

(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2013-525792  
(P2013-525792A)

(43) 公表日 平成25年6月20日(2013.6.20)

| (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 D        | 4 B 0 2 4   |
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/53 U        | 4 B 0 6 4   |
| CO 7 K 16/18 (2006.01)  | GO 1 N 33/543 5 4 5 A | 4 H 0 4 5   |
| C 1 2 N 15/02 (2006.01) | CO 7 K 16/18 Z N A    |             |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 B       |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-506662 (P2013-506662)  
 (86) (22) 出願日 平成23年4月28日 (2011.4.28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成24年12月26日 (2012.12.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/056763  
 (87) 国際公開番号 WO2011/135035  
 (87) 国際公開日 平成23年11月3日 (2011.11.3)  
 (31) 優先権主張番号 10161375.0  
 (32) 優先日 平成22年4月28日 (2010.4.28)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 510129509  
 ユーロディアグノスティカ アーベー  
 Euro-Diagnostica AB  
 スウェーデン国 マルメ ビー.オー.ボックス 50117 ユーロディアグノスティカ アーベー  
 (74) 代理人 100075557  
 弁理士 西教 圭一郎  
 (72) 発明者 ストリドスベリ, マッツ  
 スウェーデン国 ウプサラ グランドウンゲヴァーゲン 13  
 (72) 発明者 ソマリン, イングヴェ  
 スウェーデン国 マルメ メデオ  
 Fターム(参考) 4B024 AA12 BA44 HA15  
 4B064 AG27 DA14

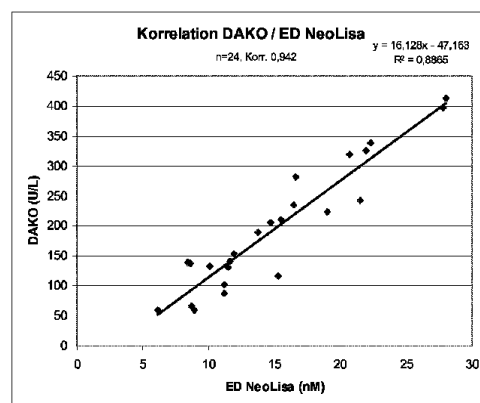
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クロモグラニンAのための免疫測定法、抗体およびキット

(57) 【要約】

本発明は、ヒトCGAのアミノ酸配列のアミノ酸配列236~251または264~279によって表されるポリペプチドのエピトープに反応するモノクローナル抗体に関する。さらに本発明は、CGAのための免疫測定法におけるこれらのモノクローナル抗体の使用と、これらの2つの抗体を含む免疫試薬と、両方のモノクローナル抗体に基づくCGA含有免疫試薬の測定のための試験キットとに関する。

Fig. 2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

C G A ポリペプチドを測定するための方法であって、

試料を、C G A ポリペプチドの存在または量を測定するために、モノクローナル抗体のセットに反応させることを含み、

少なくとも1つのモノクローナル抗体が、ヒトC G Aのアミノ酸配列のアミノ酸配列236～251によって表わされるC G Aポリペプチド(配列番号2によって表わされる)のエピトープに反応し、少なくとも1つの他のモノクローナル抗体が、ヒトC G Aのアミノ酸配列のアミノ酸配列264～279によって表わされるC G Aポリペプチド(配列番号3によって表わされる)のエピトープに反応することを特徴とする方法。

10

## 【請求項 2】

(1)ヒトC G Aアミノ酸配列のアミノ酸236～251によって表わされるポリペプチド(配列番号2で表される)のエピトープに反応するモノクローナル抗体、および(2)ヒトC G Aアミノ酸配列のアミノ酸264～279によって表わされるポリペプチド(配列番号3で表される)のエピトープに反応するモノクローナル抗体からなる群から選択されることを特徴とする、C G Aポリペプチドに対するモノクローナル抗体。

