

(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2004-537036

(P2004-537036A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 4 B O 6 4
CO 7 K 16/18	CO 7 K 16/18	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10	GO 1 N 33/493	A 4 H O 4 5
GO 1 N 33/493	GO 1 N 33/52	B
GO 1 N 33/52	GO 1 N 33/543	5 4 5 A

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-577560 (P2002-577560)	(71) 出願人	500116487 ヘスカ コーポレーション アメリカ合衆国 80525 コロラド州 フォート コリンズ プロスペクト パ ークウェイ 1613
(86) (22) 出願日	平成14年3月28日 (2002.3.28)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月26日 (2003.9.26)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/011105	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02002/079781	(72) 発明者	マクドナルド, トーマス アメリカ合衆国 ネブラスカ 68112 , オマハ, フローレンス ハイッ ールバード 9967
(87) 国際公開日	平成14年10月10日 (2002.10.10)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/279,391		
(32) 優先日	平成13年3月28日 (2001.3.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/342,268		
(32) 優先日	平成13年12月21日 (2001.12.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 動物において早期腎疾患を検出する方法

## (57) 【要約】

本発明は、動物の早期の腎疾患を検出する方法を提供する。本方法は、(a) 試験される動物からサンプルを獲得する工程および(b) サンプル中のアルブミン量を決定する工程を包含する。10 μg/ml ~ 約300 μg/ml の範囲のアルブミン量が、早期の腎疾患の存在を示す。本発明はまた、早期の腎疾患の存在を検出するのに使用され得るイヌ、ネコ、およびウマのアルブミンに対する抗体を提供する。本発明はまた、動物において早期腎疾患を検出するための方法およびキットに関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

早期の腎疾患を検出する方法であって：

- (a) 動物からサンプルを獲得する工程；および
  - (b) 該サンプル中のアルブミン量を決定する工程、
- を包含し、ここで、該サンプルの比重が  $1.010 \text{ g/ml}$  に対して正規化される場合、該サンプル中の約  $10 \mu\text{g/ml}$  ~ 約  $300 \mu\text{g/ml}$  の範囲のアルブミン量が、早期の腎疾患を示す、方法。

## 【請求項 2】

後期段階の腎疾患の発達する危険のある動物を同定する方法であって：

- (a) 該動物からサンプルを獲得する工程；および
  - (b) 該サンプル中のアルブミン量を決定する工程、
- を包含し、ここで、該サンプルの比重が  $1.010$  に対して正規化される場合、該サンプル中の約  $10 \mu\text{g/ml}$  ~ 約  $300 \mu\text{g/ml}$  の範囲のアルブミン量が、その動物が後期段階の腎疾患の危険にあることを示す、方法。

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法に従って早期の腎疾患を検出するための手段を備える、キット。

## 【請求項 4】

請求項 2 に記載の方法に従って早期の腎疾患を検出するための手段を備える、キット。

## 【請求項 5】

キットであって：

- (a) 動物アルブミンに選択的に結合するアルブミン結合化合物；および
  - (b) 動物から収集されたサンプル中のアルブミン量を検出するための手段、
- を備え、ここで、該アルブミン量が約  $10 \mu\text{g/ml}$  ~ 約  $50 \mu\text{g/ml}$  の範囲である場合、該手段は該サンプル中のアルブミンを検出する、キット。

## 【請求項 6】

請求項 3 に記載のキットであって：および

- (a) 動物アルブミンに選択的に結合するアルブミン結合化合物；
  - (b) 該サンプルの比重が  $1.010 \text{ g/ml}$  に対して正規化される場合に該アルブミン量が  $10 \mu\text{g/ml}$  ~  $300 \mu\text{g/ml}$  の範囲である場合、該サンプル中のアルブミン量を評価するための手段、
- を備える、キット。

## 【請求項 7】

請求項 4 に記載のキットであって：および

- (a) 動物アルブミンに選択的に結合するアルブミン結合化合物；
  - (b) 該サンプルの比重が  $1.010 \text{ g/ml}$  に対して正規化される場合に該アルブミン量が  $10 \mu\text{g/ml}$  ~  $300 \mu\text{g/ml}$  の範囲である場合、該サンプル中のアルブミン量を評価するための手段、
- を備える、キット。

## 【請求項 8】

イヌ、ネコ、およびウマからなる群より選択される動物種のアルブミンに選択的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

## 【請求項 9】

イヌ、ネコ、およびウマからなる群より選択される動物のアルブミンに選択的に結合する抗体を産生する培養細胞。

## 【請求項 10】

前記サンプル中のアルブミン量が：

- (a) 該サンプルをアルブミン結合化合物と接触させてアルブミン - 化合物複合体を形成し；
- (b) 該アルブミン - 化合物複合体を検出し；そして

(c) 検出される該アルブミン - 化合物複合体の量から、該サンプル中に存在するアルブミン量を評価すること、  
により決定される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

【請求項 11】

前記アルブミン結合化合物が、抗アルブミン抗体である、請求項 10 に記載の発明。

【請求項 12】

前記アルブミン結合化合物が、イヌ、ネコ、およびウマからなる群より選択される動物由来のアルブミンを認識する抗アルブミン抗体である、請求項 10 に記載の発明。

【請求項 13】

前記サンプル中のアルブミン量が、酵素連結免疫アッセイ、ラジオ免疫アッセイ、蛍光免疫アッセイ、化学発光アッセイ、ラテラルフローアッセイ、ディプスティックアッセイ、凝集アッセイ、粒子ベースのアッセイ、免疫沈降アッセイ、免疫ドットアッセイ、免疫プロットアッセイ、免疫拡散アッセイ、リン光アッセイ、フロー - スルーアッセイ、クロマトグラフィーアッセイ、PAGE ベースのアッセイ、電気的検知アッセイ、表面プラスモン共鳴アッセイ、および蛍光相関分光アッセイからなる群より選択されるアッセイを用いて決定される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

10

【請求項 14】

前記サンプル中のアルブミン量が、酵素連結免疫ソルベント検定法 (ELISA) を用いて決定される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

【請求項 15】

前記サンプル中のアルブミン量が、単回工程アッセイを用いて決定される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

20

【請求項 16】

前記サンプル中のアルブミン量が、ディプスティックベースのアッセイを用いて決定される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

【請求項 17】

前記アルブミン量が、該アルブミン量が約  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  ~ 約  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲である場合に前記サンプル中のアルブミンを検出するアッセイを用いて決定される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

【請求項 18】

前記アルブミン量が、該アルブミン量が約  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  である場合に前記サンプル中のアルブミンを検出するアッセイを用いて決定される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

30

【請求項 19】

前記アルブミン量が、該アルブミン量が約  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$  である場合に前記サンプル中のアルブミンを検出するアッセイを用いて決定される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

【請求項 20】

前記アルブミン量が、該アルブミン量が約  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  である場合に前記サンプル中のアルブミンを検出するアッセイを用いて決定される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

40

【請求項 21】

前記動物が、イヌ、ネコ、およびウマからなる群より選択される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

【請求項 22】

前記動物がイヌである、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

【請求項 23】

前記動物がネコである、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

【請求項 24】

前記動物がウマである、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

50

## 【請求項 25】

前記サンプルが、糸球体からのアルブミンの漏出を測定するのに有用な体液である、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

## 【請求項 26】

前記サンプルが尿である、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

## 【請求項 27】

前記サンプルが、アルブミン量を決定する前に前処理される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

## 【請求項 28】

前記サンプルが、比重を調節することにより前処理される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。 10

## 【請求項 29】

前記サンプルが、比重を 1.010 g/ml に調節することにより前処理される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

## 【請求項 30】

前記アルブミン量が、単回工程アッセイを用いて決定される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。

## 【請求項 31】

前記アルブミン量が、ディップスティックアッセイまたは ELISA アッセイを用いて決定される、請求項 1、2、3、4、5、6、または 7 に記載の発明。 20

## 【請求項 32】

前記抗体が、H352、H386、H387、H388、H389、H390、H391、H393、H394、H395、H396、H397、H398、H399、H400、H401、および H402 からなる群より選択される抗体のアルブミンに対する選択的結合を阻害する、請求項 8 または 9 に記載の抗体。

## 【請求項 33】

前記抗体が、H352、H386、H387、H388、H389、H390、H391、H393、H394、H395、H396、H397、H398、H399、H400、H401、および H402 からなる群より選択される抗体により認識される同一のエピトープに結合する、請求項 8 または 9 に記載の抗体。 30

## 【請求項 34】

前記抗体が、H352、H386、H387、H388、H389、H390、H391、H393、H394、H395、H396、H397、H398、H399、H400、H401、および H402 からなる群より選択される、請求項 8 または 9 に記載の単離された抗体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(発明の分野)

本発明は、動物における早期腎疾患の検出に関し、より具体的には、早期腎疾患のマーカーとしてのマイクロアルブミン尿症 (microalbuminuria) の使用に関する。 40

## 【背景技術】

## 【0002】

(発明の背景)

糸球体疾患は、腎不全および死を導き得る多数の腎疾患を説明するために使用される広い用語である。糸球体に対する損傷は、タンパク質 (例えば、アルブミン) に対する毛細管透過率を増大させ、尿中のタンパク質の存在を生じる (蛋白尿という)。

## 【0003】

ヒトにおいて、蛋白尿は、糖尿病、高血圧症および IgA 腎症を含む多数の疾患から生じ 50

得る。ヒトにおける蛋白尿についての従来の試験は、例えば、Bakris、Curr. Opin. in Neph. and Hypertension、5:219-223(1996)に記載されるような標準的なタンパク質ディップスティックアッセイを使用することである。サンプル中のタンパク質を測定するためにスルホサリチル酸に化学的に浸漬されたディップスティックは、例えば、Boehringer-Mannheim、Germany (Chemstrips<sup>TM</sup>)およびAmes Co.、USA (Albustix<sup>TM</sup>)から市販される。これらのディップスティックアッセイの1つの欠点は、これらが、検出されるべき尿中の有意な量のタンパク質を必要とすることである。1日当たり300ミリグラム未満のヒトにおけるタンパク質の量は、このディップスティックアッセイによっては検出不能であるが、蛋白尿はなお存在し得る。これらのタンパク質ベ

10

#### 【0004】

「ミクロアルブミン尿症」と称される、尿中のより少量のアルブミンは、正常な患者のアルブミンレベルよりも高いが、顕在的な蛋白尿を有する(すなわち臨床的に蛋白尿である)患者よりは低い、アルブミンレベルを示す。ヒトにおいて、ミクロアルブミン尿症は、Watts、Clin. Chem.、32(8):1544-1548(1986)に従って、1日当たり30ミリグラムと300ミリグラムとの間のアルブミン量をいう。ヒトのミクロアルブミン尿症を検出するための方法は公知であり、そして公知のディップスティック法によって検出不能な量のヒトアルブミンを検出するために、抗ヒトアルブミン抗体を使用する方法が挙げられる。ヒトミクロアルブミン尿症を検出するこのような方法は、例えば、Suzukiらに対して1993年9月21日に発行された米国特許第5,246,835号に記載されている。

20

30

40

50

#### 【0005】

ミクロアルブミン尿症は、ヒトにおいて検出され得るが、ヒトにおけるミクロアルブミン尿症を検出することの有用性は、少なくともいくつかの報告によれば、非常に限定され得る。例えば、腎疾患を予測するためにミクロアルブミン尿症試験を使用することは、Bakris(前出)に従って、糖尿病を有するヒトについてのみ推奨されている。糖尿病以外の疾患(例えば、高血圧症、心疾患およびIGA腎症)は、Bakris(前出)によれば、ヒトにおける一貫したミクロアルブミン尿症を導かないので、ミクロアルブミン尿症を検出することは、これらの非糖尿病性障害状態に関連する後期腎疾患について、乏しい予測価値を有する。従って、非糖尿病のヒト患者において潜在的な腎疾患または早期腎疾患についてスクリーニングするためにミクロアルブミン尿症試験を使用することは、一般に、Bakris(前出)によっては推奨されていない。

#### 【0006】

腎疾患はまた、コンパニオン動物(特にイヌおよびネコ)における有意な健康問題でもある。イヌにおいて、腎疾患の主な原因は、腎臓における糸球体への損傷である。イヌにおける糸球体損傷は、多数の方法で生じ得るが、これは最も一般に、Batamuziら、Vet Record、143:16-20(1988)に記載されるような全身的な病気の結果として、循環する免疫複合体(すなわち、抗体/抗原複合体)が糸球体毛細管において沈着する場合に引き起こされる。いくつかの疾患が、免疫複合体形成の病因(例えば、デロフィラリア症および他の寄生生物感染、糖尿病、甲状腺機能低下症などを含む)に關与していた。

#### 【0007】

獣医学における早期腎疾患は、組織病理学(Vaden、Proc. 17<sup>th</sup> ACVIM、420(1999))において報告されるような、光学顕微鏡または時には免疫蛍光の使用を含む)によって検出可能な糸球体の変化によって特徴付けられている。しかし、こ

の論文において報告されるように、これらの技術は、腎疾患の原因の誤診を導き得る。腎疾患の原因を決定することは、適切な処置レジメンを処方する際に有用である。例えば、腎疾患の原因が免疫媒介性である場合、免疫抑制治療が適切であり得る。しかし、ヒトのミクロアルブミン尿症を検出するために現在利用可能なアッセイは、イヌのミクロアルブミン尿症を検出するには、十分に高感度ではない。

【0008】

従って、コンパニオン動物におけるイヌの早期腎疾患を検出するためのアッセイについての必要性が存在する。本発明は、この必要性を満たし、そして関連の利点を同様に提供する。

【発明の開示】

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

(発明の要旨)

本発明は、動物において早期腎疾患を検出するための方法およびキットに関する。早期腎疾患について試験される好ましい動物は、コンパニオン動物であり、イヌ、ネコおよびウマが最も好ましい。本明細書中に開示される方法およびキットの実施形態は、動物由来のサンプル中の、 $10 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 300 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲のアルブミンの存在が、早期腎疾患を示すとして使用され得るという発見に基づく。試験される最も好ましいサンプルは尿であるが、糸球体からのアルブミンの漏出を測定するために有用な任意のサンプルが使用され得る。アルブミンを検出し得る任意のアッセイが、本発明の方法およびキットにおいて使用され得るが、好ましい方法およびキットは、免疫学ベースのアッセイ、特に一工程アッセイを使用する。最も好ましいアッセイは、抗アルブミン抗体を使用する、免疫学ベースのアッセイである。

20

【0010】

本発明はまた、動物サンプル中のアルブミンレベルを検出する際に使用され得る単離された抗体を提供する。試験動物由来のアルブミンに結合する任意の抗体が使用され得る；好ましい抗体は、イヌアルブミンおよび/またはネコアルブミンおよび/またはウマアルブミンに結合する。好ましい抗体は、TNB1、TNB3、TNB4、TNB5、TNB6、H352、H386、H387、H388、H389、H390、H391、H393、H394、H395、H396、H397、H398、H399、H400、H401およびH402である。本発明を実行するために適切な抗体を産生する培養細胞もまた含まれる。

30

【0011】

(発明の詳細な説明)

本発明は一般に、動物における早期腎疾患を検出する新規方法に関し、そして1種以上の動物種由来のアルブミンに選択的に結合する新規抗体に関する。より具体的には、本発明は、ミクロアルブミン尿症の存在が、動物における早期腎疾患、特に免疫媒介性の腎疾患を予測するために使用され得るという発見に関する。従って、この方法はまた、動物についての処置を処方するために有用であり得る。適切な処置は、後期腎疾患の発症を遅延または予防するために設計され得る。このような処置の例としては、例えば、薬理的改変または食事改変が挙げられる。本発明はまた、処方された処置の有効性をモニタリングする際に有用である。

40

【0012】

本発明の方法は、一般に以下の工程によって達成され得る：

(a) 動物からサンプルを獲得する工程；および

(b) このサンプル中のアルブミンの量を決定する工程。

このサンプル中の約 $10 \mu\text{g}/\text{ml} \sim$ 約 $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲のアルブミンの量が、早期腎疾患を示す。

【0013】

用語「1つの(「a」または「an」)」実体は、1以上のその実体をいうことに留意の

50

こと。例えば、(1つの)タンパク質(a protein)は、1以上のタンパク質または少なくとも1つのタンパク質をいう。このように、用語「1つの(「a」、「an」)」、「1以上」および「少なくとも1つ」は、本明細書中で交換可能に使用される。用語「含む(comprising)」、「含む(including)」および「有する」もまた、交換可能に使用され得る。さらに、用語「量」および「レベル」もまた交換可能であり、そして濃度または特定の量を記載するために使用され得る。さらに、用語「~からなる群より選択される」は、その後列挙される群のメンバー(2以上のメンバーの混合物(すなわち組み合わせ)を含む)の1以上をいう。

#### 【0014】

本明細書中で使用する場合、用語「腎疾患」は、糸球体濾過プロセスの機能不全として定義される。糸球体機能不全は、疾患の根本原因に依存して、一過性であるかまたは慢性であり得る。糸球体機能不全の1つの結果は、正常には血中に保持されるタンパク質が、糸球体を通して糸球体濾液に、そして最終的に尿中に漏出することである。糸球体機能不全に起因して尿中に存在し得るタンパク質の1つの例は、アルブミンであり、尿における低レベルでのその存在は、ミクロアルブミン尿症と命名されている。用語「ミクロアルブミン尿症」は、本明細書中で使用する場合、1.010 g/mlの比重に対してサンプルを正規化した場合の、約10 µg/ml ~ 約300 µg/mlの範囲でサンプル中に存在するアルブミンの量をいう。これは、代表的には低い(すなわち10 µg/ml未満)である、健康な動物において見出される量よりも高い。ミクロアルブミン尿症は、例えば、免疫複合体媒介性の糸球体腎炎から生じる腎臓に対する損傷の結果として生じ得る。本明細書中で使用する場合、用語「後期腎疾患」は、動物の血清代謝物レベル(特に、血液-尿窒素(BUN)レベルおよび血清クレアチニンレベル)の上昇と対応する、動物がその腎機能の70%以上を失った状態を定義するために使用される。本明細書中で使用する場合、用語「早期腎疾患」は、腎機能における検出可能な変化を有さない動物におけるミクロアルブミン尿症の存在(すなわち、増大したBUN、血清クレアチニン、または減少した尿濃縮能)として定義される。このように、1.010 g/mlの比重に対してサンプルを正規化した場合の、約10 µg/ml ~ 約300 µg/mlの範囲のサンプル中のアルブミンレベルが、早期腎疾患を示す。

#### 【0015】

本明細書中で使用する場合、用語「動物」は、早期腎疾患を発症し得る任意の非ヒト生物を包含することを意味する。ミクロアルブミン尿症について試験される適切な動物は、コンパニオン動物(すなわち、ペット)、食用動物、労働動物または動物園の動物が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい動物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ネコ、イヌ、ウマ、フェレットおよび他のイタチ科、ウシ、ヒツジ、ブタおよびげっ歯類。より好ましい動物としては、ネコ、イヌ、ウマなどのコンパニオン動物が挙げられ、ネコ、イヌおよびウマがさらにより好ましい。本明細書中で使用する場合、用語「コンパニオン動物」とは、ペットのような、ヒトが尊重する任意の動物をいう。本明細書中で使用する場合、ネコとは、ネコ科(すなわち、Felidae)の任意のメンバーをいい、飼いネコ、野生のネコおよび動物園のネコを含む。ネコの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：飼いネコ、ライオン、トラ、ヒョウ、パンサー、クーガー、ボブキャット、ヤマネコ、ジャガー、チーターおよびサーバル。好ましいネコは、飼いネコである。本明細書中で使用する場合、イヌとは、イヌ科の任意のメンバーをいい、以下が挙げられるが、これらに限定されない：飼いイヌ、野生のイヌ、キツネ、オオカミ、ジャッカルおよびコヨーテなどのイヌ科のメンバー。好ましいイヌは、飼いイヌである。本明細書中で使用する場合、ウマとは、ウマ科の任意のメンバーをいう。ウマは、有蹄動物であり、以下が挙げられるが、これらに限定されない：飼いウマおよび野生のウマ(例えば、ウマ、ロバ(ass, donkey)およびシマウマ)。好ましいウマは、競走馬を含む飼いウマである。

#### 【0016】

本発明の1つの実施形態において、サンプルは、ミクロアルブミン尿症について試験され

るべき動物から、獲得されるかまたは収集される。この動物は、早期腎疾患を有する疑いがあってもなくてもよい。サンプルは、糸球体からのアルブミン漏出を測定するために使用され得る、動物から獲得された任意の検体である。好ましいサンプルは、糸球体からのアルブミン漏出を測定するために使用され得る体液である。当業者は、適切なサンプルを容易に同定し得る。

**【0017】**

尿は、サンプルとして特に適切である。尿サンプルは、当該分野で公知の方法（例えば、動物が排尿しながらの収集、またはカテーテル法もしくは膀胱穿刺による収集を含む）によって動物から収集され得る。尿は、アッセイ前に凍結（refrigerateまたはfrozen）され得るが、好ましくは収集直後にアッセイされる。

10

**【0018】**

本発明のためには必要ないが、このサンプルは、所望の場合には前処理され得る。例えば、このサンプルは、所望の比重に対して正規化され得る。当該分野で公知の適切な希釈方法によってサンプルを正規化することは、サンプルの濃度（例えば、比重）に依存しないマイクロアルブミン尿症の定量を可能にする。任意の所望の比重が、当業者によって容易に選択され得るが、特に適切な比重は、1.010である。別の比重値が、サンプルを正規化するために所望される場合、当業者は、所望の比重のマイクロアルブミン尿症の定義内に入る適切なアルブミン量を容易に決定し得る。

**【0019】**

サンプルの獲得後、そのサンプル中のアルブミンレベルが決定される。本明細書中で使用する場合、用語「決定する」、「アルブミンのレベルを決定する」、「アルブミンの量を決定する」、「アルブミンレベルを決定する」などは、サンプル中のアルブミンの存在を検出または測定するために使用され得る任意の技術を包含することを意味する。アルブミンは、分析物の例である。用語「分析物」は、本明細書中で使用する場合、サンプル中に存在する任意の分子または化合物を記載するために使用される。このような技術は、定性的結果または定量的結果を生じ得る。アルブミンレベルは、全長アルブミンタンパク質を検出すること、またはアルブミンのフラグメント、分解産物もしくは反応産物を検出することによって決定され得る。好ましい方法において、アルブミンのレベルは、適切なアルブミン結合化合物を使用して決定される。

20

**【0020】**

本明細書中で使用する場合、用語「アルブミン結合分子」、「アルブミン結合化合物」、「抗アルブミン化合物」などは、交換可能に使用され、そしてアルブミンに結合して安定な複合体を形成する、任意の分子をいう。好ましいアルブミン結合化合物は、動物由来のアルブミンに選択的に結合する化合物である。用語「アルブミンに選択的に結合する」は、アルブミンと無関係な他のタンパク質に結合することではなく、アルブミンに優先的に結合することを意味する。特に有用なアルブミン結合化合物は、抗アルブミン抗体である。本明細書中で使用する場合、用語「抗アルブミン抗体」、「アルブミンに対する抗体」、「動物アルブミンに対する抗体」、「動物由来のアルブミンに対する特異性を有する抗体」、「動物アルブミン抗体」などは、1以上の動物由来のアルブミンに優先的に結合する抗体をいう。特に適切な抗アルブミン抗体は、異なる無関係のイヌ、ネコまたはウマのタンパク質に結合するのではなく、イヌ、ネコおよび/またはウマのアルブミンに優先的に結合する。別の特に適切な抗アルブミン抗体は、異なる無関係のイヌタンパク質に結合するのではなく、イヌアルブミンに優先的に結合する。コンパニオン動物のアルブミンに対する別の特に適切な抗体は、異なる無関係のネコタンパク質に結合するのではなく、ネコアルブミンに優先的に結合する。コンパニオン動物アルブミンに対する別の特に適切な抗体は、異なる無関係のウマタンパク質に結合するのではなく、ウマアルブミンに優先的に結合する。

30

40

**【0021】**

本発明はまた、単離された（すなわち、その天然の環境から取り出された）抗体を含み、この抗体は、1以上の動物種のアルブミンに選択的に結合する。本発明の単離された抗体

50

は、血清中の抗体、または種々の程度まで精製された抗体を含み得る。本発明の抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得るか、あるいは機能的等価物（例えば、抗体フラグメントおよび遺伝子操作された抗体（単鎖抗体またはアルブミン上の1つ以上のエピトープに結合し得るキメラ抗体を含む））であり得る。本発明における使用のために有効な抗体を生成するために適切な方法は、以下の工程を包含する：（a）有効量のタンパク質、ペプチドまたはそれらのミメトープ（mimetope）を動物に投与して、抗体を産生する工程；および（b）その抗体を回収する工程。規定されたタンパク質またはミメトープに対して惹起された抗体は、有利であり得る。なぜなら、このような抗体は、そうしないと診断アッセイにおいて干渉を生じ得る他の物質に対する抗体が、実質的に混入しないからである。このような抗体を生成するための方法は、当該分野で公知であり、  
10  
そしてHarlowら、Antibodies, a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Labs Press, 1988)において詳細に記載され、そしてこの方法は、例えば、腹水から取り出され、当該分野で公知の方法によって精製されたポリクローナル抗体の調製物を生成するために動物を免疫して、動物アルブミンに対して反応性の調製物を得る工程を包含する。多くの種が、密接に関連した配列を共有するタンパク質を有するので、標準的な免疫プロトコルを使用して1種のみ由来するタンパク質を認識する抗体を生成することは困難であり得る。従って、抗体を生成するために使用される標準的な方法の改変（例えば、サブトラクティブハイブリダイゼーション技術）もまた意図される。このような改変は、当業者に公知な改変であり得るか、または本出願に開示されるようなさらに改変された技術であり得る。別の方法にお  
20  
いて、本発明において使用するための抗体は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Labs Press, 1989)に開示される技術を使用して組換え的に生成される。

