



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101967190 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 09

(21) 申请号 201010119083. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2004. 05. 12

C07K 16/26 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 5/20 (2006. 01)

03010591. 0 2003. 05. 12 EP

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(62) 分案原申请数据

200480012497. 3 2004. 05. 12

(83) 生物保藏信息

DSMZDSM ACC2593 2003. 05. 07

DSMZDSM ACC2592 2003. 05. 07

DSMZDSM ACC2591 2003. 05. 07

DSMZDSM ACC2590 2003. 05. 07

DSMZDSM ACC2654 2004. 05. 06

(71) 申请人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 V · 克勒姆特 A · 博格亚

A · 加卢塞尔 M · 格罗尔

K · 哈勒迈尔 C · 赛德尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 梁谋 付磊

权利要求书 1 页 说明书 16 页 序列表 4 页

附图 10 页

(54) 发明名称

用结合天然脑钠尿肽前体分子氨基酸 38-44 的单克隆抗体检测天然脑钠尿肽前体分子的方法

(57) 摘要

本发明涉及特异性结合天然脑钠尿肽前体分子 (proBNP) 的抗体、天然 proBNP 的特异性检测方法、确定天然 proBNP 水平与心力衰竭诊断之间相关性的方法、天然 proBNP 的检测试剂盒以及产生抗天然 proBNP 抗体的杂交瘤细胞系。

1. 一种特异性结合天然 proBNP 的抗体,其中所述特异性结合天然 proBNP 的抗体是这样的抗体:就患者样品中所测得的针对 proBNP 的值而言,所述抗体与 MAB 10.4.63 的相关性为通过线性回归分析求出的 r - 值至少 $r = 0.95$ 或 0.95 以上,其中使用至少 20 个和至多 25 个取自天然 proBNP 的 NT-proBNP- 水平为 10ng/ml 至 150ng/ml 的患者的血清样品而且所述抗体结合由 proBNP 的氨基酸 38-44 组成的表位。

2. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体是单克隆抗体。

3. 权利要求 2 的抗体,其中所述单克隆抗体是单克隆抗体 MAB10.4.63,其由保藏号为 DSM ACC2654 的杂交瘤细胞系产生。

4. 权利要求 1 的抗体,其中所述抗体是分离的多克隆抗体。

5. 一种测定天然 proBNP 的试剂盒,所述试剂盒包括权利要求 1-4 中任一项的抗体和检测天然 proBNP 的辅助试剂。

6. 杂交瘤细胞系 DSM ACC2654,其保藏于德意志微生物保藏中心。

用结合天然脑钠尿肽前体分子氨基酸 38-44 的单克隆抗体 检测天然脑钠尿肽前体分子的方法

[0001] 本申请是以下申请的分案申请：申请日：2004 年 5 月 12 日；申请号：200480012497.3；发明名称：同上。

技术领域

[0002] 本发明涉及特异性结合总脑钠尿肽前体分子 (proBNP) 亚群即天然 proBNP 的抗体、天然 proBNP 的特异性检测方法、确定天然 proBNP 水平与心力衰竭诊断之间相关性的方法、天然 proBNP 的检测试剂盒以及产生抗天然 proBNP 抗体的杂交瘤细胞系。

[0003] 发明背景

[0004] 心力衰竭是一个普遍现象，在西方世界尤其如此。按照 Roche 医学词典 (Urban & Schwarzenberg, 1993)，心力衰竭是在运动时或者甚至在休息时心脏无法急性或慢性地产生产代谢所必需的血流，或者不能保证静脉回流（不能回流和流出）。因此削弱了心脏的泵功能。心力衰竭的原因非常复杂。其中，在此要提到的是心肌的炎性变化和变性性变化、冠状动脉灌注障碍、冠状动脉梗塞和损伤。这导致外周血流发生改变、呼吸系统障碍、肾功能障碍和电解质代谢障碍（水肿），降低骨骼肌系统的效率。

[0005] 按照纽约心脏协会 (New York Heart Association, NYHA)，可在活动后，用物理实验将心力衰竭分为下列 NYHA 级别：I 级，是指在正常体力活动后完全没有疼痛；II 级，是指体力活动受到轻微限制；III 级，是指体力活动受到严重限制；IV 级，是指在任何体力活动都可能加重不适症状，甚至在大多数休息时间中也有不适症状。

[0006] 对于使用糖苷类药、血管扩张药、ACE 抑制剂和 / 或 β -阻滞剂对心力衰竭进行有效药物治疗来说，首先，必须准确无误地鉴定和诊断出心力衰竭，有可能的话，按照严重程度将其分类，外加监控治疗过程。

[0007] 在本领域，已经研究了一些血清标记作为心力衰竭早期诊断的标记候选者，例如 ANP（心房钠尿肽激素）和 proANP、CNP（C-钠尿肽）、肾上腺髓质素、神经肽 Y、内皮缩血管肽和 BNP（脑钠尿肽）。ANP 和 proANP 在理论上均代表诊断心力衰竭的合适标记；然而，在实践上，它们不很稳定，或者在血液中仅具有短的半寿期，这些对常规诊断性测定来说是严重缺陷 (Buckley, M. G. 等, Clin. Sci. 95(1998) 235-239; Cleland, J. G. 等, Heart 75(1996) 410-413)。

[0008] 通常引用和有意义的标记是 BNP（脑钠尿肽）。最初 BNP 是在猪脑中鉴定出来的。BNP 是在结构和功能上均类似于 ANP（心房钠尿肽）的一种心脏激素 (Sudoh, T. 等, Nature 332(1988) 78-81)。人 BNP 由 32 个氨基酸组成，主要由心室分泌并在人体血浆中循环。使用 BNP 作为诊断标记，是从例如 EP-A-0 542 255 中得知的。BNP 具有分子内二硫桥且是一种不很稳定的分析物。推测这是由于其生理功能是作为激素，所以它必须很快被分解。因此，用它作为诊断标记，在样品采集和操作过程中必须小心和特别注意 (Masuta, C. 等, Clin. Chem. 44(1998) 130; Tsuji, T. 等, Clin. Chem. 40(1994) 672-673)。

[0009] BNP 的前体分子，即 proBNP，是由 108 个氨基酸组成。proBNP 被切割成上述

32 个 C-端氨基酸 (77-108) (称为 BNP) 和 N-端氨基酸 1-76 (称为 N-端 proBNP (或 NT-proBNP))。BNP、N-端 proBNP (1-76) 以及其它分解产物 (Hunt, P. J., 等, Biochem. Biophys. Res. Com. 214 (1995) 1175-1183) 均在血液中循环。还没有完全弄清楚是否完整前体分子 (proBNP 1-108) 也存在于血浆中。然而,有报道表明 (Hunt, P. J. 等, Peptides, 第 18 卷, 第 10 期 (1997), 1475-1481), 在血浆中可检测到低量释放的 proBNP (1-108), 但是因为在 N-端非常快速的部分分解, 所以一些氨基酸会不存在。

[0010] 正如本领域所知的, N-端 proBNP (1-76) 被认为是心力衰竭的标记之一。

[0011] WO 93/24531 (US 5, 786, 163) 公开了 N-端 proBNP 的免疫学鉴定方法以及用于该方法的抗体。在 WO 93/24531 中, 制备了针对一种来自 N-端 proBNP 的肽的多克隆抗体。已经表明, 在竞争性试验中, 所产生的抗体能结合免疫肽 (氨基酸 47-64)。

[0012] 在 WO 93/24531 中所进行的竞争性试验中, 标记形式的肽 47-64 作为示踪物, 与样品中的 proBNP 或者未标记的肽标准品 47-64 竞争性结合来自兔血清的多克隆抗体。孵育 48 小时后, 仅达到中等竞争, 结果是检出下限约为 250 fmol/ml。在自动化实验室中, 对于常规样品检验来说, 该竞争性试验的长时间孵育是不可接受的。

[0013] Hunt, P. J. 等, Clinical Endocrinology 47 (1997) 287-296, 也介绍了用于检测 N-端 proBNP 的竞争性试验。在该项测定中, 在进行测定之前, 需要对血浆样品进行复杂的提取; 这可能导致分析物的破坏和测定误差。所用的抗血清是按照 WO 93/24531 的方法, 通过用合成肽进行免疫而类似地生产的。Hunt 等通过用 N-端 proBNP 氨基酸 1-13 进行免疫, 生产抗血清, 并使用由氨基酸 1-21 所组成的肽作为标准品。对于该项试验, 也需要长时间孵育。在孵育 24 小时后, 达到的检出下限为 1.3 fmol/ml。

[0014] Ng, L. 等在 WO 00/35951 中公开了用于诊断 N-端 proBNP 的另一方法。该方法基于针对对应于人 proBNP 氨基酸 65-76 的合成肽所产生的抗体的应用。

[0015] Hughes, D. 等, Clin. Sci. 96 (1999) 373-380, 报道了 N-端 proBNP 的两种不同测定方法。在第一种测定方法中, 使用由包含对应于 proBNP 氨基酸 65-76 的合成肽的免疫原所产生的多克隆抗体; 而在第二种测定方法中, 按类似方法产生多克隆抗体, 但是对应于氨基酸 37-49。按照 Hughes, D. 等报告的数据, 由 proBNP 氨基酸 37-49 相应肽所产生的并与之反应的抗体并不与完整的内源 proBNP 反应。根据这样的测定, 无法区别患有左心室功能障碍的患者和正常对照。对于基于 proBNP 65-76 的测定来说, 则可以清楚地区别同样的患者组。

[0016] Goetze, J. P. 等, Clin. Chem. 48 (2002) 1035-1042, 介绍了用于 N-端 proBNP 的最 N-端氨基酸 (1-21) 的测定方法。该测定方法基于针对对应于相同的 proBNP 氨基酸 (1-21) 的合成肽所产生的多克隆抗体。

[0017] Goetze, J. P. 等 (参见上文) 的测定方法需要完全消化样品及其中所包含的各种 proBNP。据称, 该测定方法也能有效降低非特异性结合。

[0018] Karl, J. 等在 WO 00/45176 中首次公开, 在夹心免疫测定中可以对 N-端 proBNP 进行灵敏而快速地检测。在 WO 00/45176 中公开的优选表位介于 N-端 proBNP 氨基酸 10 和 50 之间。

[0019] US 2003/0219734 引用了这一事实: 同一样品中可以存在来自 proBNP (1-108)、BNP (77-108) 以及 N-端 proBNP (1-76) 的多种不同来源的 BNP 相关多肽。

[0020] Mair, J. 等, Clin. Chem. Lab. Med. 39 (2001) 571-588, 已经总结了心钠尿肽测定对心力衰竭诊断和控制的影响。他们强调, 目前市售的测定法未经标准化, 即它们没有用通用标准进行标定。在一些测定法中, 甚至需要提取血浆。因此, 用来自不同生产商的检测试剂盒所获得的结果可能会有显著性差异。因此, 来自临床研究的参考区间和决定限仅对于所用的具体测定法来说是有效的, 但决不能外推到 N- 端 proBNP 的其它测定法中。

