

(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2004-536831
(P2004-536831A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/26	C07K 16/26	2G054
A61K 39/395	A61K 39/395 N	4C085
A61P 3/14	A61K 39/395 ZNAD	4H045
A61P 5/20	A61P 3/14	
A61P 43/00	A61P 5/20	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 99 頁) 最終頁に続く		

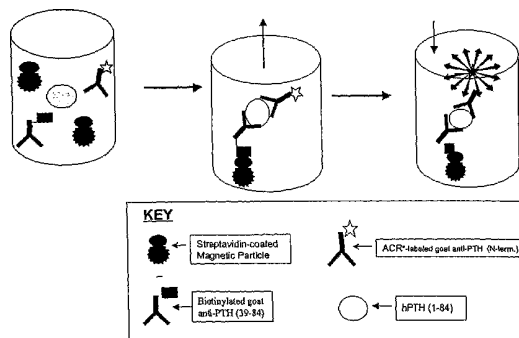
(21) 出願番号	特願2003-510000 (P2003-510000)	(71) 出願人	501251987 クエスト ダイアグノスティクス インヴェ エストメンツ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 デラウェア州 1989 9 ウィルミントン デラウェア アヴェ ニュー 300
(86) (22) 出願日	平成14年7月3日 (2002.7.3)	(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 禎男
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月5日 (2004.1.5)	(74) 代理人	100084009 弁理士 小川 信夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/021356	(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤
(87) 国際公開番号	W02003/003986	(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治
(87) 国際公開日	平成15年1月16日 (2003.1.16)		
(31) 優先権主張番号	09/898,398		
(32) 優先日	平成13年7月3日 (2001.7.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 副甲状腺ホルモン抗体および関連した方法

(57) 【要約】

抗原の三次元エピトープを認識し結合する抗体を調製する方法が提供される。本方法は副甲状腺ホルモンの生理活性三次元アミノ末端に結合する抗体を調製するために特に有用である。このように作製した抗体は診断および治療用途に使用される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 動物を生理活性ヒト副甲状腺ホルモンで免疫感作すること；および、
b) 前記動物から抗体を回収すること、
を含み、前記抗体が生理活性ヒト副甲状腺ホルモンの 3 次元構造を特異的に認識する、生理活性ヒト副甲状腺ホルモンの 3 次元エピトープに対する抗体を作製する方法。

【請求項 2】

さらに、動物から抗体を回収する前に前記動物をヒト副甲状腺ホルモンで 2 回目の免疫感作をすることを含み、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

ヒト副甲状腺ホルモンが担体に結合している、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

担体がキーホールリンペットヘモシアニンである、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

生理活性ヒト副甲状腺ホルモンが配列番号 1 を含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

更に、抗体を単離することを含み、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 7】

抗体がアフィニティークロマトグラフィーによって単離される、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

固相に連結したヒト副甲状腺ホルモンの断片によって抗体をスクリーニングすることによって抗体が単離される、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

a) 動物を副甲状腺ホルモンで免疫感作すること；
b) 前記動物を副甲状腺ホルモンで 2 回目の免疫感作すること；および、
c) 前記動物から抗体を回収すること、
を含み、前記抗体が生理活性ヒト副甲状腺ホルモン 3 次元エピトープを特異的に認識および結合する、生理活性ヒト副甲状腺ホルモン 3 次元エピトープを認識および結合する抗体を作製する方法。

【請求項 10】

副甲状腺ホルモンが担体に結合している、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

担体がキーホールリンペットヘモシアニンである、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

副甲状腺ホルモンがヒト副甲状腺ホルモンである、請求項 9 記載の方法。

【請求項 13】

回収した抗体を単離することを更に含む請求項 9 記載の方法。

【請求項 14】

抗体がアフィニティークロマトグラフィーによって単離される、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

固相に連結したヒト副甲状腺ホルモンの断片によって抗体が単離される、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

副甲状腺ホルモンの断片が、配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 13 番、13 ~ 34 番および 39 ~ 84 番からなる群より選ばれる、請求項 15 記載方法。

【請求項 17】

抗体が配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 13 番からなる副甲状腺ホルモンの断片によって単離される、請求項 15 記載の方法。

【請求項 18】

a) 配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 84 番を含む副甲状腺ホルモンで動物を免疫感作すること

10

20

30

40

50

;

b) 前記動物を副甲状腺ホルモンで2回目の免疫感作すること; および、

c) 前記動物から抗体を回収すること、

を含み、前記抗体が生理活性副甲状腺ホルモン3次元エピトープを認識および結合する抗体である、生理活性副甲状腺ホルモン3次元エピトープを認識および結合する抗体を作製する方法。

【請求項19】

回収した抗体を単離することを更に含む請求項18記載の方法。

【請求項20】

副甲状腺ホルモンの生理活性3次元エピトープが配列番号1のアミノ酸1~13番からなる、請求項18記載の方法。 10

【請求項21】

a) キーホールリンペットヘモシアニンに結合した、配列番号1のアミノ酸1~84番を含む副甲状腺ホルモンで動物を免疫感作すること;

b) 続いて前記動物を副甲状腺ホルモンで免疫感作すること; および、

c) 前記動物から抗体を回収すること、

を含み、前記抗体が副甲状腺ホルモンの生理活性3次元アミノ末端を認識および結合するものである、副甲状腺ホルモンの生理活性3次元アミノ末端を認識および結合する抗体を作製する方法。

【請求項22】

副甲状腺ホルモンの生理活性3次元アミノ末端が配列番号1のアミノ酸1~13番からなる、請求項21記載の方法。 20

【請求項23】

副甲状腺ホルモンの生理活性3次元エピトープを認識および結合する単離抗体。

【請求項24】

生理活性3次元エピトープが副甲状腺ホルモンのアミノ末端である、請求項23記載の単離抗体。

【請求項25】

副甲状腺ホルモンがヒト副甲状腺ホルモンである、請求項23記載の単離抗体。

【請求項26】

生理活性3次元エピトープが配列番号1のアミノ酸1~13番からなる、請求項23記載の方法。 30

【請求項27】

配列番号1の1番の位置のSerから13番の位置のLysまでのアミノ酸配列を含むペプチドを認識する単離抗体。

【請求項28】

配列番号1の1番の位置のSerから13番の位置のLysまでのアミノ酸配列からなるペプチドを認識する請求項27記載の単離抗体。

【請求項29】

ヒト副甲状腺ホルモンの生理活性アミノ末端部分と免疫反応性である抗体。 40

【請求項30】

生理活性アミノ末端部分が配列番号1の1~13番アミノ酸を含む請求項29記載の抗体。

【請求項31】

生理活性アミノ末端部分が配列番号1の1~13番アミノ酸からなる請求項29記載の抗体。

【請求項32】

請求項29記載の抗体および製薬的に許容できる担体を含む治療組成物。

【請求項33】

副甲状腺ホルモンの生理活性部分に結合することによりアデニレートシクラーゼ活性を低 50

下させる請求項 29 記載の抗体。

【請求項 34】

ポリクローナル抗体である、請求項 23 ~ 33 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 35】

モノクローナル抗体である、請求項 23 ~ 33 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 36】

ヒト化抗体である、請求項 23 ~ 33 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 37】

抗体断片である、請求項 23 ~ 33 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 38】

検出可能なマーカーに結合した、請求項 23 ~ 33 のいずれか 1 項記載の抗体。

【請求項 39】

副甲状腺ホルモンの生理活性 3 次元エピトープに特異的に結合する抗体であって、前記エピトープが配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 13 番からなる前記抗体。

【請求項 40】

以下の工程を含む方法によって作製される、ヒト副甲状腺ホルモンの生理活性 3 次元エピトープを認識および結合するポリクローナル抗体：

a) キーホールリンベットヘモシアニンに結合したヒト副甲状腺ホルモンで動物を免疫感作する工程；

b) 前記動物をヒト副甲状腺ホルモンで免疫感作する工程；および、

c) 前記動物から抗体を回収する工程であって、前記抗体がヒト副甲状腺ホルモンの生理活性 3 次元エピトープを認識および結合する抗体である、前記工程。

【請求項 41】

以下の工程を含む方法によって作製される、ヒト副甲状腺ホルモンの生理活性 3 次元エピトープを認識および結合するポリクローナル抗体：

a) キーホールリンベットヘモシアニンに結合したヒト副甲状腺ホルモンで動物を免疫感作する工程；

b) 前記動物をヒト甲状腺ホルモンで免疫感作する工程；および、

c) 前記動物から抗体を回収する工程であって、前記抗体がヒト副甲状腺ホルモンの生理活性 3 次元エピトープを認識および結合する抗体であり、前記生理活性 3 次元エピトープが配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 13 番からなるエピトープである前記工程。

【請求項 42】

生理活性副甲状腺ホルモンに選択的である抗体。

【請求項 43】

生理活性副甲状腺ホルモンに選択的であり、配列番号 1 の少なくとも最初の 13 アミノ酸の一つを認識および結合する、生理活性副甲状腺ホルモンに選択的である抗体。

【請求項 44】

副甲状腺ホルモンまたはその変種の生理活性 3 次元エピトープを認識および結合する単離抗体。

【請求項 45】

副甲状腺ホルモンまたはその断片の生理活性 3 次元エピトープを認識および結合する単離抗体。

【請求項 46】

副甲状腺ホルモンの生理活性 3 次元エピトープを認識および結合する抗体を含むキット。

【請求項 47】

抗体が検出可能な標識に結合している請求項 46 記載のキット。

【請求項 48】

生理活性 3 次元エピトープが配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 13 番からなる、請求項 46 記載のキット。

【請求項 49】

10

20

30

40

50

副甲状腺ホルモンを含む生物学的サンプルを患者から得るための道具をさらに含む、請求項 4 6 記載のキット。

【請求項 5 0】

検出可能な標識が化学発光マーカー、蛍光マーカー、放射性マーカーおよび酵素マーカーからなる群より選ばれる、請求項 4 7 記載のキット。

【請求項 5 1】

検出可能な標識がアクリジニウムエステルである請求項 4 7 記載のキット。

【請求項 5 2】

a) 副甲状腺ホルモンの生理活性 3 次元エピトープを認識および結合する抗体にサンプルを曝露すること；および

10

b) 抗体 - ホルモン複合体を検出すること、
を含む、サンプル中の生理活性副甲状腺ホルモンを検出する方法。

【請求項 5 3】

副甲状腺ホルモンの生理活性 3 次元エピトープを認識および結合する抗体が検出可能なマーカーに結合している、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 4】

工程 b) の前に、副甲状腺ホルモンを認識および結合する別の抗体に抗体 - ホルモン複合体を曝露することを更に含む、請求項 5 2 記載の方法。

【請求項 5 5】

a) 副甲状腺ホルモンの生理活性 3 次元エピトープを認識および結合する捕獲抗体にサンプルを曝露すること；

20

b) 捕獲抗体 - ホルモン複合体を前記捕獲抗体とは異なるエピトープに結合する検出抗体に曝露すること；および、

c) 前記抗体 - ホルモン複合体を検出すること、
を含む、サンプル中の生理活性副甲状腺ホルモンを検出する方法。

【請求項 5 6】

検出抗体が化学発光マーカーに結合している、請求項 5 5 記載の方法。

【請求項 5 7】

化学発光マーカーがアクリジニウムエステルである、請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 8】

サンプルが副甲状腺機能亢進症の患者からのサンプルである請求項 5 2 または 5 5 記載の方法。

30

【請求項 5 9】

サンプルが副甲状腺機能低下症の患者からのサンプルである請求項 5 2 または 5 5 記載の方法。

【請求項 6 0】

ヒト副甲状腺ホルモンの生理活性 3 次元アミノ末端を認識および結合する抗体を含む免疫アッセイ。

【請求項 6 1】

ヒト副甲状腺ホルモンの生理活性 3 次元アミノ末端が配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 1 3 番を含む請求項 6 0 記載の免疫アッセイ。

40

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明は、タンパク質の 3 次元エピトープを特異的に認識する抗体およびその抗体を作製および使用する方法を提供する。ある実施態様においては、副甲状腺ホルモンの生理的に活性な 3 次元エピトープを認識し結合する抗体を作製する方法が開示される。好ましい実施態様において、本方法によりヒト副甲状腺ホルモンの最初の 1 3 アミノ酸を認識して結合する抗体が作製される。より好ましい実施態様において、本発明の抗体は非生理活性副甲状腺ホルモンとは実質的に交差反応しない。

【0 0 0 2】

50

本発明はまた、抗原（好ましくはヒト副甲状腺ホルモンのような副甲状腺ホルモン）の3次元エピトープと免疫複合体を形成することのできる（モノクローナルまたはポリクローナル）抗体および抗体の精製調製物を提供する。そのような抗体は抗原、副甲状腺ホルモンまたはその変種を用いて生成される。この抗体は好ましくは副甲状腺ホルモンの生物学的活性（すなわち、天然には副甲状腺ホルモンのそのレセプターへの結合によって始動するカスケードの一つの構成要素）を中和する（すなわち、部分的または完全に阻害する）ことができる。好ましい実施態様において、本発明の抗体は副甲状腺レセプターと免疫複合体を形成することができ、PTHレセプターの生物学的活性（すなわち、アデニレートシクラーゼ活性化またはホスホリパーゼC刺激）を中和することができる。

【0003】

製薬的に許容できる担体中に副甲状腺ホルモンに対する抗体またはその誘導体を含む治療組成物も本発明の範囲内である。これらの治療組成物は、副甲状腺ホルモンによる副甲状腺ホルモンレセプターの過剰刺激によって特徴付けられる種々の疾病を治療する手段を提供する。これらの抗体は、例えば、PTHに関連した高カルシウム血症とPTHと関連しない高カルシウム血症とを区別するためのような診断薬として有用である。

本発明の抗体は上述のいずれかのペプチド、例えば、ヒト副甲状腺ホルモンを認識する。一つの実施態様において、本抗体は配列番号1の位置1のSerから位置13のLeuまでのアミノ酸配列またはこのアミノ酸配列に含まれる部分を認識する。

一つの実施態様において、本抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。

【0004】

本発明に従って、副甲状腺ホルモン又はその変種を測定するための方法は以下の工程を含む：サンプルと副甲状腺ホルモン、またはその変種を認識する第1の抗体との混合物をインキュベーションする工程；副甲状腺ホルモンまたはその変種を認識する標識した第2の抗体を前記混合物に添加し、さらにインキュベーションする工程；および、前記混合物中に生じる抗原-抗体複合体を検出する工程。

あるいは、本発明に従って、副甲状腺ホルモン又はその変種を測定するための方法は以下の工程を含む：サンプル、副甲状腺ホルモンまたはその変種を認識する第1の抗体、および副甲状腺ホルモンまたはその変種を認識する標識した第2の抗体の混合物をインキュベーションする工程；および、前記混合物中に得られる抗原-抗体複合体を検出する工程。

【0005】

本発明のペプチドに対する免疫学的アッセイは以下の工程を含む：上述したいずれかのペプチドを含むサンプルを上述した抗体のいずれかと、抗原-抗体複合体を形成する条件下でインキュベーションする工程；および、抗原-抗体複合体を定量する工程。

副甲状腺ホルモンの生理活性形態の免疫学的アッセイのためのキットは上述した抗体のいずれかを含む。

本明細書に記載した特徴、または、特徴の組合せは、そのような組合せのいずれかに含まれる特徴が文脈、本明細書、および当業者の知識から明らかであるように相互に矛盾しない限りは、本発明の範囲に含まれる。

本発明のさらなる利点および特徴は以下の詳細な記載および請求の範囲において明らかにされる。

【0006】

発明の詳細な記載

以下の記載は生理活性副甲状腺ホルモン、特にヒト副甲状腺ホルモンを認識し結合する抗体、および前記抗体を作製および使用する方法を開示するが、この記載は副甲状腺ホルモンのみに限定されると解してはならない。この観点から、本明細書に開示される本方法および使用は、その生理活性が少なくとも部分的にポリペプチド若しくはその一部の三次構造に関連している、いかなるポリペプチドについても実施できる。

【0007】

I. 定義

10

20

30

40

50

別に定義しない限り、本明細書において使用する全ての技術用語および科学用語は本発明が属する分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。本発明のため、以下の用語は以下に示すように定義される。

本明細書において、用語「PTH」および「副甲状腺ホルモン」は互換的に使用される。副甲状腺ホルモンはカルシウム吸収を腎臓および骨においては直接制御し、腸においては間接的に制御する。成熟副甲状腺ホルモンは「プレプロPTH」のシグナル配列の切断、続いて「プロPTH」から「プロ」配列が切断されることによって *in vivo* で合成される。本明細書において、副甲状腺ホルモンは、副甲状腺ホルモンを作ることのできるいかなる動物からの甲状腺ホルモンも包含し、それらの動物にはヒト、非ヒト霊長類、ウマ、イヌ、ネコ、ヤギ、およびげっ歯類が含まれるが、これらには限定されない。加えて、副甲状腺ホルモンには、本明細書において論じる副甲状腺ホルモン変種（天然には副甲状腺ホルモンを発現しない生物において組換え的に合成される副甲状腺ホルモンが含まれる）が包含される。

10

本明細書において、用語「hPTH」、「ヒトPTH」および「ヒト副甲状腺ホルモン」は互換的に使用される。加えて、hPTHは用語PTHまたは副甲状腺ホルモンに包含される。ヒトPTHは以下で規定される配列（配列番号1）においてアミド結合によって配列した84個のアミノ酸残基から本質的になる。

【0008】

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly
Lys His Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu
Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe Val Ala
Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp Ala Gly Ser
Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val
Glu Ser His Glu Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys
Ala Asp Val Asn Val Leu Thr Lys Ala Lys Ser Gln

20

【0009】

ヒトPTHは *in vivo* で合成することができ、または、この分野で既知の標準的技術を用いて合成することができる。

当業者はPTHの構造または配列に変動が生じ得ることを理解するであろう。本明細書において、PTHの「変種」とは、PTHの生物学的活性と類似の、または、本質的に類似の生物学的活性を有するポリペプチドとして定義される。一つの分子と他の分子が本質的に類似の構造、または両者が類似の生物学的活性を有する場合に、両者は「本質的に類似」と称される。例えば、PTHの生物学的活性には、PTHのレセプターに対するPTHの結合、そのレセプターにおける続いてのPTHの結合または作用の阻止が含まれる。PTHの別の生物学的活性には、アデニレートシクラーゼ活性の制御が含まれる。PTHの変種には、PTHの類似体、断片または伸長物が含まれる。PTHの変種には、天然に生じるPTHおよび組換え的に合成されたPTHが含まれる。例えば、PTHの「変種」は1以上のアミノ酸置換を含んでよい。アミノ酸置換は、この分野でよく理解されているように保存的でも比保存的でもよい。保存的置換とは、生物学的活性、または三次（例えば、三次元）構造に影響を与えずに一つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換することをいう。加えて、PTHの変種には、この分野でよく理

30

40

【0010】

Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys
Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys
Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys

50

Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Cys-His-Asn-Leu-Gly-Lys
 Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Cys-His-Asn-Leu-Gly-Lys
 Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Cys-His-Asn-Leu-Gly-Lys
 Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Cys-His-Asn-Leu-Gly-Lys

【0011】

本明細書において、「生理活性PTH」または「生理活性hPTH」とは、PTHの生物学的活性の少なくとも一つを有するPTHまたはhPTHポリペプチドをいう。例えば、ポリペプチドがアデニレートシクラーゼ活性を制御することができる場合にそのPTHは生理活性であると考えられる。一つの実施態様において、PTHはそのレセプターに結合することによってアデニレートシクラーゼ活性を制御する。他の生物学的活性も生理活性PTHを定義するために使用される。生理活性hPTHには、少なくとも配列番号1のアミノ酸1～13番を含むPTH変種が含まれる。生理活性PTHの更なる例には配列番号1のアミノ酸1～34番が含まれる。配列番号1のアミノ酸1～84番のような完全長PTH分子も生理活性PTHである。

10

本明細書において、「抗体」とは、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子群によって実質的にコードされる、抗原を特異的に認識しそれに結合するポリペプチドまたはその断片を言う。認識されている免疫グロブリン遺伝子には、 κ 、 λ 、 μ 、 δ 、および ϵ 定常領域遺伝子および免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。抗体には、Fab'、F(ab)₂、Fabc、およびFv断片のような断片も含まれる。本明細書において、用語「抗体」には完全な抗体の改変によって作製された抗体断片または組換えDNA技術によって新たに合成された抗体断片および、さらに今では慣用技術となった技術によって作製される「ヒト化」抗体が含まれる。

20

【0012】

抗体はタンパク質との結合反応において機能する場合にその抗体はタンパク質に「特異的に結合する」またはタンパク質に対して「免疫反応性」であるという。タンパク質への抗体の結合は、不均一なタンパク質集団および他の物質の存在下で、サンプル中のそのタンパク質の存在を決定することを可能とする。従って、指定した免疫アッセイ条件下で、特異的な抗体は特定の抗原に優先的に結合し、サンプル中に存在する他のタンパク質に有意には結合しない。そのような条件におけるタンパク質への特異的な結合は特定のタンパク質に対する特異性について選別した抗体を必要とする。ペプチドが免疫反応性であるかどうかを決定するためのいくつかの方法がこの分野で知られている。免疫化学発光測定アッセイ(ICMA)、酵素-結合免疫吸着アッセイ(ELISA)および放射免疫測定(RIA)はその例である。

30

抗体は、その抗体がPTHの非生理活性形態に比較して優先的にPTHの生理活性形態に結合する場合、生理活性PTHに「選択的」であるという。好ましい実施態様において、抗体が非生理活性PTHよりも少なくとも10倍優先的に生理活性PTHに結合する場合、その抗体は生理活性PTHに選択的である。より好ましい実施態様において、生理活性PTHに選択的な抗体は非生理活性PTHよりも少なくとも100倍優先的に生理活性PTHに結合する。別の実施態様において、生理活性PTHに選択的な抗体は非生理活性PTHよりも少なくとも200倍優先的に生理活性PTHに結合する。さらに別の好ましい実施態様において、生理活性PTHに選択的な抗体は非生理活性PTHよりも少なくとも500倍優先的に結合する。一層好ましい実施態様において、生理活性PTHに選択的な抗体は非生理活性PTHよりも少なくとも1000倍優先的に結合する。

40

【0013】

「標識」とは分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、または化学的手段によって検出可能な構成成分を言う。例えば、有用な標識には、蛍光色素、化学発光化合物、放射性同位体、高電子密度試薬、酵素、着色粒子、ビオチン、またはジゴキシゲニンが含まれる。標識はしばしば放射能、蛍光、着色、または酵素活性のような測定可能なシグナルを生成し、結合した標識の量を定量するためにこれらを使用することができる。

化学発光化合物の例には、ルシフェリン、ルミノール誘導体、ピロガロール、イソルミノ

50

ール、エクオリン、環式アリアルヒドラジド、ジオキセタン、ロジウムキレート（電気化学発光）、オキサレートエステル、熱化学発光標識、アクリジニウムその他が含まれる。これらの標識はこの分野でよく知られた技術を用いて（米国特許第5,284,952号を参照せよ。この特許の開示は参照により全体が本明細書に取り込まれるものとする。）、タンパク質、例えば抗-PTH抗体に結合させることができる。一つの実施態様において、抗-hPTH₁₋₁₃のような検出抗体は米国特許第5,284,952号、5,110,932号および第5,338,847号（これらの開示は参照により全体が本明細書に取り込まれるものとする。）のような方法を使用することによりアクリジニウムで標識しても良い。

