(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6681349号
(P6681349)

(45)発行日　令和2年4月15日(2020.4.15)　(24)登録日　令和2年3月25日(2020.3.25)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 16/44	(2006.01)	C07K	16/44	
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	H
C07C 401/00	(2006.01)	C07C	401/00	

請求項の数 5　(全 54 頁)

(21)出願番号	特願2016-575396(P2016-575396)
(86)(22)出願日	平成27年6月22日(2015.6.22)
(65)公表番号	特表2017-526630(P2017-526630A)
(43)公表日	平成29年9月14日(2017.9.14)
(86)国際出願番号	PCT/US2015/036907
(87)国際公開番号	WO2015/200182
(87)国際公開日	平成27年12月30日(2015.12.30)
審査請求日	平成29年5月12日(2017.5.12)
審判番号	不服2018-8550(P2018-8550/J1)
審判請求日	平成30年6月21日(2018.6.21)
(31)優先権主張番号	62/018,012
(32)優先日	平成26年6月27日(2014.6.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

早期審査対象出願

(73)特許権者　507269175
シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノスティックス・インコーポレーテッド
ＳＩＥＭＥＮＳ　ＨＥＡＬＴＨＣＡＲＥ　ＤＩＡＧＮＯＳＴＩＣＳ　ＩＮＣ.
アメリカ合衆国、ニューヨーク　１０５９１、タリータウン、ベネディクト・アベニュー　５１１
(74)代理人　100075166
弁理士　山口　巖
(74)代理人　100133167
弁理士　山本　浩
(72)発明者　シャーマ、マノイ
アメリカ合衆国　１９７０７　デラウエア、ホッケシン、ピムリコ　コート　５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ビタミンDエピマーに特異的な結合パートナー

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

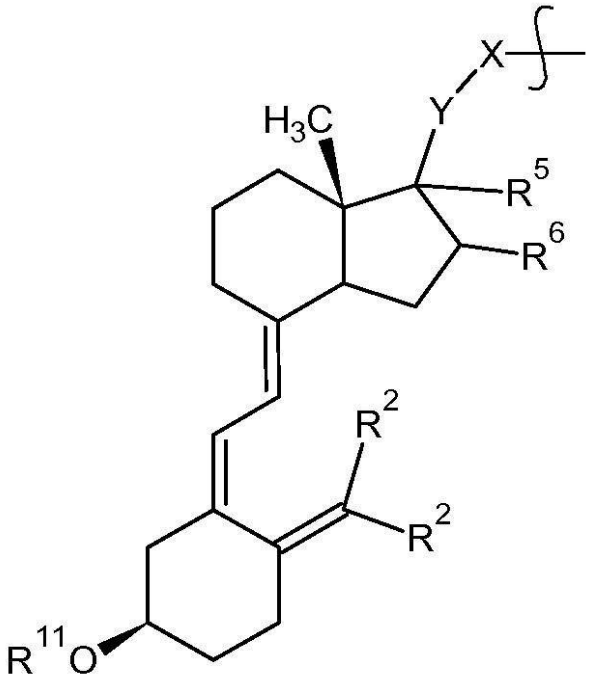
下記式の化合物に対して調製された結合パートナーであって、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD$_3$に特異的に結合するが２５－ヒドロキシビタミンD、カルシジオール、１，２５－ジヒドロキシビタミンD$_3$、１，２５－ジヒドロキシビタミンD$_4$、１，２５－ジヒドロキシビタミンD$_5$及び１，２５－ジヒドロキシビタミンD$_6$からなる群から選ばれる２５－ヒドロキシビタミンDとは観察可能な交差反応性を示さない抗体である結合パートナー。

（R^1）$_p$－（L）$_q$－Z

式中、

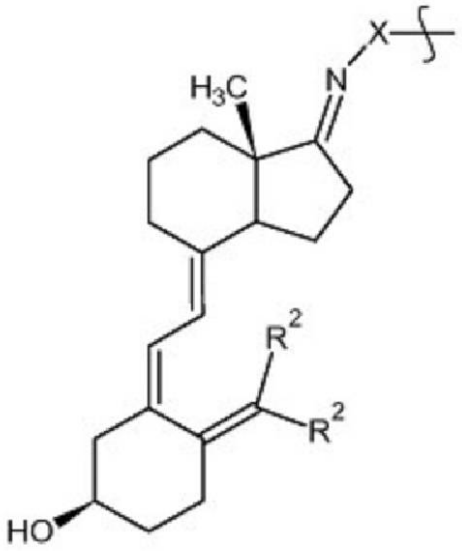
R^{1}は、

【化１】



であるか

【化２】



であり、

Ｙは、Ｏ、Ｓ、ＣＲ又はＮＲ^{4}であり、

Ｘは、－Ｏ－（ＣＨ$_{2}$）$_{n}$－Ｃ（Ｏ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{w}$－Ｃ（Ｏ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{w}$－Ｃ（Ｏ）－（ＣＨ$_{2}$）$_{x}$－Ｃ（Ｏ）－、－（ＣＨ$_{2}$）$_{w}$－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ（ＣＨ$_{2}$）$_{y}$－Ｃ（Ｏ）－又はＮＲ^{3}Ｃ（Ｏ）－であり、

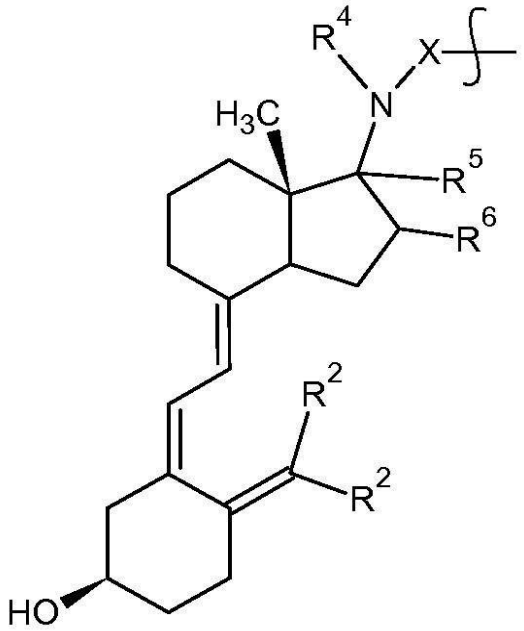
Ｒは、独立して水素原子又はアルキル基であり、

Ｒ^{2}は、水素原子であり、

Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、独立して水素原子若しくはアルキル基であり、Ｒ^{5}及びＲ^{6}は、水素原子であり、

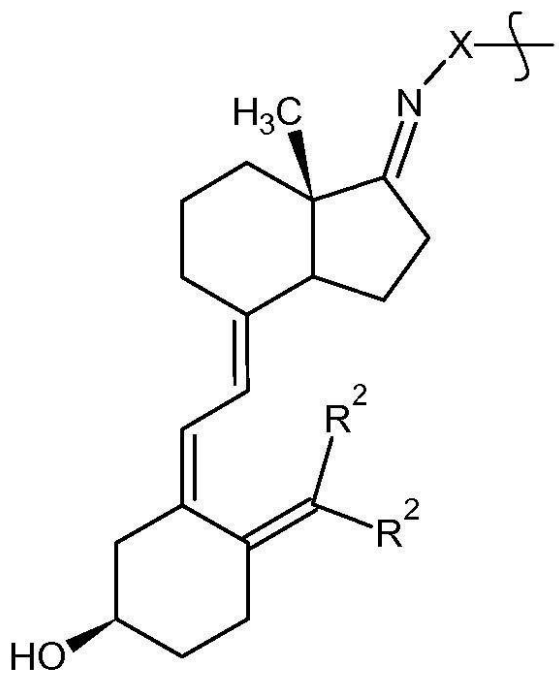
Ｒ^{11}は、水素原子であり、

ｎは、１から１０の整数であり、
ｗは、０から１０の整数であり、
ｘは、１から１０の整数であり、
ｙは、１から１０の整数であり、
ｐは、１であり、
Ｌは、結合基であり、
ｑは、０又は１であり、
Ｚは、免疫原性担体である。
【請求項２】
前記化合物において、Ｒ[1]が
【化３】



である、請求項１に記載の結合パートナー。
【請求項３】
前記化合物において、
Ｒ[1]が

【化４】



である、請求項１に記載の結合パートナー。

【請求項４】

エピマービタミンＤを含有すると考えられる試料からエピマービタミンＤを単離する方法であって、

前記試料を含有する水性媒体を、請求項１に記載の抗体が結合したアフィニティークロマトグラフィー媒体と接触させて、前記エピマービタミンＤを捕捉する工程と、

前記水性媒体を前記アフィニティークロマトグラフィー媒体から分離する工程と、を含む、方法。

【請求項５】

前記エピマービタミンＤを前記アフィニティークロマトグラフィー媒体から分離する工程を、更に、含む、請求項４に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本特許出願は、２０１４年６月２７日に出願された米国仮特許出願第６２／０１８０１２号に関して、米国特許法第１１９条（ｅ）に基づき優先権を主張する。上記特許出願の全内容を、参照により本発明に明示的に援用する。

【０００２】

本発明は、ビタミンＤ異性体及びその代謝産物を始めとするビタミンＤ被検体を含むと考えられる試料中におけるそれらの存在及び／又は量を測定するための組成物、方法及びキットに関する。より具体的には、本発明は、ビタミンＤのエピマーに特異的な結合パートナー（例えば抗体）に関する。

【背景技術】

【０００３】

多くの小分子化合物又はハプテン（例えば薬物及びビタミン）には異性体が存在し、そのうちの１つの形態のみが活性を有する。活性型の被検体を正確に測定するためには、被検体の非活性型異性体の存在に対処しなければならない。被検体の両異性体（即ち活性型及び非活性型）が測定されてしまうと、それは、活性型異性体の機能に依存する個体にとり有害となり得る不正確性につながりうる。生体試料中の一対の異性体被検体の各々の濃度を正確に評価することは、異性体のうちの１つだけが活性を示し、非活性型異性体の量

を含んだ測定値が試料中の被検体の濃度を歪める場合には、特に重要である。例えば、生体試料中のビタミンＤ濃度の測定は、ビタミンＤ欠乏が哺乳動物において多くの障害に関連するため、重要である。幼児において、例えば、３－エピ異性体の量を含んだビタミンＤの測定値は、幼児におけるビタミンＤ濃度の不正確な評価をもたらし、これが、適切な栄養補給の欠乏をもたらす。幼児が必要に応じて適切なビタミンＤ施療を受けることができるように、活性型ビタミンＤを測定することが重要である。

【０００４】

用語「ビタミンＤ」は、一群の脂溶性セコステロイドを指す。ヒトにおいては、ビタミンＤは、コレカルシフェロール（ビタミン$Ｄ_3$）又はエルゴカルシフェロール（ビタミン$Ｄ_2$）として摂取することができ、日光への曝露が十分な場合に、体内でコレステロールから合成できることから、ビタミンＤは特有の性質を有する。ビタミンＤは、通常は、必須栄養分と考えられているが、この後者の性質のため、非必須食物ビタミンと考えられる場合もある。ビタミンＤは、カルシウムイオンのホメオスタシスの正の制御において重要な生理的役割を果たす。ビタミン$Ｄ_3$は、動物により合成されるビタミンの形態である。それはビタミン$Ｄ_2$と同様、乳製品及び特定の食品製品に添加される一般的な補助栄養素でもある。

【０００５】

摂取されたビタミン$Ｄ_3$及び体内で合成されたビタミン$Ｄ_3$の双方とも、生理活性を有する代謝産物となるために代謝活性化を経なければならない。ヒトにおいては、ビタミン$Ｄ_3$活性化の最初のステップは、主に肝臓で起こり、ヒドロキシル化を経て中間代謝産物である２５－ヒドロキシコレカルシフェロールを生成する。カルシジオールは、循環系におけるビタミン$Ｄ_3$の主要な形態である。ビタミン$Ｄ_2$も、また、同様の代謝活性化を受けて２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_2$となる。これらの化合物は、総称して２５－ヒドロキシビタミンＤ（略して２５（ＯＨ）Ｄ）と称され、それらは、ビタミンＤの状態を決定するために血清中で測定される主要な代謝産物である。２５（ＯＨ）Ｄ及びそのエピマーは、いずれも、生物学的機能を発揮するためには１，２５（ＯＨ）Ｄに変換される必要があるプレホルモンである。１，２５（ＯＨ）Ｄの生物活性と、３－エピ－１，２５（ＯＨ）Ｄの生物活性との比較は複雑である。

【０００６】

ビタミンＤ化合物である２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_3$及び２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_2$は、３－位におけるエピマーであり、これらのエピマーは、それぞれ、２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_3$、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_3$、２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_2$及び３－エピ－２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_2$と称される。これらのエピマー化合物のそれぞれのエピマーのうち１つのみが、即ち、２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_3$及び２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_2$のみが活性を有する。２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_3$及び２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_2$のエピマーの構造を図１に示す。

【先行技術文献】

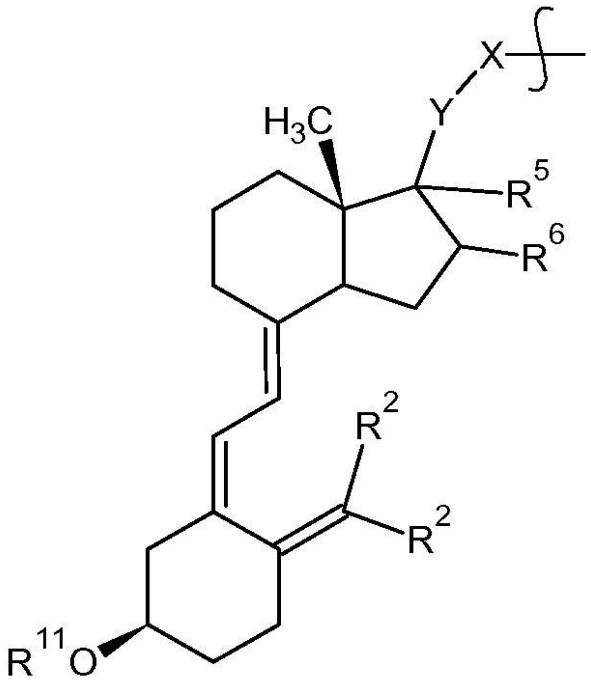
【特許文献】

【０００７】

【特許文献１】米国特許第５，０８９，３９０号明細書
【特許文献２】米国特許第５，３４０，７１６号明細書
【特許文献３】米国特許第６，２５１，５８１号明細書
【特許文献４】米国特許第５，７０９，９９４号明細書
【特許文献５】米国特許第３，８１７，８３７号明細書
【特許文献６】米国特許第３，９９６，３４５号明細書
【特許文献７】米国特許第４，２３３，４０２号明細書
【特許文献８】米国特許第５，３５４，６９３号明細書
【特許文献９】米国特許第７，１８６，５１８号明細書
【特許文献１０】米国特許第５，１４７，５２９号明細書
【特許文献１１】米国特許第５，１２８，１０３号明細書

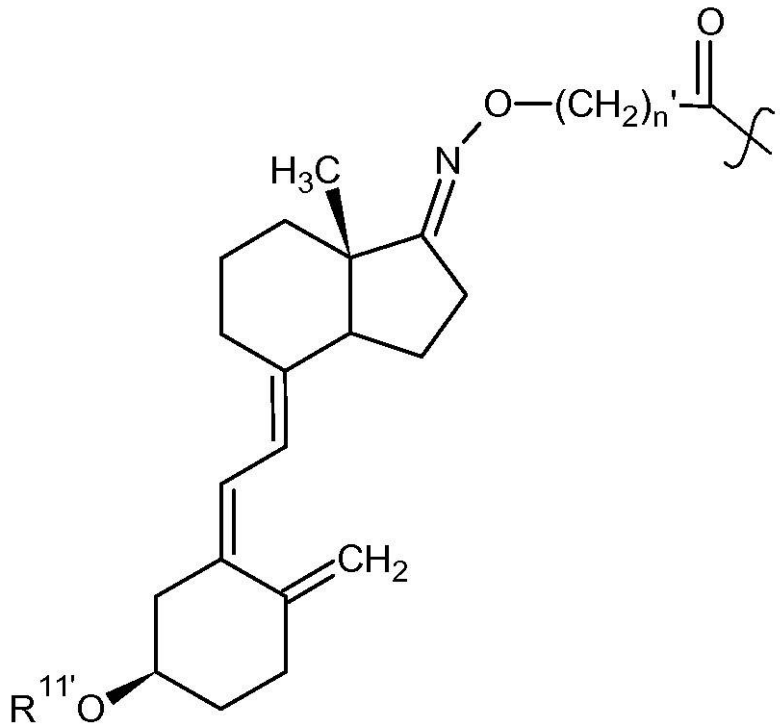
【特許文献１２】米国特許第５，１５８，８７１号明細書
【特許文献１３】米国特許第４，６６１，４０８号明細書
【特許文献１４】米国特許第５，１５１，３４８号明細書
【特許文献１５】米国特許第５，３０２，５３２号明細書
【特許文献１６】米国特許第５，４２２，２８４号明細書
【特許文献１７】米国特許第５，４４７，８７０号明細書
【特許文献１８】米国特許第５，４３４，０５１号明細書
【特許文献１９】米国特許第６，３５５，８０３号明細書
【特許文献２０】米国特許第６，６７３，５６０号明細書
【特許文献２１】米国特許第７，０９７，９９５号明細書
【特許文献２２】米国特許第７，３１９，０４１号明細書
【特許文献２３】米国特許第７，１７９，６６０号明細書
【特許文献２４】米国特許第６，１５３，４４２号明細書
【特許文献２５】米国特許出願公開第２００５／０１１８７２７Ａ号明細書
【特許文献２６】米国特許第５，９２９，０４９号明細書
【特許文献２７】米国特許第７，１７２，９０６号明細書
【特許文献２８】米国特許第７，０２２，５２９号明細書
【特許文献２９】米国特許第７，２２９，８４２号明細書
【非特許文献】
【０００８】
【非特許文献１】Ｎ．Ｊ．Ｔｕｒｒｏ，“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ”，１３２頁，Ｗ．Ａ．Ｂｅｎｊａｍｉｎ　Ｉｎｃ．，Ｎ．Ｙ．１９６５
【非特許文献２】Ｋｏｅｈｌｅｒ及びＭｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ　２６５：４９５－４９７，１９７５
【非特許文献３】Ｍｅｌｃｈｅｒｓら編、Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ（Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　１９７８））
【非特許文献４】Ｎａｔｕｒｅ　２６６：４９５（１９７７）
【非特許文献５】Ｓｃｉｅｎｃｅ　２０８：６９２（１９８０）
【非特許文献６】Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｏｆ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ　７３（Ｐａｒｔ　Ｂ）：３－４６（１９８１）
【非特許文献７】Ｙａｌｏｗら、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．３９：１１５７（１９６０）
【非特許文献８】Ｎｇｏ及びＬｅｎｈｏｆｆ、ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔ．（１９８０）１１６：２８５－２８８
【非特許文献９】Ｏｅｌｌｅｒｉｃｈ、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．（１９８４）２２：８９５－９０４
【非特許文献１０】Ｋｈａｎｎａら、Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ａｃｔａ（１９８９）１８５：２３１－２４０
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
ビタミンＤ欠乏は、哺乳動物において幾つかの障害に関連するため、生体試料中のビタミンＤ濃度を評価することは重要である。試料中のビタミンＤ及びエピマー形態のビタミンＤ、並びにそれらの代謝産物の正確且つ高感度な濃度測定のための試薬及び方法に対する需要が存在する。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
本明細書に記載の原理に従う幾つかの例は、以下の式（Ｉ）の化合物に対して調製された結合パートナー（例えば抗体）に関する。
$(R^1)_p-(L)_q-Z$　　（Ｉ）

ここで、R^1は、
【化１】



であるか又は水素原子であって、少なくとも１つのR^1は水素原子ではなく、
式中、Ｙは、Ｏ、Ｓ、ＣＲ又はＮR^4であり、
Ｘは、－Ｏ－（CH_2）$_n$－Ｃ（Ｏ）－、－（CH_2）$_w$－Ｃ（Ｏ）－、－（CH_2）$_w$－Ｃ（Ｏ）－（CH_2）$_x$－Ｃ（Ｏ）－、－（CH_2）$_w$－Ｃ（Ｏ）－ＮＨ（CH_2）$_y$－Ｃ（Ｏ）－、－ＮR^3Ｃ（Ｏ）－であり、
Ｒは、独立して、水素原子又はアルキル基であり、
R^2は、独立して、水素原子又はアルキル基であり、
R^3、R^4、R^5及びR^6は、独立して、水素原子若しくはアルキル基であるか、又は、R^4及びR^5が一緒になって結合を形成するか、又は、R^5とR^6が一緒になって結合を形成し、
R^3、R^4、R^5及びR^6は、独立して、水素原子若しくはアルキル基であるか、又は、R^4及びR^5が一緒になって結合を形成するか、又は、R^5とR^6が一緒になって結合を形成し、
R^{11}は、水素原子、アルキル基又はアシル基であり、
ｎは、１から１０の整数であり、
ｗは、０から１０の整数であり、
ｘは、１から１０の整数であり、
ｙは、１から１０の整数であり、
ｐは、１から１０の整数であり、
Ｌは、結合基であり、
ｑは、０又は１であり、
Ｚは、ポリ（アミノ酸）免疫原性担体又は非ポリ（アミノ酸）免疫原性担体である。
【００１１】
本明細書に記載の原理に従う幾つかの例は、以下の式（ＩＩ）の化合物に対して又はこれらの化合物の２つ以上の混合物に対して生じた抗体に関する。
ＮＨR^1’－（CH_2）$_r$，－ＮR^1’’’－（（CH_2）$_r$，－ＮR^1’’’’）$_s$，－（CH_2）$_r$，－ＮR^7’－Ｚ’（ＩＩ）

式中、
Ｒ１’、Ｒ１’’又はＲ１’’’は、各々独立して、
【化２】

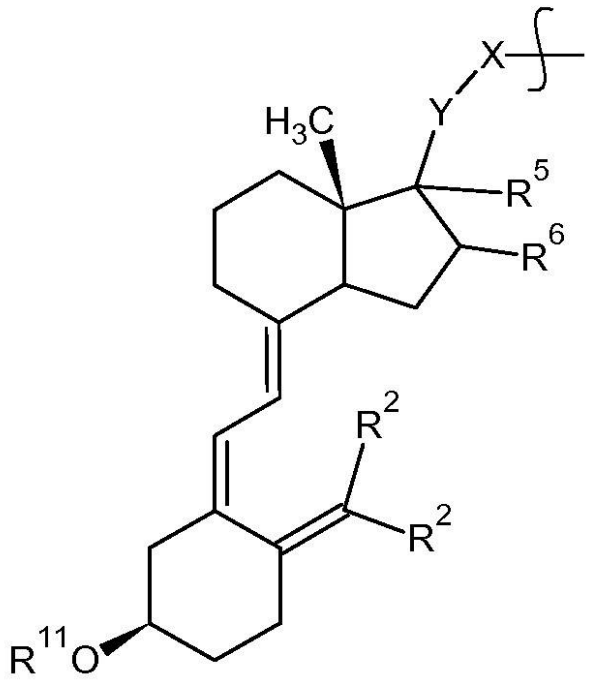


及び水素原子から選択され、
Ｒ１’、Ｒ１’’又はＲ１’’’のうちの少なくとも１つは水素原子ではなく、
ｎ’は、１から１０の整数であり、
ｒ’は、独立して１から１０の整数であり、
ｓ’は、１から１０の整数であり、
Ｒ７’は、水素原子又はアルキル基であり、
Ｒ１１’は、水素原子、アルキル基又はアシル基であり、
Ｚ’は、ポリ（アミノ酸）免疫原性担体又は非ポリ（アミノ酸）免疫原性担体である。
【００１２】
本明細書に記載の原理に従う幾つかの例は、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ$_3$に対して特異的であり、非－エピ－ビタミンＤ化合物とは、検出可能ないかなる程度にも、結合しない抗体に関する。
【００１３】
本明細書において提供される図面は、縮尺製図されたものではなく、本明細書に記載の原理に従う特定の例の理解を促進する目的で、説明のために提供されるものであり、添付の特許請求の範囲を限定するものではない。
【図面の簡単な説明】
【００１４】
【図１】２５－ヒドロキシビタミンＤ$_3$及び２５－ヒドロキシビタミンＤ$_2$のエピマー形態の化学式を示す。
【図２】本明細書に記載の原理に従う例にかかる化合物の合成概略図である。
【図３】本明細書に記載の原理に従う例にかかる化合物の合成概略図である。
【図４】本明細書に記載の原理に従う例にかかる化合物の合成概略図である。
【図５】本明細書に記載の原理に従う例にかかる化合物の合成概略図である。

【図６】本明細書に記載の原理に従う例にかかる化合物の合成概略図である。
【図７】本明細書に記載の原理に従う例にかかる化合物の合成概略図である。
【図８】本明細書に記載の原理に従う例にかかる化合物の合成概略図である。
【図９】抗－３－エピマー－ＶＤ抗体が添加され又は添加されていない試薬を用いて得られた標準曲線の比較を示す。
【図１０】抗－３－エピマー－ＶＤ抗体を用いた試料における３－エピ－２５（ＯＨ）Ｄの測定用の免疫測定法の標準曲線を示す。
【発明を実施するための形態】
【００１５】
［化合物］
上記のように、本明細書に記載の原理に従う幾つかの例は、式（Ｉ）の化合物に対して生じた結合パートナー（例えば、抗体等）に関する。

$$(R^1)_p-(L)_q-Z \qquad (I)$$

ここで、R^1は、
【化３】



であるか又は水素原子であって、少なくとも１つのR^1は水素原子ではなく、
式中、Ｙは、Ｏ、Ｓ、ＣＲ又はNR^4であり、
Ｘは、$-O-(CH_2)_n-C(O)-$、$-(CH_2)_w-C(O)-$又は$-NR^3-C(O)-$であり；幾つかの例では、例えばＹがNR^4であるとき、Ｘは、$-O-(CH_2)_n-C(O)-$であり、例えばＹがＯ又はＳであるとき、Ｘは、$-(CH_2)_w-C(O)-$、$-(CH_2)_w-C(O)-(CH_2)_x-C(O)-$又は$-(CH_2)_w-C(O)-NH(CH_2)_y-C(O)-$であり、例えばＹがＣＲであるとき、Ｘは、$-NR^3-C(O)-$であり、
Ｒは、独立して、水素原子又はアルキル基であり、
R^2は、独立して、水素原子又はアルキル基であり、
R^3、R^4、R^5及びR^6は、独立して、水素原子若しくはアルキル基であるか、又は、R^4及びR^5が一緒になって結合を形成するか、又は、R^5及びR^6が一緒になって結合を形成し、
R^{11}は、水素原子、アルキル基又はアシル基であり、
ｎは、例えば、１～１０、又は１～９、又は１～８、又は１～７、又は１～６、又は１～

