



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105392780 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 09

(21) 申请号 201480041536. 6

C07K 16/44(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 05. 22

G01N 33/531(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/58(2006. 01)

61/827, 506 2013. 05. 24 US

G01N 33/94(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 01. 22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2014/061634 2014. 05. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/188377 EN 2014. 11. 27

(71) 申请人 雀巢产品技术援助有限公司

地址 瑞士沃韦

(72) 发明人 F·塞尔瓦拉 F·普林森 S·辛格

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07D 263/62(2006. 01)

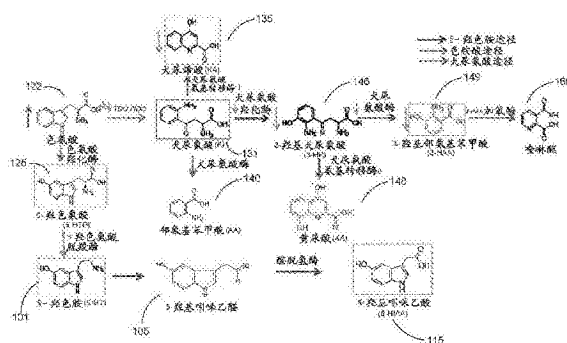
权利要求书7页 说明书45页 附图21页

(54) 发明名称

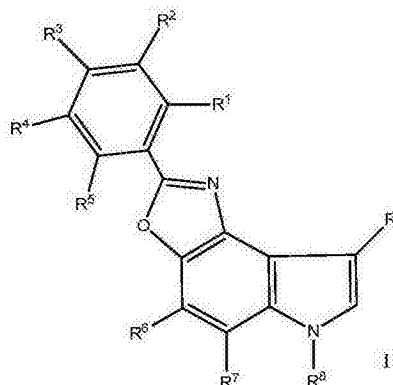
用于预测肠易激综合征诊断的途径特异性测定

(57) 摘要

本发明提供针对 5-羟色胺、色氨酸、犬尿氨酸途径中代谢物的抗体和用于制备所述抗体的方法。制备的抗体对相关的代谢物具有低交叉反应性,并且是用于特异性和灵敏免疫测定的试剂。本发明还提供多种代谢物和短链脂肪酸的稳定衍生物。衍生物可以与生物分子如运载蛋白缀合并与佐剂组合以刺激免疫反应。衍生物也可以与其他生物分子缀合。



1. 式 I 的化合物：



其中：R 是选自烷基、烷氧基、烷氧烷基、氨烷基、酰氨基烷基、羧烷基、取代的羧烷基的成员；并且

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 $R^{11}B$ 的成员；

L 是接头；

R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接；并且

B 是生物分子。

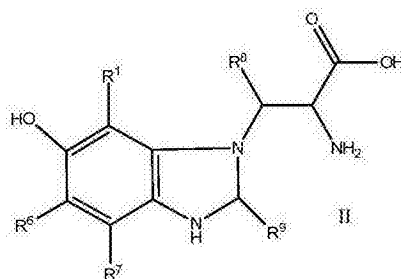
2. 权利要求 1 的化合物，其中 R 是选自氨烷基、羧烷基和取代的羧烷基的成员。

3. 权利要求 1 的化合物，其中 R 是选自 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ 的成员。

4. 权利要求 1 的化合物，其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 的组的至少一个成员是 $R^{11}B$ 。

5. 权利要求 4 的化合物，其中 B 是选自蛋白质、免疫原性肽和生物素的成员。

6. 式 II 的化合物：



其中 R^1 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、和 R^9 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 $R^{11}B$ 的成员；

L 是接头；

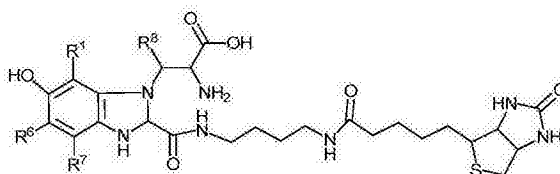
R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接；并且

B 是生物分子。

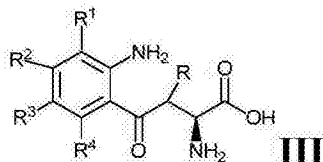
7. 权利要求 6 的化合物，其中 R^1 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、和 R^9 的组的至少一个成员是 $R^{11}B$ 。

8. 权利要求 7 的化合物，其中 B 是选自蛋白质、免疫原性肽或生物素的成员。

9. 权利要求 8 的化合物，其中所述化合物具有以下式：



10. 式 III 的化合物：



其中 R、R¹、R²、R³和 R⁴各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 R¹¹B 的成员；

L 是接头；

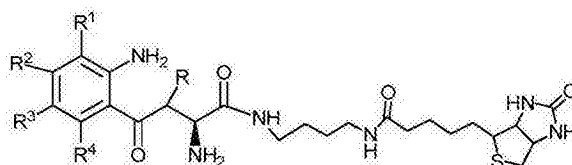
R¹¹是在化合物和生物分子之间所得到的连接；并且

B 是生物分子。

11. 权利要求 10 的化合物，其中 R、R¹、R²、R³和 R⁴的组的至少一个成员是 R¹¹B。

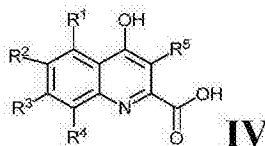
12. 权利要求 11 的化合物，其中 B 是选自蛋白质、免疫原性肽或生物素的成员。

13. 权利要求 12 的化合物，其中化合物具有下式：



其中 R、R¹、R²、R³和 R⁴各自是氢。

14. 式 IV 的化合物：



其中 R¹、R²、R³、R⁴和 R⁵各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 R¹¹B 的成员；

L 是接头；

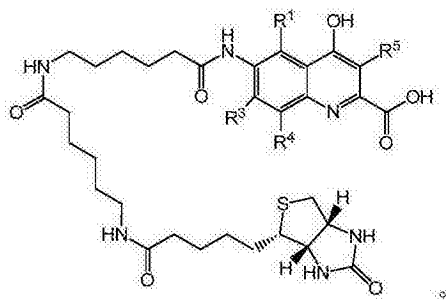
R¹¹是在化合物和生物分子之间所得到的连接；并且

B 是生物分子。

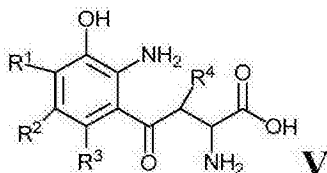
15. 权利要求 14 的化合物，其中 R¹、R²、R³、R⁴和 R⁵的组的至少一个成员是 R¹¹B。