[0021] 按照同一思路, Goetze, J. P. 等 (参见上文) 和 Mair, J. (Clin. Chem. 48 (2002) 977-978) 注意到, 不同的 N- 端 proBNP 测定法之间的差异, 无论是所得数值上还是其临床结论上, 对于该标记候选者的广泛使用来说, 都有重大问题。

[0022] 显然, 急需提供改进的 N- 端 proBNP 测定法, 例如重复性更好、更标准化、更好表征或 / 和临床相关性更好的 N- 端 proBNP 测定法。

发明内容

[0023] 本发明的一个目的是开发一种更具特异性的检测方法, 用于测定 N- 端 proBNP 和 / 或 N- 端 proBNP 临床相关片段或亚群。

[0024] 如下所述的和如所附权利要求书要求保护的发明至少部分解决了本领域已知的一个或多个问题。

[0025] 已经令人惊奇地发现, 可以特异性检测循环中存在的所有 proBNP 类型 (总 proBNP) 的一个亚群。该亚群称为天然 N- 端 proBNP 或者简称为“天然 proBNP”。引人注目的是, 天然 proBNP 亚群比起总 proBNP 来说具有更好的临床相关性。

[0026] 在第一个实施方案中, 本发明涉及特异性结合天然 proBNP 的分离的抗体。

[0027] 本发明也涉及特异性检测天然 proBNP 的方法, 所述方法包括下述步骤: 在允许形成抗天然 proBNP 抗体 - 天然 proBNP 复合物的条件下, 使怀疑或已知含有 proBNP 的样品与特异性结合天然 proBNP 的抗体接触, 然后检测所形成的复合物。

[0028] 本发明还公开了诊断心力衰竭的方法, 所述方法包括检测天然 proBNP 并确定天然 proBNP 水平与心力衰竭之间的相关性。因此天然 proBNP 的这一相关值说明心力衰竭的存在与否或其状态。

[0029] 本发明也涉及测定天然 proBNP 的试剂盒, 所述试剂盒包括特异性结合天然 proBNP 的抗体和用于检测天然 proBNP 的辅助试剂。还要求保护分别由杂交瘤细胞系 MAB 10. 4. 63 和 MAB 16. 1. 39 所产生的单克隆抗体, 所述细胞系产生抗天然 proBNP 的特异性单克隆抗体并且已经保藏于 DSMZ。

[0030] 我们在通向本发明的实验过程中, 已经发现并确定人血中至少存在两个 proBNP 群体。其中一个 proBNP 群体看来在所有可用免疫学方法检测的 proBNP 分子中占大多数。该群体称为“总”proBNP。我们的研究已经表明, 可概括为总 proBNP 的 proBNP 分子显然具有共同的中部核心结构, 其范围从 proBNP 的约 10 位氨基酸至约 66 位氨基酸。优选通过本发明方法检测的总 proBNP 中包含氨基酸 10-66。正如技术人员将会理解的, 可通过免疫学方法, 用竞争性测定或夹心测定来容易地检测出所述总 proBNP。优选用夹心测定来检测总 proBNP。所述夹心测定可设计成包括分别结合天然 proBNP 表位的 C- 端和 N- 端的抗体。然而, 也可以例如使用能进行夹心测定并能与天然 proBNP 表位的 N- 端表位反应的抗体, 来检测总 proBNP。显而易见的是, 在这样的总 proBNP 的竞争性测定或夹心测定中, 不必使用

抗天然 proBNP 抗体。

[0031] 术语“天然 proBNP”，是指其上存在为 MAB 10.4.63 所识别的表位的任何 proBNP 分子。按照以下进一步证明的发现，该表位仅存在于所有 proBNP 分子的一个亚群（即“总”proBNP 的一个亚群）上。我们发现并能确定，总 proBNP 的这一亚群称为“天然 proBNP”，可用特异性结合配偶体、优选多克隆抗体和 / 或单克隆抗体进行检测。

[0032] 称为天然 proBNP 的亚群必定不是均一的多肽片段。天然 proBNP 多肽的长度可变化。预期在用于天然 proBNP 的夹心免疫测定中鉴定的大多数分子代表 N-端 proBNP (1-76) 或其片段。优选以适于测定包含氨基酸 10-66 的 NT-proBNP 片段的方式，建立天然 proBNP 的检测方法。天然 proBNP 的特性是存在为 MAB 10.4.63 所识别的天然 proBNP 表位。

[0033] 在一个实施方案中，本发明涉及特异性结合天然 proBNP 的抗体，其中所述特异性结合天然 proBNP 的抗体是这样的抗体：就患者样品中所测得的 proBNP 值而言，所述抗体与 MAB 10.4.63 的相关性为 r -值至少 $r = 0.95$ 或更高。

[0034] 基于本发明的发现、公开内容和保藏物，技术人员将能够毫无疑问地评价抗体是特异性结合天然 proBNP 还是总 proBNP。MAB 10.4.63 被认为是特异性结合天然 proBNP 的抗体的原型实例，而 MAB 18.4.34 被认为是结合总 proBNP 的抗体的原型实例。任何 proBNP 的结合物，无论是什么，都可以分别评价其对天然 proBNP 或总 proBNP 的结合特异性。

[0035] “特异性结合”天然 proBNP 的抗体是这样的抗体：就患者样品中所测得的 proBNP 值而言，所述抗体与 MAB 10.4.63 的相关性为 r -值至少 $r = 0.95$ 或更高。用相关的临床样品，评价天然 proBNP 的结合特异性与 MAB 10.4.63 结合特性的相关性。使用至少 20 个和至多 25 个血清样品，该样品取自天然 proBNP 的 NT-proBNP-水平为 10ng/ml 至 150ng/ml 的患者。用 Biacore®3000 系统测定与 proBNP 的结合。确定测定值与用 MAB 10.4.63 所测得的天然 proBNP 值之间的相关性，通过线性回归分析进行统计学评价。优选运用 MS-Excel 拟合 $y = ax+b$ 型线性回归，求出相关系数 r 和斜率。甚至更优选所述抗体将检测出总 proBNP 中由 MAB 10.4.63 所结合的基本上相同的天然 proBNP 亚群，其中按照上述方法，对基本上相同亚群的结合得到的相关性为 $r = 0.98$ 或更高。

[0036] 可以认为，MAB 18.4.34 是测定总 proBNP 的原型抗体。对于任何特异性结合天然 proBNP 的抗体（使用如上所述的相同样品和方法）来说，与 MAB 18.4.34 即与总 proBNP 的相关性通常比与 MAB 10.4.63 的相关性低。优选 MAB 18.4.34 与特异性结合 proBNP 的天然 proBNP 亚部分的抗体的相关性为 $r = 0.94$ 或更低。甚至更优选该相关性为 $r = 0.9$ 或更低，或者低到 $r = 0.8$ 或更低。

[0037] 当比较用所述方法比较所测得的绝对量时，总 proBNP 的检测方法与 MAB 10.4.63 相比较时，总是得到约 2-20 倍，在大多数情况下约 2-5 倍的较高 proBNP 值。除了上述给定的相关性外，在以上方法比较中特异性结合天然 proBNP 的优选抗体的斜率也小于 1.5。最优选斜率介于 0.4 和 1.5 之间。

[0038] 优选所述特异性结合发生在结合亲和性最少为 10^7L/mol 时。对天然 proBNP 来说，特异性结合剂的亲和性更优选为 10^8L/mol ，或者甚至更优选为 10^9L/mol 。

[0039] 如上所解释的，MAB 10.4.63 的一个非常重要和优选特征是这一事实：该抗体仅结合典型临床样品中所包含的总 proBNP 的约 5% 和约 50% 之间的可变部分。

[0040] 特异性结合天然 proBNP 的抗体的原型实例是由克隆 MAB10.4.63 所产生的单克隆

抗体,克隆 MAB 10.4.63 已保藏于 DSMZ。MAB 10.4.63 结合与 MAB 16.1.39 基本上相同的表位。然而,因为 MAB10.4.63 对天然 proBNP 的亲合性更高,所述已经选定该抗体作为特异性结合天然 proBNP 的(单克隆)抗体的原型。

[0041] 按照实施例小节所述的方法,已经产生 MAB 10.4.63。通过使用对应于完全确定的 proBNP 序列的短合成肽,已经对由 MAB 10.4.63 或其它抗体所识别的 proBNP 上的表位进行了鉴定、表征和作图。该方法是已知的并称为 PepScan 分析。

[0042] 简而言之,已经合成了包含 proBNP 的 8 个连续氨基酸的 69 个合成肽,所述合成肽包含 N-端半胱氨酸、间隔分子和生物素。每个这样的肽都从 N-端至 C-端向前步移 1 个氨基酸。因此,肽 1 包含氨基酸 1-8,肽 2 包含氨基酸 2-9,以此类推,肽 69 包含氨基酸 69-76。

[0043] 已经发现, MAB 10.4.63 与肽 35(氨基酸 35-42)至 38(氨基酸 38-45)有明显反应,所述肽共同具有 proBNP 的 38-42 位氨基酸。与肽 37(跨越 proBNP 的氨基酸 37-44)的反应性最强。因此,可推断 MAB 10.4.63 与基本上由 proBNP 氨基酸 38 至 43 或 44 所组成的表位发生反应。

[0044] 正如技术人员将会理解的,表位的存在与否取决于三级结构、二级修饰、复合物的形成、可及性等。显然, MAB 10.4.63 和抗天然 proBNP 的其它抗体在这一方面具有非常特殊的要求,并且不与典型样品中存在的大多数 proBNP 分子发生反应。因为短的合成 PepScan 肽不太可能具有三级结构或二级修饰,所以由 MAB 10.4.63 所识别的表位应该是未修饰的,因此认为术语“天然”是适合的。

[0045] 当分别测定和比较临床样品(例如人血清)中所包含的合成 proBNP(1-76)和 proBNP 时,基于抗天然 proBNP 抗体的测定和检测总 proBNP 的测定在反应强度上表现出显著性差异。使用合成 proBNP(1-76),可以容易地建立检测方法并标准化。使用这样的测定,测定 或者在合成基质中或者补充天然样品(例如人血清)的合成 proBNP,在这两种测定中所测出的水平相同。然而,令人惊奇的是,当在这两种测定中测定天然样品(例如人血清)中所包含的 proBNP 时,发现了显著性差异。

[0046] 分别使用与总 proBNP 反应的抗体(例如单克隆抗体 MAB 17.3.1、18.4.34 或 18.29.23)来进行测定,看来能检测出血清样品中存在的所有 proBNP 分子,即总 proBNP。相比之下,基于与天然 proBNP 反应的抗体(例如 MAB 10.4.63)仅检测到该总 proBNP 的一小部分。

[0047] 本发明可以证明,总 proBNP 的天然 proBNP 亚群在临床上显示出与生物活性 BNP 非常好的相关性。当然,在测定 BNP 时,已经观察了对于取样和处理中获取准确 BNP 值的所有注意事项。对于天然 proBNP 的测定来说,无需特别注意的常规样品处理已证明是令人满意的。

