

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-517004  
(P2016-517004A)

(43) 公表日 平成28年6月9日(2016.6.9)

(51) Int.Cl.

GO1N 33/53 (2006.01)

F1

GO1N 33/53

H

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2016-503649 (P2016-503649)  
 (86) (22) 出願日 平成26年3月19日 (2014.3.19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年11月5日 (2015.11.5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/055503  
 (87) 国際公開番号 WO2014/147121  
 (87) 国際公開日 平成26年9月25日 (2014.9.25)  
 (31) 優先権主張番号 102013205055.0  
 (32) 優先日 平成25年3月21日 (2013.3.21)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

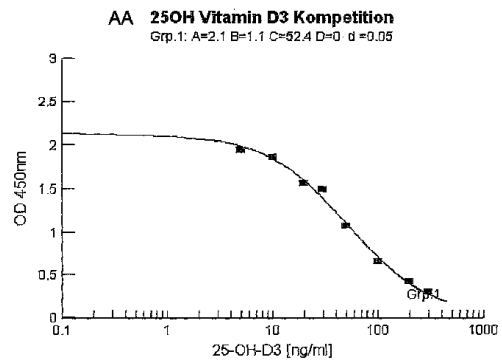
(71) 出願人 502057669  
 オルゲンテック ディアグノスティカ ゲ  
 ゼルシャフト ミット ベシュレンクテル  
 ハフツング  
 ドイツ連邦共和国 マインツ カールーツ  
 アイス-シュトラーセ 49  
 (74) 代理人 100114890  
 弁理士 アインゼル・フェリックス=ライ  
 ンハルト  
 (74) 代理人 100099483  
 弁理士 久野 琢也  
 (72) 発明者 ローベアト ポッペ  
 ドイツ連邦共和国 マインツ ベーベルシ  
 ュトラーセ 48

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビタミンD代謝物を測定するための方法および試薬

(57) 【要約】

本発明は、ビタミンDを含む試料を、少なくとも1つのヒドロトロブ物質および少なくとも1つの遷移金属塩を含む遊離試薬と接触させて、結合されたビタミンDを遊離させるための方法に関する。前記遊離させたビタミンDは、続いて定量的に測定することができる。本発明は、さらに、少なくとも1つのヒドロトロブ物質および少なくとも1つの遷移金属塩を含む、ビタミンDを遊離および場合により測定するための試薬、ならびに、ビタミンDの遊離および場合により測定するための前記試薬の使用に関する。



AA 25-OH Vitamin D3 Competition

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ビタミンDを遊離させるためのインビトロの方法であって、以下の工程：

a) 結合されたビタミンDを含む試料を、以下：

i. 少なくとも1つのヒドロトローブ物質、および

ii. 少なくとも1つの遷移金属塩

を含む遊離試薬と接触させる工程、

ならびに

b) 前記結合されたビタミンDを遊離させる工程

を含む前記方法。

10

## 【請求項 2】

前記試験される試料が、好ましくは、血液、血清、血漿または乳汁から選択される生物学的液体であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記ヒドロトローブ物質が、芳香族酸および/またはそのエステル、アミドまたは塩、好ましくは、N, N - ジメチルベンズアミド、ジメチル安息香酸、1, 2 - ナフトキノンスルホン酸、トルエンスルホン酸、スルファニル酸、アントラキノン - 2 - スルホン酸、アニリン - 2 - スルホン酸、および/またはそれらの塩、および特に好ましくはパラトルエンスルホン酸および/またはそのエステル、アミド、または塩であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

## 【請求項 4】

前記遷移金属塩が、第 5 族、第 6 族、第 7 族、第 8 族、第 10 族および/または第 12 族の金属の塩、好ましくは、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケルおよび/または亜鉛の塩、特に好ましくは、鉄(III)塩、最も好ましくは塩化鉄(III)またはクエン酸鉄(III)であることを特徴とする、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記遊離試薬が、さらに、錯化剤、好ましくは、クエン酸、EDTA および/またはそれらの塩を含むことを特徴とする、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記遊離試薬を、前記ヒドロトローブ物質の最終濃度を 200 ~ 1000 mM に、および/または前記遷移金属塩の最終濃度を 5 ~ 100 mM に調節する量で前記試料に添加することを特徴とする、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の方法。

30

## 【請求項 7】

ビタミンDを測定するためのインビトロの方法であって、以下の工程：

a) および b) 結合されたビタミンDを遊離させるための、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項に記載の方法にしたがう工程、および

c) 前記遊離させたビタミンDを測定する工程

を含む前記方法。

40

## 【請求項 8】

前記ビタミンDが、25 - ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>、25 - ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>、1, 25 - ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>、1, 25 - ジヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>、ビタミンD<sub>3</sub>、ビタミンD<sub>2</sub> およびそれらの混合物を含む群から選択され、ここで、前記ビタミンDが、好ましくは25 - ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub> および/または25 - ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub> であることを特徴とする、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記ビタミンDを測定する工程を、前記遊離試薬を分離することなく行うことを特徴とする、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

工程 c) のビタミンDの濃度を測定する工程を、免疫学的方法により、好ましくは、競

50

合的免疫学的方法により行うことを特徴とする、請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1】

ビタミン D を遊離させるための試薬であって、

- a) 少なくとも 1 つのヒドロトロープ物質、
- b) 少なくとも 1 つの遷移金属塩、および
- c) 場合により、少なくとも 1 つの錯化剤

を含む前記試薬。

【請求項 1 2】

前記ヒドロトロープ物質が、芳香族酸および/またはそのエステル、アミドまたは塩、好ましくは、N, N - ジメチルベンズアミド、ジメチル安息香酸、1, 2 - ナフトキノンスルホン酸、パラトルエンサルホン酸、スルファニル酸、アントラキノン - 2 - スルホン酸、アニリン - 2 - スルホン酸および/またはそれらの塩、特に好ましくは、トルエンサルホン酸および/またはそのエステル、アミドまたは塩であることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の試薬。