#### 【0022】

先に記載したように、他の好ましい方法は、モノクローナル抗体を生成することを含む。短く言うと、モノクローナル抗体は、免疫した動物由来の脾細胞と骨髄腫細胞との（ハイブリドーマを生成するための）融合から生成される。ハイブリドーマは、適切な抗体の生成のためにスクリーニングされ得、次いで培養され、そして抗体が回収される。本明細書中で使用される場合、用語「培養細胞」とは、抗体を生成するハイブリドーマまたは任意  
30  
の細胞をいう。このようなハイブリドーマを生成およびスクリーニングするための方法は、Harlowら（前出）に記載されている。生成された抗体を動物アルブミンと反応させるための抗原を調製する方法は、当該分野に公知であり、そして例えばHarlowら（前出）に記載されている。動物に注入するための抗原物質の調製は、当該分野に公知の任意の方法を含み、そして例えば、全長タンパク質を使用すること、タンパク質の免疫原性領域から選択されたペプチドを使用すること、例えば、ジニトロフェノールカップリング、アルシニル（arsynyl）カップリング、抗原の変性のような方法によって抗原を改変すること、タンパク質キャリア（例えばキーホールリンペットヘモシアニン、ビーズへのクラスII-T-細胞レセプター結合部位を含むペプチド）、ビーズと抗原とのカ  
40  
ップリング、および当該分野で公知の他の任意の方法が挙げられる。Harlowら（前出）を参照のこと。

#### 【0023】

本発明の抗アルブミン抗体は、多機能抗体（例えば、動物アルブミンに特異的に結合する少なくとも1つの機能部分を有する2機能抗体を含み得る。このような多機能抗体は、例えば、動物アルブミンに結合する分子の部分と、キメラ分子が基質に結合されるか、またはアルブミンへの結合を弱めないような様式において検出されることを可能にする第二部分を含むキメラ分子を含み得る。適切な第二部分としては、免疫グロブリン分子、蛍光タンパク質または酵素のフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0024】

抗体アルブミン抗体に加えて、アルブミン結合分子はまた、アルブミンに結合するタンパ  
50

ク質およびペプチドを含み得る。このようなタンパク質およびペプチドは、天然供給源、組換え供給源または合成供給源由来であり得、そして精製されていても精製されていなくてもよい。非抗体タンパク質、アルブミン結合タンパク質の例としては、42キログルトン(kDa)の*Staphylococcus aureus*由来のプロテインA、*S. aureus*および*Escherichia coli*由来のプロテインG、ラット60-kDaアルブミン結合タンパク質(gp60)ならびにヒト尿管カビリン(cubilin)タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。アルブミンを検出するための、(これらの種または他の種に由来する)このようなタンパク質の機能的相同体の使用はまた、意図される。アルブミン結合能力を保持するアルブミン結合タンパク質のハイブリットまたは融合物もまた使用され得る。このようなハイブリットにおいて、このタンパク質のアルブミン結合部分は、このハイブリッドが基質に結合されることまたは検出されることを可能にする第二部分に結合される。適切な第二部分の例としては、免疫グロブリン分子のフラグメント、エピトプタグ、蛍光タンパク質または酵素が挙げられるがこれらに限定されない。

10

20

30

40

50

#### 【0025】

本発明において使用されるアルブミン結合分子は、処方物に含まれ得る。例えば、抗体は、抗体が溶解される緩衝液および/またはキャリアと組み合わせられ得る。適切な緩衝液またはキャリアは当業者に公知である。適切な緩衝液の例としては、アルブミン結合分子がアルブミンに選択的に結合するように機能し得る任意の緩衝液(例えば、以下)が挙げられるが、これらに限定されない:リン酸緩衝化生理食塩水、水、生理食塩水、リン酸緩衝液、HEPES緩衝液(N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸緩衝化生理食塩水)、TES緩衝液(Tris-EDTA緩衝化生理食塩水)、Tris緩衝液およびTAE緩衝液(Tris-アセテート-EDTA)。キャリアの例としては、ポリマーマトリクス、トキシイドおよび血清アルブミン(例えば、ウシ血清アルブミン)が挙げられるが、これらに限定されない。キャリアは、アルブミン結合分子と組み合わせられ得るか、またはアルブミンに選択的に結合するアルブミン結合分子の能力を実質的に阻害しないような様式でアルブミン結合分子に結合(conjugate)され(すなわち、結合(attach)され)得る。さらに、本発明の適切な処方物は、種特異的アルブミンに対するアルブミン結合分子だけでなく、アルブミンを検出するのに有用な1つ以上のさらなる抗原または抗体を含み得る。

#### 【0026】

本明細書中で使用される場合、用語「接触(する)」とは、例えば、このサンプルとアルブミン結合化合物とを組み合わせるかまたは混合することによる、アルブミン結合化合物へのアルブミンを含むと推定されるサンプルの導入をいう。アルブミンがサンプルに存在する場合、次いでアルブミン化合物複合体は形成され;このような複合体形成は、アルブミンに選択的に結合するための抗アルブミン化合物の能力をいい、検出され得る安定な複合体を形成する。検出は、定性的、定量的または半定量的であり得る。アルブミン結合化合物に対するサンプル中の結合アルブミンは、複合体を形成するのに適切な条件下で達成される。このような条件(例えば、適切な濃度、緩衝液、温度、反応時間)およびこのような条件に最適な方法は、当業者に公知である。結合は、当該分野で標準的な種々の方法(酵素イムノアッセイ(例えば、ELISA)、免疫沈降、イムノプロットアッセイならびに例えば、Sambrookら(前出)およびHarlowら(前出)に記載されるような他のイムノアッセイ)を用いて測定され得るが、これらに限定されない。これらの参考文献はまた、複合体形成条件の例を提供する。

#### 【0027】

1つの実施形態において、アルブミン/アルブミン結合化合物複合体(本明細書中でアルブミン化合物複合体とも称される)は、溶液において形成され得る。別の実施形態において、アルブミン/アルブミン結合化合物複合体は、アルブミンまたはアルブミン結合化合物が、(例えばコートされた)基板上に固定されるように形成され得る。固定技術は当業者に公知である。適切は基板材料としては、プラスチック、ガラス、ゲル、セルロイド

、繊維 ( fabric )、紙および粒子物質が挙げられるが、これらに限定されない。適切な基板材料の例としては、ラテックス、ポリスチレン、ナイロン、ニトロセルロース、アガロース、コットン、P V D F ( ポリ - ビニリデン - フルオリド )、および磁性樹脂が挙げられるが、これらに限定されない。基盤材料のための適切な形状は、ウェル ( 例えば、マイクロタイター皿ウェル )、マイクロタイタープレート、ディップスティック、ストリップ、ビーズ、ラテラルフロー装置 ( lateral flow apparatus )、膜、フィルター、チューブ、皿、セルロイド型マトリクス、磁性粒子、および他の粒子が挙げられるが、これらに限定されない。特に好ましい基板としては、例えば、E L I S A プレート、ディップスティック、イムノドットストリップ、ラジオイムノアッセイプレート、アガロースビーズ、プラスチックビーズ、ラテックスビーズ、スポンジ、木綿系、プラスチックチップ、免疫プロット膜、免疫プロット紙およびフロースルー ( flow - through ) 膜が挙げられる。1つの実施形態において、粒子のような基板は、検出マーカを含み得る。基板材料の例の詳細については、例えば、Kemeny, D. M. ( 1991 ) A Practical Guide to ELISA, Pergamon Press, Elmsford, NY 33 - 44 頁および Price, C and Newman, D 編、Principles and Practice of Immunoassay、第2版 ( 1997 ) Stockton Press, NY, NY ( これらの両方はその全体が参考として本明細書中に援用される ) を参照のこと。

10

## 【0028】

好ましい実施形態において、抗アルブミン化合物は、基板 ( 例えば、マイクロタイター皿ウェル、ディップスティックまたは免疫ドットスリップ、またはラテラルフロー装置 ) 上に固定される。動物から収集されたサンプルは、この基板に塗布され、そして抗アルブミン化合物アルブミン複合体形成物が基板に結合される ( すなわち、サンプル中のアルブミンが、基板上に固定された抗アルブミン化合物に結合する ) ことを可能にする適切な ( すなわち十分な ) 条件下でインキュベートされる。

20

## 【0029】

本発明に従って、一旦形成されたアルブミン結合分子 / アルブミン複合体は検出され得る。本明細書中で使用される場合、用語「複合体形成を検出すること」は、アルブミンに複合体化したアルブミン結合化合物の存在を同定することをいう。複合体が形成される場合、形成された複合体の量は、定量され得るが、定量される必要はない。複合体形成または推定アルブミン組成物とアルブミン結合化合物との間の結合は、当該分野で標準的な種々の方法 ( 例えば、Sambrookら、( 前出 ) を参照のこと ) ( これらの例は、本明細書中に開示されている ) によって測定され得る。複合体は、1つ以上の以下のアッセイの使用が挙げられるが、これらに限定されない種々の方法において検出され得る：酵素連結イムノアッセイ、競合的酵素結合免疫アッセイ、ラジオイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、化学発光アッセイ、ラテラルフローアッセイ、フロースルーアッセイ、凝集アッセイ、粒子ベースのアッセイ ( 例えば、磁性粒子またはラテックスもしくはポリスチレンビーズのようなプラスチックポリマーのような ( しかし、これらに限定されない ) 粒子状物質 ( particulate ) を使用する )、免疫沈降アッセイ、BioCore<sup>TM</sup> アッセイ ( 例えば、金コロイドを使用する )、イムノドットアッセイ ( 例えば、CMG's Immunodot System, Fribourg, Switzerland ) およびイムノプロットアッセイ ( 例えば、ウエスタンプロット )、リン光アッセイ、フロースルーアッセイ、粒子ベースのアッセイ、クロマトグラフィーアッセイ、PAGEベースのアッセイ、表面プラズモン共鳴アッセイ、分光学的アッセイならびに電気的検知アッセイ。このようなアッセイは当業者に周知である。

30

40

## 【0030】

アッセイは、それらがどのように使用されるかに依存して、定性的結果または定量的結果を与えるために使用され得る。このアッセイ結果は、アルブミン分子全体またはフラグメント、アルブミンの分解産物または反応産物を検出することに基づき得る。いくつかのアッセイ ( 例えば、凝集、粒子分離、および免疫沈降 ) は、検出マーカを必要としないで

50

、視覚的に（例えば、目によってか、またはデンシトメーターもしくは分光計のような機器によって）観察され得る。

【0031】

他のアッセイにおいて、抗アルブミン化合物または抗アルブミン化合物に選択的に結合する試薬に対する検出マーカの結合体化（すなわち、結合（attachment））は、複合体形成を検出するのを助ける。検出マーカは、抗アルブミン化合物のアルブミンへの結合能力を阻害しない部位で、抗アルブミン化合物または試薬と結合体化され得る。結合体化の方法は、当業者に公知である。検出マーカの例としては、放射標識、蛍光標識、化学発光標識、発光団標識、酵素標識、燐光標識、電子標識；金属ゾル標識、有色ビーズ、物理学的標識またはリガンドが挙げられるが、これらに限定されない。リガンドとは、別の分子に選択的に結合する分子をいう。好ましい検出マーカとしては、フルオレセイン、放射性同位体、ホスファターゼ（例えば、アルカリホスファターゼ）、ビオチン、アビジン、ペルオキシダーゼ（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、およびビオチン関連化合物あるいはアビジン関連化合物（例えば、ストレプトアビジンもしくはImmunoPure（登録商標）NeutrAvidin）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0032】

1つの実施形態において、動物アルブミン化合物複合体は、検出マーカと結合体化された特異的化合物抗体とサンプルとを接触させることによって検出され得る。検出マーカは、抗アルブミン抗体または他の化合物（これは、抗化合物抗体または、検出されているイヌアルブミン結合化合物に結合する他の化合物の能力をブロックしないような様式において、アルブミン結合化合物に結合する）と結合体化され得る。好ましい検出マーカは、フルオレセイン、放射性同位体、ホスファターゼ（例えば、アルカリホスファターゼ）、ビオチン、アビジン、ペルオキシダーゼ（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、およびビオチン関連化合物またはアビジン関連化合物（例えば、ストレプトアビジンもしくはImmunoPure（登録商標）NeutrAvidin）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0033】

別の実施形態において、複合体は、指標分子と複合体とを接触させることによって検出される。適切な指標分子は、アルブミン/アルブミン結合複合体またはアルブミンに結合可能な分子を含む。このように、指標分子は、例えば、抗体のようなアルブミン結合試薬を含み得る。好ましい指標分子（抗体である）は、例えば、抗アルブミン抗体が生成される動物の種に由来する抗体と反応する抗体が含まれる。指標分子自体は、本発明の検出マーカに結合（attach）され得る。例えば、抗体は、ビオチン、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたはフルオレセインと結合体化され得る。

30

【0034】

本発明は、1つ以上の層および/または第二の型の分子もしくは指標分子の存在を検出する能力のある他の結合分子をさらに含み得る。例えば、指標分子に選択的に結合する標識されていない（すなわち、検出マーカと結合体化していない）二次抗体は、二次抗体と選択的に結合する標識された（すなわち、検出マーカと結合体化された）三次抗体に結合され得る。適切な二次抗体、三次抗体および他の二次分子または三次分子は、当業者によって容易に選択され得る。好ましい三次分子は、二次分子の特徴に基づいて当業者によって選択され得る。同様のストラテジーが次の層に適用され得る。

40

【0035】

好ましくは、指標分子は検出マーカと結合体化される。必要であれば、発色試薬が添加され、基板は分析のために検出デバイスに供される。いくつかのプロトコールにおいて、洗浄工程が過剰な試薬を除去するために、1つまたは両方の複合体形成工程の後に加えられる。このような工程が使用される場合、これらは、過剰な試薬が除去されるが、この複合体は保持されるような、当業者に公知の条件を含む。

【0036】

50

マイクロアルブミン尿症を検出するための1つの実施形態は、ラテラルフローアッセイ（例えば、Pronovostらによって1995年6月13日に公表された米国特許第5,424,193号；Imrichらによって1995年5月16日に公表された米国特許第5,415,994号；Millerらによって1994年12月22日に公開されたWO94/29696；ならびにPawlakらによって1994年1月20日に公開されたWO94/01775に記載されている実施例に関連する。ラテラルフローアッセイは、単回工程アッセイの例である。単回工程アッセイにおいて、一旦サンプルが獲得され、そして試験のために準備されると、分析物の存在を検出するために、使用者はたった一つの動作のみが必要である。例えば、サンプル（全体または一部分）は、デバイスに適用され、次いでデバイスはサンプル中の分析物を測定する。1つの実施形態において、サンプルはラテラルフロー装置に配置される。この装置は以下の構成要素を備える：（a）流路を規定する支持体構造；（b）特異的抗体と結合体化されたビーズを含む標識試薬であって、標識ゾーンにおける支持構造内で浸漬されている、標識試薬；ならびに（c）捕捉試薬。好ましい抗体は、本明細書中に開示される抗体である。捕捉試薬は、標識試薬が標識ゾーンから捕捉ゾーンに流れ得るような様式において、標識ゾーンに流体結合される捕捉ゾーン内の標識試薬の下流に配置される。この支持体構造は、標識ゾーンから捕捉ゾーンへのビーズの流れを妨げない材料を備える。支持体構造としての使用に適切な材料としては、イオン性（すなわち、アニオン性またはカチオン性）が挙げられる。このような材料の例としては、ニトロセルロース、PVDfまたはカルボキシメチルセルロースが挙げられるが、これらに限定されない。支持体構造は、ラテラルな流路およびゾーン（すなわち、標識ゾーンおよび捕捉ゾーン）に分けられる流路を規定する。この装置はさらに、流路に沿って配置される（好ましくは、標識試薬の上流）サンプル受け取りゾーンを備える。支持体構造における流路は、捕捉ゾーンの支持体構造下流の部分（好ましくは、流路の末端）で、標識ゾーンおよび捕捉ゾーンからの過剰な液体を吸収し得る吸収剤に接続されることによって作製される。

10

20

#### 【0037】

別の実施形態において、アルブミンを検出するために使用されるラテラルフロー装置は、以下を備える：（a）流路を規定する支持体構造；（b）上記のような抗アルブミン抗体を含む標識試薬、標識ゾーンにおいて支持体構造内に浸漬させた標識試薬；ならびに（c）標識試薬が標識ゾーンから捕捉ゾーンに流れ得るような様式において、標識ゾーンに流体結合される捕捉ゾーン内の標識試薬の下流に配置される捕捉試薬。好ましくは、この装置はまた、流路に沿って（好ましくは、標識試薬の上流に）配置されるサンプル受け取りゾーンを備える。好ましくは、この装置はまた、流路の末端に配置される吸収剤を含む。1つの好ましい実施形態は、抗イヌアルブミン抗体を含む捕捉試薬を備える。

30

#### 【0038】

一旦アルブミンレベルが測定されると、次いで初期の腎疾患が存在するか否かの評価がなされ得る。初期腎疾患の存在を評価することは、健康な動物において見出されるレベルと、試験サンプル中のアルブミンレベルとを比較することを意味する。サンプルにおけるマイクロアルブミン尿症の存在（腎機能における変化の非存在において）は、初期の腎疾患の指標である。本明細書中で使用する場合、用語「初期腎疾患の指標」は、糸球体機能不全が、アルブミンが約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約 $300\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲内で尿に到達することを可能にするように存在することを意味する。サンプル中に存在するアルブミンの量は、初期の腎疾患を除いて存在する損傷の量に依存して変わり得、このアルブミンレベルは、健康な動物において見出されるよりも高いが、蛋白尿を測定するために使用される現在の方法によって検出可能な量よりも低い。本発明において、サンプル中のアルブミンレベルが約 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ～約 $300\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲内にあることが決定される場合、初期の腎疾患の決定がなされる。アルブミンレベルのより高いレベルはまた、約 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $75\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $125\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $150\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $175\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $225\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 、約 $275\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または約 $300\mu\text{g}/\text{ml}$ であり得る。サンプル

40

50

中のアルブミンレベルは、腎臓の損傷の重篤度に非常に依存し得る。本発明の好ましい実施形態は、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、または約90%の腎機能が喪失した場合、アルブミンを検出し得る。より好ましい実施形態は、医療処置のための時間内にマイクロアルブミン尿症を検出し得、これは次いで、最終段階の腎疾患の発症を遅延または予防し得る。このような処置は、例えば、薬理的化合物の使用あるいは腎疾患の進行を遅延または予防するための食事制限が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0039】

本発明の1つの実施形態は、動物中のマイクロアルブミン尿症 (microalbuminuria) を検出し得る「ディップスティック」デバイスである。ディップスティックは、使用される方法に部分的に依存する種々の様式で構築され得る。ディップスティックは、サンプル(例えば、尿の流れ)中で直接保持され得るか、回収容器中に含まれるサンプル中に直接浸漬され得るか、またはプラスチックのカセットもしくは台の中に含まれるストリップに適用されるサンプルを有し得るかのいずれかである。ディップスティックの別の例は、「フロー-スルー」デバイスであり、このデバイスの例は、吸収剤レザバに取り付けられる膜上に固定される捕捉抗体に基づく異成分免疫測定アッセイ系 (heterogeneous immunometric assay system) である。「ビーズ」は、検出分子に共有結合的に架橋され得るかまたは非共有結合的に架橋され得る、ラテックスまたはポリスチレンのようなマトリックスから構成される粒子基材をいう。「ディップスティック」アッセイの好ましい実施形態は、MacKayおよびFredricksonの米国特許第5,656,502号(1997年8月12日発行)、ならびにFredricksonの米国特許第6,001,658号(1999年12月14日発行)(これらの両方は、本明細書中に参考として援用される)に記載される免疫測定系 (immunometric system) である。特に好ましいのは、Diagnostic Chemicals Ltd., PEI, CA. から入手可能な Immuno Dip<sup>TM</sup> デバイスである。

#### 【0040】

非免疫学的方法もまた、使用され得る。マイクロアルブミン尿症を検出するために、アルブミンを濃縮するための尿の前濃縮のような方法が使用されて、タンパク質に対する試験の感度を上げ得る。このような非免疫学的方法としては、例えば、尿の電気泳動が挙げられ、ここで、マイクロアルブミン尿症の検出は、当該分野で公知の方法によって決定され得る(例えば、タンパク質染色が挙げられる)。別の実施形態において、タンパク質に基づくアルブミン試験を使用して、動物からの尿の前濃縮したサンプルに基づいてマイクロアルブミン尿症を決定し得る。

#### 【0041】

本発明の方法を使用して、イヌ、ネコ、ウマ、または他の動物中のネフロパシーを検出し得る(特に、ネフロパシーが、糸球体のネフロパシー、特に糸球体腎炎である場合)。より詳細には、マイクロアルブミン尿症測定は、標的動物中の初期の腎疾患の存在と相関する。本明細書中に使用される場合、用語「ネフロパシー」および/または「腎疾患」は、腎臓の任意の疾患をいい、そしてこれには、例えば、糸球体、尿細管、または間質性腎組織の腎炎が挙げられ得る。

#### 【0042】

このような初期段階のネフロパシーは、多くの異なる原因から生じ得、この原因としては、例えば、アレルギー、癌、動物中の任意の組織の寄生虫感染、ウイルス感染、または細菌感染、腎毒素への曝露、免疫媒介疾患(例えば、全身性エリテマトーデスおよび脈管炎)、悪性腫瘍、ビタミンD3殺菌薬、腎盂腎炎、レプトスピラ症、尿路閉塞、慢性炎症性疾患、膿皮症、膀胱炎、前立腺炎、免疫媒介疾患、歯の疾患、高血圧、または糖尿病が挙げられる。本明細書中に使用される場合、「感染因子」は、動物を感染する因子であり、これには、ウイルス、細菌、真菌、内部寄生生物および外部寄生生物が挙げられるが、これらに限定されない。ウイルス感染因子の例としては、アデノウイルス、カリチウイルス、

コロナウイルス、ジステンパーウイルス、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、免疫不全ウイルス、感染性腹膜炎ウイルス、白血病ウイルス、腫瘍ウイルス、パピローマウイルス、パラインフルエンザウイルス、パルボウイルス、狂犬病ウイルス、およびレオウイルス、ならびに他の癌を引き起こすウイルスおよび癌に関連するウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。細菌感染因子の例としては、以下：

【 0 0 4 3 】

【 化 1 】

*Actinomyces, Bacillus, Bacteroides, Bartonella, Bordetella, Borrelia, Brucella, Campylobacter, Capnocytophaga, Clostridium, Corynebacterium, Coxiella, Dermatophilus, Ehrlichia, Enterococcus, Escherichia, Francisella, Fusobacterium, Haemobartonella, Helicobacter, Klebsiella, L-form bacteria, Leptospira, Listeria, Mycobacteria, Mycoplasma, Neorickettsia, Nocardia, Pasteurella, Peptococcus, Peptostreptococcus, Proteus, Pseudomonas, Rickettsia, Rochalimaea, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus, および Yersinia*

10

が挙げられるが、これらに限定されない。真菌感染因子の例としては、以下：

【 0 0 4 4 】

【 化 2 】

*Absidia, Acremonium, Alternaria, Aspergillus, Basidiobolus, Bipolaris, Blastomyces, Candida, Chlamydia, Coccidioides, Conidiobolus, Cryptococcus, Curvularia, Epidermophyton, Exophiala, Geotrichum, Histoplasma, Madurella, Malassezia, Microsporium, Moniliella, Mortierella, Mucor, Paecilomyces, Penicillium, Phialemonium, Phialophora, Prototheca, Pseudallescheria, Pseudomicrodochium, Pythium, Rhinosporeidium, Rhizopus, Scolecobasidium, Sporothrix, Stemphylium, Trichophyton, Trichosporon, および Xylohypha*

20

30

が挙げられるが、これらに限定されない。原生動物寄生虫感染因子の例としては、以下：

【 0 0 4 5 】

【 化 3 】

*Babesia, Balantidium, Besnoitia, Cryptosporidium, Eimeria, Encephalitozoon, Entamoeba, Giardia, Hammondia, Hepatozoon, Isospora, Leishmania, Microsporidia, Neospora, Nosema, Pentatrachomonas, Plasmodium, Pneumocystis, Sarcocystis, Schistosoma, Theileria, Toxoplasma, および Trypanosoma*

