

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-506623

(P2006-506623A)

(43) 公表日 平成18年2月23日(2006.2.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53</b> (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	4 B O 2 4
<b>GO 1 N 33/543</b> (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 D	4 H O 4 5
<b>CO 7 K 16/18</b> (2006.01)	CO 7 K 16/18	
<b>C 1 2 N 15/09</b> (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2004-552311 (P2004-552311)	(71) 出願人	504198957
(86) (22) 出願日	平成15年11月17日 (2003.11.17)		シン. クス ファーマ、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年6月20日 (2005.6.20)		カナダ国、エム9ダブリュー 1イー7
(86) 国際出願番号	PCT/CA2003/001773		オンタリオ、トロント、マーマック ドライブ 1
(87) 国際公開番号	W02004/046727	(74) 代理人	100086461
(87) 国際公開日	平成16年6月3日 (2004.6.3)		弁理士 齋藤 和則
(31) 優先権主張番号	10/299,977	(74) 代理人	100086287
(32) 優先日	平成14年11月18日 (2002.11.18)		弁理士 伊東 哲也
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ヤコブスキー、ジョージ
			カナダ国、エルOジー 1ジェイO オンタリオ、ケトルビィ、キール ストリート 17725

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NT-proBNP検出用ポリクローナル・ポリクローナル・エライサ検定法

## (57) 【要約】

種々の体液、血液、血清、血漿、尿およびこれらと同等物である非限定試料中に含まれる NT-proBNP 量を確認するための特異的で高感度の生体外のエライサ検定法および診断検査キットが開示されている。上記 NT-proBNP エライサ検定法は、サンドイッチ・エライサ技術を用いて、ヒト血漿中で循環する NT-proBNP を測定する。ヒト proBNP 内の標的アミノ酸配列を関する特異的結合特性を備えた抗体を得るために、組換え型ヒト proBNP (あるいは rhproBNP) を免疫原として使用するために発現させかつ精製した。アミノ酸配列に特異的なポリクローナル抗体 (PAb) をその後、配列親和性精製手段によってヤギ血清から精製した。ヒト proBNP の定量法の較正に使用する材料を得るために、組換え型ヒト proBNP (あるいは rhproBNP) を発現させかつ精製した。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

うっ血性心不全を患う患者を診断し、階層化し、その死亡率の予測に有用な酵素結合免疫吸着検査法（エライサ）であって、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 25、配列番号 1 のアミノ酸 26 ~ 51、配列番号 1 のアミノ酸 52 ~ 76、および配列番号 1 のアミノ酸 77 ~ 108 からなる群より選択されたアミノ酸配列に特異的な分離ポリクローナル抗体を採取するステップと、上記群より第 1 のポリクローナル抗体を選択しかつ上記ポリクローナル抗体を固形支持体に付着させ、NT-proBNP の免疫原フラグメントを含む疑わしい臨床試料を上記分離ポリクローナル抗体に反応させるステップと、上記ポリクローナル抗体によって認識されたアミノ酸配列とは別で異なるアミノ酸配列を認識するものとして選択された第 2 のポリクローナル検知抗体を与えるステップと、免疫反応を引き起こすステップと、上記免疫反応を検出するステップを含む、検定法。

10

## 【請求項 2】

上記第 1 のポリクローナル抗体は、配列番号 1 のアミノ酸 26 ~ 51 からなるアミノ酸配列に特異的なものとして選択され、上記第 2 のポリクローナル抗体は、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 25 からなるアミノ酸配列に特異的なものとして選択されている、請求項 1 記載の検定法。

## 【請求項 3】

上記第 1 のポリクローナル抗体は、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 25 からなるアミノ酸配列に特異的なものとして選択され、上記第 2 のポリクローナル抗体は、配列番号 1 のアミノ酸 26 ~ 51 からなるアミノ酸配列に特異的なものとして選択されている、請求項 1 記載の検定法。

20

## 【請求項 4】

上記検出ステップは直接的である、請求項 1 記載の検定法。

## 【請求項 5】

上記検出ステップは間接的である、請求項 1 記載の検定法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、体液、特にヒト血漿中の脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体の N 末端（NT-proBNP）濃度を測定するのに特異的で高感度の生体外の測定方法である NT-proBNP 蛋白質エライサ検定法および試験キットに関するものである。特に、この発明は、特に高い診断特異性を有し、これによりうっ血性心不全死の前兆となるように特に示される NT-proBNP 蛋白質エライサ検定法に関するものである。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

B タイプのナトリウム排泄増加性ペプチド（脳ナトリウム排泄増加性ペプチド、BNP）は、構造的に類似しているが、遺伝的に別種のナトリウム排泄増加性ペプチド（NPs）の系統に属しており、デボールド（de Bold）ら（デボールド（de Bold）AJ、濾胞性心房：水 - 電解液バランス変化の効果。生物医学学会議事録（Proc Soc Exp Biol Med）1979年、第161巻：508頁～511頁；デボールド（de Bold）AJ、ボレンスタイン（Borenstein）HB

50

、ベレス (Veress) AT、およびソネンベルグ (Sonnenberg) H。ラットにおける心房性心筋抽出物の静脈注射に対して急速な効果のあるナトリウム排泄増加反応。ライフサイエンス (Life Sci) 1981年、第28巻、89頁~94頁)によって記述されている。

上記ナトリウム排泄増加性ペプチド (NPs) は、効果のある利尿性、ナトリウム排泄増加性および血管拡張性を有しており、心臓血管性疾患、特にニューヨーク心臓協会 (NYHA) における患者のうっ血性心不全 (CHF) (ブームスマ (Boomsma) F およびファンデンマイラケル (van den Meiracker) AH。血漿AタイプおよびBタイプのナトリウム排泄増加性ペプチド：生理学、方法論および臨床用途。心臓血管研究 (Cardiovasc Res) 2001年、第51巻、442頁~449頁)のクラスI~IVに有用な診断用および予後用マーカーとして報告されてきた。

10

#### 【0003】

上記脳ナトリウム排泄増加性ペプチド (BNP) の遺伝子は、108個のアミノ酸残基を有する前駆分子、ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体 (配列番号1) をコード化する。心筋細胞による分泌前に、このホルモン前駆体の分割は、COOH末端からの生理活性BNPの生成を招く。1995年には、ハント (Hunt) P J、ヤンドル (Yandle) TG、ニコルス (Nicholls) MG、リチャーズ (Richards) AM、およびエスピナー (Espiner) EA。脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体 (ProBNP) のアミノ末端部のヒト血漿中での循環。生物化学生物物理学研究会 (Biochem Biophys Res Commun) 1995年、第14巻、1175頁~1183頁；ハント (Hunt) P J、リチャーズ (Richards) AM、ニコルス (Nicholls) MG、ヤンドル (Yandle) TG、ドウティ (Doughty) RNおよびエスピナー (Espiner) EA。免疫活性アミノ末端脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体 (NT-ProBNP)：心臓機能障害の新規マーカー。臨床内分泌疾患 (Clin Endocrinol) 1997年、第47巻、287頁~296頁)は、分割され、また血漿中で循環したホルモン前駆体、NT-ProBNPおよび同様のBNPのN末端に対応するフラグメントが潜在的に重要であり、心不全としてより識別性の高いマーカーであったことを示した。

