



(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 1505/2004
(22) Anmeldetag: 2004-09-08
(43) Veröffentlicht am: 2008-07-15

(51) Int. Cl.⁸: **G01N 33/53** (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:
US 2004/0018577A1
BIONDO AW ET AL., VET PATHOL.
2003, 40(5):501-506
EP 1016867A1 JORTANI SA ET AL.,
CLIN CHEM. 2004, 50(2):265-278
WO 2000/35951A1

(73) Patentanmelder:
BIOMEDICA MEDIZINPRODUKTE
GMBH & CO KG
A-1210 WIEN (AT)

(54) VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON PROBPNP

- (57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon umfassend die Schritte:
- Bereitstellen einer feline oder canine Probe,
 - Inkontaktbringen der Probe mit mindestens einem Antikörper, der bei der Bestimmung von feline proBNP oder Fragmenten davon an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20 bis 42 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 57 bis 80 des feline proBNP und bei der Bestimmung von canine proBNP oder Fragmenten davon an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20 bis 86 des canine proBNP bindet, und
 - Bestimmen der Anwesenheit und/oder Konzentration des in der Probe vorhandenen feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon.

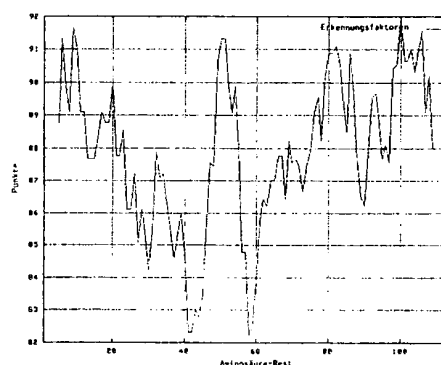


Fig. 1A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
10																					
Sequenz 1 (AA 1-20)	P	P	L	E	G	H	S	T	A	S	F	I	S	G	L	A	S	A	S	A	S
Sequenz 2 (AA 21-40)	S	L	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L
Sequenz 3 (AA 41-60)	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S
Sequenz 4 (AA 61-80)	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S

Fig. 1B

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von proBNP oder Fragmenten davon in Säugetieren.

Herzerkrankungen spielen nicht nur beim Menschen eine bedeutende Rolle, auch Tiere, im Speziellen Haustiere, wie Hunde und Katzen, sind von diesen Erkrankungen betroffen. Studien haben ergeben, dass beispielsweise jedes zehnte Hundeherz funktionsgestört ist. Die dabei auftretenden Herzerkrankungen betreffen beispielsweise die Herzklappen und den Herzmuskel. Da das Herz in der Lage ist Funktionsstörungen zunächst durch Mehrarbeit auszugleichen, bleibt eine solche Erkrankung zumeist verborgen, was zur Folge hat, dass sich durch die vermehrte Herzbelastung der Zustand des Herzens verschlechtert. Die aus Herzkrankheiten resultierenden Symptome, wie Müdigkeit, Kreislaufschwäche, Abgeschlagenheit, sind meist dann erkennbar, wenn das Herz des Haustieres die Schwäche nicht mehr kompensieren kann. In einem solchen Fall ist die Herzerkrankung bereits so weit fortgeschritten, dass eine vollständige Heilung kaum mehr möglich ist.

Chronische Herzklappen- und Herzmuskelveränderungen sind in der Regel nicht heilbar, wobei aber durch medikamentösen Einsatz das weitere Fortschreiten der Herzerkrankung verlangsamt werden kann. Aus diesem Grund ist es wichtig, eine Frühdiagnose für auftretende Herzerkrankungen zu stellen. Routinemäßig werden hierfür vor allem physikalische Methoden, wie das Abhören der Herztöne, die Aufnahme eines Elektrokardiogramms, Röntgen- und Ultraschalluntersuchungen, eingesetzt. Diese Untersuchungsmethoden weisen vor allem den Nachteil auf, dass sie erst dann durchgeführt werden können, wenn bereits sichtbare bzw. hörbare Schäden am Herzen direkt erkennbar werden. Des Weiteren benötigen physikalische Untersuchungsmethoden geeignete und in der Regel teure Vorrichtungen, um eine entsprechende Diagnose durchzuführen.

Die am häufigsten vorkommenden Herzkrankheiten beispielsweise bei Hunden sind Herzde-kompensation und dilatative Kardiomyopathie, welche vorwiegend große Tiere betrifft. Dilatative Kardiomyopathie ist eine Herzerkrankung, die zu einer Vergrößerung der Herzkammern bei normal dicker Wand führt, wobei diese Vergrößerung rasch eine Herzschwäche im betroffenen Tier zur Folge hat. Durch die Zugabe von Taurin in Futtermitteln konnte das Risiko an dilatativer Kardiomyopathie zu erkranken, signifikant reduziert werden. Bei einer der dilatativen Kardiomyopathie verwandten Krankheit, der restriktiven Kardiomyopathie, welche häufig in älteren Katzen beobachtet wird, ist eine kontinuierliche Abnahme der Herzfunktion mit einer reduzierten Pumpfähigkeit beobachtbar. Die bei Katzen am häufigsten vorkommende Herzerkrankung ist hypertrophe Kardiomyopathie. Diese Herzmuskelerkrankung führt zu einer Verdickung der Herzwand und einer daraus resultierenden reduzierten Fähigkeit, die Herzkammern mit Blut zu füllen. Das führt zu einer Anhäufung von Blut in der linken Herzkammer und zu einer stark reduzierten Menge an Blut, die durch den Körper gepumpt wird.

Bei vielen Herzerkrankungen, wie z.B. Herzinsuffizienz, dilatativer Kardiomyopathie, hypertropher Kardiomyopathie, linksventrikulärer Hypertrophie und Dysfunktion, wird ein Peptidhormon, das sogenannte BNP (brain natriuretic peptide) ausgeschüttet. Dieses Hormon bewirkt die Ausscheidung von Flüssigkeit über die Niere und reguliert somit das Herz-Kreislauf-System. Da dieses Peptid im Herzen produziert wird und bei Überlastung und Überfüllung des Herzens vermehrt produziert wird, ist die Bestimmung des BNP-Spiegels im Blut ein geeignetes Mittel zur Beurteilung von Herzschwäche.

BNP wie auch andere natriuretische Peptide spielen bei der Regulierung des Wasserhaushaltes und des Blutdrucks eine bedeutende Rolle. Wenn die Herzwand gedehnt wird, schüttet diese vermehrt BNP aus, was zu einer Ausscheidung von Natrium und Flüssigkeit über die Niere und zu einer Erweiterung der Blutgefäße führt, welche in Summe den Blutdruck und die Füllung des Herzens zu senken vermögen. BNP wird von den Herzmuskelzellen als proBNP synthetisiert, welches schließlich in n-terminales proBNP und BNP gespalten wird. Beide Teile des BNPs werden an das Blut abgegeben und können darin bestimmt werden.

