

(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2008-512664

(P2008-512664A)

(43) 公表日 平成20年4月24日(2008.4.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 B	2 G O 5 4
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18 Z N A	4 H O 4 5
CO 7 K 14/575 (2006.01)	CO 7 K 14/575	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 Z	
	GO 1 N 21/78 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2007-530714 (P2007-530714)
 (86) (22) 出願日 平成17年9月8日 (2005.9.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年4月26日 (2007.4.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/054446
 (87) 国際公開番号 W02006/027374
 (87) 国際公開日 平成18年3月16日 (2006.3.16)
 (31) 優先権主張番号 A1505/2004
 (32) 優先日 平成16年9月8日 (2004.9.8)
 (33) 優先権主張国 オーストリア (AT)

(71) 出願人 307008141
 ビオメディカ・メディツィーンプロダク
 テ・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレン
 クテル・ハフツング・ウント・コムパニー
 ・コマンディットゲゼルシャフト
 オーストリア、アー―1 2 1 0ヴィーン、
 ディヴィツシュガッセ 4番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100127638
 弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ネコおよびイヌのproBNPの決定

(57) 【要約】

本発明は、ネコまたはイヌのproBNPまたはそのフラグメントを決定する方法であって、

下記のステップ：

- ネコまたはイヌのサンプルを提供するステップ、
 - 該サンプルを、ネコのproBNPまたはそのフラグメントを決定する場合に、ネコのproBNPのアミノ酸20～42を含む領域および/またはアミノ酸57～80を含む領域において少なくとも一つのエピトープと結合する少なくとも一つの抗体を接触させるステップ、またイヌのproBNPまたはそのフラグメントを決定する場合に、イヌのproBNPのアミノ酸20～86を含む領域において少なくとも一つのエピトープに結合する少なくとも一つの抗体と接触させるステップ、
 - そして
 - サンプル中に存在するネコまたはイヌのproBNPまたはそのフラグメントの存在および/または濃度を決定するステップ、
- を含む方法。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ネコまたはイヌのproB N Pまたはそのフラグメントを決定する方法であって、下記のステップ：

- ネコまたはイヌのサンプルを提供するステップ、
 - 該サンプルと、ネコのproB N Pまたはそのフラグメントを決定する場合に、ネコのproB N Pのアミノ酸 20 ~ 42 を含む領域および / またはアミノ酸 57 ~ 80 を含む領域において少なくとも一つのエピトープに結合する少なくとも一つの抗体を接触させるステップ、またイヌのproB N Pまたはそのフラグメントを決定する場合に、イヌのproB N Pのアミノ酸 20 ~ 86 を含む領域において少なくとも一つのエピトープに結合する少なくとも一つの抗体を接触させるステップ、
- そして

- サンプル中に存在するネコまたはイヌのproB N Pまたはそのフラグメントの存在および / または濃度を決定するステップ、
- を含む方法。

【請求項 2】

ネコのproB N Pまたはそのフラグメントを決定する場合に、少なくとも一つの該抗体が、ネコのproB N Pのアミノ酸 25 ~ 35 を含む領域および / またはアミノ酸 45 ~ 55 を含む領域および / またはアミノ酸 60 ~ 80 を含む領域において、少なくとも一つのエピトープと結合することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

イヌのproB N Pまたはそのフラグメントを決定する場合に、少なくとも一つの該抗体が、イヌのproB N Pのアミノ酸 25 ~ 41 を含む領域および / またはアミノ酸 55 ~ 65 を含む領域および / またはアミノ酸 74 ~ 86 を含む領域において少なくとも一つのエピトープと結合することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも一つのエピトープが少なくとも 3 つのアミノ酸を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

少なくとも一つの抗体がポリクローナルおよび / またはモノクローナルであることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

少なくとも一つのさらなる抗体が、該少なくとも一つの抗体または少なくとも一つのエピトープに結合することを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも一つの抗体および / または少なくとも一つのさらなる抗体が標識されることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも一つの抗体および / または少なくとも一つのさらなる抗体が、ペルオキシダーゼ、特にセイヨウワサビペルオキシダーゼ、ビオチン、蛍光染料、金コロイドまたは放射性核種で標識されることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも一つの抗体または少なくとも一つのさらなる抗体が、固体相に結合することを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

ネコまたはイヌのproB N Pまたはそのフラグメントの決定が、ラジオイムノアッセイ、免疫結合アッセイ、ウェスタンブロット、免疫組織化学、酵素イムノアッセイ、側方流動装置(LFD, 試験ストリップ)、およびその組合せ物からなる群から選択される方法によって行われることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

ネコのproBNPのアミノ酸20～42を含む領域および/またはアミノ酸57～80を含む領域において少なくとも一つのエピトープと結合することを特徴とする、抗体または抗体混合物。

【請求項12】

ネコのproBNPのアミノ酸25～35を含む領域および/またはアミノ酸45～55を含む領域および/またはアミノ酸60～80を含む領域において少なくとも一つのエピトープと結合することを特徴とする、請求項11に記載の抗体または抗体混合物。

【請求項13】

イヌのproBNPのアミノ酸20～86を含む領域において少なくとも一つのエピトープと結合することを特徴とする、抗体または抗体混合物。

10

【請求項14】

イヌのproBNPのアミノ酸25～41を含む領域および/またはアミノ酸55～65を含む領域および/またはアミノ酸74～86を含む領域において少なくとも一つのエピトープと結合することを特徴とする、請求項13に記載の抗体または抗体混合物。

【請求項15】

少なくとも一つのエピトープが少なくとも3つのアミノ酸を含むことを特徴とする、請求項11～14のいずれかに記載の抗体または抗体混合物。

【請求項16】

ネコのproBNPのアミノ酸20～42の領域および/またはアミノ酸57～80の領域において少なくとも3個のアミノ酸を含むことを特徴とする、ペプチド。

20

【請求項17】

ネコのproBNPのアミノ酸25～35の領域および/またはアミノ酸45～55の領域および/またはアミノ酸60～80の領域において少なくとも3個のアミノ酸を含むことを特徴とする、請求項16に記載のペプチド。

【請求項18】

イヌのproBNPのアミノ酸20～86の領域において少なくとも3個のアミノ酸を含むことを特徴とする、ペプチド。

【請求項19】

イヌのproBNPのアミノ酸25～41の領域および/またはアミノ酸55～65の領域および/またはアミノ酸74～86の領域において少なくとも3個のアミノ酸を含むことを特徴とする、請求項18に記載のペプチド。

30

【請求項20】

ペプチドが、化学的に合成されたペプチド、サンプルから単離されたペプチド、または組み換え的に調製されたペプチドであることを特徴とする、請求項16～19のいずれかに記載のペプチド。

【請求項21】

請求項1～10のいずれかに記載の方法においてネコまたはイヌのproBNPまたはそのフラグメントを決定するための、請求項11～15のいずれかに記載の抗体または抗体混合物の使用。

【請求項22】

請求項11～15のいずれかに記載の抗体または抗体混合物を産生するための、請求項16～20のいずれかに記載のペプチドの使用。

40

【請求項23】

請求項1～10のいずれかに記載の方法における、ポジティブコントロールまたは濃度決定のための標準としての、請求項16～20のいずれかに記載のペプチドの使用。

【請求項24】

ネコまたはイヌのproBNPまたはそのフラグメントを決定するためのキットであって、次のもの：

請求項11～15のいずれかに記載の少なくとも一つ抗体または少なくとも一つの抗体混合物、

50

少なくとも一つの抗体または少なくとも一つの抗体混合物がネコまたはイヌのproB N Pまたはそのフラグメントに結合することを定性的および/または定量的に検出するための手段、および

