

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-521683

(P2016-521683A)

(43) 公表日 平成28年7月25日(2016.7.25)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C07D 498/04 (2006.01)	C07D 498/04	103 4 B 06 4
C07D 519/00 (2006.01)	C07D 519/00	C S P 4 C 03 1
C07D 215/48 (2006.01)	C07D 215/48	4 C 07 1
C07D 495/04 (2006.01)	C07D 495/04	103 4 C 07 2
C07J 43/00 (2006.01)	C07J 43/00	4 C 09 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-514523 (P2016-514523)	(71) 出願人	599132904 ネステク ソシエテ アノニム スイス国, ブベイ, アブニュー ネスレ 55
(86) (22) 出願日	平成26年5月22日 (2014.5.22)	(74) 代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(85) 翻訳文提出日	平成28年1月20日 (2016.1.20)	(74) 代理人	100107456 弁理士 池田 成人
(86) 國際出願番号	PCT/IB2014/061634	(74) 代理人	100162352 弁理士 酒巻 順一郎
(87) 國際公開番号	W02014/188377	(74) 代理人	100140453 弁理士 戸津 洋介
(87) 國際公開日	平成26年11月27日 (2014.11.27)	(74) 代理人	100140888 弁理士 渡辺 欣乃
(31) 優先権主張番号	61/827,506		
(32) 優先日	平成25年5月24日 (2013.5.24)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】過敏性腸症候群の診断を予測するための経路特異的なアッセイ

(57) 【要約】

本発明は、セロトニン、トリプトファン、キヌレニン経路における代謝産物に対する抗体、及び抗体を調製するための方法を提供する。調製された抗体は、関連の代謝産物に対して低い交差反応性を有し、特異的で高感度の免疫アッセイのための有用な試薬である。本発明は、様々な代謝産物及び短鎖脂肪酸の安定な誘導体も提供する。誘導体は、担体タンパク質などの生体分子にコンジュゲートすることができ、免疫応答を刺激するためのアジュバントと組み合わせることができる。誘導体は、他の生体分子にコンジュゲートすることもできる。

【選択図】 図1

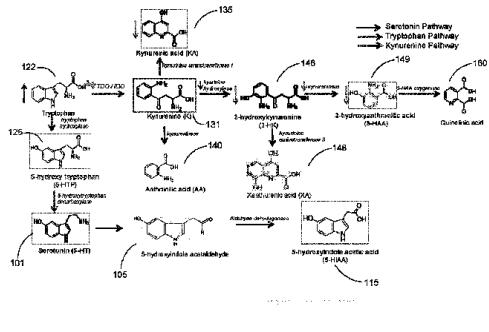


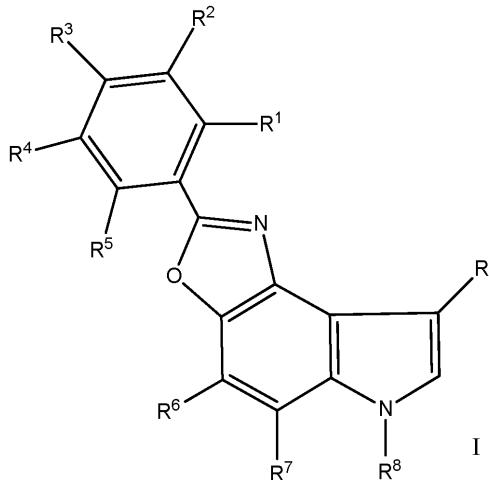
FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 I の化合物：

【化 1】



(式中、Rは、アルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アミノアルキル、アミドアルキル、カルボキシアルキル、置換カルボキシアルキルからなる群から選択されるメンバーであり、

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、及びR⁸は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR¹¹Bからなる群から独立に選択されるメンバーであり、

Lは、リンカーであり、

R¹¹は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、

Bは、生体分子である)。

【請求項 2】

Rが、アミノアルキル、カルボキシアルキル、及び置換カルボキシアルキルからなる群から選択されるメンバーである、請求項1に記載の化合物。

【請求項 3】

Rが、-CH₂CH₂NH₂、-CH₂CH₂CO₂H、及びCH₂CH(NH₂)CO₂Hからなる群から選択されるメンバーである、請求項1に記載の化合物。

【請求項 4】

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、及びR⁷の群の少なくとも1つのメンバーがR¹¹Bである、請求項1に記載の化合物。

【請求項 5】

Bが、タンパク質、免疫原性ペプチド、及びビオチンからなる群から選択されるメンバーである、請求項4に記載の化合物。

【請求項 6】

式 I I の化合物：

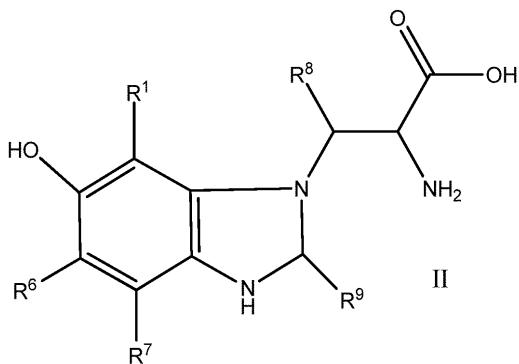
10

20

30

40

【化2】



10

(式中、R¹、R⁶、R⁷、R⁸、及びR⁹は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR¹¹ Bからなる群から独立に選択されるメンバーであり、

Lは、リンカーであり、

R¹¹は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、

Bは、生体分子である)。

20

【請求項7】

R¹、R⁶、R⁷、R⁸、及びR⁹の群の少なくとも1つのメンバーがR¹¹ Bである、請求項6に記載の化合物。

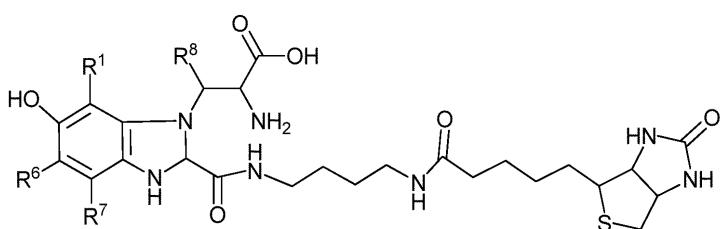
【請求項8】

Bが、タンパク質、免疫原性ペプチド、又はビオチンからなる群から選択されるメンバーである、請求項7に記載の化合物。

【請求項9】

式：

【化3】



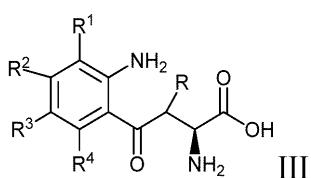
30

を有する、請求項8に記載の化合物。

【請求項10】

式IIIの化合物：

【化4】



40

(式中、R、R¹、R²、R³、及びR⁴は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR¹¹

50

¹ B からなる群から独立に選択されるメンバーであり、
L は、リンカーであり、
R ¹ ¹ は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、
B は、生体分子である)。

【請求項 1 1】

R、R ¹、R ²、R ³、及びR ⁴ の群の少なくとも 1 つのメンバーが R ¹ ¹ B である、
請求項 1 0 に記載の化合物。

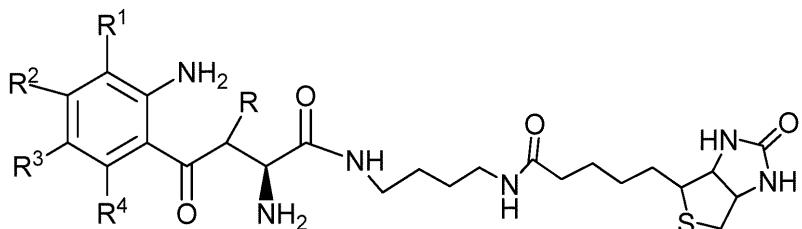
【請求項 1 2】

B が、タンパク質、免疫原性ペプチド、又はビオチンからなる群から選択されるメンバーである、
請求項 1 1 に記載の化合物。 10

【請求項 1 3】

式 :

【化 5】



10

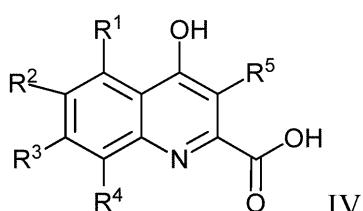
20

(式中、R、R ¹、R ²、R ³、及びR ⁴ は各々水素である)
を有する、請求項 1 2 に記載の化合物。

【請求項 1 4】

式 I V の化合物 :

【化 6】



30

(式中、R ¹、R ²、R ³、R ⁴、及びR ⁵ は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR ¹ ¹ B からなる群から独立に選択されるメンバーであり、

L は、リンカーであり、

R ¹ ¹ は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、
B は、生体分子である)。 40

【請求項 1 5】

R ¹、R ²、R ³、R ⁴、及びR ⁵ の群の少なくとも 1 つのメンバーが R ¹ ¹ B である、
請求項 1 4 に記載の化合物。

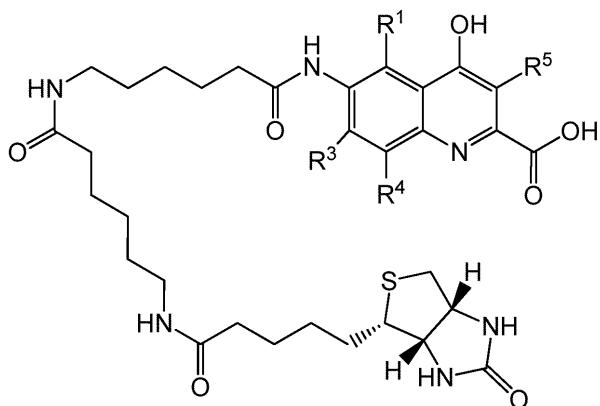
【請求項 1 6】

B が、タンパク質、免疫原性ペプチド、又はビオチンからなる群から選択されるメンバーである、
請求項 1 5 に記載の化合物。

【請求項 1 7】

式 :

【化 7】



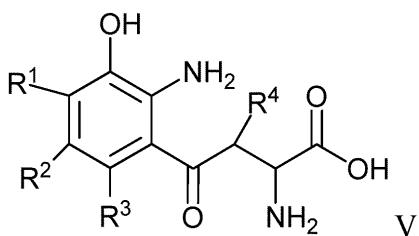
10

を有する、請求項 1 6 に記載の化合物。

【請求項 1 8】

式 V の化合物：

【化 8】



20

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及び $R^{11}B$ からなる群から独立に選択されるメンバーであり、

30

Lは、リンカーであり、

$R^{11}B$ は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、

Bは、生体分子である)。

【請求項 1 9】

R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 の群の少なくとも 1 つのメンバーが $R^{11}B$ である、請求項 1 8 に記載の化合物。

【請求項 2 0】

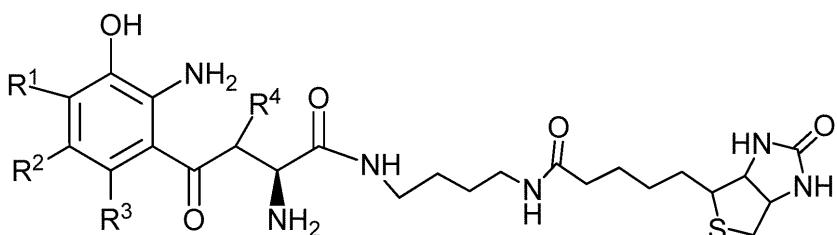
Bが、タンパク質、免疫原性ペプチド、及びビオチンからなる群から選択されるメンバーである、請求項 1 9 に記載の化合物。

【請求項 2 1】

40

式：

【化 9】



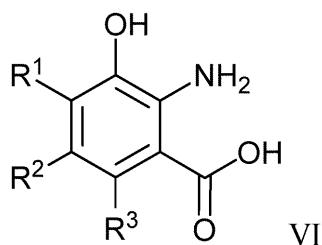
50

(式中、R¹、R²、R³、及びR⁴は各々水素である)を有する、請求項20に記載の化合物。

【請求項 22】

式 V I の化合物：

【化 10】



10

(式中、 R^1 、 R^2 、及び R^3 は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及び $R^{11}B$ からなる群から独立に選択されるメンバーであり、

しは、リンクーであり、

R^{1-1} は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、

B は、生体分子である)。

30

【請求項 2 3】

R¹、R²、R³、及びR⁴の群の少なくとも1つのメンバーがR¹⁻¹Bである、請求項22に記載の化合物。

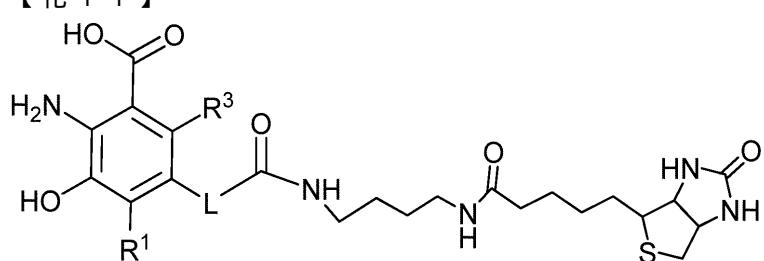
【請求項 24】

【請求項 2-1】
B が、タンパク質、免疫原性ペプチド、又はビオチンからなる群から選択されるメンバ-である。請求項 2-3 に記載の化合物

【請求項 25】

三

【化 1 1】

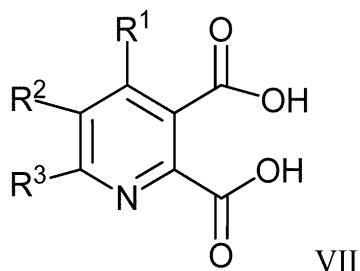


(式中、 R^1 及び R^3 は各々水素である) を有する、請求項 2 4 に記載の化合物。

【請求項 26】

式 VI の化合物：

【化12】



10

(式中、R¹、R²、及びR³は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR¹⁻¹Bからなる群から独立に選択されるメンバーであり、

Lは、リンカーであり、

R¹⁻¹は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、

Bは、生体分子である)。

【請求項27】

R¹、R²、及びR³の群の少なくとも1つのメンバーがR¹⁻¹Bである、請求項26に記載の化合物。

20

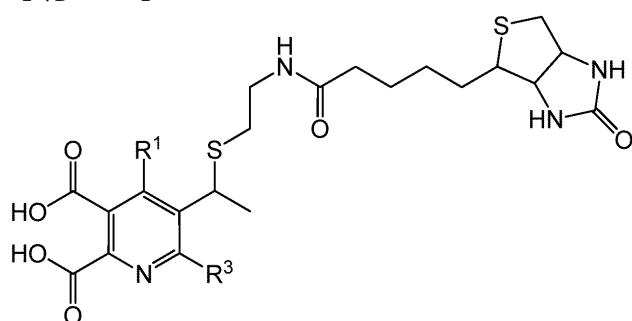
【請求項28】

Bが、タンパク質、免疫原性ペプチド、又はビオチンからなる群から選択されるメンバーである、請求項27に記載の化合物。

【請求項29】

式:

【化13】



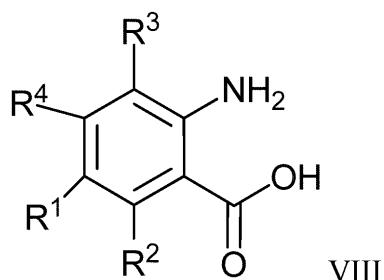
30

(式中、R¹及びR³は各々水素である)
を有する、請求項28に記載の化合物。

【請求項30】

式VIIの化合物:

【化14】



40

50

(式中、R¹、R²、R³、及びR⁴は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR¹⁻¹Bからなる群から独立に選択されるメンバーであり、

Lは、リンクーであり、

R^{1-1} は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、

B は、生体分子である)。

【請求項 31】

10

R^1 、 R^2 、及び R^3 の群の少なくとも1つのメンバーが $R^{1-1}B$ である、請求項30に記載の化合物。

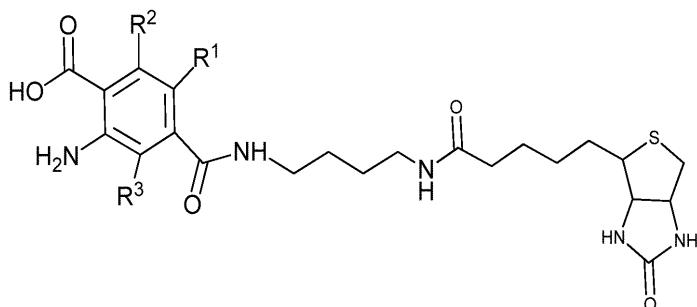
【請求項 3 2】

B が、タンパク質、免疫原性ペプチド、又はビオチンからなる群から選択されるメンバ-である、請求項 3-1 に記載の化合物。

【請求項 3 3】

式：

【化 1 5 】



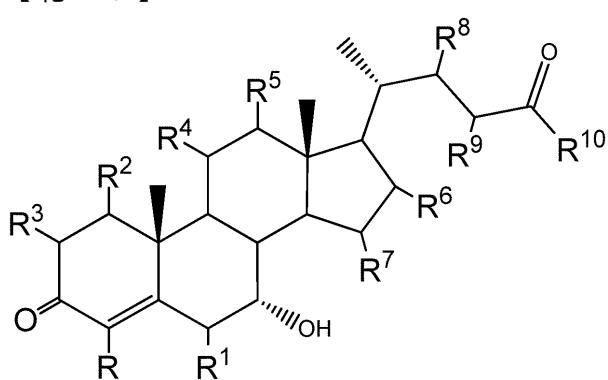
(式中、 R^1 、 R^2 、及び R^3 は各々水素である)を有する、請求項3.2に記載の化合物。

【請求項 3 4】

20

式 X の 化 合 物 :

【化 1 6】



30

(式中、R、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、及びR¹⁰は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR¹¹ Bからなる群から独立に選択されるメンバーであり)

しは、リンクであります。

50

R¹⁻¹は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、
Bは、生体分子である)。

【請求項 3 5】

R¹、R²、及びR³の群の少なくとも1つのメンバーがR¹⁻¹である、請求項34に記載の化合物。

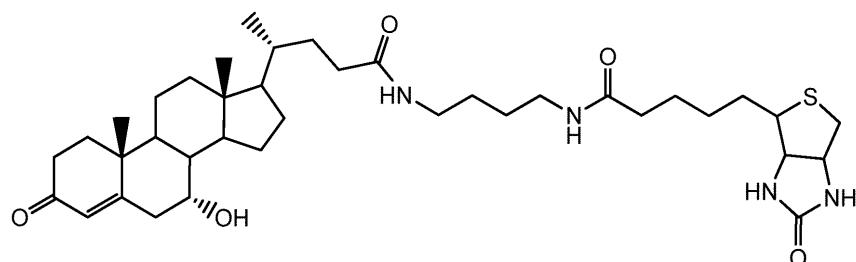
【請求項 3 6】

Bが、タンパク質、免疫原性ペプチド、又はビオチンからなる群から選択されるメンバーである、請求項35に記載の化合物。

【請求項 3 7】

式:

【化17】



を有する請求項36に記載の化合物。

【請求項 3 8】

5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、トリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン、及び5-ヒドロキシインドール酢酸からなる群から選択されるメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 3 9】

5-ヒドロキシトリプトファン(5-OH)に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、トリプトファン、5-ヒドロキシトリプタミン、及び5-ヒドロキシインドール酢酸からなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 4 0】

5-トリプトファンに特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、5-ヒドロキシトリプトファン、5-ヒドロキシトリプタミン、及び5-ヒドロキシインドール酢酸からなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 4 1】

5-ヒドロキシインドール酢酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、トリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン、及び5-ヒドロキシトリプタミンからなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 4 2】

キヌレンインに特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、キヌレン酸、3-ヒドロキシキヌレンイン、3-ヒドロキシアントラニル酸、キノリン酸、アントラニル酸、O-硫酸セロトニン、及びO-リン酸セロトニンからなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項 4 3】

キヌレン酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、キヌレンイン、3-ヒドロキシキヌレンイン、3-ヒドロキシアントラニル

10

20

30

40

50

酸、キノリン酸、アントラニル酸、O-硫酸セロトニン、及びO-リン酸セロトニンからなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項44】

3-ヒドロキシキヌレニンに特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、キヌレニン、キヌレン酸、3-ヒドロキシアントラニル酸、キノリン酸、アントラニル酸、O-硫酸セロトニン、及びO-リン酸セロトニンからなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項45】

3-ヒドロキシアントラニル酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、キヌレニン、キヌレン酸、3-ヒドロキシキヌレニン、キノリン酸、アントラニル酸、O-硫酸セロトニン、及びO-リン酸セロトニンからなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項46】

キノリン酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、キヌレニン、キヌレン酸、3-ヒドロキシキヌレニン、3-ヒドロキシアントラニル酸、アントラニル酸、O-硫酸セロトニン、及びO-リン酸セロトニンからなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項47】

アントラニル酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、キヌレニン、キヌレン酸、3-ヒドロキシキヌレニン、3-ヒドロキシアントラニル酸、キノリン酸、アントラニル酸、及びO-リン酸セロトニンからなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項48】

O-硫酸セロトニンに特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、キヌレニン、キヌレン酸、3-ヒドロキシキヌレニン、3-ヒドロキシアントラニル酸、キノリン酸、アントラニル酸、及びO-リン酸セロトニンからなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項49】

O-リン酸セロトニンに特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、キヌレニン、キヌレン酸、3-ヒドロキシキヌレニン、3-ヒドロキシアントラニル酸、キノリン酸、アントラニル酸、及びO-硫酸セロトニンからなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項50】

7- - -ヒドロキシ-4-コレステリン-3-オン誘導体に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、コレステロール及び7- - -コレステロールからなる群から選択されるメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項51】

プロピオン酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、酪酸に対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項52】

酪酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、前

10

20

30

40

50

記抗体が、プロピオン酸に対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメント。

【請求項53】

抗体がポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体である、請求項38～52のいずれか一項に記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項54】

ポリクローナル抗体がウサギ抗体である、請求項53に記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項55】

抗体がFab又はFab2フラグメントである、請求項38～52のいずれか一項に記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項56】

抗体が組換え抗体である、請求項38～52のいずれか一項に記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項57】

哺乳動物からの体液又は組織試料中の、セロトニン(5-HT)、5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)、キヌレン(K)、キヌレン酸(KA)、3-ヒドロキシキヌレン(3-HK)、3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAA)、キノリン酸、アントラニル酸、及びこれらの組合せからなる群から選択される代謝産物をアッセイするための方法であって、方法が、

試料を、セロトニン(5-HT)、5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)、キヌレン(K)、キヌレン酸(KA)、3-ヒドロキシキヌレン(3-HK)、3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAA)、キノリン酸、アントラニル酸、及びこれらの組合せからなる群から選択される代謝産物に特異的に結合する抗体と混合するステップと、

抗体が代謝産物に特異的に結合するか否かを決定するステップであり、特異的な抗体の結合が、代謝産物が試料中に存在することの指標である、ステップとを含む方法。

【請求項58】

哺乳動物からの体液又は組織試料中の7-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンをアッセイするための方法であって、方法が、

試料を、7-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンに特異的に結合する抗体と混合するステップと、

抗体が7-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンに特異的に結合するか否かを決定するステップであり、特異的な抗体の結合が、代謝産物が試料中に存在することの指標である、ステップとを含む方法。

【請求項59】

哺乳動物からの体液又は組織試料中のプロピオン酸及び酪酸及びこれらの組合せからなる群から選択される代謝産物をアッセイするための方法であって、方法が、

試料を、プロピオン酸及び酪酸及びこれらの組合せからなる群から選択される代謝産物に特異的に結合する抗体と混合するステップと、

抗体が代謝産物に特異的に結合するか否かを決定するステップであり、特異的な抗体の結合が、代謝産物が試料中に存在することの指標である、ステップとを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

【関連出願の相互参照】

[0001]本出願は、全ての目的でその教示の全文が参照により本明細書に組み込まれる

10

20

30

40

50

013年5月24日に出願された米国特許出願第61/827,506号の優先権を主張するものである。本出願は、本明細書と同日付に出願された代理人事件番号88473-909073-026610P CのCT出願を参照により組み込むものである。

【0002】

[0002]過敏性腸症候群(IBS)は全ての消化管障害のなかでも最も一般的なものであり、一般集団の10~20%が罹患しており、消化系の愁訴を有する全患者の50%超を占める。しかし、研究によれば、IBSに罹ったものの約10%~50%しか実際に治療を求めないことが示唆されている。IBSを有する患者は、例えば、主として排便に関連する腹痛、下痢、便秘又は交代性の下痢及び便秘、腹部膨満、ガス、並びに大便中の過剰な粘液などの種々の症状を表す。40%を超えるIBS患者は非常に重い症状を有するため、仕事を休んだり、社会生活を控えたり、性交を避けたり、約束を取り消したり、旅行を中止したり、薬物を摂取したりしなければならず、さらには困惑を恐れて家に閉じこもることさえある。米国におけるIBSの医療費は、推定で1年あたり80億ドルである(Talleyら、Gastroenterol.、109巻、1736~1741頁(1995年))。

10

【0003】

[0003]IBS患者は、患者の主な腸の症状に従って3つの群：便秘優勢IBS(IBS-C)、下痢優勢IBS(IBS-D)、下痢と便秘の症状を交互に繰り返すIBS(IBS-M)、及び分類不能型IBS(IBS-U)に分類される。現在の臨床診療では、IBSの診断は Rome III 診断基準に基づき、患者が表す症状に従う。この障害を同定するのに用いることができる生物学的、エックス線撮影的、内視鏡的、又は生理学的な特異的生物マーカーは存在しない。

20

【0004】

[0004]過敏性腸症候群は、不均質な消化管(GI)機能障害である。その病原性における免疫系の関与を指摘する証拠がますます増えつつある。GI感染症は、IBS症状の開始を引き起こす引き金因子であり得る。一方、IBSはしばしば「脳-腸管障害」と記述される。GIの運動、及び5-HTシグナル伝達経路の調節不全によって媒介される分泌における変化が、腸管の習性における不規則さの根底になり得る。結腸の神経に近接する肥満細胞の活性化が、IBSを有する患者が経験する腹痛に相關していた。肥満細胞は、活性化されると様々な炎症メディエータを生成及び放出することができるところがよく知られている。しかし、これらの異なる経路がどのように相互に情報交換するのか、及びこれらの相互作用が健常対象と同様にIBS患者で振る舞うか否かは明らかではない。

30

【0005】

[0005]IBSの正確な病態生理学は未だ解明されていない。腸管の運動障害及び内臓感覚の変化は、症状の病原性に対する重要な原因と考えられている一方で(Quigley、Scand. J. Gastroenterol.、38巻(補完237)、1~8頁(2003年)；Mayerら、Gastroenterol.、122巻、2032~2048頁(2002年))、この病状は、脳-腸管の情報交換の妨害、腸管感染症、腸の炎症、及び/又は微生物相の変更によって特徴付けられるストレス関連障害とみられている。近年、腸管感染症及び腸の炎症に対する役割も提唱されている。研究により細菌学的に確認された胃腸炎の後にIBSが開始することが記述されている一方、他の研究によりIBSにおける低グレードの粘膜炎症(Spillerら、Gut、47巻、804~811頁(2000年)；Dunlopら、Gastroenterol.、125巻、1651~1659頁(2003年)；Cumberlandら、Epidemiol. Infect.、130巻、453~460頁(2003年))及び免疫活性化(Gweeら、Gut、52巻、523~526頁(2003年)；Pimentelら、Am. J. Gastroenterol.、95巻、3503~3506頁(2000年))の証拠が提供されている。腸管フローラ(例えば、腸管の微生物叢)も関係しており、最近の研究により、免疫活性の変調による障害の処置におけるプロバイオティック生物体であるビフィドバクテリウム(Bifidobacterium)の有効性が実証された(Si

40

50

mrenら、Gut、62巻、159～176頁（2013年）。

【0006】

[0006] 抗菌抗体、ストレスホルモン、炎症性サイトカイン、及び肥満細胞マーカーの、様々な腸の疾患又は障害における役割を裏付ける証拠が相次いでいる。例えば、抗菌抗体であるOmpC、CBir1、F1aX、及びF1a2は、炎症性腸疾患（IBD）の重要な生物マーカーであることが証明されている。大腸菌（Escherichia coli）K12タンパク質（例えば、Era、FocA、FrvX、GabT、YbaN、YcdG、YhgN、及びYidX）に対する抗体のサブセットを用いて、クローン病（CD）を有する個体と健常対照とを、さらにCDを有する個体と潰瘍性大腸炎を有する個体とを区別することができる（Chenら、Mol. Cell Proteomics、8巻、1765～1776頁（2009年））。カンピロバクタージェジュニ（Campylobacter jejuni（C. jejuni、Cj））、大腸菌（E. coli、Ec）、サルモネラエンテリティディス（Salmonella enteritidis（S. enteritidis、Se））、シゲラフレクスネリ（Shigella flexneri（S. flexneri、Sf））からの感染によってしばしば引き起こされる、IBSに付随する感染後小腸細菌異常増殖（SIBO）を有する個体は、感染性細菌のフラゲリンタンパク質に対する抗体を有することがある（Spiller R及びGarsed K.、Gastroenterology、136巻、1979～1988頁（2009年））。

10

20

30

40

【0007】

[0007] 遠位の腸管セグメントにおける肥満細胞の浸潤及び活性化の増大は、IBSの症状の開始及び重症度に関連する。肥満細胞は、IBS患者における粘膜の刺激に対する内臓求心性神経の応答の上昇にも関係する。肥満細胞の過形成は、感染後IBS及び非感染後IBSの両方とも、これらの細菌による感染の後に通常観察される。-トリプターゼ、ヒスタミン、及びプロスタグランジンE2（PGE2）などの肥満細胞マーカーの測定は、IBSの臨床診断において重要な意味がある。IBSの診断において助けとなる肥満細胞マーカーを用いる詳しい方法は、全ての目的でその開示の全文が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,114,616号及び米国特許出願公開第2012/244558号に記載されている。

