

(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2008-528984

(P2008-528984A)

(43) 公表日 平成20年7月31日 (2008.7.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 Z N A D	4 H O 4 5
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 7 5	
<b>CO 7 K 14/575 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 1	
	CO 7 K 14/575	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2007-552570 (P2007-552570)	(71) 出願人	506352201
(86) (22) 出願日	平成18年1月25日 (2006.1.25)		スフィンゴテック・ゲーエムベーハー
(85) 翻訳文提出日	平成19年9月19日 (2007.9.19)		ドイツ・16556・ボルグスドルフ・ト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/000659		ウルベンヴェーク・6
(87) 国際公開番号	W02006/079528	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開日	平成18年8月3日 (2006.8.3)		弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号	102005003687.2	(74) 代理人	100089037
(32) 優先日	平成17年1月26日 (2005.1.26)		弁理士 渡邊 隆
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
		(72) 発明者	アンドレア・エルンスト
			ドイツ・16761・ヘンニヒスドルフ・
			ファルケンゼール・シュトラッセ・4
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 循環液へのニューロテンシンの放出を測定するためのイムノアッセイ

## (57) 【要約】

本発明は、哺乳類プロニューロテンシンのN-末端部分の免疫反応性 (PNT免疫反応性) であって、ニューロテンシンまたはニューロメジン免疫反応性ではない免疫反応性をテスト哺乳類の血清サンプルまたは血漿サンプルにおいて選択的に測定する、ニューロテンシンの哺乳類の循環液への放出を測定するための免疫診断測定方法に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

哺乳類の循環液へのニューロテンシンの放出を測定するための免疫診断アッセイ方法であって、哺乳類のプロニューロテンシンのN-末端部分の免疫反応性（PNT免疫反応性）をテスト哺乳類の血清サンプルまたは血漿サンプルにおいて選択的に測定し、前記免疫反応性が、ニューロテンシンまたはニューロメジン免疫反応性ではない、方法。

**【請求項 2】**

PNTのN-末端の部分配列に特異的に結合する抗体を用いて、血清サンプルまたは血漿サンプルにおいて、前記のPNTのN-末端部分の免疫反応性を測定する、請求項1に記載の方法。

10

**【請求項 3】**

PNTのN-末端部分の異なる部分配列に特異的に結合する2つの異なる抗体を使用したサンドイッチアッセイにおいて、血清サンプルまたは血漿サンプルにおける前記のPNT免疫反応性を測定する、請求項2に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記の哺乳類のプロニューロテンシンが、ヒトの血清または血漿において測定されるヒトのプロニューロテンシンである、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 5】**

完全なヒトのプレプロニューロテンシンのアミノ酸24から140の領域（配列番号6）中のヒトのプレプロニューロテンシン（配列番号1）のペプチド配列と連帯したPNTの免疫反応性を、選択的に測定する、請求項4に記載の方法。

20

**【請求項 6】**

前記の測定を、完全なヒトのプレプロニューロテンシン（配列番号1）のアミノ酸配列67から85（配列番号4）およびアミノ酸配列121から140（配列番号5）に特異的に結合する2つの抗体を用いたサンドイッチアッセイとして実施する、請求項4または5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記の抗体が、特異的なモノクローナルおよび/またはアフィニティ精製したポリクローナル抗体である、請求項2から6のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記の抗体の一方が、ヒトのプレプロニューロテンシン（配列番号1）のアミノ酸67から85（配列番号4）を含む合成ペプチド配列を含む抗原を用いた動物の免疫化によって得られ、前記の抗体の他方が、対応するアミノ酸121から140（配列番号5）を含む合成ペプチド配列を含む抗原を用いた免疫化によって得られる、請求項2から7のいずれか一項に記載の方法。

30

**【請求項 9】**

前記の抗体の一方が、固相に結合した形態で使用され、前記の抗体の他方が標識され、または選択的に標識可能である、請求項3から8のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

放射性同位体、または化学発光、生物発光、蛍光もしくは酵素標識を用いた標識を、前記の標識抗体または標識すべき抗体を標識するために使用する、請求項9に記載の方法。

40

**【請求項 11】**

一次抗体および二次抗体の両方を液体の反応混合液中に分散させて使用し、蛍光または化学発光の消光または増幅に基づく標識システムの一部である第1の標識コンポーネントが、一次抗体に結合し、この標識システムの第2の標識コンポーネントが、検出すべきプロニューロテンシンに対する両方の抗体の結合後に、測定溶液において得られたサンドイッチ複合体の検出を可能とする測定可能なシグナルを生じるように二次抗体に結合している、請求項3から8のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記の標識システムが、蛍光または化学発光色素、特にシアニンタイプの色素と組み合

50

わせた希土類クリプテートまたはキレートを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項 1 3】

イムノクロマトグラフィー測定装置の使用によるポイント-オブ-ケア方法として実施し、直接視覚的に検出可能なラベルを、標識のためのラベルとして使用する、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

患者の栄養状態および/または消化機能をモニターするために実施する、請求項1から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記の患者が、人工的に栄養が与えられている患者である、請求項14に記載の方法。

10

【請求項 1 6】

パーキンソン病、セリアック病、慢性炎症性腸疾患（クローン病または潰瘍性大腸炎）、腸癌または膵臓癌、膵炎、甲状腺疾患、嚢胞性線維症および肝炎から選択される疾患に罹患した患者のサンプルを使用した、診断、モニターリングまたは治療に関連して、前記の測定を実施する、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

バッファー溶液および洗浄溶液などの一般的な付属試薬に加えて、

- 固相に固定化した形態の、ヒトのプロニューロテンシンの部分配列に対して特異的な一次抗体を含む第1の免疫試薬、
- 可溶化し、標識化した形態の、ヒトのプロニューロテンシンの部分配列に対して特異的な二次抗体を含む第2の免疫試薬、および
- 特異的な一次および二次抗体についての結合部位を有する、規定量のペプチド調製物を含む標準キャリブレーション溶液

20

を少なくとも含む、請求項3から12および14から16のいずれか一項に記載の方法を実施するためのキット。

【請求項 1 8】

前記の固相が、テストチューブの壁であり、二次抗体が、化学発光標識によって標識されている、請求項17に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0 0 0 1】

本発明は、一般的な診断に適した、循環液へのペプチドニューロテンシンの放出を測定することを意図した方法に関する。

【0 0 0 2】

最初に、単純化の理由で、「診断」または「一般的な診断」のような用語は、本願明細書においては、概して、狭い意味での診断目的だけでなく、他の目的のために（例えば、診断目的の試験の開始前の、もしくは治療の開始前のテスト被検体の代謝状態の測定するため、または、病気もしくは治療手段の経過をモニターするための等の、比較的長い期間にわたって患者をモニターして観察するため）、生体分子の測定を含むことを企図する全体的な意味において使用するということを注意すべきである。研究目的で、例えば、ニューロテンシン受容体アゴニストなどの医薬の開発または栄養のための製品の開発と相まった研究目的での測定は、また、論じられるより具体的な関係のために具体的な場合を除外することを除き、用語「診断」に含まれる。

