

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5730908号
(P5730908)

(45) 発行日 平成27年6月10日(2015. 6. 10)

(24) 登録日 平成27年4月17日(2015. 4. 17)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 27/62 (2006.01)

F I

G O 1 N 27/62

V

請求項の数 39 (全 64 頁)

(21) 出願番号	特願2012-550213 (P2012-550213)	(73) 特許権者	510075457
(86) (22) 出願日	平成23年1月25日 (2011. 1. 25)		ディーエイチ テクノロジーズ デベロッ プメント プライベート リミテッド
(65) 公表番号	特表2013-518258 (P2013-518258A)		シンガポール国 048624 シンガポ ール, ユーオービー プラザ, ラッフ ルズ プレイス 80 ナンバー25-0 1
(43) 公表日	平成25年5月20日 (2013. 5. 20)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/022454	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02011/091436		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成23年7月28日 (2011. 7. 28)	(74) 代理人	100062409
審査請求日	平成26年1月24日 (2014. 1. 24)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	61/297, 917	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成22年1月25日 (2010. 1. 25)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビタミンD3、ビタミンD2、およびこれらの代謝体の定量分析

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

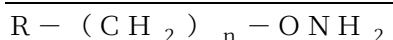
試料中のビタミンD分析物を定量するための方法であって、前記ビタミンD分析物が、
ビタミンD2、ビタミンD3、ビタミンD2の代謝体、およびビタミンD3の代謝体のう
ちの1つまたは複数を含み、前記方法が、

ビタミンD分析物をジエノフィル試薬で処理して、ディールス・アルダー付加物を形成
させること；

前記ディールス・アルダー付加物をアミノキシマススペクトロメトリー (MS) タグ化
試薬で標識して、標識付加物を形成させること；および

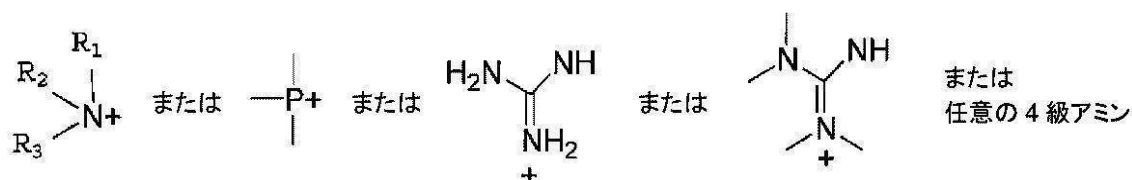
マスマスペクトロメトリーを用いて前記標識付加物を分析すること、
を含み、

前記アミノキシMSタグ化試薬が、以下の構造：



(式中、Rは、

【化 16】



であり、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、各々独立に、水素原子またはアルキル基であり、かつ n は1～20である。)を有する化合物を含む、
方法。

10

【請求項2】

既知濃度の既知ビタミンD分析物を含む標準を提供すること；

前記標準中の前記既知ビタミンD分析物をジエノフィル試薬で処理して、標準ディールス・アルダー付加物を形成させること；

前記標準ディールス・アルダー付加物をアミノキシMSタグ化試薬で標識して、標識標準付加物を形成させること；

前記標識標準付加物と前記標識付加物を混合して、混合物を形成させること；および

前記混合物を分離して、分離された標識分析物を形成させること

をさらに含み、ここで、前記標識付加物を分析することが、前記分離された分析物を分析
することを含み、請求項1に記載の方法。

20

【請求項3】

前記標準ディールス・アルダー付加物を標識するのに用いられる前記アミノキシMSタグ化試薬が、同重体タグのセットに由来する第1の同重体タグを含み、かつ前記ディールス・アルダー付加物を標識するのに用いられる前記アミノキシMSタグ化試薬が、前記第1の同重体タグとは異なる前記同重体タグのセットに由来する第2の同重体タグを含む、
請求項2に記載の方法。

【請求項4】

マスペクトロメトリーを用いて前記標識付加物を分析することが、前記標識付加物のLC-MSMS分析を用いることを含む、請求項1に記載の方法。

30

【請求項5】

三連四重極MSプラットフォームを用いる前記標識分析物の親娘イオンランジションモニタリング(PDITM)をさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記標識付加物が、MSMS時にニュートラルロスを経て、荷電分析物種であるレポーターイオンを残す、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記標識付加物が、MSMS時に荷電フラグメントを失う、請求項4に記載の方法。

【請求項8】

前記アミノキシMSタグ化試薬が、MSMS時にタグフラグメントであるレポーターイオンを形成させる、請求項4に記載の方法。

40

【請求項9】

前記ビタミンD分析物が複数の異なるビタミンD分析物を含み、かつ前記標識することが、複数の異なるタグ化試薬で標識することを含み、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記ビタミンD2の代謝体が、ビタミンD2のモノヒドロキシ代謝体および／またはジヒドロキシ代謝体を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記ビタミンD3の代謝体が、ビタミンD3のモノヒドロキシ代謝体および／またはジヒドロキシ代謝体を含む、請求項1に記載の方法。

50

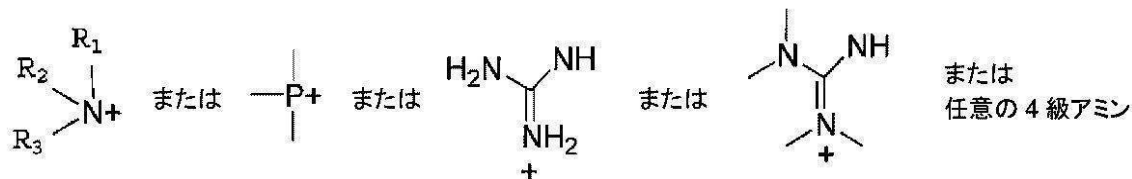
【請求項 1 2】

包装中に、ジエノフィル試薬およびアミノキシMSタグ化試薬を含むキットであって、
前記アミノキシMSタグ化試薬が、以下の構造：



(式中、Rは、

【化 1 8】



10

であり、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、各々独立に、水素原子またはアルキル基であり、かつ n は1～20である。)を有する化合物を含む、
キット。

【請求項 1 3】

既知ビタミンD分析物を含む標準を含む、請求項 1 2 に記載のキット。

【請求項 1 4】

既知濃度の既知ビタミンD分析物を含む標準を含む、請求項 1 2 に記載のキット。

20

【請求項 1 5】

前記アミノキシMSタグ化試薬が、同重体タグのセットに由来する同重体タグを含み、かつ前記キットが、前記同重体タグのセットに由来する同重体タグをそれぞれ含む複数の異なるアミノキシMSタグ化試薬をさらに含む、請求項 1 2 に記載のキット。

【請求項 1 6】

前記ビタミンD分析物を標識するための指示書を含む、請求項 1 2 に記載のキット。

【請求項 1 7】

試料中のビタミンD分析物を定量するための方法であって、前記ビタミンD分析物が、ビタミンD 2、ビタミンD 3、ビタミンD 2の代謝体、およびビタミンD 3の代謝体のうちの1つまたは複数を含み、前記方法が、

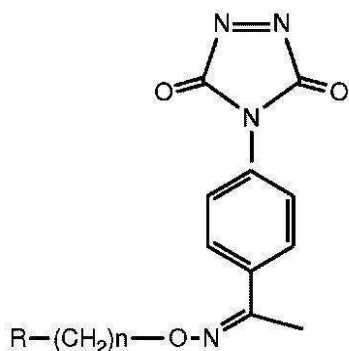
30

ビタミンD分析物をジエノフィル含有1段階タグ化試薬で処理して、標識ディールス・アルダー付加物を形成させること；および

マスペクトロメトリーを用いて前記標識付加物を分析すること
を含み、

前記1段階タグ化試薬が以下の構造：

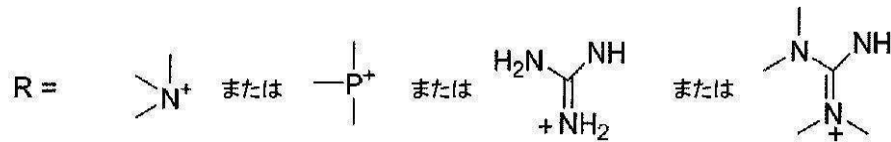
【化 1 2】



40

(式中、

【化 1 3】



である。)を有する化合物を含む、
方法。

【請求項 1 8】

10

既知濃度の既知ビタミンD分析物を含む標準を提供すること；

前記標準中の前記既知ビタミンD分析物を1段階ジエノフィル含有標識ディールス・アルダー試薬で処理して、標識標準付加物を形成させること；

前記標識標準付加物と前記標識付加物を混合して、混合物を形成させること；および

前記混合物を分離して、分離された標識分析物を形成させること；

をさらに含み、ここで、前記標識付加物を分析することが、前記分離された分析物を分析することを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記標準を標識するのに用いられる前記1段階ジエノフィル含有ディールス・アルダー試薬が、同重体タグのセットに由来する第1の同重体タグを含み、かつ前記試料を標識するのに用いられる前記1段階ジエノフィル含有ディールス・アルダー試薬が、前記第1の同重体タグとは異なる前記同重体タグのセットに由来する第2の同重体タグを含む、請求項 1 8 に記載の方法。

20

【請求項 2 0】

マスマススペクトロメトリーを用いて前記標識付加物を分析することが、前記標識付加物のLC-MS/MS分析を用いることを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1】

三連四重極MSプラットフォームを用いる前記標識分析物の親娘イオンラングションモニタリング(PDITM)をさらに含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

30

前記ビタミンD分析物が、複数の異なるビタミンD分析物を含み、かつ前記標識することが、複数の異なるタグ化試薬で標識することを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記ビタミンD2の代謝体がビタミンD2のモノヒドロキシ代謝体および／またはジヒドロキシ代謝体を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記ビタミンD3の代謝体が、ビタミンD3のモノヒドロキシ代謝体および／またはジヒドロキシ代謝体を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

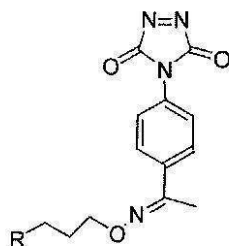
【請求項 2 5】

包装中に、ジエノフィルを含有する標識ディールス・アルダー試薬を含む、キットであって、

40

前記標識ディールス・アルダー試薬が、以下の構造：

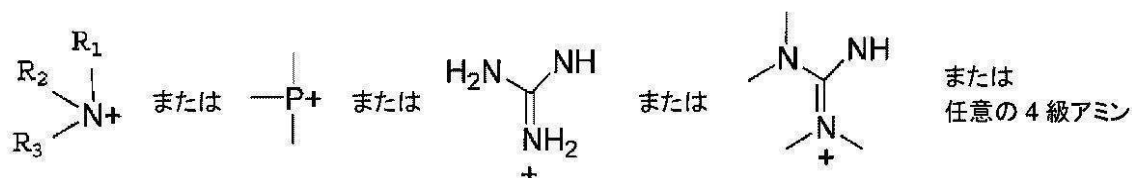
【化 2 0】



10

(式中、Rは、

【化 2 1】



であり、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、各々独立に、水素原子またはアルキル基であり、かつ n は1～20である。)を有する化合物を含む、

20

キット。

【請求項 2 6】

既知ビタミンD分析物を含む標準を含む、請求項25に記載のキット。

【請求項 2 7】

既知濃度の既知ビタミンD分析物を含む標準を含む、請求項25に記載のキット。

【請求項 2 8】

前記標識ディールス・アルダー試薬が、同重体タグのセットに由来する同重体タグを含み、かつ前記キットが、前記同重体タグのセットに由来するそれぞれの同重体タグを含む複数の異なる1段階タグ化試薬をさらに含む、請求項25に記載のキット。

30

【請求項 2 9】

前記ビタミンD分析物を標識するための指示書を含む、請求項25に記載のキット。

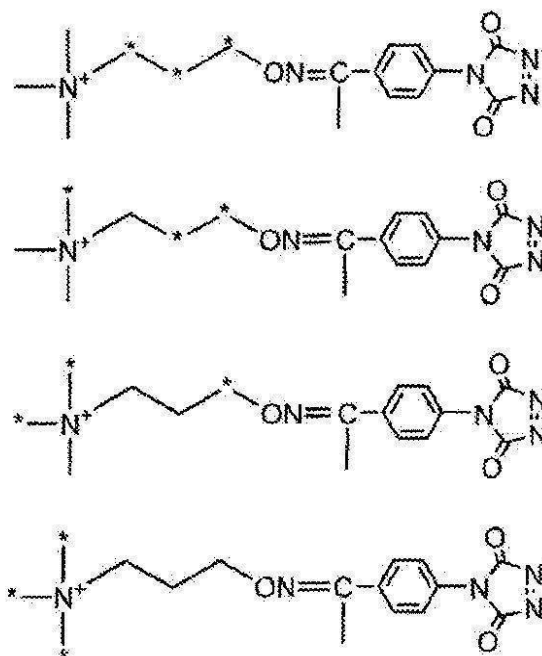
【請求項 3 0】

前記複数の異なるタグ化試薬が同重体タグを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記同重体タグが以下の構造：

【化 2 4】



10

20

から選択される、請求項 3 0 に記載の方法。

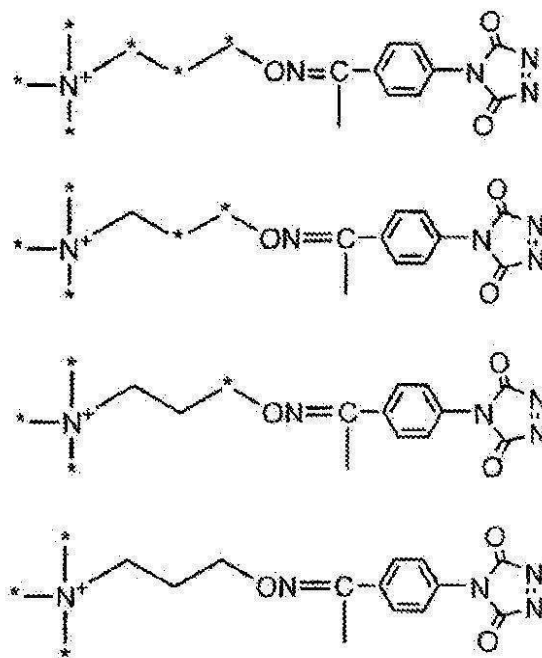
【請求項 3 2】

前記複数の異なるタグ化試薬が質量差タグを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記質量差タグが以下の構造：

【化 2 5】



30

40

から選択される、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

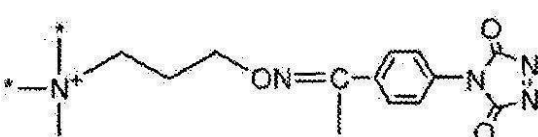
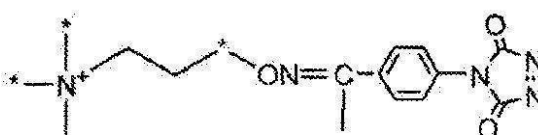
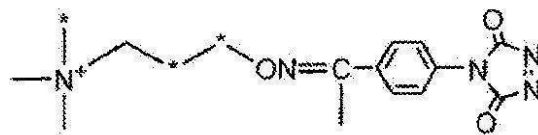
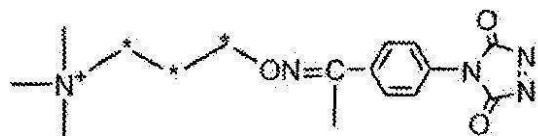
前記複数の異なるタグ化試薬が同重体タグを含む、請求項 9 に記載の方法。

50

【請求項 3 5】

前記同重体タグが以下の構造：

【化 2 6】



10

20

から選択される、請求項 3 4 に記載の方法。

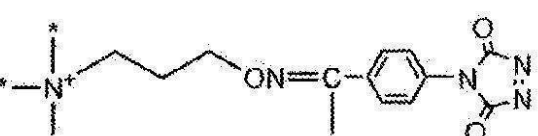
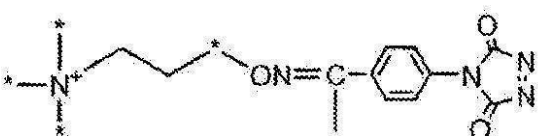
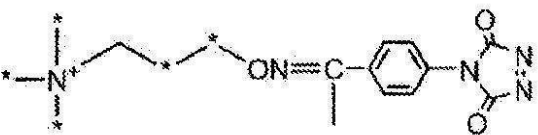
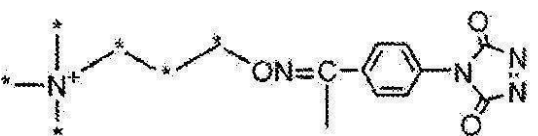
【請求項 3 6】

前記複数の異なるタグ化試薬が質量差タグを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記質量差タグが以下の構造：

【化 2 7】



30

40

から選択される、請求項 3 6 に記載の方法。

50

【請求項 38】

前記アミノキシMSタグ化試薬が、質量差タグのセットに由来する質量差タグを含み、かつ前記キットが、前記質量差タグのセットに由来する質量差タグをそれぞれ含む複数の異なるアミノキシMSタグ化試薬をさらに含む、請求項12に記載のキット。

【請求項 39】

前記標識ディールス・アルダー試薬が、質量差タグのセットに由来する質量差タグを含み、かつ前記キットが、前記質量差タグのセットに由来するそれぞれの質量差タグを含む複数の異なる1段階タグ化試薬をさらに含む、請求項25に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2010年1月25日に出願された、先願米国仮特許出願第61/297,917号明細書の利益を主張する。

【0002】

本教示は、マスマススペクトロメトリーおよびマスマススペクトロメトリーに有用なタグ化試薬の分野に関するものである。

【背景技術】

【0003】

ビタミンD3、ビタミンD2、ならびに25-ヒドロキシおよび1,25ジヒドロキシ類似体などのビタミンD3およびビタミンD2の代謝体を含む、ビタミンDファミリーの代謝体の分析は、これらの分析物が血漿などの測定基質中に低レベルで存在するために、従来は困難であった。ビタミンD3、ビタミンD2、およびそれらの代謝体の従来の分析方法は、さらなる欠点を有する。ビタミンD3およびその代謝体を分析するために用いられるイムノアッセイおよびLC/UV法は、例えば、特異的ではなく、試料処理が複雑である。また、分析物の誘導体化を利用するためにLC/MSMSを伴う戦略は、アッセイが臨床状況で実行可能とされるのに必要な検出限界を達成しておらず、多重化能も欠いている(Shimada, et al., Analyst, December 1991, Vol 116, 1393-1397; Higashi et al., Chem. Pharm. Bull., 54(11), 1479-1485 (2006))。これらの欠点を克服する、これらの分析物を定量する方法の必要性が存在する。

20

30

【0004】

誘導体化に利用することができる、ビタミンD3、ビタミンD2、ならびにビタミンD3およびビタミンD2の代謝体中の2つの官能基が、ヒドロキシル基と共役ジエン官能基とを含むことが分かっている。ShimadaらおよびHigashiらにより記載されているクックソン試薬は、ディールス・アルダー化学を利用して、ビタミンD3、ビタミンD2、およびそれらの代謝体中のジエン官能基を通してトリアゾロン誘導体を付加する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

40

【0005】

様々な実施形態によって、本教示の方法は、本明細書でビタミンD分析物と総称される、ビタミンD2、ビタミンD3、およびそれらの代謝体を定量する方法を提供する。この代謝体は、例えば、ビタミンD2およびビタミンD3のモノヒドロキシおよびジヒドロキシ代謝体を含むことができる。ビタミンD2、ビタミンD3、ならびにビタミンD2およびビタミンD3のモノヒドロキシおよびジヒドロキシ代謝体の定量は、マスマススペクトロメトリー(MS)タグ化試薬を用いる分析物の標識、および多重反応モニタリング(MRM)作業フローを用いる標識分析物のLC-MSMS分析を含むことができる。標識分析物は、逆相カラム上での異なる保持時間と、異なる質量とを有することができる。高エネルギー衝突下で、レポーター基を生成させることができる。各レポーター基について検出さ

50

れる強度またはピーク面積を同定にだけでなく、定量にも用いることができる。

【0006】

いくつかの実施形態では、ビタミンD分析物のファミリー中のジエン官能基を利用する2段階誘導体化プロセスを提供する。いくつかの実施形態では、ビタミンD分析物は、1段階プロセスで誘導体化される。試験試料中の分析物の定量は、LC-MSMSおよびMRM作業フローを用いて達成することができる。試薬設計によって、アッセイの感度が高まり、多重化能が提供される。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

試料中のビタミンD分析物を定量するための方法であって、前記ビタミンD分析物が、
ビタミンD2、ビタミンD3、ビタミンD2の代謝体、およびビタミンD3の代謝体のう
ちの1つまたは複数を含み、前記方法が、

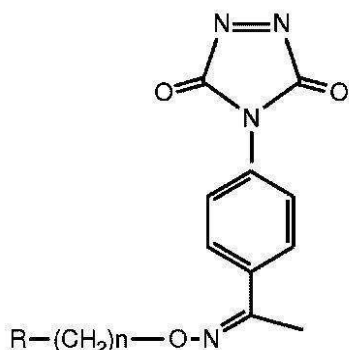
ビタミンD分析物をジエノフィル含有1段階タグ化試薬で処理して、標識ディールス・
アルダー付加物を形成させること；および

マスペクトロメトリーを用いて前記標識付加物を分析すること
を含む、方法。

(項目2)

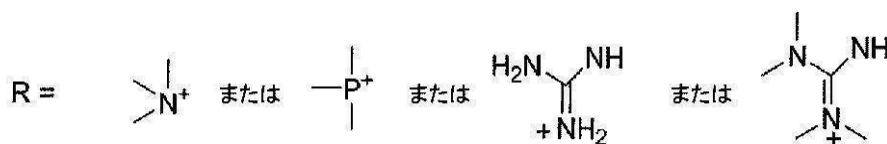
前記1段階タグ化試薬が以下の構造：

【化12】



(式中、

【化13】

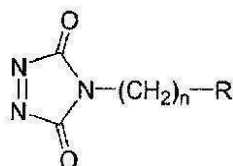


である。)を有する化合物を含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記1段階タグ化試薬が以下の構造：

【化14】



10

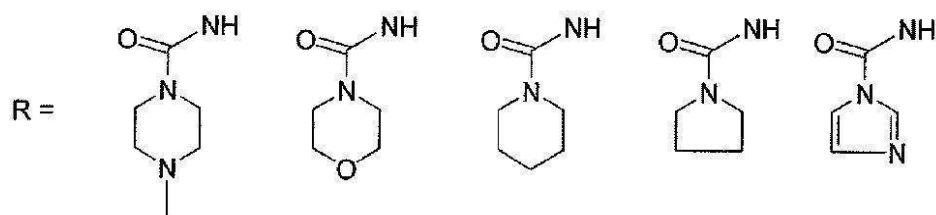
20

30

40

50

(式中、
【化 1 5】



10

である。)を有する化合物を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

既知濃度の既知ビタミン D 分析物を含む標準を提供すること；

前記標準中の前記既知ビタミン D 分析物を 1 段階ジエノフィル含有標識ディールス・アルダー試薬で処理して、標識標準付加物を形成させること；

前記標識標準付加物と前記標識付加物を混合して、混合物を形成させること；および

前記混合物を分離して、分離された標識分析物を形成させること；

をさらに含み、ここで、前記標識付加物を分析することが、前記分離された分析物を分析することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

20

前記標準を標識するのに用いられる前記 1 段階ジエノフィル含有ディールス・アルダー試薬が、同重体タグのセットに由来する第 1 の同重体タグを含み、かつ前記試料を標識するのに用いられる前記 1 段階ジエノフィル含有ディールス・アルダー試薬が、前記第 1 の同重体タグとは異なる前記同重体タグのセットに由来する第 2 の同重体タグを含む、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

マスマススペクトロメトリーを用いて前記標識付加物を分析することが、前記標識付加物の LC-MS/MS 分析を用いることを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

三連四重極 MS プラットフォームを用いる前記標識分析物の親娘イオンラングションモニタリング (PDITM) をさらに含む、項目 6 に記載の方法。

30

(項目 8)

前記ビタミン D 分析物が、複数の異なるビタミン D 分析物を含み、かつ前記標識することが、複数の異なるタグ化試薬で標識することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

前記ビタミン D 2 の代謝体がビタミン D 2 のモノヒドロキシ代謝体および／またはジヒドロキシ代謝体を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 10)

