

(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2016-512323  
(P2016-512323A)

(43) 公表日 平成28年4月25日(2016.4.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	B
	GO 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

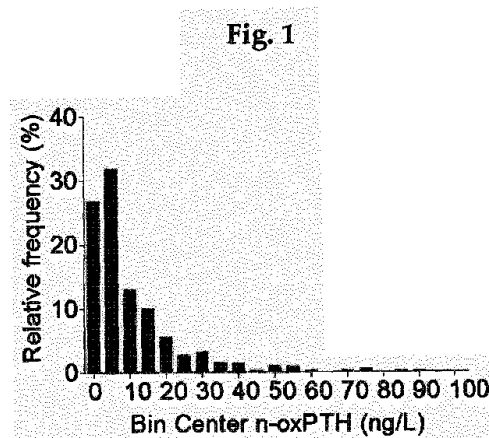
(21) 出願番号	特願2015-560717 (P2015-560717)	(71) 出願人	514212788 イムンダイアグノスティック・アー・ゲー
(86) (22) 出願日	平成26年3月7日 (2014.3.7)		ー
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月6日 (2015.11.6)		ドイツ国、64625・ベンスハイム、シ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/054508		ュトウベンバルトーアレー・8・アー
(87) 国際公開番号	W02014/135701	(74) 代理人	110001173
(87) 国際公開日	平成26年9月12日 (2014.9.12)		特許業務法人川口国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	13158401.3	(72) 発明者	アルムブルステル, フランツ・パウル
(32) 優先日	平成25年3月8日 (2013.3.8)		ドイツ国、64625・ベンスハイム、シ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ュトウベンバルトーアレー・8・アー、 イムンダイアグノスティック・アー・ゲー ー気付

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非酸化の生物学的に活性な副甲状腺ホルモンは血液透析患者における死亡率を決定する

(57) 【要約】

酸化ストレスを受けている腎臓患者、特に血液透析患者における副甲状腺ホルモン濃度の調節に干渉する薬物療法の必要性をインビトロでモニターおよび評価するための新しい方法。図1は、66歳の年齢中央値(IQR、56から75歳)、266日の透析の開始からの時間中央値(透析歴)(IQR、31から1209日)および1.2の透析用量中央値(k<sub>t</sub>/V)(IQR、1.1から1.3)での、340人の血液透析患者(224人の男性および116人の女性)におけるn-oxPTH濃度の分布を示す。慢性腎疾患の原因は、113症例(33%)において腎硬化症、107症例(31%)において糖尿病性腎症、29症例(9%)において慢性糸球体腎炎、9症例(3%)において多発性嚢胞腎疾患および82症例(24%)において他/未知であった。n-oxPTH濃度中央値は、5.9 ng/L(IQR、2.4から14.0 ng/L)であった。n-oxPTH濃度は、男性および女性において差はなかった(5.9 ng/L; IQR、2.4から14.2 ng/L; n = 224; 対5.5 ng/L; IQR、2.4から1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

酸化ストレスを受けている腎臓患者における副甲状腺ホルモン濃度の調節に干渉する薬物療法の必要性をインビトロでモニターおよび評価するための方法であって、

前記腎臓患者由来の血漿または血清サンプルと、酸化ヒトPTHペプチドのアミノ酸3から34の間に位置する三次元エピトープを認識および特異的に結合するが、非酸化ヒトPTH(1-84)およびこの断片には結合しない抗体とを接触させることによって、メチオニン8もしくは18のいずれかもしくはこの両方またはトリプトファン22において酸化されたヒトPTHペプチドから、前記腎臓患者由来の血漿または血清サンプルを精製する工程、

10

ヒトPTH配列のアミノ酸3から34の間に位置して受容体への結合およびcAMP-シクラーゼの活性化を担うドメインを少なくとも含有する、ヒトPTH(1-84)およびこの断片に対する抗体に基づくイムノアッセイによって、前記サンプルにおける免疫反応性ヒトPTH(iPTH)ペプチドの量を測定する工程ならびに

血液循環中に副甲状腺の細胞によって分泌される免疫反応性ヒトPTH(iPTH)ペプチドの割合および前記腎臓患者が患っている前記酸化ストレスによって免疫反応性ヒトPTH(iPTH)ペプチドが酸化される割合を含む、前記腎臓患者についてのPTHの状態値(n-oxPTH値)を得る工程ならびに

前記PTHの状態値(n-oxPTH)を、罹患率および総死亡率が低い基準値と比較して、PTHの状態値の調節に関する薬物療法の必要性、またはヒト副甲状腺ホルモンもしくはこの活性断片もしくはこの両方を前記患者へ補充する必要性を決定する工程を含む方法。

20

**【請求項 2】**

前記サンプルが、血液透析治療を受けている腎臓患者由来のものである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記サンプルが、慢性腎疾患(CKD)または尿毒症または副甲状腺機能亢進症に罹患している腎臓患者由来のものである、請求項1または2に記載の方法。

**【請求項 4】**

酸化ヒトPTHペプチドのアミノ酸3から34の間に位置する三次元エピトープを認識および特異的に結合するが、非酸化ヒトPTH(1-84)およびこの断片には結合しない抗体が結合した固相と、血漿または血清の前記サンプルとを接触させる工程を含む、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

30

**【請求項 5】**

酸化ヒトPTHペプチドのアミノ酸3から34の間に位置する三次元エピトープを認識および特異的に結合する前記抗体によって結合された前記ペプチドを、定量的に測定することをさらに含む、請求項1から4のいずれかに記載の方法。

**【請求項 6】**

免疫反応性ヒトPTH(iPTH)ペプチドの測定が、2-サイトイムノアッセイの使用を含む、請求項1から5のいずれかに記載の方法であって、一方の抗体が、PTH受容体1および2へのPTHペプチドの結合に関与するドメインに結合するモノクローナル抗体である、方法。

40

**【請求項 7】**

免疫反応性ヒトPTH(iPTH)ペプチドの測定が、2-サイトイムノアッセイの使用を含む、請求項1から5のいずれかに記載の方法であって、一方の抗体が、ヒトPTHの一番端のアミノ末端のアミノ酸パリンおよびセリンを含む抗原決定基に結合し、他方の抗体が、ヒトPTH配列のアミノ酸14から34の間の領域に結合する、方法。

**【請求項 8】**

免疫反応性ヒトPTH(iPTH)の測定が、2-サイトイムノアッセイの使用を含む、請求項1から5のいずれかに記載の方法であって、一方の抗体が、ヒトPTH配列のア

50

ミノ酸 1 から 13 を含む抗原決定基に結合する、方法。

【請求項 9】

酸化ヒトPTHペプチドに対して特異的な前記抗体が、8位および/または18位において酸化メチオンを含まない、ヒトPTH配列のアミノ酸3から34の間の三次元エピトープに結合する、請求項1から8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

免疫反応性ヒトPTH(iPTH)の割合および酸化ヒトPTHペプチドのアミノ酸3から34の間に位置する三次元エピトープを認識および選択的に結合する前記抗体によって結合されたPTHペプチドの量の測定をさらに含む、請求項1から9のいずれかに記載の方法。

10

【請求項11】

酸化ヒトPTHペプチドのアミノ酸3から34の間に位置する三次元エピトープを認識および選択的に結合する抗体と、請求項4から10のいずれかに開示される血漿または血清における免疫反応性インタクトヒトPTH(iPTH)を測定するための抗体の組み合わせとを有する、固相を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、慢性腎疾患(CKD)を有する患者の血漿サンプルにおける副甲状腺ホルモン濃度をモニターするための手段および方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

慢性腎疾患ステージ5を有する患者における過剰な死亡率は、重要な未解決の問題である。慢性腎疾患ステージ5を有する患者の毎年の死亡率は、約10から20%である。副甲状腺ホルモン(PTH)は、最近の大規模な研究がPTHおよび死亡率の間のJ型の関連性を実証したように、血液透析を必要とする患者における過剰な死亡率についての原因となる因子であるように思われる。結果的に、副甲状腺ホルモン(PTH)は、骨障害(腎性骨ジストロフィー)、ミオパシー、神経性の異常、貧血、そう痒症および心筋症を含む複数の全身性の影響を有する尿毒症毒素として説明されてきた。副甲状腺機能亢進症は、CKDにおいて一般的であり、未治療のまま放置された場合、深刻な病的状態および死亡をもたらす。現在のPTHアッセイによって測定される低いPTH濃度も、高いPTH濃度も、血液透析を受けている患者における心臓血管系疾患の進行および総死亡率の実質的な増加に関連する(Floege J. et al, ARO Investigators. Serum iPTH, calcium and phosphate, and the risk of mortality in a European haemodialysis population. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26:1948-1955; Torres PA et al, Calcium-sensing receptor, calcimimetics, and cardiovascular calcifications in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2012; 82:19-25; Souberbielle JC et al. in Parathyroid hormone measurement in CKD. *Kidney Int*. 2010; 77:93-100)。

