

(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2009-510415

(P2009-510415A)

(43) 公表日 平成21年3月12日(2009.3.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	H

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2008-532657 (P2008-532657)  
 (86) (22) 出願日 平成18年9月27日 (2006. 9. 27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年3月27日 (2008. 3. 27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/009361  
 (87) 国際公開番号 W02007/039194  
 (87) 国際公開日 平成19年4月12日 (2007. 4. 12)  
 (31) 優先権主張番号 05021246.3  
 (32) 優先日 平成17年9月29日 (2005. 9. 29)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

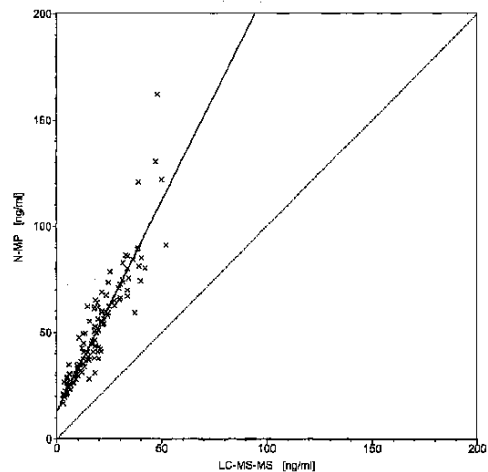
(71) 出願人 591003013  
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  
 F. HOFFMANN-LA ROCH  
 E AKTIENGESELLSCHAFT  
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  
 グレンツァーヘルストラッセ124  
 (74) 代理人 100095832  
 弁理士 細田 芳徳  
 (72) 発明者 キリアトソウリス, アポストロス  
 ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム 82  
 362, シュヴァタッヒヴェーク 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビタミンD化合物のための放出試薬

(57) 【要約】

本発明は、ビタミンD結合タンパク質に結合されたビタミンD化合物を放出させるための試薬組成物、この試薬を用いて25-ヒドロキシビタミンD化合物がビタミンD結合タンパク質から放出され、このようにして得られる混合物が解析される、25-ヒドロキシビタミンD化合物の検出のための方法、ビタミンD化合物を放出させるための試薬の使用、ならびに通常の免疫学的試薬に加えてビタミンD化合物を放出させるための試薬を含む25-ヒドロキシビタミンDを検出するためのキットに関する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

3.8~4.8のpH値を有し、ジメチルスルホキシド(DMSO)および液体有機アミドを含む群より選択される5~30容量%の1つ以上の両親媒性試薬、ならびに任意に0.7~8容量%の短鎖(C1~C3)アルコールを含む、ビタミンDを放出するための試薬組成物。

**【請求項 2】**

両親媒性試薬としてジメチルホルムアミド(DMF)、N,N-ジメチルアセトアミド、テトラメチル尿素(TMU)、N-メチルピロリドン(N-MP)、1,3-ジメチル-3,4,5,6-テトラヒドロ-2(1H)-ピリミドン(DMPU)およびヘキサメチルホスホン酸トリアミド(HMPT)を使用することを特徴とする、請求項1記載の試薬組成物。

10

**【請求項 3】**

7~20容量%の両親媒性試薬が存在することを特徴とする、請求項1または2記載の試薬組成物。

**【請求項 4】**

短鎖アルコールとしてエタノールが存在することを特徴とする、請求項1~3いずれか記載の試薬組成物。

**【請求項 5】**

a) 試験される試料とビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させる試薬を混合し、3.8~4.8のpH値を有し、ジメチルスルホキシド(DMSO)および液体有機アミドからなる群より選択される5~20容量%の1つ以上の両親媒性試薬、ならびに任意に0.5~5容量%の短鎖(C1~C3)アルコールを含む混合物を形成する工程、

20

b) a)の混合物の免疫学的分析

を含む、25-ヒドロキシビタミンD化合物の免疫学的検出方法。

**【請求項 6】**

25-ヒドロキシビタミンD化合物が25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>、1.25-ジヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および1.25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>から選択される、請求項5記載の方法。

**【請求項 7】**

25-ヒドロキシビタミンD化合物、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>が測定される、請求項5記載の方法。

30

**【請求項 8】**

ビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させるための、請求項1~4いずれか記載の試薬組成物の使用。

**【請求項 9】**

放出が、ビタミンD結合タンパク質の表現型に非依存的である、ビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させるための、請求項1~4いずれか記載の試薬組成物の使用。

**【請求項 10】**

請求項1~4いずれか記載の試薬組成物をさらに含むことを特徴とする、少なくとも25-ヒドロキシビタミンD化合物の免疫学的検出のための成分を含む、25-ヒドロキシビタミンDの検出のためのキット。

40

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****(背景情報)**

本発明は、ビタミンD結合タンパク質に結合されたビタミンD化合物を放出させるための試薬組成物、この試薬の使用によって25-ヒドロキシビタミンD化合物がビタミンD結合タンパク質から放出され、このようにして得られる混合物が解析される25-ヒドロキシビタミンD化合物を検出するための方法に関する。また、本発明は、ビタミンD化合物を放出させる試薬の使用、一般的な免疫学的試薬に加えてビタミンD化合物を放出させる試薬を含

50

む、25-ヒドロキシビタミンDを検出するためのキットに関する。

【0002】

ビタミンDの十分な供給は、用語「ビタミン」が既に示すように、生命維持に必要である。ビタミンDの欠乏は、くる病または骨粗鬆症などの重篤な疾患をもたらす。ビタミンDは、前世紀の初めは依然として単独の物質とみなされていたが、ここ30年の間に、ビタミンD系は、ビタミンD代謝産物の複雑で種々のネットワークに変化した。現在、40を超える異なるビタミンD代謝産物が知られている(Zerwekh, J.E., Ann. Clin. Biochem. 41 (2004) 272-281)。

【0003】

人間は、皮膚上で日光からの紫外線の作用によりD<sub>3</sub>ビタミン類またはカルシフェロールのみ生産することができる。皮膚で生産されたビタミンD<sub>3</sub>は、これを肝臓に輸送するいわゆるビタミンD結合タンパク質に結合し、そこで、25-ヒドロキシル化によって25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>に変換される。現在、既に述べた2つの器官である皮膚および肝臓に加えて数多くの他の組織がビタミンD代謝に関与することが知られている(Schmidt-Gayk, H. et al. (編), "Calcium regulating hormones, ビタミンD代謝産物 and cyclic AMP", Springer Verlag, Heidelberg (1990), pp.24-47を参照)。25-ヒドロキシビタミンDおよびより詳しくは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>は、その量に関してヒト生体におけるビタミン-Dの主要な貯蔵形態である。必要な場合、これらの前駆体は腎臓で変換され、生物学的に活性な1,25-ジヒドロキシビタミンD、いわゆるDホルモンが形成され得る。生物学的に活性なビタミンDは、とりわけ、腸からのカルシウム摂取、骨鈣化作用を調節し、例えばインスリン系などの多数の他の代謝経路に影響する。

【0004】

患者のビタミンD状態を調べる場合、ビタミンDレベル自体を測定することは、ビタミンD(ビタミンD<sub>2</sub>およびビタミンD<sub>3</sub>)の濃度が食物摂取に応じて大きく変動するためほとんど利益はない。また、ビタミンDは、循環系において比較的短い生物学的半減期(24時間)を有し、したがって、この理由によっても、患者のビタミンD状態の測定のために適当なパラメータではない。また、同じことがビタミンDの生理学的に活性な形態(1,25-ジヒドロキシビタミンD)に当てはまる。これらの生物学的活性形態はまた、25-ヒドロキシビタミンDと比べ、比較的小さく高度に変動する濃度で生じる。これらのすべての理由のため、25-ヒドロキシビタミンDの定量は特に、患者の全体的なビタミンD状態を包括的に解析するのに適当な手段である。