20

30

#### 【0004】

多くの研究は、アミノ末端脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体 (NT-ProBNP) を含むナトリウム排泄増加性ペプチド (NPs) の血漿濃度を測定する臨床的用途を示してきた。ナトリウム排泄増加性ペプチド (NPs) は、心疾患を患う患者の診断およびリスク層別化用を選択されるバイオマーカーとして提案されてきた (クラリコ (Vlerico) A、デルリイ (Del Ry) S およびジアネッシ (Giannessi) D。心臓ナトリウム排泄増加性ホルモン (心房ナトリウム排泄増加性ペプチド、脳ナトリウム排泄増加性ペプチドおよび関連ペプチド) の測定。臨床診療では、新世代の免疫検定法の必要性。臨床化学 (Clin Chem) 2000年、第46巻、1529頁~1534頁；マイア (Mair) J、ハンメル-リヒアー (Hammerer-Lercher) A およびプシェンドルフ (Puschendorf) B。心不全の診断および管理における心臓ナトリウム排泄増加性ペプチドの定量の効果。臨床化学的医学研究 (Clin Chem Lab Med) 2001年、第39巻、571頁~588頁；サグネラ ジーエイ。血漿脳ナトリウム排泄増加性ペプチドおよび関連ペプチドの測定および意義。臨床生物化学年報 2001年、第38巻、83頁~93頁；セルバイス (Selvais) PL、ドンキエール (Donckier) JE、ロバート エイ (Robert) A、ラルー (Laloux) O、ファンリンデン (van Linden) F、アン (Ahn) S、ケテルスラガーズ (Ketelslegers) JM、およびルソー (Rousseau) MF。心疾患の診断およびリスク層別化用の心臓ナトリウム排泄増加性ペプチド：心臓ホルモン活性化に対する左心室機能不全および冠状動

40

50

脈疾患の影響。欧州臨床研究誌 (Eur J Clin Invest) 1998年、第28巻、636頁~642頁; マクドノー (McDonagh) TA、カニンガム (Cunningham) AD、モリソン (Morrison) CE、マクマリー (McMurray) JJ、フォード (Ford) I、モートン (Morton) JJ およびダールジエ (Dargie) HJ。左心室機能不全、ナトリウム排泄増加性ペプチドおよび都市群における死亡率。心臓 (Heart) 2001年、第86巻、21頁~26頁)。数種の研究は、NP測定値を使用して、左心室機能不全を患う患者、徴候がない患者(すなわち、NYHAクラスI)であっても、それを確認する実用性を示しており、選別手段としてのNP測定値が高い危険率で、再評価および治療を必要とする心不全群(例えば、冠状動脈疾患、高血圧症、糖尿病、高齢)内に標的患者を効果的に助けることになることが示唆されてきた(ヒューズ (Hughes) D、タルワー (Talwar) S、スクアア (Squire) IB、デイビス (Davies) JE およびエヌジー (Ng) LL。NT-proBNPに関する免疫蛍光検定法: 左心室機能不全用試験の開発。臨床科学 (Clin Sci) 1999年、第96巻、373頁~380頁; オムランド (Omland) T、アークバーク (Aakvaag) A、ビクモ (Vik-Mo) H。軽度左心室機能障害を患う患者確認用選別試験としての血漿心臓ナトリウム排泄増加性ペプチドの定量。心臓 (Heart) 1996年、第76巻、232頁~237頁; マクドノー (McDonagh) TA、ロブ (Robb SD)、マードック (Mordoch) DR、モートン (Morton) JJ、フォード (Ford) I、モリソン (Morrison) CEら。左心室収縮不全の生化学的検出。ランセット (Lancet) 1998年、第351巻、9頁~13頁; シュルツ (Schulz) H、ランビック (Langvik)、ランドセイゲン (Lund Sagen) E、スミス (Smith) J、アーマジ (Ahmadi) N およびホール (Hall) C。ヒト血漿中における脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体の放射性免疫検定法。スカンジナビア臨床研究誌 (Scan J Clin Lab Invest) 2001年、第61巻、33頁~42頁; タルワー (Talwar) S、スクアア (Squire) IB、デイビス (Davies) JE、バレット (Barnett) DB およびエヌジー (Ng) LL。血漿中のNT-proBNPおよび高い危険率群における左心室収縮不全の心電図評価。欧州心臓誌 (Eur Heart J) 1999年、第20巻、1736頁~1744頁; ハイスタッド (Hystand) ME、ゲイラン (Geiran) OR、アトラマダール (Attramadal) H、スパークランド (Spurkland) A、ベージ (Vege) A、シモンセン (Simonsen) S およびホール (Hall) C。局所的な心性徴候および重篤な慢性心不全を患う患者におけるナトリウム排泄増加性ペプチドの濃度。スカンジナビア生理学集 (Acta Physiol Scand) 2001年、第171巻、395頁~403頁; ホブス (Hobbs) FDR、デイビス (Davis) RC、ロアルフ (Roalfe) AK、ヘアー (Hare) R、デービス (Davies) MK およびケンクレ (Kenkre) JE)。心不全の診断におけるナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体のN末端検定法の信頼性: 代表および高い危険率の群落におけるコホート研究。BMJ 2002年、第324巻、1498頁)。ナトリウム排泄増加性ペプチド (NPs) については、心不全における疾病率および死亡率の双方に対する良好な予後徴候の値を有することが示されてきた。数種の研究は、左心室機能不全の予知および急性心筋梗塞の生存におけるNP測定値の実用性(リチャーズ (Richards) AM、ニコルス (Nicholls) MG、ヤンドル (Yandle) TG、フロントン (Frampton) C、エスピナー (Espiner) EA、ターナー (Turner) JGら。血漿中のNT-proBNPおよびアドレノメダリン。左心室の新規神経分泌ホルモン性予知剤および心筋梗塞後の予後。リンパ系 1998年、第97巻、1921頁~1929頁; ラチナー (Luchner) A、ヘングステンベルグ (Hengstenberg) C、ロウエル (Lowell) H、トランスキ (Trawinski) J、バウマン (Baumann) M、リーゲル (Riegger) GAJら。心筋梗塞後のNT-proBNP。心臓-腎機能のマ

10

20

30

40

50

カー。高血圧症 (Hypertension) 2002年、第39巻、99頁～104頁；キャンベル (Campbell) DJ、ムニール (Munir) V、ヘネシー (Hennessey) OFおよびデント (Dent) AW。緊急救命部にいる急性冠状症候群を疑われている被験者における血漿脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体のアミノ末端量：追跡のために患者を選別する役割を与えることができるか？インターン医学誌 (Intern Med J) 2001年、第31巻、211頁～219頁；ニルソン (Nilsson) JC、グロニング (Groenning) BA、ニールセン (Nielsen) G、フリッツ・ハンセン (Fritz-Hansen) T、トロインスキ (Trawinski) J、ヒルドブランド (Hidebrandt) PRら。急性心筋梗塞後の1年における左心室のリモデリングおよびNT-proBNPの予測値。米国心臓誌 (Am Heart J) 2002年、第143巻、696頁～702頁)。ナトリウム排泄増加性ペプチド (NP) 量をモニターすることは、個別の患者の必要な強度を満たすために治療法を調整しかつ治療の有効性をモニターする上でのガイダンスをも与える可能性がある (リチャーズ (Richards) AM、ドーティ (Doughty) R、ニコルス (Nicholls) G、マクマホン (MacMahon) S、シャープ (Sharpe) N、マーフィ (Murphy) Jら。血漿NT-proBNPおよびアドレノメダリン。慢性の虚血性左心室機能不全におけるカーベディロール (Carvedilol) からの恩恵の予後利用および予測。米国心臓学会誌 (J Am Coll Cardiol) 2001年、第37巻、1781頁～1787頁；トルートン (Troughton) RW、フランプトン (Frampton) CM、ヤンドル (Yandle) TG、エスピナー (Espiner) EA、ニコルス (Nicholls) MGおよびリチャーズ (Richards) AM。血漿脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体のアミノ末端 (N-BNP) の濃度によって誘導された心不全治療。ランセット (Lancet) 2000年、第355巻、1126頁～1130頁)。