５、又は１～４、又は１～３、又は１～２、又は２～１０、又は２～９、又は２～８、又は２～７、又は２～６、又は２～５、又は２～４、又は２～３、又は３～１０、又は３～９、又は３～８、又は３～７、又は３～６、又は３～５、又は３～４、又は４～１０、又は４～９、又は４～８、又は４～７、又は４～６、又は４～５、又は５～１０、又は５～９、又は５～８、又は５～７、又は５～６、又は６～１０、又は６～９、又は６～８、又は６～７、又は７～１０、又は７～９、又は７～８、又は８～１０、又は８～９、又は９～１０の整数であり、

ｗは、例えば、０～１０、１～１０、又は１～９、又は１～８、又は１～７、又は１～６、又は１～５、又は１～４、又は１～３、又は１～２、又は２～１０、又は２～９、又は２～８、又は２～７、又は２～６、又は２～５、又は２～４、又は２～３、又は３～１０、又は３～９、又は３～８、又は３～７、又は３～６、又は３～５、又は３～４、又は４～１０、又は４～９、又は４～８、又は４～７、又は４～６、又は４～５、又は５～１０、又は５～９、又は５～８、又は５～７、又は５～６、又は６～１０、又は６～９、又は６～８、又は６～７、又は７～１０、又は７～９、又は７～８、又は８～１０、又は８～９、又は９～１０の整数であり、

ｘは、例えば、１～１０、又は１～９、又は１～８、又は１～７、又は１～６、又は１～５、又は１～４、又は１～３、又は１～２、又は２～１０、又は２～９、又は２～８、又は２～７、又は２～６、又は２～５、又は２～４、又は２～３、又は３～１０、又は３～９、又は３～８、又は３～７、又は３～６、又は３～５、又は３～４、又は４～１０、又は４～９、又は４～８、又は４～７、又は４～６、又は４～５、又は５～１０、又は５～９、又は５～８、又は５～７、又は５～６、又は６～１０、又は６～９、又は６～８、又は６～７、又は７～１０、又は７～９、又は７～８、又は８～１０、又は８～９、又は９～１０の整数であり、

ｙは、例えば、１～１０、又は１～９、又は１～８、又は１～７、又は１～６、又は１～５、又は１～４、又は１～３、又は１～２、又は２～１０、又は２～９、又は２～８、又は２～７、又は２～６、又は２～５、又は２～４、又は２～３、又は３～１０、又は３～９、又は３～８、又は３～７、又は３～６、又は３～５、又は３～４、又は４～１０、又は４～９、又は４～８、又は４～７、又は４～６、又は４～５、又は５～１０、又は５～９、又は５～８、又は５～７、又は５～６、又は６～１０、又は６～９、又は６～８、又は６～７、又は７～１０、又は７～９、又は７～８、又は８～１０、又は８～９、又は９～１０の整数であり、

ｐは、例えば、１～１０、又は１～９、又は１～８、又は１～７、又は１～６、又は１～５、又は１～４、又は１～３、又は１～２、又は２～１０、又は２～９、又は２～８、又は２～７、又は２～６、又は２～５、又は２～４、又は２～３、又は３～１０、又は３～９、又は３～８、又は３～７、又は３～６、又は３～５、又は３～４、又は４～１０、又は４～９、又は４～８、又は４～７、又は４～６、又は４～５、又は５～１０、又は５～９、又は５～８、又は５～７、又は５～６、又は６～１０、又は６～９、又は６～８、又は６～７、又は７～１０、又は７～９、又は７～８、又は８～１０、又は８～９、又は９～１０の整数であり、

Ｌは結合基であり、

ｑは、０又は１であり、

Ｚは、ポリ（アミノ酸）免疫原性担体部分又は非ポリ（アミノ酸）免疫原性担体部分である。

【００１６】

本明細書で用いられる用語「アルキル」には、直鎖状、分岐鎖状又は環状構造の、指定された炭素原子数のアルキル基が含まれる。「アルキル」の例には、これらに限定されないが、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、ｓｅｃ－及びｔｅｒｔ－ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、ノルボルニルが含まれる。幾つかの例では、アルキル基は、１～１０、又は１～９、又は１～８、又は１～７、又は１～６、又は１～

５、又は１～４、又は１～３、又は１～２、又は２～１０、又は２～９、又は２～８、又は２～７、又は２～６、又は２～５、又は２～４、又は２～３、又は３～１０、又は３～９、又は３～８、又は３～７、又は３～６、又は３～５、又は３～４、又は４～１０、又は４～９、又は４～８、又は４～７、又は４～６、又は４～５、又は５～１０、又は５～９、又は５～８、又は５～７、又は５～６、又は６～１０、又は６～９、又は６～８、又は６～７、又は７～１０、又は７～９、又は７～８、又は８～１０、又は８～９、又は９～１０個の炭素原子を含み、非置換であってもよく、或いは、１～５、又は１～４、又は１～３、又は１～２、又は２～５、又は２～４、又は２～３、又は３～５、又は３～４、又は４～５個の炭素原子を有するヒドロキシ基又はアルコキシ基の１つ以上で置換されていてもよい。

【００１７】

本明細書で用いられる用語「アシル」は、$R^{12}C(O)-$を意味し、式中、R^{12}は、アルキル又はアリール基である。

【００１８】

本明細書で用いられる用語「アリール」は、芳香族炭化水素から１つの原子の除去により派生し、１つ以上の芳香族環（通常、１～４個の芳香族環、例えばフェニル基（ベンゼンから）、ナフチル基（ナフタレンから））を有する有機基を意味し、例えばフェニル、ナフチル、フェナントリル基が挙げられる。

【００１９】

本明細書で用いられる用語「結合基」は、水素原子の数を除いて約２～約５０の原子、又は４～約３０の原子を有する化学的部分を指し、通常、炭素、酸素、硫黄、窒素及びリンからなる群から、各々、独立して選択される、２～約３０の原子、又は３～約２０の原子の鎖を有する。幾つかの例では、結合基の一部又は全体は、これらに限定されないが、例えば、ポリ（アミノ酸）のアミノ酸残基に結合する分子の一部であってもよい。結合基中のヘテロ原子の数は、０～約２０、１～約１５、又は約２～約１０の範囲であってもよい。結合基は、脂肪族基又は芳香族基であってよい。ヘテロ原子が存在するとき、酸素は、通常、炭素、硫黄、窒素又はリン原子に結合したオキソ基又はオキシ基として存在し、窒素原子は、通常、炭素、酸素、硫黄又はリン原子に結合した、ニトロ基、ニトロソ基又はアミノ基として存在し、硫黄原子は、酸素原子と同様であり、リン原子は、通常、ホスホネート及びリン酸モノ－又はジエステルとして、炭素、硫黄、酸素又は窒素原子に結合する。結合基と接合される分子との間で共有結合を形成する一般的な官能基は、アルキルアミン、アミジン、チオアミド、エーテル、ウレア、チオウレア、グアニジン、アゾ、チオエーテル並びにカルボン酸エステル、スルホン酸エステル及びリン酸エステル、アミド並びにチオエーテルである。

【００２０】

多くの場合、結合基が、例えば、窒素類縁体及び硫黄類縁体を含む非オキソカルボニル基、リン酸基、アミノ基、アルキル化剤（例えばハロ基又はトシルアルキル基）、オキシ基（ヒドロキシ基又は硫黄類縁体、メルカプト基）、オキソカルボニル基（例えばアルデヒド基又はケトン基）、又は活性オレフィン（例えばビニルスルホン基又はα，β－不飽和エステル基）等の、結合官能基（分子部分との反応性を有する官能基）を有するとき、これらの官能基は、アミノ基、カルボキシ基、活性オレフィン及びアルキル化剤（例えばブロモアセチル）に結合する。アミンとカルボン酸若しくはその窒素誘導体又はリン酸とが結合する場合、アミド、アミジン及びホスホルアミドが形成される。メルカプタンと活性化オレフィンとが結合する場合、チオエーテルが形成される。メルカプタンとアルキル化剤とが結合する場合、チオエーテルが形成される。アルデヒドとアミンとが還元条件下で結合する場合、アルキルアミンが形成される。ケトン又はアルデヒドとヒドロキシルアミン（置換基によりヒドロキシ基の水素が置換された誘導体を含む。）とが結合する場合、オキシム官能基（＝Ｎ－Ｏ－）が形成される。カルボン酸又はリン酸とアルコールとが結合する場合、エステルが形成される。

【００２１】

本明細書で用いられる用語「免疫原性担体」は、ハプテンと接合する基又は分子部分を意味する。免疫原性担体とハプテンとの接合体（ｃｏｎｊｕｇａｔｅ）を、例えば、これらに限定されないが、哺乳動物、鳥類（例えばニワトリ又はハト）、両生類又は爬虫類等の、免疫応答を惹起できる有機体に注射してもよく、又は、当該接合体を試験管内試料（ヒトを含む哺乳動物、鳥類、両生類又は爬虫類）への接種に用いてもよく、或いは、ハプテンの結合パートナーの調製技術に用いてもよい。

用語「結合パートナー」は、特定の結合ペアの一員である分子を指し、これは、特異的に結合する２つの異なる分子のうちの１つであり、それにより、他の分子と相補的であるとして定義される。用語「結合パートナー」は、特定の結合ペアの一員である分子を指し、これは、２つの異なる分子のうちの一方であって、他の分子に特異的に結合し、それにより、当該他の分子と相補的であるとして定義される。例えば、特定の結合ペアの一員は、その表面上又は空洞内に、当該特定の結合ペアの他の一員の特定の空間及び極性組織と特異的に結合する領域を有してもよい。結合パートナーは、これは説明のためであって限定するものではないが、例えば、抗体又はアプタマー（例えば、核酸アプタマー又はペプチドアプタマー）であってもよい。例えば、免疫原性担体は、免疫応答を惹起し、ハプテンに対する結合パートナーの産生を促進する免疫原として使用されてもよい。他の技術としては、ファージディスプレイ及びインビトロ選択が含まれる。免疫原性担体は、時には、抗原性担体とも称される。本明細書に記載の原理に従う幾つかの例において、ポリ（アミノ酸）免疫原性担体及び非ポリ（アミノ酸）免疫原性担体を始めとする免疫原性担体を含有する免疫原が、合成され、抗体の調製に用いられる。ハプテンは、対応する抗体に特異的に結合し得る化合物であるが、それら自体は、抗体調製用の免疫原（又は抗原）の機能を果たさない。従って、ハプテンは、免疫原性担体に結合させて、この担体が、例えば抗体の産生に用いられる。

【００２２】

免疫原性担体であるポリ（アミノ酸）の分子量範囲（ダルトン）は、例えば、約５，０００～約１０，０００，０００、又は約２０，０００～約６００，０００、又は約２５，０００～約２５０，０００である。「ポリ（アミノ酸）免疫原性担体部分」には、例えばアルブミン、血清タンパク質（例えばグロブリン）、眼球レンズタンパク質及びリポタンパク質等のタンパク質が含まれる。当該タンパク質の例としては、これらに限定されないが、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、キーホールリンペットヘモシニアン（ＫＬＨ）、卵オボアルブミン及びウシガンマグロブリン（ＢＧＧ）等が挙げられる。「非ポリ（アミノ酸）免疫原性担体部分」には、多糖類、核酸及び粒子（生物学的材料及び合成材料）が含まれる。多様な免疫原性担体は、Ｄａｖａｌｉａｎらの特許文献１第４欄第５７行～第５欄第５行に記載されており、当該内容を参照により本発明に援用する。

【００２３】

上述のように、免疫原性担体部分は、単糖の高分子量ポリマーである多糖類であって、それは天然物でも合成物でもよく、通常、単糖の反復的な縮合を有する。多糖類の例は、澱粉、グリコーゲン、セルロース、炭水化物ガム（例えばアラビアガム）、寒天等である。多糖類は、ポリ（アミノ酸）残基及び／又は脂質残基を含んでいてもよい。

【００２４】

本明細書で用いられる用語「標識」には、ポリ（アミノ酸）標識及び非ポリ（アミノ酸）標識が含まれる。用語「ポリ（アミノ酸）標識部分」には、これらに限定されないが、例えば酵素、抗体、ペプチド及び免疫原等のタンパク質である標識が含まれる。標識タンパク質（例えば酵素）の場合、重量平均分子量の範囲は、約１０，０００～約６００，０００、又は約１０，０００～約３００，０００である。本明細書に記載の原理に従う化合物（類縁体基）は、通常、タンパク質の、約２００，０００の分子量当たり少なくとも１つ、又は約１５０，０００の分子量当たり少なくとも約１つ、又は約１００，０００の分子量当たり少なくとも約１つ、又は約５０，０００の分子量当たり少なくとも約１つ、又は４０，０００の分子量当たり少なくとも約１つ、又は３０，０００の分子量当たり少なくとも約１つ、又は２０，０００の分子量当たり少なくとも１つ、又は１０，０００の分

子量当たり少なくとも１つ、又は５，０００の分子量当たり少なくとも１つの割合で存在する。酵素の場合、類縁体基の数は、通常、１～約２０、約２～約１５、約３～約１２又は約６～約１０個である。

【００２５】

酵素としては、これは説明のためであって限定するものではないが、例えば脱水素酵素（例えばグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ（Ｇ６ＰＤＨ）及び乳酸脱水素酵素）等の酸化還元酵素；過酸化水素を生成し、この過酸化水素を色素前駆体の色素への酸化に使用する酵素（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ及びミクロペルオキシダーゼ）；加水分解酵素（例えばアルカリホスファターゼ及びβ－ガラクトシダーゼ）；ルシフェラーゼ（例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌のルシフェラーゼ）；トランスフェラーゼ；酵素の組合せ（これらに限定されないが、サッカライドオキシダーゼ（例えばグルコース及びガラクトースオキシダーゼ）又は複素環オキシダーゼ（例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ）を、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化する酵素、即ち、ペルオキシダーゼ（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ又はミクロペルオキシダーゼ）に結合させたもの）が挙げられる。

【００２６】

本明細書で用いられる用語「非ポリ（アミノ酸）標識」には、タンパク質ではない標識が含まれる。非ポリ（アミノ酸）標識は、直接検出できるか、又は検出可能な信号を発生させる反応により検出できる。非ポリ（アミノ酸）標識は、アイソトープであっても非アイソトープであってもよく、これは説明のためであって限定するものではないが、例えば放射性同位元素、発光化合物（これには、これは説明のためであって限定するものではないが、例えば蛍光化合物及び化学発光化合物が含まれる。）、触媒をコードするポリヌクレオチド、プロモーター、色素、補酵素、酵素基質、放射性基、有機小分子（分子量２００～２，０００）、粒子及び増幅可能なポリヌクレオチド配列であってもよい。

【００２７】

上述のとおり、「有機小分子」は、約２００～約２，０００、又は約２００～約１，５００、又は約２００～約１，０００、又は約２００～約５００の分子量を有する。かかる「有機小分子」には、これらに限定されないが、例えば、ビオチン、蛍光分子（例えば、フルオレセイン及びローダミン等）、化学発光分子及びジニトロフェノールが含まれる。有機小分子の結合パートナーは、当該小分子を特異的に認識し、これに結合する分子である。小分子の結合パートナーは、当該小分子の性質により規定され、これらに限定されないが、例えば、アビジン、ストレプトアビジン、当該有機小分子に対する抗体（これには、限定するものではないが、蛍光分子に対する抗体（例えばフルオレセイに対する抗体、ローダミンに対する抗体）、化学発光分子に対する抗体、及び抗ジニトロフェノール抗体が含まれる。）が含まれる。

【００２８】

本明細書で用いられる用語「非標識ポリ（アミノ酸）部分」及び「非免疫原性担体ポリ（アミノ酸）部分」は、特定の条件においては、当該部分が標識又は免疫原性担体であるともみなされるが、通常、標識又は免疫原性担体とはみなされないポリ（アミノ酸）のことを指す。例えば、抗体は、標識とはみなされないが、当該抗体が信号生成部分又は信号生成システムの一部分を含むように変性された場合には、標識ともみなされる。更に、抗体は、免疫原性担体とはみなされないが、特定の条件下においては、その高分子量故に、免疫原性担体であり得る。

【００２９】

幾つかの例では、非ポリ（アミノ酸）標識は、支持体、磁気粒子、アクリジニウムエステル、磁気粒子とアクリジニウムエステルとの組合せ（例えば、アクリジニウムエステルで標識された常磁性粒子）、化学発光粒子及び増感剤粒子からなる群から選択されうる。

【００３０】

「共有結合」という用語は、直接的な結合（例えば、分子間の化学結合）による分子の結合のことを指す。「非共有結合」という用語は、分子に結合している相補的な特異的結

合ペア（ｓｂｐ）メンバーの間の特異的な結合が関与する分子の結合のことを指す。

【００３１】

幾つかの例では、本明細書に記載の原理に従う化合物は、例えば共有結合又は非共有結合性結合により、支持体と会合してもよい。上述したように、本明細書に記載の原理に従う幾つかの例では、R^2は支持体であって、有機又は無機の、固体又は液体状の、水不溶性の材料から構成されてもよく、透明であっても又は部分的に透明であってもよい。例えば、上記支持体は、これらに限定されないが、例えば、ビーズ等の粒子（粒子状の支持体）、フィルム、膜、チューブ、ウェル、ストリップ、ロッド、繊維又は平面（例えば平板又は紙）等の多数の形状のうちのいかなる形状を有していてもよい。当該支持体は、それが用いられる媒体中に懸濁可能であってもよく、そうでなくともよい。懸濁可能な支持体の例としては、例えば、ラテックス等の高分子材料、脂質二重層又はリポソーム、油滴、細胞及びヒドロゲル、並びに磁気粒子が挙げられる。他の支持体組成物としては、これは例示のためであって限定するものではないが、例えば、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ポリ（塩化ビニル）、ポリアクリルアミド、ポリアクリレート、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ（４－メチルブテン）、ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ（エチレンテレフタレート）、ナイロン、ポリ（ビニルブチレート）等のポリマーが挙げられ、れらは、単独で又は他の材料と組み合わせて使用できる。当該支持体は、更に、例えば色素、触媒又は他の検出可能基で、標識されてもよく、又は標識されなくともよい。

【００３２】

本明細書に記載の原理に従う幾つかの例では、前記支持体は粒子であってもよい。当該粒子は、約０．０２ミクロン以上、約１００ミクロン以下の平均直径を有する。幾つかの例では、当該粒子は、約０．０５ミクロン～約２０ミクロン、又は約０．３ミクロン～約１０ミクロンの平均直径を有する。当該粒子は、有機物質であっても無機物質であってもよく、膨潤性であっても非膨潤性であってもよく、多孔性であっても非多孔性であってもよく、好適には、水に近い密度、通常、約０．７ｇ／ｍＬ～約１．５ｇ／ｍＬの密度を有しており、透明であっても、部分的に透明であっても又は不透明であってもよい材料から構成される。当該粒子は、細胞及び微生物等の生体物質、例えば、赤血球、白血球、リンパ球、ハイブリドーマ、連鎖球菌、黄色ブドウ球菌、及び大腸菌、ウイルス等であってよい。当該粒子は、有機又は無機ポリマー、リポソーム、ラテックス粒子、磁性又は非磁性粒子、リン脂質小胞、カイロミクロン、リポタンパク質等から構成された粒子であり得る。幾つかの例では、当該粒子は、二酸化クロム（クローム）粒子又はラテックス粒子である。

【００３３】

磁気粒子には、常磁性粒子、強磁性粒子及び反磁性粒子が含まれる。かかる粒子としては、これらに限定されないが、例えば、クロム、銅、コバルト、アルミニウム、マンガン、鉄及びニッケルを始めとする周期律表の４～７周期の遷移金属が挙げられる。

【００３４】

化学発光粒子は、化学発光化合物と会合した粒子である。ここで用いられる「～と会合した」の用語は、例えば化学発光化合物等の化合物と粒子とが、例えば、直接的又は間接的な結合、吸着、吸収、取り込み又は溶解等により会合することを意味する。利用できる化学発光化合物の例は、特許文献２及び特許文献３に記載されており、それらの開示内容を参照により本発明に援用する。本明細書に記載の原理に従う幾つかの例では、化学発光化合物は、光活性化可能な物質であり、光による直接的な又は増感された励起又は一重項酸素との反応を経て化学反応を受け、準安定な反応生成物を形成し、当該生成物は、分解して、それと同時又はその後に、通常、２５０～１，２００ｎｍの波長範囲内の光を放出する。「光活性化可能な」という用語は、「光化学的に活性化可能」であることを含む。幾つかの例では、化学発光化合物は、一重項酸素と反応してジオキセタン又はジオキセタノンを形成する化合物である。後者は、通常、電子リッチなオレフィンである。かかる電子リッチなオレフィンの例としては、エノールエーテル、エナミン、９－アルキリデン－Ｎ－アルキルアクリダン、アリールビニルエーテル、ジオキセン、アリールイミダゾール

、９－アルキリデン－キサンタン及びルシゲニンが挙げられる。他の化合物としては、ルミノール、及び他のフタルヒドラジド、及び、光化学的に不安定な保護基で保護されることにより化学発光反応の進行から保護されている化学発光化合物が挙げられ、これらの化合物としては、例えば、ホタルルシフェリン、アクアホリン及びルミノールが挙げられる。利用できるかかる化学発光化合物の例は、特許文献４に記載されており、その関連する開示内容を参照により本発明に援用する。

【００３５】

増感剤粒子は、増感剤化合物と会合した粒子であり、当該化合物には、これに限定されないが、光増感剤化合物が含まれる。利用できる増感剤化合物の例は、特許文献２及び特許文献３に記載されているものであり、その関連する開示内容を参照により本発明に援用する。

【００３６】

光増感剤は、通常、光励起により一重項酸素を生成する増感剤である。幾つかの例では、当該光増感剤は、化学発光化合物より長波長の光を吸収し、化学発光化合物より低いエネルギー三重項を有する。光増感剤は、光活性化可能な物質（例えば色素及び芳香族化合物）であり得る。光増感剤は、通常、通常、複数の二重結合又は三重結合で共有結合した原子から構成される化合物である。当該化合物は、２００～１，１００ｎｍ、通常、３００～１，０００ｎｍ、好ましくは４５０～９５０ｎｍの波長範囲の光を吸収しなければならない。典型的な光増感剤には、これらに限定されないが、例えば、アセトン、ベンゾフェノン、９－チオキサントン、エオシン、９，１０－ジブロモアントラセン、メチレンブルー、メタロポルフィリン（例えばヘマトポルフィリン）、フタロシアニン、クロロフィル、ローズベンガル、バックミンスターフラーレン及びこれらの化合物の誘導体が挙げられる。他の光増感剤の例は、非特許文献１に列挙されている。光増感剤は、一重項酸素による光活性化を補助する。通常、光増感剤は光を吸収し、それにより形成された励起された光増感剤が酸素を活性化して一重項酸素を生じ、これが化学発光化合物と反応し、準安定な発光中間体を生じさせる。

【００３７】

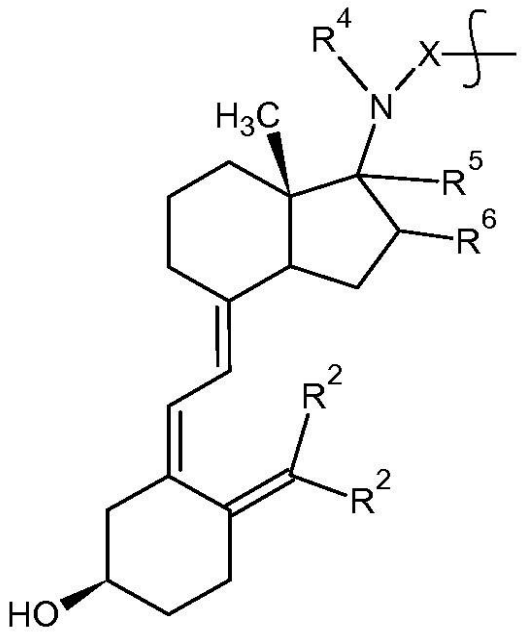
本明細書に記載の式では、結合を横切る曲線は、式中の分子部分の結合箇所を示す。

【００３８】

本明細書に記載の原理に従う幾つかの例は、例えば式（ＩＶ）の化合物に対して生じたか、又は当該化合物の２つ以上の混合物に対して生じた抗体等の結合パートナーに関する。

式（ＩＶ）の化合物は、式（Ｉ）の化合物において、R^1が

【化４】



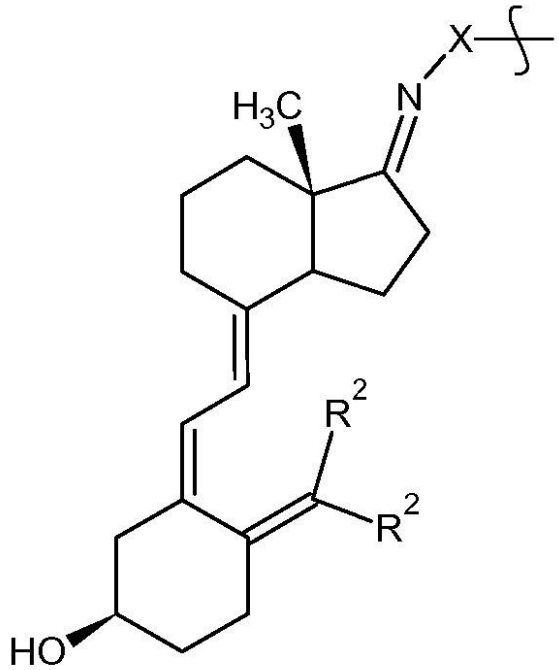
であるか又は水素原子であり、
ここで、少なくとも１つのＲ^{1}が水素原子ではない化合物である。

