

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6923449号
(P6923449)

(45) 発行日 令和3年8月18日(2021.8.18)

(24) 登録日 令和3年8月2日(2021.8.2)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	S
GO 1 N 33/532	(2006.01)	GO 1 N 33/532	A
GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N 33/574	A
CO 7 K 16/44	(2006.01)	CO 7 K 16/44	

請求項の数 19 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2017-556244 (P2017-556244)	(73) 特許権者	300004500
(86) (22) 出願日	平成28年5月2日 (2016.5.2)		アイデックス ラボラトリーズ インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2018-515761 (P2018-515761A)		IDEXX Laboratories, Inc.
(43) 公表日	平成30年6月14日 (2018.6.14)		アメリカ合衆国 メイン州 ウェストブルック アイデックス ドライブ ワン
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/030478		One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092, United States of America
(87) 国際公開番号	W02016/176691	(74) 代理人	230104019
(87) 国際公開日	平成28年11月3日 (2016.11.3)		弁護士 大野 聖二
審査請求日	平成31年4月5日 (2019.4.5)	(74) 代理人	100119183
(31) 優先権主張番号	62/155, 158		弁理士 松任谷 優子
(32) 優先日	平成27年4月30日 (2015.4.30)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎疾患の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動物が、腎疾患に罹患しているかどうかの決定を補助するための方法であって、動物からの血液サンプル中の - アミノイソ酪酸 (BAIB) を測定すること、およびサンプル中の BAIB の濃度を、健康な動物からのサンプル中の BAIB における濃度に関する参照濃度と比較すること、を含む、前記測定がサンプルと抗 BAIB 抗体とを接触させ、サンプル中の抗体と BAIB との結合または結合の量を決定することを含む、方法。

【請求項 2】

動物対象における腎疾患の診断を補助する方法であって、対象の血液サンプル中の BAIB の濃度を測定すること、BAIB のレベルを、健康な対象における BAIB の参照濃度と比較すること、およびサンプル中の BAIB の値が参照濃度を超えるか否かを判定することを含む、前記測定がサンプルと抗 BAIB 抗体とを接触させ、サンプル中の抗体と BAIB との結合または結合の量を決定することを含む、方法。

【請求項 3】

腎疾患が、器質的損傷の結果である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

10

20

器質的損傷が、炎症、線維症、または傷害の結果である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

腎疾患が、糸球体腎炎である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

損傷が、腎結石の結果である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

腎結石が、シュウ酸塩の結晶である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

参照濃度が、健康な動物における B A I B の濃度の 9 5 パーセント値を反映している、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 9】

動物が、ネコ類であり、血清または血漿の参照濃度が、 $2.0 \mu\text{g} / \text{dL}$ の B A I B である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

動物が、イヌ類であり、血清または血漿の参照濃度が、 $1.2 \mu\text{g} / \text{dL}$ の B A I B である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

動物対象が、腎疾患に罹患しているかどうかの決定を補助するための方法であって、対象の血液サンプル中の B A I B の濃度および対称性ジメチルアルギニン (S D M A) を測定することであって、前記測定がサンプルと抗 B A I B 抗体とを接触させ、サンプル中の抗体と B A I B との結合または結合の量を決定することを含み、ならびに

20

S D M A の濃度 [S D M A] に対する B A I B の濃度 [B A I B] の比が 0.15 より高いか否か、または [B A I B] に対する [S D M A] の比が 7 未満であるか否かを判定すること、

を含む方法。

【請求項 12】

動物対象における腎障害の診断を補助する方法であって、

対象の血液サンプル中の B A I B および S D M A の濃度を測定することであって、前記測定がサンプルと抗 B A I B 抗体とを接触させ、サンプル中の抗体と B A I B との結合または結合の量を決定することを含み、ならびに

30

B A I B および S D M A のレベルを、健康な対象における B A I B および S D M A の参照濃度と比較すること、

腎機能の喪失の診断を補助する工程において、サンプル中の S D M A の濃度が S D M A 参照濃度を超えるか否かを判定すること、ならびに

腎機能の喪失が器質的損傷の結果との診断を補助する工程において、サンプル中の B A I B の濃度が B A I B 参照濃度を超えるか否かを判定すること、

を含む方法。

【請求項 13】

B A I B の参照濃度および S D M A の参照濃度のうちの少なくとも 1 つが、健康な動物からのサンプル中の B A I B および S D M A の濃度の 9 5 パーセント値を反映している、請求項 12 に記載の方法。

40

【請求項 14】

動物が、ネコ類であり、血清または血漿の参照濃度が、 $2.0 \mu\text{g} / \text{dL}$ の B A I B である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

動物が、イヌ類であり、血清または血漿の参照濃度が、 $1.2 \mu\text{g} / \text{dL}$ の B A I B である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

血清または血漿の S D M A に対する参照濃度が、 $1.4 \mu\text{g} / \text{dL}$ である、請求項 12 に記載の方法。

50

【請求項 17】

腎疾患に関連する死亡率の決定を補助するための方法であって、

(a) 患者からの血液サンプル中の B A I B を測定することであって、前記測定がサンプルと抗 B A I B 抗体とを接触させ、サンプル中の抗体と B A I B との結合または結合の量を決定することを含み、および

(b) 腎疾患に関連する死亡率の決定を補助する工程において、サンプルが閾値よりも高い血中 B A I B 濃度を有するか否かを判定すること、
を含む方法。

【請求項 18】

S D M A を測定すること、および、患者のサンプルが閾値よりも高い血中 S D M A 濃度を有するか否かを判定すること、をさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 19】

血液サンプルが、血清または血漿である、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2015年4月30日に出願した米国仮特許出願第62/155,158号の利益を主張するものであり、その全体が参照によって本明細書に組み込まれている。

20

【0002】

本開示は、一般に、腎機能の決定に関する。より詳細には、本開示は、腎疾患の進行を診断、予測および決定するための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

腎機能を迅速かつ正確に測定できることは重要である。例えば、薬の投薬は、腎不全患者に適したものでなければならぬ。したがって、腎機能を正確に評価することは、臨床医学において必要なことである。しかし、腎不全の診断は、確実なマーカー、および/または利用可能な診断試験の不足によって妨げられる。臨床診療においては、腎機能を評価するために、通常、血清クレアチニンが使用される。しかし、血清クレアチニンの使用は、データが比較的大きく変動しうるため、不正確さを欠点として持つ。加えて、クレアチニンが増加するまでに、最大で腎機能の75%が失われうることは公知である。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

したがって、本発明者らは、当分野における、正確さが増した腎機能評価方法の必要性を認識している。

【課題を解決するための手段】

【0005】

一態様において、本開示は、動物が、腎疾患に罹患しているかどうかを決定する方法であって、動物からの尿サンプルまたは血液サンプル中の - アミノイソ酪酸 (B A I B) を測定すること、および、サンプル中の B A I B の濃度に基づいて腎疾患を決定することを含む方法に関する。該方法は、サンプル中の B A I B の濃度を、健康な動物からのサンプル中の B A I B の濃度に関する参照濃度と比較することをさらに含む。

40

【0006】

別の態様において、本開示は、動物対象における腎疾患を診断する方法であって、対象から尿または血液サンプルを得ること、サンプル中の B A I B の濃度を測定すること、B A I B のレベルを、健康な対象における B A I B の参照濃度と比較すること、ならびに、サンプル中の B A I B の値が参照濃度を超える腎障害を診断することを含む方法に関する。

50

【0007】

本開示の種々の態様において、参照濃度は、健康な動物におけるBAIBの濃度の95パーセントイル値を反映することができる。また、腎疾患は、器質的損傷(structural damage)の結果でありうる。例えば、器質的損傷は、炎症、線維症、傷害、腎結石(例えば、シュウ酸塩石)またはがんによる浸潤の結果でありうる。腎疾患は、糸球体腎炎である。

【0008】

さらなる態様において、本開示は、動物対象が、腎疾患に罹患しているかどうかを決定するための方法に関する。該方法は、対象から血液または尿サンプルを得ること、サンプル中のBAIBの濃度および対称性ジメチルアルギニン(SDMA)を測定すること、ならびに、SDMAの濃度[SDMA]に対するBAIBの濃度[BAIB]の比が0.15より高い場合、または[BAIB]に対する[SDMA]の比が7未満である場合、腎疾患を決定することを含む。

10

【0009】

さらに、本開示は、動物対象における腎障害を診断する方法に関する。該方法は、対象から血液または尿サンプルを得ること、サンプル中のBAIBおよびSDMAの1つまたは複数の濃度を測定すること、ならびに、BAIBおよびSDMAのレベルを、健康な対象におけるBAIBおよびSDMAの参照濃度と比較することを含む。サンプル中のSDMAの濃度がSDMA参照濃度を超える場合、腎疾患が診断される。また、サンプル中のBAIBの濃度がBAIB参照濃度を超える場合、腎機能の喪失は、器質的損傷の結果であると診断される。

20

【0010】

さらに、本開示は、腎疾患に関連する死亡率を決定するための方法に関する。該方法は、患者からの血液サンプル中のBAIBを測定すること、および、患者が閾値よりも高い血中BAIB濃度を有する場合、患者が腎疾患に関連する死の高い可能性を有すると決定することを含む。該方法はまた、SDMAを測定すること、および、患者が閾値よりも高い血中SDMA濃度を有する場合、患者が腎疾患に関連する死の高い可能性を有すると決定することも含む。

【0011】

さらにまた、本開示は、BAIBおよび検出可能な標識を含むSDMAコンジュゲート、BAIBと、グルタルアルデヒドおよびポリリジンの1つを含むコンジュゲート、ならびに、BAIBおよびキャリアタンパク質を含むコンジュゲートに関する。

30

【0012】

別の態様において、本開示は、BAIBに特異的な抗BAIB抗体に関する。該抗体は、サンプル中のBAIBの存在または量を決定する方法に関する本開示の様々な態様において、使用されうる。例えば、該方法は、抗BAIB抗体をサンプルと接触させること、および、サンプル中の抗体とBAIBとの結合または結合の量を決定することを含む。該方法はまた、サンプルおよび抗体を、BAIBおよび検出可能な標識を含むコンジュゲートと接触させることも含む。いくつかの実施形態において、抗体は、標識を含む。

【0013】

別の態様において、本開示は、抗BAIB抗体を含むキットに関する。該キットは、抗SDMA抗体をさらに含む。

40

【発明を実施するための形態】

【0014】

その種々の態様において、本開示は、腎疾患および腎疾患に関連する死亡率の決定、診断、進行、および予後に関する。本開示は、動物において、腎機能、および腎障害の存在、可能性または進行を決定するための方法を含む。

【0015】

種々の態様において、本開示は、腎疾患の存在、可能性または進行、および、腎疾患に関連する死亡率を決定する、
- アミノイソブチレートとしても知られる - アミノイソ

50

酪酸 (BAIB) の使用に関する。BAIBは、ネフロン¹の減少をもたらす腎臓の器質的損傷のマーカーであり、したがって、腎がん(kidney cancer)、腎癌(renal carcinoma)、転移性腎癌、腎臓の新生物浸潤、腎臓の炎症、低形質細胞性間質性腎炎(interstitial hy poplasmocytic nephritis)、糸球体炎症および腎線維症のマーカーである。

【0016】

加えて、動物、特に、ネコおよびイヌからの血液サンプル中の対称性ジメチルアルギニン (SDMA) およびクレアチニンは、予後の精度を改善するために、BAIBと併せて使用される。したがって、本開示は、動物対象からの血液サンプル中のBAIBの濃度を測定するための；動物対象からの血液サンプル中のSDMAおよび/またはクレアチニンの濃度を測定するための；ならびに、BAIBの濃度のみに基づいて、またはSDMAおよび/もしくはクレアチニンと組み合わせて、腎疾患の存在、可能性または進行を決定するための、方法を含む。

10

【0017】

SDMAは、内因性一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害物質である非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) の構造異性体である。ADMAもSDMAも、L-アルギニン残基の核内メチル化から生じ、タンパク質分解後、細胞質中に放出される。SDMAは、タンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ5 (PRMT5) およびPRMT7によって産生される。メチルアルギニン、例えば、SDMA、ADMA、およびモノメチルアルギニンを有するタンパク質は、RNAプロセッシング、タンパク質シャトリング、およびシグナル伝達に關与する (BedfordおよびRichard、Mol. Cell、2005年、18(3) : 263~72)。そのようなメチル化タンパク質の分解から生じた遊離型SDMAは、主に、腎排泄によって排出されるのに対して、ADMAは、大部分は代謝される。ADMAは、冠動脈疾患 (CAD) のリスク因子、例えば、高血圧、高コレステロール血症、高ホモシステイン血症、インスリン抵抗性、年齢、および平均動脈圧と強く相関する。SDMAは、腎機能のパラメーター、例えば、糸球体濾過量 (GFR)、イヌリンクリアランス、およびクレアチンクリアランスと相関する。