10

【請求項 1 3】

前記遷移金属塩が、第 5 族、第 6 族、第 7 族、第 8 族、第 10 族および/または第 12 族の金属の塩、好ましくは、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケルおよび/または亜鉛の塩、特に好ましくは、鉄(III)塩、最も好ましくは、塩化鉄(III)またはクエン酸鉄(III)であることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の試薬。

20

【請求項 1 4】

請求項 1 1 に記載の試薬であって、水性液体中の該試薬の総質量に対して 5 ~ 30 質量%、好ましくは 10 ~ 25 質量%の前記少なくとも 1 つのヒドロトロープ物質、および 0.1 ~ 5 質量%、好ましくは 0.2 ~ 2 質量%の前記少なくとも 1 つの遷移金属塩を有することを特徴とする前記試薬。

【請求項 1 5】

請求項 1 2 から 1 4 までのいずれか 1 項に記載の遊離試薬およびビタミン D の測定試薬を含む、ビタミン D を測定するための試薬。

【請求項 1 6】

請求項 1 1 から 1 5 までのいずれか 1 項に記載の試薬の、結合されたビタミン D を、特に請求項 7 から 10 までのいずれか 1 項に記載の方法で遊離させるための使用。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ビタミン D を含む試料を、少なくとも 1 つのヒドロトロープ物質 (hydro trope Substanz) および少なくとも 1 つの遷移金属塩を含む遊離試薬と接触させて、結合されたビタミン D を遊離させるための方法に関する。前記遊離させたビタミン D は、続いて定量的に測定することができる。本発明は、さらに、ビタミン D を遊離および場合により測定するための、少なくとも 1 つのヒドロトロープ物質および少なくとも 1 つの遷移金属塩を含む試薬、ならびにビタミン D を遊離および場合により測定するための前記遊離試薬の使用に関する。

40

【0002】

ビタミン D の十分な補給は、人間にとって不可欠である。ビタミン D の最も豊富に存在する生理学的形態は、ビタミン D<sub>3</sub> またはビタミン D<sub>2</sub> である。生理的に作用する最も重要なビタミン D<sub>3</sub> の誘導體 (コレカルシフェロール) は、25 OHD<sub>3</sub> (25 - ヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> またはカルシジオール) および 1, 25 - (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (1 - アルファ, 25 - ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> またはカルシトリオール) である。一般に、圧倒的な量のビタミン D<sub>3</sub> は、別のビタミンのように食物と一緒に摂取されるのではなく、UV 光の影響下に皮膚で生成される。ここで、7 - ジヒドロキシコレステロールが、UV 照射によって反応してプレビタミン D<sub>3</sub> になり、ここで、不安定な中間生成物が再構成してビタミン D<sub>3</sub> に

50

なる。食物において、ビタミンD<sub>3</sub>は、特に、脂肪の豊富な魚に含まれている。体内で見られるビタミンDのさらなる形態は、ビタミンD<sub>2</sub>（カルシフェロールまたはエルゴカルシフェロール）であり、これは、菌類に見られるものであり、食物と一緒に摂取することができる。ビタミンD<sub>3</sub>およびビタミンD<sub>2</sub>のプレパラート（*P r a e p a r a t e*）は、十分な量のビタミンDを補給するためのさらなる源である。

【0003】

ビタミンDおよびその天然誘導体は、極めて疎水性の分子である。血中では、ビタミンDは、ビタミンD結合タンパク（DBP）との複合体として輸送される。DBPは、アルブミン群に含まれるものであり、ビタミンD、ビタミンD代謝物および脂肪酸を結合する。

10

【0004】

肝臓では、ビタミンDは、シトクロームP450により、C-25位で酸化される。結果として生じる25OHD（25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>または25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>）は、主に血液循環中に存在しているビタミンD代謝物である。血清25OHD濃度は、人間のビタミンDの状態を評価するための指標として用いられる。

【0005】

腎臓およびさらなる組織において、25OHDの1,25(OH)<sub>2</sub>D（ビタミンDの生理的活性形態）への転換が行われ、この転換によって、ビタミンD受容体（VDR）での結合後に、ビタミンDに応じて調節される（VDRE）遺伝子活性が制御される。

20

【0006】

ビタミンDの十分な補給は、通常の骨構造ならびにカルシウムおよびリンの吸収の調節に不可欠である。VDRの1,25(OH)<sub>2</sub>Dによる活性化は、腸のカルシウム吸収の効率を約30%、およびリン吸収を約80%上昇させる。25OHD血清濃度が、30ng/mlよりも低下する場合、腸におけるカルシウム吸収の明らかな減少および副甲状腺ホルモン濃度の上昇を伴う。ビタミンDの欠乏は、骨折の危険が高い骨粗しょう症の主要因と見なされており、さらなる健康リスクを伴う。血清ビタミンD濃度が、栄養摂取および太陽光への曝露によって大きく変動する一方、血清25OHD濃度は、ビタミンDの供給状態を求めるための優れた指標とされる。したがって、血清25OHD濃度の測定は、医学的診断において日常的に行われるものである。

30

【0007】

25OHDおよび別のビタミンD物質のDBPへの結合は、ビタミンD代謝物の測定において大きな障害である。いずれの測定方法もビタミンD代謝物をDBP複合体から遊離させることを前提としている。

【0008】

血清中のビタミンDおよびその代謝物を測定できるようにするためには、それらをDBPとの結合から遊離させる必要がある。これは、種々の方法、例えば、DBPの有機溶媒（例えば、エタノール、メタノール）による沈殿、またはビタミンDおよびその代謝物を水相から相形成溶媒、例えば、クロロホルムまたはヘキサンによる抽出により行うことができる。

40

【0009】

US7,482,162B2（*Immunodiagnostic Systems Ltd.*）は、DBPに結合された1,25(OH)<sub>2</sub>Dを遊離させるための非競合型の置換試薬として、8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸アンモニウム塩（8-ANS）を使用することを記載している。

