

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4132677号  
(P4132677)

(45) 発行日 平成20年8月13日(2008.8.13)

(24) 登録日 平成20年6月6日(2008.6.6)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 33/53 (2006.01)** GO 1 N 33/53 B  
**CO 7 K 14/635 (2006.01)** CO 7 K 14/635 Z NA

請求項の数 27 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2000-593958 (P2000-593958)	(73) 特許権者	501027108
(86) (22) 出願日	平成12年1月13日 (2000.1.13)		スキャンティボディーズ・ラボラトリー、
(65) 公表番号	特表2002-535622 (P2002-535622A)		インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成14年10月22日 (2002.10.22)		アメリカ合衆国カリフォルニア州9270
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/000855		1, サンティ, エイブラハム・ウェイ 9
(87) 国際公開番号	W02000/042437		336
(87) 国際公開日	平成12年7月20日 (2000.7.20)	(74) 代理人	100099623
審査請求日	平成14年9月17日 (2002.9.17)		弁理士 奥山 尚一
審査番号	不服2005-21521 (P2005-21521/J1)	(74) 復代理人	100125380
審査請求日	平成17年11月7日 (2005.11.7)		弁理士 中村 綾子
(31) 優先権主張番号	09/231, 422	(74) 代理人	100096769
(32) 優先日	平成11年1月14日 (1999.1.14)		弁理士 有原 幸一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100107319
(31) 優先権主張番号	09/344, 639		弁理士 松島 鉄男
(32) 優先日	平成11年6月26日 (1999.6.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 完全型副甲状腺ホルモンの測定方法ならびに副甲状腺疾患および慢性腎不全患者の骨状態の識別方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト完全型副甲状腺ホルモンをアッセイするためのキットであって、

a) Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Gln - Leu - Met (配列番号4) からなるヒト完全型副甲状腺ホルモンの初期ペプチド配列に特異的な第1の抗体又は抗体断片であって、該初期ペプチド配列中の少なくとも4つのアミノ酸が該抗体又は抗体断片との反応部位の一部である、標識された第1の抗体又は抗体断片と、

b) 前記ヒト完全型副甲状腺ホルモンのアミノ酸配列34から84 (配列番号3) を認識する第2の抗体又は抗体断片と

を含み、阻害性の非(1~84)副甲状腺ホルモン断片を検出することなく、生物学的サンプル中のヒト完全型副甲状腺ホルモン量を測定するキット。

【請求項2】

前記標識された第1の抗体又は抗体断片が、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、あるいはそれらの断片である請求項1に記載のキット。

【請求項3】

前記標識が、化学発光剤、測色剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤、及び放射性同位元素からなる群から選択される請求項1又は2に記載のキット。

【請求項4】

前記第2の抗体又は抗体断片が固相支持体に吸着されている請求項1~3のいずれかに記載のキット。

## 【請求項 5】

前記固相支持体が、タンパク質結合表面、金属コロイド粒子、ラテックス粒子又はポリマービーズからなる群から選択される請求項 4 に記載のキット。

## 【請求項 6】

前記ヒト完全型副甲状腺ホルモンが、前記第 1 の抗体又は抗体断片及び前記第 2 の抗体又は抗体断片に結合した後に、該第 1 の抗体又は抗体断片及び該第 2 の抗体又は抗体断片の結合部位以外の部位に特異的に結合する第 3 の抗体又は抗体断片であって、それにより沈殿塊を生成する第 3 の抗体又は抗体断片をさらに含む請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のキット。

## 【請求項 7】

ヒト完全型副甲状腺ホルモンをアッセイするためのキットであって、

- a) Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Gln - Leu - Met (配列番号 4) からなるヒト完全型副甲状腺ホルモンの初期ペプチド配列に特異的な第 1 の抗体又は抗体断片であって、該初期ペプチド配列中の少なくとも 4 つのアミノ酸が該抗体又は抗体断片との反応部位の一部である、実質的に純粋な第 1 の抗体又は抗体断片と、
- b) 前記ヒト完全型副甲状腺ホルモンのアミノ酸配列 34 から 84 (配列番号 3) を認識する、標識された第 2 の抗体又は抗体断片と
- を含み、阻害性の非 (1 ~ 84) 副甲状腺ホルモン断片を検出することなく、生物学的サンプル中のヒト完全型副甲状腺ホルモン量を測定するキット。

## 【請求項 8】

前記第 1 の抗体又は抗体断片が、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、あるいはそれらの断片である請求項 7 に記載のキット。

## 【請求項 9】

前記第 1 の抗体又は抗体断片が、固相支持体に吸着されている請求項 7 または 8 に記載のキット。

## 【請求項 10】

前記固相支持体が、タンパク質結合表面、金属コロイド粒子、ラテックス粒子又はポリマービーズからなる群から選択される請求項 9 に記載のキット。

## 【請求項 11】

前記標識が、化学発光剤、測色剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤、及び放射性同位元素からなる群から選択される請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載のキット。

## 【請求項 12】

ヒト完全型副甲状腺ホルモンが前記第 1 の抗体又は抗体断片及び前記第 2 の抗体又は抗体断片に結合した後に、該第 1 の抗体又は抗体断片及び該第 2 の抗体又は抗体断片の結合部位以外の部位に特異的に結合する第 3 の抗体又は抗体断片であって、それにより沈殿塊を生成する第 3 の抗体又は抗体断片をさらに含む請求項 7 ~ 11 のいずれかに記載のキット。

## 【請求項 13】

ラット完全型副甲状腺ホルモンをアッセイするためのキットであって、

- a) Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Gln - Leu - Met (配列番号 7) からなるラット完全型副甲状腺ホルモンの初期ペプチド配列に特異的な第 1 の抗体又は抗体断片であって、該初期ペプチド配列中の少なくとも 4 つのアミノ酸が該抗体又は抗体断片との反応部位の一部である、標識された第 1 の抗体又は抗体断片と、
- b) 前記ラット完全型副甲状腺ホルモンのアミノ酸配列 34 から 84 (配列番号 8) を認識する第 2 の抗体又は抗体断片と
- を含み、阻害性の非 (1 ~ 84) 副甲状腺ホルモン断片を検出することなく、生物学的サンプル中のラット完全型副甲状腺ホルモン量を測定するキット。

## 【請求項 14】

a) 検査すべき人から得られたサンプルを、Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Gln - Leu - Met (配列番号 4) からなるヒト完全型副甲状腺ホルモンの初期

10

20

30

40

50

ペプチド配列に特異的な抗体又は抗体断片であって、該初期ペプチド配列中の少なくとも4つのアミノ酸が前記抗体又は抗体断片との反応部位の一部である、抗体又は抗体断片と接触させるステップと、

b) 該サンプルを、前記ヒト完全型副甲状腺ホルモンのアミノ酸配列34から84(配列番号3)を認識する第2の抗体又は抗体断片とさらに接触させるステップとを含み、該サンプルにおける阻害性の非(1~84)副甲状腺ホルモン断片を検出することなく、完全型副甲状腺ホルモン値のみを免疫アッセイ法を用いて決定する、実質的に正常な副甲状腺機能を有する人と副甲状腺機能亢進症の人とを識別するための分析方法。

【請求項15】

a) 検査すべき人から得られたサンプルを、Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met(配列番号4)からなるヒト完全型副甲状腺ホルモンの初期ペプチド配列に特異的な抗体又は抗体断片であって、該初期ペプチド配列中の少なくとも4つのアミノ酸が前記抗体又は抗体断片との反応部位の一部である、抗体又は抗体断片と接触させるステップと、

b) 該サンプルを、前記ヒト完全型副甲状腺ホルモンのアミノ酸配列34から84(配列番号3)を認識する第2の抗体又は抗体断片とさらに接触させるステップとを含み、該サンプルにおける阻害性の非(1~84)副甲状腺ホルモン断片を検出することなく、完全型副甲状腺ホルモン値のみを免疫アッセイ法を用いて決定する、副甲状腺機能亢進症の治療効果をモニタリングするための分析方法。

【請求項16】

a) 検査すべき人から得られたサンプルを、Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met(配列番号4)からなるヒト完全型副甲状腺ホルモンの初期ペプチド配列に特異的な抗体又は抗体断片であって、該初期ペプチド配列中の少なくとも4つのアミノ酸が前記抗体又は抗体断片との反応部位の一部である、抗体又は抗体断片と接触させるステップと、

b) 該サンプルを、前記ヒト完全型副甲状腺ホルモンのアミノ酸配列34から84(配列番号3)を認識する第2の抗体又は抗体断片とさらに接触させるステップと、を含み、該サンプルにおける阻害性の非(1~84)副甲状腺ホルモン断片を検出することなく、完全型副甲状腺ホルモン値のみを免疫アッセイ法を用いて決定する、正常な骨機能を有する人と副甲状腺関連の骨疾患を有する人とを識別するための分析方法。

