

(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2015-513538
(P2015-513538A)

(43) 公表日 平成27年5月14日(2015.5.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
CO7K 16/26 (2006.01)	CO7K 16/26	2GO41
CO7K 1/22 (2006.01)	CO7K 1/22	4HO45
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	B
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543	5O1D
GO1N 30/88 (2006.01)	GO1N 30/88	2O1R

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-558135 (P2014-558135)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月22日 (2013. 2. 22)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月15日 (2014. 10. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/053632
 (87) 国際公開番号 W02013/124462
 (87) 国際公開日 平成25年8月29日 (2013. 8. 29)
 (31) 優先権主張番号 12156441.3
 (32) 優先日 平成24年2月22日 (2012. 2. 22)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 514212788
 イムーンダイアグノスティック・アー・ゲ
 ー
 ドイツ国、64625・ベンスハイム、シ
 ュトゥーベンバルト-アレー・8・アー
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 アルムブルステル, フランツ・パウル
 ドイツ国、64625・ベンスハイム、シ
 ュトゥーベンバルト-アレー・8・アー、
 イムーンダイアグノスティック・アー・ゲ
 ー

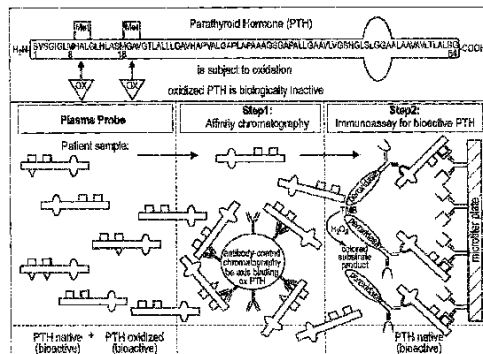
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酸化的ストレスに苦しむ患者の上皮小体ホルモンを測定する手段および方法

(57) 【要約】

酸化した、不活性ヒト上皮小体ホルモンおよびこの断片に特異的な立体構造エピトープに対する抗体または抗体断片を得る方法；酸化した、不活性ヒト上皮小体ホルモンを体液の試料から除去する方法；試料中の活性上皮小体ホルモンの濃度を決定する方法、ならびに透析中の患者における腎不全または二次性甲状腺機能亢進症を診断するインビトロ法。抗体は、8、18位またはこの両方のメチオニンが酸化された上皮小体ホルモンまたはこの断片を含有する免疫原により動物を免疫化するステップ、および抗体を回収するステップによって得られ、抗体または抗体断片または一本鎖抗体の相補性決定領域は、通常の生物活性ヒト上皮小体ホルモンではなく、酸化上皮小体ホルモンおよびこの断片のみに存在する三次構造の立体構造エピトープ（抗原決定基）を特異的に認識し、一方、相補性結合領域に対する結合表面はヒト上皮小体ホルモンの酸化メチオニンを1つも含まない。

FIG. 1B



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

不活性ヒト上皮小体ホルモン（hPTH）ペプチドおよびこの循環断片に特異的な抗体分子を得るための方法であって、

a) ハプテンとして酸化上皮小体ホルモンまたは上皮小体ホルモンの酸化断片を含む免疫原により非ヒト動物を免疫化することによってヒト上皮小体ホルモンペプチドに対する抗体を得て、前記抗体を非ヒト動物から回収するステップ、

b) 生理的条件下で生物活性ヒト上皮小体ホルモンペプチドに結合する抗体分子から抗体を選択または精製して、酸化上皮小体ホルモンまたはこの断片を特異的に認識する抗体を得るステップ、

c) 8、18位またはこの両方におけるメチオニンR-スルホキシド、メチオニンL-スルホキシドまたはメチオニンスルホンから独立して酸化hPTHペプチドに結合している抗体から酸化上皮小体ホルモンに対する抗体を選択または精製して、酸化ヒト上皮小体ホルモンペプチドおよびこの循環断片の立体構造エピトープ（三次タンパク質構造）に特異的に結合する相補性決定領域を有する抗体分子を得るまたは単離するステップを含む、方法。

10

【請求項 2】

22位に酸化トリプトファンを含むhPTHアミノ酸配列（一次タンパク質構造）または1もしくは2位もしくはこの両方における最端アミノ末端アミノ酸を欠くhPTHアミノ酸配列に対する抗体分子の結合によって、抗体分子をさらに選択または精製するステップを含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 3】

抗体が、抗体産生細胞クローン、マウスまたはラットB-細胞クローンから得られる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

抗体が、合成抗体ライブラリーのクローンによって発現された組換え抗体、抗体断片または一本鎖抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

免疫原が、ハプテンとして、合成酸化ヒト上皮小体ホルモン、ヒト上皮小体ホルモンの合成酸化断片またはヒト上皮小体ホルモンのアミノ酸配列1から38を含む合成酸化ペプチド、またはこれらの実質的な部分、断片もしくはバリエーションのいずれか1つが結合している担体タンパク質である、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 6】

抗体が、固相またはマーカー分子に連結した合成酸化hPTHペプチドの断片を使用してアフィニティークロマトグラフィーによって精製または選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

立体構造エピトープが、ヒト上皮小体ホルモンのアミノ酸配列3から34から構成される、請求項1から6のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

請求項1から7のいずれかに記載されたようにして精製された抗体または抗体断片または一本鎖抗体断片が固相に結合している、試験試料から酸化的に不活性化されたヒト上皮小体ホルモンを除去するための結合物質。

40

【請求項 9】

スラリーの形態である、請求項8に記載の結合物質。

【請求項 10】

体液の試料中のヒト上皮小体ホルモンの濃度を測定する方法であって、試料を請求項8または9に記載された固相またはスラリーと最初に接触させるステップ、およびフロースルーまたは上清中の上皮小体ホルモンの濃度を測定するステップを含む、方法。

【請求項 11】

50

体液の試料中のヒト上皮小体ホルモンの濃度を測定する方法であって、2サイトイムノアッセイによって上皮小体ホルモンの濃度を測定するステップを含み、2つの抗体のうちの1つがアミノ末端部分において上皮小体ホルモンのアミノ酸1から34と結合する、方法。

【請求項12】

体液の試料中のヒト上皮小体ホルモンの濃度を測定する方法であって、タンデム質量分析によって上皮小体ホルモン断片の濃度を測定するステップを含む、方法。

【請求項13】

インビトロで二次性上皮小体機能亢進症、腎不全またはこの両方を決定するための方法における、請求項1から12のいずれかに記載の結合物質もしくは抗体または方法の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、体液の試料中の上皮小体ホルモンの濃度を測定する手段および方法に関する。

【背景技術】

【0002】

上皮小体ホルモン（PTH）は副甲状腺（上皮小体（Glandulae parathyroideae））において形成され、血液循環中に分泌される。インタクトな形態において、この上皮小体ホルモンは、84個のアミノ酸および約9500ダルトンの分子量を有する単一ポリペプチド鎖からなる（SWISS-PROT：P01270、PTH Y-HUMANを参照のこと。）。ビタミン-Dおよびカルシトニンと一緒に、この上皮小体ホルモンは骨格からカルシウムおよびリン酸塩の動員をもたらし、腸内のカルシウムの取り込みおよび腎臓を介するリン酸塩の排出を増加させる。したがって、血漿または血清中の生物学的に活性なPTHペプチドの濃度は、上皮小体機能亢進症もしくは上皮小体機能低下症の存在および程度を決定するための；骨芽細胞および/もしくは破骨細胞活性を定量するための；ビタミン-Dおよびビタミン-D代謝産物による治療のための；閉経後透析患者におけるアルミニウムもしくは起こり得るエストロゲン欠乏の存在を推定するための；腎移植術または病理学的骨髄変化、尿毒症病態および慢性腎不全の治療もしくは予防の後のステロイドもしくはシクロスポリン用量を決定するための、重要な診断パラメーターである。

20

30

【0003】

二次性上皮小体機能亢進症はさらに、腎機能の悪化に対する適応反応として慢性腎疾患において高い頻度で生じる。これは、循環している1,25-ジヒドロキシビタミンDが慢性腎疾患のステージ2において非常に早期に減少し始め、糸球体濾過率（GFR）がさらに減少するにつれて下がり続け、腎臓の1-ヒドロキシラーゼが、高リン血症、高尿酸血症、代謝性アシドーシスおよび25-ヒドロキシビタミンD欠損によって阻害されるためである。GFRが60mL/分/1.73・m²以下に減少すると、リン酸塩は保持され、PTHの分泌を刺激する。GFRが50mL/分/1.73・m²以下に減少すると、低カルシウム血症が発症し、PTHの放出をさらに刺激する。疾患進行と共に、インタクトなPTH（aa 1-84）半減期は増加し、ホルモンのC末端断片が血清中に蓄積する。ホルモンに対する末端器官抵抗の関連状態が存在するが、この慢性的上昇は、特に皮質骨の骨量の減少、骨折、血管石灰化、心血管疾患を生じる重大な結果となり、それ故、心血管死亡率が増加する（Fraser WD、「Hyperparathyroidism」、Lancet、2009、374、145fを参照のこと。）。したがって、血清中の生物学的に活性なPTHペプチドの濃度を決定する確実な方法が、上皮小体機能亢進症を有する患者を検出するため、および治療介入の後のモニタリングのために重要となる。