【0010】

WO2011/144661（*Roche Diagnostics GmbH*）は、炭酸塩または炭酸水素塩を遊離させる物質を、還元剤およびアルカリ化合物と組み合わせる試薬混合物を記載しており、ここで、ビタミンD代謝物は、pH範囲11~14でDBP複合体から遊離される。

50

【0011】

EP 2 126 586 (Immundiagnostik AG) は、ビタミンD代謝物の遊離の結果生じたDBPを不活性化し、それに続いてELISA試験システムにおいてビタミンD代謝物を測定するために、プロテイナーゼKの使用下でのタンパク質分解法の適用に関する。

【0012】

US 7,087,395 (Quest) は、NaOH、洗剤、シクロデキストリン誘導体およびサリチル酸塩からなるアルカリ性の試薬混合物を使用して、pH 13で、血清を前処理して、ビタミンD代謝物をDBPから遊離させる方法に関する。

【0013】

WO 2008/138783 (Nordic Biosciences A/S) は、10  
ビタミンDをDBP複合体から遊離させるために、血清試料または血漿試料をパモ酸で前処理することを記載している。

【0014】

しかし、ビタミンDをDBPとの複合体から遊離させるための従来公知の方法は、労働集約的であり、自動化しにくい、またはミスが起きやすい。

【0015】

ビタミンDを測定するための自動化試験法は、理想的には反応バッチを直接さらに分析することができる条件下で、DBPとの複合体からの遊離を必要とする。しかし、DBPは、極めて安定したタンパクであり、ビタミンDの結合能1900 ng/mlに相当する比較的高い血清濃度で存在している。これは、平均血清25OHD濃度が30 ng/ml20  
の場合、25OHDの結合能の60倍を上回ることを示す。

【0016】

遊離試薬は、ビタミンDをDBPとの安定した結合から切り離し、DBP血清濃度が高いことによって存在している、著しく過剰なビタミンDの結合能を不活性化して、さらに、遊離させたビタミンDの、検出試薬、一般に抗体への結合を可能にすることも望ましい。

【0017】

したがって、本発明の課題は、結合されたビタミンDを遊離させるための試薬であって、結合されたビタミンDをタンパク複合体から遊離させる場合の従来の問題を解決し、およびビタミンDを直接定量的に測定するための自動化方法における使用に好適な試薬を提供することである。30

【0018】

先行技術の試薬組成物の制約および欠点は、本発明により少なくとも部分的に取り除かれる。本発明は、結合されたビタミンDを遊離させるための試薬であって、ビタミンDの効率的な遊離を可能にする前記試薬を提供する。この試薬は、さらに、ビタミンDの測定試薬を含んでいてよい。前記遊離試薬の使用は、測定されるビタミンDを試料から単離させる必要がないという利点を提供する。添加された遊離試薬を有する試料は、さらに処理することなしに、直接、免疫学的測定方法に供することができる。これによって、先行技術よりも経済的かつ時間を節約してビタミンDを測定することができる。

【0019】

したがって、本発明によって、ビタミンD、特に、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>または25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>の濃度を測定するための確実かつ自動化可能な方法が提供される。40

【0020】

したがって、本発明の第一の実施態様は、以下の工程：

a) 結合されたビタミンDを、特に、タンパク質との複合体の形態として含む試料を、以下：

i. 少なくとも1つのヒドロトローブ物質、および

ii. 少なくとも1つの遷移金属塩

を含む遊離試薬と接触させる工程、50

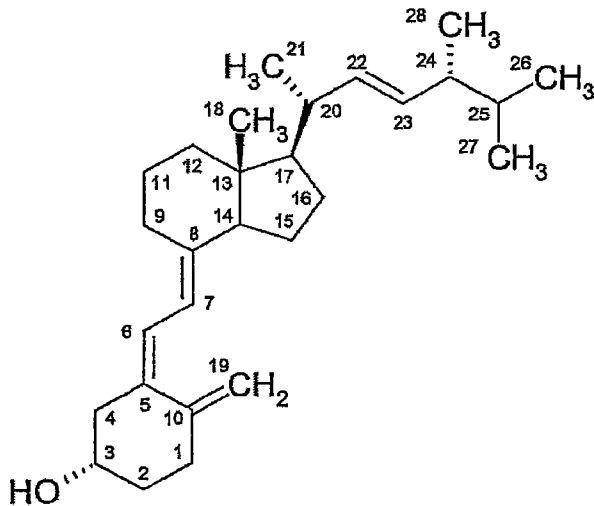
および

b) 前記結合されたビタミンDを遊離させる工程を含む、ビタミンDを遊離させるためのインビトロの方法に関する。

【0021】

特に記載がない場合、「ビタミンD」という言葉は、構造式I【化1】

構造式I



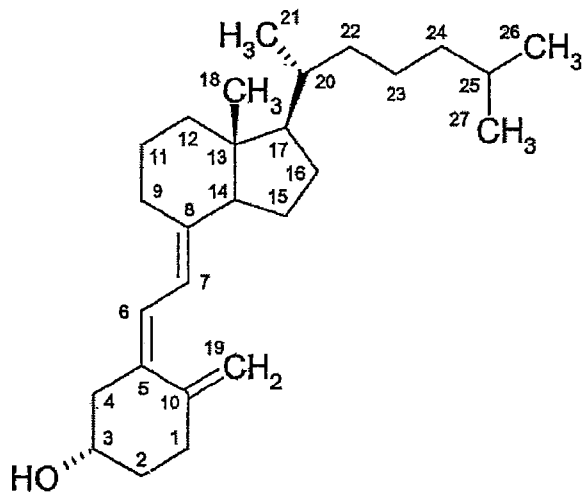
10

20

または構造式II

【化2】

構造式II



30

40

に記載のビタミンD<sub>2</sub>基本骨格またはビタミンD<sub>3</sub>基本骨格を有するあらゆる天然由来の化合物を含む。

【0022】

構造式IおよびII中の炭素原子の番号は、ステロイド命名法にしたがって表示されている。25-ヒドロキシビタミンDは、構造式IまたはIIの25位でヒドロキシル化されているビタミンD代謝物、つまり、25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>ならびに25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>を表す。さらなるヒドロキシビタミンD化合物は、例えば、1,25-ジヒドロキシビタミンDまたは24,25-ジヒドロキシビタミンDである。

