

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年4月27日(27.04.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/068248 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) C12M 1/34 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/038704

(22) 国際出願日: 2022年10月18日(18.10.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2021-171927 2021年10月20日(20.10.2021) JP

(71) 出願人: 積水メディカル株式会社(SEKISUI
MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030027 東京
都中央区日本橋二丁目1番3号 Tokyo (JP).

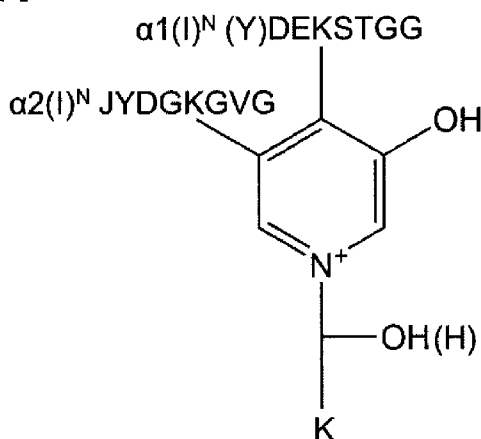
(72) 発明者: 清水 知(SHIMIZU Tomo); 〒1030027 東京
都中央区日本橋二丁目1番3号 積水メ
ディカル株式会社内 Tokyo (JP). 浅井 智英
(ASAI Tomohide); 〒1030027 東京都中央区日
本橋二丁目1番3号 積水メディカル株式
会社内 Tokyo (JP). 妹尾 理子(SEO Satoko);
〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目1番3号
積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP). 小笠
原 利佳子(OGASAWARA Rikako); 〒1030027
東京都中央区日本橋二丁目1番3号 積水
メディカル株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人 もえぎ特許事務所(MOEGI
PATENT ATTORNEYS); 〒1030022 東京都中
央区日本橋室町一丁目12番3号 K a n
a I P l a t z 7階 Tokyo (JP).

(54) Title: IMMUNOASSAY METHOD FOR CROSS-LINKED N-TELOPEPTIDE OF TYPE I COLLAGEN, IMMUNOASSAY KIT, AND ANTIBODY OR ANTIBODY FRAGMENT THEREOF

(54) 発明の名称: I型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定方法及び免疫測定キット、並びに抗体又はその抗体断片

[図1]



(57) Abstract: An immunoassay method for a cross-linked N-telopeptide of type I collagen comprises a step of bringing into contact a biological sample and an antibody binding with peptide fragment comprising the amino acid sequence represented by JYDGKVG (SEQ ID NO: (1), or an antibody fragment of said antibody. According to this method, the operation is simple and NTx can be accurately measured.

(57) 要約: 生体試料と、J Y D G K G V G (配列番号1) で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体又はその抗体断片とを接触させる工程を含む、I型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定方法。この方法によれば、操作が簡便であり、NTxを精度よく測定できる。

[続葉有]



WO 2023/068248 A1

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定方法及び免疫測定キット、並びに抗体又はその抗体断片

技術分野

[0001] 本発明は、Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定方法及び免疫測定キットに関する。本発明はまた、抗体又はその抗体断片に関する。

背景技術

[0002] Ⅰ型コラーゲン架橋N-テロペプチド (cross-linked N-telopeptide of type I collagen) (以後、NTxと称することがある) は、骨由来Ⅰ型コラーゲン分解産物である。Ⅰ型コラーゲンが、骨吸収の過程でCat Kにより消化されることにより、NTxが産生される。産生された後、NTxは、血液及び／又は尿中に排出される。

[0003] NTxは、骨吸収の亢進により高値を示す。したがって、NTxは、骨の吸収を直接に反映する指標となる。NTxは、この特性により、骨粗鬆症の診断又は治療効果判定のマーカーとして利用されている。

[0004] 特許文献1には、尿中のNTxを測定することにより、骨吸収の速度を測定することが記載されている。特許文献2には、NTxに結合するモノクローナル抗体1H11が記載されている。また、特許文献2には、モノクローナル抗体1H11が認識するエピトープについて記載されている。

モノクローナル抗体を用いたELISA法によるNTxの測定キットも販売されている（非特許文献1）。しかしながら、より、操作が簡便であり、精度よく測定できる、NTxの測定方法が望まれていた。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特表平3-500818号公報

特許文献2：特表平11-505804号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：「I型コラーゲン架橋N-テロペプチドキット オステオマーク（登録商標）」（アボット ダイアグノスティクス メディカル株式会社）体外診断用医薬品の添付文書

非特許文献2：J. Bone Miner. Res 1992, 7 (11), 1251~1258 A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、操作が簡便であり、NTxを精度よく測定できる、NTxの測定方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、NTx測定の際に測定系に存在する尿酸の量が、NTxの測定値に影響することを発見した。NTx測定の検体として用いられる尿及び血清等の生体試料には尿酸が含まれている。また、NTxを高濃度で含む尿検体は、NTxの濃度既知の尿で希釈する必要がある。この希釈用の尿にも尿酸が含まれている。生体試料又は希釈用の尿の尿酸濃度は様々である。したがって、これらの生体試料又は希釈用の尿に含まれる尿酸の量によりNTxの測定値が影響され、NTxの正確な測定ができない場合があった。

本発明者らは鋭意検討し、JYDGKGVG（配列番号1）（Jはピログルタミン酸）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体を用いることで、NTx測定の際に尿酸が存在していても、NTxの測定値が影響を受けにくい免疫測定が可能であることを確認して、本発明を完成するに至った。

特許文献2には、モノクローナル抗体1H11と、JYDGKGVG（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片とをアッセイしても、商業的に意味のある抗体結合値が得られなかったことが記載されている。また、非特許文献2には、モノクローナル抗体1H11のエピトープは、単純に $\alpha 1$ 及び $\alpha 2$ のN-テロペプチドの個々の配列を合成したことによる直鎖ペプチドではないことが議論されている。また、非特許文献2には、エピトープが、特定の架橋ペプチド配列の立体的構造にあると考えられることも議論されている。これは、モノクローナル抗体1H11は、免疫原として、NTxを使用しているからだと考えられる。

すなわち、本発明者らは、モノクローナル抗体1H11とは異なる反応性を有する抗体を用いることにより、前記課題を解決することができることを見出したのである。

本発明は以下の内容に関する。

<1> 生体試料と、JYDGKGVG（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体又はその抗体断片とを接触させる工程を含む、I型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定方法。

<2> 抗体又はその抗体断片が、QYDGK(C)GVG（配列番号2）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する、<1>に記載の免疫測定方法。

<3> 抗体又はその抗体断片が、モノクローナル抗体又はその抗体断片である、<1>又は<2>に記載の免疫測定方法。

<4> 生体試料が、尿、血液、血漿、又は血清である、<1>～<3>のいずれかに記載の免疫測定方法。

<5> 接触させる工程において、測定系に含まれる尿酸の濃度が、0.001～0.1質量%である、<1>～<4>のいずれかに記載の免疫測定方法。

<6> 接触させる工程が、JYDX₁KGX₂G（配列番号3）で表されるアミノ酸配列を含む検出用ペプチド断片の存在下で、生体試料と、抗体又は

その抗体断片とを接触させる工程であり、 X_1 及び X_2 は、任意のアミノ酸であり、

検出用ペプチド断片が、固相又は標識物質に結合しており、

抗体又はその抗体断片が、検出用ペプチド断片に結合する、＜1＞～＜5＞のいずれかに記載の免疫測定方法。

＜7＞ X_1 が、グリシン又はセリンであり、 X_2 が、バリン又はロイシンである、＜6＞に記載の免疫測定方法。

＜8＞ 標識物質に由来するシグナルを測定する工程をさらに含み、

検出用ペプチド断片が、固相に結合しており、

抗体又はその抗体断片が、標識物質と間接的又は直接的に結合している、

＜1＞～＜7＞のいずれかに記載の免疫測定方法。

＜9＞ 固相が磁性粒子であり、標識物質がルテニウム錯体である、＜8＞に記載の免疫測定方法。

＜10＞ J Y D G K G V G（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体又はその抗体断片を含む、生体試料中のⅠ型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定キット。

＜11＞ 抗体又はその抗体断片が、Q Y D G K（C）G V G（配列番号2）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する、＜10＞に記載の免疫測定キット。

＜12＞ 抗体又はその抗体断片が、モノクローナル抗体又はその抗体断片である、＜10＞又は＜11＞に記載の免疫測定キット。

＜13＞ 生体試料が、尿、血液、血漿、又は血清である、＜10＞～＜12＞のいずれかに記載の免疫測定キット。

＜14＞ J Y D X_1 K G X_2 G（配列番号3）で表されるアミノ酸配列を含む検出用ペプチド断片

をさらに含み、 X_1 及び X_2 は、任意のアミノ酸であり、

抗体又はその抗体断片が、検出用ペプチド断片に結合する、＜10＞～＜13＞のいずれかに記載の免疫測定キット。

＜15＞ X_1 が、グリシン又はセリンであり、 X_2 が、バリン又はロイシンである、＜14＞に記載の免疫測定キット。

＜16＞ 検出用ペプチド断片が、固相に結合しており、抗体又はその抗体断片が、標識物質と間接的又は直接的に結合している、＜10＞～＜15＞のいずれかに記載の免疫測定キット。

＜17＞ 固相が磁性粒子であり、標識物質がルテニウム錯体である、＜16＞に記載の免疫測定キット。

＜18＞ JYDGKGVG（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体又はその抗体断片。

＜19＞ QYDGK（C）GVG（配列番号2）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する、＜18＞に記載の抗体又はその抗体断片。

＜20＞ モノクローナル抗体である、＜18＞又は＜19＞に記載の抗体又はその抗体断片。

＜21＞ ＜1＞～＜9＞のいずれかに記載の免疫測定方法に用いるための、JYDX₁KGX₂G（配列番号3）で表されるアミノ酸配列又はその一部を改変したアミノ酸配列を含む検出用ペプチド断片が結合した固相、ここで、 X_1 及び X_2 は、任意のアミノ酸である。