16. 权利要求 15 的化合物，其中 B 是选自蛋白质、免疫原性肽或生物素的成员。

17. 权利要求 16 的化合物，其中化合物具有下式：



18. 式 V 的化合物：



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 $R^{11}B$ 的成员；

L 是接头；并且

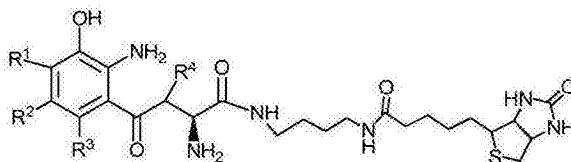
R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接；并且

B 是生物分子。

19. 权利要求 18 的化合物，其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 的组的至少一个成员是 $R^{11}B$ 。

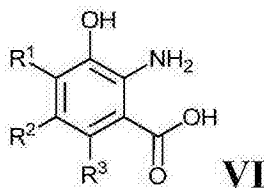
20. 权利要求 19 的化合物，其中 B 是选自蛋白质、免疫原性肽和生物素的成员。

21. 权利要求 20 的化合物，其中化合物具有下式：



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自是氢。

22. 式 VI 的化合物：



其中 R^1 、 R^2 和 R^3 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 $R^{11}B$ 的成员；

L 是接头；

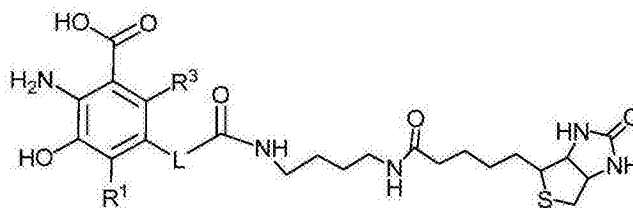
R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接；并且

B 是生物分子。

23. 权利要求 22 的化合物，其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 的组的至少一个成员是 $R^{11}B$ 。

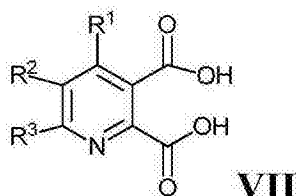
24. 权利要求 23 的化合物，其中 B 是选自蛋白质、免疫原性肽或生物素的成员。

25. 权利要求 24 的化合物, 其中化合物具有下式:



其中 R^1 和 R^3 各自是氢。

26. 式 VII 的化合物:



其中 R^1 、 R^2 和 R^3 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 $R^{11}B$ 的成员;

L 是接头; 并且

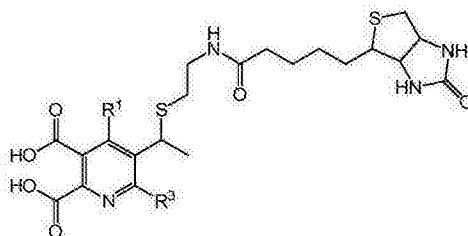
R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接; 并且

B 是生物分子。

27. 权利要求 26 的化合物, 其中 R^1 、 R^2 和 R^3 的组的至少一个成员是 $R^{11}B$ 。

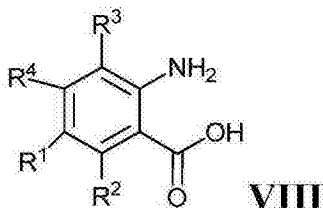
28. 权利要求 27 的化合物, 其中 B 是选自蛋白质、免疫原性肽和生物素的成员。

29. 权利要求 28 的化合物, 其中化合物具有下式:



其中 R^1 和 R^3 各自是氢。

30. 式 VIII 的化合物:



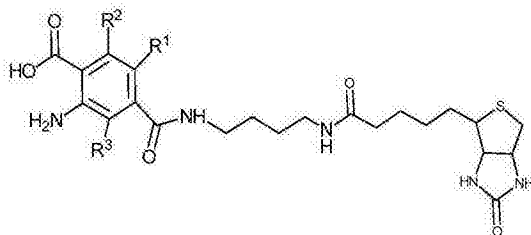
其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 $R^{11}B$ 的成员;

L 是接头; 并且

R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接; 并且

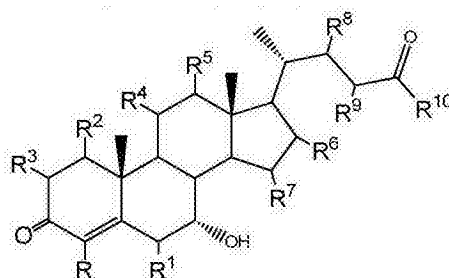
B 是生物分子。

31. 权利要求 30 的化合物, 其中 R^1 、 R^2 和 R^3 的组的至少一个成员是 $R^{11}B$ 。
32. 权利要求 31 的化合物, 其中 B 是选自蛋白质、免疫原性肽或生物素的成员。
33. 权利要求 32 的化合物, 其中化合物具有下式:



其中 R^1 、 R^2 和 R^3 各自是氢。

34. 式 X 的化合物:



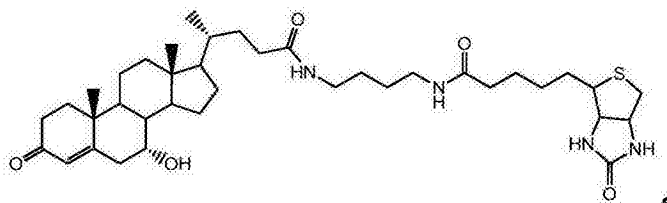
其中 R 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 $R^{11}B$ 的成员;

L 是接头;

R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接; 并且

B 是生物分子。

35. 权利要求 34 的化合物, 其中 R^1 、 R^2 和 R^3 的组的至少一个成员是 R^{11} 。
36. 权利要求 35 的化合物, 其中 B 是选自蛋白质、免疫原性肽或生物素的成员。
37. 权利要求 36 的化合物, 其中化合物具有下式:



38. 与 5-羟色胺 (5-HT) 特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体对选自色氨酸、5-羟基色氨酸和 5-羟基吲哚乙酸的成员具有小于 1% 交叉反应性。