30

40

【0003】

従って、最も低い罹患率および最も高い生存に関連する濃度にPTHを保つことを目指して、ガイドラインが確立された。Kidney Disease Outcomes Quality Initiative(KDOQI)ガイドラインは、血漿PTH濃度がCKDのステージに従って目標範囲内(例えば、CKDステージ5を有する患者において150から300ng/L)に保たれるように、慢性腎疾患(CKD)を有する患者のPTH濃度を定期的に測定することおよび患者の薬物療法(例えばビタミンD、リン吸着

50

薬、カルシウム受容体作動薬)を調整することを推奨する。薬理学的アプローチが適切に作用しない場合、副甲状腺摘出術(parathyroidectomy)が考えられ得る。

#### 【0004】

二次性副甲状腺機能亢進症もまた、循環1,25-ジヒドロキシビタミンDが早くもCKDのステージ2において減少し、糸球体濾過率(GFR)が減少するとともに下がり続ける場合、腎機能の悪化に対する適応応答として起こり得る。慢性腎疾患は、高リン血症、高尿酸血症、代謝性アシドーシスおよび時にまた25-ヒドロキシビタミンDの欠乏による酵素阻害などのような機能的な理由のゆえの1-ヒドロキシラーゼ活性の進行性の損失に関連する。しかしながら、より重要であるのは、単純に、健康な腎臓組織、従って(hense)、1-ヒドロキシラーゼの損失であり、これはCKDにおける1-ヒドロキシラーゼ活性の機能的な低下を説明する。GFRが60mL/分/1.73・m<sup>2</sup>未満に減少すると、PTHの分泌を直接またはklotho/FGF23系を介して刺激するホスフェートが保持される。そのうえ、1,25-ジヒドロキシビタミンDの欠乏は、副甲状腺(parathyroid gland)におけるPTHの分泌/遺伝子発現が1,25-ジヒドロキシビタミンDによってネガティブにコントロールされるので、この状況においてPTHの分泌の増加の一因となる。

10

#### 【0005】

低カルシウム血症は、GFRが50mL/分/1.73・m<sup>2</sup>未満に減少すると起こり、血液循環中への副甲状腺の細胞からの副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌をさらに刺激する。インタクトな形態では、ヒト副甲状腺ホルモン(hPTH)は、84アミノ酸および約9500ダルトンの分子量を有する単一のポリペプチド鎖からなる(SWISS-PROT:P01270、PTHY-HUMANを参照されたい。)。疾患進行により、インタクトなhPTH(aa1-84)の半減期が増加し、また、ホルモンの免疫反応性C-末端断片が血清中に蓄積する傾向がある。副甲状腺活性の慢性的な上昇は、次いで、骨量減少、骨折、血管石灰化、心臓血管系疾患、従って心血管系死亡率の上昇をもたらす(Fraser WD, Hyperparathyroidism. Lancet. 2009; 374: 145fを参照)。

20

#### 【0006】

PTHの測定の使用に関する問題の一部は、利用されるアッセイの解釈に関する混乱であった。血液中のPTHの測定は、RIAがPTHの測定のために最初に開発された1960年代の初め以来、進化してきた(Berson SA et al, Proc Natl Acad Sci USA. 1963; 49: 613-617)。しかしながら、これらの第1世代のアッセイは、使用される抗血清の異なる特質ならびにPTHがインタクトな84アミノ酸ペプチドの形態だけではなく、ホルモンの複数の断片、特に、PTH分子の中央およびカルボキシ(C)末端領域由来の複数の断片としても循環するということが分かったために、信頼できないことが判明した。分泌後のPTHペプチドは、腎臓において数分以内に活性断片および不活性断片に分解され、それぞれの断片は、さらに様々な半減期を有する。第2世代のPTHイムノアッセイは、一方が生物学的活性を有するPTHペプチドのアミノ末端部分に結合し、他方がこのカルボキシ末端部分に結合する2つの抗体を使用して開発された(John MR et al. (1999), J. Clin. Endocrinol. Metab., 84: 4287-4290; Gao P et al. 2000, Poster M455, ASBMR 22nd Annual Meeting; Roth HJ et al. (2000), Poster P1288; 11th International Congress of Endocrinology, Sydney)。しかしながら、血清中の測定免疫反応性PTH濃度および臨床所見の間に不一致がなおあった(Goltzman D et al, in Discordant disappearance of bioactive and immunoreactive parathyroid hormone after parathyroidectomy, J Clin Endocrinol Met

30

40

50

ab 1984, 58(1):70-75。従って、第3世代のインタクトPTHアッセイが、開発されたが、これは、尿毒症の患者における、骨疾患または二次性副甲状腺機能亢進症の他の臨床的な兆候の診断を改善するに至っていない(Brossard JH et al., Influence of glomerular filtration rate on non-(1-84) parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assays, Clin Chem. 2000; 46:697-703)。一方、幾つかの免疫反応性PTH断片がインタクトPTHペプチドと同等の生物学的活性を有するのに対して、hPTH(3-34)などのような他の断片は、副甲状腺ホルモンの効果を阻害することが認められているように思われる(EP-A 0349545; Schmidt-Gayk et al. (1999) Osteologie forum, 5, 48-58)、Suva et al. (1987) Science, 237, 893ff; EP 0451867を参照されたい。)。大きくて不活性であるが、免疫反応性の非(1-84)PTH断片(immunoreactive non-(1-84)PTH fragments)が、誤った測定を導くことがさらに想定されていた(LePage R. et al. (1998) Clin. Chem., 44, 805-809)。また、ジペプチジルペプチダーゼ-4(DPP4)は、多くの細胞型の表面上で発現されており、これは幾分無差別的なセリンエキソペプチダーゼである。このことは、PTHの一番端の2つのN-末端アミノ酸は、cAMP-シクラーゼ活性およびPTHペプチドの受容体への結合に必要であるが、その一方で、PTHはDPP4または類似するエキソプロテアーゼ(exoprotease)の基質であるという説を導く。結果的に、アミノ末端において、「インタクトな」PTHペプチド鎖と、一番端のアミノ末端で1つまたは2つのアミノ酸を欠乏しているPTHペプチドとを、区別することができる抗体を用いる2-サイトイムノアッセイ(two-site immunoassay)もまた、開発された(WO2001/44818(Armbuster et al)、WO96/10041(Magerlein et al); WO2003/03986(Hutchison JS)を参照されたい。))。

#### 【0007】

尿毒症の患者の血清サンプルにおける酸化PTHペプチド鎖の発見は、非酸化PTH(1-84)およびこの生物学的に活性な断片の測定のためのイムノアッセイの開発をさらに導いた(WO2002/082092)。このように、血漿中の副甲状腺ホルモンを測定するために利用可能な、およびある患者グループにおいて類似し他の患者グループにおいて顕著に異なる様々な「生物活性」PTHペプチド具体物の濃度を測定するのに利用可能な、おびただしい数のイムノアッセイがある。そのため、罹患率および死亡率を低下させるために腎臓患者の薬物療法の調節を可能にする、患者のPTHの状態についての信頼できる情報を得ることは望ましいと思われる(Sprague SM et al, The Case for Routine Parathyroid Hormone Monitoring, Clin J Am Soc Nephrol, Oct 2012, as doi:10.2215/CJN.04650512e; Goldsmith DJA, ebuttal: The Case for Routine Parathyroid Hormone Monitoring Clin J Am Soc Nephrol 8:319-320, 2013. doi:10.2215/CJN.10231012も参照されたい。)。そのため、PTH測定の技術的現状は、問題である。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0008】

【特許文献1】欧州特許出願公開第0349545号明細書

【特許文献2】国際公開第2001/044818号

【特許文献3】国際公開第96/010041号

【特許文献4】国際公開第2003/003986号

【特許文献5】国際公開第2002/082092号

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Floege J. et al, ARO Investigators. Serum iPTH, calcium and phosphate, and the risk of mortality in a European haemodialysis population. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26:1948-1955

【非特許文献2】Torres PA et al, Calcium-sensing receptor, calcimimetics, and cardiovascular calcifications in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2012; 82:19-25

【非特許文献3】Souberbielle JC et al. in Parathyroid hormone measurement in CKD. *Kidney Int*. 2010; 77:93-100

【非特許文献4】Fraser WD, Hyperparathyroidism. *Lancet*. 2009; 374:145f

【非特許文献5】Berson SA et al, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1963; 49:613-617

【非特許文献6】John MR et al. (1999), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84.4287-4290

【非特許文献7】Gao P et al. 2000, Poster M455, ASBMR 22nd Annual Meeting

【非特許文献8】Roth HJ et al. (2000), Poster P1288; 11th International Congress of Endocrinology, Sydney

