

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5458011号
(P5458011)

(45) 発行日 平成26年4月2日(2014.4.2)

(24) 登録日 平成26年1月17日(2014.1.17)

(51) Int.Cl.		F I	
C07K	14/47	(2006.01)	C O 7 K 14/47 Z N A
G01N	33/68	(2006.01)	G O 1 N 33/68
G01N	33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53 D
C07K	16/18	(2006.01)	C O 7 K 16/18
C12N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2

請求項の数 17 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-519443 (P2010-519443)
 (86) (22) 出願日 平成20年8月1日(2008.8.1)
 (65) 公表番号 特表2010-535737 (P2010-535737A)
 (43) 公表日 平成22年11月25日(2010.11.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/060188
 (87) 国際公開番号 W02009/019236
 (87) 国際公開日 平成21年2月12日(2009.2.12)
 審査請求日 平成23年7月6日(2011.7.6)
 (31) 優先権主張番号 0705711
 (32) 優先日 平成19年8月3日(2007.8.3)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

微生物の受託番号 CNCM CNCM 1-3746

(73) 特許権者 592096719
 ビオーラド・イノベーションズ
 フランス92430マルヌ・ラ・コケット
 、ブルヴァール・レイモン・ボワンカレ
 3番
 (73) 特許権者 592236245
 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェ
 ルシュ・シアンティフィック
 CENTRE NATIONAL DE
 LARECHERCHE SCIENTI
 FIQUE
 フランス75794パリ、セデックス16
 、リュ・ミケランジュ3番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規BNP(1-32)エピトープおよび前記エピトープに対する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式(I):



を有するヒトBNP(1-32)エピトープを担持するポリペプチドであって、

式中

- a_1 は、Hであってもよいし、チオール官能基、アルコール官能基、アミノキシ官能基、第一級アミンまたは第二級アミン官能基、アミノカルボキシル基、ピオチニル基およびアセチル基から選択される官能基または化学基を表していてもよく；

- a_2 は、OH官能基、NH₂官能基またはアルコキシル基を表していてもよく；

- X_1 は、存在しないかまたは存在し、存在する場合はCとGCの中から選択され；

- X_2 は、存在しないかまたは存在し、存在する場合はIとISの中から選択され；

- R_1 および R_2 は、同一であっても異なってもよく、存在しても存在しなくてもよく、式(I)の前記ポリペプチドが、配列GCFGRKMDRISを含むヒトBNP(1-32)の11個を超えるアミノ酸の部分を含まないという条件で、任意のアミノ酸、または2個から15個のアミノ酸のペプチド鎖を表す、ポリペプチド。

【請求項2】

ヒトBNP(1-32)またはヒトプロBNP(1-108)ならびに配列FGRKMDRを含んでなるそれらの個々の断片に対するリガンドの調製のための請求項1に記載のポリペプチドの使用であって、該リガンドが、請求項1に定義されるエピトープを認識す

10

20

る抗体または抗体断片、アプタマー、およびファージディスプレイによって得られる請求項 1 に定義されるエピトープを特異的に認識するポリペプチドからなる群から選択される
ところの、使用。

【請求項 3】

ヒト BNP (1 - 3 2) またはヒトプロ BNP (1 - 1 0 8) ならびに配列 F G R K M D R を含んでなるそれらの個々の断片に対するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製のための請求項 1 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 4】

ヒト BNP (1 - 3 2) またはヒトプロ BNP (1 - 1 0 8) ならびに配列 F G R K M D R を含んでなるそれらの個々の断片に対するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製する方法であって、ハイブリドーマを得るために、

- 請求項 1 に記載のポリペプチドにより免疫化された動物由来の免疫グロブリンを分泌するリンパ球を骨髓腫細胞と融合させる、

方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法から得ることができるハイブリドーマ。

【請求項 6】

登録番号 CNCM I - 3 7 4 6 で CNCM (C o l l e c t i o n N a t i o n a l e d e C u l t u r e s d e M i c r o o r g a n i s m e s , I n s t i t u t P a s t e u r , 2 5 , r u e d u D o c t e u r R o u x , 7 5 7 2 4 P a r i s C e d e x 1 5 , 仏国) に 2 0 0 7 年 4 月 1 3 日 に寄託されたハイブリドーマ。

【請求項 7】

配列 F G R K M D R のエピトープに特異的なリガンドであって、該エピトープを認識する抗体または抗体断片、アプタマー、およびファージディスプレイによって得られる該エピトープを特異的に認識するポリペプチドによって構成される群から選択される、リガンド。

【請求項 8】

配列 F G R K M D R のエピトープを特異的に認識する抗体、または前記エピトープを特異的に認識する前記抗体の断片によって構成される請求項 7 に記載のリガンド。

【請求項 9】

生体サンプルにおいて、ヒト BNP (1 - 3 2) またはヒトプロ BNP (1 - 1 0 8) ならびに配列 F G R K M D R を含んでなるそれらの個々の断片を検出するための、請求項 7 または 8 に記載のリガンドの使用。

【請求項 10】

生体サンプルにおいて、ヒト BNP (1 - 3 2) 、または配列 F G R K M D R を含有するヒトプロ BNP (1 - 1 0 8) の誘導体を検出する方法であって：

1) 抗原 - リガンド複合体の形成を可能にする条件下、請求項 7 または 8 に記載の少なくとも 1 つのリガンドと前記生体サンプルとを接触させること、および

2) 形成した可能性のある複合体をいずれも検出すること、
を含んでなる方法。

【請求項 11】

個体における少なくとも 1 つの心臓病態および / または血管病態の診断、予後、または危険性の層別化、あるいは少なくとも 1 つの心臓病態および / または血管病態に対する治療を受けている個体の治療モニタリングを補助するためのイン・ビトロでの方法であって、

1) 抗原 - リガンド複合体の形成を可能にする条件下、請求項 7 または 8 に記載の少なくとも 1 つのリガンドと前記個体からの生体サンプルとを接触させるステップと、

2) 形成した可能性のある複合体をいずれも検出するステップと、
を含んでなる方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

- 前記病態が、
- 鬱血性心不全、
 - 急性冠動脈症候群、
 - 脳血管性発作、
 - 腎不全、
 - 呼吸困難、
 - 高血圧、
 - じゅく状斑破裂、
 - 未熟新生児における動脈管開存症、および/または
 - 糖尿病、

10

を含んでなる群から選択される請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

以下の一般式 (I I I) :



を有するマルチエピトープ標準物質であって、

式中：

- n は、0 ~ 8 の間の整数であり；
- k は、n > 0 の場合、3 ~ n + 2 の間の整数であり；
- E₁、E₂、および E_k は、互いに異なり、1 つは、R₁ - X₁ - F G R K M D R - X₂ - R₂ ペプチド配列を表し、式中 X₁、X₂、R₁ および R₂ は、請求項 1 に定義されたとおりであり、他は、ヒトプロBNP (1 - 1 0 8) の配列から選択される 3 個から 1 5 個のアミノ酸の配列を表し；
- t₁ は、水素原子、アセチル基、1 個から 1 0 個のアミノ酸のペプチド配列、1 個 ~ 1 0 個の N - アセチル化アミノ酸のペプチド配列、ピオチニル基またはピオシチニル基、ピオチニル基またはピオシチニル基を担持する 1 個から 1 0 個のアミノ酸のペプチド配列、または線状アミノアルキル (C₁ - C₁₀) カルボニル鎖を表し；
- t₂ は、ヒドロキシル基、アミノ基、1 個から 1 0 個のアミノ酸のペプチド配列、末端アミノ基を担持する 1 個から 1 0 個のアミノ酸のペプチド配列、または線状または分枝状アミノアルキル (C₁ - C₁₀) カルボニル鎖を表し；
- L₁ および L_k は、同一であっても異なってもよく、ペプチド鎖の結合基を表す、マルチエピトープ標準物質。

20

30

【請求項 1 4】

ヒトBNP (1 - 3 2) またはヒトプロBNP (1 - 1 0 8) ならびに配列 F G R K M D R を含んでなるそれらの個々の断片を検出するためのキットであって、少なくとも

- 請求項 7 または 8 に記載のリガンド；および
 - 請求項 1 3 に記載のマルチエピトープ標準物質、
- を含んでなるキット。

【請求項 1 5】

個体における脳卒中の診断を補助するためのイン・ビトロでの方法であって、

- 1) 抗原 - リガンド複合体の形成を可能にする条件下、請求項 7 または 8 に記載の少なくとも 1 つのリガンドと前記個体からの生体サンプルとを接触させるステップと、
- 2) 形成した可能性のある複合体をいずれも検出するステップと、

を含み、ここに、標識形態で存在するプロBNP (1 - 1 0 8) の R A P R₇₆ S₇₇ P 配列に対するモノクローナル抗体と組み合わせて、前記ステップ 1 の少なくとも 1 つのリガンドが固相上に固定された形態で使用されるか、または固相上に固定された形態で存在するプロBNP (1 - 1 0 8) の R A P R₇₆ S₇₇ P 配列に対するモノクローナル抗体と組み合わせて、前記ステップ 1 の少なくとも 1 つのリガンドが標識形態で使用される、方法。

40

【請求項 1 6】

50

個体における少なくとも1つの心臓病態および/または血管病態の診断、予後、または危険性の層別化、あるいは少なくとも1つの心臓病態および/または血管病態に対する治療を受けている個体の治療モニタリングを目的とした診断キットの製造のための請求項7または8に記載の少なくとも1つのリガンドの使用であって、ここに、該診断、予後、危険性の層別化、または治療モニタリングが、

1) 抗原-リガンド複合体の形成を可能にする条件下、請求項7または8に記載の少なくとも1つのリガンドと前記個体からの生体サンプルとを接触させるステップと、

2) 形成した可能性のある複合体をいずれも検出するステップと、
を含んでなるところの、使用。

【請求項17】

個体における脳卒中の診断を目的とした診断キットの製造のための請求項7または8に記載の少なくとも1つのリガンドの使用であって、ここに、該診断が、

1) 抗原-リガンド複合体の形成を可能にする条件下、請求項7または8に記載の少なくとも1つのリガンドと前記個体からの生体サンプルとを接触させるステップと、

2) 形成した可能性のある複合体をいずれも検出するステップと、

を含み、前記ステップ1の少なくとも1つのリガンドが固相上に固定された形態で、標識形態で存在するプロBNP(1-108)のRAPR₇₆S₇₇P配列に対するモノクローナル抗体と組み合わせて使用されるか、または前記ステップ1の少なくとも1つのリガンドが標識形態で、固相上に固定された形態で存在するプロBNP(1-108)のRAPR₇₆S₇₇P配列に対するモノクローナル抗体と組み合わせて使用されるところの、
使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2007年8月3日に出願された米国仮特許出願第60/935,269号明細書(本明細書に援用)の利益を主張する。

【0002】

本発明は、ヒト脳のナトリウム排泄増加ペプチド(BNP)ならびにヒトにおける鬱血性心不全のインビトロ診断に関する。より具体的には、本発明は、BNP(1-32)分子に存在する新規エピトープ、前記エピトープに対する抗体、特に20G7モノクローナル抗体、このような抗体を用いたBNP(1-32)およびプロBNP(1-108)ならびにそれら個々の断片の免疫学的アッセイに関する方法、および前記アッセイを実施するための試験キットに関する。

【0003】

鬱血性心不全は、特に高齢者によく見られる一般的な臨床的症候群である。それは通常、身体的労作時の咳、倦怠、末梢浮腫の発現などの非特異的症状の潜伏性トリガリングの形態で発現する。疾患重症度(New York Heart AssociationによるI~IV NYHAの段階に等級分けされている)の診断および評価は、臨床的徴候と特定の試験および検査(エコー心電図、シンチグラフィ、運動試験など)の結果を組み合わせた解釈に基づく。

【背景技術】

【0004】

鬱血性心不全の重症度および高額な患者管理費用のため、この症候群の早期診断がきわめて望ましいことは明らかである。早期診断によって、この症候群がより重症の鬱血性心不全になることを避けたり、それへの急速な進行を遅らせたりする上で好適な治療の実施に寄与すると考えられるからである。したがって、鬱血性心不全および/または好ましくない予後または引き続く合併症の危険性がある人々を同定することが必要である。またこのことにより、治療を受けている患者を治療的にモニタリングする(速やかに、簡便に、そして低コストで)ために同じ手段を提案することが可能になるであろう。今日、鬱血性心不全の診断、予後およびモニタリングのためのこのような方法は用いられており、下記

10

20

30

40

50

に記載されているが、それらはやや不十分であることが実証されており、また完全に有益とは限らない。

【0005】

急性冠動脈症候群（ACS）もまた、現代の大きな健康問題である。それらは、以下の心臓疾患を含んでなる：Q波心筋梗塞、ST部分の上昇を有する、または有さない心筋梗塞、心筋梗塞の恐れまたは不安定なアンギナ。

【0006】

ACSの診断、予後およびモニタリングはまた、医療界において最も重要である。ナトリウム排泄増加ペプチド（BNP（1-32）、NT-プロBNP（1-76）、およびプロBNP（1-108））のアッセイは、これらの適用においてきわめて高い関心が寄せられている。

10

【0007】

同じことは、息切れ（呼吸困難を特徴とする疾患）、脳血管発作（CVA）（「脳卒中」または「脳溢血」としても知られている）、および腎不全などの関連病態ならびにこれらの病態に関連した糖尿病の場合にも当てはまる。

【0008】

鬱血性心不全を予測し得る前駆症状マーカーは長い間求められていた。これに関して、心筋細胞が、ナトリウム排泄活性を有するペプチド：心耳を出所源とするペプチド、ラットにおいて非特許文献1によって発見されたANP（心房ナトリウム排泄ペプチド）、およびブタおよびヒトにおいて特許文献1の発明者らによっておよび非特許文献2によって発見されたBNP（脳ナトリウム排泄性ペプチド）として知られている心耳-心室起源のナトリウム排泄ペプチドを産生し分泌することが示されている。

20

【0009】

BNPの前駆体であるプレプロBNP（1-134）は、心筋細胞内でのこの分子の貯蔵形態である。前記前駆体は、シグナルペプチドおよびプロBNP（1-108）の放出のために、その分泌中および/または分泌後に開裂する。プロBNP（1-108）は、配列：

H₁ P L G S P G S A S D L E T S G L Q E Q R N H L Q G K L S E L Q V E Q T S L E
P L Q E S P R P T G V W K S R E V A T E G I R G H R K M V L Y T L R A P R₇₆ S
77 P K M V Q G S G C F G R K M D R I S S S S G L G C K V L R R H₁₀₈（配列番号1）

30

である108個のアミノ酸のポリペプチドで構成されている。

【0010】

それは、分泌中および/または分泌後に、アミノ酸Arg₇₆とアミノ酸Ser₇₇との間で、一方はBNP（77-108）またはBNP-32またはBNP（1-32）（以下この用語を用いる）としても知られているBNPへ、そしてプロBNPのN末端断片またはNT-プロBNP（1-76）（以下この用語を用いる）としても知られているプロホルモンBNP（1-76）のN末端部分へと開裂する。

【0011】

この分子の血管活性形態であるBNP（1-32）は、配列：

S₁ P K M V Q G S G C F G R K M D R I S S S S G L G C K V L R R H₃₂（配列番号2）

40

である32個のアミノ酸のペプチドで構成されている。

【0012】

17個のアミノ酸は2つの酸化システイン残基（C₁₀およびC₂₆）の間のジスルフィド結合によって閉じたループを形成し、前記ループは、上流を9個のアミノ酸（これがN末端部分を構成する）、下流を6個のアミノ酸（これがC末端部分を構成する）で囲まれている。

【0013】

良好な生物活性を得るためにはこのループの完全性が重要である。ループを形成する1

50

7個の残基のうち、11個は2つの他のナトリウム排泄ペプチドであるANP（A型のナトリウム排泄ペプチド）とCNP（C型のナトリウム排泄ペプチド）においても保存されている。

【0014】

NT-プロBNP（1-76）は、プロBNP（1-108）の76個のN末端アミノ酸によって形成され、以下の配列：

H₁ P L G S P G S A S D L E T S G L Q E Q R N H L Q G K L S E L Q V E Q T S L E
P L Q E S P R P T G V W K S R E V A T E G I R G H R K M V L Y T L R A P R₇₆（
配列番号3）

を有する。

10

【0015】

興味深いことに、これら3つのポリペプチド、プロBNP（1-108）、NT-プロBNP（1-76）およびBNP（1-32）は、抗体の特定の組み合わせを用いた種々のアッセイが開発された方法において鬱血性心不全の良好なマーカーであることが実証されている。

【0016】

実際、非特許文献3の初期の研究以来、プロBNP（1-108）が血液中を循環していることが認められていたため、プロBNP（1-108）を検出するための種々の免疫学的アッセイが提案されている。特許文献2には、プロBNP（1-108）の1-76の部分で認識する抗体および抗BNP（1-32）抗体の助けによるプロBNP（1-108）のサンドイッチアッセイが記載されている。このタイプのアッセイは、捕捉抗体により認識されるエピトープを有する開裂プロBNP（1-108）の副産物、すなわちNT-プロBNP（1-76）およびその進行的開裂から生じる産物の固相（捕捉抗体）へ結合することにより、感度が不足である。

20

【0017】

特許文献3には、一方ではNT-プロBNP（1-76）およびBNP（1-32）（ヒンジ76抗体とも称される）のヒンジに位置する配列RAPRSPのエピトープを認識する抗体、他方では抗BNP（1-32）抗体の助けによるプロBNP（1-108）の検出が記載されており、このタイプのアッセイのこのような方法において、アッセイはプロホルモンのみに特異的である。すなわち、NT-プロBNP（1-76）のとBNP（1-32）との2つの形態の交差反応性はない。

30

【0018】

NT-プロBNP（1-76）

NT-プロBNP（1-76）のアッセイに関して、特許文献4には、NT-プロBNP（1-76）の検出に基づいた鬱血性心不全のインビトロ診断のための方法が記載されている。しかしながら、特許文献4に記載されている方法は、血液サンプル中のNT-プロBNP（1-76）に対して、容易には実施されないようである。実際、ヒトの血清に対してではなく、合成ペプチドであるペプチドNT-プロBNP（47-64）を用いて得られた標準的な範囲に対して実施された例のみが示されている。この欠点を克服するためには、きわめて高度な自動システムが必要であることが分かっている。

40

【0019】

最後に、BNP（1-32）の複数のアッセイが種々の抗体を用いて開発されている。例えば、特許文献5には、BNP（1-32）の環状構造を認識する2つのモノクローナル抗体（KY-hBNPIおよびKY-hBNPII）が記載されているが、他の詳細は記載されていない。

【0020】

また、特許文献6には、BNP（1-32）のC末端K₂₇VLRRH₃₂エピトープの最後のアミノ酸であるヒスチジンH₃₂を認識するモノクローナル抗体が記載されている。BNP（1-32）上に存在する他のエピトープが知られている：配列₁SPKMVQGS₁₀GC（配列番号22）、₅VQGS₁₀GC₁₀FR₁₃（配列番号21）および₁

50

${}_5$ MDRISSSSGLG $_{25}$ (配列番号23)の3つのエピトープもまた、特許文献7および特許文献8に、高度に免疫原性なものとして記載されている。前記文書には、これらのエピトープに対する単一特異的抗体も記載されている。

【0021】

2005年に、HyTest社(Turku、フィンランド国)は、BNP(1-32)に特異的な種々の抗体を市場に出した。非特許文献4による論文に記載されたこれらの抗BNP(1-32)抗体のいくつかは、BNP(1-32)の1-10、11-22、17-23または26-32の領域を標的にしている。BNP(1-32)の ${}_{11}$ FGRKMDRISSSS ${}_{22}$ (配列番号61)ペプチドを用いて、Balb/cマウスを免疫化することによって得られた17の抗体のうち、24C5と26E2のモノクローナル抗体のみが記載されている。しかし、それらのエピトープは正確には特徴付けられておらず、それらが、BNP(1-32)の上記のアミノ酸11から22の配列に対するものであることが示されているのみである。

