[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410095878.4

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1316248C

[22] 申请日 2004.11.26
[21] 申请号 200410095878.4
[30] 优先权
[32] 2003.11.28 [33] DE [31] 10355731.8
[73] 专利权人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司
地址 瑞士巴塞尔
[72] 发明人 J·施平克 A·尼希特尔
V·克勒姆特 K·哈勒迈尔
M·格罗尔 A·博格亚
A·加鲁塞尔
[56] 参考文献
WO03087819A1 2003.10.23
JP2002 - 272458A 2002.9.24
US6461828B1 2002.10.8
CN1339107A 2002.3.6
审查员 刘玉玲
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李连涛 徐雁漪

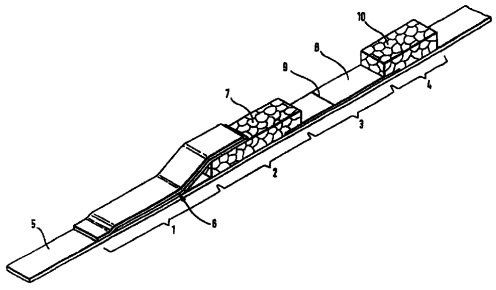
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 5 页

[54] 发明名称

确定 NT - proBNP 的分析夹心测试

[57] 摘要

本发明涉及采用特殊抗体组合的用于测定 NT - proBNP 的免疫快速测试。本发明中的快速测试可以有利地呈现为免疫层析测试条。



1. 用于测定 NT-proBNP 的免疫夹心测试元件，其特征在于：它采用如下的抗体组合：

MAB 18.4.34(27-31)与：PAB(39-50)或 PAB(38-42)或 PAB(44-50)或

MAB 17.3.1(13-16)与：PAB(39-50)或 PAB(38-42)或 PAB(44-50)或

MAB 18.4.34(27-31)与 MAB(38-42)。

2. 如权利要求 1 所要求保护的免疫夹心测试元件，其特征在于 MAB(38-42)为 MAB 16.1.39(38-42)。

3. 如权利要求 1 或 2 所要求保护的免疫夹心测试元件，其特征在于它是一种免疫快速检测元件。

4. 如权利要求 3 所要求保护的免疫夹心测试元件，其特征在于所述的抗体之一以抗体－金络合物的形式存在。

5. 如权利要求 3 所要求保护的免疫夹心测试元件，其特征在于所述的抗体之一以生物素化的抗体形式存在。

6. 一种检测 NT-proBNP 的方法，其特征在于应用如权利要求 1 至 5 中任意一项所要求保护的免疫夹心测试元件。

确定 NT-proBNP 的分析夹心测试

本发明涉及一种分析夹心测试，特别是一种测试元件，尤其是一种利用夹心原理测定 N-末端前脑钠尿肽（NT-proBNP）的呈免疫层析测试条。

NT-proBNP 是一种用于诊断和控制心力衰竭的非常有前途的标志物。例如，在 WO0045176 中的 1 至 4 页综述了心力衰竭及 NT-proBNP 作为心脏病标志物的重要性，给出了作为标志物的实施例，WO0045176 在此详细的作为参考。此外，文献 US 5786163、US6461828、US6117644、EP1151304、WO02083913 以及申请日为 2003 年 12 月 5 日的 EP 专利申请号 030105910.0（Klemt 等）均涉及 NT-proBNP 及其抗体和检测方法。

目前，体外诊断市场中唯一可利用的 NT-proBNP 测试为 Roche 诊断公司的基于夹心反应及电化学发光检测原理的全自动 Elecsys® NT-proBNP 检测。该检测被设计用于大规模中心实验室，并且为了进行测试，除了须精确计量的液体试剂之外，还需要相对复杂的仪器来定量液体和检测发光信号。目前市场上还没有使用简单的、仅通过显色而无需采用评估仪器的快速检测（如果需要的话）NT-proBNP 的方法。

免疫可检测物质的快速检测长期以来已知存在许多不同的参数，例如参见 WO9706439、EP0291194、US 5591645、US4861711、US 5141850、US6506612、US5458852、US5073484。在这些文献中的免疫检测试剂（主要是标记或未标记的抗体或抗原）通常是以存在于载体上的干燥形式提供的，该载体允许样品液体（特别是体液，例如血液、血清、血浆、尿、唾液等）转移至或进入载体中。基于该目的，所述载体优选具有毛细管的效果，例如具有毛细管通道的膜或塑料载体。业内专家通常称其为免疫层析测试条或测试装置。

