

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 202338

(P2003 - 202338A)

(43)公開日 平成15年7月18日(2003.7.18)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-コード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/18	ZNA	C 0 7 K 16/18	ZNA 4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/531	A 4 B 0 6 5
G 0 1 N 33/531		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
// C 1 2 N 15/02		C 1 2 N 5/00	B

審査請求 有 請求項の数 21 O L (全 32数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 264031(P2002 - 264031)
 (62)分割の表示 特願平7 - 508839の分割
 (22)出願日 平成6年9月19日(1994.9.19)
 (31)優先権主張番号 1040/93
 (32)優先日 平成5年9月17日(1993.9.17)
 (33)優先権主張国 デンマーク(DK)

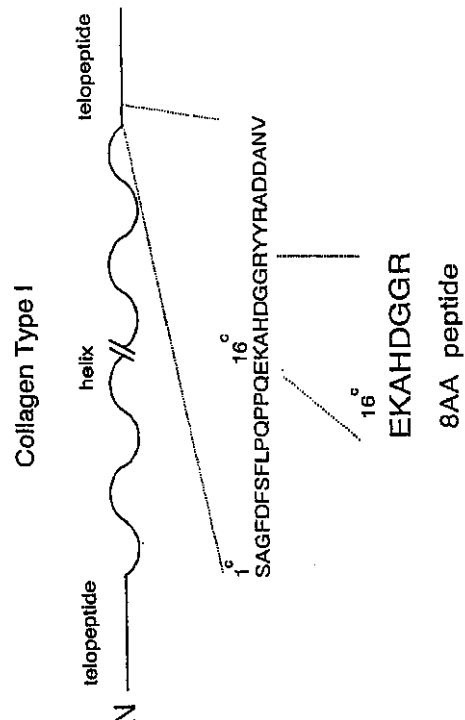
(71)出願人 501286163
 オステオミ-ター・ピオテク・エ- / エス
 OSTEOMETER BIOTECH
 A / S
 デンマーク国、デーカ - 2730 ヘルレフ、
 ヘルレフ・ホ-フェデガーデ、207番、オス
 テオバルク
 (72)発明者 クイスト、ペル
 デンマーク国、ディーケー - 2930、クラム
 ベンボルク、タールバク・ストランドベイ、
 103番ジー
 (74)代理人 100062498
 弁理士 竹内 卓 (外1名)
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 体液中のコラーゲン断片を測定する方法、該方法を実施するためのテストキット及び手段、並びにコラーゲンの代謝に関連する疾患の存在を診断するために該方法を使用する方法・用途

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 コラーゲンの代謝に関する疾患を診断するために体液中のコラーゲン断片を測定する方法の提供。

【解決手段】 体液の試料をコラーゲン断片に対する少なくとも一つの免疫学的結合性パ-トナ-と接触させることから成る体液中のコラーゲン断片を測定する方法において、前記免疫学的結合性パ-トナ-が、実質的にコラーゲンに由来する配列を有する合成ペプチドと免疫反応性を示し且つ架橋のための可能な部位を含有するものである前記測定方法。該免疫学的結合性パ-トナ-は、全抗体としてか又はその免疫学的に活性な断片としてのいずれかで、試料中のコラーゲン断片を定量するための測定方法に組み込まれる。免疫学的結合性パ-トナ-の一つ又は複数と接触させること以外に、該試料は対応する合成ペプチドに直接接触させても構わない。更に、該方法を実施するためのテストキットおよび具体的な手段を包含する。また、特異的ペプチドの構造も説明・記載する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 体液中のコラーゲン断片の測定方法であって、前記体液の試料をコラーゲン断片に対する少なくとも一つの免疫学的結合性パ-トナ-と接触させること、前記結合性パ-トナ-が、実質的にコラーゲンに由来する配列を持つ合成ペプチドと免疫反応性を示しかつ架橋のための潜在的部位を含有する抗体であること、及び前記該免疫学的結合性パ-トナ-の一つ又は複数を、全抗体または免疫学的に活性なその断片のいずれかとして、試料中のコラーゲン断片の定量測定法に組み込むこととを特徴とする、前記測定方法。

【請求項2】 体液中の試料を、免疫学的結合性パ-トナ-の一つまたは複数と接触させることに加えて、架橋出来る潜在的部位を含有する対応した合成ペプチドと直接接触させる、請求項第1項に記載された方法。

【請求項3】 該免疫学的結合性パ-トナ-が、架橋出来る潜在的部位を含有する対応した合成ペプチドを用いて免疫化することによって生成されたものである、請求項第1項または第2項に記載された方法。

【請求項4】 架橋出来る潜在的部位が、ペプチド配列に一体化されたリシンまたはヒドロキシリシン残基から成る、請求項第1項に記載された方法。

【請求項5】 該合成ペプチドの配列が、実質的に下記する構造のうちの一つから成る、ヒトI型コラーゲンの配列に由来するものである、請求項第1項又は第2項に記載された方法。

Asp-Glu-Lys-Ser-Thr-Gly-Gly

Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg

Gly-Met-Lys-Gly-His-Arg

Gly-Ile-Lys-Gly-His-Arg

Gly-Phe-Lys-Gly-Ile-Arg

又は Gly-Leu-Pro-Gly-Leu-Lys-Gly-His-Asn

【請求項6】 該合成ペプチドの配列が、実質的に下記する構造のうちの一つから成る、ヒトII型コラーゲンの配列に由来するものである、請求項第1項又は第2項に記載された方法。

Glu-Lys-Gly-Pro-Asp

Gly-Val-Lys

Pro-Gly-Val-Lys-Gly

Pro-Gly-Pro-Lys-Gly-Glu

Gly-Gln-Lys-Gly-Glu-Pro

又は Gly-Asp-Ile-Lys-Asp-Ile-Val

【請求項7】 該合成ペプチドの配列が、実質的に下記する構造のうちの一つから成る、ヒトIII型コラーゲンの配列に由来するものである、請求項第1項又は第2項に記載された方法。

Asp-Val-Lys-Ser-Gly-Val

Glu-Lys-Ala-Gly-Gly-Phe-Ala

Gly-Phe-Pro-Gly-Met-Lys-Gly-His-Arg

又は Gly-Ala-Ala-Gly-Ile-Lys-Gly-His-Arg

【請求項8】 該体液がヒトの尿、血液、血清または滑液・滑膜液である請求項第1項に記載された方法。

【請求項9】 請求項第1項ないし第8項のうちの何れか一項に記載された方法において使用される該合成ペプチドのいずれかに対して結合するモノクローナル抗体を産生する能力を有する細胞系。

【請求項10】 請求項第9項に記載された細胞系によって産生されるモノクローナル抗体。

【請求項11】 実質的に下記する構造のうちの一つから成る、ヒトI型コラーゲンの配列に由来する配列：

Asp-Glu-Lys-Ser-Thr-Gly-Gly

Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg

Gly-Met-Lys-Gly-His-Arg

Gly-Ile-Lys-Gly-His-Arg

Gly-Phe-Lys-Gly-Ile-Arg

又は Gly-Leu-Pro-Gly-Leu-Lys-Gly-His-Asnと

実質的に下記する構造のうちの一つから成る、ヒトII型コラーゲンの配列に由来する配列：

Glu-Lys-Gly-Pro-Asp

Gly-Val-Lys

Pro-Gly-Val-Lys-Gly

Pro-Gly-Pro-Lys-Gly-Glu

Gly-Gln-Lys-Gly-Glu-Pro

又は Gly-Asp-Ile-Lys-Asp-Ile-Val、及び

実質的に下記する構造のうちの一つから成る、ヒトIII型コラーゲンの配列に由来する配列：

Asp-Val-Lys-Ser-Gly-Val

Glu-Lys-Ala-Gly-Gly-Phe-Ala

Gly-Phe-Pro-Gly-Met-Lys-Gly-His-Arg

30 又は Gly-Ala-Ala-Gly-Ile-Lys-Gly-His-Arg

から成る群から選択される合成ペプチドを用いて免疫化することによって生成せめられる免疫学的結合性パ-トナ-。

【請求項12】 Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Argなる配列を有する合成ペプチドを用いて免疫化することによって生成せめられる請求項第11項に記載された免疫学的結合性パ-トナ-。

【請求項13】 体液中のコラーゲン断片の量を数量化するためのテストキットであって、前記キットが実質的にコラーゲンに由来し且つ架橋出来る潜在的部位を有する合成ペプチドと免疫反応性を示す少なくとも一つの免疫学的結合性パ-トナ-を包含して成るものである、前記テストキット。

【請求項14】 請求項第12項に記載された免疫学的結合性パ-トナ-を包含して成る、請求項第13項に記載されたテストキット。

【請求項15】 コラーゲン代謝に関連した疾患の存在を患者において診断する方法であって、下記する三つの工程から成る前記診断方法：

50 (a) 前記患者から採取した試料をコラーゲン断片に対

する少なくとも1つの免疫学的結合性パ-トナ-と接触させること。なお、該結合性パ-トナ-は、その配列がコラーゲンに実質的に由来し且つ架橋出来る潜在的部位を含有する合成ペプチドに免疫反応性を示す抗体またはその断片であるとする；

(b) 該試料中のコラーゲン断片に結合した前記抗体の量を検出すること；及び

(c) 該量を、コラーゲン代謝に関連した何れの疾患にも罹患していない対照被験者から採取した試料中において測定した前記抗体の結合量に基づいて予め確立・作成しておいた標準に前記量を比較対照すること。

【請求項16】 該抗体が、架橋出来る潜在的部位を含有する対応した合成ペプチドを用いて免疫化することによって生成せしめたものである、請求項第13項に記載された方法。

【請求項17】 所定の疾患を診断するため、骨組織、結合組織および他の組織の代謝の他のマーカーと組み合わせてコラーゲン断片の測定を行うことから成る、請求項第13項に記載された方法。

【請求項18】 請求項第11項に記載された合成ペプチドを体液中における該ペプチドの量を数量化するに際しての標準として使用する方法・用途。

【請求項19】 請求項第11項に記載された合成ペプチドを免疫原剤の調製において使用する方法・用途。

【請求項20】 診断剤として使用される、請求項第11項に記載された免疫学的結合性パ-トナ-。

【請求項21】 請求項第11項に記載された合成ペプチドから成る免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、体液中のコラーゲン断片を測定する方法に関する。本発明は、さらに、本発明の該方法を実施するのに用いる、合成ペプチド、モノクローナルおよびポリクローナル抗体ならびに細胞系を含む手段に関する。なおさらに、本発明は、コラーゲンの代謝に関連する疾患、特に骨粗鬆症を診断するために前記方法を使用する方法・用途に関する。

【0002】

【従来の技術とその問題点】コラーゲンとコラーゲン代謝疾患

骨粗鬆症はヒトにおいて最も広範に認められる骨の疾病である。原発性骨粗鬆症は、高い骨折受傷性を伴うのであるが、骨格の骨質量の漸進的減少に起因する疾患であり、アメリカ合衆国だけでも1500万乃至2000万の人々が罹患していると推定されている。この疾患の基礎は、骨の再形成、即ち骨組織の形成および吸収の速度が年齢に依存して不均衡になることである。

【0003】アメリカ合衆国においては毎年、骨粗鬆症に関連した骨折が約120万件も老人に起こっており、これには約538000の脊椎の圧縮骨折、約2270

00の股関節骨折および相当数の末梢骨の初期骨折を含む。股関節骨折については、その12乃至20%が致命的である。その理由は、重度の外傷および出血を引き起こし、而も助かった患者の半分は家庭での看護を必要とする。骨粗鬆症関連傷害から生じる合計コストは今や、米国で年間少なくとも100億ドルに達する(Riggs, New England Journal of Medicine. 327:620-727(1992))。

【0004】骨粗鬆症は、閉経後の女性に最も広範に生起するのであるが、それは平均して閉経後10年以内にその骨の質量の15%を失うからである。またこの疾病は、老齢になるに従い男性でもまた若い無月経の女性運動競技者でも起こる。骨粗鬆症が持つ社会的かつ経済的影響の重要性は大きく而も増大しているにも係わらず、患者または健常な被験者において骨吸収速度を測定するための信頼できる測定方法は、その利用可能性は極めて限定されている。コラーゲン代謝の異常を必然的に伴う(およびこれに関連した)他の疾患としては、パジェット病、マルファン症候群、骨形成不全、コラーゲン組織における新生物増殖、小人症、慢性関節リウマチ、変形性関節症および脈管炎症候群などがある。

【0005】ヒトコラーゲンには、これまでに三種類のものが公知であり報告されている。クラスIコラーゲンは、I型、II型、III型、V型およびXI型にさらに細分され、フィブリルを形成することが知られている。I型乃至III型のアミノ酸配列を(これまでに解明されたところまで)添付書類Aとして添付する。

【0006】I型コラーゲンは、骨の有機マトリックスの90%以上を占めており、従って原理的にはI型コラーゲンの分解を追跡することによって骨吸収速度を推定することが可能である。同様に、結合組織を包含する他の疾病状態は多数あるが、コラーゲンの分解を測定することによって追跡することが出来る。その例としては、慢性関節リウマチおよび変形性関節症に関連するII型コラーゲンの分解および脈管炎症候群におけるIII型コラーゲンの分解が挙げられる。

【0007】ヒトIII型コラーゲン、ヒト・プロ1(I)コラーゲン及びヒトIII型コラーゲンの全プレプロ1(III)鎖のアミノ酸配列並びにこれらに対応するcDNAクローンが、いくつかのグループの研究者によって研究されその結果決定されている；即ち、Loil et al., Nucleic Acids Research 12:9383-9394(1984); Sangiorgi et al., Nucleic Acids Research, 13:2207-2225(1985); Baldwin et al., Biochem. J., 262:521-528(1989); およびAla-Kokko et al., Biochem. J. 260:509-516(1989)を参照。

【0008】I、IIおよびIII型コラーゲンは全て、プロコラーゲン分子として生体内で形成されるのであるが、このプロコラーゲン分子は、コラーゲン分子に結合したN-末端およびC-末端プロペプチド配列

から構成されて成る。コラーゲン合成の過程で生体内で自然に生成するプロペプチドを除去すると、残るコラーゲン分子のコアは、その大半は非三重ラセンである末端テロペプチド配列を有する三重ラセンから成っている。これらのテロペプチド配列は、細胞外でのコラーゲンフィブリルの分子間架橋が起こる部位として重要な機能を有する。またこのアルファラセン領域も架橋可能な部位を含んでいるが、この領域から得られるペプチドは本発明の一部を構成する。

【0009】分子間架橋結合は、コラーゲンフィブリルに対して生物力学的安定性を付与する。これらの架橋結合の形成は、リシンおよびヒドロキシリシンの対応するアルデヒドへの修飾によって開始される。コラーゲンの隣接鎖に位置するそれらの残基のうちのいくつかは、自発的に相異なる分子間架橋結合を形成する。コラーゲンテロペプチド上にラセン領域から架橋する部位の正確な位置は、既に以前に報告済である。例えば、Kuehn, K., *Immunochemistry of the extracellular matrix*, 1:1-29, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1982)、Eyre, D.R., *Ann. Rev. Biochem.*, 53:717-48(1984)または米国特許第5140103号を参照。さらに、I型、II型およびIII型コラーゲンにおいて架橋するためのいくつかの潜在的な可能性のある部位について、アミノ酸配列を後記表1に示す。

【0010】繊維状蛋白質であるコラーゲンおよびエラスチンは、リシンまたはヒドロキシリシンの側鎖からのアルデヒド形成に基づくユニークな機構によって架橋される。架橋の4つの相同な座がI型、II型およびIII型コラーゲンの分子で明らかにされている(総説については、Kuehn, K., *Immunochemistry of the extracellular matrix*, 1:1-29 (1982)を参照)。2つはアルデヒド部位であり、それぞれ各テロペプチド領域におけるものである。残りの二つの部位は、分子の各末端から約90残基離れて対称的に位置するヒドロキシリシンである。コラーゲン分子がフィブリルにパックすると、ラセン領域におけるこれらの後者の部位は一列に配列し、隣接分子中のテロペプチドアルデヒドと反応する。かくして、3-ヒドロキシピリジニウム残基がヒドロキシリシン由来アルデヒドからの成熟架橋結合であるという強力な証拠が得られる。しかしながら、別の経路、すなわち、リシン残基のアルデヒド結合からの成熟架橋残基は依然知られていない。

【0011】コラーゲン分解に関する先行技術による測定方法

これまでに生体内(in vivo)でのコラーゲンの分解を追跡するため開発されてきた測定方法は、コラーゲンの分解産物を含む種々の生化学的マーカーを測定することによるものであった。しかしながら、これらの方法はいずれも、架橋可能部位を持つコラーゲン断片から本質的に誘導した配列を有する合成ペプチドと免疫反応性を示

す抗体の形態をとる免疫学的結合性パトナを使用するものではなかった。

【0012】例えば、ヒドロキシプロリンは、その大半がコラーゲンおよび骨や他の全ての結合組織における主要構造タンパク質に限定されているアミノ酸であるが、尿中に排泄される。その排泄速度は、ある種の状態、特に前記したときパジェット病-骨の代謝回転が大幅に増大する代謝的骨疾患である-において増加することが知られている。