＜22＞ 磁性粒子である、＜21＞に記載の固相。

＜23＞ X_1 が、グリシン又はセリンであり、 X_2 が、バリン又はロイシンである、＜21＞又は＜22＞に記載の固相。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、操作が簡便であり、NTxを精度よく測定できる、NTxの測定方法及び測定キットを提供することができる。本発明によれば、測定方法及び測定キットに用いることができる、抗体又はその抗体断片を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1] NTxの化学構造を示す図である。

[図2]本発明の免疫測定方法の一実施形態を示す図である。

[図3]抗原固相化ELISA（固相：N×7ペプチド又はN×2ペプチド、抗体：S8823OR）の結果を示す図である。

[図4]抗原固相化ELISA（固相：N×7ペプチド又はN×2ペプチド、抗体：1H11）の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、発明の態様（aspect）に分けて説明をしているが、それぞれの態様に記載の事項、語句の定義、及び実施形態は、他の態様においても適用可能である。

[0012] 1. I型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定方法

（I型コラーゲン架橋N-テロペプチド（NTx））

I型コラーゲン架橋N-テロペプチドは、骨由来I型コラーゲン分解産物である。I型コラーゲンが、骨吸収の過程でCat Kにより消化されることにより、NTxが産生される。産生された後、NTxは、血液及び／又は尿中に排出される。

NTxは、骨吸収の亢進により高値を示す。したがって、NTxは、骨の吸収を直接に反映する指標となる。NTxは、この特性により、骨粗鬆症の診断又は治療効果判定のマーカーとして利用されている。

また、骨粗鬆症の診断又は治療効果判定以外にも、NTxは、以下のような目的で測定される。

- ・ 原発性副甲状腺機能亢進症の手術適応の決定
- ・ 副甲状腺機能亢進症手術後の治療効果判定
- ・ 悪性腫瘍の骨転移の指標及び骨転移病巣の進行度の指標

なお、本発明の免疫測定方法は、上記の目的で行われるものに限定されるものではない。

[0013] NTxは、図1に示される構造を有する。NTxでは、ピリジニウム架橋

構造に α 1鎖と α 2鎖が結合している。 α 2鎖は、JYDGKGVG（配列番号1）で表されるアミノ酸配列を有している。

[0014]（生体試料）

本明細書における「生体試料」としては、主に生体由来の固形組織及び体液を挙げることができる。

生体試料としては、体液が好ましい、体液としては、血液、血清、血漿、尿、涙液、耳漏、前立腺液、又は呼吸器分泌液が挙げられる。生体試料としては、尿、血液、血漿、又は血清が好ましく、尿又は血清がより好ましく、尿がさらに好ましい。

生体試料を採取する対象は、ヒト又は動物（例えば、サル、イヌ、又はネコ）を含み、好ましくはヒトである。生体試料は、対象からの生体試料そのものであってもよく、採取した生体試料に通常行われる希釈、濃縮等の処理を行ったものであってもよい。なお、本発明に用いられる生体試料の採取や調製を行う者は、本発明の免疫測定方法を行う者と同一人物でもよく、別人物であってもよい。また、本発明の免疫測定方法に用いられる生体試料は、本発明の免疫測定方法の実施時に採取又は調製されたものでもよく、予め採取又は調製され保存されたものであってもよい。

生体試料は、骨吸収亢進を生じる代謝性疾患、例えば、骨粗鬆症、原発性副甲状腺機能亢進症、又は骨転移の疑いのある悪性腫瘍（特に、乳癌、肺癌、若しくは前立腺癌）を罹患する対象から採取された生体試料であることができる。

[0015]（抗体）

本発明の免疫測定方法では、本発明の効果が得られる限りにおいて、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を用いることができる。本発明の免疫測定方法では、モノクローナル抗体を用いることが好ましい。本発明の免疫測定方法では、本発明の効果が得られる限りにおいて、抗体の機能を有する抗体断片も使用することができる。また、本発明の免疫測定方法では、本発明の効果が得られる限りにおいて、抗体は、いずれのアイソタイプ（Ig

M、IgD、IgG、IgA、又はIgE）であってもよいが、IgGが好ましい。

[0016] (モノクローナル抗体)

本明細書において、「モノクローナル抗体」とは、単一の抗体産生細胞に由来するクローンから得られた抗体又はその抗体分子を意味する。本発明の免疫測定方法では、本発明の効果が得られる限りにおいて、該モノクローナル抗体の機能を有する抗体断片も使用することができる。モノクローナル抗体の機能を有する抗体断片としては、例えば、モノクローナル抗体の酵素的消化により得られる該モノクローナル抗体のFab部分を含む機能性断片、遺伝子組換えによって作製される該モノクローナル抗体のFab部分を含む機能性断片、及びファージディスプレイ法で作製されたscFvを含む機能性断片等が挙げられる。

[0017] (標識物質)

本発明で用いられる抗体には、標識物質が結合していることが好ましい。標識物質が発するシグナルの強さを測定して、生体試料中のNTxの量を測定することができる。標識物質は、本発明で用いられる抗体に直接結合していてもよく、二次抗体を介して間接的に結合していてもよい。以後、標識物質が結合している、本発明で用いられる抗体を、標識抗体と呼ぶことがある。標識抗体を調製するための標識物質としては、例えば金属錯体、酵素、不溶性粒子、蛍光物質、化学発光物質、電気化学発光物質（例えば、ルテニウム錯体等）、ビオチン、アビジン、放射性同位体、金コロイド粒子、又は着色ラテックスが挙げられる。標識物質と抗体との結合法としては、当業者に利用可能な物理吸着、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法、又は過ヨウ素酸法を用いることができる。

本発明の免疫測定方法においては、標識物質として、電気化学発光物質を用いることが好ましく、ルテニウム錯体を使用することがより好ましい。また、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（HRP）又はアルカリホスファターゼ（ALP）などの酵素を標識物質として用いる場合には、その酵素

の特異的基質を用いて酵素活性を測定することができる。例えば、酵素がH R Pの場合には、例えばO-フェニレンジアミン（O P D）あるいは3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（T M B）を用いることができ、A L Pの場合にはp-ニトロフェニル・ホスフェートなどを用いることができる。

[0018] 本明細書において、抗原や抗体を固相に物理的あるいは化学的に担持させることあるいは担持させた状態を「固定化」又は「固相化」と表現することがある。また、N T xの「分析」、「検出」、又は「測定」という用語は、N T xの存在、非存在の判定及びN T xの定量を含む。

[0019]（J Y D G K G V G（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片）

本発明の免疫測定方法で用いられる抗体又はその抗体断片は、J Y D G K G V G（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する。以後、J Y D G K G V G（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体又はその抗体断片を、本発明の抗体と呼ぶことがある。本発明の抗体は、J Y D G K G V G（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片に加えて、Q Y D G K（C）G V G（配列番号2）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片とも結合することが好ましい。「Q Y D G K（C）G V G」中の（C）は、Kの側鎖に結合している。すなわち、「（C）」と「G V G」中の1つ目の「G」は、いずれもKに結合している。

本発明の抗体は、単離された抗体又はその抗体断片、好ましくは単離されたモノクローナル抗体又はその抗体断片であることができる。

[0020] 本発明の抗体は、好ましくは、J Y D G K G V G（配列番号1）で表されるアミノ酸配列を含むペプチド断片と特異的に結合する。「特異的に結合する」とは、抗体又はその抗体断片が、特定のアミノ酸配列を有するペプチド断片以外には、実質的に結合しないことを意味する。

本発明の抗体は、より好ましくは、N T x中の α 1鎖の部分及びピリジニウム架橋構造のいずれとも実質的に結合しない。

本発明の抗体は、好ましくは、Q Y D G K (C) G V G（配列番号2）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片、及び／又は J Y D X₁ K G X₂ G（配列番号3）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する。配列番号3において、X₁及びX₂は、任意のアミノ酸であり、好ましくは、X₁が、グリシン又はセリンであり、X₂が、バリン又はロイシンである。より好ましくは、X₁が、グリシンであり、X₂が、バリンである。

[0021] 本発明の抗体とあるアミノ酸配列を有するペプチド断片とが「実質的に結合しない」か否かを確認するために、例えば、S P R法に基づき、B i a c o r e（登録商標）T 1 0 0やT 2 0 0を使用し、本発明の抗体を固定化して測定を行うことができる。上記S P R法以外の当業者に周知の方法又は手段によっても「実質的に結合しない」ことを確認できる。

[0022]（検出用ペプチド断片）

本発明の免疫測定方法で競合法を採用する場合は、好ましくは、J Y D X₁ K G X₂ G（配列番号3）で表されるアミノ酸配列を含む検出用ペプチド断片の存在下で、生体試料と本発明の抗体とを接触させる。本発明の抗体は、N T x中の α 2鎖及び検出用ペプチド断片のいずれとも結合するため、本発明の抗体とN T x中の α 2鎖との結合と、本発明の抗体と検出用ペプチド断片との結合とが競合する（図2参照）。検出用ペプチド断片の長さは、例えば、50アミノ酸以下、30アミノ酸以下、20アミノ酸以下、又は10アミノ酸以下である。検出用ペプチド断片は、J Y D X₁ K G X₂ G（配列番号3）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片であることが好ましい。検出用ペプチド断片は、固相又は標識物質のいずれと結合していてもよいが、固相と結合していることが好ましい。

測定系への、生体試料、本発明の抗体、及び検出用ペプチド断片の添加順序は、本発明の効果が得られる限りにおいて、限定されることはない。

[0023] 検出用ペプチド断片の存在下で、競合法により本発明の免疫測定方法を行う場合、本発明の抗体は、検出用ペプチド断片に結合する。検出用ペプチド断片は、J Y D X₁ K G X₂ G（配列番号3）で表されるアミノ酸配列を含む

ことができる。配列番号3において、 X_1 及び X_2 は、任意のアミノ酸であり、好ましくは、 X_1 が、グリシン又はセリンであり、 X_2 が、バリン又はロイシンである。より好ましくは、 X_1 が、グリシンであり、 X_2 が、バリンである。

検出用ペプチド断片は、合成によって調製してもよく、NTx又はNTx中の $\alpha 2$ 鎖を抽出して使用してもよい。検出用ペプチド断片は、遺伝子組換えタンパク質である $\alpha 2$ 鎖、又はJYDX₁KGX₂G（配列番号3）を含む遺伝子組換えタンパク質であることができる。