【0014】

標識のために使用する蛍光物質には、フルオレセイン、フルオレサミン、フルオレセインイソチオシアネート、ウンベリフェロン、ローダミン、テキサスレッド色素、フタロシアニン、クマリン、スクアレン、アントラセン、エリスロシン、ユーロピウムキレートその他が含まれる。

標識のために使用する放射性同位体の例には、¹⁴C、³H、³²P、¹⁸F、または¹²⁵Iが含まれる。

これまで開発されており、本発明のアッセイに使用できる酵素の例として、米国特許第3,654,090、第3,791,932号、第3,839,153号、第3,850,752号、米国特許第3,817,837号、第3,879,262号、Journal of Immunological Methods 1:247 (1972)および、Journal of Immunology 109:129 (1972)に記載されたものが挙げられる（これらの開示は、引用によりその全体が本明細書に取り込まれるものとする）。他の酵素の例には、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルコニダーゼ、ホスファターゼ、ペプチダーゼ、アルカリホスファターゼその他が含まれるが、これらに限定されない。本発明において有用な補酵素には酵素が反応物を触媒して検出可能な産物、例えば光による検出、を容易にする分子および/またはタンパク質が含まれる。補酵素には、FADおよびNADが含まれるが、これらに限定されない。一つの実施態様において、抗-PTHはNADで標識することができる。例えば、米国特許第4,380,580を参照せよ（この特許の開示は引用によりその全体が本明細書に取り込まれるものとする）。

【0015】

着色粒子の例には、金コロイド、またはブルーラテックスが含まれる。ある実施態様において、標識は本発明の抗体とカップリングされて副甲状腺ホルモンの生理活性形態の存在を決定することを可能とする。

他の標識には、分光学的に活性な物質の非活性前駆体（英国特許第9,139,403号およびフランス国特許第2,201,299号；米国特許第3,880,934号に対応）および電子スピン共鳴部分（米国特許第3,850,578号）が含まれ得る。

用語「単離」された、「精製」された、または「生物学的に純粋」とは、物質がその天然状態にある時に通常付随する構成成分から少なくとも部分的に分離されており、しばしば本質的若しくは実質的にそれらの構成成分を含まない物質についていう。純度および均一性は典型的には、この分野でよく理解されているように、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高性能液体クロマトグラフィーのような分析的化学的技術を用いて決定される。一般に、単離した抗体は調製物中の全巨大分子種の80%を超えるであろう。好ましくは抗体は調製物中に存在する全巨大分子種の90%より多くを代表するように精製されるであろう。より好ましくは、抗体は95%より高く精製され、さらに好ましくは、本抗体は本質的に均一にまで精製され、その場合、他の巨大分子種は通常の技術では検出されない。

【0016】

用語「免疫アッセイ」は、分析物に特異的に結合させるために抗体を用いるアッセイである。免疫アッセイは、分析物を単離、標的化、および/または定量するために特定の抗体の特異的結合特性を使用することを特徴とする。

本発明の発明者は、迅速、容易、かつ正確に生理活性PTH、特にhPTHを測定する目的で種々の研究を行った。その結果、hPTHの生理活性形態を特異的に認識する抗体が作製された。本発明者は、これらの、それぞれがhPTHの異なるエピトープを認識する抗体を組み合わ

10

20

30

40

50

せを用いて免疫アッセイを構築した。

【0017】

II. 本発明の組成物

本発明の抗体はタンパク質の三次元エピトープを認識し、これに結合する。特に本抗体はPTHの生理活性形態を特異的に認識する。本発明の抗体に結合するタンパク質の例の一つはヒトPTHである。

本発明の抗体はアメリカタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection) (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA)に2001年7月3日に寄託され、アクセッション番号PTA-3496が付与されている。寄託物は寄託時には生存しており、生存しなくなった場合には出願人により代替されるであろう。

寄託物は本出願が継続している間37 CFR 1.14および35 USC § 122の下に長官に対して入手可能状態に置かれ、30年間または最新の請求後5年間のいずれか長いほうの期間、寄託機関で維持されるであろう。

【0018】

本発明の好ましい抗体はhPTHの生理的に活性な形態(生理活性hPTH)を認識し、結合する。本発明をいかなる理論や作用機序にも限定するつもりはないが、hPTHのアミノ末端(N-末端)領域のインタクトなヘリックス構造にそった最初のアミノ酸(配列番号1の位置1のSer)はhPTHが生理的に活性であるためには存在していなければならないと考えられている。さらに、hPTHの生理活性N-末端領域は13アミノ酸(配列番号1のアミノ酸1~13番)からなる3次元らせん構造であると考えられている。本発明の抗体は、このN-末端領域の3次元エピトープを認識して結合する。一つの実施態様において、このエピトープはhPTHのこの13アミノ酸(配列番号1のアミノ酸1~13番)のすべてを含む。他の実施態様において、このエピトープはhPTHの最初の13アミノ酸内のアミノ酸の組み合わせを含む。例えば、このエピトープはアミノ酸3, 4番および5番; 2, 4番および6番; 8, 10番、および13番; またはこれらの混合を含んでよい。

【0019】

一つの実施態様において、本発明の抗体は最初の13アミノ酸の少なくとも1つ、および、アミノ酸14~84番、好ましくは13~34番からなる領域内に位置する少なくとも1つの異なるアミノ酸を認識し、結合する。例えば、本発明の抗体はアミノ酸3, 7番および14番; 4, 8番、および33番; または5, 14番、および15番を含むエピトープを認識し、結合し得る。

本発明のある実施態様において、本発明の抗体はポリクローナル抗体である。

別の実施態様において、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。

本発明の一つの実施態様において、抗体はPTHまたはhPTHの最初の13アミノ酸内のエピトープを認識し結合し、この最初の13アミノ酸の外にあるPTHまたはhPTHのエピトープには結合しない。好ましい実施態様において、本抗体はPTHまたはhPTHの最初の7アミノ酸内のエピトープを認識し結合する。

【0020】

III. 本発明の組成物の作製方法

副甲状腺ホルモンまたはその変種は当業者に知られた通常の方法のいずれかによる抗体作製に使用することができる。それらの方法にはポリクローナル抗体を作製する方法およびモノクローナル抗体を作製する方法が含まれる。

本発明のポリクローナル抗体は、フロイントの完全アジュバントのようなエマルジョンとしてインタクトなPTH、その変種またはそれらの混合物で動物を免疫することによって作製される。抗体作製に使用する動物の例には、マウス、ラット、ウサギまたはヤギが含まれるが、これらに限定されない。インタクトなPTHは完全長PTH分子として、例えば、「プレ」配列および「プロ」配列が切断された後のPTHポリペプチドとして定義することができる。ヒトPTHが使用される態様においてはインタクトなhPTHは配列番号1に記載したアミノ酸配列を有する。好ましい実施態様においては、インタクトなPTHは、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)のような担体タンパク質に連結していることが好ましい。担

10

20

30

40

50

体タンパク質の他の例には、ウシ血清アルブミン (BSA)、ヘモシアニン、およびウシチオグロブリン (BTG) が含まれる。ある実施態様において、ここに記載するように、担体タンパク質は注目する抗原 (例えば、PTH) にグルタルアルデヒドで連結される。他の方法はこの技術分野にてよく知られている。

【0021】

最初の免疫感作後、動物には実質的に純粋なインタクトな生理活性PTH、その変種またはそれらの混合物の1回以上の追加的免疫感作ブーストを行う。免疫感作は腹腔内投与、皮下投与又は静脈投与で行うことができる。このようにして、PTHの内部エピトープに対する抗体の広いスペクトルを超えて、正しいコンフォーメーションのPTH表面エピトープに対する抗体が上昇する。

10

免疫原調製物に対する動物の免疫応答はテスト採血および注目するポリペプチドに対する反応性の力価を決定することによって監視することができる。免疫原に対する抗体のかなりの高力価が得られたならば、その動物から血液を集め抗血清を回収する。

【0022】

一つの実施態様においては、抗体は血清を抗体アフィニティー精製カラムに曝露することによって単離される。抗体を単離する他の技術がこの分野で知られている。アフィニティーカラムはPTHのペプチド、好ましくはhPTHをカラムの固相に連結させることによって構築する。本発明の好ましい実施態様において、このカラムはhPTHのアミノ酸1-13番 (hPTH₁₋₁₃)、13-34番 (hPTH₁₃₋₃₄) および39-84番 (hPTH₃₉₋₈₄) からなるhPTHペプチドを含む。他のペプチド、またはそれらの組み合わせを使用して本発明の抗体を単離することもできる。

20

当業者には容易に理解されるであろうが、ペプチドhPTH₁₋₁₃はhPTHの最初の13アミノ酸内にあるhPTHエピトープを認識する抗体に特異的に結合するであろう。同様にペプチドhPTH₁₃₋₃₄はhPTHのアミノ酸13~34番内にあるhPTHエピトープを認識する抗体に特異的に結合するであろう。また、ペプチドhPTH₃₉₋₈₄はhPTHのアミノ酸39~84番内にあるhPTHエピトープを認識する抗体に特異的に結合するであろう。

従って前述した方法により、hPTHの最初の13アミノ酸に特異的に結合する抗体 (抗-hPTH₁₋₁₃抗体) が選択的に単離される。加えて、抗-hPTH₁₋₁₃抗体によって認識されるエピトープは最初の13アミノ酸内のアミノ酸のどんな組み合わせも含み得る。一つの実施態様において、この抗体はhPTHの13アミノ酸全体 (すなわち、配列番号1のアミノ酸1~13番) からなるエピトープを認識する。

30

当業者が理解するように、抗体含有血清をペプチド共役アフィニティーカラムへかける順番は本発明を実施する際に決定要因ではない。しかしながら、好ましい実施態様において、まず血清をhPTH₃₉₋₈₄ペプチドを含むカラムに曝露し、次に、得られた血清 (例えばhPTH₃₉₋₈₄に結合する抗体を含まない血清) をhPTH₁₃₋₃₄ペプチドを含むカラムに曝露し、続いて得られた血清 (例えば、hPTH₃₉₋₈₄およびhPTH₁₃₋₃₄抗体を含まない血清) をhPTH₁₋₁₃ペプチドを含むカラムへ曝露することが望ましい。

【0023】

生理活性PTHを認識し結合するモノクローナル抗体も提供される。モノクローナル抗体はこの分野で知られた通常の方法を用いて作製することができる。例えば、KohlerとMilstein (1975), Nature, 256:495-97を参照せよ。簡単に言うと、マウスのような動物にPTH、好ましくは上述したような担体タンパク質に共役させたPTHを注射する。動物を1回以上の純粋なPTH注射によりブーストし、融合の3日前に経静脈 (IV) ブースターによって過剰免疫する。マウスの脾臓細胞を単離し、通常の方法に従ってミエローマ細胞に融合させる。ハイブリドーマを標準的なヒポキサンチン/アミノプテリン/チミン (HAT) 培地中で常法に従って選抜する。生理活性PTHを認識する抗体を分泌するハイブリドーマを同定し、培養し、標準的な免疫学的技術によってサブクローニングする。

40

しばしば、抗体は検出可能シグナルを与える物質と共有結合的または非共有結合的に結合させることにより標識されるであろう。本発明の一つの実施態様において、この標識は化学発光化合物である。好ましい化学発光化合物はアクリジニウムエステルである。

50

【0024】

III. 本発明の構成物を使用する方法

A. 免疫アッセイ

本発明の免疫学的アッセイはサンプル中の抗原を定量するために使用することができる。種々のアッセイおよび関連試薬およびパラメータの例は米国、出願番号09/761,969号(2001年1月16日出願)中に提供されている(この内容全体は引用に本明細書に取り込まれるものとする)。

免疫アッセイの一つの例は「サンドイッチ」免疫アッセイである。サンドイッチ免疫アッセイにおいて、抗体は固相に固定化され(捕獲抗体)、抗原とインキュベーションされ、検出可能標識を有する抗体(検出抗体)とさらにインキュベーションされる。本発明の好ましい態様において、PTHの生理的に活性な部分を認識しないPTH抗体を磁性粒子のような固相に共役させ、この抗体をPTHを含むサンプルとインキュベーションし、さらに生理活性PTHに特異的に結合する、検出可能標識と共役した抗体とインキュベーションする。より好ましい実施態様において、PTHのアミノ酸1-13を認識しないhPTH類似体を磁性粒子と共役させ、この抗体をhPTHを含むサンプルとインキュベーションし、さらにアクリジニウムエステルと共役した、生理活性hPTHを認識する抗体とインキュベーションする。本発明のサンドイッチ免疫アッセイにおいて、サンプル、第1の抗体および標識した第2の抗体を同時にインキュベーションしても良い。適切な固相基材の例には、マイクロタイタープレート、ビーズ、チューブ、膜、フィルター紙またはプラスチックカップが含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0025】

免疫学的アッセイの別の例には、検出可能標識で標識された抗原および非標識抗原を抗体と競合的に反応させるアッセイが含まれる。さらに、抗原を固相に固定化し、希釈血清または精製抗体とインキュベーションし、さらに検出可能標識で標識された抗免疫グロブリンとインキュベーションし、それによって標識された結合物質を得ることもできる。

サンドイッチ技術が使用される場合、PTHの異なるエピトープに対する2種の抗体が使用される。一つの抗体は、検出可能標識で標識され(検出抗体)、他の抗体は固相抗体として固相に結合させ、あるいは、固相に特異的に結合することができるように作製される(捕獲抗体)。これらの抗体を種々の濃度の抗原と反応させ、複数の抗原-抗体複合体を形成させる。この抗原-抗体複合体は固相に結合しているため、固相を複合体から分離し、固相における標識の量を測定する。標識と抗原の濃度との関係をプロットし、標準曲線を得る。

30

【0026】

未知の濃度の抗原を含むサンプルを反応系に加えた場合、反応後に測定された標識の量を表準曲線に当てはめることにより抗原の濃度を決定することができる。測定するサンプルの例はPTHまたはその変種を含むサンプルであってよく、血漿、血清、血液、尿その他が含まれる。

本発明の免疫アッセイにはサンドイッチ放射免疫アッセイ(RIA)、サンドイッチ酵素免疫アッセイ(EIA)、サンドイッチ蛍光免疫アッセイ(FIA)、サンドイッチ化学発光免疫アッセイ(CLIA、ICMA)、サンドイッチ化学発光-酵素免疫アッセイ(CLEIA)およびサ

40

ンドイッチアッセイに基づく免疫クロマトグラフィー法が含まれる。捕獲抗体の固相へのカップリング、および標識抗体を標識することはこの分野の当業者に知られたどの方法で行うこともできる。本発明の好ましい態様において、捕獲抗体はビオチンにカップリングされ、磁性粒子はストレプトアビジンで被覆される。ビオチンはストレプトアビジンに結合し、それによって捕獲抗体の固相へのカップリングが達成される。

【0027】

B. スクリーニングアッセイ

本発明は更に被験者のPTHレベルを検出するアッセイを提供する。好ましい実施態様において、本アッセイは被験者の血液中のPTHの異常なレベルを検出する方法を提供する。

これらのアッセイはPTH活性を制御する能力を決定するための試験化合物のスクリーニン

50

グテストに特に有用である。このような場合、試験化合物が反応系に加えられ、抗体のPTHへの結合に対するその試験化合物の効果が観察される。本発明の抗体の生理活性PTHへの結合を阻害する化合物は潜在的な生理活性PTH阻害因子として考えることができ、さらに、異常なPTH活性または濃度と関連した疾病治療のための潜在的治療薬剤として考慮することができる。

一つの例において、PTHを認識する抗体はPTHレセプターへの結合についてPTHと競合する能力がスクリーニングされる。使用する抗体は粗血清からのものでもよく、細胞培地または腹水でも、または未精製形態であっても良い。PTH類似物のPTHレセプターへの結合を低下させる抗体は競合因子として分類される；低下させない抗体は非競合因子である。

【0028】

化合物（抗体を含む）はcAMP蓄積、細胞内カルシウム、および/またはイノシトールリン酸アッセイを用いてそのアゴニスト特性又はアンタゴニスト特性についてスクリーニングすることができる。サイクリックAMP蓄積は上述したようにアッセイにより測定することができる。PTHレセプターへの結合についてPTHと競合し、cAMP蓄積に対するPTHの効果を阻害する化合物は競合的PTHアンタゴニストと考えられる。逆に、PTHレセプターへのPTHの結合と競合しないが、（おそらくレセプター活性化部位を遮断することにより）cAMP蓄積のPTH活性化を阻止する化合物は、非競合的アンタゴニストと考えられる。PTHレセプターへの結合についてPTHと競合し、PTHの存在下または非存在下でcAMP蓄積を刺激する化合物は競合的アゴニストである。PTHレセプターへの結合についてPTHと競合はしないが、PTHの存在下または非存在下でcAMP蓄積を刺激することのできる化合物、またはPTH単独の場合よりも高濃度に蓄積を刺激する化合物は非競合的アゴニストとして考えられるであろう。

10

20

【0029】

C. 診断的使用

本発明の抗体は、本発明の細胞レセプターとその特異的なリガンドの間の相互作用に関連していることを特徴とし得る疾病の診断、分類、予後、および/または治療に有用である。例えば、高カルシウム血症または低カルシウム血症のある形態はPTHとPTHレセプターとの相互作用に関連している。高カルシウム血症とは血清カルシウム濃度の異常な上昇がある状態である；これはしばしば、副甲状腺機能亢進症、骨粗鬆症、乳癌、肺および前立腺癌、頭部および頸部癌、扁平上皮癌、食道癌、多発性骨髄腫および副腎腫を含む他の疾病を伴っている。低カルシウム血症とは、血清カルシウム濃度が以上に低い状態であり、有効なPTHの欠損に起因するものであろう。

30

一つの例において、本発明の化合物は高カルシウム血症の診断、および高カルシウム血症状態、すなわち、PTHによって媒介される高カルシウム血症（例えば、副甲状腺機能亢進症および悪性の液性高カルシウム血症）と、この因子が関与しない疾病（例えば骨と直接接触している転移性腫瘍細胞の存在によって媒介される局所的溶骨性高カルシウム血症、および、破骨細胞刺激因子（インターロイキン）、リンホトキシン、カルシトリオール、E型プロスタグランジン、およびビタミンD-様ステロールのような液性因子の増加によって媒介されるある種の希な悪性腫瘍関連高カルシウム血症）と関連した高カルシウム血症とを区別するために使用される診断薬を製造するために使用される。

40

【0030】

診断の一つの方法において、血清中の全カルシウムおよび/またはイオン化カルシウム濃度が本発明のPTHアンタゴニストの投与の前後に標準的な技術によって測定される。

PTH関連高カルシウム血症は本発明のアンタゴニスト投与に続く血清カルシウム濃度の低下として検出することができるであろう。対照的に、PTH以外の因子によって媒介される高カルシウム血症については本アンタゴニストの投与後も血清カルシウム濃度は不変のままであろう。

本発明の他の診断的応用により、PTH関連腫瘍、例えば、悪性の液性高カルシウム血症と関連した腫瘍を診断するため、または、癌治療の間のPTHのレベルを監視するために生物学的サンプル中のPTHレベルの測定が可能である。この方法は、本明細書に記載したアッ

50

セイの一つを用いて組織サンプル中に存在するPTHへの副甲状腺ホルモンレセプターの結合をアッセイすることを含む。

【0031】

高カルシウム血症が疑われる患者は本発明の化合物を用いて治療することができるかもしれない。症状は突然に現れ、戻さないと致死的であり得るので、迅速な干渉が重要である。一つの応用において、血清カルシウム濃度はPTHのアンタゴニストを含む即時的な治療進行によって安定化される。そのようなアンタゴニストにはPTHの生物学的活性を阻止すると（本明細書に記載したアッセイにより）決定された本発明の化合物が含まれる。アンタゴニストを投与するため、適切な抗体は一般に生理食塩水のような適切な担体中で製剤化されることにより医薬製造に使用され、PTHレセプターへのPTH結合に対して十分な競合を生じる用量（例えば、血清カルシウムレベルを10mg/lより低くするために十分な用量）で静脈投与される。典型的な用量は一日に体重1kgあたり1ng~10mgであろう。許容できるカルシウムレベル（すなわち、10.1mg/dlより低い濃度）を長期間維持するため、治療は必要に応じて繰り返すことができる。加えて、本発明の医薬を投与するために他の投与態様を使用することもできる。これは背景にある高カルシウム血症を引き起こした疾病状態の迅速な治療のために必要かもしれない；あるいは、例えば骨粗鬆症のような疾病の長期治療に使用することもできる。

10

【0032】

D. 医薬組成物および治療方法

本発明はさらに本発明の組成物および製薬的に許容できる担体を含む医薬組成物を含む。そのような医薬組成物は本発明の方法によって同定される少なくとも一つの抗体の治療的または予防的用量を含まなければならない。製薬的に許容できる担体は、意図した宿主へこの化合物をデリバリーするために適したどのような共存可能な非毒性物質であってもよい。滅菌水、アルコール、脂質、ワックス、および不活性固体を担体として使用することができる。製薬的に許容できるアジュバント、緩衝剤、分散剤、その他も本医薬組成物に取り込むことができる。活性物質を取り込んだ医薬組成物の調製は医学文献および科学文献によく記載されている。例えば、1982年、レミントン製薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)第16版、Mark Publishing Company, Easton, Pa., を参照されたし。この文献は引用により全体が本明細書に取り込まれるものとする。

20

【0033】

ここまで記載してきた医薬組成物は、非経口投与および経口投与の両方を含む宿主への全身投与に適している。本医薬組成物は通常非経口的に投与、すなわち、皮下、筋肉または静脈投与されるであろう。従って、本発明は、宿主への投与のための組成物を提供し、前記組成物は上述したように、許容できる担体中の同定された化合物の製薬的に許容できる溶液を含む。

30

製薬的担体中の化合物の濃度は変動し得る。すなわち、この濃度は0.1質量%以下から約20質量%またはそれ以上にまで変動し得る。筋肉注射用の典型的な医薬組成物は例えば1~4mlの緩衝化滅菌水と1 μ g~1mgの本発明の方法によって同定される化合物を含むように作製されるであろう。静脈内インフュージョン用の典型的な組成物は100~500mlの滅菌リンガー液と約1~100mgの化合物を含むように作製することができる。

40

【0034】

本発明で開示されるような放出組成物および検出組成物を含む種々のキットをPTH、またはその変種のサンプル中の濃度を決定するために使用することができる。しかしながら、それらは本発明の組成物を使用することのできる多数の可能なキットの例に過ぎない。他のキットも本発明の範囲内として考慮されている。例えば、以下の特許、論文および指示マニュアルは本発明の放出組成物を含むように適合させることができる：米国特許第4,935,339号、第4,121,1978号；第5,232,836号；第5,064,770号；第5,202,266号；第4,816,417号；第5,821,020号および第5,981,779号；これらの開示は引用により全体が本明細書に取り込まれるものとする。適合の一つは、これらで使用されている組成物を本組成物と置換することである。

50

広い態様において、本発明のキットはPTHまたはその変種の濃度を決定するための自動化アッセイ系に使用するように適合させることができる。例えば、本発明のキットは、好ましくはニコール・アドバンテージ (Nichols Advantage) システムと一緒に使用することができる。

【0035】

実施例

実施例 1

hPTHを認識し結合する抗体の作製

A. 免疫感作

ヒト副甲状腺ホルモン1-84はBACHEM, California Inc., Torrance, CAから購入した。製品番号H-1370.1000である。 10

