치라고도 부름)가 형성된다.
- <66> 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 천연 proBNP 의 특이적 검출 방법은 샌드위치 면역측정법이며, 여기서 천연 proBNP 에 대한 제 1 항체 및 총 proBNP 에 대한 제 2 항체를 사용하고, proBNP 에 대한 상기 제 2 항체 및 천연 proBNP 에 대한 제 1 항체는 모두 천연 proBNP 의 상이한 에피토프에 결합하여, (첫 번째) 항-천연 proBNP 항체 - 천연 proBNP - (두 번째) 항-proBNP 항체 복합체를 형성한다.
- <67> 당업자에게 자명한 바, 또한 제 1 (포획) 항체로서 총 proBNP 에 대한 항체 및 (추적, 검출 또는 라벨링) 제 2 항체로서 항-천연 proBNP 항체를 사용하여 천연 proBNP 검출을 위한 샌드위치 분석을 설정할 수도 있다.
- <68> 바람직하게, 천연 proBNP 의 측정을 위한 상기 샌드위치 방법은 하기 단계를 포함한다:
- <69> a) 고체상에 결합하기에 적당한 기를 함유하는 제 1 천연 proBNP-특이적 항체를 샘플과 혼합하는 단계 또는 이미 고체상에 결합된 제 1 천연 proBNP-특이적 항체를 샘플과 혼합하는 단계,
- <70> b) 제 1 항체-천연 proBNP-제 2 항체 복합체가 형성되는 조건 하에 상기 용액을, 천연 proBNP 및 총 proBNP 모두에 존재하며 라벨을 지닌 천연 proBNP 에피토프 외의 에피토프와 결합하는 총 proBNP 에 대한 제 2 항체와 혼합하는 단계,

- <71> c) 형성된 면역 복합체를 고체상에 결합시키는 단계
- <72> d) 액체상으로부터 고체상을 분리하는 단계
- <73> e) 한 개 또는 두 개의 상에서 라벨을 검출하는 단계.
- <74> 정량 시험에서, 표준으로서 일정량의 천연 proBNP 를 이용하여 동일 측정을 수행하고, 상기 샘플 측정 후, 단계 f), 즉 표준 또는 표준 곡선 값을 샘플에 대해 수득한 값과 비교하는 단계를 수행하고, 대응하는 천연 proBNP 농도를 외삽법으로 추정한다.
- <75> 천연 proBNP 에 특이적인 제 1 항체를 고체상에 직접 또는 특이적 결합쌍 시스템(specific binding pair system)에 의해 간접적으로 결합시킬 수 있다. 상기 항체의 고체상에 대한 직접 결합은, 예컨대 흡착식 등의 당업자에 공지된 방법을 따른다. 결합이 특이적 결합쌍 시스템에 의한 간접적 방식인 경우, 제 1 항체는 천연 proBNP 에 대한 항체 및 특이적 결합쌍 시스템의 제 1 파트너로 이루어진 콘주게이트이다. 특이적 결합쌍 시스템은 서로 특이적으로 반응가능한 두 파트너를 의미한다. 상기 결합은 면역학적 결합 또는 대안적인 특이적 결합을 기초로 할 수 있다. 바람직한 조합은 비오틴과 각각 아비딘, 스트렙타비딘 또는 항-비오틴, 합텐과 항-합텐, 항체의 Fc-절편과 상기 Fc-절편에 대한 항체 또는 탄수화물과 렉틴이다. 바람직하게, 비오틴과 아비딘, 또는 비오틴과 스트렙타비딘의 조합을 특이적 결합쌍 시스템으로 이용한다.
- <76> 특이적 결합쌍 시스템의 제 2 파트너는 고체상에 코팅된다. 바람직하게는 스트렙타비딘 또는 아비딘이 사용된다. 상기 특이적 결합쌍 시스템의 상기 파트너의 불용성 담체 물질에의 결합은 당업자에 공지된 표준 절차에 따라 수행할 수 있다. 여기서 공유적 결합 및 흡착식 결합 모두가 적절하다.
- <77> 고체상으로서, 특이적 결합쌍 시스템의 제 2 파트너로 코팅된 폴리스티렌 또는 유사한 플라스틱 재질의 시험관 또는 마이크로타이터 플레이트가 적당하다. 더 적당하고 특히 바람직한 것은 라텍스 입자, 마그네틱 입자, 분자체(molecular sieve) 물질, 및 유리 미립자등의 입자 물질이다. 종이 또는 니트로셀룰로오스 또한 담체로 사용할 수 있다. 상술한 바와 같이 특이적 결합쌍 시스템의 제 2 파트너로 코팅된 자기 비드를 사용하는 것이 특히 바람직하다. 면역학적 반응의 완료 및 형성된 면역학적 복합체의 고체상에서의 결합 후, 상기 미립자들을, 예컨대 여과, 원심분리 또는 자기 입자의 경우 자석에 의해 액체상으로부터 분리할 수 있다. 그 후, 고체상에 결합된 라벨(또는 액체상 또는 둘 다에 잔존하는 라벨)의 검출을 표준 절차에 따라 수행한다.
- <78> 총 proBNP 에 결합하는 제 2 항체는, 천연 proBNP 및 총 proBNP 모두에 존재하는 천연 proBNP 에피토프 이외의 에피토프에 결합한다. 천연 proBNP 분자상의 이들 두 에피토프에 대한 양 항체의 동시 결합이 가능함에 틀림없는데, 이는, 그렇지 않을 경우 샌드위치 복합체가 형성될 리 없기 때문이다.
- <79> 본 발명의 연구원들은 또한 상술한 샌드위치 분석에 매우 적합한 proBNP 상의 에피토프를 동정하였다.
- <80> 다수의 단일클론 항체가 생성되었다. 재조합 proBNP 상에서 인지되는 모든 에피토프가 환자 샘플의 proBNP 측정에 동일하게 적합하지는 않다는 것을 확인할 수 있다.
- <81> 각각 MAB 17.3.1, 18.4.34, 및 18.29.23 에 의해 인지되는 본질적으로 각 아미노산 13-16, 27-31, 및 64-67 로 이루어진 세 가지 에피토프는 대다수의 (N-말단) proBNP 분자에 존재하는 것으로 나타났는 바, 즉 총 proBNP 의 에피토프이다. 이들 하이브리도마는 2003년 5월 7일에 DSMZ 에 기탁되었다. 상기 하이브리도마에 의해 제조된 항체는 총 proBNP 의 측정을 위한 이상적인 틀을 나타낸다. 경쟁적 분석 유형에서 단독으로 사용되거나 또는 샌드위치 분석에서 서로 조합 또는 PAB 가 총 proBNP 와 반응하면서 사용될 경우, 총 proBNP 를 쉽게 측정할 수 있다.
- <82> 본 발명에 따른 바람직한 하이브리도마 세포주인 MAB<NT-proBNP>1.21.3 (= MAK<NT-proBNP> 1.21.3= MAB 1.21.3), MAB<NT-proBNP>17.3.1, MAB<NT-proBNP>18.4.34 및 MAB<NT-proBNP>18.29.23 을, 특허 절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한 부다페스트 조약에 의해 독일의 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) 에 기탁하였다:

세포주	기탁번호	기탁일
MAB<NT-proBNP>17.3.1	DSM ACC 2591	2003년 5월 7일
MAB<NT-proBNP>18.4.34	DSM ACC 2592	2003년 5월 7일
MAB<NT-proBNP>18.29.23	DSM ACC 2593	2003년 5월 7일
MAB<NT-proBNP>1.21.3	DSM ACC 2650	2004년 4월 27일