Mit Herzerkrankungen bei Tieren beschäftigen sich unter anderem folgende einschlägigen Veröffentlichungen: 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.

Im Stand der Technik ist bereits eine Vielzahl an Verfahren bekannt, mit deren Hilfe humanes proBNP bzw. deren Fragmente im Serum eines Individuums detektiert werden kann. Beispielfhaft seien hierin die EP 0 648 228 B1, WO 03/87819 und FR 2 843 396 erwähnt.

In der US 2004/0018577 ist ein Immunoassay der mindestens drei Antikörper umfasst, welche alle an unterschiedlichen Epitopen eines Analyten zu binden vermögen offenbart. Die dabei zu detektierenden Analyten betreffen insbesondere die Detektion von Markern betreffend Herzerkrankungen, wobei unter anderem auch BNP und proBNP detektiert werden können.

Biondo A.W. et al. (Vet.Pathol. 2003, 40(5):501-506) beschreiben ein Verfahren zum Nachweis von ANP und BNP in Katzen mittels polyklonaler Antikörper, die gegen ein Peptid des ANP, welches die Aminosäuren 1 bis 28 umfasst, bzw. gegen ein Peptid, welches die Aminosäuren 43 bis 56 von proBNP umfasst, gerichtet sind.

In der EP 1 016 867 A1 wird ein Immunoassay für den Nachweis von preproBNP in Säugetieren beschrieben. Dabei werden Antikörper verwendet, die gegen Peptide, umfassend die Aminosäuren 27 bis 102, 73 bis 102 und 27 bis 64 von humanem BNP, gerichtet sind.

Jortani S.A. et al. (Clin.Chem.2003, 50(2):265-278) beschreiben die Verwendung von BNP und dessen prepro- und pro-Formen als mögliche Marker für Herzerkrankungen. In diesem Artikel werden keine bevorzugten Peptidregionen von BNP erwähnt, die sich eignen würden, Herzerkrankungen bei Hunden und Katzen nachzuweisen.

In der WO 2000/35951 werden mehrere Peptide geoffenbart, gegen welche Antikörper hergestellt werden können, die sich in einem Verfahren zur Diagnose von Herzerkrankungen eignen. Dabei werden drei Peptide, umfassend die Aminosäuren 1 bis 13, 37 bis 49 und 65 bis 76 des humanen Nt-pro-BNP-Proteins geoffenbart, welche auch zur Herstellung von Antikörpern, die gegen diese Peptide gerichtet sind, herangezogen werden können.

Des Weiteren gibt es am Markt mehrere Testkits zur Detektion von humanem proBNP bzw. deren Fragmente (z.B. von Roche und Biomedica). Nichtsdestotrotz gibt es kein bekanntes Verfahren, mit dessen Hilfe spezifisch proBNP in tierischen Proben bestimmt werden kann. Daher und aufgrund der kostenintensiven und aufwendigen physikalischen Untersuchungen von Tieren ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, geeignete Mittel zur Bestimmung von proBNP bzw. dessen Fragmenten zur Verfügung zu stellen.

Daher sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung von feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon umfassend die Schritte:

- Bereitstellen einer feline oder canine Probe,
- Inkontaktbringen der Probe mit mindestens einem Antikörper, der bei der Bestimmung von feline proBNP oder Fragmenten davon an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20-42 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 57-80 des feline proBNP (SEQ ID No. 1) und bei der Bestimmung von canine proBNP oder Fragmenten davon an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20 bis 86 des canine proBNP's (SEQ ID No. 2) bindet, und
- Bestimmen der Anwesenheit und/oder Konzentration des in der Probe vorhandenen feline

oder caninen proBNP's oder Fragmenten davon, vor.

Es wurde festgestellt, dass ein Antikörper, der an ein Epitop in den offenbaren Bereichen des felines bzw. caninen proBNP sich sehr gut eignet, um proBNP spezifisch zu bestimmen.

Es wird darauf hingewiesen, dass die hierin offenbaren felines und caninen proBNP-Sequenzen beispielhaft für die Familie der Felidae bzw. der Canidae herangezogen wurden, womit einzelne von diesen hierin offenbaren Sequenzen abweichende Aminosäuren in den proBNP Sequenzen von Tieren anderer Gattungen dieser Familien ebenfalls unter die hierin offenbaren Sequenzen fallen, sofern diese abweichenden Aminosäuren nicht die Epitope der hierin offenbaren Antikörper in der Weise betreffen, dass eine spezifische Bindung nicht mehr ermöglicht wird. Die Aminosäuresequenzen, die hierin offenbart sind, sind in öffentlichen Datenbanken (z.B. Swiss-Prot: canines BNP - P16859 und felines BNP - Q9GLK4) publiziert.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Proben umfassen flüssige Proben, wie beispielsweise Blut, Urin, aber auch Gewebeproben, wie beispielsweise Gewebeschnitte der Herzmuskulatur oder des Gehirns. Je nach Bedarf können die Proben entsprechend aufbereitet werden, um beispielsweise das spätere in Kontakt Bringen der Probe mit den erfindungsgemäßen Antikörpern zu erleichtern bzw. zu ermöglichen. So können aus Blutproben Fraktionen enthaltend proBNP bzw. Fragmente davon, bereitgestellt werden oder aber auch Gewebeproben können beispielsweise homogenisiert und ebenfalls von nicht-proteinhaltigen Fraktionen abgetrennt werden.

Die Bindung von mindestens einem Antikörper an ein Epitop des felines oder caninen proBNP in der Probe bedeutet, dass der Antikörper in der Lage ist, ein Epitop in einem definierten Sequenzbereich eines spezifischen Proteins zu binden, wobei der mindestens eine Antikörper nicht in der Lage ist Epitope des Proteins außerhalb des definierten Bereiches spezifisch zu binden.

Erfindungsgemäß kann ein Antikörper der ein Epitop zu binden vermag eingesetzt werden um proBNP oder Fragmente davon zu bestimmen. Dennoch kann es von Vorteil sein mehrere (z.B. zwei, drei, vier oder fünf) Antikörper, welche verschiedene Epitope des proBNP zu binden vermögen, einzusetzen.

Die Anwesenheit bzw. die Konzentration des in der Probe befindlichen felines oder caninen proBNP oder Fragments davon kann durch im Stand der Technik bekannte Methoden erfolgen. Beispielhaft sei hierbei, die Durchführung von Enzym-Immunoassays (z.B. ELISA) bei flüssigen Proben bzw. Immunhistochemischen Verfahren bei Gewebeproben erwähnt.