【００３９】

本明細書に記載の原理に従う幾つかの例は、例えば、（７ａＳ，Ｅ）－４－（（Ｚ）－２－（（Ｒ）－５－ヒドロキシ－２－メチレン－シクロヘキシリデン）エチリデン）－７ａ－メチルオクタヒドロ－１Ｈ－インデン－１－オンの誘導体（ＨＭＣＨＥＭＯＩＯ誘導体）、即ち、式（Ｖ）の化合物に対して生じたか、又はこの化合物のうちの２つ以上の混合物に対して生じた抗体等の結合パートナーに関する。

式（Ｖ）の化合物は、式（Ｉ）の化合物において、Ｒ^{1}が

【化５】



であるか又は水素原子であり、ここで、少なくとも１つのＲ^{1}が水素原子ではない化合物である。

【００４０】

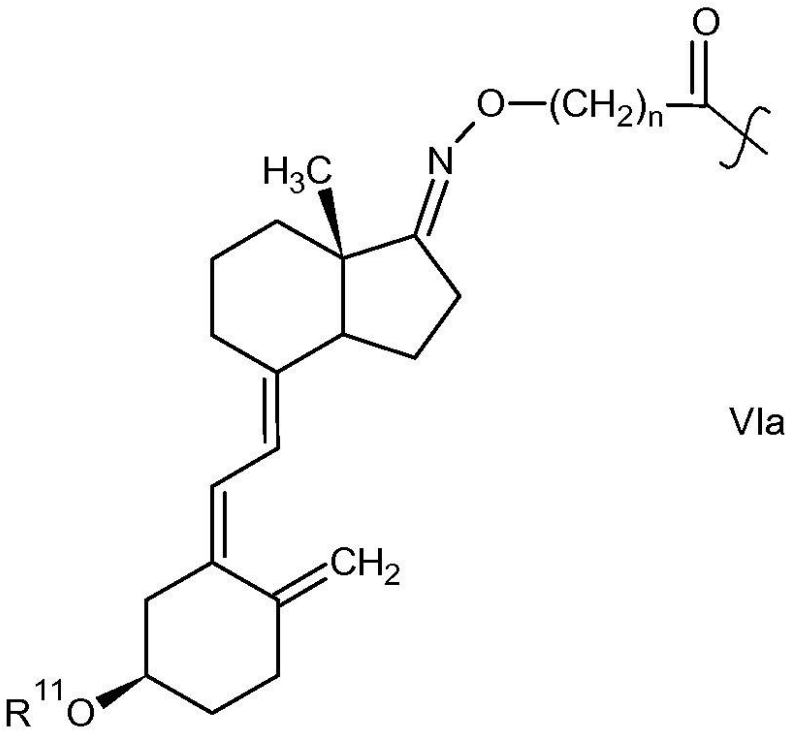
本明細書に記載の原理に従う幾つかの例は、式（ＶＩ）の化合物に対して生じたか、又は上記の化合物のうちの２つ以上の混合物に対して生じた抗体に関する。

式（ＶＩ）の化合物は、式（Ｉ）の化合物において、

$(R^1)_p-(L)_q-$が、$NHR^1-(CH_2)_r-NR^1-((CH_2)_r-NR^1)_s-(CH_2)_r-NR^7-$であり、

ここで、R^1は、独立して、

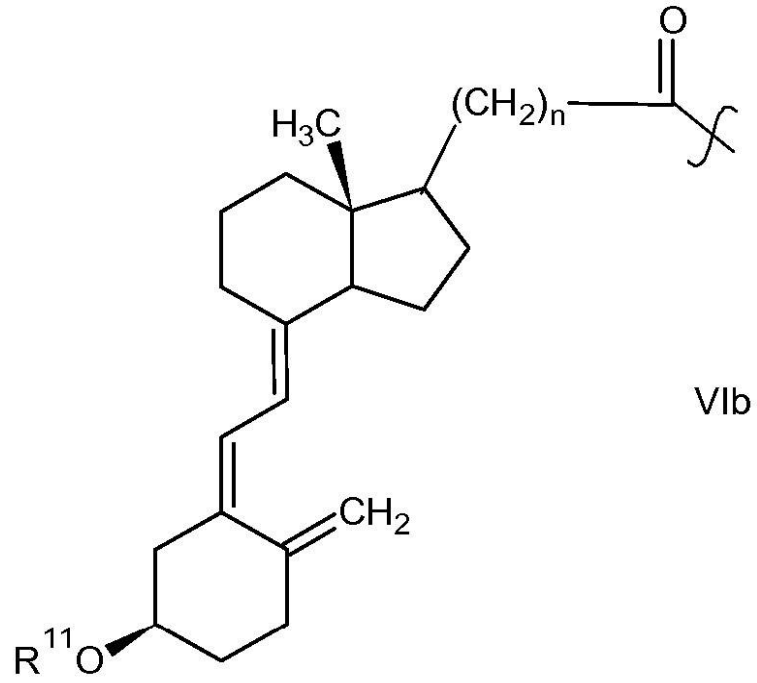
【化６】



VIa

又は

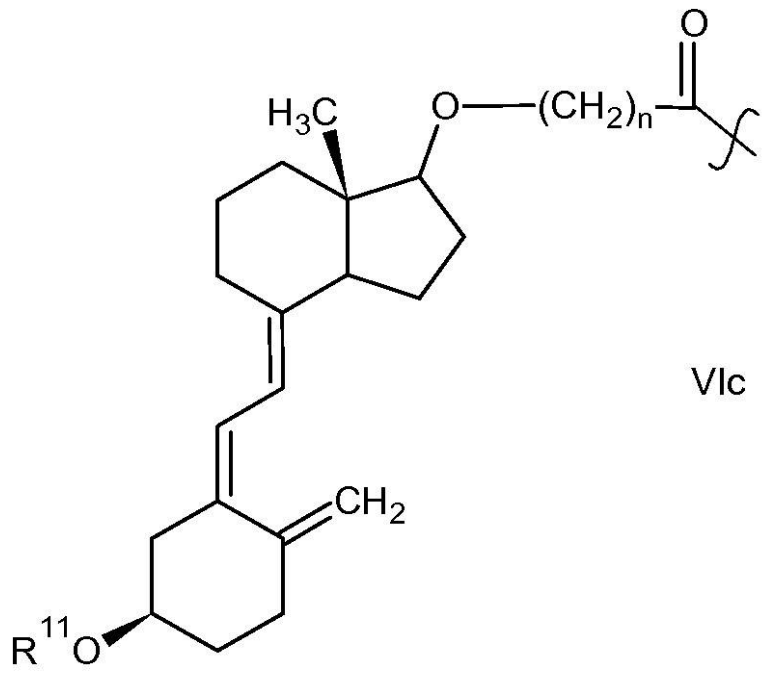
【化７】



VIb

又は

【化８】



VIc

であるか又は水素原子であり、

ここで、少なくとも１つのＲ[1]が水素原子ではなく、

ｐ、ｑ及びｎは、上記のとおり定義され、

ｒは、独立して、例えば、１～１０、又は１～９、又は１～８、又は１～７、又は１～６、又は１～５、又は１～４、又は１～３、又は１～２、又は２～１０、又は２～９、又は２～８、又は２～７、又は２～６、又は２～５、又は２～４、又は２～３、又は３～１０、又は３～９、又は３～８、又は３～７、又は３～６、又は３～５、又は３～４、又は４

～１０、又は４～９、又は４～８、又は４～７、又は４～６、又は４～５、又は５～１０、又は５～９、又は５～８、又は５～７、又は５～６、又は６～１０、又は６～９、又は６～８、又は６～７、又は７～１０、又は７～９、又は７～８、又は８～１０、又は８～９、又は９～１０の整数であり、
ｓは、例えば、１～１０、又は１～９、又は１～８、又は１～７、又は１～６、又は１～５、又は１～４、又は１～３、又は１～２、又は２～１０、又は２～９、又は２～８、又は２～７、又は２～６、又は２～５、又は２～４、又は２～３、又は３～１０、又は３～９、又は３～８、又は３～７、又は３～６、又は３～５、又は３～４、又は４～１０、又は４～９、又は４～８、又は４～７、又は４～６、又は４～５、又は５～１０、又は５～９、又は５～８、又は５～７、又は５～６、又は６～１０、又は６～９、又は６～８、又は６～７、又は７～１０、又は７～９、又は７～８、又は８～１０、又は８～９、又は９～１０の整数であり、
R^7は、水素原子又はアルキル基である。

【００４１】

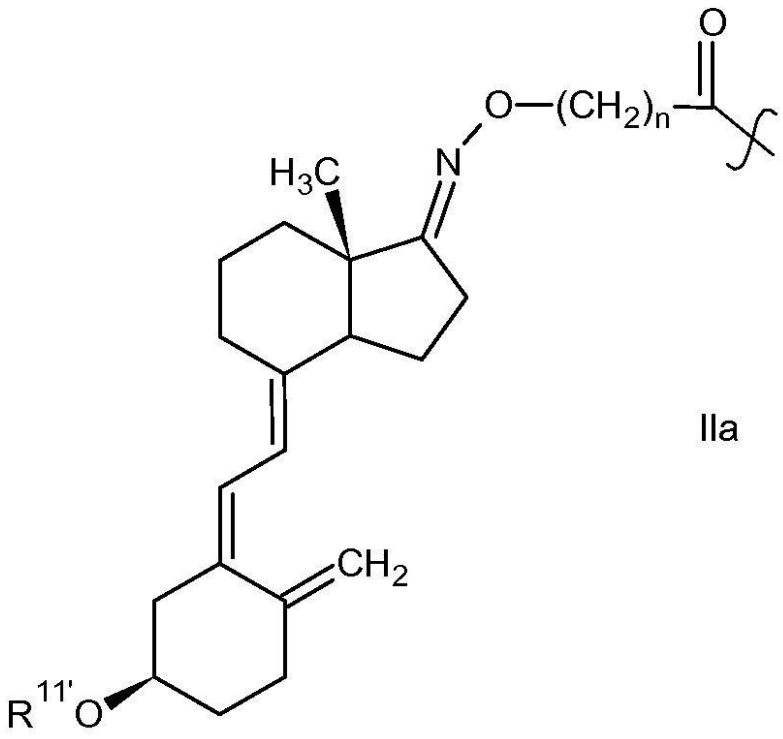
本明細書に記載の原理に従う幾つかの例は、例えば、式（ＩＩ）の化合物に対して生じたか、又は上記の化合物のうちの２つ以上の混合物に対して生じた抗体等の結合パートナーに関する。

式（ＩＩ）の化合物は、

$NHR^{1'}-(CH_2)_r,-NR^{1''}-((CH_2)_r,-NR^{1'''})_s,-(CH_2)_r,-NR^7'-Z'$　（ＩＩ）

であり、式中、
$R^{1'}$、$R^{1''}$又は$R^{1'''}$は、各々独立して、

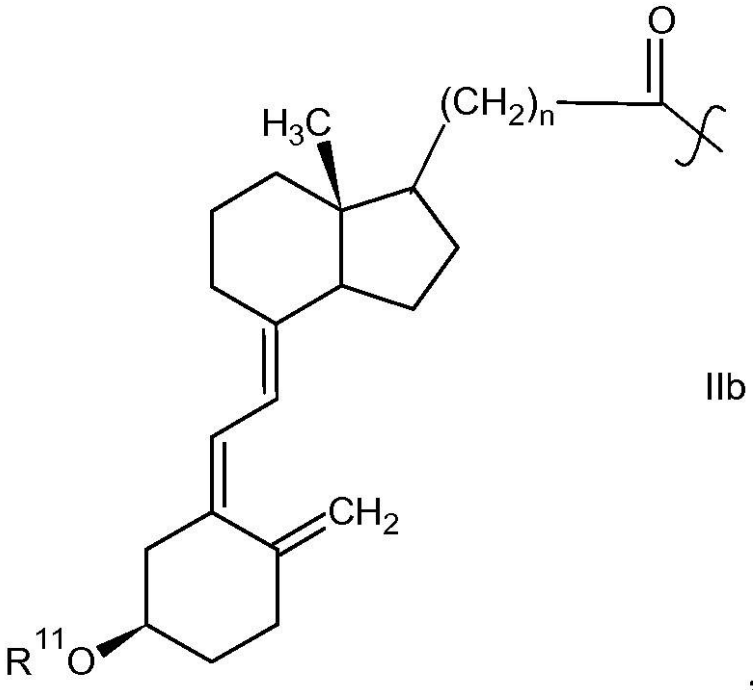
【化９】



IIa

、

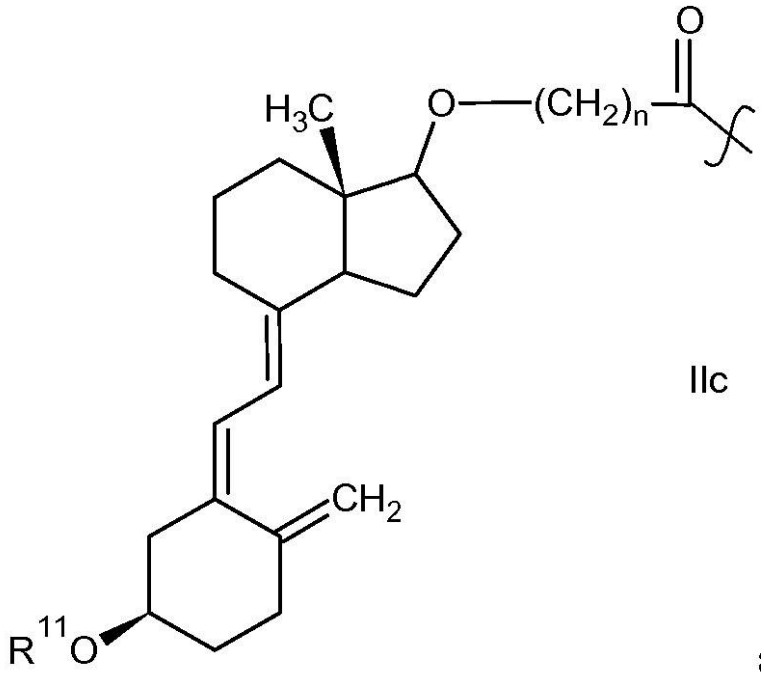
【化１０】



IIb

、

【化１１】



IIc

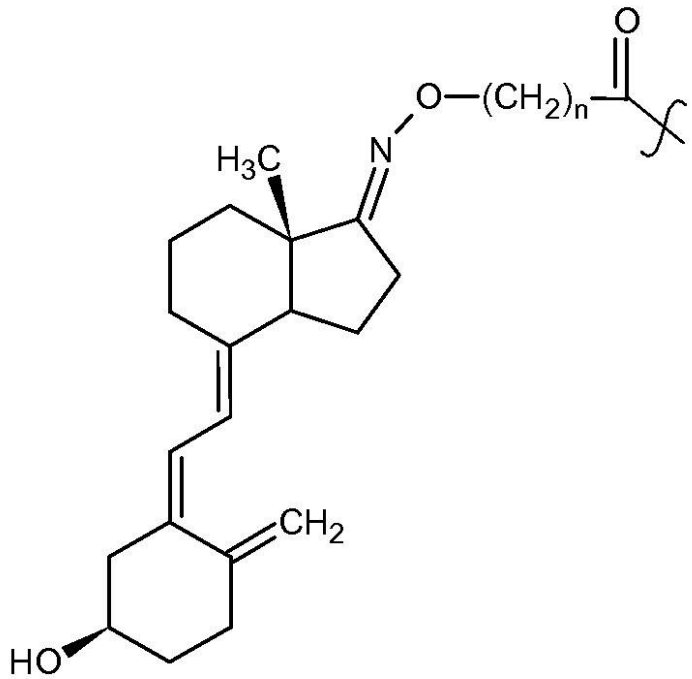
及び水素原子からなる群から選択され、
ここで、Ｒ１’、Ｒ１’’又はＲ１’’’のうちの少なくとも１つは、水素原子ではなく、
ｎ及びｗは、上記のとおり定義され、
ｒ’は、独立して、例えば、１～１０、又は１～９、又は１～８、又は１～７、又は１～６、又は１～５、又は１～４、又は１～３、又は１～２、又は２～１０、又は２～９、又は２～８、又は２～７、又は２～６、又は２～５、又は２～４、又は２～３、又は３～１０、又は３～９、又は３～８、又は３～７、又は３～６、又は３～５、又は３～４、又は

４～１０、又は４～９、又は４～８、又は４～７、又は４～６、又は４～５、又は５～１０、又は５～９、又は５～８、又は５～７、又は５～６、又は６～１０、又は６～９、又は６～８、又は６～７、又は７～１０、又は７～９、又は７～８、又は８～１０、又は８～９、又は９～１０の整数であり、
ｓ’は、例えば、１～１０、又は１～９、又は１～８、又は１～７、又は１～６、又は１～５、又は１～４、又は１～３、又は１～２、又は２～１０、又は２～９、又は２～８、又は２～７、又は２～６、又は２～５、又は２～４、又は２～３、又は３～１０、又は３～９、又は３～８、又は３～７、又は３～６、又は３～５、又は３～４、又は４～１０、又は４～９、又は４～８、又は４～７、又は４～６、又は４～５、又は５～１０、又は５～９、又は５～８、又は５～７、又は５～６、又は６～１０、又は６～９、又は６～８、又は６～７、又は７～１０、又は７～９、又は７～８、又は８～１０、又は８～９、又は９～１０の整数であり、
R^{7}’は、水素原子又はアルキル基であり、
R^{11}’は、水素原子、アルキル基又はアシル基であり、
Ｚ’は、ポリ（アミノ酸）免疫原性担体又は非ポリ（アミノ酸）免疫原性担体である。

【００４２】

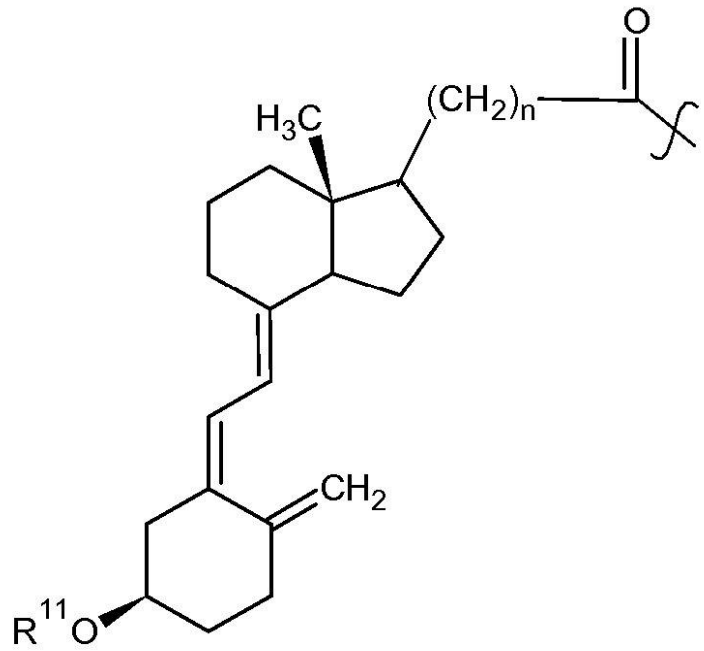
幾つかの例では、ｓ’は、１である。幾つかの例では、R^{7}’は、水素原子である。幾つかの例では、ｒ’は、２である。幾つかの例では、R^{1}’’及びR^{1}’’’は、水素原子である。幾つかの例では、R^{1}’及びR^{1}’’’が水素原子である。幾つかの例では、R^{1}’及びR^{1}’’’が水素原子である。幾つかの例では、R^{1}’、R^{1}’’及びR^{1}’’’のいずれも水素原子ではなく、即ち、R^{1}’、R^{1}’’及びR^{1}’’’は、全て

【化１２】



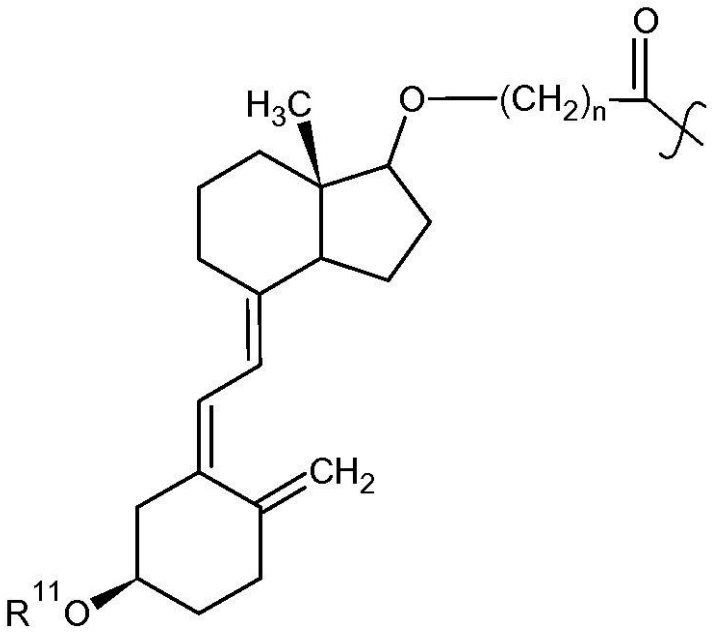
又は

【化１３】



又は

【化１４】



である。

【００４３】

本明細書に記載の原理に従う幾つかの例は、本明細書に記載の原理に従う抗体の有効量を含有する医薬組成物に関する。

【００４４】

［化合物の調製］

本明細書に記載の原理に従うＨＭＣＨＥＭＯＩＯ誘導体である化合物の調製方法の例を以下に示すが、これらは説明を目的とするものであり、本発明を限定するものではない。他のアプローチを採用して、本明細書に記載の原理と一致する上記の化合物及び他の化合物を生成させてもよい。

【００４５】

式（ＶＩＩ）の化合物（（７ａＳ，Ｅ）－４－（（Ｚ）－２－（（Ｒ）－５－ヒドロキシ－２－メチレンシクロヘキシリデン）エチリデン）－７ａ－メチルオクタヒドロ－１Ｈ－インデン－１－オン）の調製例を図２に示す。参照する図２では、式（ＶＩＩＩ）の化合物（式中、R^{11}Ｏはアセチル基である。）を処理して式（ＩＸ）のケタールを生成させる。一例では、式（ＶＩＩＩ）の化合物を、ベンゼン等の芳香族溶媒中で、強い有機酸（例えばｐ－トルエンスルホン酸）の存在下、ケタールを生成させる条件（温度及び時間）下で、エチレングリコールで処理する。幾つかの例では、上記反応は、約１０時間～約２４時間、又は約１２～約２０時間に亘り、還流下に実施する。

【００４６】

式（ＩＸ）の化合物を処理して、ハロゲン化物基（例えば塩化物基又は臭化物基）を導入する。一例では、式（ＩＸ）の化合物を、アルカン（例えばヘキサン）等の有機溶媒中、臭化物グループを、例えば、式（ＩＸ）の化合物に導入する条件下で、Ｎ－ブロモスクシンイミド及びフリーラジカル開始剤（例えばアゾビスイソブチロニトリル）で処理し、式（Ｘ）の化合物を得る。幾つかの例では、上記反応を、約３０分間、還流下に実施する。

【００４７】

式（Ｘ）の化合物のハロゲンを除去し、共役する２つの二重結合を有する式（ＸＩ）の化合物を得る。一例では、式（Ｘ）の化合物を、例えばエーテル（例えばテトラヒドロフラン）等の極性有機溶媒中、例えば、ハロゲン化水素を除去する条件下で、例えばフッ化テトラ－ｎ－ブチルアンモニウム等の穏やかな塩基で処理し、二重結合（式ＸＩの化合物）を生成させる。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約２５℃である。反応時間は、約２時間である。

【００４８】

式（ＸＩ）の化合物のアセチル基（R^{11}）を、例えばアルカノール（例えばメタノール又はエタノール）等の極性有機溶媒中で、例えば水酸化ナトリウム又は水酸化カリウム等の無機塩基による処理により除去する。反応成分を、アセチル基を除去する条件下に供し、式（ＸＩＩ）の化合物を得る。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約２５℃、即ち、室温である。反応時間は、約４時間～約８時間である。

【００４９】

式（ＸＩＩ）の化合物のケタール基を、例えば、例えばｐ－トルエンスルホン酸等の強い有機酸を用いて、水と例えばアセトン等の極性有機溶媒との混合物中、ケタールを除去する条件下で、除去し、式（ＸＩＩＩ）の化合物を得る。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約２５℃である。反応時間は、約１２時間～約４８時間である。

【００５０】

式（ＶＩＩ）の化合物は、式（ＸＩＩＩ）の化合物を、例えばアルカノール（例えばメタノール又はエタノール）、エーテル（例えばエチルエーテル）、ケトン（例えばアセトン）又はこれらの２つ以上の組合せ等の極性有機溶媒中、式（ＸＩＩＩ）を開環させる条件下で、開環用の試薬により、例えば紫外線（光化学反応）で、処理することにより形成される。幾つかの例では、光化学反応中の温度は、約－２０℃～約０℃である。光化学反応の時間は、約１～約１０分、又は約３～約５分である。光化学反応後、エタノール中で約３時間、中間生成物の還流を行なう。