## 【請求項 3】

請求項2に記載の抗体を含む免疫試薬であって、前記モノクローナル抗体が、

a) マイクロタイタープレートの壁などの固体支持体、または

b) 酵素、放射性元素もしくは化合物などの検出可能な標識、または

c) ビオチンもしくはストレプトアビジンなどの特異的結合試薬のいずれかに結合することを特徴とする免疫試薬。

20

## 【請求項 4】

C G Aを検出するための試験キットであって、少なくとも、

a) ヒトC G Aアミノ酸配列のアミノ酸236～251によって表わされるポリペプチド(配列番号2で表される)のエピトープに反応するモノクローナル抗体と、

b) ヒトC G Aアミノ酸配列のアミノ酸264～279によって表わされるポリペプチド(配列番号3で表される)のエピトープに反応するモノクローナル抗体とを含むことを特徴とする試験キット。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、クロモグラニンA(C G A)の測定のための方法に関する。さらに本発明は、C G Aに対するモノクローナル抗体と、それに基づく免疫試薬であって、本発明に係る測定法において用いることができる免疫試薬と、C G Aを測定するための方法において用いるための試験キットとに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

クロモグラニン(C G 's)およびセクレトグラニンは、脳内および散在性神経内分泌系に存在する、神経伝達物質およびペプチドホルモンと共に蓄えられる酸性タンパク質ファミリーを構成する(Winkler, H. & Fischer-Colbrie, R., 1992)。これらのタンパク質は、異なる遺伝子の産物であるが、それらは酸性アミノ酸残基の豊富さ、および翻訳後切断の潜在的な位置としての塩基性アミノ酸の数対などのいくつかの全体的な構造特性を共有する。C G 'sは、全身の神経内分泌細胞において、神経ペプチドおよびホルモンと共に蓄えられ、共放出される。ホルモン顆粒およびホルモンパッケージの産生におけるC G 'sの機能が示唆される。また、C G 'sは、ホルモン放出の抑制、血管拡張および抗微生物効果などの生物学的活性を示す、より小さな断片に切断されてもよい(Stridsberg M, 2000)。

40

## 【0003】

通常、神経内分泌由来の腫瘍は、C G Aの血中/血漿濃度の増加を示す(O' Connor, D

50

T, Deftos LJ, 1986)。神経内分泌腫瘍は、神経内分泌細胞に由来し、典型的な神経内分泌腫瘍は、カルチノイド腫瘍、褐色細胞腫、神経芽腫、小細胞肺癌、副甲状腺腺腫、下垂体腫瘍および膵島腫瘍であり、MEN1およびMEN2症候群を含む。これは、異なる神経内分泌腫瘍症候群、すなわちガストリン産生腫瘍、インスリン分泌性膵島細胞腫、グルカゴン産生腫瘍、ソマトスタチン産生腫瘍、膵ポリペプチド (PP) 産生腫瘍 (PPomas)、および非機能性内分泌腫瘍も含む(Eriksson, B. et al., 2000)。これらの腫瘍において、CGAが最高の血中マーカであることが示された(Bajetta, E. et al., 1999)。

#### 【0004】

このような理由から、CGAの定性的および定量的測定のための、特異的、正確かつ迅速な測定法を有することが望ましい。

10

#### 【0005】

CGAのためのいくつかの測定方法が報告された。US4,758,522は、標識CGAとCGAに対する抗体とを用いる競合測定法に基づいて、試料中のヒトCGAを測定する方法に関する。抗体に結合した、または結合していない標識CGAの量は、試料中のCGAの尺度として測定される。CGA試料は、内分泌または副腎由来の組織から得られてもよい。

#### 【0006】

EP1078266B1は、ヒトCGAの配列145~234のエピトープに特異的に結合する少なくとも1つの(モノクローナルまたはポリクローナル)抗体の使用に基づくCGA免疫測定法に関する。より具体的には、それは、CGAのための免疫測定法において、ヒトCGAの配列145~197のエピトープに特異的に結合する抗体、および/またはヒトCGAの配列219~234のエピトープに特異的に結合する抗体の使用に関する。必要に応じて、これら2つの抗体は、CGAの測定法において、ヒトCGAの配列250~301のエピトープに特異的に結合する抗体に組み合わせることができる。