【0013】このような理由で、これまで尿中ヒドロキシプロリンがコラーゲン分解についてのアミノ酸マーカーとして広く使用されてきたのである; Singer, F.R. et al., *Metabolic Bone Disease*, Vol. II (eds. Avioli, L.V., and Kane, S.M.), 489-575(1978), Academic Press, New York を参照。

【0014】米国特許第3,600,132号は、コラーゲン代謝における変動を追跡するため血清、尿、腰椎液やその他の細胞間液などの体液中のヒドロキシプロリンの測定方法を開示している。該特許においては、ヒドロキシプロリンは、パジェット病、マルファン症候群、骨形成不全、コラーゲン組織における新生物増殖及び種々の形態の小人症のような病理学的状態に関連して、コラーゲンの同化および異化が増大することと相関関係がある旨述べられている。

【0015】パジェット病に関連する骨吸収はまた、骨コラーゲンの分解の後に尿に排泄されるヒドロキシプロリンを含んだ小さいペプチドを測定することによっても追跡されてきた; Russel et al., *Metab. Bone Dis. and Rel. Res.* 4 and 5, 255-262(1981)及び前掲Singer, F.R., et al.を参照。

【0016】パジェット病の場合は、尿中ヒドロキシプロリンの増加は恐らくは、その大半は骨分解に基くものである; しかしながら、ヒドロキシプロリンは一般には、骨分解についての特異的指標としては使用することは出来ない。尿中のヒドロキシプロリンの多くは、新規のコラーゲン合成(新たに産生された蛋白質のうちのかなりの量が組織繊維に一体化させることなく分解され、排泄される)に由来し且つある種の血中タンパク質やヒドロキシプロリンを含有する他のタンパク質の代謝変化に由来する可能性があるからである。

【0017】さらには、タンパク質分解に由来する遊離ヒドロキシプロリンの約80%は肝臓で代謝され、決して尿には出現しない。Kiviriko, K.I., *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 5:93(1970)及びWeiss, P.H. and Klein, L., *J. Clin. Invest.* 48:1(1969)を参照。ヒドロキシプロリンは骨粗鬆症の良好なマーカーであるが、扱うのが面倒であって、骨に含まれるコラーゲンに特異的である。

【0018】ヒドロキシリシンおよびその配糖体誘導体は、共にコラーゲン性タンパク質にとって独特なもので

あって、コラーゲン分解のマーカーとしてヒドロキシプロリンよりも正確であると考えられてきた。しかしながら、ヒドロキシプロリンについて前記したと同様の理由によって、ヒドロキシリシンおよびその配糖体は、恐らくは骨吸収の非特異的マーカーとしては同等であろう； Krane, S.M. and Simon, L.S., *Develop. Biochem.* 22: 185(1981)を参照。

【0019】また別の研究者は、関節疾病におけるコラーゲン分解の指標として架橋性化合物である3-ヒドロキシピリジニウムを測定してきている。その背景および例については、Wu and Eyre, *Biochemistry*, 23:1850 (1984); Black et al., *Annals of the Rheumatic Diseases*, 48:641-644(1989); Robins et al.; *Annals of the Rheumatic Diseases*, 45:969-973(1986);およびSeibel et al., *The Journal of Dermatology*, 16:964 (1989)を参照。本発明とは異なって、これらの先行研究者は体液から得たペプチドを加水分解し、次いで個々の3-ヒドロキシピリジニウム残基の存在を探索していたのである。

【0020】I型、II型およびIII型コラーゲンの分解を測定するための測定方法は、米国特許第4、973、666号および米国特許第5、140、103号に開示されている。しかしながら、これらの両特許とも、架橋剤である3-ヒドロキシピリジニウムを含有するコラーゲン断片に限定されており、一方本発明は、この具体的な特別の架橋構造の存在または不存在に依存しないのである。さらに、前記した測定方法は、抗体を産生させるためおよび測定における抗原のために用いる3-ヒドロキシピリジニウムを含有するコラーゲン断片を尿から精製するという退屈で複雑な操作を必要とする。

【0021】現在のところ、米国特許第4、973、666号および米国特許第5、149、103号に記載されたアプローチを用いる臨床データはほとんど利用できない。特に、(前記特許に記載された方法によって測定した)I型コラーゲンのペプチドを含有する3-ヒドロキシピリジニウムの尿中濃度と(骨密度メトリーによって反復測定した数値により測定した)現実の骨損失との間の相関関係に関するデータは公表されていない。尿中でのペプチドを含有する3-ヒドロキシピリジニウムの存在は、骨再吸収過程前の異なる時点においてこのような特異的架橋構造が骨組織において正当に形成されることを必要とする。これらの過程については情報は、殆ど入手出来ないため、本発明においては、架橋構造の正確な形成という、このような依存性を回避しようとして意図したのである。更には予備的データによれば、本発明の一つの実施態様においてはこの測定方法で反応性を有する分子の大部分は分子量が4、000ダルトン以上であることが判っている。これとは逆に、2、000ダルトン未満の分子量を持つ分子のみが本測定方法で用いたモノクローナル抗体によって尿中で同定され

るのである；Hanson et al., *Journal of Bone and Mineral Research* 7: 1251-1258(1992)を参照。このことは、本発明の方法は反応性のプロフィールが極めて多様であること、即ち、この方法は前記米国特許に記載された方法とは違って、極めて異なる分子を検出することを証明するものである。

【0022】前記研究者は何れも、本発明に記載するように、コラーゲン分解に際して生体内(in vivo)で自然に生成する線状の架橋可能コラーゲン断片を特異的に測定することを報告していない。

【0023】英国特許出願第2、205、643号では、体内でのIII型コラーゲンの分解は、体液中のIII型コラーゲン由来のN-末端テロペプチドの濃度を測定することによって定量的に測定出来ることが報告されている。この方法は、架橋可能構造の周辺における特異的で、低分子量である配列と反応性を有する抗体を使用する方法に関するものではない。つまりこの方法は、III型コラーゲンを細菌性コラゲナーゼで分解することによって放出・遊離されたN-末端テロペプチドに対して生成した抗体を使用するものであって、前記テロペプチドは、この方法においては標識されたうえで使用されるのである。

【0024】Schroeter-Kermaniらは、*Immunol. Invest.* 19:475-491(1990)においてI型およびII型コラーゲンのCNBr断片に基づいた免疫学的測定システムを記載報告している。ペプシン可溶性コラーゲンを用い、かかるテロペプチドは組織に残される(前記英国特許出願第2、205、643号参照)。従って、断片およびそれから生成した抗体の間に一致関係はない。更にはこの文献には、抽出された組織試料についての測定値しか記載されていない。

【0025】ペプシン可溶性I型コラーゲンに対して生成させたモノクローナル抗体の開発が、Werkmeisterらによって*Eur. J. Biochem.* 187:439-443(1990)に記載報告されている。この抗体は、組織セグメントの免疫組織学的染色を行うためにまた細胞培養液中のコラーゲン含量を測定するために使用される。このような測定は体液について実施されるものではない。

【0026】欧州特許出願第0505210号は、I型コラーゲン由来のC-末端テロペプチドに対する抗体試薬の開発について記載している。免疫原は、ヒト骨コラーゲンを細菌性コラゲナーゼで可溶化することによって調製される。このようにして調製された抗体は、架橋および非架橋テロペプチドとも反応する能力があり、ピリジノリン以外の架橋剤を使用することができる。しかしながら、この方法は、本発明の測定方法とは顕著に異なる免疫測定方法が得られることになる。

【0027】国際特許出願WO91/09114号によれば、固体基質への細胞接着を促進するのに使用される、幾つかの合成ペプチドが開示されている。免疫学的

試薬としての合成ペプチドの使用については、言及されていない。

【0028】コラーゲン分解は、ある種のプロコラーゲンペプチドを数量化することによって測定できることを示す多数の報告がある。プロペプチドは、プロコラーゲン分子中の位置および生体内(in vivo)でのその切断のタイミングによってコラーゲンコアのテロペプチドおよびアルファラセン領域から区別される；米国特許第4,504,587号；米国特許第4,312,853号；Pierard et al., Analytical Biochemistry 141:127-136(1984)；Niemala, Clin. Chem. 31/8: 1301-1304(1985)；およびRohde et al., European Journal of Clinical Investigation, 9:451-459(1979)を参照。

【0029】欧州特許出願第0298210号および第0339443号は共に、I I型プロコラーゲンペプチドおよびその断片の免疫学的測定を記載している。更には、プロコラーゲンの測定に基づく方法が欧州特許出願0465104号に開示されている。プロコラーゲンペプチドの形成およびコラーゲン断片の形成は異なる時期に起こり、且つこのような断片はコラーゲン分子の異なる部分に由来するので、これらの方法は、本発明の方法とは明らかに異なる。

【0030】免疫学的試薬を開発するためにI X型コラーゲンに由来する配列を有する合成ペプチドの使用が、PCT特許出願WO90/08195号に開示されている。また同様に、該出願には、体液中のI X型コラーゲン断片の測定するためにこのようにして産生された抗体を使用する用途が記載されている。I X型コラーゲンは、架橋可能な部位を含有していないので、この特許出願は本発明を予測させるものではない。

【0031】米国特許第4,778,768号は、滑液の液状試料中のプロテオグリカンモノマーまたはその抗原断片の定量を行うことから成る、関節軟骨内部で生起する変化を測定する方法に関するものである。この米国特許は、分解コラーゲンに由来するコラーゲン断片の検出には関するものではない。

【0032】Dodge, J. は、Clin. Invest. 83:647-661(1981)において、ヒトおよびウシのI I型コラーゲンの解かれたアルファ鎖および臭化シアン誘導ペプチドと特異的に反応するポリクローナル抗血清を用いるI I型コラーゲンの分解を分析する方法を幾つか開示している。本発明とは異なり、コラーゲンの分解産物は体液中に検出されるのではなく、細胞培養の染色によって、即ち「in situ」検出によって組織化学的に検出されているのである。Dodgeと本発明の間の主要な差異は、DodgeはI I型コラーゲンの分解をin situにて測定する点である。

【0033】前記文献のいずれも、分解したフィブリルコラーゲンの量をin vivoで測定するために実測可能であるような、具体的なテロペプチドまたはアルファラセ

ンの構造を特定してはいない。

【0034】1994年2月17日に公開された国際出願94/03813号は、とりわけすべての締約国についての欧州特許を指定している。従って、それはEPC第54(3)条の規定になる先行技術となる。

【0035】該出願は、試料中のコラーゲンまたはコラーゲン断片を検出するに際して、コラーゲンのC-末端またはN-末端ドメインに対応する合成線状ペプチドを含有する結合性パ-トナ-を線状合成ペプチドに対する抗体および試料と共にインキュベートし、該抗体の該結合性パ-トナ-に対する抗体の結合を測定することから成る競合的免疫測定方法を記載している。この特許出願は、架橋出来る潜在的な部位を含有する合成ペプチドに言及しておらず、従って、本出願の新規性を阻害するものではない。

【0036】

【課題を解決するための手段】本発明は、患者および健康なヒト被験者の体液中において特定のコラーゲン断片が存在するという発見に基づく。このコラーゲン断片は、コラーゲン分解と共に生成されるので、架橋出来る潜在的な部位の存在によって、例えば、リシンまたはヒドロキシリシンの存在によって部分的に特徴づけられる(Kuehn, K., Immunochemistry of the extracellular matrix, 1:1-29(1982))。

【0037】本発明の方法は、I型、I I型及びI I I型のヒト・コラーゲンの分解の測定に使用可能である。

【0038】本発明は、コラーゲン分解に際してin vivoで産生される特定種のコラーゲン断片の存在およびその量を測定し；次いで、健康な個人、即ちコラーゲン代謝に影響を及ぼす疾患に罹患していない個人において同一種のコラーゲンを測定することによって作成した所定の標準値と前記コラーゲン断片検出値とを比較してコラーゲンの分解を測定する方法を提供するものである。なお、該個人は試験を受けるべき被験者と性別および年齢は一致させるものとする。

【0039】本発明は、これらの架橋構造を有さない合成ペプチドと免疫反応性を示す抗体を用いる。

【0040】好ましいある実施態様においては、本方法は、体液中のコラーゲン断片とコラーゲンに実質的に由来する合成ペプチドとが免疫学的結合性パ-トナ-に対して起こる競争的結合に基づく。

【0041】本発明は、コラーゲン分解に際して生じるコラーゲン断片の(定性的および定量的)検出を行うたの新規でかつ非常に簡単な方法を提供する。

【0042】本明細書において開示し特許請求する本発明の目的のために、下記する用語は以下の通り定義される。

【0043】「抗体」：モノクローナルもしくはポリクローナル抗体またはその免疫反応性断片(即ち、同一の抗原決定基に結合できる能力を持つ)、Fab、Fa

b'およびF(a b')₂断片を含むがこれらに限定されない。

【0044】「架橋可能部位」：in vivoで他のコラーゲン分子のテロペプチドまたはラセンアミノ酸配列とで架橋結合を形成できるリシンまたはヒドロキシリシンを含有するコラーゲンのテロペプチドまたはラセンアミノ酸配列における座。

【0045】「架橋可能ペプチド」：少なくとも1つの架橋可能部位を含むコラーゲン配列の断片を含有するペプチド。

【0046】テストキット：測定を行うのに用いる試薬と指示薬の組合せ。

【0047】実質的に由来する（構造について）：類似の抗原性を持つ構造、すなわち、前記合成ペプチド何れもが該合成ペプチドに対して免疫反応性を持つ免疫学的結合性パ-トナ-に結合するのを、非関連ペプチドのレベルを超えて阻害する能力を持つ構造。

【0048】CrossLaps ELISA：1(1)C1アミノ酸配列EK A H D G G Rに対する抗血清の反応性に基づく競合的免疫測定。この測定は8 A A ELISAとも呼ばれる。

【0049】この方法は又動物体液中のコラーゲン断片を測定するためにも、例えばコラーゲン代謝を測定するために用いることもできると想定される。また本方法は、新規医薬品のコラーゲン代謝に対する影響を評価するために該医薬品の臨床試験中においても使用することもできる。

【0050】より具体的には、本発明は、コラーゲンの前記配列に対応した合成ペプチドを使用することによってコラーゲン断片を測定する方法に関する。一般に、これらの合成ペプチドは全コラーゲン分子よりも少ないアミノ酸残基を有し、10アミノ酸よりも少ない場合が多いであろう。また、体液、例えば尿中に存在する分子に対応する合成ペプチドは架橋出来る潜在的部位、好ましくはリシンまたはヒドロキシリシンを構造中に結合させているであろう。

【0051】本発明は、前記合成ペプチドに対して免疫反応性を持つ抗体を使用することによってコラーゲン断片を測定することを包含するが、なお該ペプチドは各々架橋可能部位を有するコラーゲン断片に由来する配列を有する。

【0052】また、本発明は、前記合成ペプチドと免疫反応性のモノクローナル抗体を産生する細胞系（例えば、ハイブリドーマ）をも含む。更には本発明は、融合細胞ハイブリッドによって産生されたモノクローナル抗体、および検出可能なマーカーにカップリングしたその抗体（ならびにその結合性断片、例えばF a b）を含む。検出可能なマーカーの例としては、以下に限定されるものではないが、酵素、発色団、発蛍光団、補酵素、酵素阻害剤、化学ルミネッセンス物質、常磁性金属、ス

ピン標識および放射性同位体が挙げられる。

【0053】本発明の方法は、体液中においてコラーゲン分解に由来する特定のコラーゲン断片の濃度を数量化することから成り、代表的な測定法において、患者体液中のコラーゲン断片および固体表面に固定化された合成ペプチドを、合成ペプチドに免疫反応性を持つ免疫学的結合性パ-トナ-と接触させる。適当な体液としては、例えば、ヒト尿、血液、血清、血漿および滑液がある。また本方法は、例えば唾液および汗に対しても使用可能であることも想定している。この体液はそのまま使用するか又は接触工程に先立って精製しても構わない。この精製工程は、例えば以下に限定されるものではないが、カートリッジ吸着および溶出、分子ふるいクロマトグラフィー、透析、イオン交換、アルミナクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、およびそれらの組合せを含めた多数の標準的な手法を用いて実施することができる。

【0054】本発明は、体液中のコラーゲン断片の定量のための簡便化された方法を実現することにある。ある代表的な方法において、架橋出来る潜在的な部位を含有する合成ペプチドを抗体の産生に使用し、その後コラーゲン分解によってin vivoで生じたコラーゲン断片の定量のための検定に組み込み使用するのである。従って、該合成ペプチドも免疫原性剤として特徴づけられ、免疫原性組成物で使用できる。

【0055】また本発明は、体液中においてコラーゲンの分解に由来するコラーゲン断片の量を定量するのに有用なキットを包含する。本キットは、少なくとも1種の免疫学的結合性パ-トナ-、例えばコラーゲンの分解に由来するペプチドに特異的なモノクローナルまたはポリクローナル抗体から成る。所望ならば、テストキットの免疫学的結合性パ-トナ-は前記したもののごとき検出可能なマーカーに結合してもよい。従って一般的に言って、免疫学的結合性パ-トナ-も診断剤としてに有用である。以下に本発明を詳細に説明する。添付図面を参照されたい。