[0048] 用本发明建立的所有数据都清楚地表明,在本发明中鉴别的且与 MAB 10.4.63 特异性结合的表位是合适抗天然 proBNP 抗体的主要表位。显然,由 MAB 10.4.63 所识别的该天然 proBNP 表位可进行天然修饰或者可变成蛋白复合物的组成部分,所述修饰或复合改变了该表位,使得 MAB 10.4.63 在较低程度上结合或者完全不结合所述修饰的或复合的 proBNP。携带所述修饰的“非天然”proBNP 表位的 proBNP 仅在总 proBNP 测定中可明显检测到。

[0049] 因为其内在的高度重现性,所以单克隆抗体是检测天然 proBNP 的优选工具。因

此,在一个优选的实施方案中,本发明涉及特异性结合天然 proBNP 的单克隆抗体。

[0050] 正如技术人员将会理解的,可以发现其它单克隆抗体,所述抗体比起 MAB 10.4.63 来说在与 PepScan 肽 35-38 的反应性上可表现出微小差异。抗天然 proBNP 的单克隆抗体只要仅检测出总 proBNP 的一个亚群就没有偏离本发明的精神,其与总 proBNP 群体中所包含的并且为 MAB 10.4.63 所结合的天然 proBNP 亚群的相关性为 r - 值至少 $r = 0.95$ 或更高。所述相关性是用 Biacore® 系统进行测定并如上所述进行统计学评价。甚至更优选所述单克隆抗体将检测出总 proBNP 中由 MAB 10.4.63 所结合的基本上相同的天然 proBNP 亚群,其中按照上述方法,对基本上相同亚群得到的相关性为 $r = 0.98$ 或更高。

[0051] 在一个优选的实施方案中,本发明也涉及一种制备单克隆抗体的方法,所述方法包括下述步骤:用 proBNP 免疫合适的非人类动物,优选小鼠、大鼠、兔子或绵羊,由此得到产生抗体的 B 细胞,将这些 B 细胞与合适的融合配偶体融合,然后对由如此获得的杂交瘤所产生的抗体对天然 proBNP 的反应性进行检验。优选仅选出这样的单克隆抗体并用于免疫测定:在合适的患者样品中所述单克隆抗体与 MAB 10.4.63 的相关性为 r - 值至少 0.95。如上所述对所述相关性进行评价。优选用合成 proBNP 或在原核宿主中产生的 proBNP 或者用至少包含 proBNP 氨基酸 41-44 的 proBNP 合成肽或其片段,进行免疫。

[0052] 现在,该 MAB 10.4.63 是可得到的,当然也可以制备、纯化和鉴定可用于特异性检测天然 proBNP 的多克隆抗体。例如,目前已经发现,可以制备、纯化抗天然 proBNP 的多克隆抗体 (PAB) 并且按照其与 MAB 10.4.63 的相关性进行表征。

[0053] 正如技术人员将会理解的,有各种方式产生结合天然 proBNP 的 PAB。显然,例如可以在不同的成功的免疫纯化途径中使用一种或多种合成肽作为免疫吸附剂。

[0054] 抗天然 proBNP 的多克隆抗体只要仅检测出总 proBNP 的一个亚群就没有偏离本发明的精神,其与总 proBNP 群体中所包含的并且为 MAB 10.4.63 所结合的天然 proBNP 亚群的相关性为 r - 值至少 $r = 0.95$ 或更高。所述相关性是用 Biacore® 系统进行测定并如上所述进行统计学评价。甚至更优选所述多克隆抗体制备物将检测出总 proBNP 中为 MAB 10.4.63 所结合的基本上相同的天然 proBNP 亚群,其中按照上述方法,对基本上相同亚群的结合得到的相关性为 $r = 0.98$ 或更高。

[0055] 获取所述抗天然 proBNP 的 PAB 的一种方法是,用重组产生或合成产生的 proBNP 进行免疫,通过亲和纯化来纯化由此获得的天然 proBNP 的特异性抗体,如上所述通过患者样品对如此获得的多克隆抗体进行评价。

[0056] 因此,在一个优选的实施方案中,本发明涉及产生多克隆抗体的方法,所述方法包括下述步骤:用 proBNP 免疫合适的非人类动物,由此得到多克隆抗体,然后对由如此获得的抗体对天然 proBNP 的反应性进行检验。优选仅选出这样的多克隆抗体并用于天然 proBNP 免疫测定:在合适的患者样品中,所述多克隆抗体与 MAB 10.4.63 的相关性为 r - 值至少 0.95。如上所述对所述相关性进行评价。

[0057] 对于任何特异性结合天然 proBNP 的多克隆抗体 (用相同样品和方法) 来说,对 MAB 18.4.34 的相关性,即对总 proBNP 的相关性明显低于对 MAB 10.4.63 的相关性。因为多克隆抗体制备物通常含有不同特性的各种抗体,优选 MAB 18.4.34 对于特异性结合总 proBNP 的天然 proBNP 亚部分的多克隆抗体的相关性为 $r = 0.94$ 或更低。甚至更优选低至 0.9 或更低。优选特异性结合天然 proBNP 的多克隆抗体制备物与 MAB 10.4.63 的相关性为

$r = 0.98$ 或更高,而与 MAB 18.4.34 的相关性为 $r = 0.94$ 或更低,或者与 MAB 18.4.34 的相关性甚至更优选为 $r = 0.9$ 或更低。

[0058] 优选使用合成 proBNP 或在原核宿主中产生的 proBNP 或者用至少包含 proBNP 氨基酸 41-44 的 proBNP 合成肽或其片段,来进行免疫,以获得抗天然 proBNP 的多克隆抗体。

[0059] 在我们的实验过程中,已经在不同的夹心测定法中制备、分析和联合应用了大量不同的免疫学试剂并用于检测 proBNP。这些不同的免疫学试剂的组合表明,大多数测定法显然都是对总 proBNP 进行测定。

[0060] 已经发现,所研究的总 proBNP 测定法表现出对 BNP 的合理相关性,其与心力衰竭诊断的合理诊断准确性密切相关,参见例如 Mair, J. 参见上文。

[0061] 然而,比起更好地分别区分 NYHA 0 级或 I 级患者和 NYHA II 级、III 级或 IV 级患者之间的总 proBNP 的测定来说,现在建立了仅检测天然 proBNP 的测定法。这也导致对心力衰竭患者的改进的临床鉴别。

[0062] 因此,在一个优选的实施方案中,本发明涉及一种特异性检测天然 proBNP 的方法,所述方法包括下述步骤:在允许形成抗天然 proBNP 抗体-天然 proBNP 复合物的条件下,使怀疑或已知含有 proBNP 的样品与特异性结合天然 proBNP 的抗体接触,然后检测所形成的复合物。优选所述特异性检测天然 proBNP 的方法用来区别 NYHA 0 级和 I 级与 NYHA II 级、III 级或 IV 级。

[0063] “抗天然 proBNP 抗体-天然 proBNP 复合物”也简称为“抗体-天然 proBNP 复合物”。

[0064] 术语“抗体”是指单克隆抗体或多克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体或可通过基因工程获得的其它抗体,以及技术人员已知的所有抗体片段,例如 $F(ab')_2$ 、 Fab' 或 Fab 片段。可以使用对天然 proBNP 具有合适特异性的其它结合剂,来替代抗体或抗体片段。但必须保证仅特异性结合天然 proBNP,即类似于 MAB 10.4.63。

[0065] 正如技术人员所理解的,有许多方法使用特异性结合天然 proBNP 的抗体来检测天然 proBNP,所有这些方法在相关教科书中都有详细介绍(参见例如 Tijssen, P., Practice and theory of enzymeimmunoassays 11(1990)Elsevier, Amsterdam 或 Diamandis 等主编.(1996)Immunoassays, Academic Press, Boston)。

[0066] 在本发明的正文中,已经通过 Biacore[®]系统,分析了用于检测总 proBNP 或天然 proBNP 的许多试剂和试剂组合,其中的部分结果见各实施例小节。

[0067] 在临床常规诊断中,通常使用基于不均一的免疫测定法。在本发明的一个优选实施方案中,天然 proBNP 的检测方法是竞争性免疫测定法。

[0068] 甚至更优选的是依照夹心测定原理的免疫测定法,其中形成抗体-抗原-抗体复合物,也称为夹心法。

[0069] 在本发明的一个优选实施方案中,天然 proBNP 的特异性检测方法是夹心免疫测定法,其中使用第一抗天然 proBNP 抗体和第二抗总 proBNP 抗体,并且其中所述第二抗 proBNP 抗体和第一抗天然 proBNP 抗体两者均在不同表位上结合天然 proBNP,从而形成(第一)抗天然 proBNP 抗体-天然 proBNP-(第二)抗 proBNP 抗体复合物。

[0070] 正如技术人员将会理解的,也可以使用抗总 proBNP 抗体作为第一(捕获)抗体,而用抗天然 proBNP 抗体作为(示踪、检测或标记)第二抗体,建立检测天然 proBNP 的夹心

测定法。

[0071] 优选测定天然 proBNP 的所述夹心法包括下述步骤：

[0072] a) 将样品与携带适于结合固相的基团的第一天然 proBNP- 特异性抗体进行混合，或者将样品与已经结合到固相上的第一天然 proBNP- 特异性抗体进行混合，

[0073] b) 在形成第一抗体 - 天然 proBNP- 第二抗体复合物的条件下，将该溶液与抗总 proBNP 的第二抗体混合，所述第二抗体结合到天然 proBNP 表位除外的表位上，所述表位存在于天然 proBNP 和总 proBNP 上并且携带标记，

[0074] c) 使所形成的免疫复合物结合到固相上，

[0075] d) 将固相从液相中分离出来，

[0076] e) 检测一相或两相中的标记。

[0077] 在定量测定中，用确定量的天然 proBNP 作为标准品进行同样的测定，并且在样品测定之后进行步骤 f)，即将标准测定值或标准曲线与样品测定值或曲线进行比较，外推天然 proBNP 的相应浓度。

[0078] 对天然 proBNP 具有特异性的第一抗体可以直接与固相结合，或者通过特异性结合对系统间接结合。该抗体按照技术人员已知方法例如以吸附方式与固相直接结合。当结合是通过特异性结合对系统间接进行时，第一抗体是由抗天然 proBNP 抗体和特异性结合对系统的第一配偶体组成的缀合物。特异性结合对系统是指彼此能特异性结合的两个配偶体。这样的结合可以基于免疫结合或者基于交替的特异性结合。优选的组合分别是生物素和抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或抗生物素、半抗原和抗半抗原、抗体的 Fc 片段和抗该 Fc 片段的抗体或者糖和凝集素。优选生物素和抗生物素蛋白的组合或者生物素和链霉抗生物素蛋白的组合用作特异性结合对系统。

[0079] 特异性结合对系统的第二配偶体包被在固相上。优选使用链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白。可以按照技术人员已知的标准方法，将特异性结合对系统的该配偶体结合到不溶性载体材料上。在此，共价结合以及吸附结合都是合适的。