20

#### 【0007】

当技術分野で公知の方法の欠点は、主に、天然CGAに隣接して一般的に存在するCGA由来ペプチドとの交差反応によって、偽陽性または偽陰性の結果が得られることである。特に、ポリクローナル抗体を用いる測定法は、そのような欠点に悩まされる。この問題を克服するために、モノクローナル抗体を用いることが示唆されたが、実際には、従来技術に記載されたようなモノクローナル抗体に基づくCGA測定法は、ポリクローナル抗体に基づく測定法よりもさらに劣るものである。

30

#### 【0008】

本発明は、これらの欠点を克服または改善する方法に関する。

#### 【発明の概要】

#### 【0009】

本発明に係る免疫測定法は、2つの新規で異なる抗体に特異的に結合するという事実に基づいて、CGAポリペプチドを検出する。1つの抗体は、CGAポリペプチドのエピトープの1つに特異的に結合し、他方の抗体は、CGAポリペプチドの別のエピトープに結合する。

40

#### 【0010】

一実施形態では、本発明は、CGAポリペプチドを測定するための方法であって、試料を、CGAポリペプチドの存在または量を測定するためにモノクローナル抗体のセットに反応させることを含み、少なくとも1つのモノクローナル抗体が、ヒトCGAのアミノ酸配列のアミノ酸配列236~251によって表わされるCGAポリペプチド(配列番号2によって表わされる)のエピトープに反応し、少なくとも1つの他のモノクローナル抗体が、ヒトCGAのアミノ酸配列のアミノ酸配列264~279によって表わされるCGAポリペプチド(配列番号3によって表わされる)のエピトープに反応する方法に関する。

#### 【0011】

本明細書において、ヒトCGAのアミノ酸配列は、1987年にKoneckiらによって報

50

告された439アミノ酸長の配列を意味し、配列番号1によって表わされる。用語CGAポリペプチドは、上述の疾患の診断に有用である、ヒトCGAの全長ポリペプチド配列またはその断片を表すことを意味する。好ましくは、そのような断片は、配列番号1および配列番号2に含まれるアミノ酸配列に反応するモノクローナル抗体に反応するエピトープを少なくとも含むべきである。

【0012】

本発明に係る免疫測定法は、様々な形態をとることができる。好ましくは、免疫測定法は、CGAタンパク質が2つの異なる抗体の間に挟まれるサンドイッチ形態に基づくものである。CGAに対する抗体の特異的結合の検出に適した形態は、たとえば酵素免疫測定法(ELISA)および放射性免疫測定法(RIA)である。また、他の検出方法が好適に用いられてもよい。

10

【0013】

他の実施形態によれば、本発明は、CGAに対するモノクローナル抗体であって、ヒトCGAアミノ酸配列のアミノ酸236~251によって表されるポリペプチドのエピトープに反応するモノクローナル抗体に関する。

【0014】

さらなる実施形態によれば、本発明は、CGAに対するモノクローナル抗体であって、ヒトCGAアミノ酸配列のアミノ酸264~279によって表されるポリペプチドのエピトープに反応するモノクローナル抗体に関する。

【0015】

本発明のさらなる実施形態によれば、本発明に係る方法に用いるための試験キットに関する。そのような試験キットは、少なくとも2つのモノクローナル抗体に基づく免疫試薬を含み、1つはヒトCGAアミノ酸配列のアミノ酸236~251によって表わされるポリペプチドのエピトープに反応し、他方は、ヒトCGAアミノ酸配列のアミノ酸264~279によって表わされるポリペプチドのエピトープに反応する。