„Antikörper“ gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen auch Fragmente von Antikörpern, die in der Lage sind ein erfindungsgemäßes Epitop zu erkennen. So kann ein Antikörper beispielsweise lediglich aus dem F(ab)-Teil bestehen, der die antigen-bindende Seite aufweist. Diese Antikörperfragmente können des Weiteren Teil eines bispezifischen Antikörpers oder eines „Heterominibodies“ (siehe z.B. EP 1 100 830 B1) sein.

„proBNP oder deren Fragmente“ umfassen erfindungsgemäß alle proBNP Bruchstücke, die in vivo entstehen (z.B. Nt-proBNP) oder in vitro erzeugt werden (z.B. durch Versetzen einer Probe mit Protease oder chemischen Substanzen wie CNBr), und die erfindungsgemäßen Epitope aufweisen.

Die Verwendung von Antikörpern, die an diese Epitope zu binden vermögen, in einem erfindungsgemäßen Verfahren erwies sich als besonders vorteilhaft.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bindet der mindestens eine Antikörper an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25-35 und/oder im Bereich

umfassend die Aminosäuren 60-80 des felines proBNP (SEQ ID Nr. 1).

Es wurde gezeigt, dass vor allem die oben angeführten Aminosäurenbereiche des felines proBNP Epitope aufweisen, die eine spezifische Bindung von Antikörpern erlauben.

5

In einem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung können mehrere Antikörper, die mehrere unterschiedliche Epitope an felines bzw. caninen proBNP spezifisch zu binden vermögen, eingesetzt werden. Aus diesem Grund kann mindestens ein Antikörper, der an mindestens ein Epitop zu binden vermag, erfindungsgemäß eingesetzt werden. Weiters sei hierbei angemerkt, dass die hier angegebenen Aminosäurebereiche nicht nur ein Epitop, sondern je nach Größe mehrere Epitope umfassen können. Somit umfasst das erfindungsgemäße Verfahren die Verwendung einer Kombination mehrerer Antikörper, die an mindestens ein Epitop spezifisch binden können.

10

15

Erfindungsgemäß bindet bei der Bestimmung von caninen proBNP oder Fragmenten davon der mindestens eine Antikörper an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25-41 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 55-65 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 74-86 des caninen proBNP (SEQ ID Nr. 2).

20

Antikörper, die Epitope in diesen Bereichen erkennen, eignen sich besonders gut zur Bestimmung von proBNP bzw. dessen Fragmente in einer Probe caninem Ursprungs.

25

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das mindestens eine Epitop mindestens drei, mindestens vier, mindestens fünf, mindestens sechs, mindestens sieben, mindestens acht, mindestens neun, mindestens zehn Aminosäuren.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der mindestens eine Antikörper polyklonal und/oder monoklonal.

30

Die in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Antikörper können sowohl polyklonal als auch monoklonal sein. Zur Herstellung dieser Antikörper werden Peptidfragmente umfassend die hierin offenbarten Aminosäurebereiche des felines bzw. des caninen proBNP verwendet. Diese Peptidfragmente können entweder synthetisch (Merrifield R.P., 1963, J Am Chem Soc 85, 2000, 149), rekombinant oder durch chemischen oder enzymatischen Abbau proBNP rekombinanten oder nativen Ursprungs hergestellt werden. Die daraus gewonnenen Peptide werden abhängig von ihrer Größe an einen immunogenen Träger (z.B. KLH) gebunden oder direkt zur Herstellung von polyklonalen oder zur Herstellung von monoklonalen (z.B. Köhler G. and Milstein C., 1975, Nature 256:495; Galfre et al., 1977, Nature 266:550) eingesetzt. Erfindungsgemäß können die Antikörper auch rekombinant hergestellt werden. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten Antikörpern sind dem Fachmann hinreichend bekannt (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 2001).

35

40

45

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bindet an den mindestens einen Antikörper oder an das mindestens eine Epitop mindestens ein weiterer Antikörper, wodurch beispielsweise die Ausführung des erfindungsgemäßen Tests als Sandwich-Assay ermöglicht wird.

50

Die Bindung eines weiteren Antikörpers an den mindestens einen Antikörper ermöglicht es, diesen und indirekt das an den mindestens einen Antikörper gebundene Epitop qualitativ bzw. quantitativ zu bestimmen. Bindet der mindestens eine weitere Antikörper an das mindestens eine Epitop, ist es möglich, die Bindung des mindestens einen Antikörpers an das mindestens eine Epitop, wenn beispielsweise der mindestens eine Antikörper an eine Festphase immobilisiert ist, qualitativ bzw. quantitativ über ein Enzymimmunoassay zu bestimmen.

55

Vorzugsweise ist der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Anti-

körper markiert.

Der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper ist dabei mit Enzym, wie Peroxidase, insbesondere Horseradish-Peroxidase, Biotin, Fluoreszenzfarbstoff, insbesondere Fluorescein (FITC, DFTF), R-Phycoerythrin (PE), Peridiniumchlorophyll-Protein (PerCP) und Tandemkonjugate wie PE-Cy5 oder PE-Texas-Rot, Goldkolloid oder Radionuklide markiert.

Durch die Markierung eines der beiden Antikörper ist es möglich, durch eine Sekundärreaktion oder aber auch direkt die Anwesenheit bzw. Konzentration des markierten Antikörpers gebunden an das mindestens eine Epitop zu bestimmen. Die Antikörper selbst könnten wiederum durch Protein A Konjugate (z.B. Protein A Gold Konjugat) detektiert werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der mindestens eine Antikörper oder der mindestens eine weitere Antikörper an eine Festphase gebunden.

Durch die Bindung des mindestens einen Antikörpers oder des mindestens einen weiteren Antikörpers können beispielsweise Antikörperchips, beschichtete Mikrotiterplatten oder Lateral Flow Devices hergestellt werden, die in einer Vielzahl von Verfahren eingesetzt werden können.

Vorzugsweise erfolgt die Bestimmung von feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon durch ein Verfahren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Radioimmunassay, Immunbindungsassay, Westernblot, Immunhistochemie, Enzymimmunoassay, Lateral Flow Device (LFD, Teststreifen) und Kombinationen davon.

Die oben erwähnten Verfahren sind dem Fachmann hinreichend bekannt. Einen Überblick über diese Verfahren ist beispielsweise in „Bioanalytik“ (Lottspeich und Zorbas, Spektrum Verlag 1998). Lateral Flow Devices (LFD, Teststreifen) sind beispielsweise in der WO 02/059567 offenbart.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Antikörper oder Antikörpermischungen, die an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20-42 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 57-80 des feline proBNP (SEQ ID Nr. 1).

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform binden die Antikörper oder Antikörpermischungen an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25-35 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 60-80 des feline proBNP (SEQ ID Nr. 1).

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen Antikörper oder eine Antikörpermischung, die an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20-86 des canine proBNP (SEQ ID Nr. 2) binden.