[0080] 由聚苯乙烯或类似塑料制成的固相试管或微量滴定板是合适的并且已用特异性结合对系统的第二配偶体进行包被。更合适的和特别优选的是颗粒状基质，例如乳胶颗粒、磁颗粒、分子筛材料和玻璃珠。也可使用纸或硝化纤维素作为载体。特别优选使用如上所述的特异性结合对系统的第二配偶体包被的磁珠。当完成免疫反应且形成的免疫复合物结合到固相上后，可以通过例如过滤、离心或者如果是磁颗粒的情况下通过磁力，从液相中分离出这些微粒。然后，按照标准方法，检测与固相结合的标记物（或者检测残留在液相或两者中的标记物）。

[0081] 与总 proBNP 结合的第二抗体结合天然 proBNP 表位除外的表位，所述表位存在于天然 proBNP 和总 proBNP 上。这两种抗体很可能同时结合天然 proBNP 分子上的这两种表位，因为在别的情况下则不能形成夹心复合物。

[0082] 本发明的研究人员也鉴定出 proBNP 上的表位，所述表位非常适合于上述夹心测定。

[0083] 已经产生了大量的单克隆抗体。可以确定，并非重组 proBNP 上鉴定的所有表位都同样适合于测定患者样品中的 proBNP。

[0084] 基本上分别由氨基酸 13-16、27-31 和 64-67 组成的并分别被 MAB17. 3. 1、18. 4. 34

和 18.29.23 所识别的三个表位,看来存在于绝大多数(N-端)proBNP 分子上,即是总 proBNP 的表位。这些杂交瘤已于 2003 年 7 月 5 日保藏于 DSMZ。由这些杂交瘤产生的抗体代表了测定总 proBNP 的理想工具。如果单独用于竞争性测定法或者与相互或者与总 proBNP 反应的 PAB 联合用于夹心测定中时,可以容易地测定总 proBNP。

[0085] 已经依据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约的规定,将本发明优选的杂交瘤细胞系 MAB<NT-proBNP>16.1.39 (= MAK<NT-proBNP>16.1.39 = MAB 16.1.39)、MAB<NT-proBNP>17.3.1、MAB<NT-proBNP>10.4.63、MAB<NT-proBNP>18.4.34 和 MAB<NT-proBNP>18.29.23 保藏于德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ),德国):

[0086]

细胞系	保藏号	保藏日
MAK<NT-proBNP>16.1.39	DSM ACC 2590	07.05.2003
MAK<NT-proBNP>17.3.1	DSM ACC 2591	07.05.2003
MAK<NT-proBNP>18.4.34	DSM ACC 2592	07.05.2003
MAK<NT-proBNP>18.29.23	DSM ACC 2593	07.05.2003
MAK<NT-proBNP>10.4.63	DSM ACC 2654	06.05.2004

[0087] 从所述细胞系获得的抗体是本发明的优选实施方案。

[0088] 在检测天然 proBNP 时,优选在夹心测定中,联合使用如上所述的抗总 proBNP 单克隆抗体以及特异性结合天然 proBNP 的抗体。这样,所述夹心法得到的是仅对总 proBNP 的天然 proBNP 亚群的特异性检测结果。在用于测定天然 proBNP 的夹心法中,优选抗总 proBNP 的抗体是基本上分别结合氨基酸 13-16、27-31 和 64-67 的抗体。这些表位例如分别被 MAB 17.3.1、18.4.34 和 18.29.23 所识别。最优选使用结合氨基酸 27-31 的抗体,例如 MAB 18.4.34,用于测定天然 proBNP 的夹心法中。

[0089] 技术人员已知的所有生物液体都可用作天然 proBNP 体外特异性检测方法的样品。优选用于体外诊断的样品是体液,例如全血、血清、血浆、尿液或唾液。特别优选使用血清或血浆。

[0090] 除了如上所述的用液相检测试剂的所谓湿测法之外,也可使用适于检测抗原、半抗原、肽、蛋白、抗体等的所有标准的干测法。这些干测法或例如描述于 EP-A-0 186 799 的测试条将除待测样品之外的所有试验成分都结合在一个载体上。

[0091] 在一个优选的实施方案中,本发明涉及一种诊断心力衰竭的方法,所述方法包括检测天然 proBNP 并确定天然 proBNP 水平与心力衰竭存在之间的相关性。正如技术人员将会理解的,天然 proBNP 水平也可用于判断心力衰竭不存在或其严重程度。

[0092] 也优选在心力衰竭患者的随访以及在治疗监控中使用天然 proBNP 的判断标准。

[0093] 另一个优选的实施方案涉及一种测定天然 proBNP 的试剂盒,所述试剂盒包括特异性结合天然 proBNP 的抗体和用于检测天然 proBNP 的辅助试剂。

[0094] 下面提供实施例、参考文献、序列表和附图,以帮助理解本发明和所附权利要求书中给出的实质保护范围。人们知道,在不偏离本发明的精神的情况下,可以对所提出的方案进行修改。

附图说明

[0095] 图 1 :MAB 10. 4. 63 的表位鉴定

[0096] 通过使用 69 个不同的得自 proBNP(1-76) 序列的生物素化 8 聚体肽,分析了 MAB 10. 4. 63 的反应性概况,每个肽都向前步移 1 个氨基酸,因而覆盖了 proBNP(1-76) 的全部序列。给出消光值,单位为 mE。观察到对肽 37 和 38 的强反应性。

[0097] 图 2 :Biacore 分析中使用的仪器设置

[0098] 用该图中给出的 Biacore®3000 分析仪的操作方式,评价了不同的抗 proBNP 抗体对天然 proBNP 的特异性。

[0099] 图 3-8 :MAB 10. 4. 63 与不同单克隆抗 proBNP 抗体和多克隆抗 proBNP 抗体的相关性

[0100] 在夹心测定中,使用 Biacore 3000 分析仪,分析了 proBNP 浓度约为 10mg/ml 和以上(通过使用 MAB 10. 4. 63 进行测定并使用合成 proBNP 作为标定物)的 20 份人血清。用 MAB 10. 4. 63 所测得的数值在 X 轴上给出。用所述方法比较使用的抗体所测得的相应数值在 Y 轴上给出。MAB 10. 4. 63 与 MAB 16. 1. 39、MAB 18. 4. 34、MAB 18. 29. 23、PAB 30-38、PAB 44-51 和 PAB 41-46 的相关性分别见图 3、4、5、6、7 和 8。

[0101] 实施例 1

[0102] 重组 N- 端 proBNP(1-76) 的制备方法

[0103] 1. 重组 N- 端 proBNP 的克隆

[0104] 通过基因合成,制备 N- 端 proBNP(氨基酸序列 1-76) 的核苷酸序列。为了让该基因在大肠杆菌(E. coli)中获得最佳表达,使其 DNA 序列适于大肠杆菌中最频繁使用的密码子。用于制备该基因的寡核苷酸序列如下:

[0105] Pro5 '(SEQ ID NO:1):

[0106] 5 'CCGGATCCCACCCGCTG3 '

[0107] Pro1hum(SEQ ID NO:2):

[0108] 5 'CGGGATCCCACCCGCTGGGTTCCCCGGGTTCCGCTTCCGACCTGGAAAC

[0109] CTCCGGTCTGCAGGAACAGCGTAACCACT3 '

[0110] Pro2hum(SEQ ID NO:3):

[0111] 5 'CGGTTCCAGGGAGGTCTGTTCAACCTGCAGTTCGGACAGTTTACCCTGCA

[0112] GGTGGTTACGCTGTTCTGCTG3 '

[0113] Pro3hum(SEQ ID NO:4):

[0114] 5 'CAGACCTCCCTGGAACCGCTGCAGGAATCCCCGCGTCCGACCGGTGTTT

[0115] GGAAATCCCGTGAAGTTGCTAC 3 '

[0116] Pro4hum(SEQ ID NO:5):

[0117] 5 'CCCAAGCTTAACGCGGAGCACGCAGGGTGTACAGAACCATTTTACGGTG

[0118] ACCACGGATACCTTCGGTAGCAACTTCACGGGATTTCC3 '

[0119] Pro3 '(SEQ ID NO:6):

[0120] 5 'CCCAAGCTTAACGCGGAGC3 '

[0121] 使用这些引物,通过 PCR(聚合酶链式反应),进行基因的制备。将扩增的基因克隆到合适的载体例如载体 pUC19 中,然后测序。对于在表达载体 pQE8 中克隆的基因来说,通过限制切割位点 Bam HI 和 Hind III,将所述基因从载体 pUC19 上切割下来,然后以允许表达

具有N-端组氨酸-标记的蛋白的方式连接到载体pQE8上,然后转化大肠杆菌M15[pREP4]。

[0122] 2. N-端 proBNP 在大肠杆菌中的表达

[0123] 为了在大肠杆菌中表达所述基因,重组大肠杆菌克隆的过夜培养物在 Luria 肉汤(含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 50 μ g/ml 卡那霉素)中转染 1/60 并在 OD550 为 1 时用 IPTG(异丙基硫代半乳糖苷;1mM 终浓度)诱导。诱导后,培养物于 37°C 再培养 4 小时。然后将培养物离心,将细胞沉淀收集在 50mM 磷酸钠缓冲液(pH 8.0);300mM NaCl 中。通过超声消化细胞悬液后,将悬液离心,上清液上样到 Ni-NTA(次氨基三乙酸)柱。用 50mM 磷酸钠缓冲液(pH 8.0);300mM NaCl;20mM 咪唑进行洗涤后,用 50mM 磷酸钠缓冲液(pH 8.0);300mM NaCl;300mM 咪唑洗脱组氨酸-标记的 N-端 proBNP。收集洗脱流分,对 50mM Tris pH 8.0 进行透析。为了分离杂质,将透析液上样到 Q-琼脂糖凝胶柱。纯化的 N-端 proBNP 质量通过 MALDI-TOF 进行测定。发现该制备物(=重组 proBNP)含有 proBNP 1-76 和 proBNP 1-66,后者很可能代表降解产物。

[0124] 实施例 2

[0125] NTproBNP(1-76) 酰胺的合成

[0126] 通过最佳化固相肽合成方案(Merrifield(1962)Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 21,412),在 ABI 433 肽合成仪上,合成 NTproBNP(1-76) 酰胺(swissprot:检索号 P16860;氨基酸 27 至氨基酸 134)。简而言之,该肽在 Rink-Linker 修饰的聚苯乙烯固相上,通过重复缀合 8 倍过量的氨基酸而装配,所述氨基酸每个都被暂时的吡啶不稳定性 Fmoc-基团和永久的酸不稳定性 tBu-、BOC-、OtBu-、Trt-或 Pmc-基团保护,这取决于侧链功能。为了获取氧化稳定性材料,10 位甲硫氨酸被等价正亮氨酸交换。此外,为了抵抗蛋白酶降解,其 C 端通过使用 Rink linkage 而酰胺化。装配后,从固相上取下完全保护的肽,通过用三氟乙酸与合适的阳离子清除剂的混合物进行处理,释放永久保护基,最后通过制备型反相 HPLC 纯化分离所述肽。3 次 125 μ mol 规模的合成分别得到 16.0mg、17.1mg 和 18.0mg RP-HPLC 单峰纯物质(冻干物)。其身份用 MALDI 质谱和 ESI 质谱证明[8439.4]。