39. 与 5-羟基色氨酸 (5-OH) 特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体对选自色氨酸、5-羟色胺和 5-羟基吲哚乙酸的一种或多种成员具有小于 1% 交叉反应性。

40. 与 5-色氨酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体对选自 5-羟基色氨酸, 5-羟色胺和 5-羟基吲哚乙酸的一种或多种成员具有小于 1% 交叉反应性。

41. 与 5-羟基吲哚乙酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体对选自色氨酸、5-羟基色氨酸和 5-羟色胺的一种或多种成员具有小于 1% 交叉反应性。

42. 与犬尿氨酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对选自犬尿烯酸、3-羟基犬尿氨酸、3-羟基邻氨基苯甲酸、喹啉酸、邻氨基苯甲酸、5-羟色胺-0-硫酸和5-羟色胺-0-磷酸的一种或多种成员具有小于1%交叉反应性。

43. 与犬尿烯酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对选自犬尿氨酸、3-羟基犬尿氨酸、3-羟基邻氨基苯甲酸、喹啉酸、邻氨基苯甲酸、5-羟色胺-0-硫酸和5-羟色胺-0-磷酸的一种或多种成员具有小于1%交叉反应性。

44. 与3-羟基犬尿氨酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对选自犬尿氨酸、犬尿烯酸、3-羟基邻氨基苯甲酸、喹啉酸、邻氨基苯甲酸、5-羟色胺-0-硫酸和5-羟色胺-0-磷酸的一种或多种成员具有小于1%交叉反应性。

45. 与3-羟基邻氨基苯甲酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对选自犬尿氨酸、犬尿烯酸、3-羟基犬尿氨酸、喹啉酸、邻氨基苯甲酸、5-羟色胺-0-硫酸和5-羟色胺-0-磷酸的一种或多种成员具有小于1%交叉反应性。

46. 与喹啉酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对选自犬尿氨酸、犬尿烯酸、3-羟基犬尿氨酸、3-羟基邻氨基苯甲酸、邻氨基苯甲酸、5-羟色胺-0-硫酸和5-羟色胺-0-磷酸的一种或多种成员具有小于1%交叉反应性。

47. 与邻氨基苯甲酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对选自犬尿氨酸、犬尿烯酸、3-羟基犬尿氨酸、3-羟基邻氨基苯甲酸、喹啉酸、5-羟色胺-0-硫酸和5-羟色胺-0-磷酸的一种或多种成员具有小于1%交叉反应性。

48. 与5-羟色胺-0-硫酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对选自犬尿氨酸、犬尿烯酸、3-羟基犬尿氨酸、3-羟基邻氨基苯甲酸、喹啉酸、邻氨基苯甲酸和5-羟色胺-0-磷酸的一种或多种成员具有小于1%交叉反应性。

49. 与5-羟色胺-0-磷酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对选自犬尿氨酸、犬尿烯酸、3-羟基犬尿氨酸、3-羟基邻氨基苯甲酸、喹啉酸、邻氨基苯甲酸和5-羟色胺-0-硫酸的一种或多种成员具有小于1%交叉反应性。

50. 与7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮衍生物特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对选自胆固醇和7- α -胆固醇的成员具有小于1%交叉反应性。

51. 与丙酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对丁酸具有小于1%交叉反应性。

52. 与丁酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对丙酸具有小于1%交叉反应性。

53. 根据权利要求38-52中任一项的抗体或其片段,其中抗体是多克隆或单克隆抗体。

54. 根据权利要求53的抗体或其片段,其中多克隆抗体是兔抗体。

55. 根据权利要求38-52中任一项的抗体或其片段,其中抗体是Fab或Fab2片段。

56. 根据权利要求38-52中任一项的抗体或其片段,其中抗体是重组抗体。

57. 用于测定来自哺乳动物的流体或组织样品中选自5-羟色胺(5-HT)、5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)、5-羟基色氨酸(5-HTP)、犬尿氨酸(K)、犬尿烯酸(KA)、3-羟基犬尿氨酸(3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA)、喹啉酸、邻氨基苯甲酸及其组合的代谢物的方法,所述方法包括:

将样品与抗体混合,所述抗体与选自5-羟色胺(5-HT)、5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)、

5- 羟基色氨酸 (5-HTP)、犬尿氨酸 (K)、犬尿烯酸 (KA)、3- 羟基犬尿氨酸 (3-HK)、3- 羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA)、喹啉酸、邻氨基苯甲酸及其组合的代谢物特异性结合 ;并且

确定抗体是否与代谢物特异性结合,其中特异性抗体结合表示在样品中存在代谢物。

58. 用于测定来自哺乳动物的流体或组织样品中 7- α - 羟基 -4- 胆甾烯 -3- 酮的方法,所述方法包括 :

将样品与抗体混合,所述抗体与 7- α - 羟基 -4- 胆甾烯 -3- 酮特异性结合 ;并且

确定抗体是否与 7- α - 羟基 -4- 胆甾烯 -3- 酮特异性结合,其中特异性抗体结合表示在样品中存在代谢物。

59. 用于测定来自哺乳动物的流体或组织样品中选自丙酸和丁酸及其组合的代谢物的方法,所述方法包括 :

将样品与抗体混合,所述抗体与选自丙酸和丁酸及其组合的代谢物特异性结合 ;并且

确定抗体是否与代谢物特异性结合,其中特异性抗体结合表示在样品中存在代谢物。

用于预测肠易激综合征诊断的途径特异性测定

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求来自 2013 年 5 月 24 日提交的美国专利申请号 61/827,506 的优先权, 所述文献的教授内容在此通过引用方式完整并入本文用于全部目的。本申请通过参考方式并入同一日期提交的携带代理人案号 88473-909073-026610PC 的 PCT 申请。

[0003] 发明背景

[0004] 肠易激综合征 (IBS) 是全部肠胃病的最常见形式, 侵袭 10-20% 的一般人群并占据存在消化道主诉的全部患者的 50%。但是, 研究表明仅约 10% 至 50% 罹患 IBS 的那些患者实际上寻求就医。IBS 患者表现不同症状, 如, 例如, 主要与排便相关的腹痛、腹泻、便秘或交替腹泻和便秘、腹部膨胀、粪便带气体和过多粘液。超过 40% 的 IBS 患者具有如此严重的症状, 从而他们不得不请假休息、限制社交生活, 避免性交、取消约会、终止旅行、服用药物并且甚至因害怕尴尬而幽闭于其房间中。在美国, 估计的 IBS 卫生保健成本是每年 80 亿美元 (Talley 等人, *Gastroenterol.*, 109:1736-1741 (1995))。