【0056】

【発明の実施の態様】本発明の方法の好ましい一つの実施態様においては、尿中のI、IIおよびIII型コラーゲン断片は、尿試料を計量して取り、コラーゲンに由来する配列を有する合成ペプチドおよび該合成ペプチドに免疫反応性を示す抗体とこの試料とを接触させることによって行う阻害ELISA（酵素結合イムノソルベント検定法）を用いて測定する。合成ペプチドは固体支持体に固定化し、また抗体は該合成ペプチドに対して生成させる。

【0057】これら試薬と試料を合わせてインキュベートし、ペルオキシダーゼ結合（リベリング）（revealing）抗体を添加する。もう1度インキュベーションした後、ペルオキシダーゼ基質溶液を添加する。最終のイン

キュベーションを短時間で行った後、酵素反応を停止し、吸光度を450nmで測定し、同一手法によって標準溶液で得られた標準曲線と比較する。

【0058】合成ペプチドを標準の調製に用いる。関連合成ペプチドのストック溶液中の合成ペプチドの濃度を、アミノ酸定量測定法によって測定する。ストック溶液の3倍希釈物を調製し、引き続いて、阻害ELISAにおける標準曲線の作成で用いる。

【0059】合成ペプチドの調製

合成ペプチドの調製は、当該分野でよく知られた手法に準じて、例えば、通常「Merrifield合成」と表記される固相ペプチド合成技術によって行うことができる。また、古典的液相技術を用いることもできる。対象となる配列は、潜在的架橋可能な部位を含む（例えば、Kuehn, K., *Immunochimistry of the extra-cellular matrix*,

1:1-29(1982)、Eyre, D.R., *Ann, Rev. Biochem.* 53:717-48(1984)、または米国特許第5、140、103号参照)。このようなペプチド配列の例を幾つか後記表1に示す。

【0060】合成ペプチドに関しては、(a)対応する天然コラーゲン断片を認識する抗体を生起させる、または(b)かかる抗体の天然断片への結合を阻害する、という二つの能力を損失させることなく、架橋可能部位から(またはそれへ)1以上のアミノ酸残基を省略(または付加)することができる。抗体を生成させるためにより長いコラーゲン断片および/またはキメラペプチドを用いることができ、原理的には、本測定法において免疫原および競合体と同一のペプチドを用いる必要はない。

【0061】

【表1】

本発明による合成ペプチドについての基礎として使用すべき種々の型のコラーゲンにおける潜在的架橋可能な部位を持つアミノ酸配列の例

I型コラーゲン

潜在的部位

テロペプチドにおける： N C

$\alpha 1(I)$ N-末端 Asp-Glu-Lys-Ser-Thr-Gly-Gly ($\alpha 1(I)N1$)

$\alpha 1(I)$ C-末端 Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg ($\alpha 1(I)C1$)

$\alpha 2(I)$ C-末端 潜在的部位なし

潜在的部位

ラセンにおける：

$\alpha 1(I)$ (N近傍) Gly-Met-Lys-Gly-His-Arg

$\alpha 1(I)$ (C近傍) Gly-Ile-Lys-Gly-His-Arg

$\alpha 2(I)$ (N近傍) Gly-Phe-Lys-Gly-Ile-Arg

$\alpha 2(I)$ (C近傍) Gly-Leu-Pro-Gly-Leu-Lys-Gly-His-Asn

II型コラーゲン

潜在的部位

テロペプチドにおける： N C

$\alpha 1(II)$ N-末端 Pro-Gly-Pro-Lys-Gly-Glu

Gly-Gln-Lys-Gly-Glu-Pro

Gly-Asp-Ile-Lys-Asp-Ile-Val

$\alpha 1(II)$ C-末端 Glu-Lys-Gly-Pro-Asp

潜在的部位

ラセンにおける：

$\alpha 1(II)$ (N近傍) Gly-Val-Lys

Pro-Gly-Val-Lys-Gly

III型コラーゲン

潜在的部位

テロペプチドにおける： N C

$\alpha 1(III)$ N-末端 Asp-Val-Lys-Ser-Gly-Val

$\alpha 1(III)$ C-末端 Glu-Lys-Ala-Gly-Gly-Phe-Ala

潜在的部位

ラセンにおける：

$\alpha 1(III)$ (N近傍) Gly-Phe-Pro-Gly-Met-Lys-Gly-His-Arg

$\alpha 1(III)$ (C近傍) Gly-Ala-Ala-Gly-Ile-Lys-Gly-His-Arg

抗体の調製

モノクローナルおよびポリクローナル両抗体の調製方法は当該分野でよく知られている。例えば、Campbell, A. M., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13 (1986)を参照。免疫化によって合成ペプチドに対する抗体を産生できる。しかしながら、これらの化合物は分子量が比較的小さいため、ハプテンを担体分子に結合させるのが好ましい。適当な担体分子としては、以下に限定されるものではないが、例え

ばウシ血清アルブミン、チログロブリン、オバルミン、破傷風毒素及びキイホール・リンベット(keyhole limpet)ヘモシアニンがある。好ましい担体は、ウシ血清アルブミンである。免疫化動物の抗体産生細胞に対してその最も免疫原性の高い形態でハプテンを提示するために、多数の代替カップリングプロトコルを使用できる。適当な手法としては、以下に限定されるものではないが、グルタルアルデヒド、カルボジイミドおよび過ヨウ素酸塩が挙げられる。好ましい結合剤は、グルタルアルデヒド

およびカルボジイミドである。

【0062】抗体の調製は、コラーゲン断片または担体に結合させた合成ペプチドによる免疫化を含む従来公知の技法によって行われる。免疫原性を改善するためには、注射前に免疫原をアジュバントと混合する。アジュバントの例としては、以下に限定されるものではないが、水酸化アルミニウム、フロイントのアジュバント、および免疫刺激複合体 (ISCOM) がある。ISCOM は、Mo rein, B.ら (Nature 308:457-560(1984))によって記載されている方法に準じて作成できる。

【0063】ハプテン担体分子に対するモノクローナルまたはポリクローナル抗体はいずれでも産生させることが出来る。モノクローナル抗体の産生を行うには、マウスを免疫化するのが好ましい。免疫化マウスから絨毛細胞を収集し、ホモジナイズし、その後ポリエチレングリコールの存在下で癌細胞と融合させて、コラーゲンに由来するペプチド断片に特異的なモノクローナル抗体を産生する細胞ハイブリッドを得る。適当な癌細胞としては、以下に限定されるものではないが、骨髄腫、肝癌、および肉腫細胞がある。モノクローナル抗体の産生につ

【0064】コラーゲンに由来するペプチド断片と反応性を示すポリクローナル抗体を調製するには、種々の動物種を免疫化させればよい。適当な動物種としては、以下に限定されるものではないが、ニワトリ、ウサギ、およびヤギがある。ニワトリおよびウサギが好ましい。

【0065】抗体断片は、当該分野で公知である種々の方法によって調製される (E.Ishikawa, Journal of Immunoassay 3:209-327(1983) 参照)。

【0066】免疫学的測定法の実施

従って、前記した方法で調製した抗体を用いた免疫学的測定を利用することによって、事前に分別または加水分解することなく生物学的流体試料を測定することができる。生物学的液体中で所望コラーゲンが持つ特異性は、測定構成法において一種の合成ペプチド (抗体の産生に際して用いたか又は何れにする抗体が免疫化学的な反応性を示す) の使用と組み合わせるとかかる抗体によって

【0067】この代替法として、かかる免疫学的測定をモノクローナル抗体を用いて実施しても構わない。この測定設計の基礎的考え方は、検定の特異性を抗原 (コラーゲンに対する合成ペプチド) から抗体 (モノクローナル抗体に対するウサギ抗血清からの) にシフトさせることである。このような構成法を用いると、測定は合成ペプチドを用いる必要がない。このような免疫学的測定の

変法は、精製したコラーゲナーゼ処理コラーゲンで予め被覆したマイクロタイタープレート中でペルオキシダーゼ結合抗体溶液と共に患者試料または標準溶液をインキュベートすることによって行われる。洗浄した後、プレートのウェルを基質溶液と共に暗所でインキュベートする。停止溶液の添加によって発色反応を停止し、最後に吸光度を測定する。

【0068】これらの免疫学的測定法それ自体は、当該分野で広く公知となっている種々の標準的な測定プロトコルから選択されるいずれかの手法を用いて行われる。一般に理解されているように、測定法の構成は、特異的免疫学的結合性パ - トナ - と所望の特異性分析物との相互反応に依存し且つ分析物と免疫学的結合性パ - トナ - とによって形成された複合体を検出する何らかの手段を利用するものである。免疫学的結合性パ - トナ - は、固体支持体に複合体化し、分析物に対する捕捉性免疫学的結合性パ - トナ - として使用される。このプロトコルは、直接的形態で実行出来るのであって、この場合は分析物 / 免疫学的結合性パ - トナ - の複合体の形成は、例えば、蛍光、放射性または酵素標識によって検出される。又は競合的形態で実行可能であって、この場合標識化標準は免疫学的結合性パ - トナ - を求めて分析物と競合するのである。このような形態はまた、凝集測定法として構成してもよく又は複合体を適当な沈殿剤を反応混合物に添加することによって沈殿させてもよい。この免疫学的測定のプロトコルの具体的設計は、種々幅広い選択が可能であって、当該分野で利用可能な臨床測定装置およびプロトコルの数は膨大である。このような種々のプロトコルについては、米国特許第 5, 001, 225 号を参照。

【0069】標準的な検出プロトコル、例えば、放射性同位体標識、蛍光標識又は ELISA を用いた免疫学的測定法を実施するための抗体およびリピーリング試薬は、直接的または競合的形態の何れであって、測定のために必要な成分および指示を含むキットとして好便に供されてもよい。本発明の一つの具体例においては、かかるキットは、関連合成ペプチドで被覆したマイクロタイタープレート、標準曲線の作成のための標準溶液、分析実行の定性的テストのための尿対照、前記合成ペプチドと反応性のウサギ抗体、基質溶液、停止溶液、洗浄緩衝液および指示マニュアルを含む。

【0070】免疫学的測定法の構成は、抗体および特異的合成ペプチドを用いて行うことが出来るので、適宜の生物学的液体中における対応するコラーゲン断片配列の比並びにその個別の含有量とその合計を測定すればよい。即ち、この測定法は、いくつかの天然ペプチド配列を決定できるか又は単一のペプチド配列か若しくはこれらの如何なる所望の組合せをも決定できるような抗体を含むように設計することが可能である。

【0071】骨吸収のインジケータとして本明細書で

特定したペプチドを使用するのに加えて、骨代謝バランスの測定も、同一個体から採取した同一または他の適宜の生物学的液体中における骨形成マーカーを実質的に同時に測定することによって有利に行える。「実質的に同時」とは、同一日、好ましくは4時間以内を意味する。例えばかかるマーカーとしては、(BGPの骨GLA蛋白質としても公知の)オステオカルチン、I型プロコラーゲン、骨アルカリ性ホスファターゼおよび合成アルカリ性ホスファターゼがある。これらのマーカーの適当な測定方法は、例えば、DeImase, P.D.らのJ. Bone Min, Res. (1986)1:333-337に見出すことができる。

【0072】本発明の測定方法は、分解が起こった場合コラーゲン誘導ペプチドを生じるような組織の代謝状態を測定するための指標を提供するものである。種々の意味で有用である。まずI型コラーゲンの分解を検討する場合、これら測定法は、例えば過剰骨吸収を明示することによって被験者の異常状態を評価する方法となる。つまりこのことによって、骨粗鬆症症状の存在または悪性疾患の転移的進行が判る。過剰骨吸収によって特徴付けられる他の疾患症状としては、パジェット病および上皮小体亢進症がある。同様に、結合組織に関係する多くの他の疾病状態を、コラーゲンの分解の測定によって追跡できる。その例としては、慢性関節リウマチおよび変形性関節症に関連するII型コラーゲン分解および脈管炎症候群におけるIII型コラーゲン分解がある。被験者の状態は連続的に追跡できるので、これらの測定法の適用は、これらのまたは他の症状を治療するために適用した療法の進行状態を追跡するのにも使用できる。さらにこれらの測定法は、毒性物質の投与はしばしば組織分解の結果をもたらすので、毒性の尺度としても使用

【0073】即ち、これら測定法は、疾患症状、治療または被験者に直接投与された物質または被験者が環境で暴露された物質の効果の指標としてコラーゲン組織の代謝状態を使用することが可能である如何なる状況においても適用して構わない。

【0074】

【実施例】以下に記載する実施例は、本発明を具体的に説明するものであって、本発明を限定するものではない。

【0075】実施例1：尿中の特異的ペプチド配列の免疫学的測定

固相技術によって調製した3種のペプチド(1(I)C1、1(I)N1および2(I)N1)(20及び21ペプチド、表1参照)を免疫原の調製に用いる。免疫化を行うために、当該分野でよく知られたグルタルアルデヒド試薬および方法を用いて、該ペプチドをウシ血清アルブミンに共有結合させる。モノクローナルおよびポリクローナル両抗体を該ペプチドに対して生成させる。モノクローナル抗体の産生のために、Balb/cマウス

をペプチド-BSA結合体で免疫化し、糞臓またはリンパ節からの細胞とAg8骨髄腫細胞とを融合させて標準的な技術を用いて、ハイブリドーマ細胞系を調製する。ポリクローナルをウサギおよびニワトリで生起させる。抗血清およびハイブリドーマ細胞培地のスクリーニングは、カルボジイミド試薬および当該分野で公知の方法を用いて調製した適当なペプチド-ゼラチン結合体で被覆したマイクロタイタープレートを用いてELISAによって行った。

【0076】尿中における3種のペプチド配列(1(I)C1、1(I)N1および2(I)N1)の測定は、阻害ELISAによって以下のように行う。

【0077】各々、コラーゲン断片を可能性として含有する尿試料(10または25μl)または参照標準として0.05~15μgペプチド/mlを含有する溶液を、0.1%Tween-20界面活性剤PBS-Tを含有し且つ0.1%(w/v)BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水中に1:5,000~1:20,000に希釈したペプチドに対する免疫学的結合性パトナ-75μlに添加する。各試料は、適当なペプチドを含有するゼラチン結合体で予め被覆した平底96-ウェルのマイクロタイタープレートにおいて二回繰り返して調製する。60分後、該プレートをPBS-T(3回)で洗浄し、一次抗体の種に対して調製したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗体を用いる標準的技法によって結合抗体を検出する。ペルオキシダーゼ基質を添加し、1MH₂PO₄を用いて酵素反応を停止させた後に自動マイクロタイタープレート中で発色を450nmで測定する。分析物を含有する試料は、プレート中の固定化ペプチドに対する一次抗体の結合を減少させ、かくして色濃度が低下する。試料中の分析物の量は、log-linearプロットを用いてコンピューター計算した各プレートに含まれる標準からの予め確立した曲線を参照して定量する。図1、2および3は、1(I)C1(CrossLaps)免疫測定(図1)、1(I)N1免疫測定(図2)および2(I)N1免疫測定(図3)についての典型的な標準曲線を示す。

【0078】実施例2：HPLCにてのピリジノリン測定に対する相関関係

40 多数の非選択尿試料について、全ピリジノリンの濃度(HPLC法、例えば、Uebelhart, D., Bone and Mineral, 8:87-96(1990)参照)を測定した。このHPLCシステムで得られた値は、二回の免疫学的測定で得られた値(CrossLapsおよび1(I)N1ペプチドに基づく測定)と相関関係にあった。

【0079】図4は、全ピリジノリン(HPLC)およびCrossLaps免疫測定(n=59)との相関関係を示す。直線回帰分析で計算した相関はr=0.80である。

【0080】図5は、全ピリジノリン(HPLC)および1(I)N1免疫検定(n=36)の間の相関関係を示

す。直線回帰分析で計算した相関は $r = 0.95$ である。

【0081】実施例3：I型コラーゲンの分解産物の測定のためのモノクローナル抗体を用いる測定

モノクローナル抗体は、適当な担体蛋白質に結合させた1(I)C1合成ペプチドでのマウスの免疫化によって生じさせた。細胞融合、クローニングおよびハイブリドーマ増殖は、標準的操作方法により行った。スクリーニング操作には、マイクロタイタープレート中に固定化した1(I)C1合成ペプチドに対する反応性に関する試験を含むものであった。

【0082】抗体の特異性は、I型コラーゲンのC-テロペプチドに基く異なる重複配列を用いた阻害実験によって試験した。

【0083】かかる抗体の一つであるMAbA7の特異性を図6に示す。

【0084】抗体MAbA7を用い測定を開発した。略言すれば、グルタルアルデヒドを用いて合成ペプチド1(I)C1をウシ血清アルブミンに結合させ、該結合体をマイクロタイタープレートの被覆に用いた。また代替の物質を用いることもできるが、必須の要件はアルギニンの後で解離切断された配列EK AHDGGR(R)の露呈である。

【0085】かかる代替物の一つは、細菌コラゲナーゼで処理したI型コラーゲンである。また別の代替物は、組換えペプチドにおけるEK AHDGGR配列の発現物であってもよく、必須の要件は再度EK AHDGGR配列のカルボキシ末端(すなわち、アルギニン残基)の露呈である。

【0086】被覆に続き、マイクロタイタープレートのウェルを、尿 $15\mu\text{l}$ およびホースラディッシュペルオキシダーゼに結合したMAbA7の $100\mu\text{l}$ と共にインキュベートする。