【0005】

ビタミンD結合タンパク質への25-ヒドロキシビタミンDまたは他のビタミンD化合物の結合により、ビタミンD化合物の測定が非常に複雑になる。すべての公知の方法は、結合タンパク質と形成された複合体から解析されるビタミンD化合物を放出させるか、または脱離させることを必要とする。以下において、これを、簡略化のため、ビタミンD結合タンパク質からのビタミンD化合物の放出というが、もちろん、これは、ビタミンD化合物およびビタミンD結合タンパク質の複合体からだけでなく、ビタミンD結合タンパク質単独からも放出され得る。

【0006】

ビタミンD結合タンパク質は、正確にリフォールディングする傾向が大きいいため、しばしば、まずビタミンD化合物を放出させ、次いで、解析されるビタミンD化合物からビタミンD結合タンパク質を分離することが必要である。

【0007】

25-ヒドロキシビタミンDの高い臨床的重要性のため、25-ヒドロキシビタミンDがいくぶん確実に測定されることを可能にする多数の方法が文献から知られている。

【0008】

例えば、Haddad, J.G. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 33 (1971) 992-995およびEisman, J.A. et al., Anal. Biochem. 80 (1977) 298-305は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)を用いた血液試料中の25-ヒドロキシビタミンD濃度の測定を記載している

。

## 【0009】

25-ヒドロキシビタミンDの測定のための他のアプローチは、とりわけ、乳汁中に存在するものなどのビタミンD結合タンパク質の使用に基づく。したがって、Holick, M.F.およびRay, R. (US 5,981,779)ならびにDeLuca et al. (EP 0 583 945)は、ヒドロキシビタミンDおよびジヒドロキシビタミンDに関するビタミンDアッセイを記載しており、該アッセイはこれらの物質のビタミンD結合タンパク質への結合に基づき、この場合、これらの物質の濃度は、競合試験手順によって測定される。しかしながら、この方法の必要条件は、測定されるビタミンD代謝産物を、まず、元の血液または血清試料から単離しなければならず、例えばクロマトグラフィーによって精製しなければならないことである。

10

## 【0010】

Armbruster, F.P. et al. (WO 99/67211)は、エタノール沈殿によるビタミンD測定のために血清または血漿試料を調製すべきであることを教示する。この方法では、タンパク質沈殿物は遠心分離によって除去され、エタノール上清みは可溶性ビタミンD代謝産物を含む。これらは、競合的結合アッセイにおいて測定され得る。

## 【0011】

あるいは、EP 0 753 743は、タンパク質は、過ヨウ素酸塩を用いて血液または血清試料から分離され得ることを教示する。この場合、ビタミンD化合物は、過ヨウ素酸塩で処理した試料由来のタンパク質無含有上清み中で測定される。いくつかの市販の試験では、血清または血漿試料の抽出にアセトニトリルが推奨される(例えば、DiaSorinのラジオイム

20

## 【0012】

近年、原理的には試料中に存在する結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させるのに適するいくつかの異なる放出試薬が提案された。しかしながら、この放出または脱離は、比較的穏やかな条件下で行なうべきであり、したがって、結合試験において放出試薬で処理した試料の直接使用が可能になる(例えば、WO 02/57797およびUS 2004/0132104を参照)。近年の莫大な努力にもかかわらず、ビタミンDの測定に利用可能なすべての方法は、面倒な試料調製、不十分な標準化、試験手順間の不十分な一致または強化(spiked)ビタミンDの不良な回収などの不都合点を有する(これについては、特に、上記のZerwekh, J.E.を参照)。

30

## 【0013】

ビタミンD化合物のための試験を自動化することは特に困難である。自動化は、非常に困難な問題の解決、すなわち、綱渡りを成功させるようなこと(surviving a tightrope walk)を必要とする。一方において、適当な放出試薬の補助によりビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させることが必要であり、他方において、条件は、試料が直接さらに解析され得るように選択されなければならない。この直接のさらなる解析の必要条件は、一方において、ビタミンD結合タンパク質は、この解析中、ビタミンD化合物に結合しないか、またはもはや有意な程度で結合せず、したがって、この解析を妨害しないことであり、他方において、使用される放出試薬は、検査されるビタミンD結合タンパク質への抗体などの検出試薬の結合を妨害しないことである。また、生化学的に異なったふるまいをするヒト集団にはビタミンD結合タンパク質の異なる対立遺伝子が存在することが知られている。ビタミンD化合物の放出および測定は、種々の対立遺伝子/表現型で同等であるべきである。

40

## 【0014】

したがって、本発明の目的は、従来技術の問題を少なくとも一部解決し得るビタミンD化合物、特にヒドロキシビタミンD化合物のための放出試薬を開発することであった。ビタミンD化合物を放出させるのに適当な試薬組成物、25-ヒドロキシビタミンD化合物を測定するための方法、この試薬組成物を用いた25-ヒドロキシビタミンD化合物の測定のための試薬組成物およびキットの使用が以下に記載され、添付の特許請求の範囲に包含される。

。

50

## 【0015】

(発明の要旨)

本発明は、3.8~4.8のpH値を有し、ジメチルスルホキシド(DMSO)および液体有機アミドを含む群から選択される1種類以上の両親媒性試薬を5~30容量パーセントならびに任意に短鎖(C1~C3)アルコールを0.7~8容量パーセントを含む、ビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させるための試薬組成物に関する。

## 【0016】

さらに、本発明は、a) 検査される試料を、ビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させる試薬と混合し、3.8~4.8のpH値を有し、ジメチルスルホキシド(DMSO)および液体有機アミドを含む群から選択される1種類以上の両親媒性試薬を5~20容量パーセントならびに任意に短鎖(C1~C3)アルコールを0.5~5容量パーセントを含む混合物をもたらし工程、およびb) a)の混合物の免疫学的解析工程を含む、25-ヒドロキシビタミンD化合物の免疫学的検出のための方法に関する。

10

## 【0017】

また、ビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させるために、どのようにして本発明の試薬組成物が使用され得るかが記載される。

## 【0018】

また、試験手順に必要な試薬、およびビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させる本発明による試薬組成物を含む25-ヒドロキシビタミンDを検出するためのキットが開示される。

20

## 【0019】

(詳細説明)

第1の好ましい態様において、本発明は、3.8~4.8のpH値を有し、ジメチルスルホキシド(DMSO)および液体有機アミドを含む群から選択される1種類以上の試薬を5~30容量パーセントならびに任意に短鎖(C1~C3)アルコールを0.7~8容量パーセントを含む、ビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させるための試薬組成物に関する。

## 【0020】

液体有機アミドは、20℃の温度で液体であるすべての有機アミドである。好ましい有機アミドは、ジメチルホルムアミド(DMF)、メチルエチルホルムアミド、N-メチルピロリドン(N-MP)、N,N-ジメチルアセトアミド、テトラメチル-尿素(TMU)、1,3-ジメチル-3,4,5,6-テトラヒドロ-2(1H)-ピリミドン(DMPU)およびヘキサメチルリン酸トリアミド(HMPT)である。

30

## 【0021】

ビタミンD放出試薬のために本発明に従って使用され得る化学物質の群は、両親媒性化合物であるという共通の特徴を有する。ビタミンDを放出させるための試薬組成物は、より好ましくは、7~20%の前記両親媒性試薬を含む。

## 【0022】

放出試薬は、好ましくは、DMSO、DMF、N-MPおよび/またはDMPUを含む。

## 【0023】

原則として、例えば、数種類の液体アミドからなる上記に特定した数種類の両親媒性試薬混合物が本発明による試薬組成物中に存在し得る。好ましくは上記の両親媒性試薬の3種類のみ、より好ましくは2種類のみ、また好ましくは1種類のみが使用される。

40

## 【0024】

また、本発明による試薬組成物のpHは、pH3.8~pH4.6、より好ましくはpH3.9~pH4.5、また好ましくはpH4.0~pH4.5であることが好ましい。

## 【0025】

上記のように、放出試薬は、0.7~7容量パーセントの短鎖(C1~C3)アルコールをさらに含み得る。それは、かかる短鎖アルコールもまた放出試薬中に存在する場合、好都合であることが証明された。短鎖アルコールの割合は、好ましくは0.8~5容量パーセントである。