[0024] 例えば、固相に検出用ペプチド断片を物理的に吸着させる、又は化学的に結合（適当なスペーサーを介してよい）させることにより、検出用ペプチド断片が結合した固相を製造することができる。固相と検出用ペプチド断片との結合には、ストレプトアビジンとビオチンとを用いることが好ましい。具体的には、固相にストレプトアビジンを結合させ、そして、検出用ペプチド断片とビオチンとを結合させる。次に、当該ストレプトアビジンとビオチンとを結合させることにより、固相と検出用ペプチド断片とを結合させることができる。検出用ペプチド断片とビオチンとの結合は、ペプチド断片に含まれるリジンのアミノ基を介して行うことが好ましい。

[0025] 固相としては、ポリスチレン樹脂などの高分子基材、ガラスなどの無機基材、又はセルロースやアガロースなどの多糖類基材などからなる固相を用いることができる。固相の形状は特に限定されず、板状（例えば、マイクロプレートやメンブレン）、ビーズ若しくは粒子状（例えば、ラテックス粒子、磁性粒子）、又は筒状（例えば、試験管）など任意の形状を選択できる。

[0026] 本発明の免疫測定方法においてモノクローナル抗体を用いる場合、例えば、後述の競合法を採用して、モノクローナル抗体を1種のみ用いて、NTxの免疫測定をすることが好ましい。モノクローナル抗体を2種用いる場合は、2種類のモノクローナル抗体は、異なるエピトープを認識することが好ましい。「異なるエピトープを認識する」とは、エピトープとして認識するアミノ酸配列が重複しないことを意味する。エピトープが複数ある場合、その

うちの1つがもう一方の抗体の複数のエピトープのうちの1つと異なればよい。

[0027] 本明細書において、抗体又はその抗体断片が特定の物質又はアミノ酸配列と「反応する」、「認識する」、及び「結合する」は、同義で用いられる。抗体が抗原（化合物）と「反応する」か否かの確認は、抗原固相化ELISA、競合ELISA、又はサンドイッチELISAなどにより行うことができる。その他、表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance）の原理を利用した方法（SPR法）などにより行うことができる。SPR法は、Biacore（登録商標）の名称で市販されている、装置、センサー、又は試薬類を使用して行うことができる。

[0028] 例えば、後述する調製例1のスクリーニング方法（抗原固相化ELISA）と同様の操作をした場合に、ペプチド断片を添加していないネガティブコントロールと比較して、有意に吸光度が上昇したペプチド断片を、抗体とペプチド断片とが結合したと評価することができる。

[0029] （モノクローナル抗体の調製方法）

本発明の免疫測定方法においてモノクローナル抗体を用いる場合、モノクローナル抗体は、抗原（免疫原）として、QYDGK（C）GVG（配列番号2）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片をリン酸緩衝生理食塩水などの溶媒に溶解し、この溶液を非ヒト動物に投与して免疫することにより調製できる。必要に応じて前記溶液に適宜のアジュバントを添加した後、エマルジョンを用いて免疫を行ってもよい。アジュバントとしては、油中水型乳剤、水中油中水型乳剤、水中油型乳剤、リポソーム、水酸化アルミニウムゲルなどの汎用されるアジュバントのほか、生体成分由来のタンパク質又はペプチド性物質などを用いてもよい。

[0030] 免疫に用いる動物の種類も特に限定されないが、哺乳動物、例えばマウス、ラット、ウシ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、アルパカ、マウス、又はラットが好ましく、より好ましくはマウス又はラットを用いることができる。動物の免疫は、一般的な手法に従って行えばよく、例えば、抗原の溶液、好ましく

はアジュバントとの混合物を動物の皮下、皮内、静脈、又は腹腔内に注射することにより行うことができる。免疫応答は、一般的に免疫される動物の種類及び系統によって異なるので、免疫スケジュールは使用される動物に応じて適宜設定することが望ましい。抗原投与は最初の免疫後に何回か繰り返し行うことが好ましい。

[0031] 本発明のモノクローナル抗体を得るために、引き続き以下の操作が行われることができるが、これらに限定されることはない。モノクローナル抗体それ自体の製造方法については当業界で周知されており、かつ汎用されているので当業者は前記の抗原を用いることによって本発明のモノクローナル抗体を調製することが可能である（例えばAntibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988) 第6章などを参照のこと）。

[0032] 最終免疫後、免疫した動物から抗体産生細胞である脾臓細胞あるいはリンパ節細胞を摘出し、高い増殖能を有する骨髓腫由来の細胞株と細胞融合することによりハイブリドーマを作製することができる。細胞融合には抗体産生能（質・量）が高い細胞を用いることが好ましく、また骨髓腫由来の細胞株は融合する抗体産生細胞の由来する動物と適合性があることがより好ましい。細胞融合は、当該分野で公知の方法に従って行うことができる。

[0033] クローニング工程後、産生されるモノクローナル抗体とQYDGK (C)GVG（配列番号2）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片との結合能をELISA、RIA法、又は蛍光抗体法などの方法を用いてアッセイすることができる。これらの操作により、選択されたハイブリドーマが所望の性質を有するモノクローナル抗体を産生するか否かを確認することができる。

前記のようにして選別されたハイブリドーマを大量培養することにより、所望の特性を有するモノクローナル抗体を製造することができる。大量培養の方法は特に限定されないが、例えば、ハイブリドーマを適宜の培地中で培

養してモノクローナル抗体を培地中に産生させる方法、及び哺乳動物の腹腔内にハイブリドーマを注射して増殖させ、腹水中にモノクローナル抗体を産生させる方法などを挙げることができる。

[0034] モノクローナル抗体としては、抗体分子全体のほかに抗原抗体反応活性を有するモノクローナル抗体の抗体断片を使用することも可能である。前記のように動物への免疫工程を経て得られたもののほか、遺伝子組み換え技術を使用して得られるモノクローナル抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体等を用いることも可能である。モノクローナル抗体の断片としては例えば、 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $s c F v$ などが挙げられる。これらのフラグメントは前記のようにして得られるモノクローナル抗体をタンパク質分解酵素（例えば、ペプシンやパパインなど）で処理すること、あるいは該抗体のDNAをクローニングして大腸菌や酵母を用いた培養系で発現させることにより調製できる。

[0035] (尿酸)

本発明の免疫測定方法は、測定系に、尿酸を含むことができる。尿酸とは、分子式 $C_5H_4N_4O_3$ （CAS RN 69-93-2）で表される有機化合物である。

抗体抗原反応時の、尿酸の濃度は、本発明の効果が得られる限り限定されないが、例えば0.001～0.1質量%であり、好ましくは0.01～0.1質量%である。

本明細書において、尿酸の量は、尿酸酸化酵素であるウリカーゼを用いた「酵素法」により測定することができる。

[0036] (免疫測定方法) 「免疫測定方法」とは抗原と抗体の反応を利用して、生体試料の中に含まれる物質のレベルを測定する方法である。「レベル」とは、物質の量、濃度、又は存在若しくは不存在の確認等を含む。

本発明の免疫測定方法としては、電気化学発光免疫測定法（ECLIA）、酵素免疫測定法（ELISA）、ラテックス免疫比濁法（LTTA法）、化学発光免疫測定法、イムノクロマトグラフィー、及び蛍光抗体法が挙げら

れるが、これらに限定されるものではない。本発明の免疫測定方法は、好ましくは、E L I S A、又はE C L I Aである。本発明の免疫測定方法は、インビボ又はインビトロの免疫測定方法であることができる。また、感度を増強するために、増感剤を使用することもできる。

測定系における本発明の抗体の濃度は、免疫測定方法又は生体試料の種類等に応じて適宜調整することができるが、例えば、 $0.1 \text{ ng/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ であることができる。

[0037] 以下、免疫測定方法として、競合E L I S A及び競合E C L I Aを例示して、測定の手順及び原理を説明する。下記は本発明の一実施形態における測定の手順及び原理を単に例示するものであり、本発明の範囲を何ら限定するものではない。また、下記の免疫測定方法の各々において、抗体の固相への固定化の方法、抗体と標識物質との結合方法、及び標識物質の種類等の具体的な方法は、前述のものを含め、当業者に周知の方法を制限なく使用することができる。

[0038] 本発明の免疫測定方法としては、以下のような工程（１）～（３）を含む競合法である競合E L I S Aを挙げることができる。工程（１）～（３）を行う順序は限定されない。

（１）分析する生体試料を、検出用ペプチド断片を固定化したマイクロプレートに添加する

（２）酵素で標識した本発明の抗体をマイクロプレートに添加する

（３）前記酵素の基質を添加して、酵素反応に由来するシグナルを測定する。

生体試料中にN T xが存在し、生体試料中のN T xと本発明の抗体との反応と、固相に固定化した検出用ペプチド断片と本発明の抗体との反応との間で競合が生じると、シグナルの強度が低下する。また、抗体を酵素に替えてビオチンで標識することもできる。その場合、ビオチンに酵素で標識したストレプトアビジンを結合させることができる。そして、基質としてO P D等を添加することにより生じる発色シグナルを測定することができる。

[0039] 競合E L I S Aにおいて、二次抗体を用いることもできる。本明細書において、二次抗体とは、本発明の抗体を特異的に認識する抗体である。二次抗体を用いる場合、以下の手順（１）～（５）を採用することができる。

（１）分析する生体試料を、検出用ペプチド断片を固定化したマイクロプレートに添加する

（２）本発明の抗体をマイクロプレートに添加する

（３）さらに酵素標識した二次抗体を添加する

（４）基質を加えて発色させる

（５）プレートリーダー等を用いて、前記基質のシグナルを測定する。

[0040] 電気化学発光免疫測定法（E C L I A）とは、通電により標識物質を発光させ、その発光量を検出することで被検出物質の量を測定する方法を意味する。電気化学発光免疫測定法では、標識物質として、ルテニウム錯体を用いることができる。電極上で発生させたラジカルによりルテニウム錯体を励起状態にして発光させる。そして、このルテニウム錯体の発光量を検出することができる。

本発明の免疫測定方法としては、以下のような工程（１）～（３）を含む、競合法である競合E C L I Aを挙げることができる。工程（１）及び（２）を行う順序は限定されない。