前記ビタミン D 3 の代謝体が、ビタミン D 3 のモノヒドロキシ代謝体および／またはジヒドロキシ代謝体を含む、項目 1 に記載の方法。

40

(項目 11)

試料中のビタミン D 分析物を定量するための方法であって、前記ビタミン D 分析物が、ビタミン D 2、ビタミン D 3、ビタミン D 2 の代謝体、およびビタミン D 3 の代謝体のうちの 1 つまたは複数を含み、前記方法が、

ビタミン D 分析物をジエノフィル試薬で処理して、ディールス・アルダー付加物を形成させること；

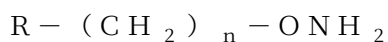
前記ディールス・アルダー付加物をアミノキシマススペクトロメトリー (MS) タグ化試薬で標識して、標識付加物を形成させること；および

マスマススペクトロメトリーを用いて前記標識付加物を分析すること、を含む、方法。

50

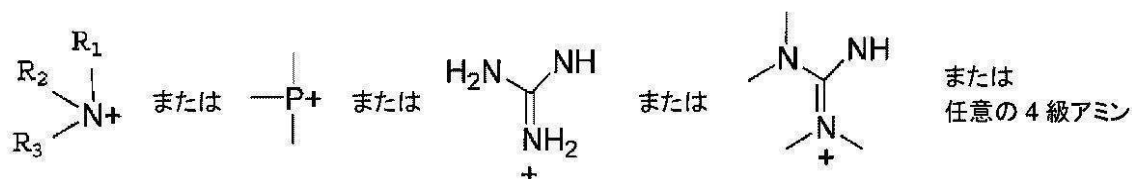
(項目 1 2)

前記アミノキシMSタグ化試薬が、以下の構造：



(式中、Rは、

【化 1 6】



10

であり、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、各々独立に、水素原子またはアルキル基であり、かつ n は1～20である。)を有する化合物を含む、項目11に記載の方法。

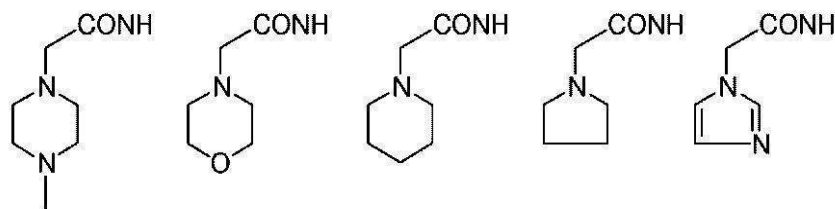
(項目 1 3)

前記アミノキシMSタグ化試薬が、以下の構造：



(式中、Rは、次の5つの構造

【化 1 7】



20

のうちの1つまたは複数を組み、かつ n は1～20である。)を有する化合物を含む、項目11に記載の方法。

30

(項目 1 4)

既知濃度の既知ビタミンD分析物を含む標準を提供すること；

前記標準中の前記既知ビタミンD分析物をジエノフィル試薬で処理して、標準ディールス・アルダー付加物を形成させること；

前記標準ディールス・アルダー付加物をアミノキシMSタグ化試薬で標識して、標識標準付加物を形成させること；

前記標識標準付加物と前記標識付加物を混合して、混合物を形成させること；および

前記混合物を分離して、分離された標識分析物を形成させること

をさらに組み、ここで、前記標識付加物を分析することが、前記分離された分析物を分析することを含む、項目11に記載の方法。

40

(項目 1 5)

前記標準ディールス・アルダー付加物を標識するのに用いられる前記アミノキシMSタグ化試薬が、同重体タグのセットに由来する第1の同重体タグを含み、かつ前記ディールス・アルダー付加物を標識するのに用いられる前記アミノキシMSタグ化試薬が、前記第1の同重体タグとは異なる前記同重体タグのセットに由来する第2の同重体タグを含む、項目14に記載の方法。

(項目 1 6)

マススペクトロメトリーを用いて前記標識付加物を分析することが、前記標識付加物のLC-MSMS分析を用いることを含む、項目11に記載の方法。

(項目 1 7)

50

三連四重極MSプラットフォームを用いる前記標識分析物の親娘イオンランジションモニタリング(PDITM)をさらに含む、項目16に記載の方法。

(項目18)

前記標識付加物が、MSMS時にニュートラルロスを経て、荷電分析物種であるレポーターイオンを残す、項目16に記載の方法。

(項目19)

前記標識付加物が、MSMS時に荷電フラグメントを失う、項目16に記載の方法。

(項目20)

前記アミノキシMSタグ化試薬が、MSMS時にタグフラグメントであるレポーターイオンを形成させる、項目16に記載の方法。

10

(項目21)

前記ビタミンD分析物が複数の異なるビタミンD分析物を含み、かつ前記標識することが、複数の異なるタグ化試薬で標識することを含む、項目11に記載の方法。

(項目22)

前記ビタミンD2の代謝体が、ビタミンD2のモノヒドロキシ代謝体および／またはジヒドロキシ代謝体を含む、項目11に記載の方法。

(項目23)

前記ビタミンD3の代謝体が、ビタミンD3のモノヒドロキシ代謝体および／またはジヒドロキシ代謝体を含む、項目11に記載の方法。

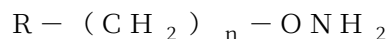
(項目24)

20

包装中に、ジエノフィル試薬およびアミノキシMSタグ化試薬を含むキット。

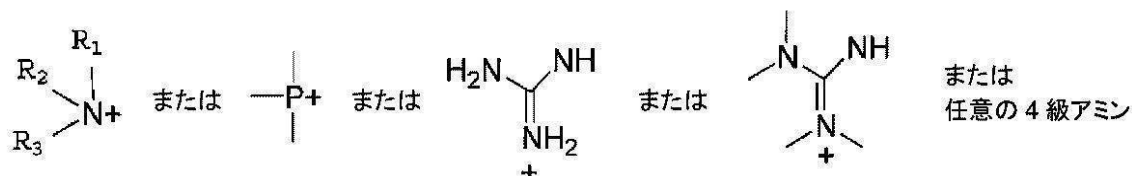
(項目25)

前記アミノキシMSタグ化試薬が、以下の構造：



(式中、Rは、

【化18】

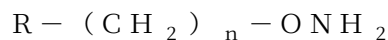


30

であり、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、各々独立に、水素原子またはアルキル基であり、かつ n は1～20である。)を有する化合物を含む、項目24に記載のキット。

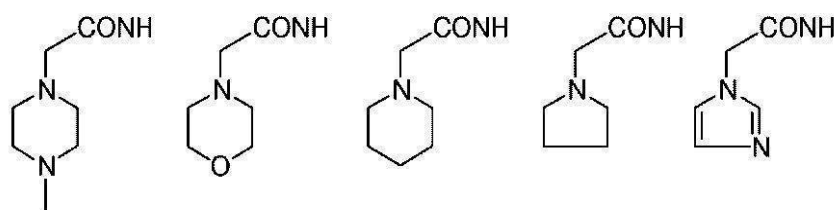
(項目26)

前記アミノキシMSタグ化試薬が、以下の構造：



(式中、Rは、次の5つの構造

【化19】



40

のうちの1つまたは複数を含み、かつ n は1～20である。)を有する化合物を含む、項目24に記載のキット。

50

(項目 27)

既知ビタミンD分析物を含む標準を含む、項目 24 に記載のキット。

(項目 28)

既知濃度の既知ビタミンD分析物を含む標準を含む、項目 24 に記載のキット。

(項目 29)

前記アミノキシMSタグ化試薬が、同重体タグのセットに由来する同重体タグを含み、かつ前記キットが、前記同重体タグのセットに由来する同重体タグをそれぞれ含む複数の異なるアミノキシMSタグ化試薬をさらに含む、項目 24 に記載のキット。

(項目 30)

前記ビタミンD分析物を標識するための指示書を含む、項目 24 に記載のキット。

10

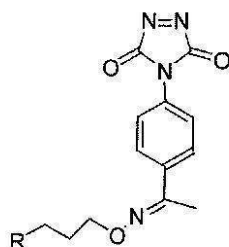
(項目 31)

包装中に、ジエノフィルを含有する標識ディールス・アルダー試薬を含む、キット。

(項目 32)

前記標識ディールス・アルダー試薬が、以下の構造：

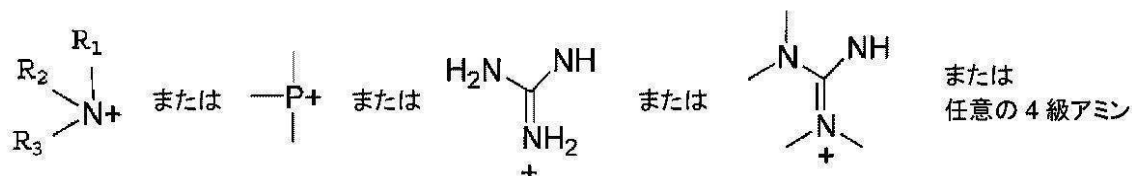
【化 20】



20

(式中、Rは、

【化 21】



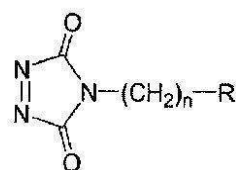
30

であり、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、各々独立に、水素原子またはアルキル基であり、かつ n は1～20である。)を有する化合物を含む、項目 31 に記載のキット。

(項目 33)

前記アミノキシMSタグ化試薬が、以下の構造：

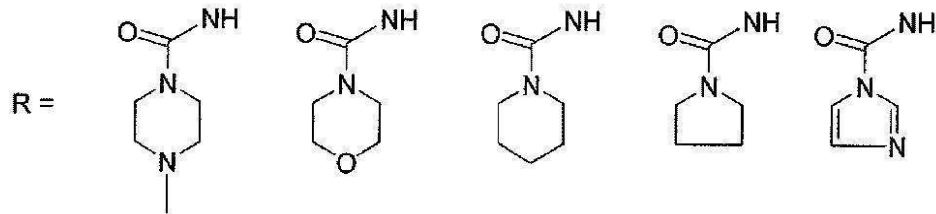
【化 22】



40

(式中、

【化 2 3】



である。)を有する化合物を含む、項目 3 1 に記載のキット。

10

(項目 3 4)

既知ビタミン D 分析物を含む標準を含む、項目 3 1 に記載のキット。

(項目 3 5)

既知濃度の既知ビタミン D 分析物を含む標準を含む、項目 3 1 に記載のキット。

(項目 3 6)

前記標識ディールス・アルダー試薬が、同重体タグのセットに由来する同重体タグを含み、かつ前記キットが、前記同重体タグのセットに由来するそれぞれの同重体タグを含む複数の異なる 1 段階タグ化試薬をさらに含む、項目 3 1 に記載のキット。

(項目 3 7)

前記ビタミン D 分析物を標識するための指示書を含む、項目 3 1 に記載のキット。

20

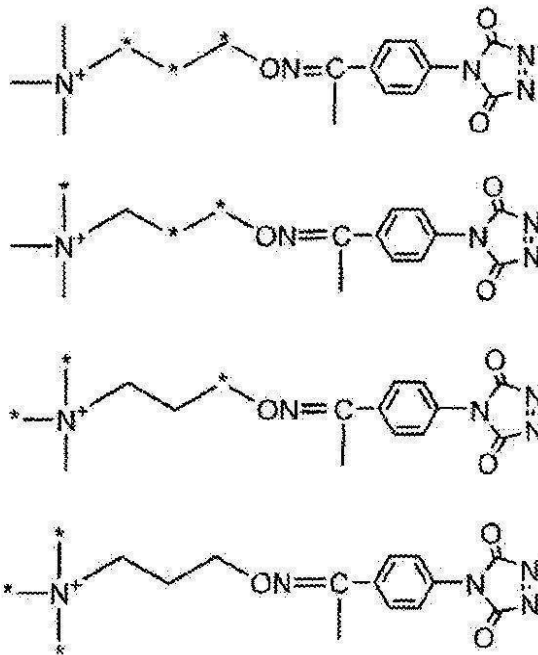
(項目 3 8)

前記複数の異なるタグ化試薬が同重体タグを含む、項目 8 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記同重体タグが以下の構造：

【化 2 4】



30

40

から選択される、項目 3 8 に記載の方法。

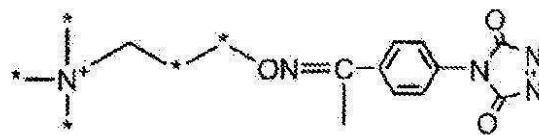
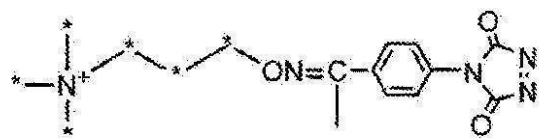
(項目 4 0)

前記複数の異なるタグ化試薬が質量差タグを含む、項目 8 に記載の方法。

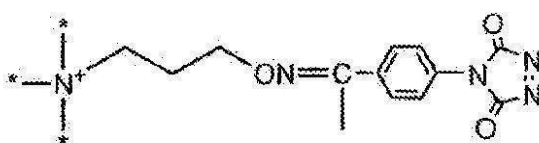
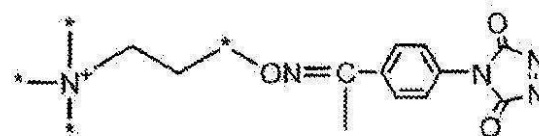
(項目 4 1)

50

前記質量差タグが以下の構造：
【化 2 5】



10



20

から選択される、項目 4 0 に記載の方法。

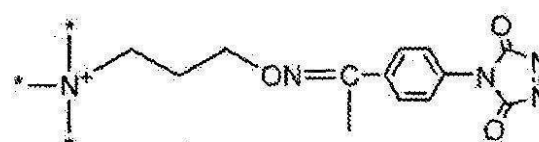
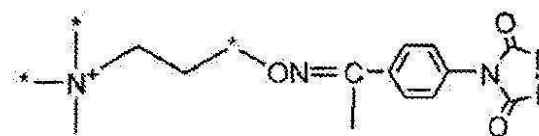
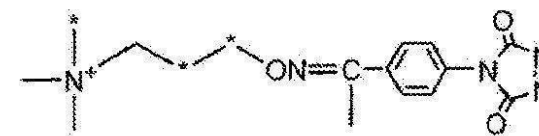
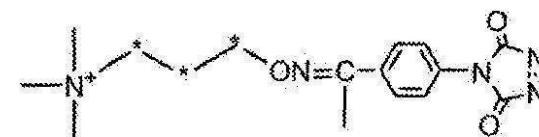
(項目 4 2)

前記複数の異なるタグ化試薬が同重体タグを含む、項目 2 1 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記同重体タグが以下の構造：

【化 2 6】



30

40

50

から選択される、項目 4 2 に記載の方法。

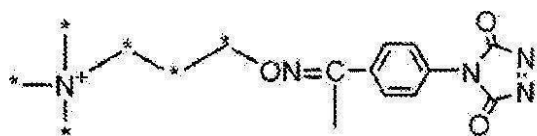
(項目 4 4)

前記複数の異なるタグ化試薬が質量差タグを含む、項目 2 1 に記載の方法。

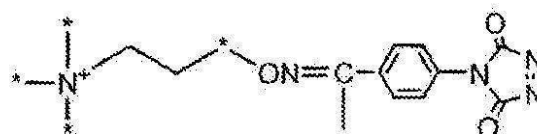
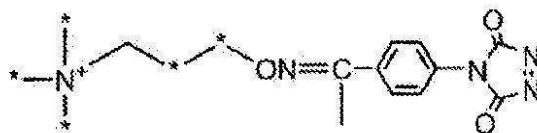
(項目 4 5)

前記質量差タグが以下の構造：

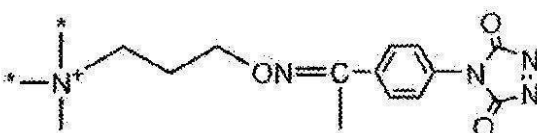
【化 2 7】



10



20



から選択される、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記アミノキシMSタグ化試薬が、質量差タグのセットに由来する質量差タグを含み、かつ前記キットが、前記質量差タグのセットに由来する質量差タグをそれぞれ含む複数の異なるアミノキシMSタグ化試薬をさらに含む、項目 2 4 に記載のキット。

30

(項目 4 7)

前記標識ディールス・アルダー試薬が、質量差タグのセットに由来する質量差タグを含み、かつ前記キットが、前記質量差タグのセットに由来するそれぞれの質量差タグを含む複数の異なる 1 段階タグ化試薬をさらに含む、項目 3 1 に記載のキット。

【0007】

本教示は、添付の図面を参照してより完全に理解されるであろう。図面は、本教示を説明するためのものであって、限定するためのものではない。

【図面の簡単な説明】

40

【0008】

【図 1】本教示の様々な実施形態によるビタミン D 分析物を標識するために用いることができる 2 段階化学反応の反応スキームを示す。

【図 2 A】本教示の様々な実施形態による 4 重アッセイで用いることができる 4 つのアミノキシタグ化試薬の例示的セットを示す。

【図 2 B】本教示の様々な実施形態による 4 重アッセイで用いることができる 4 つのアミノキシタグ化試薬の例示的セットを示す。

【図 3 A】本教示の様々な実施形態による、荷電分析物種をレポーターイオンとして残すアミノキシ試薬を用いて、モノヒドロキシビタミン D 3 のレポーターイオンを生成させるフラグメンテーションパターンを示す反応スキームである。

50

【図 3 B】本教示の様々な実施形態による、荷電分析物種をレポーターイオンとして残すアミノキシ試薬を用いて、ジヒドロキシビタミン D 3 のレポーターイオンを生成させるフラグメンテーションパターンを示す反応スキームである。

【図 3 C】本教示の様々な実施形態による、タグフラグメントをレポーターイオンとして生じるアミノキシ試薬を用いて、モノヒドロキシビタミン D 3 のレポーターイオンを生成させるフラグメンテーションパターンを示す反応スキームである。

【図 4 A】本教示の様々な実施形態による 2 重アッセイでの相対定量に関わる様々な工程を示す模式的流れ図である。

【図 4 B】本教示の様々な実施形態による 2 重アッセイでの絶対定量に関わる様々な工程を示す模式的流れ図である。

10

【図 4 C】本教示の様々な実施形態による 4 重アッセイでの相対定量に関わる様々な工程を示す模式的流れ図である。

【図 4 D】本教示の様々な実施形態による 4 重アッセイでの絶対定量に関わる様々な工程を示す模式的流れ図である。

【図 5】本教示の様々な実施形態による 2 つの例示的質量差試薬ペアを示す。

【図 6】本教示の様々な実施形態による標識分析物の H P L C 分離を示すスペクトグラムである。

【図 7】本教示の様々な実施形態によって得られた、標識ビタミン D 3 の M S M S スペクトグラムである。

【図 8】本教示の様々な実施形態によって得られた、標識ビタミン D 3 の M S ³ スペクトグラムを示す。

20

【図 9】本教示の様々な実施形態によって得られた、標識モノヒドロキシビタミン D 3 の M S M S スペクトグラムを示す。

【図 10】本教示の様々な実施形態によって得られた、標識ジヒドロキシビタミン D 3 の M S M S スペクトグラムを示す。

【図 11】本教示の様々な実施形態によって得られた、標識ビタミン D 2 の M S M S スペクトグラムを示す。

【図 12 A】ビタミン D 分析物の 1 段階タグ化方法で用いることができる一般式および例示的置換基を示す。

【図 12 B】ビタミン D 分析物の 1 段階タグ化方法で用いることができる一般式および例示的置換基を示す。

30

【図 13】本教示の様々な実施形態によるビタミン D 分析物を標識するために用いることができる、1 段階化学反応の反応スキーム、およびタグ化分子の例示的置換基を示す。

【図 14】本教示の様々な実施形態によるビタミン D 分析物を標識および定量するために用いることができる、1 段階化学反応の反応スキーム、タグ化分子に用いることができる例示的置換基、および M S M S 作業フローを示す。

【図 15】本教示の様々な実施形態によるジヒドロキシビタミン D 3 分析物を標識および定量するために用いることができる、1 段階化学反応の反応スキーム、タグ化分子に用いることができる例示的置換基、および M S M S 作業フローを示す。

【図 16】本教示の様々な実施形態によるモノヒドロキシビタミン D 3 分析物を標識および定量するために用いることができる、1 段階化学反応の反応スキーム、タグ化分子に用いることができる例示的置換基、および M S M S 作業フローを示す。

40

【図 17】各セットが本教示の様々な実施形態による 4 重アッセイで用いることができる 4 つの異なる試薬を含む、例示的同重体タグの 2 つの異なるセットを示す。

【図 18】各セットが本教示の様々な実施形態による 4 重アッセイで用いることができる 4 つの異なる試薬を含む、例示的質量差タグの 2 つの異なるセットを示す。

【図 19】本教示の様々な実施形態による、Q A O - C 誘導体化 1 α, 25 - ジヒドロキシビタミン - D₃、P T A D 1 α, 25 - ジヒドロキシビタミン - D₃、および非誘導体化 1 α, 25 - ジヒドロキシビタミン - D₃ の比較を示す。

【図 20】本教示の様々な実施形態による、Q A O - C 誘導体化 1 α, 25 - ジヒドロキ

50

シビタミン-D₃、PTAD 1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃、および非誘導体化1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃の感度の比較を示す。

【図21】本教示の様々な実施形態による、ビタミン-D₃異性体の分離を示す。

【図22】本教示の様々な実施形態による、ヒト血清試料中での1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃からのビタミン-D₃異性体の分離を示す。

【図23】本教示の様々な実施形態による、ヒト血清試料の分析における1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃からのビタミン-D₃異性体の分離を示す。

【図24】本教示の様々な実施形態による、2回の試行(two runs)由来の男性血清試料中に検出された1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃の量を示す。

【図25】本教示の様々な実施形態による、2回の試行(two runs)由来の女性血清試料中に検出された1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃の量を示す。

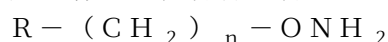
【発明を実施するための形態】

【0009】

様々な実施形態によって、試料中のビタミンD分析物を定量する方法が提供される。ビタミンD分析物は、ビタミンD₂、ビタミンD₃、ビタミンD₂の代謝体、およびビタミンD₃の代謝体のうちの1つまたは複数を含むことができる。いくつかの実施形態では、本方法は、ビタミンD分析物をジエノフィル試薬で処理して、ディールス・アルダー付加物を形成させることを含む。その後、ディールス・アルダー付加物をアミノキシマススペクトロメトリー(MS)タグ化試薬で標識して、標識付加物を形成させる。その後、マスペクトロメトリーを用いて、標識付加物を分析する。他の実施形態では、1段階タグ化試薬、例えば、ジエノフィルを含有する標識ディールス・アルダー試薬を用いる。

【0010】

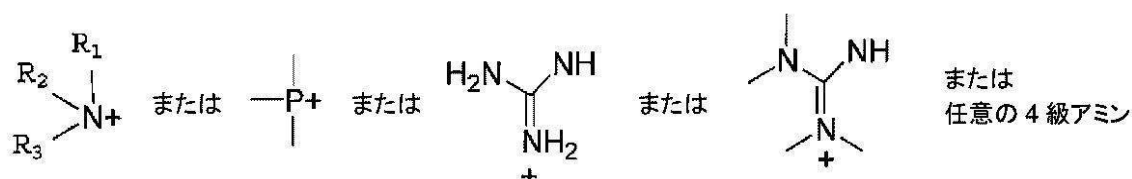
2段階化学を用いる様々な実施形態によって、アミノキシMSタグ化試薬は、以下の構造を有する化合物を含むことができる。



(式中、Rは、

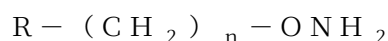
【0011】

【化1】



であり、R₁、R₂、およびR₃は、各々独立に、水素原子またはアルキル基であり、かつnは1~20、1~15、1~10、または1~5であることができる。)

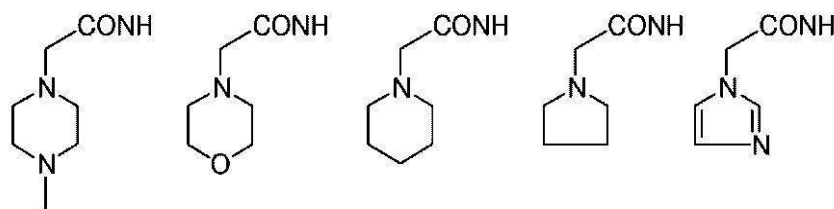
いくつかの実施形態では、アミノキシMSタグ化試薬は、以下の構造を有する化合物を含むことができる。