20

【0016】

各抗体は、捕捉抗体として、または検出抗体として用いられてもよい。試験キットに含まれる免疫試薬は、測定方法および形態によって異なる。

【0017】

一実施形態では、抗体の少なくとも1つは、直接的または間接的に、酵素または放射性マーカなどの標識に結合してもよい。

30

【0018】

さらなる実施形態では、抗体の少なくとも1つは、マイクロタイタープレートなどの好適な固相に結合してもよい。

【0019】

さらなる実施形態では、抗体の少なくとも1つは、(お互いに結合することができる)ピオチンまたはストレプトアビジンなどの普遍的連結剤に結合してもよい。そのような連結剤は、測定法の工程の前またはその間に、固相または標識へ、抗体を間接的に結合させるために利用することができる。

【0020】

CGAの特定されたエピトープの1つに対するモノクローナル抗体を産生する細胞は、たとえば1975年にKoelerおよびMilsteinによって記載された方法によって得ることができる。

40

【0021】

さらに本発明は、それぞれヒトCGAアミノ酸配列のアミノ酸配列236~251および264~279によって表わされるポリペプチドのエピトープに反応するモノクローナル抗体に関する。

【0022】

結論として、本発明は、ポリクローナル抗体を採用する測定法の欠点を回避すると同時に、モノクローナル抗体を採用する従来技術の方法と比較して向上した特異性および感度

50

を有する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】CGAの検量線。

【図2】商用試験(Dako)と本発明に係る試験との比較。

【図3】第2商用試験(CIS-BIO)と本発明に係る試験との比較。

【図4】NEOLISAで分析された、107人の神経内分泌患者の血漿と120人の献血者の血漿とに由来する血漿。参照領域<3.0(赤線)。

【実施例】

【0024】

10

材料

CGAのペプチド236~251に対するモノクローナル抗体で被覆されたマイクロタイターストリップ(12×8)。

希釈液中にヒトCGAを含む検量用試料。Cal1=0nmol/L(希釈液)、Cal2=1nmol/L、Cal3=5nmol/L、Cal4=15nmol/L、Cal5=30nmol/L、Cal6=50nmol/L。

凍結乾燥ローコントロール(L)。

凍結乾燥ハイコントロール(H)。

30mLの希釈液(Dil)。

CGAのペプチド264~279に対する、HRP標識抗体を含むコンジュゲート150μL。100倍に濃縮した。

20

15mLのコンジュゲートバッファ

15mLのTMB基質

15mLの停止液(0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。

35mLの洗浄液、20倍に濃縮した。

クロモグラニンAのELISA法

【0025】

手順

全ての溶液を室温で使用した。インキュベーションを室温(20~30)で行った。

試料の希釈およびインキュベーション

30

【0026】

全ての試料を、試験プレートに移す前に、別の希釈プレートで5倍希釈した。検量用試料と、ローコントロールと、ハイコントロールと、患者の血漿とを、使用前に全て50μLの血漿+200μLの希釈剤で希釈した。その後、その100μLを試験プレートへ2重に移す前に、上下にピペティングして十分に混合した。試験プレートを60分間インキュベートした。

試料のインキュベート後

【0027】

試験プレートは、ウェル毎に300μLの洗浄液で3回洗浄し、各回についてウェルを満たし、空にした。最後の洗浄後、吸収紙上でストリップを軽くたたいてウェルを空にした。

40

コンジュゲートの添加

100μLのコンジュゲートを各ウェルに添加した。

試験プレートを30分間インキュベートした。

コンジュゲートのインキュベート後

試験プレートを、上述のように洗浄した。

基質溶液を添加した。

100μLのTMB基質を各ウェルに添加し、試験プレートを15分間、暗所でインキュベートした。

停止液の添加

50

100  $\mu$ L の停止液を各ウェルに添加した。OD (光学密度) を、マイクロプレートリーダーで2時間以内に450 nmで読み取った。620 nmのODを基準波長として読み取った。

#### 実施例 1

##### モノクローナル抗体

#### 【0028】

ヒトCGAの、それぞれアミノ酸配列236~251 (さらに抗体2E8として本明細書に示される) およびアミノ酸配列264~279 (さらに抗体1H6として本明細書に示される) によって表わされるポリペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体は、基本的に1975年のKoelerおよびMilsteinの方法によって調製された。

