(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2005-503530
(P2005-503530A)
(43)公表日　平成17年2月3日(2005.2.3)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G01N 33/74	G01N 33/74		4B063
C12Q 1/06	C12Q 1/06		
G01N 33/50	G01N 33/50	G	
// G01N 33/53	G01N 33/53	A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 28 頁）

(21)出願番号　特願2001-523874(P2001-523874)
(86)(22)出願日　平成11年9月10日(1999.9.10)
(85)翻訳文提出日　平成14年3月11日(2002.3.11)
(86)国際出願番号　PCT/US1999/020724
(87)国際公開番号　WO2001/020339
(87)国際公開日　平成13年3月22日(2001.3.22)
(81)指定国　AP(GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CU,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(71)出願人　502132449
バイエックス，インコーポレイティド
アメリカ合衆国，カリフォルニア　９４５６８，ダブリン，シエラ　レーン　６６９３，スイート　エフ
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100092624
弁理士　鶴田　準一
(74)代理人　100087871
弁理士　福本　積
(74)代理人　100082898
弁理士　西山　雅也
(74)代理人　100081330
弁理士　樋口　外治

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ホルモン補充療法のモニタリング

(57)【要約】
本発明は閉経前後、閉経初期又は閉経後期の女性におけるホルモン補充療法の有効性をモニタリングするための方法であって、閉経の段階に依存する間隔で、女性の体液中のホルモンレベルを試験し、そして当該試験結果に基づいて女性に投与される補充ホルモンのレベルを調整することを含んで成る方法を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
閉経前後の女性におけるホルモン補充療法の有効性をモニタリングする方法であって、
ａ．閉経前後の女性から体液試料を入手し、
ｂ．約７日～約９０日の間隔で閉経前後の女性の体液のホルモンレベルを試験し、ここで、ホルモンレベルの試験は、プロゲステロン、テストステロン、エストラジオール、卵胞刺激ホルモン、及びエストリオールの少なくとも１つのレベルについて試験することを含んで成る；そして
ｃ．当該試験結果に基づいて女性に投与される補充ホルモンのレベルを調節すること、
を含んで成る方法。
【請求項２】
閉経初期又は閉経後期の女性におけるホルモン補充療法の有効性をモニタリングする方法であって：
ａ．閉経初期又は閉経後期の女性から体液試料を入手し、
ｂ．約３０日～約１８０日の間隔で閉経初期又は閉経後期の女性の体液のホルモンレベルを試験し、ここで、ホルモンレベルの試験は、プロゲステロン、テストステロン、エストラジオール、卵胞刺激ホルモン、及びエストリオールの少なくとも１つのレベルについて試験することを含んで成る；そして
ｃ．当該試験結果に基づいて女性に投与される補充ホルモンのレベルを調節すること、
を含んで成る方法。
【請求項３】
前記体液が唾液である、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記体液が唾液である、請求項２に記載の方法。
【請求項５】
閉経前後の女性におけるホルモン補充療法の有効性をモニタリングするキットであって：
ａ．体液回収用具；
ｂ．請求項１に記載の方法に従い、閉経前後の女性におけるホルモン補充療法の有効性をモニタリングするための前記体液回収用具を用いるための説明書を含んで成るキット。
【請求項６】
閉経初期又は閉経後期の女性におけるホルモン補充療法の有効性をモニタリングするためのキットであって：
ａ．体液回収用具；
ｂ．請求項２に記載の方法に従い、閉経の女性におけるホルモン補充療法の有効性をモニタリングするための前記体液回収用具を使用するための説明書、
を含んで成るキット。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本発明の分野
本発明は、閉経の種々の段階におけるホルモン補充療法の有効性をモニタリングするための方法に関する。
【０００２】
本発明の背景
閉経は、受胎能の終わりを表す、女性の一生における自然の事象であり、そしてエストロゲン及びプロゲステロンの卵巣での産生の低下から生じる。厳格な意味において、閉経は最後の月経期間から１年後に起こる、ある日の事象を意味する。多くの女性が、「自然な」閉経を経験するが、複数の女性が、多くの医学的な干渉のいずれか１つ、例えば卵巣の外科的摘出、又は放射線又は化学療法による卵巣の損傷により、「誘導された」閉経を経験する。
【０００３】

閉経前後は最大７年間を意味し、ここで、女性は月毎のエストロゲンレヘルの幅広い変動を有する。閉経前後は、女性が４０代のときに通常開始し、そして月経停止から１年後に終了する。閉経前後の間、女性は１ヶ月エストロゲン欠乏にあることもあるが、次の月は欠乏状態にはない。彼女達は、月毎に変動し得る閉経の症状、例えば一過性熱感及び不眠を経験することがある。閉経前後の間、エストロゲン欠乏の診断は、厳密に１ヶ月で、かつ適切なホルモン補充療法（「ＨＲＴ」）を処方され得るが、次の月は、ＨＲＴ量は多過ぎるか、又は十分でないことがある。

【０００４】

閉経／閉経後の初期（以後「閉経初期」と称する）は、閉経終了から１年後を始まりとする１０年間を意味し、このとき、女性は典型的に５０代から６０代前半である。閉経初期の間、エストロゲンレベルは一慣して低い傾向にあるが、生活様式の変化、疾患、体重の増大又は減少、運動の増大又は減少、並びに／あるいはストレスが最適なＨＲＴ量を変化させることがある。

【０００５】

閉経／閉経後の後期（以降「閉経後期」と称する）は、６５才以上で開始する。高齢の女性におけるエストロゲン代謝についてはほとんど知られておらず、そして７０才～９０才の女性の間で有意に異なることがある。生様様式の変化、疾患、体重の増大又は減少、運動の増大又は減少、並びに／あるいはストレスは最適なＨＲＴ量を変化させることがあり、このことは非常に高齢な女性において減少し得る。

【０００６】

閉経前の女性における主要な循環エストロゲンは、エストラジオール－１７βである。エストラジオールは直接的な卵巣からの分泌によって、又はテストステロン及びエストロンの末梢性の変換によって産生される。