【0087】1時間後、該プレートを洗浄し、基質(例えば、TMB)を添加する。

【0088】MAbA7のエピトープ特異性は図6から明らかである。マイクロタイタープレート中での固定化EK AHDGGRに対するMAbA7の反応性は、異なる合成ペプチドでのコインキュベーションによって開始させた。得られた結果から、アルギニンの後の切断はMAbA7ELISAにおける検出に必須であることが判った。

【0089】実施例4：他のペプチド断片および抗体に基づくELISA測定結果に対するCrossLaps ELISAの相関関係

20人の閉経後婦人から採取した尿についてのCrossLaps ELISAとMAbA7ELISAとの間の相関を図7に示す。

MAbA7ELISAは競合測定であり、ここに、マイクロタイタープレート中に固定化した合成8A Aペプチド(EK AHDGGR)はモノクローナル抗体(MAbA7)への結合について患者試料中のコラーゲン断片と

競合する。

【0090】結果は高い相関関係を示し、二回の測定結果は同一または関連した代謝過程を反映していることが判る。

【0091】同様に、CrossLapsとN₂ELISA間の相関関係を図8に示す。N₂は競合測定法であり、この場合I型コラーゲンにおける2鎖中のN-テロペプチドからのN₂(I)N₁ペプチド断片(QYDGGKGVG)は、前記と同様に生成させた抗-QYDGGKGVG抗血清に対する結合につき、患者試料中のコラーゲン断片と競合する。結果は高い相関関係を示し、これから二回の測定結果は同一または関連する代謝過程を反映することが判る。

【0092】実施例5：CrossLaps ELISAの検討
現在好ましい合成ペプチドGlu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg(またはEK AHDGGR)を、前記したように「CrossLapsTM」と命名される酵素結合イムノソルベント測定法(ELISA)において一体化させた。CrossLaps ELISAは、フランスの専門家(Garnroら)のグループによって調べられており、結果はJ. Clin. Endocrinol. Metab. 79, No.3(1994)に発表されるであろう。

【0093】検討結果の要約を以下に記載する。

【0094】CrossLaps ELISAは、I型コラーゲンの1鎖のC-テロペプチドの一部(Glu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Arg, CrossLaps抗原)に特異的な8個のアミノ酸(8A A)のアミノ酸配列を持つ固定化合成ペプチドに基づく。この配列に対して生成させた抗体でのインキュベーションの間に、該固定化ペプチドと尿中のI型コラーゲンの1鎖の分解産物との間で競合が起こる。

【0095】略言すれば、 $25\mu\text{L}$ 尿試料または標準をCrossLaps抗原-被覆マイクロプレートの各ウェルに添加し、続いて、 $75\mu\text{L}$ の抗-CrossLaps抗血清に添加する。該プレートを攪拌下で室温にて1時間インキュベートし、洗浄緩衝液で5回洗浄する。ヤギ抗ウサギ免疫グロブリンGホースラディッシュペルオキシダーゼ結合体($100\mu\text{L}$)を各ウェルに添加する。室温での1時間のインキュベーションの後に、プレートを前記したごとく5回洗浄する。酵素基質($100\mu\text{L}$ /ウェル)を添加し、暗所での15分間のインキュベーションの後に、 $100\mu\text{L}$ のリン酸(1モル/L)を添加することによって反応を停止する。 450nm における光学密度をマイクロプレートリーダーにて測定する。二回の重複測定を各尿試料について行い、データを、標準比色技術によって測定して、尿クレアチニン(Cr)mmol当たりのマイクログラムとして表す。

【0096】いくつかの試料においては、Py rおよびD-Py rの全排出量を、HPLCによって加水分解試料について測定し、尿中ヒドロキシプロリンを分光光度法によって測定した。

【0097】CrossLaps ELISAを用いて、年齢が31~

89歳である146人の婦人および60人の男性からなる健康成人の標本においてまた代謝的骨疾病に罹患した患者において、骨マトリックス分解の間に放出されたI型コラーゲンペプチドの尿中排泄量を測定した。測定内および測定間の変動係数は、各々、10%および13%以下であった。尿試料からのCrossLaps抗原の回収率は92~115%の範囲であり、該ELISAは連続試料希釈について直線的であった。CrossLaps測定は、遊離ピリジノリン(Py r)または遊離デオキシピリジノリン(D - Py r)いずれとも交差反応しない。ELISAによ

10 って測定したCrossLapsおよび高速液体クロマトグラフィーによって測定したPy rの全排泄量は、正常婦人において高度に相関していた($n = 91$; $r = 0.73$; $P < 0.001$)。尿中CrossLaps排泄量は婦人の年齢と共に増加したが、男性ではそうはならなかった。婦人においては、閉経は、HPLCによって測定した全D - Py r (+91%)および全Py r (+47%)より平均増加よりも高い骨アルカリ性ホスファターゼ(+48%)およびオステオカルチン[+41%; 217ないし524 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ クレアチニン(Cr)]のCrossLaps排

20 泄量が141%増加したことによって反映された。尿中CrossLaps排泄量は、パジェット病において($n = 32$; 平均、 $1810 \pm 2300 \mu\text{g}/\text{mmol}$ Cr; $P < 0.001$)、および一次上皮小体亢進症を持つ患者において($n = 10$; 平均、 $780 \pm 380 \mu\text{g}/\text{mmol}$ Cr; $P < 0.001$)、および甲状腺機能亢進症を持つ患者において($n = 27$; 平均、 $1280 \pm 970 \mu\text{g}/\text{mmol}$ Cr; $P < 0.001$)、対照値から増加しており、Z - スコア(性別および年齢が合致した対照の平均からのSD数)は各々4.4 \pm 6.6、30 1.5 \pm 1.2および6.7 \pm 6.5であった。パジェット病の患者においては、尿中ヒドロキシプロリンのレベルと高度に相関し($r = 0.91$; $P < 0.001$)、3日間のビス・ホスホネートパミドロネートによる静脈内治療を行った場合、尿中CrossLaps排泄量の減少は尿中ヒドロキシプロリンのそれよりも大きかった(-71% - 対 - -17%; $P < 0.001$)。甲状腺機能亢進症の患者においては、CrossLaps排泄量はほとんどの患者において(78%)正常範囲を超えて上昇し、甲状腺機能亢進症の治療1カ月内に正常に戻った。40

【0098】これらの観察に基づき、Garneroらは、この新しい便利な測定法は、骨吸収速度の指標として感度が優れ且つ特異的でありまた骨粗鬆症や他の代謝的骨疾患の患者の臨床検査および治療の追跡に有用であると結論づけている。

【0099】実施例6: MA b A 7 ELISA の検査
前記したごとく、モノクローナル抗体MA b 7 Aに基づく測定構成では、合成ペプチドを使用する必要がない。このような種類の測定法は、3段階にて以下のごとく実施される。

【0100】第1の段階において、精製したコラゲナーゼ処理コラーゲン(CTC)で事前被覆したマイクロタイタープレートのウェルを15 μl の標準溶液または尿試料および100 μl のペルオキシダーゼ結合モノクローナル抗体溶液と共に室温で1時間インキュベートする。

【0101】第2の段階で洗浄を行った後、ウェルを100 μl の基質溶液と共に室温で15分間暗所でインキュベートする。最後に、第3の段階において、発色反応を100 μl の停止溶液の添加によって停止する。450 nmにおける吸光度を2時間以内に測定する。

【0102】図9は、閉経に伴う骨吸収の増加に関するMA b 7 A ELISAの検出を示す。18人の閉経前および38人の閉経後の婦人からの尿試料をテストした。t - スコア(閉経前婦人の標準偏差数として表した平均値の差)は、二つの母集団間の分離が相対的に微細なることを示す。

【0103】図10は、CrossLaps ELISAによって行った閉経に伴う骨吸収の増加係わる同様の検定を示す。尿試料は図8のものと同ーである。

【0104】ホルモン代替療法(HRT)に過程において生化学的マーカーにおける変化が図11から明らかである。エストロゲン(塗りつぶした丸)またはプラセボ(塗りつぶさない丸)を服用した婦人から採取した尿試料をベースラインにおいて又12カ月間の治療を行った後で試験した。12カ月後の値をベースライン値の100分率として表す。得られた結果から、CrossLaps ELISAおよびMA b 7 A ELISA(被覆剤としてCTCまたは合成ペプチドEK A HD G G Rを使用)は、抗吸収治療に対して同等の感度を有することが判る。

【0105】実施例7: 臨床結果
実施例1に記載した免疫学的測定方法(1(I)C1ペプチド、即ちCrossLaps ELISAを使用した)を異なる個体からの尿試料に適用し、分析物の量を数量化した。得られた値は、尿検定で通常行われているように、尿試料中の尿クレアチニン含有量と関連づけた。年令マッチングさせた健常婦人(閉経前および閉経後)で得られた値を表2に示す。

【0106】

【表2】

26
年齢マッチングさせた健常婦人（閉経前および閉経後）から採取した尿試料に
おけるα1（I）C1ペプチドの測定

群	α1（I）C1ペプチド (mg/mmolクレアチニン)
閉経前 (n=104)	0.263±0.143
閉経後 (n=180)	0.426±0.190

個々の値については、図12を参照。閉経前および閉経後の値の間の差は、高度に有意である(P<0.0001)。定量的試験方法のZ-スコアは、二つの母集団の間を差別化する当該方法の能力を表わす。

【0107】表3は、年齢マッチングさせた健常な閉経前(n=140)および閉経後婦人(n=180)から*

*採取した同一セットの尿試料に適用した場合におけるCrossLaps免疫学的測定法とHPLCによるピリジノリンに関する最新の技術水準測定法のZ-スコアを示す。

【0108】
【表3】

*
年齢マッチングさせた健常な婦人（閉経前および閉経後）から採取した尿試料
に適用した場合における2つの異なるテスト方法（全ピリジノリン（HPLC）およびCrossLaps免疫学的測定法）について得られたZ-スコア

テスト方法	Z-スコア
α1（I）C1免疫学的測定法（CrossLaps）	1.14
全ピリジノリン（HPLC）	1.25

表3から分かるように、2の方法の差別化能力はほぼ同様である。

【0109】ある測定法を吸収の指標として使用するためには、ホルモン代替療法（HRT）のインパクトを測

定出来ることが非常に重要である。表4は、かかる検討においてCrossLaps ELISA で得られた結果を示す。

【表4】

*
CrossLaps ELISA におけるホルモン置換療法およびプラセボ療法を受けた婦人
から採取した尿試料についての測定

群	α1(I)C1ペプチド (mg/mmolクレアチニン)	
	t=0	t=12カ月
HRT (n=92)	0.457±0.176	0.176±0.103
プラセボ (n=45)	0.459±0.209	0.402±0.187

個々の値については、図13を参照。HRTを受ける群における高度に有意な低下が、12カ月後に観察される(P<0.001)。

【0110】実施例8：尿中のI型コラーゲン分解産物の定量・数量化に際しての本発明の免疫学的測定法(CrossLaps ELISA)の評価

ピリジノリン(Pyrr)およびデオキシピリジノリン(D-Pyrr)は成熟コラーゲン間の架橋物であり、主として骨および軟骨で見い出されるのであるが、他方では皮膚には存在しない。D-PyrrはPyrrよりも骨により特異的であるが、いずれも絶対的には骨特異的ではない。しかしながら、PyrrおよびD-Pyrrの全排泄量の測定は、骨吸収の指標として使用できる。PyrrおよびD-Pyrrは、通常はHPLCを用いて分離した後加水分解された尿において蛍光分光学的に測定されるのであるが、長時間を要する、複雑な方法で、ルーチンの使用には適さない。

【0111】本実施例は、尿中においてPyrrおよびD-Pyrrの構造とは独立したI型コラーゲン特異的ペプチド配列を測定する測定法、即ちCrossLaps ELISA を記

載するものである。骨の有機マトリックスは90%以上がI型コラーゲンから成るので、この測定法で測定したペプチド配列は、骨吸収の潜在的なマーカーである。

【0112】この測定法について参照値を確立するために、年齢が30~51歳(平均±1SD; 39.3±5.56)の102人の健康な閉経前婦人から採取した試料を検査測定した。全ての婦人は正常な膣出血の経歴を有し、カルシウム代謝に影響することが知られている医薬は一切服用していなかった。同様に、年齢が45~57歳(平均±1SD; 51.1±2.38)の初期閉経後婦人から採取した料を測定したが、これらの婦人は全て、自然な閉経の履歴の持主であった(平均閉経年齢20.1±9.90月)。更に年齢が68~72歳(平均±1SD; 70.0±1.19)の後期閉経後婦人から採取した試料(n=165)を測定したが、これらの婦人は全て自然な閉経の経歴の持主であった(平均閉経年齢26.8±6.82月)。これらの婦人のいずれもカルシウム代謝に影響することが知られている医薬品は一切服用していなかった。

【0113】テストした測定法及びD-Pyrr(HPLC

C法)の比較を行うために、年齢30.0~65.0歳の214人の健康な婦人から採取した尿試料を測定した。この測定法およびHprを比較するために、年齢30.0~54.0歳の健康な婦人から成るもう一つの集団から採取した試料を測定した(n=421)。

【0114】実験は、8AA特異的合成ペプチドに基づくCrossLaps ELISA については実施例5に概説したのと実質的に同様に行った。略言すれば、25μLの標準または未知試料を予め被覆したELISA プレート中の適当なウェルに二連にてピペットを用いて入れる。次いで、75μLの抗体溶液(8AAに対するウサギ抗体)を各ウェルに添加し、該プレートをシーリングテープで覆い、振とう器具上室温にて60分間インキュベートする。また、下記の操作は全て室温で行った。インキュベーション後に、該プレートを希釈した洗浄緩衝液で3回洗浄した。

【0115】ペルオキシダーゼ結合抗体(ウソギIgGに対するHRP-結合ヤギ抗体、100μL/ウェル)を添加し、シールしたウェルを振とう器具上、60分間インキュベートした。もう一度洗浄した後、100μLのTMB基質溶液をすべてのウェルに添加し、これをシールし、15分間インキュベートした。100μLの停止溶液の添加して15分後酵素反応を停止した。光学密度を450nmでELISA レーダーで読み取った。

【0116】補正曲線は、五つの標準液(0.5~10.5μg/ml)の平均吸光度をプロットすることによって対数-直線グラフ紙上で作成した。各患者の試料における8AA相当物の濃度を、補正曲線上で内挿法によって決定した。

【0117】その他のマーカーPyrの尿中濃度をHPLC法によって測定した。略言すれば、架橋物は、セルロースクロマトグラフィーによって加水分解尿試料から抽出し、逆相HPLCによって分離し、分光蛍光光度法によって同定した。蛍光ピークの面積は、ヒト骨皮質から精製した補正済Pyr外部標準との比較によって数量化した。測定内および全測定変動係数*

表5. 測定の精度

試料	試験内		合計	
	平均 (mg/L)	CV (%)	平均 (mg/L)	CV (%)
A	2.20	5.7	2.20	6.3
B	3.51	4.1	3.51	5.2
C	7.12	6.2	7.12	8.3

これらのデータは、同一ロットの8AA ELISAを用いて三つの尿試料を4日間毎日6回測定した数値に基づいて計算した。

*は、標準曲線の範囲内では10%以下であった(14.4~216pmol、注入試料容量:130μL)。

【0118】Hprの尿中濃度は、分光光度法によって測定した。測定内および全測定変動係数は標準曲線の範囲(38~305μmpL/L)では13%以下であった。

【0119】8AA測定、PyrおよびHprについての値は、正規化のために対応するクレアチニン値で除した。

【0120】結果

図14は、本測定法にて用いた抗体を生成させるために選択した8AAペプチドの位置の模式図である。測定で用いた標準液は、0.5ないし10.5mg/Lの測定範囲を規定するものである。テストした尿試料の約5%は10.5mg/Lよりも高い値を有していた。これらの試料を標準液A中で1+3に希釈し、再テストした。検出限界(ゼロ標準マイナス2xSD(ゼロ標準)なる平均吸光度に等しい吸光度に対応する濃度として定義)は0.2mg/Lである。

【0121】技術的なバリデーションを行うために、検定の精度を計算した。表5には、内部および全変動係数をまとめて示す。これらのデータは、同一ロットのELISAを用いて三つの尿試料を4日間の毎日6回測定した数値に基づいて計算した。平均の試験内及び全CV値は、各々5.3および6.6%であった。分析的回収率は、三つの異なる尿試料に対して合成ペプチドを量を増やしながら添加した後に測定したが、平均して100%であった(表6)。

【0122】ELISA法において高濃度の試料を希釈した場合の効果を表7に示す。試料は、ゼロ標準液で希釈した(500mM TRIS、0.1% Tween20、0.1% BSA pH=8.0)。未希釈尿試料中の含有量に対して、100%なる数値を割り当てた。尿試料の種々の希釈液についての全平均は99%であった。

【0123】

【表5】

【0124】

【表6】

表6. 尿試料に添加した8AA抗原の²⁰回収率 (n=5)

添加8AA (mg/L)	回収8AA	
	平均±SD (mg/L)	平均±SD
1.50	1.46±0.14	97±9
3.00	3.06±0.19	102±6
6.00	6.10±0.34	102±6

