

(19)日本国特許庁 (J P)

公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-97197

(P2002-97197A)

(43)公開日 平成14年4月2日(2002.4.2)

(51)Int.Cl⁷

識別記号

F I

テマコード^{*} (参考)

C 0 7 J 51/00

C 0 7 J 51/00

4 C 0 9 1

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/53

A

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 12数)

(21)出願番号 特願2001-215260(P2001-215260)

(22)出願日 平成13年7月16日(2001.7.16)

(31)優先権主張番号 特願2000-217314(P2000-217314)

(32)優先日 平成12年7月18日(2000.7.18)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 597096105

株式会社 矢内原研究所

静岡県富士宮市栗倉2480番地の1

(71)出願人 000206956

大塚製薬株式会社

東京都千代田区神田司町2丁目9番地

(72)発明者 矢内原 昇

静岡県静岡市北403番地の22

(72)発明者 加藤 郁夫

静岡県富士宮市泉町675 ロイヤルプラザい
ずみ野310号

(74)代理人 100065215

弁理士 三枝 英二 (外 8 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エストラジオール誘導体およびこれを使用した測定法

(57)【要約】

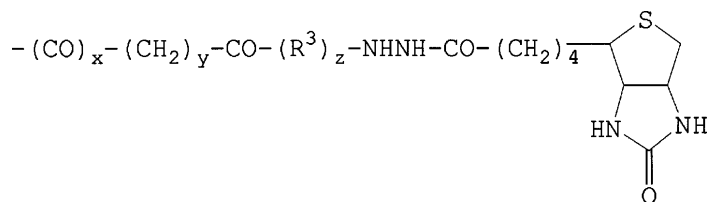
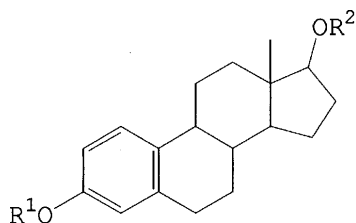
(式中、R¹およびR²は一方が水素原子で他方が基

【課題】 エストロゲンの高感度免疫測定法を提供。

【解決手段】 一般式(1)：

【化2】

【化1】



を示す。該基においてR³は同一または相異なってアルギニン残基またはリジン残基を示す。xは0または1、yは1-5の整数、またzは1-3の整数を示す)で表わされるビオ

チン化エストラジオール誘導体を標識体として利用するエストロゲンの高感度免疫測定法。

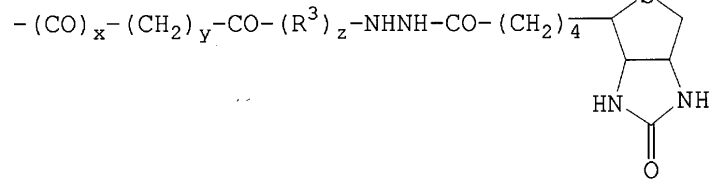
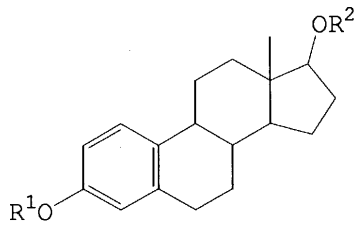
1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)：

【化1】



を示す。該基において、 R^3 は同一または相異なってアルギニン残基またはリジン残基、 x は0または1、 y は1-5の整数および z は1-3の整数をそれぞれ示す。)で表わされるビオチン化エストラジオール誘導体。

【請求項2】 R^1 が水素原子、 R^3 がアルギニン残基、 X が20 1、 Y が2および Z が2である請求項1に記載のビオチン化エストラジオール誘導体。

【請求項3】 R^2 が水素原子、 R^3 がアルギニン残基、 X が0、 Y が1および Z が2である請求項1に記載のビオチン化エストラジオール誘導体。

【請求項4】 請求項1に記載のビオチン化エストラジオール誘導体を測定系の標識体として利用することを特徴とする、エストロゲンの免疫測定法。

【請求項5】 エストロゲンが 17β -エストラジオールである請求項4に記載の免疫測定法。

【請求項6】 エストロゲンがエストロンである請求項4に記載の免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エストロゲン(estrogens)、特に 17β -エストラジオールおよびエストロンの免疫測定法および該測定法に利用される標識体に関する。

【0002】

【従来の技術】エストロゲンは、ステロイドホルモン 40 (女性ホルモン)の代表例である。現在、エストロゲンに属する化合物として十数種類が知られている。このエストロゲンは、ヒト血中においては他の女性ホルモンと同様に安定なエストラジオールに代謝される。このエストラジオールは、主として尿として排出され、河川、湖水、海水、排水、土壌などの環境中に拡散される。

【0003】エストロゲンが注目されるのは、ヒト、家畜、魚類などの女性化の問題である。例えば 17 -エストラジオールは、エストロゲン受容体と反応する。エストラジオールの該受容体への結合活性は、現在問題とされ 50

* (式中、 R^1 および R^2 は一方が水素原子で、他方が基

* 【化2】

ている環境ホルモンとしてのビスフェノールA、ノニルフェノール、アルキルフタレート類などの1千-1万倍にも及ぶ。

【0004】従来より、 17β -エストラジオールおよびエストロンの測定は、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイなどの免疫測定法によってなされている。これらの免疫測定法は、ヒト血中女性ホルモンの測定のための測定技術として知られている。

【0005】しかしながら、これらの測定法は、本来、血中女性ホルモンの検出、測定を目的として開発されたものであり、河川、湖水、海水、排水、土壌などの環境中のエストロゲンの検出、測定に利用するときには、なお感度などの面で課題を残している。

【0006】

30 【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、従来技術の課題を解決したエストロゲンの高感度な免疫測定系を提供することにある。