10

20

30

40

50

## 【0005】

(先行技術)

ホール (Hall) による国際出願WO93/24531号 (特許文献1) (米国特許5,786,163号) (特許文献2) は、脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体のアミノ末端を同定する免疫学的方法およびこの方法に使用された抗体を記述するものである。上記抗体を得るためには、脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体のアミノ末端の配列から単独で合成されたペプチドが使用される。ペプチド免疫化による抗体の生成は基本的には可能であるが、分子全体に関する親和性は、概ね検査手順において必要な感度に到達するのに低すぎる。さらに、ペプチドを用いて得られた抗体が、例えば上記ペプチドのC末端を識別することができ、したがって分子全体のフラグメントにのみ結合することができ、これにより抗体が、一般に分子全体に結合することができず、あるいは限定的範囲にのみ結合することができるという結果になる危険性がある。国際出願WO93/24531号 (特許文献1) では、脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体のアミノ末端由来の1つのペプチドに対する抗体が生成されている。生成された抗体が競合検査フォーマットにおける免疫化ペプチド (アミノ酸47～64) に結合することが示されている。しかしながら、抗体が、試料中の分子全体として未変性の脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体のアミノ末端に結合することができることについては示されていない。さらに、試料中に国際出願WO93/24531号 (特許文献1) に記述されたサンドイッチ検査法は、適正な標準材料および2つの異なるエピトープに対する抗体が存在しないので、記述されているようには実行することができる。さらに、トレーサとして標識化されたペプチド47～64が試料すなわち標識化されていない標準ペプチド47～64と競合してラビット血清由来のポリクローナル抗体に結合する、国際特許出願WO93/24531号 (特許文献1) で実行された競合検査は、非常に穏やかな競合のみが、約250 fmol/mlの下限検出限界が誘導される48時間の培養後に、達成されるという事実で苦慮することになる。これは、健常者と心不全を患う患者とを識別するものではなく、あるいは患者試料を心不全の重篤度で識別して層別化するものでもない。さらに、長期培養の競合検査は、

自動分析における試料の定期的な測定を受け入れることができない。

【0006】

ハント(Hunt)ら(臨床内分泌学(Clinical Endocrinology) 1997年、第47巻、287頁~296頁)は、NT-proBNPを検出する競合検査についても記述するものである。このため、血漿試料の複合抽出が測定前に必要であり、これは、分析物の破壊および測定ミスにつながる可能性がある。使用された抗血清は、合成ペプチドの免疫化によって、国際出願WO93/24531号(特許文献1)と同様に生成されており、ハントらは、脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体のアミノ酸1~13のN末端の免疫化によって抗血清を生成し、アミノ酸1~13のペプチドは標準試料として用いられている。このため、長期培養も必要である。24時間の培養後に、  
1.3 fmol/mlの下限検出限界が達成される。

10

NT-proBNPの同定法という名称でカールらにより出願された国際出願WO00/45176号(特許文献3)は、組換え型のNT-proBNPの免疫原の使用によって分離されたモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を開示するものである。上記参考文献は、体液中のNT-proBNPに対して特異的な上記抗体を使用する検定情報を示唆するものである。より完全に記述されるように、この発明の検定法に対する上記検定法に関する受信者動作特性(ROC)図の曲線下領域(AUC)の比較は、この発明が優れた診断特性を証明することを示している。

【0007】

ナトリウム排泄増加性ペプチドフラグメントという名称で出願された国際出願WO00/35951号(特許文献4)は、NT-proBNPの配列の異なるエピトープに対する2つの抗体を利用するNT-proBNPの検定法に着目している。この検定法は、抗体が、免疫原としての合成ペプチドフラグメントに対して生成される点で、ホール(Hall)(米国特許第5,786,163号)(特許文献2)の欠陥と同様の欠陥に苦しむことになる。

20

【特許文献1】国際出願WO93/24531号公報

【特許文献2】米国特許5,786,163号公報

【特許文献3】国際出願WO00/45176号公報

【特許文献4】国際出願WO00/35951号公報

【発明の開示】

30

【0008】

この発明で開示されたNT-proBNP蛋白質エリサ検定法および検査キットは、種々の体液、すなわち血液、血清、血漿、尿およびこれらと同等物である非限定試料中におけるNT-proBNP濃度を測定することができる特異的で高感度の生体外の検定法である。次の実施例および記述は、ヒト血漿中での検定法の使用を例証することになる。

この明細書で使用されているように、用語「1つまたは複数の抗体」は、任意のアイソタイプ(IgA、IgG、IgE、IgD、IgM)のポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体あるいはこれらの抗原結合部位を含むが、F(ab)フラグメントおよびFvフラグメント、単一鎖抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体およびFab発現ライブラリに限定されるものではない。

40

上記NT-proBNPエリサ検定法は、ヒト血漿中で循環するNt-proBNPを測定するサンドイッチ・エリサ技術を使用する。ヤギ・ポリクローナル抗Nt-proBNP捕獲タンパク質でおおわれているマイクロプレート穴は、固相を構成する。被験体の血漿、標準および対照を被覆穴に添加し、培養緩衝液で培養した。試料抽出ステップは必要としない。もしNt-proBNPタンパク質が被験体に存在する場合、上記穴に被覆されたNt-proBNP特異的抗体によって捕捉される。培養および洗浄後、ビオチン標識ヤギ・ポリクローナル抗Nt-proBNP検出抗体を穴に添加する。検出抗体が、抗Nt-proBNP捕獲抗体に結合したNt-proBNPタンパク質に結合することで、サンドイッチが形成される。培養および洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)-ストレプトアビジン複合体溶液を上記穴に加える。培養および洗浄に続いて、酵

50

素基質を穴に添加して培養する。次に、酸性溶液を添加して酵素反応を停止させる。固定HRPの酵素活性の度合いを450nmで穴内の酸化酵素産物の光学濃度を測定することによって、決定する。450nmの吸光度は、被験体試料内のNt-proBNP量に比例する。一組のNt-proBNPタンパク質標準を用いて、試験試料および対照群に含まれるNt-proBNP濃度が計算できる吸光度対Nt-proBNP濃度の標準曲線を作る。

#### 【0009】

したがって、この発明の目的は、組換え型ヒトproBNPに対して生成され、ヒトproBNP内の標的アミノ酸配列に特異的な親和性を示すように特異的に選択されたヤギポリクローナル抗体を提供することにある。

10

この発明の他の目的は、ヒトNT-proBNPを定量し、これによって、うっ血性心不全患者の死亡率を精確に予測するための診断/選別ツールを確定することができる定量法を提供することにある。

この発明の他の目的は、NT-proBNP量を確定する概略の診断/選別手順を実行する目的のためのエライサ検査キットを提供することにある。

#### 【0010】

(図面の簡単な説明)