（１）分析する生体試料を、検出用ペプチド断片を固定化した磁性粒子を含む測定系に添加する

（２）電気化学発光物質、好ましくはルテニウム錯体で標識した本発明の抗体を測定系に添加する

（３）発光標識に由来する発光の強度を計測する。

生体試料中にN T xが存在し、生体試料中のN T xと本発明の抗体との反応と、磁性粒子に固定化した検出用ペプチド断片と本発明の抗体との反応との間で競合が生じると、発光強度が低下する。

[0041] 本発明の免疫測定方法は、必要に応じて、以下の工程を含むこともできる。

- ・ 生体試料の前処理工程、
- ・ 検出用ペプチド断片を固相に固定化する工程、
- ・ 検出用ペプチド断片に結合していない抗体、及び生体試料を洗浄して除去する B/F 洗浄工程、
- ・ 既知濃度の NTx 含有試料を測定した際の発光強度に基づいて、計測した発光強度から生体試料中の NTx 濃度を算出する工程、及び／又は
- ・ 算出した生体試料中の NTx 濃度を第一閾値と比較する比較工程。

[0042] 前処理としては、生体試料のろ過、及び検体希釈液による生体試料の希釈などが挙げられる。

[0043] 第一閾値は、感度、生体試料等の種類、及び NTx の測定の目的を考慮して、適宜設定することができる。第一閾値は、生体試料が尿である場合、測定の目的に応じて、以下の値を採用できる。

- ・ 副甲状腺摘出術の適応：200 nM BCE / mM · Cre 以上
- ・ 悪性腫瘍（乳癌、肺癌、前立腺癌）の骨転移の指標：100 nM BCE / mM · Cre 以上
- ・ 骨吸収亢進の指標：55 nM BCE / mM · Cre 以上
- ・ 骨粗鬆症薬剤治療の指標（骨折高リスクの指標）：54.3 nM BCE / mM · Cre 超
- ・ 骨粗鬆症薬剤治療の指標（骨量減少高リスクの指標）：35.3 nM BCE / mM · Cre 以上。

[0044] 第一閾値は範囲であってもよい。「第一閾値が範囲である」とは、示される範囲の間に、具体的な閾値が存在し、測定値がその具体的な閾値より大きいか又は小さいか判定することにより疾患の有無等を判断することを意味する。

第一閾値が範囲である場合、第一閾値は、1.0 ~ 300 nM BCE / mM · Cre の間、5.0 ~ 250 nM BCE / mM · Cre の間、又は 7.0 ~ 220 nM BCE / mM · Cre の間に存在することができる。

本発明の免疫測定方法では、シグナルの強さが第一閾値より高い場合は、

骨吸収亢進を生じる代謝性疾患、例えば、骨粗鬆症若しくは原発性副甲状腺機能亢進症を罹患している、又は、悪性腫瘍（特に、乳癌、肺癌、若しくは前立腺癌）を有する対象において、骨転移の疑いがあると判定する工程を含むことができる。

本発明の免疫測定方法では、シグナルの強さが第一閾値より低い場合は、骨吸収亢進を生じる代謝性疾患、例えば、骨粗鬆症若しくは原発性副甲状腺機能亢進症を罹患していない、又は、悪性腫瘍（特に、乳癌、肺癌、若しくは前立腺癌）を有する対象において、骨転移の疑いがないと判定する工程を含むことができる。

[0045] 本発明の免疫測定方法により算出した生体試料中のNTx濃度に基づいて、骨粗鬆症を罹患している対象における、特定の医薬の治療効果を判定することができる。この場合、本発明の免疫測定方法は、上記工程に加えて、以下の工程をさらに含むことができる。

- ・対象に、特定の医薬を投与する工程、及び／又は
- ・対象から採取した生体試料中のNTx濃度を第二閾値と比較する工程。

この場合、第二閾値は、免疫測定方法の感度、生体試料の種類、及びNTxの測定の目的を考慮して、適宜設定することができる。第二閾値は、対象に特定の医薬を投与する前の前記対象におけるNTxの測定値であってもよい。

本発明の免疫測定方法では、シグナルの強さが第二閾値より低い場合は、特定の医薬が骨粗鬆症に対して治療効果があると判定する工程、又はシグナルの強さが第二閾値より高い場合は、特定の医薬が骨粗鬆症に対して治療効果がないと判定する工程、を含むことができる。

前記の治療効果の判定では、数日毎に測定を行い、治療効果をモニタリングしてもよい。

前記特定の医薬としては、例えば、ビスフォスフォネート製剤、抗RANKL抗体（デノスマブ）、カルシウム製剤等が挙げられる。

[0046] 2. 生体試料中のI型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定キット

本発明の生体試料中のNTxの免疫測定キット（以下、単に本発明の免疫測定キットと称することがある）は、本発明の抗体を含む。

本発明の免疫測定キットは、本発明の抗体を一種含む、競合法、好ましくは競合ELISA又は競合ECLAのための免疫測定キットであることができる。

[0047] 本発明の免疫測定キットとしては、イムノクロマトグラフィー、ELISA、電気化学発光免疫測定法、ラテックス免疫比濁法、化学発光免疫測定法、及び蛍光抗体法を実施するための免疫測定キットが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

本発明の免疫測定キットは、インビボ又はインビトロのサンプルを分析するための免疫測定キットであることができる。

[0048] 本発明の免疫測定キットには、ほかに、標準抗原物質、精度管理用抗原試料といった、他の検査試薬、検体希釈液、及び／又は使用説明書などを含むこともできる。抗体を含む試薬等の濃度は、当業者であれば適宜調整可能である。

[0049] 以下、競合ELISA及び競合ECLAを例示して、キットに含まれる試薬を説明する。

[0050] 競合ELISAの場合、本発明の免疫測定キットは、以下に示す（A）を含むことができる。

（A）本発明の抗体。

（A）本発明の抗体は、酵素で標識されていることが好ましい。

[0051] 競合ELISAの場合は、本発明の免疫測定キットは、前記（A）に加えて、以下（B）及び／又は（C）を含むことが好ましい。

（B）JYDX₁KGX₂G（配列番号3）で表されるアミノ酸配列を含む検出用ペプチド断片、但し、X₁及びX₂は、任意のアミノ酸であり、好ましくは、X₁が、グリシン又はセリンであり、X₂が、バリン又はロイシンである。より好ましくは、X₁が、グリシンであり、X₂が、バリンである。

（C）（B）を固定化するための固相、好ましくはイムノプレート

(B) 検出用ペプチド断片は、予め (C) 固相に固定化された状態でキットに含まれていてもよい。(B) 検出用ペプチド断片と (C) 固相が、キットに別々に含まれている場合は、免疫分析を行う者が、(B) 検出用ペプチド断片を (C) 固相に固定化する。

また、本発明の免疫測定キットは、(D) 本発明の抗体に特異的に結合する二次抗体をさらに含んでもよい。

[0052] 競合 E C L I A の場合は、本発明の免疫測定キットは、以下に示す (A) を含むことができる。

(A) 電気化学発光物質（例えば、ルテニウム錯体等）で標識した本発明の抗体を含む標識試薬

[0053] 競合 E C L I A の場合は、本発明の免疫測定キットは、前記 (A) に加えて、以下 (B) 及び (C) を含むことが好ましい。

(B) J Y D X₁ K G X₂ G（配列番号 3）で表されるアミノ酸配列を含む検出用ペプチド断片、但し、X₁ 及び X₂ は、任意のアミノ酸であり、好ましくは、X₁ が、グリシン又はセリンであり、X₂ が、バリン又はロイシンである。より好ましくは、X₁ が、グリシンであり、X₂ が、バリンである。

(C) (B) を固定化するための固相、好ましくは磁性粒子

(B) 検出用ペプチド断片は、予め (C) 固相に固定化された状態でキットに含まれていてもよい。(B) 検出用ペプチド断片と (C) 固相が、キットに別々に含まれている場合は、分析を行う者が、(B) 検出用ペプチド断片を (C) 固相に固定化する。

[0054] 次に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、特に説明のない限り、%は質量%を意味する。

実施例

[0055] 《調製例 1 モノクローナル抗体の調製》

免疫原及びスクリーニング用抗原の調製

I m j e c t M a l e i m i d e - A c t i v a t e d O v a l b u

min (Thermo scientific社製、CAT No. 77126) を0.2 mLの精製水で溶解し、10 mg/mLのMaleimide-Activated Ovalbumin溶液を調製した。2 mgのペプチドQYDGK (C) GVG ((C) はKの側鎖に結合、Nx-2ペプチド) を0.2 mLのPBSで溶解し、10 mg/mLのペプチド溶液とした。調整したMaleimide-Activated Ovalbumin溶液とペプチド溶液とを混合し、室温で2時間攪拌した。得られた反応液をPBSで透析し、システインのチオール基を介してOvalbuminが結合したペプチド(免疫原)を得た。

[0056] 免疫方法

20 μ Lの免疫原をFreund's Complete Adjuvant (Difco Laboratories社製) と混合し、6週齢、F344/Jc1ラットの背部皮下、又はフットパッドに免疫した。2週間後、20 μ Lの免疫原をFreund's Incomplete Adjuvant (Difco Laboratories社製) と混合し、前記ラットの背部皮下、又はフットパッドに免疫し、同様の操作を2週間毎に継続した。3回免疫実施以降、十分な抗体力価上昇の確認できた個体に、PBSで希釈した免疫原を腹腔免疫した。腹腔免疫の1～3日後に、脾臓細胞、腸骨リンパ節細胞及び鼠頸部リンパ節細胞を回収し、電気融合法によりミエローマ細胞SP2/Oと融合した。融合細胞は96wellプレートで培養し、融合から7又は8日後に培養上清を回収した後、後述する抗原固相化ELISAによるスクリーニングを実施し、Nx-2ペプチドに反応した株を選択しクローニングした。

[0057] スクリーニング方法 (抗原固相化ELISA)

Imject Maleimide-Activated BSA (Thermo scientific社製、CAT No. 77126) を0.2 mLの精製水で溶解し、10 mg/mLのMaleimide-Activated BSA溶液を調製した。2 mgのNx-2ペプチドを0.2 mL

