



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101842707 A

(43) 申请公布日 2010.09.22

(21) 申请号 200880011741.2

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22) 申请日 2008.04.14

代理人 封新琴

(30) 优先权数据

20075251 2007.04.13 FI
60/911,603 2007.04.13 US

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
C07K 16/26(2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.10.12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/FI2008/050184 2008.04.14

(87) PCT申请的公布数据

W02008/125733 EN 2008.10.23

(71) 申请人 西特斯特有限公司

地址 芬兰图尔库

(72) 发明人 娜塔利亚·N·塔姆

亚历克西·G·卡特鲁卡
弗拉迪米尔·L·菲拉托夫
奥尔加·V·科洛索瓦

权利要求书 1 页 说明书 4 页 序列表 2 页
附图 6 页

(54) 发明名称

用于对选自 BNP 和 BNP 原的不稳定抗原定量的免疫测定法

(57) 摘要

本发明涉及用于检测 BNP、BNP 原及其片段的免疫测定法。本质上,所述测定法包括:a)使所述抗原接触对与 BNP 的氨基酸 11-22 对应的片段或对此肽的包含所述序列中至少三个氨基酸的一部分特异性的第一抗体,以获得一级免疫复合物;b)使步骤(a)得到的所述一级免疫复合物接触识别所述一级免疫复合物的第二抗体,以得到二级免疫复合物,其中所述抗体不能识别游离的 BNP、BNP 原或游离的第一抗体;c)检测所述二级免疫复合物。

1. 一种免疫测定方法,其用于检测样品中选自下组的不稳定抗原:BNP, BNP 原及其片段,所述方法包括

(a) 使所述抗原接触对 BNP 分子的片段₁₁FGRKMDRIS₂₂SSS₂₂(SEQ ID NO:3) 或对此肽的包含所述序列中至少三个氨基酸残基的部分特异性的第一抗体,以获得一级免疫复合物;

(b) 使步骤(a)得到的所述一级免疫复合物接触识别所述一级免疫复合物的第二抗体,以获得二级免疫复合物,其中所述第二抗体不能识别游离的 BNP、BNP 原或其片段或游离的第一抗体,或以比它识别所述一级免疫复合物显著要低(低 10 倍或更小)的亲和力识别它们;并

(c) 检测所述二级免疫复合物形成。

2. 一种单克隆抗体,其对 BNP 分子的片段₁₁FGRKMDRIS₂₂SSS₂₂ 或对此肽的包含所述序列中至少三个氨基酸残基的部分是特异性的。

3. 一种单克隆抗体,其对 BNP、BNP 原或其片段与如下抗体的一级免疫复合物是特异性的,所述抗体对 BNP 分子的片段₁₁FGRKMDRIS₂₂SSS₂₂ 或对此肽的包含所述序列中至少三个氨基酸残基的部分是特异性的。

4. 一种免疫测定试剂盒,其用于检测样品中选自下组的抗原:BNP, BNP 原及其片段,所述试剂盒包括

(a) 第一抗体,其对 BNP 分子的片段₁₁FGRKMDRIS₂₂SSS₂₂(SEQ ID NO:3) 或对此肽的包含所述序列中至少三个氨基酸残基的部分是特异性的,所述抗体能够与所述抗原形成一级免疫复合物;和

(b) 第二抗体,其识别步骤(a)得到的所述一级免疫复合物且对由所述抗原和所述第一抗体形成的 BNP 第二表位是特异性的,且能够与所述一级免疫复合物形成二级免疫复合物,其中所述第二抗体不能识别游离的 BNP、BNP 原或其片段或游离的第一抗体,或以比它识别所述一级免疫复合物显著要低(低 10 倍或更小)的亲和力识别它们。

用于对选自 BNP 和 BNP 原的不稳定抗原定量的免疫测定法

发明领域

[0001] 本发明涉及免疫测定法,并提供了用于检测不稳定抗原的免疫测定方法。所述方法对于检测 BNP、BNP 原 (proBNP) 及其片段是特别合适的。

[0002] 发明背景

[0003] BNP 和 BNP 原是心力衰竭 (HF) 的可靠标志物,在临床实践中被广泛使用。文献中记载了数种类型的三明治式免疫测定法 (常规测定法),它们利用对 BNP 的或 BNP 原分子 BNP 片段的不同表位特异性的两种单克隆或多克隆抗体。

[0004] 已知 BNP 分子是极端不稳定的分子,在水溶液中快速丢失其免疫学活性。这种活性丢失通常与该肽的蛋白水解性降解有关。通常用于定性或定量抗原免疫检测的三明治式免疫测定法利用对两种或更多种不同表位特异性的两种或更多种抗体。各表位之间的距离越长,蛋白水解的位点会位于抗体的表位之间的概率越高,如此提高测定法对抗原的蛋白水解性降解的敏感性。反之亦然,各表位彼此越接近,分子的蛋白水解性降解位于各表位之间的概率越小。

[0005] 已经记载了用于很小的分子的免疫测定方法,包括应用所谓的抗变形抗体。披露了例如用于检测地高辛 (Self 等,1994, Clin. Chem. 40 :2035-2041) 和血管紧张素 II (Towbin 等,1995, J. Immunol. Meth. 181 :167-176) 的此类方法。