図1は、proBNP前駆蛋白質から開始するNT-proBNPおよび標的ペプチドを選択する方法を示す図である。

図2は、ヤギ・ポリクローナル/ポリクローナル検定法の受信者動作特性(ROC)曲線を示すグラフである。

20

図3は、対照量に対するNYHAのクラスIIIおよびIVにおけるNT-proBNP量を示すボックス図である。

図4は、年齢によって階層化された対照被験者におけるNT-proBNP量のボックス図である。

図5は、この発明のヤギ・ポリクローナル/ポリクローナル検定法を利用するエライサ手順の概要を示す図である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0011】

上記NT-proBNPエライサ検定法は、ヒト血漿中で循環するNT-proBNPを測定するためにサンドイッチ・エライサ技術を使用する。ヤギポリクローナル抗NT-proBNP捕捉蛋白質で被覆されたマイクロプレート穴は固層を構成する。被験者用血漿、標準品および対照物は上記被覆された穴に添加され、培養緩衝液で培養される。試料抽出ステップは必要とされない。仮にNT-proBNP蛋白質が検査試料中に存在する場合には、その蛋白質は、上記穴上に被覆されたNT-proBNPに特異的な抗体によって捕捉されることになる。培養および洗浄後、ビオチン標識ヤギポリクローナル抗Nt-proBNP検出抗体は上記穴に添加される。上記検査用抗体は、上記NT-proBNP蛋白質、あるいはこれらの免疫原性フラグメント、例えば上記抗体によって認識され、それらは順々に抗NT-proBNP捕捉抗体に結合されているポリペプチドフラグメントに結合し、これによりサンドイッチを形成することができる。培養および洗浄後、ビオチン標識ヤギポリクローナル抗Nt-proBNP検出抗体は上記穴に添加される。培養および洗浄に続けて、酵素基質は上記穴に添加されかつ培養される。酸性溶液は、その後、上記酵素反応を停止するために添加される。固定化されたHRPの酵素活性度は、上記穴中で酸化された酵素生成物の吸光度を450nmで測定することによって確認される。450nmでの吸光度は、被験試料中のNt-proBNP量に比例する。Nt-proBNP標準品セットは、被験表品および対照物中のNT-proBNP濃度が計算できる、NT-proBNP濃度に対する吸光度の標準曲線を作成するために使用される。免疫反応の検出がこの技術分野において周知の直接法あるいは間接法を介して達成できるものと理解される。

30

40

#### 【0012】

50

ヒト proBNP 内の標的アミノ酸配列に対する特異的結合特性を備えた抗体を得るために、組換え型ヒト proBNP (すなわち rhproBNP) は、免疫原として使用するために発現されかつ精製された。proBNP-pUC9 プラスミド構成体は、アドルフ・ジョイ・デボールド (Adolfo J. De Bold) 博士 (オタワ心臓研究所 (Ottawa Heart Institute)) から入手された。rhproBNP のオープンリーディングフレーム (ORF) の全長は、重合酵素連鎖反応 (PCR) および pET32c (NcoI/HhoI) へのサブクローニングによって得られた。上記 pET32c ベクターは、最終融合蛋白質が S 標識およびエンテロキナーゼ部位を含まないように 81 個のヌクレオチドを除去することによって修正された。rhproBNP のオープンリーディングフレーム (ORF) の N 末端における配列は、チオレドキシン標識およびポリヒスチジン標識およびトロンピン分割部位で構成した。上記 C 末端には余分な配列が存在しなかった。上記蛋白質は、大腸菌 BL21 (DE3) 中で発現され、未精製の細胞抽出物は非変性条件で調製された。次の親和的精製は、供給者により推奨された Ni-NTA クロマトグラフィによって終了された。注射前に、rhproBNP 溶液中のエンドトキシン量は、供給者により推奨されたデトキシゲル (Detoxigel) (登録商標) エンドトキシン除去用樹脂を用いて許容レベルまで下げられた。

10

## 【0013】

ポリクローナル抗体の生成および精製：

図 1 は、4 つのコンストラクト (ページの上から下にかけて) を示す。すなわち、pre-proBNP (前駆体) a.a. #1-134; proBNP a.a. #27-134 (= proBNP a.a. #1-108); NT-proBNP (a.a. #1-76) + BNP-32 (a.a. #77-108)、および proBNP (a.a. #1-108)。第 4 のコンストラクト (頁の下部) は、3 つのペプチドを示す。すなわち、ペプチド 1 = proBNP a.a. #1-25; ペプチド 2 = proBNP a.a. #26-51、およびペプチド 3 = proBNP a.a. #52-76 である。アミノ酸ペプチド 2 (a.a. 26-51) に対して親和性精製されるヤギ・ポリクローナル抗体が捕捉体として用いられることを目的として選択される点に注目する。アミノ酸ペプチド 1 (a.a. 1-25) に対して親和性精製されるヤギ・ポリクローナル抗体が検出体として用いられることを目的として選択される。ヤギ・ポリクローナル抗体もまたアミノ酸ペプチド 3 (a.a. 52-78) に対して親和性精製されたが、この材料は最終的な NT-proBNP エライサ・フォーマットで使用するためには選択されなかった。

20

30

ヤギ (ラマンチャ (La Mancha) またはトゲンバーグ (Toggenburg) 種) は、精製された組換え型ヒト proBNP (rhproBNP) で免疫化された。完全フロイントアジュバント内に乳化された 500 μg の精製 rhproBNP の複数部位への主要な筋肉内注射が投与され、その後、不完全フロイントアジュバント内に乳化された 500 μg の精製 rhproBNP の複数部位への 250 μg の筋肉内注射が隔週で投与された。免疫化されたヤギの力価は、ハーフサンドイッチ・エライサ技術を用いて血清を選別することによって定期的にモニターされた。

40

## 【0014】

配列番号 1 の proBNP (1~25、26~51、52~76 あるいは 77~108) 内のアミノ酸配列に特異的なポリクローナル抗体 (PAb) は、その後、供給者の推奨に従い、次の蛋白質またはペプチド配列：

1. ヒト IgG (ジャクソン免疫研究社 (Jackson ImmunoResearch))
2. マウス IgG (ジャクソン免疫研究社 (Jackson ImmunoResearch))
3. キーホールリンペットヘモシニアン (エイディーアイ社 (ADI Inc.)) に結合された配列番号 1 の proBNP アミノ酸配列 #1~25 (HPLGSPGSA S D L E T S G L Q E Q R N H L Q)

50

または

3. キーホールリンペットヘモシニアン(エイディーアイ社(ADI Inc.))に結合された配列番号1のproBNPアミノ酸配列#26~51(GKLSLELQVEQT SLEPLQESPRPTGVW)

または

4. キーホールリンペットヘモシニアン(エイディーアイ社(ADI Inc.))に結合された配列番号1のproBNPアミノ酸配列#52~76(KSREVAATEGIR GHRKMVLYTLRAPR)

5. キーホールリンペットヘモシニアン(エイディーアイ社(ADI Inc.))に結合された配列番号1のproBNPアミノ酸配列#77~108(BNP-32、SPKMVQSGCGFRKMDRISSS SGLGCKVLR RH)に結合された臭化シアン活性化セファロース4B(ファルマシア社(Pharmacia))を用いてヤギ血清から精製された。 10