10

【0022】

特許文献9には、BNP(1-32)に存在する別のエピトープが記載されている。これは、ヒトBNP(1-32)の環状構造の一部を形成するアミノ酸13-20に含まれるアミノ酸R ${}_{13}$ (K ${}_{14}$)(M ${}_{15}$)D ${}_{16}$ R ${}_{17}$ I ${}_{18}$ (配列番号24)の配列を有する。この出願には、このエピトープを特異的に認識する3-631-436と称されるモノクローナル抗体も記載されている。4つのアミノ酸、R ${}_{13}$ 、D ${}_{16}$ 、R ${}_{17}$ 、およびI ${}_{18}$ が、このエピトープへの3-631-436抗体の結合に関して機能的に重要であると述べている。このエピトープの上流に位置するアミノ酸(フェニルアラニンF ${}_{11}$ やグリシンG ${}_{12}$ など)は記載されていない。

20

【0023】

BNP(1-32)ホルモンの欠点の1つは、血漿中および血清中で不安定なことである。実際、プロテアーゼタイプの酵素がBNP(1-32)を開裂するようである。例えば、非特許文献5は、BNP(1-32)のC末端位のArg ${}_{30}$ -Arg ${}_{31}$ 結合と同様に、プロテアーゼによってBNP(1-32)のN末端部分、より具体的にはPro ${}_{2}$ -Lys ${}_{3}$ 結合が開裂すると考えられることを報告している。非特許文献6および非特許文献7は、特にN末端位におけるBNP(1-32)の分解を記載している。

30

【0024】

同様に、エンドペプチダーゼによって生じたいくつかの結合開裂が、報告されている(非特許文献8)。したがって、BNP(1-32)のアッセイには、特別な注意が必要であり(非特許文献9;非特許文献10)、抗体の好適な選択を暗示している。

【0025】

最近、いくつかのチームにより、ナトリウム排泄ペプチドがグリコシル化形態および/または切断形態で循環する可能性が示されている(非特許文献11;非特許文献12;非特許文献13)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0026】

【特許文献1】EP418308

【特許文献2】国際公開第99/13331号パンフレット

【特許文献3】国際公開第2004/14952号パンフレット

【特許文献4】国際公開第93/24531号パンフレット

【特許文献5】JP2676114B2

【特許文献6】EP542255

【特許文献7】国際公開第97/32900号パンフレット

【特許文献8】米国特許第6,162,902号明細書

【特許文献9】国際公開第2006/88700号パンフレット

【非特許文献】

40

50

【 0 0 2 7 】

【非特許文献 1】 de Boldら Life Science 1981, vol. 28(1): 89-94

【非特許文献 2】 Sudohら(1988) Nature 332:78-81

【非特許文献 3】 Tateyama ら (1992) Biochemical and Biophysical Research Communications 185: 760-767

【非特許文献 4】 Seferianら (2007) Clinical Chemistry 53:5, 866-873

【非特許文献 5】 Shimizuら (2002) Clinica Chimica Acta 316: 129-135

【非特許文献 6】 Boerrigterら (2007) Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 292: R897-90

【非特許文献 7】 Hawkridgeら (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102:17442-7

10

【非特許文献 8】 Davidson & Struthers (1994) J. Hypertension 13: 329-336

【非特許文献 9】 Davidsonら (1995) Circulation 91:1276-7

【非特許文献 1 0】 Gobinet-Georgesら (2000) Clin. Chem. Lab. Med. 38:519-23

【非特許文献 1 1】 Schellenberger (2006) Arch. Biochem. Biophys. 451: 160-6

【非特許文献 1 2】 Liangら (2007) Journal of the American College of Cardiology 49: 1071-8

【非特許文献 1 3】 Lamら (2007) Journal of the American College of Cardiology 49: 1193-292

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【 0 0 2 8 】

鬱血性心不全、ACS、呼吸困難、および他の心欠陥疾患、ならびにCVAおよび糖尿病や腎不全などの関連病態の早期診断に関して、特にBNP(1-32)の不安定性を考慮して、BNP(1-32)およびプロBNP(1-108)を検出するための試薬および方法の改善が常に求められている。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 9 】

本発明は主に、ヒトBNP(1-32)分子に存在する未知の予想されなかったエピトープおよび前記エピトープを認識する特異的なモノクローナル抗体の本発明者らによる全く予想外の発見から導かれている。全ての予想に反して、発明者らは、BNP(1-32)の配列F₁₁GRKMDR₁₇(配列番号51)は、BNP(1-32)の環状構造(アミノ酸10-26)を認識する抗体を作出するための有益なエピトープを構成することを発見し、前記F₁₁G₁₂RK₁₄MDR₁₇(配列番号51)エピトープを特異的に認識する20G7と称するモノクローナル抗体を得た。言い換えると、20G7抗体は、BNP(1-32)のF₁₁GRKMDR₁₇(配列番号51)エピトープに特異的なモノクローナル抗体である。

30

【 0 0 3 0 】

本発明はまた、20G7モノクローナル抗体および前記抗体を含有する試薬を用いてBNP(1-32)およびプロBNP(1-108)ならびにそれらの循環性断片を検出するための免疫アッセイ法を提供する。

40

【 0 0 3 1 】

実際、ヒトBNP(1-32)の環状領域(アミノ酸10-26)に位置するペプチドを合成し、前記ペプチドによりマウスを免疫化した際、前記ペプチドがフェニルアラニンF₁₁残基、リジンK₁₄残基およびアルギニンR₁₇残基を含有する場合は、得られたいくつかの抗体はこのタイプのペプチドにのみ反応すること、また国際出願国際公開第2006/88700号パンフレットに記載されたエピトープにおいて特に重要なイソロイシンI₁₈は、本発明によるエピトープに属していなかったことを、本発明者らは認めた。

【 0 0 3 2 】

例えば、本発明者らは、何匹かのマウスをTGCFGRKMDRISTSTAI GCK

50

V L (配列番号4) ペプチドで、他のマウスを S G C Y G R K M D R I S T S T A I G C K V L (配列番号5) ペプチドで免疫化した。S G C Y G R K M D R I S T S T A I G C K V L (配列番号5) ペプチドで免疫化したマウスにおいてよりも、T G C F G R K M D R I S T S T A I G C K V L (配列番号4) ペプチドで免疫化したマウスにおいて、B N P (1 - 32) に対する免疫応答がはるかに大きいことが観察された。双方の場合とも、システインは鎖内ジスルフィド結合を介して酸化形態で存在していることに注意されたい。

【0033】

免疫化マウスの脾臓細胞と骨髄腫細胞とのリンパ球融合後、本発明者らは、種々のハイブリッドクローンを作製することができた。特に、フェニルアラニン F₁₁ 残基、リジン K₁₄ 残基およびアルギニン R₁₇ 残基を含有する B N P (1 - 32) およびプロ B N P (1 - 108) のペプチドのみを認識する 20G7 - 15 / 03 / 2007 と称されるモノクローナル抗体 (以下、便宜上「20G7」と称する) を得た。実際、これらのアミノ酸、F₁₁、K₁₄ および R₁₇ は、B N P (1 - 32) およびプロ B N P (1 - 108) ならびにそれらそれぞれの断片に対する 20G7 モノクローナル抗体の最適な結合によって重要であることが実証された。

【0034】

20G7 - 15 / 03 / 2007 モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマは、C N C M (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75 724 Paris Cedex 15, 仏国) において、Bio - Rad により、2007年4月13日に、登録番号 C N C M I - 3746 で寄託された。

【0035】

驚くべきことに、また予想外なことに、本発明者らの観察によると、20G7抗体は、その残基、F₁₁、K₁₄ および R₁₇ が個々に、または一緒にアラニンによって置換されると、このペプチドの抗原反応性は、天然の S G C F G R K M D R I S S S S S G L G C K V L (配列番号6) ペプチドの抗原反応性に比較してかなりの影響を受けるが、このエピトープの他のアミノ酸を置換した場合は、このペプチドの抗原反応性にほとんど影響がなかった。また、20G7抗体についての詳細な研究により、20G7抗体が、F₁₁ G R K M D R₁₇ (配列番号51) エピトープを認識するが、A₁₁ G R K M D R₁₇ (配列番号62) 配列も、G R K M D R₁₇ I₁₈ (配列番号52) 配列も、C₁₀ F₁₁ G R K M D (配列番号50) 配列も認識しないことが示された。

【発明を実施するための形態】

【0036】

したがって、20G7モノクローナル抗体は、B N P (1 - 32) の F₁₁ G R K M D R₁₇ (配列番号51) エピトープ配列を認識するが、出願国際公開第97 / 32900号パンフレットの上記 V Q G S G C F G R (配列番号21)、S P K M V Q G S G C (配列番号22) および M D R I S S S S S G L G (配列番号23) のエピトープも、出願国際公開第2006 / 88700号パンフレットの R (K) (M) D R I (配列番号24) のエピトープも実質的に認識しない。

【0037】

したがって、本発明は、式 (I) :



を有するヒト B N P (1 - 32) エピトープを担持するポリペプチドに関するものであり、

- a₁ は、Hであってもよいし、チオール官能基、アルコール官能基、アミノキシ官能基、第一級アミンまたは第二級アミン官能基、アミノカルボキシル基、ピオチニル基およびアセチル基から選択される官能基または化学基を表していてもよく；

- a₂ は、OH官能基、NH₂官能基またはアルコキシル基を表していてもよく (当業者

10

20

30

40

50

には明白であろうが、 a_2 はこのポリペプチド最後のアミノ酸の酸性官能基にあるカルボニル(-CO-)部分に結合している)；

- X_1 は、存在しないか、または存在し、存在する場合は、CとGCの中から選択され；
 - X_2 は、存在しないか、または存在し、存在する場合は、IとISの中から選択され；
 - R_1 および R_2 は、同一であっても異なっていてもよく、存在しても存在しなくてもよく、式(I)の前記ポリペプチドが、配列GCFGRKMDRIS(配列番号63)など、ヒトBNP(1-32)の11を超えるアミノ酸の部分を含まないという条件で、任意のアミノ酸または2個から15個のアミノ酸のペプチド鎖を表す。

【0038】

同等な代替物として、式(I)はまた以下のように定義することもできる：

$a_1 - (R_1) - (G) - (C) - FGRKMDR - (I) - (S) - (R_2) - a_2$
 式中、 a_1 、 a_2 、 R_1 および R_2 は上記の定義のとおりである。

【0039】

「エピトープ」または「エピトープ部位」は、少なくとも1種の抗体によって認識されかつその抗体を前記アミノ酸配列に結合させるアミノ酸配列を意味する。

【0040】

好ましい実施形態において、 R_1 および R_2 は、担体分子、試薬またはマーカー分子に結合できる。

【0041】

別の好ましい実施形態において、前記ポリペプチドは、 $a_1 - SGRKMDR - a_2$ (配列番号33)、 $a_1 - GCFGRKMDRI - a_2$ (配列番号34)、 $a_1 - C$
 $FGRKMDRIS - a_2$ (配列番号35) および $a_1 - FGRKMDRISS - a_2$ (配列番号36) からなる群において選択され、式中、 a_1 および a_2 は上記に定義された
 とおりである。

【0042】

別の好ましい実施形態において、上記に定義されたポリペプチドは、式(II)

$a_1 - FGRKMDR - a_2$ (II)

に相当し、式中、 a_1 および a_2 は上記に定義されたとおりである。

【0043】

本発明はまた、ヒトBNP(1-32)またはヒトプロBNP(1-108)ならびに配列FGRKMDR(配列番号51)を含んでなるそれらの個々の断片に対するリガンドを調製するための、上記に定義したポリペプチドの使用に関する。

【0044】

本発明による「プロBNP(1-108)の断片」は、特にBNP(1-32)を含む、プロBNP(1-108)よりも小さな任意の断片を意味する。例えば、Lamら(2007) J. Am. Coll. Cardiol. 49:1193-1202に記載され、ジペプチダーゼによる開裂によって作製されるプロBNP(3-108)断片である。本発明による用語「プロBNP(1-108)の断片」にはまた、リン酸化、グリコシル化など、プロBNP(1-108)の少なくとも1つの翻訳後修飾に供された任意のポリペプチドも含まれる。例えば、Schell enbergerら(2006) Arch. Biochem. Biophys. 51:160-6は、プロBNP(1-108)が、完全に、または部分的にO-グリコシル化されている糖タンパク質であることを示した。

【0045】

本発明による「BNP(1-32)の断片」は、BNP(1-32)よりも小さい任意の断片を意味する。またこの場合、BNP(1-32)の分解が既に文献に報告されている：例えば、BNP(3-32)断片は、Lamら(上記)およびHawkrigeら(2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:17442-7により記載されている。

【0046】

用語「プロBNP(1-108)」および「BNP(1-32)」ならびに「プロBNP(1-108)の断片」および「BNP(1-32)の断片」には、リン酸化、グリコ

10

20

30

40

50

シル化などの少なくとも1つの翻訳後修飾に供された任意のポリペプチドが含まれる。例えば、Schellenbergerら(2006) Arch. Biochem. Biophys. 51:160-6は、プロBNP(1-108)が、完全に、または部分的にO-グリコシル化されている糖タンパク質であることを示している。

【0047】

「ヒトBNP(1-32)またはヒトプロBNP(1-108)ならびに配列FGRKMDRを含んでなるそれらの個々の断片に対するリガンド」とは、ヒトBNP(1-32)、ヒトプロBNP(1-108)またはそれらの断片に特異的に結合することのできる任意の分子のことである。

【0048】

リガンドの認識または標的に対する結合を言う場合の用語「特異的」は、リガンドが、標的に構造的に類似していない他の標的に実質的に相互作用することなく、標的と相互作用することを意味する。FGRKMDRエピトープの「特異的」な認識とは、そのエピトープを含んでなる標的とリガンドとの相互作用が、そのエピトープのもの以外に、抗原性の決定因子、特にアミノ酸を実質的に含まないことを意味する。特にこれは、リガンドが、BNP(1-32)および/またはプロBNP(1-108)配列のアミノ酸配列ならびにFGRKMDRエピトープを含んでなるアミノ酸を含んでなるそれらの個々の断片に結合することはできるが、その全体にFGRKMDRエピトープを含まないBNP(1-32)および/またはプロBNP(1-108)配列のアミノ酸配列に結合することができないことを意味する。

【0049】

また、Launeら(2002) Journal of Immunological Methods 267:53-70によると、アラニンによる置換によってエピトープの抗原性の少なくとも50%減少に至ると、前記エピトープに存在するアミノ酸は、「重要」であると言われる。

【0050】

さらに、アラニンによる置換によってエピトープの抗原性の少なくとも80%減少に至ると、前記エピトープに存在するアミノ酸は、「必須」であると言われる。

【0051】

本発明によるFGRKMDRエピトープを特異的に認識するリガンドは、配列VQGS GCFGR(配列番号21)、SPKMVQGS GC(配列番号22)、MDRISS S SGLG(配列番号23)、RKMDRI(配列番号24)およびRKMDRISS(配列番号25)を有するペプチドと実質的に相互作用しないことが好ましい。

【0052】

「配列VQGS GCFGR、SPKMVQGS GC、MDRISS S SGLG、RKMDRIおよびRKMDRISSを有するペプチドと実質的に相互作用しない」という表現は、そのリガンドの、これらの配列の1つまたは他の1つとの交差反応が、20%未満、好ましくは10%未満、より好ましくは5%未満、特に好ましくは2%未満であることを意味する。

【0053】

標的の特異的認識の範囲内で、 $10^6 M^{-1}$ 超の結合定数が好ましく、 $10^8 M^{-1}$ 超の結合定数がより好ましく、 $10^{10} M^{-1}$ 超の結合定数が特に好ましい。

【0054】

残基F₁₁、K₁₄およびR₁₇のアラニンによる置換は、エピトープペプチドに対する、登録番号CNCM I-3746でのCNCM(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75 724 Paris Cedex 15、仏国)においてBio-Radにより2007年4月13日に寄託されたハイブリドーマにより作製されたモノクローナル抗体の結合におけるそれぞれ82%、95%および85%の減少が特徴であるから、残基F₁₁、K₁₄およびR₁₇もまた本発明によるリガンドの結合にとって必須であることが好ましい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 5 】

エピトープを認識する抗体または前記抗体の断片、アプタマー、およびファージディスプレイによって得られたエピトープを特異的に認識するポリペプチドによって構成される群からリガンドが選択されることが好ましい。

【 0 0 5 6 】

この文脈において、用語「抗体」とは、任意のポリクローナルまたはモノクローナル抗体のことである。

【 0 0 5 7 】

断片 s c F v、F a b、F a b'、F (a b')₂、ならびにラクダー本鎖抗体は、エピトープを認識する抗体断片の例である。

10

【 0 0 5 8 】

「アプタマー」は当業者によく知られている。アプタマーはヌクレオチドの化合物、特にリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド、または標的、特にタンパク質標的に特異的に結合する天然ペプチドである。天然ヌクレオチドのアプタマーおよびそれらの製造は、特に Ellington ら (1990) Nature 346:818-22 および Bock ら (1992) Nature 355:564-6 に記載されている。天然ペプチドのアプタマーおよびそれらの作製は、特に Hopp e-Seyler ら (2000) J. Mol. Med. 78:426-30 に記載されている。

【 0 0 5 9 】

「ファージディスプレイ」は、バクテリオファージのカプシド上に発現させ、カプシドコード遺伝子内に挿入された核酸配列によってコードされたポリペプチドリガンドを選択するための技法を表す。この技法は、当業者によく知られており、特に Scott & Smith (1990) Science 249:386-390 および Marks ら (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597 により記載されている。ファージディスプレイによって入手可能なポリペプチドは、s c F v タイプのポリペプチド (一本鎖可変断片) であることが好ましい。この技法は特に、Winter ら (1994) Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 により記載されている。

20

【 0 0 6 0 】

リガンドは、化学合成または遺伝子工学によって得ることもできる。

【 0 0 6 1 】

上記に定義されたポリペプチドは、抗体、特にモノクローナル抗体の調製に用いられることが好ましい。

30

【 0 0 6 2 】

この文脈において本発明はまた、ヒト B N P (1 - 3 2) またはヒトプロ B N P (1 - 1 0 8) ならびに配列 F G R K M D R を含んでなるそれらの個々の断片に対するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製のための上記に定義したポリペプチドの使用に関する。

【 0 0 6 3 】

したがって本発明はまた、ヒト B N P (1 - 3 2) またはヒトプロ B N P (1 - 1 0 8) ならびに配列 F G R K M D R を含んでなるそれらの個々の断片に対するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製のための方法であって、ハイブリドーマを得るために、

40

- 免疫グロブリンを分泌するリンパ球のサンプルを、上記のポリペプチドにより免疫化されたマウス、ウサギまたはラットなどの動物から採取され、
- 次いでこれらのリンパ球を、S p 2 骨髄腫細胞 (A T C C C R L - 1 5 8 1) などの骨髄腫細胞と融合させる

方法に関する。

【 0 0 6 4 】

本発明はまた、上記に定義したハイブリドーマを調製するための方法により得ることのできるハイブリドーマに関する。

【 0 0 6 5 】

より具体的には、本発明は、登録番号 C N C M I - 3 7 4 6 で C N C M (C o l l e

50

ction Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75 724 Paris Cedex 15、仏国)にBio-Radにより2007年4月13日に寄託されたハイブリドーマに関する。