40

【0004】

血清中のPTHを測定するための、第一世代のイムノアッセイは、放射性標識ウシPTH

50

Hペプチドおよび上皮小体ホルモンに対するポリクローナル抗血清に基づくものであった (Berson SAら、Proc Natl Acad Sci USA、1963、49、613-617)。生物活性はPTHペプチドのアミノ末端部分に位置し、循環内へのこの分泌後、PTHペプチドが活性および不活性断片内で数分以内に分解されると、ラジオイムノアッセイにより不活性分解産物も検出していた。したがって、第一世代のPTHアッセイは、確実な臨床的測定値を生み出さなかった。なぜなら、腎不全を有する患者の血清は高濃度の不活性PTH断片を含有しているからである。

【0005】

第二世代のイムノアッセイは2つの抗体を使用し、一方は生物活性を有するPTHペプチドのアミノ末端部分において結合し、他方はこのC末端部分において結合している。しかしながら、合成断片を用いた特性付けにより、これらのイムノアッセイが不活性の大きなPTH(aa 7-84)断片も決定することが示された(John MRら(1999)、J. Clin. Endocrinol. Metab.、84、4287-4290; Gao Pら 2000、Poster M455、ASBMR 22nd Annual Meeting; Roth HJら(2000)、Poster P1288、11th International Congress of Endocrinology、Sydney)。大きなPTH断片はPTH受容体の結合部位についてインタクトなPTHペプチドとおそらく競合するので、不活性の大きなPTH断片(7-84)のこの同時決定が、測定したPTH濃度と臨床所見との不一致の原因とされた。

【0006】

第三世代のPTHアッセイが不活性の大きなPTH断片に関する問題を克服するために開発されたが、これは尿毒症患者における骨疾患または二次性上皮小体機能亢進症の他の臨床徴候の診断を改善することができない(Brossard JHら、「Influence of glomerular filtration rate on non-(1-84) parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assays」、Clin Chem. 2000、46、697-703)。測定における定誤差または骨芽細胞のPTH耐性またはPTH受容体の遺伝的に減少した発現に関しての推測がなされている。

【0007】

要約すると、上皮小体ホルモンは、活性および不活性断片に数分以内で肝臓、腎臓および循環内において切断されること、ならびに一部の断片はインタクトなPTHペプチドと同程度である生物活性を有するのに対して、hPTH(3-34)などの他の断片は上皮小体ホルモンの効果を阻害するよう見えることが当該分野において一般に認められている(EP-A0349545、Schmidt-Gaykら(1999) Osteologie forum、5、48-58)、Suvaら(1987) Science、237、893ff、EP0451867を参照のこと。)。さらに、この大きなPTH non-(1-84)断片は誤った決定を導く場合がある(LePage R.ら(1998) Clin. Chem.、44、805-809)。「大きなPTH断片」という用語は、アミノ末端においてアミノ酸残基を欠いているが、第二世代のPTHアッセイにより検出されるPTH断片のために作られている。さらに、ジペプチジルペプチダーゼ-4(DPP4)は多くの細胞種類の表面上に発現され、かなり無差別なセリンエキソペプチダーゼである。これが、PTHがさらにインビボでDPP4の基質であるまたは同様のエキソプロテイナーゼであるという仮説をもたらした。この結果として、最端の2個のアミノ末端アミノ酸を欠失している生物学的に活性なPTHペプチドと生物学的に不活性なPTHペプチドとを識別できる抗体を利用する2サイトイムノアッセイ(two-site immunoassay)が開発された(WO2001/44818(Armbusterら)、WO96/10041(Magerleinら)、WO2003/03986(Hutchison JS)を参照のこと。)

【0008】

しかしながら、尿毒症患者の血清試料は、不活性であるインタクトなPTHポリペプチ

ド鎖を含有し得ることが見出された。なぜなら、PTHポリペプチド鎖はこのメチオニンの1つにおいて酸化されるからである。このような種類の酸化は、血漿が酸化的ストレスに曝露されている透析患者に特に関係しているように見える。これが、非酸化PTH(a a 1 - 84)およびこの生物学的に活性な断片を決定するためのイムノアッセイの開発をもたらした(WO2002/082092)。それにも関わらず、正常な骨変質を有する尿毒症患者が時々、健康な腎臓を有する患者におけるよりも2.5倍超高いインタクトなPTHの血清レベル(健康な腎臓を有する患者の場合の病理学的限度: 65 μg PTH/L; 尿毒症病態を有する患者について: 165 μg PTH/L血清)を有する理由を確かめる必要がある。さらに、比較的高いPTH値を有する尿毒症患者はしばしば骨変質において顕著な相違を現す(Slatopolsky Eら(2000)、Kidney Int.、58、753-761)。したがって、これらの患者はしばしば血清中で8から10倍高いPTH濃度を有するが、骨特異的アルカリ性ホスファターゼ(オスターゼ(ostease))について低い正常値を有する。これらの患者は過剰なPTH活性の症状がないように見える。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】欧州特許出願公開第0349545号明細書

【特許文献2】欧州特許出願公開第0451867号明細書

【特許文献3】国際公開第2001/044818号

【特許文献4】国際公開第96/10041号

【特許文献5】国際公開第2003/003986号

【特許文献6】国際公開第2002/082092号

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】SWISS - PROT: P01270、PTHY - HUMAN

【非特許文献2】Fraser WD、「Hyperparathyroidism」、Lancet. 2009、374、145f

【非特許文献3】Berson SAら、Proc Natl Acad Sci US A. 1963、49、613-617

【非特許文献4】John MRら(1999)、J. Clin. Endocrinol. Metab.、84.4287-4290

【非特許文献5】Gao Pら 2000、Poster M455、ASBMR 22nd Annual Meeting

【非特許文献6】Roth HJら(2000)、Poster P1288、11th International Congress of Endocrinology、Sydney

【非特許文献7】Brossard JHら、「Influence of glomerular filtration rate on non-(1-84) parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assays」、Clin Chem. 2000、46、697-703

【非特許文献8】Schmidt-Gaykら(1999) Osteologie forum、5、48-58

【非特許文献9】Suvaら(1987) Science、237、893ff

【非特許文献10】LePage R.ら(1998) Clin. Chem.、44、805-809

【非特許文献11】Slatopolsky Eら(2000)、Kidney Int.、58、753-761

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

したがって、当該技術水準は依然として問題となっている。さらに、本発明の目的は、体液の試料中の活性化上皮小体ホルモンを決定するための迅速で確実な方法であって、特に腎機能の悪化の早期検出を可能にする、方法を利用可能にすることである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 2 】

(発明の要旨)

この問題は、誤って折り畳まれた不活性化ヒト上皮小体ホルモンおよびこの断片に特異的な立体構造エピトープに対する抗体または抗体断片を得る方法であって、a) 酸化上皮小体ホルモンもしくは上皮小体ホルモンの酸化断片またはこの両方を含む免疫原により動物を免疫化するステップ、およびb) 抗体を回収するステップを含み、抗体または抗体断片または一本鎖抗体の相補性決定領域が、通常の生物活性ヒト上皮小体ホルモンではなく、酸化上皮小体ホルモンおよびこの断片に存在する立体構造エピトープ(抗原決定基)のみを特異的に認識する、方法によって解決される。

10

【 0 0 1 3 】

本開示はさらに、8、18位またはこの両方にメチオニンR-スルホキシド、メチオニンL-スルホキシドまたはメチオニンスルホンを含む、ヒト上皮小体ホルモンまたはこの断片により提示される立体構造エピトープを認識する相補性決定領域に関する。相補性決定領域はまた、22位に酸化トリプトファンを含むならばに/または1および2位もしくはこの両方において最端アミノ末端アミノ酸を欠くヒト上皮小体ホルモンまたはこの断片の立体構造エピトープを認識できる。明確化のために言うと、これは、アミノ酸配列の8、18または22位に酸化アミノ酸を含むヒト上皮小体ホルモンまたはこの断片である。このことは、立体構造エピトープが、これらの酸化アミノ酸のいずれか1つを含む一次構造から構成されていることを意味しておらず、立体構造エピトープは、別の三次構造に反転している酸化PTH配列により形成された三次構造であり、立体構造エピトープは、この別の三次構造の特徴的な部分である、この理由のため、それぞれの抗体または抗体断片が全ての種類の酸化されたまたは誤って折り畳まれたPTH構造を認識する。

20

【 0 0 1 4 】

開示された抗体はモノクローナルマウスまたはラット抗体であってもよい。好ましくは不完全フロイント(鉱油のみ)と共に与えられる抗原投与のための好ましい免疫原は、ハプテンとして、合成酸化ヒト上皮小体ホルモン、ヒト上皮小体ホルモンの合成酸化断片またはヒト上皮小体ホルモンのアミノ酸配列1から38を含む合成酸化ペプチドまたはこれらの実質的な部分、断片もしくはバリエーションのいずれか1つが結合している担体タンパク質である。この抗原投与により誘発される抗体は、固相またはマーカ分子に連結した合成酸化ヒト上皮小体ホルモンの断片を使用したアフィニティークロマトグラフィーにより単離され得るまたはスクリーニングされ得る。抗体のスクリーニングまたは単離は、8位におけるメチオニンがおそらく最初に酸化されるアミノ酸配列3から34を好ましくは含む、酸化ヒト上皮小体ホルモンまたはこの断片によって構成されている立体構造エピトープを使用して行われる。

30

【 0 0 1 5 】

本開示のさらなる態様は、透析中の患者の血清試料などの試料から酸化ヒト上皮小体ホルモンを除去するための結合物質であって、上記に開示されている、抗体または抗体断片または一本鎖抗体断片が固相に結合している、結合物質を含む。結合物質は、スラリー、好ましくは酸化PTHおよびこの断片に対して共有結合した立体構造抗体を有するセファロースビーズのスラリーの形態であってもよい。

