

(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2010-523994

(P2010-523994A)

(43) 公表日 平成22年7月15日(2010.7.15)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|--------------------|-------------|
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 B | 4 B O 6 4 |
| GO 1 N 33/577 (2006.01) | GO 1 N 33/577 B | 4 H O 4 5 |
| CO 7 K 16/18 (2006.01) | CO 7 K 16/18 Z N A | |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | C 1 2 P 21/08 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2010-502538 (P2010-502538)
 (86) (22) 出願日 平成20年4月14日 (2008.4.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年10月6日 (2009.10.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/FI2008/050184
 (87) 国際公開番号 W02008/125733
 (87) 国際公開日 平成20年10月23日 (2008.10.23)
 (31) 優先権主張番号 20075251
 (32) 優先日 平成19年4月13日 (2007.4.13)
 (33) 優先権主張国 フィンランド (FI)
 (31) 優先権主張番号 60/911,603
 (32) 優先日 平成19年4月13日 (2007.4.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508347579
 ヒュテスト アエルテデー、
 H Y T E S T L T D .
 フィンランド国、エフアイー20520
 トゥルク、ヨウカハイセンカトゥー 6、イ
 ンテルゲート 6階
 (74) 代理人 100116838
 弁理士 渡邊 潤三
 (72) 発明者 タムー、ナタリア、エヌ。
 ロシア国、115035、モスクワ、アー
 ル、63、コスモダミアンスカヤ エヌエ
 ービー、エスティー、4/22 ビー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BNPおよびp r o B N Pからなる群より選ばれる不安定な抗原を定量するための免疫アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、BNP、p r o B N Pおよびそれらの断片を検出するための免疫アッセイに関する。このアッセイは実質的に以下の工程を包含する： a) 抗原を、BNP分子のアミノ酸11番～22番に対応する断片またはそこに含まれる少なくとも3個のアミノ酸残基を包含する部分配列からなるペプチドに特異的な第1抗体と接触させて、1次免疫複合体を得、b) 工程(a)で得た1次免疫複合体を、1次免疫複合体を認識する抗体であって、遊離のBNP、p r o B N P、または遊離の第1抗体を認識することができない第2抗体と接触させて、2次免疫複合体を得、そしてc) 2次免疫複合体を検出する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

BNP、proBNP、およびそれらの断片からなる群より選ばれる不安定な抗原をサンプルから検出するための、以下の工程を包含する免疫アッセイの方法。

(a) 抗原を、BNP分子の₁₁FGRKMDRIS₂₂SS₂₂(配列番号3)断片またはそこに含まれる少なくとも3個のアミノ酸残基を包含する部分配列からなるペプチドに特異的な第1抗体と接触させて、1次免疫複合体を得、

(b) 工程(a)で得た1次免疫複合体を、1次免疫複合体を認識する抗体であって、遊離のBNP、proBNPやそれらの断片、または遊離の第1抗体を認識することができないか、1次免疫複合体を認識する際の親和性の10分の1以下の低い親和性でもって認識する抗体である第2抗体と接触させて、2次免疫複合体を得、そして

(c) 2次免疫複合体の形成を検出する。

【請求項 2】

BNP分子の₁₁FGRKMDRIS₂₂SS₂₂断片またはそこに含まれる少なくとも3個のアミノ酸残基を包含する部分配列からなるペプチドに特異的な、モノクローナル抗体。

【請求項 3】

BNP、proBNPまたはそれらの断片、およびBNP分子の₁₁FGRKMDRIS₂₂SS₂₂断片またはそこに含まれる少なくとも3個のアミノ酸残基を包含する部分配列からなるペプチドに特異的な抗体からなる1次免疫複合体に特異的な、モノクローナル抗体。

【請求項 4】

BNP、proBNP、およびそれらの断片からなる群より選ばれる抗原をサンプルから検出するための、以下の(a)と(b)を含む免疫アッセイキット。

(a) BNP分子の₁₁FGRKMDRIS₂₂SS₂₂(配列番号3)断片またはそこに含まれる少なくとも3個のアミノ酸残基を包含する部分配列からなるペプチドに特異的であり、且つ該抗原と共に1次免疫複合体を形成しうる第1抗体、および