- <84> 상기 세포주에서 얻을 수 있는 항체는 본 발명의 바람직한 구현예이다.
- <85> 천연 proBNP 의 검출에서, 상술한 바와 같이 총 proBNP 에 대한 단일클론 항체를 바람직하게, 샌드위치 분석에서 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 항체와 조합하여 사용한다. 이 경우, 상기 샌드위치 분석은 총 proBNP 의 천연 proBNP 하위 집단만을 특이적으로 검출하는 결과를 낳는다. 천연 proBNP 측정을 위한 상기 샌드위치에서 총 proBNP 에 대한 바람직한 항체는 본질적으로 아미노산 13-16, 27-31, 및 64-67 에 각각 결합하는 항체이다. 예컨대, 이들 에피토프는 각각 MAB 17.3.1, 18.4.34, 및 18.29.23 에 의해 인지된다. 가장 바람직하게는 MAB 18.4.34 과 같이 아미노산 27 - 31 에 결합하는 항체를 천연 proBNP 의 샌드위치 분석에 사용한다.
- <86> 당업자에 공지된 모든 생물학적 액체를 시험관내(in vitro) 천연 proBNP 의 특이적 검출 방법에서 샘플로서 사용할 수 있다. 시험관내 진단용으로 바람직한 샘플은 전혈, 혈청, 혈장, 소변 또는 타액과 같은 체액이다. 각각 혈청 또는 혈장을 사용하는 것이 특히 바람직하다.
- <87> 상술한 바와 같은 액상 시약을 이용한 이른바 습윤 시험(wet test) 외에, 항원, 합텐, 펩티드, 단백질, 항체 등의 검출에 적합한 모든 표준 건조 시험 유형도 사용할 수 있다. 예를 들어 EP-A-0 186 799 에 기재된 바와 같은 건조 시험물 또는 테스트 스트립(strip)은 분석 대상 샘플을 제외하고는 모든 시험 성분을 하나의 담체에 결합시킨다.
- <88> 바람직한 구현예에서, 본 발명은 천연 proBNP 의 검출 및 천연 proBNP 수준을 심부전의 존재와 상호연관시키는 것을 포함하는 심부전의 진단 방법에 관한 것이다. 천연 proBNP 수준이 심부전의 부재 또는 그 경중도를 확인하는데 사용될 수도 있다는 것을 당업자라면 이해할 수 있을 것이다.
- <89> 또한, 바람직하게 천연 proBNP 측정법을 심부전 환자의 예후 관찰 및 치료 모니터링에 사용할 수 있다.
- <90> 추가적인 바람직한 구현예는 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 항체 및 천연 proBNP 검출용 보조 시약을 포함하는 천연 proBNP 측정용 키트에 관한 것이다.
- <91> 하기 실시예, 참조 문헌, 서열 목록 및 도면은 본 발명의 이해를 돕고자 제출되며, 본 발명의 진정한 범위는 첨부된 청구의 범위에 제시된다. 본 발명의 요지를 벗어나지 않는 한, 제시된 방법에서 변형이 가능하다.

## 효 과

- <92> 본 발명은, 천연 proBNP 에 결합하는 항체, 천연 proBNP 의 특이적 검출 방법, 천연 proBNP 수준과 심부전 진단의 연관 방법, 천연 proBNP 검출 키트 및 천연 proBNP 에 대한 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주를 제공한다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <93> 실시예 1
- <94> 재조합 N-말단 proBNP (1-76) 의 제조 방법
- <95> 1. 재조합 N-말단 proBNP 의 클로닝
- <96> 유전자 합성법으로 N-말단 proBNP 의 뉴클레오타이드 서열(아미노산 서열 1-76) 을 제조하였다. 대장균(*E. coli*) 유전자의 최적 발현을 얻기 위해, DNA 서열을 대장균에서 가장 빈번하게 사용되는 코돈에 맞췄다. 유전자의 제조를 위해 사용된 올리고뉴클레오타이드 서열은 하기와 같다:

Pro5' (SEQ ID NO: 1):

5'CCGGATCCCACCCGCTG3'

Pro1hum (SEQ ID NO: 2):

5'CGGGATCCCACCCGCTGGGTTCCCCGGGTTCCGCTTCCGACCTGGAAAC  
CTCCGGTCTGCAGGAACAGCGTAACCACT3'

<97>

Pro2hum (SEQ ID NO: 3):

5'CGGTTCCAGGGAGGTCTGTTCAACCTGCAGTTCGGACAGTTTACCCTGCA  
GGTGGTTACGCTGTTCTCTGC3'

Pro3hum (SEQ ID NO: 4):

5'CAGACCTCCCTGGAACCGCTGCAGGAATCCCCGCGTCCGACCGGTGTTT  
GGAAATCCCGTGAAGTTGCTAC 3'

Pro4hum (SEQ ID NO: 5):

5'CCCAAGCTTAACGCGGAGCACGCAGGGTGACAGAACCATTTTACGGTG  
ACCACGGATACCTTCGGTAGCAACTTCACGGGATTTCC3'

Pro3' (SEQ ID NO: 6):

5'CCCAAGCTTAACGCGGAGC3'

<98>

<99>

유전자 제조는 PCR (중합효소 연쇄반응) 을 이용하여 상기 프라이머로 수행하였다. 증폭된 유전자를, 예컨대 벡터 pUC19 와 같은 적절한 벡터에서 클로닝한 후 시퀀싱하였다. 발현 벡터 pQE8 에서 유전자를 클로닝하기 위해, 상기 유전자를 제한 절단점 (restriction cutting point) Bam HI 및 Hind III 에서 pUC19 벡터로부터 절단한 후, pQE8 벡터에 연결하여 N-말단 히스티딘-태그를 지닌 단백질을 발현시키고 *E. coli* M15 [pREP4] 에 도입하였다.

<100>

2. 대장균에서의 N-말단 proBNP 의 발현

<101>

대장균의 유전자 발현을 위해, 제조한 대장균 클론의 오버나이트(over-night) 배양체를 Luria-Broth (100µg/ml 암피실린 및 50µg/ml 카나마이신) 에서 1/60 핵산전달감염(transfect)시키고, IPTG (이소프로필티오갈락토시드; 최종 농도 1 mM) 로 1 의 OD 550 에서 유도하였다. 유도 후, 배양체를 37℃에서 추가로 4 시간 배양하였다.

이어서, 배양체를 원심분리하고 세포 펠렛을 50 mM Na-인산염 완충액, pH 8.0; 300 mM NaCl 에서 수거하였다. 초음파에 의한 세포 현탁액 분해 후, 상기 현탁액을 원심분리하고, 상청액을 Ni-NTA (니트로로-트리아세테이트) 칼럼에 도입하였다. 50 mM Na 인산염 완충액, pH 8.0; 300 mM NaCl; 20 mM 이미다졸을 이용한 세척 단계 후, 히스티딘-태그(tagged) N-말단 proBNP 를 50 mM Na-인산염 완충액, pH 8.0; 300 mM NaCl; 300 mM 이미다졸로 용출하였다. 용출 분획을 수거하여 50 mM Tris pH 8.0 로 투석하였다. 불순물을 분리하기 위해, 투석액을 Q-세파로스 칼럼에 도입하였다. 정제된 N-말단 proBNP 질량을 MALDI-TOF 로 측정하였다. 상기 제조물 (= 재조합 proBNP) 은 proBNP 1-76 및 proBNP 1-66 를 함유하는 것으로 밝혀졌으며, 후자는 분해 산물을 나타낼 가능성이 크다.

<102>

실시예 2

<103>

NTproBNP (1-76) 아미드의 합성

<104>

NTproBNP (1-76) 아미드 (swissprot: 기탁번호 P16860; aa 27 - aa 134) 를 ABI 433 펩티드 합성기 상에서 최적화 고체상 펩티드 합성 프로토콜 (optimized solid phase peptide synthesis protocol) (Merrifield (1962) Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 21,412) 에 의해 합성하였다. 요약하면, Rink-Linker 변형 폴리스티렌 고체상에서, 결사슬 작용기에 따라 일시적 피페리딘 불안정(labile) Fmoc- 및 영구적 산 불안정 tBu-, BOC-, OtBu-, Trt- 또는 Pmc-기에 의해 각각 보호되는 8 배 과량의 아미노산을 반복적으로 접합시킴으로써 펩티드를 조립하였다. 산화 안정성 물질을 얻기 위해, 10 번 위치의 메티오닌을 등량의 아미노산 노르루신으로 대체하였다. 또한, 단백질 분해에 대응하여 안정화시키기 위해, C-말단을 Rink 연결을 이용하여 아미드화(amidate)하였다. 상기 조립 후, 완전히 보호된 펩티드를 고체상으로부터 제거하고, 영구적 보호기를 적절한 양이온 스캐빈저(scavenger) 혼합물 중의 트리플루오르아세트산으로 처리하여 이탈시키고, 마지막으로 제조용 역상 HPLC 정제에 의해 분리하였다. 세 번의 125 µmol 스케일 합성으로 각각 16.0, 17.1 및 18.0 mg RP-HPLC 단일 피크의 순수 물질 (동결건조물) 을 수득하였다. 그 동일성은 MALDI- 및 ESI-질량 분석법

[8439.4] 에 의해 입증되었다.