40

【0 0 0 3】

本出願における発明のより具体的な言及が具体的には人の医薬に関するものであったとしても、獣医の薬または動物育種の分野での適用も、また、原則的には含まれることも事実である。それゆえ、大部分の言及の、本発明の非-ヒトの哺乳類への適用は、過剰な説明の必要なく当業者には明白である。ヒトの医薬についてより詳細に開示された方法の、獣医の薬への類似の適用が、例えば、対応するペプチド配列が多く他の動物で知られていることから、追隨する。獣医への適用に加えて、例えば、市販の動物の飼料状態および

50

飼料利用をモニターすることとしての、哺乳類育種に関する適用も、考えられる。

【背景技術】

【0004】

ニューロテンシンは、ヒトを含む様々な哺乳類の様々な組織および循環液に存在するトリデカペプチドであり、その一次構造は、全ての哺乳類で同一であると考えられている。ニューロテンシンは、配列表において配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する。

【0005】

大部分の生物学的に活性なペプチドのように（5：カッコ内の数字の形態の参考文献は、添付の参考文献のリストに関する）、ニューロテンシンは、酵素によるプロセッシングによって、プレプロニューロテンシン（シグナル配列を有する）またはプロニューロテンシン（PNT：シグナル配列を有さない）と称される前駆体分子から形成される。ニューロテンシン（NT）に加えて、哺乳類のプレプロニューロテンシン/プロニューロテンシンは、更なる生物学的に活性なペプチド、ヘキサペプチドニューロメジンN（NMN：配列番号3）を含む。ニューロテンシン前駆体ペプチドは、とりわけ、イヌ、ウシおよびげっ歯類の組織から単離され、最終的にはヒトの組織からも単離された。成熟ペプチドNTおよびNMNは、異なる哺乳類で同一のアミノ酸配列を有するのに対して、異なる哺乳類種の前駆体分子、すなわち、プレプロニューロテンシンまたはプロニューロテンシンは、アミノ酸の数が異なる。それ故、ラットまたはウシのプレプロニューロテンシンは、例えば、169のアミノ酸しか有さないのに対して、ヒトのプレプロニューロテンシンは、170のアミノ酸を有する（17）。

10

20

【0006】

ヒトのプレプロニューロテンシンのヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、ちょうどイヌ（9）、ラット（17）およびウシ（17；後記の米国特許の図2における異なるプレプロニューロテンシン配列の比較も参照）のプレプロニューロテンシンのように、ここ数年で知られるようになった（配列番号1；米国特許第6,274,720号参照）。プレプロニューロテンシン（配列番号1）のアミノ酸1から23は、いわゆるシグナル配列を表す。

【0007】

プロニューロテンシンの発現は、最初に中枢神経系（CNS）、特定の腸内分泌細胞、いわゆる末端小腸におけるN細胞、および腸管を貫通する神経線維で生じる（13）。しかしながら、PNTおよびNTは、また、副腎組織および心臓組織でも検出された（24；23）。

30

【0008】

プロニューロテンシンから形成された生物学的に活性なニューロテンシン（NT）は、様々な哺乳類組織で検出され、多くの異なる機能と関連して論じられてきた。それ故、ニューロテンシンは、脳における神経伝達物質として主要な働きをし、鎮痛作用および体温調節作用を有する（6；8）。更にその上、NTは、神経伝達物質アセチルコリンおよびグルタミン酸の放出を調節し（19；18）、下垂体ホルモンの分泌を刺激し（29）、そして、ドーパミン神経伝達に影響を及ぼし（18）、このことにより、パーキンソン病との関連性が示唆されている（28）。

【0009】

消化管におけるニューロテンシンの分泌は、食物摂取によって刺激される（15）。食事後きわめて短い間に、顕著なNTの増加見られ、この増加は、何時間にわたって続く（14）。タンパク質およびグルコースと比較して、脂肪の摂取が、NT産生にもっとも強い影響をもたらすことを示すことができた（27）。ニューロテンシンは、明らかに、ある種の「満足因子」を表す、なぜならば、NTの分泌によって、食欲が抑制され、それゆえ、食物摂取が減少するからである（34）。脂肪過多の（太りすぎの）患者においては、NTの血漿濃度が、通常の体重のヒトと比較して減少しており、このことが、恐らく、増大した食欲および増大した食物摂取の原因である（35；4）。興味深いことに、喫煙者も、非喫煙者よりも、食事摂取後にNT濃度顕著に増大することが示された（26）。このことは、変化したニューロテンシン分泌が、増大した食欲の原因である可能性があり、そして、喫煙を止めた後に喫煙者だったヒトの頻度高く観察される体重増加の原因である可能性があることを指

40

50

摘している。

【0010】

消化管においては、ニューロテンシンは、インスリンおよびグルカゴンなどの膵臓ホルモンの分泌を刺激し、胃酸の分泌を阻害し、そして、大腸の運動性を刺激する(33)。NTは、膵臓、大腸および小腸組織などの消化管の増殖を促進し(12;36;10)、このことにより、NTが、これらの組織における腫瘍の形成に関与しているという仮説が引き起こしている。

【0011】

同じ前駆体ペプチドから形成される第二のペプチドであるニューロメジンN(配列番号3)は、あまり良くは特徴づけされていない。恐らくは、ニューロメジンNは、ニューロテンシンと類似の作用を有している、なぜならば、これら2つは、アミノ酸配列において類似性を有しており、そして、同じ受容体に結合するからである(33)。

10

【0012】

分子量によって画分を分離するためのHPLC手法と組み合わせた、NTまたはNMNの遊離のC末端に特異的であり、それ故、このような暴露したCOOH末端を有さずタンパク質的にプロセッシングを受けていないプロニューロテンシン形態を認識しない抗体を用いたラジオイムノアッセイを使用して、異なる組織抽出物を研究することによって、NTおよびNMNに加えて、不完全に切断された、いわゆるラージNTおよび/またはNMNペプチドも、組織依存的な方法で、PNTのプロセッシングにおいて形成されうることが見出された(7;13;25)。

20

【0013】

多くの研究が、様々な病気におけるニューロテンシンの形成または発生に関するものであり、これらの研究は、最初に、組織サンプルおよび組織抽出物を用いて実施されている。患者の血液サンプルにおけるニューロテンシンの測定に基づく研究に関しては、例えば、パーキンソン病の患者の血漿におけるニューロテンシンの濃度が、増加することが見出されていることに注意すべきである(30)。穀物グルテンに非耐性であるセリアック病の患者においては、絶食状態のコントロールのヒトと比較して、増加したニューロテンシンの濃度の増加が、血漿中で検出された(2)。膵炎の患者におけるニューロテンシンの血漿濃度は、健康なコントロールのヒトと比較して、食事後に増加する(22)。甲状腺疾患の場合は、顕著に低いニューロテンシンの濃度が、中枢の(または二次的な)甲状腺機能低下の患者の血漿において見出された(31)。二次的な甲状腺機能低下は、甲状腺ホルモンの分泌を制御する下垂体の領域の障害によって引き起こされる。一方、顕著により高いニューロテンシン濃度(31)が、コントロールと比較して、末端の(または一次的な)甲状腺機能低下または甲状腺機能亢進の患者の血液で見いだされた。一次的な甲状腺機能低下は、甲状腺そのものの機能障害によって引き起こされる。嚢胞性線維症の患者は、健康なコントロールのヒトよりも、食事摂取前および食事摂取の両方で、血漿中でニューロテンシンの濃度が高い(16;1;21)。