【請求項17】

a) 検査すべき人から得られたサンプルを、Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met(配列番号4)からなるヒト完全型副甲状腺ホルモンの初期ペプチド配列に特異的な抗体又は抗体断片であって、該初期ペプチド配列中の少なくとも4つのアミノ酸が前記抗体又は抗体断片との反応部位の一部である、抗体又は抗体断片と接触させるステップと、

b) 該サンプルを、前記ヒト完全型副甲状腺ホルモンのアミノ酸配列34から84(配列番号3)を認識する第2の抗体又は抗体断片とさらに接触させるステップと、を含み、該サンプルにおける阻害性の非(1~84)副甲状腺ホルモン断片を検出することなく、完全型副甲状腺ホルモン値のみを免疫アッセイ法を用いて決定する、副甲状腺関連の骨疾患をモニタリングするための分析方法。

【請求項18】

a) 試験すべきヒトから得られたサンプルを、Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met(配列番号4)からなるヒト完全型副甲状腺ホルモンの初期ペプチド配列に特異的な抗体又は抗体断片であって、該初期ペプチド配列中の少なくとも4つのアミノ酸が前記抗体又は抗体断片との反応部位の一部である、抗体又は抗体断片と接触させるステップと、該サンプルを、前記ヒト完全型副甲状腺ホルモンのアミノ酸配列34から84(配列番号3)を認識する第2の抗体又は抗体断片とさらに接触させるステップとを含む、完全型副甲状腺ホルモン値を決定するステップと

b) 該サンプルにおける総副甲状腺ホルモン値を、免疫アッセイを用いて決定するス

10

20

30

40

50

テップと、

c) 該サンプルにおける完全型副甲状腺ホルモン値、副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値、及び総副甲状腺ホルモン値からなる群から選択されるパラメータの少なくとも2つを比較するステップと

を含み、

ステップc)において、副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値を選択する場合には、副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値を、完全型副甲状腺ホルモン値及び総副甲状腺ホルモン値から計算するステップをさらに含む、実質的に正常な副甲状腺機能を有する人と副甲状腺機能亢進症の人とを識別するための分析方法。

【請求項19】

a) 試験すべきヒトから得られたサンプルを、Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Gln - Leu - Met (配列番号4)からなるヒト完全型副甲状腺ホルモンの初期ペプチド配列に特異的な抗体又は抗体断片であって、該初期ペプチド配列中の少なくとも4つのアミノ酸が前記抗体又は抗体断片との反応部位の一部である、抗体又は抗体断片と接触させるステップと、該サンプルを、前記ヒト完全型副甲状腺ホルモンのアミノ酸配列34から84 (配列番号3)を認識する第2の抗体又は抗体断片とさらに接触させるステップとを含む、完全型副甲状腺ホルモン値を決定するステップと

b) 該サンプルにおける総副甲状腺ホルモン値を、免疫アッセイを用いて決定するステップと、

c) 該サンプルにおける完全型副甲状腺ホルモン値、副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値、及び総副甲状腺ホルモン値からなる群から選択されるパラメータの少なくとも2つを比較するステップと

を含み、

ステップc)において、副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値を選択する場合には、副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値を、完全型副甲状腺ホルモン値及び総副甲状腺ホルモン値から計算するステップをさらに含む、副甲状腺機能亢進症の治療効果をモニタリングするための分析方法。

【請求項20】

a) 試験すべきヒトから得られたサンプルを、Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Gln - Leu - Met (配列番号4)からなるヒト完全型副甲状腺ホルモンの初期ペプチド配列に特異的な抗体又は抗体断片であって、該初期ペプチド配列中の少なくとも4つのアミノ酸が前記抗体又は抗体断片との反応部位の一部である、抗体又は抗体断片と接触させるステップと、該サンプルを、前記ヒト完全型副甲状腺ホルモンのアミノ酸配列34から84 (配列番号3)を認識する第2の抗体又は抗体断片とさらに接触させるステップとを含む、完全型副甲状腺ホルモン値を決定するステップと

b) 該サンプルにおける総副甲状腺ホルモン値を、免疫アッセイを用いて決定するステップと、

c) 該サンプルにおける完全型副甲状腺ホルモン値、副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値、及び総副甲状腺ホルモン値からなる群から選択されるパラメータの少なくとも2つを比較するステップと

を含み、

ステップc)において、副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値を選択する場合には、副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値を、完全型副甲状腺ホルモン値及び総副甲状腺ホルモン値から計算するステップをさらに含む、正常な骨機能を有する人と副甲状腺関連の骨疾患を有する人とを識別するための分析方法。

【請求項21】

a) 試験すべきヒトから得られたサンプルを、Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Gln - Leu - Met (配列番号4)からなるヒト完全型副甲状腺ホルモンの初期ペプチド配列に特異的な抗体又は抗体断片であって、該初期ペプチド配列中の少なくとも4つのアミノ酸が前記抗体又は抗体断片との反応部位の一部である、抗体又は抗体断片

10

20

30

40

50

と接触させるステップと、該サンプルを、前記ヒト完全型副甲状腺ホルモンのアミノ酸配列 34 から 84 (配列番号 3) を認識する第 2 の抗体又は抗体断片とさらに接触させるステップとを含む、完全型副甲状腺ホルモン値を決定するステップと

b) 該サンプルにおける総副甲状腺ホルモン値を、イムノアッセイを用いて決定するステップと、

c) 該サンプルにおける完全型副甲状腺ホルモン値、副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値、及び総副甲状腺ホルモン値からなる群から選択されるパラメータの少なくとも 2 つを比較するステップと

を含み、

ステップ c) において、副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値を選択する場合には、副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値を、完全型副甲状腺ホルモン値及び総副甲状腺ホルモン値から計算するステップをさらに含む、副甲状腺関連の骨疾患をモニタリングするための分析方法。

10

【請求項 22】

前記サンプルが、血清、血漿、及び血液のサンプルからなる群から選択される請求項 14 ~ 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

前記完全型副甲状腺ホルモン値が、前記副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値と比較される請求項 18 ~ 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

前記完全型副甲状腺ホルモン値が、前記総副甲状腺ホルモン値と比較される請求項 18 ~ 21 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 25】

前記副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片値が、前記総副甲状腺ホルモン値と比較される請求項 18 ~ 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

前記比較が比率または割合の形態である請求項 18 ~ 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 27】

前記完全型副甲状腺ホルモン値が、完全型副甲状腺ホルモンと副甲状腺ホルモン阻害性ペプチド断片とを識別する抗体を用いて決定される請求項 18 ~ 26 のいずれかに記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

[技術分野]

本発明は、副甲状腺機能亢進等の副甲状腺疾患の患者を、正常状態または非罹病状態と識別する、斬新な方法および装置に関する。生物学的試料中の完全型副甲状腺ホルモン(以下、w-PTHと略す)すなわち非断片化PTH 1~84、ならびにPTH拮抗物質の役割を果たすことができる非w-PTHペプチド断片を検出する。非w-PTHペプチド断片の値と、w-PTHの値と、またはこれらの値の組み合わせとのいずれかの値を比較するか、またはこれらを独立に使用することにより、副甲状腺および骨関連の疾患状態を識別すること、ならびにこのような状態と正常な状態とを識別することが可能である。

40

【0002】

[関連出願]

本願は、米国特許および商標庁に提出された非暫定実用特許出願、出願番号第08/231,422号の一部係属出願である。

【0003】

[背景技術]

カルシウムは、細胞透過性、骨および歯の形成、血液凝固、神経インパルスの伝達、および通常の筋収縮において非常に重要な役割を果たす。血中カルシウムイオン濃度は、カルシトロールおよびカルシトニンと共に、主として副甲状腺ホルモン(PTH)により制御

50

される。カルシウム取り込みおよび排泄は変化する可能性があるが、PTHは、フィードバック機構により細胞内および周囲の体液中における安定したカルシウム濃度の維持に役立つ。血清カルシウムが低下すると、副甲状腺はPTHを分泌し、貯蔵カルシウムの放出に影響を及ぼす。血清カルシウムが上昇すると、PTH分泌低下により、貯蔵カルシウム放出が阻害される。

