



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년05월02일

(11) 등록번호 10-2528381

(24) 등록일자 2023년04월27일

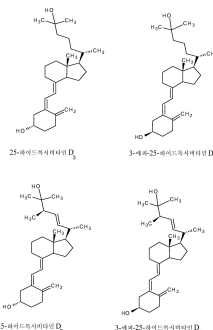
- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 401/00 (2006.01) **A61K 31/59** (2006.01)
G01N 33/82 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07C 401/00 (2013.01)
A61K 31/59 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7002239
- (22) 출원일자(국제) 2015년06월22일
 심사청구일자 2020년04월14일
- (85) 번역문제출일자 2017년01월24일
- (65) 공개번호 10-2017-0027791
- (43) 공개일자 2017년03월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/036904
- (87) 국제공개번호 WO 2015/200180
 국제공개일자 2015년12월30일
- (30) 우선권주장
 62/018,008 2014년06월27일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2005067673 A2*
 (뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 강신건

(54) 발명의 명칭 **비타민 D에 관한 조성물****(57) 요약**

본 발명은 비타민 D 이성질체 및 이의 대사산물을 포함하는 비타민 D 분석물을 함유하는 것으로 의심되는 샘플에서 비타민 D 분석물의 존재 및/또는 양을 결정하기 위한 조성물, 방법 및 키트에 관한 것이다. 화합물은 화학식 I 즉, $(R^1)_p-(L)_q-Z$ (여기에서, R, L, p 및 q는 본원에 정의된 바와 같음)의 화합물을 포함한다. 이들 화합물은 상응하는 항체에 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에 기재된 원리에 따른 화합물 및 항체는 치료학적 활성을 가질 수 있다. 이들 화합물은 비타민 D와 관련된 특정 질병 상태의 치료를 제공하는 양인 치료학적 유효량으로 투여될 수 있다. 본원에 기재된 원리에 따른 화합물의 예의 투여는 유사한 유용성을 제공하는 제제의 허용되는 투여 모드 중 임의의 모드로 수행될 수 있다.

대표도

(52) CPC특허분류

G01N 33/82 (2013.01)

C07C 2601/14 (2017.05)

C07C 2602/24 (2017.05)

(72) 발명자

샤르마, 마노이

미국 19707 델라웨어 호케썬 펄리코 코트 5

드리난, 마르틴 에이.

미국 19711 델라웨어 뉴어크 엘크턴 로드 719

웨이, 티 쿠안

미국 19808 델라웨어 윌밍턴 어센션 드라이브 97

(56) 선행기술조사문헌

EP00794175 A2

US06787660 B1

US20020107411 A1

US20100014467 A1

US20130059825 A1

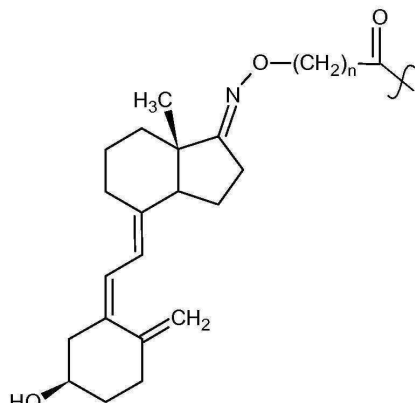
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 화학식 $\text{NHR}^1-(\text{CH}_2)_r-\text{NR}^1-((\text{CH}_2)_r-\text{NR}^1)_s-(\text{CH}_2)_r-\text{NR}^7-\text{Z}$ 의 화합물을 포함하는 비타민 D의 존재 또는 양을 결정하기 위한 조성물로서,



R^1 은 독립적으로 HO 또는 H이고, 여기서 적어도 하나의 R^1 은 H가 아니고,

r 은 독립적으로 1 내지 10의 정수이고,

s 는 1 내지 10의 정수이고,

R^7 은 H 또는 알킬이고,

n 은 0 내지 10의 정수이고,

Z 는 OR^8 이며, 여기서 R^8 은 H, 알킬, 또는 NR^9R^{10} 이며, 여기서 R^9 및 R^{10} 은 독립적으로 H 또는 알킬, 폴리(아미노산) 면역원성 담체(poly(amino acid) immunogenic carrier), 비-폴리(아미노산) 면역원성 담체(non-poly(amino acid) immunogenic carrier), 폴리(아미노산) 표지 모이어티(poly(amino acid) label moiety), 비-폴리(아미노산) 표지 모이어티, 비-표지 폴리(아미노산) 모이어티, 비-면역원성 담체 폴리(아미노산) 모이어티, 또는 지지체인, 조성물.

청구항 2

삭제

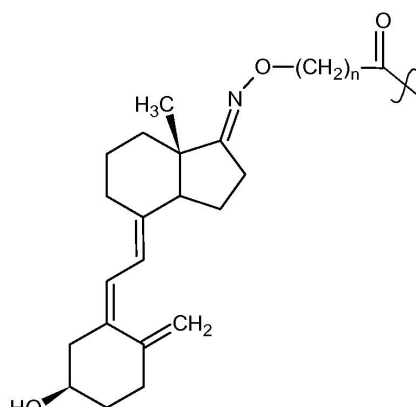
청구항 3


삭제

청구항 4

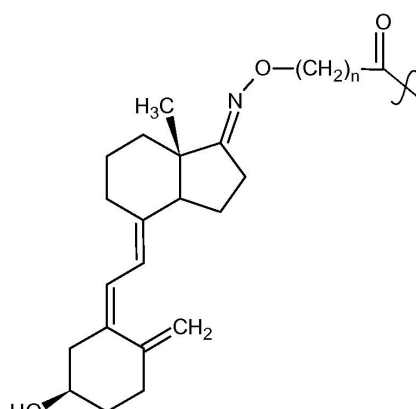
삭제


청구항 5



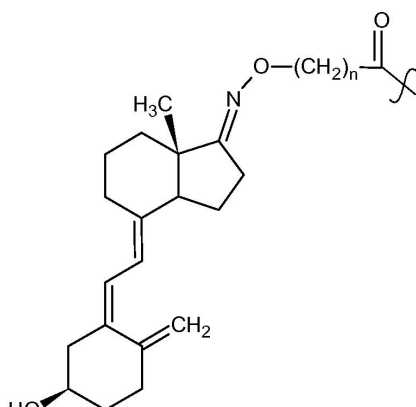
제 1항에 있어서, r이 2이고, s가 1이고, R⁷이 H이고, 하나의 R¹이 인, 조성물.


청구항 6



제 1항에 있어서, r이 2이고, s가 1이고, R⁷이 H이고, 2개의 R¹이 인, 조성물.

청구항 7

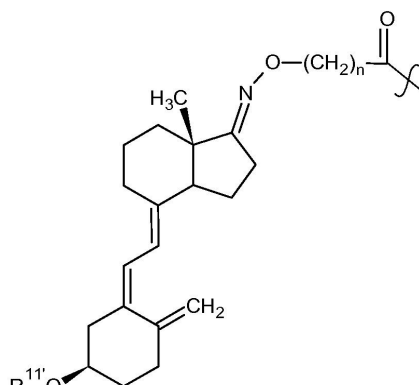


제 1항에 있어서, r이 2이고, s가 1이고, R⁷이 H이고, 3개의 R¹이 인, 조성물.

청구항 8

하나 이상의 화학식 $\text{NHR}^{1'}-(\text{CH}_2)_{r'}-\text{NR}^{1''}-((\text{CH}_2)_{r'}-\text{NR}^{1'''})_s-(\text{CH}_2)_{r'}-\text{NR}^{7'}-\text{Z}'$ 의 화합물을 포함하는 비타민 D의 존재 또는 양을 결정하기 위한 조성물로서,

상기 식에서,



$R^{1'}$, $R^{1''}$ 또는 $R^{1'''}$ 은 각각 독립적으로 $R^{11'}O$ 및 H로부터 선택되고,

여기서, $R^{1'}$, $R^{1''}$ 또는 $R^{1'''}$ 중 적어도 하나는 H가 아니고,

n' 은 1 내지 10의 정수이고,

r' 은 독립적으로 1 내지 10의 정수이고,

s' 은 1 내지 10의 정수이고,

$R^{7'}$ 은 H 또는 알킬이고,

$R^{11'}$ 은 H, 알킬, 또는 아실이고,

Z' 은 폴리(아미노산) 면역원성 담체, 비-폴리(아미노산) 면역원성 담체, 폴리(아미노산) 표지 모이어티, 비-폴리(아미노산) 표지 모이어티, 비-표지 폴리(아미노산) 모이어티, 비-면역원성 담체 폴리(아미노산) 모이어티, 또는 지지체인, 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, s' 가 1인 조성물.

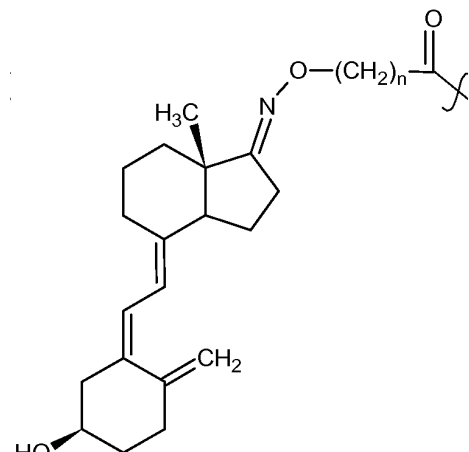
청구항 10

제 8항에 있어서, $R^{7'}$ 가 H인 조성물.

청구항 11

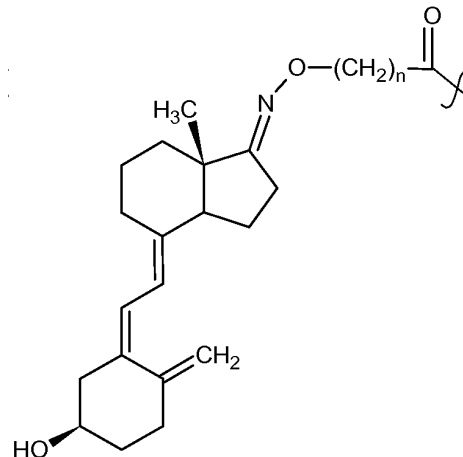
제 8항에 있어서, r' 가 2인 조성물.

청구항 12



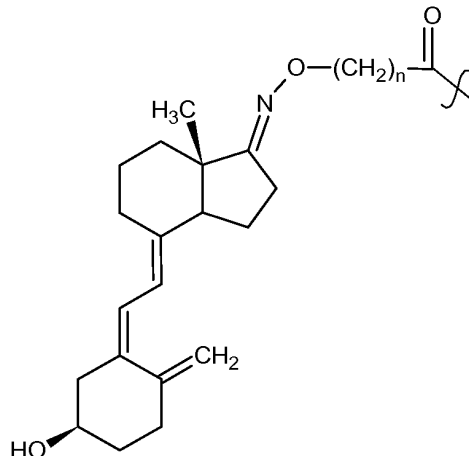
제 8항에 있어서, $R^{1'}$ 가 HO이고, $R^{1''}$ 및 $R^{1'''}$ 가 H인 조성물.

청구항 13



제 8항에 있어서, R^{1'} 및 R^{1''}가 이고, R^{1'''}가 H인 조성물.

청구항 14



제 8항에 있어서, R^{1'}, R^{1''} 및 R^{1'''}이 인 조성물.

청구항 15

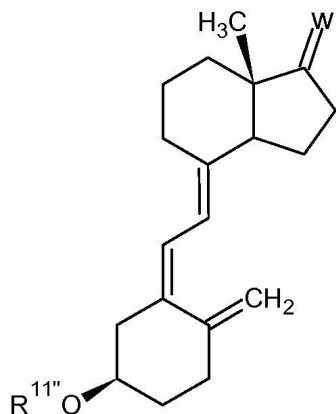
제 8항에 있어서, Z'가 소 혈청 알부민(albumin), 소 감마 글로불린(gamma globulin), 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 및 난(egg) 난알부민(ovalbumin)으로 구성된 군으로부터 선택된 폴리(아미노산) 면역원성 담체인 조성물.

청구항 16

제 8항에 있어서, Z'가 효소인 폴리(아미노산) 표지이거나 촉매제를 코딩하는(coding) 폴리뉴클레오티드(polynucleotide), 프로모터(promoter), 염료, 형광 분자, 화학발광 분자, 보조효소, 효소 기질, 방사성 기, 작은 유기 분자, 증폭가능한 폴리뉴클레오티드 서열 및 입자로 구성된 군으로부터 선택된 비-폴리(아미노산) 표지 모이어티인 조성물.

청구항 17

하나 이상의 하기 화학식의 화합물을 포함하는 비타민 D의 존재 또는 양을 결정하기 위한 조성물로서:



상기 식에서,

W는 $N-O-(CH_2)_n-C(O)-Z''$ 이며,

n"는 1 내지 10의 정수이고,

$R^{11''}$ 은 H, 알킬, 또는 아실이고,

Z'' 는 OR^8 이고, 여기서, R^8 은 H, 알킬, 또는 NR^9R^{10} 이며, 여기서 R^9 및 R^{10} 은 독립적으로 H 또는 알킬인, 조성물.

청구항 18

제 17항에 있어서, Z'' 가 OH인 조성물.

청구항 19

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 35 USC § 119(e) 하에서 2014년 6월 27일에 출원된 미국 가출원 62/018,008호의 이익을 주장한다. 상기 언급된 특허 출원의 전체 내용은 참조로서 명백히 본원에 포함된다.

배경 기술

[0002] 본 발명은 비타민(vitamin) D를 함유할 것으로 의심되는 샘플(sample)에서 비타민 D 이성질체 및 이의 대사산물을 포함하는 비타민 D 분석물의 존재 및/또는 양을 결정하기 위한 조성물, 방법 및 키트(kit)에 관한 것이다.

[0003] 용어 "비타민 D"는 지용성 세코스테로이드(secosteroid)의 그룹(group)을 의미한다. 인간에서, 비타민 D는 콜레칼시페롤(cholecalciferol)(비타민 D_3) 또는 에르고칼시페롤(ergocalciferol)(비타민 D_2)로서 섭취될 수 있고, 태양 노출이 적당할 때 신체도 이를 합성할 수 있으므로(콜레스테롤(cholesterol)로부터 합성) 독특하다. 비타민 D는 대다수가 이를 필수 영양소로 고려하지만 이러한 후자의 속성으로 인해, 일부는 이를 필수적이지 않은 식이 비타민으로 간주한다. 비타민 D는 칼슘 이온(calcium ion) 항상성의 양성 조절에서 중요한 생리학적 역할을 담당한다. 비타민 D_3 은 동물에 의해 합성되는 비타민의 형태이다. 이것은 또한 비타민 D_2 와 같이 유제품 및 특정 식품에 첨가되는 일반적인 보충물이다.

[0004] 식이 및 본질적으로 합성된 비타민 D_3 둘 모두는 생리활성 대사산물을 생성하기 위해 대사 활성화를 거쳐야 한다. 인간에서, 비타민 D_3 활성화의 초기 단계는 주로 간에서 발생하고, 중간체 대사산물 25-하이드록시콜레칼

시페롤(25-hydroxycholecalciferol)을 형성하기 위한 하이드록실화(hydroxylation)를 포함한다. 칼시디올(calcidiol)은 순환계에서 비타민 D₃의 주요 형태이다. 비타민 D₂ 또한 25-하이드록시비타민(25-hydroxyvitamin) D₂로의 유사한 대사 활성화를 겪는다. 종합적으로, 이들 화합물은 25-하이드록시비타민 D(약어 25(OH)D)로 언급되고, 이들은 비타민 D 상태를 결정하기 위해 혈청에서 측정되는 주요 대사산물이며; 25(OH)D 및 이의 에피머(epimer)는 둘 모두 생물학적 기능을 발휘하기 위해 1,25(OH)D로 전환될 필요가 있는 전구-호르몬(pre-hormone)이다. 3-에피-1,25(OH)D의 생리활성에 비한 1,25(OH)D의 생리활성의 비교는 복잡하다.

[0005] 비타민 D 화합물 25-하이드록시비타민 D₃ 및 25-하이드록시비타민 D₂는 3-위치에서 에피머로 존재하며, 에피머는 각각 25-하이드록시비타민 D₃ 및 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 및 25-하이드록시비타민 D₂ 및 3-에피-25-하이드록시비타민 D₂로 명명된다. 이들 에피머 화합물 각각의 에피머 중 단지 하나, 즉, 25-하이드록시비타민 D₃ 및 25-하이드록시비타민 D₂가 각각 활성이다. 25-하이드록시비타민 D₃ 및 25-하이드록시비타민 D₂의 에피머에 대한 구조는 도 1에 기재되어 있다.

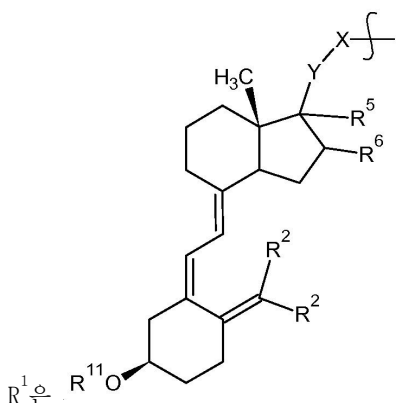
[0006] 많은 소분자 화합물 또는 합텐(hapten), 예를 들어, 약물 및 비타민은 이성질체 형태로 존재하며, 이 중 하나의 형태만 활성이다. 분석물의 활성 형태의 정확한 측정을 획득하기 위해, 분석물의 비-활성 이성질체의 존재가 다루어져야 한다. 분석물의 둘 모두의 이성질체 형태, 즉, 활성 및 비-활성 형태의 측정은 분석물의 활성 형태의 기능에 따라 개체에 유해할 수 있는 부정확성을 발생시킬 수 있다. 생물학적 샘플 내의 한 쌍의 이성질체 분석물 각각의 수준을 정확하게 평가하는 것은 특히 이성질체 중 하나만 활성인 경우에 중요하며, 비-활성 이성질체의 양을 포함하는 측정은 샘플 내의 분석물의 수준을 왜곡시킨다. 예를 들어, 생물학적 샘플 중 비타민 D 수준을 평가하는 것은 비타민 D 결핍이 포유동물에서 다수의 질병과 관련되므로 중요하다. 유아에서, 예를 들어, 3-에피(epi) 이성질체의 양을 포함하는 비타민 D 측정은 유아에서 비타민 D 수준의 부정확한 평가를 발생시킬 수 있고, 이는 이어서 적절한 보충의 결핍을 초래할 수 있다. 유아가 필요시 적절한 비타민 D 요법을 받을 수 있도록 하기 위해 비타민 D의 활성 형태를 측정하는 것은 중요하다.

[0007] 생물학적 샘플 중 비타민 D 수준을 평가하는 것은 비타민 D 결핍이 포유동물에서 다수의 질병과 관련되므로 중요하다. 샘플에서 비타민 D, 비타민 D의 에피머 형태, 및 비타민 D 유사체 및 이들의 대사산물의 농도를 정확하고 민감하게 결정하기 위한 시약 및 방법에 대한 요구가 있다.

발명의 내용

[0008] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 화학식 I (R^1)_p-(L)_q-Z의 화합물; 및 상기 화학식의 화합물 중 2개 이상의 혼합물을 포함하는 화합물에 관한 것이다:

[0009] 상기 식에서,



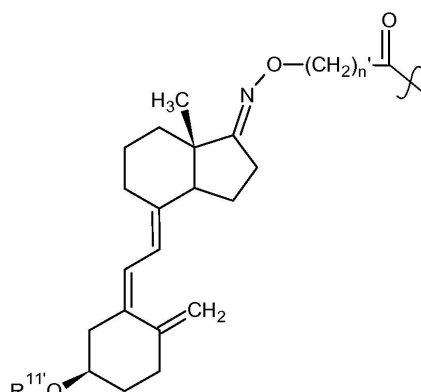
[0010] R¹은 R¹¹O 또는 H이고, 여기서 적어도 하나의 R¹은 H가 아니고,

[0011] Y는 O, S, CR, 또는 NR⁴이고,

[0012] X는 -O-(CH₂)_n-C(O)-, -(CH₂)_w-C(O)-, -(CH₂)_w-C(O)-(CH₂)_x-C(O)-, -(CH₂)_w-C(O)-NH(CH₂)_y-C(O)-, -NR³-C(O)-이고,

[0013] R은 독립적으로 H 또는 알킬이고,

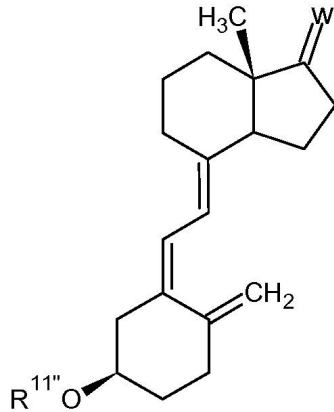
- [0014] R^2 는 독립적으로 H 또는 알킬이고,
- [0015] R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 는 독립적으로 H 또는 알킬이거나, R^4 및 R^5 는 함께 취해져 결합을 형성할 수 있거나, R^5 및 R^6 는 함께 취해져 결합을 형성할 수 있고,
- [0016] R^{11} 은 H, 알킬, 또는 아실이고,
- [0017] n은 1 내지 10의 정수이고,
- [0018] w는 0 내지 10의 정수이고,
- [0019] x는 1 내지 10의 정수이고,
- [0020] y는 1 내지 10의 정수이고,
- [0021] p는 1 내지 10의 정수이고,
- [0022] L은 연결기이고,
- [0023] q는 0 또는 1이고,
- [0024] Z는 OR^8 이며, 여기서 R^8 은 H, 알킬, 또는 NR^9R^{10} 이며, 여기서 R^9 및 R^{10} 은 독립적으로 H 또는 알킬, 폴리(아미노산) 면역원성 담체(poly(amino acid) immunogenic carrier), 비-폴리(아미노산) 면역원성 담체(non-poly(amino acid) immunogenic carrier), 폴리(아미노산) 표지 모이어티(poly(amino acid) label moiety), 비-폴리(아미노산) 표지 모이어티, 비-표지 폴리(아미노산) 모이어티, 비-면역원성 담체 폴리(아미노산) 모이어티, 또는 지지체이다.
- [0025] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 화학식 II $NHR^{1'}-(CH_2)_{r'}-NR^{1''}-((CH_2)_{r'}-NR^{1'''})_{s'}-(CH_2)_{r'}-NR^{7'}-Z'$ 의 화합물; 및 상기 화합물 중 2개 이상의 혼합물을 포함하는 화합물에 관한 것이다:
- [0026] 상기 식에서,



- [0027] $R^{1'}$, $R^{1''}$ 또는 $R^{1'''}$ 은 각각 독립적으로 $R^{11'}O$ 및 H로부터 선택되고,
- [0028] 여기서, $R^{1'}$, $R^{1''}$ 또는 $R^{1'''}$ 중 적어도 하나는 H가 아니고,
- [0029] n'은 1 내지 10의 정수이고,
- [0030] r'은 독립적으로 1 내지 10의 정수이고,
- [0031] s'은 1 내지 10의 정수이고,
- [0032] $R^{7'}$ 은 H 또는 알킬이고,
- [0033] $R^{11'}$ 은 H, 알킬, 또는 아실이고,
- [0034] Z'는 폴리(아미노산) 면역원성 담체, 비-폴리(아미노산) 면역원성 담체, 폴리(아미노산) 표지 모이어티, 비-폴리(아미노산) 표지 모이어티, 비-표지 폴리(아미노산) 모이어티, 또는 비-면역원성 담체 폴리(아미노산) 모이어티

티이다.

[0035] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 화학식 III 화합물; 및 상기 화합물 중 2개 이상의 혼합물을 포함하는 화합물에 관한 것이다:



[0036]

상기 식에서,

[0038] W는 O 또는 $N-O-(CH_2)_n-C(O)-Z''$ 이며,

[0039] n''는 1 내지 10의 정수이고,

[0040] $R^{11''}$ 은 H, 알킬, 또는 아실이고,

[0041] Z''는 OR^8 이고, 여기서, R^8 은 H, 알킬 또는 NR^9R^{10} 이며, 여기서 R^9 및 R^{10} 은 독립적으로 H 또는 알킬이다.

[0042] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 비타민 D를 함유하는 것으로 의심되는 샘플에서 비타민 D 분석물의 존재 및 양 중 하나 또는 둘 모두를 결정하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도면의 간단한 설명

본원에 제공된 도면은 비례적인 것은 아니며, 본원에 기재된 원리에 따라 특정 예의 이해를 도우려는 목적으로 제공되고, 예시에 의해 제공되며, 첨부된 청구항의 범위에 대한 제한이 아니다.

도 1은 25-하이드록시비타민 D₃ 및 25-하이드록시비타민 D₂의 에피머 형태에 대한 화학식의 도시이다.

도 2는 본원에 기재된 원리에 따른 예에 따른 화합물의 합성의 개략도이다.

도 3은 본원에 기재된 원리에 따른 예에 따른 화합물의 합성의 개략도이다.

도 4는 본원에 기재된 원리에 따른 예에 따른 화합물의 합성의 개략도이다.

도 5는 본원에 기재된 원리에 따른 예에 따른 화합물의 합성의 개략도이다.

도 6은 본원에 기재된 원리에 따른 예에 따른 화합물의 합성의 개략도이다.

도 7은 본원에 기재된 원리에 따른 예에 따른 화합물의 합성의 개략도이다.

도 8은 본원에 기재된 원리에 따른 예에 따른 화합물의 합성의 개략도이다.

도 9는 부가된 항-3-에피머-VD 항체와 함께 및 부가된 항-3-에피머-VD 항체가 없이 시약을 이용하여 생성된 표준 곡선의 비교를 예시한다.