LのPBSで溶解し、 10 mg/ml のペプチド溶液とした。調整したMaleimide-Activated BSA溶液とペプチド溶液を混合し、室温で2時間攪拌した。得られた反応液をPBSで透析し、システインのチオール基を介してBSAが結合したペプチド ($N \times -2$ ペプチド結合BSA)を得た。 $0.1\text{ }\mu\text{L/ml}$ の濃度でPBSに溶解した $N \times -2$ ペプチド結合BSAを $50\text{ }\mu\text{L}$ ずつ96wellプレートの各ウェルに分注し、室温で2時間静置した。各ウェルをPBSTで3回洗浄後、ブロッキング液 ($1\% \text{ BSA-PBST}$) を $100\text{ }\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。各ウェルからブロッキング液を除去後、培養上清を $50\text{ }\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。各ウェルをPBSTで3回洗浄後、ブロッキング液で 10000 倍希釈したHRP標識ヤギ抗ラットIgG (Fc) ポリクローナル抗体 (Southern Biotech社製) を $50\text{ }\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。各ウェルをPBSTで3回洗浄後、OPD発色液を $50\text{ }\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注し、室温で10分間静置した。停止液を $50\text{ }\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに添加し、反応を停止した。プレートリーダーで波長 492 nm における吸光度を測定し、 $N \times -2$ ペプチド結合BSAと抗体との反応性を確認した。 $N \times -2$ ペプチド及びNTxに反応する3株の抗体を樹立した。樹立した抗体からS88230R抗体を選定し、抗体産生細胞を用いて腹水を作製、プロテインGカラムで腹水を精製して以降の試験に用いた。

[0058] 1H11抗体の作製

HB-10611ハイブリドーマ(ATCC)を培養し、その培養上清からプロテインAカラムを用いて、抗体を精製して以降の試験に用いた。

[0059] 《実施例1 NTx測定系への尿酸の影響評価》

ビオチン標識 $N \times 7$ ペプチドの調製

JYDGKGVGのアミノ酸配列から成るペプチド ($N \times 7$ ペプチド) 2 mg を $100\text{ mM PBS pH}7.5$ 1 mL に溶解し、 $N \times 7$ ペプチド溶液を調製した。Ez-Link NHS-PEG12-Biotin (T

hermo Scientific社製) 12.7mgを脱水DMF 0.041mLに溶解し、全量をN×7ペプチド溶液に添加した。氷上で3時間攪拌後、逆相クロマトグラフィーで精製し、未反応のビオチン試薬を除去してビオチン標識N×7ペプチド溶液を得た。

[0060] N×7ペプチド固相ELISA

Pierce Streptavidin Coated Plates (Thermo Scientific社製) をPBSTで3回洗浄した後、0.1μg/mLのビオチン標識N×7ペプチドを50μLずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。各ウェルをPBSTで3回洗浄後、0.3又は0.05μg/mLのS88230R抗体又は1H11抗体と、0.02、0.05又は0.10%の尿酸を含む溶液を50μLずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。各ウェルをPBSTで3回洗浄後、ブロッキング液で9500倍に希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG(H+L) (Southern Biotech社製)、又はブロッキング液で8500倍に希釈したHRP標識ヤギ抗ラットIgG(H+L) (Southern Biotech社製) を50μLずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。各ウェルをPBSTで3回洗浄後、OPD発色液を50μLずつ各ウェルに分注し、室温で10分間静置した。停止液を50μLずつ各ウェルに添加し、反応を停止した。プレートリーダーで波長492nmにおける吸光度を測定した。尿酸を含まない試料を測定した際の吸光度を100%として、各検体測定時の吸光度比を算出した。

[0061] NT×固相ELISA

N×7ペプチド固相ELISAのペプチド固相プレートを、I型コラーゲン架橋N-テロペプチドキット オステオマーク (アボット ダイアグノスティクス メディカル株式会社) の抗原結合プレートに変更した以外は、実施例1のN×7ペプチド固相ELISAのビオチン標識N×7ペプチド添加の工程より後の工程と同様の操作を行った。製品の添付文書の記載によると、抗原結合プレートは、1ウェル中、感度が20nmol BCE/Lとな

る量のNTxを含有している。

[0062] 表1に結果を示す。固相抗原にN×7ペプチドを用いた場合には、いずれの抗体についても尿酸添加濃度上昇に応じた吸光度変動を認めなかった。一方固相抗原にNTxを用いた場合には、いずれの抗体についても尿酸添加濃度上昇に応じた吸光度低下を認め、尿酸により抗原抗体反応が阻害されていた。1H11よりもS88230Rの方が尿酸による抗原抗体反応の阻害割合が軽微であった。

[0063] [表1]

		吸光度比							
固相抗原		Nx7 ペプチド				NTx			
抗体		S88230R		1H11		S88230R		1H11	
抗体濃度 [μ g/mL]		0.05	0.3	0.05	0.3	0.05	0.3	0.05	0.3
尿酸濃度	0%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	0.02%	97%	99%	99%	97%	91%	96%	95%	93%
	0.05%	100%	98%	100%	95%	87%	92%	84%	83%
	0.10%	102%	98%	100%	100%	73%	84%	65%	66%

[0064] 液相競合ELISA

Pierce Streptavidin Coated Plates (Thermo Scientific社製)をPBSTで3回洗浄した。その後、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ のビオチン標識N×7ペプチドを $50 \mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。各ウェルをPBSTで3回洗浄後、0、0.03、又は0.08%の尿酸を含む20mM HEPES、pH 7.6で5倍希釈した骨粗鬆症患者由来の尿検体（ビジコムジャパン社） $25 \mu\text{L}$ と、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ のS88230R抗体又は1H11抗体 $25 \mu\text{L}$ を順次分注、混合し、室温で1時間静置した。二次抗体の分注以降は、実施例1のN×7ペプチド固相ELISAと同様の操作を行った。尿酸を含まない試料を測定した際の吸光度を100%として、各検体測定時の吸光度比を算出した。

[0065] 結果を表2に示す。S88230R抗体を用いた測定では、尿酸濃度上昇に応じた吸光度変動は軽微であったが、1H11抗体を用いた測定では、尿

尿酸濃度上昇に応じて顕著に吸光度が上昇した。S88230R抗体を用いたNTx測定系では、検体中の尿酸濃度の影響を受けずに測定ができると考えられる。

[0066] [表2]

		吸光度比			
抗体		S88230R		1H11	
尿検体		検体 1	検体 2	検体 1	検体 2
尿酸濃度	0%	100%	100%	100%	100%
	0.03%	104%	99%	108%	105%
	0.08%	106%	104%	120%	121%

[0067] 《実施例2 抗体の特異性試験1》

ペプチド競合ELISA

Pierce Streptavidin Coated Plates (Thermo Scientific社製)をPBSTで3回洗浄した後、 $0.1\mu\text{g/mL}$ のビオチン標識Nx7ペプチドを $50\mu\text{L}$ ずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置した。各ウェルをPBSTで3回洗浄後、 0.03 、 0.02 、 0.08 、 0.4 、 2 、 10mg/mL のNx2又はNx7ペプチドを各ウェルに $25\mu\text{L}$ ずつ分注し、続けて $0.15\mu\text{L/mL}$ のS88230R抗体又は1H11抗体を各ウェルに $25\mu\text{L}$ ずつ分注し1時間静置した。二次抗体の分注以降は、実施例1のNx7ペプチド固相ELISAと同様の操作を行った。

[0068] 結果を図3、4に示す。抗体が液相ペプチドと反応する場合、液相ペプチドと抗体との反応が、固相ペプチドと抗体との反応と競合するため、液相ペプチド濃度上昇に応じて吸光度が低下する。S88230R抗体は、免疫源であるNx2と反応したが、1H11抗体はNx2と反応しなかった。また、Nx7を液相に加えた場合に、S88230R抗体は1H11抗体よりも低いペプチド濃度において吸光度が低下しており、S88230R抗体は1H11抗体よりも強くNx7と反応すると考えられた。以上のような抗体とペプチドとの反応性の違いが、NTx測定時の尿酸による測定値への影響の

差を生んでいると考えられた。

[0069] 《実施例3 抗体の特異性試験2》

実施例2と同様の操作でS88230R抗体及び1H11抗体と各ペプチドとの反応性を評価した。結果を表3に示す。N×7ペプチドの4アミノ酸目のGをSに置換したN×7-m3ペプチド、及び、N×7ペプチドの7アミノ酸目のVをLに置換したN×7-m5ペプチドと、S88230R抗体が反応したのに対し、これらのペプチドと1H11抗体は反応しなかった。S88230R抗体と1H11抗体とは、N×7ペプチドの4番目のアミノ酸であるGと、7番目のアミノ酸であるVについて、反応性が大きく異なると考えられた。

[0070] [表3]

		抗体とペプチドの反応性	
ペプチド	アミノ酸配列	S88230R	1H11
N x 2	QYDGK (C) GVG (配列番号2)	++	—
N x 7	JYDGKGVG (配列番号1)	++	+
N x 7-m1	JFDGKGVG (配列番号4)	—	—
N x 7-m2	JYEGKGVG (配列番号5)	+/-	+
N x 7-m3	JYDSKGVG (配列番号6)	+	—
N x 7-m4	JYDGKSVG (配列番号7)	—	—
N x 7-m5	JYDGKGLG (配列番号8)	+++	—
N x 7-m6	JYDGKGVLS (配列番号9)	—	—

—：反応しない、+/-：弱く反応する、+：反応する、++：強く反応する、+++：非常に強く反応する

[0071] 《実施例4 希釈測定への影響評価》

S88230R抗体を用いたECLA測定

N×7ペプチド固相化磁性粒子の調製

30 mg/mLのStreptavidin固相磁性粒子100 μ LをPBSで3回洗浄し、PBSを完全に除去後、3.3 μ g/mLの濃度でPBSに溶解したビオチン標識Nx7ペプチド溶液600 μ Lを添加し、25℃で2～3時間攪拌した。得られた磁性粒子を磁性粒子保存液（50 mM HEPES、1% BSA、150 mM NaCl、2 mM EDTA・4 Na、0.01% Tween 20、pH 7.2）で3回洗浄後、磁性粒子保存液300 μ Lで磁性粒子を懸濁し、Nx7ペプチド固相化磁性粒子懸濁液を得た。Nx7ペプチド固相化磁性粒子懸濁液を、R2試薬（50 mM HEPES、1% BSA、150 mM NaCl、2 mM EDTA・4 Na、0.01% Tween 20、pH 7.2）で0.05 mg/mL濃度に調整しECLIA測定に供した。