[0127] 实施例 3

[0128] 抗总 proBNP 或抗天然 proBNP 的单克隆抗体各自的制备和筛选

[0129] 1. 获取抗 N-端 proBNP 的单克隆抗体

[0130] 用 100 μ g N-端 proBNP 抗原以及完全弗氏佐剂,腹膜内免疫 Balb/c 小鼠(8-12 周龄)。分别使用重组的以及通过肽合成而制备的 proBNP(1-76)作为免疫小鼠的抗原。6 周后,再进行 3 次免疫,其间隔为 4 周。最后一次免疫后 1 周采血,测定试验动物血清中的抗体效价。从阳性反应小鼠的脾脏中,获取 B 淋巴细胞,与永久性骨髓瘤细胞系融合。按照众所周知的 Köhler 和 Millstein(Nature 256,1975,第 495-497 页)的方法进行融合。用常规方法例如通过市售的细胞分选仪或者通过“有限稀释”,克隆阳性杂交瘤的原代培养物。

[0131] 为了产生腹水,给 Balb/c 小鼠腹膜内注射 5×10^6 个杂交瘤细胞,所述小鼠之前已经用 0.5ml Pristan 处理过 1-2 次。2-3 周后,可从小鼠腹部获取腹水。可按常规方法从中分离抗体。

[0132] 2. 分别抗 proBNP 肽、合成 proBNP 和人血清中的 proBNP 的单克隆抗体的筛选试验

[0133] 为了鉴别杂交瘤细胞培养上清液中抗 proBNP 抗体的存在,按照三次筛选测定方式,评价上清液。

[0134] a) 对合成 N-端 proBNP 的反应性

[0135] 在室温下,在搅拌时使微量滴定板(Nunc,Maxisorb)与 $2.5\mu\text{g/ml}$ 合成 NT-proBNP(作为抗原)在 $100\mu\text{l}$ /孔荷载缓冲液(包被缓冲液,产品目录号 0726 559,Scil Diagnostics, GmbH)中结合 1 小时。荷载后处理在 PBS 缓冲液(磷酸缓冲盐溶液, Oxid, Code-BR 14a)和 1% Byco C 中进行 30 分钟。随后,用洗涤缓冲液(0.9M 氯化钠溶液, 0.05% 吐温 20)进行洗涤。在室温下,在搅拌时将 $100\mu\text{l}$ /孔抗体样品孵育 1 小时。用洗涤溶液再洗涤 2 次。然后在室温下,在搅拌时再与 100mU/ml 、 $100\mu\text{l}$ /孔检测抗体 PAB<M-Fcy> 山羊-F(ab')₂-过氧化物酶缀合物(Chemicon,产品目录号 AQ127P)孵育 1 小时。用洗涤缓冲液再次洗涤后,用常规方法测定过氧化物酶活性(例如用 ABTS®,室温 30 分钟,用 ELISA 读板器读取 405nm 的消光值的变化,单位为 mU)。

[0136] b) 使用合成肽进行表位表征供表位分析用

[0137] 为了进行表位分析,将荷载链霉抗生物素蛋白的微量滴定板与来自 proBNP 序列(1-76)的肽-生物素缀合物一起孵育。应用 69 个 8 聚体肽来扫描完整 proBNP 序列,所述 69 个 8 聚体肽通过每个序列向前步移 1 个氨基酸而获得,即分别为 1-8, 2-9, 3-10, 4-11……66-73, 67-74, 68-75 和 69-76。已经测试了另外的生物素化序列,分别包含 1-10, 8-18, 1-21, 16-30, 30-38, 32-43, 39-50, 47-57, 50-63, 62-70 和 64-76 位的氨基酸。已经将各个抗原肽溶于 PBS 缓冲液(磷酸缓冲盐溶液, Oxid, Code-BR 14a)和 0.5% Byco C 中至 250ng/ml 。为了进行肽包被,将每种溶液各 $100\mu\text{l}$ 分配给微量滴定板的不同孔,然后在室温下温和搅拌 1 小时。然后,用洗涤缓冲液(0.9M 氯化钠溶液, 0.05% 吐温 20)进行洗涤。如上 a) 所述进行抗体样品孵育和检测反应。因为它们与某些 NT-proBNP 肽有反应性,所以可以描绘出单克隆抗体或多克隆抗体所识别的表位的位置。

[0138] PepScan 的一个实例如图 1 所示。由杂交瘤 10.4.63 分泌的单克隆抗体与肽 36-38 的反应最强烈。这对应于至少由 proBNP 氨基酸 38-43(SEQ ID NO:11)组成的表位。因为很清楚地观察到与肽 37 和 38 的最强烈的反应性,可以认为共享表位包括氨基酸 38-42。

[0139] c) 与患者样品中 proBNP 的反应性

[0140] 在室温下,在搅拌时将微量滴定板(Nunc,Maxisorb)各孔用 $100\mu\text{l}$ /孔含 $5\mu\text{g/ml}$ PAB<人 proBNP>S-IgG(IS, (1-21) 或 (30-38)S-IgG 的荷载缓冲液(包被缓冲液,产品目录号 0726 559,Scil Diagnostics, GmbH)包被 1 小时。荷载后处理在 PBS 缓冲液(磷酸缓冲盐溶液, Oxid, Code-BR14a)和 1% Byco C 中进行 30 分钟。然后,用洗涤缓冲液(0.9M 氯化钠溶液, 0.05% 吐温 20)进行洗涤。在室温下,在搅拌时与 $100\mu\text{l}$ /孔用 PBS 缓冲液稀释的患者血浆中的天然抗原一起孵育。再次洗涤后,在室温下,在搅拌时与 $100\mu\text{l}$ /孔杂交瘤上清液孵育 1 小时。然后用洗涤溶液再洗涤 2 次,在室温下,在搅拌时与 100mU/ml 、 $100\mu\text{l}$ /孔的检测抗体 PAB<M-Fcy> 山羊-F(ab')₂-过氧化物酶缀合物(Chemicon,产品目录号 AQ127P)再孵育 1 小时。用洗涤缓冲液再次洗涤后,用常规方法测定过氧化物酶活性(例如用 ABTS®,室温 30 分钟,用 ELISA 读板器读取 405nm 的消光值的变化,单位为 mU)。

[0141] 仅与合成产生的 N-端 proBNP 或与人血清中的 proBNP 有阳性反应的杂交瘤培养物进行进一步处理。

[0142] 实施例 4

[0143] 抗 N-端 proBNP 的多克隆抗体的制备

[0144] 1. 免疫

[0145] 用重组 N-端 proBNP (参见实施例 1) 以及完全弗氏佐剂免疫绵羊。剂量为每只动物 0.1mg。在 10 个月内,按 4 周的间隔重复免疫。第一次免疫后 6 周和其后每月一次,获取血清样品,测定其敏感性和效价。

[0146] 2. 从绵羊血清纯化多克隆抗体

[0147] 从用重组 N-端 proBNP 免疫的绵羊的原始血清开始,用 aerosil® (1.5%) 进行脱脂处理,脱去脂质成分。然后通过硫酸铵沉淀 (2M) 分离免疫球蛋白。溶解的沉淀对 15mM KPO_4 , 50mM NaCl (pH 7.0) 透析,在 DEAE 琼脂糖凝胶上进行层析。在洗脱中,获取 IgG 流分 (= PAB<NT-proBNP>S-IgG (DE))。

[0148] 3. 用于制备对总 proBNP 具有特异性的多克隆抗体的亲和层析

[0149] 对于特异性结合总 proBNP 的多克隆抗体 (= PAB<NT-proBNP>S-IgG (IS, 1-21), 或简称 PAB<1-21>) 的亲和纯化,使用肽 HPLGSPGSASDLETSGLQEQR-C((1-21) 21-Cys, SEQ ID NO:7)。通过共价结合 1mg 肽 (1-21) 21-Cys 与 2ml 马来酰亚胺活化的 EAH 琼脂糖凝胶 4B (Amersham Biosciences, 产品目录号 17-0569-01), 制备亲和基质。

[0150] 柱子中填充了 10ml 亲和基质并用 50mM KPO_4 、150mM NaCl pH 7.5 (PBS) 进行平衡。2g PAB<NT-proBNP>S-IgG (DE) 上样到该柱子。柱子用 PBS 和 20mM KPO_4 、500mM NaCl、0.1% Triton X-100、0.5% 脱氧胆酸钠 (pH 7.5) 洗涤。用 ImmunoPure® Gentle Ag/Ab 洗脱缓冲液 (Pierce, 产品目录号 21013) 洗脱特异性结合亲和基质的 IgG, 并且称为 PAB<1-21>。亲和基质用 1M 丙酸再生并在 PBS/ NaN_3 中保存。

[0151] 类似方法用于产生对总 proBNP 具有特异性的亲和纯化的多克隆抗体 PAB<NT-proBNP>S-IgG (IS, 30-38), 或简称 PAB<30-38> (Karl, J. 等, WO 00/45176)。

[0152] 4. 用于制备对天然 proBNP 具有特异性的多克隆抗体的亲和层析

[0153] 通过顺序亲和层析, 获取抗天然 proBNP 的多克隆抗体 (= PAB<NT-proBNP>S-IgG (IS, 41-46), 或简称 PAB<41-46>)。按照如上所述相同的方法, 使用 3 个单独的肽即 CEUEU-SLEPLQE((37-43) 37-Cys, SEQ ID NO:8)、CEUEU-SPRPTGVW((44-51) 44-Cys, SEQ ID NO:9) 和 C-EPLQESPRPTG((39-50) 39-Cys, SEQ ID NO:10) (EUEU 唯一功能作为后面肽的延伸接头), 来制备 3 个单独的亲和基质。首先, 将 PAB<NT-proBNP>S-IgG (DE) 上样到包含肽 (37-43) 37-Cys 的亲和基质上, 以除去主要结合 NT-proBNP 序列 37-43 的所有多克隆抗体。然后, 流分上样到包含肽 (44-51) 44-Cys 的第二亲和基质, 以捕获主要结合 NT-proBNP 序列 44-51 的多克隆抗体。如上所述, 洗脱并收集结合的抗体 (= PAB<44-51>)。最后, 第二亲和纯化的流分流到包含肽 (39-50) 39-Cys 的第三亲和基质上。如上所述, 洗脱并收集结合的抗体。用已知称为 PepScan 分析的方法进行测定, 从第三亲和基质上洗脱的抗体对序列 41-46 (= PAB<41-46>) 中的表位具有特异性, 所述表位代表重叠序列 37-43 和 44-51 之间的其余表位。