所望により、ポジティブコントロールまたは濃度決定のための標準として、請求項16~20のいずれかに記載のペプチドおよび/またはネコまたはイヌのproB N Pまたはそのフラグメント、を含むキット。

【請求項25】

ネコまたはイヌのproB N Pまたはそのフラグメントの少なくとも一つの抗体または少なくとも一つの抗体混合物に関する結合を定性的および/または定量的に検出するための手段が、少なくとも一つのさらなる抗体を含むことを特徴とする、請求項24に記載のキット。

10

【請求項26】

少なくとも一つの抗体および/または少なくとも一つのさらなる抗体が標識されることを特徴とする、請求項24または25に記載のキット。

【請求項27】

少なくとも一つの抗体および/または少なくとも一つのさらなる抗体が、ペルオキシダーゼ、特にセイヨウワサビペルオキシダーゼ、ビオチン、蛍光染料、金コロイドまたは放射性核種によって標識されることを特徴とする、請求項24~26のいずれかに記載のキット。

【請求項28】

請求項1~10のいずれかに記載の方法における、請求項24~27のいずれかに記載のキットの使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳類におけるproB N Pまたはそのフラグメントを決定する方法に関する。

【0002】

心疾患は、これらの疾患に苦しめられるヒトだけでなく、動物、特にイヌまたはネコなどのペットにおいて重要な役割を担う。例えばイヌの1割の心臓は機能不全を有することが研究から判っている。心疾患発症には、例えば心臓弁および心筋と関連がある。最初、心臓は、より激しい仕事を行うことにより機能不全を補償できるので、殆どの症例において、このような疾患は隠蔽されたままで心臓への高い負荷により心臓状態を低下させる。心疾患から生じる症状、例えば疲労、循環不全、脱力感、ペットの心臓がもはや衰弱を補償できなくなった時にたいいてい認識され得る。このような場合においては、心疾患は、もはや完治不能であるような程度まで進行している。

30

【0003】

原則として、慢性の心臓弁および心筋変化は治癒し得ないが、医薬品の使用によって、心疾患のさらなる進行を抑制することができる。ゆえに、心疾患発症について初期診断が為されるべきである。常法として、主に物理的方法、例えば心音の聴診、心電図、X線および超音波試験の記録がこの目的に使用される。これら試験方法は、既に可視できるか、または聴診し得る異常が直接心臓で認識される場合にのみ実施され得るという主な欠点を有する。さらに、物理的試験方法は、各診断を実施するためには、適切であるが一般には高額な装置が必要である。

40

【0004】

イヌにおいて最も頻繁に発症する心疾患は、心臓代謝不全および拡張型心筋症であって、これは主に大型動物が罹患する。拡張型心筋症は、正常な壁の厚みを持つ心臓の心室拡張を引き起こす心臓疾患で、かかる拡張は、急速に罹患動物における心不全を引き起こす。タウリンを餌に混合することによって、拡張型心筋症により病気に陥るリスクが顕著に低下され得る。拡張型心筋症と関連のある病気においては、高齢のネコにおいて頻繁に見

50

出される拘束性心筋症は、ポンプ機能の低下による心機能における連続的低下が観察され得る。ネコにおいて最も頻繁に起こる心疾患は、肥大性心筋症である。心筋に関するこの疾患は、心臓壁の肥厚化をもたらし、結果として心臓の心室を血液で充填させる能力を低下させる。これは、左室中に血液を蓄積させ、全身をめぐる血液量を著しく低下させる。

【0005】

多くの心疾患、例えば心不全、拡張型心筋症、肥大性心筋症、左室肥大および機能不全において、ペプチドホルモン、いわゆるBNP(脳性ナトリウム利尿ペプチド)が分泌される。このホルモンは、腎臓を介する液体の排泄をもたらし、心血管系を調節する。このペプチドは心臓で産生され、また過度の緊張および心臓の鬱血の場合に産生が増強されるので、血液のBNPレベルを決定することは、心不全を評価するための適当な手段である。

10

【0006】

BNPに加えて、他のナトリウム利尿ペプチドは、水分バランスおよび血圧を調節する際に重要な役割を担う。心臓壁が拡張される場合、BNPの分泌量が増加して、腎臓を介するナトリウムおよび液体の排泄および血管拡張をもたらし、最終的に血圧および心臓の充填レベルを低下させ得る。BNPは、最終的にN末端proBNPおよびBNPに解裂されるproBNPとして心筋の細胞によって合成される。BNPの両方の一部分が、血液に送達され、そこで決定され得る。

【0007】

動物における心疾患は、特に次の該当文献で論じられている：Bright JM and Cali JV, J Am Vet Med Assoc 2000, 216:1110-4; Guglielmini C, Vet Res Commun 2003, 27 Suppl 1:555; Boswood A et al., J Small Anim Pract 2003, 44:104-8; Takemura N et al., J Vet Med Sci 2003, 65:1265-7; MacDonald KA et al., J Vet Intern Med 2003, 17:172-7; Greco DS et al., Can Vet J 2003, 44:293-7; Monnet E et al., J Am Vet Med Assoc 1997, 211:569-72; Hamlin RL et al., J Vet Intern Med 1996, 10:85-7; Gaschen L et al., J Vet Intern Med 1999, 13:346-56。

20

【0008】

個々の血清中のヒトproBNPまたはそのフラグメント各々の検出に役立つ多くの方法が、先行技術によってすでに知られている。例示のために、ここでEP 0 648 228 B1、WO 03/87819およびFR 2 843 396について述べるべきであろう。

【0009】

US 2004/0018577では、少なくとも3つの抗体を含むイムノアッセイが開示されており、この全てのものが検体中の様々なエピトープと結合し得る。検出されるべき検体は、特に心疾患に関するマーカーの検出と関係があり、ここではBNPおよびproBNPもまた検出され得る。

30

【0010】

Biondo A.W. et al. (Vet. Pathol. 2003, 40(5):501-506)は、proBNPのアミノ酸1~28およびアミノ酸43~56を含むANPの各ペプチドに関するポリクローナル抗体を用いて、ネコにおけるANPおよびBNPを検出するための方法を説明するものである。

【0011】

EP 1 016 867 A1では、イムノアッセイによる哺乳類における前proBNPの検出を説明している。ヒトBNPのアミノ酸27~102、73~102および27~64を含むペプチドに関する抗体が使用されている。

40

【0012】

Jortani S.A. et al. (Clin. Chem. 2003, 50(2):265-278)は、心疾患の潜在的なマーカーとして、BNPおよびBNPのプレプロ(prepro)およびプロ(pro)形態の使用を説明するものである。この文献には、イヌおよびネコにおける心疾患を検出するのに適当であるBNPの好ましいペプチド領域についての記載はない。

【0013】

WO 2000/35951では、抗体を調製できるいくつかのペプチドが開示されており、これは

50

心疾患を診断するための方法に相当である。ヒト N t - p r o - B N P タンパク質のアミノ酸 1 ~ 1 3、3 7 ~ 4 9、および 6 5 ~ 7 6 を含む 3 つのペプチドが開示されており、これらのペプチドに関する抗体を調製するために使用できる。

【 0 0 1 4 】

さらに、ヒト pro B N P またはそのフラグメント各々を検出するためのいくつかの試験キットが、市販購入し得る(例えば Roche および Biomedica から)。しかしながら、動物サンプル中で特異的に pro B N P を決定できる方法は知られていない。そのため、本発明は、動物の診察が高額かつ複雑であるので、pro B N P またはそのフラグメント各々を決定するための適当な手段を提供することを目的とする。