[0072] ルテニウム標識S88230R抗体の調製

1 mg/mLのS88230R抗体1 mLに、10 mg/mLのRuthenium (II) Tris (bipyridyl) -NHS Ester（DMSOに溶解）68 μ Lを添加し室温で30分攪拌後、2 mol/Lのグリシン50 μ Lを添加し室温で10分間攪拌した。得られた反応液から、セファデックスG-25を用いて未反応の抗体やルテニウム錯体を除去し、ルテニウム標識S88230R抗体を得た。

[0073] キャリブレーター及び試料の調製

Nx7ペプチドをR1試薬（50 mM HEPES、1% BSA、150 mM NaCl、2 mM EDTA・4 Na、0.01% Tween 20、非特異反応抑制剤、pH 7.2）で250 ng/mLとなるよう溶解し標準品とした。標準品をR1試薬で1、2、4、8、16、32、64、128倍に希釈した溶液をそれぞれ調製し、キャリブレーターとして用いた。試料としては、原液の尿検体か、任意の溶液で希釈した尿検体を用いた。

[0074] ECLIA測定

ECLIAによるNTxの測定は、ECLIA自動測定装置「ピコルミII」を用いて実施した。キャリブレータ及び試料を20 μ Lずつそれぞれ

反応管に注入した。R 1 試薬で $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調整したルテニウム標識 S 8 8 2 3 0 R 抗体 $50 \mu\text{L}$ をそれぞれの反応管に注入し攪拌した。 $0.05 \text{mg}/\text{mL}$ の N x 7 ペプチド固相化磁性粒子 $25 \mu\text{L}$ をそれぞれの反応管に注入し、10.5 分間反応させた。反応管内の液を吸引除去し、ピコルミ B F 洗浄液（積水メディカル（株）製） $350 \mu\text{L}$ で磁性粒子を洗浄した。反応管に発光電解液（積水メディカル（株）製）を $300 \mu\text{L}$ 注入し、ビーズをフローセル電極に導いて、発光量を測定した。キャリブレーションの測定結果から、 $\text{Logit} - \text{Log}$ 1 次式で検量線を作成し、各試料の測定値を算出した。なお、尿で希釈した試料の測定値は、希釈に用いた尿由来の N T x 値を実測値から差し引いて算出した。

[0075] オステオマーク測定

I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドキット オステオマーク（アボット ダイアグノスティクス メディカル株式会社）を用い、製品の添付文書に従って N T x の測定を実施した。標準品はキットに付属のものを、試料は E C L I A による測定と同様のものを用いた。なお、尿で希釈した試料の測定値は、希釈に用いた尿由来の N T x 値を実測値から差し引いて算出した。

[0076] 本実施例の E C L I A 試薬及びオステオマークを用いて、尿、生理食塩水又は尿酸希釈液（ 0.15% 尿酸、 20mM H E P E S、 150mM N a C l、 $\text{pH} 7.6$ ）で10倍希釈した骨粗鬆症患者由来尿（ビジコムジャパン社）25例を測定した。尿で希釈した場合の測定値を100%とし、各希釈用溶液で希釈した場合の希釈回収率を算出した。結果を表4に示す。E C L I A 試薬を用いて生理食塩水で希釈測定した場合に希釈回収率の平均値が129%と高値化したが、各検体の希釈回収率は、平均値 $\pm 20\%$ 以内と、希釈による測定値のばらつきは軽微であった。E C L I A 試薬を用いて尿酸希釈液で希釈測定をした場合は、回収率、回収率のばらつきのいずれも良好であった。一方、添付文書において、検体の希釈には尿を用いるよう記載しているオステオマークで、生理食塩水、尿酸希釈液を用いた希釈測定を行った場合、希釈回収率の平均値はそれぞれ101%、118%と良好であつ

たが、各検体の希釈回収率のばらつきが大きかった。本実施例の E C L I A 試薬は、検体毎の尿酸値による測定値への影響が軽微であるため、希釈測定によって尿酸値が変動した場合においても、測定値のばらつきが少なかったと考えられる。したがって、本実施例の E C L I A 試薬は希釈測定時の測定値に一定の補正係数を乗算することにより、尿以外の希釈用溶液による希釈測定が可能である。これにより、尿による希釈測定時に必要となる、測定後に希釈用に用いた尿の N T × 値を差し引くという煩雑な操作が不要となり、N T × 測定の利便性を向上することができる。加えて、希釈用溶液に尿酸を添加することによって、測定値の補正なしに希釈測定が可能となる。

[0077]

[表4]

希釈回収率

検体	E C L I A測定		オステオマーク測定	
	生食希釈	尿酸希釈	生食希釈	尿酸希釈
検体 1	139%	89%	88%	106%
検体 2	140%	91%	88%	82%
検体 3	128%	86%	74%	96%
検体 4	132%	87%	99%	99%
検体 5	123%	89%	118%	125%
検体 6	120%	80%	102%	100%
検体 7	122%	82%	94%	110%
検体 8	131%	91%	89%	98%
検体 9	128%	73%	89%	119%
検体 1 0	121%	80%	91%	121%
検体 1 1	121%	82%	114%	92%
検体 1 2	152%	95%	133%	171%
検体 1 3	113%	92%	123%	129%
検体 1 4	133%	95%	119%	119%
検体 1 5	134%	101%	144%	182%
検体 1 6	121%	97%	105%	133%
検体 1 7	134%	79%	81%	105%
検体 1 8	117%	92%	96%	114%
検体 1 9	122%	87%	92%	105%
検体 2 0	125%	91%	105%	116%
検体 2 1	147%	94%	121%	127%
検体 2 2	145%	90%	88%	123%
検体 2 3	118%	92%	104%	130%
検体 2 4	131%	97%	85%	111%
検体 2 5	136%	108%	93%	132%
平均値	129%	90%	101%	118%
最大値	152%	108%	144%	182%
最小値	113%	73%	74%	82%
最大最小間差	39%	35%	70%	99%

[0078] 《実施例 5 抗体の特異性試験 3》

実施例 3 の R 1 試薬に、表 5 に記載のペプチドをそれぞれ溶解し、0、3
5、6、140、570 ng/mL 濃度のペプチドと 0.1 μ g/mL 濃度の
ルテニウム標識 S 8 8 2 3 0 R 抗体を含む溶液 70 μ L を調製して、E C L I
A 試薬で測定した。また、実施例 2 と同様の操作で 0、0.1、1.0、1

0 μ g/mLに調製したペプチド溶液をオステオマークで測定した。各ペプチドの測定値から、各測定系に含まれる抗体とペプチドとの反応性を評価した。結果を表5に示す。S88230R抗体と、Nx7、Nx7-m3及びNx7-m5ペプチドとの反応性は、オステオマークに含まれる抗体と前記ペプチドとの反応性よりも強かった。Nx7-m3ペプチドはNx7ペプチドの4番目のアミノ酸であるGをSに、Nx7-m5ペプチドはNx7ペプチドの7番目のアミノ酸であるVをLに置換したペプチドであり、これらの置換によるペプチドとS88230R抗体との反応性への影響は軽微だった。したがって、Nx7ペプチドの4アミノ酸目及び／又は7アミノ酸目を置換したペプチドを検出用ペプチドとして用いた場合にも、本発明の効果が得られると考えられる。

[0079] [表5]

ペプチド	アミノ酸配列	抗体とペプチドの反応性	
		S88230R	オステオマーク抗体
Nx7	JYDGKGVG	+++	++
Nx7-m1	JFDGKGVG	+/-	-
Nx7-m2	JYEGKGVG	+	++
Nx7-m3	JYDSKGVG	++	-
Nx7-m4	JYDGKSVG	+	+
Nx7-m5	JYDGKGLG	+++	+
Nx7-m6	JYDGKGV S	+/-	-

-：反応しない、+/-：弱く反応する、+：反応する、++：強く反応する、+++：非常に強く反応する

産業上の利用可能性

[0080] 本発明によれば、操作が簡便であり、NTxを精度よく測定できる、NTxの測定方法及び測定キットを提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 生体試料と、J Y D G K G V G（配列番号1）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体又はその抗体断片とを接触させる工程を含む、I型コラーゲン架橋N-テロペプチドの免疫測定方法。
- [請求項2] 前記抗体又はその抗体断片が、Q Y D G K（C）G V G（配列番号2）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する、請求項1に記載の免疫測定方法。
- [請求項3] 前記抗体又はその抗体断片が、モノクローナル抗体又はその抗体断片である、請求項1又は2に記載の免疫測定方法。
- [請求項4] 生体試料が、尿、血液、血漿、又は血清である、請求項1又は2に記載の免疫測定方法。
- [請求項5] 前記接触させる工程において、測定系に含まれる尿酸の濃度が、0.001～0.1質量%である、請求項1又は2に記載の免疫測定方法。
- [請求項6] 前記接触させる工程が、J Y D X₁ K G X₂ G（配列番号3）で表されるアミノ酸配列を含む検出用ペプチド断片の存在下で、前記生体試料と、前記抗体又はその抗体断片とを接触させる工程であり、前記X₁及び前記X₂は、任意のアミノ酸であり、
前記検出用ペプチド断片が、固相又は標識物質に結合しており、
前記抗体又はその抗体断片が、前記検出用ペプチド断片に結合する、請求項1又は2に記載の免疫測定方法。
- [請求項7] 前記X₁が、グリシン又はセリンであり、前記X₂が、バリン又はロイシンである、請求項6に記載の免疫測定方法。
- [請求項8] 前記標識物質に由来するシグナルを測定する工程をさらに含み、
前記検出用ペプチド断片が、固相に結合しており、
前記抗体又はその抗体断片が、前記標識物質と間接的又は直接的に

結合している、請求項 1 又は 2 に記載の免疫測定方法。

[請求項9] 前記固相が磁性粒子であり、前記標識物質がルテニウム錯体である、請求項 8 に記載の免疫測定方法。

[請求項10] J Y D G K G V G (配列番号 1) で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体又はその抗体断片を含む、生体試料中の I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドの免疫測定キット。