在患有急性呼吸窘迫症的病人中，尽可能地快速进行 NT-proBNP 测定有利于排除或诊断心力衰竭作为呼吸窘迫症的原因从而进行正确的治疗。由于 Elecsys® NT-proBNP 检测仅能在中心实验室中进行，从而很难在常规时间以外快速地测定 NT-proBNP。因此，如果具有能在常规时间以外能在紧急病房中直接进行快速的检测将对紧急病房十分有利。不过，这种快速检测必须保证具有与中心实验室的参考方法（Elecsys®

NT-proBNP）相同的参考范围和截止值，从而保证不依赖于具体进行的检测类型的结果的较好的可比性。

用于 Elecsys® NT-proBNP 检测的多克隆抗体（PAB）是 NT-proBNP 的一种非常特别的部分（“天然” NT-proBNP; 参见 Klemt 等的申请日为 2003 年 12 月 5 日的 EP 专利申请号 030105910.0; 根据该文献，测试识别了包括 1-21（AA 1-21）和 39-50（AA 39-50）位氨基酸的 NT-proBNP 的表位）。然而，已经证实，这些多克隆抗体不适用于采用颗粒标记例如胶体金作为标记物的 NT-proBNP 快速检测，因为由于快速检测的组分之间（例如载体物质、基质等）的物理化学相互作用，这类抗体在信号产生方面显示出非常不理想的可变性。这导致在不同的批次间测试效果具有相当大的波动性。

因此，本发明的目的是克服现有技术中存在的缺陷。特别是，本发明的目的是提供一种测定 NT-proBNP 的快速测试，其能重复生产并与实验方法存在良好的关联。

该目标由本发明的主题内容实现了。

本发明涉及一种免疫测试，尤其是快速检测的形式，例如如在专利的独立权利要求中所表征的分析测试元件。在从属权利要求中描述了优选实施例。

用于在夹心方式中进行免疫测试的本发明的方案以及特别是与 Elecsys®参考方法十分相关的快速检测采用了一种包括至少两个抗 NT-proBNP 的抗体的特定抗体的组合，其中至少一个抗体为多克隆抗体（PAB）。根据本发明的另一夹心测试抗体可以是 MAB 或是多克隆抗体（PAB）。在这种联系中，这些抗体（缩写为 AB）之一至少靶向包括 38 至 50 氨基酸的 NT-proBNP 表位部分（如下简写为 AB(38-50)或 MAB(38-50)或 PAB(38-50)）。至少有一个另外的抗体至少作用于包括 1 至 37 或 43 至 76 氨基酸(如下简写为 AB(1-37)或 AB(43-76)或 MAB(1-37)或 MAB(43-76)或 PAB(1-37)或 PAB(43-76)）的 NT-proBNP 的表位部分。被抗体识别的表位可以稍微重叠，优选重叠少于 5 个氨基酸，尤其优选少于 2 个氨基酸。

一种抗体的组合优选地包括至少一种抗 NT-proBNP 的多克隆抗体（PAB）和一种单克隆抗体（MAB）(也称为 PAB/MAB 组合)。

本发明中采用的术语 PAB(X-Y)表示一种多克隆抗体，其靶向包括 X

到 Y 位的氨基酸的 NT-proBNP 表位。MAB(X-Y)是一种相应的单克隆抗体。AB(X-Y)一般表示一种靶向包括 X 到 Y 位氨基酸的 NT-proBNP 表位的抗体。

MABa.b.c(X-Y)为一种靶向包括 X 至 Y 位氨基酸的 NT-proBNP 表位的单克隆抗体，其来源于保藏的细胞系 a.b.c.。

为了保证抗体一标记缀合物的可重现的质量，优选 MAB 被固定于颗粒标记物上，特别是金标记物上。

其他合适的颗粒标记物为例如彩色的乳胶、其他的金属溶胶标记物、聚合物标记物或半导体纳米微晶体（也称为量子点）。MAB-标记缀合物优选地以可经样品液体作用而分离的方式存在于快速检测装置中，例如经浸渍合适的载体介质如羊毛状覆盖物、膜等的方式。不过，也可以将 MAB-标记的缀合物作为溶液添加至快速检测装置中。

