

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-148821

(P2011-148821A)

(43) 公開日 平成23年8月4日(2011.8.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07J 41/00 (2006.01)	C07J 41/00	4B050
C07J 75/00 (2006.01)	C07J 75/00	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 A	4B064
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 511A	4C091
C07K 14/765 (2006.01)	GO1N 33/543 521	4H045

審査請求 有 請求項の数 17 O L 外国語出願 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-90267 (P2011-90267)	(71) 出願人	594199337 オルソークリニカル ダイアグノスティクス、インコーポレイティド アメリカ合衆国、ニューヨーク 14650、ロチェスター、インディゴ クリーク ドライブ 100
(22) 出願日	平成23年4月14日 (2011.4.14)	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(62) 分割の表示	特願平11-282460の分割	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
原出願日	平成11年10月4日 (1999.10.4)	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(31) 優先権主張番号	60/102836	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(32) 優先日	平成10年10月2日 (1998.10.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 還元型コルチゾール接合体

(57) 【要約】

【課題】 コルチゾール接合体の新規な製造方法の提供。

【解決手段】 本発明は、コルチゾール接合体の製造方法であって、3 - コルチゾールカルボキシメチルオキシムのウシ血清アルブミン接合体 (3 - CMO - BSA) と水素化ホウ素ナトリウムとを反応させることを含んで成る方法に関する。

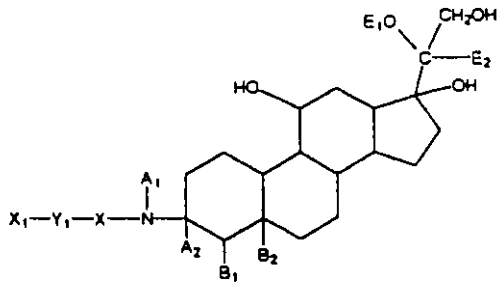
【選択図】 なし

水性組成物中の請求項 1 に記載の還元型コルチゾール接合体。

【請求項 6】

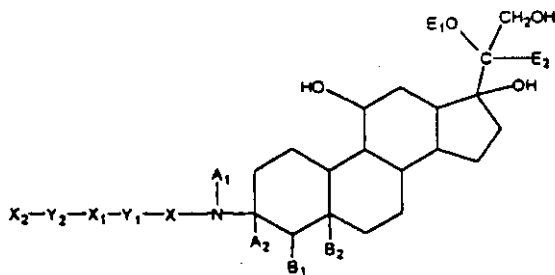
下式

【化 2】



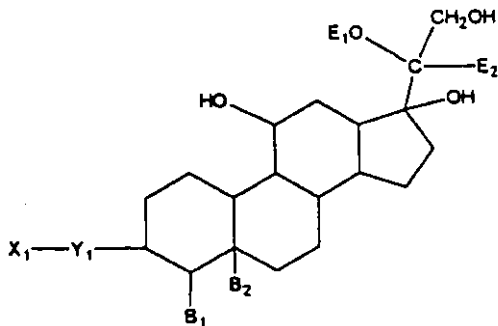
IA ,

10



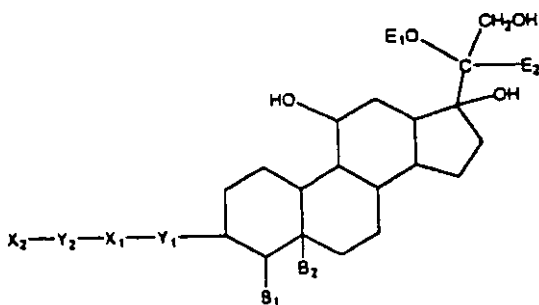
IB ,

20



IC または

30



ID

40

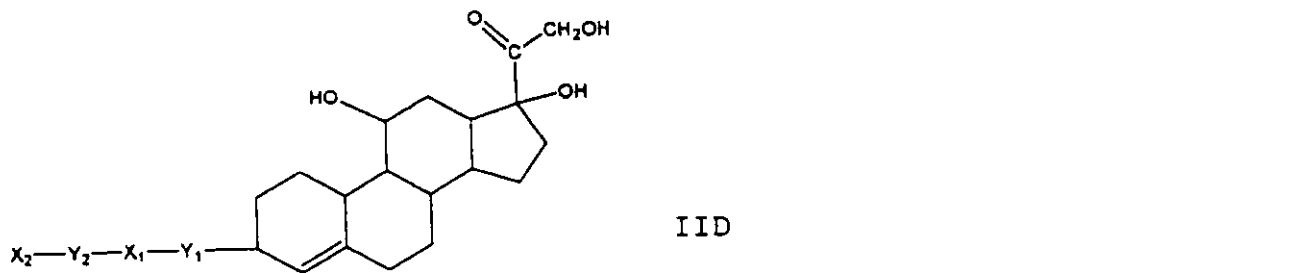
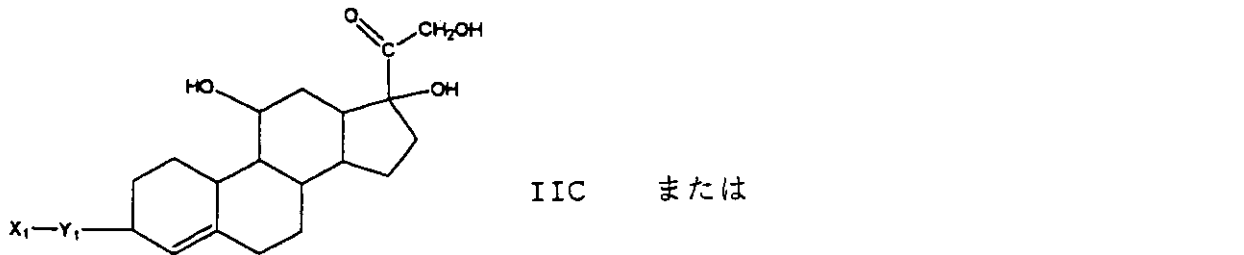
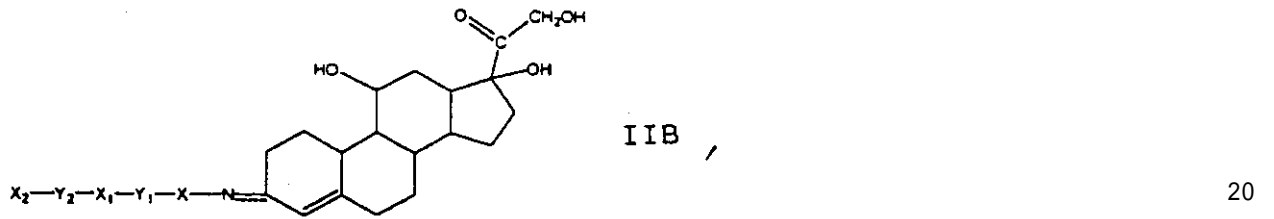
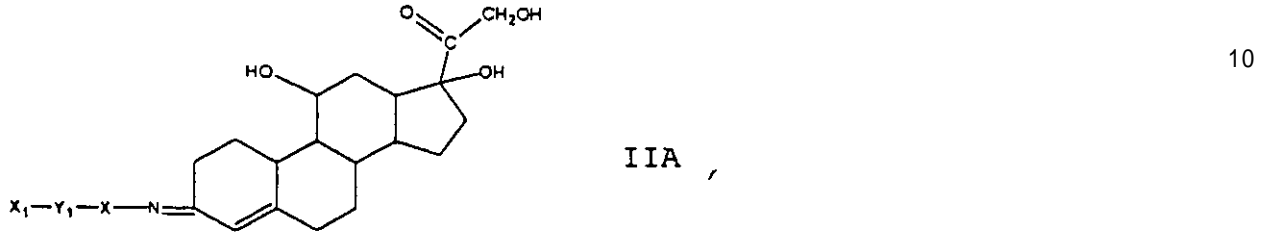
(上式中、XはO、S、スルホニルまたはホスホノであり；X1は標識されたもしくは未標識の天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識であり；Y1は連結基または結合であり；X2は標識されたもしくは未標識の天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識であり；Y2は連結基または結合であり；A1とA2は各々水素であるか、またはA1とA2が一緒になって単結合を形成し、B1とB2は各々水素である

50

か、または B 1 と B 2 が一緒になって単結合を形成し、E 1 と E 2 は各々水素であるか、または E 1 と E 2 が一緒になって単結合を形成し、ただし A 1 と A 2 、または B 1 と B 2 、または E 1 と E 2 の少なくとも 1 つが各々水素である) を有する還元型コルチゾール接合体の製造方法であって、

下式の化合物

【化 3】



を還元剤と反応させることを含んで成る方法。

【請求項 7】

前記還元剤が水素化ホウ素塩である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

X が O であり、X 1 がウシ血清アルブミンであり、そして Y 1 がメチレンカルボニルオキシである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

X 2 がペルオキシダーゼである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

10

20

30

40

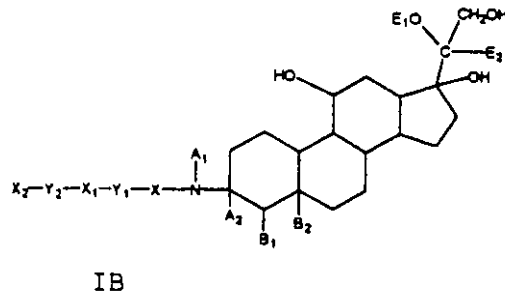
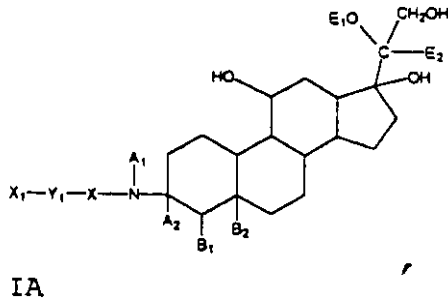
50

Y₂ が (4 - [2, 5 - ジオキソ - 3 - { (2 - エチルカルボニル) スルファニル } テトラヒドロ - 1H - 1 - ピロリル] メチル) - 1 - シクロヘキサンカルボニルであり、そして X₂ が西洋ワサビペルオキシダーゼである、請求項 9 に記載の方法。

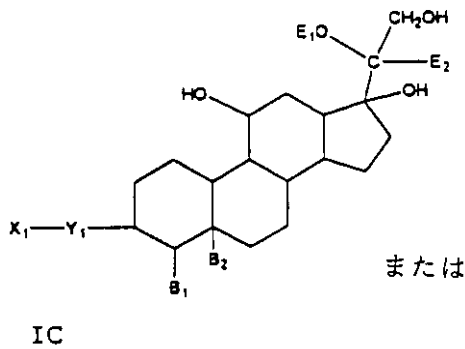
【請求項 11】

下式

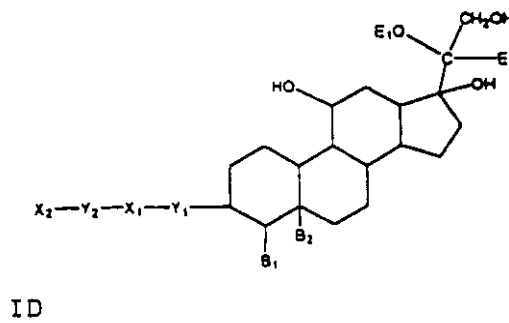
【化 4】



10



または



20

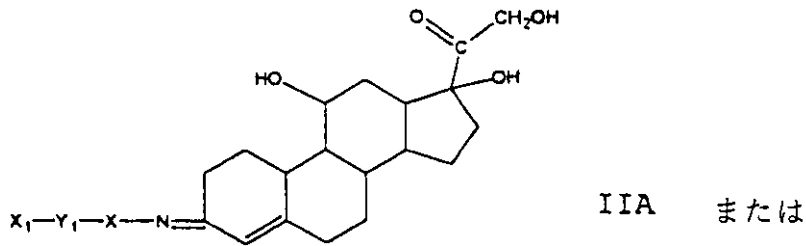
30

(上式中、XはO、S、スルホニルまたはホスホノであり；X₁ は標識されたもしくは未標識の天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識であり；Y₁ は連結基または結合であり；X₂ は標識されたもしくは未標識の天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識であり；Y₂ は連結基または結合であり；A₁ とA₂ は各々水素であるか、またはA₁ とA₂ が一緒になって単結合を形成し、B₁ とB₂ は各々水素であるか、またはB₁ とB₂ が一緒になって単結合を形成し、E₁ とE₂ は各々水素であるか、またはE₁ とE₂ が一緒になって単結合を形成し、ただしA₁ とA₂、またはB₁ とB₂、またはE₁ とE₂ の少なくとも1つが各々水素である)を有する還元型コルチゾール接合体の製造方法であって、

