

(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2014-516540

(P2014-516540A)

(43) 公表日 平成26年7月17日(2014.7.17)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/18 Z N A	4 B O 2 9
<b>C O 7 K 16/46 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/46	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 5/078 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/00 2 O 2 J	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-512897 (P2014-512897)  
 (86) (22) 出願日 平成24年5月18日 (2012. 5. 18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年1月17日 (2014. 1. 17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/038637  
 (87) 国際公開番号 W02012/162165  
 (87) 国際公開日 平成24年11月29日 (2012. 11. 29)  
 (31) 優先権主張番号 13/458, 847  
 (32) 優先日 平成24年4月27日 (2012. 4. 27)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/488, 630  
 (32) 優先日 平成23年5月20日 (2011. 5. 20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507269175  
 シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノステ  
 イックス・インコーポレーテッド  
 S I E M E N S H E A L T H C A R E  
 D I A G N O S T I C S I N C .  
 アメリカ合衆国、ニューヨーク 1059  
 1、タリータウン、ベネディクト・アベニ  
 ュー 511  
 (74) 代理人 110001508  
 特許業務法人 津国  
 (74) 代理人 100078662  
 弁理士 津国 肇  
 (74) 代理人 100131808  
 弁理士 柳橋 泰雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 25-ヒドロキシビタミンD2およびD3に対する抗体ならびにその使用

(57) 【要約】

本明細書において、25-ヒドロキシビタミンD2および/もしくは25-ヒドロキシビタミンD3などのビタミンD誘導体、またはビタミンD-C22免疫原性分子もしくは化合物などの25-ヒドロキシビタミンDアナログと結合する能力がある抗体を発生するために使用することができる抗原性分子が提供される。これらの抗原性分子および関連する抗原性化合物を使用して産生される抗体も記載される。加えて、本明細書において、対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法、ビタミンD欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法、対象でのビタミンD欠乏の進行をモニタリングするための方法、およびビタミンD欠乏の処置を必要とする対象でのその処置をモニタリングするための方法が開示される。また、25-ヒドロキシビタミンD2およびD3の検出または定量のための方法および試薬、ビタミンDアナログを安定化するための方法、ならびに生物学的試料中のビタミンD結合タンパク質から25-ヒドロキシビタミンD2およびD3を分離するための方法が提供される。

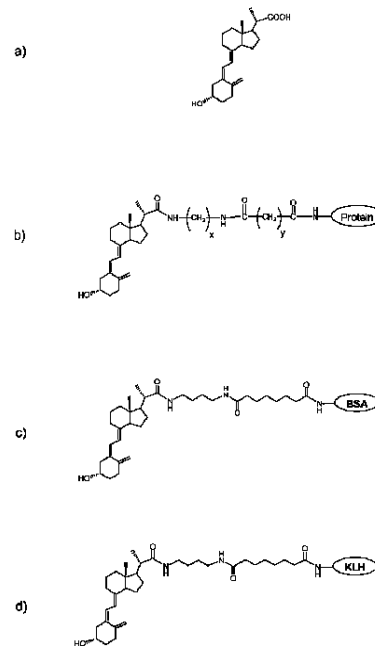


Figure 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 10 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、配列番号 11 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2、配列番号 12 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、配列番号 27 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2、および配列番号 28 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 を含む、単離された抗体またはその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 2】

重鎖可変ドメインが、配列番号 16 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

## 【請求項 3】

軽鎖可変ドメインが、配列番号 32 で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 4】

重鎖定常領域が、マウス I g G 1 抗体のアミノ酸配列を含む、請求項 1 記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 5】

軽鎖定常領域が、マウス I g 鎖のアミノ酸配列を含む、請求項 1 または 4 記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

## 【請求項 6】

抗体が、マウス抗体である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の抗体。

20

## 【請求項 7】

抗体が、リコンビナントである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の抗体。

## 【請求項 8】

抗体が、25 - ヒドロキシビタミン D 2 と結合する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の抗体。

## 【請求項 9】

抗体が、25 - ヒドロキシビタミン D 3 と結合する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の抗体。

## 【請求項 10】

抗体が、25 - ヒドロキシビタミン D 2 および 25 - ヒドロキシビタミン D 3 と結合する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の抗体。

30

## 【請求項 11】

実質的に類似の親和性で 25 - ヒドロキシビタミン D 2 および 25 - ヒドロキシビタミン D 3 と結合する、請求項 10 記載の抗体。

## 【請求項 12】

抗体が、溶液中でビタミン D 2 またはビタミン D 3 と有意に結合しない、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項記載の抗体。

## 【請求項 13】

抗体が、哺乳類にビタミン D - C 22 を含む免疫原を注射することによって産生される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項記載の抗体。

40

## 【請求項 14】

免疫原が、さらに、担体タンパク質、および直鎖中に少なくとも 6 個の原子を含むリンカーを含む、請求項 13 記載の抗体。

## 【請求項 15】

担体タンパク質が、ウシ血清アルブミンまたはキーホールリンペットヘモシアニンである、請求項 14 記載の抗体。

## 【請求項 16】

リンカーが、約 12 ~ 16 個の原子の直鎖を含む、請求項 14 または 15 記載の抗体。

## 【請求項 17】

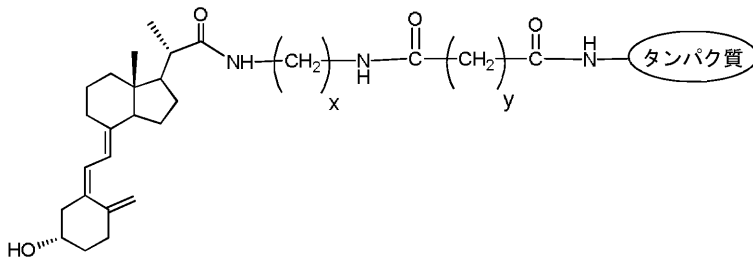
50

リンカーが、14個の原子の直鎖を含む、請求項16記載の抗体。

【請求項18】

免疫原が、式：

【化3】



10

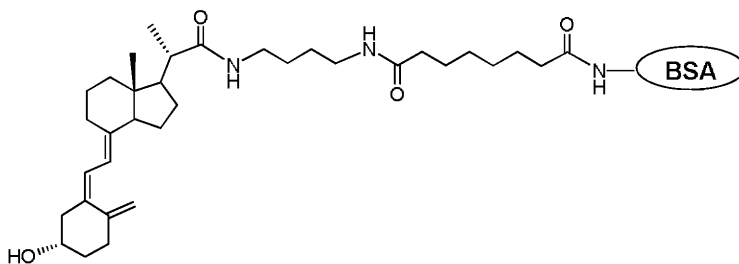
[式中、xおよびyは、独立して1～12であり、少なくとも1個のリンカーコンジュゲーション型ビタミンD-C22分子が担体タンパク質と結合している]

によって表される、請求項13～17のいずれか一項記載の抗体。

【請求項19】

免疫原が、式：

【化4】



20

[式中、少なくとも1個のリンカーコンジュゲーション型ビタミンD-C22分子がBSA担体タンパク質と結合している]

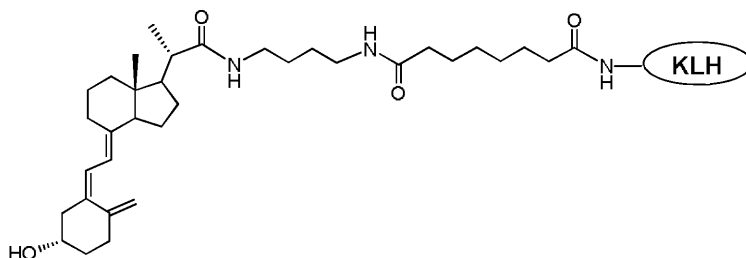
によって表される、請求項13～18のいずれか一項記載の抗体。

30

【請求項20】

免疫原が、式：

【化5】



40

[式中、少なくとも1個のリンカーコンジュゲーション型ビタミンD-C22分子がKLH担体タンパク質と結合している]

によって表される、請求項13～18のいずれか一項記載の抗体。

【請求項21】

哺乳類がマウスである、請求項13または20記載の抗体。

【請求項22】

ビタミンD-C22を含む免疫原を哺乳類に注射することを含む、請求項1記載の抗体

50

を産生させる方法。

【請求項 2 3】

免疫原が、さらに、担体タンパク質、および直鎖中に少なくとも 6 個の原子を含むリンカーを含む、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

担体タンパク質が、ウシ血清アルブミン ( B S A ) またはキーホールリンペットヘモシアニン ( K L H ) である、請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 5】

リンカーが、約 1 2 ~ 1 6 個の原子の直鎖を含む、請求項 2 3 または 2 4 記載の方法。

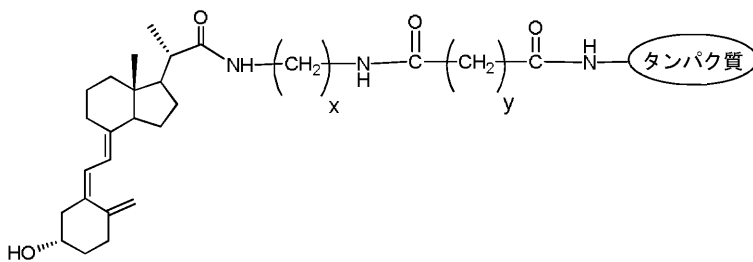
【請求項 2 6】

リンカーが、1 4 個の原子の直鎖を含む、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】

免疫原が、式：

【化 6】



10

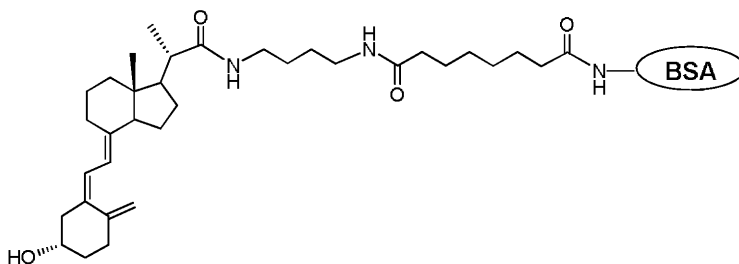
20

[ 式中、x および y は、独立して 1 ~ 1 2 であり、少なくとも 1 個のリンカーコンジュゲーション型ビタミン D - C 2 2 分子が担体タンパク質と結合している ]  
 によって表される、請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 8】

免疫原が、式：

【化 7】



30

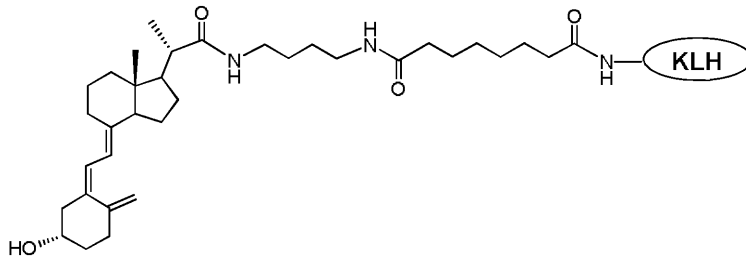
[ 式中、少なくとも 1 個のリンカーコンジュゲーション型ビタミン D - C 2 2 分子が B S A 担体タンパク質と結合している ]  
 によって表される、請求項 2 2 ~ 2 7 のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 2 9】

免疫原が、式：

## 【化 8】



10

【式中、少なくとも1個のリンカーコンジュゲーション型ビタミンD - C<sub>22</sub>分子がKLH担体タンパク質と結合している】

によって表される、請求項22～27のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項30】

哺乳類がマウスである、請求項22または29記載の方法。

## 【請求項31】

請求項1～21のいずれか一項記載の抗体を発現している、単離された細胞。

## 【請求項32】

免疫処置されたマウスから得られる、請求項31記載の細胞。

## 【請求項33】

細胞が、ハイブリドーマである、請求項32記載の細胞。

20

## 【請求項34】

細胞が、リコンビナント産生される、請求項31記載の細胞。

## 【請求項35】

請求項1～21のいずれか一項記載の抗体をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項36】

ポリヌクレオチドが、リコンビナントである、請求項35記載の単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項37】

ポリヌクレオチドが、cDNAである、請求項35または36記載の単離されたポリヌクレオチド。

30

## 【請求項38】

ポリヌクレオチドが、重鎖CDR1をコードする配列番号2で示される配列；重鎖CDR2をコードする配列番号3で示される配列；および重鎖CDR3をコードする配列番号4で示される配列を含む、抗体重鎖をコードする単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項39】

配列番号8を含む、請求項38記載の単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項40】

軽鎖CDR1をコードする配列番号18で示される配列；軽鎖CDR2をコードする配列番号19で示される配列；および軽鎖CDR3をコードする配列番号20で示される配列を含む、抗体軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチド。

40

## 【請求項41】

配列番号24を含む、請求項40記載の単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項42】

請求項38および40記載のポリヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項43】

請求項38記載の配列が、請求項40記載の配列と異なるオープンリーディングフレーム内に存在する、請求項42記載の単離されたポリヌクレオチド。

50

**【請求項 4 4】**

試料を、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項記載の抗体または抗原結合フラグメントと接触させることを含む、該試料中の 2 5 - ヒドロキシビタミン D 2 または 2 5 - ヒドロキシビタミン D 3 を検出する方法。

**【請求項 4 5】**

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項記載の抗体または抗原結合フラグメントが、検出可能にラベルされている、請求項 4 4 記載の方法。

**【請求項 4 6】**

対象から得られた生物学的試料中の総 2 5 - ヒドロキシビタミン D レベルを決定することを含む、該対象でのビタミン D 欠乏を検出するための方法であって、  
生物学的試料中のレベルと正常対照中のレベルまたは閾値レベル 3 0 ng/mL との間の減少が、該対象でのビタミン D 欠乏を示す方法。

10

**【請求項 4 7】**

ビタミン D 欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法であって、該対象から得られた生物学的試料中の総 2 5 - ヒドロキシビタミン D レベルを決定すること；および正常対照でのレベルまたは閾値レベル 3 0 ng/mL に対する生物学的試料中のレベルの減少が決定された場合、該対象にビタミン D 欠乏のための処置を施すことを含む方法。

**【請求項 4 8】**

ビタミン D 欠乏の進行のモニタリングを必要とする対象での該モニタリングするための方法であって、該方法が、

20

1 回目に該対象から得られた第 1 の生物学的試料中の総 2 5 - ヒドロキシビタミン D レベルを決定すること；および

該 1 回目よりも後の 2 回目に該対象から得られた第 2 の生物学的試料中の総 2 5 - ヒドロキシビタミン D レベルを決定すること

を含み；ここで、第 1 の生物学的試料中のレベルと第 2 の生物学的試料中のレベルとの間の減少が、該対象でのビタミン D 欠乏の進行を示し、ここで、第 1 の生物学的試料中のレベルと第 2 の生物学的試料中のレベルとの間にほとんどまたは全く変化がないことが、対象でのビタミン D 欠乏の安定化を示し、ここで、第 1 の生物学的試料中のレベルと第 2 の生物学的試料中のレベルとの間の増加が、対象でのビタミン D 欠乏の軽減を示す方法。

**【請求項 4 9】**

ビタミン D 欠乏の処置を必要とする対象における該処置をモニタリングするための方法であって、該方法が、

30

1 回目に該対象から得られた第 1 の生物学的試料中の総 2 5 - ヒドロキシビタミン D レベルを決定すること；および

該 1 回目よりも後の 2 回目に、該ビタミン D 欠乏についての該対象の処置後に該対象から得られた第 2 の生物学的試料中の総 2 5 - ヒドロキシビタミン D レベルを決定すること

を含み；ここで、第 1 の生物学的試料中のレベルに対する第 2 の生物学的試料中のレベルの増加または安定化が、該対象でのビタミン D 欠乏の処置の有効性を示し、ここで、第 1 の生物学的試料中のレベルに対する第 2 の生物学的試料中のレベルの減少が、該対象でのビタミン D 欠乏の処置の無効果を示す方法。

40

**【請求項 5 0】**

処置が、ビタミン D 摂取を補充することである、請求項 4 7 または 4 9 記載の方法。

**【請求項 5 1】**

処置が光線療法である、請求項 4 7 または 4 9 記載の方法。

**【請求項 5 2】**

光線療法が、自然太陽光への曝露増加または紫外線 B の人工光源への曝露である、請求項 5 1 記載の方法。

**【請求項 5 3】**

2 5 - ヒドロキシビタミン D が、2 5 - ヒドロキシビタミン D 2 および 2 5 - ヒドロキシビタミン D 3 である、請求項 4 6、4 7、4 8、または 4 9 記載の方法。

50

## 【請求項 5 4】

2 5 - ヒドロキシビタミン D 2 および 2 5 - ヒドロキシビタミン D 3 のレベルが、生物学的試料を、2 5 - ヒドロキシビタミン D 2 および 2 5 - ヒドロキシビタミン D 3 の両方を認識する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させることによって決定される、請求項 4 6 ~ 4 9 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 5 5】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 5 4 記載の方法。

## 【請求項 5 6】

抗体または抗原結合フラグメントが、2 5 - ヒドロキシビタミン D 2 および 2 5 - ヒドロキシビタミン D 3 について等モル認識を有する、請求項 5 4 または 5 5 記載の方法。

10

## 【請求項 5 7】

抗体または抗原結合フラグメントが、ビタミン D 3 またはビタミン D 2 と有意な交差反応性を有さない、請求項 5 4、5 5、または 5 6 記載の方法。

## 【請求項 5 8】

抗体または抗原結合フラグメントが、配列番号 2 6 で示される L c C D R 1、配列番号 2 7 で示される L c C D R 2、および配列番号 2 8 で示される L c C D R 3、配列番号 1 0 で示される H c C D R 1、配列番号 1 1 で示される H c C D R 2 および配列番号 1 2 で示される H c C D R 3 を含む、請求項 5 4、5 5、5 6、または 5 7 記載の方法。

## 【請求項 5 9】

抗体がモノクローナル抗体 1 0 H 9 である、請求項 5 4、5 5、5 6、5 7、または 5 8 記載の方法。

20

## 【請求項 6 0】

抗体を発生するために使用される抗原が、vit D - C 2 2 - ジアミノブタン - スベロイル - B S A である、請求項 5 4、5 5、5 6、5 7、5 8、または 5 9 記載の方法。

## 【請求項 6 1】

決定するステップが、競合イムノアッセイによって行われる、請求項 5 4 ~ 6 0 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 6 2】

抗体が、化学発光化合物、リン光化合物、蛍光化合物、放射性ラベル、ビオチン、または酵素でラベルされている、請求項 5 4 ~ 6 1 のいずれか一項記載の方法。

30

## 【請求項 6 3】

抗体が、固相支持体上に固定化されている、請求項 5 4 ~ 6 2 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 6 4】

抗体が、担体タンパク質とコンジュゲーションされている、請求項 5 4 ~ 6 3 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 6 5】

抗体 - 担体タンパク質が、固相支持体上に固定化されている、請求項 6 4 記載の方法。

## 【請求項 6 6】

生物学的試料中の 2 5 - ヒドロキシビタミン D 2 および 2 5 - ヒドロキシビタミン D 3 の総レベルが、強化化学発光 ( E C L )、酵素イムノアッセイ ( E I A )、免疫組織化学 ( I H C )、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ ( R I A )、免疫蛍光、平衡透析、免疫識別、または酵素結合免疫吸着検定 ( E L I S A ) によって検出される、請求項 5 4 ~ 6 5 のいずれか一項記載の方法。

40

## 【請求項 6 7】

生物学的試料が血液である、請求項 4 6 ~ 6 6 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 6 8】

生物学的試料が血清である、請求項 4 6 ~ 6 6 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 6 9】

50

生物学的試料が血漿である、請求項 46 ~ 66 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 70】

生物学的試料を、25 - ヒドロキシビタミン D2 および 25 - ヒドロキシビタミン D3 の両方を認識する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる前に、該生物学的試料が、8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) で処理される、請求項 54 ~ 69 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 71】

生物学的試料を、25 - ヒドロキシビタミン D2 および 25 - ヒドロキシビタミン D3 の両方を認識する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、該生物学的試料が、8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) で処理される、請求項 54 ~ 69 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 72】

生物学的試料を、25 - ヒドロキシビタミン D2 および 25 - ヒドロキシビタミン D3 の両方を認識する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させる前に、該生物学的試料が、8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) およびエチレングリコールで処理される、請求項 54 ~ 69 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 73】

生物学的試料を、25 - ヒドロキシビタミン D2 および 25 - ヒドロキシビタミン D3 の両方を認識する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、該生物学的試料が、8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) およびエチレングリ

20

コールで処理される、請求項 54 ~ 69 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 74】

対象でのビタミン D 欠乏が、疾患を示すか、または疾患に関連する、請求項 46 ~ 73 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 75】

疾患が、くる病、骨軟化症、高血圧症、骨粗鬆症、自己免疫病、心血管疾患、統合失調症、うつ病、神経系疾患、糖尿病、感染症、喘息、アレルギーまたはガンである、請求項 74 記載の方法。

【請求項 76】

生物学的試料が、8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) およびエチレングリコールで処理される、請求項 46 ~ 49 のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 77】

生物学的試料が、メタノールで処理されない、請求項 76 記載の方法。

【請求項 78】

生物学的試料が、メタノールで処理される、請求項 76 記載の方法。

【請求項 79】

25 - ヒドロキシビタミン D アナログが、接触させるステップの後に生物学的試料に添加される、請求項 54 記載の方法。

【請求項 80】

25 - ヒドロキシビタミン D アナログがラベルされている、請求項 79 記載の方法。

40

【請求項 81】

25 - ヒドロキシビタミン D アナログが、8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) を含む緩衝液中に存在する、請求項 79 記載の方法。

【請求項 82】

ラベルされた 25 - ヒドロキシビタミン D アナログが、8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) を含む緩衝液中に存在する、請求項 80 記載の方法。

【請求項 83】

決定するステップが 20 分以内を要する、請求項 46、47、48、または 49 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 84】

50

25 - ヒドロキシビタミンDアナログを8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) と接触させることを含む、25 - ヒドロキシビタミンDアナログを安定化する方法。

【請求項85】

さらに、25 - ヒドロキシビタミンDアナログ / 8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) をアッセイ系外で2ヶ月間よりも長く保存することを含む、請求項84記載の方法。

【請求項86】

さらに、25 - ヒドロキシビタミンDアナログ / 8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) をアッセイ系内で7日間よりも長く保存することを含む、請求項84記載の方法。

10

【請求項87】

容器中で生物学的試料と置換緩衝液とを混合すること；  
該容器に、第1のラベルとコンジュゲーションされた、25 - ヒドロキシビタミンD2および25 - ヒドロキシビタミンD3と優先的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを添加すること；

該容器に、担体タンパク質および第2のラベルとコンジュゲーションされた25 - ヒドロキシビタミンDアナログを添加すること；

該容器に、第2のラベルを認識する抗体とコンジュゲーションされた固相支持体を添加すること；ならびに

20

生物学的試料中の総25 - ヒドロキシビタミンDレベルを測定すること  
を含む、対象から得られた生物学的試料中の総25 - ヒドロキシビタミンDレベルを決定することによって、該対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法であって、  
ここで、生物学的試料中のレベルと正常対照中のレベルまたは閾値レベル30 ng/mLとの間の減少が、該対象でのビタミンD欠乏を示す方法。

【請求項88】

置換緩衝液が、8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) を含む、請求項87記載の方法。

【請求項89】

置換緩衝液が、8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) およびエチレングリコールを含む、請求項87記載の方法。

30

【請求項90】

置換緩衝液が、8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS)、エチレングリコールおよびメタノールを含む、請求項87記載の方法。