【００５１】

図３は、説明のためであって限定するものではないが、式（ＩＩａ）（ここで、Ｚは、これに限定されないが、例えばＢＳＡである。）の化合物の調製方法の例を示す。参照する図３では、式（ＶＩＩ）の化合物を、アミノオキシ酢酸（ＸＩＸ）と反応させ、式（ＸＸ）のオキシム（２－（（７ａＳ，Ｅ）－４－（（Ｚ）－２－（（Ｒ）－５－ヒドロキシ－２－メチレンシクロヘキシリデン）エチリデン）－７ａ－メチルオクタヒドロ－１Ｈ－インデン－１－イリデンアミノオキシ）酢酸）を生成させる。反応は、例えばアルコール（例えばメタノール又はエタノール）等の有機溶媒中、オキシムを生成させる条件下で実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１０℃～約３０℃、又は約１５℃～約２５

℃である。反応時間は、約１時間～約３０時間、又は約２時間～約２４時間である。

【００５２】

別個の反応において、ポリ（アミノ）酸免疫原性担体（本例では、これは例示のためであって限定するものではないが、ＢＳＡ（式（ＩＩ）のＺ’がＢＳＡである。））を、式（ＸＸＩ）の化合物と合一して、式（ＸＸＩａ）の化合物を生成させる。反応は、約５．０～約７．０、又は約５．５～約６．５、又は約６のｐＨで、水性緩衝媒体中で、実施する。ＢＳＡのカルボン酸官能基とＸＸＩの１つ以上のアミノ基との反応を促進するための活性化剤を反応媒体中に含有させる。そのようなカップリング剤としては、これらに限定されないが、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド（ＥＤＡＣ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）又はＮ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－Ｏ－（Ｎ－スクシンイミジル）ウロニウムテトラフルオロボレート又はこれらの２つ以上の組合せが挙げられる。反応は、アミドを生成させる条件下で実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約２５℃である。反応時間は、例えば、約３時間～約２４時間、又は約４時間～約２０時間、又は約４時間～約１０時間である。

【００５３】

式（ＸＸ）の化合物を、例えば、これらに限定されないが、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＡＣ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）又はＮ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－Ｏ－（Ｎ－スクシンイミジ、ル）ウロニウムテトラフルオロボレート、又は上記の２つ以上の組合せ等の活性化剤で処理して、活性化された（ＸＸ）を生成させる。反応は、例えばアルカノール（例えばメタノール又はエタノール）、エーテル（例えばエチルエーテル又はテトラヒドロフラン）、ケトン（例えばアセトン）、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、ジクロロメタン若しくはジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）又はこれらの２つ以上の組合せ等の極性有機溶媒で実施するが、極性有機溶媒は、水を含有していてもよい。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約３０℃、又は約２０℃～約２５℃、即ち、室温である。反応時間は、約１２時間～約３６時間、又は約２０～約３０時間である。活性化された（ＸＸ）を式（ＸＸＩａ）の化合物と反応させ、式（ＩＩａ）の化合物を得る。上記のとおり、$R^{1'}$は式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、$R^{1''}$及び$R^{1'''}$は、各々、水素原子である。しかしながら、本明細書に記載の原理と一致するように、得られる生成物は化合物の混合物である場合もあり、混合物の１つの化合物においては、$R^{1'}$が式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、混合物の他の化合物においては、$R^{1'}$及び$R^{1''}$が両方とも式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、混合物の他の化合物においては、$R^{1'}$及び$R^{1'''}$がいずれも式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、混合物の他の化合物においては、$R^{1'}$、$R^{1''}$及び$R^{1'''}$が３つとも式（ＩＩａ）の化合物の部分である。反応は、例えばＤＭＦ又はＤＭＳＯ等の有機溶媒中、例えば、アミドを生成させる条件下で実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約３０℃、又は約２０℃～約２５℃、即ち、ほぼ室温である。反応時間は、約１２時間～約３６時間、又は約２０～約３０時間である。

【００５４】

図４は、これは例示のためであって限定するものではないが、式（ＶＩａ）の化合物を調製し、式（ＶＩａ）の化合物を式（ＩＩａ）の化合物（ここで、Ｚは、これは例示のためであって限定するものではないが、ＢＳＡである。）に変換する方法の代替的な例を表す。参照する図４では、式（ＶＩＩ）の化合物を、アミノオキシ酢酸（ＸＩＸ）と反応させ、式（ＸＸ）のオキシムを生成させる。反応は、例えばアルコール（例えばメタノール又はエタノール）等の有機溶媒中、オキシムを生成させる条件下で実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１０℃～約３０℃、又は約１５℃～約２５℃である。反応時間は、約１時間～約３０時間、又は約２時間～約２４時間である。

【００５５】

式（ＸＸ）のオキシムを式（ＸＸＩ）の化合物と結合させ、式（ＶＩａ）の化合物を生成させる。反応は、例えばアルカン（例えばヘキサン又はペンタン）等の有機溶媒中、アミドを生成させる条件下で実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約２

５℃である。反応時間は、約１０時間～約４８時間である。

【００５６】

式（ＶＩａ）の化合物を、ポリ（アミノ）酸免疫原性担体と反応させ、式（ＩＩａ）の化合物（ここで、式（ＩＩ）のＺ’は、これは例示のためであって限定するものではないが、ＢＳＡである。）を得る。図示するとおり、$R^{1'}$は、式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、$R^{1''}$及び$R^{1'''}$は、各々、水素原子である。しかしながら、本明細書に記載の原理と一致して、得られる生成物は、化合物の混合物である場合もあり、混合物の１つの化合物においては、$R^{1'}$が式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、混合物の他の化合物においては、$R^{1'}$及び$R^{1''}$が両方とも式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、混合物の他の化合物においては、$R^{1'}$及び$R^{1'''}$が両方とも式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、混合物の他の化合物においては、$R^{1'}$及び$R^{1''}$及び$R^{1'''}$の３つがいずれも式（ＩＩａ）の化合物の部分である。反応は、例えばアルカン（例えばヘキサン又はペンタン）等の有機溶媒中、アミドを生成させる条件下で実施する。幾つかの例では、反応中の温度は約１５℃～約２５℃である。反応時間は、約１０時間～約４８時間である。

【００５７】

参照する図５には、これは例示のためであって限定するものではないが、本明細書に記載の原理に従う化合物の調製方法の他の例を示す。他のアプローチを用いて、本明細書に記載の原理に従う化合物を生成させてもよい。式（ＸＶＩＩＩ）の化合物（Ｙが式（Ｉ）において、Ｙが炭素原子である。）の調製を図５で示す。参照する図５では、式（ＶＩＩ）の化合物（例えば図３に記載のようにして調製した。）を処理して、フリーのヒドロキシ基を保護し（R^{13}は、保護基である。）、式（ＸＩＶ）の化合物を生成させる。反応条件は、例えば、保護基の性質に、依存する。

【００５８】

一例では、式（ＶＩＩ）の化合物を、シリルエーテルを生成させる条件下で、塩化ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルで処理する。反応は、例えばピリジン、ジメチルスルホキシド、エーテル（例えばテトラヒドロフラン、エチルエーテル又は１，４－ジオキサン）、アセトニトリル、ジクロロメタン又はジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）等の極性有機溶媒中で、実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１０℃～約３０℃、又は約１５℃～約２５℃である。反応時間は、約１時間～約３０時間、又は約２時間～約２４時間である。

【００５９】

保護基の例としては、これは例示であって限定ではないが、例えば、シリル基（これらに限定されないが、例えば、トリメチルシリル、トリメチルシリル、ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリル、トリイソプロピルシリル、ｔｅｒｔ－ブチルジフェニルシリル基等）、ｔ－ブトキシカルボニル（ｔ－Ｂｏｃ）基、フルオレニルメチルオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）基、アセトアミノメチル（Ａｃｍ）基、トリフェニルメチル（Ｔｒｔ）基、ベンジルオキシカルボニル基、ビフェニルイソプロピルオキシカルボニル基、１－アミルオキシカルボニル基、イソボルニルオキシカルボニル基、α－ジメチル－３，５－ジメトキシベンジルオキシカルボニル基、ｏ－ニトルフェニルスルフェニル基、２－シアノ－１，１－ジメンチル－エトキシカルボニル基、ブロモベンジルオキシ基、カルバミル基及びホルミル基等が挙げられる。

【００６０】

式（ＸＶ）の化合物は、式（ＸＩＶ）の化合物から、例えば、亜鉛の存在下のα－ハロエステルとの反応（レフォルマトスキー反応）によって形成される。この例では、式（ＸＩＶ）の化合物を、例えば$BrZnCH_2COOR^{14}$（Ｚｎ及び実施例のα－ブロモ酢酸エチル、ｗ＝１）等のレフォルマトスキー試薬で処理し、式（ＸＶ）の化合物を得る。反応は、例えばエーテル（例えばテトラヒドロフラン又はエチルエーテル）又は芳香族溶媒（例えばベンゼン又はトルエン）等の有機溶媒中で、実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約４℃～約１００℃、又は約１０℃～約９０℃である。反応時間は、約４時

間～約２４時間である。

【００６１】

式（ＸＶ）の化合物のフリーのヒドロキシ基を還元して、式（ＸＶＩ）の化合物を生成させる。式（ＸＶ）の化合物は、これに限定されないが、例えば、トシレートエステルの形成、それに続く例えば$LiAlH_4$又は$NaBH_4$等の金属水素化物による処理、ヒドロキシ基の除去によるアルケンの生成（例えば濃有機酸（例えば濃硫酸又は濃塩酸）による処理等による。）、それに続く、例えばプラチナ又はパラジウム等の触媒の存在下における水素化を含む方法によって処理することによって、ヒドロキシ基が還元される。反応の条件は、例えば使用される試薬の性質及び溶媒の性質のうちの一方又は両方に依存する。

【００６２】

得られる式（ＸＶＩ）の化合物を処理することによりエステル基を加水分解してカルボン酸基とし（脱エステル化反応）、式（ＸＶＩＩ）の化合物を得る。多くのアプローチが上記脱エステル化反応に利用できるが、当該アプローチの例としては、これらに限定されないが、例えば、鹸化、即ち、加熱を伴う、例えばＮａＯＨ又はＫＯＨ等の水性塩基による、処理、又は酸加水分解、即ち、例えば（例えば塩酸又は硫酸等の）水性鉱酸等の水性酸による処理等が挙げられる。反応条件は、例えば、試薬の性質及びエステルの性質の１つ以上に依存する。

【００６３】

式（ＸＶＩＩＩ）の化合物は、式（ＸＶＩＩ）の化合物からの保護基R^{13}の除去によって形成される。様々なアプローチが保護基の除去に使用でき、かかる反応としては、これらに限定されないが、希釈した（例えば塩酸又は硫酸等の）鉱酸による処理；（例えば酢酸等の）有機酸による処理を、例えばアルカノール（例えばメタノール又はエタノール）、エーテル（例えばエチルエーテル又はテトラヒドロフラン）、ケトン（例えばアセトン）、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、ジクロロメタン若しくはジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）又はこれらのうちの２つ以上の組合せ等の極性有機溶媒中（これは、水を含んでいてもよい。）における、保護基を除去する条件下での反応により、式（ＸＶＩＩＩ）の化合物を得る反応；が挙げられる。反応条件は、例えば、試薬の性質及び保護基の性質の１つ以上に依存する。

【００６４】

図６は、これは例示のためであって限定するものではないが、式（ＶＩｂ）の化合物を調製し、式（ＶＩｂ）の化合物の式（ＩＩｂ）の化合物（これは例示のためであって限定するものではないが、式中、Ｚ’は、ＫＬＨである。）へ転換する方法の例を表す。参照する図６では、式（ＸＶＩＩＩ）の化合物を処理してカルボン酸基を活性化し、これに限定されないが、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル（式ＸＸＩＩの化合物）の形成反応等を行なわせる。反応は、例えば、ジメチルスルホキシド、エーテル（例えばテトラヒドロフラン又はエチルエーテル）、アセトニトリル、ジクロロメタン又はジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）等の極性有機溶媒中で、ＮＨＳエステルを形成させる条件下で、実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約２５℃である。反応時間は、約４時間～約４８時間である。

【００６５】

式（ＸＸＩＩ）のＮＨＳエステルを、式（ＸＸＩ）の化合物と結合させて、式（ＶＩｂ）の化合物を生成させる。反応は、例えばアルカン（例えばヘキサン又はペンタン）等の有機溶媒中、例えばアミドを生成させる条件下で、実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約２５℃である。反応時間は、約４時間～約４８時間である。

【００６６】

式（ＶＩｂ）の化合物を、ポリ（アミノ）酸免疫原性担体（式（ＩＩ）のＺ’は、例えば、ＫＬＨである。）と反応させて、式（ＩＩｂ）の化合物を得る。図示されるとおり、R^{1}’は、式（ＩＩｂ）の化合物の部分であり、R^{1}’’及びR^{1}’’’は、各々、水素原子である。しかしながら、本明細書に記載の原理と一致して、得られる生成物は、化合

物の混合物であってもよく、混合物の１つの化合物では、$R^{1'}$が式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、混合物の他の化合物では、$R^{1'}$及び$R^{1''}$が両方とも式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、混合物の他の化合物では、$R^{1'}$及び$R^{1''''}$が両方とも式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、混合物の他の化合物では、$R^{1'}$及び$R^{1''}$及び$R^{1'''}$の３つ全てが式（ＩＩｂ）の化合物の部分である。反応は、例えばアルカン（例えばヘキサン又はペンタン）等の有機溶媒中、アミドを生成させる条件下で実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約２５℃である。反応時間は、約４時間～約４８時間である。

【００６７】

代替的経路では、式（ＩＩｂ）の化合物は、式（ＸＶＩＩＩ）の化合物から、式（ＩＩａ）の化合物の調製について上記図３に関して説明したのと同様の方法で、調製してもよい。

【００６８】

本明細書に記載の原理に従う化合物の調製方法の他の例を、これは説明のためであって限定するものではないが、図７を参照しつつ記載する。他のアプローチを用いて、本明細書に記載の原理と一致する化合物を生成させてもよい。式（ＸＸＶＩＩ）の化合物（式（Ｉ）において、Ｙが酸素原子であり、ｗが０～１０又は１～１０である。）の調製を、図７中に示す。参照する図７では、式（ＶＩＩ）の化合物（例えば、図２に関して述べたように調製した。）を処理してフリーのヒドロキシ基を保護して（R^{15}は、保護基である。）、式（ＸＸＩＩＩ）の化合物を生成させる。反応条件は、例えば保護基の性質に依存する。

【００６９】

一例では、式（ＶＩＩ）の化合物を、シリルエーテルを形成する条件下で、これは例示のためであって限定するものではないが、塩化ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルで、処理する。反応は、例えばピリジン、ジメチルスルホキシド、エーテル（例えばテトラヒドロフラン、エチルエーテル又は１，４－ジオキサン）、アセトニトリル、ジクロロメタン又はジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）等の極性有機溶媒中で実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約２５℃である。反応時間は、約４時間～約４８時間である。

【００７０】

式（ＸＸＩＩＩ）の化合物から、例えば、ケトン基のヒドロキシ基への還元により、式（ＸＸＩＶ）の化合物を生成させる。式（ＸＸＩＩＩ）の化合物を、これに限定されないが、例えば$LiAlH_4$又は$NaBH_4$等の金属水素化物による処理を始めとする方法により、ヒドロキシ基を還元処理して、式（ＸＸＩＶ）の化合物を得る。上記反応は、例えばアルカノール（例えばエタノール）等の有機溶媒中で実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約０℃～約２５℃である。反応時間は、約０．５時間～約４時間である。

【００７１】

式（ＸＸＶ）の化合物は、式（ＸＸＩＶ）の化合物から、例えば塩基の存在下でのハロエステル（これに限定されないが、例えばα－ハロエステル）との反応によって、形成される。この例では、式（ＸＸＩＶ）の化合物を、例えば、$BrCH_2COOR^{16}$（表示の例では、α－ブロモ酢酸エチル。ｗは１であり、R^{16}はエチル基である。）で処理し、式（ＸＸＶ）の化合物を得る。この反応は、例えばＫＯＨ、ＮａＯＨ、Na_2CO_3又はK_2CO_3等の塩基の存在下で、式（ＸＸＩＶ）の化合物のヒドロキシ基から、アルコキシドイオンを生成させ、このアルコキシドをハロエステルと反応させることにより、実施される。反応溶媒は、水性溶媒であり、例えば上記の極性有機溶媒を１％～４０％含有していてもよい。幾つかの例では、反応中の温度は、例えば、約５０℃～約１００℃、又は約５０℃～約９０℃である。反応時間は、例えば、約０．５時間～約２４時間、又は約１時間～約８時間である。

【００７２】

得られる式（ＸＸＶ）の化合物を処理してエステル基をカルボン酸基に加水分解（脱エステル化反応）させて、式（ＸＸＶＩ）の化合物を得る。多くのアプローチを脱エステル

化に利用できるが、当該処理としては、これらに限定されないが、例えば、鹸化、即ち、加熱を伴う、例えばＮａＯＨ又はＫＯＨ等の水性塩基による処理；酸加水分解、即ち、例えば水性鉱酸等の水性酸（例えば塩酸又は硫酸等）による処理が挙げられる。反応条件は、例えば試薬の性質及びエステルの性質の１つ以上に依存する。

【００７３】

式（ＸＸＶＩＩ）の化合物は、式（ＸＸＶＩ）の化合物からの保護基R^{15}の除去によって形成される。様々なアプローチを用いて保護基を除去できるが、その例としては、これらに限定されないが、希鉱酸（例えば塩酸又は硫酸等）による処理；有機酸（例えば酢酸等）による処理を、例えばアルカノール（例えばメタノール又はエタノール）、エーテル（例えばエチルエーテル、テトラヒドロフラン又は１，４－ジオキサン）、ケトン（例えばアセトン）、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル、ジクロロメタン、ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）等の極性有機溶媒、又はこれらのうちの２つ以上の組合せ（これらは、水を含有していてもよい。）中で、保護基を除去する条件下で行ない、式（ＸＸＶＩＩ）の化合物を得ることが挙げられる。反応条件は、例えば、試薬の性質及び保護基の性質の１つ以上に依存する。

【００７４】

図８は、これは説明のためであって限定するものではないが、式（ＶＩｃ）の化合物を調製し、式（ＶＩｃ）の化合物の式（ＩＩｃ）の化合物へ変換する方法の一例を表す（ここで、これは例示であって限定ではないが、式中、Ｚ’は、酵素Ｇ６ＰＤＨである。）。参照する図８では、式（ＸＸＶＩＩ）の化合物を処理してカルボン酸基を活性化して、これに限定されないが、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル（式（ＸＸＶＩＩＩ）の化合物）を生成させる反応を行なわせる。反応は、例えばジメチルスルホキシド、エーテル（例えばテトラヒドロフラン、エチルエーテル又は１，４－ジオキサン）、アセトニトリル、ジクロロメタン又はジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）等の極性有機溶媒中、例えば、ＮＨＳエステルを生成させる条件下で実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約２５℃である。反応時間は、約１時間～約２４時間である。

【００７５】

式（ＸＸＶＩＩＩ）のＮＨＳエステルを式（ＸＸＩ）の化合物と結合させ、式（ＶＩｃ）の化合物を生成させる。反応は、例えばアルカン（例えばヘキサン又はペンタン）等の有機溶媒中、例えば、アミドを生成させる条件下で、実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約２５℃である。反応時間は、約１時間～約２４時間である。

【００７６】

式（ＶＩｃ）の化合物を、酵素Ｇ６ＰＤＨ（例えば、式ＩＩのＺ’は、Ｇ６ＰＤＨである。）と反応させ、式（ＩＩｃ）の化合物を得る。図示するとおり、$R^{1'}$は、式（ＩＩｃ）の化合物の部分であり、$R^{1''}$及び$R^{1'''}$は、各々、水素原子である。しかしながら、本明細書に記載の原理と一致して、得られる生成物は、化合物の混合物であってもよく、混合物の１つの化合物においては、$R^{1'}$が式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、混合物の他の化合物においては、$R^{1'}$及び$R^{1''}$は両方とも式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、混合物の他の化合物においては、$R^{1'}$及び$R^{1'''}$は両方とも式（ＩＩａ）の化合物の部分であり、混合物の他の化合物においては、$R^{1'}$、$R^{1''}$及び$R^{1'''}$の３つは全て式（ＩＩｃ）の化合物の部分である。反応は、例えばアルカン（例えばヘキサン又はペンタン）等の有機溶媒中、アミドを生成させる条件下で実施する。幾つかの例では、反応中の温度は、約１５℃～約２５℃である。反応時間は、約１時間～約２４時間である。

【００７７】

代替的経路では、式（ＩＩｃ）の化合物は、式（ＸＸＶＩＩ）の化合物から、式（ＩＩａ）の化合物の調製に関して、図３で記載された方法と類似する上述の方法で調製することができる。

【００７８】

本明細書に記載の原理に従う他の化合物は、上述の方法に類似する方法で調製すること

ができる。

【００７９】

［結合パートナーの調製］

Ｚがポリ（アミノ酸）免疫原性担体又は非ポリ（アミノ酸）免疫原性担体である、本明細書に記載の原理に従う化合物の例を用いて、例えば、ビタミンＤに対するアプタマー又はビタミンＤに対する抗体等の、ビタミンＤに対する結合パートナーを調製することができ、これらの例としては、例えば、ビタミン$Ｄ_3$に特異的な抗体、ビタミン$Ｄ_2$に特異的な抗体、２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_3$に特異的な抗体、２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_2$に特異的な抗体、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_3$に特異的な抗体及び３－エピ－２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_2$に特異的な抗体等が挙げられるが、これらに限定されない。特に興味深い例としては、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_3$に特異的な抗体、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_2$に特異的な抗体及び他のビタミンＤ化合物のエピマーに特異的な抗体（「ビタミンＤエピマーに対する抗体」という。）が挙げられ、これらは、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_3$及び３－エピ－２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_2$のアッセイに使用するか、又は、非エピマービタミンＤのアッセイに使用することにより、ビタミンＤの存在を検出すべき試料中に存在しうる、例えば３－エピ－２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_3$及び３－エピ－２５－ヒドロキシビタミン$Ｄ_2$等の、エピマー形態のビタミンＤによる干渉を減少し又は排除することができる。

【００８０】

抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよく、また、完全長の免疫グロブリン又はその断片を含んでいてもよく、当該免疫グロブリンには、これらに限定されないが、例えばＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭ等の様々なクラス及びアイソタイプが含まれる。前記断片は、Ｆａｂ、Ｆｖ及び$Ｆ（ａｂ’）_2$、Ｆａｂ’等を含んでいてもよい。更に、特定の分子への結合親和性が維持される限り、必要に応じて、免疫グロブリン又はその断片の凝集体、ポリマー及び接合体を使用できる。

【００８１】

本明細書に記載の原理に従う抗体は、これらに限定されないが、例えば、宿主の免疫及び血清（ポリクローナル）の採取、連続的なハイブリッド細胞株の調製、並びに分泌されたタンパク質（モノクローナル）の採取、又は天然の抗体との特異的な結合に必要となるアミノ酸配列を少なくともコードするヌクレオチド配列又はその変異体等のクローニング又は発現等を始めとする技法により調製することができる。

【００８２】

モノクローナル抗体は、連続的にハイブリッド細胞株を調製し、分泌されたタンパク質を回収する等の技術（体細胞雑種形成法）により、調製できる。モノクローナル抗体は、非特許文献２の標準的方法によって調製できる。モノクローナル抗体の技術のレヴューは、非特許文献３、非特許文献４、非特許文献５及び非特許文献６において見ることができる。

【００８３】

抗体調製の他のアプローチでは、抗体結合部位をコードする配列を染色体ＤＮＡから取得し、クローニングベクターに挿入することができ、それを細菌において発現させ、対応する抗体結合部位を有する組み換え型タンパク質を調製することができる。このアプローチは、天然の抗体との特異的な結合に必要となるアミノ酸配列又はその変異体を少なくともコードするヌクレオチド配列等のクローニング又は発現により実施できる。

【００８４】

モノクローナル抗体調製の１つのアプローチでは、第一ステップとして、マウス、ネズミ、ヤギ、ヒツジ又はウシ等の抗体産生動物の、式（Ｉ）の化合物（式中、Ｚは、例えば免疫原性担体である。）を含有する免疫原による免疫が含まれる。免疫処置は、完全フロイント補助剤等の補助剤又はモノホスホリルリピドＡ及び合成トレハロースジコリノミコラート補助剤等の他の補助剤を使用し又は使用しないで、実施できる。次のステップは、脾臓細胞を抗体産生動物から単離し、抗体産生脾臓細胞と適切な融合パートナー（典型的

には骨髄腫細胞）とを、例えばポリエチレングリコールの使用又は他の技術により融合させることを含む。典型的には、用いられる骨髄腫細胞は、ヒポキサンチン－チミジン（ＨＴ）培地中では通常どおり増殖するが、融合細胞の選択用のヒポキサンチン－アミノプテリン－チミジン（ＨＡＴ）培地中では増殖できない骨髄腫細胞である。次のステップは、典型的には、ＨＡＴ培地中での選択による、融合細胞の選択を含む。次のステップは、例えば酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）又はスクリーニングに適切な他の免疫測定法等の、免疫測定法を用いた、適切な抗体の産生のためのクローン化融合細胞のスクリーニングを含む。