40

が挙げられるが、これらに限定されない。蠕虫寄生虫感染因子の例としては、以下：

【 0 0 4 6 】

【 化 4 】

*Acanthocheilonema, Aelurostrongylus, Ancylostoma, Angiostrongylus, Ascaris, Brugia, Bunostomum, Capillaria, Chabertia, Cooperia, Crenosoma, Dictyocaulus, Dioctophyme, Dipetalonema, Diphyllbothrium, Diplydium, Dirofilaria, Dracunculus, Enterobius, Filaroides, Haemonchus, Lagochilascaris, Loa, Mansonella, Muellerius, Nanophyetus, Necator, Nematodirus, Oesophagostomum, Onchocerca, Opisthorchis, Ostertagia, Parafilaria, Paragonimus, Parascaris, Physaloptera, Protostrongylus, Setaria, Spirocercia, Spirometra, Stephanofilaria, Strongyloides, Strongylus, Thelazia, Toxascaris, Toxocara, Trichinella, Trichostrongylus, Trichuris, Uncinaria, および Wuchereria*

10

が挙げられるが、これらに限定されない。外部寄生生物感染因子の例としては、ノミ、ダニ（カタダニおよびヒメダニを含む）、小虫（例えば、ユスリカ、蚊、チョウバエ、ブユ、アブ、ノサシバエ、メクラアブ、ツェツェバエ、サシバエ、蠅蛆症を引き起こすハエ、および刺す羽虫）、アリ、クモ、シラミ、ダニ、および半翅類の昆虫（例えば、トコジラミおよびサシガメ）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

## 【0047】

本発明はまた、複数の分析物を測定するために使用され得る。他の分析物は、初期腎疾患を検出する際の使用に適したサンプル中で検出され得る任意の分析物であり得る。さらなる分析物が、例えば、感染疾患または先天性代謝異常を検出するために使用され得る。

## 【0048】

本発明はまた、試験される動物由来のアルブミンに結合する抗体に関する。好ましい抗体は、サンプル中でのアルブミンの量が約  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  である場合に、そのアルブミンレベルを検出する抗体である。別の好ましい抗体は、サンプル中でのアルブミンの量が約  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは約  $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは約  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  である場合に、そのアルブミンレベルを検出する抗体であり、その検出方法は、米国特許第 6,001,658 号に記載されるディップスティックである。好ましい抗体は、動物のアルブミン（好ましくは、イヌアルブミン）への選択的な結合のためのモノクローナル抗体：TNB1、TNB3、TNB4、TNB5、TNB6、H352、H386、H387、H388、H389、H390、H391、H393、H394、H395、H396、H397、H398、H399、H400、H401、またはH402のいずれかと競合する抗体である。別の好ましい実施形態は、抗体TNB3、TNB6およびH402によって結合されるエピトープと同じかまたは関連するエピトープ（配列相同性によって規定されるような）に結合する抗体である。好ましい抗体は、TNB1、TNB3、TNB4、TNB5、TNB6、H352、H386、H387、H388、H389、H390、H391、H393、H394、H395、H396、H397、H398、H399、H400、H401、およびH402からなる群より選択される。より好ましいのは、TNB3、TNB6 およびH402からなる群より選択される抗体である。本明細書中に使用される場合、用語「競合する」および「選択的結合を阻害する」とは、含まれる実施例に記載されるように、ある抗体が、同じタンパク質への別の抗体の結合を妨げる能力をいう。

30

40

## 【0049】

本発明はまた、本明細書中に開示される方法を用いて動物のアルブミンを検出するのに適したキットを含む。適切な検出手段としては、本明細書中に開示される技術が挙げられ、所望の動物アルブミンに結合する化合物（例えば、抗アルブミン抗体など）を利用する。そういうものとして、キットはまた、検出可能なマーカー（例えば、アルブミン結合化合

50

物に選択的に結合する抗体または他の指標分子)を含み得る。キットはまた、関連する成分(例えば、緩衝液、標識、容器、挿入物、管状材料、バイアル、シリンジなどが挙げられるが、これらに限定されない)を含み得る。

#### 【0050】

本発明は、イヌにてマイクロアルブミン尿症をマーカーとして使用して、糖尿病にかかっていないイヌおよび糖尿病のイヌにおいて腎疾患の発症を予測し得るという驚くべき発見に基づく。なぜなら、マイクロアルブミン尿症は、糖尿病にかかっていないヒト患者において予測的な価値を明らかに有しているわけではないからである。同様の用途が、他の動物において意図される。しかし、この驚くべき発見にもかかわらず、本発明までは、イヌにおいてマイクロアルブミン尿症を検出するための有効な方法は存在しなかった。従来のヒトマイクロアルブミン尿症検出方法は、以下の実施例に記載されるように、イヌのマイクロアルブミン尿症を検出しない。

10

#### 【0051】

以下の実施例は、例示目的のために提供され、本発明の範囲を制限することは意図されない。

#### 【実施例】

#### 【0052】

##### (実施例1)

(正常なCRFイヌおよびARFイヌにおけるマイクロアルブミン尿症の測定)

尿サンプルを、Colorado State University Teaching Hospitalにおいて134匹のイヌ被験体から収集した。これらのサンプルは、正常なイヌ由来の尿、慢性腎不全に罹患するイヌ由来の尿、急性腎不全に罹患するイヌ由来の尿、および腎不全を有さない蛋白尿イヌ由来の尿を含んだ。サンプルを、 $-20$ で少なくとも24時間凍結し、その後、使用前に解凍した。アルブミンレベルを、McDonald, Weber & Thiele, 「Construction and Use of a Template Block for Radial Immunodiffusion」Anal Biochem 186:165-168(1990)に記載されるように、市販の抗アルブミン抗体(ポリクローナルウサギ抗イヌアルブミン(Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, N.Y.によって配給されるNordic Immunologyから入手可能)を用いて、微量放射免疫拡散アッセイ(microradial immunodiffusion assay)によって定量した。このアッセイに関して、1.5%(vol/vol)の抗体を、PBS中の溶解した0.75%(wt/vol)EEOAガロースに添加した。0.75mmの厚みのゲルを、2枚のガラスプレート間に注いだ。ゲルを固形化し、そして、一方のガラスプレートを取り外した後、ゲルをわずかに乾燥させた。アクリルブロック(McDonaldら(前出)に記載される)を、アガロースゲル上に配置し、そして5 $\mu$ lのサンプルまたは標準物質を、そのアクリルブロックの各ウェルに配置した。サンプルを希釈せず泳動するか、または生じる環が測定するには大きすぎる場合は、サンプルを希釈して再度試験した。イヌアルブミンを用いた標準曲線(Sigma, St. Louis, MOから入手可能なイヌアルブミン画分V)は、10~100 $\mu$ g/mlの範囲内で直線状であった。アクリルブロックをアガロース上に残し、そしてそのユニットを、湿潤チャンバに配置し、室温で一晩インキュベートした。次いで、アガロースゲルを希釈水に数時間浸漬して、過剰なタンパク質をゲルから除去し、ゲルを乾燥させ、次いで、沈降素環が容易に可視化され得るようにクマシーブリリアントブルーを用いて染色した。各環の直径を測定し、そして各サンプルからの環の直径を標準曲線と比較し、そして各サンプルのアルブミン濃度を計算した。

20

30

40

#### 【0053】

尿中のアルブミンを測定するためにこの系を用いることの利点は、この系が、ゲル中に切り込まれたウェルを用いる従来のアッセイよりも、より感度が高いという点である。この感度の上昇は、アガロース中に切り込まれたウェルの端によって作製されるより大きな表

50

面積と対照的に、小さな面積への抗原の濃縮された送達に関連する。この初期の研究に関して、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下のレベルを有するサンプルを、正常とみなし、 $51 \mu\text{g}/\text{ml}$ と $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ との間のレベルを有するサンプルを、ミクロアルブミン尿症とみなし、そして $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ を超えるレベルを有するサンプルをマクロアルブミン尿症とみなした。この研究の結果を、表1に示す。

【0054】

(表1. 134匹のイヌの尿サンプル中の尿アルブミンレベル)

【0055】

【表1】

アルブミンレベル	動物の数	パーセンテージ
正常 (0-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	59	44%
ミクロアルブミン尿症 (51-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	21	16%
マクロアルブミン尿症 (>300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	54	40%

10

(実施例2)

(ミクロアルブミン尿症のELISA定量)

ウサギ抗イヌ血清アルブミンIgG(抗CSA IgG)をコーティング緩衝液(50 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ , pH 9.6)中で $375 \text{ ng}/\text{ml}$ に希釈する。この希釈した抗CSA IgG溶液を、MaxiSorp<sup>TM</sup> C8 Break-apart Microwells(Nuncカタログ番号473768)のプレートに $100 \mu\text{l}$ /ウェルで添加し、被覆し、そして一晩(16~24時間)4℃でインキュベートする。このプレートを0.05% Tween 20を含むリン酸緩衝化生理食塩水(PBS-T)を用いて自動プレート洗浄器中で4回洗浄し、ドライプロット(dry)した。ブロッキング緩衝液(StabilCoat<sup>TM</sup>(Surmodicsカタログ番号SC01-1000から入手可能))を $200 \mu\text{l}$ /ウェルで添加し、被覆し、そして室温で少なくとも1時間インキュベートする。

20

【0056】

ブロッキングの間、イヌ血清アルブミン(CSA)希釈シリーズを調製する。第1に、CSAを、アッセイ希釈液(PBS-T中の0.1% カゼイン加水分解物)中で $120 \text{ ng}/\text{ml}$ に希釈する。この溶液を連続希釈し(1部に対して1部)、 $60 \text{ ng}/\text{ml}$ 、 $30 \text{ ng}/\text{ml}$ 、 $7.5 \text{ ng}/\text{ml}$ 、 $3.75 \text{ ng}/\text{ml}$ 、および $1.875 \text{ ng}/\text{ml}$ を作製する。最後の5つの標準物質を、「ゼロ」標準物質(CSA無しのアッセイ希釈液)と共に、標準曲線( $30 \text{ ng}/\text{ml}$ 以下)のために使用する。試験する各尿サンプルを、アッセイ希釈液中で1/500希釈、1/1000希釈、1/2000希釈、1/4000希釈、1/8000希釈、1/16000希釈および1/32000希釈する。

30

【0057】

次いで、このプレートを、自動プレート洗浄器中で4回洗浄し、ドライプロットする。CSA標準物質および希釈尿サンプルを、試験ウェルに各々 $100 \mu\text{l}$ /ウェルで添加する。アッセイ希釈液を、バックグラウンドコントロールのために2連のウェルに添加する。プレートを被覆し、そして室温で2時間インキュベートする。前回のよう、このプレートをPBS-Tを用いて4回洗浄し、ドライプロットする。

40

【0058】

ビオチン標識されたヤギ抗CSA IgG(Bethyl Laboratories, カタログ番号E40-113)をアッセイ希釈液中で $125 \text{ ng}/\text{ml}$ に希釈する。希釈したビオチン標識ヤギ抗CSA IgGを $100 \mu\text{l}$ /ウェルで全ての試験ウェルに添加する。プレートを覆い、室温で30分間インキュベートする。前回のよう、このプレートをPBS-Tを用いて4回洗浄し、ドライプロットする。

50

## 【0059】

西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたストレプトアビジン（KPLカタログ番号14-30-00）をアッセイ希釈液中で500 ng/mlに希釈し（1/1000希釈）、100 μl/ウェルで全ての試験ウェルに添加する。これをカバーし、室温で30分間インキュベートする。前回のように、このプレートをPBS-Tを用いて4回洗浄し、ドライプロットする。

## 【0060】

TMBマイクロウェルペルオキシダーゼ2成分システム（KPLカタログ番号50-76-03）溶液を等量で一緒に混合し、そしてそのTMB混合物を100 μl/ウェルで全てのウェルに添加する。これをカバーし、室温で30分間インキュベートする。各ウェルにおいて100 μl/ウェルの停止溶液（1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>）をこのTMBに直接添加することによって、反応を停止させる。これらのウェルを吸光光度計にて450 nmで読み取る。全ての2連のウェルの値の平均をとり、そして存在する場合、全ての試験値からバックグラウンド値を差し引く。標準値から標準曲線を作成し、そして回帰線を作成する（ $r^2 > 0.95$ ）。回帰式を用いて、各サンプルについてのCSA（ng/ml）の値を計算し、そしてこの値に希釈倍率を乗算する。標準曲線の直線部分にある値のみを、使用するべきである。

## 【0061】

（実施例3）

（イヌ尿における微量蛋白尿検出用ImmunoDip<sup>TM</sup>スティックの使用）  
 ヒトにおける微量蛋白尿検出用の3つのImmunoDip<sup>TM</sup>スティック（製品番号700-01）を、Diagnostic Chemicals Limited, Charlottetown, Prince Edward Island, Canadaから得た。2つのイヌ尿サンプル（1086および1098と番号付けた）を、Colorado State University Veterinary Teaching Hospital, Fort Collins, Coloradoのイヌから得た一群のサンプルから選択した。サンプル1086および1098は、イヌにおける微量蛋白尿を検出するためのインハウスELISAにより決定したそれらのアルブミンレベルに基づいて、選択した。サンプル1086は、陰性サンプルであり、サンプル1098は、アルブミン濃度221 μg/mlを有した。陽性コントロールとして、約50 μlのヒト血液を、5 mlの脱イオン水に添加した。

## 【0062】

尿におけるアルブミンの測定を、製造業者の指示に従って実施した。簡単に述べると、3 mlの尿または血液添加水を、試験管に加えた。ImmunoDipスティックを袋から取り出し、そして尿を含む試験管中に配置し、その流体レベルが、デバイス中の通気孔より上にあることを確認した。このデバイスを、そのサンプル中に最低3分間は放置し、その後、そのデバイスを取り出した。そしてその試験キットに添付する結果の解釈挿入物に従って2つのバンドの相対強度を比較することによって、そのデバイスを読み取った。このインハウスELISAおよびImmunoDip試験の結果を、表2に示す。

## 【0063】

（表2．微量蛋白尿の結果についてのImmunoDip<sup>TM</sup>スティック）

## 【0064】

【表2】

サンプル	インハウス ELISA	ImmunoDip
1086	0 μg/ml	陰性
1098	221 μg/ml	陰性
血液添加水	試験せず	陽性

10

20

30

40

50

ヒト尿アルブミンについてのImmunoDip試験における検出限界は、 $12 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。サンプル1098は、この下限より有意に上のレベルでイヌ尿を含んだが、ImmunoDip<sup>TM</sup>試験によって、アルブミンについて陰性であった。これらのデータは、このデバイスが、イヌアルブミンを、少なくとも微量蛋白尿を検出するためには認識しないことを示唆する。

## 【0065】

(実施例4)

(イヌ尿における微量蛋白尿検出用Micral(登録商標)試験片の使用)

ヒトにおける微量蛋白尿検出用の14個のMicral(登録商標)尿試験片(製品番号417146)を、Roche BMC, Indianapolis, Indianaから得た。13個のイヌ尿サンプルを、従業員のイヌから得た一群のサンプルから選択した。使用のためのサンプルは、イヌにおける微量蛋白尿を検出するためのインハウスELISAにより決定したそれらのアルブミンレベルに基づいて、選択した。サンプル2A、4A、および16Aは、陰性サンプルであったが、残りのサンプルは、 $31.3 \mu\text{g}/\text{ml} \sim > 650 \mu\text{g}/\text{ml}$ の値の範囲のアルブミン濃度を有した。陽性コントロールとして、 $50 \mu\text{l}$ のヒト血液を、 $5 \text{ml}$ の脱イオン水に添加した。

## 【0066】

尿中のアルブミンの測定を、製造業者の指示に従って実施した。簡単に述べると、各イヌの尿を、サンプル収集コップ中に収集した。さらに、血液添加水を、試験管中に配置した。Micral(登録商標)スティックをバイアルから取り出し、そしてその収集コップ(または血液添加水を含む試験管)中に配置して、その流体レベルが、各場合にそのデバイスの2つの黒線より上であることを確認した。そのデバイスを、サンプル中に5秒間放置し、取り出し、そして1分間水平に設置した。その試験に添付する結果挿入物に従ってその試験パッドの色をバイアル上の色目盛と比較することによって、その結果を、決定した。インハウスELISAおよびMicral(登録商標)試験の結果を、表3に示す。

## 【0067】

ヒトアルブミンについてのMicral(登録商標)試験の検出限界は、約 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。いくつかのサンプルは、この下限よりも有意に上のイヌアルブミンレベルを含んだが、Micral(登録商標)試験によって、アルブミンについて陰性であった。これらのデータは、このデバイスが、イヌ尿アルブミンを、少なくとも微量蛋白尿を検出するためには認識しないことを、示唆する。

## 【0068】

(表3. Micral(登録商標)尿試験片の結果)

## 【0069】

【表3】

サンプル	インハウス ELISA	Micral®
1A	79.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$	陰性
2A	3.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$	陰性
4A	5.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$	陰性
5A	35.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$	陰性

10

20

30

40

9A	48.6 $\mu\text{g/ml}$	陰性
15A	69.4 $\mu\text{g/ml}$	陰性
16A	8.3 $\mu\text{g/ml}$	陰性
29A	119.1 $\mu\text{g/ml}$	陰性
86A	31.3 $\mu\text{g/ml}$	陰性
87A	65.2 $\mu\text{g/ml}$	陰性
14	>650 $\mu\text{g/ml}$	陰性
19	陽性	陰性
45	650 $\mu\text{g/ml}$	陰性
血液添加水	試験せず	陽性

10

(実施例5)

(イヌ尿における微量蛋白尿検出用 ImmunoDip<sup>TM</sup> スティックの使用)  
 ヒトにおける微量蛋白尿検出用の14個のImmunoDip<sup>TM</sup> スティック(製品番号700-01)を、Diagnostic Chemicals Limited, Charlottetown, PE, Canadaから得た。13個のイヌ尿サンプルを、見かけ上正常であるイヌから得た一群のサンプルから選択した。使用のためのサンプルは、イヌにおける微量蛋白尿を検出するためのインハウスELISAにより決定したそれらのアルブミンレベルに基づいて、選択した。サンプル2A、4Aおよび16Aは、陰性サンプルであったが、残りのサンプルは、31.3  $\mu\text{g/ml}$  ~ >650  $\mu\text{g/ml}$  の値の範囲のアルブミン濃度を有した。陽性コントロールとして、50  $\mu\text{l}$  のヒト血液を、5 ml の脱イオン水に添加した。

20

【0070】

尿中のアルブミンの測定を、製造業者の指示に従って実施した。簡単に述べると、3 ml の尿または血液添加水を、試験管に加えた。ImmunoDip スティックを袋から取り出し、そして尿を含む試験管中に配置し、その流体レベルが、各場合に、デバイス中の通気孔より上にあることを確認した。このデバイスを、そのサンプル中に最低3分間は放置し、その後、そのデバイスを取り出した。そしてその試験キットに添付する結果の解釈挿入物に従って2つのバンドの相対強度を比較することによって、そのデバイスを読み取った。このインハウスELISAおよびImmunoDip試験の結果を、表4に示す。

30

【0071】

(表4. 微量蛋白尿の結果についてのImmunoDip<sup>TM</sup> スティック)

【0072】

【表4】

サンプル	インハウス ELISA	ImmunoDip <sup>TM</sup>
1A	79.4 $\mu\text{g/ml}$	陰性

2A	3.9 $\mu\text{g/ml}$	陰性
4A	5.9 $\mu\text{g/ml}$	陰性
5A	35.9 $\mu\text{g/ml}$	陰性
9A	48.6 $\mu\text{g/ml}$	陰性
15A	69.4 $\mu\text{g/ml}$	陰性
16A	8.3 $\mu\text{g/ml}$	陰性
29A	119.1 $\mu\text{g/ml}$	陰性
86A	31.3 $\mu\text{g/ml}$	陰性
87A	65.2 $\mu\text{g/ml}$	陰性
14	>650 $\mu\text{g/ml}$	陰性
19	陽性	陰性
45	650 $\mu\text{g/ml}$	陰性
血液添加水	試験せず	陽性

10

ヒトアルブミンについての Immunodip<sup>T M</sup> 試験の検出限界は、約 20  $\mu\text{g/ml}$  である。いくつかのサンプルは、この下限よりも有意に上のイヌアルブミンレベルを含んだが、Immunodip<sup>T M</sup> 試験によって、アルブミンについて陰性であった。これらのデータは、このデバイスが、イヌ尿アルブミンを、少なくとも微量蛋白尿を検出するためには認識しないことを、示唆する。

20

【0073】

(実施例6)

(イヌ尿における微量蛋白尿検出用 Micral (登録商標) 試験片の使用)

ヒトにおける微量蛋白尿検出用の5個の Micral (登録商標) 尿試験片 (製品番号 417146) を、Roche BMC, Indianapolis, Indiana から得た。13個のイヌ尿サンプルを、見かけ上正常であるイヌから得た一群のサンプルから選択した。使用のためのサンプルは、イヌにおける微量蛋白尿を検出するためのインハウス ELISA により決定したそれらのアルブミンレベルに基づいて、選択した。サンプル7および12は、陰性サンプルであったが、サンプル14および25は、それぞれ、621  $\mu\text{g/ml}$  および >650  $\mu\text{g/ml}$  のアルブミンレベルを有した。陽性コントロールとして、50  $\mu\text{l}$  のヒト血液を、5 ml の脱イオン水に添加した。

30

【0074】

尿中のアルブミンの測定を、製造業者の指示に従って実施した。簡単に述べると、各イヌの尿を、サンプル収集コップ中に収集した。陽性コントロールとして、血液添加水を、試験管中に配置した。Micral (登録商標) スティックをバイアルから取り出し、そしてその収集コップ (または血液添加水を含む試験管) 中に配置して、その流体レベルが、各場合にそのデバイスの2つの黒線より上であることを確認した。そのデバイスを、サンプル中に5秒間放置し、取り出し、そして1分間水平に設置した。その試験に添付する結果挿入物に従ってその試験パッドの色をバイアル上の色目盛と比較することによって、その結果を、決定した。インハウス ELISA および Micral (登録商標) 試験の結果を、表5に示す。

40

【0075】

(表5. Micral (登録商標) 尿試験片の結果)

【0076】

【表5】

サンプル	インハウス ELISA	Micral®
7	2.1 µg/ml	陰性
12	0.8 µg/ml	陰性
14	621 µg/ml	陰性
25	>650 µg/ml	陰性
血液添加水	試験せず	陽性

ヒト尿アルブミンについてのMicral（登録商標）尿試験の検出限界は、約20 µg/mlである。サンプル14および25は、この下限よりも有意に上のイヌアルブミンレベルを含んだが、Micral（登録商標）試験によって、アルブミンについて陰性であった。これらのデータは、このデバイスが、イヌ尿アルブミンを、少なくとも微量蛋白尿を検出するためには認識しないことを、示唆する。

【0077】

（実施例7）

（イヌにおける微量蛋白尿の有病率）

この研究のために、2つの別個の集団を試験した。1つのサンプル集団は、臨床的に正常なイヌ（n=86）に由来した。第2のサンプル集団は、慣用的健康スクリーニング、選択手順、および健康問題評価について示された、Colorado State University Teaching Hospitalの患者（n=150）に由来した。抗原捕捉ELISAを使用して、微量蛋白尿を定量した。この測定の結果を、比重1.010に正規化して、種々の尿濃度を計算に入れた。この病院の患者の尿中のアルブミンをまた、Pestsix 8<sup>TM</sup>尿タンパク質試験片（Index xカタログ番号98-06959-00）を使用して試験した。

【0078】

この86匹の臨床的に正常なイヌのうち、68匹（79%）が、正規化アルブミン濃度<1.0 mg/dLを有し、16匹（19%）が、正規化アルブミン濃度>1.0 mg/dLかつ<30 mg/dLを有し、そして2匹（2%）が、正規化アルブミン濃度>30.0 mg/dLを有した。159人の病院の患者のうち、112人（70%）が、尿試験片陰性であり、そして112個中51個（46%）の試験片陰性サンプルが、正規化アルブミン濃度>1.0 mg/dLを有した。逆に、80個のサンプル中の、<1.0 mg/dLアルブミンを有する19個（24%）が、尿試験片に対して陽性であった（表6を参照のこと）。

【0079】

（表6）

【0080】

【表6】

正規化尿アルブミン濃度 (サンプル数)	尿タンパク質試験片の結果 (n=159)			
	陰性 (112)	微量 (20)	1+ (15)	2-4+ (12)
<1.0 mg/dL (80)	61 (54%)	12 (60%)	5 (33%)	2 (17%)
>1.0および<30.0 mg/dL (58)	49 (44%)	6 (30%)	2 (13%)	1 (8%)
>30.0 mg/dL (21)	2 (2%)	2 (10%)	8 (53%)	9 (75%)

試験した2つの集団において、微量蛋白尿の有病率（>1.0 mg/dLかつ<30.0 mg/dL）は、19%~36%の範囲であった。これらの結果から、有意な数のイヌにおいて微量蛋白尿が蔓延しているようである。さらに、蛋白尿検出用の市販の尿タンパク質試験片の使用は、かなりの数の偽陽性結果を生じる。