30

【0014】

血液中でのニューロテンシンの濃度は、常に、ラジオイムノアッセイタイプのアッセイを使用して測定されてきた。このアッセイにおいては、ニューロテンシンまたは遊離のニューロテンシンの特定の部分配列(例えばニューロテンシンの遊離のC末端)を特異的に結合する1つの抗体の結合部位についての、サンプル中の測定すべきニューロテンシンと添加した標識ニューロテンシンまたはニューロテンシンフラグメントとの競合を測定している。NMN濃度の測定は、類似の方法で実施されていた。

40

【0015】

特定の病気の場合におけるニューロテンシンの発生についての前記の類似の結果により、食物摂取の機能としてニューロテンシンの形成を刺激する実証された可能性についての前記の類似の結果により、そしてまた、特定の病理状態で顕著に異なることが証明した前記の類似の結果により、血液サンプル中のニューロテンシンの測定は、基本的に前途有望であり臨床的に用途の広い診断ツールとなる。それ故、例えば、患者の通常の研究において、臨床ケアの間のモニターリングのために、食物を利用する能力のモニターリングのた

50

めに、腸の機能のモニターリングのために、または、治療の成功をモニターリングするための治療を伴う測定だけでなく、前記した科学文献の考察に起因する他の状況において、このような測定を使用することは可能であると思われる。

【特許文献1】米国特許第6,274,720号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

しかしながら、血液サンプルにおけるニューロテンシンの測定は、現在のところ、通常の医療診断には採用されていない。この第一の理由が、*ex vivo*血液サンプルにおける周囲温度でのニューロテンシン濃度の安定性が、通常の測定にとっては極めて低いことである（20）（3から4時間しか半減期を有しない）。このことが、（サンプリング、血漿の回収、対応する研究試験の実施までに研究室への運送という）存在する研究室の複雑な実行性とともに、今までのところ、通常の診断における、ニューロテンシンの使用を妨げている。第二の理由は、*in vivo*血液で、2から6分のみという短い半減期であることが知られているからである。このことは、ニューロテンシン受容体への結合および/またはニューロテンシンの分解が迅速で効率的であることが原因であり（3）、そして、潜在的に見積もりが困難である時間依存的に、測定を困難なものとする。血液サンプルにおける瞬間的に測定可能なNTの濃度は、測定時間までの、刺激（例えば食物の供給）の結果としての、全体的なNTの生合成および循環液へのNTの放出の測定ではなく、むしろ、受容体への結合および分解によるNT除去がその生合成および循環液への放出についての情報を大いに薄めてしまう、ランダムな暫定的な状態を表す。

【課題を解決するための手段】

【0017】

本願の目的は、テスト哺乳類（特にヒト患者）サンプルにおけるニューロテンシン放出を測定できることを提供することである。この測定は、通常の使用に適し、医療的診断に関するニューロテンシン放出の測定についての前記で概要した有効性を利用することが可能となり、そして、医学/臨床の決められた方法としての実施が可能となる。

【0018】

この目的は、ニューロテンシンの哺乳類循環液への放出を測定する免疫診断的なアッセイ方法によって達成される。この方法は、請求項1に記載の最も一般的な形態においては、哺乳類のプロニューロテンシンのN-末端部分の免疫反応性（PNT免疫反応性）を、テスト哺乳類の血清サンプルまたは血漿サンプルにおいて選択的に測定することの特徴とする。前記免疫反応性は、ニューロテンシンまたはニューロメジンNの免疫反応性ではない。

【0019】

このような方法の有利な進歩は、本明細書の好ましい実施態様の言及とともに、請求項2から16によって再構築される。

【0020】

本発明の目的は、更に、請求項1に記載のこのような方法の好ましい実施態様のためのキットによって、請求項17および18に記載されているように達成される。

【0021】

以下に、本発明に基づく新規な発見、および誘導される発明の応用を、具体的な試験結果および図を参照に、より詳細に説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

「哺乳類のプロニューロテンシンのN-末端部分の免疫反応性」とは、それぞれの哺乳類プレプロニューロテンシンの部位24のアミノ酸から（シグナルペプチド後が部位1となる）、それぞれの哺乳類プレプロニューロテンシンのニューロメジンNの最初のアミノ酸（Lys）の3つ前のアミノ酸までのアミノ酸領域に位置する免疫反応性を意味する。全ての既知の場合において、対象とする領域は、少なくともアミノ酸24から139または140のそれぞれ、すなわち、配列番号6のヒトペプチドで示す配列を少なくとも含む。

## 【 0 0 2 3 】

血液サンプルまたは血清サンプルまたは血漿サンプルにおける、ヒトのプロニューロテンシンのN-末端部分（特に、NMNもNTも含まず、フリーのNMNまたはNTの形成をもたらすタンパク質プロセッシングにおいて除去され、その後、不用品の一種となる部分）にアサイメントされた免疫反応性の測定において、NTの発生が生じた場合に文献データに対応する再現性ある結果が、得ることができるかという問題点を調べるために、PNTのこのN-末端に特異的なサンドイッチアッセイ（実施例において、より詳細に開示する）を開発した。このアッセイは、ヒトのプレプロニューロテンシンのアミノ酸67から85およびアミノ酸121から140の両方を含むヒトPNTのN-末端ペプチドのみを、特異的に認識する。

## 【 0 0 2 4 】

このアッセイを使用したヒトの血液サンプルの測定（以下により詳細に記す）により、発生および動態によるNTの形成/放出を反映するPNT免疫反応性が測定されたことが示された。

## 【 0 0 2 5 】

比較的に長い期間、室温で保存した血液サンプルに由来する血清サンプルおよび血漿サンプルの繰り返した測定の場合、更にその上、血漿ex vivoでのPNT免疫反応性の安定性が、驚くほどに高いことが見出された。免疫反応性の認識可能なロスは、7日後でさえ検出されなかったもので、室温での半減期は、7日よりもはるかに長く、それゆえ、成熟ニューロテンシンのex vivo安定性（cf. 3）、および、大きくて不完全にプロセッシングを受けたプロニューロテンシンペプチドの1つのex vivo安定性を超えるものである。

## 【 0 0 2 6 】

安定性測定の結果を図1に示す。

## 【 0 0 2 7 】

それ故、血液サンプルにおけるプロニューロテンシンまたはPNR断片の測定は、完全に、日常的な使用に適合し、日常的な医療診断に利用可能な血液におけるNT/NMN/PNT放出速度を求めるのに適する。

## 【 0 0 2 8 】

使用したアッセイの調製、測定におけるその使用、および得られた測定結果を、実験セクションおよび実施例および関連する説明において、より詳細に開示する。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 2 9 】

（実験セクション：N-末端プロニューロテンシン配列にアサイメントされた免疫反応性の測定）

< 1 . 抗体の調製 >

< 1 . 1 . 免疫原 >

人のプレプロニューロテンシン（配列番号1）の2つの異なるペプチド部分配列、すなわちPNT3（配列番号4）およびPNT4（配列番号5）を選択し、Jerini(Berlin, Germany)によって合成ペプチドとして合成した。加えて、それぞれのペプチドを、アミノ-末端システイン残基（Cys0）を用いて提供した。