#### 【0004】

完全型のヒトPTH（本技術分野ではhPTHと呼ばれることもあるが、本発明では、完全型PTHまたはw-PTHと呼ぶ）は、図1に示す通り、独特の84アミノ酸ペプチド（配列番号1）である。このペプチドは、プロテインキナーゼC活性化に關与するドメイン（アミノ酸残基28～34）ならびにアデニル酸サイクラーゼ活性化に關与するドメイン（アミノ酸残基1～7）を含み、骨に対して同化作用を有することが研究で確認されている。しかし、腺内代謝または末梢代謝により生成される公算が高い様々な異化作用型の分解されたPTHペプチドまたは断片化PTHペプチドが循環内に存在する。たとえば、w-PTHは、アミノ酸34と35の間で切断されて、（1～34）PTHのN末端断片と（35～84）PTHのC末端断片が生じ得る。同様に、アミノ酸36と37の間または37と38の間で切断が起こり得る。最近、PTHのN末端付近で切り取られた「非（1～84）PTH」と呼ばれる大きなPTH断片が開示された。（R. LePage et al, "A non-(1-84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples" Clin Chem (1998); 44: 805-810 参照）。

#### 【0005】

PTHの正確な測定が臨床上必要なことは、十分に証明されている。血清PTHレベルは、以下の疾患を有する患者にとって最も重要な指標の1つである。それらは、家族性低カルシウム尿症、高カルシウム尿症、多発性内分泌腺腫症I型およびII型、骨粗鬆症、パジェット骨疾患、副甲状腺の過形成および腺腫に起因する原発性副甲状腺機能亢進、偽副甲状腺機能低下、および続発性副甲状腺機能亢進を引き起こす恐れがある腎不全である。

#### 【0006】

PTHは、慢性腎不全患者の病気の経過において、ある役割を果たす。腎性骨ジストロフィー（RO）は、嚢胞性線維性骨炎（PTH過剰に起因する）、骨軟化症非鈣化骨基質（ビタミンD不足に起因する）、骨格外石灰化/骨化（カルシウム代謝異常およびリン代謝異常に起因する）、および無力性骨疾患（PTH抑制が一因である）を含む複雑な骨格疾患である。慢性腎不全患者は、ROが発症する恐れがある。腎機能障害により血清リンが増加し（高リン血症）、腎による1,25ジヒドロキシビタミンD（1,25-D）産生が減少する。前者の結果として、胃腸のカルシウム吸収減少による続発性副甲状腺機能亢進、および血清リンの上昇に回答したPTH上昇による嚢胞性線維性骨炎が起こる。後者は、低カルシウム血症および骨軟化症を引き起こす。続発性副甲状腺機能亢進が発症すると、副甲状腺のカルシウム受容体およびビタミンD受容体の発現が減少するため、副甲状腺のそのホルモン調節物質に対する応答が低下する。血清カルシウムが低下する。ROは、指の壊疽、骨痛、骨折、および筋の衰弱につながる。

#### 【0007】

人間において、生物学的に活性な循環しているPTHレベルの測定が行われてきた。1つの重大な問題は、PTHが、通常は10～65pg/mlという低レベルで存在することである。極めて循環レベルが低いことに加えて、PTHが不均質性であることおよびその多くの循環断片があるという問題がある。多くの場合、イムノアッセイは、循環PTH断片による実質的且つ有意な阻害に直面している。たとえば、幾つかの市販されているPTHキットは、非（1～84）PTH断片と、ほぼ100%の交差反応を示す（LePageの論文を参照）。

10

20

30

40

50

## 【0008】

PTHイムノアッセイは長い年月をかけて変化してきた。1つのアプローチは、Arnold W. Lindall et al. に付与された米国特許第4,369,138号に記載の二重抗体沈降イムノアッセイである。第1の抗体は(65~84)PTH断片に対して高いアフィニティを有する。第1の抗体を含む試料に放射能標識した(65~84)PTHペプチドを加え、内因性非標識ペプチドに関して競合させる。第1の抗体および放射能標識したPTH断片複合体に結合する第2の抗体を加え、それによって、沈殿を形成する。沈殿も上清も放射能を測定することができる。内因性レベルをそれから算出することができる。

## 【0009】

PTH断片の阻害をなくすために、Nichol's Institute of San Juan Capistrano, CaliforniaによるAllegro(登録商標)Intact PTHアッセイ等の、インタクトPTH(I-PTH)用の放射免疫測定法(IRMA)が導入された。1つの方式では、捕捉抗体がhPTHのC末端部分に特異的に結合し、標識抗体が捕捉されたhPTHのN末端に特異的に結合する。別の方式では、2つのモノクローナル抗体が使用され、その両者がhPTHのN末端部分に付着する。残念ながら、これらのアッセイでは、w-PTHペプチドと非w-PTHペプチド断片が測定されるが、両者が識別されないため、問題がある。非w-PTH断片の内因性濃度がかかなり大きい副甲状腺機能亢進患者および腎不全患者では、このように識別不可能であることが表面化している。

## 【0010】

最近、研究者が、N末端PTH断片に適した特異的結合アッセイを行った。(Gao, Ping et al "Immunochemical luminometric assay with two monoclonal antibodies against the N-terminal sequence of human parathyroid hormone", Clinical Chimica Acta 245(1996)39-59参照)。この免疫化学照度測定法は、2つのモノクローナル抗体を使用し、N末端の(1~34)PTH断片を検出するが、中間部分のPTH断片またはC末端のPTH断片を検出しない。これらのアッセイのデザインにおける重要な因子は、C末端のPTH断片との反応を排除することである。

## 【0011】

## [発明の開示]

本発明は、副甲状腺疾患患者(たとえば、原発性副甲状腺機能亢進、続発性副甲状腺機能亢進、およびその時期)を、正常状態または非罹病状態と識別するため、治療中または治療後の副甲状腺の機能をモニタリングするため、すなわち、手術中および手術後の副甲状腺機能のモニタリングならびに治療、および副甲状腺関連の骨疾患および副甲状腺機能亢進症の治療効果のモニタリングを行うための斬新な方法および装置に関する。すなわち、生物学的な試料のw-PTHすなわち非断片化PTH、PTH拮抗物質の役割を果たすことができる非w-PTHペプチド断片、またはこれら2つの値の組み合わせのいずれかの少なくとも1つという、3つの異なるパラメータの、血清中または血中レベルを検出する。これらの値の間関係、ならびに値そのものが、健常者と副甲状腺疾患の患者との間で著しく異なるため、2つの値を比較するか、上記3つの値の1つを独立に試験することにより、副甲状腺および骨関連の疾患状態を識別し、疾患状態と正常な状態とを識別することができる。

## 【0012】

本発明は、(配列番号2[PTH<sub>3~84</sub>])から(配列番号3[PTH<sub>34~84</sub>])までの間のアミノ酸配列を有するペプチドである非w-PTHペプチド断片は、in vivoで、拮抗物質または阻害物質(PIN)の役割をするという発見を含む(図12参照)。換言すれば、w-PTHのPTH受容体への結合およびその後の生物学的活性は、このPINペプチド断片の存在による影響を受ける。PTH結合部位が遮断されるという点で、

10

20

30

40

50

P T HまたはP T H類似体に関してP T H受容体を阻害することができる。w - P T H濃度とP I N濃度との関係はP T H関連疾患によって異なり、従って、これらの関係は疾患状態を示すものである。本発明は、P I Nの拮抗物質性が明らかになったことを考慮すると同様に役に立つ副甲状腺関連の骨疾患、および結果として生じる骨損失または増加をモニタリングするための斬新な方法および装置に関する。P I Nが増量することにより、P T Hのカルシウム放出活性が阻害される。

#### 【0013】

w - P T Hを測定する際に、P I Nを測定することは望ましくない。血清、血漿または血液等の試料中のw - P T H量を測定する本発明の方法は、P T HペプチドS E R - V A L - S E R - G L U - I L E - G L N - L E U - M E T (配列番号4)に特異的な第1の抗体を使用するか抗体断片を使用するかによって異なってもよく、少なくとも4つのアミノ酸を認識する抗体が、従来のイムノアッセイ形式におけるシグナル抗体または捕捉抗体のいずれかとしての、ペプチドの抗体反応部分の一部である一般的な様式を含む。(他の種に存在する類似したペプチド、たとえば、第1のアミノ酸セリンがアラニンで置換されているラットペプチドを使用することもできる)。シグナル抗体または捕捉抗体のいずれかとして使用する場合、存在する全てのw - P T Hに結合させるのに十分な抗体を加える。次に、第1の抗体を、存在するあらゆるw - P T Hに結合させ、それによって複合体を形成させる。複合体を、好ましくはw - P T HのC末端にて、標識するために、第2の抗体および従来のイムノアッセイ標識、たとえば化学発光剤、測色剤、エネルギー移動剤、酵素、蛍光剤、および放射性同位元素を含む特異的結合標識が使用され、また、第1の抗体と実質的に同時に、あるいは第1の抗体に続いて、加えることができる。最終的に、従来の技術を使用して標識複合体の量を測定し、それによって、試料中のw - P T Hレベルを算出する。シグナル抗体を使用する場合、第1の抗体は依然としてN末端にて付着するが、第2の抗体はC末端にて付着する補足抗体の役割を果たす。