【請求項91】

第1のラベルが、化学発光化合物、リン光化合物、蛍光化合物、放射性ラベル、ビオチン、または酵素を含む、請求項87、88、89、および90のいずれか一項記載の方法。

【請求項92】

担体タンパク質が、ウシ血清アルブミンを含む、請求項87、88、89、90および91のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項93】

第2のラベルが、フルオレセインを含む。請求項87、88、89、90、91および92のいずれか一項記載の方法。

【請求項94】

固相支持体が、常磁性粒子である、請求項87～93のいずれか一項記載の方法。

【請求項95】

固相支持体とコンジュゲーションされている抗体が、フルオレセインと結合する抗体である、請求項87記載の方法。

【請求項96】

50

方法が、20分以内を要する、請求項87～95のいずれか一項記載の方法。

【請求項97】

25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3と優先的に結合する抗体または抗原結合フラグメントが、好ましい実施態様において配列番号26で示されるLc CDR1、配列番号27で示されるLc CDR2、および配列番号28で示されるLc CDR3、配列番号10で示されるHc CDR1、配列番号11で示されるHc CDR2および配列番号12で示されるHc CDR3を含む、請求項87～97のいずれか一項記載の方法。

【請求項98】

25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3と優先的に結合する抗体が、モノクローナル抗体10H9である、請求項87～97のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項99】

モノクローナル抗体を発生するために使用される抗原が、ビタミンD-C22-ジアミノブタン-スベロイル-BSAである、請求項87～97のいずれか一項記載の方法。

【請求項100】

25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3と優先的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントが、固相支持体上に固定化されている、請求項87～99のいずれか一項記載の方法。

【請求項101】

25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3と優先的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントが、担体タンパク質とコンジュゲーションされている、請求項87～99のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項102】

25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3と優先的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントと担体タンパク質とのコンジュゲートが、固相支持体上に固定化されている、請求項101記載の方法。

【請求項103】

生物学的試料が、血液である、請求項87～102のいずれか一項記載の方法。

【請求項104】

生物学的試料が、血清である、請求項87～102のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項105】

生物学的試料が、尿または血漿である、請求項87～102のいずれか一項記載の方法。

【請求項106】

25-ヒドロキシビタミンDアナログが、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)を含む安定化緩衝液中に存在する、請求項87～105のいずれか一項記載の方法。

【請求項107】

対象でのビタミンD欠乏が、疾患を示す、請求項87～106のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項108】

疾患が、くる病、骨軟化症、高血圧症、骨粗鬆症、自己免疫病、心血管疾患、統合失調症、うつ病、神経系疾患、糖尿病、感染症、喘息、アレルギーまたはガンである、請求項107記載の方法。

【請求項109】

25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3と優先的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントが、ビタミンD3またはビタミンD2と有意な交差反応性を有さない、請求項87～108のいずれか一項記載の方法。

【請求項110】

50

25 - ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および25 - ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>と優先的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントが、25 - ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および25 - ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>について等モル認識を有する、請求項87～109のいずれか一項記載の方法。

【請求項111】

生物学的試料中の総25 - ヒドロキシビタミンDレベルを測定するステップが、化学発光を測定することを含む、請求項87～110のいずれか一項記載の方法。

【請求項112】

25 - ヒドロキシビタミンDアナログが、ビタミンD - C<sub>22</sub>である、請求項79、80、81、82、84、85、86および87のいずれか一項記載の方法。

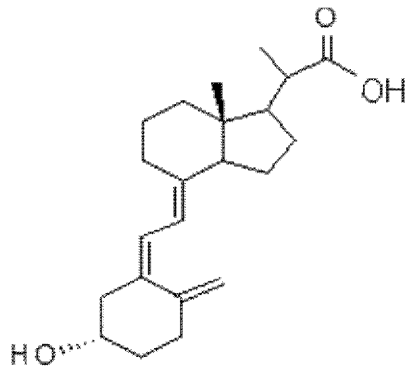
10

【請求項113】

ハイブリドーマならびに25 - ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および25 - ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>と結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを産生させる方法であって：

a . 動物に、ビタミンD - C<sub>22</sub>

【化9】



20

またはカルボン酸官能基が保護されてアミドを形成しているその誘導体を含む免疫原を免疫処置すること；

b . 動物から脾臓細胞を回収すること；

c . 脾臓細胞をミエロマ細胞と融合させてハイブリドーマを形成させること；ならび

30

に  
d . 該ハイブリドーマから、25 - ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および25 - ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>と結合する抗体または抗原結合フラグメントを産生させること  
を含む方法。

【請求項114】

抗体または抗原結合フラグメントが、試料中の25 - ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および25 - ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>を検出する、請求項113記載の方法。

【請求項115】

抗体または抗原結合フラグメントが、25 - ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および25 - ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>の等モル認識を有する、請求項113記載の方法。

40

【請求項116】

抗体が、25 - ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および25 - ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>の交差反応パーセンテージ100%～102%を有する、請求項113記載の方法。

【請求項117】

抗体が、配列番号10で示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR<sub>1</sub>、配列番号11で示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR<sub>2</sub>、配列番号12で示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR<sub>3</sub>、配列番号26で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR<sub>1</sub>、配列番号27で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR<sub>2</sub>、および配列番号28で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR<sub>3</sub>を含む、請求項113記載の方法。

【請求項118】

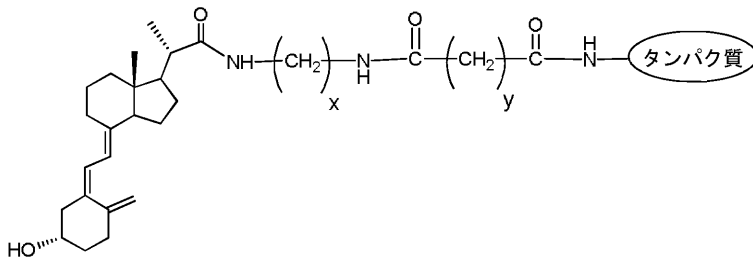
50

免疫原が、タンパク質担体に取り付けられている、請求項 1 1 3 記載の方法。

【請求項 1 1 9】

免疫原が、式：

【化 1 0】



10

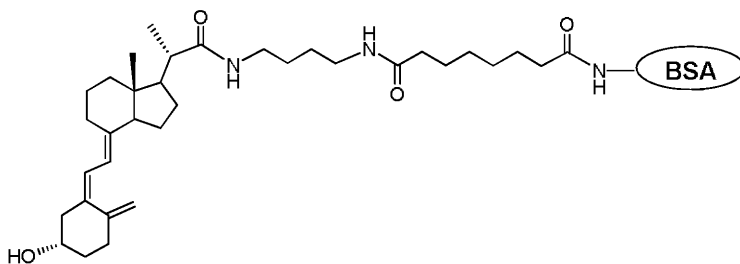
[ 式中、x および y は、独立して 1 ~ 12 であり、少なくとも 1 個のリンカー-コンジュゲーション型ビタミン D - C 22 分子が、担体タンパク質と結合している ]

によって表される、請求項 1 1 3 記載の方法。

【請求項 1 2 0】

免疫原が、式：

【化 1 1】



20

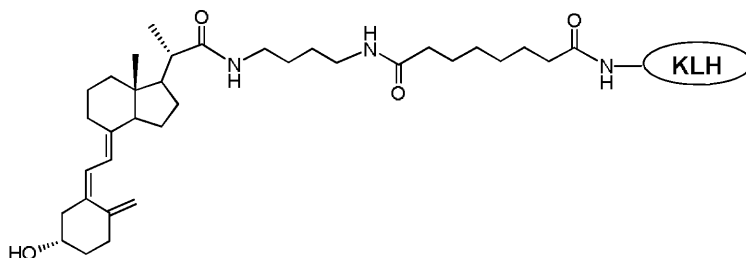
[ 式中、x および y は、独立して 1 ~ 12 であり、少なくとも 1 個のリンカー-コンジュゲーション型ビタミン D - C 22 分子が、ウシ血清アルブミン ( B S A ) と結合している ]

によって表される、請求項 1 1 3 記載の方法。

【請求項 1 2 1】

免疫原が、式：

【化 1 2】



40

[ 式中、少なくとも 1 個のリンカー-コンジュゲーション型ビタミン D - C 22 分子が、キーホールリンペットヘモシアニン ( K L H ) と結合している ]

によって表される、請求項 1 1 3 記載の方法。

【請求項 1 2 2】

25 - ヒドロキシビタミン D 2 および 25 - ヒドロキシビタミン D 3 と結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

【請求項 1 2 3】

50

配列番号 10 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、配列番号 11 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2、配列番号 12 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、配列番号 27 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2、および配列番号 28 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 を含む抗体またはその抗原結合フラグメントを産生するハイブリドーマ細胞。

【請求項 124】

試料中の 25 - ヒドロキシビタミン D 2 および 25 - ヒドロキシビタミン D 3 と結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 125】

抗体または抗原結合フラグメントが、25 - ヒドロキシビタミン D 2 および 25 - ヒドロキシビタミン D 3 の等モル認識を有する、請求項 124 記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 126】

抗体または抗原結合フラグメントが、25 - ヒドロキシビタミン D 2 および 25 - ヒドロキシビタミン D 3 の交差反応パーセンテージ 100% ~ 102% を有する、請求項 124 記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 127】

抗体が、配列番号 10 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1、配列番号 11 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2、配列番号 12 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1、配列番号 27 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2、および配列番号 28 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 を含む、請求項 124 記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 128】

生物学的試料中の総 25 - ヒドロキシビタミン D レベルを検出または決定するための方法であって、該試料を、25 - ヒドロキシビタミン D 2 および 25 - ヒドロキシビタミン D 3 と結合する抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させることを含む方法。

【請求項 129】

決定するステップが、フルオレセインコンジュゲーション型ビタミン D - C 22 を使用する競合イムノアッセイを含む、請求項 128 記載の方法。

【請求項 130】

抗体および抗原結合フラグメントが、25 - ヒドロキシビタミン D 2 および / または 25 - ヒドロキシビタミン D 3 などのビタミン D 誘導体を検出するために使用される、請求項 128 記載の方法。

【請求項 131】

試料中の 25 - ヒドロキシビタミン D 2 および 25 - ヒドロキシビタミン D 3 と結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含むキット。

【請求項 132】

試料中の 25 - ヒドロキシビタミン D 2 および 25 - ヒドロキシビタミン D 3 と結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含む診断装置。

【請求項 133】

さらに、アルカリホスファターゼコンジュゲーション型ビタミン D - C 22 - ウシ血清アルブミン ( B S A ) を含む、請求項 131 記載のキット。

【請求項 134】

さらに、アルカリホスファターゼ - コンジュゲーション型ビタミン D - C 22 - ウシ血清アルブミン ( B S A ) を含む、請求項 132 記載の診断装置。

【請求項 135】

装置が、強化化学発光 ( E C L )、酵素イムノアッセイ ( E I A )、免疫組織化学 ( I H C )、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ ( R I A )、免疫蛍光、平衡透

10

20

30

40

50

析、免疫識別、または酵素結合免疫吸着検定 ( E L I S A ) を行う、請求項 1 3 2 記載の装置。

【請求項 1 3 6】

- a . 動物を、ビタミン D - C 2 2 を含む免疫原で免疫処置すること；
- b . 動物から脾臓細胞を回収すること；および

脾臓細胞をミエローマ細胞と融合させてハイブリドーマを形成させることを含む、ハイブリドーマを産生させる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2011年5月20日に提出された米国特許仮出願第61/488,630号の利益を主張する、2012年4月27日に提出された米国特許出願第13/458,847号の優先権を主張し、それらの両方は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

技術分野

本明細書において、25-ヒドロキシビタミンD2およびD3の検出または定量的な方法および試薬、ビタミンDアナログを安定化するための方法、ならびに生物学的試料中のビタミンD結合タンパク質から25-ヒドロキシビタミンD2およびD3を分離するための方法が提供される。

【0003】

背景

ビタミンDは、カルシウムの腸管吸収およびカルシウムホメオスタシスのレギュレーションに参与するステロイドホルモンである。ビタミンDは、強く健康な骨の形成および維持に不可欠である。

【0004】

ビタミンD欠乏は、日光への不十分な曝露、不十分な食事摂取、吸収減退、異常代謝、またはビタミンD抵抗性に起因しうる。ビタミンD欠乏は、くる病、骨軟化症、骨粗鬆症、高血圧症、心血管疾患、統合失調症、うつ病、神経系疾患、糖尿病、感染症、喘息、アレルギー、ガン、およびいくつかの自己免疫病に結び付いていた。

【0005】

消費されようと産生されようと、両形態のビタミンD ( D 2 および D 3 ) は、肝臓によって25-ヒドロキシビタミンD ( 2 5 ( O H ) D ) に代謝され、次に肝臓または腎臓内で1,25-ジヒドロキシビタミンDに変換される。ビタミンD代謝物は、血漿中で担体タンパク質に結合され、身体全体に分布する。25(OH)Dは、ビタミンD状態の最も信頼できる臨床指標である代謝物であると一般に認められている。それは、血清25(OH)DレベルがビタミンDの体内貯蔵レベルを反映し、ビタミンD欠乏の臨床症状と相関するからである。

【0006】

健康管理にとってのビタミンD検出の価値にかかわらず、ビタミンDまたはその誘導体の検出のための正確で高感度なアッセイは限られている。ビタミンD用の好結果のアッセイの開発にとっての一障害は、被験生物学的試料中で強固に結合した25-ヒドロキシビタミンD3および25-ヒドロキシビタミンD2をそれらのビタミンD結合タンパク質 ( D B P ) から単離することの技術的困難性であった。DBPは、ビタミンDステロール、G-アクチン、脂肪酸および走化性薬剤と結合する血清糖タンパク質である。Swamy et al., Archives of Biochemistry and Biophysics 402: 14-23 (2002)。血漿中で、25-ヒドロキシビタミンD3および25-ヒドロキシビタミンD2は、2~3週間の半減期を有し、それでも0.05%未満が遊離型で存在するだけである。大部分は、水素結合および疎水性相互作用を伴う $10^9 \text{ M}^{-1}$ のような高い会合親和性でDBPと結合している。

10

20

30

40

50

## 【0007】

ビタミンDに関する競合結合イムノアッセイを開発する上での別の障害は、抗体結合部位を生物学的試料中のビタミンDと競合するために使用されるビタミンDアナログの不安定性である。DBPの不在下のビタミンDは、生物学的試料または緩衝溶液中で高度に不安定である。

## 【0008】

したがって、生物学的試料中に存在する遊離型またはDBP結合型のいずれかのビタミンDおよびビタミンD誘導体を正確に検出および/または定量するアッセイ方法の必要性が存在する。

## 【0009】

概要

本明細書において、ビタミンD由来分子と結合する能力がある抗体を発生させるために使用できる抗原性分子が提供される。いくつかの態様では、抗原性分子は、担体タンパク質にコンジュゲーションして抗原性化合物を形成することができる。抗原性分子への担体タンパク質のコンジュゲーションは、化学リンカーの使用によって生じうる。いくつかの態様では、抗原性タンパク質は、異なるビタミンD誘導体と結合する、モノクローナル抗体などの抗体を発生しうる。記載された抗原性分子の多くは、ビタミンD-C22免疫原を組み入れている(図1(a))。より具体的には、本明細書において、ビタミンD-C22ジアミノブタン-スベロイル-BSA(ビタミンD-C22BSA)を発生させるための、ウシ血清アルブミン(BSA)とコンジュゲーションされたビタミンD-C22免疫原が開示される(図1(c))。または、ビタミンD-C22ジアミノブタン-スベロイル-KLH(vitD-C22KLH)を発生させるために、ビタミンD-C22をKLHとコンジュゲーションすることができる(図1(d))。本明細書において提供される前記抗原性分子および抗原性化合物は、マウスなどの哺乳類において抗原反応性抗体を発生させるために使用することができる。抗原反応性モノクローナル抗体を産生するクローン性ハイブリドーマ細胞系を産生させるために、今度は、免疫処置された哺乳類は、B細胞源として使用することができる。

## 【0010】

本明細書において、25-ヒドロキシビタミンD2および/もしくは25-ヒドロキシビタミンD3などのビタミンD誘導体、またはビタミンD-C22免疫原性分子もしくは化合物などの25-ヒドロキシビタミンDアナログと結合できる単離された抗体およびその抗原結合フラグメントも開示される。いくつかの態様では、前記抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの局面では、前記抗体および抗原結合フラグメントは、配列番号10で示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、配列番号11で示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、配列番号12で示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR3、配列番号26で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、配列番号27で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、および配列番号28で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3を有する。そのような抗体は、本明細書記載のモノクローナル抗体10H9によって例示される。さらに記載されるように、本明細書において提供される抗体は、本質的にモノクローナルであるものの、1種以上の抗原と優先的に結合する能力を有する。これに関して、本明細書に提供される抗体のいくつかは、本質的に識別不能なように25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3と結合することができる。記載された抗体および抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドならびに前記ポリヌクレオチドの増殖および/または発現のためのベクターも提供される。

## 【0011】

さらに、本明細書において、対象から得られた生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルを決定することによって、その対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法が提供され、ここで、正常対照でのレベルまたは閾値レベル30ng/mLに対して生物学的試料中のレベルが減少していることが、対象でのビタミンD欠乏を示す。

## 【0012】

また、本明細書において、対象から得られた生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルを決定すること、および正常対照でのレベルまたは閾値レベル30 ng/mLに対して生物学的試料中のレベルが減少していることが検出された場合、その対象にビタミンD欠乏のための処置を施すことによって、ビタミンD欠乏を有する疑いのある対象を処置するための方法が提供される。

【0013】

また、本明細書において、1回目に対象から得られた第1の生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルを決定すること、および次に1回目よりも後の2回目に対象から得られた第2の生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルを決定することによって、ビタミンD欠乏の進行、退行、または安定化のモニタリングを必要とする対象でのそのモニタリングのための方法が開示され、ここで、第1の生物学的試料中のレベルと第2の生物学的試料中のレベルの間の減少は、対象でのビタミンD欠乏の進行または悪化を示し、ここで、第1の生物学的試料中のレベルと第2の生物学的試料中のレベルとの間にほとんどまたは全く変化がないことは、対象でのビタミンD欠乏の安定化を示し、第1の生物学的試料中のレベルと第2の生物学的試料中のレベルとの間の増加は、対象でのビタミンD欠乏の退行または改善を示す。

10

【0014】

また、本明細書において、1回目に対象から得られた第1の生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルを決定すること、および次に1回目よりも後の2回目に、ビタミンD欠乏についての対象の処置後に、対象から得られた第2の生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルを決定することによって、前記ビタミンD欠乏の処置を必要とする対象でのその処置をモニタリングするための方法が提供され、ここで、第1の生物学的試料中のレベルに対して第2の生物学的試料中のレベルが増加または安定化していることは、前記対象でのビタミンD欠乏の処置が有効であることを示し、ここで、第1の生物学的試料中のレベルに対して第2の生物学的試料中のレベルが減少していることは、前記対象でのビタミンD欠乏の処置が無効であることを示す。

20

【0015】

25-ヒドロキシビタミンDアナログを8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)と接触させることによって25-ヒドロキシビタミンDアナログを安定化するための方法が開示される。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。

30

【0016】

また、本明細書において、対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法が提供される。対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法は、生物学的試料と置換緩衝液を混合することによって、対象から得られた生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルを決定することを伴う。好ましい態様では、置換緩衝液は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)を含有する。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。置換緩衝液は、さらに、エチレングリコールを含有しうる。いくつかの態様では、置換緩衝液は、ANSおよびメタノールを含有する。いくつかの好ましい態様では、置換緩衝液は、ANS、エチレングリコール、およびメタノールを含有する。次に、第1のラベルとコンジュゲーションした、25-ヒドロキシビタミンD2および/もしくは25-ヒドロキシビタミンD3などのビタミンD誘導体、またはビタミンD-C22免疫原性分子もしくは化合物などの25-ヒドロキシビタミンDアナログと優先的に結合する抗体または抗原結合フラグメントが、アッセイ混合物と混合される。25-ヒドロキシビタミンD2および/もしくは25-ヒドロキシビタミンD3などのビタミンD誘導体、またはビタミンD-C22免疫原性分子もしくは化合物などの25-ヒドロキシビタミンDアナログと優先的に結合する抗体または抗原結合フラグメントは、好ましくは、本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメント、例えば、配列番号26で示される

40

50

Lc CDR1、配列番号27で示されるLc CDR2、および配列番号28で示されるLc CDR3、配列番号10で示されるHc CDR1、配列番号11で示されるHc CDR2および配列番号12で示されるHc CDR3を含む抗体または抗原結合フラグメントである。好ましい態様では、抗体は、モノクローナル抗体10H9である。次に、第2のラベルを有する25-ヒドロキシビタミンDアナログが、アッセイ混合物と混合される。25-ヒドロキシビタミンDアナログは、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)を含む安定化緩衝液中に存在しうる。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。いくつかの態様では、25-ヒドロキシビタミンDアナログは、担体タンパク質とコンジュゲーションされる。第2のラベルを認識する抗体とコンジュゲーションされた固相支持体も、アッセイ混合物と混合される。生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルは、第1のラベルによって送り出されるシグナルを測定することによって決定され、ここで、正常対照でのレベルまたは閾値レベル30 ng/mLに対する生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルの減少は、対象でのビタミンD欠乏を示す。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】ビタミンD-C22分子および抗原性化合物の化学構造を示す図である。図1(a)に非コンジュゲーション型ビタミンD-C22分子を示す。図1(b)に、一般的なビタミンD-C22抗原性化合物を表示する。図1(c)および1(d)に、ビタミンD-C22分子がリンカーによってBSAまたはKLHのいずれかにコンジュゲーションされた特異的ビタミンD-C22抗原性化合物であるD-C22ジアミノブタン-スベロイル-BSA(図1(c))およびD-C22ジアミノブタン-スベロイル-KLH(図1(d))を示す。

【図2】vitD-C22酸の化学的製造方法を示す図である。

【図3】vitD-C22酸をvitD-DAB-スベロイル-NHSまたはvitD-DAB-PEG5-NHSのいずれかに変換する化学的方法を示す図である。

【図4】タンパク質担体にvitD-C22、vitD-DAB-スベロイル-NHSまたはvitD-DAB-PEG5-NHSをコンジュゲーションするための化学反応スキームを説明する図である。

【図5】ビタミンD-DAB-PEG5-BSA-フルオレセインコンジュゲートを製造するための二段階反応を示す図である。

【図6】25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>または25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>のいずれかの存在下または不在下での、ビタミンD-C22-ジアミノブタン-スベロイルKLHと、ハイブリドーマ10H9上清からの抗体との間の結合度のグラフ表示である。

【図7】25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>または25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>のいずれかの存在下または不在下での、ビタミンD-C22-ジアミノブタン-スベロイル-アルカリホスファターゼと精製10H9モノクローナル抗体との間の結合度のグラフ表示である。

【図8】ADVIA Centaur総ビタミンDアッセイの模式図を示す図である。この図は、説明だけを目的とし、決して限定として見なしてはならない。

【図9】ADVIA Centaur総ビタミンDアッセイの検出限界(LoD)および実効感度(functional sensitivity)(点線)を示す精度プロファイルを示す図である。

【図10】119人のドナーからセラムレッドトップ(serum red top)チューブおよびSSTチューブ中に採取された総ビタミンDレベルと、実効感度の間の相関を示す図である。

【図11】119人のドナーからセラムレッドトップチューブおよびEDTAチューブ中に採取された総ビタミンDレベルの相関を示す図である。

【図12】ADVIA Centaurと市販の総ビタミンDアッセイとの相関を示す図である。

【図13】ADVIA CentaurとLC-MS/MS総ビタミンDアッセイとの相関を示す図で

10

20

30

40

50

ある。

【図14】10H9モノクローナル抗体重鎖可変領域の注釈付きの説明を提供する図である。

【図15】10H9モノクローナル抗体軽鎖可変領域の注釈付きの説明を提供する図である。

【0018】

例証的態様の詳細な説明

説明の局面に関する様々な用語が、本明細書および特許請求の範囲にわたり使用される。そのような用語は、別段の指示がない限り、それらの通常の意味が与えられるべきである。他の具体的に定義された用語は、本明細書に提供される定義と一致するように解釈すべきである。