50

## 【0026】

本発明の意味における短鎖アルコールは、メタノール、エタノール、プロパノールおよびイソプロパノールである。エタノールは、短鎖アルコールとして特に適当であることが証明され、したがって、より好ましい。

## 【0027】

ビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させるための好ましい試薬組成物は、3.8~4.8のpH値を有し、ジメチルスルホキシド(DMSO)および液体有機アミドを含む群から選択される1種類以上の試薬を5~30容量パーセントならびに短鎖(C1~C3)アルコールを0.7~8容量パーセントを含む。

## 【0028】

ビタミンD自体は例外として、ビタミンD代謝由来の他の公知の化合物は、ビタミンD結合タンパク質に結合する。ビタミンD結合タンパク質をコードする遺伝子は、ヒト集団において異なる対立遺伝子の形態で生じる。これらの対立遺伝子にコードされるポリペプチドは生化学的に異なる、すなわち、これらは異なる表現型をもたらすことが知られている。これらの生化学的な差はまた、ビタミンD化合物の結合および放出に影響する。本発明による試薬組成物は、ビタミンD結合タンパク質の表現型とは無関係にビタミンD化合物を放出させるのに適当である。したがって、本発明の好ましい態様は、ビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させるため、または、上記で説明したように、ビタミンD結合タンパク質およびビタミンD化合物の複合体からビタミンD化合物を放出させるための本発明による試薬組成物の使用である。

## 【0029】

本発明による試薬組成物は、異なる表現型のビタミンD結合タンパク質を含むか、または含み得る試料中のビタミンD化合物を放出させるためのさらに好ましく使用される。

## 【0030】

ビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させる目的のため、本発明による試薬組成物は、試料(好ましくは、血清または血漿)と混合される。試料に対する放出試薬の混合比は、好ましくは10:1~1:10である。

## 【0031】

さらに、約1/3~3容量部、より好ましくは1/2~2容量部の放出試薬を1容量部の試料と混合することが好ましい。

## 【0032】

緩衝液組成および濃度は、ビタミンDのための免疫学的物質とのインキュベーション中、両親媒性試薬の特定のpH範囲および所望の濃度が調整されるように当業者によって選択される。本発明による試薬組成物は、好ましくは20mM~400mMの緩衝液部分を含む。この緩衝液部分は、特に好ましくは、30mM~350mMまたは50mM~300mMである。

## 【0033】

また、本発明は、a) 検査される試料を、ビタミンD結合タンパク質から検出されるビタミンD化合物を放出させる試薬と混合し、3.8~4.8のpH値を有し、ジメチルスルホキシド(DMSO)および液体有機アミドを含む群から選択される1種類以上の両親媒性試薬を5~20容量パーセントならびに任意に短鎖(C1~C3)アルコールを0.5~5容量パーセントを含む混合物をもたらす工程、およびb) a)の混合物の免疫学的解析工程を含む、25-ヒドロキシビタミンD化合物の免疫学的検出のための方法に関する。

## 【0034】

本発明による25-ヒドロキシビタミンD化合物の免疫学的検出には、試料由来の25-ヒドロキシビタミンD化合物(=解析物)を免疫学的物質とともに、該混合物について上記した条件下でインキュベートすることが必須である。このインキュベーション中、pHは特に好ましくはpH4.0~pH4.5である。本発明に従って選択される両親媒性試薬の濃度は、免疫学的試薬との解析物のインキュベーション中、好ましくは7~15容量パーセント、より好ましくは8~12容量パーセントである。短鎖アルコールは、免疫学的試薬との前記インキュベーション中、好ましくは0.7~1.5容量パーセント、より好ましくは0.8~1.2容量パーセン

10

20

30

40

50

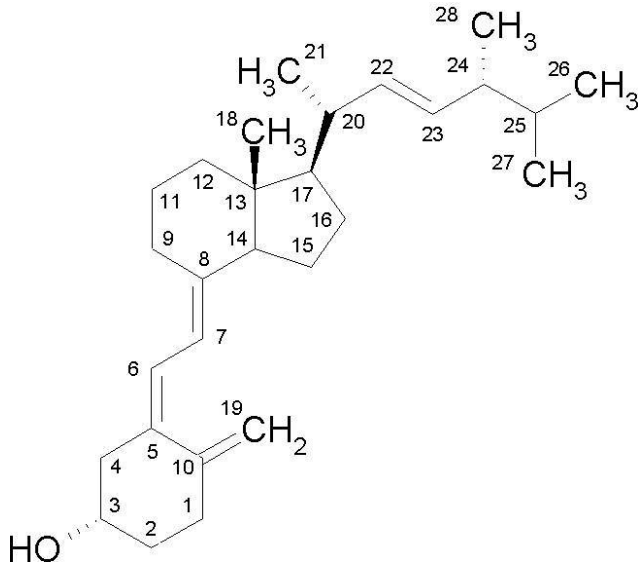
トの濃度で存在する。

【 0 0 3 5 】

特に記載のない限り、用語「ビタミンD化合物」は、以下の構造式IおよびIIによるビタミンD<sub>2</sub>の主鎖またはビタミンD<sub>3</sub>の主鎖を含むすべての化合物を含むと理解されたい。

【 0 0 3 6 】

式I

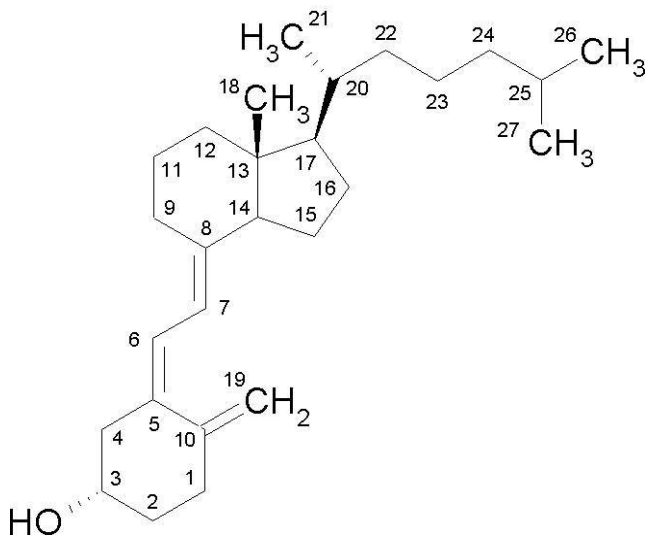


10

20

【 0 0 3 7 】

式II



30

【 0 0 3 8 】

構造式IおよびIIにおいて、ビタミンDの位置はステロイド命名法に従って記載する。25-ヒドロキシビタミンDは、構造式IおよびIIの25位がヒドロキシル化されたビタミンD代謝産物、すなわち、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>を表す。さらなる25-ヒドロキシビタミンD化合物は、1,25および24,25-ジヒドロキシビタミンD形態である。

40

【 0 0 3 9 】

1,25-ジヒドロキシビタミンDは、構造式IおよびIIの1位および25位にヒドロキシル化を有するビタミンDの活性形態(いわゆるDホルモン)をいう。

【 0 0 4 0 】

他の既知のビタミンD代謝産物は、24-、25-ジヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および24,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>である。

【 0 0 4 1 】

50

ビタミンD化合物の免疫学的検出は、好ましくは、25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>、1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>を含む群から選択される少なくとも1種類の25-ヒドロキシビタミンD化合物が検出されるように行なわれる。

【0042】

既に上記のように、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>は、診断用のビタミンDの特に重要な形態である。本発明による方法では、25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および/または25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>の検出が好ましい。

【0043】

原則として、1種類以上の25-ヒドロキシビタミンD化合物に結合する抗体または他の特異的結合ポリペプチドなどのすべてのタンパク質性結合パートナーが免疫学的物質として使用され得る。25-ヒドロキシビタミンD化合物の検出のための上記の方法における使用のための必要条件は、検査される25-ヒドロキシビタミンD化合物への結合が選択されたインキュベーション条件下で生じることだけである。