【 0 0 1 5 】

それ故に、本発明は、
下記のステップ；

- ネコまたはイヌの pro B N P サンプルを提供するステップ、
- 該サンプルと、ネコの pro B N P またはそのフラグメントを決定する場合に、ネコの pro B N P のアミノ酸 2 0 ~ 4 2 を含む領域および / またはアミノ酸 5 7 ~ 8 0 を含む領域において少なくとも一つのエピトープに結合する少なくとも一つの抗体を接触させるステップ、またイヌの pro B N P またはそのフラグメントを決定する場合に、イヌの pro B N P のアミノ酸 2 0 ~ 8 6 を含む領域において少なくとも一つのエピトープに結合する少なくとも一つの抗体を接触させるステップ、

そして

- サンプル中に存在するネコまたはイヌの pro B N P またはそのフラグメントの存在および / または濃度を決定するステップ、

を含む、ネコまたはイヌの pro B N P またはそのフラグメントを決定する方法を提供するものである。

ネコまたはイヌの pro B N P 各々の開示された領域におけるエピトープに結合し得る抗体が、pro B N P を特異的に決定するために十分に相当であることが判った。

【 0 0 1 6 】

明細書中に開示されたネコおよびイヌの pro B N P 配列が、ネコ科またはイヌ科各々のファミリーについて例示の目的で使用されており、従ってこれらのファミリー以外の種の動物の pro B N P 配列において本明細書中に開示された配列とは異なる個々のアミノ酸もまた、特異的結合がもはや可能でない様式において、これらの異なるアミノ酸が明細書に開示された抗体のエピトープに関係しないということであれば、本明細書に開示された配列の範囲内にあることを明記する。本明細書に開示されたアミノ酸配列は、公的なデータベース(例えば、Swiss-Prot: イヌの B N P -P16859 および ネコ B N P -Q9GLK4)に公開されている。

【 0 0 1 7 】

本発明の方法で使用したサンプルは、例えば血液、尿などの液体サンプルだけでなく、組織サンプル、例えば心筋または脳のなどの組織セクションを含む。必要に応じて、該サンプルを、例えば後にサンプルと本発明の抗体とを接触させることを容易にするか、または可能となるように処理し得る。このように、pro B N P またはそのフラグメント各々を含有する画分は、血液サンプルから提供され得るか、または組織サンプルは、例えば均質化され、および同様に非タンパク様画分から分離される。

【 0 0 1 8 】

少なくとも一つの抗体がサンプル中のネコまたはイヌの pro B N P のエピトープに結合することは、該抗体が特異的なタンパク質の規定された配列領域においてエピトープと結合でき、この少なくとも一つの該抗体は、規定された領域のタンパク質以外のエピトープとは特異的に結合できないことを意味する。

【 0 0 1 9 】

本発明に従って、エピトープと結合し得る抗体を使用して、pro B N P またはそのフラグメントを決定することができる。にもかかわらず、pro B N P の異なるエピトープを結

10

20

30

40

50

合できるいくつかの(例えば、2、3、4または5の)抗体を使用することは有利であり得る。

【0020】

サンプル中に存在するネコまたはイヌのproBNP、またはそのフラグメントの存在または各濃度の決定は、先行技術において知られた方法によって達成され得る。例示の目的では、酵素免疫アッセイ(例えばELISA)の実施は、液体サンプルの場合に言及することができ、また組織サンプルの場合においては免疫組織化学的方法が言及することができる。

【0021】

本発明の「抗体」は、また本発明のエピトープを認識し得る抗体のフラグメントを含む。このように、抗体は、例えば単に抗原結合側を示すF(ab)部分を含む。これらの抗体フラグメントは、さらに二重特異的抗体またはヘテロミニボディ(例えば、EP 1 100 830 B1を参照されたい)の一部でもあり得る。

10

【0022】

本発明の「proBNPまたはそれらのフラグメント」は、イン・ビボ(例えば、Nt-proBNP)またはイン・ビトロ(例えばサンプルをプロテアーゼまたは化学物質、例えばCNBrと混合することによる)で形成され、そして本発明のエピトープを有する全てのproBNPフラグメントを含む。

【0023】

好ましい実施態様によれば、少なくとも一つの抗体は、ネコのproBNPのアミノ酸25~35を含む領域および/またはアミノ酸45~55を含む領域および/またはアミノ酸60~80を含む領域において少なくとも一つのエピトープに結合する。

20

【0024】

最初にネコのproBNPの上記アミノ酸領域は、抗体の特異的な結合を可能にするエピトープを有することが示されている。

【0025】

本発明の方法において、ネコまたはイヌの各proBNP上のいくつかの異なるエピトープを特異的に結合し得るいくつかの抗体が使用され得る。このため、少なくとも一つのエピトープに結合し得る少なくとも一つの抗体は、本発明に従って使用され得る。さらに、本明細書に記載されたアミノ酸領域が、それらのサイズによって一つのエピトープを含み得るだけでなく、いくつかのエピトープも含み得ることを述べておく。即ち、本発明の方法は、少なくとも一つのエピトープに特異的に結合し得るいくつかの抗体の組合せの使用を含む。

30

【0026】

本発明に従って、イヌのproBNPまたはそのフラグメントを決定する場合に、少なくとも一つの抗体は、イヌのproBNPのアミノ酸25~41を含む領域および/またはアミノ酸55~65を含む領域および/またはアミノ酸74~86を含む領域において少なくとも一つのエピトープと結合する。

【0027】

これらの領域においてエピトープを認識する抗体は、特にイヌ起源のサンプル中でproBNPまたはそのフラグメントを決定するために十分適当である。

40

【0028】

好ましい実施態様に従って、少なくとも一つのエピトープは、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個のアミノ酸である。

【0029】

好ましい実施態様によれば、少なくとも一つの抗体は、ポリクローナルおよび/またはモノクローナルである。

【0030】

本発明の方法で用いた抗体は、ポリクローナル、ならびにモノクローナルであり得る。

50

これらの抗体を調製するために、ネコおよび/またはイヌのproBNPの本明細書で開示されたアミノ酸領域を含むペプチドフラグメントが使用される。これらのペプチドフラグメントは、合成的に(Merrifield R.P., 1963, J Am Chem Soc 85, 2000, 149)、組み換え的に、または組換え体またはネイティブ起源のproBNPの化学的あるいは酵素的分解により作成され得る。それらのサイズによって、それらから回収されたペプチドは、免疫原担体(例えばKLH)に結合されるか、または直接ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を調製するために使用される(例えば、Koehler G. および Milstein C., 1975, Nature 256:495; Galfre et al., 1977, Nature 266:550)。本発明に従って、抗体も組み換え的に調製され得る。組換え抗体を調製するための方法は、当業者には十分知られている(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 2001を参照されたい)。

10

【0031】

さらなる好ましい実施態様に従って、少なくとも一つのさらなる抗体は、少なくとも一つの抗体または少なくとも一つのエピトープに結合し、これにより例えばサンドイッチアッセイとして本発明の試験を実施することが可能となる。

【0032】

さらなる抗体が少なくとも一つの抗体に結合することにより、後者および間接的には少なくとも一つの抗体に定性的および定量的に各々結合した該エピトープを決定することが可能となる。少なくとも一つのさらなる抗体が少なくとも一つのエピトープと結合する場合、少なくとも一つの抗体が、少なくとも一つの抗体が固相上で固定されるならば、酵素イムノアッセイを介して、少なくとも一つのエピトープに定性的および定量的に各々結合することを決定できる。

20

【0033】

好ましくは、少なくとも一つの抗体および/または少なくとも一つのさらなる抗体が標識される。

【0034】

そうする際に、少なくとも一つの抗体および/または少なくとも一つのさらなる抗体は、酵素、例えばペルオキシダーゼ、特にセイヨウワサビペルオキシダーゼ、ビオチン、蛍光染料、特にフルオロセイン(FITC、DFTF)、R-フィコエリトリン(PE)、ペリジニウムクロロフィルタンパク質(PerCP)およびタンデム結合体、例えばPE-Cy5またはPE-Texas Red、金コロイドまたは放射性核種によって標識される。