KLH, ヘモシアニン、キーホールリンペットはCalbiochem, La Jolla, CAから購入した。製品番号374805。

グルタルアルデヒドはSigma Chemical Co. St. Louis, MOから購入した。製品番号G-6247である。

ヒト副甲状腺ホルモンはモル比200:1で以下のようにKLHにカップリングさせた：

1mgのPTHを0.20mlの0.1 N 酢酸に可溶化した。可溶化PTHは0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.4中で1mg/mlに希釈した。キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)を0.1M リン酸ナトリウムpH7.2中に可溶化し、タンパク質含有量10mg/mlの濃度とした。タンパク質含有量として1モルのKLHに対して200モルPTHというモル比を計算し、2種のタンパク質を4 にて混合した。25%水性溶液を0.1Mリン酸ナトリウムpH7.2で1%に希釈することによって10mg/ml(1%)のグルタルアルデヒド溶液を調製した。1%グルタルアルデヒドを最終濃度0.655mg/mlで加えることにより、1モルのKLHに対して200モルのPTHという混合物をカップリングさせた。このグルタルアルデヒド架橋タンパク質混合物を4 にて5~8時間保持し、反応を等体積の0.01Mリン酸ナトリウム、0.15M NaCl pH7.4を添加して希釈することにより停止させた。PTH-KLHの総タンパク質濃度は架橋効率80%と仮定して計算した。 20

【0036】

Strategic BioSolutions, Ramona, CA, から購入したヤギを飼育し、以下のように免疫感作した： 30

最初の免疫感作については、ヤギを等体積のフロイントの完全アジュバントで可溶化した2mlのPTH-KLH 0.1mgで免疫した。0.1mgPTH-KLH 1mlと1mlのフロイント完全アジュバント。動物の複数の部位に皮内注射した。

続くブーストは3~4週間ペース(毎月)で、等体積のフロイントの不完全アジュバント中で上述のように調製した2mlの0.05mg PTH-KLHを用いて、前のように動物の側面に皮内注射して行った。少なくとも2~3回のフロイントの不完全アジュバント中のPTH-KLHによるブーストを行った。

続く全てのブーストについては、次に、0.02mgの純粋なPTH₁₋₈₄のみを上述のように2mlの抗原についてフロイントの不完全アジュバント中で可溶化し、前のように動物の側面に皮内注射して免疫感作した。このようにして、直線状PTH配列の内部に対するよりも立体配置エピトープに対する抗体クローンが優先的にブーストされる。 40

純粋なPTH₁₋₈₄の少なくとも2回のブースト後、動物を採血し、血餅除去血清を集めた。特異性と力価をBIAcore装置を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) により決定した。

【0037】

実施例 2

立体配置的PTH₁₋₁₃に対する抗体の単離

PTHアミノ酸配列PTH₃₈₋₈₄、PTH₁₃₋₃₄およびPTH₁₋₁₃に対するアフィニティーカラムを以下のように作製した：

PTH₃₈₋₈₄およびPTH₁₃₋₃₄はBACHEM, Californiaから購入した(製品番号はそれぞれH-4926, 1000およびH-4145.1000)。PTH₁₋₁₃はResearch Genetics, Huntsville, ALにて化学的に 50

合成した。

各PTHペプチドのそれぞれを、PharmaciaのCNBr活性化セファロース4-Bに、2mlのセファロース4-Bに対して1～2mgのペプチドを用いてPharmaciaの手順通りにカップリングさせた。

PTH₁₋₁₃に対するアフィニティー精製抗体は以下のように調製した：

上述のように調製したヤギ免疫血清をアフィニティーカラム上でまず抗-PTH₃₈₋₈₄抗体を取り出し、続いて抗-PTH₁₃₋₃₄抗体を取り出し、最後に抗-PTH₁₋₁₃抗体を取り出すことにより連続的に精製した。全ての3つのアフィニティーカラムについての血清抽出物は同じである：

少なくとも0.5リットルのヤギ免疫血清を上述した順番でそれぞれのアフィニティーカラムに通した。各アフィニティーカラムはセファロース-4Bに結合した少なくとも10mgのペプチドからなっている。

カラムを0.01Mリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.4で280nmにおける分光学的吸収が変化しなくなるまでよく洗浄した。

【0038】

非特異的血清タンパク質を除去するため、次にこのカラムを0.1M酢酸ナトリウム、0.15M NaCl pH4.0で洗浄し、再度280nmの吸収をモニターした。次に、ペプチド配列に対する特異的な抗体を0.2M グリシンpH2.3で溶出させた。弱い緩衝剤グリシンによる2.3という低いpHの溶出によりセファロース4-Bに共有結合したペプチドから抗体が解離する。最終的に溶出するPTH₁₋₁₃に対する抗体を希釈液0.1N NaOHを添加して中和してpHを7.4に戻した。

アフィニティー精製ヤギ抗-PTH₁₋₁₃は次にHPLC分析によりその純度についてテストする。280nmの吸収におけるモル吸光係数によって測定したタンパク質濃度、 $1.4 A^{280} = 1 \text{ mg/ml}$ 。次にアフィニティー精製抗体結合性および特異性をBIAcore装置によるSPRを用いて決定した。抗体は4℃で保存し、又は長期保存のためには-70℃で保存する。

【0039】

hPTH₁₋₁₃、hPTH₁₃₋₃₄、およびPTH₃₉₋₈₄からなる抗体アフィニティー精製カラムをそれぞれセファロース4Bに結合したこれらのペプチドを用いて作製する。免疫感作手順により生成される動物血清は以下の手順によりそれぞれの抗体について単離することができる。最初に、hPTH₃₉₋₈₄に対する抗体が血清から取り出され、続いてhPTH₁₋₃₄に対する抗体が取り出される。次に、最後のhPTH₁₋₁₃のアフィニティーカラムを用いて生理的に活性な立体配置的に正しいhPTHのN-末端配列を認識する抗hPTH₁₋₁₃抗体が単離される。我々の実験では重複するエピトープが無いことを証明するためにhPTH₁₃₋₃₄に対する抗体およびhPTH₃₉₋₈₄に対する抗体を初めに取り出したが、生理的に活性なhPTH₁₋₁₃立体配置抗体を他の抗体を初めに取り出さずに単離することが可能である。

【0040】

実施例3

アクリジニウムによる抗-PTH₁₋₁₃抗体の標識

精製した抗-PTH₁₋₁₃抗体を以下の方法でアクリジニウムで標識した：

抗体のようなタンパク質中のリジンのアミノ基のアクリジニウムエステルに対する反応によって「スルホニルクロリドエステル」としてアクリジニウムを本発明の抗体に架橋する。反応生成物はセファロースG-25上で0.1Mリン酸ナトリウムpH6.0を用いて排除クロマトグラフィーによって分離する。

【0041】

実施例4

生理活性hPTHに対する免疫測定アッセイ

生理活性N-末端PTHに対するアフィニティー精製した抗体（抗-PTH₁₋₁₃）を検出のために標識し、抗-PTH₃₉₋₈₄抗体を捕獲のために標識する。

ビオチン化捕獲抗体（抗-PTH₃₉₋₈₄）はサンプルからのPTHを結合させるために使用する。捕獲抗体は完全長PTH（PTH₁₋₈₄）およびPTHのC-末端断片の両方を認識する。アクリジ

ニウム標識検出抗体（抗-PTH₁₋₁₃）はサンプル中のPTHの生理活性N-末端エピトープに結合させるために使用する。捕獲抗体は優先的に生理活性PTH（例えば、立体配置的に正しいN-末端領域を有するPTH）を認識し結合する。捕獲抗体および検出抗体はサンプル中のPTH分子を「サンドイッチ」にする。このサンドイッチ複合体はストレプトアビジン被覆磁性粒子に結合している。次にこの粒子をこの分野で知られた分光計で定量する。この手順は図1に例示してある。

【0042】

正常な被験者（例えば、一見して健康で、歩行可能で、薬用していない被験者）からサンプルを入手する。正常な被験者は正常なカルシウムレベルおよび25(OH) ビタミンDレベルを有している。またクレアチン浄化にかけ、クレアチン浄化値が70ml/分よりも低い被験者からも血清を入手する。慢性腎不全（CRF）を経験している被験者からもサンプルを入手した。これらのサンプルは透析被験者から得られたEDTA血漿からなっていた。

10

本発明の好ましい実施態様において、150 μ lの生物学的サンプルを70 μ lのビオチン化ヤギ抗-PTH₃₉₋₈₄捕獲抗体、25 μ lのアクリジニウム標識ヤギ抗-PTH₁₋₁₃抗体、および15 μ lのストレプトアビジン被覆磁性粒子と合わせた。この組み合わせを37℃にて30分間インキュベーションした。この組み合わせを洗浄し、分光計で読みとった。

【0043】

抗-PTH₁₋₁₃が検出のために標識され、抗-PTH₃₉₋₈₄が捕獲のために標識されている、PTH₁₋₈₄のための免疫放射測定アッセイ（IRMA）を用いると以下の観察結果が得られる。断片、PTH₁₋₆およびPTH₇₋₁₃はこのアッセイを阻害しないであろう。PTH₁₋₃₄からなるPTH断片はこのアッセイを強く阻害し、PTH断片2-34, 3-34, 4-34および5-34は、PTH₁₋₃₄のアミノ酸位置1からアミノ酸が除去されるに従って応答が低下しつつこのアッセイを阻害する（図4）。他の断片による結果は図18に示す。PTH₇₋₈₄断片による阻害も何の効果も見られなかった。これらのことは立体配置エピトープはPTH₁₋₁₃中の少なくとも完全な残基配列に強く依存していることを示している。

20

【0044】

次に、このアッセイをPTH₇₋₈₄断片の存在を示す臨床患者サンプルを用いた研究に使用した。以下に示すようにこの研究は、インタクトな生理活性N-末端抗体がインタクトな生理活性PTH₁₋₈₄のみを検出できるという点でその臨床的有用性を明瞭に示している。本発明の抗体およびNIDインタクト-PTHアッセイを初期および末期腎疾病の患者に使用した相関研究により、PTH断片（PTH₇₋₈₄）に対するインタクトPTH（PTH₁₋₈₄）の割合は類似しているが（それぞれ、0.71および0.69という傾き）、正常な被験者（傾き0.52）とは異なっていることが示唆される（図6～8を参照せよ）。

30

【0045】

実施例5

表面プラズモン共鳴（SPR）

表面プラズモン共鳴（SPR）は、表面に結合した物質の質量の関数として表面における光の屈折率の変化により応答を測定する技術である。BIAcoreによる商業的に入手可能な装置を用いてSPRを用いて抗体とそれらの抗原との間の非共有結合的相互作用が測定されてきた。例えば、Malmqvist, M, Curr. Opin. Biotechnol. 5, 282-286, (1993); O'Shanessy, D.J., Curr. Opin. Biotechnol. 5, 65-71, (1993); Schuck, P., Curr. Opin. Biotechnol. 8, 498-502, (1997); これらの開示は引用により全体が本明細書に取り込まれるものとする。BIAcore装置は免疫試薬の測定における固有の道具であることが示されている（Adamczyk, M.ら、Bioconjugate Chem. 10, 176-185 (1999); およびAdamczyk, M.ら、Bioconjugate Chem. 8, 133-145, (1997); これらの開示は引用により全体が本明細書に取り込まれるものとする）。

40

【0046】

簡単に言うと、共有結合的にウサギ抗-ヤギFc抗体を結合したCM5センサーチップを使用した。使用したバッファは0.005%界面活性剤P-20を含むpH7.4のリン酸緩衝生理食塩水である。流速は10 μ l/分とした。1回の処理あたり本発明の抗体のおよそ500応答単位（RU

50

)を固定化した。この方法は一般に、検出抗体(すなわち抗PTH₁₋₁₃抗体)を流速40 μg/mlで1分間注入し、続いて阻害ペプチド(すなわち本明細書に記載のPTH断片)を流速100 μg/mlで2分間注入し、2分間洗浄し、次にPTH₁₋₈₄を1 μg/mlで1分間注入することを含む。各注入が終わった後、抗体とPTH₁₋₈₄との結合を30秒間測定した。それぞれの実行の後、表面を10mM Gly-HClで再生した。

SPR実験の結果によりN-末端抗-hPTH₁₋₁₃抗体の立体配置特異性は以下の様に証明される: 図10において、PTH配列1-6および7-13は抗-hPTH₁₋₁₃抗体の結合について単独では競合できず、従って抗体結合に重要である。PTH₁₋₁₃はPTHの本発明の抗体への結合を阻害する。このデータは本発明の抗体はPTH₁₋₆およびPTH₇₋₁₃断片両方の中のアミノ酸残基に結合することを示している。結合のためには、少なくとも13アミノ酸からなるインタクトな全三

10

【0047】

図11はN-末端のアミノ酸残基1番および2番がN-末端抗-PTH抗体の結合に重要であることを示している。この最初のアミノ酸の除去は正しい立体配置構造が失われるので抗体の結合性を顕著に低下させる。この点について、ペプチドPTH₁₋₃₄およびPTH₂₋₃₄はPTHの本発明の抗体への結合に対する最も強い阻害を示す。

図12において、残基10~13番(特に13番)の除去はN-末端抗-PTH抗体の結合を制限する。PTHペプチドPTH₁₋₆およびPTH₁₋₇はPTH₁₋₈₄の本発明の抗体への結合を阻害せず、結合の阻害は阻害ペプチドの大きさがPTH₁₋₁₀からPTH₁₋₁₃へ増加すると順次顕著になっていく。

図13において、N-末端PTHペプチド1-34、1-38および1-84はPTHのN-末端工程への結合をPT

20

H 1-13よりも強く阻害している。これらの結果はPTH 1-13ペプチドは、立体配置的ではあるが、より大きなPTH分子の一部である場合にPTHアミノ酸1-13がとるであろう三次元配置と正確に同じにはフォールディングしないことを示しており、更に、インタクトな生理活性N-末端PTH₁₋₁₃抗体の固有の立体配置結合を示している。これらの結果をまとめると、抗体結合について重要な決定基である、2つの別個のPTH領域中のアミノ酸残基(N-末端領域アミノ酸1-2および10-13)が明らかにされる。これらの領域はPTHの直線配列中で隣接していないので、インタクトな生理活性N-末端抗 PTH₁₋₁₃抗体はPTHの立体配置(非直線)エピトープを認識する。

【0048】

実施例 6

高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)

被験者から生物学的サンプルを抽出し、0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)中の80%アセトニトリルで溶出した。得られた濃縮サンプルをスピードヴァキュームで乾燥させた。次に乾燥サンプルを最少体積(例えば0.5ml)の0.1%TFA中に溶解した。

HPLCは分析用C18カラムで行い、流速1.5ml/分とし、0.1%TFA中の直線アセトニトリル勾配をかけ、1.0分間画分を集めた。次に濃縮画分をスピードヴァキュームで乾燥させた。得られた画分を続いてリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の0.7%ウシ血清アルブミン(BSA)中で可溶化した。続いてこれらの画分をNichols Institute Diagnostics(NID)(ニコール・インスティテュート・ダイアグノスティクス) Advantage(アドバンテージ)にてインタクトPTHを用いてアッセイし、続いて、バイオ-インタクトアッセイ(すなわち、本発明のアッセイ)およびPTH₁₋₃₈アッセイを行った。

30

40

NIDインタクトPTHアッセイはPTH₇₋₈₄およびPTH₁₋₈₄を認識する。バイオ-インタクトアッセイはPTH₁₋₈₄を認識するがPTH₇₋₈₄を認識しない(図3)。PTH₁₋₃₈アッセイはPTH₁₋₈₄、PTH₁₋₃₄、PTH₁₋₃₈を認識するがPTH₇₋₈₄を認識しない。

【0049】

HPLC実験の結果はHPLCは化学的に合成したPTH断片(PTH₁₋₈₄、PTH₁₋₃₄、PTH₁₋₃₈、およびPTH₇₋₈₄)を分離することを示している(図14A)。NIDアッセイによって検出されたように、HPLCは患者サンプル中のPTHを主として2つの主要ピークに分離する。最初のピークはPTH₇₋₈₄断片に対応し、2番目のピークはPTH₁₋₈₄に対応する(図3、14B、15Aおよび15B)。当業者であれば分かるように実際の保持時間は変動するである。

50

本発明の抗体を用いた本発明のアッセイにより、おそらくインタクトなアミノ末端部分を有するPTH断片に対応するさらなるピークを検出することも可能である。

ヒト血清患者サンプルのHPLC分析により、インタクトなPTH₁₋₈₄のみを検出するという本抗体の特異性を証明するという点で、インタクトな生理活性N-末端抗-PTH₁₋₁₃抗体の臨床的有用性がここでも示される。

【0050】

種々の刊行物および/または文献が本明細書において引用されており、それらの内容は引用により本明細書に取り込まれるものとする。

本発明は種々の特定の実施例および実施態様について記載されてきたが、本発明はそれらに限定されず、請求の範囲にて種々に実施できることは言うまでもない。

10

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】図1は、本発明において使用される手順の模式的図解である。

【図2】添加(spiked)PTH(ピコモル)に対する観察されたPTH濃度(ピコモル)のグラフを表す。添加PTHはアッセイ反応中に加えた特定の量のPTHをピコモルで表したものである。図2(A)はNichols Advantage - インタクトPTHアッセイを図示したものである。図2(B)は本発明の抗体を用いたバイオ - インタクトPTHアッセイを図示したものである。

【図3】図3は、(本発明の抗体を用いた)バイオ - インタクトPTHおよび(Nichols Advantage - インタクトPTHアッセイを用いた)インタクト - PTHの画分番号に対するPTH濃度のグラフである。本発明の抗体を用いると(バイオインタクトPTH)、断片、PTH₇₋₈₇に対応するピークが存在しないことに注意せよ。

20

【図4】図4は、「競合因子」濃度(ピコモル)の関数としての観察されたPTH濃度(ピコモル)のグラフである。競合因子はPTHのアミノ酸1-34番、2-34番、3-34番、4-34番、および5-34番からなるPTHペプチドである。

【図5】図5は、バイオ - インタクトPTH濃度(ピコグラム/ml)に対する変動のパーセンテージ用量係数のグラフである。

【図6】図6は、「正常な」被験者に関するNichols Advantageインタクト - PTH濃度(ピコグラム/ml)に対するバイオ - インタクトPTH濃度(ピコグラム/ml)のグラフである。

【図7】図7は、腎機能が損傷した被験者に関するNichols Advantageインタクト - PTH濃度(ピコグラム/ml)に対するバイオ - インタクトPTH濃度(ピコグラム/ml)のグラフである。

30

【図8】図8は、慢性腎不全の患者に関するNichols Advantageインタクト - PTH濃度(ピコグラム/ml)に対するバイオ - インタクトPTH濃度(ピコグラム/ml)のグラフである。

【図9】図9は、バイオ - インタクトPTHに関する、自動化ICMA PTH濃度(ピコグラム/ml)に対する手動免疫放射定量アッセイPTH濃度(ピコグラム/ml)のグラフである。ICMAは免疫化学発光定量アッセイ(Immuno Chemiluminescence Metric Assay)として定義される。バイオ - インタクトPTHは、本発明のアッセイであり、PTHは本発明の抗体(例えば、検出(タグ)抗体として抗-PTH₁₋₁₃抗体、および、捕獲抗体として抗-PTH₃₈₋₈₄抗体)により測定される。

40

【図10】図10は、抗-PTH₁₋₁₃抗体に対するPTHの比を阻害性PTHペプチドの関数として図示したグラフである。「1-6」はPTH(配列番号1)のアミノ酸1-6番からなるペプチドの使用を示す；「7-13」はPTH(配列番号1)のアミノ酸7-13番からなるペプチドの使用を示す；および、「1-13」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-13番からなるペプチドの使用を示す。

【図11】図11は、抗-PTH₁₋₁₃抗体に対するPTHの比を阻害性PTHペプチドの関数として図示したグラフである。「1-34」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-34番からなるペプチドの使用を示す；「2-34」はPTH(配列番号1)のアミノ酸2-34番からなるペプチドの使用を示す；「3-34」はPTH(配列番号1)のアミノ酸3-34番からなるペプチドの使用を示す；「4-34」はPTH(配列番号1)のアミノ酸4-34番からなるペプチドの使用を示す；

50

および、「5-34」はPTH(配列番号1)のアミノ酸5-34番からなるペプチドの使用を示す。

【図12】図12は、抗-PTH₁₋₁₃抗体に対するPTHの比を阻害性PTHペプチドの関数として図示したグラフである。「1-6」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-6番からなるペプチドの使用を示す；「1-7」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-7番からなるペプチドの使用を示す；「1-8」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-8番からなるペプチドの使用を示す；「1-9」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-9番からなるペプチドの使用を示す；「1-10」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-10番からなるペプチドの使用を示す；「1-11」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-11番からなるペプチドの使用を示す；「1-12」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-12番からなるペプチドの使用を示す；および、「1-13」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-13番からなるペプチドの使用を示す。 10

【図13】図13は、抗-PTH₁₋₁₃抗体に対するPTHの比を阻害性PTHペプチドの関数として図示したグラフである。「1-13」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-13番からなるペプチドの使用を示す；「1-38」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-38番からなるペプチドの使用を示す；「1-34」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-34番からなるペプチドの使用を示す；「1-84」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-84番からなるペプチドの使用を示す；および、「1-13」は、PTH(配列番号1)のアミノ酸1-13番からなるペプチドの使用を示す。

【図14】保持時間(分)の関数としてPTH濃度(ピコモル)のグラフを表したものである。図14(A)はPTH標準品(PTH₁₋₈₄；PTH₇₋₈₄；PTH₁₋₃₈およびPTH₁₋₃₄)のHPLC測定値を表している。図14(B)は、「高」PTH群(例えば、200pg/mlより高い)のHPLC測定値を表したものである。データは「インタクトPTH」(黒い菱形)；PTH₁₋₈₄(黒四角)；およびPTH₁₋₃₈(三角)について示してある。 20

【図15】保持時間(分)の関数としてPTH濃度(ピコモル)のグラフを表したものである。図15(A)は、「正常」PTH群に関するHPLC測定値を表した図である。データは「インタクトPTH」(黒菱形)；TH₁₋₈₄(黒四角)；およびPTH₁₋₃₈(三角)について示してある。図15(B)は、「高」PTH群(例えば、500pg/mlより大きい)に関するPLC測定値を表した図である。データは「インタクトPTH」(黒菱形)；TH₁₋₈₄(黒四角)；およびPTH₁₋₃₈(三角)について示してある。

【図16】保持時間(分)の関数としてPTH濃度(ピコモル)のグラフを表したものである。図16(A)はプロテアーゼ阻害因子無しのサンプルについてHPLC測定値を表した図である。図16(B)は、プロテアーゼ阻害因子を含むサンプルについてHPLC測定値を表した図である。データは「インタクトPTH」(黒菱形)；TH₁₋₈₄(黒四角)；およびPTH₁₋₃₈(三角)について示してある。 30

【図17】保持時間(分)の関数としてPTH濃度(ピコモル)のグラフを表したものである。図17(A)は、患者KについてHPLC測定値を表した図である。図17(B)は、患者GについてHPLC測定値を表した図である。図17(C)は、患者PについてHPLC測定値を表した図である。患者K、G、Pは全て慢性腎不全であった。

【図18】観察されたPTH濃度(ピコモル)を「競合因子」濃度(ピコモル)の関数として表したグラフである。阻害因子はPTHのアミノ酸1-84番、7-84番、7-13番、1-6番、1-34番、13-34番および1-13番からなるPTHペプチドである。 40