(b) 工程(a)で得た1次免疫複合体を認識し、該抗原と第1抗体によって形成されたBNPの第2エピトープに特異的であり、且つ該1次免疫複合体と共に2次免疫複合体を形成しうる抗体であって、遊離のBNP、proBNPやそれらの断片、または遊離の第1抗体を認識することができないか、1次免疫複合体を認識する際の親和性の10分の1以下の低い親和性でもって認識する抗体である第2抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫アッセイに関し、不安定な抗原を検出するための免疫アッセイの方法を提供する。本発明の方法は、BNP、proBNPおよびそれらの断片の検出に特に適している。

【背景技術】

【0002】

BNPとproBNPは、臨床において広く使用されている、心不全(HF)の信頼性の高いマーカーである。BNPまたはproBNP分子由来のBNP断片の異なるエピトープに特異的な2種のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を使用する数種のサンドウィッチ免疫アッセイ(従来のアッセイ)が、文献に記載されている。

【0003】

BNP分子は、水溶液中では急速に免疫学的活性を喪失する非常に不安定な分子として知られている。このような活性の喪失は、通常、ペプチドのタンパク分解と関連している。抗原の定性的または定量的な免疫検出に一般的に用いられているサンドウィッチ免疫アッセイは、2種以上の異なるエピトープのそれぞれに特異的な2種以上の抗体を使用する。エピトープ間の距離が長いほど、抗体に対応する複数のエピトープの間にタンパク分解部位が含まれる確率が上昇するため、抗原のタンパク分解に対するアッセイの感受性が上

10

20

30

40

50

昇する。それとは逆に、エピトープが互い近くに位置しているほど、エピトープ間で分子のタンパク分解性開裂が生じる確率も減少する。

【0004】

非常に小さな分子を対象とした免疫アッセイ方法に関する記載もあり、そこには抗メタタイプ抗体と呼ばれる抗体の使用も含まれている。このような方法は、例えばジゴキシンの検出 (Self et al, 1994, Clin. Chem. 40:2035-2041) およびアンジオテンシンIIの検出 (Towbin et al, 1995, J. Immunol. Meth. 181:167-176) について開示されている。

【0005】

しかしながら、このような方法は非常に特異的なモノクローナル抗体を必要するため、種々の検体に応用することは簡単ではない。

10

【0006】

発明の詳細な説明

本願明細書に、ヒト血液中のBNPおよびproBNPの定量化のための免疫アッセイについて記載する。このアッセイを「不均等サンドウィッチ法」と命名した。このアッセイは、全ての不安定な抗原の免疫検出に応用可能である。

【0007】

本願で開示する免疫アッセイは2種の異なるモノクローナル抗体を使用する。BNPまたはproBNPの検出において、第1モノクローナル抗体(モノクローナル抗体24C5)は、BNPのアミノ酸残基11番~22番(${}_{11}\text{FGRKMDRISSSS}_{22}$)(proBNPのアミノ酸残基87番~98番に対応)を包含する領域(またはこの領域の一部)に特異的である(図1)。第2抗体(即ち、モノクローナル抗体Ab-BNP2とAb-BNP4)はシグナル発生成分によって標識されており、第1抗体と抗原(BNP、proBNPまたはそれらの断片)であって、該断片は、アミノ酸残基 ${}_{11}\text{FGRKMDRISSSS}_{22}$ またはこのアミノ酸配列内の少なくとも3個のアミノ酸残基を包含するものである)からなる免疫複合体を認識する。第2抗体は、遊離の抗原やその断片、または遊離のモノクローナル抗体24C5を認識しない(または10分の1以下の低い親和性をもって認識する)。従って、モノクローナル抗体24C5とBNP(またはproBNPやそれらの断片)を包含する1次免疫複合体は、第2抗体(モノクローナル抗体Ab-BNP2とAb-BNP4)の抗原となる。

20

【0008】

従って、本発明の一般的な目的は、不安定な抗原をサンプルから検出するための、以下の工程を包含する免疫アッセイの方法を提供することである。

30

(a) 目的の抗原を、この抗原分子の第1エピトープに特異的な第1抗体と接触させて、1次免疫複合体を得、

(b) 工程(a)で得た1次免疫複合体を、1次免疫複合体を認識し、目的の抗原と第1抗体によって形成された第2エピトープに特異的な抗体であって、遊離の抗原やその断片、または遊離の第1抗体を認識することができないか、1次免疫複合体を認識する際の親和性の10分の1以下の低い親和性をもって認識する抗体である第2抗体と接触させて、2次免疫複合体を得、そして

40

(c) 2次免疫複合体の形成を検出する。

【0009】

本発明の詳細な目的は、BNP、proBNP、およびそれらの断片からなる群より選ばれる不安定な抗原をサンプルから検出するための、以下の工程を包含する免疫アッセイの方法を提供することである。