## 【 0 0 3 0 】

< 1 . 2 . 抗体回収 >

免疫化目的のために、N-末端システイン残基を補ったペプチドPNT3（配列番号4）およびPNT4（配列番号5）を、Limulus polyphemusに由来するヘモシアニンとコンジュゲートさせ、ウサギを免疫化するための標準方法に従って使用し、PNTペプチドコンジュゲートに対する抗血清を得た。

## 【 0 0 3 1 】

< 1 . 3 . 抗体の精製 >

ウサギ抗血清のポリクローナル抗体を、リガンド特異的アフィニティ精製によって精製した。この目的のために、Cys(0)-ペプチドPNT3（配列番号4）およびPNT4（配列番号5）を、Pierce(Boston, USA)によって供給されたSulfoLinkゲルへと結合した。結合は、製造

10

20

30

40

50

者の方法に従って、以下のように実施した：

ポリカーボネートカラム（15mm×80mm）を、5mlのアフィニティマトリクスで満たした。カラムをPBS（136mM NaCl、1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、20.4mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・2H<sub>2</sub>O、2.7mM KCl、pH7.12）を用いて平衡化した後、5mgのそれぞれの前記ペプチドを秤量して、PBSで溶かしてクローストカラムに加え、ゲル物質を緩やかに攪拌することによって均一にした。室温での15分間のインキュベーションおよびゲル物質の堆積後、カラムを5回3mlのPBSを用いて洗浄した。フリーの結合部位を飽和させるために、5mlの50mM L-システイン溶液を、それぞれの場合に、カラムに加え、均一になった後、ゲル物質を再度15分間室温でインキュベートした。ゲル物質が堆積後、それぞれのカラムを、5mlの1M NaCl溶液で6回洗浄し、その後、PBSを用いて洗浄した。

10

#### 【0032】

ゲル物質を、25mlのそれぞれのウサギ抗血清プールと混合し、緩やかに攪拌することによって室温で一晩インキュベートした。血清-ゲル混合物を、ポリカーボネートカラムに加え、余分な血清を除去した。その後、カラムを250mlのPBSを用いて洗浄し、非結合の血清タンパク質を除去した。結合抗体の脱離は、50mMクエン酸(pH2.2)を用いたカラムの溶出によって実施した。溶出液を1mlのフラクションに回収した。各フラクションのタンパク質濃度を、Perbio(Bonn, Germany)のBCA-タンパク質アッセイキットを使用して求め、>1mg/mlのタンパク質含量を有するフラクションをまとめた。アフィニティ精製した抗体を、PBSを用いた透析により再緩衝化し、タンパク質含量を再度測定した。その後、4 で保存した。

20

#### 【0033】

##### < 2 . アッセイ調製 >

##### < 2 . 1 . 固相 >

ペプチドPNT3に対するアフィニティ精製したポリクローナルウサギ抗体を、ポリスチロールチューブ（Startube、12mm×75mm、Greiner、Germany）に固定した。この目的のために、抗体溶液を、PBSを用いてタンパク質濃度が6.7μg/mlになるように希釈し、各チューブ当たり300μlをピペティングした（チューブ当たり2μgの抗体に対応）。これらを室温で24時間インキュベートし、その後、それぞれを4mlのPBSで3回洗浄した。更なる使用まで、チューブを4 で保存した。

30

#### 【0034】

##### < 2 . 2 . 標識した抗体 >

PNT4に対するアフィニティ精製したポリクローナルウサギ抗体（PBS中で1mg/ml）を、アクリジニウムエステル-N-ヒドロキシ-スクシンイミド（アセトニトリル中で1mg/ml、Invant、Hennigsdorf、Germany）を用いて、発光標識した。標識のために、200μlの抗体を、4μlのアクリジニウムエステルと混合し、20分間インキュベートし、フリーのアクリジニウムエステル結合を、40μlの50mMグリシン溶液を加えることによって飽和させた。標識したパッチを、BioSil 400-ゲルろ過カラム（BioRad、Munich、Germany）を用いたHPLCによって、フリーのアクリジニウムエステルと分離した。PBSを、溶媒として使用した。

#### 【0035】

##### < 3 . PNT測定の実施 >

##### < 3 . 1 . 測定条件 >

試験する50μlの血漿サンプルおよび150μlのアッセイバッファー（PBSバッファー、10mM EDTA）を、抗体-コーティングチューブ（2 . 1 . ）にピペティングし、16時間室温でインキュベートした。その後、チューブを、1mlのPBSを用いて5回洗浄した。20ngの標識抗体（2 . 1 . ）（100μlのPBSバッファー、10mM EDTA）を、その後、各チューブに加えた。チューブを2時間室温でインキュベートし、非結合のトレーサー抗体を、1mlのPBSを用いて5回洗浄することによって除去した。

40

#### 【0036】

チューブに結合した標識抗体を、市販のルミノメーター（Berthold LB 952T/16）での発光測定を使用して定量した。

50



## 【 0 0 3 7 】

## &lt; 3 . 2 . キャリブレーション &gt;

測定するサンプルにおけるプロニューロテンシンの濃度または免疫反応性を測定することができるために、明らかに健康なヒトの50のEDTA血漿を、PNTについてスクリーニングし、最も高いPNT免疫反応性を有する血漿をプールした。この血漿プールから、ウマ血清 (Sigma, Germany) を用いて、多くの希釈サンプルを産生した。仮の濃度100ユニット/mlを、最も高いスタンダードとした (希釈を行わなかったEDTA血漿)。図2は、PNT標準曲線を示す。プロニューロテンシンアッセイの分析的な検出感度は、約1U/mlである。

## 【 0 0 3 8 】

## &lt; 4 . 測定の結果 &gt;

10

## &lt; 4 . 1 . 明らかに健康なヒトの血漿におけるプロニューロテンシン免疫反応性 &gt;

明らかに健康なコントロールのヒトは、血液中に、高いPNT測定値を有している。その度数分布を図4に示す。その中央値は、35.1U/mlと測定された。

## 【 0 0 3 9 】

## &lt; 4 . 2 . 食物摂取の間および食物摂取の後での、健康なテスト被検体の循環液におけるPNT免疫反応性の測定 &gt;

ニューロテンシンの形成または放出は、食物摂取によって刺激されることが知られている (15 ; 14)。血液中のPNT濃度も食物摂取によって影響を受けるか、そして、PNT免疫反応性の変化の動態が前記のNT濃度と並行して進むかどうかを求めるために、以下の試験を実施した：6人のテスト被検体 (3人は男性のヒトで3人は女性のヒト) を14時間断食させた。その後、テスト被検体が、一定量の液体または食物を特定の時間に摂取し、そして、血液サンプルを特定の時間に採取した。試験の経過を、表1に要約する。