20

【0018】

BAIBは、(例えば、SDMAによって示されるような) 腎機能が、正常な参照範囲内である場合でも、腎臓の損傷または病変のマーカーでありうる。

【0019】

本開示のさらなる態様を記載する前に、多くの用語を以下に定義する。

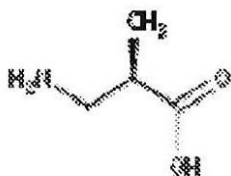
30

【0020】

BAIBは、 β -アミノイソ酪酸 (β -アミノイソブチレート) である。BAIBの構造は、

【0021】

【化1】



40

である。

【0022】

BSAは、ウシ血清アルブミンである。

【0023】

50

腎疾患は、器質的損傷を伴ってまたは伴わずに、ネフロン機能（濾過効率）の喪失を含む。器質的損傷は、病変、炎症、線維症、傷害、浸潤および他の原因によって起こりうる。がんは器質的損傷の原因でありうるが、がん自身は、一般に、腎疾患として識別されない。したがって、いくつかの実施形態において、腎疾患に、腎がんは含まれない。

【0024】

腎結石は、腎臓または泌尿器の解剖学的構造の任意の部分における石を指し、腎石（nephrolith）、尿細管または尿管内の腎石、および膀胱の石を含む。腎結石は、しばしば器質的損傷および腎疾患につながる。

【0025】

C M I A は、化学発光磁気免疫アッセイである。

10

【0026】

D I P E A は、N, N - ジイソプロピルエチルアミンである。

【0027】

D M F は、ジメチルホルムアミドである。

【0028】

E I A は、酵素免疫アッセイである。

【0029】

E L I S A は、酵素結合免疫吸着アッセイである。

【0030】

E S I - M S は、エレクトロスプレーイオン化質量分析である。

20

【0031】

F P I A は、蛍光偏光免疫アッセイである。

【0032】

G F R は、糸球体濾過量である。

【0033】

H A T U は、(1H - 7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウランヘキサフルオロホスフェートメタナミニウム(methanamininium)である。

【0034】

K L H は、キーホールリンペットヘモシアニンである。

30

【0035】

M E I A は、微粒子酵素免疫アッセイである。

【0036】

P B S は、リン酸緩衝生理食塩水である。

【0037】

R I A は、放射免疫アッセイである。

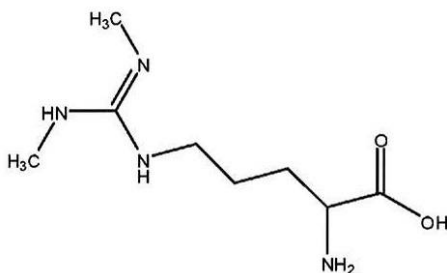
【0038】

S D M A は、対称性ジメチルアルギニンである。S D M A の構造は、

【0039】

【化2】

40



である。

【0040】

遊離型SDMAは、ポリペプチド鎖の一部ではないSDMAを指す。SDMAの1つまたは複数のアミノ酸残基が、ポリペプチドに存在しうる。

【0041】

TFAは、トリフルオロ酢酸である。

【0042】

用語「類似体」は、本明細書で使用する場合、概して、1つまたは複数の個々の原子が異なる原子（複数可）または異なる官能基（複数可）で置きかえられた化合物を指す。例えば、類似体は、受容体に対する分析物と競合できる、分析物の改変形態であってもよく、改変は、分析物が別の部分、例えば、標識または固体担体に結合する手段を与える。分析物類似体は、分析物と同じように抗体に結合することができる。

10

【0043】

用語「抗体」は、本明細書で使用する場合、概して、抗原への曝露に反応して、Bリンパ球細胞により産生される糖タンパク質を指し、その抗原に特異的に結合する。用語「抗体」を、最も広い意味で使用し、詳細には、それは、所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、複数特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体フラグメントを包含する。

【0044】

本明細書で使用する場合、「抗BAIB」、「抗BAIB抗体部分」、もしくは「抗BAIB抗体フラグメント」および/または「抗BAIB抗体変異体」などは、BAIBと特異的に結合する、免疫グロブリン分子の少なくとも一部分、例えば、限定されないが、重鎖もしくは軽鎖定常領域の1つの相補性決定領域（CDR）、フレームワーク領域、またはその任意の一部分を含む任意のタンパク質またはペプチド含有分子を含む。

20

【0045】

本明細書で使用する場合、「抗SDMA」、「抗SDMA抗体部分」、もしくは「抗SDMA抗体フラグメント」および/または「抗SDMA抗体変異体」などは、SDMAと特異的に結合する、免疫グロブリン分子の少なくとも一部分、例えば、限定されないが、重鎖もしくは軽鎖定常領域の1つの相補性決定領域（CDR）、フレームワーク領域、またはその任意の一部分を含む任意のタンパク質またはペプチド含有分子を含む。

30

【0046】

用語「抗体フラグメント」は、本明細書で使用する場合、完全長の抗体の一部分、概して、その抗原結合または可変領域を指す。詳細には、例えば、抗体フラグメントとしては、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメント；ダイアボディ（diabodies）；線状抗体；一本鎖抗体分子；ならびに抗体フラグメントからの複数特異性抗体を挙げることができる。

【0047】

用語「抗原」は、本明細書で使用する場合、概して、抗原に特異的な抗体と適切な条件下で反応することができる物質を指す。

40

【0048】

用語「分析物」は、本明細書で使用する場合、概して、検出および/または測定されるサンプル中の物質または物質のセットを指す。

【0049】

用語「動物」は、本明細書で使用する場合、概して、任意の動物、例えば、ヒト、またはヒト以外の動物、例えば、ネコ、イヌ、またはウマを指す。

【0050】

用語「サンプル」は、本明細書で使用する場合、一般に、尿、または、それらに限定されないが、全血、血漿、および血清を含む任意の血液由来の流体サンプルを指す。本開示の方法で使用する血清を用意するために、1つまたは複数の血清サンプルは、動物対象か

50

ら得られる。血清サンプルを、例えば、血液サンプルとして動物対象から得ることができ、次いで、分離して血清を用意することができる。ある種の実施形態において、血清は、血液から分離することなく測定することができる。当業者が理解する通り、単一で得られたサンプルを、多数の濃度を測定するために分ける、または使用することができる。あるいは、複数のサンプルを動物対象から得ることができ、(少なくとも)1つのサンプルは、目的の各分析物または多数の分析物について、連続的に、並行に、または同時に測定する。ある種のそのような場合において、サンプルは、ほぼ同時(例えば、互いに60分以内、30分以内、または10分以内)に動物から得られる。

【0051】

用語「交差反応性」は、本明細書で使用する場合、概して、抗体の個々の抗原結合部位の、2つ以上の抗原決定基と反応する能力、または抗体分子の集団の、2つ以上の抗原と反応する能力を指す。一般に、交差反応は、(i)交差反応性抗原が、免疫抗原と共通のエピトープを有すること、または(ii)交差反応性抗原が、免疫抗原上のエピトープと構造的に類似するエピトープを有することを理由にして起こる(複数特異性)。

10

【0052】

用語「免疫アッセイ」は、本明細書で使用する場合、概して、測定可能な反応を生じさせる抗体抗原複合体を用いる検定を指す。「抗体抗原複合体」を、用語「免疫複合体」と互換的に使用することができる。一般に、免疫アッセイとしては、非競合型免疫アッセイ、競合型免疫アッセイ、均一系免疫アッセイ、および不均一系免疫アッセイが挙げられる。「競合型免疫アッセイ」において、試験サンプル中の標識されていない分析物(または抗原)は、免疫アッセイにおいて、標識されている抗原と競合する能力によって測定される。標識されていない抗原は、標識されている抗原の結合能力を妨げる。なぜなら、抗体の結合部位がすでにふさがれているからである。「競合型免疫アッセイ」において、試験サンプルに存在する抗原の量は、標識から生じるシグナルの量と逆の関係にある。結合した抗体抗原複合体の分離を必要とする免疫アッセイは、一般に、「不均一系免疫アッセイ」と呼ばれ、抗体抗原複合体の分離を必要としない免疫アッセイは、一般に、「均一系免疫アッセイ」と呼ばれる。当業者は、様々な免疫アッセイの形態を容易に理解するであろう。

20

【0053】

「接触」は、本明細書で使用する場合、最も広い態様において、本明細書で別段の定めがない限り、任意の順で試薬を組み合わせることを指すために使用される。

30

【0054】

用語「免疫複合体」は、本明細書で使用する場合、概して、補体結合を伴ってまたは伴わずに抗原と抗体分子との結合により形成される複合体を指す。抗体または抗原のどちらか一方が標識された場合、抗原と抗体との結合の結果として、標識は、免疫複合体と関連する。したがって、抗体が標識された場合、結合の結果として、標識は、抗原と関連するようになる。同様に、抗原が標識された場合(例えば、標識を有する分析物類似体)、抗原と抗体との結合の結果として、標識は、抗体と関連するようになる。

【0055】

用語「標識」は、本明細書で使用する場合、(例えば、共有結合もしくは非共有結合で、単独で、または被包化されて)本開示の抗体、BAIB類似体、SDMA類似体または抗原と直接または間接的にコンジュゲートさせることができる、検出可能な化合物、組成物、または固体担体を指す。標識は、それ自体で検出可能(例えば、ラジオアイソトープ標識、化学発光色素、電気化学的標識、金属キレート、ラテックス粒子、または蛍光標識)であってもよいし、酵素標識の場合において、検出可能である基質化合物または組成物の化学的変化を触媒してもよい(例えば、酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど)。本開示で用いる標識は、それらに限定されないが、アルカリホスファターゼ;グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(「G6PDH」);西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP);化学発光物質(chemiluminescer)、例えば、イソルミノール、蛍光物質(fluorescer)例えば、フルオ

40

50

ロセインおよびローダミン化合物；リボザイム；ならびに色素でありうる。標識はまた、それ自体が検出可能であってもよい特異的結合分子（例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン(digoxigenin)、マルトース、オリゴヒスチジン、2,4-ジニトロベンゼン、フェニルヒ酸(phenylarsenate)、ssDNA、dsDNAなど)であってもよい。標識は、別の分子または固体担体に結合してもよく、標識された分子の検出を可能にする特性で選択される。標識の利用は、電磁放射または直接可視化の検出などの手段によって検出することができ、場合により、測定することができるシグナルをもたらす。

【0056】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用する場合、概して、実質的に均一な抗体の集団（すなわち、集団を構成する個々の抗体が同一である）から得られる抗体を指す。モノクローナル抗体は、特異性が高く、単一の抗原部位に対するものである。異なるエピトープに対する異なる抗体を典型的には含むポリクローナル抗体調製物に対して、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一のエピトープに対するものである。修飾語「モノクローナル」は、抗体の特徴を指すだけであり、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈されるべきではない。詳細には、例えば、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法によって作製されてもよいし、組換えDNA法によって作製されてもよいし、公知の技術を使用してファージ抗体ライブラリーから単離されてもよい。

10

【0057】

用語「ポリペプチド」は、本明細書で使用する場合、概して、ペプチド結合でつながったアミノ酸配列を有する分子を指す。この用語は、タンパク質、融合タンパク質、オリゴペプチド、環状ペプチド、およびポリペプチド誘導体を含む。抗体および抗体の誘導体を、別の段落ですでに述べたが、抗体および抗体の誘導体を、本開示の目的のために、ポリペプチドおよびポリペプチド誘導体のサブクラスとして取り扱う。

20

【0058】

用語「固体担体」は、本明細書で使用する場合、本開示の抗体またはSDMA類似体が付着できる非水性マトリクスを指す。固体担体の例としては、ガラス（例えば、多孔質ガラス）、合成および天然ポリマー、多糖類（例えば、アガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコールおよびシリコーン、磁気粒子、ラテックス粒子、クロマトストリップ、マイクロタイターポリスチレンプレート、または結合されていない材料から洗浄もしくは分離される抗原および/または抗体と結合することができる任意の他の物質で部分的または全体的に形成される担体が挙げられる。ある種の実施形態において、適用に応じて、固体担体は、アッセイプレートのウェルである場合もあるし、精製カラム（例えば、親和クロマトグラフィーカラム）である場合もある。

30

【0059】

「受容体」は、分子の特定の空間的および極性組織、例えば、エピトープまたは決定部位を認識できる任意の化合物または組成物を指す。受容体の例としては、抗体、Fabフラグメントなどが挙げられる。

【0060】

「結合特異性」または「特異的結合」は、例えば、ポリペプチドと、ポリペプチドに特異的なポリクローナルもしくはモノクローナル抗体、または抗体フラグメント（例えば、Fv、単鎖Fv、Fab'、もしくはF(ab')₂フラグメント）などの第1の分子の第2の分子への実質的な認識を指す。例えば、「特異性」は、本明細書で使用する場合、概して、個々の抗体結合部位の、たった1つの抗原決定基と反応する能力、または抗体分子の集団の、たった1つの抗原と反応する能力を指す。一般に、抗原-抗体反応においては、高度な特異性が存在する。抗体は、(i)抗原の一次構造、(ii)抗原の異性形態、ならびに(iii)抗原の二次および三次構造における違いを区別することができる。高い特異性を示す抗体-抗原反応は、低い交差反応性を示す。