【０００７】

閉経後の女性の有力なエストロゲンはエストロンである（Ｈａｍｍｏｎｄ，Ｃｌｉｍａｃｔｅｒｉｃ（Ｃｈａｐｔｅｒ４２，ｐｐ．７７１－７９０；Ｄａｎｆｏｒｔｈ’ｓ Ｏｂｓｔｅｔｒｉｃｓ ａｎｄ Ｇｙｎｅｃｏｌｏｇｙ，７ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，ｅｄ．Ｓｃｏｔｔ ｅｔ ａｌ．，ＪＢ Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏ．，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ＰＡ（１９９４））。エストロンの生物学的能力はエストラジオールの１／３にすぎない。閉経後の卵巣及び副腎は事実上エストロンを全く産生しない。閉経後の産生率は、エストロンの場合４０μｇ／日であり、そしてエストラジオールの場合６μｇ／日であり、これを生殖年齢の女性において比較すると、エストラジオールの場合は８０～５００μｇ／日であり、そしてエストロンの場合は８０～３００μｇ／日である（Ｈａｍｍｏｎｄ，１９９４）。

【０００８】

閉経後の女性において、事実上全てのエストラジオールがエストロンの変換によるものと思われる（Ｈａｍｍｏｎｄ，１９９４）。閉経の女性におけるテストステロンの産生は一定のままであるが、わずかに約０．１％のテストステロンがエストラジオールに変換される。閉経後の女性におけるテストステロンレベルは、エストロゲンレベルと同程度ではないが低下する。

【０００９】

処方されるエストロゲン補充療法は、長年閉経に関連する障害を処置するために広く使用されてきた。しかしながら、エストロゲン療法はなおも非常に「一か八か」の処置である（米国特許第５，５５０，０２９号を参照のこと。これは引用によってその全体が本明細書に組み入れられる）。ＨＲＴのアプローチは慣習的で経験的なものである。処置は常用の用量で開始され、そして女性が応答しなければ、ＨＲＴの非有効性についての原因を評価することなしに用量が増やされる。（Ｎｏｔｅｌｏｖｉｔｚ，Ｃｏｍｔｅｍｐｏｒａｒｙ Ｏｂ／Ｇｙｎ，Ｆｅｂｒｕａｒｙ １９９９ ｐｐ．５４－６４）

【００１０】

投与される用量は、女性がどの閉経の時期にあるかに関係無く、そしてエストロゲンレベ

ルが、しばしば閉経前後の女性において月毎に広く変化するという事実に関わらず、年１回の試験結果に基づいて典型的に決定される。（例えば、Ｎｏｔｅｌｏｖｉｔｚ，Ｆｅｂｒｕａｒｙ １９９９；Ｓａｎｔｏｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．Ｍｅｔａｂ．８１：１４９５－１５０－１（１９９６）を参照のこと）。更に、複数の専門家が、症状及び出血以外の任意な手段によって用量をモニタリングする必要がないことを発見している。（Ｆｒｏｍ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｇｙｎｅｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｎｆｅｒｔｉｌｉｔｙ，４ｔｈ ｅｄ．，ｐ．１５５，Ｓｐｅｒｏｆｆ，Ｇｌａｓｓ，ａｎｄ Ｋａｓｅ，ｅｄｓ．，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ（ＭＤ）１９８９）。更に、ＨＲＴのプロトコールは、短期間（例えば吐き気又は腹部膨満）又は長期間（例えばガンになりやすさの増大）であり得る、一過性の副作用によって悪影響を及ぼされ得る。

【００１１】

従って、年１回の試験による常用のＨＲＴ療法はしばしば有効でない。この成功を欠いた直接の結果として、わずかに１５％の閉経後の女性が現在もエストロゲン療法を受け、そして８０％程度の女性が処置の開始後にＨＲＴを中止していると推定される。長期間のＨＲＴの結果と関連している不確実さ、及び処置においてありがちな非有効性が、不必要な医療費、代替処置、例えば栄養補助食品の潜在的利益の延期、並びに若干の副作用の危険性、例えば乳ガン及び子宮内膜ガン、高血圧及び胆のうの疾患にかかりやすくなることを、患者についての危険性を相殺する正味の利益無しに引き起こす。更に、エストロゲンに対して良好に応答する女性は、用量の減少による利益を受けることができる。市場には多くのタイプのエストロゲンが存在しており、そして更に多くのものが研究及び開発において存在している。あるタイプのエストロゲンが、別のものよりも個々の必要性により適していることがある。

【００１２】

閉経後の女性の人口は増大している。米国の女性は、現在、閉経後が彼女達の人生の約１／３を占めると推定されている。従って、閉経前後、閉経初期及び後期の問題は、主要な公衆衛生の現状を関心あるものにしてきた。（Ｆｒｏｍ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｇｙｎｅｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｉｎｆｅｒｔｉｌｉｔｙ，４ｔｈ ｅｄ．，ｐ．１３４，Ｓｐｅｒｏｆｆ，Ｇｌａｓｓ，ａｎｄ Ｋａｓｅ，ｅｄｓ．，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ（ＭＤ）１９８９）。エストロゲン欠乏は、多くの問題、例えば骨粗鬆症及び心疾患の危険性の増大と関連している。

【００１３】

従って、閉経の段階及び相当するホルモンレベルの変動を考慮する、ＨＲＴの有効性を評価するための新規アプローチは、長期のＨＲＴの結果と現時点で関連している不確かさを減少させることによって、治療計画における有用性を有するだろう。

【００１４】

本発明の要約

本発明は、閉経前後、閉経初期、又は閉経後期の女性におけるホルモン補充療法の有効性をモニタリングするための方法であって、閉経の段階に依存する間隔で女性の体液中のホルモンレベルを試験し、そして当該試験結果に基づいて女性に投与される補充ホルモンレベルを調節することを含んで成る方法に関する。好ましい態様において、当該試験は唾液で行われる。

【００１５】

好ましい態様の詳細な説明

本発明の方法は、ホルモン補充療法の有効性の、更に積極的なモニタリングを提供し、そしてその結果、閉経の症状、例えばうつ病、一過性熱感、不眠、及び精力の低下に有用なだけでなく、骨粗鬆症及び心疾患に対するホルモン補充療法の保護効果を向上させ得る。