- <105> 실시예 3
- <106> 총 또는 천연 proBNP 각각에 대한 단일클론 항체의 제조 및 스크리닝
- <107> 1. N-말단 proBNP 에 대한 단일클론 항체의 수득
- <108> 8-12 주령의 Balb/c 마우스를 완전 프로인트 항원보강제와 함께 100 $\mu$ g N-말단 proBNP 항원으로 복강내 면역시켰다. 각각 펩티드 합성에 의해 합성 제조된 재조합 및 proBNP (1-76) 를 마우스 내에서 항원으로 사용하였다. 6 주 후, 4 주 간격으로 세 번의 면역화를 추가로 수행하였다. 마지막 면역화 후 일주일 후에 혈액을 채취하고, 시험 동물 혈청 중의 항체 타이터(titre)를 측정하였다. 양성 반응한 마우스의 지라로부터 B-림프구를 수득하고, 영구 골수종 세포주와 융합하였다. 상기 융합은 공지된 Koehler 및 Millstein (Nature 256, 1975, p. 495-497) 법에 의해 수행하였다. 양성 하이브리도마의 1차 배양물을, 예컨대 시판 중인 세포 분류기 또는 "한계 희석법(limiting dilution)" 등의 통상의 방법으로 클로닝하였다.
- <109> 복수(ascites) 생성을 위해, 미리 0.5 ml Pristan 으로 1-2회 처리한 Balb/c 마우스에  $5 \times 10^6$  하이브리도마 세포를 복강내 주입하였다. 2-3 주 후, 마우스의 복부 부위로부터 복수를 수득하였다. 그로부터, 통상의 방법으로 항체를 분리하였다.
- <110> 2. 인간 혈청내 proBNP, 합성 proBNP 및 proBNP 펩티드 각각에 대한 단일클론 항체의 스크리닝 시험
- <111> 하이브리도마 세포의 배양 상청액내 proBNP 에 대한 항체의 존재를 확인하기 위해, 세 가지 스크리닝 분석 유형에 따라 상청액을 평가하였다.
- <112> a) 합성 N-말단 proBNP 와의 반응성
- <113> 마이크로타이터 플레이트 (Nunc, Maxisorb) 에, 로딩 버퍼(loading buffer) (Coating buffer, Cat. No. 0726 559, Scil Diagnostics, GmbH) 100  $\mu$ l/웰 내의 항원으로서 2.5  $\mu$ g/ml 합성 NT-proBNP 를 교반하, 실온에서 1 시간 동안 결합시켰다. 포스트-로딩(post-loading)은 PBS 완충액 (인산염 완충 식염수, Oxid, Code-BR 14a) 및 1% Byco C 에서 30 분간 수행하였다. 이어서, 세척 완충액 (0.9 염화나트륨 용액, 0.05% Tween 20) 으로 세척을 수행하였다. 항체 샘플의 배양을, 실온에서 교반하에 1 시간 동안 100  $\mu$ l/웰로 수행하였다. 그 후, 세척 용액을 이용한 세척 단계를 추가로 2 회 실시하였다. 이어서, 검출용 항체 PAB < M-Fcy > Goat-F(ab')<sub>2</sub>-페록시다아제 콘쥬게이트 (Chemicon, Cat. No. AQ127P), 100 mU/ml, 100  $\mu$ l/웰을 이용하여 실온에서 교반하에 1 시간 동안 추가 배양하였다. 세척 완충액을 이용한 추가 세척 단계 후, 통상의 방법으로 페록시다아제 활성을 확인하였다 (예를 들어, ABTS® 이용, 실온에서 30 분간, ELISA 판독기에 의해 405 nm 에서 소멸차(extinction difference)를 mU 단위로 읽음).
- <114> b) 에피토프 분석을 위한 합성 펩티드를 이용한 에피토프의 특성화
- <115> 에피토프 분석을 위해, 스트렙타비딘-적재 마이크로타이터 플레이트를 proBNP (1-76) 서열로부터 유래된 펩티드 비오틴 콘쥬게이트로 배양하였다. 완전한 proBNP-서열을, 서열을 따라 순차적으로 단일 아미노산 단위로 시프팅된 69 개의 8-머 펩티드, 즉 각각 1-8, 2-9, 3-10, 4-11 에서 66-73, 67-74, 68-75, 및 69-76 까지를 적용함으로써 스캐닝하였다. 추가적인 비오틴화 서열을 각 아미노산 위치 1-10, 8-18, 1-21, 16-30, 30-38, 32-43, 39-50, 47-57, 50-63, 62-70 및 64-76 을 포함하여 시험하였다. 개별적 항원성 펩티드를 0.5% Byco C 와 함께 PBS 완충액 (인산염 완충 식염수, Oxid, Code-BR 14a) 에 250 ng/ml 용해시켰다. 펩티드 코팅을 위해, 각 용액 100  $\mu$ l 를 마이크로타이터 플레이트의 별도 웰에 분배한 후, 실온에서 1 시간 동안 가볍게 흔들었다. 이어서, 세척 완충액 (0.9m 염화나트륨 용액, 0.05% Tween 20) 으로 세척을 수행하였다. a) 에 기재한 바와 같이 항체 샘플 배양 및 검출 반응을 실시하였다. 특정 NT-proBNP 펩티드와의 반응성으로 인해, 단일- 또는 다클론 항체에 의해 인지된 에피토프의 위치를 나타낼 수 있었다.
- <116> PepScan 의 예는 도 1 에 나타내었다. 하이브리도마 1.21.3 에 의해 분비된 단일클론 항체는 펩티드 번호 39 - 42 와 강하게 반응한다. 이는 proBNP 의 아미노산 41 - 46 (SEQ ID NO: 11) 로 이루어진 공유 에피토프와 일치한다
- <117> c) 환자 샘플내 proBNP 와의 반응성
- <118> 마이크로타이터 플레이트의 웰 (Nunc, Maxisorb) 을, 로딩 버퍼 (Coating buffer, Cat.No. 0726 559, Scil

Diagnostics, GmbH) 중의 5  $\mu\text{g/ml}$  PAB < 인간 proBNP > S-IgG (IS, (1-21) 또는 (30-38) S-IgG 로, 100  $\mu\text{l}$ /웰, 실온에서 교반하 1 시간 동안 코팅하였다. 포스트-로딩을 PBS 완충액 (인산염 완충 식염수, Oxid, Code-BR 14a) 및 1% Byco C 에서 30 분간 수행하였다. 이어서, 세척 완충액 (0.9 염화나트륨 용액, 0.05% Tween 20) 을 이용하여 세척을 수행하였다. PBS 완충액으로 희석된 환자 혈장의 천연 항원을 이용한 배양을, 실온에서 교반하에 100  $\mu\text{l}$ /웰로 1 시간 수행하였다. 추가 세척 단계 후, 하이브리도마 상청액의 배양을 실온에서 교반하에 100  $\mu\text{l}$ /웰로 1시간 수행하였다. 이어서, 세척 용액으로 세척을 2 회 실시하고, 검출 항체 PAB < M-Fcy > 염소-F(ab')<sub>2</sub>-페록시다아제 콘주게이트 (Chemicon, Cat. No. AQ127P) 를 이용하여, 100 mU/ml, 100  $\mu\text{l}$ /웰, 실온에서 교반하에 1 시간 동안 추가로 배양하였다. 세척 완충액을 이용한 추가적 세척 단계 후, 페록시다아제 활성을 통상의 방법으로 확인하였다 (예를 들어, ABTS®, 실온에서 30 분간, ELISA 관독기에 의해 405 nm 에서 소멸차를 mU 단위로 읽음).