(a) 抗原を、BNP分子の ${}_{11}\text{FGRKMDRISSSS}_{22}$ 断片またはそこに含まれる少なくとも3個のアミノ酸残基を包含する部分配列からなるペプチドに特異的な第1抗体と接触させて、1次免疫複合体を得、

(b) 工程(a)で得た1次免疫複合体を、1次免疫複合体を認識する抗体であって、遊離のBNP、proBNPやそれらの断片、または遊離の第1抗体を認識することができないか、1次免疫複合体を認識する際の親和性の10分の1以下の低い親和性でも

50

って認識する抗体である第2抗体と接触させて、2次免疫複合体を得、そして

(c) 2次免疫複合体の形成を検出する。

【0010】

本発明者らは、本発明の方法に適応可能な特異的モノクローナル抗体の開発に成功した。これら抗体を提供することも本発明の特定の目的である。

【0011】

ここに記載する不均等サンドウィッチ法は、離れて位置する複数のエピトープのそれぞれに特異的な抗体を使用するアッセイと比べて、抗原のタンパク分解に対して並外れた非感受性を発揮する。

【0012】

さらにこのような手法は、他の1種以上の抗原と類似した抗原(即ち、複数の異なるエピトープをその表面に有しているものの、特定の抗原を他の抗原から区別するための独自のエピトープは1つ(または複数であっても非常に限られた数)である抗原)の、免疫検出のために開発したアッセイとしても使用することができる。

【0013】

実施例

注：安定Eu-キレートで標識した抗体を、全ての実験において検出用抗体として使用した。実験で使用したモノクローナル抗体24C5、Ab-BNP2、Ab-BNP4、57H3および50E1は、フィンランド国、トゥルク、ヒュテスト アエルテーデー (Hytest Ltd) より入手可能である。

【実施例1】

【0014】

抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、モノクローナル抗体24C5と複合体を形成していないBNPやproBNPを認識しない(図2)

図2Aおよび図2Bに示した実験においては、抗原(それぞれBNPおよびproBNP)をプレートの被覆に使用し、直接免疫アッセイによってEu-標識抗体を抗原で試験した。抗体24C5は両方の形態の抗原を認識したが、モノクローナル抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、2種の抗原のいずれに対しても応答を示さなかった(シグナルはバックグラウンド値と同等)。

【0015】

図2Cに示した実験においては、BNP分子上の種々のエピトープに対して特異的なポリクローナル抗体でプレートを被覆した。第2工程では、プレートをまずBNPと共にインキュベートし、次にEu-標識抗体とインキュベートした。このような手法は、プレート表面に対していろいろな配向で抗原を結合する助けとなり、プレート表面上の分子の配向が実験結果に影響しないことを保証する。この実験においては、上述と同じ結果が得られた。即ち、モノクローナル抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、モノクローナル抗体24C5と複合体を形成していない抗原を認識することはできなかった。

【実施例2】

【0016】

抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、モノクローナル抗体24C5と免疫複合体を形成しているBNPおよびペプチド11-22を認識することができる(図3)

モノクローナル抗体24C5は、BNP分子の11番~22番断片またはproBNPの対応する87番~98番領域に特異的である。免疫複合体である24C5-BNPおよび24C5-ペプチド11-22がモノクローナル抗体であるAb-BNP2とAb-BNP4によって認識され得ることを示すために、モノクローナル抗体24C5を用いてプレートを被覆し、その後、プレートをBNP、またはBNP配列のアミノ酸11番~22番に対応する合成ペプチド(ペプチド11-22)と共にインキュベートした。モノクローナル抗体24C5と抗原との間に免疫複合体が形成された後、プレートをBNP分子の26番~32番領域に特異的なEu-標識抗体Ab-BNP2、Ab-BNP4および57H3と共にインキュベートした。

10

20

30

40

50

【0017】

不均等サンドウィッチ法はBNPとペプチドをほぼ同じ効率で認識する。抗体24C5（被覆）-57H3-Euを使用するアッセイは、ペプチド11-22を認識しなかった（シグナルはバックグラウンド値と同等）。