#### 【0014】

P I Nを測定する際に、P I Nを直接測定することもでき、あるいは間接的に測定することもできる。最初にw - P T Hを測定し、次いで総P T Hを測定することにより、間接的測定を行うことができる。w - P T H値を総P T H値から減算することにより、P I N値が得られる。(本発明では、「総P T H」は、w - P T H(天然の主たるP T H受容体結合作動物質)とP I N(天然の主たるP T H受容体結合拮抗物質)との和を指す。)総P T Hアッセイは、配列番号4ではなく、P T HのN末端を検出することにより、P I Nとw - P T Hの両者を検出する。P T Hのアミノ酸7~38を検出することにより、このアッセイは、両者を検出することができる。市販の総P T H用アッセイは、S c a n t i b o d i e s L a b o r a t o r y , I n c . o f S a n t e e , C a l i f o r n i aから入手できる。少なくとも4つのアミノ酸が、ペプチドの抗体反応部分の一部である、P T Hのアミノ酸7~38を含むP T HペプチドL E U - M E T - H I S - A S N - L E U - G L Y - L Y S - H I S - L E U - A L A - S E R - V A L - G L U - A R G - M E T - G L N - T R P - L E U - A R G - L Y S - L Y S - L E U - G L N - A S P - V A L - H I S - A S N - P H E - V A L - A L A - L E U - G L Y (配列番号5)の一部(好ましくは、アミノ酸9~34)に特異的な抗体または抗体断片を使用することにより、総P T Hの直接測定を行うことができる。このような抗体あるいは抗体断片を、シグナル抗体または捕捉抗体のいずれかとして、従来のイムノアッセイ形式で使用することができる。

#### 【0015】

副甲状腺疾患状態と正常な状態とを識別するため、または副甲状腺疾患状態の治療効果をモニタリングするために、w - P T H値、P I N値、または総P T H(w - P T HとP I Nとの組み合わせ)値の間の関係、換言すれば、P I N値と総P T H値、P I N値とw - P T H値、またはw - P T H値と総P T H値の間の関係を比較することができる。たとえば、w - P T Hと総P T H、P I Nと総P T H、またはP I Nとw - P T Hとの間の比率を使用することができる。(比較は、これらの全因子の神経回路網の形をとることさえ可能

10

20

30

40

50

である。) 選択される比較方法に関わらず、これらの値は、健常者と副甲状腺疾患患者との間で、また副甲状腺疾患の様々な時期の間で、有意に異なる。

【0016】

あるいは、副甲状腺疾患状態と正常な状態を識別するか、w-PTH、PIN、または総PTH単独のいずれかの値を独立に試験することによって副甲状腺疾患状態に対する治療効果をモニタリングすることができる。

【0017】

[本発明を実行するための最良の形態]

本発明を開示するにあたって、多数のよく似た、種依存的PTH型が存在することを念頭に置かなければならない。hPTHのアミノ酸配列を図1に示す。しかし、たとえば、ラットPTH、ウシPTH、またはブタPTHの場合、hPTH配列のアミノ酸の幾つかに置換が見られる。本発明の場合、抗体または抗体断片を互換的に使用して、これらのPTHを測定することができるが、PTH測定が行われる種と一致する配列をもつPTHに特異的な抗体を使用することが好ましい。

10

【0018】

[w-PTHイムノアッセイ]

本発明の好ましい態様は、図2および3に示す、しばしばサンドイッチアッセイと呼ばれる放射免疫測定法(IRMA)である。このようなアッセイ(10)で使用される要素としては、固体支持体(14)に付着させた捕捉抗体(12)、およびそれに付着させた、標識(18)を有するシグナル抗体(16)を含む。図2に示す通り、一般に、C末端断片(22)に特異的な捕捉抗体が選択され、標識抗体は、アデニル酸サイクラーゼ活性化用ドメイン(24)を含むw-PTH先端部分のペプチド配列に特異的である。しかし、図3に示す通り、これらの抗体の特異性を逆転させることも可能である。

20

【0019】

あるいは、従来の沈降アッセイまたは比濁アッセイと同様、w-PTHが溶液から沈降するか溶液中で識別される、イムノアッセイをデザインすることも可能である。たとえば、少なくとも3つの抗体を使用して、沈殿塊を形成することができる。先端部分を認識するw-PTH抗体およびC末端抗体に加えて、PTHの中間部分に付着する、少なくとも3つの抗体を使用することができる。w-PTHと少なくとも3つの抗体の複合塊は、従来の技法で測定できる標識沈殿塊を形成する。別の方法は、先端部分を認識するw-PTH配列抗体をコロイド状固体支持体、たとえばラテックス粒子に結合することであろう。

30

【0020】

さらに詳細には、クロラミンTで酸化し、1mCiの<sup>125</sup>I放射性同位元素と共に室温で25秒間インキュベートし、メタ硫酸水素ナトリウムで還元することによって、アフィニティ精製ヤギ抗(1~6)PTH抗体の50μgをヨウ素化することにより、シグナル抗体を作製することができる(Scantibodies Laboratory, Inc. 製, Santee California, U.S.A.)。ヨウ素化混合物を、PD-10脱塩カラム(Pharmacia社製, Uppsala, Sweden)を通過させ、製造会社の説明書に従うことにより、標識されなかった<sup>125</sup>I放射性同位元素を、<sup>125</sup>Iヤギ抗(1~6)PTHシグナル抗体と分離させる。脱塩カラムから回収した分画をガンマカウンターで測定し、<sup>125</sup>Iヤギ抗(1~6)抗体を示す分画をプールし、100μl当たり約300,000DPM(崩壊/分)に希釈する。この溶液が、w-PTH IRMAで使用されるトレーサー溶液である。

40

【0021】

当業者に周知の受動吸収技法を使用して、アフィニティ精製ヤギ抗PTH39~84抗体(Scantibodies Laboratory, Inc. 製, Santee, California, U.S.A.)を、12x75mmポリスチレン管(Nunc社製, Denmark)に付着させることにより、捕捉抗体被覆試験管を作製する。この試験管を空にし、乾燥させ、固相抗体被覆試験管を作成する。

【0022】

50

試料のw-PTHアッセイを実施するために、人間血清試料200µmを固相固体被覆試験管に加える。各管にトレーサー溶液（標識したヤギ抗（1～6）シグナル抗体）100µlを加える。この管を、170rpmで振盪しながら、室温にて20～22時間インキュベートする。この間に、{固相ヤギ抗（39～84）PTH抗体}と{w-PTH}と{125-I-ヤギ免疫化学反応ヤギ抗（1～6）抗体}というサンドイッチを形成する免疫化学反応が起きる。このインキュベーション後、この試験管を蒸留水で洗浄する。ガンマカウンターを使用して、固相上の放射能（その量は存在するw-PTHの量に対応する）を測定する。試料中のw-PTH濃度を確認するために、標準および対照からの結果ならびにコンピューターソフトウェアを使用して、試料に関する放射能データを従来の分析法で処理する。図4に、このようなアッセイ用の標準曲線を示す。

10

## 【0023】

## [先端部分のw-PTH配列ペプチド]

上記アッセイにおけるシグナル抗体を作製するために、まず、hPTH(Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met)、ラットPTH(Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met)のいずれかに対応する合成PTHペプチド、または共通配列における少なくとも先端部分の4つのアミノ酸を作製する。選択されたペプチドは、アッセイを行う上で、2つの役割を果たすことができる。第1に、ポリクローナル抗体あるいはモノクローナル抗体を作製する特異的な材料である。第2に、所望のシグナル抗体または捕捉抗体を単離するためのアフィニティ精製法の材料である。