(式中、Rは、次の5つの構造

【0012】

【化2】



のうちの1つまたは複数であることができるが、これらに限定されず、かつnは1~20

、1～15、1～10、または1～5であることができる。)

本方法はさらに、既知濃度の既知ビタミンD分析物を含む標準を提供すること、この標準の既知ビタミンD分析物をジエノフィル試薬で処理して、標準ディールス・アルダー付加物を形成させること、およびこの標準ディールス・アルダー付加物をアミノキシMSタグ化試薬で標識して、標識標準付加物を形成させることを含むことができる。その後、標識標準を試料から得られた付加物および標識付加物と混合して、混合物を形成させることができる。その後、この混合物を分離して、分離された標識分析物を形成させることができ、この分離された分析物を分析することができる。

【0013】

いくつかの実施形態では、標準ディールス・アルダー付加物を標識するのに用いられるアミノキシMSタグ化試薬は、同重体タグのセットに由来する第1の同重体タグを含むことができる。試料由来のディールス・アルダー付加物を標識するのに用いられるアミノキシMSタグ化試薬は、同重体タグの同じセットに由来するが、第1の同重体タグとは異なる第2の同重体タグを含むことができる。標識付加物は、マスマスプロトメトリーを用いて、標識付加物のLC-MSMS分析を用いて、これらの組合せを用いて、または同様の方法を用いて、分析することができる。

【0014】

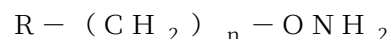
いくつかの実施形態では、標識分析物の親娘イオンランジションモニタリング(PDITM)を、三連四重極MSプラットフォームを用いて実施する。PDITMおよびその使用についてのさらなる詳細は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2006/0183238 A1号明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、アミノキシMSタグ化試薬は、MSMS時にニュートラルロスを経て、荷電分析物種であるレポーターイオンを残す。いくつかの実施形態では、アミノキシMSタグ化試薬は、MSMS時にタグフラグメントであるレポーターイオンを形成させる。

【0015】

様々な実施形態によって、ビタミンD分析物は、複数の異なるビタミンD分析物を含むことができ、かつ標識することが、複数の異なるそれぞれのタグ化試薬、例えば、各々の異なるタイプの分析物のための異なるタグ化試薬で各々標識することを含むことができる。分析すべき代謝体であって、その検出のためにキットを構成することができる代謝体は、ビタミンD2の分析物、例えば、ビタミンD2のモノヒドロキシ代謝体および/またはビタミンD2のジヒドロキシ代謝体を含むことができる。いくつかの実施形態では、代謝体はビタミンD3の代謝体であり、かつビタミンD3のモノヒドロキシ代謝体および/またはビタミンD3のジヒドロキシ代謝体を含むことができる。

【0016】

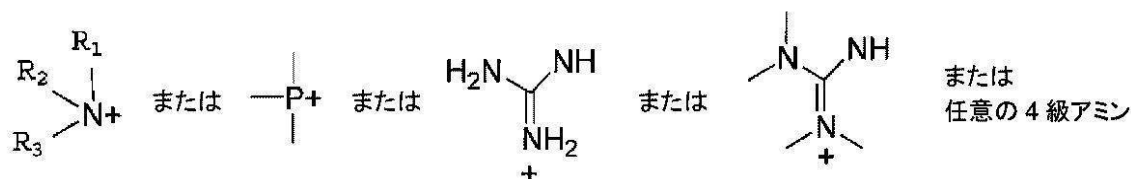
本教示のさらに他の実施形態によって、ジエノフィル試薬および1種以上のアミノキシMSタグ化試薬を含むキットが提供される。アミノキシMSタグ化試薬は、以下の構造を有する化合物を含むことができる。



(式中、Rは、

【0017】

【化3】



であり、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、各々独立に、水素原子またはアルキル基であり、かつnは1～20、1～15、1～10、または1～5であることができる。)

本キットは、以下の構造を有する化合物を含むアミノキシMSタグ化試薬を含むことが

10

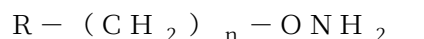
20

30

40

50

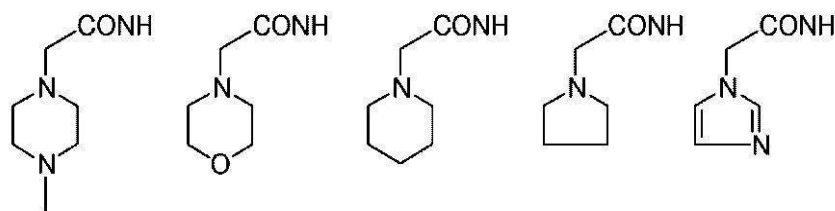
できる。



(式中、Rは、次の5つの構造

【0018】

【化4】



10

のうちの1つまたは複数であることができるが、これらに限定されず、かつnは1～20、1～15、1～10、または1～5であることができる。)

本キットは、既知ビタミンD分析物を含む標準を含むことができる。標準は、既知濃度の既知ビタミンD分析物を含むことができる。いくつかの実施形態では、本キットに含まれるアミノキシMSタグ化試薬は、同重体タグのセットに由来する1種以上の同重体タグを含むことができる。いくつかの実施形態では、本キットは、同重体タグのセットに由来する複数の異なる同重体タグを含むことができる。

【0019】

20

本キットは、ビタミンD分析物を標識するための指示書、例えば、紙の指示書または例えば、コンパクトディスク上の電子ファイルにフォーマット化された指示書を含むこともできる。いくつかの実施形態では、本キットは、試料しか添加する必要がない、単一の容器中のホモジニアスアッセイを含むことができる。本キットの他の構成要素は、緩衝液、他の試薬、1種以上の標準、混合用容器などを含むことができる。

【0020】

様々な実施形態によって、本教示は、本明細書でビタミンD分析物と総称される、ビタミンD2、ビタミンD3、および／またはビタミンDファミリー由来の代謝体のうちの1つまたは複数の定量方法を提供する。ビタミンD分析物は、例えば、ビタミンD2、ビタミンD3、ならびに／またはビタミンD2もしくはビタミンD3もしくは構造関連化合物もしくはジエン官能基を有する任意の分析物のモノヒドロキシ、ジヒドロキシおよびトリヒドロキシ代謝体を含むことができる。様々な実施形態によって、1種以上のビタミンD分析物の定量方法は、分析物を修飾し、その後、マスマススペクトロメトリーを用いて質量分析する2段階化学反応を含むことができる。様々な実施形態によって、この2段階化学反応は、ビタミンD分析物中の共役ジエン官能基を誘導体化して、標識を分析物に付着させることを含むことができる。

30

【0021】

図1に示すように、2段階化学反応は、まず、ビタミンD分析物をアセチル基を有するジエノフィル試薬で処理して、ディールス・アルダー付加物を形成させることを含むことができる。次に、ディールス・アルダー付加物をマスマススペクトロメトリー(MS)タグ化試薬で処理することができる。いくつかの実施形態によって、液体クロマトグラフィー-タンデムマスマススペクトロメトリー(LC-MS/MS)を用いて、修飾された分析物を分析することができる。様々な分析物の付加物は、逆相カラム上での様々な異なる保持時間と、異なる質量とを有することができ、かつカラムから別々の時間に溶出させることができる。カラムからの溶出物をMSMS分析に供することができる。高エネルギー衝突下で、レポーター基を生成させることができる。レポーター基の強度またはピーク面積を同定および／または定量に用いることができる。

40

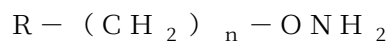
【0022】

様々な実施形態によって、1種以上のビタミンD分析物を標識またはタグ化するための複数のマスマススペクトロメトリー(MS)タグ化試薬が提供される。いくつかの実施形態に

50

よって、MS タグ化試薬は十分にフラグメント化し、強いレポーターイオンを提供することができる。いくつかの実施形態によって、MS タグ化試薬は、多重反応モニタリング (MRM) アッセイ用に特別に設計されているアミノキシMS タグ化試薬を含むことができる。いくつかの実施形態によって、少なくとも2つの異なるカテゴリーのアミノキシMS タグ化試薬を用いて、高エネルギー衝突下でレポーター基を生成させることができる。使用可能な第1のカテゴリーおよび第2のカテゴリーまたは第1のセットおよび第2のセットのアミノキシMS タグ化試薬由来の例示的な化合物を以下に示す：

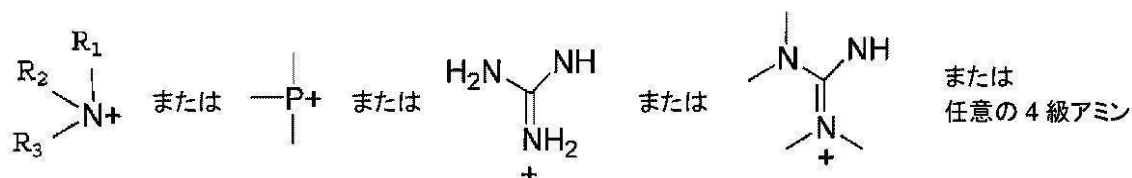
第1のカテゴリー



(式中、Rは、

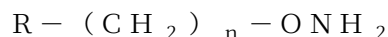
【0023】

【化5】



であり、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、各々独立に、水素原子またはアルキル基であり、かつ n は1～20、1～15、1～10、または1～5であることができる。)；

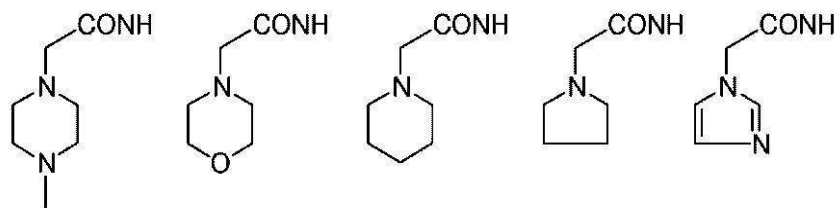
第2のカテゴリー



(式中、Rは、次の5つの構造

【0024】

【化6】



のうちの1つまたは複数であることができるが、これらに限定されず、かつ n は1～20、1～15、1～10、または1～5であることができる。)

図3Aおよび3Bに示すように、第1のカテゴリーのアミノキシMS タグ化試薬由来のアミノキシMS タグ化試薬は、高エネルギー衝突 (MSMS) 時にニュートラルロスを経て、後に MS^3 分析に供することができるレポーターイオンとして荷電分析物種を残すことができる。図3Aに示すビタミンD分析物は、モノヒドロキシビタミンD3である。図3Bに示すビタミンD分析物は、ジヒドロキシビタミンD3である。第2のカテゴリーのアミノキシMS タグ化試薬由来のアミノキシMS タグ化試薬は、図3Cに示すように、高エネルギー衝突によって、レポーターイオンとしてのタグフラグメントを生じさせることができる。図3Cに示すビタミンD分析物は、モノヒドロキシビタミンD3である。

【0025】

様々な実施形態によって、各々のタイプのアミノキシMS タグ化試薬について、複数の同重体タグ化または質量差タグ化試薬を調合し、用いることができる。図2Aおよび2Bは、各々それぞれ、同重体4重アミノキシMS タグ化試薬のセットを示している。同重体タグ化試薬の各々のセットは、同一の化学構造および質量を有することができるが、異なる組合せおよび／または位置の同位体を含むことができる。

【0026】

様々な実施形態によって、ある同重体試薬のセットに由来する第1の同重体タグを、例

10

20

30

40

50

例えば、既知濃度の、既知ビタミンD分析物を含むことができる標準と接触させることができる。接触は、第1の同重体タグと標準の反応に有利に働く条件の下で行なうことができる。第1の同重体タグと同じ同重体試薬のセットに由来する第2の同重体タグを、未知濃度のビタミンD分析物を含む試料と接触させることができる。以下でさらに記載するように、標準および試料のタグ化分析物を一緒に混合し、分析して、試料中の分析物の濃度を決定することができる。分析は、混合物を分離して、分離された分析物を形成させること、およびこの分離された分析物を分析することを含むことができる。使用可能な分離方法としては、ガスクロマトグラフィー法、液体クロマトグラフィー法、他のクロマトグラフィー法、電気泳動法、電気浸透法、質量差分法などが挙げられる。例示的な実施形態では、液体クロマトグラフィーを用いて、混合物中の様々な分析物を分離し、それにより、分離された分析物を形成させる。

10

【0027】

いくつかの実施形態では、クロマトグラフィー分離を逆相カラム上で実施することができる、このカラムから溶出するピークをその後の分析に供することができる。いくつかの実施形態では、その後の分析は、マスマススペクトロメトリー、またはより具体的には、親娘イオントランジションモニタリング(PDITM)を含むことができる。PDITMの結果を比較することによって、以下でさらに詳細に記載するように、試料中のビタミンD分析物の濃度を決定することができる。PDITMおよびその使用についてのさらなる詳細は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2006/0183238 A1号明細書に見出すことができる。

20

【0028】

いくつかの実施形態によって、同重体タグ化試薬の代わりに質量差タグ化試薬を用いることができる。例示的な質量差試薬ペアを図5に示す。

【0029】

様々な実施形態によって、アミノキシMSタグ化試薬を、多重アッセイでの相対定量および絶対定量に用いることができる。いくつかの実施形態によって、アミノキシMSタグ化試薬を、2重、3重、4重、および他の多重アッセイに用いることができる。

【0030】

例示的な定量方法を、それぞれ、2重アッセイの相対定量および絶対定量を示す、図4Aおよび4Bを参照しながら示す。図4Aに記載されているように、本方法は、既知ビタミンD分析物を含む第1の試料を標識することから始めることができる。第1の試料は、例えば、既知濃度の既知ビタミンD分析物を含む標準であることができる(図4B)。第1の試料を同重体タグのセットに由来する第1の同重体タグで標識することができる。次に、未知濃度の未知分析物を有する第2の試料を同重体タグの同じセットに由来する第2の同重体タグで標識することができる。その後、標識した第1の試料を、標識した第2の試料と組み合わせて、混合物を形成させることができる。その後、混合物を、例えば、逆相カラム上での液体クロマトグラフィー(LC)分離などの分離に供することができる。標識分析物は、カラム上でのその様々な、異なる保持時間のために、別々の時間にカラムから溶出することができる。逆相カラムから溶出したピークは、第1の試料由来の標識分析物を含むピークと、第2の試料由来の標識分析物を含むピークとを含むことができる。次に、カラムから溶出した各々のピークを親娘イオントランジションモニタリング(PDITM)に供することができる。図4Aに示すように、第2の試料から生成されたレポーターシグナルと比べた、第1の試料から生成されたレポーターシグナルのピーク面積のシグナル強度の比から、試験試料中の分析物の相対濃度が得られる。標識標準の濃度が既知の場合、図4Bに示すように、試料中の分析物の具体的な濃度を決定することができる。

30

40

【0031】

別の例示的な相対定量および絶対定量の方法を、それぞれ、4重アッセイの相対定量および絶対定量を示す、図4Cおよび4Dを参照しながら示す。図4Cに記載されているように、本方法は、4つの試料を、同じ同重体タグのセットに由来する第1、第2、第3、および第4の同重体タグでそれぞれ標識することから始めることができる。図4Dに示す

50

ように、これらの試料のうちの1つは、既知濃度の既知ビタミンD分析物を有する標準であることができる。標識試料を組み合わせ、混合物を形成させることができる。その後、混合物を、例えば、逆相カラム上での液体クロマトグラフィー（LC）分離などの分離に供することができる。標識分析物は、カラム上でのその様々な、異なる保持時間のために、別々の時間にカラムから溶出させることができる。逆相カラムから溶出したピークは、標識分析物を含むピークと、標識標準を含むピークとを含むことができる。次に、カラムから溶出した各々のピークを親娘イオンランジションモニタリング（PDITM）に供することができる。図4Cに示すように、標識試験試料から生成されたレポーターシグナルと比べた、標識標準から生成されたレポーターシグナルのピーク面積のシグナル強度の比から、試験試料中の分析物の相対濃度が得られる。標識標準の濃度が既知の場合、図4Dに示すように、試料中の分析物の具体的な濃度を決定することができる。

10

【0032】

様々な実施形態によって、1種以上のビタミンD分析物の相対定量の方法は、1種以上の分析物を標識し、その後、マスペクトロメトリーを用いて分析することを含むことができる。いくつかの実施形態によって、1種以上の分析物は、ビタミンD3および／またはビタミンD3の代謝体であることができる。いくつかの実施形態によって、本方法は、ビタミンD3および／またはビタミンD3の代謝体を含む標準試料と、試験試料の両方をMSタグ化試薬で標識することを含むことができる。いくつかの実施形態によって、MSタグ化試薬は、アミノキシタグ化試薬であることができる。いくつかの実施形態によって、アミノキシタグ化試薬は、同重体タグのセットを含むことができる。いくつかの実施形態によって、標準試料を、図1に示すように、2段階で、同重体タグのセットに由来する第1の同重体タグで標識することができる。第1段階では、標準試料中のビタミンD分析物を、アセチル基を有するジエノフィル試薬で処理して、ディールス・アルダー付加物を形成させることができる。第2段階では、ディールス・アルダー付加物を第1の同重体タグで処理することができる。試験試料を、標準試料に対して用いたのと同様の2段階のプロセスで、第1の同重体タグとは異なる、同じ同重体タグのセットに由来する第2の同重体タグで標識することができる。その後、標識標準試料と標識試験試料を組み合わせることができ、得られた混合物を、逆相カラム上での液体クロマトグラフィー（LC）分離に供することができる。標識ビタミンD3および／またはビタミンD3代謝体は、異なる保持時間を有することができ、かつ別々の時間にカラムから溶出することができる。溶出ピークは、標識分析物を含むピークと、標識標準を含むピークとを含むことができる。図6は、標識ビタミンD3分析物のHPLC分離を示す。その後、カラムからの溶出物を、マスペクトロメトリーを用いて分析することができる。

20

30

【0033】

図7は、MSMSを用いた標識ビタミンD3のマスペクトグラムを示す。いくつかの実施形態によって、同重体タグがアミノキシMSタグ化試薬である場合、レポーターシグナルをさらなるフラグメンテーション（MS³）に供することができる。レポーターシグナルをさらなるフラグメンテーションに供することによって、標準データベースとの比較による分析物の確認的同一性を可能にするピークを提供することができる。いくつかの実施形態によって、カラムからの溶出物を親娘イオンランジションモニタリング（PDITM）に供することができる。

40

【0034】

図8は、MS³を用いて得られた標識ビタミンD3のマスペクトグラムを示す。試験試料から生成されたレポーターシグナルと比べた標準から生成されたレポーターシグナルのシグナル強度またはピーク面積の比は、標準試料と比べた試験試料中の分析物の濃度を示すことができる。

【0035】

標準試料が既知濃度のビタミンD分析物を有する場合、ビタミンD分析物の絶対定量を、相対定量について上に記載したのと同じ方法で行なうことができることが理解されるべきである。また、ビタミンD3および／またはビタミンD3の代謝体が上述のものである

50

場合、任意のビタミンD分析物を用いることができることが理解されるべきである。例えば、図11は、本教示に従って標識されているビタミンD2のMSMSスペクトグラムを示す。

【0036】

本教示のタグ化化学および方法論は、既知の方法と比べて増大した感度を提供し、 ^2H を含有する、 ^{13}C を含有する、 ^{15}N を含有する、および ^{18}O を含有するビタミンD分析物の標準に対する必要性をなくす。いくつかのビタミンD分析物の同位体標識標準は市販されておらず、そのため、本教示なしでは、これらの分析物の絶対定量が困難になっている。本教示によって、各分析物は、その独自の内部標準を有することができる。レポーターシグナルは、標準試料に、および試験試料に特異的なものであることができる。

10

【0037】

同重体タグは多重化を可能にし、ビタミンD分析物の多重化分析についてこれまでに知られている唯一の方法を提供し、また、試料当たりのスループットが高くかつコストが低い分析を提供する。図3Aおよび3Bに示すように、全てのビタミンD分析物中に1つの共通の官能基があるので、各分析物に1つのタグしか必要ない。いくつかの実施形態では、PDITMを用いることによって、特異性が高くなり、エラーのリスクが減る。試薬設計によって、それがFlashQuant（商標）適用のための優れたツールになり、分析物の正体の確認を助けるMS³性能が可能になる。

【0038】

様々な実施形態によって、試料中のビタミンD分析物を定量する方法が提供されており、ここで、この方法は、ビタミンD分析物を1段階タグ化試薬、例えば、ディールス・アルダー付加物でタグ化することを含む。その後、生成物をマスマススペクトロメトリーを用いて分析することができる。様々な実施形態によって、タグ化試薬は、図12Aに示す構造を有する化合物を含むことができる。高エネルギー衝突下で、レポーター基を生成させる。レポーター基の強度またはピーク面積を定量に用いる。図12Aに示す1段階タグ化試薬は、高エネルギー衝突（MSMS）時にニュートラルロスを経て、荷電分析物種を、図14および15に示すようなレポーターイオンとして残し、その後、このレポーターイオンをMS³分析に供することができる。

20

【0039】

いくつかの実施形態では、タグ化試薬は、図12Bに示す構造を有する化合物を含むことができる。図12Bに示す1段階タグ化試薬は、高エネルギー衝突によって、図16に示すようなタグフラグメントを生成させ、その後、このレポーターイオンをMS³分析に供することができる。

30

【0040】

本方法はさらに、既知濃度の既知ビタミンD分析物を含む標準を提供し、かつ標準の既知ビタミンD分析物を本教示による1段階タグ化試薬でタグ化して、標識標準を形成させることを含むことができる。その後、この標識標準を標識試料と混合して、混合物を形成させることができる。その後、この混合物を分離して、分離された標識分析物を形成させることができ、かつこの分離された分析物を分析することができる。

【0041】

いくつかの実施形態では、標識標準に用いられる1段階試薬は、同重体タグのセットに由来する第1の同重体タグを含むことができる。標識試料は、同じ同重体タグのセットに由来するが、第1の同重体タグとは異なる、第2の同重体タグを含むことができる。その後、標識試料を、マスマススペクトロメトリー、標識試料のLC-MSMS分析、それらの組合せなどを用いて分析することができる。

40

【0042】

いくつかの実施形態では、標識標準に用いられる1段階試薬は、質量差タグのセットに由来する第1の質量差タグを含むことができる。標識試料は、同じ質量差タグのセットに由来するが、第1の質量差タグとは異なる、第2の質量差タグを含むことができる。その後、標識試料を、マスマススペクトロメトリー、標識試料のLC-MSMS分析、それらの組

50

合せなどを用いて分析することができる。

【0043】

いくつかの実施形態では、三連四重極MSプラットフォームを用いて標識分析物の親娘イオンランジションモニタリング(PDITM)を行なう。PDITMおよびその使用についてのさらなる詳細は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2006/0183238 A1号に記載されている。上述のように、いくつかの実施形態では、1段階タグ化試薬は、MSMS時にニュートラルロスを経て、荷電分析物種であるレポーターイオンを残す。いくつかの実施形態では、1段階タグ化試薬は、MSMS時にタグフラグメントとなるレポーターイオンを形成させる。

【0044】

様々な実施形態によって、ビタミンD分析物は、複数の異なるビタミンD分析物を含むことができ、標識することは、複数の異なるそれぞれのタグ化試薬、例えば、各々異なるタイプの分析物についての異なるタグ化試薬で各々標識することを含むことができる。分析すべき代謝体であって、その検出のためにキットを構成することができる代謝体は、ビタミンD2の分析物、例えば、ビタミンD2のモノヒドロキシ代謝体および／またはビタミンD2のジヒドロキシ代謝体を含むことができる。いくつかの実施形態では、代謝体はビタミンD3の代謝体であり、ビタミンD3のモノヒドロキシ代謝体および／またはビタミンD3のジヒドロキシ代謝体を含むことができる。