【0044】

用語抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fab断片、F(ab)<sub>2</sub>断片または単鎖抗体などのこれらの抗体の抗原結合断片を意味する。特異的結合ポリペプチドは、特に、ファージディスプレイMcCafferty, J. et al., Nature 348 (1990) 552-554、組換えDNA技術(US 4,816,567)によって、またはリコンビナトリアル抗体ライブラリー(Larri ck, J.W.およびFry, K.E. Hum. Antibod. Hybridomas, 2 (1991) 172-189) から得られ得るものなどの結合パートナーである。従来の様式で作製されるポリクローナルもしくはモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用することが好ましい。

【0045】

すべての公知のビタミンD代謝産物は、したがって免疫原性ではない。ビタミンD代謝由来の成分の化学的活性化およびその担体分子またはレポーター基へのカップリングは、些細なことではない。したがって、成功する免疫のためには、例えばハプテンとして25-ヒドロキシビタミンDを含むコンジュゲートを作製することが必須である。用語ハプテンは、当業者により、それ自体では免疫原性ではないが、より大きな担体分子とカップリングさせることにより、これに対して抗体が生じ得る形態で存在する物質である理解される。ハプテンコンジュゲートの作製に適切な担体物質は当業者に公知である。ウシ血清アルブミン、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼまたはいわゆるキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)が通常担体物質として使用される。

【0046】

式IおよびIIに示す構造の種々の位置が、原理的に、活性化および担体物質のカップリングに相当である。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3位を介したカップリングは、例えば、適当な様式で25-ヒドロキシビタミンDに結合する抗体の作製に有利なことが示されている。

【0047】

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>に結合する抗体の作製方法を実施例に詳細に記載する。

【0048】

本発明による試薬組成物は、25-ヒドロキシビタミンD化合物のための自動化された試験における使用に相当であることが示された。本発明は、好ましくは、特に25-ヒドロキシビタミンD化合物の測定のための免疫学的試験におけるビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させるための本発明による試薬組成物の使用に関する。

【0049】

25-ヒドロキシビタミンDのための試験は、好ましくは完全に自動化される。この場合の完全に自動化されるとは、実験者は試料を自動解析装置に配置するだけでよく、すべてのさらなる工程は、解析装置によって自動的に行なわれることを意味する。完全に自動化された試験は、特に好ましくは、Roche Diagnosticsの自動化Elecsys(登録商標)解析装置で

10

20

30

40

50

行なわれる。

【0050】

本発明による試薬組成物は、好ましくは、25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および/または25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>の検出のための方法において使用される。

【0051】

試験は、好ましくは、本発明による試薬組成物がいわゆる試料緩衝液として使用される、すなわち、試料が本発明による試薬組成物と混合される競合的イムノアッセイとして行なわれる。かかる競合試験では、試験物に規定の量で添加されるビタミンD化合物は、検出抗体の結合部位に関して試料物由来の対応するビタミンD化合物と競合する。試料中に存在するビタミンD化合物が多いほど、検出シグナルは少ない。

10

【0052】

25-ヒドロキシビタミンD化合物の免疫学的検出のための方法は、本発明の知識に基づいて、種々の様式で行なわれ得る。

【0053】

例えば、好ましい様式では、試料をまず本発明による試薬組成物と混合し、さらなる試験成分を添加する前にインキュベートする。

【0054】

また、好ましい様式では、試料、本発明による試薬組成物および免疫学的物質を直接一緒に混合し、続いてインキュベーションを行なう。

【0055】

また、本発明による試薬組成物が既に免疫学的物質を含むことも可能であり好ましい。これは、この態様において、本発明による試薬組成物がさらに好ましくは、25-ヒドロキシビタミンDに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体を含むことを意味する。

20

【0056】

多くの市販の試験システムは、アビジンまたはストレプトアビジン(SA)でコーティングされた固相、例えば、SAコーティングマイクロタイタープレートまたはSAコーティングラテックスの使用に基づいている。

【0057】

ビオチン化された解析物の誘導体は、例えば、試験手順の前または手順中に、このSA固相に結合される。25-ヒドロキシビタミンDを検出する場合、これは、例えば、ビオチン化25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>および/またはビオチン化25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>であり得る。SAコーティング固相を使用する場合、試料、本発明による試薬組成物、ビオチン化25-ヒドロキシビタミンD誘導体および免疫学的物質と一緒に混合してインキュベートすることが可能であり好ましい。

30

【0058】

本発明の教示によれば、当業者は、ビタミンD化合物の検出に必要とされるすべての成分を含む試験キットを作製することが可能である。特に、ビタミンD化合物の検出のための好ましい試験キットは、ビタミンD化合物に対する抗体に加えて、かかるキットが、3.8~4.8のpH値を有し、ジメチルスルホキシド(DMSO)および液体有機アミドを含む群から選択される1種類以上の両親媒性試薬を5~30容量パーセントならびに任意に短鎖(C1~C3)アルコールを0.7~8容量パーセントを含む試薬組成物を備えることを特徴とする。

40

【0059】

本発明は、以下の実施例および図面によってさらに明らかにされる。実際の保護範囲は、本発明に添付された特許請求の範囲からもたらされる。

【0060】

実施例 1

25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>-3-ヘミスクシネート-KLHの合成

この合成のために、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>を3位(式II参照)で化学的に活性化し、免疫原支持体としてKLHに結合させた。この合成を、中間工程25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>-3-ヘミスクシネートおよび25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>-3-ヘミスクシネート-N-ヒドロキシス

50

クシニミドエステルを介して行なった。

【 0 0 6 1 】

1.1 25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>-3-ヘミスクシネートの調製

10mg (25 μmol) 25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, No. H-4014) を、1mlの無水ピリジンに溶解して、室温、暗室下で4日間、125mg (1.25mmol) の無水コハク酸と共に攪拌する。反応混合物を10mlの酢酸エチルに溶解してそれぞれの場合において、2x10mlの水、0.1M塩酸およびその後再び水で洗浄する。約1gの無水硫酸ナトリウムを用いて有機相を乾燥させて濾過して、真空下で溶媒を除去する。残りの固体を高真空下で乾燥させる。10.5mg (収率84%) の無色の固形物を得る。

【 0 0 6 2 】

1.2 25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>-3-ヘミスクシネート-N-ヒドロキシスクシニミドエステルの調製

10.0mg (20 μmol) の25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>-3-ヘミスクシネートを7mlの無水ジクロロメタンに溶解し、2.76mg (24 μmol) のN-ヒドロキシ-スクシニミドおよび3.72mg (24 μmol) N(3-ジメチルアミノプロピル)-N-エチル-カルボジイミド (EDC) と混合する。アルゴン下で一晩攪拌して、次いで有機相を10mlの水で2度洗浄し、約1gの無水硫酸ナトリウムで乾燥させ濾過する。真空下で溶媒を除去し、残りの反応生成物を高真空下で3時間、乾燥させる。さらなる精製を行なうことなくコンジュゲートに使用する、11.3mg (収率94%) のN-ヒドロキシスクシニミドエステルを得る。

【 0 0 6 3 】

1.3 25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>-3-ヘミスクシネート-KLHの合成

150mgのキーホールリンペットヘモシアニン (KLH; Sigma-Aldrich No. H 8283) を25mlの0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH8.0に溶解し、2ml DMSO中11.3mgのN-ヒドロキシ-スクシニミドエステルを添加した。室温で一晩攪拌し、次いで生成物をゲルカラム (AcA 202、カラム容積0.5l ; 0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH7.0) で精製する。コンジュゲートされたタンパク質を含有する画分をUV吸光 (λ=256nm) で検出して貯める。10%グリセロールを添加して、灰色乳光溶液を免疫に使用した。

【 0 0 6 4 】

実施例 2

25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>に対する抗体の生成および単離

2.1 免疫

ヒツジで抗体を生成する。実施例 1 の25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>-3-ヘミスクシネートKLHコンジュゲートを免疫に使用する。免疫用量は動物当たり0.1mgである。完全フロイトアジュバント中で1回目の免疫を行なう。10ヶ月間、不完全フロイトアジュバント中で4週間の間隔で、さらに免疫を行なう。各免疫間隔の中間点で血清を回収する。