20

## 【0024】

簡単に記載すると、Applied Biosystem, Inc. 製(Foster City, California, U.S.A)モデル431自動ペプチドシンセサイザーで、Fmoc(9-フルオロニルメトキシカルボニル)をアミノ保護基として使用して、このようなペプチドを合成することができる。全てのアミノ酸および溶剤は、Applied Biosystem社から入手され、合成級のものである。合成に続いて、トリフルオロ酢酸(TFA)中に6.67%のフェノール、4.4%(V/V)のチオアニソールおよび8.8%のエタンジオールを含む反応混合液を使用して、このペプチドを樹脂から分離し、側鎖を脱ブロックする。分離されたペプチドを沈降させ、冷ジエチルエーテルで数回洗浄する。次いで、これを水に溶解し、凍結乾燥する。粗ペプチドをアミノ酸分析装置(Waters PICO-TAG System社製, Boston, Massachusetts, U.S.A)、およびVYDAC(TM)C8カラムと移動緩衝液として水中に0.1%のTFAおよび0.1%のTFA中に99.9%のアセトニトリルとを使用した逆相HPLCに供する。適当なアミノ酸組成に加えて1つの主要なピークが存在することは、このペプチドが、さらなる使用に適する証拠と考えられる。

30

## 【0025】

次いで、このようにして得られるペプチドを、製造会社からの説明書に従って、架橋アガロースビーズ(Pharmacia社製, Uppsala, Swedenからの活性化Sepharose 4B)に付着させる。先端部分のアミノ酸配列を認識するペプチド配列をビーズ上に準備し、w-PTHイムノアッセイ用の先端部分の配列抗体を単離するための、ポリクローナル抗体血清源をアフィニティ精製することができる。

40

## 【0026】

## [先端部分のアミノ酸配列を認識するw-PTH抗体]

アフィニティ精製抗(1～6)PTH抗体を作製するために、先ず、上述の選択された先端部分のPTH配列ペプチドを、ヤギに注入する免疫原として使用する。このペプチドは、注射用免疫原として単独で、一般に約5,000～10,000,000の分子量をもつ非PTHペプチドに組み込んで、w-PTH完全配列の一部として、使用することができる。この免疫原を、同量のフロイント完全アジュバント(軽鉱油、Ar1lace1データジェント、および不活化結核菌の混合物である)と混合する。このようにして得られた混合物をホモジナイズして水/油乳剤を作製し、これを、抗体を作製するために動物(一

50

般にヤギ)に注入する。免疫原用量は約50~400 $\mu$ gである。以後毎月、同用量の免疫原複合体をフロイント完全アジュバントを除いてヤギに毎月注入する。免疫後約3ヶ月後から、ヤギから毎月採血する。遠心分離により血液から赤血球を分離し、(1~6)PTH抗体が多い血清(抗血清)を分離する。

#### 【0027】

所望の(1~6)PTH抗体に対する抗血清を精製するために、分離カラムに、上述の先端部分のPTH配列ペプチド結合ビーズを充填し、0.1Mのリン酸緩衝食塩水(PBS)でカラムを洗浄し、平衡化する。(1~6)PTH特異性をもたない抗体を除去するために、抗血清をカラムに負荷し、0.01MのPBSで洗浄する。溶出液(0.1Mのグリシン塩化水素緩衝液、pH2.5)を、カラムを通過させることにより、結合した特異的ヤギ抗(1~6)PTHポリクローナル抗体を、カラムの固相PTH1~6から溶出させる。当業者に周知の通り、1.0Mのリン酸緩衝液、pH7.5を加えるか、0.01MのPBSと緩衝液交換するかのいずれかによって、ポリクローナル抗体がカラムから出た後、溶出したポリクローナル抗体を中和する。このポリクローナル抗体を2~8で保存する。

#### 【0028】

##### [w-PTHアッセイと総PTHアッセイとの間の比較]

本発明のw-PTH IRMAアッセイと、従来 of Intact PTHすなわちI-PTHイムノアッセイ、Allegro Nichols Intact-PTHアッセイ(Nichols Institute Diagnostics of San Juan Capistrano社, California, U.S.Aにより市販および作製されている)とを、PTH正常者と慢性尿毒症罹患患者との両方で比較した。このI-PTHイムノアッセイは、PINとPTHの間で100%交差反応性であるため、事実上、総PTHアッセイである(図10参照)。

#### 【0029】

図5に、本発明のw-PTH IRMAアッセイおよび上記I-PTHアッセイの両方で測定した健常者からの正常なヒト血清試料34検体の結果を示す。各例で、IRMAにより検出されるw-PTHレベルは、I-PTHアッセイで報告されるw-PTHレベルより低く、本IRMAが、I-PTHアッセイで検出される阻害性の非(1~84)PTH断片を検出しないことがわかる(図11参照)。図11は、このような阻害がいかにして発生するかを示す図である。本発明における、先端部分のPTHペプチド配列に特異的でないN末端のPTHに特異的なシグナル抗体を検出することができる。w-PTH(図6の上部)のみならず、PIN、非(1~84)PTH断片(図6の下部)も検出することができる。

#### 【0030】

慢性尿毒症患者157例のアッセイ結果の比較を図7に示す。w-PTH IRMAおよび上記I-PTHを使用して、これらの患者からの血清試料を測定した。各例で、w-PTHレベルはI-PTH値より低い。

#### 【0031】

##### [臨床使用]

188例を含む臨床状況で、本発明のw-PTHアッセイおよびPINアッセイを使用した。このグループには、健常な副甲状腺を有する31例および連続して透析を受けている慢性尿毒症患者157例が含まれていた。各人の血液試料を採取し、Scantibodies Laboratory, Inc.からのw-PTHアッセイ、ならびに総PTH値を与えるNichols InstituteからのI-PTHアッセイを使用して測定した。

#### 【0032】

表1に、透析を受けている慢性尿毒症患者の、w-PTHアッセイ、PINアッセイおよび総PTHアッセイの結果を、個々に、また比較して示す。

#### 【0033】

【表1】

患者 番号	総PTH pg/ml	W-PTH pg/ml	PIN pg/ml	総PTH に対する PIN	w-PTH に対する PIN	総PTH に対する 全PTH
1	1410	740	670	48%	91%	52%
2	185	89	96	52%	108%	48%
3	231	104	127	55%	122%	45%
4	1020	590	430	42%	73%	53%
5	270	159	111	41%	70%	59%
6	201	100	101	50%	101%	50%
7	380	100	280	74%	280%	26%
8	460	277	183	40%	66%	60%
9	380	197	183	48%	93%	52%
10	880	522	358	41%	69%	59%
11	310	154	156	50%	101%	50%
12	880	451	429	49%	95%	51%
13	670	418	252	38%	60%	63%
14	390	221	169	43%	76%	57%
15	170	108	62	36%	57%	64%
16	510	381	129	25%	34%	75%
17	200	67	133	67%	199%	34%
18	170	109	61	36%	56%	64%
19	360	199	161	45%	81%	55%
20	260	164	96	37%	59%	63%
21	440	372	68	15%	18%	85%

10

20

【0034】

【表1(つづき)】

患者 番号	総PTH pg/ml	W-PTH pg/ml	PIN pg/ml	総PTH に対する PIN	w-PTH に対する PIN	総PTH に対する 全PTH
22	120	51.7	68.3	57%	132%	43%
23	600	527	73	12%	14%	83%
24	220	130	90	41%	69%	59%
25	190	136	54	28%	40%	72%
26	220	118	102	46%	86%	54%
27	630	334	296	47%	89%	53%
28	150	90	60	40%	67%	60%
29	170	106	64	38%	60%	62%
30	810	489	321	40%	66%	60%
31	570	319	251	44%	79%	56%
32	570	467	103	18%	22%	82%
33	400	300	100	25%	33%	75%
34	560	378	182	33%	48%	68%
35	310	121	189	61%	156%	39%
36	240	98	142	59%	145%	41%
37	280	133	157	54%	118%	48%
38	230	124	106	46%	85%	54%
39	350	319	31	9%	10%	91%
40	200	133	67	34%	50%	67%
41	920	564	356	39%	63%	61%
42	210	89	121	58%	136%	42%
43	1990	904	1086	55%	120%	45%
44	300	212	88	29%	42%	71%
45	260	132	128	49%	97%	51%
46	140	72	68	49%	94%	51%
47	250	129	121	48%	94%	52%
48	130	72	58	45%	81%	56%
49	1840	1000	840	46%	84%	54%
50	280	167	113	40%	68%	60%
51	490	268	222	45%	83%	55%
52	150	77.1	72.9	49%	95%	51%
53	140	58.1	81.9	59%	141%	42%
54	210	92.7	117.3	56%	127%	44%
55	160	79	81	51%	103%	49%
56	480	296	184	38%	62%	62%
57	480	281	199	41%	71%	59%
58	270	120	150	56%	125%	44%