20

## 【 0 0 4 0 】

【表 1】

表 1：食物刺激テストの経過

サンプリングポイント	栄養状態
1	14 時間の断食後
2	15 時間の断食後
3	液体（11 の水）摂取後 5 分
4	液体摂取後 15 分
5	液体摂取後 45 分
6	液体摂取後 1 時間 15 分
7	液体摂取後 1 時間 45 分
8	液体摂取後 3 時間
9	食物摂取後 5 分 (約 250kcal のサラダおよび約 100kcal のピザ)
10	食物摂取後 15 分
11	食物摂取後 30 分
12	食物摂取後 1 時間
13	食物摂取後 2 時間
14	食物摂取後 3 時間
15	食物摂取後 4 時間

10

20

30

## 【 0 0 4 1 】

PNTの分泌は、液体の摂取によっては刺激されないことが見出された。食物摂取の直前、すなわち、最も長い断食事間の後で、PNT濃度が最も低くなった。この値を、各個人のテスト被検体について100%と定義し、各テスト被検体の全ての他の測定は、この値に基

40

## 【 0 0 4 2 】

前記したアッセイで測定することができ、使用した2つの抗体についての結合部位を有する1つまたは複数のN-末端プロニューロテンシン断片と連帯した免疫反応性が、成熟ペプチドNTについて記載されているように、食物摂取の刺激が原因となって増加した。

## 【 0 0 4 3 】

それゆえ、PNT免疫反応性の測定は、患者/テストを受けるヒトの代謝状態を評価するた

50

めに、成熟ニューロテンシンの代わりに使用することができる。一定量の栄養を投与することによって、PNT放出の個々の刺激性は、食物摂取後の特定時間での測定値と、基礎値との間の差異（例えば、PNT<sub>食物摂取後3時間</sub>およびPNT<sub>断食</sub>）として、またはこのような値の比率もしくは係数として測定することができる。表2は、実施例による対応する評価を示す。

【0044】

【表2】

表2：食物刺激前後でのPNT免疫反応性（U/ml）および絶対差および係数

	テスト 被検体 1	テスト 被検体 2	テスト 被検体 3	テスト 被検体 4	テスト 被検体 5	テスト 被検体 6
PNT <sub>基礎</sub>	10.5	2.3	4.8	5.0	5.7	5.8
PNT <sub>5分</sub>	32.3	10.7	9.6	23.0	27.1	15.5
PNT <sub>5時間</sub>	42.4	18.4	20.0	22.7	41.5	40.6
$\Delta$ PNT <sub>5分</sub> マイナス PNT <sub>基礎</sub>	21.8	8.45	4.8	18.0	21.4	9.7
$\Delta$ PNT <sub>3時間</sub> マイナス PNT <sub>基礎</sub>	31.9	16.1	15.2	17.7	35.8	34.8
PNT <sub>5分</sub> /PNT <sub>基礎</sub>	3.1	4.7	2	4.6	4.8	2.7
PNT <sub>3時間</sub> /PNT <sub>基礎</sub>	4.0	8	4.2	4.5	7.3	7

表中における、記号の意味を以下に示す。

PNT<sub>基礎</sub>：18時間の断食後のPNT免疫反応性（基礎値）

PNT<sub>5分</sub>：食物摂取後5分でのPNT免疫反応性

PNT<sub>3時間</sub>：食物摂取後3時間でのPNT免疫反応性

【0045】

< 4.3. 人工的に栄養を与えた患者の循環液中のPNT濃度の測定 >

既に示したように、健康なヒトの血液中のPNT濃度は、食物摂取によって刺激を受けることができる。非経口的手段（静脈カテーテルによる）で人工的に栄養を与えられ、一般的に集中治療を受ける（例えば、現存する敗血症または多発外傷）患者の血漿におけるPNT免疫反応性の対応する測定においては、通常に栄養を摂取するコントロールよりも顕著に低いPNTを有することが見出された。このような測定においては、相対的なPNT免疫反応性の中央値は2.7U/mlであり、係数が13より低いことが見出された（図4参照）。

【0046】

< 4.4. 炎症性腸疾患（クローン病または潰瘍性大腸炎）の患者の循環液におけるPNT免疫反応性の測定 >

クローン病または潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患の患者のサンプルの測定においては、ここでも、測定可能なPNT免疫反応性の中央値である10U/mlは、コントロールのヒトの値よりも低いことが見出された（図5）。しかしながら、患者の中の個体によっては、実質的により高い測定値を示した（100U/mlより高い値）。

【0047】

< 4.5. A型またはC型肝炎の患者の循環液におけるPNT免疫反応性の測定 >

一方、A型またはC型肝炎の患者のサンプルの測定においては、循環液に、健康なコント

ロールと比較して、112U/mlというより高いPNT濃度が見出された（図5）。

【0048】

< 5 . ヒト血清中の免疫反応性プロニューロテンシンの単離および特徴 >

< 5 . 1 . アフィニティカラムの調製 >

PNT3ペプチド（配列番号4；1.1.参照）に対する5mgの精製したウサギポリクローナルを、製造者の方法に従って、2mlのCarboLinkゲル（Pierce、Boston、USA）に結合し、ポリカーボネートカラム（15mm×80mm）に移した。その後、ゲルを、20mlのPBSで洗浄した。

【0049】

< 5 . 2 . 免疫反応性PNTのアフィニティ精製 >

32U/mlの相対濃度を有する10の個体血清100mlを含む混合した血清サンプルを、Na EDTA（最終濃度10mM）と混合し、その後、0.2μmフィルターでろ過した。調製した混合血清サンプルを4、流速2ml/minで、六回連続して、アフィニティカラムにアプライした。その後、カラムを50mlのPBSで洗浄し、結合した免疫反応性PNTを、50mMのグリシン/HCl溶液（pH2.0）で溶出させた。カラム溶出液を、280nmの吸光度で連続してモニターし、グリシン/HCl溶液によって溶出したタンパク質フラクション（最終容量3ml）を、さらにHPLC手法によって分析した。

【0050】

< 5 . 3 . 逆相HPLC分析 >

アフィニティ精製によって得られた物質を、Waters(Eschborn, Germany)のC<sub>18</sub>カラムμBondapak 0.4×30mmを用いた逆相HPLCによって精製した。流速は、1ml/minとした。使用した移動相および溶出条件を、以下の表3に示す。

【0051】

【表3】

表3：プロニューロテンシン-IRのRP-HPLCの溶出条件

移動相 A: 5% アセトニトリル 20 mM 酢酸アンモニウム		
移動相 B: 90% アセトニトリル 20 mM 酢酸アンモニウム		
グラジエント	0.0 分 2.5 分 5.0 分 55.0 分 60.0 分	100% A / 0% B 100% A / 0% B 89% A / 11% B 30% A / 70% B 0% A / 100% B

【0052】

カラム溶出液を、連続して215nmの吸光度で測定し、0.5mlのフラクションに回収した。前記のセクション2、および3、で記載したPNTアッセイを用いて、PNT免疫反応性を検出することができたフラクションを求めた。主な免疫反応性は、フラクション67に溶出されたことが見出された。

【0053】

ポジティブなPNT免疫反応性を有するフラクション67を、窒素ガスを用いた処理によって乾燥させた。その後、質量分析によって、サンプルを分析した。

## 【 0 0 5 4 】

## &lt; 5 . 4 . 質量分析 &gt;

ペプチドを、プロテアーゼGlu-Cまたはトリプシンによって分解し、得られたフラグメントを、SMART HPLCによってそれ自身知られた方法で得て、その後、質量分析によって詳細に調べた。