Vorzugsweise bindet der Antikörper oder die Antikörpermischung an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25-41 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 55-65 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 74-86 des canine proBNP (SEQ ID Nr. 2).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform bindet der Antikörper oder die Antikörpermischung an ein Epitop, das mindestens drei, mindestens vier, mindestens fünf, mindestens sechs, mindestens sieben, mindestens acht, mindestens neun, mindestens zehn Aminosäuren umfasst. Die erfindungsgemäßen Epitope sind vorzugsweise höchstens 40, höchstens 35, höchstens 30, insbesondere höchstens 25, höchstens 20 oder höchstens 15 Aminosäuren lang.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Peptid umfassend mindestens drei Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 20-42 und/oder im Bereich der Aminosäuren 57-80

des feline proBNP (SEQ ID Nr. 1).

Gemäß einer weiteren Ausführungsform umfasst das Peptid mindestens drei Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 25-35 und/oder im Bereich der Aminosäuren 60-80 des feline proBNP (SEQ ID Nr. 1).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Peptid umfassend drei Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 20-86 des caninen proBNP (SEQ ID Nr. 2).

Vorzugsweise umfasst das Peptid mindestens drei Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 25-41 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 55-65 und/oder im Bereich der Aminosäuren 74-86 des caninen proBNP (SEQ ID Nr. 2).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das Peptid chemisch synthetisiert oder von einer Probe isoliert bzw. rekombinant hergestellt.

Um das Epitop aus einem Peptid, welches aus einer Probe isoliert bzw. rekombinant hergestellt wurde, entsprechend herzustellen, kann dieses mit an sich bekannten enzymatischen bzw. chemischen Methoden weiterverarbeitet werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäßen Antikörpers oder einer Antikörpermischung zur Bestimmung von feline oder caninem proBNP oder Fragmenten davon in dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Die erfindungsgemäßen Peptide können in kompetitiven Immunoassays in markierter Form eingesetzt werden.

Vorzugsweise werden die Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung zur Herstellung eines Antikörpers oder einer Antikörpermischung verwendet werden.

Des Weiteren werden die Peptide gemäß der vorliegenden Erfindung als Positivkontrolle bzw. als Standard für Konzentrationsbestimmungen in einem erfindungsgemäßen Verfahren angewendet.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Kit zur Bestimmung von feline oder caninem proBNP oder Fragmenten davon, umfassend mindestens einen erfindungsgemäßen Antikörper oder mindestens eine erfindungsgemäße Antikörpermischung, Mittel zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion einer Bindung des mindestens einen Antikörpers oder der mindestens einen Antikörpermischung an feline oder caninem proBNP oder Fragmenten davon und gegebenenfalls erfindungsgemäße Peptide und/oder felines oder canines proBNP oder Fragmente davon als Positiv-Kontrolle oder Standard für eine Konzentrationsbestimmung.

Erfindungsgemäß kann der Kit mindestens einen weiteren Antikörper umfassen.

Dieser zusätzliche Antikörper weist eine Avidität zum mindestens einen Antikörper oder aber auch zum mindestens einen Epitop auf.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper markiert.

Vorzugsweise umfasst die Markierung Enzyme, wie Peroxidasen, insbesondere Horseradish-Peroxidase, Biotin, Fluoreszenzfarbstoffe, insbesondere Fluoreszein (FITC, DFTF), R-Phycoerythrin (PE), Peridiniumchlorophyll-Protein (PerCP) und Tandemkonjugate wie PE-Cy5 oder PE-Texas-Rot, Goldkolloid oder Radionuklide.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäßen Kits in einem Verfahren zur Bestimmung von feline oder canine proBNP.

Mit dem Verfahren der vorliegenden Erfindung ist es möglich nicht nur proBNP und dessen Fragmente in Katzen und Hunden nachzuweisen sondern auch in anderen Säugetieren wie Pferden, Rindern, Elefanten, Mäusen (Seq ID No. 3, Swiss-Prot: P40753), Schweinen (Seq ID No. 4, Swiss-Prot: P07634), Ratten (Seq ID No. 5, Swiss-Prot: P13205), Kamelen (Seq ID No. 6, Swiss-Prot: Q6L7Z3) und Schafen (Seq ID No. 7, Swiss-Prot: O46541) und Fischen, wie Barschen (Seq ID No. 8, Swiss-Prot: Q805E8), Stören (Seq ID No. 9, Swiss-Prot: P83965) und Kugelfischen (Seq ID No. 10, Swiss-Prot: Q805D7).

Um proBNP in den oben genannten Tieren nachzuweisen, sind Antikörper, die an mindestens einem Epitop in einem Aminosäurebereich von Aminosäurerest 1 bis Aminosäurerest 80 des entsprechenden proBNPs binden, bevorzugt. Insbesondere sind Antikörper bevorzugt, die an mindestens einem Epitop umfassend die Aminosäurebereiche 1-15, 15-30, 20-30, 25-35, 30-40, 35-50, 35-55, 45-55, 50-70, 60-70, 60-80 und 70-80 binden. Die folgenden besonders bevorzugten spezifischen Epitope wurden ebenfalls mit dem der vorliegenden Erfindung zugrunde liegenden Schema aufgefunden (siehe Beispiele).

Tabelle 1

	Swiss-Prot Nr.	AS-Bereich
Maus	P40753	1-15, 20-30, 50-70
Schwein	P07634	20-30, 35-50, 60-70
Ratte	P13205	1-15, 30-40, 45-55, 60-80
Kamel	Q6L7Z3	20-30, 55-65, 70-80
Schaf	O46541	1-15, 20-30, 45-55, 60-80
Barsch	Q805E8	15-30, 35-50, 70-80
Stör	P83965	1-20, 25-35, 70-80
Kugelfisch	Q805D7	115-30, 35-55, 60-80

Die bevorzugten Längen der Epitope sind, wie oben für Hunde und Katzen angegeben, auch für die oben genannten Tiere gegeben.

Die vorliegende Erfindung ist weiters, durch die folgenden Beispiele und Figuren veranschaulicht, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

Fig.1 zeigt Epitop-Erkennungsfaktoren (Recognition factors) entsprechend dem Programm ProtScale der caninen proBNP-Aminosäuresequenz (Fig. 1A) und Aminosäuresequenzen der erfindungsgemäßen caninen proBNP-Epitope (Fig. 1B).

Fig. 2 zeigt Epitop-Erkennungsfaktoren (Recognition factors) der feline proBNP-Aminosäuresequenz berechnet mit ProtScale (Fig. 2A) und Aminosäuresequenzen der erfindungsgemäßen feline proBNP-Epitope (Fig. 2B).

Fig. 3 zeigt Standardkurven basierend auf ELISA-Untersuchungen unter Verwendung von erfindungsgemäßen Antikörpern mit caninem (Fig. 3A) und feline (Fig. 3B) proBNP. Es konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die proBNP-Bestimmung mit den erfindungsgemäßen Antikörpern über einen weiten Konzentrationsbereich linear verläuft.