精製されたポリクローナル抗体は、pH7.4の20mMリン酸緩衝生理食塩水に対して透析され、限外ろ過によって濃縮され、-20℃で保存された。

【0015】

組換え型ヒトNT-proBNPの発現

ヒトNT-proBNPの定量方法の検量に使用される材料を得るために、組換え型ヒトNT-proBNP(すなわちrhNT-proBNP)が発現されかつ精製された。 20  
上記proBNP-pUC9プラスミド構成体は、アドルフォ ジェイ・デボールド(Adolfo J. De Bold)博士(オタワ心臓研究所(Ottawa Heart Institute))から入手された。rhproBNPのオープンリーディングフレーム(ORF)は、重合酵素連鎖反応(PCR)およびpET32c(NcoI/HhoI)へのサブクローニングによって得られた。上記rhNT-proBNPのN末端における配列は、チオレドキシン、ポリヒスチジンおよびS標識、並びにトロンビンおよびエンテロキナーゼ分割部位で構成した。上記C末端には余分な配列が存在しなかった。上記蛋白質は、大腸菌BL21(DE3)中で発現され、未精製の細胞抽出物は非変性条件下で調製された。次の親和的精製は、供給者により推奨されたNi-NTAクロマトグラフィによって終了された。

組換え型ヒトproBNPおよび組換え型ヒトNT-proBNPに対する最適なエライサの特異性および感度を、捕捉体としてのproBNPアミノ酸ペプチド配列26~51に対する親和性を利用して精製されたヤギポリクローナル抗体と、検出体としてのproBNPアミノ酸ペプチド配列1~25に対して親和性精製されたヤギ・ポリクローナル抗体との組み合わせを用いて得た。ここで図5を参照すると、この発明の上記エライサ検定法を実行する手順が明らかにされる。 30

【0016】

図5に示す手順の概要は、以下の通りである：

50μL培養緩衝液+50μL試料/校正物質を添加；室温で2時間培養；100μL検出体溶液を添加；室温で1時間培養；100μLの指示溶液を添加；室温で30分間培養；TMB溶液を100μL添加；暗所で10分間培養；100μLのH2SO4で反応を停止；OD450nmを読み取る。 40

その後、上記手順に従って検査されたヒト血漿試料由来のデータ分析を、心不全の患者に対して明らかな健常者のNT-proBNP量を測定する際に、優れた感度および特異性をもたらす上記抗体の組み合わせの有用性を示した。

この発明に従うエライサ検査キットは、上述した手順を実行する目的のために提供されている。

【0017】

試薬供給品：

抗NT-proBNP蛋白質被覆マイクロ滴定細片

マイクロ滴定用96穴を含む1つの細片保持器にヤギポリクローナル抗NT-proBN 50

P抗体で被覆した。期間満了まで、乾燥剤を入れたポーチ内に2～8 で保存する。

#### NT-proBNP蛋白質標準品

次の標準品：0、50、150、375、1500および3000 pg/mlのNT-proBNPの1つをそれぞれ含む6つのバイアル瓶が用意される。各バイアル瓶は、0 pg/mlの対照物が1.0 mlを含むことを除き、0.5 mlを含むものである。仮に再検査が望ましい場合には、余分量は、3000 pg/ml以上の値を有する試料の希釈に余裕をとるものである。-70±10 で保存する。この温度で維持し、上記標準品は、6ヶ月まで、凍結/解凍の少なくとも3回の間で、安定である。

#### NT-proBNP蛋白質対照物

NT-proBNPを含む各0.5 mlの2つのバイアル瓶は、蛋白質の低濃度および高濃度で制御する。-70±10 で保存する。この温度で維持し、上記標準品は、6ヶ月まで、凍結/解凍の少なくとも3回の間で、安定である。

#### 【0018】

##### 培養緩衝液

10 mlの培養緩衝液を含む1つのバイアル瓶。期間満了まで2～8 で保存する。

##### 検出体としての抗体

10 mlのビオチン標識抗-NT-proBNPヤギ・ポリクローナル抗体を含む1つのバイアル瓶。期間満了まで2～8 で保存する。

##### 西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)結合体

西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)で標識化された10 mlのストレプトアビジンを含む1つのバイアル瓶。期間満了まで2～8 で保存する。

##### クロモゲン溶液

3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質溶液10 mlを含む1つのバイアル瓶。期間満了まで2～8 で保存する。

##### 濃縮洗浄液

非イオン性界面活性剤を有するリン酸緩衝生理食塩水60 mlを含む1つの瓶。使用前に、脱イオン水で25倍に希釈する。2～8 で保存する。

##### 停止溶液

1規定の硫酸10 mlを含む1つの瓶。2～8 で保存する。

#### 【0019】

##### 試薬の調製：

##### 洗浄溶液：

内容物、60 mlの濃縮洗浄溶液をきれいな容器に注ぎ、1500 mlの蒸留/脱イオン水を添加して1560 mlの洗浄溶液を得る。瓶が密閉状態に保たれて内容物がひどく汚染されなければ、洗浄溶液が室温で1ヶ月間安定である。

##### マイクロプレート細片：

汚染を回避するために、使用に必要な数の細片を取り除く。乾燥剤が設けられた小袋に残存する細片を再び密閉する。この小袋を乾燥剤を含む密閉容器に入れることが望ましい。

#### 【0020】

##### 検定の手順：

試料、標準品、および対照物を第1の穴への添加と最後の穴への添加とのあいだの時間は、10分を超えてはならない。多くの試料に関しては、少量のバッチでエライサを実施して、この時間枠に対応する。

1. 使用されるべきマイクロプレートの穴に印を付ける。

2. 半自動ピペットを用いて、50 μlの培養緩衝液を各穴に添加する。

3. 高精度マイクロピペットを用いて、50 μlの各検査試料、NT-proBNP標準品あるいはNT-proBNP対照物を適切な微小穴に添加する。標準曲線の整合性を保証するために、次のような上記プレートへの添加順が推奨される：

a. 検査試料、

b. NT-proBNP標準品、

10

20

30

40

50

c. NT - proBNP 対照物。

正副 2 つの NT - proBNP 標準品および NT - proBNP 対照物で検査することが推奨される。

4. 粘着性プレートカバーを用いて微小穴を覆い、室温で、オービタル型マイクロプレートシェーカー上で 2 時間、培養する。

5. 適切なマイクロプレート洗浄器を用いて、各穴について 3 回にわたって吸引しかつ洗浄液で洗浄を行う。吸収材料上に上記プレートを逆さにするによって乾燥させる。

#### 【0021】

不完全な洗浄が逆に検定精度に影響を与えるので、マイクロプレート用自動洗浄器の使用は大いに推奨される。これに代えて、仮にマイクロプレート用自動洗浄器が入手できない場合には、洗浄は、微小穴の内容物を吸引しかつ 340  $\mu$ l の洗浄溶液を各微小穴に再充填するステップを 3 回反復することによって手動的に達成することができる。