10

【0019】

本明細書および添付の特許請求の範囲に使用する単数形「a」、「an」および「the」には、内容について別段のはっきりした指示がない限り、複数の指示対象が含まれる。したがって、例えば「細胞(a cell)」への参照には、2個以上の細胞の組み合わせなどが含まれる。

【0020】

量、持続時間(temporal duration)などの測定可能な値を参照するときに、規定値から最大±20%の変動が開示の方法を行うために適するので、本明細書に使用する用語「約」は、その変動を包含することが意味される。別段の指示がない限り、明細書および特許請求の範囲に使用される成分の量、分子量などの性質、反応条件などを表現する全ての数字は、全ての場合に用語「約」によって修飾されると理解されたい。したがって、特に正反対のことが示されない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に示される数値パラメータは、本発明によって得ようと努められる所望の性質に応じて変動しうる近似である。最低限でも、そして特許請求の範囲への均等論の適用を限定しようとするのではなく、各数値パラメータは、少なくとも、報告された有効数字の数に照らして、通常の丸め処理(rounding techniques)を適用することによって解釈すべきである。

20

【0021】

本発明の広い範囲を述べている数値域および数値パラメータは、近似であるにもかかわらず、具体例に示された数値は、できる限り正確に報告される。しかし、任意の数値は、本質的に、それらの個々の試験測定から見出される標準偏差に必然的に起因するある程度の誤差を含有する。

30

【0022】

「単離された」は、自然状態から「人工的に」変化されたことを意味する。分子または組成物が自然界に存在する場合に、それがその本来の環境から変えられるか、もしくは取り出されたならば、またはその両方ならば、それは「単離」されている。例えば、生きた植物または動物中に自然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離されて」おらず、その自然状態の共存物質から分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書に採用された用語として「単離されて」いる。

【0023】

同意語として「核酸分子」または「核酸」と呼ばれる「ポリヌクレオチド」は、未改変のRNAもしくはDNAまたは改変されたRNAもしくはDNAでありうる任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを表す。「ポリヌクレオチド」には、非限定的に、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖領域と二本鎖領域との混合であるDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖領域と二本鎖領域との混合であるRNA、DNAおよびRNAを含むハイブリッド分子(一本鎖、またはより典型的には二本鎖、もしくは一本鎖領域と二本鎖領域との混合でありうる)が含まれる。加えて、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を含む三本鎖領域を表す。ポリヌクレオチドという用語には、また、1個または複数の改変塩基を含有するDNAまたはRNA、および安定性または他の理由のために改変されたバックボーンを有す

40

50

るDNAまたはRNAが含まれる。「改変された」塩基には、例えば、トリチル化塩基およびイノシンなどの珍しい塩基が含まれる。DNAおよびRNAに多様な改変を加えることができることから、「ポリヌクレオチド」は、自然界に典型的に見出されるものに比べて化学的、酵素的または代謝的に改変された形態のポリヌクレオチド、ならびにウイルスおよび細胞に特徴的な化学形態のDNAおよびRNAを包含する。「ポリヌクレオチド」は、また、しばしばオリゴヌクレオチドとも呼ばれる相対的に短い核酸鎖を包含する。

【0024】

核酸またはアミノ酸配列に関して「実質的に同じ」は、2種以上の配列の間の少なくとも65%の同一性を意味する。好ましくは、この用語は、2種以上の配列の間の少なくとも70%の同一性、より好ましくは少なくとも75%の同一性、より好ましくは少なくとも80%の同一性、より好ましくは少なくとも85%の同一性、より好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも91%の同一性、より好ましくは少なくとも92%の同一性、より好ましくは少なくとも93%の同一性、より好ましくは少なくとも94%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、より好ましくは少なくとも96%の同一性、より好ましくは少なくとも97%の同一性、より好ましくは少なくとも98%の同一性、より好ましくは少なくとも99%以上の同一性を表す。そのような同一性は、mBLASTアルゴリズムを用いて決定することができる(Altschul et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7)。

10

【0025】

「ベクター」は、別の核酸セグメントの複製または発現をもたらすように、そのセグメントが作動可能に挿入されうるプラスミド、ファージ、コスミド、またはウイルスなどのレプリコンである。

20

【0026】

「作動可能に連結される」または「作動可能に挿入される」という用語は、コード配列の発現を可能にするように、コード配列の発現に必要な調節配列が、コード配列に対して適切な位置の核酸分子内に置かれることを意味する。例として、プロモーターが、コード配列の転写または発現をコントロールする能力がある場合、そのプロモーターは、コード配列と作動可能に連結されている。コード配列は、センス方向またはアンチセンス方向でプロモーターまたは調節配列と作動可能に連結されうる。「作動可能に連結される」という用語は、時に、発現ベクター内の他の転写制御エレメント(例えばエンハンサー)の配置に適用される。

30

【0027】

DNAなどの外因性核酸または異種核酸が細胞内部に導入されている場合、細胞は「トランスフォーメーション」されている。トランスフォーメーション性DNAは、細胞のゲノム内に組み込まれている(共有結合)場合も、または組み込まれていない場合もある。例えば、原核生物、酵母、および哺乳類細胞では、トランスフォーメーション性DNAは、プラスミドなどのエピソームエレメント上に維持することができる。真核細胞に関して、安定トランスフォーメーションされた細胞、または「安定細胞」は、真核細胞が、トランスフォーメーション性DNAを含有する娘細胞集団から構成される細胞系またはクローンを樹立する能力によって実証される。「クローン」は、単一細胞または共通祖先から有糸分裂によって得られる細胞集団である。「細胞系」は、in vitroで多世代にわたり安定成長する能力がある初代細胞のクローンである。本明細書に提供されるいくつかの実施例では、細胞は、その細胞にDNAをトランスフェクションすることによってトランスフォーメーションされる。

40

【0028】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または改変ペプチド結合、すなわちペプチドイソスターによって相互に結合された2個以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質を表す。「ポリペプチド」は、一般にペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと呼ばれる短鎖、および広くタンパク質と呼ばれる長鎖の両方を表す。ポリペプチドは、遺伝

50

子にコードされる20種のアミノ酸以外のアミノ酸を含有しうる。「ポリペプチド」には、翻訳後プロセッシングなどの自然過程、または当技術分野で周知の化学的改変技法のいずれかによって改変されたアミノ酸配列が含まれる。そのような改変は、基礎的な教科書、研究書、および研究文献に詳細に記載されている。改変は、ペプチド主鎖、アミノ酸側鎖およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含めた、ポリペプチド内の任意の場所に存在しうる。同じ種類の改変が、所与のポリペプチド内のいくつかの部位に、同じまたは多様な程度で存在しうる。また、所与のポリペプチドは、多種類の改変を含有しうる。ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分岐している場合があり、それらが分岐を伴って、または伴わずに、環状の場合もある。環状、分岐および分岐環状ポリペプチドは、自然翻訳後過程に起因しうるか、または合成法によって製造されうる。改変には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジル(phosphotidyl)イノシトールの共有結合、架橋結合、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有架橋結合の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 $\alpha$ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカーの形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解性プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などの、タンパク質へのアミノ酸の転移RNA介在性付加、およびユビキチン化が挙げられる(例えば、Proteins - Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993およびWold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pgs. 1-12、出典: Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter et al., Analysis for Protein Modifications and Nonprotein Cofactors, Meth Enzymol (1990) 182:626-646およびRattan et al., Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann NY Acad Sci (1992) 663:48-62参照)。

10

20

## 【0029】

「生体分子」には、タンパク質、ポリペプチド、核酸、脂質、単糖、多糖、およびその全てのフラグメント、アナログ、ホモログ、コンジュゲート、および誘導体が含まれる。

## 【0030】

「発現する」および「産生する」という用語は、本明細書において同義語的に使用され、遺伝子産物の生合成を表す。これらの用語は、RNAへの遺伝子転写を包含する。これらの用語は、また、1種または複数のポリペプチドへのRNAの翻訳を包含し、さらに、全ての自然の転写後改変および翻訳後改変を包含する。抗体またはその抗原結合フラグメントの発現または産生は、細胞の細胞質でのもの、または細胞培養の成長培地などの細胞外環境内へのものでありうる。

30

## 【0031】

「抗体」は、別段の記載がない限り、各アイソタイプの様々なモノマー形態およびポリマー形態を含めた全てのアイソタイプの免疫グロブリン(IgG、IgA、IgE、IgM、IgD、およびIgY)を表す。

## 【0032】

抗原結合フラグメントは、特定抗原に対して結合親和性を示しうる任意のタンパク質性構造である。いくつかの抗原結合フラグメントは、親抗体分子の抗原結合特異性を保持する、インタクトな抗体の部分から構成される。例えば、抗原結合フラグメントは、特定抗原と結合することが知られている抗体の少なくとも1種の可変領域(重鎖もしくは軽鎖可変領域のいずれか)または1種もしくは複数のCDRを含みうる。適切な抗原結合フラグメントの例には、非限定的に、二重特異性抗体および単鎖分子、ならびにFab、F(ab')<sub>2</sub>、Fc、Fab<sub>c</sub>、およびFv分子、単鎖(Sc)抗体、個別の抗体軽鎖、個別の抗体重鎖、抗体鎖またはCDRと他のタンパク質、タンパク質足場、または分子とのキメラ融合体、重鎖モノマーまたはダイマー、軽鎖モノマーまたはダイマー、1本の重鎖および1本の軽鎖から成るダイマーなどが挙げられる。抗原結合フラグメントを産生するた

40

50

めに全ての抗体アイソタイプを使用することができる。追加的に、抗原結合フラグメントは、関心が持たれる所与の抗原に対する親和性を付与する配向でポリペプチドセグメントをうまく組み入れることができる、タンパク質足場などの非抗体タンパク質性フレームワークを含みうる。抗原結合フラグメントは、リコンビナント産生させるか、またはインタクトな抗体の酵素もしくは化学切断によって産生させることができる。語句「抗体またはその抗原結合フラグメント」は、所与の抗原結合フラグメントが、その語句中で参照される抗体の1個または複数のアミノ酸セグメントを組み入れていることを意味するために使用することができる。

【0033】

「抗体組成物」は、本明細書記載の少なくとも1種の薬学的に許容される担体、化学療法剤、または診断部分と一緒にされる抗体またはその結合フラグメントを表す。

10

【0034】

「特異的結合」は、抗体または抗原結合フラグメントが、他の生体分子と結合できる親和性よりも大きな親和性で特定の生体分子と結合する能力を表す。この用語は、特定の結合相互作用が、他のそのような相互作用の全てではなく大部分よりも、相互作用要素に恵まれていることを意味する「優先的」結合の同義語として使用される。

【0035】

本明細書記載の態様は、特定の方法、試薬、化合物、組成物または生物学的システムに限定されず、もちろん変動しうる。さらに、本明細書において使用される用語は、特定の抗体または抗原結合フラグメントを説明することだけを目的とし、限定するつもりはない。

20

【0036】

抗原性分子および抗原性化合物

本明細書において、ビタミンD由来分子と結合する能力がある抗体を発生させるために使用することができる抗原性分子が提供される。いくつかの態様では、抗原性化合物を形成させるために、抗原性分子を担体タンパク質とコンジュゲーションすることができる。抗原性分子への担体タンパク質のコンジュゲーションは、化学リンカーの使用によって生じうる。いくつかの態様では、抗原タンパク質は、異なるビタミンD誘導体と等しく結合する抗体を生じうる。

【0037】

本明細書記載の抗原性分子は、図1(a)に示すように、未コンジュゲーション型でC22カルボキシ基を含むビタミンD炭素数22誘導体(ビタミンD-C22)の使用に基づく(Hollis et al., Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993))。この化合物に基づく抗原性分子は、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3(これらの分子は、ビタミンD-C22分子に不在の側枝(side arm)だけが構造的に異なる)の共通部分を保持する。ビタミンD-C22、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の間の構造共通性を考えると、ビタミンD-C22に基づく抗原を使用して発生された抗体は、25-ヒドロキシビタミンD2と25-ヒドロキシビタミンD3との両方を認識することができる可能性がある。

30

【0038】

本明細書に開示された抗原性分子は、抗原性化合物を産生させるために担体タンパク質と組み合わせることができる。担体タンパク質の使用は、抗原性分子が哺乳類での免疫応答を誘発する能力を高めるために有用でありうる。例えば、担体タンパク質は、ホストでのより長い半減期を可能にすることができ、または複数の抗原性分子を同じ担体と結合させて多価抗原性化合物を産生させることができる。いくつかの態様では、記載された抗原性分子は、タンパク質担体に直接取り付け(affix)することができる。例えば、ビタミンD-C22は、ウシ血清アルブミン(BSA)と直接コンジュゲーションすることができる。いくつかの態様では、多価抗原性化合物を産生させるために、複数の抗原性分子を同じ担体タンパク質とコンジュゲーションすることができる。所与のタンパク質担体とコンジュゲーションされうる抗原性分子の数は、使用される担体に基づき変動する。例えば、

40

50

B S A は、比較的適度な数の、おそらく約 10 ~ 約 25 個の抗原性分子の連結に対応し；または、キーホールリンペットヘモシアニン ( K L H ) などの担体は、約 200 ~ 約 300 個の抗原性分子に対応しうる。一態様では、約 7 ~ 約 21 個の抗原性分子が担体とコンジュゲーションされるように、ビタミン D - C 2 2 が B S A とコンジュゲーションされる。一態様では、約 12 ~ 約 16 個の抗原性分子が担体とコンジュゲーションされるように、ビタミン D - C 2 2 が B S A とコンジュゲーションされる。別のそのような態様では、約 14 個のビタミン D - C 2 2 分子が B S A 担体とコンジュゲーションされる。当業者は、本明細書記載の目的のために、多種多様な担体タンパク質を使用できることを理解している。いくつかの適切な担体には、少数だけ挙げると、K L H、P E G 化 K L H、Concholepas concholepasヘモシアニン ( C C H )、カチオン化 B S A、および卵白アルブミン

10

20

30

40

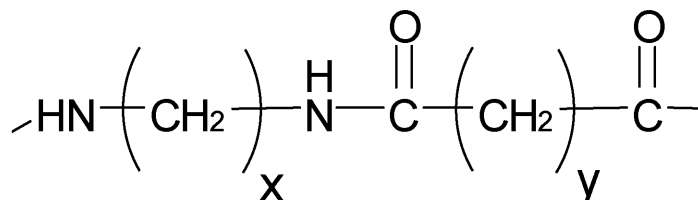
50

## 【 0 0 3 9 】

本明細書記載の抗原性化合物の別の局面は、前記担体タンパク質への前記抗原性分子の間接的コンジュゲーションを可能にする化学リンカーでありうる。化学リンカーは、アルキル、アリール、アルキルオキシ、アミド、スルホンアミドまたはカルボニルまたはペプチド基から構成されうる。タンパク質へのビタミン D 誘導体のコンジュゲーションは、タンパク質のアミノ基と、ビタミン d 誘導体の反応性 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル ( N H S エステル ) 基との間の反応によって達成することができる。リンカーの長さは、使用される担体および担体とコンジュゲーションされる抗原性分子の数に応じて変動しうる。しかし、他の態様では、B S A または K L H などの多様な担体タンパク質とのコンジュゲーションのために、同じ抗原性分子を同じリンカーと共に使用することができる。いくつかの態様では、リンカーは、式

## 【 0 0 4 0 】

## 【 化 1 】



[ 式中、x および y は、独立して、約 1 から約 12 まで変動しうる ]

を有する直鎖から構成される。このリンカーは、図 1 ( b ) に示される式を有する一般抗原性化合物を与える。いくつかの態様では、x は 3 でありえ、y は 6 でありうる。いくつかの態様では、x は 3 でありえ、y は 7 でありうる。いくつかの態様では、x は 4 でありえ、y は 7 でありうる。いくつかの態様では、x は 5 でありえ、y は 7 でありうる。いくつかの態様では、x は 4 でありえ、y は 6 でありうる。いくつかの態様では、x は 5 でありえ、y は 6 でありうる。いくつかの態様では、x は 3 でありえ、y は 5 でありうる。いくつかの態様では、x は 4 でありえ、y は 5 でありうる。いくつかの態様では、x は 5 でありえ、y は 5 でありうる。いくつかの態様では、x は 3 でありえ、y は 4 でありうる。いくつかの態様では、x は 4 でありえ、y は 4 でありうる。いくつかの態様では、x は 5 でありえ、y は 4 でありうる。いくつかの態様では、リンカーは、ビタミン D - C 2 2 と B S A をコンジュゲーションしてビタミン D - C 2 2 ジアミノブタン - スペロイル - B S A ( v i t D - C 2 2 B S A ) ( 図 1 ( c ) ) を産生させるために使用される。別の態様では、リンカーは、ビタミン D - C 2 2 と K L H コンジュゲーションしてビタミン D - C 2 2 ジアミノブタン - スペロイル - K L H ( v i t D - C 2 2 K L H ) ( 図 1 ( d ) ) を産生させるために使用される。

## 【0041】

本明細書に提供される抗原性分子および抗原性化合物は、哺乳類において抗原反応性抗体を産生させるために使用することができる。抗体を産生させるために使用することができる哺乳類には、マウス、ラット、ヤギ、ウマ、ブタ、ウシ、ウサギ、ロバ、ヒトなどが挙げられる。一態様では、哺乳類はマウスである。抗原陽性血清を有する哺乳類は、抗体産生B細胞の供給源として使用することができ、そのB細胞を単離して、ハイブリドーマ細胞などの長寿命抗体産生細胞を産生させるために使用することができる。いくつかの態様では、免疫処置されたマウスから単離されたB細胞は、ビタミンD - C 2 2またはビタミンD誘導体と結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を産生させるために使用することができる。

10

## 【0042】

抗体

本明細書において、25 - ヒドロキシビタミンD 2および/もしくは25 - ヒドロキシビタミンD 3などのビタミンD誘導体、またはビタミンD - C 2 2免疫原性分子もしくは化合物などの25 - ヒドロキシビタミンDアナログと優先的に結合する、単離された抗体または抗原結合フラグメントが記載される。一態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、モノクローナル抗体または抗原結合フラグメントである。

## 【0043】

5個のクラスの免疫グロブリンがあり、その際、Fc領域中の重鎖の一次構造が免疫グロブリンのクラスを決定する。具体的には、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 鎖は、それぞれIg A、Ig D、Ig E、Ig GおよびIg Mアイソタイプに対応する。前記抗体または抗原結合フラグメントには、4本鎖免疫グロブリンの構造の全てのアイソタイプおよび合成マルチマーが挙げられる。前記抗体または抗原結合フラグメントには、また、一般にメンドリまたはシチメンチョウの血清およびメンドリまたはシチメンチョウの卵黄から見出されるIg Yアイソタイプが挙げられる。抗体または抗原結合フラグメントは、非共有結合的に、優先的に、そして可逆的に抗原と結合する。

20

## 【0044】

開示された主題の抗体または抗原結合フラグメントは、任意の種から得ることができる。例えば、抗体または抗原結合フラグメントは、マウス、ラット、ヤギ、ウマ、ブタ、ウシ、ウサギ、ロバ、ヒトなどから得ることができる。いくつかの態様では、抗体および抗原結合フラグメントは、マウスから得られる。いくつかの態様では、抗体および抗原結合フラグメントは、本明細書記載の免疫原性化合物を免疫処置されたマウスから得られる。いくつかの態様では、抗体および抗原結合フラグメントは、ビタミンD - C 2 2 BSAを免疫処置されたマウスから得られる。いくつかの態様では、抗体は、本明細書記載の免疫原性分子または化合物を使用して産生されたモノクローナル抗体である。前記モノクローナル抗体は、本明細書記載の免疫原性分子または化合物の任意の1種以上を免疫処置されたマウスから得ることができる。例えば、25 - ヒドロキシビタミンD 2および/もしくは25 - ヒドロキシビタミンD 3などのビタミンD誘導体、またはビタミンD - C 2 2免疫原性分子もしくは化合物などの25 - ヒドロキシビタミンDアナログと優先的に結合する能力があるモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、ビタミンD - C 2 2免疫原性分子または化合物を免疫処置されたマウスから得ることができる。

30

40

## 【0045】

いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、キメラでありうる。本明細書に使用される用語「キメラ」抗体または抗原結合フラグメントは、非ヒト哺乳類、げっ歯類、または爬虫類の抗体アミノ酸配列由来の少なくとも1種の可変ドメインの少なくともいくつかの部分を含む一方で、その抗体またはその抗原結合フラグメントの残りの部分がヒト由来である、抗体またはその抗原結合フラグメントを意味する。例えば、キメラ抗体は、ヒトFcまたは他のそのような構造ドメインを有するマウス抗原結合ドメインを含みうる。

## 【0046】

50

いくつかの態様では、前記抗体は、ヒト化されうる。例えば、ヒト抗体のCDRを本明細書記載の重鎖および軽鎖CDRと交換して、本明細書記載の抗体と同じまたは実質的に類似の結合特徴を有する抗体またはその抗原結合フラグメントであるが、ヒト定常領域およびヒトフレームワーク領域から構成される抗体またはその抗原結合フラグメントを産生させることができる。そのような抗体を産生させる方法は、当業者に一般に公知であり、したがって本開示の範囲内であると見なすべきである。

#### 【0047】

本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントは、例えば診断応用のために、様々な化学的部分または生体分子部分と、ラベル化またはその他の方法でコンジュゲーションすることができる。その部分は、検出可能なラベル、例えば化学発光ラベル（例えば、アクリジニウムエステルおよびスルホンアミド、ルミノールおよびイソルミノール）、リン光ラベル、蛍光ラベル（例えばFITC）、電気化学発光ラベル（例えばルテニウム（II）キレート）、クローニングされた酵素ドナー、LOCI（luminescent oxygen channeling immunoassay）用の光増感粒子または化学発光粒子、TR-FIA（time-resolved fluorescence immunoassay）用のランタニドキレート、放射性ラベル、ビオチン、ジゴキシゲニン、酵素など、例えば、非限定的にトリチウム、炭素14、鉛212、ビスマス212、アスタチン211、ヨウ素131、スカンジウム47、レニウム186、レニウム188、イットリウム90、ヨウ素123、ヨウ素124、ヨウ素125、臭素77、インジウム111などの放射性核種、およびホウ素10またはアクチニドなどの核分裂性核種でありうる。いくつかの態様では、試料中の結合型抗体を検出するために、酵素が前記抗体または抗原結合タンパク質とコンジュゲーションされる場合がある。そのような酵素コンジュゲートには、非限定的に、アルカリホスファターゼ（AP）、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PDH）が挙げられる。溶液に基づくイムノアッセイで抗体結合を決定するために使用される他の酵素は、本明細書記載の抗体および抗原結合フラグメント用のコンジュゲートとしての使用に適していることが、当業者によって理解されている。加えて、イムノアッセイでの検出を可能にするために、アクリジニウムエステルなどの化合物も、提供された抗体および抗原結合フラグメントとコンジュゲーションすることができる。