[0006] 然而,将这种类型的方法应用于不同分析物的任务不容易,因为此类方法中需要非常特异性的单克隆抗体。

[0007] 发明概述

[0008] 我们在这里描述一种用于对人血液中的 BNP 和 BNP 原定量的免疫测定法。我们已经将这种测定法命名为“不等三明治式 (unequal sandwich)”。这种测定法适用于所有不稳定抗原的免疫检测。

[0009] 本申请中所描述的免疫测定法利用两种不同的单克隆抗体。在检测 BNP 或 BNP 原时,第一单克隆抗体 (MAb 24C5) 对包含 BNP 氨基酸残基 11-22 (${}_{11}\text{FGRKMDRISSSS}_{22}$) (与 BNP 原的氨基酸残基 87-98 对应) 的区域 (或此区域的一部分) 是特异性的 (图 1)。用信号生成构件标记的第二抗体 (即 MAb Ab-BNP2 和 Ab-BNP4) 识别第一抗体与抗原 (BNP、BNP 原、或其包含氨基酸残基 ${}_{11}\text{FGRKMDRISSSS}_{22}$ 的片段或此序列的包含所述序列中至少三个氨基酸残基的一部分) 的免疫复合物。第二抗体不识别 (或以很低 (低 10 倍或更小) 的亲合力识别) 游离的抗原或其片段或游离的 MAb 24C5。如此,包含 MAb 24C5 和 BNP (或 BNP 原或其片段) 的一级免疫复合物充当第二抗体 (MAb Ab-BNP2 和 Ab-BNP4) 的抗原。

[0010] 因此,本发明的总体目标是用于检测样品中不稳定抗原的免疫测定方法,包括

[0011] (a) 使感兴趣抗原接触对所述抗原分子的第一表位特异性的第一抗体,以获得一级免疫复合物;

[0012] (b) 使步骤 (a) 得到的所述一级免疫复合物接触识别所述一级免疫复合物且对由所述感兴趣抗原和所述第一抗体形成的第二表位特异性的第二抗体,以获得二级免疫复合物,其中所述第二抗体不能识别游离的抗原或其片段或游离的第一抗体,或以比它们识别

所述一级免疫复合物显著要低（低 10 倍或更小）的亲和力识别它们；并

[0013] (c) 检测所述二级免疫复合物形成。

[0014] 本发明的一个具体目标是用于检测样品中选自下组的抗原的免疫测定方法：BNP，BNP 原及其片段，包括

[0015] (a) 使所述抗原接触对 BNP 分子的片段₁₁FGRKMDRIS₂₂SSS₂₂或对此肽的包含所述序列中至少三个氨基酸残基的部分特异性的第一抗体，以获得一级免疫复合物；

[0016] (b) 使步骤 (a) 得到的所述一级免疫复合物接触识别所述一级免疫复合物的第二抗体，以获得二级免疫复合物，其中所述第二抗体不能识别游离的 BNP、BNP 原或其片段或游离的第一抗体，或以比它识别所述一级免疫复合物显著要低（低 10 倍或更小）的亲和力识别它们；并

[0017] (c) 检测所述二级免疫复合物形成。

[0018] 我们成功地生成了适用于本发明方法的特异性单克隆抗体。这些抗体是本发明的具体目标。

[0019] 与利用对相距较远的表位特异性的抗体的测定法相比，本文中所描述的不等三明治式展现出对抗原的蛋白水解性降解的非常不易感性。

[0020] 而且，此类办法可用于为如下抗原的免疫检测开发测定法的情况，所述抗原与一种或多种其它抗原类似；在其表面上具有众多不同表位，但是只有一个（或多个，但是非常有限的数目）将该特定抗原区别于所有其它抗原的独特表位。

[0021] 附图简述

[0022] 图 1：BNP 和 BNP 原结构和 MA b 24C5 的表位特异性。

[0023] MA b 24C5 识别 BNP 分子包含氨基酸残基 11-22 的片段和由氨基酸残基 87-98 组成的 BNP 原片段（以深色标示）。

[0024] 图 2A、2B 和 2C：抗体 Ab-BNP2 和 Ab-BNP4 不识别不与 MA b 24C5 复合的 BNP 或 BNP 原。

[0025] 将 Eu 标记的 MA b 24C5，Ab-BNP2、Ab-BNP4 (200ng/ 孔) 在用以下各项包被的板中温育：

[0026] A. BNP 50ng/ 孔

[0027] B. BNP 原 100ng/ 孔

[0028] C. 与 BNP (0.5ng/ 孔) 预温育的多克隆抗 BNP 抗体 (2 μ g/ 孔)

[0029] 图 3：抗体 Ab-BNP2 和 Ab-BNP4 能识别 BNP (或肽 11-22) 与 MA b 24C5 的免疫复合物。

[0030] 三步测定方案：

[0031] 第一步：将板用捕捉 MA b 24C5 预包装；

[0032] 第二步：清洗后，将板与抗原 (BNP 或肽 11-22) 一起温育；

[0033] 第三步：清洗后，将板与检测 (Eu³⁺ 标记的) 抗体 (Ab-BNP2、Ab-BNP4 或 57H3) 一起温育。

[0034] 清洗后，添加增强液并测量信号。

[0035] 图 4：抗体 Ab-BNP2 和 Ab-BNP4 能识别 BNP 原，其与 MA b 24C5 形成免疫复合物。

[0036] 三步测定方案：

[0037] 第一步:将板用捕捉 MAb 24C5 预包装;