【0066】

一般に、ハイブリドーマおよびモノクローナル抗体を得るために用いられる方法論は、Kohler & Milstein (1975) Nature 256:495-497により記載されたリンパ球融合およびハイブリドーマ培養の慣例的方法に従うことができる。モノクローナル抗体を調製するための他の方法も知られている(例えば、Harlowら編、1988 "Antibodies: a laboratory manual")。

10

【0067】

この慣例的方法に代替法も存在する。モノクローナル抗体は例えば、ハイブリドーマからクローン化した核酸を発現させることによって産生させることができる。

【0068】

本発明はまた、配列FGRKMDRのエピトープに特異的なリガンドに関する。

【0069】

このリガンドは、エピトープ、アプタマー、およびファージディスプレイによって得られたエピトープを特異的に認識するポリペプチドを認識する抗体または前記抗体の断片によって構成される群から選択されることが好ましい。

【0070】

20

このリガンドは、配列FGRKMDRのエピトープを特異的に認識する抗体、またはこのエピトープを特異的に認識する前記抗体の断片によって構成されることがより好ましい。このリガンドは、モノクローナル抗体、特に上記に定義されたハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体によって構成されることがさらに好ましい。

【0071】

したがって本発明は特に、登録番号CNCM I - 3746でCNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75 724 Paris Cedex 15、仏国)において2007年4月13日に寄託されたハイブリドーマによって産生されたモノクローナル抗体により構成された上記に定義されたりガンドに関する。

30

【0072】

本発明はさらに具体的に、登録番号CNCM I - 3746でCNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75 724 Paris Cedex 15、仏国)に2007年4月13日に寄託されたハイブリドーマによって産生されたモノクローナル抗体により構成された上記に定義されたりガンドの少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)、特に全てのCDRを有する上記に定義されたりガンドに関する。CDR、および抗体からCDRをリガンドに、好ましくは他の抗体に転移させる方法は当業者によく知られており、特に、例えば、Nicaiseら(2004) Protein Science 13:1882-1891 または Kettleboroughら(1991) Protein Engineering 4:773-783に記載されている。

40

【0073】

また、上記に定義されたりガンドを、担体分子、試薬または標識分子に結合させることができる。

【0074】

本発明はまた、生体サンプル中に、ヒトBNP(1-32)またはヒトプロBNP(1-108)ならびに配列FGRKMDRを含んでなるそれら個々の断片を検出するための上記に定義されたりガンドに関する。

【0075】

50

実際、本発明はまた、

- 1) 生体サンプルを、好ましくは、抗原 - リガンド複合体を形成させる条件下、上記に定義した少なくとも1種のリガンドに接触させること、および
 - 2) 形成した可能性のある複合体をいずれも検出すること
- を含んでなる、ヒトBNP(1-32)またはヒトプロBNP(1-108)ならびに配列FGRKMDRを含有するそれら個々の断片を生体サンプル中に検出するための方法に関する。

【0076】

本発明の文脈において、「生体サンプル」またはさらに「生体液サンプル」は、血液、血漿、血清、脳脊髄液、唾液、尿および涙液などの生体液体によって構成されることが好ましい(例えば、Michielsenら(2008) Ann Clin Biochem 45:389-94; Cortesら(2006) Eur J Heart Fail 8:621-7; Kirchhoffら(2006) J Neurotrauma 23:943-9; Kanekoら(1993) Brain Res 612:104-9を参照)。この場合、用語「生体サンプル」には、採取したサンプルと種々の処置、特に、本発明による処理および方法における使用に好適にする処置に供したサンプルとの双方が含まれることを意味する。

10

【0077】

好ましい一実施形態において、上記の検出方法は、ヒトBNP(1-32)またはヒトプロBNP(1-108)ならびにそれらの個々の断片に特異的であって、かつ本発明によるリガンドの特異性とは異なる特異性を有する少なくとも1つの追加リガンドに生体サンプルを接触させる少なくとも1つの追加ステップを含んでなる。

20

【0078】

追加リガンドは抗体であることが好ましい。

【0079】

本発明はまた、

- 1) 個体からの生体サンプルを、好ましくは、抗原 - リガンド複合体を形成可能とする条件下、上記に定義した少なくとも1種のリガンドに接触させるステップ、
 - 2) 形成した可能性のある複合体をいずれも検出するステップ、および
 - 3) ステップ2における検出結果に基づいて、個体における病態の診断、予後、発現の危険性または治療的追跡を判定するステップ
- を含んでなる、個体における心臓および/または血管の少なくとも1つの病態の診断、予後、危険性の層別化または治療的追跡の方法に関する。

30

【0080】

特定の一実施形態において、上記に定義した方法は、生体サンプルを、ヒトBNP(1-32)、または本発明によるリガンドの特異性とは異なる特異性を有するヒトプロBNP(1-108)誘導体に特異的な少なくとも1種の追加リガンドに接触させる少なくとも1つの追加ステップを含んでなる。

【0081】

追加リガンドは抗体であることが好ましい。

【0082】

病態は、

- 鬱血性心不全
- 急性冠動脈症候群
- 脳血管性発作
- 腎不全
- 呼吸困難
- 高血圧
- じゅく状斑破裂
- 未熟新生児における動脈管開存症、および/または
- 糖尿病

40

からなる群から選択されることが好ましい。

50

【 0 0 8 3 】

「鬱血性心不全」は、器官の代謝的要求を満足させる上で十分な血液を心臓が送り出すことのできない原因が心機能の異常にあり、および／または心臓が要求を満たしてはいるが、異常に高い吸い入れ圧を伴う病態を意味する。これは特に、左心室および／または右心室の不全に関連し得る。

【 0 0 8 4 】

「急性冠動脈症候群」は、特に二つに分類される：

- 一般に、急性全冠動閉塞に対応するQ波壁内梗塞の形成が現れる、S T部分の持続的なアップスロープ(すなわち上昇)を伴う急性冠動脈不全、および
- プラーク破裂および不完全な血栓形成に対応しかつ異なる治療を必要とする不安定アンギナとしても知られている、非Q波梗塞に対応するS T部分のアップスロープを伴わない(すなわち上昇がない)急性冠動脈不全。

10

【 0 0 8 5 】

「呼吸困難」は、緊張感または閉塞感を伴う呼吸困難を特徴とする病態を意味する。これは幾つかの原因による可能性があるきわめて一般的な症状である。適切な治療を可能にするのは、系統的アプローチのみである。

【 0 0 8 6 】

世界保健機構の定義によると、「脳血管性偶発症状」または「C V A」または「脳卒中」または「脳溢血」は、24時間超継続する症状を伴う脳機能障害の局所的または全体的な臨床的徴候の急速な発現を特徴とし、血管起源以外には原因が明らかではなく、死に至り得る病態を意味する。

20

【 0 0 8 7 】

上記の処置および方法は、当業者に周知の種々の様式に従って、例えば、サンドイッチ法または競合法により、1ステップまたは2ステップで、固相または均質相において実施することができる。

【 0 0 8 8 】

1つは捕捉リガンド、他方は検出リガンドである2つのリガンド(好ましくは抗体)間で固相におけるサンドイッチ法を用いることが好ましい。このタイプの免疫アッセイは当業者に特によく知られている。例えば、Seferian ら(2007) Clin. Chem. 53:866-873による論文は、各回に一对の抗体(固相に固定した抗体および検出に標識化抗体)を用いた、BNP(1-32)およびプロBNP(1-108)をアッセイするためのサンドイッチ免疫アッセイ(または2部位での免疫定量アッセイ)の一例を提供している。

30

【 0 0 8 9 】

「捕捉リガンド」は、生体サンプルに存在するBNP(1-32)および／またはプロBNP(1-108)抗原、ならびにそれらそれぞれの断片に結合することのできるリガンドを意味する。

【 0 0 9 0 】

生体サンプル中の抗原の存在は、検出手段、特に「検出リガンド」によって明らかにされる。標識化された検出リガンドは、捕捉リガンドによって認識されるエピトープ部位とは異なるエピトープ部位を認識することによって、捕捉された抗原に結合することができる。

40

【 0 0 9 1 】

用語「標識化」とは、直接的な標識化および間接的な標識化(例えば、それら自体が標識化されている他のリガンドにより、または、限定的ではないが標識化されたアビジン-ビオチン対などの標識化された「親和対」の試薬を用いて)の双方を言う。

【 0 0 9 2 】

サンドイッチ法の場合、捕捉リガンドは、患者生来の抗原上のエピトープを特異的に認識するように選択されることが好ましく、一方検出リガンドは、患者生来の抗原上の他のエピトープを特異的に認識するように選択されることが好ましい。

【 0 0 9 3 】

50

捕捉リガンドは固相状に固定されることが好ましい。固相の非限定的な例として、マイクロプレート、特にNunc（デンマーク国）によって販売されているものなどのポリスチレンマイクロプレートを使用し得る。固体粒子またはビーズ、Dyna1、Merck-EuroLab（仏国）により（商標Estapor™）およびPolymer Laboratoriesにより製造されたものなどの常磁性ビーズ、またはさらに、ポリスチレンまたはポリプロピレンの試験管、ガラス、プラスチックまたはシリコンのチップなども使用できる。

【0094】

形成した抗原-抗体複合体の存在を明らかにするために、ELISAアッセイ、放射線免疫アッセイ、または他の任意の検出方法を用いることができる。したがって、リガンド、特に抗体の種々のタイプの標識化が可能である（放射性、酵素的、蛍光など）。

10

【0095】

検出はまた、表面プラズモン共鳴（SPR）などの質量蓄積に基づいた新規方法により、圧電検出により、また、質量分光分析または第二の標識リガンドの非存在下でリガンド-抗原タイプ相互作用の試験を可能にすると確定された他の任意の方法によっても実施できる。

【0096】

上記の処置または方法の好ましい実施は、標識形態で存在するBNP（1-32）のN末端部分に対する少なくとも1種のモノクローナルまたはポリクローナル抗体と組み合わせて、固相上に固定した上記のリガンドを用いることにある。

20

【0097】

上記の処置または方法の他の好ましい実施は、HyTestから入手可能な標識形態で存在する50B7抗体（BNP（1-32）の26-32のペプチドに特異的）などのBNP（1-32）のC末端部分に対する少なくとも1種のモノクローナルまたはポリクローナル抗体と組み合わせて、固相上に固定した上記のリガンドを用いることにある。

【0098】

あるいは、上記の方法または処置のさらに別の好ましい実施により、固相上の固定化形態で存在するBNP（1-32）のN末端またはC末端部分に対する少なくとも1種のモノクローナルまたはポリクローナル抗体と組み合わせて、上記に定義したリガンドを標識形態で用いることができる。

30

【0099】

上記の方法または処置の好ましい実施は、標識形態で存在する、HyTestから入手可能な16F3抗体（NT-プロBNPの13-20ペプチドに特異的）などのNT-プロBNP（1-108）のN末端部分に対する少なくとも1種のモノクローナルまたはポリクローナル抗体と組み合わせて、固相上に固定した上記のリガンドを用いることにある。

【0100】

あるいは、上記の方法または処置の好ましい実施は、固相上の固定化形態で存在する、HyTestから入手可能な16F3抗体（NT-プロBNPの13-20ペプチドに特異的）などのプロBNP（1-108）のN末端部分に対する少なくとも1種のモノクローナルまたはポリクローナル抗体と組み合わせて、上記に定義したリガンドを標識形態で用いることにある。

40

【0101】

上記の方法または処置の他の好ましい実施は、標識形態で存在する、プロBNP（1-108）のRAPR₇₆S₇₇P（配列番号55）配列に対するモノクローナル抗体（特許出願国際公開第2004/14952号パンフレット、またはGiulianiら(2006) Clin. Chem. 52:1054-1061に記載されたものなど）と組み合わせて、固相上に固定した上記のリガンドを用いることにある。

【0102】

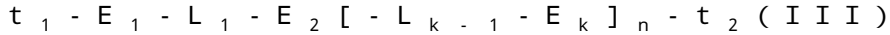
あるいは、上記の方法または処置の好ましい実施は、固相上の固定化形態で存在する、

50

プロBNP (1 - 108) のRAPR₇₆S₇₇P (配列番号55) 配列に特異的なモノクローナル抗体 (特許出願国際公開第2004/14952号パンフレット、またはGiulianiら(2006) Clin. Chem. 52:1054-1061 に記載されたものなど) と組み合わせて、上記に定義したリガンドを標識形態で用いることにある。

【0103】

本発明はまた、以下の一般式 (III)



を有するマルチエピトープ標準物質に関するものであり、
式中

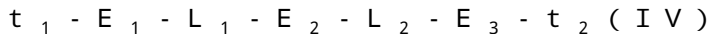
- n は、0 ~ 8 の間の整数であり；
- k は、n > 0 の場合、3 ~ n + 2 の間の整数であり；
- E₁、E₂、および E_k は互いに異っており、1 つは、R₁ - X₁ - FGRKMDR - X₂ - R₂ ペプチド配列を表し、式中、X₁、X₂、R₁ および R₂ は上記で定義したとおりであり、他は、ヒトプロBNP (1 - 108) の配列から選択される3個から15個のアミノ酸の配列を表し；
- t₁ は、水素原子、アセチル基、1個から10個のアミノ酸のペプチド配列、1個から10個のN - アセチル化アミノ酸のペプチド配列、ビオチニル基またはビオシチニル基、ビオチニル基またはビオシチニル基を担持する1個から10個のアミノ酸のペプチド配列または線状アミノアルキル (C₁ - C₁₀) カルボニル鎖を表し；
- t₂ は、ヒドロキシル基、アミノ基、1個から10個のアミノ酸のペプチド配列、末端アミノ基を担持する1個から10個のアミノ酸のペプチド配列、または線状または分枝状のアミノアルキル (C₁ - C₁₀) カルボニル鎖を表し (当業者には明白であろうが、t₂ は、E_n ペプチド鎖における最後のアミノ酸の酸性官能基のカルボニル (-CO-) 部分に結合している)；
- L₁ および L_k は、同一であっても異なっていてもよく、ペプチド鎖の結合基を表す。

10

20

【0104】

上記のマルチエピトープ標準物質は、以下の一般式 (IV)：



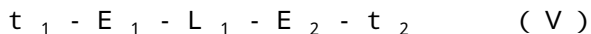
に対応することが好ましく、

式中、E₁、E₂、E₃、L₁、L₂、t₁ および t₂ は上記に定義したとおりである。

30

【0105】

上記のマルチエピトープ標準物質は、以下の一般式 (V)：



に対応することが好ましく、

式中、E₁、E₂、L₁、t₁ および t₂ は上記に定義したとおりである。

【0106】

上記の標品 (または標準物質) は、BNP (1 - 32)、プロBNP (1 - 108) および/またはそれらの上記断片の1つをアッセイするための標準曲線確立のために用いられる。前記標準物質の利点の1つは、特にそれらの安定性である。

【0107】

BNP (1 - 32) のアッセイに用いられる場合、本発明によるバイエピトープ標準物質は、本発明によるFGRKMDRエピトープ、およびプロBNP (1 - 108) の77から108のアミノ酸配列から選択される別の異なるエピトープを含んでなることが好ましい。

40

【0108】

プロBNP (1 - 108) のアッセイに用いられる場合、本発明によるバイエピトープ標準物質は、本発明によるFGRKMDRエピトープ、およびプロBNP (1 - 108) の特異性を確実にするために、プロBNP (1 - 108) の1 - 76のアミノ酸配列から選択される別の異なるエピトープを含んでなることが好ましい。

【0109】

50

BNP (1-32) のアッセイに用いられる場合、本発明によるトリエピトープ標準物質は、本発明による $R_1 - X_1 - FGRKMDR - X_2 - R_2$ エピトープ、およびプロBNP (1-108) の 77-108 のアミノ酸配列から選択される別の異なる 2 つのエピトープを含んでなることが好ましい。

【0110】

プロBNP (1-108) のアッセイに用いられる場合、本発明によるトリエピトープ標準物質は、本発明による $R_1 - X_1 - FGRKMDR - X_2 - R_2$ エピトープ、およびプロBNP (1-108) の 1-108 のアミノ酸配列から選択される別の異なる 2 つのエピトープを含んでなることが好ましい。

【0111】

上記の標準物質において、 $R_1 - X_1 - FGRKMDR - X_2 - R_2$ は、SGCFGRKMDR (配列番号33)、GCFGRKMDRI (配列番号34)、CFGRKMDRIS (配列番号35)、FGRKMDRISS (配列番号36)、FGRKMDR (配列番号8)、SFGGRKMDRISS (配列番号64)、およびCFGRKMDRISSSSGLGCK (配列番号65) によって構成される群から選択されるペプチド配列を表すことが好ましい。

【0112】

$R_1 - X_1 - FGRKMDR - X_2 - R_2$ と異なる配列は、PRSPKMOVQG (配列番号56)、APRSPKMV (配列番号57)、SGLGCKVL (配列番号58)、SPKMOVQGS (配列番号59)、YTLRAPRSPKMOVG (配列番号60)、YTLRAPRSPKMV (配列番号66)、YTLRAPRSPKMOVQG (配列番号67)、SGLGCKVLR RH (配列番号68)、およびSGLGCKVLR (配列番号69) によって構成される群から選択されることが好ましい。

【0113】

本発明によるマルチエピトープ標準物質は、以下の式：

$Ac - YTLRAPRSPKMOV - L_1 - SFGGRKMDRISS - NH_2$;
 $Ac - YTLRAPRSPKMOV - L_1 - CFGRKMDRISSSSSGLGCK - NH_2$;

$Ac - YTLRAPRSPKMOVQG - L_1 - FGRKMDR - NH_2$;

$Ac - FGRKMDR - L_1 - SGLGC^* KVLRRH - OH$;

$Ac - FGRKMDR - L_1 - SGLGC^* KVLR - NH_2$;

$Ac - SPKMOVQGS - L_1 - FGRKMDR - NH_2$;

$Ac - YTLRAPRSPKMOV - L_1 - FGRKMDR - L_2 - SGLGC^* KVLRRH - OH$;

および $Ac - YTLRAPRSPKMOV - L_1 - FGRKMDR - L_2 - SGLGC^* KVLR - NH_2$;

によって定義されるマルチエピトープ標準物質からなる群から選択されることが好ましく、

式中、Ac はアセチル基を表し、 C^* はアセトアミドメチルブロック化システインを表す。

【0114】

L_1 および L_2 は、

$-NH - (CH_2)_5 - CO -$

を表すことが好ましい。

【0115】

この基は、特にヘキサアミノ酸として知られるカップリング剤に由来する。

【0116】

E_1 、 E_2 および E_3 が存在する場合、標準物質はトリエピトープと言われ、 E_1 と E_2 のみが存在する場合、標準物質はバイエピトープと言われる。

【0117】

10

20

30

40

50

さらに本発明は、少なくとも

- 上記のリガンド；および

- 上記のマルチエピトープ標準物質および/または上記のポリペプチド

を含んでなる、ヒトBNP(1-32)またはヒトプロBNP(1-108)ならびに配列FGRKMDRを含んでなるそれらそれぞれの断片を検出するためのキットに関する。

【0118】

特定の一実施形態において、上記のキットはまた、陽性の生体対照サンプルを含んでなる。

【0119】

本発明によるキットは、少なくとも、登録番号CNCMI-3746でCNCM(Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75 724 Paris Cedex 15, 仏国)においてBio-Radにより2007年4月13日に寄託されたハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体を含んでなることが好ましい。

【0120】

以下の実施例および図は、限定することなく本発明を例示するものである。

【図面の簡単な説明】

【0121】

【図1】20G7抗体と、Spot法により合成されたBNP(1-32)の配列(左から右へ、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16および配列番号17)を表す固定化ペンタデカペプチドとの反応性を示す図である。