30

【0035】

2つの抗体の一つを標識することによって、二次反応において、または直接的に少なくとも一つのエピトープに結合する標識化抗体の存在および/または濃度を決定することもできる。この抗体自身は、タンパク質A結合体(例えば、タンパク質A金結合体)によっても検出され得る。

【0036】

好ましい実施態様によれば、少なくとも一つの抗体、または少なくとも一つのさらなる抗体が固相に結合される。

【0037】

少なくとも一つの抗体、または少なくとも一つのさらなる抗体を結合することによって、例えば抗体チップ、被覆されたマイクロタイタープレートまたは側方流装置などを作成することが可能であり、これは非常に多くの方法において使用することができる。

40

【0038】

好ましくは、ネコまたはイヌのproBNPまたはそのフラグメントの決定は、ラジオイムノアッセイ、免疫結合アッセイ、ウェスタンブロット、免疫組織化学、酵素イムノアッセイ、側方流装置(LFD、試験ストリップ)およびその組合せからなる群から選択される方法によって為される。

【0039】

上記の方法は当業者には十分知られている。これらの方法に関する概説は、例えばWO 0

50

2/059567に開示されている、例えば"Bioanalytik" (Lottspeich および Zorbas, Spektrum Verlag 1998). Lateral flow devices (LFD, test strips)に示される。

【0040】

さらなる態様に従って、本発明は、ネコのproBNPのアミノ酸20～42を含む領域および/またはアミノ酸57～80を含む領域において少なくとも一つのエピトープに結合する抗体または抗体混合物に関する。

【0041】

さらなる好ましい実施態様に従って、抗体または抗体混合物は、ネコのproBNPのアミノ酸25～35を含む領域および/またはアミノ酸45～55を含む領域および/またはアミノ酸60～80を含む領域において少なくとも一つのエピトープに結合する。

10

【0042】

さらなる態様に従って、本発明は、イヌのproBNPのアミノ酸20～86を含む領域において少なくとも一つのエピトープに結合する抗体または抗体混合物に関する。

【0043】

好ましくは、抗体または抗体混合物は、イヌのproBNPのアミノ酸25～41を含有する領域および/またはアミノ酸55～65を含む領域および/またはアミノ酸74～86を含む領域において少なくとも一つのエピトープに結合する。

【0044】

好ましい実施態様によれば、該抗体または該抗体混合物は、少なくとも3個の、少なくとも4個の、少なくとも5個の、少なくとも6個の、少なくとも7個の、少なくとも8個の、少なくとも9個の、少なくとも10個のアミノ酸を含むエピトープと結合する。本発明のエピトープは、多くて40個のアミノ酸長を有し、多くて35個のアミノ酸長、多くて30個のアミノ酸長、特に多くて25個のアミノ酸長、多くて20個のアミノ酸長または多くて15個のアミノ酸長を有するのが好ましい。

20

【0045】

本発明のさらなる態様は、ネコのproBNPのアミノ酸20～42を含む領域および/または57～80個のアミノ酸を含む領域において、少なくとも3個のアミノ酸を含有するペプチドに関する。

【0046】

さらなる実施態様によれば、該ペプチドは、ネコのproBNPのアミノ酸25～35の領域および/またはアミノ酸45～55の領域および/またはアミノ酸60～80の領域において、少なくとも3個のアミノ酸を含む。

30

【0047】

本発明のさらなる態様は、イヌのproBNPのアミノ酸20～86の領域において3つのアミノ酸を含むペプチドに関する。

【0048】

好ましくは、ペプチドは、イヌのproBNPのアミノ酸25～41の領域および/またはアミノ酸55～65の領域および/またはアミノ酸74～86の領域において、少なくとも3個のアミノ酸を含む。

【0049】

好ましい実施態様によれば、ペプチドは、化学的に合成されるか、またはサンプルから単離されるか、または組み換え的に各々調製される。

40

【0050】

サンプルから単離されるか、または組み換え的に作成されるペプチドから、エピトープを適切に調製するために、後者は、自体既知の方法によって酵素的または化学的にさらに処理され得る。

【0051】

本発明のさらなる態様は、本発明の方法においてネコまたはイヌのproBNPまたはそのフラグメントを決定するための、本発明の抗体の使用または抗体混合物の使用に関する。

50

【 0 0 5 2 】

本発明のペプチドは、標識した形態で競合的イムノアッセイに使用され得る。

【 0 0 5 3 】

好ましくは、本発明のペプチドは、抗体または抗体混合物を調製するために使用される。

【 0 0 5 4 】

さらに、本発明のペプチドは、本発明の方法におけるポジティブコントロールまたは濃度決定のための標準として各々使用される。

【 0 0 5 5 】

本発明のさらなる態様は、

本発明の少なくとも一つの抗体または本発明の少なくとも一つの抗体混合物、少なくとも一つの抗体のまたは少なくとも一つの抗体混合物が、ネコまたはイヌのproB N Pまたはそのフラグメントに結合することを定性的および/または定量的に検出するための手段、および
所望により、ポジティブコントロールまたは濃度決定のための標準として、本発明のペプチドおよび/またはネコまたはイヌのproB N Pまたはそのフラグメント、
を含む、
ネコまたはイヌのproB N Pまたはそのフラグメントを決定するためのキットに関する。

10

【 0 0 5 6 】

本発明によれば、該キットは少なくとも一つのさらなる抗体を含み得る。

20

【 0 0 5 7 】

このさらなる抗体は、少なくとも一つの抗体、または少なくとも一つのエピトープとの結合活性を有する。

【 0 0 5 8 】

好ましい実施態様によれば、少なくとも一つの抗体および/または少なくとも一つのさらなる抗体が標識される。

【 0 0 5 9 】

好ましくは、該標識化物は、酵素、例えばペルオキシダーゼ、特にセイヨウワサビペルオキシダーゼ、ビオチン、蛍光染料、特にフルオロセイン(FITC、DFTF)、R-フィコエリトリン(PE)、ペリジニウムクロロフィルタンパク質(PerCP)およびタンデム結合体、例えばP E-Cy5またはPE-Texas Red、金コロイドまたは放射性核種を含む。

30

【 0 0 6 0 】

本発明のさらなる態様は、ネコまたはイヌのproB N Pを決定する方法において本発明のキットの使用に関する。

【 0 0 6 1 】

本発明の方法に伴って、ネコおよびイヌにおいてproB N Pおよびそのフラグメントを検出するだけでなく、その他の哺乳類、例えばウマ、ウシ、ゾウ、マウス(Swiss-Prot: P40753)、ブタ(Swiss-Prot: P07634)、ラット(Swiss-Prot: P13205)、ラクダ(Swiss-Prot: Q6L7Z3)およびヒツジ(Swiss-Prot: O46541)および魚類、例えばスズキ(Swiss-Prot: Q805E8)、チョウザメ(Swiss-Prot: P83965)およびフグ(Swiss-Prot: Q805D7)においても検出することができる。

40

【 0 0 6 2 】

上記動物においてproB N Pを検出するために、対応するproB N Pのアミノ酸残基1 ~ 80のアミノ酸領域において少なくとも一つのエピトープに結合する抗体が好ましい。特に、アミノ酸領域1 ~ 15、15 ~ 30、20 ~ 30、25 ~ 35、30 ~ 40、35 ~ 50、35 ~ 55、45 ~ 55、50 ~ 70、60 ~ 70、60 ~ 80および70 ~ 80を含む少なくとも一つのエピトープに結合する抗体が好ましい。下記の特に好ましい特定のエピトープは、本発明の基本となるスキームにも見られた(参照、実施例)。