【0008】

[0008] IBS患者は、脳-腸管軸及び腸管の微生物叢によって媒介される、腹部腸管運動及び内臓の過感受性を経験するのが典型的である。IBSを含めたストレス感受性の障害では、視床下部-下垂体-副腎皮質系（HPA）のストレスホルモン、例えば、腸管ホルモン、セロトニン、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、及びカテコールアミンが放出され、よって、例えば、腸管の生理学的機能が制御される。代謝産物が駆動する経路を含めた脳-腸管軸の調節不全は、運動を低下させ、疼痛又は不快感を増大することにより、消化管機能に有害な影響を及ぼす可能性がある。セロトニン経路に対する治療薬は、IBSの処置について現在調査中である。腸の胆汁酸分泌及び吸収の調節不全もIBSに関連する。いくつかの試験により、消化管機能は腸管の微生物叢による影響を受けることも示されている。例えば、食事、抗生物質、病原体、及び宿主の免疫応答が腸管の微生物叢の共同体を変化させることがあり、これがひいては腸の機能を変更する可能性がある。

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

[0009] 前述を鑑みて、当技術分野において、脳-腸管-微生物叢軸をモニタリングすることにより、個体におけるIBSを診断するための方法が必要とされている。様々な代謝経路及び異化経路が適切に機能しているか否かを評価するアッセイが必要とされている。本発明は、これら及びその他の必要性を満たすものである。

【課題を解決するための手段】

50

【0010】

[0010]本発明は、セロトニン、トリプトファン、及びキヌレニン経路における代謝産物に対する抗体、及び抗体を調製するための方法を提供する。調製された抗体は、関連の代謝産物に対して低い交差反応性を有し、1つ又は複数の以下の代謝産物：セロトニン（5-HT）、5-ヒドロキシインドール酢酸（5-HIAA）、5-ヒドロキシトリプトファン（5-HTP）、キヌレニン（K）、キヌレン酸（KA）、3-ヒドロキシキヌレニン（3-HK）、3-ヒドロキシアントラニル酸（3-HAA）、キノリン酸、及びアントラニル酸に対して特異的で高感度の免疫アッセイのための有用な試薬である。

【0011】

[0011]本発明は、セロトニン（5-HT）、5-ヒドロキシインドール酢酸（5-HIAA）、5-ヒドロキシトリプトファン（5-HTP）、キヌレニン（K）、キヌレン酸（KA）、3-ヒドロキシキヌレニン（3-HK）、3-ヒドロキシアントラニル酸（3-HAA）、キノリン酸、及びアントラニル酸の安定な誘導体も提供する。誘導体は、担体タンパク質などの生体分子にコンジュゲートすることができ、免疫応答を刺激するためのアジュバントと組み合わせることができる。誘導体は、他の生体分子にコンジュゲートすることもできる。

10

【0012】

[0012]他の態様において、本発明は、抗体を作成するための方法を提供する。方法は、
(a) 担体タンパク質にコンジュゲートしている、セロトニン（5-HT）、5-ヒドロキシインドール酢酸（5-HIAA）、5-ヒドロキシトリプトファン（5-HTP）、キヌレニン（K）、キヌレン酸（KA）、3-ヒドロキシキヌレニン（3-HK）、3-ヒドロキシアントラニル酸（3-HAA）、キノリン酸、及びアントラニル酸からなる群から選択される誘導体を含む免疫原を提供するステップと、

20

(b) 動物の免疫系が抗体を作成する条件下で、動物を免疫原で免疫化するステップと、

(c) 抗体を動物から除去するステップと
を含む。

20

【0013】

[0013]ある種の他の態様において、本発明は、ヒトなどの哺乳動物からの体液又は組織試料中の、セロトニン（5-HT）、5-ヒドロキシインドール酢酸（5-HIAA）、5-ヒドロキシトリプトファン（5-HTP）、キヌレニン（K）、キヌレン酸（KA）、3-ヒドロキシキヌレニン（3-HK）、3-ヒドロキシアントラニル酸（3-HAA）、キノリン酸、アントラニル酸、及びこれらの組合せからなる群から選択されるメンバーをアッセイするための方法を提供する。方法は、試料を、本明細書に記載する抗体と合わせ、次いで抗体が、試料からのセロトニン（5-HT）、5-ヒドロキシインドール酢酸（5-HIAA）、5-ヒドロキシトリプトファン（5-HTP）、キヌレニン（K）、キヌレン酸（KA）、3-ヒドロキシキヌレニン（3-HK）、3-ヒドロキシアントラニル酸（3-HAA）、キノリン酸、アントラニル酸、及びこれらの組合せからなる群から選択されるメンバーに特異的に結合するか否かを決定することを含む。例えば、これらの方では、試料からのセロトニン（5-HT）に対する特異的な抗体の結合が、試料中にセロトニン（5-HT）が存在することの指標である。

30

【0014】

[0014]本発明は、胆汁酸代謝産物に対する抗体、及び抗体を調製するための方法も提供する。調製された抗体は、関連の代謝産物に対して低い交差反応性を有し、7-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンに対する特異的で高感度の免疫アッセイに有用な試薬である。

40

【0015】

[0015]本発明は、7-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンの安定な誘導体も提供する。誘導体は、担体タンパク質などの生体分子にコンジュゲートすることができ、免疫応答を刺激するためのアジュバントと組み合わせることができる。誘導体は、他の生体

50

分子ともコンジュゲートすることができる。

【0016】

[0016]他の態様において、本発明は、7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンの抗体を作成するための方法を提供する。方法は、

(a) 担体タンパク質にコンジュゲートしている、7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンの誘導体を含む免疫原を提供するステップと、

(b) 動物の免疫系が抗体を作成する条件下で、動物を免疫原で免疫化するステップと、

、
(c) 抗体を動物から除去するステップと
を含む。

10

【0017】

[0017]ある種の他の態様において、本発明は、ヒトなどの哺乳動物からの体液又は組織試料中の7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンをアッセイするための方法を提供する。方法は、試料を、本明細書に記載する抗体と合わせ、次いで、抗体が試料からの7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンに特異的に結合するか否かを決定することを含む。例えば、これら的方法では、試料からの7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンに対する特異的な抗体の結合が、7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンが試料中に存在することの指標である。

【0018】

[0018]加えて、本発明は、短鎖脂肪酸に対する抗体、及び抗体を作成する方法を提供する。調製された抗体は関連する代謝産物に対する低い交差反応性を有し、プロピオン酸及び酪酸に対する特異的で高感度の免疫アッセイに有用な試薬である。

20

【0019】

[0019]本発明は、プロピオン酸及び酪酸などの短鎖脂肪酸(SCFA)の安定な誘導体も提供する。誘導体は、担体タンパク質などの生体分子にコンジュゲートすることができ、免疫応答を刺激するためのアジュバントと組み合わせることができる。誘導体は、他の生体分子にコンジュゲートすることもできる。

【0020】

[0020]他の態様において、本発明は、短鎖脂肪酸の抗体を作成するための方法を提供する。方法は、

30

(a) 担体タンパク質にコンジュゲートしている、短鎖脂肪酸の誘導体を含む免疫原を提供するステップと、

(b) 動物の免疫系が抗体を作成する条件下で、動物を免疫原で免疫化するステップと、

、
(c) 抗体を動物から除去するステップと
を含む。

【0021】

[0021]ある種の他の態様において、本発明は、ヒトなどの哺乳動物からの体液又は組織試料中の短鎖脂肪酸をアッセイするための方法を提供する。方法は、試料を、本明細書に記載する抗体と合わせ、次いで、抗体が、試料からの短鎖脂肪酸に特異的に結合するか否かを決定することを含む。例えば、これら的方法では、試料からのプロピオン酸に対する特異的な抗体の結合が、試料中にプロピオン酸が存在することの指標である。

40

【0022】

[0022]前述に加えて、本発明は、本明細書の代謝産物の存在又は濃度を用いて、対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を決定するための方法を提供する。方法は、本明細書に記載するアッセイ方法により、患者の血液、血漿、又は血清中の1つ又は複数の代謝産物を測定することを含む。

【0023】

[0023]本発明は、患者におけるIBSに対する処置が効果的であるか否かを決定するための方法も提供する。方法は、本明細書に記載するアッセイ方法により、患者の血液、血

50

漿、又は血清中の 1 つ又は複数の代謝産物を測定することを含む。

【 0 0 2 4 】

[0024] ある種の他の態様において、本発明は、 I B S と以前に診断された患者を評価するための方法を提供する。方法は、本明細書に記載するアッセイ方法により、患者の血液、血漿、又は血清中の 1 つ又は複数の代謝産物を測定することを含む。

【 0 0 2 5 】

[0025] これら及び他の態様、利点、及び実施形態は、以下の詳細な説明及び図面を読めばより明らかになろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 6 】

【図 1】 I B S の複雑な病態生理学を図示し、セロトニン、トリプトファン、及びキヌレン経路の代謝産物を強調した図である。

【図 2】 本発明の抗体生成の一方法の流れ図を示す図である。

【図 3】 ある種の代謝産物の不安定な性質を示す、 T L C クロマトグラムを示す図である。

【図 4】 本発明の安定化された誘導体に対する必要性を示す、セロトニンのシグナルの減少を示す図である。

【図 5】 本発明の誘導体化された代謝産物の安定な性質を示す、 T L C クロマトグラムを示す図である。

【図 6】 セロトニン及び本発明の誘導体の H P L C トレースを示す図である。

【図 7】 5 - ヒドロキシンドール酢酸及び本発明の誘導体の H P L C トレースを示す図である。

【図 8】 患者の血清中の経路の代謝産物を検出するのに用いた競合的 E L I S A の例示的な実施形態を示す図である。

【図 9】 採血 1 ~ 5 (B 1 、 B 2 、 B 3 、 B 4 、及び B 5) におけるウサギ A 及びウサギ B からの抗血清中で検出されたベンゾオキサゾール誘導体に対する抗体のデータの棒グラフを示す図である。

【図 10】 ウサギ A 及び B において S e r - D に対して產生された抗体の親和性を評価するために行われた滴定実験からのデータを示す図である。

【図 11】 図 11 の B に図示する直接アッセイを用いた抗血清の交差反応性の減少を示す図である。抗血清は 5 - H G に特異的であり (図 11 の A) 、 5 - ヒドロキシトリプトファン (5 - O H T r y p ; 図 11 の C) 及び 5 - ヒドロキシンドール酢酸 (5 - H I A A ; 図 11 の D) などの構造的に類似な化合物に対して交差反応性を示さなかった。

【図 12】 図 12 の B に図示する競合アッセイを用いて試験した、抗血清の交差反応性の欠如を示す図である。図 12 の A は、ヒト血清中に S e r - D が存在すると、抗 S e r - D 抗体の、ビオチン化 S e r - D に対する結合が阻害されることを示す。遊離 S e r - D の量が増大すると、検出される抗体は少なくなった。図 12 の C ~ E は、トリプトファン (図 12 の C) 、 5 - ヒドロキシトリプトファン (図 12 の D) 、及び 5 - ヒドロキシンドール酢酸 (図 12 の E) 誘導体が存在した場合、ビオチン化 S e r - D に結合する抗体の量に変化はなかった、又はわずかな変化があったことを示す。

【図 13】 I B S - D 患者におけるセロトニンの平均量は、健常対照における平均量に比べて有意差があったことを示す図である。図 13 の A は、 E L I S A データのグラフを示す。図 13 の B はデータの概要を表にしたものを見せる。図 13 の C は四分位値分析を示す。

【図 14】 複数日行ったセロトニンアッセイは安定であり、再現性があったことを示す図である。

【図 15】 E L I S A を本発明の抗体と用いて測定したセロトニンレベルを示す図である。カルチノイド腫瘍、アルツハイマー病、又は自閉症を有する患者からの試料を試験した。健常対照に比べて、カルチノイド腫瘍を有する患者のセロトニンレベルはより高く、アルツハイマー病又は自閉症を有する患者のレベルはより低かった。

10

20

30

40

50

【図16】図16のAは、胆汁酸がFGF19シグナル伝達を活性化し、これがひいては胆汁酸代謝を制御することを示す図である。図16のBは、様々な徴候に対するFGF-19データのグラフである。

【図17】図17のAは、抗原（例えば、KYA-L）からのデータは、500ng/ml～31.3ng/mlの範囲であることを示す図である。図17のBは、KYA-Lは31.3ng/ml～0の範囲であることを示す図である。データは、抗体がキヌレン酸に特異的に結合することを示す。

【図18】抗KYA-L抗体の交差反応性の欠如を示す図である。図18のAは、KYA-L抗原は、ビオチン化抗原と競合したことを示す。対照的に、増大量のKy（図18のB）、H-Ky（図18のC）、及びTryp（図18のD）が存在しても、アッセイで検出された抗KYA-Lのレベルを変更しなかった。結果は、抗KYA-L抗体は、キヌレン代謝産物と交差反応せず、キヌレン酸に特異的であることを示す。

【図19】プロピオン酸特異的抗体の存在に対して試験した免疫化ウサギからの抗血清の結果を示す図である。

【図20】競合アッセイを用いて試験した抗Prop L抗体の交差反応性の欠如を示す図である。抗体はプロピオン酸に特異的であり（図20のA）、酪酸（図20のB）又はセロトニン（図20のC）と交差反応性を示さなかった。

【発明を実施するための形態】

【0027】

I. 定義

[0046]本明細書で用いる「一つの（a）」、「一つの（an）」、又は「その（the）」の語は、1メンバーを有する態様を含むだけではなく、1つを超えるメンバーを有する態様も含む。例えば、「ポリアミン化合物及び賦形剤」を含む実施形態は、少なくとも第2のポリアミン化合物、少なくとも第2の賦形剤、又は両方を有するある態様を提示すると理解されたい。

【0028】

[0047]「アッセイ」の語は、分析物の検出又は定量化を含む。典型的には、アッセイの実行は、用いられるペルオキシダーゼの量に対する光の出力の相関を必要とし、これによりペルオキシダーゼは直接決定される物質である。本発明は、いずれかの反応物（ルミノール、ペルオキシダーゼ、又は酸化剤）の存在又は量を決定するのに有用であるが、反応物は必ずしも、決定しようとする物質そのものではない。例えば、酸化剤（例えばH₂O₂）は、先立つ反応、又は一連の先立つ反応によって生成することができる。

【0029】

[0048]抗体又は抗原結合性フラグメントは、対象の代謝産物に、他の代謝産物に対する1%未満の交差反応性で特異的に結合する。何らかの交差反応性が生じる場合、交差反応性は最小限であり、例えば、別の代謝産物に対する交差反応性の1%未満、又は約0.03～0.9%、又は0.02～0.8%、又は0.05～0.5%、又は0.03～0.9%などである。

【0030】

[0049]本明細書で用いる「アシリル」は、本明細書で規定する、アルカノイル、アロイル、ヘテロシクロイル、又はヘテロアロイル基を含む。代表的なアシリル基には、アセチル、ベンゾイル、ニコチノイルなどが含まれる。

【0031】

[0050]本明細書で用いる「アルカノイル」にはアルキル-C(=O)-基が含まれ、アルキル基は本明細書で規定する通りである。代表的なアルカノイル基には、アセチル、エタノイルなどが含まれる。

【0032】

[0051]本明細書で用いる「アルケニル」には、炭素-炭素二重結合又は三重結合を少なくとも1つ含む、炭素原子2個～約15個の、直鎖又は分岐鎖脂肪族炭化水素基が含まれる。好ましいアルケニル基は、炭素原子を2個～約12個含む。より好ましいアルケニル

10

20

30

40

50

基は、炭素原子を2個～約6個含む。一態様において、炭素-炭素二重結合を含む炭化水素基が好ましい。第2の態様において、炭素-炭素三重結合を含む炭化水素基が好ましい（すなわち、アルキニル）。本明細書で用いる「低級アルケニル」には、炭素原子2個～約6個のアルケニルが含まれる。代表的なアルケニル基には、ビニル、アリル、n-ブテニル、2-ブテニル、3-メチルブテニル、n-ペンテニル、ヘプテニル、オクテニル、デセニル、プロピニル、2-ブチニル、3-メチルブチニル、n-ペンチニル、ヘプチニルなどが含まれる。

【0033】

[0052]アルケニル基は、非置換でも、又は任意選択により置換されていてもよい。任意選択により置換されている場合、アルケニル基の1つ又は複数（例えば、1～4個、1～2個、又は1個）の水素原子は、フルオロ、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、チオ、及びアルキルチオからなる群から独立に選択される部分で置き換えられていてもよい。

10

【0034】

[0053]本明細書で用いる「アルケニレン」は、炭素-炭素二重結合又は三重結合を少なくとも1個含む、直鎖又は分岐鎖の二価炭化水素鎖を含む。好ましいアルケニレン基は鎖に炭素を2個～約12個含み、より好ましいアルケニレン基は鎖に炭素を2個～6個含む。一態様において、炭素-炭素二重結合を含む炭化水素基が好ましい。第二の態様において、炭素-炭素三重結合を含む炭化水素基が好ましい。代表的なアルケニレン基には、-CH=CH-、-CH₂-CH=CH-、-C(CH₃)=CH-、-CH₂CH=CHCH₂-、エチニレン、プロピニレン、n-ブチニレンなどが含まれる。

20

【0035】

[0054]本明細書で用いる「アルコキシ」にはアルキル-O-基が含まれ、アルキル基は本明細書で規定される通りである。代表的なアルコキシ基には、メトキシ、エトキシ、n-プロポキシ、i-プロポキシ、n-ブトキシ、ヘプトキシなどが含まれる。

【0036】

[0055]アルコキシ基は非置換でも、又は任意選択により置換されていてもよい。任意選択により置換されている場合、アルコキシ基の1つ又は複数（例えば、1～4個、1～2個、又は1個）の水素原子は、フルオロ、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、チオ、及びアルキルチオからなる群から独立に選択される部分で置き換えられていてもよい。

30

【0037】

[0056]本明細書で用いる「アルコキシアルキル」にはアルキル-O-アルキレン-基が含まれ、アルキル及びアルキレンは本明細書で規定される通りである。代表的なアルコキシアルキル基には、メトキシエチル、エトキシメチル、n-ブトキシメチル、及びシクロペンチルメチルオキシエチルが含まれる。

【0038】

[0057]本明細書で用いる「アルコキシカルボニル」にはエステル基、すなわちアルキル-O-CO-基が含まれ、アルキルは本明細書で規定される通りである。代表的なアルコキシカルボニル基には、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、t-ブチルオキシカルボニルなどが含まれる。

40

【0039】

[0058]本明細書で用いる「アルコキシカルボニルアルキル」にはアルキル-O-CO-アルキレン-基が含まれ、アルキル及びアルキレンは本明細書で規定される通りである。代表的なアルコキシカルボニルアルキルには、メトキシカルボニルメチル、エトキシカルボニルメチル、メトキシカルボニルエチルなどが含まれる。

【0040】

[0059]本明細書で用いる「アルキル」には、鎖に炭素原子を約1個～約20個有する、直鎖でも、又は分岐鎖でもよい、脂肪族炭化水素基が含まれる。好ましいアルキル基は、鎖に炭素原子を1個～約12個有する。より好ましいアルキル基は、鎖に炭素原子を1個

50

~ 6 個有する。本明細書で用いる「分岐鎖」には、メチル、エチル、又はプロピルなどの1つ又は複数の低級アルキル基が直鎖アルキル鎖に接続しているものが含まれる。本明細書で用いる「低級アルキル」は、直鎖でも、又は分岐鎖でもよい、鎖に炭素原子を1個~約6個、好ましくは炭素原子を5個又は6個含む。代表的なアルキル基には、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、t-ブチル、n-ペンチル、及び3-ペンチルが含まれる。

【0041】

[0060]アルキル基は、非置換でも、又は任意選択により置換されていてもよい。任意選択により置換されている場合、アルキル基の1つ又は複数（例えば、1~4個、1~2個、又は1個）の水素原子は、フルオロ、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、アシルアミノ、チオ、及びアルキルチオからなる群から独立に選択される部分で置き換えられていてもよい。

10

【0042】

[0061]本明細書で用いる「アルキレン」には、炭素原子1個~約6個の直鎖又は分岐鎖の二価炭化水素鎖が含まれる。好ましいアルキレン基は、炭素原子1個~約4個を有する低級アルキレン基である。代表的なアルキレン基には、メチレン、エチレンなどが含まれる。

【0043】

[0062]本明細書で用いる「アルキルチオ」にはアルキル-S-基が含まれ、アルキル基は本明細書で規定する通りである。好ましいアルキルチオ基は、アルキル基が低級アルキルであるものである。代表的なアルキルチオ基には、メチルチオ、エチルチオ、イソプロピルチオ、ヘプチルチオなどが含まれる。

20

【0044】

[0063]本明細書で用いる「アルキルチオアルキル」にはアルキルチオ-アルキレン-基が含まれ、アルキルチオ及びアルキレンは本明細書で規定される通りである。代表的なアルキルチオアルキル基には、メチルチオメチル、エチルチオプロピル、イソプロピルチオエチルなどが含まれる。

【0045】

[0064]本明細書で用いる「アミド」には式 $Y_1 Y_2 N - C(O) -$ の基が含まれ、 Y_1 及び Y_2 は独立に、水素、アルキル、若しくはアルケニルであり、又は Y_1 及び Y_2 は、それらを介して Y_1 及び Y_2 が連結される窒素と一緒に、繋がれて4員~7員アザヘテロシクリル基（例えば、ピペリジニル）を形成する。代表的なアミド基には、1級アミド（ $H_2N - C(O) -$ ）、メチルアミド、ジメチルアミド、ジエチルアミドなどが含まれる。「アミド」が $-C(O)NRR'$ 基であるのが好ましく、 R 及び R' は、H及びアルキルからなる群から独立に選択されるメンバーである。 R 及び R' の少なくとも1つがHであるのがより好ましい。

30

【0046】

[0065]本明細書で用いる「アミドアルキル」にはアミド-アルキレン-基が含まれ、アミド及びアルキレンは本明細書で規定される通りである。代表的なアミドアルキル基には、アミドメチル、アミドエチレン、ジメチルアミドメチルなどが含まれる。

40

【0047】

[0066]本明細書で用いる「アミノ」には式 $Y_1 Y_2 N -$ の基が含まれ、 Y_1 及び Y_2 は独立に、水素、アシル、若しくはアルキルであり、又は Y_1 及び Y_2 は、それを介して Y_1 及び Y_2 が連結される窒素と一緒に、繋がれて4員~7員アザヘテロシクリル基（例えば、ピペリジニル）を形成する。任意選択によって、 Y_1 及び Y_2 が独立に水素又はアルキルである場合、付加的な置換基を窒素に加え、四級アンモニウムイオンを作成してもよい。代表的なアミノ基には、一級アミノ（ $H_2N -$ ）、メチルアミノ、ジメチルアミノ、ジエチルアミノなどが含まれる。「アミノ」が $-NRR'$ 基であるのが好ましく、 R 及び R' は、H及びアルキルからなる群から独立に選択されるメンバーである。 R 及び R' の少なくとも1つがHであるのが好ましい。

50

【0048】

[0067]本明細書で用いる「アミノアルキル」にはアミノ-アルキレン-基が含まれ、アミノ及びアルキレンは本明細書で規定される通りである。代表的なアミノアルキル基には、アミノメチル、アミノエチル、ジメチルアミノメチルなどが含まれる。

【0049】

[0068]本明細書で用いる「アロイル」にはアリール-CO-基が含まれ、アリールは本明細書で規定される通りである。代表的なアロイルには、ベンゾイル、ナフタ-1-オイル、及びナフタ-2-オイルが含まれる。

【0050】

[0069]本明細書で用いる「アリール」には、炭素原子6個～約14個、好ましくは炭素原子6個～約10個の芳香族単環又は多環環系が含まれる。代表的なアリール基には、フェニル及びナフチルが含まれる。

10

【0051】

[0070]本明細書で用いる「芳香環」には、酸素、硫黄、セレン、及び窒素からなる群から選択されるヘテロ原子を0個～4個含んでいてもよい、5～12員の芳香族単環又は縮合多環部分が含まれる。例示的な芳香環には、ベンゼン、ピロール、フラン、チオフェン、イミダゾール、オキサゾール、チアゾール、トリアゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリダジン、ピリミジン、ナフタレン、ベンゾチアゾリン(benzathiazoline)、ベンゾチオフェン、ベンゾフラン、インドール、ベンズインドール、キノリンなどが含まれる。芳香環基は、1つ又は複数のポジションが、ハロ、アルキル、アルコキシ、アルコキシカルボニル、ハロアルキル、シアノ、スルホネート、アミノスルホニル、アリール、スルホニル、アミノカルボニル、カルボキシ、アシルアミノ、アルキルスルホニル、アミノ、及び置換又は非置換の置換基で置換されていてもよい。

20

【0052】

[0071]本明細書で用いる「生体分子」には、生物学的系で用いるための天然又は合成の分子が含まれる。好ましい生体分子には、タンパク質、ペプチド、酵素基質、ホルモン、抗体、抗原、ハプテン、アビジン、ストレプトアビジン、炭水化物、炭水化物誘導体、オリゴ糖、多糖、及び核酸が含まれる。より好ましい生体分子には、タンパク質、ペプチド、アビジン、ストレプトアビジン、又はビオチンが含まれる。

30

【0053】

[0072]本明細書で用いる「カルボキシ」及び「カルボキシル」には、HOOC(O)-基(すなわち、カルボン酸)又はその塩が含まれる。

【0054】

[0073]本明細書で用いる「カルボキシアルキル」にはHOOC(O)-アルキレン-基が含まれ、アルキレンは本明細書に規定する。代表的なカルボキシアルキルには、カルボキシメチル(すなわち、HOOC(O)CH₂-)及びカルボキシエチル(すなわち、HOOC(O)CH₂CH₂-)が含まれる。

【0055】

[0074]本明細書で用いる「シクロアルキル」には、炭素原子約3個～約10個、好ましくは炭素原子約5個～約10個の非芳香族単環又は多環環系が含まれる。より好ましいシクロアルキル環は環原子を5個又は6個含む。シクロアルキル基は、sp²-混成炭素(例えば、環内又は環外オレフィンを組み入れる環)を少なくとも1個、任意選択により含む。代表的な単環シクロアルキル基には、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘキセニル、シクロヘプチルなどが含まれる。代表的な多環シクロアルキルには、1-デカリニン、ノルボルニル、アダマンチルなどが含まれる。

40

【0056】

[0075]本明細書で用いる「シクロアルキレン」には、炭素原子を約4個～約8個有する二価シクロアルキルが含まれる。好ましいシクロアルキレン基には、1,2-、1,3-、又は1,4-cis-又はtrans-シクロヘキシレンが含まれる。

50

【0057】

[0076]本明細書で用いる「ハロ」又は「ハロゲン」には、フッ素、塩素、臭素、又はヨウ素が含まれる。

【0058】

[0077]本明細書で用いる「ヘテロ原子」には、炭素又は水素以外の原子が含まれる。代表的なヘテロ原子には、O、S、及びNが含まれる。ヘテロ原子の窒素又は硫黄原子は、任意選択によって、対応するN-オキシド、S-オキシド(スルホキシド)、又はS、S-ジオキシド(スルホン)に酸化される。好ましい一態様において、ヘテロ原子は、アルキレン炭素原子に対して少なくとも2つの結合を有する(例えば、-C₁~C₉アルキレン-O-C₁~C₉アルキレン-)。いくつかの実施形態において、ヘテロ原子は、アシル、アルキル、アリール、シクロアルキル、ヘテロシクリル、又はヘテロアリール基でさらに置換されている(例えば、-N(Me)-、-N(Ac)-)。

10

【0059】

[0078]本明細書で用いる「ヒドロキシアルキル」には、1つ又は複数のヒドロキシ基で置換されている、本明細書に規定するアルキル基が含まれる。好ましいヒドロキシアルキルは低級アルキルを含む。代表的なヒドロキシアルキル基には、ヒドロキシメチル及び2-ヒドロキシエチルが含まれる。

【0060】

[0079]「連結基」すなわちLは、代謝産物の誘導体を、担体タンパク質、ビオチン、又はストレプトアビシンなどの生体分子と繋ぐ原子を含む。R. Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc. (1992年)も参照されたい。一実施形態において、Lはタンパク質と接続反応する前の連結基前駆物質を表し、R^{1~1}は、本発明の化合物とタンパク質又はビオチンとの間に生じる接続部を表す(すなわち、R^{1~1}は、生体分子に繋がれる連結基間に生じる接続部である)。好ましい反応性の官能基には、ホスホラミダイト基、活性化エステル(例えば、NHSエステル)、チオシアネート、イソチオシアネート、マレイミド、及びヨードアセトアミドが含まれる。Lは、環に共有結合した、末端のアミノ、カルボン酸、又はスルフヒドリル基を含むことができる。場合によっては、末端のアミノ、カルボン酸、又はスルフヒドリル基が示され、-L-NH₂、又は-L-C(O)OH若しくは-L-SHとして表される。

20

【0061】

[0080]本明細書で用いる「オキソ」には、式>C=Oの基(すなわち、カルボニル基-C(O)-)が含まれる。

【0062】

[0081]本明細書で用いる「スルホネート」には、H⁺、Na⁺、K⁺などの陽イオンによってバランスがとられているのが好ましい、-SO₃⁻基が含まれる。

30

【0063】

[0082]本明細書で用いる「スルホネートアルキル」にはスルホネート-アルキレン-基が含まれ、スルホネート及びアルキレンは本明細書で規定される通りである。より好ましい実施形態には、炭素原子2~6個を有するアルキレン基が含まれ、最も好ましい実施形態には炭素2、3、又は4個を有するアルキレン基が含まれる。代表的なスルホネートアルキルには、スルホネートメチル、3-スルホネートプロピル、4-スルホネートブチル、5-スルホネートペンチル、6-スルホネートヘキシルなどが含まれる。

40

I I . 実施形態

【0064】

[0083]セロトニン(5-HT)は、消化管の運動、分泌、及び感覚の制御において決定的な役割を果たす。腸管神経系内のセロトニン作動性シグナル伝達における5-HTレベルの不均衡は、過敏性腸症候群(IBS)、機能性消化不良、非心臓性の胸痛、自閉症、及び胃潰瘍形成を含めた様々な障害に関連している。特定の神経系領域において5-HTレベルを同時進行で制御することが必要であり、5-HTの異化作用はこの制御において

50

重要な役割を果たす。5-HTの他の化合物への異化的な変換は、5-HTの全体的なレベルに影響を及ぼすため、これらの変換生成物の形成は、5-HT制御における根本的な因子であり得る。5-HTに関する3つの経路が、トリプトファン、セロトニン、及びキヌレニン経路である。これらの関係の模式図を図1に示す。