【００８５】

必要となる特異性を有する（本明細書に記載の原理に従って、免疫原から調製された）抗体は、これらは説明のためであって限定するものではないが、例えば、ＥＬＩＳＡ、ドットブロット、ウエスタン分析及び表面プラズモン共鳴等を始めとするスクリーニング方法によって選択されうる。このようにして、特定のアッセイにおいて、対象のビタミンＤ被検体と結合するが対象外のビタミンＤ分子とは、検出可能ないかなる程度にも結合しない抗体が得られる。本明細書に記載の原理に従う幾つかの例では、対象のビタミンＤ被検体と結合する抗体は、対象のビタミンＤ被検体に対して、例えば、約10^{7}～約10^{14}リットル／モル、又は約10^{7}～約10^{11}リットル／モル、又は約10^{7}～約10^{12}リットル／モル、又は約10^{8}～約10^{14}リットル／モル、又は約10^{8}～約10^{11}リットル／モル、又は約10^{8}～約10^{12}リットル／モルの結合親和性を有する。用語「検出可能な程度」は、対象のビタミンＤ被検体（例えば３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ）と特異的に結合する抗体が、対象外のビタミンＤ分子（例えば非－エピ－ビタミンＤ化合物）に対して、例えば約10^{4}リットル／モル未満、又は約10^{3}リットル／モル未満、又は約10^{2}リットル／モル未満、又は約１０リットル／モル未満の結合親和性を有することを意味する。

【００８６】

本明細書に記載の原理に従う１つの例では、Ｚが免疫原性担体である式（Ｉ）の化合物から調製された免疫原を用いて、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3に特異的な抗体を調製する。当該抗体は、２５－ヒドロキシビタミンD_3、又は、例えば２５－ヒドロキシビタミンＤ、カルシジオール、１，２５－ジヒドロキシビタミンD_3、１，２５－ジヒドロキシビタミンD_4、１，２５－ジヒドロキシビタミンD_5及び１，２５－ジヒドロキシビタミンD_6等の、非－エピ－ビタミンＤ化合物を始めとする他のビタミンＤ変異体とは、検出可能ないかなる程度にも結合しない。

【００８７】

本明細書に記載の原理に従う他の例では、Ｚが免疫原性担体である式（Ｉ）の化合物から調製された免疫原を用いて、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_2に特異的な抗体を調製する。当該抗体は、２５－ヒドロキシビタミンD_2、又は、例えば２５－ヒドロキシビタミンＤ、カルシジオール、１，２５－ジヒドロキシビタミンD_3、１，２５－ジヒドロキシビタミンD_4、１，２５－ジヒドロキシビタミンD_5、及び１，２５－ジヒドロキシビタミンD_6等の、非－エピ－ビタミンＤ化合物を含む他のビタミンＤ変異体と、検出可能ないかなる程度にも結合しない。

【００８８】

一例では、これは説明のためであって限定するものではないが、式（Ｉ）の化合物のＺがＢＳＡである免疫原を用いる。この免疫原は、マウス（例えば、ＢＡＬＢ／ｃマウス、スイスウェブスターマウス又はＡＪ種のマウス）の腹膜内への免疫に用いられる。３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3及びオボアルブミンの接合体（オボアルブミンコンジュゲート）を用いて、これらのマウスから得た血清試料における抗－３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3抗体の検出を行なう。この抗体の、マイクロタイタープレートによるＥＬＩＳＡを用い、オボアルブミンコンジュゲートへの、次いで３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3への、結合性を解析する。最も高い力価を有するマウスを、融合の３日前にブーストする。融合日に、これらのマウスから脾臓細胞を採取し、ＰＥＧによる融

合プロトコルを用いて、骨髄腫細胞株Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３と融合する。約１０日後、プレートＥＬＩＳＡを使用して、抗－３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ$_3$抗体に関して、ハイブリドーマ上清をスクリーニングする。陽性クローンを更に増殖させ、サブクローニングし、上清を、プロテインＡセファロースカラムを用いて、精製する。ＥＬＩＳＡを使用して、精製された抗体試料の、オボアルブミンコンジュゲート及びフリーの３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ$_3$に対する、結合を試験する。

【００８９】

上記のように調製された、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ$_3$又は３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ$_2$に特異的な抗体の具体例としては、これは説明のためであって限定するものではないが、例えば抗体４Ｇ８及び抗体８Ｆ１０が挙げられる。

【００９０】

幾つかの例では、本明細書に記載の原理に従う抗体は、ビタミンＤ化合物の精製に使用できる。例えば、上記のような抗体を支持体に結合させ、当該支持体を、ビタミンＤ化合物の精製に使用できる。一例では、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ$_3$に対する抗体を、アフィニティー精製クロマトグラフィーの基質、例えばカラム等、に結合させ、ビタミンＤ調製物を当該クロマトグラフィー基質と接触させてもよく、これにより、基質上の抗体がビタミンＤ調製物中の３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ$_3$と結合し、他のビタミンＤ化合物が基質から溶出される。

【００９１】

［ビタミンＤに対するアッセイの概要］

本明細書に記載の原理に従う幾つかの例は、ビタミンＤ被検体を含むと考えられる試料中のビタミンＤ被検体の存在及び含有量の一方又は両方を決定する方法に関し、本明細書では「ビタミンＤアッセイ」と称する。

【００９２】

用語「ビタミンＤ」は、２５－ヒドロキシビタミンＤ、カルシジオール、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_2$、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_3$、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_4$、１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_5$、及び１，２５－ジヒドロキシビタミンＤ$_6$のうちの１つ以上を指し、また上記の全てのもののエピマー形態及び代謝産物を含む。即ち、ビタミンＤ被検体には、上記で定義されるビタミンＤ及びビタミンＤのエピマーが含まれる。本明細書に記載の原理に従う幾つかの例は、ビタミンＤのエピマー形態（例えば３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ$_3$又は３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ$_2$）を含有すると考えられる試料中のビタミンＤのエピマー形態の存在及び含有量の一方又は両方を決定する方法に関し、本明細書では「ビタミンＤエピマーアッセイ」と称する。

【００９３】

ビタミンＤ被検体の測定方法の一例では、これは説明のためであって限定するものではないが、試料と、本明細書に記載の原理に従って得られたビタミンＤのエピマーに対する抗体と、ビタミンＤ類縁体及び信号生成システムの部材を含む接合体と、を含有してなる組合せが提供される。

【００９４】

上述のように、試料及び試薬は、「媒体中で組み合わせて」提供される。媒体へ添加して組み合わせる順序は変化しうるが、本明細書で記載されるアッセイフォーマットでは、或る優先順位がある実施形態が存在しうる。一例では、これは説明のためであって限定するものではないが、均質アッセイの場合のように、全ての材料を同時に添加し、信号に対してアッセイ媒体が与える効果を測定する。他の例では、これは説明のためであって限定するものではないが、各試薬又は試薬群を、順次、合一することができる。幾つかの実施形態では、上記の各添加の後に、インキュベーションのステップを行なってもよい。不均質アッセイにおいて、１つ以上のインキュベーションステップの後に、分離及び洗浄ステップを行なってもよい。

【００９５】

用語「ビタミンＤ類縁体」は、ビタミンＤに対する抗体又はビタミンＤのエピマーに対する抗体のようなレセプターに対してビタミンＤ被検体と競合する化合物を指す。ビタミンＤ類縁体は、修飾型ビタミンＤであってもよく、当該修飾により、ビタミンＤが他の分子（これらに限定されないが、例えば支持体、標識、小分子又は小分子の結合パートナー等）に結合する手段が提供される。ビタミンＤ類縁体は、直接的に又は結合基によって間接的に他の分子に結合されてもよい。ビタミンＤ類縁体は、例えば、ビタミンＤの構造的関連分子であってもよく、結合基を通じて他の分子に接合するビタミンＤであってもよい。本明細書に記載の原理に従う幾つかの例では、ビタミンＤ類縁体は、式中、Ｚがポリ（アミノ酸）標識部分若しくは非ポリ（アミノ酸）標識部分である式（Ｉ）の化合物であるか、又は、式中、Ｚが免疫原性担体であって、それにより、式（Ｉ）の化合物がビタミンＤに対する抗体との結合に関してビタミンＤ被検体と競合する式（Ｉ）の化合物であってもよい。

【００９６】

分析すべき試料は、ビタミンＤ被検体を含むと考えられる試料である。当該試料は、生体試料又は非生体試料であってもよい。生体試料は、哺乳動物の被検体又は非哺乳動物の被検体に由来してもよい。哺乳動物の被検体は、例えばヒト又は他の動物の種であってもよい。生体試料には、全血、血清、血漿、痰、リンパ液、精液、膣粘液、糞便、尿、脊髄液、唾液、便、脳髄液、涙液、粘液等の生物学的流体；髪、皮膚又は器官若しくは他の身体部分由来の切除された部位若しくは組織等の生物学的組織；等が含まれる。多くの例では、前記試料は全血、血漿又は血清である。これに限定されないが、例えば廃棄物流、を含む非生物学的試料を、本明細書に記載の原理に従う化合物を用いて分析してもよい。

【００９７】

前記試料の調製は、通常用いられるいかなる媒体中で行なってもよく、媒体は、例えば、以下に詳述するアッセイ媒体であってもよい。幾つかの例では、例えば、血球を溶解させる等の、試料の前処理を行なってもよい。幾つかの例では、そのような前処理は、その後のアッセイを妨害しない媒体中で実施される。

【００９８】

ビタミンＤ被検体及びビタミンＤ類縁体をビタミンＤ被検体に対する抗体に結合させる条件下に、媒体中の上記組合せを曝して、複合体を生成させる。複合体の量が、試料中のビタミンＤ被検体の存在又は量の一方又は両方に関連する場合に、複合体の量を測定する。

【００９９】

ビタミンＤ被検体のアッセイは、任意のアッセイ成分又は生成物を分離しない（均質な場合）でも又は分離して（不均質な場合）も、実施できる。不均質アッセイは、通常、１つ以上の分離ステップを必要とし、競合的又は非競合的なアッセイであってよい。免疫測定法は、標識され又は標識されていない試薬を用いてよい。非標識の試薬を用いる免疫測定法は、通常、本明細書に記載の原理に従って免疫原の接合体から調製した１つ以上の抗体を含む比較的大きな複合体の形成を伴う。そのようなアッセイは、抗体複合体の検出において、例えば、免疫沈降法及び凝集法と、対応する、例えば比濁法及び濁度測定等の、光散乱法を伴う。標識された免疫測定法には、これらに限定されないが、例えば化学発光免疫測定法、酵素免疫測定法、蛍光分極免疫測定法、放射免疫測定法、阻害アッセイ、誘導ルミネセンスアッセイ及び蛍光酸素チャネリングアッセイが含まれる。

【０１００】

一般的な免疫測定法の１つのグループは、本明細書に記載の原理に従う化合物を限られた濃度で用いる免疫測定法を含む。免疫測定法の他のグループは、１つ以上の主要な試薬の過剰量、例えば本明細書に記載の原理に従う化合物の過剰量、の使用を伴う。免疫測定法の他のグループは、分離のない均質アッセイを含み、その際、標識されたビタミンＤ類縁体からの信号が、本明細書に記載の原理に従い産生された抗体への当該標識されたビタミンＤ類縁体の結合により、調整され、これにより、試料中に存在し得るビタミンＤ被検体と競合する。

【０１０１】
上記のように、上記アッセイは、分離なしに（均質に）又はアッセイ成分若しくは生成物のいずれかの分離を行なって（不均質な方法で）実施できる。均質な免疫測定法の例としては、Ｒｕｂｅｎｓｔｅｉｎらの特許文献５第３欄第６行～第６欄第６４行に記載のＥＭＩＴ（登録商標）アッセイ（シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノスティックス・インコーポレーテッド社、イリノイ州、ディアフィールド）、Ｕｌｌｍａｎらの特許文献６第１７欄第５５行～第２３欄第２５行に記載の免疫蛍光法、Ｍａｇｇｉｏらの特許文献７第６欄第２５行～第９欄第６３行に記載の酵素チャネリング免疫測定法（「ＥＣＩＡ」）、例えば、中でも特許文献８に記載の蛍光分極免疫測定法（「ＦＰＩＡ」）、及び酵素結合免疫吸着測定法（「ＥＬＩＳＡ」）等の酵素免疫測定法が挙げられる。不均質アッセイの例としては、非特許文献７に開示された放射免疫測定法が挙げられる。上記の開示内容の関連部分を、参照により本発明に援用する。
【０１０２】
他の酵素免疫測定法は、例えば、非特許文献８において議論された酵素調整媒介免疫測定法（「ＥＭＭＩＡ」）、非特許文献９において開示された基質標識蛍光免疫測定法（「ＳＬＦＩＡ」）、非特許文献１０において開示された複合酵素ドナー免疫測定法（「ＣＥＤＩＡ」）、例えば、特許文献９、特許文献１０、特許文献１１、特許文献１２、特許文献１３、特許文献１４、特許文献１５、特許文献１６、特許文献１７及び特許文献１８に記載の粒子強化比濁阻害免疫測定法（「ＰＥＴＩＮＩＡ」）、粒子強化比濁免疫測定法（「ＰＥＴＩＡ」）、アフィニティー二酸化クロム免疫測定法（「ＡＣＭＩＡ」）アッセイフォーマット等の均質粒子標識免疫測定法であり、これらの全開示内容を参照により本発明に援用する。
【０１０３】
他のアッセイには、特許文献１９、特許文献２０、特許文献２１及び特許文献２２で議論されているようなアクリジニウムエステル標識アッセイが含まれ、これらの関連する開示内容を参照により援用する。アクリジニウムエステル標識アッセイの具体例は、固相として常磁性粒子を用いたアクリジニウムエステル標識免疫測定法（「ＡＤＶＩＡ」免疫測定法）である。他のアッセイには、ゾル粒子免疫測定法（「ＳＰＩＡ」）、分散色素免疫測定法（「ＤＩＡ」）、メタロ免疫測定法（「ＭＩＡ」）、酵素膜免疫測定法（「ＥＭＩＡ」）及び蛍光免疫測定法（「ＬＩＡ」）が含まれる。他のタイプのアッセイには、ビタミンＤ被検体の結合の際の接合体の光学的、音響的及び電気的特性の変化のモニターを伴うイムノセンサーアッセイが含まれる。そのようなアッセイには、例えば光学イムノセンサーアッセイ、音響イムノセンサーアッセイ、半導体イムノセンサーアッセイ、電気化学的変換器イムノセンサーアッセイ、電位差測定イムノセンサーアッセイ、電流測定電極アッセイが含まれる。
【０１０４】
不均質アッセイは、通常、１つ以上の分離ステップを必要とし、競合的でも又は非競合的であってもよい。様々な競合的及び非競合的な不均質アッセイのフォーマットが、特許文献１第１４欄第２５行～第１５欄第９行に記載されており、その開示内容を参照により本発明に援用する。競合的な不均質アッセイの例では、ビタミンＤ被検体に対する抗体を結合した支持体を、ビタミンＤ被検体を含むと考えられる試料及び本明細書に記載の原理に従う標識化合物を含む媒体と接触させる。試料中のビタミンＤ被検体は、検出可能な標識を有するビタミンＤ類縁体と、ビタミンＤ被検体に対する抗体への結合に関して、競合する。支持体と媒体とを分離した後、支持体又は媒体の標識物の活性が、従来法により測定され、試料中のビタミンＤ被検体の量と関係づけられる。上記の競合的な不均質アッセイの変形では、前記支持体が、標識された試薬としてのビタミンＤ類縁体を有し、ビタミンＤ抗体が標識を含む。
【０１０５】
幾つかの例では、分析すべき試料は、アッセイ媒体中で、ビタミンＤ被検体に対する抗体及び標識されたビタミンＤ類縁体と合一される。当該媒体を、標識されたビタミンＤ類

縁体とビタミンＤ被検体に対する抗体とを含有する複合体の存在又は量の一方又は両方に関して試験し、このとき、当該複合体の存在及び／又は量が、試料中のビタミンＤ被検体の存在及び／又は量の指標となる。

【０１０６】

本明細書に記載の原理に従う幾つかの例では、分析すべき試料を前処理して、例えば血漿又は血清タンパク質等の、ビタミンＤと結合する内因性の結合物質から、ビタミンＤ被検体を放出させる。内因性の結合物質からのビタミンＤ被検体の放出は、例えば、分解剤又は放出剤又は分解剤と放出剤との組み合わせを、順次、添加することにより実施できる。分解剤は、内因性の結合物質を分解して、最早、それらがビタミンＤと結合できないようにするものである。かかる分解剤には、これらに限定されないが、タンパク分解酵素Ｋ、並びに、タンパク分解酵素Ｋ及び界面活性剤（例えばドデシル硫酸ナトリウム）等のタンパク質変性剤が含まれる。内因性の結合物質からビタミンＤを放出させるための放出剤には、これは説明のためであって限定するものではないが、例えばサリチル酸、ワルファリン、スルホン酸、トルエンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、（例えば１－アニリノナフタレン－８－スルホン酸（１，８－ＡＮＳ）及び８－アニリノナフタレン－１－スルホン酸（８－ＡＮＳ）を始めとする）アニリノナフタレンスルホン酸（ＡＮＳ）、サリチル酸及び上記化合物の誘導体等の酸性変性剤が含まれる。

【０１０７】

分解又は放出作用を実施させる際の、例えば時間、温度、ｐＨ及び放出剤の媒体中の濃度等の条件は、例えば、内因性の結合物質の性質、試料の性質及び放出剤の性質等に依存する。一般に、当該条件は、所望の効果又は機能を発揮させるのに十分な条件である。本明細書に記載の原理に従う幾つかの例では、放出剤の有効な濃度は、約０．０１～約２０ｍｇ／ｍＬ、又は約０．０１～約１０ｍｇ／ｍＬ、又は０．０１～約５ｍｇ／ｍＬ、又は約０．１～約２０ｍｇ／ｍＬ、又は、０．１～約１０ｍｇ／ｍＬ、又は約０．１～約５ｍｇ／ｍＬ、又は約０．１～約１ｍｇ／ｍＬである。内因性の結合物質からビタミンＤ被検体を放出させるための試料の前処理は、アッセイの実施前の別のステップとして又はアッセイの第１ステップとして実施できる。いずれの場合も、１つ以上の試薬が、分解剤及び／又は放出剤の活性を停止させるために必要となりうる。

【０１０８】

アッセイを実施するための条件は、通常、最適のアッセイ感度を提供する穏やかなｐＨで、水性の緩衝媒体中でアッセイを実施することを含む。前記水性媒体は、水のみでもよく、又は、０．１～約４０体積％の共溶媒を含んでもいてよい。媒体のｐＨは、例えば、約４～約１１の範囲、又は約５～約１０の範囲、又は約６．５～約９．５の範囲でありうる。ｐＨは、通常、あらゆる特定の結合ペアの結合メンバーとの最適の結合や、信号生成システムに含まれる部材等のアッセイに用いられる他の試薬のための最適ｐＨ、等々の妥協物である。様々な緩衝剤を用いて、望ましいｐＨを達成し、アッセイの間のｐＨを維持することができる。緩衝剤の例には、これは説明のためであって限定するものではないが、例えばホウ酸塩、リン酸塩、炭酸塩、ＴＲＩＳ、バルビタール、ＰＩＰＥＳ、ＨＥＰＥＳ、ＭＥＳ、ＡＣＥＳ、ＭＯＰＳ及びＢＩＣＩＮＥが含まれる。使用される具体的な緩衝剤の種類は重要ではないが、個々のアッセイにおいて、１つの緩衝剤又はもう１つの他の緩衝剤の使用が好ましい場合もある。

【０１０９】

上記アッセイ方法において、様々な補助的材料を使用してもよい。例えば、緩衝剤に加えて、媒体は、媒体の安定化剤及び使用される試薬の安定化剤を含んでいてもよい。幾つかの実施形態では、これらの添加物に加えて、例えばアルブミン等のタンパク質；例えばホルムアミド等の有機溶媒；第四級アンモニウム塩；例えば硫酸デキストラン等のポリアニオン；結合促進物質、例えばポリアルキレングリコール；例えばデキストラン又はトレハロース等の多糖類を添加してもよい。前記媒体は、血餅形成の防止剤を含有していてもよい。かかる試薬は当技術分野で公知であり、これらに限定されないが、例えばＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ、クエン酸塩、ヘパリン等を含む。前記媒体は、これらに限定されないが、例

えばアジ化ナトリウム、硫酸ネオマイシン、ＰＲＯＣＬＩＮ（登録商標）３００、ストレプトマイシン等の１つ以上の防腐剤を含有してもよい。前記媒体は、更に、１つ以上の界面活性剤を含有していてもよい。上記の材料のいずれであっても、それを使用する場合は、それは、所望の効果又は機能を発揮させるのに十分な濃度又は量で存在する。

【０１１０】

アッセイにおいて使用される様々な試薬の添加の間の時間間隔を始めとする１つ以上の時間間隔で、１つ以上のインキュベーション時間を、前記媒体に適用してもよい。前記媒体は、通常、試薬中の様々な成分の結合及び試料中のビタミンＤの結合を生じさせるのに十分な温度で十分な時間インキュベートされる。上記の方法を実施する際、通常、中庸の温度が用いられ、一般には、測定の間、一定温度、好ましくは室温が用いられる。幾つかの例では、インキュベーション温度は、例えば、約５℃～約９９℃、又は約１５℃～約７０℃、又は約２０℃～約４５℃である。インキュベーション時間は、幾つかの例では、例えば、約０．２秒～約２４時間、又は約１秒～約６時間、又は約２秒～約１時間、又は約１分～約１５分である。上記時間は、媒体の温度及び様々な試薬の結合速度に依存し、それは会合速度定数、濃度、結合定数及び解離速度定数によって決定される。

【０１１１】

ビタミンＤ被検体を含むと考えられる試料中のビタミンＤ被検体を測定する方法の１つの例では、１つの合一物が媒体に添加される。当該合一物は、試料、放出剤（当該試料が前処理されず内因性の結合物質からのビタミンＤ被検体が放出されなかった場合）、ビタミンＤに対する抗体及び標識されたビタミンＤ類縁体を含んでおり、ここで、当該標識は、ポリ（アミノ酸）標識又は非ポリ（アミノ酸）標識である。媒体は、ビタミンＤとビタミンＤに対する抗体とを含む複合体又は標識化合物とビタミンＤに対する抗体とを含む複合体の一方又は両方の、存在及び量の一方又は両方について試験される。複合体の存在及び／又は量の一方又は両方は、試料中のビタミンＤ被検体の存在及び／又は量の指標となる。

【０１１２】

公知のアッセイの幾つかは、信号生成システム（ｓｐｓ）を利用するが、当該システムは第１及び第２のｓｐｓ部材を使用する。前記の「第１」及び「第２」の呼称は、全くの任意な表記であり、本発明の方法におけるｓｐｓ部材の何らかの順序若しくは順位又はｓｐｓ部材の添加に関する何らかの順序を示唆するものではない。ｓｐｓの１つの部材の活性化が、例えば光又は活性化産物等の生成物を、生じさせ、その結果、ｓｐｓのもう１つの部材が活性化されるという点で、これらのｓｐｓ部材は関連を有し得る。

【０１１３】

アッセイの幾つかの実施形態では、ｓｐｓ部材は、例えば光増感剤及び化学発光組成物等の増感剤を含み、増感剤の活性化により、化学発光組成物を活性化させる生成物が生じる。第２のｓｐｓ部材は、通常、結合した及び／又は未結合のｓｐｓ部材の量、即ち、検出すべきビタミンＤ被検体又は本発明の原則に従う化合物に、結合し又は結合していないｓｐｓ部材の量、に関連する検出可能な信号を発生させる。本明細書に記載の原理に従う幾つかの例では、増感剤試薬又は化学発光試薬のうちのいずれか１つは、本発明の化合物試薬を含む。

【０１１４】

特定の例では、誘導発光免疫測定法を使用してもよい。誘導発光免疫測定法は、特許文献２に記載されており、その開示内容を参照により本発明に援用する。１つのアプローチでは、当該アッセイは、光増感剤が結合した粒子を用いるものであり、当該粒子には、ビタミンＤ類縁体が結合している（粒子－化合物試薬）。化学発光試薬は、ビタミンＤ被検体に対する抗体を含有する。ビタミンＤ被検体は、ビタミンＤに対する抗体との結合に関して、粒子－化合物試薬と競合する。ビタミンＤ被検体が存在する場合、化学発光試薬に近接する粒子－化合物試薬の分子数が減少する。それにより、アッセイ信号が減少する。光増感剤は、２つの標識が近接して存在するとき、一重項酸素を発生させ、化学発光試薬を活性化させる。活性化された化学発光試薬は、次に、発光する。生じる光の量は、形成

される複合体の量に関連し、これが、次に、試料中に存在するビタミンＤ被検体の量に関連する。

【０１１５】

誘導発光免疫測定法の他の具体例では、当該アッセイは、化学発光化合物が結合した粒子を用いるものであり、当該粒子には、ビタミンＤ類縁体が結合している（粒子－化合物試薬）。光増感剤試薬は、ビタミンＤに対する抗体を含有する。ビタミンＤ被検体は、ビタミンＤに対する抗体との結合に関して、粒子－化合物試薬と競合する。ビタミンＤ被検体が存在する場合、光増感剤試薬に近接する粒子－化合物試薬の分子数が減少する。それにより、アッセイ信号が減少する。光増感剤は、２つの標識が近接して存在するとき、一重項酸素を発生させ、粒子－化合物試薬の化学発光化合物を活性化させる。活性化された化学発光試薬は、次に、発光する。生じる光の量は、形成される複合体の量に関連し、これが、次に、試料中に存在するビタミンＤ被検体の量に関連する。

【０１１６】

誘導発光アッセイの他の具体例では、例えばアビジン又はストレプトアビジン（これらは、ビオチンの結合パートナーである。）等の小分子に対する結合パートナーと接合した光増感剤粒子を用いる。ビオチンを含有するビタミンＤ類縁体（化合物－ビオチン試薬）も、また、用いられる。ビタミンＤ被検体に対する抗体を含有する化学発光試薬を、検出システムの一部として用いる。反応媒体をインキュベートして、光増感剤粒子のアビジン又はストレプトアビジンを、アビジンとビオチンとの間の結合により、化合物－ビオチン試薬に結合させ、また、化学発光試薬の一部分であるビタミンＤ被検体に対する抗体を、今や光増感剤粒子に結合しているビタミンＤ被検体又はビタミンＤ類縁体へ結合させる。次に、媒体を光照射して光増感剤を励起させることにより、光増感剤は、その励起状態で、酸素を一重項状態に活性化できる。ビタミンＤ被検体が存在するため、光増感剤の近傍に存在する化学発光試薬が減少し、それにより、一重項酸素による化学発光試薬の活性化が減少し、発光も減少する。次に、媒体における発光又は放出光の存在及び／又は量を試験し、その存在が、ビタミンＤ被検体の存在及び／又は量と相関し、ビタミンＤ被検体の存在下に信号の減少が観察される。