6. 半自動ピペットを用いて、各穴に 100  $\mu$ l のピオチン標識 Nt - proBNP 抗体を添加する。

7. 室温で、オービタル型マイクロプレートシェーカー上で 1 時間、上記穴を培養する。

8. 適切なマイクロプレート洗浄器を用いて、各穴について 3 回にわたって吸引しかつ洗浄液で洗浄を行う。吸収材料上に上記プレートを逆さにするによって乾燥させる。

9. 半自動ピペットを用いて 100  $\mu$ l の HRP - ストレプトアビジン結合体を各穴に添加する。

10. 粘着性プレートカバーを用いて微小穴を覆い、室温で、オービタル型マイクロプレートシェーカー上で 30 分間、培養する。

#### 【0022】

11. 微小穴について 3 回にわたって吸引しかつ洗浄液で洗浄を行う。吸収材料上に上記プレートを逆さにするによって乾燥させる。

12. 半自動ピペットを用いて 100  $\mu$ l の TMB 溶液を各穴に添加する。

13. 室温で、5 分間で暗所中で穴を培養する。直射日光に曝すことを避ける。

14. 半自動ピペットを用いて 100  $\mu$ l の停止溶液 (1 規定の硫酸) を各穴に添加する。

15. マイクロプレート読取器を用いて 450 nm で上記溶液の吸光度を測定する。

#### 【0023】

計算結果：

- ・標準品、対照物あるいは被験血漿を含む穴ごとに平均吸光度を計算する。

- ・x 軸 (一次) にとった NT - proBNP 濃度 (pg/ml) に対する y 軸 (二次) にとった標準品のグラフに平均吸光度をプロットする。

- ・正副の点の平均を通過するように、最適な標準曲線を引く。

- ・上記標準曲線に書き入れることによって、被験血漿および対照品の各 NT - proBNP 濃度を確認する。

被験血漿試料の読みは、最も低い標準品より低いものとして報告されるべきである。

これに代えて、コンピュータプログラムは、エライサ・タイプのデータを取り扱って被験血漿および対照品の NT - proBNP 濃度を評価するのに使用されてもよい。

次のデータは、この検定法を用いて用量反応曲線例を示すものである。

#### 【0024】

10

20

30

40

## 【数 1】

標準用量 (pg/ml)	平均吸光度: 450nm
0	0.069
50	0.105
150	0.173
375	0.323
1500	0.997
3000	1.796

10

注意：上記値は、標準曲線に代えて使用されるべきではなく、検定時に調製されるべきである。

## 【0025】

特徴的性能

品質管理：

上記キット内に用意され、低品質および高品質を示す2つの対照物が各検定法において分析されなければならない。各研究所が各検定例の変動用に追加の対照物を使用することが推奨される。

20

特異性

以下の物質を試験して、Nt-proBNPエリサ検定で交叉反応性を持たないことが示された。

## 【0026】

## 【数 2】

タンパク質	濃度	交叉反応 (%)
BNP-32	3 $\mu$ g/ml	0
cTnI	3 $\mu$ g/ml	0
cTnI/T/C 結合体	3 $\mu$ g/ml	0
CKMB	3 $\mu$ g/ml	0

30

## 【0027】

精度 / 回収率検査

正常ヒト結晶試料（検出不可能な内生Nt-proBNPタンパク質レベルを含む）をNt-proBNPによってスパイクし、最終濃度が1000、450、および90pg/mlの試料を生じた。Nt-proBNPの精度値は、81%と106%の間であった（平均値 = 96.6%）。

## 【0028】

40

【表 1】

Table 1. 精度/回収率

試料	精度/回収率		観察 Nt-proBNP pg/ml	精度 (%)
	内生 Nt-proBNP pg/ml	添加 Nt-proBNP pg/ml		
1	0	1000	1030.032	103
	0	450	456.004	101
	0	90	87.624	97
2	0	1000	936.927	94
	0	450	433.574	96
	0	90	82.571	92
3	0	1000	990.567	99
	0	450	438.747	97
	0	90	72.469	81
4	0	1000	1003.113	100
	0	450	478.468	106
	0	90	94.365	105
5	0	1000	970.876	97
	0	450	407.735	91
	0	90	80.887	90

10

Nt-proBNP検定の精度を、高内生Nt-proBNPの6つの臨床試料も用いて評価した。2、4、8、16、32、および64倍に試料を希釈し、各々の希釈剤を三重反復検定した。精度は、期待値の85%ないし114%であった。

20

## 【0029】

NT-proBNP臨床データの概要

データは、融合性心不全（NYHAのクラスIIIおよびクラスIV）であると診断された161人の被験者および200人の健常者対照被験者から提供されている。受信者動作特性（ROC）曲線は図2に示されており、0.991の曲線下領域（AUC）はこれに対応する0.0053の標準誤差（s.e.）を含むようにして得られた。図3は、対照被験者および心不全被験者におけるproBNPレベルのボックスプロットを示すものであり、96.7pg/mLの最適カットオフ・レベルで（対照被験者に関するNT-proBNPレベルが97.5パーセンタイル値である）、上記心不全被験者に関する診断感度は上記カットオフを上回るNT-proBNPレベルを有する被験者161人のうちの150人で93.2%であった。

30

健常な通常の対照被験者に関して年齢区分によって層別化されるNT-proBNPレベルのボックスプロットを図4に示す。年齢の増加に伴ってNT-proBNP同一水準の中央値が僅かに高くなる傾向があるが、年齢区分の間の違いは、この点で重要ではない（ノンパラメトリック・クラスカル・ワリスの検定を実行する場合、 $p = 0.073$ ）。

## 【0030】

他のNT-proBNPおよびBNP検定との比較：

バイオサイトトリアージBNP検査への生成挿入物（トリアージ（Triage）（著作権）脳ナトリウム排泄増加性ペプチド（BNP）検査、生成挿入物、バイオサイト診断社（Biosite Diagnostics, Inc.）、2001年）において、804人の心不全被験者および1286人の対照被験者から得られた臨床データにおける受信者動作特性（ROC）曲線の分析は、0.955の曲線下領域（AUC）（標準誤差 = 0.0053）を示した。ヘンリー（Hanley）およびマクニール（McNeil）（ヘンリー（Hanley）JAおよびマクニール（McNeil）Jの手順（1982年）「受信者動作特性（ROC）曲線下の領域の意図および用途」放射線医学（Radiology）第143巻、29頁～36頁）に続けて、ここに開示されたNT-proBNP検定の曲線下領域（AUC）と上記曲線下領域（AUC）を比較すると、ここに開示されたNT-proBNP検定が優れた診断特性を示す、著しく高い曲線下領域（

40

50

AUC) ( $p < 0.001$ ) を有することが分かる。

【0031】

フィッシャー (Fischer) ら (フィッシャー (Fischer) Y、フィルツマイア (Filzmaier) K、スチーグラ (Stiegler) H、グラフ (Graf) J、フース (Fuhs) S、フランク (Franke) A、ジャンセンス (Janssens) U およびグレスナー (Gressner) AM (2001年)、「脳ナトリウム排泄増加性ペプチドの定量に関する新規で高速ベッドサイド検査」、臨床化学第47巻、591頁~594頁)は、潜在的な心臓疾患および疑わしい心不全を患う93人の被験者に関するロッシュ診断に由来するNT-proBNP検査に上記トリアージBNP検査を比較したデータ特性を与えた。心室機能を低下させた被験者を、心室機能を維持した被験者から識別する際に、0.91 (標準誤差  $\pm 0.033$ ) の曲線下領域 (AUC) が上記トリアージBNP検査で得られ、0.86 (標準誤差  $\pm 0.040$ ) の曲線下領域 (AUC) がロッシュNT-proBNP検定で得られた。同一ケース由来の曲線下領域 (AUC) を比較し、NT-proBNP検定がロッシュNT-proBNP検定 ( $p = 0.005$ ) よりも著しく高い曲線下領域 (AUC) を有することが分かる、ヘンリーおよびマクニール (ヘンリー (Hanley) JA およびマクニール (McNeil) BJ) の手順 (1983年)「同一ケース由来の受信者動作特性 (ROC) 曲線下の領域を比較する方法」放射線医学第148巻、839頁~843頁)に続けて、 $r = 0.947$  の2つの神経ホルモン測定値間の報告された相関関係が与えられた。