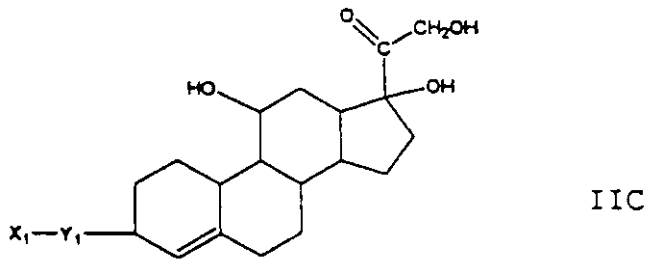
40

(i) 下式の化合物

【化5】



10

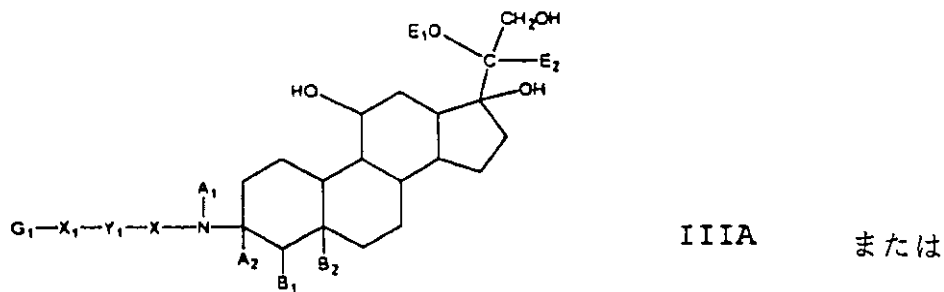


を還元剤と反応させ、それにより化合物 I A または I C を形成させ；そして

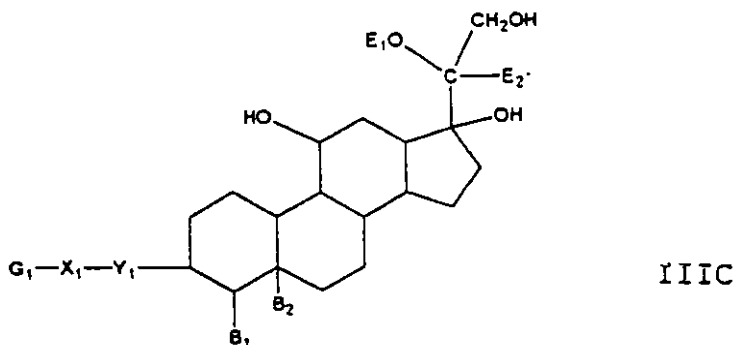
20

(ii) 場合により、化合物 I A または I C を第一のカップリング剤と反応させて、下式の化合物

【化6】



30



40

(上式中、G 1 はカップリング基である) を形成させ；

(iii) 場合により、X 2 を第二のカップリング剤と反応させて、X 2 - G 2 (ここで G 2 はカップリング基 G 1 と共に共有結合を形成することができるカップリング基であり、そして G 1 と G 2 は同じであってもよい) を形成させ；

(iv) 場合により、化合物 I A または I C を X 2 - G 2 (ここで G 2 は X 1 の官能基と共有結合することができる) と反応させて、還元型コルチゾール接合体 I B また

50

は I D を形成させ ;

(v) 場合により、化合物 IIIA または IIIC を X_2 (ここで G_1 は X_2 の官能基と共有結合することができる) と反応させて、還元型コルチゾール接合体 I B または I D を形成させ ;

(vi) 場合により、化合物 IIIA または IIIC を $X_2 - G_2$ と反応させて、還元型コルチゾール接合体 I B または I D を形成させるという各段階を含んでなる方法。

【請求項 1 2】

X が O であり、そして X_1 がウシ血清アルブミンである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

Y_1 がメチレンカルボニルオキシである、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

X_2 がペルオキシダーゼであり、第一のカップリング剤が 4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステルであり、そして第二のカップリング剤が S - アセチルチオ酢酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステルである、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

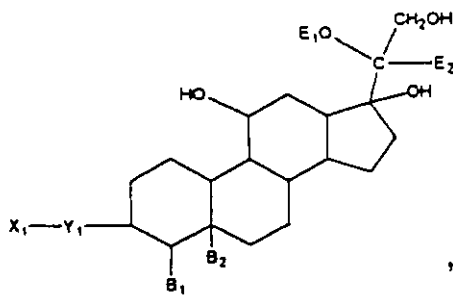
コルチゾールについての競合アッセイの実施方法であって、

A) コルチゾールを含む疑いのある試料を

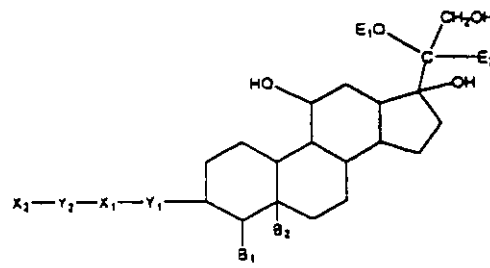
i) コルチゾールを結合する固定化されたまたは固定化可能なレセプターと接触させ、それにより固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合したコルチゾールと、固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しないコルチゾールとを形成させ、

ii) 下式

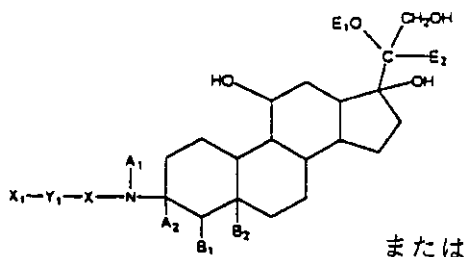
【化 7】



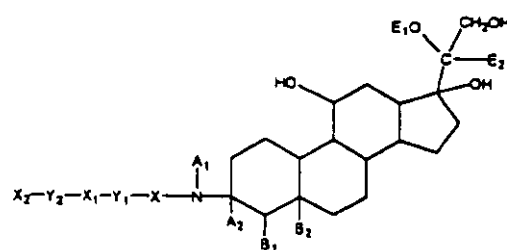
IA



IB



IC



ID

または

10

20

30

40

50

(上式中、XはO、S、スルホニルまたはホスホノであり；X₁は標識されたもしくは未標識の天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識であり；Y₁は連結基または結合であり；X₂は標識されたもしくは未標識の天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識であり；Y₂は連結基または結合であり；A₁とA₂は各々水素であるか、またはA₁とA₂が一緒になって単結合を形成し、B₁とB₂は各々水素であるか、またはB₁とB₂が一緒になって単結合を形成し、E₁とE₂は各々水素であるか、またはE₁とE₂が一緒になって単結合を形成し、ただしA₁とA₂、またはB₁とB₂、またはE₁とE₂の少なくとも1つが各々水素であり、そしてX₁とX₂の少なくとも1つが標識された天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識である)

10

を有する還元型コルチゾール接合体と接触させ、それにより固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合した標識還元型コルチゾール接合体と、固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しない標識還元型コルチゾール接合体とを形成させ；そして

B) 試料中のコルチゾールの量の指標として、前記固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合した標識還元型コルチゾール接合体か、前記固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しない標識還元型コルチゾール接合体のいずれかを検出するという各段階を含んで成る方法。

【請求項16】

XがOであり、そしてX₁がウシ血清アルブミンである、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

Y₁がメチレンカルボニルオキシであり、そしてX₂がペルオキシダーゼである、請求項16に記載の方法。

20

【請求項18】

X₁がペルオキシダーゼであり、Y₂が(4-[2,5-ジオキソ-3-{(2-エチルカルボニル)スルファニル}テトラヒドロ-1H-1-ピロリル]メチル)-1-シクロヘキサンカルボニルであり、そしてX₂が西洋ワサビペルオキシダーゼである、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しない標識還元型コルチゾール接合体から、前記固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合した標識還元型コルチゾール接合体を分離することを更に含んで成る、請求項15に記載の方法。

30

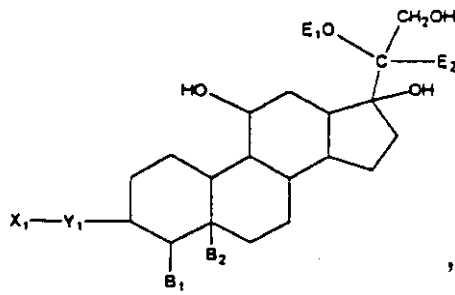
【請求項20】

コルチゾールについての競合結合アッセイの実施方法であって、該方法は

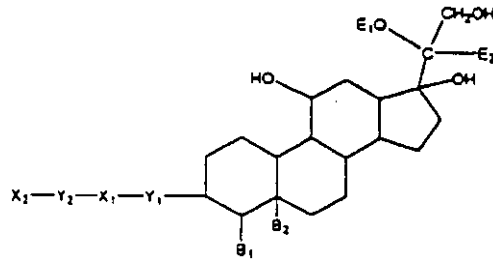
- a) 展開区画、
- b) 1または複数の試薬区画、
- c) 支持体、並びに

前記区画の1区画または複数区画において一緒にまたは別々に、コルチゾールを結合する固定化されたレセプター、および場合により下式

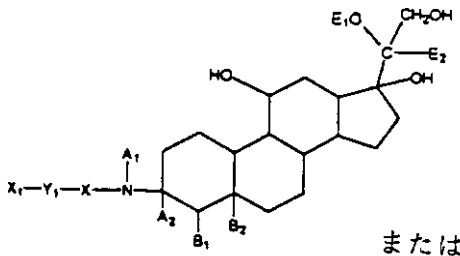
【化 8】



IA

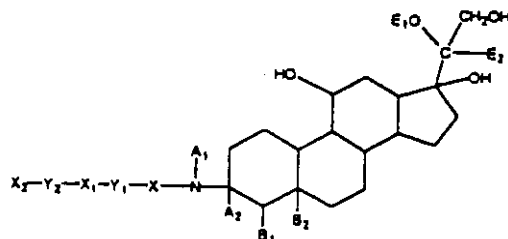


IB



IC

または



ID

(上式中、XはO、S、スルホニルまたはホスホノであり；X₁は標識されたもしくは未標識の天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識であり；Y₁は連結基または結合であり；X₂は標識されたもしくは未標識の天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識であり；Y₂は連結基または結合であり；A₁とA₂は各々水素であるか、またはA₁とA₂が一緒になって単結合を形成し、B₁とB₂は各々水素であるか、またはB₁とB₂が一緒になって単結合を形成し、E₁とE₂は各々水素であるか、またはE₁とE₂が一緒になって単結合を形成し、ただしA₁とA₂、またはB₁とB₂、またはE₁とE₂の少なくとも1組が各々水素であり、そしてX₁とX₂の少なくとも1つが標識された天然もしくは合成ポリマーであるか、または標識である)