40

【0061】

「実質的な結合」または「実質的に結合する」は、特定のアッセイ条件下でのアッセイ

50

混合物における分子間の特異的結合または認識の程度を指す。最も広い態様において、実質的な結合は、第1の分子が第2の分子を結合するまたは第2の分子を認識する能力の欠如と、第1の分子が第3の分子と結合するまたは第3の分子を認識する能力との差に関連し、当該差は、分子の相対濃度、ならびにインキュベーションの時間および温度を含む特定のセットのアッセイ条件下で、特異的な結合を区別する意味あるアッセイの実施を可能にするのに十分である。別の態様においては、交差反応という意味において、1つの分子は、別の分子と結合するまたは別の分子を認識する能力が実質的に欠如し、ここでは、特定のセットのアッセイ条件下で、第1の分子が第2の分子について、第3の分子に対して示す反応性の25%未満、10%未満、5%未満、または1%未満の反応性を示す。特異的な結合は、広く知られている多くの方法、例えば、免疫組織化学アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、放射免疫アッセイ(RIA)、またはウェスタン・ブロットアッセイを使用して試験することができる。

10

【0062】

用語「塩」は、本明細書で使用する場合、酸と化合物の塩基性官能基との間に形成される塩を意味する。塩の例としては、それらに限定されないが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、重酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチシン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルカル酸塩、サッカラート、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、およびパモ酸塩(すなわち、1,1'-メチレン-ビス-(2-ヒドロキシ-3-ナフトエート))が挙げられる。用語「塩」はまた、酸性官能基、例えば、カルボン酸官能基を有する化合物と、無機または有機塩基との間に形成される塩も指す。適切な塩基としては、それらに限定されないが、アルカリ金属、例えば、ナトリウム、カリウムおよびリチウムの水酸化物；アルカリ土類金属、例えば、カルシウムおよびマグネシウムの水酸化物；他の金属、例えば、アルミニウムおよび亜鉛の水酸化物；アンモニア、および有機アミン、例えば、非置換またはヒドロキシ置換モノ-、ジ-、またはトリアルキルアミン；ジシクロヘキシルアミン；トリブチルアミン；ピリジン；N-メチル、N-エチルアミン；ジエチルアミン；トリエチルアミン、モノ-、ビス-、またはトリス-(2-ヒドロキシ-低級アルキルアミン)、例えば、モノ-、ビス-、またはトリス-(2-ヒドロキシエチル)アミン、2-ヒドロキシ-tert-ブチルアミン、またはトリス-(ヒドロキシメチル)メチルアミン、N,N-ジ-低級アルキル-N-(ヒドロキシ低級アルキル)-アミン、例えば、N,N-ジメチル-N-(2-ヒドロキシエチル)アミン、またはトリ-(2-ヒドロキシエチル)アミン；N-メチル-D-グルカミン；ならびにアミノ酸、例えば、アルギニン、リシンなどが挙げられる。

20

30

【0063】

本開示を続ける場合、一態様において、本開示は、動物が、腎障害、例えば、腎疾患に罹患しているかどうかを決定するための方法に関する。該方法は、動物からの尿または血液サンプル中のBAIBを測定すること、および、サンプル中のBAIBの濃度に基づいて、器質的損傷の結果である腎疾患を決定することを含む。例えば、該方法は、サンプル中のBAIBの濃度を、健康な動物の集団からのサンプル中のBAIBにおける濃度に関係する参照濃度と比較することを含む。動物の血液サンプル中のBAIB濃度の参照範囲または正常な範囲は、明白に健康な(非疾患の)対象からのサンプルを使用して設定することができる。一態様において、参照上限は、健康なネコ対象の集団の95パーセントイル値を表す。参照限界を超える血液または尿のBAIB濃度[BAID]を有する対象は、腎障害、例えば、腎臓の器質的損傷に罹患しているとしてみなされうる。加えて、こうした患者はまた、腎疾患に関連する早期死亡の高い可能性を有することも特徴とする。ネコ対象の場合、95パーセントイル値の参照限界は、ネコの集団に対して約2.0 μg/dLのBAIBであってもよい。95パーセントイル値の範囲は、例えば、約1.5~2

40

50

、 $5 \mu\text{g}/\text{dL}$ を含み、特に、約 1.5 、 1.6 、 1.7 、 1.8 、 1.9 、 2.0 、 2.1 、 2.2 、 2.3 、 2.4 および $2.5 \mu\text{g}/\text{dL}$ を含むことができる。イヌの場合、 95 パーセンタイル値は、約 $1.0 \sim 2.0$ であり、特に、約 1.0 、 1.1 、 1.2 、 1.3 、 1.4 、 1.5 、 1.6 、 1.7 、 1.8 、 1.9 および $2.0 \mu\text{g}/\text{dL}$ である。

【0064】

本開示の別の態様は、BAIBおよびSDMAの組合せを使用して、腎障害を決定することを含む。この態様において、BAIBおよびSDMAの両参照範囲は、公知であり、または健康な対象の集団から得ることができる。参照値より高いBAIB濃度およびSDMA濃度の値は、腎障害を示しうる。SDMAに対する健康な対象の 95 パーセンタイル値を表す適切な参照上限は、例えば、 $14 \mu\text{g}/\text{dL}$ であってもよい。WO2015/035115を参照されたい。腎障害の予後はまた、対象からの血液サンプル中のBAIBの濃度とSDMAの濃度との比を計算することでも達成されうる。 $[\text{BAIB}]/[\text{SDMA}]$ 比が 0.15 超である、または $[\text{SDMA}]/[\text{BAIB}]$ 比が 7 未満であることは、腎障害を示し、死亡の兆候となる。正常なSDMA濃度の存在下でのBAIB濃度の上昇は、正常な腎機能であっても器質的損傷を示す可能性がある。上昇したSDMA濃度の存在下でのBAIB濃度の減少は、器質的損傷の不在下でのネフロン機能の喪失を示す可能性がある。

10

【0065】

他の態様において、本開示は、腎結石を診断する方法に関する。該方法は、対象からのサンプル中のBAIBの濃度を測定すること、および、対象が、参照限界より高いBAIB濃度を有するかを決定することを含む。参照限界より高いBAIBレベルの上昇は、器質的損傷を示すが、これは腎結石によって起こりうる。超音波、CTスキャンまたはX線による腎臓のさらなる分析は、腎結石の他の症状がなくても確証的でありうる。

20

【0066】

別の態様において、本開示は、腎疾患を決定する方法に関し、ここで、該方法は、対象からの2つ以上のサンプルにおけるBAIBの濃度を決定することを含み、ここで、該サンプルは、数分、数時間、数日、週、数か月または数年にわたり、対象から得られる。腎疾患の診断または進行は、サンプル中のBAIBの濃度に基づいて決定することができる。サンプル中のBAIBの濃度が一連のサンプルにわたって上昇している場合、腎疾患、例えば、腎臓の器質的損傷が悪化していることを決定することができる。死亡率または早期死亡はまた、一連のサンプル中のBAIBの濃度の上昇に基づいて、予測されうる。

30

【0067】

本開示はまた、本明細書に記載された計算もしくは比の決定を行う、または、腎疾患もしくは腎機能障害を診断するためのコンピューティング装置にも関する。該コンピューティング装置は、疾患の状態を決定するために使用することができる方程式から値を実行時に算出するソフトウェア命令のための記憶装置を含む。

【0068】

ある種の実施形態において、遊離型SDMAの濃度は、参照によりそれら全体がそれぞれ本明細書に組み込まれる、米国特許第 $8,481,690$ 号、WO2015/035155、2015年2月20日に出版された米国仮特許出願第 $62/118,832$ 号に記載されている、免疫学的方法、装置およびキットを使用して決定される。該方法は、1種または複数のSDMA類似体を含む対照、校正物質、または標準物質を含むことができる。特に、該方法は、それに限定されないが、マイクロプレートおよびラテラルフロー装置を使用することを含めて、当業者に周知の免疫アッセイ技術を使用することで達成することができる。SDMAを検出するためにサンプルが得られる動物対象としては、ヒトおよびヒト以外の動物（例えば、ペット、家畜など）対象が挙げられる。

40

【0069】

サンプルは、EMIT（登録商標）（酵素増幅免疫アッセイ技術）均一免疫アッセイシステムに基づいて、改変されたアッセイを使用して分析されうる。従来のEMIT（登録

50

商標)アッセイにおいて、分析物を含有するサンプルは、抗分析物抗体、分析物と酵素とのコンジュゲート、および、酵素と接触した場合にシグナルを発生する基質と接触する。抗体とコンジュゲートの結合は、酵素活性を阻害し、または減少させる。分析物がサンプル中に存在する場合、サンプルの分析物は、抗体と結合するために、コンジュゲートさせた分析物と競合し、その結果、酵素/基質からのシグナルはより多く発生する。分析物が存在しない場合、抗体とコンジュゲートとの間でさらに結合が起こり、シグナル発生を制限または妨げる可能性がある。したがって、分析物がより多く存在する場合、シグナルはより多く発生する。動力学アッセイは、サンプル中の分析物の存在または量を指標として、シグナル発生速度を使用することができる。

【0070】

一態様において、シグナルは、当業者には周知のように、酵素/基質システムに特異的な波長での吸光度として測定される。例えば、G6PDH/NADの酵素/基質システムについて340nmで吸光度を測定することで、G6PDHの存在下での、NADからNADHへの変換の相対量の値が得られ、これを使用して酵素による基質の変換を反映した反応速度を得ることができる。

【0071】

反応速度は、酵素媒介反応の間に、複数の時点でシグナル(例えば、吸光度)を測定することによって決定することができる。シグナル測定の時間および間隔の決定は、試薬の濃度およびアッセイの温度を考慮する当該技術の範囲内である。例えば、速度は、サンプル(または校正物質)と全試薬とを室温で組み合わせた後、最初の約2~10分間で吸光度を測定することによって決定され、さらに1~15分間に、5~60秒ごとに測定することができる。反応速度は、吸光度の経時的変化として表されることができる。例えば、吸光度は、サンプル(または校正物質)と全試薬とを組み合わせた後、約1、2、3、4、5、6、7、8、9または10分から開始して測定することができる。吸光度は、通常、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15分間に、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55または60秒の間隔で測定する。これらの時間はそれぞれ、反応条件、分析物および試薬に応じて、延長または短縮することができる。

【0072】

本開示の一実施形態によれば、分析物は、BAIBまたはSDMAであり、酵素コンジュゲートシステムは、G6PDH/NADである。参照によりそれら全体がそれぞれ本明細書に組み込まれる、2015年2月20日に出願された米国仮特許出願第62/118,832号および2016年2月19日に出願された米国特許出願第15/048,209号を参照されたい。本実施形態において、BAIBまたはSDMAの類似体は、動物、例えば、ヒト、ネコおよびイヌからの血清または血漿サンプル中のBAIBまたはSDMAの存在または量を決定するために、G6PDHにコンジュゲートされ、アッセイにおいてコンジュゲートとして使用される。本実施形態の一態様において、校正物質は、公知の量のBAIBまたはSDMAと校正物質マトリクス(例えば、処理血清)とを組み合わせることによって調製される。

【0073】

また、固相アッセイ形式は、よく使用される結合アッセイ技術である。分析物の存在(例えば、BAIBまたはSDMA)が、コンジュゲートおよび/または固定化された相補性結合メンバーへの分析物の結合によって示される、いくつものアッセイ装置および手順が存在する。1つの特定の態様において、固定化された結合メンバー(例えば、抗BAIBまたは抗SDMA抗体)は、アッセイの間に、固相、例えば反応ウェル、ディップスティック、試験紙、フロースルーパッド、紙、ファイバーマトリクス、または他の適切な固相材料に結合する、または結合するようになる。サンプル中のBAIBまたはSDMAと固定化抗体との結合反応は、標識にコンジュゲートしたBAIBまたはSDMAを含むある量のBAIBまたはSDMA類似体をサンプルに添加することによって決定される。サンプルとBAIBまたはSDMA類似体との混合物を固相に接触させた後、混合物および

10

20

30

40

50

固相をインキュベートして、固定化抗体とB A I BまたはS D M A、およびB A I BまたはS D M A類似体の中で結合させる。インキュベーション後、結合していない反応物は、固相から除去される。類似体への抗体の結合によって抗体と結び付いた標識の量が測定される。抗体に結び付いた標識の量は、サンプル中のB A I BまたはS D M Aの量に反比例する。ある種の実施形態において、B A I BおよびS D M Aは、上記の本開示によれば、別々に標識され、同時に測定される。他の実施形態において、B A I BおよびS D M Aは、単独で、連続的に、または、並行に測定される。