10

#### 【0029】

抗体2E8は、捕捉抗体としてELISA法に用いられ、抗体1H6は、HRPに結合する検出用抗体として用いられる。

#### 実施例 2

##### CGAの酵素結合免疫測定法における検量線

6つの検量用試料のセットは、それぞれ検量用試料1について0 nmol/L、検量用試料2について1 nmol/L、検量用試料3について5 nmol/L、検量用試料4について15 nmol/L、検量用試料5について30 nmol/L、検量用試料6について50 nmol/Lの値となるように準備される。

キット内の検量用試料は、CGAに対応する合成ペプチドである。ペプチドの検量用試料は、精製されたCGAの天然断片に等しい反応をもたらすように設定される (Stridsberg, M et al. 1993, Stridsberg et al. 1995)。

20

#### 【0030】

検量線は、6つの検量用試料のnmol/Lの値に対するODをプロットすることによって描かれる。

#### 【0031】

検量用試料の測定結果は、表1および図1に示される。

#### 【0032】

#### 【表1】

| 検量用試料 | nmol/l CGA | OD    |
|-------|------------|-------|
| 1     | 0          | 0.056 |
| 2     | 1          | 0.178 |
| 3     | 5          | 0.785 |
| 4     | 15         | 1.743 |
| 5     | 30         | 2.423 |
| 6     | 50         | 2.886 |

30

40

#### 実施例 3

#### 【0033】

実施例1に係る試験系と、市販の試験キット (Dako) との間の相関関係

この比較のために、患者試料は、本発明の実施例1に係る試験系において試験され、続いてDako (Dako Denmark A/S; Produktionsvej 42; DK-2600 Glostrup; Denmark) から商業的に得られたクロモグラニンA ELISAキット (コードK0025) に用いら

50

れた。後者の試験キットは、広く用いられており、簡略化された2重ポリクローナル抗体サンドイッチ法に基づき、試料と、ペロキシダーゼ共役抗クロモグラニンAとを、抗クロモグラニンAで被覆されたマイクロウェルにおいて同時にインキュベートした。この試験キットにおける全ての抗体は、ウサギポリクローナル抗体であると報告されている。D a k o 試験キットは、製造メーカーの使用説明書に従って用いられた。この測定法において、ODを450nmと、650nmとで読み取った。

#### 【0034】

この比較の結果は、図2に示される。本明細書において、X軸での値は、本発明に係る試験キット(ED NeoLisa)からnmol/lで得られるデータであり、Y軸の値は、D a k o 試験キット(DAKO)から得られるU/Iで得られるデータである。

10

#### 【0035】

本発明に係る試験キットとD a k oのELISAとの間の相関関係は、良好であると結論付けることができる。相関係数：0,942。

#### 実施例4

#### 【0036】

実施例1に係る試験システムと、第2商用試験キット(CIS-BIO)との間の相関関係  
この比較のために、患者試料の一群は、本発明の実施例1に係る試験系において試験され、続いてC I S B I Oから商業的に得られたC I S - B I O クロモグラニンA E L I S Aキット(Chromo®; Prod. no.: CGA-ELISA)に用いられた。後者の試験キットは、E P 1 0 7 8 2 6 6 B 1に記載された試験キットに対応する。それは、サンドイッチ法に基づき、前記捕捉抗体は、ヒトクロモグラニン配列のアミノ酸配列145~197のエピトープに特異的に結合するマウスモノクローナル抗体であり、前記検出抗体は、ヒトクロモグラニン配列のアミノ酸配列219~234のエピトープに特異的に結合するマウスモノクローナル抗体である。C I S - B I O試験キットは、製造メーカーの使用説明書に従って用いた。

20

#### 【0037】

この比較の結果は、図3に示される。本明細書において、X軸での値は、ng/lでC I S - B I O試験キット(CIS-BIO)から得られるデータであり、Y軸の値は、nmol/lで本発明に係る試験キット(ED NeoLisa)から得られるデータである。