[0038] 第二步:清洗后,将板与 BNP 原 (5ng/ml) 一起温育;

[0039] 第三步:清洗后,将板与检测抗体 (Ab-BNP2、Ab-BNP4 或 57H3) 一起温育。清洗后,添加增强液并测量信号。

[0040] 图 5:BNP 在正常人血浆中的稳定性。

[0041] 将合成的 BNP 掺入合并的正常人血浆 (2ng/ml),于 +4℃温育不同时间段。在三种不同测定法中测试免疫学活性 - 一种常规的和两种不等的三明治式。

[0042] 图 6:HF 患者和健康供体的血液中的 BNP/BNP 原测量。在三种测定法中测试了 6 名心力衰竭患者的血浆样品 (HF1 至 HF6) 和健康供体的血浆样品 (NP1 至 NP4)。在所有测定法中使用合成的 BNP (Bachem) 作为校准物。

[0043] 图 7A、7B 和 7C:两种不等三明治式 (24C5-Ab-BNP2、24C5-Ab-BNP4) 和一种常规测定法 (50E1-24C5-Eu) 的校准曲线。抗原:合成的 BNP (Bachem)。

实施例

[0044] 注意:在所有实验中使用稳定的 Eu 螯合物标记的抗体作为检测抗体。实验中所使用的单克隆抗体 24C5, Ab-BNP2、Ab-BNP4、57H3 和 50E1,可得自 Hytest Ltd, Turku, Finland。

[0045] 实施例 1:抗体 Ab-BNP2 和 Ab-BNP4 不识别不与 MAb 24C5 复合的 BNP 或 BNP 原 (图 2)

[0046] 在图 2A 和图 2B 所呈现的实验中,将抗原 (分别为 BNP 和 BNP 原) 用于板包被,并在直接免疫测定法中用抗原测试 Eu 标记的抗体。抗体 24C5 识别这两种形式的抗原,而 MAb Ab-BNP2 和 Ab-BNP4 对这两种抗原均没有响应 (信号与背景相当)。

[0047] 在图 2C 所呈现的实验中,将板用对 BNP 分子上不同表位特异性的多克隆抗体包被。在第二步,将板与 BNP,然后与 Eu 标记的抗体一起温育。此类办法有助于获得抗原对板表面的可变取向,确保分子在板表面上的取向对实验结果没有影响。在此实验中,得到了与上文所述相同的结果:MAb Ab-BNP2 和 Ab-BNP4 不能识别不与 MAb 24C5 复合的抗原。

[0048] 实施例 2:抗体 Ab-BNP2 和 Ab-BNP4 能识别与 MAb 24C5 形成免疫复合物的 BNP 和肽 11-22 (图 3)

[0049] MAb 24C5 对 BNP 分子的片段 11-22 或对 BNP 原的相应区域 87-98 是特异性的。为了证明免疫复合物 24C5-BNP 和 24C5-肽 11-22 能被 MAb Ab-BNP2 和 Ab-BNP4 识别,我们将 MAb 24C5 用于板包被,然后将板与 BNP 或对应于 BNP 序列的氨基酸 11-22 的合成肽 (肽 11-22) 一起温育。在 MAb 24C5 与抗原之间的免疫复合物形成后,将板与 Eu 标记的、对 BNP 分子的区域 26-32 特异性的抗体 Ab-BNP2、Ab-BNP4 和 57H3 一起温育。

[0050] 不等三明治式几乎以相同效率识别 BNP 和肽。利用抗体 24C5 (包被)-57H3-Eu 的测定法不识别肽 11-22 (信号与背景相当)。

[0051] 实施例 3:抗体 Ab-BNP2 和 Ab-BNP4 能识别与 MAb 24C5 形成免疫复合物的 BNP 原 (图 4)

[0052] 不等三明治式以与常规测定法相同的效率识别 BNP 原。我们将 MAb 24C5 用于板包被,然后将板首先与重组 BNP 原 (5ng/ml),然后与 Eu 标记的、对 BNP 分子的区域 26-32 特异

性的抗体 Ab-BNP2, Ab-BNP4 和 57H3 一起温育。在不等三明治式和常规免疫测定法中得到的信号是相当的。我们得出结论,新的测定法可用于 BNP 原的定量免疫检测。

[0053] 实施例 4 :抗原的表观稳定性 (图 5)

[0054] 将合成的 BNP (Bachem) 掺入合并的正常人血浆 (2ng/ml), 于 +4°C 温育不同时间段, 并在三种不同测定法中测试免疫学活性 - 一种常规的和两种不等的三明治式。

[0055] 与通过利用对 BNP 分子不同部分特异性的两种 Mab 进行的常规 BNP 测定法所测定的稳定性相比, 在本文描述的不等三明治式中所测定的抗原表观稳定性显著更高。作为常规测定法的例子, 我们使用如下测定法, 该测定法利用对 BNP 分子的区域 26-32 特异性的 MAbs 50E1 和对 BNP 分子的区域 11-22 特异性的 MAbs 24C5。在使用不等三明治式来测定免疫反应性的情况中, 于 +4°C 温育 24 小时后观察到大约 70% 的免疫学活性 (利用 Ab-BNP2 和 Ab-BNP4 的测定法分别为 69.8% 和 68%), 而在常规测定法的情况中只有 28%。在开始温育后 6 天, 在常规测定法的情况中观察不到免疫反应性, 而在不等三明治式的情况中观察到大约 1/4 的初始免疫反应性。