【0023】

1,25-ジヒドロキシビタミンDは、構造式IおよびIIの1位ならびに25位でヒ

50

ドロキシ化されているビタミンDの活性形態（いわゆるDホルモン）を指す。

【0024】

別のよく知られているビタミンD化合物は、24, 25 - ジヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>、24, 25 - ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>、およびC3 - epi - 25 - ヒドロキシビタミンDである。

【0025】

「結合されたビタミンDの遊離」という言葉は、ビタミンDが結合しているタンパク質、特にDBPとの複合体からビタミンDを完全または部分的に分離させることを意味する。実質的に、試料中に存在しているすべてのビタミンDが遊離されるのが好ましい。この関連において、「実質的に」、ビタミンDの少なくとも90%、95%、98%、好ましくはビタミンDの少なくとも99%が遊離されることを意味する。

10

【0026】

「ヒドロトロブ物質」または「ヒドロトロブ化合物」という言葉は、不溶性であるか、または溶解しにくい有機化合物の水性溶媒中での溶解性を高める化合物を表す。ここで、前記ヒドロトロブ化合物は、水の表面張力を低下させ、それによって切り離される物質の分散性を容易にする（ヒドロトロブ）。

【0027】

「遷移金属塩」という言葉は、元素周期表の第II族～第XII族もしくは第Ib族～第VIIb族および第VIII族の金属の無機塩または有機塩を表す。

【0028】

試験される試料は、例えば、血液、血清、血漿または乳汁から選択される生物学的液体であるのが好ましい。前記試料は、通常、生物、好ましくは、哺乳類、例えば、人に由来するものである。

20

【0029】

前記ヒドロトロブ物質は、好ましくは、芳香族酸および/またはそのエステル、アミドまたは塩である。これらは、N, N - ジメチルベンズアミド、ジメチル安息香酸、1, 2 - ナフトキノンスルホン酸、パラトルエンスルホン酸、スルファニル酸、アントラキノン - 2 - スルホン酸、アニリン - 2 - スルホン酸および/またはそれらの塩からなる群から選択されるのが好ましい。前記ヒドロトロブ物質は、トルエンスルホン酸および/またはそのエステル、アミドまたは塩であるのが特に好ましい。

30

【0030】

前記ヒドロトロブ物質は、HLB値12～18を有しているのがさらに好ましい。「HLB値(hydrophilic lipophilic balance)」という言葉は、W. C. グリフィンによって導入された、非イオノゲンの界面活性剤および乳化剤の親水性および親油性の基準である。化合物の対応のHLB値は、当該分野で公知の方法によって求めることができる。

【0031】

本発明による方法の遷移金属塩は、第5族、第6族、第7族、第8族、第10族および/または第12族の金属の塩、例えば、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケルおよび/または亜鉛の塩を含むのが好ましい。前記遷移金属塩は、鉄(III)塩が特に好ましく、塩化鉄(III)またはクエン酸鉄(III)が最も好ましい。ここで、前記塩は、遷移金属カチオンおよび無機または有機のアニオンからなる。

40

【0032】

前記無機アニオンには、ハロゲン化物、例えば、フッ化物、塩化物、臭化物またはヨウ化物、硫化物、炭酸塩、炭酸水素塩、硫酸塩、リン酸塩、硝酸塩およびチオシアン酸塩が含まれる。

【0033】

前記有機アニオンには、カルボン酸アニオン、例えば、ギ酸塩、酢酸塩、パルミチン酸塩、クエン酸塩、シュウ酸塩、フマル酸塩、安息香酸、マレイン酸塩またはサリチル酸塩、および有機硫酸塩、例えば、ラウリル硫酸塩が含まれる。

50

## 【0034】

前記遊離試薬は、さらに、錯化剤、好ましくは、クエン酸、EDTAおよび/またはそれらの塩、最も好ましくは、クエン酸および/またはその塩を含んでよい。「錯化剤」という言葉は、錯体の形成を可能にする化合物、例えば、キレート形成剤を表す。

## 【0035】

前記遊離試薬は、前記ヒドロトローブ物質の最終濃度を200~1000mM、特に300~700mMに、および前記遷移金属塩の最終濃度を5~100mM、特に10~40mMに調節する量で前記試料に添加されるのが好ましい。前記遊離試薬は、水性溶媒中に主要液として装入されるのが好ましく、この遊離試薬の総質量に対して5~30質量%、好ましくは10~25質量%の前記ヒドロトローブ物質、および0.1~5質量%、好ましくは、0.2~2質量%の前記遷移金属塩を有するものである。

10

## 【0036】

本発明のさらなる実施態様は、以下の工程：

a) 結合されたビタミンDを、特に、タンパク質との複合体の形態として含む試料を、以下：

i. 少なくとも1つのヒドロトローブ物質、および

ii. 少なくとも1つの遷移金属塩、

を含む遊離試薬と接触させる工程、

b) 前記結合されたビタミンDを遊離させる工程、および

20

c) 前記遊離させたビタミンDを測定する工程を含む、ビタミンD化合物を測定するためのインビトロの方法を含む。

## 【0037】

工程c)の前記遊離させたビタミンDを測定する工程は、時間に関して、工程a)およびb)の後か、または工程a)およびb)と同時に実施することができる。工程c)は、測定されるビタミンDから前記遊離試薬を分離することなく、工程a)およびb)と同時に実施されるのが好ましく、これによって、試料中のビタミンDを測定するための一段階法が提供される。