【0125】

【表7】
表7. 8AA ELISAにおける尿試料希釈の効果、試料濃度及び希釈試料中の8AA含有パーセント

希釈	X		Y		Z	
	(mg/L)	%	(mg/L)	%	(mg/L)	%
純物	6.64	100	8.36	100	9.23	100
1+1	3.45	104	4.06	97	4.10	89
1+3	1.68	101	2.30	110	2.11	91
1+7	0.73	88	0.16	111	1.22	106

【0126】凍結および解凍を5回まで反復した後本測定法で測定を行っても、テストした五つの試料において尿中濃度は有意に変化しなかった(5回の凍結-解凍サイクル後の初期値のパーセント:平均±SD, n=5:98.5±4.5%)。さらに、別の五つの試料においては、測定した抗原は、20において少なくとも7日間、如何なる添加物を加えなくても安定であった(初期値のパーセント:平均±SD, n=5:99.8±5.1%)。

【0127】図15は、二つの閉経後集団(初期閉経後、n=254、後期閉経後n=165)における8AA ELISAの個別値を、ハッチングを施した領域によって示してある健常な閉経前範囲(平均±2SD)と比較して示してある(閉経後範囲250±220mg/mol Cr, n=102)。初期閉経後婦人のうち36.7%は、閉経前婦人の3SD限界を超える値を有していた。この数字は、後期閉経後群に対しては31.5%であった。初期閉経後婦人に対して得られた平均値は後期閉経後婦人のそれとは異ならず(419mh/mol対412mg/mol)、閉経年齢の増加に伴って値が変化する傾向はなかった。

【0128】図16は、8AA ELISAとHPLCで測定したD-Pyrとの間の相関関係を示す。相関関係は高度に有意であり、r-値として0.83が得られた。

【0129】図17は、ELISAとHprの間の相関関係を示す。また、この相関関係も高度に有意であり、r-値は0.78であった。

【0130】上記にて説明した測定法においては、I型コラーゲンのC-テロペプチドに特異的であって現在のところ好ましいペプチド配列としてGlu-Lys-Ala-His-Asp-Gly-Gly-Argを抗体の生成に使用した(図14参照)。このような分子部分を選択する理由はいくつかあって、

この配列は分子間架橋物にとって重要な領域を含有しており、さらに架橋残基の近傍部とこれらの分子の持つコンパクトな構造とが、かかるペプチドが更に一層腎臓分解されるのを防御することが以前から示唆されている。従って、成熟I型コラーゲンの部分的分解から生じるかかるペプチド配列が尿中で見いだされることが予測される。

【0131】この実験の結果から、評価したELISA法は、精度、回収率、および尿試料の希釈の点で良好な性能を有することが判った(表5、6および7)。尿試料の長期取扱いおよび測定に関して、テストした試料は反復して凍結し解凍ことが出来又これらの試料中の抗原は20で少なくとも7日間安定であることが判明したのである。図15から判るように、テストした婦人の各々36.7%および31.5%は数値が高かった(平均+2SD以上)。またこの知見は、全ての婦人の約1/3が閉経後に加速された骨損失を経験するものと推定する従前の知見とよく合致する。

【0132】D-Pyrは骨吸収マーカーとして十分に確立されたものである。D-Pyr測定法(HPLC)および8AA ELISAにおいて平行試料(n=214)について得られた結果を比較することによって、高度の相関関係が見いだされた(r=0.83)。このことは、8AA ELISAが、ピリジノリンによって反映されることと類似または平行した代謝過程を反映するものであることを示唆している。骨吸収のもう一つのよく確立されたマーカーであるHprに対しても相関関係があるので、さらに8AA ELISAがin vivoでの骨吸収を反映するものであることが判る。

【0133】実施例9:骨吸収の新しいマーカーとしての本発明の免疫学的検査法(Cross-Laps ELISA)の使用骨吸収NO増大は骨損失が増大したことの直接的な病理性

因子であるため、これまでに骨吸収に対して特異的であるマーカーを発見すべく多大な努力が傾注されてきた。カルシウムやヒドロキシプロリンの尿中排泄量が、骨吸収の指標として長年使用されてきたが、いずれも骨代謝に対しては特異的ではない。

【0134】本実施例は、骨吸収のマーカーとしての本発明に基づく好ましい免疫学的測定法(CrossLaps™ ELISA)を評価する。骨代謝回転に対する他のマーカーも比較する目的で評価に含める。

【0135】閉経前婦人：血清および尿試料を年齢30~50歳(平均±1SD; 39.1±5.5)の104人の健康な閉経前婦人から採取して分析したが、全ての婦人は規則的な膣出血の経歴の持主であり、カルシウム代謝に影響することが知られている医薬品は一切服用していなかった。

【0136】閉経後婦人：閉経後婦人は、二つの大規模な、二重盲検プラセボ対照、無作為化試験の一部を構成するものがあった。この試験の主要目的は、初期閉経後骨損失についての異なる予防的療法を評価することであった。

【0137】ベースライン値は、年齢45~55歳の180人の無作為に選択した健康な閉経後婦人(平均±1SD; 50.6±2.36)で測定したが、これら婦人は全て6カ月から3年の自然の閉経の履歴を有し(平均±1SD; 20.0±10.4カ月)また誰もカルシウム代謝に影響することが知られている医薬品を服用していなかった。

【0138】更に、長期間に亘る血清及び尿試料について、12カ月間のホルモン代替療法終えて無作為に選択した80人の婦人及び12カ月間のプラセボ治療を終えて無作為に選択した35人の婦人から採取して測定した。ホルモン療法は、2mgの経口エストロジオールに1mgのシプロテロンアセテート、0.75mgのレボノルゲステレル、1mgのデソゲステロル、または10mgのメドロキシプロゲステロンアセテートいずれかを組み合わせるものであった。何れのグループもホルモンおよびプラセボ療法内で同様に反応したので、データは一緒に分析した。プラセボ治療を受けたこれらの婦人のうち35人は2年間追跡し、3カ月毎に反復して前腕骨質量測定し、これにより骨損失の速度が計算できた(%/年)。

【0139】血液および尿試料

血液試料を採取し、二日目の朝の尿を少なくとも8時間の絶食の後に午前8と10時の間に採集した。試料は分析するまで-20℃まで貯蔵した。

【0140】測定法は前記したごとくに行った(実施例6)。測定内および測定間変動係数は、各々、6%および8%以下であり、検出限界は0.2g/mlであった。

【0141】ピリジノリン(Py r)およびデオキシピ

リジノリン(D-Py r)の尿中濃度をHPLC法によって、これら試料から無作為に選択したサブセット、即ち合成した81の試料で測定した(29人の閉経前および52人の閉経後試料)。略言すれば、架橋物は、セルロースクロマトグラフィーによって加水分解した尿試料から抽出し、逆相HPLCによって分離し、分光光度法によって同定した。蛍光ピークの領域は、ヒト骨皮質から精製した、補正済のPy rおよびD-Py r外部標準と比較することによって定量した、測定内および測定間変動はPy rについては10%以下であり、D-Py rについては15%以下であった。ヒドロキシプロリン(Hp r)の尿中含有量は、分光光度法によって測定し、オステオカルチンの血清中含有量はラジオイムノ測定(RIA)によって測定した。クレアチニンは自動分析器で測定し、得られた値を用いて尿中パラメーターを補正した(CrossLaps, Py r, D-Py r, Hp r)。遠位前腕の骨ミネラル含量(BMC)は、骨デンシトメーターを用いて単一光子吸収法によってベースラインにて3カ月毎に測定した。とう骨と尺骨の間の距離が8mmとなったところで走査を開始した。長期in vivo精度は1%未満である。腰椎脊髄の骨ミネラル密度(BMD)は二重エネルギー光子またはX-線吸収法いずれかによって測定した。

【0142】統計的解析

CrossLapsおよびPy rのベースライン値は直線回帰分析によって補正した。両軸にクレアチニンを導入するのを回避するために、用いた値はクレアチニンについて補正しなかった。閉経前および閉経後グループ間の差異は、対となっていないデータにつき、スチューデントt-検定によって評価した。T-スコアは、閉経前標準偏差における閉経前平均値からの閉経後偏差として計算した。T-スコアは、偏差分析によって比較した。12カ月のホルモン療法の間異なるマーカーおよび骨におけるベースラインからの減少は、対のデータについて、スチューデントt-検定によって評価した。プラセボおよびホルモングループにおける変化は、パーセント尺度で評価した。個々のベースライン値は100%と定義し、その後の値は全てベースライン値のパーセントとして計算した。各グループの平均値は、対となっていないデータについてスチューデントt-検定によって比較した(損失速度)。CrossLapsのベースライン値は、直線回帰分析によって損失速度に対して相関つけた。

【0143】結果

図18において、CrossLapsとPy rとの間の相関関係が可視化されている(n=81)。r-値は0.83である。

【0144】図19は、閉経前(n=104)および閉経後(n=180)婦人におけるCrossLaps/Cr、Hp r/Crおよびオステオカルチンの個別の数値を示す。閉経後婦人は、これら3種のマーカーの全ての数値

が71% (CrossLaps)、23% (Hpr) および52% (オステオカルチン) となり数値が有意に増加した。閉経に対する応答がT - スコアで表される場合、CrossLapsはT - スコアが1.6であり、Hprは0.7であり、オステオカルチンについては1.0であった ($P < 0.001$)。試料から無作為に選択したサブセットにおいて (閉経前 $n = 29$ および閉経後 $n = 28$)、パーセントでの増加は、Pyrについて31%、D - Pyrについては50%であった。対応するT - スコアは、PyrならびにD - Pyrについては1.3であり、これはCrossLapsのT - スコアと有意に異ならなかった (CrossLapsについてのT - スコアは同一サブグループで1.5であった)。ベースラインで測定した180人の閉経後婦人のうち、41%は閉経前平均値の2倍標準偏差以上のCrossLaps値を有していた。Hpr およびオステオカルチンについて対応する値は、各々12%および23%であった。図20は、ベースライン値のパーセントで表した、12カ月のホルモン代替療法 ($n = 80$) またはプラセボ ($n = 35$) 療法後のCrossLaps / Cr、オステオカルチンおよび前腕骨質量を示す。すべてのマ

ーカーにおいて、プラセボグループと比較すると、ホルモングループにおいては統計的に有意に減少した。CrossLapsは60.7%減少し、Hprは30.5%減少し、オステオカルチンは55.4%減少した。試料のランダムに選択したサブセットにおいて (ホルモン置換 $n = 12$ およびプラセボ $n = 12$)、パーセント減少はPyrについて22%、D - Pyrについて29%であった。1年につき前腕骨質量は3.1%減少し、脊椎骨質量は3.1%であった、

【0145】図21は、24カ月にわたる前腕骨質量測定によって測定したCrossLaps / Crのベースライン値および損失の速度 (% / 年) の間の相関関係を示す。この相関関係から、t - 値として - 0.61が得られた ($P < 0.001$)。Hpr およびオステオカルチンについての対応する相関関係から、- 0.46 および - 0.44がr - 値として得られた。前記したことから、CrossLapsは、骨吸収の感受性マーカーであることが示されているピリジノリンに対して高度に有意に相関関係を有することが証明される。このことは、CrossLapsが骨吸収の感受性マーカーであり得ることを示している。本試験における試料は、婦人の均質な群を代表するものであり、従って数値の範囲は比較的狭い。もしパジェット病および極端に高い骨代謝回転を持つ患者が含まれていたならば、相関関係はより高くなったと予測される。CrossLapsにおける閉経時の増加は顕著であり (70%を超える)、このことから、閉経時に起こる代謝変化の感受性マーカーであることが判る。T - 値は試験母集団が異なると大幅に異なり得るので、注意深く解釈されるべきである。しかしながら、異なるマーカーを比較する場合には、T - 値は、注目するマーカーの感度の指標を与え

る価値ある手段である。かくして本試験のデータは、CrossLapsがカルシウム代謝に及ぼす閉経の影響に対して感受性であることを示す。閉経前婦人は閉経後婦人と年齢が一致しなかった。しかしながら、彼女らは平均して40歳であり、かくして、年齢のインパクトはもしあったとしても、些細のものに違いない。さらにこのような比較試験において、マーカーは同様の方法で影響を最も受け易いであろう。

【0146】CrossLaps値は、ホルモン代替療法にตอบสนองして実質的に減少し、このことから、治療効果を追跡するための有用なマーカーとなる可能性が開ける。ホルモン代替療法 (オステオカルチン、Hpr、PyrおよびD - Pyr) を追跡するのに通常使用されるマーカーと比較して、CrossLapsはテストした他の吸収マーカーよりも良好に機能した。しかしながら、PyrおよびD - Pyr実験で使用した試料は比較的少数であったため、これ以上の確固たる結論を得る可能性が制限されている。また、X - スコアは、標準偏差においてプラセボグループからの活性グループの偏差として算出されるものであるが、他のマーカーについてよりもCrossLapsについて高くなる (CrossLapsTMにつき1.5、Hprにつき0.7、およびオステオカルチンにつき1.1; $P < 0.001$)。

【0147】閉経後骨質量損失の速度は、骨代謝回転の生化学的マーカーのパネルによって評価できることが示された。損失速度は、骨粗鬆症の危険の第1の指針となり、骨質量測定に付託する件数を減少できるであろう。CrossLapsと単一ホトン吸収法マーカーによって測定された損失速度との間の相関関係は、- 0.61であることが判明したが (図21)、これは、骨代謝回転の他のマーカーを用いて従前に見い出されているものよりも高い。かくして、尿中CrossLaps濃度は、損失速度を予測するのに使用されるであろう。もし3.0% / 年を超える骨損失が危険因子であると定義されるならば、この母集団における600 $\mu\text{g} / \text{mmol Cr}$ なるCrossLapsカットオフ限界を使用すると、診断感度は73%となりまた特異性は79%となる。3% / 年の骨質量損失のレベルを用いて「速い」および「遅い」骨損失者を区別した。何故ならば、損失のこの速度は2つのモードがある骨損失分布において適当な分離を与えることが以前に見い出されているからである。

【0148】本実施例において、脊椎骨損失の速度は必要な精度で測定されなかった。というのも、測定の多くはDPAで行われたからである。従ってベースラインCrossLapsに対する相関関係は算出されない。

【0149】健康な閉経後のグループの15年の追跡において、損失の速度は骨折の後期発生に有意に関係し、損失速度はそれ自体危険因子であることが判った。一般に、たとえ同一の結果が得られるとしても、急速な変化は遅い変化よりも身体によって十分に許容されないこと

が広く受け入れられている。この事実によって、骨代謝回転が大きい人を同定することが一層重要となってくる。この意味で、ほとんど80%の特異性および70%を超える感度であることから、本発明の方法は、閉経後骨粗鬆症の危険評価における潜在的に有用なスクリーニングパラメーターとなる。

【0150】すべての引用した特許、特許出願および文献はその全体を出典明示して本明細書の一部とみなす。しかしながら、矛盾する場合は、本開示が優先、支配する。

*【0151】上記においては、具体的な実施例を述べて本発明を記載してきた。しかしながら、以下にて特許請求する本発明の精神を逸脱することなく、多くの追加、削除および修正が可能であることは当業者に明らかであろう。

【0152】附属書類 A

コラーゲンアルファ1 (I) 鎖の前駆体 - ヒト (断片)
ホモサピエンス (人)
残基の数 = 1341

*10

1 M F S F V D L R L L L L A A T A L L T H G Q E E G Q V E G
31 Q D E D I P P I T C V Q N G L R Y H D R D V W K P E P C Q I
61 C V C D N G K V L C D D V I C D E T K N C P G A E V P E G E
91 C C P V C P D G S E S P T D Q E T T G V E G P K G D T G P R
121 G P R G P A G P P G R D G I P G Q P L P G P P G P G P P
151 G P P G L G G N F A P Q L S Y G Y D E K S T G G I S V P G P
181 M (G P S G P R G L P G P P G A P G P Z G F Z G P P G Z P G Z
211 P G A S G P) M (G P R G P P G P P G K B G B G Z A G K P G R
241 P G Z R G P P G P Z G A R G L P G T A G L P) G M K G H R (G F
271 S G L B G A K G B A G P A G P K G Z P G S P G Z B G A P G Z)
301 M / G P P G P K G N S G E P G A P G S K G D T G A K G E P G P
331 V G V Q G P P G P A G E E G K R G A R G E P G P T G L P G P
361 P G E R G G P G S R G F P G A D G V A G P K G P A G E R G S
391 P G P A G P K G S P G E A G R P G E A G L P G A K G L T G S
421 P G S P G P D G K T G P P G P A G Q D G R P G P P G P G A
451 R G Q A G V M G F P G P K G A A G E P G K A G E R G V P G P
481 P G A V G P A G K D G E A G A Q G P P A G P A G E R G G E
511 Q G P A G S P G F Q G L P G P A G P P G E A G K P G E Q G V
541 P G D L G A P G P S G A R G E R G F P G E R G V Q G P P G P
571 A G P R G A N G A P G N D G A K G D A G A P G A P G S Q G A
601 P G L Q G M P G E R G A A G L P G P K G D R G D A G P K G A
631 D G S P G K D G V R G L T G P I G P P G P A G A P G D K G E
661 S G P S G P A G P T G A R G A P G D R G E P G P P G P A G F
691 A G P P G A D G Q P G A K G E P G D A G A K G D A G P P G P
721 A G P A G P P G P I G N V G A P G A K G A R G S A G P P G A
751 T G F P G A A G R V G P P G P S G N A G P P G P P G P A G K
781 E G K G P R G E T G P A G R P G E V G P P G P P G P A G E
811 K G S P G A D G P A G A P G T P G P Q G I A G Q R G V V G L
841 P G Q R G E R G F P G L P G P S G E P G K Q G P S G A S G E
871 R G P P G P M G P P G L A G P P G E S G R E G A P G A E G S
901 P G R D G S P G A K G D R G E T G P A G P P G A X G A X G A
931 P G P V G P A G K S G D R G E T G P A G P A G P V G P A G A
961 R G P A G P Q G P R G D K G E T G E Q D R G I K G H R G F
991 S G L Q G P P G P P G S P G E Q G P S G A S G P A G P R G P
1021 P G S A G A P G K D G L N G L P G P I G P P G P R G R T G D
1051 A G P V G P P G P P G P P G P P G P P S A G F D F S P Q
1081 P P Q E K A H D G G R Y Y R A D D A N V V R D R D L E V D T
1111 T L K S L S Q Q I E N I R S P E G X R K N P A R T C R D L K
1141 M C H S D W K S G E Y W I D P N Q G C N L D A I K V F C N M
1171 E T G E T C V Y P T Q P S V A Q K N W Y I S K N P K D K R H
1201 V W F G E S M T D G F Q F E Y G G Q G S D P A D V A I Q L T
1231 F L R L M S T E A S Q N I T Y H C K N S V A Y M D Q Q T G N
1261 L K K A L L L X G S N E I E I R A E G N S R F T Y S V T V D
1291 G C T S H T G A W G K T V I E Y K T T K S S R L P I I D V A
1321 P L D V G A P D Q E F G F D V G P V C F L