[0056] 实施例 5 :心力衰竭患者 (HF 患者) 的血液和健康供体的血液中的 BNP/BNP 原测量 (图 6)

[0057] 不等三明治式以及常规 BNP 测定法能够检测人血液中的展示“BNP 免疫反应性”的两种形式的抗原 - 即 BNP 和 BNP 原。在三种测定法中测试来自数名 HF 患者和健康供体的血液样品 - 一种常规的, 利用对 BNP 分子的片段 26-32 特异性的捕捉 MAbs 50E1 和检测 MAbs 24C5-Eu, 和两种不等三明治式。所有测定法使用合成的 BNP 进行校准。由图 6 可见, 三种测定法中的测试结果非常相似。在有些样品中, 常规测定法中的测试结果低于不等三明治式测定法中的测试结果。此观察结果可以通过此类样品中的 BNP 是部分降解的事实来解释, 但是由于抗原在不等三明治式中展示更好的表观稳定性的事实, 通过这些测定法测得的抗原值高于在常规测定法中测得的抗原值。

[0058] 实施例 6 :校准曲线 (图 7)

[0059] 图 7 (A、B 和 C) 中呈现了两种不等三明治式测定法和一种常规测定法的校准曲线, 其中使用合成的 BNP 作为抗原。两种不等三明治式均展现出高灵敏度, 与常规测定法的灵敏度相当且可用于人血液中 BNP 和 BNP 原免疫反应性的精确检测。

序列表

<110> 西特斯特有限公司

<120> 用于对选自 BNP 和 BNP 原的不稳定抗原定量的免疫测定法

<130>46313

<160>3

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>32

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>1

Ser	Pro	Lys	Met	Val	Gln	Gly	Ser	Gly	Cys	Phe	Gly	Arg	Lys	Met	Asp
1			5					10					15		
Arg	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Cys	Lys	Val	Leu	Arg	Arg	His
			20					25					30		

<210>2

<211>108

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>2

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	Asn	His	Leu	Gln	Gly	Lys	Leu	Ser	Glu	Leu	Gln
			20					25						30	
Val	Glu	Gln	Thr	Ser	Leu	Glu	Pro	Leu	Gln	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Thr
			35					40						45	
Gly	Val	Trp	Lys	Ser	Arg	Glu	Val	Ala	Thr	Glu	Gly	Ile	Arg	Gly	His
			50					55						60	
Arg	Lys	Met	Val	Leu	Tyr	Thr	Leu	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Lys	Met
65						70								75	
															80

Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser
85 90 95
Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His
100 105