【0081】

（実施例8）

（イヌ血清アルブミンの精製）

10

20

30

40

50

この実施例は、イヌ血清アルブミンを生成するための方法を開示する。イヌ血清を、50%（重量/体積）硫酸アンモニウムに調節し、そしてその溶液を4℃にて3時間振動させ、そして10,000×gで30分間の遠心分離によって不溶性物質を沈殿させた。その上清を取り出し、25mM Tris（pH 8.0）中に透析した。その可溶性物質を、予め平衡化したHi-Trap Q-Sepharoseカラム（Pharmacia, Peapack, NJ）上にローディングし、そして25カラム体積（CV）に対する直線勾配0~1.0M NaClを使用して、タンパク質を溶出した。収集した画分を、SDS-PAGEによって分析し、そしてイヌアルブミンを含む画分をプールし、そして必要になるまで保存した。この方法を使用して、414mgのアルブミンを、20mlのイヌ血清から精製した。タンパク質配列決定によって、その精製タンパク質がイヌアルブミンであることを確認した。

10

## 【0082】

(実施例9)

(抗イヌアルブミン抗体の生成)

この実施例は、イヌ血清アルブミン（CSA）を認識するモノクローナル抗体（Mab）であるTNB1、TNB2、TNB3、TNB4、TNB5、TNB6を生成するために使用される方法を開示する。

## 【0083】

Balb/Cマウスを、25μg、50μgまたは100μgのイヌ血清アルブミン（Sigma, St. Louis, MOから入手可能）のいずれかと混合した完全フロイントアジュバントを皮下注射することによって、免疫した。4週間後、血液サンプルを入手し、抗CSA抗体力価をELISAにより決定した。このデータに基づいて、100μgのCSAで免疫した3匹のマウスを、ハイブリドーマを生成する際にさらに使用するために選択した。これらのマウスのうちの2匹に、100μgのCSAを含む静脈内（IV）注射を投与し、3番目のマウスに、100μgを腹腔内投与した。3日後、それらのマウスに安楽死させ、脾臓を取り出し、そしてT細胞を除去し、そしてその脾細胞を、標準的プロトコルに従ってSP2/0マウス骨髓腫細胞と融合した。個々のハイブリドーマコロニーを、CSAを認識するMabの生成について試験し、そして陽性コロニーを増殖させ、そして安定なMab分泌株が樹立されるまで希釈クローニングした。

20

## 【0084】

(実施例10：サブラクティブハイブリダイゼーションを使用する、抗イヌアルブミン抗体の生成)

この実施例は、サブラクティブハイブリダイゼーション技術を利用して、イヌ血清アルブミン（CSA）を認識するモノクローナル抗体（Mab）を作製する手順を開示する。

30

## 【0085】

抗イヌCSAハイブリドーマ細胞株を、以下の公開されたサブラクティブハイブリダイゼーション法を使用して作製した。Balb/Cマウスの腹腔内に、1.0mgのBSAフラクションV（Boehringer Mannheim, Indianapolis, INから入手可能）を注射し、続いて、BSAを注射してから10分後、24時間後および48時間後にシクロホスファミド（CY）（100mg/kg）をIP注射した。このBSA/CY処置を、2週間後に繰り返した。さらに2週間後、マウスに完全フロイントアジュバントと混合した100μgのCSA（実施例8に記載のように生成した）を皮下（SC）注射した。さらに2週間が過ぎた後、血液サンプルを得て、ELISAにより、CSAおよびBSAに対する血清抗体力価を決定した。次いで、2回目のCSA（100μg）の腹腔内注射を行い、その動物の抗CSA抗体力価を高めた。2週間後、マウスにCSA（50μg）の静脈内（IV）注射を行い、3日後にマウスを屠殺し、その脾細胞を採取し、標準的な手順に従ってポリエチレングリコール（PEG）を使用して、マウスSP2/0骨髓腫細胞と融合した。個々のハイブリドーマコロニーを、CSAを認識するMabの生成について試験し、ポジティブコロニーを増殖させ、安定なMab分泌株が樹立されるまで、希釈物をクローニングした。この手順により、ハイブリドーマ株H398

40

50

およびH399の生成がもたらされた。

【0086】

上記の手順により生成されたハイブリドーマ細胞株に加えて、以下の改変サブトラクティブハイブリダイゼーション手順を使用して、さらなる抗CSAハイブリドーマ細胞株を製作した。30 $\mu$ gのCSA（実施例8に記載のように生成した）を、Balb/Cマウスのフットパッドに注射した。3ヵ月後、このマウスに、30 $\mu$ gのCSAを腹腔内（IP）注射した。IP注射の4ヵ月後、マウスに、2回目の1.0mgのBSAのIP注射を行い、続いて、BSA注射の10分後、24時間後、および48時間後に、シクロホスファミド（CY）（100mg/kg）のIP注射を行った。2週間後、このBSA/CY処置を繰り返し、さらに2週間を経た後、このマウスに、完全フロイントアジュバントと混合したCSA（100 $\mu$ g）の皮下（SC）注射を行った。さらに2週間後、血液サンプルを得て、ELISAにより、CSAおよびBSAに対する血清抗体力価を決定した。次いで、このマウスに、CSA（50 $\mu$ g）の静脈内（IV）注射を行い、3日後、このマウスを安楽死させ、その脾細胞を採取し、標準的な手順に従ってポリエチレングリコール（PEG）を使用して、マウスSP2/0骨髄腫細胞と融合した。個々のハイブリドーマコロニーを、CSAを認識するMAbの生成について試験し、ポジティブコロニーを増殖させ、安定なMAb分泌株が樹立されるまで、希釈物をクローニングした。このプロトコルにより、ハイブリドーマ細胞株H384、H385、H386、H387、H388、H389、H390、H391、H392、H393、H394、H395、H396、H400、H401およびH402を生成がもたらされた。

10

20

【0087】

（実施例11：ELISAによるイヌ血清アルブミンの検出）

この実施例は、抗イヌ血清アルブミン（CSA）抗体がCSAを検出する能力を試験するための固相ELISAの使用を開示する。

【0088】

マイクロタイタープレートのウェルを、炭酸塩緩衝液（50mM 炭酸塩/炭酸水素酸塩、pH 9.6）中のCSA（50 $\mu$ g/ウェル）（実施例8に記載のように生成した）でコーティングし、このプレートを4℃にて一晩保存した。翌日、過剰な液体を除去し、プレートの液体を吸い取って乾燥させ、150 $\mu$ lのブロッキング緩衝液（0.05% Tween-20含有PBS中の0.1% カゼイン）を各ウェルに添加した。このプレートを室温（RT）にて30分間インキュベートし、その後、そのブロッキング緩衝液を除去し、50 $\mu$ lのハイブリドーマ上清（ブロッキング緩衝液中で希釈するか、希釈しないかのいずれか）を各ウェルに添加した。RTにて1時間インキュベートした後、そのウェルを、洗浄緩衝液（0.05% Tween-20含有PBS）を使用して洗浄し、50 $\mu$ lのHRP結合体化ヤギ抗マウスIgGおよびIgM（KPL Labs, Gait Hershburg, MDから入手可能）を各ウェルに添加し、そのプレートをRTにて30分間インキュベートした。そのウェルを洗浄緩衝液で2回洗浄し、50 $\mu$ lのTMB Substrate System（KPL Labsから入手可能）を各ウェルに添加した。このプレートを、RTにて10分間インキュベートし、その後、50 $\mu$ lの2N スルホン酸を各ウェルに添加することにより、反応を停止させた。ELISAプレートリーダーを使用して450nmにてこのプレートを読み取り、その結果を、以下の表7に示す。

30

40

【0089】

【表7】

表7.

抗体	未希釈	1:10	1:100
TNB1	1288	852	326
TNB3	1242	1263	922
TNB4	1449	1431	1546
TNB5	1528	1585	1478
TNB6	1782	1436	1103
H386	1274	1273	1187
H387	1394	1369	1326
H388	1485	1529	1408
H389	1685	1646	1265
H390	1558	892	250
H391	1490	1325	916
H393	1744	1603	1640
H394	435	955	577
H395	1265	1049	1001
H396	1564	1773	1390
H397	49	59	48
H398	1822	1641	1501
H399	775	144	64
H400	1572	1610	1239
H401	1839	1683	1511
H402	1799	1752	1447

10

20

(実施例12:いくつかの種に由来するアルブミンのELISAによる検出)

この実施例は、ウェルを、ウシ血清アルブミン(BSA)、イヌ血清アルブミン(CSA)、ウマ血清アルブミン(HSA)またはヒト血清アルブミン(HuSA)アルブミンを3×段階希釈液(5μg/ml~0.002g/ml)でコーティングしたことを除いて、実施例11に概説したプロトコルを使用したELISAにより、3種類の抗イヌアルブミンモノクローナルAbが示されたアルブミンを認識する能力を実証する。さらに、10μgの示された抗体を、各ウェルにて使用した。この結果を、表8に示す。

【0090】

【表8】

30

表8.

アルブミン濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	TNB3			
	コートタンパク質			
	BSA	CSA	HSA	HuSA
5	.62	3.53	1.67	.12
1.667	.52	3.50	1.37	.15
.556	.43	3.51	.87	.17
.185	.57	3.43	.34	.16
.062	.20	3.14	.19	.15
.021	.17	2.08	.16	.16
.007	.17	.35	.13	.13
.002	.11	.20	.09	.10

アルブミン濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	TNB6			
	コートタンパク質			
	BSA	CSA	HSA	HuSA
5	.18	3.68	.90	1.69
1.667	.42	3.59	.69	.78
.556	.30	3.59	.52	.47
.185	.24	3.43	.32	.23
.062	.22	3.17	.26	.26
.021	.21	2.36	.22	.22
.007	.20	1.18	.21	.22
.002	.22	.55	.21	.23

アルブミン濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	H402			
	コートタンパク質			
	BSA	CSA	HSA	HuSA
5	.41	3.41	.87	.97
1.667	.40	3.35	.71	.59
.556	.38	3.31	.57	.41
.185	.35	3.23	.42	.37
.062	.32	2.98	.36	.34
.021	.35	2.10	.32	.31
.007	.35	1.20	.18	.31
.002	.35	.65	.32	.33

このデータは、mAbのTNB3、TNB6およびH402が、BSA、HSAまたはHuSAと比較して、CSAに対するはるかに高い親和性を有することを実証する（実施例13：抗アルブミンmAb H402、TNB3およびTNB6を使用する競合ELISA）

この実施例は、H402モノクローナル抗体、TNB3モノクローナル抗体およびTNB6モノクローナル抗体が、イヌ血清アルブミン（CSA）への結合について競合する能力を比較する。抗体間の競合を、ELISAプレート全体をCSAでコーティングし、標識一次抗体をこのプレートのウェル全てに添加し、次いで、いくつかの非標識抗体がCSAへの結合について一次抗体と競合する能力を測定することにより、測定した（全ての一次

10

20

30

40

50

抗体を、Pierce Chemical, Rockford, ILから入手可能なビオチンを使用して、製造業者の指示に従って標識した)。このようにして、各プレートを使用して、単一の一次抗体がCSAに結合する能力について2つの他の抗アルブミン抗体と競合する能力を試験した。さらに、ヒト高親和性IgEレセプター鎖(抗FcεRI)の細胞外ドメインに対して惹起された抗体を、各プレートに対してネガティブコントロールとして使用した。アッセイの詳細は、以下のとおりである。

【0091】

3枚のELISAプレートを、4にて1μg/mlのCSAで一晩コーティングした。翌日、そのウェルを、洗浄緩衝液(PBS+0.05% Tween-20)を使用して洗浄し、ブロッキング溶液(STABILCOAT(登録商標)IMMUNOASSAY STABILIZER; SurModics, Inc., Eden Prairie, Minnesotaから入手可能)を使用して、製造業者の指示に従ってブロッキングした。次いで、そのウェルを、洗浄緩衝液を使用して洗浄し、100μlの単一の標識一次抗体(20ng/mlのH402、8ng/mlのTNB3または12ng/mlのTNB6のいずれか)(濃度を、希釈緩衝液(PBS+0.05% Tween-20中の0.1% カゼイン)を使用して調節した)を、各プレートが異なる一次抗体を保持するように、個々のプレートの全てのウェルに添加した。次いで、各プレートの1列のウェルに、100μlの非標識二次抗体(H402、TNB3、TNB6または抗HuFCRIのいずれかを20μg/ml)を添加した。次いで、最終的な二次抗体濃度が、10μg/ml~9ng/mlになるようにプレートをまたがって各二次抗体を希釈して、2倍連続希釈を行った。これらのプレートを室温(RT)にて2時間インキュベートし、洗浄緩衝液で洗浄し、100μlの西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン(希釈緩衝液中で1:1000希釈)を添加した。RTにて1時間インキュベートした後、そのウェルを洗浄緩衝液で洗浄し、100μlの発色溶液(TMB基質; KPL Labs, Gaithersburg, MDから入手可能)を各ウェルに添加した。RTにて30分インキュベートした後、ELISAプレートリーダーを使用して、450nmにてそのプレートを読み取った。このアッセイの結果を、以下の表9に示す。

10

20

【0092】

【表9】

表9.

H402 (一次抗体)				
	競合(二次)抗体			
抗体濃度 (ng/ml)	H402	TNB3	TNB6	抗 HuFCER1
10000	.069	2.292	.087	2.584
5000	0.164	2.328	0.195	2.576
2500	0.271	2.341	0.300	2.551
1250	0.517	2.275	0.559	2.569
625	1.212	2.255	1.093	2.592
312.5	2.104	2.262	1.683	2.540
156.25	2.548	2.293	2.239	2.557
78.125	2.670	2.381	2.402	2.512
39.06	2.752	2.461	2.514	2.518
19.53	2.765	2.427	2.655	2.660
9.77	2.798	2.657	2.611	2.639
0	2.710	2.641	2.577	2.642

10

TNB3 (一次抗体)				
	競合(二次)抗体			
抗体濃度 (ng/ml)	H402	TNB3	TNB6	抗 HuFCER1
10000	2.295	0.090	2.290	2.479
5000	2.493	0.245	2.409	2.645
2500	2.445	0.395	2.247	2.508
1250	2.480	0.796	2.185	2.397
625	2.485	1.534	2.239	2.428
312.5	2.378	2.084	2.208	2.483
156.25	2.529	2.535	2.324	2.484
78.125	2.463	2.643	2.351	2.497
39.06	2.566	2.674	2.390	2.509
19.53	2.607	2.740	2.520	2.602
9.77	2.763	2.716	2.611	2.669
0	2.867	2.798	2.756	2.764

20

30

TNB6 (一次抗体)				
	競合(二次)抗体			
抗体濃度	H402	TNB3	TNB6	抗 HuFCER1

(ng/ml)				
10000	0.122	2.307	0.134	2.490
5000	0.303	2.410	0.310	2.604
2500	0.459	2.177	0.473	2.569
1250	0.769	2.276	0.733	2.550
625	1.446	2.283	1.383	2.501
312.5	2.126	2.319	2.053	2.402
156.25	2.502	2.430	2.358	2.564
78.125	2.647	2.455	2.480	2.516
39.06	2.743	2.496	2.557	2.530
19.53	2.745	2.579	2.605	2.582
9.77	2.787	2.697	2.654	2.559
0	2.772	2.685	2.319	2.377

10

このデータは、モノクローナル抗体H402およびTNB6が、これら抗体が同じまたは密接に関連するエピトープを共有することと一致して、イヌ血清アルブミンの結合について競合することを実証する。このデータはさらに、TNB3によるイヌ血清アルブミンの結合が、H402によってもTNB6によっても影響を受けないことを実証する。

## 【0093】

(実施例14：イヌアルブミンおよびネコアルブミンのH352、H398およびTNB3による結合)

20

この実施例は、3種類の抗アルブミン抗体(H352、H398およびTNB3)がイヌアルブミン(CSA)またはネコアルブミン(FSA)に結合する能力を比較する。

## 【0094】

結合アッセイを、以下のように行った。検出を可能にするために、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)(Pierce Chemical, Rockford, IL)を、CSAまたはFSAのいずれかに、製造業者のプロトコルに従って結合体化した。マイクロタイタープレートのウェルを、炭酸塩緩衝液(50mM炭酸塩/炭酸水素塩, pH9.6)中の一定範囲(10µg/ml~9.77ng/ml)の抗体(H352、H398またはTNB3のいずれか)でコーティングし、そのプレートを、4℃にて一晩保存した。翌日、過剰な液体を除去し、ウェルを、ブロッキング溶液(STABILCOAT(登録商標)IMMUNOASSAY STABILIZER; SurModics, Inc., Eden Prairie, Minnesotaから入手可能)を使用して、製造業者の指示に従ってブロックした。ブロッキング溶液を除去した後、ウェルを、洗浄緩衝液(0.05% Tween-20含有PBS)を使用してリンスし、HRP-FSA(炭酸緩衝液中で1:400希釈)またはHRP-CSA(炭酸塩緩衝液中で1:800希釈)をウェルに添加し、プレートを室温(RT)にて30分インキュベートした。HRP-アルブミン結合体を除去し、ウェルを、洗浄緩衝液を使用して2回洗浄し、50µlのTMB Substrate System(KPL Labs, Gaithersburg, MDから入手可能)を各ウェルに添加した。このプレートを、RTにて10分インキュベートし、その後、50µlの2Nスルホン酸を各ウェルに添加することにより反応を停止させた。ELISAプレートリーダーを使用して、450nmにてプレートを読み取った。結果を、以下の表10に示す。

30

40

## 【0095】

## 【表10】

表10.

MAb 濃度 (ng/ml)	mAb					
	H352		H398		TNB3	
	FSA	CSA	FSA	CSA	FSA	CSA
10000	4.200	4.184	2.984	3.887	0.055	4.191
5000	4.200	4.200	1.944	2.806	0.047	4.184
2500	4.189	4.160	1.532	2.333	0.049	4.177
1250	4.127	4.200	1.187	1.941	0.099	4.186
625	2.740	4.084	0.493	0.769	0.043	4.178
312.5	1.266	2.814	0.168	0.282	0.045	3.410
156.25	0.713	1.598	0.095	0.135	0.043	2.400
78.13	0.324	0.859	0.078	0.090	0.042	1.109
39.06	0.178	0.413	0.053	0.063	0.043	0.543
19.53	0.107	0.236	0.047	0.055	0.049	0.309
9.77	0.077	0.132	0.050	0.051	0.059	0.191
0	0.044	0.048	0.048	0.061	0.049	0.048

10

このデータは、モノクローナル抗体H352が、ほぼ等しい親和性でFSAおよびCSAの両方に結合することを実証する。モノクローナル抗体H398はまた、FSAおよびCSAの両方を認識するが、CSAに対する親和性のほうが高い。最後に、このデータは、モノクローナル抗体TNB3が、CSAに特異的に結合するが、FSAには特異的に結合しないことを実証する。

20

## 【0096】

(実施例15：イヌ糸状虫誘導性腎疾患に罹患したイヌにおけるアルブミン)

この実施例は、イヌ*Dirofilaria immitis*誘導性ネフロパシーに存在するアルブミンレベルを開示する。このモデルにおいて、動物に、Grauer, G.F.ら, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 39(4), 1988, p380-387に記載されるように、抗原-抗体複合体に起因した腎損傷を生じる*D. immitis*を感染させ、糸球体損傷を誘導した。このモデルにおいて、感染の約7ヵ月後に、*D. immitis*抗原が血液中に存在することは公知である。この実施例に関しては、動物に*D. immitis*を感染させ、カテーテル挿入により1ヶ月に1回尿サンプルを回収した。いくつかの場合には、カテーテル挿入のプロセスが、上昇したアルブミンレベルを招き得ることに注意のこと；結果として、動物が、2つの連続したサンプル中でマイクロアルブミン尿症(microalbuminuric)であることが分かった場合は、マイクロアルブミン尿症(microalbuminuria)について陽性と判断されるのみである。各サンプル中のアルブミン量を、ELISAアッセイを使用して決定した。結果を、以下の表11に示す。N/Aと表示したボックスは、サンプルが利用可能でなかったことを示す。

30

## 【0097】

## 【表11】

40

表11.

感染後の 月数	動物識別子											
	HOP (A)	IGH (A)	POR (A)	SSH (A)	XTJ (A)	YOH (A)	AXH (B)	CAH (B)	FVH (B)	GUH (B)	HOH (B)	VIP (B)
	174.9	0.2	2.3	1.9	0.3	2.9	8.0	72.6	0.3	3.7	4.2	2.1
1	2.1	3.8	2.4	0.3	N/A	8.7	4.0	4.0		3.7	0.2	0.4
2	33.8	2.0	9.5	2.4	29.9	N/A	3.3	0.2	3.0	3.3	0.9	2.6
4	1.3	16.4	0.3	3.0	0.3	0.3	3.7	22.7	2.5	2.3	1.8	5.4
5	2.2	4.2	N/A	2.0	18.1	4.2	3.4	3.0	0.3	1.9	0.2	4.1
6	4.9	9.9	N/A	2.5	N/A	0.3	0.2	2.6	2.7	1.5	0.4	0.4
7	1.4	48.1	0.3	0.3	20.7	45.6	3.9	0.3	1.9	20.7	3.3	8.1
8	8.4	N/A	18.0	N/A	60.6	16.2	3.1	4.8	6.5	2.8	8.5	15.4
9	26.2	2.9	4.4	0.4	46.8	16.1	6.0	0.3	24.6	3.6	0.3	N/A
10	N/A	11.0	3.4	10.8	26.2	15.7	13.1	21.3	54.0	60.3	0.2	46.0
11	52.1	125.7	43.5	36.9	180.6	67.8	3.9	27.3	11.5	6.5	59.5	736.
12	58.5	16.2	22.2	52.9	51.3	54.9	6.8	76.2	23.4	5.9	97.4	167.2
13	113.5	56.4	25.1	8.1	132.4	112.7	14.7	30.1	327.2	13.3	65.5	132.6
14	134.3	60.2	132.1	16.8	123.0	82.9	66.6	65.8	500.0	5.0	285.7	69.06.1
15	206.0	4.0	122.0	23.7	39.1	18.6	3.8	16.4	500.0	8.0	107.8	34.8
16	37.3	7.6	500.0	5.4	52.5	10.1	5.5	17.8	500.0	4.9	43.1	N/A
17	N/A	45.2	N/A	8.6	181.6	89.1	30.9	19.8	500.0	16.4	53.0	N/A
18	18.8	112.1	211.1	5.4	70.4	26.8	10.5	14.9	N/A	5.4	21.3	N/A
19	16.7	67.0	176.7	12.1	208.4	N/A	N/A	36.3	N/A	4.9	57.1	N/A
20	N/A	N/A	N/A	N/A	500.0	N/A	N/A	N/A	N/A	1.9	N/A	N/A
21	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	37.9	9.2	41.7	N/A	11.0	17.1	N/A
22	1.6	4.7	75.8	9.1	500.0	27.2	22.2	500.0	N/A	3.2	46.2	N/A
23	83.2	37.6	30.3	17.5	500.0	60.3	54.3	500.0	N/A	5.2	37.7	N/A

10

20

このデータは、D . i m m i t i sでの感染後に、尿中アルブミンレベルが進行的に増加することを実証する。さらに、大部分の動物は、血中にD . i m m i t i s抗原が現れてから1~2ヶ月以内にミクロアルブミン尿症になった。ミクロアルブミン尿症は、研究の終わりまでに全ての動物において検出することができた。

## 【0098】

(実施例16: 遺伝性腎炎に罹患したイヌにおけるアルブミンレベル)

この実施例は、ミクロアルブミン尿症(MA)のレベルと、腎疾患について一般的に使用されているマーカー(尿タンパク質/クレアチニン(UP/C)比)とを遺伝性腎炎(HD)に罹患した動物において経時的に比較する。このモデルにおいて、動物は、Lee, GE, American Journal of Veterinary Research, 1999: 60, p 373-383に記載されるように、動物の寿命の間に腎疾患の急速な発症を生じる遺伝的欠損を有する。この実施例において、正常なイヌの集団(colony)およびHDに罹患したイヌの集団から、尿を定期的に回収した。各サンプル中のアルブミン量を、ELISAアッセイを使用して決定した。さらに、尿タンパク質/クレアチニン(UP/C)比を、獣医関係の実験室を使用して決定した。この測定により、腎疾患は、UP/C比が1.0より大きい場合に存在すると考えられる。この研究の結果を、以下の表12に示す。

30

## 【0099】

## 【表12】

表12.