## 【0038】

工程c)のビタミンDの濃度を測定する工程は、測定されるビタミンDを、免疫学的結合パートナーに結合させて、免疫複合体を形成させる免疫学的方法であるのが好ましい。「免疫学的結合パートナー」という言葉は、抗体を含む。

30

## 【0039】

好適な免疫学的方法の例は、不均一測定法、均一測定法、サンドイッチ測定法、競合測定法、酵素免疫測定法、放射免疫測定法、蛍光偏光免疫測定法、微粒子酵素免疫測定法、および化学発光磁気免疫測定法を含む。上述の試験形態の多くは、一段階法か、または二段階法で実施することができる。一段階法で実施することができる試験形態が使用されるのが好ましい。

## 【0040】

「不均一測定法」という言葉は、前記免疫複合体と別の構成成分とを、例えば、洗浄によって分離することが必要な方法を指す。

40

## 【0041】

「均一測定法」という言葉は、前記免疫複合体を、別の構成成分と分離させる必要がない方法を指す。

## 【0042】

「競合測定法」という言葉は、試料中に存在しているビタミンDと、検出可能な(例えば、標識された)トレーサーとを、免疫学的結合パートナーに関して競合させる方法を指す。

## 【0043】

「サンドイッチ測定法」という言葉は、ビタミンDを、2つの免疫学的結合パートナー

50

との間に結合させ、この2つの免疫学的結合パートナーのうちの少なくとも1つが検出可能（例えば、標識による）である方法を指す。

【0044】

「酵素免疫測定法」という言葉は、酵素を標識として利用する方法を指す。そのような標識の例は、アルカリ性ホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼおよび - ガラクトシダーゼである。ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) は、例えば、好ましい不均一のサンドイッチ酵素免疫測定法である。

【0045】

「放射免疫測定法」という言葉は、放射性同位元素を標識として利用する方法を指す。そのような標識の例は、ヨウ素125である。

10

【0046】

前記好適な方法は、検出工程を含む。この工程は、標識の検出を含んでよい。ここで、前記目的のために当該分野で公知のあらゆる標識を使用することができる。好適な標識の例は、酵素標識（上述の通り）放射性同位元素標識（上述の通り）、蛍光偏光標識、例えば、フルオレスセインまたはローダミン、化学発光性標識、例えば、ルミノールまたはアクリジニウムエステル、およびポリヒスチジン標識を含む。

【0047】

工程c)においてビタミンDの濃度を測定する場合、競合免疫学的方法が使用されるのが特に好ましい。好適な競合試験形態は、当業者に十分に公知である。一般的な競合結合測定法において、トレーサー、つまり、ビタミンDの標識形態を有する受容体または抗体を、試験する試料と接触させる。その場合、前記受容体または抗体に結合して存在しているトレーサーの量は、前記試料中の標識されていないビタミンDの割合を示す。代替的に、競合結合測定法は、トレーサーに結合した受容体または抗体を、試験する試料と接触させる工程、および試料中のビタミンDの量を示す、排除されたトレーサーの量を測定する工程を含んでよい。ビオチンで標識したトレーサーおよびペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジンによる検出が使用されるのが最も好ましい。

20

【0048】

ビタミンDを測定するために、試料構成成分が分離されないことが好ましい。方法工程a)、b)およびc)は、抽出または精製をそれぞれの方法工程の間で行うことなく、単一の反応容器内で実施することができる。

30

【0049】

本発明による方法により遊離されて、測定されるビタミンDには、あらゆる公知のビタミンD化合物、例えば、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>、25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>、1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>、1,25-ジヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>、ビタミンD<sub>3</sub>、ビタミンD<sub>2</sub>およびそれらの混合物が含まれる。前記ビタミンD化合物は、25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>および/または25-ヒドロキシビタミンD<sub>2</sub>であるのが特に好ましい。

【0050】

本発明のさらなる実施態様は、以下：

40

a) 少なくとも1つのヒドロトローブ物質、および

b) 少なくとも1つの遷移金属塩

を含む、ビタミンDを遊離させるための試薬に関する。

【0051】

前記試薬が、さらに錯化剤を含んでいるのが好ましい。錯化剤として、クエン酸、EDTAおよび/またはそれらの塩が使用されるのが好ましく、クエン酸および/またはその塩がより好ましい。

【0052】

さらなる実施態様において、前記試薬は、さらに、ビタミンDを測定するための、少なくとも1つの試薬を含む。

50

## 【0053】

本発明のさらなる実施態様は、上記試薬の、結合されたビタミンDを遊離させるため、および場合によりこの遊離させたビタミンDを測定するための使用である。

## 【0054】

さらに、本発明を以下の図および例によってより詳しく説明する。

## 【0055】

図1は、定義された濃度の25-OH-D<sub>3</sub>の、血清DBPとの結合からの遊離、およびビオチン25-OH-D<sub>3</sub>トレーサー試薬との競合を特性化した図である。25-OH-Dの特異的競合法のELISA検出のために、ビタミンDを含まない血清マトリックス(SerCon、Seracare Inc.)中で、0、5、10、20、20、50、100、200、300 ng/ml濃度の25-OH-D<sub>3</sub>の希釈系に、ビオチン-25-OH-Dトレーサー試薬7.5 ng/mlの存在下で、ビタミンD遊離試薬80 μlを加えて、抗25-OH-Dの抗体で被覆されたマイクロプレートのウェルに塗布した。競合する25-OH-D濃度によって決まるトレーサーの結合を、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンおよびテトラメチルベンジジン(TB)呈色反応を用いて、450 nmでODを測定して決定した。

10

## 【0056】

図2は、定義された濃度の25-OH-D<sub>3</sub>および25-OH-D<sub>2</sub>を有する血清(6 PLUS 1 Multilevel Serum Calibrator Set 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>、Chromsystems GmbH)、ならびにビタミンDを含まない血清マトリックス(SerCon、Seracare Inc.)中でのその希釈の比較分析は、HPLCおよびLC-MS/MSが定義する25-OH-D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>濃度と、Alegria(登録商標)自動システム(ORG270、ORGENTEC)における25-OH-D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>の直接測定法との高い一致を示した。