#### 【0038】

我々のNEOLISAと、CisBio CgA ELISAとの間の相関関係は、乏しいものであった。相関係数：0,451。

30

#### 実施例5

#### 【0039】

#### 臨床的感度

臨床特性を有する、全部で107検体のヘパリン血漿試料を、120人の献血者の血漿試料に続いて測定した。表2および図4に結果を要約する。

#### 【0040】

## 【表 2】

表 2 臨床的感度および特異性

| 診断           | 全体  | 陽性 | 陰性  | 感度(%) |
|--------------|-----|----|-----|-------|
| 腸クロム親和性様腫瘍   | 4   | 3  | 1   | 75    |
| 内分泌腺腫瘍       | 30  | 19 | 11  | 63    |
| 前腸カルチノイド     | 10  | 7  | 3   | 70    |
| 肺カルチノイド      | 9   | 4  | 5   | 44    |
| 中腸カルチノイド     | 47  | 28 | 19  | 60    |
| 神経作用性ホルモン分化  | 6   | 2  | 4   | 33    |
| 傍神経節腫        | 1   | 1  | 0   | 100   |
| 全体           | 107 | 64 | 43  | 60    |
|              |     |    |     |       |
| 診断           | 全体  | 陽性 | 陰性  | 感度(%) |
|              |     |    |     |       |
| 献血者 (コントロール) | 120 | 2  | 118 | 98    |

10

20

## 【 0 0 4 1 】

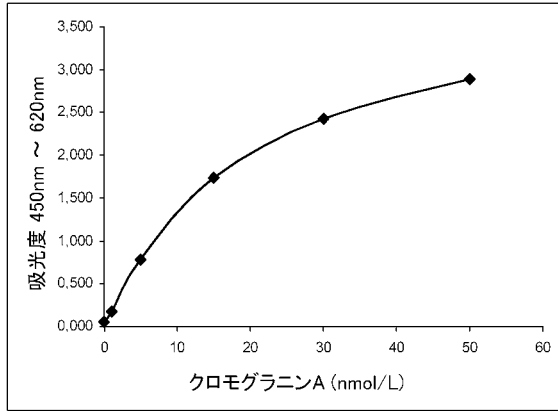
## 参考文献

1. Bajetta, E., Ferrari, L., Martinetti, A., Celio, L., Procopio, G., Artale, S., Zilembo, N., Di Bartolomeo, M., Seregini, E. and Bombardieri, E. Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patient with neuroendocrine tumours. *Cancer*1999, 86:858-865.
2. Eriksson, B., Oeberg, K. and Stridsberg, M. Tumour markers in neuroendocrine tumours. *Digestion* 2000, 62:33-38.
3. Koehler and Milstein. *Nature* 1975, 256:495.
4. Konecki et al. *Biol. Chem.* 1987, 262: 17026-17030.
5. O'Connor, D.T. and Deftos, L.J. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *New England Journal of Medicine* 1986, 314:1145-1151.
6. Stridsberg, M., Hellman, U., Wilander, E., Lundqvist, G., Hellsing, K. and Oeberg, K. Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumours: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments. *Journal of Endocrinology*1993, 139:329-337.
7. Stridsberg, M., Oeberg, K., Li, Q., Engstrom, U. and Lundqvist, G. Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. *Journal of Endocrinology* 1995, 144:49-59.
8. Stridsberg, M. Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods. *Advanced Experimental and Medical Biology*2000, 482: 319-327.
9. Winkler, H. and Fischer-Colbrrie, R. The chromogranin A and B: The first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 1992, 49:497-528.