動物識別子										
年齢 (週)	Fenzi (コントロール)		Jake (コントロール)		Ned (コントロール)		Oscar (コントロール)		Pete (コントロール)	
	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )
8	0.1	2	1.6	0	0.2	5	0.6	2	0.9	3
11	0.2	2	0.7	5	0.2	5	0.2	8	0.3	4
13	0.3	1	0.3	0	0.2	5	0.9	3	0.4	2
15	1.0	3	0.6	6	0.2	5	0.3	4	0.2	2
17	0.2	1	0.2	3	0.2	5	0.1	3	0.2	6
19	0.4	15	0.5	4	0.2	5			0.1	3
21	0.1	4	1.0	7	0.2	5	0.1	2	0.1	1
23	0.3	0	0.2	3	0.2	5	0.2	1	0.1	1
25	0.6	1	0.1	6	0.2	5	0.1	1	0.1	20
27	0.1	1	0.2	6	0.2	5	0.1	0	0.1	6
30	0.1	2	0.1	4	0.2	5	0.1	2	0.0	1
34	0.2	220	0.1	4	0.2	5	0.1	1	0.1	2
38	0.1	1	0.1	2	0.2	5	0.1	1	0.1	4
年齢 (週)	Ethan (HN)		Fraser (HN)		Greg (HN)		Ike (HN)		Lester (HN)	
	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )
8	0.2	4	0.1	6	0.1	2	1.0	6	0.8	10
11	0.3	9	0.2	4	0.1	4	0.2	10	0.4	8
13	0.6	4	0.2	1	0.3	2	0.2	1	0.5	12
15	0.5	8	0.3	12	0.1	12	0.7	7	0.3	3
17	0.1	17	0.6	358	0.2	487	1.0	557	0.4	7
19	1.0	82	2.3	314	0.4	2	4.4	918	0.6	115
21	3.0	136	1.1	30	0.2	2	6.6	1574	1.0	561
23	6.2	4954	5.1	2145	0.3	71	12.5	5560	3.0	615
25	10.1	744	9.0	3000	1.6	603	16.6	2920	3.7	17
27	6.6	1179	7.3	2020	3.5	1499	15.3	3904	7.0	1477
30	15.7	2734	12.3	2696	5.7	1733	16.5	2276	9.3	1679
34	11.6	1901	12.9	2	8.2	309	4.4	3608	8.7	1992
38	6.4	3310	13.9	3597	8.8	4845	8.5	4465	8.1	1919
年齢 (週)	Naie (HN)		Newt (HN)		Quark (HN)		Quirt (HN)		Eddie (HN)	
	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )
8	0.4	6	0.2	5	0.1	2	0.4	1	1.6	16
11	0.4	0	0.4	0	0.1	3	0.4	4	0.2	10
13	0.4	5	0.2	4	0.7	11	0.2	3	0.4	6
15	0.4	2	0.1	19	0.3	5	0.1	1	0.3	6
17	0.3	4	1.1	116	0.4	74	0.1	12	0.1	5
19	0.6	7	1.5	265	0.6	232	0.2	25	0.4	10
21	0.2	52	2.4	1321	2.8	620	0.6	267	1.2	1063
23	2.1	340	8.7	2665	9.2	1223	3.4	543	2.8	1307
25	2.2	622	9.6	4711	8.8	1938	4.6	1208	8.7	1947
27	3.2	483	10.1	1309	7.8	2007	9.1	3054	6.9	1052
30	5.8	1529	9.0	2989	14.1	3419	9.3	2747	13.9	3188
34	7.3	1483	8.8	1806	13.1	3055	9.9	6379	10.5	4927
38	8.9	2955	8.1	6487	12.2	3118	9.5	3044	12.7	6717
年齢 (週)	Felix (HN)		Fred (HN)		Gus (HN)		Neal (HN)		Norm (HN)	
	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C 比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )
8	0.7	1	0.3	3	0.1	5	0.8	0	0.3	1
11	0.1	8	0.1	12	0.1	4	0.2	3	0.1	1
13	0.1	1	0.5	1	0.1	22	0.4	3	0.1	0
15	0.3	5	0.6	1	0.2	55	0.1	2	0.5	1

10

20

30

17	0.8	122	0.5	6	1.7	24	0.4	2	0.7	4
19	0.3	87	0.3	13	2.2	77	0.6	428	0.5	7
21	0.8	903	0.8	9	3.9	16	0.6	210	1.3	354
23	2.6	1679	0.6	81	9.3	1565	6.6	1335	5.7	1535
25	6.9	16170	1.9	152	6.4	3950	8.4	4091	9.5	3290
27	10.2	2452	3.5	11	5.2	1263	10.1	1158	5.5	798
30	12.0	2612	8.1	1887	8.3	2648	9.2	2523	6.8	2796
34	9.3	4146	7.1	3403	8.5	4583	10.1	1767	11.5	2603
38	10.4	6218	10.8	7141	7.9	3758	10.4	2906	7.0	3403
	Paul (HN)		Quinn (HN)		Scooter (HN)					
年齢 (週)	UP/C比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )	UP/C比	MA ( $\mu\text{g/ml}$ )
8	0.6	4	0.1	5	1.4					
11	0.1	8	0.1	1	0.2	3				
13	0.4	1	0.2	5	0.3	7				
15	0.2	0	0.2	1	0.1	21				
17	0.1	6	0.1	3	0.3	66				
19	0.7	6	0.6	5	2.7	323				
21	0.1	58	0.1	16	4.3	20				
23	1.3	206	0.6	29	8.8	2678				
25	2.0	598	1.5	224	11.3	2957				
27	4.2	674	2.1	431	10.1	3864				
30	4.0	2650	5.4	1468	11.2	2118				
34	5.5	0	10.0	1395	12.5	5098				
38	6.4	4324	8.6	1624	8.4	3238				

このデータは、遺伝性腎炎に罹患した動物においてマイクロアルブミン尿症が進行的に増大することを実証する。さらに、実質的に全ての動物において、UP/C比が1.0より大きくなる前にマイクロアルブミン尿症が検出された。

【0100】

本発明は、現在好ましい実施形態を参照して記載されてきたが、本発明の趣旨から逸脱することなく、種々の改変が行われ得ることが当業者に理解されるはずである。従って、本発明は、特許請求の範囲によってのみ制限される。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 October 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/079781 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53, 31/00, 33/00
- (74) Agents: VERSER, Carol, Talkington et al.; Heska Corporation, 1613 Prospect Parkway, Fort Collins, CO 80525 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/11105
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM, GR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 28 March 2002 (28.03.2002)
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GL, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/279,391 28 March 2001 (28.03.2001) US  
60/342,268 21 December 2001 (21.12.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:  
US 60/342,268 (CIP)  
Filed on 21 December 2001 (21.12.2001)  
US 60/279,391 (CIP)  
Filed on 28 March 2001 (28.03.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): HESKA CORPORATION [US/US]; 1613 Prospect Parkway, Fort Collins, CO 80525 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): MCDONALD, Thomas [US/US]; 9967 Florence Heights Blvd., Omaha, NE 68112 (US), JENSEN, Wayne, A. [US/US]; 9133 NCR #5, Wellington, CO 80549 (US), WEBER, Annika [US/US]; 802 N. 74th St., Omaha, NE 68114 (US), AN-DREWS, Janet, S. [US/US]; 3308 W. Prospect Road, Fort Collins, CO 80526 (US).
- Declarations under Rule 4.17:**  
of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only  
of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only  
of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:**  
with international search report  
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/079781 A1

(54) Title: METHODS OF DETECTING EARLY RENAL DISEASE IN ANIMALS

(57) Abstract: The present invention provides a method for the detection of early renal disease in animals. The method includes the steps of (a) obtaining a sample from an animal to be tested and (b) determining the amount of albumin in the sample. An amount of albumin in the range of from 10 µg/ml to about 300 µg/ml indicates the presence of early renal disease. The present invention also provides antibodies to canine, feline and equine albumin which can be used to detect the presence of early renal disease.

WO 02/079781

PCT/US02/11105

1

5 METHODS OF DETECTING EARLY RENAL DISEASE IN ANIMALS

## FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to detection of early renal disease in animals, and more particularly to use of microalbuminuria as a marker of early renal disease.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

Glomerular disease is a broad term used to describe a number of renal diseases that can lead to renal failure and death. Damage to the glomerulus increases capillary permeability to proteins such as albumin, resulting in the presence of proteins in urine (referred to as proteinuria).

15 In humans, proteinuria can result from a number of diseases, including diabetes, hypertension and IgA nephropathy. The conventional test for proteinuria in humans is to use a standard protein dipstick assay as described, for example, in Bakris, *Curr. Opin. in Neph. and Hypertension*, 5:219-223 (1996). Dipsticks that are chemically impregnated with sulfosalicylic acid to measure proteins in a sample  
20 are commercially available, for example from Boehringer-Mannheim, Germany (Chemstrips™) and Ames Co., USA (Albustix™). One drawback to these dipstick assays is that they require a significant amount of protein in the urine to be detected. Amounts of protein in humans of less than 300 milligrams per day are not detectable by the dipstick assay, yet proteinuria may still be present. Another drawback to these  
25 protein-based assays is that they are incapable of discriminating between different types of protein (e.g., albumin, globulin, etc.) that may be present in urine. Proteinuria may result from the leakage of serum proteins into glomerular filtrate due to glomerulonephritis; however, proteinuria may also be present due to problems unrelated to renal disease such as bladder infections or a high-protein diet.

30 Lower amounts of albumin in the urine, referred to as "microalbuminuria," indicate a level of albumin that is greater than in normal patients, but lower than in patients with overt proteinuria, i.e., clinically proteinuric. In humans, microalbuminuria refers to amounts of albumin between 30 milligrams per day and 300 milligrams per day according to Watts, *Clin. Chem.*, 32(8):1544-1548 (1986).  
35 Methods to detect human microalbuminuria are known and include those methods that use an anti-human albumin antibody to detect amounts of human albumin that are not detectable by known dipstick methods. Such methods of detecting human

WO 02/079781

2

PCT/US02/11105

5 microalbuminuria are described, for example, in U.S. Patent No. 5,246,835, issued on September 21, 1993, to Suzuki et al.

Although microalbuminuria can be detected in humans, the utility of  
detecting microalbuminuria in humans may be very limited, at least according to  
some reports. For example, using the microalbuminuria tests to predict renal disease  
10 has only been recommended for humans with diabetes according to Bakris, *supra*.  
Because disorders other than diabetes, such as hypertension, heart disease and IgA  
nephropathy do not lead to consistent microalbuminuria in humans, according to  
Bakris, *supra*, detecting microalbuminuria has poor predictive value for later renal  
disease associated with these non-diabetic disorders states. Accordingly, using  
15 microalbuminuria tests to screen for potential or early renal disease in non-diabetic  
human patients is generally not recommended by Bakris, *supra*.

Renal disease is also a significant health problem in companion animals,  
particularly dogs and cats. In dogs, the primary cause of renal disease is damage to  
the glomerulus in the kidney. Although glomerular damage in dogs can occur in any  
20 number of ways, it is most commonly caused when circulating immune complexes  
(i.e., antibody/antigen complexes) are deposited in the glomerular capillaries as a  
result of systemic illness as described in Batamuzi, et al., *Vet Record*, 143;16-20  
(1988). Several diseases have been implicated in the pathogenesis of immune  
complex formation, including for example, dirofilariasis and other parasitic  
25 infections, diabetes, hypothyroidism and others.

Early renal disease in veterinary medicine has been characterized by  
glomerular changes detectable by histopathology, including the use of light  
microscopy or occasionally immunofluorescence as reported in Vaden, *Proc. 17<sup>th</sup>*  
*ACVIM*, 420 (1999). However, as reported in that paper, these techniques can lead to  
30 misdiagnosis of the cause of the renal disease. Determining the cause of the renal  
disease is useful in formulating an appropriate treatment regimen. For example, if  
the cause of the renal disease is immune-mediated, then immunosuppressive therapy  
may be appropriate. However, currently available assays to detect human  
microalbuminuria are not sufficiently sensitive to detect canine microalbuminuria.

35 Thus, a need exists for assays to detect canine early renal disease in  
companion animals. The present invention satisfies this need and provides related  
advantages as well.

WO 02/079781

PCT/US02/11105

3

## 5 SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a method and kit for the detection of early renal disease in animals. Preferred animals to test for early renal disease are companion animals with dogs, cats and horses being the most preferred. Method and kit embodiments disclosed herein are based on the discovery that the presence of albumin in a sample from an animal, in the range of 10 µg/ml to 300 µg/ml can be used as an indicator of early renal disease. The most preferred sample to test is urine although any sample that is useful for measuring leakage of albumin from the glomerulus can be used. Any assay capable of detecting albumin may be used in the instant method or kit although preferred methods and kits employ immunologically-based assays, preferably single-step assays. The most preferred assay is an immunologically-based assay utilizing an anti-albumin antibody.

The present invention also provides isolated antibodies which can be used in detecting albumin levels in animal samples. Any antibody which binds albumin from the test animal can be used; preferred antibodies bind canine albumin and/or feline albumin and/or equine albumin. Preferred antibodies are TNB1, TNB3, TNB4, TNB5, TNB6, H352, H386, H387, H388, H389, H390, H391, H393, H394, H395, H396, H397, H398, H399, H400, H401, and H402. Also included are cultured cells which produce antibodies suitable for practicing the present invention.

## 25 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention generally relates to a novel method of detecting early renal disease in animals and to novel antibodies that selectively bind to albumin from one or more specie of animal. More particularly, the present invention relates to the discovery that the presence of microalbuminuria can be used to predict early renal disease in animals, particularly immune-mediated renal diseases. Therefore, the methods can also be useful for prescribing a treatment for an animal. Suitable treatment can be designed to delay or prevent the onset of late-stage renal disease. Examples of such treatment include, for example, pharmacological or dietary modification. The present invention is also useful in monitoring the effectiveness of a prescribed treatment.

35 A method of the present invention can be generally accomplished by:

- (a) obtaining a sample from an animal; and
- (b) determining the amount of albumin in the sample.

WO 02/079781

4

PCT/US02/11105

5 An amount of albumin in a range of from about 10 $\mu$ g/ml to about 300  $\mu$ g/ml in the sample is indicative of early renal disease.

It is to be noted that the term "a" entity or "an" entity refers to one or more of that entity. For example, a protein refers to one or more proteins or at least one protein. As such, the terms "a" "an" "one or more" and "at least one" can be used interchangeably herein. The terms "comprising," "including," and "having" can also  
10 be used interchangeably. In addition, the terms "amount" and "level" are also interchangeable and may be used to describe a concentration or a specific quantity. Furthermore, the term "selected from the group consisting of" refers to one or more members of the group in the list that follows, including mixtures (i.e. combinations)  
15 of two or more members.

As used herein, the term "renal disease" is defined as a dysfunction of the glomerular filtration process. Glomerular dysfunction may be transient or it may be chronic, depending on the underlying cause of the disease. One consequence of glomerular dysfunction is that proteins which are normally retained in the blood, leak  
20 through the glomerulus, into the glomerular filtrate and eventually into the urine. One example of a protein which may be present in urine due to glomerular dysfunction is albumin and its presence in urine at low levels has been termed microalbuminuria. The term "microalbuminuria," as used herein, refers to an amount of albumin that is present in a sample in a range from about 10  $\mu$ g/ml to about 300  
25  $\mu$ g/ml when the sample is normalized to a specific gravity of 1.010 grams/milliliter (g/ml). This is greater than the amount found in healthy animals which is typically low, i.e., less than 10  $\mu$ g/ml. Microalbuminuria may arise as a consequence of damage to the kidney resulting from, for example, immune-complex-mediated glomerulonephritis. As used herein, the term "late-stage renal disease" is used to  
30 define a state in which an animal has lost 70% or more of its renal function, with corresponding, elevated levels in the animal's serum metabolites, in particular blood-urea nitrogen (BUN) and serum creatinine levels. As used herein, the term "early renal disease" is defined as the presence of microalbuminuria in an animal in the absence of detectable changes in renal function (i.e. increased BUN, serum creatinine  
35 or decreased ability to concentrate urine). As such, an albumin level in a sample ranging from about 10  $\mu$ g/ml to about 300  $\mu$ g/ml when the sample is normalized to a specific gravity of 1.010 g/ml is indicative of early renal disease.

- 5 As used herein, the term "animal" is meant to encompass any non-human organism capable of developing early renal disease. Suitable animals to test for microalbuminuria include, but are not limited to companion animals (i.e. pets), food animals, work animals, or zoo animals. Preferred animals include, but are not limited to, cats, dogs, horses, ferrets and other Mustelids, cattle, sheep, swine, and rodents.
- 10 More preferred animals include cats, dogs, horses and other companion animals, with cats, dogs and horses being even more preferred. As used herein, the term "companion animal" refers to any animal which a human regards as a pet. As used herein, a cat refers to any member of the cat family (i.e., Felidae), including domestic cats, wild cats and zoo cats. Examples of cats include, but are not limited to,
- 15 domestic cats, lions, tigers, leopards, panthers, cougars, bobcats, lynx, jaguars, cheetahs, and servals. A preferred cat is a domestic cat. As used herein, a dog refers to any member of the family Canidae, including, but not limited to, domestic dogs, wild dogs, foxes, wolves, jackals, and coyotes and other members of the family Canidae. A preferred dog is a domestic dog. As used herein, a horse refers to any
- 20 member of the family Equidae. An equid is a hoofed mammal and includes, but is not limited to, domestic horses and wild horses, such as, horses, asses, donkeys, and zebras. Preferred horses include domestic horses, including race horses.
- In one embodiment of the present invention, a sample is obtained, or collected, from an animal to be tested for microalbuminuria. The animal may or may
- 25 not be suspected of having early stage renal disease. A sample is any specimen obtained from the animal that can be used to measure albumin leakage from the glomerulus. A preferred sample is a bodily fluid that can be used to measure albumin leakage from the glomerulus. Those skilled in the art can readily identify appropriate samples.
- 30 Urine is particularly suitable as the sample. Urine samples can be collected from animals by methods known in the art, including, for example, collecting while the animal is voiding, or collecting by catheterization, or by cystocentesis. Urine may be refrigerated or frozen before assay, but is preferably assayed soon after collection.
- 35 Although not necessary for the present invention, the sample may be pre-treated as desired. For example, the sample can be normalized to a desired specific gravity. Normalizing the sample by appropriate dilution methods known in the art

WO 02/079781

6

PCT/US02/11105

5 permits quantification of microalbuminuria independent of the concentration (e.g.  
specific gravity) of the sample. Although any desired specific gravity can be readily  
selected by those skilled in the art, a particularly suitable specific gravity is 1.010. If  
another specific gravity value is desired for normalizing a sample, those skilled in the  
art can readily determine the appropriate albumin amounts that would fall within the  
10 definition of microalbuminuria for the desired specific gravity.

After obtaining the sample, the level of albumin in that sample is determined.  
As used herein, the terms "determine," "determine the level of albumin," "determine  
the amount of albumin," "determine the albumin level," and the like are meant to  
encompass any technique which can be used to detect or measure the presence of  
15 albumin in a sample. Albumin is an example of an analyte. The term "analyte, as  
used herein, is used to describe any molecule or compound present in a sample.  
Such techniques may give qualitative or quantitative results. Albumin levels can be  
determined by detecting the entire albumin protein or by detecting fragments,  
degradation products or reaction products of albumin. In a preferred method, the  
20 level of albumin is determined using a suitable albumin-binding compound.

As used herein, the terms "albumin-binding molecule", "albumin-binding  
compound", "anti-albumin compound", and the like are used interchangeably and  
refer to any molecule which binds to albumin and forms a stable complex. A  
preferred albumin-binding compound is one which selectively binds albumin from an  
25 animal. The term "selectively binds albumin" means to preferentially bind to  
albumin as opposed to binding other proteins unrelated to albumin. A particularly  
useful albumin-binding compound is an anti-albumin antibody. As used herein, the  
terms "anti-albumin antibody," "antibody to albumin," "antibody to animal  
albumin," "antibody having specificity for albumin from animals," "animal albumin  
30 antibody," and the like refer to an antibody that preferentially binds albumin from  
one or more animals. A particularly suitable anti-albumin antibody preferentially  
binds to canine, feline and/or equine albumin as opposed to binding to different,  
unrelated canine, feline or equine proteins. Another particularly suitable anti-  
albumin antibody preferentially binds to canine albumin as opposed to binding to a  
35 different, unrelated canine protein. Another particularly suitable antibody to  
companion animal albumin preferentially binds to feline albumin as opposed to  
binding to a different, unrelated feline protein. Another particularly suitable

WO 02/079781

7

PCT/US02/11105

5 antibody to companion animal albumin preferentially binds to equine albumin as opposed to binding to a different, unrelated equine protein.

The present invention also includes isolated (i.e., removed from their natural milieu) antibodies that selectively bind to albumin of one or more animal species.

10 Isolated antibodies of the present invention can include antibodies in serum, or antibodies that have been purified to varying degrees. Antibodies of the present invention can be polyclonal or monoclonal, or can be functional equivalents such as antibody fragments and genetically-engineered antibodies, including single chain antibodies or chimeric antibodies that can bind to one or more epitopes on albumin. A suitable method to produce antibodies effective for use in the present invention

15 includes (a) administering to an animal an effective amount of a protein, peptide or mimotope thereof to produce the antibodies and (b) recovering the antibodies.

Antibodies raised against defined proteins or mimitopes can be advantageous because such antibodies are not substantially contaminated with antibodies against other substances that might otherwise cause interference in a diagnostic assay.

20 Methods to produce such antibodies are known in the art and are described in detail in Harlow et al., *Antibodies, a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Labs Press, 1988), and include immunizing animals to produce preparations of polyclonal antibodies that are recovered from, for example, ascites fluid and purified by methods known in the art to yield preparations that are reactive to animal albumin.

25 Many species have proteins sharing closely related sequences and therefore it may be difficult using standard immunization protocols to produce antibodies which recognize a protein from only one species. Therefore, modification of standard methods used to produce antibodies, such as, for example, subtractive hybridization techniques, are also contemplated. Such modifications can be those known to those skilled in the art or additionally modified techniques as disclosed within this

30 application. In another method, antibodies for use in the present invention are produced recombinantly using techniques disclosed in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Labs Press, 1989).

As noted previously, other suitable methods include producing monoclonal antibodies. Briefly, monoclonal antibodies are produced from the fusion of spleen cells from an immunized animal and myeloma cells to produce a hybridoma. Hybridomas can be screened for production of the proper antibody, then cultured and

WO 02/079781

8

PCT/US02/11105

5 the antibodies harvested. As used herein, the term "cultured cell" refers to hybridomas or any cell which produces an antibody. Methods to produce and screen such hybridomas are described in Harlow, et al., *supra*. Methods to prepare an antigen so that antibodies produced will be reactive with animal albumin are known in the art and are described, for example, in Harlow, et al., *supra*. Preparation of the antigen material for injection into the animal includes any technique known in the art, and include, for example, using the full-length protein, using peptides selected from immunogenic regions of the protein, modifying the antigen by methods such as, for example, dinitrophenol coupling, arsynyl coupling, denaturation of the antigen, coupling antigen to protein carriers such as, for example, keyhole limpet hemacyanin, peptides containing Class II- T-cell receptor binding sites, to beads, and any other method known in the art. See Harlow, et al., *supra*.

The anti-albumin antibodies of the present invention can include multifunctional antibodies, for example a bifunctional antibody having at least one functional portion that specifically binds to animal albumin. Such multifunctional antibodies can include, for example, a chimeric molecule comprising a portion of the molecule that binds to animal albumin and a second portion that enables the chimeric molecule to be bound to a substrate or to be detected in such a manner that the binding to the albumin is unimpaired. Examples of suitable second portions include but are not limited to a fragment of an immunoglobulin molecule, a fluorescent protein or an enzyme.

In addition to anti-albumin antibodies, albumin-binding molecules can also include proteins and peptides that bind to albumin. Such proteins and peptides may be from natural, recombinant or synthetic sources and may or may not be purified. Examples of non-antibody, albumin-binding, proteins include, but are not limited to, the 42-kilodalton (kDa) Protein A from *Staphylococcus aureus*, Protein G from *S. aureus* and *Eschericia coli*, the rat 60-kDa albumin binding protein (gp60) and the human renal tubule cubilin protein. The use of functional homologues of such proteins, from these or other species, for the detection of albumin is also contemplated. Hybrids or fusions of albumin-binding proteins which retain their albumin-binding ability may also be used. In such hybrids, the albumin-binding portion of the protein would be joined to a second portion which allows the hybrid to be bound to a substrate or to be detected. Examples of suitable second portions

WO 02/079781

9

PCT/US02/11105

5 include, but are not limited to, a fragment of an immunoglobulin molecule, an epitope tag, a fluorescent protein or an enzyme.

An albumin-binding molecule used in the present invention can be contained in a formulation. For example, an antibody can be combined with a buffer in which the antibody is solubilized, and/or with a carrier. Suitable buffers and carriers are  
10 known to those skilled in the art. Examples of suitable buffers include any buffer in which an albumin-binding molecule can function to selectively bind to albumin, such as, but not limited to, phosphate buffered saline, water, saline, phosphate buffer, HEPES buffer (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonic acid buffered saline) TES buffer (Tris-EDTA buffered saline), Tris buffer and TAE buffer (Tris-acetate-  
15 EDTA). Examples of carriers include, but are not limited to, polymeric matrices, toxoids, and serum albumins, such as bovine serum albumin. Carriers can be combined with an albumin-binding molecule or conjugated (i.e. attached) to an albumin-binding molecule in such a manner as to not substantially interfere with the ability of the albumin-binding molecule to selectively bind to albumin. In addition,  
20 suitable formulations of the present invention can include not only the albumin-binding molecule to specie-specific albumin, but also one or more additional antigens or antibodies useful for detecting albumin.