优选地，来源于免疫哺乳动物，尤其是绵羊、山羊或兔子的 PAB 优选地作为生物素衍生物存在于快速检测系统中，并且可以与抗生物素蛋白或链霉亲和素检测线相连。不过，也可以直接将 PAB 固定于快速检测装置中，例如以存在于合适的层析膜上的检测线的形式。

根据本发明，也可以采用，虽然不是那么优选，溶于溶液中的标记的 AB，特别是标记的 MAB，和第二抗体，特别是第二抗 MAB 或 PAB 用于快速检测。一种可捕获适当标记的 AB 的结合伙伴位于测试装置的检测区，从而可以将包括第一抗体、被分析物和第二抗体的夹心复合体结合至快速检测系统的固相上。

如本发明中所采用的 MAB 无需必须识别在参考系统（Elecsys®测试）中检测出的表位（AA 1-21）从而保证与参考测试的良好地关联：权利要求 1 中提到的抗体组合，尤其是 MAB/PAB 组合 MAB 17.3.1(13-16)/PAB(39-50)和 MAB 18.4.34(27-31)/PAB(39-50)与采用抗 NT-proBNP 的 AA 1-21 和 AA 39-50 表位的多克隆抗体（PAB(1-21)和 PAB(39-50)）的 Elecsys®参考系统关联性很好。

采用本领域熟练技术人员已知的方法，特别是参照 WO0045176 的实施例 2 的方法可以获得、定性和鉴定多克隆抗体如 PAB(1-21)和 PAB(39-50)。

采用本领域熟练技术人员已知的方法，特别是参照 WO0045176 的实施例 3 或申请日为 2003 年 12 月 5 日的 EP 专利申请号 030105910.0（Klemt

等）中的方法可以获得、定性和鉴定单克隆抗体如 MAB(38-42)和 MAB(44-50)。

通过本领域熟练技术人员已知的方法（同时也参照 WO0045176 的实施例 2 和 Klemt 等的申请日为 2003 年 12 月 5 日的 EP 专利申请号 030105910.0），采用如金或其他标记物、生物素等来标记抗体。例如在 EP-A0898170 中详细描述了采用金标记的过程。

特别是可以根据 Klemt 等的申请日为 2003 年 12 月 5 日的 EP 专利申请号 030105910.0 实施例 3 的记载来获得优选的单克隆抗体 MAB 17.3.1(13-16)、MAB 16.1.39(38-42)、MAB 18.29.23(64-67)和 MAB 18.4.34(27-31)。相应的细胞系保藏于“Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSZM)”（保存编号和日期为：MAB 17.3.1(13-16)为 DSM ACC2591(2003/05/07)；MAB 16.1.39(38-42)为 DSM ACC2590(2003/05/07)；MAB 18.29.23(64-67)为 DSM ACC2593(2003/05/07)；和 MAB 18.4.34(27-31)为 DSM ACC2592 (2003/05/07)）。

与组合 MAB 17.3.1(13-16)/PAB(39-50)一样，组合 MAB 18.4.34(27-31) /PAB(39-50)与参考实验有较好的相关性（也参见实施例 2）。

此外，组合 MAB 18.4.34(27-31) /PAB(39-50)被证实对于本发明的测试十分有效：这种组合使函数曲线特别适合于特别合适的快速检测系统（参见实施例 3）。与之相比较，组合 MAB 17.3.1(13-16)/PAB(39-50)显示出较差的检测灵敏度。

采用如下实施例和附图进一步阐明本发明。

图 1 显示了呈免疫层析测试条形状的本发明的快速检测装置的优选实施例的略图。

图 2 显示了 Elecsys®湿润测试形式的抗体组合 MAB 17.3.1(13-16)/PAB(39-50)与 Elecsys®参考方法 PAB(1-21)/PAB(39-50)的相关性。

图 3 显示了 Elecsys®湿润测试形式的抗体组合 MAB 18.4.34(27-31) /PAB(39-50)与 Elecsys®参考方法 PAB(1-21)/PAB(39-50)的相关性。

图 4 显示了采用不同抗体组合的根据实施例 1 所述的 NT-proBNP 测试条的函数曲线。

图 5 显示了采用抗体组合：Au-MAB18.4.34(27-31) /Bi-PAB(39-50)的

NT-proBNP 测试条与 Elecsys® NT-proBNP 测试试剂盒的相关性。

图中的编号表示:

1. 样品加样区
2. 红血球分离区
3. 检测区
4. 吸收区
5. 载体材料
6. 样品加样基质(“生物素羊毛状覆盖物”和“金羊毛状覆盖物”)
7. 红血球分离基质
8. 检测基质
9. 线状的固定区
10. 吸收基质

实施例

1) 用于测定全血中 NT-proBNP 的检测装置的制备(参考图 1)

测试装置(图 1)由其上装有加样区(1)、红血球分离区(2)、检测区(3)和吸收区(4)的载体材料(5)组成。部分与红血球分离区(7)相重叠的样品加样基质(6)位于样品的加样区(1)中。红血球分离基质(7)又稍稍与检测基质(8)(检测区)重叠,其中检测基质上覆盖有呈线状的(9)固定物质。一种吸收基质(10)稍稍与检测基质(8)重叠。与待检测的被分析物形成复合体形式所需的所有试剂均置于样品的加样基质中(6)。在本技术方案中,样品加样区由两层叠放的羊毛状覆盖物组成,其中第一层(“金羊毛状覆盖物”)浸渍了抗 NT-proBNP 的金标记的抗体(MAB 18.4.34(27-31)),第二层羊毛状覆盖物(“生物素羊毛状覆盖物”)中浸渍了抗 NT-proBNP 的生物素化抗体(PAB(39-50))。一由链霉亲和素制成的线(9)位于检测区中。

一层 350μm 厚的聚酯油(Pütz)作为载体层(5)。一层 360μm 厚的聚酯羊毛状覆盖物(Roche 诊断公司)被用作样品加样基质(6)的“金羊毛状覆盖物”或“生物素羊毛状覆盖物”。一层 1.8mm 厚的玻璃纤维羊毛状覆盖物(Roche 诊断公司)被用作红血球分离基质(7)。一层 140μm 厚的硝酸纤维膜(Sartorius)被用作检测基质(8)。一层 1.8mm 厚的玻璃纤维羊毛状覆盖物(Roche 诊断公司)被用作吸收基质(10)。如图 1

所示，单独的组件（6、7、8、10）通过热熔粘合的方式轻微重叠的粘合于载体层上（5）。

“金和生物素羊毛状覆盖物”的浸渍制剂为：

“金羊毛状覆盖物”： 100mM Hepes pH7.4, 0.1% Tween®,
20μg/ml 生物素化的 PAB(39-50)

“生物素羊毛状覆盖物”： 100mM Hepes pH7.4, OD 4 MAB 18.4.34(27-31)金络合物

2） Elecsys®形式的表位/抗体组合 MAB 17.3.1(13-16)/PAB(39-50)和 MAB 18.4.34(27-31) /PAB(39-50)与 Elecsys® NT-proBNP 检测试剂盒的相关性（参考图 2 和 3）

在 Elecsys® 2010（Roche 诊断公司）上通过电化学发光免疫实验来确定 MAB/PAB 组合 MAB 17.3.1(13-16)/PAB(39-50)和 MAB 18.4.34(27-31) /PAB(39-50)与 Elecsys®检测试剂盒（PAB(1-21)/PAB(30-50)）的相关性。为了进行该实验，将 PAB(39-50)用作生物素化的捕获剂，并且 MABs 的钌化 $F(ab')_2$ 片段被用作检测试剂。在每一实验中将 20μl 的样品或标准物与 75μl 的两种抗体试剂在 37℃下温育 9 分钟。随后，加入 35μl 的覆盖有链霉亲和素的磁性聚苯乙烯颗粒，并在室温下再温育 9 分钟。在 Elecsys® 2010 上常规检测等量温育溶液的电化学发光信号，并通过标准曲线的方式将其转化为浓度信号。

现在采用两种 MAB/PAB 的改进测试方法和 Elecsys®试剂盒来检测来源于患有心力衰竭的病人的临床样本。结果示于图 2 和 3 中。两种 MAB/PAB 的改进测试均获得了与 Elecsys®试剂盒较好的相关性(r=0.978 和 r=0.957)。