[0005] 将 IBS 患者根据其优势肠症状划分成三类: 便秘 - 优势 IBS (IBS-C)、腹泻 - 优势 IBS (IBS-D)、腹泻和便秘症状交替的 IBS (IBS-M) 以及未分型的 IBS (IBS-U)。在当前临床实践中, IBS 的诊断基于罗马 III 标准并根据患者呈现的症状进行。不存在可以用来鉴定这种病症的特异性生物学标志物、放射摄影标志物、内窥镜标志物或生理学生物标志物。

[0006] 肠易激综合征是一种不均均性胃肠道 (GI) 功能病症。其发病机理中指向累及免疫系统的证据日益增加。胃肠感染可能是造成 IBS 症状发作的引发因子。在另一方面, 经常将 IBS 描述为“脑 - 消化道病症”。由 5-HT 信号传导途径失调介导的 GI 运动性和分泌改变可能是排便习惯不规律的基础原因。靠近结肠神经的肥大细胞的激活与 IBS 患者体验到的异常疼痛相关。众所周知肥大细胞能够在激活时产生并释放多种炎性介质。然而, 不清楚这些不同途径彼此如何通讯并且它们的相互作用是否在 IBS 患者按照与健康对象中相同的方式进行。

[0007] 精确的 IBS 病理生理学仍待阐明。尽管认为消化道运动障碍及改变的内脏感知对症状发病机制作出重要贡献 (Quigley, *Scand. J. Gastroenterol.*, 38 (Suppl. 237): 1-8 (2003); Mayer 等人, *Gastroenterol.*, 122:2032-2048 (2002)), 但将这种状况视为应激相关的病症, 其特征在于脑 - 消化道通讯扰乱、肠感染、肠道炎症和 / 或微生物区系改变。最近, 也已经提出肠感染和肠道炎症的作用。研究已经记录了经细菌学证实的胃肠炎后 IBS 发作, 而其他已经提供了 IBS 中低等级粘膜炎症 (Spiller 等人, *Gut*, 47:804-811 (2000); Dunlop 等人, *Gastroenterol.*, 125:1651-1659 (2003); Cumberland 等人, *Epidemiol. Infect.*, 130:453-460 (2003)) 和免疫激活 (Gwee 等人, *Gut*, 52:523-526 (2003); Pimentel 等人, *Am. J. Gastroenterol.*, 95:3503-3506 (2000)) 的证据。还已经牵涉肠道菌群 (例如, 肠道微生物群), 并且最近研究展示, 益生菌生物双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 通过调节免疫活性治疗该病症的有效性 (Simren 等人, *Gut*, 62:159-176 (2013))。

[0008] 存在日益增长的支持抗微生物抗体、应激激素、炎性细胞因子和肥大细胞标志物在多种肠道疾病或病症中发挥作用的大量证据。例如, 已经证明抗微生物抗体 OmpC、

CBir1、FlaX 和 Fla2 是炎性肠病 (IBD) 的有价值生物标志物。针对大肠杆菌 K12 蛋白 (例如, Era、FocA、FrvX、GabT、YbaN、YcdG、YhgN 和 YidX) 的抗体亚群可以用来区分患有克罗恩病 (CD) 的个体和健康对照并且区分患有 CD 和溃疡性结肠炎的个体 (Chen 等人, Mol. Cell Proteomics, 8:1765-1776, (2009))。患有 IBS 相关的感染后小肠细菌性长出 (SIBO) 的个体可以具有针对感染性细菌鞭毛蛋白的抗体, 所述的感染后小肠细菌性长出经常由来自空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) (空肠弯曲杆菌 ((C)jejuni)、Cj)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (大肠杆菌 (*E. coli*)、Ec), 肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) (肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*)、Se)、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*) (福氏志贺氏菌 (*S. flexneri*)、Sf) 感染引起 (Spiller R 和 GarsedK., Gastroenterology, 136: 1979-1988 (2009))。

[0009] 消化道远端区段增加的肥大细胞浸润和激活与 IBS 的症状发作和严重程度相关。这些细胞还涉及 IBS 患者中内脏传入神经对粘膜刺激的反应性升高。在感染后 IBS 和非感染后 IBS 中, 均观察到这些细菌感染之后肥大细胞增生。对肥大细胞标志物如 β -类胰蛋白酶、组胺和前列腺素 E2 (PGE2) 的测量在临床诊断 IBS 中具有重要意义。美国专利号 8, 114, 616 和美国专利申请公开号 2012/244558 中描述了使用肥大细胞标志物辅助诊断 IBS 的详细方法, 所述文献的公开内容因而通过引用的方式完整并入用于全部目的。

[0010] IBS 患者通常体验到脑-肠道轴和肠道微生物群介导的异常肠道运动性和内脏超敏反应。在包括 IBS 的应激敏感性病症中, 释放下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 轴的应激激素, 如胃肠激素、5-羟色胺、促皮质素激素 (ACTH)、皮质醇、促皮质素-释放激素和儿茶酚胺, 因此控制例如肠道的生理功能。脑-肠道轴的失调 (图 2) 可能通过降低运动性及增加疼痛或不适不利地影响胃肠道功能。目前正研究针对 5-羟色胺途径的治疗药物以治疗 IBS。肠胆汁酸分泌和吸收的失调也与 IBS 相关。一些研究已经还显示胃肠道功能受肠道微生物群影响。例如, 膳食、抗生素、病原体和宿主的免疫反应可能改变肠道微生物群落, 这转而可以改变肠道功能。

[0011] 鉴于前述情况, 本领域需要通过监测脑-肠道-微生物群轴诊断个体中 IBS 的方法。需要评估各种代谢途径和异化途径是否正常发挥作用的测定。本发明满足了这些需求和其他需求。