【０１１７】

誘導発光アッセイの他の具体例では、例えばアビジン又はストレプトアビジン（これらは、ビオチンの結合パートナーである。）等の小分子に対する結合パートナーと接合した光増感剤粒子を用いる。接合試薬は、ビオチンと接合したビタミンＤ被検体に対する抗体を含有する。ビタミンＤ類縁体が用いられ、化学発光粒子に結合した化合物（化学発光化合物試薬）も用いられる。反応媒体をインキュベートして、光増感剤粒子のアビジン又はストレプトアビジンを、アビジンとビオチンとの間の結合により、抗体－ビオチン試薬と結合させ、また、ビタミンＤ被検体に対する抗体を、（もし、試料中に存在すれば）ビタミンＤ被検体と、そして、化学発光化合物試薬の一部分であるビタミンＤ類縁体と結合させる。次に、媒体を光照射して光増感剤を励起させることにより、光増感剤は、その励起状態で、酸素を一重項状態に活性化できる。ビタミンＤ被検体が存在するため、光増感剤の近傍に存在する化学発光試薬が減少し、それにより、一重項酸素による化学発光試薬の活性化が減少し、発光も減少する。次に、媒体における発光又は放出光の存在及び／又は量を試験し、その存在が、ビタミンＤ被検体の存在及び／又は量と相関し、ビタミンＤ被検体の存在により信号の減少が観察される。

【０１１８】

ビタミンＤ被検体の検出のためのアッセイフォーマットの他の一例は、これは説明のためであって限定するものではないが、ＡＣＭＩＡアッセイフォーマットである。ＡＣＭＩＡアッセイフォーマットにおいて、ビタミンＤ類縁体で被覆されたクローム粒子（クローム粒子試薬）を第一成分として用いる。第二成分は、ビタミンＤ被検体に対する抗体である。この抗体は、レポーター酵素（例えばβ－ガラクトシダーゼ）と架橋して抗体－酵素接合体を形成しているが、当該酵素を過剰量、即ち、試料に存在し得るビタミンＤ被検体の全てと結合させるのに必要となる量よりも多い量、で反応容器に添加する。事前に放出

剤で処理された試料を、ビタミンＤ被検体に対する抗体で処すると、抗体が試料中のビタミンＤ被検体と結合する。抗体－酵素接合体を媒体中の試料と混合し、ビタミンＤ被検体を抗体と結合させる。次に、クローム粒子試薬を添加し、あらゆる過剰の抗体－酵素接合体と結合させる。次に、磁石を用いて全てのクローム粒子及び過剰量の抗体－酵素を懸濁液から引出し、上清を最終反応容器へ移す。レポーター酵素の基質を最終反応容器に添加し、酵素活性を、分光測光法により、時間経過に伴う吸光度の変化として、測定する。この信号の量は、試料中のビタミンＤ被検体の量に関連する。

【０１１９】

本明細書に記載の原理に従うビタミンＤアッセイの他の例は、固相として常磁性粒子を用いたアクリジニウムエステル標識免疫測定法（ＡＤＶＩＡ免疫測定法）である。このビタミンＤアッセイの例において使用される検出システムには、小分子接合体又は捕捉接合体としての、小分子で標識されたビタミンＤ類縁体（捕捉部分）と、固相（ＳＰ）としての、小分子で被覆された常磁性ラテックス粒子に対する結合パートナーと、ビタミンＤ被検体に対する、アクリジニウムエステルで標識された抗体（検出抗体）と、が含まれる。前記小分子は、例えばビオチン又はフルオレセインであってよく、各結合パートナーは、ストレプトアビジン又はフルオレセイン抗体であってよい。ビタミンＤ類縁体は、直接、又は、例えばタンパク質（例えばウシ血清アルブミン（ＢＳＡ））等の連結基を介して、前記小分子に連結されてもよい。患者の試料中のビタミンＤ被検体は、検出用のアクリジニウムエステル標識された検出抗ビタミンＤ抗体への結合に関して、捕捉部分のビタミンＤ類縁体と競合する。ビタミンＤを含有すると考えられる試料を、１，８－ＡＮＳで前処理する。このアッセイは、Ｃｅｎｔａｕｒ（登録商標）、Ｃｅｎｔａｕｒ（登録商標）ＸＰ又はＣｅｎｔａｕｒ（登録商標）ＣＰ装置（シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノスティックス・インコーポレーテッド社製、デラウエア州、ニューアーク）を用いて、添付されたメーカーの説明書に従い、実施できる。

【０１２０】

本明細書に記載の原理に従うビタミンＤ被検体のアッセイの他の例は、固相として常磁性粒子を用いたアクリジニウムエステル標識免疫測定法（ＡＤＶＩＡ免疫測定法）である。このビタミンＤアッセイの例において使用される検出システムには、ビオチン接合体又は捕捉接合体としての、小分子で標識されたビタミンＤ被検体に対する抗体（捕捉抗体）と、固相（ＳＰ）としての、ストレプトアビジンで被覆された常磁性ラテックス粒子と、アクリジニウムエステルで標識されたビタミンＤ類縁体（検出ハプテン）と、が含まれる。アクリジニウムエステル標識は、ビタミンＤ類縁体に直接結合して検出ハプテンを形成してもよく、又は、例えば、タンパク質（例えばＢＳＡ）等の連結基を用いてもよい。患者の試料中のビタミンＤ被検体は、抗ビタミンＤ抗体に対する結合に関して、アクリジニウムエステル標識された検出ハプテンと競合する。ビタミンＤを含むと考えられる試料を、１，８－ＡＮＳで前処理する。このアッセイは、Ｃｅｎｔａｕｒ（登録商標）、Ｃｅｎｔａｕｒ（登録商標）ＸＰ又はＣｅｎｔａｕｒ（登録商標）ＣＰ装置（シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノスティックス・インコーポレーテッド社製、デラウエア州、ニューアーク）を用いて、添付されたメーカーの説明書に従い、実施できる。上記のアクリジニウムエステルアッセイの変形として、小分子を、例えばビオチン又はフルオレセインとしてもよい。

【０１２１】

分析されうる試料中のビタミンＤ被検体の濃度は、例えば、一般に、約10^{-5}～約10^{-17}Ｍ、又は約10^{-6}～約10^{-14}Ｍで変わり得る。通常、当該アッセイが（試料中に存在するビタミンＤ被検体の量に対して）定性的か、半定量的か、又は定量的か、具体的な検出方法、及び期待されるビタミンＤ被検体の濃度等を考慮し、様々な試薬の濃度が決定される。

【０１２２】

アッセイ媒体中の様々な試薬の濃度は、通常、ビタミンＤ被検体の対象濃度範囲、アッセイの性質、等によって決定される。しかしながら、各試薬の最終濃度は、通常、対象の

濃度範囲全体にわたるアッセイ感度を最適化するため、経験的に決定される。つまり、ビタミンＤ被検体の濃度における有意な変化は、正確に測定可能な信号の差異を提供するものでなければならない。信号生成システムの性質及び被検体の性質等に関する考慮により、通常、様々な試薬の濃度が決定される。

【０１２３】

［本明細書に記載の原理に従う試薬を使用した、ビタミンＤのエピマーのアッセイの例］

上記のように、本明細書に記載の原理に従う１つの具体例は、ビタミンＤのエピマーを含有すると考えられる試料中におけるビタミンＤのエピマーの存在及び量の一方又は両方を決定する方法に関する。上記のアッセイフォーマットのいずれも、Ｚが免疫原性担体である式（Ｉ）の化合物を免疫原として調製された抗体を用いて実施しうる。幾つかの例では、前記免疫原は、式（ＩＩａ）の化合物である（図３を参照）。幾つかの例では、前記免疫原は式（ＩＩｂ）の化合物である（図５を参照）。幾つかの例では、用いる抗体は、抗体４Ｇ８．２又は抗体８Ｆ１０．２である。本明細書に記載の原理に従う他の免疫原から調製された抗体は、上記のアッセイフォーマットのいずれにおいても使用できる。

【０１２４】

ビタミンＤのエピマーのためのアッセイの１つの例は、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3を含有すると考えられる試料における３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3の検出のための誘導発光アッセイである。試料を放出剤で処理し、内因性の結合部分から３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3を放出させる。次に、試料を、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3に対する抗体である抗体４Ｇ８．２を含有する試薬と合一し、反応媒体中でビオチン（抗体－ビオチン試薬）と接合させ、それをインキュベートし、抗体－ビオチン試薬と３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3被検体とを結合させる。次に、化学発光粒子に結合したビタミンＤ類縁体としての式（ＩＩａ）の化合物を含有する化学発光試薬を添加する。化学発光試薬は、過剰の抗体－ビオチン試薬（即ち、試料中の３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3被検体と結合しない抗体－ビオチン試薬）と結合する。次に、ストレプトアビジンに接合した光増感剤粒子試薬を添加する。反応媒体をインキュベートし、光増感剤粒子のストレプトアビジンを、ストレプトアビジンとビオチンとの間の結合により、抗体－ビオチン試薬に結合させる。次に、媒体を光照射して光増感剤を励起させ、光増感剤は、その励起状態において、酸素を一重項状態に活性化させ得る。３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3被検体が存在するため、光増感剤の近傍に存在する化学発光試薬の量が減少し、それにより、一重項酸素による化学発光試薬の活性化が減少し、発光も減少する。次に、媒体を、発光又は放出光の存在及び／又は量に関して解析する。その際、光の存在が、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3被検体の存在及び／又は量と相関し、３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンD_3被検体の存在により信号の減少が観察される。

【０１２５】

［ブロッキング抗体としての、本明細書に記載の原理に従う抗体を使用した、ビタミンＤ被検体のアッセイの例］

本明細書に記載の原理に従う抗体は、ビタミンＤ被検体の非エピマー形態のアッセイにおいて、３－エピマーとの交差反応性の最小化又は除去に使用できる。３－エピマービタミンＤとビタミンＤ被検体に対する抗体との交差反応性に起因する全非エピマービタミンＤ被検体の過大評価が、ブロッキング剤として、Ｚが免疫原性担体である式（Ｉ）の化合物である免疫原により調製された抗体を使用することにより、実質的に回避され得る。

【０１２６】

非エピマービタミンＤ被検体のアッセイの１つの例では、当該アッセイでは、化学発光試薬として、オレフィン性色素とビタミンＤ類縁体としての２５－ヒドロキシビタミンD_3とを含有するケミビーズ（ｃｈｅｍｉｂｅａｄ）試薬を用いる。非エピマービタミンＤ被検体を含むと考えられる試料を、アッセイ媒体中で非－エピマービタミンＤ被検体に対するビオチン化抗体及び抗体８Ｆ１０である第二抗体と、次いで、ケミビーズ試薬と合一する。ケミビーズは、試料由来の非エピマービタミンＤ被検体により占められていないモ

ノクローナル抗体結合部位の小部位と結合する。抗体８Ｆ１０は、試料中に存在し、また、ビオチン化抗体との交差反応により測定を阻害する３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ$_3$に結合する。その後、光増感剤（センシビーズ（ｓｅｎｓｉｂｅａｄｓ））を含有するストレプトアビジン結合増感剤ビーズを反応混合物に添加する。これにより、ケミビーズ／センシビーズのペアが形成され、その濃度は、試料中の非エピマービタミンＤ被検体の濃度と逆相関する。６８０ｎｍでの光照射により、増感剤ビーズが一重項酸素を発生させ、それがセンシビーズと対をなすケミビーズ中に拡散し、化学発光試薬中のオレフィン性色素と反応し、約６１２ｎｍの化学発光信号を誘発する。当該信号は、非エピマービタミンＤ被検体の濃度と逆相関する。

【０１２７】

［本明細書に記載の原理に従う標識化合物を用いたビタミンＤ被検体のアッセイの例］

ビタミンＤ被検体のアッセイは、Ｚがポリ（アミノ酸）標識又は非ポリ（アミノ酸）標識又は支持体である式（Ｉ）の化合物を用いて実施できる。

【０１２８】

ビタミンＤ被検体の検出アッセイの非限定的な一例では、これは説明のためであって限定するものではないが、ＡＣＭＩＡアッセイフォーマットを採用する。Ｚが非ポリ（アミノ酸）標識である式（Ｉ）の化合物であるビタミンＤ類縁体で被覆されたクローム粒子（クローム粒子試薬）を第一成分として用いる。第二成分は、ビタミンＤ被検体に対する抗体である。レポーター酵素（例えばβ－ガラクトシダーゼ）と架橋して抗体－酵素接合体を形成するこの抗体を、過剰量で、即ち、試料中に存在し得る全てのビタミンＤ被検体と結合するのに必要な量よりも多い量で、反応容器に添加する。予め放出剤で処理した試料をビタミンＤに対する抗体で処理し、この抗体は、試料中のビタミンＤ被検体と結合する。抗体－酵素接合体を媒体中で試料と混合し、ビタミンＤ被検体を抗体と結合させる。次に、クローム粒子試薬を添加し、あらゆる過剰な抗体－酵素接合体と結合させる。次に、磁石を用いて全てのクローム粒子及び過剰な抗体－酵素を懸濁液から引出し、上清を最終反応容器へ移す。レポーター酵素の基質を最終反応容器に添加し、時間経過に伴う吸光度変化として、分光測光法で酵素活性を測定する。この信号の量は、試料でビタミンＤ被検体の量と相関する。

【０１２９】

上記の例において、本明細書に記載の原理に従う抗体は、試料中に存在しうる３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ$_3$の、ビタミンＤ被検体に対する抗体への結合を、ブロックするのに使用してもよい。抗－３－エピ－２５－ヒドロキシビタミンＤ$_3$抗体は、Ｚが免疫原性担体である式（Ｉ）の化合物である免疫原を用いて調製された抗体であってもよい。

【０１３０】

［試験ステップ］

アッセイ方法の次のステップでは、媒体について、ビタミンＤ被検体とビタミンＤ被検体に対する抗体とを含有する複合体、及び／又は、ビタミンＤ類縁体とビタミンＤに対する抗体とを含む複合体の存在を試験する。これらの複合体の一方又は両方の存在及び／又は量は、試料中のビタミンＤ被検体の存在及び／又は量を示す。

【０１３１】

「ビタミンＤ被検体の量を測定する」の用語は、ビタミンＤの定量的、半定量及び定性的測定を指す。定量的、半定量的及び定性的方法、並びに他の全てのビタミンＤ被検体の測定方法は、ビタミンＤ被検体の量を測定する方法であると考えられる。例えば、単にビタミンＤ被検体を含有すると考えられる試料中におけるビタミンＤ被検体の有無を検出するのみである方法も、本発明の範囲内に含まれるとみなされる。用語「検出する」こと及び「測定する」こと、並びに測定することについての他の一般的な同義語は、本発明の範囲内に含まれることが意図される。

【０１３２】

多くの実施形態では、媒体の試験では、媒体からの信号の検出を必要とする。信号の存

在及び／又は量は、試料中のビタミンＤ被検体の存在及び／又は量と相関する。検出の具体的方法は、信号生成システムの性質に依存する。上記で議論したように、信号を発生させる信号標識が外的手段によって検出可能な信号を発生できる方法は、多数存在する。信号生成システムの活性化は、信号生成システムの部材の性質に依存する。

【０１３３】

測定中の温度は、一般に、例えば、約１０℃～約７０℃、又は約２０℃～約４５℃、又は約２０℃～約２５℃の範囲である。１つのアプローチでは、ビタミンＤ被検体の既知の濃度を用いて標準曲線を作成する。キャリブレーター及び他のコントロールを用いてもよい。

【０１３４】

あらゆる標識から発生する発光又は光は、例えば、光電子増倍管若しくはフォトダイオードを用いて又は光量を測定するための他のあらゆる適切な手段によって、視覚的に、写真によって、光量測定的（ａｃｔｉｎｏｍｅｔｒｉｃａｌｌｙ）に、又は分光光度的に測定でき、その際、当該光量は、媒体中のビタミンＤ被検体の量と相関する。信号の存在及び／又は量に関する試験は、また、信号の検出を含み、それは、通常、単に信号を解読するステップのみである。信号は、通常、装置を用いて解読され、装置の性質は信号の性質に依存する。当該装置としては、これらに限定されないが、例えば、分光光度計、蛍光測定器、吸収スペクトロメータ、照度計及びケミルミノメーターが挙げられる。

【０１３５】

［アッセイ実施用試薬を含むキット］

アッセイ実施用試薬を含むキットは、具体的なアッセイの性質に基づき調製できる。本明細書に記載の原理に従う幾つかの例では、キットは、例えば、Ｚが免疫原性担体である式（Ｉ）の化合物である免疫原を用いて調製した抗体等の、結合パートナーを含んでいてもよい。本明細書に記載の原理に従う幾つかの例では、キットは、Ｚが支持体を含むポリ（アミノ酸）標識部分又は非ポリ（アミノ酸）標識部分である式（Ｉ）の化合物である試薬を含んでいてもよい。キットは、ビタミンＤ被検体の具体的なアッセイを行なうための他の試薬も含んでいてもよい。幾つかの実施形態では、キットは、例えば、粒子に結合したアビジン又はストレプトアビジン、ビオチン化された式（Ｉ）の化合物、ビタミンＤ被検体に対する標識された抗体等の、ビオチン－結合パートナーを、一括された組合せで含む。当該キットは、アッセイを実施するための他の試薬を更に含んでもよく、その性質は具体的なアッセイフォーマットに依存する。

【０１３６】

各試薬は、それぞれ、別々の容器に含まれてもよく、又は、試薬の交差反応性及び安定性に応じて、様々な試薬を１つ以上の容器中で合一してもよい。当該キットは、例えば、追加の特定の結合ペアの部材、信号生成システムの部材及び補助的試薬等の、アッセイ用の他の別個に包装された試薬を更に含んでいてもよい。

【０１３７】

キットの中の様々な試薬の相対的な量は、本発明の方法の実施の間に必要となる反応を実質的に最適化する試薬の濃度を提供し、更に、アッセイ感度を実質的に最適化するために、広範囲に変化させることができる。適切な条件下において、キット中の試薬の１つ以上は、通常、凍結乾燥された賦形剤を含む乾燥粉末として提供することができる。当該粉末は、溶解した際、本明細書に記載の原理に従う化合物試薬を用いる方法又はアッセイを実施するのに適切な濃度の試薬溶液を与える。当該キットは、本明細書に記載の原理に従う化合物試薬を含む試薬の使用方法に関する書面による説明書を更に含んでいてもよい。

【０１３８】

［本明細書に記載の原理に従う化合物を含有する医薬組成物］

本明細書に記載の原理に従う化合物及び抗体の例は、治療的活性を有しうる。これらの化合物は、治療的有効量、即ち、ビタミンＤが関与する特定の疾患症状の治療をする量で投与される。本明細書に記載の原理に従う化合物例の投与は、同様の作用を発揮する薬剤の投与に関して認められたいずれの方法によっても実施できる。当該化合物は、予防的及

び治療的に使用できる。

【０１３９】

投与される化合物の量は、治療対象の患者及び疾患症状の１つ以上、重篤度、投与方法及びスケジュール（例えば経口投与）、並びに担当医の判断に依存する。

【０１４０】

上記の症状の治療のために本発明の化合物を使用する際、薬学的に許容できるいかなる投与方法も使用できる。本明細書に記載の原理に従う化合物は、単独で、又は、これらに限定されないが、固体状、半固体状、液体状又はエアゾール状の剤形で、例えば錠剤、カプセル、粉末、液体、注射可能剤、懸濁液、坐薬及びエアゾール等で、他の薬学的に許容できる賦形剤との組合せで投与することができる。当該化合物は、例えばデポー注入、浸透ポンプ、錠剤及び経皮（エレクトロトランスポートを含む）パッチ等の、予定された速度での化合物の持続投与のための、好ましくは正確な投与量での単独投与に適する単位投与剤形にて、徐放性の又は放出が制御された剤形として、投与することもできる。前記医薬組成物は、従来公知の１つ以上の医薬用担体又は賦形剤と、本明細書に記載の原理に従う化合物とを含有する。更に、これらの組成物は、例えば、他の薬剤、医薬品、担体及び補助剤を含有してもよい。

【０１４１】

薬学的に許容できる組成物は、意図された投与方法に従い、本明細書に記載の原理に従う化合物を約０．１重量％～約９０重量％含有し、その残りは、例えば、適切な医薬用賦形剤及び担体である。

【０１４２】

上記で詳述した症状に対する１つの投与方法は、簡便な毎日の薬剤投与計画を用いた経口投与であり、それは重篤度に応じて調節することができる。そのような経口投与の場合、薬学的に許容できる組成物は、例えば、マンニトール、ラクトース、澱粉、ポビドン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、クロスカルメロースナトリウム、グルコース、ゼラチン、ショ糖及び炭酸マグネシウム、及びこれらの２つ以上の組合せ等の、通常使用される任意の賦形剤と混合して形成してもよい。かかる組成物は、例えば溶液、懸濁液、錠剤、分散可能な錠剤、ピル、カプセル、粉末又は持続放出性製剤であってもよい。

【０１４３】

１つのアプローチでは、これは説明のためであって限定するものではないが、組成物は、ピル又は錠剤の形であってもよく、本明細書に記載の原理に従う化合物に加えて、例えば、ラクトース、ショ糖又はリン酸二カルシウム等の希釈剤又はこれらの２つ以上の組合せ、例えばステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤、例えばクロスカルメロースナトリウム等の崩壊剤、例えば澱粉、アラビアゴム、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、セルロース及びその誘導体等のバインダーを、含有していてもよい。

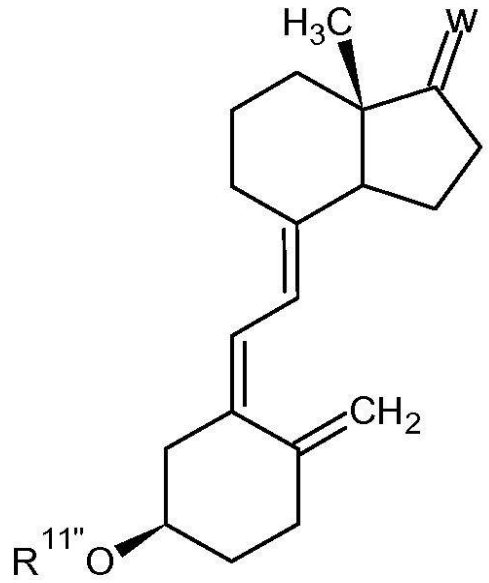
【０１４４】

非経口投与は、通常、皮下、筋肉内又は静脈内への注入を特徴とする。注射可能な薬剤は、溶液若しくは懸濁液として、注入前の、液体中の溶液又は懸濁液に適する固形物として、又はエマルジョンとして、従来の形態で調製できる。適切な賦形剤には、これらに限定されないが、例えば、水、食塩水、右旋糖、グリセロール及びエタノールが含まれる。更に、投与される医薬組成物は、例えば湿潤剤又は乳化剤、ｐＨ緩衝剤、並びに、例えば、酢酸ナトリウム、ポリオキシエチレン、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート及びシクロデキストリン等の溶解促進剤等の、非毒性の助剤を少量含んでいてもよい。

【０１４５】

本明細書に記載の原理に従う１つの例では、医薬組成物は、下記式の化合物を含有し、

【化１５】



式中、Ｗは、Ｏ又はＮ－Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_n$’’Ｃ（Ｏ）－Ｚ’’であり、
ｎ’’は１から１０の整数であり、
Ｒ^{11}’’は、水素原子、アルキル基又はアシル基であり、

【０１４６】

Ｚ’’は、ＯＲ^{8}であり、式中、Ｒ^{8}は水素原子、アルキル基又はＮＲ^{9}Ｒ^{10}であり、Ｒ^{9}及びＲ^{10}は独立して水素原子又はアルキル基である。

【０１４７】

本明細書で用いられる用語「少なくとも」は、指定された項目の数が、記載された数と等しいかそれ以上であることを意味する。本明細書で用いられる用語「約」は、記載された数がプラス又はマイナス１０％異なってもよいことを意味し、例えば「約５」は４．５～５．５の範囲を意味する。

【０１４８】

以下の説明は、本明細書に記載の原理に従う具体的実施例に関するものであり、説明のためであって限定のためではない。これらの具体例は、本発明及び添付の請求項の範囲を限定することを意図するものではない。多数の改変、並びに代替的な組成物、方法及びシステムが、本開示の技術思想及び範囲から逸脱することなく考案されうる。

【実施例】

【０１４９】

特に明記しない限り、下記の実験の材料は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ社（ミズーリ州、セントルイス）又はＦｌｕｋａ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ社（ウィスコンシン州、ミルウォーキー）から購入できる。本実施例で開示される部及びパーセンテージは、特に明記しない限り、体積に対する重量（ｗ／ｖ）により表される。

［定義］

ｍｇ＝ミリグラム
ｇ＝グラム
ｎｇ＝ナノグラム
ｍＬ＝ミリリットル
μＬ＝マイクロリットル
μｍｏｌ＝マイクロモル
℃＝摂氏温度
ｍｉｎ＝分
ｓｅｃ＝秒
ｈｒ＝時間