【００１６】

本明細書で使用する場合、用語「閉経」は、閉経後期から１年後に起こる、ある日の事象を意味する。

【００１７】
本明細書で使用する場合、「閉経の女性」は、本明細書で議論されている閉経の段階、例えば閉経前後、閉経、閉経初期、及び閉経後期、のいずれかの女性を意味する。
【００１８】
本明細書で使用する場合、「ホルモン補充療法」は、エストロゲン又はエストロゲン類似体単独での、又はプロゲステロン若しくは他のホルモンと組み合わせた処置を包含する。
【００１９】
本明細書で使用する場合、「閉経前後」は、女性が４０代のときに通常開始する、最長７年間を意味し、ここで、当該女性は月毎に幅広いエストロゲンレベルの変動を有する。閉経前後は、閉経停止から１年後に終了する。
【００２０】
本明細書で使用する場合、「閉経／閉経後の初期」（以後「閉経初期」と称する）は、女性が典型的に５０代から６０代前半にあるときの、月経終了から１年後を始めとする１０年間を意味する。
【００２１】
本明細書で使用する場合、用語「閉経／閉経後後期」（以後「閉経後期」と称する）は６５才以上で起こる。
【００２２】
１つの観点において、前記方法は、患者の閉経の段階に基づいてＨＲＴの有効性をモニタリングし、そして当該試験の結果に基づいたＨＲＴ量の調節の頻度を変えることを含んで成る。
【００２３】
好ましい態様において、閉経前後の女性のホルモンレベルは、約１週間毎から約３ヶ月毎の間でモニタリングされ得る。最も好ましい態様において、閉経前後の女性のホルモンレベルは月１回を基準としてモニタリングされ、そしてＨＲＴ量はこれらのホルモン測定に基づいて調整され得る。このことは、年１回の産科／婦人科検診で試験し、そして１年間一定の量を処方する、標準的な臨床的習慣と対照的である。
【００２４】
別の好ましい態様において、閉経初期又は閉経後期の女性のホルモンレベルは約１ヶ月毎から約６ヶ月毎にモニタリングされ、そしてＨＲＴ量はホルモン測定に基づいて１ヶ月毎に調整され得る。このことは、年１回の産科／婦人科検診で試験し、そして１年間一定の量を処方する、標準的な臨床的慣習と対照的である。
【００２５】
それぞれの場合において、本発明の方法は、年１回の産科／婦人科検診で試験し、そして閉経前後の女性のホルモンレベルの変動、又は高齢の女性のホルモンレベルの変化を考慮せずに１年間一定の量を処方する、標準的な臨床的慣習と異なる。本発明の更に頻繁なホルモン試験及びＨＲＴ量の調節は、従来技術の方法で可能なものよりも優れたＨＲＴの滴定を可能にする。
【００２６】
好ましい態様において、閉経女性の体液中のエストラジオールレベルは、ＨＲＴの有効性の指標として測定される。更に好ましい態様において、体液中のプロゲステロン、テストステロン、及び／又はエストリオールのレベルも測定される。
【００２７】
本発明において、閉経女性の体液中のエストラジオール、プロゲステロン、テストステロン、卵胞刺激ホルモン、及び／又はエストリオールのレベルを測定するために使用するアッセイのタイプに制限は無い。ホルモン解析のための現在のアッセイのいずれか、同様に将来発展すると思われるアッセイが使用され得る。その様なアッセイの例を後文で詳述する。
【００２８】
前記アッセイは体液、例えば血液（又は血液画分、特に血清若しくは血漿）、尿、子宮頸

部又は膣の分泌物、汗、又は唾液のうちのいずれかの試料で実施され得る。唾液が試料採取の単純さについて好ましい。

【００２９】

「試料」は解析される材料であり、そして通常直接的な生物起源のものであるが、前処理が、解析物と通常会合している標準的な生物学的化合物（例えば、全血液試料において血漿から分離された赤血球）のいくつかを除去することもある。

【００３０】

本発明の更に広い観点において、一慣性が維持される限り、体液試料の回収及び取り扱いについて制限は無い。いくつかの体液、例えば唾液及び血漿によっては、ホルモンレベルの多少の日内変動がある。他の体液、特に尿については変動が生じ、そして可能な範囲で、例えば１日のうちの同じ時間で試料を採取することによって、変動を推定することが好ましい。しかしながら、臨床的な体液中の解析物の測定の一貫性を保証するために、他の技術が利用され得る。例えば、クレアチニンは尿中のホルモンアッセイを標準化するために同時に測定され得る。クレアチニンは腎臓において一定の割合で産生され、そしてクレアチニン濃度の測定は、当業界で周知の様に、尿試料中の量の誤差の補正を可能にする。

【００３１】

好ましい態様において、ホルモンレベルは上述の様に測定され、そして用量の変更は、ホルモンレベルが以下の至適範囲から逸脱すると思われる場合に指示される（In Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility, 4th edition, ed. Speroff et al., Williams and Wilkins（Baltimore, MD）, p.629（1989）; In Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed., W. B. Saunders and Co.（Philadelphis, PA）, pp.1811－1814; 1831－1835; 1999）：

【表１】

ホルモン	起源	至適範囲
エストラジオール	血液	５pg／ml－600pg／ml
エストラジオール非複合型	尿	４－20pg／ml
エストロゲン（合計）	血液	100－400pg／ml
エストロゲン（合計）	尿	15－18pg／ml
エストロン（非複合型）	血液	0.4－25ng／ml
エストロン（非複合型）	尿	10－35ng／ml
プロゲステロン	血液	15ng／dL－2500ng／dL
テストステロン（合計）	血液	15ng／dL－80ng／dL
卵胞刺激ホルモン(FSH)	血液	１－19mIU／ml
FSH	尿	２－15IU／d

【００３２】

本発明の方法に従い、唾液のホルモンレベル（結果として至適な唾液のホルモンレベル）は血液レベルの約１０％であることが想定される。

【００３３】

多くの異なる可能な臨床上の目的により、有効な閉経処置の指標となる実際のホルモンレベル、及び治療するための変更は、担当医によって最良のものが選択される。

【００３４】

臨床解析における当業者には、所定のホルモンについての簡易なアッセイが、追加情報無

しに担当医によって得られ、又は解釈されることを期待していないが、ＨＲＴの有効性をモニタリングするための他の情報を組み合わせて熟練の医師によって使用され得ることを認識するだろう。