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【0057】

【図1】定義された濃度の25-OH-D<sub>3</sub>の、血清DBPとの結合からの遊離、およびビオチン25-OH-D<sub>3</sub>トレーサー試薬との競合を特性化した図

【図2】定義された濃度の25-OH-D<sub>3</sub>および25-OH-D<sub>2</sub>を有する血清、ならびにビタミンDを含まない血清マトリックス中でのその希釈の比較分析を示す図

## 【0058】

30

## 例1：ビタミンD遊離試薬の製造

トルエンスルホン酸ナトリウムを水に溶かして、クエン酸ナトリウム1 Mおよび塩化鉄(III) 1 Mの主要液を用いて、トルエンスルホン酸ナトリウム 1 M、クエン酸ナトリウム100 mMおよび塩化鉄(III) 50 mMの最終濃度に調節した。

## 【0059】

## 例2：25-OH-D抗体の固相への結合

25-OH-ビタミン-D<sub>3</sub>もしくは25-OH-ビタミン-D<sub>2</sub>に対する抗体を、pH 8.0のトリス塩緩衝液中で、濃度1 μg/mlに希釈した。マイクロプレート(Maxisorb、Nunc)のウェルを、前記抗体希釈液100 μlで被覆して、37 °Cで乾燥して、試験実施まで4 °Cで貯蔵した。

40

## 【0060】

## 例3：競合結合分析

ビタミンDを含まない血清マトリックス(Seracore、Seracare Inc.)に、定義された濃度の25-OH-D<sub>3</sub>を加えた。前記濃度系それぞれ80 μlを、25-OH-D-ビオチントレーサーであらかじめ被覆したマイクロプレートのウェルに充填して、トレーサー試薬を再可溶化させるために、5分、RT(室温)(20~27 °C)で保温した。次に、例1のビタミンD遊離試薬80 μlを、前記試料に加えて混合した。ビタミンD遊離試薬で希釈した前記試料100 μlを、25-OH-D抗体で被覆したウェルに移して、室温で30分保温した。続いて、前記試料パッチを取り除いて、前記ウェルを3回、それぞれ洗浄緩衝液200 μlで洗浄した。抗体結合したビオチン-25-OH-Dトレー

50

サーを、ペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジンおよびテトラメチルベンジジン (TMB) 呈色反応によって検出した。50 mMのリン酸100  $\mu$ lを添加して基質反応を停止した後、450 nmで光学密度を測定した。ここで、図1に示される通り、25 OH D<sub>3</sub>濃度が5 ng/mlの場合にすでに、ビオチン-25 OH Dトレースーの特異的競合が示された。

**【0061】**

例4：Alegria (登録商標) 25-OH ビタミンD<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>自動試験システムにおける、血清または血漿中の25-ヒドロキシビタミンDの測定 HPLC+LC-MS/MSに基づく25 OH D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>測定方法と、Alegria (登録商標) 25-OH ビタミンD<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>自動試験システムとの相関関係を試験するため、血清または血漿試料、ならびにその希釈段階を、測定まで一定分量で-20 にて貯蔵した。前記血清または血漿試料の25 OH D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>濃度は、HPLC+LC-MS/MSに基づく方法によって特徴付けられたものであった (6 PLUS 1 Multilevel Serum Calibrator Set 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>, Chromsystems GmbH)。

10

**【0062】**

Alegria (登録商標) 25-OH ビタミンD<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>自動試験システムで測定するために、前記試料それぞれ80  $\mu$ lを、Alegria (登録商標) 試験片のキャビティ (Kavitatet) Aに装入した。ここで、1つの試験片の8つのキャビティは、ビタミンD遊離試薬、ストレプトアビジン-HRP共役体、TMB基質、25 OH Dキャリアクション溶液、および25-OH D抗体が被覆されたキャビティをそれぞれ試料測定に対して含んでいた。試験の処理は、Alegria (登録商標) 自動装置で自動的に行った。ここで、試験片内で、前記試料それぞれ、および試験辺内の検量用試料 (calibrator) に、25 OH D-ビオチントレーサーおよびビタミンD遊離試薬を混合し、前記25 OH D抗体が被覆されたキャビティに移して、30分保温した後に洗浄した。抗体結合したビオチン-25 OH Dトレースーの検出を、ペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジンおよびテトラメチルベンジジン (TMB) 呈色反応によって、650 nmで光学密度を測定して行った。

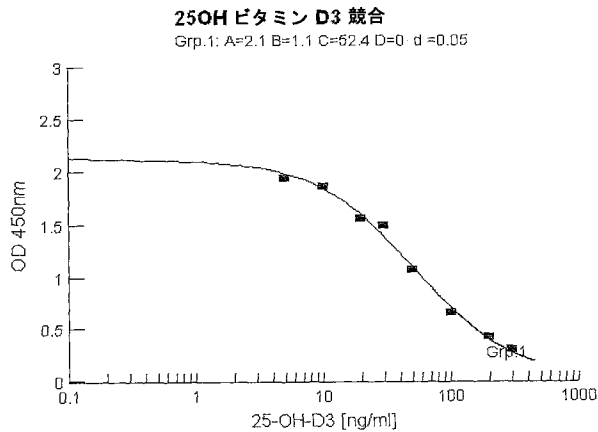
20

**【0063】**

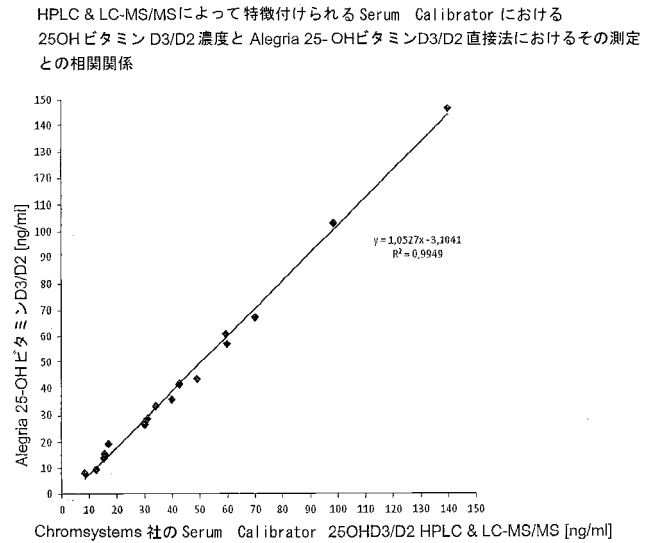
図2に示される通り、HPLCおよびLC-MS/MSによって定義された血清試料の25-OH D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>の濃度と、Alegria (登録商標) 自動システム (ORG 270、ORGENTEC) における25-OH ビタミンD<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>直接測定法との高い一致が観察された。