- <119> 합성 제조된 N-말단 proBNP 또는 인간 혈청 중의 proBNP 와 양성 반응하는 하이브리도마 배양체만을 추가 처리하였다.
- <120> 실시예 4
- <121> pro BNP 에 대한 양(sheep) 단일클론 항체의 제조
- <122> 1. N-말단 proBNP 에 대한 양 단일클론 항체의 수득
- <123> 양을 완전 프로인트 항원보강제 내의 제조합 N-말단 proBNP 으로 면역화하였다. 투여량은 동물 1 마리 당 0.1 mg 이었다. 면역화 작업은 10 개월에 걸쳐 4 주 간격으로 반복하였다. 첫 번째 면역화 후 6 주째 및 그 이후 한 달에 한 번씩 혈청 샘플을 수득하고 이의 민감도 및 타이터를 시험하였다.
- <124> 융합용 림프구를 면역화된 양의 림프절로부터 수득하였다. 따라서, 림프절 제거 3 일전, 제조합 N-말단 proBNP 를 이용하여 서혜부(inguinale) 양 림프절에 직접 최종 추가 접종을 수행하였다.
- <125> 림프절을 외과적으로 절제한 후, 멸균 조건하에 림프구를 제조 및 분리하였다. 1 림프절에서 약  $2 \times 10^9$  세포가  $1 \times 10^8$  세포/비알(vial) 밀도로 액체 질소에 저장된다.
- <126> 융합을 위해, 1 비알의 냉동된  $1 \times 10^8$  림프절 림프구를 해동하고 융합제(fusing agent) 인 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 함께 히포산틴 및 티미딘 민감성 골수중/이종골수중 세포 (마우스 NS1 x 양 림프구, 클론 1 C 10, Bioventix, Inc.) 와 2 : 1 비율로 혼합하였다.
- <127> 수 개의 96-웰 플레이트에 웰 당  $1-3 \times 10^4$  세포 (또는 이종골수중) 를 분주하고, 선택 배지에서 배양하였다. 8-10 일 후, ELISA 분석에 의해 하이브리도마 세포의 N-말단 pro BNP 에 대한 반응성에 관한 연구 및 스크리닝을 실시하였다.
- <128> 양성 하이브리도마의 1차 배양체를 시판 중인 세포 분류기 또는 "한계 희석법"을 이용하여 통상의 방법으로 클로닝하였다.
- <129> 2. proBNP 펩티드, 합성 proBNP, 및 인간 혈청의 proBNP 각각에 대한 단일클론 항체의 스크리닝 시험
- <130> 하이브리도마 세포의 배양 상청액내 proBNP 에 대한 항체의 존재를 확인하기 위해, 세 가지 스크리닝 분석 유형에 따라 상청액을 평가하였다.
- <131> a) 합성 N-말단 proBNP 와의 반응성
- <132> 마이크로타이터 플레이트 (Nunc, Maxisorb) 를, 실온에서 교반하에 로딩 버퍼 (Coating buffer, Cat. No. 0726 559, Scil Diagnostics, GmbH) 100  $\mu\text{l}$ /웰 내의 항원으로서 2.5  $\mu\text{g/ml}$  합성 NT-proBNP 로 1 시간 동안 코팅하였다. 포스트-로딩은 PBS 완충액 (인산염 완충 식염수, Oxid, Code-BR 14a) 및 1% Byco C 에서 30 분간 수행하였다. 이어서, 세척 완충액 (0.9 염화나트륨 용액, 0.05% Tween 20) 으로 세척을 수행하였다. 항체 샘플의 배양을, 실온에서 교반하에 1 시간 동안 100  $\mu\text{l}$ /웰로 수행하였다. 그 후, 세척 용액을 이용한 세척 단계를 추가로 2 회 실시하였다. 이어서, 검출용 항체 페록시다아제-접합된 AffiniPure Donkey Anti-Sheep IgG (Dianova Code Number 713-035-147) (PBS 완충액에서 1 : 40000 으로 희석), 100  $\mu\text{l}$ /웰을 이용하여 실온에서 교반하에 1 시간 동안 추가 배양하였다. 세척 완충액을 이용한 추가 세척 단계 후, 통상의 방법으로 페록시다아제 활성을 확인하였다 (예를 들어, ABTS® 이용, 실온에서 30 분간, ELISA 관독기에 의해 405 nm 에서

소멸차를 mU 단위로 읽음).

<133> b) 에피토프 분석을 위한 합성 펩티드를 이용한 에피토프의 특성화

<134> 에피토프 분석을 위해, 스트렙타비딘-적재 마이크로타이터 플레이트를 proBNP (1-76) 서열로부터 유래된 펩티드 비오틴 콘주게이트로 배양하였다. 완전한 proBNP-서열을, 서열을 따라 순차적으로 단일 아미노산 단위로 시프팅된 69 개의 8-머 펩티드, 즉 각각 1-8, 2-9, 3-10, 4-11 에서 66-73, 67-74, 68-75, 및 69-76 까지를 적용함으로써 스캐닝하였다. 추가적인 비오틴닐화 서열을 각 아미노산 위치 1-10, 8-18, 1-21, 16-30, 30-38, 32-43, 39-50, 47-57, 50-63, 62-70 및 64-76 을 포함하여 시험하였다. 개별적 항원성 펩티드를 0.5% Byco C 와 함께 PBS 완충액 (인산염 완충 식염수, Oxid, Code-BR 14a) 에 250 ng/ml 용해시켰다. 펩티드 코팅을 위해, 각 용액 100  $\mu$ l 를 마이크로타이터 플레이트의 별도 웰에 분배한 후, 실온에서 1 시간 동안 가볍게 흔들었다. 이어서, 세척 완충액 (0.9m 염화나트륨 용액, 0.05% Tween 20) 으로 세척을 수행하였다. a) 에 기재한 바와 같이 항체 샘플 배양 및 검출 반응을 실시하였다. 특정 NT-proBNP 펩티드와의 반응성으로 인해, 단일- 또는 다클론 항체에 의해 인지된 에피토프의 위치를 나타낼 수 있었다.

<135> c) 환자 샘플내 proBNP 와의 반응성

<136> 마이크로타이터 플레이트의 웰 (Nunc, Maxisorb) 을, 로딩 버퍼 (Coating buffer, Cat.No. 0726 559, Scil Diagnostics, GmbH) 중의 5  $\mu$ g/ml MAB < 인간 proBNP > M-18.4.34-IgG 로, 100  $\mu$ l/웰, 실온에서 교반하 1 시간 동안 코팅하였다. 포스트-로딩을 PBS 완충액 (인산염 완충 식염수, Oxid, Code-BR 14a) 및 1% Byco C 에서 30 분간 수행하였다. 이어서, 세척 완충액 (0.9 염화나트륨 용액, 0.05% Tween 20) 을 이용하여 세척을 수행하였다. PBS 완충액으로 희석된 환자 혈장의 천연 항원을 이용한 배양을, 실온에서 교반하에 100  $\mu$ l/웰로 1 시간 수행하였다. 추가 세척 단계 후, 하이브리도마 상청액의 배양을 실온에서 교반하에 100  $\mu$ l/웰로 1시간 수행하였다. 이어서, 세척 용액으로 세척을 2 회 실시하고, 검출용 항체 페록시다아제-접합된 AffiniPure Donkey Anti-Sheep IgG (Dianova Code Number 713-035-147) (PBS 완충액 내에서 1:40000 으로 희석) 를 이용하여, 100 mU/ml, 100  $\mu$ l/웰, 실온에서 교반하에 1 시간 동안 추가로 배양하였다. 세척 완충액을 이용한 추가적 세척 단계 후, 페록시다아제 활성을 통상의 방법으로 확인하였다 (예를 들어, ABTS®, 실온에서 30 분간, ELISA 판독기에 의해 405 nm 에서 소멸차를 mU 단위로 읽음).

<137> 합성 제조된 N-말단 proBNP 또는 인간 혈청 중의 proBNP 와 양성 반응하는 하이브리도마 배양체만을 추가 처리하였다.

<138> 실시예 5

<139> N-말단 proBNP 에 대한 다클론 항체의 제조

<140> 1. 면역화

<141> 양을 완전 프로인트 항원보강제 내의 재조합 N-말단 proBNP (실시예 1 참조) 로 면역화하였다. 그 투여량은 동물 1 마리당 0.1 mg 이었다. 10 개월에 걸쳐 4 주 간격으로 면역화 작업을 반복하였다. 첫 번째 면역화 후 6 주째 및 그 후 한 달에 한 번씩 혈청 샘플을 채취하여 그 민감도 및 타이터를 시험하였다.

<142> 2. 양 혈청에서 유래된 다클론 항체의 정제

<143> 재조합 N-말단 proBNP 로 면역화된 양의 미정제 혈청으로부터, 지질 성분을 aerosil® (1.5 %) 로 탈지처리하여 제거하였다. 그 후, 암모늄 설페이트 침전 (2 M) 에 의해 면역글로불린을 분리하였다. 용해된 침전물을 15 mM KPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl pH 7.0 에 대해 투석하고, DEAE 세파로스에 크로마토그래피를 실시하였다. IgG 분획 (= PAB < NT-proBNP > S-IgG (DE)) 을 플로우 스루(flow through)에서 수득하였다.

<144> 3. 총 proBNP 에 특이적인 다클론 항체의 제조를 위한 어피니티 크로마토그래피

<145> 총 proBNP (= PAB < NT-proBNP > S-IgG (IS,1-21), 또는 간단하게 PAB < 1-21 >) 에 특이적으로 결합하는 다클론 항체의 어피니티 정제를 위해, 펩티드 HPLGSPGSASDLTSLQEQR-C ((1-21) 21-Cys, SEQ ID NO: 7) 를 사용하였다. 펩티드 (1-21) 21-Cys 1 mg 와 말레이미드 활성화 EAH-세파로스 4B (Amersham Biosciences, Product No 17-0569-01) 2 ml 의 공유 결합에 의해 어피니티 매트릭스를 제조하였다.