【 0 0 6 5 】

2.2 ポリクロナルヒツジ抗体の精製

Aerosil (登録商標) (1.5%) の補助により25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>-3-ヘミスクシネート-LKHコンジュゲートで免疫したヒツジの血清から脂質含有成分を取り除く。その後、硫酸アンモニウム (1.7M) を用いて免疫グロブリンを沈殿させる。50mM NaClを含有するpH7.0の15mMリン酸カリウム緩衝液で沈殿物を透析し、その後DEAEセファロースでクロマトグラフィーにより精製する。IgG画分 (=PAB < 25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> > S-IgG (DE)) をこのクロマトグラフィーカラムのフロースルーから得る。

【 0 0 6 6 】

2.3 25-ヒドロキシビタミンD特異的抗体を精製するためのアフィニティークロマトグラフィー

特異性決定因子としてコンジュゲート25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>を含有する免疫吸着体をポリクロナル抗体の免疫クロマトグラフ精製用に調製する。以下の手順により免疫吸着体を得る。

【 0 0 6 7 】

10

20

30

40

50

a) ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>-3-2' シアノエチルエーテルの合成

20.6mg (50 μmol) 25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub> (Fluka No.17937) を内部温度計を備えた25ml 三口丸底フラスコ中、10ml 乾燥アセトニトリルにアルゴン雰囲気下で溶解する。1.5ml tert.-ブタノール/アセトニトリル(9:1) を溶液に添加し、氷浴中6 まで冷却する。続いて820 μl のアクリロニトリル溶液(1.0ml アセトニトリル中86 μl のアクリロニトリル) を添加し、15分間6 で攪拌する。次いで、205 μl の水素化カリウム溶液(0.5ml tert.-ブタノール/アセトニトリル9:1 中25mg KH) を添加する。フロキュレーションを生じた後に透明な溶液が得られる。反応溶液をさらに45分、6 で攪拌し、続いて4 で60分間攪拌する。

【0068】

10

その後反応溶液を10ml メチルtert.-ブチルエーテルで希釈し、毎回10ml のH<sub>2</sub>Oで2回洗浄する。有機相を約1gの無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、G3ガラスフリットで濾過し、回転式エバポレーターで蒸発させる。それを高真空下で乾燥させ約55mgの質量を有する粘性の透明な残渣とする。

【0069】

b) ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>-3-3' アミノプロピルエーテル

先に得られたニトリル全体を15ml ジエチルエーテルに溶解し、攪拌しながら7.5ml ジエチルエーテル中の7.5mg水素化リチウム懸濁物と混合する。反応混合物を室温で1時間攪拌する。その後38.4の水素化リチウムアルミニウムの6.6ml ジエチルエーテル中懸濁物を添加する。これは混合物の強い混濁を生じる。反応混合物をさらに1時間室温で攪拌し、次いで反応混合物を氷浴中で0~5 に冷却して35mlの水を注意深く添加する。10Mの水酸化カリウム溶液を添加してpHを強塩基性にする。

20

【0070】

これを毎回65mlのメチルtert.-ブチルエーテルで3回抽出する。混合した有機相を約5gの無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ、濾過して室温で回転式エバポレーターにより蒸発させる。残渣を乾燥させオイルポンプを用いて質量定常性にする。粗生成物5ml DMSOおよび3.0mlアセトニトリルに溶解して予備的HPLCにより精製する。

溶出A = Millipore H2O + 0.1%トリフルオロ酢酸;

溶出B = 95%アセトニトリル + 5%Millipore H2O + 0.1% TFA;

勾配: 100分で50%B ~ 100%B

30

流速: 30ml / 分

温度: 室温

カラム寸法: = 5.0cm; L = 25cm;

カラム材質: Vydac C18 / 300 / 15 ~ 20 μm

測定波長: 226 nm

【0071】

生成物含有量が85%より高いHPLC (Vydac C18 / 300 / 5 μm; 4.6 x 250mm) による画分を丸底フラスコに集め、凍結乾燥して13.7mg (収量58%) を無色凍結乾燥物として得る。

【0072】

40

c) ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>-3-3'-N-(ヘミスベリル)アミノプロピル-エーテル-ヒドロキシスクシニミドエステルの合成

11.7mg (25 μmol) のアミノ誘導体を5mlの新しい蒸留DMFに溶解し、92mg (250 μmol) のスベリン酸-N-ヒドロキシスクシニミドエステルを添加する。3.5 μl トリエチルアミンを添加し、溶液を一晚アルゴン下で攪拌する。粗生成物を予備的HPLC (上述の条件) で精製する。凍結乾燥後10.1mg (収率56%) のN-ヒドロキシスクシニミドエステルを得る。

【0073】

d) ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>免疫吸着体の合成

G3ガラスフリット上で20ml EAHセファロース (Amersham Biosciences, No. 17-0569-03) を200ml 0.5M塩化ナトリウム溶液を用いて洗浄して200ml 0.03Mリン酸ナトリウム緩衝

50

液pH7.1で平衡化する。余分な液体をフリットから排出した後懸濁物を200mlの同じ緩衝液に溶解し、10ml DMSO中で1.7mg (2.3  $\mu$ mol) のN-ヒドロキシスクシニミドエステルを添加する。反応混合物をシェーカーで、室温で一晩かき混ぜる。それを再びガラスフリットに移し、排出させて500ml 0.05Mリン酸カリウム緩衝液/0.15M塩化ナトリウムpH7.0で洗浄する。完全に排出した後、それを25mlの同じ緩衝液に再懸濁し、保存のために0.15mlの25%アジ化ナトリウム溶液を添加する。

【0074】

e) 抗体の精製

10mlのd)のアフィニティマトリックスをカラムに詰め、50mMリン酸カリウム緩衝液、150mM NaCl、pH7.5 (PBS) で平衡化する。3.6gのPAB < 25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> > S-IgG (DE) をカラムに流す。カラムをPBS、0.05% Tween (登録商標) 20および30mM塩化ナトリウムを含有する0.5M NaCl溶液で段階的に洗浄する。特異的に結合した免疫グロブリンを3mM HCl溶液を用いてアフィニティマトリックスから解離する。凍結乾燥物をPBSに溶解し、Superdex200 (登録商標) 上でクロマトグラフィーにより凝集物を除去し、この方法で得られる免疫吸着したポリクローナル抗体をさらなる工程に使用する。免疫アフィニティマトリックスを1Mプロピオン酸で再生し、0.9%アジ化ナトリウムを含有するPBS溶液中で保存する。

10

【0075】

実施例 3

25-ヒドロキシビタミンDの検出アッセイ

20

製造業者の指示に従い市販のアッセイを用いる。25-ヒドロキシビタミンDの測定を、文献に記載されるようにHPLC ("Immundiagnostik" Company, Bensheim, 注文番号KC 3400の25(OH)ビタミンD<sub>3</sub>用試験) またはLC-MS-MS (Vogeser, M. et al., Clin. Chem. 50 (2004) 1415-1417) により実施する。

【0076】

新しい免疫試験の成分の調製および一般的な試験手順を、以下に記載する：

【0077】

3.1 ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>-3-3'-N-(ヘミスベリル)アミノプロピル-エーテル-ピオチン-( -Ala)-Glu-Glu-Lys( )コンジュゲート (=Ag-Bi) の合成

13.7mg (25  $\mu$ mol) ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>-3-3'アミノプロピルエーテルを3.5ml DMSOに溶解し、28.7mg (30  $\mu$ mol) ピオチン-( -Ala)-Glu-Glu-Lys( )-ヘミ-スベリン酸-N-ヒドロキシスクシニミドエステル (Roche Applied Science, No. 11866656) および12.5  $\mu$ l トリエチルアミンを添加して、それを室温で一晩攪拌する。反応溶液を4.5ml DMSOに希釈し、0.45  $\mu$ mのマイクロフィルターで濾過し、続いて予備的HPLC (条件は実施例2.3 b) を参照) により精製する。解析HPLCによる85%より多くの生成物を含有する画分を集めて凍結乾燥する。9.8mg (収率30%) の精製ピオチンコンジュゲートを得る。