【 0 0 7 4 】

B A I BまたはS D M Aに対する1つまたは複数の抗体の、装置または固体担体への固定化は、抗体が、サンプル、希釈および/または洗浄手順によって流されないように行われ、1つまたは複数の抗体は、物理的吸着によって(すなわち、化学リンカーの使用なしで)、または化学的結合によって(すなわち、化学リンカーを使用して)、表面に付着させることができる。化学的結合は、表面での抗体のより強い付着をもたらすことができ、表面結合分子の所定の配向および形態を与えることができる。

10

【 0 0 7 5 】

別の実施形態において、特定種において生じたB A I BまたはS D M A抗体は、固体担体に結合する抗種抗体との相互作用によって、固体担体に結合する。1つの特定の態様において、抗B A I Bまたは抗S D M A抗体は、ウサギにおいて生じさせ、担体は、ウサギにおいて生じた抗B A I Bまたは抗S D M A抗体を認識する、抗ウサギ抗体に結合している。この態様において、抗体は、その種から得られた抗血清の形態であってもよい。抗B A I Bまたは抗S D M A抗体は、サンプルを固相に添加する前に、抗種抗体を有する固相に付すこともできるし、抗B A I Bまたは抗S D M A抗体は、サンプルを固相に添加する前に、サンプルと混合させることもできる。どちらの場合でも、抗B A I Bまたは抗S D M A抗体は、固相上の抗種抗体への結合によって、固相に結合するようになる。

20

【 0 0 7 6 】

別の実施形態において、1つまたは複数の標識された抗体は、混合物を固体担体に付す前に、試験サンプルと混合させることができる。この場合において、B A I BまたはS D M A類似体は、サンプル、希釈および/または洗浄手順によって流されないように固体担体に付着させることができる。サンプル中の標識された抗体は、サンプル中のB A I BまたはS D M Aに結合し、したがって、固体担体でのB A I BまたはS D M A類似体と結合させるために利用することができない。混合物を固体担体に付し、適切にインキュベートした後、混合物は、固体担体から洗浄される。サンプルのB A I BまたはS D M Aに結合していなかった抗体は、固体担体上のB A I BまたはS D M A類似体に結合することになる。サンプル中のB A I BまたはS D M Aの存在または量は、B A I BまたはS D M A類似体に結合した抗体の量に反比例する。抗体上の標識に関連するシグナルは、適切な方法によって測定することができる。

30

【 0 0 7 7 】

抗体抗原複合体の検出は、当業者に周知の様々な手法、例えば、比濁法、酵素標識化、放射性標識、発光、または蛍光によって実現することができる。免疫アッセイ法は、当業者に公知であり、それらに限定されないが、放射免疫アッセイ(R I A)、酵素免疫アッセイ(E I A)、蛍光偏光免疫アッセイ(F P I A)、微粒子酵素免疫アッセイ(M E I A)、酵素増幅免疫アッセイ技術(E M I T)アッセイ、免疫濁度または凝集アッセイ、ラテラルフロー装置を含むコロイド金ベースの免疫アッセイ、および化学発光磁気免疫アッセイ(C M I A)を含むと理解されている。R I Aにおいて、抗体または抗原は、放射能で標識され、競合または非競合形式で使用される。E I Aにおいて、抗体または抗原は、基質を、測定されるシグナル、例えば、色の変化、を生じる産物に変える酵素で標識される。F P I Aにおいて、抗原は、蛍光標識で標識され、試料からの標識されていない抗原と競合する。測定される分析物の量は、測定されるシグナルの量に反比例する。M E I Aにおいて、固相の微粒子は、目的の抗原に対する抗体で被覆され、分析物を捕捉するために使用される。検出のための抗体は、E I A法のように、酵素で標識される。測定され

40

50

る分析物の濃度は、測定されるシグナルの量に比例する。C M I Aにおいて、化学発光標識が、抗体または抗原へコンジュゲートされ、その基質と合わさった時に光を発生する。C M I Aは、競合または非競合形式に設定することができ、それぞれ、存在する分析物の量に反比例または正比例する結果をもたらす。

【 0 0 7 8 】

特異的結合アッセイにおける、試薬に浸漬した試験紙の使用も周知である。そのような手法において、試験サンプルは、試験紙の一部分に付され、試験紙材料を移動、または運ばれる(wick)。したがって、検出または測定される分析物は、試験サンプル自体でありうるまたは別個に添加される溶出液を利用して、材料中をまたは材料に沿って通過する。分析物は、分析物の相補性結合メンバーが固定化されている、試験紙上の捕捉部分または検出部分へと移動する。分析物が検出部分で結合する程度は、試験紙に組み込むこともできるまたは別個に付すことができるコンジュゲートを利用して決定することができる。一実施形態において、B A I BまたはS D M Aに特異的な抗体は、離れた所で固体担体に固定化される。サンプルの添加後、固体担体でのB A I B - またはS D M A - 抗体複合体の検出は、当分野で公知の任意の手段によるものでありうる。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5, 726, 010号は、ラテラルフロー装置の一例、S N A P (登録商標)免疫アッセイ装置(I D E X X L a b o r a t o r i e s) を記載している。

10

【 0 0 7 9 】

他の検出技術は、磁気粒子またはマイクロビーズ、例えば、超常磁性酸化鉄に浸漬したポリマービーズを用いる。これらのビーズは、例えば、分析物の特異的な結合相手に結び付く。ビーズは、試験されるサンプル中の標的の分析物と結合し、次いで、通常、磁気によって溶液から単離または分離される。一度単離が行われたら、直接的に、光学的に、またはカメラによって、特定の画像かまたは標識を観察することを含む、他の試験を行うことができる。

20

【 0 0 8 0 】

さらなる実施形態において、B A I BまたはS D M A類似体、特に、チオール含有、ヒドロキシル含有、アミノ含有、およびカルボキシレート含有B A I BまたはS D M A類似体は、B A I BまたはS D M Aを他の分子(コンジュゲートする標的)、例えば、活性タンパク質と連結させることができ、B A I BまたはS D M Aコンジュゲートを形成する。本明細書に記述するB A I BまたはS D M A類似体は、B A I BまたはS D M Aを、コンジュゲートする標的、例えば、タンパク質、ポリペプチド、検出可能な標識、固体担体などに連結させることができ、B A I BまたはS D M Aコンジュゲートをもたらす。本明細書に記述するB A I BまたはS D M Aコンジュゲートを使用して、B A I BまたはS D M Aに特異的な免疫アッセイで使用する抗体を作ることができる。B A I BまたはS D M A類似体は、B A I BまたはS D M Aに特異的な免疫アッセイで使用する標識とコンジュゲートさせることもできる。

30

【 0 0 8 1 】

一実施形態において、B A I Bは、キャリアタンパク質とコンジュゲートされ、「ハプテン-キャリア」免疫原を形成し、それを、B A I Bを含むエピトープへの免疫反応を刺激するために使用することができる。免疫原タンパク質の例としては、それらに限定されないが、B S A、K L H、およびオボアルブミンが挙げられる。ハプテンを免疫原タンパク質とコンジュゲートするためのプロトコルは、当分野で公知である(例えば、A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l、E . H a r l o w および D . L a n e 編、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y (C o l d S p r i n g H a r b o r、N Y、1988) 78~87頁を参照されたい)。

40

【 0 0 8 2 】

適切なS D M A類似体は、例えば、参照によりそれら全体が組み込まれる米国特許第8, 481, 690号およびW O 2 0 1 5 / 0 3 5 1 5 5 に記載される。

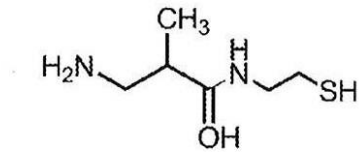
【 0 0 8 3 】

50

BAIB類似体は、例えば、BAIB - チオール（アミノ末端およびカルボキシ末端）ならびにBAIB - FMOC（フルオレニルメチルオキシカルボニル）を含み、ここに示す：

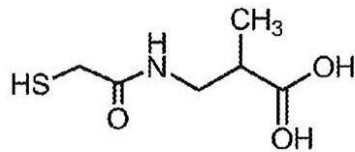
【0084】

【化3】



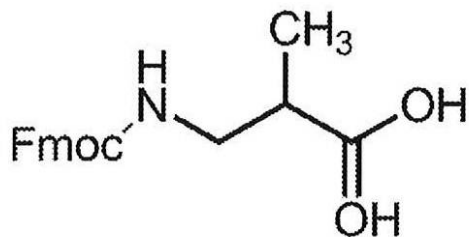
BAIB-SH (カルボキシ末端)

10



BAIB-SH (アミノ末端)

20



BAIB-Fmoc

30

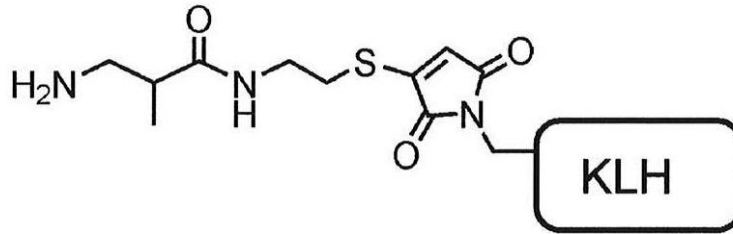
【0085】

これらの類似体を使用して、例えば、以下：グルタルアルデヒド - BAIBコンジュゲート、ポリリジン - BAIBコンジュゲート、BAIB（アミノ末端） - BSAコンジュゲート、BAIB（カルボキシ末端） - BSAコンジュゲート、BAIB（アミノ末端） - K LHコンジュゲート、BAIB（カルボキシ末端） - K LHコンジュゲート、BAIB - G 6 P D Hコンジュゲートおよび粒子にコンジュゲートさせたBAIBを含む、BAIBのコンジュゲートを調製することができる。これらのコンジュゲートのいくつかの構造を、ここに示す。

【0086】

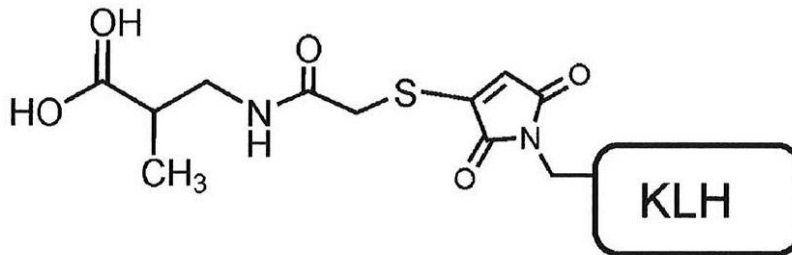
40

【化4 - 1】



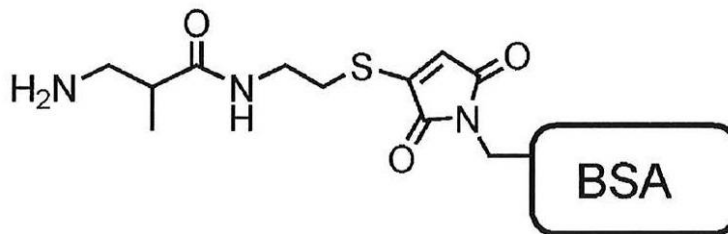
BAIB (カルボキシ末端) - KLH コンジュゲート,

10



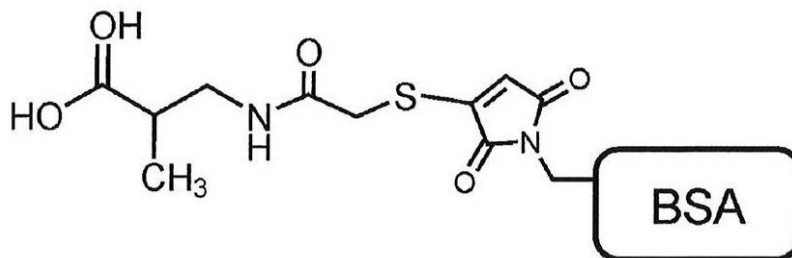
20

BAIB (アミン末端) - KLH コンジュゲート,



30

BAIB (カルボキシ末端) -BSA コンジュゲート,



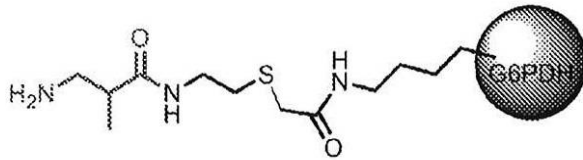
40

BAIB (アミン末端) -BSA コンジュゲート,

50

【 0 0 8 7 】

【 化 4 - 2 】



BAIB-G6PDH コンジュゲート

10

【 0 0 8 8 】

代替的实施形態において、BAIBおよび/またはSDMA類似体は、検出可能な標識に連結される。標識は、それ自体で検出可能（例えば、ラジオアイソトープ標識、化学発光色素、電気化学的標識、金属キレート、ラテックス粒子、または蛍光標識）であってもよいし、酵素標識の場合において、検出可能である基質化合物または組成物の化学的变化を触媒してもよい（例えば、酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）。標識は、それ自体が検出可能であってもよい特異的結合分子（例えば、