30

【 図 1 】



【 図 2 】



## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成27年1月12日 (2015.1.12)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

## 【 請求項 1 】

ビタミンDを遊離させるためのインビトロの方法であって、以下の工程：

a) 結合されたビタミンDを含む試料を、以下：

- i . 少なくとも1つのヒドロトローブ物質、および
- ii . 少なくとも1つの遷移金属塩

を含む遊離試薬と接触させる工程、  
ならびに

b) 前記結合されたビタミンDを遊離させる工程

を含む前記方法。

## 【 請求項 2 】

前記試験される試料が、好ましくは、血液、血清、血漿または乳汁から選択される生物学的液体であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

## 【 請求項 3 】

前記ヒドロトローブ物質が、芳香族酸および/またはそのエステル、アミドまたは塩、好ましくは、N,N-ジメチルベンズアミド、ジメチル安息香酸、1,2-ナフトキノンスルホン酸、トルエンサルホン酸、スルファニル酸、アントラキノン-2-スルホン酸、アニリン-2-スルホン酸、および/またはそれらの塩、および特に好ましくはパラトル

エンシルホン酸および/またはそのエステル、アミド、または塩であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記遷移金属塩が、第 5 族、第 6 族、第 7 族、第 8 族、第 10 族および/または第 12 族の金属の塩、好ましくは、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケルおよび/または亜鉛の塩、特に好ましくは、鉄(III)塩、最も好ましくは塩化鉄(III)またはクエン酸鉄(III)であることを特徴とする、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記遊離試薬が、さらに、錯化剤、好ましくは、クエン酸、EDTA および/またはこれらの塩を含むことを特徴とする、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記遊離試薬を、前記ヒドロトロップ物質の最終濃度を 200 ~ 1000 mM に、および/または前記遷移金属塩の最終濃度を 5 ~ 100 mM に調節する量で前記試料に添加することを特徴とする、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

ビタミン D を測定するためのインビトロの方法であって、以下の工程：

a) および b) 結合されたビタミン D を遊離させるための、請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項に記載の方法にしたがう工程、および  
c) 前記遊離させたビタミン D を測定する工程  
を含む前記方法。

【請求項 8】

前記ビタミン D が、25 - ヒドロキシビタミン D<sub>3</sub>、25 - ヒドロキシビタミン D<sub>2</sub>、1, 25 - ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub>、1, 25 - ジヒドロキシビタミン D<sub>2</sub>、ビタミン D<sub>3</sub>、ビタミン D<sub>2</sub> およびそれらの混合物を含む群から選択され、ここで、前記ビタミン D が、好ましくは 25 - ヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> および/または 25 - ヒドロキシビタミン D<sub>2</sub> であることを特徴とする、請求項 1 から 7 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記ビタミン D を測定する工程を、前記遊離試薬を分離することなく行うことを特徴とする、請求項 1 から 8 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

工程 c) のビタミン D の濃度を測定する工程を、免疫学的方法により、好ましくは、競合的免疫学的方法により行うことを特徴とする、請求項 1 から 9 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

ビタミン D を遊離させるための試薬であって、

- a) 少なくとも 1 つのヒドロトロップ物質、
- b) 少なくとも 1 つの遷移金属塩、および
- c) 場合により、少なくとも 1 つの錯化剤

を含み、

水性液体中の該試薬の総質量に対して 5 ~ 30 質量%、好ましくは 10 ~ 25 質量%の前記少なくとも 1 つのヒドロトロップ物質、および 0.1 ~ 5 質量%、好ましくは 0.2 ~ 2 質量%の前記少なくとも 1 つの遷移金属塩を有する前記試薬。

【請求項 12】

前記ヒドロトロップ物質が、芳香族酸および/またはそのエステル、アミドまたは塩、好ましくは、N, N - ジメチルベンズアミド、ジメチル安息香酸、1, 2 - ナフトキノンスルホン酸、パラトルエンシルホン酸、スルファニル酸、アントラキノン - 2 - スルホン酸、アニリン - 2 - スルホン酸および/またはそれらの塩、特に好ましくは、トルエンシルホン酸および/またはそのエステル、アミドまたは塩であることを特徴とする、請求項 11 に記載の試薬。

**【請求項 1 3】**

前記遷移金属塩が、第 5 族、第 6 族、第 7 族、第 8 族、第 1 0 族および / または第 1 2 族の金属の塩、好ましくは、バナジウム、クロム、マンガン、鉄、コバルト、ニッケルおよび / または亜鉛の塩、特に好ましくは、鉄 ( I I I ) 塩、最も好ましくは、塩化鉄 ( I I I ) またはクエン酸鉄 ( I I I ) であることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の試薬。