Fig. 4 zeigt die Bestimmung von proBNP in 47 kranken und 28 gesunden Katzen. Die Konzentration von proBNP in den Proben ermöglicht es die Schwere der Krankheit zu bestimmen. FAT - Feline atriale Thrombose, HKMP - hypertrophe Kardiomyopathie, LVH - linksventrikuläre

Hyertrophie.

BEISPIELE:

5 Beispiel 1: Herstellung der Antikörper

Epitope können beispielsweise durch Berechnung mit ProtScale (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>) nach dem Algorithmus von Fraga S. ("Theoretical prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences.", 1982; Can. J. Chem. 60:2606-2610) bestimmt werden.

Die Peptidfragmente wurden aus denjenigen Bereichen der Aminosäuresequenz des felines oder caninen Nt-proBNP ausgewählt bei denen ein Maximum der Epitop-Erkennungsfaktoren (entsprechend den Ergebnissen des ProtScale-Programms) erhalten wurden, da diese Epitope sich als besonders immunogen herausgestellt haben und leicht zugänglich für Antikörper sind. Die ausgewählten Peptide wurden des felines oder caninen proBNP wurden chemisch synthetisiert und an ein geeignetes Träger-Protein (z.B. KLH) konjugiert.

Je ein an KLH konjugiertes Peptid/Epitop wurde drei Schafen injiziert. Jedes Schaf erhielt für die erste Immunisierung 0.5 mg des entsprechenden Antigens vermischt mit Freud'schem Adjuvans (Guildhay, UK) und BCG (Bacillus Calmette Guérin) und 0.25 mg der Immunogene für das weitere Steigern der Immunantwort.

Erfindungsgemäß hat sich gezeigt, dass der Einsatz von polyklonalen Antikörpern sehr gute und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Dennoch ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern in einem Verfahren wie in der vorliegenden Erfindung beschrieben ebenfalls möglich. Monoklonale Antikörper gegen Peptide/Epitope des felines oder caninen proBNP können durch dem Fachmann bekannte Standardmethoden hergestellt werden (siehe hierzu beispielsweise Köhler G und Milstein C, Nature, 1975, 256:495-497).

30 Beispiel 2: Bestimmung der Antikörperreaktivität mittels ELISA

Die Reaktivität von Antikörpern bzw. Seren gegen Peptide/Epitope des proBNP's, welche aus dem Blut der Schafe gewonnen werden, wurde mit Hilfe eines ELISA-Tests untersucht. Zunächst wurden die Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C mit Streptavidin (0.5 µg/ml, 200 µl pro Well) beschichtet, gewaschen, mit 1% BSA in 0,1 M PBS pH 7,5 enthaltend 0.25 % Tween 20 blockiert, nochmals gewaschen und für 3 h bei 4°C mit synthetischen proBNP Peptidsequenzen konjugiert an Biotin (0.25 µg/ml, 200 µl pro Well) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Serum-Proben mit 0,1 M Phosphatpuffer enthaltend 3% BSA 1:1000/1:10000/1:100000 verdünnt und auf die Mikrotiterplatte aufgebracht. Die Bindung der Antikörper an den Peptiden/Epitopen auf der Platte wurde durch die Zugabe von Anti-Schaf-IgG Antikörpern, welche mit Horseradish-Peroxidase konjugiert sind, und von einer Substratlösung umfassend TMB (Tetramethylbenzidin) festgestellt. Die Reaktion der Horseradish-Peroxidase mit TMB wurde durch die Zugabe von 0,9% Schwefelsäure gestoppt. Die Farbentwicklung wurde mit einem Photometer, welches in der Lage ist Mikrotiterplatten zu analysieren, überwacht.

Beispiel 3: Nt-proBNP Messung in Proben gesunder und kranker Tiere

In die Wells einer Mikrotiterplatte beschichtet mit einem der erfindungsgemäßen Antikörper wurden 20 µl felines oder canines Serum pipettiert und mit 200 µl eines zweiten weiteren, Peroxidase markierten erfindungsgemäßen Antikörper in 0.1M Phosphatpuffer pH 7 bei Raumtemperatur für 4-16h inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit 5 x 300 µl 0.1M Phosphatpuffer pH 7 mit 0.1% Triton X100 gewaschen und 200 µl Tetramethylbenzidin als Substrat zugesetzt. Nach 20-30 Minuten Farbentwicklung wird die Reaktion durch Zusatz von 50 µl 0.9%

Schwefelsäure gestoppt und die Farbintensität, welche direkt proportional zur Menge an Nt-proBNP ist, mit einem Mikrotierplatten-Photometer gemessen. Die genaue Konzentration wird durch Vergleich mit einer Eichkurve aus rekombinantem feline oder canine Nt-proBNP bestimmt.

Beispielhaft wurde die Konzentration von Nt-proBNP in 8 gesunden und in 15 herzkranken Hunden mit Hilfe von Antikörpern gegen Epitope im Bereich der Aminosäuren 25-41 und 74-86 des caninen Nt-proBNPs bestimmt (Tabelle 2):

Tabelle 2

Gesundheitszustand	Nr.	canines Nt-proBNP
gesund		<i>pmol/l</i>
	1	862
	2	1060
	3	753
	4	531
	5	980
	6	674
	7	695
	8	1010
herzkrank		
	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

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit den Antikörpern der vorliegenden Erfindung die Konzentration von Nt-proBNP im Serum von Tieren effizient bestimmt werden kann und mit deren Ergebnisse eine Diagnose über den Gesundheitszustand erstellt werden kann bzw. der Verlauf einer Therapie überwacht werden kann.

Fig. 4 zeigt des Weiteren die Bestimmung von Nt-proBNP in 47 kranken und 28 gesunden Katzen. Dabei wurde festgestellt, dass die Konzentration von detektiertem Nt-proBNP in direkten Zusammenhang mit der Schwere der Herzerkrankung steht. Bei diesen Versuchen wurden

Antikörper die Epitope im Bereich umfassend die Aminosäuren 35 bis 45 und 68 bis 80 binden eingesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen zahlreiche Veröffentlichungen, in denen ein ähnlicher Zusammenhang postuliert wurde.

5 Beispiel 4: Kreuzreaktivität

Rekombinantes felines, canines und humanes Nt-proBNP wurden auf Mikrotiterplatten beschichtet (250ng/ml, 200µl/well, über Nacht Raumtemperatur). Die Platten wurden anschließend gewaschen, und mit einer Verdünnung der anti-humanen, anti-felinen und anti-caninen Antisera (10-100µg/ml, in 0.1M Phosphatbuffer pH 7) in Kontakt gebracht. Die Menge gebundener Antikörper wurde nach einem Waschschriff mit einem geeigneten sekundären Antikörper (Peroxidase markierter Anti-Schaf Antikörper), gemessen. Dabei zeigte sich, dass die jeweiligen Antikörper sehr gut mit den entsprechenden Nt-proBNP Molekülen reagierten (also anti-feliner Antiserum mit feline Nt-proBNP) aber überraschenderweise nicht oder in sehr geringem Ausmass mit den Nt-proBNP Molekülen der jeweiligen anderen Spezies.