## 【 0 0 5 5 】

質量分析においては、完全に、既知のプレプロニューロテンシン1 - 170 (配列番号1) のアミノ酸24 - 140の配列と完全に一致した配列 (配列番号6) が求まった。それ故、117個のアミノ酸を含み、プレプロニューロテンシン24-140として分解されるプロニューロテンシンペプチドが、ヒトの血液中で循環していることが示された。前記の方法によって免疫反応性として求めた物質が、C末端成熟ペプチドであるニューロメジンNおよびニューロテンシンを含むことは全く指摘されなかった。

10

## 【 0 0 5 6 】

## [参考文献]

1. ALLEN J. M., PENKETH A. R., ADRIAN T. E., LEE Y. C., SARSON D. L., HODSON M. E., BATTEN J. C., BLOOM S. R. (1983). Adult cystic fibrosis: postprandial response of gut regulatory peptides. *Gastroenterology* 85: 1379-1383
2. BARDELLAM T., FRAQUELLI M., PERACCHI M., CESANA B. M., BIANCHI P. A., CONTE D. (2000). Gastric emptying and plasma neurotensin levels in untreated celiac patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 35:269-73
3. BARELLI H., FOX-THRELKELD J. E., DIVE V., DANIEL E. E., VINCENT J. P., CHECLER F. (1994). Role of endopeptidase 3.4.24.16 in the catabolism of neurotensin, in vivo, in vascularly perfused dog ileum. *British Journal of Pharmacology* 112: 127 + 132 10
4. BECK B. (2000). Neuropeptides and obesity. *Nutrition* 16: 916-923
5. BEINFELD M. C. (1998). Prohormone and proneuropeptide processing. Recent progress and future challenges. *Endocrine* 8:1-5
6. BISSETTE G., NEMEROFF C. B., LOOSEN P. T., PRANGE A. J. JR., LIPTON M. A. (1976). Hypothermia and intolerance to cold induced by intracisternal administration of the hypothalamic peptide neurotensin. *Nature* 262:607-9 20
7. CARRAWAY R. E., MITRA S. P., SPAULDING G. (1992). Posttranslational processing of the neurotensin/neuromedin-N precursor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 668:1-16
8. CLINESCHMIDT B. V., MARTIN G. E., VEBER D. F. (1982). Antinocisponsive effects of neurotensin and neurotensin-related peptides. *Annals of N Y Acadademy Sciences* 400:283-306
9. DOBNER P. R., BARBER D. L., VILLA-KOMAROFF L., MCKIERNAN C. (1987). Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor. *PNAS USA* 84: 3516-3520 30
10. EVERS B. M., IZUKURA M., CHUNG D. H., PAREKH D., YOSHINAGA K., GREELEY G. H. JR., UCHIDA T., TOWNSEND C. M. JR., THOMPSON J. C. (1992). Neurotensin stimulates growth of colonic mucosa in young and aged rats. *Gastroenterology* 103:86-91
11. FERRARO L., TANGANELLI S., O'CONNER W. T., BIANCHI C., UNGERSTEDT U., FUXE K. (1995). Neurotensin increases endogenous glutamate release in the neostriatum of the awake rat. *Synapse* 20: 362-364 40
12. FEURLE G. E., MULLER B., RIX E. (1987). Neurotensin induces hyperplasia of the pancreas and growth of the gastric antrum in rats. *Gut* 28 Suppl:19-23

13. FRIRY C., FELICIANGELI S., RICHARD F., KITABGI P., ROVERE C. (2002). Production of recombinant large proneurotensin/neuromedin N-derived peptides and characterization of their binding and biological activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 1161-1168
14. GULLO L., PEZZILLI R., TOMASSETTI P., DE GIORGIO R. (1998). Plasma cholecystokinin and neurotensin after an ordinary meal in humans. A prolonged study. *Gastroenterological and Clinical Biology* 22: 25-28
15. HAMMER R. A., CARRAWAY R. E., LEEMAN S. E. (1982). Elevation of plasma neurotensinlike immunoreactivity after a meal. *Journal of Clinical Investigation* 70: 74-81
16. HERZIG K. H., DOMAGK J., NUSTEDE R., STERN M., BEWIG B., CICHY W. K., FOLSCH U. R. (1997). Plasma concentrations of cholecystokinin and neurotensin in patients with cystic fibrosis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 32: 315-319
17. KISLAUSKIS E., BULLOCK B., MCNEIL S., DOBNER P. R. (1988). The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences. *Journal Biological Chemistry* 263: 4963-4968
18. KITABGI P. (1989). Neurotensin modulates dopamine transmission at several levels along brain dopaminergic pathways. *Neurochemistry International* 14: 111-119
19. LAPCHAK P., ARAUJO D. M., QUIRION R., BEAUDET A. (1990). Neurotensin regulation of endogenous acetylcholine release for rat cerebral cortex: effect of quinolinic acid lesions of the basal forebrain. *Journal of Neurochemistry* 55: 1397-1403
20. LEE Y. C., UTTENTHAL L. O., SMITH H. A., BLOOM S. R. (1986). In vitro degradation of neurotensin in human plasma. *Peptides* 7: 383-387
21. MURPHY M. S., BRUNETTO A. L., PEARSON A. D., GHATEI M. A., NELSON R., EASTHAM E. J., BLOOM S. R., GREEN A. A. (1992). Gut hormones and gastrointestinal motility in children with cystic fibrosis. *Digestive Diseases and Sciences* 37: 187-192
22. NUSTEDE R., KOHLER H., FOLSCH U. R., SCHAFMAYER A. (1991). Plasma concentrations of neurotensin and CCK in patients with chronic pancreatitis with and without enzyme substitution. *Pancreas* 6: 260-265
23. REINECKE M., WEIHE E., CARRAWAY R. E., LEEMAN S. E., FORSSMANN W. G. (1982). Localization of neurotensin immunoreactive nerve fibres in the guinea-pig heart: evidence derived by immunohistochemistry, radioimmunoassay and chromatography. *Neuroscience* 7: 1785-1795
24. ROKAEUS A., FRIEDG., LUNDBERG J. M. (1984). Occurrence, storage and release of neurotensin-like immunoreactivity from the adrenal gland. *Acta Physiology Scandinavia* 120: 373-80