20

【 0 0 8 9 】

SDMAおよびBAIBならびにKLHまたはBSAの類似体のコンジュゲートは、BAIBおよびSDMAと実質的に結合する抗体（すなわち、抗BAIBおよびSDMA抗体）を生じる免疫原として使用されうる。本開示の方法、装置、およびキットに有用な抗SDMA抗体および抗BAIB抗体は、BAIBおよびSDMAに高い親和性で結合することを特徴とする。したがって、本明細書に記述するのは、単離された、遺伝子組換えの、合成の、および/またはインビボで生成された抗BAIB抗体および抗SDMA抗体、ならびに、そのような抗体を作製および使用する方法であり、診断用および治療用の組成物、方法および装置を含む。本明細書に記述する抗体は、例えば、患者のサンプル中のSDMAおよびBAIBを決定するためのアッセイの試薬として有用である。一実施形態において、もたらされた抗体は、BAIBおよび遊離型SDMA（すなわち、ポリペプチド鎖の一部ではないSDMA）を検出することができる。

30

【 0 0 9 0 】

抗体を作製するための方法は、1つまたは複数のBAIBおよびSDMAコンジュゲートを免疫原として使用して、免疫反応を刺激することを含むことができる。該方法は、適切な免疫化プロトコルを使用して、1つまたは複数のBAIBおよびSDMAコンジュゲートを動物に投与すること、および、動物の体液（複数可）から適切な抗体を分離することを含む。あるいは、コンジュゲートをファージディスプレイ法で使用して、それらの表面に適切な抗体を示すファージを選択することができ、その後、少なくとも適切な抗体の様々なドメイン領域をコードする核酸配列の分離が続く。ファージディスプレイ法は、当業者に周知である（例えば、Antibody Phage Display; Methods in Molecular Biology, Vol, 178, O'Brien, Philippa M.; Aitken, Robert (Eds.) 2002を参照されたい）。モノクローナル抗体は、当分野で一般に知られた方法によって、調製することができる。

40

【 0 0 9 1 】

50

本明細書に記述するBAIBおよびSDMA類似体は、受容体結合アッセイ、例えば、BAIBおよびSDMAの免疫アッセイで使用する検出可能なコンジュゲートを与えるために、標識に連結させることができる。同様に、抗BAIBおよび抗SDMA抗体も、受容体結合アッセイ、例えば、免疫アッセイで使用する検出可能な抗SDMA抗体および抗BAIB抗体を与えるために、標識に連結させることができる。類似体および抗体は、当業者に周知の方法を使用して、標識に連結させることができる。例えば、Immunoc hemical Protocols ; Methods in Molecular B iology、Vol. 295、R. Burns編(2005)。検出可能なコンジュゲートまたは検出可能な抗SDMA抗体は、試験サンプル中のBAIBおよび/またはSDMAの存在または量に関するシグナルを出すために、様々な均一系および/または競合型アッセイ形式で使用することができる。

10

【0092】

特定の実施形態において、免疫アッセイ法は、抗BAIBおよび抗SDMA抗体の検出のための競合型免疫アッセイである。競合型免疫アッセイは、以下の例示的な方法で行うことができる。動物の体液からの、サンプルは、固体担体とコンジュゲートしたBAIB類似体またはSDMA類似体、および検出可能な標識とコンジュゲートした抗BAIBおよび抗SDMA抗体と接触させる。サンプルに存在する、目的の抗体は、固体担体とコンジュゲートした類似体との結合のために、検出可能な標識とコンジュゲートした抗BAIBおよび抗SDMA抗体と競合する。固体担体と結び付いた標識の量は、結合していない抗体および固体担体を分離した後に決定することができる。代替的实施形態において、競合型免疫アッセイは、以下の例示的な方法で行われる。動物の体液からの、BAIBおよびSDMAを含有するサンプルは、検出可能な標識に連結したBAIB類似体またはSDMA類似体、次いで、固体担体とコンジュゲートした抗BAIBまたは抗SDMA抗体と接触させる。サンプル中のSDMAまたはBAIBは、標識された抗体に連結したBAIBまたはSDMAコンジュゲートと結合するために、固体担体上のSDMAまたはBAIBと競合する。どちらの場合でも、得られたシグナルは、サンプルに存在するBAIBまたはSDMAの量と逆関係である。

20

【0093】

血清中のクレアチニンの濃度は、当業者によって知られているように、様々な方法で測定することができる。例えば、Catalyst Dx (商標) Chemistry AnalyzerまたはVetTest (登録商標) Chemistry Analyzerは、クレアチニンの試験に適合したドライスライド、例えば、IDEXX Laboratoriesから市販されているものと共に使用することができる。他の分析装置およびスライド、例えば、Ortho Clinical Diagnosticsから入手可能なVITROS (登録商標) 950分析装置およびVITROS (登録商標) CREAスライド、ならびにRoche DiagnosticsからのCOBAS (登録商標)分析装置および関連したキットも使用することができる。酵素湿式アッセイ(Enzymatic wet assay)も使用することができる。例えば、当業者は、Integra 800分析装置で酵素湿式化学法を使用することができる。1つの特定のアッセイは、552nmでの検出、および659nmでの吸光度ブランキングを伴う、クレアチナーゼ/クレアチナーゼ/サルコシンオキシダーゼ系に基づく。当業者は、比色法、例えば、ピクリン酸に基づくもの、例えば、Jaffeアッセイも使用することができる。当業者に公知の他の方法、例えば、参照によりそれぞれが本明細書に組み込まれる米国特許公開第2005/0266574号および米国特許第4,818,703号に記載されているものも、クレアチニン濃度を測定するために使用することができる。ある種の実施形態において、クレアチニン濃度の測定は、アイソトープ希釈質量分析を使用して行われる。

30

40

【0094】

以下のものは、例示の目的で示すにすぎず、上記の広義の用語で説明している本発明の範囲を限定することを意図するものではない。本開示で引用したすべての参考文献は、参

50

照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0095】

実施例1：BAIB血清レベルの液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)アッセイ

液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)アッセイは、BAIB血清レベルを測定するために最適化された。

【0096】

イヌの処理血清は、以下の通り調製した：未処置の市販のイヌの血清(500 mL)は、2フィートのSNAKESKIN(商標)透析チューブ(3.5K MWCO、35 mm Dry I.D.)(Thermo Scientific)に充填し、4で少なくとも6時間、20gの炭素粉末を有するPBS緩衝液(20 L)に対して透析した。プロセスは、緩衝液と炭素を交換しながら、3回繰り返した。血清中のBAIB濃度は、透析前後に、LC-MSによって測定された。透析前の血清において、BAIB濃度は、2~3 µg/dLであった。透析後、BAIB濃度は、検出限界を下回った。イヌのチャコール処理血清を、使用するために-80で保管した。

10

【0097】

LC-MS標準曲線を、以下の手順に従って作成した。

【0098】

水中に50 µg/dLのD3-BAIB(3つの重水素原子で標識されたBAIB)(CDN ISOTOPES型番D-7229)を溶解することによって内部標準を調製した。

20

【0099】

アッセイ標準を、水中の1 mg/mLのBAIBの溶液を最初に調製することによって調製した。8 µLのこの溶液を、7992 µLのイヌの処理血清に移し、逐次的に処理血清(上記で調製)に希釈して表1の希釈系列を生成した。

【0100】

【表1】

表1

30

ID	[BAIB] µg/dL
STD 1	0.78
STD 2	1.56
STD 3	3.13
STD 4	6.25
STD 5	12.5
STD 6	25
STD 7	50
STD 8	100

40

【0101】

50

サンプルを、以下に従ってLC - MSについて調製した：

1. 50 μ Lの試験サンプルまたは参照標準を、バイアルに移した。
2. 50 μ Lの内部標準溶液を、バイアルに添加し、溶液を、完全に混合した。
3. 300 μ Lの純粋なアセトニトリルを、バイアルに添加し、溶液を、完全に混合した。
4. バイアルを、20分間、3000 \times gで遠心分離し、上澄みを、デカント、濾過し(0.2 μ m)、下記の条件下でLC - MSにかけた。

【0102】

LC - MSを、以下の条件下で行った：

移動相A：水、0.1%ギ酸、0.5mMペルフルオロヘプタン酸 (Sigma 342 10 041 - 5G)

移動相B：アセトニトリル、0.1%ギ酸

カラム：Acquity CSH C18 1.7 μ m、2.1 \times 30mm (Waters 186005295)

スキャンタイプ：MRM

スキャンモード：正極性

イオン源：ターボスプレー

【0103】

分析物	Q1質量 (Da)	Q3質量 (Da)	Dwell (ミリ秒)	DP	CEC	XP
BAIB	104.1	85.900	15	41	19	12
D3-BAIB	107.1	88.9	15	41	19	12

注入量：2 μ L

流速：1 mL/分

カラム温度：20 $^{\circ}$ C

冷却器温度：15 $^{\circ}$ C

初期%B：0%

【0104】

時間プログラム

時間(分)	モジュール	イベント	パラメーター
1.00	ポンプ	ポンプB濃度	5
2.20	ポンプ	ポンプB濃度	100
2.50	ポンプ	ポンプB濃度	100
2.60	ポンプ	ポンプB濃度	0
4.00	システムコントローラー	停止	

【0105】

時間0分で、0%Bで開始する。1分で5%Bになる勾配に強める。1.2分間で100%Bになる勾配に強める(2.20分マーク)。0.3分間、100%Bを保ち(2.5分マーク)、その後、初期状態に戻す(0%B)。

【 0 1 0 6 】

実施例 2 : 健康なおよび疾患を有するネコにおける B A I B の測定

正常なネコ対象における B A I B 参照レベルを、両方の性で様々な種の 5 8 匹のネコにおいて決定した。血清サンプルを集め、上記の通り L C - M S にかき、個別の試験サンプルを標準（上記で測定）と比較して B A I B レベルを決定した。この集団における 9 5 パーセンタイル値に基づく参照上限は、 $2.0 \mu\text{g} / \text{dL}$ であった。

【 0 1 0 7 】

腎疾患に罹患しているネコの血清中 B A I B 濃度 [B A I B] をまた、L C - M S によって 1 0 匹のネコにおいても測定した。加えて、S D M A 濃度 [S D M A] を、L C - M S によって測定した。

【 0 1 0 8 】

B A I B および S D M A のレベルを、表 2 に示す。

【 0 1 0 9 】

【表 2 - 1】

表2

サンプル日*	SDMA µg/dL	BAIB µg/dL	不調和	SDMA: BAIB	BAIB: SDMA
第0週	14	0	なし		0
第63週	10	1.2	なし	8	0
第105週	14	0	なし		0
第115週	17	0	なし		0
第125週	13	2.3	なし	6	0
第131週	13	0	なし		0
第139週	13	1.35	なし	10	0
ネコ-2					
第0週	12	0.404	なし	30	0
第57週	14	0.887	なし	16	0
第74週	19	0	なし		0
第84週	18	0	なし		0
第90週	15	0	なし		0
第98週	17	0	なし		0
ネコ-3					
第0週	17	3.12	なし	5	0
第76週	18	2.39	なし	8	0
第97週	16	0	なし		0
第105週	18	0	なし		0
第117週	15	0	なし		0
第123週	14	0	なし		0
第131週	14	0	なし		0
ネコ-4					
第0週	20	3.67	なし	5	0
第71週	23	0	なし		0
第74週	21	0	なし		0
第84週	18	1.3	なし	14	0
第90週	20	0	なし		0
第98週	19	0	なし		0
ネコ-5					

10

20

30

40

【表 2 - 2】

第0週	9	0.152	なし	59	0
第45週	16	0	なし		0
第98週	28	0	なし		0
第108週	25	0	なし		0
第114週	28	0	なし		0
第122週	29	0	なし		0
ネコ-6					
第0週	12	16.3	なし	1	1
第53週	13	4.46	なし	3	0
第111週	16	9.99	なし	2	1
第121週	17	10.9	なし	2	1
第131週	17	13.2	あり	1	1
第137週	15	13.2	あり	1	1
第145週	25	28.3	あり	1	1
ネコ-7					
第0週	26	26.2	あり	1	1
第52週	38	42.5	あり	1	1
第85週	43	51.5	あり	1	1
第95週	42	68.5	あり	1	2
第101週	41	65.6	あり	1	2
第109週	44	57.7	あり	1	1
ネコ-8					
第0週	9	0	なし		0
第47週	9	0	なし		0
第102週	7	0	なし		0
第121週	45	67.2	あり	1	1
第127週	86	132	あり	1	2
ネコ-9					
第0週	20	27	あり	1	1
第41週	19	20.5	あり	1	1
第98週	33	28.1	あり	1	1
第115週	40	39.3	あり	1	1
第119週	31	95.8	あり	0	3
ネコ-10					
第0週	20	17.7	あり	1	1