10

20

【0032】

ハーメル・レチェ (Hammerer-Lercher) ら (ハーメル・レチェ (Hammerer-Lercher) A、ニューバル (Neubauer) E、ミューラ (Muller) S、パチンゲル (Pachinger) O、プチェンドル (Puschenodorf) B およびメイヤ (Mair) J (2001年)、「診断中の左心室機能不全における脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体のN末端、脳ナトリウム排泄増加性ペプチドおよび動脈ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体のN末端の競合比較」、臨床化学第310巻、193頁~197頁)は、安定した慢性心不全を患う57人の患者の同一人数に関して、シオノギIMRA BNP検定を、生物医学EIA NT-proBNP検定と比較した。心室機能を低下させた被験者を、心室機能を維持した被験者から識別する際に、0.75 (標準誤差  $\pm 0.06$ ) の曲線下領域 (AUC) が上記BNP検査で得られ、0.67 (標準誤差  $\pm 0.07$ ) の曲線下領域 (AUC) が生物医学NT-proBNP検定で得られた。ヘンリー (Hanley) およびマクニール (McNeil) (ヘンリー (Hanley) JA およびマクニール (McNeil) BJ) の方法 (1983年)「同一ケース由来の受信者動作特性 (ROC) 曲線下の領域を比較する方法」放射線医学 (Radiology) 第148巻、839頁~843頁)に続けて、シオノギBNP検定が生物医学NT-proBNP検定よりも著しく高い曲線下領域 (AUC) を有することが分かる、

30

40

【0033】

ルヒナー (Lercher) ら (ルヒナー (Lercher) A、ヘングステンベルグ (Hengstenberg) C、ロウエル (Lowel) H、トランスキ (Trawinski) J、パウマン (Baumann) M、リーゲル (Riegger) G、シュンカールト (Schunkekr t) H およびホルマー (Holmer) S (2002年)、「心筋梗塞後の脳ナトリウム排泄増加性ペプチド前駆体のN末端」、高血圧症 (Hypertension) 第39巻、99頁~104頁)は、594人の心筋梗塞被験者および449人の健常被験者を含む被験者中において、心室機能を低下させた被験者を予測するロッシュEIA NT-proBNP検定の機能を確定するために大規模臨床研究を行った。上記作成者は、35%未満の左心室駆出率を有する被験者を、より高い駆出率の被験者から識別する際に、NT-proBNPに関する0.77 (標準誤差  $\pm 0.057$ ) の曲線下領域 (AUC) を引用した。この曲線下領域 (AUC) は、ここに開示されたNT-proBNP検定 ( $p = 0.0001$ ) に関して引用されたものより

50

著しく低い。

したがって、曲線下領域 ( A U C ) 分析を基準にして N T - p r o B N P の存在を確認するための種々の利用可能な検定の定量化に基づいて、この発明の検定法は優れた診断特性を示すことが期待される。

【 0 0 3 4 】

この明細書に記述された全ての特許および刊行物は、この発明の属する技術分野における当業者のレベルで示されている。全ての特許および刊行物は、仮に各刊行物が参照することによって組み込まれるように詳細にかつ個別的に示された場合に、参照することによってこの明細書に組み込まれる。

この発明の特定の形態が示されているが、この明細書に記述されかつ示された特定の形態あるいは配置に限定されるものではないことは理解されるべきである。この発明の範囲を逸脱することなく、種々の変更がなされてもよく、この明細書に示されかつ記述された事柄に限定されるものとみなされるべきではないことは、この技術分野における当業者にとって明白なことである。この技術分野における 1 人の当業者は、この発明が、目的を実行し、本来の目的および利点ばかりでなく、上述した目的および利点を得るのに適していることは容易に正当評価されるはずである。この明細書に記述された実施の形態、方法、手順および技術は、好適な実施の形態の現在、代表的なものであり、当該実施の形態は実施例と意図されたものであり、その実施例の範囲に限定されるものとして意図されたものではない。その変更および他の用途は、この発明の精神の範囲内に包含されかつ添付の請求項の範囲によって規定されたものと、この技術分野における当業者が考えるはずである。この発明が特定の好適な実施の形態に関連して記述されたが、請求項に記述された発明が上記特定の実施の形態に必要以上に限定されるべきでないとは理解されるべきである。実際は、この技術分野における当業者にとって明白であり、この発明を実施するための記述されたモードの種々の修正は、次の請求項の範囲内にあるものと意図されている。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 5 】

【 図 1 】 p r o B N P 前駆蛋白質から開始する N T - p r o B N P および標的ペプチドを選択する方法を示す図である。

【 図 2 】 ヤギ・ポリクローナル / ポリクローナル検定法の受信者動作特性 ( R O C ) 曲線を示すグラフである。

【 図 3 】 対照量に対する N Y H A のクラス I I I および I V における N T - p r o B N P 量を示すボックス図である。

【 図 4 】 年齢によって階層化された対照被験者における N T - p r o B N P 量のボックス図である。

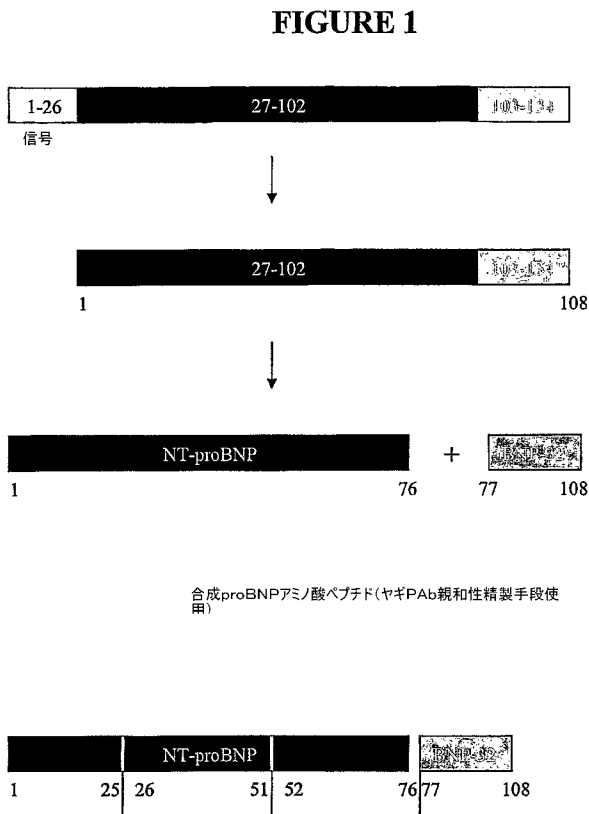
【 図 5 】 この発明のヤギ・ポリクローナル / ポリクローナル検定法を利用するエライサ手順の概要を示す図である。

10

20

30

【 図 1 】



【 図 2 】

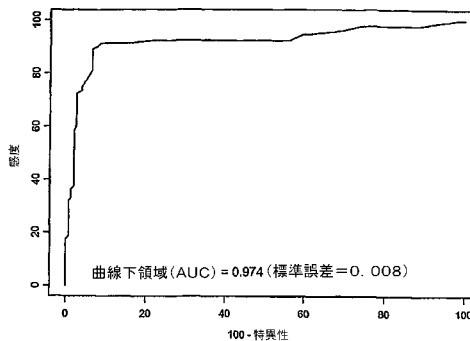


Figure 2: NT-proBNPに関する受信者動作特性(ROC) 曲線(ヤギーヤギ検定法)