ｗ／ｖ＝重量／体積
ＴＬＣ＝薄層クロマトグラフィー
ＨＰＬＣ＝高速液体クロマトグラフィー
ＥＤＡ＝エチレンジアミン
ＥｔＯＡｃ＝酢酸エチル
ＤＭＦ＝ジメチルホルムアミド
ＤＭＳＯ＝ジメチルスルホキシド
ＭｅＯＰ＝１－メトキシ－２－プロパノール
ＭＥＳ＝２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸
ＣＭＯ＝カルボキシメトキシオキシム
ＴＭＢ＝テトラメチルベンジジン
ＳＮＨＳ＝スルホ－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド
高ｐＨ洗浄緩衝剤＝５．５ｍＭのNa_3PO_4＋４．４ｍＭのNa_2CO_3（ｐＨ１１）
ハプテン洗浄緩衝剤＝５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、３００ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、０．１％のＴＲＩＴＯＮ（登録商標）Ｘ４０５、０．１５％のＰＲＯＣＬＩＮ（登録商標）防腐剤及び１ｍｇ／ｍＬのネオマイシン
ＤＩ＝脱イオンされた
ＥＬＩＳＡ＝酵素結合免疫吸着測定法
ＵＰＡ＝超粒子アナライザー
ＬＯＣＩ＝発光酸素チャネリング免疫測定法
ＢＳＡ＝ウシ血清アルブミン
ＢＧＧ＝ウシガンマグロブリン
ｍＩｇＧ＝マウス免疫グロブリン
ＭＳ＝質量分析法

【０１５０】

（実施例１）

［R^{11}がアセチル基である図２の化合物の調製］

５－アンドロステン－３α－オール－１７－オン　アセテート（ＶＩＩＩ）（１００ｍｇ）を、ベンゼン中、一晩還流下に、エチレングリコール（０．２４５ｍＬ）及びｐ－トルエンスルホン酸一水和物（４ｍｇ）と反応させ、５－アンドロステン－３α－オール－１７－オン　アセテート　エチレンケタール（ＩＸ）（１１２ｍｇ）を得た。エチレンケタールＩＸ（１１２ｍｇ）を、ヘキサン（１３ｍＬ）中、３０分間、還流下に、Ｎ－ブロモスクシンイミド（６９ｍｇ）／アゾイソブチロニトリル（３．３ｍｇ）で臭素化して化合物Ｘを得、次に、ＴＨＦ（７．３ｍＬ）中、室温で、２時間、テトラブチルアンモニウムフルオライド（ＴＨＦ（１．６ｍＬ）中、１Ｍ）で脱臭化水素化し、アンドロスター５，７－ジエン－３α－オール－１７－オン　アセテート　エチレンケタール（ＸＩ）（５５ｍｇ）を得た。アンドロスター５，７－ジエン－３α－オール－１７－オン　アセテート　エチレンケタール（ＸＩ）（５５ｍｇ）を、メタノール（１０ｍＬ）中、室温で約５時間、１Ｎ水酸化ナトリウム（２ｍＬ）と反応させ、アンドロスター５，７－ジエン－３α－オール－１７－オン　エチレンケタール（ＸＩＩ）（４８ｍｇ）を得た。アンドロスター５，７－ジエン－３α－オール－１７－オン　エチレンケタール（ＸＩＩ）（４８ｍｇ）を、アセトン（５ｍＬ）及び水（０．２ｍＬ）の混合液中、室温で一晩、ｐ－トルエンスルホン酸一水和物（３５ｍｇ）と反応させ、アンドロスター５，７－ジエン－３α－オール－１７－オン（ＸＩＩＩ）（４３．４ｍｇ）を得た。アンドロスター５，７－ジエン－３α－オール－１７－オン（ＸＩＩＩ）（４３．４ｍｇ）を、エーテル（１，１００ｍＬ）中、－２０～０℃で、ＶＹＣＯＲ（登録商標）フィルター（Ａｃｅ　Ｇｌａｓｓ社、ニュージャージー州、ヴァインランド）を備えた４５０ｗの水銀ランプ下で５分間照射し、プレＨＭＣＨＥＭＯＩＯを得、これをエタノール（１５ｍＬ）中、３時間還流し、ＨＭＣＨＥＭＯＩＯ（ＶＩＩ）（１３．５ｍｇ）を得た。

【０１５１】

上記のＨＭＣＨＥＭＯＩＯ（ＶＩＩ）（１３．５ｍｇ）を、１ｍＬのメタノール中、室温で一晩、Ｏ－（カルボキシメチル）ヒドロキシルアミンヘミヒドロクロライド（１２ｍｇ）及び酢酸ナトリウム（２４ｍｇ）と反応させ、ＨＭＣＨＥＭＯＩＯ－ＣＭＯ（１３．２ｍｇ）（図３の式（ＸＸ）の化合物、ｎ＝１）を得た。

【０１５２】

カチオン化ＢＳＡを以下に示すように調製した。トリエチレンテトラアミン（０．５ｍＬ）（図３の式（ＸＸＩ）の化合物、式中、ｒ＝１及びｓ＝１）を、４．５ｍＬの５０ｍＭのＭＥＳ緩衝剤（ｐＨ６）に添加し、ｐＨを６に調整し、次いで、２０ｍｇのＢＳＡを添加した。合一物を撹拌し、完全に成分を溶解させた。ＥＤＡＣ（５ｍｇ）を、５時間に亘って１時間毎に、上記の溶液に添加した。１０ｍＬのＡＭＩＣＯＮ（登録商標）セル（Ａｍｉｃｏｎ社、マサチューセッツ州、ベヴァリー）中、１０ｍＬの洗浄緩衝剤（１０ｍＭのリン酸塩＋３００ｎＭのＮａＣｌ）（ｐＨ７）で１０回、溶液を洗浄した。次に、１００ｍｇのＴＷＥＥＮ（登録商標）２０を５０ｍＬの丸底フラスコに添加した。洗浄緩衝剤（５０ｍＬ）を添加し、混合物を１０分間撹拌し、Ｔｗｅｅｎ２０を分散させた。カチオン化ＢＳＡ（図３の式（ＸＸＩａ）の化合物、ｒ＝１及びｓ＝２）を、約５ｍｇ／ｍＬの濃度で、０．２％のＴＷＥＥＮ（登録商標）２０を有する洗浄緩衝剤中に保存した。

【０１５３】

ＨＭＣＨＥＭＯＩＯ－ＣＭＯ　ＢＳＡ（図３の式（ＩＩａ）の化合物）の調製のため、ＥＤＡＣ（２５ｍｇ）及び１０ｍｇのＮＨＳを、上記のように調製した１３．２ｍｇのＨＭＣＨＥＭＯＩＯ－ＣＭＯ（ＸＸ）と共に１０ｍＬのフラスコに添加した。ＤＭＦ（０．５ｍＬ）をフラスコに添加した。混合物を室温で２４時間撹拌し、活性化されたＨＭＣＨＥＭＯＩＯ－ＣＭＯを得た。溶液は清澄であった。ＴＬＣ（酢酸エチル：メタノール＝１：１）の結果、残留出発物質がないことが示された。

【０１５４】

上記の活性化されたＨＭＣＨＥＭＯＩＯ－ＣＭＯを、上記のカチオン化ＢＳＡ溶液に滴下して添加し、混合物を室温で一晩撹拌した。混合物をＡｍｉｃｏｎ（登録商標）セル（Ａｍｉｃｏｎ社、マサチューセッツ州、ベヴァリー）へ移し、次いで、洗浄緩衝剤１０ｍＬで５回洗浄し、約４ｍＬまで濃縮した（３０，０００のカットオフ）。溶出液として洗浄緩衝剤（ｐＨ　７．０）を用い、ＳＤ－２５カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏ－Ｓｃｉｅｎｃｅｓ社、ペンシルベニア州、ピッツバーグ）で混合物を更に分離し、ＨＭＣＨＥＭＯＩＯ－ＣＭＯ　ＢＳＡ化合物の混合物（図３の式（ＩＩａ）の化合物について上述した混合物）を得た。

【０１５５】

（実施例２）

［抗体の調製］

ＡＪ種のマウス（メス、少なくとも８週齢）を免疫して、モノクローナル抗体を産生させた。上記で得た１００μｇの免疫原（ＨＭＣＨＥＭＯＩＯ－ＣＭＯ　ＢＳＡ）を、Ｆｒｕｅｎｄｓの完全補助剤（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社、Ｃａｔ＃Ｆ５８８１）中に添加し１００μＬとし、１回目の免疫を行なった。３週後、同じ免疫原１００μｇをＦｒｕｅｎｄの不完全補助剤（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社、Ｃａｔ＃Ｆ５５０６）中に添加し１００μＬとし、ブースト免疫を行なった。更に３週後にも、同じ免疫原１００μｇをＦｒｕｅｎｄの不完全補助剤中に添加し１００μＬとし、第二のブースト免疫を行なった。最後のブースト免疫の１週間後、マウスから採血し、抗血清を、抗－３－エピマー抗体に関してＥＬＩＳＡで試験した。次に、潅流ブーストを同じ免疫原で融合前の３日間連続して行なった（ＰＢＳ中、５０μＬ中２０μｇ、補助剤なし）。４日目にマウスを安楽死させ、脾臓を摘出した。脾臓細胞を分離し、Ｐ３－Ｘ６３Ａｇ８．６５３（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８０（商標））と称される非分泌マウス骨髄腫細胞株を用いた標準法により細胞融合を行なった。標準法によりクローニングを行なった。

【０１５６】

得られたクローンを、結合及び阻害ＥＬＩＳＡでスクリーニングした。以下の結合ＥＬ

ＩＳＡ免疫測定法は、以下のプロトコルの手順に従う。ウェルあたり５０μＬのＰＢＳ中の１μｇ／ｍＬのＢＳＡ接合体を用い、上記と同様の方法で調製したオボアルブミンに接合した３－エピマーで、プレートを被覆した。プレートの被覆は、室温で１時間以上、行なった。次にプレートを叩いて乾燥させ、ウェルあたり２００μＬのブロッキング緩衝剤希釈液（０．０５％のＴＷＥＥＮ（登録商標）２０を含有するＰＢＳ中、０．５％のカゼイン溶液）でブロッキングした。プレートのブロッキングは、２℃～８℃で１時間又は一晩行なった。次に、プレートを３回洗浄し、叩いて乾燥させた。スクリーニングすべきモノクローナル抗体を次に、以下のとおり各ウェルに添加した。融合細胞の増殖プレートの対応するウェルから採取した２５μＬの培養上清を２５μＬのＰＢＳと混合した。インキュベーションは、プレートを振とうしながら、室温で約１時間、実施した。プレートを、０．０５％のＴＷＥＥＮ（登録商標）２０を含有するＭＩＬＬＩ－Ｑ（登録商標）水（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社、マサチューセッツ州、ビレリカ）を洗浄バッファーとし、プレートスタッカーを有するプレートウォッシャー（ＢｉｏＴｅｋ社、バーモント州、ウィヌースキ）を用いて、洗浄した。酵素接合体（１：３０００までブロッキング緩衝剤希釈液で希釈されたＨＲＰに結合したヤギ抗マウスＩｇＧ）をウェルあたり５０μＬ添加した。室温で約１時間振とうしてインキュベートした。次に、プレートを洗浄し、色素溶液（ＴＭＢ、Ｍｏｓｓ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅｓ社、メリーランド州、パサデナ）をウェル当たり１００μＬ添加し、室温で１０分間インキュベートした。ＥＬＩＳＡプレートリーダーを用い、６５０ｎｍでプレートを解析した。

【０１５７】

上記のスクリーニング法に基づいて、適切なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選抜した。かかるモノクローナル抗体の１つを、抗体８Ｆ１０と命名するが、これは、ＩｇＧ２ａカッパ抗体である。かかるモノクローナル抗体の他のもの、抗体４Ｇ８と命名するが、これは、ＩｇＧ２ａカッパ抗体である。

【０１５８】

更に、以下のプロトコルに従う阻害ＥＬＩＳＡ手順を使用してクローンをスクリーニングした。ウェルあたり５０μＬの、リン酸塩緩衝食塩水中の１μｇ／ｍＬのオボアルブミンに接合した３－エピマーで、プレートを被覆した。プレートの被覆を、室温で１時間以上又は約２℃～８℃で一晩、行なった。次に、プレートを叩いて乾燥させ、ウェルあたり２００μＬのブロッキング緩衝剤希釈液（０．０５％のＴＷＥＥＮ（登録商標）２０を含有するＰＢＳ中、０．５％のカゼイン溶液）でブロッキングした。プレートブロッキングは、プレートを振とうしながら、室温で３０分間以上インキュベーションすることにより、行なった。プレートを洗浄した。次いで、スクリーニングすべきモノクローナル抗体を、以下のとおり、フリーの３－エピマーと共に各ウェルに、添加した。融合細胞の増殖プレートの対応するウェルから採取したウエル当たり２５μＬの培養上清を移し、２μｇ／ｍＬの３－エピマー－２５ＯＨビタミン$Ｄ_3$の２５μＬを添加した。インキュベーションは、プレートを振とうしながら、室温で約１時間、実施した。プレートを、０．０５％のＴＷＥＥＮ（登録商標）２０を含有するＭＩＬＬＩ－Ｑ（登録商標）水（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社、マサチューセッツ州、ビレリカ）を洗浄バッファーとし、プレートスタッカーを有するプレートウォッシャー（ＢｉｏＴｅｋ社、バーモント州、ウィヌースキ）を用いて、洗浄した。酵素接合体（１：３０００までブロッキング緩衝剤希釈液で希釈されたＨＲＰに結合したヤギ抗マウスＩｇＧ）をウェルあたり５０μＬ添加した。インキュベーションは、プレートを振とうしながら、室温で約１時間、実施した。次に、プレートを洗浄し、色素溶液（ＴＭＢ、Ｍｏｓｓ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅｓ社、メリーランド州、パサデナ）をウェル当たり１００μＬ添加した。目的の抗体がハイブリドーマ上清に存在する場合、フリーの３－エピマーを含まないウェルと比較し、光学濃度の減少が観察された。コントロールとして、フリーの３－エピマー－２５ＯＨビタミン$Ｄ_3$の代わりに、２５ＯＨビタミン$Ｄ_3$を用い、抗体の特異性をモニターした。３－エピマーに結合し、２５ＯＨビタミン$Ｄ_3$に結合しない抗体を選抜した。

【０１５９】

［ポリクローナル抗体の調製］
ＨＭＣＨＥＭＯＩＯ－ＣＭＯ　ＢＳＡを５００μｇ／回用いてウサギを免疫した。１回の初回免疫及び５回ブースト免疫を２週間隔で実施し、２匹の試験個体と１匹の生産個体を集め、上記のように、抗血清をＥＬＩＳＡ試験した。
【０１６０】
（実施例３）
［２５ＯＨビタミンＤに対する免疫測定法］
［免疫測定法手順］
使用した２５ＯＨビタミンＤ（２５（ＯＨ）Ｄ）免疫測定法フォーマットは、ＬＯＣＩ（登録商標）アッセイ法に基づく均質な競合化学発光免疫測定法である。当該アッセイは、Ｓｉｅｍｅｎｓ　Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎ（登録商標）ＥＸＬで自動化された統合臨床化学システム（シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノスティックス・インコーポレーテッド社、イリノイ州、ディアフィールド）で実施した。アッセイにおいて、血清試料中及び血漿試料中の２５（ＯＨ）$Ｄ_2$及び／又は２５（ＯＨ）$Ｄ_3$の総濃度を測定した。ＬＯＣＩ（登録商標）アッセイ試薬には、放出試薬、２つの合成ビーズ試薬及びビオチン化モノクローナル抗２５ＯＨビタミンＤ抗体試薬が含まれていた。第一ビーズ試薬（「センシビーズ（Ｓｅｎｓｉｂｅａｄｓ）」と称する。）は、ストレプトアビジンで被覆され、感光性色素を含有していた。第二ビーズ試薬（「ケミビーズ（Ｃｈｅｍｉｂｅａｄｓ）」と称する。）は、２５（ＯＨ）$Ｄ_3$類縁体で被覆され、化学発光色素を含有していた。試料を放出試薬とインキュベートし、ビタミンＤ結合タンパク質から３－エピマー化合物を含む２５（ＯＨ）Ｄ分子を放出させた。次に、反応混合物をビオチン化抗体とインキュベートし、ビオチン化２５（ＯＨ）Ｄ抗体複合体を生成させた。ビオチン化抗体（ヒツジモノクローナル抗体）が、３－エピ－２５（ＯＨ）Ｄと交差反応したため、抗－３－エピマー－ＶＤ抗体である８Ｆ１０．１の１００μｇ／ｍＬを添加し、３－エピマービタミンＤ化合物に由来するアッセイ信号を最小にした。ケミビーズを添加し、過剰なフリーのビオチン化抗体と結合させた。次に、センシビーズを添加し、ビオチン化抗体のビオチン部分と結合させた。その結果、ケミビーズ－類縁体／抗体－ビオチン／ストレプトアビジン－センシビーズの凝集体が形成された。反応混合物の６８０ｎｍの光による照射により、センシビーズから一重項酸素が発生し、これがケミビーズに拡散し、化学発光反応を誘発した。得られる化学発光信号を６１２ｎｍで測定した結果、試料中の全２５（ＯＨ）Ｄの濃度に逆比例していた。
【０１６１】
［免疫測定法用試薬の調製］
［２５（ＯＨ）$Ｄ_3$ケミビーズの合成］
２５（ＯＨ）$Ｄ_3$カルバメートとＥＰＲＭ－ＥＤＡとを結合させることにより、２５（ＯＨ）$Ｄ_3$ケミビーズを合成した。使用した材料は、ＥＰＲＭ－ＥＤＡビーズ、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＤＡＣ）、Ｆｌｕｋａ　スルホ－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＳＮＨＳ）、２５（ＯＨ）$Ｄ_3$－３－カルバメート、ＧＡＦＡＣ（登録商標）界面活性剤溶液（１６％）、無水ＤＭＳＯ、１０％のＭｅＯＰ及び１％のＧＡＦＡＣ（登録商標）界面活性剤を含む５０ｍＭのＭＥＳ緩衝剤（ｐＨ６）である。
【０１６２】
［ＥＰＲＭ－ＥＤＡビーズの調製］
ＥＰＲＭビーズ（２，０００ｍｇ、２０．０ｍＬ）を４０ｍＬのバイアルに添加する。ＥＰＲＭビーズは、特許文献２３に記載の手順と同様の方法で調製し、化学発光化合物は、２－（４－（Ｎ，Ｎ－ジ－テトラデシル）－アニリノ－３－フェニルチオキセンのユウロピウムキレートとする。ＥＤＡ（８００ｍｇ、８９０μＬ）を、１０ｍＬのＭＥＳ緩衝剤（ｐＨ６）（「緩衝剤」）及び約４．２ｍＬの６Ｎ　ＨＣｌと合一する。混合物のｐＨは、約６．９であるか又は約６．９に調整する。ＥＤＡ溶液をＥＰＲＭビーズにボルテックスしながら添加し、混合物を１５分間室温で振とうする。ナトリウムシアノボロハイド

ライド（４００ｍｇ）を、１５ｍＬのバイアル中で１０ｍＬのＤＩ水と合一し、当該合一物を上記のビーズ混合物に添加する。混合物を１８～２０時間、３７℃で振とうする。ビーズを６本の４０ｍＬの遠心チューブへ移す。ＭＥＳ緩衝剤を添加して３５ｍＬの体積とし、混合物を、３０分間、１９，０００ｒｐｍで遠心分離する。上清をデカントし、撹拌ロッドで撹拌しながら２ｍＬの緩衝剤中でビーズを再懸濁し、更に緩衝剤を添加して３５ｍＬとする。混合物を氷冷しながら３０秒間１８ワットの電力で混合物を超音波処理する。洗浄／超音波処理ステップを４回実施し、全ての活性化化合物を除去する。ＭＥＳ緩衝剤の最後の遠心分離後、５％のＭｅＯＰ及び０．１％のＴＷＥＥＮ（登録商標）２０を含有する緩衝剤（「第２緩衝剤」）をチューブに２ｍＬ添加し、再懸濁ステップを行なう。超音波処理の前に、更なる第２緩衝剤を添加して３５ｍＬとする。ビーズ懸濁液を３０分間、１９，０００ｒｐｍで遠心分離する。上清を廃棄する。最後の超音波処理では、各チューブに第２緩衝剤を１２ｍＬ用い、２５ｍｇ／ｍＬの希釈液を得る。ＵＰＡ装置で測定した結果、粒径は２７７ｎｍである。

【０１６３】

ＥＰＲＭケミビーズは、特許文献２４及び特許文献２５に記載の方法と同様の方法で調製する。これらの文献の関連する開示内容を参照により本発明に援用する。ＥＰＲＭケミビーズは、アミノデキストラン内層と、フリーのアルデヒド官能基を有するデキストランアルデヒド外層とを、有する。例えば特許文献２６、特許文献２３及び特許文献２７を参照されたい。これらの関連する開示内容を、参照により、本発明に援用する。反応は、適切な緩衝剤、例えばＭＥＳ、を用いた緩衝水性媒体中、約０～約４０℃の温度で、約１６～約６４時間、約５．５～約７．０又は約６のｐＨで実施する。反応は、適切なクエンチ剤（例えばカルボキシメトキシアミンヘミヒドロクロライド（ＣＭＯ））を添加してクエンチし、次に粒子を洗浄することにより行なう。

【０１６４】

デキストランアルデヒド外層のアルデヒド基は、還元的アミノ化条件下でエチレンジアミンと反応して、エチレン鎖及び末端アミノ基を含有するペンダント部分を有するＥＰＲＭ－ＥＤＡ試薬を形成する。還元的アミノ化条件は、例えば金属水素化物等の、還元剤の使用を伴う。反応は、約１時間～約４８時間、約２０℃～約１００℃の反応中温度で、水性媒体中で実施する。

【０１６５】

［２５（ＯＨ）Ｄ$_3$－３－カルバメート（２５（ＯＨ）Ｄ$_3$－３－カルバメート）の合成］

ＣｈｅｍＲｅａｇｅｎｔｓ．ｃｏｍ（テキサス州、シュガーランド）から購入した２２ｍｇ（５５μｍｏｌ）の２５（ＯＨ）Ｄ$_3$と、１００ｍｇ（４２０μｍｏｌ）のジスクシンイミジルカーボネート（ＤＳＣ）と、１ｍＬの無水のアセトニトリル中の１００μＬのトリエチルアミンとの混合物を、ホイルでカバーした５ｍＬのフラスコ中、室温、窒素下で１８時間、撹拌し、活性化２５（ＯＨ）Ｄ$_3$を調製した。ＴＬＣ（ＥｔＯＡｃ：ヘキサン＝２：１）では、残留出発物質が検出されなかった。１０ｍＬのフラスコに、１５０ｍｇのカルボキシメトキシルアミンヘミヒドロクロライド（ＣＭＯ）、０．３ｍＬのトリエチルアミン及び１ｍＬのＤＭＦを添加し、懸濁液を調製した。ＣＭＯ懸濁液に、撹拌しながら、活性化２５（ＯＨ）Ｄ$_3$を含有する溶液を滴下添加し、更に１８時間撹拌を継続した。真空状態とし、可能な限り多量の溶媒を除去した（温浴の温度を５０℃以下に維持した。）。ＥｔＯＡｃ（２５ｍＬ）を残渣に添加し、２ｍＬのブラインで３回洗浄した。有機相を無水Ｎａ$_2$ＳＯ$_4$で乾燥し、濾過し、ロータリエバポレーターを用いて溶媒を除去した。乾燥の後、粗生成物（４２ｍｇ）を得、ＨＰＬＣで精製した。高真空下での乾燥の後、純粋な生成物（２４ｍｇ）を得た。生成物を１．２ｍＬの無水ＤＭＳＯ中に溶解した。アリコートをバイアルに移し、－７０℃で保存した。

【０１６６】

［ＥＰＲＭ－ＥＤＡとハプテン２５（ＯＨ）Ｄ$_3$－カルバメートとのカップリング］

１．２ｍｇのハプテンを２ｍＬのバイアルに添加した。１１．２ｍｇのＥＤＡＣ、１５

．５ｍｇのＳＮＨＳ、及び３．７３ｍＬの無水ＤＭＳＯを５ｍＬのバイアルに添加した。ＥＤＡＣ／ＳＮＨＳ溶液を回転させ、内容物を溶解させた。１．１４ｍＬのＥＤＡＣ／ＳＮＨＳ溶液を、ハプテンを含有するバイアルに添加した。混合物を２２時間回転した。ＥＰＲＭ－ＥＤＡ（２００ｍｇ）を、高ｐＨ洗浄緩衝剤で１回、次いでＭＥＳ緩衝剤（ｐＨ６）で洗浄した。５ｍＬのバイアルに、１．０８ｍＬ（１００ｍｇ）の洗浄緩衝剤、続いて１４３ｍＬの１．６％のＧＡＦＡＣ（登録商標）界面活性剤を添加した。小型の試験管に、２５６の無水ＤＭＳＯ、続いて４９μＬのＥＤＡＣ／ＳＮＨＳ／ハプテンを添加した。ＤＭＳＯ／ハプテン溶液をビーズ混合物に滴下添加した（添加の間、ボルテックスを行なった）。ビーズ／ハプテン混合物を室温で一晩回転した。

【０１６７】

ビーズ／ハプテン混合物を５０ｍＬの遠心チューブへ移し、１０％の１－メトキシ－２－プロパノール／１％のＧＡＦＡＣ（登録商標）界面活性剤／ＭＥＳ緩衝剤（ｐＨ６）で希釈して３５ｍＬとした。チューブを１０℃で３０分間、１８，５００ｒｐｍで遠心分離した。上清を廃棄し、同じ緩衝剤１ｍＬで置き換えた。撹拌ロッドを用いてペレットを再懸濁させた。バイアルに同じ緩衝剤を３５ｍＬまで充填した。チューブを氷冷しながら、１分間、１８～２１ワットでチューブを超音波処理した。遠心分離／洗浄を６回繰り返した。６回目の洗浄後、緩衝剤をハプテン洗浄緩衝剤（ｐＨ７．２）に交換し、更に２回洗浄を行なった。１ｍＬのハプテン洗浄緩衝剤を用いた最後の洗浄及び再懸濁後、４ｍＬのハプテン洗浄緩衝剤を添加した。ビーズ混合物をカップソニケーター中で、５０％の出力で超音波処理した。ＵＰＡで測定した結果、粒径は２９８ｎｍであった。パーセント固体アッセイを実施し、ビーズ混合物を１０ｍｇ／ｍＬまで希釈した。このケミビーズ試薬は、５０ｍＭのＭＥＳ緩衝剤中に調製した。