<146> 어피니티 매트릭스 10 ml 로 컬럼을 채우고, 50 mM KPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl pH 7.5 (PBS) 로 평형을 맞췄다. 2g 의 PAB < NT-proBNP > S-IgG (DE) 를 칼럼에 도입하였다. 상기 칼럼을 PBS 및 20 mM KPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl,

0.1 % Triton X-100, 0.5% Na-디옥시콜산 pH 7.5 로 세척하였다. 어피니티 매트릭스에 특이적으로 결합된 IgG 를 ImmunoPure® Gentle Ag/Ab 용출 완충액 (Pierce, Product N° 21013) 으로 용출하였고, 이를 PAB < 1-21 > 이라 칭한다.

<147> 어피니티 매트릭스를 1 M 프로피온산으로 재생하고 PBS/NaCl 에 보존하였다.

<148> 총 proBNP 에 특이적인 어피니티 정제된 다클론 항체 PAB < NT-proBNP > S-IgG (IS, 30-38), 또는 간단하게 PAB < 30-38 > 을 생성하기 위해 유사한 절차를 이용하였다 (Karl, J. 등, WO 00/45176).

<149> 4. 천연 proBNP 에 특이적인 다클론 항체의 제조를 위한 어피니티 크로마토그래피

<150> 천연 proBNP 에 대한 다클론 항체 (= PAB < NT-proBNP > S-IgG (IS, 41-46), 또는 간단하게 PAB < 41-46 >) 를 연속 어피니티 크로마토그래피(sequential affinity chromatography)에 의해 수득하였다. 상술한 바와 같은 방법으로, 3 가지 개별 펩티드, CEUEU-SLEPLQE ((37-43) 37-Cys, SEQ ID NO: 8), CEUEU-SPRPTGVW ((44-51) 44-Cys, SEQ ID NO: 9) 및 C-EPLQESPRPTG ((39-50) 39-Cys, SEQ ID NO: 10) (EUEU 는 뒤에 오는 펩티드를 위한 연장된 링커(extended linker)로서의 기능만 함) 를 사용하여 3 가지 개별 어피니티 매트릭스를 제조하였다.

NT-proBNP 서열 37-43에 주로 결합된 모든 다클론 항체를 제거하기 위해, (37-43) 37-Cys 펩티드를 함유한 어피니티 매트릭스에 PAB < NT-proBNP > S-IgG (DE) 를 우선 도입하였다. 이어서, (44-51) 44-Cys 펩티드를

함유한 제 2 어피니티 매트릭스에 플로우 스트림을 도입하여 NT-proBNP 서열 44-51 에 주로 결합하는 다클론 항체를 포획하였다. 결합된 항체를 용출하고 상술한 바와 같이 수거하였다 (=PAB < 44-51 >). 마지막으로,

제 2 어피니티 정제의 플로우 스트림을 (39-50) 39-Cys 펩티드를 함유한 제 3 어피니티 매트릭스로 전달하였다.

결합된 항체를 용출하고 상술한 바와 같이 수거하였다. PepScan 분석이라 불리는 공지된 방법에 의해 측정된 바, 제 3 어피니티 매트릭스의 용출된 항체는 서열 41-46 (=PAB < 41-46 >) 의 에피토프에 대해 특이적이며, 이는 37-43 및 44-51 사이의 오버래핑 서열의 잔여 에피토프를 나타낸다.

<151> 실시예 6

<152> proBNP 에 대한 단일클론 및 다클론 항체의 Biacore 분석

<153> 천연 NT-proBNP 에 대한 단일클론 및 다클론 항체의 특이성을 Biacore 3000 분석기를 이용하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정하였다. 모든 표면 플라즈몬 공명 측정은 실험용 CM5 센서칩을 구비한 Biacore 3000 분석기를 이용하여 25°C에서 수행하였다. 런닝 버퍼(running buffer)는 HBS (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA 및 0.005 % P20 (=Polysorbate), pH 7.4) 였다.

<154> \*1. 리간드 PAB < NT-proBNP, 1-21 > S-IgG 의 부동화

<155> 총 NT-proBNP 에 대한 포획 항체(capture antibody)로 사용된 리간드를 아민-커플링 화학반응을 이용하여 부동화하였다. 커플링 전에, 0.1 % SDS, 50 mM NaOH, 10 mM HCl 및 100 mM 인산을 10 µl 주입하여 20 µl/분의 유속에서 센서칩을 미리 조건화하였다. 모든 플로우 셀 (flow cell) 의 표면을 유속 20µl/분의 0.1 M NHS (N-히드록시수신이미드) 및 0.1 M EDC (3-(N,N-디메틸-아미노)프로필-N-에틸카르보디이미드)의 1:1 혼합물로 5 분간 활성화하였다. 10 mM 소듐아세테이트, pH 5.0 내 30 µg/ml 농도의 리간드를 모든 4 플로우 셀에 5 분간 주입하였다. 1 M 에타놀아민, pH 8.0 을 5분간 주입한 다음, HBSwash (100mM HEPES pH 7.4, 1.5 M NaCl, 3.4mM EDTA, 0.05% P20 (=Polysorbate), 2 % DMSO), 100 mM HCl 및 2 x 100 mM 인산을 30 초간 주입함으로써 표면을 블로킹하여, 비공유 결합 리간드를 제거하였다. 상기 리간드의 밀도는 약 16.000 RU 였다.

<156> 2. 환자 샘플의 NT-proBNP 농도 측정

<157> Biacore 3000 에서 하기 방법을 수행하기 위해, 도 2 에 첨부된 프로그램을 사용하였다. 20% 말 혈청(1 mg/ml 카르복시메틸텍스트란 + HBS 로 1:5 로 희석된 말 혈청)내 0, 2.5, 5, 10, 20 및 40 nM 농도의 합성 NT-proBNP(1-76)아미드를 보정기로 사용하였다. 카르복시메틸텍스트란을 첨가하여 혈청 성분이 센서칩 표면에 비특이적으로 결합하는 것을 방지하였다.

<158> > 10 ng/ml 천연 NT-proBNP 를 함유한 환자 샘플을 1 mg/ml 카르복시메틸텍스트란도 함유한 HBS 를 이용하여 1:5 로 희석하였다.

<159> 보정기 및 환자 샘플을 10µl/분의 유속으로 10분간 모든 4 개 플로우 셀에 주입한 후, HBS 를 100µl/분의 유속으로 30초간 주입하여 비특이적으로 결합된 혈청 성분을 제거하였다. 그 특이성을 측정하고자 하는 항체를 HBS 내 500 nM 농도, 10 µl/분의 유속으로 3 분간 주입하였다. 플로우 셀 1 은 항체 1, 플로우 셀 2 는 항

체 2 등으로 하였다. 항체의 RU 단위의 결합 데이터, 항체 주입 10 초 전 반응과 다음 항체 또는 HBS 각각의 주입 10초 전 반응 사이의 차로써 측정하였다.

<160> 환자 샘플내의 NT-proBNP 농도 계산을 위해, BIA 평가 소프트웨어 버전 4.1 을 이용하였다. 각 항체에 대해, 합성 NT-proBNP (1-76) 아미드의 보정 곡선을 spline fit 을 이용하여 생성하고, 1:5 희석 환자 샘플의 대응 농도를 계산하였다. 상기 농도에 5 를 곱하여 희석되지 않은 혈청내 NT-proBNP 의 농도를 얻었다.

<161> 3. 항체의 특이성 측정

<162> 항체가 인간 혈청의 천연 또는 총 NT-proBNP 에 결합하는지 여부를 결정하기 위해, 문제의 항체를 이용하여 측정된 NT-proBNP 의 농도 (y-축) 를, 참조 항체 MAB 1.21.3 으로 측정된 대응 샘플의 농도 (x-축) 에 대하여 플롯팅하였다. MS-엑셀을 이용하여  $y = ax + b$  유형의 선형 회귀 곡선을 그리고, 상관계수 r 및 기울기를 계산하였다.