を有する標識還元型コルチゾール接合体

を含んで成る乾式分析要素を使用し、

A) 前記乾式分析要素の展開区画を

i) コルチゾールを含む疑いのある試料と接触させ、それにより固定化されたレセプターに結合したコルチゾールと、固定化されたレセプターに結合しないコルチゾールとを形成させ、

ii) 前記標識還元型コルチゾール接合体が乾式分析要素中に存在しない場合には、その標識還元型コルチゾール接合体と接触させ、それにより前記固定化されたレセプターに結合した標識還元型コルチゾール接合体と、前記固定化されたレセプターに結合しない標識還元型コルチゾール接合体とを形成させ、

B) 試料中のコルチゾールの量の指標として、前記固定化されたレセプターに結合した標識還元型コルチゾール接合体か、前記固定化されたレセプターに結合しない標識還元型コルチゾール接合体のいずれかを検出する

10

20

30

40

50

という各段階を含んで成る方法。

【請求項 2 1】

X が O であり、そして X 1 がウシ血清アルブミンである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

Y 1 がメチレンカルボニルオキシである、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

X 1 がペルオキシダーゼであり、Y 2 が (4 - [2 , 5 - ジオキソ - 3 - { (2 - エチルカルボニル) スルファニル } テトラヒドロ - 1 H - 1 - ピロリル] メチル) - 1 - シクロヘキサンカルボニルであり、そして X 2 が西洋ワサビペルオキシダーゼである、請求項 2 2 に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

前記固定化されたレセプターに結合しない標識還元型コルチゾール接合体から、前記固定化されたレセプターに結合した標識還元型コルチゾール接合体を分離することを更に含んで成る、請求項 2 0 に記載の方法。

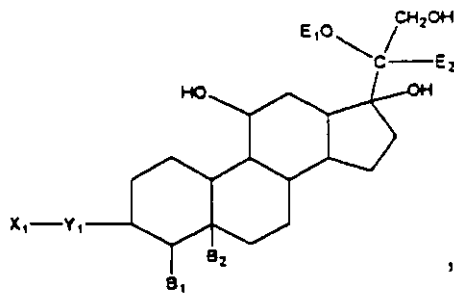
【請求項 2 5】

抗コルチゾール抗体の産生方法であって、

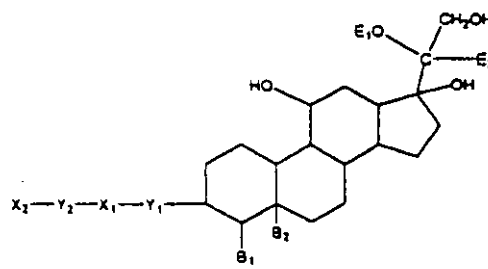
A) 下式

【化 9】

20

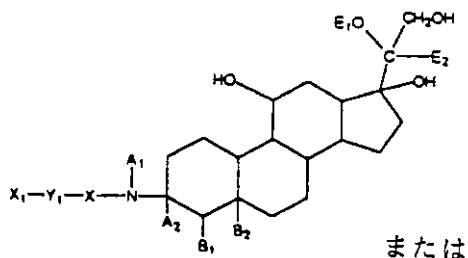


IA



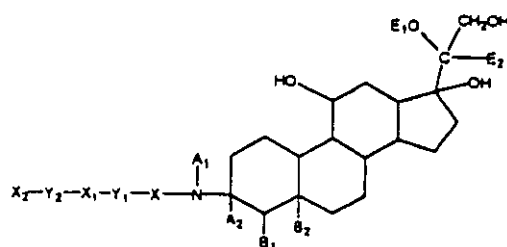
IB

30



IC

または



ID

40

(上式中、X は O、S、スルホニルまたはホスホノであり ; X 1 は標識されたもしくは未標識の天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識であり ; Y 1 は連結基または結合であり ; X 2 は標識されたもしくは未標識の天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識であり ; Y 2 は連結基または結合であり ; A 1 と A 2 は各々水素であるか、または A 1 と A 2 が一緒になって単結合を形成し、B 1 と B 2 は各々水素であるか、または B 1 と B 2 が一緒になって単結合を形成し、E 1 と E 2 は各々水素で

50

あるか、または E 1 と E 2 が一緒になって単結合を形成し、ただし A 1 と A 2 、または B 1 と B 2 、または E 1 と E 2 の少なくとも 1 つが各々水素である) を有する還元型コルチゾール接合体を用いて宿主動物を免疫し、それによりコルチゾールを結合する抗体を産生させ;

B) 前記宿主動物の血清または血漿からコルチゾールを結合する抗体を単離し; または

C) 抗体産生細胞を含有する脾臓、リンパ系組織または他の組織を取り出し;

D) 前記抗体産生細胞を取り出し;

E) 前記抗体産生細胞からハイブリドーマを作製し;

F) コルチゾールを結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択し; そして

G) コルチゾールを結合する抗体を単離する

という各段階を含んで成る方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗コルチゾール抗体に対する改善された特異性を有するハプテンおよび接合体標識、それらの製造方法、並びにコルチゾールの検出のためのイムノアッセイにおける使用方法に関する。より詳しくは、本発明は西洋ワサビペルオキシダーゼと還元型コルチゾールを含んで成る接合体に関する。

【背景技術】

【0002】

コルチゾールはヒトに存在する主要な糖質コルチコイドである。それは副腎皮質の束状体と網状体により合成されそして分泌される。それは炭水化物、タンパク質および脂質代謝の調節に参与している。ステロイドは血管虚脱を防ぎ、炎症を減らし、そして免疫系を抑制する働きをするので、手術後または他の大きな外傷後にはコルチゾールレベルが10倍上昇し得る。

【0003】

高アドレナリン症に関連する3つの主要な医学疾患がある: クッシング症候群、高アルドステロン症、および先天性副腎過形成。クッシング症候群は、循環中の糖質コルチコイド、特にコルチゾールの濃度の増加から生じるいずれかの状態を説明するのに用いられる用語である (Clinical Chemistry: Theory, Analysis and Correlation; Lawrence A. Kaplan, Amedeo J. Pesce, CV Mosby Company, 1989, 673-4頁)。

【0004】

コルチゾール関連状態の診断、治療および追跡には、ヒト血清、血漿または尿中のコルチゾールの検出および定量が必要である。

【0005】

コルチゾールについての競合結合イムノアッセイは、通常は固定化されたまたは固定化可能な支持体に結合された抗コルチゾール抗体、および標識コルチコールまたはコルチゾールの標識類似体 (誘導體) を含んで成る。標識コルチゾールに言及するときは常に、特に断らない限り、標識コルチゾールという用語はコルチゾールの標識類似体 (誘導體) を包含するものであると解釈すべきである。標識コルチゾールは、限定数の抗コルチゾール抗体結合部位を目当てにコルチゾールと競争する。コルチゾールの量の指標として、遊離のまたは結合した標識コルチゾールか誘導されるシグナルが測定される。

【0006】

コルチゾールについてのイムノアッセイの感度および特異性は標識コルチゾールに依存する。標識コルチゾールが、限定数の抗コルチゾール結合部位を目当てに、試料中に存在するかもしれないコルチゾールに構造的に類似したステロイドと効率的に競争することが重要である。そうでなければ、試料中のコルチゾールの量の臨床的に許容される測定は得られないだろう。

【0007】

酵素11 - ヒドロキシラーゼ欠損を有する個体、またはメチラポンを投与された個体は

10

20

30

40

50

、コルチゾールに構造的に類似しており、そして抗コルチゾール抗体への結合を目当てに標識コルチゾールと潜在的に競争することができる、11 - デオキシコルチゾールのレベルが大きく増加するだろう (Fundamentals of Clinical Chemistry, Tietz, N.W., W.B. Saunders Co., 1987, 569 頁)。抗コルチゾール抗体を目当てに標識コルチゾールと潜在的に競争することができる、試料中に存在することがある他のコルチゾール様ステロイドとしては、プレドニソロン、コルチゾンおよびコルチコステロイドが挙げられる。抗コルチゾール抗体を目当てにした標識コルチゾールとのそのような競争は、交差反応性と呼ばれる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0008】

市販のコルチゾールアッセイは、上述したステロイドの全てと交差反応を示し得る。例えば、10%より大きい11 - デオキシコルチゾールとの交差反応性が観察されており、これはコルチゾールについてのアッセイの正確度を大きく害する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

コルチゾールについての従来技術のアッセイに伴う課題は、本明細書に記載する接合体標識を使って解決される。

【0010】

本発明は、新規還元型コルチゾール接合体を含んで成る組成物、それらの製造方法およびコルチゾールについてのイムノアッセイにおけるそれらの使用方法に関する。

20

【0011】

別の面では、本発明は、抗コルチゾール抗体または抗還元型コルチゾール抗体を惹起させるための免疫原またはハプテンとしての還元型コルチゾールの接合体に関する。

【0012】

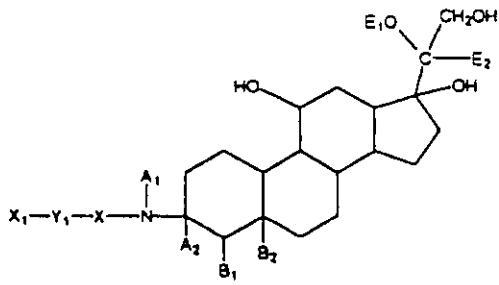
意外にも、本発明の標識還元型コルチゾール接合体が、抗コルチゾール抗体への結合を目当てにコルチゾール様ステロイドと効率的に競争し、それによって従来技術の標識コルチゾール接合体と比較して有意に低い交差反応性を示すことがわかった。本発明の標識還元型コルチゾール接合体を含んで成るコルチゾールについてのイムノアッセイは、コルチゾールの測定のための改善された特異性と感受性の両方を示す。