【0045】

様々な実施形態によって、本教示は、本明細書でビタミンD分析物と総称される、ビタミンD2、ビタミンD3、および／またはビタミンDファミリー由来の代謝体のうちの1つまたは複数の定量方法を提供する。ビタミンD分析物は、例えば、ビタミンD2、ビタミンD3、ならびに／またはビタミンD2もしくはビタミンD3のモノヒドロキシ、ジヒドロキシおよびトリヒドロキシ代謝体を含むことができる。様々な実施形態によって、1種以上のビタミンD分析物の定量方法は、分析物を修飾し、その後、マスマススペクトロメトリを用いて質量分析する1段階化学反応を含むことができる。様々な実施形態によって、この1段階化学反応は、ビタミンD分析物中の共役ジェン官能基を誘導体化して、ジェノフィル含有タグ化試薬を分析物に付着させ、図13～16に例示するような、ディールス・アルダー付加物を形成させることができる。図13～16は、4つの異なる1段階タグ化試薬と、それぞれの1段階タグ化試薬の部分を含むことができる例示的な置換基とを用いる、4つの異なるそれぞれの反応を示している。

【0046】

図17は、各々のセットが、本教示の様々な実施形態による、4重アッセイで用いることができる4つの異なる試薬を含む、例示的な2つの異なる同重体タグのセットを示す。様々な実施形態では、重原子同位体を分子上の様々な位置に配置することができる。

【0047】

図18は、各々のセットが、本教示の様々な実施形態による、4重アッセイで用いることができる4つの異なる試薬を含む、例示的な2つの異なる質量差タグのセットを示す。様々な実施形態では、重原子同位体を分子上の様々な位置に配置することができる。

【0048】

図19は、本教示の様々な実施形態による、QAO-C誘導体化1 α , 25-ジヒドロキシビタミン-D₃、PTAD 1 α , 25-ジヒドロキシビタミン-D₃(PTADはクックソン型試薬である)；および非誘導体化1 α , 25-ジヒドロキシビタミン-D₃のフラグメンテーションパターンを比較したものである。図19に示すように、QAO-C誘導体化1 α , 25-ジヒドロキシビタミン-D₃は、PTAD 1 α , 25-ジヒドロキシビタミン-D₃のスペクトルまたは非誘導体化1 α , 25-ジヒドロキシビタミン-D₃のスペクトルと比べて、きれいなマスマススペクトルを生成させる。

【0049】

図20は、本教示の様々な実施形態による、QAO-C誘導体化1 α , 25-ジヒドロキシビタミン-D₃、PTAD 1 α , 25-ジヒドロキシビタミン-D₃、および非誘

10

20

30

40

50

導体化1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃のシグナル強度を比較したものである。図20に示すように、QAO-C誘導体化1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃の場合、PTAD 1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃と比べて、平均11倍の感度の増大があり、QAO-C誘導体化1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃の場合、非誘導体化1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃と比べて、平均192倍の感度の増大があった。

【0050】

図21は、液体クロマトグラフィーで分離されている同重体ジヒドロキシビタミン-D₃代謝体を示す。本教示の様々な実施形態によって、図21に示すように、分離されなければ、1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃を妨害することがあるビタミン-D₃異性体が分離される。

10

【0051】

図22は、本教示の様々な実施形態による、ヒト血清試料中のビタミン-D₃異性体からの1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃の分離を示す。

【0052】

図23は、本教示の様々な実施形態による、ヒト血清試料の分析におけるビタミン-D₃異性体からの1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃の分離を示す。

【0053】

図24は、本教示の様々な実施形態による、2回の試行由来の男性血清試料中で検出された1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃の量を示す。

20

【0054】

図25は、本教示の様々な実施形態による、2回の試行由来の女性血清試料中で検出された1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃の量を示す。

【0055】

いくつかの実施形態では、タグ化化学および本方法は、任意の三連四重極装置、例えば、MaldiソースとともにFlashQuant（商標）を含む装置を用いて実施することができる。試薬キット、データ分析ソフトウェア、およびMSプラットフォームは、いくつかの実施形態では、ビタミンD₃およびその代謝体の分析器として提供される。同じ方法をビタミンD₂およびその代謝体に利用することができる。

【0056】

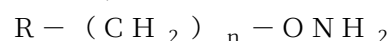
30

本教示の様々な実施形態によって用いることができる様々な液体クロマトグラフィーおよびマススペクトロメトリーの方法、システム、およびソフトウェアとしては、2009年5月31日に出版された米国仮特許出願第61/182,748号明細書、および2006年8月17日に公開された米国特許出願公開第2006/0183238 A1号明細書に記載されているものが挙げられる。これらの参考文献は両方とも、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0057】

本教示の様々な実施形態によって、ジエノフィル試薬およびアミノキシMSタグ化試薬のうちの1つまたは複数を含むことができるキットが提供される。いくつかの実施形態によって、アミノキシMSタグ化試薬は、以下の構造：

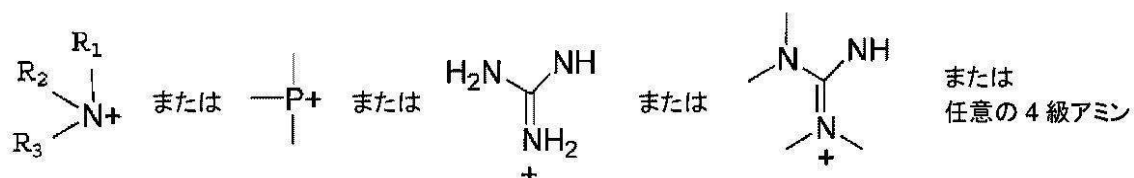
40



(式中、Rは、

【0058】

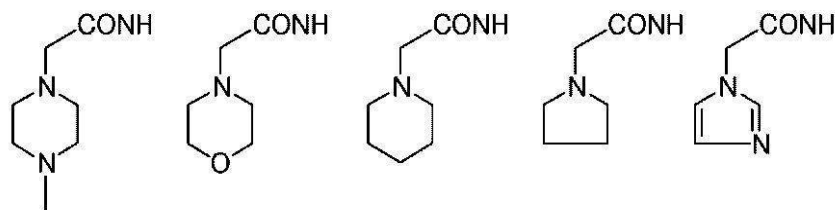
【化7】



50

であり、 R_1 、 R_2 、および R_3 は、各々独立に、水素原子もしくはアルキル基であり、かつ n は1～20、1～15、1～10、もしくは1～5であることができる。)；または構造：

$R - (CH_2)_n - ONH_2$
(式中、 R は、次の5つの構造
【0059】
【化8】



10

のうちの1つまたは複数を含み、かつ n は1～20、1～15、1～10、または1～5であることができる。)

を有する化合物を含むことができる。いくつかの実施形態では、 R は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Pappinらに対する米国特許第7,195,751号明細書に記載のタグ化試薬に関連して記載されている R 基のいずれかであることができる。

20

【0060】

いくつかの実施形態では、キットは、既知濃度の既知ビタミンD分析物を含む少なくとも1つの標準を含むことができる。いくつかの実施形態によって、アミノキシMSタグ化試薬は、同重体タグのセットに由来する同重体タグであることができ、いくつかの実施形態では、キットは、同重体タグのセットに由来する複数の異なる同重体タグを含むことができる。いくつかの実施形態によって、アミノキシMSタグ化試薬は、質量差タグのセットに由来する質量差タグであることができ、いくつかの実施形態では、キットは、質量差タグのセットに由来する複数の異なる質量差タグを含むことができる。いくつかの実施形態によって、キットは、ジエノフィル試薬、アミノキシMSタグ化試薬、既知ビタミンD分析物を含む標準および／または既知濃度の既知ビタミンD分析物を含むことができ、かつビタミンD分析物を標識するための指示書をさらに含むことができる。

30

【0061】

本教示のさらに他の実施形態によって、キットは、図12Aに示すような1段階タグ化試薬、図12Bに示すような1段階タグ化試薬、それらの組合せなどを含むことができる。キットは、既知ビタミンD分析物を含む標準を含むこともできる。いくつかの実施形態では、標準は、既知濃度の既知ビタミンD分析物を含むことができる。いくつかの実施形態では、キットに含まれる1段階タグ化試薬は、同重体タグのセットに由来する1種以上の同重体タグを含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、同重体タグのセットに由来する複数の異なる同重体タグを含むことができる。いくつかの実施形態では、キットに含まれる1段階タグ化試薬は、質量差タグのセットに由来する1種以上の質量差タグを含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、質量差タグのセットに由来する複数の異なる質量差タグを含むことができる。

40

【0062】

様々な実施形態によって、キットは、緩衝液、1つ以上のクロマトグラフィーカラム、および任意でアッセイの実施に有用な他の試薬および／または成分を含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、例えば、使用者が試料を添加する必要しかないようなホモジニアスアッセイを含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、較正または正規化用の試薬または標準を含むことができる。アッセイを実施するために用いることができるか、またはアッセイを実施するために用いるべき機器の設定に関する情報も、キットに含めることができる。いくつかの実施形態では、試料調製、操作条件、容量、

50

温度設定などに関する情報がキットに含まれる。

【0063】

キットは、1つ以上の試薬容器および適切な指示書を含む密閉容器に包装することができる。1つ以上のアッセイ、測定値、トランジションペア、操作指示書、操作を実行するためのソフトウェア、それらの組合せなどに関する電子情報をその上に保存した、電子媒体をキットに含めることができる。

【0064】

様々な実施形態によって、QAOC試薬およびその中間体の合成のための方法を提供することができる。

【実施例】

10

【0065】

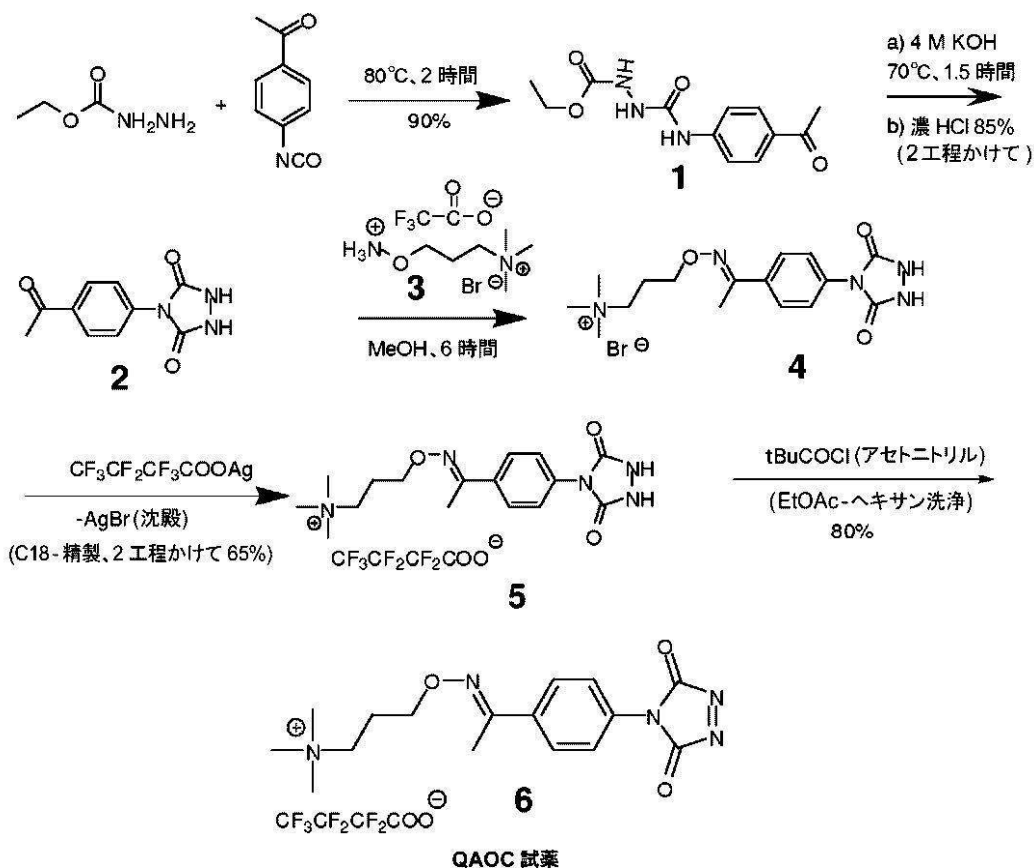
本教示の態様は、本教示の範囲を限定するものと決して解釈されるべきではない以下の実施例を踏まえてさらに理解することができる。

実施例1

QAOC試薬の合成における工程の説明：

【0066】

【化9】



20

30

40

p-アセチル-4-フェニル-1-カルベトキシセミカルバジド (1) の合成：

カルバジン酸エチル (6.46 g、62.05 mmol) のトルエン (100 mL) 溶液に、4-アセチルフェニルイソシアネート (10 g、62.05 mmol) のトルエン (250 mL) 溶液を滴加した。反応混合物を室温で2時間、その後、80℃で2時間攪拌した。反応液中に形成された沈殿を濾過し、真空オープン中で乾燥させると、p-アセチル-4-フェニル-1-カルベトキシセミカルバジド1 (16.5 g、90%) が得られた。それを、さらに精製することなく、次の反応工程で用いた。(合成は以下の文献から取り入れた：Organic Syntheses, Coll. Vol. 6, p. 936 (1988); Vol. 51, p. 121 (1971). 4-PHENYL-1, 2,

50

4-TRIAZOLINE-3, 5-DIONE)。様々な態様では、本実施例で用いられる成分の各々の値を約5%～約20%の範囲の量だけ増加または減少させることができ、例えば、各成分を、本実施例で用いられる値よりも5%少ない量から5%多い量で用いることができるか、各成分を、本実施例で用いられる値よりも10%少ないもしくは10%多い量で用いることができるか、各成分を、本実施例で用いられる値よりも15%少ない量から15%多い量で用いることができるか、または各成分を、本実施例で用いられる値よりも20%少ない量から20%多い量で用いることができる。様々な態様では、これらの値を約±5%～20%だけ変化させることができる。

p-アセチル-4-フェニルウラゾール(2)の合成：

p-アセチル-4-フェニル-1-カルボトキシセミカルバジド1(15g、56mmol)を4M KOH水溶液(28mL、112mmol)とともに70℃で約2時間加熱した。残った粒状固体を、焼結フィルター漏斗を用いて濾過除去した。濾液を室温に冷却し、濃HClで酸性化した。形成された沈殿を濾過し、真空オーブン中で乾燥させると、p-アセチル-4-フェニルウラゾール2が薄黄色の固体(12.4g、85%)として得られた。¹H NMR(400MHz、DMSO-d₆)：s=1.65(s, 3H), 6.70(d, 2H), 7.10(d, 2H), 9.50(s, 2H)。(合成は以下の文献から取り入れた：Organic Syntheses, Coll. Vol. 6, p. 936(1988)；Vol. 51, p. 121(1971)。4-PHENYL-1, 2, 4-TRIAZOLINE-3, 5-DIONE)。様々な態様では、本実施例で用いられる成分の各々の値を約5%～約20%の範囲の量だけ増加または減少させることができ、例えば、各成分を、本実施例で用いられる値よりも5%少ない量から5%多い量で用いることができるか、各成分を、本実施例で用いられる値よりも10%少ないもしくは10%多い量で用いることができるか、各成分を、本実施例で用いられる値よりも15%少ない量から15%多い量で用いることができるか、または各成分を、本実施例で用いられる値よりも20%少ない量から20%多い量で用いることができる。様々な態様では、これらの値を約±5%～20%だけ変化させることができる。

p-アセチル-4-フェニルウラゾール臭化4級アミノオキシ付加物(4)の合成：

p-アセチル-4-フェニルウラゾール2(2.10g、9.58mmol)と4級アミノオキシタグ3(100mLのメタノール-酢酸(95：5 v/v)中、6.74g、20.6mmolの懸濁液(標識試薬としての4級アミノオキシタグは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2011-0003395号明細書に記載されている)を周囲温度で48時間攪拌した。この段階でのHPLC分析により、2の生成物p-アセチル-4-フェニルウラゾール4級アミノオキシ付加物4への95%変換が示された。カラム：DeltaPak C18、3.9×150mm、緩衝液A：水+0.1% TFA、緩衝液B：アセトニトリル+0.085% TFA、波長(シグナル=254nm、参照=360nm)、流量=1mL/分。分析物の濃度は、メタノール中、約0.25mg/mLであった。p-アセチル-4-フェニルウラゾール2の保持時間=5.1分、およびp-アセチル-4-フェニルウラゾール4級アミノオキシ付加物4の保持時間=5.5分。ES-MSデータ：M⁺(計算M⁺=C₁₆H₂₄N₅O₃+ = 334.19)、観測M⁺=334.20および275.50(-Me₃N))。メタノールの除去後、粗生成物を白色の固体として単離した。様々な態様では、本実施例で用いられる成分の各々の値を約5%～約20%の範囲の量だけ増加または減少させることができ、例えば、各成分を、本実施例で用いられる値よりも5%少ない量から5%多い量で用いることができるか、各成分を、本実施例で用いられる値よりも10%少ないもしくは10%多い量で用いることができるか、各成分を、本実施例で用いられる値よりも15%少ない量から15%多い量で用いることができるか、または各成分を、本実施例で用いられる値よりも20%少ない量から20%多い量で用いることができる。様々な態様では、これらの値を約±5%～20%だけ変化させることができる。

【0067】

対イオン交換：そのようにして得られた固体を40mLの水に溶解させ、そのうちの3

10

20

30

40

50

0 mL (11.50 mmol の4) を交換に用いた。(50 mL フアルコンチューブ中) この溶液に、ヘプタフルオロ酪酸銀 (15 mL の脱イオン水中 3.69 g、11.53 mmol) の溶液を一度に添加し、チューブをはじいて短く混合した。沈殿を 3000 rpm で2分間の遠心分離により分離した。ヘプタフルオロ酪酸銀の希釈溶液 (1滴) を添加して、上清に臭化物イオン (Br⁻) がないかを調べた。濁りの形成は、Br⁻ の存在を示す。臭化物イオンの完全な沈殿を確実にするために、さらに 0.2 当量 (5 mL 水中、0.738 mg) のヘプタフルオロ酪酸銀を添加し、混合し、遠心分離し、Br⁻ がないかを調べた。透明な溶液は、全ての Br⁻ の完全な消費を示す。濾液をシリンジに採取し、5 ミクロンフィルター (25 mm、Millex LCR、PTFE、25 mL/フィルター) に通して再濾過し、フラッシュクロマトグラフィーで精製した (2 回に分けて精製した: 43 g、C18 Isco カラム、流量 = 40 mL/分、溶媒 A: 水、溶媒 B: メタノール、カラムは、100 mL の 50% B、その後、250 mL の 2% B で平衡化した。試料を溶液としてカラムに充填し、0~6 分間は 2% B、その後、6~35 分間は 2~85% B とした。波長 = 254 nm)。生成物を含む画分を、純度について分析的 HPLC で分析、純粋な (>95%) 画分をプールして、ロータリーエバポレーター内で乾燥させると、p-アセチル-4-フェニルウラゾール 4 級アミノオキシ付加物ヘプタフルオロブチレート 5 が白色の固体として得られた。固体を 20 mL のトルエンとともに共蒸発させ、水の完全な除去を確実にするために真空下で乾燥させた。最終的な収量および HPLC 純度は、2.6 g (65%) および >98% であった。様々な態様では、本実施例で用いられる成分の各々の値を約 5%~約 20% の範囲の量だけ増加または減少させることができ、例えば、各成分を、本実施例で用いられる値よりも 5% 少ない量から 5% 多い量で用いることができるか、各成分を、本実施例で用いられる値よりも 10% 少ないもしくは 10% 多い量で用いることができるか、各成分を、本実施例で用いられる値よりも 15% 少ない量から 15% 多い量で用いることができるか、または各成分を、本実施例で用いられる値よりも 20% 少ない量から 20% 多い量で用いることができる。様々な態様では、これらの値を約 ±5%~20% だけ変化させることができる。

QAO-C 試薬 (6) の合成:

p-アセチル-4-フェニルウラゾール 4 級アミノオキシ付加物ヘプタフルオロブチレート 5 (800 mg、1.46 mmol、アルゴン雰囲気下) の冷懸濁液に、tBuOC1 (7 mL の無水アセトニトリル中 0.175 mL、1.46 mmol) の溶液を攪拌しながら滴加した (2~3 分間の添加)。添加し終わった後、反応液を 0~5℃ で 30 分間攪拌した。アセトニトリルを (窒素を通気した) ロータリーエバポレーターで除去し、ピンク色の固体を (一面のアルゴンの下、パストゥールピペットで上から除去される) 無水 EtOAc で洗浄した。真空下で乾燥させた後、0.65 g (80%) の 6 が橙赤色 {とうせきしょく} の固体として得られた。生成物を湿気をなくして -40℃ で保存し、明るい光から保護した。様々な態様では、本実施例で用いられる成分の各々の値を約 5%~約 20% の範囲の量だけ増加または減少させることができ、例えば、各成分を、本実施例で用いられる値よりも 5% 少ない量から 5% 多い量で用いることができるか、各成分を、本実施例で用いられる値よりも 10% 少ないもしくは 10% 多い量で用いることができるか、各成分を、本実施例で用いられる値よりも 15% 少ない量から 15% 多い量で用いることができるか、または各成分を、本実施例で用いられる値よりも 20% 少ない量から 20% 多い量で用いることができる。様々な態様では、これらの値を約 ±5%~20% だけ変化させることができる。

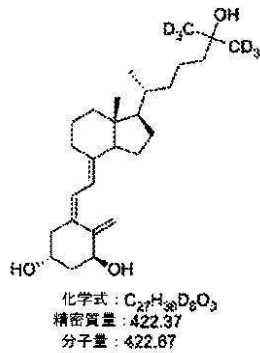
試料の調製および分析に用いられる他の化学物質および試薬:

1. 内部標準: 1α, 25-ジヒドロキシビタミン-D₃ (26, 26, 26, 27, 27, 27-d₆)。[d6-1, 25 DHVD₃]

供給元: Medical Isotopes Inc. Pelham, NH. 製品番号: D3222、1 mg。

【0068】

【化10】



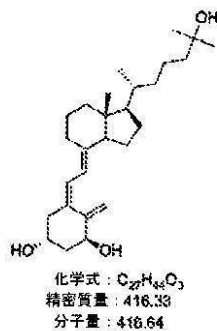
10

2. 分析物: 1 α , 25-ジヒドロキシビタミン-D₃

供給元: T R C, C a n a d a, 製品番号: C 1 4 4 5 0 0、1 m g。

【0069】

【化11】



20

3. 溶媒:

a) ジイソプロピルエーテル: 供給元: A l d r i c h、製品番号 3 8 2 7 9

b) ヘキサン (H P L C 等級): 供給元: J T B A K E R、製品番号 9 3 0 4 - 0 3

c) イソプロパノール (i - P r O H): 供給元: A l d r i c h、製品番号 2 7 8 4 7 5

30

d) メタノール (H P L C 等級): 供給元、A C R O S、A C 6 1 0 0 9 - 0 0 4 0

e) アセトニトリル (H P L C 等級): 供給元、E M D、製品番号 A X 0 1 4 5 - 1

f) 脱イオン水

g) ギ酸 (M S 等級): 供給元、F l u k a、製品番号 5 6 3 0 2

h) ジメチルホルムアミド (D M F): 供給元、A l d r i c h、製品番号 2 7 0 5 4 7

4. H P L C および固相カートリッジおよび供給元:

a) C h r o m a b o n d 2 4 位置コレクションラック: 供給元、M a c h e r e y N a g e l、製品番号 7 3 0 5 0 8

b) 異なるカラムの組合せ用の C h r o m a b o n d アダプター: 供給元、M a c h e r e y N a g e l、製品番号 7 3 0 1 0 1

40

c) C h r o m a b o n d カラム X T R、6 m l、1 0 0 0 m g B I G: 供給元、M a c h e r e y N a g e l、製品番号 7 3 0 4 8 7、2 5 0

d) S e p - P a k (登録商標) V a c シリカカートリッジ 6 c c / 5 0 0 m g 5 5 - 1 0 5 μ m 3 0 本 / 箱: 供給元、W a t e r s、製品番号 W A T 0 4 3 4 0 0

e) 5 m L P P バイアル: 供給元、V W R、製品番号 1 6 4 6 5 - 2 6 2

f) V W R (登録商標) 培養チューブ、使い捨て、F l i n t G l a s s 1 6 $\times$ 1 5 0 m m: 供給元、V W R、製品番号 6 0 8 2 5 - 4 3 5

g) マイクロ遠心チューブ 1. 7 m L: 供給元、N a t i o n a l S c i e n t i f i c、製品番号 2 0 1 7 2 - 6 9 8