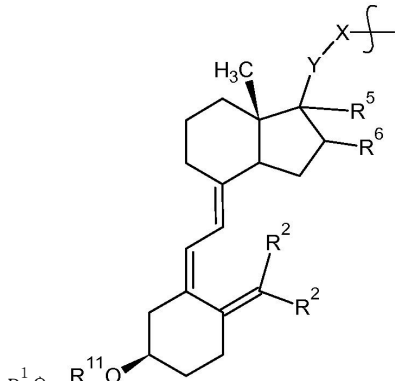
도 10은 항-3-에피머-VD 항체를 이용한 샘플 중의 3-에피-25(OH)D의 결정을 위한 면역검정법에 대한 표준 곡선이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 화합물

[0045] 상기 언급된 바와 같이, 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 화학식 I (R^1)_p-(L)_q-Z의 화합물; 및 상기 화합물 중 2개 이상의 혼합물을 포함하는 화합물에 관한 것이다:

[0046] 상기 식에서,



[0047] R^1 은 $R^{11}O$ 또는 H이고, 여기서 적어도 하나의 R^1 은 H가 아니고,

[0048] Y는 O, S, CR, 또는 NR^4 이고,

[0049] X는 $-O-(CH_2)_n-C(O)-$, $-(CH_2)_w-C(O)-$, 또는 $-NR^3-C(O)-$ 이고; 일부 예에서, 예를 들어, Y가 NR^4 인 경우 X는 $-O-(CH_2)_n-C(O)-$ 이거나, 예를 들어, Y가 O 또는 S인 경우 $-(CH_2)_w-C(O)-$, $-(CH_2)_w-C(O)-(CH_2)_x-C(O)-$, 또는 $-(CH_2)_w-C(O)-NH(CH_2)_y-C(O)-$ 이거나, 예를 들어, Y가 CR인 경우 $-NR^3-C(O)-$ 이고,

[0050] R은 독립적으로 H 또는 알킬이고,

[0051] R^2 는 독립적으로 H 또는 알킬이고,

[0052] R^3 , R^4 , R^5 및 R^6 는 독립적으로 H 또는 알킬이거나, R^4 및 R^5 는 함께 취해져 결합을 형성할 수 있거나, R^5 및 R^6 는 함께 취해져 결합을 형성할 수 있고,

[0053] R^{11} 은 H, 알킬, 또는 아실이고,

[0054] n은, 예를 들어, 1 내지 10, 또는 1 내지 9, 또는 1 내지 8, 또는 1 내지 7, 또는 1 내지 6, 또는 1 내지 5, 또는 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 내지 2, 또는 2 내지 10, 또는 2 내지 9, 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 7, 또는 2 내지 6, 또는 2 내지 5, 또는 2 내지 4, 또는 2 내지 3, 또는 3 내지 10, 또는 3 내지 9, 또는 3 내지 8, 또는 3 내지 7, 또는 3 내지 6, 또는 3 내지 5, 또는 3 내지 4, 또는 4 내지 10, 또는 4 내지 9, 또는 4 내지 8, 또는 4 내지 7, 또는 4 내지 6, 또는 4 내지 5, 또는 5 내지 10, 또는 5 내지 9, 또는 5 내지 8, 또는 5 내지 7, 또는 5 내지 6, 또는 6 내지 10, 또는 6 내지 9, 또는 6 내지 8, 또는 6 내지 7, 또는 7 내지 10, 또는 7 내지 9, 또는 7 내지 8, 또는 8 내지 10, 또는 8 내지 9, 또는 9 내지 10의 정수이고,

[0055] w는, 예를 들어, 0 내지 10, 1 내지 10, 또는 1 내지 9, 또는 1 내지 8, 또는 1 내지 7, 또는 1 내지 6, 또는 1 내지 5, 또는 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 내지 2, 또는 2 내지 10, 또는 2 내지 9, 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 7, 또는 2 내지 6, 또는 2 내지 5, 또는 2 내지 4, 또는 2 내지 3, 또는 3 내지 10, 또는 3 내지 9, 또는 3 내지 8, 또는 3 내지 7, 또는 3 내지 6, 또는 3 내지 5, 또는 3 내지 4, 또는 4 내지 10, 또는 4 내지 9, 또는 4 내지 8, 또는 4 내지 7, 또는 4 내지 6, 또는 4 내지 5, 또는 5 내지 10, 또는 5 내지 9, 또는 5 내지 8, 또는 5 내지 7, 또는 5 내지 6, 또는 6 내지 10, 또는 6 내지 9, 또는 6 내지 8, 또는 6 내지 7, 또는 7 내지 10, 또는 7 내지 9, 또는 7 내지 8, 또는 8 내지 10, 또는 8 내지 9, 또는 9 내지 10의 정수이고,

[0056] x는, 예를 들어, 1 내지 10, 또는 1 내지 9, 또는 1 내지 8, 또는 1 내지 7, 또는 1 내지 6, 또는 1 내지 5, 또는 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 내지 2, 또는 2 내지 10, 또는 2 내지 9, 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 7, 또는 2 내지 6, 또는 2 내지 5, 또는 2 내지 4, 또는 2 내지 3, 또는 3 내지 10, 또는 3 내지 9, 또는 3 내지 8, 또는 3 내지 7, 또는 3 내지 6, 또는 3 내지 5, 또는 3 내지 4, 또는 4 내지 10, 또는 4 내지 9, 또는 4

내지 8, 또는 4 내지 7, 또는 4 내지 6, 또는 4 내지 5, 또는 5 내지 10, 또는 5 내지 9, 또는 5 내지 8, 또는 5 내지 7, 또는 5 내지 6, 또는 6 내지 10, 또는 6 내지 9, 또는 6 내지 8, 또는 6 내지 7, 또는 7 내지 10, 또는 7 내지 9, 또는 7 내지 8, 또는 8 내지 10, 또는 8 내지 9, 또는 9 내지 10의 정수이고,

[0057] y는, 예를 들어, 1 내지 10, 또는 1 내지 9, 또는 1 내지 8, 또는 1 내지 7, 또는 1 내지 6, 또는 1 내지 5, 또는 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 내지 2, 또는 2 내지 10, 또는 2 내지 9, 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 7, 또는 2 내지 6, 또는 2 내지 5, 또는 2 내지 4, 또는 2 내지 3, 또는 3 내지 10, 또는 3 내지 9, 또는 3 내지 8, 또는 3 내지 7, 또는 3 내지 6, 또는 3 내지 5, 또는 3 내지 4, 또는 4 내지 10, 또는 4 내지 9, 또는 4 내지 8, 또는 4 내지 7, 또는 4 내지 6, 또는 4 내지 5, 또는 5 내지 10, 또는 5 내지 9, 또는 5 내지 8, 또는 5 내지 7, 또는 5 내지 6, 또는 6 내지 10, 또는 6 내지 9, 또는 6 내지 8, 또는 6 내지 7, 또는 7 내지 10, 또는 7 내지 9, 또는 7 내지 8, 또는 8 내지 10, 또는 8 내지 9, 또는 9 내지 10의 정수이고,

[0058] p는, 예를 들어, 1 내지 10, 또는 1 내지 9, 또는 1 내지 8, 또는 1 내지 7, 또는 1 내지 6, 또는 1 내지 5, 또는 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 내지 2, 또는 2 내지 10, 또는 2 내지 9, 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 7, 또는 2 내지 6, 또는 2 내지 5, 또는 2 내지 4, 또는 2 내지 3, 또는 3 내지 10, 또는 3 내지 9, 또는 3 내지 8, 또는 3 내지 7, 또는 3 내지 6, 또는 3 내지 5, 또는 3 내지 4, 또는 4 내지 10, 또는 4 내지 9, 또는 4 내지 8, 또는 4 내지 7, 또는 4 내지 6, 또는 4 내지 5, 또는 5 내지 10, 또는 5 내지 9, 또는 5 내지 8, 또는 5 내지 7, 또는 5 내지 6, 또는 6 내지 10, 또는 6 내지 9, 또는 6 내지 8, 또는 6 내지 7, 또는 7 내지 10, 또는 7 내지 9, 또는 7 내지 8, 또는 8 내지 10, 또는 8 내지 9, 또는 9 내지 10의 정수이고,

[0059] L은 연결기이고,

[0060] q는 0 또는 1이고,

[0061] Z는 OR^8 이며, 여기서 R^8 은 H, 알킬 또는 NR^9R^{10} 이며, 여기서 R^9 및 R^{10} 은 독립적으로 H 또는 알킬, 폴리(아미노산) 변역원성 담체 모이어티, 비-폴리(아미노산) 변역원성 담체 모이어티, 폴리(아미노산) 표지 모이어티, 비-폴리(아미노산) 표지 모이어티, 비-표지 폴리(아미노산) 모이어티, 비-변역원성 담체 폴리(아미노산) 모이어티, 또는 지지체이다.

[0062] 본원에서 사용되는 용어 "알킬"은 선형, 분지형, 또는 고리형 배치의 지정된 수의 탄소 원자의 알킬기를 포함한다. "알킬"의 예는, 비제한적으로, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 2차- 및 3차-부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 노르보르닐을 포함한다. 일부 예에서, 알킬은 1 내지 10개, 또는 1 내지 9개, 또는 1 내지 8개, 또는 1 내지 7개, 또는 1 내지 6개, 또는 1 내지 5개, 또는 1 내지 4개, 또는 1 내지 3개, 또는 1 내지 2개, 또는 2 내지 10개, 또는 2 내지 9개, 또는 2 내지 8개, 또는 2 내지 7개, 또는 2 내지 6개, 또는 2 내지 5개, 또는 2 내지 4개, 또는 2 내지 3개, 또는 3 내지 10개, 또는 3 내지 9개, 또는 3 내지 8개, 또는 3 내지 7개, 또는 3 내지 6개, 또는 3 내지 5개, 또는 3 내지 4개, 또는 4 내지 10개, 또는 4 내지 9개, 또는 4 내지 8개, 또는 4 내지 7개, 또는 4 내지 6개, 또는 4 내지 5개, 또는 5 내지 10개, 또는 5 내지 9개, 또는 5 내지 8개, 또는 5 내지 7개, 또는 5 내지 6개, 또는 6 내지 10개, 또는 6 내지 9개, 또는 6 내지 8개, 또는 6 내지 7개, 또는 7 내지 10개, 또는 7 내지 9개, 또는 7 내지 8개, 또는 8 내지 10개, 또는 8 내지 9개, 또는 9 내지 10개의 탄소 원자를 함유하며, 이는 비치환될 수 있거나, 이들 중 하나 이상은 하이드록시, 1 내지 5개, 또는 1 내지 4개, 또는 1 내지 3개, 또는 1 내지 2개, 또는 2 내지 5개, 또는 2 내지 4개, 또는 2 내지 3개, 또는 3 내지 5개, 또는 3 내지 4개, 또는 4 내지 5개의 탄소 원자의 알콕시 중 하나 이상에 의해 치환될 수 있다.

[0063] 본원에서 사용되는 용어 "아실"은 R^{12} 가 알킬 또는 아릴인 $R^{12}C(O)-$ 를 의미한다.

[0064] 본원에서 사용되는 용어 "아릴"은 하나의 원자의 제거에 의해 방향족 탄화수소로부터 유래되고, 하나 이상의 방향족 고리, 보통 1 내지 4개의 방향족 고리, 예를 들어, 페닐(벤젠으로부터의 페닐), 나프틸(나프탈렌으로부터의 나프틸) 등, 예를 들어, 페닐, 나프틸, 페난트릴을 함유하는 유기 라디칼(radical)을 의미한다.

[0065] 본원에서 사용되는 표현 "연결기"는 수소를 계수하지 않고 약 2 내지 약 50개의 원자, 또는 4 내지 약 30개의 원자를 포함할 수 있고, 일반적으로 탄소, 산소, 황, 질소, 및 인으로 구성되는 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 2 내지 약 30개의 원자, 또는 3 내지 약 20개의 원자의 사슬을 포함할 수 있는 화학 모이어티를 의미한다. 일부 예에서, 연결기의 일부 또는 전부는 연결되는 분자의 일부, 비제한적인 예로, 예를 들어, 폴리(아미노산) 상의 아미노산 잔기일 수 있다. 연결기 내의 헤테로원자(heteroatom)의 수는 0 내지 약 20개, 또는 1 내

지 약 15개, 또는 약 2 내지 약 10개의 범위 내일 수 있다. 연결기는 지방족 또는 방향족일 수 있다. 헤테로 원자가 존재하는 경우, 산소는 보통 탄소, 황, 질소 또는 인에 결합된 옥소 또는 옥시로 존재하고, 질소는 보통 탄소, 산소, 황 또는 인에 결합된 니트로, 니트로소 또는 아미노로 보통 존재하고; 황은 산소와 유사한 한편; 인은 보통 포스포네이트 및 포스페이트 모노(mono)- 또는 디에스테르(diester)로서 탄소, 황, 산소 또는 질소에 결합된다. 연결기와 컨주게이션되는(conjugated) 분자 사이에 공유 결합을 형성시키는데 있어서 일반적인 작용기는 알킬아민, 아미딘, 티오아미드, 에테르, 우레아, 티오우레아, 구아니딘, 아조, 티오에테르 및 카르복실레이트, 설포네이트, 및 포스페이트 에스테르, 아미드 및 티오에스테르이다.

[0066] 대부분의 경우, 연결기가 연결 작용기(모이어티와의 반응을 위한 작용기), 예를 들어, 비-옥소카르보닐기, 예를 들어, 질소 및 황 유사체, 포스페이트기, 아미노기, 알킬화제(alkylating agent), 예를 들어, 할로 또는 토실알킬, 옥시(하이드록실 또는 황 유사체, 머캡토) 옥소카르보닐(예를 들어, 알데하이드 또는 케톤), 또는 활성 올레핀, 예를 들어, 비닐 설폰 또는 α -, β -불포화 에스테르를 갖는 경우, 이들 작용기는 아민기, 카르복실기, 활성 올레핀, 알킬화제, 예를 들어, 브로모아세틸에 연결된다. 아민 및 카르복실산 또는 이의 질소 유도체 또는 인산이 연결되는 경우, 아미드, 아미딘 및 포스포라미드가 형성된다. 머캡탄 및 활성화 올레핀이 연결되는 경우, 티오에테르가 형성된다. 머캡탄 및 알킬화제가 연결되는 경우, 티오에테르가 형성된다. 알데하이드 및 아민이 환원 조건하에서 연결되는 경우, 알킬아민이 형성된다. 케톤 또는 알데하이드 및 하이드록실아민(치환기가 하이드록실기의 수소 대신에 존재하는 경우 이들의 유도체를 포함함)이 연결되는 경우, 옥심 작용기(=N-O-)가 형성된다. 카르복실산 또는 포스페이트산 및 알콜(alcohol)이 연결되는 경우, 에스테르가 형성된다.

[0067] 본원에서 사용되는 용어 "면역원성 담체"는 합텐에 컨주게이션되는 기 또는 모이어티를 의미한다. 면역원성 담체 및 합텐의 컨주게이트(conjugate)는 면역 반응을 유도할 수 있는 유기체, 비제한적인 예로, 포유동물, 조류(예를 들어, 닭 또는 비둘기), 양서류, 또는 파충류로 주입될 수 있거나; 컨주게이트는 시험관내 샘플(인간을 포함하는 포유동물, 조류, 양서류 또는 파충류)을 접종시키기 위해 이용될 수 있거나, 합텐에 대한 결합 파트너(binding partner)를 생성시키는 기술에서 달리 이용될 수 있다. 표현 "결합 파트너"는 특정 결합 쌍의 구성원인 분자를 의미하며, 이는 다른 분자에 특이적으로 결합하고 이에 의해 다른 분자와 상보적인 것으로 정의되는 2개의 상이한 분자 중 하나이다. 예를 들어, 특정 결합쌍의 한 구성원은 특정 결합 쌍의 다른 구성원의 특정한 공간적 및 극성 구성에 특이적으로 결합하는 표면 상 또는 공동 내 영역을 가질 수 있다. 결합 파트너는, 비제한적인 예로, 예를 들어, 항체 또는 앵타머(예를 들어, 핵산 앵타머(aptamer) 또는 펩티드(peptide) 앵타머)일 수 있다. 한 예에서, 면역원성 담체는 면역 반응을 유도하고 합텐에 대한 결합 파트너의 생성을 유도하기 위한 면역원으로 이용될 수 있다. 다른 기술은 파지 디스플레이(phage display) 및 시험관내 선택을 포함한다. 면역원성 담체는 때때로 항원성 담체로도 언급된다. 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예에서, 폴리(아미노산) 및 비-폴리(아미노산) 면역원성 담체를 포함하는 면역원성 담체를 포함하는 면역원이 합성되고, 항체를 제조하기 위해 이용된다. 합텐은 상응하는 항체에 특이적으로 결합할 수 있으나, 그 자체는 항체의 제조를 위한 면역원(또는 항원)으로 작용하지 않는 화합물이다. 결과적으로, 합텐은, 예를 들어, 항체를 발생시키기 위해 이용될 수 있는 면역원성 담체에 연결된다.

[0068] 면역원성 담체인 폴리(아미노산)에 대한 분자량 범위(달톤(Dalton))는, 예를 들어, 약 5,000 내지 약 10,000,000, 또는 약 20,000 내지 약 600,000, 또는 약 25,000 내지 약 250,000이다. "폴리(아미노산) 면역원성 담체 모이어티"는 단백질, 예를 들어, 알부민(albumin), 혈청 단백질, 예를 들어, 글로불린(globulin), 안구수정체 단백질 및 지질단백질을 포함한다. 예시적 단백질은, 예를 들어, 소 혈청 알부민(BSA: bovine serum albumin), 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH: keyhole limpet hemocyanin), 난(egg) 난알부민(ovalbumin), 및 소 감마-글로불린(BGG: bovine gamma-globulin)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. "비-폴리(아미노산) 면역원성 담체 모이어티"는 다당류, 핵산 및 입자(생물학적 및 합성 물질)를 포함한다. 매우 다양한 면역원성 담체가 참조로서 본원에 포함되는 문헌[Davalian, et al., 미국특허 5,089,390호, 컬럼(column) 4, 57열 내지 컬럼 5, 5열]에 기재되어 있다.

[0069] 상기 언급된 바와 같이, 면역원성 담체 모이어티는 자연적으로 또는 합성적으로 제조될 수 있고, 보통 다당류의 반복된 축합을 수반하는 다당류의 고분자량 중합체인 다당류일 수 있다. 다당류의 예는 전분, 글리코젠(glycogen), 셀룰로스(cellulose), 탄수화물 검(gum), 예를 들어, 아라비아 검(gum arabic), 아가(agar) 등이다. 다당류는 또한 폴리(아미노산) 잔기 및/또는 지질 잔기를 함유할 수 있다.

[0070] 본원에서 사용되는 용어 "표지"는 폴리(아미노산) 표지 및 비-폴리(아미노산) 표지를 포함한다. 용어 "폴리(아미노산) 표지 모이어티"는 단백질, 비제한적인 예로, 예를 들어, 효소, 항체, 펩티드, 및 면역원인 표지를 포함한다. 표지 단백질, 예를 들어, 효소를 이용할 때, 중량 평균 분자량 범위는 약 10,000 내지 약 600,000 또는

약 10,000 내지 약 300,000일 것이다. 예를 들어, 단백질의 약 200,000 분자량 당 본원에 기재된 원리에 따른 적어도 1개의 화합물(유사체 그룹), 또는 약 150,000 분자량 당 적어도 약 1개의 화합물(유사체 그룹), 또는 약 100,000 분자량 당 적어도 약 1개의 화합물(유사체 그룹), 또는 약 50,000 분자량 당 적어도 약 1개의 화합물(유사체 그룹), 또는 40,000 분자량 당 적어도 약 1개의 화합물(유사체 그룹), 또는 30,000 분자량 당 적어도 약 1개의 화합물(유사체 그룹), 또는 20,000 분자량 당 적어도 1개의 화합물(유사체 그룹), 또는 10,000 분자량 당 적어도 하나의 화합물(유사체 그룹), 또는 5,000 분자량 당 적어도 1개의 화합물(유사체 그룹)이 보통 존재한다. 효소의 경우, 유사체 그룹의 수는 보통 1 내지 약 20, 약 2 내지 약 15, 약 3 내지 약 12, 또는 약 6 내지 약 10이다.

[0071] 효소는, 비제한적인 예로, 예를 들어, 산화환원 효소, 예를 들어, 데하이드로게나제(dehydrogenase), 예를 들어, 글루코스-6-포스페이트 데하이드로게나제(G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase) 및 락테이트(lactate) 데하이드로게나제; 과산화수소의 생성 및 염료 전구체를 염료로 산화시키기 위한 과산화수소의 사용을 수반하는 효소, 예를 들어, 호스라디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase), 락토퍼옥시다제(lactoperoxidase) 및 마이크로퍼옥시다제(microperoxidase); 가수분해효소, 예를 들어, 알칼리성 포스파타제(alkaline phosphatase) 및 β -갈락토시다제(β -galactosidase); 루시페라제(luciferase), 예를 들어, 개뿔벌레 루시페라제, 및 박테리아 루시페라제(bacterial luciferase); 전이효소; 염료 전구체를 산화시키기 위해 과산화수소를 이용하는 효소, 즉, 퍼옥시다제, 예를 들어, 호스라디쉬 퍼옥시다제, 락토퍼옥시다제 또는 마이크로퍼옥시다제와 커플링된(coupled) 효소, 비제한적인 예로, 당류 산화효소, 예를 들어, 글루코스 및 갈락토스(galactose) 산화효소, 또는 헤테로사이클릭 산화효소(heterocyclic oxidase), 예를 들어, 요산분해효소 및 잔틴 산화효소(xanthine oxidase)의 조합물을 포함한다.

[0072] 본원에서 사용되는 용어 "비-폴리(아미노산) 표지"는 단백질이 아닌 표지를 포함한다. 비-폴리(아미노산) 표지는 직접 검출될 수 있거나, 검출 가능한 신호를 발생시키는 반응을 통해 검출 가능하다. 비-폴리(아미노산) 표지는 동위원소 또는 비-동위원소일 수 있으며, 비제한적인 예로, 예를 들어, 방사성동위원소, 발광 화합물(예를 들어, 형광 화합물 및 화학발광 화합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않음), 촉매를 코딩하는(coding) 폴리뉴클레오티드(polynucleotide), 프로모터(promoter), 염료, 보조효소, 효소 기질, 방사성 기, 유기 소분자(분자량 200 내지 2,000), 입자, 및 증폭 가능한 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있다.

[0073] 상기 언급된 바와 같은, "유기 소분자"는 약 200 내지 약 2,000, 또는 약 200 내지 약 1,500, 또는 약 200 내지 약 1,000, 또는 약 200 내지 약 500의 분자량을 갖는다. 상기 "유기 소분자"는, 비제한적인 예로, 예를 들어, 바이오틴(biotin), 형광 분자(예를 들어, 플루오레세인(fluorescein) 및 로다민(rhodamine)), 화학발광 분자, 및 디니트로페놀(dinitrophenol)을 포함한다. 유기 소분자에 대한 결합 파트너는 소분자를 특이적으로 인지하고 이에 결합하는 분자이다. 소분자에 대한 결합 파트너는 소분자의 특성에 의해 규정되며, 비제한적인 예로, 예를 들어, 아비딘(avidine), 스트렙타비딘(streptavidin), 유기 소분자에 대한 항체(비제한적인 예로, 예를 들어, 형광 분자에 대한 항체(예를 들어, 플루오레세인에 대한 항체 및 로다민에 대한 항체), 화학발광 분자에 대한 항체, 및 디니트로페놀에 대한 항체를 포함한다.

[0074] 본원에서 사용되는 용어 "비-표지 폴리(아미노산) 모이어티" 및 "비-면역원성 담체 폴리(아미노산) 모이어티"는 보통 표지 또는 면역원성 담체로 간주되지 않는 폴리(아미노산)를 의미하나, 상기 모이어티는 특정 상황에서 표지 또는 면역원성 담체일 수 있다. 예를 들어, 항체는 표지로 간주되지 않을 수 있으나, 항체가 신호 생성 모이어티 또는 신호 생성 시스템(system)의 일부를 포함하도록 변형되는 경우 표지일 수 있다. 또한, 항체는 면역원성 담체로 간주되지 않을 수 있으나, 그럼에도 불구하고 이의 높은 분자량으로 인해 특정 상황에서 면역원성 담체가 될 수 있다.

[0075] 일부 예에서, 비-폴리(아미노산) 표지는 지지체, 자성 입자, 아크리디늄 에스테르(acridinium ester), 자성 입자와 아크리디늄 에스테르의 조합물(예를 들어, 아크리디늄 에스테르 표지된 상자성 입자), 화학발광 입자 및 증감제 입자로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0076] 용어 "공유"는, 예를 들어, 직접 연결에 의한, 예를 들어, 분자 사이의 화학 결합에 의한 분자의 부착을 의미한다. 용어 "비-공유"는 분자에 부착되는 상보적인 특정 결합쌍(sbp: specific binding pair) 구성원 사이의 특정 결합을 수반하는 분자의 부착을 의미한다.

[0077] 일부 예에서, 본원에 기재된 원리에 따른 화합물은, 예를 들어, 공유 또는 비-공유 결합에 의해 지지체와 회합될 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예에서, Z는 유기 또는 무기, 고체 또는 유체, 수 불용성 물질로 구성될 수 있고, 투명하거나 부분적으로 투명할 수 있는 지지체일 수 있다. 지지체는

다수의 형태, 비제한적인 예로, 예를 들어, 입자(미립자 지지체), 예를 들어, 비드(bead), 필름(film), 막, 관, 웰(well), 스트립(strip), 막대, 섬유, 또는 평면 표면, 예를 들어, 판 또는 종이 중 임의의 형태를 가질 수 있다. 지지체는 이용되는 매질 중에 현탁 가능하거나 현탁 가능하지 않을 수 있다. 현탁 가능한 지지체의 예는, 예를 들어, 중합 물질, 예를 들어, 라텍스(latex), 지질 이중층 또는 리포솜(liposome), 오일 비말(oil droplet), 셀(cell) 및 하이드로겔(hydrogel), 및 자성 입자이다. 다른 지지체 조성물은 단독으로 사용되거나 다른 물질과 함께 사용되는 중합체, 비제한적인 예로, 예를 들어, 니트로셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트, 폴리(비닐 클로라이드), 폴리아크릴아미드, 폴리아크릴레이트, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리(4 메틸부텐), 폴리스티렌, 폴리메타크릴레이트, 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 나일론(nylon), 폴리(비닐 부티레이트)를 포함한다. 지지체는, 예를 들어, 염료, 촉매 또는 다른 검출 가능한 기로 추가로 표시될 수 있거나, 추가로 표시되지 않을 수 있다.

[0078] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예에서, 지지체는 입자일 수 있다. 입자는 적어도 약 0.02 마이크론(micron) 및 약 100 마이크론 이하의 평균 직경을 갖는다. 일부 예에서, 입자는 약 0.05 마이크론 내지 약 20 마이크론, 또는 약 0.3 마이크론 내지 약 10 마이크론의 평균 직경을 갖는다. 입자는 바람직하게는 물에 근접한 밀도, 일반적으로 약 0.7 g/mL 내지 약 1.5 g/mL의 유기 또는 무기, 팽창성 또는 비-팽창성, 다공성 또는 비-다공성 입자일 수 있으며, 이는 투명하거나, 부분적으로 투명하거나, 불투명할 수 있는 물질로 구성될 수 있다. 입자는, 예를 들어, 생물학적 물질, 예를 들어, 세포 및 미생물, 예를 들어, 적혈구, 백혈구, 림프구(lymphocyte), 하이브리도마(hybridoma), 스트렙토코커스(streptococcus), 스태필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus), 및 E. 콜리(E. coli), 바이러스(virus)일 수 있다. 입자는 또한 유기 및 무기 중합체, 리포솜, 라텍스 입자, 자성 또는 비-자성 입자, 인지질 소포, 킬로미크론(chylomicron), 지질단백질 등으로 구성된 입자일 수 있다. 일부 예에서, 입자는 크로뮴 디옥사이드(chromium dioxide)(크롬(chrome)) 입자 또는 라텍스 입자이다.

[0079] 자성 입자는 상자성 입자, 강자성 입자 및 반자성 입자를 포함한다. 상기 입자는, 비제한적인 예로, 예를 들어, 크롬, 구리, 코발트(cobalt), 알루미늄(aluminum), 망간(manganese), 철, 및 니켈(nickel)을 포함하는 주기율표의 4-7주기의 전이 금속을 포함한다.

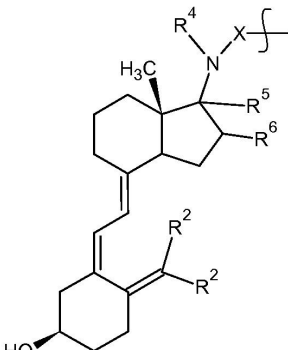
[0080] 화학발광 입자는 화학발광 화합물과 회합된 입자이다. 본원에서 사용되는 표현 "-와 회합된"은 화합물, 예를 들어, 화학발광 화합물 및 입자가, 예를 들어, 직접 또는 간접 결합, 흡착, 흡수, 혼입, 또는 용해에 의해 회합될 수 있는 것을 의미한다. 이용될 수 있는 화학발광 화합물의 예는 관련 개시내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 5,340,716호 및 6,251,581호에 기재된 것이다. 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예에서, 화학발광 화합물은 광에 의한 직접 또는 감광 여기시(excitation) 또는 일중항(singlet) 산소와의 반응시 화학 반응을 겪어 보통 250 내지 1200 nm의 파장 범위 내의 광의 동시 또는 후속 방출과 함께 분해될 수 있는 준안정 반응 생성물을 형성하는 광활성화 가능한 물질이다. 용어 "광활성화 가능한"은 "광화학적으로 활성화 가능한"을 포함한다. 일부 예에서, 화학발광 화합물은 일중항 산소와 반응하여 디옥세탄 또는 디옥세타논을 형성하는 화합물이다. 후자는 보통 전자 풍부 올레핀이다. 상기 전자 풍부 올레핀의 예는 에놀 에테르, 에나민, 9-알킬리덴-N-알킬아크리단, 아릴비닐에테르, 디옥센, 아릴이미다졸, 9-알킬리덴-잔탄 및 루시게닌(lucigenin)이다. 다른 화합물은 루미놀(luminol) 및 다른 프탈하이드라지드(phthalhydrazide), 및 광화학적으로 불안정한 보호기에 의해 보호됨으로써 화학발광 반응을 겪는 것으로부터 보호되는 화학발광 화합물을 포함하며, 상기 화합물은, 예를 들어, 개뿔벌레 루시페린(luciferin), 아쿠아포르인(aquaphorin), 및 루미놀을 포함한다. 이용될 수 있는 상기 화학발광 화합물의 예는 관련 개시내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 5,709,994호에 기재된 것이다.