<210>3

<211>12

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>3

Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser
1 5 10

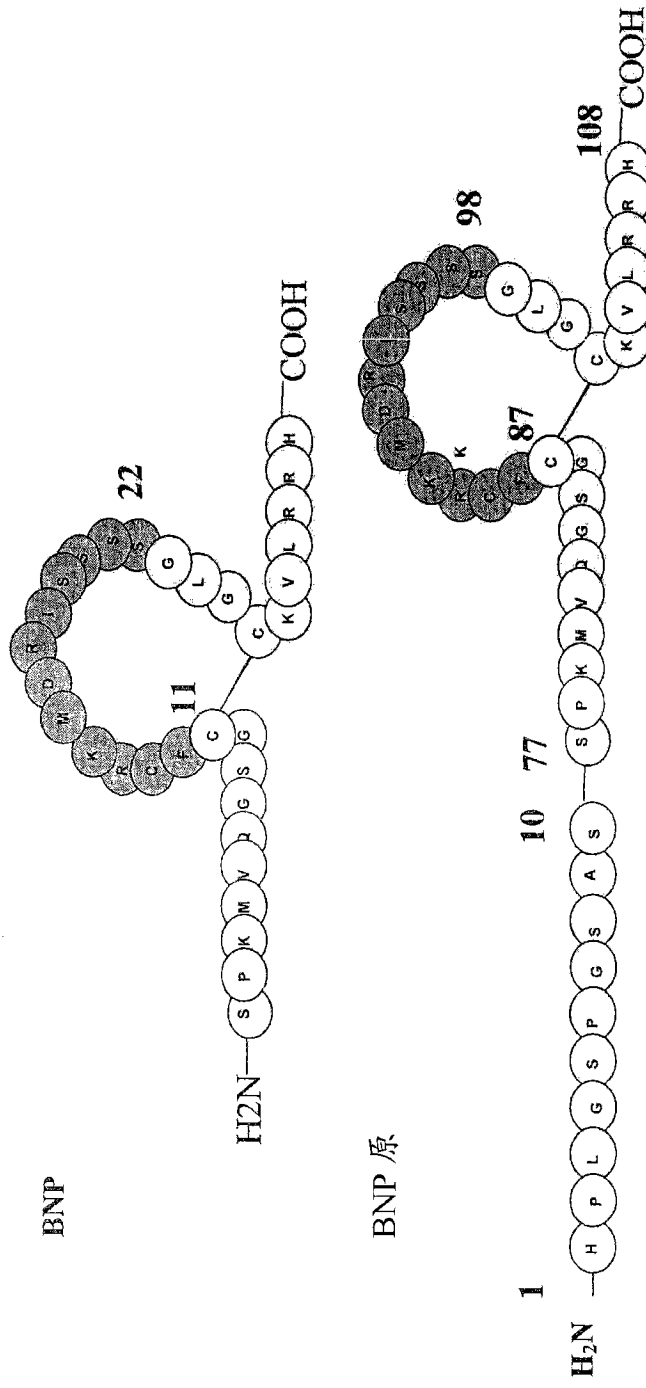