【0153】コラーゲンアルファ1 (I) 鎖の前駆体の配列は以下から調製：
Chu, M.L., de Wet, W., Bernard, M., Ding, J.F., Morabito, M., Myers, J., Williams, C., and Ramirez, F., Nature 310, 337-340, 1984 (ヒト、残基1-181の配列、DNA配列から翻訳)
Click, E.M., and Bornstein, P., Biochemistry 9, 4699-4706, 1970 (ヒト皮膚、CNBr0-1, CNBr2, CNBr4, CNBr5, 残基162-301の部分配列)
Morgan, P.H., Jacob, H.G., Segrest, J.P., and Cunn

ingham, L.W., J. Biol. Chem. 245, 5042-5048, 1970
40 (ヒト皮膚残基263-268の配列)
Bernard, M.P., Chu, M.L., Myers, J.C., Ramirez, F., Eikenberry, E.F., and Prockop, D.J., Biochemistry 22, 5213-5223, 1983 (mRNA配列から翻訳した残基302-1341の配列)

【0154】コラーゲンアルファ2 (I) 鎖の前駆体
ホモサピエンス (人)
残基の数 = 1368

```

          5          10          15          20          25          30
1  M L S F V D T R T L L L A V T L C L A T C Q S L Q E E T V
31 R K G P A G D R G P P R G E R G P P P G P P G R D G G E D G P T G
61 P P G P P G P P P G L G G N F A A Q Y D D G K G V G L G P
91 G P M G L M G P R G P P G A A G A P G P Q G F Q G P A G E P
121 G E P G Q T G P A G A R G P A G P P G K A G E D G H P G K P
151 G R P G E R G V V G P Q G A R G F P G T P G L P G F K G I R
181 G H N G L D G L K G Q P G A P G V K G E P G A P G E N G T P
211 G Q T G A R G L P G E R G R V G A P G P A G A R G S D G S V
241 G P V G P A G P N G S A G P P G F P G A P G P K G E I G A V
271 G N A G P T G P A G P R G E V G L P G L S G P V G P P G N P
301 G A N G L T G A K G A A G L P G V A G A P G L P G P R G I P
331 G P P G A A G T T G A R G L V G E P G P A G S K G E S G N K
361 G E P G S A G P Q G P P S G E E G K R G P N G E A G S A
391 G P P G P P G L R G S P G S R G L P G A D G R A G V M G P P
421 G S R G A S G P A G V R G P N G D A G R P G E P G L M G P R
451 G L P G S P G N I G P A G K E G P V G L P G I D G R P G P I
481 G P V G A R G E P G N I G F P G P K G P T G D P G K N G D K
511 G H A G L A G A R G A P G P D G N N G A Q G P P G P Q G V Q
541 G G K G E Q G P A G P P G F Q G L P G P S G P A G E V G K P
571 G E R G L H G E F G L P G P A G P R G E R G P P G E S G A A
601 G P T G P I G S R G P S G P P G P D G N K G E P G V V G A V
631 G T A G P S G P S G L P G E R G A A G I P G G K G E K G E P
661 G L R G E I G N P G R D G A R G A H G A V G A P G P A G A T
691 G D R G E A G A A G P A G P A G P R G S P G E R G E V G P A
721 G P N G F A G P A G A A G Q P G A K G E R G G K G P K G E N
751 G V V G P T G P V G A A G P A G P N G P P G P A G S R G D G
781 G P P G M T G F P G A A G R T G P P G P S G I S G P P G P P
811 G P A G K E G L R G P R G D Q G P V G R T G E V G A V G P P
841 G F A G E K G P S G E A G T A G P P G T P G P Q G L L G A P
871 G I L G L P G S R G E R G L P G V A G A V G E P G P L G I A
901 G P P G A R G P P G A V G S P G V N G A P G E A G R D G N P
931 G N D G P P G R D G Q P G H K G E R G Y P G N I G P V G A A
961 G A P G P H G P V G P A G K H G N R G E T G P S G P V G P A
991 G A V G P R G P S G P Q G I R G D K G E P G E K G P R G L P
1021 G F K G H N G L Q G L P G I A G H H G D Q G A P G S V G P A
1051 G P R G P A G P S G P A G K D G R T G H P G T V G P A G I R
1081 G P Q G H Q G P A G P P P P G P P G P P G V S G G G Y D F
1111 G Y D G D F Y R A D Q P R S A P S L R P K D Y E V D A T L K
1141 S L N N Q I E T L L T P E G S R K N P A R T C R D L R L S H
1171 P E W S S G Y Y W I D P N Q G C T M E A I K V Y C D F P T G
1201 E T C I R A Q P E N I P A K N W Y R S S K D K K H V W L G E
1231 T I N A G S Q F E Y N V E G V T S K E M A T Q L A F M R L L
1261 A N Y A S Q N I T Y H C K N S I A Y M D E E T G N L K K A V
1291 I L Q G S N D V E L V A E G N S R F T Y T V L V D G C S K K
1321 T N E W G K T I I E Y K T N K P S R L P F L D I A P L D I G
1351 G A D H E F F V D I G P V C F K

```

【0155】コラーゲンアルファ2 (I) 鎖の前駆体の配列は以下から調製：
de Wet, W., Bernard, M., Benson-Chanda, V., Chu, M. L., Dickson, L., Weil, D., and Ramirez, F., J. Bio I. Chem. 262, 16032-16036, 1987 (mRNA配列から翻訳した配列)

表題：ヒトプロ - アルファ - 2 (I) コラーゲン遺伝子の構成

【0156】コラーゲンアルファ1 (I I) 鎖の前駆体ホモサピエンス (人)

残基の数 = 1 4 1 8

```

1 MIRLGAPQSL VLLTLLVAAV LRCQGDVRO PGPKGQKGEF GDIKDIVGPK
51 GPPPGQGPAG EQQPRGDRGD KGEKGAAPGR GRDGEPTLGL NPGPPGPPGP
101 PGPPGLGGNF AAQMAGGFDE KAGGAQLGVM QGPMGPMGPR GPPPGAGAPG
151 PQGFQGNPGE PGEFVSGPM GPRGPPGFPK KPGDDGEAGK PGKAGERGPP
201 GPQGARGFPG TPGLPGVKGH RGYPLDGAKE GEAGAPGVKG ESGSPGENGS
251 PGPMGPRGLP GERGRTGPAG AAGARGNDGQ PGPAGPPGPV GPAGGPGFPG
301 APGAKGEAGP TGARGPEGAQ GPRGEPGTFP SPGPAGASGN PGTDGIPGAK
351 GSAGAPGIAG APGFPGPRGP PDPQATGFLP GPKGQTKPKG IAGFKGEGFP
401 KGEPGPAGPQ GAPGPAGEEG KRGARGEPPG VGPVIGPPGER GAPGNRGFPG
451 QDGLAGPKGA PGERGPSGLA GPKGANGDPG RPEFPLPGA RGLTGRPGDA
501 GPQKGVGPGS APGEDGRPGP PGPQARGQP GVMGFPPGPK ANGEFPGAGE
551 KGLPGAPGLR GLPGKDGETG AEGPPGPAGP AGERGEQGA GSPGFQGLPG
601 PPGPPGEGGK PGDQVPGEA GAPLVGPRG ERGFPPGERG PGAQGLQGR
651 GLPGTPTDGL PKGASGPAGP PGAQPPGLQ GMPGERGAAG IAGPKDRGD
701 VGEKGEAGP GKDGGRLTG PIGPPGAGA NGEKGEVGP GPAGSAGARG
751 APGERGETGP PGTSGIAGPP GADGQPAKG EQGEAGQKD AGAPGQGPS
801 GAPGPQGTG VTGPKGARGA QGPPGATGFP GAAGRVPGP SNGNPGPPGP
851 PGPSPKDGPK GARGDSGPP RAGEPGLQP AGPPGEKGEF GDDGSPGAEF
901 PPGPQGLAGQ RGI VGLPGQR GERGFPLPG PSGEFQQA PGASGDRGPP
951 GPVGPGLTG PAGEFREGS PGADGPPGRD GAAGVKGRG ETGAVGAPGA
1001 PGPPGSPGA GPTGKQDRG EAGAQQPMGP SPGAGARGIQ GPQPPRGDKG
1051 EAGEPGERGL KHRGFTGLQ GLPGPPGPGS DQASGPAGP SGPRGPPGPV
1101 GPSGKDGANG IPGPIGPPGP RGRSGETGPA GPPGNPPGP PPGPPPGID
1151 MSAFAGLGR EKGPDPLQYM RADQAAGLR QHDAEVDATL KSLNNQIESI
1201 RSPEGRKNP ARTCRDLKLC HPEWKSVDYW IDPNQCTLD AMKVFCNMF
1251 GETCVYPNPA NVPKKNWSS KSKEKHIWF GETINGGFHF SYGDDNLAPN
1301 TANVQMTFLR LLSTEGSQNI TYHCKNSIAY LDEAAGNLKK ALLIQSNDV
1351 EIRAEGNSRF TYTALKDGT KHTGKWKTV IEYRSQKTSR LPIIDIPMD
1401 IGGPEQFV DIGPVCFL

```

【0157】コラーゲンアルファ1 (I I) 鎖前駆体の配列は、以下から調製

Su, M.W., Lee, B., Ramirez, F., Manchdo, M. and Horton, W., *Nucleic Acids, Res.*, 17, 9473, 1989

ヒト I I 型プロコラーゲンをコードする全 c DNA のヌクレオチド配列

Baldwin, C.T., Reginato, A.M., Smith, C., Jimenez, S.A., and Prockop, D.J., *Biochem. J.* 262, 521-528, 1989

ヒト I I 型プロコラーゲンをコードする c DNA クロー 10
 ンの構造。アルファ - 1 (I I) 鎖はフィブリル状コラーゲンの2つの他のアルファ鎖よりもアルファ - 1 (I) 鎖により類似する。

Ala-Kokko, L., Baldwin, C.T., Moskowitz, R.W., and

Prockop, D.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 656-6568, 1990

中度軟骨形成不全症に伴う原発性変形性関節症の原因としての I I 型プロコラーゲン遺伝子 (COL2A1) における単一塩基突然変異

Ramirez, F.

EMBL Data Libraryに提出、1988年12月

参照番号 : S04892

Vikkula, M. and Peltonen, L.

FEBS Lett. 250, 171-174, 1989

I I 型コラーゲン遺伝子における多形領域の構造分析

【0158】コラーゲンアルファ1 (I I I) 鎖の前駆体 ホモサピエンス (人)

残基の数 = 1078

1/Q N Y S P Q Y D S Y D V K S G G V A V G G L A G Y P G P A G
 31 P P G P P G P P G T S G H P G S P G S P G Y Q G P P G E P P G
 61 Q A G P S G P P G P P G A I G P S G P A G K D G E S G R P P G
 91 R P G D R G L P G P P G I K G P A G I P G F P G M K G H R G
 121 F D G R N G E K G E T G A P G L K G E N G L P G E N G A P G
 151 P M G P R G A P G E R G R P G L P G A A G A R G N D G A R G
 181 S D G Q P G P P G P P G T A G F P G S P G A K G E V G P A G
 211 S P G S N G A P G Q R G E P G P Q G H A G A Q G P P G P P G
 241 I N G S P G G K G E M G P A G I P G A P G L M G A R G P P G
 271 P A G A N G A P G L R G G A G E P G K N G A K G E P P R G
 301 E R G E A G I P G V P G A K G E D G K D G S P G D P G A N G
 331 L P G A A G E R G A L G S R G P A G P N G I P G E K G P A G
 361 E R G A P G P A G P R G A A G E P G R D G V P G G P G M R G
 391 M P G S P G G P G S D G K P G P P G S Q G E S G R P G P P G
 421 P S G P R G Q P G V M G F P G P K G N D G A P G K N G E R G
 451 P G G P G P Q G P P G K N G E Y G P Q G P P G P T G P P G
 481 D K G D T G P R G P Q G L Q G L P G T G G P P G E N G K P G
 511 E P G P K G E A G A P G A P G G K G D A G A P G E R G P P G
 541 L A G A P G L R G G A G P P G P E G K G A A G P P G P P G
 571 A A G T P G L Q G M P G E R G G L G S P G P K G D K G E P G
 601 G P G A D G V P G K D G P R G P T G P I G P P G P A G Q P P G
 631 D K G E G G A P G L P G I A G P R G S P G E R G E T G P P G
 661 P A G F P G A P G Q N G E P G G K G E R G A P G E K G E G G
 691 P P G V A G P P P G S G P A G P P G P Q G V K G E R G S P S G
 721 G P G A A G F P G A R G L P G P P G S N G N P G P P G P S G
 751 S P G K D G P P G P A G N T G A P G S P G V S G P K G D A G
 781 Q P G E K G S P G A Q G P P G A P G P L G I A G I T G A R G
 811 L A G P P G M P G P R G S P G P Q G V K G E S G K P G A N G
 841 L S G E R G P P G P Q G L P G L A G T A G E P G R D G N P G
 871 S D G L P G R D G S P G G K G D R G E N G S P G A P G A P G
 901 H P G P P G P V G P A G K S G D R G E S G P A G P A G P G
 931 P A G S R G A P G P Q G P R G D K G E T G E R G A A G I K G
 961 H R G F P G N P G A P G S P G P A G Q Q G A I G S P G P A G
 991 P R G P V G P S G P P G K D G T S G H P P I G P P P R G
 1021 N R G E R G S E G S P G H P G Q S G P P G P P G A P G P C C
 1051 G G V G A P A I A G I G A E K A G G F A P Y Y G D E P M/

【0159】コラーゲンアルファ-1(III)鎖前駆体の配列、以下から調製

Janezko, R.A., and Ramirez, F., Nucleic Acids Res. 17, 6742, 1989

全ヒト・アルファ-1(III)コラーゲンのヌクレオチドおよび核酸配列

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例で詳細に記載する 1(I)C1免疫測定(「CrossLaps」とも称する)についての典型的標準曲線である。

【図2】 実施例で詳細に記載する 1(I)NI免疫測定についての典型的標準曲線である。

【図3】 実施例で詳細に記載する 2(I)N1免疫測定についての典型的標準曲線である。

【図4】 全ピリジノリン(HPLC)とCrossLaps免疫測定との間の相関関係を示す。

【図5】 全ピリジノリン(HPLC)と 1(I)免疫測定との間の相関関係を示す。

【図6】 抗体MAbA7のエピトープ特異性を示す。

【図7】 1(I)C1ペプチド断片に基づくCrossLaps ELISAとMAbA7ELISAとの間の相関相関を示す。

【図8】 CrossLaps ELISAと 2(I)N1ペプチド断片に基づいたN 2ELISA との間の相関相関を示す。

【図9】 閉経に関連した骨吸収の増加をMAbA7ELISAによって検出する方法を示す。

【図10】 閉経に関連する骨吸収の増加のCrossLaps ELISAによる検出を示す。

【図11】 CrossLaps ELISAおよびMAbA7 ELISA

によって測定した、ホルモン代替療法の際に於ける生物化学的マーカーの変化を示す。

【図12】 健康な年齢適合させた婦人からの採取した尿試料のCrossLapsにおける測定の個々の数値を示す。

【図13】 ホルモン代替療法を受けている婦人およびCrossLaps免疫測定におけるプラセボからの尿試料の測定の個々の値を示す。

【図14】 CrossLaps免疫測定について選択された8AAペプチドの位置の模式的表示である。

10 【図15】 初期閉経後婦人(n=245)および後記閉経婦人からの個々の8AA値を示す。ハッチングを施した領域は閉経前婦人(n=102)の群からの平均値±2SDを示す。