30

【0013】

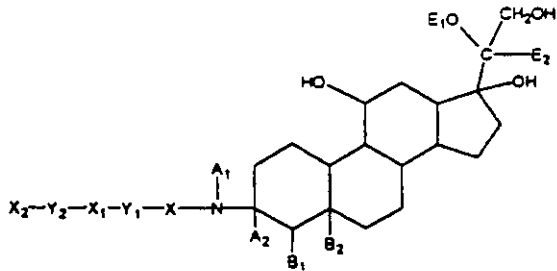
従って、本発明は、下式

【化 1】



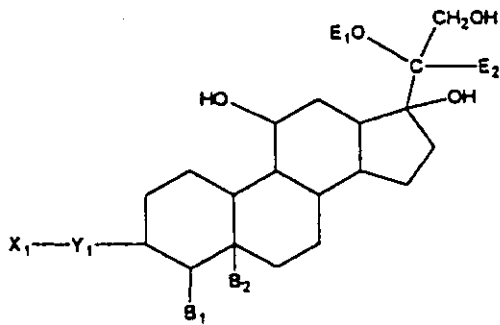
IA ,

10



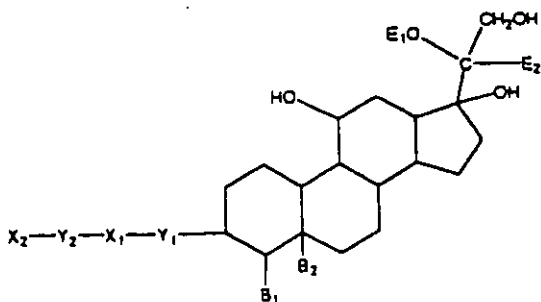
IB ,

20



IC または

30



ID

40

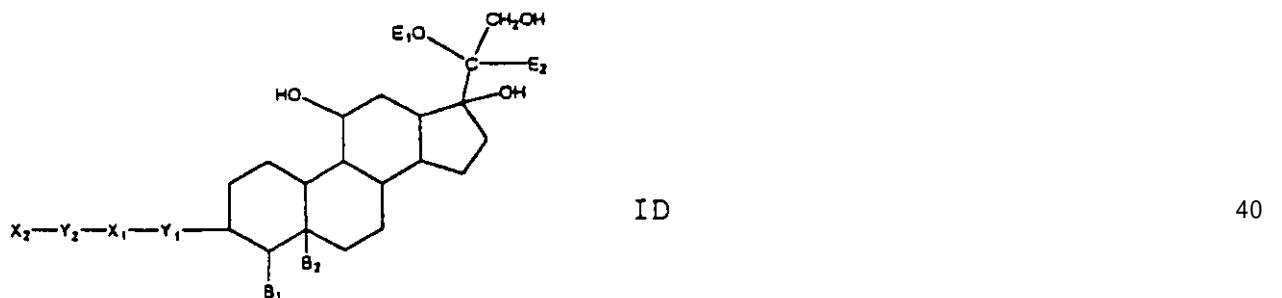
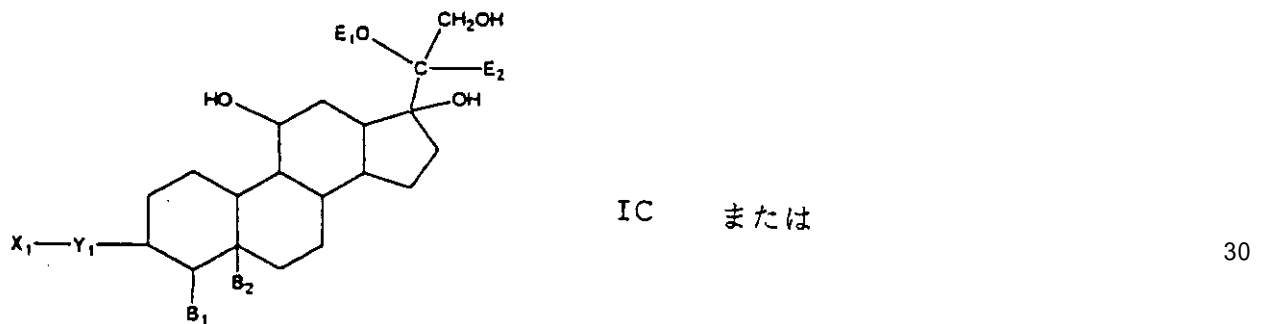
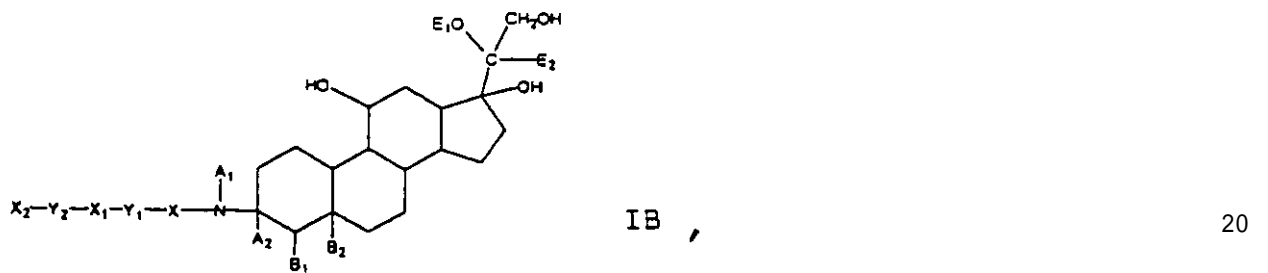
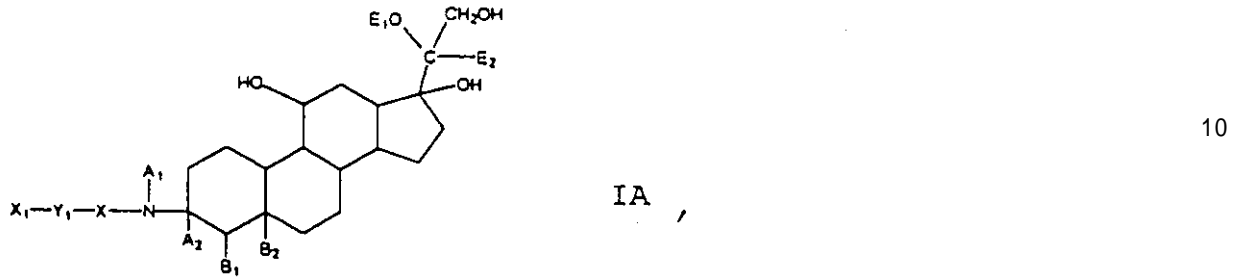
(上式中、XはO、S、スルホニルまたはホスホノであり；X1は標識されたもしくは未標識の天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識であり；Y1は連結基または結合であり；X2は標識されたもしくは未標識の天然もしくは合成ポリマーであるかまたは標識であり；Y2は連結基または結合であり；A1とA2は各々水素であるか、またはA1とA2が一緒になって単結合を形成し、B1とB2は各々水素であるか、またはB1とB2が一緒になって単結合を形成し、E1とE2は各々水素であるか、またはE1とE2が一緒になって単結合を形成し、ただしA1とA2、またはB1とB2、またはE1とE2の少なくとも1つが各々水素である)を有する還元型コルチゾール接合体を提供する。

50

【 0 0 1 4 】

別の面では、本発明は還元型コルチゾール接合体の製造方法にも関する。従って、本発明者らは、下式

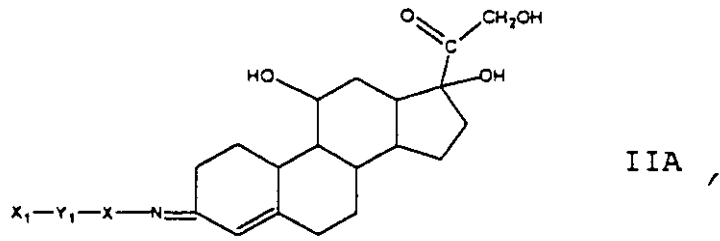
【化2】



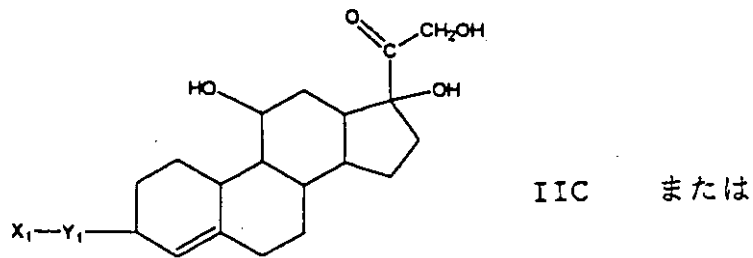
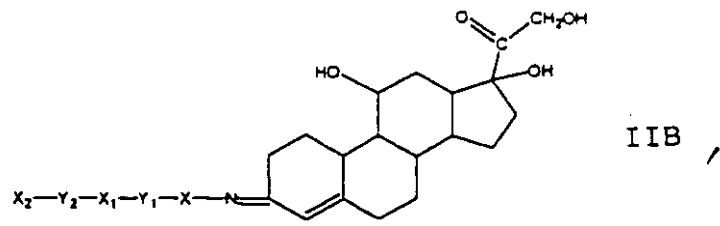
(上式中、X, X1, Y1, X2, Y2, A1, A2, B1, B2, E1 および E2 は前に定義した通りである)

を有する還元型コルチゾール接合体の製造方法であって、
下式の化合物

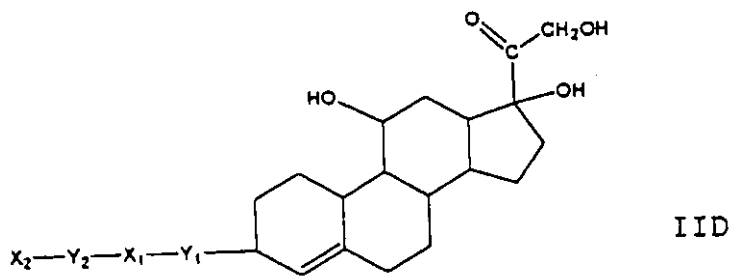
【化3】



10



20



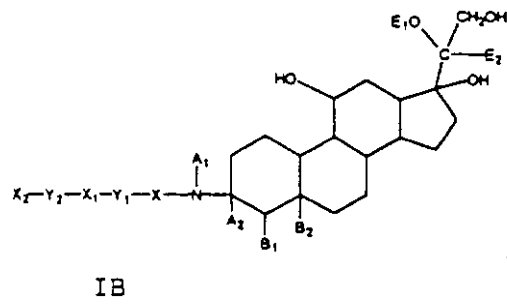
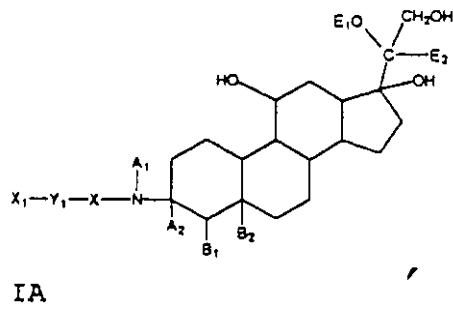
30

を還元剤と反応させることを含んで成る方法を提供する。

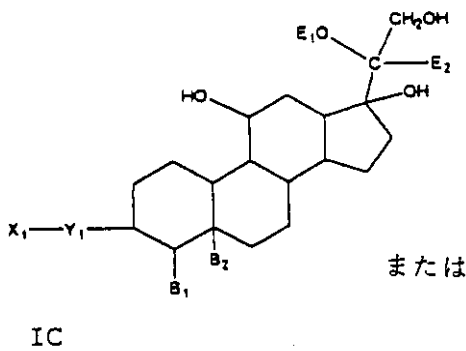
【0015】

本発明者らは、下式

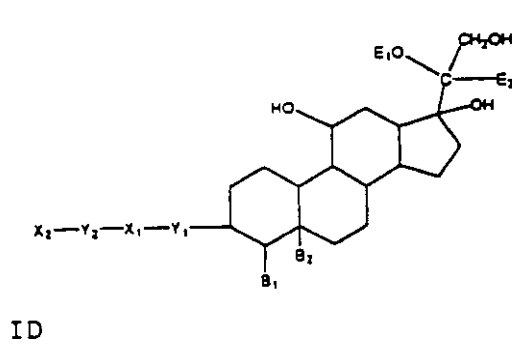
【化 4】



10



または



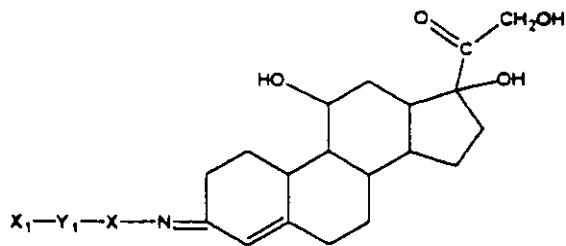
20

(上式中、X, X₁, Y₁, X₂, Y₂, A₁, A₂, B₁, B₂, E₁ および E₂ は前に定義した通りである) を有する還元型コルチゾール接合体の別の製造方法であって、