图 1

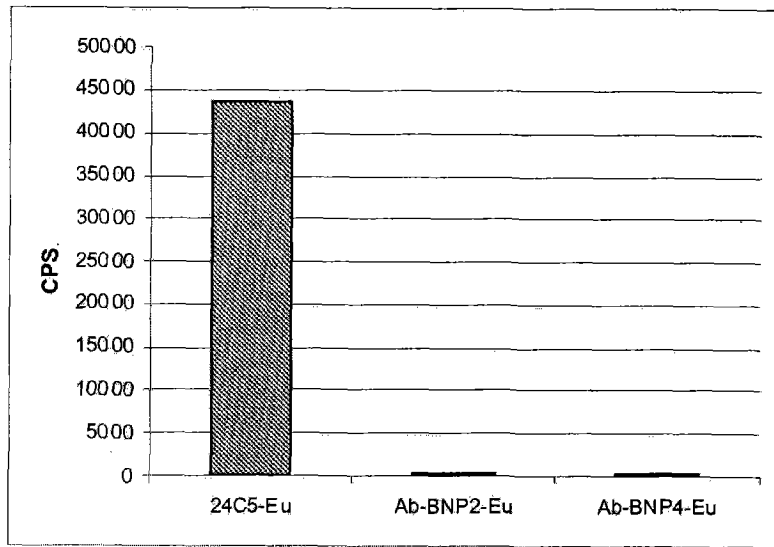


图 2A

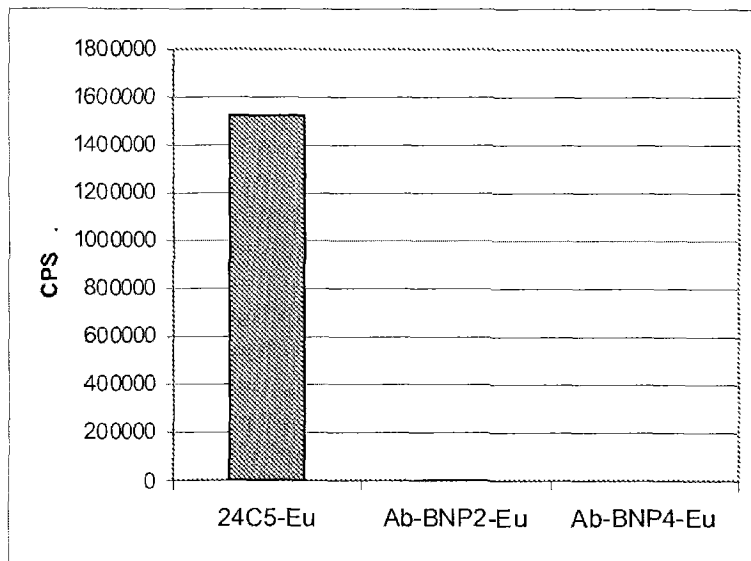


图 2B

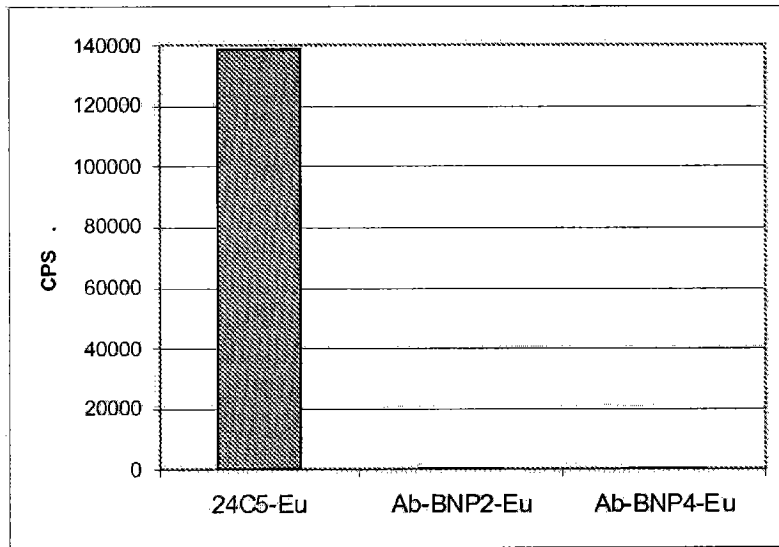


图 2C