【非特許文献9】Goltzman D et al, in Discordant disappearance of bioactive and immunoreactive parathyroid hormone after parathyroidectomy, *J Clin Endocrinol Metab* 1984, 58(1):70-75

【非特許文献10】Brossard JH et al., 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11】Schmidt-Gayk et al. (1999) *Osteologie forum*, 5, 48-58)

【非特許文献12】Suva et al. (1987) *Science*, 237, 893ff; EP 0 451 867

【非特許文献13】LePage R. et al. (1998) *Clin. Chem.*, 44, 805-809

【非特許文献14】Sprague SM et al, The Case for Routine Parathyroid Hormone Monitoring, *Clin J Am Soc Nephrol*, Oct 2012, as doi:10.2215/CJN.04650512e

【非特許文献15】Goldsmith DJA, ebuttal: The Case for Routine Parathyroid Hormone Monitoring *Clin J Am Soc Nephrol* 8:319-320, 2013. doi:10.2215/CJN.10231012

【発明の概要】

10

20

30

40

50

## 【0010】

この問題は、PTH分泌に干渉しCKD患者に通常処方される薬剤を選ぶ方法について信頼できる情報を与える、PTHをモニターおよび評価する方法によって解決される。これらの薬剤の使用もまた、国際的なガイドラインによって指導される。

## 【0011】

結果的に、本開示は、酸化ストレスを受けている腎臓患者における、副甲状腺ホルモン濃度の調節に干渉する薬物療法の必要性をインビトロでモニターおよび評価するための方法であって、酸化ヒトPTHペプチドのアミノ酸3から34の間に位置する三次元エピトープを認識および特異的に結合するが、非酸化ヒトPTH(1-84)およびこの断片には結合しない抗体と、前記サンプルとを接触させることによって、メチオニン8もしくは18のいずれかまたはこの両方またはトリプトファン22において酸化されたヒトPTHペプチドから、前記腎臓患者由来の血漿または血清のサンプルを精製する工程；ヒトPTH配列のアミノ酸3から34の間に位置して受容体への結合およびcAMP-シクラーゼの活性化を担うドメインを少なくとも含有する、ヒトPTH(1-84)およびこの断片に対する抗体に基づくイムノアッセイによって、前記サンプルにおける免疫反応性ヒトPTH(iPTH)ペプチドの量を測定する工程；ならびに、血液循環中に副甲状腺の細胞によって分泌される免疫反応性ヒトPTH(iPTH)ペプチドの割合および前記患者が患っている酸化ストレスによって免疫反応性ヒトPTH(iPTH)ペプチドが酸化される割合を含む、前記腎臓患者についてのPTHの状態値(n-oxPTH値)を得る工程；ならびに、前記PTHの状態値(n-oxPTH)を、罹患率および総死亡率が低い基準値と比較して、PTHの状態値の調節に関する薬物療法の必要性、またはヒト副甲状腺ホルモンもしくはこの活性断片またはこの両方を前記患者へ補充する必要性を決定する工程；を含む方法に関する。前記方法は、血液透析治療を必要とする腎臓患者由来のサンプルに特に使用することができる。他の場合には、サンプルは、慢性腎疾患(CKD)または尿毒症または副甲状腺機能亢進症に罹患している腎臓患者由来のものであってもよい。

10

20

## 【0012】

前記方法は、好ましくは、酸化ヒトPTHペプチドのアミノ酸3から34の間に位置する三次元エピトープを認識および特異的に結合するが、非酸化ヒトPTH(1-84)およびこの断片には結合しない抗体が結合した固相と、血漿または血清の前記サンプルとを、接触させる工程を含む。

30

## 【0013】

前記方法は、2-サイトイムノアッセイの使用を包含してもよい、免疫反応性があるヒトPTH(iPTH)ペプチドの測定を含み、一方の抗体が、PTH受容体1および2へのPTHペプチドの結合に関与するドメインに結合するモノクローナル抗体である。また、前記測定には、2-サイトイムノアッセイの使用を含んでいてもよく、一方の抗体が、ヒトPTHの一番端のアミノ末端のアミノ酸バリンおよびセリンを含む抗原決定基に結合し、他方の抗体が、ヒトPTH配列のアミノ酸14から34の間の領域に結合する。他の実施形態では、免疫反応性があるヒトPTH(iPTH)の測定が、2-サイトイムノアッセイの使用を含んでいてもよく、一方の抗体が、ヒトPTH配列のアミノ酸1から13を含む抗原決定基に結合する。

40

## 【0014】

酸化ヒトPTHペプチドに対して用いられる抗体は、8位および/または18位において酸化メチオニンを含むヒトPTH配列のアミノ酸3から34の間の三次元エピトープに選択的に結合する。言い換えれば、分析により、酸化ヒトPTH配列に特異的な、用いられるモノクローナル抗体が、メチオニンスルホキシドまたはメチオニンスルホンのいずれか1つを含む、ヒトPTH配列のアミノ酸3から34の間の立体配置的なエピトープに結合することが示された。

## 【0015】

本開示の態様は、免疫反応性ヒトPTH(iPTH)の割合および酸化ヒトPTHペプチドのアミノ酸3から34の間に位置する三次元エピトープを認識および選択的に結合す

50

る前記抗体によって結合されたPTHペプチドの量の測定に関する。

【0016】

さらなる態様は、酸化ヒトPTHペプチドのアミノ酸3から34の間に位置する三次元エピトープを認識および選択的に結合する抗体を有する固相および上記に開示される血漿または血清における免疫反応性インタクトヒトPTH(iPTH)を測定するための抗体の組み合わせを含むキットに関する。

【0017】

開示される方法は、ヒト副甲状腺ホルモンの酸化された抗原決定基に結合する抗体と前記サンプルとを接触させることによって、酸化ストレスを受けやすく、メチオニン8もしくは18のいずれかまたはこの両方またはトリプトファン22において酸化されたPTHペプチド鎖から、患者由来の血漿または血清のサンプルを精製することを一般に含む。PTHの酸化およびその後の不活性化は、血液透析治療を受けているCKD患者が、従来のPTH測定に干渉する酸化ストレスを受けているため、問題点となる。前記方法は、さらに、血液循環中に副甲状腺の細胞によって分泌されるPTHペプチドの割合と、血液透析治療による酸化ストレスによって酸化されて血液循環からクリアランスされるPTHペプチドの平衡に相当するPTHの状態(以下「n-oxPTH」状態)を得るために、受容体への結合およびcAMP-シクラーゼの活性化を担うドメインを少なくとも含有する、ヒト副甲状腺ホルモンのペプチドの濃度を測定するイムノアッセイによる、前記精製サンプル中の分泌副甲状腺ホルモンの状態の決定を含む。次いで、開示される方法は、分泌副甲状腺ホルモンの調節に関する薬物療法の必要性、または副甲状腺ホルモンの直接的な補充の必要性を決定するために、血液透析患者総死亡率が低いn-oxPTHの状態と、測定されたn-oxPTHの状態とを比較する。

10

20

【0018】

方法は、ヒト副甲状腺ホルモンの酸化抗原決定基に結合する抗体が結合した固相と前記血漿サンプルを接触させる工程を含む。結合剤は、スラリーの形態をしていてもよい。

【0019】

好ましい態様によれば、前記方法は、2-サイトイムノアッセイの使用を含み、一方の抗体が、PTH受容体1および2へのPTHペプチドの結合に関与するドメインに結合するモノクローナル抗体である。抗体は、WO2003/003986(Hutchinson JS)において開示されるように、またはWO01/44818(Armbuster FP et al)もしくはUS6,030,790(Adermann et al)において記載されるように、ヒト副甲状腺ホルモンのアミノ酸1から13の間のエピトープを認識および選択的に結合するものであってもよい。分泌された効力のあるヒトPTHペプチドの濃度を測定するための、さらに適した抗体は、WO00/42437において開示される。

30

【0020】

他の実施形態では、前記方法は、2-サイトイムノアッセイの使用を含み、一方の抗体が、ヒトPTHの一番端のアミノ末端のアミノ酸バリンおよびセリンを含む抗原決定基に結合し、他方の抗体が、ヒトPTH配列のアミノ酸14から34の間の領域に結合する。

【0021】

好ましい実施形態では、免疫反応性があるPTHペプチドを精製するための抗体が、8および/もしくは18におけるいずれかのメチオニンでのまたは22位のトリプトファンでの天然の副甲状腺ホルモンの酸化に続く、ペプチド立体構造の変化によって形成される、ヒト副甲状腺ホルモンのアミノ酸3から34の間に位置する三次元抗原決定基を認識する。利用可能なNMRデータはないが、PTHペプチド立体構造の同様の変化が、一番端のアミノ末端のアミノ酸セリンおよびバリンのタンパク分解性の除去によってもたらされ、そのため立体構造抗体が、ミスフォールドされたペプチドをも除去することも、当業者は十分に理解しているであろう。立体構造の変化が、酸化ストレスに続くペプチドの酸化を相乗的に導くかどうかはまだ解明されていない。しかしながら、酸化および立体構造の変化は、血漿からのPTHのクリアランスの割合を暗示する。