50

h) マイクロ遠心チューブ 0.65 mL: 供給元、National Scientific、製品番号 20172-910

i) HPLC バイアルおよびキャップ: 供給元、Agilent、製品番号 9301-0978 および 5182-0540

5. 機器および HPLC カラム:

a) 13 mm バイアルおよび 0.65 mL 遠心分離チューブ用のローターを備えた高速真空濃縮機

b) 小型遠心分離機

c) Thermolyne ボルテックスシェーカー

d) タイマー

e) 5500 QTRAP マススペクトロメーター

f) 島津 UPLC

g) ACQUITY UPLC BEH C18 カラム、2.1 × 100 mm、1.7 μm、製品番号 186002352

h) 必要なバイアルラックおよびホルダー

i) 交差汚染を避けるために、Rainin 製の RT 1000F、RT 200F および RT 20F チップとともに用いられる 5 mL、1 mL、200 μL および 20 μL ピペット (推奨)。

固相抽出および誘導体化方法

1. シリカカートリッジ上に内部標準 (15 μL の DMF 中、150 pg の d6-1, 25 DHVD₃) をスパイクする。

【0070】

2. アダプターを用いてコレクションラック上で Chromabond XTR とシリカカートリッジを組み立てる。Chromabond XTR カートリッジが上になるようにする。ガラス管をシリカカートリッジの下に配置して、洗浄液を回収する。

【0071】

3. 血漿または血清試料を周囲温度に平衡化し、短くボルテックス処理して、均一な懸濁液を得、1.7 mL マイクロ遠心チューブ中に 200 μL を分注する。700 μL の水で希釈し、30 秒間ボルテックス処理し、スピンドウンする。

【0072】

4. 希釈した試料を Chromabond XTR カラムに充填し、10 分間待つ (タイマーを用いる)。

【0073】

5. シリカカラムに対してジイソプロピルエーテル (4 × 1 mL) を用いて、Chromabond XTR カラムを溶出させる。溶出工程と溶出工程の間で 3 分間待つ (タイマーを用いる)。

【0074】

6. Chromabond XTR カラムを取り外して廃棄し、ヘキサン中の 4% (2 × 4.5 mL) および 6% (2 × 3 mL) の iPrOH でシリカカラムを洗浄する。洗浄液とガラス管を廃棄する。

【0075】

7. ヘキサン (4.5 mL) 中の 25% の iPrOH で 1, 25 DHVD₃ を 5 mL チューブに溶出させ、スピードバック中、周囲温度で乾燥させる。

【0076】

8. 300 μL の MeOH をこの 5 mL チューブに添加し、1 分間ボルテックス処理し、スピンドウンし、この MeOH 溶液を 0.65 mL マイクロ遠心分離チューブに移し、スピードバック中、周囲温度で乾燥させる。

【0077】

9. 誘導体化: QAO-クックソン試薬 (20 μL、アセトニトリル中、0.5 mg/mL) をこの 0.65 mL マイクロ遠心分離チューブに添加し、15 秒間ボルテックス処

10

20

30

40

50

理し、スピンドウンする。これらの試料全ての1回目のボルテックス処理が終わった後、このボルテックス処理工程をもう1回繰り返す。全てのチューブをスピンドウンし、周囲温度で30分間待つ。

【0078】

QAO-クックソン試薬溶液を固体試薬から新たに作製し、1時間の誘導体化工程のうちに用いることができる。試薬は、アセトニトリル中2mg/mLの濃度まで良好な溶解度を有する。

【0079】

10. 20 µLの水を添加し、混合し、スピンドウンし、この溶液をHPLCバイアルに移して、分析する。

LC-MS法

コメント：DHVD3_C18_2.1×100mm 1.7uAcquity_08530254156 21_Dec02_2010

同期モード：LC Sync

自動平衡化：オフ

収集時間：3分60秒

スキャン回数：774回

ファイル中の周期：1

収集モジュール：収集方法

ソフトウェアバージョン Analyst 1.5.1

MS法の特徴：

周期1：

周期中のスキャン：774回

相対開始時間：0.00msec

周期中の実験：1

周期1 実験1：

スキャンタイプ：MRM (MRM)

定期MRM：なし

極性：ポジティブ

スキャンモード：N/A

イオン供給源：ターボスプレー

分解能Q1：ユニット

分解能Q3：ユニット

強度閾値：0.00cps

整定時間：0.0000msec

MR一時停止：5.0070msec

MCA：なし

段階サイズ：0.00Da

@Q1	Mass (Da)	Q3	Mass (Da)	Dwell (msec)	Param
Start	Stop	ID	748.500	689.400	150.00
d0DHVD3 (1, 25:24, 25, 23:25) _NeuL					

@Q1	Mass (Da)	Q3	Mass (Da)	Dwell (msec)	Param
Start	Stop	ID	754.540	695.400	150.00
d6DHVD3 (1, 25:24, 25:23, 25) _NeuL					

10

20

30

40

50

パラメータ表（周期1 実験1）：

CUR：25.00

IS：3500.00

TEM：650.00

GS1：50.00

GS2：55.00

CAD：ミディアム

DP 80.00

EP 10.00

CE 43.00

CXP 15.00

10

一体型Harvardシリンジポンプ法の特徴（未使用）

シリンジ直径（mm）：4.61

流速：7.000 uL／分

【0080】

【表1】

Valcoバルブダイバータ

	総時間(分)	位置
1	0.0	B
2	1.0	A
3	4.0	B

20

島津LC法の特徴

島津LCシステム平衡時間＝4.00分

島津LCシステム注入容量＝20.00 uL

島津LC法パラメータ

ポンプ

＝＝＝＝＝

ポンプAモデル：LC-20AD

ポンプBモデル：LC-20AD

ポンプモード：バイナリーフロー

総流量：0.7000 mL／分

ポンプB濃度：5.0%

B曲線：0

圧力範囲（ポンプA／B）：0～1422 psi

オートサンプラー

＝＝＝＝＝＝＝＝＝

モデル：SIL-20AC

リンス容量：200 uL

ニードルストローク：52 mm

リンス速度：35 uL／秒

サンプリング速度：15.0 uL／秒

ページ時間：25.0分

リンス浸漬時間：0秒

リンスモード：吸引の前後

クーラー対応：あり

クーラー温度：5℃

30

40

50

コントロールバイアルのニードルストローク：5 2 mm

ポンプ方法：リンスポートのみ

リンス時間：2 秒

オープン

=====

モデル：C T O－2 0 A

温度調節：可能

温度：4 0 ℃

最大温度：5 0 ℃

システムコントローラ

10

=====

モデル：C B M－2 0 A

電源：オン

イベント 1：オフ

イベント 2：オフ

イベント 3：オフ

イベント 4：オフ

時間プログラム

=====

【 0 0 8 1 】

20

【表 2】

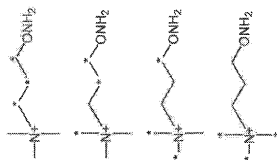
時間	モジュール	イベント	パラメータ
0.20	ポンプ注入	ポンプ B 濃度	5
0.30	ポンプ注入	ポンプ B 濃度	35
5.00	ポンプ注入	ポンプ B 濃度	50
5.50	ポンプ注入	ポンプ B 濃度	95
6.00	ポンプ注入	ポンプ B 濃度	95
6.05	システムコントローラ	停止	

30

本教示の他の実施形態は、本明細書の検討および本明細書に開示された本教示の実施から当業者に明らかになるであろう。本明細書および実施例は単に例示的なものと考えられることが意図される。

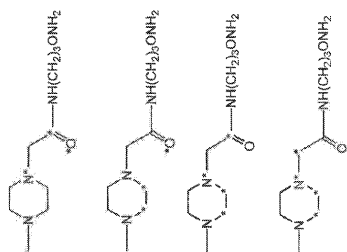
【図 2 A】

FIG. 2A



【図 2 B】

FIG. 2B



【図 1 2 B】

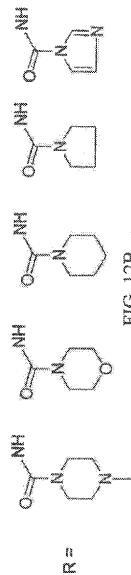
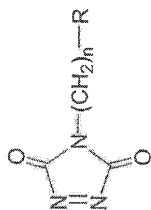


FIG. 12B

【図 1 7】

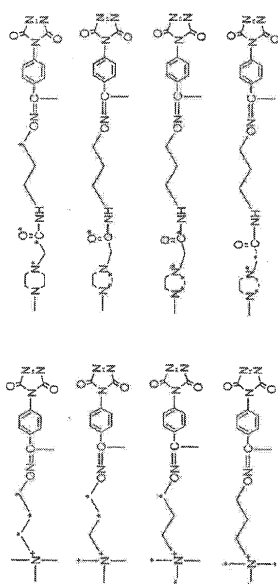


FIG. 17

【図 1 8】

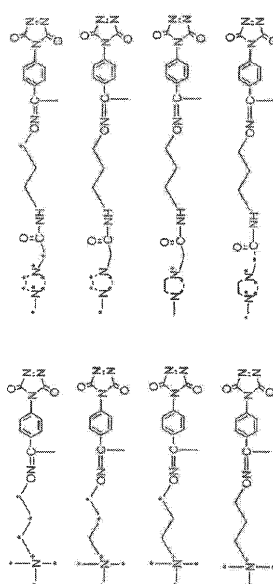
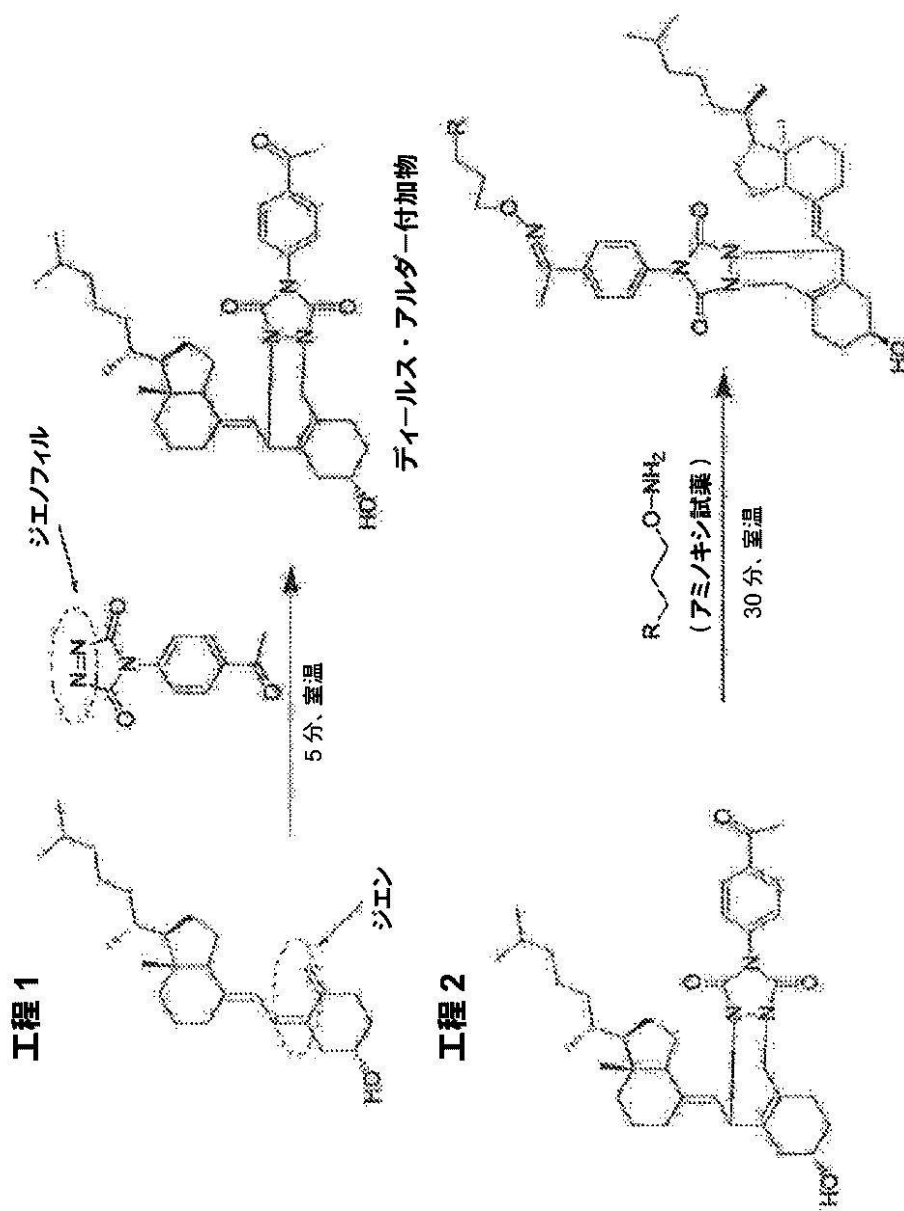