(i) 下式の化合物

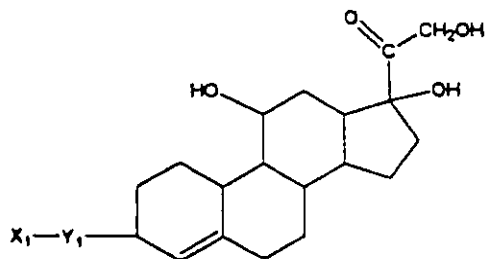
30

【化 5】



または

40

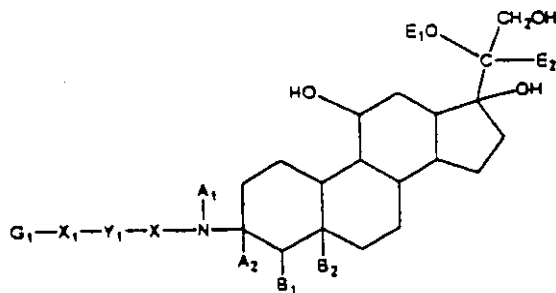


を還元剤と反応させ、それにより化合物 I A または I C を形成させ；そして

50

(ii) 場合により、化合物 I A または I C を第一のカップリング剤と反応させて、下式の化合物

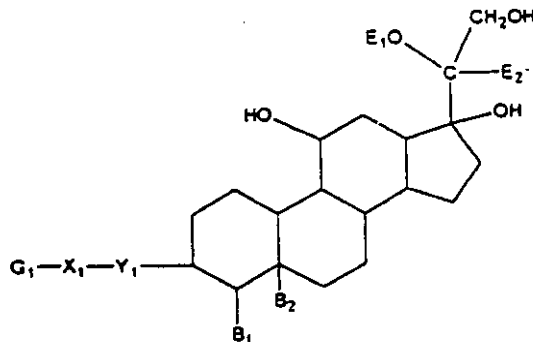
【化 6】



IIIA

または

10



IIIC

20

(上式中、G 1 はカップリング基である)を形成させ;

(iii) 場合により、X 2 を第二のカップリング剤と反応させて、X 2 - G 2 (ここで G 2 はカップリング基 G 1 と共に共有結合を形成することができるカップリング基であり、そして G 1 と G 2 は同じであってもよい)を形成させ;

(iv) 場合により、化合物 I A または I C を X 2 - G 2 (ここで G 2 は X 1 の官能基と共有結合することができる)と反応させて、還元型コルチゾール接合体 I B または I D を形成させ;

30

(v) 場合により、化合物 IIIA または IIIC を X 2 (ここで G 2 は X 2 の官能基と共有結合することができる)と反応させて、還元型コルチゾール接合体 I B または I D を形成させ;

(vi) 場合により、化合物 IIIA または IIIC を X 2 - G 2 と反応させて、還元型コルチゾール接合体 I B または I D を形成させることを含んでなる方法も提供する。

【0016】

別の面では、本発明は、新規標識還元型コルチゾール接合体を使用するコルチゾールの定性または定量測定方法に関する。

40

【0017】

従って、コルチゾールについての競合アッセイの実施方法であって、

A) コルチゾールを含む疑いのある試料を

i) コルチゾールを結合する固定化されたまたは固定化可能なレセプターと接触させ、それにより固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合したコルチゾールと、固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しないコルチゾールとを形成させ、

ii) 前に定義した式 I A, I B, I C または I D の標識還元型コルチゾール接合体と接触させ、それにより固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合した標識還元型コルチゾール接合体と、固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しない標識還

50

元型コルチゾール接合体とを形成させ；

B) 試料中のコルチゾールの量の指標として、前記固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合した標識還元型コルチゾール接合体か、前記固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しない標識還元型コルチゾール接合体のいずれかを検出するという各段階を含んで成る方法を提供する。

【0018】

別の態様では、上述したアッセイ方法に、固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しない標識還元型コルチゾール接合体から、固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合した標識還元型コルチゾール接合体を分離するという段階を組み合わせることができる。

10

【0019】

更に、コルチゾールについての競合結合アッセイの別の実施方法であって、該方法は

- a) 展開区画、
- b) 1または複数の試薬区画、
- c) 支持体、並びに

前記区画の1区画または複数区画において一緒にまたは別々に、コルチゾールを結合する固定化されたレセプター、および場合により前に定義した式IA, IB, ICまたはIDの標識還元型コルチゾール接合体を含んで成る乾式分析要素を使用し、

- A) 前記乾式分析要素の展開区画を

20

i) コルチゾールを含む疑いのある試料と接触させ、それにより固定化されたレセプターに結合したコルチゾールと、固定化されたレセプターに結合しないコルチゾールとを形成させ、

ii) 前記標識還元型コルチゾール接合体が乾式分析要素中に存在しない場合には、その標識還元型コルチゾール接合体と接触させ、それにより前記固定化されたレセプターに結合した標識還元型コルチゾール接合体と、前記固定化されたレセプターに結合しない標識還元型コルチゾール接合体とを形成させ；

B) 場合により、前記固定化されたレセプターに結合しない標識還元型コルチゾール接合体から前記固定化されたレセプターに結合した標識還元型コルチゾール接合体を分離し；そして

30

C) 試料中のコルチゾールの量の指標として、前記固定化されたレセプターに結合した標識還元型コルチゾール接合体か、前記固定化されたレセプターに結合しない標識還元型コルチゾール接合体のいずれかを検出するという各段階を含んで成る方法も提供する。

【0020】

別の面では、本発明は前に定義した式IA, IB, ICまたはIDのハプテンまたは免疫原およびそのような免疫原を含んで成る組成物に関する。本発明はまた、抗コルチゾール抗体の産生方法であって、本発明の免疫原を使用して宿主動物を免疫し、前記宿主動物から血液を採取し、そして前記宿主動物の血清または血漿からコルチゾールを結合する抗体を分離することを含んで成る方法にも関する。別の関連した方法では、免疫した宿主動物から抗体産生細胞が存在する脾臓、胸腺または他の組織を除去し、除去された前記脾臓、胸腺または他の組織の抗体産生細胞を使って抗体を分泌するハイブリドーマを作製し、そしてコルチゾールを結合する抗体を選択する。

40

【0021】

別の態様では、本発明は、コルチゾールについてのイムノアッセイにおける交差反応性を減少させる方法であって、式IA, IB, ICまたはIDの標識還元型コルチゾール接合体を使用することを含んで成る方法にも関する。

【0022】

上述した本発明の標識還元型コルチゾール接合体は、抗コルチゾール抗体への結合を目標にコルチゾール様ステロイドと効率的に競争し、それによって従来技術の標識コルチ

50

ゾール接合体と比較して有意に少ない交差反応性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

ウシ血清アルブミンと西洋ワサビペルオキシダーゼを含んで成る特定の還元型コルチゾール接合体に関して本発明を詳細に説明する。これは、本発明を例示するために行うのであって、決してこの特定例に本発明を限定するつもりではない。別の還元型コルチゾール接合体、それらの合成、および免疫原としての使用または競合もしくは非競合イムノアッセイにおける還元コルチゾール標識としての使用、並びに本明細書中に与えられる教示から明らかであるかまたは当業者に既知である他の面も包含される。

【0024】

本発明の目的上、「天然ポリマー」は、下記のものを含むがそれに限定されない生物学的起源より得られるものとして定義される：微生物、真菌、ウイルス、ヒト、ウシ、ブタ、マウス、ネコ、イヌ、ラットまたは昆虫。そのような天然ポリマーとしては、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、リポタンパク質、並びにそれらの組換え種および化学的に修飾された種、多糖類、セルロース、コラーゲン、並びにラテックスが挙げられる。幾分具体的な例としては、デキストラン、ブタ、ヒト、マウス、ラットおよびウシ血清アルブミンまたはグロブリン、ストレプトアビジン、抗体、酵素、例えばペルオキシダーゼ、
-ガラクトシダーゼおよびアルカリ性ホスファターゼが挙げられる。

【0025】

「合成ポリマー」は、本明細書中では必ずしも生物学的起源より直接得られないポリマーとして定義される。それは当業者に周知である方法により調製されるものである。例えば、乳化重合、イオン重合、カルボニル重合、ラジカル重合などを使ったモノマー縮合によって調製される。合成ポリマーとしては、ホモポリマー、例えばポリアクリルアミド、ポリスチレン、置換ポリアクリルアミド、ポリメタクリレートおよびポリスチレン、並びに2以上の異なるモノマー単位を含んで成るコポリマー、例えばアクリルアミドまたは置換アクリルアミド、スチレンおよび置換スチレンなどが挙げられ、それらは当業者に周知であろう。それはブロックコポリマー、グラフトコポリマー、水性可溶性および水性不溶性ポリマー、並びに天然ポリマーとの共有結合および非共有結合体も包含する。

【0026】

本明細書中で定義される用語「標識」としては、例えば吸収、蛍光もしくは反射分光光度法、または放射線検出法を使って、直接または間接的に検出することができる化学要素、化合物および酵素が挙げられる。標識は天然または合成ポリマーであってもよい。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼは標識と天然ポリマーの両方である。しかし標識は必ずしも天然または合成ポリマーでなくてもよい。

【0027】

直接検出できる標識は、本質的に検出可能なシグナルを生成することができるものである。そのような標識としては、蛍光またはリン光を生成できる有機および無機物質、例えば非限定的にフルオレセインおよびその誘導体、並びにN-(3-フルオロアントリル)マレイミド、放射性核種、例えば炭素14、トリチウムおよびリン32などが挙げられる。適当なスペクトル吸収を有する物質、例えば非限定的にアゾ-オキソ、アゾ-テトラゾ、アジン、オキサジン、チアジン、キノリン、インダミン、ピロンおよびピラゾロン色素も含まれる。

【0028】

間接検出できる標識は、検出可能なシグナルの生成のために1または複数の追加の物質の存在を必要とする。そのような標識としては、典型的には、1または複数の基質、補因子、金属などの存在を必要とする酵素が挙げられるが、それらに限定されない。ペルオキシダーゼ、特に一般的な標識である西洋ワサビペルオキシダーゼは、化学発光生成物または色素を生成するのに、それぞれ電子供与体と酸化剤、例えばルミノール、ジ-もしくはトリアリールイミダゾールロイコ色素および過酸化水素を必要とする。他の酵素、例えば
-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼなども含

10

20

30

40

50

まれる。

【0029】

一般に、標識としては放射性標識、酵素、発色団、蛍光団、安定な遊離基、並びに酵素補因子、阻害剤およびアロステリックエフェクターが挙げられる。

【0030】

本発明の目的上、「還元剤」は、二重結合、例えば炭素-炭素、炭素-窒素、炭素-酸素および炭素-硫黄二重結合を水素化することができる任意の化合物または試薬混合物である。

【0031】

有用な還元剤としては、非限定的に、水素化アルミニウム、水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素、およびそれらの塩が挙げられる。パラジウム、白金もしくはニッケル上での接触水添、または他の水素化法を使用することもできる。水素化ホウ素ナトリウムが好ましい還元剤である。

10

【0032】

「連結基」は、本明細書中では、1または複数の原子を含んで成る化学基として定義される。連結基は、各分子との共有結合を通して、例えば天然ポリマーを天然ポリマーに、合成ポリマーを合成ポリマーに、天然ポリマーを合成ポリマーに、標識を天然または合成ポリマーに、標識を還元型コルチゾールに、標識をコルチゾールになどというように或る分子を別の分子に結合する。

【0033】

連結基は、置換されたまたは未置換の直鎖また分枝鎖アルキルまたはヘテロアルキル、例えばオキシアルキル、チオアルキル、アミノアルキル、置換されたもしくは未置換のアルケニル、単置換もしくは多置換されたまたは未置換の炭化水素複素環、単置換もしくは多置換されたまたは未置換のアリールまたはヘテロアリール環、例えば非限定的に、イミダゾリル、イソオキサゾリル、ピリジル、ペペリジル、ペペラジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、オキサジアゾリル、ピリダジル、ピリミジル、ピラジニル、キノリニルおよびキナゾリニルが挙げられる。