【 図 1 】

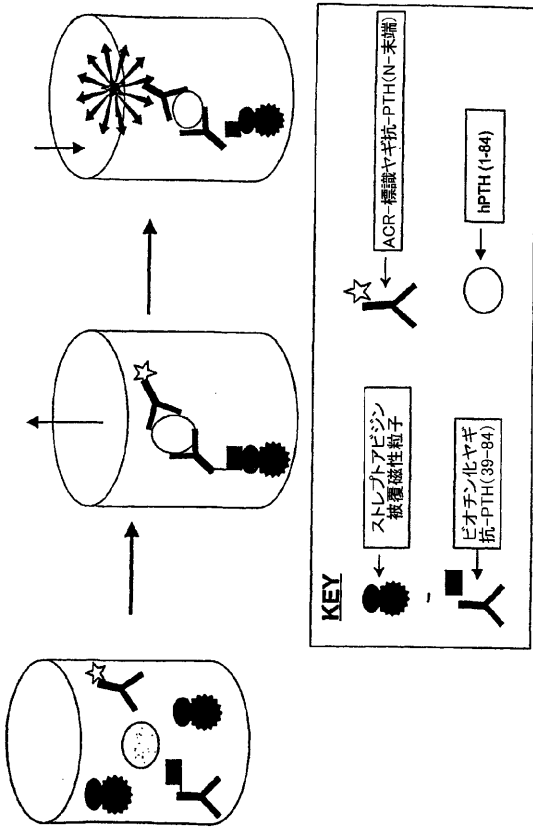


Figure 1

【 図 2 】

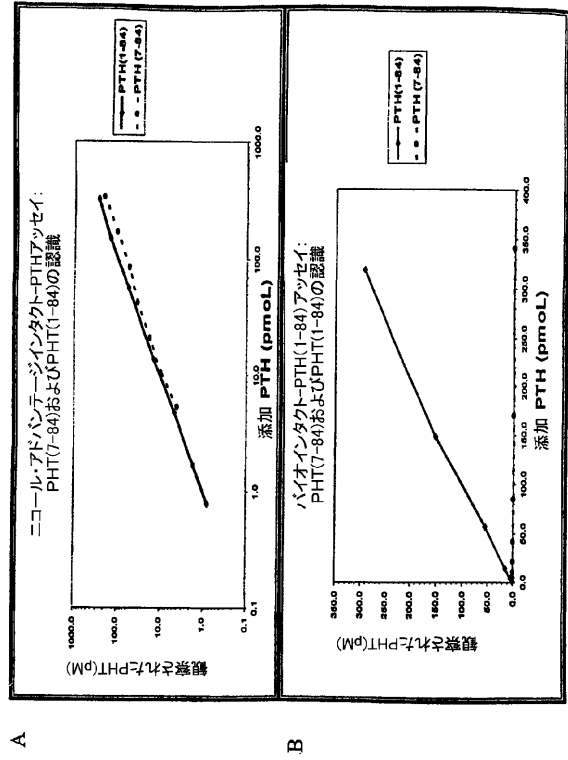


Figure 2

【 図 3 】

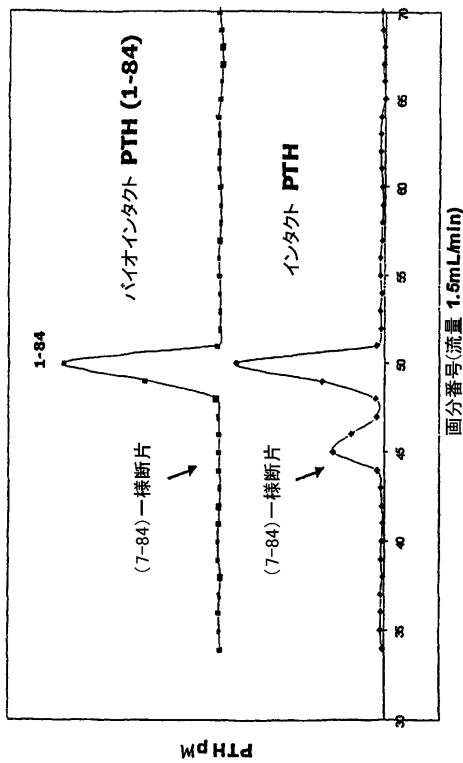


Figure 3

【 図 4 】

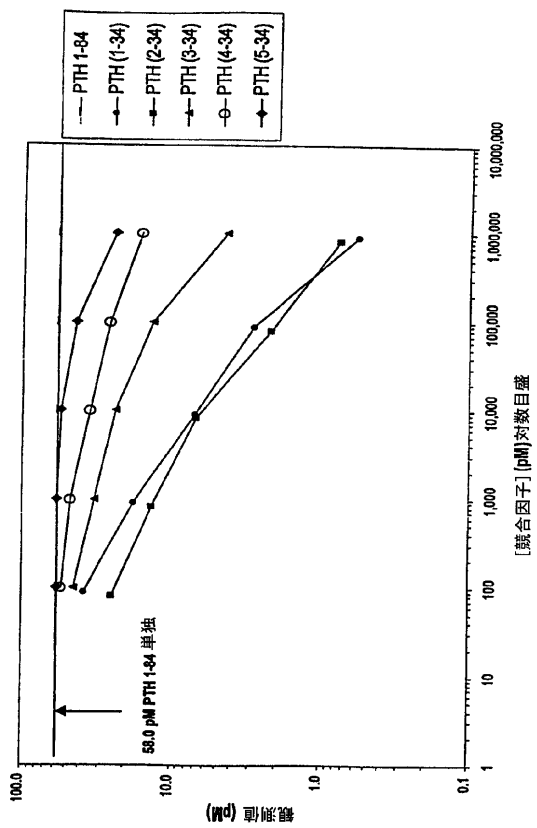


Figure 4

【 図 5 】

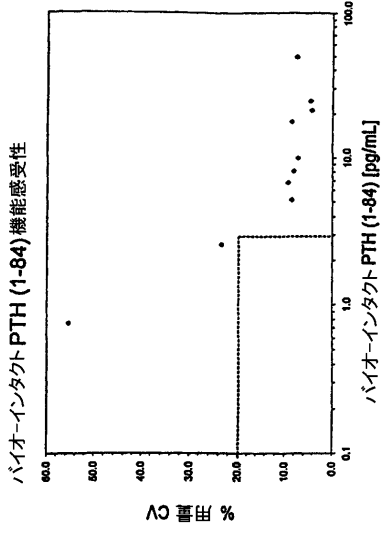


Figure 5

【 図 6 】

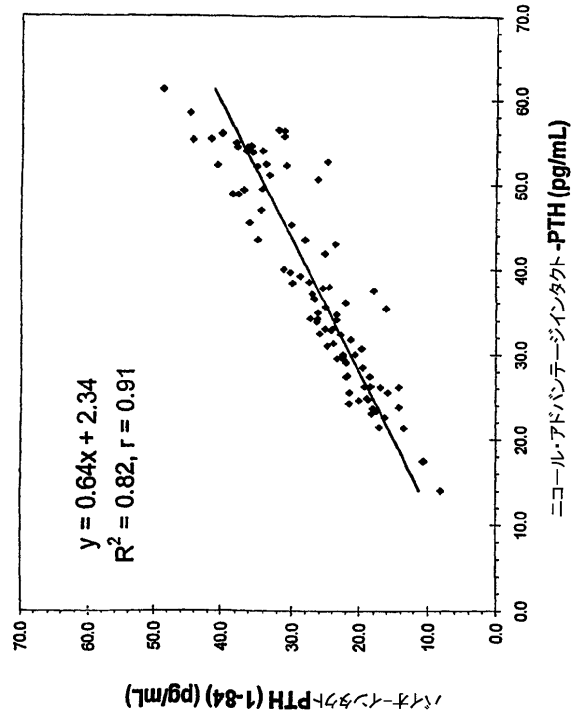


Figure 6

【 図 7 】

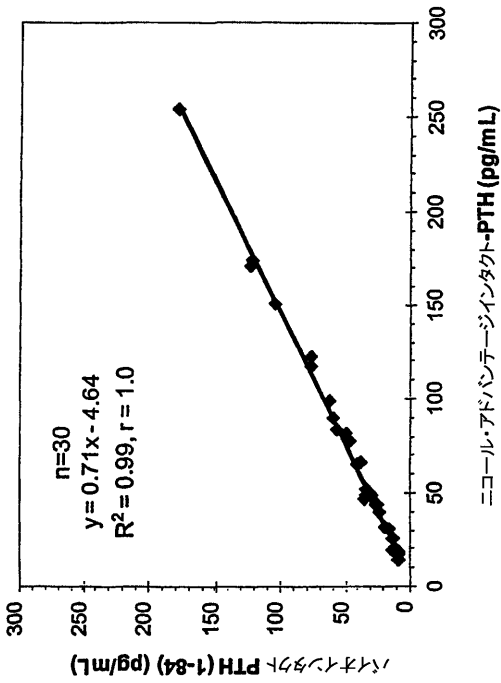


Figure 7

【 図 8 】

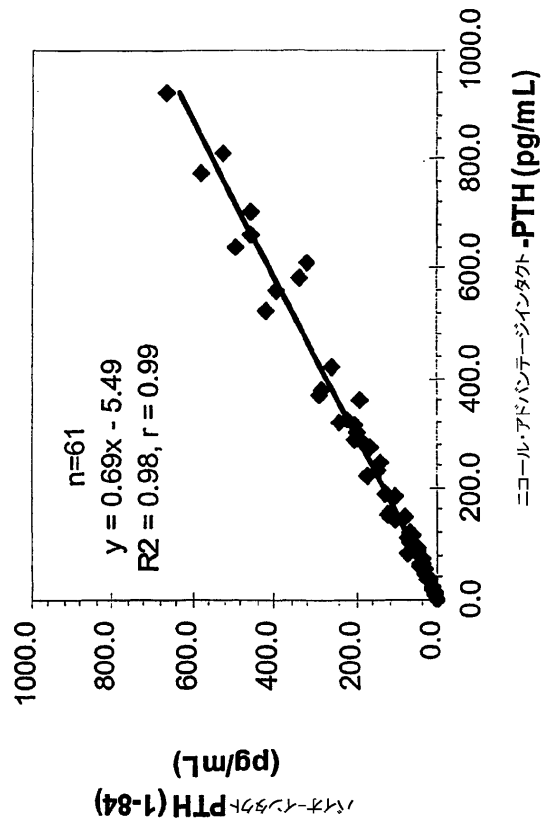


Figure 8

【 図 9 】

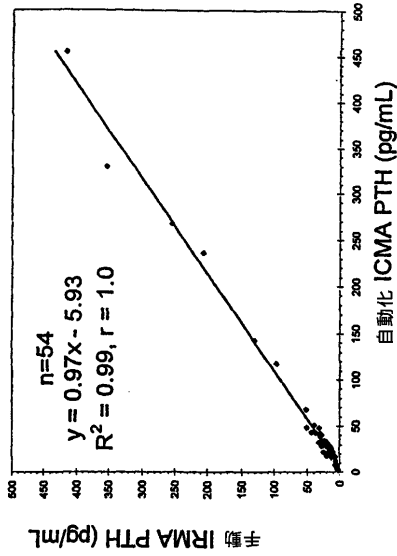


Figure 9

【 図 10 】

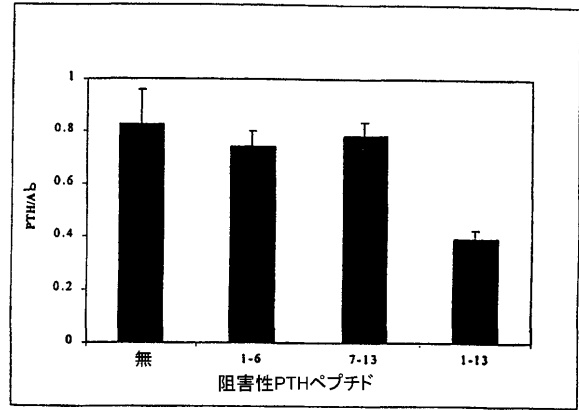


Figure 10

【 図 11 】

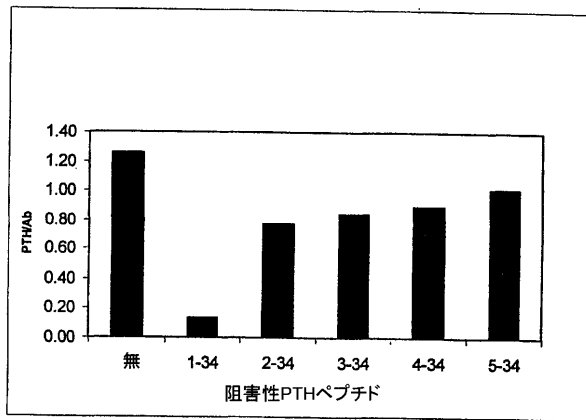


Figure 11

【 図 12 】

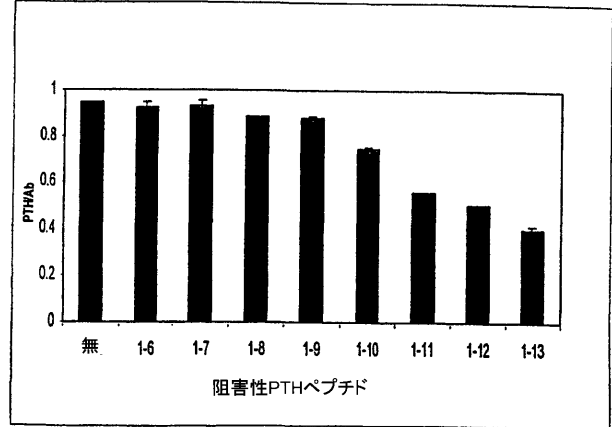


Figure 12

【 図 1 3 】

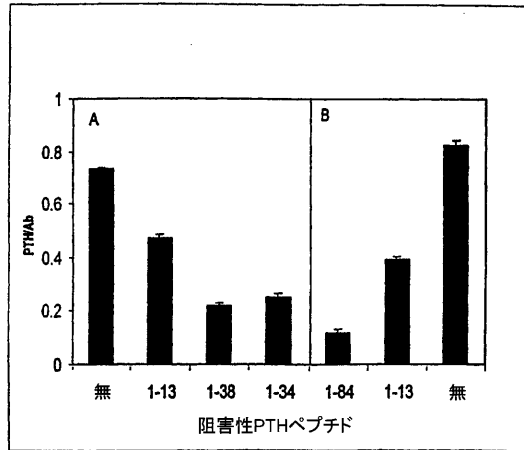


Figure 13

【 図 1 4 】

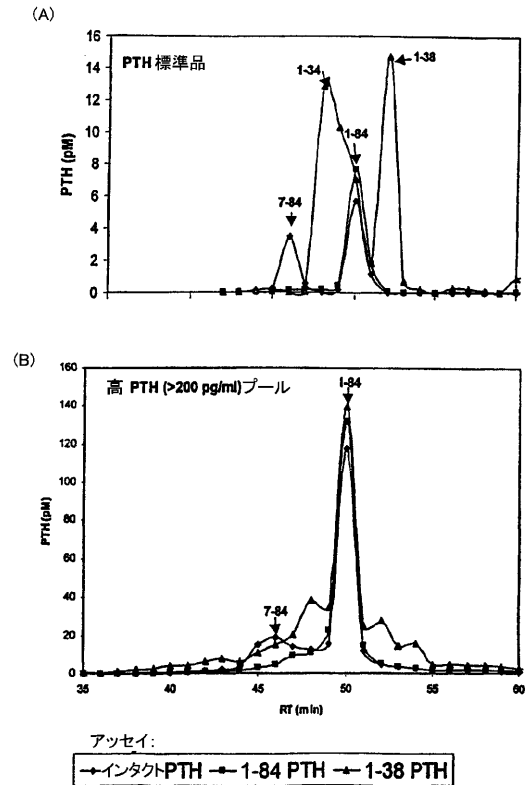


Figure 14

【 図 1 5 】

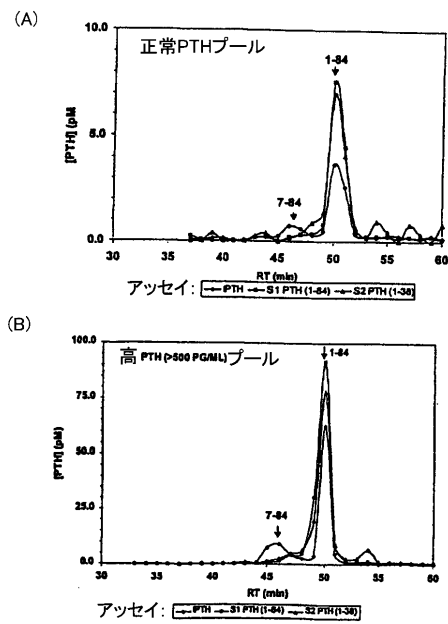


Figure 15

【 図 1 6 】

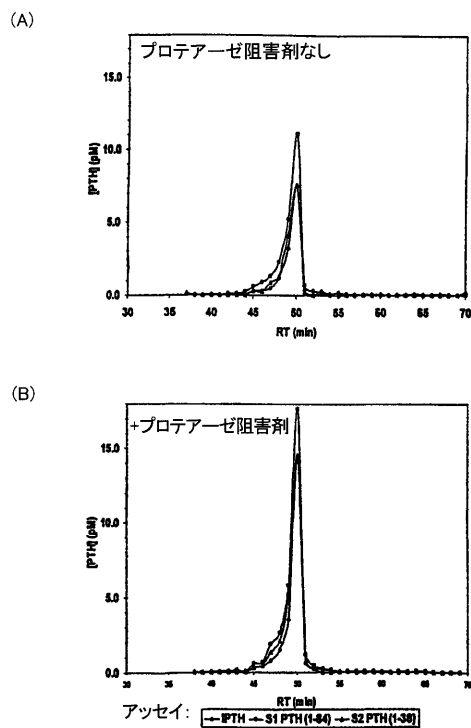


Figure 16

【 図 17 】

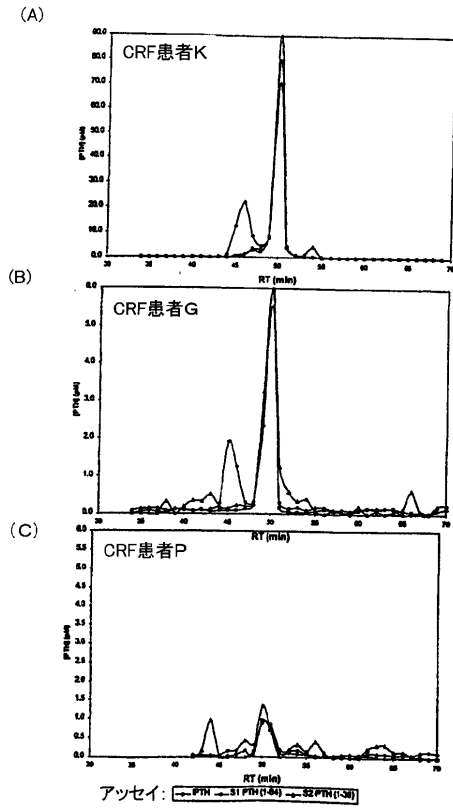


Figure 17

【 図 18 】

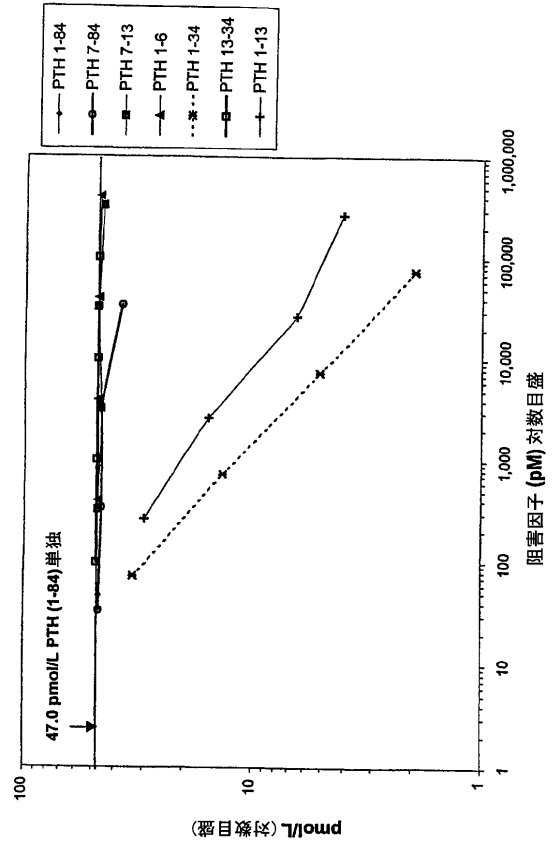


Figure 18

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
16 January 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/003986 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K**
- (21) International Application Number: PCT/US02/21356
- (22) International Filing Date: 3 July 2002 (03.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/898,398 3 July 2001 (03.07.2001) US
- (71) Applicant: QUEST DIAGNOSTICS INVESTMENTS INCORPORATED (US/US); 300 Delaware Avenue, Wilmington, DE 19899 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PI, PJ, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, SM, SN, ST, SV, SZ, TD, TH, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

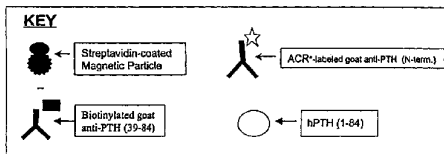
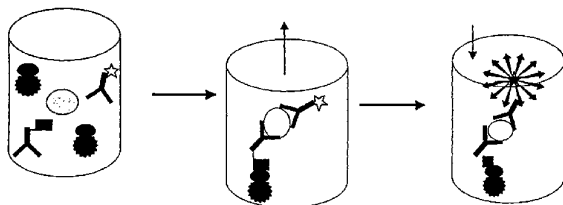
Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(72) Inventor: HUTCHISON, James, Scott; 2 Celano Court, Newport Beach, CA 92657 (US).

(74) Agents: STOUT, Donald, E. et al.; Stout, Usa, Buyan & Mollins, 4 Venture, Suite 300, Irvine, CA 92618 (US).

(54) Title: PARATHYROID HORMONE ANTIBODIES AND RELATED METHODS



WO 03/003986 A2

(57) Abstract: Methods of preparing antibodies that recognize and bind three-dimensional epitopes of antigens are disclosed. The methods are particularly useful for preparing antibodies that bind the bioactive, three-dimensional amino terminus of parathyroid hormone. The antibodies so produced are used in diagnostic and therapeutic applications.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

PARATHYROID HORMONE ANTIBODIES AND RELATED METHODS

SUMMARY OF THE INVENTION

5 The present invention provides antibodies that specifically recognize three-dimensional epitopes of proteins and methods for producing and using same. In one embodiment, methods for producing antibodies that recognize and bind the bioactive, three-dimensional epitope of parathyroid hormone are
10 disclosed. In a preferred embodiment, the methods produce antibodies that recognize and bind the first thirteen amino acids of human parathyroid hormone. In a more preferred embodiment, the antibodies of the invention are substantially not crossreactive with non-bioactive parathyroid hormone.

15

The invention also provides an antibody (monoclonal or polyclonal), and a purified preparation of an antibody, which is capable of forming an immune complex with a three-dimensional epitope of an antigen (preferably a parathyroid hormone, such as a human parathyroid hormone) such antibody
20 being generated by using as an antigen, parathyroid hormone, or a variant thereof. This antibody is preferably capable of neutralizing (i.e., partially or completely inhibiting) a biological activity of the parathyroid hormone (i.e., a component of one of the cascades naturally triggered by the parathyroid hormone binding to its receptor). In preferred
25 embodiments, the antibody of the invention is capable of forming an immune complex with parathyroid hormone receptor and is capable of neutralizing a biological activity of the PTH receptor (i.e. adenylate cyclase activation or
30 phospholipase C stimulation).