【 0 0 6 3 】

【表 1】

表 1

	Swiss-Prot 番号	AA-領域
マウス	P40753	1-15, 20-30, 50-70
ブタ	P07634	20-30, 35-50, 60-70
ラット	P13205	1-15, 30-40, 45-55, 60-80
ラクダ	Q6L7Z3	20-30, 55-65, 70-80
ヒツジ	O46541	1-15, 20-30, 45-55, 60-80
スズキ	Q805E8	15-30, 35-50, 70-80
チョウザメ	P83965	1-20, 25-35, 70-80
フグ	Q805D7	15-30, 35-55, 60-80

10

【 0 0 6 4 】

イヌおよびネコについて上記したように、エピトープの好ましい長さを上記動物に対してさらに示す。

【 0 0 6 5 】

本発明は、下記の実施例および図によって説明されが、それらによって限定されるものではない。

20

【実施例 1】

【 0 0 6 6 】

実施例 1 : 抗体の調製

エピトープは、例えば、Fraga S. ("Theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences.", 1982; Can. J. Chem. 60:2606-2610) のアルゴリズムのProtScale(<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>)を用いる計算によって決定できる。

【 0 0 6 7 】

これらのエピトープが、特に免疫原性であり、抗体に容易に接触できることが判ったため、そのペプチドフラグメントを、最大のエピトープ認識ファクター(ProtScale プログラムの結果に対応する)が得られたネコまたはイヌのNt-proBNPのアミノ酸配列のその領域から選択した。ネコまたはイヌのproBNPの選択したペプチドを、化学的に合成し、適当な担体タンパク質(例えばKLH)と結合した。

30

【 0 0 6 8 】

KLHと結合した1つのペプチド/エピトープの各々を3匹のヒツジに注射した。最初の免疫化のために、各ヒツジに、フロインドアジュバント(Guildhay, UK)およびBCG(Bacillus Calmette-Guearin)、および免疫応答をさらに増加させるための免疫原(0.25 mg)を混合した対応する抗原(0.5 mg)を与えた。

40

【 0 0 6 9 】

本発明により、ポリクローナル抗体の使用は、非常に良好かつ再現性のある結果を提供することが示された。しかし、本発明に記載した方法においてモノクローナル抗体なども使用できる。ネコまたはイヌのproBNPのペプチド/エピトープに対するモノクローナル抗体は、当業者には既知の標準的方法によって調製され得る(これに関して、例えばKoehler G および Milstein C, Nature, 1975, 256:495-497を参照されたい)。

【実施例 2】

【 0 0 7 0 】

実施例 2 : E L I S A による抗体の反応性の決定

ヒツジの血液から回収されるproBNPのペプチド/エピトープに対する抗体または血清

50

の各反応性をELISA試験によってアッセイした。最初に、マイクロタイタープレートを、4 でストレプトアビジン(0.5 µg/ml, 200 µl/ウェル)にて終夜被覆し、洗浄し、0.25% Tween 20 を含有する0.1 M PBS(pH 7.5)の1% BSAでブロッキングし、1回以上洗浄し、3時間4 でビオチン(0.25 µg/ml, 200 µl/ウェル)と結合した合成proBNPペプチド配列と共にインキュベートした。さらなる洗浄ステップの後、血清サンプルを、3% BSAを含有する0.1 Mリン酸緩衝液にて1:1000/1:1000/1:10000希釈し、マイクロタイタープレートに加えた。プレート上のペプチド/エピトープに対する抗体の結合は、セイヨウワサビペルオキシダーゼと結合した抗ヒツジIgG抗体およびTMB(テトラメチル-ベンジジン)を含有する基質溶液の添加によって決定した。セイヨウワサビペルオキシダーゼとTMBとの反応を、0.9% 硫酸の添加により停止させた。顕色展開を、マイクロタイタープレートを分析し得る分光計を用いて追跡した。

【実施例3】

【0071】

実施例3：健康および罹患動物のサンプル中のNt-proBNP測定

本発明の抗体の一つを用いて被覆したマイクロタイタープレートのウェル中に、ネコまたはイヌ血清(20 µl)をピペットで移し、0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7)中のさらなるペルオキシダーゼ標識した本発明の第二の抗体(200 µl)と共に4~16時間、室温でインキュベートした。次に、マイクロタイタープレートを、0.1% トライトンx100を有する0.1 Mリン酸緩衝液(300 µl, pH 7)を用いて5回洗浄し、テトラメチルベンジジン(200 µl)を基質として添加した。20~30分間の顕色展開の後、該反応を0.9% 硫酸(50 µl)を添加することによって停止し、Nt-proBNPの量に直接的に比例する色調強度を、マイクロタイタープレート分光計によって測定した。正確な濃度は、組換え体ネコまたはイヌのNt-proBNP由来の校正曲線との比較によって決定した。

【0072】

例示の目的で、8匹の健康なイヌおよび心疾患に罹患した15匹のイヌにおいて、イヌNt-proBNP(表2)のアミノ酸25~41および74~86の領域においてエピトープに対する抗体を用いてNt-pro-BNPの濃度を測定した：

10

20

【表 2】

表 2

健康状態	番号	イヌのNt-proBNP
健康		pmol/l
	1	862
	2	1060
	3	753
	4	531
	5	980
	6	674
	7	695
	8	1010
心疾患罹患		
	43	2460
	44	1950
	45	2140
	46	2170
	47	1480
	48	1560
	49	1390
	50	1450
	51	1520
	52	1790
	53	1310
	54	1140
	55	1975
	57	1720
	58	3020

10

20

30

【0073】

これらの結果は、本発明の抗体を用いて、Nt-proBNPの濃度が、動物の血清中で効率的に決定でき、その結果によって、健康状態に対する診断を確立できるか、または治療の経過を各々追跡できることを示す。

【0074】

さらに、図4は、47匹の罹患したネコおよび28匹の健康なネコにおけるNt-proBNPの決定を示す。検出されたNt-proBNPの濃度が、心疾患の重症度と直接相関することを見出した。これらの試験において、アミノ酸35～45および68～80を含む領域においてエピトープを結合する抗体を使用した。得られた結果により、同様の関連性が想定された多くの文献を確認される。

40

【実施例4】

【0075】

実施例4：交差反応性

組換え体ネコ、イヌおよびヒトNt-proBNPを、マイクロタイタープレート(250 ng/ml, 200 μ l/ウェル, 終夜室温)上に被覆した。次に、このプレートを洗浄し、抗ヒト、抗ネコおよび抗イヌの抗血清(10-100 μ g/ml, 0.1 M リン酸緩衝液中で, pH 7)の希釈物と

50

接触させた。洗浄工程の後に、結合抗体の量を適当な二次抗体(ペルオキシダーゼ標識化抗ヒツジ抗体)を用いて測定した。各抗体は、対応するNt-proB N P分子(即ち、ネコ Nt-proB N Pを用いる抗ネコ抗血清)とは十分反応するが、驚くべきことに各々他種のNt-proB N P分子と反応しないかまたは非常にわずかな程度反応することが示された。

【 0 0 7 6 】

ネコNt-proB N Pのエピトープに対して産生された抗体は高い特異性を示しており、対応するヒト配列には非常に低い程度にしか結合できないことが示された。抗体の特異性に関する測定において、Nt-proB N Pは、抗体を産生するために使用されたペプチドではなく、結合パートナーとしての完全なポリペプチドとして使用された。Nt-proB N Pのネコエピトープに対する抗体は、ヒトNt-proB N Pの完全な配列の領域にわたっていかなる交差反応も示さないことが示された。例外は、ネコNt-proB N Pのアミノ酸1～20の領域において結合する抗体のみである。ネコNt-proB N Pと結合する場合、この抗体は、ヒトNt-proB N Pと結合する場合よりも、ちょうど2倍の高い相対的反応性を示す。