Es konnte gezeigt werden, dass die Antikörper, die gegen Epitope des felinen Nt-proBNP erzeugt wurden, eine hohe Spezifität aufweisen und nur in einem sehr geringen Ausmaß an die entsprechende humane Sequenz binden kann. Da bei der Messung der Antikörper-Spezifität Nt-proBNP als gesamtes Polypeptid als Bindungspartner eingesetzt wurde und nicht die Peptide, die für die Herstellung der Antikörper verwendet wurden, konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die Antikörper gegen feline Epitope des Nt-proBNP keine Kreuzreaktion über den gesamten Sequenzbereich des humanen Nt-proBNP aufweisen. Eine Ausnahme bildet lediglich der Antikörper der im Bereich der Aminosäuren 1 bis 20 des felinen Nt-proBNP bindet. Dieser Antikörper zeigt bei der Bindung an feline Nt-proBNP nur eine doppelt so hohe relative Reaktivität als bei der Bindung an humanen Nt-proBNP.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen humane Epitope des Nt-proBNP ebenfalls eine geringe Reaktivität gegenüber feline Nt-proBNP aufweisen. Somit konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass Antikörper, die gegen Epitope des humanen Nt-proBNP gerichtet sind nicht an feline Nt-proBNP binden können und somit nicht zur Bestimmung von Nt-proBNP in Katzen herangezogen werden können (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3

Antiserum Nr.	Antikörper-Spezifität	Relative Reaktivität	Rel. Reaktivität gegenüber den entsprechenden humanen Sequenzen
S2189	AA 1-20 felin	2.3	1.2
S2190	AA 45-55 felin	3.7	0.01
S2191	AA 25-35 felin	1.0	0.2
S2192	AA 60-80 felin	4.2	0.3
S2072	AA 8-29 human	0.4	-----
S2104	AA 32-57 human	0.25	-----
S2102	AA 60-80 human	1.7	-----

Die Kreuzreaktivität wurde ebenfalls mit Antikörpern gegen Epitope des caninen Nt-proBNP und mit Antikörpern gegen Epitope des humanen Nt-proBNP getestet. Auch bei caninen Sequenzen konnte ein vergleichbares Ergebnis wie bei den Untersuchungen mit felinen Sequenzen erzielt werden (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4

Antiserum Nr.	Antikörper-Spezifität	Relative Reaktivität	Rel. Reaktivität gegenüber den entsprechenden humanen Sequenzen
S2195	AA 1-22 canin	2.2	1.1
S2196	AA 25-41 canin	6.3	0.2
S2197	AA 55-65 canin	1.0	0.03
S2198	AA 74-86 canin	1.9	0.6
S2072	AA 8-29 human	0.1	-----
S2104	AA 32-57 human	0.3	-----
S2102	AA 60-80 human	1.5	-----

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bestimmung von felinelem oder caninelem proBNP oder Fragmenten davon umfassend die Schritte:
 - Bereitstellen einer felineen oder caninen Probe,
 - Inkontaktbringen der Probe mit mindestens einem Antikörper, der bei der Bestimmung von felinelem proBNP oder Fragmenten davon an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20 bis 42 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 57 bis 80 des felineen proBNP und bei der Bestimmung von caninelem proBNP oder Fragmenten davon an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20 bis 86 des caninen proBNP bindet, und
 - Bestimmen der Anwesenheit und/oder Konzentration des in der Probe vorhandenen felineen oder caninen proBNP oder Fragmenten davon.
2. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass bei der Bestimmung von felinelem proBNP oder Fragmenten davon der mindestens eine Antikörper an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25 bis 35 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 60 bis 80 des felineen proBNP bindet.
3. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass bei der Bestimmung von caninelem proBNP oder Fragmenten davon der mindestens eine Antikörper an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25 bis 41 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 55 bis 65 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 74 bis 86 des caninen proBNP bindet.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet*, dass das mindestens eine Epitop mindestens 3 Aminosäuren umfasst.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, *dadurch gekennzeichnet*, dass der mindestens eine Antikörper polyklonal und/oder monoklonal ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, *dadurch gekennzeichnet*, dass an den mindestens einen Antikörper oder an das mindestens eine Epitop mindestens ein weiterer Antikörper bindet.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, *dadurch gekennzeichnet*, dass der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper markiert ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, *dadurch gekennzeichnet*, dass der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper mit Peroxidase, insbesondere horseradish

dish-Peroxidase, Biotin, Fluoreszenzfarbstoff, Goldkolloid oder Radionuklide markiert ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, *dadurch gekennzeichnet*, dass der mindestens eine Antikörper oder der mindestens eine weitere Antikörper an eine Festphase gebunden ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Bestimmung von felinelem oder caninem proBNP oder Fragmenten davon durch ein Verfahren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Radioimmunassay, Immunbindungsassay, Westernblot, Immunhistochemie, Enzymimmunoassay, Lateral Flow Device (LFD, Teststreifen) und Kombinationen davon, erfolgt.
11. Antikörper oder Antikörpermischung, *dadurch gekennzeichnet*, dass dieser/diese an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20 bis 42 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 57 bis 80 des felinelem proBNP's bindet.
12. Antikörper oder Antikörpermischung nach Anspruch 11, *dadurch gekennzeichnet*, dass dieser/diese an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25 bis 35 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 60 bis 80 des felinelem proBNP bindet.
13. Antikörper oder Antikörpermischung, *dadurch gekennzeichnet*, dass dieser/diese an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 20 bis 86 des caninen proBNP bindet.
14. Antikörper oder Antikörpermischung nach Anspruch 13, *dadurch gekennzeichnet*, dass dieser/diese an mindestens ein Epitop im Bereich umfassend die Aminosäuren 25 bis 41 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 55 bis 65 und/oder im Bereich umfassend die Aminosäuren 74 bis 86 des caninen proBNP bindet.
15. Antikörper oder Antikörpermischung nach einem der Ansprüche 11 bis 14, *dadurch gekennzeichnet*, dass das mindestens eine Epitop mindestens 3 Aminosäuren umfasst.
16. Peptid, *dadurch gekennzeichnet*, dass dieses mindestens 3 Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 20 bis 42 und/oder im Bereich der Aminosäuren 57 bis 80 des felinelem proBNP umfasst.
17. Peptid nach Anspruch 16, *dadurch gekennzeichnet*, dass dieses mindestens 3 Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 25 bis 35 und/oder im Bereich der Aminosäuren 60 bis 80 des felinelem proBNP umfasst.
18. Peptid, *dadurch gekennzeichnet*, dass dieses mindestens 3 Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 20 bis 86 des caninen proBNP umfasst.
19. Peptid nach Anspruch 18, *dadurch gekennzeichnet*, dass dieses mindestens 3 Aminosäuren im Bereich der Aminosäuren 25 bis 41 und/oder im Bereich der Aminosäuren 55 bis 65 und/oder im Bereich der Aminosäuren 74 bis 86 des caninen proBNP umfasst.
20. Peptid nach einem der Ansprüche 16 bis 19, *dadurch gekennzeichnet*, dass das Peptid ein chemisch synthetisiertes, von einer Probe isoliertes oder rekombinant hergestelltes Peptid ist.
21. Verwendung eines Antikörpers oder einer Antikörpermischung nach einem der Ansprüche 11 bis 15 zur Bestimmung von felinelem oder caninem proBNP oder Fragmenten davon in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

22. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 16 bis 20 zur Herstellung eines Antikörpers oder einer Antikörpermischung nach einem der Ansprüche 11 bis 15.
23. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 16 bis 20 als Positiv-Kontrolle oder als Standard für eine Konzentrationsbestimmung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
24. Kit zur Bestimmung von feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon umfassend mindestens einen Antikörper oder mindestens eine Antikörpermischung nach einem der Ansprüche 11 bis 15, Mittel zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion einer Bindung des mindestens einen Antikörpers oder der mindestens einen Antikörpermischung an feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon und gegebenenfalls Peptide nach einem der Ansprüche 16 bis 20 und/oder feline oder canine proBNP oder Fragmente davon als Positiv-Kontrolle oder Standard für eine Konzentrationsbestimmung.
25. Kit nach Anspruch 24, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Mittel zur qualitativen und/oder quantitativen Detektion einer Bindung des mindestens einen Antikörpers oder der mindestens einen Antikörpermischung an feline oder canine proBNP oder Fragmenten davon mindestens einen weiteren Antikörper umfassen.
26. Kit nach Anspruch 24 oder 25, *dadurch gekennzeichnet*, dass der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper markiert ist.
27. Kit nach einem der Ansprüche 24 bis 26, *dadurch gekennzeichnet*, dass der mindestens eine Antikörper und/oder der mindestens eine weitere Antikörper Peroxidase, insbesondere horseradish-Peroxidase, Biotin, Fluoreszenzfarbstoff, Goldkolloid oder Radionuklide markiert ist.
28. Verwendung eines Kits nach einem der Ansprüche 24 bis 27 in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

Hiezu 4 Blatt Zeichnungen

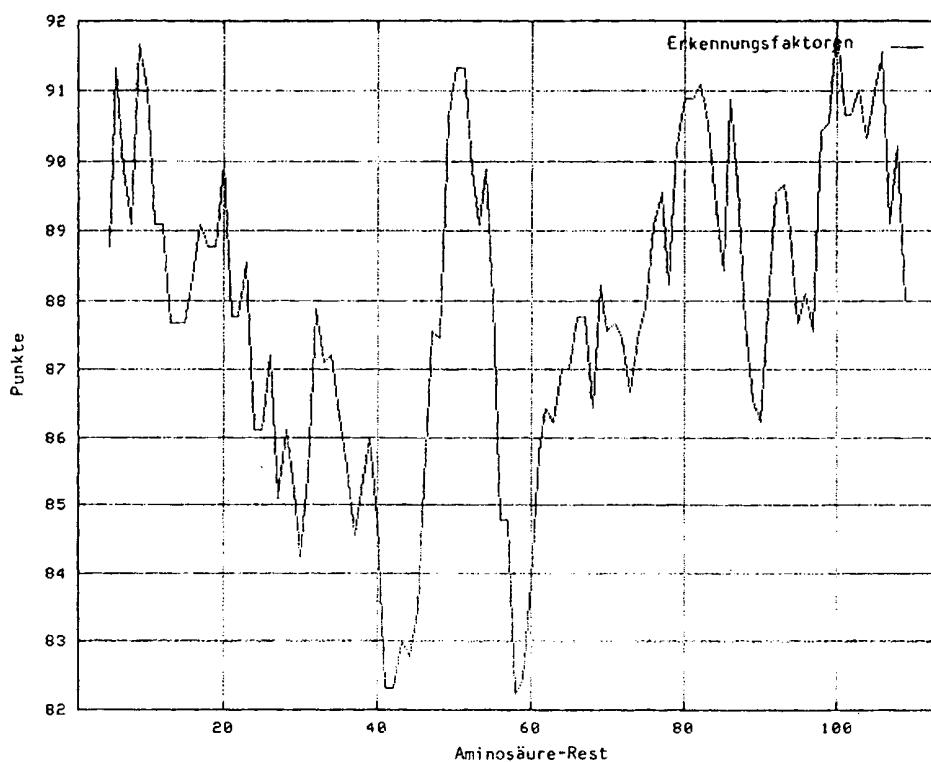


Fig. 1A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
ID																						
Epitope 1 AA 1-22	H	P	L	G	G	R	S	P	A	S	E	A	E	A	S	G	L	W	A	V	Q	E
Epitope 2 AA 25-41	Q	E	L	L	G	R	L	K	D	A	V	S	E	L	Q	A	E					
Epitope 3 AA 32-48	K	D	A	V	S	E	L	Q	A	E	Q	L	A	L	E	P	L					
Epitope 4 AA 45-55	L	E	P	L	H	R	S	H	S	P	A	E										
Epitope 5 AA 74-86	V	L	Q	A	L	R	R	L	R	S	P	K	M									

