



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **325020**

(13) **B1**

**NORGE**

(51) Int Cl.

*G01N 33/53 (2006.01)*

*G01N 33/68 (2006.01)*

*G01N 33/74 (2006.01)*

### Patentstyret

---

(21)	Søknadsnr	20001273	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.09.10 PCT/JP98/04063
(22)	Inng.dag	2000.03.10	(85)	Videreføringsdag	2000.03.10
(24)	Løpedag	1998.09.10	(30)	Prioritet	1997.09.11, JP, 246684/97
(41)	Alm.tilgj	2000.05.10			
(45)	Meddelt	2008.01.14			
(73)	Innehaver	Shionogi & Co Ltd, 1-8, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, 541-0045 OSAKA-SHI, OSAKA, JP			
(72)	Oppfinner	Hidehisa Asada, Takatsuki-shi, Osaka, JP Hiroyuki Shimizu, Kobe-shi, Hyogo, JP Kazuaki Endou, Takatsuki-shi, Osaka, JP			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO			

---

(54)	Benevnelse	<b>Immunanalyse som er spesifikk for pattedyr-<math>\gamma</math>-BNP-derivater samt sett</b>			
(56)	Anførte publikasjoner	D1) JP, 5-507210 D2) JP, 3-297392 D3) Sawada Y. et al. FEBS letters (1997) vol. 400 (2), s. 177-182			
(57)	Sammendrag				

Immunanalyse som er spesifikk for pattedyr- $\gamma$ -BNP-derivater, at den anvender det første antistoff som er reaktivt med pattedyr- $\alpha$ -BNP og det andre antistoff som er reaktivt med pattedyr-prepro-BNP eller  $\gamma$ -BNP-derivater, og ikke  $\alpha$ -BNP, og der minst ett av det første og det andre antistoff eventuelt er påvisbart merket eller immobilisert.

## Teknisk område

Foreliggende oppfinnelse immunanalyse som er spesifikk for pattedyr- $\gamma$ -BNP-derivater samt sett.

Foreliggende oppfinnelse angår en immunanalyse for hjerne-natriuretisk peptid (BNP) som er et medlem av familien av natriuretiske peptider, og nærmere bestemt angår oppfinnelsen en immunanalyse for  $\gamma$ -BNP og derivater av dette.

## 10 Bakgrunnsteknikk

Familien av natriuretiske peptider inkluderer tre medlemmer, dvs atrielt natriuretisk peptid (ANP), hjerne-natriuretisk peptid (BNP) og type C natriuretisk peptid (CNP). Blant disse er ANP og BNP hjertehormoner som hovedsakelig blir biosyntetisert i, og utskilt fra, hjertet. ANP og BNP har lignende struktur. ANP er et peptid med 28 aminosyrer med en ringstruktur (sirkulær struktur) dannet ved hjelp av en disulfidbinding mellom den 7. og den 23. sisteinrest, mens BNP er et peptid med 32 aminosyrer med en ringstruktur dannet ved hjelp av en disulfidbinding mellom den 10. og den 26. sisteinrest. Disse modne peptider med 28 og 32 aminosyrer er blitt ansett å bli produsert fra sine respektive forløpere når en ledersekvens avspaltes intracellulært, eller ved sekresjonstidspunktet. Det vil si at det er blitt rapportert at humant BNP først blir syntetisert som et preprohormon (heretter referert til som prepro-BNP) i myokardiale celler, og dette spaltes før, eller ved tidspunktet for, sekresjon, mellom Ser<sup>26</sup>-His<sup>27</sup> for å gi pro-BNP (heretter referert til  $\gamma$ -BNP, og som videre spaltes mellom Arg<sup>102</sup>-Ser<sup>103</sup> for å gi BNP-32 (heretter referert til  $\alpha$ -BNP) og BNP(1-76), og at det førstnevnte oppviser aktiviteten. Det er blitt ansett at i det minste ringstrukturen må bibeholdes for ekspresjonen av aktivitet.

Sekresjonen av hjertehormoner stimuleres av forskjellige hjertesykdommer, den avspeiler godt endringen i hjertefunksjonen. Sekresjonen av ANP blir hovedsakelig akselerert når atriet utsettes for en belastning, mens biosyntesen og sekresjonen av BNP stimuleres når ventrikkelen utsettes for en belastning. Både ANP og BNP er således anvendelige som indikatorer ved diagnosen av hjertesykdom. I løpet av undersøkelsene av rollen til de respektive hormoner *in vivo* er de fordelaktige trekk ved BNP som en indikator for diagnostisering av hjertesykdom blitt åpenbare. Blodkonsentrasjonen av BNP er for eksempel kun 1/6 av ANP i et normalt individ, men den blir høyere enn ANP i pasienter med hjertesvikt eller lignende; blodkonsentrasjonen av BNP øker, slik som ANP, i tilfellet med hjertesvikt, og plasmakonsentrasjonen av BNP overskrider ofte konsentrasjonen av ANP og avspeiler mer nøyaktig alvorligheten av hjertedysfunksjon; plasmakonsentrasjonen av ANP og BNP øker i perifert blod, og økningshastigheten er høyere for BNP. BNP-nivå i

pasienter med hjertesvikt øker dessuten iblant til flere ti ganger til flere hundre ganger nivået i friske, normale individer, og endringen i BNP i tilfellene med hjertesvikt er så markert at ingen andre hormoner er sammenlignbare med dette. Av disse årsaker er nyttigheten av BNP-måling foreslått (Y. Saito et al., *Mebio*, 12(5), 28, 1995).