【 0 0 7 7 】

さらに、Nt-proB N Pのヒトエピトープに対する抗体も、ネコ Nt-proB N Pに対して低い反応性を示し得る。このように、ヒトNt-proB N Pのエピトープに対する抗体はネコNt-proB N Pと結合できない、即ちネコにおいて(表3を参照されたい)Nt-proB N Pを決定するために用いることが出来ないことを示すことができた。

【 0 0 7 8 】

【表3】

表3

抗血清番号	抗体特異性	相対的反応性	対応するヒト配列に対する相対的反応性
S2189	AA 1-20 ネコ	2.3	1.2
S2190	AA 45-55 ネコ	3.7	0.01
S2191	AA 25-35 ネコ	1.0	0.2
S2192	AA 60-80 ネコ	4.2	0.3
S2072	AA 8-29 ヒト	0.4	-----
S2104	AA 32-57 ヒト	0.25	-----
S2102	AA 60-80 ヒト	1.7	-----

【 0 0 7 9 】

交差反応性を、イヌのNt-proB N Pのエピトープに対する抗体、およびヒトNt-proB N Pのエピトープに対する抗体を用いて試験した。また、イヌの配列を用いて、ネコの配列を用いた試験に匹敵し得る結果が達成され得た(表4を参照されたい)。

【 0 0 8 0 】

【表4】

表4

抗血清番号	抗体特異性	相対的反応性	対応するヒト配列に対する相対的反応性
S2195	AA 1-22 イヌ	2.2	1.1
S2196	AA 25-41 イヌ	6.3	0.2
S2197	AA 55-65 イヌ	1.0	0.03
S2198	AA 74-86 イヌ	1.9	0.6
S2072	AA 8-29 ヒト	0.1	-----
S2104	AA 32-57 ヒト	0.3	-----
S2102	AA 60-80 ヒト	1.5	-----

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 1 】

【図1】図1は、イヌのproBNPアミノ酸配列(図1A)のプログラムProtScaleに対応するエピトープ認識ファクター、および本発明のイヌのproBNPエピトープのアミノ酸配列(図1B)を示す。

【図2】図2は、ProtScaleを用いて計算したネコのproBNPアミノ酸配列のエピトープ認識ファクター(図2A)、および本発明のネコのproBNPエピトープのアミノ酸配列(図2B)を示す。

【図3】図3は、イヌのproBNP(図3A)およびネコのproBNP(図3B)と、本発明の抗体を用いるELISAアッセイを基にした標準曲線を示す。本発明の抗体を用いるproBNPの決定により、広い濃度範囲にわたって直線的であることを示すことができた。

【図4】図4は、47匹の罹患したネコおよび28匹の健康なネコにおけるproBNPの決定を示す。サンプル中のproBNPの濃度から、疾患の重症度を決定することができる。FAT - ネコ心房血栓症、HCM - 肥大大心筋症、LVH - 左室肥大。

10

【図1】

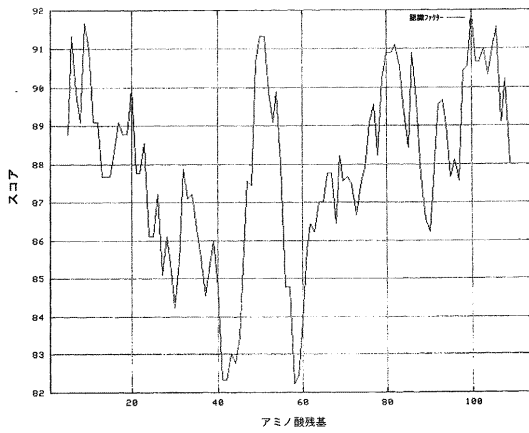


Fig. 1A

ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
エピトープ 1, AA 1-22																						
エピトープ 2, AA 25-41																						
エピトープ 3, AA 32-46																						
エピトープ 4, AA 45-55																						
エピトープ 5, AA 74-86																						

Fig. 1B

【図2】

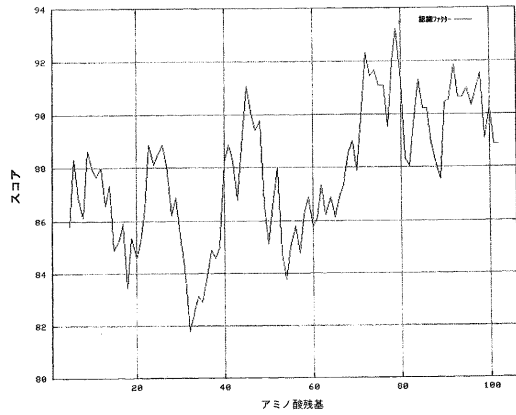


Fig. 2A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
エピトープ 1, AA 1-20																						
エピトープ 2, AA 35-45																						
エピトープ 3, AA 45-60																						
エピトープ 4, AA 68-80																						

Fig. 2B

【 図 3 】

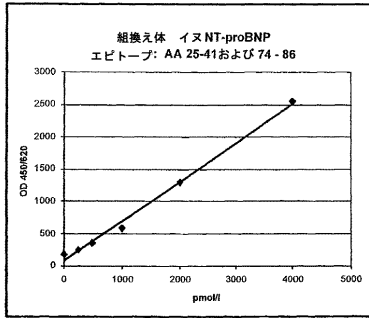


Fig. 3A

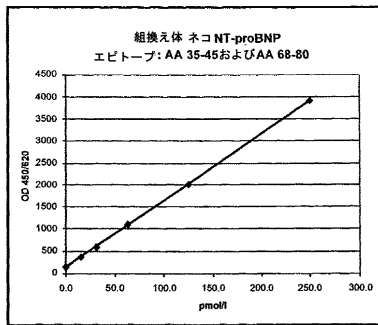


Fig. 3B

【 図 4 】

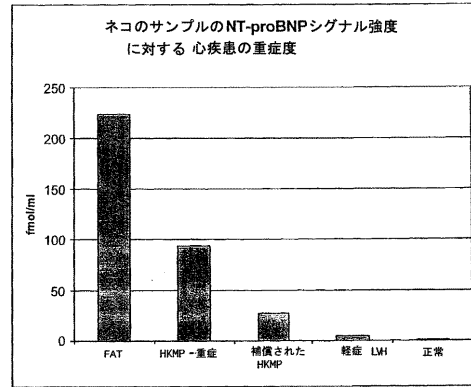


Fig. 4

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成18年7月8日 (2006.7.8)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ネコまたはイヌのproBNPを決定する方法であって、
下記のステップ：

- ネコまたはイヌのサンプルを提供するステップ、
- 該サンプルと、ネコのproBNPを決定する場合に、ネコのproBNPのアミノ酸20～42を含む領域および/またはアミノ酸57～80を含む領域において少なくとも一つのエピトープに結合する少なくとも一つの抗体を接触させるステップ、またイヌのproBNPを決定する場合に、イヌのproBNPのアミノ酸20～86を含む領域において少なくとも一つのエピトープに結合する少なくとも一つの抗体を接触させるステップ、

そして
- サンプル中に存在するネコまたはイヌのproBNPの存在および/または濃度を決定するステップ、
を含む方法。

【 請求項 2 】

ネコのproBNPを決定する場合に、少なくとも一つの前記抗体が、ネコのproBNPのアミノ酸25～35を含む領域および/またはアミノ酸60～80を含む領域において、少なくとも一つのエピトープと結合することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