【実施例3】

【0018】

抗体Ab-BNP2とAb-BNP4は、モノクローナル抗体24C5と免疫複合体を形成するproBNPを認識することができる（図4） 不均等サンドウィッチ法は、従来のアッセイと同じ効率でproBNPを認識する。本発明者らはモノクローナル抗体24C5を用いてプレートを被覆し、その後プレートを、初めに組み換えproBNP（5ng/ml）、続いてBNP分子の26番～32番領域に特異的なEu-標識抗体であるAb-BNP2、Ab-BNP4または57H3と共にインキュベートした。不均等サンドウィッチ法と従来の免疫アッセイのそれぞれで得られたシグナルは同等であった。そこで、新規なアッセイはproBNPの定量的免疫検出に使用可能であると結論付けた。

10

【実施例4】

【0019】

抗原の見かけ上の安定性（図5）

合成BNP（Bachem製）をプールした正常ヒト血漿に加え（2ng/ml）、+4で種々の時間インキュベートし、免疫活性を3種の異なるアッセイ、即ち、1種の従来法と2種の不均等サンドウィッチ法で試験した。

20

【0020】

本願明細書に記載した不均等サンドウィッチ法によって決定した抗原の見かけ上の安定性は、BNP分子の異なる部位に特異的な2種のモノクローナル抗体を使用する従来のBNPアッセイによって決定した安定性と比べて有意に高かった。従来のアッセイの一例として、BNP分子の領域26番～32番に特異的なモノクローナル抗体50E1とBNP分子の領域11番～22番に特異的なモノクローナル抗体24C5を用いるアッセイを使用した。不均等サンドウィッチ法を免疫活性の決定に使用した場合には、免疫活性の約70%（Ab-BNP2を用いたアッセイとAb-BNP4を用いたアッセイがそれぞれ69.8%と68%）が+4において24時間インキュベートした後に観察され、従来のアッセイの場合は28%しか観察されなかった。インキュベーション開始から6日後には、従来のアッセイ法では免疫活性が見られなかったが、不均等サンドウィッチ法の場合には、初期免疫活性の約1/4が観察された。

30

【実施例5】

【0021】

心不全患者（HF患者）血液および健常ドナー血液におけるBNP/proBNPの測定（図6）

従来のBNPアッセイのみならず、不均等サンドウィッチ法も“BNP免疫活性”を示す抗原の2つの形態、即ち、BNPとproBNP、をヒト血液中から検出することができる。数人のHF患者および健常ドナーから得た血液サンプルについて、以下の3種のアッセイで試験した：BNP分子の26番～32番断片に特異的な捕捉モノクローナル抗体50E1と検出モノクローナル抗体24C5-Euを用いた1種の従来法、および2種の不均等サンドウィッチ法。全てのアッセイにおいて、合成BNPを検量に用いた。図6から明らかのように、3種のアッセイによる試験結果は非常に類似していた。いくつかのサンプルにおいては、従来のアッセイによる試験結果は不均等サンドウィッチ法よりも低かった。この観察結果は、このようなサンプルにおいてはBNPが部分的に分解されていたものの、不均等サンドウィッチ法において抗原はより高い見かけ上の安定性を提示するため、これらアッセイで決定した抗原値は従来のアッセイよりも高くなったと説明することができる。

40

【実施例6】

【0022】

50

検量曲線 (図 7)

合成 BNP を抗原として使用した 2 種の不均等サンドウィッチ法および 1 種の従来アッセイのための検量曲線を、図 7 (A、B と C) に示した。両方の不均等サンドウィッチ法が、従来のアッセイと同等の高感受性を示し、ヒト血液中の BNP 免疫活性および proBNP 免疫活性の厳密な検出にも使用可能である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 3 】

【図 1】BNP と proBNP の構造およびモノクローナル抗体 24C5 のエピトープ特異性。モノクローナル抗体 24C5 は、BNP 分子のアミノ酸残基 11 番 ~ 22 番を包含する断片および proBNP のアミノ酸残基 87 番 ~ 98 番からなる断片 (灰色で示した) を認識する。

【図 2 A】抗体 Ab - BNP 2 と Ab - BNP 4 は、モノクローナル抗体 24C5 と複合体を形成していない BNP や proBNP を認識しない。Eu - 標識モノクローナル抗体 24C5、Ab - BNP 2、Ab - BNP 4 (200 ng / ウェル) を、50 ng / ウェルの BNP で被覆したプレート内でインキュベートした。

【図 2 B】抗体 Ab - BNP 2 と Ab - BNP 4 は、モノクローナル抗体 24C5 と複合体を形成していない BNP や proBNP を認識しない。Eu - 標識モノクローナル抗体 24C5、Ab - BNP 2、Ab - BNP 4 (200 ng / ウェル) を、100 ng / ウェルの proBNP で被覆したプレート内でインキュベートした。