**【請求項 1 4】**

請求項 1 2 または 1 3 に記載の遊離試薬およびビタミン D の測定試薬を含む、ビタミン D を測定するための試薬。

**【請求項 1 5】**

請求項 1 1 から 1 4 までのいずれか 1 項に記載の試薬の、結合されたビタミン D を、特に請求項 7 から 1 0 までのいずれか 1 項に記載の方法で遊離させるための使用。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/055503
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/82 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/092917 A1 (IMMUNDIAGNOSTIK AG [DE]; ARMBRUSTER FRANZ PAUL [DE]; ROTH HEINZ-JUERGE) 7 August 2008 (2008-08-07) claims 6,7 page 3, paragraph 3 -----	1-16
X	DATABASE WPI Week 201143 Thomson Scientific, London, GB; AN 2011-E01872 XP002726076, & CN 101 973 913 A (WANG Y) 16 February 2011 (2011-02-16) abstract ----- -/--	11-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 June 2014		04/07/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Gundlach, Björn

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/055503
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"Iron(III) p-toluenesulfonate", INTERNET CITATION, 9 August 2005 (2005-08-09), pages 1-4, XP007922743, Retrieved from the Internet: URL:http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=173580 [retrieved on 2014-06-20] the whole document	11-13
A	----- B.K ROY ET AL: "Functions of hydrotropes (sodium salicylate, proline, pyrogallol, resorcinol and urea) in solution with special reference to amphiphile behaviors", COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS, vol. 203, no. 1-3, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 155-166, XP55124142, ISSN: 0927-7757, DOI: 10.1016/S0927-7757(01)01099-8 abstract	1-16
A	----- SALEH A M ET AL: "Study of the interaction of menadione with hydrotropic salts", DIE PHARMAZIE, GOVI VERLAG PHARMAZEUTISCHER VERLAG GMBH, ESCHBORN, DE, vol. 29, no. 8, 1 August 1974 (1974-08-01) , pages 525-527, XP008170008, ISSN: 0031-7144 page 525, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 1 -----	1-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/055503

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008092917	A1	07-08-2008	AT 472734 T 15-07-2010
			AU 2008209736 A1 07-08-2008
			DK 2126586 T3 11-10-2010
			EP 2126586 A1 02-12-2009
			ES 2348126 T3 30-11-2010
			HR P20100532 T1 30-11-2010
			JP 5185291 B2 17-04-2013
			JP 2010518369 A 27-05-2010
			PT 2126586 E 17-09-2010
			US 2010068725 A1 18-03-2010
			WO 2008092917 A1 07-08-2008
-----			
CN 101973913	A	16-02-2011	NONE
-----			

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/055503

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> INV. G01N33/82 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2008/092917 A1 (IMMUNDIAGNOSTIK AG [DE]; ARMBRUSTER FRANZ PAUL [DE]; ROTH HEINZ-JUERGE) 7. August 2008 (2008-08-07) Ansprüche 6,7 Seite 3, Absatz 3	1-16
X	DATABASE WPI Week 201143 Thomson Scientific, London, GB; AN 2011-E01872 XP002726076, & CN 101 973 913 A (WANG Y) 16. Februar 2011 (2011-02-16) Zusammenfassung	11-13
	-----	
	-----	
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 23. Juni 2014		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 04/07/2014
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Gundlach, Björn

1

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (April 2005)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/055503

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	"Iron(III) p-toluenesulfonate", INTERNET CITATION, 9. August 2005 (2005-08-09), Seiten 1-4, XP007922743, Gefunden im Internet: URL: <a href="http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=173580">http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=173580</a> [gefunden am 2014-06-20] das ganze Dokument	11-13
A	----- B.K ROY ET AL: "Functions of hydrotropes (sodium salicylate, proline, pyrogallol, resorcinol and urea) in solution with special reference to amphiphile behaviors", COLLOIDS AND SURFACES A: PHYSICOCHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS, Bd. 203, Nr. 1-3, 1. April 2002 (2002-04-01), Seiten 155-166, XP55124142, ISSN: 0927-7757, DOI: 10.1016/S0927-7757(01)01099-8 Zusammenfassung	1-16
A	----- SALEH A M ET AL: "Study of the interaction of menadione with hydrotropic salts", DIE PHARMAZIE, GOVI VERLAG PHARMAZEUTISCHER VERLAG GMBH, ESCHBORN, DE, Bd. 29, Nr. 8, 1. August 1974 (1974-08-01) , Seiten 525-527, XP008170008, ISSN: 0031-7144 Seite 525, Spalte 1, letzter Absatz - Spalte 2, Absatz 1	1-16
	-----	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2014/055503

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2008092917 A1	07-08-2008	AT 472734 T	15-07-2010
		AU 2008209736 A1	07-08-2008
		DK 2126586 T3	11-10-2010
		EP 2126586 A1	02-12-2009
		ES 2348126 T3	30-11-2010
		HR P20100532 T1	30-11-2010
		JP 5185291 B2	17-04-2013
		JP 2010518369 A	27-05-2010
		PT 2126586 E	17-09-2010
		US 2010068725 A1	18-03-2010
		WO 2008092917 A1	07-08-2008
-----			
CN 101973913 A	16-02-2011	KEINE	
-----			

## フロントページの続き

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

(72)発明者 ヴキッチ ソスキッチ

ドイツ連邦共和国 マインツ アム フォアト エリーザベト 17

专利名称(译)	测量维生素D代谢物的方法和试剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016517004A</a>	公开(公告)日	2016-06-09
申请号	JP2016503649	申请日	2014-03-19
[标]申请(专利权)人(译)	ORGEN技术诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	Orugentekku鹿ING亚诺斯锡卡GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	ローベアトポッペ ヴキッチソスキッチ		
发明人	ローベアト ポッペ ヴキッチ ソスキッチ		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/82		
FI分类号	G01N33/53.H		
优先权	102013205055 2013-03-21 DE		
其他公开文献	JP6429857B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种使含有维生素D的样品与含有至少一种水溶助长剂物质和至少一种过渡金属盐的释放剂接触以释放结合的维生素D的方法。随后可以定量测量释放的维生素D。本发明进一步提供了用于游离和任选地测量维生素D的试剂，其包含至少一种水溶助长剂物质和至少一种过渡金属盐，以及所述用于游离和任选地测量维生素D的试剂。关于使用。