【０１６８】

［抗－２５（ＯＨ）Ｄ抗体のビオチン化］

ＮＨＳ－ＰＥＯ$_4$－ビオチン（Ｐｉｅｒｃｅ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ社、イリノイ州、ロックフィールド）を、抗－２５（ＯＨ）Ｄ抗体（ヒツジモノクローナル抗体、Ｂｉｏｖｅｎｔｉｘ社製、英国、サリー州、ファーナム）にカップリングさせた。３ｍｇの抗－２５（ＯＨ）Ｄ抗体を、各１０ｍＬの抗体透析緩衝剤（１０ｍＭのＮａＨ$_2$ＰＯ$_4$、ｐＨ７．０／３００ｍＭのＮａＣｌ）／１０ｍＬ　Ａｍｉｃｏｎで、２回、緩衝剤交換し、３．０ｍｇ／ｍＬまで濃縮した。１ｍｇのＮＨＳ－ＰＥＯ４－ビオチンを、１００μＬの抗体透析緩衝剤中に溶解し、１０ｍｇ／ｍＬのビオチン試薬液を調製し、それ（３５μＬ）を抗－２５（ＯＨ）Ｄ抗体溶液に添加した。反応混合物を一晩室温で振とうした。各１０ｍＬの抗体透析緩衝剤／１０ｍＬ　Ａｍｉｃｏｎで混合物を３回洗浄し、次いで、約１ｍＬまで濃縮した。ＵＶ　Ａ２８０により濃度を測定した。ビオチン化された抗－２５（ＯＨ）Ｄ抗体試薬を、２５ｍＭのクエン酸緩衝剤、３００ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、ブロッキングタンパク質及び防腐剤を含有する水性緩衝剤（ｐＨ５．０）中に調製した。

【０１６９】

［センシビーズ］

ストレプトアビジン－増感剤ビーズを、特許文献２４、特許文献２８、特許文献２９及び特許文献２５に記載された方法と同様の方法を使用して調製した。光増感剤を、ビス－（トリヘキシル）－シリコン－ｔ－ブチル－フタロシアニンとした。Ｓｅｎｓｉｂｅａｄ試薬の濃度は、１５０ｍＭのＮａＣｌを含有するＨＥＰＥＳ緩衝剤（ｐＨ８．０）中、２００μｇ／ｍＬであった。

【０１７０】

［放出試薬］

５ｍＭのＨＥＰＥＳ緩衝剤中のサリチル酸ナトリウム。

【０１７１】

［免疫測定の結果］

アッセイにおける３－エピマーの交差反応性に対する抗－３－エピマー－ＶＤ抗体８Ｆ１０．１（抗－３－エピマーＶＤ　Ａｂ）の添加の効果を表１に示す。２５（ＯＨ）Ｄ$_2$

又は２５（ＯＨ）Ｄ$_3$化合物を含有する１０の患者血清を、シグマ社から購入した１００ｎｇ／ｍＬの３－エピマービタミンＤ$_3$化合物（ストックＮｏ．７５１３２４）でスパイクした。３－エピマーの交差反応性は、２５（ＯＨ）Ｄ$_2$又は２５（ＯＨ）Ｄ$_3$の、スパイクとしての３－エピマー化合物の有無による相違を、添加した３－エピマー化合物の量で除算することにより算出した。抗－３－エピマー－ＶＤ抗体８Ｆ１０．１の１００μｇ／ｍＬの添加により、３－エピマー交差反応性の平均値が１３．７％から２％未満まで減少した。

【表１】

サンプル ID	3－エピマーD3 スパイクの有無	抗3－エピマーVD抗体無添加		抗3－エピマーVD抗体添加	
		ng/mL	交差反応性	ng/mL	交差反応性
1	なし	30.2		30.7	
	あり	48.0	17.9%	33.0	2.2%
2	なし	22.5		23.2	
	あり	40.5	17.9%	25.6	2.4%
3	なし	19.8		20.7	
	あり	31.6	11.9%	22.5	1.8%
4	なし	40.4		40.5	
	あり	53.0	12.6%	41.4	1.0%
5	なし	46.6		45.6	
	あり	62.7	16.1%	49.2	3.5%
6	なし	47.3		48.5	
	あり	57.5	10.2%	46.4	-2.0%
7	なし	53.1		55.4	
	あり	62.2	9.1%	55.4	0.0%
8	なし	39.5		40.8	
	あり	50.0	10.5%	43.8	3.0%
9	なし	47.4		48.6	
	あり	62.8	15.3%	50.8	2.2%
10	なし	23.6		24.8	
	あり	39.1	15.5%	28.6	3.8%
平均交差反応性			**13.7%**		**1.8%**

【０１７２】

図９は、抗－３－エピマー－ＶＤ抗体８Ｆ１０．１（３－エピマーＡｂ）を含む試薬又は含まない試薬を用いて得た標準曲線の比較を示す。２本の曲線の完全な重複は、抗－３－エピマー－ＶＤ抗体８Ｆ１０．１が、２５（ＯＨ）Ｄ$_3$の測定に影響を及ぼさないことを示し（図９の２５ＯＨＶｉｔＤ$_3$）、これは、当該抗体が３－エピマー化合物に特異的であり、２５（ＯＨ）Ｄ$_3$と観察可能な交差反応性を有さないことを示す。

【０１７３】

（実施例４）

［３－エピ－２５ＯＨビタミンＤに対する免疫測定法］

［免疫測定法手順］

３－エピ－２５ＯＨビタミンＤ（３－エピ－２５（ＯＨ）Ｄ）の測定では、上記実施例３で述べたと同様のＬＯＣＩ（登録商標）アッセイ法に基づく均質競合化学発光免疫測定法を使用した。当該アッセイは、Ｓｉｅｍｅｎｓ　Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎ（登録商標）ＥＸＬで自動化された統合臨床化学システム（シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノスティックス・インコーポレーテッド社）で実施した。３－エピ－２５（ＯＨ）Ｄの測定に用いられるＬＯＣＩ（登録商標）アッセイ試薬は、放出試薬、２つの合成ビーズ試薬及びビオチ

ン化モノクローナル抗－３－エピマー抗体試薬を含むものであった。第１ビーズ試薬（センシビーズ）は、ストレプトアビジンで被覆され、感光性色素を含有していた。第二ビーズ試薬（ケミビーズ）は、上記実施例１と同様の方法で調製した３－エピマー類縁体（上記式（ＩＩａ）の化合物、式中、Ｚ’は非ポリ（アミノ酸）標識である。即ち、ＥＰＲＭ－ＥＤＡケミビーズである。）で被覆されていた。試料を放出試薬とインキュベートして、ビタミンＤ結合タンパク質から３－エピマー化合物を始めとする２５（ＯＨ）Ｄ分子を放出させた。次いで、反応混合物をビオチン化抗体とインキュベートして、３－エピ－２５（ＯＨ）Ｄ／ビオチン化抗体複合体を生成させた。ケミビーズを添加し、過剰のフリーのビオチン化抗体を捕捉した。次に、センシビーズを添加し、ビオチン化抗体のビオチン部分と結合させた。その結果、ケミビーズ－類縁体／抗体－ビオチン／ストレプトアビジン－センシビーズの凝集体が形成された。反応混合物を６８０ｎｍの光で照射すると、センシビーズから一重項酸素が発生し、これがケミビーズ中に拡散し、化学発光反応を誘発した。得られた化学発光信号を６１２ｎｍで測定したところ、試料中の総３－エピ－２５（ＯＨ）Ｄの濃度に逆比例していた。

【０１７４】

［免疫測定法用試薬の調製］

［３－エピマー類縁体ケミビーズの合成］

この３－エピ－２５（ＯＨ）Ｄの検出アッセイに用いるケミビーズを、２５（ＯＨ）D_3ケミビーズの合成に関する実施例３に記載の方法と同様の方法で調製した。このとき、ハプテンは、Ｚ’がケミビーズである式（ＩＩａ）の化合物である。

【０１７５】

［ケミビーズ試薬］

５０ｎＭのＭＥＳ緩衝剤中の３－エピマー類縁体ケミビーズ。

【０１７６】

［抗－３－エピマー－ＶＤ抗体８Ｆ１０．１のビオチン化］

抗－３－エピマー－ＶＤ抗体８Ｆ１０．１のビオチン化は、抗－２５（ＯＨ）Ｄ抗体のビオチン化に関する上記実施例３に記載の方法と同様の方法で実施した。

【０１７７】

［ビオチン化抗体試薬］

２５ｍＭのクエン酸緩衝剤中の、上記ビオチン化抗－３－エピマー－ＶＤ抗体８Ｆ１０．１。

【０１７８】

［センシビーズ試薬］

センシビーズ試薬は、実施例３の場合と同様とした。

【０１７９】

［免疫測定法の結果］

図１０は、抗－３－エピマー－ＶＤ抗体８Ｆ１０．１を用いた試料における３－エピ－２５（ＯＨ）Ｄ測定免疫測定の標準曲線を示す。化学発光のキロカウントは、上記のようにして測定された化学発光信号を表す。

【０１８０】

本明細書で引用される全ての刊行物及び特許出願は、あたかも、それら個々の刊行物又は特許出願が個別具体的に参照により本発明に援用されると示されていたように、参照により本発明に援用される。

【０１８１】

上記の実施例は、本明細書に記載の原理を表す多くの具体例のうちの幾つかを単に例示するに過ぎないことを理解すべきである。当業者であれば、以下の請求項により定義される範囲から逸脱することなく、多数の変形態様を容易に考案できることは明らかである。

【図１】

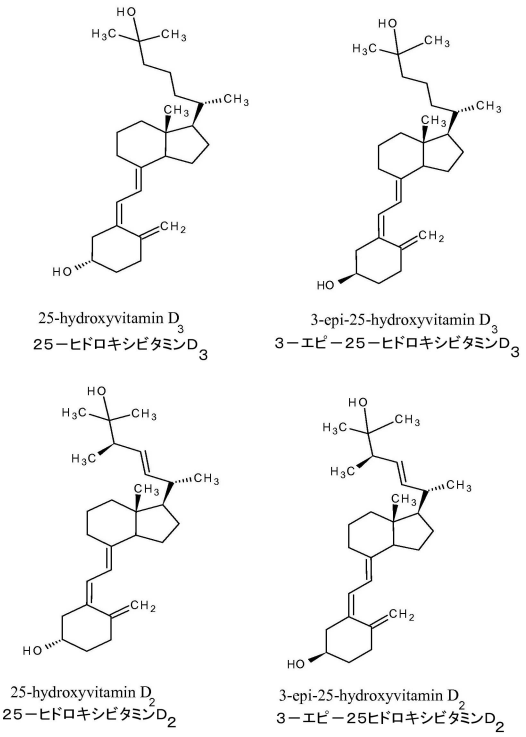


FIG. 1

【図２】

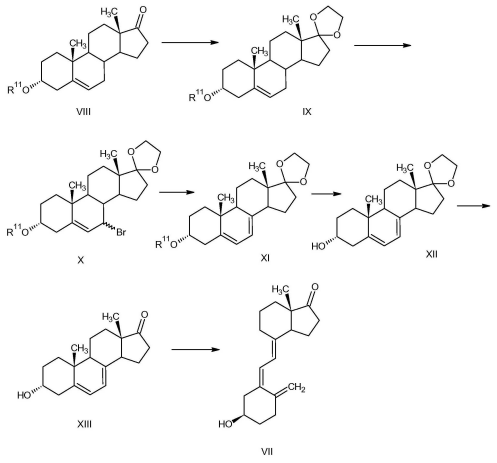


FIG. 2

【図３】

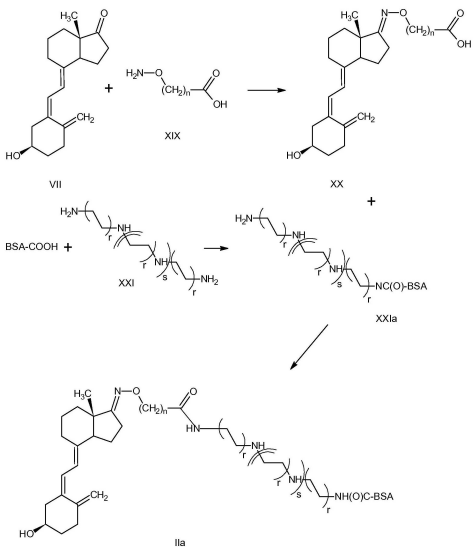


FIG. 3

【図４】

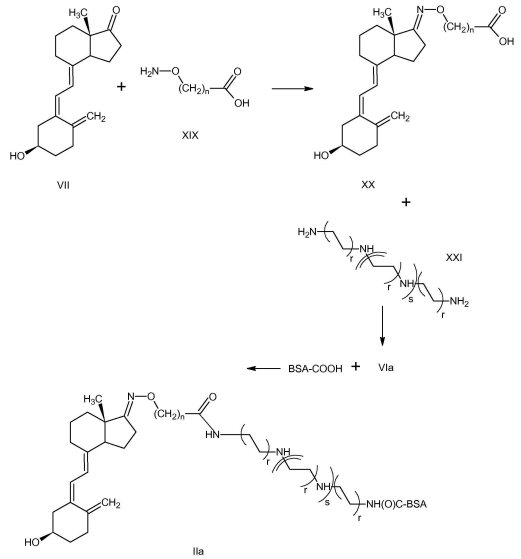


FIG. 4

【図５】

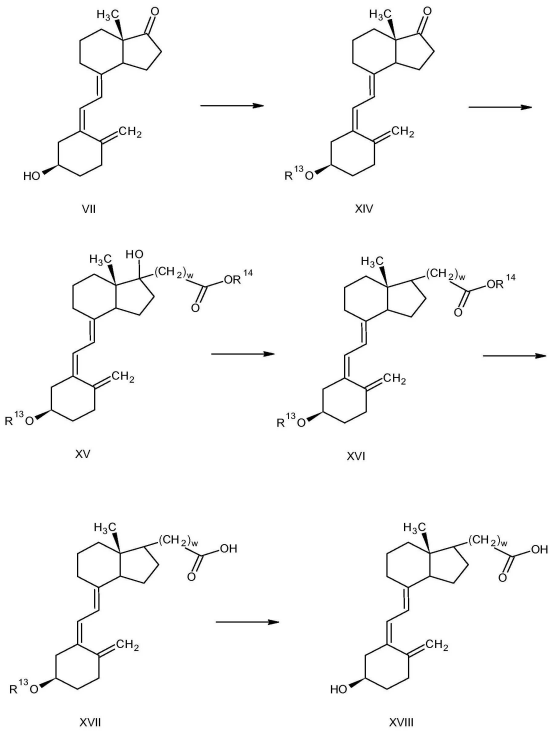


FIG. 5

【図６】

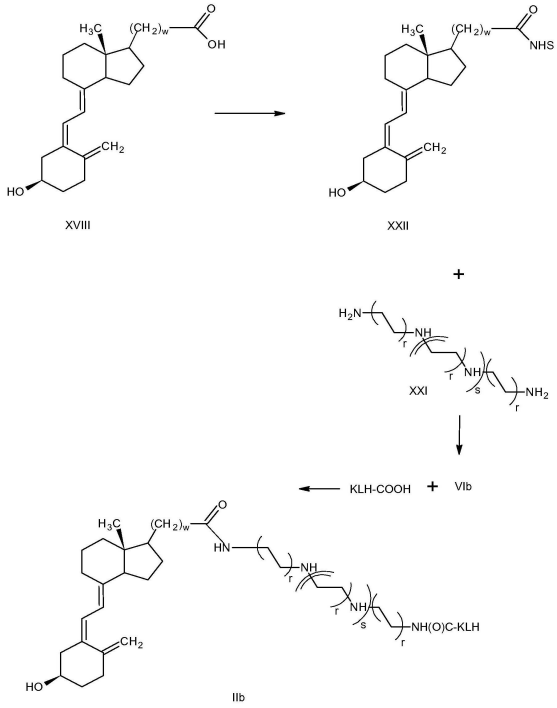


FIG. 6

【図７】

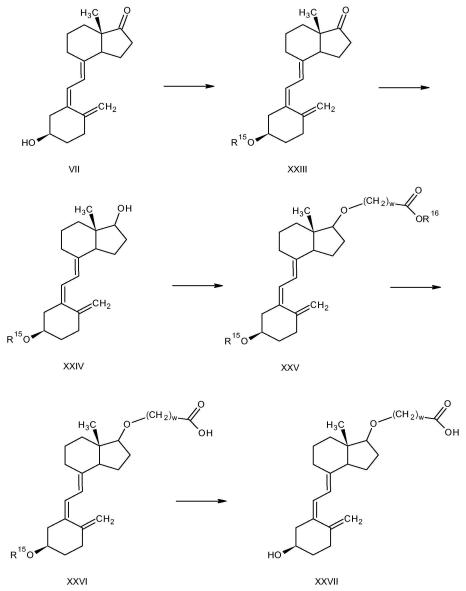


FIG. 7

【図８】

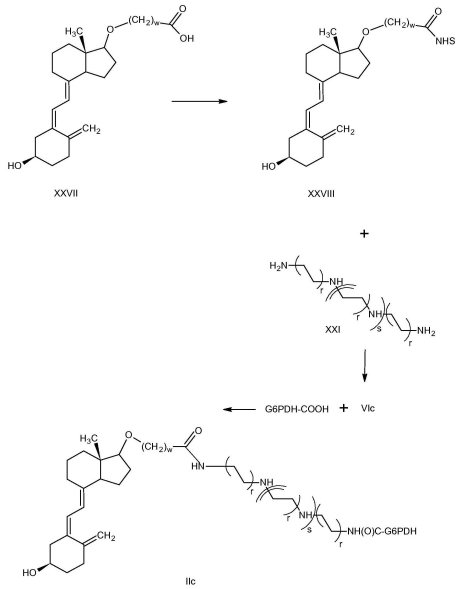


FIG. 8

【図９】

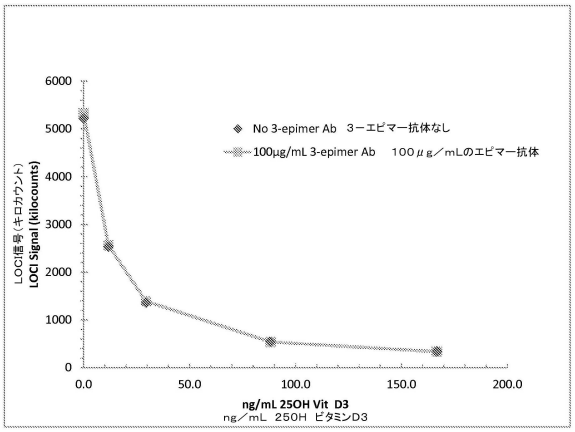


FIG. 9

【図１０】

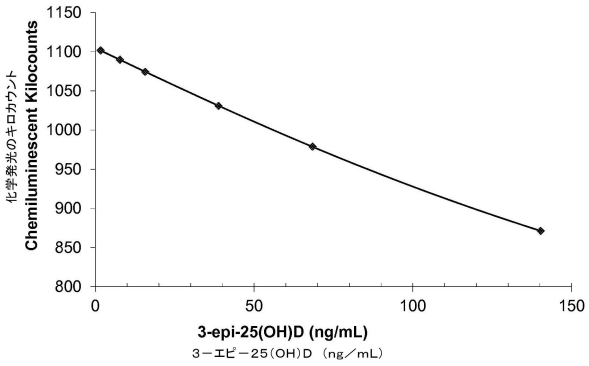


FIG. 10

フロントページの続き

(72)発明者　マレーエヴァ、タチアナ
アメリカ合衆国　０８０３３　ニュー　ジャージー、ハドンフィールド、ウエスト　クリスタル　レイク　アヴェニュー　２１０、アパートメント　１４１エイ
(72)発明者　スミルノフ、ユーリイ
アメリカ合衆国　０８０３３　ニュー　ジャージー、ハドンフィールド、ウエスト　クリスタル　レイク　アヴェニュー　２１０、アパートメント　１４１エイ
(72)発明者　ベドジク、ウイリアム　ディー.
アメリカ合衆国　１９７３０　デラウエア、オデッサ、メイン　ストリート　３１０
(72)発明者　トゥオン、ジュウ
アメリカ合衆国　１９０６０　ペンシルヴェニア、ガーネット　ヴァレイ、ウッズヴュー　ドライヴ　１２０１
(72)発明者　ウエイ、ティエ　チュエン
アメリカ合衆国　１９８０８　デラウエア、ウイルミントン、アセンション　ドライヴ　９７

合議体
審判長　田村　聖子
審判官　中島　庸子
審判官　小暮　道明

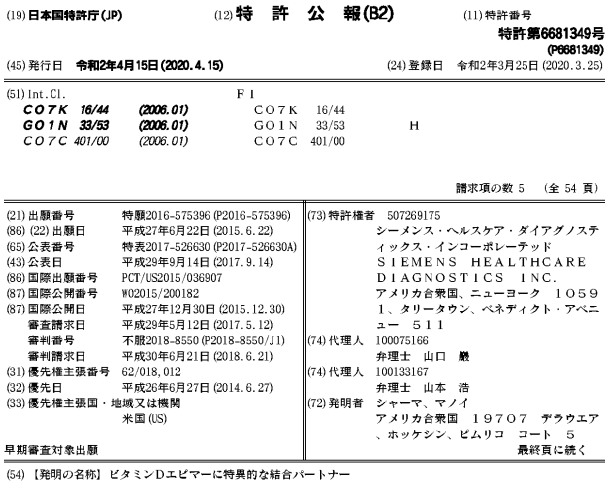
(56)参考文献　国際公開第２０１２／１６２１６５号
神戸川明, エンザイムイムノアッセイにおける酵素標識法の種類とその特性, 日本臨牀, １９９５年, ｖｏｌ. ５３, ｎｏ. ９, ｐ. ６６－７３
Ｃｌｉｎｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ, ２０１２年, ｖｏｌ. ４５, ｐ. ３２６－３３０

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
IPC　C12N15/00-90
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＥＭＢＡＳＥ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）

专利名称(译)	维生素D差向异构体的特异性结合伴侣		
公开(公告)号	JP6681349B2	公开(公告)日	2020-04-15
申请号	JP2016575396	申请日	2015-06-22
[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		
当前申请(专利权)人(译)	西门子医疗诊断公司		
[标]发明人	シャーママノイ マレーエヴァタチアナ スミルノフユーリイ ベドジクウイリアムディー トゥオンジュウ ウエイティエチュエン		
发明人	シャーマ、マノイ マレーエヴァ、タチアナ スミルノフ、ユーリイ ベドジク、ウイリアム ディー. トゥオン、ジュウ ウエイ、ティエ チュエン		
IPC分类号	C07K16/44 G01N33/53 C07C401/00		
CPC分类号	B01D15/3809 C07K16/26 C07K2317/33 C07K1/22 C07K16/44 G01N33/82		
FI分类号	C07K16/44 G01N33/53.H C07C401/00		
代理人(译)	山口岩 山本浩		
优先权	62/018012 2014-06-27 US		
其他公开文献	JP2017526630A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

产生针对其中Z为免疫原性载体的式（I）化合物的抗体。 这些化合物能够与相应的抗体特异性结合。 所述抗体对维生素D的差向异构体具有特异性。根据本文所述原理的抗体可用于在非表观形式的维生素D分析物的测定中最小化或消除3-表位的交叉反应性。 可以基本上避免由于使用3-表位维生素D与针对维生素D分析物的抗体发生交叉反应而导致的总非表观维生素D分析物的过高估计，而采用针对免疫原的抗体（作为阻断剂）制备的抗体作为封闭剂。 式（I），其中Z为免疫原性载体。



(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号 特許第6681349号 (P6681349)

(45)発行日　令和2年4月15日(2020.4.15)　(24)登録日　令和2年3月25日(2020.3.25)

(51)Int.Cl.		F I	
C07K 16/44	(2006.01)	C07K 16/44	
G01N 33/53	(2006.01)	G01N 33/53	H
C07C 401/00	(2006.01)	C07C 401/00	

請求項の数 5　(全 54 頁)

(21)出願番号	特願2016-575396 (P2016-575396)
(86)(22)出願日	平成27年6月22日 (2015.6.22)
(65)公表番号	特表2017-526630 (P2017-526630A)
(43)公表日	平成29年9月14日 (2017.9.14)
(86)国際出願番号	PCT/US2015/036907
(87)国際公開番号	WO2015/200182
(87)国際公開日	平成27年12月30日 (2015.12.30)
審査請求日	平成29年5月12日 (2017.5.12)
審判番号	不服2018-8550 (P2018-8550/J1)
審判請求日	平成30年6月21日 (2018.6.21)
(31)優先権主張番号	62/018,012
(32)優先日	平成26年6月27日 (2014.6.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
早期審査対象出願	

(73)特許権者　507269175
シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノスティックス・インコーポレーテッド
ＳＩＥＭＥＮＳ　ＨＥＡＬＴＨＣＡＲＥ　ＤＩＡＧＮＯＳＴＩＣＳ　ＩＮＣ.
アメリカ合衆国、ニューヨーク　１０５９１、タリータウン、ベネディクト・アベニュー　５１１
(74)代理人　100075166
弁理士　山口　巖
(74)代理人　100133167
弁理士　山本　浩
(72)発明者　シャーマ、マノイ
アメリカ合衆国　１９７０７　デラウエア、ホッケシン、ビムリコ　コート　５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ビタミンDエピマーに特異的な結合パートナー