40

【 0 0 1 6 】

本開示の別の態様は、体液の試料中のヒト上皮小体ホルモンの濃度を測定する方法であって、試料を、酸化上皮小体ホルモンを認識する抗体を含む、記載されている固相またはスラリーと接触させるステップ、およびフロースルーまたは上清中の上皮小体ホルモンの濃度を測定するステップを含む、方法に関する。

50

【 0 0 1 7 】

体液の試料中のヒト上皮小体ホルモンの濃度を測定する方法は、2サイトイムノアッセイによって上皮小体ホルモンの濃度を測定するステップを含んでもよく、ここで1つの抗体がアミノ末端部分において上皮小体ホルモンのアミノ酸1から34と結合する。

【 0 0 1 8 】

本開示は、試料中のヒト上皮小体ホルモンの濃度を測定する方法であって、場合によって現代液体クロマトグラフィーが先行する、タンデム質量分析によって上皮小体ホルモン断片の濃度を測定するステップを含む、方法をさらに包含する。

【 0 0 1 9 】

本開示の別の態様は、特に、インビトロで二次性上皮小体機能亢進症、腎不全またはこの両方を決定するための診断方法において先行する請求項のいずれかに記載されている結合物質もしくは抗体の使用または方法に関する。

10

【 0 0 2 0 】

本発明は、好ましい実施形態を例示するのに役立つ、付随の表および図面と併せて読まれる場合、最適に理解される。しかしながら、本発明は図面に開示されている特定の実施形態に限定されないことは理解される。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 1 】

【 図 1 A 】メチオニンならびにこの酸化形態のメチオニンスルホキシドおよびメチオニンスルホンの式を示す図である。成熟PTHのポリペプチド鎖内の8および18位に2つのメチオニンが存在する。

20

【 図 1 B 】ヒト試料中の上皮小体ホルモンを測定する新規方法を示す概略図である。

【 図 2 A 】非消化酸化合成分PTH(1-84)oxのNanoLC-ESI-FTMS全イオンクロマトグラムである。

【 図 2 B 】保持時間間隔18.30から20.50分についての拡大した合計FTMSスペクトルを示す図である。このスペクトルはPTHoxおよびこの断片に属するいくつかの異なる荷電した分析物イオンを含む。

【 図 3 A 】酸化合成分PTH(1-84)oxを結合するアフィニティカラムからのフロースルー画分のNanoLC-ESI-FTMS全イオンクロマトグラムである。

【 図 3 B 】16.50~18.50分の保持時間間隔についての拡大した合計FTMSスペクトルを示す図である。このスペクトルはPTHまたは酸化PTHに属するいかなる分析物質量も示さない。

30

【 図 4 A 】非消化酸化合成分PTH(1-84)oxを含むアフィニティカラムからの溶出液のNanoLC-ESI-FTMS全イオンクロマトグラムである。

【 図 4 B 】PTHのいくつかの異なる荷電した分析物イオンを含む16.50-18.50分の保持時間間隔についての拡大した合計FTMSスペクトルを示す図である。

【 図 5 - 1 】比較のために、非消化酸化合成分PTH(1-84)oxを含む出発原料(図1B)およびアフィニティカラムに結合した後の対応する溶出液(図3B)の拡大したスペクトルを示す図である。

【 図 5 - 2 】比較のために、非消化酸化合成分PTH(1-84)oxを含む出発原料(図1B)およびアフィニティカラムに結合した後の対応する溶出液(図3B)の拡大したスペクトルを示す図である。

40

【 図 6 】透析中の患者の血清中において直接決定された「インタクトなPTH値」(青い棒)(さらなる詳細に関して表2も参照のこと。)、ならびに試料から誤って折り畳まれたおよび酸化されたPTHペプチドを除去した後を比較している棒グラフである。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 2 】

メチオニン残基8および/または18における上皮小体ホルモン(PTH)ペプチドの酸化の結果、生物活性の損失を生じる。(Galceranら、「Absence of biological effects of oxidized parath

50

roid hormone - (1 - 34) in dogs and rats」、Endocrinology 1984、115(6)、2375 - 2378。Horiiuchi Nら、「Effects of oxidation of human parathyroid hormone on its biological activity in continuously infused, thyroparathyroid-ectomized rats」、J Bone Miner Res 1988、3(3)、353 - 358。Zull JEら、「Effect of methionine oxidation and deletion of amino-terminal residues on the conformation of parathyroid hormone」、Circular dichroism studies、J Biol Chem 1990、265(10)、5671 - 5676)。このように、独立群による研究により、PTHの酸化がそれぞれの受容体とのこの相互作用を減少させること、および酸化PTHペプチドがPTHの第2のメッセンジャーであるcAMPを生成するためにPTH受容体を刺激できないことが示されている。WO2002/082092 (Roth HJら)は、酸化PTHと「生物活性PTH」とを区別できる2サイトイムノアッセイを開示しており、この2サイトイムノアッセイにおいて、酸化メチオニン8または18に結合するマスキング抗体が添加され、それにより2サイトイムノアッセイの抗体は、立体障害に起因して上皮小体受容体結合ドメインを含む近接部位にもはや結合できない。さらなる研究により、多数の反応性酸素種(ROS)が上皮小体ホルモンの酸化におそらく関与する問題に加えて、このようなマスキング抗体は、メチオニンの酸化が2つの異なる立体異性体、メチオニンS-スルホキシド(Met-S-O)および硫黄がキラル中心であるメチオニンR-スルホキシド(Met-R-O)またはさらにメチオニンスルホン(MetO₂)を生じ、それによりこのような抗体は過剰の一次構造に結合しなければならないという免疫学的問題を克服しなければならないことが示された。

【0023】

メチオニンスルホキシド酸化は、グルタチオン、ヒスチジンジペプチド、尿酸、ビリルビン、アスコルビン酸またはトコフェロールなどの低分子量抗酸化物質(LMWA)によってインビボで阻害される。一旦、Met-S-OおよびMet-R-Oを含むPTHが酸化されると、内因性メチオニンスルホキシドレダクターゼA型(MRSA)がMet-R-OではなくMet-S-Oのみを還元し得る。メチオニンスルホキシドエピメラーゼがあるまたはMet-R-Oを還元するための他の経路があるかに関わらず、立体異性体は示されたままである。このように、酸化がMet-S-O、Met-R-OまたはMetO₂を生じるかどうかに応じて、PTHの酸化は部分的にのみ可逆的である。しかしながらMetO₂への酸化は可逆的ではない。しかしながら、酸化メチオニンは疎水性が低く、極性が高いので、PTHのいずれかのメチオニン酸化がこのフォールディングおよび三次構造に影響を与えることが本発明者らによって発見された。このことは、臨床診療において従来から使用されているインタクトなPTHアッセイが、PTH関連の骨および心臓血管の異常をあまり反映していない理由を説明できる。

【0024】

本開示は、酸化されたまたは誤って折り畳まれたPTHポリペプチドの全ての形態を、例えば、酸化的ストレスおよび/またはメチオニン酸化に起因する新たな三次構造を取る全てのPTH分子を、血清または血漿試料から除去するための迅速で確実な方法を提供する。本開示は、透析中の患者に特に重要である血清試料中の正確に折り畳まれた生物活性PTH分子の量または濃度を測定する方法を提供している。以下の例において、本発明者らは、酸化的ストレスに曝露されていることが知られている患者集団：末期：間欠的血液透析中の腎疾患患者(Witko-Sarsat Vら、「Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia」、Kidney Int.、1996年5月、49(5)、1304 - 13)において、本明細書に開示され

ている方法およびアッセイの戦略を使用した。本開示は、PTHを測定する確立された方法が全体的に、PTHのフォールディングおよび酸化状態を検討した結果と比較して活性PTHの高すぎる血漿濃度を生じることを実証している。さらに、従来のPTH測定と、全ての酸化されたおよび誤って折り畳まれたPTHポリペプチド鎖の除去後の測定との間の相関関係は非常に弱いことが判明した。

【0025】

本開示は、上皮小体ホルモンのアミノ酸配列3から34を少なくとも含み、生物学的に不活性である、酸化上皮小体ホルモンおよびこの断片の全ての形態に特異的である共通の立体構造エピトープに対する抗体をさらに提供している。この定義は、酸化ヒト上皮小体ホルモンの全ての形態、特にoxPTH(aa 1-84)、oxPTH(aa 1-52)、oxPTH(aa 1-34)、oxPTH(1-36)、oxPTH(aa 1-37)、oxPTH(1-38)、oxPTH(aa 3-84)、oxPTH(aa 3-38)などを包含する。したがって、誤って折り畳まれたおよび/または酸化されたヒト上皮小体ホルモンの特異的な立体構造エピトープは、上皮小体ホルモンのアミノ末端部分に存在する構造から構成される。ヒト上皮小体ホルモンの全ての酸化形態は、不活性であって、誤って折り畳まれているように見える。したがって、本開示は、ヒト上皮小体ホルモンのアミノ末端部分が生物学的に不活性である別の三次構造に反転できる情報を含む。代替的構造フリップは、第2の最端もしくはアミノ末端におけるより多く(6個)のアミノ酸の削除によって、または8、18位もしくはこの両方におけるメチオニン残基の酸化(この酸化はメチオニンの疎水性側鎖をより極性および親水性にする。)によって、またはさらに23位におけるトリプトファンの酸化によってももたらされる可能性がある。しかしながら、血清中の少ない量の上皮小体ホルモンの起因して、これらの「分解または不活性機構」のどちらが生理学的に十分に関係しているかは完全に全く不明確である。言い換えると、血清中の「大きなPTH断片」が、以前に酸化された上皮小体ホルモンの分解産物またはこの逆であるかどうか、および酸化が不活性化のための生物学的機構を指向するかどうかは依然として検査中である。