Under disse forutsetninger er det blitt foreslått en immunanalyse som anvender anti-BNP-antistoff og som er anvendelig for diagnose av hjerteinsuffisiens. Japansk patentpublikasjon (KOHYO) 7-507210 beskriver en metode for måling av  $\gamma$ -BNP (1-76) produsert ved bionedbrytning med protease eller lignende. Denne metode er imidlertid rettet på  $\gamma$ -BNP (1-76) som mangler delen (delene) som er essensielle for utøvelse av aktivitet, slik som ringstruktur, og kan derfor ikke bestemme hormonaktiviteten direkte.

Et analysesett for måling av  $\alpha$ -BNP med natriuretisk aktivitet er blitt markedsført ("BNP-32", Peninsula). Med dette produkt kan nedbrytningsproduktet av  $\alpha$ -BNP i blod, inkludert fragmenter som mangler aktivitet på grunn av deleringen av C-terminalt område, også måles. Dersom den lave blodkonsentrasjon av BNP tas i betraktning kan målingene som involverer nedbrytningsproduktene ikke ignoreres. Denne metode har således for store mangler til å være en analyse for BNP ved etablering av en nøyaktig diagnose av hjertesvikt.

Et sett for måling av BNP fritt for de ovennevnte mangler er blitt markedsført ("SHIONORIA BNP", Shionogi), som karakteristisk anvender et antistoff som gjenkjenner strukturen som essensiell for utøvelse av aktivitet. Denne metode vil imidlertid påvirkes betydelig av prosessen for oppsamling og lagring av blodprøver, fordi  $\alpha$ -BNP er ekstremt ustabil i oppsamlet blod. Det er derfor foreslått at prøven bør behandles spesielt, for eksempel ved tilsetning av et middel for inhibering av nedbrytning til et blodoppsamlingsrør, eller opprettholdelse av prøven ved lav temperatur for å oppnå pålitelige data. Slike prosedyrer kan vanskeliggjøre den omfattende kliniske anvendelse av BNP-analysesett.

JP 3-297392 gjør kjent et monoklonalt antistoff som kan anvendes i diagnostisk immunanalyse av BNP.

Sawada Y. et al. *FEBS letters* (1997) bind. 400(2), s. 177-182 undersøker kløyving av BNP i en hjertefeilmodell i rotte og identifiserer furin som den essensielle endoproteasen som er viktig for prosessering av BNP.

### **Beskrivelse av oppfinnelsen**

De foreliggende oppfinnere har utført omfattende forskning for det formål å etablere en nøyaktig metode for diagnostisering av hjertesykdommer som involverer BNP, og de har funnet at BNP eksisterer i blod i form av  $\gamma$ -BNP, eller dets nedbrytningsprodukt, som i det minste strukturelt omfatter  $\alpha$ -BNP-komponenten

(heretter referert til som "γ-BNP-derivat"), og ikke i form av α-BNP som hittil er blitt betraktet som dominerende. Oppfinnerne har også funnet at γ-BNP er stabilt enn α-BNP i blod, dvs at en rolle for den N-terminale struktur av γ-BNP, blant mange, vil være stabilisering av BNP. Dette indikerer at en organisme biosyntetiserer minst 2

5 typer av BNP-molekyler som deler BNP-aktiviteten, men som har forskjellig halveringstid. Disse funn gav oppfinnerne det syn at det er absolutt nødvendig å etablere en metode som ikke kun er spesifikk for α-BNP, men også for γ-BNP, for å oppnå en nøyaktig diagnose av hjertesykdommer.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en immunanalyse som er spesifikk

10 for pattedyr-γ-BNP-derivater, kjennetegnet ved at den anvender det første antistoff som er reaktivt med pattedyr-α-BNP, og det andre antistoff som er reaktivt med pattedyr-prepro-BNP, eller γ-BNP-derivater, og ikke reaktivt med α-BNP.

Som anvendt heri, refererer betegnelsen "pattedyr-α-BNP" til et peptid med lav molekylvekt og med natriuretisk aktivitet, som er avledet fra pattedyr-prepro-

15 BNP eller γ-BNP ved fjerning av det N-terminale område som et resultat av reaksjon ved den karboksyterminale ende av signalsekvensen. I tilfelle med humant BNP er α-BNP et peptid som består av 32 C-terminale aminosyrer (nr 103 – 134) av aminosyresekvensen SEQ ID NO: 1, og som har en ringstruktur. Den karboksyterminale ende av signalsekvensen på prepro-BNP-molekylet varierer litt, avhengig av arten.

20 Den er for eksempel nr 102 Arg for humant BNP, mens den er aminosyre nr 100 for grise- eller hunde-BNP.

Som anvendt heri refererer betegnelsen "pattedyr-γ-BNP" til et pro-BNP som omfatter et partielt peptid med 32 aminosyrer som tilsvarer α-BNP ved det karboksyterminale område. For humant γ-BNP er dette pro-BNP med 108 aminosyrer

25 fra nr 27 His til nr 134 His av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 1. Betegnelsen "prepro-BNP" referer til et peptid med 134 aminosyrer fra nr 1 Met til nr 134 His av aminosyresekvensen av SEQ ID NO: 1, for menneske.

Som anvendt heri, referer betegnelsen "pattedyr-γ-BNP-derivat" til et peptid-fragment avledet fra pattedyr-prepro-BNP eller γ-BNP, hovedsakelig gjennom *in vivo*-proteasereaksjonen, og dette fragment inkluderer, eller er større enn, α-BNP. Selv om et γ-BNP-derivat vil omfatte et molekyl med den samme eller en mindre størrelse sammenlignet med γ-BNP generelt, kan det omfatte et molekyl som er større enn γ-BNP. Dersom ikke annet er spesielt angitt inkluderer betegnelsen "γ-BNP-derivat", som anvendt heri, selve γ-BNP.