【0065】

[0084]ある態様において、本発明は、トリプトファン、セロトニン、及びキヌレニン経路における代謝産物を測定するためのアッセイを提供する。例えば、図1を参照すると、キヌレニン経路内の、5-HT 101、5-HIAA (5-ヒドロキシインドール-3-酢酸) 115、及び代謝産物を測定することにより、IBS、並びにカルチノイド症候群、うつ病、高血圧、自閉症、アルツハイマー病、及び片頭痛などの他の病理学的現象の診断を助ける上で理解ができるようになる。

10

【0066】

[0085]代謝産物を測定する先行技術の方法は、非存在、又は感度、特異度、及び再現性の欠如のいずれかである。その上、5-HT及び5-HIAAなどの代謝産物は非常に不安定であり、そのためこれらを測定するのは非常に困難となっている。

【0067】

A. セロトニン経路の代謝産物に対するアッセイ

[0086]一態様において、本発明は、代謝産物の誘導体及びそのコンジュゲート、セロトニン代謝産物の抗体を生成するための方法及び抗体を提供する。ある態様において、5-HT及び5-HIAAなどの代謝産物は酸素に対して感受性があり、よって不安定であるため、誘導体化が好ましい。血漿中のセロトニンのレベルは約0.6~179 nmol/Lの範囲である。穏やかな条件下で5-HT及び5-HIAAを化学的に誘導体化することにより化合物は安定化する。よって、一態様において、本発明は、セロトニン代謝産物の安定なベンゾオキサゾール誘導体を提供する。安定なベンゾオキサゾール誘導体は、その蛍光のため、高感度のHPLCによって検出することができる。

20

【0068】

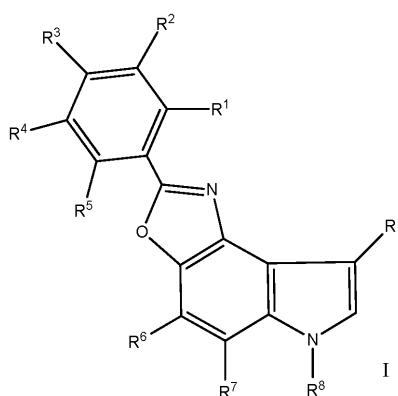
[0087]本発明は、セロトニン(5-HT)及び5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)の安定な誘導体を提供する。

【0069】

[0088]一態様において、本発明は、式Iの化合物を提供し：

30

【化1】



40

式中、Rは、アルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、アミノアルキル、アミドアルキル、カルボキシアルキル、置換カルボキシアルキルからなる群から選択されるメンバであり、

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、及びR⁸は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル

50

、 L、及び R¹ B からなる群から独立に選択されるメンバーであり、
 L は、リンカーであり、
 R¹ は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、
 B は、生体分子である。

【0070】

[0089] 一態様において、R は、アミノアルキル、カルボキシアルキル、及び置換カルボキシアルキルからなる群から選択されるメンバーである。別の一態様において、R は、 - C H₂ C H₂ N H₂、 - C H₂ C H₂ C O₂ H、及び C H₂ C H (N H₂) C O₂ H からなる群から選択されるメンバーである。

【0071】

[0090] L は、担体タンパク質又はビオチンなど、生体分子に対する接続のための連結基を表す。例えば、L は、環に共有結合した、末端のアミノ、カルボン酸、又はスルフヒドリル基を含むことができる。場合によっては、末端のアミノ、カルボン酸、又はスルフヒドリル基が示され、 - L - N H₂、又は - L - C (O) O H 若しくは - L - S H として表される。

【0072】

[0091] R¹ は、本発明の化合物と、担体タンパク質、ペプチド、又はビオチンなどの生体分子との間に生じる接続部を表す（すなわち、R¹ は、生体分子に繋がれる連結基を含む）。

【0073】

[0092] L は、直接連結、又は共有結合性の連結からなる群から選択されるメンバーであり、共有結合性の連結は、直鎖又は分岐鎖の、環状又は複素環の、飽和又は不飽和の、C、N、P、O、及びS からなる群から選択される原子を1~60 個有し、L は原子価を満たすための付加的な水素原子を有することができ、連結は、エーテル、チオエーテル、アミン、エステル、カーバメート、尿素、チオ尿素、オキシ、若しくはアミド結合のあらゆる組合せ、又は単、二重、三重、若しくは芳香族性の炭素-炭素結合であり、又はリン-酸素、リン-硫黄、窒素-窒素、窒素-酸素、若しくは窒素-白金結合であり、又は芳香族若しくは芳香族複素環 (heteroaromatic) 結合を含む。ある態様において、L は、末端のアミノ、カルボン酸、又はスルフヒドリル基を含む。

【0074】

[0093] ある好ましい態様において、L は式：
 - X¹ - Y¹ - X² -
 のものであり、式中、X¹ は、二価の基、直接連結、酸素、任意選択により置換されている窒素及び硫黄の群から選択されるメンバーであり、Y¹ は、直接連結、及び任意選択によりヘテロ原子によって割り込まれているC₁~C₁₀ アルキレンの群から選択されるメンバーであり、X² は、二価の基、直接結合、酸素、任意選択により置換されている窒素及び硫黄の群から選択されるメンバーである。

【0075】

[0094] X¹ 及び X² の二価の基が、直接連結、任意選択により置換されているアルキレン、任意選択により置換されているアルキレンオキシカルボニル、任意選択により置換されているアルキレンカルバモイル、任意選択により置換されているアルキレンスルホニル、アリーレンスルホニル、任意選択により置換されているアリーレンオキシカルボニル、任意選択により置換されているアリーレンカルバモイル、任意選択により置換されているチオカルボニル、任意選択により置換されているスルホニル、及び任意選択により置換されているスルフィニルの群から各々独立に選択されるのが好ましい。

【0076】

[0095] ある好ましい態様において、L は - (C H₂)_n - であり、r は1~10 の整数であり、好ましくはn は1~5 の整数、例えば1~4、又は1、2、3、4、若しくは5 である。

【0077】

10

20

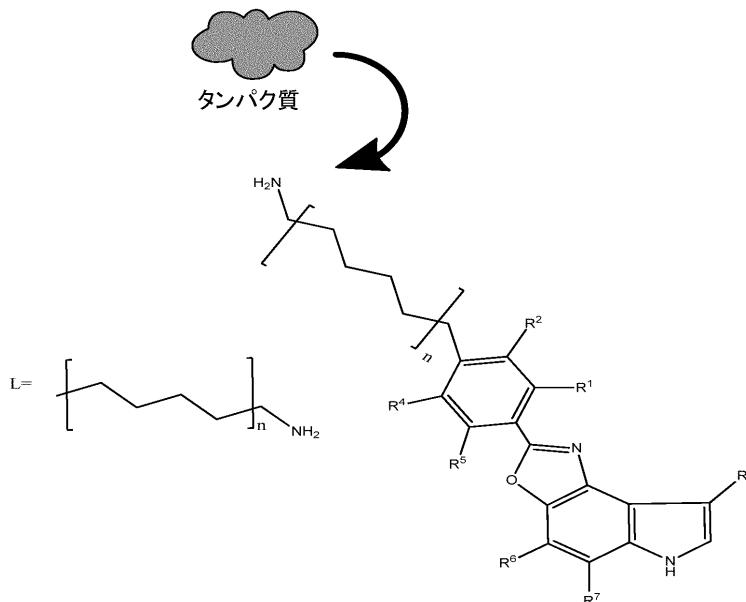
30

40

50

[0096] 加えて、ベンゾオキサゾール誘導体を用いて免疫原性コンジュゲートを作成することができる。例えば、一態様において、本発明のコンジュゲートを用いて、対象の代謝産物に特異的である免疫原性の応答を產生させる。場合によっては、ベンゾオキサゾール誘導体及びリンカーアーム (n は約 1 ~ 4 である) を用いて、B S A などの担体タンパク質をアミノ (又はスルフヒドリル) 末端に付け加えることができる。このように生成した抗体の親和性及び特異性を試験するために、ビオチン化されているハプテンを作成する。本発明は、セロトニン (5 - H T) 、5 - ヒドロキシインドール酢酸 (5 - H I A A) 、及びセロトニン経路における他の代謝産物の安定な誘導体を提供する。誘導体は、担体タンパク質などの生体分子にコンジュゲートすることができ、アジュバントと組み合わせて免疫応答を刺激することができる。誘導体は、他の生体分子にコンジュゲートすることもできる。ある態様において、さらなるコンジュゲーションのための一セロトニン代謝産物の誘導体は以下の構造を有する :

【化 2】



【0078】

[0097] 式 I の化合物を、当技術分野においてよく知られているコンジュゲーションの化学反応を用いて、担体分子と反応させることができる。例えば、活性化エステル (NHS エステル) は、一級アミンと反応して安定なアミド結合を作成することができる。マレイミド及びチオールは一緒に反応し、チオエーテルを作成することができる。ハロゲン化アルキルは、アミン及びチオールと反応して、それぞれアルキルアミン及びチオエーテルを作成する。タンパク質にコンジュゲートすることができる反応性部分を提供するあらゆる誘導体を、本明細書において利用することができる。当技術分野で知られている通り、遊離のアミノ基、遊離のカルボン酸基、又は遊離のスルフヒドリル基を含む部分は、タンパク質のコンジュゲーションに有用な反応基を提供する。例えば、遊離のアミノ基はタンパク質に、タンパク質上の利用可能なカルボキシ部分に対する、グルタルアルデヒド架橋連結により、又はカルボジイミド架橋連結によりコンジュゲートすることができる。また、遊離のスルフヒドリル基を有するハプテンを、タンパク質のマレイミド活性化により、例えば、スルホスクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - S M C C) を用いて、タンパク質にコンジュゲートさせ、次いでスルフヒドリル基に連結してもよい。

【0079】

[0098] アミン含有代謝産物に対する接続のためのカルボン酸基を有する担体タンパク質を連結する場合、カルボン酸を、活性化試薬を用いて、より反応性の形態に最初に変換して、例えば、N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステル又は混合の無水物を形成させてもよい。アミン含有代謝産物を、得られた活性化された酸で処理してアミド連結を

10

20

30

40

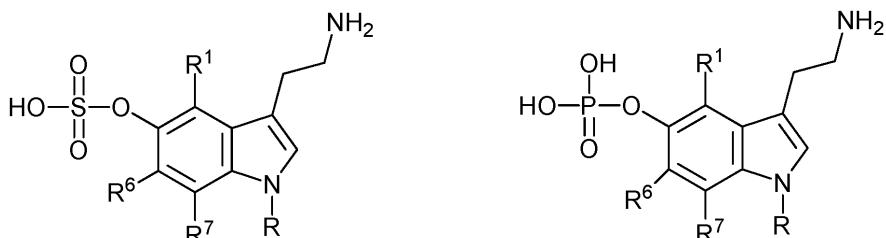
50

形成させる。当業者であれば、代替的に、NHSエステルは代謝産物上にあってもよく、アミンは担体タンパク質上にあってもよいことを認識されよう。

【0080】

[0099]誘導体化により代謝産物を安定化させるプロセスにより、免疫原性のコンジュゲートに対する抗体の産生が可能になる。抗体があれば、抗体が対象の代謝産物に極めて特異的であるELISAなどの免疫アッセイを用いることができる。他の場合には、誘導体は、以下に示すセロトニン-O-硫酸及びセロトニン-O-リン酸を含み：

【化3】



式中、R、R¹、R⁶、及びR⁷は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシ、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR¹¹Bからなる群から独立に選択されるメンバーである。

【0081】

[0100]図1に示す通り、セロトニン経路における対象の代謝産物は、例えば、セロトニン101、5-ヒドロキシインドールアセトアルデヒド105、及び5-ヒドロキシインドール酢酸115である。よって、一態様において、本発明は、5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)101に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原性結合フラグメントであって、抗体は、トリプトファン122、5-ヒドロキシトリプトファン125、及び5-ヒドロキシインドール酢酸115からなる群から選択されるメンバーなどの1つ又は複数の代謝産物に対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。別の一態様において、本発明は、5-ヒドロキシインドール酢酸115に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原性結合フラグメントであって、抗体は、トリプトファン122、5-ヒドロキシトリプトファン125、及び5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)101からなる群から選択される1つ又は複数の代謝産物に対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【0082】

[0101]次に図2を振り返ると、一態様において、本発明は、代謝産物コンジュゲートに対する抗体を提供する。ステップ201では、代謝産物又はその安定な誘導体を調製する。ステップ222では、ウシ血清アルブミンBSAなどの担体タンパク質を誘導体にコンジュゲートする。ステップ231では、コンジュゲートを、ウサギ、マウス、ヒツジ、ニワトリ、ヤギなどの哺乳動物中に注射することによって抗体を作成する。その後、ビオチン化ハプテン251を用いて、このように生成した抗体を試験してもよい。

【0083】

[0102]他の態様において、本発明は、抗体を作成するための方法を提供する。方法は：(a)セロトニン(5-HT)、5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)、及び5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)からなる群から選択される誘導体を含む免疫原を提供するステップであって、各誘導体は担体タンパク質にコンジュゲートしている、ステップと、

(b)動物の免疫系が抗体を作成する条件下で、動物を免疫原で免疫化するステップと、

10

20

30

40

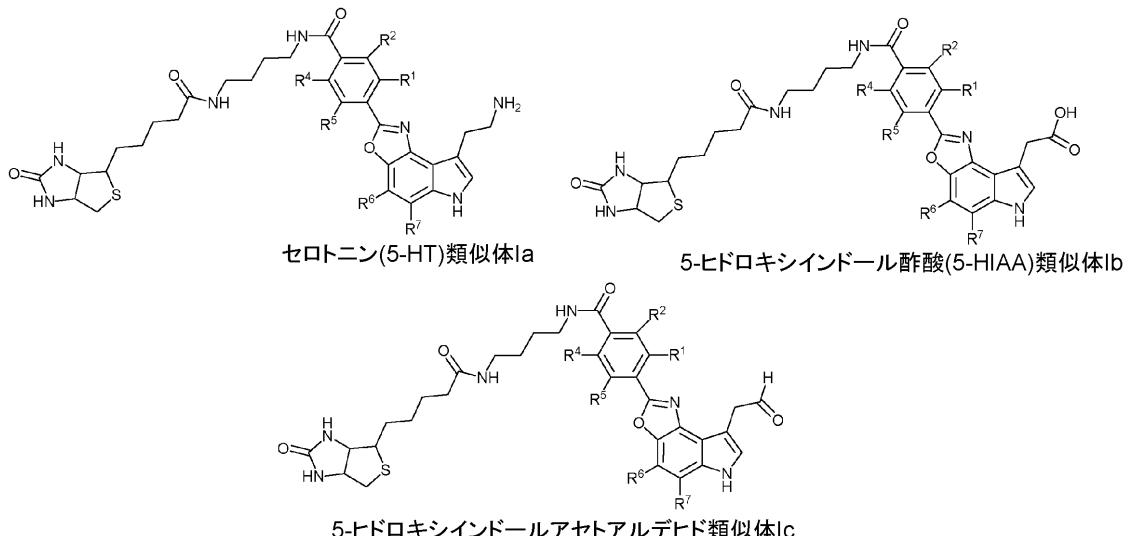
50

(c) 抗体を動物から除去するステップとを含む。

【0084】

[0103] 一態様において、哺乳動物から産生された抗体を、本発明のコンジュゲートを用いて血清から除去することができる。例えば、一態様において、式Ia、Ib、及びIcの化合物を用いて抗体を血清から除去することができ、このコンジュゲートは以下の構造を有する：

【化4】



【0085】

[0104] 式Ia、Ib、又はIcのビオチン化化合物を用いて、これらの対応する抗体を哺乳動物（例えば、ウサギ、マウス、又はヤギ）から除去することができる。その後、二次抗体を用いて抗体コンジュゲートを検出する。

【0086】

[0105] 別の一態様において、本明細書に記載する方法を用いてこのように生成した抗体を用いて、ELISA又はCERなどの免疫アッセイを用いることにより、対象の経路における代謝産物の量又はレベルを定量化することができる。

【0087】

[0106] 一態様において、本発明は、抗体-抗原反応を行うアッセイ方法を提供する。例えば、抗原、又は5-HTなどの代謝産物により、抗原-抗体複合体を形成するためのペルオキシダーゼ標識した抗体との反応が可能になる。このように形成した抗原-抗体複合体を、次いで固定した抗体と反応させ、これによりペルオキシダーゼの活性を、例えば、基質として働くルミノールとの反応によって産生される化学発光によって測定する。代謝産物の存在、濃度、及び/又はレベルをそれにより測定する。

【0088】

[0107] 場合によっては、本発明の抗体を、代謝産物の存在、レベル、及び濃度を検出するための酵素標識を利用する酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）などの免疫アッセイにおいて用いる。一態様において、本発明の特異的な抗体をプレートに吸収させる。非特異的な部位を、特定のアッセイの特異的な免疫化学反応において活性な部分のないタンパク質溶液でブロックする。対象の代謝産物を、プレート上の抗体によって捕獲する。その後、コンジュゲートを、酵素標識を有する別の抗体によって検出することができる。酵素標識を、化学発光試薬と反応させ、検出する。

【0089】

[0108] ELISAの別の一実施形態において、代謝産物又は誘導体を固定化してもよい。本発明の抗体を用いて、固定化した代謝産物に結合させることができる。その後、コンジュゲートを、酵素標識を有する別の抗体によって検出することができる。次いで、酵素標識を、化学発光試薬と反応させ、検出する。

10

20

30

40

50

【0090】

[0109]本明細書に記載するいづれかの代謝産物を検出するためのアッセイ方法は、当技術分野において知られているあらゆる免疫アッセイを含むことができる。いくつかの態様において、アッセイは液相中で行う。他の実施形態において、アッセイは固相上、例えば、ビーズ、又はマイクロプレート、例えば96ウエルマイクロタイプレートの上で行う。これらの方法に有用な免疫アッセイの非限定的な例として、ラジオイムノアッセイ、マイクロアレイアッセイ、蛍光偏光免疫アッセイ、FRETを含む免疫アッセイ、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、又はCERがある。

【0091】

[0110]ハプテンの検出に有用であると当技術分野で知られているあらゆるELISAを、本発明のアッセイに利用することができる。ハプテン用のELISAは競合的なフォーマットを利用するのが一般的であり、すなわち、試料中のハプテン(代謝産物)は、標識化したハプテン(例えば、ビオチン-ハプテン又は酵素-ハプテンコンジュゲート)と抗ハプテン抗体結合部位を競合し、このため試料中に存在するハプテンが多いほど、標識化したハプテンの結合は少なくなる。よって、これらの競合アッセイでは、試料中に増大量のハプテンがあることで、固相に結合する酵素は少くなり、結果として着色したシグナルは減少する。このような競合アッセイでは、試料を、標識化したハプテンとともに加えて抗体結合部位に対して直接競合させてもよく、又は、試料のハプテンが結合していないところに標識化したハプテンが単に結合するように試料及び標識化したハプテンを逐次的に加えてよい。

10

20

【0092】

[0111]いくつかの実施形態において、ELISAは、ハプテンがシグナル伝達酵素に直接結合する直接競合ELISA、又は酵素が例えば二次抗体などの別の分子若しくはストレプトアビシンに結合する間接競合ELISAである。

【0093】

[0112]一実施形態において、本明細書で生成する抗体は、固相に直接的又は間接的いづれかで結合し、後者では固相が抗-抗体でコーティングされ(例えば、ウサギIgG抗体に結合するヤギ抗体(ヤギ抗ウサギIgG))、抗体は抗-抗体に結合する。抗-抗体は「二次抗体」としても知られている。これらのアッセイでは、試料及び標識化したハプテンを固相に加えて、コーティングされている固相上の抗体結合部位と競合させる。洗浄後、シグナルが産生され、それにより固相に結合している標識化したハプテンの量を測定する。

30

【0094】

B.トリプトファン経路の代謝産物に対するアッセイ

[0113]別の一態様において、本発明は、トリプトファン経路における代謝産物の抗体を生成するための抗原を提供する。場合によっては、過敏性腸症候群(IBS)においてセロトニン機能が不規則であるのは、セロトニン前駆物質であるL-トリプトファン122の代謝が変化したことによる。トリプトファン122はセロトニンに対する前駆物質として働く必須アミノ酸であるが、キヌレニン経路内で代替的に代謝され、他の神経活性剤(neuroactive agent)の生成をまねき得る。

40

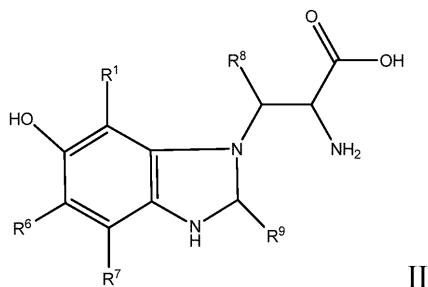
【0095】

[0114]本発明は、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)に対する抗体、及び抗体を調製するための方法を提供する。

【0096】

[0115]トリプトファン代謝産物のベンゾオキサゾールへの誘導体化(セロトニン代謝産物に類似する)は任意である。トリプトファン経路における対象の代謝産物は、例えば、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)125及びトリプトファン122である。一態様において、トリプトファン代謝産物の誘導体は式IIの構造を有し：

【化5】



10

R^1 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、及び R^9 は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシリル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシリル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及び $R^{11}B$ からなる群から独立に選択されるメンバーであり、

Lは、リンカーであり、

$R^{11}B$ は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、

Bは、生体分子である。

【0097】

[0116] 別の一態様において、式IIの化合物を用いて、抗体を作成するために、当技術分野ではよく知られているコンジュゲーションの化学反応を用いて、担体タンパク質にコンジュゲートすることができる。活性化エステル（NHSエステル）は、一級アミンと反応して安定なアミド結合を作成することができる。マレイミド及びチオールは一緒に反応し、チオエーテルを作成することができる。ハロゲン化アルキルは、アミン及びチオールと反応して、それぞれアルキルアミン及びチオエーテルを作成する。タンパク質にコンジュゲートすることができる反応性部分を提供するあらゆる誘導体を、本明細書において利用することができる。当技術分野で知られている通り、遊離のアミノ基、遊離のカルボン酸基、又は遊離のスルフヒドリル基を含む部分は、タンパク質のコンジュゲーションに有用な反応基を提供する。例えば、遊離のアミノ基はタンパク質に、タンパク質上の利用可能なカルボキシ部分に対する、グルタルアルデヒド架橋連結により、又はカルボジイミド架橋連結により、コンジュゲートすることができる。また、遊離のスルフヒドリル基を有するハプテンは、タンパク質のマレイミド活性化により、例えば、スルホスクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホ-SMCC）を用いて、タンパク質にコンジュゲートし、次いでスルフヒドリル基に連結することができる。

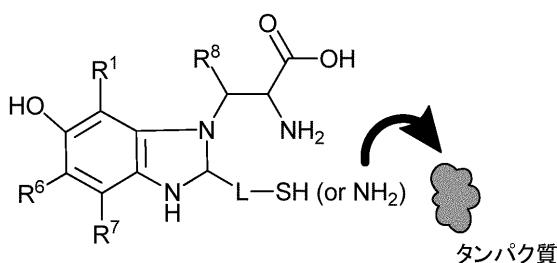
20

30

【0098】

[0117] -コンジュゲーションに対する例示的な模式図は以下の通りである：

【化6】

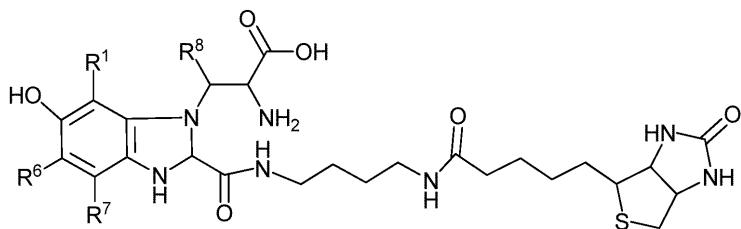


40

【0099】

[0118] 哺乳動物から產生された抗体を、本発明のコンジュゲートを用いて血清から除去することができる。例えば、一態様において、式IIの化合物は式IIaの構造を有する：

【化7】



5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)ビオチン誘導体 IIa

【0100】

10

[0119] 本発明は、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)の安定な誘導体、及び抗体を作成するための方法も提供する。方法は、

(a) 5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)の誘導体を含む、免疫原を提供するステップと、

(b) 動物の免疫系が抗体を作成する条件下で、動物を免疫原で免疫化するステップと、

(c) 抗体を動物から除去するステップとを含む。

【0101】

20

[0120] 別の一態様において、本発明は、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)125に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、抗体は、トリプトファン122、5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)101、及び5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)125からなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【0102】

30

[0121] ある種の他の態様において、本発明は、ヒトなどの哺乳動物からの体液又は組織試料中の5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)に対してアッセイするための方法を提供する。方法は、試料を、本明細書に記載する抗体と合わせ、次いで抗体が試料からの5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)に特異的に結合するか否かを決定することを含む。例えば、これらの方法では、試料からの(5-HTP)に対する特異的な抗体の結合が、セロトニン(5-HTP)が試料中に存在することの指標である。

【0103】

30

[0122] 場合によっては、本発明の抗体を、代謝産物のレベル及び濃度を検出するための酵素標識を利用することができます、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)又はC E E Rなどの免疫アッセイにおいて用いる。

【0104】

40

C. キヌレニン経路の代謝産物に対するアッセイ

[0123] 場合によっては、キヌレニン経路の代謝産物は、内臓痛のメカニズムにおいて役割を果たし、IBSにおける低レベルの免疫活性化に関連している。食餌性のトリプトファンのわずか1%がセロトニンに変換され、95%を超えてキヌレニンに代謝される。IBSでは、キヌレニンレベル及び「キヌレニン：トリプトファン比」の両方が、著しく増大する。キヌレニン経路には、神経変性プロセスに関係する、NMDA受容体の興奮毒である、キノリン酸の生成が含まれる。IBS患者は、キヌレン酸(N-メチル-D-アスパルテート(NMDA)受容体アンタゴニスト)の濃度の低減、並びにアントラニル酸及び3-ヒドロキシアントラニル酸(内因性NMDA受容体アゴニストの前駆物質)の増大を示すのが典型的である。キヌレニン経路に沿ったトリプトファン代謝は、IBS-Dで阻害される。本発明は、トリプトファン及びキヌレニン経路の代謝産物のレベルを決定するための免疫アッセイを提供するものであり、これはIBS患者の状態を決定するのに診断上重要である。

50

【0105】

[0124]本発明は、キヌレニン（K）、キヌレン酸（KA）、3-ヒドロキシキヌレニン（3-HK）、3-ヒドロキシアントラニル酸（3-HAA）、キノリン酸、及びアントラニル酸の安定な誘導体も提供する。誘導体は、担体タンパク質などの生体分子にコンジュゲートすることができ、免疫応答を刺激するためのアジュバントと組み合わせることができる。誘導体は、他の生体分子にコンジュゲートすることもできる。

【0106】

[0125]他の態様において、本発明は、抗体を作成するための方法を提供する。方法は、
(a)キヌレニン（K）、キヌレン酸（KA）、3-ヒドロキシキヌレニン（3-HK）
)、3-ヒドロキシアントラニル酸（3-HAA）、キノリン酸、及びアントラニル酸からなる群から選択される誘導体を含む免疫原を提供するステップであって、各誘導体は担体タンパク質にコンジュゲートしている、ステップと、
10

(b)動物の免疫系が抗体を作成する条件下で、動物を免疫原で免疫化するステップと、
(c)抗体を動物から除去するステップと
を含む。

【0107】

[0126]ある種の他の態様において、本発明は、ヒトなどの哺乳動物からの体液又は組織試料中のキヌレニン（K）、キヌレン酸（KA）、3-ヒドロキシキヌレニン（3-HK）、3-ヒドロキシアントラニル酸（3-HAA）、キノリン酸、及びアントラニル酸からなる群から選択されるメンバーに対してアッセイするための方法を提供する。方法は、試料を、本明細書に記載する抗体と合わせ、次いで、抗体が、試料からのセロトニン（5-HT）、5-ヒドロキシインドール酢酸（5-HIAA）、5-ヒドロキシトリプトファン（5-HTP）、キヌレニン（K）、キヌレン酸（KA）、3-ヒドロキシキヌレニン（3-HK）、3-ヒドロキシアントラニル酸（3-HAA）、キノリン酸、及びアントラニル酸に特異的に結合するか否かを決定することを含む。例えば、これら的方法では、試料からのキヌレニンに対する特異的な抗体の結合が、キヌレニンが試料中に存在することの指標である。
20

【0108】

[0127]ある態様において、本発明の免疫アッセイは、生体液中の代謝産物をモニタリングするための、信頼でき、容易な方法を提供する。本発明は、キヌレニン代謝産物を検出及び定量化するための高い特異度及び感度の信頼できる免疫アッセイを提供する。
30

【0109】

[0128]図1に示す通り、場合によっては、キヌレニン経路の代謝産物には、キヌレニン131、キヌレン酸135、3-ヒドロキシキヌレニン146、3-ヒドロキシアントラニル酸149、キノリン酸160、アントラニル酸140、及びキサンツレン酸148が含まれる。本発明は、これら代謝産物の各々に特異的な抗体を提供し、したがって高い特異度及び感度の免疫アッセイも提供する。

【0110】

[0129]表1は、本発明の、特に興味をひく代謝産物、対応する代謝産物の類似体、及びビオチン化類似体を示す。
40

【表1】

	代謝産物	リンカーを有する類似体	ビオチン化類似体
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

【0111】

[0130]上記において、Lは、環に共有結合した、末端のアミノ、カルボン酸、又はスルフヒドリル基を含むことができる。場合によっては、末端のアミノ、カルボン酸、又はスルフヒドリル基が示され、-L-NH₂、又は-L-C(O)OH若しくは-L-SHと

10

20

30

40

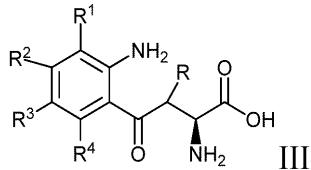
50

表される。

【0112】

[0131]さらに別の一態様において、本発明は式IIIの化合物を提供し、

【化8】



10

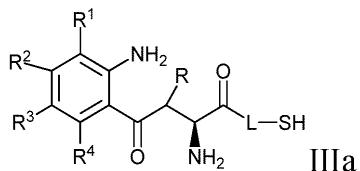
式中、R、R¹、R²、R³、及びR⁴は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR¹¹ Bからなる群から独立に選択されるメンバーであり、Lは、リンカーであり、R¹¹は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、Bは、生体分子である。式IIIの化合物は、キヌレニンに特異的な抗体を作成するのに有用である。