Also within the invention is a therapeutic composition including, in a pharmaceutically-acceptable carrier, an

WO 03/003986

PCT/US02/21356

antibody to parathyroid hormone, or a derivative thereof.
These therapeutic compositions provide a means for treating
various disorders characterized by overstimulation of
parathyroid hormone receptors by a parathyroid hormone. These
5 antibodies are useful as diagnostics, such as for
distinguishing those cases of hypercalcemia related to PTH
from those which are not.

The antibody of the present invention recognizes any of the
10 above-mentioned peptides, for example human parathyroid
hormone.

In one embodiment, the antibody recognizes an amino acid
sequence from Ser at position 1 to Leu at position 13 of SEQ
15 ID No. 1 or a portion, or portions, included in the amino acid
sequence.

In one embodiment, the antibody is a polyclonal antibody or a
monoclonal antibody.

20 The method for measuring parathyroid hormone or a variant
thereof according to the present invention includes the steps
of: incubating a mixture of a sample and a first antibody
recognizing the parathyroid hormone, or variant thereof;
25 adding a labeled second antibody recognizing the parathyroid
hormone, or variant thereof, to the mixture, followed by
further incubation; and detecting the resulting antigen-
antibody complex in the mixture.

30 Alternatively, the method for measuring parathyroid hormone or
a variant thereof according to the present invention includes
the steps of: incubating a mixture of a sample, a first
antibody recognizing the parathyroid hormone, or variant
thereof, and a labeled second antibody recognizing the

WO 03/003986

PCT/US02/21356

parathyroid hormone, or variant thereof; and detecting the resulting antigen-antibody complex in the mixture.

5 The immunological assay for a peptide of the present invention comprises the steps of: incubating a sample including any of the above-mentioned peptides with any of the above-mentioned antibodies under conditions for forming an antigen-antibody complex; and quantifying the antigen-antibody complex.

10 The kit for an immunological assay of the bioactive forms of parathyroid hormone includes any of the above-mentioned antibodies.

15 Any feature or combination of features described herein are included within the scope of the present invention provided that the features included in any such combination are not mutually inconsistent as will be apparent from the context, this specification, and the knowledge of one of ordinary skill in the art.

20 Additional advantages and aspects of the present invention are apparent in the following detailed description and claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

25 FIG. 1 is a schematic illustration of the procedures used according to the invention.

FIG. 2 depicts graphs of observed PTH concentration (picomoles) versus spiked PTH (picomoles). Spiked PTH is defined as the addition of the specified amount of PTH in picomoles into the assay reaction. FIG. 2A illustrates the Nichols Advantage Intact-PTH assay. FIG. 2B illustrates the bio-intact PTH assay using the antibodies of the invention.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

FIG. 3 is a graph of PTH concentration (picomoles) versus fractionation number for bio-intact PTH (using the antibodies of the invention) and intact PTH (using the Nichols Advantage Intact PTH assay). Note the absence of the peak corresponding to the fragment, PTH₇₋₃₄, using the antibodies of the invention (bio-intact PTH).

FIG. 4 is a graph of observed PTH concentration (picomoles) as a function of "competitor" concentration (picomoles). The competitors are PTH peptides consisting of amino acids 1-34, 2-34, 3-34, 4-34, and 5-34 of PTH.

FIG. 5 is a graph of percent dose coefficient of variation versus bio-intact PTH concentration (picograms/mL).

FIG. 6 is a graph of bio-intact PTH concentration (picograms/mL) versus Nichols Advantage intact-PTH concentration (picograms/mL) for "normal" subjects.

FIG. 7 is a graph of bio-intact PTH concentration (picograms/mL) versus Nichols Advantage intact-PTH concentration (picograms/mL) for subjects with impaired renal function.

FIG. 8 is a graph of bio-intact PTH concentration (picograms/mL) versus Nichols Advantage intact-PTH concentration (picograms/mL) for subjects with chronic renal failure.

FIG. 9 is a graph of manual immunoradiometric assay PTH concentration (picograms/mL) versus automated ICMA PTH concentration (picograms/mL) for bio-intact PTH. ICMA is defined as Immuno Chemiluminescence Metric Assay. Bio-intact

WO 03/003986

PCT/US02/21356

PTH refers to the assay of the invention in which PTH is measured with the antibodies of the invention (e.g., anti-PTH₁₋₁₃) as the detection (tag) antibody, and with anti-PTH₃₈₋₈₄ as the capture antibody.

5

FIG. 10 is a graph illustrating the ratio of PTH to anti-PTH₁₋₁₃ antibodies as a function of the inhibitory PTH peptide. "1-6" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-6 of PTH (SEQ ID NO: 1); "7-13" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 7-13 of PTH (SEQ ID NO: 1); and "1-13" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-13 of PTH (SEQ ID NO: 1).

FIG. 11 is a graph illustrating the ratio of PTH to anti-PTH₁₋₁₃ antibodies as a function of the inhibitory PTH peptide. "1-34" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-34 of PTH (SEQ ID NO: 1); "2-34" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 2-34 of PTH (SEQ ID NO: 1); "3-34" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 3-34 of PTH (SEQ ID NO: 1); "4-34" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 4-34 of PTH (SEQ ID NO: 1); and "5-34" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 5-34 of PTH (SEQ ID NO: 1).

FIG. 12 is a graph illustrating the ratio of PTH to anti-PTH₁₋₁₃ antibodies as a function of the inhibitory PTH peptide. "1-6" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-6 of PTH (SEQ ID NO: 1); "1-7" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-7 of PTH (SEQ ID NO: 1); "1-8" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-8 of PTH (SEQ ID NO: 1); "1-9" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-9 of PTH (SEQ ID NO: 1); "1-10" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-10 of PTH (SEQ ID NO: 1); "1-11" indicates the use of a peptide

WO 03/003986

PCT/US02/21356

consisting of amino acids 1-11 of PTH (SEQ ID NO: 1); "1-12" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-12 of PTH (SEQ ID NO: 1); and "1-13" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-13 of PTH (SEQ ID NO: 1).

5

FIG. 13 is a graph illustrating the ratio of PTH to anti-PTH₁₋₁₃ antibodies as a function of the inhibitory PTH peptide. "1-13" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-13 of PTH (SEQ ID NO: 1); "1-38" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-38 of PTH (SEQ ID NO: 1); "1-34" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-34 of PTH (SEQ ID NO: 1); "1-84" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-84 of PTH (SEQ ID NO: 1); and "1-13" indicates the use of a peptide consisting of amino acids 1-13 of PTH (SEQ ID NO: 1).

FIG. 14 depicts graphs of PTH concentration (picomoles) as a function of retention time (minutes). FIG. 14A depicts the HPLC measurements for PTH standards (PTH₁₋₈₄; PTH₇₋₈₄; PTH₁₋₃₈; and PTH₁₋₃₄). FIG. 14B depicts the HPLC measurements for a "high" PTH group (e.g., greater than 200pg/ml). Data are shown for "intact PTH" (closed diamonds); PTH₁₋₈₄ (closed squares); and PTH₁₋₃₈ (triangles).

FIG. 15 depicts graphs of PTH concentration (picomoles) as a function of retention time (minutes). FIG. 15A depicts the HPLC measurements for a "normal" PTH group. Data are shown for "intact PTH" (closed diamonds); PTH₁₋₈₄ (closed squares); and PTH₁₋₃₈ (triangles). FIG. 15B depicts the HPLC measurements for a "high" PTH group (e.g., greater than 500pg/ml). Data are shown for "intact PTH" (closed diamonds); PTH₁₋₈₄ (closed squares); and PTH₁₋₃₈ (triangles).

WO 03/003986

PCT/US02/21356

FIG. 16 depicts graphs of PTH concentration (picomoles) as a function of retention time (minutes). FIG. 16A depicts the HPLC measurements for samples without protease inhibitors. FIG. 16B depicts the HPLC measurements for samples with protease inhibitors. Data are shown for "intact PTH" (closed diamonds); PTH₁₋₈₄ (closed squares); and PTH₁₋₃₈ (triangles).

FIG. 17 depicts graphs of PTH concentration (picomoles) as a function of retention time (minutes). FIG. 17A depicts the HPLC measurements for subject K. FIG. 17B depicts the HPLC measurements for subject G. FIG. 17C depicts the HPLC measurements for subject P. Subjects K, G, and P all had chronic renal failure

FIG. 18 is a graph of observed PTH concentration (picomoles) as a function of "competitor" concentration (picomoles). The competitors are PTH peptides consisting of amino acids 1-84, 7-84, 7-13, 1-6, 1-34, 13-34, and 1-13 of PTH.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Although the following description discloses antibodies that recognize and bind bioactive parathyroid hormone, and in particular, human parathyroid hormone, and methods of making and using the same, the description should not be construed to be limited to only parathyroid hormone. In that regard, the methods and uses disclosed herein, can be practiced with any polypeptide in which the bioactivity of the polypeptide is related, at least in part, to the polypeptide's, or a portion thereof, tertiary structure.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

I. Definitions

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by those of ordinary skill in the art to which this invention belongs. For purposes of the present invention, the following terms are defined below.

As used herein, the terms "PTH" and "parathyroid hormone" are used interchangeably. Parathyroid hormone regulates calcium absorption directly in the kidney and bone, and indirectly in the intestine. Mature parathyroid hormone is synthesized in vivo by cleavage of the signal sequence of "preproPTH", and the subsequent cleavage of the "pro" sequence from "proPTH". Parathyroid hormone, as used herein, encompasses parathyroid hormone from any animal capable of making parathyroid hormone, including, but not limited to, humans, non-human primates, horses, dogs, cats, goats, and rodents. In addition, parathyroid hormone encompasses parathyroid hormone variants, discussed herein, that include recombinantly synthesized parathyroid hormone expressed in organisms that naturally do not express parathyroid hormone.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

As used herein, the terms "hPTH", "human PTH", and "human parathyroid hormone" are used interchangeably. In addition, hPTH is encompassed by the terms PTH or parathyroid hormone. Human PTH consists essentially of 84 alpha-amino acid residues arranged by amide linkage in the sequence (SEQ ID NO:1) identified below:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly
Lys His Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu
10 Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe Val Ala
Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp Ala Gly Ser
Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val
Glu Ser His Glu Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys
Ala Asp Val Asn Val Leu Thr Lys Ala Lys Ser Gln

15

Human PTH can be synthesized in vivo, or synthetically using standard techniques known in the art.

Persons skilled in the art will appreciate that variations in the structure or sequence of PTH may occur. As used herein, a "variant" of PTH is defined as a polypeptide that possesses biological activity that is similar, or substantially similar, to a biological activity of PTH. A molecule is said to be "substantially similar" to another molecule if both molecules have substantially similar structures, or if both molecules possess a similar biological activity. For example, a biological activity of PTH includes the binding of PTH to a receptor for PTH and preventing the subsequent binding or action of PTH at that receptor. Another biological activity of PTH includes regulation of adenylate cyclase activity. Variants of PTH include analogs, fragments, or extensions, of PTH. Variants of PTH include naturally occurring PTH and recombinantly synthesized PTH. For example, a "variant" of PTH may have one or more amino acid substitutions. An amino

20

25

30

WO 03/003986

PCT/US02/21356

acid substitution may be conservative or non-conservative, as is well understood in the art. A conservative substitution refers to a substitution of one amino acid with another amino acid without affecting the biological activity, or tertiary
5 (e.g., three-dimensional) structure, of the protein. In addition, variants of PTH include PTH molecules that have modified amino acid side chains, as is well known in the art. Thus, if a molecule possesses at least one biological activity that is similar to an activity of PTH, it is considered a
10 "variant" of PTH. For example, variants include peptides or polypeptides that essentially have the sequence of PTH amino acids in the 1-13 region. Variants also include such peptides with approximately 1 or 2 amino acid substitutions. Further examples of variants of hPTH consist or comprise the following
15 sequences (SEQ ID NOs: 2-8):

Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys

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

20

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

Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Cys-His-Asn-Leu-Gly-Lys

25

Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Cys-His-Asn-Leu-Gly-Lys

Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Cys-His-Asn-Leu-Gly-Lys

30

Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Cys-His-Asn-Leu-Gly-Lys

As used herein, "bioactive PTH" or "bioactive hPTH" refers to a PTH, or hPTH, polypeptide that has at least one biological activity of PTH. For example, PTH is considered to be bioactive when the polypeptide is able to regulate adenylate

WO 03/003986

PCT/US02/21356

cyclase activity. In one embodiment, PTH regulates adenylate cyclase activity by binding to its receptor. Other biological activities are also used to define bioactive PTH. Examples of bioactive hPTH include PTH variants that comprise at least
5 amino acids 1-13 of SEQ ID NO:1. A further example of bioactive PTH includes amino acids 1-34 of SEQ ID NO: 1. A full length PTH molecule, such as amino acids 1-84 of SEQ ID NO: 1, is also a bioactive PTH.

10 As used herein, "antibody" refers to a polypeptide substantially encoded by an immunoglobulin gene or immunoglobulin genes, or fragments thereof, which specifically recognize and bind an antigen. The recognized immunoglobulin genes include the kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon
15 and mu constant region genes, as well as the immunoglobulin variable region genes. Antibodies include fragments, such as Fab', F(ab)₂, Fabc, and Fv fragments. The term "antibody," as used herein, also includes antibody fragments either produced
20 by the modification of whole antibodies or those synthesized de novo using recombinant DNA methodologies, and further includes "humanized" antibodies made by now conventional techniques.

An antibody "specifically binds to" or "is immunoreactive
25 with" a protein when the antibody functions in a binding reaction with the protein. The binding of the antibody to the protein permits determination of the presence of the protein in a sample in the presence of a heterogeneous population of proteins and other agents. Thus, under designated immunoassay
30 conditions, the specified antibodies bind preferentially to a particular protein and do not significantly bind to other proteins present in the sample. Specific binding to a protein under such conditions requires an antibody that is selected for specificity for a particular protein. Several methods for

WO 03/003986

PCT/US02/21356

determining whether or not a peptide is immunoreactive with an antibody are known in the art. Immuno chemiluminescence metric assays (ICMA), enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and radioimmunoassays (RIA) are some examples.

5

An antibody is "selective for" bioactive PTH when the antibody preferentially binds to bioactive forms of PTH compared to non-bioactive forms of PTH. In a preferred embodiment, an antibody is selective for bioactive PTH when it binds to bioactive PTH at least 10 times more preferentially than non-bioactive PTH. In a more preferred embodiment, the antibody selective for bioactive PTH binds at least 100 times more preferentially than non-bioactive PTH. In another preferred embodiment, the antibody selective for bioactive PTH binds at least 200 times more preferentially than non-bioactive PTH. In yet another preferred embodiment, the antibody selective for bioactive PTH binds at least 500 times more preferentially than non-bioactive PTH. In an even more preferred embodiment, the antibody selective for bioactive PTH binds at least 1000 times more preferentially than non-bioactive PTH.

A "label" is a composition detectable by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, or chemical means. For example, useful labels include fluorescent dyes, chemiluminescent compounds, radioisotopes, electron-dense reagents, enzymes, colored particles, biotin, or dioxigenin. A label often generates a measurable signal, such as radioactivity, fluorescent light, color, or enzyme activity, which can be used to quantitate the amount of bound label.

30

Examples of chemiluminescent compounds include luciferin, a luminol derivative, pyrogallol, isoluminol, aequorin, cyclic arylhydrazides, dioxetanes, rhodium chelates (electrochemiluminescent), oxalate esters,

WO 03/003986

PCT/US02/21356

thermochemiluminescent labels, acridinium and the like. These labels may be attached to a protein, for example an anti-PTH antibody, using techniques well known in the art. (See U.S. Patent No. 5,284,952, the disclosure of which is incorporated in its entirety herein by reference.) In one embodiment, a detection antibody, such as an anti-hPTH₁₋₁₃ antibody, may be labeled with an acridinium by employing the methods found in U.S. Patent Nos. 5,284,952, 5,110,932, and 5,338,847, the disclosures of which are incorporated in their entirety herein by reference.

Examples of the fluorescent material to be used for labeling include fluorescein, fluorescamine, fluorescein isothiocyanate, umbelliferone, rhodamine, Texas red dyes, phthalocyanines, coumarin, squaraine, anthracene, erythrosine, europium chelates and the like.

Examples of radioactive isotopes to be used for labeling include ¹⁴C, ³H, ³²P, ¹⁸F or ¹²⁵I.

Exemplary enzymes which have been developed and can be used in assays of the invention are those described in U.S. Pat. Nos. 3,654,090; 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; U.S. Pat. No. 3,817,837; 3,879,262; Journal of Immunological Methods 1: 247(1972); and the Journal of Immunology 109:129(1972), the disclosures of which are incorporated in their entirety herein by reference. Other examples of enzymes include, but are not limited to, alkaline phosphatase, beta galactosidase, horseradish peroxidase, gluconidase, phosphatase, peptidase, alkaline phosphatase and the like. Co-enzymes useful in this invention include molecules and/or proteins which facilitate an enzyme to catalyze a reactant to produce a detectable product, for example light. A co-enzyme may include, without limitation, FAD and NAD. In one embodiment, an anti-PTH may

WO 03/003986

PCT/US02/21356

be labeled with a NAD. See for example, U.S. Patent 4,380,580, the disclosure of which is incorporated in its entirety herein by reference.

5 Examples of colored particles include colloidal gold, or blue latex. In certain embodiments, labels are coupled to the antibodies of the invention to permit determination of the presence of bioactive forms of parathyroid hormone.

10 Other labels may include a non-active precursor of a spectrophotometrically-active substance (British Pat. No. 1,392,403 and French Pat. No. 2,201,299, which patents correspond to U.S. Pat. No. 3,880,934) and electron spin resonance moieties (U.S. Pat. No. 3,850,578).

15 The terms "isolated", "purified", or "biologically pure" refer to material that is at least partially separated from, and that is often substantially, or essentially, free from components which normally accompany it as found in its native state. Purity and homogeneity are typically determined using
20 analytical chemistry techniques such as polyacrylamide gel electrophoresis or high performance liquid chromatography, as is well understood in the art. Generally, an isolated antibody will comprise more than 80% of all macromolecular
25 species present in the preparation. Preferably, the antibody is purified to represent greater than 90% of all macromolecular species present. More preferably, the antibody is purified to greater than 95%, and even more preferably, the antibody is purified to essential homogeneity, wherein other
30 macromolecular species are not detected by conventional techniques.

The term "immunoassay" is an assay that utilizes an antibody to specifically bind an analyte. The immunoassay is

WO 03/003986

PCT/US02/21356

characterized by the use of specific binding properties of a particular antibody to isolate, target, and/or quantify the analyte.

5 The inventor of the present invention conducted numerous studies for the purpose of rapidly, readily, and precisely measuring bioactive PTH, specifically hPTH. As a result, he produced an antibody that specifically recognizes bioactive forms of hPTH. The inventor has constructed immunoassays
10 using combinations of antibodies, each recognizing different epitopes of the hPTH.

II. Compositions of the invention

15 The antibodies of the invention recognize and bind three-dimensional epitopes of proteins. In particular, the antibodies specifically recognize bioactive forms of PTH. One example of a protein that binds to the antibodies of the invention is human PTH.

20 The antibodies of the invention have been deposited with the American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA) on July 3, 2001, and have been designated Accession No. PTA-3496. The deposit was viable at
25 the time of deposit and will be replaced by Applicants should they become non-viable.

The deposit will be made available to the Commissioner during pendency of the application under the terms of 37 CFR 1.14 and
30 35 USC § 122, and will be maintained in the depository for a period of 30 years or 5 years after the last request, whichever is longer.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

The preferred antibodies of the invention recognize and bind bioactive forms of hPTH (bioactive hPTH). Without wishing to limit the invention to any theory or mechanism of operation, it is believed that the first amino acid (Ser at position 1 of SEQ ID NO: 1) along with the intact helix structure of the amino terminus (N-terminal region) of hPTH must be present in order for hPTH to be bioactive. Furthermore, the bioactive N-terminal region of hPTH is thought to be a three dimensional helical structure consisting of thirteen amino acids (amino acids 1-13 of SEQ ID NO: 1). The antibodies of the invention recognize and bind to a three-dimensional epitope of the N-terminal region. In one embodiment, the epitope comprises all of the thirteen amino acids of hPTH (amino acids 1-13 of SEQ ID NO: 1). In other embodiments, the epitopes comprise a combination of the amino acids within the first thirteen amino acids of hPTH. For example, the epitopes may comprise a combination of amino acids 3, 4, and 5; 2, 4, and 6; 8, 10, and 13; or mixtures thereof.

In one embodiment, antibodies of the present invention recognize and bind at least one amino acid within the first thirteen amino acids and at least one additional amino acid located within the region consisting of amino acids 14 to 84, preferably 13 to 34. For example, antibodies of the present invention may recognize and bind to an epitope comprising amino acids 3, 7, and 14; 4, 8, and 33; or 5, 14, and 15.

In one embodiment of the invention, the antibodies of the invention are polyclonal antibodies.

In another embodiment, the antibodies of the invention are monoclonal antibodies.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

In one embodiment of the invention, the antibody recognizes and binds an epitope within the first thirteen amino acids of PTH, or hPTH, and does not bind an epitope of PTH, or hPTH, beyond the first thirteen amino acids. In a preferred
5 embodiment, the antibody recognizes and binds an epitope within the first seven amino acids of PTH, or hPTH.

III. Methods of making the compositions of the invention

10 Parathyroid hormone or variants thereof, may be used to generate antibodies by any conventional method well known to those skilled in the art, including those which generate polyclonal antibodies and those which generate monoclonal antibodies.

15 The polyclonal antibodies of the invention may be produced by immunizing animals with intact PTH, variants thereof, or mixtures thereof, in an emulsion, such as Freund's complete adjuvant. Examples of animals used to produce antibodies
20 include, but are not limited to, mice, rats, rabbits, or goats. Intact PTH may be defined as the full length PTH molecule, for example, the PTH polypeptide after the "pre" and "pro" sequences have been cleaved. In embodiments where human PTH is employed, the intact hPTH has the amino acid sequence
25 depicted in SEQ ID NO: 1. In a preferred embodiment, the intact PTH is preferably linked to a carrier protein, such as keyhole limpet hemocyanin (KLH). Other examples of carrier proteins include bovine serum albumin (BSA), hemocyanin, and bovine thioglobulin (BTG). In certain embodiments, the
30 carrier protein is linked to the antigen of interest (e.g., PTH) with glutaraldehyde, as described herein. Other methods are well known in the art.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

After the initial immunization, the animals receive one or more additional immunization boosts of substantially pure, intact bioactive PTH, variants thereof, or mixtures thereof. The immunizations can be administered intraperitoneally, subcutaneously, or intravenously. Thus, the antibodies to surface conformationally correct epitopes are elevated above the large spectrum of antibodies to internal epitopes of PTH.

The animal's immune response to the immunogen preparation may be monitored by taking test bleeds and determining the titer of reactivity to the polypeptide of interest. When approximately high titers of antibody to the immunogen are obtained, blood is collected from the animal and antisera are recovered.

In one embodiment, the antibodies are isolated by exposing the sera to antibody affinity purification columns. Other techniques of isolating the antibodies are well known in the art. The affinity columns are constructed by linking peptides of PTH, preferably hPTH, to a solid phase of the columns. In preferred embodiments of the invention, the columns include hPTH peptides consisting of amino acids 1-13 (hPTH₁₋₁₃), 13-34 (hPTH₁₃₋₃₄), and 39-84 (hPTH₃₉₋₈₄) of hPTH. Other peptides, or combinations thereof, could be utilized to isolate the antibodies of the invention.