3）采用两种不同 MAB/PAB 组合的 NT-proBNP 测试条的函数曲线

按照实施例 1 的方法制备 NT-proBNP 测试条。采用了如下用于试剂羊毛状覆盖物的浸渍制剂：

“生物素羊毛状覆盖物”： 100mM Hepes pH7.4, 0.1% Tween®,
20μg/ml 生物素化的 PAB(39-50)

“金羊毛状覆盖物”： 100mM Hepes pH7.4, OD 4 MAB 18.4.34(27-31)或 MAB 17.3.1(13-16)金络合物

向来源于健康捐赠者的肝素化的血液样品中加入来源于患心力衰竭病人的含 NT-proBNP 的血清，并将其等分。取 150μl 的混合血样加样至测试条上，并利用 CARDIAC Reader®（Roche 诊断公司）检测。样品检测后的反应时间为 12 分钟。为了确定样品的 NT-proBNP 浓度，从同一等分样品离心获得血浆并通过 Elecsys® NT-proBNP 试剂盒（Roche 诊断公司）进行检测。通过这种方式获得的两种测试条改进系统 MAB 17.3.1(13-16)/PAB(39-50)和 MAB 18.4.34(27-31) /PAB(39-50)的函数曲线示于图 4 中。其中改进系统 MAB 18.4.34(27-31) /PAB(39-50)具有相当陡峭得多的标准曲线因此测试更灵敏。

4）采用 AB 组合：Au-MAB18.4.34(27-31) /Bi-PAB(39-50)的 NT-proBNP 测试条与 Elecsys® NT-proBNP 试剂盒的相关性

将来源于患有心力衰竭的病人的含 NT-proBNP 的血清加入肝素化的来源于健康捐赠者的血液样品中，并被等分。取 150μl 的这种混合血样加样至测试条上，并按照标准方法利用 CARDIAC Reader®（Roche 诊断公司）进行检测。从相同样品中离心获得血浆，并采用 Elecsys® NT-proBNP 试剂盒（Roche 诊断公司）在 Elecsys® 1010 分析系统中进行检测。采用这种方式制备了 60 份样品并采用两个系统检测。图 5 显示了两个系统的测量值。其相关性很好，r=0.95.。