【 0 0 3 5 】

【 表 1 ( つ づ き ) 】

患者 番号	総PTH pg/ml	W-PTH pg/ml	PIN pg/ml	総PTH に対する PIN	w-PTH に対する PIN	総PTH に対する 全PTH
59	97	45	52	54%	116%	46%
60	330	154	176	53%	114%	47%
61	110	56	54	49%	96%	51%
62	660	456	204	31%	45%	69%
63	300	137	163	54%	119%	46%
64	240	145	95	40%	66%	60%
65	100	66.5	33.5	34%	50%	67%
66	410	416.3	-6.3	-2%	-2%	102%
67	410	235.7	174.3	43%	74%	57%
68	45	14.4	30.6	68%	213%	32%
69	200	102.3	97.7	49%	96%	51%
70	300	134	166	55%	124%	45%
71	320	202	118	37%	58%	63%
72	440	254	186	42%	73%	58%
73	190	99.6	90.4	48%	91%	52%
74	160	74.6	85.4	53%	114%	47%
75	600	429.8	170.2	28%	40%	72%
76	1140	632	508	45%	80%	55%
77	440	211	229	52%	109%	48%
78	450	276	174	39%	63%	61%
79	510	344	166	33%	48%	67%
80	190	62.8	127.2	67%	203%	33%
81	170	86	84	49%	98%	51%
82	180	103.4	76.6	43%	74%	57%
83	78	22.7	55.3	71%	244%	29%
84	230	117	113	49%	97%	51%
85	160	96	64	40%	67%	60%
86	220	89	131	60%	147%	40%
87	470	321.5	148.5	32%	46%	68%
88	310	137	173	56%	126%	44%
89	2050	1127	923	45%	82%	55%
90	930	414	516	55%	125%	45%
91	180	65	115	64%	177%	36%
92	560	238	322	58%	135%	43%
93	640	597	43	7%	7%	93%
94	590	382	208	35%	54%	65%
95	270	103	167	62%	162%	38%

【 0 0 3 6 】

【 表 1 ( つづき ) 】

10

20

30

40

患者 番号	総PTH pg/ml	W-PTH pg/ml	PIN pg/ml	総PTH に対する PIN	w-PTH に対する PIN	総PTH に対する 全PTH
96	560	349	211	38%	60%	62%
97	180	78	102	57%	131%	43%
98	790	429	361	46%	84%	54%
99	670	372	298	44%	80%	56%
100	140	20.4	119.6	85%	586%	15%
101	190	117	73	38%	62%	62%
102	190	108	82	43%	76%	57%
103	430	217	213	50%	98%	50%
104	560	439	121	22%	28%	78%
105	500	357.7	142.3	28%	40%	72%
106	1560	777	783	50%	101%	50%
107	62	24.3	37.7	61%	155%	39%
108	430	226	204	47%	90%	53%
109	160	67.2	92.8	58%	138%	42%
110	530	346	184	35%	53%	65%
111	260	142	118	45%	83%	55%
112	580	163	417	72%	256%	28%
113	440	579	-139	-32%	-24%	132%
114	500	232.3	267.7	54%	115%	46%
115	160	60	100	63%	167%	38%
116	340	202	138	41%	68%	59%
117	260	138	122	47%	88%	53%
118	260	119	141	54%	118%	46%
119	160	84	76	48%	90%	53%
120	130	46	84	65%	183%	35%
121	190	104	86	45%	83%	55%
122	420	334	86	20%	26%	80%
123	630	440	190	30%	43%	70%
124	75	26.4	48.6	65%	184%	35%
125	260	143	117	45%	82%	55%
126	640	409	231	36%	56%	64%
127	130	66.7	63.3	49%	95%	51%
128	700	381	319	46%	84%	54%
129	560	376	184	33%	49%	67%
130	<b>240</b>	<b>107</b>	133	55%	124%	45%
131	110	63	47	43%	75%	57%
132	420	297	123	29%	41%	71%

10

20

30

40

【 0 0 3 7 】

【表1 (つづき)】

患者 番号	総PTH pg/ml	W-PTH pg/ml	PIN pg/ml	総PTH に対する PIN	w-PTH に対する PIN	総PTH に対する 全PTH
133	580	229	351	61%	153%	39%
134	310	201.2	108.8	35%	54%	65%
135	160	97.9	62.1	39%	63%	61%
136	290	138.7	151.3	52%	109%	48%
137	200	96.2	103.8	52%	108%	48%
138	770	662.7	107.3	14%	16%	86%
139	290	130.7	159.3	55%	122%	45%
140	260	219	41	16%	19%	84%
141	350	211	139	40%	66%	60%
142	730	463.5	266.5	37%	57%	63%
143	490	231	259	53%	112%	47%
144	160	87	73	46%	84%	54%
145	380	222	158	42%	71%	58%
146	210	93.5	116.5	55%	125%	45%
147	630	383.4	246.6	39%	64%	61%
148	150	83.2	66.8	45%	80%	55%
149	320	152.5	167.5	52%	110%	48%
150	900	467.6	432.4	48%	92%	52%
151	1180	818.6	361.4	31%	44%	69%
152	120	38.4	81.6	68%	213%	32%
153	5230	1388	3842	73%	277%	27%
154	34	10.5	23.5	69%	224%	31%
155	1020	590.6	429.4	42%	73%	58%
156	180	76.6	103.4	57%	135%	43%
157	120	51.1	68.9	57%	135%	43%
中央値	300	154	127	46%	84%	54%

10

20

30

【0038】

表2に、健常者のw-PTHアッセイ、PINアッセイおよび総PTHアッセイの結果を、個々に、また比較して示す。

【0039】

【表2】

患者 番号	総PTH pg/ml	W-PTH pg/ml	PIN pg/ml	総PTH に対する PIN	w-PTH に対する PIN	総PTH に対する 全PTH
1	17.13	3.32	13.81	81%	416%	19%
2	32.92	10.49	22.43	68%	214%	32%
3	31.32	10.31	21.01	67%	204%	33%
4	41.84	12.72	29.12	70%	229%	30%
5	33.03	10.09	22.94	69%	227%	31%
6	44.32	14.23	30.09	68%	211%	32%
7	31.47	6.8	24.67	78%	363%	22%
8	20.82	10.03	10.79	52%	108%	48%
9	34.64	15.95	18.69	54%	117%	46%
10	23.69	5.25	18.44	78%	351%	22%
11	53.98	17.82	36.16	67%	203%	33%
12	52.71	18.83	33.88	64%	180%	36%
13	26.92	5.63	21.29	79%	378%	21%
14	39.93	11.86	28.07	70%	237%	30%
15	48.84	20.47	28.37	58%	139%	42%
16	29.56	13.68	15.88	54%	116%	46%
17	36.19	14.69	21.5	59%	146%	41%
18	20.96	6.99	13.97	67%	200%	33%
19	59.29	27.89	31.4	53%	113%	47%
20	45.57	18.23	27.34	60%	150%	40%
21	35.64	18.72	16.92	47%	90%	53%
22	38.53	19.56	18.97	49%	97%	51%
23	21.71	9.34	12.37	57%	132%	43%
24	32.42	13.51	18.91	58%	140%	42%
25	28.5	10.41	18.09	63%	174%	37%
26	18.17	7.8	10.37	57%	133%	43%
27	39.96	17.29	22.67	57%	131%	43%
28	34.08	15.24	18.84	55%	124%	45%
29	42.95	19.59	23.36	54%	119%	46%
30	38.4	12.16	26.24	68%	216%	32%
31	47.57	18.45	29.12	61%	158%	39%
中央値	34.64	13.51	21.5	61%	158%	39%

【0040】

明らかに、これらの2群の中央値における統計学的な有意差から、これらのアッセイを単独で使用するにより、あるいはそれぞれの値を比較することにより2つを識別できることが分かる。

【0041】

【表3】

10

20

30

40

試料のタイプ	総PTH (pg/ml)	w-PTH (pg/ml)	PIN (pg/ml)	総PTHに対するPIN	w-PTHに対するPIN	総PTHに対する全PTH
慢性尿毒症 (n=157) 中央値	300	154	127	46%	84%	55%
健常者 (n=31) 中央値	34.64	13.51	21.5	61%	158%	37%
p値	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