【図16】 D-Pyrおよび8AA ELISAの間の相関を示す。214人の年齢が30.0-65.0歳の健康な婦人について、8AAELISAで得られた値をD-Pyr(HPLC)と比較した。

【図17】 Hprおよび8AA ELISAの間の相関を示す。421人の健康な年齢が30.0-54.0歳の婦人について、8AAELISAで得られた値をHprと比較した。

【図18】 CrossLaps™ ELISAで得られた値とHPLCでのピリジノリン(n=81)との相関を示す。

【図19】 閉経前(n=104)および閉経後(n=180)の婦人におけるCrossLaps™、Hprおよびオステオカルシン(osteocalcin)を示す。T-スコアはBottom panelで示す。

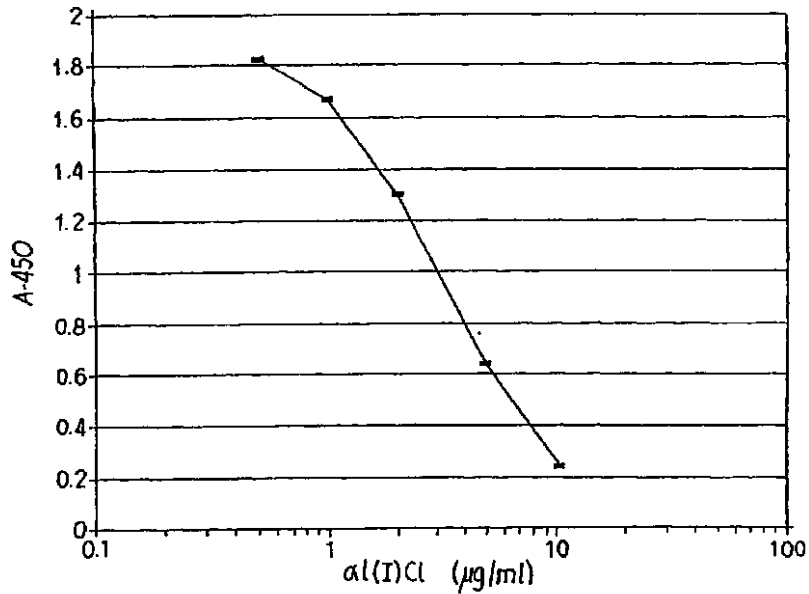
【図20】 ベースライン値のパーセントとして表示

た、12カ月のホルモン代替療法 (n = 80) (.) またはプラセボ (n = 35) 療法後における生化学的パラメーターならびに前腕 (o) および脊椎 (.) の骨質量の平均変化を示す。ハッチングを施した領域は閉経前婦*

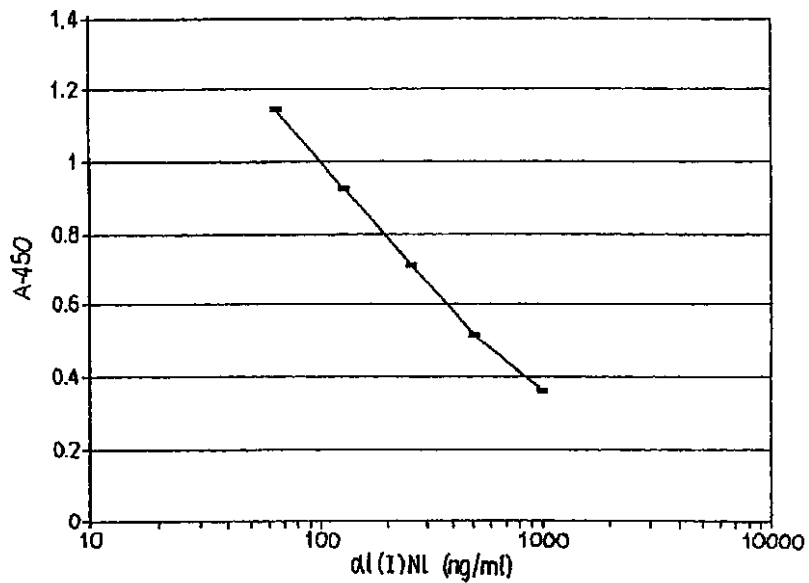
*人での変動を表す。

【図21】 24カ月の期間におけるCrossLaps™/Crのベースライン値と9回の前腕骨質量測定値から決定した損失速度 (%/年) との間の相関相関を示す。

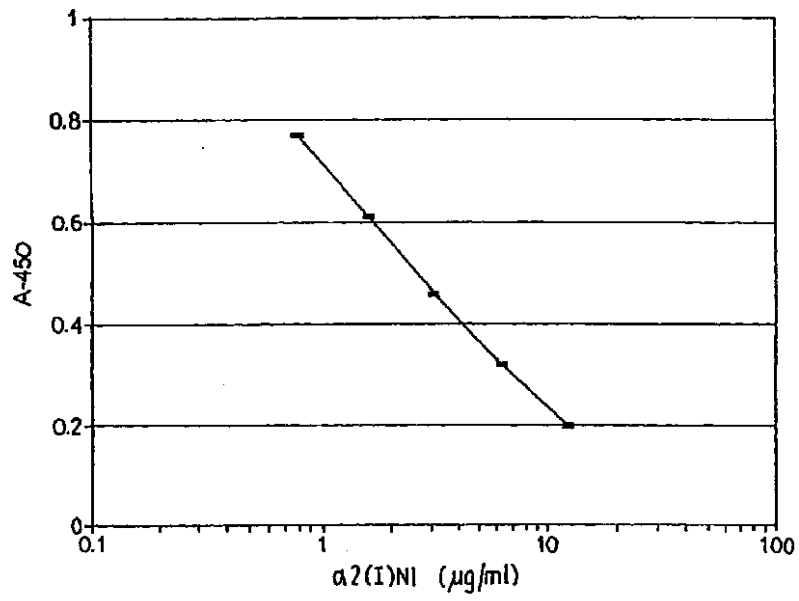
【図1】



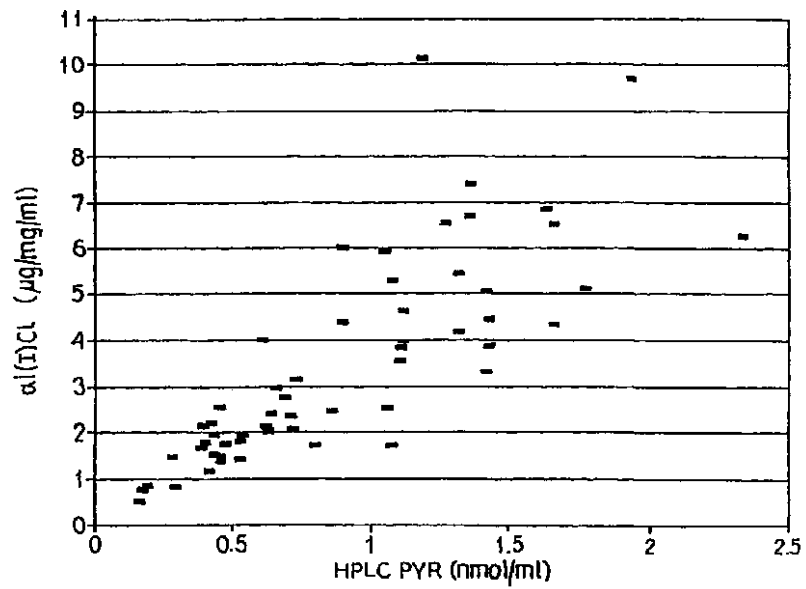
【図2】



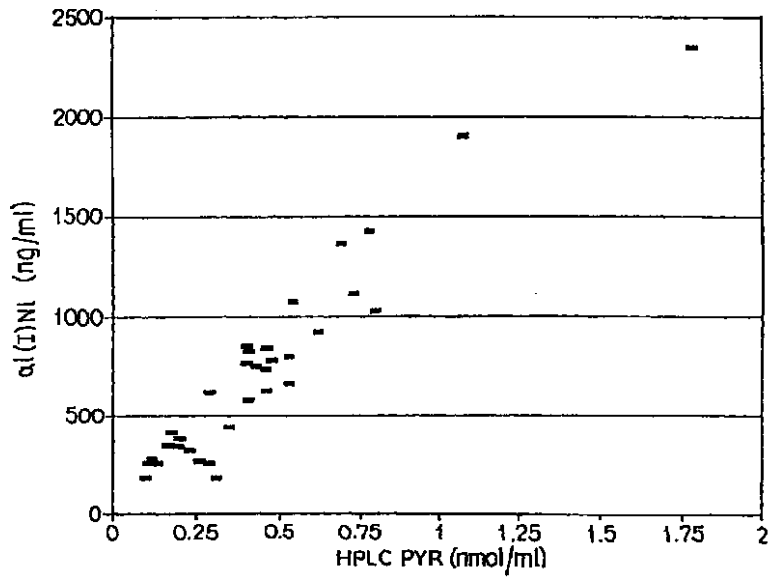
【図3】



【図4】



【図5】



【図6】

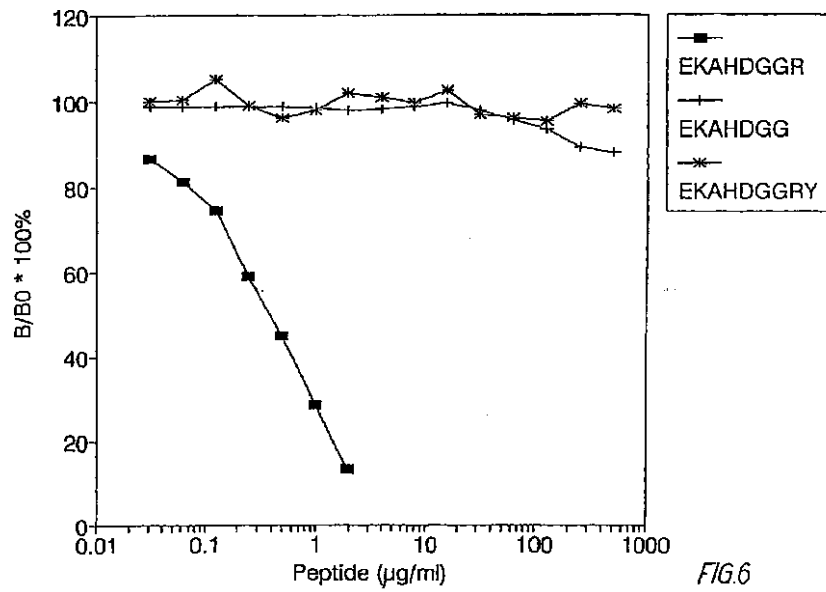
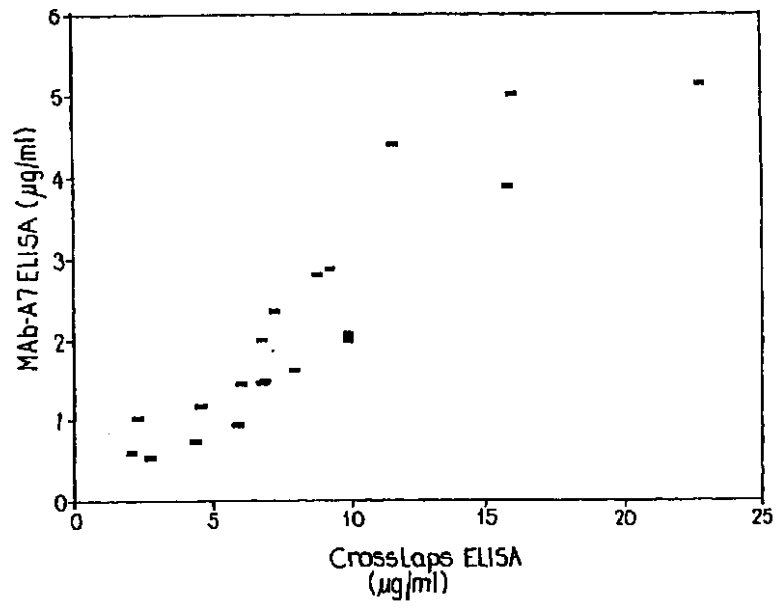


FIG.6

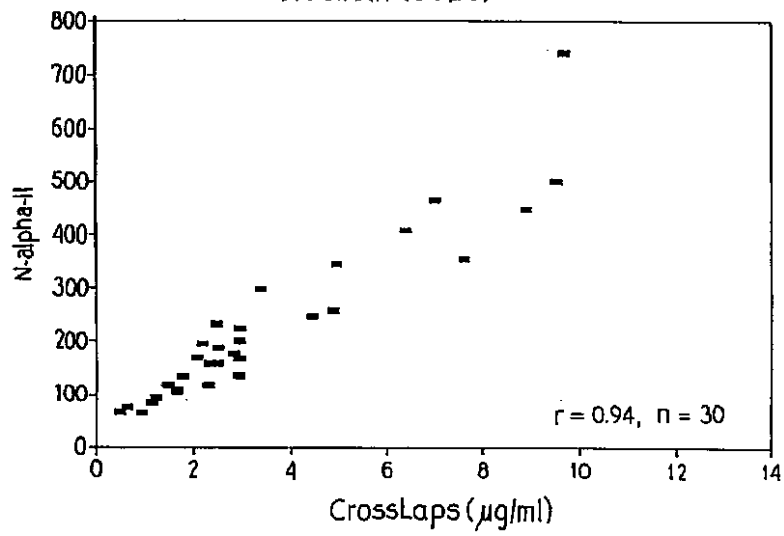
【図7】



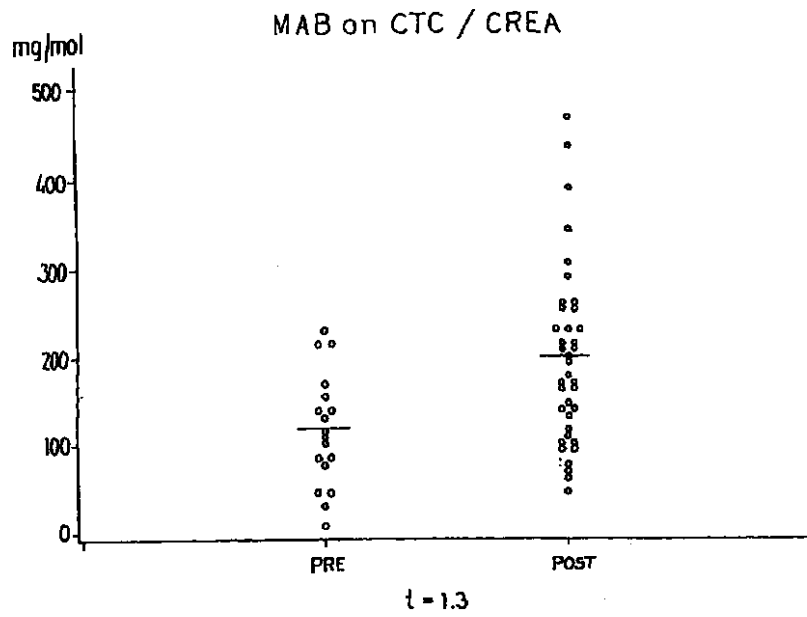
【図8】

CrossLaps (C-alpha) x N-alpha-II

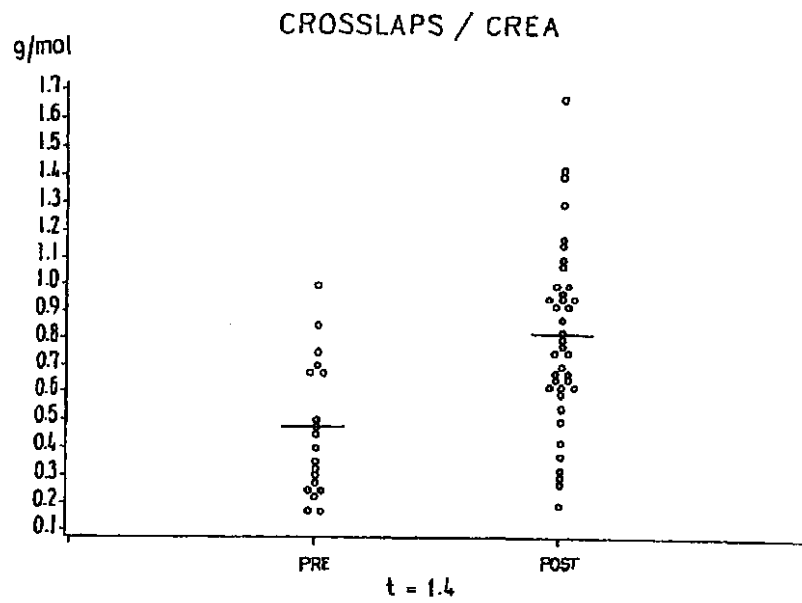
異なる尿試料 (10 μl)