Fig. 1B

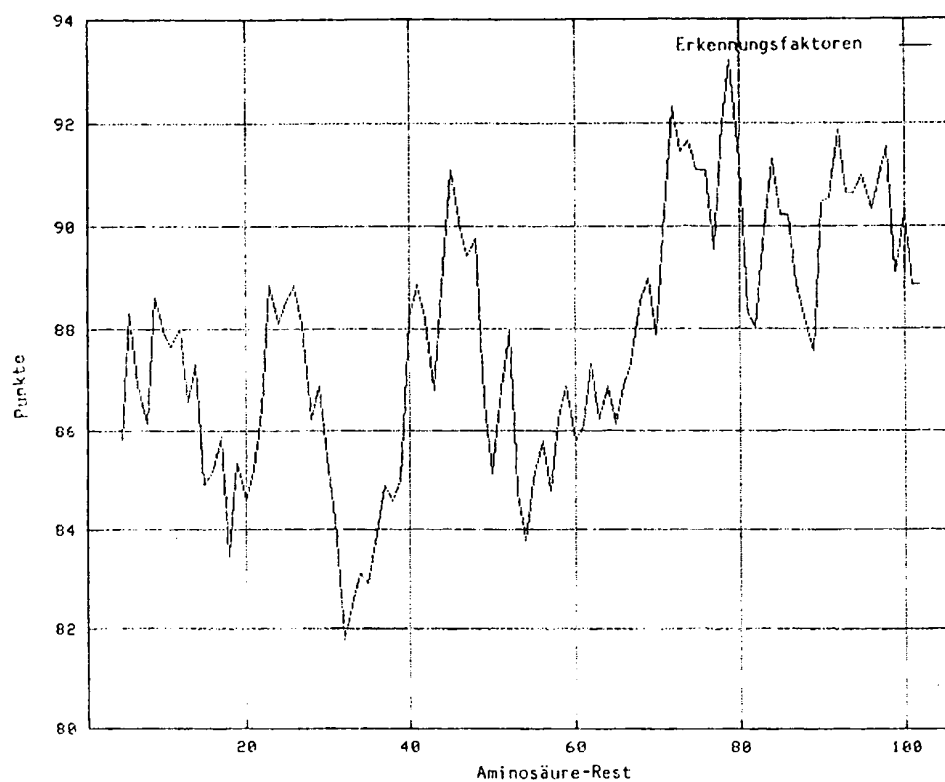


Fig. 2A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Epitope 1, AA 1-22	H	P	L	G	G	P	G	P	A	S	E	A	S	A	I	Q	E	L	L	D		
Epitope 2, AA 25-41	M	A	L	G	P	L	Q	Q	G	H	S											
Epitope 3, AA 32-48	H	S	F	A	E	S	W	E	A	C	E	E	P	P	A	R						
Epitope 4 AA 45-55	V	L	A	F	H	D	N	V	L	R	A	L	R	R	L	G	S	S	K	M		

Fig. 2B



Int. Cl.⁸: **G01N 33/53** (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

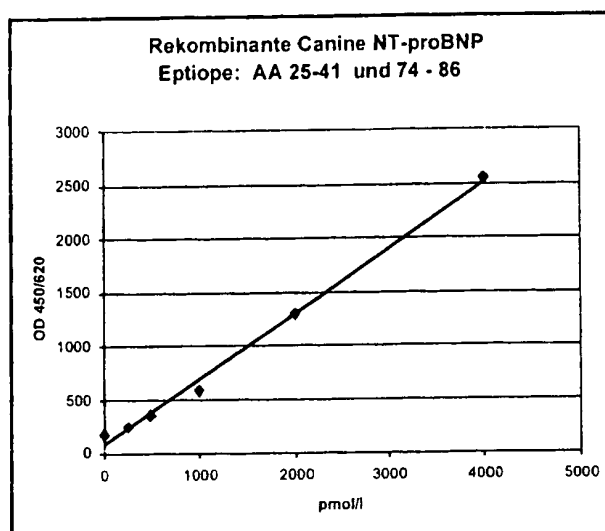


Fig. 3A

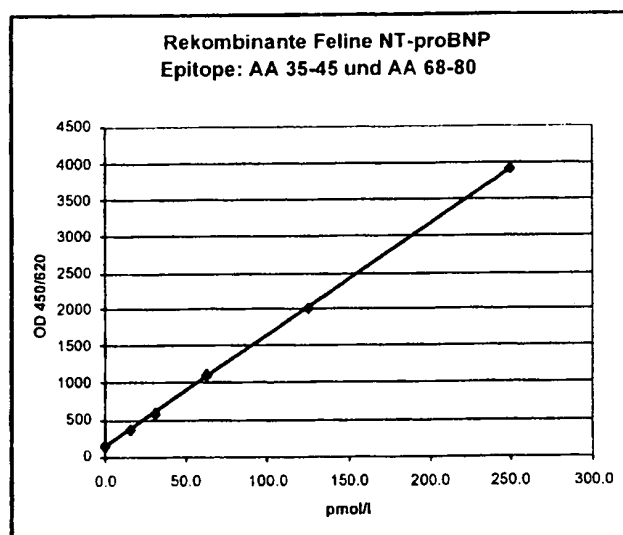


Fig. 3B

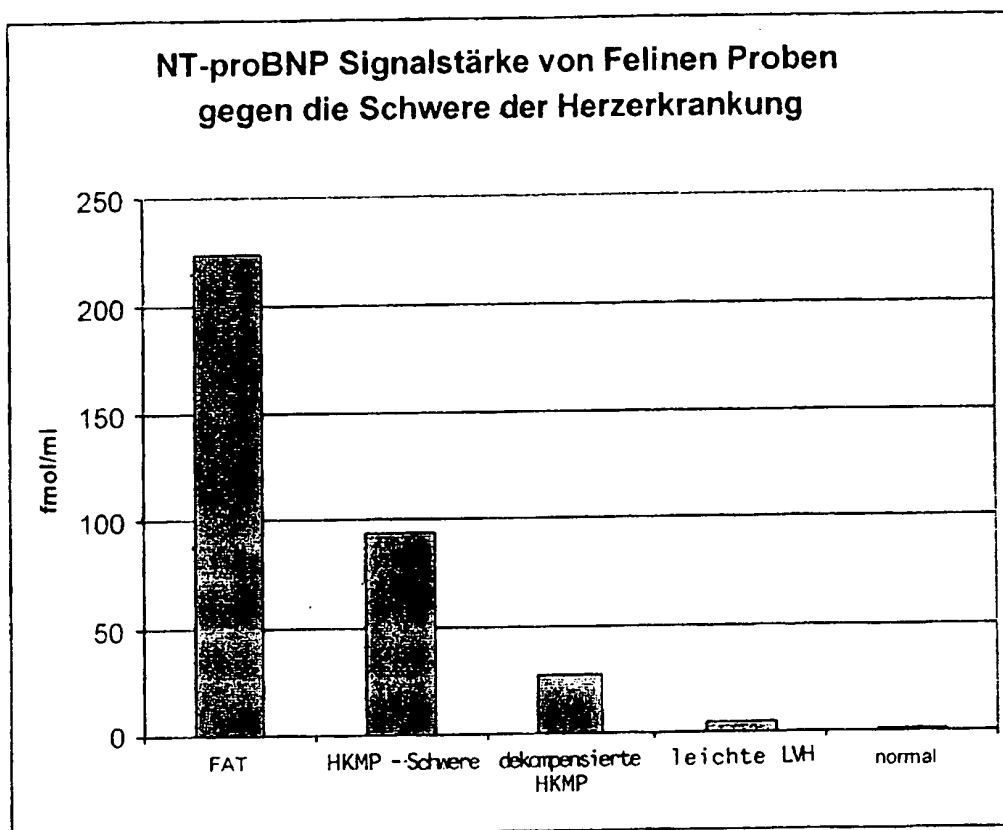


Fig. 4