30

【0078】

3.2 アフィニティークロマトグラフィーで精製される25-ヒドロキシビタミンD (=PAB-Ru) に対するポリクローナル抗体のルテニウム付加

実施例2.3 e)でアフィニティ精製される抗体を100mMのリン酸カリウム緩衝液、pH8.5に移し、タンパク質濃度を1mg/mlに調整する。ルテニウム付加試薬 (ルテニウム(II)tris(ピピリジル)-N-ヒドロキシスクシニミドエステル) をDMSOに溶解し、7.5:1のモル比で抗体溶液に添加する。60分の反応時間後に、I-リシンを添加して反応を停止し、余分な標識試薬をSephadex G25上でゲル透化クロマトグラフィーにより分離する。

40

【0079】

3.3 イムノアッセイの試験手順

Roche Diagnostics companyのElecsys (登録商標) システムを用いて試料を測定する。25  $\mu$ lの試料を30  $\mu$ lの放出試薬と混合し (A)、同時にまたは続いて15  $\mu$ lのルテニウム付加検出抗体と混合し (B)、9分間インキュベートする。次の工程でピオチン付加壁抗原 (biotinylated wall antigen) (50  $\mu$ l) を添加し (C)、pH値をさらなる放出試薬 (

50

50  $\mu$ l) の添加 (A) により所望の範囲で一定にする。さらに9分間インキュベートした後、ストレプトアビジン (SA) でコートした磁性ポリプロピレン粒子 (30  $\mu$ l) を添加してさらに9分間インキュベートし、その後結合するルテニウム付加抗体の量を常法で測定する。

## 【0080】

放出試薬 (A) は

220mM	酢酸緩衝液、pH4.0
0.1%	オキシピリオン
0.1%	MIT
1%	EtOH
0.1%	ポリドカノール
0.2%	ウサギIgG

10

および指定の場合は両親媒性試薬

を含有する。

## 【0081】

ルテニウム付加 <25-OH-ビタミンD> 抗体コンジュゲートを有する溶液 (B) は

20mM	リン酸緩衝液、pH6.5
0.1%	オキシピリオン (oxypyrrion)
0.1%	MIT (N-メチルイソチアゾロン-HCl)
1%	EtOH (エタノール)
0.1%	ポリドカノール
1%	ウサギIgG (DET)
2.0 $\mu$ g/ml	PAB-Ru (実施例3.2由来)

20

および指定の場合は両親媒性試薬

を含有する。

## 【0082】

ビオチン付加壁抗原を有する溶液 (C) は

20mM	リン酸緩衝液、pH6.5
0.1%	オキシピリオン
1%	EtOH
0.1%	ポリドカノール
0.2%	ウサギIgG
0.18 $\mu$ g/ml	Ag-Bi (実施例3.1由来)

30

および指定の場合は両親媒性試薬

を含有する。

## 【0083】

SAコートラテックス粒子 (D) の懸濁物は

0.72mg/ml	470ng/mlの結合容量を有するSAコート磁性ポリプロピレン粒子
-----------	-----------------------------------

を含有する。

## 【0084】

## 実施例4

両親媒性試薬の添加/無添加緩衝液での試料のインキュベーション

これまでの試験において、白色人種のヒト由来の血清およびアフリカ系のヒト由来の血清は、25-ヒドロキシビタミンDの検出のいくつかの試験手順で異なる振る舞いをするのが観察された。そのため、異なる民族系のドナー由来の正常血清が具体的に試験された。

## 【0085】

## 4.1 DMSOの添加および無添加のインキュベーション条件の比較 (白色人種)

以下の2種類の緩衝液組成物

(a) DMSOを添加しない (= -DMSO) 放出試薬 (A)、溶液 (B) および溶液 (C)、ならびに

50

(b) 10% DMSOをさらに含有する (= +DMSO) 放出試薬 (A)、溶液 (B) および溶液 (C)

を放出試薬として使用した。

【0086】

白色人種のヒト由来の全部で約50の正常血清を試験して、それぞれの時間で標準的なLC-MS-MS法と比較した。図1に見られるように、免疫試験の値はLC-MS-MSに対応する(0.86のr値を直線回帰で測定した)。しかしながら、図1も、回帰直線の傾きが非常に小さい(0.44と計算された)ことを明確に示している。これは試料の強い偽回復を示す。

【0087】

LC-MS-MSとDMSOを使用した免疫試験の方法比較を図2に示す。DMSOを添加しない試薬組成物との比較で高い総相関( $r=0.89$ )および高い傾き(0.60)が計算される。

10

【0088】

#### 4.2 DMSOの添加および無添加のインキュベーション条件の比較(白色人種およびアフリカ人種)

約50が白人人種のヒト由来であり、31がアフリカ系のヒト由来である全部で80の正常血清を免疫学的に分析し、それぞれの時点で標準的なLC-MS-MS法と比較した。実施例4.1と同じ緩衝液(a)および(b)を使用した。図3に見られるように、免疫試験の値は、LC-MS-MSとそれ程良く相関しなかった。直線回帰により0.69のr値が測定された。しかしながら、図3も、回帰の傾きが非常に小さい(0.30と計算された)ことを明確に示している。

【0089】

20

LC-MS-MSとDMSOを使用した免疫試験の方法比較を図4に示す。DMSOを含まない試薬と比較して、有意に高い相関( $r=0.93$ )および大きく向上した傾き(0.70)が見られた。

【0090】

#### 実施例5

##### 種々の両親媒性試薬の比較

以下の緩衝液組成物

(b) 10% DMSOをさらに含有する (= +DMSO) 放出試薬 (A)、溶液 (B) および溶液 (C)

(c) 10% DMFをさらに含有する (= +DMF) 放出試薬 (A)、溶液 (B) および溶液 (C) ならびに、

30

(d) 10% N-MPをさらに含有する (= +N-MP) 放出試薬 (A)、溶液 (B) および溶液 (C)

を使用する。

【0091】

種々の人種のヒト由来の約135の正常血清を、ビタミンD結合タンパク質からビタミンD化合物を放出させるための種々の試薬組成物を用いて試験して、それぞれの時点で標準的なLC-MS-MS法と比較する。図5、6および7から分かるように、DMSOに加えてDMFおよびN-MPも、ビタミンD化合物の放出し薬用の添加物として適している。免疫学的試験の値は、3つ全ての添加物についてLC-MS-MSと非常に良く相関する。直線回帰を用いて、 $r=0.91$ (緩衝液(b))、 $0.92$ (緩衝液(c))、および $0.92$ (緩衝液(d))の値が測定された。よって、本発明の試薬組成物により、ビタミンD結合タンパク質の表現型に依存することなく25ヒドロキシビタミンDの測定が可能になる。

40

【0092】

免疫試験の絶対値は本実施例および予備的な参照値に基づくこれまでの実施例で決定されるので、有益な値を有さない。確実な絶対値を決定するためのLC-MS-MSによる参照の標準化はさらに実施される必要がある。該相対値は、本発明の試薬組成物により達成される有意な試験の改善を示す。

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1】図1は、イムノアッセイ(-DMSO)とLC-MS-MSの方法の比較である。25-ヒドロキ

50

シビタミンDを、液体クロマトグラフィーおよび質量分光法 (LC-MS-MS) の組合せならびにインキュベーションにDMSOを添加しない緩衝液 (= -DMSO) を使用したイムノアッセイ (IA) により測定した。全53の試料のng/mlでの結果を、LC-MS-MSについてX軸に、およびIAについてY軸にプロットする。

【図2】図2は、イムノアッセイ (+DMSO) とLC-MS-MSの方法の比較である。25-ヒドロキシビタミンDを、LC-MS-MS、およびDMSOを含んだ緩衝液 (= +DMSO) をインキュベーションに使用したIAにより測定した。全48の試料のng/mlでの結果を、LC-MS-MSについてX軸に、およびIAについてY軸にプロットする。