As used herein, the term "contacting" refers to the introduction of a sample putatively containing albumin to an albumin-binding compound, for example, by  
25 combining or mixing the sample with the albumin-binding compound. When albumin is present in the sample, an albumin-compound complex is then formed; such complex formation refers to the ability of an anti-albumin compound to selectively bind to the albumin in order to form a stable complex that can be detected. Detection can be qualitative, quantitative, or semi-quantitative. Binding  
30 albumin in the sample to the albumin-binding compound is accomplished under conditions suitable to form a complex. Such conditions (e.g., appropriate concentrations, buffers, temperatures, reaction times) as well as methods to optimize such conditions are known to those skilled in the art. Binding can be measured using a variety of methods standard in the art including, but not limited to, enzyme  
35 immunoassays (e.g., ELISA), immunoprecipitations, immunoblot assays and other immunoassays as described, for example, in Sambrook et al., *supra*, and Harlow, et al., *supra*. These references also provide examples of complex formation conditions.

5 In one embodiment, an albumin/albumin-binding compound complex, also referred to herein as an albumin-compound complex, can be formed in solution. In another embodiment, an albumin/albumin-binding compound complex can be formed in which the albumin or the albumin-binding compound is immobilized on (e.g., coated onto) a substrate. Immobilization techniques are known to those skilled  
10 in the art. Suitable substrate materials include, but are not limited to, plastic, glass, gel, celluloid, fabric, paper, and particulate materials. Examples of substrate materials include, but are not limited to, latex, polystyrene, nylon, nitrocellulose, agarose, cotton, PVDF (poly-vinylidene-fluoride), and magnetic resin. Suitable shapes for substrate material include, but are not limited to, a well (e.g., microtiter dish well), a microtiter plate, a dipstick, a strip, a bead, a lateral flow apparatus, a  
15 membrane, a filter, a tube, a dish, a celluloid-type matrix, a magnetic particle, and other particulates. Particularly preferred substrates include, for example, an ELISA plate, a dipstick, an immunodot strip, a radioimmunoassay plate, an agarose bead, a plastic bead, a latex bead, a sponge, a cotton thread, a plastic chip, an immunoblot membrane, an immunoblot paper and a flow-through membrane. In one  
20 embodiment, a substrate, such as a particulate, can include a detectable marker. For descriptions of examples of substrate materials, see, for example, Kemeny, D.M. (1991) *A Practical Guide to ELISA*, Pergamon Press, Elmsford, NY pp 33-44, and Price, C. and Newman, D. eds. *Principles and Practice of Immunoassay*, 2<sup>nd</sup> edition (1997) Stockton Press, NY, NY, both of which are incorporated herein by reference  
25 in their entirety.

In a preferred embodiment, an anti-albumin compound is immobilized on a substrate, such as a microtiter dish well, a dipstick, an immunodot strip, or a lateral flow apparatus. A sample collected from an animal is applied to the substrate and  
30 incubated under conditions suitable (i.e., sufficient) to allow for anti-albumin compound-albumin complex formation bound to the substrate (i.e., albumin in the sample binds to the anti-albumin compound immobilized on the substrate).

In accordance with the present invention, once formed, an albumin-binding molecule /albumin complex is detected. As used herein, the term "detecting complex  
35 formation" refers to identifying the presence of albumin-binding compound complexed to albumin. If complexes are formed, the amount of complexes formed can, but need not be, quantified. Complex formation, or selective binding, between a

5 putative albumin-composition with an albumin-binding compound can be measured  
(i.e., detected, determined) using a variety of methods standard in the art (see, for  
example, Sambrook et al. *supra.*), examples of which are disclosed herein. A  
complex can be detected in a variety of ways including, but not limited to use of one  
or more of the following assays: an enzyme-linked immunoassay, a competitive  
10 enzyme-linked immunoassay, a radioimmunoassay, a fluorescence immunoassay, a  
chemiluminescent assay, a lateral flow assay, a flow-through assay, an agglutination  
assay, a particulate-based assay (e.g., using particulates such as, but not limited to,  
magnetic particles or plastic polymers, such as latex or polystyrene beads), an  
immunoprecipitation assay, a BioCore™ assay (e.g., using colloidal gold), an  
15 immunodot assay (e.g., CMG's Immunodot System, Fribourg, Switzerland), and an  
immunoblot assay (e.g., a western blot), an phosphorescence assay, a flow-through  
assay, a particulate-based assay, a chromatography assay, a PAGE-based assay, a  
surface plasmon resonance assay, a spectrophotometric assay and an electronic  
sensory assay. Such assays are well known to those skilled in the art.

20 Assays can be used to give qualitative or quantitative results depending on  
how they are used. The assay results can be based on detecting the entire albumin  
molecule or fragments, degradation products or reaction products of albumin. Some  
assays, such as agglutination, particulate separation, and immunoprecipitation, can be  
observed visually (e.g., either by eye or by machines, such as a densitometer or  
25 spectrophotometer) without the need for a detectable marker.

In other assays, conjugation (i.e., attachment) of a detectable marker to the  
anti-albumin compound or to a reagent that selectively binds to the anti-albumin  
compound aids in detecting complex formation. A detectable marker can be  
conjugated to the anti-albumin compound or reagent at a site that does not interfere  
30 with ability of the anti-albumin compound to bind albumin. Methods of conjugation  
are known to those of skill in the art. Examples of detectable markers include, but  
are not limited to, a radioactive label, a fluorescent label, a chemiluminescent label, a  
chromophoric label, an enzyme label, a phosphorescent label, an electronic label; a  
metal sol label, a colored bead, a physical label, or a ligand. A ligand refers to a  
35 molecule that binds selectively to another molecule. Preferred detectable markers  
include, but are not limited to, fluorescein, a radioisotope, a phosphatase (e.g.,  
alkaline phosphatase), biotin, avidin, a peroxidase (e.g., horseradish peroxidase),

WO 02/079781

12

PCT/US02/11105

5 beta-galactosidase, and biotin-related compounds or avidin-related compounds (e.g., streptavidin or ImmunoPure® NeutrAvidin).

In one embodiment, an animal albumin-compound complex can be detected by contacting a sample with a specific compound-antibody conjugated to a detectable marker. A detectable marker can be conjugated to an anti-albumin antibody or other compound which binds the albumin-binding-compound in such a manner as not to block the ability of the anti-compound antibody or other compound to bind to the canine albumin-binding compound being detected. Preferred detectable markers include, but are not limited to, fluorescein, a radioisotope, a phosphatase (e.g., alkaline phosphatase), biotin, avidin, a peroxidase (e.g., horseradish peroxidase),  
10 beta-galactosidase, and biotin-related compounds or avidin-related compounds (e.g., streptavidin or ImmunoPure® NeutrAvidin).

In another embodiment, a complex is detected by contacting the complex with an indicator molecule. Suitable indicator molecules include molecules that can bind to the albumin/ albumin-binding molecule complex or to the albumin. As such, an indicator molecule can comprise, for example, an albumin-binding reagent, such as an antibody. Preferred indicator molecules that are antibodies include, for example, antibodies reactive with the antibodies from species of animal in which the anti- albumin antibodies are produced. An indicator molecule itself can be attached to a detectable marker of the present invention. For example, an antibody can be  
20 conjugated to biotin, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase or fluorescein.

The present invention can further comprise one or more layers and/or types of secondary molecules or other binding molecules capable of detecting the presence of an indicator molecule. For example, an untagged (i.e., not conjugated to a detectable marker) secondary antibody that selectively binds to an indicator molecule can be  
30 bound to a tagged (i.e., conjugated to a detectable marker) tertiary antibody that selectively binds to the secondary antibody. Suitable secondary antibodies, tertiary antibodies and other secondary or tertiary molecules can be readily selected by those skilled in the art. Preferred tertiary molecules can also be selected by those skilled in the art based upon the characteristics of the secondary molecule. The same strategy can be applied for subsequent layers.

35 Preferably, the indicator molecule is conjugated to a detectable marker. A developing agent is added, if required, and the substrate is submitted to a detection

WO 02/079781

13

PCT/US02/11105

5 device for analysis. In some protocols, washing steps are added after one or both complex formation steps in order to remove excess reagents. If such steps are used, they involve conditions known to those skilled in the art such that excess reagents are removed but the complex is retained.

One embodiment to detect microalbuminuria involves the use of a lateral flow assay, examples of which are described in U.S. Patent No. 5,424,193, issued June 13, 1995, by Pronovost et al.; U.S. Patent No. 5,415,994, issued May 16, 1995, by Imrich et al; WO 94/29696, published December 22, 1994, by Miller et al.; and WO 94/01775, published January 20, 1994, by Pawlak et al. A lateral flow assay is an example of a single-step assay. In a single-step assay, once the sample has been obtained and made ready for testing, only a single action is necessary on the part of the user to detect the present of an analyte. For example, the sample, in whole or part, can be applied to a device which then measures analyte in the sample. In one embodiment, a sample is placed in a lateral flow apparatus that includes the following components: (a) a support structure defining a flow path; (b) a labeling reagent comprising a bead conjugated to a specific antibody, the labeling reagent being impregnated within the support structure in a labeling zone; and (c) a capture reagent. Preferred antibodies include those disclosed herein. The capture reagent is located downstream of the labeling reagent within a capture zone fluidly connected to the labeling zone in such a manner that the labeling reagent can flow from the labeling zone into the capture zone. The support structure comprises a material that does not impede the flow of the beads from the labeling zone to the capture zone. Suitable materials for use as a support structure include ionic (i.e., anionic or cationic) material. Examples of such a material include, but are not limited to, nitrocellulose, PVDF, or carboxymethylcellulose. The support structure defines a flow path that is lateral and is divided into zones, namely a labeling zone and a capture zone. The apparatus can further include a sample receiving zone located along the flow path, preferably upstream of the labeling reagent. The flow path in the support structure is created by contacting a portion of the support structure downstream of the capture zone, preferably at the end of the flow path, to an absorbent capable of absorbing excess liquid from the labeling and capture zones.

In another embodiment, a lateral flow apparatus used to detect albumin includes: (a) a support structure defining a flow path; (b) a labeling reagent

5 comprising an anti- albumin antibody as described above, the labeling reagent  
impregnated within the support structure in a labeling zone; and (c) a capture  
reagent, the capture reagent being located downstream of the labeling reagent within  
a capture zone fluidly connected to the labeling zone in such a manner that the  
labeling reagent can flow from the labeling zone into the capture zone. The  
10 apparatus preferably also includes a sample receiving zone located along the flow  
path, preferably upstream of the labeling reagent. The apparatus preferably also  
includes an absorbent located at the end of the flow path. One preferred embodiment  
includes a capture reagent comprising anti-canine albumin antibody.

Once the albumin level has been measured, an assessment of whether early  
15 renal disease is present can then be made. Assessing the presence of early renal  
disease means comparing the level of albumin in the test sample to the level found in  
healthy animals. The presence of microalbuminuria in the sample, in the absence of  
changes in renal function, is indicative of early renal disease. As used herein, the  
term "indicative of early renal disease" is means sufficient glomerular dysfunction is  
20 present to allow albumin to pass into the urine in the range of from about 10  $\mu\text{g/ml}$  to  
about 300  $\mu\text{g/ml}$ . The amount of albumin present in the sample may vary depending  
on the amount of damage present but in early renal disease, the albumin level is  
higher than that found in healthy animals but lower than that detectable by current  
methods used to measure proteinuria. In the present invention, a determination of  
25 early renal disease is made when the level of albumin in the sample is determined to  
be in the range of from about 10  $\mu\text{g/ml}$  to about 300  $\mu\text{g/ml}$ . The upper range of  
albumin levels can also be about 25  $\mu\text{g/ml}$ , about 50  $\mu\text{g/ml}$ , about 75  $\mu\text{g/ml}$ , about  
100  $\mu\text{g/ml}$ , about 125  $\mu\text{g/ml}$ , about 150  $\mu\text{g/ml}$ , about 175  $\mu\text{g/ml}$ , about 200  $\mu\text{g/ml}$ ,  
about 225  $\mu\text{g/ml}$ , about 250  $\mu\text{g/ml}$ , about 275  $\mu\text{g/ml}$ , or about 300  $\mu\text{g/ml}$ . The level  
30 of albumin in the sample may vary depending on the severity of the damage to the  
kidney. Preferred embodiments of the present inventions can detect albumin when  
about 10%, about 20%, about 30%, about 40%, about 50%, about 60%, about 70%,  
about 80%, or about 90% of kidney function is lost. A more preferred embodiment  
can detect microalbuminuria in time for medical intervention which may then delay  
35 or prevent the onset of late-stage renal disease. Such intervention may, for example,  
include, but is not limited to the use of pharmacological compounds or dietary  
modifications to delay or prevent the progression of renal disease.

5 One embodiment of the present invention is a "dipstick" device which can detect microalbuminuria in animals. Dipsticks may be constructed in a variety of ways that partly depend on the way in which they will be used. They may be held directly in a sample (e.g., a urine stream), dipped directly in sample contained in a collection vessel, or have sample applied to a strip contained in a plastic cassette or platform. Another example of a dipstick is a "flow-through" device, an example of 10 which is a heterogenous immunometric assay system based on a capture antibody immobilized onto a membrane attached to an absorbent reservoir. A "bead" refers to a particulate substrate composed of a matrix such as latex or polystyrene, which can be covalently or non-covalently cross-linked to a detection molecule. A preferred 15 embodiment of the "dipstick" assay is an immunometric system, described in U.S. Patent No. 5,656,502, issued on August 12, 1997, to MacKay and Fredrickson, and U.S. Patent No. 6,001,658, issued December 14, 1999 to Fredrickson, both incorporated herein by reference. Particularly preferred is an ImmunoDip™ device available from Diagnostic Chemicals Ltd., PEI, CA.

20 Non-immunological methods may also be used. In order to detect microalbuminuria, methods such as preconcentration of the urine in order to concentrate albumin may be used to increase sensitivity of the test to protein. Such non-immunological methods include, for example, urine electrophoresis, where detection of microalbuminuria can be determined by methods known in the art, and 25 include, for example, protein staining. In another embodiment, a protein based albumin test may be used to determine microalbuminuria on a preconcentrated sample of urine from an animal.

The methods of the present invention can be used to detect nephropathy in a canid, felid, equid, or other animal, particularly when the nephropathy is 30 glomerulonephropathy, and especially glomerulonephritis. More specifically, the microalbuminuria measurement is correlated to the presence of early renal disease in a target animal. As used herein, the term "nephropathy" and/or "renal disease" refers to any disease of the kidneys, and may include, for example, nephritis of the glomerular, tubular, or interstitial renal tissues.

35 Such early stage nephropathy can result from many different causes, including, for example, allergy, cancer, parasitic, viral, or bacterial infection of any tissue in the animal, exposure to renal toxins, immune-mediated diseases, such as

- 5 systemic lupus erythematosus and vasculitis, malignancy, Vitamin D3 rodenticides, pyelonephritis, leptospirosis, urinary tract obstruction, chronic inflammatory disease, pyoderma, pancreatitis, prostatitis, immune-mediated diseases, dental disease, high blood pressure, or diabetes. As used herein, an "infectious agent" is one that infects animals and include, but are not limited to, viruses, bacteria, fungi, endoparasites and
- 10 ectoparasites. Examples of viral infectious agents include, but are not limited to, adenoviruses, caliciviruses, coronaviruses, distemper viruses, hepatitis viruses, herpesviruses, immunodeficiency viruses, infectious peritonitis viruses, leukemia viruses, oncogenic viruses, papilloma viruses, parainfluenza viruses, parvoviruses, rabies viruses, and reoviruses, as well as other cancer-causing or cancer-related
- 15 viruses. Examples of bacterial infectious agents include, but are not limited to, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Coxiella*, *Dermatophilus*, *Ehrlichia*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium*, *Haemobartonella*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, L-form bacteria, *Leptospira*, *Listeria*, *Mycobacteria*, *Mycoplasma*, *Neorickettsia*, *Nocardia*, *Pasteurella*, *Peptococcus*,
- 20 *Peptostreptococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Rochalimaea*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, and *Yersinia*. Examples of fungal infectious agents include, but are not limited to, *Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Basidiobolus*, *Bipolaris*, *Blastomyces*, *Candida*, *Chlamydia*,
- 25 *Coccidioides*, *Conidiobolus*, *Cryptococcus*, *Curvalaria*, *Epidermophyton*, *Exophiala*, *Geotrichum*, *Histoplasma*, *Madurella*, *Malassezia*, *Microsporium*, *Moniliella*, *Mortierella*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phialemonium*, *Phialophora*, *Prototheca*, *Pseudallescheria*, *Pseudomicrodochium*, *Pythium*, *Rhinosporidium*, *Rhizopus*, *Scolecobasidium*, *Sporothrix*, *Stemphylium*, *Trichophyton*, *Trichosporon*,
- 30 and *Xylohypha*. Examples of protozoan parasite infectious agents include, but are not limited to, *Babesia*, *Balantidium*, *Besnoitia*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Encephalitozoon*, *Entamoeba*, *Giardia*, *Hammondia*, *Hepatozoon*, *Isoospora*, *Leishmania*, Microsporidia, *Neospora*, *Nosema*, *Pentatrichomonas*, *Plasmodium*, *Pneumocystis*, *Sarcocystis*, *Schistosoma*, *Theileria*, *Toxoplasma*, and *Trypanosoma*.
- 35 Examples of helminth parasite infectious agents include, but are not limited to, *Acanthocheilonema*, *Aelurostrongylus*, *Ancylostoma*, *Angiostrongylus*, *Ascaris*, *Brugia*, *Bunostomum*, *Capillaria*, *Chabertia*, *Cooperia*, *Crenosoma*, *Dictyocaulus*,

- 5 *Diocetophyme, Dipetalonema, Diphyllbothrium, Diplydium, Dirofilaria,*  
*Dracunculus, Enterobius, Filaroides, Haemonchus, Lagochilascaris, Loa,*  
*Mansonella, Muellerius, Nanophyetus, Necator, Nematodirus, Oesophagostomum,*  
*Onchocerca, Opisthorchis, Ostertagia, Parafilaria, Paragonimus, Parascaris,*  
*Physaloptera, Protostrongylus, Setaria, Spirocerca, Spirometra, Stephanofilaria,*  
10 *Strongyloides, Strongylus, Thelazia, Toxascaris, Toxocara, Trichinella,*  
*Trichostrongylus, Trichuris. Uncinaria, and Wuchereria.* Examples of ectoparasite  
infectious agents include, but are not limited to, fleas, ticks, including hard ticks and  
soft ticks, flies such as midges, mosquitoes, sand flies, black flies, horse flies, horn  
flies, deer flies, tsetse flies, stable flies, myiasis-causing flies and biting gnats, ants,  
15 spiders, lice, mites, and true bugs, such as bed bugs and kissing bugs.

The present invention may also be used to measure multiple analytes. Other  
analytes may be any analyte which can be detected in sample suitable for use in  
detecting early renal disease. Additional analytes can be used to detect, for example,  
infectious disease or inborn errors of metabolism.

- 20 The present invention also relates to antibodies that bind to albumin from an  
animal being tested. A preferred antibody is one which detects albumin levels when  
the amount in the sample is about 50µg/ml, more preferably 25 µg/ml, more  
preferably 10 µg/ml. Another preferred antibody is one which detects albumin levels  
when the amount in the sample is about 50µg/ml, more preferably about 25 µg/ml,  
25 more preferably about 10 µg/ml and the detection method is a dipstick device  
described in U.S. Patent No. 6, 001, 658. A preferred antibody is one which  
competes with any of the monoclonal antibodies TNB1, TNB3, TNB4, TNB5,  
TNB6, H352, H386, H387, H388, H389, H390, H391, H393, H394, H395, H396,  
H397, H398, H399, H400, H401, or H402 for selective binding to animal albumin,  
30 preferably canine albumin. Another preferred embodiment is an antibody which  
binds to the same or related epitope, as defined by sequence homology, bound by the  
antibodies TNB3, TNB6 and H402. A preferred antibody is selected from the group  
consisting of TNB1, TNB3, TNB4, TNB5, TNB6, H352, H386, H387, H388, H389,  
H390, H391, H393, H394, H395, H396, H397, H398, H399, H400, H401, and H402  
35 . More preferred is an antibody selected from the group consisting of TNB3, TNB6  
and H402. As used herein, the terms "compete" and "inhibit selective binding" refer

5 to the ability of an antibody to prevent another antibody from binding to the same protein as described in the included examples.

The present invention also includes kits suitable for detecting animal albumin using the methods disclosed herein. Suitable means of detection include the techniques disclosed herein, utilizing compounds that bind the desired animal albumin, such as, for example, an anti-albumin antibody. As such, a kit can also  
10 comprise a detectable marker, such as an antibody that selectively binds to the albumin binding compound or other indicator molecules. The kit can also contain associated components, such as, but not limited to, buffers, labels, containers, inserts, tubings, vials, syringes and the like.

15 The present invention is based on a surprising discovery that microalbuminuria in canids can be used as a marker to predict the development of renal disease in nondiabetic dogs as well as diabetic dogs because microalbuminuria does not clearly have predictive value in nondiabetic human patients. Similar uses are contemplated in other animals. However, despite this surprising discovery, until  
20 the present invention, effective methods to detect microalbuminuria in dogs did not exist. Conventional human microalbuminuria detection methods do not detect dog microalbuminuria as described in the examples below.

The following examples are provided for the purposes of illustration and are not intended to limit the scope of the present invention.

25 Example 1

Measurement of Microalbuminuria in Normal, CRF and ARF Dogs

Urine samples were collected from 134 canine patients at the Colorado State University Teaching Hospital. These samples included urine from normal dogs, dogs suffering chronic renal failure, dogs suffering acute renal failure, and proteinuric dogs  
30 without renal failure. Samples were frozen at -20°C for at least 24 hours and then thawed prior to use. Albumin levels were quantified by a microradial immunodiffusion assay as described in McDonald, Weber & Thiele, "Construction and Use of a Template Block for Radial Immunodiffusion" *Anal Biochem* 186:165-168 (1990) using a commercial anti-albumin antibody (polyclonal rabbit anti-dog  
35 albumin, available from Nordic Immunology distributed by Accurate Chemical and Scientific Corp., Westbury, N.Y.). For this assay the antibody at 1.5% (vol/vol) was added to melted 0.75% (wt/vol) EEO agarose in PBS. Gels, at a thickness of 0.75 mm

WO 02/079781

19

PCT/US02/11105

5 were poured between two glass plates. The gels were allowed to solidify and after one of the glass plates was removed, allowed to dry slightly. Acrylic blocks, described in McDonald et al., *supra.*, were placed on the agarose and 5  $\mu$ l sample or standard was placed in each well of the acrylic block. Samples were run either undiluted or if the resulting ring was too large to measure the sample was diluted and re-tested. The standard curve using dog albumin (dog albumin fraction V, available from Sigma, St. Louis, MO) was linear within the range of 10 - 100  $\mu$ g/ml. The acrylic blocks were left on the agarose and the unit was placed in a moist chamber and incubated overnight at room temperature. The agarose gels were then soaked in distilled water for several hours to remove the excess protein from the gel, the gel was dried and then stained with Coomassie Brilliant Blue so that the precipitin rings could be readily visualized. The diameter of each ring was measured and the ring diameter from each sample was compared to the standard curve and the albumin concentration of each sample was calculated.

The advantage of using this system for measuring albumin in the urine is that this system is more sensitive than the traditional assay with wells cut into the gels. This increased sensitivity is related to the concentrated delivery of the antigen into a small area as opposed to the larger surface area created by the edges of a well cut into the agarose. For this initial study, samples that had less than or equal to 50  $\mu$ g/ml were deemed normal, samples that had levels between 51 and 300  $\mu$ g/ml were deemed microalbuminuric, and those that had levels over 300  $\mu$ g/ml were deemed macroalbuminuric. The results of this study are shown in Table 1.