【0026】

本開示はまた、不活性化された、誤って折り畳まれたまたは酸化されたヒト上皮小体ホルモンの立体構造エピトープまたは抗原決定基に特異的に結合する抗体を得る方法に関する。本開示は、不活性化された、誤って折り畳まれたまたは酸化されたヒト上皮小体ホルモンを、血清、血漿または全血などの体液から除去するための試薬をさらに提供している。好ましい実施形態は、PTHの少なくともアミノ酸3から34を含む、不活性化された、酸化されたおよび/または誤って折り畳まれた上皮小体ホルモンまたはこの断片に特異的な立体構造エピトープを認識する共有結合した抗体を有するカラム材料に関する。本開示は、生物学的に活性なhPTH(aa 1-84)またはこの生物学的に活性な断片を認識しないが、上皮小体ホルモンのアミノ末端部分1から38における任意の1つの位置において、この部分が不活性で、この受容体に結合できない別の三次構造に反転するように修飾または酸化されている、不活性なPTHペプチドのみを認識する抗体を提供している。

【0027】

したがって、本開示は、患者、特に透析中で、反応性酸素種(ROS)および酸化的ストレスを受けている患者の血清または血漿中の活性上皮小体ホルモン濃度を測定する方法および手段を提供している。

【実施例】

【0028】

実施例1

hPTH(aa 1-84)の酸化

Bachem AG (Bubendorf, Switzerland) から購入した 200 μg のヒトPTH(1-84)を 400 μl の 0.1 M 酢酸(0.5 μg/μl の最終濃度)中に溶解し、30%過酸化水素と1:1で混合し、37 °Cにて45分間インキュ

10

20

30

40

50

ベートして、メチオニン 8、18 およびこの両方が酸化された PTH (1-84) ペプチドの混合物を得た。その後、混合物を氷上で冷却し、アリコートに分け、凍結乾燥した。

【0029】

hPTH (aa 1-38) コンジュゲートの酸化

ヒトPTH (aa 1-38) ペプチド (Art. No. A1105AG.1、Immunodiagnostik AG、Bensheim、Germany) をカルボジイミド法によってウシチレオグロブリン (thyreoglobulin) に結合し、1.0 ml の 0.1% 酢酸緩衝液、pH 5.0 中に溶解し、30% 過酸化水素と 1:1 で混合し、37 °C にて 18 時間インキュベートして、oxPTH (aa 1-38) コンジュゲートを得た。

10

【0030】

ビオチン-hPTH (aa 1-38) の酸化

ヒトPTH (aa 1-38) ペプチド (Art. No. A1105AG.1、Immunodiagnostik AG、Bensheim、Germany) を 1.0 ml の 0.1% 酢酸緩衝液、pH 5.0 中に溶解し、30% 過酸化水素と 1:1 で混合し、37 °C にて 2 時間インキュベートして、oxPTH (aa 1-38) ペプチドを得た。凍結乾燥後、oxPTH (aa 1-38) を、水溶性ビオチン-スルホスクシンイミジルエステルを使用してビオチンにコンジュゲートした。

【0031】

実施例 2

酸化PTH (aa 1-38) の立体構造エピトープに対するモノクローナル抗体

モノクローナル抗体を BALB/c - マウスにおいて産生させた。腹腔内空洞での不完全フロイント (鉱油のみ) による一次および二次免疫の両方のために、マウスを 200 μg にて oxPTH (aa 1-38) チレオグロブリンコンジュゲートにより免疫化した。抗血清の各々を非酸化ビオチン-hPTH (1-38) に対する結合について試験した。oxPTH (aa 1-38) ペプチドを特異的に認識する抗体を検出するために、本発明者らは二重抗体分離技術を使用し、トレーサーとして ¹²⁵I-ストレプトアビジンにより標識したビオチン-oxPTH (aa 1-38) を使用した。細胞融合および HAT 選択の後、選択したハイブリドーマを同じ方法、すなわちヒトPTH (aa 1-84) ではなくヒト酸化PTH (aa 1-84) に対する結合についてスクリーニングした。

20

30

【0032】

モノクローナル抗体 (MAB) の特異性の最終的な特性付けのために、ならびに酸化 hPTH (aa 1-38) ペプチドに共通している、例えば、酸化状態およびキラリティーから独立して酸化 hPTH (aa 1-38) の全ての形態 (8、18 位およびこの両方における Met-R-O、Met-S-O および MetO₂) に共通している立体構造エピトープを認識するモノクローナル抗体の識別のために、抗体を CNBr 活性化セファロース 4B (GE Healthcare Bio-Sciences、Uppsala、Sweden) 上で固定化した。スラリーの 100 μl アリコートをカラム (MobiSpin Column、MobiTec、Göttingen、Germany) に充填し、PBS 緩衝液、pH 7.4 により平衡化した。次いで 2.5 μg の凍結乾燥した酸化 hPTH (1-84) を 300 μl の平衡化緩衝液中に溶解し、カラムに適用した。カラムを室温にて 1 時間、回転させてインキュベートし、300 μl の平衡化緩衝液で洗浄し、続いて 300 μl の蒸留水で 3 回洗浄し、次いで 200 μl の溶出緩衝液 (0.1% TFA) により 2 回溶出した。カラムのフロースルー、洗浄画分 (平衡化緩衝液および水) および溶出液を別々に回収し、凍結乾燥し、nanoLC-ESI-FT-MS によって分析した。酸化 hPTH (aa 1-38) は、8、18 位またはこの両方で酸化した、様々な酸化 PTH 断片を規則的に生じるので、特定の種類のタンパク質酸化から独立して酸化上皮小体ホルモンに結合している抗体または抗体クローンを選択できる。この結果として、酸化 hPTH (aa 1-84) およびこの断片の全ての形態に存在する立体構造

40

50

エピトープを認識するモノクローナル抗体（「oxPTH-ConformAB」）をさらなる分析および特性付けのために選択した。選択したoxPTH-ConformABは、非酸化PTH（aa 1-84）ではなく、酸化されたおよび誤って折り畳まれたhPTH断片の全ての形態を高い親和性により特異的に認識した。

【0033】

実施例 3

nanolc-esi-ft-ms/ms

実施例1のヒトPTH（aa 1-84）の酸化を調べるために、試料を高分解能nanolc-esi-ft-ms/msによって直接分析して、全分子種の質量を決定し、3つのエンドプロテアーゼ（ArgC、LysCおよびキモトリプシン）による切断後、8および/または18位におけるメチオニン酸化を特性付けた。

10

【0034】

非消化ヒトPTH（aa 1-84）およびoxPTH（aa 1-84）試料を、2%ギ酸による酸性化後、nanolc-esi-ft-msに直接適用した。

【0035】

消化した酸化ヒトPTH（aa 1-84）試料（1nmol）を、30分間、20mMのTCEP（トリス[2-カルボキシル]-ホスフィン）還元剤を含有する8Mの尿素による消化前に変性させた。ヨードアセトアミドを50mMの最終濃度に添加し、混合物をさらに20分間、暗所にてインキュベートした。0.8Mの尿素に希釈した後、Proteome Factory、Berlin、DEのSOPに従って、試料をArgC、LysCおよびキモトリプシンのそれぞれにより消化した。酵素対タンパク質比（w/w）は各消化物において1:50であった。酸性化したペプチド消化物（ArgC、LysCおよびキモトリプシン）をプールし、溶媒A（0.1%ギ酸/5%アセトニトリル/94.9%ddH₂O）および溶媒B（0.1%ギ酸/99.9%アセトニトリル）を用いた35分のnanolc勾配（Agilent 1100nanolcシステム）を使用してnanolc-esi-ms（LTQ-FT、Thermo Scientific）分析に適用した。

20

【0036】

試験のために、実施例1の合成酸化hPTH（1-84）を、正確に折り畳まれたhPTH（この抗原決定基はメチオニンスルホキシドまたはメチオニンスルホンを含まない。）ではなく、oxhPTH（aa 1-84）および酸化hPTH（aa 1-38）ポリペプチド鎖に存在する抗原決定基のみに結合する特異的モノクローナルoxPTH-立体構造抗体（MAB）を含むカラム上でアフィニティークロマトグラフィーにかけた。nanolc-esi-ft-msによる試料中の酸化PTH分子の除去後、酸化hPTH（1-84）またはこの断片は全く検出できなかったため、所与の試料の全ての酸化PTH形態をイムノアフィニティークラム上でoxPTH-ConformABにより認識し、フロースルーから定量的に除去した。質量精度はMSデータについて5ppmより良かった。MSデータを、予測されたペプチド質量に従ってMASCOT（Matrix Science）およびQualbrowser（Thermo Scientific）によって分析した。結果を表1ならびに図2および3に示す。

30

【0037】

40

【表 1】

表1

非消化hPTH(a a 1-84)oxおよび溶出液(カラムに結合したoxPTH-断片)のスペクトルにおける荷電ピークの推定質量

質量 [M/Z]	荷電 Z	MW [DA]	MW 増加
728.16	13	9453.08	+32
729.39	13	9469.07	+48
730.62	13	9485.06	+64
731.85	13	9501.05	+80
780.50	12	9354.00	+32
781.83	12	9369.96	+48
783.17	12	9386.04	+64
788.76	12	9453.12	+32
790.09	12	9469.08	+48
791.42	12	9485.04	+64
792.75	12	9501.00	+80
851.36	11	9353.96	+32
852.82	11	9370.02	+48
854.27	11	9385.97	+64
860.28	11	9452.08	+32
861.73	11	9468.03	+48
863.19	11	9484.09	+64
864.64	11	9500.04	+80