【0113】

[0132]一態様において、式IIIの化合物は式IIIaの構造を有し、式中、Lは末端のSHを含み：

20

【化9】



場合によっては、チオール基を用いて担体タンパク質、ビオチン、又は他の生体分子を繋ぐことができる。

【0114】

[0133]別の一態様において、式IIIの化合物を用いて、抗体を作成するために、当技術分野ではよく知られているコンジュゲーションの化学反応を用いて、担体タンパク質にコンジュゲートすることができる。例えば、活性化エステル(NHSエステル)は、一級アミンと反応して安定なアミド結合を作成することができる。マレイミド及びチオールは一緒に反応して、チオエーテルを作成することができる。ハロゲン化アルキルは、アミン及びチオールと反応して、それぞれアルキルアミン及びチオエーテルを作成する。タンパク質にコンジュゲートすることができる反応性部分を提供するあらゆる誘導体を、本明細書において利用することができる。当技術分野で知られている通り、遊離のアミノ基、遊離のカルボン酸基、又は遊離のスルフヒドリル基を含む部分は、タンパク質のコンジュゲーションに有用な反応基を提供する。例えば、遊離のアミノ基はタンパク質に、タンパク質上の利用可能なカルボキシ部分に対して、グルタルアルデヒド架橋連結により、又はカルボジイミド架橋連結により、コンジュゲートすることができる。また、遊離のスルフヒドリル基を有するハプテンは、タンパク質のマレイミド活性化により、例えば、スルホスルシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)を用いて、タンパク質にコンジュゲートし、次いでスルフヒドリル基に連結することができる。

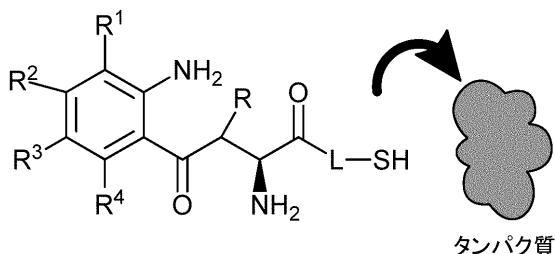
30

40

【0115】

[0134]コンジュゲーションのための例示的な模式図は以下の通りであり、式中、Lは末端のSHを含む：

【化 1 0 】

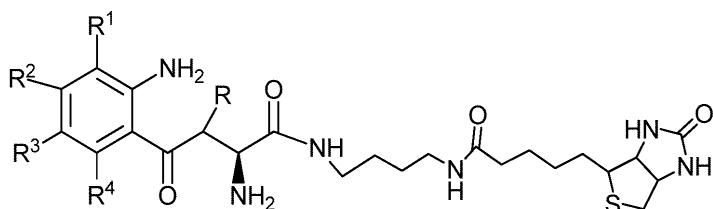


〔 0 1 1 6 〕

[0135] 哺乳動物から産生された抗体は、本発明のコンジュゲートを用いて血清から除去することができる。例えば、一態様において、式 I I I の化合物は式 I I I a の構造を有し：

10

【化 1 1】



20

式中、 R 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 は各々水素である。

[0 1 1 7]

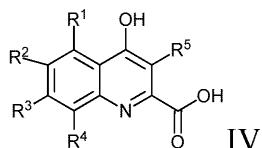
[0136]一態様において、本発明は、キヌレニンに特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、抗体は、キヌレン酸135、3-ヒドロキシキヌレン酸146、3-ヒドロキシアントラニル酸149、キノリン酸160、及びアントラニル酸140からなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

[0 1 1 8]

[0137] さらに別の一態様において、本発明は式 I~IV の化合物を提供し：

30

【化 1 2】



式中、R、R¹、R²、R³、R⁴、及びR⁵は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR¹は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、Bは、生体分子である。式IVの化合物は、キヌレン酸135に特異的な抗体を作成するのに有用である。

40

[0 1 1 9]

[0138] 別の一態様において、式Ⅳの化合物を用いて、抗体を作成するために、当技術分野ではよく知られているコンジュゲーションの化学反応を用いて、担体タンパク質にコンジュゲートすることができる。例えば、活性化エチル（NHSエチル）は、一级アミンと反応して安定なアミド結合を作成することができる。マレイミド及びチオールは一緒に反応し、チオエーテルを作成することができる。ハロゲン化アルキルは、アミン及びチオールと反応して、それぞれアルキルアミン及びチオエーテルを作成する。タンパク質にコンジュゲートすることができる反応性部分を提供するあらゆる誘導体を、本明細書に

50

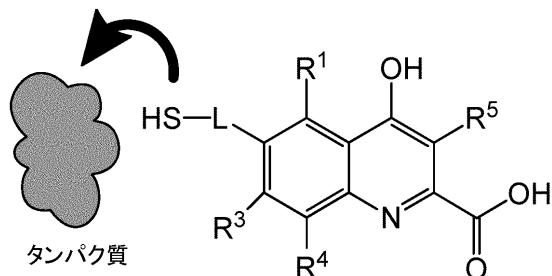
おいて利用することができる。当技術分野で知られている通り、遊離のアミノ基、遊離のカルボン酸基、又は遊離のスルフヒドリル基を含む部分は、タンパク質のコンジュゲーションに有用な反応基を提供する。例えば、遊離のアミノ基はタンパク質に、タンパク質上の利用可能なカルボキシ部分に対して、グルタルアルデヒド架橋連結により、又はカルボジイミド架橋連結によりコンジュゲートすることができる。また、遊離のスルフヒドリル基を有するハプテンは、タンパク質のマレイミド活性化により、例えば、スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)を用いて、タンパク質にコンジュゲートし、次いでスルフヒドリル基に連結することができる。

【0120】

10

[0139]コンジュゲーションのための例示的な模式図は以下の通りであり、式中、Lは末端のSHを含む：

【化13】

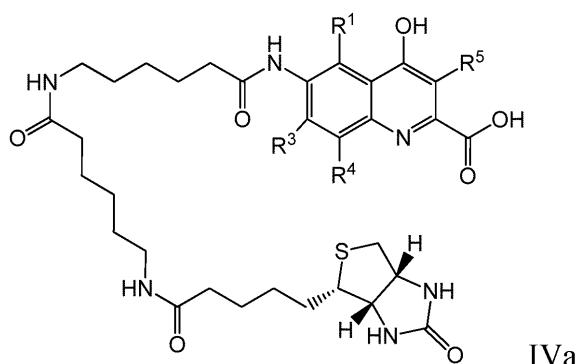


20

【0121】

[0140]哺乳動物から産生された抗体は、本発明のコンジュゲートを用いて血清から除去することができる。例えば、一態様において、式IVの化合物は式IVaの構造を有し：

【化14】



30

式中、R¹、R³、R⁴、及びR⁵は各々水素である。

【0122】

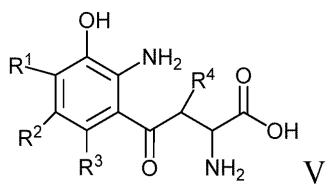
[0141]別の一態様において、本発明は、キヌレン酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、抗体は、キヌレニン131、3-ヒドロキシキヌレニン146、3-ヒドロキシアントラニル酸149、キノリン酸160、及びアントラニル酸140からなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

40

【0123】

[0142]さらに別の一態様において、本発明は式Vの化合物を提供し：

【化15】



式中、R¹、R²、R³、及びR⁴は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR¹¹からなる群から独立に選択されるメンバーである。式Vの化合物は、3-ヒドロキシキヌレン(3-HK)146に対する抗体を作成するのに有用である。

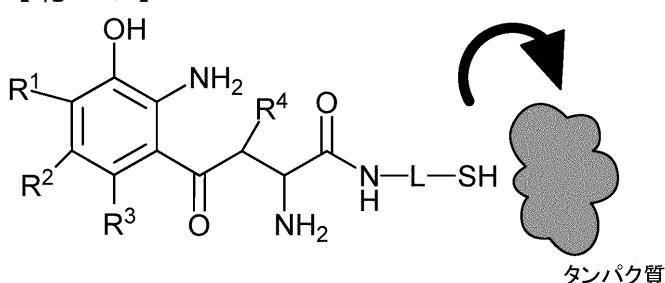
【0124】

[0143]別の一態様において、式Vの化合物を用いて、抗体を作成するために、当技術分野ではよく知られているコンジュゲーションの化学反応を用いて、担体タンパク質にコンジュゲートすることができる。例えば、活性化エステル(NHSエステル)は、一級アミンと反応して安定なアミド結合を作成することができる。マレイミド及びチオールは一緒に反応し、チオエーテルを作成することができる。ハロゲン化アルキルは、アミン及びチオールと反応して、それぞれアルキルアミン及びチオエーテルを作成する。タンパク質にコンジュゲートすることができる反応性部分を提供するあらゆる誘導体を、本明細書において利用することができる。当技術分野で知られている通り、遊離のアミノ基、遊離のカルボン酸基、又は遊離のスルフヒドリル基を含む部分は、タンパク質のコンジュゲーションに有用な反応基を提供する。例えば、遊離のアミノ基はタンパク質に、タンパク質上の利用可能なカルボキシ部分に対して、グルタルアルデヒド架橋連結により、又はカルボジイミド架橋連結によりコンジュゲートすることができる。また、遊離のスルフヒドリル基を有するハブテンは、タンパク質のマレイミド活性化により、例えば、スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)を用いて、タンパク質にコンジュゲートし、次いでスルフヒドリル基に連結することができる。

【0125】

[0144]コンジュゲーションのための例示的な模式図は以下の通りであり、式中、Lは末端のSHを含む：

【化16】



【0126】

[0145]哺乳動物から産生された抗体は、本発明のコンジュゲートを用いて血清から除去することができる。例えば、一態様において、式Vの化合物は式Vaの構造を有し：

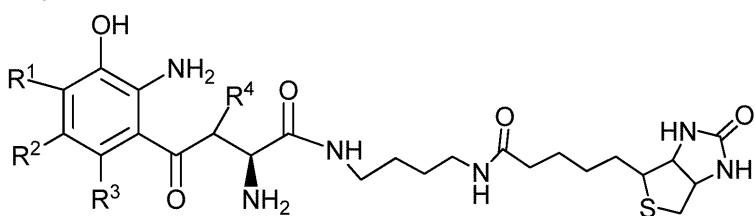
10

20

30

40

【化 1 7 】



式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、及び R^4 は各々水素である。

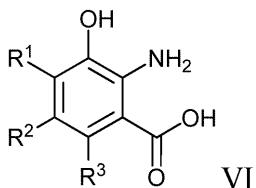
【 0 1 2 7 】

[0146] なお別の一態様において、本発明は、3-ヒドロキシキヌレンイン(3-HK)に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、抗体は、キヌレンイン131、キヌレン酸135、3-ヒドロキシアントラニル酸149、キノリン酸160、及びアントラニル酸140からなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【 0 1 2 8 】

[0147] さらに別の一態様において、本発明は式VIIの化合物を提供し、

【化 1 8】



式中、 R^1 、 R^2 、及び R^3 は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、 L 、及び R^{11} からなる群から独立に選択されるメンバーであり、 L は、リンカーであり、 R^{11} は、化合物と生体分子との間に生じる接続部である。式VIの化合物は、3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAA)149に対する抗体を作成するのに有用である。

[0 1 2 9]

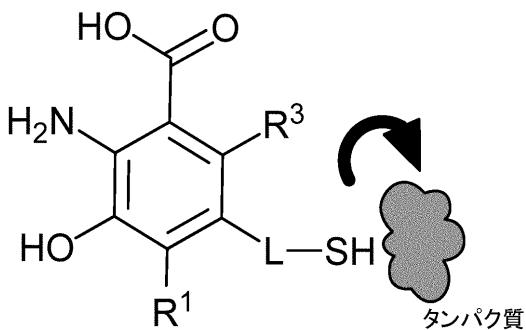
[0148] 別の一態様において、式VIの化合物を用いて、抗体を作成するために、当技術分野ではよく知られているコンジュゲーションの化学反応を用いて、担体タンパク質にコンジュゲートすることができる。活性化エステル（NHSエステル）は、一級アミンと反応して安定なアミド結合を作成することができる。マレイミド及びチオールは一緒に反応し、チオエーテルを作成することができる。ハロゲン化アルキルは、アミン及びチオールと反応して、それぞれアルキルアミン及びチオエーテルを作成する。タンパク質にコンジュゲートすることができる反応性部分を提供するあらゆる誘導体を、本明細書において利用することができる。当技術分野で知られている通り、遊離のアミノ基、遊離のカルボン酸基、又は遊離のスルフヒドリル基を含む部分は、タンパク質のコンジュゲーションに有用な反応基を提供する。例えば、遊離のアミノ基はタンパク質に、タンパク質上の利用可能なカルボキシ部分に対して、グルタルアルデヒド架橋連結により、又はカルボジイミド架橋連結によりコンジュゲートすることができる。また、遊離のスルフヒドリル基を有するハプテンは、タンパク質のマレイミド活性化により、例えば、スルホスクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホ-SMC）を用いて、タンパク質にコンジュゲートし、次いでスルフヒドリル基に連結することができる。

【 0 1 3 0 】

〔0149〕コンピュレーションのための例示的な模式図は以下の通りであり、式中、 \mathbf{I} は未

端の S H を含む：

【化 1 9】

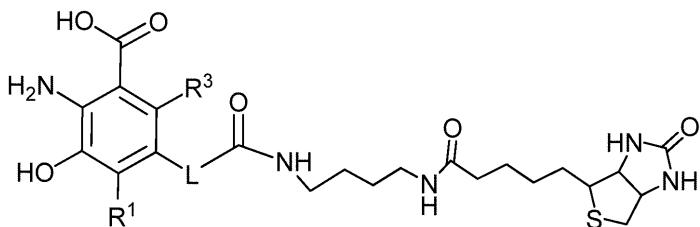


10

[0 1 3 1]

[0150] 哺乳動物から産生された抗体は、本発明のコンジュゲートを用いて血清から除去することができる。例えば、一態様において、式V I の化合物は式V I a の構造を有し：

【化 2 0】



20

式中、 R^1 及び R^3 は各々水素である。

〔 0 1 3 2 〕

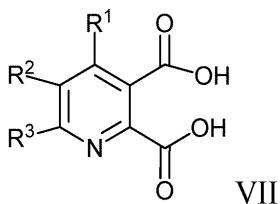
[0151]さらに別の一態様において、本発明は、3-ヒドロキシアントラニル酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、抗体は、キヌレン131、キヌレン酸135、3-ヒドロキシキヌレン146、キノリン酸160、及びアントラニル酸140からなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【 0 1 3 3 】

30

[0152] さらに別の一態様において、本発明は式VIIの化合物を提供し：

【化 2 1】



式中、 R^1 、 R^2 、及び R^3 は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及び $R^{1-1}B$ からなる群から独立に選択されるメンバーであり、Lは、リンカーであり、 R^{1-1} は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、Bは生体分子である。化合物は、キノリン酸に対する抗体を作成するのに有用である。

[0 1 3 4]

[0153] 別の一様において、式VIIの化合物を用いて、当技術分野ではよく知られているコンジュゲーションの化学反応を用いて、担体タンパク質にコンジュゲートすることができる。例えば、活性化エステル（NHSエステル）は、一級アミンと反応して安定な

50

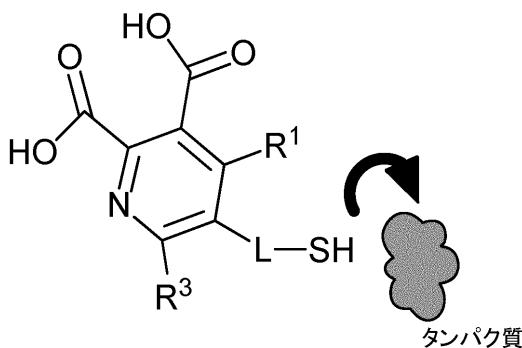
アミド結合を作成することができる。マレイミド及びチオールは一緒に反応し、チオエーテルを作成することができる。ハロゲン化アルキルは、アミン及びチオールと反応して、それぞれアルキルアミン及びチオエーテルを作成する。タンパク質にコンジュゲートすることができる反応性部分を提供するあらゆる誘導体を、本明細書において利用することができる。当技術分野で知られている通り、遊離のアミノ基、遊離のカルボン酸基、又は遊離のスルフヒドリル基を含む部分は、タンパク質のコンジュゲーションに有用な反応基を提供する。例えば、遊離のアミノ基はタンパク質に、タンパク質上の利用可能なカルボキシ部分に対して、グルタルアルデヒド架橋連結により、又はカルボジイミド架橋連結によりコンジュゲートすることができる。また、遊離のスルフヒドリル基を有するハプテンは、タンパク質のマレイミド活性化により、例えば、スルホスクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - S M C C) を用いて、タンパク質にコンジュゲートし、次いでスルフヒドリル基に連結することができる。

10

〔 0 1 3 5 〕

[0154] コンジュゲーションのための例示的な模式図は以下の通りであり、式中、Lは末端のSHを含む：

【化 2 2】



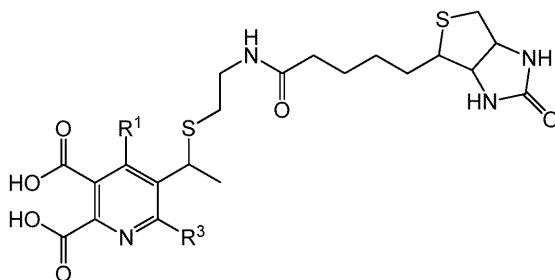
30

[0 1 3 6]

[0155] 哺乳動物から産生された抗体は、本発明のコンジュゲートを用いて血清から除去することができる。例えば、一態様において、式VIIの化合物は式VIIaの構造を有し：

30

【化 2 3】



40

式中、 R^1 及び R^3 は各々水素である。

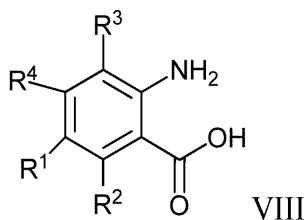
【 0 1 3 7 】

[0156]一態様において、本発明は、キノリン酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、抗体は、キヌレニン、キヌレン酸、3-ヒドロキシキヌレニン、3-ヒドロキシアントラニル酸、及びアントラニル酸からなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

〔 0 1 3 8 〕

[0157] さらに別の一様性において、本発明は式Vイエの化合物を提供し、

【化24】



式中、R¹、R²、R³、及びR⁴は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR¹¹Bからなる群から独立に選択されるメンバーであり、Lは、リンカーであり、R¹¹は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、Bは、生体分子である。式VIIの化合物は、アントラニル酸に対する抗体を作成及び生成するのに有用である。

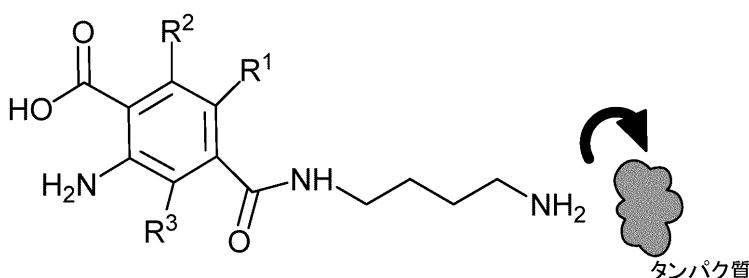
【0139】

[0158]別の一態様において、式VIIの化合物を用いて、当技術分野ではよく知られているコンジュゲーションの化学反応を用いて、担体タンパク質にコンジュゲートすることができる。例えば、活性化エステル（NHSエステル）は、一級アミンと反応して安定なアミド結合を作成することができる。マレイミド及びチオールは反応し、チオエーテルを作成することができる。ハロゲン化アルキルは、アミン及びチオールと反応して、それぞれアルキルアミン及びチオエーテルを作成する。タンパク質にコンジュゲートすることができる反応性部分を提供するあらゆる誘導体を、本明細書において利用することができる。当技術分野で知られている通り、遊離のアミノ基、遊離のカルボン酸基、又は遊離のスルフヒドリル基を含む部分は、タンパク質のコンジュゲーションに有用な反応基を提供する。例えば、遊離のアミノ基はタンパク質に、タンパク質上の利用可能なカルボキシ部分に対して、グルタルアルデヒド架橋連結により、又はカルボジイミド架橋連結によりコンジュゲートすることができる。また、遊離のスルフヒドリル基を有するハプテンは、タンパク質のマレイミド活性化により、例えば、スルホスクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホ-SMCC）を用いて、タンパク質にコンジュゲートし、次いでスルフヒドリル基に連結することができる。

【0140】

[0159]コンジュゲーションのための例示的な模式図は以下の通りであり、式中、Lは末端のSHを含む：

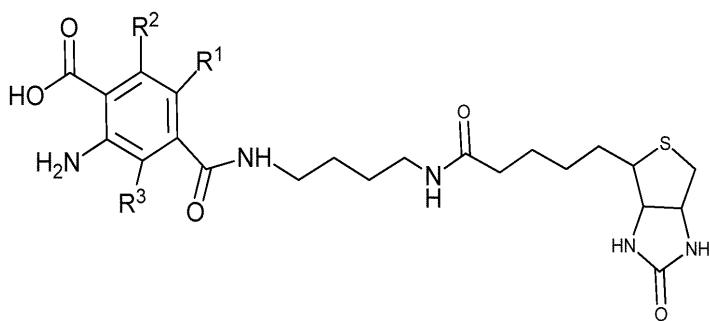
【化25】



【0141】

[0160]哺乳動物から產生された抗体は、本発明のコンジュゲートを用いて血清から除去することができる。例えば、一態様において、式VIIの化合物は式VIIaの構造を有し：

【化26】



10

式中、R¹、R²、及びR³は各々水素である。

【0142】

[0161] なお別の一態様において、本発明は、アントラニル酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、抗体は、キヌレニン、キヌレン酸、3-ヒドロキシキヌレニン、3-ヒドロキシアントラニル酸、及びキノリン酸からなる群から選択される1つ又は複数のメンバーに1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【0143】

[0162] 別の一態様において、本発明は、あらゆる他の代謝産物に対して1%未満の交差反応性を有する、図1の各々の代謝産物に対する抗体を提供する。

20

【0144】

[0163] ある種の他の態様において、本発明は、ヒトなどの哺乳動物からの体液又は組織試料中のキヌレニン(K)、キヌレン酸(KA)、3-ヒドロキシキヌレニン(3-HK)、3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAA)、キノリン酸、アントラニル酸、及びこれらの組合せからなる群から選択されるメンバーに対するアッセイの方法を提供する。

【0145】

[0164] 方法は、試料を、本明細書に記載する抗体と合わせ、次いで、抗体が、試料からのキヌレニン(K)、キヌレン酸(KA)、3-ヒドロキシキヌレニン(3-HK)、3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAA)、キノリン酸、アントラニル酸、及びこれらの組合せからなる群から選択されるメンバーに特異的に結合するか否かを決定することを含む。例えば、これらの方法では、試料からの3-HKに対する特異的な抗体の結合が、3-HKが試料中に存在することの指標である。

30

【0146】

D. 短鎖脂肪酸に対するアッセイ

[0165] ある態様において、本発明は、短鎖脂肪酸(SCFA)に対するアッセイを提供する。例えば、IBS-Dを有する小児患者の糞便のSCFAプロファイルは、全SCFA、アセテート、及びプロピオネートの濃度が低く、n-ブチレートの濃度及びパーセント値が高いことによって特徴付けられる。IBS-Dを有する患者の結腸の細菌叢によるSCFA生成における相違は、消化管症状の発症に関連し得る。ベイヨネラ(Veiloneilla)及びラクトバシラス(Lactobacillus)を組み合わせると酢酸及びプロピオン酸が生成されることが、研究により示されている。高レベルの酢酸及びプロピオン酸は、腹部症状及び生活の質の低下に関連し得る(Treem WR、J Pediatr Gastroenterol Nutr.、1996年10月、23巻(3)、280~6頁; Le Gallら、J Proteome Res.、2011年9月2日、10巻(9)、4208~1頁; 及びTana C.、Neurogastroenterol Motil.、2010年5月、22巻(5)、512~9頁を参照されたい)。

40

【0147】

[0166] 本発明は、IBSの素因を決定し、又はIBSの診断における助けとなるために

50

、 S C F A のレベル及び濃度を測定するための E L I S A 及び C E E R などの免疫アッセイを提供する。

【 0 1 4 8 】

[0167] 本発明は、短鎖脂肪酸に対する抗体及び抗体を作成する方法を提供する。調製された抗体は、関連の代謝産物に対して低い交差反応性を有し、プロピオン酸及び酪酸に特異的で高感度の免疫アッセイに対する有用な試薬である。

【 0 1 4 9 】

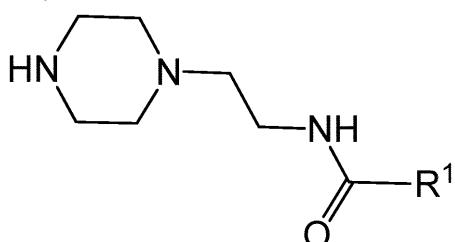
[0168] 本発明は、プロピオン酸及び酪酸などの短鎖脂肪酸 (S C F A) の安定な誘導体も提供する。誘導体は、担体タンパク質などの生体分子にコンジュゲートすることができ、免疫応答を刺激するためのアジュバントと組み合わせることができる。誘導体は、他の生体分子にコンジュゲートすることもできる。

10

【 0 1 5 0 】

[0169] アセテート、プロピオネート、及びブチレートの分子サイズは小型であるため、リンカーを用いて、免疫原性のハプテンを作成するために S C F A にコンジュゲートしてもよい。例えば、場合によっては、以下のリンカーを用いることができる：

【 化 2 7 】



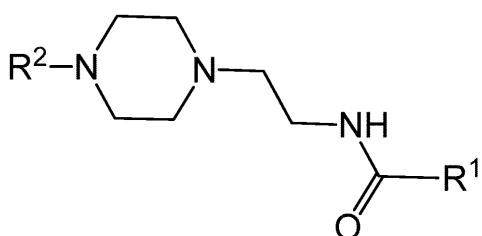
20

式中、 R¹ は単鎖アルキル基 (C₂ 、 C₃ 、 C₄ 、 C₅ 、 又は C₆) である。

【 0 1 5 1 】

[0170] 別の一例において、化合物は式 I X を有する：

【 化 2 8 】



30

【 0 1 5 2 】

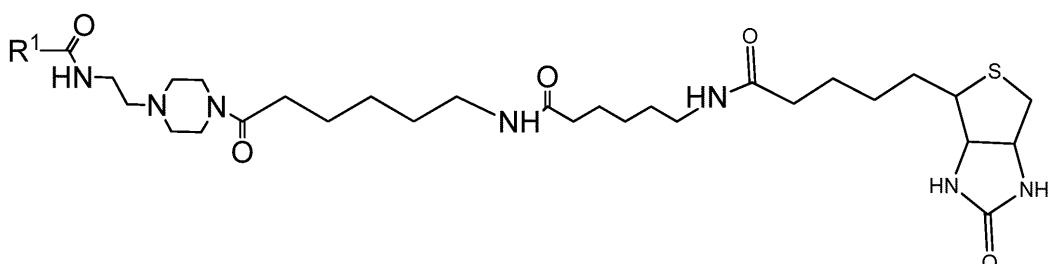
[0171] R² は L 又は R¹ B であり、 B は生体分子である。

【 0 1 5 3 】

[0172] これらの化合物を用いて哺乳動物から産生された抗体を、本発明のコンジュゲートを用いて血清から除去することができる。例えば、一態様において、このようなコンジュゲートは以下の構造を有する：

40

【 化 2 9 】



40

【 0 1 5 4 】

50

[0173]他の態様において、本発明は、短鎖脂肪酸の抗体を作成するための方法を提供する。方法は、

(a) 担体タンパク質にコンジュゲートしている、短鎖脂肪酸の誘導体を含む免疫原を提供するステップと、

(b) 動物の免疫系が抗体を作成する条件下で、動物を免疫原で免疫化するステップと、

(c) 抗体を動物から除去するステップとを含む。

【0155】

[0174]一態様において、本発明は、プロピオン酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、抗体は酪酸に対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。 10

【0156】

[0175]別の一態様において、本出願は、酪酸に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、抗体はプロピオン酸に対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【0157】

[0176]ある種の他の態様において、本発明は、ヒトなどの哺乳動物からの体液又は組織試料中の短鎖脂肪酸に対するアッセイの方法を提供する。体液は、血液、尿、血漿、汗、唾液、吸引液、涙液などのあらゆる生体液であってよい。方法は、試料を、本明細書に記載する抗体と合わせ、次いで、抗体が、試料からの短鎖脂肪酸に特異的に結合するか否かを決定することを含む。例えば、これらの方法では、試料からのプロピオン酸に対する特異的な抗体の結合が、プロピオン酸が試料中に存在することの指標である。 20

【0158】

E. 胆汁酸吸収不良を測定するためのアッセイ

[0177]胆汁酸吸収不良（BAM）は、慢性下痢及びIBS-Dの発症に寄与し得る。血清7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンは、胆汁酸の（肝臓）合成を決定するための一試験であり、胆汁酸の（肝臓）合成は、コレステロールからの胆汁酸合成におけるコレステロール7-ヒドロキシラーゼ（律速酵素である）の活性に相関する。 30

【0159】

[0178]本発明は、胆汁酸代謝産物に対する抗体、及び抗体を調製するための方法も提供する。調製された抗体は、関連の代謝産物に対して低い交差反応性を有し、7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンに対する特異的で高感度の免疫アッセイのための有用な試薬である。