40

50

## 【0022】

本発明の態様は、慢性腎疾患に罹患している患者由来の血清または血漿サンプルの試験に関する。さらなる態様は、尿毒症の患者または甲状腺機能亢進症を有する患者由来のサンプルの試験に関する。

## 【0023】

本発明は、好ましい実施形態を例証する添付の表および図と共に読まれた場合、最も理解される。しかしながら、本発明が図中に開示される特定の実施形態に限定されないことが理解される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0024】

【図1】340人の血液透析患者における、測定された非酸化副甲状腺ホルモンの状態 ( $n\text{-oxPTH}$ ) についての測定血清値の相対度数 (%) 分布を示す図である。

【図2】340人の血液透析患者における死亡についてのKaplan Meier生存曲線を示す図である；患者は、測定された非酸化副甲状腺ホルモン ( $n\text{-oxPTH}$ ) の状態濃度の三分位値に層別化した (ログランク検定、カイ2乗 = 14.30 ;  $p = 0.0008$ ) 。

【図3】健康な対象における正常な  $iPTH$  範囲 ( $70\text{ ng/L}$ ) よりも高い、測定  $iPTH$  濃度を有する血液透析患者における死亡についてのKaplan Meier生存曲線を示す図である。(A)は患者が、測定可能な非酸化副甲状腺ホルモン ( $n\text{-oxPTH}$ ) の状態の中央値に従って層別化された場合 (ログランク検定、カイ2乗 = 0.046 ;  $p = 0.80$ )、 $n\text{-oxPTH}$  の状態は、患者の予後と相関しない。(B)は患者が、 $iPTH$  濃度の中央値に従って層別化された場合 (ログランク検定、カイ2乗 = 3.852 ;  $p = 0.049$ )、 $iPTH$  アッセイを使用して測定される酸化  $PTH$  の濃度は、患者の予後を予測する。

【図4】340人の血液透析患者における死亡についてのKaplan Meier生存曲線を示す図である。国際的なガイドラインに従って、患者を、非常に低い ( $< 20\text{ ng/L}$ )、低い ( $20$  から  $65\text{ ng/L}$ )、中程度 ( $65$  から  $150\text{ ng/L}$ )、目標 ( $150$  から  $300\text{ ng/L}$ ) および高い ( $> 300\text{ ng/L}$ ) 濃度に相当する5つの  $iPTH$  カテゴリーに層別化した (カイ2乗 16.35 ; ログランク検定によって  $P = 0.0026$ )。  $iPTH$  濃度および予後の間のJ型のパターンは、血液透析患者について特徴的であり、従って、今回の研究において見られた発見が全体的に適切であることを示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0025】

動物実験は、メチオニン残基の  $PTH$  の酸化が生物学的活性の損失をもたらすことを示した。あらゆる酸化ストレスまたは副甲状腺ホルモンの酸化的非活性化は、血液循環中への副甲状腺ホルモンの分泌の増加によって、補い得、またはさらに過剰に補い得る。ここで、本発明者らは、治療上の決定および特定の薬物療法のきっかけとなる、酸化ストレスパラメーターおよび血液透析患者における死亡率へのこの影響力を開示する。より正確には、血清中の非酸化インタクト免疫反応性  $PTH$  ( $n\text{-oxPTH}$ ) およびインタクト免疫反応性  $PTH$  ( $iPTH$ ) の影響を比較し、血液透析患者の生存と関連させる。

## 【0026】

「インタクト  $PTH$ 」は、受容体への結合および  $cAMP$  - シクラーゼの活性化を担うドメインを少なくとも含有する  $PTH$  ペプチドを検出する1 - または2 - サイトイムノアッセイによって測定される場合、免疫反応性  $PTH$  ペプチドの量または濃度として定義される。このドメインは、 $PTH$  のタンパク質のアミノ末端部分 ( $hPTH$  (1 から 37)) に位置する。 $cAMP$  受容体への結合ドメインは、 $His^{14}$  から  $Phe^{34}$  の領域を含み、 $DNA$  合成刺激ドメインは、 $Asp^{30}$  から  $Phe^{34}$  を含む。完全なアミノ末端ペプチド  $hPTH$  (1 - 34) は、正確なフォールディングおよび  $cAMP$  依存性シグナル経路の刺激に必要とされる。刺激能力は、 $Ser^1$  および  $Val^2$  の欠失と同時に失われるが、 $cAMP$  受容体への結合能力は、この欠失によって影響を受けず、活性化部位お

10

20

30

40

50

よび受容体への結合部位が異なるドメインに位置することを示す。

【0027】

PTHの生物活性は、PTHペプチド鎖の正確なフォールディングならびに8位および/もしくは18位の1つ以上のメチオニンのまたはトリプトファン22での酸化が存在しないことによって影響を受けるので、上記に定義される免疫反応性「インタクトPTH」は「生物活性PTH」と同義ではない。多数の研究にもかかわらず、副甲状腺ホルモンの生物活性およびこの非活性化についての経路は、不明瞭なままであり、「有効な生物活性」を含むと言われるPTHペプチドの実体とほとんど関連させることができない。患者におけるPTH生物活性および血漿免疫活性の消失の不一致は、動的なPTHの平衡を示唆し、そのため、PTHの薬物療法には、刻一刻の「インタクトPTH」活性の分泌の割合および刻一刻の「oxPTHペプチド」のクリアランスの割合の測定が必要とされ、そのため、開示されるn-oxPTHの状態の測定は、両方のPTHの割合を考慮し、患者によって必要とされる、適したPTHの薬物療法のための方向を示すことができる。

10

【0028】

n-oxPTHの測定は、例えばhPTH(35-84)およびこの断片のような、多くのC-末端PTH分解産物と臨床的に妥当な交差反応性を有しない、「生物活性」PTHの測定のための試験系を使用して実行することができる。これらには、例えばRoche Diagnostics GmbH、MannheimのElesys(商標)2010 PTHイムノアッセイおよびScantibodies社のCAP-PTH-IRMAがある。エレクトロケミルミネセンスイムノアッセイは、hPTHのアミノ酸26から32を含むアミノ末端立体構造エピトープに対するモノクローナル捕捉抗体およびアミノ酸55から64に対応するC-末端hPTHエピトープに対するルテニウム複合体マクトレーサー抗体を用いる。モノクローナル捕捉抗体は、不活性な「大きなhPTH(7から84)断片」を認識するが、hPTH(1-34)、hPTH(1-35)またはhPTH(1-37)などのような生物活性hPTH-断片を認識しない(Gao *et al.*, 2000, Poster M455, ASBMR 22nd Annual Meeting, Roth H *et al.* (2000), Poster PI 288; 11th International Congress of Endocrinology, Sydney)。Scantibodies社(Santee, CA, US)のCAP-PTH-IRMAは、大きなPTH(7-84)断片に結合しないと記載される、hPTH(1-6)のN-末端領域に対するポリクローナル抗体を用いる。さらに、Quest Diagnostics Inc.は、「Bio-Intact PTH test」を導入し、FDAの許可を得たが、これは、分解性向を有する分子の断片ではなく、副甲状腺ホルモン分子全体を認識すると言われているからである。現在、PTH測定は、血液における不活性PTH断片の存在によって複雑になることが多く、これは、このような試験の臨床的な有用性に影響を与える。84アミノ酸鎖からなるPTH分子全体を認識する際に、Bio-Intact PTHアッセイは、PTHの生物学的効果にとって不可欠であると考えられるPTHのN-末端領域に対して特異性を有する。Bio-Intact PTH試験は、アミノ酸1から13を含む三次元エピトープに結合すると記載される専用の抗体を使用する。血液循環中へのhPTHの分泌の割合を決定するために如何なるイムノアッセイが使用されようとも、結果として生じるhPTHの状態は、これらのイムノアッセイが、分解の経路、多くの活性、部分的活性および不活性PTH断片、血清または血漿におけるこれらの異なる半減期などのような、すべての関連因子を考慮することができるとは限らないので、真のPTH生物活性を反映しない。

20

30

40

【0029】

本出願は、n-oxPTHの三分位値が上位のn-oxPTH濃度を有する血液透析患者は、n-oxPTHの三分位値が下位の患者と比較して、生存の増加を示すことを明らかにする。多変数調整の後に、血液透析患者における死亡の見込みについて、n-oxPTH三分位値が高くなるほどその見込みが低下したのに対して、年齢が高くなるほどその見込みが増加した。本発明の開示の妥当性は、本発明者らのコホートからのiPTHデー