【図2】FGRKMDRエピトープ(ペプチドの各残基をアラニンにより置換)に対する20G7抗体の結合のAlascan分析結果を示し、F残基、K残基、およびR残基の重要性を示す図である。

【図3】配列番号51(「AA11-AA17」、菱形)、配列番号62(「変異AA11-AA17」、円形)または配列番号9(「欠失AA11-AA17」、三角形)の可溶性ペプチドの濃度を増加させた存在下、BNP(1-32)に対する抗体20G7および24C5の結合阻害を表す図である。

【図4】FGRKMDRエピトープ(ペプチドの各残基をアラニンにより置換)に対する11A8抗体の結合のAlascan分析結果を示し、F残基、G残基、K残基、およびR残基の重要性を示す図である。

【図5】20G7抗体により検出されたBNP(1-32)の標準的範囲を表す図である。

【図6】20G7抗体により検出された組換えプロBNP(1-108)の標準的範囲を表す図である。

【図7】鬱血性心不全を有する患者における20G7抗体によるBNP(1-32)とプロBNP(1-108)の検出間の相関関係を示す図である。

【図8】NYHAクラスI(図8A)、NYHAクラスII(図8B)およびNYHAクラスIII(図8C)の鬱血性心不全を有する対象からのサンプルにおける20G7抗体によるBNP(1-32)とプロBNP(1-108)の検出間の相関関係を示す図である。

【図9】健常な対象からのサンプルにおける20G7抗体によるBNP(1-32)とプロBNP(1-108)の検出間の相関関係を示す図である。

【図10】腎不全を有する対象からのサンプルにおける20G7抗体によるBNP(1-32)とプロBNP(1-108)の検出間の相関関係を示す図である。

【図11】虚血性発作および対照のクエン酸塩添加血漿サンプル中のBioPlex(商標)2200プロBNPの濃度を示す図である。ギザギザ状のボックスは、最小値、第一四分位数、中央値、第三四分位数および最大値を示す。

【図12】急性冠動脈症候群を有する対象からのサンプルにおける20G7抗体によるB

10

20

30

40

50

NP (1 - 3 2) とプロBNP (1 - 1 0 8) の検出間の相関関係を示す図である。

【図13】固定化ヒンジ76抗体および本発明により発見した20G7抗体を用いた免疫アッセイにより、グリコシル化プロBNP (1 - 1 0 8) のアッセイと非グリコシル化プロBNP (1 - 1 0 8) のアッセイとの相関関係を示す図である。

【図14】BioPlex (商標) 2 2 0 0 装置の使用による、パイエピトープ標準物質 CaliproBNP 1 の標準範囲を示す図である。

【図15】BioPlex (商標) 2 2 0 0 装置の使用による、パイエピトープ標準物質 CaliproBNP 3 の標準範囲を示す図である。

【図16】固定化ポリクローナル抗体L21016および本発明により発見した20G7抗体を用いた免疫アッセイにより、パイエピトープ標準物質 CaliproBNP 5、プロBNP (1 - 1 0 8) およびBNP (1 - 3 2) の標準範囲を示す図である。

10

【図17】2つの免疫アッセイ様式 (第1のものは、ヒンジ76抗体の固定および本発明により発見した20G7抗体に基づき、(白色円形と黒色円形)、第2のものは、ヒンジ76抗体の固定およびBNP (1 - 3 2) のC末端部分に位置するエピトープに対する抗体の発見に基づいている (白色三角形と黒色三角形)) におけるトリエピトープ標準物質 CaliproBNP 6 およびプロBNP (1 - 1 0 8) の標準範囲を示す図である。

【実施例】

【0122】

実施例1：ペプチド合成

材料および方法

20

当業者に周知の標準的方法により合成ペプチドを調製した。本法の一例は、容易に実施できるという事実のため有利である Merrifield 合成である (Merrifield、(1 9 6 3) ; R . C . Sheppard (1 9 7 1) ; Athertonら (1 9 8 9)) 。 Perspective からの「Pioneer」シンセサイザー、または ABI からの「433」シンセサイザーを、自動シンセサイザーとして使用することができる。これらのペプチド類を、均質相合成によっても得ることができる。

【0123】

以下の合成は、「Fmoc」化学 (9 - フルオレニルメチルオキシカルボニル) を用いる Pioneer シンセサイザー内で実施された：各ステップにおいて、試薬 (すなわち、保護アミノ酸およびカップリング活性化剤 (TBTU (2 - (1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート) / HOBt (N - ヒドロキシベンゾトリアゾール)) を過剰に (「樹脂上で置換できる基の試薬 / モルのモル」比 = 5 で) 添加した。合成工程の最後に、ペプチドを、トリフルオロ酢酸液 (試薬 K) により樹脂から分離した。次いで、ペプチドを、冷却エーテル中に沈殿させ、凍結乾燥してから、引き続き HPLC により精製した。

30

【0124】

本法において、本発明者らは、以下のアミノ酸配列を含有するペプチドを合成した：

配列番号4：Ac - T G C F G R K M D R I S T S T A I G C K V L C y s - C O N H 2

、

配列番号5：5：Ac - S G C Y G R K M D R I S T S T A I G C K V L - C y s C O N H 2

40

配列番号6：Ac - S G C F G R K M D R I S S S S G L G C K V L - C y s C O N H 2

配列番号7：Ac - S G C F G R K M D R I A T S T A I G C K V L - C y s C O N H 2

配列番号8：Ac - F G R K M D R - C O N H 2

配列番号9：Ac - G R K M D R - C O N H 2

配列番号10：Ac - F G R K M D - C O N H 2

配列番号11：Ac - R K M D R I - C O N H 2

【0125】

実施例2 - 免疫原の調製：免疫化のために担体タンパク質へのペプチドのカップリング

これらのペプチドによりマウスを免疫化するために、ペプチドをより免疫原性にする目

50

的で、種々の官能基（チオール、アミン、アルデヒドなど）を介して、KLH（キーホールリンペットヘモシアニン）、チログロブリン、またはBSA（ウシ血清アルブミン）などの担体タンパク質に前記ペプチドを結合させる必要がある。ペプチドをタンパク質に結合させるために用いられるカップリング剤は、ヘテロ二官能性であってもホモ二官能性であってもよい。最も頻繁に用いられる試薬は、BS3、sSMCC、SPDP、グルタルアルデヒドなどである。

【0126】

使用されるカップリング法は、化学的カップリング剤としてNHSエステル官能基およびマレイミド基、および担体タンパク質としてKLH（Pierce、#77600）を有する二官能性sSMCC（Pierce、#22322）を含んだ。

10

【0127】

2 - a . KLHの活性化

方法：

10 mg / ml の最終濃度を得るために、20 mg のKLHを、2 ml のリン酸緩衝生理食塩水（20 mM のリン酸塩、0.9 M のNaCl、pH 7.2）に溶解した（ボルテックスせず）。並行して、4 mg のsSMCCを、400 μl の注射用水に溶解して10 mg / ml の最終濃度を得た。引き続き2 ml のKLH（20 mg）を、200 μl のsSMCC（2 mg）と混合し、この混合物を、緩やかに攪拌しながら（1分当り20回転）室温（20）で1時間インキュベートした。

【0128】

2 - b . 活性化KLHの脱塩：

方法：

PD10 Sephadex TM G-25mカラム（Ge healthcare、米国、参照先；17-0851-01）を、リン酸緩衝生理食塩水（20 mM のリン酸塩、0.9 M のNaCl、pH 7.2、100 mM のEDTA）で平衡にした。2 ml の活性化KLHを、カラムに沈着させ、引き続き0.9 M のNaCl、pH 7.2および100 mM のEDTAで補足された20 mM PBS緩衝液の3.5 mlで溶出を開始し；500 μl のフラクションを集めた。1 / 25に希釈された各フラクションに対して、光学密度（OD）を280 nmで測定し、次いで活性化KLHを含有するフラクションを同定し、Beer-Lambert則： $OD = Cl$ に従って測定した、

20

30

式中ODは光学密度であり、

$$= 1.499 \text{ であり、}$$

Cは濃度であり、l = 1 cmであり、活性化KLHの濃度を測定することができ、リン酸緩衝生理食塩水中7.4 mg / mlに換算される。

【0129】

2 - c . 活性化KLHに対するペプチドのカップリング

方法：

10 mg の凍結乾燥ペプチドを1 ml のMilli-Q水に溶解し、超音波ディスインテグレート内で脱気して10 mg / ml の最終濃度を得、次いで7.4 mg の活性化KLH（すなわち、2 - b で得られた1 ml の溶液）と混合した。この混合物を、緩やかに攪拌しながら（20 rpm）室温（20）で2時間インキュベートした。引き続き20 mM のPBS緩衝液 + 0.9 M のNaCl pH 7.2中、5 mg / ml の濃度でのシステイン溶液を導入してペプチド / KLH溶液中1 mM の最終濃度が得られ、全混合物を、緩やかに攪拌しながら（20 rpm）室温（20）で20分間インキュベートした。

40

【0130】

2 - d . 結合ペプチドの特徴付け

方法：

次に結合ペプチドの濃度を、以下のとおりBradford法（Bradford M., Anal. Biochem., 1976; 72: 248-54）により測定した：595 nmでのODから当サンプルのKLH濃度を測定するために、KLHの50 μg / ml から1000 μg / ml の標準範囲

50

を調製した。この標準範囲を作製し、本アッセイを実施するために、サンプルの50 μ Lの各ポイントを、1.5mLのクーマシーブルー(Bio-Rad、#1856210)中に希釈した。

【0131】

濃度を測定したら、PBSを、KLH結合ペプチドに加えて、結合ペプチドの濃度を1mg/mLにした。

【0132】

実施例3 - マウスの免疫化およびモノクローナル抗体の産生

3 - a) マウスの免疫化：

モノクローナル抗体を産生させるために、以下のペプチド：

Ac - T G C F G R K M D R I S T S T A I G C K V L - C y s - C O N H 2、(配列番号4)

Ac - S G C Y G R K M D R I S T S T A I G C K V L - C y s C O N H 2 (配列番号5)

のうちの1つを用いて、

10匹のマウス(Balb/c株メス、5週齢、参照：SIFE055、Charles Rivers、MA、米国)を免疫化し、実施例2に従ってKLHに結合させた(各ペプチドに対して5匹のマウス)。

【0133】

最初の注射に関しては、フロイント完全アジュバント(Sigma、#F-5881)中で1/2に希釈した100 μ gのKLH結合ペプチド(1mg/mLの濃度)の乳濁液を調製し、200 μ Lの前記乳濁液(すなわち、100 μ gのペプチド)を各マウスに皮下注射した。20日の間隔で、各マウスにKLH結合ペプチド(すなわち、100 μ gのペプチド)およびフロイント不完全アジュバント(Sigma、#F-5506)の乳濁液の200 μ Lのブースターショットを3回、皮下に、次いで腹腔内に注射した。

【0134】

最後のブースターショットの20日後、得られた抗体をELISA法(下記の実施例4に従って)により評価した後、以下のプロトコルに従って高度免疫処置を受けさせるために、BNP(1-32)に対して最大の反応を示したマウスを保持した：

- PBSで1/20に希釈した1mg/mLのペプチド-KLHを200 μ L皮下注射
- 45分の待機、
- PBSで1/20に希釈した1mg/mLのペプチド-KLHを200 μ L、最初の注射とは異なった部位での皮下注射、
- 45分の待機、
- PBSで1/10に希釈した1mg/mLのペプチド-KLHを200 μ L、前の注射とは異なった部位での皮下注射、
- 30分の待機、
- PBSで1mg/mLに希釈したプロメタジン(2.5% Phenergan、注射液、UCB)の100 μ Lを腹腔内注射、
- 15分の待機、
- PBSで3/10に希釈した1mg/mLで200 μ Lのペプチド-KLHを、前の注射とは異なった部位での腹腔内注射。

【0135】

これらの免疫化後、配列番号4ペプチドで免疫化したマウスS2は、下記の実施例4に記載された抗体検出用プロトコルを用いると、BNP(1-32)に対して極めて反応性の抗血清を産生することが判明した。前記マウスの脾臓からのリンパ球を、引き続きリンパ球融合に供し、下記3bのプロトコルに従って実施した。

【0136】

3 - b) モノクローナル抗体の産生：

骨髓腫SP2細胞(ATCC CRL-1581)で免疫化されたマウスS2の脾臓細胞のリンパ球融合は、KohlerおよびMilsteinの周知のプロトコル(1975) Nature 56:495-497に従って実施した。

【0137】

このようにして、本発明者らは、種々のハイブリッドクローンを産生させることができた。特に、20G7-15/03/2007(以下、便宜上「20G7」と称す)と称されるモノクローナル抗体を得た。20G7-15/03/2007(20G7)モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマは、登録番号CNCM I-3746でCNCM(French National Collection of Cultures of Microorganisms, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75 724 Paris Cedex 15, 仏国)に2007年4月13日に寄託された。

10

【0138】

当業者に周知のモノクローナル抗体を得るための他のプロトコルを使用できることは言うまでもない。

【0139】

実施例4 - 免疫化の際のマウスの応答を評価するために抗BNP(1-32)抗体の検出

4.1 材料:

以下の試薬を用いた:

- Maxisorpの96ウェル平底マイクロプレート(Nunc、デンマーク国)
- PBS(リン酸緩衝生理食塩水)緩衝液、pH7.4、Gibco錠剤。参照:18912-014(Invitrogen)
- BNP(1-32):合成ペプチド(Sigma-Aldrich、米国、#B-5900)

20

または

- プロBNP(1-108)(大腸菌(E. coli)中で産生された組換えタンパク質、HyTest、フィンランド国)
- Tween(登録商標)20(Sigma-Aldrich、米国、#P1379)
- ウサギ中で産生され、ペルオキシダーゼに結合された抗マウスIgG二次抗体(Sigma、米国、#A9044)
- H₂O₂(0.1Mのクエン酸緩衝液中0.04%、pH4)
- OPD(オルト-フェニレンジアミン、Sigma、米国#P8412)
- 硫酸(H₂SO₄、4N)
- 実施例3で免疫化されたマウスからの血清

30

【0140】

4.2 方法と原理:

マウス血清サンプル中の抗BNP(1-32)抗体の存在を検出するために、ELISA試験を固体支持上で実施した。

幾つかの抗原を、96ウェルマイクロプレートの腔内での吸着により固定化した。残りの空の部位を飽和してブロックし、免疫血清をインキュベートし、存在していると考えられる抗体(《Ac》)を抗原(《Ag》)に結合させ、Ag-Ac複合体を形成した。この複合体を、酵素に結合させた免疫複合体(抗マウスIgG抗体)を用いて検出した。この場合の酵素は、無色の基質を所望の抗体の存在を示す着色産物に変換するHRP(西洋わさびペルオキシダーゼ)であった。最終着色産物の形成は、490nmにおける光学密度(OD)の読取りを実施することによって定量化した。当業者に周知であるこの方法に従って、得られたODは、試験したマウス血清サンプル中の抗体の存在(高いOD)または非存在(低いOD)を示す。この試験には、当業者によく知られている多くの変型(抗原捕捉、競合アッセイなど)がある。

40

【0141】

1) マイクロプレート上での抗原の固定

50

BNP (1-32) またはプロBNP (1-108) の各抗原を、PBS 中、0.5 μg/mL の最終濃度になるように溶解し、次いで4 で一晩インキュベートすることによって、Maxisorp マイクロプレート上で1ウェル当たり100 μL を基準に固定化した。PBS 0.1% のTween (登録商標) 20 (PBS-T) で3回洗浄後、マイクロプレートを、1% ミルク (半脱脂乳) を含有する0.1% PBS-T の溶液 (100 μL /ウェル) で飽和し、次いで37 で1時間インキュベートした。

【0142】

2) マウスにより産生した抗体の免疫学的検出:

マイクロプレートを、0.1% PBS-T で3回洗浄した。先に免疫化したマウスからの各血清を、引き続き0.1% ミルク (半脱脂乳) を含有する0.1% PBS-T で10倍希釈し、次いで1ウェル当たり100 μL を基準に沈着させ、37 で2時間インキュベートした。このマイクロプレートを再び0.1% PBS-T で3回洗浄し、次いで1ウェル当たり100 μL を基準に、0.1% ミルク (半脱脂乳) を含有する0.1% PBS-T 中で1/3, 000 に希釈したペルオキシダーゼに結合した複合体の存在下、37 で1時間インキュベートした。最後に、このマイクロプレートを0.1% PBS-T で3回洗浄し、次いでペルオキシダーゼ基質を、1ウェル当たり100 μL を基準に沈着させた。このマイクロプレートを、室温で20分間暗所に置いた。この酵素反応は、1ウェル当たり50 μL の硫酸 (H₂SO₄, 4N) を添加することによって中止させ、引き続き490 nm でのOD を各ウェルごとに測定した。

10

【0143】

抗体を検出するためにこの方法を用いることによって、マウスS2 (配列番号4のペプチドで免疫化された) からの血清は、BNP (1-32) およびプロBNP (1-108) と極めて反応性であることを本発明者らは見出した。引き続き、前記高度免疫マウスからのリンパ球とSp2 骨髄腫との間で実施されたリンパ球融合後、本法はまた、重要なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ: 20G7モノクローナル抗体を産生する20G7ハイブリドーマの同定も可能にした。

20

【0144】

実施例5: 20G7モノクローナル抗体のエピトープの特徴付け

5.1 《Spot》技法によるエピトープの特徴付け

5.1.1 材料:

装置および試薬は全て、C. Granier, S. Villard, D. Laune (Mapping and Characterization of Epitopes using the SPOT method. Cells/Cell Biology: A Laboratory Handbook, third edition (Volume 1), chapter 62, editor: Julio Celis, Elsevier, 2005) に記載されている。

30

【0145】

5.1.2 方法:

「SPOT」または「エピトープマッピング」法を用いて、20G7モノクローナル抗体のエピトープを特徴付けした。Frank (Tetrahedron, 1992; 48: 9217-32) により記載されたこの方法は、官能化された支持体 (アミノポリエチレングリコール-セルロース) 上で、予め決められた配列を有する多数のペプチド類をセルロース膜上で合成することを可能にし、またこの場合、20G7抗体である可溶性リガンドに対するそれらの反応性の試験を可能にする。

40

【0146】

5.1.2.1 ペプチド合成

ペプチド合成の全工程 (アミノ酸の活性化、化学反応など) は、Molinaら (Pept Res. 1996, Vol. 9: p 151-5)、およびC. Granier, S. Villard, D. Laune (Mapping and Characterization of Epitopes using the SPOT method. Cells/Cell Biology: A Laboratory Handbook, third Edition (Volume 1), chapter 62, Editor: Julio Celis, Elsevier, 2005) に詳述されている。

【0147】

50

BNP (1 - 3 2) 配列は、2つのアミノ酸のオフセットを有する重なりペптаデカペプチド (配列番号 1 2 から 2 0) :

配列番号 1 2	S P K M V Q G S G C F G R K M	
配列番号 1 3	K M V Q G S G C F G R K M D R	
配列番号 1 4	V Q G S G C F G R K M D R I S	
配列番号 1 5	G S G C F G R K M D R I S S S	
配列番号 1 6	G C F G R K M D R I S S S S G	
配列番号 1 7	F G R K M D R I S S S S G L G	
配列番号 1 8	R K M D R I S S S S G L G C K	
配列番号 1 9	M D R I S S S S G L G C K V L	10
配列番号 2 0	R I S S S S G L G C K V L R R	

の形態で全体的に合成された。

【 0 1 4 8 】

他の以下のペプチド :