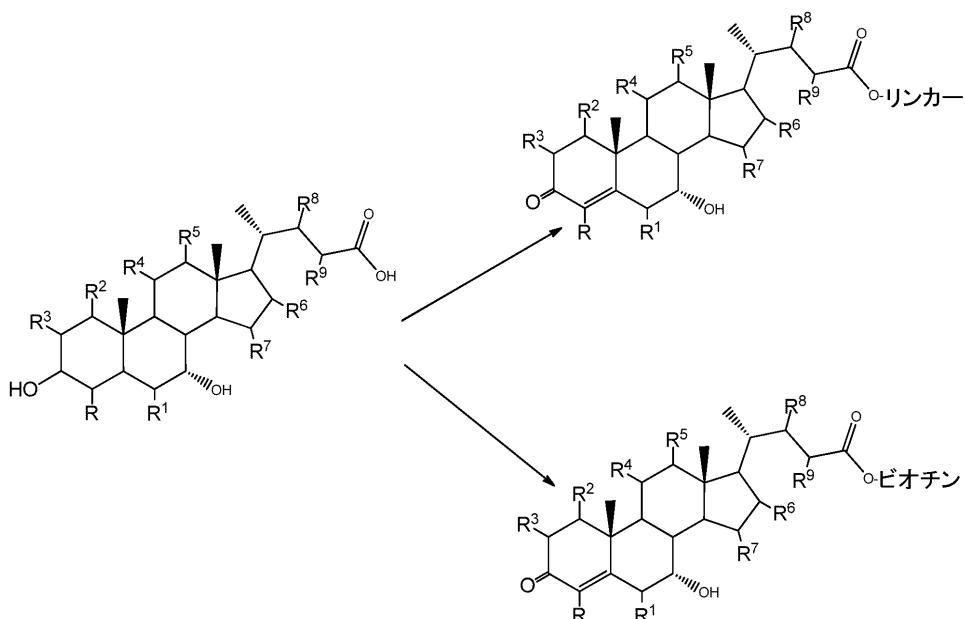
【0160】

[0179]本発明は、7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンの安定な誘導体も提供する。誘導体は、担体タンパク質などの生体分子にコンジュゲートすることができ、免疫応答を刺激するためのアジュバントと組み合わせることができる。誘導体は、他の生体分子にコンジュゲートすることもできる。

【0161】

[0180]本発明は、リンカーを有し、生物学的に重要な官能基を保持する7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンの合成を提供する。一態様において、本発明は、以下に示す通り、7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オン誘導体及びそのビオチン類似体の合成を提供する： 40

【化30】



10

【0162】

[0181] 別の一態様において、式X-Iの化合物を用いて、当技術分野ではよく知られているコンジュゲーションの化学反応を用いて、担体タンパク質にコンジュゲートすることができる。例えば、活性化エステル（NHSエステル）は、一級アミンと反応して安定なアミド結合を作成することができる。マレイミド及びチオールは一緒に反応し、チオエーテルを作成することができる。ハロゲン化アルキルは、アミン及びチオールと反応して、それぞれアルキルアミン及びチオエーテルを作成する。タンパク質にコンジュゲートすることができる反応性部分を提供するあらゆる誘導体を、本明細書において利用することができる。当技術分野で知られている通り、遊離のアミノ基、遊離のカルボン酸基、又は遊離のスルフヒドリル基を含む部分は、タンパク質のコンジュゲーションに有用な反応基を提供する。例えば、遊離のアミノ基はタンパク質に、タンパク質上の利用可能なカルボキシ部分に対して、グルタルアルデヒド架橋連結により、又はカルボジイミド架橋連結によりコンジュゲートすることができる。また、遊離のスルフヒドリル基を有するハプテンは、タンパク質のマレイミド活性化により、例えば、スルホスクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホ-SMCC）を用いて、タンパク質にコンジュゲートし、次いでスルフヒドリル基に連結することができる。

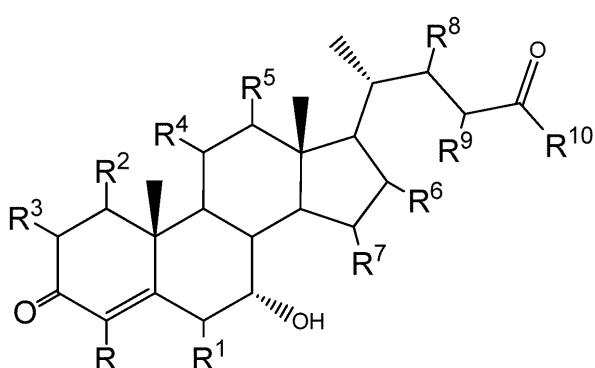
20

30

【0163】

[0182] したがって、一態様において、本発明は、式Xの化合物を提供する：

【化31】



40

【0164】

[0183] 式中、R、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、及びR¹⁰は各々、水素、アルキル、ハロ、ヒドロキシル、アルコキシ、アミノ、アロイル、アルカノイル、アミド、置換アミド、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、スルホ

50

ネート、アルコキシアルキル、カルボキシ、カルボキシアルキル、アルコキシカルボニルアルキル、スルホネートアルキル、L、及びR¹⁻¹Bからなる群から独立に選択されるメンバーであり、Lは、リンカーであり、R¹⁻¹は、化合物と生体分子との間に生じる接続部であり、Bは、生体分子である。

【0165】

[0184]他の態様において、本発明は、7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンの抗体を作成するための方法を提供する。方法は：

(a) 担体タンパク質にコンジュゲートしている、7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンの誘導体を含む免疫原を提供するステップと、

(b) 動物の免疫系が抗体を作成する条件下で、動物を免疫原で免疫化するステップと、

(c) 抗体を動物から除去するステップとを含む。

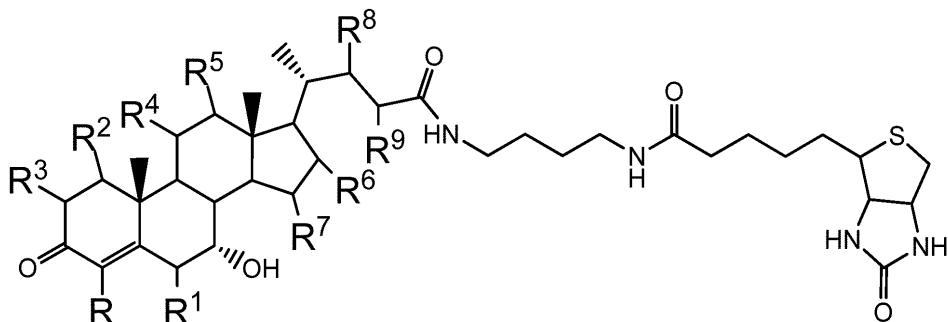
【0166】

[0185]ある種の他の態様において、本発明は、ヒトなどの哺乳動物からの体液又は組織試料中の7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンに対するアッセイの方法を提供する。方法は、試料を、本明細書に記載する抗体と合わせ、次いで、抗体が、試料からの7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンに特異的に結合するか否かを決定することを含む。例えば、これらの方法では、試料からの7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンに対する特異的な抗体の結合が、7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンが試料中に存在することの指標である。

【0167】

[0186]哺乳動物から産生された抗体は、本発明のコンジュゲートを用いて血清から除去することができる。例えば、一態様において、式Xaの化合物は式Xaの構造を有し：

【化32】



式中、R、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、及びR¹⁰は各々水素である。

【0168】

[0187]別の一態様において、本出願は、7- - -ヒドロキシ-4-コレステン-3-オン誘導体に特異的に結合する単離された抗体又はその抗原結合性フラグメントであって、抗体は、コレステロール及び7- - -コレステロールからなる群から選択されるメンバーに対して1%未満の交差反応性を有する、抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【0169】

F. 抗体

[0188]一般に、小分子(ハプテン)に対する抗体を産生するには、ハプテンを担体タンパク質(CP)に架橋して、ハプテンを免疫原性にする。場合によっては、アミン含有神経伝達物質及び生体アミン(すなわち、アミノ化ハプテン)を、グルタルアルデヒドを介した1ステップの連結によって適切な担体タンパク質(CP)に連結し、非アミン含有ハプテン(例えば、5-HIAA、DOPAC、メラトニンなど)を、マンニッヒ縮合反応

10

20

30

40

50

によってCPにコンジュゲートする。場合によっては、ハプテンは、免疫系によって認識されるための主要な分子の特徴から遠位の部位で、スペーサー基に連結している所望のバックボーン分子構造から構成される。リンカーの他方の終端上の官能基は、抗原性の担体タンパク質に対する共有結合性の接続を容易に形成することができる。リンカーアームはまた、対象の化合物に対する親和性及び特異性を最大にするのに最適な距離での、ハプテンの担体タンパク質からの分離に寄与する。リンカーの両端に形成した化学結合及びこのスペーサーアームの長さ(炭素原子3~9個)は、親和性及び特異性に関する質、並びに免疫応答の量(抗体の量)にとって重要である。(Meyerら、1991年、J. Histochim. Cytochem. 39巻、749~760頁、Singh、Surilら、Bioconjugate Chem.、15巻、1号、2004年; Ivy Carrollら、J. Med. Chem.、2011年、54巻(14)、5221~5228頁)。10

【0170】

I II I . 抗体の生成

[0189]抗体の産生及び選択はいくつかの方法によって達成することができる。対象の代謝産物に対応する合成及び精製した抗原を、例えば、マウス又はウサギ又は別の哺乳動物に注射して、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を産生する。当業者であれば、例えば、Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow and Lane編集、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y. (1988年)に記載されているように、抗体の生成に多くの手順が利用できることを認識していると予想される。当業者であれば、抗体を擬する(例えば、抗体の機能的な結合領域を保持する)、結合性フラグメント又はFabフラグメントも様々な手順によって遺伝情報から調製することができることも理解していると予想される。例えば、Antibody Engineering, A Practical Approach, Borrebaeck編集、Oxford University Press、Oxford (1995年); 及びHuseら、J. Immunol.、149巻、3914~3920頁(1992年)を参照されたい。20

【0171】

[0190]これらの方針により産生された抗体は、次いで、対象の精製された抗原(本明細書に記載するビオチン化抗原など)で親和性及び特異性に対して最初にスクリーニングすることによって選択することができ、必要であれば、抗体の親和性及び特異性に対する結果を、結合から除外するのが望ましい他の抗原と比較する。スクリーニングの手順は、精製された抗原をマイクロタイタープレートの別々のウエルに固定化することを伴い得る。プレートには、プレート上に固定化したストレプトアビシンを有することができ、次いで、潜在的な抗体又は抗体の群を含む溶液をそれぞれのマイクロタイターウエル中に配置し、約30分~2時間インキュベートする。次いでマイクロタイターウエルを洗浄し、標識化した二次抗体(例えば、産生させる抗体がマウス抗体であれば、アルカリホスファターゼにコンジュゲートしている抗マウス抗体)をウエルに加え、約30分間インキュベートし、次いで洗浄する。基質をウエルに加えると、ビオチン化抗原などの固定化抗原に対する抗体が存在するところで呈色反応が出現する。30

【0172】

[0191]このように同定した抗体を、次いで、親和性及び特異性に対してさらに分析してもよい。標的の代謝産物に対する免疫アッセイの開発では、精製した標的の代謝産物は、選択した抗体を用いて免疫アッセイの感度及び特異度を判断するための標準として作用する。様々な抗体の結合親和性は異なり得るため、例えば、ある種の抗体の組合せは立体的に相互に妨害し得るため、抗体のアッセイ性能は、その抗体の絶対的な親和性及び特異性よりも重要な尺度であり得る。40

【0173】

[0192]当業者であれば、抗体又は結合性フラグメントを生成し、対象の様々な代謝産物

10

20

30

40

50

に対する親和性及び特異性に対してスクリーニング及び選択をする上で多くのアプローチをとることができるが、これらのアプローチは本発明の範囲を変えるものではないことを認識されよう。

【0174】

A. ポリクローナル抗体

[0193] ポリクローナル抗体は、本発明の抗原、及びアジュバントを、複数回皮下 (s.c.) 又は腹腔内 (i.p.) 注射することによって動物に產生させるのが好ましい。二官能性又は誘導体化の薬剤を用いて、対象の抗原を、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、又はダイズトリプシン阻害剤など、免疫化しようとする種に免疫原性であるタンパク質の担体にコンジュゲートするのが有用であり得る。二官能性又は誘導体化の薬剤の非限定的な例には、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル (システイン残基を介したコンジュゲーション) 、 N - ヒドロキシスクシンイミド (リジン残基を介したコンジュゲーション) 、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、 SOCl_2 、及び $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{N}\text{R}$ が含まれ、 R 及び R^1 は異なるアルキル基である。

10

【0175】

[0194] 例えば、抗原又はコンジュゲート $100\text{ }\mu\text{g}$ (ウサギ) 又は $5\text{ }\mu\text{g}$ (マウス) を 3 容積のフロイント完全アジュバントと合わせ、溶液を複数の部位に皮内注射することによって、動物を、本発明の抗原、又は免疫原性のコンジュゲート若しくはその誘導体に対して免疫化する。1か月後、動物に、複数の部位に皮内注射することによって、フロイント不完全アジュバント中コンジュゲートのオリジナルの量の約 $1/5 \sim 1/10$ で追加免疫する。7日～14日後、動物を出血させ、血清を抗体の力価に対してアッセイする。力価がプラトートになるまで動物に追加免疫するのが典型的である。動物に同じ抗原のコンジュゲートで追加免疫するのが好ましいが、異なる免疫原性の抗原に対するコンジュゲーション及び / 又は異なる架橋連結の試薬を介したコンジュゲーションを用いてもよい。場合によっては、ミョウバンなどの凝集性の薬剤を用いて免疫応答を増強してもよい。

20

B. モノクローナル抗体

【0176】

[0195] モノクローナル抗体は、実質的に均一な抗体の集団から得るのが一般的であり、すなわち、集団を含む個々の抗体は、微量存在し得る、可能な、天然に存在する変異以外は同一である。よって、修飾語「モノクローナル」は、抗体の特性が、別個の抗体の混合物ではないことを示す。例えば、モノクローナル抗体は、 Kohler ら、 Nature 、 256 卷、 495 頁 (1975 年) によって記載されるハイブリドーマ法を用いて、又は当技術分野で知られているあらゆる組換え DNA 法によって (例えば、米国特許第 4,816,567 号を参照されたい) 作成することができる。

30

【0177】

[0196] ハイブリドーマ法では、マウス又は他の適切な宿主動物 (例えば、ハムスター) を上記に記載した通り免疫化して、免疫化に用いる対象のポリペプチドに特異的に結合する抗体を生成し、又は抗体を生成することができるリンパ球を誘発する。或いは、リンパ球を *in vitro* で免疫化する。免疫化したリンパ球を、次いで、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤 (fusing agent) を用いてミエローマ細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成させる (例えば、 Godring 、 Monoclonal Antibodies: Principles and Practice 、 Academic Press 、 59 ~ 103 頁 (1986 年) を参照されたい) 。このように調製したハイブリドーマ細胞を、非融合の親のミエローマ細胞の増殖又は生存を阻害する 1 つ又は複数の物質を含むのが好ましい、適切な培養培地に接種し、増殖させる。例えば、親のミエローマ細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGprt) を欠く場合、ハイブリドーマ細胞用の培養培地は、 HGprt - 欠損細胞の増殖を妨げる、ヒポキサンチン、アミノプレリン、及びチミジンを含む (HAT 培地) のが典型的である。

40

50

【0178】

[0197] 好ましいミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定な高レベルの抗体の生成を支持し、及び／又はH A T 培地などの培地に感受性のある細胞である。ヒトモノクローナル抗体を生成するのに好ましいこのようなミエローマ細胞株の例には、それだけには限定されないが、マウスミエローマ株、例えば、M O P C - 2 1 及びM P C - 1 1 マウス腫瘍に由来するもの (S a l k I n s t i t u t e C e l l D i s t r i b u t i o n C e n t e r ; S a n D i e g o , C A から入手可能) 、S P - 2 又はX 6 3 - A g 8 - 6 5 3 細胞 (t h e A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n ; R o c k v i l l e , M D から入手可能) 、及びヒトミエローマ又はマウス・ヒトヘテロミエローマ細胞株 (例えば、K o z b o r 、J . I m m u n o l . 、1 3 3 卷、3 0 0 1 頁 (1 9 8 4 年) ; 及びB r o d e u r ら、M o n o c l o n a l A n t i b o d y P r o d u c t i o n T e c h n i q u e s a n d A p p l i c a t i o n s , M a r c e l D e k k e r , I n c . , N e w Y o r k 、5 1 ~ 6 3 頁 (1 9 8 7 年) を参照されたい) が含まれる。
10

【0179】

[0198] ハイブリドーマ細胞が増殖する培養培地を、対象のポリペプチドに対するモノクローナル抗体の生成に対してアッセイすることができる。ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降により、又はラジオイムノアッセイ (R I A) 若しくは酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) などのi n v i t r o の結合アッセイにより決定するのが好ましい。モノクローナル抗体の結合親和性は、M u n s o n らのS c a t c h a r d 分析、A n a l . B i o c h e m . 、1 0 7 卷、2 2 0 頁 (1 9 8 0 年) などを用いて決定することができる。
20

【0180】

[0199] ハイブリドーマ細胞が、所望の特異性、親和性、及び／又は活性の抗体を生成することを同定した後、クローンを限界希釈法によってサブクローニングし、標準法によって増殖させてもよい (例えば、G o d i n g 、M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : P r i n c i p l e s a n d P r a c t i c e , A c a d e m i c P r e s s 、5 9 ~ 1 0 3 頁 (1 9 8 6 年) を参照されたい)。この目的に適した培養培地には、例えば、D - M E M 又はR P M I - 1 6 4 0 培地が含まれる。加えて、ハイブリドーマ細胞を、動物における腹水腫瘍としてi n v i v o で増殖させてもよい。サブクローニングによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、プロテインA - セファロースヒドロキシルアバタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又は親和性クロマトグラフィーなどの従来の抗体精製法によって、培養培地、腹水、又は血清から分離することができる。
30

【0181】

[0200] モノクローナル抗体をコードするD N A を、従来の手順を用いて容易に単離及び配列決定することができる (例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)。ハイブリドーマ細胞は、このようなD N A の好ましい供給源として働く。単離後は、D N A を発現ベクター中に配置してもよく、次いで発現ベクターを、他のやり方では抗体を生成しない大腸菌細胞、サルC O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、又はミエローマ細胞などの宿主細胞中にトランスフェクトして、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を誘発する。例えば、S k e r r a ら、C u r r . O p i n . I m m u n o l . 、5 卷、2 5 6 ~ 2 6 2 (1 9 9 3 年) ; 及びP l u c k t h u n 、I m m u n o l R e v . 、1 3 0 卷、1 5 1 ~ 1 8 8 頁 (1 9 9 2 年) を参照されたい。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインに対するコード配列を、相同のマウス配列の代わりに置換することによって (例えば、米国特許第4 , 8 1 6 , 5 6 7 号、及びM o r r i s o n ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、8 1 卷、6 8 5 1 頁 (1 9 8 4 年) を参照されたい)、又は免疫グロブリンコード配列を、非免疫グロブリンポリペプチドに対するコード配列の全て又は一部に共有結合で繋ぐことによって、D N A を修飾しても
40

よい。

【0182】

[0201]さらなる一実施形態において、モノクローナル抗体又は抗体フラグメントは、例えば、McCaffertyら、Nature、348巻、552～554頁(1990年)；Clacksonら、Nature、352巻、624～628頁(1991年)；及びMarksら、J.Mol.Biol.、222巻、581～597頁(1991年)に記載されている技術を用いて產生される、抗体ファージライブリから単離してもよい。チェインシャフリングによる高親和性(nM範囲)のヒトモノクローナル抗体の生成は、Marksら、Biotechnology、10巻、779～783頁(1992年)に記載されている。非常に大型のファージライブリを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染及びin vivo組換えの使用は、Waterhouseら、Nuc.Acids Res.、21巻、2265～2266頁(1993年)に記載されている。よって、これらの技術は、モノクローナル抗体を產生するための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な代替である。

C. 抗体フラグメント

【0183】

[0202]抗体フラグメントを生成するために様々な技術が開発されている。伝統的に、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解性の消化に由来していた(例えば、Morimotoら、J.Biochem.Biophys.Meth.、24巻、107～117頁(1992年)；及びBrennanら、Science、229巻、81頁(1985年)を参照されたい)。しかし、これらのフラグメントは今では、組換え宿主細胞を用いて直接生成することができる。例えば、抗体フラグメントは、上記に論じた抗体ファージライブリから単離することができる。或いは、Fab'-SHフラグメントを大腸菌細胞から直接回収し、化学的にカップリングさせてF(ab')₂フラグメントを形成することができる(例えば、Carterら、Biotechnology、10巻、163～167頁(1992年)を参照されたい)。別のアプローチによると、F(ab')₂フラグメントは、組換え宿主細胞の培養物から直接単離することができる。抗体フラグメントを生成するための他の技術は、当業者であれば明らかである。他の実施形態では、選り抜きの抗体は、単鎖Fvフラグメント(scFv)である。例えば、PCT公開国際公開第93/16185号パンフレット、並びに米国特許第5,571,894号及び第5,587,458号を参照されたい。抗体フラグメントは、米国特許第5,641,870号に記載される通り、直鎖抗体であってもよい。このような直鎖抗体フラグメントは単一特異性でも、又は二重特異性でもよい。

【0184】

D. 二重特異性抗体

[0203]二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、同じ対象のポリペプチドの2つの異なるエピトープに結合し得る。他の二重特異性抗体は、対象のポリペプチドに対する結合部位を、1つ又は複数の付加的な抗原に対する結合部位(複数可)と組み合わせてもよい。二重特異性抗体は、全長の抗体又は抗体フラグメントとして調製することができる(例えば、F(ab')₂二重特異性抗体)。

【0185】

[0204]二重特異性抗体を作成するための方法は当技術分野で知られている。全長の二重特異性抗体の伝統的な生成は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づくものであり、この場合2つの鎖は異なる特異性を有する(例えば、Millssteinら、Nature、305巻、537～539頁(1983年)を参照されたい)。免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の取合せはランダムであるため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は10個の異なる抗体分子の潜在的な混合物を生成し、その中で1つだけが正しい二重特異性の構造を有する。正しい分子の精製は通常、親和性クロマトグラフィーによって行う。同様の手順が、PCT公開国際公開第93/08829号パンフレット及びT

10

20

30

40

50

rauneckerら、EMBO J.、10巻、3655～3659頁(1991年)に開示されている。

【0186】

[0205] 様々なアプローチに従って、所望の結合特異性(抗体-抗原組合せ部位)を有する抗体の可変ドメインを、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合する。融合が、ヒンジ、CH2、及びCH3領域の少なくとも一部を含む、免疫グロブリン重鎖定常ドメインであるのが好ましい。少なくとも1つの融合物に存在する、軽鎖の結合に必要な部位を含む、第1の重鎖定常領域(CH1)を有するのが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物をコードするDNA、及び所望により、免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクター中に挿入し、適切な宿主生物体中に同時トランスフェクトする。これにより、構築物で用いられる不均等な比率の3つのポリペプチド鎖が最適の収率をもたらす実施形態において、3つのポリペプチドフラグメントの相互の比率を調節する上ですぐれた柔軟性がもたらされる。しかし、等しい比率の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収率をもたらす場合、又は比率が特に重要ではない場合は、2つ又は3つ全てのポリペプチド鎖に対するコード配列を1つの発現ベクター中に挿入することが可能である。

10

【0187】

[0206] このアプローチの好ましい一実施形態において、二重特異性抗体は、アームの一方における第一の結合特異性を有するハイブリッドの免疫グロブリン重鎖、及びアームの他方におけるハイブリッドの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)から構成される。二重特異性分子の半分だけに免疫グロブリン軽鎖が存在することにより容易な分離方法が提供されるため、この非対称性の構造により、不要な免疫グロブリン鎖の組合せから所望の二重特異性化合物の分離が促進される。例えば、PCT公開国際公開第94/04690号パンフレット及びSureshら、Meth. Enzymol.、121巻、210頁(1986年)を参照されたい。

20

【0188】

[0207] 米国特許第5,731,168号に記載されている別のアプローチに従って、一対の抗体分子間の界面を、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体のパーセント値を最大にするように操作することができる。好ましい界面は、抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部分を含む。この方法では、第1の抗体分子の界面からの1つ又は複数の小型アミノ酸の側鎖が、大型の側鎖(例えば、チロシン又はトリプトファン)で置き換えられている。大型のアミノ酸側鎖を小型のアミノ酸側鎖(例えば、アラニン又はスレオニン)で置き換えることにより、大型の側鎖(複数可)に対する同一又は同様のサイズの代償性の「孔」が、第2の抗体分子の界面上に作り出される。これにより、ホモ二量体などの他の不要な最終産物を上回ってヘテロ二量体の収率を増大するためのメカニズムがもたらされる。

30

【0189】

[0208] 二重特異性抗体には、架橋連結している、又は「ヘテロコンジュゲートの」抗体が含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲートにおける抗体の1つがアビジンにカップリングし、他方がビオチンにカップリングしていてよい。ヘテロコンジュゲート抗体は、あらゆる便利な架橋連結方法を用いて作成することができる。適切な架橋連結剤及び技術は当技術分野ではよく知られており、米国特許第4,676,980号などに記載されている。

40

【0190】

[0209] 抗体フラグメントから二重特異性抗体を产生するのに適する技術も、当技術分野で知られている。例えば、二重特異性抗体は、化学連結を用いて調製することができる。場合によっては、二重特異性抗体は、インタクトな抗体をタンパク質分解性に切断してF(ab')₂フラグメントを产生する手順により产生することができる(例えば、Brennanら、Science、229巻、81頁(1985年)を参照されたい)。これらのフラグメントはジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されて、近接するジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を防ぐ。产生されたF(ab')フラ

50

グメントを、次いで、チオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換する。次いで、F a b ' - TNB 誘導体の1つを、メルカプトエチルアミンで還元することにより F a b ' - チオールに再変換し、等モル量の他の F a b ' - TNB 誘導体と混合して二重特異性抗体を形成させる。

【 0191 】

[0210] いくつかの実施形態において、F a b ' - SH フラグメントを大腸菌から直接回収し、化学的にカップリングして二重特異性抗体を形成することができる。例えば、完全にヒト化した二重特異性抗体 F (a b ')₂ 分子は、S h a l a b y ら、J . E x p . M e d . 、175巻、217~225頁(1992年)に記載されている方法により生成することができる。各 F a b ' フラグメントは大腸菌から別々に分泌され、二重特異性抗体を形成するために in vitro の定方向(d i r e c t e d) 化学的カップリングを受けるものであった。

10

【 0192 】

[0211] 組換え細胞培養物から直接、二重特異性抗体フラグメントを作成及び単離するための様々な技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて生成されている。例えば、K o s t e l n y ら、J . I mm u n o l . 、148巻、1547~1553頁(1992年)を参照されたい。F o s 及びJ u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合によって、2つの異なる抗体の F a b ' ポーションに連結した。抗体のホモ二量体をヒンジ領域で還元してモノマーを形成させ、次いで再び酸化して(re - o x i d i z e) 抗体のヘテロ二量体を形成させた。抗体のホモダイマーを生成するのに、この方法を利用することもできる。H o l l i n g e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 、90巻、6444~6448頁(1993年)により記載されている「ダイアボディ」技術により、二重特異性抗体のフラグメントを生成するための代替的なメカニズムが提供されている。フラグメントは、非常に短いため同じ鎖上の2つのドメイン間に対形成することができないリンカーによって、軽鎖可変ドメイン(V L)に接続される重鎖可変ドメイン(V H)を含む。したがって、1フラグメントの V H 及び V L ドメインは、別のフラグメントの相補的な V L 及び V H ドメインとの対形成を強いられ、それにより2つの抗原結合性部位が形成する。単鎖 F v (s F v) ダイマーを用いることにより二重特異性抗体フラグメントを作成するための別の戦略は、G r u b e r ら、J . I mm u n o l . 、152巻、5368頁(1994年)に記載されている。

20

【 0193 】

[0212] 原子価が2を超える抗体も企図される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。例えば、T u t t ら、J . I mm u n o l . 、147巻、60頁(1991年)を参照されたい。

30

【 0194 】

E . 抗体の精製

[0213] 組換え技術を用いる場合、抗体は、単離された宿主細胞内で、宿主細胞の細胞膜周辺腔において生成されても、又は宿主細胞から培地中に直接分泌されてもよい。抗体が細胞内で生成される場合、例えば、遠心分離又は限外濾過により、粒子状の残屑を最初に除去する。C a r t e r ら、B i o T e c h . 、10巻、163~167頁(1992年)は、大腸菌の細胞膜周辺腔中に分泌される抗体を単離するための手順を記載している。簡潔に述べると、細胞のペーストを酢酸ナトリウム(pH 3 . 5)、E D T A 、及びフッ化フェニルメチルスルホニル(P M S F)の存在下で約30分間、解凍する。細胞残屑は遠心分離によって除去することができる。抗体が培地中に分泌される場合は、このような発現系からの上清を、市販のタンパク質濃縮フィルタ、例えば、A m i c o n 又はM i l l i p o r e P e l l i c o n 限外濾過ユニットを用いて濃縮するのが一般的である。タンパク質分解を阻害するために P M S F などのプロテアーゼ阻害剤があらゆる前述のステップに含まれていてもよく、外来性の汚染菌の増殖を防ぐために抗生物質が含まれていてもよい。

40

50

【0195】

[0214]細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及び親和性クロマトグラフィーを用いて精製することができる。プロテインAの親和性リガンドとしての適合性は、抗体に存在するあらゆる免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインAを用いて、ヒト1、2、又は4の重鎖をベースにした抗体を精製することができる（例えば、Lin d m a r k ら、J. Immunol. Meth.、62巻、1~13頁（1983年）を参照されたい）。プロテインGは、マウスの全アイソタイプ及びヒト3に推奨される（例えば、Guss ら、EMBO J.、5巻、1567~1575頁（1986年）を参照されたい）。親和性リガンドが接続するマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他のマトリクスが利用できる。細孔制御ガラス又はポリ（スチレンジビニル）ベンゼンなどの機械的に安定なマトリクスにより、アガロースで実現することができるより速い流速及びより短い処理時間が可能になる。抗体がCH3ドメインを含む場合、Baker bond ABX（商標）樹脂（J. T. Baker；Philadelphia, N. J.）が精製に有用である。イオン交換カラム上の分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE（商標）上のクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラムなど）上のクロマトグラフィー、等電点電気泳動、SDS-PAGE、及び硫酸安塩析など、タンパク質を精製するための他の技術も、回収しようとする抗体に応じて利用できる。