[0012] 发明简述

[0013] 本发明提供针对 5-羟色胺、色氨酸和犬尿氨酸途径中代谢物的抗体和用于制备所述抗体的方法。制备的抗体对相关的代谢物具有低交叉反应性并且是用于以下一种或多种代谢物的特异性和灵敏免疫测定的试剂: 5-羟色胺 (5-HT)、5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA)、5-羟基色氨酸 (5-HTP)、犬尿氨酸 (K)、犬尿烯酸 (KA)、3-羟基犬尿氨酸 (3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA)、喹啉酸和邻氨基苯甲酸。

[0014] 本发明还提供 5-羟色胺 (5-HT)、5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA)、5-羟基色氨酸 (5-HTP)、犬尿氨酸 (K)、犬尿烯酸 (KA)、3-羟基犬尿氨酸 (3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA)、喹啉酸和邻氨基苯甲酸的稳定衍生物。衍生物可以与生物分子如运载蛋白缀合并与佐剂组合以刺激免疫反应。衍生物也可以与其他生物分子缀合。

[0015] 在其他方面, 本发明提供用于产生抗体的方法。该方法包括:

[0016] (a) 提供免疫原, 所述免疫原包含与运载蛋白缀合的选自 5-羟色胺 (5-HT)、5-羟

基吡啶乙酸 (5-HIAA)、5- 羟基色氨酸 (5-HTP)、犬尿氨酸 (K)、犬尿烯酸 (KA)、3- 羟基犬尿氨酸 (3-HK)、3- 羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA)、喹啉酸和邻氨基苯甲酸的衍生物；

[0017] (b) 在使得动物的免疫系统产生抗体的如此条件下用免疫原免疫动物；并且

[0018] (c) 从动物取出抗体。

[0019] 在某些其他方面，本发明提供用于测定来自哺乳动物（如人）的流体样品或组织样品中选自 5- 羟基色氨酸 (5-HT)、5- 羟基吡啶乙酸 (5-HIAA)、5- 羟基色氨酸 (5-HTP)、犬尿氨酸 (K)、犬尿烯酸 (KA)、3- 羟基犬尿氨酸 (3-HK)、3- 羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA)、喹啉酸、邻氨基苯甲酸及其组合的成员的方法。该方法包括将与样品与本文所述的抗体组合，并且随后确定抗体是否与来自样品的选自 5- 羟基色氨酸 (5-HT)、5- 羟基吡啶乙酸 (5-HIAA)、5- 羟基色氨酸 (5-HTP)、犬尿氨酸 (K)、犬尿烯酸 (KA)、3- 羟基犬尿氨酸 (3-HK)、3- 羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA)、喹啉酸、邻氨基苯甲酸及其组合的成员特异性结合。例如，在这些方法中，特异性抗体与来自样品的 5- 羟基色氨酸 (5-HT) 结合提示样品中存在 5- 羟基色氨酸 (5-HT)。

[0020] 本发明还提供针对胆汁酸代谢物的抗体和用于制备针对胆汁酸代谢物的抗体的方法。制备的抗体对相关的代谢物具有低交叉反应性，并且是用于 7- α - 羟基 -4- 胆甾烯 -3- 酮的特异性和灵敏免疫测定的试剂。

[0021] 本发明还提供 7- α - 羟基 -4- 胆甾烯 -3- 酮的稳定衍生物。衍生物可以与生物分子如运载蛋白缀合并与佐剂组合以刺激免疫反应。衍生物也可以与其他生物分子缀合。

[0022] 在其他方面，本发明提供用于产生 7- α - 羟基 -4- 胆甾烯 -3- 酮的抗体的方法。该方法包括：

[0023] (a) 提供免疫原，所述免疫原包含与运载蛋白缀合的 7- α - 羟基 -4- 胆甾烯 -3- 酮的衍生物；

[0024] (b) 在使得动物的免疫系统产生抗体的如此条件下用免疫原免疫动物；并且

[0025] (c) 从动物取出抗体。

[0026] 在某些其他方面，本发明提供测定来自哺乳动物（如人）的流体样品或组织样品中 7- α - 羟基 -4- 胆甾烯 -3- 酮的方法。该方法包括将样品与本文所述的抗体组合，随后确定抗体是否与来自样品的 7- α - 羟基 -4- 胆甾烯 -3- 酮特异性结合。例如，在这些方法中，特异性抗体与来自样品的 7- α - 羟基 -4- 胆甾烯 -3- 酮结合表示样品中存在 7- α - 羟基 -4- 胆甾烯 -3- 酮。

[0027] 此外，本发明提供针对短链脂肪酸的抗体和产生针对短链脂肪酸的抗体的方法。制备的抗体对相关的代谢物具有低交叉反应性，并且是用于丙酸和丁酸的特异性和灵敏免疫测定的试剂。

[0028] 本发明还提供短链脂肪酸 (SCFA)（如丙酸和丁酸）的稳定衍生物。衍生物可以与生物分子如运载蛋白缀合并与佐剂组合以刺激免疫反应。衍生物也可以与其他生物分子缀合。

[0029] 在其他方面，本发明提供用于产生短链脂肪酸的抗体的方法。该方法包括：

[0030] (a) 提供免疫原，所述免疫原包含与运载蛋白缀合的短链脂肪酸衍生物；

[0031] (b) 在使得动物的免疫系统产生抗体的如此条件下用免疫原免疫动物；并且

[0032] (c) 从动物取出抗体。

[0033] 在某些其他方面，本发明提供测定来自哺乳动物（如人）的流体样品或组织样品

中短链脂肪酸的方法。该方法包括将样品与本文所述的抗体组合,随后确定抗体是否与来自样品的短链脂肪酸特异性结合。例如,在这些方法中,特异性抗体与来自样品的丙酸结合表示样品中存在丙酸。

[0034] 除前述之外,本发明还提供使用本文中的代谢物的存在或浓度确定对象中肠易激综合征(IBS)诊断的方法。该方法包括通过本文所述的测定方法测量患者血液,血浆或血清中的一种或多种代谢物。