【図 2 C】抗体 Ab - BNP 2 と Ab - BNP 4 は、モノクローナル抗体 24C5 と複合体を形成していない BNP や proBNP を認識しない。Eu - 標識モノクローナル抗体 24C5、Ab - BNP 2、Ab - BNP 4 (200 ng / ウェル) を、BNP (0.5 ng / ウェル) とプレインキュベートしたポリクローナル抗 BNP 抗体 (2 μg / ウェル) で被覆したプレート内でインキュベートした。

【図 3】抗体 Ab - BNP 2 と Ab - BNP 4 は、モノクローナル抗体 24C5 と BNP (またはペプチド 11 - 22) との免疫複合体を認識することができる。3つの工程からなるアッセイのプロトコルは次の通りである。第 1 工程：プレートを捕捉モノクローナル抗体 24C5 でプレコートし、第 2 工程：プレートを洗浄した後、抗原 (BNP またはペプチド 11 - 22) と共にインキュベートし、第 3 工程：プレートを洗浄した後、検出用 (Eu³⁺ 標識) 抗体 (Ab - BNP 2、Ab - BNP 4 または 57H3) と共にインキュベートした。洗浄後、増幅溶液を添加し、シグナルを測定した。

【図 4】抗体 Ab - BNP 2 と Ab - BNP 4 は、モノクローナル抗体 24C5 と免疫複合体を形成する proBNP を認識することができる。3つの工程からなるアッセイのプロトコルは次の通りである。第 1 工程：プレートを捕捉モノクローナル抗体 24C5 でプレコートし、第 2 工程：プレートを洗浄した後、proBNP (5 ng / ml) と共にインキュベートし、第 3 工程：プレートを洗浄した後、検出用抗体 (Ab - BNP 2、Ab - BNP 4 または 57H3) と共にインキュベートした。洗浄後、増幅溶液を添加し、シグナルを測定した。

【図 5】正常ヒト血漿中の BNP の安定性。合成 BNP をプールした正常ヒト血漿に加え (2 ng / ml)、+ 4 で種々の時間インキュベートした。免疫活性を 3 種の異なるアッセイ、即ち、1 種の従来法と 2 種の不均等サンドウィッチ法で試験した。

【図 6】HF 患者および健常ドナーの血液における BNP / proBNP 測定。心不全患者 6 人の血漿サンプル (HF 1 ~ HF 6) および健常ドナーの血漿サンプル (NP 1 ~ NP 4) を 3 種のアッセイで試験した。合成 BNP (Bachem 製) を全てのアッセイの検量に使用した。