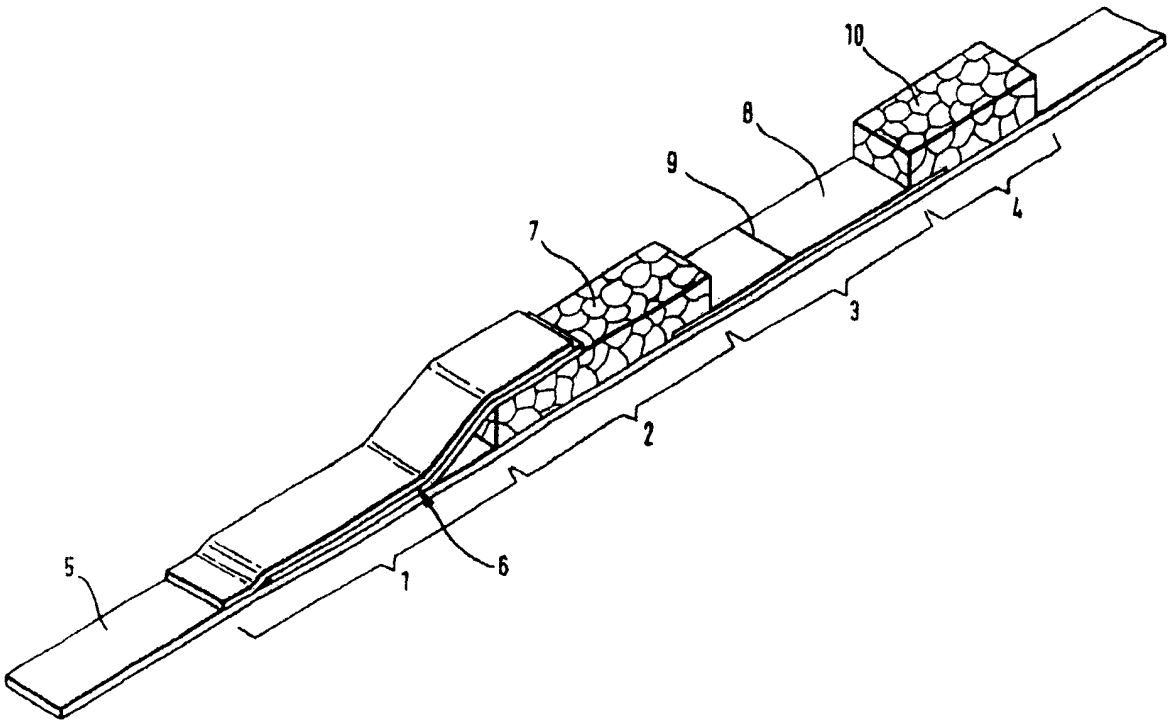


图 1

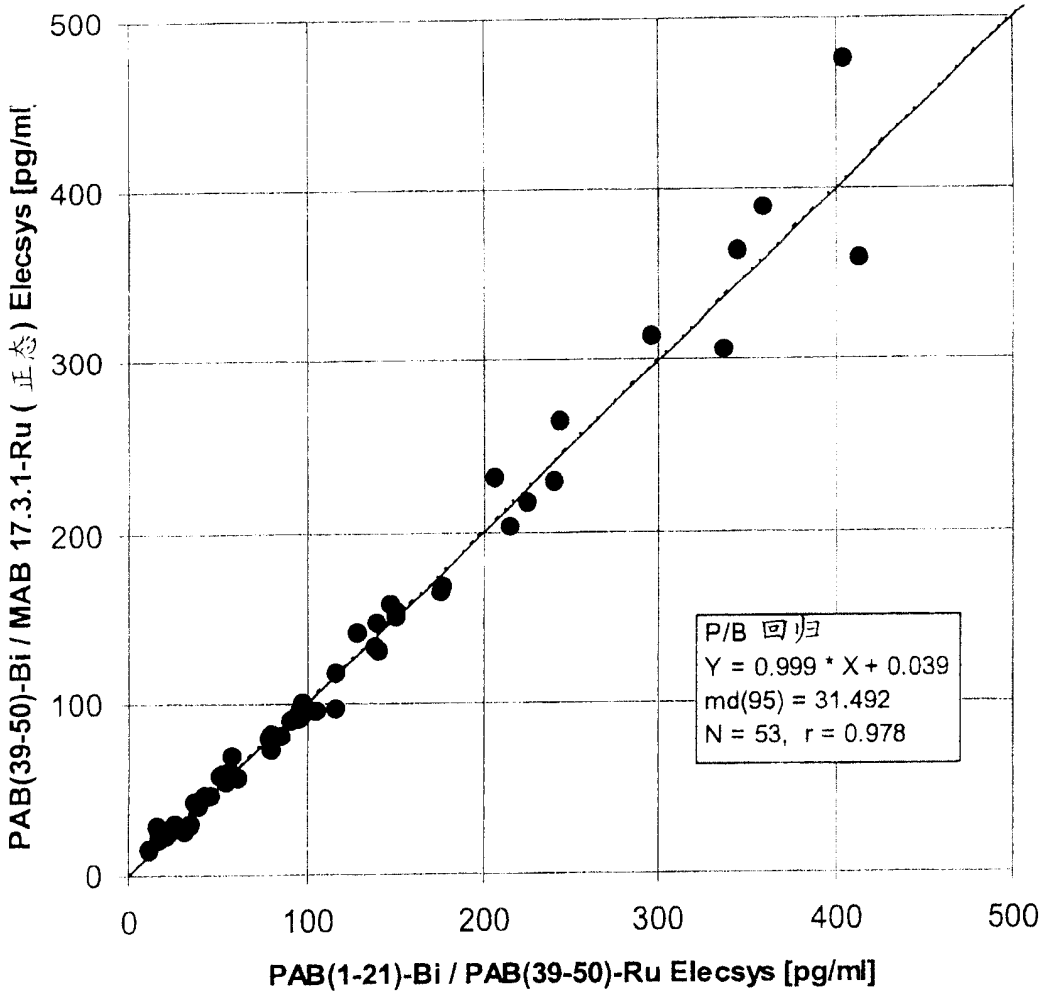

500
400
300
200
100
0
0
100
200
300
400
500
PAB(39-50)-Bi / MAB 17.3.1-Ru (正态) Elecsys [pg/ml]
PAB(1-21)-Bi / PAB(39-50)-Ru Elecsys [pg/ml]
P/B 回归
Y = 0.999 * X + 0.039
md(95) = 31.492
N = 53, r = 0.978