[請求項11] 前記抗体又はその抗体断片が、Q Y D G K (C) G V G (配列番号 2) で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する、請求項 10 に記載の免疫測定キット。

[請求項12] 前記抗体又はその抗体断片が、モノクローナル抗体又はその抗体断片である、請求項 10 又は 11 に記載の免疫測定キット。

[請求項13] 生体試料が、尿、血液、血漿、又は血清である、請求項 10 又は 11 に記載の免疫測定キット。

[請求項14] J Y D X₁ K G X₂ G (配列番号 3) で表されるアミノ酸配列を含む検出用ペプチド断片をさらに含み、
前記 X₁ 及び前記 X₂ は、任意のアミノ酸であり、
前記抗体又はその抗体断片が、前記検出用ペプチド断片に結合する、請求項 10 又は 11 に記載の免疫測定キット。

[請求項15] 前記 X₁ が、グリシン又はセリンであり、前記 X₂ が、バリン又はロイシンである、請求項 14 に記載の免疫測定キット。

[請求項16] 前記検出用ペプチド断片が、固相に結合しており、前記抗体又はその抗体断片が、標識物質と間接的又は直接的に結合している、請求項 10 又は 11 に記載の免疫測定キット。

[請求項17] 前記固相が磁性粒子であり、前記標識物質がルテニウム錯体である、請求項 16 に記載の免疫測定キット。

[請求項18] J Y D G K G V G (配列番号 1) で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体又はその抗体断片。

[請求項19] Q Y D G K (C) G V G (配列番号 2) で表されるアミノ酸配列が

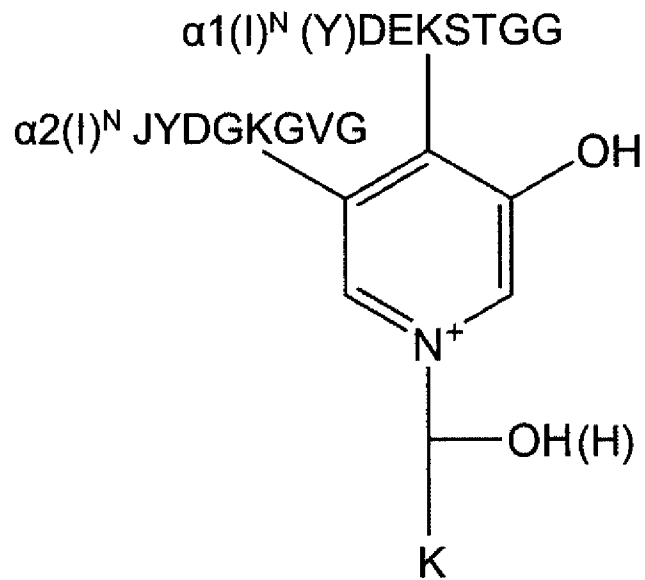
ら成るペプチド断片と結合する、請求項 18 に記載の抗体又はその抗体断片。

[請求項20] モノクローナル抗体である、請求項 18 又は 19 に記載の抗体又はその抗体断片。

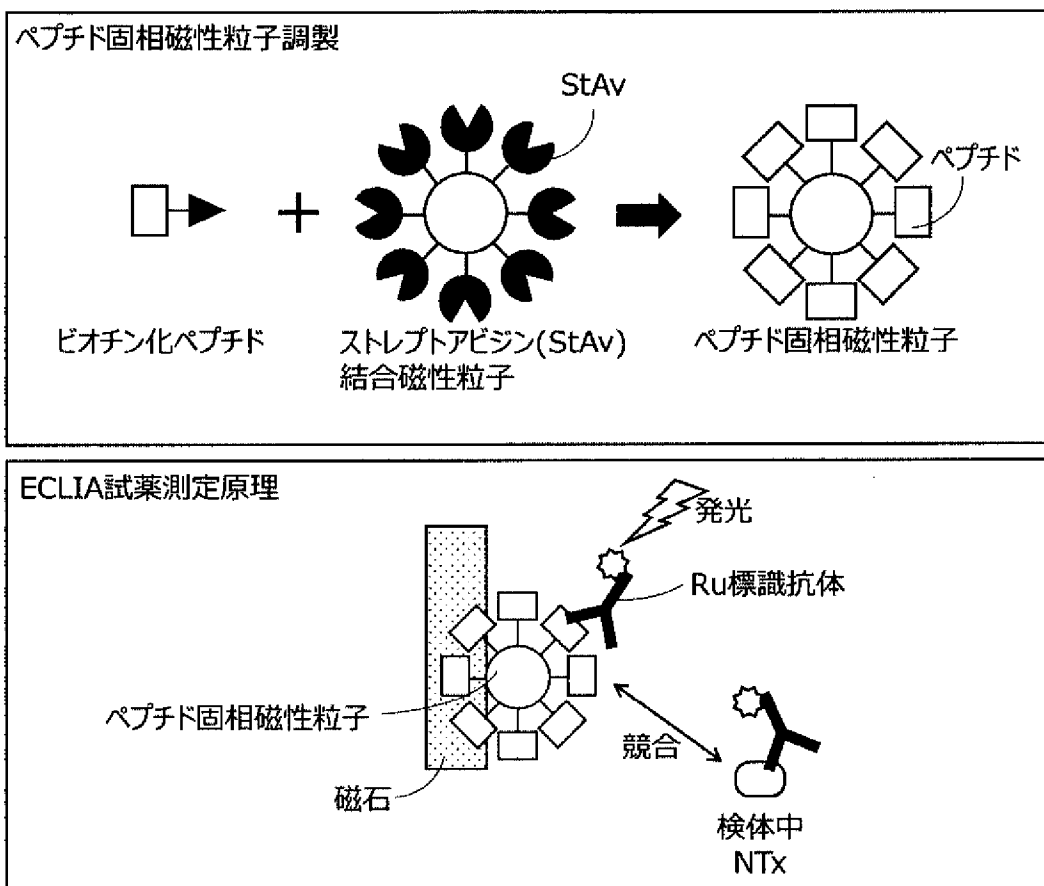
[請求項21] 請求項 1 又は 2 に記載の免疫測定方法に用いるための、 $JYDX_1KGX_2G$ （配列番号 3）で表されるアミノ酸配列又はその一部を改変したアミノ酸配列を含む検出用ペプチド断片が結合した固相、ここで、前記 X_1 及び前記 X_2 は、任意のアミノ酸である。

[請求項22] 磁性粒子である、請求項 21 に記載の固相。

[図1]

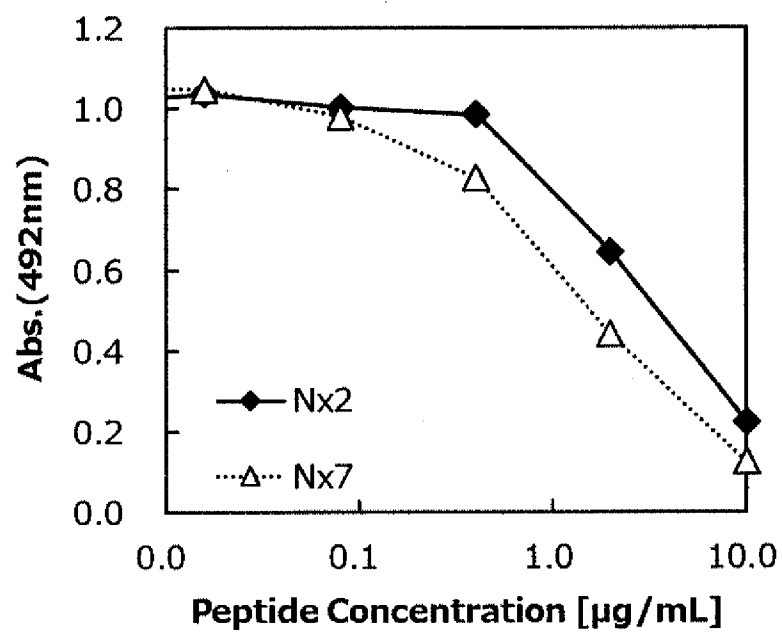


[図2]



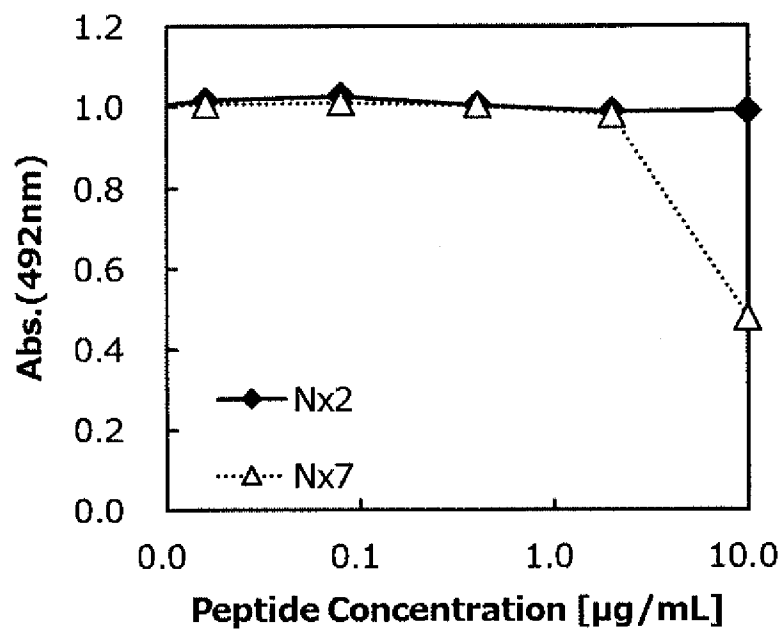
[図3]

S 8 8 2 3 0 R 抗体



[図4]