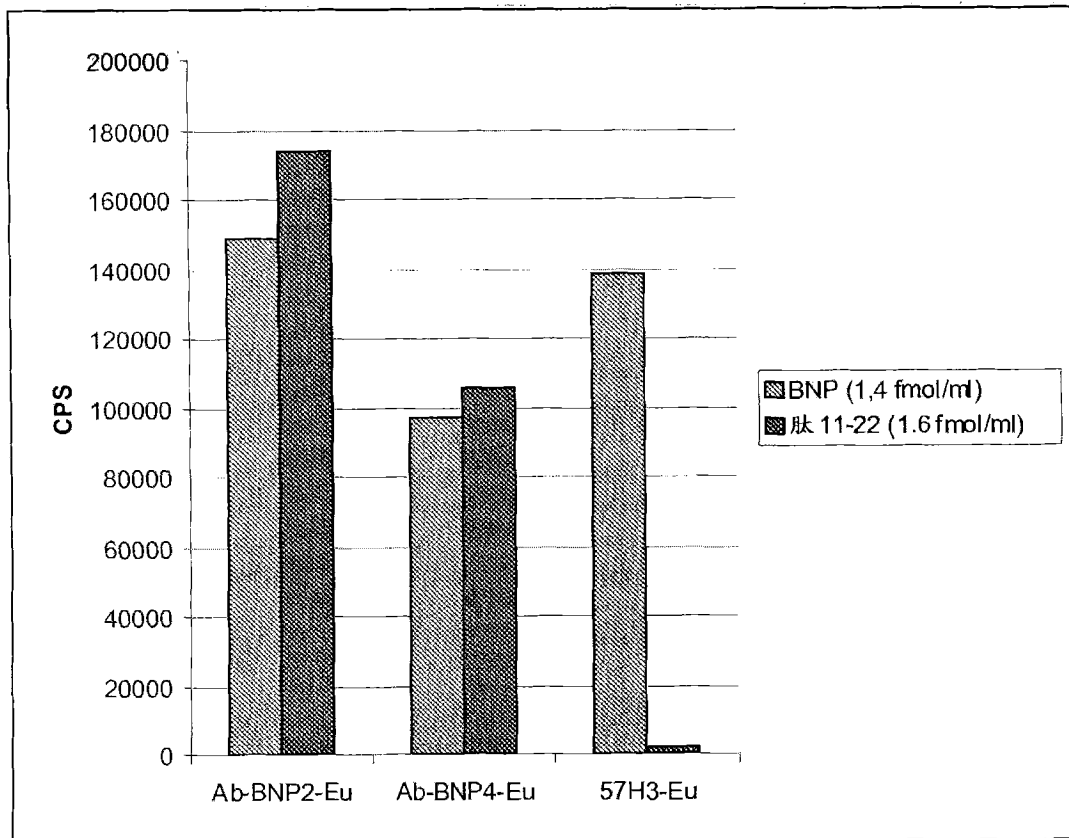


图 3

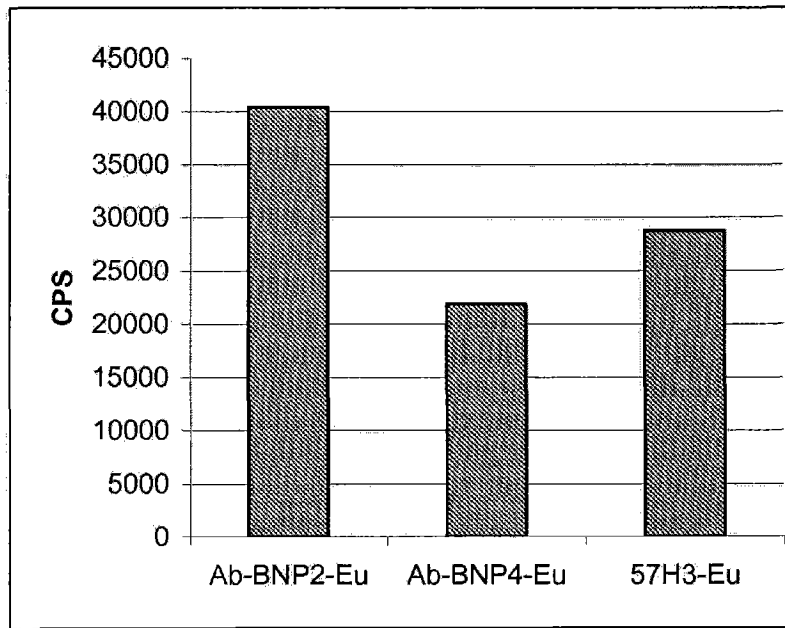


图 4

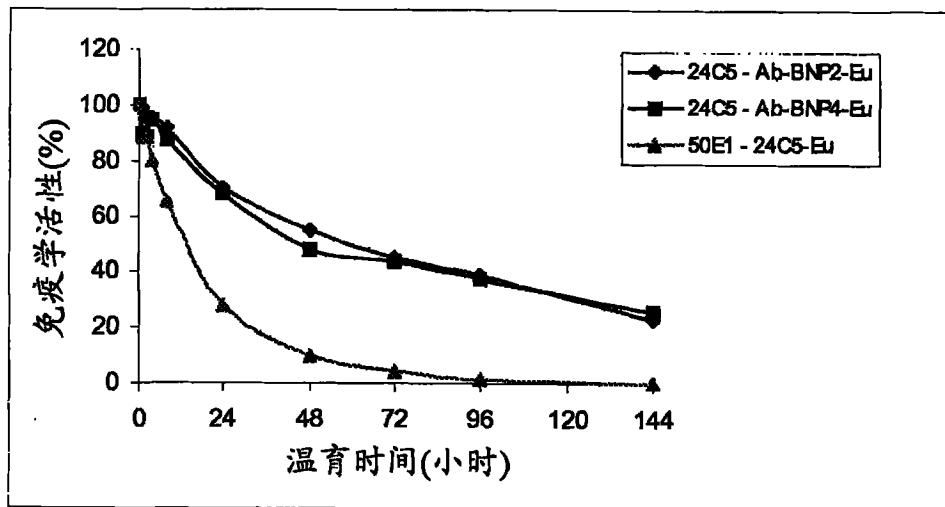


图 5

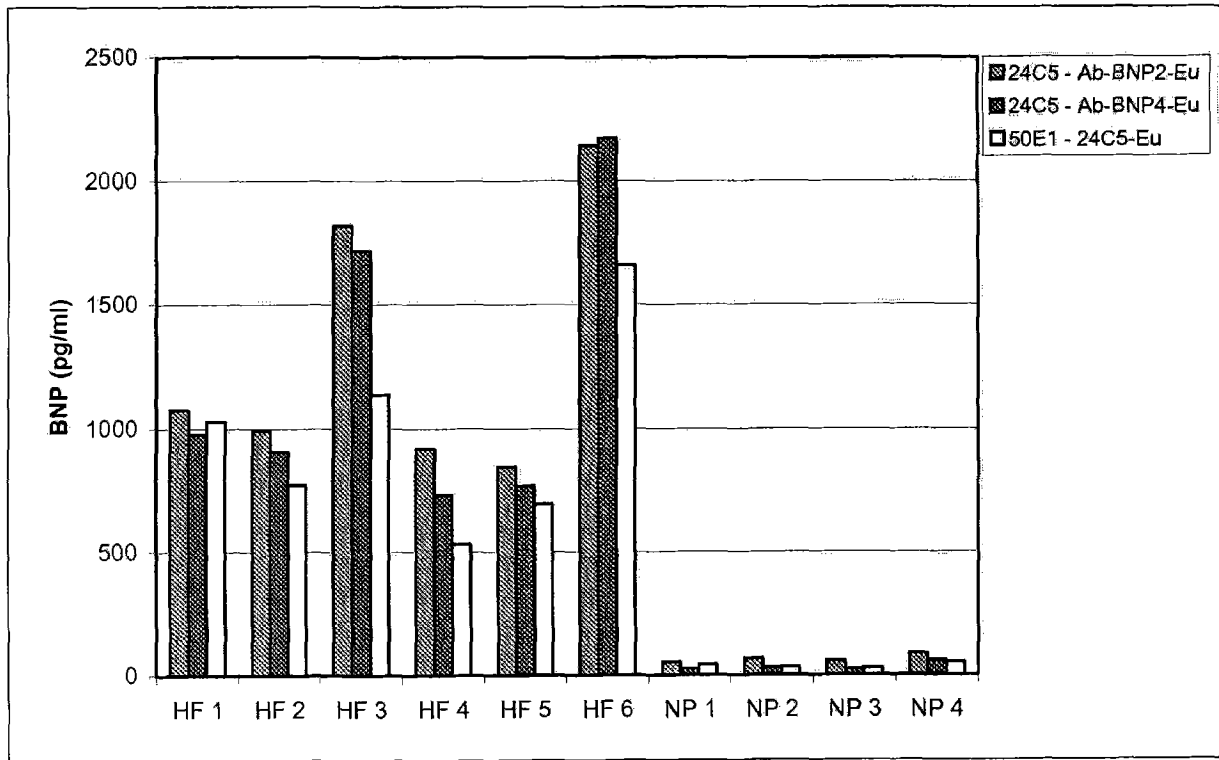