30

Betegnelsen "stabil", når anvendt heri i forbindelse med BNP, betyr at et BNP-molekyl opprettholder den C-terminale ringstruktur, inkludert C-terminalen av BNP, og natriuretiske aktivitet etter at det har gjennomgått nedbrytning med protease, og at aktiviteten ikke er vesentlig redusert selv 24 timer etter oppsamling av

35

blodprøver. I lys av denne definisjon er  $\gamma$ -BNP-derivatet som målstoffet (analytten) i den foreliggende immunanalyse, stabilt.

På den annen side betyr betegnelsen "ustabil" at en BNP-prøve gjennomgår degenerering med protease ved det C-terminale område, og at den natriuretiske aktivitet er betydelig redusert 24 timer etter oppsamling av blodprøver. I lys av denne definisjon er  $\alpha$ -BNP ustabil.

### Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 er et kromatogram oppnådd i et  $\alpha$ -BNP-analysesystem der gelfiltrerings-HPLC ble utført ved anvendelse av Superdex 75 på en plasmaprøve. I figur 1 angir A posisjonen for elueringen av  $\alpha$ -BNP.

Figur 2 er et kromatogram oppnådd i et  $\alpha$ -BNP-analysesystem der gelfiltrerings-HPLC ble utført ved anvendelse Superdex 75 på en plasmaprøve forskjellig fra prøven vist i figur 1. I figur 2 angir A posisjonen av elueringen av  $\alpha$ -BNP.

Figur 3 er et kromatogram oppnådd i en immunanalyse spesifikk for  $\gamma$ -BNP der gelfiltrerings-HPLC ble utført ved anvendelse av Superdex 75 i en plasmaprøve samme som vist i figur 2. I figur 2 angir A posisjonen av elueringen av  $\alpha$ -BNP.

Figur 4 er et diagram som viser forholdet mellom lagringstiden og BNP-immunreaktivitet for  $\alpha$ -BNP oppbevart i humant plasma ved 25 °C.

Figur 5 er et diagram som viser forholdet mellom lagringstiden og BNP-immunreaktivitet for  $\gamma$ -BNP oppbevart i humant plasma ved 4 °C.

### Beste måte for utøvelse av oppfinnelsen

I en utførelsesform av foreliggende oppfinnelse angår den en fremgangsmåte som benytter 2 antistoffer, der det første antistoff er reaktivt med pattedyr- $\alpha$ -BNP og det andre antistoff er reaktivt med prepro-BNP eller  $\gamma$ -BNP-derivater, og er ikke reaktivt med  $\alpha$ -BNP.

Antistoffer anvendt i den foreliggende fremgangsmåte kan være monoklonale eller polyklonale antistoffer. Det første antistoff kan fremstilles i overensstemmelse med en metode kjent i teknikken, ved anvendelse som antigen av et humant- $\alpha$ -BNP som er kommersielt tilgjengelig eller kjemisk syntetisert, eller et partielt peptid av dette. Alternativt kan det også anvendes et monoklonalt antistoff som medfølger et kommersielt tilgjengelig  $\alpha$ -BNP-analysesystem (sett) for måling av  $\alpha$ -BNP ("SHIONORIA", Shionogi), som er reaktivt med det C-terminale område av  $\alpha$ -BNP.

Som det andre antistoff kan det anvendes ethvert antistoff, forutsatt at det tilfredsstillende ovenfor angitte betingelser. Foretrukne eksempler på slike antistoffer inkluderer de som er spesifikke for aminosyresekvensen vist ved aminosyrer nr. 27 –

102 av SEQ ID NO: 1, eller metabolitter derav.  $\gamma$ -BNP-derivatene, som en analytt som skal måles ved hjelp av den foreliggende fremgangsmåte, inkluderer fortrinnsvis minst den partielle aminosyresekvens vist ved aminosyrer nr 27 –134 av SEQ ID NO: 1, i tilfelle med humant BNP. I en foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse rettes det således fortrinnsvis spesiell oppmerksomhet mot utvelgelse av et antigen for å oppnå et antistoff som er i stand til å gjenkjenne aminosyresekvensen vist ved aminosyrer nr 27 –102. Fremstillingen av et slikt antistoff kan utføres ved hjelp av enhver metode kjent i teknikken. Teoretisk kan  $\gamma$ -BNP-molekylet spaltes ved hjelp av protease på steder som tilsvarer nr 47 (Arg), nr 53 (Lys) og nr 72 (Arg) i aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 1, og et antistoff som gjenkjenner en aminosyresekvens vist ved aminosyrer nr 73 – 102 av SEQ ID NO: 1, kan derfor anvendes som det andre antistoff.

Analysen ifølge foreliggende oppfinnelse kan enten være en kompetitiv analyse eller en Sandwich-analyse, og et antistoff som skal anvendes kan være et monoklonalt eller polyklonalt antistoff.

Minst ett av det første og det andre antistoff kan være påvisbart merket eller immobilisert på et fast støttemateriale.

Metoden for merking eller immobilisering av et antistoff er kjent for fagfolk. Eksempler på markører inkluderer, uten begrensning, radioaktive isotoper, enzymer, fluorescerende stoffer, luminescerende stoffer og partikler. Merkingen av et antistoff kan utføres ifølge en metode kjent for fagfolk, for eksempel metoden beskrevet av Kono et al. (Kaku-Igaku Gijutu, 13 (1), 2, (1993)).