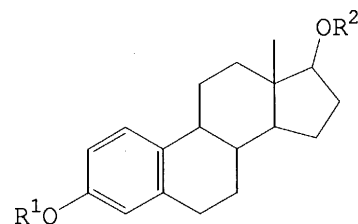
【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、鋭意研究の結果、下記一般式(1)で表わされる新規なビオチン化エストラジオール誘導体を、エストロゲンの免疫測定系における標識体として利用するときには、高感度なエストロゲンの検出、測定系が確立できることを見出した。本発明はこの知見に基づいて完成されたものである。

【0008】本発明は、一般式(1)

【0009】

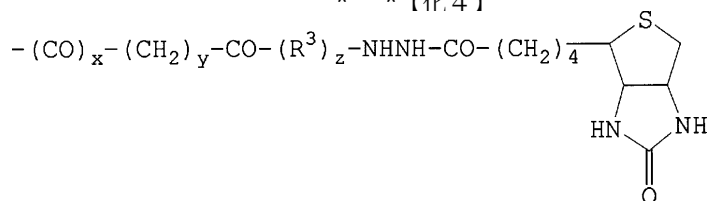
【化3】



【0010】(式中、 R^1 および R^2 は一方が水素原子で、他方が基

【0011】

* * 【化4】



【0012】を示す。該基において、 R^3 は同一または相異なってアルギニン残基またはリジン残基、 x は0または1、 y は1-5の整数および z は1-3の整数をそれぞれ示す。)で表わされるビオチン化エストラジオール誘導体(以下、化合物(1)という)を提供する。

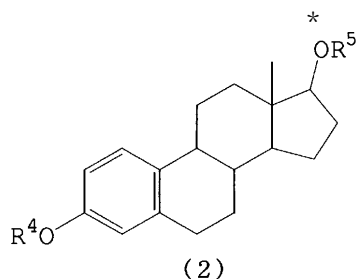
【0013】特に本発明は、一般式(1)中、 R^1 が水素原子、 R^3 がアルギニン残基、 X が1、 Y が2および Z が2であるビオチン化エストラジオール誘導体、および R^2 が水素原子、 R^3 がアルギニン残基、 X が0、 Y が1および Z が2であるビオチン化エストラジオール誘導体を提供する。

【0014】また、本発明は、化合物(1)を測定系の標識体として利用することを特徴とするエストロゲンの免疫測定法、特に 17β -エストラジオールおよびエストロ

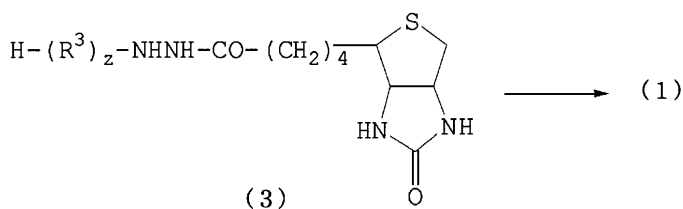
【0015】

【発明の実施の形態】本発明の化合物(1)は、免疫測定系の液相に可溶性である(水溶性である)ことによって特徴付けられる。従って、これはエストロゲンの免疫測定系における標識体として極めて有用である。

【0016】従来より、ビオチンは、アビジンとともに間接標識剤として慣用されている。またビオチンは、一般の酵素類と比較して、低分子(分子量244.31)であることより標識体としての利用がより好ましいと考えられる。しかしながら、ビオチンは、それ自体水溶性に乏しく、水溶性に欠けるエストラジオールと結合させて得られる結合体は水不溶性となる。そのため、ビオチンはこのようなエストロゲンの免疫測定系には利用することができない。



+



* 【0017】これに対して、本発明の化合物(1)は、エストロゲンの免疫測定系への利用に適した水溶性を具備している。しかも該化合物(1)は、エストロゲンの測定系に用いられる抗体との交差反応性を消失していない。これらの点より、該化合物(1)は、斯界で要望されるエストロゲンの免疫測定系への利用に適している。

【0018】本発明測定法の好ましい一つの態様は、後記実施例3に詳述する酵素免疫測定法である。この好ましい態様によれば、約1.2-5000pg/mLの範囲の 17β -エストラジオールが測定可能である。また、約1.2-20000pg/mLの範囲のエストロンが測定可能である。

【0019】これらのことから、本発明測定法は、例えば河川、湖水などを検体としてこれらの環境中に存在するエストロゲンを測定することができる非常に高感度な測定法である。

【0020】本発明化合物(1)は、エストロゲン、特に生理活性の高いことが知られている例えば 17β -エストラジオール、エストロンなどの免疫測定法に、標識体として有利に利用することができる。

【0021】該化合物(1)を表す前記一般式(1)において、 R^3 で示されるアミノ酸残基(ArgおよびLys)は、特に断らない限り、D体およびL体の両者を包含する。

【0022】本発明化合物(1)は、例えば下記一般式(2)で示される化合物(以下、化合物(2)という)と、一般式(3)で示される化合物(以下、化合物(3)という)との縮合反応により製造することができる。

【0023】

【化5】

【0024】(式中、 R^4 および R^5 は一方が水素原子で、他方が基- $(CO)_x-(CH_2)_y-COOH$ を示す。 R^3 、 x 、 y および z

は前記に同じ。)

化合物(3)は、一般的なペプチド化学合成法に従い、例えばビオチンのヒドラジドに所望のアミノ酸の1種($z=1$ の場合)または2種以上($z=2$ または3の場合)を順次縮合反応させることにより製造することができる。該縮合反応は、公知の各種縮合反応法に従うことができる。この縮合反応法は、通常の液相法および固相法を包含する。

【0025】該縮合反応法としては、例えばアジド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA(ジフェニルホスホリルアジド)法、DCC+添加物法(添加物:1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキスクシンイミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミドなど)、ウッドワード法などを例示できる。

【0026】これら各方法に利用される溶媒も、この種ペプチド縮合反応に慣用される各種の溶媒から適宜選択することができる。その例としては、例えばN-メチルピロリドン(NMP)、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)などおよびこれらの混合溶媒などを例示できる。