[0081] 증감제 입자는, 광증감제 화합물을 포함하나 이에 제한되지 않는 증감제 화합물과 회합된 입자이다. 이용될 수 있는 증감제 화합물의 예는 관련 개시내용이 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 5,340,716호 및 6,251,581호에 기재된 것이다.

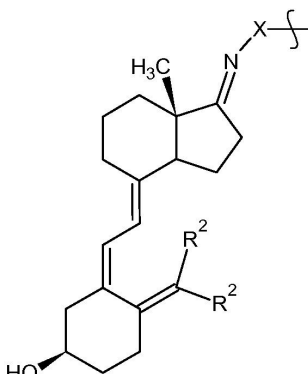
[0082] 광증감제는 보통 광에 의한 여기에 의한 일중항 산소의 생성을 위한 증감제이다. 일부 예에서, 광증감제는 화학발광 화합물보다 긴 파장에서 흡수되며, 화학발광 화합물보다 더 낮은 삼중항 에너지를 갖는다. 광증감제는 광활성화 가능할 수 있다(예를 들어, 염료 및 방향족 화합물). 광증감제는 보통 다수의 건유게이션된 이중 또는 삼중 결합을 갖는 보통 공유적으로 결합된 원자로 구성된 화합물이다. 화합물은 200-1100 nm, 보통 300-1000 nm, 바람직하게는 450-950 nm의 파장 범위에서 광을 흡수해야 한다. 통상적인 광증감제는 예를 들어, 아세톤, 벤조페논, 9-티옥산톤, 에오신, 9,10-디브로모안트라센, 메틸렌 블루(methylene blue), 메탈로포르피린(예를 들어, 헤마토포르피린), 프탈로시아닌, 염록소, 로즈 벵갈(rose bengal), 버크민스터풀러렌(buckminsterfullerene), 및 이들 화합물의 유도체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다른 광증감제의 예

는 문헌[N.J. Turro, "Molecular Photochemistry", page 132, W. A. Benjamin Inc., N.Y. 1965]에 열거되어 있다. 광증감제는 광활성화를 도우며, 활성화는 일중항 산소에 의해 발생한다. 보통, 광증감제는 광을 흡수하며, 이에 따라 형성된 여기된 광증감제는 산소를 활성화시켜 일중항 산소를 발생시키고, 이는 화학발광 화합물과 반응하여 준안정 발광 중간체를 제공한다.

[0083] 본원에 기재된 화학식에서, 결합 사이의 구불구불한 선은 화학식에서 모이어티의 부착점을 나타낸다.



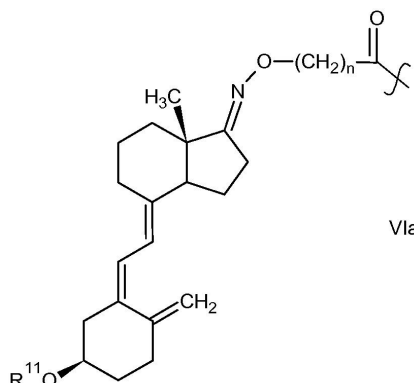
[0084] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 R¹이 HO 또는 H이고, 여기서 적어도 하나의 R¹이 H가 아닌 화학식 I의 화합물인, 화학식 IV의 화합물; 및 상기 화합물 중 2개 이상의 혼합물을 포함하는 화합물에 관한 것이다.



[0085] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 R¹이 HO 또는 H이고, 여기서 적어도 하나의 R¹이 H가 아닌 화학식 I의 화합물인, 화학식 V의 화합물 또는 (7a*S*,*E*)-4-((*Z*)-2-((*R*)-5-하이드록시-2-메틸렌-사이클로헥실렌)에틸리텐)-7a-메틸옥타하이드로-1*H*-인덴-1-온의 유도체(HMCHEMOIO 유도체); 및 상기 화합물 중 2개 이상의 혼합물을 포함하는 상기 화합물에 관한 것이다.

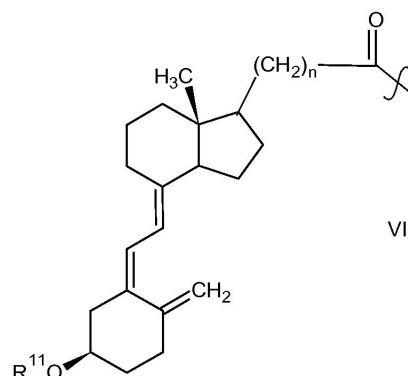
[0086] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는,

[0087] (R¹)_p-(L)_q-가 NHR¹-(CH₂)_r-NR¹-((CH₂)_r-NR¹)_s-(CH₂)_r-NR⁷-이고, 여기서 R¹이 독립적으로



VIa

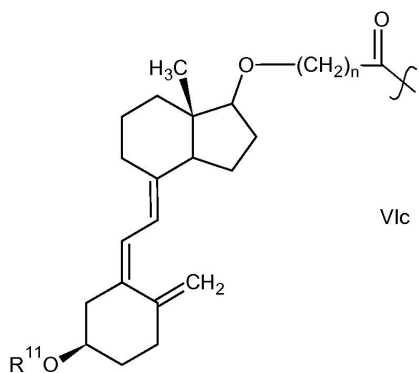
또는



VIb

또는

[0088]



VIc

또는 H이고,

[0089] 여기서, 적어도 하나의 R^1 이 H가 아니고,

[0090] p, q 및 n이 상기 정의된 바와 같고,

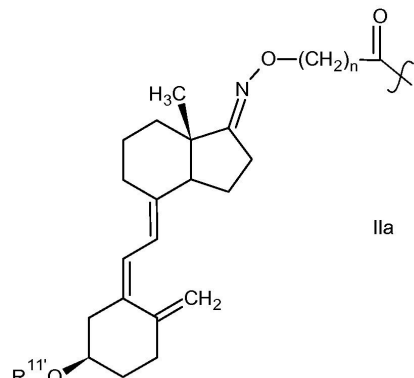
[0091] r이 독립적으로, 예를 들어, 1 내지 10, 또는 1 내지 9, 또는 1 내지 8, 또는 1 내지 7, 또는 1 내지 6, 또는 1 내지 5, 또는 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 내지 2, 또는 2 내지 10, 또는 2 내지 9, 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 7, 또는 2 내지 6, 또는 2 내지 5, 또는 2 내지 4, 또는 2 내지 3, 또는 3 내지 10, 또는 3 내지 9, 또는 3 내지 8, 또는 3 내지 7, 또는 3 내지 6, 또는 3 내지 5, 또는 3 내지 4, 또는 4 내지 10, 또는 4 내지 9, 또는 4 내지 8, 또는 4 내지 7, 또는 4 내지 6, 또는 4 내지 5, 또는 5 내지 10, 또는 5 내지 9, 또는 5 내지 8, 또는 5 내지 7, 또는 5 내지 6, 또는 6 내지 10, 또는 6 내지 9, 또는 6 내지 8, 또는 6 내지 7, 또는 7 내지 10, 또는 7 내지 9, 또는 7 내지 8, 또는 8 내지 10, 또는 8 내지 9, 또는 9 내지 10의 정수이고,

[0092] s가, 예를 들어, 1 내지 10, 또는 1 내지 9, 또는 1 내지 8, 또는 1 내지 7, 또는 1 내지 6, 또는 1 내지 5, 또는 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 내지 2, 또는 2 내지 10, 또는 2 내지 9, 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 7, 또는 2 내지 6, 또는 2 내지 5, 또는 2 내지 4, 또는 2 내지 3, 또는 3 내지 10, 또는 3 내지 9, 또는 3 내지 8, 또는 3 내지 7, 또는 3 내지 6, 또는 3 내지 5, 또는 3 내지 4, 또는 4 내지 10, 또는 4 내지 9, 또는 4 내지 8, 또는 4 내지 7, 또는 4 내지 6, 또는 4 내지 5, 또는 5 내지 10, 또는 5 내지 9, 또는 5 내지 8, 또는 5 내지 7, 또는 5 내지 6, 또는 6 내지 10, 또는 6 내지 9, 또는 6 내지 8, 또는 6 내지 7, 또는 7 내지 10, 또는 7 내지 9, 또는 7 내지 8, 또는 8 내지 10, 또는 8 내지 9, 또는 9 내지 10의 정수이고,

[0093] R^7 이 H 또는 알킬인, 화학식 I의 화합물인 화학식 VI의 화합물; 및 상기 화합물 중 2개 이상의 혼합물을 포함하는 화합물에 관한 것이다.

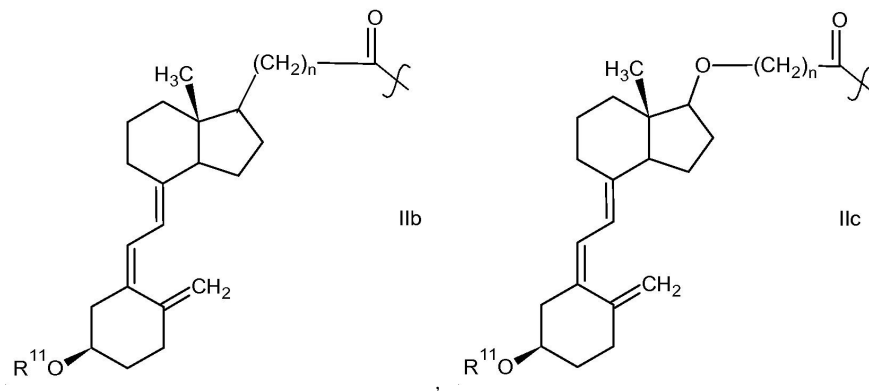
[0094] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 화학식 II: $NHR^{1'}-(CH_2)_r-NR^{1''}-((CH_2)_r-NR^{1'''})_s-(CH_2)_r-NR^{7'}-Z'$ 의 화합물; 및 상기 화합물 중 2개 이상의 혼합물을 포함하는 화합물에 관한 것이다:

[0095] 상기 식에서,



IIa

[0096] $R^{1'}$, $R^{1''}$ 또는 $R^{1'''}$ 은 각각 독립적으로



및 H로 구성된 군으로부터 선택

되고,

[0097] 여기서, $R^{1'}$, $R^{1''}$ 또는 $R^{1'''}$ 중 적어도 하나는 H가 아니고,

[0098] n 및 w는 상기 정의된 바와 같고,

[0099] r' 은 독립적으로, 예를 들어, 1 내지 10, 또는 1 내지 9, 또는 1 내지 8, 또는 1 내지 7, 또는 1 내지 6, 또는 1 내지 5, 또는 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 내지 2, 또는 2 내지 10, 또는 2 내지 9, 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 7, 또는 2 내지 6, 또는 2 내지 5, 또는 2 내지 4, 또는 2 내지 3, 또는 3 내지 10, 또는 3 내지 9, 또는 3 내지 8, 또는 3 내지 7, 또는 3 내지 6, 또는 3 내지 5, 또는 3 내지 4, 또는 4 내지 10, 또는 4 내지 9, 또는 4 내지 8, 또는 4 내지 7, 또는 4 내지 6, 또는 4 내지 5, 또는 5 내지 10, 또는 5 내지 9, 또는 5 내지 8, 또는 5 내지 7, 또는 5 내지 6, 또는 6 내지 10, 또는 6 내지 9, 또는 6 내지 8, 또는 6 내지 7, 또는 7 내지 10, 또는 7 내지 9, 또는 7 내지 8, 또는 8 내지 10, 또는 8 내지 9, 또는 9 내지 10의 정수이고,

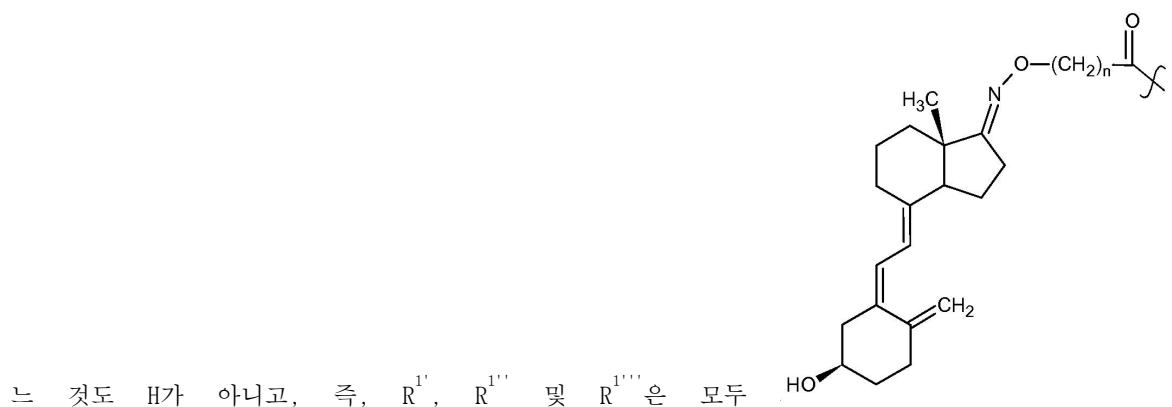
[0100] s' 은, 예를 들어, 1 내지 10, 또는 1 내지 9, 또는 1 내지 8, 또는 1 내지 7, 또는 1 내지 6, 또는 1 내지 5, 또는 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 내지 2, 또는 2 내지 10, 또는 2 내지 9, 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 7, 또는 2 내지 6, 또는 2 내지 5, 또는 2 내지 4, 또는 2 내지 3, 또는 3 내지 10, 또는 3 내지 9, 또는 3 내지 8, 또는 3 내지 7, 또는 3 내지 6, 또는 3 내지 5, 또는 3 내지 4, 또는 4 내지 10, 또는 4 내지 9, 또는 4 내지 8, 또는 4 내지 7, 또는 4 내지 6, 또는 4 내지 5, 또는 5 내지 10, 또는 5 내지 9, 또는 5 내지 8, 또는 5 내지 7, 또는 5 내지 6, 또는 6 내지 10, 또는 6 내지 9, 또는 6 내지 8, 또는 6 내지 7, 또는 7 내지 10, 또는 7 내지 9, 또는 7 내지 8, 또는 8 내지 10, 또는 8 내지 9, 또는 9 내지 10의 정수이고,

[0101] $R^{7'}$ 은 H 또는 알킬이고,

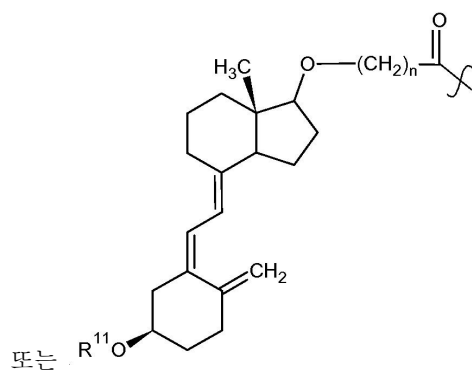
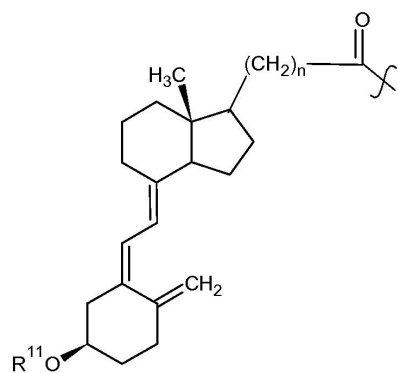
[0102] $R^{11'}$ 은 H, 알킬, 또는 아실이고,

[0103] Z' 은 폴리(아미노산) 면역원성 담체, 비-폴리(아미노산) 면역원성 담체, 폴리(아미노산) 표지 모이어티, 비-폴리(아미노산) 표지 모이어티, 비-표지 폴리(아미노산) 모이어티, 비-면역원성 담체 폴리(아미노산) 모이어티, 또는 지지체이다.

[0104] 일부 예에서, s' 은 1이다. 일부 예에서, $R^{7'}$ 은 H이다. 일부 예에서, r' 은 2이다. 일부 예에서, $R^{1''}$ 및 $R^{1'''}$ 은 H이고; 일부 예에서, $R^{1'}$ 및 $R^{1'''}$ 은 H이고; 일부 예에서, $R^{1'}$ 및 $R^{1''}$ 은 H이다. 일부 예에서, $R^{1'}$, $R^{1''}$ 및 $R^{1'''}$ 은

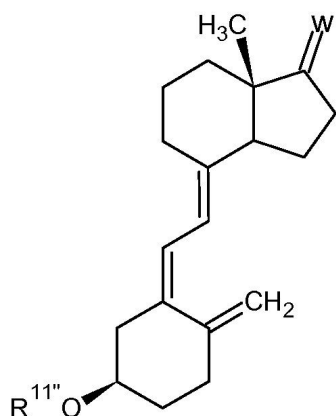


는 것도 H가 아니고, 즉, $R^{1'}$, $R^{1''}$ 및 $R^{1'''}$ 은 모두 HO 또는



또는 이다.

[0105] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 하기 화학식 III의 화합물; 및 상기 화합물 중 2개 이상의 혼합물을 포함하는 화합물에 관한 것이다:



[0106]

[0107] 상기 식에서,

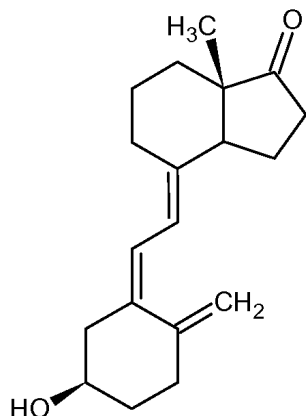
[0108] W는 O 또는 $N-O-(CH_2)_n-C(O)-Z''$ 이며,

[0109] n"는 예를 들어, 1 내지 10, 또는 1 내지 9, 또는 1 내지 8, 또는 1 내지 7, 또는 1 내지 6, 또는 1 내지 5, 또는 1 내지 4, 또는 1 내지 3, 또는 1 내지 2, 또는 2 내지 10, 또는 2 내지 9, 또는 2 내지 8, 또는 2 내지 7, 또는 2 내지 6, 또는 2 내지 5, 또는 2 내지 4, 또는 2 내지 3, 또는 3 내지 10, 또는 3 내지 9, 또는 3 내지 8, 또는 3 내지 7, 또는 3 내지 6, 또는 3 내지 5, 또는 3 내지 4, 또는 4 내지 10, 또는 4 내지 9, 또는 4 내지 8, 또는 4 내지 7, 또는 4 내지 6, 또는 4 내지 5, 또는 5 내지 10, 또는 5 내지 9, 또는 5 내지 8, 또는 5 내지 7, 또는 5 내지 6, 또는 6 내지 10, 또는 6 내지 9, 또는 6 내지 8, 또는 6 내지 7, 또는 7 내지 10, 또는 7 내지 9, 또는 7 내지 8, 또는 8 내지 10, 또는 8 내지 9, 또는 9 내지 10의 정수이고,

[0110] $R^{11''}$ 은 H, 알킬, 또는 아실이고,

[0111] Z'' 는 OR^8 이고, 여기서, R^8 은 H, 알킬 또는 NR^9R^{10} 이며, 여기서 R^9 및 R^{10} 은 독립적으로 H 또는 알킬이다.

[0112] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 하기 화학식 VII의 화합물에 관한 것이다:



[0113]

[0114] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 상기 정의된 화합물, 예를 들어, 화학식 III의 화합물 및 화학식 VII의 화합물, 및 상기 화합물 중 2개 이상의 혼합물을 포함하는 상기 화합물 중 하나 이상을 유효량으로 포함하는 약제 조성물에 관한 것이다.

[0115] 화합물의 제조

[0116] 본원에 기재된 원리에 따른 HMCHEMOIO 유도체인 화합물을 제조하는 방법의 예는 비제한된 예로서 하기 논의되어 있다. 상기 화합물 및 본원에 기재된 원리와 일치하는 다른 화합물을 형성시키기 위해 다른 접근법이 이용될 수 있다.

[0117] 화학식 VII의 화합물((7a*S*,*E*)-4-((*Z*)-2-((*R*)-5-하이드록시-2-메틸렌사이클로헥실리덴)에틸리덴)-7a-메틸옥타하이드로-1*H*-인덴-1-온)의 제조의 예는 도 2에 기재되어 있다. 도 2를 참조하여, R¹⁰가 아세틸인 화학식 VIII의 화합물은 화학식 IX의 케탈을 형성하도록 처리된다. 한 예에서, 화학식 VIII의 화합물은 케탈을 형성시키기 위한 조건(온도 및 시간)하에서 강한 유기산, 예를 들어, *p*-톨루엔 설폰산의 존재하에서 방향족 용매, 예를 들어, 벤젠 중에서 에틸렌 글리콜로 처리된다. 일부 예에서, 반응은 약 10시간 내지 약 24시간, 또는 약 12 내지 약 20시간의 기간 동안 환류하에서 수행된다.

[0118] 화학식 IX의 화합물은 할라이드 기, 예를 들어, 클로라이드 기 또는 브로마이드 기를 도입하도록 처리된다. 한 예에서, 화학식 IX의 화합물은, 예를 들어, 화학식 IX의 화합물로 브로마이드 기를 도입시키기 위한 조건하에서 유기 용매, 예를 들어, 알칸(예를 들어, 헥산) 중에서 *N*-브로모석신이미드 및 자유 라디칼 개시자, 예를 들어, 아조비스이소부티로니트릴로 처리되어, 화학식 X의 화합물을 제공한다. 일부 예에서, 반응은 약 30분 동안 환류하에서 수행된다.

[0119] 화학식 X의 화합물의 할라이드는 제거되어 컨쥬게이션된 2개의 이중 결합을 갖는 화학식 XI의 화합물을 제공한다. 한 예에서, 화학식 X의 화합물은, 예를 들어, 하이드로겐 할라이드를 제거하기 위한 조건하에서 극성 유기 용매, 예를 들어, 에테르(예를 들어, 테트라하이드로푸란) 중에서 약한 염기, 예를 들어, 테트라-*n*-부틸암모늄 플루오라이드로 처리되어, 이중 결합을 형성한다(화학식 XI의 화합물). 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 2시간이다.

[0120] 화학식 XI의 화합물의 아세틸기(R¹¹)는 극성 유기 용매, 예를 들어, 알칸올(예를 들어, 메탄올 또는 에탄올) 중에서 무기 염기, 예를 들어, 소듐 하이드록시드(sodium hydroxide) 또는 포타슘 하이드록시드(potassium hydroxide)를 이용한 처리에 의해 제거된다. 반응 구성요소는 아세틸기를 제거하기 위한 조건으로 처리되어, 화학식 XII의 화합물을 제공한다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃, 또는 실온이다. 반응의 기간은 약 4시간 내지 약 8시간이다.

[0121] 화학식 XII의 화합물의 케탈기는, 예를 들어, 케탈을 제거하기 위한 조건하에서 물과 극성 유기 용매, 예를 들어, 아세톤의 혼합물 중에서 강한 유기산, 예를 들어, *p*-톨루엔 설폰산을 이용하여 제거되어, 화학식 XIII의 화합물을 생성시킨다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 12시간 내지 약 48시간이다.

- [0122] 화학식 VII의 화합물은 화학식 XIII의 고리를 개방시키기 위한 조건하에서 극성 유기 용매, 예를 들어, 알칸올(예를 들어, 메탄올 또는 에탄올), 에테르(예를 들어, 에틸 에테르), 케톤(예를 들어, 아세톤), 또는 상기 중 2개 이상의 조합물 중에서 화학식 XIII의 화합물을 고리를 개방시키기 위한 시약을 이용한 처리, 예를 들어, UV 광을 이용한 처리(광 반응)에 의해 형성된다. 일부 예에서, 광 반응 동안의 온도는 약 -20℃ 내지 약 0℃이다. 광 반응의 기간은 약 1 내지 약 10분, 또는 약 3 내지 약 5분이다. 광 반응에 이어 약 3시간 동안 에탄올 중에서 중간체를 환류시키는 것이 후속된다.
- [0123] 도 3은, 비제한적인 예로, 화학식 IIa의 화합물(여기서, Z는, 비제한적인 예로, BSA임)을 제조하는 방법의 예를 도시한다. 도 3을 참조하여, 화학식 VII의 화합물은 아미노옥시아세트산(XIX)과 반응하여 화학식 XX의 옥심(2-((7aS,E)-4-((Z)-2-((R)-5-하이드록시-2-메틸렌사이클로헥실리덴)에틸리덴)-7a-메틸옥타하이드로-1H-인덴-1-일리덴아미노옥시)아세트산)을 형성한다. 반응은 옥심을 형성시키기 위한 조건하에서 유기 용매, 예를 들어, 알콜(예를 들어, 메탄올 또는 에탄올) 중에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 10℃ 내지 약 30℃, 또는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 1시간 내지 약 30시간, 또는 약 2시간 내지 약 24시간이다.
- [0124] 별개의 반응에서, 폴리(아미노)산 번역원성 담체(본 예에서, 비제한적인 예로, BSA임(화학식 II의 Z'은 BSA임))는 화학식 XXI의 화합물과 조합되어 화학식 XXIa의 화합물을 형성한다. 반응은 약 5.0 내지 약 7.0, 또는 약 5.5 내지 약 6.5, 또는 약 6의 pH의 수성 완충 매질 중에서 수행된다. BSA의 카르복실산 작용기와 XXI의 아민기(들) 중 하나 이상의 반응을 촉진시키기 위한 활성화제가 반응 매질에 포함된다. 상기 커플링 작용제(coupling agent)는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드(EDAC), N-하이드록시석신이미드(NHS), 또는 N,N,N',N'-테트라메틸-O-(N-석신이미딜)우로늄 테트라플루오로보레이트, 또는 상기 중 2개 이상의 조합물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 반응은 아마이드를 형성시키기 위한 조건하에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은, 예를 들어, 약 3시간 내지 약 24시간, 또는 약 4시간 내지 약 20시간, 또는 약 4시간 내지 약 10시간이다.
- [0125] 화학식 XX의 화합물은, 예를 들어, 활성화제, 비제한적인 예로, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDAC), N-하이드록시석신이미드(NHS), 또는 N,N,N',N'-테트라메틸-O-(N-석신이미딜)우로늄 테트라플루오로보레이트, 또는 상기 중 2개 이상의 조합물로 처리되어 활성화된 XX를 형성한다. 반응은 물을 또한 함유할 수 있는 극성 유기 용매, 예를 들어, 알칸올(예를 들어, 메탄올 또는 에탄올), 에테르(예를 들어, 에틸 에테르 또는 테트라하이드로푸란), 케톤(예를 들어, 아세톤), 디메틸설폭사이드, 아세토니트릴, 디클로로메탄, 또는 디메틸포름아미드(DMF), 또는 상기 중 2개 이상의 조합물에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 30℃, 또는 약 20℃ 내지 약 25℃, 또는 대략 실온이다. 반응의 기간은 약 12시간 내지 약 36시간, 또는 약 20 내지 약 30시간이다. 활성화된 XX는 화학식 XXIa의 화합물과 반응되어 화학식 IIa의 화합물을 제공한다. 제시된 바와 같이, R^{1'}은 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, R^{1''} 및 R^{1'''}은 각각 H이다. 그러나, 본원에 기재된 원리와 일치하게, 생성된 생성물은 혼합물의 한 화합물에서 R^{1'}이 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, 혼합물의 또 다른 화합물에서 R^{1'} 및 R^{1'} 둘 모두가 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, 혼합물의 또 다른 화합물에서 R^{1'} 및 R^{1'''} 둘 모두가 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, 혼합물의 또 다른 화합물에서 R^{1'} 및 R^{1'''} 및 R^{1'''} 3개 모두가 화학식 IIa의 화합물의 모이어티인 화합물의 혼합물일 수 있다. 반응은 예를 들어, 아마이드를 형성시키기 위한 조건하에서 유기 용매, 예를 들어, DMF 또는 DMSO 중에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 30℃, 또는 약 20℃ 내지 약 25℃, 또는 대략 실온이다. 반응의 기간은 약 12시간 내지 약 36시간, 또는 약 20 내지 약 30시간이다.
- [0126] 도 4는, 비제한적인 예로, 화학식 VIa의 화합물의 제조 및 화학식 VIa의 화합물의 화학식 IIa의 화합물(여기서, Z는, 비제한적인 예로, BSA임)로의 전환 방법의 대안적 예를 도시한다. 도 4를 참조하여, 화학식 VII의 화합물은 아미노옥시아세트산(XIX)과 반응하여 화학식 XX의 옥심을 형성한다. 반응은 옥심을 형성시키기 위한 조건하에서 유기 용매, 예를 들어, 알콜(예를 들어, 메탄올 또는 에탄올) 중에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 10℃ 내지 약 30℃, 또는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 1시간 내지 약 30시간, 또는 약 2시간 내지 약 24시간이다.
- [0127] 화학식 XX의 옥심은 화학식 XXI의 화합물과 조합되어 화학식 VIa의 화합물을 형성한다. 반응은 아마이드를 형성시키기 위한 조건하에서 유기 용매, 예를 들어, 알칸(예를 들어, 헥산 또는 펜탄) 중에서 수행된다. 일부 예

서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 10시간 내지 약 48시간이다.