[0035] 本发明还提供确定 IBS 的治疗是否在患者中有效的方法。该方法包括通过本文所述的测定方法测量患者血液,血浆或血清中的一种或多种代谢物。

[0036] 在某些其他方面,本发明提供评价先前诊断患有 IBS 的患者的方法。该方法包括通过本文所述的测定方法测量患者血液,血浆或血清中的一种或多种代谢物。

[0037] 当连同下述发明详述和附图图阅读时,这些和其他方面、优点和实施方案将变得更显而易见。

[0038] 附图简述

[0039] 图 1 图示 IBS 的复杂病理生理学并突出显示 5- 羟色胺途径、色氨酸途径和犬尿氨酸途径的代谢物。

[0040] 图 2 图示产生抗体的本发明方法的流程图。

[0041] 图 3 图示 TLC 色谱图,其显示某些代谢物的不稳定性质。

[0042] 图 4 图示 5- 羟色胺信号丢失,这显示需要本发明的稳定化衍生物。

[0043] 图 5 图示 TLC 色谱图,其显示性质本发明的衍生化代谢物的稳定性质。

[0044] 图 6 图示 5- 羟色胺和本发明衍生物的 HPLC 迹线。

[0045] 图 7 图示 5- 羟基吲哚乙酸和本发明衍生物的 HPLC 迹线。

[0046] 图 8 显示用来检测患者血清中途径代谢物的竞争性 ELISA 的示例性实施方案。

[0047] 图 9 显示针对苯并噁唑衍生物的抗体的数据的柱状图,所述苯并噁唑衍生物在放血 1-5 (B1、B2、B3、B4 和 B5) 时来自兔 A 和兔 B 的抗血清中检出。

[0048] 图 10 显示来自滴定实验的数据,其中进行所述滴定实验以评估兔 A 和兔 B 中针对 Ser-D 产生的抗体的亲和力。

[0049] 图 11A-D 图示使用如图 11B 中简述的直接测定时缺少抗血清的交叉反应性。抗血清是 5-HT (图 11A) 特异性的并且对结构上相似的化合物如 5- 羟基色氨酸 (5-OHTrp ;图 11C) 和 5- 羟基吲哚乙酸 (5-HIAA ;图 11D) 未显示交叉反应性。

[0050] 图 12A-E 图示使用如图 12B 中简述的竞争性测定测试的抗血清缺少交叉反应性。图 12A 显示人血清中 Ser-D 的存在抑制抗 Ser-D 抗体与生物素化的 Ser-D 的结合。随着游离 Ser-D 的量增加,检出更少的抗体。图 12C-E 显示当存在色氨酸 (图 12C)、5- 羟基色氨酸 (图 12D) 和 5- 羟基吲哚 (图 12E) 衍生物时,与生物素化的 Ser-D 结合的抗体量无变化或细微变化。

[0051] 图 13A-C 显示与健康对照中相比,IBS-D 患者中 5- 羟色胺的平均量显著不同。图 13A 显示 ELISA 数据的图像。图 13B 显示表格化的数据总结并且图 13C 显示四分位数分析结果。

[0052] 图 14 显示在多日进行的 5- 羟色胺测定是稳定和可重复的。

[0053] 图 15 显示使用 ELISA 以本发明抗体测量的 5- 羟色胺水平。测试了来自具有类癌

瘤、阿尔茨海默病或自闭症患者的样品。与健康对照相比,具有类癌瘤的患者具有更高水平的 5-羟色胺,而具有阿尔茨海默病或自闭症的患者具有较低的水平。

[0054] 图 16A 显示胆汁酸激活 FGF19 信号传导,后者转而调节胆汁酸代谢。图 16B 是多种适应症的 FGF-19 数据的图像。

[0055] 图 17A 显示来自范围从 500ng/ml 至 31.3ng/ml 的抗原(例如,KYA-L)的数据;图 17B 显示范围从 31.3ng/ml 至 0 的 KYA-L。数据显示,抗体特异性结合犬尿烯酸。

[0056] 图 18A-D 图示抗 KYA-L 抗体缺少交叉反应性。图 18A 显示 KYA-L 抗原与生物素化的抗原竞争。与之相反,渐增量的 Ky(图 18B)、H-Ky(图 18C)和 Trypt(图 18D)的存在不改变测定中检测到的抗 KYA-L 的水平。结果显示,抗 KYA-L 抗体不与犬尿氨酸代谢物交叉反应并且对犬尿烯酸特异。

[0057] 图 19 显示来自经免疫的兔的抗血清的结果,其中对所述经免疫的兔测试丙酸特异性抗体的存在。

[0058] 图 20A-C 显示使用竞争性测定测试的抗 PropL 抗体缺少交叉反应性。抗体是丙酸特异性的(图 20A)并且不与丁酸(图 20B)或 5-羟色胺(图 20C)显示交叉反应性。

[0059] 发明详述

[0060] I. 定义

[0061] 术语“a”、“an”或“the”如本文所用不仅包括具有一个成员的方面,还包括具有多于一个成员的方面。例如,包含“多胺化合物和赋形剂”的实施方案应当理解为存在具有至少第二种多胺化合物、至少第二种赋形剂或这两者的某些方面。

[0062] 术语“测定”包括分析物的检测或定量。通常,实施测定需要光输出与所用过氧化物酶的量的关联,从而过氧化物酶是直接测定的物质。尽管本发明可用于确定任何反应物(鲁米诺,过氧化物酶或氧化剂)的存在或量,但是反应物不必然是待测定的物质本身。例如,氧化剂(例如, H_2O_2)可以由先前反应或一系列先前反应产生。

[0063] 抗体或抗原结合片段以与其他代谢物小于 1% 的交叉反应性与目的代谢物特异性结合。如果任何交叉反应性出现,则交叉反应性是最低,如小于与另一种代谢物的交叉反应性的 1%、或约 0.03-0.9%;或 0.02-0.8%;或 0.05% 至 0.5% 或 0.03% -0.9%。

[0064] 如本文所用的“酰基”包括如本文定义的烷基酰基、芳基酰基、杂环酰基或杂芳基酰基。代表性酰基包括乙酰基、苯甲酰基、烟酰基等。

[0065] 如本文所用的“烷基酰基”包括烷基 -C(O)- 基团,其中烷基如本文定义。代表性烷基酰基包含乙酰基、乙基酰基(ethanoyl)等。

[0066] 如本文所用的“烯基”包括含有至少一个碳-碳双键或叁键的 2 个至约 15 个碳原子的直链或分枝的脂族烃基团。优选的烯基具有 2 个至约 12 个碳原子。更优选的烯基含有 2 个至约 6 个碳原子。在一个方面,优选含有碳-碳双键的烃基。在第二方面,优选含有碳-碳叁键的烃基(即,炔基)。如本文所用的“低级烯基”包括 2 个至约 6 个碳原子的烯基。代表性烯基包含乙烯基、烯丙基、正丁烯基、2-丁烯基、3-甲基丁烯基、正戊烯基、庚烯基、辛烯基、癸烯基、丙炔基、2-丁炔基、3-甲基丁炔基、正戊炔基、庚炔基等。