Table 1. Urinary albumin levels in 134 canine urine samples

Albumin Level	Number of Animals	Percentage
Normal (0-50 $\mu$ g/ml)	59	44%
Microalbuminuria (51-300 $\mu$ g/ml)	21	16%
Macroalbuminuria (>300 $\mu$ g/ml)	54	40%

### 30 Example 2

#### ELISA Quantification of Microalbuminuria

Rabbit anti-canine serum albumin IgG (anti-CSA IgG) is diluted to 375 ng/ml in coating buffer (50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> /NaCHO<sub>3</sub>, pH 9.6). The diluted anti-CSA IgG solution is added to a plate of MaxiSorp™ C8 Break-apart Microwells (Nunc Cat. #

WO 02/079781

20

PCT/US02/11105

- 5 473768) at 100  $\mu$ l/well, covered and incubated overnight (16 to 24 hours) at 4°C.  
The plate is washed four times with phosphate buffered saline with 0.05% Tween 20 (PBS-T) in an automatic plate washer and blotted dry. Blocking buffer (StabiCoat™ available from Surmodics Cat. #SC01-1000) is added at 200  $\mu$ l/well, covered and incubated at room temperature for at least 1 hour.
- 10 While blocking, the canine serum albumin (CSA) dilution series is prepared. First, the CSA is diluted to 120 ng/ml in assay diluent (0.1% casein hydrolysate in PBS-T). This solution is serially diluted (1 part to 1 part) to make 60 ng/ml, 30 ng/ml, 7.5 ng/ml, 3.75 ng/ml, and 1.875 ng/ml. The last 5 standards are used for the standard curve (30 ng/ml and less) along with a "zero" standard (assay diluent with no CSA). Each urine sample to be tested is diluted 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 15 1/8000, 1/16000 and 1/32000 in assay diluent.
- The plate is then washed four times in an automatic plate washer and blotted dry. The CSA standard and diluted urine sample are added at 100  $\mu$ l/well of each to the test wells. Assay diluent is added to duplicate wells for background control. The plate is covered and incubated for 2 hours at room temperature. As previously, the plate is washed four times with PBS-T and blot dry.
- 20 Dilute biotin labeled goat anti-CSA IgG (Bethyl Laboratories, Cat. #E40-113) to 125 ng/ml in assay diluent. Add 100  $\mu$ l/well of diluted biotin labeled goat anti-CSA IgG to all test wells. Cover plate and incubate for 30 minutes at room temperature. As previously, wash the plate four times with PBS-T and blot dry.
- 25 Dilute horseradish peroxidase labeled streptavidin (KPL Cat.# 14-30-00) to 500 ng/ml (1/1000 dilution) in assay diluent and add to all test wells at 100  $\mu$ l/well. Cover and incubate at room temperature for 30 minutes. As previously, wash the plate four times with PBS-T and blot dry.
- 30 Mix TMB microwell peroxidase 2 component system (KPL Cat.#50-76-03) solutions together at equal volumes and add 100  $\mu$ l/well of the TMB mixture to all wells. Cover and incubate for 30 minutes at room temperature. The reaction is stopped by adding 100  $\mu$ l/well of stop solution (1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) directly to the TMB in each well. Read the wells at 450 nm in a spectrophotometer. Average the values of all duplicate wells, if any, and subtract background value from all the test values. 35 Generate a standard curve from the standard values and generate a regression line ( $r^2 > 0.95$ ). Using the regression formula, compute the CSA (ng/ml) value for each

WO 02/079781

21

PCT/US02/11105

5 sample and multiply this value by the dilution factor. Only those values that fall in the linear portion of the standard curve should be used.

Example 3

Use of the ImmunoDip™ stick for the Detection of Microalbuminuria in Canine Urine

10 Three ImmunoDip™ sticks (product number 700-01) for the detection of microalbuminuria in humans, were obtained from Diagnostic Chemicals Limited, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. Two canine urine samples (numbered 1086 and 1098) were selected from a group of samples obtained from dogs at the Colorado State University Veterinary Teaching Hospital, Fort Collins, Colorado.

15 Samples 1086 and 1098 were selected based on their albumin-levels as determined by an in-house ELISA to detect microalbuminuria in dogs. Sample 1086 was a negative sample, and sample 1098 had an albumin concentration of 221 µg/ml. For a positive control, approximately 50 µl of human blood was added to 5 ml deionized water

20 Measurement of albumin in the urine was performed following the manufacturer's directions. Briefly, 3 ml of urine or the blood-spiked water was added to a test tube. The ImmunoDip stick was removed from the pouch and placed in the test tube containing the urine making sure the fluid level was above the vent hole in the device. The device was left in the sample for a minimum of 3 minutes

25 after which it was removed and read by comparing the relative intensities of the two bands according to the interpretation-of-results insert that accompanies the test kit. The results of the in-house ELISA and the ImmunoDip tests are shown in Table 2.

Table 2. ImmunoDip™ stick for microalbuminuria results

Sample	In-House ELISA	ImmunoDip
1086	0 µg/ml	Negative
1098	221 µg/ml	Negative
Blood-spiked Water	Not-tested	Positive

30

The limit of detection in the ImmunoDip test for human urine albumin is 12 µg/ml. Sample 1098 contained canine urine at a level significantly above this lower limit yet was negative for albumin by the ImmunoDip™ test. These data suggest that

WO 02/079781

22

PCT/US02/11105

5 this device does not recognize canine albumin, at least not in order to detect  
microalbuminuria.

Example 4

Use of Micral® Test Strips for the Detection of Microalbuminuria in Canine Urine

10 Fourteen Micral® urine test strips (product number 417146) for the detection  
of microalbuminuria in humans, were obtained from Roche BMC, Indianapolis,  
Indiana. Thirteen canine urine samples were selected from a group of samples  
obtained from employee's dogs. Samples for use were selected based on their  
albumin-levels as determined by an in-house ELISA to detect microalbuminuria in  
dogs. Samples 2A, 4A & 16 A were negative samples while the remaining samples  
15 had albumin concentrations ranging in value from 31.3 to >650 µg/ml. As a positive  
control, 50 µl of human blood was added to 5 ml deionized water.

Measurement of albumin in the urine was performed following the  
manufacturer's directions. Briefly, each dog's urine was collected in a sample  
collection cup. In addition, blood-spiked water was placed in a test tube. The  
20 Micral® stick was removed from the vial and placed in the collection cup (or test tube  
containing the blood-spiked water) making sure the fluid level was above the devices  
two black lines in each case. The device was left in sample for 5 seconds, removed  
and allowed to sit horizontally for 1 minute. The result was determined by  
comparing the color of the test pad to the color scale on the vial in accordance with  
25 the result insert that accompanied the test. The results of the in-house ELISA and the  
Micral® test are shown in Table 3.

The detection limit in the Micral® test for human albumin is about 20 µg/ml.  
Several samples contained canine albumin levels significantly above this lower limit  
yet were negative for albumin by the Micral® test. These data suggest that this  
30 device does not recognize canine urine albumin, at least not in order to detect  
microalbuminuria.

Table 3. Micral® urine test strip results

Sample	In-house ELISA	Micral®
1A	79.4 µg/ml	Negative
2A	3.9 µg/ml	Negative
4A	5.9 µg/ml	Negative
5A	35.9 µg/ml	Negative

WO 02/079781

23

PCT/US02/11105

9A	48.6 µg/ml	Negative
15A	69.4 µg/ml	Negative
16A	8.3 µg/ml	Negative
29A	119.1 µg/ml	Negative
86A	31.3 µg/ml	Negative
87A	65.2 µg/ml	Negative
14	>650 µg/ml	Negative
19	Positive	Negative
45	650 µg/ml	Negative
Blood-spiked water	Not tested	Positive

5

**Example 5**

Use of the ImmunoDip™ stick for the Detection of Microalbuminuria in Canine Urine

10 Fourteen ImmunoDip™ sticks (product number 700-01) for the detection of microalbuminuria in humans, were obtained from Diagnostic Chemicals Limited, Charlottetown, PE, Canada. Thirteen canine urine samples were selected from a group of samples obtained from dogs that were apparently normal. Samples for use were selected based on their albumin levels as determined by an in-house ELISA to detect microalbuminuria in dogs. Samples 2A, 4A & 16 A were negative samples  
15 while the remaining samples had albumin concentrations ranging in value from 31.3 to >650 µg/ml. As a positive control, 50 µl of human blood was added to 5 ml deionized water.

Measurement of albumin in the urine was performed following the manufacturer's directions. Briefly, 3 ml of urine or the blood-spiked water was  
20 added to a test tube. The ImmunoDip stick was removed from the pouch and placed in the test tube containing the urine making sure the fluid level was above the device's vent hole in each case. The device was left in the sample for a minimum of 3 minutes after which, it was removed and read by comparing the relative intensities of the two bands according to the interpretation-of-results insert that accompanies the  
25 test kit. The results of the in-house ELISA and the ImmunoDip tests are shown in Table 4.

Table 4. ImmunoDip™ Stick for Microalbuminuria results

Sample	In-house ELISA	ImmunoDip™
1A	79.4 µg/ml	Negative

WO 02/079781

24

PCT/US02/11105

2A	3.9 µg/ml	Negative
4A	5.9 µg/ml	Negative
5A	35.9 µg/ml	Negative
9A	48.6 µg/ml	Negative
15A	69.4 µg/ml	Negative
16A	8.3 µg/ml	Negative
29A	119.1 µg/ml	Negative
86A	31.3 µg/ml	Negative
87A	65.2 µg/ml	Negative
14	>650 µg/ml	Negative
19	Positive	Negative
45	650 µg/ml	Negative
Blood-spiked water	Not tested	Positive

5

The detection limit in the ImmunoDip™ test for human albumin is about 20 µg/ml. Several samples contained canine albumin levels significantly above this lower limit yet were negative for albumin by the ImmunoDip™ test. These data suggest that this device does not recognize canine urine albumin, at least not in order to detect microalbuminuria.

10

#### Example 6

Use of Micral® Test Strips for the Detection of Microalbuminuria in Canine Urine

Five Micral® urine test strips (product number 417146) for the detection of microalbuminuria in humans were obtained from Roche BMC, Indianapolis, Indiana. Thirteen canine urine samples were selected from a group of samples obtained from dogs that were apparently normal. Samples for use were selected based on their albumin-levels as determined by an in-house ELISA to detect microalbuminuria in dogs. Samples 7 and 12 were negative samples while samples 14 and 25 had albumin levels of 621 µg/ml and >650 µg/ml, respectively. As a positive control, 50 µl of human blood was added to 5 ml deionized water.

20

Measurement of albumin in the urine was performed following the manufacturer's directions. Briefly, each dog's urine was collected in a sample collection cup. For the positive control, blood-spiked water was placed in a test tube. The Micral® stick was removed from the vial and placed in the collection cup (or test tube containing the blood-spiked water) making sure the fluid level was above the devices two black lines in each case. The device was left in sample for 5 seconds, removed and allowed to sit horizontally for 1 minute. The result was determined by comparing the color of the test pad to the color scale on the vial in accordance with

25

WO 02/079781

25

PCT/US02/11105

- 5 the result insert that accompanied the test. The results of the in-house ELISA and the Micral® test are shown in Table 5.

Table 5. Micral® urine test strip results

Sample	In-House ELISA	Micral®
7	2.1 µg/ml	Negative
12	0.8 µg/ml	Negative
14	621 µg/ml	Negative
25	>650 µg/ml	Negative
Blood-spiked water	Not tested	Positive

10

The limit of detection in the Micral® test for human urine albumin is about 20 µg/ml. Samples 14 and 25 contained canine albumin levels significantly above these lower levels yet were negative for albumin by the Micral® test. These data suggest that this device does recognize canine urine albumin, at least not in order to

15 detect microalbuminuria.

Example 7

## Prevalence of Microalbuminuria in dogs

For this study, two separate populations were examined. One sample population was derived from clinically normal dogs (n=86). The second sample population was derived from Colorado State University Teaching Hospital patients (n=150) presented for routine health screening, elective procedures, as well as evaluation of health problems. Microalbuminuria was quantitated using an antigen capture ELISA. The results of this measurement were normalized to a specific gravity of 1.010 to account for varying urine concentrations. Albumin in the urine of the hospital patients was also tested using Petstix 8™ urine protein test strips (Idexx Cat.# 98-06959-00).

Of the 86 clinically normal dogs, 68 (79%) had normalized albumin concentrations <1.0 mg/dL, 16 (19%) had normalized albumin concentrations >1.0 mg/dL and <30.0 mg/dL, and 2(2%) had normalized albumin concentrations >30.0 mg/dL. Of the 159 hospital patients, 112 (70%) were urine test strip negative and 51 of the 112 (46%) test-strip negative samples had normalized albumin concentrations >1.0 mg/dL. Conversely, 19 of 80 (24%) of samples with <1.0 mg/Dl albumin were positive on urine test strip (see Table 6).

WO 02/079781

26

PCT/US02/11105

5

Table 6

Normalized Urine Albumin Concentrations (# of samples)	Urine Protein Test Strip Result (n=159)			
	Neg. (112)	Trace (20)	1+ (15)	2-4+ (12)
<1.0 mg/dL (80)	61 (54%)	12 (60%)	5 (33%)	2 (17%)
>1.0 and <30.0 mg/dL (58)	49 (44%)	6 (30%)	2 (13%)	1 (8%)
>30.0 mg/dL (21)	2 (2%)	2 (10%)	8 (53%)	9 (75%)

In the two populations examined, prevalence of microalbuminuria (>1.0 mg/dL and <30.0 mg/dL) ranged from 19% to 36%. From these results, it appears microalbuminuria is prevalent in a significant number of dogs. Furthermore, use of commercially available urine protein test strips for the detection of albuminuria yields a substantial number of false positive results.

#### Example 8

##### Purification of canine serum albumin

This Example discloses a method for producing canine serum albumin. Canine serum was adjusted to 50% (w/v) ammonium sulfate, the solution rocked for 3 hours at 4°C, and the insoluble material precipitated by centrifugation at 10,000 x g for 30 minutes. The supernatant was removed and dialyzed into 25 mM Tris, pH 8.0. The soluble material was loaded onto a pre-equilibrated, Hi-Trap Q-Sepharose column (Pharmacia, Peapack, NJ) and the proteins eluted using a linear gradient of 0 to 1.0 M NaCl over 25 column volumes (CV). Collected fractions were analyzed by SDS-PAGE and fractions containing canine albumin were pooled and stored until needed. Using this method, 414 mg of albumin was purified from 20 ml of canine serum. Protein sequencing confirmed the purified protein was canine albumin.

#### Example 9

##### Production of anti-canine albumin antibodies

This example discloses the method used to produce monoclonal antibodies (Mabs) TNB1, TNB2, TNB3, TNB4, TNB5, TNB6 which recognize canine serum albumin (CSA).

Balb/C mice were immunized by subcutaneous injection with Complete Freund's Adjuvant mixed with either 25 µg, 50 µg or 100 µg of canine serum albumin (available from Sigma, St. Louis, MO). After four weeks, blood samples were obtained and anti-CSA antibody titers determined by ELISA. Based on this data, the three mice immunized with 100 µg of CSA were chosen for further use in producing

WO 02/079781

27

PCT/US02/11105

5 hybridomas. Two of these mice were given intravenous (IV) injections containing 100 µg of CSA and the third mouse received 100 µg intraperitoneally. Three days later, the mice were euthanized, the spleens removed and depleted of T-cells and the spleen cells fused with SP2/0 mouse myeloma cells following standard protocols. Individual hybridoma colonies were tested for the production of MAb which  
10 recognize CSA and positive colonies were expanded and dilution cloned until stable MAb secreting lines were established.

Example 10

Production of anti-canine albumin antibodies using subtractive hybridization

This Example discloses procedures utilizing subtractive hybridization  
15 techniques to produce monoclonal antibodies (Mabs) which recognize canine serum albumin (CSA).

Anti-canine CSA hybridoma cell lines were produced using the following, published method of subtractive hybridization. Balb/C mice were injected intraperitoneally with 1.0 mg of BSA Fraction V (available from Boehringer  
20 Mannheim, Indianapolis, IN), followed by IP injections of cyclophosphamide (CY)(100 mg/kg) at 10 minutes, 24, and 48 hours post-BSA injection. This BSA/CY treatment was repeated two weeks later. After another two weeks, the mouse was given a subcutaneous (SC) injection containing 100 µg of CSA (produced as described in Example 8) mixed with Complete Freund's Adjuvant. After an additional  
25 two weeks had passed, blood samples were obtained and serum antibody titers against CSA and BSA were determined by ELISA. A second injection of CSA (100 µg) was then given intraperitoneally to boost the animals anti-CSA antibody titers. Two weeks later, the mouse was given an intravenous (IV) injection of CSA (50 µg) and after three days, the mouse was sacrificed, its splenocytes harvested and fused with  
30 mouse SP2/0 myeloma cells using polyethylene glycol (PEG) following standard procedures. Individual hybridoma colonies were tested for the production of MAb which recognize CSA and positive colonies were expanded and dilution cloned until stable MAb secreting lines were established. This procedure resulted in the production of hybridoma lines H398 and H399.

35 In addition to the hybridoma cell lines produced by the above procedure, the following modified subtractive hybridization procedure was used to produce additional anti-CSA hybridoma cell lines. 30 µg of CSA (produced as described in

WO 02/079781

28

PCT/US02/11105

5 Example 8) were injected into the footpad of a Balb/C mouse. Three months later, the mouse was given an intraperitoneal (IP) injection containing 30  $\mu$ g of CSA. Four months after the IP injection, the mouse was given a second IP injection containing 1.0 mg of BSA, followed by IP injections of cyclophosphamide (CY)(100 mg/kg) at 10 minutes, 24, and 48 hours post-BSA injection. After two weeks, this BSA/CY  
10 treatment was repeated and after two more weeks had elapsed, the mouse was given a subcutaneous (SC) injection of CSA (100  $\mu$ g) mixed with complete Freund's adjuvant. After another two weeks, blood samples were obtained and serum antibody titers against CSA and BSA were determined by ELISA. The mouse was then given an intravenous (IV) injection of CSA (50  $\mu$ g) and three days later, the mouse was  
15 euthanized, its splenocytes harvested and fused with mouse SP2/0 myeloma cells using polyethylene glycol (PEG) following standard procedures. Individual hybridoma colonies were tested for the production of MAbs which recognize CSA and positive colonies were expanded and dilution cloned until stable MAb secreting lines were established. This protocol resulted in the production of hybridoma cell  
20 lines H384, H385, H386, H387, H388, H389, H390, H391, H392, H393, H394, H395, H396, H400, H401 and H402.

#### Example 11

##### Detection of canine serum albumin by ELISA

25 This example discloses the use of a solid-phase ELISA to test the ability of the anti-canine serum albumin (CSA) antibodies to detect CSA.

The wells of a microtiter plate were coated with CSA (50  $\mu$ g/well) (produced as described in Example 8) in carbonate buffer (50 mM carbonate/bicarbonate, pH 9.6) and the plate stored overnight at 4°C. The following day, excess liquid was removed, the plate blotted dry, and 150  $\mu$ l of Blocking buffer (0.1% casein in PBS  
30 containing 0.05% Tween-20) were added to each well. The plate was incubated at room temperature (RT) for 30 minutes, after which, the Blocking buffer was removed and 50  $\mu$ l of hybridoma supernatant (either undiluted or diluted in blocking buffer) were added to each well. Following a one hour incubation at RT, the wells were washed twice using Wash buffer (PBS containing 0.05% Tween-20), 50  $\mu$ l of HRP-  
35 conjugated, goat, anti-mouse IgG and IgM (available from KPL Labs, Gaithersburg, MD) were added to each well and the plate incubated at RT for 30 minutes. The wells were washed twice with Wash buffer, and 50  $\mu$ l of TMB Substrate System (available

WO 02/079781

29

PCT/US02/11105

- 5 from KPL Labs) were added to each well. The plate was incubated at RT for 10 minutes after which, the reaction was stopped by the addition of 50  $\mu$ l of 2N sulfuric acid to each well. The plate was read at 450 nm using an ELISA plate reader and the results are shown below in Table 7.

10 Table 7.

Antibody	Undiluted	1:10	1:100
TNB1	1288	852	326
TNB3	1242	1263	922
TNB4	1449	1431	1546
TNB5	1528	1585	1478
TNB6	1782	1436	1103
H386	1274	1273	1187
H387	1394	1369	1326
H388	1485	1529	1408
H389	1685	1646	1265
H390	1558	892	250
H391	1490	1325	916
H393	1744	1603	1640
H394	435	955	577
H395	1265	1049	1001
H396	1564	1773	1390
H397	49	59	48
H398	1822	1641	1501
H399	775	144	64
H400	1572	1610	1239
H401	1839	1683	1511
H402	1799	1752	1447

Example 12

Detection of albumin from several species by ELISA

- 15 This example demonstrates the ability of three anti-canine albumin monoclonal Abs to recognize bovine (BSA), canine (CSA), equine (HSA) or human (HuSA) serum albumin by ELISA using the protocol outlined in Example 11 with the exception the wells were coated with 3X serial dilutions (from 5  $\mu$ g/ml to 0.002g/ml) of the indicated albumin. In addition, 10  $\mu$ g of the indicated antibody was used in
- 20 each well. The results are shown in Table 8.

WO 02/079781

30

PCT/US02/11105

5 Table 8.

TNB3				
Coat Protein				
Albumin Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	BSA	CSA	HSA	HuSA
5	.62	3.53	1.67	.12
1.667	.52	3.50	1.37	.15
.556	.43	3.51	.87	.17
.185	.57	3.43	.34	.16
.062	.20	3.14	.19	.15
.021	.17	2.08	.16	.16
.007	.17	.35	.13	.13
.002	.11	.20	.09	.10

TNB6				
Coat Protein				
Albumin Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	BSA	CSA	HSA	HuSA
5	.18	3.68	.90	1.69
1.667	.42	3.59	.69	.78
.556	.30	3.59	.52	.47
.185	.24	3.43	.32	.23
.062	.22	3.17	.26	.26
.021	.21	2.36	.22	.22
.007	.20	1.18	.21	.22
.002	.22	.55	.21	.23

H402				
Coat Protein				
Albumin Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	BSA	CSA	HSA	HuSA
5	.41	3.41	.87	.97
1.667	.40	3.35	.71	.59
.556	.38	3.31	.57	.41
.185	.35	3.23	.42	.37
.062	.32	2.98	.36	.34
.021	.35	2.10	.32	.31
.007	.35	1.20	.18	.31
.002	.35	.65	.32	.33

5 This data demonstrates mAb's TNB3, TNB6 and H402 have a much greater affinity for CSA as compared with BSA, HSA or HuSA.

Example 13

Competition ELISA using the anti-albumin mAb's H402, TNB3 and TNB6

10 This example compares the ability of the H402, TNB3 and TNB6 monoclonal antibodies to compete for binding to canine serum albumin (CSA). Competition between antibodies was measured by coating an entire ELISA plate with CSA, adding a labeled primary antibody to all the wells of the plate and then measuring the ability of several unlabeled antibodies to compete with the primary antibody for binding to the CSA. (All primary antibodies were labeled using biotin available from Pierce  
15 Chemical, Rockford, IL according to the manufacturers instructions). In this manner, each plate was used to test the ability of a single primary antibody to compete with two other anti-albumin antibodies for the ability to bind CSA. In addition, antibody raised against the extracellular domain of human high affinity IgE receptor alpha chain (anti-FcεR1α) was used on each plate as a negative control. The details of the  
20 assay are as follows:

Three ELISA plates were coated overnight at 4°C with CSA at 1μg/ml. The following day, the wells were washed using Wash buffer (PBS + 0.05% Tween-20) and blocked with Blocking Solution (STABILCOAT® IMMUNOASSAY STABILIZER; available from SurModics, Inc., Eden Prairie, Minnesota) according to  
25 the manufacturer's directions. The wells were then washed using Wash buffer, and 100 μl of a single, labeled, primary antibody, either H402 at 20 ng/ml, TNB3 at 8 ng/ml or TNB6 at 12 ng/ml (concentrations were adjusted using Dilution buffer (0.1% casein in PBS + 0.05% Tween-20)) were added to all of the wells of an individual plate so that each plate held a different primary antibody. To one row of wells on  
30 each plate was then added 100 μl of unlabeled secondary antibody, either H402, TNB3, TNB6 or anti-HuFcεR1 at 20 μg/ml. Two-fold serial dilutions were then performed, diluting each secondary antibody across the plate so that the final concentrations of secondary antibody were from 10 ug/ml to 9 ng/ml. The plates were incubated at room temperature (RT) for 2 hours, washed with Wash buffer and  
35 100 μl of horse-radish-peroxidase conjugated Streptavidin (diluted 1:1000 in Dilution buffer) were added. Following a 1 hour incubation at RT, the wells were washed with Wash buffer and 100 μl of developing solution (TMB Substrate; available from KPL

- 5 Labs, Gaithersburg, MD) were added to each well. After a 30 minute RT incubation, the plates were read at 450 nm using an ELISA plate reader. The results of this assay are shown below in Table 9.

Table 9.

H402 as Primary Antibody				
Antibody Concentration (ng/ml)	Competing (secondary) Antibody			Anti-HuFCER1
	H402	TNB3	TNB6	
10000	0.069	2.292	0.087	2.584
5000	0.164	2.328	0.195	2.576
2500	0.271	2.341	0.300	2.551
1250	0.517	2.275	0.559	2.569
625	1.212	2.255	1.093	2.592
312.5	2.104	2.262	1.683	2.540
156.25	2.548	2.293	2.239	2.557
78.125	2.670	2.381	2.402	2.512
39.06	2.752	2.461	2.514	2.518
19.53	2.765	2.427	2.655	2.660
9.77	2.798	2.657	2.611	2.639
0	2.710	2.641	2.577	2.642

10

TNB3 as Primary Antibody				
Antibody Concentration (ng/ml)	Competing (secondary) Antibody			Anti-HuFCER1
	H402	TNB3	TNB6	
10000	2.295	0.090	2.290	2.479
5000	2.493	0.245	2.409	2.645
2500	2.445	0.395	2.247	2.508
1250	2.480	0.796	2.185	2.397
625	2.485	1.534	2.239	2.428
312.5	2.378	2.084	2.208	2.483
156.25	2.529	2.535	2.324	2.484
78.125	2.463	2.643	2.351	2.497
39.06	2.566	2.674	2.390	2.509
19.53	2.607	2.740	2.520	2.602
9.77	2.763	2.716	2.611	2.669
0	2.867	2.798	2.756	2.764

TNB6 as Primary Antibody				
Antibody Concentration	Competing (secondary) Antibody			Anti-HuFCER1
	H402	TNB3	TNB6	

WO 02/079781

33

PCT/US02/11105

(ng/ml)				
10000	0.122	2.307	0.134	2.490
5000	0.303	2.410	0.310	2.604
2500	0.459	2.177	0.473	2.569
1250	0.769	2.276	0.733	2.550
625	1.446	2.283	1.383	2.501
312.5	2.126	2.319	2.053	2.402
156.25	2.502	2.430	2.358	2.564
78.125	2.647	2.455	2.480	2.516
39.06	2.743	2.496	2.557	2.530
19.53	2.745	2.579	2.605	2.582
9.77	2.787	2.697	2.654	2.559
0	2.772	2.685	2.319	2.377

5

The data demonstrate that the monoclonal antibodies H402 and TNB6 compete for binding of canine serum albumin consistent with these antibodies sharing the same, or closely related, epitopes. The data further demonstrate that binding of canine serum albumin by TNB3 is unaffected by H402 or TNB6.