[0128] 화학식 VIa의 화합물은 폴리(아미노)산 면역원성 담체(화학식 II의 Z'은, 비제한적인 예로, BSA임)와 반응되어 화학식 IIa의 화합물을 제공한다. 제시된 바와 같이, R^{1'}은 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, R^{1''} 및 R^{1'''}은 각각 H이다. 그러나, 본원에 기재된 원리와 일치하게, 생성된 생성물은 혼합물의 한 화합물에서 R^{1'}이 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, 혼합물의 또 다른 화합물에서 R^{1'} 및 R^{1''} 둘 모두가 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, 혼합물의 또 다른 화합물에서 R^{1'} 및 R^{1'''} 둘 모두가 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, 혼합물의 또 다른 화합물에서 R^{1'} 및 R^{1''} 및 R^{1'''} 3개 모두가 화학식 IIa의 화합물의 모이어티인 화합물의 혼합물일 수 있다. 반응은 아미드를 형성시키기 위한 조건하에서 유기 용매, 예를 들어, 알칸(예를 들어, 헥산 또는 펜탄) 중에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 10시간 내지 약 48시간이다.

[0129] 본원에 기재된 원리에 따른 화합물의 예를 제조하는 방법의 또 다른 예는, 비제한적인 예로, 도 5와 관련하여 기재되어 있다. 본원에 기재된 원리와 일치하는 화합물을 형성시키기 위해 다른 접근법이 이용될 수 있다. 화학식 XVIII의 화합물(Y는 화학식 I에서 C임)의 제조는 도 5에 기재되어 있다. 도 5를 참조하여, 화학식 VII의 화합물(예를 들어, 도 3에 논의된 바와 같이 제조됨)은 자유 하이드록실기를 보호하기 위해(R¹³은 보호기임) 처리되어 화학식 XIV의 화합물을 형성한다. 반응의 조건은, 예를 들어, 보호기의 특성에 의존된다.

[0130] 한 예에서, 화합물 VII의 화합물은 실릴 에테르를 형성시키기 위한 조건하에서 3차-부틸디메틸실릴 클로라이드로 처리된다. 반응은 극성 유기 용매, 예를 들어, 피리딘, 디메틸설폭사이드, 에테르(예를 들어, 테트라하이드로푸란, 에틸 에테르 또는 1,4-디옥산), 아세토니트릴, 디클로로메탄, 또는 디메틸포름아미드(DMF)에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 10℃ 내지 약 30℃, 또는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 1시간 내지 약 30시간, 또는 약 2시간 내지 약 24시간이다.

[0131] 보호기의 예는, 비제한적인 예로, 예를 들어, 실릴기(비제한적인 예로, 예를 들어, 트리메틸실릴, 트리메틸실릴, 3차-부틸디메틸실릴, 트리-이소프로필실릴, 3차-부틸디페닐실릴), t-부톡시카르보닐(t-Boc), 플루오레닐메틸옥시카르보닐(Fmoc), 아세트아미노메틸(Acm), 트리페닐 메틸(Trt), 벤질옥시카르보닐, 바이페닐이소프로필옥시카르보닐, 1-아밀옥시카르보닐, 이소보르닐옥시카르보닐, 알파-디메틸-3,5-디메톡시벤자일옥시카르보닐, o-니트로페닐설폰, 2-시아노-1,1-디메틸-에톡시카르보닐, 브로모벤질옥시, 카르바미, 및 포르미이다.

[0132] 화학식 XV의 화합물은, 예를 들어, 아연의 존재하에서 알파-할로에스테르와의 반응(레포르마츠키 반응(Reformatsky reaction))에 의해 화학식 XIV의 화합물로부터 형성된다. 이러한 예에서, 화학식 XIV의 화합물은 레포르마츠키 시약, 예를 들어, BrZnCH₂COOR¹⁴ (Zn 및 에틸 알파-브로모아세테이트가 예에서 제시됨, w = 1)으로 처리되어 화학식 XV의 화합물을 제공한다. 반응은 유기 용매, 예를 들어, 에테르(예를 들어, 테트라하이드로푸란 또는 에틸 에테르) 또는 방향족 용매(예를 들어, 벤젠 또는 톨루엔)에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 4℃ 내지 약 100℃, 또는 약 10℃ 내지 약 90℃이다. 반응의 기간은 약 4시간 내지 약 24시간이다.

[0133] 화학식 XV의 화합물의 자유 하이드록실기는 환원되어 화학식 XVI의 화합물을 형성한다. 화학식 XV의 화합물은, 예를 들어, 토실레이트 에스테르 형성 후, 금속 하이드라이드(hydride), 예를 들어, LiAlH₄ 또는 NaBH₄를 이용한 처리; 알켄을 형성시키기 위한 하이드록실의 제거(예를 들어, 농축된 유기산, 예를 들어, 농축된 황산 또는 농축된 염산을 이용한 처리에 의해) 후, 촉매, 예를 들어, 백금 또는 팔라듐(palladium)의 존재하에서의 수소화 반응을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 방법에 의해 하이드록시기를 환원시키도록 처리될 수 있다. 반응을 위한 조건은, 예를 들어, 이용되는 시약의 특성 및 용매의 특성 중 하나 또는 둘 모두에 의존한다.

[0134] 생성된 화학식 XVI의 화합물은 에스테르기를 카르복실산기로 가수분해(탈에스테르화(de-esterification) 반응)시키기 위해 처리되어 화학식 XVII의 화합물을 제공한다. 다수의 접근법이 탈에스테르화를 위해 이용 가능하며, 예를 들어, 비누화, 또는 열과 함께 수성 염기, 예를 들어, NaOH 또는 KOH를 이용한 처리; 또는 산 가수분해 또는 수성 산, 예를 들어, 수성 광산(예를 들어, 염산 또는 황산)을 이용한 처리를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 반응을 위한 조건은, 예를 들어, 시약의 특성 및 에스테르의 특성 중 하나 이상에 의존된다.

[0135] 화학식 XVIII의 화합물은 화학식 XVII의 화합물로부터의 보호기 R¹³의 제거에 의해 형성된다. 다양한 접근법이

보호기의 제거를 위해 이용될 수 있으며, 이는 화학식 XVIII의 화합물을 생성시키기 위해 보호기를 제거하기 위한 조건하에서, 물을 또한 함유할 수 있는 극성 유기 용매(예를 들어, 알칸올(예를 들어, 메탄올 또는 에탄올), 에테르(예를 들어, 에틸 에테르 또는 테트라하이드로푸란), 케톤(예를 들어, 아세톤), 디메틸설폭시드, 아세토니트릴, 클로로메탄, 또는 디메틸포름아미드(DMF), 또는 상기 중 2개 이상의 조합물 중에서 희석 광산(예를 들어, 염산 또는 황산)을 이용한 처리; 유기산(예를 들어, 아세트산)을 이용한 처리를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 반응을 위한 조건은, 예를 들어, 시약의 특성 및 보호기의 특성 중 하나 이상에 의존된다.

[0136] 도 6은, 비제한적인 예로, 화학식 VIb의 화합물의 제조 및 화학식 VIb의 화합물의 화학식 IIb의 화합물(여기서, Z'은, 비제한적인 예로, KLH임)로의 전환 방법의 예를 도시한다. 도 6을 참조하여, 화학식 XVIII의 화합물은 비제한적으로, N-하이드록시석신이미드(NHS) 에스테르(화학식 XXII의 화합물)를 형성시키도록 반응시키는 것과 같이 카르복실산기를 활성화시키도록 처리된다. 반응은, 예를 들어, NHS 에스테르를 형성시키기 위한 조건하에서 극성 유기 용매, 예를 들어, 디메틸설폭시드, 에테르(예를 들어, 테트라하이드로푸란 또는 에틸 에테르), 아세토니트릴, 디클로로메탄, 또는 디메틸포름아미드(DMF) 중에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 4시간 내지 약 48시간이다.

[0137] 화학식 XXII의 NHS 에스테르는 화학식 XXI의 화합물과 조합되어 화학식 VIb의 화합물을 형성한다. 반응은, 예를 들어, 아미드를 형성시키기 위한 조건하에서 유기 용매, 예를 들어, 알칸(예를 들어, 헥산 또는 펜탄) 중에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 4시간 내지 약 48시간이다.

[0138] 화학식 VIb의 화합물은 폴리(아미노)산 면역원성 담체(화학식 II의 Z'은, 예를 들어, KLH임)와 반응되어 화학식 IIb의 화합물을 제공한다. 제시된 바와 같이, R^{1'}은 화학식 IIb의 화합물의 모이어티이고, R^{1''} 및 R^{1'''}은 각각 H이다. 그러나, 본원에 기재된 원리와 일치하게, 생성된 생성물은 혼합물의 한 화합물에서 R^{1'}이 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, 혼합물의 또 다른 화합물에서 R^{1'} 및 R^{1''} 둘 모두가 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, 혼합물의 또 다른 화합물에서 R^{1'} 및 R^{1'''} 둘 모두가 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, 혼합물의 또 다른 화합물에서 R^{1'} 및 R^{1''} 및 R^{1'''} 3개 모두가 화학식 IIb의 화합물의 모이어티인 화합물의 혼합물일 수 있다. 반응은 아미드를 형성시키기 위한 조건하에서, 유기 용매, 예를 들어, 알칸(예를 들어, 헥산 또는 펜탄) 중에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 4시간 내지 약 48시간이다.

[0139] 대안적 경로에서, 화학식 IIb의 화합물은 화학식 IIa의 화합물의 제조를 위한 도 3에 대해 상기 기재된 것과 유사한 방식으로 화학식 XVIII의 화합물로부터 제조될 수 있다.

[0140] 본원에 기재된 원리에 따른 화합물의 예를 제조하는 방법의 또 다른 예는, 비제한적인 예로, 도 7과 관련하여 기재되어 있다. 본원에 기재된 원리와 일치하는 화합물을 형성시키기 위해 다른 접근법이 이용될 수 있다. 화학식 XXVII의 화합물(Y는 화학식 I에서 O이고, w는 0 내지 10 또는 1 내지 10임)의 제조는 도 7에 기재되어 있다. 도 7을 참조하여, 화학식 VII의 화합물(예를 들어, 도 2에 논의된 바와 같이 제조됨)은 자유 하이드록실기를 보호하기 위해(R¹⁵은 보호기임) 처리되어 화학식 XXIII의 화합물을 형성한다. 반응의 조건은, 예를 들어, 보호기의 특성에 의존된다.

[0141] 한 예에서, 화학식 VII의 화합물은 실릴 에테르를 형성시키기 위한 조건하에서 3차-부틸디메틸실릴 클로라이드(비제한적인 예)로 처리된다. 반응은 극성 유기 용매, 예를 들어, 피리딘, 디메틸설폭시드, 에테르(예를 들어, 테트라하이드로푸란, 에틸 에테르, 또는 1,4-디옥산), 아세토니트릴, 디클로로메탄, 또는 디메틸포름아미드(DMF)에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 4시간 내지 약 48시간이다.

[0142] 화학식 XXIV의 화합물은, 예를 들어, 케톤기의 하이드록시기로의 환원에 의해 화학식 XXIII의 화합물로부터 형성된다. 화학식 XXIII의 화합물은 금속 하이드라이드, 예를 들어, LiAlH₄ 또는 NaBH₄를 이용한 처리를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 방법에 의해 하이드록시기를 환원시키도록 처리되어 화학식 XXIV의 화합물을 제공할 수 있다. 반응은 유기 용매, 예를 들어, 알칸올(예를 들어, 에탄올) 중에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 0℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 0.5시간 내지 약 4시간이다.

[0143] 화학식 XXV의 화합물은, 예를 들어, 염기의 존재하에서 할로 에스테르(비제한적인 예) 알파-할로에스테르와의

반응에 의해 화학식 XXIV의 화합물로부터 형성된다. 이러한 예에서, 화학식 XXV의 화합물은, 예를 들어, $\text{BrCH}_2\text{COOR}^{16}$ (에틸 알파-브로모아세테이트가 예에서 제시됨, w는 1이고, R^{16} 은 에틸임)으로 처리되어 화학식 XXV의 화합물을 제공한다. 반응은 염기, 예를 들어, KOH, NaOH, Na_2CO_3 , 또는 K_2CO_3 의 존재하에서 화학식 XXIV의 화합물의 하이드록시기로부터 알콕시드 이온을 형성시키고, 알콕시드와 할로에스테르의 반응에 의해 수행된다. 반응을 위한 용매는, 상기 기재된 바와 같이 1% 내지 40%의 극성 유기 용매를 함유할 수 있는 수성 용매이다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는, 예를 들어, 약 50℃ 내지 약 100℃, 또는 약 50℃ 내지 약 90℃이다. 반응의 기간은, 예를 들어, 약 0.5시간 내지 약 24시간, 또는 약 1시간 내지 약 8시간이다.

[0144] 생성된 화학식 XXV의 화합물은 에스테르기를 카르복실산기로 가수분해(탈에스테르화 반응)시키도록 처리되어 화학식 XXVI의 화합물을 제공한다. 다수의 접근법이 탈에스테르화를 위해 이용 가능하며, 예를 들어, 비누화 또는 열과 함께 수성 염기, 예를 들어, NaOH 또는 KOH를 이용한 처리; 산 가수분해 또는 수성 산, 예를 들어, 수성 광산(예를 들어, 염산 또는 황산)을 이용한 처리를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 반응을 위한 조건은, 예를 들어, 시약의 특성 및 에스테르의 특성 중 하나 이상에 의존된다.

[0145] 화학식 XXVII의 화합물은 화학식 XXVI의 화합물로부터의 보호기 R^{15} 의 제거에 의해 형성된다. 다양한 접근법이 보호기의 제거를 위해 이용될 수 있으며, 이는 화학식 XXVII의 화합물을 생성시키기 위해 보호기를 제거하기 위한 조건하에서 물을 또한 함유할 수 있는 극성 유기 용매(예를 들어, 알칸올(예를 들어, 메탄올 또는 에탄올), 에테르(예를 들어, 에틸 에테르, 테트라하이드로푸란, 또는 1,4-디옥산), 케톤(예를 들어, 아세톤), 디메틸설폭시드, 아세토니트릴, 디클로로메탄, 디메틸포름아미드(DMF), 또는 상기 중 2개 이상의 조합물 중에서 희석 광산(예를 들어, 염산 또는 황산)를 이용한 처리; 유기산(예를 들어, 아세트산)을 이용한 처리를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 반응을 위한 조건은, 예를 들어, 시약의 특성 및 보호기의 특성 중 하나 이상에 의존된다.

[0146] 도 8은, 비제한적인 예로, 화학식 VIc의 화합물의 제조 및 화학식 VIc의 화합물의 화학식 IIc의 화합물(여기서, Z' 은, 비제한적인 예로, 효소 G6PDH임)로의 전환 방법의 예를 도시한다. 도 8을 참조하여, 화학식 XXVII의 화합물은 비제한적으로, N-하이드록시석신아미드(NHS) 에스테르(화학식 XXVIII의 화합물)를 형성시키도록 반응시키는 것과 같이 카르복실산기를 활성화시키도록 처리된다. 반응은, 예를 들어, NHS 에스테르를 형성시키기 위한 조건하에서 극성 유기 용매, 예를 들어, 디메틸설폭시드, 에테르(예를 들어, 테트라하이드로푸란, 에틸 에테르, 또는 1,4-디옥산), 아세토니트릴, 디클로로메탄, 또는 디메틸포름아미드(DMF) 중에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 1시간 내지 약 24시간이다.

[0147] 화학식 XXVIII의 NHS 에스테르는 화학식 XXI의 화합물과 조합되어 화학식 VIc의 화합물을 형성한다. 반응은, 예를 들어, 아미드를 형성시키기 위한 조건하에서 유기 용매, 예를 들어, 알칸(예를 들어, 헥산 또는 펜탄) 중에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 1시간 내지 약 24시간이다.

[0148] 화학식 VIc의 화합물은 효소, G6PDH(화학식 II의 Z' 은, 예를 들어, G6PDH임)와 반응되어 화학식 IIc의 화합물을 제공한다. 제시된 바와 같이, $\text{R}^{1'}$ 은 화학식 IIc의 화합물의 모이어티이고, $\text{R}^{1''}$ 및 $\text{R}^{1'''}$ 은 각각 H이다. 그러나, 본원에 기재된 원리와 일치하게, 생성된 생성물은 혼합물의 한 화합물에서 $\text{R}^{1'}$ 이 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, 혼합물의 또 다른 화합물에서 $\text{R}^{1'}$ 및 $\text{R}^{1''}$ 둘 모두가 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, 혼합물의 또 다른 화합물에서 $\text{R}^{1'}$ 및 $\text{R}^{1''}$ 둘 모두가 화학식 IIa의 화합물의 모이어티이고, 혼합물의 또 다른 화합물에서 $\text{R}^{1'}$ 및 $\text{R}^{1''}$ 및 $\text{R}^{1'''}$ 3개 모두가 화학식 IIc의 화합물의 모이어티인 화합물의 혼합물일 수 있다. 반응은 아미드를 형성시키기 위한 조건하에서 유기 용매, 예를 들어, 알칸(예를 들어, 헥산 또는 펜탄) 중에서 수행된다. 일부 예에서, 반응 동안의 온도는 약 15℃ 내지 약 25℃이다. 반응의 기간은 약 1시간 내지 약 24시간이다.

[0149] 대안적 경로에서, 화학식 IIc의 화합물은 화학식 IIa의 화합물의 제조를 위한 도 3에 대해 상기 기재된 것과 유사한 방식으로 화학식 XXVII의 화합물로부터 제조될 수 있다.

[0150] 본원에 기재된 원리에 따른 다른 화합물은 상기 기재된 것과 유사한 방식으로 제조될 수 있다.

[0151] 결합 파트너의 제조

[0152] Z가 폴리(아미노산) 면역원성 담체 또는 비-폴리(아미노산) 면역원성 담체인 본원에 기재된 원리에 따른 화합물의 예가, 예를 들어, 비타민 D₃에 특이적인 항체, 비타민 D₂에 특이적인 항체, 25-하이드록시비타민 D₃에 특이적

인 항체, 25-하이드록시비타민 D₂에 특이적인 항체, 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃에 특이적인 항체, 및 3-에피-25-하이드록시비타민 D₂에 특이적인 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는 비타민 D에 대한 결합 파트너, 예를 들어, 비타민 D에 대한 앵타머 또는 비타민 D에 대한 항체를 제조하기 위해 이용될 수 있다. 특히 흥미로운 것은 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃에 특이적인 항체, 3-에피-25-하이드록시비타민 D₂에 특이적인 항체, 및 다른 비타민 D 화합물의 에피머에 특이적인 항체("에피머 비타민 D에 대한 항체")이며, 이들은 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 및 3-에피-25-하이드록시비타민 D₂에 대한 검정에서 이용될 수 있거나, 비타민 D의 존재에 대해 시험되는 샘플에 존재할 수 있는 비타민 D의 에피머 형태, 예를 들어, 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 및 3-에피-25-하이드록시비타민 D₂로부터의 간섭을 감소시키거나 배제시키기 위한 비-에피머 비타민 D에 대한 검정에서 이용될 수 있다.

[0153] 항체는 모노클로날(monoclonal) 항체 또는 폴리클로날(polyclonal) 항체일 수 있으며, 이는 완전 면역글로불린(immunoglobulin) 또는 이의 단편을 포함할 수 있고, 면역글로불린은, 예를 들어, 다양한 부류 및 아이소형(isotype), 예를 들어, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이의 단편은 Fab, Fv 및 F(ab')₂, Fab' 등을 포함할 수 있다. 또한, 면역글로불린 또는 이들의 단편의 응집물, 중합체, 및 컨주게이트가 특정 분자에 대한 결합 친화성이 유지되는 한 적절한 경우에 이용될 수 있다.

[0154] 본원에 기재된 원리에 따른 항체는, 예를 들어, 숙주의 면역화 및 혈청(폴리클로날)의 수거, 연속 하이브리드(hybrid) 세포주 제조 및 분비된 단백질(모노클로날) 수거 또는 적어도 자연 항체의 특이적 결합에 필요한 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 돌연변이화된 형태의 클로닝(cloning) 및 발현을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0155] 모노클로날 항체는 연속 하이브리드 세포주 제조 및 분비된 단백질 수거와 같은 기술(체세포 하이브리드화(hybridization) 기술)에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체는 문헌[Koehler and Milstein, *Nature* 265:495-497, 1975]의 표준 기술에 따라 생성될 수 있다. 모노클로날 항체 기술의 개관은 문헌[Lymphocyte Hybridomas, ed. Melchers, et al. Springer-Verlag (New York 1978), *Nature* 266: 495 (1977), *Science* 208: 692 (1980), 및 *Methods of Enzymology* 73 (Part B): 3-46 (1981)]에서 발견된다.

[0156] 항체의 제조를 위한 또 다른 접근법에서, 항체 결합 부위를 코딩하는 서열은 염색체 DNA로부터 절제되어 클로닝 벡터(cloning vector)로 삽입될 수 있고, 이는 박테리아(bacteria)에서 발현되어 해당 항체 결합 부위를 갖는 재조합 단백질을 생성할 수 있다. 이러한 접근법은 적어도 자연 항체의 특이적 결합에 필요한 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 돌연변이화된 형태를 클로닝하고 발현시키는 것을 수반한다.

[0157] 모노클로날 항체의 생성을 위한 한 접근법에서, 첫 번째 단계는, 예를 들어, Z가 면역원성 담체인 화학식 I의 화합물을 포함하는 면역원을 이용한 항체-생성 동물, 예를 들어, 마우스(mouse), 래트(rat), 염소, 양, 또는 소의 면역화를 포함한다. 면역화는 애주번트(adjuvant), 예를 들어, 완전 프로인트 애주번트(complete Freund's adjuvant) 또는 다른 애주번트, 예를 들어, 모노포스포릴 지질 A(monophosphoryl lipid A) 및 합성 트레할로스 디코리노미콜레이트(trehalose dicorynomycolate) 애주번트와 함께 또는 이들 없이 수행될 수 있다. 다음 단계는 항체-생성 동물로부터 비장 세포를 분리시키고, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 또는 다른 기술의 사용에 의해 항체-생성 비장 세포와 적절한 융합 파트너, 통상적으로 골수종 세포를 융합시키는 것을 포함한다. 통상적으로, 사용되는 골수종 세포는 보통 하이포잔틴-티미딘(HT: hypoxanthine-thymidine) 배지에서 성장하나, 융합된 세포의 선택에 사용되는 하이포잔틴-아미노테린-티미딘(HAT: hypoxanthine-aminopterin-thymidine)에서 성장할 수 없는 세포이다. 다음 단계는 통상적으로 HAT 배지에서의 선택에 의한 융합된 세포의 선택을 포함한다. 다음 단계는 면역검정, 예를 들어, 효소결합 면역흡착 측정법(ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay) 또는 스크리닝(screening)에 적절한 다른 면역검정을 이용한 적절한 항체 생성에 대한 클로닝된 하이브리드의 스크리닝을 포함한다.

[0158] 필수적인 특이성을 갖는 항체(본원에 기재된 원리에 따라 면역원으로부터 제조됨)는, 비제한적인 예로, 예를 들어, ELISA, 도트 블롯(dot blot), 웨스턴 분석(Western analysis), 및 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance)을 포함하는 스크리닝 방법에 의해 선택될 수 있다. 이러한 식으로, 특정 검정에서 관심 비타민 D 분석물에 결합하고, 관심 대상이 아닌 비타민 D 분자에는 임의의 검출 가능한 정도로 결합하지 않는 항체가 획득된다. 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예에서, 관심 비타민 D 분석물에 결합하는 항체는, 예를 들어, 약 10⁷ 내지 약 10¹⁴ 리터(liter)/몰(mole), 또는 약 10⁷ 내지 약 10¹¹ 리터/몰, 또는 약 10⁷ 내지 약 10¹² 리터/몰,

또는 약 10^8 내지 약 10^{14} 리터/몰, 또는 약 10^8 내지 약 10^{11} 리터/몰, 또는 약 10^8 내지 약 10^{12} 리터/몰의 관심 비타민 D 분석물에 대한 결합 친화성을 갖는다. 표현 "임의의 검출 가능한 정도"는 관심 비타민 D 분석물(예를 들어, 3-에피-25-하이드록시비타민 D)에 특이적으로 결합하는 항체가, 예를 들어, 약 10^4 리터/몰 미만, 또는 약 10^3 리터/몰 미만, 또는 약 10^2 리터/몰 미만, 또는 약 10 리터/몰 미만의 관심 대상이 아닌 비타민 D 분자(예를 들어, 비-에피-비타민 D 화합물)에 대한 결합 친화성을 갖는 것을 의미한다.

[0159] 본원에 기재된 원리에 따른 한 예에서, Z가 면역원성 담체인 상기 화학식 I의 화합물로부터 제조된 면역원은 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃에 특이적인 항체를 제조하기 위해 이용되며, 상기 항체는 25-하이드록시비타민 D₃ 또는 비타민 D의 다른 변이체, 예를 들어, 비-에피-비타민 D 화합물, 예를 들어, 25-하이드록시비타민 D; 칼시디올; 1,25-디하이드록시비타민 D₃; 1,25-디하이드록시 비타민 D₄; 1,25-디하이드록시 비타민 D₅; 및 1,25-디하이드록시 비타민 D₆에 임의의 검출 가능한 정도로 결합하지 않는다.