50

タを、国際的なガイドラインによる5つのカテゴリーへ層別化することにより、前記ガイドラインによる目標のiPTH濃度を有する血液透析患者が、他のグループと比較して、より長い生存期間の中央値を有することを明らかにするという事実によって強固なものとなっている。J型の生存パターンは、多数の死亡率メタアナリシスから、iPTHデータ由来の結果を確証するものである。PTHの酸化がこの生物学的活性の損失をもたらすことはよく知られているが、現在のPTHアッセイはPTHの分泌形態およびクリアランス形態を区別しない。正常範囲の上限(70ng/L)を超えるiPTHを示す血液透析患者のサブグループにおける本発明者らの分析は、クリアランスおよび酸化の増加の悲惨な影響から、ホルモンの真の影響を明確に区別した。免疫反応性PTHのクリアランスの増加は、ほとんどの現在のイムノアッセイによって注目されているが、酸化および非活性化の増加については注目されていない。本発明者らは、このサブグループにおける死亡率の増加が、生物学的に活性なn-oxPTHには依存せず、全タンパク質酸化およびタンパク質の機能と構造の損傷に関連する酸化の代わりとしてのiPTHのタンパク質酸化に依存したことを観察した。

#### 【0030】

ヒトPTHは、84アミノ酸を有するポリペプチドとして副甲状腺の主細胞によって分泌される。血液循環中に分泌した後に、本質的なドメインを含む生物活性PTHペプチドは、骨および腎臓において高濃度で存在する副甲状腺ホルモン1受容体ならびに中枢神経系、膵臓、精巣および胎盤において高濃度で存在する副甲状腺ホルモン2受容体の活性化によって、血中カルシウムを増加させる。これらの生物活性PTHペプチドの半減期は、わずかおよそ4分間である。また、これらのPTHペプチドの酸化が生物学的活性の損失をもたらし得ることも知られていた(Galceran T et al, in Absence of biological effects of oxidized parathyroid hormone - (1-34) in dogs and rats. *Endocrinology*. 1984; 115: 2375-2378; Horiuchi N. Effects of oxidation of human parathyroid hormone on its biological activity in continuously infused, thyroparathyroidectomized rats. *J Bone Miner Res*. 1988; 3: 353-358; Zull JE et al, in Effect of methionine oxidation and deletion of amino-terminal residues on the conformation of parathyroid hormone. *Circular dichroism studies*. *J Biol Chem*. 1990; 265: 5671-5676)。実際に、多くの刊行物が、慢性腎不全患者における酸化ストレスの影響を扱ってきた(Martin-Mateo MC et al (1999), *Ren Fail* 21: 55-167; Hasselwander O et al (1998) (*Free Radic Res* 29: 1-11; Zoccali C et al. (2000) *Nephrol Dial Transplant* 15: Suppl. 2; Canaud B et al (1999) *Blood Purif* 17: 99-106)。様々なワーキンググループが、酸化副甲状腺ホルモンおよびこの生物学的活性について調査してきた(Alexiewicz L M et al. (1990), *J Am Soc Nephrol* 1: 236-244; Zull J E et al (1990) *J Biol Chem* 265: 5671-5676; Pitts T O et al. (1988) *Miner Electrolyte Metab* 15: 267-275; Horiuchi N (1988) *J Bone Miner Res* 3: 353-358; Frelinger A L et al. (1986) *Arch Biochem Biophys* 244: 641-649; Galceran T et al. (1984) *Endocrinology* 115, 2375-2378; Frelinger A L et al. (1984) *J Biol Chem* 259: 5507-

10

20

30

40

50

5513; O'Riordan J L H et al. (1974) J Endocr  
63:117-124; Logue F C et al (1991) Ann Clin  
Biochem 28:160-166; Logue F C (1991b) J Imm  
un Meth 39:159)。しかしながら、透析患者における酸化ストレスならび  
に罹患率および総死亡率に対する影響は、これまでに、調査も認識もされていない。

#### 【0031】

いわゆるインタクトPTH (iPTH) およびバイオインタクト (bio-intact) サンドイッチアッセイは、非酸化PTHペプチド鎖 (n-oxPTH) および酸化PTHペプチド鎖 (oxPTH) を区別しない。質量分析を使用して、本発明者らは、最近、血液透析患者における酸化ストレスが、インビボにおいてヒトPTHの酸化ならびに8位および/または18位において酸化メチオニン残基を有する様々な不活性PTH産物を導き得ることを実証した (Hocher B et al in Measuring parathyroid hormone (PTH) in patients with oxidative stress - do we need a fourth generation parathyroid hormone assay? PLoS One, 2012; 7:e40242)。この発見および血漿または血清における非酸化および酸化「インタクト」PTHペプチド鎖の間での免疫学的な区別は、血液透析患者への新しい薬物療法を可能にするn-oxPTHの状態のきっかけとなる。以後、用語n-oxPTHは、PTHペプチド鎖の酸化による血清または血漿におけるPTHのクリアランスを考慮した後の、血清または血漿における、上記に定義されたとおりの免疫反応性「インタクト」PTH (iPTH) の濃度に対して使用される。血液透析患者の総死亡率が、免疫反応性の分泌インタクトPTHと、PTHのアミノ末端部分における酸化に対して免疫反応性であるPTHペプチド鎖の平衡に関連づけられることを本発明者らが発見したので、測定されるn-oxPTH濃度が血清中に存在する「真の」PTH生物活性を示すかどうかは関係がない。酸化されたPTH鎖が除去された後にのみ、その結果として生じる、血清の中に分泌されているiPTHの割合が、インビトロのパラメーターを与え、このパラメーターは、ビタミンD、リン結合剤またはカルシウム受容体作動薬の治療が、国際的なガイドラインによって提供される治療目標を実現するための調整を必要とするかどうかに関しての治療上の決定を可能にする。血液透析患者における総死亡率と相関する動的PTHパラメーターの発見は、そのうえ、適切な薬物療法および治療を可能にする。下記に記載される実施例では、血清中のPTH濃度は、直接に(全インタクト副甲状腺ホルモン、iPTH)、および酸化したヒトPTHペプチド鎖に結合するモノクローナル抗体を使用してサンプルから酸化したPTHの分子の除去した後の両方で、第3世代インタクトPTHイムノアッセイ系 (Elesys (商標) 2010 PTH Roche) によって測定した。

#### 【0032】

本発明者らの研究における血液透析患者(224人の男性/116人の女性)は、66歳の年齢中央値を有した。170人の患者(50%)は、5年間の経過観察期間の間に死亡した。n-oxPTH中央値濃度は、死亡した患者(5.0 ng/L; p=0.002)と比較して、生存者(7.2 ng/L)においてより高かった。生存分析は、最も低いn-oxPTH三分位値と比較して、最も高いn-ox-PTH三分位値において生存の増加を示した(カイ2乗14.3; p=0.0008)。生存期間の中央値は、最も高いn-oxPTH三分位値において1702日であったのに対して、最も低いn-oxPTH三分位値においてわずか453日であった。多変数調整Cox回帰は、年齢が高くなるほど死亡の見込みを増加させたのに対して、n-oxPTHが高くなるほど、死亡の見込みを低下させたことを示した。iPTHアッセイの正常範囲の上限(70 ng/L)を超える、ベースライン時の分泌iPTH濃度を有する患者のサブグループを分析する他のモデルは、このサブグループにおける死亡率がn-oxPTH濃度ではなくPTH酸化に関連したことを明らかにした。国際的なガイドラインに従う目標PTH濃度(PTH目標=150から300ナノグラム/L)と生存者におけるn-oxPTH中央値(7.2 ng

10

20

30

40

50

/L)との間の大きな数字の差異は、当業者の注意をのがれることはなく、また、これを予想することはできなかつたであろう。結論として、血液透析患者の死亡率に対するn-oxPTHおよびiPTH濃度の予知力は、実質的に異なる。そのため、n-oxPTHの測定は、動的PTHホルモンの状態をより正確に反映する。iPTH関連性の死亡率は、とりわけiPTH濃度が高い場合、主に、PTHタンパク質酸化および酸化ストレスに関連する死亡率を反映する。これは、新しい薬物療法プログラムおよび治療のきっかけとなる。当業者は、PTHの酸化の程度および本質的な酸化ストレスの測定が、新しい治療および薬物療法プログラムを導くことを十分に理解するであろう。従って、血清または血漿内の酸化PTHペプチドの定量的な量は、調節およびモニタリングを必要とする重要な医学的パラメーターに相当する。