【図3】図3は、イムノアッセイ (-DMSO) とLC-MS-MSの方法の比較である。25-ヒドロキシビタミンDを、LC-MS-MS、およびDMSOを含まない緩衝液インキュベーションに使用したIAにより測定した。アフリカ系のヒト由来の31の試料を試料として使用した。全78の試料のng/mlでの結果を、LC-MS-MSについてX軸に、およびIAについてY軸にプロットする。

10

【図4】図4は、イムノアッセイ (+DMSO) とLC-MS-MSの方法の比較である。25-ヒドロキシビタミンDを、LC-MS-MS、およびDMSOを含んだ緩衝液をインキュベーションに使用したIAにより測定した。アフリカ系のヒト由来の中で特に31の試料を試料として使用した。全79の試料のng/mlでの結果を、LC-MS-MSについてX軸に、およびIAについてY軸にプロットする。

【図5】図5は、イムノアッセイ (+DMSO) とLC-MS-MSの方法の比較である。25-ヒドロキシビタミンDを、LC-MS-MS、およびDMSOを含んだ緩衝液をインキュベーションに使用したIAにより測定した。アフリカ系のヒト由来の中で特に81の試料を試料として使用した。全136の試料のng/mlでの結果を、LC-MS-MSについてX軸に、およびIAについてY軸にプロットする。

20

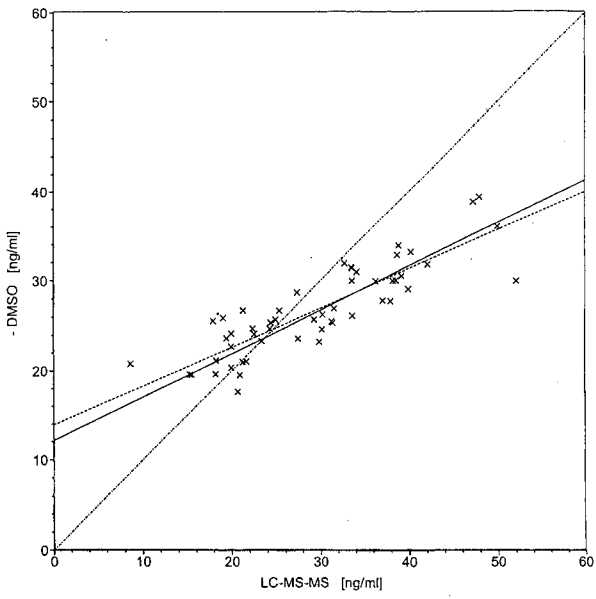
【図6】図6は、イムノアッセイ (+DMF) とLC-MS-MSの方法の比較である。25-ヒドロキシビタミンDを、LC-MS-MS、およびジメチルホルムアミドを含んだ緩衝液 (= +DMF) をインキュベーションに使用したIAにより測定した。アフリカ系のヒト由来の中で特に81の試料を試料として使用した。全136の試料のng/mlでの結果を、LC-MS-MSについてX軸に、およびIAについてY軸にプロットする。

【図7】図7は、イムノアッセイ (+N-MP) とLC-MS-MSの方法の比較である。25-ヒドロキシビタミンDを、LC-MS-MS、およびN-MPを含んだ緩衝液 (= +N-MP) をインキュベーションに使用したIAにより測定した。アフリカ系のヒト由来の中で特に81の試料を試料として使用した。全135の試料のng/mlでの結果を、LC-MS-MSについてX軸に、およびIAについてY軸にプロットする。