FIG. 18

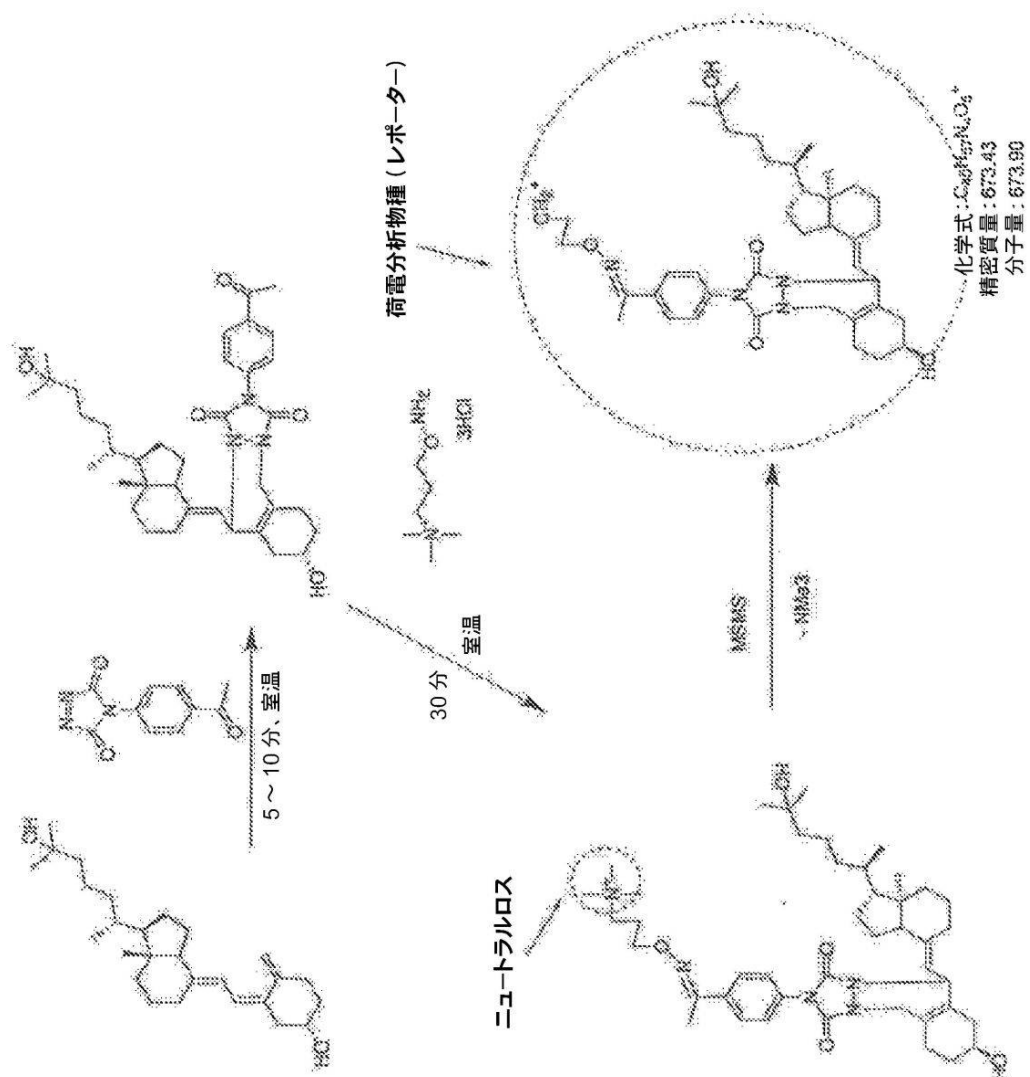
【図 1】

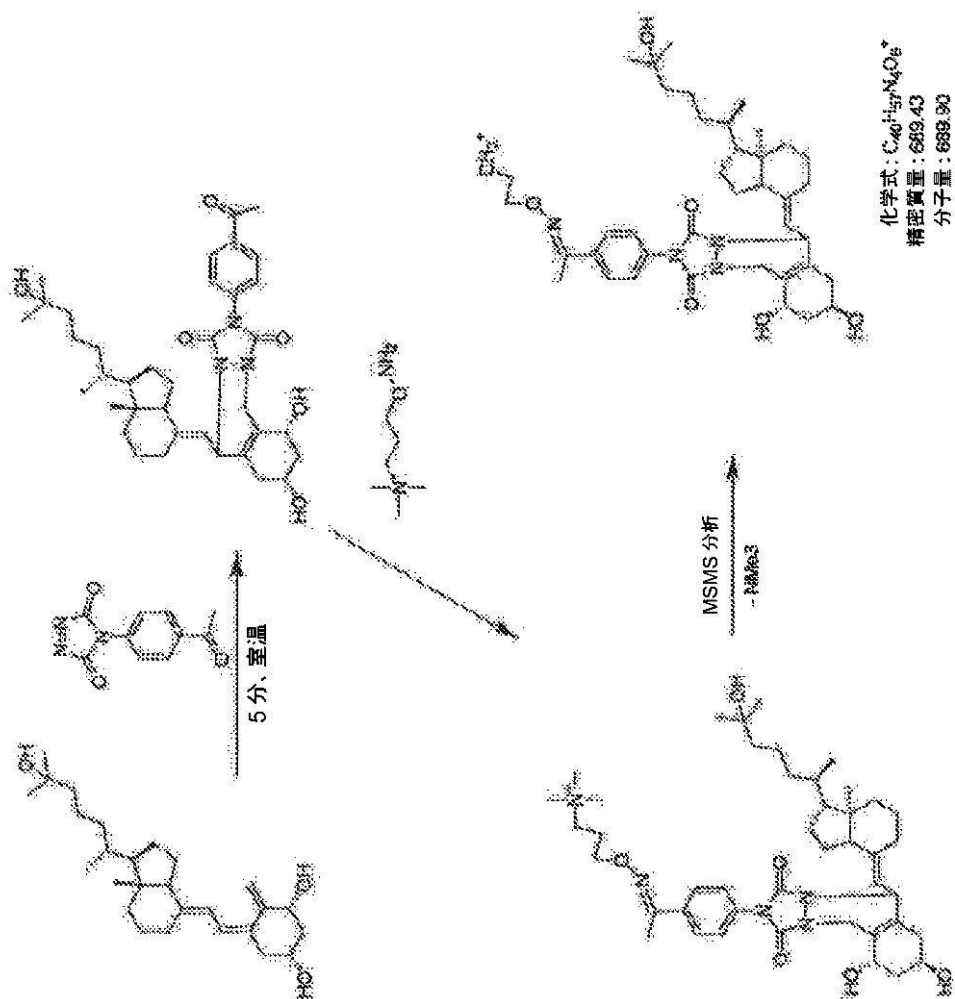
図 1



【図 3 A】

図 3A

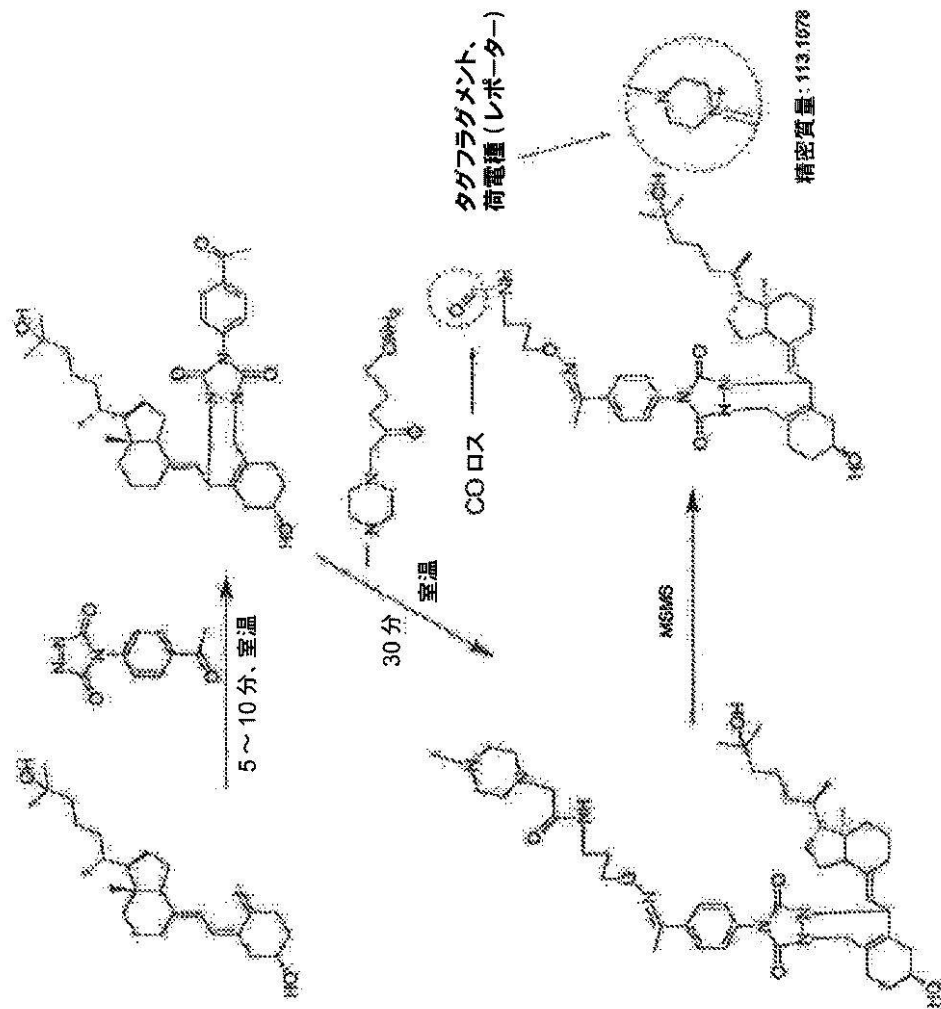




化学式: $C_{40}H_{57}N_4O_8$
精密質量: 689.43
分子量: 689.90

【図 3 C】

図 3C



【図 4 A】

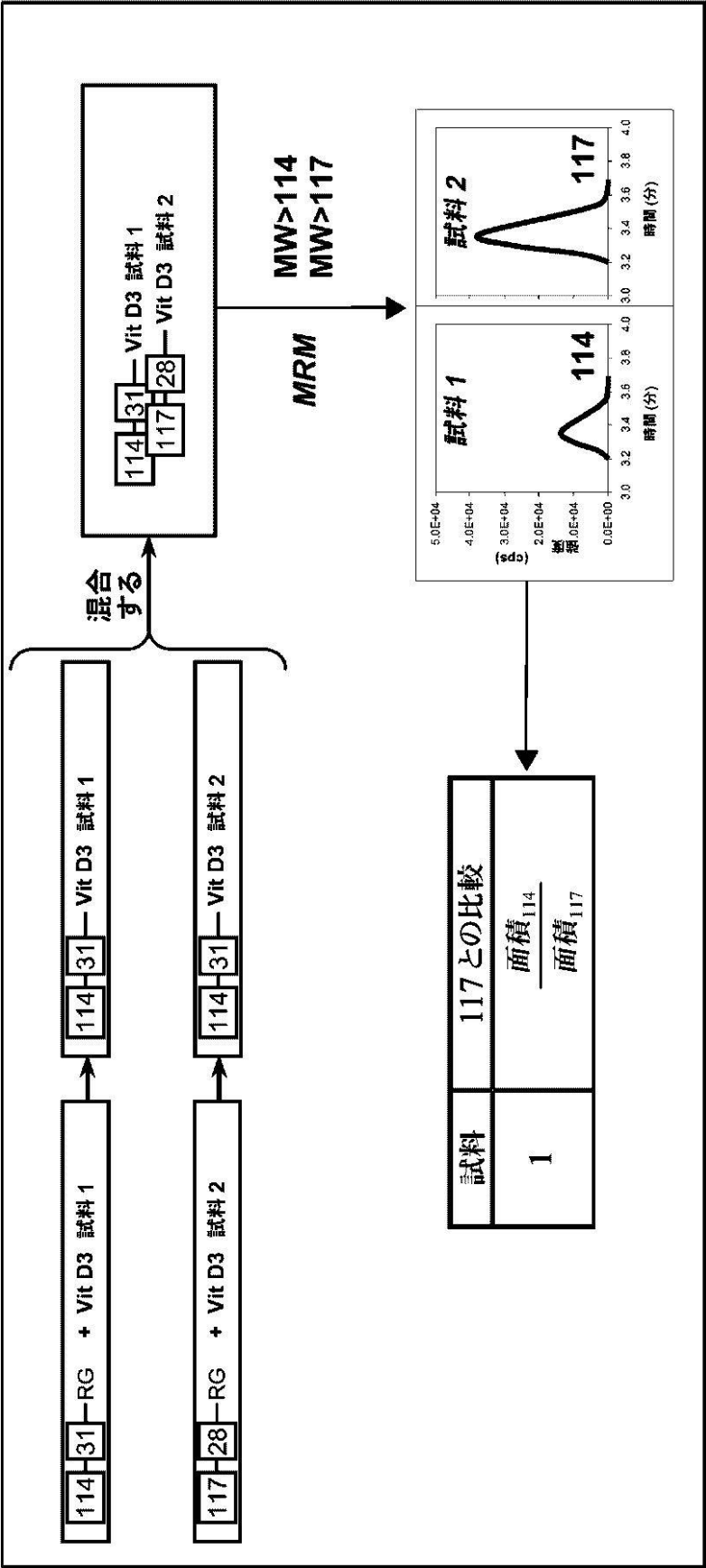


図 4A

【図 4 B】

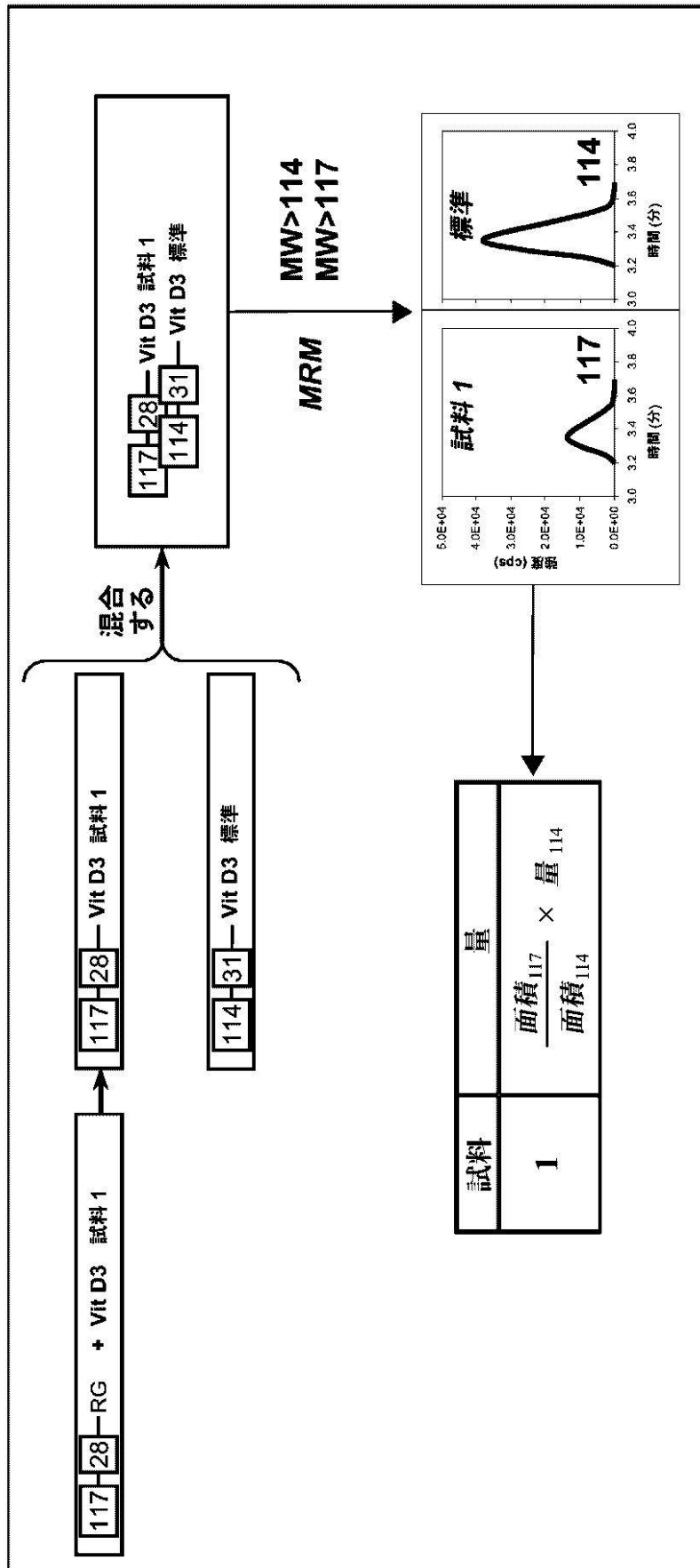


図 4B

【図 4 C】

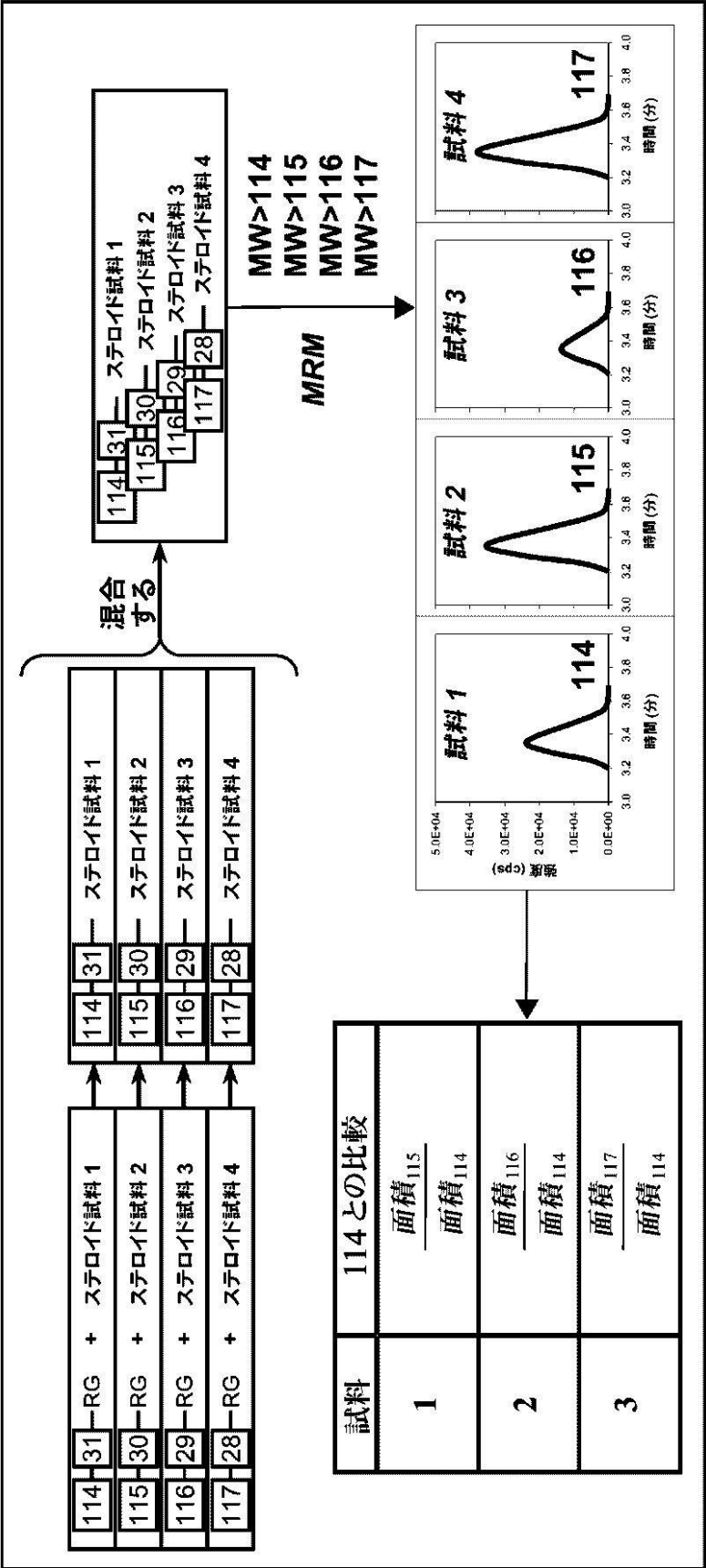


図 4C

【図 4 D】

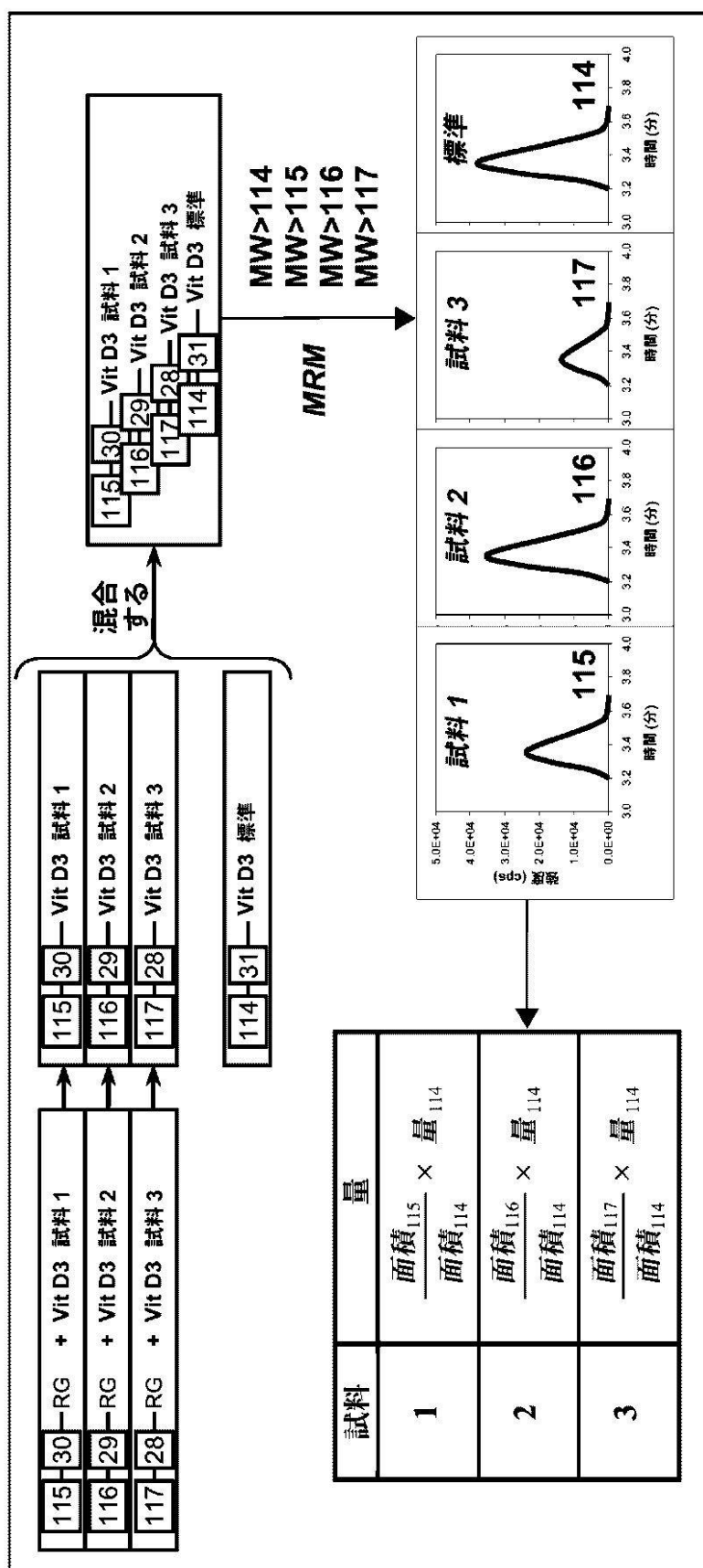
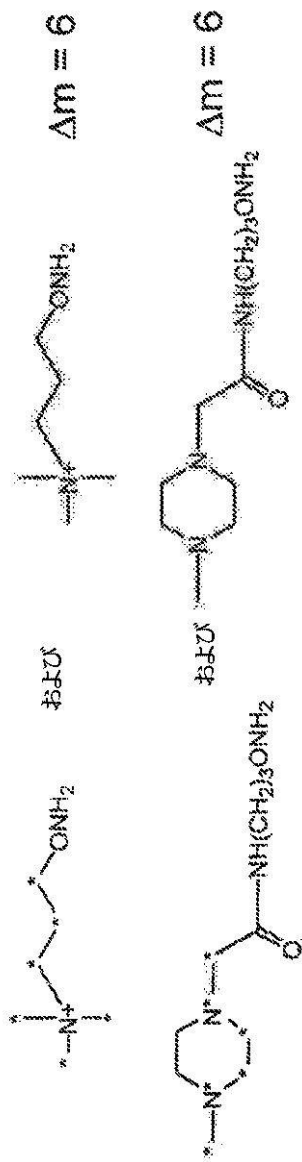


图 4D

【図 5】

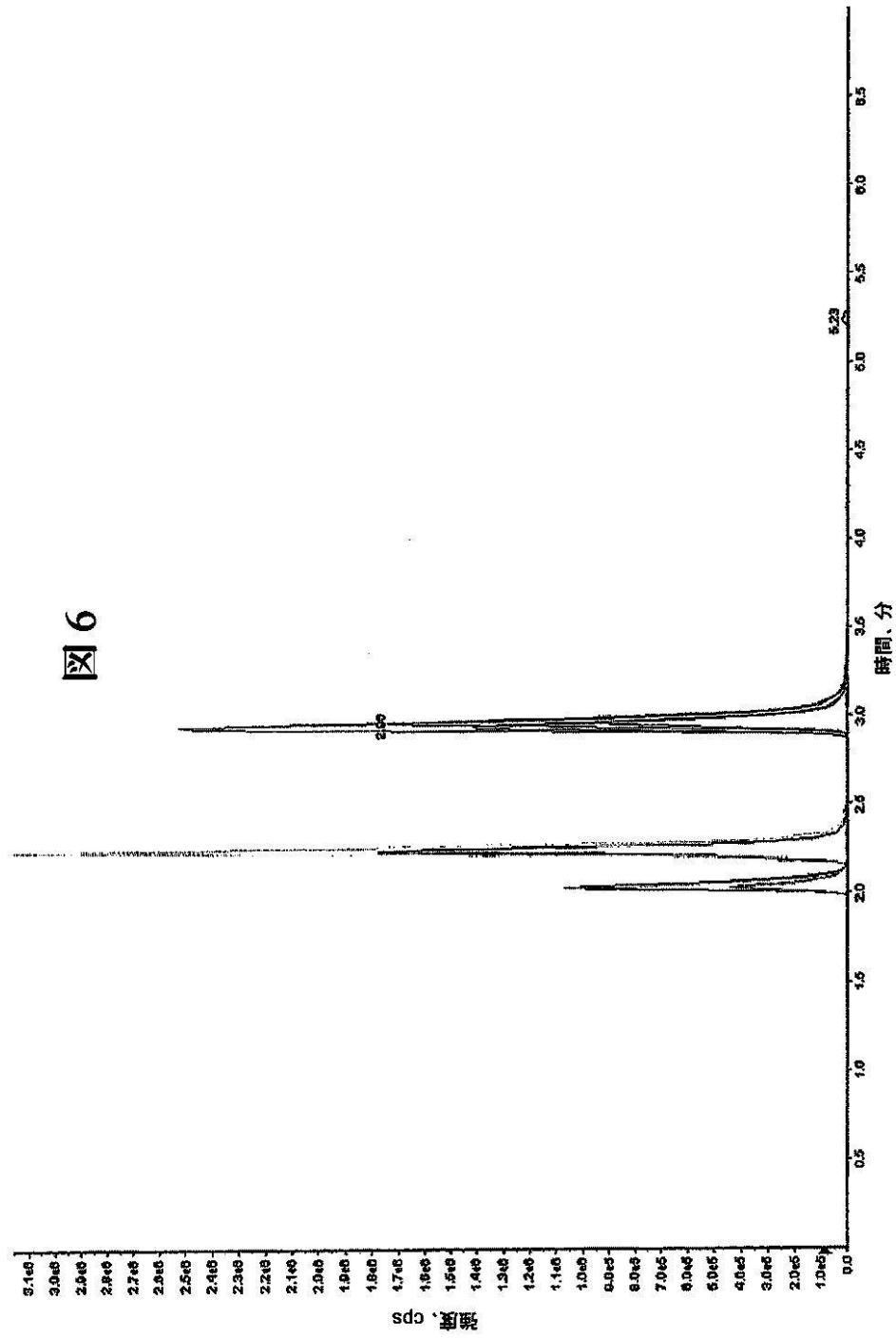
図 5



【図 6】

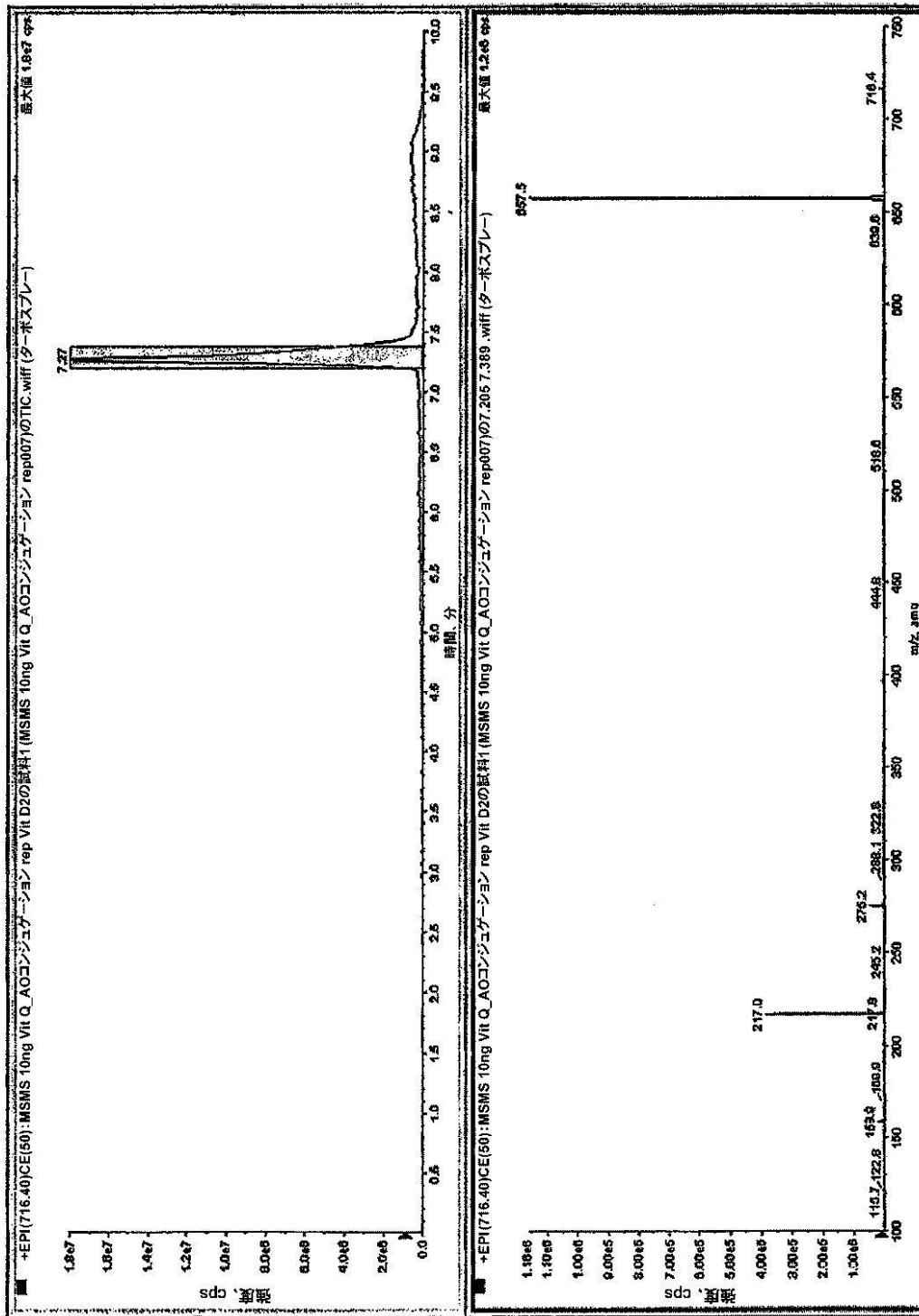
最大値 4.7e6 cps

MRM (8ペア) 1 ng MRMVt D3 D2 & 代謝体の試料 1 の 728.5/659.4 amu (1 ng MRM001) の XIC. wiff (ターボスプレー)