[0067] 烯基可以是未取代或任选地取代的。当任选地取代时,烯基的一个或多个氢原子(例如,1 至 4 个、1 至 2 个、或 1 个)可以更换为独立选自氟、羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、酰氨基、硫代和烷硫基的部分。

[0068] 如本文所用的“亚烯基”包括含有至少一个碳-碳双键或叁键的直链或分枝的双价烃链。优选的亚烯基包括链中的 2 个至约 12 个碳,并且更优选的亚烯基包括链中的 2 个至约 6 个碳。在一个方面,优选含有碳-碳双键的烃基。在第二方面,优选含有碳-碳叁键的烃基。代表性亚烯基包括 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-$ 、亚乙炔基、亚丙炔基、正-亚丁炔基等。

[0069] 如本文所用的“烷氧基”包括烷基-O-基团,其中烷基如本文定义。代表性烷氧基包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、庚氧基等。

[0070] 烷氧基可以是未取代或任选地取代的。当任选地取代时,烷氧基的一个或多个氢原子(例如,1 至 4 个、1 至 2 个、或 1 个)可以更换为独立选自氟、羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、酰氨基、硫代和烷硫基的部分。

[0071] 如本文所用的“烷氧烷基”包括烷基-O-亚烷基,其中烷基和亚烷基如本文定义。代表性烷氧烷基包括甲氧乙基、乙氧甲基、正丁氧甲基和环戊基甲氧乙基。

[0072] 如本文所用的“烷氧羰基”包括酯基;即,烷基-O-CO-基团,其中烷基如本文定义。代表性烷氧羰基包括甲氧羰基、乙氧羰基、叔丁氧羰基等。

[0073] 如本文所用的“烷氧羰基烷基”包括烷基-O-CO-亚烷基,其中烷基和亚烷基如本文定义。代表性烷氧羰基烷基包括甲氧羰基甲基、乙氧羰基甲基、甲氧羰基乙基等。

[0074] 如本文所用的“烷基”包括脂族烃基团,其可以是在链中具有约 1 个至约 20 个碳原子的直链或支链。优选的烷基在链中具有 1 个至约 12 个碳原子。更优选的烷基在链中具有 1 个至 6 个碳原子。如本文所用的“分枝链”包括一种或多种低级烷基如甲基、乙基或丙基与直链烷基链连接。如本文所用的“低级烷基”包括在链中 1 个至约 6 个碳原子、优选地 5 个或 6 个碳原子,所述链可以是直链或分枝的。代表性烷基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔-丁基、正戊基和 3-戊基。

[0075] 烷基可以是未取代或任选地取代的。当任选地取代时,烷基的一个或多个氢原子(例如,1 至 4 个、1 至 2 个、或 1 个)可以更换为独立选自氟、羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、酰氨基、硫代和烷硫基的部分。

[0076] 如本文所用的“亚烷基”包括 1 个至约 6 个碳原子的直链或分枝的双价烃链。优选的亚烷基是具有 1 个至约 4 个碳原子的低级亚烷基。代表性亚烷基包括亚甲基、亚乙基等。

[0077] 如本文所用的“烷硫基”包括烷基-S-基团,其中烷基如本文定义。优选的烷硫基是其中烷基是低级烷基的那些。代表性烷硫基包括甲基硫基、乙基硫基、异丙基硫基、庚基硫基等。

[0078] 如本文所用的“烷基硫代烷基”包括烷硫基-亚烷基,其中在本文定义了烷硫基和亚烷基。代表性烷基硫代烷基包括甲基硫代甲基、乙基硫代丙基、异丙基硫代乙基等。

[0079] 如本文所用的“酰氨基”包括式 $\text{Y}_1\text{Y}_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-$ 的基团,其中 Y_1 和 Y_2 独立地是氢、烷基或烯基;或 Y_1 和 Y_2 连同经其连接 Y_1 和 Y_2 的氮接合以形成 4 元至 7 元氮杂环基(例如,哌啶基)。代表性酰氨基包括伯酰氨基($\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{O})-$)、甲基酰氨基、二甲基酰氨基、二乙基酰氨基等。优选地,“酰氨基”是 $-\text{C}(\text{O})\text{NRR}'$ 基团,其中 R 和 R' 是独立选自 H 和烷基的成员。更优选地,R 和 R' 中至少之一是 H。

[0080] 如本文所用的“酰氨基烷基”包括酰氨基-亚烷基,其中在本文定义了酰氨基和亚

烷基。代表性酰氨基烷基包括酰氨基甲基、酰氨基亚乙基、二甲基酰氨基乙基等。

[0081] 如本文所用的“氨基”包括式 Y_1Y_2N- 的基团,其中 Y_1 和 Y_2 独立地是氢、酰基或烷基;或 Y_1 和 Y_2 连同经其连接 Y_1 和 Y_2 的氮接合以形成 4 元至 7 元氮杂环基(例如,哌啶)。任选的,当 Y_1 和 Y_2 独立地是氢或烷基时,可以添加额外的取代基至氮,产生季铵离子。代表性氨基包括初级氨基(H_2N-)、甲基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基等。优选地,“氨基”是 $-NRR'$ 基团,其中 R 和 R' 是独立选自 H 和烷基的成员。优选地, R 和 R' 中至少之一是 H。