【0027】尚、上記縮合反応において、反応に関与しない官能基は、常法に従い通常の保護基により保護でき、これらは反応終了後に脱離できる。これら各反応方法は公知であり、それらに用いられる試薬類も公知のものから適宜選択できる。

【0028】例えば、アミノ基の保護基としては、ベンシルオキシカルボニル(Z)、第三級ブトキシカルボニル(Boc)、イソボルニルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニルなどを例示できる。

【0029】カルボキシル基の保護基としては、例えば30メチルエステル、エチルエステル、第三級ブチルエステルなどの低級アルキルエステル或いはベンジルエステルやp-メトキシベンジルエステルなどを形成し得る基を例示することができる。

【0030】アルギニンのグアニジノ基の保護基としては、例えば2,2,5,7,8-ペンタメチルクロモン-6-スルホニル(Pmc)、2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル(Pbf)、ニトロ、Z、Boc、p-トルエンスルホニルなどを例示できる。

【0031】これら保護基の脱離反応もまた慣用される40方法、例えば接触還元法、液体アンモニア/ナトリウム、フッ化水素、臭化水素、塩化水素、トルフルオロ酢酸(TFA)、酢酸、メタンスルホン酸などを用いる方法などに従い実施できる。

【0032】ビオチンのヒドラジドは、例えばZ、Boc、Troc(N-トリクロロエトキシカルボニル基)などの任意の保護基で保護されたヒドラジンとビオチンとを、上記と同様に縮合反応させ、次いで得られる化合物の保護基を脱離反応させることにより製造することができる。

【0033】化合物(3)と化合物(2)との縮合反応も、上50

記した縮合反応に準じて実施することができ、保護基の導入と脱離も同様に行うことができる。

【0034】得られる化合物(1)は、常法に従い、高速液体クロマトグラフィーなどの各種の精製手段により適宜その精製を行うことができる。

【0035】化合物(1)の利用によれば、通常の免疫測定法、例えば酵素イムノアッセイ(EIA)、酵素イムノメトリックアッセイ(ELISA)、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイなどの各種免疫分析方法によって、エストロゲン、特に 17β -エストラジオールまたはエストロンの高感度な検出、測定が可能である。

【0036】本発明免疫測定法は、本発明化合物(1)を測定系の標識体として利用することを必須とし、それ以外は、通常の各種免疫分析方法、例えば競合法、サンドイッチ法などの各種方法に従い実施することができる。

【0037】測定系の抗体は、所望により、各種の任意の固相に固定化して用いることができる。当該固相としては、この種の技術分野において慣用される各種の固相が利用できる。該固相への抗体の固定化も、特に制限はなく、通常の物理的結合および化学的結合のいずれによっても実施することができる。

【0038】本発明免疫測定法における免疫反応も特に制限はなく、通常の免疫測定法で採用されている条件、例えば、一般には 45°C 以下、通常約 $4-40^{\circ}\text{C}$ にて約0.5時間から数時間程度の条件下に実施することができる。

【0039】また、反応に使用される溶媒および反応系のpHも当該反応に悪影響を与えないものであれば特に制限されない。溶媒の例としては、例えばクエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス塩緩衝液、酢酸緩衝液などを挙げることができる。

【0040】本発明測定法は、好適には、本発明化合物(1)を標識体として用いる競合法に従い、以下の如くして実施することができる。例えば、まず、測定対象のエストロゲンに向けられた所望の抗体(抗エストロゲン抗体)を固相化してなる固相化抗体に、標識体としての本発明化合物(1)の存在下に、測定対象とするエストロゲンを含み得る検体を加えて、抗原抗体反応(競合)を行わせる。次いで、固相化抗体に結合した標識体を通常のアビジンからなる検出試薬を用いて測定する。

【0041】アビジンからなる検出試薬としては、特に制限されることなく、例えば当業界で一般に利用されている各種の標識剤で修飾したアビジンもしくはストレプトアビジンを用いることができる。

【0042】標識剤としても、特に制限されず、従来公知のものの中でも利用することができる。好ましい具体例としては、アルカリフォスファターゼ(ALP)、ペルオキシダーゼ(HRP)などの酵素類を例示することができる。これら標識剤によるアビジンの修飾は、公知の方法に従って実施できる。また、これらの修飾体は、市販品としても入手できる。

【0043】本発明の免疫測定法は、特に好ましくは、後述する実施例に記載の高感度ELISAに従って実施することができる。

【0044】本発明免疫測定法の好ましい一つの態様には、 17β -エストラジオールの免疫測定・検出法が含まれる。この方法においては、好ましくは、 R^2 が水素原子である本発明化合物(1)が測定系の標識体として利用される。また、 17β -エストラジオールに反応性を有する抗体が測定系の特異抗体として利用される。該抗体は、例えば R^5 が水素原子である化合物(2)を免疫原として利用して後述する方法に従って得ることができる。

【0045】また、本発明免疫測定法の他の好ましい一つの態様には、エストロンの免疫測定・検出法が含まれる。この方法においては、好ましくは、 R^1 が水素原子である本発明化合物(1)が測定系の標識体として利用される。また、エストロンに反応性を有する抗体が測定系の特異抗体として利用される。該抗体は、例えば R^4 が水素原子である化合物(2)を免疫原として利用して後述する方法に従って得ることができる。

【0046】本発明に従うエストロゲンの免疫測定法は、その操作などの簡便性を考慮すれば、本発明化合物(1)を有効成分として含有する測定キットを利用して実施されるのが好ましい。該測定キットは、前記したアビジンからなる検出試薬、抗エストロゲン抗体、標準抗原およびアッセイ緩衝液などの、当該検出および測定の実施に際して必要な他の試薬などを、更に含有することができる。