30

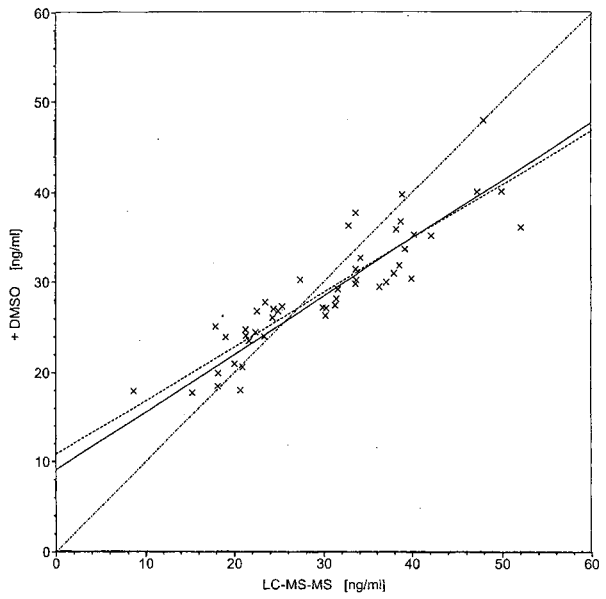
【 図 1 】

Fig. 1



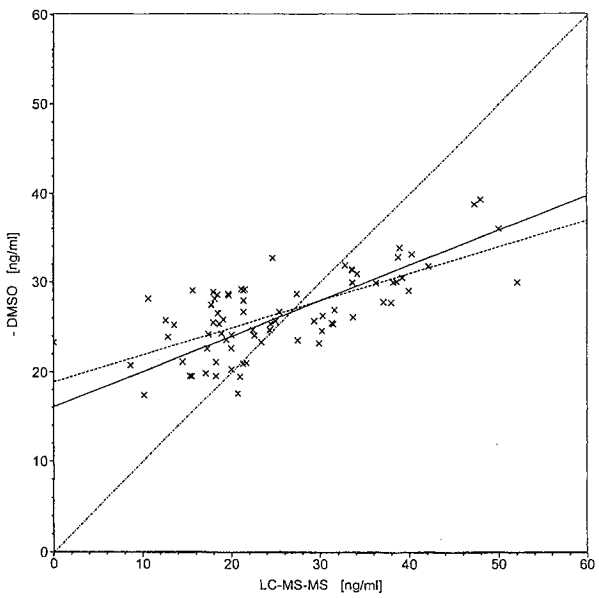
【 図 2 】

Fig. 2



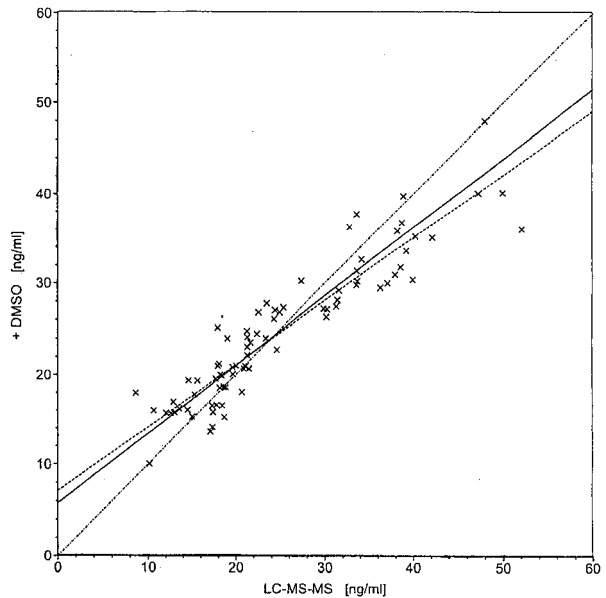
【 図 3 】

Fig. 3



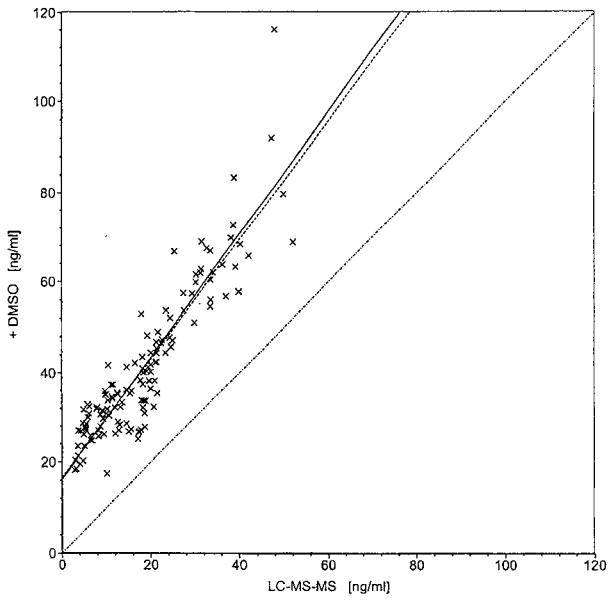
【 図 4 】

Fig. 4



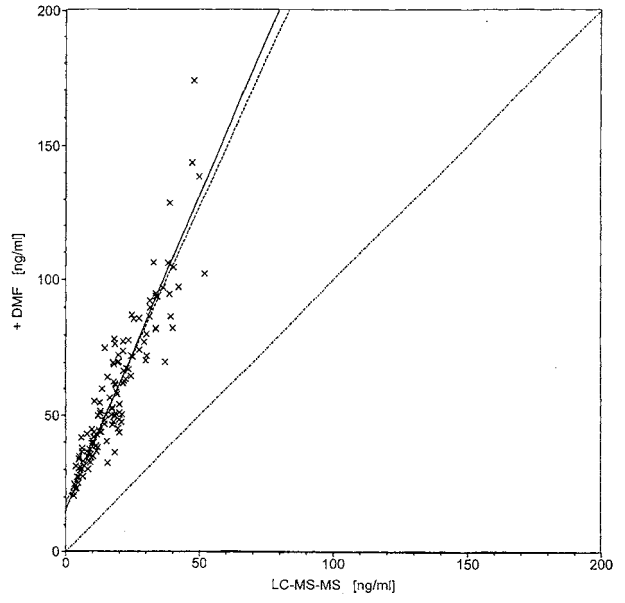
【 図 5 】

Fig. 5



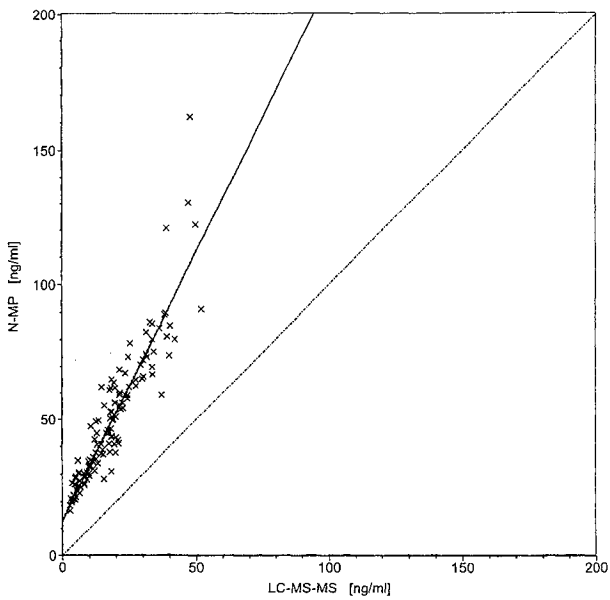
【 図 6 】

Fig. 6



【 図 7 】

Fig. 7



## 【手続補正書】

【提出日】平成19年3月5日(2007.3.5)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項1

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【請求項1】

3.8～4.8のpH値を有し、ジメチルスルホキシド(DMSO)および液体有機アミドからなる群より選択される5～30容量%の1つ以上の両親媒性試薬、ならびに任意に0.7～8容量%の短鎖(C1～C3)アルコールを含む、ビタミンD結合タンパク質からビタミンDを放出するための試薬組成物。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2006/009361

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. 601N33/82		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) GO1N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/096900 A1 (LAURIE DAVID ET AL) 20 May 2004 (2004-05-20) the whole document	1-10
A	ZERWEKH J E: "The measurement of vitamin D: Analytical aspects" ANNALS OF CLINICAL BIOCHEMISTRY 2004 UNITED KINGDOM, vol. 41, no. 4, 2004, pages 272-281, XP008056470 ISSN: 0004-5632 the whole document	1-10
A	US 2005/079563 A1 (GUPTA RAJAN) 14 April 2005 (2005-04-14) the whole document	1-10
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  30 November 2006		Date of mailing of the international search report  18/12/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  VON EGGELKRAUT, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2006/009361

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BRAUN A ET AL: "INTERACTION OF THE VITAMIN D-BINDING PROTEIN GROUP-SPECIFIC COMPONENT AND ITS LIGAND 25 HYDROXYVITAMIN D-3 BINDING DIFFERENCES OF THE VARIOUS GENETIC TYPES DISCLOSED BY ISOELECTRIC FOCUSING" ELECTROPHORESIS, vol. 11, no. 6, 1990, pages 478-483, XP002409903 ISSN: 0173-0835 the whole document</p>	9
A	<p>KAWAKAMI M ET AL: "Quantative studies of the interactions of cholecalciferol (vitamin D3) and its metabolites with different genetic variants of the serum binding protein for these sterols" BIOCHEMICAL JOURNAL 1979 UNITED KINGDOM, vol. 179, no. 2, 1979, pages 413-423, XP008072245 abstract</p>	9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/009361

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004096900	A1	20-05-2004	
		AT 329260 T	15-06-2006
		AU 2090002 A	18-06-2002
		DK 1352238 T3	02-10-2006
		EP 1352238 A2	15-10-2003
		WO 0246746 A2	13-06-2002
		JP 3787121 B2	21-06-2006
		JP 2004515763 T	27-05-2004
US 2005079563	A1	14-04-2005	NONE

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

- (72)発明者 フェルトマン, ズアンネ  
ドイツ連邦共和国 ペンツベルク 8 2 3 7 7 イグナーツ - ライン - シュトラーセ 8
- (72)発明者 フーバー, エラスムス  
ドイツ連邦共和国 フィニング 8 6 9 2 3, エステー . ヴィリバルト 1 2
- (72)発明者 コーボルト, ウーヴェ  
ドイツ連邦共和国 ヴァイルハイム 8 2 3 6 2, ラーベルシュトラーセ 5
- (72)発明者 プールマン, アンゲラ  
ドイツ連邦共和国 ノイリート 8 2 0 6 1 エタラーシュトラーセ 1 6
- (72)発明者 フォン プロフ, レオポルト  
ドイツ連邦共和国 ホーエンバイセンベルク 8 2 3 8 3 シェッツェンシュトラーセ 3 1
- (72)発明者 ホルン, ニコーレ  
ドイツ連邦共和国 ニーダーペキング 8 2 3 4 3, フェルト . - ファウ . - ミラー - シュトラーセ 1 8

Fターム(参考) 2G045 BB02 CA25 CA26 DA57 FB03

专利名称(译)	维生素D化合物的释放试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009510415A</a>	公开(公告)日	2009-03-12
申请号	JP2008532657	申请日	2006-09-27
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	キリアトソウリスアポストロス フェルトマンズアンネ フーバーエラスムス コーボルトウーヴェ プーلمانアンゲラ フォンプロフレオポルト ホルンニコレ		
发明人	キリアトソウリス,アポストロス フェルトマン,ズアンネ フーバー,エラスムス コーボルト,ウーヴェ プーلمان,アンゲラ フォンプロフ,レオポルト ホルン,ニコレ		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/44 G01N33/52 G01N33/82 Y10T436/10 G01N1/34		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/48.A G01N33/53.H		
F-TERM分类号	2G045/BB02 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA57 2G045/FB03		
优先权	2005021246 2005-09-29 EP		
其他公开文献	JP4852614B2 JP2009510415A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于释放与维生素D结合蛋白结合的维生素D化合物的试剂组合物，使用该试剂从维生素D结合蛋白释放的25-羟基维生素D化合物，并由此获得除通常的免疫试剂外，检测25-羟基维生素D化合物的方法，释放维生素D化合物的试剂的使用，以及释放维生素D化合物的试剂羟基维生素D，含有25-羟基维生素D。