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre et sett for immunanalyse som er spesifikt for pattedyr- $\gamma$ -BNP-derivater, kjennetegnet ved at det omfatter 2 antistoffer der det første antistoff er reaktivt med pattedyr- $\alpha$ -BNP og det andre antistoff er reaktivt med pattedyr-prepro-BNP eller  $\gamma$ -BNP-derivater, og er ikke reaktivt med  $\alpha$ -BNP.

Settet ifølge oppfinnelsen kan anvendes for en kompetitiv analyse eller en Sandwich-analyse, og et antistoff skal anvendes kan være et monoklonalt eller polyklonalt antistoff.

Minst ett av det første og det andre antistoff kan være merket påvisbart eller immobilisert på et fast støttemateriale. Settet ifølge oppfinnelsen kan videre inneholde et middel for påvisning av markøren. Eksempler på markør inkluderer, uten begrensning, radioaktive isotoper, enzymer, fluorescerende stoffer, luminescerende stoffer eller partikler.

De følgende eksempler og testeksempler gis for ytterligere å illustrere foreliggende oppfinnelse uten å begrense oppfinnelsens ramme.

Eksempel 1**Måling av  $\gamma$ -BNP-derivater ved Sandwich-IRMA**

I de følgende eksempler er de vanlige reagenser som anvendes av spesiell kvalitet fra Wako Pure Chemicals Industries, Ltd. eller Nacalai Tesque, Inc. Det bovine serum albumin (BSA) er innkjøpt fra Sigma.

## (1) Fremstilling av plasmaprøve

1) Venøst blod ble oppsamlet fra pasienter med hjertesykdom eller fra friske, frivillige individer, og plassert i blodoppsamlingsrør inneholdende EDTA og aprotinin (500 KIU/l, Sigma) avledet fra bovin lunge. Rørene ble sentrifugert ( $\times 2000$  g ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) i 5 minutter med H-107RGA (Kokusan) for å separere blodceller. De resulterende plasmaprøver ble nedfrosset og lagret ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  inntil anvendelse.

2) Plasmaprøvene preparert under 1) ovenfor fra pasienter med hjertesykdom eller friske, frivillige individer, ble fraksjonert ved hjelp av gelfiltrerings-HPLC-system LC10A (Shimadzu) utstyrt med Superdex 75 10/30-kolonne (Pharmacia). Etter ekvilibrering av kolonnen med 0,1 M fosfatbuffer (pH 7,5, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA) ved en strømningshastighet på 1 ml/minutt, ble 1 ml plasmaprøve injisert, og 1 ml av utløpet eluert fra kolonnen ble oppsamlet. Hver fraksjon ble underkastet måling ved hjelp av analysesystemer for måling av  $\alpha$ -BNP eller  $\gamma$ -BNP som beskrevet i henholdsvis (2)-2) og (2)-3) nedenfor.

(2) Konstruksjon av analysesystem for måling av  $\alpha$ -BNP- eller  $\gamma$ -BNP-derivat.

1) I analysesystemet ble de følgende peptider, antistoffer og sett anvendt.

- Humant  $\alpha$ -BNP (Peptide Institute)
- Antistoff mot det aminoternale område av  $\gamma$ -hBNP (aminosyrer nr 27 – 64 av SEQ ID NO: 1) (Peptide Institute)
- Monoklonalt antistoff mot den karboksyterminale struktur av  $\alpha$ -BNP (BC203). BC203 et immobilisert antistoff medfølgende SHIONORIA BNP-sett (Shionogi), hvor et monoklonalt antistoff rettet mot den karboksyterminale struktur av  $\alpha$ -BNP er immobilisert på kuler.
- Monoklonalt antistoff mot ringstrukturen av  $\alpha$ -BNP (KYBNPII). KYBNPII er et monoklonalt antistoff medfølgende SHIONORIA BNP-sett (Shionogi), som er rettet mot ringstrukturen (112 – 128) av  $\alpha$ -BNP og er merket med  $^{125}\text{I}$ .

2) Måling av plasmafraksjon ved hjelp av analysesystem for  $\alpha$ -BNP.

Målingen av  $\alpha$ -BNP ble utført ved hjelp av det kommersielt tilgjengelige "SHIONORIA BNP-sett" (Shionogi). Analysen er basert på sandwich-IRMA (immunradiometrisk analyse) som benytter et monoklonalt antistoff KYBNPII

spesifikt for ringstrukturen av  $\alpha$ -BNP, og et annet monoklonalt antistoff BC203 spesifikt for den karboksyterminale struktur av  $\alpha$ -BNP. Analysen ble utført i overensstemmelse med fabrikantens instruksjoner.

5 Dette vil si at 100  $\mu$ l av hver av prøvene for analyse, eller standardløsninger (0, 4, 10, 150, 600 eller 2000 pg/ml av en  $\alpha$ -BNP-løsning) ble overført til et polystyrentestrør. Til testrøret ble det tilsatt 200  $\mu$ l jodmerket anti-BNP-antistoff ( $^{125}\text{I}$ ) løsning, etterfulgt av en polystyrenkule på hvilken anti-BC203-antistoff var blitt immobilisert. Blandingen ble omrørt og tillatt og reagere ved henstand i 18 timer ved 4 °C. Etter vask 2 ganger med 2 ml vaskeløsning ble radioaktiviteten målt på  $\gamma$ -teller  
10 ARC-600 (Aloka). Resultatene er vist i figur 1 og 2.

3) Måling av plasmafraksjon ved hjelp av analysesystem for  $\gamma$ -BNP-derivat.