【0047】本発明免疫測定法は、河川、湖水、海水、排水、土壌などを被検物質として、これら環境中のエストロゲンの検出・測定に、特に有用である。また、ヒトおよび動物の組織、血液、尿、骨髄液などおよび魚類の組織、血液などを被検物質として、これらの被検物質中のエストロゲンの検出、測定などにも有用である。

【0048】本発明免疫測定法に利用される抗エストロゲン抗体は、測定対象であるエストロゲンに特異反応性を有するものであればよく、その種類に特に制限はない。この抗体には、前記した抗体或いはそれらに準じて製造される抗体が含まれる。その例としては、温血動物の抗血清、鶏卵抗体などのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を挙げることができる。

【0049】これらの抗体は、測定対象とするエストロゲンに応じて適宜選択して使用することができる。好ましい抗体の例としては、 17β -エストラジオールおよび／またはエストロンと反応性を有する抗体を挙げることができる。

【0050】エストロゲンのような低分子有機化合物を抗原として産生される抗体の力価は、一般に、ポリクローナル抗体の方がモノクローナル抗体よりも優れることが本発明者により確認されている。従って、本発明免疫測定法でもポリクローナル抗体の利用が好ましい。

【0051】ポリクローナル抗体は、免疫抗原を温血動物（ヒトを除く）に免疫することにより動物体内に産生される。免疫化の方法乃至手法は、基本的には常法に従うことができる。

【0052】免疫抗原としては、好ましくは化合物(2)とキャリア蛋白との結合体を利用することができる。

【0053】キャリア蛋白としては、抗原またはハプテンの免疫原性を高めるものとして当該分野で知られている各種キャリア蛋白を制限なく利用できる。その例としては、例えばアルブミン、グロブリン、チオグロブリン、ヘモシアニンなどの各種動物蛋白質、ポリリジンなどを挙げることができる。

【0054】これらキャリア蛋白質と化合物(2)との結合反応は、前記した縮合反応と同様にして実施される。その際用いられる試薬も慣用されるものでよい。

【0055】化合物(2)のキャリア蛋白結合体は、それ自体所望の免疫原性を有し、本発明測定法に好ましく利用し得る特異抗体の製造用免疫抗原として使用できる。

【0056】該免疫抗原としては、上記キャリア蛋白結合体を更に適当な高分子吸着体に吸着させて得られる吸着体を使用することもできる。

【0057】高分子吸着体としては、免疫原性を高めるものとして当該分野で知られている各種高分子物質を利用することができる。その例としては、例えばポリビニルピロリドン、ラテックス、ブタチオグロブリンなどの血清蛋白質、炭素末などを挙げることができる。

【0058】所望の吸着体は、これらの高分子吸着体と前記キャリア蛋白結合体とを常法に従い混和することにより得ることができる。

【0059】免疫化および所望の抗体の取得操作も、常法に従うことができる。例えば、ウサギ、ヒツジ、モルモット、ニワトリのような温血動物に、上記抗原を通常フロイントの完全アジュバントと混和して調製した乳化物を、複数回注射免疫し、得られる抗血清を常法に従い取得することにより、ポリクローナル抗体を取得できる。ニワトリを利用する場合には、上記抗原を複数回免疫して、該ニワトリが産卵する鶏卵にイムノグロブリン(IgY)を産生させ、そして該鶏卵の卵黄より、常法に従いIgYを取得することによっても、所望のポリクローナル抗体を得ることができる。

【0060】本発明測定法に利用し得る特異抗体は、モノクローナル抗体であることもできる。このモノクローナル抗体は、例えば上記抗原をフロイントの完全アジュバントとともにマウスに複数回投与して免疫化して抗体を産生させ、得られる抗体産生細胞と骨髄細胞または脾細胞とを、例えば細胞融合法などの常法に従い融合し、クローニングし、目的とする抗体を産生する単一クローン細胞を分離し、該細胞を培養することにより取得することができる。

【0061】かくして得られる各抗体は、所望により、

硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの常法に従い更に精製することができる。

【0062】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。これらの実施例は非制限的なものであり、本発明の範囲はこれらの例によって限定解釈されるべきものではない。

【0063】実施例1 抗体の製造

(1) β -エストラジオール 3-カルボキシメチル エーテル(6.3mg, 0.019mmol; Sigma社)をDMSO 100 μ Lと0.1M PBS(pH5.0)1mLに溶解し、同緩衝液1mLに溶解したキーホール・リンペット・ヘモシアニン(KLH; 20mg; Pierce Chemical Company)と混合し、水溶性カルボジイミド(10mg; ペプチド研究所)を混合し、更に水溶性カルボジイミド(178mg)を添加して、室温で30分間反応させた。

【0064】上記反応液(2mL)を50%ポリビニルピロリドン(2mL; Merck社)と混合し、更に等量のフロインドアジュバント(4mL; カルバイオケム社)を加えて乳化させた。

【0065】得られた乳化物を、家兎3匹(日本ホワイト、雄性、体重2.0-2.5kg)に、免疫抗原が2mg/家兎となるように調製して皮内注射した。追加免疫を、初回の注射量の半量の投与量にて、2週間毎に6回注射免疫を繰り返すことにより行った。最終免疫の1週間後、充分な力価の抗血清の産生を認めた後の家兎の血液を全採血した。血液を37°Cにて1時間、その後4°Cにて一夜放置し、3000rpmで遠心分離することにより抗血清を得、これを凍結乾燥した。

【0066】(2) β -エストラジオール-17-コハク酸エステル(6.3mg; Sigma社)を用いて、上記(1)と同様にして乳化物を調製した。得られた乳化物を家兎3匹に免疫抗原として1mg/家兎となるように調製して皮内注射し、上記(1)と同様にして抗血清を得た。