#### 【0048】

抗体結合は、主に、6個のCDR領域、特にH鎖CDR3によって決定される（Kala et al., 132 J. Biochem. 535-41 (2002); Morea et al., 275 J. Mol. Biol. 269-94 (1998); and Chothia et al., 196 J. Mol. Biol. 901-17 (1987)）。しかし、抗体フレームワーク領域は、抗原抗体相互作用に（Panka et al., 85 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 3080-4 (1988)）、特にCDRループのコンフォメーションに影響を及ぼすことに役割を果たしうる（Foote et al., 224 J. Mol. Biol. 487-99 (1992)）。したがって、記載された抗体または抗原結合フラグメントは、25-ヒドロキシビタミンD2および/もしくは25-ヒドロキシビタミンD3またはビタミンD-C22に基づく免疫原に対する優先的結合を付与する、HまたはL鎖のCDRまたはFWR領域の任意の組み合わせを含みうる。当技術分野で日常的に実施されるドメインシャフリング実験（Jirholt et al., 215 Gene 471-6 (1998); Soederlind et al., 18 Nature Biotechnology 852-6 (2000)）を、ここに記載および例示された明細書にしたがって25-ヒドロキシビタミンD2および/もしくは25-ヒドロキシビタミンD3またはビタミンD-C22に基づく免疫原と優先的に結合する抗体を発生させるために採用することができる。そのようなドメインシャフリング実験によって発生した抗体または抗原結合フラグメントは、本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントの範囲内である。さらに、CDRは、また、CDR足場形成として役立つ抗体様タンパク質を工学処理することによって、所与の抗原と結合するように配置することができる（Nicaise et al., 13 Protein Sci. 1882 (2004)）。そのような抗原結合タンパク質は、本明細書記載の抗体の範囲内である。

#### 【0049】

本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントは、多様な形態で存在することができ

10

20

30

40

50

るが、表 1 に示される抗体セグメントの 1 個または複数を含むであろう。

【 0 0 5 0 】

【 表 1 】

表 1. 記載された抗体およびその抗原結合フラグメントの抗体セグメント (「Lc」は軽鎖を意味し、「Hc」は重鎖を意味する)

10H9 抗体セグメント	アミノ酸配列番号	DNA 配列番号
Lc CDR1	26	18
Lc CDR2	27	19
Lc CDR3	28	20
Lc FWR1	29	21
Lc FWR2	30	22
Lc FWR3	31	23
Lc FWR4	25	17
Lc 可変ドメイン	32	24
Hc CDR1	10	2
Hc CDR2	11	3
Hc CDR3	12	4
Hc FWR1	13	5
Hc FWR2	14	6
Hc FWR3	15	7
Hc FWR4	9	1
Hc 可変ドメイン	16	8

10

20

30

【 0 0 5 1 】

いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 0 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 1 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 2 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 6 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 7 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 8 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 1 0 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列；配列番号 1 1 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列；および配列番号 1 2 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 2 6 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列；配列番号 2 7 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列；および配列番号 2 8 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖および軽鎖を含む場合があ

40

50

り、ここで、重鎖は、配列番号 10 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列；配列番号 11 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列；および配列番号 12 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を有し；軽鎖は、配列番号 26 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列；配列番号 27 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列；および配列番号 28 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列を有する。C D R の抗原結合配置は、また、C D R 足場形成として抗体様タンパク質を使用して工学処理することができる。そのような工学処理された抗原結合タンパク質は、本開示の範囲内である。

**【0052】**

いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 13 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 1 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 14 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 2 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 15 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 3 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 29 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 1 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 30 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 2 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 31 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 3 アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 13 と実質的に同じまたは同一の F W R 1 アミノ酸配列；配列番号 14 と実質的に同じまたは同一の F W R 2 アミノ酸配列；および配列番号 15 と実質的に同じまたは同一の F W R 3 アミノ酸配列を有する重鎖を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 29 と実質的に同じまたは同一の F W R 1 アミノ酸配列；配列番号 30 と実質的に同じまたは同一の F W R 2 アミノ酸配列；および配列番号 31 と実質的に同じまたは同一の F W R 3 アミノ酸配列を有する軽鎖を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖および軽鎖を含む場合があり、ここで、重鎖は、配列番号 13 と実質的に同じまたは同一の F W R 1 アミノ酸配列；配列番号 14 と実質的に同じまたは同一の F W R 2 アミノ酸配列；および配列番号 15 と実質的に同じまたは同一の F W R 3 アミノ酸配列を含み；軽鎖は、配列番号 29 と実質的に同じまたは同一の F W R 1 アミノ酸配列；配列番号 30 と実質的に同じまたは同一の F W R 2 アミノ酸配列；および配列番号 31 と実質的に同じまたは同一の F W R 3 アミノ酸配列を含む。

**【0053】**

いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 10 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列；配列番号 11 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列；および配列番号 12 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列；配列番号 13 と実質的に同じまたは同一の F W R 1 アミノ酸配列；配列番号 14 と実質的に同じまたは同一の F W R 2 アミノ酸配列；および配列番号 15 と実質的に同じまたは同一の F W R 3 アミノ酸配列を有する重鎖を含みうる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号 26 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列；配列番号 27 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列；および配列番号 28 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列；配列番号 29 と実質的に同じまたは同一の F W R 1 アミノ酸配列；配列番号 30 と実質的に同じまたは同一の F W R 2 アミノ酸配列；および配列番号 31 と実質的に同じまたは同一の F W R 3 アミノ酸配列を有する軽鎖を含む。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖および軽鎖を含み、ここで、重鎖は、配列番号 10 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列；配列番号 11 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列；および配列番号 12 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列；配列番号 13 と実質的に同じまたは同一の F W R 1 アミノ酸配列；配列番号 14 と実質的に同じまたは同一の F W R 2 アミノ酸配列；および配列番号 15 と実質的に同じまたは同一の F W R 3 アミノ酸配列を含

み；軽鎖は、配列番号 26 と実質的に同じまたは同一の C D R 1 アミノ酸配列；配列番号 27 と実質的に同じまたは同一の C D R 2 アミノ酸配列；および配列番号 28 と実質的に同じまたは同一の C D R 3 アミノ酸配列；配列番号 29 と実質的に同じまたは同一の F W R 1 アミノ酸配列；配列番号 30 と実質的に同じまたは同一の F W R 2 アミノ酸配列；および配列番号 31 と実質的に同じまたは同一の F W R 3 アミノ酸配列を含む。C D R および F W R の抗原結合配置は、また、C D R 足場形成として抗体様タンパク質を使用して工学処理することができる。そのような工学処理された抗原結合タンパク質は、本開示の範囲内である。

#### 【0054】

いくつかの態様では、本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントは、マウス重鎖を有する。いくつかの態様では、本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントは、マウス軽鎖を有する。記載された抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖および軽鎖を有する場合があります、ここで、重鎖はマウス重鎖であり、軽鎖はマウス軽鎖である。いくつかの態様では、本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントは、マウス I g G 1 重鎖を有する。いくつかの態様では、本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントは、マウス I g 軽鎖を有する。前記抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖および軽鎖を有する場合があります、ここで、重鎖はマウス I g G 1 重鎖であり、軽鎖はマウス I g 鎖である。

10

#### 【0055】

抗体をコードするポリヌクレオチド

20

25 - ヒドロキシビタミン D 2 および / もしくは 25 - ヒドロキシビタミン D 3 などのビタミン D 誘導体、またはビタミン D - C 2 2 免疫原性分子もしくは化合物などの 25 - ヒドロキシビタミン D アナログと優先的に結合する抗体または抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドも記載される。記載されたポリヌクレオチドは、多様な形態で存在することができ、したがって、ネイティブなポリヌクレオチド、リコンビナントポリヌクレオチド ( c D N A など )、または合成的に産生されたポリヌクレオチドでありうる。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 10 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1 配列、例えば配列番号 2 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 11 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 2、例えば配列番号 3 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 12 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 3、例えば配列番号 4 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 26 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1、例えば配列番号 18 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 27 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 2、例えば配列番号 19 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 28 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 3、例えば配列番号 20 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。ポリヌクレオチドは、配列番号 10 と実質的に同じまたは同一の C D R 1、例えば配列番号 2；配列番号 11 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、例えば配列番号 3；および配列番号 12 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、例えば配列番号 4 を有する重鎖を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしうる。ポリヌクレオチドは、配列番号 26 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1、例えば配列番号 18；配列番号 27 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、例えば配列番号 19；および配列番号 28 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、例えば配列番号 20 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしうる。ポリヌクレオチドは、配列番号 10 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1、例えば配列番号 2；配列番号 11 と実質的に同じまたは同一のヌクレオチド配列、例えば配列番号 3 によってコードされる C D R 2；および配列番号 12 と実質的に同じまたは同一のヌクレオチド配列、例えば配列番号 4 によってコードされる C D R 3；および配列番号 26 と実質的に同じまたは同一

30

40

50

の軽鎖 C D R 1、例えば配列番号 1 8；配列番号 2 7 と実質的に同じまたは同一の C D R 2、例えば配列番号 1 9；および配列番号 2 8 と実質的に同じまたは同一の C D R 3、例えば配列番号 2 0 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードしうる。

【 0 0 5 6 】

いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 1 3 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 1、例えば配列番号 5 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 1 4 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 2、例えば配列番号 6 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 1 5 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 3、例えば配列番号 7 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 9 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 1、例えば配列番号 2 1 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 3 0 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 2、例えば配列番号 2 2 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 3 1 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 3、例えば配列番号 2 3 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 1 3 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 1、例えば配列番号 5；配列番号 1 4 と実質的に同じまたは同一の F W R 2、例えば配列番号 6；および配列番号 1 5 と実質的に同じまたは同一の F W R 3、例えば配列番号 7 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 9 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 1、例えば配列番号 2 1；配列番号 3 0 と実質的に同じまたは同一の F W R 2、例えば配列番号 2 2；および配列番号 3 1 と実質的に同じまたは同一の F W R 3、例えば配列番号 2 3 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、重鎖および軽鎖を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、ここで、重鎖 F W R 1 は、配列番号 1 3 と実質的に同じまたは同一、例えば配列番号 5 であり；重鎖 F W R 2 は、配列番号 1 4 と実質的に同じまたは同一、例えば配列番号 6 であり；重鎖 F W R 3 は、配列番号 1 5 と実質的に同じまたは同一、例えば配列番号 7 であり；軽鎖 F W R 1 は、配列番号 2 9 と実質的に同じまたは同一、例えば配列番号 2 1 であり；軽鎖 F W R 2 は、配列番号 3 0 と実質的に同じまたは同一、例えば配列番号 2 2 であり；軽鎖 F W R 3 は、配列番号 3 1 と実質的に同じまたは同一、例えば配列番号 2 3 である。

【 0 0 5 7 】

いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 1 0 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1、例えば配列番号 2；配列番号 1 1 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 2、例えば配列番号 3；および配列番号 1 2 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 3、例えば配列番号 4；配列番号 1 3 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 1、例えば配列番号 5；配列番号 1 4 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 2、例えば配列番号 6；および配列番号 1 5 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 3、例えば配列番号 7 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 6 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1、例えば配列番号 1 8；配列番号 2 7 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 2、例えば配列番号 1 9；および配列番号 2 8 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 3、例えば配列番号 2 0；配列番号 2 9 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 1、例えば配列番号 2 1；配列番号 3 0 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 2、例えば配列番号 2 2；および配列番号 3 1 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 3、例えば配列番号 2 3 を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする。

【 0 0 5 8 】

いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、重鎖および軽鎖を有する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードし、ここで、そのポリヌクレオチドは、配列番号 1 0 と実質

10

20

30

40

50

的に同じまたは同一の重鎖 C D R 1、例えば配列番号 2；配列番号 1 1 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 2、例えば配列番号 3；配列番号 1 2 と実質的に同じまたは同一の重鎖 C D R 3、例えば配列番号 4；配列番号 1 3 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 1、例えば配列番号 5；配列番号 1 4 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 2、例えば配列番号 6；および配列番号 1 5 と実質的に同じまたは同一の重鎖 F W R 3、例えば配列番号 7；および配列番号 2 6 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 1、例えば配列番号 1 8；配列番号 2 7 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 2、例えば配列番号 1 9；配列番号 2 8 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 C D R 3、例えば配列番号 2 0；配列番号 2 9 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 1、例えば配列番号 2 1；配列番号 3 0 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 2、例えば配列番号 2 2；および配列番号 3 1 と実質的に同じまたは同一の軽鎖 F W R 3、例えば配列番号 2 3 をコードする。

10

**【 0 0 5 9 】**

工学処理された抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドも、本開示の範囲内である。

**【 0 0 6 0 】**

いくつかの態様では、前記ポリヌクレオチド（およびそれらがコードするペプチド）は、リーダー配列を含む。当技術分野において公知の任意のリーダー配列を採用することができる。いくつかの態様では、リーダー配列は、抗体の重鎖または軽鎖リーダー配列であるか、またはそれに基づきうる。リーダー配列には、非限定的に、制限部位または翻訳開始部位が含まれうる。

20

**【 0 0 6 1 】**

重鎖および軽鎖ならびにそれらをコードする遺伝子の中に存在するおそれがある自然配列変異のせいで、独特な結合特性（例えば特異性および親和性）にほとんどまたは全く影響なしに、そのアミノ酸配列または本明細書記載の抗体もしくは抗原結合フラグメントをコードする遺伝子内に多少のレベルの変異が見出されることが予期されよう。そのような予期は、一部に遺伝コードの縮重のせいであり、さらにはコードされるタンパク質の性質をあまり変化させない保存的アミノ酸配列変異の進化的成功のせいである。したがって、いくつかの態様は、本明細書における抗体または抗原結合フラグメントと 9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の相同性を有する抗体または抗原結合フラグメントを含む。他の態様は、2 5 - ヒドロキシビタミン D 2 および / もしくは 2 5 - ヒドロキシビタミン D 3 などのビタミン D 誘導体、またはビタミン D - C 2 2 免疫原性分子もしくは化合物などの 2 5 - ヒドロキシビタミン D アナログと優先的に結合する抗体またはそのような抗体の抗原結合フラグメントであって、本明細書記載の抗体および抗原結合フラグメントと顕著な相同性を共有しないフレームワーク、足場、または他の非結合領域を有するが、結合性を付与するために必要な 1 種または複数の C D R または他の配列（本明細書記載のそのような配列と 9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 相同である）を実際に組み入れている、抗体または抗原結合フラグメントを含む。

30

**【 0 0 6 2 】**

本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントには、前記抗体または抗原結合フラグメントの生物学的性質（例えば結合親和性または結合選好性）を有する 1 個または複数のアミノ酸置換、欠失、または付加を有する変異体が含まれる。当業者は、1 個または複数のアミノ酸置換、欠失、または付加を有する変異体を産生させることができる。これらの変異体には：（ a ） 1 個以上のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸で置換された変異体、（ b ） 1 個以上のアミノ酸がポリペプチドから付加または欠失された変異体、（ c ） 1 個以上のアミノ酸が置換基を含む変異体、および（ d ）ポリペプチドが、例えば抗体に対するエピトープ、ポリヒスチジン配列、ビオチン部分などの、ポリペプチドに有用な性質を付与しうる、融合パートナー、タンパク質タグまたは他の化学部分などの別のペプチドまたはポリペプチドと融合された変異体が含まれうる。本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントには、ある種からのアミノ酸残基が、保存された位置または保存されていない位置のいずれかで、別の種での対応する残基に置換されている変異体が含ま

40

50

れうる。他の態様では、保存されていない位置のアミノ酸残基は、保存的または非保存的残基で置換されている。遺伝的（抑制、欠失、突然変異など）、化学的、および酵素的技法を含めた、これらの変異体を得るための技法は、当業者に公知である。

#### 【0063】

本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントは、IgM、IgD、IgG、IgA およびIgEなどのいくつかの抗体アイソタイプを具体化する。抗体またはその抗原結合フラグメントの特異性は、主として、CDRのアミノ酸配列および配置によって決定される。したがって、抗原特異性を変化させずに、あるアイソタイプのCDRを別のアイソタイプに移行させることができる。または、抗原特異性を変化させずに、ハイブリドーマに、ある抗体アイソタイプから別のアイソタイプへとスイッチさせる（アイソタイプスイッチング）技法が確立されている。したがって、そのような抗体アイソタイプは、前記抗体または抗原結合フラグメントの範囲内である。

10

#### 【0064】

本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントは、25-ヒドロキシビタミンD2および/もしくは25-ヒドロキシビタミンD3などのビタミンD誘導体、またはビタミンD-C22免疫原性分子もしくは化合物などの25-ヒドロキシビタミンDアナログに対して、 $1 \times 10^{-2}$ 未満の解離定数( $K_D$ )が含まれる結合親和性(M単位)を有する。いくつかの態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-3}$ 未満である。他の態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-4}$ 未満である。いくつかの態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-5}$ 未満である。なお他の態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $2 \times 10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-6}$ 、 $4 \times 10^{-6}$ 、 $5 \times 10^{-6}$ 、 $6 \times 10^{-6}$ 、 $7 \times 10^{-6}$ 、 $8 \times 10^{-6}$ 、または $9 \times 10^{-6}$ 未満である。他の態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $2 \times 10^{-7}$ 、または $3 \times 10^{-7}$ 、 $2 \times 10^{-7}$ 、 $3 \times 10^{-7}$ 、 $4 \times 10^{-7}$ 、 $5 \times 10^{-7}$ 、 $6 \times 10^{-7}$ 、 $7 \times 10^{-7}$ 、 $8 \times 10^{-7}$ 、または $9 \times 10^{-7}$ 未満である。他の態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $2 \times 10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $4 \times 10^{-8}$ 、 $5 \times 10^{-8}$ 、 $6 \times 10^{-8}$ 、 $7 \times 10^{-8}$ 、 $8 \times 10^{-8}$ 、または $9 \times 10^{-8}$ 未満である。他の態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-9}$ 、 $2 \times 10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-9}$ 、 $4 \times 10^{-9}$ 、 $5 \times 10^{-9}$ 、 $6 \times 10^{-9}$ 、 $7 \times 10^{-9}$ 、 $8 \times 10^{-9}$ 、または $9 \times 10^{-9}$ 未満である。他の態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-10}$ 、 $2 \times 10^{-10}$ 、 $3 \times 10^{-10}$ 、 $2 \times 10^{-10}$ 、 $3 \times 10^{-10}$ 、 $4 \times 10^{-10}$ 、 $5 \times 10^{-10}$ 、 $6 \times 10^{-10}$ 、 $7 \times 10^{-10}$ 、 $8 \times 10^{-10}$ 、または $9 \times 10^{-10}$ 未満である。なお他の態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-11}$ 、 $2 \times 10^{-11}$ 、 $3 \times 10^{-11}$ 、 $4 \times 10^{-11}$ 、 $5 \times 10^{-11}$ 、 $6 \times 10^{-11}$ 、 $7 \times 10^{-11}$ 、 $8 \times 10^{-11}$ 、または $9 \times 10^{-11}$ 未満である。いくつかの態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-12}$ 未満である。他の態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-13}$ 未満である。他の態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-14}$ 未満である。なお他の態様では、 $K_D$ は、 $1 \times 10^{-15}$ 未満である。

20

30

#### 【0065】

本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントは、いくつかの態様では、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の等モル認識を行う。

#### 【0066】

例えば、抗体またはその抗原結合フラグメントがそのエピトープと結合するのを共有結合が阻止しないように、任意の種類分子を抗体またはその抗原結合フラグメントに共有結合させることによって、本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントを改変することができる。適切な改変の例には、非限定的に、グリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化などが挙げられる。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、それ自体、公知の保護/プロテクト基、タンパク質分解切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質との連結などによって誘導体化することができる。抗体または抗原結合フラグメントは、活性または安定性を改善する翻訳後部分を抗体またはその抗原結合フラグメント上に有する。これらの部分には、硫黄、メチル、糖質、リンおよび免疫グロブリン分子上に通常見出される他の化学基が挙げられる。さらに、抗体または抗原結

40

50

合フラグメントは、1個以上の非古典的アミノ酸を含有しうる。

【0067】

本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントは、診断ラベルでラベル、または診断ラベルとコンジュゲーションすることができる。

【0068】

本明細書記載のポリヌクレオチドを含むベクターも提供される。ベクターは、発現ベクターでありうる。したがって、関心が持たれるポリペプチドをコードする配列を含有するリコンビナント発現ベクターが提供される。発現ベクターは、非限定的に、調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー）、選択マーカー、およびポリアデニル化シグナルなどの1種以上の追加的な配列を含有しうる。いくつかの態様では、ベクターは、本明細書記載の抗体または抗原結合タンパク質の重鎖セグメントをコードしうる。いくつかの態様では、ベクターは、本明細書記載の抗体または抗原結合タンパク質の軽鎖セグメントをコードしうる。ときには、重鎖および軽鎖構成要素は、単一のベクターによってコードされうる。他の態様では、重鎖および軽鎖構成要素は、異なるベクターによってコードされうる。多種多様な宿主細胞をトランスフォーメーションするためのベクターは、周知であり、それには、非限定的に、プラスミド、ファージミド、コスミド、バキュロウイルス、バクミド、細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）、ならびに他の細菌、酵母およびウイルスベクターが挙げられる。

10

【0069】

本明細書の範囲内のリコンビナント発現ベクターは、適切な調節エレメントと作動可能に連結されうる、少なくとも1種のリコンビナントタンパク質をコードする合成、ゲノム、またはcDNA由来核酸フラグメントを含む。そのような調節エレメントには、転写プロモーター、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、ならびに転写および翻訳の終止をコントロールする配列が含まれうる。発現ベクター、特に哺乳類発現ベクターは、また、複製起点、発現されるべき遺伝子に連結された適切なプロモーターおよびエンハンサー、他の5'または3'フランキング非転写配列、5'または3'非翻訳配列（必要なりボソーム結合部位など）、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、または転写終止配列などの1種または複数の非転写エレメントを含みうる。宿主において複製する能力を付与する複製起点もまた、組み入れることができる。

20

【0070】

脊椎動物細胞をトランスフォーメーションする際に使用されるべき、発現ベクター中の転写および翻訳コントロール配列は、ウイルス起原によって提供することができる。例示的なベクターは、Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983)に記載のように構築することができる。

30

【0071】

いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントをコードする配列は、以下の遺伝子用のプロモーターなどの、強力な構成的プロモーターのコントロール下に置かれる：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）、アデノシンデアミナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、 $\alpha$ -アクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチンなど。加えて、多数のウイルスプロモーターが、原核細胞で構成的に機能し、前記態様での使用に適している。そのようなウイルスプロモーターには、非限定的に、サイトメガロウイルス（CMV）前初期プロモーター、SV40の初期および後期プロモーター、マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーター、マロニー（Maloney）白血病ウイルスの末端反復配列（LTR）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、および他のレトロウイルス、ならびに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターが挙げられる。一態様では、抗体またはその抗原結合フラグメントのコード配列は、メタロチオネインプロモーター、テトラサイクリン誘導プロモーター、ドキシサイクリン誘導プロモーター、プロテインキナーゼR、2', 5'-オリゴアデニル酸合成酵素、Mx遺伝子、ADAR1などの1個以上のインターフェロン活性化応答エレメント（ISRE）を含有するプロモーターなどの誘

40

50

導プロモーターのコントロール下に置かれる。

【0072】

本明細書記載のベクターは、1個以上の配列内リボソーム進入部位(IRES)を含有しうる。融合ベクター内へのIRES配列の包含は、いくつかのタンパク質の発現を高めるために有益でありうる。いくつかの態様では、ベクター系は、任意の上述の核酸配列の上流または下流でありうる1個または複数のポリアデニル化部位(例えばSV40)を含む。ベクター構成要素は、遺伝子産物を発現させるために最適な間隔を提供するように(すなわちORFの間に「スペーサー」ヌクレオチドを導入することによって)、連続的に連結もしくは配置する、または別の方法で位置付けることができる。IRESモチーフなどの調節エレメントも、発現のために最適な間隔を提供するように配置することができる。