配列番号 2 1	V Q G S G C F G R	
配列番号 2 2	S P K M V Q G S G C	
配列番号 2 3	M D R I S S S S G L G	
配列番号 2 4	R K M D R I	
配列番号 2 5	R K M D R I S S	

もまた合成された。

【 0 1 4 9 】

BNP (1 - 3 2) 配列はまた、1つのアミノ酸のオフセットを有する重なりデカペプチド (配列番号 2 6 から 4 8) :

配列番号 2 6	S P K M V Q G S G C	
配列番号 2 7	P K M V Q G S G C F	
配列番号 2 8	K M V Q G S G C F G	
配列番号 2 9	M V Q G S G C F G R	
配列番号 3 0	V Q G S G C F G R K	
配列番号 3 1	Q G S G C F G R K M	
配列番号 3 2	G S G C F G R K M D	30
配列番号 3 3	S G C F G R K M D R	
配列番号 3 4	G C F G R K M D R I	
配列番号 3 5	C F G R K M D R I S	
配列番号 3 6	F G R K M D R I S S	
配列番号 3 7	G R K M D R I S S S	
配列番号 3 8	R K M D R I S S S S	
配列番号 3 9	K M D R I S S S S G	
配列番号 4 0	M D R I S S S S G L	
配列番号 4 1	D R I S S S S G L G	
配列番号 4 2	R I S S S S G L G C	40
配列番号 4 3	I S S S S G L G C K	
配列番号 4 4	S S S S G L G C K V	
配列番号 4 5	S S S G L G C K V L	
配列番号 4 6	S S G L G C K V L R	
配列番号 4 7	S G L G C K V L R R	
配列番号 4 8	G L G C K V L R R	

H

の形態で合成された。

【 0 1 5 0 】

1つのアミノ酸のオフセットを有するヘptaペプチドの選択 (配列番号 4 9 から 5 3)

50

:
 配列番号 4 9 G C F G R K M
 配列番号 5 0 C F G R K M D
 配列番号 5 1 F G R K M D R
 配列番号 5 2 G R K M D R I
 配列番号 5 3 R K M D R I S

もまた合成された。

【 0 1 5 1 】

5 . 1 . 2 . 2 免疫学的試験

免疫活性に関する以下の試験は、Launeら (J. Immunol. Methods, 2002, Vol. 267(1), p 53-70) に詳細に記載されている。手短に言うと、この原理は以下のとおりであった。膜を、各々 10 分間づつ 3 回、TBS 浴 (トリス緩衝生理食塩水、pH 7.0) により再水和させ、引き続き 15 ml の 10% 飽和緩衝液 (「ブロック用緩衝液」、Roche) および TBS 0.1% の Tween (登録商標) 20 (TBS-T) 中 5% のショ糖の存在下、攪拌しながら室温で一晩インキュベートすることにより飽和させた。この膜を 10 分間、0.1% の TBS-T により 3 回洗浄した後、この膜を、試験する抗体 (この場合 20G7) および飽和緩衝液で希釈したアルカリホスファターゼに結合した複合体の存在下、攪拌しながら 37 °C で 90 分間インキュベートした。この膜を各浴 10 分間づつ 0.1% の TBS-T で 2 回、次いで CBS (クエン酸緩衝生理食塩水) で 2 回の洗浄後、アルカリホスファターゼ基質を添加し、膜を室温で、シグナルが出現する速度に依って 1 分から 30 分間インキュベートした。

【 0 1 5 2 】

5 . 1 . 2 . 3 結果

この場合、BNP (1-32) 配列は、2つのアミノ酸のオフセットを有する重なりペプタデカペプチド (配列番号 12 から 20) の形態で全体的に合成された。図 1 に示されるように、これらのペプチドを、精製 20G7 抗体と接触させると、5種の連続ペプチドだけが抗体と反応し、それらの共通配列は、F₁₁GRKMDR₁₇ (図 1) である：

配列番号 1 3 K M V Q G S G C F G R K M D R
 配列番号 1 4 V Q G S G C F G R K M D R I S
 配列番号 1 5 G S G C F G R K M D R I S S S
 配列番号 1 6 G C F G R K M D R I S S S S G
 配列番号 1 7 F G R K M D R I S S S S G L G

【 0 1 5 3 】

このパターンだけが、BNP (1-32) に対する抗体の結合に実際に関与することを保証するために、このエピトープを確認し、正当性を立証する目的で、1つのアミノ酸だけのオフセットを有するより短いペプチド (デカペプチド (配列番号 26 から 48) およびヘプタペプチド (配列番号 49 から 53) もまた合成した。各々の実験において、20G7 により同定された共通のペプチド配列は、F₁₁GRKMDR₁₇ であった (デカペプチドに関しては、配列番号 33 から 36、およびヘプタペプチドに関しては配列番号 51)。

【 0 1 5 4 】

エピトープの認識のためにどの残基が重要であり、必須であることを判定するために、よく知られており上述の (Launeら、上記) 「Alascan」法に従って各個々の残基の関与を評価する目的で、最少の配列である F₁₁GRKMDR₁₇ の各々の残基をアラニン (A) により連続的に置換した。図 2 に示されるように、F₁₁、K₁₄ および R₁₇ 残基を、それぞれアラニンにより置換すると、結合が 82%、95% および 85% と減少し、これらの残基が必須であることを示している。

【 0 1 5 5 】

11 位、14 位および 17 位におけるこれらのアミノ酸は、20G7 モノクローナル抗体によるエピトープの認識のために必須である。これらのデータは、複数 (n = 4) の反

10

20

30

40

50

復実験の平均値である。したがってこの理由から、必須のF₁₁、K₁₄およびR₁₇アミノ酸を含んでなる本発明によるF₁₁GRKMDR₁₇エピトープは、重要なアミノ酸がR₁₃、D₁₆、R₁₇およびI₁₈である別のエピトープ(R₁₃(K₁₄)(M₁₅)D₁₆R₁₇I₁₈)を開示する特許出願国際公開第2006/88700に認められたものとは異なっていることが明白である。

【0156】

20G7抗体の結合過程に対するこれら残基の寄与効果のより十分な理解を得るために、F₁₁、K₁₄およびR₁₇アミノ酸を、生化学的性質の近いアミノ酸と置換した。例えば、F₁₁を他の芳香族アミノ酸(トリプトファンおよびチロシン)と置換した。これら「相同性」アミノ酸からなる配列が、同じ方法で20G7抗体により認識されたという事実により、抗体結合にとって必須であるのは11位におけるペプチドの芳香族性であることが示唆されている。K₁₄およびR₁₇に関しては、それら双方をアルギニンおよびリジンにより置換して、アミノ酸の側鎖の効果、また正電荷の存在を調べた。またこの場合、20G7に対する結合が保持されることから、この置換は、事実上保存的であることが判明し、正電荷の重要性を強く示している。

【0157】

異なる必須残基を有するHyTestからの24C5抗体には、同じことが当てはまらない。

【0158】

やはり膜上で合成されたヒトBNP(1-32)のVQSGSGCFGR、SPKMVQGS GC、MDRISSSSGLG、R₁₃KMDRI₁₈およびR₁₃KMDRIS S₂₀(配列番号21から配列番号25)ペプチド配列を、Spot法を用いて20G7抗体により試験した。20G7の結合に必須である残基が無いことから、前記抗体は前記ペプチドに全く結合せず、20G7が、これらのペプチドと2%未満の交差反応を示す結果となった。

【0159】

5.2可溶性ペプチドによる特徴付け

第二のステップにおいて、F₁₁GRKMDR₁₇ペプチドが、実際に20G7抗体のエピトープであったことを確かめるために、このペプチドとBNP(1-32)との間の競合アッセイを実施する目的で、この配列を可溶性形態で合成した。並行して20G7抗体への結合におけるF₁₁残基の寄与の高さを確認するために、他の2種の追加ペプチド(1つは、FをAにより置換したもの、他方は、Fを単に欠失させたもの)もまた、可溶性形態で合成した。さらに、同様の競合アッセイをHytestの24C5抗体と実施して、この残基の重要性が20G7抗体に特異的であることを立証した。

1 - 配列番号51:天然エピトープの配列:F₁₁GRKMDR₁₇

2 - 配列番号62:エピトープの変異配列:A₁₁GRKMDR₁₇

3 - 配列番号9:F₁₁残基の欠失した配列:G₁₂RKMDR₁₇

【0160】

5.2.1材料

- Maxisorpの96ウェル平底マイクロプレート(Nunc、デンマーク国)、
- PBS(リン酸緩衝生理食塩水)緩衝液、pH7.4、Gibco錠剤。照会先:18912-014(Invitrogen)、
- BNP(1-32):合成ペプチド(Sigma-Aldrich、米国、#B-5900)、
- Tween(登録商標)20(Sigma-Aldrich、米国、#P1379)
- モノクローナル20G7抗体(Bio-Rad)、
- モノクローナル24C5抗体(HyTest、Turku、フィンランド国)、
- ウサギ中で産生され、ペルオキシダーゼに結合された抗マウスIgG二次抗体(Sigma、米国、#A9044)、

10

20

30

40

50

- H_2O_2 (0.1 Mのクエン酸緩衝液中0.04%、pH4)、
- OPD (オルト-フェニレンジアミン、Sigma、米国#P8412)、
- 硫酸 (H_2SO_4 、4N)。

【0161】

5.2.2 方法

免疫アッセイの原理は、4.2に記載されたものと同一であった。手短に言うと、合成BNP(1-32)を、PBS緩衝液中で希釈して0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でMaxisorpマイクロプレート上で直接固定化した。各可溶性ペプチドAA11-AA17(天然、変異、または欠失)の20 ng/ml から10,000 ng/ml の標準範囲を、緩衝液/血清中に調製し、0.1%のミルク(半脱脂乳)を含有するPBS0.1%のTween (登録商標)20(PBS-T)中0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度で、100 μl のモノクローナル抗体液(20G7抗体または24C5抗体)に混合した。次に抗体の結合を、ペルオキシダーゼで標識された抗マウス複合体により検出した。20G7抗体の応答強度を、HyTestからのモノクローナル24C5抗体の1つと比較した。1)配列F₁₁GRKMDR₁₇が、実際に20G7抗体エピトープであることを表し、および2)F₁₁残基が、20G7によるBNP(1-32)の認識にとって必須であることを判定するために、可溶性ペプチドの存在下、BNP(1-32)の認識の減少に相当する阻害パーセントを各可溶性ペプチドに関して測定した。

10

【0162】

5.2.3 結果

図3は、濃度を増加させた可溶性ペプチド(天然;配列番号51、変異;配列番号62、欠失:配列番号9)の存在下、BNP(1-32)に対するモノクローナル抗体(20G7または24C5)結合の阻害パーセントを示している。

20

【0163】

変異(配列番号62)または欠失(配列番号9)させた可溶性AA11-AA17ペプチドの存在下、本発明の20G7抗体が、BNP(1-32)の認識において24C5抗体とは異なる挙動をすることが認められることは大いに注目される。変異(A₁₁GRKMDR₁₇)または欠失(G₁₂GRKMDR₁₇)させた可溶性ペプチドの添加により、添加されたいずれのペプチド濃度(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで)でも、20G7によるBNP(1-32)の認識は阻害されなかったが、一方、天然ペプチド(配列番号51に相当するF₁₁GRKMDR₁₇)が添加されると、完全な阻害が見られる。この実験により、24C5抗体に反して、BNP(1-32)に対する20G7抗体の結合においてF₁₁残基の重要性が確認されている。

30

【0164】

実施例6 - 他の抗BNP(1-32)モノクローナル抗体のエピトープの特徴付け - 20G7抗体との比較

6.1 材料、方法およびプロトコル:

実施例5に記載されたものと同じニトロセルロース膜および同じ反応性条件を用いて、これらの抗体を試験した。

【0165】

6.2 結果:

本発明者らは、以下の特徴付けされた一連のモノクローナル抗体:20G7、11A8、17F10、Mab1、Mab2およびMab3を得た。表1に示されるように、他のモノクローナル抗体は、本発明のモノクローナル20G7と同じエピトープすなわち、FGRKMDRを有するが、20G7と比較して異なった必須のアミノ酸を有する。

40

【0166】

【表1】

表1ーモノクローナル抗体の特徴付け

モノクローナル抗体	免疫原	エピトープ	必須の残基
20G7	配列番号4	F ₁₁ GRKMDR ₁₇	F, K およびR
11A8	配列番号4	F ₁₁ GRKMDR ₁₇	F, G, K およびR
17F10	配列番号4	F ₁₁ GRKMDR ₁₇	F, K, D およびR
Mab1	配列番号4	F ₁₁ GRKMDR ₁₇	F, G, R およびK
Mab2	配列番号4	F ₁₁ GRKMDR ₁₇	F およびK
Mab3	配列番号4	F ₁₁ GRKMDR ₁₇	F, G, R およびK

10

【0167】

図4は、例えば、11A8抗体に関してalascan分析(上記5.1.2.3に記載された方法で、各残基の個々の関連を評価するための、アラニンによる配列F₁₁GRKMDR₁₇の各残基の連続置換)の結果を示す。4つの残基(F、G、KおよびR)の置換は、配列F₁₁GRKMDR₁₇の重大な結合減少が生じ、4つの残基がBNP(1-32)への結合に必須であることを立証している。

【0168】

実施例7- 表面プラスモン共鳴技術によるモノクローナル抗体の抗体-抗原相互作用の特徴付け

20

7.1 材料:

- BIAcore (登録商標) 2000および3000の分析器 (Pharmacia、Uppsala、スウェーデン国)、
- BNP(1-32) (合成ペプチド、Sigma、米国、#B-5900)、
- プロBNP(1-108) (大腸菌(E. Coli)中で産生された組換えタンパク質、HyTest、フィンランド国)、
- 抗Fc断片抗体 (Sigma、米国)、
- モノクローナル抗体20G7、11A8、17F10 (Bio-Rad、Marne s l a Coquette、仏国)、
- PBS緩衝液 (リン酸緩衝生理食塩水)、pH7.4。

30

【0169】

7.2 方法:

7.2.1. 原理:

BIAcore (登録商標) 2000および3000の分析器 (その原理は、表面プラスモン共鳴技術 (SPR) に基づく) を用いて、20G7モノクローナル抗体および他のモノクローナル抗体と、BNP(1-32)またはプロBNP(1-108)との相互作用の反応速度論および親和性を明らかにした。本発明者らは製造元の取扱説明書に従った。

【0170】

40

表面プラスモン共鳴SPR技術 (BIAcore (登録商標)、Pharmacia) は、Ferrieresら (2000, FEBS Letters, 479(3): 99-105) にその全体が記載されている。モノクローナル抗体は、抗Fc断片抗体を用いることによりバイオセンサーまたは固体表面上に固定されたが、一方、可溶性抗原 (BNP(1-32)またはプロBNP(1-108)) は、室温でバイオセンサーの表面上で一定流量で濃度を増加させて (0.001256 μg/ml から 0.125 μg/ml まで) 循環させた。SPRシグナルが検出される角度は、消滅波が伝播する媒体の屈折率に直接比例する。屈折率の変化は、共鳴単位で表される (RU、1000共鳴単位は、活性領域の1mm²当り1ngの固定化タンパク質に相当する)。抗原とモノクローナル抗体との間の相互作用および親和性の定量化は、製造元のソフトウェアBIAevaluation (BIAcore (登録商

50

標)、Pharmacia、Uppsala、スウェーデン国)を用い、全体的なデータ処理により会合速度定数(k_a)および解離速度定数(k_d)を算出することによって評価される。 mol/l での平衡解離定数($KD = k_d / k_a$)は、モノクローナル抗体に対するBNP(1-32)抗原またはプロBNP(1-108)抗原の親和性を反映する。

【0171】

7.2.2. 結果:

表2は、モノクローナル抗BNP抗体(20G7を含む)と、2つの組換え抗原BNP(1-32)およびプロBNP(1-108)との間の相互作用の特性を示す。

【0172】

【表2】

表2—種々のモノクローナル抗BNP抗体と、BNP(1-32)抗原およびプロBNP(1-108)抗原との間の相互作用

BNP	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KA (M^{-1})	KD (M)
20G7	$1.40 \cdot 10^6$	$2.38 \cdot 10^{-4}$	$5.90 \cdot 10^9$	$1.70 \cdot 10^{-10}$
11A8	$8.58 \cdot 10^5$	$2.23 \cdot 10^{-3}$	$3.85 \cdot 10^8$	$2.59 \cdot 10^{-9}$
17F10	$5.84 \cdot 10^5$	$2.82 \cdot 10^{-4}$	$2.07 \cdot 10^9$	$4.83 \cdot 10^{-10}$

プロBNP	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KA (M^{-1})	KD (M)
20G7	$1.02 \cdot 10^6$	$1.74 \cdot 10^{-4}$	$5.90 \cdot 10^9$	$1.69 \cdot 10^{-10}$
11A8	$7.63 \cdot 10^5$	$1.19 \cdot 10^{-3}$	$6.43 \cdot 10^8$	$1.56 \cdot 10^{-9}$
17F10	$9.34 \cdot 10^5$	$2.15 \cdot 10^{-4}$	$4.35 \cdot 10^9$	$2.30 \cdot 10^{-10}$

【0173】

表2に、BNP(1-32)またはプロBNP(1-108)とモノクローナル抗体との間の相互作用の平衡解離定数(M中のKD)の算出を可能にする種々の特性(会合速度定数(k_a)および解離速度定数(k_d))を要約してある。20G7モノクローナル抗体が、優れた会合定数(k_a)および低い解離定数(k_d)を示すため、相互作用に関するこれらの結果で、BNP(1-32)アッセイおよびプロBNP(1-108)アッセイにより得られたデータが確認され、BNP(1-32)およびプロBNP(1-108)に関して同一である $1.70 \cdot 10^{-10}$ Mの優れた親和性定数により特徴付けされる(表2)。

【0174】

他のモノクローナル抗体(11A8および17F10)に関する例も提供されており、その親和性定数は、ナノモル範囲(2×10^{-10} Mから 9.35×10^{-10} Mまで、表2)にある。

【0175】

実施例8 - 20G7モノクローナル抗体を用いるBNP(1-32)アッセイ

8.1 材料:

- Maxisorpの96ウェル平底マイクロプレート(Nunc、デンマーク国)、
- PBS(リン酸緩衝生理食塩水)緩衝液、pH7.4、Gibco錠剤。照会先: 8912-014(Invitrogen)、
- BNP(1-32): 合成ペプチド(Sigma-Aldrich、米国、#B-5900)、
- プロBNP(1-108)(大腸菌(E. Coli)中で産生された組換えタンパク質、HyTest、フィンランド国)、
- Tween(登録商標)20(Sigma-Aldrich、米国、#P1379)

10

20

30

40

50

- ウサギを、BNP(1-32)の1-10の領域を標的とする免疫原で免疫化することにより得られたL21016ウサギポリクローナル抗体、そのエピトープは、BNP(1-32)の配列S₁PKMV₅(配列番号54)である、
- 20G7モノクローナル抗体(Bio-Rad)、
- 24C5および26E2モノクローナル抗体(HyTest、Turku、フィンランド国)、
- ウサギ中で産生され、ペルオキシダーゼに結合された抗マウスIgG抗体複合体(Sigma、米国、#A9044)、
- 0.1Mのクエン酸緩衝液中、0.04%のH₂O₂、pH4、
- OPD(オルト-フェニレンジアミン、Sigma、米国、#P8412)、
- 硫酸(H₂SO₄、4N)。

10

【0176】

8.2.方法と原理:

最初に、BNP(1-32)の20pg/mlから10,000pg/mlまでの標準範囲を、合成BNP(1-32)から緩衝液/血清中で調製した。

【0177】

このアッセイは、固相上での捕捉にL21016のウサギポリクローナル抗体(Bio-Rad)を用い、マイクロプレート上のサンドイッチELISA原理に基づいた。そのエピトープは、1ウェル当り5μg/ml溶液100μlによる受動的吸着によって固定されたBNP(1-32)のS₁PKMV₅配列であった。

20

【0178】

0.1%ミルク(半脱脂乳)を含有するPBSの0.1%Tween(登録商標)20(PBS-T)緩衝液中、0.5μg/mlの濃度での溶液中100μlのモノクローナル抗体液(20G7、24C5または26E2抗体)を、検出用試薬として用いた。したがって20G7の応答強度を、24C5および26E2のモノクローナル抗体の強度と比較した。

【0179】

表3に、490nmでの光学密度(OD)で表されかつ標準濃度のBNP(1-32)の存在下、前記抗体により得られたBNP(1-32)の分析アッセイ結果を要約してある。

30

【0180】

【表3】

表3-種々の抗体を用いたBNP(1-32)の分析アッセイ時に得られたOD値

BNP(1-32) (pg/ml)	20G7	24 C5	26 E2
10,000	3.752	0.077	0.048
5,000	3.056	0.068	0.041
2,500	1.950	0.067	0.035
1,250	1.111	0.056	0.031
625	0.625	0.059	0.029
312.5	0.404	0.063	0.027
156.25	0.180	0.071	0.032
78	0.099	0.052	0.055
39	0.066	0.055	0.032
20	0.031	0.068	0.034
0	0.024	0.071	0.022

40

【0181】

2種の抗体24C5および26E2は、本発明の20G7抗体とは全く異なる挙動をすることが認められることは大いに注目される。したがって、これらの結果により、後者の

50

アッセイ様式において、20G7は、BNP(1-32)アッセイに関して24C5および26E2抗体よりもはるかに好適であることが確認される。

【0182】

図5に示され、20G7モノクローナル抗体で得られた標準範囲は、20pg/mlから10,000pg/mlまで線形である($r^2 = 0.96$)。2種の市販の抗体24C5および26E2は、検体が高濃度でもBNP(1-32)を検出する上であまり有効でないか、または全く有効でない(表3)。

【0183】

実施例9 - サンドイッチELISAにおけるモノクローナル抗体の相補性試験

9.1. 材料:

- BNP(1-32)の配列S₁PKMV₅(配列番号54)を認識するL21016ウサギポリクローナル抗体(Bio-Rad)によりプライムされたMaxisorpの96ウェル平底マイクロプレート(Nunc、デンマーク国)、

- PBS(リン酸緩衝生理食塩水)緩衝液、pH7.4、Gibco錠剤。参照:18912-014(Invitrogen)、

- Tween(登録商標)20(Sigma-Aldrich、米国、#P1379)

- BNP(1-32)の合成ペプチド(Sigma-Aldrich、米国、#B-5900)、

- プロBNP(1-108)(大腸菌(E.Coli)中で産生された組換えタンパク質、HyTest、フィンランド国)、

- 20G7抗体(0.001μg/mlから1μg/mlまでの種々の濃度に調製されたエピトープF₁₁GRKMDR₁₇(配列番号8)に対して特異的)、

- 0.5μg/mlの単一濃度でBNP(1-32)のC-末端部分を認識する50B7モノクローナル抗体(HyTest、フィンランド国)、

- ウサギ中で産生され、ペルオキシダーゼに結合させた抗マウスIgG二次抗体(Sigma、米国、#A9044)、

- 0.04%のH₂O₂(0.1Mのクエン酸緩衝液中、pH4、Sigma、米国)

- OPD(オルト-フェニレンジアミン、Sigma、米国、#P8412)、

- 硫酸(H₂SO₄、4N)。

【0184】

9.2 方法:

9.2.1 原理:

このアッセイは、固相上での捕捉にL21016のウサギポリクローナル抗体(Bio-Rad)を用い、マイクロプレート上のサンドイッチELISA原理に基づいた。そのエピトープは、受動的吸着により固定されたBNP(1-32)の配列S₁PKMV₅(配列番号54)であり(実施例8参照)、検出用には2種のモノクローナル抗体(エピトープF₁₁GRKMDR₁₇(配列番号8)に対する20G7モノクローナル抗体およびBNP(1-32)のC-末端部分を標的とする50B7モノクローナル抗体(HyTest、フィンランド国)の組合わせであった。しかしながら、20G7抗体は、濃度を変えて使用し、一方、50B7モノクローナル抗体は、0.5μg/mlの一定濃度で使用した。

【0185】

20G7抗体および50B7抗体のエピトープ相補性を、20G7抗体の濃度を変えて試験した。BNP(1-32)の検出を改善するために、この様式により、評価される2種のモノクローナル抗体の協同作用が可能になる。

【0186】

9.2.2. プロトコル:

5ng/mlのBNP(1-32)溶液100μlを各マイクロプレートウェルに添加

10

20

30

40

50

し、そこでL21016のポリクローナル抗体を吸着させ、37で2時間インキュベートした。このマイクロプレートに0.1%PBS-Tで3回洗浄し、次いで50B7抗体および20G7抗体希釈物の1つを含有する100μLの混合物をそれに配分し、37で2時間インキュベートした。0.1%PBS-Tで3回洗浄した後、1ウェル当たり100μLを基準にペルオキシダーゼ-ウサギ抗マウスIgG抗体複合体(0.1%ミルク(半脱脂乳)を含有する0.1%PBS-T中で1/3,000に希釈)を、37で1時間インキュベートした。最後に、0.1%PBS-Tで3回洗浄した後、100μL/ウェルを基準に、H₂O₂+OPD溶液を沈着させた。このマイクロプレートを、室温で20分間暗所に置いた。この酵素反応は、1ウェル当たり50μLの硫酸(H₂SO₄、4N)を添加することによって中止させ、引き続き490nmでのODを各ウェルで測定した。

10

【0187】

9.2.3. 結果

表4は、20G7および50B7モノクローナル抗体を用いて、490nmでの光学密度で表されたBNPの分析アッセイ結果を示している。

【0188】

【表4】

表4-BNP(1-32)検出用の2種のモノクローナル抗体の協同作用

20G7 の値域 (μg/ml)	光学密度 490 nm
0.5	3.792
0.1	3.753
0.05	3.747
0.01	3.531
0.005	3.272
0.001	1.948
0	1.296

20

【0189】

2種の抗体間で相乗作用があることが認められた。言い換えれば、2種の抗体の効果が加算された:20G7が無いと、シグナル(OD)が1.296に制限され、20G7の添加が増すにつれて、得られるシグナル(OD)が増加した。

30

【0190】

本発明によるF₁₁G₁₇R₁₇K₁₇M₁₇D₁₇R₁₇(配列番号8)エピトープ(BNP(1-32)のループ内に位置する)を標的とする20G7モノクローナル抗体、およびBNP(1-32)のC-末端領域を標的とする50B7モノクローナル抗体の双方を用いることによって、BNP(1-32)の検出は有意に改善される。このことから、検出に使用される2種のモノクローナル抗体の累積または協同的な寄与が立証される。

【0191】

この種の相補性はまた、20G7モノクローナル抗体と、BNP(1-32)配列の他の位置(主としてN-末端位置、C-末端位置における)に位置したエピトープを認識する他の抗体との間でも想定することができる。使用される抗体数は、立体障害問題に遭遇しない限り、3つ以上であってもよい。

40

【0192】

実施例10-20G7モノクローナル抗体を用いるプロBNP(1-108)アッセイ

10.1. 材料:

- BNP(1-32)の合成ペプチド(Sigma-Aldrich、米国、#B-5900)、

- プロBNP(1-108)(大腸菌(E. coli)中で産生された組換えタンパク

50

質、HyTest、フィンランド国)、

- プロBNP (1-108) のヒンジ配列: エピトープ R A P R₇₆ S₇₇ P (配列番号 55) (Giulianiら、Clin. Chem., 52: 6, 1054-1061, 2006) を認識するモノクローナル抗体 (例えば、Bio-Rad からのヒンジ 76 抗体) によりプライムされた Maxisorp の 96 ウェル平底マイクロプレート (Nunc、デンマーク国)、

- ペルオキシダーゼに結合した 20G7 モノクローナル抗体 (Bio-Rad)、
- ペルオキシダーゼに結合した 24C5 モノクローナル抗体 (HyTest、フィンランド国)、

- ペルオキシダーゼに結合した 26E2 モノクローナル抗体 (HyTest、フィンランド国)、

- PBS (リン酸緩衝生理食塩水) 緩衝液、pH 7.4、Gibco 錠剤。照会先: 18912-014 (Invitrogen)、

- Tween (登録商標) 20 (Sigma-Aldrich、米国、#P1379)。

【0193】

10.2 方法:

10.2.1. プロBNP (1-108) の分析アッセイの原理

最初に、プロBNP (1-108) の 20 pg/ml から 10,000 pg/ml までの標準範囲を、0.1% PBS-T 緩衝液中、組換えプロBNP (1-108) から調製した。

【0194】

このアッセイは、固相上での捕捉にモノクローナル抗体 (例えば、Bio-Rad からのヒンジ 76 抗体) を用い、マイクロプレート上のサンドイッチ ELISA 原理に基づき、プロBNP (1-108) のヒンジ配列: 1 ウェル当り 0.5 μg/ml 溶液 100 μl による受動的吸着により固定されたエピトープ R A P R₇₆ S₇₇ P (配列番号 55) を認識する。

【0195】

0.5 μg/ml の濃度でかつ 0.1% PBS-T 緩衝液 (0.1% の半脱脂乳を含有する) の溶液中でペルオキシダーゼに結合させた 100 μl のモノクローナル抗体液 (20G7、24C5 または 26E2 抗体) を、検出用抗体として用いた。この技術的ポイント以外では、プロトコルは、実施例 8 における ELISA のものと同一であった。したがって 20G7 の検出特性を、24C5 および 26E2 のモノクローナル抗体の特性と比較した。

【0196】

表 5 は、光学密度 (OD) で表され、標準濃度のプロBNP (1-108) の存在下、前記抗体を用いることにより得られたプロBNP (1-108) の分析アッセイ結果を示している。

【0197】

10.3. 結果:

【0198】

10

20

30

40

【表5】

表5-プロBNP(1-108)と種々の抗体との分析アッセイ

プロBNP(1-108) (pg/ml)	20G7	24 C5 (Hytest)	26 E2 (Hytest)
10,000	>4	0.220	0.158
5,000	3.845	0.117	0.041
2,500	3.272	0.069	0.031
1,250	1.955	0.068	0.024
625	0.997	0.070	0.024
312.5	0.512	0.035	0.028
156.25	0.264	0.055	0.027
78	0.126	0.056	0.033
39	0.092	0.056	0.028
20	0.069	0.052	0.028
0	0.045	0.044	0.024

10

【0199】

本発明の20G7抗体が、BNP(1-32)のみならずプロBNP(1-108)を検出することが認められることは大いに注目される。さらに、この場合もまた、これらの2種のHyTest抗体は、20G7抗体とは全く異なった挙動をする。このことから、BNP(1-32)およびプロBNP(1-108)アッセイにおける20G7抗体の重要な利点を確認される。

20

【0200】

図6は、20G7モノクローナル抗体によって得られた、20pg/mlから10,000pg/mlのプロBNP($r^2 = 0.99$ 、図6)の線形標準範囲を示しており、一方、HyTestからの2種の市販の抗体は、高濃度のプロBNP(1-108)であってもプロBNP(1-108)を検出する上であまり有効性でないか、または全く有効でない(表5)。

【0201】

実施例11-本発明者らにより得られた他のモノクローナル抗体を用いたプロBNP(1-108)およびBNP(1-32)アッセイ

30

表6は、11A8および17F10モノクローナル抗体を用い、実施例8および10からの2つのELISAプロトコルに従って生じた結果を示す。

【0202】

検出に用いられたこれらの標識モノクローナル抗体は、それぞれ¹SPKMV⁵領域またはヒンジ76抗体を標的とするウサギポリクローナル(L21016)を捕捉のために使用する場合、BNP(1-32)およびプロBNP(1-108)を高度に検出することができる。

【0203】

表6は、それぞれ標準濃度のプロBNP(1-108)およびBNP(1-32)の存在下、光学密度で表され、前記抗体により得られたプロBNP(1-108)およびBNP(1-32)の分析アッセイ結果を示す。

40

【0204】

【表 6】

表 6 - プロBNP (1-108) およびBNP (1-32) と種々のモノクローナル抗体との分析アッセイ

BNP(1-32)またはプロBNP(1-108) (pg/ml)	プロBNP(1-108)		BNP(1-32)	
	17F10	11A8	17F10	11A8
10,000	3.769	3.734	3.717	3.693
5000	3.808	3.779	2.712	2.534
2,500	3.453	3.024	1.495	1.481
1,250	2.118	1.406	0.828	0.871
625	0.937	0.618	0.341	0.389
312.5	0.489	0.259	0.172	0.211
156	0.242	0.130	0.095	0.123
78	0.139	0.088	0.070	0.114
39	0.125	0.087	0.059	0.097
20	0.100	0.078	0.059	0.071
0	0.076	0.063	0.059	0.068

10

20

【0205】

本発明の17F10および11A8抗体が、BNP(1-32)のみならずプロBNP(1-108)を検出することが認められることは大いに注目される。

【0206】

実施例12 - 鬱血性心不全被験者および正常な被験者におけるBNP(1-32)アッセイおよびプロBNP(1-108)アッセイ

12.1. サンプル:

- 民間供給源 (Promedex、NY、米国) に由来し、NYHA (New York Heart Association) クラスのIからIIIのうちの1つに属し、志願者の同意文書に署名した鬱血性心不全被験者からの55検体のEDTA血漿。被験集団は以下のとおりである: NYHAクラスIが10人の患者、NYHAクラスIIが21人の患者およびNYHAクラスIIIが24人の患者。

30

- 正常被験者 (健康志願者、Promedex、NY、米国) からの48検体のEDTA血漿。

【0207】

12.2. BNP(1-32)アッセイおよびプロBNP(1-108)アッセイに関する材料と方法

使用される材料と方法は、BNP(1-32)に関しては上記8.2に記載されたもの、プロBNP(1-108)に関しては上記10.2に記載されたものと同じであった。

【0208】

12.3 結果

12.3.1. 鬱血性心不全患者におけるBNP(1-32)アッセイおよびプロBNP(1-108)のアッセイの結果

8.2に開示されたBNP(1-32)アッセイにより、鬱血性心不全患者の血漿から得られたBNP(1-32)の値は、本発明によるプロBNP(1-108)アッセイの値と相関性があることが判明した ($r^2 = 0.935$ 、図7)。

40

【0209】

より詳細には、患者が彼らのNYHAクラスに従って試験される場合に相関性が維持される (NYHAクラスI、IIおよびIIIに関してそれぞれ $r^2 = 0.997$ 、 $r^2 = 0.903$ 、 $r^2 = 0.832$ 、それぞれ8A、8Bおよび8Cを参照)。

50

【0210】

このように、20G7抗体によるこれらの結果によって、鬱血性心不全のマーカーとしてのBNP(1-32)アッセイまたはプロBNP(1-108)アッセイの有用性が再確認される。

【0211】

これらの実験を、標識形態での24C5抗体および26E2抗体(HyTest)により再現したが、相関性は見られなかった。

【0212】

12.3.2. 健常被験者におけるBNP(1-32)アッセイおよびプロBNP(1-108)のアッセイの結果

固相におけるモノクローナルヒンジ76抗体および検出に20G7抗体-ペルオキシダーゼ複合体を用いるプロBNP(1-108)アッセイによって、健常被験者からの血漿より得られたプロBNP(1-108)の値は、検出に20G7抗体を用いるBNP(1-32)アッセイの値と相関性が高い($r^2 = 0.702$)ことが判明した(図9)。

【0213】

したがって結論として、健常被験者よりも鬱血性心不全患者の方が多量のBNP(1-32)およびプロBNP(1-108)を検出することによって、本発明による20G7抗体が、鬱血性心不全患者におけるBNP(1-32)アッセイおよびプロBNP(1-108)アッセイに全く適切であることは極めて明白である(表7)。

【0214】

【表7】

表7

	プロBNP(1-108) (pg/ml)	BNP(1-32) (pg/ml)
健常被験者	37 ± 32	227 ± 172
NYHA 患者	762 ± 839	1716 ± 1754

【0215】

実施例13 - 腎不全患者におけるBNP(1-32)アッセイおよびプロBNP(1-108)アッセイ

13.1 サンプル:

Lapeyronie病院、Montpellier、仏国に由来し、志願者の同意文書に署名した33人の腎不全患者からのEDTA血漿。

【0216】

13.2. BNP(1-32)アッセイおよびプロBNP(1-108)アッセイに関する材料と方法

使用される材料と方法は、BNP(1-32)に関しては上記8.2に記載されたもの、およびプロBNP(1-108)に関しては上記10.2に記載されたものと同じであった。

【0217】

13.3 結果

固相におけるヒンジ76抗体および検出に20G7抗体-ペルオキシダーゼ複合体を用いるプロBNP(1-108)アッセイによって、腎不全患者の血漿より得られたプロBNP(1-108)の値は、本発明の20G7抗体を用いるBNP(1-32)アッセイの値と相関性が高い($r^2 = 0.899$)ことが判明した(図10)。本発明による20G7抗体は、腎不全患者におけるBNP(1-32)アッセイおよびプロBNP(1-108)アッセイに極めて適切である。

【0218】

実施例14 - 虚血性脳卒中患者におけるプロBNP(1-108)アッセイ

14.1. 患者サンプル:

14.1. 患者サンプル: 50

- 脳卒中発症の3時間以内に救急診療部に入院した虚血性脳卒中患者から32のクエン酸塩添加血漿サンプルを試験した。脳卒中の重症度は、National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS)により評価した。

- 脳卒中集団からの患者に性別および年齢を適合させた、明らかに健常の血液供与者から42のクエン酸塩添加血漿サンプルを試験した。

クエン酸塩添加血漿サンプルの全てを-80℃に保存した。分析前に、サンプルを解凍し、4℃で15分間3000gで遠心分離した。

【0219】

14.2. 材料と方法:

サンプルの全てを、BioPlex (商標) 2200プロBNPアッセイ (Bio-Rad)により試験した。

【0220】

14.2.1. 技術の原理:

BioPlex (商標) 2200は、マルチプレックスの磁気ビーズ技術とフローサイトメトリー技術とを組合わせて、完全自動化ランダムアクセスプラットフォーム上でマルチ検体検出を提供する。磁気粒子(直径8μm、カルボキシル修飾表面)を、互いに異なる波長で放射し、635nmで有意に吸着する2つの蛍光体で染色する(クラス染料CL1およびCL2)。レポーター蛍光体である-フィコエリトリン(PE)は、高モルの吸光係数、量子収率、耐光退色性があり、自己消光が無く安定性であるため選択された。この検出器により、3つの波長: 2つのクラス染料およびレポーター染料での光が同時に測定される。

【0221】

14.2.2. BioPlex (商標) 2200のプロBNP:アッセイ原理

BioPlex (商標) 2200のプロBNPアッセイは、二段階サンドイッチ蛍光免疫学的アッセイである。第一ステップにおいて、BioPlex (商標) 2200システムにより、反応器内に50μLの患者サンプル、抗プロBNP(1-108)モノクローナル抗体(エピトープRAPR₇₆S₇₇P(配列番号58))を認識するヒンジ76モノクローナル抗体、Bio-Rad)でコーティングされた磁気染色ビーズおよびアッセイ用緩衝液が組合わされる。次いで、11分のインキュベーションおよび洗浄サイクル後、フィコエリトリン(PE)に結合した抗ヒトBNPモノクローナル抗体20G7複合体を添加し、2分間インキュベートした。過剰の複合体を除去後、ビーズ混合物は、PEの蛍光により染色ビーズおよびビーズ上に捕捉された抗原量を識別する検出器を通過させる。6つの異なる標準物質の1組を用いて校正後、3つのレベルの品質管理および患者のサンプル結果を、pg/mLで表す。