1 H 1 1 抗体



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/038704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07K 16/18</i> (2006.01)i; <i>C07K 16/46</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/13</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/62</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/53</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/543</i> (2006.01)i; <i>C12M 1/34</i> (2006.01)i FI: G01N33/53 D ZNA; C07K16/18; C07K16/46; C12M1/34 F; C12N15/13; C12N15/62 Z; G01N33/543 541A 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) C07K16/18; C07K16/46; C12M1/34; C12N15/13; C12N15/62; G01N33/53; G01N33/543 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPUS/REGISTRY (STN)																										
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 9-509736 A (OSTEOMETER BIOTECH AS) 30 September 1997 (1997-09-30) claims, pages 19-21, table 1, examples 1, 4</td> <td>1-8, 10-16, 18-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>9, 17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 10-300749 A (MITSUBISHI CHEM. CORP.) 13 November 1998 (1998-11-13) claims, examples 1-7</td> <td>1-8, 10-16, 18-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>9, 17</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 11-505804 A (WASHINGTON RESEARCH FOUND.) 25 May 1999 (1999-05-25) claims, pages 13-16</td> <td>18, 20</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 10-260183 A (WASHINGTON RESEARCH FOUND.) 29 September 1998 (1998-09-29) claims</td> <td>1, 3-8, 10, 12-16, 18, 20-22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>9, 17</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	JP 9-509736 A (OSTEOMETER BIOTECH AS) 30 September 1997 (1997-09-30) claims, pages 19-21, table 1, examples 1, 4	1-8, 10-16, 18-22	Y		9, 17	X	JP 10-300749 A (MITSUBISHI CHEM. CORP.) 13 November 1998 (1998-11-13) claims, examples 1-7	1-8, 10-16, 18-22	Y		9, 17	X	JP 11-505804 A (WASHINGTON RESEARCH FOUND.) 25 May 1999 (1999-05-25) claims, pages 13-16	18, 20	X	JP 10-260183 A (WASHINGTON RESEARCH FOUND.) 29 September 1998 (1998-09-29) claims	1, 3-8, 10, 12-16, 18, 20-22	Y		9, 17
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																								
X	JP 9-509736 A (OSTEOMETER BIOTECH AS) 30 September 1997 (1997-09-30) claims, pages 19-21, table 1, examples 1, 4	1-8, 10-16, 18-22																								
Y		9, 17																								
X	JP 10-300749 A (MITSUBISHI CHEM. CORP.) 13 November 1998 (1998-11-13) claims, examples 1-7	1-8, 10-16, 18-22																								
Y		9, 17																								
X	JP 11-505804 A (WASHINGTON RESEARCH FOUND.) 25 May 1999 (1999-05-25) claims, pages 13-16	18, 20																								
X	JP 10-260183 A (WASHINGTON RESEARCH FOUND.) 29 September 1998 (1998-09-29) claims	1, 3-8, 10, 12-16, 18, 20-22																								
Y		9, 17																								
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 11 November 2022		Date of mailing of the international search report 29 November 2022																								
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.																								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/038704

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 6-508138 A (WASHINGTON RESEARCH FOUND.) 14 September 1994 (1994-09-14) claims	1, 3-8, 10, 12-16, 18, 20-22 9, 17
Y	CN 111007269 A (DIRUI MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 14 April 2020 (2020-04-14) claims	9, 17
Y	ベータクロスラプスキット エクルーシス 試薬 β -CTx 添付文書, non-official translation (Beta Cross Lapse Kit Ecrusis Reagent β -CTx Package Insert.) 特に、1. エクルーシス試薬 β -CTx, (particularly, 1. Ecrusis reagent β -CTx)	9, 17
A	JP 3-500818 A (WASHINGTON RESEARCH FOUND.) 21 February 1991 (1991-02-21) claims, gazette, page 8, upper left column, lines 10-12	1-22
A	JP 8-233811 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 13 September 1996 (1996-09-13) entire text, all drawings	1-22
A	LUNG, F. -D. T. et al. Surface plasmon resonance detection of interactions between peptide fragments of N-telopeptide and its monoclonal antibodies. Journal of Peptide Research. 2004, vol. 63, no. 4, pp. 365-370 entire text, all drawings	1-22
A	HANSON, Dennis A. et al. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: Quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in Urine. Journal of Bone and Mineral Research. 1992, vol. 7, no. 11, pp. 1251-1258 entire text, all drawings	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/038704

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

“The form of Annex C/ST.25 text file” above shall read as “the form of ST.26.”.

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(Invention 1) Claims 1-17 and 21-22

Claims 1-17 and 21-22 pertain to an immunoassay method of type I collagen crosslinked N-telopeptide, comprising a step for contacting with an antibody capable of binding to a peptide fragment comprising an amino acid sequence represented by JYDGKGVG (SEQ ID NO: 1) or an antibody fragment thereof, or a kit and idea used for the method, and thus are classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 18-20

Claims 18-20 and claim 1 classified as invention 1 share the technical feature of an antibody capable of binding to a peptide fragment comprising an amino acid sequence represented by JYDGKGVG (SEQ ID NO: 1) or an antibody fragment thereof. However, this technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the content disclosed in document 1, and thus cannot be said to be a special technical feature. In addition, there are no other same or corresponding special technical features among these inventions.

Further, claims 18-20 are not dependent on claim 1. Moreover, claims 18-20 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Accordingly, claims 18-20 cannot be classified as invention 1.

Claims 18-20 are therefore classified as invention 2.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/038704

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	9-509736	A	30 September 1997	WO 95/008115 A1 claims, pages 18-20, table 1, examples 1, 4 EP 1104887 A2	
JP	10-300749	A	13 November 1998	WO 1998/049556 A1 claims, examples 1-7	
JP	11-505804	A	25 May 1999	US 5817755 A claims, tables WO 1996/036645 A1	
JP	10-260183	A	29 September 1998	US 5140103 A claims WO 1991/008478 A2	
JP	6-508138	A	14 September 1994	US 5320970 A claims WO 1992/021698 A1	
CN	111007269	A	14 April 2020	(Family: none)	
JP	3-500818	A	21 February 1991	US 4973666 A claims, column 8, lines 42-45 WO 1989/004491 A1	
JP	8-233811	A	13 September 1996	US 5763272 A entire text, all drawings EP 718309 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 16/18(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i; C12M 1/34(2006.01)i FI: G01N33/53 D ZNA; C07K16/18; C07K16/46; C12M1/34 F; C12N15/13; C12N15/62 Z; G01N33/543 541A		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K16/18; C07K16/46; C12M1/34; C12N15/13; C12N15/62; G01N33/53; G01N33/543		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2022年 日本国実用新案登録公報 1996-2022年 日本国登録実用新案公報 1994-2022年		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII); CAplus/REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 9-509736 A（オステオミーター・バイオテック・エー／エス）30.09.1997（1997 - 09 - 30） [特許請求の範囲], 19-21頁, 表1, 実施例1, 実施例4	1-8, 10-16, 18-22
Y		9, 17
X	JP 10-300749 A（三菱化学株式会社）13.11.1998（1998 - 11 - 13） [特許請求の範囲], 例1-7	1-8, 10-16, 18-22
Y		9, 17
X	JP 11-505804 A（ワシントン リサーチ ファンデーション）25.05.1999（1999 - 05 - 25） [特許請求の範囲], 13-16頁	18, 20
X	JP 10-260183 A（ワシントン リサーチ ファンデーション）29.09.1998（1998 - 09 - 29） [特許請求の範囲]	1, 3-8, 10, 12-16, 18, 20-22
Y		9, 17
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般の技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 11.11.2022	国際調査報告の発送日 29.11.2022	
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 大瀧 真理 2J 9812 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 6-508138 A (ワシントン リサーチ ファウンデーション) 14.09.1994 (1994 - 09 - 14) [請求の範囲]	1, 3-8, 10, 12-16, 18, 20-22
Y		9, 17
Y	CN 111007269 A (DIRUI MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 14.04.2020 (2020 - 04 - 14) [請求の範囲]	9, 17
Y	ベータクロスラプスキット エクルーシス 試薬 β -CTx 添付文書 特に、1. エクルーシス試薬 β -CTx	9, 17
A	JP 3-500818 A (ワシントン リサーチ ファウンデーション) 21.02.1991 (1991 - 02 - 21) [請求の範囲], 公報第8頁左上欄10-12行	1-22
A	JP 8-233811 A (ペーリンガー マンハイム ゲーエムペーハー) 13.09.1996 (1996 - 09 - 13) 全文, 全図	1-22
A	LUNG, F.-D.T. et al., Surface plasmon resonance detection of interactions between peptide fragments of N-telopeptide and its monoclonal antibodies, Journal of Peptide Research, 2004, Vol.63, No.4, pp.365-370 全文, 全図	1-22
A	HANSON, DENNIS A. et al., A Specific Immunoassay for Monitoring Human Bone Resorption: Quantitation of Type I Collagen Cross-linked N-Telopeptides in Urine, JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, 1992, Vol.7, No.11, pp.1251-1258 全文, 全図	1-22

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（発明１）請求項１－１７、２１－２２

請求項１－１７、２１－２２は、ＪＹＤＧＫＧＶＧ（配列番号１）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体又はその抗体断片とを接触させる工程を含む、Ⅰ型コラーゲン架橋Ｎ－テロペプチドの免疫測定方法、又は、その方法に用いるキット及び構想であって、発明１に区分する。

（発明２）請求項１８－２０

請求項１８－２０は、発明１に区分された請求項１と、ＪＹＤＧＫＧＶＧ（配列番号１）で表されるアミノ酸配列から成るペプチド断片と結合する抗体又はその抗体断片という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献１の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項１８－２０は、請求項１の従属請求項ではない。また、請求項１８－２０は、発明１に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項１８－２０は発明１に区分できない。

そして、請求１８－２０は、発明２に区分する。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の
申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2022/038704

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	9-509736	A	30.09.1997	WO 95/008115 A1 claims, pp. 18-20, table1, example1, example4 EP 1104887 A2	
JP	10-300749	A	13.11.1998	WO 1998/049556 A1 [特許請求の範囲], 例1-7	
JP	11-505804	A	25.05.1999	US 5817755 A [請求の範囲], [表] WO 1996/036645 A1	
JP	10-260183	A	29.09.1998	US 5140103 A [請求の範囲] WO 1991/008478 A2	
JP	6-508138	A	14.09.1994	US 5320970 A [請求の範囲] WO 1992/021698 A1	
CN	111007269	A	14.04.2020	(ファミリーなし)	
JP	3-500818	A	21.02.1991	US 4973666 A [請求の範囲], 8欄42-45行 WO 1989/004491 A1	
JP	8-233811	A	13.09.1996	US 5763272 A 全文, 全図 EP 718309 A1	