10

【0073】

ベクターは、当技術分野において周知の選択マーカーを含みうる。選択マーカーには、正のおよび負の選択マーカー、例えば抗生物質耐性遺伝子(例えばネオマイシン耐性遺伝子、ヒグロマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ペニシリン耐性遺伝子)、グルタミン酸合成酵素遺伝子、HSV-TK、ガンシクロビル選択用のHSV-TK誘導体、または6-メチルプリン選択用の細菌プリンヌクレオシドホスホリラーゼ遺伝子が挙げられる(Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000))。選択マーカーまたはクローニング部位をコードする核酸配列は、関心が持たれるポリペプチドをコードする核酸配列またはクローニング部位の上流または下流でありうる。

20

【0074】

本明細書記載のベクターは、様々な細胞に、前記抗体または抗原結合フラグメントをコードする遺伝子をトランスフォーメーションするために使用することができる。例えば、ベクターは、抗体または抗原結合フラグメントを産生する細胞を発生させるために使用することができる。したがって、別の局面は、本明細書において記載および例示された抗体または抗原結合フラグメントなどの、25-ヒドロキシビタミンD2および/もしくは25-ヒドロキシビタミンD3などのビタミンD誘導体、またはビタミンD-C22免疫原性分子もしくは化合物などの25-ヒドロキシビタミンDアナログと結合する抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする核酸配列を含むベクターをトランスフォーメーションされた宿主細胞を特徴とする。

30

【0075】

細胞に外来遺伝子を導入するための多数の技法が、当技術分野において公知であり、それらの方法は、本明細書において記載および例示された多様な態様にしたがって前記方法を実施する目的でリコンビナント細胞を構築するために使用することができる。異種遺伝子配列が細胞後代によって遺伝および発現可能であるように、その結果、レシピエント細胞の必要な発生および生理機能が破壊されないように、使用される技法は、宿主細胞に異種遺伝子配列が安定導入されるよう備えるべきである。使用できる技法には、非限定的に、染色体導入(例えば、細胞融合、染色体介在性遺伝子導入、微小細胞介在性遺伝子導入)、物理的方法(例えば、トランスフェクション、スフェロプラスト融合、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リボソーム担体)、ウイルスベクター導入(例えば、リコンビナントDNAウイルス、リコンビナントRNAウイルス)などが挙げられる(Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985)に記載)。リン酸カルシウム沈殿およびポリエチレングリコール(PEG)誘導性の細菌プロトプラストと哺乳類細胞との融合も、細胞をトランスフォーメーションするために使用することができる。

40

【0076】

本明細書記載の抗体または抗体結合フラグメントの発現に使用するために適した細胞は、好ましくは、真核細胞、より好ましくは植物、げっ歯類、またはヒト起源の細胞、例えば、非限定的にNSO、CHO、perC.6、Tk-ts13、BHK、HEK293細胞、COS-7、T98G、CV-1/EBNA、L細胞、C127、3T3、HeLa、NS1、Sp2/0ミエロマ細胞、およびとりわけBHK細胞系である。加えて、

50

抗体の発現は、ハイブリドーマ細胞を使用して果たすことができる。ハイブリドーマを産生させるための方法は、当技術分野において十分に確立されている。

【0077】

本明細書記載の発現ベクターをトランスフォーメーションされた細胞は、本明細書記載の抗体または抗体結合フラグメントのリコンビナント発現について選択またはスクリーニングすることができる。リコンビナント陽性細胞がエクспанションされ、所望の表現型（高レベル発現、増強された成長特性、または例えばタンパク質の改変または翻訳後改変の変化により所望の生化学的特徴を有するタンパク質を産生する能力など）を示すサブクローンについてスクリーニングされる。これらの表現型は、所与のサブクロンの固有の性質または突然変異が原因でありうる。突然変異は、化学物質、UV波長光、放射線、ウイルス、挿入突然変異原、DNA mismatches 修復阻害、またはそのような方法の組み合わせの使用によりもたらすことができる。

10

【0078】

所望のタンパク質を発現している細胞が同定されたならば、それをエクспанションさせて選択することができる。トランスフォーメーションされた細胞は、いくつかの方法で選択することができる。例えば、関心が持たれるポリペプチドの発現について細胞を選択することができる。蛍光タンパク質の産生などの選択マーカーを含有するベクターをトランスフォーメーションされた細胞は、そのマーカーの発現についてポジティブ選択することができる。他の態様では、薬物耐性遺伝子を有するベクターを含有する細胞は、選択条件下で成長する能力についてポジティブ選択することができる。

20

【0079】

アッセイおよび方法

本明細書記載の抗体および抗原結合フラグメントは、試料中のビタミンD誘導体またはアナログを検出するために使用することができる。いくつかの態様では、抗体および抗原結合フラグメントは、25-ヒドロキシビタミンD2および/もしくは25-ヒドロキシビタミンD3などのビタミンD誘導体、またはビタミンD-C22免疫原性分子もしくは化合物などの25-ヒドロキシビタミンDアナログを検出するために使用される。いくつかの態様では、前記抗体および抗原結合フラグメントは、患者または対象から得られた生物学的試料中のビタミンD誘導体またはアナログを検出するために使用することができる。いくつかの態様では、試料は、血液、または血清などの血液成分でありうる。好ましい態様では、患者または対象はヒトである。いくつかの局面では、生物学的試料は、ヒト患者または対象から、例えばヒト血液から得ることができる。記載された方法は、抗体および抗原結合フラグメント単独で、または他の容易に入手可能な抗体または検出試薬と共に使用することができる。

30

【0080】

本明細書において、対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法が提供される。好ましい態様では、対象はヒトである。方法は、対象から得られた生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルを決定することを含み、ここで、正常対照中のレベルまたは閾値レベル30 ng/mLに対する、生物学的試料中のレベルの減少または低下は、対象でのビタミンD欠乏を示す。

40

【0081】

25-ヒドロキシビタミンDは、2種の形態、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3のいずれかでありうる。対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法の好ましい態様では、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3のレベルは、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させることによって決定される。

【0082】

競合的または非競合的のいずれかの様々な異種および同種プロトコールを、対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法の実施に採用することができる。好ましい態様では、

50

方法は、連続競合イムノアッセイによって行われる。Centaur（商標）、Vista（商標）、およびImmulite（商標）は、競合イムノアッセイを行うために使用することができるアッセイ系である。

【0083】

対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法によると、生物学的試料中の25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の総レベルは、強化化学発光（ECL）、酵素イムノアッセイ（EIA）、免疫組織化学（IHC）、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ（RIA）、免疫蛍光、平衡透析、免疫識別（immunodifferentiation）、または酵素結合免疫吸着検定（ELISA）によって検出することができる。

10

【0084】

対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法の好ましい態様では、その方法にしたがって使用される抗体または抗原結合フラグメントは、ビタミンD2および/またはビタミンD3と交差反応しない。好ましい態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントである。例えば、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号26で示されるLc CDR1、配列番号27で示されるLc CDR2、および配列番号28で示されるLc CDR3、配列番号10で示されるHc CDR1、配列番号11で示されるHc CDR2および配列番号12で示されるHc CDR3を含む。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3について等モル認識する性質を有する。好ましい態様では、抗体は、モノクローナル抗体10H9である。

20

【0085】

対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法に使用することができる、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3を認識する抗体および抗原結合フラグメントは、例えば、検出可能なラベルでラベルすることができる。例示的なラベルには、非限定的に、化学発光化合物（例えばアクリジニウムエステル化合物）、リン光化合物、蛍光化合物、放射性ラベル、ビオチン、または酵素が挙げられる。言及された例示的なラベルは、通常、非限定的に、異なる化学物質の添加、光による刺激、または基質もしくは他の化合物への曝露が含まれる方法によって励起された場合にのみ検出することができる。アクリジニウムエステル化合物を使用する場合、化学発光は、適切な計装によって読み取ることができる閃光を生じるペルオキシドおよび酸/塩基によってトリガーされる。検出可能なラベルが検出可能になり始める前に、随意の洗浄ステップを用いることができる。

30

【0086】

抗体または抗原結合フラグメントは、固相支持体上に固定化することができる。

【0087】

抗体または抗原結合フラグメントは、担体タンパク質とコンジュゲーションすることができる。抗体または抗原結合タンパク質と担体タンパク質との間の複合体も、固相支持体上に固定化することができる。

【0088】

対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法に使用するための固相支持体には、常磁性粒子；商標SEPHADEX（Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.）で入手可能な架橋デキストラン；アガロース；ポリスチレンビーズ；シート、ストリップもしくはパドルなどの、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロースもしくはナイロンベースのウェブ；またはポリスチレンもしくはポリ塩化ビニル製などのチューブ、プレートもしくはマイクロタイタープレートのウェルが挙げられる。常磁性粒子を使用する場合、随意の洗浄ステップの間に、ある磁場源を用いて、粒子および粒子に直接または間接的に結合している分子を保持することができる。分子は、共有結合的に、塩橋、水素結合または別の種類の結合によって、結合することができる。

40

【0089】

50

生物学的試料は、血液、血清または血漿でありうる。いくつかの態様では、生物学的試料は、本明細書記載の方法への使用前に、生物学的条件下で最大24時間保存することができる。

【0090】

対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法のいくつかの態様では、生物学的試料は、その生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させる前に、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)で処理またはそれと混合される。または、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)で処理またはそれと混合することができる。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。ANSは、例えば、置換緩衝液中に存在しうる。場合により、生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させる前に、または生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、メタノールを8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)と共に使用することができる。メタノールは、例えば、置換緩衝液に入れることができる。

10

【0091】

対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法のいくつかの態様では、また、その生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させる前に、生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)およびエチレングリコールで処理またはそれと混合される。または、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)およびエチレングリコールで処理またはそれと混合することができる。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。ANSおよびエチレングリコールは、置換緩衝液中に存在しうる。場合により、生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させる前に、または生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、メタノールを8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)およびエチレングリコールと共に使用することができる。メタノールは、例えば、置換緩衝液に入れることができる。

20

30

【0092】

対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法のいくつかの態様では、25-ヒドロキシビタミンDアナログは、接触させるステップの後に、生物学的試料に添加される。25-ヒドロキシビタミンDアナログはラベルすることができる。25-ヒドロキシビタミンDアナログまたはラベルされた25-ヒドロキシビタミンDアナログは、また、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)を含む安定化緩衝液中に存在しうる。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。

40

【0093】

本明細書記載のビタミンDアナログは、図1(a)に示すような未コンジュゲーションのときにC22カルボキシ基を含むビタミンD炭素数22誘導体(ビタミンD-C22)の使用に基づきうる(Hollis et al., Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993))。いくつかの態様では、ビタミンDアナログは、ビタミンD-C22でありうる。いくつかの態様では、ビタミンDアナログは、担体タンパク質とコンジュゲーションしている場合がある。

【0094】

対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法のいくつかの態様では、前記ビタミンD

50

アナログは、タンパク質担体に直接取り付けることができる。例えば、ビタミンD - C 22は、ウシ血清アルブミン ( B S A ) と直接コンジュゲーションすることができる。所与のタンパク質担体とコンジュゲーションされうるビタミンDアナログの数は、使用される担体に基づき変動する。当業者は、本明細書記載の目的のために、多種多様な担体タンパク質を使用できることを理解している。いくつかの適切な担体には、少数だけ挙げると、K L H、P E G 化 K L H、Concholepas concholepasヘモシアニン ( C C H )、カチオン化 B S A、および卵白アルブミンが含まれる。

【 0 0 9 5 】

ビタミンDアナログへの担体タンパク質のコンジュゲーションは、化学リンカーの使用によって起こりうる。化学リンカーは、アルキル、アリール、アルキルオキシ、アミド、スルホンアミドまたはカルボニルまたはペプチド基から構成されうる。タンパク質へのビタミンDアナログまたはビタミンD誘導体のコンジュゲーションは、タンパク質のアミノ基とビタミンDアナログまたはビタミンD誘導体の反応性N - ヒドロキシスクシンイミドエステル ( N H S エステル ) 基との間の反応によって果たすことができる。

10

【 0 0 9 6 】

対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法のいくつかの態様では、ビタミンDレベルは、生物学的試料が置換緩衝液と混合された時点から開始して20分以内に検出することができる。

【 0 0 9 7 】

対象でのビタミンD欠乏は、疾患を示すか、または疾患に関連しうる。ビタミンD欠乏に関連する疾患には：くる病、骨軟化症、高血圧症、骨粗鬆症、自己免疫病、心血管疾患、統合失調症、うつ病、神経系疾患、糖尿病、感染症、喘息、アレルギーまたはガンを挙げることができる。

20

【 0 0 9 8 】

本明細書において、また、対象から得られた生物学的試料中の総25 - ヒドロキシビタミンDレベルを決定すること、および正常対照でのレベルまたは閾値レベル30 ng/mLに対する生物学的試料中のレベルの減少が決定された場合、対象にビタミンD欠乏の処置を施すことによって、ビタミンD欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法が提供される。好ましい態様では、対象はヒトである。ビタミンD欠乏を処置するためにいくつかの適切な方法がある。ビタミンD欠乏は、ビタミンD摂取の補充または光線療法によって処置することができる。光線療法には、自然太陽光への曝露増加または紫外線Bの人工光源への曝露が含まれうる。

30

【 0 0 9 9 】

ビタミンD欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法の好ましい態様では、25 - ヒドロキシビタミンD2および25 - ヒドロキシビタミンD3のレベルは、生物学的試料を、25 - ヒドロキシビタミンD2および25 - ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させることによって決定される。

【 0 1 0 0 】

ビタミンD欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法を行う際に、競合的または非競合的のいずれかの様々な異種および同種プロトコルを採用することができる。好ましい態様では、その方法は、連続競合イムノアッセイによって行われる。Centaur ( 商標 )、Vista ( 商標 )、およびImmulite ( 商標 ) は、競合イムノアッセイを行うために使用することができるアッセイ系である。

40

【 0 1 0 1 】

ビタミンD欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法によると、生物学的試料中の25 - ヒドロキシビタミンD2および25 - ヒドロキシビタミンD3の総レベルは、強化化学発光 ( E C L )、酵素イムノアッセイ ( E I A )、免疫組織化学 ( I H C )、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ ( R I A )、免疫蛍光、平衡透析、免疫識別、または酵素結合免疫吸着検定 ( E L I S A ) によって検出することができる。

【 0 1 0 2 】

50

ビタミンD欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法の好ましい態様では、その方法にしたがって使用される抗体または抗原結合フラグメントは、ビタミンD2および/またはビタミンD3と交差反応しない。好ましい態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントである。例えば、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号26で示されるLc CDR1、配列番号27で示されるLc CDR2、および配列番号28で示されるLc CDR3、配列番号10で示されるHc CDR1、配列番号11で示されるHc CDR2および配列番号12で示されるHc CDR3を含む。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の等モル認識の性質を有する。好ましい態様では、抗体は、モノクローナル抗体10H9である。

10

**【0103】**

ビタミンD欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法に使用することができる、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3を認識する抗体および抗原結合フラグメントは、例えば、検出可能なラベルでラベルすることができる。例示的なラベルには、非限定的に、化学発光化合物（例えばアクリジニウムエステル化合物）、リン光化合物、蛍光化合物、放射性ラベル、ビオチン、または酵素が挙げられる。言及された例示的なラベルは、通常、非限定的に、異なる化学物質の添加、光による刺激、または基質もしくは他の化合物への曝露が含まれる方法によって励起された場合にのみ検出することができる。アクリジニウムエステル化合物を使用する場合、化学発光は、適切な計装によって読み取ることができる閃光を生じるペルオキシドおよび酸/塩基によってトリガーされる。検出可能なラベルが検出可能になり始める前に、随意の洗浄ステップを用いることができる。

20

**【0104】**

抗体または抗原結合フラグメントは、固相支持体上に固定化することができる。

**【0105】**

抗体または抗原結合フラグメントは、担体タンパク質とコンジュゲーションすることができる。抗体または抗原結合タンパク質と担体タンパク質との間の複合体も、固相支持体上に固定化することができる。

**【0106】**

本明細書記載の方法に使用するための固相支持体には、常磁性粒子；商標SEPHADEX（Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.）で入手可能な架橋デキストラン；アガロース；ポリスチレンビーズ；シート、ストリップもしくはパドルなどの、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロースもしくはナイロンベースのウェブ；またはポリスチレンもしくはポリ塩化ビニル製などのチューブ、プレートもしくはマイクロタイプレートのウェルが挙げられる。常磁性粒子を使用する場合、随意の洗浄ステップの間に、ある磁場源を用いて、粒子および粒子に直接または間接的に結合している分子を保持することができる。分子は、共有結合的に、塩橋、水素結合または別の種類の結合によって、結合することができる。

30

**【0107】**

生物学的試料は、血液、血清または血漿でありうる。いくつかの態様では、生物学的試料は、本明細書記載の方法に使用する前に、生物学的条件下で最大24時間、保存することができる。

40

**【0108】**

ビタミンD欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法のいくつかの態様では、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させる前に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート（ANS）で処理またはそれと混合される。または、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート（ANS）で処理または

50

それと混合することができる。ANSは、ANSの酸または塩（例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩）の形態でありうる。ANSは、例えば、置換緩衝液中に存在しうる。場合により、生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させる前に、または生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、メタノールを8-アニリノ-1-ナフトレンスルホネート（ANS）と共に使用することができる。メタノールは、例えば、置換緩衝液中加入することができる。

**【0109】**

ビタミンD欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法のいくつかの態様では、また、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させる前に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフトレンスルホネート（ANS）およびエチレングリコールで処理またはそれと混合される。または、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフトレンスルホネート（ANS）およびエチレングリコールで処理またはそれと混合することができる。ANSは、ANSの酸または塩（例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩）の形態でありうる。ANSおよびエチレングリコールは、置換緩衝液中に存在しうる。場合により、生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させる前に、または生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、メタノールを8-アニリノ-1-ナフトレンスルホネート（ANS）およびエチレングリコールと共に使用することができる。メタノールは、例えば、置換緩衝液中加入することができる。

10

20

**【0110】**

ビタミンD欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法のいくつかの態様では、25-ヒドロキシビタミンDアナログが、接触させるステップの後に生物学的試料に添加される。25-ヒドロキシビタミンDアナログはラベルすることができる。25-ヒドロキシビタミンDアナログまたはラベルされた25-ヒドロキシビタミンDアナログは、また、8-アニリノ-1-ナフトレンスルホネート（ANS）を含む安定化緩衝液中に存在しうる。ANSは、ANSの酸または塩（例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩）の形態でありうる。

30

**【0111】**

本明細書記載のビタミンDアナログは、図1(a)に示すような未コンジュゲーションのときにC22カルボキシ基を含むビタミンD炭素数22誘導体（ビタミンD-C22）の使用に基づきうる（Hollis et al., Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993)）。いくつかの態様では、ビタミンDアナログは、ビタミンD-C22でありうる。いくつかの態様では、ビタミンDアナログは、担体タンパク質とコンジュゲーションしている場合がある。

**【0112】**

ビタミンD欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法のいくつかの態様では、記載されたビタミンDアナログは、タンパク質担体に直接取り付けることができる。例えば、ビタミンD-C22は、ウシ血清アルブミン（BSA）と直接コンジュゲーションすることができる。所与のタンパク質担体とコンジュゲーションできるビタミンDアナログの数は、使用される担体に基づき変動する。当業者は、本明細書記載の目的のために、多種多様な担体タンパク質を使用できることを理解している。いくつかの適切な担体には、少数だけ挙げると、KLH、PEG化KLH、Concholepas concholepasヘモシアニン（CCH）、カチオン化BSA、および卵白アルブミンが含まれる。

40

**【0113】**

ビタミンDアナログへの担体タンパク質のコンジュゲーションは、化学リンカーの使用によって起こりうる。化学リンカーは、アルキル、アリール、アルキルオキシ、アミド、スルホンアミドまたはカルボニルまたはペプチド基から構成されうる。タンパク質へのピ

50

タミンDアナログまたはビタミンD誘導体のコンジュゲーションは、タンパク質のアミノ基とビタミンDアナログまたはビタミンD誘導体の反応性N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHSエステル)基との間の反応によって果たすことができる。

【0114】

ビタミンD欠乏を有すると疑われる対象を処置するための方法のいくつかの態様では、ビタミンDレベルは、生物学的試料が置換緩衝液と混合された時点から開始して20分以内に検出することができる。

【0115】

対象でのビタミンD欠乏は、疾患を示すか、または疾患に関連しうる。ビタミンD欠乏に関連する疾患には：くる病、骨軟化症、高血圧症、骨粗鬆症、自己免疫病、心血管疾患、統合失調症、うつ病、神経系疾患、糖尿病、感染症、喘息、アレルギーまたはガンを挙げることができる。

10

【0116】

本明細書において、さらに、1回目に、対象から得られた第1の生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルを決定すること、および次に1回目よりも後の2回目に対象から得られた第2の生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルを決定することによって、ビタミンD欠乏の進行をモニタリングする必要がある対象でのそのモニタリングのための方法が提供され、ここで、第1の生物学的試料中のレベルから第2の生物学的試料中のレベルの間の減少は、対象でのビタミンD欠乏の進行を示し、ここで、第1の生物学的試料中のレベルから第2の生物学的試料中のレベルの間でほとんどまたは全く変化ないことは、対象でのビタミンD欠乏の安定化を示し、ここで、第1の生物学的試料中のレベルから第2の生物学的試料中のレベルの間の増加は、対象でのビタミンD欠乏の軽減を示す。好ましい態様では、対象はヒトである。

20

【0117】

対象でのビタミンD欠乏の進行をモニタリングするための方法の好ましい態様では、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3のレベルは、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させることによって決定される。

【0118】

競合的または非競合的のいずれかの様々な異種および同種プロトコールは、対象でのビタミンD欠乏の進行をモニタリングするための方法の実施に採用することができる。好ましい態様では、方法は、競合イムノアッセイによって行われる。Centaur(商標)、Vista(商標)、およびImmulite(商標)は、競合イムノアッセイを行うために使用することができるアッセイ系である。

30

【0119】

対象でのビタミンD欠乏の進行をモニタリングするための方法によると、生物学的試料中の25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の総レベルは、強化化学発光(ELC)、酵素イムノアッセイ(EIA)、免疫組織化学(IHC)、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫蛍光、平衡透析、免疫識別、または酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって検出することができる。

40

【0120】

対象でのビタミンD欠乏の進行をモニタリングするための方法の好ましい態様では、その方法にしたがって使用される抗体または抗原結合フラグメントは、ビタミンD2および/またはビタミンD3と交差反応しない。好ましい態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントである。例えば、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号26で示されるLc CDR1、配列番号27で示されるLc CDR2、および配列番号28で示されるLc CDR3、配列番号10で示されるHc CDR1、配列番号11で示されるHc CDR2および配列番号12で示されるHc CDR3を含む。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の等モル認識の性質を

50

有する。好ましい態様では、抗体は、モノクローナル抗体 10H9 である。

【0121】

これらの方法に使用することができる、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3を認識する抗体および抗原結合フラグメントは、例えば、検出可能なラベルでラベルすることができる。例示的なラベルには、非限定的に、化学発光化合物（例えばアクリジニウムエステル化合物）、リン光化合物、蛍光化合物、放射性ラベル、ビオチン、または酵素が挙げられる。言及された例示的なラベルは、通常、非限定的に、異なる化学物質の添加、光による刺激、または基質もしくは他の化合物への曝露が含まれる方法によって励起された場合にのみ検出することができる。アクリジニウムエステル化合物を使用する場合、化学発光は、適切な計装によって読み取ることができる閃光を生じるペルオキシドおよび酸/塩基によってトリガーされる。検出可能なラベルが検出可能になり始める前に、随意の洗浄ステップを用いることができる。