【図 7】

図 7



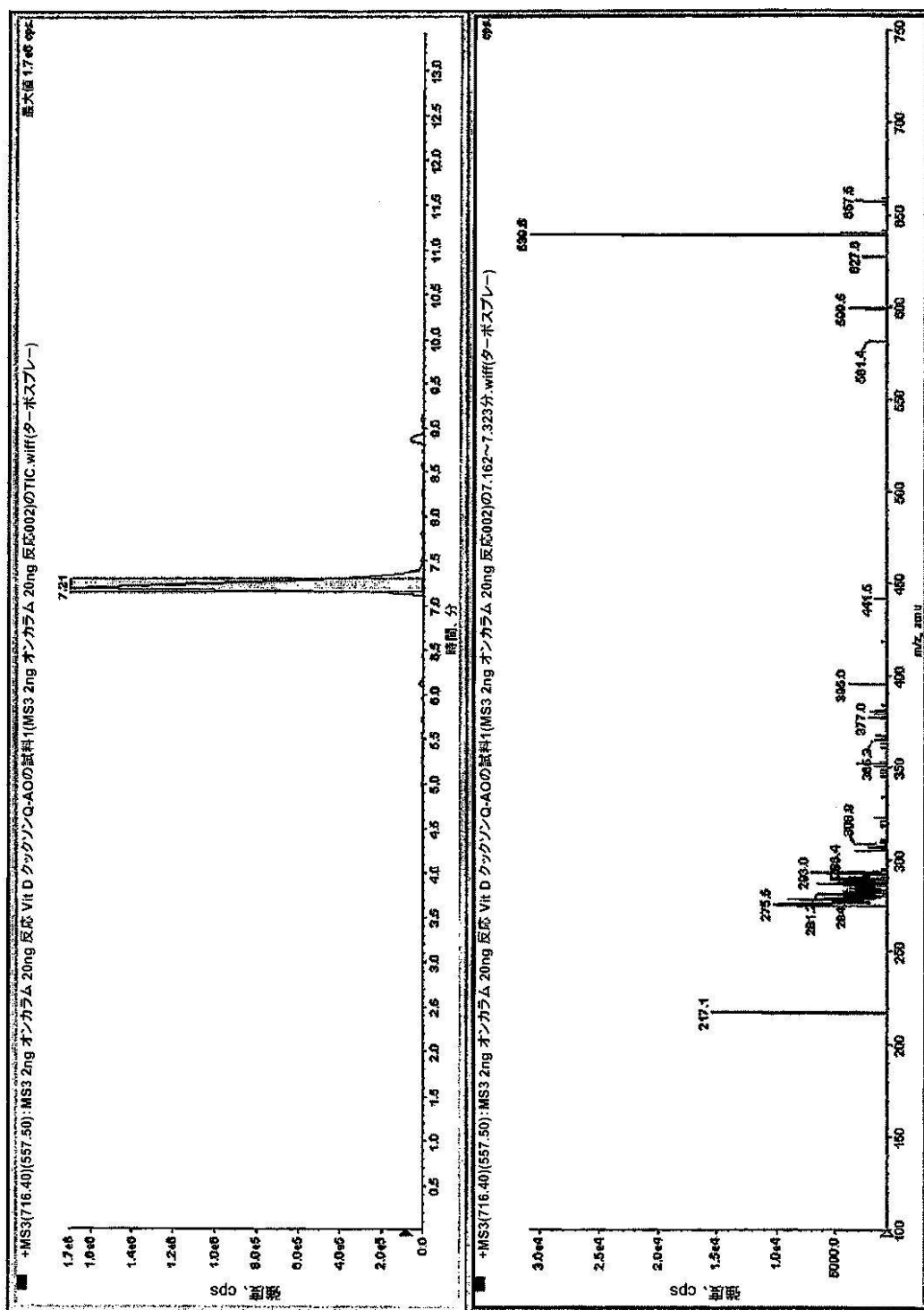
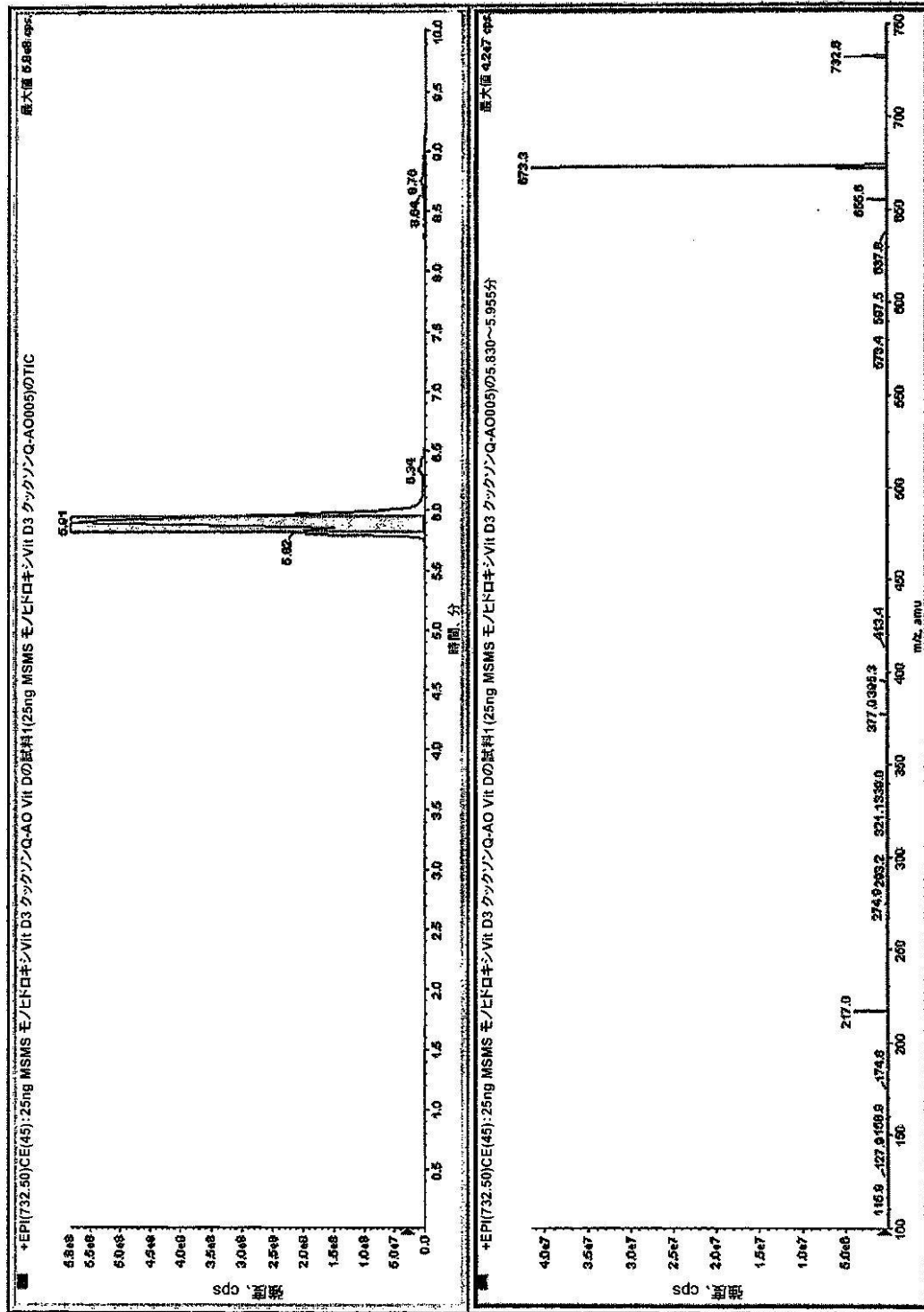
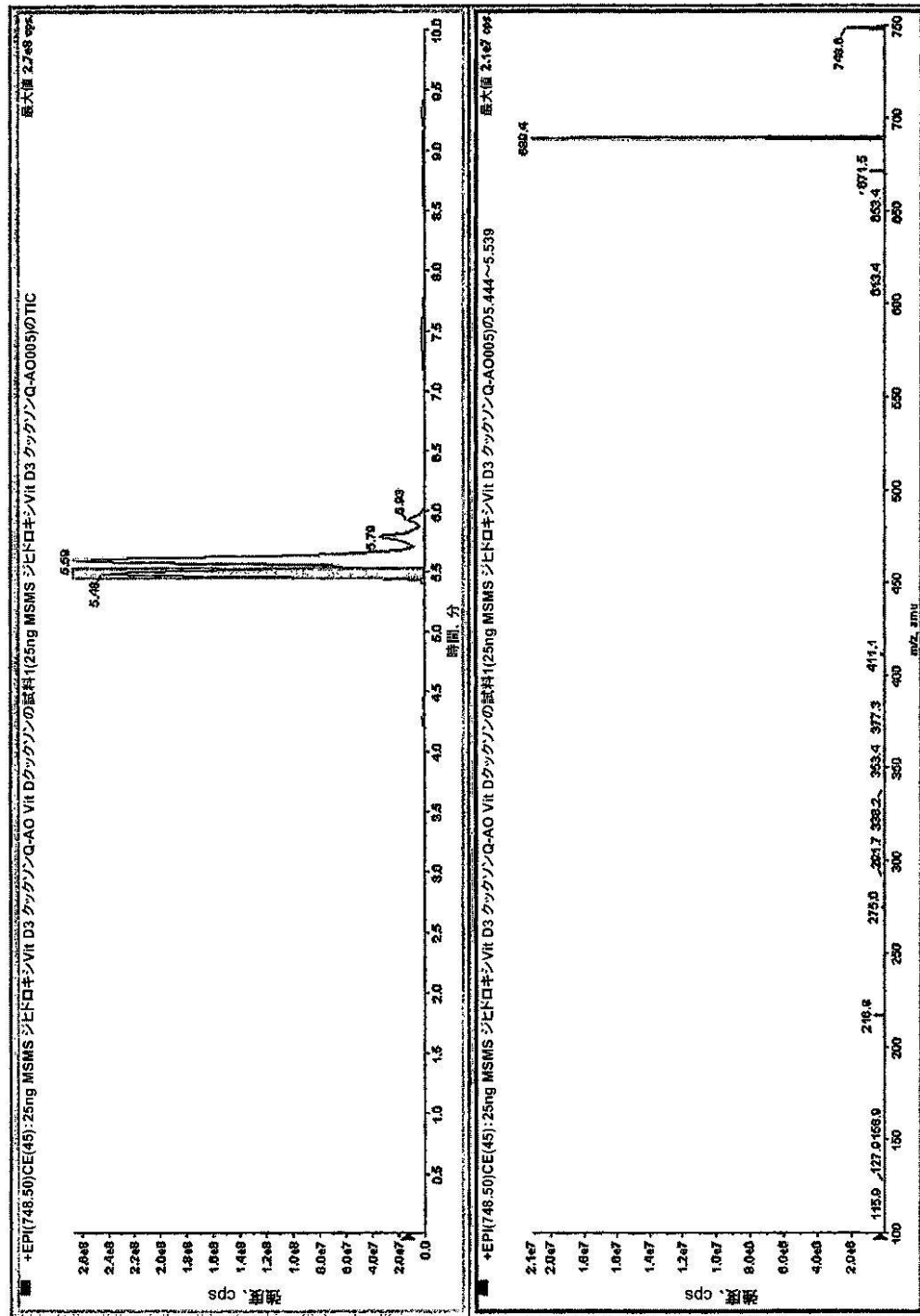


図 9



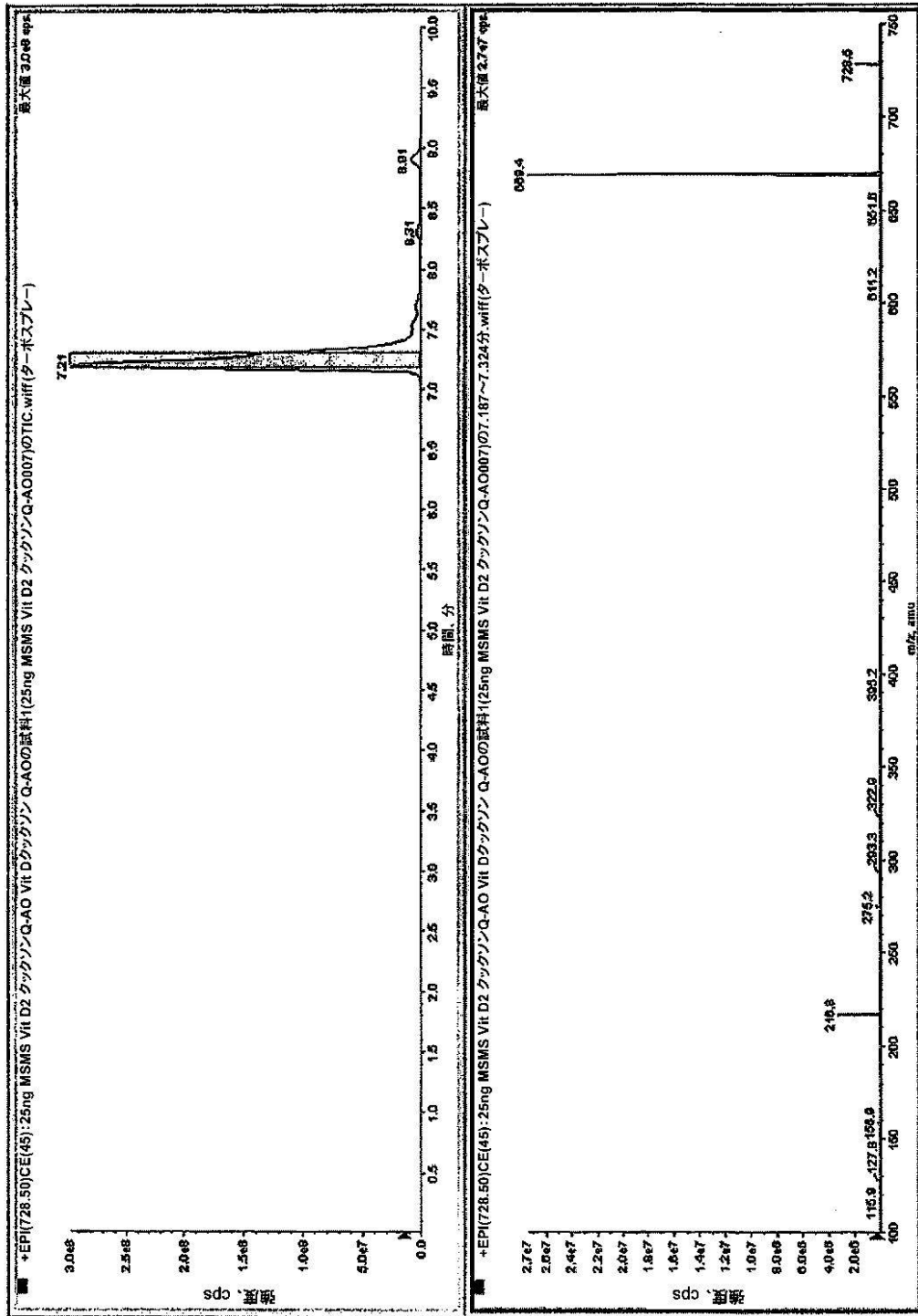
【図10】

図 10

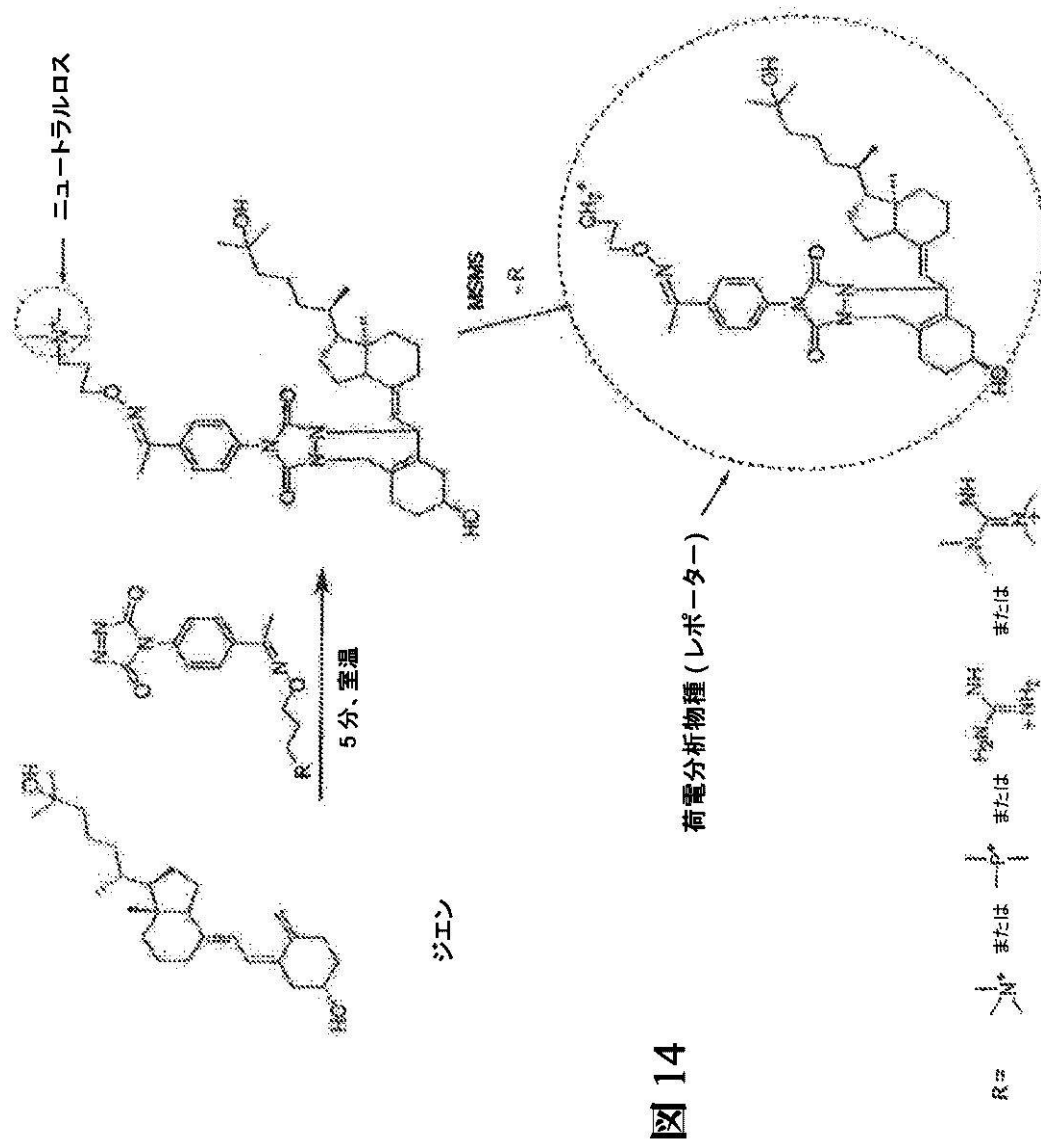


【図 11】

図 11



【図 14】



【図 15】

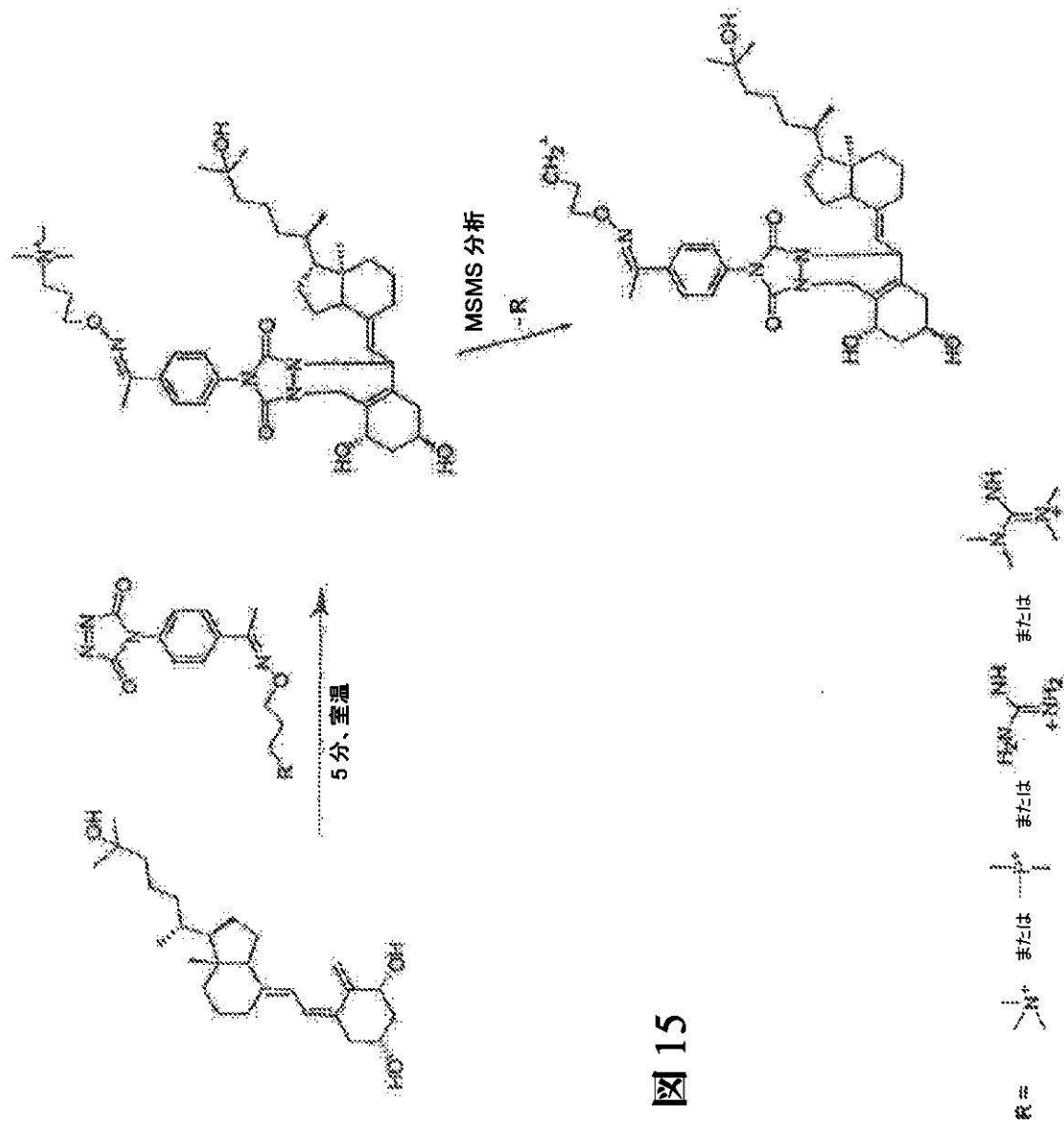
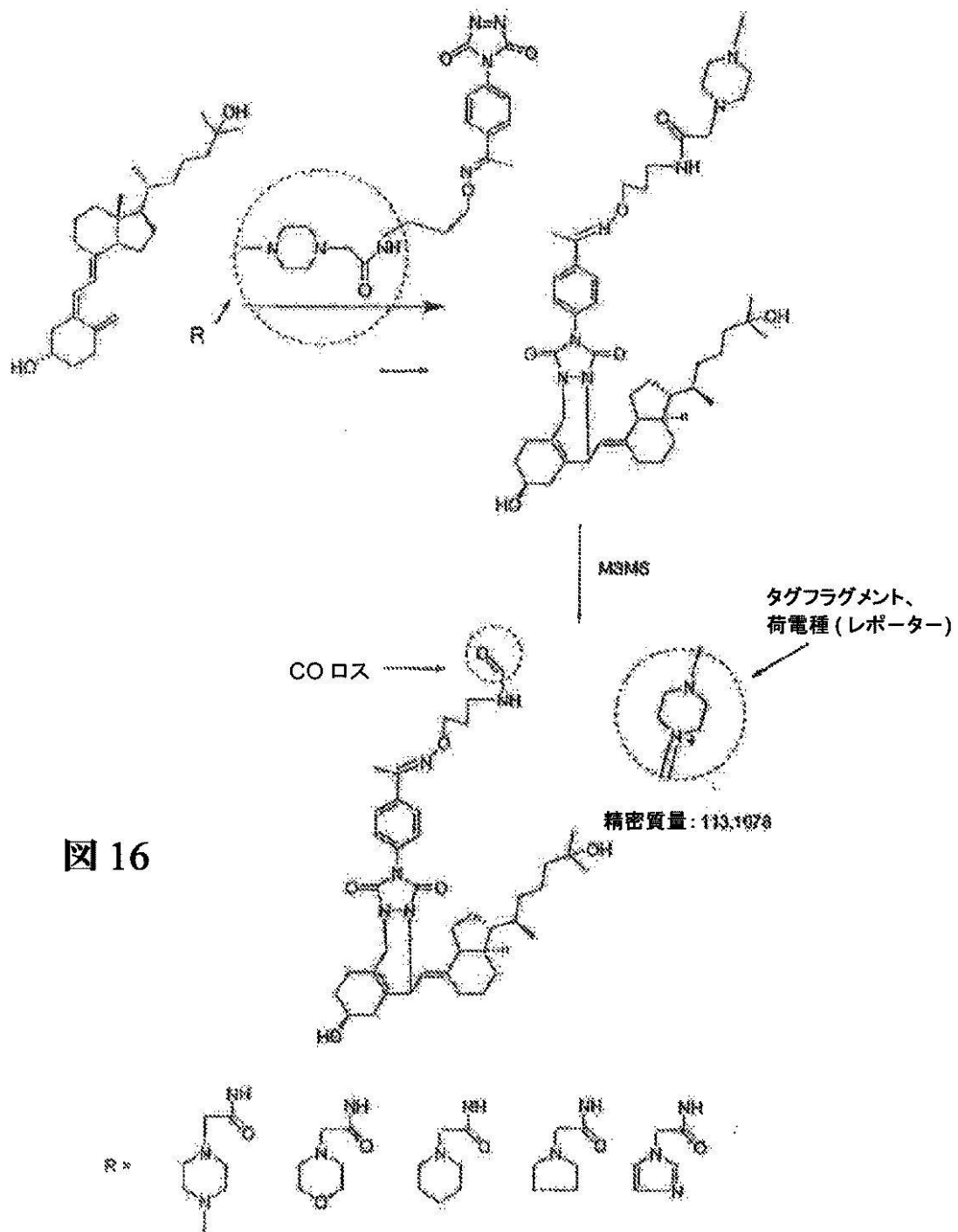