10

20

30

40

25. ROVERE C., BARBERO P., MAORET J.-J., LABURTHE M., KITABGI P. (1998). Pro-neurotensin/neuromedin N expression and processing in human colon cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246: 155-159
26. RÖKAEUS A., THOR K., ROSELL S. (1984). Cigarette smoking potentiates fat-induced elevation of neurotensin-like immunoreactivity in human plasma. *Acta Physiologica Scandinavica* 121: 181-184
27. ROSELL S., RÖKAEUS A. (1979). The effect of ingestion of amino acids, glucose and fat on circulating neurotensin-like immunoreactivity. *Acta Physiologica Scandinavica* 107: 263-267
28. ROSTENE W., BROUARD A., DANA C., MASUO Y., AGID F., VIAL M., LHIAUBET A. M., PELAPRAT D. (1992). Interaction between neurotensin and dopamine in the brain. Morphofunctional and clinical evidence. *Annals N Y Academy Sciences* 668:217-31
29. ROWE W, VIAU V, MEANEY MJ, QUIRION R. (1992). Central administration of neurotensin stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal activity. The paraventricular CRF neuron as a critical site of action. *Annals N Y Academy Sciences* 668:365-7
30. SCHIMPF R.-M., AVARD C., FENELON G., LHIAUBET A.-M., TENNEZE L., VIDAILHET M., ROSTENE W. (2001). Increased plasma neurotensin concentrations in patients with parkinson's disease. *Journal of Neurological and Neurosurgical Psychiatry* 70: 784-786
31. SCHIMPF R. M., GOURMELEN M., SCARCERIAUX V., LHIAUBET A. M., ROSTENE W. (1995). Plasma neurotensin levels in humans: relation to hormone levels in diseases involving the hypothalamo-pituitary-thyroid axis. *European Journal of Endocrinology* 133: 534-538
32. STROUD RM, WALTER P. (1999). Signal sequence recognition and protein targeting. *Current Opinion Structure Biology* 9:754-9
33. VINCENT J. P. (1995). Neurotensin receptors: binding properties, transduction pathways, and structure. *Cellular Molecular Neurobiology* 15:501-12
34. WILDING J. P. (2002). Neuropeptides and appetite control. *Diabetic medicine* 19: 619-627
35. WISEN O. BJORVELL H., CANTOR P., JOHANSSON C., THEODORSSON E. (1992). Plasma concentrations of regulatory peptides in obesity following modified sham feeding (MSF) and a liquid test meal. *Regulatory Peptides* 39: 43-54
36. WOOD J. G., HOANG H. D., BUSSJAEGER L. J., SOLOMON T. E. (1988). Neurotensin stimulates growth of small intestine in rats. *American Journal of Physiology* 255:G813-7.

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 7 】

【図 1】図1は、テスト被検体の血液から得られた血清、EDTA血漿およびヘパリン血漿サンプルにおける、7日間までの期間にわたる、室温での、ヒトPNTのN末端配列にアサイメ



ントされた免疫反応性のex vivo安定性の測定結果を示す。

【図2】図2は、実施例においてより詳細に記載したPNTサンドイッチアッセイの標準曲線を示す。

【図3】図3は、前記したサンドイッチアッセイを用いた、通常に栄養を摂取したノーマルなヒトおよび人工的に栄養を与えた患者の場合における、血漿中のPNT免疫反応性の測定結果を示す。

【図4】図4は、前記したサンドイッチアッセイを用いた、食物の供給に依存した、通常に栄養を摂取したノーマルなヒトの血漿におけるPNT免疫反応性の経時変化の測定結果を示す。

【図5】図5は、前記したサンドイッチアッセイを用いた、通常に栄養を摂取したノーマルなヒト、ならびに、慢性炎症性腸疾患（クローン病または潰瘍性大腸炎）および肝炎の患者の場合における、血漿中のPNT免疫反応性の測定結果を示す。