图 6

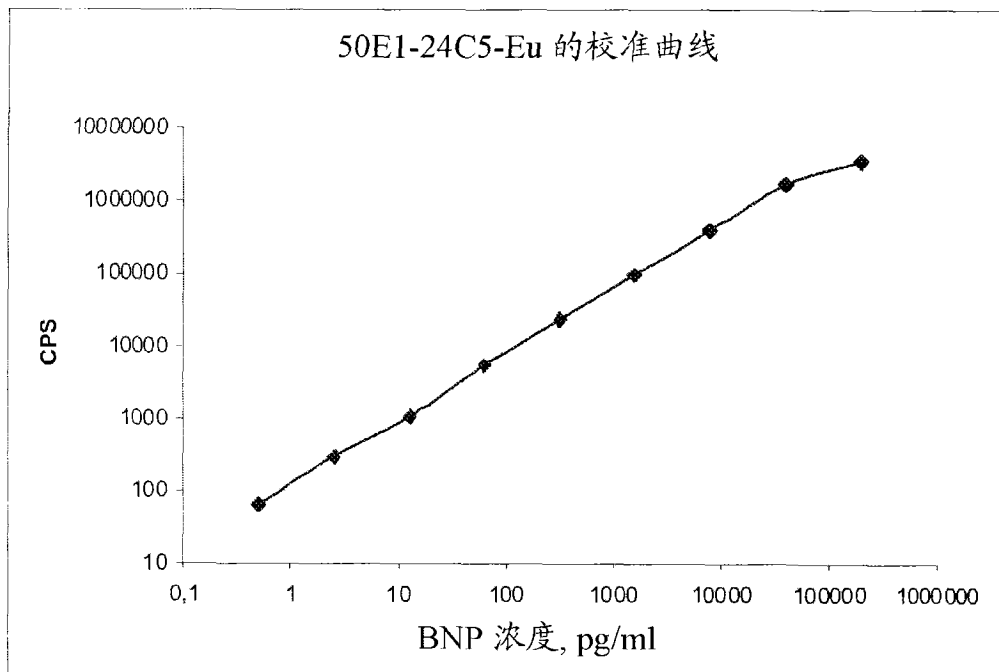


图 7A

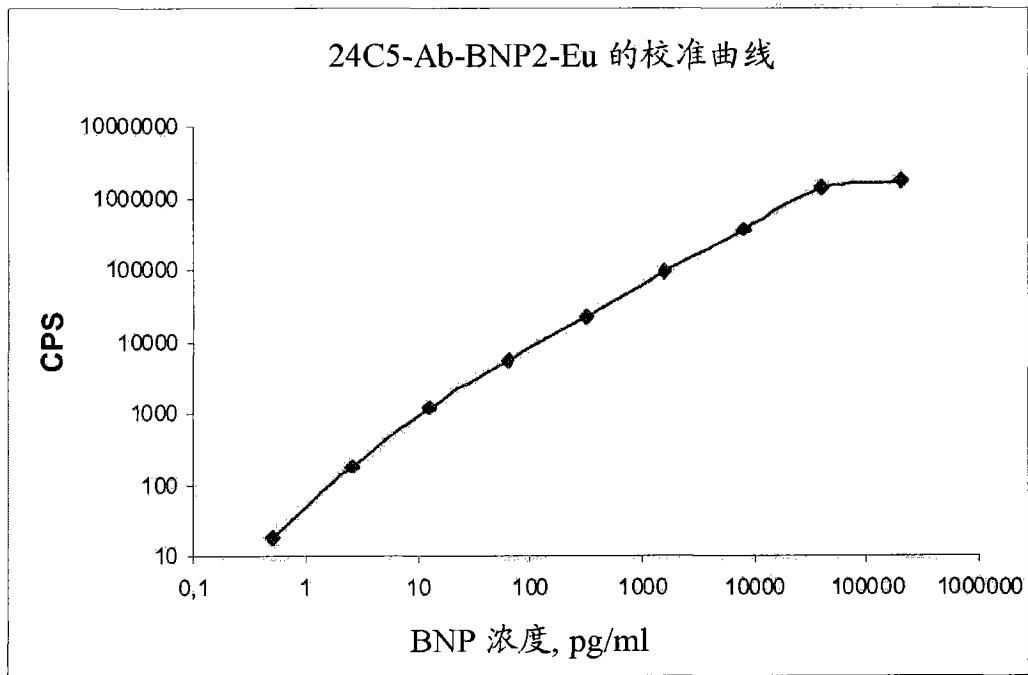


图 7B

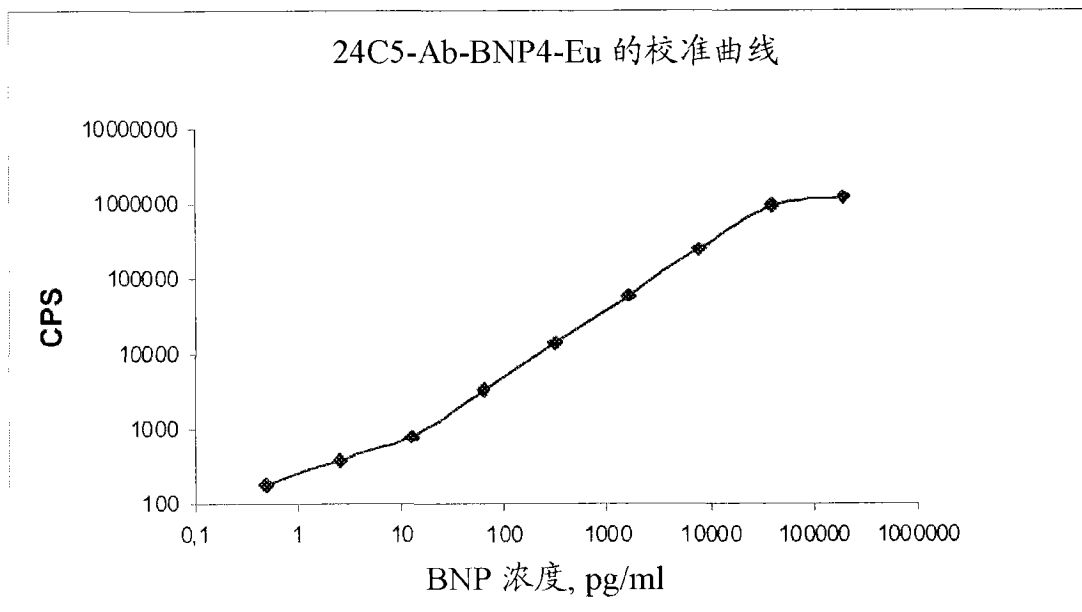


图 7C