10

## 【0042】

本発明は、かなり多数の上記の好ましい特徴を組み込むことができることを、当業者は理解できるであろう。

## 【0043】

本明細書に記載の全ての刊行物および未公開の特許出願を、引用することにより本明細書の一部をなすものとする。

## 【0044】

現在、およびこの特許明細書から発行される特許の存続期間中、当業者に明白である、したがって本発明の精神および範囲の中である本発明のその他の実施形態は、本明細書に記載されていない。

20

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒトw-PTHの線図である。

【図2】 本発明の抗体をトレーサーエレメントとして使用したw-PTHアッセイの線図である。

【図3】 本発明の抗体を捕捉エレメントとして使用したw-PTHアッセイの線図である。

【図4】 w-PTHアッセイ用の標準曲線を示すグラフである。

【図5】 「正常な」PTH値を有する健常者に関する従来のI-PTHアッセイと本発明のw-PTHアッセイとを比較するグラフである。

30

【図6】 従来のI-PTHアッセイにおける、PINによる阻害を示す線図である。

【図7】 慢性尿毒症患者に関する、従来のI-PTHアッセイと本発明のw-PTHアッセイとを比較するグラフである。

【図8】 健常者、原発性副甲状腺機能亢進患者、および慢性尿毒症患者に関する、w-PTHの分布を示すグラフである。

【図9】 受容体レベルで、いかにして、PINがw-PTHの作用を遮断し、それによって、人間がw-PTHの生物学的作用に非感受性になるかを示す線図である。

【図10】 本発明で使用する総PTHアッセイにおける、w-PTHとPINの完全な交差反応性を示すグラフである。

40

【図11】 本発明で使用するw-PTHアッセイが、いかにPINを検出しないかを示すグラフである。

【図12】 PINが、いかにw-PTHのin vivoインヒビターであるかを示すグラフである。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Cantor, Thomas L  
Gao, Ping

<120> Methods for Differentiating Parathyroid and Bone Status Related Diseases

<160> 5

10

<170> Microsoft Word 7.0

<210> 1

<211> 84 [integer length]

<212> PRT

20

<400> 1

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu

1                    5                    10                    15

Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp

20                    25                    30

Val His Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp

35                    40                    45

Ala Gly Ser Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val

50                    55                    60

30

Glu Ser His Glu Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asn Lys Ala Asp Val  
 65 70 75

Asn Val Leu Thyr Lys Ala Lys Ser Gln  
 80

<210> 2

10

<211> 82 [integer length]

<212> PRT

<400> 2

Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser  
 1 5 10 15

20

Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His  
 20 25 30

Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp Ala Gly  
 35 40 45

Ser Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Ser  
 50 55 60

30

His Glu Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asn Lys Ala Asp Val Asn Val  
 65 70 75

Leu Thyr Lys Ala Lys Ser Gln

80

<210> 3

<211> 51 [integer length]

<212> PRT

10

<400> 3

Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp Ala Gly Ser

1                    5                    10                    15

Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Ser His

20                    25                    30

20

Glu Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asn Lys Ala Asp Val Asn Val Leu

35                    40                    45

Thyr Lys Ala Lys Ser Gln

50

30

<210> 4

<211> 8 [integer length]

<212> PRT

<400> 4

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met

1                    5

10

<210> 5

<211> 32 [integer length]

<212> PRT

<400> 5

20

Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Met Glu Arg Val

1                    5                    10                    15

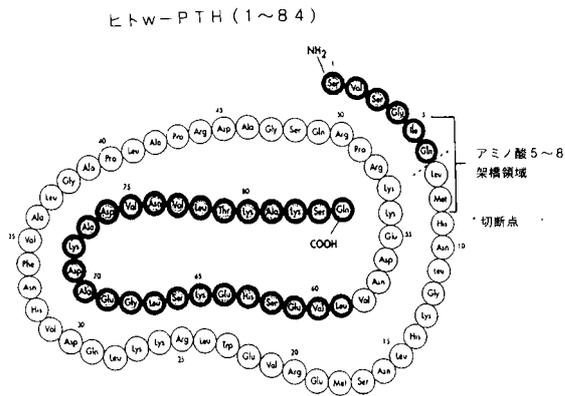
Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe Val Ala