【0067】実施例2 ビオチン化エストラジオール誘導体の調製

(1) Boc-Arg(Z)₂-NHNH-ビオチン(保護基Z:ベンジルオキシカルボニル基)の合成

水溶性カルボジイミド(212 μ L, 1.2mmol)を、Boc-Arg *

Fab-マスペクトル: 理論値 (C₄₄H₆₈N₁₂O₈S + H)⁺:

925

(4) ビオチン化エストラジオール誘導体2: 化合物(1)(R²=水素原子、R³=アルギニン残基、x=0、y=1およびz=2)の合成

上記(3)と同様にして、目的とするビオチン化エストラジオール誘導体2を合成した。即ち、Boc-Arg(Z)₂-Arg(Z)₂-NHNH-ビオチン(20.4mg, 0.019mmol)をTFA処理後、 β -エストラジオール-3-カルボキシメチルエーテル(6.3mg, 0.019mmol)とDMF(1mL)中、水溶性カルボジイミド/

Fab-マスペクトル: 理論値 (C₄₂H₆₆N₁₂O₇S + H)⁺:

883

*(Z)₂-OH(543mg, 1.0mmol)、HOBt(162mg, 1.2mmol)およびビオチン-N₂H₃(258mg, 1.0mmol)のDMF溶液(10mL)に-10°Cで滴下し、室温で18時間攪拌後、溶媒を留去した。残渣に氷冷下に蒸留水を加えて固化し、沈殿を集めた。DMF-酢酸エチルから再結晶して、Boc-Arg(Z)₂-CONHNH-ビオチンを775mg(99.1%)で得た。

【0068】(2) Boc-Arg(Z)₂-Arg(Z)₂-NHNH-ビオチンの合成

上記(1)で調製したBoc-Arg(Z)₂-NHNH-ビオチン(352mg, 0.45mmol)をTFA(3mL)に溶解し、氷冷下に30分間攪拌後、エーテルを加えて処理して脱Boc化を行った。得られた脱Boc体を上記と同様にBoc-Arg(Z)₂-OH(293mg, 0.54mmol)と水溶性カルボジイミド(114 μ L, 0.65mmol)/HOBt(88mg, 0.65mmol)を用いてDMF(5mL)中で縮合反応させ、溶媒を留去後、残渣に氷冷下に蒸留水を加えて固化し、DMF-酢酸エチルで再結晶して、502mg(92.4%)の目的物を得た。

【0069】(3) ビオチン化エストラジオール誘導体1: 化合物(1)(R¹=水素原子、R³=アルギニン残基、x=1、y=2およびz=2)の合成

上記(2)で得たBoc-Arg(Z)₂-Arg(Z)₂-NHNH-ビオチン(65.2mg, 0.054mmol)をTFA(0.5mL)で氷冷下に30分間処理して、脱boc化を行った。得られた脱Boc体を、 β -エストラジオール-17-コハク酸エステル(20.1mg, 0.054mmol)およびHOBt(8.8mg, 0.065mmol)と共にDMF(2mL)に溶解させた後、-10°Cで水溶性カルボジイミド(11.4 μ L, 0.065mmol)を滴下し、室温で18時間攪拌後、溶媒を留去し、残渣に蒸留水を加えて固化した。DMF-酢酸エチルより再沈殿して、60mgの目的化合物(Argの保護体)を得た。

【0070】この保護体をメタノール(10mL)-50%酢酸(10mL)の混合溶媒中、10%Pd-C(10mg)の存在下に水素ガスを通じ、室温で4時間接触還元した。触媒を濾去後、濾液を凍結乾燥して、40mgの粗生成物を得た。

【0071】粗製品(40mg)を50%酢酸(2mL)に溶解後、0.1%TFA/CH₃CN混合溶媒系(75/25→60/40, 30分間)を溶出液としてカラム(YMC-PackD-ODS-5; 20×250mm)による分取用逆相HPLCで精製して、目的とする標記化合物を26mg得た。

【0072】

HOBt法により縮合反応した後、同様の後処理を行って目的化合物の保護体21mgを得た。この保護体をメタノール(5mL)-50%酢酸(5mL)の混合溶媒中、10%Pd-C(3mg)の存在下に水素ガスを通じて接触還元して、粗生成物14mgを得た。この粗製品(14mg)を50%酢酸(1.5mL)に溶解後、同様にして分取用逆相HPLCで精製して、目的とする化合物3.5mgを得た。

【0073】

実施例3 免疫測定系

(1) 本発明誘導体を標識体として用いる17 β -エストラジオールのためのELISA系を以下の通り設定した。

【0074】(1-1)試薬および材料：

〈アッセイ緩衝液〉

0.1%BSA含有PBS(-)

〈96ウェルプレート〉

ヤギ抗ウサギIgG(Fc)抗体固相化96ウェルプレート

〈標識体〉

本発明のビオチン化エストラジオール誘導体2

〈HRP標識試薬〉

ストレプトアビジンHRP (カルバイオケム社)

〈基質〉

TMB (Tetramethyl benzidine) 溶液 (シグマ社)

〈抗血清〉

RY725(実施例1の(1)で得たウサギ抗血清)

〈標準品〉

17 β -エストラジオール (シグマ社)

〈洗浄液〉

0.05% Tween 20含有生理食塩水

〈酵素反応停止液〉

2N硫酸

(1-2)ELISA手順：

(a) 96ウェルプレートの各ウェルに標準液または検体100 μ Lを分注した後、本発明ビオチン化エストラジオール誘導体からなる標識体(0.2ng/mL)50 μ Lおよび抗血清($\times$ 32000)50 μ Lを加える。