10

20

30

40

【表 2 - 3】

第41週	17	6.56	あり	3	0
第98週	17	11.6	あり	1	1
第115週	19	8.54	あり	2	0
第125週	17	12.2	あり	1	1
第131週	16	12.4	あり	1	1
第139週	16	14.9	あり	1	1
*第0週=最初のサンプル					

10

【0110】

ネコのSDMAの濃度[SDMA]の参照上限は、 $14 \mu\text{g}/\text{dL}$ で、これは健康な対象におけるSDMAの濃度の95パーセントイル値を表す。WO2015/035115を参照されたい。

【0111】

上昇したBAIBレベルは、腎臓の器質的損傷の重症度のマーカーであり、死亡の兆候である。約7未満の[SDMA]/[BAIB]比は、腎疾患における機能的損傷ならびに器質的損傷を示す。約0.15より高い[BAIB]/[SDMA]比はまた、腎疾患における器質的損傷による機能喪失も示す。高い[BAIB]/[SDMA]比は、早期死亡の高い可能性を反映し、低い[BAIB]/[SDMA]比は、早期死亡の低い可能性を反映する。ネコの[SDMA]/[BAIB]比の参照限界は、7である。ネコの[BAIB]/[SDMA]比の参照限界は、0.15である。

20

【0112】

実施例3：腎結石を有するネコのBAIB

BAIBの血清レベルは、腎結石に罹患しているネコ対象において、様々な時間で決定される。上昇した血清中BAIB濃度は、表3に示される通り、腎結石を示した。

【0113】

30

【表 3 - 1】

表3

ID	時間 (週)	BAIB ($\mu\text{g/dL}$)	診断	注釈
ネコ-A	0	20	シュウ酸塩石/糸球体腎炎	
ネコ-A	8	117	100%シュウ酸カルシウム一水和物	死亡 第56週
ネコ-B	0	9		
ネコ-B	24	32	100%シュウ酸カルシウム一水和物腎結石	左腎結石 第116週 腎機能不全 第129週
ネコ-C	0	16	シュウ酸塩結晶	
ネコ-C	2	12	シュウ酸塩結晶	
ネコ-D	0	33	腎結石/急性機能不全	
ネコ-D	12	219	100%シュウ酸カルシウム一水和物	死亡
ネコ-E	0	26	シュウ酸塩腎結石	
ネコ-F	0	8	小さな腎結石(放射線写真)、2010年1月	
ネコ-F	160	16	腎結石;100%シュウ酸カルシウム一水和物	
ネコ-G	0	20	シュウ酸塩石/腎機能不全/尿石症 (Urolithiasis)	
ネコ-G	8	57	右腎超音波検査で大結石の存在を示す; また同日、X線で白い影の存在を有する; シュウ酸カルシウム二水和物および一水和物	死亡 第8週
ネコ-H	0	13	ストラバイト/シュウ酸塩	
ネコ-I	0	14.1		
ネコ-I	26	16.4	腎臓(両側)および膀胱の結石	
ネコ-I	86	13.7	結石の診断後、特別食なし	
ネコ-I	138	13.4	結石が2倍になる前、複数の市販銘柄を 給餌	

10

20

30

【表 3 - 2】

ネコ-I	203	463.5	100%シュウ酸カルシウム一水和物	死亡 第203週
ネコ-J	0	14.9		
ネコ-J	41	18.6	左腎シュウ酸塩石	
ネコ-J	104	25.0		
ネコ-J	185	24.0	剖検時に見られた癥痕および線維症	
ネコ-K	0	1.631		
ネコ-K	112	1.5	左腎に少量の小結石(ストラバイト、シュウ酸塩はなし)	
ネコ-K	71	1.3		
ネコ-K	225	1.8		
ネコ-L	0	14.9	シュウ酸カルシウム一水和物20%;雑材 80%	
ネコ-L	56	23.0		
ネコ-L	115	13.3		
ネコ-L	165	19.7		
ネコ-L	214	15.8	両側シュウ酸塩腎結石、左より右が多い	
ネコ-M	0	21.7		
ネコ-M	80	22.5		
ネコ-M	133	20.7		
ネコ-M	137	23.3		
ネコ-M	178	16.8	腎結石;5%シュウ酸カルシウム一水和物 、95%雑材	死亡 第178週
ネコ-N	0	16.1		
ネコ-N	24	14.0		
ネコ-N	80	10.4		
ネコ-N	147	15.6		
ネコ-N	194	31.4		
ネコ-N	217	22.6	尿石症;100%シュウ酸カルシウム一水和物	死亡 第217週
ネコ-O	0	23.3		
ネコ-O	61	33.7		
ネコ-O	123	24.29	右腎シュウ酸塩石 第230週	

10

20

30

40

【表 3 - 3】

ネコ-P	0	2.153		
ネコ-P	28	2.614		
ネコ-P	81	1.544		
ネコ-P	152	1.376		
ネコ-P	175	1.0	5%のみ潜在的なシュウ酸カルシウム一水和物(定かでない)、95%雑材	死亡 第175週
ネコ-Q	0	14.3	2014年12月17日、左腎臓、シュウ酸塩石により肥大;右腎臓は正常で小さい。	
ネコ-Q	88	11.2		
ネコ-Q	129	16.5		
ネコ-R	0	1.1		
ネコ-R	86	1.5		
ネコ-R	152	1.2		
ネコ-R	202	1.3		
ネコ-R	244	3.6	腎結石;100%シュウ酸カルシウム一水和物	死亡 第244週
ネコ-S	0	1.8	左腎結石(特徴付けられず、シュウ酸塩ではない可能性がある) 第152週	
ネコ-S	79	1.3	右腎結石(特徴付けられず、シュウ酸塩ではない可能性がある) 第192週	
ネコ-S	115	1.767	食欲不振(第150~153週)。体重減少(第162~165週)。高脂肪食を投入。	
ネコ-U	0	15.09		
ネコ-U	52	19.67		
ネコ-U	75	18.57		
ネコ-U	124	22.73		
ネコ-U	128	33.15		
ネコ-U	213	46.55	腎結石;75%シュウ酸カルシウム一水和物、25%雑材	死亡 第213週
ネコ-V	0	0.84		
ネコ-V	56	2.01		
ネコ-V	143	1.69		
ネコ-V	195	2.43		

10

20

30

40

【表 3 - 4】

ネコ-V	215	1.37	腎結石;100%シュウ酸カルシウム一水和物	死亡 第215週
ネコ-W	0		2014年1月3日、尿管または膀胱結石の可能性。	
ネコ-W	31		剖検時、肉眼的に正常な腎臓。	
ネコ-W	46	12	髓質石灰化を伴う腎臓のI/p炎症。	
ネコ-Z	0	0.98		
ネコ-Z	56	1.75		
ネコ-Z	115	1.47		
ネコ-Z	163	1.2		
ネコ-Z	183	0.98	腎結石;100%シュウ酸カルシウム一水和物	死亡 第183週
ネコ-AA	0	1.0		
ネコ-AA	24	1.0	X線は左腎結石、発熱および腎盂腎炎を示す。	
ネコ-AA	77	1.8	レーザー療法	
ネコ-AA	127	1.3	現在、両側腎結石を有する。	
ネコ-AA	179	2.0		
ネコ-AA	254	140.1	両側シュウ酸塩石	
ネコ-AC	0	15.0		
ネコ-AC	56	17.5		
ネコ-AC	118	13.4		
ネコ-AC	163	13.7		
ネコ-AC	220	12.9		
ネコ-AC	231	16.8	剖検時、シュウ酸塩腎結石	
ネコ-AD	0	26	シュウ酸塩石	
ネコ-AE	0	16.6		
ネコ-AE	20	20.5	腎または膀胱結石;100%シュウ酸カルシウム一水和物剖検-膀胱結石。	死亡 第20週
ネコ-AF	0	2.1	尿石症/膀胱結石;100%シュウ酸カルシウム一水和物	
ネコ-AG	0	17.7		
ネコ-AG	56	20.1		
ネコ-AG	118	10.0		
ネコ-AG	146	18.4		

10

20

30

40

【表 3 - 5】

ネコ-AG	232	21.3	腎結石;100%シュウ酸カルシウムおよびリン酸カルシウムのアパタイト形態剖検-右腎結石。	死亡 第232週
ネコ-AH	0	20.2		
ネコ-AH	32	23.0		
ネコ-AH	74	16.0		
ネコ-AH	110	74.1	腎結石;100%シュウ酸カルシウム一水和物	死亡 第110週
ネコ-AI	0	18.3		
ネコ-AI	54	23.2		
ネコ-AI	117	35.7		
ネコ-AI	177	23.0		
ネコ-AI	223	13.8	腎結石;100%シュウ酸カルシウム一水和物	死亡 第223週
ネコ-AJ	0	14.1		
ネコ-AJ	28	17.5		
ネコ-AJ	81	37.1		
ネコ-AJ	135	22.9		
ネコ-AJ	145	33.4	腎結石;95%シュウ酸カルシウム一水和物、5%シュウ酸カルシウム二水和物	死亡 第146週
ネコ-AK	0	0.9	X線は膀胱および右腎結石を示す	
ネコ-AK	84	1.0		
ネコ-AK	140	0.9		
ネコ-AK	190	0.6		
ネコ-AK	214			
ネコ-AK	263	1.6	尿石症/膀胱結石;100%シュウ酸カルシウム一水和物	

*第0週=最初のサンプル

【0114】

実施例 4：糸球体腎炎に罹患しているネコ対象のBAIBレベル

4匹のネコ患者および1匹のイヌ患者は、腎疾患の結果として死亡した。患者の死後、剖検により、糸球体腎炎の診断となった。SDMA、BAIBおよびCREは、患者の死亡の前に集めた貯蔵したサンプルにおいて、遡及的に(上記した通り)測定された。BAIBは、表4で示される通り、これらの患者で上昇した。

【0115】

10

20

30

40

【表4】

表4

サンプル名	SDMA	BAIB	CRE
ネコ-1	40	95.8	1.99
ネコ-2	86	132	2.49
ネコ-3	42	68.5	2.64
ネコ-4	20	117	1.96
イヌ-1	24	52	1.12

10

【0116】

実施例5：腎障害を有するイヌにおけるBAIBレベル

正常なイヌ対象におけるBAIB参照レベルは、両方の性で様々な種の136匹のイヌにおいて決定した。血清サンプルを集め、上記の通りLC-MSで分析した。この集団における95パーセンタイル値に基づく参照上限は、 $1.24 \mu\text{g/dL}$ であった。

20

【0117】

血清中SDMA濃度と血清中CRE濃度との間の不調和（すなわち、 $[\text{SDMA}] / [\text{CRE}]$ の高い比および正常値より高い血清SDMA）の存在は、時期尚早の死亡のリスクを示すことは公知である。WO2015/035155を参照されたい。したがって、血清BAIB、CREおよびSDMAを、SDMAおよびCREの様々なレベルで、13匹のイヌにおいて測定した。比 $[\text{BAIB}] / [\text{SDMA}]$ を計算した。これらのデータを、表5に表す。

【0118】

30

【表5】

表5

イヌ	SDMA ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	CRE (mg/dL)	BAIB ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	SDMA : CRE 不調和*	[BAIB]/[SDMA]
イヌ-1	14	1.7	0	なし	0
イヌ-2	12	1.6	0	なし	0
イヌ-3	7	0.5	0	なし	0
イヌ-4	12	1.4	0	なし	0
イヌ-5	10	1.6	0	なし	0
イヌ-6	56	7.7	1	なし	0.0
イヌ-7	21	2.4	0	なし	0.0
イヌ-8	20	8.6	4	なし	0.2
イヌ-9	21	2.2	96.1	あり	4.6
イヌ-10	50	1.4	77.1	あり	1.5
イヌ-11	21	1.6	24.1	あり	1.1
イヌ-12	84	1.6	30	あり	0.4
イヌ-13	64	5.4	91.3	あり	1.4

*[SDMA]/[CRE]>10およびSDMA>14 $\mu\text{g}/\text{dL}$

【0119】

それに続いて、イヌのコホートをモニタリングした。[SDMA] : [CRE]不調和を示すイヌにおいて、BAIBは、正常なカットオフ値より高く上昇した。[SDMA] : [CRE]不調和を示すイヌにおいて、[BAIB] / [SDMA]比は、不調和を示さないイヌに対して上昇した。追跡すると、[SDMA] : [CRE]不調和を示すイヌは、死亡と報告された。1.5より高い[BAIB] / [SDMA]の比を、腎機能障害および時期尚早の死亡のリスクを示すとして決定した。上昇した血清中BAIB濃度は、腎機能障害および時期尚早の死亡のリスクを示す。