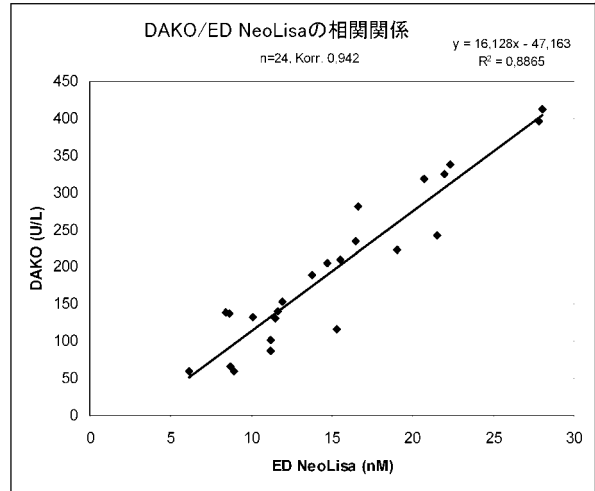
30

40

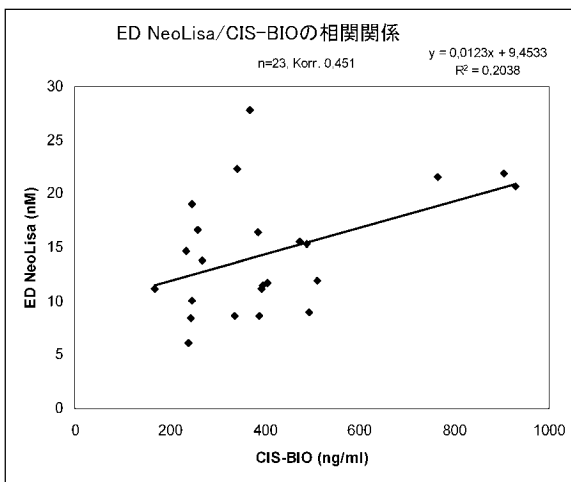
【 図 1 】



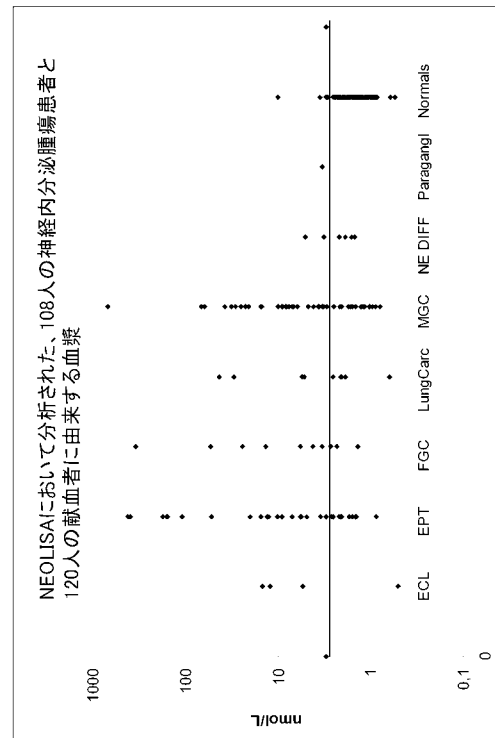
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【配列表】

2013525792000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/056763

|   |   |   |
|---|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<br>INV. C07K16/18 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68<br>ADD.  |   |   |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |   |   |
| B. FIELDS SEARCHED<br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C07K G01N  |   |   |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |   |   |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)<br>EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data  |   |   |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |   |   |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.   |
| X   | TARTAGLIA ANDREAS ET AL: "Chromogranin A in gastric neuroendocrine tumours: an immunohistochemical and biochemical study with region-specific antibodies.", VIRCHOWS ARCHIV : AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY APR 2006 LNKD-PUBMED:16408221, vol. 448, no. 4, April 2006 (2006-04), pages 399-406, XP002585661, ISSN: 0945-6317 | 1-3   |
| A   | tables 2, 3<br>the whole document<br>-----<br>-/--  | 4   |
| <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<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"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<br>"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<br>"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.<br>"&" document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search<br>21 July 2011   |   | Date of mailing of the international search report<br>28/07/2011  |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016  |   | Authorized officer<br>Hoesel, Heidi   |