[0160] 본원에 기재된 원리에 따른 또 다른 예에서, Z가 면역원성 담체인 상기 화학식 I의 화합물로부터 제조된 면역원은 3-에피-25-하이드록시비타민 D₂에 특이적인 항체를 제조하기 위해 이용되며, 상기 항체는 25-하이드록시비타민 D₂ 또는 비타민 D의 다른 변이체, 예를 들어, 비-에피-비타민 D 화합물, 예를 들어, 25-하이드록시비타민 D; 칼시디올; 1,25-디하이드록시비타민 D₃; 1,25-디하이드록시 비타민 D₄; 1,25-디하이드록시 비타민 D₅; 및 1,25-디하이드록시 비타민 D₆에 임의의 검출 가능한 정도로 결합하지 않는다.

[0161] 한 예에서, 비제한적인 예로, 화학식 I의 화합물 내의 Z가 BSA인 면역원이 이용된다. 이러한 면역원은 마우스(예를 들어, BALB/c 마우스, 스위스 웹스터(Swiss Webster) 마우스 또는 AJ 계통의 마우스)를 복막내 면역화시키기 위해 이용된다. 이들 마우스로부터의 혈청 샘플은 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 및 난알부민의 컨쥬게이트(난알부민 컨쥬게이트)를 이용하여 항-3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 항체에 대해 시험된다. 미세역가 플레이트(microtiter plate) ELISA가 이용되며, 난알부민 컨쥬게이트 및 이후 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃로의 결합에 대해 항체가 조사된다. 가장 높은 역가를 갖는 마우스가 융합 3일 전에 부스팅된다(boosted). 융합일에, 비장 세포가 이들 마우스로부터 수거되고, PEG 보조 융합 프로토콜(protocol)을 이용하여 골수종 세포주 P3X63Ag8.653과 융합된다. 약 10일 후, 하이브리도마 상층액이 플레이트 ELISA를 이용하여 항-3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 항체에 대해 스크리닝된다. 양성 클론(positive clone)이 추가로 확장되고, 서브클로닝되고(sub-cloned), 상층액이 단백질 A 세파로스 컬럼(sepharose column)을 이용하여 정제된다. 정제된 항체 샘플이 난알부민 컨쥬게이트 및 자유 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃로의 결합에 대해 ELISA를 이용하여 시험된다.

[0162] 비제한적인 예로, 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃에 특이적이거나 3-에피-25-하이드록시비타민 D₂에 특이적인 상기 기재된 바와 같이 제조된 항체의 특정 예는, 예를 들어, 항체 4G8 및 항체 8F10을 포함한다.

[0163] 일부 예에서, 본원에 기재된 원리에 따른 결합 파트너, 예를 들어, 항체는 비타민 D 화합물을 정제하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 항체, 예를 들어, 상기 기재된 항체는 지지체에 결합될 수 있고, 지지체는 비타민 D 화합물을 정제하기 위해 이용될 수 있다. 한 예에서, 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃에 대한 항체는 친화성 정제 크로마토그래피(chromatography) 기관, 예를 들어, 컬럼(column)에 결합될 수 있고, 비타민 D 제조물은 크로마토그래피 기관과 접촉될 수 있으며, 여기서 기관 상의 항체는 비타민 D 제조물로부터의 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃에 결합하는 한편, 다른 비타민 D 화합물은 기관으로부터 용리된다.

[0164] 비타민 D에 대한 검정의 일반적 설명

[0165] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 비타민 D 분석물을 함유하는 것으로 의심되는 샘플 중 비타민 D 분석물의 존재 및 양 중 하나 또는 둘 모두를 결정하는 방법에 관한 것으로, 이는 "비타민 D에 대한 검정"으로 본원에서 언급될 수 있다.

[0166] 표현 "비타민 D"는 25-하이드록시비타민 D; 칼시디올; 1,25-디하이드록시 비타민 D₂; 1,25-디하이드록시비타민 D₃; 1,25-디하이드록시 비타민 D₄; 1,25-디하이드록시 비타민 D₅; 및 1,25-디하이드록시 비타민 D₆; 및 이들 모두의 에피머 형태 및 대사산물 중 하나 이상을 의미한다. 따라서, 비타민 D 분석물은 상기 정의된 바와 같은 비타민 D 및 비타민 D의 에피머를 포함한다. 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예는 비타민 D의 에피머 형태(예

를 들어, 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 또는 3-에피-25-하이드록시비타민 D₂)를 함유하는 것으로 의심되는 샘플 중 비타민 D의 에피머 형태의 존재 및 양 중 하나 또는 둘 모두를 결정하는 방법에 관한 것으로, 이는 "비타민 D의 에피머에 대한 검정"으로 본원에서 언급될 수 있다.

[0167] 비타민 D 분석물을 결정하기 위한 방법의 비제한적 예시의 한 예에서, 샘플, 결합 파트너, 예를 들어, 본원에 기재된 원리에 따라 생성된 비타민 D의 에피머에 대한 항체, 결합 파트너, 예를 들어, 비타민 D 분석물에 대한 항체 및 비타민 D 유사체와 신호 생성 시스템의 구성원을 포함하는 컨주게이트를 포함하는 조합물이 제공된다.

[0168] 상기 언급된 대로, 샘플 및 시약은 "매질 중에 조합되어" 제공된다. 조합물을 형성시키기 위한 매질로의 첨가 순서는 변할 수 있지만, 본원에 기재된 검정 포맷(format)의 일부 구체예에 대해 특정 선호도가 있을 것이다. 한 예에서, 비제한적인 예로, 첨가 순서는 동종 검정에서와 같이 재료 모두를 동시에 첨가하고, 신호에 대해 검정 매질이 갖는 효과를 측정하는 것이다. 또 다른 예에서, 비제한적인 예로, 각각의 시약, 또는 시약의 그룹은 순차적으로 조합될 수 있다. 일부 구체예에서, 인큐베이션(incubation) 단계가 상기 논의된 각 첨가 이후에 수반될 수 있다. 이종 검정에서, 분리 및 세척 단계가 또한 1회 이상의 인큐베이션 단계 후에 이용될 수 있다.

[0169] 표현 "비타민 D 유사체"는 비타민 D에 대한 항체 또는 비타민 D의 에피머에 대한 항체와 같은 수용체에 대한 비타민 D 분석물과 경쟁하는 화합물을 의미한다. 비타민 D 유사체는 변형된 비타민 D일 수 있으며, 여기서 변형은 비타민 D를 또 다른 분자, 비제한적인 예로, 예를 들어, 지지체, 표지, 소분자, 또는 소분자에 대한 결합 파트너에 연결시키는 수단을 제공한다. 비타민 D 유사체는 또 다른 분자에 직접적으로 또는 연결기에 의해 간접적으로 연결될 수 있다. 비타민 D 유사체는, 예를 들어, 비타민 D와, 또는 연결기를 통해 또 다른 분자에 컨주게이션된 비타민 D와 구조적으로 관련된 분자일 수 있다. 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예에서, 비타민 D 유사체는 Z가 폴리(아미노산) 표지 모이어티 또는 비-폴리(아미노산) 표지 모이어티이거나, Z가 면역원성 담체인 화학식 I의 화합물일 수 있으며, 이러한 화학식 I의 화합물은 비타민 D 항체와의 결합에 대해 비타민 D 분석물과 경쟁한다.

[0170] 분석하려는 샘플은 비타민 D 분석물을 함유할 것으로 의심되는 샘플이다. 샘플은 생물학적 샘플 또는 비-생물학적 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 포유동물 대상체 또는 비-포유동물 대상체로부터 유래될 수 있다. 포유동물 대상체는, 예를 들어, 인간 또는 그 밖의 동물 종일 수 있다. 생물학적 샘플은 전혈, 혈청, 혈장, 가래, 림프액(lymphatic fluid), 정액, 질 점액, 대변, 소변, 척수액, 침, 분변, 뇌척수액, 눈물, 점액 등과 같은 생물학적 유체; 털, 피부, 기관 또는 다른 신체 부위로부터의 절편 또는 절제 조직과 같은 생물학적 조직 등을 포함한다. 많은 예에서, 샘플은 전혈, 혈장 또는 혈청이다. 예를 들어, 폐기 스트림(waste stream)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 비-생물학적 샘플이 또한 본원에 기재된 원리에 따른 화합물을 이용하여 분석될 수 있다.

[0171] 샘플은, 예를 들어, 하기에서 보다 충분히 논의되는 검정 매질일 수 있는 임의의 편리한 매질에서 제조될 수 있다. 일부 예에서, 예를 들어, 혈액 세포를 용해시키는 것과 같은 전처리가 샘플에 적용될 수 있다. 일부 예에서, 이러한 전처리는 이후에 검정을 방해하지 않는 매질에서 수행된다.

[0172] 매질 중의 조합물은 비타민 D 분석물 및 비타민 D 유사체가 비타민 D 분석물에 대한 항체에 결합하여 복합체를 형성하는 조건으로 처리된다. 복합체의 양이 측정되며, 여기에서 복합체의 양은 샘플 중 비타민 D 분석물의 존재 및 양 중 하나 또는 둘 모두와 관련된다.

[0173] 비타민 D 분석물에 대한 검정은 임의의 검정 구성요소 또는 생성물의 분리 없이(동종) 또는 분리와 함께(이종) 수행될 수 있다. 이종 검정법은 보통 1회 이상의 분리 단계를 포함하고, 경쟁적 또는 비-경쟁적일 수 있다. 면역검정법은 표지되거나 표지되지 않은 시약을 포함할 수 있다. 표지되지 않은 시약을 포함하는 면역검정법은 보통 본원에 기재된 원리에 따라 면역원성 컨주게이트로부터 제조되는 하나 이상의 항체를 포함하는 비교적 큰 복합체의 형성을 포함한다. 그러한 검정은, 예를 들어, 항체 복합체의 검출을 위한 면역침전 및 응집 방법 및 상응하는 광 산란 기법, 예를 들어, 비탁법 및 비탁분석법을 포함한다. 표지된 면역검정법은, 예를 들어, 화학발광 면역검정법, 효소 면역검정법, 형광 편광 면역검정법, 방사성면역검정법, 억제 검정법, 유도 발광 검정법, 및 형광 산소 채널링(channeling) 검정법을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0174] 면역검정법의 한 일반적인 그룹은 본원에 기재된 원리에 따른 제한된 농도의 화합물을 이용하는 면역검정법을 포함한다. 면역검정법의 또 다른 그룹은 예를 들어, 본원에 기재된 원리에 따른 과량의 화합물과 같은 하나 이상의 과량의 주요 시약의 이용을 포함한다. 면역검정법의 또 다른 그룹은, 본원에 기재된 원리에 따라 생성된 항체에 표지된 비타민 D 유사체가 결합하여 이에 따라 샘플에 존재할 수 있는 비타민 D 분석물과 경쟁시, 표지

된 비타민 D 유사체로부터의 신호가 조절되는 분리-불포함 동종 검정법을 포함한다.

- [0175] 상기 언급된 대로, 검정은 임의의 검정 구성요소 또는 생성물의 분리 없이(동종) 또는 분리와 함께(이종) 수행될 수 있다. 동종 면역검정은 문헌[Rubenstein, et al., 미국특허 3,817,837호, 컬럼(column) 3, 6열 내지 컬럼 6, 64열]에 기재된 EMIT® 검정 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL); 문헌[Ullman, et al., 미국특허 3,996,345호, 컬럼 17, 59열 내지 컬럼 23, 25열]에 기재된 것들과 같은 면역형광 방법; 문헌[Maggio, et al., 미국특허 4,233,402호, 컬럼 6, 25열 내지 컬럼 9, 63열]에 기재된 것들과 같은 효소 채널링 면역검정("ECIA": enzyme channeling immunoassay); 예를 들어, 특허, 미국특허 5,354,693호에 기재된 형광 편광 면역검정("FPIA": fluorescence polarization immunoassay); 및 효소결합 면역흡착 측정법("ELISA")과 같은 효소 면역검정에 의해 예시된다. 예시적인 이종 검정은 문헌[Yalow, et al., J. Clin. Invest. 39:1157 (1960)]에 기재된 방사성면역검정이다. 상기 기재의 관련 부분은 모두 본원에 참조로서 포함된다.
- [0176] 그 밖의 효소 면역검정은, 예를 들어, 문헌[Ngo and Lenhoff, FEBS Lett. (1980) 116:285-288]에 의해 논의된 효소 조절 매개된 면역검정("EMMIA": enzyme modulate mediated immunoassay); 문헌[Oellerich, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1984) 22:895-904]에 기재된 기질 표지된 형광 면역검정("SLFIA": substrate labeled fluorescence immunoassay); 문헌[Khanna, et al., Clin. Chem. Acta (1989) 185:231-240]에 기재된 조합 효소 공여체 면역검정("CEDIA": combined enzyme donor immunoassay); 입자 강화된 혼탁 억제 면역검정("PETINIA": particle enhanced turbidimetric inhibition immunoassay), 입자 강화된 혼탁 면역검정("PETIA": particle enhanced turbidimetric immunoassay)과 같은 동종 입자 표지된 면역검정; 미국특허 7,186,518호, 5,147,529호, 5,128,103호, 5,158,871호, 4,661,408호, 5,151,348호, 5,302,532호, 5,422,284호, 5,447,870호, 및 5,434,051호에 기재된 친화성 이산화크롬(Chromium dioxide) 매개된 면역검정("ACMIA": Affinity Chromium dioxide Mediated Immuno Assay) 검정 포맷이고, 이들의 기재는 그 전문이 본원에 포함된다.
- [0177] 그 밖의 검정은 미국특허 6,355,803호; 6,673,560호; 7,097,995호 및 7,319,041호에서 논의된 것들과 같은 아크리디늄 에스테르(acridinium ester) 표지 검정을 포함하며, 이의 관련 기재는 본원에 참조로서 포함된다. 아크리디늄 에스테르 표지 검정의 특정한 예는 고품상으로서 상자성 입자를 이용하는 아크리디늄 에스테르 표지 면역검정("ADVIA" 면역검정)이다. 그 밖의 검정은 졸(sol) 입자 면역검정("SPIA": sol particle immunoassay), 분산 염료 면역검정("DIA": disperse dye immunoassay); 금속면역검정("MIA": metalloimmunoassay); 효소 막 면역검정("EMIA": enzyme membrane immunoassay); 및 발광면역검정("LIA": luminoimmunoassay)을 포함한다. 그 밖의 유형의 검정은 비타민 D 분석물의 결합시에 본 발명의 컨쥬게이트의 광학, 음향 및 전기적 특성에서의 변화를 모니터링하는(monitoring) 것을 포함하는 면역센서(immunosensor) 검정을 포함한다. 그러한 검정은, 예를 들어, 광학 면역센서 검정, 음향 면역센서 검정, 반도체 면역센서 검정, 전기화학적 변환기 면역센서 검정, 전위차 면역센서 검정, 전류측정 전극 검정을 포함한다.
- [0178] 이종 검정법은 보통 1회 이상의 분리 단계를 포함하고, 경쟁적 또는 비-경쟁적일 수 있다. 다양한 경쟁적 및 비-경쟁적 이종 검정 포맷은 본원에 참조로서 포함되는 문헌[Davalian, et al., 미국특허 5,089,390호, 컬럼 14, 25열 내지 컬럼 15, 9열]에 기재되어 있다. 경쟁적 이종 검정의 예에서, 결합된 비타민 D 분석물에 대한 항체를 갖는 지지체는 비타민 D 분석물을 함유할 것으로 의심되는 샘플 및 본원에 기재된 원리에 따른 표지된 화합물을 함유하는 매질과 접촉된다. 샘플 중의 비타민 D 분석물은 비타민 D 분석물에 대한 항체와의 결합에 대해, 검출가능한 표지를 갖는 비타민 D 유사체와 경쟁한다. 지지체 및 매질을 분리시킨 후에, 지지체 또는 매질의 표지 활성은 통상적인 기법에 의해 결정되고, 샘플 중 비타민 D 분석물의 양과 관련된다. 상기 경쟁적 이종 검정의 변형에서, 지지체는 표지된 시약으로서 비타민 D 유사체를 포함하고, 비타민 D 항체는 표지를 포함한다.
- [0179] 일부 예에서, 분석하려는 샘플은 검정 매질에서 비타민 D 분석물에 대한 항체 및 표지된 비타민 D 유사체와 조합된다. 매질은 표지된 비타민 D 유사체 및 비타민 D 분석물에 대한 항체를 포함하는 복합체의 존재 및 양 중 하나 또는 둘 모두에 대해 조사되는데, 여기서 그러한 복합체의 존재 및/또는 양은 샘플 중 비타민 D 분석물의 존재 및/또는 양을 나타낸다.
- [0180] 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예에서, 분석하려는 샘플은, 비타민 D에 결합하는 예를 들어, 혈장 또는 혈청 단백질과 같은 내인성 결합 물질로부터 비타민 D 분석물을 방출하기 위해 전처리로 처리된다. 내인성 결합 물질로부터 비타민 D 분석물의 방출은, 예를 들어, 순차적으로 이용되는 분해제 또는 방출제 또는 분해제와 방출제의 조합물의 첨가에 의해 수행될 수 있다. 분해제는 내인성 결합 물질을 파괴시켜 이들이 더 이상 비타민 D

에 결합하지 못하게 하는 것이다. 그러한 작용제는 프로테아제 K(proteinase K) 및 프로테아제 K 및 단백질 변성제, 예를 들어, 세척제(예를 들어, 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate))를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 내인성 결합 물질로부터 비타민 D를 방출시키기 위한 방출제는, 비제한적인 예로서, 산성 변성제, 예를 들어, 살리실산(salicylic acid), 와파린(warfarin), 설펜산(sulfonic acid), 톨루엔 설펜산(toluene sulfonic acid), 나프탈렌 설펜산(naphthalene sulfonic acid), 아닐리노나프탈렌 설펜산(ANS: anilinonaphthalene sulfonic acid)(예를 들어, 1-아닐리노나프탈렌-8-설펜산(1,8-ANS) 및 8-아닐리노나프탈렌-1-설펜산(8-ANS) 포함), 살리실산 및 상기의 유도체 및 염을 포함한다.

[0181] 예를 들어, 기간, 온도, pH 및 매질 중 방출제의 농도와 같은 분해 또는 방출 작용을 수행하기 위한 조건은, 예를 들어, 내인성 결합 물질의 특성, 샘플의 특성, 및 방출제의 특성에 의존적이다. 일반적으로, 상기 조건은 요망되는 효과 또는 기능을 달성하기에 충분하다. 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예에서, 방출제의 효과적인 농도는 약 0.01 내지 약 20 mg/mL, 또는 약 0.01 내지 약 10 mg/mL, 또는 약 0.01 내지 약 5 mg/mL, 또는 약 0.1 내지 약 20 mg/mL, 또는 약 0.1 내지 약 10 mg/mL, 또는 약 0.1 내지 약 5 mg/mL, 또는 약 0.1 내지 약 1 mg/mL이다. 내인성 결합 물질로부터 비타민 D 분석물을 방출하기 위한 샘플의 전처리는 검정을 수행하기 전에 분리 단계로서 또는 검정에서 제 1 단계로서 수행될 수 있다. 어떠한 경우든, 하나 이상의 시약이 분해제 및/또는 방출제의 작용을 중단시키는데 요구될 수 있다.

[0182] 검정을 수행하기 위한 조건은 일반적으로 최적의 검정 민감도를 제공하는 중간 pH의 수성 완충된 매질에서 검정을 수행하는 것을 포함한다. 수성 매질은 단독으로 물일 수 있거나, 0.1 내지 약 40 부피 퍼센트(percent)의 공용매를 포함할 수 있다. 매질에 대한 pH는, 예를 들어, 약 4 내지 약 11의 범위, 또는 약 5 내지 약 10의 범위, 또는 약 6.5 내지 약 9.5의 범위 내일 것이다. pH는 보통 임의의 특이적 결합 쌍의 결합 구성원들의 최적 결합, 신호 생성 시스템의 구성원과 같은 검정의 다른 시약에 최적인 pH 등등의 사이에서 타협될 것이다. 다양한 완충제를 이용하여 요망되는 pH를 달성하고 검정 동안 pH를 유지할 수 있다. 예시적인 완충제는, 비제한적 예로서, 예를 들어, 보레이트(borate), 포스페이트(phosphate), 카르보네이트(carbonate), TRIS, 바르비탈(barbital), PIPES, HEPES, MES, ACES, MOPS, 및 BICINE을 포함한다. 이용되는 특정 완충제는 중요하지 않지만, 개별 검정에서 어느 한 또는 또 다른 완충제가 바람직할 수 있다.

[0183] 다양한 보조 물질이 검정 방법에 이용될 수 있다. 예를 들어, 완충제 외에, 매질은 매질 및 이용되는 시약에 대한 안정화제를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 이들 첨가제 외에, 단백질, 예를 들어, 알부민(albumin); 유기 용매, 예를 들어, 포름아미드(formamide); 사차 암모늄(ammonium) 염; 다음이온(polyanion), 예를 들어, 텍스트란 설페이트(dextrane sulfate); 결합 증강제, 예를 들어, 폴리알킬렌 글리콜; 다당류, 예를 들어, 텍스트란 또는 트레할로스가 포함될 수 있다. 매질은 또한 혈전의 형성을 막는 작용제를 포함할 수 있다. 그러한 작용제는 당 분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어, EDTA, EGTA, 시트레이트, 헤파린(heparin)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 매질은 또한 하나 이상의 보존제, 예를 들어, 비제한적인 예로, 소듐 아지드, 네오마이신(neomycin) 설페이트, PROCLIN® 300, 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함할 수 있다. 매질은 하나 이상의 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 임의의 상기 물질은, 이용되는 경우, 요망되는 효과 또는 기능을 달성하기에 충분한 농도 또는 양으로 존재한다.

[0184] 1회 이상의 인큐베이션 기간은 상기 언급된 것들을 포함하는 검정에 이용되는 다양한 시약들의 첨가 사이에 임의의 간격을 포함하는 하나 이상의 간격으로 매질에 적용될 수 있다. 매질은 보통 시약의 다양한 구성요소의 결합 및 샘플 중 비타민 D의 결합이 발생하기에 충분한 온도와 시간으로 인큐베이션된다. 상기 방법을 수행하기 위해 일반적으로 보통(moderate) 온도가 이용되고, 측정의 기간 동안 보통 일정한 온도, 바람직하게는 실온이 이용된다. 일부 예에서, 인큐베이션 온도는, 예를 들어, 약 5° 내지 약 99°C, 또는 약 15°C 내지 약 70°C, 또는 약 20°C 내지 약 45°C의 범위이다. 인큐베이션을 위한 기간은, 일부 예에서, 예를 들어, 약 0.2초 내지 약 24시간, 또는 약 1초 내지 약 6시간, 또는 약 2초 내지 약 1시간, 또는 약 1분 내지 약 15분이다. 기간은 매질의 온도, 및 결합 속도 상수, 농도, 결합 상수 및 해리 속도 상수에 의해 결정되는 다양한 시약의 결합 속도에 의존적이다.

[0185] 비타민 D 분석물을 함유할 것으로 의심되는 샘플 중 비타민 D 분석물을 결정하기 위한 방법의 예에서, 조합물이 매질 중에 제공되고, 조합물은 샘플, 방출제(샘플이 내인성 결합 물질로부터 비타민 D 분석물을 방출하도록 전처리되지 않은 경우), 비타민 D에 대한 항체, 및 표지된 비타민 D 유사체(여기서 표지는 폴리(아미노산) 표지 또는 비-폴리(아미노산) 표지임)를 포함한다. 매질은 비타민 D 및 비타민 D에 대한 항체를 포함하는 복합체, 또는 비타민 D에 대한 표지된 화합물 및 항체를 포함하는 복합체 중 하나 또는 둘 모두의 존재 및 양 중 어느 하나 또는 둘 모두에 대해 조사된다. 복합체들 중 하나 또는 둘 모두의 존재 및/또는 양은 샘플 중 비타민 D 분

석물의 존재 및/또는 양을 나타낸다.

- [0186] 일부 공지된 검정은 제 1 및 제 2 신호 생성 시스템(sps; signal producing system) 구성원을 이용하는 sps를 활용한다. "제 1" 및 "제 2"의 지정은 완전히 임의적이며, sps 구성원 간에 임의의 순서 또는 순위 또는 본 발명의 방법에서 sps 구성원의 임의의 첨가 순서를 제한하려는 것이 아니다. sps 구성원들은 sps 중 한 구성원의 활성화가, 예를 들어, 광 또는 활성화 생성물과 같은 생성물을 생성시키고, 이는 sps의 또 다른 구성원의 활성화를 발생시킨다는 점에서 관련이 있을 수 있다.
- [0187] 검정의 일부 구체예에서, sps 구성원은 증감제, 예를 들어, 광증감제, 및 화학발광 조성물을 포함하고, 이 때 증감제의 활성화는 화학발광 조성물을 활성화시키는 생성물을 발생시킨다. 제 2 sps 구성원은 보통 결합되고/거나 결합되지 않은 sps 구성원의 양, 즉 검출하려는 비타민 D 분석물 또는 본원에 기재된 원리에 따른 화합물에 결합되거나 결합되지 않은 sps 구성원의 양과 관련된 검출가능한 신호를 발생시킨다. 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예에서, 증감제 시약 또는 화학발광 시약 중 어느 하나는 본 발명의 화합물 시약을 포함한다.
- [0188] 특정한 예에서, 유도성 발광 면역검정이 이용될 수 있다. 유도성 발광 면역검정은 미국특허 5,340,716호(Ullman)에서 언급되며, 이의 기재는 본원에 참조로서 포함된다. 한 접근법에서, 검정은 광증감제와 회합된 입자를 이용하고, 여기서 비타민 D 유사체는 입자에 결합된다(입자-화합물 시약). 화학발광 시약은 비타민 D 분석물에 대한 항체를 포함한다. 비타민 D 분석물은 비타민 D에 대한 항체와의 결합에 대해 입자-화합물 시약과 경쟁한다. 비타민 D 분석물이 존재하는 경우, 화학발광 시약과 근접하게 되는 입자-화합물 시약의 분자의 수는 더 적어진다. 따라서, 검정 신호가 감소할 것이다. 광증감제는 일중항 산소를 발생시키고, 2개의 표지가 근접할 때 화학발광 시약을 활성화시킨다. 활성화된 화학발광 시약은 후속하여 광을 생성한다. 생성된 광의 양은 형성된 복합체의 양과 관련되고, 이는 다시 샘플에 존재하는 비타민 D 분석물의 양과 관련된다.
- [0189] 유도성 발광 면역검정의 또 다른 특정 예에서, 검정은 화학발광 화합물이 회합된 입자를 이용하고, 여기에서 비타민 D 유사체는 입자에 결합된다(입자-화합물 시약). 광증감제 시약은 비타민 D에 대한 항체를 포함한다. 비타민 D 분석물은 비타민 D에 대한 항체와의 결합에 대해 입자-화합물 시약과 경쟁한다. 비타민 D 분석물이 존재하는 경우, 광증감제 시약과 근접하게 되는 입자-화합물 시약의 분자의 수는 더 적어진다. 따라서, 검정 신호가 감소할 것이다. 광증감제는 일중항 산소를 발생시키고, 2개의 표지가 근접할 때 입자-화합물 시약의 화학발광 화합물을 활성화시킨다. 활성화된 화학발광 화합물은 후속하여 광을 생성한다. 생성된 광의 양은 형성된 복합체의 양과 관련되고, 이는 다시 샘플에 존재하는 비타민 D 분석물의 양과 관련된다.
- [0190] 유도성 발광 검정의 또 다른 특정 예에서, 소분자에 대한 결합 파트너, 예를 들어, 아비딘 또는 스트렙타비딘(바이오틴에 대한 결합 파트너임)에 컨쥬게이션된 광증감제 입자가 이용된다. 바이오틴을 포함하는 비타민 D 유사체(화합물-바이오틴 시약)도 이용된다. 비타민 D 분석물에 대한 항체를 포함하는 화학발광 시약이 검출 시스템의 일부로서 이용된다. 반응 매질은, 광증감제 입자의 아비딘 또는 스트렙타비딘이 아비딘과 바이오틴 간의 결합에 의해 화합물-바이오틴 시약에 결합하도록 그리고 또한 화학발광 시약의 일부인 비타민 D 분석물에 대한 항체가 비타민 D 분석물 또는 현재 광증감제 입자에 부착되어 있는 비타민 D 유사체에 결합하도록 인큐베이션된다. 그 후, 매질에 광을 조사하여 광증감제를 여기시키며, 광증감제는 산소를 일중항 상태로 활성화시키는 여기된 상태일 수 있다. 현재 비타민 D 분석물의 존재로 인해 보다 적은 화학발광 시약이 광증감제와 근접하므로, 화학발광 시약은 일중항 산소에 의해 덜 활성화되고 덜 발광한다. 이어서 매질은 발광 또는 방출된 광의 존재 및/또는 양에 대해 조사되고, 이의 존재는 비타민 D 분석물의 존재 및/또는 양과 관련되며, 신호의 감소는 비타민 D 분석물의 존재시에 관찰된다.
- [0191] 유도성 발광 검정의 또 다른 특정 예에서, 소분자에 대한 결합 파트너, 예를 들어, 아비딘 또는 스트렙타비딘(바이오틴에 대한 결합 파트너임)에 컨쥬게이션된 광증감제 입자가 이용된다. 컨쥬게이트 시약은 바이오틴에 컨쥬게이션된 비타민 D 분석물에 대한 항체를 포함한다. 비타민 D 유사체가 이용되고, 여기에서 화학발광 입자에 부착된 화합물(화학발광-화합물 시약)이 또한 이용된다. 반응 매질은, 광증감제 입자의 아비딘 또는 스트렙타비딘이 아비딘과 바이오틴 간의 결합에 의해 항체-바이오틴 시약에 결합하도록 그리고 또한 비타민 D 분석물에 대한 항체가 존재하는 경우 샘플 중의 비타민 D 분석물 및 화학발광-화합물 시약의 일부인 비타민 D 유사체에 결합하도록 인큐베이션된다. 그 후, 매질에 광을 조사하여 광증감제를 여기시키며, 광증감제는 산소를 일중항 상태로 활성화시키는 여기된 상태일 수 있다. 현재 비타민 D 분석물의 존재로 인해 보다 적은 화학발광-화합물 시약이 광증감제와 근접하므로, 화학발광 시약은 일중항 산소에 의해 덜 활성화되고 덜 발광한다. 이어서 매질은 발광 또는 방출된 광의 존재 및/또는 양에 대해 조사되고, 이의 존재는 비타민 D 분석물의 존재 및/또는 양과 관련되며, 신호의 감소는 비타민 D 분석물의 존재시에 관찰된다.