イヌのproB N Pを決定する場合に、少なくとも一つの該抗体が、イヌのproB N Pのアミノ酸 25 ~ 41 を含む領域および/またはアミノ酸 55 ~ 65 を含む領域および/またはアミノ酸 74 ~ 86 を含む領域において少なくとも一つのエピトープと結合することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも一つのエピトープが少なくとも3つのアミノ酸を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

少なくとも一つの抗体がポリクローナルおよび/またはモノクローナルであることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

少なくとも一つのさらなる抗体が、該少なくとも一つの抗体または少なくとも一つのエピトープに結合することを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも一つの抗体および/または少なくとも一つのさらなる抗体が標識されることを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも一つの抗体および/または少なくとも一つのさらなる抗体が、ペルオキシダーゼ、特にセイヨウワサビペルオキシダーゼ、ビオチン、蛍光染料、金コロイドまたは放射性核種で標識されることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも一つの抗体または少なくとも一つのさらなる抗体が、固体相に結合することを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

ネコまたはイヌのproB N Pの決定が、ラジオイムノアッセイ、免疫結合アッセイ、ウェスタンブロット、免疫組織化学、酵素イムノアッセイ、側方流動装置(LFD, 試験ストリップ)、およびその組合せ物からなる群から選択される方法によって行われることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

ネコのproB N Pのアミノ酸 20 ~ 42 を含む領域および/またはアミノ酸 57 ~ 80 を含む領域において少なくとも一つのエピトープと結合することを特徴とする、抗体または抗体混合物。

【請求項 12】

ネコのproB N Pのアミノ酸 25 ~ 35 を含む領域および/またはアミノ酸 60 ~ 80 を含む領域において少なくとも一つのエピトープと結合することを特徴とする、請求項 11 に記載の抗体または抗体混合物。

【請求項 13】

イヌのproB N Pのアミノ酸 20 ~ 86 を含む領域において少なくとも一つのエピトープと結合することを特徴とする、抗体または抗体混合物。

【請求項 14】

イヌのproB N Pのアミノ酸 25 ~ 41 を含む領域および/またはアミノ酸 55 ~ 65 を含む領域および/またはアミノ酸 74 ~ 86 を含む領域において少なくとも一つのエピトープと結合することを特徴とする、請求項 13 に記載の抗体または抗体混合物。

【請求項 15】

少なくとも一つのエピトープが少なくとも3つのアミノ酸を含むことを特徴とする、請求項 11 ~ 14 のいずれかに記載の抗体または抗体混合物。

【請求項 16】

ネコのproB N Pのアミノ酸 20 ~ 42 の領域および/またはアミノ酸 57 ~ 80 の領域を含むことを特徴とする、ペプチド。

【請求項 17】

ネコのproB N Pのアミノ酸 25 ~ 35 および / または アミノ酸 60 ~ 80 を含むことを特徴とする、請求項 16 に記載のペプチド。

【請求項 18】

イヌのproB N Pのアミノ酸 20 ~ 86 を含むことを特徴とする、ペプチド。

【請求項 19】

イヌのproB N Pのアミノ酸 25 ~ 41 および / または アミノ酸 55 ~ 65 および / または アミノ酸 74 ~ 86 を含むことを特徴とする、請求項 18 に記載のペプチド。

【請求項 20】

ペプチドが、化学的に合成されたペプチド、サンプルから単離されたペプチド、または組み換え的に調製されたペプチドであることを特徴とする、請求項 16 ~ 19 のいずれかに記載のペプチド。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法においてネコまたはイヌのproB N P を決定するための、請求項 11 ~ 15 のいずれかに記載の抗体または抗体混合物の使用。

【請求項 22】

請求項 11 ~ 15 のいずれかに記載の抗体または抗体混合物を産生するための、請求項 16 ~ 20 のいずれかに記載のペプチドの使用。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法における、ポジティブコントロールまたは濃度決定のための標準としての、請求項 16 ~ 20 のいずれかに記載のペプチドの使用。

【請求項 24】

ネコまたはイヌのproB N P を決定するためのキットであって、次のもの：

請求項 11 ~ 15 のいずれかに記載の少なくとも一つの抗体または少なくとも一つの抗体混合物、

少なくとも一つの抗体または少なくとも一つの抗体混合物がネコまたはイヌのproB N P に結合することを定性的および / または定量的に検出するための手段、および

所望により、ポジティブコントロールまたは濃度決定のための標準として、請求項 16 ~ 20 のいずれかに記載のペプチドおよび / またはネコまたはイヌのproB N P を含むキット。

【請求項 25】

ネコまたはイヌのproB N P の少なくとも一つの抗体または少なくとも一つの抗体混合物に関する結合を定性的および / または定量的に検出するための手段が、少なくとも一つのさらなる抗体を含むことを特徴とする、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 26】

少なくとも一つの抗体および / または少なくとも一つのさらなる抗体が標識されることを特徴とする、請求項 24 または 25 に記載のキット。

【請求項 27】

少なくとも一つの抗体および / または少なくとも一つのさらなる抗体が、ペルオキシダーゼ、特にセイヨウワサビペルオキシダーゼ、ビオチン、蛍光染料、金コロイドまたは放射性核種によって標識されることを特徴とする、請求項 24 ~ 26 のいずれかに記載のキット。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法における、請求項 24 ~ 27 のいずれかに記載のキットの使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/054446

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 586 396 B1 (SEILHAMER J.J. ET AL.) 1 July 2003 (2003-07-01) abstract; claims 1-10; figures 5,8 column 18, lines 35-55	1, 3-10, 13-28
X	BIONDO A.W. ET AL.: "Immunohistochemistry of atrial and brain natriuretic peptides in control cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy." VETERINARY PATHOLOGY, vol. 40, no. 5, September 2003 (2003-09), pages 501-506, XP002355515 ISSN: 0300-9858 cited in the application abstract Material and Methods	2, 4-10, 12, 16-22
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention	
E earlier document but published on or after the international filing date	*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	
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)	*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.	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 23 November 2005	Date of mailing of the international search report 08/12/2005	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 840-2040, Tx. 81 851 epo nl, Fax: (+31-70) 840-3016	Authorized officer Barz, W	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP2005/054446

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 114 923 A (SEILHAMER J.J. ET AL.) 19 May 1992 (1992-05-19)	16-20
A	abstract; claims 1-4; figure 3	1-15, 21-28
X	EP 0 648 228 A (MEDINNOVA SF) 19 April 1995 (1995-04-19)	16-20
A	cited in the application claims 1-15; examples 1-3	1-15, 21-28
Y	US 2004/096920 A1 (DAVEY M. ET AL.) 20 May 2004 (2004-05-20)	1
Y	abstract; claim 1; figure 1	
Y	WO 00/45176 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; KARL, JOHANN; LILL, HELMUT; STAHL, PETER; KRUE) 3 August 2000 (2000-08-03)	1
Y	abstract; claims 1-19; examples 2-6	
X	US 2003/069186 A1 (BURNETT J.C. ET AL.) 10 April 2003 (2003-04-10)	16-20,22
X	claims 1-21; figure 1	
A	WO 00/71576 A (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 30 November 2000 (2000-11-30)	1-28
A	the whole document	
A	JORTANI S.A. ET AL.: "Strategies for developing biomarkers of heart failure." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 50, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 265-278, XP002355516 ISSN: 0009-9147 cited in the application the whole document	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/054446**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-10, 21, 23 and 28 relate to methods for treatment of the animal body by surgery ("Preparation of a feline or canine sample), the search was carried out and was based on corresponding methods which do not involve such treatment by surgery.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP2005/054446