【００３５】

好ましい態様において、標準的な酵素のイムノアッセイが、ホルモンレベルを測定するために使用される。この技術を用いる典型的なアッセイにおいて、酵素標識した、競合的な結合成分は、当該アッセイの抗体を産生するために使用される免疫原と結合した、エストラジオール、テストステロン、プロゲステロン、及び／又はエストリオール（又は当該アッセイにおいて使用される抗体を産生するために使用されるそれらの一部）を含んで成る。酵素標識はこの部分と、好ましくはかさ高いリンカー、例えばアビジン－ビオチン複合体を介して結合する。その様な競合的結合化合物の使用は、競合物に対する抗体の結合の親和性を操作することを試みることなく、同時に、その様な解析に必要な、急な競合結合曲線を提供することなく抗体を使用可能にする。

【００３６】

典型的なその様なアッセイにおいて、抗体は固体表面、例えばマイクロタイタープレートのウェル、試験管、又は多孔性の試薬片（例えばセルロース又はグラスファイバー）に付着する。続いて、抗体でコーティングした固体表面は同時に試料及び競合的結合化合物と接触させられる。一緒にした、解析物と競合的結合化合物の合計に存在するものより少ない抗体結合部位を提供することによって、溶液中の前記分子の画分のみが固体表面と結合するだろう。存在している解析物の分子が無ければ、結合部位の全てが競合的結合化合物によって塞がれ、その結果最大量の酵素が固体表面に付着する。前記酵素の基質が、試料を洗い流した後に固体表面と接触させられると、当該酵素と基質との反応は、使用者に、試料中に解析物が存在していないこと（ネガティブな結果）を示唆する検出可能なシグナル（通常色の形成）を提供する。解析物が試料中に存在しない場合、解析物は結合部位に関して競合しており、その結果、酵素標識した競合物がほとんど結合し得ない。解析物が結合するのに比べて、あまり素速く抗体と結合しない、かさ高い結合組成物を用いることによって、そして加えた試料の量と比較して、結合部位の数を適切に選択することによって（これは当業者にとって標準的な技術である）、あらかじめ選択した最小レベル以上で存在する解析物は、競合的結合組成物の結合及び、それによる固体表面に対する酵素の結合を考慮しないだろう。従って、十分な解析物が試料中に存在するならば、色の変化を生む反応後に酵素は存在せず、そしてこの結果、反応混合物は同一の色のままである（すなわち、この反応スキームを用いるポジティブな反応）。

【００３７】

色の形成が解析物の存在の指標となる他の反応スキームも使用され得る。これまでの例は、エストラジオール、テストステロン、プロゲステロン、及び／又はエストリオールが測定され得る競合的結合アッセイの多くのタイプのうちの１つに過ぎない。

【００３８】

エストラジオール、テストステロン、プロゲステロン、及び／又はエストリオールについてのアッセイにおける使用のための抗体の産生は常用のものであり、そして本明細書では詳細に説明しない。抗体を産生する技術は文献において周知であり、そしてＡｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８８）Ｅｄｓ．Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ Ｐｒｅｓｓ，並びに米国特許第４，３８１，２９２号、第４，４５１，５７０号及び第４，６１８，５７７号の適用によって例示される。エストラジオールに特異的な抗体の産生の例については、Ｌａｓｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｆｅｒｔｉｌｉｔｙ ａｎｄ Ｓｔｅｒｉｌｉｔｙ（１９８５）４３：８６１－８６７、及びＭｕｎｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ａｂｓｔｒａｃｔ，Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｇｙｎｅｃｏｌｏｇｉｃ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｍａｒｃｈ １９８９を参照のこと。同一の技術が、テストステロン、プロゲステロン、及び／又はエストリオールに対する抗体を産生するのに使用され得る。ステロイド類に特異的な抗体の産生のための一般的な技術の簡単な説明は

、この方法に不慣れなもののために、含める。

【００３９】

動物は、上述の様に調製した、免疫原、通常タンパク質と共有結合した注目のホルモンを含む組成物を注射される。複数回の注射又はアジュバントの使用は、最大の免疫系の刺激及び抗体の産生を保証するでろう。ポリクローナル抗体が所望ならば、それらは単純に免疫化した動物から血液を採取し、そして標準的な技術によって他の血液成分から抗体を分離することによって調製され得る。モノクローナル抗体を得るために、免疫化した動物由来の脾臓又はリンパ球を摘出し、そして不死化させ、又は当業者に知られている細胞融合法によってハイブリドーマを調製するために使用される。不死化細胞によって分泌される抗体は、所望の特異性の抗体を分泌するクローンを決定するためにスクリーニングされる。モノクローナル抗エストリオール抗体の場合、当該抗体はエストリオールと結合しなければならない。所望の特異性の抗体を産生する細胞は、所望のモノクローナル抗体を産生するために選択され、クローン化され、そして増殖させられる。

【００４０】

抗体は、固体支持材料に対するタンパク質材料の付着について知られている技術を用いて、本発明のアッセイにおける使用のために固体表面に付着され得る。固体の支持体は試験管又はマイクロタイタープレートのプラスチック表面、ポリマービーズ、ディップスティック、あるいはフィルター材料を含む。当該付着方法は、前記支持体に対するタンパク質の非特異的吸着及び、典型的には遊離アミノ基を介する、固体支持体上の化学反応基、例えば活性化カルボキシル、ヒドロキシル、又はアルデヒド基に対するタンパク質の共有結合を含む。

【００４１】

本発明の好ましい観点において、試験され得る体液は体液回収キット、例えば、限定しないが、引用によってその全体が本明細書に組み入れられる、米国特許第５，７８６，２２７号及び第５，７８６，２２８号に記載のものに回収される。前記体液回収キットは、試料がフィルター中に存在している防腐剤又は他の物質、例えば色素又はプロテアーゼ阻害剤と混合された後に、特に粘性のある生物学的試料、例えば唾液を管の内側に回収し、そして保存するために適合させられる。