10

#### 【実施例】

#### 【0033】

##### [実施例1]

##### PTH測定

第3世代のエレクトロケミルミネセンスPTHイムノアッセイシステムによって、直接に(iPTH)、および酸化ヒトPTH(n-oxPTH)に対して産生されたモノクローナル抗体を使用してサンプルからミスフォールドまたは酸化したPTH分子を事前に除去した後の両方で、PTHを測定した。酸化PTHの除去は、下記に記載されるように、抗ヒト酸化PTHモノクローナル抗体を使用して実行した。抗ヒト酸化PTHモノクローナル抗体を、CNBr活性化Sephacryl S4B(GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden)上に固定した。100μl一定分量のスラリーをカラム(MobiSpin Column, MoBiTec, Göttingen, Germany)に充填し、PBSバッファー、pH7.4により平衡化した。次いで、500μlの血漿サンプルをカラムに加え、室温で2時間、回転混合しながらインキュベートし、250μlの0.1M酢酸アンモニウムバッファーpH7.0により洗浄し、その後、20%アセトニトリルを含有する、250μlの0.1M酢酸アンモニウムバッファーpH7.0により洗浄し、次いで、200μlの溶出バッファー(0.05Mギ酸、pH3.5)により2回溶出した。フロースルーを別々に収集し、凍結乾燥した。

20

#### 【0034】

次いで、サンプルを500μlのPBSバッファー、pH7.4中で戻し、一定分量をiPTHについて分析した。用いたiPTHイムノアッセイ(ECLIA Elecsys 2010; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)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型モノクローナル抗体に基づく。測定は、Roche Modular E 170で実行した。それぞれ、35.0および180.0ng/Lの濃度で、アッセイ内のCVは、4.1%、また、アッセイ間のCVは、5.8%であった。

30

#### 【0035】

##### [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はBALB/cマウスにおいて産生した。マウスは、腹腔内において、不完全フロイド(鉱油のみ)と共に、一次および二次免疫のために、200μgの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。それぞれの抗血清を、非酸化ビオチン-hPTH(1-38)への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2重抗体分離技術およびトレーサーとして、<sup>125</sup>I-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は、同じ方法で、即ち、ヒトPTH(1-84)ではなく、ヒト酸化PTH(aa 1-84)への結合について、スクリーニングした。

40

50

## 【0036】

モノクローナル抗体 (MAB) の特異性の最終的な特徴付けのために、ならびに酸化状態およびキラリティー (8位、18位およびこの両方での Met - R - O、Met - S - O および Met O<sub>2</sub>) とは無関係に、酸化 hPTH (1 - 38) ペプチドに共通する、例えば、酸化 hPTH (aa 1 - 38) のすべての形態に共通す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同定のために、抗体を、CNBr 活性化 Sepharose 4B (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) 上に固定した。100 μl 一定分量のスラリーをカラム (MobiSpin Column, MoBiTec, Gottingen, Germany) に充填し、PBS バッファー、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 の平衡化バッファー中に溶解し、カラム上加えた。カラムを室温で1時間、回転させながらインキュベートし、300 μl の平衡化バッファーにより洗浄し、その後、300 μl の蒸留水により3回洗浄し、次いで、200 μl の溶出バッファー (0.1% TFA) により2回溶出した。フロースルー、洗浄画分 (平衡化バッファーおよび水) ならびにカラムの溶出物を別々に収集し、凍結乾燥し、nanoLC-ESI-FT-MS によって分析した。酸化 hPTH (aa 1 - 84) およびこの断片のすべての形態上に存在する立体構造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徴付けのために選択した。選択した oxPTH-ConformAB は、酸化およびミスフォールド hPTH 断片のすべての形態を高い親和性で特異的に認識したが、非酸化 PTH (aa 1 - 84) は認識しなかった。

## 【0037】

## [ 実施例 3 ]

## 患者

340人の血液透析患者における前向きコホート研究について5年間、経過観察した。本発明者らの適格性判定基準により、末期の慢性腎疾患ステージ5のために血液透析治療を受けているすべての成人の一般の患者およびインフォームドコンセントがあることを含めた。それぞれの患者からのインフォームドコンセントおよび地方の倫理委員会による倫理の承認を得た。組み入れ時の透析歴およびセッション当たりの血液透析治療の継続時間についてのデータを得た。患者はすべて、ダイアライザーの再利用なしで生体適合性の膜を使用して、4から5時間、毎週、3回、定期的に透析した。血流量は、250から300 mL / 分であり、透析液流量は、500 mL / 分であり、透析液伝導率は、135 mS であった。血圧は透析前に測定した。透析前の血液サンプルは研究エントリー時に得た。血液は、血液透析セッションの開始直前に収集した。

## 【0038】

臨床および検査データは、年齢、性別、薬物療法 (アンジオテンシン変換酵素阻害剤、遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬およびエリトロポイエチンの使用)、ボディマス指数 (身長<sup>2</sup>で割った体重として計算)、収縮期および拡張期血圧、血清アルブミン、血清コレステロール、血清トリグリセリド、血清尿素、血清クレアチニン、血清カルシウム、血清カリウムならびに血清リンを含めた。

## 【0039】

170人の患者 (50%) は、5年間の経過観察期間の間に死亡した。死亡の原因は、急死、感染症または癌を含む心血管系として分類された。

## 【0040】

## [ 実施例 4 ]

## n - oxPTH 測定の統計分析

図1は、66歳の年齢中央値 (IQR、56から75歳)、266日の透析の開始からの時間中央値 (透析歴) (IQR、31から1209日) および1.2の透析用量中央値 (kt/V) (IQR、1.1から1.3) での、340人の血液透析患者 (224人の男性および116人の女性) における n - oxPTH 濃度の分布を示す。慢性腎疾患の原

因は、113症例(33%)において腎硬化症、107症例(31%)において糖尿病性腎症、29症例(9%)において慢性糸球体腎炎、9症例(3%)において多発性嚢胞腎疾患および82症例(24%)において他/未知であった。n-oxPTH濃度中央値は、5.9 ng/L(IQR、2.4から14.0 ng/L)であった。n-oxPTH濃度は、男性および女性において差はなかった(5.9 ng/L; IQR、2.4から14.2 ng/L; n=224; 対5.5 ng/L; IQR、2.4から14.0 ng/L; n=116; p=0.915)。

【0041】

表1は、n-oxPTHの三分位値によって層別化した治療事例および検査変数の分布を要約する。三分位値の限界値は、それぞれ3.3 ng/Lおよび10.3 ng/Lのn-oxPTH濃度であった。n-oxPTHの三分位値が上位の血液透析患者は、より高い体重、ボディマス指数およびより高い尿素、食物タンパク質摂取量について代用される、より高いクレアチニン、筋肉量について代用されるならびに鈣質代謝障害の典型的なサイン、即ち、低血清カルシウム濃度および高血清リン濃度を有した。さらに、血清リン濃度は、正比例して(Spearman  $r=0.245$ ;  $p<0.001$ )、血清カルシウム濃度は、反比例して(Spearman  $r=-0.160$ ;  $p=0.004$ )、n-oxPTH濃度と相関した。他方では、年齢(Spearman  $r=-0.099$ )および透析歴(Spearman  $r=0.098$ )は、n-oxPTHと有意に相関しなかった。

【0042】

10

20

【表 1】

表 1

非酸化インタクト副甲状腺ホルモン (n-oxPTH) の三分位値による  
血液透析患者のベースライン臨床のおよび生化学的特質

特質	1 三分位値	2 三分位値	3 三分位値	P 値
年齢 (年)	68 (57-76)	67 (56-77)	65 (54-72)	0.125
性別 (女性%)	35%	35%	35%	0.928
透析歴 (日)	241 (31-1233)	263 (58-913)	425 (31-1507)	0.429
真性糖尿病 (%)	31%	46%	38%	0.076
喫煙者 (%)	31%	30%	35%	0.732
体重 (kg)	70 (60.0-80)	70 (60-78)	75 (67-85)	0.003
ボディマス指数 (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>b</sup>	24.3 (21.1-26.5)	24.1 (21.9-26.3)	25.6 (22.9-29.4)	0.003
収縮期血圧 (mmHg)	134 (110-146)	133 (112-149)	138 (118-153)	0.326
拡張期血圧 (mmHg)	69 (58-80)	67 (57-80)	72 (60-83)	0.185
ヘモグロビン (mg/dL)	10.0 (9.1-11.4)	10.2 (9.3-11.2)	10.5 (8.9-11.8)	0.589
白血球 (10 <sup>9</sup> /L)	8.0 (5.9-10.1)	8.4 (6.0-10.8)	8.1 (6.3-11.3)	0.895
血小板 (10 <sup>9</sup> /L)	218 (178-272)	221 (167-275)	230 (174-296)	0.846
血清アルブミン (g/L)	3.3 (2.9-3.7)	3.3 (2.8-3.6)	3.4 (2.9-3.8)	0.371
血清コレステロール (mg/dL)	152 (129-186)	151 (125-190)	150 (126-189)	0.963
尿素 (mg/dL)	69 (47-93)	57 (48-89)	77 (57-102)	0.026
血清クレアチニン (mg/dL)	5.5 (3.8-7.9)	5.6 (3.7-7.9)	7.1 (5.8-9.3)	0.001
血清カリウム (ミリモル/L)	4.8 (4.0-5.3)	4.5 (4.1-5.2)	4.9 (4.2-5.3)	0.238
血清カルシウム (ミリモル/L)	2.30 (2.19-2.50)	2.19 (2.06-2.37)	2.22 (2.06-2.40)	0.001
血清リン (mg/dL)	1.55 (1.07-1.91)	1.43 (1.21-1.90)	1.90 (1.36-2.30)	0.001
透析用量 (ktV)	1.2 (1.1-1.3)	1.2 (1.1-1.4)	1.2 (1.0-1.4)	0.227
アンジオテンシン変換酵素阻害剤 (%)	26%	26%	26%	0.992
β-遮断薬 (%)	60%	60%	60%	0.996
カルシウムチャネル遮断薬 (%)	28%	34%	29%	0.583
エリトロポイエチン療法 (%)	57%	53%	42%	0.064