As persons skilled in the art will readily understand, the peptides hPTH₁₋₁₃ will specifically bind to antibodies that recognize epitopes of hPTH within the first thirteen amino acids of hPTH. Similarly, peptides hPTH₁₃₋₃₄ will specifically bind to antibodies that recognize epitopes of hPTH within the amino acids 13-34 of hPTH. Also, peptides hPTH₃₉₋₈₄ will bind to antibodies that recognize epitopes of hPTH within the amino acids 39-84 of hPTH.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

Thus, by way of the foregoing method, the antibodies that specifically bind to an epitope within the first thirteen amino acids of hPTH (anti-hPTH₁₋₁₃ antibodies) are selectively isolated. In addition, the epitopes recognized by the anti-hPTH₁₋₁₃ antibodies can include any combination of amino acids within the first thirteen amino acids. In one embodiment, the antibodies recognize an epitope consisting of the entire thirteen amino acids of hPTH (i.e., amino acids 1-13 of SEQ ID NO: 1).

As persons skilled in the art will understand, the order in which the antibody-containing sera are exposed to the peptide-coupled affinity columns is not determinative in practicing the invention. However, in preferred embodiments, it is desired to first expose the sera to a column containing the hPTH₃₉₋₈₄ peptides, then to expose the resulting sera (e.g., the sera without the antibodies that bind hPTH₃₉₋₈₄) to a column containing hPTH₁₃₋₃₄ peptides, and subsequently exposing the resulting sera (e.g., the sera without hPTH₃₉₋₈₄ and hPTH₁₃₋₃₄ antibodies) to a column containing hPTH₁₋₁₃ peptides.

Monoclonal antibodies that recognize and bind bioactive PTH are also provided. Monoclonal antibodies can be produced using conventional methods known in the art. See, for example, Kohler and Milstein, (1975) Nature, 256:495-97. Briefly, animals, such as mice, are injected with PTH preferably coupled to a carrier protein as described above. The animals are boosted with one or more pure PTH injections, and are hyperimmunized by an intravenous (IV) booster 3 days before fusion. Spleen cells from the mice are isolated and are fused by standard methods to myeloma cells. Hybridomas are selected in standard hypoxanthine/aminopterin/thymine (HAT) medium, according to standard methods. Hybridomas

WO 03/003986

PCT/US02/21356

secreting antibodies which recognize bioactive PTH are identified, cultured, and subcloned using standard immunological techniques.

5 Frequently, the antibodies will be labeled by joining, either covalently or non-covalently, a substance which provides for a detectable signal. In one embodiment of the invention, the labels are chemiluminescent compounds. A preferred chemiluminescent compound is an acridinium ester.

10

III. Methods of using the composition of the invention

A. Immunoassays

15 The immunological assays of the present invention can be used for quantifying an antigen in a sample. Examples of various assays and related reagents and parameters are provided in U.S. Ser. No. 09/761,969, filed January 16, 2001, the entire contents of which are incorporated by reference.

20

One example of an immunoassay is a "sandwich" immunoassay. In the sandwich immunoassay, an antibody is immobilized on a solid phase (capture antibody), incubated with an antigen, and further incubated with an antibody with a detectable label (detection antibody). In a preferred embodiment of the invention, a PTH antibody that does not recognize the bioactive portion of PTH is coupled to a solid phase, such as magnetic particles, the antibody is incubated with a sample containing PTH, and is further incubated with an antibody that specifically binds bioactive PTH, coupled to a detectable label. In a more preferred embodiment, a hPTH antibody that does not recognize amino acids 1-13 of hPTH is coupled to magnetic particles, the antibody is incubated with a sample containing hPTH, and is further incubated with an antibody

25

30

WO 03/003986

PCT/US02/21356

that recognizes bioactive hPTH coupled to an acridinium ester. In the sandwich immunoassay of the present invention, a sample, the first antibody and the labeled second antibody may be incubated simultaneously. Examples of suitable solid phase
5 substrates include, but are not limited to, microtiter plates, beads, tubes, membranes, filter papers, or plastic cups.

Another example of the immunological assays include assays in which an antigen labeled with a detectable label and an
10 unlabeled antigen are competitively reacted with an antibody. In addition, an antigen can be immobilized on a solid phase, incubated with a diluted antiserum or a purified antibody, and further incubated with an antiimmunoglobulin labeled with a
15 detectable label, thereby obtaining a labeled binding substance.

When the sandwich technique is used, two kinds of antibodies against different epitopes of PTH are first prepared. One
antibody is labeled with a detectable label (detection
20 antibody) and the other antibody is allowed to bind to a solid phase as a solid phase antibody or is made to be able to specifically bind to a solid phase (capture antibody). These antibodies are allowed to react with antigens in various concentrations to form a plurality of antigen-antibody
25 complexes. Since the antigen-antibody complexes are bound to solid phases, the solid phases are separated from the complexes, and the amount of label in the solid phases is measured. The relationship between the label and the concentration of the antigen is plotted to obtain a standard
30 curve.

When a sample including an unknown concentration of antigen is added to the reaction system, the concentration of the antigen can be determined by applying the amount of label measured

WO 03/003986

PCT/US02/21356

after the reaction to the standard curve. Examples of samples to be measured can be those containing PTH, or variants thereof, and include plasma, serum, blood, urine, and the like.

5

The sandwich immunoassay of the present invention includes a sandwich radioimmunoassay (RIA), a sandwich enzymeimmunoassay (EIA), a sandwich fluoroimmunoassay (FIA), a sandwich chemiluminescence immunoassay (CLIA, ICMA), a sandwich chemiluminescence-enzymeimmunoassay (CLEIA) and an immunochromatographic method based on the sandwich assay.

10

The coupling of the capture antibody to the solid phase, and the labeling of the detection antibody can be performed by any method known to those skilled in the art. In a preferred embodiment of the invention, the capture antibody is coupled to biotin, and the magnetic particles are coated with streptavidin. The biotin binds to the streptavidin, thereby achieving the coupling of the capture antibody to the solid phase.

15

20

B. SCREENING ASSAYS

The present invention further provides assays for detecting levels of PTH in a subject. In a preferred embodiment, the assays provide methods for detecting abnormal levels of PTH in a subject's blood.

25

These assays are particularly useful for screening test compounds to determine their ability to regulate PTH activity. In such cases, a test compound is added to the reaction system and the effect of the test compound on the binding of antibodies to PTH can be observed. Those compounds which inhibit the binding of the antibodies of the invention to

30

WO 03/003986

PCT/US02/21356

bioactive PTH can be considered as potential bioactive PTH inhibitors and further as potential therapeutic agents for treatment of conditions associated with abnormal PTH activity or concentrations.

5

In one example, those antibodies that recognize PTH are screened for their ability to compete with PTH for binding to a PTH receptor. The antibody used may be from crude antiserum, cell medium, or ascites, or in purified form.

10 Antibodies that reduce binding of the PTH analog to the PTH receptor are classified as competitive; those which do not are noncompetitive.

Compounds, including antibodies, may be screened for their
15 agonistic or antagonistic properties using cAMP accumulation, intracellular calcium, and/or inositol phosphate assays. Cyclic AMP accumulation can be measured by the assays, as described above. A compound that competes with PTH for binding to the PTH receptor, and that inhibits the effect of
20 PTH on cAMP accumulation, is considered a competitive PTH antagonist. Conversely, a compound that does not compete for PTH binding to the PTH receptor, but which still prevents PTH activation of cAMP accumulation (presumably by blocking the receptor activation site) is considered a non-competitive
25 antagonist. A compound that competes with PTH for binding to the PTH receptor, and which stimulates cAMP accumulation in the presence or absence of PTH, is a competitive agonist. A compound that does not compete with PTH for binding to the PTH receptor but which is still capable of stimulating cAMP
30 accumulation in the presence or absence of PTH, or which stimulates a higher accumulation than that observed by PTH alone, would be considered a non-competitive agonist.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

C. Diagnostic uses

The antibodies of the invention are useful for the diagnosis, classification, prognosis, and/or treatment of disorders which may be characterized as related to the interaction between a cell receptor of the invention and its specific ligand. For example, some forms of hypercalcemia and hypocalcemia are related to the interaction between PTH and the PTH receptor(s). Hypercalcemia is a condition in which there is an abnormal elevation in serum calcium level; it is often associated with other diseases, including hyperparathyroidism, osteoporosis, carcinomas of the breast, lung and prostate, epidermoid cancers of the head and neck of the esophagus, multiple myeloma, and hypernephroma. Hypocalcemia, a condition in which the serum calcium level is abnormally low, may result from a deficiency of effective PTH.

In one example, the compounds of the invention are used to manufacture diagnostic agents which are used as diagnostic tools to diagnose hypercalcemia and to distinguish between-hypercalcemic conditions, i.e., to differentiate hypercalcemia mediated by PTH (e.g., hyperparathyroidism and humoral hypercalcemia of malignancy), from hypercalcemia associated with diseases which do not involve these factors (e.g., local osteolytic hypercalcemia mediated by the presence of metastatic tumor cells in direct contact with bone, and certain rare types of malignancy-related hypercalcemias mediated by an increase of humoral factors, such as osteoclast activating factor (interleukin), lymphotoxin, calcitriol, type E prostaglandins, and vitamin D-like sterols).

In one method of diagnosis, serum total and/or ionized calcium levels are measured by standard techniques before and after the administration of the PTH antagonists of the invention.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

PTH related hypercalcemias would be detectable as a decrease in serum calcium levels following administration of the antagonist of the invention. In contrast, for hypercalcemic conditions mediated by factors other than PTH, the serum calcium levels would remain unchanged even after administration of the antagonist.

Another diagnostic application of the invention permits measurement of the level of PTH in a biological sample in order to diagnose PTH related tumors, e.g., tumors which are associated with humoral hypercalcemia of malignancy, and for monitoring the levels of PTH during cancer therapy. This method involves assaying binding of the parathyroid hormone receptor to PTH present in a tissue sample, using one of the assays described herein.

A patient who is suspected of being hypercalcemic may be treated using the compounds of the invention. Rapid intervention is important because symptoms may appear abruptly and, unless reversed, can be fatal. In one application, serum calcium levels are stabilized by an immediate course of treatment which includes antagonists of PTH. Such antagonists include the compounds of the invention which have been determined (by the assays described herein) to interfere with the biological activity of PTH. To administer the antagonist, the appropriate antibody (is used in the manufacture of a medicament, generally by being formulated in an appropriate carrier such as physiological saline, and administered intravenously, at a dosage that provides adequate competition for PTH binding to the PTH receptor (e.g., a dosage sufficient to lower the serum calcium level to below 10 mg/dl). Typical dosage would be 1 ng to 10 mg of the antibody per kg body weight per day. Treatment may be repeated as necessary for long term maintenance of acceptable calcium levels (i.e.,

WO 03/003986

PCT/US02/21356

levels <10.1 mg/dl). In addition, other modes of administration can be used to administer a medicament of the invention. This may be necessary for acute treatment of an underlying disease condition triggering hypercalcemia; or it may used, e.g., for chronic treatment of conditions such as osteoporosis.

D. Pharmaceutical compositions and therapeutic methods

10 The present invention further comprises pharmaceutical compositions incorporating the compositions of the invention and including a pharmaceutically acceptable carrier. Such pharmaceutical compositions should contain a therapeutic or prophylactic amount of at least one antibody identified by the
15 methods of the present invention. The pharmaceutically acceptable carrier can be any compatible, non-toxic substance suitable to deliver the compounds to an intended host. Sterile water, alcohol, fats, waxes, and inert solids may be used as the carrier. Pharmaceutically acceptable adjuvants,
20 buffering agents, dispersing agents, and the like may also be incorporated into the pharmaceutical compositions. Preparation of pharmaceutical conditions incorporating active agents is well described in the medical and scientific literature. See, for example, Remington's Pharmaceutical
25 Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 16th Ed., 1982, the disclosure of which is incorporated herein by reference.

The pharmaceutical compositions just described are suitable
30 for systemic administration to the host, including both parenteral and oral administration. The pharmaceutical compositions will usually be administered parenterally, i.e. subcutaneously, intramuscularly, or intravenously. Thus, the present invention provides compositions for administration to

WO 03/003986

PCT/US02/21356

a host, where the compositions comprise pharmaceutically acceptable solution of the identified compound in an acceptable carrier, as described above.

5 The concentration of the compound in the pharmaceutical carrier may vary widely, i.e. from less than about 0.1% by weight of the pharmaceutical composition to about 20% by weight, or greater. Typical pharmaceutical composition for intramuscular injection would be made up to contain, for
10 example, one to four ml of sterile buffered water and one µg to one mg of the compound identified by the method of the present invention. The typical composition for intravenous infusion could be made up to contain 100 to 500 ml of sterile Ringer's solution and about 1 to 100 mg of the compound.

15 Various kits comprising a releasing composition and a detecting composition as disclosed in this invention may be used for determining the concentration of PTH, or variants thereof, in a sample. However, such are only examples of the
20 many possible kits which may employ the compositions of the invention. Other kits are contemplated to be within the scope of this invention. For example, the following patents, articles and instruction manuals disclose assay methods which may be adapted to include a releasing composition of the
25 present invention: U.S. Patent No. 4,935,339; No. 4,121,1978; No. 5,232,836; No. 5,064,770; No. 5,202,266; No. 4,816,417; No. 5,821,020 and No. 5,981,779; the disclosures of which are incorporated in their entirety by reference herein. One adaptation would be to replace the compositions used therein
30 with the present compositions.

In a broad embodiment, the kit of the present invention may be adapted to be employed in an automated assay system to determine the concentration of PTH or variants thereof. For

WO 03/003986

PCT/US02/21356

example, the kit of the present invention may preferably be used in conjunction with the Nichols Advantage system.

EXAMPLES

5

Example 1

Production of antibodies that recognize and bind bioactive hPTH

10

A. Immunization

Human Parathyroid Hormone 1-84 was purchased from BACHEM, California Inc., Torrance, CA. Product No. H-1370.1000.

15

KLH, Hemocyanin, Keyhole Limpet was purchased from Calbiochem, La Jolla, CA. Product No. 374805.

20

Glutaraldehyde was purchased from Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. Product No. G-6247.

Human Parathyroid Hormone was coupled to KLH in molar ratios of 200:1 as follows:

25

One milligram of PTH was solubilized in 0.20 mL 0.1 N Acetic Acid. The solubilized PTH was diluted to 1 mg/mL in 0.1M Na Phosphate, 0.15 M NaCl pH 7.4. Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) was solubilized in 0.1 M Na Phosphate pH 7.2 to a concentration 10 mg/mL by protein content. Molar ratios by

30

protein content of 200 moles PTH to 1 mole of KLH were calculated and the two proteins mixed at 4 degrees C. A 10 mg/ml (1%) solution of Glutaraldehyde was prepared by diluting the 25% aqueous solution to 1% in 0.1M Na Phosphate pH 7.2. The mixture of 200 moles PTH to 1 mole KLH were coupled by the

WO 03/003986

PCT/US02/21356

addition of 1% glutaraldehyde to a final glutaraldehyde concentration of 0.655 mg/mL. The glutaraldehyde cross-linked protein mixture was kept at 4 degrees C for 5-8 hours and the reaction stopped by dilution by the addition of an equal volume of 0.01 M Na Phosphate, 0.15 M NaCl pH 7.4. The total protein concentration of the PTH-KLH was calculated on the assumption of an 80% crosslinking efficiency.

Goats, purchased through Strategic BioSolutions, Ramona, CA, were boarded and immunized as follows:

For the first immunization, goats were immunized with 2 ml of 0.1 mg of PTH-KLH solubilized with an equal volume of Complete Freund's Adjuvant. One mL with 0.1 mg PTH-KLH with one mL Complete Freund's Adjuvant. The animals were injected intradermally on the animals at multiple sites.

Subsequent boosts were performed on a 3-4 week bases (monthly) with 2 mL of 0.05 mg of PTH-KLH, prepared as above, in an equal volume of Incomplete Freund's and injected intradermally, as before, on the animal's side. At least two to three boosts of PTH-KLH in Incomplete Freund's were performed.

For all subsequent boosts, the animals were then immunized only with 0.02 mg of pure PTH₁₋₈₄ solubilized, as above, in Incomplete Freund's Adjuvant for 2 mL of immunogen, and injected as before on the animal's side intradermally. In this manner, antibody clones to conformation epitopes are boosted preferentially to internalize linear PTH sequences.

After at least 2 boosts of pure PTH₁₋₈₄, the animals were bled, and off-the-clot serum was collected. The specificity and

WO 03/003986

PCT/US02/21356

titer were determined using Surface Plasmon Resonance (SPR) using BIACore instrumentation.

Example 2

5

Isolation of antibodies to conformational PTH₁₋₁₃

Affinity columns to PTH amino acid sequences PTH₃₈₋₈₄, PTH₁₃₋₃₄ and PTH₁₋₁₃ were constructed as follows:

10

PTH₃₈₋₈₄ and PTH₁₃₋₃₄ were purchased through BACHEM, California, Product numbers H-4926.1000 and H-4145.1000, respectively. PTH₁₋₁₃ was chemically synthesized by Research Genetics, Huntsville, Al.

15

Each of the respective PTH peptides were coupled to CNBr Activated Sepharose 4-B, by Pharmacia, as outlined in their procedure, with 1-2 mg of peptide to 2 mL of Sepharose 4-B.

20 Affinity purified antibody to PTH₁₋₁₃ was prepared as follows:

Goat immune serum prepared as above, was sequentially purified on the affinity columns first to remove anti-PTH₃₈₋₈₄ antibodies, then anti-PTH₁₃₋₃₄ antibodies, and finally anti-PTH₁₋₁₃ antibodies. The serum extraction for all three affinity columns is the same:

At least 0.5 liters of goat immune serum was passed of the respective affinity columns in the order noted above. Each affinity column consisting of at least 10 mg of peptide linked to Sepharose-4B.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

The columns were washed extensively with 0.01 M Na Phosphate, 0.15 M NaCl pH 7.4. until the Spectrophotometric absorption at 280 nm no longer changed.

- 5 To remove non-specific serum proteins, the columns were then washed with 0.1 M Na Acetate, 0.15 M NaCl pH 4.0, again monitoring the absorption at 280 nm. Specific antibodies to the peptide sequences were then eluted with 0.2 M Glycine pH 2.3. The low pH 2.3 elution by the weak buffer glycine
- 10 dissociates the antibody from the covalently linked peptide to Sepharose 4-B. The final eluted antibodies to PTH₁₋₁₃ are then neutralized with the addition of dilute 0.1 N NaOH to bring the pH back to 7.4.
- 15 The affinity purified goat anti-PTH₁₋₁₃, is then tested for purity by HPLC analysis. Protein concentration determined by molar extinction coefficient, absorption at 280 nm, $1.4 A^{280} = 1 \text{ mg/mL}$. The affinity purified antibody binding and specificity then were determined using SPR by BIAcore
- 20 instrumentation. The antibody is stored at 4 degrees C, or -70 degrees C for long term storage.

Antibody affinity purification columns consisting of hPTH₁₋₁₃, hPTH₁₃₋₃₄, and hPTH₃₉₋₈₄ are constructed with these peptides

25 respectively linked to Sepharose 4B. The animal serum generated in the immunization sequence can be isolated for these respective antibodies in the following sequence. First antibodies to hPTH₃₉₋₈₄ are removed from the sera, followed by removing antibodies to hPTH₁₋₃₄. Then the final affinity column

30 of hPTH₁₋₁₃ is used to isolate the anti-hPTH₁₋₁₃ antibodies which recognize the bioactive conformationally correct N-Terminal sequence of hPTH. Although in our experiments the antibodies to hPTH₁₃₋₃₄ and hPTH₃₉₋₈₄ were first removed to prove there were no overlapping epitopes, it is possible to isolate the

WO 03/003986

PCT/US02/21356

bioactive hPTH₁₋₁₃ conformational antibodies without removing the other antibodies first.

EXAMPLE 3

5

Labeling of anti-PTH₁₋₁₃ antibody with acridinium

A purified anti-PTH₁₋₁₃ antibody was labeled with acridinium by the method as follows:

10

Acridinium as a "sulfonyl chloride ester" is crosslinked to the antibody of the invention by the reaction of the lysyl moiety of the epsilon amino group of lysine in proteins, such as antibodies, to the acridinium ester. The reaction products are separated by size exclusion chromatography on Sepharose G-25 with 0.1 M Na Phosphate, pH 6.0.

15

EXAMPLE 4

20

Immunometric assay for bioactive hPTH

Affinity purified antibodies to bioactive N-Terminal PTH (anti-PTH₁₋₁₃) are labeled for detection and anti-PTH₃₉₋₈₄

25

antibodies are labeled for capture.

Biotinylated capture antibodies (anti-PTH₃₉₋₈₄) are used to bind PTH from a sample. The capture antibodies recognize both full length PTH (PTH₁₋₈₄) and C-terminal fragments of PTH.

30

Acridinium labeled detection antibodies (anti-PTH₁₋₁₃) are used to bind the bioactive N-terminal epitope of PTH in a sample. The capture antibody preferably recognizes and binds bioactive PTH (e.g., PTH that has a conformationally correct N-terminal region). The capture and detection antibodies "sandwich" the

WO 03/003986

PCT/US02/21356

PTH molecules in the sample. The sandwich complex is bound to streptavidin-coated magnetic particles. The particles are then quantitated in a luminometer as is known in the art. The procedures are illustrated in FIG. 1.

5

Samples are obtained from normal subjects (e.g., subjects that are apparently healthy, ambulatory, and non-medicated. The normal subjects have normal calcium and 25(OH) vitamin D levels. Samples are also obtained from sera of subjects that was submitted for creatine clearance, and had a creatine clearance of less than 70 mL/min. Samples were also obtained from subjects experiencing chronic renal failure (CRF). These samples consisted of EDTA plasma obtained from subjects on dialysis.

10

In a preferred embodiment of the invention, 150 μ L of the biological samples were combined with 70 μ L of biotinylated goat anti-PTH₃₉₋₈₄ capture antibodies, 25 μ L acridinium labeled goat anti-PTH₁₋₁₃ antibodies, and 15 μ L streptavidin coated magnetic particles. The combination was incubated at 37 degrees C for 30 minutes. The combination was washed, and read in a luminometer.

Using an immunoradiometric assay (IRMA) for PTH₁₋₈₄, where the anti-PTH₁₋₁₃ is labeled for detection and anti-PTH₃₉₋₈₄ is labeled for capture, the following observations are noted. Fragments, PTH₁₋₆ and PTH₇₋₁₃ will not inhibit the assay. PTH fragments consisting of PTH₁₋₃₄ strongly inhibit the assay, where PTH fragments 2-34, 3-34, 4-34 and 5-34 inhibit the assay in diminishing response as amino acids are removed from amino acid position one on PTH₁₋₃₄ (FIG. 4). Results with other fragments are shown in FIG. 18. Inhibition with a PTH₇₋₈₄ fragment also was observed to have no effect. Indicating that

WO 03/003986

PCT/US02/21356

the conformational epitope is strongly dependent on at least full residue sequence in PTH₁₋₁₃.