Et antistoff mot den aminoternale del (nr 27 – 64) av  $\gamma$ -hBNP ble først merket med  $^{125}\text{I}$ .

15 IgG ble rensset fra anti-serum (Peptide Institute) fremstilt mot den aminoternale del (aminosyrer nr 27 – 64 av SEQ ID NO: 1) av  $\gamma$ -hBNP, ved anvendelse av MASPII-sett (Bio-Rad) og erstattet med 0,5 M fosfatbuffer (pH 7,5) ved anvendelse av Centricon 30 (Amicon). Merkingen av antistoff ble utført ved hjelp av kloramin-T-metoden. Til et glassrør ble det tilsatt 170  $\mu$ l rensset IgG-løsning (77,6  $\mu$ g, IgG), og 10  $\mu$ l Na  $^{125}\text{I}$ -løsning (34,2 MBq, Amersham) ble tilsatt. Etter tilsetning av  
20 0,1 % kloramin-T-løsning (20  $\mu$ l), ble blandingen kraftig omrørt ved romtemperatur i 30 sekunder. Reaksjonen ble stanset ved tilsetning av 20  $\mu$ l 0,25 % natriumpyrosulfidløsning og 20  $\mu$ l 5 % vandig kaliumjodidløsning. Når reaksjonsblandingen ble behandlet med Ampure SA-kolonne (Amersham) for å fjerne ureagert  $^{125}\text{I}$  og for  
25 avsalting, ble det oppnådd en løsning inneholdende  $^{125}\text{I}$ -merket antistoff.

Sandwich-IRMA ble deretter utført i plasmafraksjoner ved anvendelse av det resulterende antistoff og polystyrenkuler applisert med et antistoff som gjenkjenner karboksyterminale struktur av  $\alpha$ -BNP (BC203).

100  $\mu$ l av hver av prøvene for analyse ble plassert i polystyrenrør, etterfulgt  
30 av 200  $\mu$ l 0,1 M fosfatbuffer (pH 7,5, 0,3 M, 5 mM EDTA, 0,2 % BSA og 500 KIU/l bovint lungeaprotinin (Sigma), og et polystyrenrør på hvilket BC203-antistoff var blitt immobilisert. Blandingen ble omrørt og tillatt og reagere med henstand i 18 timer ved 4 °C. Etter vask 2 ganger med 2 ml vaskeløsning ble 300  $\mu$ l  $^{125}\text{I}$ -merket antistoff-løsning tilsatt. Blandingen ble omrørt og tillatt å reagere ved henstand i 18 timer ved  
35 4°C. Etter vask 2 ganger med 2 ml vaskeløsning ble radioaktiviteten målt på en  $\gamma$ -teller ARC-600 (Aloka). Resultatene er vist i figur 3.

(3) Resultater

Figur 1, 2 og 3 viser kromatogrammene fra gelfiltrerings-HPLC av plasmaprøver fra pasienter, hvor A er posisjonen for elueringen av  $\alpha$ -BNP.

Figur 1 viser resultatet av målingen utført ved hjelp av  $\alpha$ -BNP-analysesettet beskrevet i (2)-2) ovenfor. I figur 1, representerer den vertikale aksekonsentrasjonen av BNP-lignende stoffer i hver fraksjon, og den horisontale akse viser volumet av løsningen eluert fra kolonnen som målt ved hjelp av SHIONORIA-BNP-sett. Fylte trekanter, åpne kvadrater og åpne romber representerer henholdsvis målingene i forskjellige plasmaprøver.

Figur 2 viser resultatet fra målingen utført ved hjelp av  $\alpha$ -BNP-analysesett beskrevet i (2)-2) ovenfor i prøver forskjellige fra de som er vist i figur 1. I figur 2 representerer den vertikale akse konsentrasjonen av BNP-lignende stoffer i hver fraksjon, og i den horisontale akse viser volumet av løsning eluert fra kolonnen som målt ved hjelp av SHIONORIA-BNP-sett. De fylte trekanter og fylte kvadrater viser henholdsvis målingene i forskjellige plasmaprøver.

Fra figur 1 og 2 fremgår det at det eksisterer stoffer med molekylvekt høyere enn  $\alpha$ -BNP og med BNP-lignende immunreaktivitet i plasma fra pasienter med hjertesykdom, og at de er de viktigste stoffer med BNP-immunreaktivitet.

Figur 3 viser resultatene fra målingen utført ved hjelp av  $\gamma$ -BNP-analysesettet beskrevet i (2)-3) ovenfor i de samme prøver som vist i figur 2. I figur 3 representerer den vertikale akse radioaktiviteten målt ved hjelp av  $\gamma$ -BNP-immunanalysesystemet, og den horisontale akse viser volumet av løsning eluert fra kolonnen. De fylte sirkler representerer målinger av  $\alpha$ -BNP oppnådd etter fraksjonering av human  $\alpha$ -BNP-løsning ved hjelp HPLC, på lignende måte som beskrevet i tilfellet med plasma.

Fra figur 3 fremgår det at immunanalysen spesifikk for  $\gamma$ -BNP-derivat ifølge foreliggende oppfinnelse, kan påvise de viktigste stoffer med BNP-immunreaktivitet, men kan ikke påvise  $\alpha$ -BNP i det hele tatt.

Resultatene ovenfor indikerer at immunanalysen for  $\gamma$ -BNP ifølge foreliggende oppfinnelse er ufølsom for  $\alpha$ -BNP, men spesifikk for  $\gamma$ -BNP-derivater. Det fremgår dessuten også at  $\gamma$ -BNP er det viktigste stoff med BNP-immunreaktivitet.