## 표 1

<163> 다양한 항-proBNP 항체의 특성

항체	인지된 에피토프	합성 proBNP	환자 샘플 proBNP
MAB 17.3.1	아미노산 13-16	+++	+++
MAB 18.4.34	아미노산 27-31	+++	+++
MAB 18.29.23	아미노산 62-76	+++	+++
MAB 1.21.3	아미노산 42-46	+++	+
PAB < 1-21 >	아미노산 1-21	+++	+++
PAB < 44-51 >	아미노산 44-51	+++	++
PAB < 41-46 >	아미노산 41-46	+++	+

<164> +++ 는 합성 proBNP 및 환자 샘플의 proBNP 모두 유사한 정도로 매우 잘 인지됨을 나타냄.

<165> + 는 합성 proBNP 에서 얻은 값에 비해 15% 범위인 환자 샘플 proBNP 와의 반응을 나타냄.

<166> 표 1 로부터, 대부분의 proBNP 에피토프가 합성 proBNP 및 환자 샘플내에 포함된 proBNP 상에 동일 방식으로 존재함이 명백하다. 이는, 각각 MAB 17.3.1, MAB 18.4.34, MAB 18.29.23 및 PAB < 1-21 > 로 예시된다.

<167> 그러나, 한 에피토프는 합성 proBNP 및 환자 샘플내에 포함된 proBNP 상에 동일 방식으로 존재하지 않는 것으로 추측된다. 이 에피토프는 본질적으로 아미노산 41-44 로 이루어지며, MAB 1.21.3 및 PAB < 41-46 > 에 의해 인지된다. 상기 면역학적 시약을 이용하면, 환자 샘플내에 존재하는 총 proBNP 의 하위집단만이 인지될 것으로 생각된다.

<168> 이는 환자 샘플내의 proBNP 를 총 proBNP 분석 또는 천연 proBNP 분석으로 측정할 경우 각각 현저하게 다른 결과를 가져온다. 상기 총 proBNP 의 하위집단만이 천연 proBNP 에 특징적인 에피토프를 지니는 것으로 보인다.

<169> 도 3 내지 7 로써 명백한 바와 같이, PAB < 41-46 > 은 MAB 1.21.3 과 매우 밀접한 상관관계를 나타내는 반면, 총 proBNP 에 대한 항체, 즉 MAB 18.4.34, MAB 18.29.23 및 PAB 30-38 은 MAB 1.21.3 에 대하여 훨씬 낮은 상관관계를 보인다. PAB < 44-51 > 은 흥미롭게도 혼합 반응성(mixed reactivity)을 보이며, MAB 1.21.3 에 대하여  $r=0.95$  미만의 상관관계를 가지므로 천연 proBNP 에 특이적으로 결합하는 항체로서는 적합하지 않다.

<170> 실시예 7

<171> 각 천연 및 총 proBNP 분석의 임상 비교

<172> 임상 연구에서, NYHA-상태에 따라 분류된 246 개의 환자 샘플을 각각 천연 proBNP 및 총 proBNP 에 대한 샌드위치 면역측정법에 의해 분석하였다. 이 연구의 결과를 표 2 에 나타내었다.

## 표 2

<173> 환자 샘플의 총 proBNP 및 천연 proBNP 의 비교 분석

NYHA	n	천연 proBNP 임의 단위	NYHA X/ NYHA 0	총 proBNP pg/ml	NYHA X/ NYHA 0
0	119	337	1,0	638	1,0
1	32	355	1,1	717	1,1
2	62	655	1,9	1072	1,7
3	30	2947	8,7	3609	5,6
4	3	12755	38	15902	25

<174> 질병이 진행 중인 환자 (NYHA X = 등급 2 이상) 에 비해 질병이 없거나 매우 경미한 환자 (NYHA-등급 0 및 1) 의 구별이 임상적으로 매우 중요하다. 표 2 에서 알 수 있듯이, 등급 0/1 에서 등급 2 이상 사이에 상당한 증가가 있다. 모든 등급 2, 3, 및 4 에서의 이러한 증가는 총 proBNP 에 비해 천연 proBNP 에 대하여 더 분명하다. 이는 천연 proBNP 에 대한 민감도/특이성 프로파일 및 그의 임상적 효용이 총 proBNP 에 비하여 더 우수하다는 것으로 해석된다.

<175> 참조 문헌 목록

Buckley, M.G., et al., Clin. Sci. 95 (1998) 235-239  
 Cleland, J.G., et al., Heart 75 (1996) 410-413  
 Diamandis et al., eds. (1996) Immunoassay, Academic Press, Boston  
 EP-A-0 186 799  
 EP-A-0 542 255  
 Goetze, J.P., et al., Clin. Chem. 48 (2002) 1035-1042  
 Hughes, D., et al., Clin. Sci. 96 (1999) 373-380  
 Hunt, P.J., et al., Peptides 18 (1997) 1475-1481  
 Hunt, P.J., et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 214 (1995) 1175-1183  
 Hunt, P.J., et al., Clinical Endocrinology 47 (1997) 287-296  
 Köhler, G. and Millstein, C., Nature 256 (1975) 495-497  
 Mair, J., Clin. Chem. 48 (2002) 977-978  
 Mair, J., et al., Clin. Chem. Lab. Med. 39 (2001) 571-588  
 Masuta, C., et al., Clin. Chem. 44 (1998) 130  
 Merrifield, R.B., Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 21 (1962) 412  
 Sudoh, T., et al., Nature 332 (1988) 78-81  
 Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11 (1990)  
 특히 p 43-78; Elsevier, Amsterdam 전체,  
 Tsuji, T., et al., Clin. Chem. 40 (1994) 672-673  
 Urban & Schwarzenberg, 1993, Roche Medical Dictionary  
 US 5,786,163  
 US 2003/0219734  
 WO 00/35951  
 WO 00/45176  
 WO 93/24531

<176>

**도면의 간단한 설명**

<177> 도 1: MAB 1.21.3 에 대한 에피토프 동정

<178> MAB 1.21.3 의 반응성 프로파일을, 각각 아미노산 1 개씩 시프팅되어 완전한 proBNP (1-76) 서열을 커버하는 proBNP (1-76) 서열에서 유래된 69 개의 상이한 비오틴일화 8-머(biotinylated 8-mer) 펩티드를 사용하여 분석 하였다. 종결은 mE-단위로 주어졌다. 강한 반응성이 펩티드 번호 39 내지 42 에서 발견되었다.

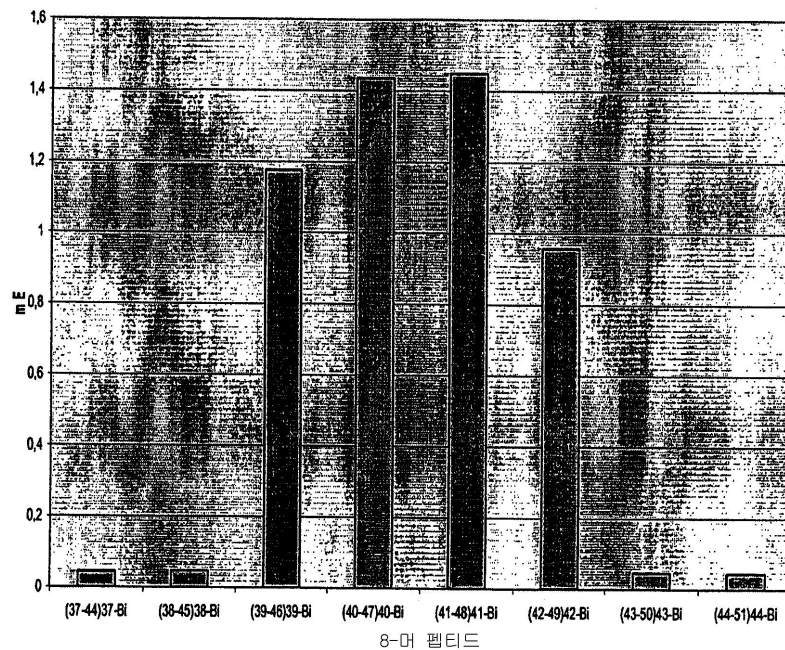
<179> 도 2: Biacore 분석에서 사용된 기계 설정

- <180> proBNP 에 대한 다양한 항체의 천연 proBNP 특이성을 본 도면에 나타낸 것과 같은 Biacore® 3000 분석기 작동 모드를 이용하여 평가하였다.
- <181> 도 3 내지 7: MAB 1.21.3 과 다양한 단일- 및 다클론 항-proBNP 항체의 상관관계
- <182> proBNP 농도 약 10mg/ml 이상 (MAB 1.21.3 및 합성 proBNP 를 보정기(calibrator)로 사용하여 측정) 인 20 개의 인간 혈청을 Biacore 3000 분석기를 이용하여 샌드위치 분석법으로 분석하였다. MAB 1.21.3 을 이용하여 측정된 값은 x-축에 주어졌다. 비교 방법에서 사용된 항체를 이용하여 측정된 대응값은 y-축에 주어졌다. MAB 1.21.3 와 MAB 18.4.34, MAB 18.29.23, PAB 30-38, PAB 44-51 및 PAB 41-46 과의 상관관계는 각각 도 3, 4, 5, 6, 및 7 에 주어졌다.