- [0192] 비제한적인 예로, 비타민 D 분석물의 검출을 위한 검정 포맷의 또 다른 예는 ACMIA 검정 포맷이다. ACMIA 검정 포맷의 경우, 비타민 D 유사체(크롬 입자 시약)로 코팅된(coated) 크롬 입자는 제 1 구성요소로서 이용된다. 제 2 구성요소는 비타민 D 분석물에 대한 항체이다. 항체-효소 컨쥬게이트를 형성하기 위해 리포터 효소(reporter enzyme)(예를 들어, β -갈락토시다제)와 가교되는 이러한 항체는 과량, 즉 샘플에 존재할 수 있는 모든 비타민 D 분석물에 결합하는데 요구되는 것보다 많은 양으로 반응 용기에 첨가된다. 미리 방출제로 처리된 샘플은 샘플 중 비타민 D 분석물에 결합하는 비타민 D 분석물에 대한 항체로 처리된다. 항체-효소 컨쥬게이트는 매질에서 샘플과 혼합되어, 비타민 D 분석물이 항체와 결합되게 한다. 이어서, 크롬 입자 시약이 첨가되어 임의의 과량의 항체-효소 컨쥬게이트와 결합된다. 그 후, 현탁액 중의 크롬 입자 및 과량의 항체-효소를 모두 당기는 자석이 적용되고, 상청액이 최종 반응 컨테이너(container)로 보내진다. 리포터 효소의 기질이 최종 반응 컨테이너에 첨가되고, 효소 활성이 시간 경과에 따른 흡광도의 변화로서 분광학적으로 측정된다. 이러한 신호의 양은 샘플 중 비타민 D 분석물의 양과 관련된다.
- [0193] 본원에 기재된 원리에 따른 비타민 D에 대한 검정법의 또 다른 예는 고형상으로서 상자성 입자를 이용한 아크리디늄 에스테르 표지 면역검정(ADVIA 면역검정)이다. 비타민 D 검정의 이러한 예에 이용되는 검출 시스템은 소분자 컨쥬게이트 또는 포획 컨쥬게이트로서 소분자-표지된 비타민 D 유사체(포획 모이어티), 고형상(SP: solid phase)으로서 소분자-코팅된 상자성 라텍스 입자에 대한 결합 파트너, 및 비타민 D 분석물에 대한 아크리디늄 에스테르 표지된 항체(검출 항체)를 포함한다. 소분자는, 예를 들어, 바이오틴 또는 플루오레세인일 수 있고, 개별적인 결합 파트너는 스트렙타비딘 또는 플루오레세인에 대한 항체일 수 있다. 비타민 D 유사체는 소분자에 직접 또는, 예를 들어, 단백질, 예를 들어, 소 혈청 알부민(BSA)과 같은 연결기를 통해 연결될 수 있다. 환자 샘플 중 비타민 D 분석물은 아크리디늄 에스테르 표지된 검출 항-비타민 D 항체와의 결합을 위한 포획 모이어티의 비타민 D 유사체와 경쟁한다. 비타민 D를 함유할 것으로 의심되는 샘플은 1,8-ANS를 이용한 전처리로 처리된다. 검정은 Centaur®, Centaur® XP 또는 Centaur® CP 장치(Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE) 상에서 이와 함께 제공된 제조사의 지침에 따라 수행될 수 있다.
- [0194] 본원에 기재된 원리에 따른 비타민 D 분석물에 대한 검정법의 또 다른 예는 고형상으로서 상자성 입자를 이용한 아크리디늄 에스테르 표지 면역검정(ADVIA 면역검정)이다. 비타민 D 검정의 이러한 예에 이용되는 검출 시스템은 바이오틴 컨쥬게이트 또는 포획 컨쥬게이트로서 비타민 D 분석물에 대한 소분자-표지된 항체 (포획 항체), 고형상(SP)으로서 스트렙타비딘-코팅된 상자성 라텍스 입자, 및 아크리디늄 에스테르 표지된 비타민 D 유사체(검출 합텐)를 포함한다. 아크리디늄 에스테르 표지는 비타민 D 유사체에 직접 결합하여 검출 합텐을 형성할 수 있거나 예를 들어, BSA와 같은 예를 들어, 단백질을 포함하는 연결기가 사용될 수 있다. 환자 샘플 중 비타민 D 분석물은 항-비타민 D 항체와의 결합을 위해 아크리디늄 에스테르 표지된 검출 합텐과 경쟁한다. 비타민 D를 함유할 것으로 의심되는 샘플은 1,8-ANS를 이용한 전처리로 처리된다. 검정은 Centaur®, Centaur® XP 또는 Centaur® CP 장치(Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark DE) 상에서 이와 함께 제공된 제조사의 지침에 따라 수행될 수 있다. 상기 아크리디늄 에스테르 검정의 변형에서, 소분자는 예를 들어, 바이오틴 또는 플루오레세인일 수 있다.
- [0195] 검정될 수 있는 샘플 중 비타민 D 분석물의 농도는 일반적으로, 예를 들어, 약 10^{-5} 내지 약 10^{-17} M, 또는 약 10^{-6} 내지 약 10^{-14} M로 다양하다. 검정이 정성적, 반-정량적 또는 정량적(샘플에 존재하는 비타민 D 분석물의 양에 대하여)일지의 여부, 특정 검출 기법 및 비타민 D 분석물의 예상 농도와 같은 사항이 일반적으로 다양한 시약의 농도를 결정한다.
- [0196] 검정 매질에서 다양한 시약의 농도는 일반적으로, 관심 비타민 D 분석물의 농도 범위, 검정 특성 등에 의해 결정될 것이다. 그러나, 각 시약의 최종 농도는 일반적으로 관심 범위에 걸쳐 검정의 민감도를 최적화하기 위해 경험적으로 결정된다. 즉, 유의한 비타민 D 분석물의 농도에서의 변화는 정확하게 측정가능한 신호 차이를 제공해야 한다. 신호 생성 시스템의 특성 및 분석물의 특성과 같은 사항이 일반적으로 다양한 시약의 농도를 결정한다.
- [0197] 본원에 기재된 원리에 따른 시약을 이용한 비타민 D의 에피머에 대한 검정의 예
- [0198] 상기 언급된 바와 같이, 본원에 기재된 원리에 따른 한 특정 예는 비타민 D의 에피머를 함유하는 것으로 의심되는 샘플 중 비타민 D의 에피머의 존재 및 양 중 하나 또는 둘 모두를 결정하는 방법에 관한 것이다. Z가 면역원성 담체인 화학식 I의 화합물인 면역원에 대해 발생된 항체를 이용하여 상기 검정 포맷 중 임의의 검정 포맷이 이용될 수 있다. 일부 예에서, 면역원은 화학식 IIa의 화합물(도 3 참조)이다. 일부 예에서, 면역원은 화

화학식 IIb의 화합물(도 5 참조)이다. 일부 예에서, 이용되는 항체는 항체 4G8 또는 항체 8F10이다. 본원에 기재된 원리와 일치하는 다른 면역원으로부터 생성된 항체가 상기 검정 포맷 중 임의의 검정 포맷에서 이용될 수 있다.

[0199] 비타민 D의 에피머에 대한 검정법의 한 예는 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃를 함유하는 것으로 의심되는 샘플 중 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃의 검출을 위한 유도성 발광 검정법이다. 샘플은 내인성 결합 모이어티로부터 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃를 방출시키는 방출제로 처리된다. 이후, 샘플은 반응 매질 중 바이오틴에 컨쥬게이션된 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃에 대한 항체인 항체 4G8.2를 포함하는 시약(항체-바이오틴 시약)과 조합되며, 이는 항체-바이오틴 시약과 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 분석물 사이의 결합을 가능케 하도록 인큐베이션된다. 이후, 화학발광 입자에 부착된 비타민 D 유사체로서 화학식 IIa의 화합물을 포함하는 화학발광 시약이 첨가된다. 화학발광 시약은 과량의 항체-바이오틴 시약, 즉, 샘플 중 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 분석물에 결합하지 않은 항체-바이오틴 시약에 결합한다. 이후, 스트렙타비딘에 컨쥬게이션된 광증감제 입자 시약이 첨가된다. 광증감제 입자의 스트렙타비딘이 스트렙타비딘과 바이오틴 사이의 결합에 의해 항체-바이오틴 시약에 결합하도록 하기 위해 반응 매질이 인큐베이션된다. 그 후, 매질에 광을 조사하여 광증감제를 여기시키며, 광증감제는 산소를 일중항 상태로 활성화시키는 여기된 상태가 될 수 있다. 현재 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 분석물의 존재로 인해 보다 적은 화학발광 시약이 광증감제와 근접하므로, 화학발광 시약은 일중항 산소에 의해 덜 활성화되고 덜 발광한다. 이어서 매질은 발광 또는 방출된 광의 존재 및/또는 양에 대해 조사되고, 이의 존재는 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 분석물의 존재 및/또는 양과 관련되며, 신호의 감소는 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 분석물의 존재시에 관찰된다.

[0200] 차단 항체로서 본원에 기재된 원리에 따른 항체를 사용하는 비타민 D 분석물에 대한 검정의 예

[0201] 본원에 기재된 원리에 따른 항체는 비-에피머 형태의 비타민 D 분석물에 대한 검정에서 3-에피머 교차-반응성을 최소화하거나 제거하는데 사용될 수 있다. 비타민 D 분석물에 대한 항체와 3-에피머 비타민 D의 교차-반응성에 의해 초래된 총 비-에피머 비타민 D 분석물의 과대-평가는 Z가 면역원성 담체인 화학식 I의 화합물인 면역원에 대하여 제조된 항체를 차단제로서 사용하여, 실질적으로 회피될 수 있다.

[0202] 비-에피머 비타민 D 분석물에 대한 검정의 한 예에서, 검정은 화학발광 시약으로서, 올레핀 염료를 포함하는 케미비드(chemibead) 시약 및 비타민 D 유사체로서 25-하이드록시비타민 D₃을 사용한다. 비-에피머 비타민 D 분석물을 함유하는 것으로 의심되는 샘플은 검정 매질에서 비-에피머 비타민 D 분석물에 대한 비오틴화(biotinylated) 항체, 및 항체 8F10인 제 2 항체와 조합되며, 이어서 케미비드 시약과 조합된다. 케미비드는 샘플로부터의 비-에피머 비타민 D 분석물이 차지하지 않은 모노클로날 항체 결합 부위의 분획에 결합된다. 항체 8F10은 샘플에 존재하고 비오틴화된 항체와의 교차-반응에 의한 측정에 개입하는 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃에 결합한다. 후속하여, 광증감제(센시비드(sensibead))를 포함하는 스트렙타비딘 커플링된 증감제 비드가 반응 혼합물에 첨가된다. 이는 농도가 샘플 중의 비-에피머 비타민 D 분석물 농도에 반비례하는 케미비드/센시비드 쌍의 형성으로 이어진다. 680 nm에서 조사하면, 증감제 비드는 일중항 산소를 생성하며, 이는 센시비드와 쌍을 이루는 케미비드 내로 확산되며, 화학발광에서 올레핀 염료와 반응하고, 대략 612nm에서 화학발광 신호를 촉발하며, 이는 비-에피머 비타민 D 분석물 농도와 반비례한다.

[0203] 본원에 기재된 원리에 따른 표지된 화합물을 사용하는 비타민 D 분석물에 대한 검정의 예

[0204] 비타민 D 분석물에 대한 검정은 Z가 폴리(아미노산) 표지 또는 비-폴리(아미노산) 표지 또는 지지체인 화학식 I의 화합물을 사용하여 수행될 수 있다.

[0205] 비타민 D 분석물의 검출을 위한 검정의 한 예에서, 비제한적 예로서 ACMIA 검정 포맷이 이용된다. Z가 크롬 입자(크롬 입자 시약)인 비-폴리(아미노산) 표지인 화학식 I의 화합물인 비타민 D 유사체로 코팅된 크롬 입자가 제 1 구성요소로서 이용된다. 제 2 구성요소는 비타민 D 분석물에 대한 항체이다. 항체-효소 컨쥬게이트를 형성하기 위해 리포터 효소(예를 들어, β -갈락토시다제)와 가교된 이러한 항체는 과량 즉, 샘플 중에 존재할 수 있는 모든 비타민 D 분석물에 결합하는데 필요한 양보다 많은 양으로 반응 용기에 첨가된다. 미리 방출제로 처리된 샘플은 샘플 중 비타민 D 분석물에 결합하는 비타민 D에 대한 항체로 처리된다. 항체-효소 컨쥬게이트는, 비타민 D 분석물이 항체에 결합하는 것을 허용하기 위해 매질 중에서 샘플과 혼합된다. 이어서, 임의의 과량의 항체-효소 컨쥬게이트를 결합시키기 위해 크롬 입자 시약이 첨가된다. 그 후, 현탁액 중의 크롬 입자 및 과량

의 항체-효소를 모두 당기는 자석이 적용되고, 상청액이 최종 반응 컨테이너로 보내진다. 리포터 효소의 기질이 최종 반응 컨테이너에 첨가되고, 효소 활성이 시간 경과에 따른 흡광도의 변화로서 분광학적으로 측정된다. 이러한 신호의 양은 샘플 중의 비타민 D 분석물의 양과 관련된다.

[0206] 상기 예에서, 본원에 기재된 원리에 따른 항체는 샘플에 존재할 수 있는 3-에피-25-하이드록시비타민 D₃의 비타민 D 분석물에 대한 항체와의 결합을 차단하는데 사용될 수 있다. 항-3-에피-25-하이드록시비타민 D₃ 항체는 Z가 면역원성 담체인 화학식 I의 화합물인 면역원에 대해 발생된 항체일 수 있다.

[0207] 시험 단계

[0208] 검정 방법의 다음 단계에서, 매질은 비타민 D 분석물 및 비타민 D 분석물에 대한 항체를 포함하는 복합체 및/또는 비타민 D 유사체 및 비타민 D에 대한 항체를 포함하는 복합체의 존재에 대해 시험된다. 복합체들 중 하나 또는 둘 모두의 존재 및/또는 양은 샘플 중 비타민 D 분석물의 존재 및/또는 양을 나타낸다.

[0209] 표현 "비타민 D 분석물의 양을 측정한다"는 비타민 D의 정량적, 반정량적 및 정성적 결정을 의미한다. 정량적, 반정량적 및 정성적인 방법, 뿐만 아니라 비타민 D 분석물을 결정하기 위한 모든 다른 방법은 비타민 D 분석물의 양을 측정하는 방법으로 간주된다. 예를 들어, 비타민 D 분석물을 함유할 것으로 의심되는 샘플에서 비타민 D 분석물의 존재 또는 부재만을 검출하는 방법이 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 고려된다. 용어 "검출하는" 및 "결정하는", 뿐만 아니라 측정을 위한 다른 일반적인 동의어가 본 발명의 범위 내에서 고려된다.

[0210] 다수의 구체예에서, 매질의 시험은 매질로부터 신호의 검출을 포함한다. 신호의 존재 및/또는 양은 샘플 중 비타민 D 분석물의 존재 및/또는 양과 관련된다. 특정 검출 방식은 신호 생성 시스템의 특성에 의존적이다. 상기 논의된 대로, 신호 생성 신호의 표지가 외부 수단에 의해 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 수많은 방법이 있다. 신호 생성 시스템의 활성화는 신호 생성 시스템 구성원의 특성에 의존적이다.

[0211] 측정 동안의 온도는 일반적으로, 예를 들어, 약 10℃ 내지 약 70℃ 또는 약 20℃ 내지 약 45℃, 또는 약 20℃ 내지 약 25℃의 범위이다. 한 접근법에서, 표준 곡선은 공지된 농도의 비타민 D 분석물을 이용하여 형성된다. 교정기 및 다른 제어기도 이용될 수 있다.

[0212] 임의의 표지로부터 생성된 광 또는 발광은, 예를 들어, 광전자증배관(photomultiplier) 또는 포토다이오드(photodiode)를 이용함에 의해서나, 그 양을 결정하기 위한 임의의 다른 편리한 수단에 의해, 시각적으로, 사진에 의해, 광량측정에 의해, 분광측정에 의해 측정될 수 있으며, 이는 매질 중 비타민 D 분석물의 양과 관련된다. 신호의 존재 및/또는 양에 대한 시험은 일반적으로 단순히 신호를 관측하는 단계인 신호의 검출도 포함한다. 신호는 일반적으로 기기를 이용하여 관측되며, 기기의 특성은 신호의 특성에 따라 좌우된다. 기기는, 예를 들어, 분광광도계, 형광계, 흡수 분광계, 발광측정계, 및 화학발광측정계일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0213] 검정을 수행하기 위한 시약을 포함하는 키트

[0214] 검정을 수행하기 위한 시약을 포함하는 키트가 특정 검정의 특성을 기초로 하여 포뮬레이션될(formulated) 수 있다. 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예에서, 키트는 Z가 면역원성 담체인 화학식 I의 화합물인 면역원에 대해 발생된 예를 들어, 항체와 같은 결합 파트너를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 원리에 따른 일부 예에서, 키트는 Z가 지지체를 포함하는 폴리(아미노산) 표지 모이어티 또는 비-폴리(아미노산) 표지 모이어티인 화학식 I의 화합물인 시약을 포함할 수 있다. 또한, 키트는 비타민 D 분석물에 대한 특정 검정을 수행하기 위한 다른 시약을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 키트는 입자와 회합된 바이오틴-결합 파트너, 예를 들어, 아비딘 또는 스트렙타비딘, 화학식 I의 비오틴닐화된(biotinylated) 화합물 및 비타민 D 분석물에 대한 표지된 항체를 패키징된(packaged) 조합물로 포함한다. 키트는 검정을 수행하기 위한 다른 시약을 추가로 포함할 수 있으며, 이의 특성은 특정 검정 포맷에 좌우된다.

[0215] 시약들은 각각 분리된 컨테이너에 있을 수 있거나, 다양한 시약들은 시약의 교차-반응성 및 안정성에 따라 하나 이상의 컨테이너에서 조합될 수 있다. 키트는 예를 들어, 추가의 특이적 결합 쌍 구성원, 신호 생성 시스템 구성원, 및 보조 시약과 같은 검정을 수행하기 위해 별도로 패키징된 다른 시약들을 추가로 포함할 수 있다.

[0216] 키트에서 다양한 시약들의 상대적인 양은 본 발명의 방법 동안 발생할 필요가 있는 반응들을 실질적으로 최적화하는 시약의 농도를 제공하고, 추가로 검정의 민감도를 실질적으로 최적화하기 위해 광범위하게 변화될 수 있다. 적절한 환경하에 키트의 시약들 중 하나 이상은 부형제를 포함하는, 일반적으로 동결건조된 건조 분말로 제공될 수 있고, 이는 용해시에 본원에 기재된 원리에 따른 화합물 시약을 이용한 방법 또는 검정을 수행하는데

적절한 농도를 지닌 시약 용액을 제공할 것이다. 키트는 본원에 기재된 원리에 따른 화합물 시약을 포함하는 시약을 활용하는 방법의 서면으로 된 설명을 추가로 포함할 수 있다.

[0217] 본원에 기재된 원리에 따른 화합물을 함유하는 약제 조성물

[0218] 본원에 기재된 원리에 따른 화합물 및 항체의 예는 치료학적 활성을 가질 수 있다. 이들 화합물은 치료학적 유효량으로 투여될 수 있으며, 이는 비타민 D와 관련된 특정 질병 상태의 치료를 제공하는 양이다. 본원에 기재된 원리에 따른 화합물의 예의 투여는 유사한 효능을 제공하는 작용제에 대한 임의의 허용된 투여 방식에 의해 수행될 수 있다. 상기 화합물은 예방적 및 치료적 둘 모두로 사용될 수 있다.

[0219] 투여되는 화합물의 양은 치료되는 대상체 및 질병 상태, 고통의 중증도, 투여 방식 및 스케줄(schedule)(예를 들어, 경구 투여) 및 처방 의사의 판단 중 하나 이상에 의존적이다.

[0220] 상기 병태의 치료를 위해 본 발명의 화합물을 사용하는데 있어서, 임의의 약제학적으로 허용되는 투여 방식이 이용될 수 있다. 본원에 기재된 원리에 따른 화합물은 단독으로 또는 약제학적으로 허용되는 다른 부형제와 조합되어 비제한적인 예로, 예를 들어 정제, 캡슐(capsule), 분말, 액체, 주사제, 현탁액, 좌약 및 에어로졸(aerosol) 형태와 같은, 고체, 반고체, 액체 또는 에어로졸 투여 형태로 투여될 수 있다. 화합물은 또한 바람직하게는, 정확한 투여량의 단일 투여에 적합한 단위 투여 형태로 예를 들어, 소정의 속도로 화합물을 연장 투여하기 위해, 데포 주입(depot injection), 삼투압 펌프(osmotic pump), 환제, 및 경피(전기전달 포함) 패치(patch)를 포함하는 지연된 또는 제어된 방출 투여 형태로 투여될 수 있다. 약제 조성물은 하나 이상의 통상적인 약제학적 담체 또는 부형제 및 본원에 기재된 원리에 따른 화합물을 포함한다. 또한, 이들 조성물은 예를 들어, 다른 의약 제제, 약제학적 제제, 담체 및 애쥬번트를 포함할 수 있다.

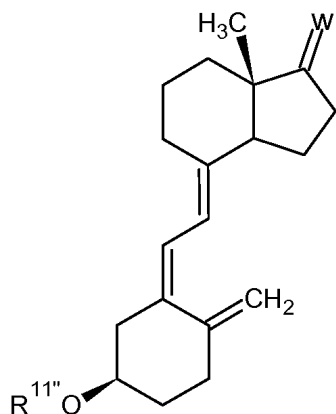
[0221] 의도된 투여 방식에 따라, 약제학적으로 허용되는 조성물은 약 0.1 중량% 내지 약 90 중량%의 본원에 기재된 원리에 따른 화합물을 함유할 것이며, 나머지는 예를 들어, 적합한 약제학적 부형제 및 담체이다.

[0222] 상기 상술된 병태를 위한 한 투여 방식은 편리한 1일 투약 요법을 이용하는 경구 투여이며, 이는 고통의 정도에 따라 조절될 수 있다. 이러한 경구 투여를 위해, 약제학적으로 허용되는 조성물은 임의의 일반적으로 사용되는 부형제 예를 들어, 만니톨(mannitol), 락토스(lactose), 전분, 포비돈(povidone), 마그네슘 스테아레이트(magnesium stearate), 소듐 사카린(sodium saccharine), 활석, 셀룰로스(cellulose), 크로스카르멜로스 소듐(croscarmellose sodium), 글루코스(glucose), 젤라틴(gelatin), 수크로스(sucrose), 및 마그네슘 카보네이트(magnesium carbonate), 및 이들의 2개 이상의 조합물의 혼입에 의해 형성된다. 이러한 조성물은 예를 들어 용액, 현탁액, 정제, 분산성 정제, 환제, 캡슐, 분말 또는 서방형 제형일 수 있다.

[0223] 비제한적 예시로서의 한 접근법에서, 조성물은 환제 또는 정제의 형태일 수 있으며, 본원에 기재된 원리에 따른 화합물과 함께 예를 들어, 희석제, 예컨대, 락토스, 수크로스, 또는 디칼슘 포스페이트(dicalcium phosphate), 또는 이들의 2개 이상의 조합물; 예를 들어, 윤활제 예컨대, 마그네슘 스테아레이트; 예를 들어, 붕해제 예컨대, 크로스카르멜로스 소듐; 및 예를 들어, 결합제 예컨대, 전분, 아카시아 검(gum acacia), 폴리비닐피롤리딘(polyvinylpyrrolidone), 젤라틴, 셀룰로스 및 이들의 유도체를 함유할 수 있다.

[0224] 비경구 투여는 일반적으로, 피하, 근육내 또는 정맥내 주입을 특징으로 한다. 주입제는 액체 용액 또는 현탁액, 주입 전 액체 중의 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태, 또는 에멀전(emulsion)으로서의 통상적인 형태로 제조될 수 있다. 적합한 부형제는 예를 들어, 물, 염수, 덱스트로스(dextrose), 글리세롤(glycerol) 및 에탄올을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 투여되는 약제 조성물은 또한 소량의 비-독성 보조 물질 예컨대 습윤제 또는 유화제, pH 완충제 및 용해도 증강제, 예를 들어, 소듐 아세테이트(sodium acetate), 폴리옥시 에틸렌(polyoxyethylene), 소르비탄 모노라우레이트(sorbitan monolaurate), 트리에탄올아민 올레레이트(triethanolamine oleate), 및 사이클로덱스트린(cyclodextrin)을 함유할 수 있다.

[0225] 본원에 기재된 원리에 따른 한 예에서, 약제학적 조성물은 하기 화학식의 화합물을 포함한다:



[0226]

[0227] 상기 식에서, W는 O 또는 $N-O-(CH_2)_n-C(O)-Z''$ 이며,

[0228] n''는 1 내지 10의 정수이고,

[0229] $R^{11''}$ 은 H, 알킬, 또는 아실이고,

[0230] Z''는 OR^8 이고, 여기에서, R^8 은 H, 알킬 또는 NR^9R^{10} 이며, 여기에서 R^9 및 R^{10} 은 독립적으로 H 또는 알킬이다.