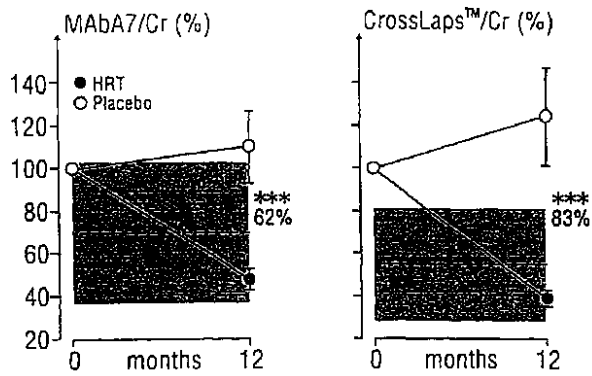
【図9】



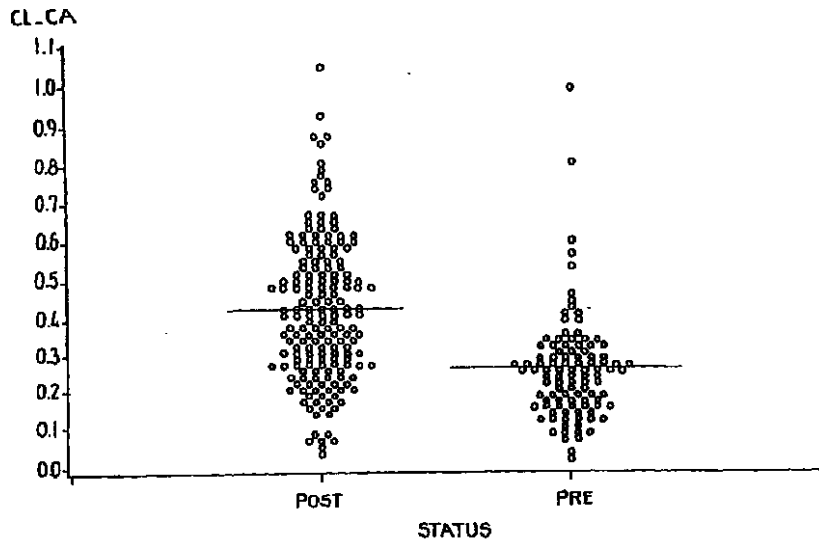
【図10】



【図11】

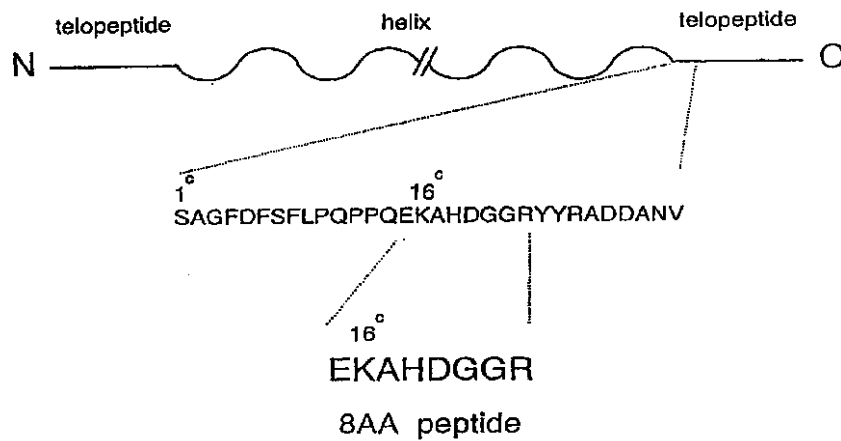


【図12】

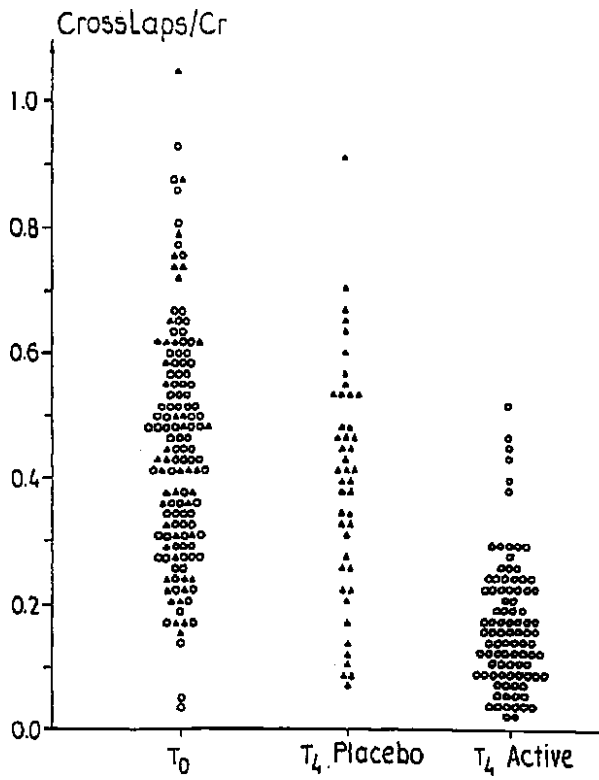


【図14】

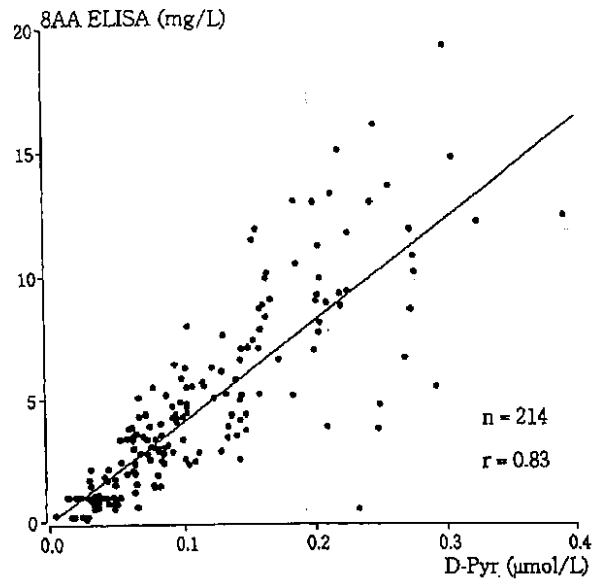
Collagen Type I



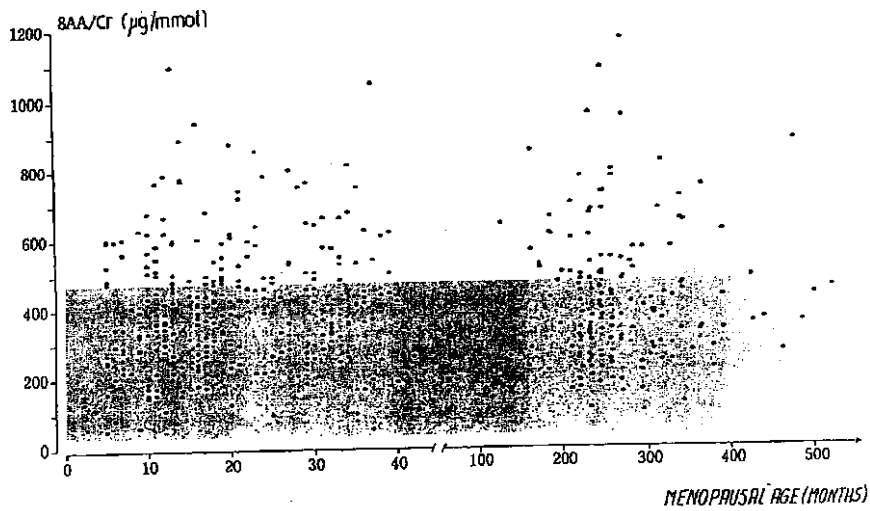
【図13】



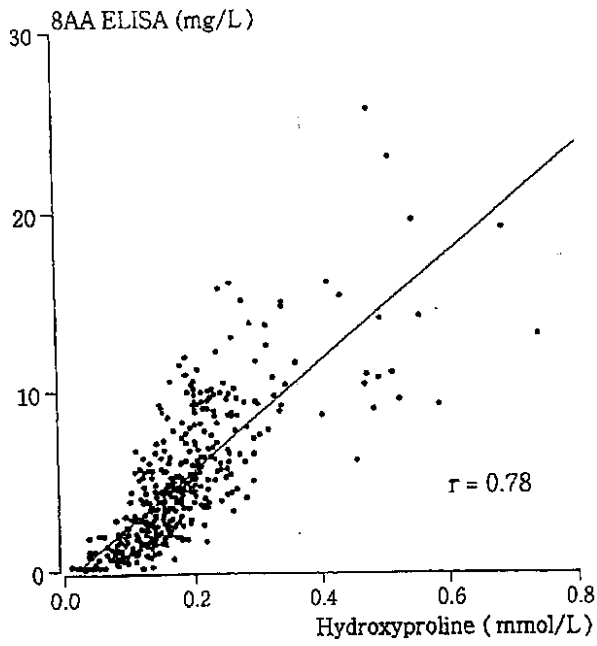
【図16】



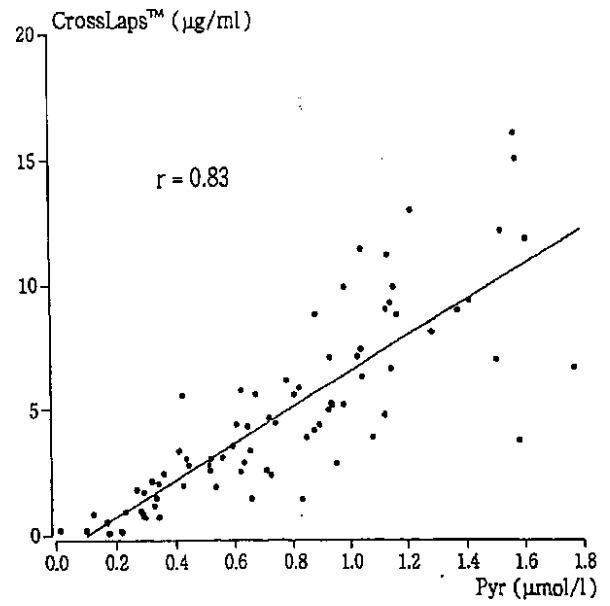
【図15】



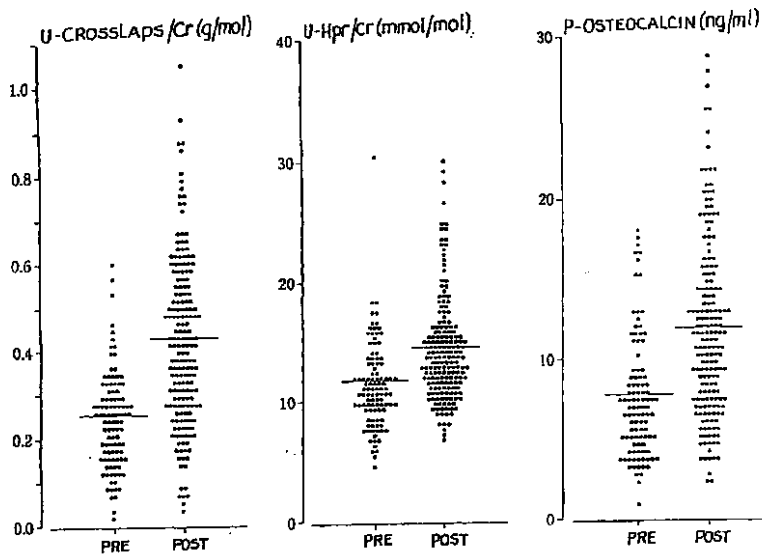
【図17】



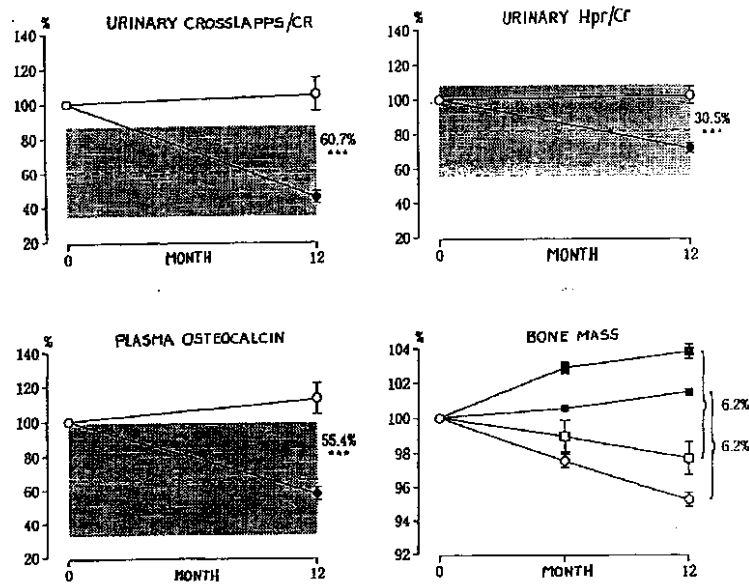
【図18】



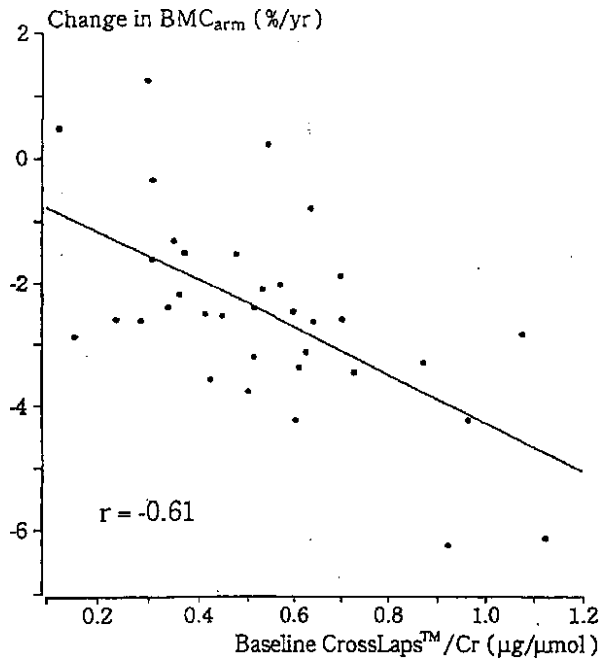
【図19】



【図20】



【図21】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
C 1 2 P 21/08

識別記号

F I
C 1 2 N 15/00

テ-マ-コード (参考)
C

(72)発明者 クイスト、ペル
デンマーク国、ディーケー - 2930、クラム
ベンボルク、タールバク・ストランドベ
イ、103番ジー

(72)発明者 ボンデ、マルチン
デンマーク国、ディーケー - 2800、リング
ビー、リストフテベイ、15番
Fターム(参考) 4B024 AA11 BA44 GA03 HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA91X AA91Y AB05 BA08
CA25 CA46
4H045 AA10 AA30 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	测量体液中胶原片段的方法，测试试剂盒和实施所述方法的方法，以及使用所述方法诊断与胶原代谢相关的疾病的存在的方法·用途		
公开(公告)号	JP2003202338A	公开(公告)日	2003-07-18
申请号	JP2002264031	申请日	2002-09-10
申请(专利权)人(译)	Osuteomita-Bioteku-ER / ES		
[标]发明人	クイストベル ボンデマルチン		
发明人	クイスト、ベル ボンデ、マルチン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K5/083 C07K7/06 C07K14/78 C07K16/18 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 G01N33/531 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6887 C07K14/78 G01N2333/78 G01N2800/108		
FI分类号	G01N33/53.D C07K16/18.ZNA G01N33/531.A C12P21/08 C12N5/00.B C12N15/00.C C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	199301040 1993-09-17 DK		
其他公开文献	JP3790727B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(带更正) 要解决的问题：提供一种用于测量体液中的胶原蛋白片段以诊断与胶原蛋白代谢有关的疾病的方法。一种用于测量体液中胶原蛋白片段的方法，包括使体液样品与至少一种胶原蛋白片段的免疫结合伴侣接触，该方法包括以下步骤：与具有衍生自胶原蛋白的序列的合成肽基本上发生免疫反应，并含有可能的交联位点。将免疫学结合伴侣掺入测定中以定量作为整体抗体或其免疫活性片段的样品中的胶原蛋白片段。除了与一种或多种免疫结合伴侣接触外，还可以使样品与相应的合成肽直接接触。此外，它包括测试套件和用于执行该方法的特定工具。另外，将解释和描述特定肽的结构。

にコラーゲンの代謝に関連する疾患の存在を診断するために該方法を使用する方法・用途 (修正有)

(57)【要約】
 【課題】コラーゲンの代謝に関する疾患を診断するために体液中のコラーゲン断片を測定する方法の提供。
 【解決手段】体液の試料をコラーゲン断片に対する少なくとも一つの免疫学的結合性バ・トナ・と接触させることから成る体液中のコラーゲン断片を測定する方法において、前記免疫学的結合性バ・トナ・が、實質的にコラーゲンに由来する配列を有する合成ペプチドと免疫反応性を示し且つ架橋のための可能な部位を含有するものである前記測定方法。該免疫学的結合性バ・トナ・は、全抗体としてか又はその免疫学的に活性な断片としてのいずれかで、試料中のコラーゲン断片を定量するための測定方法に組み込まれる。免疫学的結合性バ・トナ・の一つ又は複数と接触させること以外に、該試料は対応する合成ペプチドに直接接触させても構わない。更に、該方法を実施するためのテストキットおよび具体的な手段を包含する。また、特異的ペプチドの構造も説明・記載する。