## 도면

### 도면1

에피토프 분석 양(Sheep) Mab<NTproBNP 42-46> 1.21.3



도면2a

Biacore로 기록하고 BIACORE 3000 제어 소프트웨어 버전 4.1로 실행하는,  
8개의 상이한 항체를 이용한 20개 환자 샘플 NT-proBNP 측정용 프로그램

```

DEFINE APROG Sandwich
PARAM %apo %anr %aco %bnr %bco %c1po %c1nr %c1co %c2po %c2nr %c2co %c3po %c3nr %c3co %c4po
%c4nr %c4co

KEYWORD anr %anr
KEYWORD aco %aco
KEYWORD bnr %bnr
KEYWORD bco %bco
KEYWORD c1nr %c1nr
KEYWORD c1co %c1co
KEYWORD c2nr %c2nr
KEYWORD c2co %c2co
KEYWORD c3nr %c3nr
KEYWORD c3co %c3co
KEYWORD c4nr %c4nr
KEYWORD c4co %c4co

CAPTION Sandwich: AG: %anr %aco mit %bnr %bco, AB: %c1nr, %c2nr, %c3nr, %c4nr

FLOW 10 -f
FLOWPATH 1,2,3,4

DIPNEEDLE r2e1
* QUICKINJECT %apo 100 Icalibrator/human serum
-0:10 RPOINT -b BL_start

FLOW 100
* QUICKINJECT r2f6 50 IHBS

FLOW 10 -f

FLOWPATH 1
DIPNEEDLE r2e2
* QUICKINJECT %c1po 30 IAB1/5
-0:10 RPOINT -b AG

FLOWPATH 2
DIPNEEDLE r2e3
* QUICKINJECT %c2po 30 IAB2/6
-0:10 RPOINT -b AB1

FLOWPATH 3
DIPNEEDLE r2e4
* QUICKINJECT %c3po 30 IAB3/7
-0:10 RPOINT -b AB2

FLOWPATH 4
DIPNEEDLE r2e5
* QUICKINJECT %c4po 30 IAB4/8
-0:10 RPOINT -b AB3
    
```

도면2b

```

FLOWPATH 1,2,3,4
FLOW 100

* QUICKINJECT r2f7 50 !HBS
-0:10 RPOINT -b AB4

FLOW 20

* QUICKINJECT r2e10 5 !HBSwash
* QUICKINJECT r2f3 10 !100 mM HCl
* QUICKINJECT r2f4 10 !100 mM phosphoric acid
* QUICKINJECT r2f5 10 !100 mM phosphoric acid
EXTRACLEAN
3:30 RPOINT BL_end !baseline after regen.cycle
END

DEFINE APROG Regen
CAPTION regeneration cycle
FLOW 20
FLOWPATH 1,2,3,4
* QUICKINJECT r2e10 5 !HBSwash
-0:10 RPOINT -b BL_start
* QUICKINJECT r2f3 10 !100 mM HCl
* QUICKINJECT r2f4 10 !100 mM phosphoric acid
* QUICKINJECT r2f5 10 !100 mM phosphoric acid
3:30 RPOINT BL_end !baseline after regen.cycle
END

DEFINE LOOP AG
LPARAM %apo %anr %aco %bnr %bco
TIMES 1
! %apo %anr %aco %bnr %bco
r2a1 NT-proBNP 40nM HoSer/CMD 20%/1mg/mL
r2a2 NT-proBNP 20nM HoSer/CMD 20%/1mg/mL
r2a3 NT-proBNP 10nM HoSer/CMD 20%/1mg/mL
r2a4 NT-proBNP 5nM HoSer/CMD 20%/1mg/mL
r2a5 NT-proBNP 2.5nM HoSer/CMD 20%/1mg/mL
r2a6 NT-proBNP 0nM HoSer/CMD 20%/1mg/mL
r2b1 HuSer1 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b2 HuSer2 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b3 HuSer3 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b4 HuSer4 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b5 HuSer5 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b6 HuSer6 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b7 HuSer7 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b8 HuSer8 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b9 HuSer9 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2b10 HuSer10 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c1 HuSer11 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c2 HuSer12 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c3 HuSer13 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c4 HuSer14 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c5 HuSer15 1:5 HBS/CMD 1mg/mL

```

도면2c

```

r2c6 HuSer16 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c7 HuSer17 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c8 HuSer18 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c9 HuSer19 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
r2c10 HuSer20 1:5 HBS/CMD 1mg/mL
END

DEFINE LOOP AB
LPARAM %c1po %c1nr %c1co %c2po %c2nr %c2co %c3po %c3nr %c3co %c4po %c4nr %c4co
TIMES 1
  r1a1 AB1 500nM r1a2 AB2 500nM r1a3 AB3 500nM r1a4 AB4 500nM
  r1b1 AB5 500nM r1b2 AB6 500nM r1b3 AB7 500nM r1b4 AB8 500nM
END

MAIN
RACK 2 Thermo_a
RACK 1 Thermo_c

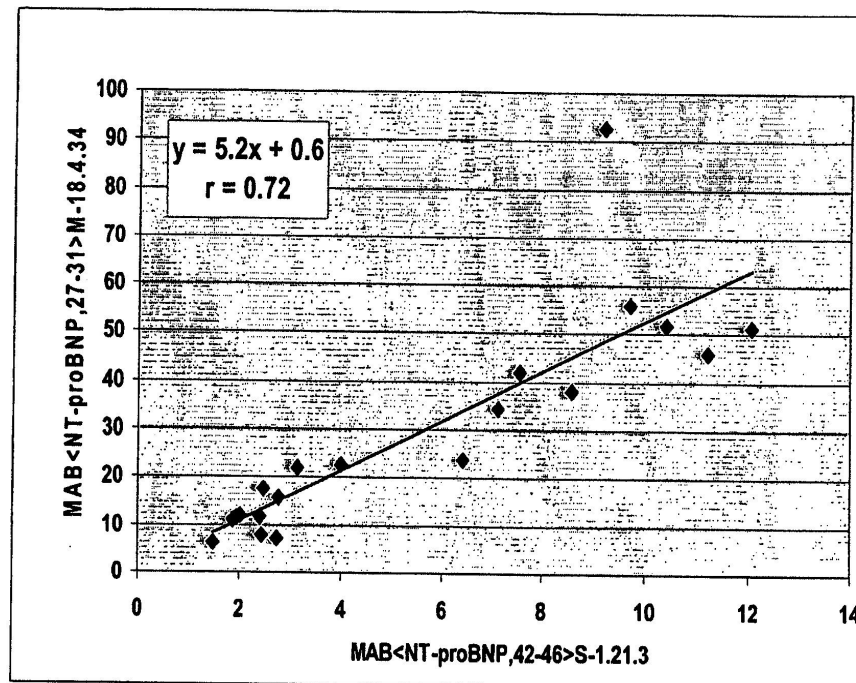
detection 1,2,3,4

LOOP AB ORDER
  APROG Regen
  unclog
  LOOP AG ORDER
    APROG Sandwich %apo %anr %aco %bnr %bco %c1po %c1nr %c1co %c2po %c2nr %c2co
    %c3po %c3nr %c3co %c4po %c4nr %c4co
  ENDOLOOP
ENDLOOP

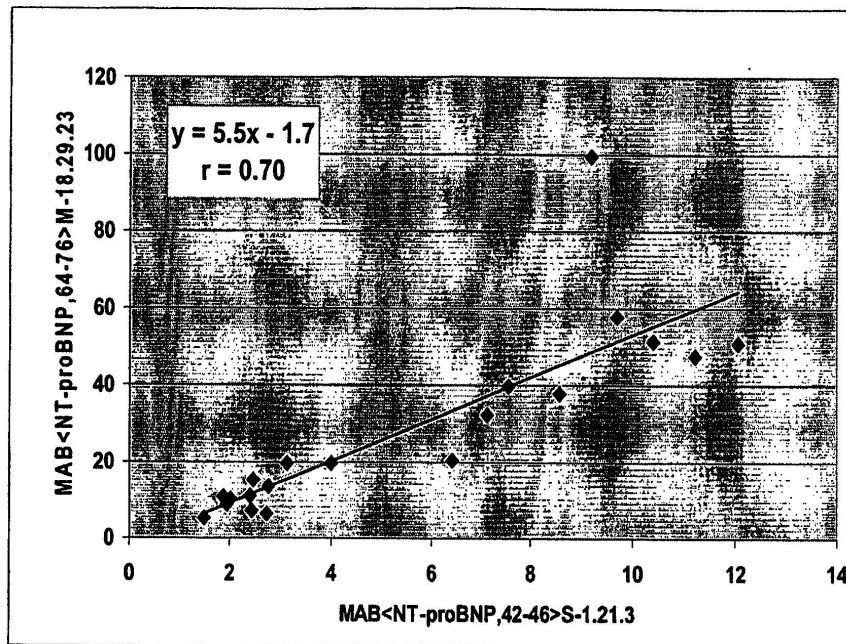
  APROG Regen
  APPEND continue
END