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/EP2011/056763 |
|---|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| X  | <p>PORTELA-GOMES G M ET AL: "Chromogranin A in human neuroendocrine tumors: An immunohistochemical study with region-specific antibodies", AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 25, no. 10, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 1261-1267, XP009134371, ISSN: 0147-5185</p>   | 1-3                   |
| A  | <p>tables 2, 3<br/>the whole document</p>   | 4                     |
| A  | <p>-----<br/>EP 1 078 266 B1 (CIS BIO INT [FR])<br/>17 November 2004 (2004-11-17)<br/>cited in the application<br/>claims 1-21; examples 2, 3; tables 2, 3<br/>the whole document</p>   | 1-4                   |
| A  | <p>-----<br/>CORTI A ET AL: "Antigenic regions of human chromogranin A and their topographic relationships with structural/functional domains.", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY / FEBS 15 JAN 1996 LNKD- PUBMED:8631342, vol. 235, no. 1-2, 15 January 1996 (1996-01-15), pages 275-280, XP002585662, ISSN: 0014-2956<br/>abstract; figure 3; table 1</p> | 1-4                   |
| A  | <p>-----<br/>GILL B M ET AL: "Chromogranin a epitopes: Clues from synthetic peptides and peptide mapping", NEUROPEPTIDES, CHURCHILL LIVINGSTONE, GB LNKD- DOI:10.1016/0143-4179(92)90521-W, vol. 21, no. 2, 1 February 1992 (1992-02-01), pages 105-118, XP026324392, ISSN: 0143-4179<br/>[retrieved on 1992-02-01]<br/>the whole document</p>              | 1-4                   |
| A  | <p>-----<br/>STRIDSBERG M: "Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods.", ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY 2000 LNKD- PUBMED:11192592, vol. 482, 2000, pages 319-327, XP009134372, ISSN: 0065-2598<br/>the whole document</p>  | 1-4                   |

2

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/056763

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date           |
|--|------------------|-------------------------|----------------------------|
| EP 1078266                             | B1               | 17-11-2004              | AT 282830 T 15-12-2004     |
|  |                  |                         | DE 69921987 D1 23-12-2004  |
|  |                  |                         | DE 69921987 T2 29-12-2005  |
|  |                  |                         | EP 1078266 A1 28-02-2001   |
|  |                  |                         | ES 2235479 T3 01-07-2005   |
|  |                  |                         | FR 2778744 A1 19-11-1999   |
|  |                  |                         | WO 9958980 A1 18-11-1999   |
|  |                  |                         | JP 4317325 B2 19-08-2009   |
|  |                  |                         | JP 2002514766 A 21-05-2002 |
|  |                  |                         | PT 1078266 E 29-04-2005    |
|  |                  |                         | US 6632624 B1 14-10-2003   |
| -----                                  |                  |                         |                            |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP2011/056763

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 P 21/08

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA51

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 嗜铬粒蛋白A，抗体和试剂盒的免疫测定  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2013525792A</a>   | 公开(公告)日 | 2013-06-20 |
| 申请号            | JP2013506662  | 申请日     | 2011-04-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | EURO DIAGNOSTICA  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 欧元 - 鹿INGÉ½锡卡安倍晋三   |         |            |
| [标]发明人         | ストリドスベリマツ<br>ソマリニンングヴェ  |         |            |
| 发明人            | ストリドスベリ,マツ<br>ソマリニン,イングヴェ   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/543 C07K16/18 C12N15/02 C12P21/08  |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/68 C07K16/18 C07K16/26 C07K16/30 C07K2317/34 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/74  |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.D G01N33/53.U G01N33/543.545.A C07K16/18.ZNA C12N15/00.B C12P21/08  |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA12 4B024/BA44 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/DA14 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA51 |         |            |
| 优先权            | 2010161375 2010-04-28 EP  |         |            |
| 其他公开文献         | JP5883848B2   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

本发明涉及与人CGA的氨基酸序列的氨基酸序列236-251或264-279所示的多肽的表位反应的单克隆抗体。本发明进一步提供了这些单克隆抗体在用于CGA的免疫测定中的用途，包括这两种抗体的免疫试剂，以及用于基于两种单克隆抗体确定含CGA的免疫试剂的测试试剂盒。关于

Fig. 2