图 2

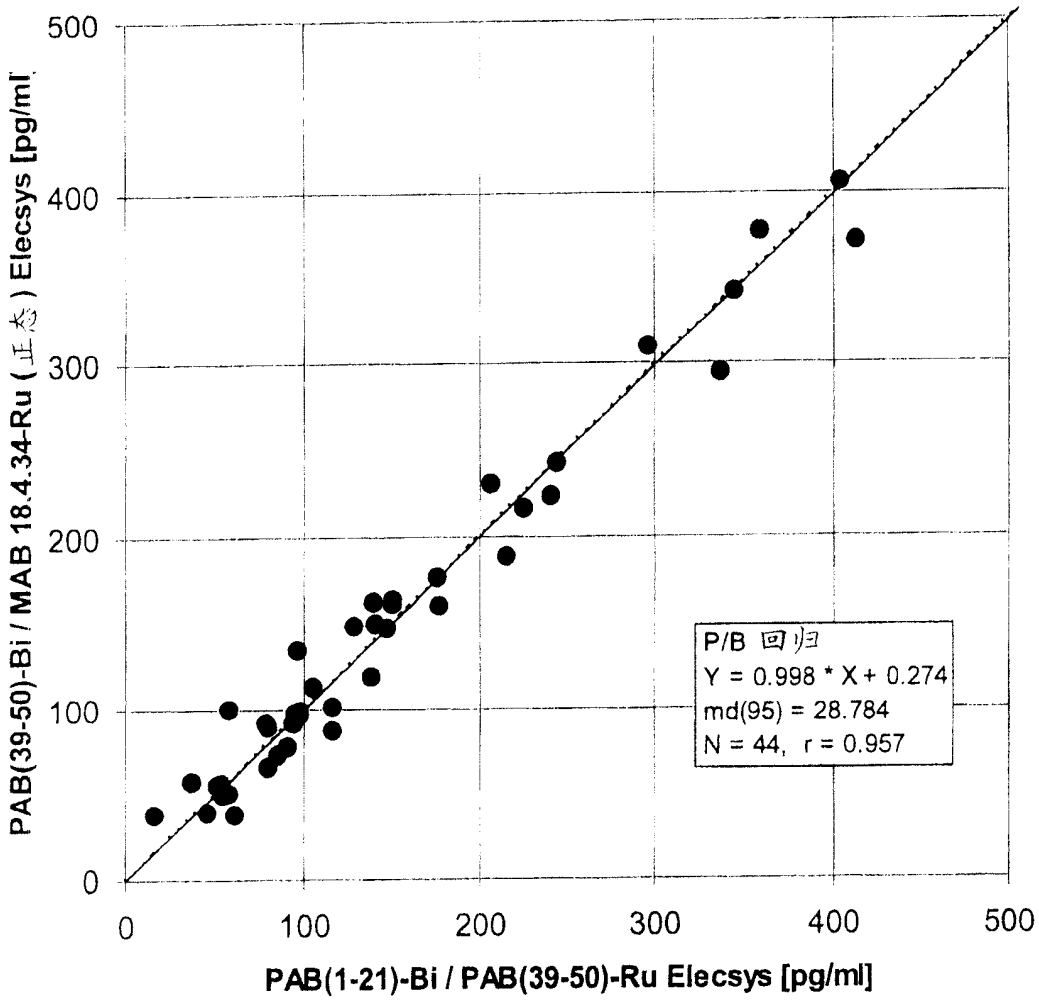

PAB(39-50)-Bi / MAB 18.4.34-Ru (正态) Elecsys [pg/ml]
PAB(1-21)-Bi / PAB(39-50)-Ru Elecsys [pg/ml]
0
100
200
300
400
500
P/B 回归
Y = 0.998 * X + 0.274
md(95) = 28.784
N = 44, r = 0.957