【0120】

実施例6：がん患者におけるBAIBおよびSDMAの測定

BAIBおよびSDMAを、診療所にいる、様々ながんを有する7匹のイヌおよび6匹のネコの患者の血清で測定した。

【0121】

7匹のイヌのがん患者のうち、1匹のみ(C6)が、正常な参照範囲の上限(3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)より高いBAIBレベルを有した。イヌのがん患者C6は、転移性腎癌を有すると見出された、すなわち、C6は、がんが腎臓に広がっていた群の中で、唯一のイヌだった。

【0122】

6匹のネコのがん患者のうち、腎臓の病理組織学的な陽性所見(転移性腎癌、リンパ形質細胞性間質性腎炎、炎症、線維症)を有する3匹の患者は、参照範囲(2.0 $\mu\text{g}/\text{dL}$)より高いBAIBの上昇したレベルを有していた(F3、F4およびF5)。正常な腎臓の病理組織像を有する3匹の患者は、正常な参照内のBAIBレベルを有していた。

【0123】

10

20

30

40

50

【表6】

表6

種	患者ID	SDMA (ug/dL)	BAIB (ug/dL)	腎臓の病理組織像
イヌ	C1	10	1	所見なし
イヌ	C2	10	0	所見なし
イヌ	C3	11	1	所見なし
イヌ	C4	12	<0.39	正常な腎臓
イヌ	C5	16	1	異常な腎臓、多病巣性腎尿細管拡張(付帯所見)
イヌ	C6	17	59	転移性腎癌
イヌ	C7	8	0	リンパ形質細胞性間質性腎炎、多病巣性、炎症
ネコ	F1	12	1	所見なし
ネコ	F2	11	1	所見なし
ネコ	F3	15	41	転移性腎癌
ネコ	F4	11	32	線維症を有する炎症
ネコ	F5	17	18	粗面化し拡張した髄質;極めて肥大し炎症を起こした皮質
ネコ	F6	11	1	所見なし

10

20

【0124】

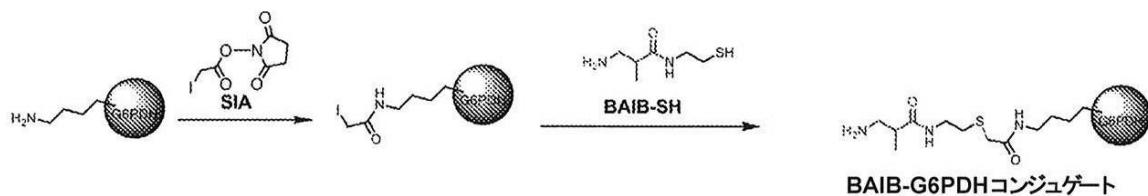
実施例7：BAIB-G6PDHコンジュゲートの調製

BAIBとG6PDHとのコンジュゲートを、NADおよびG6Pの存在下で、BAIB類似体SDMA-SHをSIA活性化G6PDHとコンジュゲートすることで調製した。

30

【0125】

【化5】



40

【0126】

SIAによる酵素予備活性化：1つのバイアルのグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(G6PDH)(12mg)を、3mLのMES緩衝液(50mM、pH8.0)に溶解し、1時間回転して、酵素を完全に溶解したことを確実にした。酵素溶液を、必要とされるまで氷上で保持した。追加の4.5mLのMES緩衝液(50mM、pH8.0)を、酵素溶液に添加し、ボルテックスでよく混合し(5秒間)、10分間氷上で溶

50

液を保持した。100 mgのG6Pを、1 mLの脱イオン水に溶解し、10分間氷上に置いた。200 mgのNADHを、1 mLの脱イオン水に溶解し、10分間氷上で保持した。0.68 mLのG6P溶液および0.34 mLのNADH溶液を、酵素溶液に添加し、ボルテックスでよく混合し(5秒間)、10分間氷上で溶液を保持した。1つのバイアルのSIA(50 mg)を、0.5 mLのDMSO(100 mg/mL)に溶解した。0.14 mLのSIA溶液を、酵素溶液に添加し、ボルテックスでよく混合し(5秒間)、アルミホイルで覆い、室温で2時間回転した。溶液を、G2 Slide-A-Lyzer透析カセットに移し、4の暗室で5時間、PBS緩衝液(4 L)に対して透析した。緩衝液を、新しいPBS(4 L)に交換し、溶液を4の暗室で一晩かけて透析した。透析緩衝液を、MES(4 L、25 mM、pH 8.0)に交換し、溶液を4で3時間透析した。12.5 mLの酵素溶液を、透析カセットから除去し、0.32 mLのMES緩衝液(1 M、pH 8.0)および0.32 mLのEDTA(0.2 M、pH 8.0)を添加して、溶液の最終濃度を50 mMのMESおよび5 mMのEDTAとした。必要ならば、酵素溶液が12.5 mL未満である場合、MESおよびEDTAの体積を、適宜に調整してもよい。溶液を、5分間アルゴンで脱気した。

10

【0127】

BAIB-SH類似体(カルボキシ末端)を、実施例12に記載の通り調製し、以下の通り活性化した酵素にカップリングした: BAIB-SH(400 eq、0.096 mmol、15.6 mg)を、水(0.156 mL)に溶解し、SIA活性G6PDH酵素溶液に添加した。反応物を4で36時間攪拌した。BAIB-G6PDHコンジュゲートを

20

【0128】

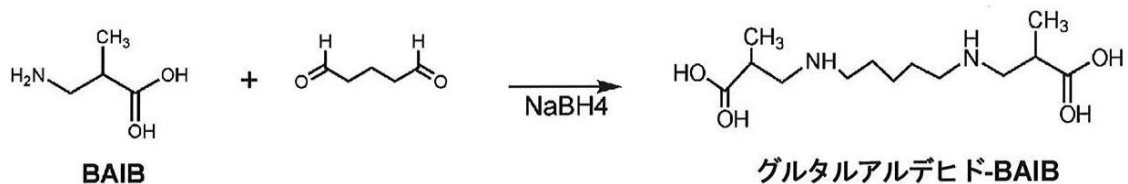
実施例8: グルタルアルデヒド-B A I Bコンジュゲートの調製

グルタルアルデヒド-B A I Bコンジュゲートを、20 mMのPBSおよび0.15 MのNaCl(5 mL、総計10 mg)中の2 mg/mLのBAIBと、25 μL(6.25 mg)の追加のグルタルアルデヒド(水中で25%)とで調製した。室温で1時間反応後、NaBH4(4 eqのBAIB、0.776 mmol、48 mg)を添加し、反応混合物を4で18時間攪拌した。

【0129】

30

【化6】



40

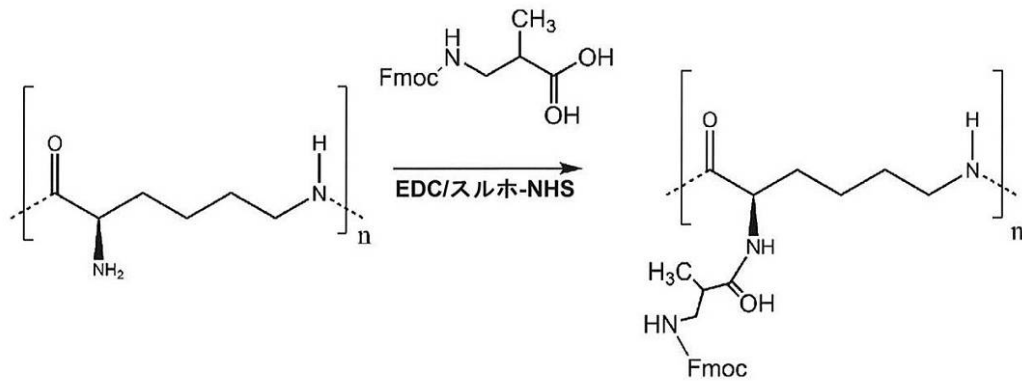
【0130】

実施例9: ポリリジン-B A I Bコンジュゲートの調製

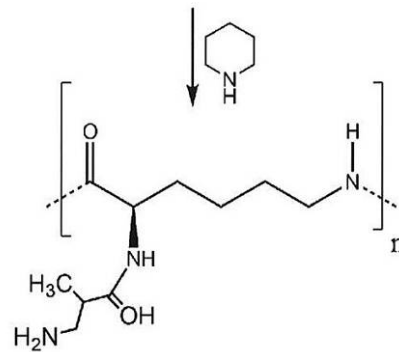
ポリリジン-B A I Bコンジュゲートを、以下の反応スキームに従って、水中の0.1 mg/mLの濃度に調製した。

【0131】

【化7】



10



20

ポリリジン-BAIBコンジュゲート

30

【0132】

Fmoc-BAIB (5 mg) を、水 (5 mL) に溶解し、EDC (2 mg) およびスルホ-NHS (3 mg) を添加した。溶液を、室温で15分間攪拌し、次いで、ポリリジン溶液 (20 mL、0.1%) を添加し、次いで、混合物を室温で3時間攪拌した。溶液を、ピペリジンに添加して最終濃度を20%とし、室温で少なくとも1時間インキュベートした。反応溶液を、次いで、4 で、10K MWCO透析カセット (30 mL) でPBS (4 L) に対して透析し、緩衝液を2回交換した。

【0133】

実施例10：粒子-BAIBコンジュゲートの調製

40

5%固体における0.4 mLの粒子を、2.8 mLの50 mMリン酸緩衝液中の、5 mg/mL濃度の0.8 mLのBAIBと混合し、4 で2日間回転させて混合した。

【0134】

実施例11：BAIB-チオール(アミン末端)およびBSAでコンジュゲートさせたBAIBの合成

例示的な免疫原であるBAIB(アミン末端)-BSAコンジュゲートを、下記の手順に従って調製した。

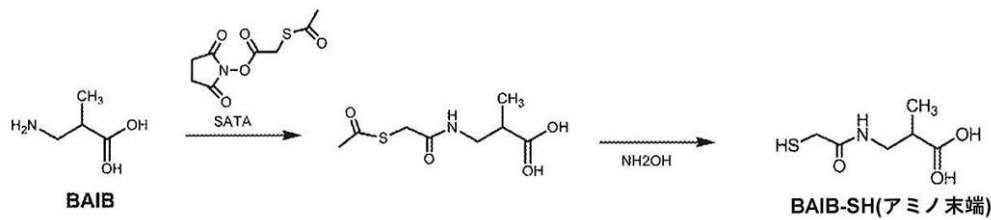
【0135】

まず、BAIB-SH類似体(アミノ末端)を、下記の反応スキームおよび下記の方法により調製した。

50

【 0 1 3 6 】

【化 8】



10

1. 22 mg (0.216 mmol) の BAIB (Sigma-Aldrich カタログ番号 217794) を、PBS (4 mL) に溶解した。

2. 50 mg (0.216 mmol) の SATA (N-スクシンイミジル S-アセチルチオ酢酸 - Thermo カタログ番号 PD199377) を、DMSO (0.4 mL) に溶解し、BAIB 溶液に添加した。

3. 反応は、20 で 30 分間、反転させた。

4. 反応を、次いで、脱アセチル化溶液 (PBS 中の 0.9 mL、0.5 M のヒドロキシルアミン、25 mM の EDTA、pH 7.3) で処理した。

20

5. 反応は、4 で 4 時間、反転させ、BAIB-SH (アミノ末端) を得た。

【 0 1 3 7 】

BAIB-SH を、以下の通り BSA にカップリングした：

1. 1 mL の反応溶液を、1 つのバイアルのマレイミド活性化 BSA (5 mg) (Sigma-Aldrich カタログ番号 054M4801V) に添加し、反応は、2 で 18 時間、反転させた。

3. コンジュゲートを 10 MW カットオフ、3 mL 透析カセット内に設置し、4 で 48 時間、PBS (4 L) に対して透析した。

4. カップリング効率を、当業者には公知の方法に従って、上記ステップ 6 から過剰なチオール溶液を使用して、エルマン試験によって決定した：10 μL のサンプル + 20 μL のエルマン試薬 + 70 μL の DTNB 緩衝液を、次いで、412 nm で読み取った。