20

【0034】

別の巨大分子への天然および合成ポリマーのような巨大分子の連結もしくはカップリング、または巨大分子へのコルチゾールまたはコルチゾールの類似体のような小分子の連結は当該技術分野で周知である。コルチゾールに特に関連して、炭素3(C3)は求核試薬、例えばアミン、オキシムおよびチオオキシム並びに当該技術分野で既知の他のものと反応性である。求核性種は、カップリング(結合)剤、標識、天然または合成ポリマーであることができる。コルチゾールのC3に共有結合する際に、それがカップリング剤または反応性官能基を有する他の種(例えば標識)である場合、それは別のカップリング剤または適当な反応性官能基を有する他の種と更に反応させることができる。そのように誘導体化されたコルチゾールは、本発明の還元型コルチゾール化合物を調製するための出発点として使用することができる。カップリング化学および連結基の詳細は、多数の刊行物中に見つけることができ、例えば、米国特許第3,654,090号;同第3,791,932号;同第3,875,011号;同第4,016,043号;同第4,040,907号;同第4,092,479号;同第4,213,894号;同第4,243,749号;同第4,376,165号;同第4,410,643号;同第4,752,658号;同第4,828,978号;同第4,879,249号;同第4,997,772号;同第5,053,497号;同第5,106,732号;同第5,147,777号;同第5,155,166号;同第5,162,219号;同第5,177,023号;同第5,284,948号;同第5,298,403号;同第5,308,749号;同第5,374,516号;同第5,391,483号;同第5,397,695号;同第5,401,633号;同第5,527,709号;同第5,543,311号;同第5,578,457号;同第5,652,346号;同第5,763,588号;同第5,770,390号明細書およびその中に引用された参考文献;Yoshitake 他, Eur. J. Biochem., 101, 395 (1979) および Tjssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 221-278頁(1985) およびその中に引用された参考文献中に見つけることができる。

30

40

【0035】

50

簡単に言えば、連結基およびそれに共有結合される分子は、アミド、エステル、エーテル、チオエステルおよびジスルフィド結合を会して連結され得る。例えば分子を縮合剤（例えばカルボジイミド、マレイミド、エチルクロロホルメートおよびグルタルアルデヒド）とカップリングさせるために分子を反応させることを含むカップリングおよび連結化学は、当該技術分野で周知である。

【0036】

「試料」なる語は、着目の分析物を含むことがある任意の物質を言う。試料は生物学的液体、例えば脳脊髄液、精液、腔分泌物、痰、腹水、涙液、汗、血清、血漿、尿、全血、赤血球、白血球および血小板などの全血成分、並びに着目の分析物を含む場合がある他の体液または体組織であることができる。場合により、試料は水、土壌および植物から得られる。

10

【0037】

自然の免疫反応を利用するイムノアッセイは、臨床化学における分析手段として広範囲な用途が見出されている。反応の特異性のために、イムノアッセイは生物学的液体中にごく低濃度で存在する生物学的分析物を定量する場合に特に有利である。そのような分析物としては、例えば、抗体、治療薬、麻酔薬、酵素、ホルモン、タンパク質などが挙げられる。

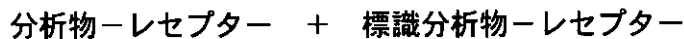
【0038】

競合結合イムノアッセイでは、標識分析物（この用語は免疫応答能のある分析物の類似体も包含する）が、一定量の適当なレセプター（これはしばしば固体支持体上に固定化されているか、またはそれに固定化することができる）との反応を目当てに未標識の分析物と競争状態に置かれる。レセプターに結合した標識分析物を遊離の標識分析物から分離する。分析物の未知濃度は、結合した標識分析物かまたは遊離の標識分析物のいずれかの測定シグナルから求めることができる。反応は次のように進行する：

20

【0039】

【化7】



30

【0040】

イムノアッセイは溶液中で、可溶性成分と不溶性成分を分離できる試験装置中で、または乾式分析要素中で実施することができる。イムノアッセイは不均一または均一アッセイであることができ、これらの用語は当該技術分野で既知である。不均一アッセイでは、シグナル測定の前に、結合した標識免疫反応体と遊離の標識免疫反応体（標識分析物または分析物に対する標識レセプター）が分離され；一方、均一アッセイでは、結合した標識免疫反応体から遊離の標識免疫反応体を分離する必要がない。本発明の還元型コルチゾール接合体は、均一アッセイと不均一アッセイの両方に使用できる。

40

【0041】

連結基およびカップリング化学に関する多数の上記刊行物も包含する、イムノアッセイおよびイムノアッセイ法に関する多数の刊行物が入手可能である。追加の刊行物としては次のものが挙げられる：米国特許第4,372,745号；同第4,670,381号；同第4,483,921号；同第4,517,288号；同第4,822,747号；同第4,824,778号；同第4,829,012号；同第4,839,299号；同第4,847,194号；同第4,847,195号；同第4,853,335号；同第4,855,226号；同第4,857,453号；同第4,857,454号；同第4,859,610号；同第4,863,876号；同第4,868,106号；同第4,868,130号；同第4,879,219号；同第5,663,054号；同第5,776,973号明細書およびその中に引用された参考文献；並びに Immunoassays in the Clinical

50

Laboratory, Nakamura他編, Alan R. Liss, Inc., (1979) ; Quantitative Enzyme Immunoassay, Engvall 他編, Blackwell Scientific Publications (1978) ; Clinical Chemistry, Sommer 他, Vol.32, 1770-1774 頁 (1986) ; Clinical Chemistry, Sommer他, 201-206 頁 (1990) ; A Primer for Multilayer Immunoassay, Berke, American Chemical Society Conference Proceeding, 303-312 頁, Plenum Press (1988) ; およびその中に引用された参考文献。

【 0 0 4 2 】

競合イムノアッセイでは、標識分析物と遊離の分析物を含む試料とを同時にまたは別々に、該分析物を結合する固定化されたまたは固定化可能なレセプターを含む混合物に添加することができる。

10

【 0 0 4 3 】

乾式分析要素の場合、標識分析物と固定化されたレセプターは、試料との接触前に要素中に一緒に存在する場合、好ましくは別々の区画に存在する。

【 0 0 4 4 】

乾式薄膜分析要素を組み立てるための常用の材料および手段は、例えば、米国特許第3,867,258号；同第3,992,158号；同第4,042,435号；同第4,050,898号；同第4,066,403号；同第4,153,668号；同第4,258,001号；同第4,292,272号および同第4,430,436号明細書に記載されている。

【 0 0 4 5 】

適当な宿主動物を免疫することにより特定の分子を結合する抗体を獲得する方法は周知である。そのような方法は十分に確立されており、そして例えば、次の刊行物に記載されている： Methods in Immunology, Garvey, J.S., Cremer, N.E. & Susssdorf, D.H., W.A. Benjamin, Inc., 第3版 (1977) および Handbook of Experimental Immunology, Weir, D.M.編, Blackwell Scientific Publications, 第3版 (1978) 。

20

【 0 0 4 6 】

抗体の分泌のためのハイブリドーマ細胞系の作製方法も周知であり、例えば、米国特許第4,950,592号；同第5,338,671号および同第5,650,324号明細書に記載されている。

【 0 0 4 7 】

HRP 標識還元型コルチゾール - 3 - CMO - BSA の調製

下記に西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識還元型コルチゾール接合体の調製方法を与える。この方法では、水素化ホウ素ナトリウムでのウシ血清アルブミン - コルチゾールオキシム接合体 (コルチゾール - 3 - CMO - BSA) の還元を、HRPとの接合前に実施した。しかしながら、コルチゾールの還元はHRPとのカップリングの後に実施することができる。

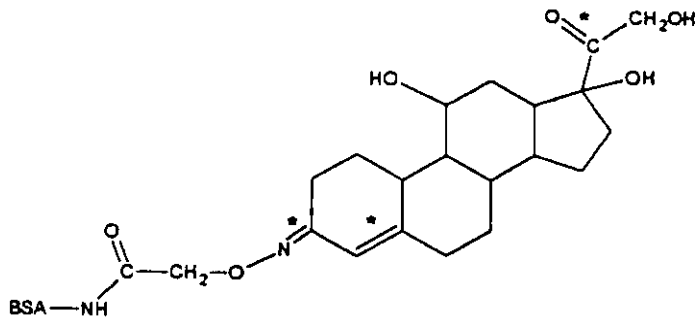
30

【 0 0 4 8 】

コルチゾール - 3 - CMO - BSA の還元部位は3箇所あり、それらは下記に示す構造中に星印により記してある。

【 0 0 4 9 】

【化 8】



10

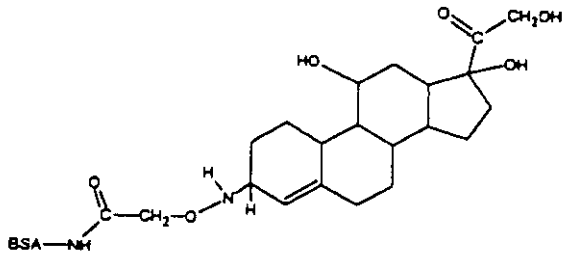
【 0 0 5 0 】

これらの部位のいずれかまたは全部を、二重結合を水素化することができる還元剤または還元性混合物での処理により還元すると、当業者には容易に明らかなように、下記に示す構造のように1部位だけが還元された生成物：

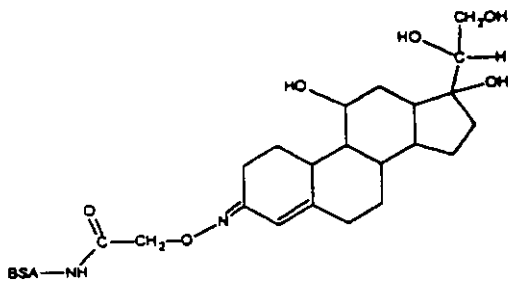
【 0 0 5 1 】

20

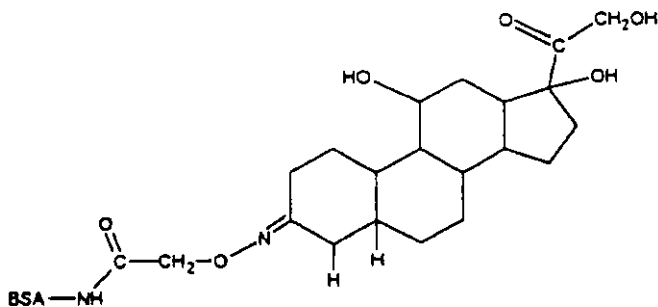
【化 9】



10



20



30

【 0 0 5 2 】

並びに、それらの部位のいずれか 2 部位が還元された化合物（3つの異なる還元種を与える）、および 3 部位全部が還元された化合物を与えることができる。コルチゾールを含んで成る他の接合体は、還元すると構造 I A , I B および I D に包括的に示される化合物を生じるが、コルチゾール - 3 - C M O - B S A について前に例示したような還元型コルチゾール種とは異なる還元種を生成するだろう。水素化できないコルチゾールの C 3 に共有結合を有する化合物は、コルチゾールの環炭素 - 炭素二重結合および / または炭素 - 酸素二重結合（カルボニル基）のところだけで還元されるだろう。全ての還元形態が個々にまたは任意の組合せで本発明に含まれる。

40

【実施例】

【 0 0 5 3 】

実施例 1 :

ウシ血清アルブミンに結合した 3 - コルチゾールカルボキシメチルオキシムの調製 (3 - C M O - B S A)

50

ヒドロコルチゾン - 3 - (O - カルボキシメチル) オキシム :