10

20

カラムのフロースルーおよび洗浄画分(平衡化緩衝液および水)のnanoLC-ESI-FT-MS分析によりhPTH(1-84)ox種のいずれかに割り当てられ得る顕著な質量ピークは観察されなかった(図3A、B)のに対して、hPTH(1-84)oxの異なる酸化状態に対応するいくつかの質量ピークを溶出液において検出した(図4A、B、表1)。出発原料、非消化酸化合成hPTH(1-84)ox(図2B)、および非消化酸化合成hPTH(1-84)ox(図4B)のアフィニティカラムからの溶出液のスペクトルの比較は図5において、ピーク強度の相違にも関わらず、同じプロファイルを示した。この結果は、合成酸化hPTH(1-84)が、異なる酸化メチオニンに対応するかなり様々な生成物からなることを実証している。しかしながら、酸化ヒトPTHに対して産生されたモノクローナル抗体(MAB)を有するカラムはhPTH(1-84)の全ての酸化形態に特異的であり、プローブからそれら全てを取り除いた。

30

40

【0038】

より正確には、インタクトな酸化hPTH(1-84)試料は18-20分にてTIC-ピークを示した。分子質量は、メチオニン酸化によって引き起こされた+16、+32、+48、+64Da(各残基についてスルホキシド、+16Daおよびスルホン、+32Daならびにそれらの組合せ、最大+64Da)およびトリプトファン23のさらなる酸化について+80Daまで移動した値に対応した。図2Aは非消化酸化合成hPTH(a a 1-84)のNanoLC-ESI-FTMS全イオンクロマトグラムを示し、図2Bは、保持時間間隔18.30-20.50分についての対応する拡大した合計FTMSスペクトルを示す。いくつかの異なる荷電分析物イオンがマークされている。

【0039】

50

図3は免疫吸着カラムに対する結合後の非消化酸化合成hPTH(1-84)oxのフロースルー画分の分析を示す。図3AはフロースルーのnanoLC-EESI-FTMS全イオンクロマトグラムを示し、図3Bは16.50-18.50分の保持時間間隔についての対応する拡大した合計FTMSスペクトルを示す。スペクトルは酸化PTHに属する分析物質量を示さない。

【0040】

図4は非消化酸化hPTH(1-84)oxのアフィニティカラムからの溶出液に関する。図4Aは溶出液のnanoLC-EESI-FTMS全イオンクロマトグラムを示し、図4Bは16.50-18.50分の保持時間間隔についての対応する拡大した合計FTMSスペクトルを再度示す。oxPTH(aa 1-84)のいくつかの異なる荷電分析物イオンは溶出液中で検出可能であった。

10

【0041】

したがって、この実施例により、ヒト上皮小体ホルモンおよびこの断片の全ての酸化された、誤って折り畳まれた形態は、上皮小体ホルモンの生物学的活性濃度を決定するために試料からこれらの断片を除去するために使用され得る特徴的な立体構造エピトープを有したことが確認される。

【0042】

実施例4

本発明者らは、本発明者らの透析ユニットにおいて治療された間欠的血液透析中の18人の患者からの供試体を研究した。供試体(EDTA-全血)を透析期間の開始前に得て、遠心分離し、即座に、血漿を得た後さらに分析するまで-80で保存した。この研究は地元の病院の倫理委員会によって承認された。書面によるインフォームドコンセントを各症例において得た。患者の特性は患者の臨床記録から得た。血清リン、カルシウムおよびC反応性タンパク質(CrP)を大学病院シャリテ(Charite)の臨床検査室の自動分析器で分析した。

20

【0043】

インタクトなPTH電気化学発光イムノアッセイ(ECLIA、Roche PTH、インタクトな[iPTH])を、PTH濃度を測定するために使用した。RocheのインタクトなPTH ECLIAは、アミノ酸26-32と反応するビオチン化モノクローナル抗体およびアミノ酸55-64と反応する捕捉ルテニウム複合体化モノクローナル抗体を使用する。決定はRoche Modular E170(登録商標)において実施した。35.0および180.0ng/Lのそれぞれの濃度にてアッセイ内のCVは4.1%であり、アッセイ間のCVは5.8%であった。

30

【0044】

ヒト試料は、直接(表2においてiPTHと命名されている)測定したまたは、酸化PTHおよび酸化PTH断片の全ての形態を認識する実施例2に記載されている選択したモノクローナルoxPTH立体構造抗体を使用して酸化PTHを除去するカラムによる酸化PTHの除去後のいずれかで測定した。より正確には、oxPTH-ConformAB結合カラムを透析中の18人の患者からの試料と共に使用し、続いて日常の臨床診療に使用されているように古典的サンドイッチPTH ECLIAを行った。

40

【0045】

【表 2】

表 2

試料 ID	腎疾患	年齢	透析中の時間 (年)	性別	IPTH (NG/L)	実際の IPTH (NG/L)	ox- iPTH (ng/L)	IPTH/実際の IPTHの比	全CA (MMOL/L)	P (MMOL/L)	CRP (MG/DL)
1	高血圧性腎症	62	0.3	m	43.63	8.9	34.73	0.204	2.58	1.24	0.43
2	糖尿病性腎症	73	4.0	m	796.2	70.62	725.6	0.089	2.2	2.15	-
3	未知	37	0.1	m	52.84	10.35	42.49	0.196	2.53	0.81	0.03
4	糖尿病性腎症	68	2.1	f	70.8	11.18	59.62	0.158	2.23	0.91	4.08
5	急性腎損傷	64	0	m	46.49	9.45	37.04	0.203	2.17	1.32	3.26
6	糖尿病性腎症	63	1.6	f	42.13	5.37	36.76	0.127	2.08	1.43	12.2
7	ADPKD	70	3.3	f	1029.00	74.76	954.2	0.073	2.1	1.37	0.53
8	心腎症候群	70	3.4	m	240.4	41.89	198.5	0.174	2.38	1.57	0.32
9	未知	70	9.0	m	105.00	18.48	86.52	0.176	2.26	1.5	3.12
10	糖尿病性腎症	65	7.0	m	1301.00	445.30	855.7	0.342	2.53	2.23	1.74
11	膜GN	45	5.4	f	311.80	24.44	287.4	0.078	1.57	2.06	0.52
12	膜性増殖性GN (Typ1)	52	1.5	m	144.10	19.24	124.9	0.134	1.87	0.73	0.17
13	高血圧性腎症	61	4.1	m	73.45	15.92	57.53	0.217	2.15	2.35	0.67
14	ADPKD	57	1.2	m	281.9	44.02	237.9	0.156	2.18	1.35	13.4
15	糖尿病性腎症	73	4.0	m	116.9	19.73	97.17	0.169	2.38	1.66	4
16	メサンギウム増殖性GN	69	8.1	m	70.81	18.51	52.3	0.261	2.62	2.28	6.7
17	間質性腎炎	61	2.6	f	76.28	11.21	65.07	0.147	2.21	1.61	2.9
18	未知	56	10.6	m	487.1	76.12	411	0.156	2.35	2.41	0.17

10

20

30

40

50

試料調製のために、固定化モノクローナルoxPTH立体構造抗体(oxPTH-ConfomAb)を有するスラリーの100μlのアリコート、PBS緩衝液、pH7

．4により平衡化したM o b i S p i nカラムに充填した。次いで500 μ lの各試料をそれぞれカラムに適用した。カラムを室温にて2時間、回転して混合しながらインキュベートし、250 μ lの0.1M酢酸アンモニウム緩衝液、pH7.0により洗浄し、続いて20%アセトニトリルを含有する250 μ lの0.1M酢酸アンモニウム緩衝液、pH7.0により洗浄し、次いで200 μ lの溶出緩衝液(0.05Mギ酸、pH3.5)により2回溶出した。カラムのフロースルー、洗浄画分および溶出液を別々に回収し、凍結乾燥した。試料を500 μ lのPBS緩衝液、pH7.4中で再構成し、アリコートをしてR o c h eのインタクトなPTH E C L I A (E l e c s y s (登録商標) PTH、インタクトアッセイ、R o c h e、P e n z b e r g、G e r m a n y)によって分析した。表2は、透析中の研究した患者の基礎的な臨床特性および検査データを示し、ならびに直接測定したiPTH (ng/L)の濃度および誤って折り置かれた、酸化されたPTH (実際のiPTH)の除去後の濃度を示す。

10

【0046】

この結果を図6にまとめた。暗い(青色)棒は、従来のR o c h eのインタクトなPTH E L C I Aによって直接決定した血清中のPTH濃度を示す。PTHの酸化形態を試料から除去すると、測定したPTH濃度は全く異なった(灰色/赤色棒)。測定したPTH濃度は、酸化PTH形態の免疫吸着および除去後にはかなり低いが、直接測定したPTH濃度と、酸化PTH形態の除去後のPTH濃度との間の関係は患者によって非常に変動した。一部の患者において、直接測定したPTHの7%のみが酸化および誤った折りたたみを含まなかったのに対して、他の患者において、直接測定したPTHの34%がインタクトなPTHであった。このように、データは、本発明者らの患者の酸化型から生物活性型への上皮小体ホルモンの驚くべき変動を示しており、上皮小体ホルモンは、おそらく、研究した患者間における曝露酸化的ストレス、存在するROSの量、メチオニンスルホレダクターゼA型の活性または血液および循環中の還元電位によって変動する。

20

【0047】

対照

回収率を決定するために、別のシリーズの測定において、500 μ lの各試料を実施例1の1ngの酸化hPTH (a a 1 - 84)と混合した。混合した試料を試料調製の部分に記載されているように処理した。酸化PTHおよびこの断片に記載されているように除去した場合、混合は測定したPTH値に影響を与えなかった。添加した酸化PTH (a a 1 - 84)の回収率は、iPTH E C L I Aによって直接決定した場合、65から105%の範囲であった。