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6586396	B1	01-07-2003	NONE
US 5114923	A	19-05-1992	NONE
EP 0648228	A	19-04-1995	AT 172989 T 15-11-1998 AU 667223 B2 14-03-1996 AU 4340593 A 30-12-1993 CA 2136961 A1 09-12-1993 DE 69321955 D1 10-12-1998 DE 69321955 T2 10-06-1999 DK 648228 T3 19-07-1999 ES 2123056 T3 01-01-1999 WO 9324531 A1 09-12-1993 JP 3375630 B2 10-02-2003 JP 7507210 T 10-08-1995 US 5786163 A 28-07-1998
US 2004096920	A1	20-05-2004	US 2004096919 A1 20-05-2004
WO 0045176	A	03-08-2000	AU 758562 B2 27-03-2003 AU 2545100 A 18-08-2000 CA 2359667 A1 03-08-2000 CN 1339107 A 06-03-2002 EP 1151304 A2 07-11-2001 HU 0105195 A2 29-04-2002 JP 2003508724 T 04-03-2003 NO 20013698 A 28-09-2001 NZ 512762 A 28-02-2003 PL 364798 A1 13-12-2004
US 2003069186	A1	10-04-2003	AU 2433901 A 25-06-2001 CA 2395585 A1 21-06-2001 EP 1242452 A2 25-09-2002 JP 2003517005 T 20-05-2003 WO 0144284 A2 21-06-2001 US 6407211 B1 18-06-2002 US 2002082219 A1 27-06-2002
WO 0071576	A	30-11-2000	AU 5043900 A 12-12-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/054446

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES G01N33/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	US 6 586 396 B1 (SEILHAMER J.J. ET AL.) 1. Juli 2003 (2003-07-01) Zusammenfassung; Ansprüche 1-10; Abbildungen 5,8 Spalte 18, Zeilen 35-55	1,3-10, 13-28
X	BIONDO A.W. ET AL.: "Immunohistochemistry of atrial and brain natriuretic peptides in control cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy." VETERINARY PATHOLOGY, Bd. 40, Nr. 5, September 2003 (2003-09), Seiten 501-506, XP002355515 ISSN: 0300-9858 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Material and Methods	2,4-10, 12,16-22
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
23. November 2005		08/12/2005
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Barz, W

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen
 PCT/EP2005/054446

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 114 923 A (SEILHAMER J.J. ET AL.) 19. Mai 1992 (1992-05-19)	16-20
A	Zusammenfassung; Ansprüche 1-4; Abbildung 3	1-15, 21-28
X	EP 0 648 228 A (MEDINNOVA SF) 19. April 1995 (1995-04-19)	16-20
A	in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-15; Beispiele 1-3	1-15, 21-28
Y	US 2004/096920 A1 (DAVEY M. ET AL.) 20. Mai 2004 (2004-05-20)	1
Y	Zusammenfassung; Anspruch 1; Abbildung 1	
Y	WO 00/45176 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; KARL, JOHANN; LILL, HELMUT; STAHL, PETER; KRUE) 3. August 2000 (2000-08-03)	1
Y	Zusammenfassung; Ansprüche 1-19; Beispiele 2-6	
X	US 2003/069186 A1 (BURNETT J.C. ET AL.) 10. April 2003 (2003-04-10)	16-20,22
X	Ansprüche 1-21; Abbildung 1	
A	WO 00/71576 A (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH) 30. November 2000 (2000-11-30)	1-28
A	das ganze Dokument	
A	JORTANI S.A. ET AL.: "Strategies for developing biomarkers of heart failure." CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 50, Nr. 2, Februar 2004 (2004-02), Seiten 265-278, XP002355516 ISSN: 0009-9147	1-28
A	in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/054446

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 1-10, 21, 23 und 28 Verfahren zur chirurgischen Behandlung des tierischen Körpers umfassen ("Bereitstellen einer felines oder caninen Probe"), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf entsprechende Verfahren ohne derartige chirurgische Behandlungsverfahren.
2. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

- Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**
- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/054446

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6586396	B1	01-07-2003	KEINE
US 5114923	A	19-05-1992	KEINE
EP 0648228	A	19-04-1995	AT 172989 T 15-11-1998 AU 667223 B2 14-03-1996 AU 4340593 A 30-12-1993 CA 2136961 A1 09-12-1993 DE 69321955 D1 10-12-1998 DE 69321955 T2 10-06-1999 DK 648228 T3 19-07-1999 ES 2123056 T3 01-01-1999 WO 9324531 A1 09-12-1993 JP 3375630 B2 10-02-2003 JP 7507210 T 10-08-1995 US 5786163 A 28-07-1998
US 2004096920	A1	20-05-2004	US 2004096919 A1 20-05-2004
WO 0045176	A	03-08-2000	AU 758562 B2 27-03-2003 AU 2545100 A 18-08-2000 CA 2359667 A1 03-08-2000 CN 1339107 A 06-03-2002 EP 1151304 A2 07-11-2001 HU 0105195 A2 29-04-2002 JP 2003508724 T 04-03-2003 NO 20013698 A 28-09-2001 NZ 512762 A 28-02-2003 PL 364798 A1 13-12-2004
US 2003069186	A1	10-04-2003	AU 2433901 A 25-06-2001 CA 2395585 A1 21-06-2001 EP 1242452 A2 25-09-2002 JP 2003517005 T 20-05-2003 WO 0144284 A2 21-06-2001 US 6407211 B1 18-06-2002 US 2002082219 A1 27-06-2002
WO 0071576	A	30-11-2000	AU 5043900 A 12-12-2000

フロントページの続き

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

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 ヴォルフガング・ヴォロスチュク

オーストリア、アー - 1 0 4 0 ヴィーン、マッティーリシュトラッセ 3 / 3 2 番

(72)発明者 ゲルハルト・ハヴァ

オーストリア、アー - 1 1 0 0 ヴィーン、ウンターレ・カイシュトラッセ 2 4 / 6 / 8 番

Fターム(参考) 2G054 AB04 CA23 EA03 EA04 GA03 GA04 GB01 GB02

4H045 AA10 AA11 AA30 BA21 CA40 DA32 DA75 DA86 EA50 FA20

FA71

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2008512664A5	公开(公告)日	2008-08-21
申请号	JP2007530714	申请日	2005-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	生物药物媒体梓下来的专业去库特GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsongu UND COM帕尼命令豪华GESELLSCHAFT		
申请(专利权)人(译)	Biomedika用药慈亲排放社库特 - GESELLSCHAFT米特Beshurenkuteru-GMBH UND Komupani科曼豪华GESELLSCHAFT		
[标]发明人	ヴォルフガングヴォロスチュク ゲルハルトハヴァ		
发明人	ヴォルフガング・ヴォロスチュク ゲルハルト・ハヴァ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C07K14/575 G01N21/78		
CPC分类号	C07K16/26 C07K2317/34 G01N33/68 G01N2333/58 G01N2800/32		
FI分类号	G01N33/53.B C07K16/18.ZNA C07K14/575 G01N21/78.Z G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/AB04 2G054/CA23 2G054/EA03 2G054/EA04 2G054/GA03 2G054/GA04 2G054/GB01 2G054/GB02 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA21 4H045/CA40 4H045/DA32 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/FA71		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 櫻井洋子		
优先权	2004001505 2004-09-08 AT		
其他公开文献	JP4995087B2 JP2008512664A		

摘要(译)

公开了用于测定样品中的犬proBNP或其片段的方法和组合物。在一种方法中，通过提供犬样品来确定犬proBNP或其片段，使样品与至少一种结合犬proBNP的氨基酸32至48的区域中的表位的抗体接触，并确定犬proBNP的存在。或其片段存在于样品中。还公开了结合犬proBNP的抗体和包含此类抗体的试剂盒。