This assay was then used in a study with clinical patient samples that demonstrate the presence of PTH₇₋₈₄ fragments. The study as shown clearly demonstrates the clinical utility of the bioactive intact N-terminal antibodies in be able to detect only the bioactive intact PTH₁₋₈₄. The correlation studies using the antibodies of the invention and the NID Intact-PTH assay in patients with early and end-stage renal disease suggest the proportion of intact PTH (PTH₁₋₈₄) to PTH fragments (PTH₇₋₈₄) is similar (slopes of 0.71 and 0.69, respectively), but is different from the normal subjects (slope of 0.52). See FIGS. 6-8).

15

Example 5

Surface Plasmon Resonance (SPR)

Surface Plasmon Resonance (SPR) is a technique in which a response is measured by the change in the refractive index of light on a surface as a function of the mass of material bound to the surface. Using a commercial instrument by BIAcore, SPR has been used to measure the kinetics of noncovalent interactions between antibodies and their antigens. See, for example, Malmqvist, M., *Curr. Opin. Immunol.* 5, 282-286, (1993); O'Shannessy, D.J., *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 65-71, (1993); Schuck, P., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 498-502, (1997); the contents of which in their entireties are incorporated by reference. The BIAcore instrument has been demonstrated to be a unique tool in the measurement of immunoreagents (Adamczyk, M. et al., *Bioconjugate Chem.* 10, 176-185, (1999); and Adamczyk, M., et al., *Bioconjugate Chem.*

WO 03/003986

PCT/US02/21356

8, 133-145, (1997); the contents of which in their entireties are incorporated by reference.

In brief, CM5 sensor chips with covalently coupled rabbit anti-goat Fc antibodies were used. The buffer used was phosphate buffered saline (PBS) at a pH of 7.4 with 0.005% surfactant P-20. The flow rate was 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Approximately 500 response units (RU) of the antibodies of the invention was immobilized per run. The method generally comprised a one minute injection of the detection antibody (i.e., anti-PTH₁₋₁₃ antibody) at a rate of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ followed by a two minute injection of an inhibitory peptide (i.e., a PTH fragment, as described herein) at a rate of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ followed by a two minute wash followed by a one minute injection of PTH₁₋₈₄ at one $\mu\text{g}/\text{mL}$. Binding of the antibody and PTH₁₋₈₄ was measured 30 seconds after the end of each injection. After each run, the surface was regenerated with 10 mM gly-HCl for regeneration.

The results of the SPR studies demonstrate the conformational specificity of the N-Terminal anti-hPTH₁₋₁₃ antibodies as follows: In FIG. 10, PTH sequences 1-6 and 7-13 cannot compete for the binding of the anti-hPTH₁₋₁₃ antibodies alone, and are therefore important for antibody binding. PTH₁₋₁₃ does inhibit binding of PTH to the antibodies of the invention. The data demonstrate that the antibodies of the invention bind to amino acid residues in both PTH₁₋₆, and PTH₇₋₁₃ fragments. The intact full three-dimensional epitope consisting of at least 13 amino acids must be present for binding.

FIG. 11 demonstrates that amino acid residues 1 and 2 at the N-terminus are important for binding of the N-terminal anti-PTH antibody. The removal of the first amino significantly reduces the binding of the antibody because the correct conformational structure is lost. In that regard, the

WO 03/003986

PCT/US02/21356

peptides PTH₁₋₃₄ and PTH₂₋₃₄ show the greatest inhibition of binding of PTH to the antibodies of the invention.

In FIG. 12, removal of residues 10-13 (especially 13) limits the binding of the N-Terminal Anti-PTH antibody. PTH peptides, PTH₁₋₆, and PTH₁₋₇ do not inhibit binding of PTH₁₋₃₄ to the antibodies of the invention, and that the inhibition of binding becomes successively more pronounced as the size of the inhibitory peptide increases from PTH₁₋₁₀ to PTH₁₋₁₃.

10

In FIG. 13, N-terminal PTH peptides 1-34, 1-38 and 1-84 inhibit the binding of PTH to the N-terminal antibody more strongly than PTH 1-13. These results indicate that the PTH 1-13 peptide, although conformational, does not fold into exactly the same three dimensional structure that PTH amino acids 1-13 assume when they are part of a larger PTH molecule, further demonstrating the unique conformational binding of bioactive intact N-Terminal PTH 1-13 antibodies.

15

These results together identify amino acid residues in two distinct regions of PTH (the N-Terminus region amino acids 1-2 and 10-13), which are important determinants for antibody binding. Since these regions are not juxtaposed in the linear sequence of PTH, the bioactive intact N-Terminal Anti-PTH 1-13 antibodies recognize a conformational (nonlinear) epitope of PTH.

20

Example 6

High pressure liquid chromatography (HPLC)

30

Biological samples are extracted from subjects, and are eluted with 80% acetonitrile in 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA). The resulting concentrate sample was dried in a speed vacuum. The

WO 03/003986

PCT/US02/21356

dry sample was then solubilized in a minimal volume (e.g., 0.5 mL) of 0.1% TFA.

HPLC was performed on an analytical C18 column, at a flow rate
5 of 1.5 mL/min, with a linear acetonitrile gradient in 0.1%
TFA, collecting 1.0 minute fractions. The concentrated
fractions were then dried in a speed vacuum. The resulting
fractions were subsequently solubilized in 0.7% bovine serum
albumin (BSA) in phosphate buffered saline (PBS). The
10 fractions were subsequently assayed on a Nichols Institute
Diagnostics (NID) Advantage with Intact PTH, the bio-intact
PTH assay (i.e., the assay of the invention), and the PTH₁₋₃₈
assay.

15 The NID Intact PTH assay recognizes PTH₇₋₈₄, and PTH₁₋₈₄. The
bio-intact assay recognizes PTH₁₋₈₄, but does not recognize
PTH₇₋₈₄ (FIG. 3). The PTH₁₋₃₈ assay recognizes PTH₁₋₈₄, PTH₁₋₃₄,
PTH₁₋₃₈, but does not recognize PTH₇₋₈₄.

20 The results of the HPLC experiments indicate that HPLC
resolves chemically synthesized PTH fragments (PTH₁₋₈₄, PTH₁₋₃₄,
PTH₁₋₃₈, and PTH₇₋₈₄) (FIG. 14A). HPLC resolves PTH in patient
samples primarily in two major peaks, as detected by the NID
assay. The first peak corresponds to PTH₇₋₈₄ fragments, and the
25 second peak corresponds to PTH₁₋₈₄ (FIG. 3, 14B, 15A, and 15B).
As persons skilled in the art will appreciate, the actual
retention times may vary.

The assay of the invention using the antibodies of the
30 invention also permits detection of additional peaks that
presumably correspond to PTH fragments that have intact amino
terminal portions.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

The HPLC analysis of human serum patient samples, the clinical utility of the bioactive intact N-Terminal anti-PTH₁₋₁₃ antibodies are again shown in demonstrating the specificity of the antibodies to only detect intact PTH 1-84.

5

Various publications and/or references have been cited herein, the contents of which are incorporated herein by reference.

While this invention has been described with respect to various specific examples and embodiments, it is to be understood that the invention is not limited thereto and that it can be variously practiced with the scope of the following claims.

10

WO 03/003986

PCT/US02/21356

What is claimed is:

1. A method for producing antibodies to a three-dimensional epitope of a bioactive human parathyroid hormone,
5 comprising:
 - a) immunizing an animal with the bioactive human parathyroid hormone; and
 - b) recovering antibodies from the animal;whereby the antibodies specifically recognize the three-
10 dimensional structure of the bioactive human parathyroid hormone.
2. The method of claim 1, further comprising immunizing the
15 animal with the human parathyroid hormone a second time before recovering the antibodies from the animal.
3. The method of claim 1, wherein the human parathyroid hormone is coupled to a carrier.
- 20 4. The method of claim 3, wherein the carrier is keyhole limpet hemocyanin.
5. The method of claim 1, wherein the bioactive human parathyroid hormone comprises SEQ ID NO: 1.
- 25 6. The method of claim 1 or 2, further comprising isolating the antibodies.
7. The method of claim 6, wherein the antibodies are
30 isolated by affinity chromatography.
8. The method of claim 7, wherein the antibodies are isolated by screening the antibodies with fragments of the human parathyroid hormone linked to a solid phase.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

9. A method for producing antibodies that recognize and bind the bioactive, three-dimensional epitope of parathyroid hormone, comprising
- 5 a) immunizing an animal with parathyroid hormone;
b) immunizing the animal with parathyroid hormone a second time; and
c) recovering the antibodies from the animal,
whereby the antibodies recognize and bind the bioactive,
10 three-dimensional epitope of parathyroid hormone.
10. The method of claim 9, wherein the parathyroid hormone is conjugated to a carrier.
- 15 11. The method of claim 10, wherein the carrier is keyhole limpet hemocyanin.
12. The method of claim 9, wherein the parathyroid hormone is human parathyroid hormone.
- 20 13. The method of claim 9, further comprising isolating the antibodies so recovered.
14. The method of claim 13, wherein the antibodies are
25 isolated by affinity chromatography.
15. The method of claim 14, wherein the antibodies are isolated by fragments of parathyroid hormone coupled to a solid phase.
- 30 16. The method of claim 15, wherein the fragments of parathyroid hormone are selected from the group consisting of amino acids 1-13, 13-34, and 39-84 of SEQ ID NO: 1.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

17. The method of claim 15, wherein the antibodies are isolated by a fragment of parathyroid hormone consisting of amino acids 1-13 of SEQ ID NO: 1.
- 5
18. A method for producing antibodies that recognize and bind the bioactive, three-dimensional epitope of parathyroid hormone, comprising
- 10
- a) immunizing an animal with parathyroid hormone, wherein the parathyroid hormone comprises amino acids 1-84 of SEQ ID NO: 1;
 - b) immunizing the animal with parathyroid hormone a second time; and
 - c) recovering the antibodies from the animal,
- 15
- whereby the antibodies recognize and bind the bioactive, three-dimensional epitope of parathyroid hormone.
19. The method of claim 18, further comprising isolating the antibodies so recovered.
- 20
20. The method of claim 18, wherein the bioactive three-dimensional epitope of parathyroid hormone consists of amino acids 1-13 of SEQ ID NO: 1.
- 25
21. A method for producing antibodies that recognize and bind the bioactive, three-dimensional amino terminus of parathyroid hormone, comprising
- 30
- a) immunizing an animal with parathyroid hormone conjugated to a keyhole limpet hemocyanin, wherein the parathyroid hormone comprises amino acids 1-84 of SEQ ID NO: 1;
 - b) subsequently immunizing the animal with parathyroid hormone; and
 - c) recovering the antibodies from the animal,

WO 03/003986

PCT/US02/21356

whereby the antibodies recognize and bind the bioactive, three-dimensional amino terminus of parathyroid hormone.

22. The method of claim 21, wherein the bioactive three-dimensional amino terminus of parathyroid hormone consists of amino acids 1-13 of SEQ ID NO: 1.
23. An isolated antibody that recognizes and binds the bioactive, three-dimensional epitope of parathyroid hormone.
24. The isolated antibody of claim 23, wherein the bioactive, three dimensional epitope is the amino terminus of parathyroid hormone.
25. The isolated antibody of claim 23, wherein the parathyroid hormone is human parathyroid hormone.
26. The isolated antibody of claim 23, wherein the bioactive, three-dimensional epitope consists of amino acids 1-13 of SEQ ID NO: 1.
27. An isolated antibody recognizing a peptide comprising an amino acid sequence from Ser in the 1 position to Lys in the 13 position of SEQ ID NO: 1.
28. An isolated antibody according to claim 27 recognizing a peptide consisting of an amino acid sequence from Ser in the 1 position to Lys in the 13 position of SEQ ID NO: 1.
29. An antibody that is immunoreactive with the bioactive amino-terminal portion of human parathyroid hormone.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

30. The antibody of claim 29, wherein the bioactive amino-terminal portion comprises amino acids 1-13 of SEQ ID NO: 1.
- 5 31. The antibody of claim 29, wherein the bioactive amino-terminal portion consists of amino acids 1-13 of SEQ ID NO: 1.
- 10 32. A therapeutic composition comprising the antibody of claim 29, and a pharmaceutically-acceptable carrier.
33. The antibody of claim 29, wherein the antibody reduces adenylate cyclase activity by binding to the bioactive portion of the parathyroid hormone.
- 15 34. Any one of the antibodies of claims 23-33, wherein the antibody is a polyclonal antibody.
35. Any one of the antibodies of claims 23-33, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
- 20 36. Any one of the antibodies of claims 23-33, wherein the antibody is a humanized antibody.
- 25 37. Any one of the antibodies of claims 23-33, wherein the antibody is an antibody fragment.
38. Any one of the antibodies of claims 23-33 coupled to a detectable marker.
- 30 39. An antibody that specifically binds to the bioactive three-dimensional epitope of human parathyroid hormone, wherein the epitope consists of amino acids 1-13 of SEQ ID NO: 1.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

40. A polyclonal antibody that recognizes and binds the bioactive three-dimensional epitope of human parathyroid hormone produced by a process comprising the following steps:
- 5
- a) immunizing an animal with human parathyroid hormone linked with keyhole limpet hemocyanin;
 - b) immunizing the animal with human parathyroid hormone; and
 - 10 c) recovering the antibodies from the animal, whereby the antibodies recognize and bind the bioactive three-dimensional epitope of human parathyroid hormone.
41. A polyclonal antibody that recognizes and binds the bioactive three-dimensional epitope of human parathyroid hormone produced by a process comprising the following steps:
- 15
- a) immunizing an animal with human parathyroid hormone linked with keyhole limpet hemocyanin;
 - 20 b) immunizing the animal with human parathyroid hormone; and
 - c) recovering the antibodies from the animal, whereby the antibodies recognize and bind the bioactive three-dimensional epitope of human parathyroid hormone, and wherein the bioactive three-dimensional epitope consists of amino acids 1-13 of SEQ ID NO: 1.
- 25
42. An antibody selective for bioactive parathyroid hormone.
- 30 43. An antibody selective for bioactive parathyroid hormone, wherein the antibody recognizes and binds at least one of the first thirteen amino acids of SEQ ID NO: 1.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

44. An isolated antibody that recognizes and binds the bioactive, three-dimensional epitope of parathyroid hormone, or a variant thereof.
- 5 45. An isolated antibody that recognizes and binds the bioactive, three-dimensional epitope of parathyroid hormone, or a fragment thereof.
46. A kit comprising an antibody that recognizes and binds the bioactive, three-dimensional epitope of parathyroid hormone.
- 10
47. The kit of claim 46, wherein the antibody is coupled with a detectable label.
- 15
48. The kit of claim 46, wherein the bioactive, three-dimensional epitope consists of amino acids 1-13 of SEQ ID NO: 1.
- 20
49. The kit of claim 46, further comprising tools for obtaining a biological sample containing parathyroid hormone from a patient.
50. The kit of claim 47, wherein the detectable label is selected from the group consisting of chemiluminescent markers, fluorescent markers, radioactive markers, and enzymatic markers.
- 25
51. The kit of claim 47, wherein the detectable label is an acridinium ester.
- 30
52. A method for detecting bioactive parathyroid hormone in a sample, comprising

WO 03/003986

PCT/US02/21356

- a) exposing the sample to an antibody that recognizes and binds the bioactive three-dimensional epitope of parathyroid hormone; and
- b) detecting the antibody-hormone complex,
- 5 thereby detecting the bioactive parathyroid hormone in the sample.
53. The method of claim 52, wherein the antibody that recognizes and binds the bioactive three-dimensional
- 10 epitope of parathyroid hormone is coupled with a detectable marker.
54. The method of claim 52, further comprising exposing the antibody-hormone complex to another antibody that
- 15 recognizes and binds parathyroid hormone before step (b).
55. A method for detecting bioactive parathyroid hormone in a sample, comprising
- 20 a) exposing the sample to a capture antibody that recognizes and binds the bioactive three-dimensional epitope of parathyroid hormone;
- b) exposing the capture antibody-hormone complex to a detection antibody that binds a different epitope than the capture antibody; and
- 25 b) detecting the antibody-hormone complex, thereby detecting the bioactive parathyroid hormone in the sample.
56. The method of claim 55, wherein the detection antibody is
- 30 coupled to a chemiluminescent marker.
57. The method of claim 56, wherein the chemiluminescent marker is an acridinium ester.

WO 03/003986

PCT/US02/21356

58. The method of claim 52 or 55, wherein the sample is from
a patient with hyperparathyroidism.
59. The method of claim 52 or 55, wherein the sample is from
5 a patient with hypoparathyroidism.
60. An immunoassay comprising an antibody that recognizes and
binds the bioactive three-dimensional amino terminus of
human parathyroid hormone.
- 10
61. The immunoassay of claim 60, wherein the bioactive three-
dimensional amino terminus consists of amino acids 1-13
of SEQ ID NO: 1.