【図 7 A】従来のアッセイ (50E1 - 24C5 - Eu) のための検量曲線。抗原：合成 BNP (Bachem 製)。

【図 7 B】不均等サンドウィッチ法 (24C5 - Ab - BNP 2) のための検量曲線。抗原：合成 BNP (Bachem 製)。

【図 7 C】不均等サンドウィッチ法 (24C5 - Ab - BNP 4) のための検量曲線。

10

20

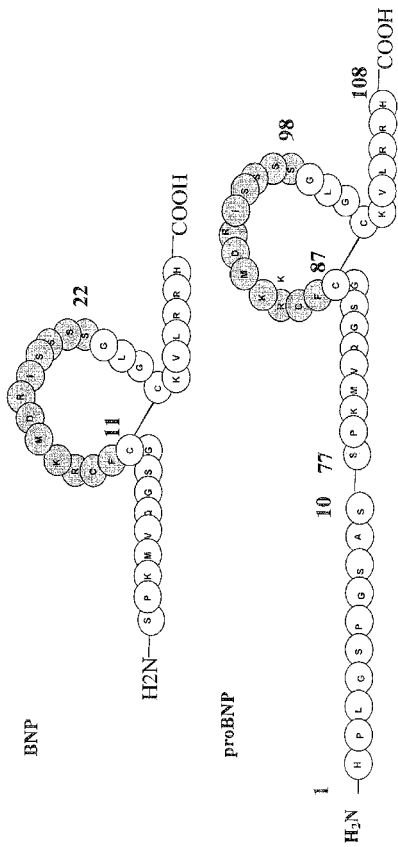
30

40

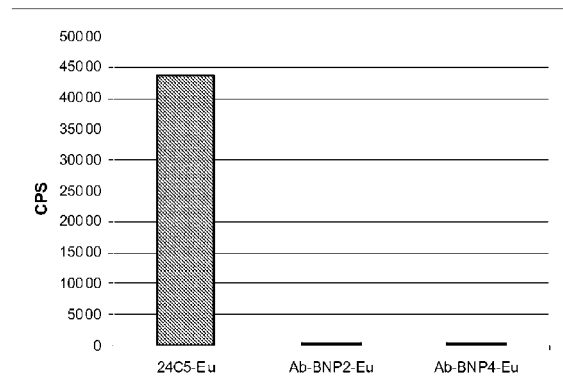
50

抗原：合成BNP（Bachem製）。

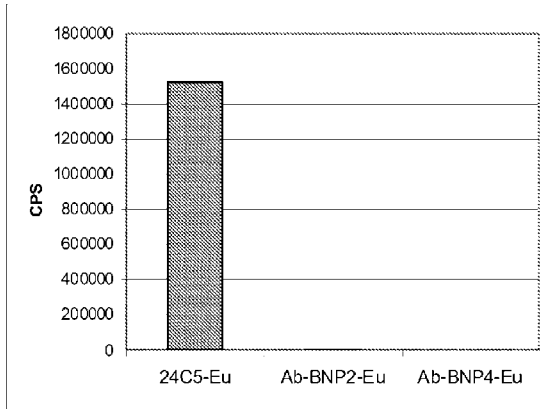
【図1】



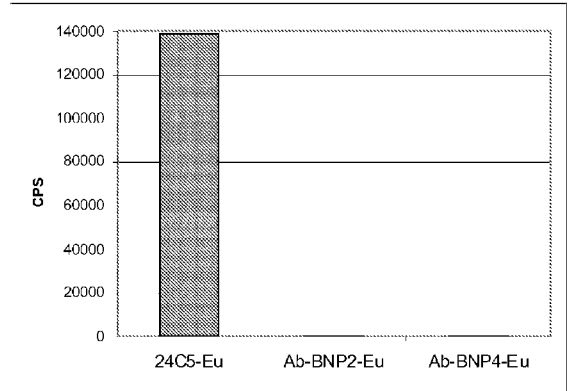
【図2A】



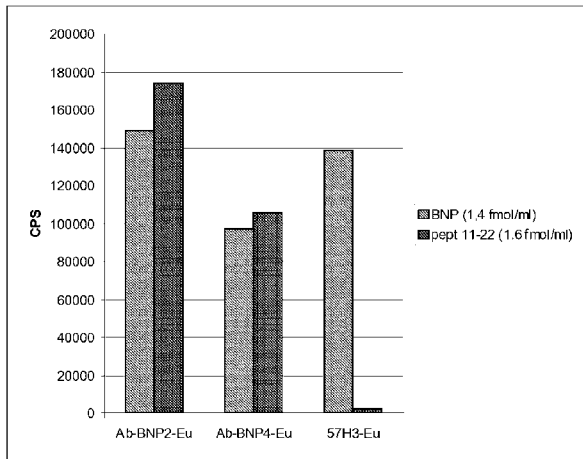
【 図 2 B 】



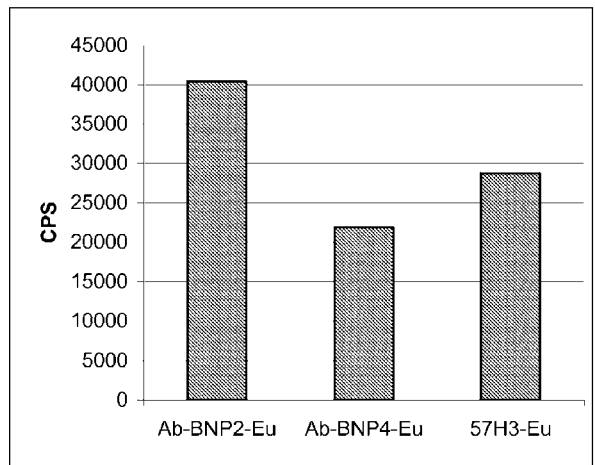
【 図 2 C 】



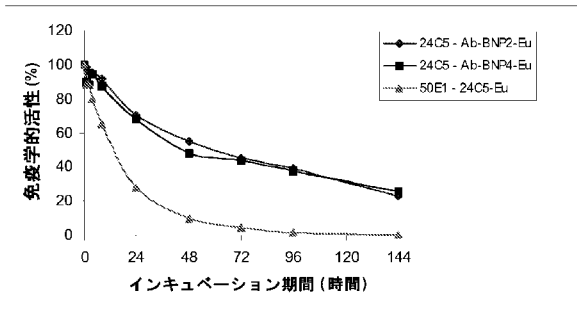
【 図 3 】



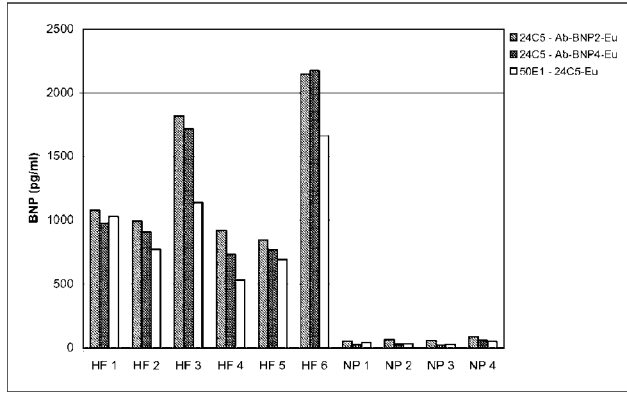
【 図 4 】



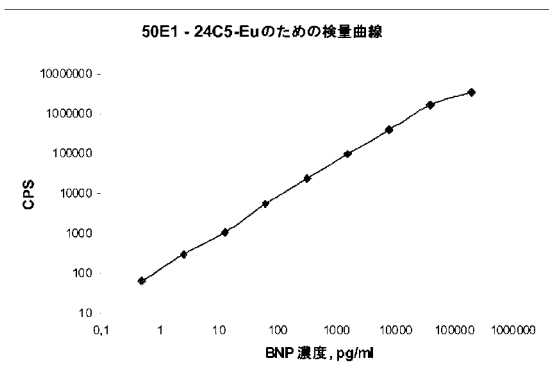
【 図 5 】



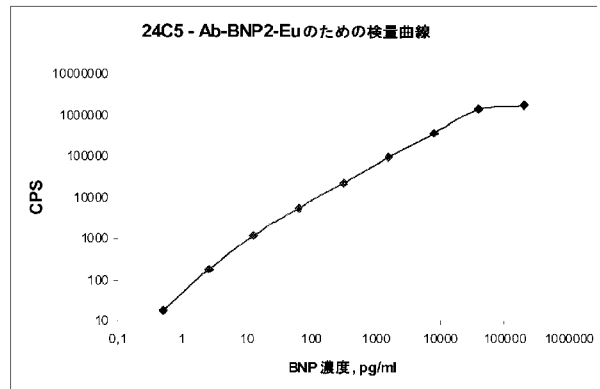
【 図 6 】



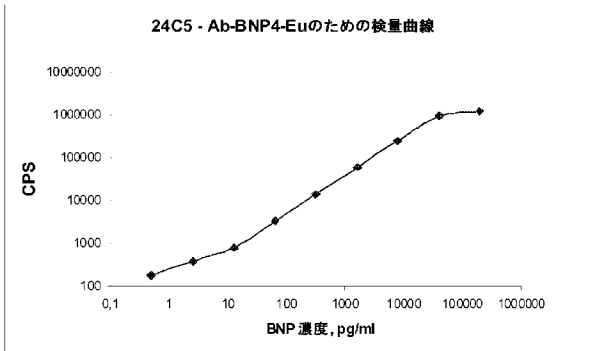
【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



【 図 7 C 】



【 配列表 】

2010523994000001.app

【 国際調査報告 】

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2008/050184

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
|---|--|--|
| IPC: see extra sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| IPC: G01N, C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| SE,DK,FI,NO classes as above | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | HAMMERER-LERCHER, A ET AL, "Natriuretic Peptides as Markers of Mild Forms of Left Ventricular Dysfunction: Effects of Assays on Diagnostic Performance of Markers", Clinical Chemistry 2004, Vol. 50, No 7, p. 1174 - 1183; page 1175, column 2, line 45 - page 1176, column 2, line 2; abstract | 2 |
| A | -- | 1,4 |
| PX | SEFERIAN, R. KARINA ET AL, "The Brain Natriuretic Peptide (BNP) Precursor Is the Major Immunoreactive Form of BNP in Patients with Heart Failure", Clinical Chemistry 2007, Vol. 53, No. 5, p. 866 - 873; page 868, column 1, line 10 - line 27 | 2 |
| | -- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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 | | Date of mailing of the international search report |
| 25 August 2008 | | 26-08-2008 |
| Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86 | | Authorized officer Terese Sandström/PR Telephone No. +46 8 782 25 00 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2008/050184