30

【 0 1 3 8 】

実施例 12：BAIB-チオール (カルボキシ末端) と BSA コンジュゲートされた BAIB との合成

例示的な免疫原である BAIB (カルボキシ末端) - BSA コンジュゲートを、以下の手順に従って調製した。

【 0 1 3 9 】

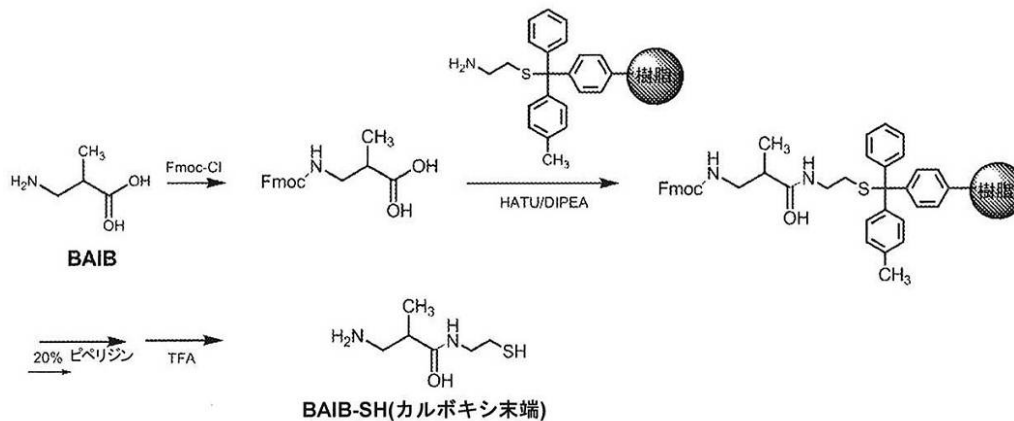
BAIB 樹脂の調製：

BAIB-SH 樹脂を、以下の一般的な反応スキームに従って、および下記のように調製した。

40

【 0 1 4 0 】

【化9】



10

1. 150 mg (0.28 mmol) の BAIB (Sigma-Aldrich カタログ番号 217794)、400 mg (0.31 mmol) の Fmoc-Cl (Fluka BCBH6153V)、0.41 mL (0.47 mmol) の DIPEA (Sigma-Aldrich カタログ番号 77996JJ)、および 18 mL の DMF (Sigma-Aldrich カタログ番号 23185) を含む混合物を、20 で 3 時間、反転させた。

20

2. 以下を、上記の混合物に添加した：1.2 g (0.093 mmol) の 4-メトキシトリチル樹脂 (Novabiochem S6013887 348) および 530 mg (0.28 mmol) の HATU (Novabiochem S8446513 309)。得られた溶液を、20 でさらに 18 時間、反転させた。

3. DMF 中の 20% ピペリジンを、次いで、添加し、15 分間反転させた (3 x 18 mL)。

3. インキュベーション後、樹脂を、DMF (4 x 18 mL)、次いで、MeOH (4 x 18 mL) で洗浄し、乾燥して 0.95 g の BAIB-SH 樹脂を得た。

30

【0141】

BAIB (カルボキシ末端) - BSA コンジュゲートの合成

1. 200 mg の BAIB-SH 樹脂を、4 mL の TFA (Sigma-Aldrich カタログ番号 91707) に添加した。

2. BAIB-TFA 混合物を、20 で 1 時間、反転させた。

3. 反応物を、乾燥して、20 mg の BAIB-チオール類似体を得た。

4. ステップ 3 からのチオールを、PBS (4 mL) に溶解した。

6. チオール溶液を、4 つのバイアルのマレイミド活性化 BSA (20 mg) (Sigma-Aldrich カタログ番号 054M4801V) に添加し、反応は、4 で 18 時間、反転させた。過剰な溶液を、エルマン試験のために保存した：10 μL のサンプル + 20 μL のエルマン試薬 + 70 μL の DTNB 緩衝液を、次いで、412 nm で読み取った。

40

7. コンジュゲートを 10 MW カットオフ、3 mL 透析カセット内に設置し、4 で 48 時間、PBS (4 L) に対して透析した。

8. カップリング効率を、当業者には公知の方法に従って、上記ステップ 5 から過剰なチオール溶液を使用して、エルマン試験によって決定した：10 μL のサンプル + 20 μL のエルマン試薬 + 70 μL の DTNB 緩衝液を、次いで、412 nm で読み取った。

【0142】

実施例 13：KLH コンジュゲートされた BAIB の合成

50

例示的な免疫原である B A I B (カルボキシ末端) - K L H コンジュゲートを、以下の手順に従って調製した：

1. 100 mg の B A I B - S H 樹脂 (上記、実施例 11 を参照されたい) を、2 mL の T F A (S i g m a - A l d r i c h カタログ番号 S H B D 1 5 3 7 V) に添加した。
2. B A I B - T F A 混合物を、20 で 1 時間、反転させ、樹脂を、濾別し、0.5 mL のアセトニトリルで洗浄した。
3. 反応を、乾燥して、15 mg の B A I B - S H を、澄んだ油として得た。
4. ステップ 3 からの油を、P B S (3 mL) に溶解して、B A I B チオール溶液を形成した。
5. 2 mL のチオール溶液を、10 mg のマレイミド活性化 K L H (S i g m a - A l d r i c h カタログ番号 0 7 2 M 4 7 9 6) に添加し、反応は、4 で 1 8 時間、反転させた。
6. コンジュゲートを 10 MW カットオフ、3 mL 透析カセット内に設置し、4 で 4 8 時間、P B S (4 L) に対して透析した。
7. カップリング効率を、当業者には公知の方法に従って、上記ステップ 5 から過剰なチオール溶液を使用して、エルマン試験によって決定した：10 μ L のサンプル + 20 μ L のエルマン試薬 + 70 μ L の D T N B 緩衝液を、次いで、412 nm で読み取った。

【 0 1 4 3 】

実施例 14：抗 B A I B ポリクローナル抗体を作製する方法

抗 B A I B ポリクローナル抗体を作製する免疫プロトコルを、当業者には周知の、以下のプロトコルに従って実施してもよい。ウサギを、例えば、上記の実施例 8 ~ 12 からの免疫原の 1 つ、または別の B A I B 特異的抗原で免疫する。それぞれの場合、例示的な免疫を、1 mL の完全フロイントアジュバントと混合された、1 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中の 0.5 mg の免疫原を注射することによって実施する。各動物の剃毛された背部に、20 ~ 30 回の皮内注射を行ってもよい。各動物の後ろ足に、等量の不完全フロイントアジュバントと混合された 1 mL の P B S 中の 0.25 mg の免疫原で追加免疫してもよい。追加免疫注射を、最初の注射後に各月に与えてもよい。各追加免疫の 7 ~ 10 日後に、各ウサギから試験採血の血液 5 mL を採取することができる。採血産物 40 mL を、3 回目の追加免疫注射後、抗血清力価が約 1 : 2000 より大きかった時、各ウサギから採取することができる。抗血清力価は、アッセイについての校正曲線の傾きが最も大きい、抗血清の希釈度である。

【 0 1 4 4 】

実施例 15：抗 B A I B モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体を生成する方法は、当該分野の技術内である。実施形態において、抗体は、グルタルアルデヒド - B A I B コンジュゲート、ポリリジン - B A I B コンジュゲート、B A I B (アミン末端) - B S A コンジュゲート、B A I B (カルボキシ末端) - B S A コンジュゲート、B A I B (アミン末端) - K L H コンジュゲート、または、B A I B (カルボキシ末端) - K L H コンジュゲートに対して生じたモノクローナル抗体である。抗体は、当業者に周知の方法を使用することによって、精製し、特徴付けられうる。

【 0 1 4 5 】

実施例 16：抗ウサギ B A I B 抗血清の調製

抗 B A I B 抗体特異性を、B A I B (アミン末端) - K L H コンジュゲートと B A I B (カルボキシ末端) - K L H コンジュゲートとの混合物に対して生じたウサギ抗 B A I B 血清を使用する結合アッセイにより示した。B A I B を量り、P B S、p H 7.4 で溶解して 1.0 mg / mL とし、さらに希釈して 50 μ g / mL とした。タンパク質 A (r P A) スラリーを、ウサギ抗 B A I B 抗血清によってインキュベートして、I g G を捕捉した。陰性対照において、タンパク質 A (r P A) スラリーを、P B S によってインキュベートした。インキュベーション後、600 μ L の r P A スラリーを、マイクロスピナラムに添加し、回転して液体を除去した。300 μ L の 50 μ g / mL の B A I B を、カラ

10

20

30

40

50

ムに添加し、25 で100分間インキュベートした。カラムを、次いで、回転し、フロースルーを集めた。フロースルーを、次いで、以下の通り、LC-MSによる分析で調製した。50 μ Lのフロースルーの各サンプルを、96ウェルのプレートにおいて、50 μ LのBAIB内部標準と混合し、次いで、20分間、3,000 \times gで遠心分離した。300 μ Lのアセトニトリルを、次いで、プレート内の各サンプルに添加し、プレートを、次いで、20分間超音波処理した。プレートを、次いで、20分間、3,000 \times gで遠心分離した。300 μ Lの上澄みを、次いで、96ウェルのプレートフィルター(0.45 μ m)に充填することによって濾過し、20分間、3,000 \times gで遠心分離した。濾過後、プレートを、次いで、4時間、SpeedVacで乾燥した。乾燥後、50 μ Lの20%アセトニトリル溶液を、各サンプルに添加した。サンプルを、次いで、LC-MS

10

【0146】

【表7】

表7

条件	元のBAIB	rPortAカラム	抗BAIB:rPortAカラム
初期BAIB ug	18.2	17.2	15.6
[BAIB]フロースルー		9.07	7.81
%フロースルー		49	43
%結合		51	57
%特異的な結合			6.6

20

【0147】

先に示した実施例は、例示的なものにすぎず、本発明のすべての可能な実施形態、応用、または変更形態の網羅的な列挙であることを意味するものではない。したがって、本発明の範囲および趣旨を逸脱することなく、上記の本発明の方法および系の種々の変更形態または変形物が、当業者に明らかである。本発明を、特定の実施形態と絡めて説明してきたが、特許請求している本発明を、そのような特定の実施形態に過度に限定すべきではないと理解すべきである。実際、本発明を実施するための上記の形態の種々の変更形態が、当業者に明らかである。

30

【0148】

本発明を、本明細書に記述した特定の方法、プロトコル、および試薬などに限定しないと理解されたい。なぜなら、それらは、当業者が認識するように変わりうるからである。本明細書で使用する用語は、特定の実施形態を記述するために使用するものにすぎず、本発明の範囲を限定していることを意図するものではないとも理解されたい。また、本明細書で使用する場合、および添付の特許請求の範囲において、単数形「1つの(a, an)」および「その(the)」は、文脈上特に明確な指示がない限り、複数の言及を含むことにも留意されたい。したがって、例えば、「1つのリンカー(linker)」への言及は、1つまたは複数のリンカー、および当業者に公知の等価物への言及である。

40

【0149】

別段の定義がない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が関係する技術分野の当業者に共通に理解されている意味と同じ意味を有する。本発明の実施形態および種々の特徴、ならびにそれらの有利な詳細を、非限定的な実施形態の参照

50

によってより十分に説明され、および/または添付図面で図示し、その後の説明で詳述する。図面に示した特徴は、必ずしも正寸ではなく、本明細書で明記されていなくても、当業者が認識するように、一実施形態の特徴を他の実施形態によって用いることができることに留意すべきである。

【0150】

本明細書に記述する任意の数値は、その低い値と高い値とが少なくとも2単位離れていれば、その低い値からその高い値まで1単位ずつ増えるすべての値を含む。一例として、ある成分の濃度、またはプロセスの変数の値、例えば、大きさ、角度、圧力、時間などが、例えば、1～90、詳細には20～80、より詳細には30～70と記載されていれば、15～85、22～68、43～51、30～32などの値を本明細書に明白に列挙していることを意図するものである。1未満の値の場合、1単位は、適宜0.0001、0.001、0.01または0.1であると考えられる。これらは、特に意図しているものの単なる一例にすぎず、列挙している最小の値から最高の値までの間の数値のすべての可能な組合せを、同じように本出願に明記しているものと考えられるべきである。

10

【0151】

特定の方法、装置、材料を記述するが、本明細書に記述するものと類似または同等の任意の方法および材料を、本発明の実施または試験において使用することができる。先に引用したすべての参考文献および刊行物の開示は、あたかも、それらそれぞれが、参照によって個々に組み込まれるように、参照によってそれら全体が本明細書に明らかに組み込まれる。

20

フロントページの続き

- (74)代理人 100149076
弁理士 梅田 慎介
- (74)代理人 100173185
弁理士 森田 裕
- (74)代理人 100162503
弁理士 今野 智介
- (74)代理人 100144794
弁理士 大木 信人
- (72)発明者 イェラミツリ, マハラクシュミ
アメリカ合衆国 04105 メイン州, ファルマウス, オールド オーク ウェイ 7
- (72)発明者 オバール, エドワード
アメリカ合衆国 04092 メイン州, ウェストブルック, スプリング ストリート 245,
ユニット 1
- (72)発明者 クウィン, ジョン ジョセフ
アメリカ合衆国 04105 メイン州, ファルマウス, ヘムロック レーン 9
- (72)発明者 イェラミツリ, マーシー, ヴィエスエヌ
アメリカ合衆国 04105 メイン州, ファルマウス, オールド オーク ウェイ 7

審査官 北条 弥作子

- (56)参考文献 国際公開第2015/035155(WO, A1)
特表2015-505965(JP, A)
国際公開第2013/115283(WO, A1)
Gejyo F, Elevation of serum levels of beta-aminoisobutyric acid in uremic patients and the toxicity of the amino acid, Clinical nephrology, 米国, 1977年, 8(6):520-525
Zeis PM, DNA degradation in the kidney of folic acid-treated guinea pigs, Cytobios, 米国, 2000年, 102(400):107-113

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)