10

【0122】

抗体または抗原結合フラグメントは、固相支持体上に固定化することができる。

【0123】

抗体または抗原結合フラグメントは、担体タンパク質とコンジュゲーションすることができる。抗体または抗原結合タンパク質と担体タンパク質との間の複合体も、固相支持体上に固定化することができる。

【0124】

対象でのビタミンD欠乏の進行をモニタリングするための方法に使用するための固相支持体には、常磁性粒子；商標SEPHADEX（Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.）で入手可能な架橋デキストラン；アガロース；ポリスチレンビーズ；シート、ストリップもしくはパドルなどの、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロースもしくはナイロンベースのウェブ；またはポリスチレンもしくはポリ塩化ビニル製のチューブ、プレートもしくはマイクロタイタープレートのウェルが挙げられる。常磁性粒子を使用する場合、随意の洗浄ステップの間に、ある磁場源を用いて、粒子および粒子に直接または間接的に結合している分子を保持することができる。分子は、共有結合的に、塩橋、水素結合または別の種類の結合によって、結合することができる。

20

【0125】

生物学的試料は、血液、血清または血漿でありうる。いくつかの態様では、生物学的試料は、本明細書記載の方法に使用する前に、生物学的条件下で最大24時間、保存することができる。

30

【0126】

対象でのビタミンD欠乏の進行をモニタリングするための方法のいくつかの態様では、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させる前に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート（ANS）で処理またはそれと混合される。または、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート（ANS）で処理またはそれと混合することができる。ANSは、ANSの酸または塩（例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩）の形態でありうる。ANSは、例えば、置換緩衝液中に存在しうる。場合により、生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させる前に、または生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、メタノールを8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート（ANS）と共に使用することができる。メタノールは、例えば、置換緩衝液の中に入れることができる。

40

【0127】

対象でのビタミンD欠乏の進行をモニタリングするための方法のいくつかの態様では、また、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミン

50

D3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させる前に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)およびエチレングリコールで処理またはそれと混合される。または、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)およびエチレングリコールで処理またはそれと混合することができる。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。ANSおよびエチレングリコールは、置換緩衝液中に存在しうる。場合により、生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させる前に、または生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、メタノールを8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)およびエチレングリコールと共に使用することができる。メタノールは、例えば、置換緩衝液に入れることができる。

10

20

30

40

50

**【0128】**

対象でのビタミンD欠乏の進行をモニタリングするための方法のいくつかの態様では、25-ヒドロキシビタミンDアナログが、接触させるステップの後に生物学的試料に添加される。25-ヒドロキシビタミンDアナログはラベルすることができる。25-ヒドロキシビタミンDアナログまたはラベルされた25-ヒドロキシビタミンDアナログは、また、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)を含む安定化緩衝液中に存在しうる。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。

**【0129】**

本明細書記載のビタミンDアナログは、図1(a)に示すような未コンジュゲーションのときにC22カルボキシ基を含むビタミンD炭素数22誘導体(ビタミンD-C22)の使用に基づきうる(Hollis et al., Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993))。いくつかの態様では、ビタミンDアナログは、ビタミンD-C22でありうる。いくつかの態様では、ビタミンDアナログは、担体タンパク質とコンジュゲーションしている場合がある。

**【0130】**

対象でのビタミンD欠乏の進行をモニタリングするための方法のいくつかの態様では、記載されたビタミンDアナログは、タンパク質担体に直接取り付けることができる。例えば、ビタミンD-C22は、ウシ血清アルブミン(BSA)と直接コンジュゲーションすることができる。所与のタンパク質担体とコンジュゲーションできるビタミンDアナログの数は、使用される担体に基づき変動する。当業者は、本明細書記載の目的のために、多種多様な担体タンパク質を使用できることを理解している。いくつかの適切な担体には、少数だけ挙げると、KLH、PEG化KLH、Concholepas concholepasヘモシアニン(CCH)、カチオン化BSA、および卵白アルブミンが含まれる。

**【0131】**

ビタミンDアナログへの担体タンパク質のコンジュゲーションは、化学リンカーの使用によって起こりうる。タンパク質へのビタミンDアナログまたはビタミンD誘導体のコンジュゲーションは、タンパク質のアミノ基とビタミンDアナログまたはビタミンD誘導体の反応性N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHSエステル)基との間の反応によって果たすことができる。

**【0132】**

対象でのビタミンD欠乏の進行をモニタリングするための方法のいくつかの態様では、ビタミンDレベルは、生物学的試料が置換緩衝液と混合された時点から開始して20分以内に検出することができる。

**【0133】**

対象でのビタミンD欠乏は、疾患を示すか、または疾患に関連しうる。ビタミンD欠乏に関連する疾患には：くる病、骨軟化症、高血圧症、骨粗鬆症、自己免疫病、心血管疾患、統合失調症、うつ病、神経系疾患、糖尿病、感染症、喘息、アレルギーまたはガンを挙

げることができる。

【0134】

本明細書において、また、1回目に、対象から得られた第1の生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルを決定すること、および次に1回目よりも後の2回目に、ビタミンD欠乏について対象を処置後に、対象から得られた第2の生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルを決定することによって、該ビタミンD欠乏の処置を必要とする対象でのその処置のモニタリングのための方法が提供され、ここで、第1の生物学的試料中のレベルに対する第2の生物学的試料中のレベルの増加または安定化は、該対象でのビタミンD欠乏の処置の有効性を示し、ここで、第1の生物学的試料中のレベルに対する第2の生物学的試料中のレベルの減少は、該対象でのビタミンD欠乏の処置の無効果を示す。好ましい態様では、対象はヒトである。

10

【0135】

対象でのビタミンD欠乏の処置をモニタリングするための方法の好ましい態様では、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3のレベルは、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させることによって決定される。

【0136】

競合的または非競合的のいずれかの様々な異種および同種プロトコールは、対象でのビタミンD欠乏の処置をモニタリングするための方法の実施に採用することができる。好ましい態様では、方法は、連続競合イムノアッセイによって行われる。Centaur(商標)、Vista(商標)、およびImmulite(商標)は、競合イムノアッセイを行うために使用することができるアッセイ系である。

20

【0137】

対象でのビタミンD欠乏の処置をモニタリングするための方法によると、生物学的試料中の25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の総レベルは、強化化学発光(ELC)、酵素イムノアッセイ(EIA)、免疫組織化学(IHC)、ウエスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫蛍光、平衡透析、免疫識別、または酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって検出することができる。

【0138】

対象でのビタミンD欠乏の処置をモニタリングするための方法の好ましい態様では、その方法にしたがって使用される抗体または抗原結合フラグメントは、ビタミンD2および/またはビタミンD3と交差反応しない。好ましい態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメントである。例えば、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号26で示されるLc CDR1、配列番号27で示されるLc CDR2、および配列番号28で示されるLc CDR3、配列番号10で示されるHc CDR1、配列番号11で示されるHc CDR2および配列番号12で示されるHc CDR3を含む。いくつかの態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3を等モル認識する性質を有する。好ましい態様では、抗体は、モノクローナル抗体10H9である。

30

【0139】

対象でのビタミンD欠乏の処置をモニタリングするための方法に使用することができる、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3を認識する抗体および抗原結合フラグメントは、例えば、検出可能なラベルでラベルすることができる。例示的なラベルには、非限定的に、化学発光化合物(例えばアクリジニウムエステル化合物)、リン光化合物、蛍光化合物、放射性ラベル、ビオチン、または酵素が挙げられる。言及された例示的なラベルは、通常、非限定的に、異なる化学物質の添加、光による刺激、または基質もしくは他の化合物への曝露が含まれる方法によって励起された場合にのみ検出することができる。アクリジニウムエステル化合物を使用する場合、化学発光は、適切な計装によって読み取ることができる閃光を生じるペルオキシドおよび酸/塩基によってトリガーされる。検出可能なラベルが検出可能になり始める前に、随意の洗浄ステップを

40

50

用いることができる。

【0140】

抗体または抗原結合フラグメントは、固相支持体上に固定化することができる。

【0141】

抗体または抗原結合フラグメントは、担体タンパク質とコンジュゲーションすることができる。抗体または抗原結合タンパク質と担体タンパク質との間の複合体も、固相支持体上に固定化することができる。

【0142】

本明細書記載の方法に使用するための固相支持体には、常磁性粒子；商標SEPHADEX (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.) で入手可能な架橋デキストラン；アガロース；ポリスチレンビーズ；シート、ストリップもしくはパドルなどの、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロースもしくはナイロンベースのウェブ；またはポリスチレンもしくはポリ塩化ビニル製などのチューブ、プレートもしくはマイクロタイタプレートのウェルが挙げられる。常磁性粒子を使用する場合、随意の洗浄ステップの間に、ある磁場源を用いて、粒子および粒子に直接または間接的に結合している分子を保持することができる。分子は、共有結合的に、塩橋、水素結合または別の種類の結合によって、結合することができる。

10

【0143】

生物学的試料は、血液、血清または血漿でありうる。いくつかの態様では、生物学的試料は、本明細書記載の方法に使用する前に、生物学的条件下で最大24時間保存することができる。

20

【0144】

対象でのビタミンD欠乏の処置をモニタリングするための方法のいくつかの態様では、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させる前に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)で処理またはそれと混合される。または、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)で処理またはそれと混合することができる。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。ANSは、例えば、置換緩衝液中に存在しうる。場合により、生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させる前に、または生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、メタノールを8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)と共に使用することができる。メタノールは、例えば、置換緩衝液中加入することができる。

30

【0145】

対象でのビタミンD欠乏の処置をモニタリングするための方法のいくつかの態様では、また、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させる前に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)およびエチレングリコールで処理またはそれと混合される。または、生物学的試料を、25-ヒドロキシビタミンD2および25-ヒドロキシビタミンD3の両方を認識する抗体または抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、その生物学的試料は、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)およびエチレングリコールで処理またはそれと混合することができる。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。ANSおよびエチレングリコールは、置換緩衝液中に存在しうる。場合により、生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させる前に、または生物学的試料を抗体もしくは抗原結合フラグメントと接触させるのと同時に、メタノールを8-アニリノ-1-ナフタレン

40

50

スルホネート (ANS) およびエチレングリコールと共に使用することができる。メタノールは、例えば、置換緩衝液中に入れることができる。

【0146】

対象でのビタミンD欠乏の処置をモニタリングするための方法のいくつかの態様では、接触させるステップの後に25-ヒドロキシビタミンDアナログが生物学的試料に添加される。25-ヒドロキシビタミンDアナログはラベルすることができる。25-ヒドロキシビタミンDアナログまたはラベルされた25-ヒドロキシビタミンDアナログは、また、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)を含む安定化緩衝液中に存在しうる。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。

10

【0147】

本明細書記載のビタミンDアナログは、図1(a)に示すような未コンジュゲーションのときにC22カルボキシ基を含むビタミンD炭素数22誘導体(ビタミンD-C22)の使用に基づきうる(Hollis et al., Clin. Chem. 39(3):529-33 (1993))。いくつかの態様では、ビタミンDアナログは、ビタミンD-C22でありうる。いくつかの態様では、ビタミンDアナログは、担体タンパク質とコンジュゲーションしている場合がある。

【0148】

対象でのビタミンD欠乏の処置をモニタリングするための方法のいくつかの態様では、記載されたビタミンDアナログは、タンパク質担体に直接取り付けることができる。例えば、ビタミンD-C22は、ウシ血清アルブミン(BSA)と直接コンジュゲーションすることができる。所与のタンパク質担体とコンジュゲーションできるビタミンDアナログの数は、使用される担体に基づき変動する。例えば、BSAは、比較的適度な数の、おそらく約10~約25個のタンパク質の連結に対応し;または、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)などの担体は、約200~約300個の抗原性分子に対応しうる。当業者は、本明細書記載の目的のために、多種多様な担体タンパク質を使用できることを理解している。いくつかの適切な担体には、少数だけ挙げると、KLH、PEG化KLH、Concholepas concholepasヘモシアニン(CCH)、カチオン化BSA、および卵白アルブミンが含まれる。

20

【0149】

ビタミンDアナログへの担体タンパク質のコンジュゲーションは、化学リンカーの使用によって起こりうる。タンパク質へのビタミンDアナログまたはビタミンD誘導体のコンジュゲーションは、タンパク質のアミノ基とビタミンDアナログまたはビタミンD誘導体の反応性N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHSエステル)基との間の反応によって果たすことができる。

30

【0150】

対象でのビタミンD欠乏の処置をモニタリングするための方法のいくつかの態様では、ビタミンDレベルは、生物学的試料が置換緩衝液と混合された時点から開始して20分以内に検出することができる。

【0151】

対象でのビタミンD欠乏は、疾患を示すか、または疾患に関連しうる。ビタミンD欠乏に関連する疾患には:くる病、骨軟化症、高血圧症、骨粗鬆症、自己免疫病、心血管疾患、統合失調症、うつ病、神経系疾患、糖尿病、感染症、喘息、アレルギーまたはガンを挙げることができる。

40

【0152】

本明細書において、また、25-ヒドロキシビタミンDアナログを8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)と接触させることによって25-ヒドロキシビタミンDアナログを安定化するための方法が提供される。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)で安定化された25-ヒドロキシビタミンDアナログは、アッセイ系外で2ヶ月間より

50

も長く保存することができる。8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) で安定化された 25 - ヒドロキシビタミンDアナログは、アッセイ系内で7日間よりも長く保存することができる。

#### 【0153】

本明細書において、また、対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法が提供される。好ましい態様では、対象はヒトである。その方法に使用するための生物学的試料は、対象から得られた血液、血清または血漿でありうる。対象でのビタミンD欠乏を検出するための方法は、生物学的試料と置換緩衝液を混合することによって、対象から得られた生物学的試料中の総25 - ヒドロキシビタミンDレベルを決定することを伴う。アッセイ混合物を形成させるために、生物学的試料を置換緩衝液に添加する、またはその逆に行うことができる。置換緩衝液は、ビタミンD結合タンパク質からビタミンDを置換する。好ましい態様では、置換緩衝液は、8 - アニリノ - 1 - ナフタレンスルホネート (ANS) を含有する。ANSは、ANSの酸または塩（例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩）の形態でありうる。置換緩衝液は、さらに、エチレングリコールを含有しうる。いくつかの態様では、置換緩衝液は、ANSおよびメタノールを含有する。いくつかの好ましい態様では、置換緩衝液は、ANS、エチレングリコール、およびメタノールを含有する。

10

#### 【0154】

次に、第1のラベルとコンジュゲーションされた、25 - ヒドロキシビタミンD2、25 - ヒドロキシビタミンD3、またはビタミンD - C22に基づく免疫原と優先的に結合する抗体または抗原結合フラグメントが、アッセイ混合物と混合される。抗体または抗原結合フラグメントは、アッセイ混合物に添加する、またはその逆に行うことができ、その一構成要素になる。25 - ヒドロキシビタミンD2、および25 - ヒドロキシビタミンD3、またはビタミンD - C22に基づく免疫原と優先的に結合する抗体、またはその抗原結合フラグメントは、好ましくは、上記抗体または抗原結合フラグメントである。好ましい態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号26で示されるLc CDR1、配列番号27で示されるLc CDR2、および配列番号28で示されるLc CDR3、配列番号10で示されるHc CDR1、配列番号11で示されるHc CDR2および配列番号12で示されるHc CDR3を含む。好ましい態様では、抗体は、モノクローナル抗体10H9である。25 - ヒドロキシビタミンD2、25 - ヒドロキシビタミンD3、またはビタミンD - C22に基づく免疫原と優先的に結合する抗体または抗原結合フラグメントは、固相支持体上に固定化することができる。25 - ヒドロキシビタミンD2、25 - ヒドロキシビタミンD3、またはビタミンD - C22に基づく免疫原と優先的に結合する抗体または抗原結合フラグメントは、担体タンパク質とコンジュゲーションすることができる。25 - ヒドロキシビタミンD2、25 - ヒドロキシビタミンD3、またはビタミンD - C22に基づく免疫原と優先的に結合する抗体または抗原結合フラグメントと、担体タンパク質との複合体は、また、固相支持体上に固定化することができる。

20

30

#### 【0155】

第1のラベルは、好ましくは、検出可能なラベルである。第1のラベルは、化学発光化合物（例えば、アクリジニウムエステル化合物）、リン光化合物、蛍光化合物、放射性ラベル、ビオチン、または酵素でありうる。言及された例示的なラベルは、通常、非限定的に、異なる化学物質の添加、光による刺激、または基質もしくは他の化合物への曝露が含まれる方法によって励起された場合にのみ検出することができる。アクリジニウムエステル化合物を使用する場合、化学発光は、適切な計装によって読み取ることができる閃光を生じるペルオキシドおよび酸/塩基によってトリガーされる。検出可能なラベルが検出可能になり始める前に、随意の洗浄ステップを用いることができる。

40

#### 【0156】

次に、第2のラベルを有する25 - ヒドロキシビタミンDアナログが、アッセイ混合物と混合される。25 - ヒドロキシビタミンDアナログは、アッセイ混合物に添加する、またはその逆に行うことができ、その一構成要素になる。第2のラベルは、抗フルオレセイ

50

ン抗体と結合するためのフルオレセイン、アビジン、ストレプトアビジン、もしくは抗ピオチン抗体と結合するためのピオチン、抗ジゴキシゲニン抗体と結合するためのジゴキシゲニン、または他のハプテンおよび結合パートナーでありうる。25-ヒドロキシビタミンDアナログは、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホネート(ANS)を含む安定化緩衝液中に存在しうる。ANSは、ANSの酸または塩(例えば、ANSナトリウム塩、ANSカリウム塩、ANSヘミマグネシウム塩またはANSアンモニウム塩)の形態でありうる。いくつかの態様では、25-ヒドロキシビタミンDアナログは、担体タンパク質とコンジュゲーションされる。担体タンパク質は、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、免疫グロブリン、またはウシグロブリンIgGでありうる。

【0157】

第2のラベルを認識する抗体とコンジュゲーションされた固相支持体は、また、アッセイ混合物と混合される。第2のラベルを認識する抗体とコンジュゲーションされた固相支持体は、アッセイ混合物に添加する、またはその逆にすることができ、アッセイ混合物の一構成要素になる。固相支持体とコンジュゲーションされた抗体は、フルオレセインと結合する抗体でありうる。

【0158】

本明細書記載の方法に使用するための固相支持体には、常磁性粒子；商標SEPHADEX(Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, N.J.)で入手可能な架橋デキストラン；アガロース；ポリスチレン粒子もしくはビーズ；シート、ストリップもしくはパドルなどの、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、ニトロセルロースもしくはナイロンベースのウェブ；またはポリスチレンもしくはポリ塩化ビニル製などのチューブ、プレートもしくはマイクロタイタープレートのウェルが挙げられる。常磁性粒子を使用する場合、随意の洗浄ステップの間に、ある磁場源を用いて、粒子および粒子と直接または間接的に結合している分子を保持することができる。分子は、共有結合的に、塩橋、水素結合または別の種類の結合によって、結合することができる。

【0159】

生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルは、第1のラベルによって送り出されるシグナルを測定することによって決定され、ここで、正常対照でのレベルまたは閾値レベル30ng/mLに対して生物学的試料中の総25-ヒドロキシビタミンDレベルが低下していることは、対象でのビタミンD欠乏を示す。

【0160】

本明細書記載の任意の診断系の免疫試薬は、分散液として溶液中に、または実質的に乾燥した粉末として、例えば凍結乾燥された形態で提供することができる。

【0161】

いくつかの態様では、ビタミンD欠乏は、生物学的試料が置換緩衝液と混合された時点から開始して20分以内に検出することができる。

【0162】

対象でのビタミンD欠乏は、疾患を示しうる。その疾患には：くる病、骨軟化症、高血圧症、骨粗鬆症、自己免疫病、心血管疾患、統合失調症、うつ病、神経系疾患、糖尿病、感染症、喘息、アレルギーまたはガンを挙げることができる。

【0163】

キット

キットは、本明細書記載の抗体または抗原結合フラグメント、ならびに例えば、対象から生物学的試料を採取するための、および/または生物学的試料中の総ビタミンD量を決定するために抗体または抗原結合フラグメントを使用するための説明書を含みうる。好ましい態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、本明細書記載の検出可能なラベルを含む。キットは、また、固体支持体と連結したビタミンDアナログを含みうる。いくつかの態様では、キットは、正常および/または欠乏ビタミンDレベルとのビタミンDの量またはレベルの相関を示す、標準曲線またはデータセットを含みうる。

【0164】

10

20

30

40

50

本明細書記載の態様をより詳細に説明するために、以下の実施例を提供する。それらは、態様を限定するのではなく、例示することを目的とする。

【0165】

実施例

実施例 I ビタミン D - C 2 2 に基づく分子および化合物の合成

ビタミン D - C 2 2 に基づく抗原を産生させるために、操作可能な形態の分子が必要であった。これを成し遂げるために、Hollis および Napoli (Clin.Chem、31:1815-1819 (1985)) の合成スキームに基づく合成スキームによりビタミン D - C 2 2 酸を産生させるよう努力した。簡潔には、23, 24 - ビスノル - 5 - コレン酸 - 3 - オール - アセテート (2.50 g) をジクロロメタン (25 mL) 中でメタノール (0.312 mL)、ジシクロヘキシルカルボジイミド (1.59 g) および N, N - ジメチルアミノピリジン (160 mg) と 3 時間反応させ、23, 24 - ビスノル - 5 - コレン酸 - 3 - オール - アセテートメチルエステル (1.808 g) を得た。ヘキサン (200 mL) 中で還流下にて 30 分間メチルエステル (1.808 g) を N - プロモスクシンイミド (1.05 g) / アゾイソブチロニトリル (51.7 mg) で臭素化し、続いて THF (112 mL) 中でフッ化テトラブチルアンモニウム (THF 中に 1 M、23.8 mL) を用いて室温で 2 時間、脱臭化水素し、23, 24 - ビスノル - 5, 7 - コレジエン酸 (choledienic acid) - 3 - オール - アセテートメチルエステル (1.21 g) を得た。23, 24 - ビスノル - 5, 7 - コレジエン酸 - 3 - オール - アセテートメチルエステル (1.21 g) をメタノール (18 mL) およびエチルエーテル (22 mL) 中で水酸化カリウム (0.50 g) と室温で 2.5 時間反応させて、23, 24 - ビスノル - 5, 7 - コレジエン酸 - 3 - オール - メチルエステル (0.962 g) を産生させた。エーテル (1100 mL) 中で、Vycor フィルターを備える 450 W 水銀灯を 23, 24 - ビスノル - 5, 7 - コレジエン酸 - 3 - オール - メチルエステル (0.960 g) に - 10 ~ 0 で 3 分間および 30 秒 × 2 回照射し、次に、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分離し、プレビタミン D - C 2 2 メチルエステルを得、それをエタノール (100 mL) 中で 3 時間還流し、ビタミン D - C 2 2 メチルエステル (0.389 g) を産生させた。ビタミン D - C 2 2 メチルエステル (249 mg) をメタノール (30 mL) 中で水酸化カリウム (6.25 g) と 60 で 5 時間反応させ、ビタミン D - C 2 2 酸 (165 mg) を得た (図 2)。