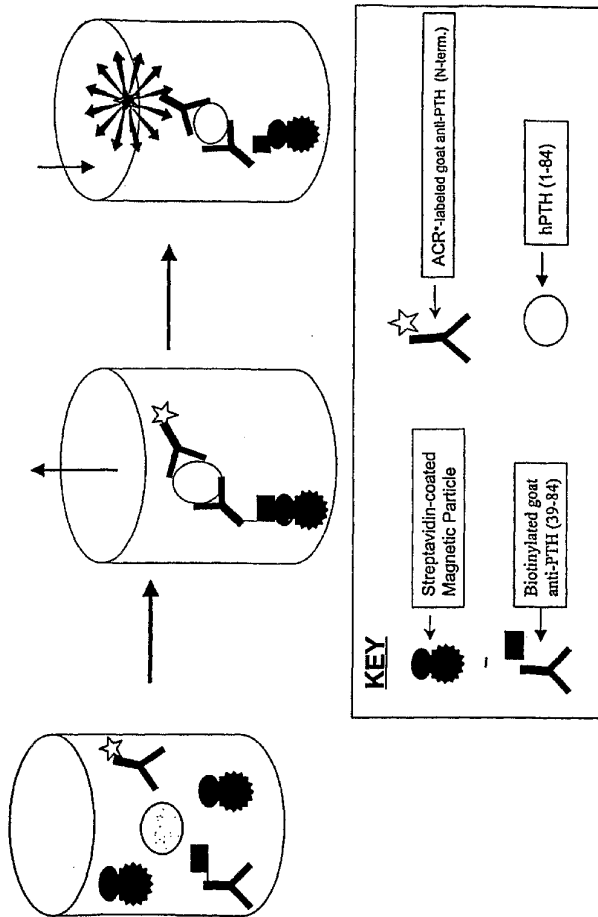


Figure 1

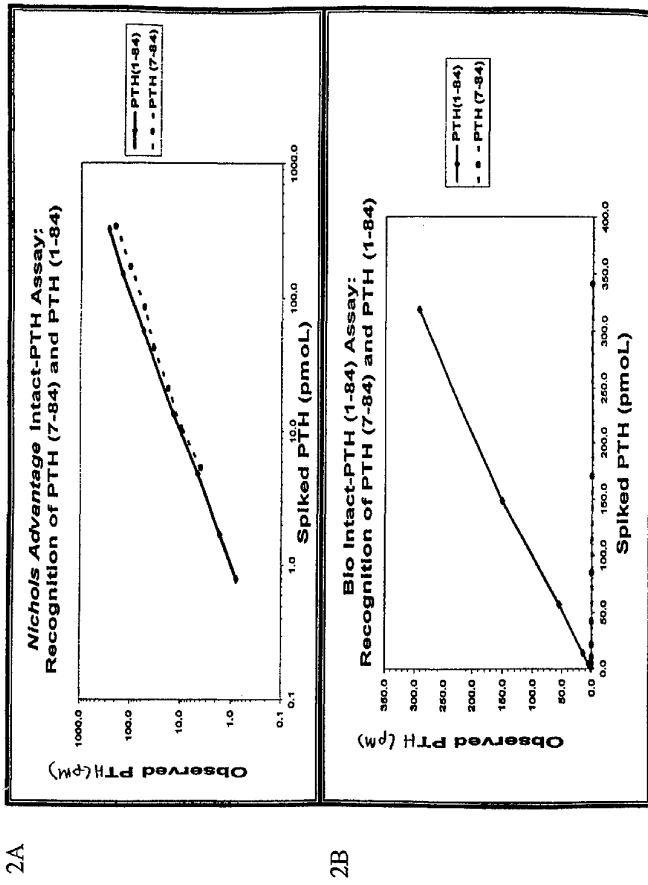


Figure 2

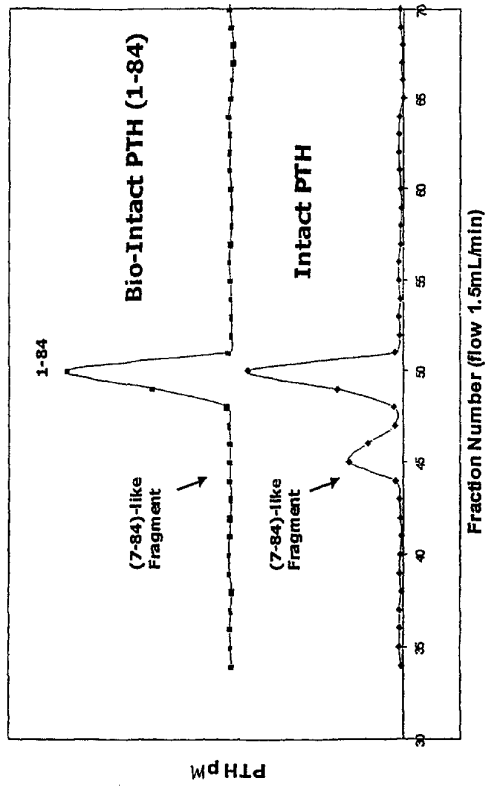


Figure 3

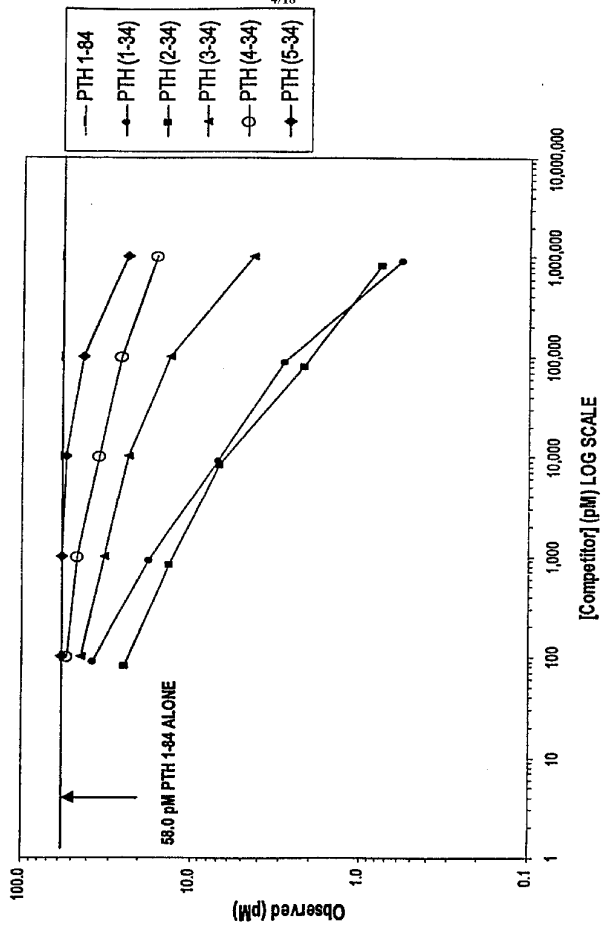


Figure 4

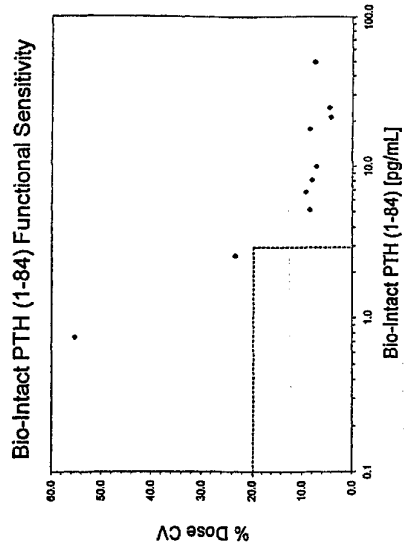


Figure 5

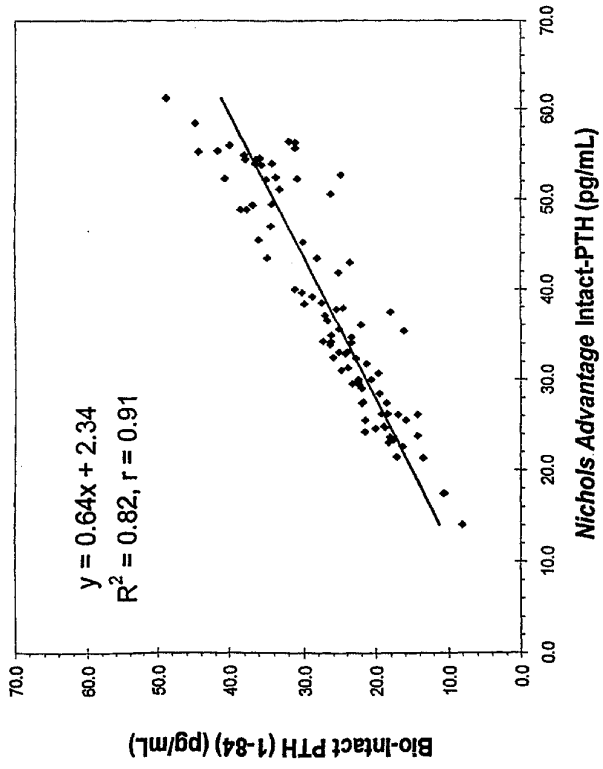


Figure 6

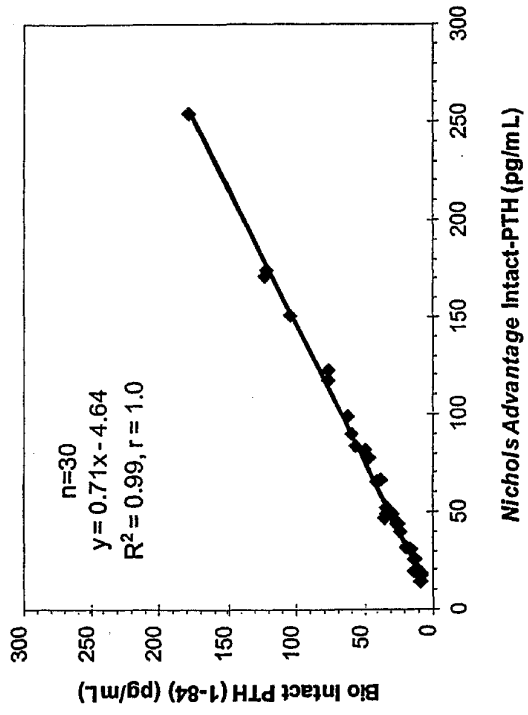


Figure 7

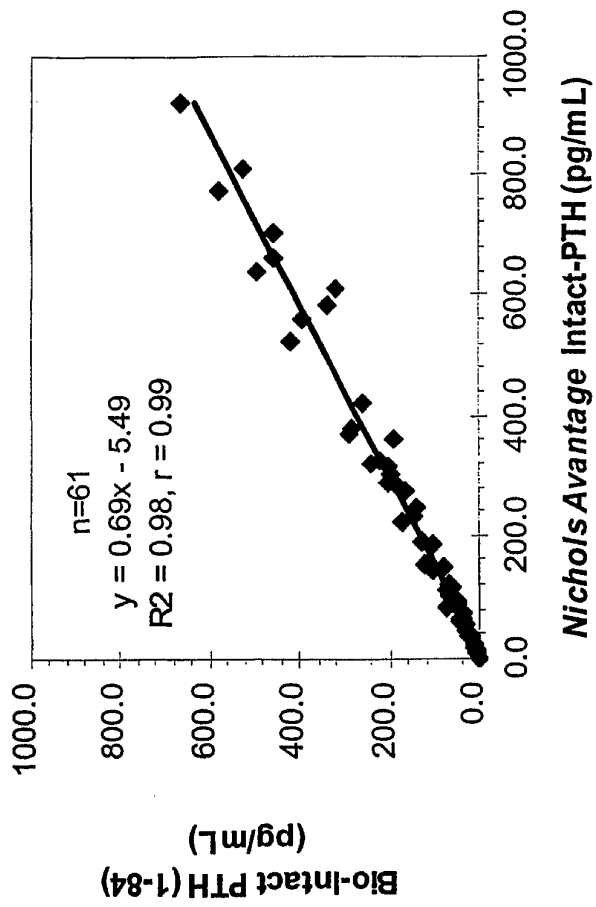


Figure 8

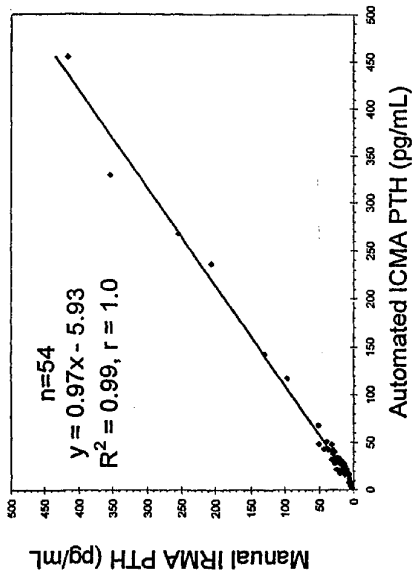


Figure 9

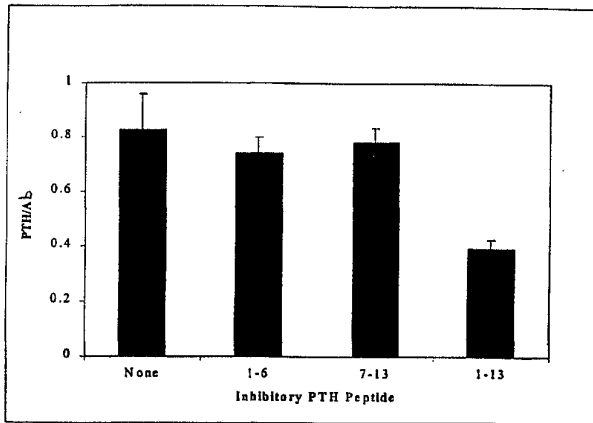


Figure 10

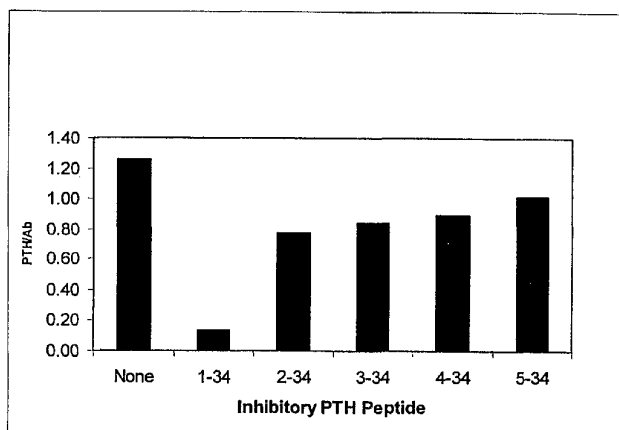


Figure 11

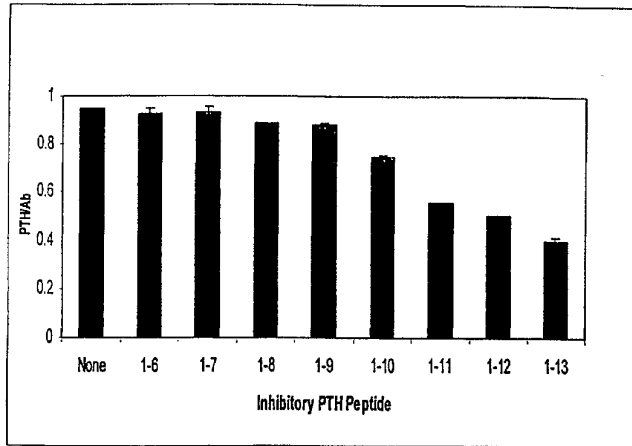


Figure 12

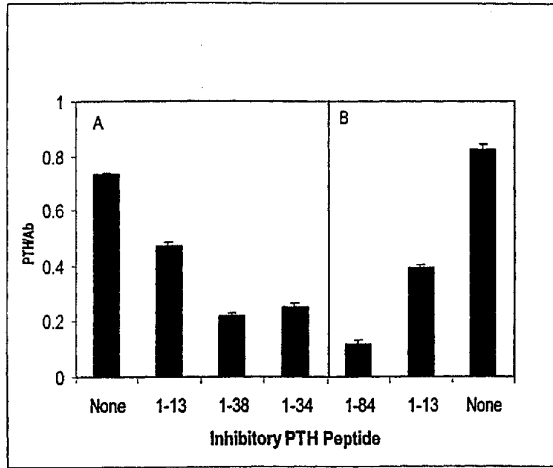


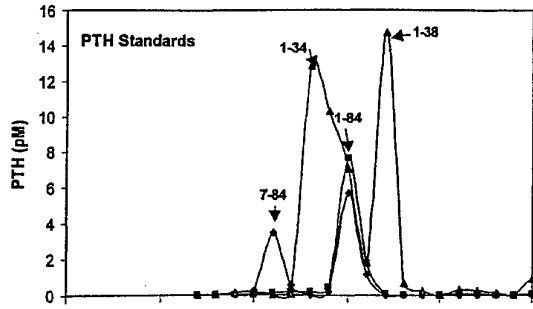
Figure 13

WO 03/003986

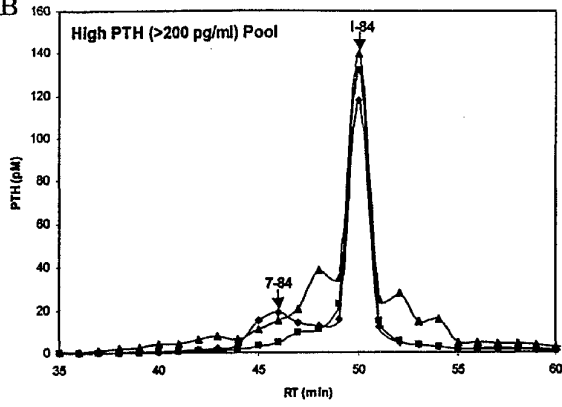
14/18

PCT/US02/21356

14 A



14 B

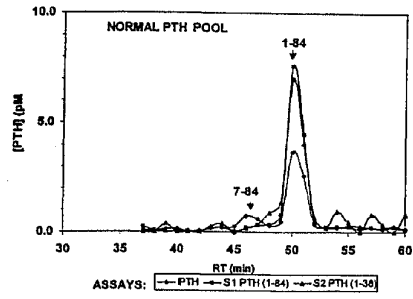


Assays:

—•— intact PTH —•— 1-84 PTH —•— 1-38 PTH

Figure 14

15 A



15 B

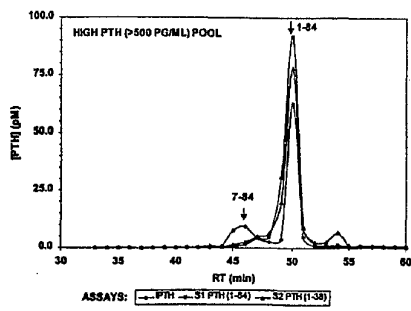
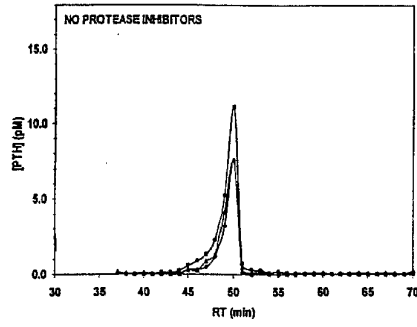


Figure 15

16 A



16 B

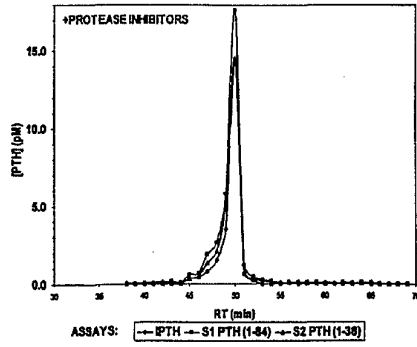
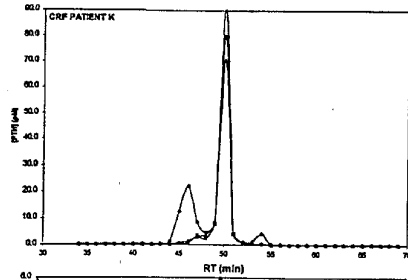
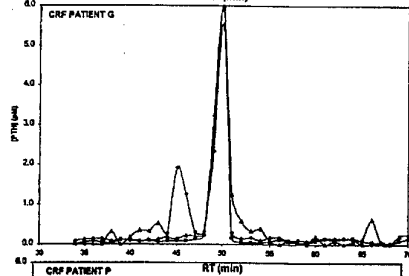


Figure 16

17 A



17 B



17 C

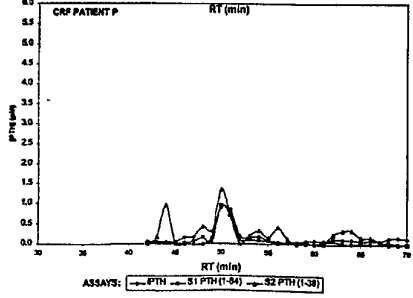


Figure 17

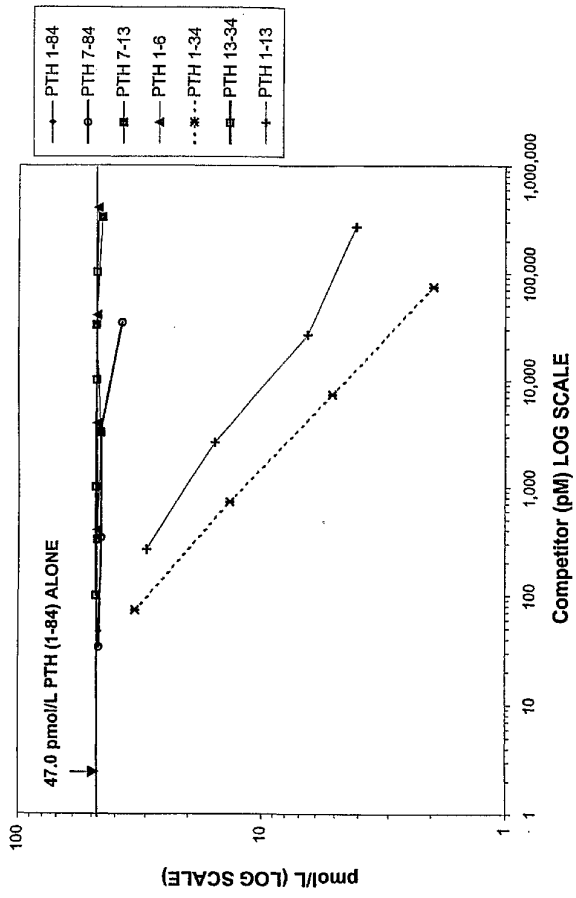


Figure 18

WO 03/003986

PCT/US02/21356

SEQUENCE LISTING

<110> Hutchison, James Scott
 <120> PARATHYROID HORMONE ANTIBODIES AND RELATED METHODS
 <130> A1713
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
 1 5 10 15
 Ser 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 Ser
 35 40 45
 Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Ser His Glu
 50 55 60
 Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys Ala Asp Val Asn Val Leu Thr Lys
 65 70 75 80
 Ala Lys Ser Gln
 <210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

WO 03/003986

PCT/US02/21356

<400> 2

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly Lys
1 5 10

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Cys His Asn Leu Gly Lys
1 5 10

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Cys His Asn Leu Gly Lys
1 5 10

WO 03/003986

PCT/US02/21356

<210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Cys His Asn Leu Gly Lys
1 5 10

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Cys His Asn Leu Gly Lys
1 5 10

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization International Bureau



(43) International Publication Date 16 January 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number WO 2003/003986 A3

(51) International Patent Classification: A61K 39/395, C07K 16/26, C12P 21/08, G01N 33/53, 33/543, 33/74

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) International Application Number: PCT/US2002/021356

(22) International Filing Date: 3 July 2002 (03.07.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/898,398 3 July 2001 (03.07.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant: QUEST DIAGNOSTICS INVESTMENTS INCORPORATED [US/US]; 300 Delaware Avenue, Wilmington, DE 19899 (US).

Published: with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of amendments

(72) Inventor: HUTCHISON, James, Scott; 2 Celano Court, Newport Beach, CA 92657 (US).

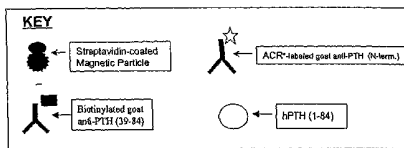
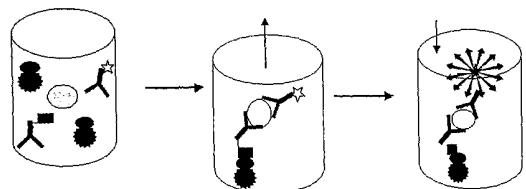
(88) Date of publication of the international search report: 1 July 2004

(74) Agents: STOUT, Donald, E. et al.; Stout, Uaa, Buyan & Mullins, 4 Venture, Suite 300, Irvine, CA 92618 (US).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

(54) Title: PARATHYROID HORMONE ANTIBODIES AND RELATED METHODS



(57) Abstract: Methods of preparing antibodies that recognize and bind three-dimensional epitopes of antigens are disclosed. The methods are particularly useful for preparing antibodies that bind the bioactive, three-dimensional amino terminus of parathyroid hormone. The antibodies so produced are used in diagnostic (Fig.1) and therapeutic applications.

WO 2003/003986 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/21356
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 29/38; C07K 16/26; C12P 21/08; G01N 33/53; 33/543, 33/74 US CL : 424/143.1, 158.1; 435/7.1, 7.94, 331, 336; 436/518, 524, 526, 528, 547, 172; 530/387.3, 387.9, 391.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Continuation Sheet		
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KURONEN et al. Hen Egg Yolk Antibodies Purified by Antigen Affinity under Highly Alkaline Conditions Provide New Tools for Diagnostics. Human Intact Parathyroid as a Model Antigen. European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. 1997, Vol. 35, No. 6, pages 435-440, see entire document, especially pages 436-437 and Fig. 2.	1-15,18,19,21,23-25,27,29,30,32-35,37,38,40,42-47,49,50,52-55,58 1-61
X	BROWN et al. Comparison of Poly- and Monoclonal Antibodies as Labels in a Two-Site Immunochemiluminometric Assay for Intact Parathyroid Hormone. Journal of Immunological Methods. 1988, Vol. 109, pages 139-144, see entire document.	1-4,6-15,23-25,27,29,30,32-35,37,38,40,42-47,49-55,60
Y	GAO et al. Measuring the Biologically Active or Authentic Whole Parathyroid Hormone (PTH) with a Novel Immunoradiometric Assay without Cross-Reaction to the PTH(7-84) Fragment. Journal of Bone and Mineral Research. September 1999, Vol. 14, Supplement 1, page S446, Abstract SU037, see entire document.	1-61
<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	*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	
B earlier application or patent published on or after the international filing date	*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	
I 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)	*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 combinations being obvious to a person skilled in the art	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 12 November 2003 (12.11.2003)	Date of mailing of the international search report 21 APR 2004	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer James L. Grun, Ph.D. Telephone No. 703-305-0196	<i>Della Callen for</i>
Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/U802/21356
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GAO et al. Immunochemiluminometric Assay with Two Monoclonal Antibodies Against the N-Terminal Sequence of Human Parathyroid Hormone. <i>Clinica Chimica Acta</i> . 1996, Vol. 245, pages 39-59, see entire document.	1-61
Y	JOHN et al. A Novel Immuradiometric Assay Detects Full-Length Human PTH but not Amino-Terminally Truncated Fragments: Implications for PTH Measurements in Renal Failure. <i>The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism</i> . 1999, Vol. 84, No. 11, pages 4287-4290, see entire document.	1-61
Y	IMMUTOPICS INTERNATIONAL. Intact-PTH [Parathyroid Hormone] ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay]. Specific Quantitative Assay for the Determination of Intact Parathyroid Hormone in Serum. Package Insert, Catalog #80-3000. 23 December 1997, pages 1-13, see entire document, especially page 2.	1-61
A	JIN et al. Crystal Structure of Human Parathyroid Hormone 1-34 at 0.9-A Resolution. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> . 01 September 2000, Vol. 275, No. 35, pages 27238-27244.	1-61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/21356

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 1:
424/145.1, 158.1; 435/7.1, 7.92, 7.94, 70.21, 432, 328, 331, 336; 436/518, 524, 526, 528, 547, 172; 530/387.3, 387.9, 388.24, 389.2, 391.3

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
DIALOG, EAST
search terms: parathyroid hormone, parathormone, parathyrin, human, antibody, imraniz?

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/76	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 30/88	G 0 1 N 21/76	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/53	B
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/543	5 4 1 B
	G 0 1 N 33/543	5 4 5 Z
	G 0 1 N 33/543	5 7 5

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 ハッチソン ジェイムス スコット

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 6 5 7 ニューポート ビーチ セラノ コート 2

Fターム(参考) 2G054 AB04 BB04 CA23 CE02 EA01 EA03

4C085 AA13 AA14 BB07 CC02 CC22 CC23 GG01 GG02 GG03 GG04

GG08

4H045 AA11 AA20 CA40 DA76 EA20 EA50 FA71 GA26

专利名称(译)	甲状旁腺激素抗体及相关方法		
公开(公告)号	JP2004536831A	公开(公告)日	2004-12-09
申请号	JP2003510000	申请日	2002-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	在莱茵公寓公司Quest Diagnostics公司		
申请(专利权)人(译)	在莱茵公寓公司Quest Diagnostics公司		
[标]发明人	ハッチソングェイムスコット		
发明人	ハッチソン ジェイムス スコット		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P3/14 A61P5/20 A61P43/00 C07K16/26 C12P21/08 G01N21/76 G01N30/88 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/78 C07K16/26 C07K2317/34 G01N2333/635		
FI分类号	C07K16/26 A61K39/395.N A61K39/395.ZNA.D A61P3/14 A61P5/20 A61P43/00.111 G01N21/76 G01N30/88.J G01N33/53.B G01N33/53.D G01N33/543.541.B G01N33/543.545.Z G01N33/543.575		
F-TERM分类号	2G054/AB04 2G054/BB04 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB07 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA26		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	09/898398 2001-07-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种制备识别和结合抗原三维表位的抗体的方法。该方法特别适用于制备与甲状旁腺激素的生理活性三维氨基末端结合的抗体。由此产生的抗体用于诊断和治疗应用。