[0231] 본원에서 사용된 표현 "적어도"는 명시된 항목의 수가 언급된 수와 동일하거나 그보다 클 수 있음을 의미한다. 본원에서 사용된 표현 "약"은 언급된 수가 플러스(plus) 또는 마이너스(minus)로 10%만큼 상이할 수 있음을 의미하고; 예를 들어, "약 5"는 4.5 내지 5.5의 범위를 의미한다.

[0232] 하기 논의는 비제한적 예로서 본원에 기재된 원리에 따른 특정 예들에 관한 것이며; 특정 예들은 본 발명의 기재 및 첨부된 청구항의 범위를 제한하려는 것이 아니다. 다수의 변형 및 대안적인 조성물, 방법, 및 시스템이 본 발명의 개시의 사상 및 범위를 벗어남이 없이 고안될 수 있다.

[0233] 실시예

[0234] 달리 지시되지 않는 한, 하기 실험의 재료들은 Sigma-Aldrich Chemical Corporation (St. Louis MO), Fluka Chemical Corporation (Milwaukee WI), 또는 Steraloids Inc. (Wilton NH)로부터 구입할 수 있다. 본원에 기재된 부(part) 및 백분율은 달리 지시되지 않는 한 중량 대 부피를 기준으로 한다.

[0235] 정의:

[0236] mg = 밀리그램(milligram)

[0237] g = 그램(들)(gram(s))

[0238] ng = 나노그램(들)(nanogram(s))

[0239] mL = 밀리리터(들)(milliliter(s))

[0240] μ L = 마이크로리터(들)(microliter(s))

[0241] μ mol = 마이크로몰(micromolar)

[0242] $^{\circ}$ C = 섭씨 도

[0243] min = 분(들)

[0244] sec = 초(들)

[0245] hr = 시간(들)

[0246] w/v = 중량 대 부피

[0247] TLC = 박막 크로마토그래피

- [0248] HPLC = 고성능 액체 크로마토그래피
- [0249] EDA = 에틸렌디아민
- [0250] EtOAc = 에틸 아세테이트
- [0251] DMF = 디메틸포름아미드
- [0252] DMSO = 디메틸설폭시드
- [0253] MeOP = 1-메톡시-2-프로판올
- [0254] MES = 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산
- [0255] CMO = 카르복시메톡시옥심
- [0256] TMB = 테트라메틸 벤지딘
- [0257] SNHS = 설포-N-하이드록시석신이미드
- [0258] 높은 pH 세척 완충액 = 5.5 mM Na_3PO_4 + 4.4 mM Na_2CO_3 , pH 11
- [0259] 합텐 세척 완충액 = 50 mM HEPES, 300mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1%
- [0260] TRITON® X405, 0.15% PROCLIN® 보존제, 및 1mg/ml 네오마이신
- [0261] DI = 탈이온된
- [0262] ELISA = 효소-결합 면역흡착 측정법
- [0263] UPA = 초 입자 분석기
- [0264] LOCI = 발광 산소 채널링 면역검정
- [0265] BSA = 소 혈청 알부민
- [0266] BGG = 소 감마 글로불린
- [0267] mIgG = 마우스 면역글로불린
- [0268] MS = 질량 분석법
- [0269] 실시예 1
- [0270] R^{11} 이 아세틸인 도 2의 화합물의 제조
- [0271] 5-안드로스텐-3 α -올-17-온 아세테이트(VIII)(100 mg)를 밤새 환류하에서 벤젠 중에서 에틸렌 글리콜(0.245 ml) 및 p-톨루엔설폰산 모노하이드레이트(4 mg)와 반응시켜 5-안드로스텐-3 α -올-17-온 아세테이트 에틸렌 케탈(IX)(112 mg)을 제공하였다. 에틸렌 케탈 IX(112 mg)을 30분 동안 환류하에서 헥산(13 ml) 중 N-브로모석신이미드(69 mg)/아조이소부티로니트릴(3.3 mg)을 이용하여 브롬화반응시켜(brominated) 화합물 X를 제공한 후, 2시간 동안 실온에서 THF(7.3 ml) 중 테트라부틸암모늄 플루오라이드(THF 중 1M, 1.6 ml)로 탈수소브롬화반응(dehydrobromination)시켜 안드로스타-5,7-디엔-3 α -올-17-온 아세테이트 에틸렌 케탈(XI)(55 mg)을 제공하였다. 안드로스타-5,7-디엔-3 α -올-17-온 아세테이트 에틸렌 케탈(XI)(55 mg)을 약 5시간 동안 실온에서 메탄올(10 ml) 중 1N 소듐 하이드록시드(2 mL)와 반응시켜 안드로스타-5,7-디엔-3 α -올-17-온 에틸렌 케탈(XII)(48 mg)을 제공하였다. 안드로스타-5,7-디엔-3 α -올-17-온 에틸렌 케탈(XII)(48 mg)을 밤새 실온에서 아세톤(5 mL) 및 물(0.2 mL)의 혼합물에서 p-톨루엔설폰산 모노하이드레이트(35 mg)와 반응시켜 안드로스타-5,7-디엔-3 α -올-17-온(XIII)(43.4 mg)을 제공하였다. 안드로스타-5,7-디엔-3 α -올-17-온(XIII)(43.4 mg)을 5분 동안 -20 내지 0°C에서 에테르(1100 ml) 중에서 VYCOR® 필터(filter)(Ace Glass Incorporated, Vineland, NJ)를 이용하여 450 w 수은 램프(lamp) 하에서 조사시켜, 예비-HMCHEMOIO를 제공하고, 이를 3시간 동안 에탄올(15 ml) 중에서 환류시켜 HMCHEMOIO(VII)(13.5 mg)를 생성시켰다.
- [0272] 상기로부터의 HMCHEMOIO(VII)(13.5 mg)를 밤새 실온에서 1 ml 메탄올 중에서 O-(카르복시메틸)하이드록실아민 헤미하이드로클로라이드(12 mg) 및 소듐 아세테이트(24 mg)와 반응시켜 HMCHEMOIO-CMO(13.2 mg)(도 3에서 화학식 XX의 화합물, 여기서 n = 1)을 제공하였다.

- [0273] 양이온화된 BSA를 다음과 같이 제조하였다: 트리에틸렌테트라아민(0.5 mL)(도 3에서 화학식 XXI의 화합물, 여기서 각각의 $r = 1$ 이고, $s = 1$)을 4.5 mL의 50 mM MES 완충액 pH6에 첨가하고, pH를 6으로 조정 한 후, 20 mg BSA를 첨가하였다. 혼합물을 혼합하여 성분을 완전히 용해시켰다. EDAC(5 mg)를 5시간 동안 매시간 마다 상기 용액에 첨가하였다. 용액을 pH7의 10 x 10 mL 세척 완충액(10mM 포스페이트 + 300nM NaCl)으로 10mL AMICON® 셀(Amicon Inc., Beverly MA)에서 세척하였다. 이후, 100 mg TWEEN®20을 50-mL 둥근 바닥 플라스크(flask)에 첨가하였다. 세척 완충액(50 mL)을 첨가하고, 혼합물을 10분 동안 교반시켜 Tween 20을 분산시켰다. 양이온화된 BSA(도 3에서 화학식 XXIa의 화합물, 여기서 각각의 $r = 1$ 이고, $s = 2$)를 약 5 mg/mL로 0.2% TWEEN® 20과 함께 세척 완충액 중에 저장하였다.
- [0274] HMCHEMOIO-CMO BSA(도 3에서 화학식 IIa의 화합물)의 제조를 위해, EDAC(25 mg) 및 10 mg NHS를 상기 기재된 바와 같이 제조된 13.2 mg HMCHEMOIO-CMO(XX)를 갖는 10 mL 플라스크에 배치하였다. DMF(0.5 mL)를 플라스크에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하여 활성화된 HMCHEMOIO-CMO를 제공하였다. 용액은 투명하였다. TLC(1:1 에틸 아세테이트:메탄올)는 남아있는 출발 물질이 없음을 나타내었다.
- [0275] 상기로부터의 활성화된 HMCHEMOIO-CMO를 상기로부터의 양이온화된 BSA 용액에 적가하고, 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 혼합물을 Amicon® 셀(Amicon Inc., Beverly MA)로 옮긴 후, 5 x 10 mL 세척 완충액으로 세척하고, 약 4 mL로 농축(30,000 컷 오프(cut off))시켰다. 혼합물을 일루턴트(elutant)로서 세척 완충액 pH 7.0을 이용하여 SD-25 컬럼(GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburg PA) 상에서 추가로 분리시켜 HMCHEMOIO-CMO BSA 화합물의 혼합물(도 3에서 화학식 IIa의 화합물에 관하여 상기 논의된 바와 같은 혼합물)을 제공하였다.
- [0276] 실시예 2
- [0277] 항체의 제조
- [0278] AJ 계통의 마우스(암컷, 적어도 8주령)를 면역화시켜 모노클로날 항체를 발생시켰다. 첫 번째 면역화는 완전 프로인트 애쥬번트(Sigma-Aldrich, Cat # F5881)를 갖는 100 μ L 부피의 상기로부터의 100 μ g의 면역원(HMCHEMOIO-CMO BSA)이었다. 3주 후, 불완전 프로인트 애쥬번트(Sigma-Aldrich Cat # F5506)를 갖는 100 μ L 부피로 동일 면역원을 이용한 부스터(boost) 면역화를 100 μ g으로 제공하였다. 이후, 또 다른 3주 후, 불완전 프로인트 애쥬번트를 갖는 100 μ L의 부피로 동일 면역원을 이용한 두 번째의 부스터(booster) 면역화를 100 μ g으로 제공하였다. 마지막 부스터 면역화 1주 후, 마우스를 채혈하고, 항-혈청을 항-3-에피머 항체에 대해 ELISA에서 시험하였다. 이후, 동일 면역원(임의의 애쥬번트가 없는 PBS 중 50 μ L 부피에서 20 μ g)과의 융합 전 3일 연속으로 예비융합 부스터를 제공하였다. 4일째에, 마우스를 희생시키고, 비장절제술을 수행하였다. 비장 세포를 분리시키고, P3-X63Ag8.653(ATCC CRL-1580™)으로 명명된 비-분비 젯과 골수종 세포주를 이용한 표준 방법에 의해 융합을 수행하였다. 클로닝을 표준 방법에 의해 수행하였다.
- [0279] 클론을 결합 및 억제 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 이후의 결합 ELISA 면역검정 절차는 하기 프로토콜에 따랐다. 플레이트를 웰 당 50 μ L의 PBS 중 1 μ g/mL로 BSA 컨쥬게이트에 대해 상기 기재된 것과 유사한 방식으로 제조된 난알부민에 컨쥬게이션된 3-에피머로 코팅(coating)하였다. 플레이트 코팅을 실온에서 1시간 이상 동안 수행하였다. 이후, 플레이트를 가볍게 쳐서 건조시키고, 웰 당 200 μ L의 차단 완충액 희석액(0.05% TWEEN® 20을 함유하는 PBS 중 0.5% 카세인(Casein) 용액)으로 차단시켰다. 플레이트 차단을 2°C-8°C에서 1시간 동안 또는 밤새 수행하였다. 이후, 플레이트를 3회 세척하고, 가볍게 쳐서 건조시켰다. 이후, 스크리닝되는 모노클로날 항체를 다음과 같이 각각의 웰에 첨가하였다: 25 μ L의 PBS를 융합 성장 플레이트의 해당 웰로부터 옮겨진 25 μ L의 배양 상청액과 혼합하였다. 플레이트 진탕과 함께 실온에서 약 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 플레이트 스택커(plate stacker)와 함께 플레이트 세척기(BioTek, Winooski VT)를 이용하여 세척하였고, 세척 완충액은 0.05% TWEEN® 20을 함유하는 MILLI-Q® 물(Millipore Corporation, Billerica, MA)이었다. 1:3000으로 차단 완충액 희석액 중에 희석된 효소 컨쥬게이트(HRP에 커플링된 염소 항-마우스 IgG)를 웰 당 50 μ L로 첨가하였다. 인큐베이션을 진탕과 함께 실온에서 약 1시간 동안 수행하였다. 이후, 플레이트를 세척하고, 색소 용액(Moss Substrates, Pasadena MD로부터의 TMB)을 실온에서 10분 동안 웰 당 100 μ L의 부피로 첨가하였다. 플레이트를 ELISA 플레이트 판독기를 이용하여 650 nm에서 판독하였다.
- [0280] 상기 스크리닝 기술을 기초로 하여, 적합한 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마를 선택하였다. 하나의 상기 모노클로날 항체를 항체 8F10으로 명명하였고, 이는 IgG2a 카파(kappa) 항체이다. 또 다른 상기 모노클로날 항체를 항체 4G8로 명명하였고, 이는 IgG2a 카파 항체이다.
- [0281] 추가로, 클론을 하기 프로토콜에 따라 억제 ELISA 절차를 이용하여 또한 스크리닝하였다. 플레이트를 웰 당 50

μL 의 포스페이트 완충 염수 중 $1 \mu\text{g/mL}$ 의 난알부민에 컨쥬게이션된 3-에피머로 코팅하였다. 플레이트 코팅을 실온에서 1시간 이상 동안 또는 약 2°C 내지 8°C 에서 밤새 수행하였다. 이후, 플레이트를 가볍게 쳐서 건조시키고, 웰 당 $200 \mu\text{L}$ 의 차단 완충액 희석액(0.05% TWEEN® 20을 함유하는 PBS 중 0.5% 카세인 용액)으로 차단시켰다. 플레이트 진탕과 함께 실온에서 30분 이상 동안 인큐베이션함으로써 플레이트 차단을 수행하였다. 플레이트를 세척하였다. 이후, 스크리닝되는 모노클로날 항체를 하기와 같이 자유 3-에피머와 함께 각각의 웰에 첨가하였다: 웰 당 $25 \mu\text{L}$ 의 배양 상청액을 융합 성장 플레이트의 해당 웰로부터 옮기고, $25 \mu\text{L}$ 의 $2 \mu\text{g/mL}$ 의 3-에피머-25OH 비타민 D_3 를 첨가하였다. 플레이트 진탕과 함께 실온에서 약 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 플레이트 스택커와 함께 플레이트 세척기(BioTek, Winooski VT)를 이용하여 세척하였고, 세척 완충액은 0.05% TWEEN® 20을 함유하는 MILLI-Q® 물(Millipore Corporation, Billerica, MA)이었다. $1:3000$ 으로 차단 완충액 희석액 중에 희석된 효소 컨쥬게이트(HRP에 커플링된 염소 항-마우스 IgG)를 웰 당 $50 \mu\text{L}$ 로 첨가하였다. 인큐베이션을 진탕과 함께 실온에서 약 1시간 동안 수행하였다. 이후, 플레이트를 세척하고, 색소 용액(Moss Substrates, Pasadena MD로부터의 TMB)을 웰 당 $100 \mu\text{L}$ 의 부피로 첨가하였다. 요망되는 항체가 하이브리도마 상청액에 존재하는 경우, 자유 3-에피머를 함유하지 않는 웰에 비해 광학 밀도에서의 감소가 관찰되었다. 항체의 특이성을 모니터(monitor)하기 위한 대조군으로서 자유 3-에피머-25 OH 비타민 D_3 대신 25OH 비타민 D_3 를 이용하였다. 3-에피머에 결합하고, 25OH 비타민 D_3 에 결합하지 않는 항체를 선택하였다.

[0282] 폴리클로날 항체 생성: 토끼를 상기 기술된 바와 같이 제조된 $500 \mu\text{g}$ /용량의 HMCHEMOIO-CMO BSA로 면역화시켰다. 1회의 일차 면역화 및 2주 간격의 5회의 부스터 면역화를 수행하였고, 2개의 시험 혈액 및 1개의 생산 혈액을 수거하고, 항-혈청을 상기 기재된 바와 같이 ELISA에서 시험하였다.

[0283] 실시예 3

[0284] 25OH 비타민 D에 대한 면역검정

[0285] 면역검정 절차

[0286] 이용된 25OH 비타민 D(25(OH)D) 면역검정 포맷은 LOCI® 검정 기술을 기초로 한 동종 경쟁 화학발광 면역검정법이었다. 검정을 Siemens Dimension® EXL 자동화 통합 임상 화학 시스템(Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL)에서 수행하였다. 검정은 혈청 및 혈장 샘플 중 25(OH) D_2 및/또는 25(OH) D_3 의 전체 농도를 측정하였다. LOCI® 검정 시약은 방출 시약, 2개의 합성 비드 시약 및 비오틴화된 모노클로날 항-25OH 비타민 D 항체 시약을 포함하였다. 첫 번째 비드 시약("센시비드"로 명명됨)을 스트랩타비딘으로 코팅시켰고, 이는 광증감성 염료를 함유하였다. 두 번째 비드 시약("케미비드"로 명명됨)을 25(OH) D_3 유사체로 코팅시켰고, 이는 화학발광 염료를 함유하였다. 샘플을 방출 시약과 함께 인큐베이션하여 비타민 D 결합 단백질로부터 3-에피머 화합물을 포함하는 25(OH)D 분자를 방출시켰다. 이후, 반응 혼합물을 비오틴화된 항체와 함께 인큐베이션하여 25(OH)D-비오틴화된 항체 복합체를 형성시켰다. 비오틴화된 항체(양 모노클로날 항체)는 3-에피-25(OH)D와 교차 반응하므로, 3-에피머 비타민 D 화합물로부터 유래되는 검정 신호를 최소화시키기 위해 $100 \mu\text{g/mL}$ 의 항-3-에피머-VD 항체 8F10.1을 첨가하였다. 과량의 자유 비오틴화 항체를 결합시키기 위해 케미비드를 첨가하였다. 이후, 비오틴화 항체의 바이오틴 부분에 결합시키기 위해 센시비드를 첨가하였다. 케미비드-유사체/항체-바이오틴/스트랩타비딘-센시비드의 응집물이 결과로서 형성되었다. 680 nm 의 광을 이용한 반응 혼합물의 조명은 센시비드로부터 일중항 산소를 발생시키며, 이는 케미비드로 확산되어, 화학발광 반응을 촉발시켰다. 생성된 화학발광 신호를 612 nm 에서 측정하였고, 이는 샘플 중의 전체 25(OH)D의 농도와 반비례한다.

[0287] 면역검정을 위한 시약의 제조

[0288] 25(OH) D_3 케미비드의 합성 - EPRM-EDA와 25(OH) D_3 카르바메이트를 커플링시켜 25(OH) D_3 케미비드를 합성하였다.

이용된 물질은 EPRM-EDA 비드, 1-에틸-3-(3-디메틸 아미노프로필)카르보디이미드(EDAC) 플루카(Fluka) 설포-N-하이드록시석신이미드(SNHS), 25(OH) D_3 -3-카르바메이트, GAFAC® 계면활성제 용액 16% , 무수 DMSO, 10% MeOP 및 1% GAFAC® 계면활성제를 함유하는 50 mM MES pH6 완충액이었다.

[0289] EPRM-EDA 비드의 제조 - EPRM 비드(2000 mg , 20.0 mL)를 40-mL 바이알(vial)에 첨가하였다. EPRM 비드를 미국 특허 7,179,660호에 기재된 것과 유사한 절차에 의해 제조하였고, 화학발광 화합물은 유로퓸 킬레이트(europium chelate)를 지닌 2-(4-(N,N, 디-테트라데실)-아닐리노-3-페닐 티옥센이었다. EDA(800 mg , $890 \mu\text{L}$)를 10 mL 의 MES pH 6 완충액("완충액") 및 약 4.2 mL 의 6N HCl과 합쳤다. 혼합물의 pH는 약 6.9 이거나, 약 6.9 로 조정하였다. EDA 용액을 볼텍싱(vortexing)하면서 EPRM 비드에 첨가하고, 혼합물을 15분 동안 실온에서 흔들었다.

소듐 시아노보로하이드라이드(400 mg)를 15 mL 바이알에서 10 mL의 DI 물과 합치고, 조합물을 상기로부터의 비드 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 37℃에서 18-20시간 동안 진탕시켰다. 비드를 6개의 40 mL 원심분리 튜브(tube)로 옮겼다. MES 완충액을 첨가하여 부피가 35 mL가 되게 하고, 혼합물을 19,000 rpm에서 30분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 따라내고, 비드를 교반-막대를 이용하여 2 mL의 완충액에 재현탁시키고, 추가의 완충액을 35 mL로 첨가하였다. 혼합물을 차게 유지하기 위해 얼음을 이용하면서, 혼합물을 18 와트(Watt)의 전력으로 30초 동안 초음파처리하였다. 모든 활성화 화학물질을 제거하기 위해 세척/초음파처리 단계를 4회 수행하였다. 마지막 MES 완충액 원심분리 후에, 5% MeOP 및 0.1% Tween® 20을 함유하는 2 mL의 완충액("제 2 완충액")을 재현탁 단계를 위해 튜브에 첨가하였다. 추가의 제 2 완충액을 초음파처리 전에 35 mL로 첨가하였다. 비드 현탁액을 19,000 rpm에서 30분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 폐기하였다. 최종 초음파처리는 25 mg/희석액 mL를 제공하기 위해 각 튜브에서 12 mL의 제 2 완충액을 이용하였다. 입자 크기는 UPA 기기 상에서 측정시 277 nm였다.

[0290] EPRM 케미비드는 관련 기재가 본원에 참조로서 포함되는 미국특허 6,153,442호 및 미국 특허 출원 공개 20050118727A호에 기재된 방법과 유사한 방식으로 제조되었다. EPRM 케미비드는 자유 알데하이드 작용기를 갖는 텍스트란 알데하이드 외층 및 아미노텍스트란 내층을 포함한다. 예를 들어, 관련 기재가 본원에 참조로서 포함되는 미국특허 5,929,049호, 7,179,660호 및 7,172,906호를 참조하라. 반응은 약 0 내지 약 40℃의 온도에서 약 16 내지 약 64시간의 기간 동안 약 5.5 내지 약 7.0, 또는 약 6의 pH에서, 예를 들어 MES와 같은 적합한 완충액을 이용한 완충된 수성 매질에서 수행되었다. 예를 들어, 카복시메톡시아민 헤미하이드로클로라이드(CMO)와 같은 적합한 켄칭제(quenching agent)의 첨가에 의해 반응물을 켄칭시키고, 후속하여 입자를 세척하였다.

[0291] 텍스트란 알데하이드 외층 상의 알데하이드기는 환원성 아민화 조건 하에 에틸렌 디아민과 반응하여 에틸렌 사슬 및 말단 아민기를 포함하는 펜던트(pendant) 모이어티를 지니는 시약 EPRM-EDA를 형성하였다. 환원성 아민화 조건은, 예를 들어, 금속 하이드라이드와 같은 환원제의 이용을 포함한다. 반응은 수성 매질에서 반응 동안 약 20℃ 내지 약 100℃의 온도에서 약 1시간 내지 약 48시간의 기간 동안 수행되었다.

[0292] 25(OH)D₃-3-카르바메이트 (25(OH)D₃-3-카르바메이트)의 합성 - 1 mL 무수 아세트니트릴 중 ChemReagents.com, Sugarland TX로부터 구입한 22 mg (55 μmol) 25(OH)D₃, 100 mg (420 μmol) 디석신아미드 카르보네이트(DSC), 100 μL 트리에틸아민의 혼합물을 5-ml 플라스크(호일(foil)로 덮음)에서 실온에서 18시간 동안 질소 하에 교반시켜 활성화 25(OH)D₃를 제조하였다. TLC(EtOAc:헥산 = 2:1)는 어떠한 출발 물질도 남아 있지 않음을 나타내었다. 150 mg의 카복시메톡시아민 헤미하이드로클로라이드(CMO), 0.3 mL 트리에틸아민 및 1 mL DMF를 10 mL 플라스크에 첨가시킴에 의해 현탁액을 제조하였다. 활성화 25(OH)D₃를 함유하는 용액을 CMO 현탁액에 교반하면서 적가하고, 교반을 또 다른 18시간 동안 지속시켰다. 진공을 적용시켜 용매를 가능한 한 많이 제거하였다(가열 조 온도는 50℃를 넘지 않게 유지시킨다). EtOAc(25 mL)를 잔류물에 첨가하고, 이를 2 mL의 염수로 3회 세척하였다. 유기상을 무수 Na₂SO₄로 건조시키고, 여과시켰다; 용매를 로타밤(rotavap)을 이용하여 제거하였다. 건조 후에 미정제 생성물(42 mg)을 획득하였고, 이를 HPLC에 의해 정제시켰다. 순수한 생성물(24 mg)을 고 진공 하에 건조시킨 후 획득하였다. 생성물을 1.2 mL의 무수 DMSO에 용해시켰다. 분취량을 바이알에 옮기고, 이를 -70℃에서 유지하였다.

[0293] EPRM-EDA와 합텐 25(OH)D₃-카르바메이트의 커플링 - 1.2 mg 합텐을 2-mL 바이알에 첨가하였다. 11.2 mg EDAC 및 15.5 mg SNHS + 3.73 mL 건조 DMSO를 5-mL 바이알에 첨가하였다. EDAC/SNHS 용액을 회전시켜 내용물을 용해시켰다. 1.14 mL EDAC/SNHS 용액을 합텐을 함유하는 바이알에 첨가하였다. 혼합물을 22시간 동안 회전시켰다. EPRM-EDA(200 mg)를 높은 pH의 세척 완충액 및 이후 MES pH6 완충액으로 1회 세척하였다. 5-mL 바이알에 1.08 mL(100 mg)의 세척 완충액을 첨가한 후 143 mL의 1.6% GAFAC® 계면활성제를 첨가하였다. 작은 시험관에 256 건조 DMSO를 첨가한 후 49 μL EDAC/SNHS/합텐을 첨가하였다. DMSO/합텐 용액을 비드 혼합물에 적가하였다(첨가 동안 볼텍싱으로 처리). 비드/합텐 혼합물을 실온에서 밤새 회전시켰다.

[0294] 비드/합텐 혼합물을 50-mL 원심분리 튜브로 옮기고, 10% 1-메톡시-2-프로판올/1% GAFAC® 계면활성제/MES pH6 완충액을 이용하여 35 mL로 희석시켰다. 튜브를 30분 동안 10℃에서 18,500 rpm에서 원심분리시켰다. 상청액을 폐기하고, 1 mL의 동일 완충액으로 대체하였다. 펠렛(pellet)을 교반-막대로 재현탁시켰다. 바이알을 동일 완충액을 이용하여 35 mL로 충전시켰다. 튜브를 저온으로 유지시키기 위해 얼음을 이용하여 1분 동안 튜브를 18-21 와트에서 초음파처리하였다. 원심분리/세척을 6회 반복하였다. 6번째 세척 후, 완충액을 합텐 세척 완

충액 pH7.2로 교환하고, 2회의 추가 세척을 수행하였다. 마지막 세척 및 1 mL 합텐 세척 완충액으로 재현탁 후, 4 mL 합텐 세척 완충액을 첨가하였다. 비드 혼합물을 컵(cup) 초음파 파쇄기(sonicator)에서 50% 전력으로 초음파처리하였다. 입자 크기를 UPA에 의해 298 nm로 측정하였다. 고형물 퍼센트 검정(percent solids assay)을 수행하였고, 비드 혼합물을 10 mg/mL로 희석시켰다. 이러한 케미비드 시약을 50 mM MES 완충액 중에서 포몰레이션시켰다.