30

【0048】

oxPTHカラムが特異的に酸化したPTHのみを除去することを確かめるために、本発明者らは、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃に結合できるカラムによる精製後に一部の試料を分析した。より正確には、本発明者らは、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃ (A r t . N o . K 1 1 0 7 - 7 3 7、I m m u n d i a g n o s t i k A G、B e n s h e i m、D E)に結合しているモノクローナル抗体を含むアフィニティカラムに血清試料を供した。このようなカラムによる処理は、表3により示されているように測定したPTH濃度にほとんど影響を与えなかった。

40

【0049】

【表 3】

表3

IPTH NG/L	ビタミンDカラム後の IPTH (NG/L)	比率
43,63	32,43	0,74
796,2	684,83	0,86
52,84	47,45	0,89
46,49	41,86	0,90
70,6	61,99	0,87

10

表3のデータは、PTHの非特異的結合が非特異的抗体を含む免疫吸着カラムについておおよそ14%を占めたことを示す。さらに、PTHの非特異的結合は全ての試料においてほぼ同じであったので、アフィニティカラムはそのまま、回収率の典型的な損失を除いてPTH測定に顕著に影響を与えなかった。言い換えれば、カラムはそのまま結果に顕著に影響を与えなかった。

【0050】

試験したモノクローナル α PTH立体構造抗体MABが、カラムから放出され、RocheのiPTH ELICAにおけるPTH定量化を妨げることを除外するために、遊離モノクローナル α PTH立体構造抗体(MAB)を1.8 μ gのMAB/mlの最終濃度にて2人の患者由来の試料に添加した。次いでiPTHイムノアッセイを使用して試料を分析した。溶媒のみを添加したこれらの試料は、それぞれ43.63[ng/L](患者a)および796,20[ng/L](患者b)の測定したiPTH濃度を有した。モノクローナル抗体を試料に添加することは結果を顕著に変えなかった。抗体を有する試料中で、本発明者らは、35,70[ng/L](患者a)および753,20[ng/L](患者b)を測定した。このように、酸化ヒトPTHに対するモノクローナル抗体(MAB)が放出される場合でさえ、これらの抗体は最後のiPTH定量化を顕著に妨げない。

20

【0051】

臨床データ

臨床特性を表2に示す。本発明者らは、長期にわたる血液透析中の17人の患者および急性腎不全に起因して透析を必要としている1人の患者を含めた。本発明者らは、iPTHイムノアッセイにより臨床供試体を分析した。全ての患者において、測定したPTH濃度は、上皮小体ホルモンの酸化形態を考慮した場合、かなり低かった(表2および図6を参照のこと)。しかしながら、iPTHイムノアッセイにより直接測定したPTH濃度と酸化PTH形態の除去後に測定したそれらの濃度との間の関係は一定ではなく、反対に、関係は、研究した患者間における酸化的ストレス度の違いにおそらく起因してかなり変動することに注目すべきである。一部の患者において、常法に従って測定したPTHの7%のみが、酸化がなかったのに対して、別の患者において、常法に従って測定したPTHの34%が実際のインタクトなPTHであった。まとめると、PTHの酸化状態を考慮せずに、現代のサンドイッチ検出システムを使用して常法に従って測定したPTH濃度は、PTHの酸化を考慮した場合の濃度より数倍高く検出される。PTHの酸化の効果は、透析を必要とするこれらの患者間で非常に変動しやすい。常法に従って測定したPTHと酸化PTHとの間に非常に弱い相関関係のみが存在する。

30

40

【0052】

一部の患者において、本発明者らは、Roche製のiPTHイムノアッセイ以外に、Roche製のPTH(1-84)アッセイシステムも使用した。本発明者らは、iPTHアッセイシステムについての上記と基本的に同様の結果を得た。PTHの酸化状態を考慮せずに、常法に従って測定したPTH濃度は、PTHの酸化を十分に考慮する濃度と比較して、数倍高かった。

50

【0053】

非常に高感度の質量分析アプローチを使用して、現在の研究により、ヒトPTH(1-84)の酸化が、上皮小体ホルモン内の8および/または18位の異なる酸化メチオニン残基(residues)に対応する様々な生成物の形成を生じることが実証された。hPTH(1-34)ox断片に対して産生されるモノクローナル抗体(MAB)を有するカラムはhPTH(1-84)の全ての酸化形態に特異的であり、それら全てを試料から取り除いた。本発明者らの研究の臨床部分により、PTHの酸化状態を考慮せずに、現在の至適基準法に基づいて常法に従って測定したPTH濃度は、PTHの酸化を考慮した場合の濃度と比較して臨床試料中に非常に高いPTH濃度を生じたことが実証された。PTH酸化の効果は、透析を必要とする患者間で非常に変動しやすい。常法に従って測定したPTHと、このホルモンの酸化を考慮したPTHデータとの間に非常に弱い相関関係のみが存在する。酸化PTH(図1)が、cAMPを生成するためにPTH受容体をもはや刺激せず、それにより生物学的に不活性である可能性が最も高いという事実を踏まえると、古典的な第三世代のサンドイッチELISA技術を使用したPTHの測定値に基づいた透析患者において上皮小体機能亢進症を治療するための臨床戦略は、おそらく誤った判定をもたらす傾向の可能性が最も高い。

10

【0054】

例えば、尿毒症患者において、非常に特異的なアッセイにより、健康な対象と比較してPTHの非抑制性画分が2.5倍高く測定されたことが知られている。さらに、尿毒症血清中で測定されたPTH濃度は、PTHに関連する骨の異常も2-2.5倍まで過大評価しているようであった。慢性腎不全を有する患者において、第二世代のアッセイによって検出された高い循環レベルのnon-1-84PTH断片(7-84PTHの可能性が最も高い)の存在および1-84PTHの生物活性に対する7-84PTHの拮抗作用がこれを説明できることが示唆された。しかしながら、この仮説は、異なるPTH断片を実際に区別するために例えば質量分析と連結したHPLCを使用した適切に設計された臨床研究において証明されなかった。他方で、PTHを検出するためにタンデム質量分析に連結した現代的な液体クロマトグラフィーを使用した本発明者らのデータにより、透析中の患者におけるPTHのこの周知の過大評価は、透析中の患者におけるPTHの酸化した生物学的に不活性な形態の存在に起因する可能性が最も高いことが示唆される。

20

【0055】

過酸化水素(H₂O₂)または次亜塩素酸(hypochlorous acid)(HOCl)などの反応性酸素種(ROS)およびヒドロキシルラジカル(OH)またはその他などのフリーラジカルがインビボで連続して形成される。ROSの形成と有効な抗酸化防御機構との間のさらなる不均衡が酸化的ストレスを生じる。一般に尿毒症は酸化的ストレスの増強に関連し、血液透析または腹膜透析は特に、このような患者において酸化的ストレス、および抗酸化レベルの減少をもたらす一因となり得る。

30

【0056】

酸化についての好ましい高感度の標的物の1つはメチオニンである。酸化生成物であるメチオニンスルホキシドは化学物質による還元によって逆転され得るまたは酵素的に逆転され得るのに対して、メチオニンスルホンへの酸化は生物学的に不可逆である。メチオニン残基の酸化は機能タンパク質の活性化または不活性化のそれぞれを導き得、得られたメチオニンスルホキシドは特定の還元酵素によって酵素的に逆転され得る。メチオニンスルホキシド還元酵素はイー・コリ(E. coli)および哺乳動物組織に見出されている。メチオニンの酸化およびこの逆転は、タンパク質活性のための調節因子として機能し得る。上皮小体ホルモンは、アミノ末端領域(8および18位)に、ペプチドの生物活性に関与する、酸化による(trough oxidation)の変更を受けやすい2つのメチオニン残基を含有する。上皮小体ホルモンの二次構造はこの受容体結合に必須であるように見える。メチオニン残基8はホルモンの折り畳みに重要であり、アミノ末端ドメインの構造におけるこの残基およびこの生物活性に関する重要な役割が証明されている。このように、PTHの二次構造において基本的な機会を生じる、メチオニン残基8の酸化は、

40

50

アデニルシクラーゼの結合および活性化の両方に関与する。

【0057】

公開されたデータおよび本発明者らの結果に基づいて、本発明者らは、ヒト成長ホルモン、ソマトマンモトロピン、黄体刺激ホルモンおよびPTHのような異なるペプチドホルモンにおけるメチオニン残基が、生物活性または受容体親和性の損失を生じる酸化に供され得ると考えている。メチオニン酸化はホルモン活性の調節において一般的な原理であり得る。しかしながら、この仮説は詳細に証明される必要がある。

【0058】

本発明者らの新規アッセイシステムは、初めて、酸化PTHの全ての形態を検出でき、結合できる非常に特異的な抗体を有する酸化PTH断片を除去することによってPTHの酸化および非酸化形態を識別できる。実際に本研究で行われたPTHの酸化形態の除去は、コーティングしたカラムによる分析、その後の第三世代のPTHアッセイ（アッセイについての原理は図6を参照のこと。）の前に行われ得る、またはさらに第三世代のサンドイッチELISAシステムの統合部分としても行われ得る。また、本発明者らのアプローチを、LC-MS/MSの前に酸化したPTH断片を免疫捕獲することによって近未来の臨床診療におけるタンデム質量分析に連結された液体クロマトグラフィー（LC-MS/MS）のような現代技術と組み合わせることは実行可能であるはずである。これにより、LC-MS/MS PTHアプローチの診断能が改善される。