10

【0196】

[0215]あらゆる予備的な精製ステップ（複数可）後、対象の抗体及び汚染物質を含む混合物を、pH約2.5~4.5の間の溶出バッファーを用いて、好ましくは低塩濃度（例えば、塩約0~0.25M）で行う、低pHの疎水性相互作用クロマトグラフィーにかけてもよい。

20

【0197】

[0216]当業者であれば、試料中の1つ又は複数の対象の分析物に特異的である、例えば結合分子又は結合パートナーなどの、抗体に類似の機能を有するあらゆる結合性分子を、本発明の方法及び組成物において用いることができるることも理解していると予想される。適切な抗体様分子の例には、それだけには限定されないが、ドメイン抗体、ユニボディ（unibody）、ナノボディ、サメ抗原反応性タンパク質、アビマー、アドネクチン、アンチカルム（anticalm）、親和性リガンド、フィロマー（phylomer）、アプタマー、アフィボディ、トリネクチンなどが含まれる。

30

【0198】

IV. 使用方法

[0217]本発明は、本明細書の代謝産物の存在又は濃度を用いて、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を決定するための方法を提供する。方法は、本明細書に記載するアッセイ方法によって、患者の血液、血漿、又は血清中の1つ又は複数の代謝産物を測定することを含む。

40

【0199】

[0218]本発明は、患者におけるIBSのための処置が効果的であるか否かを決定するための方法も提供する。方法は、本明細書に記載するアッセイ方法によって、患者の血液、血漿、又は血清中の1つ又は複数の代謝産物を測定することを含む。

【0200】

[0219]ある種の他の態様において、本発明は、IBSと以前に診断された患者を評価するための方法を提供する。方法は、本明細書に記載するアッセイ方法によって、患者の血液、血漿、又は血清中の1つ又は複数の代謝産物を測定することを含む。

50

【実施例】

【0201】

以下の実施例は説明のために提供するものであり、本発明を限定するためではない。

[0220]実施例1

A. セロトニン (5-HT) 及び 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) は酸素に感受性である

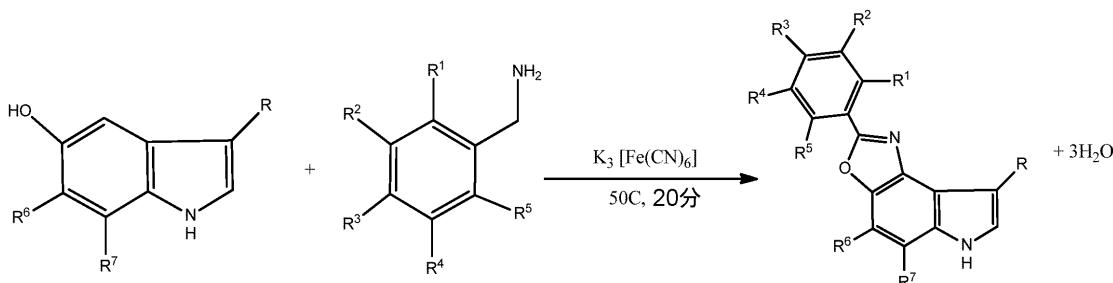
【0202】

[0221] 5-HT 及び 5-HIAA は酸素に感受性であり、非常に不安定である。これらの化合物の分解は、4 で、解凍から約 7 時間で生じる。図 3 は、5-HT 及び 5-HIAA の分解を示す薄層クロマトグラム (TLC) である。5-ヒドロキシインドールの性質は不安定であるため、これらの濃度を測定するアッセイには信頼性がない。図 4 は 5-HT が 1 週間の期間の間不安定であることを示す。

【0203】

B. ベンゾオキサゾールを生成するためのセロトニンの誘導体化

【化33】



10

20

[0222] 上記の反応物を、0.1M CAPS バッファー (pH 11.0)、0.1M p-(アミノメチル)ベンジル化合物、酸化剤 (例えば、0.05M ヘキサシアノ鉄 (II) 酸カリウム又は MnO₂)、及びメタノールを含む (10/11/22/23、v/v/v/v)、等体積の誘導体化混合物と混合した。誘導体化は、室温 (RT) から約 37 で約 5 ~ 約 30 分間行うことができる。このように生成した蛍光のベンゾオキサゾール誘導体は安定であり、TLC プレート上 UV 下で可視化することができる。

【0204】

[0223] 別の一態様において、以下の条件を用いてもよい：0.3M CAPS (pH 12)、0.1M p-(アミノメチル)ベンジル化合物、50mM ヘキサシアノ鉄 (II) 酸カリウム、及びメタノール (1/1/2/2 v/v/v/v)。ある態様において、v/v/v/v 比は、1 ~ 10 / 1 ~ 11 / 2 ~ 22 / 2 ~ 23 の範囲である。誘導体化は、室温 (RT) から約 37 で 5 分 ~ 約 30 分間行ってもよい。

30

【0205】

C. 安定なベンゾオキサゾール誘導体は蛍光性であり、HPLC によって検出することができる

[0224] ベンゾオキサゾール誘導体は、安定で、蛍光性であり、TLC プレート上 UV 下で可視化することができる (図 5)。安定なベンゾオキサゾール誘導体は、HPLC により高感度で検出することができる。試料の調製：血清 50 μl を誘導体化混合物 50 μl と、約 20 (室温) ~ 約 37 の温度で 5 ~ 30 分間インキュベートする。アセトニトリル (ACN) でタンパク質除去し (1:2 v/v の血清: ACN)、14,000 rpm で 20 分間遠心分離し、0.2 μl でろ過し、50 μl を注入する；HPLC 方法：カラム：逆相、C18 カラム：図 6 は、5-HT を分離する HPLC クロマトグラムを示す。図 7 は、5-HIAA の HPLC を示す。

40

【0206】

[0225] 実施例 2：5-HT のベンゾオキサゾール誘導体及びそのビオチン化誘導体の合成

【0207】

[0226] 以下のスキームは、I6、I7、及び I8 の合成を説明するものである：

I6 : 4-(8-(2-アミノエチル)-6H-オキサゾロ[4,5-e]インドール-2-イル)-N-(4-(5-(2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]

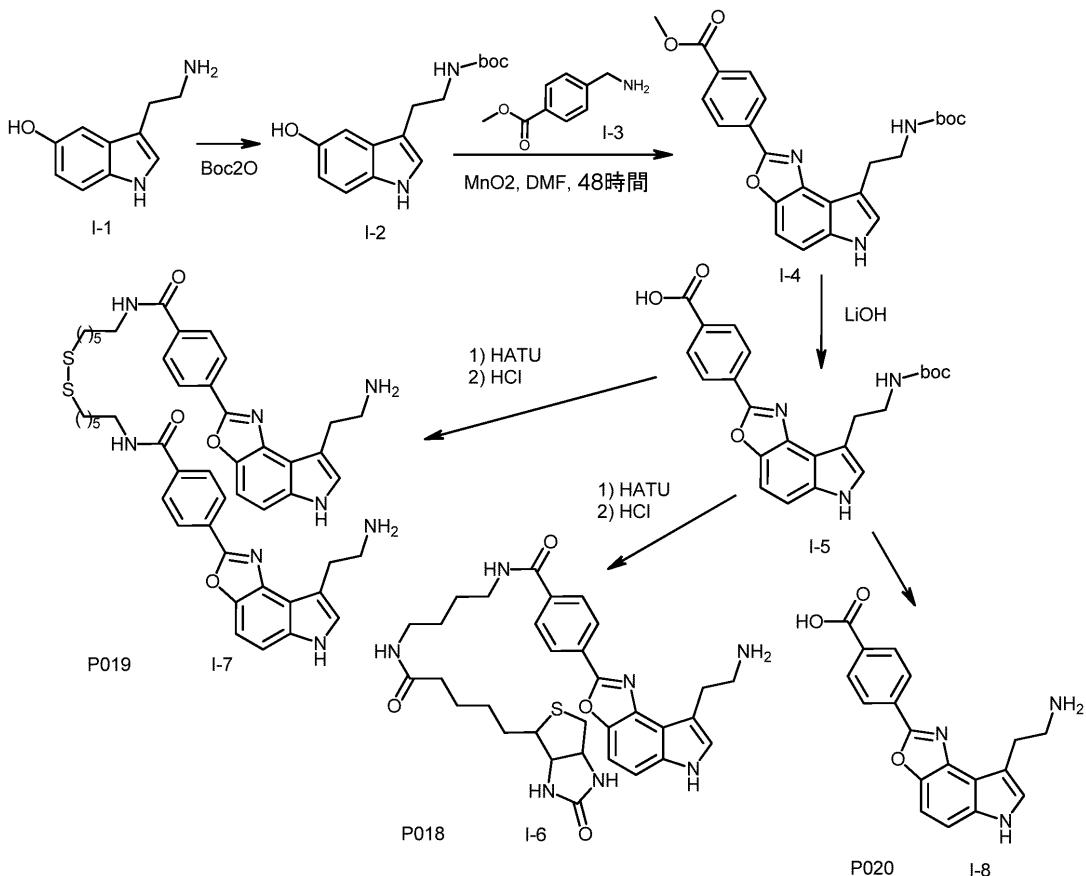
50

イミダゾール - 4 - イル) ペンタンアミド) プチル) ベンズアミド、
 I 7 : N, N' - (ジスルファンジイルビス(エタン - 2, 1 - ジイル)) ビス(4 - (8 - (2 - アミノエチル) - 6 H - オキサゾロ[4, 5 - e] インドール - 2 - イル) ベンズアミド) との 4 - (8 - (2 - アミノエチル) - 6 H - オキサゾロ[4, 5 - e] インドール - 2 - イル) - N - (4 - (5 - (2 - オキソヘキサヒドロ - 1 H - チエノ[3, 4 - d] イミダゾール - 4 - イル) ペンタンアミド) プチル) ベンズアミド化合物(1 : 1)、

I 8 : 4 - (8 - (2 - アミノエチル) - 6 H - オキサゾロ[4, 5 - e] インドール - 2 - イル) - N - (4 - (5 - (2 - オキソヘキサヒドロ - 1 H - チエノ[3, 4 - d] イミダゾール - 4 - イル) ペンタンアミド) プチル) ベンズアミド

10

【化 34】



20

30

【0208】

[0227]ステップ1: 0 の MeOH(30ml)中の化合物I-1(2.3g、10.8mmol)に、トリエチルアミン(3.3ml、23.4mmol)を加え、次いでMeOH中Boc₂O(3.47ml、16.2mmol)を滴下添加した。混合物を室温に温め、さらに2時間攪拌し、次いで濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製して、所望のboc生成物I-2(2.88)を黄色の油状物として得た。

40

【0209】

[0228]ステップ2: 化合物I-2(2,36g、8.55mmol)及び化合物I-3(2.82g、17.1mmol)を、DMF(30ml)中のMnO₂(5.98g、68.4mmol)と1日間攪拌した。混合物をろ過し、水と酢酸エチルとの間で分配した。有機層を分離し、精製して黄色固体のI-4(510mg)を得た。MS: 436.0(M+H)⁺。

【0210】

[0229]ステップ3: I-5(510mg、1.15mmol)を、THF(10ml)及び水(4ml)中のLiOH·H₂O(0.98g、23.4mmol)と1日間攪拌し、飽和NaHSO₄によって酸性化し、酢酸エチルで抽出し、濃縮して黄色固体(0.

50

5 g)を得た。

【0211】

[0230]ステップ4：無水DMF(1.5ml)中の化合物1-5(71mg、0.17mmol)に、化合物38(62mg、0.2mmol)、TEA(0.04ml、0.26mmol)及びHATU(103mg、0.26mmol)を加えた。混合物を3時間攪拌し、次いで酢酸エチルと水との間で分配した。次いで、有機層を分離し、濃縮した。粗製物を、DCM/MeOH(90/10)で溶出するシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して所望の生成物(35mg)を得、これをMeOH(2ml)中の6N HClで4時間処理し、次いで濃縮して所望の化合物I-6(30mg)を得た。MS: 618.0(M+H)⁺、4-(8-(2-アミノエチル)-6H-オキサゾロ[4,5-e]インドール-2-イル)-N-(4-(5-(2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ブチル)ベンズアミド。

【0212】

[0231]ステップ5：無水DMF(2ml)中の化合物I-5(100mg、0.23mmol)に、化合物32(53mg、0.16mmol)、TEA(0.11ml、0.8mmol)及びHATU(180mg、0.48mmol)を加えた。混合物を一夜攪拌し、次いで酢酸エチルと水との間で分配した。次いで、有機層を分離し、濃縮した。粗製物を、DCM/酢酸エチル(10/1)で溶出するシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して所望の生成物(30mg)を得、これをジオキサン(2ml)中の4N HClで一夜処理し、次いで濃縮して所望の化合物I-7(12.4mg)を得た。MS: 872.2(M+H)⁺、N,N'-(ジスルファンジイルビス(エタン-2,1-ジイル))ビス(4-(8-(2-アミノエチル)-6H-オキサゾロ[4,5-e]インドール-2-イル)ベンズアミド)(1:1)との4-(8-(2-アミノエチル)-6H-オキサゾロ[4,5-e]インドール-2-イル)-N-(4-(5-(2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ブチル)ベンズアミド化合物。

【0213】

[0232]ステップ6：I-5(50mg、0.12mmol)を、ジオキサン(2ml)及びDCM(2ml)中の4N HClと一緒に攪拌し、次いで濃縮して所望の生成物I-8(26mg)を得た。MS: 322.0(M+H)⁺、4-(8-(2-アミノエチル)-6H-オキサゾロ[4,5-e]インドール-2-イル)-N-(4-(5-(2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ブチル)ベンズアミド。

【0214】

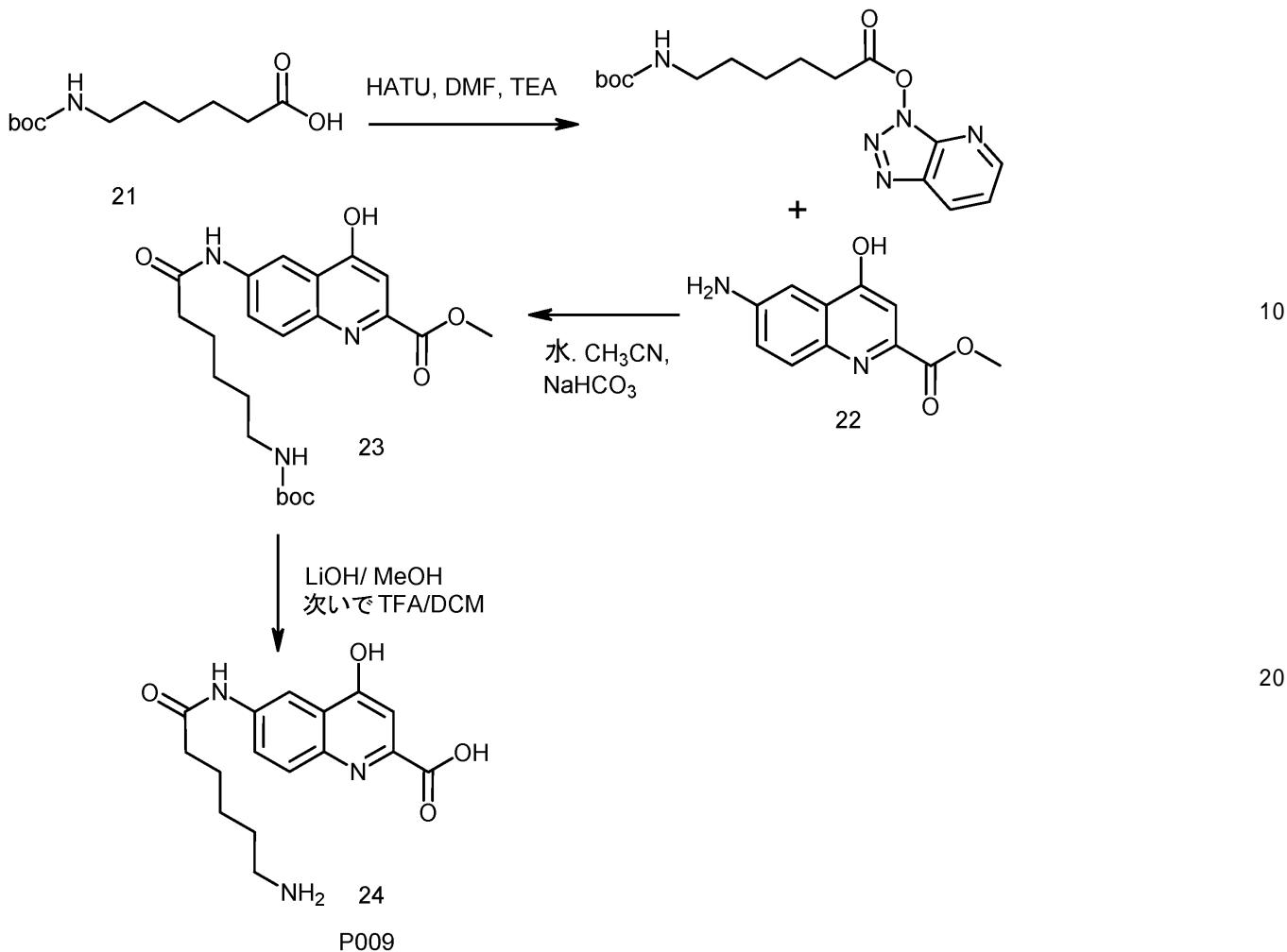
[0233]実施例3：リンカーを有するキヌレン酸の合成及びビオチン化化合物24：6-(6-アミノヘキサンアミド)-4-ヒドロキシキノリン-2-カルボン酸

10

20

30

【化35】



【0215】

[0234]ステップ1：boc-アミノ-ヘキサン酸（21、277mg、1.2mmol）、DIPPEA（0.21ml、1.2mmol）及びHATU（456mg、1.2mmol）の混合物を、DCM（5ml）及びアセトニトリル（5ml）中で30分間攪拌した。

【0216】

[0235]ステップ2：水（5ml）及びアセトニトリル（5ml）の混合物中の化合物22（218mg、1mmol）に、NaHCO₃（840mg、10mmol）を加え、続いて激しく攪拌しながら、ステップ1からの反応混合物をゆっくり加えた。その後混合物をさらに4時間攪拌し、次いで、飽和NaHSO₄によって酸性化し、これにより沈澱が生じた。固体をろ過して中間物質23を生じた。

【0217】

[0236]ステップ3：ステップ2からの固体23を、60℃で4時間、MeOH（10ml）中のLiOH·H₂O（410mg、10mmol）と攪拌し、次いでNaHSO₄飽和溶液によってpH3に酸性化し、濃縮した。得られた固体をろ過し、水で洗浄し、乾燥させた。次いで、これをDCM（2ml）中に懸濁し、続いてTFA（2ml）を加えた。スラリーを室温で4時間攪拌し、次いで濃縮した。得られた固体を酢酸エチル（30ml）と5分間攪拌し、不溶物をろ過し、酢酸エチルで洗浄し、乾燥させて、灰色固体の所望の生成物24（120mg）を得た。MS: 318.0 (M+H)⁺ 6- (6-アミノヘキサンアミド)-4-ヒドロキシキノリン-2-カルボン酸。

化合物27の合成：4-ヒドロキシ-6-(6-(5-((3aS,4S,6aR)-2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ヘキサンアミド)ヘキサンアミド)キノリン-2-カルボン酸。

10

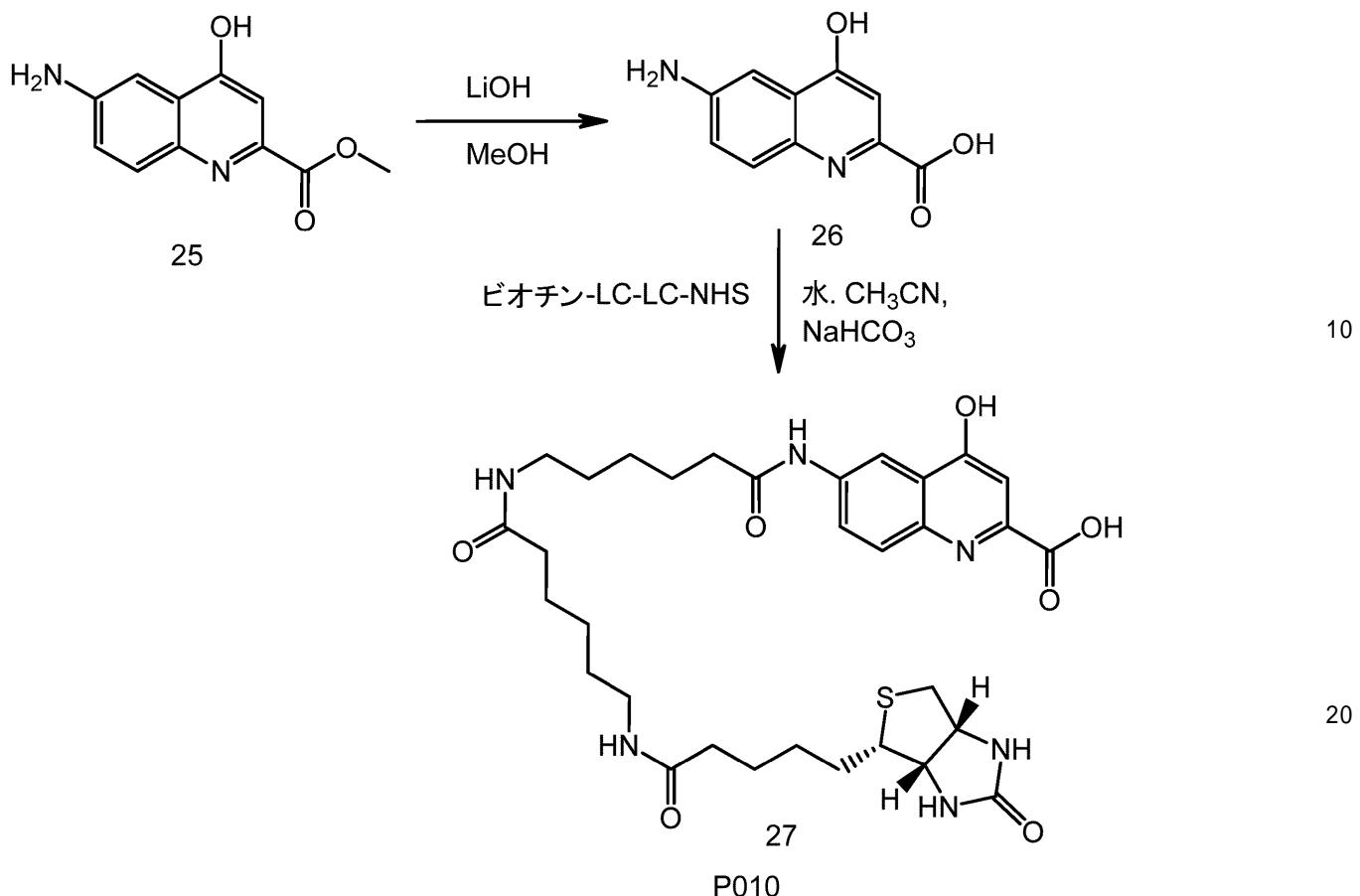
20

30

40

50

【化36】



【0218】

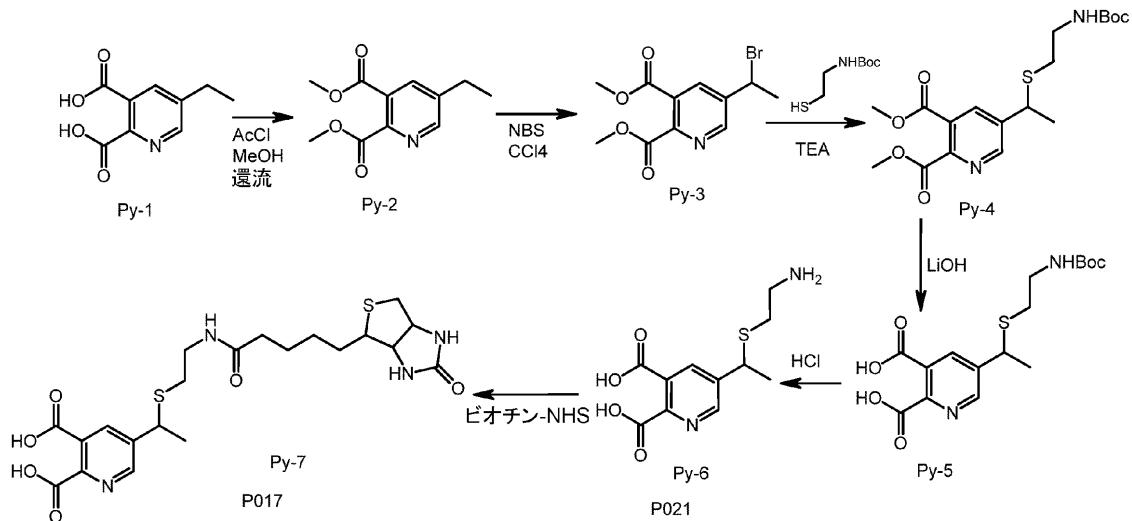
[0237] 化合物25 (327mg、1.5mmol) 及びLiOH·H₂O (430mg、10mmol) の混合物を、MeOH (10ml) 中で一夜攪拌し、次いで、6N HCl でpH7に慎重に酸性化し、濃縮してMeOHを除去した。次いで、粗製物をアセトニトリル及び水 (10ml/10ml) で希釈し、NaHCO₃ (1.26g) を加え、引き続きビオチン-LC-LC-NHS (852mg、1.5mmol) を加えた。混合物を1日間激しく攪拌し、6N HCl によって酸性化し、得られた固体をろ過し、MeOH、引き続き水で洗浄し、次いで、乾燥させて純粋な化合物27 (140mg)を得た。MS: 657.2 (M+H)⁺、4-ヒドロキシ-6-((6-((5-((3aS,4S,6aR)-2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ヘキサンアミド)ヘキサンアミド)キノリン-2-カルボン酸。

【0219】

[0238] 実施例4：リンカーを有するキノリン酸の合成及びビオチン化
Py-6:5-(1-((2-アミノエチル)チオ)エチル)ピリジン-2,3-ジカルボン酸、及びPy7:5-(1-((2-(5-(2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)エチル)チオ)エチル)ピリジン-2,3-ジカルボン酸の合成

40

【化37】



【0220】

[0239]ステップ1：MeOH（100ml）中のpy-1（5.0g、25.6mmol）に、AcCl（20ml、230mmol）を30分かけて注意深く加えた。次いで、混合物を一夜還流し、次いで濃縮し、MeOH（100ml）中に再溶解し、AcCl（20ml）を加えた。混合物を再び1日間還流し、濃縮し、水及び酢酸エチル中で分配した。有機層を、飽和NaHCO₃で洗浄し、乾燥させ、濃縮して、ジメチルエステルpy-2（3.1g）を得た。

【0221】

[0240]ステップ2：CCl₄（50ml）中のpy-2（3g、13.4mmol）を、NBS（2.4g、13.5mmol）と、AIBN（100mg）の存在下で8時間還流した。固体をろ過し、溶液を濃縮して黄色がかった油状物（py-3）を得た。MS：301.9（M+H）⁺。この材料を、さらなる精製をせずに、次のステップに用いた。

【0222】

[0241]ステップ3：DCM（30ml）中の上記油状物に、BocNHCH₂CH₂S（2.74g、15mmol）を加え、それとともにトリエチルアミン（2.1ml、15mmol）及びDBU（2.28g、15mmol）を加えた。混合物を室温で一夜攪拌し、水と酢酸エチルとの間で分配した。有機層を単離し、ヘキサンと酢酸エチルとの混合溶媒でのカラムクロマトグラフィーにより単離し、精製して、所望の化合物py-4（2.9g）を得た。MS：399.0（M+H）⁺。

【0223】

[0242]ステップ4：py-4（2.1g、5.3mmol）の混合物を、MeOH（20ml）中のLiOH·H₂O（2.22g、10eq.）と1日間攪拌し、飽和NaHSO₄によりpH3に酸性化し、酢酸エチルで抽出した。有機層を分離し、濃縮して所望の生成物（py-5、1.7g）を得た。MS：371.1（M+H）⁺。

【0224】

[0243]ステップ5：py-5（0.5g、1.35mmol）を、ジオキサン（4N、10ml）中のHClと2時間攪拌し、濃縮したところ、py-6としての油状物（HCl塩）が形成された。MS：271.0（M+H）⁺、5-（1-（（2-アミノエチル）チオ）エチル）ピリジン-2,3-ジカルボン酸。

【0225】

[0244]ステップ6：MeOH（3ml）中のHCl塩形態のpy-6（200mg、0.88mmol）に、DIPSEA（1ml、5.5mmol）を加え、引き続きビオチン-NHS（341mg、1.0mmol）を加えた。混合物を室温で12時間攪拌し、次いで濃縮し、HPLCによって精製して所望の生成物py-7（85mg）を得た。MS