【0075】(b) 4 $^{\circ}$ Cで一晩(18-20時間)反応させる。

【0076】(c) 全ウェルを洗浄液で4回洗浄する。

【0077】(d) 室温でマイクロプレート振とう器を用いて2時間反応させる。

【0078】(e) 全ウェルを洗浄液で4回洗浄する。

【0079】(f) 基質100 μ Lを加える。

【0080】(g) 室温で20分間反応させる。

【0081】(h) 酵素反応停止液を各ウェルに100 μ L分注する。

【0082】(i) マイクロプレートオートリーダーにて450nmの吸光度を測定する。

【0083】(1-3)結果

17 β -エストラジオールELISAの標準曲線を図1に示す。

【0084】該図に示す結果より、この測定系の17 β -エストラジオール測定範囲は、1.2-5000pg/mLであった。

【0085】(2) 本発明誘導体を標識体として用いるエストロンのためのELISA系を以下の通り設定した。

【0086】(2-1)試薬および材料：

〈アッセイ緩衝液〉

0.1%BSA含有PBS(-)

〈96ウェルプレート〉

ヤギ抗ウサギIgG(Fc)抗体固相化96ウェルプレート

〈標識体〉

本発明のビオチン化エストラジオール誘導体1

〈HRP標識試薬〉

ストレプトアビジンHRP (カルバイオケム社)

〈基質〉

TMB (Tetramethyl benzidine) 溶液 (シグマ社)

〈抗血清〉

RY469(実施例1の(2)で得たウサギ抗血清)

10 〈標準品〉

エストロン (シグマ社)

〈洗浄液〉

0.05%ツイーン20含有生理食塩水

〈酵素反応停止液〉

2N硫酸

(2-2)ELISA手順：

(a) 96ウェルプレートの各ウェルに標準液または検体100 μ Lを分注した後、本発明ビオチン化エストラジオール誘導体からなる標識体(0.1ng/mL)50 μ Lおよび抗血清($\times$ 32000)50 μ Lを加える。

20 【0087】(b) 室温マイクロプレート振とう器を用いて5時間反応させる。

【0088】(c) 全ウェルを洗浄液で4回洗浄する。

【0089】(d) HRP標識試薬($\times$ 5000)100 μ Lを加える。

【0090】(e) 室温でマイクロプレート振とう器を用いて1時間反応させる。

【0091】(f) 全ウェルを洗浄液で4回洗浄する。

【0092】(g) 基質100 μ Lを加える。

【0093】(h) 室温で20分間反応させる。

【0094】(i) 酵素反応停止液を各ウェルに100 μ L分注する。

【0095】(j) マイクロプレートオートリーダーにて450nmの吸光度を測定する。

【0096】(2-3)結果

エストロンELISAの標準曲線を図2に示す。

【0097】該図2に示す結果より、この測定系のエストロン測定範囲は、1.2-20000pg/mLであった。

【0098】比較例1

(1) 実施例3の(1)において、測定系の標識体として本発明誘導体に代えて市販の標識体を利用して、以下の17 β -エストラジオールのためのELISA系を設定した。

【0099】(1-1)試薬および材料：

〈アッセイ緩衝液〉

0.1%BSA含有PBS(-)

〈96ウェルプレート〉

ヤギ抗ウサギIgG(Fc)抗体固相化96ウェルプレート

〈標識体〉

エストラジオールHRP標識試薬 (Estradiol-3-peroxidas

e labelled; コスモ社)

〈基質〉

TMB (Tetramethyl benzidine) 溶液 (シグマ社)

〈抗血清〉

RY725(実施例1の(1)で得たウサギ抗血清)

〈標準品〉

17β-エストラジオール (シグマ社)

〈洗浄液〉

0.05%ツイーン20含有生理食塩水

〈酵素反応停止液〉

2N硫酸

(1-2)ELISA手順:

(a) 96ウェルプレートの各ウェルに標準液または検体100μLを分注した後、エストラジオールHRP標識試薬からなる標識体(×100)50μLおよび抗血清(×8000)50μLを加える。

【0100】(b) 4°Cで一夜反応させる。

【0101】(c) 全ウェルを洗浄液で4回洗浄する。

【0102】(d) 基質100μLを加える。

【0103】(e) 室温で30分間反応させる。

【0104】(f) 酵素反応停止液を各ウェルに100μL分注する。

【0105】(g) マイクロプレートオートリーダーにて450nmの吸光度を測定する。

【0106】(1-3)結果17β-エストラジオールELISAの標準曲線を図3に示す。

【0107】該図3に示す結果より、この測定系の17β-エストラジオール測定範囲は、19.5-5000pg/mLであった。

【0108】(2) 実施例3の(2)において、測定系の標識体として本発明誘導体に代えて市販の標識体を利用して、以下のエストロンのためのELISA系を設定した。

【0109】(2-1)試薬および材料:

〈アッセイ緩衝液〉

0.1%BSA含有PBS(-)

〈96ウェルプレート〉

ヤギ抗ウサギIgG(Fc)抗体固相化96ウェルプレート

〈標識体〉

エストラジオールHRP標識試薬(Estradiol-17-peroxidase labeled;シグマ社)

〈基質〉

TMB (Tetramethyl benzidine) 溶液 (シグマ社)

〈抗血清〉

RY469(実施例1の(2)で得たウサギ抗血清)

〈標準品〉

エストロン (シグマ社)

〈洗浄液〉

0.05%ツイーン20含有生理食塩水

〈酵素反応停止液〉

2N硫酸

(2-2)ELISA手順:

10 (a) 96ウェルプレートの各ウェルに標準液または検体100μLを分注した後、エストラジオールHRP標識試薬からなる標識体(0.25μg/mL)50μLおよび抗血清(×32000)50μLを加える。

【0110】(b) 室温マイクロプレート振とう器を用いて5時間反応させる。

【0111】(c) 全ウェルを洗浄液で4回洗浄する。

【0112】(d) 基質100μLを加える。

【0113】(e) 室温で20分間反応させる。

20 【0114】(f) 酵素反応停止液を各ウェルに100μL分注する。

【0115】(g) マイクロプレートオートリーダーにて450nmの吸光度を測定する。

【0116】(2-3)結果

エストロンELISAの標準曲線を図4に示す。

【0117】該図4に示す結果より、この測定系のエストロン測定範囲は、4.8-20000pg/mLであった。

【0118】実施例4 17β-エストラジオールELISA系の交差反応性試験

実施例3の(1)において、標準品として用いた17β-エストラジオール (シグマ社) に代えて、下記表1に示す各エストロゲンを用いて、同様にしてELISAを繰り返して、標準曲線を作成した (図5参照)。