a) 連続変数は中央値および四分位範囲として示す。グループの間で、連続変数についてノンパラメトリック Kruskal-Wallis 検定を使用し、カテゴリー変数についてカイニ乗検定を使用し、比較を行った。

b) ボディマス指数は、2乗したメートルでの身長で割ったキログラムでの体重として計算した。

## 【0043】

170人の患者(50%)は、5年間の経過観察期間の間に死亡した。死亡は、研究エントリー後、217日の中央値(IQR、67から564日)で起こった。死亡の原因は、102人の患者(60%)において心臓血管系疾患、39人の患者(23%)において

10

20

30

40

50

感染症、19人の患者(11%)において癌および10(6%)において他/未知の理由であった。n-oxPTH中央値濃度は、死亡した患者(5.0 ng/L; IQR、1.9から11.1 ng/L; Mann Whitney検定によって $p = 0.002$ )と比較して、生存者(7.2 ng/L; IQR 3.1から16.5ナノグラム/L)においてより高かった。生存分析は、下位のn-oxPTH三分位値と比較して、上位のn-oxPTH三分位値において生存の増加を示した(カイ2乗14.30; ログランク検定によって $P = 0.0008$ )。生存期間の中央値は、上位のn-oxPTH三分位値において1702日であったのに対して、下位のn-oxPTH三分位値においてわずか453日であった(図2)。

【0044】

多変数調整生存分析は、変数の保持について $p < 0.05$ を使用する変数減少法(backward)による変数選択と共に、比例ハザード回帰モデルを使用して実行した。試験した変数は、血漿n-oxPTH、iPTHカテゴリー、透析用量、透析歴、年齢、ヘモグロビンおよび血清リンであった。iPTHカテゴリー、透析用量、透析歴および血清リンは、有意な影響を示さなかった。この多変数調整Cox回帰は、年齢が高いほど死亡の見込みを増加させたことを示したのに対して、n-oxPTHが高いほど、死亡の見込みを低下させた(表2)。

【0045】

【表2】

表2  
血液透析患者における死亡の見込みを示す  
多変数調整Cox回帰

変数	B (SE)	オッズ比	(95% CI)
n-oxPTH三分位値	-0.276 (0.103)	0.759	(0.620 to 0.929)
年齢	0.068 (0.008)	1.070	(1.053 to 1.087)
ヘモグロビン	-0.169 (0.055)	0.844	(0.756 to 0.940)

多変数調整生存分析は、変数の保持について $p < 0.05$ を使用する変数減少法による変数選択と共に、比例ハザード回帰モデルを使用して実行した。試験した変数は、血漿n-oxPTH、iPTHカテゴリー、透析用量、透析歴、年齢、ヘモグロビン、血清リンであった。iPTHカテゴリー、透析用量、透析歴および血清リンは、有意な影響を示さなかった。

【0046】

さらに、正常範囲の上限(70 ng/L)を超えるiPTHを有する患者のみを分析したモデルは、このサブグループにおける死亡率が、生物学的に活性なn-oxPTHではなく、iPTHのタンパク質酸化に依存することを明らかにした。言い換えれば、n-oxPTHは、正常範囲の上限を超えるiPTH濃度を有する患者における死亡率に影響を及ぼさなかったのに対して、これらの患者において、iPTHは総死亡率に関連した(図3)。

【0047】

他のモデルを使用して、本発明者らは、非常に低い( $< 20$  ng/L)、低い(20から65 ng/L)、中程度(65から150 ng/L)、目標(150から300 ng/L)および高い( $> 300$  ng/L)に相当する国際的なガイドラインに従う5つのカテゴリーにiPTH濃度を演繹的に層別化した。生存分析は、J型のパターンを示した、即ち、目標iPTH濃度を有する患者は、他のカテゴリーと比較して、より長い生存期間の中央値を有した(カイ2乗16.35; ログランク検定によって $P = 0.0026$ )。i

PTH濃度および予後の間のこのJ型のパターンは、血液透析患者についての特質であり、これによって、本発明者らのデータが、典型的な血液透析コホートから得られたことを確認する(図4)。

【0048】

[実施例5]

統計分析

連続変数は、四分位範囲(IQR)および中央値として表現し、ノンパラメトリックMann-Whitney検定またはノンパラメトリックKruskal-Wallis検定および必要に応じてDunn多重比較post hoc検定により比較した。変数の間の関連性は、ノンパラメトリックSpearman相関を使用して試験した。事象までの時間についての(Time-to-event)分析は、Kaplan Meier方法を使用して実行した。生存曲線の比較は、ログランク(Mantel-Cox)検定を使用して実行した。カテゴリ変数は、比率として表現し、カイ二乗検定により比較した。多変数調整生存分析は、比例ハザード回帰モデルを使用して実行した。多変数モデルは、変数の保持について $p < 0.05$ を使用する変数減少法による変数の選択により構築した。45人の患者(13%)が、経過観察の間に腎臓移植を経験した。これらの患者は、移植の日に検閲した。仮説検定はすべて、両側とし、統計的有意性は0.05未満のp値を有することとして定義した。統計分析は、GraphPad Prism 5.0(GraphPad Software, San Diego, CA)またはSPSS for windows(version 15; SPSS, Chicago, IL)を使用して行った。

10

20

【0049】

要約

本出願は、血液透析患者の生存に関して、分泌されたインタクトなPTH(iPTH)、酸化によるPTH活性のクリアランス、結果として生じる非酸化インタクトPTH(n-oxPTH)に対応するパラメーターの間の、血漿または血清における動的平衡を試験する。n-oxPTH測定は、酸化PTHペプチド鎖からサンプルを精製した後にインタクトPTHイムノアッセイにより実行した。本研究は、n-oxPTHの三分位値が上位の血液透析患者が、n-oxPTHの三分位値が下位の患者と比較して、生存期間の増加を享受することを示す。多変数調整の後に、血液透析患者における死亡についての見込みについて、n-oxPTH三分位値が高くなるほど低下したのに対して、年齢が高くなるほど増加した。本開示の妥当性は、本発明者らのコホートからのiPTHデータを、国際的なガイドラインによる5つのカテゴリへ層別化することにより、前記ガイドラインによる目標のiPTH濃度を有する血液透析患者が、他のカテゴリと比較して、より長い生存期間の中央値を有したことを明らかにするという事実によって強固なものとなっている。このJ型の生存パターンは、多数の死亡率メタアナリシスから、iPTHデータ由来の結果を確認するものである。正常範囲の上限(70ng/L)を超えるiPTHを示す血液透析患者のサブグループの分析は、酸化にさらされたPTHペプチドの負の影響から、分泌されたiPTHペプチドの正の影響を明確に区別した。このサブグループにおける死亡率の増加は、iPTHのタンパク質酸化に依存した。

30

40

【0050】

このトピックに精通している腎臓学者は、この分析が、古典的な診断基準に従って二次性副甲状腺機能亢進症を有すると考えられる患者を意味する非常に高いiPTH濃度を有する透析患者に適用されるべきであることを十分に理解するであろう。本発明者らの研究コホートにおける、このような高いiPTH濃度を有する患者の数は、明確な説明を可能にするには少なすぎた。EOLVE研究コホートにおいて調査されるような二次性副甲状腺機能亢進症を有する透析患者のコホート由来の分析は、この重要な臨床的論点に対処するのを助け得る。