【0166】

ビタミン D - C 2 2 とコンジュゲーションされた化合物を形成させるために NHS 前駆体が必要であった。これを達成するために、ビタミン D - C 2 2 酸 (165 mg) をジシクロヘキシルカルボジイミド (dicyclohexylcarbodiimide) (116 mg) および N - ヒドロキシスクシンイミド (64 mg) と 1, 4 - ジオキサン中で反応させ、次に 1, 4 - ジアミノブタン (480 μL) と室温で 2 時間反応させてビタミン D - D A B (141 mg) を得た。タンパク質反応性試薬であるビタミン D - D A B - スペロイル - NHS およびビタミン D - D A B - P E G 5 - NHS は、ビタミン D - D A B から、過剰のジスクリンイミジルスベレートまたは P E G 5 - ジ - NHS との反応によって調製した。NHS エステルは、C 18 カラムを通過させる分取逆相 H P L C によって精製した。DMF (1.2 mL) およびトリエチルアミン (15 μL) 中で、ビタミン D - D A B (30 mg) を過剰のジスクシンイミジルスベレート (D S S、133 mg) と 3.5 時間反応させた。Synergi Hydro-RP カラムを通過させる分取 H P L C によって生成物 (24.5 mg) を精製し、ビタミン D - D A B - スペロイル - NHS を産生させた。DMF (2.0 mL) およびトリエチルアミン (20 μL) 中で、ビタミン D - D A B (41 mg) を過剰の B i s - P E G 5 - NHS (282 mg) と 3.5 時間反応させた。Synergi Hydro-RP カラムを通過させる分取 H P L C によって生成物 (33.7 mg) を精製してビタミン D - D A B - P E G 5 - NHS を産生させた (図 3)。タンパク質コンジュゲートは、図 4 に示すように NHS エステルとタンパク質のリシンアミノ基との間の反応によって調製した。V i t D - D A B - スペロイル - B S A は、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) (1 mL) と DMF (0.4 mL) との混液中で、V i t D - D A B - スペロイル - NHS (5 mg) を B S A (10 mg) と室温で 2 時

間反応させることによって調製し、緩衝液交換のためにPBS (pH 7.2) を用いた遠心分離によって精製した。MALDI-TOF質量分析から、BSA 1個あたり14個のビタミンDラベルのロードが示された。

【0167】

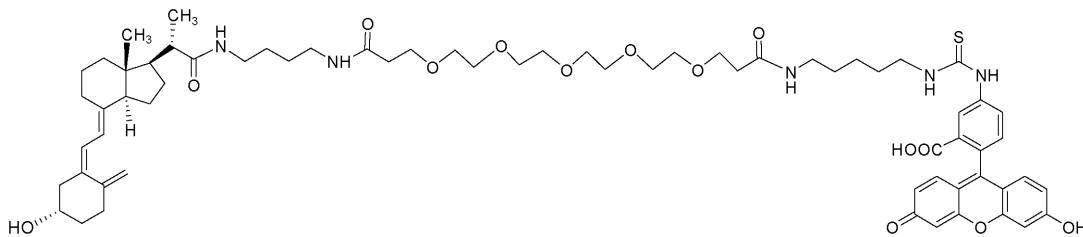
ビタミンD-DAB-PEG5-BSA-フルオレセインコンジュゲート(図5)は、BSAの遊離チオールとフルオレセイン-5-マレイミドとの間の反応に続くリシンアミノ基とビタミンD-DAB-PEG5-NHSとの反応による2段階コンジュゲーションを経て調製した。Sephadex G25カラムを用いたゲル濾過によってコンジュゲートを単離した。10:1のフルオレセイン-5-マレイミド:BSAのモル比を用い、続いて20:1のビタミンD-DAB-PEG5-NHS:BSAのモル比でのコンジュゲーションで調製されたコンジュゲートが最良のCentaur(登録商標)アッセイ曲線を生じたことが分かった。

10

【0168】

ビタミンD-フルオレセインコンジュゲートを調製し、Centaur(登録商標)アッセイ用の磁性粒子コーティング抗原として使用した。小分子誘導体であるビタミンD-DAB-PEG5-アミノペンチル-チオウレイジルフルオレセイン、MW1208(構造は下記)を磁性粒子コーティング抗原として使用しても、良好なイムノアッセイの結果が得られた。

【化2】



20

【0169】

実施例II ビタミンD-C22抗原性化合物と反応性の抗体の産生

ビタミンD-C22抗原性分子の構造局面を有する分子と優先的に結合できる抗体を産生させるために実験を行った。これらの実験は、Galfreら(Nature, 266:550(1977))の方法をOiおよびHerzenberg(Selected Methods in Cellular Immunology(1980))が改良したものにしたがって行った。まず、フロイント完全アジュバント中に乳化したビタミンD-C22 BSAをBALB/cマウスに免疫処置し、続いてフロイント不完全アジュバントを用いて二次免疫した。2回目の免疫処置の2週間後に、免疫処置後のマウスの血清を採取した。

30

【0170】

採取した血清を、以下のようなELISAによって抗原反応性について試験した: ビタミンD-C22 KLHでコーティングしたマイクロタイタープレートにマウス抗血清と共にインキュベーションし、希釈緩衝液で1時間希釈した。プレートを洗浄し、希釈緩衝液中の、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)とコンジュゲーションした二次抗体(ヤギ抗マウスIgG)を添加し、30分間インキュベーションした。プレートを洗浄し、比色分析用基質3,3',5,5'-テトラメチルバンジジン(TMB)を添加した。1N硫酸を用いて発色を止め、吸光度を450nmで測定した。被験マウス5匹全てからの血清は、正常マウス血清(NMS)に比べてかなりの反応性を示した(表2)。

40

【0171】

## 【表 2】

表 2: 免疫処置後のマウスからの血清によるビタミン D-C22 の検出

コーティング物質: 500 ng/mL Vit D-C22ジアミノブタン-スベロイル-KLH							
初回採血中のVit D C22 2008年12月5日	MOUSE #	NMS	0	1	2	3	4
	1:12800	0.070	0.931	1.357	1.669	1.795	1.622
	1:6400	0.069	1.532	2.020	2.478	2.581	2.310
	1:3200	0.070	2.234	2.685	3.126	3.161	2.845
	1:1600	0.077	2.940	3.228	3.520	3.504	3.303
	1:800	0.085	3.414	3.552	3.582	3.565	3.552
	1:400	0.100	3.585	3.573	3.680	3.630	3.578
	1:200	0.128	3.664	3.689	3.656	3.678	3.640
	1:100	0.180	3.628	3.666	3.645	3.605	3.576

10

## 【 0 1 7 2 】

実施例 I I I ビタミン D - C 2 2 抗原性化合物と反応性のモノクローナル抗体の産生

ビタミン D - C 2 2 抗原に対して正の免疫応答を示すマウスをモノクローナル抗体発生のために選択した。簡潔には、選択されたマウスから回収した脾臓細胞をマウス S p 2 / 0 ミエローマ細胞と融合させた。結果として生じた、25 - ヒドロキシビタミン D 2 および 25 - ヒドロキシビタミン D 3 と反応性の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、限界希釈手順によって少なくとも 2 回クローニングしてモノクローナル抗体産生細胞を得た。同定され、さらに試験された一つのモノクローナル細胞系は、10 H 9 ハイブリドーマであった。

20

## 【 0 1 7 3 】

ハイブリドーマクローンの単離後に、抗体が 25 - ヒドロキシビタミン D 2 および 25 - ヒドロキシビタミン D 3 の両方と結合する相対能力を決定するために研究を行った。これを判断するために、ビタミン D - C 2 2 と、抗原に対して産生された抗体 ( 10 H 9 ) との間の結合が 25 - ヒドロキシビタミン D 2 または 25 - ヒドロキシビタミン D 3 の存在によって破壊される程度を決定する抗体置換アッセイを行った。ビタミン D - C 2 2 と反応性の抗体を産生する 10 H 9 ハイブリドーマ細胞系からの細胞培養上清を、ビタミン D - C 2 2 K L H をコーティングしたマイクロタイタープレート上で 25 - ヒドロキシビタミン D 2 または 25 - ヒドロキシビタミン D 3 の存在下または不在下で 1 時間同時インキュベーションした。プレートを洗浄後に、ヤギ抗マウス I g G - H R P O を添加し、30 分間インキュベーションした。プレートを洗浄し、次にテトラメチルベンジジン ( T M B ) と共にインキュベーションした。1 N 硫酸を用いて発色を止め、吸光度を 450 nm で測定した。表 3 に示すように (そして図 6 に示すように)、ビタミン D - C 2 2 K L H への抗体結合は、25 - ヒドロキシビタミン D 2 または 25 - ヒドロキシビタミン D 3 のいずれかとの同時インキュベーションによって濃度依存的に破壊された。25 - ヒドロキシビタミン D 2 および 25 - ヒドロキシビタミン D 3 の両方は、被験抗体の等モル親和性の特徴である、実質的に類似の結合破壊プロファイルを示した。

30

40

## 【 0 1 7 4 】

## 【表 3】

表 3: 25-ヒドロキシビタミン D2 または 25-ヒドロキシビタミン D3 によるビタミン D-C22 反応性抗体の置換

コーティング物質: 50 ng/mL Vit D C22 ジアミノブタン-スベロイル-KLH				
Ag (終濃度)		0	25 OH-D2	25 OH-D3
			0.4 ug/mL	0.4 ug/mL
Vit D-C22 10H9 細胞培養 上清の 最終希釈	1:4	1.997	0.323	0.384
	1:16	1.244	0.154	0.176
	1:64	0.672	0.097	0.105
	1:256	0.313	0.086	0.090
トレーサー: 1:20K GAM-IgG-HRP (終濃度)				

10

20

## 【 0 1 7 5 】

次に、細胞上清ではなく精製抗体を使用して置換実験を行った。この実験では、2時間インキュベーションを経て関心が持たれる抗体をマイクロタイタープレート上に直接コーティングした。コーティング後のプレートを洗浄し、次に、これを、アルカリホスファターゼとコンジュゲーションしたビタミン D - C 2 2 - ジアミノブタン - スベロイルの存在下で 2 5 - ヒドロキシビタミン D 2 または 2 5 - ヒドロキシビタミン D 3 のいずれかと共に同時インキュベーションした。30分後にプレートを洗浄し、基質 p - ニトロフェニルホスフェート ( P N P P ) を添加することによって発色させた。着色した溶液の吸光度を 4 0 5 nm で測定した。再び、2 5 - ヒドロキシビタミン D 2 または 2 5 - ヒドロキシビタミン D 3 のいずれかと共に同時インキュベーションすることによってビタミン D - C 2 2 への 1 0 H 9 結合を濃度依存的に破壊した (表 4)。2 5 - ヒドロキシビタミン D 2 および 2 5 - ヒドロキシビタミン D 3 の両方は、被験抗体の等モル親和性の特徴である、実質的に類似の結合破壊プロファイルを示した (図 7)。

30

## 【 0 1 7 6 】

【表 4】

表 4: 25-ヒドロキシビタミン D2 または 25-ヒドロキシビタミン D3 によるビタミン D-C22 反応性抗体の置換

60 ug/ml Vit D-C22 MAb 10H9を 1ug/mLでコーティング		O.D.
表示終濃度での 25OH-Vit D2を25 uL	0	1.277
	5	1.189
	10	1.007
	25	0.771
	100	0.106
	200	0.080
	400	0.069
	1000	0.063
表示終濃度での 25OH-Vit D3を25 uL	0	1.213
	5	1.083
	10	0.800
	25	0.519
	100	0.115
	200	0.089
	400	0.077
	1000	0.069
25 uLのVitD C22 カルボニル-1,4-ジアミノブタン- N-スベロイル+アルカリホスファターゼ		

10

20

## 【 0 1 7 7 】

## 実施例 I V

## ビタミン D アッセイ

生物学的試料に続いて置換緩衝液を反応キュベットに加え、4.5分間反応させる。アクリジニウムエステルとコンジュゲーションしたモノクローナル抗体を添加し、5.5分間反応させて試料中の25-ヒドロキシビタミンDと結合させる。ウシ血清アルブミンおよびフルオレセインとコンジュゲーションした25-ヒドロキシビタミンDアナログを、抗フルオレセイン抗体をコーティングした常磁性粒子と一緒に添加し、3.75分間反応させる。反応キュベットを洗浄し、酸および塩基試薬を添加し、化学発光反応を開始する。結果までの時間は18分である。患者の試料中の25-ヒドロキシビタミンDの量と、系によって検出された相対光単位(RLU)の量との間に逆相関の関係が存在する。

30

## 【 0 1 7 8 】

アッセイ: ADVIA Centaur 総ビタミンDアッセイは、常磁性粒子(PMP)と共有結合した、ラベルされた抗フルオレセインモノクローナル抗体、アクリジニウムエステル(AE)でラベルされたモノクローナル抗体1種、およびフルオレセインでラベルされたビタミンDアナログを使用する18分間のワンパス型抗体競合イムノアッセイである(図8)。総ビタミンDアッセイは、1回の判定のために試料体積20μLを要する。初回結果までの時間は18分であり、処理量は240回/時間である。

40

## 【 0 1 7 9 】

簡潔には、化学発光技法を用いた連続ステップハブテン/抗体競合イムノアッセイの第1のステップは、アナライザーでキュベットに生物学的試料20μLを分注し、続いて8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸アンモニウム塩(Sigma-aldrich, St. Louis, MO)およびエチレングリコール(Sigma-aldrich, St. Louis, MO)を含有する置換緩衝液(50mM HEPES、150mM NaCl、0.09%アジ化ナトリウム、pH=7.5)

50

200  $\mu$ lを添加し、37 で4.5分間インキュベーションすることで開始する。アクリジニウムエステルでラベルされた抗25-ヒドロキシビタミンDモノクローナル抗体(モノクローナル抗体10H9)を含有するLite試薬(50  $\mu$ L)をその混合物に添加し、37 で5.5分間インキュベーションする。C22-PEG-BSA-フルオレseinコンジュゲート(50  $\mu$ L)および抗フルオレseinモノクローナル抗体でコーティングされた常磁性マイクロパーティクル(100  $\mu$ L)をその混合物に添加し、37 で3.75分間インキュベーションする。第4のステップは、C22-PEG-BSA-フルオレseinコンジュゲートおよびアクリジニウムエステルでラベルされた抗25-ヒドロキシビタミンDモノクローナル抗体が結合した固相複合体を分離し、続いて3回洗浄して遊離のLite試薬がもしあれば除去することである。最後のステップは、酸試薬の次に塩基試薬をそれぞれ300  $\mu$ L連続的に分注し、化学発光反応を開始することである。試料から結果までの総インキュベーション時間は18分である。生物学的試料中に存在する25-ヒドロキシビタミンDの量と、相対光単位(RLU)として定量された化学発光の量との間に間接的関係がある。Centaurに基づくアッセイでは、アクリジニウムエステルによって発光したRLUとビタミンDの量との間に逆相関関係があるが、それは、血漿中の担体タンパク質から放出された25-ヒドロキシビタミンDが、限られた量のアクリジニウムラベル型10H9モノクローナル抗体との結合を、ビタミンD-BSA-フルオレseinと競合するからである。患者試料中の25(OH)Dレベルがより高いと、磁性粒子上のアクリジニウム-MAb-VitD-BSA-フルオレsein複合体の量が低下し、より低いRLUが生じるであろう。

10

20

**【0180】**

精度：精度の研究は、CLSIプロトコールEP5-A2(1台のADVIA Centaurシステムで1日2回、10日間)に基づいた。総ビタミンDが4~120 ng/mLの試料を用いてアッセイ精度を決定した。

**【0181】**

分析感度：分析感度は、最低標準から得られた平均シグナル+2SDを相対光単位(RLU)で表現したものに对应する濃度として定義される。分析感度の研究は、CLSIプロトコールEP5-A2にしたがって行った。分析感度は、最低標準の60回の繰り返しを用いて決定した。

**【0182】**

ブランク限界(limit of blank)、検出限界、および実効感度：ブランク限界は、ヒト陰性基本プールの分布の95パーセンタイルに对应する分析物の濃度として定義される。3システムで2ロットの試薬を用いて総ビタミンDの低濃度標準を20回アッセイした(n=120)。検出限界(LoD)は、CLSIプロトコールEP17-Aにより決定する。検出限界は、確率95%で検出できるビタミンDの最低濃度として定義される。LoDは、3システムで2ロットの試薬を用いて20回アッセイした低レベルビタミンD試料を使用することによって決定した(n=120)。機能感度(functional sensitivity)は、1台の機器を使用して10日間にわたり決定した。1日に2回の運転を二つ組で行い、合計60回繰り返した。ADVIA Centaur総ビタミンD感度パネルのメンバーの濃度は、3.0~20.0 ng/mLであった。ロット内の0日目の2点検量線を使用して濃度を計算した。

30

40

**【0183】**

妨害研究：内因性および非内因性物質からの妨害は、NCCLS EP-7Aのガイドラインにしたがって評価した。各試料に妨害物を添加し、マッチする未添加対照と比較した。

**【0184】**

交差反応性：ADVIA Centaur総ビタミンDアッセイを用いて5種のビタミンD誘導体を分析した。27 ng/mLの総ビタミンDを含有する試料にビタミンD誘導体を添加した。添加された試料を3回の繰り返し(replicate)でアッセイし、総ビタミンD濃度を決定した。

50

## 【0185】

チューブの種類の研究：ADVIA Centaur総ビタミンDアッセイを用いて、EDTAチューブと血清セパレーターチューブ（SST）との間の相関を分析した。119人のドナーからセラムレッドトップチューブ、SSTチューブ、およびEDTAチューブに血清を採取し、Centaur総ビタミンDアッセイを用いてアッセイした。各試料を3回の繰り返しで評価した。セラムとSSTとの間、およびセラム対EDTAの直線回帰相関を決定した。

## 【0186】

方法の相関：患者の検体199個を使用して、各方法について1回の繰り返し（replicate）で、ADVIA Centaur総ビタミンDアッセイを市販のFDA認可（FDA-cleared）総ビタミンDイムノアッセイと比較した。検体濃度は5～150 ng/mLであった。加えて、患者の試料23個をLC-MS/MSおよびADVIA Centaur総ビタミンDアッセイによってアッセイした。この第2集団の検体は、11～82 ng/mLであった。

10

## 【0187】

結果

ADVIA Centaur総ビタミンDアッセイで得られたデータは、25(OH)D<sub>2</sub>および25(OH)D<sub>3</sub>の等モル検出を実証し、LC-MS/MSへのトレーサビリティを示した。25(OH)D<sub>2</sub>の交差反応性は、50 ng/mLで105%と決定された。アッセイは、検出限界（LOD）3.0 ng/mL未満、機能感度（functional sensitivity）（総CVの20%用量）4 ng/mL未満、および上限250 ng/mLを示した。22.1、52.3、121、および153 ng/mLの試料について、総アッセイCVは、それぞれ6.4%、7.1%、4.2%、および3.7%であった。最大240 ng/mLの直線性が示された。血清試料150個を用いてLC-MS/MSに対する相関研究を行い、傾き0.96、切片1.0、および回帰係数0.97を得た。

20

## 【0188】

精度：ADVIA Centaur総ビタミンDアッセイの精度プロファイルから、総CVが7.65 ng/mL総25(OH)ビタミンDでの8.8%から123.36 ng/mLでの2.0%の間であることが示される。精度分析を表5に示す。

## 【0189】

## 【表5】

表5. ADVIA Centaur総ビタミンDアッセイの精度分析

30

試料	平均 (ng/mL)	同時再現性 SD (ng/mL)	同時再現性 CV (%)	総 SD (ng/mL)	総 CV (%)
1	7.65	0.65	8.5	0.67	8.8
2	10.65	0.85	8.0	1.07	10.1
3	13.11	0.84	6.4	0.91	6.9
4	15.87	1.02	6.4	1.18	7.4
5	18.40	1.31	7.1	1.44	7.8
6	22.63	1.79	7.9	1.79	7.9
7	59.75	1.76	3.0	1.92	3.2
8	99.63	1.95	2.0	2.07	2.1
9	112.74	1.98	1.8	3.07	2.7
10	115.71	1.98	1.7	2.55	2.2
11	123.36	2.29	1.9	2.51	2.0

40

## 【0190】

分析感度：ADVIA Centaur総ビタミンDアッセイの分析感度は2.4 ng/mLであった。分析感度を表6に示す。

## 【0191】

【表 6】

表 6. ADVIA Centaur 総ビタミン D アッセイの分析感度

試料	繰り返し	平均 RLU + 2 SD	用量 (ng/mL)
ビタミン D ブランク	60	688200	2.4

## 【0192】

ブランク限界、検出限界、および機能感度：ADVIA Centaur 総ビタミン D アッセイのブランク限界は 2.8 ng/mL であり、検出限界は 3.8 ng/mL であり、機能感度は 4 ng/mL であった（図 9）。

10

## 【0193】

妨害研究：ADVIA Centaur 総ビタミン D アッセイは、内因性妨害物について検査された濃度で 10% のバイアスを示した。内因性妨害研究の結果を表 7 に示す。

## 【0194】

【表 7】

表 7. ADVIA Centaur 総ビタミン D アッセイに関する妨害研究の結果

妨害物質	濃度	予想される 総ビタミン D (ng/mL)	観測された 総ビタミン D (ng/mL)	バイアス (%)
非抱合ビリルビン	60 mg/dL	30.88	32.67	5.77
抱合ビリルビン	60 mg/dL	33.82	30.67	-9.31
アルブミン	9 g/dL	22.5	20.4	-9.33
ヘモグロビン	500 mg/dL	29.08	29.70	2.13
トリグリセリド	500 mg/dL	22.7	23.6	3.96
尿酸	20 mg/dL	35.45	33.45	-5.64

20

## 【0195】

交差反応性：ADVIA Centaur 総ビタミン D アッセイは、非ヒドロキシル化型のビタミン D 2 およびビタミン D 3、ならびに 3-エピ-25(OH)D 3 と非常に低い交差反応性を示した。交差反応性分析の結果を表 8 に示す。

30

## 【0196】

【表 8】

表 8. ADVIA Centaur 総ビタミン D アッセイの交差反応性

交差反応物質	濃度 (ng/mL)	予想される(内因性) 総ビタミン D (ng/mL)	観測された 総ビタミン D (ng/mL)	交差反応性 (%)
25-(OH)- ビタミン D3	27	0	27	100
25-(OH)- ビタミン D2	30	27	58	102
ビタミン D2	100	27	28	0.04
ビタミン D3	100	27	28	0.04
3-エピ- 25(OH)D3	100	27	27	0.0

40

## 【0197】

チューブの種類の研究：セラムレッドトップ、SST、および EDTA の種類のチューブ中に採取したドナーの検体 119 個で試料チューブの種類を対比を行った。セラムレッド

50

トップとSSTとの間の回帰分析から、相関係数(R)0.999、傾き1.01、および切片-0.14が示される(図10)。セラムレッドトップとEDTAとの間の回帰分析から、相関係数(R)0.997、傾き1.00、および切片0.41が示される(図11)。

【0198】

方法の比較：検体199個を用いて、ADVIA Centaur総ビタミンDアッセイと市販のFDA認可総ビタミンDアッセイを比較する試料の対比を行った。回帰分析から、相関係数(R)0.993、傾き1.00、および切片1.61が示された(図12)。加えて、ADVIA Centaur総ビタミンDアッセイと市販の総ビタミンD LC-MS/MSアッセイを比較して検体23個をアッセイした。回帰分析から、相関係数(R)0.98、傾き1.03、および切片-2.3が示された(図13)。

【0199】

【表 9】

配列 番号	配列
1	TTTTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCG
2	TACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAAC
3	TTTACTATCTATAATCAGAAG
4	ATAAGAGCGCATTACGACGGGAGAGTT
5	GTGCAGCTGCTCGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGA GCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTC ACTGAC
6	CTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGT
7	TTC AAGGGCAAGGCCACATTA ACTGTAGACAAGTCATCCAG CACAGCCTACATGGA ACTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTC TGCAGTCTATTACTTT
8	GTGCAGCTGCTCGAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGA GCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTC ACTGACTACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAA GAACCTTGAGTGGATTGGACTTATTAATCCTTACAATGGTTT TACTATCTATAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTAAC TG TAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACATGGA ACTCCTCAG TCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTACTTTATAAGAGC GCATTACGACGGGAGAGTTTTTTGGGGCCAAGGCACCACTCT CACAGTCTCCTCG
9	FWGQGTTLTVSS
10	YTMNWVKQSHGKN
11	FTIYNQK
12	IRAHYDGRV
13	VQLLESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTD
14	LEWIGLINPYNG
15	FKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYF

10

20

30

40

16	VQLLESGPELVKPGASMKISCKASGYSFTDYTMNWVKQSHGK NLEWIGLINPYNGFTIYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLT SEDSAVYYFIRAHYDGRVFWGQGTTTLTVSS
17	ACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTAGAAATAAAACGG
18	CAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACAT
19	CTGATCTACCAAGTTTCCAAC
20	TGCTCTCAAATTACACATTTTCCTCCC
21	TGTGAACTAGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTC AGTCTTGGAGATCAAGCCTCCGTCTCTTGCAGATCTAGT
22	CGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTC
23	CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCA GGGACAGATTTCACTCAAGATCACCAGAGTGGAGGCTGA GGATCTGGGAGTTTATTTTC
24	TGTGAACTAGTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTC AGTCTTGGAGATCAAGCCTCCGTCTCTTGCAGATCTAGTCAG AGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATCGGTAC CTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACCAA GTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGC AGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCACCAGAGT GGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAATTAC ACATTTTCCTCCCACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTAGAAAT AAAACGG
25	TFGGGTKLEIKR
26	QSLVHSNGNTYLH
27	LIYQVSN
28	CSQITHFPP
29	CELVMTQSPLSLPVSLGDQASVSCRSS
30	RYLQKPGQSPKL
31	RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKITRVEAEDLGVYF
32	CELVMTQSPLSLPVSLGDQASVSCRSSQSLVHSNGNTYLHRYLQ KPGQSPKLLIYQVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKITRVEAEDL GVYFCSQITHFPPTFGGGTKLEIKR

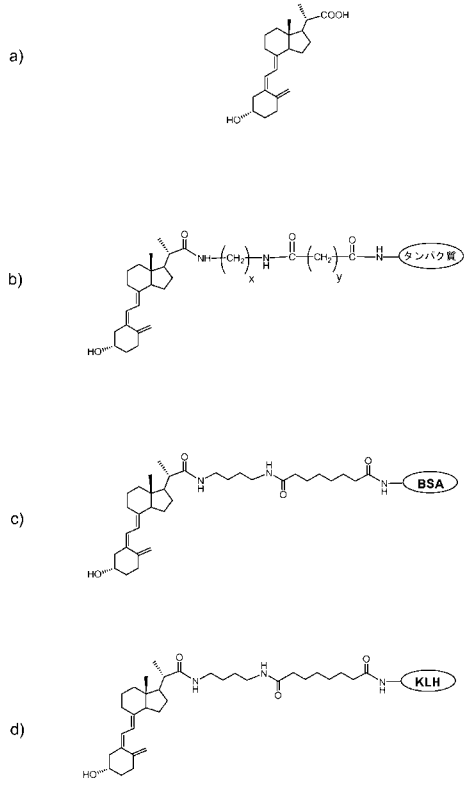
10

20

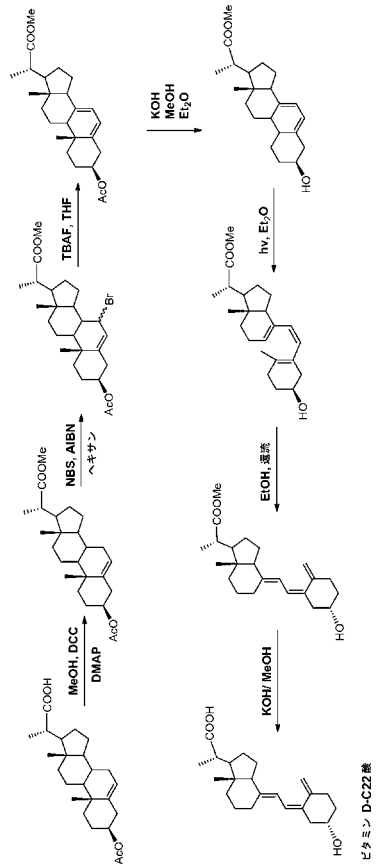
30

40

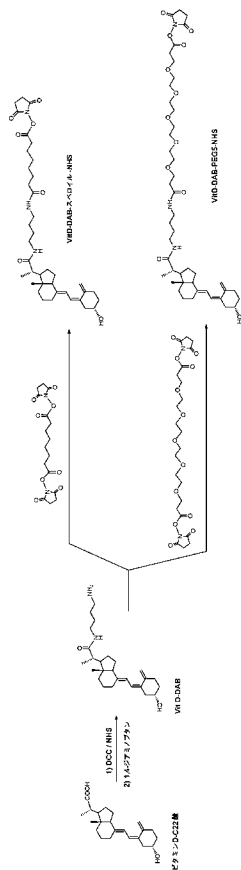
【 図 1 】



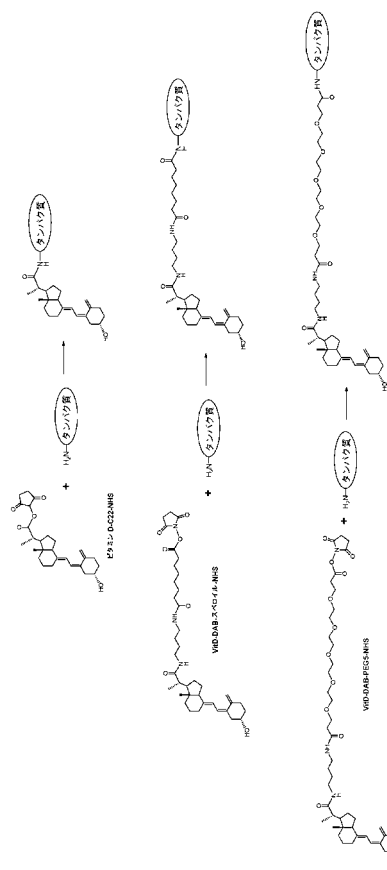
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

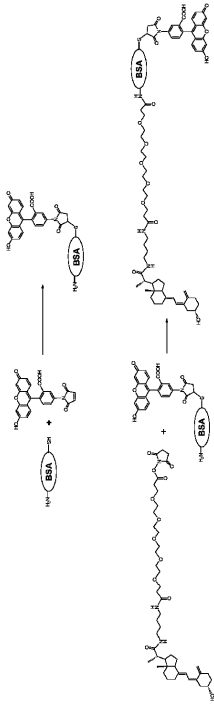
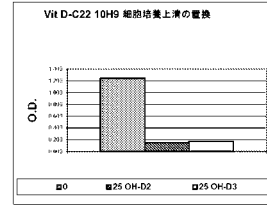
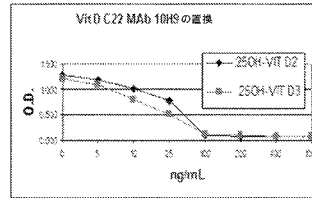


Figure 5

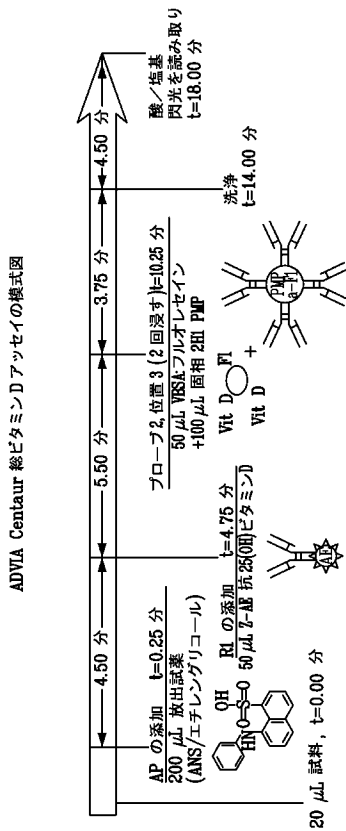
【 図 6 】



【 図 7 】

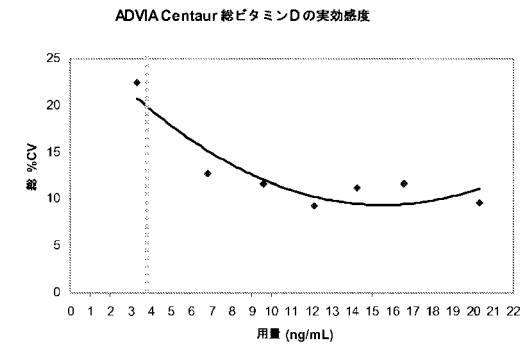


【 図 8 】

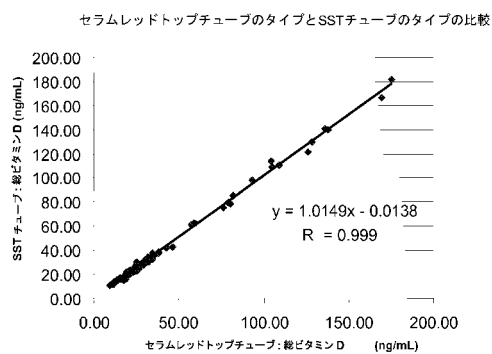


25-ヒドロキソン25-ヒドロキソン  
ビタミン D<sub>3</sub> ビタミン D<sub>2</sub>  
試料中  
25(OH) ビタミン D

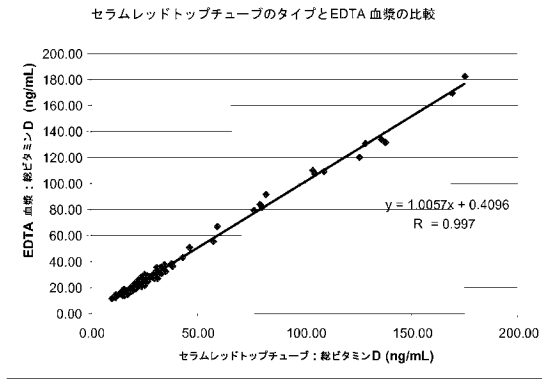
【 図 9 】



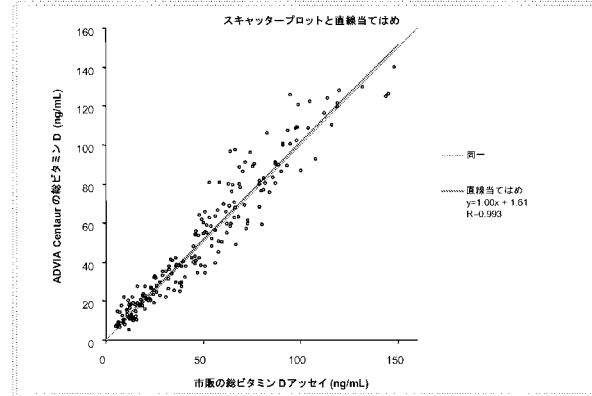
【 図 10 】



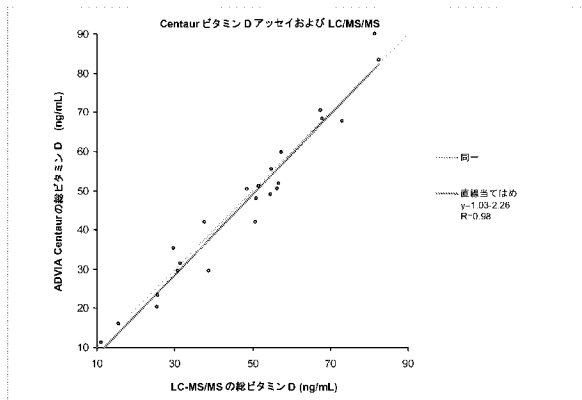
【 図 1 1 】



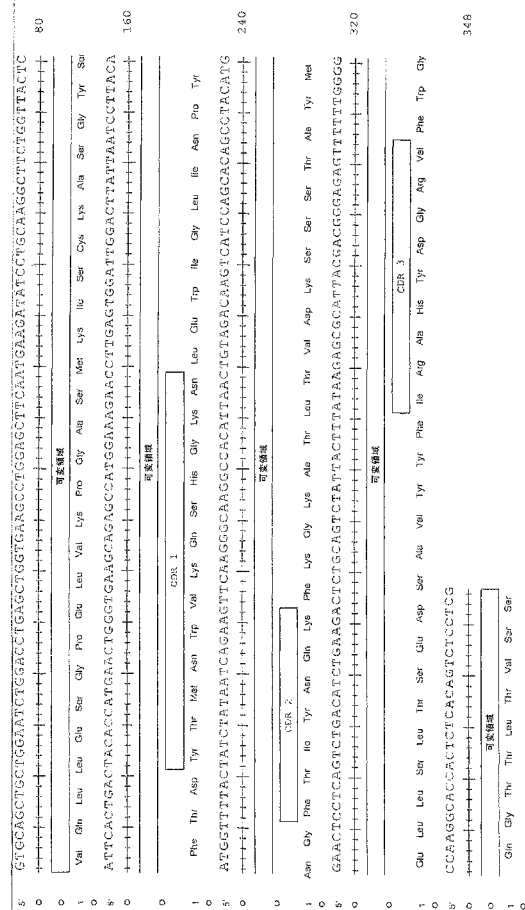
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】





## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/38637
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07K 16/26; C07H 21/00; G01N 33/53 (2012.01) USPC - 530/388.24; 536/23.53; 435/7.1 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) USPC: 530/388.24; 536/23.53; 435/7.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 530/388.24; 536/23.53; 435/7.1 (text search)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PatBase (US, EP, WO); Google Scholar, GenCore sequence search (AA, NT) Search terms; antibody, monoclonal, complementarity determining region (CDR), light chain, heavy chain, vitamin D, 25-hydroxyvitamin D2, 25-hydroxyvitamin D3, detection, quantification		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/019566 A2 (TAYLOR et al.) 18 February 2010 (18.02.2010). Especially pg 3 ln 4-7, pg 10 ln 18-21	1-5, 22-26, 38-41, 123
A	US 2010/0068725 A1 (ARMBRUSTER et al.) 18 March 2010 (18.03.2010). Especially para [0005]-[0014].	1-5, 22-26, 38-41, 123
A	US 2011/0097733 A1 (ANCIAX et al.) 28 April 2011 (28.04.2011). Especially para [0014]-[0021].	1-5, 22-26, 38-41, 123
A	US 2003/0119018 A1 (OMURA et al.) 26 June 2003 (26.06.2003) Especially SEQ ID NO: 8694	1-5, 22-26, 123
A	US 2011/0092372 A1 (ALMAGRO et al.) 21 April 2011 (21.04.2011) Especially SEQ ID NO: 99	1-5, 22-26, 123
A	US 2009/0012268 A1 (BERGMANN et al.) 8 January 2009 (08.01.2009). Especially SEQ ID NO: 1	1-5, 22-26, 123
A	US 2008/0148432 A1 (ABAD) 19 June 2008 (19.06.2008) Especially SEQ ID NO: 44946 AA 285-291	1-5, 22-26, 123
A	US 2003/0008321 A1 (FUKUI et al.) 9 January 2003 (09.01.2003) Especially SEQ ID NO: 8	1-5, 22-26, 123
A	US 2002/0062009 A1 (TAYLOR) 23 May 2003 (23.05.2003) Especially SEQ ID NO: 61	1-5, 22-26, 123
A	US 2006/0057564 A1 (WANG) 16 March 2006 (16.03.2006). Especially SEQ ID NO: 434840	38, 39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 16 October 2012 (16.10.2012)		Date of mailing of the international search report <b>09 NOV 2012</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: <b>Lee W. Young</b> PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US 12/38637
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 20070083334 A1 (MINTZ et al.) 12 April 2007 (12.04.2007) Especially SEQ ID NO: 174239	38, 39
A	US 2010/0266493 A1 (BANGA et al.) 21 October 2012 (21.10.2010). Especially SEQ ID NO: 49	38, 39
A	US 2011/0117086 A1 (PANNEQUIN et al.) 19 May 2011 (19.05.2011) SEQ ID NO: 19	40, 41
A	US 2010/0028357 A1 (MATSUBARA et al.) 4 February 2010 (04.02.2010). SEQ ID NO: 96	40, 41
A	US 2010/0311955A1 A1 (GUO et al.) 9 December 2010 (09.12.2010). Especially SEQ ID NO: 11 nt 154-174.	40, 41

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/38637

**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 filed or furnished:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purposes of search

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 in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore ver 6.4.1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/38637

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 6-21, 27-37, 42-45, 56-75, 92-94, and 96-112  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**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:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: claims 1-5, 22-26, 38-41, and 123 directed to an isolated antibody, or an antigen-binding fragment thereof, comprising a heavy chain CDR1 having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, a heavy chain CDR2 having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 11, a heavy chain CDR3 having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12, a light chain CDR1 having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26, a light chain CDR2 having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 27, and a light chain CDR3 having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 28, or a nucleic acid encoding said sequence, or a hybridoma producing said antibody.

-----for continuation, go to Extra Sheet-----

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.:  
Claims 1-5, 22-26, 38-41 and 123.

- 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

International application No.

PCT/US 12/38637

## Continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)

## Continuation of Sections 1 and 2:

Group II: claims 46-55, 76-83, 87-90 and 95 directed to a method for detecting, treating or monitoring vitamin D deficiency in a subject, said method comprising determining the level of total 25-hydroxyvitamin D in a biological sample derived from said subject; wherein a decrease between the level in the biological sample and the level in a normal control or a threshold level of 30 ng/mL is indicative of a vitamin D deficiency in said subject.

Group III: claims 84-86, directed to a method of stabilizing 25-hydroxyvitamin D analog comprising contacting the 25-hydroxyvitamin D analog with 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS).

Group IV: claims 113-121, and 136, directed to a method of producing a hybridoma and an antibody that binds to 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3, or an antigen binding fragment thereof, comprising:

- a) immunizing an animal with an immunogen comprising vitamin D-C22 or a derivative thereof in which the carboxylic acid function is protected to form an amide;
- b) harvesting spleen cells from the animal;
- c) fusing the spleen cells with myeloma cells to form a hybridoma; and
- d) producing from said hybridoma an antibody or antigen-binding fragment that binds 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3, or said hybridoma.

Group V: claim 124-127, and 131-135, directed to an isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding fragment thereof, that binds 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 in a sample.

Group VI: claims 128-130, directed to a method for detecting or determining the level of total 25-hydroxyvitamin D in a biological sample comprising contacting said sample with an antibody, or antigen-binding fragment thereof, that binds 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3.

The inventions listed as Groups I - VI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of the claims of Groups I-VI are disclosed in the Group descriptions, above.

The only common technical element shared by the above groups is that they are related to 25-hydroxyvitamin D. Groups I, IV, V and VI share the common technical element of being related to antibodies that bind to 25-hydroxyvitamin D. Groups II and VI share the common technical element of being related to determining the level of 25-hydroxyvitamin D in a sample. Groups V-VII share the common technical element of being related to an antibody that binds to both 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3. These common technical elements do not represent an improvement over the prior art of US 2011/0097733 A1 to Anclaux et al., which teaches a process for the production of a hybridoma, and a monoclonal antibody...able to recognize 25-hydroxyvitamin D.sub.3 and 25-hydroxyvitamin D.sub.3 (abstract), and the measurement of the level of 25-hydroxyvitamin D in a sample (para [0043]).

Therefore, the inventions of Groups I-VI lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 F	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 3/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/02 1 0 2	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 H	
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 7 5	
	G 0 1 N 33/543 5 1 1 H	

(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, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74) 代理人 100119079

弁理士 伊藤 佐保子

(74) 代理人 100116528

弁理士 三宅 俊男

(74) 代理人 100146031

弁理士 柴田 明夫

(74) 代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74) 代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74) 代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74) 代理人 100135873

弁理士 小澤 圭子

(72) 発明者 キャンベル, ブルース・エー

アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 1 3 0 2、カラバサス、アリジア・キャニオン・ドライブ  
2 6 0 0 5 - エフ

(72) 発明者 リン, スペンサー・シャン - シ

アメリカ合衆国、ニューヨーク 1 0 5 9 8、サンセット・ストリート 1 0 1 1、ヨークタウン  
・ハイツ

(72) 発明者 リャオ, チム

アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 1 0 8 1、アルハンブラ、エス・2 エヌディー・ストリート  
8 2 1、ナンバー 1

(72) 発明者 サハキアン, ニヴァー・パノシアン

アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 1 3 1 6、エンシノ、グリーン・メドウ・コート 4 1 7 1

(72) 発明者 フリーマン, ジェームズ・ヴィンセント

アメリカ合衆国、コネチカット 0 6 4 8 2、サンディー・フック、ウォルナット・ツリー・ヒル  
・ロード 1 2 1

(72) 発明者 エヴァンジェリスタ, ラモン・エイ

アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 2 6 5 3、ラゲーナ・ヒルズ、ベントレー・レーン 2 5 2

6 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA44 BA80 CA07 DA02 GA05 HA01 HA06  
HA15  
4B029 AA07 BB17 CC08 FA12  
4B064 AG27 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13  
4B065 AA92X AA92Y AA93X AB01 AB05 AC14 BA01 BA08 CA25 CA44  
CA46  
4C084 AA17 ZC232  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA72 GA26

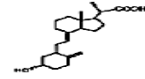
专利名称(译)	抗25-羟基维生素D 2和D 3的抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014516540A</a>	公开(公告)日	2014-07-17
申请号	JP2014512897	申请日	2012-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断公司		
[标]发明人	キャンベルブルースエー リンスペンサーシャンシ リャオチム サハキアンニヴァーパノシアン フリーマンジェームズヴィンセント エヴァンジェリスタラモンエイ		
发明人	キャンベル,ブルース・エー リン,スペンサー・シャン・シ リャオ,チム サハキアン,ニヴァー・パノシアン フリーマン,ジェームズ・ヴィンセント エヴァンジェリスタ,ラモン・エイ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K16/46 C12N5/078 C12N5/10 C12N15/02 C12P21/08 C12M1/34 A61K45/00 A61P3/02 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	A61P3/02 C07K16/44 G01N33/82 G01N2800/02		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/18.ZNA C07K16/46 C12N5/00.202.J C12N5/00.102 C12N15/00.C C12P21/08 C12M1/34.F A61K45/00 A61P3/02.102 G01N33/53.H G01N33/543.575 G01N33/543.511.H		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/GA05 4B024/HA01 4B024/HA06 4B024/HA15 4B029/AA07 4B029/BB17 4B029/CC08 4B029/FA12 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AA92Y 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/ZC232 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫 三宅 俊男 阿基奥·希巴达 田中洋子		
优先权	13/458847 2012-04-27 US 61/488630 2011-05-20 US		
其他公开文献	JP2014516540A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

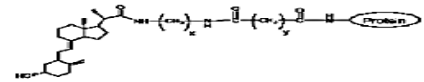
本文提供的抗原性分子可用于产生能够与维生素D衍生物(例如25-羟基维生素D2和/或25-羟基维生素D3)或25-羟基维生素D类似物(例如维生素D-C22)结合的抗体免疫原性分子或化合物。还描述了使用这些抗原性分子和相关抗原性化合物产生的抗体。另外,本文公开了用于检测受试者中维生素D缺乏症的方法,用于治疗怀疑患有维生素D缺乏症的受试者的方法,用于监视受试者中维生素D缺乏症的进展的方法以及用于监视维生素D缺乏症的治疗方法。在有需要的受试者中。还提供了用于检测或定量25-羟

基维生素D 2和D 3的方法和试剂，稳定维生素D类似物的方法，以及从生物样品中的维生素D结合蛋白中分离25-羟基维生素D 2和D 3的方法。

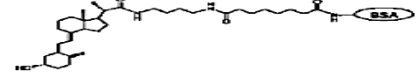
a)



b)



c)



d)

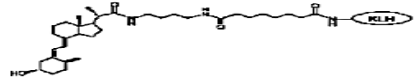


Figure 1