【0119】得られた各エストロゲンの標準曲線と、実施例3の(1)で作成した17β-エストラジオールの標準曲線とを利用して、この測定系における17β-エストラジオールと抗血清との反応性を100%としたときの、各エストロゲンと抗血清との反応性 (17β-エストラジオールとの交差反応性) を求めた。その結果を下記表1に示す。

40 【0120】

【表1】

エストロゲン	交差反応性(%)
17 β -エストラジオール	100.00
テストステロン	0.28
エストロン	0.94
プロゲステロン	0.01
d-アルドステロン	0.00
エストリオール	0.16
(+)-4-アンドロステロン-3,17-ジオン	0.02
トランス-アンドロステロン	0.02
メストラノール	0.14
エチニルエストラジオール	0.03
2-メトキシエストラジオール	1.79
ヘキサエストロール	0.00
β -エストラジオール 17-(β -D-グルクロニド)	0.00
β -エストラジオール 3-グルクロニド 17-サルフェート	0.02
β -エストラジオール 3-(β -D-グルクロニド)	37.44
β -エストラジオール 3-サルフェート	11.05
β -エストラジオール 3-サルフェート 17-グルクロニド	0.00
β -エストラジオール 3,7-ジサルフェート	0.00

【0121】実施例5 エストロンELISA系の交差反応性試験

実施例3の(2)において、標準品として用いたエストロン（シグマ社）に代えて、下記表1に示す各エストロゲンを用いて、同様にしてELISAを繰り返して、標準曲線を作成した（図6参照）。

【0122】得られた各エストロゲンの標準曲線と、実*

*実施例3の(2)で作成したエストロンの標準曲線とを利用して、この測定系におけるエストロンと抗血清との反応性を100%としたときの、各エストロゲンと抗血清との反応性（エストロンとの交差反応性）を求めた。その結果を下記表2に示す。

【0123】

【表2】

エストロゲン	交差反応性(%)
エストロン	100.00
17 β -エストラジオール	33.33
エストリオール	0.15
ビスフェノールA	<0.001
ノニルフェノール	<0.001
モノブチルフタレート	<0.001
カテキン	<0.001
エピカテキン ガレート	<0.001

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例3の(1)に従い作成された本発明免疫測定法における標準曲線である。

【図2】実施例2の(2)に従い作成された本発明免疫測定法における標準曲線である。

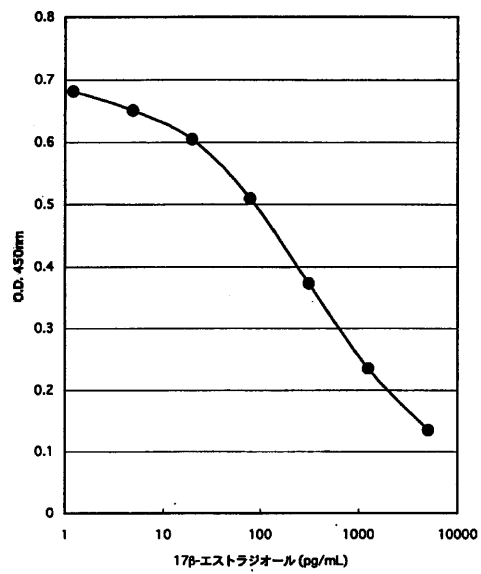
【図3】比較例1の(1)に従い作成された比較免疫測定法における標準曲線である。

【図4】比較例1の(2)に従い作成された比較免疫測定法における標準曲線である。

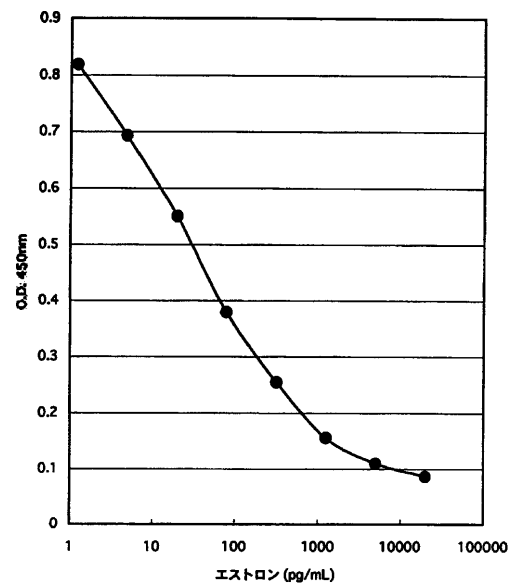
【図5】実施例4に従う交差反応性試験における各エストロゲンと抗血清との反応性を示すグラフである。