图 3

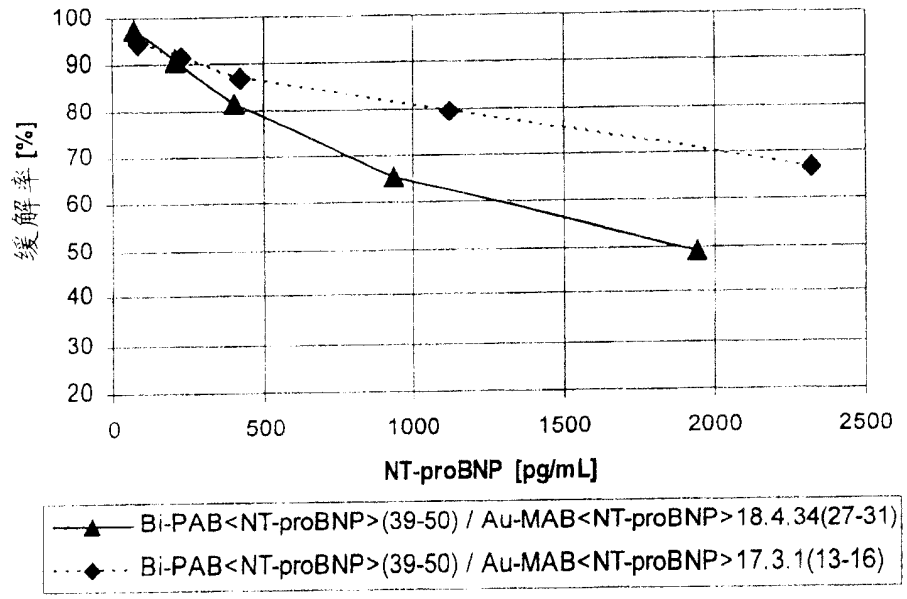

100
90
80
70
60
50
40
30
20
缓解率 [%]
0
500
1000
1500
2000
2500
NT-proBNP [pg/mL]
Bi-PAB<NT-proBNP>(39-50) / Au-MAB<NT-proBNP>18.4.34(27-31)
Bi-PAB<NT-proBNP>(39-50) / Au-MAB<NT-proBNP>17.3.1(13-16)

图 4

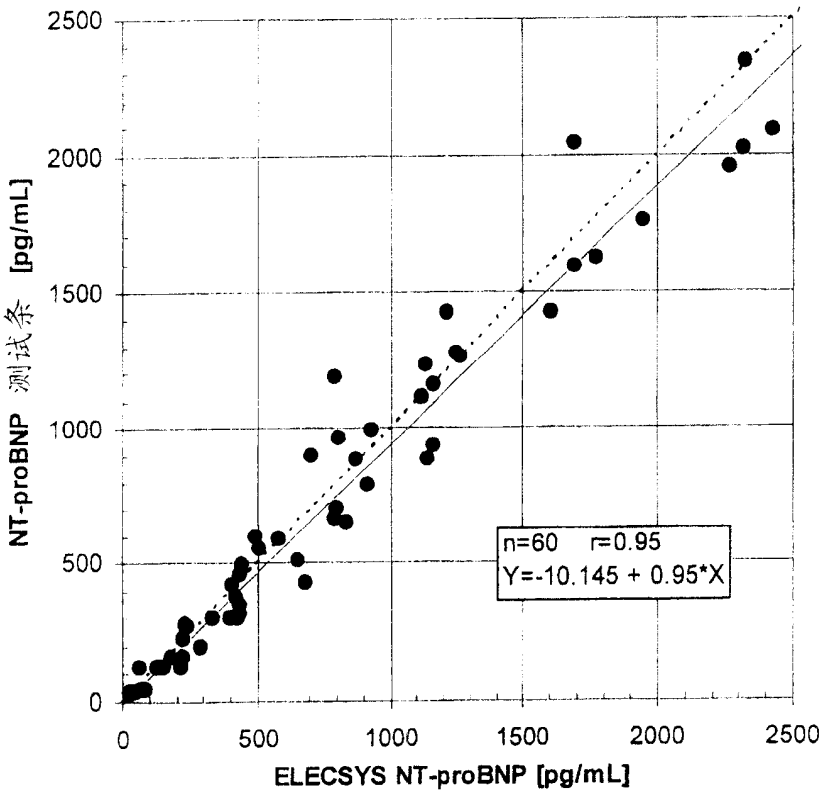

2500
2000
1500
1000
500
0
NT-proBNP 测试条 [pg/mL]
0
500
1000
1500
2000
2500
ELECSYS NT-proBNP [pg/mL]
n=60 r=0.95
Y=-10.145 + 0.95*X

图 5