10

20

30

40

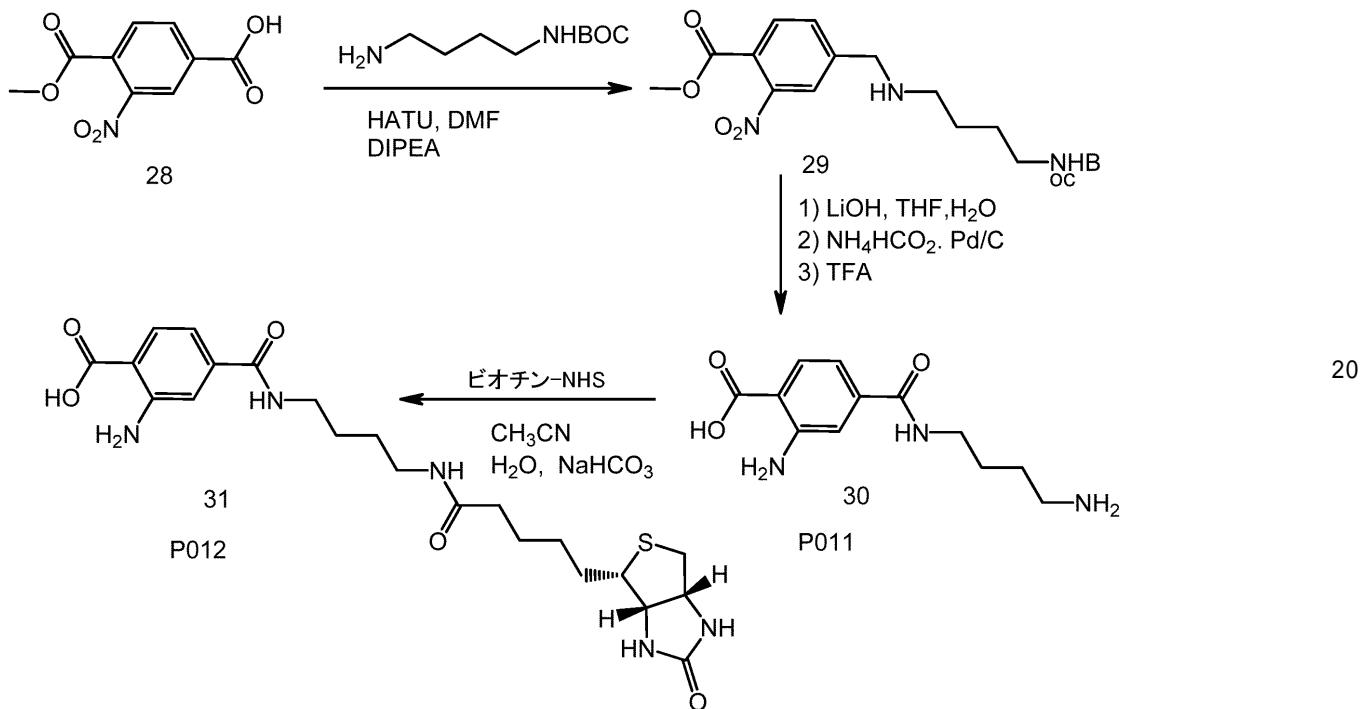
50

: 497.1 ($M + H$)⁺、5-(1-((2-(5-(2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)エチル)チオ)エチル)ピリジン-2,3-ジカルボン酸。

【0226】

[0245]実施例5：リンカーを有するアントラニル酸及びビオチン化誘導体の合成
化合物30：2-アミノ-4-((4-アミノブチル)カルバモイル)安息香酸、及び
化合物31：2-アミノ-4-((4-(5-((3aS,4S,6aR)-2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ブチル)カルバモイル)安息香酸の合成

【化38】



【0227】

[0246]ステップ1：無水DMF(12ml)中の、Boc-4-アミノブチルアミン(564mg、3mmol)、化合物28(675mg、3mmol)、DIPEA(0.8ml、4.5mmol)、HATU(1.52g、4mmol)の混合物を室温で12時間攪拌した。次いで、これを水と酢酸エチルとの間で分配した。有機層を単離し、飽和NaHSO₄、及び6N NaOHで洗浄し、次いで濃縮させて化合物29を油状物として得た。

【0228】

[0247]ステップ2：この油状物を、THF(20ml)及び水(0.5ml)の混合物中のLiOH·H₂O(1.4g、30mmol)と2日間攪拌し、飽和NaHSO₄によって酸性化し、酢酸エチルで抽出し、濃縮し、さらなる精製をせずに次のステップに用いた。

【0229】

[0248]ステップ3：ステップ2からの材料をエタノール(30ml)中に溶解し、Pd/C(200mg)及びNH₄HCO₃(3.78g、60mmol)を加えた。スラリーを還流下で3時間攪拌し、次いでろ過し、濃縮して固体を得た。副生成物をDCM/MeOHからさらに沈殿させ、ろ去し、母液を濃縮して黄色固体を得た。

【0230】

[0249]ステップ4：ステップ3からの黄色固体を、DCM(10ml)中の50%TFAと2時間攪拌した。これを濃縮し、HPLCによって精製して、黄色粉末の所望の生成物30(500mg)を得た。MS: 252.0 ($M + H$)⁺、2-アミノ-4-((4

10

20

30

40

50

- アミノブチル) カルバモイル) 安息香酸。

【0231】

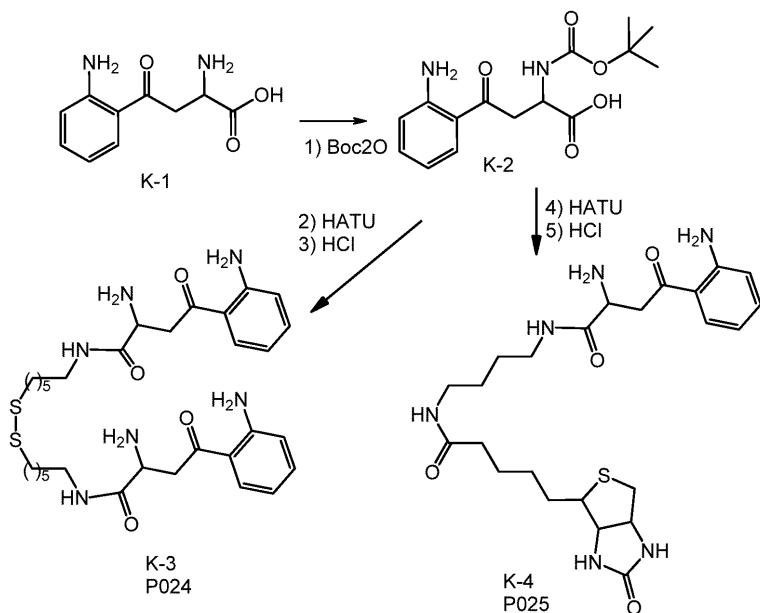
[0250]ステップ5：水中50%アセトニトリル(4ml)中の化合物30(250mg、0.68mmol)に、NaHCO₃(172mg、1.5eq)を加え、引き続きビオチン-NHS(232mg、0.68mmol)を加えた。混合物を室温で一夜攪拌し、次いで4N HClによって酸性化し、濃縮し、HPLCによって精製して所望の生成物31(158mg)、2-アミノ-4-((4-(5-((3aS,4S,6aR)-2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペントンアミド)ブチル)カルバモイル)安息香酸を得た。

【0232】

[0251]実施例6：キヌレニンのビオチン化誘導体の合成

K4：N-(4-(2-アミノ-4-(2-アミノフェニル)-4-オキソブタンアミド)ブチル)-5-(2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペントンアミドの合成

【化39】



【0233】

[0252]ステップ1：アセトニトリル及び水(10ml/20ml)の混合物中のDL-キヌレニン(DL-kyneurine)(K-1、1.0g、4.8mmol)に、二炭酸ジ-t-ブチル(2.18g、10mmol)を加え、引き続き炭酸水素ナトリウム(1.2g、20mmol)を加えた。スラリーを室温で1日間攪拌し、NaHSO₄飽和溶液によってpH3に酸性化した。粗製物を酢酸エチルにより抽出し、ヘキサン及び酢酸エチルを用いたクロマトグラフィーによって精製して所望の生成物(1.5g)を得た。

【0234】

[0253]ステップ2：DMF(2ml)中のK-1(330mg、1.3mmol)、化合物32(219mg、0.65mmol)の混合物に、HATU(760mg、2mmol)及びTEA(0.278ml、2.0mmol)を加えた。混合物を室温で24時間攪拌し、ヘキサン及び酢酸エチルを用いたクロマトグラフィーにより精製して、所望の生成物220mgを得た。

【0235】

[0254]ステップ3：ステップ2からの材料を、ジオキサン(10ml)中の4N HClと2時間攪拌し、次いで濃縮し、HPLCによって精製して所望の生成物K-3のHCl塩(118mg)を得た。MS: 645.1 (M+H)⁺。

【0236】

10

20

30

40

50

[0255]ステップ4：D M F (5 ml)中のK-1 (650 mg、1.6 mmol)、化合物38 (500 mg、1.6 mmol)の混合物に、H A T U (1.14 g、3 mmol)及びT E A (0.418 ml、3.0 mmol)を加えた。混合物を室温で24時間攪拌し、酢酸エチルで抽出し、次いで水で洗浄して、粗製生成物として760 mgの油状物を得た。

【0237】

[0256]ステップ5：ステップ4からの材料を、D C M中50%T F A (10 ml)と8時間攪拌し、次いで濃縮し、H P L Cによって精製して、所望の生成物K-4のT F A塩 (200 mg)を得た。M S : 505.1 (M + H)⁺、N- (4- (2-アミノ-4- (2-アミノフェニル)-4-オキソブタンアミド)ブチル)-5- (2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ [3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド。

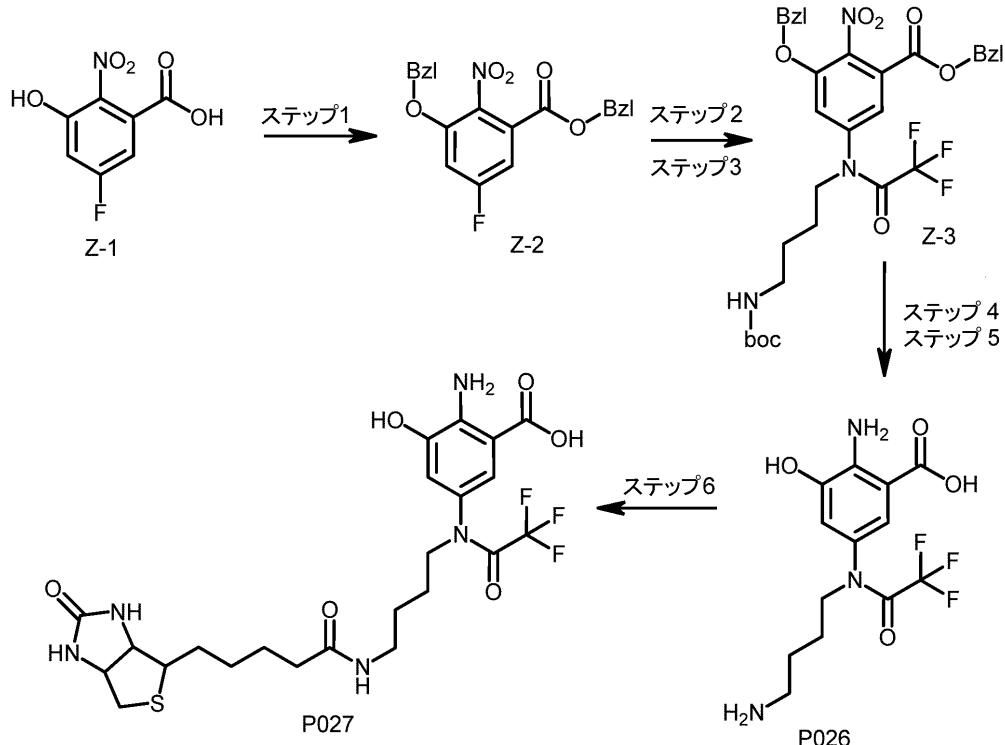
10

【0238】

[0257]実施例7：リンカーを有する3-ヒドロキシアントラニル酸の合成
P026 : 2-アミノ-5- (N- (4-アミノブチル)-2,2,2-トリフルオロアセトアミド)-3-ヒドロキシ安息香酸、
化合物P027 : 2-アミノ-3-ヒドロキシ-5- (2,2,2-トリフルオロ- N- (4- (5- (2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ [3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ブチル)アセトアミド)安息香酸の合成

20

【化40】



30

【0239】

[0258]ステップ1：無水D M F (16 ml)中のZ-1 (1.45 g、7.2 mmol)に、臭化ベンジル (1.9 ml、15.9 mmol)及びK₂CO₃ (2.51 g、18.1 mmol)を加えた。混合物を60°で4時間攪拌した。次いで、粗製物を酢酸エチル及び水で希釈した。有機層を分離し、食塩水で洗浄し、濃縮し、ヘキサン/酢酸エチルで溶出するカラムクロマトグラフィーにより精製してZ-2 (2.2 g)を得た。

40

【0240】

[0259]ステップ2：Z-2 (1.5 g、4 mmol)及びB o c N H - (C H₂)₄ N H₂ (0.9 g、4.8 mmol)及びトリエチルアミン (1.3 ml、9.6 mmol)の混合物を、アセトニトリル (20 ml)中100°で1日間加熱した。粗製物を濃縮し、ヘキサン/酢酸エチルで溶出するカラムクロマトグラフィーにより精製して置換生成

50

物 (replacement product) 1.0 g を得た。MS : 450.1 (M - Boc + H)⁺。

【0241】

[0260]ステップ3: DCM (10 ml) 中の上記の生成物 (1 g、1.8 mmol) に、トリエチルアミン (1.0 ml、4 eq) 及び無水トリフルオロ酢酸 (0.5 ml、3.6 mmol) を加えた。混合物を室温で30分間攪拌した。粗製物を濃縮し、カラムクロマトグラフィーにより精製して所望の生成物Z-3 (1.2 g)を得た。

【0242】

[0261]ステップ4: エタノール (10 ml) 中のZ-3 (1.17 g、1.8 mmol) に、Pd/C (380 mg) 及びギ酸アンモニウム (0.7 g、1.1 mmol) を加えた。混合物を1時間還流し、次いでろ過して触媒を除去した。次いで、溶液を濃縮し、カラムクロマトグラフィーにより精製して所望の中間物質 (480 mg)を得た。MS : 436.0 (M + H)⁺。

【0243】

[0262]ステップ5: 上記の中間物質をジオキサン (3 ml) 中の4N HCl 中で1時間攪拌し、形成した固体をろ過し、エーテルで洗浄し、乾燥させてCRN-P026 (260 mg)を得た。MS : 336.0 (M + H)⁺、2-アミノ-5-(N-(4-アミノブチル)-2,2-トリフルオロアセトアミド)-3-ヒドロキシ安息香酸。

【0244】

[0263]ステップ6: DMF (5 ml) 中のCRN-P026 (130 mg、0.35 mmol) に、トリエチルアミン (0.19 ml、1.4 mmol) 及びビオチン-NHS (120 mg) を加えた。混合物を室温で1日間攪拌した。反応混合物を濃縮し、粗製物をLCによって精製してCRN-P027 (150 mg)を得た。MS : 562.0 (M + H)⁺、2-アミノ-3-ヒドロキシ-5-(2,2,2-トリフルオロ-N-(4-(5-(2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ブチル)アセトアミド)安息香酸。

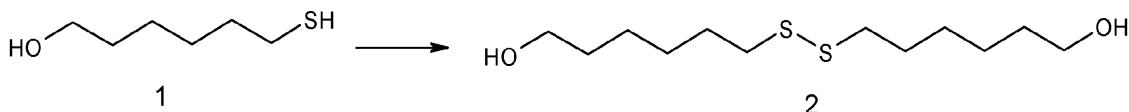
【0245】

[0264]実施例8: リンカーを有する短鎖脂肪酸の合成
P002: 6,6'-ジスルファンジイルビス(ヘキサン-1-オール)の合成

【0246】

1) ジスルフィド類似体

【化41】



[0265]酢酸エチル (100 ml) 中の化合物1 (5 g、37 mmol) に、I2を8粒子加え、引き続き、I2の赤色が持続するまで、過酸化水素 (31%) をゆっくり加えた。次いで、溶液を飽和Na2S2O3で洗浄し、乾燥させ、濃縮して黄色の油状物を得、これを室温に放置して徐々に固化させた (4.4 g)。TLCにより、生成物は、出発材料より極性が低く、わずかにUV陽性であることが示された。

【0247】

2) エステルの形成

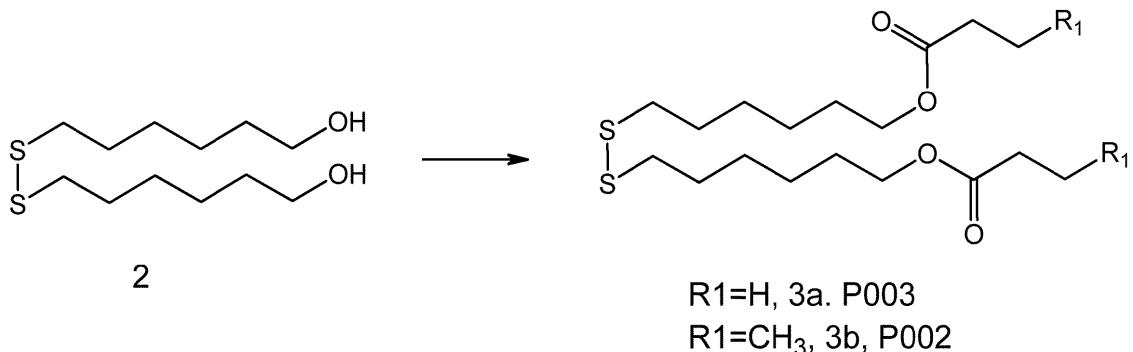
10

20

30

40

【化42】

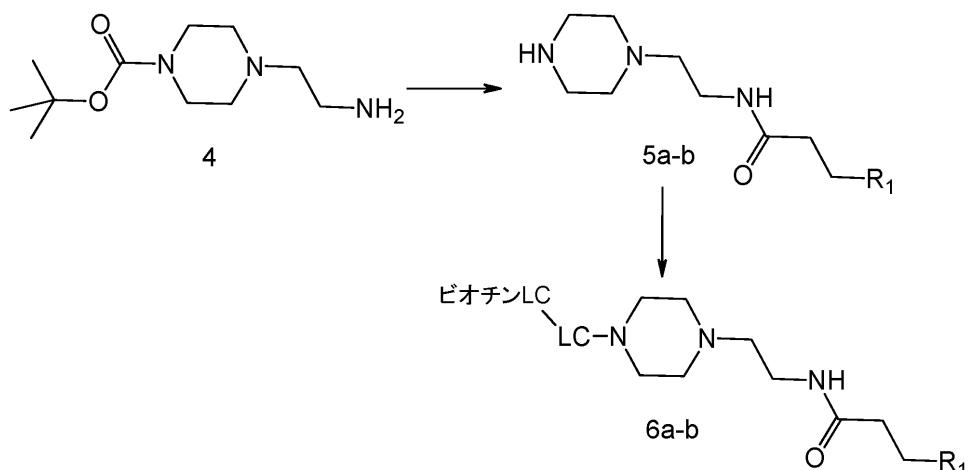


[0266] DCM (5 ml) 中の化合物 2 (470 mg, 1,77 mmol) に、塩化プロピオニル (0.337 ml, 2.4 eq) を加え、引き続きトリエチルアミン (0.511 ml, 2.4 eq) 及び DMAP 10 mg を加えた。混合物を室温で 1 時間攪拌し、濃縮した。次いで、粗製物を酢酸エチル/ヘキサン (1/9) で溶出するシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより直接精製して、所望の生成物 3a (620 mg) を得た。NMR は構造と一致する。

【0248】

[0267] DCM (5 ml) 中の化合物 2 (266 mg, 1 mmol) に DMAP 10 mg を加え、次いでトリエチルアミン (0.278 ml, 2 mmol) を加え、引き続き無水 n-酪酸 (0.326 ml, 2 mmol) を加えた。次いで、混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いでさらなる酢酸エチルで希釈した。有機層を飽和 NaHCO₃、NaHSO₄ で洗浄し、乾燥させ、濃縮して所望の生成物 3b (380 mg) を得た。NMR : パス。
P006 : (N-(6-(4-(2-アセトアミドエチル)ピペラジン-1-イル)-6-オキソヘキシル)-6-(5-(2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ヘキサンアミド、
P007 : N-(6-(4-(2-ホルムアミドエチル)ピペラジン-1-イル)-6-オキソヘキシル)-6-(5-(2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ヘキサンアミドの合成

【化43】



a: R1=H, P007
b: R1=CH₃, P006

DCM (3 ml) 中の化合物 4 (183 mg, 0.8 mmol) に、DIPPEA (0.278 ml, 2 eq)、次いで、塩化プロピオニル (130 mg, 1 mmol) を加えた。反応を室温で 1 時間攪拌した。混合物を濃縮し、酢酸エチルと水との間で分配し、酢酸

10

20

30

40

50

エチル層を分離し、乾燥させ、濃縮し、次いでジオキサン（4N、2m1）中のHClを加えた。混合物を室温で1時間攪拌し、濃縮して粗製物5aを得た。次いで、これを無水DMF（5m1）で希釈し、加え、引き続きDIPSEA（0.278m1、1.6mmol）、次いで（ビオチン-LC-LC-NHS（454mg、0.8mmol）を加えた。混合物を室温で12時間攪拌した。混合物を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。有機物を濃縮し、次いでHPLCによって精製して所望の生成物6a（390mg）を得た。NMR：パス。

【0249】

[0268]無水n-酪酸を用いた点以外は同じ手順を6bの調製に用いて、所望の生成物6a（390mg）を得た。NMR：パス

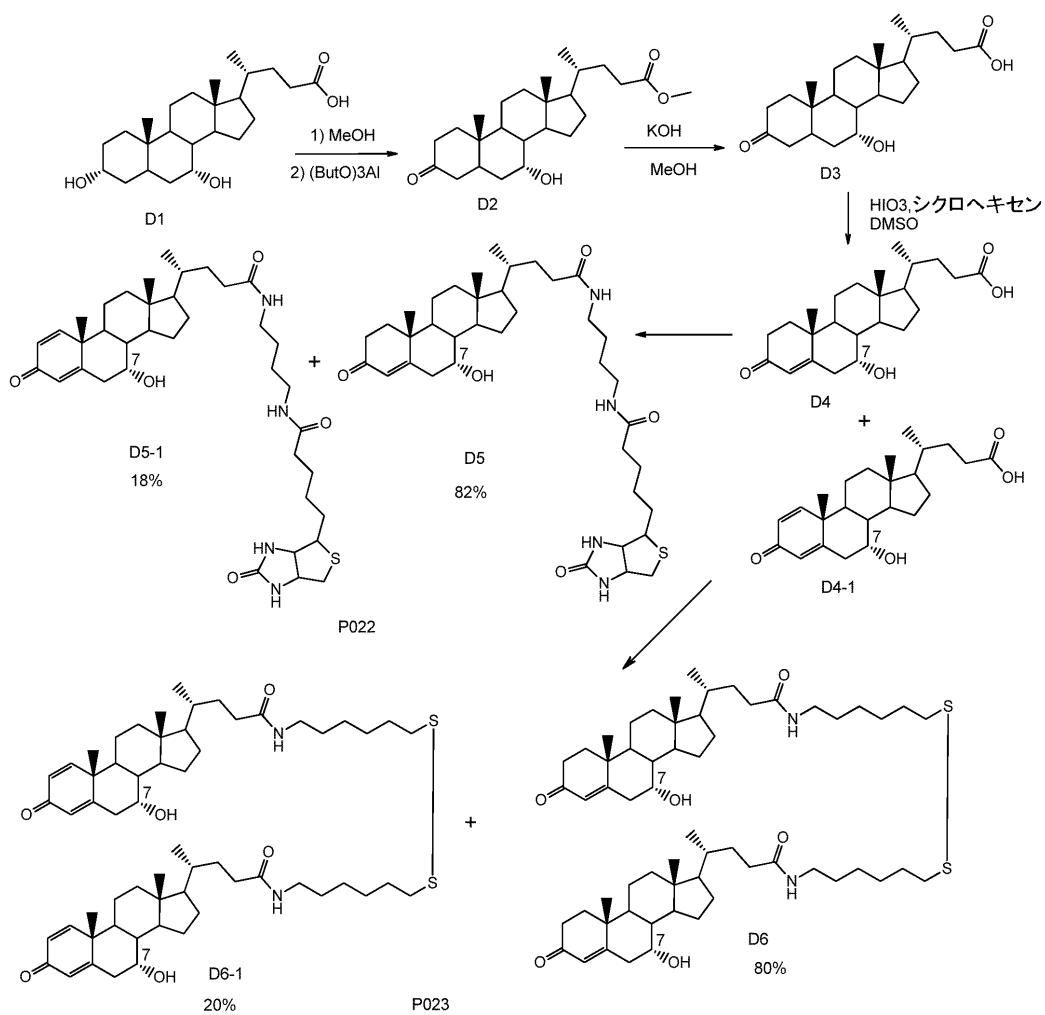
10

【0250】

[0269]実施例9：7-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オン誘導体（Chol-D）の合成

P022：(D5) (4R)-4-((7R,10R,13R)-7-ヒドロキシ-10,13-ジメチル-3-オキソ-2,3,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-テトラデカヒドロ-1H-シクロヘキセンタ[а]フェナントレン-17-イル)-N-(4-(5-(2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル)ペンタンアミド)ブチル)ペンタンアミドの合成

【化44】



【0251】

[0270]ステップ1：MeOH（90m1）中の化合物D1（9.0g、23.0mmol）に、H₂SO₄（3.0m1）を加えた。得られた反応混合物を95℃で4時間還流した。反応溶液を濃縮し、EtOAc中に溶解し、NaHCO₃飽和溶液で洗浄した。有機層をMgSO₄で乾燥させ、ろ過し、濃縮して所望のメチルエステル生成物（9.2g）を得た。

50

)を得た。この材料(6.0g、14.8mmol)を引き続き、トルエン(180mL)及びアセトン(78mL)中のAl(Ot-Bu)₃(7.3g、29.7mmol)と合わせた。得られた混合物を95~100℃で17時間還流した。反応混合物を2.0M H₂SO₄(100mL)で処理し、水及びNaHCO₃飽和溶液で洗浄した。有機層をMgSO₄で乾燥させ、ろ過し、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムにより精製して化合物D2(3.0g)を得た。

【0252】

[0271]ステップ2：化合物D2(2.5g、6.2mmol)をKOH(50mL)と合わせ、得られた混合物を周囲温度で17時間攪拌した。反応混合物をpHがあよそ3になるまで2.0HClで処理し、これをEtOAcで引き続き抽出した。有機層を食塩水で洗浄し、乾燥させ、濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムによって精製して黄色固体の所望の生成物D3を得た(2.16g)。

10

【0253】

[0272]ステップ3：HIO₃(3.52g)をDMSO(20mL)と合わせ、得られた混合物を、80℃で1時間、暗所で加熱した。DMSO(5.6mL)及びシクロヘキサン(1.44mL)中の化合物D3(2.16g、5.56mmol)の混合物に、予め調製したHIO₃溶液を加え、得られた混合物を、45℃で17時間、暗所で加熱した。反応混合物を水50mLに吸収させ、EtOAcで抽出した。有機層を乾燥させ、ろ過し、濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムにより精製して、分離できない副生成物D4-1とともに、所望の生成物D4を得た(0.58g)。

20

【0254】

[0273]ステップ4：D4及びD4-1(0.64mmol、250mg)、HATU(0.64mmol、243mg)、並びに化合物38の混合物を、DMF(5mL)と合わせた。トリエチルアミン(0.71mmol、0.097mL)を滴下添加した。得られた混合物を周囲温度で2時間攪拌した。反応混合物をNaHCO₃飽和溶液に吸収させ、EtOAcで抽出し、MgSO₄で乾燥させ、ろ過し、濃縮した。残渣を、シリカゲルカラムによって引き続き精製して、分離できない副生成物D5-1とともに、所望の生成物D5を得た(95mg、¹H NMRによって決定した比率82:18)。MS: 685.4(M+H)⁺。

30

【0255】

[0274]ステップ5：D4及びD4-1(0.73mmol、284mg)、HATU(0.73mmol、277mg)、並びに化合物32の混合物を、DMF(5mL)と合わせた。トリエチルアミン(1.46mmol、0.25mL)を滴下添加した。得られた混合物を周囲温度で1時間攪拌した。反応混合物を水に吸収させ、EtOAcで抽出し、MgSO₄で乾燥させ、ろ過し、濃縮した。残渣を、シリカゲルカラムによって引き続き精製して、分離できない副生成物D6-1とともに、所望の生成物D6を得た(165mg、¹H NMRによって決定した比率80:20)。MS: 503.2(M+H)⁺。

【0256】

[0275]実施例10：経路の代謝産物に対するELISAアッセイ

40

【0257】

[0276]本実施例は、トリプトファン、セロトニン、キヌレニン、胆汁酸代謝、及び短鎖脂肪酸経路における代謝産物など、本明細書に提供する代謝産物に特異的に結合する抗体の產生を記載するものである。本実施例は、これらの抗体を、例えば、患者の血清などの試料中の代謝産物を検出するための免疫ベースのアッセイなどのアッセイにおいて用いることができるることも示す。

【0258】

[0277]本明細書において、免疫原性のコンジュゲート(例えば、抗原)として働く、合成で作成した代謝産物の類似体(ハプテン)に対して產生された、新規な抗体をベースとした競合ELISAを提供する。類似体を、小分子を突出させ、ハプテンに特異的な免疫

50

応答を誘発するためのリンカーを用いて特異的にデザインした。図8は、患者の血清中の経路の代謝産物を検出するのに用いた、競合ELISAの例示的な実施形態を提供する。ストレプトアビジンプレートを、対象のビオチン化ハプテン（例えば、ビオチン化Ser-D）でコーティングすることにより、アッセイプレートを作成した。セロトニン及びその誘導体などの代謝産物を安定化するために、患者の試料を誘導体化混合物で誘導体化した。誘導体化した患者の血清を、次いで、対象の代謝産物（ハプテン）に対する抗体（例えば、抗-Ser-D抗体）と混合し、次いでプレートに移した。プレートを室温で1時間インキュベートした。プレートを、洗浄バッファーで数回洗浄した。ヤギ抗ウサギ抗体-HRPコンジュゲートなどの二次抗体を加え、プレートを室温で1時間インキュベートした。プレートを、洗浄バッファーで数回洗浄した。基質溶液を呈色反応用に加えた。停止溶液を加えて、基質反応を停止させた。次いで、プレートを、405nmの分光光度計で読み取った。

10

【0259】

[0278]上記に記載した実施例に記載したハプテンをベースにして免疫原性コンジュゲートを作成した。簡潔に述べると、経路の代謝産物又はその誘導体を、リンカーアームとコンジュゲートさせた。リンカーアームのフリーの末端を、アミノ又はチオール活性化により担体タンパク質に連結した。得られたハプテンを、次いで、経路の代謝産物又はその誘導体に対する抗体を産生するための抗原として用いた。例えば、Antibodies、A Laboratory Manual、Harlow及びLane編集、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.（1988年）に記載される通り、当業者には知られている標準方法に従って、ポリクローナル抗体を産生させた。

20

【0260】

[0279]各々の経路の代謝産物又はその誘導体に対する、ビオチン化ハプテンも産生した。リンカーアームを担体タンパク質にコンジュゲートする代わりに、リンカーをビオチンにコンジュゲートした。例えば、セロトニンのビオチン化ベンゾオキサゾール誘導体を、誘導体のフェニル末端にリンカーアームを、及びリンカーの他端にビオチンを含むように化学合成した。