[0154] 实施例 5

[0155] 抗 proBNP 的单克隆抗体和多克隆抗体的 Biacore 分析

[0156] 用 Biacore 3000 分析仪, 通过表面等离子共振, 测定抗天然 NT-proBNP 的单克隆抗体和多克隆抗体的特异性。所有表面等离子共振测定都于 25°C、用配备有研究级 CM5 传感器芯片的 Biacore 3000 进行。运行缓冲液为 HBS (10mM HEPES, 150mM NaCl, 3.4mM EDTA

和 0.005% P20 (= Polysorbat), pH 7.4)。

[0157] 1. 配体 PAB<NT-proBNP, 1-21>S-IgG 的固定化

[0158] 采用胺偶联化学, 将用作总 NT-proBNP 的捕获抗体的配体固定化。偶联之前, 通过以 20 μ l/min 的流速注射 10 μ l 0.1% SDS、50mM NaOH、10mM HCl 和 100mM 磷酸, 预处理传感器芯片。用 0.1M NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 和 0.1M EDC (3-(N,N-二甲基-氨基) 丙基-N-乙基碳二亚胺) 的 1:1 混合物以 20 μ l/min 的流速, 活化所有流通池表面 5 分钟。将浓度为 30 μ g/ml 溶于 10mM 乙酸钠 (pH 5.0) 的配体注射到所有 4 个流通池中达 5min。注射 5 分钟 1M 乙醇胺 (pH 8.0), 封闭表面, 接着注射 30 秒的 HBSwash (100mM HEPES pH 7.4, 1.5M NaCl, 3.4mMEDTA, 0.05% P20 (= Polysorbat), 2% DMSO)、100mM HCl 和 2x100mM 磷酸, 以除去非共价结合的配体。配体密度约为 16.000RU。

[0159] 2. 患者样品中 NT-proBNP 的浓度测定

[0160] 为了在 Biacore 3000 中进行以下方法, 使用图 2 所附程序。使用浓度为 0nM、2.5nM、5nM、10nM、20nM 和 40nM 的合成 NT-proBNP (1-76)amid 的 20% 马血清 (马血清用 HBS+1mg/ml 羧甲基葡聚糖按 1:5 稀释) 作为标定物。加入羧甲基葡聚糖来抑制血清成分对传感器芯片表面的非特异性结合。

[0161] 具有 > 10ng/ml 天然 NT-proBNP 的患者样品用也含 1mg/ml 羧甲基葡聚糖的 HBS 按 1:5 稀释。

[0162] 将标定物和患者样品以 10 μ l/min 的流速注射到所有 4 个流通池中达 10min, 接着以 100 μ l/min 的流速进行 30 秒的 HBS 注射, 以除去非特异性结合的血清成分。将已确定具有特异性的抗体, 以溶于 HBS 的 500nM 浓度、以 10 μ l/min 的流速注射 3min。流通池 1 中是抗体 1, 流通池 2 中是抗体 2, 以此类推。分别测定抗体的结合数据 (单位: RU), 作为注射抗体前 10 秒的响应与注射下一个抗体或 HBS 前 10 秒的响应之间的差异。

[0163] 为了计算患者样品中 NT-proBNP 的浓度, 运用 BIAevaluation 软件第 4.1 版。对于每种抗体, 用样条拟合绘制合成 NT-proBNP (1-76)amid 的校正曲线, 并计算 1:5 稀释的患者样品的相应浓度。浓度乘以 5 得到未稀释血清中 NT-proBNP 的浓度。

[0164] 3. 抗体特异性的测定

[0165] 为了测定抗体是结合人血清中的天然 NT-proBNP 还是总 NT-proBNP, 将用所研究的抗体测得的 NT-proBNP 浓度 (y 轴) 对用参考抗体 MAB 10.4.63 测得的相应样品浓度 (x 轴) 作图。运用 MS-Excel 来拟合 $y = ax+b$ 型线性回归曲线并计算相关系数 r 和斜率。

[0166] 表 1: 不同抗 proBNP 抗体的特征

[0167]

抗体	所识别的表位	合成 proBNP	患者样品 proBNP
MAB 17.3.1	氨基酸 13-16	+++	+++
MAB 18.4.34	氨基酸 27-31	+++	+++

[0168]

MAB 18.29.23	氨基酸 62-76	+++	+++
MAB 10.4.63	氨基酸 38-44	+++	+
MAB 16.1.39	氨基酸 38-43	+++	+
PAB<1-21>	氨基酸 1-21	+++	+++
PAB<44-51>	氨基酸 44-51	+++	++

PAB<41-46>	氨基酸 41-46	+++	+
------------	-----------	-----	---

[0169] +++ 表示合成 proBNP 和患者样品中的 proBNP 都能在类似程度上很好地识别；

[0170] + 表示与合成 proBNP 所得的值相比，与患者样品中的 proBNP 的反应范围为 15%。

[0171] 根据表 1，很显然，绝大多数 proBNP 表位看来以相同方式存在于合成 proBNP 和患者样品中含有的 proBNP 上。这样的实例分别是 MAB 17. 3. 1、MAB 18. 4. 34、MAB 28. 29. 13 和 PAB<1-21>。

[0172] 然而，有一个表位看来并不以相同方式存在于合成 proBNP 和患者样品中含有的 proBNP 上。该表位基本上由氨基酸 41-44 组成并且被 MAB 10. 4. 63 以及 PAB<41-46> 所识别。看来用这些免疫试剂，仅能识别患者样品中存在的总 proBNP 的一个亚群。当分别用总 proBNP 测定法或天然 proBNP 测定法来检测患者样品中的 proBNP 时，得到明显不同的结果。总 proBNP 中仅该亚群看来携带天然 proBNP 特征性表位。

[0173] 从图 3-8 看显而易见的是，所有抗天然 proBNP 抗体，即 MAB16. 1. 39 和 PAB<41-46> 表现出对 MAB 10. 4. 63 的非常好的相关性，而抗总 proBNP 的抗体，即 MAB 18. 4. 34、MAB 18. 29. 23 和 PAB 30-38 表现出与 MAB 10. 4. 63 的相关性低得多。有趣的是，PAB<44-51> 看来反应性有些混杂，不能作为特异性结合天然 proBNP 的抗体，因为它对 MAB 10. 4. 63 的相关性低于 $r = 0.95$ 。

[0174] 实施例 6

[0175] 天然 proBNP 和总 proBNP 测定法的各自的临床比较

[0176] 在临床研究中，分别通过用于天然 proBNP 和总 proBNP 的夹心 免疫测定，分析了按照 HYHA 状态分类的 246 个患者样品。该项研究结果见下表 2。

[0177] 表 2：患者样品中天然 proBNP 和总 proBNP 的比较性分析

[0178]

NYHA	n	246	天然 proBNP 任意单位	NYHA X/ NYHA 0	总 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	

[0179] 临床上非常重要是区别未患有或患有极轻微疾病患者（HYHA0 级和 1 级）以及正在患病的患者（NYHA X = 2 级或更高）。从表 2 可见，从 0/1 级到 2 级和更高级，有显著性增加。对于所有的 2 级、3 级和 4 级来说，这样的增加对天然 proBNP 来说比对总 proBNP 更加显著。这说明对于天然 proBNP 比起总 proBNP 来说具有更好的灵敏度 / 特异性以及临床实用性。

[0180] 参考文献目录

[0181] Buckley, M. G. 等, Clin. Sci. 95(1998)235-239

[0182] Cleland, J. G. 等, Heart 75(1996)410-413

[0183] Diamandis 等主编, (1996) Immunoassay, Academic Press, Boston

[0184] EP-A-0 186 799

[0185] EP-A-0 542 255

[0186] Goetze, J. P. 等, Clin. Chem. 48(2002)1035-1042

[0187] Hughes, D. 等, Clin. Sci. 96(1999)373-380

- [0188] Hunt, P. J. 等, Peptides 18(1997)1475-1481
- [0189] Hunt, P. J. 等, Biochem. Biophys. Res. Com. 214(1995)1175-1183
- [0190] Hunt, P. J. 等, Clinical Endocrinology 47(1997)287-296
- [0191] **Köhler**, G. 和 Millstein, C., Nature 256(1975)495-497
- [0192] Mair, J., Clin. Chem. 48(2002)977-978
- [0193] Mair, J. 等, Clin. Chem. Lab. Med. 39(2001)571-588
- [0194] Masuta, C. 等, Clin. Chem. 44(1998)130
- [0195] Merrifield, R. B., Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 21(1962)412
- [0196] Sudoh, T. 等, Nature 332(1988)78-81
- [0197] Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11(1990)
- [0198] 全书, 特别是第 43-78 页 ;Elsevier, Amsterdam
- [0199] Tsuji, T. 等, Clin. Chem. 40(1994)672-673
- [0200] Urban & Schwarzenberg, 1993, Roche Medical Dictionary
- [0201] US 5, 786, 163
- [0202] US 2003/0219734
- [0203] WO 00/35951
- [0204] WO 00/45176
- [0205] WO 93/24531

序列表

<110>Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

<120>天然 proBNP 的检测方法

<130>21732W0

<150>EP 03010591.0

<151>2003-05-12

<160>11

<170>PatentIn version 3.2

<210>1

<211>17

<212>DNA

<213>大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400>1

ccggatccca cccgctg

17

<210>2

<211>79

<212>DNA

<213>大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400>2

eggatccca cccgctgggt tccccgggtt ccgcttccga cctggaaacc tccggtctgc
aggaacagcg taaccacct

60

79

<210>3

<211>70

<212>DNA

<213>大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400>3

cggttccagg gaggtctggtt caacctgcag ttcggacagt ttaccctgca ggtggttacg	60
ctgttcctgc	70

<210>4

<211>71

<212>DNA

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400>4

cagacctccc tggaaccgct gcaggaatcc ccgcgtccga ccggtgtttg gaaatcccgt	60
gaagttgcta c	71

<210>5

<211>87

<212>DNA

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400>5

cccaagctta acgcggagca cgcagggtgt aeagaaccat ttacggtga ccacggatac	60
cttcggtagc aacttcacgg gatttcc	87

<210>6

<211>19

<212>DNA

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400>6

cccaagctta acgcggagc	19
----------------------	----

<210>7

<211>21

<212>PRT

<213> 智人 (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> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<220>

<221> 其他特征

<222> (3).. (3)

<223> Xaa 表示 β -丙氨酸

<220>

<221> 其他特征

<222> (5).. (5)

<223> Xaa 表示 β -丙氨酸

<400>8

Cys Glu Xaa Glu Xaa Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu

1

5

10

<210>9

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<220>

<221> 其他特征

<222> (3).. (3)

<223> Xaa 表示 β -丙氨酸

<220>

<221> 其他特征

<222>(5).. (5)

<223>Xaa 表示 β -丙氨酸

<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> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> 其他特征

<222>(3).. (3)

<223>Xaa 表示 β -丙氨酸

<220>

<221> 其他特征

<222>(5).. (5)