【0051】

現在のガイドラインは、幾つかの研究が300ng/Lを超えるPTH濃度でより悪い

50

予後を観察したので、PTH濃度を定期的に測定し、目標PTH濃度（即ち150から300 ng/L）を得ることを推奨している。対照的に、本発明者らは、上位の三分位値の、即ち、10.3 ng/Lを超えるn-oxPTH濃度を有する血液透析患者が、生存の増加を享受することを発見した。この発見は、驚くべきことであるが、いかなる理論によっても束縛されることを望むものではないとしても、説明はなされ得る。研究した透析コホートは、300 ng/Lを超えるiPTH濃度を有するたった数人の患者しか含まなかった。このため、このサブコホートについての解決には、より大きな研究グループを必要とする。血漿または血清からのiPTHのクリアランスは、主に肝臓および腎臓によって起こるが、酸化iPTHの半減期が非酸化iPTHを超えるという証拠がある。本当のところ、非酸化iPTHの代謝クリアランス率は、体重1 kg当たり約21.6 mL/分の範囲であるのに対して、酸化iPTHの代謝クリアランス率は、体重1 kg当たりわずか8.8 mL/分である（Neuman WF et al in The metabolism of labeled parathyroid hormone. V. Collected biological studies. Calcif Tissue Res. 1975; 18: 271-287; Hruska KA et al in Peripheral metabolism of intact parathyroid hormone. Role of liver and kidney and the effect of chronic renal failure, J Clin Invest. 1981; 67: 885-892）。従って、先行技術文献における高いiPTH濃度は、単に、大量の酸化PTHペプチド鎖の結果であるかもしれず、患者は酸化ストレスの増加を受けていた。さらに、消耗（wasting）は、測定可能な免疫反応性インタクトPTHに影響を及ぼし得る。消耗（wasting）は、炎症および酸化ストレスにさらに関連する。従って、先行技術のインタクトPTH測定に対する、消耗（wasting）による影響力は、酸化PTHペプチドの存在に関係する可能性が高い。しかしながら、これは、今後の研究において証明される必要がある。

10

20

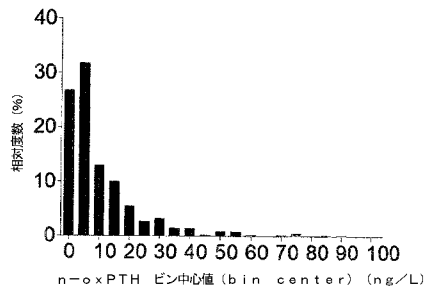
30

#### 【0052】

尿毒症の動物モデルにおけるおよび副甲状腺機能亢進症に罹患している患者における副甲状腺（parathyroid glands）の除去は、高濃度のPTHが血管石灰化、従って、尿毒症における心血管系の罹患および死亡の一因となることを証明した。同時に、酸化ストレスが、同様に、末期の腎臓病の患者において心血管系の死亡に関係することもまた真実である。本発明者らのデータは、iPTHについてのJ型の生存曲線が、2つの異なる生物学的処理の重ね合わせ（overlay）に相当することを示す。従来の免疫反応性iPTHアッセイは、これらのPTH形態を区別もせず、PTH測定に対する酸化ストレスの大きさもまた十分に理解されていなかった。CKD患者に対する治療および薬物療法に関してn-oxPTHの状態についての情報を使用する方法について知識がなかった。結論として、総死亡率についての免疫反応性n-oxPTHおよびiPTHの予知力は、実質的に異なる。従って、血漿または血清におけるあらゆる免疫反応性PTHペプチド濃度に基づく臨床的な決定は、酸化PTHのクリアランスが考慮に入れられない場合、末期の腎臓病を有する患者において判断を誤らせ得る。

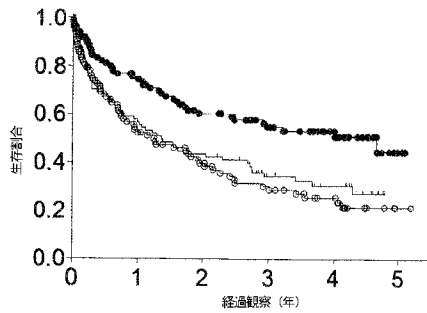
【 図 1 】

Fig. 1



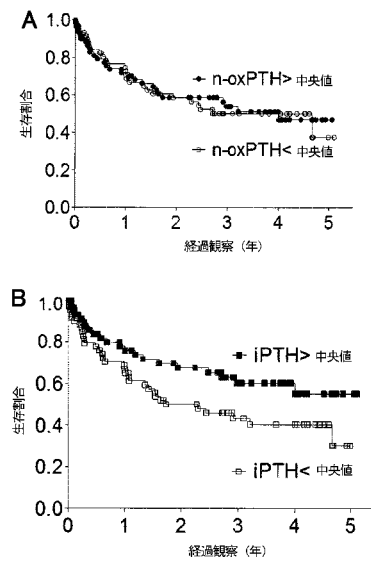
【 図 2 】

Fig. 2



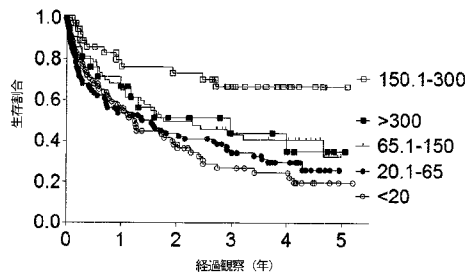
【 図 3 】

Fig. 3



【 図 4 】

Fig. 4



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/054508
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/74 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HOCHER BERTHOLD ET AL: "Measuring parathyroid hormone (PTH) in patients with oxidative stress - do we need a fourth generation parathyroid hormone assay?", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, vol. 7, no. 7, 6 July 2012 (2012-07-06), pages 1-10, XP002696480, ISSN: 1932-6203 cited in the application	1-11
Y	the whole document	1-10
Y	WO 02/082092 A2 (ABC ARMBRUSTER BIOCHEMICALS [DE]; ARMBRUSTER FRANZ PAUL [DE]; ROTH HEI) 17 October 2002 (2002-10-17) cited in the application page 5, line 26 - line 31	1-10
<input 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 June 2014		Date of mailing of the international search report  20/06/2014
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  Gundlach, Björn

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/054508

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
-----			

## フロントページの続き

(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, KM, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ホッヘル, ベルトホルト

ドイツ国、14532・クラインマハノー、エルンスト・テールマンシュトラッセ・151・アー

(72)発明者 ロート, ハイイツ・ユルゲン

ドイツ国、69126・ハイデルベルク、イム・ブライツシュピール・15

## 【要約の続き】

4.0 ng/L ; n = 116 ; p = 0.915)。

专利名称(译)	非氧化性生物活性甲状旁腺激素决定了血液透析患者的死亡率		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016512323A</a>	公开(公告)日	2016-04-25
申请号	JP2015560717	申请日	2014-03-07
[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 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 ロート,ハインツ・ユルゲン		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/74 G01N2800/347 G01N2800/52 G01N2333/635		
FI分类号	G01N33/53.B G01N33/53.D		
优先权	2013158401 2013-03-08 EP		
其他公开文献	JP6526577B2 JP2016512323A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

<b>摘要(译)</b> 一种新的体外监测和评估药物疗法需求的新方法，该疗法会干扰正在遭受氧化应激的肾病患者（尤其是血液透析患者）甲状旁腺激素水平的调节。图1显示的中位年龄为66岁（IQR，为56至75岁），从透析开始的中位时间为266天（透析史）（IQR，为31至1209天），中位透析剂量为1.2（图6显示了340位血液透析患者（224位男性和116位女性）中的n-oxPTH浓度分布（kt/V）（IQR，1.1至1.3）。慢性肾脏病的病因是肾硬化113例（33%），糖尿病肾病107例（31%），慢性肾小球肾炎29例（9%）和多发9例（3%）。其他/未知的性囊性肾病和82例（24%）。n-oxPTH的中位浓度为5.9 ng/L（IQR，2.4至14.0 ng/L）。男女之间n-oxPTH浓度无差异（5.9 ng/L；IQR，2.4至14.2 ng/L；n = 224；vs 5.5 ng/L；IQR，2.4至14.0 ng/L；n = 116；p = 0.915）。	(21) 出願番号 特願2015-560717 (P2015-560717) (66) (22) 出願日 平成26年3月7日 (2014.3.7) (85) 翻訳文提出日 平成27年11月6日 (2015.11.6) (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/054508 (87) 国際公開番号 WO2014/135701 (87) 国際公開日 平成26年9月12日 (2014.9.12) (31) 優先権主張番号 13158401.3 (32) 優先日 平成25年3月8日 (2013.3.8) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	(71) 出願人 514212788 イム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 ユトカーベンバルト-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 ユトカーベンバルト-アレー・8・アー、 イムンダイアグノスティック・アー・ゲ ー気付
	最終頁に続く	