```

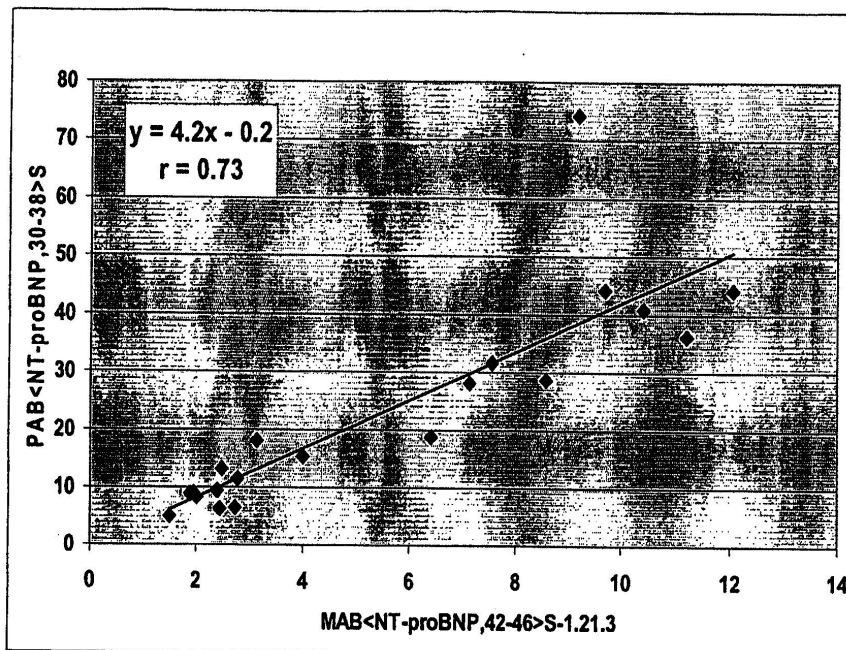
도면3



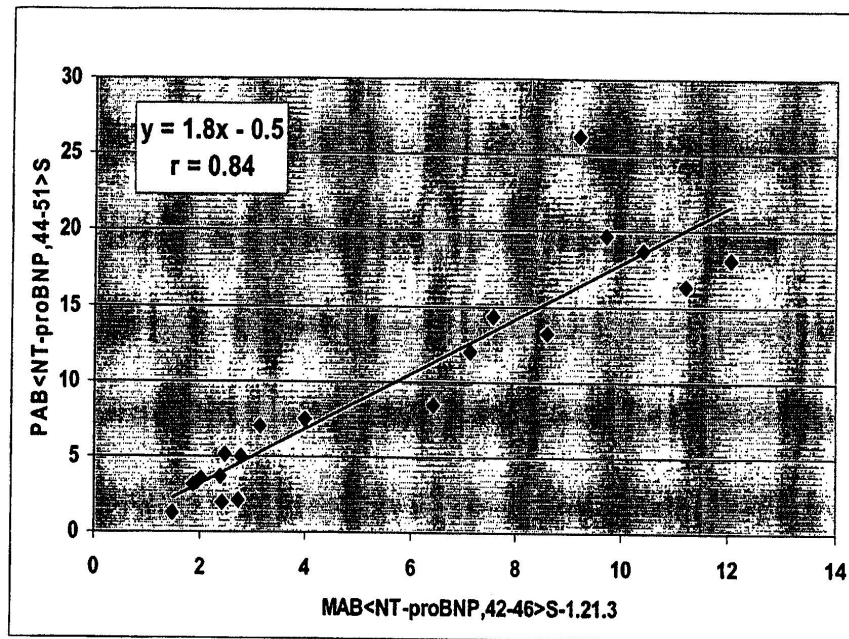
도면4



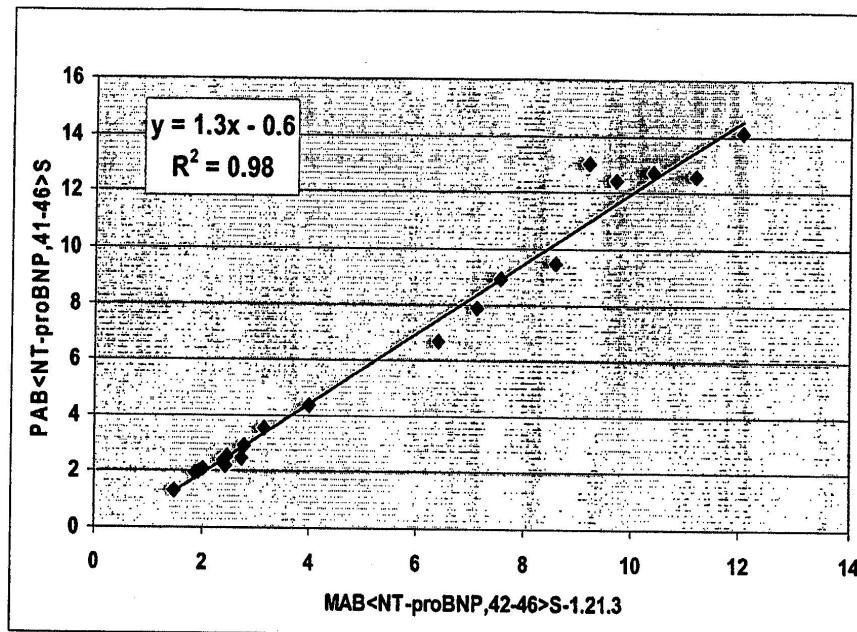
도면5



도면6



도면7



### 서열목록

- <110> Roche Diagnostics GmbH  
F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> Method of detecting native proBNP
- <130> 22564 WO

<150> EP 03010591.0  
<151> 2003-05-12

<160> 11

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<400> 1  
ccg gatccca cccgctg 17

<210> 2  
<211> 79  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<400> 2  
cgg gatccca cccgctgggt tccccgggtt ccgcttccga cctggaaacc tccggtctgc 60

aggaacagcg taaccacct 79

<210> 3  
<211> 70  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<400> 3  
cggttccagg gaggtctgtt caacctgcag ttcggacagt ttacctgca ggtggttacg 60

ctgttcctgc 70

<210> 4  
<211> 71  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<400> 4  
cagacctccc tggaaccgct gcaggaatcc ccgcgtccga ccggtgtttg gaaatcccg 60

gaagttgcta c 71

<210> 5  
<211> 87  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<400> 5  
cccaagctta acgcggagca cgcagggtgt acagaacat ttacggtga ccacggatac 60

cttcggtagc aatttcacgg gatttcc 87

<210> 6  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<400> 6  
cccaagctta acgcggagc 19

<210> 7  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly  
1 5 10 15

Leu Gln Glu Gln Arg  
20

<210> 8  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> polypeptide

<220>

<221> SITE

<222> (3)

<223> Xaa denotes beta-alanine

<220>

<221> SITE

<222> (5)

<223> Xaa denotes beta-alanine

<400> 8

Cys Glu Xaa Glu Xaa Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu  
1 5 10

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> polypeptide

<220>

<221> SITE

<222> (3)

<223> Xaa denotes beta-alanine

<220>

<221> SITE

<222> (5)

<223> Xaa denotes beta-alanine

<400> 9

Cys Glu Xaa Glu Xaa Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp  
1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> SITE  
<222> (3)  
<223> Xaa denotes beta-alanine

<220>  
<221> SITE  
<222> (5)  
<223> Xaa denotes beta-alanine

<400> 10  
Cys Glu Xaa Glu Xaa Leu Glu Pro Leu Gln Glu  
1 5 10

<210> 11  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 11  
Leu Gln Glu Ser Pro Arg  
1 5