### Testeksempel 1

#### **Stabilitet av $\gamma$ -BNP-derivater og $\alpha$ -BNP i plasma.**

Fraksjoner som mistenkes å inneholde  $\gamma$ -BNP-derivater ble oppsamlet fra fraksjonene oppnådd ved behandling av plasmaprøver oppsamlet fra pasienter med hjertesykdom, ved hjelp av gelfiltrering-HPLC. Venøst blod ble oppsamlet fra friske, frivillige individer ved anvendelse av blodopsamlingsrør inneholdende EDTA i fravær av bovint lungeaprotinin. Plasmaprøver (den minimale deteksjonsgrense av  $\alpha$ -BNP < 4 pg/ml) ble preparert på en måte lignende den beskrevet i (1)-1) ovenfor. Plasmaprøvene ble hensatt i 0, 2, 6, 24 timer ved romtemperatur (25 °C) etter tilsetning av fraksjonene. Stabiliteten av BNP-derivatet ble evaluert ved bestemmelse

av BNP-immunreaktiviteten i plasmaprøven ved hjelp av SHIONORIA BNP-sett for analysering av  $\alpha$ -BNP.

Separat ble stabiliteten av  $\alpha$ -BNP evaluert ved anvendelse av en plasmaprøve preparert ved tilsetning av kjemisk syntetisert  $\alpha$ -BNP til plasma oppsamlet fra friske, frivillige individer, og henstand ved 0, 2, 6 og 24 timer ved 4 °C i fravær av bovint lungeaprotinin, som beskrevet ovenfor. BNP-immunreaktiviteten i plasmaprøven ble bestemt ved hjelp av SHIONORIA BNP-sett på samme måte som beskrevet ovenfor.

Stabiliteten av  $\gamma$ -BNP-derivater og  $\alpha$ -BNP i plasmaprøver er vist i henholdsvis figur 4 og 5.

Fra figur 4 fremgår det at  $\gamma$ -BNP-derivater ikke taper vesentlig immunreaktivitet sammenlignet med den innledende aktivitet, selv etter 24 timers henstand ved 25 °C. I motsetning til dette fremgår det fra figur 5 at  $\alpha$ -BNP taper immunreaktiviteten til ca 40 % basert på den innledende aktivitet, etter 24 timers henstand ved 4 °C.

De ovenfor beskrevne resultater viser at  $\alpha$ -BNP er langt mindre stabilt sammenlignet med  $\gamma$ -BNP-derivat i blod, og at det sistnevnte er langt mer egnet for diagnose av hjertesykdommer enn det førstnevnte.

### **Industriell anvendelighet**

Som nevnt ovenfor øker noen ganger BNP-nivået i pasienter med hjertesvikt til flere 10 ganger til 100 ganger nivået i friske, normale individer, og endringen i BNP i tilfellene med hjertesvikt er så markert at ingen andre hormoner kan sammenlignes med denne. Nyttigheten av BNP-målinger skulle således være vist.

Immunanalysen ifølge foreliggende oppfinnelse tillater spesifikk bestemmelse av  $\gamma$ -BNP-derivater uten å måle  $\alpha$ -BNP. Den foreliggende immunanalyse kan således være et klinisk signifikant middel for diagnostisk og prognostisk overvåkning av hjertesvikt som fører til en konklusjon/bedømmelse som er noe forskjellig fra konvensjonelle BNP-analyser.

Det er dessuten beskrevet heri for første gang at  $\gamma$ -BNP, som er et målstoff for analysering ved hjelp av den foreliggende fremgangsmåte, er stabilt i blod. Immunanalysen ifølge foreliggende oppfinnelse tilveiebringer derfor stabile og pålitelige kliniske data uten å bli påvirket av prosessen med oppsamling eller lagring av prøver, eller av tiden fra oppsamlingen til målingen. Immunanalysen ifølge oppfinnelsen fordrer dessuten ikke noen spesielle forhåndsbehandlinger av blodprøver og gir derfor kliniske data på en enkel måte og bidrar derved til etablering av ytterst nøyaktig diagnose av hjertesykdommer.

Patentkrav

- 5 1. Immunanalyse som er spesifikk for pattedyr- $\gamma$ -BNP-derivater, karakterisert ved at den anvender det første antistoff som er reaktivt med pattedyr- $\alpha$ -BNP og det andre antistoff som er reaktivt med pattedyr-prepro-BNP eller  $\gamma$ -BNP-derivater, og ikke  $\alpha$ -BNP.
- 10 2. Immunanalyse ifølge krav 1, karakterisert ved at  $\gamma$ -BNP-derivatene omfatter aminosyresekvensen vist ved aminosyrer nr 27 – 102 av SEQ ID NO: 1.
- 15 3. Immunanalyse ifølge krav 1, karakterisert ved at det andre antistoff er spesifikt for aminosyresekvensen vist ved aminosyrer nr 27 – 102 av SEQ ID NO: 1.
- 20 4. Immunanalyse ifølge ethvert av kravene 1 til 3, karakterisert ved at minst ett av det første og det andre antistoff er påvisbart merket eller immobilisert.
- 25 5. Immunanalyse ifølge ethvert av kravene 1 til 3, karakterisert ved at den påvisbare markør er en radioaktiv isotop, et enzym, et fluorescerende stoff, et luminescerende stoff eller en partikkel.
- 30 6. Sett for immunanalyse som er spesifikk for pattedyr- $\gamma$ -BNP-derivater, karakterisert ved at det omfatter det første antistoff som er reaktivt med pattedyr- $\alpha$ -BNP og det andre antistoff som er reaktivt med pattedyr-prepro-BNP eller  $\gamma$ -BNP-derivater, og ikke med  $\alpha$ -BNP.
- 35 7. Sett ifølge krav 6, karakterisert ved at minst ett av det første og det andre antistoff er påvisbart merket eller immobilisert.
8. Sett ifølge krav 7, karakterisert ved at det ytterligere omfatter et middel for påvisning av markøren.