【0059】

結論として、nanoLC-ESI-FT-MSによって、本発明者らは、ヒトPTH（1-84）の酸化が、上皮小体ホルモン内の8および/または18位の異なる酸化メチオニン残基に対応する様々な生成物の形成を生じたことを実証できた。本発明者らは、酸化ヒト上皮小体ホルモンおよびこの酸化断片の共通の抗原決定基に対するモノクローナル立体構造抗体をスクリーニングし、ヒト患者の血清試料から酸化上皮小体ホルモンおよびこの断片の除去を可能にするhPTH（1-84）の全ての酸化形態に特異的なものを発見した。本発明者らはまた、本明細書において、PTHの酸化状態を考慮しない、現在の至適基準法に基づいて常法に従って測定したPTH濃度は、PTHの酸化を考慮した場合の濃度と比較して臨床試料供試体中で非常に高いPTH濃度を生じることを開示している。PTH酸化の効果はさらに、透析を必要とする患者間で非常に変動しやすい。罹患率および死亡率に対する末期の腎疾患患者における血管石灰化の影響を考えると、本発明の結果は、酸化PTH形態の「汚染」を有せずに全PTHを測定することが、PTHに関連した骨および心臓血管の異常に対してなされる臨床決定を大いに改善することを支持している。

【0060】

結論

したがって、本出願は、酸化的に不活性化されたヒト上皮小体ホルモンおよびこの循環断片に特異的な抗体分子を得る方法であって、hPTH八ブテンとして、8、18位またはこの両方にて酸化したhPTHペプチドまたはこのそれぞれの断片を含む免疫原により非ヒト動物を免疫化することによってヒト上皮小体ホルモンペプチドに対する抗体を得て、前記抗体を前記非ヒト動物から回収するステップ、生理的条件下で生物活性ヒト上皮小体ホルモンペプチドに結合している抗体分子から前記抗体を選択または精製して、酸化hPTHペプチドまたはこのそれぞれの循環断片に特異的に結合する抗体を得るステップ、8、18位またはこの両方にメチオニンR-スルホキシド、メチオニンL-スルホキシドまたはメチオニンスルホンを含むhPTHアミノ酸配列（一次タンパク質構造）に結合している抗体分子から酸化hPTHペプチドに特異的な前記抗体を選択または精製して、不活性な酸化ヒト上皮小体ホルモンペプチドおよびこの循環断片に共通している立体構造エピトープ（三次タンパク質構造）に特異的に結合する相補性決定領域を有する抗体分子を得るステップを含む、方法の開示を提供している。

【0061】

抗体分子は、22位に酸化トリプトファンを含む、またはhPTH構造がhPTH配列

の1および2位もしくはこの両方にて最端アミノ末端アミノ酸を欠く一次hPTH構造に対するこれらの結合について、これらをさらに試験するステップによって、さらに精製されてもよいまたは選択されてもよい。

【0062】

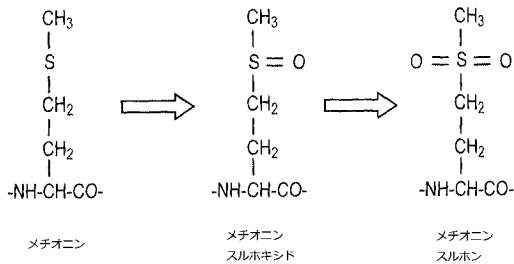
これらの選択または精製するステップに供される抗体は、マウスまたはラット細胞クローンによって産生されたモノクローナル抗体であってもよい。当業者は、スクリーニングするおよび選択するための抗体がまた、合成抗体ライブラリー由来の組換え抗体分子または抗体断片または一本鎖抗体であってもよいことを理解する。抗体が非ヒト動物から回収される場合、これらの抗体を誘導するための免疫原は好ましくは、ハプテンとして、合成酸化ヒト上皮小体ホルモン、ヒト上皮小体ホルモンの合成酸化断片またはヒト上皮小体ホルモンのアミノ酸配列1から38を含む合成酸化ペプチドまたはこれらの実質的な部分、断片もしくはバリエーションのうちのいずれか1つが結合している担体タンパク質である。

【0063】

本発明のさらなる好ましい実施形態および範囲は、添付の特許請求の範囲において指摘されている。

【図1A】

FIG. 1A



【図1B】

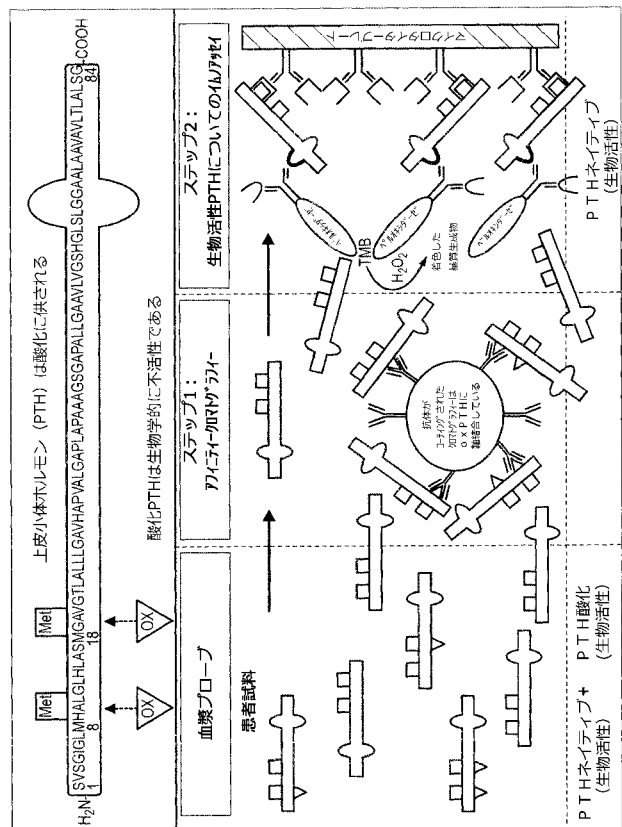
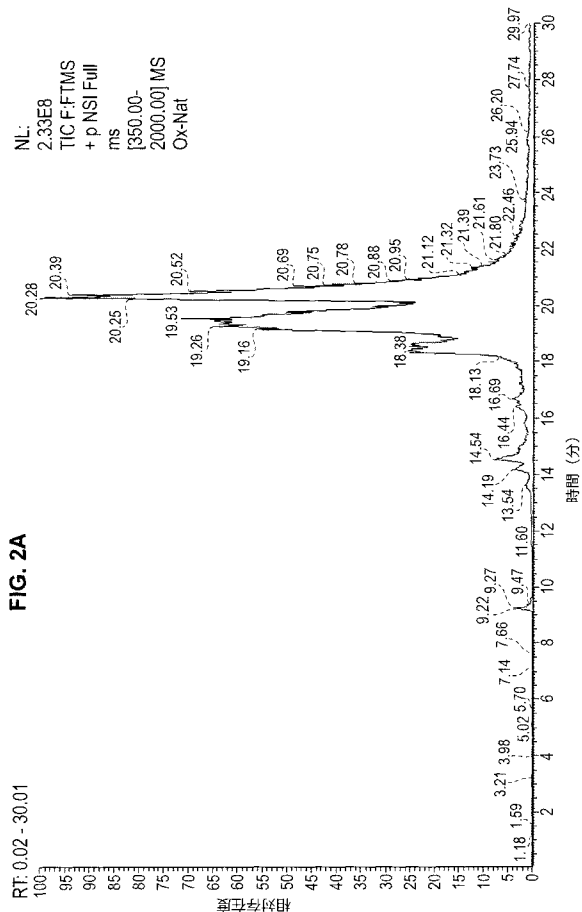
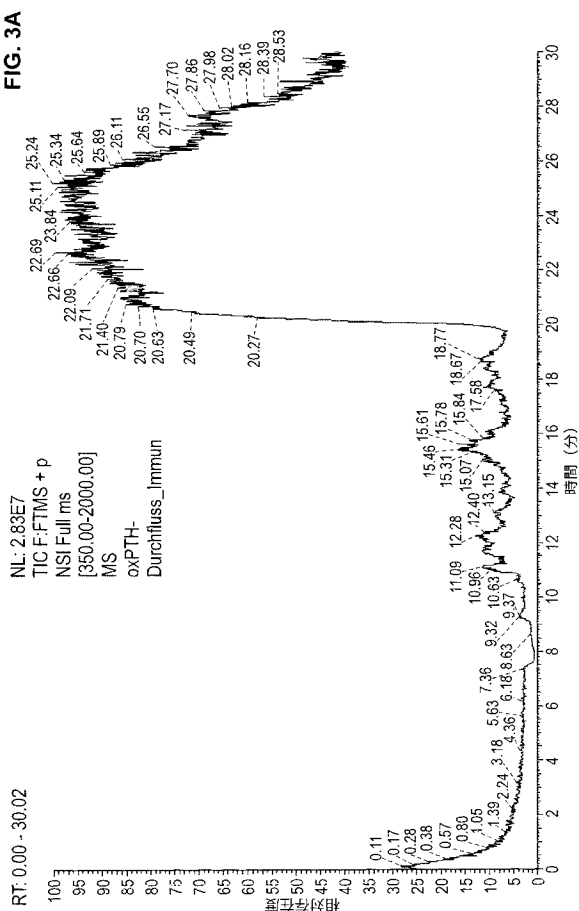