【0222】

2つの品質管理ビーズも各サンプルで試験して、システム全体の安全性を高める。

【0223】

14.3. 結果:

対照および虚血性脳卒中集団に関するBioPlex (商標) 2200のプロBNP値の分布を、表8および図11に示している。プロBNP(1-108)のレベルは、対照群と比較して虚血性脳卒中群において有意に高い(Mann-Whitney、p<0.0001)。この結果は、プロBNP(1-108)もまた、虚血性脳卒中の早期の診断のための有用な血漿バイオマーカーであることを立証している。

【0224】

10

20

30

40

【表 8】

表 8 - 虚血性脳卒中および対照のクエン酸塩添加血漿サンプルにおける B i o P l e x (商標) 2 2 0 0 のプロBNP濃度 (最小値、第一四分位数、中央値、第三四分位数および最大値)

集団	最小値 (pg/mL)	第一四分位数 (pg/mL)	中央値 (pg/mL)	第三四分位数 (pg/mL)	最大値 (pg/mL)
対照集団 (N=42)	0	0	1 (IC95%: 0-2)	2	23
虚血性脳卒中集団 (N=32)	2	34	71 (IC95%: 38-145)	219	1019

10

【0225】

本発明に記載されたモノクローナル抗体 2 0 G 7 を用いたプロBNP (1 - 1 0 8) サンドイッチアッセイが、脳卒中患者におけるプロBNP (1 - 1 0 8) 濃度を測定できることを、本発明者らは明瞭に立証している。

【0226】

実施例 15 - 急性冠動脈患者におけるプロBNP (1 - 1 0 8) アッセイ

20

15.1. サンプル:

- 民間供給源 (P r o M e d e x 、 N Y 、 米 国) に 由 来 す る 2 7 人 の 急 性 冠 動 脈 障 害 患 者 (T r o p o n i n e I 血 漿 平 均 値 は 12.5 ± 6.9 ng/mL に 達 す る) か ら の E D T A 血 漿、
- 4 8 人 の 健 常 被 験 者 (健 常 志 願 者 、 P r o M e d e x 、 N Y 、 米 国) か ら の E D T A 血 漿。

【0227】

15.2. 材料と方法

BNP (1 - 3 2) アッセイに関して使用される材料と方法は、上記 8.2 に記載されたもの、およびプロBNP (1 - 1 0 8) に関しては上記 10.2 に記載されたものと同

30

【0228】

15.3 結果

救急医療部に入院し、上記のプロBNP (1 - 1 0 8) アッセイにより急性冠動脈障害と診断された患者の血漿から得られたプロBNP (1 - 1 0 8) の値は、本発明による 2 0 G 7 抗体を用いる BNP (1 - 3 2) アッセイにより得られた値と相関性が高い ($r^2 = 0.956$) ことが判明した (図 12)。急性冠動脈障害患者の BNP (1 - 3 2) およびプロBNP (1 - 1 0 8) のレベル (プロBNP (1 - 1 0 8) および BNP (1 - 3 2) に関してそれぞれ 668 ± 619 および $1,518 \pm 1,533$ pg/mL で、本発明によりアッセイされた) は、健常被験者のレベル (プロBNP (1 - 1 0 8) およ

40

び BNP (1 - 3 2) に関してそれぞれ 37 ± 32 および 227 ± 172 pg/mL で、本発明によりアッセイされた) よりも高かった。

【0229】

したがって、本発明による 2 0 G 7 抗体 (ペルオキシダーゼに結合した) を用いるサンドイッチアッセイにより、BNP (1 - 3 2) のレベルに比例するプロBNP (1 - 1 0 8) の濃度を測定できることは極めて明白である。これらの結果により、マーカーとして、特に急性冠動脈障害のマーカーとしてのプロBNP (1 - 1 0 8) および BNP (1 - 3 2) のアッセイの有用性が再度証明されている。

【0230】

実施例 16 - 2 0 G 7 モノクローナル抗体を用いるグリコシル化形態におけるプロBNP

50

(1 - 1 0 8) のアッセイ

1 6 . 1 . 材料 :

- プロBNP (1 - 1 0 8) (非グリコシル化形態に関しては大腸菌 (E . C o l i) で産生された組換えタンパク質、およびグリコシル化形態に関して再プログラム化された H E K 2 9 3 細胞からの組換えタンパク質、HyTest、フィンランド国)、

- M a x i s o r p の 9 6 ウェル平底マイクロプレート (N u n c 、デンマーク国)、
- P B S (リン酸緩衝生理食塩水) 緩衝液、pH 7 . 4、G i b c o 錠剤。参照 : 1 8 9 1 2 - 0 1 4 (I n v i t r o g e n)、
- T w e e n (登録商標) 2 0 (S i g m a - A l d r i c h 、米国、# P 1 3 7 9)

10

、
- プロBNP (1 - 1 0 8) のヒンジ配列 : エピトープ R A P R _{7 6} S _{7 7} P (配列番号 5 5) を認識するヒンジ 7 6 モノクローナル抗体 (G i u l i a n i ら、Clin. Chem., 52: 6, 1054-1061, 2006)、

- ペルオキシダーゼに結合した 2 0 G 7 モノクローナル抗体 (B i o - R a d)。

【 0 2 3 1 】

1 6 . 2 方法 :

1 6 . 2 . 1 . グリコシル化プロBNP の分析アッセイの原理 :

グリコシル化プロBNP (1 - 1 0 8) の 2 0 p g / m l から 1 0 , 0 0 0 p g / m l の標準範囲を、0 . 1 % の P B S - T 緩衝液中で調製した。非グリコシル化プロBNP (1 - 1 0 8) の 2 0 p g / m l から 1 0 , 0 0 0 p g / m l の標準範囲を、同じ方法で 0 . 1 % の P B S - T 緩衝液中で調製した。

20

【 0 2 3 2 】

本アッセイは、固相上での捕捉にモノクローナル抗体 (B i o - R a d からのヒンジ 7 6 抗体) を用い、プロBNP (1 - 1 0 8) のエピトープ配列 R A P R _{7 6} S _{7 7} P (配列番号 5 5) を認識し、1 ウェル当り 0 . 5 μ g / m l の 1 0 0 μ l による受動的吸着により固定化されるマイクロプレート上のサンドイッチ E L I S A 原理に基づいている。

【 0 2 3 3 】

1 % ミルク (半脱脂乳) を含有する 0 . 1 % の P B S - T の溶液中、0 . 5 μ g / m l の濃度でペルオキシダーゼに結合した本発明による 2 0 G 7 モノクローナル抗体の溶液 1 0 0 μ l を、検出試薬として用いた。残りのプロトコルは、実施例 1 0 の E L I S A と同一であった。したがって、2 0 G 7 抗体の検出特性を、2 つの形態 : グリコシル化および非グリコシル化形態のプロBNP (1 - 1 0 8) に関して比較した。

30

【 0 2 3 4 】

1 6 . 3 . 結果 :

表 9 および図 1 3 に示された結果は、固定化ヒンジ 7 6 抗体および検出に 2 0 G 7 抗体を用いる免疫アッセイによりグリコシル化プロBNP (1 - 1 0 8) および非グリコシル化プロBNP (1 - 1 0 8) アッセイに対応する。

【 0 2 3 5 】

【表 9】

表 9 - 試験された各プロBNP (1-108) 形態のアッセイからの 490 nm での光学密度値

プロBNP値域 (pg/ml)	非グリコシル化 プロBNP(1-108)	グリコシル化 プロBNP(1-108)
10,000	4	3.833
5000	3.807	3.801
2,500	3.829	3.023
1,250	3.256	1.679
625	1.816	0.925
312.5	0.989	0.465
156	0.510	0.268
78	0.221	0.130
39	0.109	0.087
20	0.063	0.041
9	0.037	0.028
0	0.021	0.023

10

【0236】

プロBNP (1-108) は、20G7を用いることにより非グリコシル化形態と同様にグリコシル化形態も検出することができる。シグナル/バックグラウンド比は、非グリコシル化プロBNPの方がそのグリコシル化形態よりも僅かに大きい(20pg/mlでそれぞれ3および1.8のシグナル/バックグラウンド比が得られる)。

20

【0237】

実施例 17 - グリコシル化形態でのプロBNP (1-108) の免疫活性およびヒンジ76抗体によるプロBNP (1-108) アッセイに対する関連性

17.1. 材料:

- ProteOn XPR36分析器(表面プラズモン共鳴SPR技術、Bio-Rad、米国)

- グリコシル化形態および非グリコシル化形態(13nMから200nM)でのプロBNP (1-108) (組換えタンパク質、HyTest、フィンランド国)、

- 抗Fc断片抗体(Sigma、米国)

- エピトープRAPR₇₆S₇₇P(配列番号55)を認識し、0.1%のPBS-T中30μg/mlの濃度で使用されるモノクローナルヒンジ76抗体(Bio-Rad)

、

- PBS(リン酸緩衝生理食塩水)緩衝液、pH7.4。

30

【0238】

17.2. 方法:

17.2.1. 原理:

ProteOn XPR36分析器(その原理は、表面プラズモン共鳴技術(SPR)に基づく)を用いて、20G7モノクローナル抗体とグリコシル化および非グリコシル化プロBNP(1-108)形態との相互作用の速度論および親和性を確定する。本発明者らは製造元の取扱説明書に従った。モノクローナル抗体は、抗Fc断片抗体を用いることによりバイオセンサー(固体表面)上に固定し、一方、グリコシル化または非グリコシル化可溶性抗原プロBNP(1-108)は、室温でバイオセンサーの表面上に一定流量で濃度を増加させて(13nMから200nMまで)循環させた。SPRシグナルが検出される角度は、消滅波が伝播する媒体の屈折率に直接比例した。屈折率の変化は、共鳴単位(RU、1000共鳴単位は、表面領域の1mm²当り1ngの固定化タンパク質に相当する)で表される。抗原とモノクローナル抗体との間の相互作用および親和性の定量化は、デバイスのソフトウェア(Bio-Rad)を用いて全体的なデータ処理により会合速

40

50

度定数 (k_a) および解離速度定数 (k_d) を算出することによって評価される。mol / l での平衡解離定数 ($KD = k_d / k_a$) は、モノクローナル抗体に関してグリコシル化および非グリコシル化プロBNP (1-108) 抗原の親和性を反映する。

【0239】

17.2.2. 結果:

表10は、抗ヒンジ抗体 (エピトープRAPR₇₆S₇₇P (配列番号55) を有するヒンジ76抗体、Bio-Rad) と、グリコシル化および非グリコシル化プロBNP (1-108) との間の相互作用の特性を示す。抗ヒンジ抗体と非グリコシル化プロBNP (1-108) との間の親和性定数 ($1.73 \cdot 10^{-10}$) は、グリコシル化プロBNP (1-108) に関するもの ($2.35 \cdot 10^{-8}$) よりも大きかったが、プロBNP (1-108) のヒンジ領域を標的とする抗体は、グリコシル化および非グリコシル化双方の形態を高親和性で認識した。

10

【0240】

【表10】

表10 - グリコシル化および非グリコシル化プロBNP (1-108) に対するヒンジ76抗体の反応性

	ヒンジ76抗体		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	$KD = k_d/k_a$ M
非グリコシル化プロBNP(1-108)	$1.12 \cdot 10^6$	$1.94 \cdot 10^{-4}$	$1.73 \cdot 10^{-10}$
グリコシル化プロBNP(1-108)	$1.17 \cdot 10^5$	$2.72 \cdot 10^{-3}$	$2.35 \cdot 10^{-8}$

20

【0241】

実施例18 - バイエピトープおよびトリエピトープの標準物質

18.1. 組み込まれるエピトープの免疫活性が保存されるという条件で、本発明によるバイエピトープおよびトリエピトープの標準物質全ての構造は、線状であっても分枝状であってもよい。

【0242】

これらの標準物質を製造するために使用できる合成プロトコルは、当業者に周知のペプチド類の有機化学分野のものである (この文脈において、実施例1の「ペプチド合成」を参照されたい)。

30

【0243】

エピトープE₂ およびE₃ に関して、本発明による線状ペプチド配列は、非限定的様式で以下の配列:

配列番号56: P R S P K M V Q G

配列番号57: A P R S P K M V

配列番号58: S G L G C K L V

配列番号59: S P K M V Q G S G

配列番号60: Y T L R A P R S P K M V G

よりなる群から選択することができる。

40

【0244】

18.2. 本発明による合成エピトープの例

本発明者らは、以下の標準物質を合成した。

【0245】

18.2.1. バイエピトープの標準物質:

CaliproBNP1: Ac - Y T L R A P R S P K M V - A h x - S F G R K M D R
I S S - C O N H₂

CaliproBNP2: Ac - Y T L R A P R S P K M V - A h x - C F G R K M D R
I S S S S G L G C K - C O N H₂

50

Cal i P r o B N P 3 : A c - Y T L R A P R S P K M V Q G - A h x - F G R K M D R - C O N H ₂。

【0246】

これら3つのバイエピトープ標準物質を使用して、R A P R S P (配列番号55)を認識するモノクローナルヒンジ76抗体 (Giulianiら、上記)の固相での固定化、ならびに検出の際には、例えば、モノクローナル20G7抗体 - ペルオキシダーゼに基づき、上記10.2のとおりプロBNP (1 - 108)アッセイを検量することができる。

【0247】

Cal i p r o B N P 4 : A c - F G R K M D R - A h x - S G L G C * K V L R R H - C O O H

10

Cal i p r o B N P 4 b : A c - F G R K M D R - A h x - S G L G C * K V L R - C O N H ₂

これら2つのバイエピトープ標準物質を使用して、例えば、モノクローナル抗体50B7または50E1 (HyTest、フィンランド国)など、BNP (1 - 32)のC - 末端に特異的なモノクローナル抗体の固相での固定化、ならびに検出の際には、例えば、モノクローナル20G7抗体 - ペルオキシダーゼに基づき、BNP (1 - 32)アッセイを検量することができる。

【0248】

Cal i p r o B N P 5 : A c - S P K M V Q G S G - A h x - F G R K M D R - C O N H ₂

20

このバイエピトープ標準物質を使用して、ポリクローナル抗体L21016 (Bio-Rad)の固相での固定化、ならびに、検出の際には、例えば、モノクローナル20G7抗体 - ペルオキシダーゼに基づき、上記8.2の通りにBNP (1 - 32)アッセイを検量することができる。

【0249】

上記の標準物質の配列において、A h x基の構造式はNH - (CH₂)₅ - COである。

【0250】

式 - NH - (CH₂)₅ - CO - の結合基は、2つのペプチド配列を一緒に共有結合させることのできる周知のカップリング剤であるアミノ - ヘキサン酸 (A H X) に由来する。

30

【0251】

C * = C (A c m) = アセトアミドメチル (当業者に周知の保護基)によりブロックされたシステイン。

【0252】

トリエピトープ標準物質:

Cal i p r o B N P 6 : A c - Y T L R A P R S P K M V - A h x - F G R K M D R - A h x - S G L G C * K V L R R H - C O O H、

C A L i p r o B N P 6 b : A c - Y T L R A P R S P K M V - A h x - F G R K M D R - A h x - S G L G C * K V L R - C O N H ₂。

40

【0253】

これら2つのトリエピトープ標準物質を使用して、R A P R S P (配列番号55)を認識するモノクローナルヒンジ76抗体 (Giulianiら、上記)などの抗体および本発明のモノクローナル20G7抗体、ならびに、例えば、BNP (1 - 32)のC - 末端部分に対するエピトープを有する抗体を用いて、プロBNP (1 - 108)アッセイおよびBNP (1 - 32)アッセイの双方を検量することができる。

【0254】

18.3. 材料と方法

これら標準物質の有用性を示すために、検量および安定性の結果を、2つの異なる様式、すなわちB i o P e x (商標)アッセイおよびE L I S Aアッセイにおいて表示する。

50

- プロBNP (1 - 108) バイエピトープ、CaliproBNP1およびCaliproBNP3化合物を、実施例14に記載されたBioPex (商標) 2200プロBNPアッセイにより試験した。

- BNP (1 - 32) バイエピトープ、CaliproBNP5化合物は、実施例8.2に記載されたアッセイにより試験し、トリエピトープ、CaliproBNP6化合物は、実施例10.2に記載されたアッセイにより試験した。

【0255】

18.4. プロトコル

種々の化合物を、5%のBSA、2mMのCaCl₂、10%のアンチプロテアーゼのカクテル (Sigma参照P2714)、0.1%のプロクリン、0.095%のNaN₃ および0.1%の安息香酸ナトリウムを含有する0.1Mのコハク酸緩衝液、pH7.6で希釈した種々の濃度で試験した。

【0256】

同じ0.1Mのコハク酸緩衝液、pH7.6で、CaliproBNP1の標準物質を、1μg/mL、0.2μg/mL、0.1μg/mL、および0.02μg/mLに希釈し、CaliproBNP3の標準物質を、1.6μg/mL、0.8μg/mL、0.3μg/mL、0.06μg/mLに希釈し、CaliproBNP5およびCaliproBNP6の標準物質を、100ng/mLから0.01ng/mLに希釈した。

【0257】

化合物の安定性を、以下の方法で加速条件 (室温) で試験し、合成BNP (1 - 32) (Sigma - Aldrich、Etats - Unis、#B - 5900) および組換えプロBNP (1 - 108) (HyTest参照8PRO8) と比較した：

【0258】

組換えプロBNP (1 - 108)、合成BNP (1 - 32) および標準物質のペプチドを、上記の0.1Mのコハク酸緩衝液、pH7.6で希釈した。各溶液を、10本のチューブに分けて室温 (20 ± 5) に置いた。次に各溶液のうちの1本のチューブを、J0、J+7、J+14、J+21において凍結した。J+21において、種々の溶液を解凍し、実施例14に記載されたBioPlex (商標) 2200プロBNPアッセイ、または実施例8.2および10.2に記載された免疫アッセイによりアッセイした。

【0259】

ELISAアッセイにおいて、プロBNP (1 - 108)、BNP (1 - 32) およびCaliproBNP6の25ng/mLから0.04ng/mLの範囲を試験した。CaliproBNP4およびCaliproBNP5に関するこれらの試験範囲は、2ng/mLから0.004ng/mLであった。

【0260】

BioPlex (商標) 2200プロBNPアッセイにおいて、プロBNP (1 - 108) の2つの濃度、10ng/mLならびに1ng/mL、CaliproBNP1の2つの濃度、2μg/mLならびに0.125μg/mL、およびCaliproBNP3の2つの濃度、1μg/mLならびに0.3μg/mLの安定性を分析した。ELISA様式において、プロBNP (1 - 108) およびBNP (1 - 32) の3つの濃度、1.56ng/mL、0.78ng/mLおよび0.39ng/mL、ならびにCaliproBNP5の3つの濃度、62.5pg/mL、31ng/mLおよび15.6ng/mLを分析した。

【0261】

18.5. 結果

18.5.1. BioPlex (商標) 2200プロBNPアッセイにおけるCaliproBNP1およびCaliproBNP3の標準物質

【0262】

種々の濃度範囲におけるCaliproBNP1およびCaliproBNP3の化合物のアッセイ結果を、それぞれ図14および15に表示してある。

10

20

30

40

50

【0263】

BioPlex (商標) 2200プロBNPアッセイにおいて、CaliproBNP 1およびCaliproBNP 3の化合物は、化合物の濃度と共にシグナルの増加を生じさせることができる。したがって、これらの化合物は、プロBNP (1-108) 分子に対して標準化して、プロBNP (1-108) アッセイの標準物質として使用することができる。