[0295] 항-25(OH)D 항체의 비오틴화 - NHS-PEO₄-바이오틴(Pierce Chemical Company, Rockford IL)을 항-25(OH)D 항체(Bioventix, Farnham, Surrey, UK로부터의 양 모노클로날 항체)와 커플링시켰다. 3 mg의 항-25(OH)D 항체를 각각 10 mL 아미콘(Amicon) 중 10 mL의 항체 투석 완충액(10 mM NaH₂PO₄ pH 7.0/300 mM NaCl)으로 2회 완충액 교환하였고, 이후 3.0 mg/mL로 농축시켰다. 1mg의 NHS-PEO₄-바이오틴을 100 μ L 항체 투석 완충액에 용해시켜 10 mg/mL의 바이오틴 시약 용액을 만들고, 이를 항-25(OH)D 항체 용액에 첨가(35 μ L)하였다. 반응 혼합물을 밤새 실온에서 흔들어 주었다. 혼합물을 각각 10 mL 아미콘 중 10 mL의 항체 투석 완충액으로 3회 세척한 후, 약 1 mL로 농축시켰다. 농도를 UV A280에서 측정하였다. 비오틴화된 항-25(OH)D 항체 시약을 25 mM 시트르산 완충액, 300 mM NaCl, 1mM EDTA, 차단 단백질 및 보존제를 함유하는 pH 5.0의 수성 완충액 중에서 포몰레이션시켰다.

[0296] 센시비드 - 스트렙타비딘-증감제 비드를 미국 특허 6,153,442호, 7,022,529호, 7,229,842호 및 미국 특허 출원 공개 20050118727A호에 기재된 것과 유사한 방법을 이용하여 제조하였다. 광증감제는 비스-(트리헥실)-실리콘-t-부틸-프탈로시아닌이었다. 센시비드 시약의 농도는 150 mM NaCl을 함유하는 HEPES 완충액, pH 8.0 중 200 μ g/mL였다.

[0297] 방출 시약 - 5 mM HEPES 완충액 중 소듐 살리실레이트.

[0298] 면역검정의 결과

[0299] 검정을 위한 3-에피머 교차-반응성에 대한 항-3-에피머-VD 항체 8F10.1(항-3-에피머 VD Ab) 첨가의 효과가 표 1에 제시된다. 25(OH)D₂ 또는 25(OH)D₃ 화합물을 함유하는 10개의 환자 혈청을 Sigma로부터 구입한 100 ng/mL의 3-에피머 비타민 D₃ 화합물(스톡(Stock) 번호 751324)로 스파이킹(spiked)시켰다. 3-에피머 교차-반응성은 스파이킹된 3-에피머 화합물을 갖고 갖지 않는 25(OH)D₂ 또는 25(OH)D₃ 값들 사이의 차이를 첨가된 3-에피머 화합물의 양으로 나눔에 의해 계산되었다. 100 μ g/mL의 항-3-에피머-VD 항체 8F10.1의 첨가로, 평균 3-에피머 교차-반응성은 13.7%로부터 2% 미만으로 감소하였다.

[0300] 표 1

샘플 ID	스파이킹된 3-에피머 D ₃	항-3-에피머 VD Ab 첨가되지 않음		항-3-에피머 VD Ab 첨가됨	
		ng/mL	교차반응성	ng/mL	교차반응성
1	없음	30.2		30.7	
	있음	48.0	17.9%	33.0	2.2%
2	없음	22.5		23.2	
	있음	40.5	17.9%	25.6	2.4%
3	없음	19.8		20.7	
	있음	31.6	11.9%	22.5	1.8%
4	없음	40.4		40.5	
	있음	53.0	12.6%	41.4	1.0%
5	없음	46.6		45.6	
	있음	62.7	16.1%	49.2	3.5%
6	없음	47.3		48.5	
	있음	57.5	10.2%	46.4	-2.0%
7	없음	53.1		55.4	
	있음	62.2	9.1%	55.4	0.0%
8	없음	39.5		40.8	
	있음	50.0	10.5%	43.8	3.0%
9	없음	47.4		48.6	
	있음	62.8	15.3%	50.8	2.2%
10	없음	23.6		24.8	
	있음	39.1	15.5%	28.6	3.8%
평균 교차반응성			13.7%		1.8%

[0301]

[0302]

도 9는 항-3-에피머-VD 항체 8F10.1(3-에피머 Ab)이 첨가되고, 첨가되지 않은 시약을 이용하여 생성된 표준 곡선의 비교를 예시한다. 2개의 곡선의 완전한 중첩은 항-3-에피머-VD 항체 8F10.1이 25(OH)D₃(도 9에서 250H Vit D3)의 측정에 영향을 미치지 않는 것을 제시하며, 이는 항체가 3-에피머 화합물에 특이적이고, 25(OH)D₃와 관찰 가능한 교차-반응성을 갖지 않는 것을 나타낸다.

[0303]

실시예 4

[0304]

3-에피-25OH 비타민 D의 면역검정

[0305]

면역검정 절차

[0306]

3-에피-25OH 비타민 D(3-에피-25(OH)D)의 측정은 실시예 3에서 상기 기재된 것과 유사한 LOCI® 검정 기술을 기초로 한 동종 경쟁 화학발광 면역검정을 이용하였다. 검정을 Siemens Dimension® EXL 자동화 통합 임상 화학 시스템(Siemens Healthcare Diagnostics Inc.)에서 수행하였다. 3-에피-25(OH)D의 측정에 이용된 LOCI® 검정 시약은 방출 시약, 2개의 합성 비드 시약 및 비오틴화 모노클로날 항-3-에피머 항체 시약을 포함하였다. 첫 번째 비드 시약(센시비드)을 스트렙타비딘으로 코팅하였고, 이는 광증감성 염료를 함유하였다. 두 번째 비드 시약(케미비드)을 실시예 1에 대해 상기 기재된 것과 유사한 방식으로 제조된 3-에피머 유사체(Z'이 비-폴리(아미노산) 표지, 즉, EPRM-EDA 케미비드인 상기 화학식 IIa의 화합물)로 코팅하였다. 샘플을 방출 시약과 함께 인큐베이션하여 비타민 D 결합 단백질로부터 3-에피머 화합물을 포함하는 25(OH)D 분자를 방출시켰다. 이후, 반응 혼합물을 비오틴화된 항체와 함께 인큐베이션하여 3-에피-25(OH)D/비오틴화 항체 복합체를 형성시켰다. 과량의 자유 비오틴화 항체를 청소시키기 위해 케미비드를 첨가하였다. 이후, 센시비드를 첨가하였고, 이는 비오틴화 항체의 바이오틴 부분에 결합하였다. 케미비드-유사체/항체-바이오틴/스트렙타비딘-센시비드의 응집물이 결과로서 형성되었다. 680 nm의 광에 의한 반응 혼합물의 조명은 센시비드로부터 일중항 산소를 발생시켰고, 이는 케미비드로 확산되어, 화학발광 반응을 촉발시켰다. 생성된 화학발광 신호를 612 nm에서 측정하였고, 이는 샘플 중의 전체 3-에피-25(OH)D의 농도와 반비례한다.

[0307]

면역검정을 위한 시약의 제조

[0308]

3-에피머 유사체 케미비드의 합성 - 3-에피-25(OH)D의 검출을 위한 본 검정에서 사용하기 위한 케미비드를

25(OH)D₃ 케미비드의 합성에 대해 실시예 3에서 상기 기재된 것과 유사한 방식으로 제조하였고, 여기서 합텐은 Z'이 케미비드인 화학식 IIa의 화합물이다.

[0309] 케미비드 시약 - 50 nM MES 완충액 중 3-에피머 유사체 케미비드.

[0310] 항-3-에피머-VD 항체 8F10.1의 비오틴화 - 항-3-에피머-VD 항체 8F10.1의 비오틴화를 항-25(OH)D 항체의 비오틴화에 대해 실시예 3에 상기 기재된 것과 유사한 방식으로 수행하였다.

[0311] 비오틴화된 항체 시약 - 25 mM 시트르산 완충액 중 상기 언급된 비오틴화된 항-3-에피머-VD 항체 8F10.1.

[0312] 센시비드 시약 - 센시비드 시약은 실시예 3에서와 동일하였다.

[0313] 면역검정의 결과

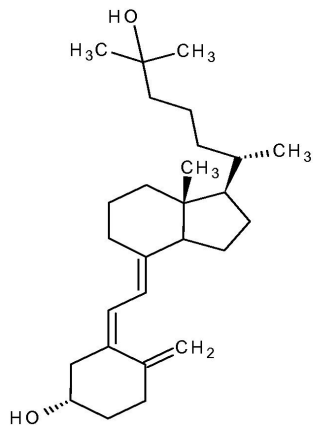
[0314] 도 10은 항-3-에피머-VD 항체 8F10.1를 이용한 샘플 중의 3-에피-25(OH)D의 결정을 위한 면역검정법에 대한 표준 곡선을 예시한다. 화학발광 킬로카운트(Kilocount)는 상기 기재된 바와 같이 측정된 화학발광 신호를 나타낸다.

[0315] 본 명세서에서 인용된 모든 간행물 및 특허 출원은 각 개별적인 간행물 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참조로서 포함된다고 기재된 바와 같이 본원에 참조로서 포함된다.

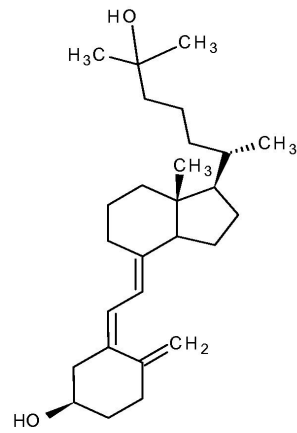
[0316] 상기 기재된 예는 본원에 기재된 원리를 나타내는 다수의 특수한 예들 중 단지 일부의 예시임이 이해되어야 한다. 명백하게, 당업자는 하기 청구범위에 의해 정의된 범위를 벗어남이 없이 많은 다른 방식을 용이하게 고안할 수 있다.

도면

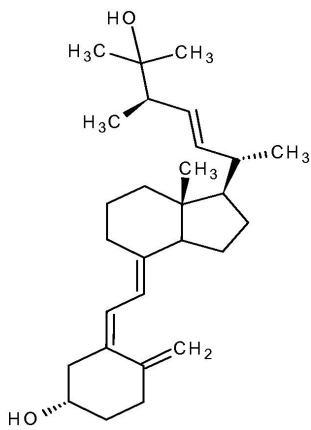
도면1



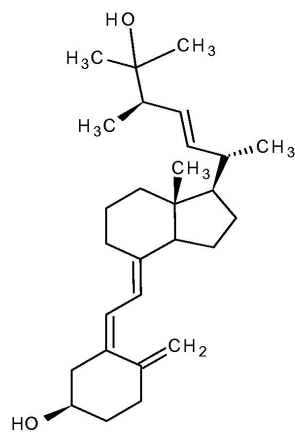
25-하이드록시비타민 D_3



3-에피-25-하이드록시비타민 D_3

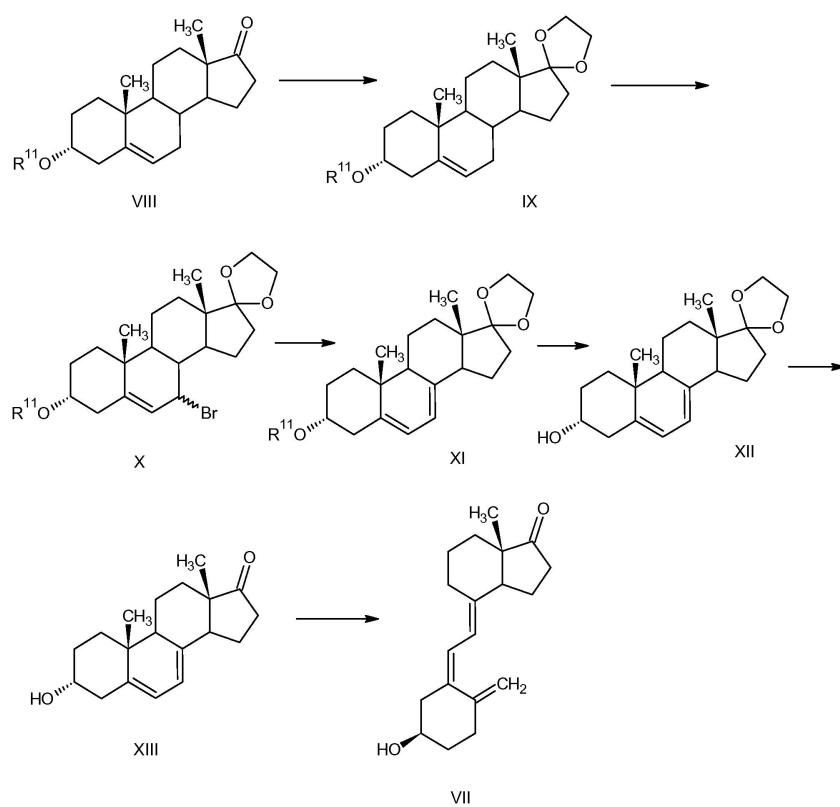


25-하이드록시비타민 D_2

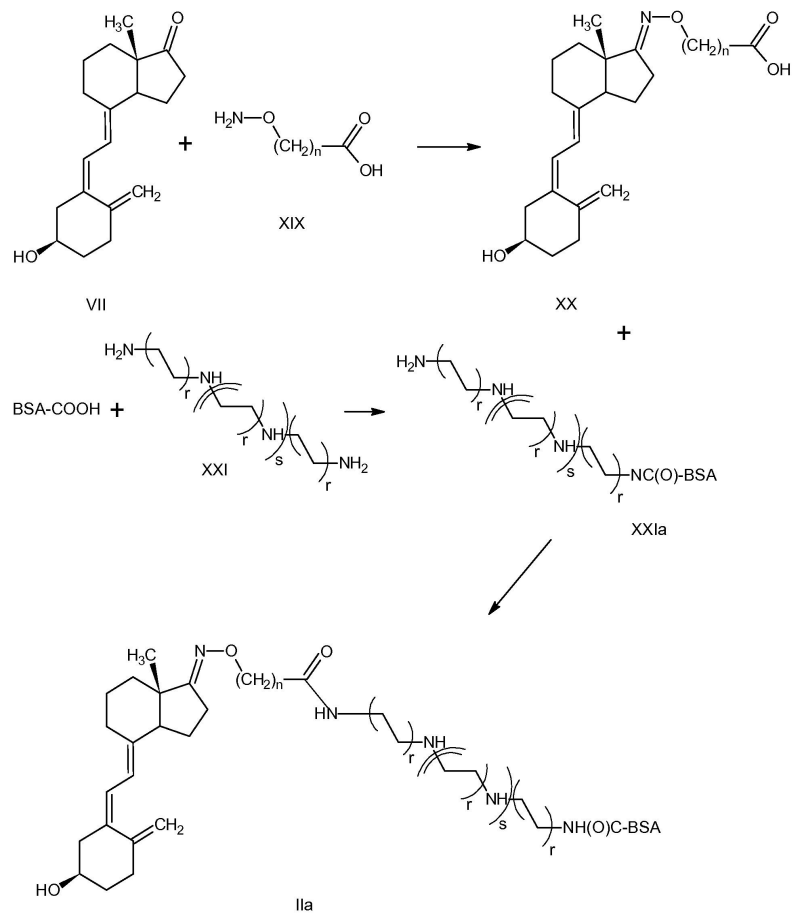


3-에피-25-하이드록시비타민 D_2

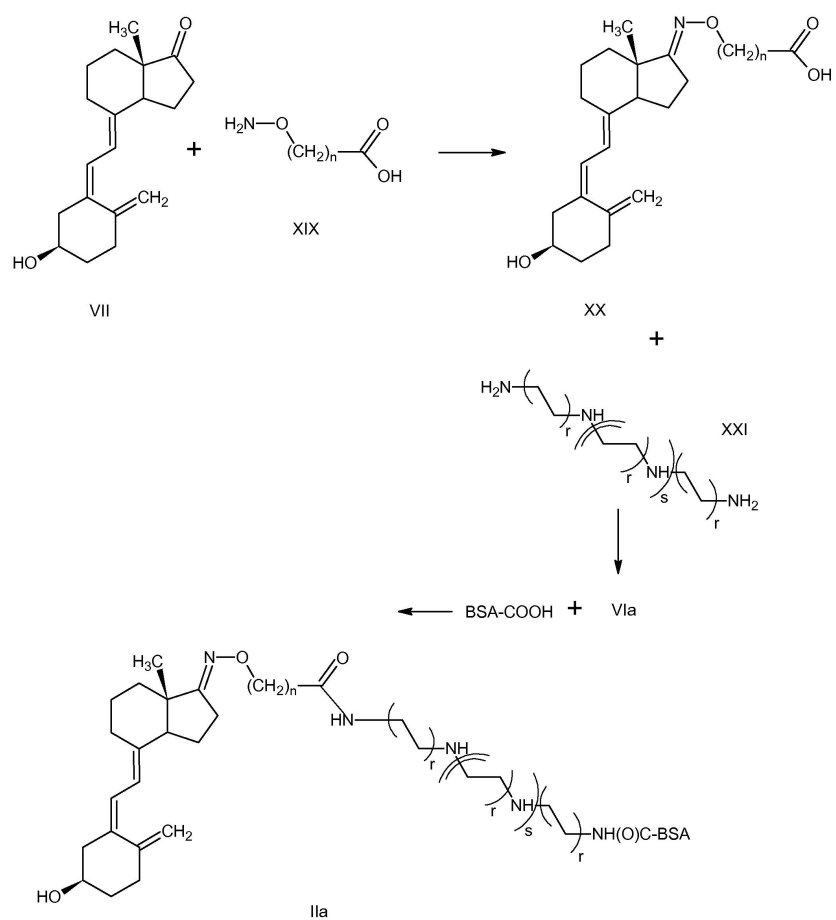
도면2



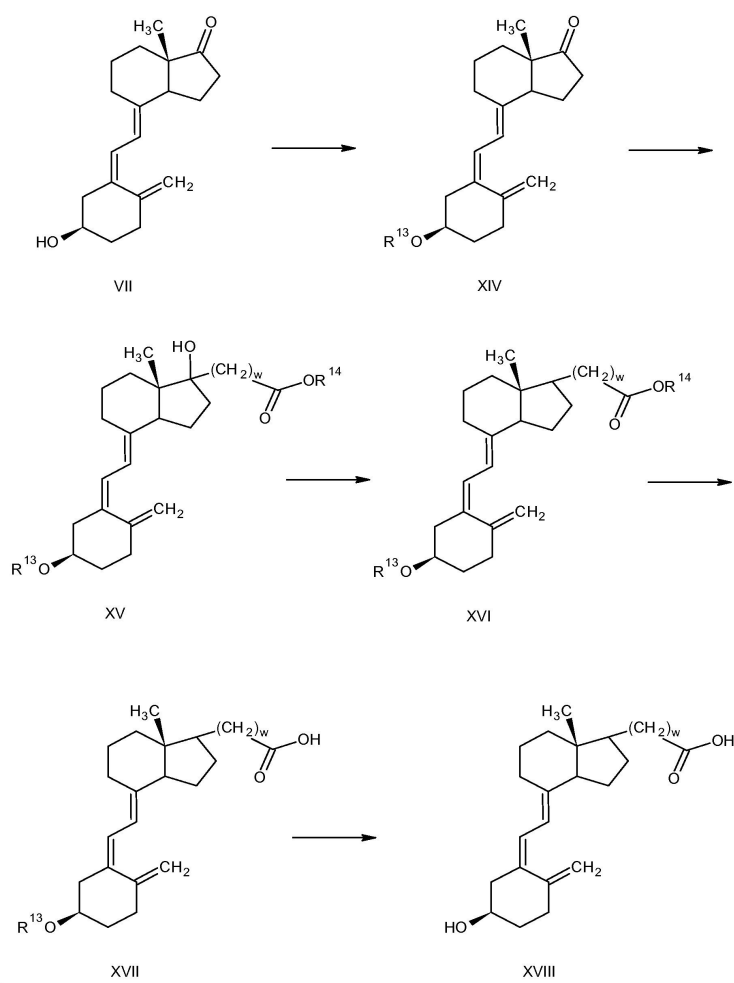
도면3



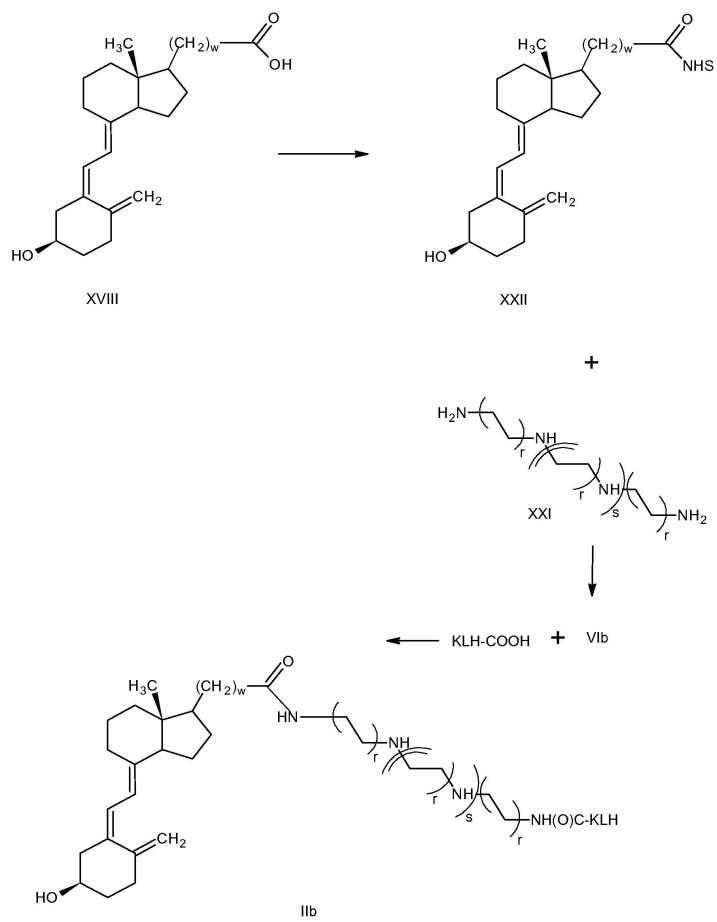
도면4



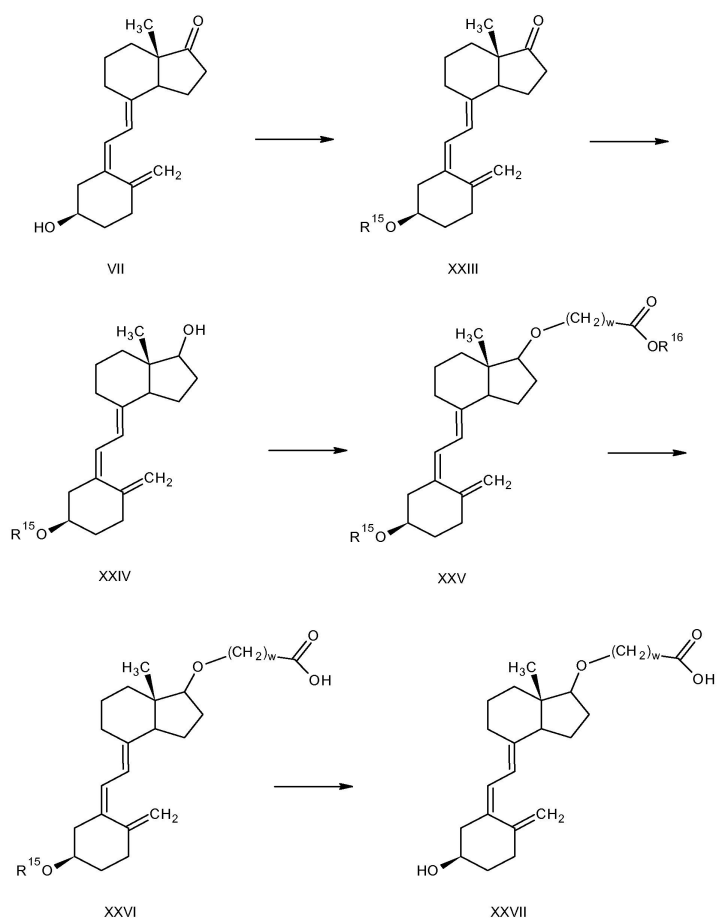
도면5



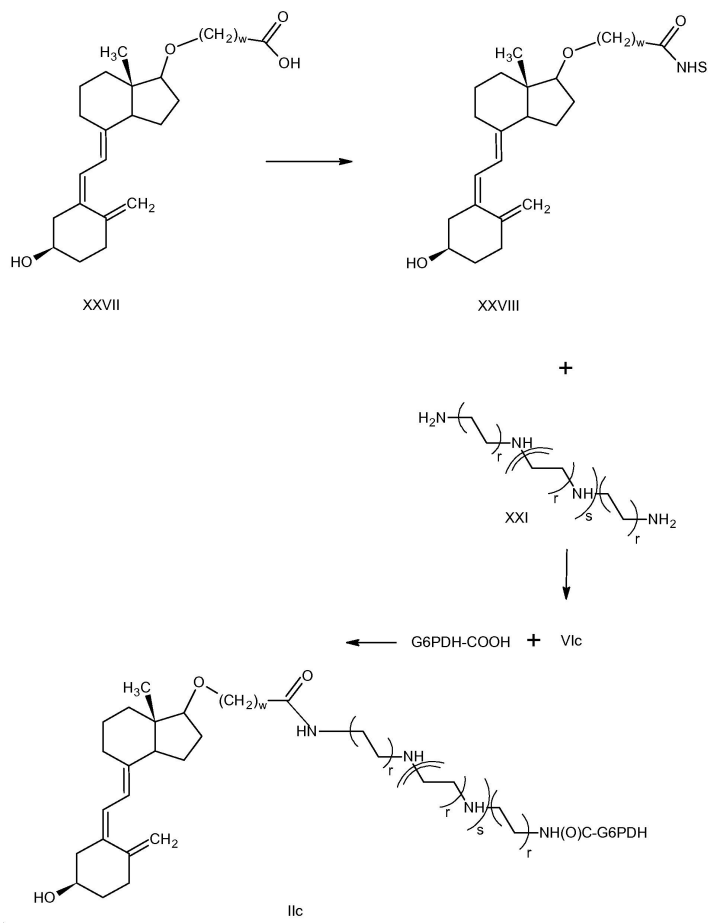
도면6



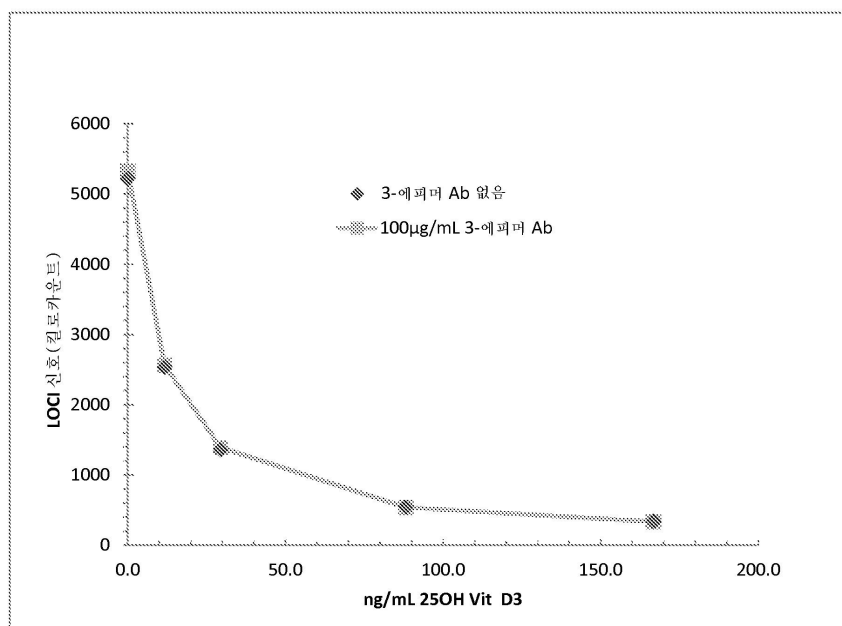
도면7



도면8



도면9



도면10