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | NAGATA, S ET AL, "A New Type Sandwich Immunoassay for Microcystin: Production of Monoclonal Antibodies Specific to the Immune Complex Formed by Microcystin and an Anti-microcystin Monoclonal Antibody", Natural Toxins 1999, Vol 7, p. 49 - 55; p. 50, column 1, line 16 - line 48; p. 54, column 2, line 7 - line 22; abstract -- | 1,3,4 |
| A | EP 1378242 A1 (BAYER CORP.), 7 January 2004 (07.01.2004), page 2, line 16 - line 32 -- | 1-4 |
| A | VOLLAND, H ET AL, "Recent developments for SPIE-IA, a new sandwich immunoassay format for very small molecules", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2004, Vol. 34, p. 737 - 752; p. 739, column 2, line 12 - p. 740, column 1, line 19 -- ----- | 1,3,4 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|--|
| International application No. PCT/FI2008/050184 |
|--|

International patent classification (IPC)**G01N 33/577** (2006.01)**C07K 16/26** (2006.01)**G01N 33/68** (2006.01)**Download your patent documents at www.prv.se**

The cited patent documents can be downloaded at www.prv.se by following the links:

- In English/Searches and advisory services/Cited documents (service in English) or
- e-tjänster/anförda dokument (service in Swedish).

Use the application number as username.

The password is **VJQAVAPQSB**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

28/06/2008

International application No.
PCT/FI2008/050184

| | | | | | | | |
|----|---------|----|------------|----|-------------|-----|------------|
| EP | 1378242 | A1 | 07/01/2004 | AT | 349219 | T | 15/01/2007 |
| | | | | AU | 2003204649 | A | 00/00/0000 |
| | | | | CA | 2430889 | A | 19/12/2003 |
| | | | | DE | 60310646 | D,T | 04/10/2007 |
| | | | | JP | 2004029021 | A | 29/01/2004 |
| | | | | US | 20040067889 | A | 08/04/2004 |

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 カトゥルーカ, アレクセイ, ジー.

フィンランド国、エフアイ - 2 0 6 1 0 トウルク、ナパトゥルンカトゥ 3 イー 3 2

(72)発明者 フィラトフ, ブラディミール, エル.

ロシア国、1 1 7 6 4 7、モスクワ、アール . 1 2 1、アカデミカ カピッシ エスティー . 3 0

(72)発明者 コロソヴァ, オルガ, プイ.

ロシア国、1 1 7 1 9 8、モスクワ、エーピーピー . 3 5 5、オストロピチアノヴァ 9 / 4

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA19 DA13

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50 FA74

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | <无法获取翻译> | | |
| 公开(公告)号 | JP2010523994A5 | 公开(公告)日 | 2011-03-24 |
| 申请号 | JP2010502538 | 申请日 | 2008-04-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 西特斯特有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Hyutesuto Aerutede. | | |
| [标]发明人 | タムーナタリアエヌ カトウルーカアレクセイジー フィラトフブラディミールエル コロソヴァオルガブイ | | |
| 发明人 | タムー,ナタリア,エヌ. カトウルーカ,アレクセイ,ジー. フィラトフ,ブラディミール,エル. コロソヴァ,オルガ,ブイ. | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/577 C07K16/18 C12P21/08 | | |
| CPC分类号 | C07K16/26 C07K2317/32 C07K2317/34 G01N33/6887 G01N33/6893 G01N33/74 G01N2333/58 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.B G01N33/577.B C07K16/18.ZNA C12P21/08 | | |
| F-TERM分类号 | 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 | | |
| 优先权 | 2007005251 2007-04-13 FI 60/911603 2007-04-13 US | | |
| 其他公开文献 | JP2010523994A JP5686593B2 | | |

摘要(译)

本发明涉及用于检测BNP，proBNP及其片段的免疫测定。基本上该测定包括：a) 使抗原与对应于BNP的氨基酸11-22的片段特异的第一抗体接触，或与包含所述序列的至少三个氨基酸的该肽的一部分接触，以获得第一顺序免疫复合物。b) 使步骤(a)中获得的一级免疫复合物与识别所述一级复合物的第二抗体接触，以获得二级免疫复合物，其中所述抗体不能识别游离BNP，proBNP或游离第一抗体；c) 检测二阶免疫复合物。