【0264】

種々の濃度範囲での組換えプロBNP (1-108) およびCaliproBNP 1ならびにCaliproBNP 3化合物の加速安定性試験の結果を、表11に表示してある。

【0265】

【表11】

表11

化合物	濃度(μg/mL)	「J0+Xにおけるシグナル/ J0におけるシグナル」比により表される緩衝液***中室温**での液体安定性*		
		J0+7	J0+14	J0+21
組換えプロBNP(1-108)	0.001	0.79	0.65	0.51
	0.01	0.85	0.72	0.69
CaliproBNP1	0.125	0.93	0.92	0.95
	2	0.95	0.93	0.91
CaliproBNP3	0.3	0.91	0.98	1.15
	1	0.92	1.02	1.06

* 安定性の受け入れ規格：J0適格後のX日目における安定性にするために、J0+Xにおけるシグナル/ J0におけるシグナル比は、 1.00 ± 0.2 に等しくなければならない。

** 室温： 20 ± 5

*** 5%のBSA、2mMのCaCl₂、10%のアンチプロテアーゼのカクテル (Sigma参照P2714)、0.1%のプロクリン、0.095%のNaN₃ および0.1%の安息香酸ナトリウムを含有する0.1Mのコハク酸緩衝液、pH7.6。

【0266】

バイエピトープ標準物質CaliproBNP 1およびCaliproBNP 3は、明らかに組換えプロBNP (1-108) よりも高い安定性を示す。

【0267】

18.5.2.20G7抗体の使用に基づいた免疫アッセイにおけるCaliproBNP 5およびCaliproBNP 6標準物質

種々の濃度範囲におけるCaliproBNP 5およびCaliproBNP 6の化合物の試験結果を、それぞれ図16および17に表示してある。

【0268】

BNP (1-32) およびプロBNP (1-108) アッセイにおいて、バイエピトープ化合物CaliproBNP 5およびトリエピトープ化合物CaliproBNP 6は、化合物の濃度と共にシグナルの増加を生じさせることができる。したがって、これらの化合物は、プロBNP (1-108) およびBNP (1-32) アッセイの標準物質として使用することができる。

【0269】

種々の濃度範囲での組換えプロBNP (1-108)、BNP (1-32) およびCaliproBNP 5化合物の加速安定性アッセイの結果を、表12に表示してある。

【0270】

10

20

30

40

【表 1 2】

表 1 2

化合物	濃度 (ng/mL)	「J0+Xにおけるシグナル/ J0におけるシグナル」比により表される緩衝液***中室温**での液体安定性*		
		J0+7	J0+14	J0+21
組換えプロBNP(1-108)	1.56	0.58	0.5	0.45
	0.78	1.08	0.82	0.88
	0.39	0.71	0.66	0.79
合成BNP(1-32)	1.56	0.71	0.7	0.55
	0.78	0.69	0.65	0.53
	0.39	0.81	0.7	0.53
CaliproBNP5	0.0625	1.02	1.02	1.1
	0.031	1.06	1.01	1.06
	0.0156	1.1	1.01	1.10

10

* 安定性の受け入れ規格：J0適格後のX日目における安定性にするために、J0+Xにおけるシグナル/ J0におけるシグナル比は、 1.00 ± 0.2 に等しくなければならない。

** 室温： 20 ± 5

*** 5%のBSA、2mMのCaCl₂、10%のアンチプロテアーゼのカクテル (Sigma参照P2714)、0.1%のプロクリン、0.095%のNaN₃および0.1%の安息香酸ナトリウムを含有する0.1Mのコハク酸緩衝液、pH7.6。

20

【0271】

再度、CaliproBNP5のバイエピトープ標準物質は、組換えプロBNP(1-108)およびBNP(1-32)よりも高い安定性を示す。

【0272】

【表 1 3 - 1】

配列の要約表

配列番号	配列
1	HPLGSPGSASDLETSGLQEQRNHLQGKLSLQVEQTSLEPLQESPRPT GVWKSREVATEGIRGHRKMVLYTLRAPRSPKMQGSGCFGRKMDRIS SSGLGCKVLRH
2	SPKMQGSGCFGRKMDRISSSGLGCKVLRH
3	HPLGSPGSASDLETSGLQEQRNHLQGKLSLQVEQTSLEPLQESPRPT GVWKSREVATEGIRGHRKMVLYTLRAPR
4	TGCFGRKMDRISTSTAIGCKVL
5	SGCYGRKMDRISTSTAIGCKVL
6	SGCFGRKMDRISSSGLGCKVL
7	SGCFGRKMDRIATSTAIGCKVL
8	FGRKMDR
9	GRKMDR
10	FGRKMD
11	RKMDRI
12	SPKMQGSGCFGRKM
13	KMQGSGCFGRKMDR
14	VQSGCFGRKMDRIS
15	GSGCFGRKMDRIS
16	GCFGRKMDRIS
17	FGRKMDRISSSGLG

30

40

【表 1 3 - 2】

18	RKMDRISSSSGLGCK
19	MDRISSSSGLGCKVL
20	RISSSSGLGCKVLR
21	VQGSGCFGR
22	SPKMVQGSGC
23	MDRISSSSGLG
24	RKMDRI
25	RKMDRISS
26	SPKMVQGSGC
27	PKMVQGSGCF
28	KMVQGSGCFG
29	MVQGSGCFGR
30	VQGSGCFGRK
31	QGSGCFGRKM
32	GSGCFGRKMD
33	SGCFGRKMDR
34	GCFGRKMDRI
35	CFGRKMDRIS
36	FGRKMDRISS
37	GRKMDRISSS
38	RKMDRISSSS
39	KMDRISSSSG

10

20

【表 1 3 - 3】

40	MDRISSSSGL
41	DRISSSSGLG
42	RISSSSGLGC
43	ISSSSGLGCK
44	SSSSGLGCKV
45	SSSGLGCKVL
46	SSGLGCKVLR
47	SGLGCKVLR
48	GLGCKVLRH
49	GCFGRKM
50	CFGRKMD
51	FGRKMDR
52	GRKMDRI
53	RKMDRIS
54	SPKMV
55	RAPRSP
56	PRSPKMVQG
57	APRSPKMV
58	SGLGCKVL
59	SPKMVQGSG
60	YTLRAPRSPKMG
61	FGRKMDRISSSS
62	AGRKMDR

30

40

【 図 1 】

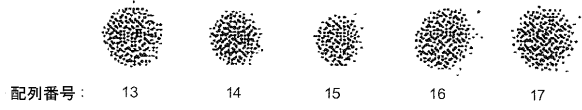


FIG.1

【 図 2 】

最少エピトープおよび残基 F 1 1 の重要性

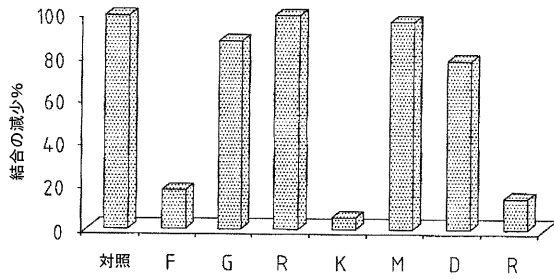


FIG.2

【 図 3 】

最少エピトープおよび F 1 1 に対する効果

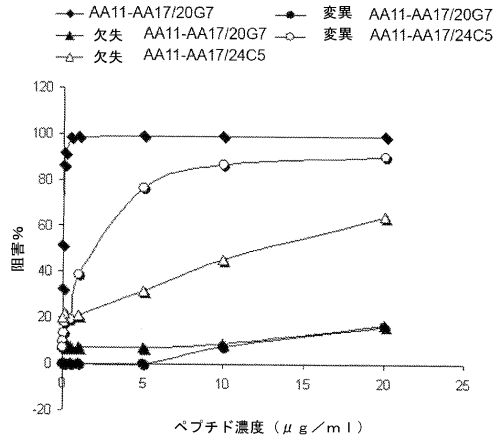


FIG. 3

【 図 4 】

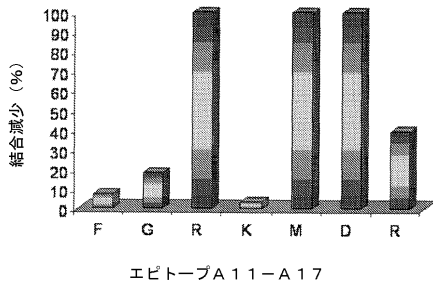


FIG. 4

【 図 6 】

20G7によるプロBNP (1-108) の検出

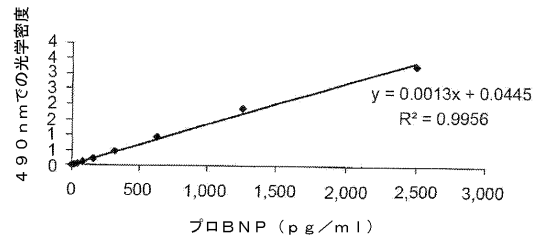


FIG. 6

【 図 5 】

20G7によるBNP (1-32) の検出

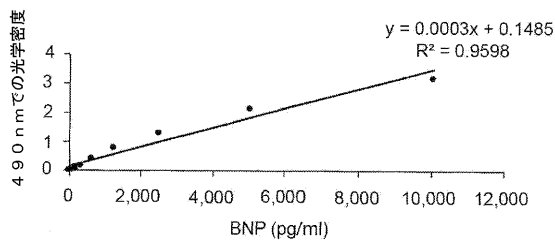


FIG. 5

【 図 7 】

鬱血性心不全におけるBNP (1-32) とプロBNP (1-108) との間の線形相関関係

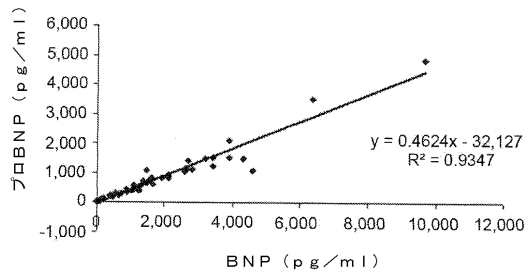


FIG. 7

【 図 8 】

NYHAクラスによる鬱血性心不全におけるBNP（1-32）とプロBNP（1-108）との間の線形相関関係

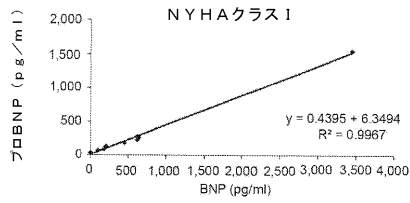


FIG. 8A

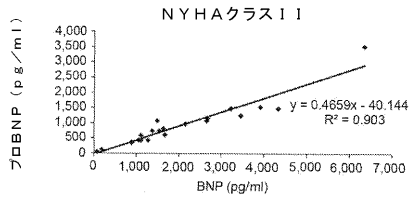


FIG. 8B

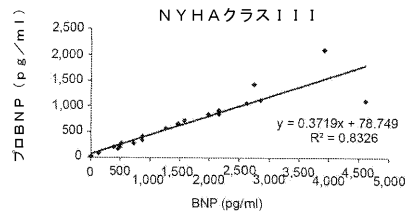


FIG. 8C

【 図 9 】

健常集団におけるBNP（1-32）とプロBNP（1-108）との間の線形相関関係

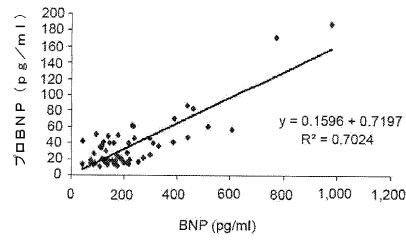


FIG. 9

【 図 10 】

腎不全におけるBNP（1-32）とプロBNP（1-108）との間の線形相関関係

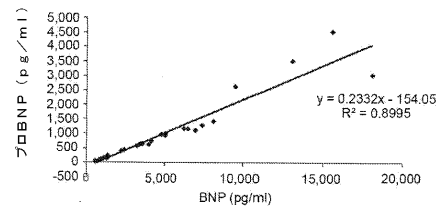


FIG. 10

【 図 11 】

虚血性脳卒中におけるプロBNP（1-108）のボックスプロット

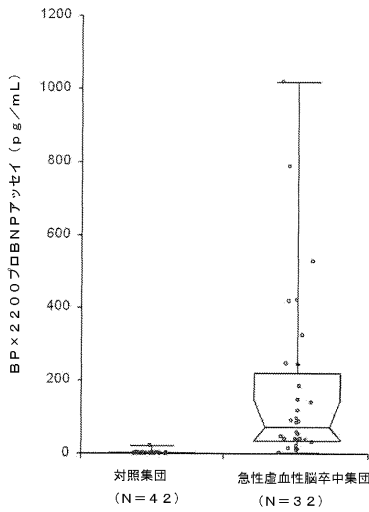


FIG. 11

【 図 12 】

急性冠動脈症候群におけるBNP（1-32）とプロBNP（1-108）との間の線形相関関係

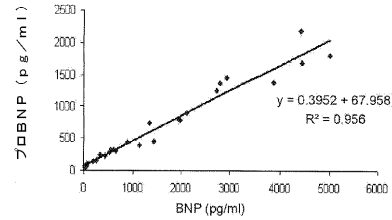


FIG. 12

【 図 13 】

グリコシル化および非グリコシル化プロBNP（1-108）の検出

グリコシル化 : $y = 0.0032x + 0.1516$
 $R^2 = 0.9623$

非グリコシル化 : $y = 0.0026x + 0.051$
 $R^2 = 0.9954$

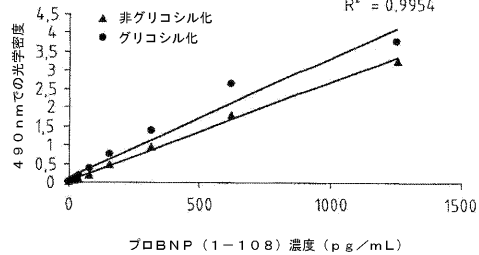


FIG. 13

【 図 1 4 】

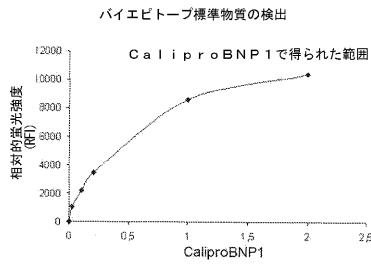


FIG. 14

【 図 1 5 】

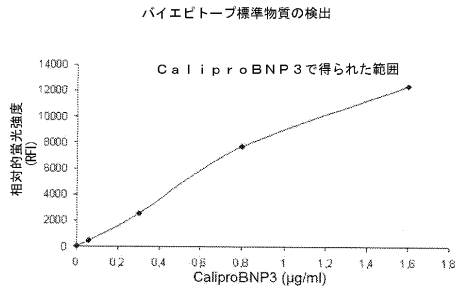


FIG. 15

【 図 1 6 】

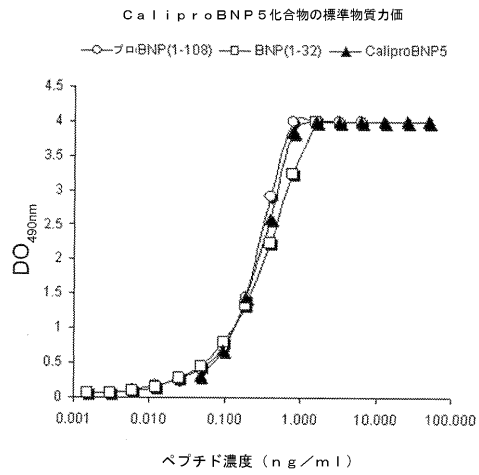


FIG. 16

【 図 1 7 】

トリエビトープ化合物CaliproBNP6の標準物質の力価

- 10. 2に記載されたアッセイによるプロBNP (1-108)
- 10. 2に記載されたアッセイによるCaliproBNP6
- △ ヒンジ76抗体およびBNP (1-32) の
- ▲ C-末端部分に対する抗体に基づくアッセイによるプロBNP (1-108)
- ▽ ヒンジ76抗体およびBNP (1-32) の
- ◇ C-末端部分に対する抗体に基づくアッセイによるCaliproBNP6

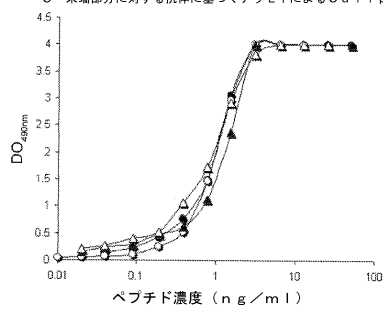


FIG. 17

【配列表】

0005458011000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08
- (74)代理人 100084146
弁理士 山崎 宏
- (74)代理人 100122301
弁理士 富田 憲史
- (72)発明者 フランソワ・リュニエ
フランス、エフ - 7 8 3 9 0 ボワ・ダルシー、リュ・デュ・ボワ5番
- (72)発明者 イザベル・ジュリアーニ
フランス、エフ - 9 2 3 8 0 ガルシュ、グランド・リュ2 2 9番
- (72)発明者 シルヴィー・ヴィラルー - ソシーヌ
フランス、エフ - 9 2 1 3 0 イシ・レ・ムリノー、ブルヴァール、ロダン9 1番
- 審査官 伊藤 佑一

(56)参考文献 国際公開第2 0 0 6 / 0 8 8 7 0 0 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 4 / 8 2 5

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

W P I

专利名称(译)	新型BNP (1-32) 表位和针对所述表位的抗体		
公开(公告)号	JP5458011B2	公开(公告)日	2014-04-02
申请号	JP2010519443	申请日	2008-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	中提琴德巴斯德 BIO RAD巴斯德 法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad公司巴斯德 全国中心德拉RECHERCHE , Shiantifiku		
当前申请(专利权)人(译)	生物 - Rad公司创新 全国中心德拉RECHERCHE , Shiantifiku		
[标]发明人	フランソワリュニエ イザベルジュリアーニ シルヴィーヴィラルールソシーヌ		
发明人	フランソワ・リュニエ イザベル・ジュリアーニ シルヴィー・ヴィラルール・ソシーヌ		
IPC分类号	C07K14/47 G01N33/68 G01N33/53 C07K16/18 C12N5/10 C12P21/08		
CPC分类号	C07K14/58 G01N33/74 G01N2333/58 G01N2800/32 G01N2800/324 G01N2800/50 G01N2800/52		
FI分类号	C07K14/47.ZNA G01N33/68 G01N33/53.D C07K16/18 C12N5/00.102 C12P21/08		
代理人(译)	田中 , 三夫 山崎 宏 富田健二		
审查员(译)	伊藤 佑一		
优先权	2007005711 2007-08-03 FR		
其他公开文献	JP2010535737A JP2010535737A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	20G7	配列番号4	F ₁₁ GRKMDR ₇	F, K およびR
本发明涉及携带式 (I) 的人BNP (1-32) 表位的多肽 : a1-R1-X1-FGRKMDR-X2-R2-a2以及FGRKMDR表位特异性的配体。	11A8	配列番号4	F ₁₁ GRKMDR ₇	F, G, K およびR
	17F10	配列番号4	F ₁₁ GRKMDR ₇	F, K, D およびR
	Mab1	配列番号4	F ₁₁ GRKMDR ₇	F, G, R およびK
	Mab2	配列番号4	F ₁₁ GRKMDR ₇	F およびK
	Mab3	配列番号4	F ₁₁ GRKMDR ₇	F, G, R およびK