<223>Xaa 表示 β -丙氨酸

<400>10

Cys Glu Xaa Glu Xaa Leu Glu Pro Leu Gln Glu

1 5 10

<210>11

<211>6

<212>PRT

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400>11

Leu Glu Pro Leu Gln Glu

1 5

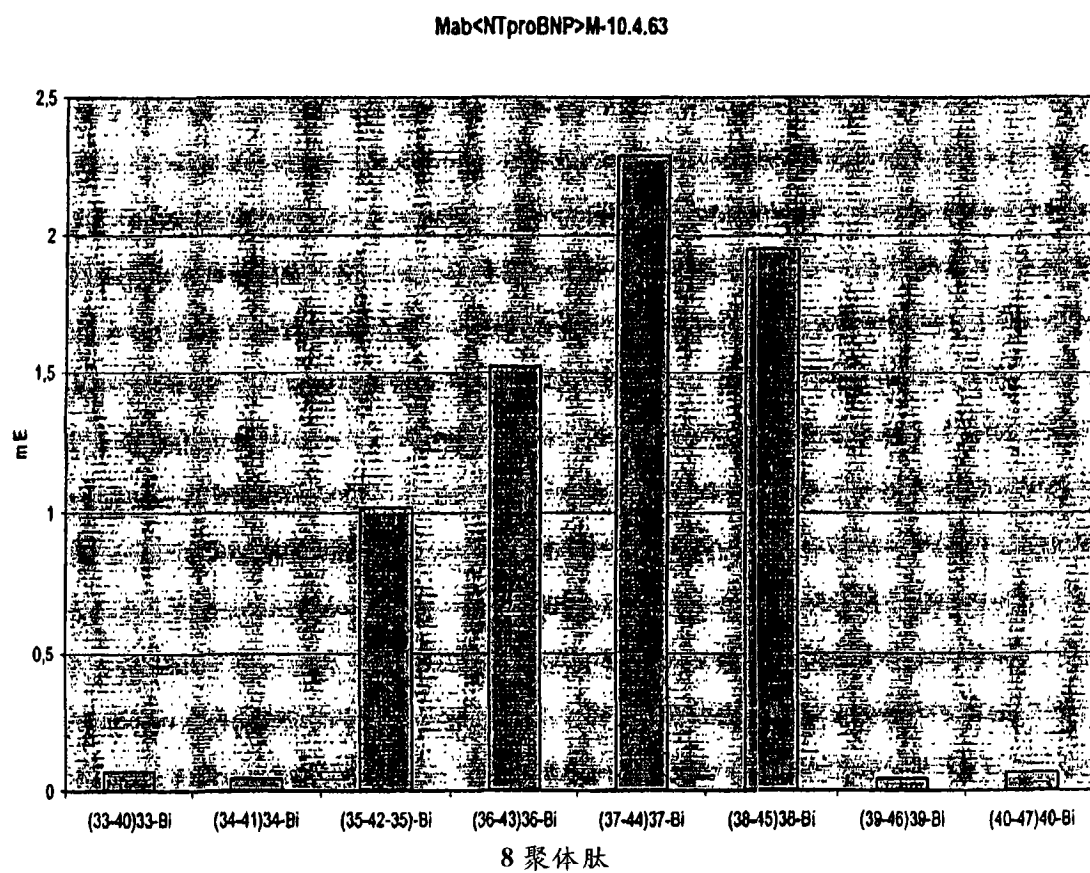


图 1

NT-proBNP 的测定程序，使用 20 个患者样品，8 种不同抗体，Biacore 编写和 BIACORE 3000 控制软件第 4.1 版来执行

```

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

```

图 2a


```

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

```

图 2b

```
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
  ENDLOOP
ENDLOOP

  APROG Regen
  APPEND continue
END
```