## SEQUENCE LISTING

<110> Shionogi & Co., Ltd.  
 <120> Immunoassay for BNP  
 5 <130> 660984  
 <140>  
 <141>  
 <150> JP 246684/1997  
 <151> 1997-9-11  
 10 <160> 2  
 <117> Word (MS-DOS text)  
 <210> 1  
 <211> 436  
 <212> DNA  
 15 <213> human  
 <400> 1  
 atg gat ccc cag aca gca cct tcc cgc gcg ctc ctg ctc ctg ctc ttc 48  
 Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe  
 1 5 10 15  
 20 ttg cat ctg gct ttc ctg gga ggt cgt tcc cac ccg ctg ggc agc ccc 96  
 Leu His Leu Ala Phe Lue Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly Ser Pro  
 20 25 30  
 ggt tca gcc tcg gac ttg gaa acg tcc ggg tta cag gag cag cgc aac 144  
 Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn  
 25 35 40 45  
 cat ttg cag ggc aaa ctg tcg gag ctg cag gtg gac cag aca tcc ctg 196  
 His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu  
 50 55 60

gag ccc ctc cag gag agc ccc cgt ccc aca ggt gtc tgg aag tcc cgg 244  
 Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg  
 65 70 75 80  
 gag gta gcc acc gag ggc atc cgt ggg cac cgc aaa atg gtc ctc tac 292  
 5 Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Try  
 85 90 95  
 acc ctg cgg gca cca cga agc ccc aag atg gtg caa ggg tct ggc tgc 340  
 Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys  
 100 105 110  
 10 ttt ggg agg aag atg gac cgg atc agc tcc tcc agt gcc ctg ggc tgc 388  
 Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys  
 115 120 125  
 aaa gtg ctg agg cgg cat 436  
 Lys Val Leu Arg Arg His  
 15 130 134  
 <210> 2  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> human  
 20 <400> 2  
 Met Asp Pro Gln Thr Ala Pro Ser Arg Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe  
 1 5 10 15  
 Leu His Leu Ala Phe Leu Gly Gly Arg Ser His Pro Leu Gly Ser Pro  
 20 25 30  
 25 Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn  
 35 40 45  
 His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu  
 50 55 60



Fig. 1

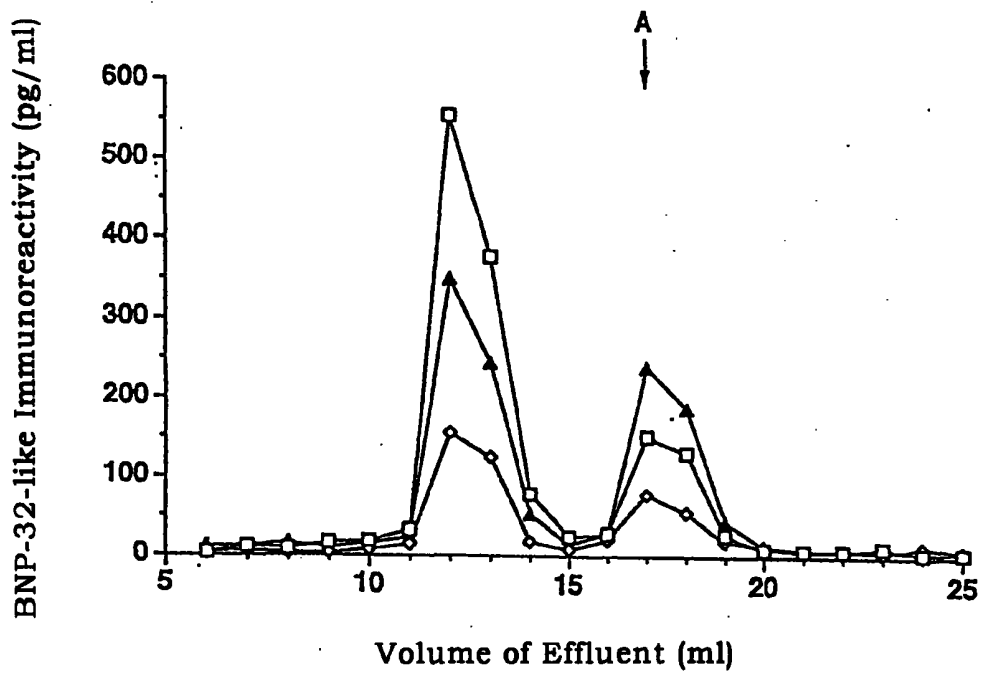
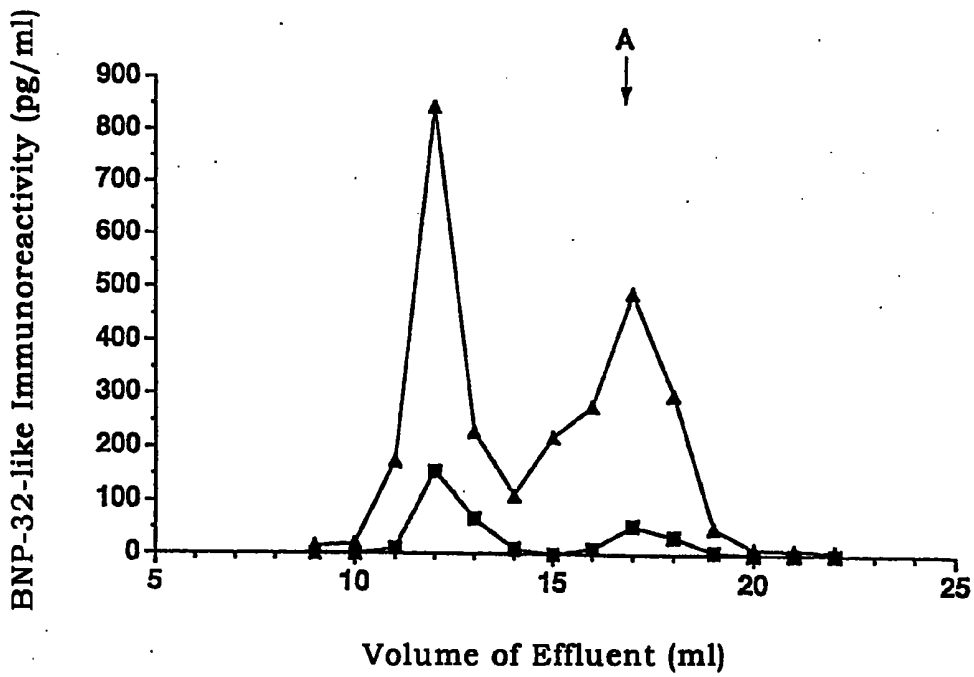