【００４２】

任意な数の材料がフィルター上に存在することもあり、その結果、それらは特に回収される試料に依存して試料と混合される。生物学的試料の場合、これは通常防腐剤を含む。防腐剤の例はアジ化ナトリウム（NaN_3）及びＰｒｏｃｌｉｎ（商標）を含む。唾液にとって特に好ましい防腐剤はチメロサールである。前記防腐剤の一般的な操作特性は、それらが、それらと一緒に混合される体液中で可溶性であり、そして前記回収キットを使用する条件下で保存するのに十分なほど安定であることにある。これらの条件が試料及び試料が回収される方法によって変わるので、幅広い因子が使用され得る。例えば、家庭での使用のために設計される回収キットは、比較的おだやかな保存条件を提供し、そしてかなり繊細な防腐剤を使用可能にする様に冷蔵され得る。現場作業のために設計される試験キットは、幅広い異なる温度及び湿度にかけられることがあり、そしてその結果、当該キットにおいて使用される防腐剤を制限することがある。

【００４３】

前記フィルター上に存在し得る他の材料として色素があり、これは、均一な混合が行われたか否かを直ちに決定ことを可能にする。色素の例には、回収される材料中で可溶性である様に選択される、標準的な色素のカタログに記載されている多くの標準的な色素のいずれかが含まれる。唾液の回収に特に有用な色素は、ＦＤＮＣ　Ｂｌｕｅ　＃１である。前記色素の必須の特徴は、それが回収される液体中で可溶性であることである。

【００４４】

本発明の個々の回収用具は、上述した２つのタイプの複数の管及び複数のキャップを含んで成る体液回収キット中に保管される。前記キットは通常、直ちに利用しやすい方法で管及びキャップを保持する様に適合された容器を含んで成るだろう（個々の管が市販の回収

キット内の原紙から得られたラック様用具の穴に挿入される、試験管ラックにおいて使用される典型的なタイプのもの）。個々の管は使用を容易にするための、内蔵のラベル（例えば、患者の名前並びに回収の日付け及び時間のためのスペースを含んでいる）を有することがあり、そして特定の試料のタイプに適合した注意書きが個々の管を有する箱に含まれることがある。

【００４５】

本発明は更に、閉経初期又は閉経後期の女性においてホルモン補充療法の有効性をモニタリングするためのキットであって、体液回収用具、例えば上述のもの、及び上述した本発明の方法を用いることによって閉経女性におけるホルモン補充療法の有効性をモニタリングするための体液回収用具を用いるための説明書を含んで成るキットを提供する。

【００４６】

本発明が実施の詳細そのもの、あるいは、示し、そして記載した化合物、組成物、方法、手段又は態様そのものに限定されないことを理解すべきであり、明白な様に変更及び等価なものは当業者にとって明らかであり、そしてその結果、本発明は特許請求の範囲にのみ限定される。

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
22 March 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/20339 A1

(51) International Patent Classification⁷: G01N 33/74, 33/76, B01L 3/00

(21) International Application Number: PCT/US99/20724

(22) International Filing Date:
10 September 1999 (10.09.1999)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **BIEX, INC.** [US/US]; Suite F, 6693 Sierra Lane, Dublin, CA 94568 (US).

(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant *(for US only)*: **DULLIEN, Vivian** [US/US]; 885 Arapahoe Avenue, Boulder, CO 80302 (US).

(74) Agent: **HARPER, David, S.**; McDonnell, Boehnen, Hulbert & Berghoff, Suite 3200, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

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

Published:
— *With international search report.*
— *With amended claims.*

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

WO 01/20339 A1

(54) Title: HORMONE REPLACEMENT THERAPY MONITORING

(57) Abstract: The present invention provides methods for monitoring the effectiveness of hormone replacement therapy in a perimenopausal, early menopausal, or late menopausal woman, comprising testing for hormonal levels in a body fluid of the woman at intervals depending on the stage of menopause, and adjusting levels of replacement hormone administered to the woman based on the test results.

HORMONE REPLACEMENT THERAPY MONITORING

Field of the Invention

The invention relates to methods for monitoring the effectiveness of hormone replacement therapy in various stages of menopause.

Background of the Invention

Menopause is a natural event in a woman's life that designates the end of fertility, and results from decreased ovarian production of estrogen and progesterone. In its strictest sense, menopause refers to a one-day event occurring one year after the last menstrual period. While the majority of women experience "natural" menopause, some women undergo "induced" menopause, due to any one of a number of medical interventions, such as surgical removal of the ovaries, or ovarian damage by radiation or chemotherapy.

Perimenopause refers to a period of up to 7 years wherein the woman has wide fluctuations in estrogen levels from month to month. Perimenopause generally starts when a woman is in her forties, and ends one year after menstruation stops. During perimenopause, a woman may be in estrogen deprivation one month but not the next. She may experience symptoms of menopause, such as hot flashes and insomnia, which also may fluctuate from month to month. During perimenopause, a diagnosis of estrogen deprivation may be accurate one month and proper hormone replacement therapy ("HRT") prescribed, while the next month the HRT dosage may be too much or not enough.

Early menopause/post-menopause (hereinafter referred to as "early menopause") refers to the 10-year period starting one year after menstruation ceases, when women are typically in their 50's to early 60's. During early menopause, estrogen levels tend to be consistently low, although lifestyle changes, disease, weight gain or loss exercise increase or decrease, and/or stress may change the optimal HRT dosage.

Late menopause/post menopause (hereinafter referred to as "late menopause") occurs at age 65 and beyond. Little is known about estrogen metabolism in aged women, and it may differ significantly between a 70 year old and a 90 year old woman. Lifestyle changes, disease, weight gain or loss, exercise increase or decrease, aging, and/or stress may change the optimal HRT dosage, which may decrease in very old women.

The principal circulating estrogen in pre-menopausal women is estradiol-17β. Estradiol is produced either by direct ovarian secretion or by peripheral conversion of testosterone and estrone.

The predominant estrogen of post-menopausal women is estrone. (Hammond, Climacteric (Chapter 42, pp. 771-790; in Danforth's Obstetrics and Gynecology, 7th edition, ed. Scott et al., JB Lippincott Co., Philadelphia, PA (1994). The biological potency of estrone is only one third that of estradiol. The post-menopausal ovary and adrenal gland produce virtually no estrone. Production rates post-menopausally are 40 μg/day for estrone and 6 μg/day for estradiol, compared with 80-500 μg/day for estradiol and 80-300 μg/day for estrone in reproductive-aged women. (Hammond, 1994)

Virtually all estradiol in post-menopausal women can be accounted for by the conversion of estrone. (Hammond, 1994) Testosterone production in the menopausal woman remains constant, but only about 0.1% of testosterone is converted to estradiol. Testosterone levels in post-menopausal women decline, but not to the same extent as estrogen levels.