ウシ血清アルブミン (コルチゾール - 3 - C M O - B S A) を下記に記載の通り調製した。あるいは、それは Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri より購入することができる。20 mg の N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) を 3.0 mL のジオキサランに溶かすことにより、N H S の原液を調製した。30 mg のジシクロヘキシルカルボジイミド (D C C) を 2.50 mL のジオキサランに溶かすことにより D C C の原液を調製した。40 mg のコルチゾール - 3 - カルボキシメチルオキシム (コルチゾール - 3 - C M O) の入ったガラス製バイアルに、1.744 mL の N H S 原液と 1.744 mL の D C C 原液を添加した。混合物を攪拌しそして周囲温度で 3 時間インキュベートした。1.00 g のウシ血清アルブミン (B S A) に 12 mL の 0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液を添加した。この溶液を透明になるまで混合し、そして 3 時間インキュベーションの終わりに、この B S A 溶液に 3.0 mL の活性化コルチゾール - 3 - C M O を添加した。混合物を攪拌し、周囲温度で 2 時間インキュベートした。2 時間のインキュベーション後、0.1 M リン酸ナトリウム + 0.3 M 塩化ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 15 mL を添加した。5.0 μ m と 0.45 μ m の Sartorius Minisarts を通して混合物を濾過し、次いで 8.0 mL / 分の流速で 5 x 70 cm の Superdex 200PG カラム上でのクロマトグラフィーにかけた。主ピークに相当する最初の試験管と、その後の 10 画分 (1 分間ずつ) を収集し、そしてプールした。プールした画分を水に対して約 15 時間透析した。透析を繰り返した。透析物を 0.2 μ m Sartorius Minsart を通して濾過し、次いで少量のアリコート凍結乾燥し、必要になるまで凍結保存した。

10

【 0 0 5 4 】

20

実施例 2 :

コルチゾール - 3 - C M O - B S A の還元および活性化

コルチゾール - 3 - C M O - B S A (24 mg) を 50 mM 炭酸ナトリウムと 100 mM 塩化ナトリウムの溶液 (pH 9.5) 4 mL 中に溶かした。水素化ホウ素ナトリウムの水溶液 (4 mg/mL) の 0.60 mL アリコートをコルチゾール - 3 - C M O - B S A 溶液に添加し、次いで 20 で 30 分間連続攪拌した。次いで約 200 μ L の 0.5 M リン酸ナトリウム溶液を使って、pH 7.2 ~ 7.5 の範囲内の値に pH を調整して過剰な水素化ホウ素を分解した。発泡が静まるまで溶液を穏やかに混合し、約 15 分間放置しておいた。次いで反応混合物を 0.45 μ m フィルターを通して濾過し、そして 0.02 M リン酸塩 (pH 7.0) で予め平衡化しておいた Sephadex G25 1.6 x 14.5 cm カラム上で約 40 mL / 時間の流速でクロマトグラフィーを行った。集めた画分サイズは約 0.67 mL (1 分間) であった。最も濃縮された 15 画分、即ち、280 nm で大きな吸収を有する画分をプールした。

30

【 0 0 5 5 】

スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサノール - 1 - カルボキシレート (S M C C) を 9.6 mg / mL の最終濃度になるように N , N - ジメチルホルムアミド (D M F) 中に溶かした。上記のクロマトグラフィー段階より収集した還元型コルチゾール - 3 - C M O - B S A 10 mL に、S M C C 溶液 186 μ L を添加した。この溶液を穏やかに混合し、次いで 20 で 1 時間インキュベートした。800 μ L のグリシン水溶液 (10% , 重量 / 容量) を使って反応をクエンチングした。クエンチングした反応混合物を、0.1 M リン酸塩 + 5 mM エチレンジアミン四酢酸 (E D T A) の溶液 (pH 6.0) で予め平衡化しておいた Sephadex G25 を充填した 3.2 x 10 cm カラム上で約 161 mL / 時間の流速でクロマトグラフィーを行った。1 mL 画分を集めた。最も濃縮された 8 画分 (280 nm で大きな吸収を有する) をプールし、そして活性化 H R P への接合に使用した。

40

【 0 0 5 6 】

実施例 3 :

H R P の活性化

西洋ワサビペルオキシダーゼを 10 mg/mL の最終 H R P 濃度になるように 0.1 M リン酸塩 (pH 7.5) に溶かした。この H R P 溶液 5 mL を 20 mL の反応バイアルに移した。H R P 溶液を含む反応バイアルに、D M F 中の S - アセチルチオ酢酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (S A T A) 溶液 (25 mg/mL) の 0.5 mL アリコートを添加した。この溶液を

50

穏やかに混合し、次いで20 で60分間インキュベートした。0.05 M EDTA と2.5 M ヒドロキシルアミンを含む溶液 (pH 7.0) のアリコート (500 μ L) を反応混合物に添加し、穏やかに混合し、次いで20 で15分間インキュベートした。次いで混合物を、約63 mL/分の流速を使って、0.1 M リン酸塩 + 5 mM EDTA 溶液 (pH 6.0) で予め平衡化されたSephadex G25の2.0 \times 10 cm カラム上でのクロマトグラフィーにかけた。1分間ずつ画分を集めた。最も濃縮された11画分 (403 nmで大きな吸収を有する) をプールした。

【0057】

実施例4：

活性化HRPと活性化された還元型コルチゾール-3-CMO-BSAとのカップリング

活性化された還元型コルチゾール-3-CMO-BSA 21.47 mL を活性化HRP 11.55 mL と合わせた。溶液を穏やかに混合し、そして20 で20時間インキュベートした。メルカプトエタノールを含む水溶液 (容量で1%のチオール) のアリコート (224 μ L) を反応混合物に添加し、生じた溶液を穏やかに混合し、そして約15分間放置しておいた。次いで、DMF中に10 mg/mLのN-エチルマレイミドを含む溶液の476 μ Lアリコートを反応混合物に添加し、そして混合した後、更に20分間インキュベートした。反応混合物を、約344 mL/時間の流速を使って、0.1 M リン酸塩 + 0.3 M NaCl 溶液 (pH 6.0) で予め平衡化されたSuperdex 200を充填した4.4 \times 50 cm カラム上でのクロマトグラフィーにかけた。1分間ずつ画分を集めた。280 nmで大きな吸収を有する最初の溶出液のあたりを中心として最も濃縮された26画分をプールした。

【0058】

接合体プール (cj) の吸収とHRP溶液 (実施例2に記載、活性化前で且つ正確な吸収測定値を得るためにリン酸緩衝液中に十分に希釈する前) の吸収を280nmと403 nmで測定した (それぞれA403cj, A280cj およびA403HRP, A280HRP)。BSA濃度に基づいた還元型コルチゾール-3-CMO-BSA-HRP接合体の濃度を、それらの測定値から次の式を使って求めた：

$$BSA \text{ (mg/mL)} = A280cj - (A403cj / [A403HRP / A280HRP]) / 0.76$$

【0059】

実施例4：

接合体の評価

HRP標識還元型コルチゾール-3-CMO-BSA (以後、HRP-RC接合体と称する) の評価は、オルソ-クリニカル ダイアグノスティクス社のVITROS Eci化学発光アッセイ方法論を使って評価した。

VITROS Eci系での使用のために下記の試薬を調製した。

【0060】

標識溶液：

- 100 ng/mL の還元型コルチゾール-3-CMO-BSA-HRP (または、本発明の接合体標識でないけれども、還元段階を除いて本発明の標識と同じ手順で担持された、20ng/mLの比較用HRP-コルチゾール接合体標識)

- 2.86 g/Lの第二リン酸ナトリウム, 無水

- 7.3 g/Lの第一リン酸ナトリウム, 一水和物

- 0.01 g/Lのフェリシアン酸カリウム

- 2.5 g/Lの8-アニリノ-1-ナフトレンスルホン酸

- 20 g/Lのウシ血清アルブミン

- 0.03 g/Lのアポ西洋ワサビペルオキシダーゼ

- 0.2%のウシグロブリン (Cohn画分IV-I)

- 1 g/Lのウシグロブリン

- 5 g/Lの正常ヒツジ血清

- 100 g/Lの活性炭処理したヒト血漿

- 20 g/LのKathon (5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンと2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンを含む保存剤)

- pH 6.4

【0061】

ビオチン化ヒツジポリクローナル抗コルチゾール溶液：

- 1.5 μg/mLのビオチン化ヒツジ抗コルチゾール グロブリン
- 21 g/Lの第二リン酸ナトリウム，無水
- 1.8 g/L の塩化ナトリウム
- 1.1 g/L のクエン酸
- 20 g/Lのウシ血清アルブミン
- 20 g/LのKathon
- pH 5.4

10

【0062】

洗浄試薬：

- 0.39 g/Lのホウ酸
- 0.35 g/Lの四ホウ酸二ナトリウム
- 0.58 g/Lの塩化ナトリウム
- 0.50 g/LのTRITON X-100 (オクチルフェノキシポリエトキシエタノール)
- 0.5 % w/w BRONIDOX (5 - ブロモ - 5 - ニトロ - 1 , 3 - ジオキサンを含む保存

剤)

- pH 8.4

【0063】

20

シグナル試薬：A 部

- 3.88 g/Lのホウ酸
- 14.2 g/Lの四ホウ酸ナトリウム
- 1.06 g/Lのクエン酸ナトリウム
- 0.08 g/Lの安息香酸ナトリウム
- 0.10 g/Lのアジ化ナトリウム
- 0.008 g/L のジエチレントリアミンペンタ酢酸
- 0.58 g/Lのグリシン
- 0.40 g/Lのルミノール

30

B 部

- 0.90 g/Lのクエン酸
- 1.68 g/Lのクエン酸ナトリウム
- 0.08 g/Lの安息香酸ナトリウム
- 0.62 g/Lの過ホウ酸ナトリウム
- 0.06 g/Lの3 - クロロ - 4 - ヒドロキシアセトアニリド
- 5.84 g/Lの塩化ナトリウム

【0064】

抗コルチゾールビオチン化ヒツジ抗体のアリコート (75 μL)、コルチゾールまたはコルチゾールに構造的に類似しているステロイドを含む血清 (後述) の試料 30 μL、およびHRP - RC接合体 75 μL を、ストレプトアビジンが予め結合されているVITROS Eci試料容器に添加した。溶液を37 で30分間インキュベートし、次いで上記の洗浄試薬を使って洗浄した。

40

【0065】

上記シグナル試薬溶液の200 μL アリコート (A部 100 μL とB部 100 μL を使用直前に混合したもの) を試料容器に添加した。溶液を37 で5分間インキュベートし、次いで化学発光強度を測定した。

【0066】

実施例 5：交差反応性

50

上記方法を使って、一定量の抗コルチゾール抗体に結合した一定量の比較用HRP標識コルチゾール接合体（非還元型コルチゾール、HRP-NRC）またはHRP-RC接合体の50%を置換する潜在的な交差反応体（コルチゾールに構造的に類似しているステロイド：11-デオキシコルチゾール、プレドニソロン、コルチコステロンおよびコルチゾン）の濃度を測定した。

【0067】

様々なレベルの潜在的な交差反応体を、比較用標識コルチゾール接合体（非還元型コルチゾール、HRP-NRC）または本発明のHRP-RC接合体のいずれかを含む試料容器へと添加した。

【0068】

到達し得る最大値（全ての接合体が置換された値）の50%に相同する光シグナル測定値を生じる交差反応体の濃度を測定し、それを使って後述のように交差反応性%を計算した。その結果を表1に列挙する。

【0069】

交差反応性%は、上述のアッセイ方法ごとに測定した、HRP-NRC比較用接合体（またはHRP-RC接合体）の50%を置換するコルチゾールの濃度を、HRP-NRCひ比較用接合体（またはHRP-RC接合体）の50%を置換する交差反応体の濃度で割った値に、100を乗じた値として定義される。

【0070】

【表1】

表1
交差反応性%

化合物	HRP-NRC 比較用標識	HRP-RC 本発明の標識
コルチゾール	100	100
プレドニソロン	34.8	24.6
11-デオキシコルチゾール	28.4	2.2
コルチゾン	5.5	1.8
コルチコステロン	4.4	3.3