図 15

【図 16】



【図19】

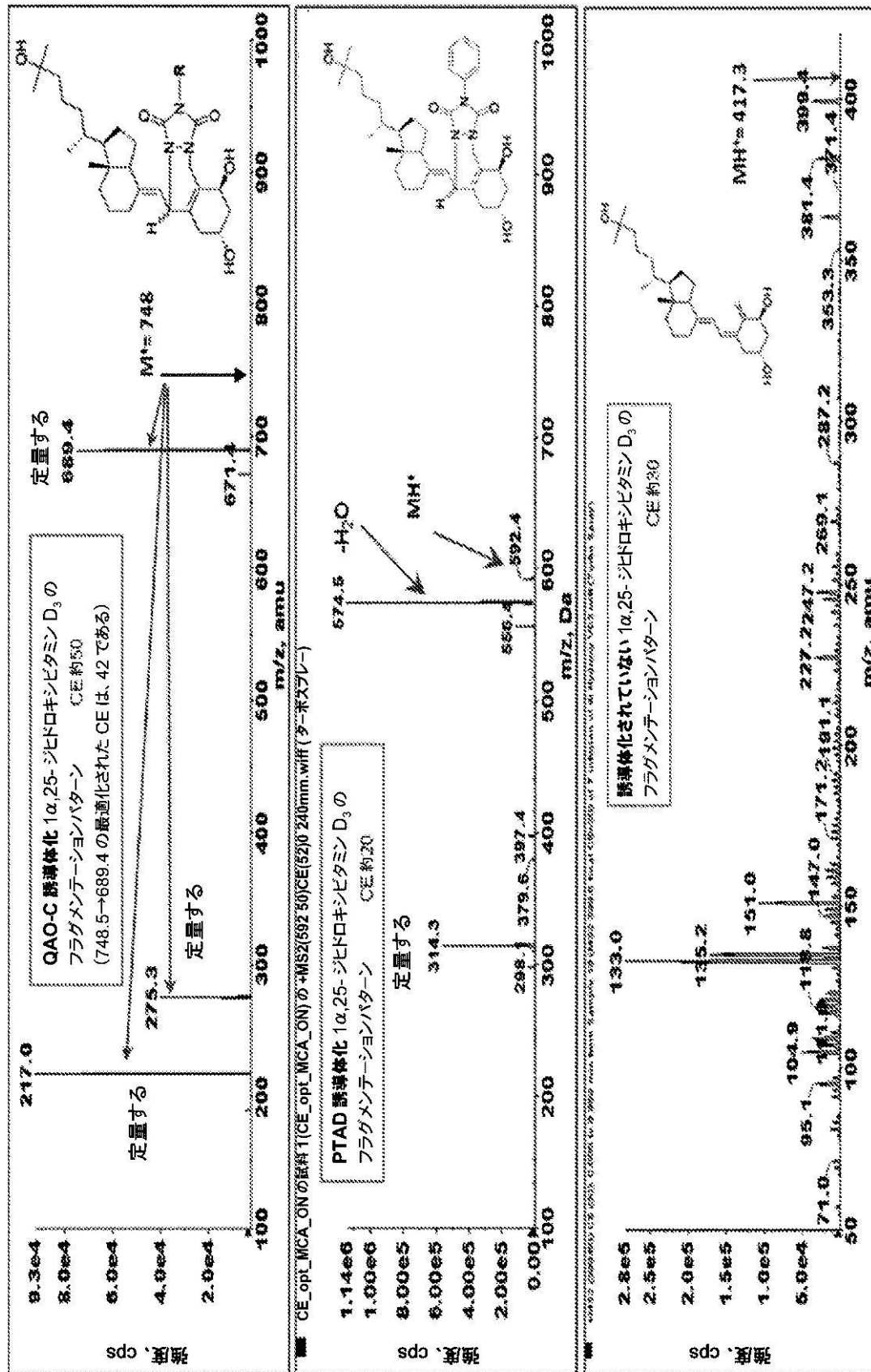


図19

【図 20】

試料およびトランジション (最も強いトランジション)	濃度 (カラム上)	3 回の注入の面積	3 回の注入の 平均面積
1 α , 25 DiHyVD ₃ 399.6→135.2	10 pg	..	検出限界未満
	25 pg	6.89 e2 5.80 e2 5.88 e2	6.19 e2
	50 pg	1.20 e3 1.15 e3 1.13 e3	1.16 e3
1 α , 25 DiHyVD ₃ _PTAD 592.5→574.4	10 pg	4.13 e3 6.04 e3 5.44 e3	5.20 e3
	25 pg	1.02 e4 1.21 e4 1.01 e4	1.08 e4
	50 pg	2.21 e4 2.18 e4 2.14 e4	2.18 e4
1 α , 25 DiHyVD ₃ _QAO-C 748.6→639.5	10 pg	4.36 e4 5.70 e4 5.49 e4	5.19 e4
	25 pg	8.97 e4 1.06 e5 1.05 e5	1.00 e5
	50 pg	2.52 e5 2.63 e5 2.60 e5	2.58 e5

平均
X 18平均
X 192平均
X 11

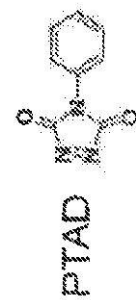
* 装置 API4000

* 反応はアセトニトリル中で実施

* 同じ 1 α , 25-DiHyVD₃ のストック溶液およびピペットを全ての反応に用いた

* 同様の濃度の PTAD (クックソン) および QAO-クックソンを用いた

* ばらつきを低く保つために、全ての反応および MS 分析を同じバッチで / 同じ日に実施した



QAO-クックソン



図 20

【図 21】

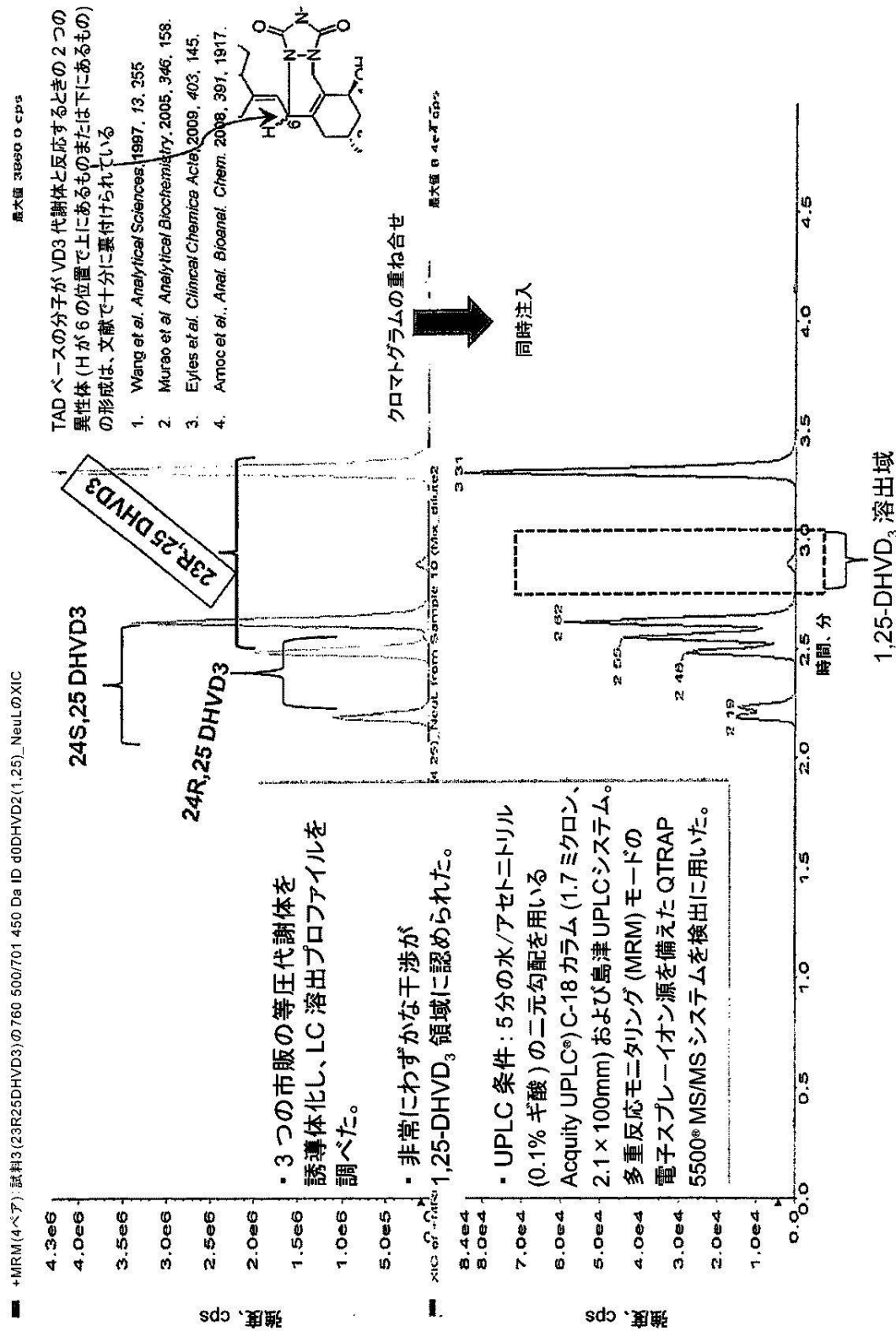
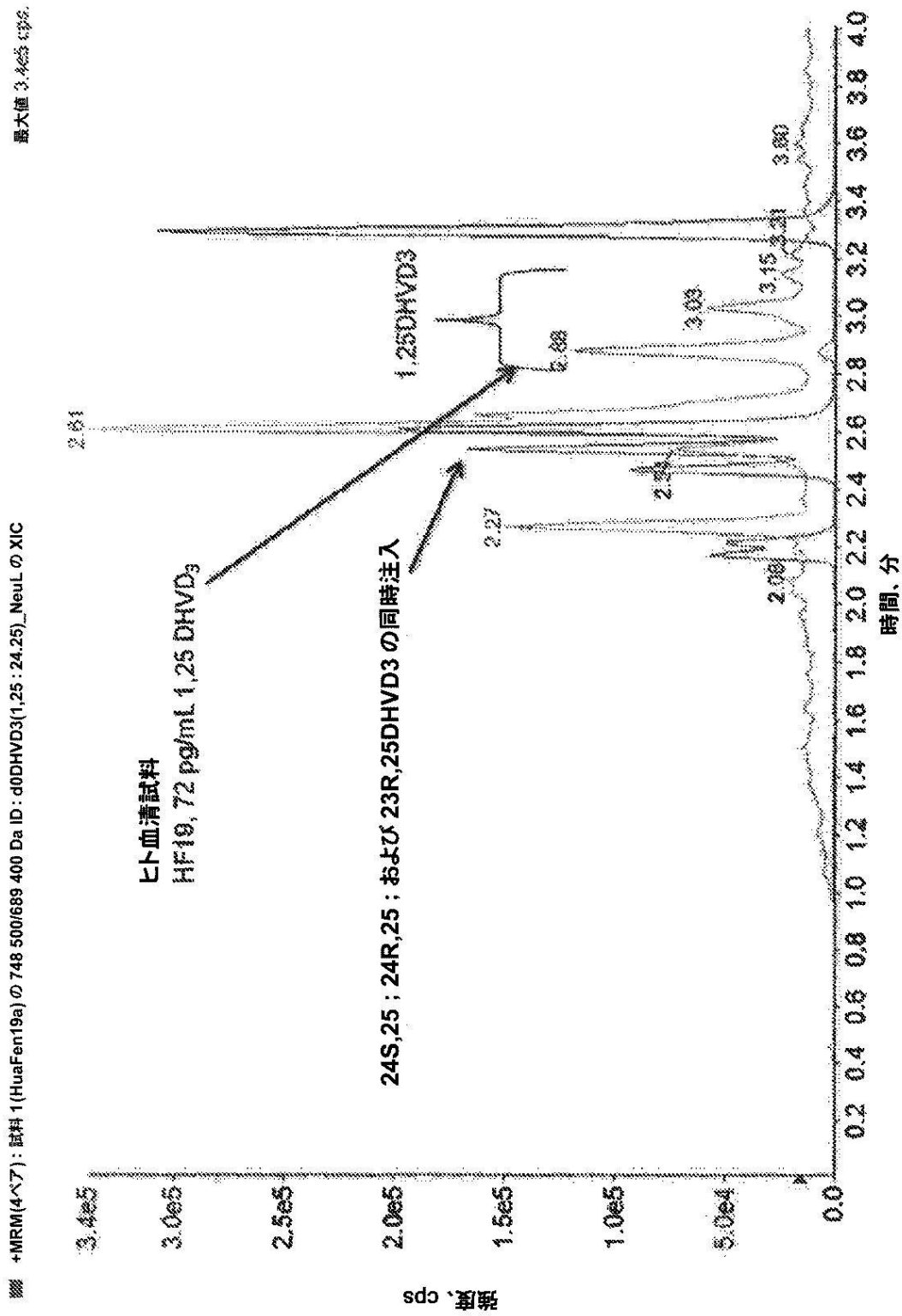


図 21

【図 22】



【図 23】

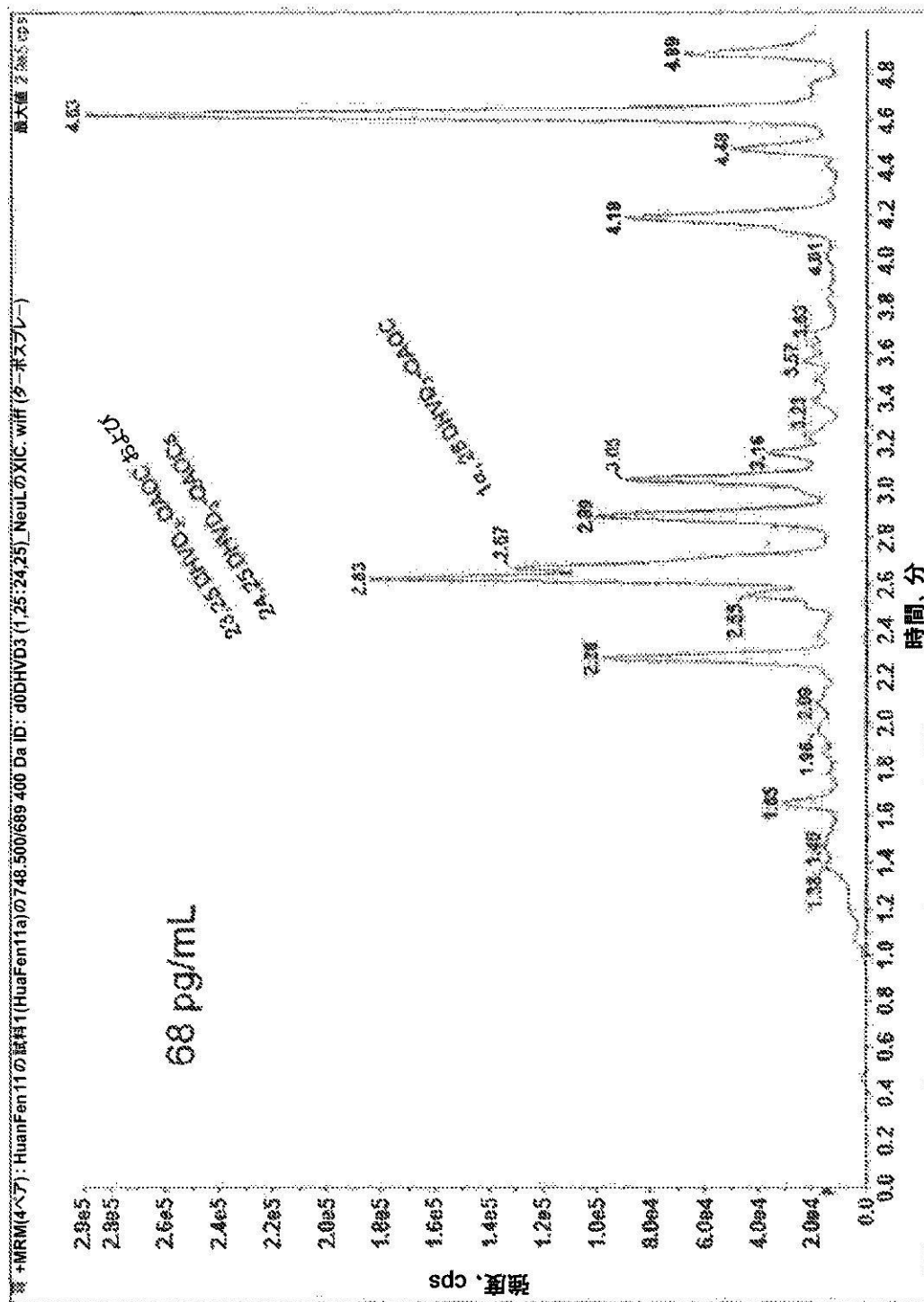


図 23

【図 24】

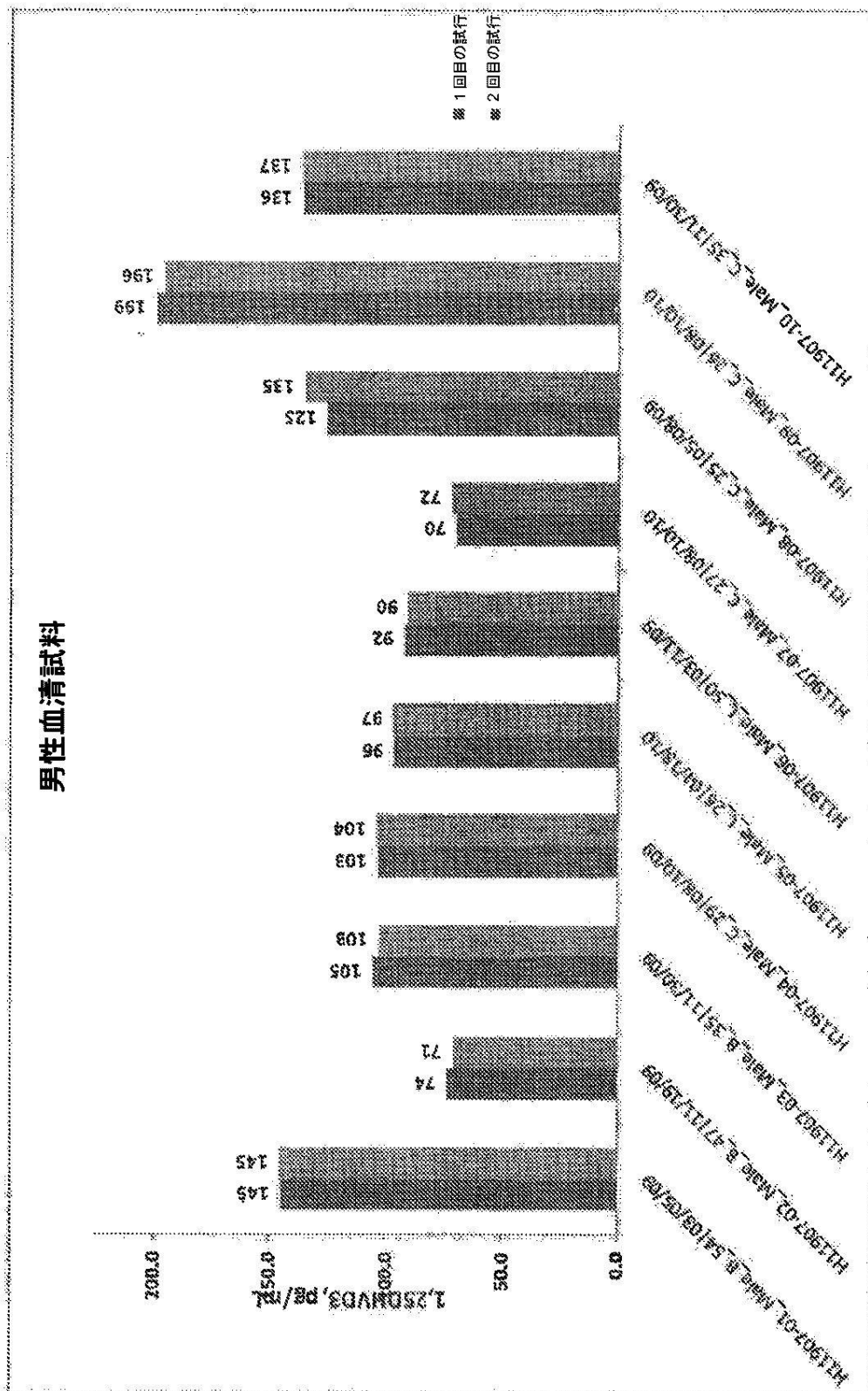


図 24

【図 25】

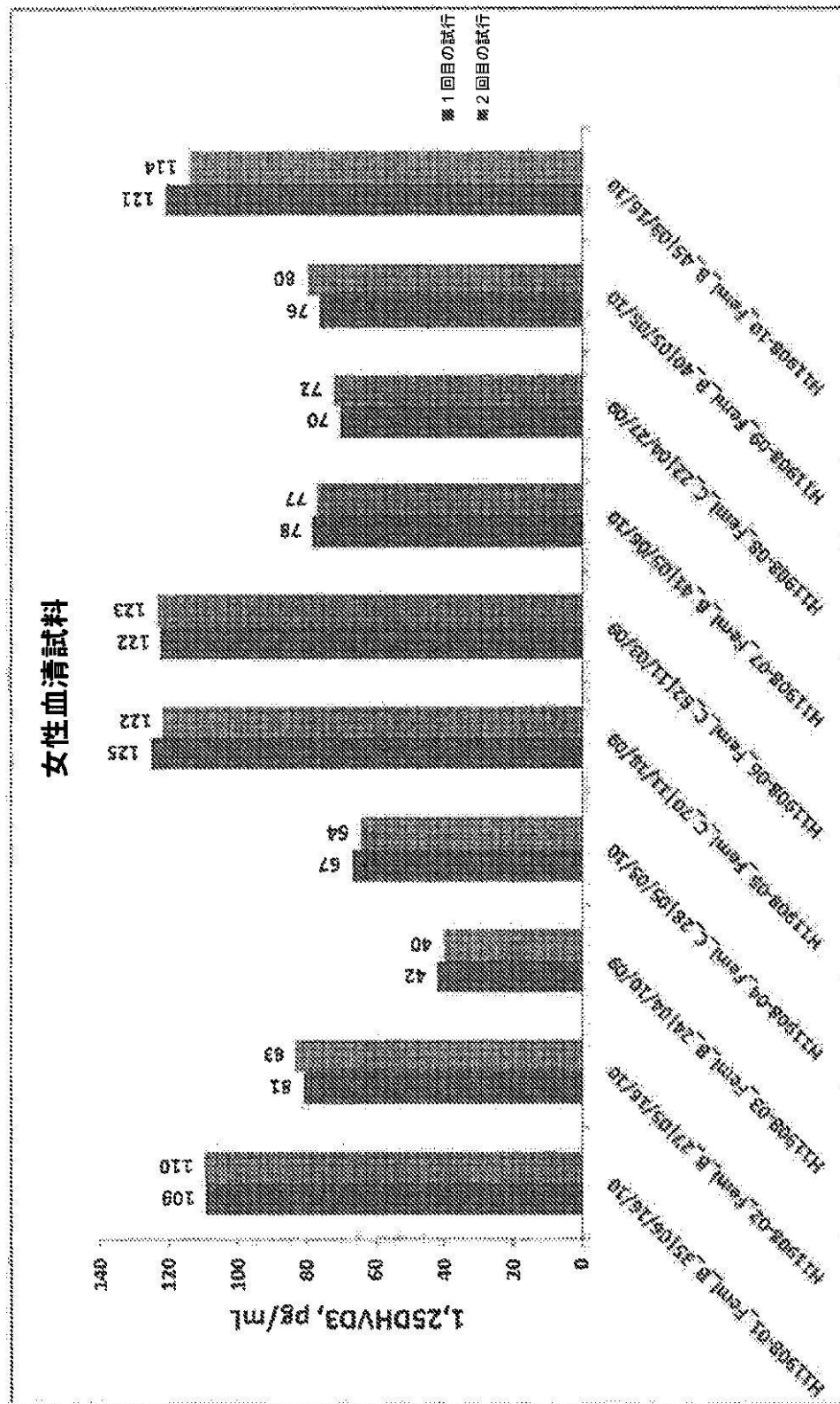


図 25

フロントページの続き

- (72)発明者 デイ, サブハカール
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01862, エヌ. ビレリカ, シューエル ストリート 9, エムエス 35 ウィッジンズ
- (72)発明者 ピライ, サシ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01460, リトルトン, ニコール レーン 1
- (72)発明者 ウィリアムソン, ブライアン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01721, アッシュランド, オリーブ ストリート 118
- (72)発明者 プルカヤスタ, サブハシシュ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01720, アクトン, スクワレル ヒル ロード 19

審査官 ▲高▼場 正光

- (56)参考文献 特表2007-515625 (JP, A)
米国特許出願公開第2009/0137056 (US, A1)
特開2005-291958 (JP, A)
国際公開第2010/141075 (WO, A1)
米国特許出願公開第2004/0220412 (US, A1)
島田和武 他, “Cookson型誘導体化試薬を用いるビタミンDの高速液体クロマトグラフィー/質量分析”, 分析化学, 2002年, Volume 51, Number 7, Pages 487-493
Alakurtti, S. 他, “Synthesis and anti-leishmanial activity of heterocyclic betulin derivatives”, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2010年 1月 7日, Volume 18, Pages 1573-1582

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N27/62-27/70
JSTPlus/JMedPlus (JDreamIII)
Registry/CAPLUS (STN)