【 図 3 】

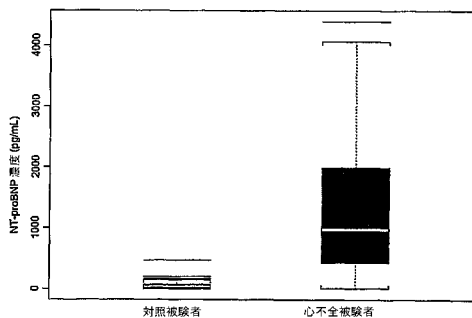


Figure 3: 対照被験者および心不全被験者(NYHAクラスIIIおよびIV)におけるNT-proBNPレベル(ヤギーヤギ検定法)

【 図 4 】

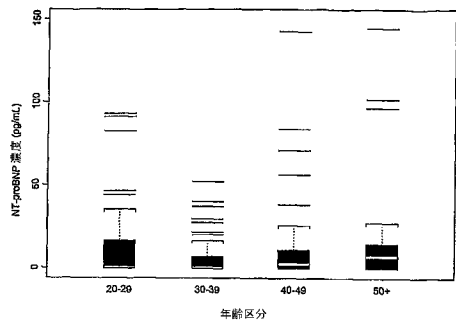
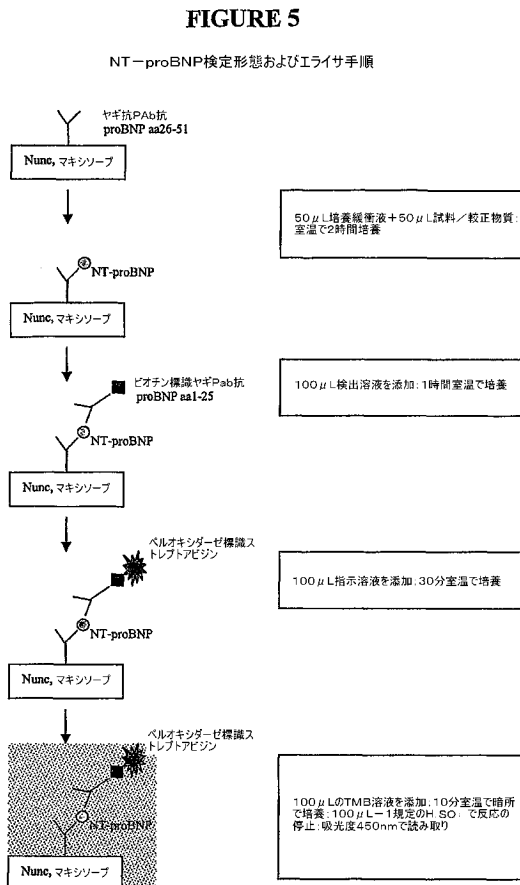


Figure 4: 年齢区分によって階層化された対照被験者におけるNT-proBNPレベル

【 図 5 】



【配列表】

2006506623000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/CA 03/01773
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/68 G01N33/74		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/35951 A (NG LEONG LOKE ; UNIV LEICESTER (GB)) 22 June 2000 (2000-06-22) cited in the application page 5, paragraph 4 - page 7, paragraph 4; claims; example 1	1-5
X	WO 00/45176 A (GALLUSSER ANDREAS ; KARL JOHANN (DE); LILL HELMUT (DE); STAHL PETER (D)) 3 August 2000 (2000-08-03) cited in the application abstract page 5, paragraph 2 - page 7, paragraph 1; example 4	1-5
X	US 6 117 644 A (DEBOLD ADOLFO J) 12 September 2000 (2000-09-12) column 3, line 20 - line 38 column 9, line 25 - column 10, line 29	1-5
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  24 March 2004		Date of mailing of the international search report  16/04/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer  Luis Alves, D

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/CA 03/01773

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FISCHER YURIKO ET AL: "Evaluation of a new, rapid bedside test for quantitative determination of B-type natriuretic peptide" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 47, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 591-594, XP002274809 &amp; ISSN: 0009-9147 the whole document</p>	1-5
A	<p>HUNT P J ET AL: "IMMUNOREACTIVE AMINO-TERMINAL PRO-BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE (NT-PROBNP): A NEW MARKER OF CARDIAC IMPAIRMENT" CLINICAL ENDOCRINOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 47, 1997, pages 287-296, XP000913471 ISSN: 0300-0664 cited in the application abstract page 288, right-hand column, paragraph 1</p>	1-5
A	<p>CLERICO A ET AL: "Measurement of cardiac natriuretic hormones (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and related peptides) in clinical practice: The need for a new generation of immunoassay methods" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WINSTON, US, vol. 46, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1529-1534, XP002247285 ISSN: 0009-9147 page 1531, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 7; table 1</p>	1-5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/CA 03/01773

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0035951	A	22-06-2000	AU 1670300 A	03-07-2000
			WO 0035951 A1	22-06-2000
WO 0045176	A	03-08-2000	AU 758562 B2	27-03-2003
			AU 2545100 A	18-08-2000
			CA 2359667 A1	03-08-2000
			CN 1339107 T	06-03-2002
			WO 0045176 A2	03-08-2000
			EP 1151304 A2	07-11-2001
			HU 0105195 A2	29-04-2002
			JP 2003508724 T	04-03-2003
			NO 20013698 A	28-09-2001
			NZ 512762 A	28-02-2003
			ZA 200106193 A	02-05-2002
US 6117644	A	12-09-2000	NONE	

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 デヴィ、ミシェル

カナダ国、エル6ティ 3エイチ3 オンタリオ、ブランプトン、エリンゲイト ロード 3

(72) 発明者 スタントン、エリック

カナダ国、エル7ピー 4エックス1 オンタリオ、バーリントン、クロフトン ウェイ 1095

(72) 発明者 クブチャク、ピーター

カナダ国、エム4ヴィ 3シー4 オンタリオ、トロント、ユニット 802、ディア パーク  
クレッセント 1

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA80 CA04 CA05 CA06 DA06 EA04 FA02 FA10 GA11

GA19 HA03 HA08 HA09 HA14

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA50 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	用于NT-proBNP检测的多克隆多克隆ELISA检测		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006506623A</a>	公开(公告)日	2006-02-23
申请号	JP2004552311	申请日	2003-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	Shinkusu制药公司		
申请(专利权)人(译)	申方框制药公司		
[标]发明人	ヤコブスキージョージ デヴィミシエル スタントンエリック クプチャクピーター		
发明人	ヤコブスキー、ジョージ デヴィ、ミシエル スタントン、エリック クプチャク、ピーター		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K16/18 C12N15/09 G01N33/68 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/74 G01N33/6887		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/543.545.D C07K16/18 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA09 4B024/HA14 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	斋藤和典 伊藤哲也		
优先权	10/299977 2002-11-18 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

用于确认各种体液，血液，血清，血浆，尿液和等效非限制性样品中NT-proBNP含量的特异性和高灵敏度体外ELISA检测和诊断检测试剂盒已被披露。在NT-proBNP ELISA测定中，使用夹心ELISA技术测量在人血浆中循环的NT-proBNP。为了获得具有关于人proBNP靶氨基酸序列特异性结合特性的抗体，其中表达，并使用重组人proBNP（或RhproBNP）作为免疫原的纯化。然后通过序列亲和纯化方法从山羊血清中纯化对氨基酸序列特异的多克隆抗体（PAb）。要获得的材料被用于校准人proBNP的测定和中表达并纯化的重组人proBNP（或rhproBNP）。

標準用量 (pg/ml)	平均吸光度: 450nm
0	0.069
50	0.105
150	0.173
375	0.323
1500	0.997
3000	1.796