Fig. 2



3/5

Fig. 3

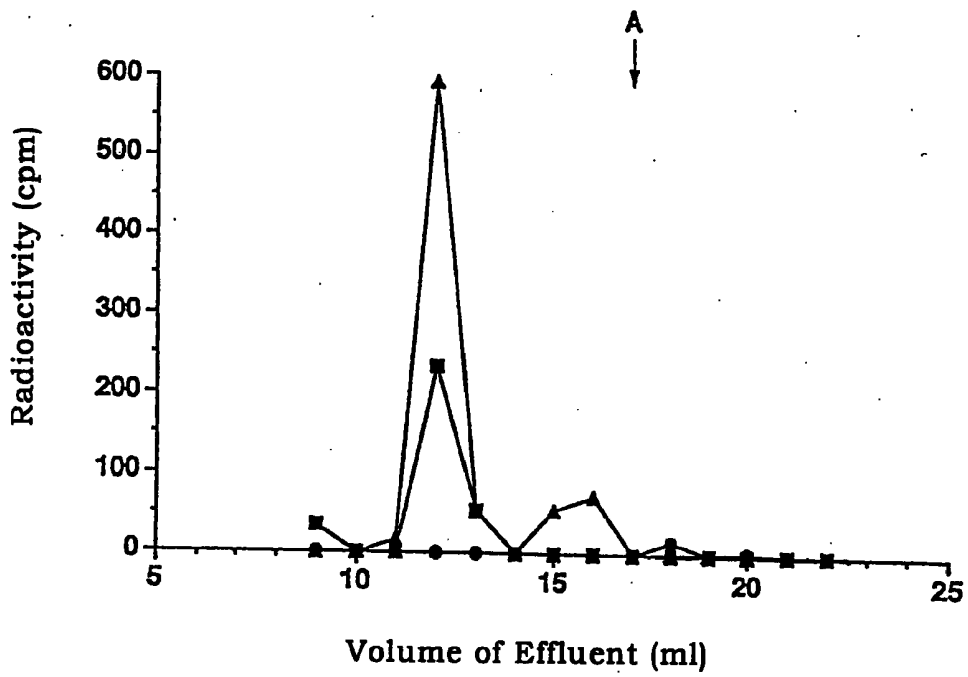


Fig. 4

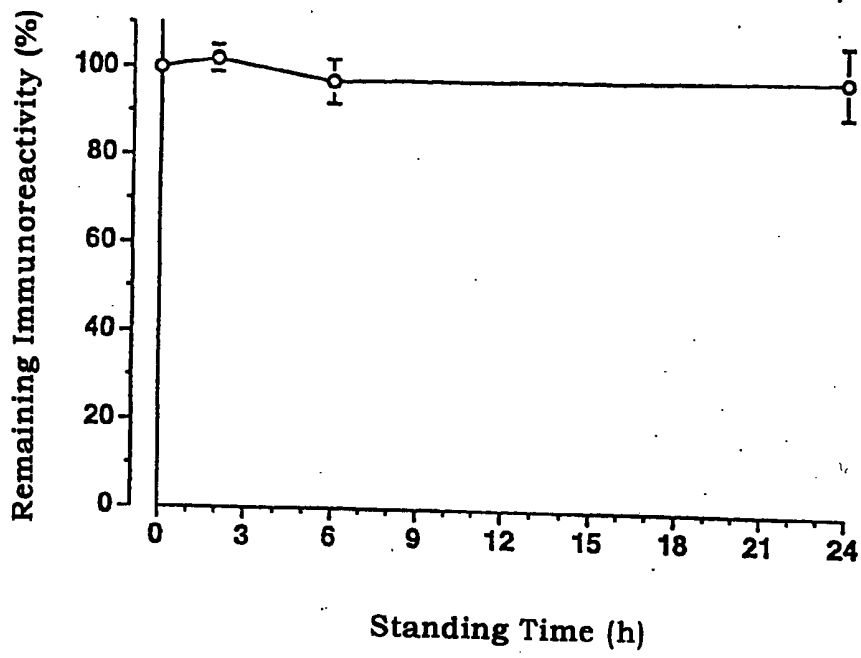


Fig. 5