10

【図1】

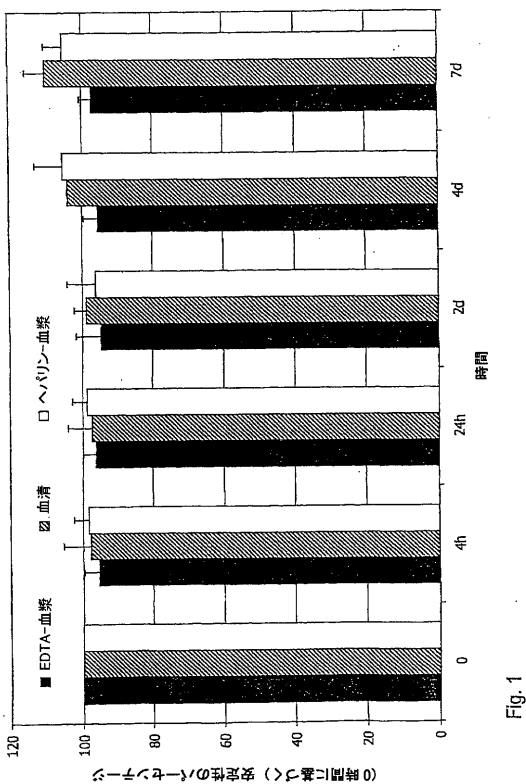


Fig. 1

【図2】

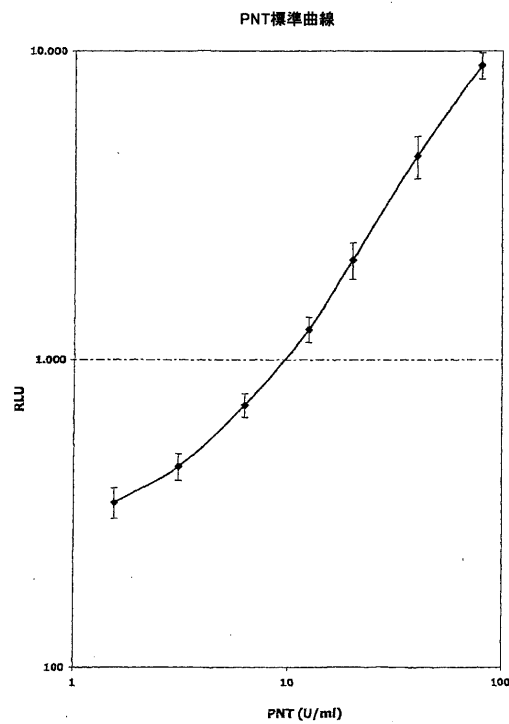


Fig. 2

【図 3】

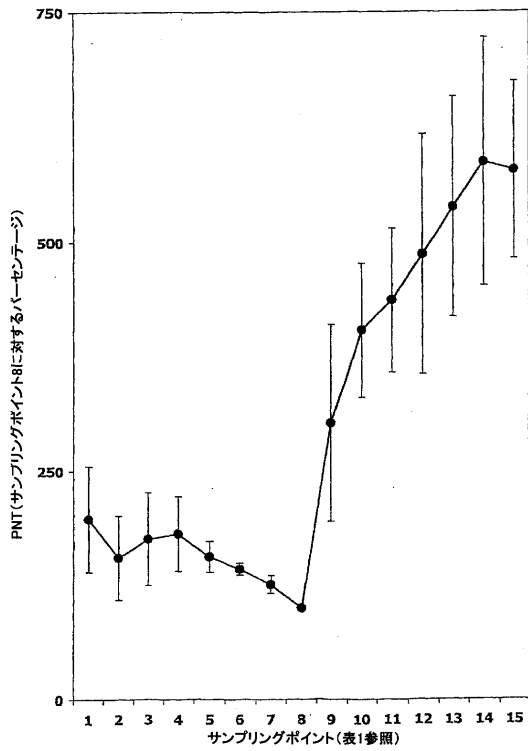


Fig. 3

【図 4】

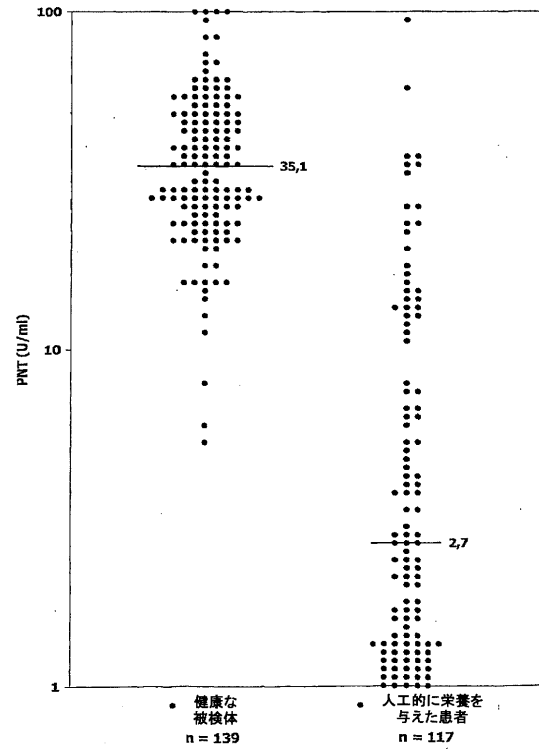


Fig. 4

【図 5】

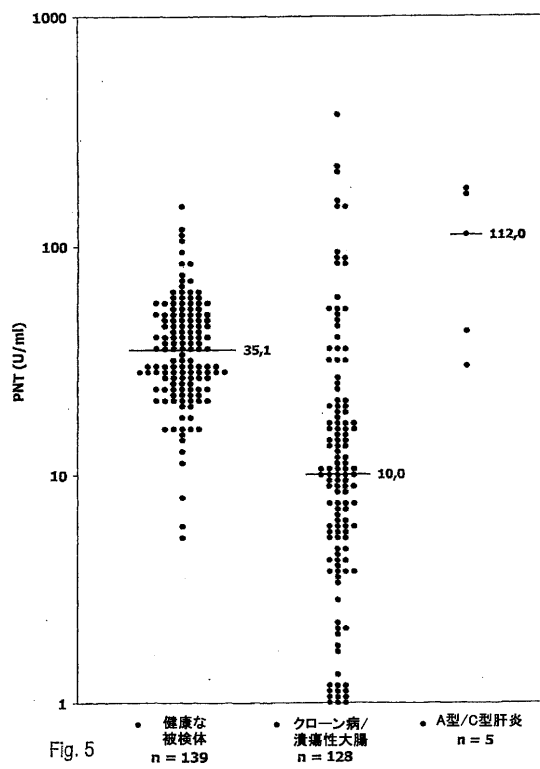


Fig. 5

【配列表】

2008528984000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/000659

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/74 C07K16/18 C07K16/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C07K		
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, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIDARD JEAN-NOEL ET AL: "Immunological and biochemical characterization of processing products from the neurotensin/neuromedin N precursor in the rat medullary thyroid carcinoma 6-23 cell line" BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 291, no. 1, 1993, pages 225-233, XP002381242 ISSN: 0264-6021	1-16
X	abstract page 226, column 2, paragraph 2 - page 227, column 1, paragraph 4 page 232, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 3 ----- -/--	17,18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 May 2006		21/06/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Klee, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/000659

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EKLUND S ET AL: "EFFECTS OF CHOLERA TOXIN ESCHERICHIA-COLI HEAT STABLE TOXIN AND SODIUM DEOXYCHOLATE ON NEUROTENSIN RELEASE FROM THE ILEUM IN-VIVO" REGULATORY PEPTIDES, vol. 26, no. 3, 1989, pages 241-252, XP009066470 ISSN: 0167-0115 abstract page 244, paragraph 7 page 249, paragraph 1 _____	1-18

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/000659

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> INV. G01N33/74 C07K16/18 C07K16/28		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
<b>B. RESEARCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N C07K		
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, Sequence Search		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BIDARD JEAN-NOEL ET AL: "Immunological and biochemical characterization of processing products from the neurotensin/neuromedin N precursor in the rat medullary thyroid carcinoma 6-23 cell line" BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 291, Nr. 1, 1993, Seiten 225-233, XP002381242 ISSN: 0264-6021	1-16
X	Zusammenfassung Seite 226, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 227, Spalte 1, Absatz 4 Seite 232, Spalte 1, Absatz 2 - Spalte 2, Absatz 3 ----- -/--	17,18
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input 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 erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer 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 nahellegend ist *8* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 24. Mai 2006		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 21/06/2006
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Klee, B

Formblatt: PCTISA/210 (Blatt 2) (April 2005)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/000659

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>EKLUND S ET AL: "EFFECTS OF CHOLERA TOXIN  ESCHERICHIA-COLI HEAT STABLE TOXIN AND  SODIUM DEOXYCHOLATE ON NEUROTENSIN RELEASE  FROM THE ILEUM IN-VIVO"  REGULATORY PEPTIDES,  Bd. 26, Nr. 3, 1989, Seiten 241-252,  XP009066470  ISSN: 0167-0115  Zusammenfassung  Seite 244, Absatz 7  Seite 249, Absatz 1  -----</p>	1-18

---

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, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, 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

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 CA40 DA30 DA75 EA50 FA71



专利名称(译)	用于测量神经降压素释放到循环液中的免疫测定法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008528984A</a>	公开(公告)日	2008-07-31
申请号	JP2007552570	申请日	2006-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	鞘脂技术游戏的Em-基于硬		
申请(专利权)人(译)	鞘脂科技有限公司		
[标]发明人	アンドレアエルンスト		
发明人	アンドレア・エルンスト		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K14/575		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/74		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/543.575 G01N33/543.521 C07K14/575		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	102005003687 2005-01-26 DE		
其他公开文献	JP5133066B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

## 摘要(译)

哺乳动物血液中神经降压素的免疫诊断测定方法包括将免疫活性N末端哺乳动物神经降压素 ( PNT-免疫反应性 ) 注射到血清样品或血浆样品中，其中神经降压素或神经介素不具有免疫反应性。包括用于实施该方法的试剂盒的独立权利要求包括至少一种辅助试剂，例如缓冲液和清洁溶液，其包含第一免疫试剂，其含有针对固定化固相中的人抗神经降压素的部分序列的第一抗体，含有第二免疫试剂。抗可溶形式的人源性降血压素的部分序列的第二抗体，以及含有用于结合第一和第二抗体的肽抑制剂的标准和校准溶液。 - 活动：Antiparkinsonian;免疫抑制;胃肠道根;抗炎;抗溃疡;抑制细胞生长;抗甲状腺; CNS根;呼吸根;嗜肝。

サンプリングポイント	栄養状態
1	14 時間の断食後
2	15 時間の断食後
3	液体 (11 の水) 摂取後 5 分
4	液体摂取後 15 分
5	液体摂取後 45 分
6	液体摂取後 1 時間 15 分
7	液体摂取後 1 時間 45 分
8	液体摂取後 3 時間
9	食物摂取後 5 分 (約 250kcal のサラダおよび約 100kcal のピザ)
10	食物摂取後 15 分
11	食物摂取後 30 分
12	食物摂取後 1 時間
13	食物摂取後 2 時間
14	食物摂取後 3 時間
15	食物摂取後 4 時間