【0261】

[0280]産生した抗体の有効性及び特異性を試験するために、以下のアッセイを用いた。対象のビオチン化ハプテン（2μg/ml）をストレプトアビジンプレート上に、室温で1時間コーティングした。プレートを洗浄し、ブロッキングバッファー（例えば、SuperBlockバッファー）でブロックして、非特異的な結合を最小にした。ウサギ抗血清を段階希釈し（1:100、1:125、1:250、1:500、1:1000）、プレートの個々のウエルに移した。プレートを、軌道を描くように振盪しながら、室温（RT）で約1時間インキュベートした。プレートを洗浄バッファー（例えば、PBST）で数回洗浄した。ヤギ抗ウサギ抗体-セイヨウワサビのペルオキシダーゼ（HRP）コンジュゲートを希釈し（1:5000）、各ウエルに加え、RTで1時間インキュベートした。プレートを洗浄バッファー（例えば、PBST）中で数回洗浄して過剰のHRPコンジュゲートを除去した。呈色基質を加え、プレートをHRP-触媒反応のためにRTでインキュベートして、検出できる色を産生させた（例えば、暗所で15分）。発色後、停止溶液（例えば、4N NaOH）を加えて、基質反応を止めた。プレートを405nmで読み取った。吸光度は、試料中の抗体の量に直接比例した。

30

【0262】

I. セロトニンのベンゾオキサゾール誘導体に対する抗体（Ser-D）

[0281]セロトニンのベンゾオキサゾール誘導体に対する抗体（例えば、実施例2に記載したSer-D）を、誘導体で免疫化したウサギにおいて上首尾に産生させた。ベンゾオキサゾール誘導体に対する抗体が、採血1~5（B1、B2、B3、B4、及びB5）におけるウサギA及びウサギBからの抗血清中で検出された。図9を参照されたい。滴定実験を行って、ウサギA及びBにおいてSer-Dに対して産生させた抗体の親和性を評価

40

50

した(図10)。

【0263】

[0282]図11のBに図示する直接アッセイを用いて、抗血清の交差反応性を試験した。簡潔に述べると、ヒト血清中のセロトニン(5-HT)又はその経路の代謝産物(例えば、5-OH Tryptophan若しくは5-HIAA)を誘導体化し、マルチウエルプレート上に4で一夜、コーティングした。プレートを洗浄バッファーで数回洗浄した。Ser-D抗原に対して産生された抗血清を、プレート上、RTで1時間インキュベートした。プレートを洗浄バッファーで数回洗浄した。ヤギ抗ウサギ抗体-HRPコンジュゲート溶液をプレートに加え、RTで1時間インキュベートした。プレートを洗浄バッファーの中で数回洗浄した。呈色基質を比色定量反応用に加え、停止溶液を加え、その後プレートを405nmで読み取った。抗血清は5-HTに特異的であり(図11のA)、5-ヒドロキシトリプトファン(5-OH Tryptophan、図11のC)及び5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA、図11のD)などの構造的に類似な化合物に対して交差反応性を示さなかった。

10

【0264】

[0283]また、図12のBに図示する競合アッセイを用いて、抗血清の交差反応性を試験した。ビオチン化抗原(例えば、ビオチン化Ser-D)をストレプトアビジンプレート上にコーティングした。ヒト血清中のセロトニン(5-HT)又はその経路の代謝産物(例えば、Tryptophan、5-OH Tryptophan、若しくは5-HIAA)を誘導体化し、抗血清に加えた。混合物をプレートに加え、RTで1時間インキュベートした。プレートを洗浄バッファーで数回洗浄した。ヤギ抗ウサギ抗体-HRPコンジュゲート溶液を加え、RTで1時間インキュベートした。プレートを洗浄バッファーの中で数回洗浄した。呈色基質を、比色定量反応用に加え、停止溶液を加え、その後プレートを405nmで読み取った。ヒト血清中にSer-Dが存在することで、抗Ser-D抗体のビオチン化Ser-Dに対する結合が阻害された(図12のA)。遊離Ser-Dの量が増大するほど、少ない抗体が検出された。対照的に、トリプトファン(図12のC)、5-ヒドロキシトリプトファン(図12のD)、及び5-ヒドロキシインドール酢酸(図12のE)誘導体が存在する場合、ビオチン化Ser-Dに結合する抗体の量に変化はなく、又はわずかな変化があった。

20

I I . セロトニンELISA

30

【0265】

[0284]抗セロトニン抗体を、上記に記載した競合ELISAにおいて用いて、血清中のセロトニンのレベルが、IBS-Dを有する患者対健常対照において異なるか否かを決定した。試験したIBS-D患者におけるセロトニンの平均量は $50 \pm 20 \text{ nM}$ であり、それに対して健常対照では $23 \pm 10 \text{ nM}$ であった(図13)。四分位値分析も、四分位値3及び4の患者は健常対照に比べて高レベルであったことを示し、よって、IBS-D患者はセロトニン機能不全を表すことが指摘された。

【0266】

[0285]セロトニンアッセイを複数日に行った場合、方法は安定性及び再現性を示した。検量線の比較では、実験日をまたがった値における差は殆ど示されなかった。図14は、4つの日にちに産生された様々な検量線を示す。この実験では、セロトニン検出の上限は約1mM又は 0.213 mg/m1 であり、検出の下限は約 1 e-10 mM (21.3 ng/m1)であった。本明細書に提供するセロトニンELISAの検出範囲は、HPLC(ARUP Labs)などの他の方法に比べて広く、HPLC法では $50 \sim 220 \text{ ng/m1}$ の範囲である。

40

【0267】

[0286]セロトニンELISAを用いて、他の疾患状態におけるセロトニンの機能不全を検出した。特に、カルチノイド腫瘍、アルツハイマー病、又は自閉症を有する患者からの試料を試験した。健常対照に比べて、カルチノイド腫瘍を有する患者のセロトニンのレベルは高かったが、アルツハイマー病又は自閉症を有する患者のレベルは低かった(図15)

50

)。

【0268】

I I . F G F 1 9 E L I S A

[0287]胆汁酸の代謝は、慢性下痢及びIBS-Dの発症の一因となる。胆汁酸合成を評価するための方法には、律速酵素であるコレステロール7-ヒドロキシラーゼの活性に相關する、血清7-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンの検出が含まれる。7-ヒドロキシ-4-コレステン-3-オンはHPLCにより測定することができるが、HPLCは高感度であるが高価であり、再現性が問題になりやすい。胆汁酸はFGF19シグナル伝達を活性化し、FGF19シグナル伝達はひいては胆汁酸の代謝を調節する(図16)。FGF19ELISA法は、血清試料中のFGF19のレベルを測定するため開発された。このアッセイを用いて、IBS-D又はIBS-Cを有する患者は、健常対照及びIBDを有する患者に比べてFGF19のレベルが高いことが示された(図16のB)。

【0269】

I I I . キヌレン酸に対する抗体

[0288]リンカー類似体を有するキヌレン酸に対するポリクローナル抗体(例えば、実施例3に記載するKYA-L)を、類似体で免疫化したウサギにおいて産生した。滴定実験を行って、抗体の有効性を評価した。図17のAは、500ng/ml~31.3ng/mlの範囲の抗原(例えば、KYA-L)からのデータを示す。図17のBは、31.3ng/ml~0の範囲のKYA-Lを示す。データは、抗体がキヌレン酸に特異的に結合することを示す。

【0270】

[0289]上記に記載した競合アッセイを用いて、抗KYA-L抗体の交差反応性を試験した。簡潔に述べると、L-キヌレン(Ky)、3-ヒドロキシ-DL-キヌレン(H-Ky)、及びL-トリプトファン(Tryp)などのキヌレン酸代謝産物を用いて、ビオチン化キヌレン酸と抗体結合に対して競合させた。図18のAは、KYA-L抗原がビオチン化抗原と競合したことを示す。対照的に、増大量のKy(図18のB)、H-Ky(図18のC)、及びTryp(図18のD)が存在しても、アッセイにおいて検出される抗KYA-Lのレベルを変更しなかった。結果より、抗KYA-L抗体はキヌレン代謝産物と交差反応せず、キヌレン酸に特異的であることが示される。

【0271】

I I I . プロピオン酸に対する抗体

[0290]実施例8に記載するリンカー類似体を有するプロピオン酸(PropL)を合成した。PropLに対する抗体を、ポリクローナル抗体を生成するための標準方法に従って産生した。免疫化したウサギからの抗血清を、プロピオン酸特異的抗体の存在に対して試験した(図19)。抗PropL抗体が採血10~12において検出された。

【0272】

[0291]上記に記載した競合アッセイを用いて、抗PropL抗体の交差反応性を試験した。抗体はプロピオン酸に特異的であり(図20のA)、酪酸又はセロトニンと交差反応性を示さなかった。

【0273】

[0292]本明細書に記載する実施例及び実施形態は説明の目的にすぎず、これらに鑑みた様々な改変又は変更が、当業者に対して示唆され、本出願の趣旨及び権限内、並びに添付の特許請求の範囲内に含まれるべきことが理解される。本明細書に列挙する出版物、特許、及び特許出願はいずれも、全ての目的でその全文が参照により本明細書に組み込まれる。

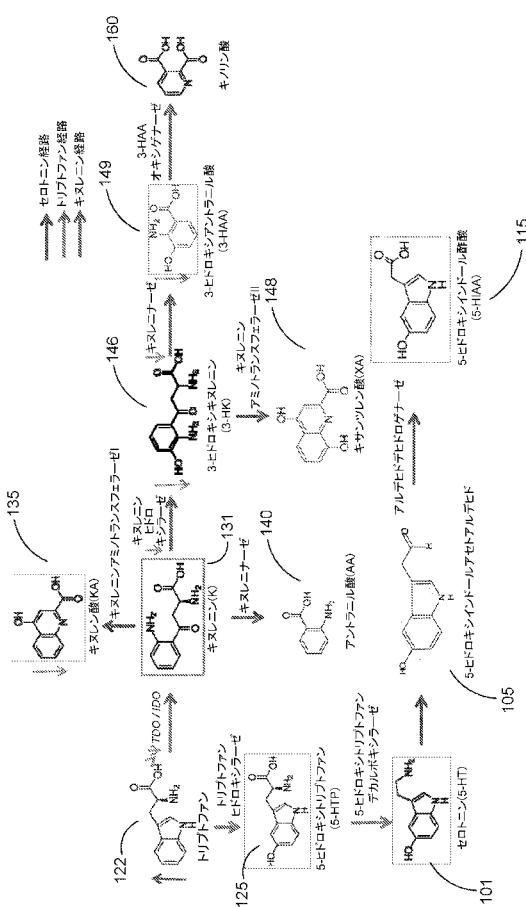
10

20

30

40

【図 1】



【図 2】

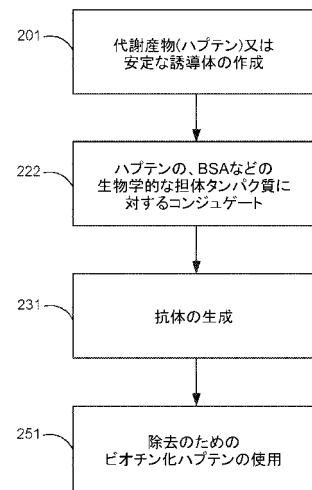


FIG. 2

【図 3】

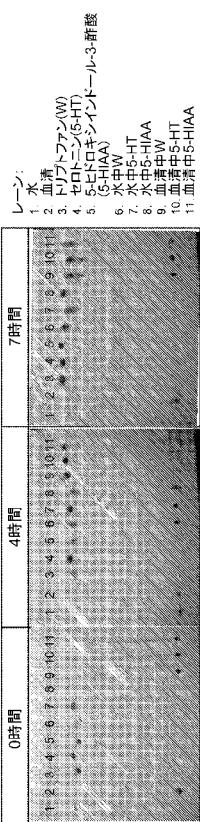


FIG. 3

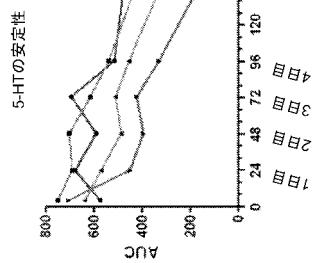
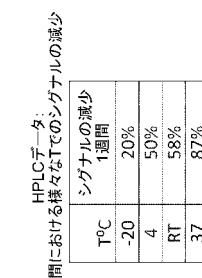
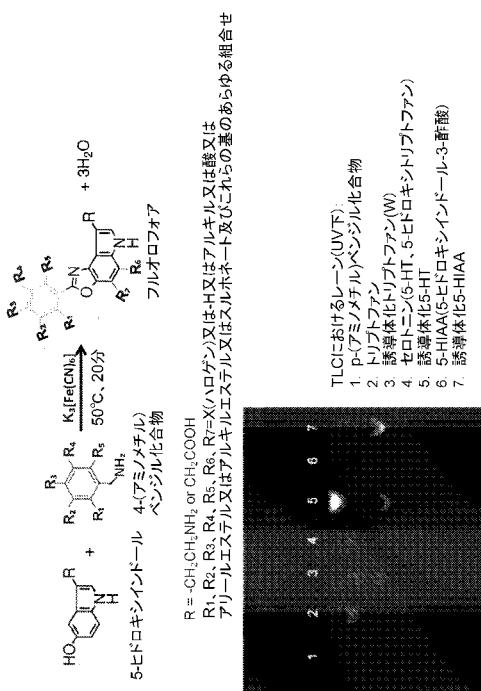


FIG. 4

【図 4】

HPLCデータ
1週間ににおける様々なTでのシグナルの減少

【図 5】



【図 6】

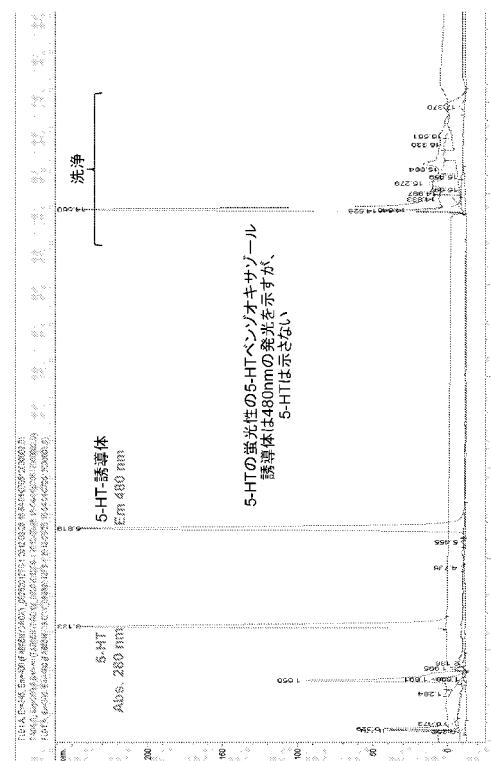


FIG. 6

【図 7】

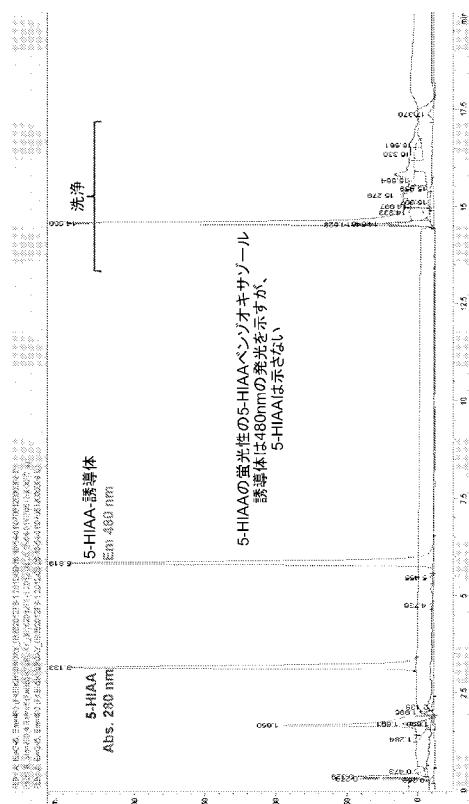
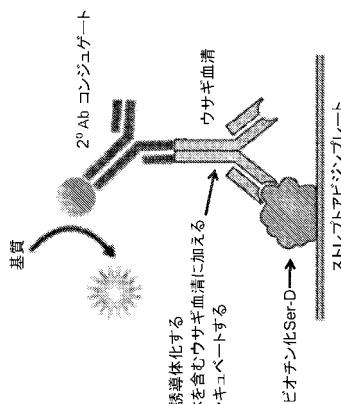


FIG. 7

【図 8】

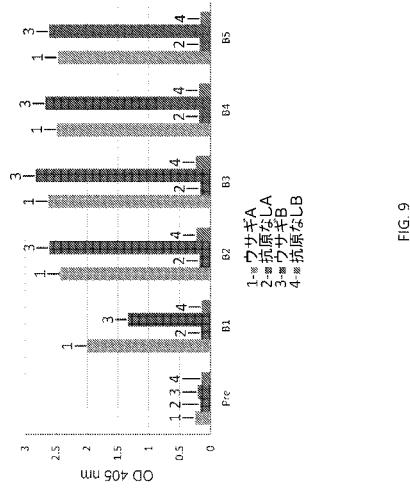


1. 誘導体化混合物で患者血清を誘導体化する。
2. 誘導体化した患者血清を抗体を含むウサギ血清に加える。
3. プレートに移し、RTで1時間インキュベートする。

FIG. 8

5-HTの蛍光性の5-HTベンジオキサゾール誘導体は480nmの発光を示すが、5-HTは示さない。

【図 9】



【図 10】

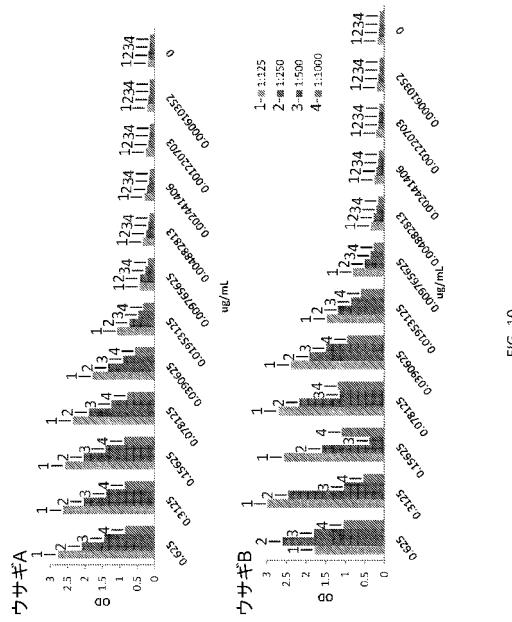
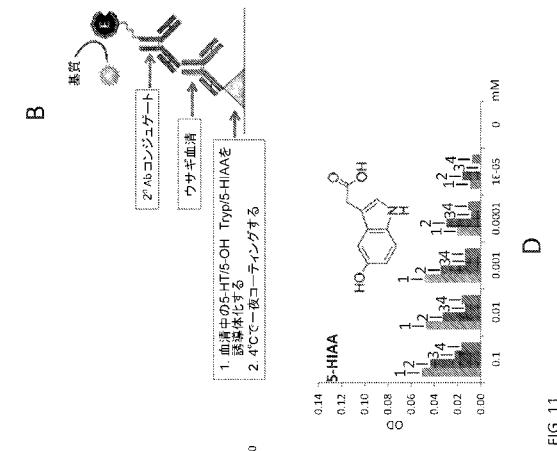


FIG. 9

【図 11】



【図 12】

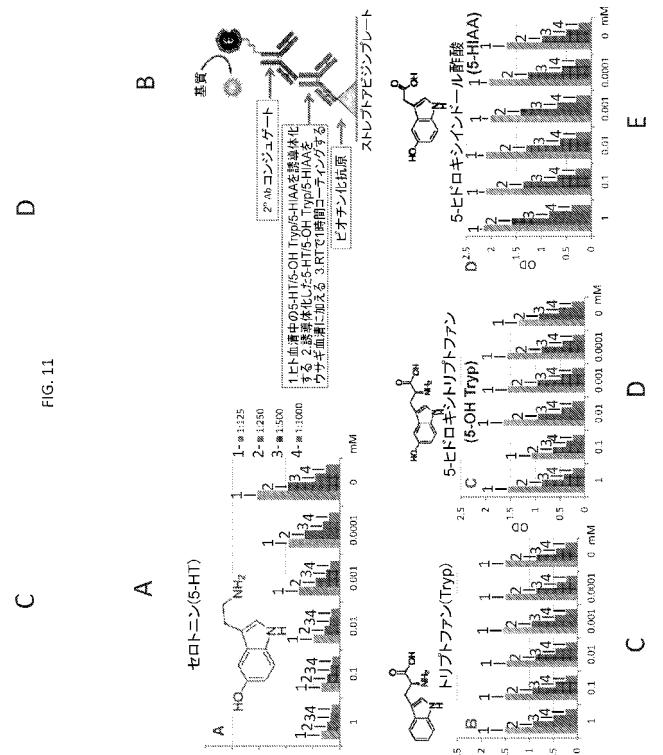


FIG. 12

【図 13】

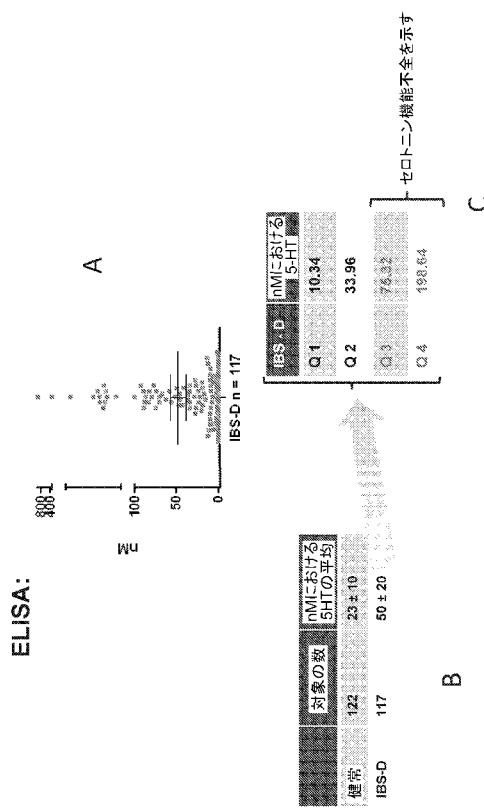


FIG. 13

【図 14】

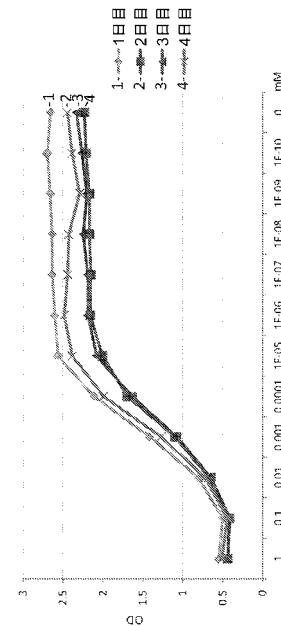


FIG. 14

【図 15】

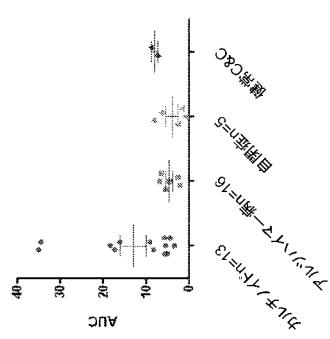


FIG. 15

【図 17】

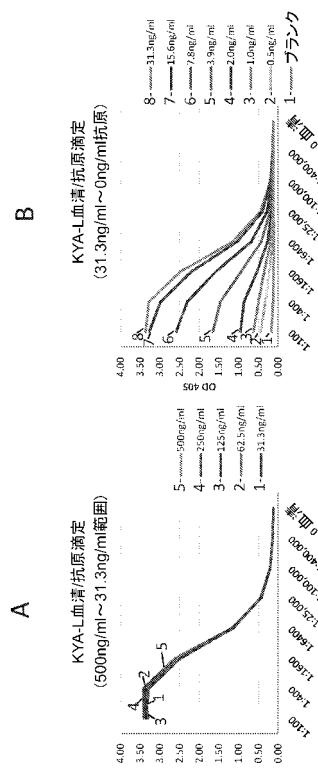
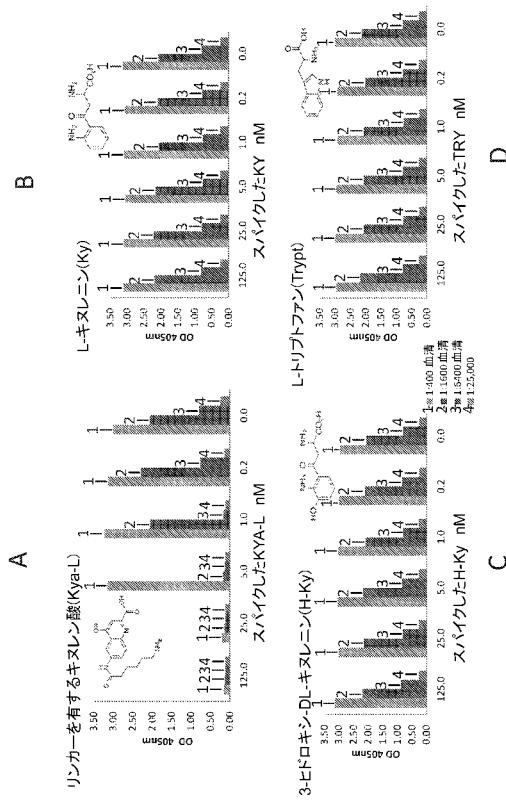


FIG. 17

【図 18】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/IB2014/061634						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07D263/62 C07K16/44 G01N33/531 G01N33/58 G01N33/94 ADD.								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D C07K G01N								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BEILSTEIN Data, BIOSIS								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;"> MIKAELO I NICHKOVA ET AL: "Evaluation of a novel ELISA for serotonin: urinary serotonin as a potential biomarker for depression", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 402, no. 4, 10 December 2011 (2011-12-10), pages 1593-1600, XP035005103, ISSN: 1618-2650, DOI: 10.1007/S00216-011-5583-1 Materials and Methods. ----- -/-/ </td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-5</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	MIKAELO I NICHKOVA ET AL: "Evaluation of a novel ELISA for serotonin: urinary serotonin as a potential biomarker for depression", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 402, no. 4, 10 December 2011 (2011-12-10), pages 1593-1600, XP035005103, ISSN: 1618-2650, DOI: 10.1007/S00216-011-5583-1 Materials and Methods. ----- -/-/	1-5
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
A	MIKAELO I NICHKOVA ET AL: "Evaluation of a novel ELISA for serotonin: urinary serotonin as a potential biomarker for depression", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 402, no. 4, 10 December 2011 (2011-12-10), pages 1593-1600, XP035005103, ISSN: 1618-2650, DOI: 10.1007/S00216-011-5583-1 Materials and Methods. ----- -/-/	1-5						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.								
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed								
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family								
Date of the actual completion of the international search 26 August 2014		Date of mailing of the international search report 10/12/2014						
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vogt, Titus						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2014/061634

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAN HUISMAN ET AL: "Studies on the immune response and preparation of antibodies against a large panel of conjugated neurotransmitters and biogenic amines: specific polyclonal antibody response and tolerance", JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 112, no. 3, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 829-841, XP055136287, ISSN: 0022-3042, DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06492.x Materials and Methods; Characterisation of antibodies against tryptamine, serotonin, 5-HIAA, and melatonin.; figures 1,2,6; tables 1,3 -----	1-5
A	CHAUVEAU ET AL.: "Rapid and specific enzyme immunoassay of serotonin", CLINICAL CHEMISTRY, vol. 37, no. 7, 1991, pages 1178-1184, XP055136253, Procedures.; figure 1; table 2 -----	1-5
X	MAKOSZA ET AL: "Synthesis of 1,3,4,5-tetrahydropyrrolo[4,3,2-de]quinolines via the vicarious nucleophilic substitution of hydrogen", TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 51, no. 26, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 7263-7276, XP002207473, ISSN: 0040-4020, DOI: 10.1016/0040-4020(95)00350-H compound 10 -----	1,2
X	TODOROKI K ET AL: "Online photocatalytic device for highly selective pre-column fluorescence derivatization of 5-hydroxyindoles with benzylamine", ANALYTICA CHIMICA ACTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 555, no. 1, 5 January 2006 (2006-01-05), pages 14-19, XP027912099, ISSN: 0003-2670 [retrieved on 2006-01-05] figure 1 ----- -/-	1-3
2		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2014/061634

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YUSUKE YAMAGISHI ET AL: "Ribosomal Synthesis of Cyclic Peptides with a Fluorogenic Oxidative Coupling Reaction", CHEMBIOCHEM, vol. 10, no. 9, 15 June 2009 (2009-06-15), pages 1469-1472, XP055136372, ISSN: 1439-4227, DOI: 10.1002/cbic.200900021 Scheme 1; Supportive information. -----	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2014/061634

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-5

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ IB2014/061634

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5

A compound of formula (I).

2-9. claims: 6-37

A compound of formula (II)-(X).

10-24. claims: 38-59

Isolated antibodies and methods for assaying metabolites.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 J 9/00 (2006.01)	C 0 7 J 9/00	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	S
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	J
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
C 0 7 K 16/26 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 0 7 K 16/26	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
	C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 セルヴァラジ, ファビヨラ
アメリカ合衆国, カリフォルニア州, サンディエゴ, レン ブラッフ ドライヴ 9704

(72)発明者 プリンセン, フレッド
アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ラホーヤ, カークウッド プレイス 610

(72)発明者 シン, シャラット
アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ランチョ サンタフェ, トップ オブ ザ モーニング ウェイ 8171

F ターム(参考) 4B064 AG26 CA19 DA01 DA13

4C031 MA01
4C071 AA01 BB01 CC02 CC21 DD06 EE13 FF04 GG06 HH08 JJ01
JJ05 KK14 LL01
4C072 AA01 AA07 BB02 BB06 CC02 CC11 EE03 FF03 GG01 HH02
JJ02 JJ03 MM08 MM10 UU01
4C091 AA01 BB05 CC01 DD01 EE07 FF01 GG02 GG13 HH01 JJ03
KK01 LL01 MM03 NN01 PA02 PA05 PB03 QQ01 RR08
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 EA20 EA50 FA71