Prescription estrogen replacement therapy has been widely used for many years for treating menopause-related disturbances. However, estrogen therapy is still very much a "hit-or-miss" treatment. (See U.S. Patent No. 5,550,029, incorporated by reference herein in its entirety.) The approach to HRT is routine and empiric. Treatment is initiated with traditional doses, and if the woman does not respond, the dose is increased without evaluating the reason for HRT non-effectiveness. (Notelovitz, Contemporary Ob/Gyn, February 1999 pp. 54-64)

The dosage administered is typically determined based on the results of annual testing, without regard to what stage of menopause a woman is in, and despite the fact that estrogen levels often vary widely from month to month in perimenopausal women. (See for example, Notelovitz, February 1999; Santoro et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 81:1495-1501 (1996). Furthermore, some authorities assert that they "find no need to monitor dosage by any means other than symptoms and bleeding. (From Clinical Gynecological Endocrinology and Infertility, 4th ed., p. 155, Speroff, Glass, and Kase, eds., Williams and Wilkins (MD) 1989) In addition, the HRT protocol may be adversely affected by transient side effects that can be short term (such as nausea or bloating) or long term (such as increased susceptibility to cancer).

Thus, traditional HRT therapy with annual testing is frequently ineffective. As a direct result of this lack of success, it is estimated that only 15% of post-menopausal women currently receive estrogen therapy, and that as many as 80% of women discontinue HRT after initiating treatment. The uncertainty associated with the outcome of long term HRT, as well as the frequent ineffectiveness of treatment, results in unnecessary health care costs, postponement of the potential benefits of alternative treatments such as dietary supplements, and a certain risk of side effects such as increased susceptibility to breast and endometrial cancers, hypertension and gall bladder disease with no actual benefit to offset the risk for the patient. Furthermore, women who respond well to estrogen may be able to benefit from a reduced dosage. There are many types of estrogens on the market and many more in research and development. It is possible that one type of estrogen may be better suited to an individual's needs than another.

The population of postmenopausal is increasing. It is estimated that women in the United States now live approximately one-third of their lives after menopause. Thus, the problems of the perimenopausal, early and late menopausal periods have achieved the status of a major public health concern. (From Clinical Gynecological Endocrinology and Infertility, 4th ed., p. 134, Speroff, Glass, and Kase, eds., Williams and Wilkins (MD) 1989) Estrogen deprivation is associated with many problems, including osteoporosis and increased risk of heart disease.

Therefore, a new approach to evaluate the effectiveness of HRT, which takes into account the menopausal stage and corresponding fluctuation in hormone levels, would have utility in therapy planning by reducing the uncertainty now associated with the outcome of long-term HRT.

Summary of the Invention

The present invention provides methods for monitoring the effectiveness of hormone replacement therapy in a perimenopausal, early menopausal, or late menopausal woman, comprising testing for hormonal levels in a body fluid of the woman at intervals depending on the stage of menopause, and adjusting levels of replacement hormone administered to the woman based on the test results. In a preferred embodiment, the test is done on saliva.

Detailed Description of the Preferred Embodiments

The methods of the present invention provide for more aggressive monitoring of the effectiveness of hormone replacement therapy, and thus are useful not only for alleviating the symptoms of menopause such as depression, hot flashes, insomnia, and decreased sexual drive, but also will improve the protective effects of hormone replacement therapy against osteoporosis and heart disease.

As used herein, the term "menopause" refers to a one-day event occurring one year after the last menstrual period.

As used herein the term "menopausal woman" refers to women in any of the menopausal stages herein discussed, including perimenopause, menopause, early menopause, and late menopause.

As used herein, the term "hormone replacement therapy" encompasses treatment with estrogen or estrogen analogs alone, or in combination with progesterone or other hormones

As used herein, the term "perimenopause" refers to a period of up to 7 years that generally starts when a woman is in her forties, wherein the woman has wide

fluctuations in estrogen levels from month to month. Perimenopause ends one year after menstruation stops.

As used herein, the term "early menopause/post-menopause" (hereinafter referred to as "early menopause") refers to the 10-year period starting one year after menstruation ceases, when women are typically in their 50's to early 60's.

As used herein, the term "late menopause/post menopause" (hereinafter referred to as "late menopause") occurs at age 65 and beyond.

In one aspect, the method comprises varying the frequency of monitoring HRT effectiveness based on the menopausal stage that a patient is in, and the adjusting the HRT dosage based on the results of the testing.

In a preferred embodiment, the hormonal level of a perimenopausal woman would be monitored between about every week to about every 3 months. In a most preferred embodiment, the hormonal level of a perimenopausal woman would be monitored on a monthly basis and HRT dosage would be tailored based on these hormonal measurements. This contrasts with the standard clinical practice of testing at annual obstetrics/gynecological examinations and prescribing a fixed dosage for one year.

In another preferred embodiment, the hormonal level of a woman in early menopause or late menopause or would be monitored Between about every month to about every 6 months, and HRT dosage would be tailored monthly based on the hormonal measurements. This contrasts with the standard clinical practice of testing at annual obstetrics/gynecological examinations and prescribing a fixed dosage for one year.

In each case, the methods of the invention deviate from the standard clinical practice of testing at annual obstetrics/gynecological examinations, and prescribing a fixed dosage for one year that does not take into account fluctuations in a woman's hormonal level in perimenopause, or changes in hormonal level in aged women. The more frequent hormone testing and adjustment of HRT dosages of the present invention allows for a better titrated HRT than is possible with prior art methods.

In a preferred embodiment, the level of estradiol in the body fluid of a menopausal woman is measured as an indicator of the effectiveness of HRT. In further preferred embodiments, the levels of progesterone, testosterone, and/or estriol in the body fluid are also measured.

In this invention, there are no limitations on the type of assay used to measure estradiol, progesterone, testosterone, follicle stimulating hormone, and/or estriol levels in the body fluid of a menopausal woman. Any of the current assays for hormone analysis can be used, as well as assays that may be developed in the future. Examples of such assays are described in detail below.