图 2c

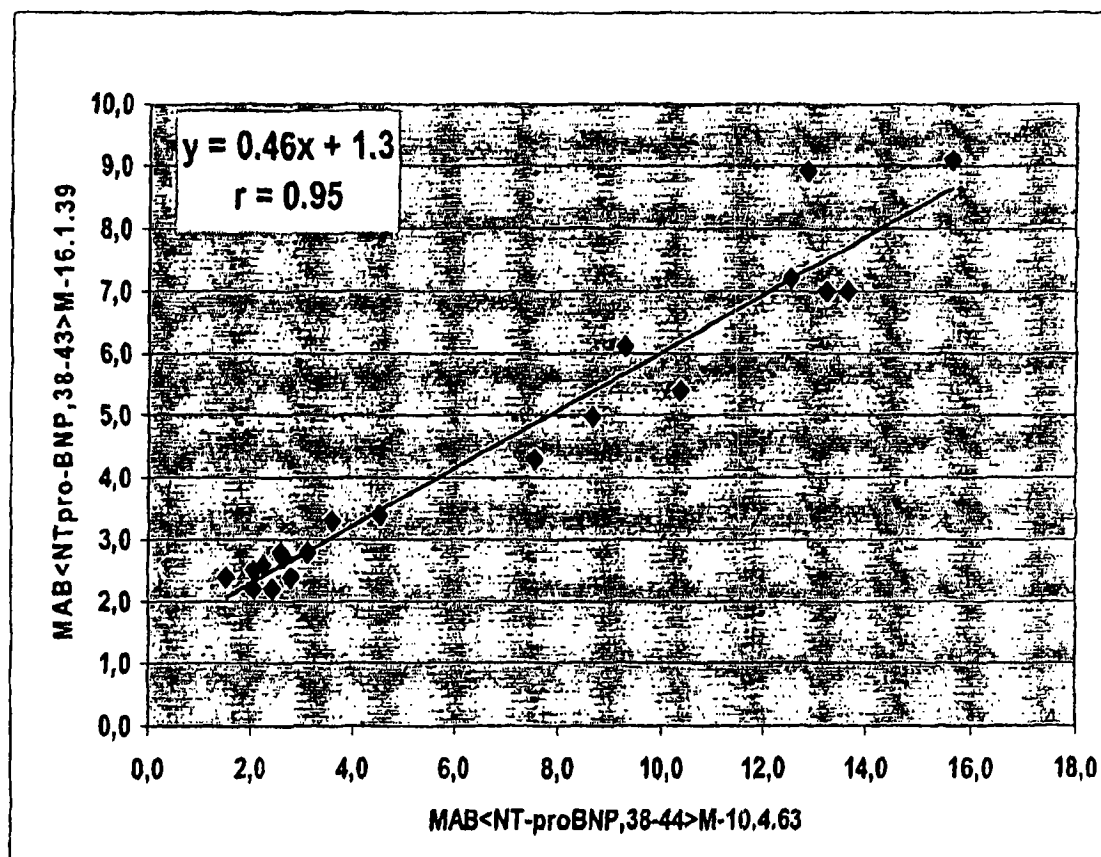


图 3

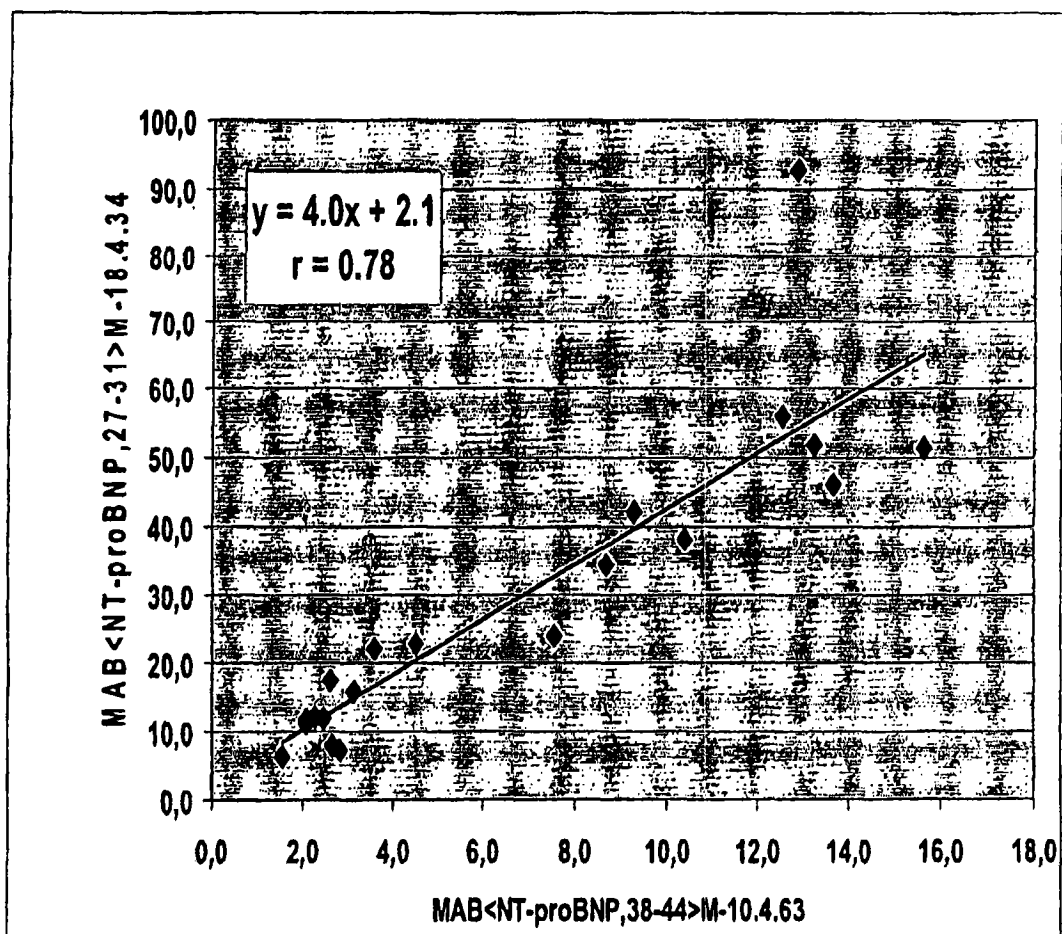


图 4

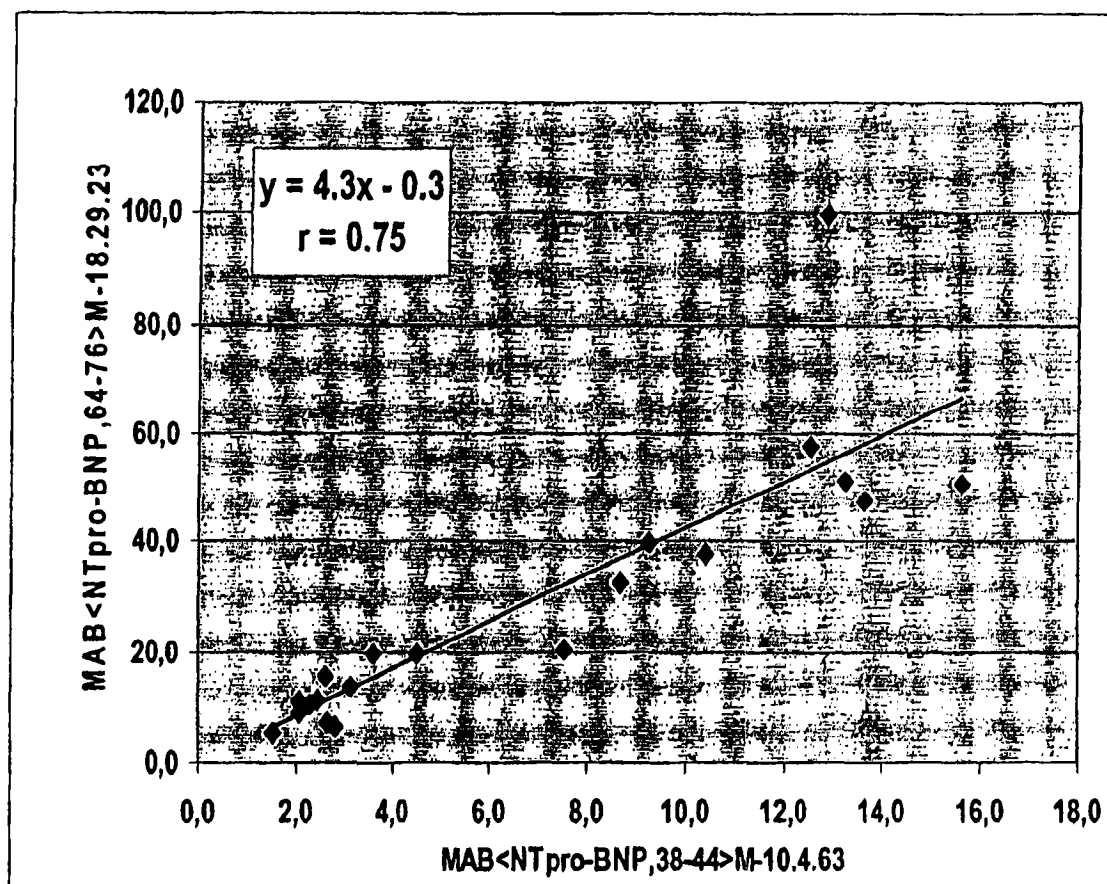


图 5

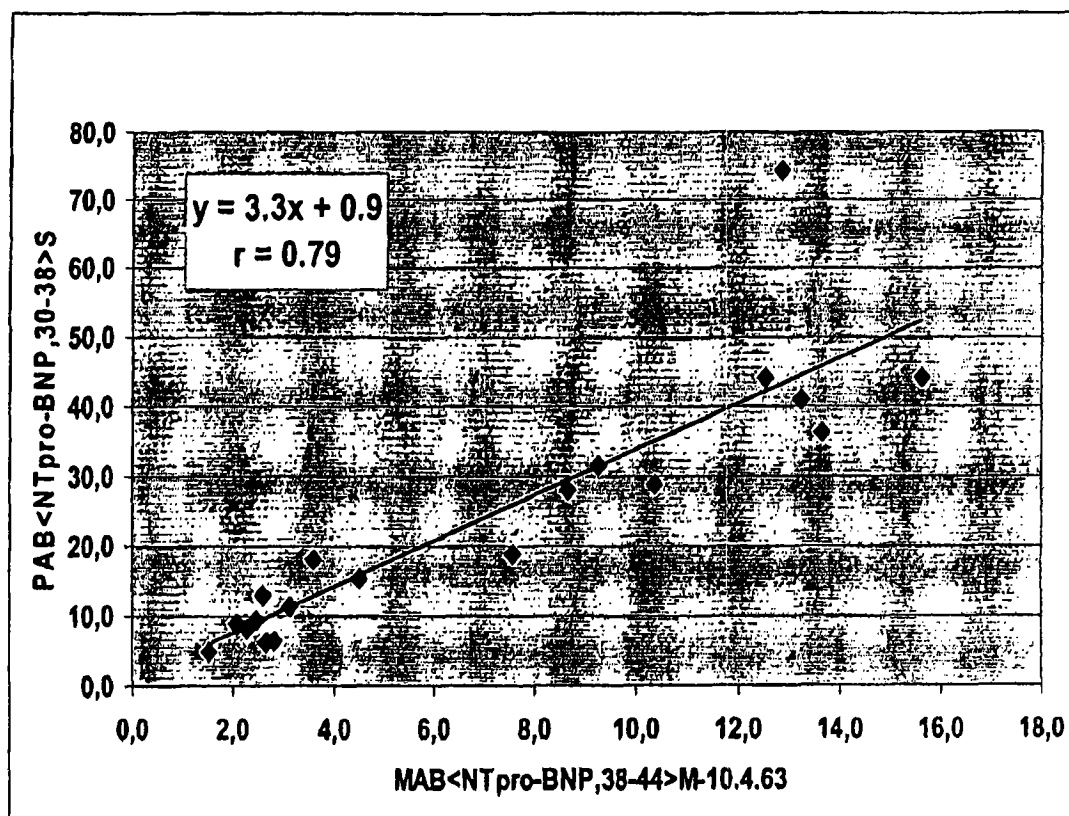


图 6

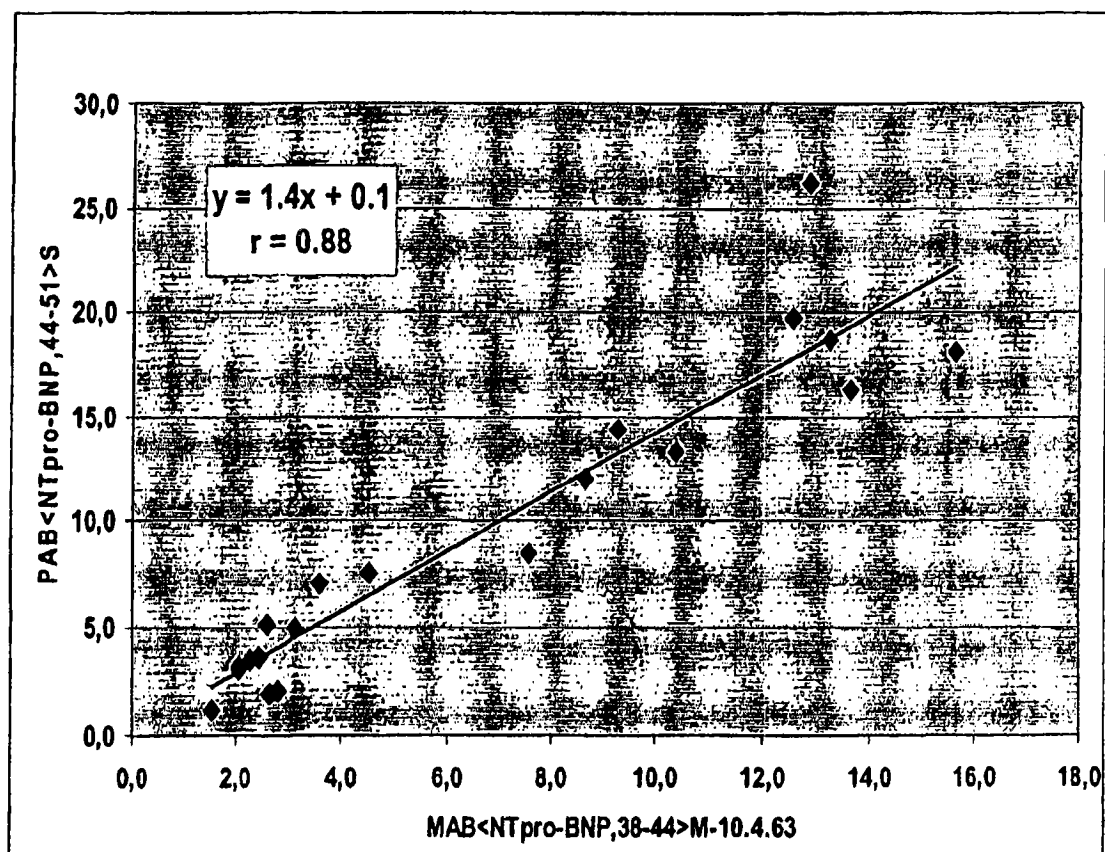


图 7

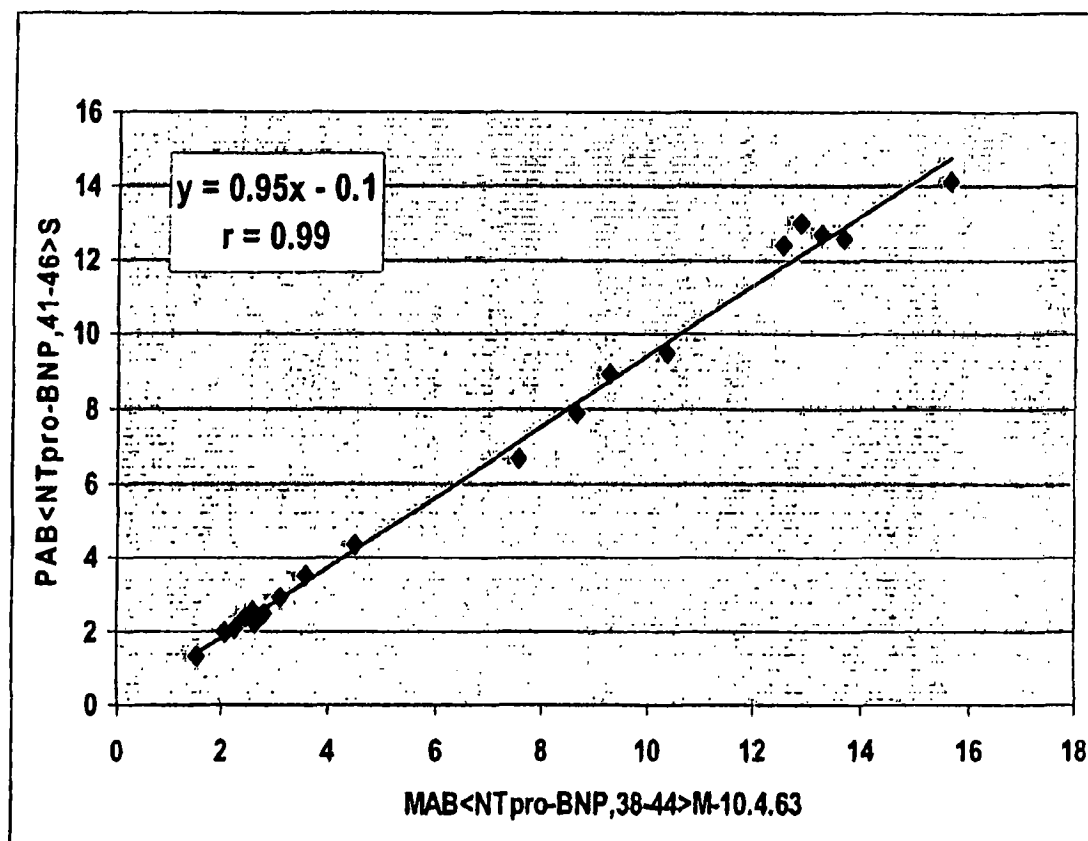


图 8