【図6】実施例5に従う交差反応性試験における各エストロゲンと抗血清との反応性を示すグラフである。

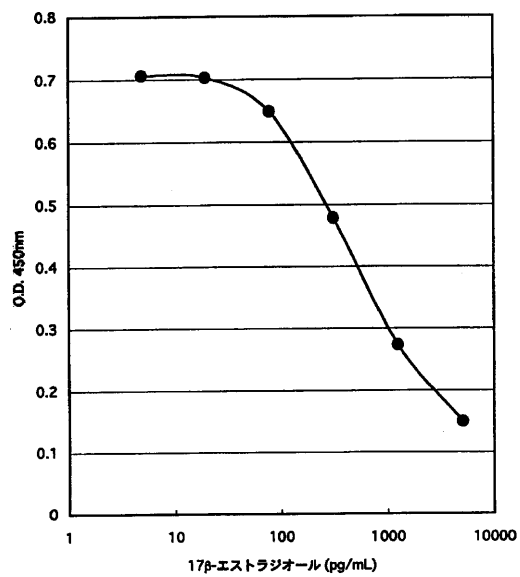
【図1】



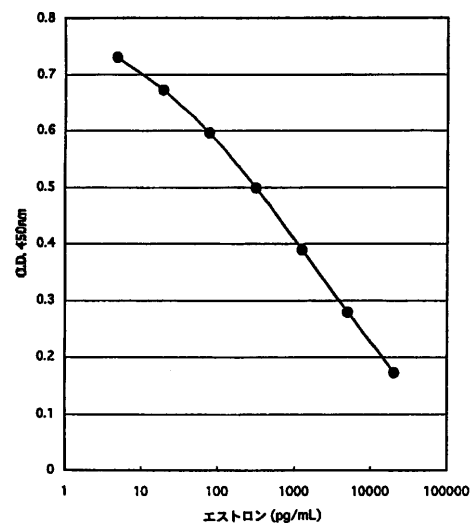
【図2】



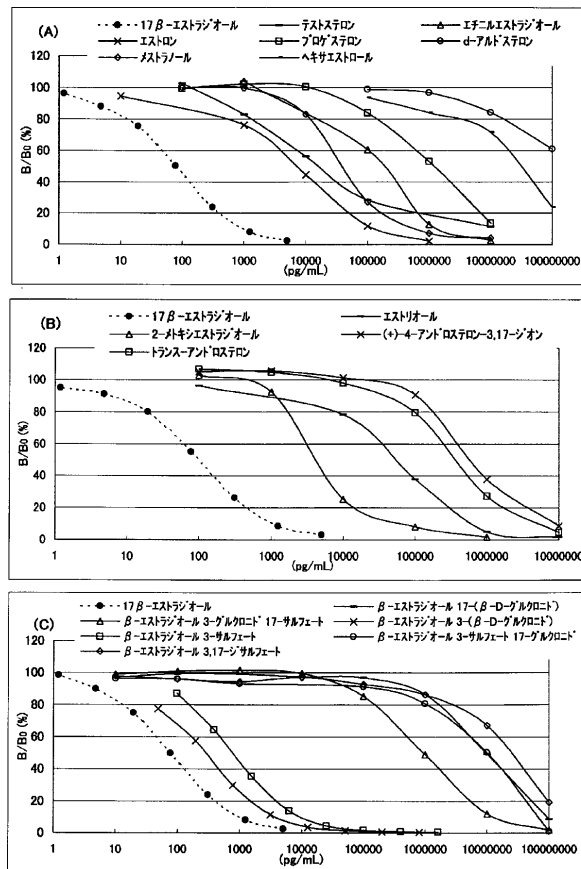
【図3】



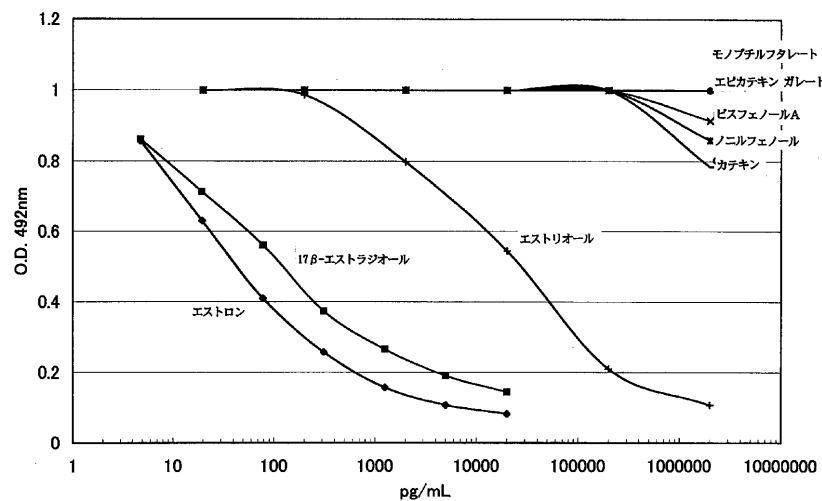
【図4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(72)発明者 北村 和之
静岡県富士宮市万野原新田3289-13 ファ
ミールC201

(72)発明者 小平 司
徳島県板野郡松茂町広島字南川向56-7

Fターム(参考) 4C091 AA01 BB03 BB04 BB07 CC03
DD01 EE04 EE05 FF01 GG01
HH01 JJ01 KK01 LL01 MM03
NN01 PA09 QQ01

专利名称(译)	雌二醇衍生物和使用其的测定方法		
公开(公告)号	JP2002097197A	公开(公告)日	2002-04-02
申请号	JP2001215260	申请日	2001-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社 矢内原研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社 矢内原研究所 大冢制药有限公司		
[标]发明人	矢内原 昇 加藤 郁夫 北村 和之 小平 司		
发明人	矢内原 昇 加藤 郁夫 北村 和之 小平 司		
IPC分类号	G01N33/53 C07J51/00		
FI分类号	C07J51/00 G01N33/53.A		
F-TERM分类号	4C091/AA01 4C091/BB03 4C091/BB04 4C091/BB07 4C091/CC03 4C091/DD01 4C091/EE04 4C091/EE05 4C091/FF01 4C091/GG01 4C091/HH01 4C091/JJ01 4C091/KK01 4C091/LL01 4C091/MM03 4C091/NN01 4C091/PA09 4C091/QQ01		
优先权	2000217314 2000-07-18 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为雌激素提供高灵敏度的免疫分析。解决方案：该方法是对雌激素的高灵敏度免疫测定，包括使用通式(1)的生物素化雌二醇衍生物作为标记物(其中，R1和R2使得其中一个为H，另一个为其中的一组。通式(2)；在该组中，R3是精氨酸残基或赖氨酸残基；x是0或1的整数；y是1-5的整数；并且z是1-3的整数)。