The assay can be carried out on any sample of body fluid, such as blood (or a blood fraction, especially serum or plasma), urine, cervical or vaginal secretions, sweat, or saliva. Saliva is preferred for simplicity of sampling.

A "sample" is the material being analyzed and is usually of direct biological origin, although pre-treatment may have removed some of the normal biological compounds normally associated with the analyte (such as red cells separated from plasma in a whole blood sample).

In the broader aspects of the invention, there are no limitations on the collection and handling of body fluid samples as long as consistency is maintained.

With some body fluids, such as saliva and plasma, there is little diurnal variation in hormone levels. For other fluids, notably urine, variations occur, and it is preferred to eliminate variations to the extent possible, for example by taking samples at the same time of day. However, other techniques can be utilized to ensure consistency of measurement of analytes in clinical fluids. For example, creatinine can be measured concurrently to standardize hormonal assays in urine. Creatinine is produced at a constant rate in the kidneys, and measurement of creatinine concentration allows correction of volume errors in urine samples, as is well known in the art.

In preferred embodiments, hormonal levels are measured as discussed above, and modification of the dosage is prescribed if the hormonal levels are found to deviate from the following optimal ranges (In Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility, 4th edition, ed. Speroff et al., Williams and Wilkins (Baltimore, MD), p. 629 (1989); In Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed., W.B. Saunders and Co. (Philadelphis, PA), pp. 1811-1814; 1831-1835; 1999):

Hormone	Source	Optimal Range
Estradiol	Blood	5 pg/ml to 600 pg/ml
Estradiol unconjugated	Urine	4-20 pg/ml
Estrogens (total)	Blood	100-400 pg/ml
Estrogens (total)	Urine	15-80 pg/ml
Estrone (unconjugated)	Blood	0.4 to 25 ng/ml
Estrone (unconjugated)	Urine	10 to 35 ng/ml
Progesterone	Blood	15 ng/dL to 2500 ng/dL
Testosterone (total)	Blood	15 ng/dL to 80 ng/dL
Follicle stimulating hormone (FSH)	Blood	1 to 19 mIU/ml
FSH	Urine	2 to 15 IU/d

According to the methods of the invention, it is assumed that salivary hormone levels (and thus optimal salivary hormonal levels) are approximately 10% of blood levels.

Because of the many different possible clinical goals, the actual hormonal level indicative of effective menopausal treatment, and the modifications to therapy, are best selected by the attending physician.

It will be recognized by those skilled in clinical analysis that instant assays for a given hormone are not expected to be obtained or to be interpreted by an attending physician in the absence of additional information, but can be used by a skilled medical practitioner in combination with other information to monitor the effectiveness of HRT.

In a preferred embodiment, standard enzyme immunoassays are used to measure hormonal levels. In a typical assay using this technique, the enzyme-labeled, competitive binding component comprises estradiol, testosterone, progesterone, and/or estriol (or the portion thereof used to generate the antibody used in the assay) bound to the immunogen that is used to produce the antibody of the assay. An enzyme label is bound to this moiety, preferably through a bulky linker such as an avidin-biotin complex. The use of such a competitive binding compound allows antibodies to be used without attempting to manipulate affinity of binding of antibody to competitor while still providing the steep competitive binding curve required for such an analysis.

In a typical such assay, antibody is attached to a solid surface, such as a microtiter plate well, a test tube, or a porous reagent strip (such as cellulose or glass fibers). The antibody-coated solid surface is then contacted simultaneously with a sample and with a competitive binding compound. By providing fewer antibody binding sites than are present in the combined total of analyte and competitive binding compound, only a fraction of the molecules in solution will bind to the solid surface.

If there are no analyte molecules present, all of the binding sites will be taken up by the competitive binding compounds so that a maximum amount of enzyme is attached to the solid surface. When a substrate for the enzyme is contacted with the solid surface after the sample is washed away, reaction of the enzyme with the substrate provides a detectable signal (usually formation of a color) that indicates to the user the absence of analyte in the sample (a negative result). If the analyte is present in the sample, analyte competes for binding sites so that less of the enzyme-labeled competitor can bind. By using a bulky binding composition, which binds less rapidly to the antibody than does the analyte, and by properly selecting the number of binding sites relative to the amount of sample added (which is a standard technique to one of skill in the art), analyte present at a concentration above a pre-selected minimum level will exclude binding of the competitive binding composition and thus binding of the enzyme to the solid substrate. Thus, if sufficient analyte is present in the sample, no enzyme is present after the reaction to produce a color change, and thus the reaction mixture stays the same color (i.e.: a positive reaction using this reaction scheme).

Other reaction schemes can be used in which the formation of color is indicative of the presence of the analyte. The previous example is merely one of many types of competitive binding assays in which estradiol, testosterone, progesterone, and/or estriol can be measured.

Antibody production for use in an assay for estradiol, testosterone, progesterone, and/or estriol is conventional and is not described here in detail. Techniques for producing antibodies are well known in the literature and are exemplified by the application Antibodies: A Laboratory Manual (1988) Eds. Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratories Press, and U.S. Patent Nos. 4,381,292,

4,451,570, and 4,618,577. For an example of production of antibodies specific for estradiol, see Lasley et al., Fertility and Sterility (1985) 43:861-867, and Munro et al., Abstract, Society for Gynecologic Investigation, San Diego, March 1989. The same techniques can be used to produce antibodies to testosterone, progesterone, and/or estriol. A brief discussion of general techniques for the production of antibodies specific for steroids is included for those who may be unfamiliar with the process.

An animal is injected with a composition containing the hormone of interest covalently attached to an immunogen, usually a protein, prepared as described above. Multiple injections or the use of an adjuvant will ensure maximum stimulation of the immune system and production of antibodies. If polyclonal antibodies are desired, they can be prepared by simply collecting blood from the immunized animal and separating the antibodies from other blood components by standard techniques. To obtain monoclonal antibodies, the spleen or lymphocytes from the immunized animal are removed and immortalized or used to prepare hybridomas by cell-fusion methods known to those skilled in the art. Antibodies secreted by the immortalized cells are screened to determine the clones that secrete antibodies of the desired specificity. For monoclonal anti-estriol antibodies, the antibodies must bind to estriol. Cells producing antibodies of the desired specificity are selected, cloned, and grown to produce the desired monoclonal antibodies.