【0071】

これらのデータは、本発明の代表的なHRP-RC接合体が、コルチゾールについてのイムノアッセイにおいて有意に低い交差反応性を提供することを示す。従って、本発明の標識還元型コルチゾールを使ったコルチゾールアッセイは、改善された正確度を示し、改善された診断、治療および追跡を提供するだろう。

【手続補正書】

【提出日】平成23年4月27日(2011.4.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

10

20

30

40

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

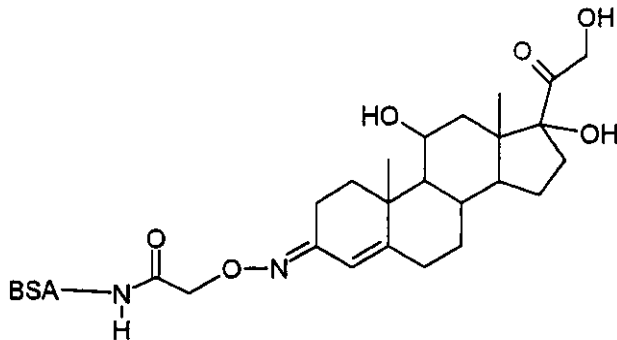
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コルチゾール接合体の製造方法であって、

3 - コルチゾールカルボキシメチルオキシシムのウシ血清アルブミン接合体 (3 - C M O - B S A)

【化 1】



3-CMO-BSA

と水素化ホウ素ナトリウムとを反応させることを含んで成る方法。

【請求項 2】

前記コルチゾール接合体と連結基とを反応させて、連結基を有するコルチゾール接合体を製造することを更に含んで成る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記連結基を有するコルチゾール接合体と標識とを反応させて、標識コルチゾール接合体を製造することを更に含んで成る、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記連結基がスクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (S M C C) である、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】

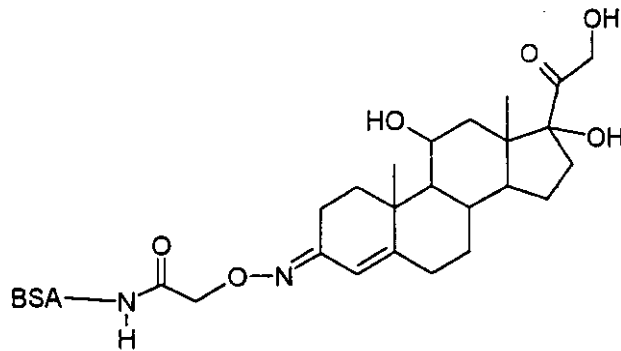
前記標識がペルオキシダーゼである、請求項 3 又は 4 に記載の方法。

【請求項 6】

標識コルチゾール接合体を製造する方法であって：

a) 3 - コルチゾールカルボキシメチルオキシシムのウシ血清アルブミン接合体 (3 - C M O - B S A)

【化 2】



3-CMO-BSA

と水素化ホウ素ナトリウムとを反応させてコルチゾール接合体を製造し；

b) 続いて、前記コルチゾール接合体と連結基とを反応させて、連結基を有するコルチゾール接合体を製造し；

c) 続いて、前記連結基を有するコルチゾール接合体と標識とを反応させて、標識コルチゾール接合体を製造すること、を含んで成り、前記連結基がスクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (S M C C) であり、且つ前記標識がペルオキシダーゼである、方法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の方法により製造されるコルチゾール接合体。

【請求項 8】

請求項 2 に記載の方法により製造される、連結基を有するコルチゾール接合体。

【請求項 9】

前記連結基がスクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (S M C C) である、請求項 8 に記載の連結基を有するコルチゾール接合体。

【請求項 10】

請求項 3 に記載の方法により製造される、標識コルチゾール接合体。

【請求項 11】

前記標識がペルオキシダーゼである、請求項 10 に記載の標識コルチゾール接合体。

【請求項 12】

請求項 6 に記載の方法により製造される、標識コルチゾール接合体。

【請求項 13】

コルチゾールについての競合アッセイの実施方法であって、

A) コルチゾールを含む疑いのある試料を

i) コルチゾールを結合する固定化されたまたは固定化可能なレセプターと接触させ、それにより固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合したコルチゾールと、固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しないコルチゾールとを形成させ、

ii) 請求項 10 に記載の標識コルチゾール接合体と接触させ、それにより固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合した標識コルチゾール接合体と、固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しない標識コルチゾール接合体とを形成させ；そして

B) 試料中のコルチゾールの量の指標として、前記固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合した標識コルチゾール接合体か、前記固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しない標識コルチゾール接合体のいずれかを検出する

という各段階を含んで成る方法。

【請求項 14】

コルチゾールについての競合アッセイの実施方法であって、

A) コルチゾールを含む疑いのある試料を

i) コルチゾールを結合する固定化されたまたは固定化可能なレセプターと接触させ、それにより固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合したコルチゾールと、固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しないコルチゾールとを形成させ、且つ

ii) 請求項 12 に記載の標識コルチゾール接合体と接触させ、それにより固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合した標識コルチゾール接合体と、固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しない標識コルチゾール接合体とを形成させ；そして

B) 試料中のコルチゾールの量の指標として、前記固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合した標識コルチゾール接合体か、前記固定化されたまたは固定化可能なレセプターに結合しない標識コルチゾール接合体のいずれかを検出する

という各段階を含んで成る方法。

【請求項 15】

コルチゾールについての競合結合アッセイの実施方法であって、該方法は

a) 展開区画、

b) 1 または複数の試薬区画、

c) 支持体、並びに

d) 前記区画の 1 区画または複数区画における、コルチゾールを結合する固定化されたレセプター、

を含んで成る乾式分析要素を使用し、

A) 前記乾式分析要素の展開区画を

i) コルチゾールを含む疑いのある試料と接触させ、それにより固定化されたレセプターに結合したコルチゾールと、固定化されたレセプターに結合しないコルチゾールとを形成させ、

ii) 請求項 10 に記載の標識コルチゾール接合体と接触させ、それにより前記固定化されたレセプターに結合した標識コルチゾール接合体と、前記固定化されたレセプターに結合しない標識コルチゾール接合体とを形成させ、

B) 試料中のコルチゾールの量の指標として、前記固定化されたレセプターに結合した標識コルチゾール接合体か、前記固定化されたレセプターに結合しない標識コルチゾール接合体のいずれかを検出する

という各段階を含んで成る方法。

【請求項 16】

コルチゾールについての競合結合アッセイの実施方法であって、該方法は

a) 展開区画、

b) 1 または複数の試薬区画、

c) 支持体、並びに

d) 前記区画の 1 区画または複数区画における、コルチゾールを結合する固定化されたレセプター、

を含んで成る乾式分析要素を使用し、

A) 前記乾式分析要素の展開区画を

i) コルチゾールを含む疑いのある試料と接触させ、それにより固定化されたレセプターに結合したコルチゾールと、固定化されたレセプターに結合しないコルチゾールとを形成させ、

ii) 請求項 12 に記載の標識コルチゾール接合体と接触させ、それにより前記固定化されたレセプターに結合した標識コルチゾール接合体と、前記固定化されたレセプターに結合しない標識コルチゾール接合体とを形成させ、

B) 試料中のコルチゾールの量の指標として、前記固定化されたレセプターに結合した標識コルチゾール接合体か、前記固定化されたレセプターに結合しない標識コルチゾール接合体のいずれかを検出する

という各段階を含んで成る方法。

【請求項 17】

抗コルチゾール抗体の単離方法であって、
請求項 7 に記載のコルチゾール接合体を用いて宿主動物を免疫し、それによりコルチゾールを結合する抗体を産生させ；そして

A) 前記宿主動物の血清または血漿からコルチゾールを結合する抗体を単離し；または

B) 抗体産生細胞を含有する脾臓、リンパ系組織または他の組織を取り出し；

i) 前記抗体産生細胞を取り出し；

ii) 前記抗体産生細胞からハイブリドーマを作製し；

iii) コルチゾールを結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択し；そして

iv) コルチゾールを結合する抗体を単離する

という各段階を含んで成る方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N	9/08 (2006.01)	C 0 7 K	14/765
C 1 2 Q	1/28 (2006.01)	C 1 2 N	9/08
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 Q	1/28
		C 1 2 P	21/08

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100166028

弁理士 北谷 賢次

(72)発明者 ハロルド シー・ウォレン

アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 4 5 4 3, ラッシュ, ストーンブルック ロード 3 9 0

(72)発明者 ブライアン エー・スナイダー

アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 4 6 1 6, ロチェスター, ノースクリフェ ドライブ 1 0 7

(72)発明者 リサ ディー・スプレイグ

アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 4 5 1 2, ネイブルズ, グリック ロード 7 1 1 0

(72)発明者 シャーリー ワイ・リン

アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 4 6 1 5, ロチェスター, レッジウッド サークル 1 0 5

(72)発明者 ポール ビー・コンテスタブル

アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 4 6 2 4, ロチェスター, ロヤリスト アベニュー 2 6

(72)発明者 ハリー エル・グロス

アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 4 4 6 4, ハムリン, ブリック スクールハウス ロード 3 2 8 0

F ターム(参考) 4B050 CC02 GG10 LL03

4B063 QA01 QA18 QQ70 QQ79 QQ96 QR02 QR48 QS15 QS26 QS28
QS33 QX02

4B064 AG27 CA20 CC24 DA13

4C091 AA02 BB01 BB05 CC01 DD01 EE02 FF01 GG01 HH01 JJ01

KK12 LL01 MM01 NN01 PA03 PA05 PA09 PB02 QQ01 RR06

SS10

4H045 AA11 BA50 BA55 CA40 DA76 EA50 FA50 FA74

【外国語明細書】

2011148821000001.pdf

专利名称(译)	皮质醇结合物减少		
公开(公告)号	JP2011148821A	公开(公告)日	2011-08-04
申请号	JP2011090267	申请日	2011-04-14
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索 - 临床诊断, 雷法团去开球		
[标]发明人	ハロルドシーウォレン ブライアンエースネイダー リサディースプレイギユ シャーリーワイリン ポールビーコンテスタブル ハリーエルグロス		
发明人	ハロルド シー.ウォレン ブライアン エー.スネイダー リサ ディー.スプレイギユ シャーリー ワイ.リン ポール ビー.コンテスタブル ハリー エル.グロス		
IPC分类号	C07J41/00 C07J75/00 G01N33/53 G01N33/543 C07K14/765 C12N9/08 C12Q1/28 C12P21/08 C12N15/02 C07J1/00 C07J5/00 G01N33/566		
CPC分类号	C07J5/00 Y10S436/817		
FI分类号	C07J41/00 C07J75/00 G01N33/53.A G01N33/543.511.A G01N33/543.521 C07K14/765 C12N9/08 C12Q1/28 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B050/CC02 4B050/GG10 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ70 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR02 4B063/QR48 4B063/QS15 4B063/QS26 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4C091/AA02 4C091/BB01 4C091/BB05 4C091/CC01 4C091/DD01 4C091/EE02 4C091/FF01 4C091/GG01 4C091/HH01 4C091/JJ01 4C091/KK12 4C091/LL01 4C091/MM01 4C091/NN01 4C091/PA03 4C091/PA05 4C091/PA09 4C091/PB02 4C091/QQ01 4C091/RR06 4C091/SS10 4H045/AA11 4H045/BA50 4H045/BA55 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA50 4H045/FA74		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜		
优先权	60/102836 1998-10-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种制备皮质醇结合物的新方法。解决方案：制备皮质醇缀合物的方法包括使与牛血清白蛋白 (3-CMO-BSA) 缀合的3-皮质醇羧甲基肟与硼氢化钠反应。 Z