FIG. 1B

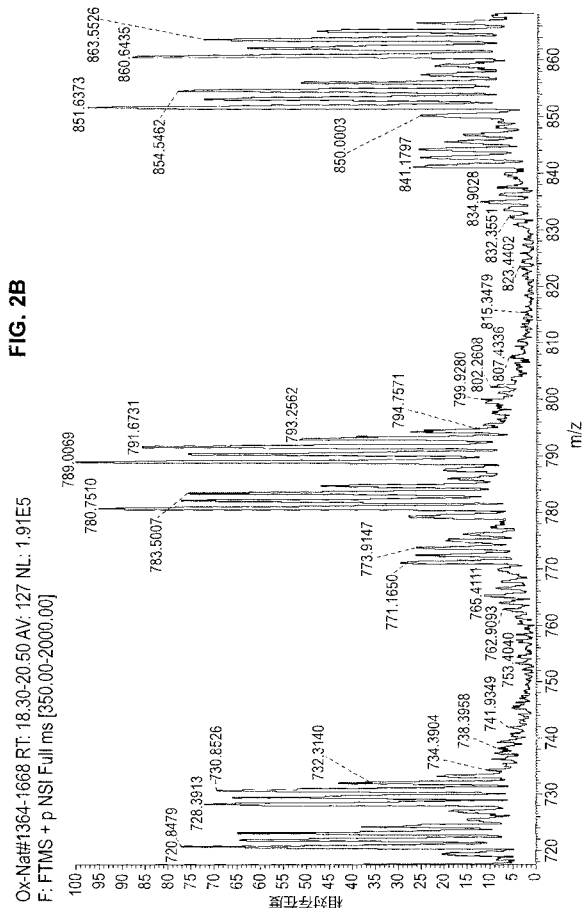
【 2 A 】



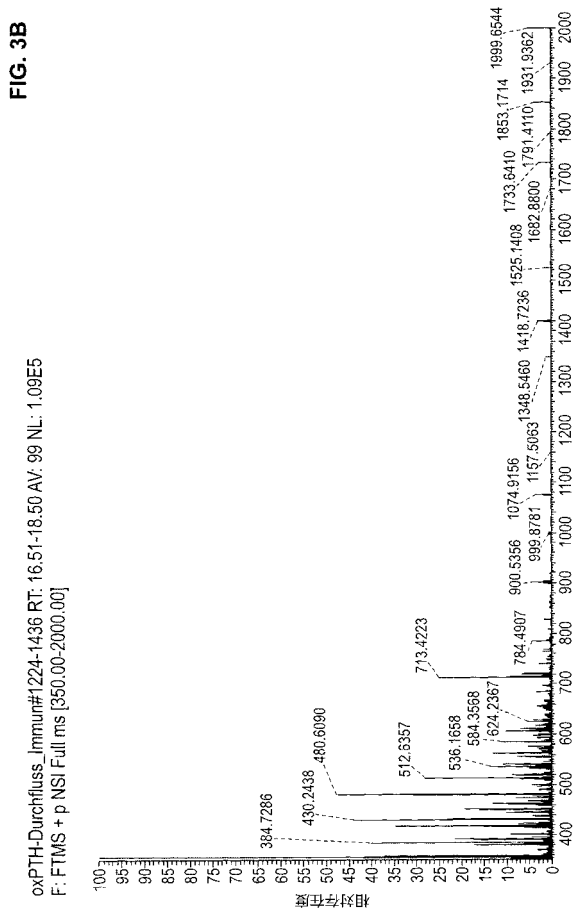
【 3 A 】



【 2 B 】



【 3 B 】



【図 6】

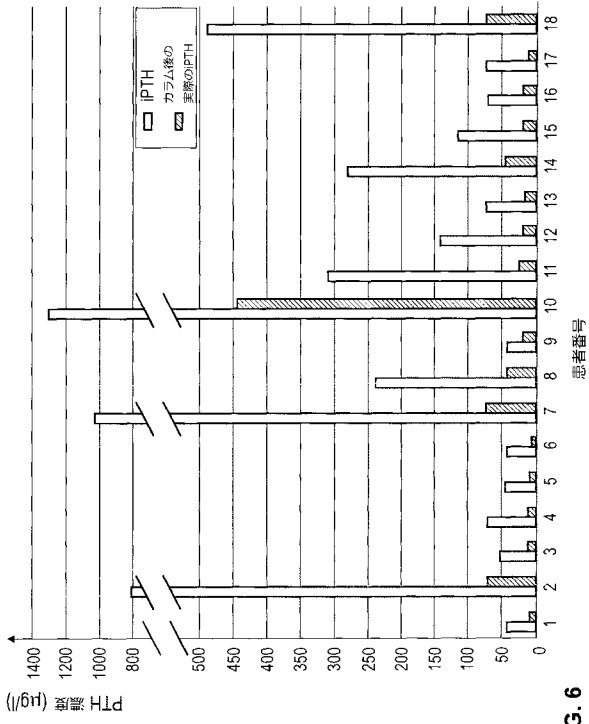


FIG. 6

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/053632

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/26 G01N33/74 ADD.		
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) C07K G01N		
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) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/082092 A2 (ABC ARMBRUSTER BIOCHEMICALS [DE]; ARMBRUSTER FRANZ PAUL [DE]; ROTH HEI) 17 October 2002 (2002-10-17) cited in the application the whole document	1-13
X	WO 03/003986 A2 (QUEST DIAGNOSTICS INVEST INC [US]) 16 January 2003 (2003-01-16) cited in the application the whole document	1-13
X	US 2007/098726 A1 (CANTOR THOMAS L [US] ET AL CANTOR THOMAS L [US]) 3 May 2007 (2007-05-03) the whole document	1-13
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 May 2013		Date of mailing of the international search report 17/05/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Covone-van Hees, M

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/053632

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	HOCHER B ET AL: "Measuring parathyroid hormone (PTH) in patients with oxidative stress - do we need a fourth generation parathyroid hormone assay?", PLOS ONE 20120706 PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE USA, vol. 7, no. 7, 6 July 2012 (2012-07-06), XP002696480, ISSN: 1932-6203 the whole document -----	1-13

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/053632

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02082092	A2	17-10-2002	AT 408842 T 15-10-2008
			DE 10116552 A1 10-10-2002
			DK 1425588 T3 26-01-2009
			EP 1425588 A2 09-06-2004
			EP 2006688 A2 24-12-2008
			JP 4294961 B2 15-07-2009
			JP 2004529342 A 24-09-2004
			US 2006211054 A1 21-09-2006
			WO 02082092 A2 17-10-2002

WO 03003986	A2	16-01-2003	AT 490785 T 15-12-2010
			AU 2002354806 A1 21-01-2003
			EP 1455821 A2 15-09-2004
			JP 2004536831 A 09-12-2004
			US 2003082179 A1 01-05-2003
			US 2005003493 A1 06-01-2005
			US 2006024772 A1 02-02-2006
			US 2006286107 A1 21-12-2006
			WO 03003986 A2 16-01-2003

US 2007098726	A1	03-05-2007	NONE

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
G 0 1 N 27/62	(2006.01)		G 0 1 N	27/62		V
C 0 7 K 17/00	(2006.01)		C 0 7 K	17/00		

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 ホッヘル, ベルトホルト
 ドイツ国、1 4 5 3 2・クラインマハノー、エルンスト・テールマンシュトラッセ・1 5 1・アー
 (72) 発明者 グリューン, ハンス・ユルゲン
 ドイツ国、6 4 6 2 5・ベンスハイム、シュトゥーベンバルト - アレー・8・アー、イムーンダイ
 アグノスティック・アー・ゲー
 (72) 発明者 ロート, ハイנטツ・ユルゲン
 ドイツ国、6 9 1 2 6・ハイデルベルク、イム・ブライツシュピール・1 5

F ターム(参考) 2G041 CA01 FA12 GA09 LA08
 4H045 AA20 AA30 EA50 FA72 GA26

专利名称(译)	测量患有氧化应激的患者的甲状旁腺激素的方法和装置		
公开(公告)号	JP2015513538A	公开(公告)日	2015-05-14
申请号	JP2014558135	申请日	2013-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	李满诊断AG		
申请(专利权)人(译)	李满诊断ARE游戏		
[标]发明人	アルムブルステルフランツパウル ホッヘルベルトホルト グリューンハンスユルゲン ロートハインツユルゲン		
发明人	アルムブルステル,フランツ・パウル ホッヘル,ベルトホルト グリューン,ハンス・ユルゲン ロート,ハインツ・ユルゲン		
IPC分类号	C07K16/26 C07K1/22 G01N33/53 G01N33/543 G01N30/88 G01N27/62 C07K17/00		
FI分类号	C07K16/26 C07K1/22 G01N33/53.B G01N33/543.501.D G01N30/88.201.R G01N27/62.V C07K17/00		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/FA12 2G041/GA09 2G041/LA08 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
优先权	2012156441 2012-02-22 EP		
其他公开文献	JP6178343B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

氧化，惰性人甲状旁腺激素和其片段的方法用于获得抗体或针对特定构象表位的抗体片段;氧化，惰性人甲状旁腺激素从体液的样品中去除的方法;样品活性甲状旁腺激素，以及在透析患者中诊断肾功能衰竭或继发性甲状腺功能亢进的体外方法。通过用含有氧化甲状旁腺激素或其片段的免疫原在8,18位甲硫氨酸或两种甲硫氨酸免疫动物并回收抗体获得抗体，其中抗体或抗体片段或互补决定单链抗体的区域中，而不是通常的生物活性的人甲状旁腺激素，仅存在于氧化甲状旁腺激素和片段（抗原决定簇）的三级结构的具体构象表位虽然互补结合区的结合表面不含人甲状旁腺激素的氧化甲硫氨酸。