Antibody can be attached to a solid surface for use in an assay of the invention using known techniques for attaching protein material to solid support materials. The solid support can include plastic surfaces of test tubes or microtiter plates, polymeric beads, dip sticks, or filter materials. The attachment methods include non-specific adsorption of the protein to the support and covalent attachment of the protein,

typically through a free amino group, to a chemically reactive group on the solid support, such as an activated carboxyl, hydroxyl, or aldehyde group.

In a preferred aspect of the invention, the body fluid to be tested is collected into a fluid collection kit, including but not limited to that described in U.S. Patent Nos. 5,786,227 and 5,786,228, herein incorporated by reference in their entirety. The fluid collection kit is particularly adapted for collecting and storing viscous biologic samples, such as saliva, in the inner tube after the sample has been mixed with a preservative or other substance located in the filter, such as a dye or protease inhibitor.

Any number of materials can be present on the filter so that they will mix with the sample, depending on the particular sample being collected. For biological samples, this will generally include a preservative. Examples of preservatives include sodium azide (NaN_3) and Proclin™. A particularly preferred preservative for saliva is thimerosal. The general operating characteristics of the preservatives are that they be soluble in the fluid with which they are to be mixed and be sufficiently stable to storage under the conditions under which the collection kit will be used. Since these conditions will vary with the sample and with the manner in which sample is collected, a wide variety of agents can be used. For example, a collection kit designed for home use can be refrigerated, which will provide for relatively mild storage conditions and allow reasonably delicate preservatives to be used. A test kit designed for field operation may be subject to a variety of different temperatures and humidities and thus would restrict the preservatives used in such a kit.

Other materials that can be present on the filter include a dye, which makes it possible to readily determine whether uniform mixing has taken place. Examples of

dyes include any of the numerous standard dyes set forth in standard dye catalogues, selected to be soluble in the material being collected. A dye particularly useful for saliva collection is FDNC Blue #1. The essential characteristic of the dye is that it be soluble in the liquid being collected.

The individual collection apparatuses of the invention can be stored in a fluid collection kit comprising multiple tubes of the two types described above and multiple caps. The kit will normally comprise a container adapted to hold the tubes and caps in a readily accessible manner (typical of the type used in a test tube rack in which the individual tubes are inserted into holes in a rack-like device, typically made of cardboard in a commercial collection kit). The individual tubes can have built-in labels for ease of use (for example, containing spaces for patient name and date and time of collection), and written instructions adapted for the particular type of sample can be included in the box that holds the individual tubes.

The instant invention further provides kits for monitoring the effectiveness of hormone replacement therapy in a early menopausal or late menopausal woman, comprising a fluid collection device, such as those described above, and instructions for using the fluid collection device for monitoring the effectiveness of hormone replacement therapy in a menopausal woman by using the methods of the invention described above.

It is to be understood that the invention is not to be limited to the exact details of operation, or to the exact compounds, compositions, methods, procedures or embodiments shown and described, as obvious modifications and equivalents will be apparent to one skilled in the art, and the invention is therefore to be limited only by the full scope of the appended claims.

We claim:

1. A method for monitoring the effectiveness of hormone replacement therapy in a perimenopausal woman, comprising

a. obtaining a body fluid sample from the perimenopausal woman;

b. testing for hormonal levels in the body fluid of the perimenopausal woman at intervals of between about 7 days to about 90 days, wherein testing for hormonal levels comprises testing for levels of at least one of progesterone, testosterone, estradiol, follicle stimulating hormone, and estriol; and

c. adjusting levels of replacement hormone administered to the woman based on the test results.

2. A method for monitoring the effectiveness of hormone replacement therapy in a early menopausal or late menopausal woman, comprising:

a. obtaining a body fluid sample from the perimenopausal woman;

b. testing for hormonal levels in the body fluid of the perimenopausal woman at intervals of between about 30 days to about 180 days, wherein testing for hormonal levels comprises testing for levels of at least one of progesterone, testosterone, estradiol, follicle stimulating hormone, and estriol; and

c. adjusting levels of replacement hormone administered to the woman based on the test results.

3. The method of claim 1 wherein the body fluid is saliva.

4. The method of claim 2 wherein the body fluid is saliva.

5. A kit for monitoring the effectiveness of hormone replacement therapy in a perimenopausal woman, comprising:

a. a fluid collection device;

b. instructions for using the fluid collection device for monitoring the effectiveness of hormone replacement therapy in a menopausal woman according to the method of claim 1.

6. A kit for monitoring the effectiveness of hormone replacement therapy in a early menopausal or late menopausal woman, comprising:

a. a fluid collection device;

b. instructions for using the fluid collection device for monitoring the effectiveness of hormone replacement therapy in a menopausal woman according to the method of claim 2.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte onal Application No
PCT/US 99/20724

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/74 G01N33/76 B01L3/00

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)
IPC 7 G01N B01L

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 practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 27800 A (ABBOTT LABORATORIES) 12 September 1996 (1996-09-12) page 1, line 14 - line 17	1,2
Y	---	3,4
Y	WO 96 03929 A (BIEX INCORPORATED) 15 February 1996 (1996-02-15) claims 1,2	3,4
X	---	5,6
	US 5 786 227 A (D.E. CHARLTON) 28 July 1998 (1998-07-28) cited in the application abstract	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in 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 document 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	Date of mailing of the international search report
16 May 2000	02/06/2000

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Van Bohemen, C

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int[illegible]ional Application No
PCT/US 99/20724

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9627800 A	12-09-1996	US 5663054 A	02-09-1997
		CA 2214085 A	12-09-1996
		EP 0813684 A	29-12-1997
		JP 11501397 T	02-02-1999
		US 5932431 A	03-08-1999
WO 9603929 A	15-02-1996	AU 2103495 A	04-03-1996
US 5786227 A	28-07-1998	US 5981293 A	09-11-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(72)発明者　ドゥリェン，ビビアン
アメリカ合衆国，コロラド　８０３０２，ブールダー，アラパホー　アベニュ　８８５

Ｆターム(参考) 4B063 QA01 QQ03 QQ94 QR48 QR71