                  20                    25                    30

Leu Gly

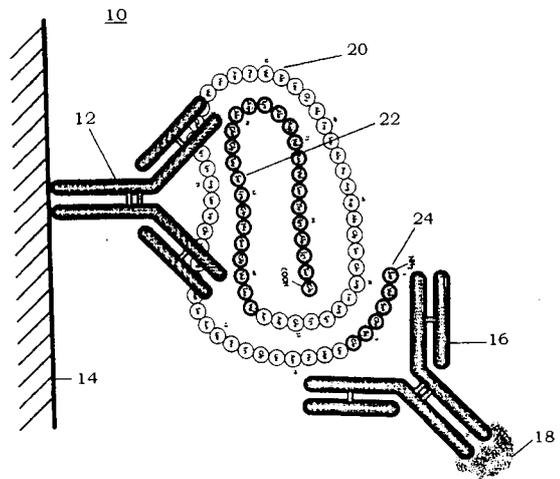
【 図 1 】

FIG. 1



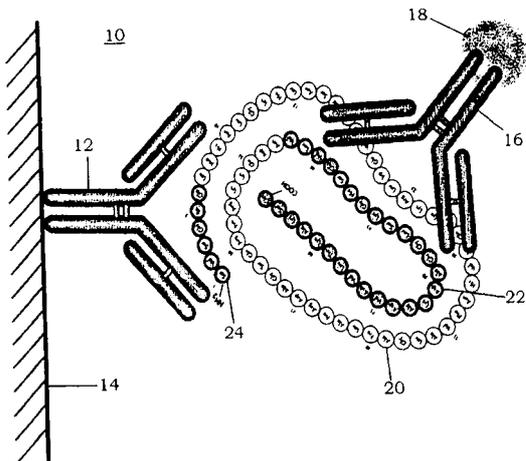
【 図 2 】

FIG. 2



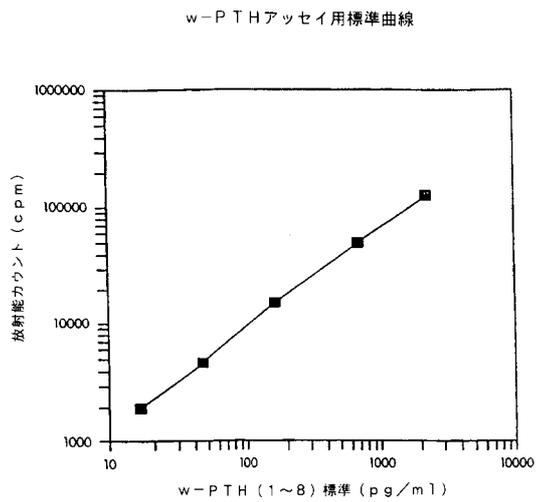
【 図 3 】

FIG. 3



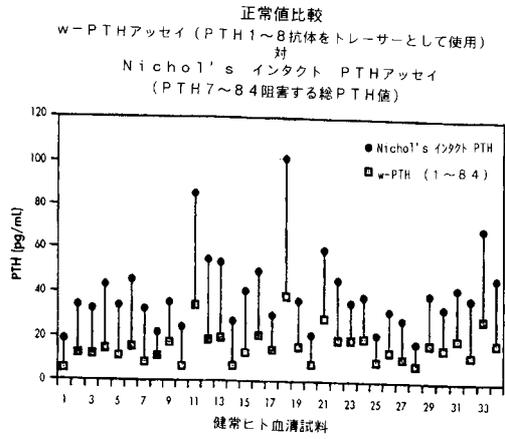
【 図 4 】

FIG. 4



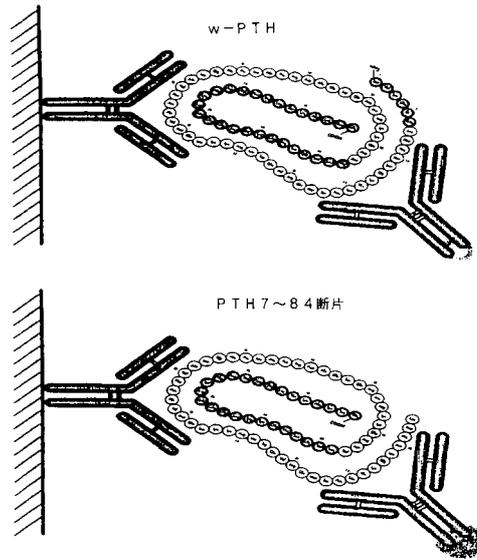
【 図 5 】

FIG. 5



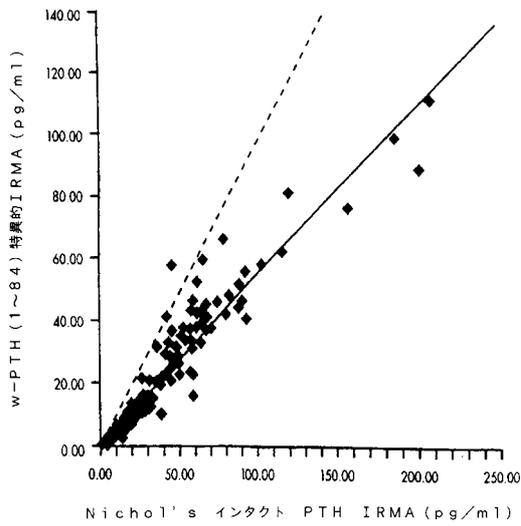
【 図 6 】

FIG. 6



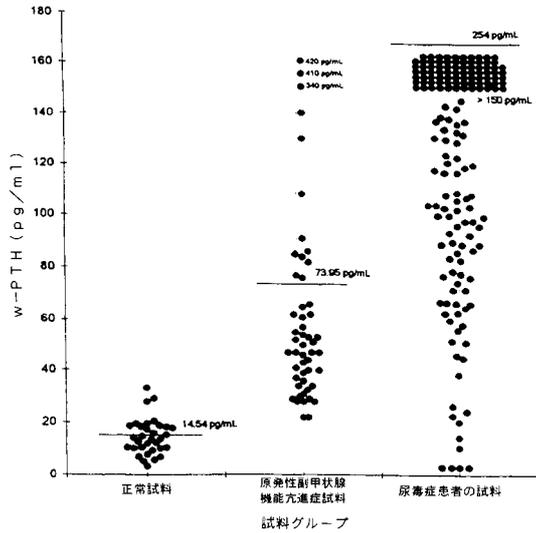
【 図 7 】

FIG. 7



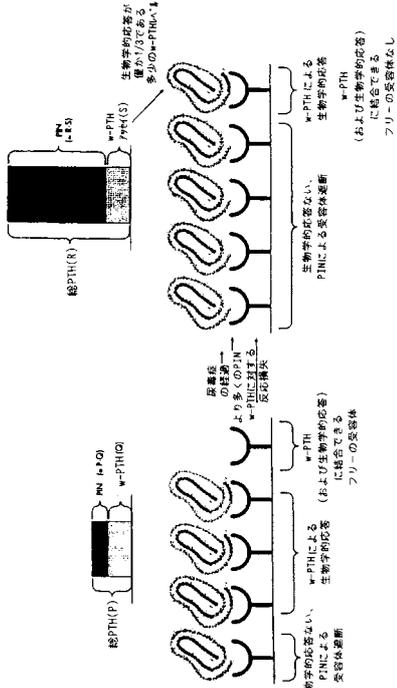
【 図 8 】

FIG. 8



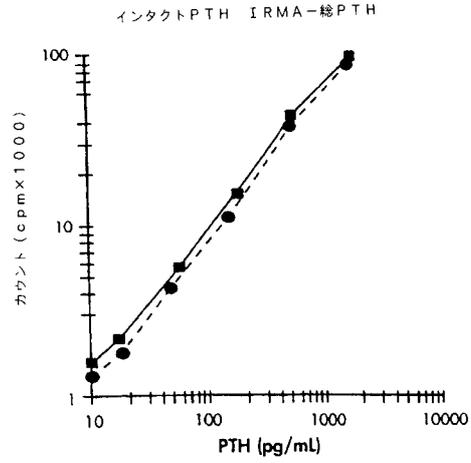
【 図 9 】

FIG. 9



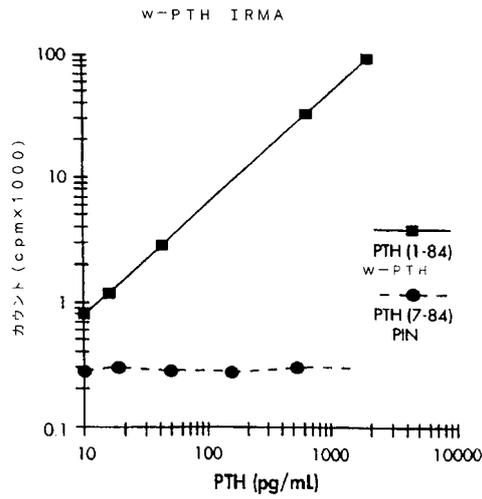
【 図 10 】

FIG. 10



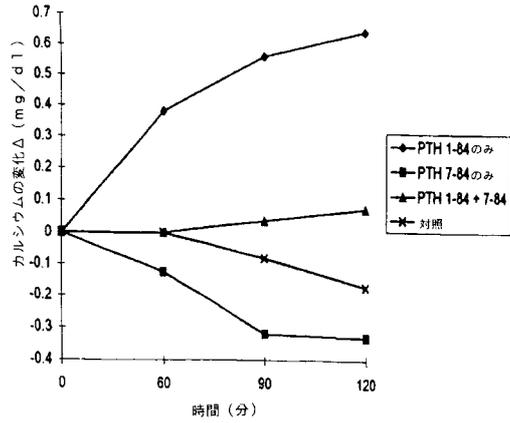
【 図 11 】

FIG. 11



【 図 12 】

FIG. 12



---

フロントページの続き

- (72)発明者 キャンター, トーマス・エル  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92701, サンティ, エイブラハム・ウェイ 9336, スキ  
ャンティボディーズ・ラボラトリー, インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ガオ, ビン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92701, サンティ, エイブラハム・ウェイ 9336, スキ  
ャンティボディーズ・ラボラトリー, インコーポレイテッド内

合議体

審判長 秋月 美紀子

審判官 山村 祥子

審判官 高橋 泰史

- (56)参考文献 特表平05-505594(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N33/48-33/98

专利名称(译)	测定完全甲状旁腺激素的方法和鉴定甲状旁腺疾病和慢性肾衰竭患者骨状态的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP4132677B2</a>	公开(公告)日	2008-08-13
申请号	JP2000593958	申请日	2000-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	微薄的身体的实验室公司		
申请(专利权)人(译)	微薄的身体的实验室, 公司		
当前申请(专利权)人(译)	微薄的身体的实验室, 公司		
[标]发明人	キャンター・トーマス・エル ガオ・ピン		
发明人	キャンター, トーマス・エル ガオ, ピン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/635 C07K16/26 G01N33/68 G01N33/74 G01N33/78		
FI分类号	G01N33/53.B C07K14/635.ZNA		
代理人(译)	中村綾子		
助理审查员(译)	高桥靖		
优先权	09/231422 1999-01-14 US 09/344639 1999-06-26 US		
其他公开文献	JP2002535622A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及用于区分患者甲状旁腺疾病(例如甲状旁腺功能亢进和相关骨病)的正常或非疾病状态的新方法和装置。人们可以检测生物样本中的全部或非碎片(1至84)甲状旁腺激素,以及可以作为甲状旁腺激素拮抗剂起作用的大型非整体甲状旁腺激素肽片段。通过比较值或独立使用大的非整体甲状旁腺激素肽片段,整个甲状旁腺激素或这些值的组合的值,能够区分甲状旁腺和骨相关疾病状态,以及区分这些状态来自正常状态。

患者 番号	総PTH pg/ml	W-PTH pg/ml	PIN pg/ml	総PTH に対する PIN	w-PTH に対する PIN	総PTH に対する 全PTH
1	1410	740	670	48%	91%	52%
2	185	89	96	52%	108%	48%
3	231	104	127	55%	122%	45%
4	1020	590	430	42%	73%	53%
5	270	159	111	41%	70%	59%
6	201	100	101	50%	101%	50%
7	380	100	280	74%	280%	26%
8	460	277	183	40%	66%	60%
9	380	197	183	48%	93%	52%
10	880	522	358	41%	69%	59%
11	310	154	156	50%	101%	50%
12	880	451	429	49%	95%	51%
13	670	418	252	38%	60%	63%
14	390	221	169	43%	76%	57%
15	170	108	62	36%	57%	64%
16	510	381	129	25%	34%	75%
17	200	67	133	67%	199%	34%
18	170	109	61	36%	56%	64%
19	360	199	161	45%	81%	55%
20	260	164	96	37%	59%	63%
21	440	372	68	15%	18%	85%