10 Example 14

Binding of canine and feline albumin by H352, H398 and TNB3

This example compares the ability of three anti-albumin antibodies (H352, H398 & TNB3) to bind canine (CSA) or feline (FSA) albumin.

The binding assay was performed as follows. To enable detection, horse-radish peroxidase (HRP) (Pierce Chemical, Rockford, IL) was conjugated to either CSA or FSA following manufacturer's protocol. The wells of a microtiter plate were coated with a range (from 10 $\mu$ g/ml to 9.77 ng/ml) of antibody (either H352, H398 or TNB3) in carbonate buffer (50 mM carbonate/bicarbonate, pH 9.6) and the plates stored overnight at 4°C. The following day, excess liquid was removed and the wells were blocked using blocking solution (STABILCOAT® IMMUNOASSAY STABILIZER; available from SurModics, Inc., Eden Prairie, Minnesota) following manufacturer's instructions. Following removal of the blocking solution, the wells were rinsed using Wash buffer (PBS containing 0.05% Tween-20) and HRP-FSA (diluted 1:400 in carbonate buffer) or HRP-CSA (diluted 1:800 in carbonate buffer) were added to the wells and the plate incubated at room temperature (RT) for 30 minutes. The HRP-albumin conjugate was removed, the wells washed twice using Wash Buffer and 50 $\mu$ l of TMB Substrate System (available from KPL Labs, Gaithersburg, MD) were added to each well. The plate was incubated at RT for 10 minutes after which the reaction was stopped by the addition of 50  $\mu$ l of 2N sulfuric

15

20

25

- 5 acid to each well. The plate was read at 450 nM using an ELISA plate reader. The results are shown below in Table 10.

Table 10.

MAb Concentration (ng/ml)	mAb					
	H352		H398		TNB3	
	Coat Protein					
	FSA	CSA	FSA	CSA	FSA	CSA
10000	4.200	4.184	2.984	3.887	0.055	4.191
5000	4.200	4.200	1.944	2.806	0.047	4.184
2500	4.189	4.160	1.532	2.333	0.049	4.177
1250	4.127	4.200	1.187	1.941	0.099	4.186
625	2.740	4.084	0.493	0.769	0.043	4.178
312.5	1.266	2.814	0.168	0.282	0.045	3.410
156.25	0.713	1.598	0.095	0.135	0.043	2.400
78.13	0.324	0.859	0.078	0.090	0.042	1.109
39.06	0.178	0.413	0.053	0.063	0.043	0.543
19.53	0.107	0.236	0.047	0.055	0.049	0.309
9.77	0.077	0.132	0.050	0.051	0.059	0.191
0	0.044	0.048	0.048	0.061	0.049	0.048

- 10 The data monoclonal antibody H352 binds to both FSA and CSA with roughly equal affinity. Monoclonal antibody H398 also recognizes both FSA and CSA although it has greater affinity for CSA. Finally, the data demonstrates that monoclonal antibody TNB3 binds specifically binds to CSA and does not bind FSA.

Example 15

- 15 Albumin in canines suffering heartworm-induced renal disease

This example discloses discloses the albumin levels present in the canine *Dirofilaria immitis*-induced nephropathy. In this model, animals are infected with *D. immitis* which results in renal damage due to antigen-antibody-complex induced damage of the glomerulus as described in Grauer, G.F., et. al., *American Journal or Tropical Medicine and Hygiene*; 39(4), 1988, p380-387. It is known in this model that *D. immitis* antigen appears in the blood approximately seven-months post-infection. For this example, animals were infected with *D. immitis* and urine samples collected monthly by catheterization. It should be noted that in some cases, the process of catheterization can result elevated albumin levels; as a result, animals were only considered positive for microalbuminuria when they were found to be

20

25

WO 02/079781

PCT/US02/11105

35

- 5 microalbuminuric in two consecutive samples. The amount of albumin in each sample was determined using an ELISA assay. The results are shown below in Table 11. Boxes labeled N/A indicate where no sample was available.

Table 11

Months Post Infection	Animal Identifier											
	HOP (A)	IGH (A)	POR (A)	SSH (A)	XTJ (A)	YOH (A)	AXH (B)	CAH (B)	FVH (B)	GUH (B)	IIOH (B)	VIP (B)
	174.9	0.2	2.3	1.9	0.3	2.9	8.0	72.6	0.3	3.7	4.2	2.1
1	2.1	3.8	2.4	0.3	N/A	8.7	4.0	4.0		3.7	0.2	0.4
2	33.8	2.0	9.5	2.4	29.9	N/A	3.3	0.2	3.0	3.3	0.9	2.6
4	1.3	16.4	0.3	3.0	0.3	0.3	3.7	22.7	2.5	2.3	1.8	5.4
5	2.2	4.2	N/A	2.0	18.1	4.2	3.4	3.0	0.3	1.9	0.2	4.1
6	4.9	9.9	N/A	2.5	N/A	0.3	0.2	2.6	2.7	1.5	0.4	0.4
7	1.4	48.1	0.3	0.3	20.7	45.6	3.9	0.3	1.9	20.7	3.3	8.1
8	8.4	N/A	18.0	N/A	60.6	16.2	3.1	4.8	6.5	2.8	8.5	15.4
9	26.2	2.9	4.4	0.4	46.8	16.1	6.0	0.3	24.6	3.6	0.3	N/A
10	N/A	11.0	3.4	10.8	26.2	15.7	13.1	21.3	54.0	60.3	0.2	46.0
11	52.1	125.7	43.5	36.9	180.6	67.8	3.9	27.3	11.5	6.5	59.5	736.
12	58.5	16.2	22.2	52.9	51.3	54.9	6.8	76.2	23.4	5.9	97.4	167.2
13	113.5	56.4	25.1	8.1	132.4	112.7	14.7	30.1	327.2	13.3	65.5	132.6
14	134.3	60.2	132.1	16.8	123.0	82.9	66.6	65.8	500.0	5.0	285.7	69.06.1
15	206.0	4.0	122.0	23.7	39.1	18.6	3.8	16.4	500.0	8.0	107.8	34.8
16	37.3	7.6	500.0	5.4	52.5	10.1	5.5	17.8	500.0	4.9	43.1	N/A
17	N/A	45.2	N/A	8.6	181.6	89.1	30.9	19.8	500.0	16.4	53.0	N/A
18	18.8	112.1	211.1	5.4	70.4	26.8	10.5	14.9	N/A	5.4	21.3	N/A
19	16.7	67.0	176.7	12.1	208.4	N/A	N/A	36.3	N/A	4.9	57.1	N/A
20	N/A	N/A	N/A	N/A	500.0	N/A	N/A	N/A	N/A	1.9	N/A	N/A
21	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	37.9	9.2	41.7	N/A	11.0	17.1	N/A
22	1.6	4.7	75.8	9.1	500.0	27.2	22.2	500.0	N/A	3.2	46.2	N/A
23	83.2	37.6	30.3	17.5	500.0	60.3	54.3	500.0	N/A	5.2	37.7	N/A

10

The data demonstrate that following infection with *D. immitis*, there is a progressive increase in the level of albumin in the urine. Additionally, most animals became microalbuminuric within 1-2 months following the time of appearance of *D. immitis* antigen in the blood. Microalbuminuria could be detected in all animals by the end of the study.

15

#### Example 16

Albumin levels in canines suffering from hereditary nephritis

- This example compares the level of microalbuminuria (MA) with a commonly used marker for renal disease, the urinary protein/creatinine (UP/C) ratio, over time in animals suffering from hereditary nephritis (HD). In this model, the animals carry a genetic defect which results in the rapid development of renal disease during the course of the animals life as described in Lee, GE, *American Journal of Veterinary Research*, 1999: 60, p373-383. In this example, urine was periodically collected from

20

5 a colony of normal dogs and a colony of dogs suffering HD. The amount of albumin in each sample was determined using an ELISA assay. In addition, the urinary protein/ creatinine UP/C) ratio was determined using veterinary reference lab. By this measurement, renal disease is considered to be present when the UP/C ratio is greater than 1.0. The results of this study are shown below in Table 12.

10

Table 12

		Animal Identification													
		Finzi (control)			Jake (control)			Nod (control)			Oscar (control)			Pete (control)	
Age (weeks)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	
8	0.1	2	1.6	0	0.2	5	0.6	2	0.9	3	0.2	5	0.9	3	
11	0.2	2	0.7	5	0.2	5	0.2	8	0.3	4	0.3	4	0.3	4	
13	0.3	1	0.3	0	0.2	5	0.9	3	0.4	2	0.3	4	0.2	2	
15	1.0	3	0.6	6	0.2	5	0.3	4	0.2	2	0.2	2	0.2	2	
17	0.2	1	0.2	3	0.2	5	0.1	3	0.2	6	0.2	6	0.2	6	
19	0.4	15	0.5	4	0.2	5	0.1	3	0.1	3	0.1	3	0.1	3	
21	0.1	4	1.0	7	0.2	5	0.1	2	0.1	1	0.1	1	0.1	1	
23	0.3	0	0.2	3	0.2	5	0.2	1	0.1	1	0.1	1	0.1	1	
25	0.6	1	0.1	6	0.2	5	0.1	1	0.1	20	0.1	20	0.1	20	
27	0.1	1	0.2	6	0.2	5	0.1	0	0.1	6	0.1	6	0.1	6	
30	0.1	2	0.1	4	0.2	5	0.1	2	0.0	1	0.0	1	0.0	1	
34	0.2	220	0.1	4	0.2	5	0.1	1	0.1	2	0.1	2	0.1	2	
38	0.1	1	0.1	2	0.2	5	0.1	1	0.1	4	0.1	4	0.1	4	
		Ethan (HN)			Frazier (HN)			Greg (HN)			Ike (HN)			Lester (HN)	
Age (weeks)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	
8	0.2	4	0.1	6	0.1	2	1.0	6	0.8	10	0.3	4	0.4	8	
11	0.3	9	0.2	4	0.1	4	0.2	10	0.4	8	0.6	4	0.5	12	
13	0.6	4	0.2	1	0.3	2	0.2	1	0.5	12	0.3	3	0.3	3	
15	0.5	8	0.3	12	0.1	12	0.7	7	0.3	3	0.3	3	0.3	3	
17	0.1	17	0.6	358	0.2	487	1.0	557	0.4	7	0.1	7	0.1	7	
19	1.0	82	2.3	314	0.4	2	4.4	918	0.6	115	0.6	115	0.6	115	
21	3.0	136	1.1	30	0.2	2	6.6	1574	1.0	561	1.0	561	1.0	561	
23	6.2	4954	5.1	2145	0.3	71	12.5	5560	3.0	615	3.0	615	3.0	615	
25	10.1	744	9.0	3090	1.6	603	16.6	2920	3.7	17	3.7	17	3.7	17	
27	6.6	1179	7.3	2020	3.5	1499	15.3	3904	7.0	1475	7.0	1475	7.0	1475	
30	15.7	2734	12.3	2696	5.7	1733	16.5	2276	9.3	1675	9.3	1675	9.3	1675	
34	11.6	1901	12.9	2	8.2	309	4.4	3608	8.7	1992	8.7	1992	8.7	1992	
48	6.4	3310	13.9	3597	8.8	4845	8.5	4465	8.1	1915	8.1	1915	8.1	1915	
		Nate (HN)			Newt (HN)			Quark (HN)			Quirt (HN)			Eddie (HN)	
Age (weeks)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	
8	0.4	6	0.2	5	0.1	2	0.4	1	1.6	16	0.4	4	0.2	10	
11	0.4	0	0.4	0	0.1	3	0.4	4	0.4	10	0.4	4	0.2	10	
13	0.4	5	0.2	4	0.7	11	0.2	3	0.4	6	0.4	6	0.4	6	
15	0.4	2	0.1	19	0.3	5	0.1	1	0.3	6	0.4	6	0.4	6	
17	0.3	4	1.1	116	0.4	74	0.1	12	0.1	5	0.4	4	0.4	4	
19	0.6	7	1.5	265	0.6	232	0.2	25	0.4	10	0.4	10	0.4	10	
21	0.2	52	2.4	1221	2.8	620	0.6	207	1.2	1063	0.6	207	1.2	1063	
23	2.1	340	8.7	2665	9.2	1223	3.4	543	2.8	1307	2.8	1307	2.8	1307	
25	2.2	622	9.6	4711	8.8	1938	4.6	1208	8.7	1947	8.7	1947	8.7	1947	
27	3.2	483	10.1	1309	7.8	2007	9.1	3054	6.9	1052	6.9	1052	6.9	1052	
30	5.8	1529	9.0	2989	14.1	3419	9.3	2747	13.9	3188	13.9	3188	13.9	3188	
34	7.3	1483	8.8	1806	15.1	3055	9.9	6379	10.5	4922	10.5	4922	10.5	4922	
38	8.9	2955	8.1	6487	12.2	3118	9.5	3044	12.7	6717	12.7	6717	12.7	6717	
		Felix (HN)			Fred (HN)			Gus (HN)			Neal (HN)			Norm (HN)	
Age (weeks)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	UP/C Ratio	MA (µg/ml)	
8	0.7	1	0.3	3	0.1	5	0.8	0	0.3	1	0.7	1	0.3	1	
11	0.1	8	0.1	12	0.1	4	0.2	3	0.1	1	0.1	1	0.1	1	
13	0.1	1	0.5	1	0.1	22	0.4	3	0.1	0	0.1	0	0.1	0	
15	0.5	5	0.6	1	0.2	55	0.1	2	0.5	1	0.5	1	0.5	1	

WO 02/079781

37

PCT/US02/11105

17	0.8	122	0.5	6	1.7	24	0.4	2	0.7	4
19	0.3	87	0.3	13	2.2	77	0.6	428	0.5	7
21	0.8	903	0.8	9	3.9	16	0.6	210	1.3	354
23	2.6	1679	0.6	81	9.3	1505	6.6	1335	5.7	1535
25	6.9	16170	1.9	152	6.4	3950	8.4	4691	9.5	3296
27	10.2	2452	3.5	11	5.2	1263	10.1	1158	5.5	798
30	12.0	2612	8.1	1887	8.3	2648	9.2	2523	6.8	2796
34	9.3	4146	7.1	3403	8.5	4583	10.1	1767	11.5	2603
38	10.4	6218	10.8	7141	7.9	3758	10.4	2906	7.0	3403
Paul (HN)										
Age	UP/C	MA	UP/C	MA	UP/C	MA	UP/C	MA	UP/C	MA
(weeks)	Ratio	(µg/ml)	Ratio	(µg/ml)	Ratio	(µg/ml)	Ratio	(µg/ml)	Ratio	(µg/ml)
8	0.6	4	0.1	5	1.4	3				
11	0.1	8	0.1	1	0.2	3				
13	0.4	1	0.2	5	0.3	7				
15	0.2	0	0.2	1	0.1	21				
17	0.1	6	0.1	3	0.3	66				
19	0.7	6	0.6	5	2.7	323				
21	0.1	58	0.1	16	4.3	20				
23	1.3	206	0.6	29	8.8	2678				
25	2.0	598	1.5	224	11.3	2957				
27	4.2	674	2.1	431	10.1	3864				
30	4.0	2650	5.4	1468	11.2	2118				
34	5.5	0	10.0	1395	12.5	6098				
38	6.4	4324	8.6	1624	8.4	3238				
Quinn (HN)										
Scooter (HN)										

5

The data demonstrate that there is a progressive increase in microalbuminuria in animals suffering from hereditary nephritis. In addition, in virtually all animals, microralbuminuria was detected prior to the UP/C ratio being greater than 1.0.

10

Although the invention has been described with reference to the presently preferred embodiments, it should be understood to those skilled in the art that various modifications can be made without departing from the spirit of the invention. Accordingly, the invention is limited only by the following claims.

WO 02/079781

38

PCT/US02/11105

5 What is claimed is:

1. A method to detect early renal disease comprising:
  - (a) obtaining a sample from an animal; and
  - (b) determining the amount of albumin in said sample,wherein an amount of albumin in a range of from about 10  $\mu\text{g/ml}$  to  
10 about 300  $\mu\text{g/ml}$  in the sample, when the specific gravity of the sample is normalized to 1.010 g/ml, is indicative of early renal disease.
2. A method to identify an animal at risk for developing late-stage renal disease comprising:
  - (a) obtaining a sample from the animal; and
  - 15 (b) determining the amount of albumin in said sample,wherein an amount of albumin in a range of about 10  $\mu\text{g/ml}$  to about 300  $\mu\text{g/ml}$  in the sample, when the specific gravity of the sample is normalized to 1.010, indicates the animal is at risk for late-stage renal disease.
3. A kit comprising a means for detecting early renal disease according to  
20 the method of claim 1.
4. A kit comprising a means for detecting early renal disease according to the method of claim 2.
5. A kit comprising:
  - (a) an albumin-binding compound which selectively binds to  
25 animal albumin; and
  - (b) a means for detecting the amount of albumin in a sample collected from an animal, wherein said means detects albumin in the sample when the amount of albumin is in the range of from about 10  $\mu\text{g/ml}$  to about 50  $\mu\text{g/ml}$ .
6. The kit of claim 3 comprising:
  - (a) an albumin-binding compound which selectively binds to  
30 animal albumin; and
  - (b) a means for assessing the amount of albumin in the sample when the amount of albumin is in the range of 10  $\mu\text{g/ml}$  to 300  $\mu\text{g/ml}$  when the specific gravity of the sample is normalized to 1.010 g/ml.
- 35 7. The kit of claim 4 comprising:
  - (a) an albumin-binding compound which selectively binds to animal albumin; and

- 5 (b) a means for assessing the amount of albumin in the sample when the amount of albumin is in the range of 10 µg/ml to 300 µg/ml when the specific gravity of the sample is normalized to 1.010 g/ml.
8. An isolated monoclonal antibody which selectively binds albumin of a specie of animal selected from the group consisting of canids, felids and equids.
- 10 9. A cultured cell which produces an antibody that selectively binds albumin of an animal selected from the group consisting of canids, felids and equids.
10. The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the amount of albumin in the sample is determined by:
- 15 (a) contacting the sample with an albumin-binding compound to form an albumin-compound complex;
- (b) detecting the albumin-compound complex; and
- (c) assessing the amount of albumin present in the sample from the amount of albumin-compound complex detected.
11. The invention of claim 10, wherein the albumin-binding compound is an anti-albumin antibody.
- 20 12. The invention of claim 10, wherein the albumin-binding compound is an anti-albumin antibody which recognizes albumin from an animal selected from the group consisting of canids, felids and equids.
13. The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the amount of albumin in the sample is determined using an assay selected from the group consisting of an enzyme-linked immunoassay, a radioimmunoassay, a fluorescence immunoassay, a chemiluminescent assay, a lateral-flow assay, a dipstick assay, an agglutination assay, a particulate-based assay, an immunoprecipitation assay, an immunodot assay, an immunoblot assay, an immunodiffusion assay, a phosphorescence assay, a flow-through assay, a chromatography assay, a PAGE-based assay, an electronic-sensory assay, a surface plasmon resonance assay and a fluorescence correlation spectroscopy assay.
- 25 30 35 14. The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the amount of albumin in the sample is determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
15. The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the amount of albumin in the sample is determined using a single-step assay.

- 5           16.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the amount of albumin in the sample is determined using a dipstick-based assay.
17.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the amount of albumin is determined using an assay that detects albumin in the sample when the amount of albumin is in the range from about 10 µg/ml to about 25 µg/ml.
- 10          18.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the amount of albumin is determined using an assay that detects albumin in the sample when the amount of albumin is about 50 µg/ml.
19.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the amount of albumin is determined using an assay that detects albumin in the sample when the amount of albumin is about 25 µg/ml.
- 15          20.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the amount of albumin is determined using an assay that detects albumin in the sample when the amount of albumin is about 10 µg/ml.
21.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the animal is
- 20    selected from the group consisting of canids, felids and equids.
22.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the animal is a canid.
23.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the animal is a felid.
- 25          24.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the animal is an equid.
25.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the sample is a bodily fluid useful for measuring leakage of albumin from the glomerulus.
26.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the sample is urine.
- 30          27.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the sample is pre-treated prior to determining the amount of albumin.
28.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the sample is pre-treated by adjusting the specific gravity.
29.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the sample is pre-
- 35    treated by adjusting the specific gravity to 1.010 g/ml.
30.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the amount of albumin is determined using a single-step assay.

WO 02/079781

41

PCT/US02/11105

- 5           31.    The invention of claim 1, 2, 3, 4, 5, 6 or 7, wherein the amount of albumin is determined using a dipstick assay or an ELISA assay.
32.    The antibody of claim 8 or 9, wherein the antibody inhibits the selective binding of an antibody selected from the group consisting of H352, H386, H387, H388, H389, H390, H391, H393, H394, H395, H396, H397, H398, H399, 10 H400, H401 and H402 to albumin.
33.    The antibody of claim 8 or 9, wherein the antibody binds the same epitope recognized by an antibody selected from the group consisting of H352, H386, H387, H388, H389, H390, H391, H393, H394, H395, H396, H397, H398, H399, H400, H401 and H402.
- 15          34.    The isolated antibody of claim 8 or 9, wherein the antibody is selected from the group consisting of H352, H386, H387, H388, H389, H390, H391, H393, H394, H395, H396, H397, H398, H399, H400, H401 and H402.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/11405
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : G01N 33/53, 31/00, 33/09 US CL : 435/7.1, 7.95; 436/2, 86, 88 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1, 7.95, 436/286, 88		
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 practicable, search terms used) STN		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,246,835 A (SUZUKI ET AL) 21 September 1993 (21.09.1993), (Summary of Invention); column 1, lines 36-47; column 3, lines 65-68 and col 4, lines 3-8; column 10, lines 10-62; column 2, lines 56-68 and column 3, lines 1-8; column 10, lines 51-54; See abstract; column 4, lines 45-68.	1, 2-7, 8, 9, 10-12, 21-26, 27
Y	US 6,152,992 A (LIAO ET AL) 28 November 2000 (28.11.2000), column 19, lines 65-67 and column 20, lines 1-36; column 21, lines 14-31.	13-20, 30-31
---		-----
Y	US 5,403,744 A (ZIMMERLE) 04 April 1995 (04.04.1995), see abstract.	28-29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categorization 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 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of actual completion of the international search 28 July 2002 (28.07.2002)		Date of mailing of the international search report 12 SEP 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D. C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Long Le <i>Helene D. Roberts for</i> Telephone No. (703) 308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

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

(72) 発明者 ジェンセン, ウェイン エー.  
 アメリカ合衆国 コロラド 80549, ウェリントン, エヌ シー アール ナンバー 5  
 9133

(72) 発明者 ウェバー, アニカ  
 アメリカ合衆国 ネブラスカ 68114, オマハ, エヌ. 74 ティー エイチ ストリ  
 ート 802

(72) 発明者 アンジュルーズ, ジャネット エス.  
 アメリカ合衆国 コロラド 80526, フォート コリンズ, ダブリュー. プロスペクト  
 ロード 3308

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA13  
 4B065 AA90Y AA91X AB05 AC14 BA08 CA25 CA46  
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 DA76 EA50 FA71 FA72

专利名称(译)	检测动物早发性肾病的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004537036A</a>	公开(公告)日	2004-12-09
申请号	JP2002577560	申请日	2002-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	六斯卡公司		
申请(专利权)人(译)	Hesuka公司		
[标]发明人	マクドナルドトーマス ジェンセンウエインエー ウェバーアニカ アンジュルーズジャネットエス		
发明人	マクドナルド, トーマス ジェンセン, ウェイン エー. ウェバー, アニカ アンジュルーズ, ジャネット エス.		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/493 G01N33/52 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/68 C07K16/18 G01N33/6893 G01N2800/347 Y10S436/808 Y10S436/815		
FI分类号	G01N33/53.D C07K16/18 G01N33/493.A G01N33/52.B G01N33/543.545.A G01N33/577.B C12N5/00. B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90Y 4B065 /AA91X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/279391 2001-03-28 US 60/342268 2001-12-21 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种检测动物早期肾病的方法。该方法包括以下步骤：  
 (a) 从待测动物中获得样品，和 (b) 测定样品中白蛋白的量。白蛋白的量在10杯/ml至约300杯/ml的范围内表明存在早期肾病。本发明还提供了犬，猫和马白蛋白的抗体，其可用于检测早期肾病的存在。

アルブミンレベル	動物の数	パーセンテージ
正常 (0-50 µg/ml)	59	44%
マイクロアルブミン尿症 (51-300 µg/ml)	21	16%
マクロアルブミン尿症 (>300 µg/ml)	54	40%