[0082] 如本文所用的“氨基烷基”包括氨基-亚烷基基团,其中本文定义了氨基和亚烷基。代表性氨基烷基包括氨基甲基、氨基乙基、二甲基氨基甲基等。

[0083] 如本文所用的“芳酰基”包括芳基 $-CO-$ 基团,其中本文定义了芳基。代表性芳酰基包括苯甲酰基、萘-1-酰基和萘-2-酰基。

[0084] 如本文所用的“芳基”包括 6 个至约 14 个碳原子、优选地 6 个至约 10 个碳原子的芳族单环或多环系统。代表性芳基包括苯基和萘基。

[0085] 如本文所用的“芳环”包括可以包括零个至 4 个选自氧、硫、硒和氮的杂原子的 5-12 元的芳族单环部分或稠合多环部分。示例性芳环包括苯、吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、三唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪、嘧啶、萘、苯并噻唑啉、苯并噻吩、苯并呋喃、吲哚、苯并吲哚、喹啉等。芳环基团可以在一个或多个位置以卤素、烷基、烷氧基、烷氧基羰基、卤代烷基、氰基、磺酸根(sulfonato)、氨基磺酰基、芳基、磺酰基、氨基羰基、羧基、酰氨基、烷基磺酰基、氨基和取代或未取代的取代基取代。

[0086] 如本文所用的“生物分子”包括生物系统中使用的天然分子或合成分子。优选的生物分子包括蛋白质、肽、酶底物、激素、抗体、抗原、半抗原、抗生物素蛋白、链霉亲和素、糖、糖衍生物、寡糖、多糖和核酸。更优选的生物分子包括蛋白质、肽、抗生物素蛋白、链霉亲和素或生物素。

[0087] 如本文所用的“羧基”和“羧基”包括 $HOC(O)-$ 基团(即,羧酸)或其盐。

[0088] 如本文所用的“羧烷基”包括 $HOC(O)-$ 亚烷基基团,其中本文定义了亚烷基。代表性羧烷基包括羧甲基(即, $HOC(O)CH_2-$) 和羧乙基(即, $HOC(O)CH_2CH_2-$)。

[0089] 如本文所用的“环烷基”包括约 3 个至约 10 个碳原子、优选地约 5 个至约 10 个碳原子的非芳族单环系统或多环系统。更优选的环烷基环含有 5 个或 6 个环原子。环烷基任选地包含至少一个 sp^2 -杂化的碳(例如,并入内环或外环烯烃的环)。代表性单环环烷基包括环戊基、环己基、环己烯基、环庚基等。代表性多环状环烷基包括 1-萘烷、冰片基、金刚烷基等。

[0090] 如本文所用的“环亚烷基”包括具有约 4 个至约 8 个碳原子的双价环烷基。优选的环烯基包括 1,2-、1,3- 或 1,4- 顺-或反-环己烯。

[0091] 如本文所用的“卤素”或“卤素”包括氟、氯、溴或碘。

[0092] 如本文所用的“杂原子”包括除碳或氢之外的原子。代表性杂原子包括 O、S 和 N。杂原子氮或硫原子可以任选地氧化成相应的 N-氧化物、S-氧化物(亚砷)或 S, S-二氧化物(砷)。在优选的方面,杂原子对亚烷基碳原子具有至少两个键(例如, $-C_1-C_9$ 亚烷基 $-O-C_1-C_9$ 亚烷基-)。在一些实施方案中,杂原子进一步用酰基、烷基、芳基、环烷基、杂环基或杂芳基取代(例如, $-N(Me)-$; $-N(Ac)-$)。

[0093] 如本文所用的“羟基烷基”包括如本文定义的以一个或多个羟基取代的烷基。优

选的羟基烷基含有低级烷基。代表性羟基烷基包括羟基甲基和 2-羟基乙基。

[0094] “连接基团”即, L, 包含使代谢物衍生物与生物分子如运载蛋白、生物素或链霉亲和素连接的原子。还参见 R. Haugland, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc. (1992)。在一个实施方案中, L 表示与蛋白质发生接合反应前的连接基团前体, 并且 R^{11} 表示本发明化合物和蛋白质或生物素之间所得到的连接 (即, R^{11} 是与生物分子连接的连接基之间所得到的连接)。优选的反应性官能团包括磷酰亚胺基团、活化酯 (例如, NHS 酯)、硫氰酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺和碘乙酰胺。L 可以包含与环共价连接的末端氨基、羧酸或硫氢基。在某些情况下, 显示末端氨基、羧酸或硫氢基并表示为 $-L-NH_2$ 或 $-L-C(O)OH$ 或 $-L-SH$ 。

[0095] 如本文所用的“氧代”包括式 $>C=O$ 基团 (即, 羰基 $-C(O)-$)。

[0096] 如本文所用的“磺酸根 (sulfonato)”包括 $-SO_3$ 基团, 优选地由阳离子如 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ 等平衡。

[0097] 如本文所用的“磺酸根烷基 (Sulfonatoalkyl)”包括磺酸根-亚烷基, 其中磺酸根和亚烷基如本文定义。更优选的实施方案包括具有 2 个至 6 个碳原子的亚烷基, 并且最优选的实施方案包括具有 2、3 或 4 个碳的亚烷基。代表性磺酸根烷基包括磺酸根甲基、3-磺酸根丙基、4-磺酸根丁基、5-磺酸根戊基、6-磺酸根己基等。

[0098] II. 实施方案

[0099] 5-羟色胺 (5-HT) 在调节胃肠道运动性、分泌和感觉方面发挥至关重要的作用。肠神经系统内部 5-羟色胺能信号传导中 5-HT 水平的不平衡已经与多种病症相关, 所述病症包括如肠易激综合征 (IBS)、功能性消化不良、非心源性胸痛、自闭症和胃溃疡形成。需要同步调节特定神经系统区域内的 5-HT 水平, 并且 5-HT 的分解代谢在这种调节中发挥重要作用。因为 5-HT 分解转化成其他化合物影响 5-HT 的总水平, 所以这些转化产物的形成可以是 5-HT 调节中的重要因素。涉及 5-HT 的三个途径是色氨酸途径、5-羟色胺途径和犬尿氨酸途径。图 1 中显示它们联系的示意图。

[0100] 在某些方面, 本发明提供用于测量色氨酸途径、5-羟色胺途径和犬尿氨酸途径中代谢物的测定。例如, 参考图 1, 测量犬尿氨酸途径内部的 5-HT101、5-HIAA (5-羟基吲哚-3-乙酸) 115 和代谢物允许在辅助诊断 IBS 和其他病理学现象如类癌综合征、抑郁、高血压、自闭症、阿尔茨海默病和偏头痛方面的认识。

[0101] 测量代谢物的现有技术方法不存在或缺少灵敏度、特异性和重现性。另外, 代谢物如 5-HT 和 5-HIAA 非常不稳定, 这使得它们极难以测量。

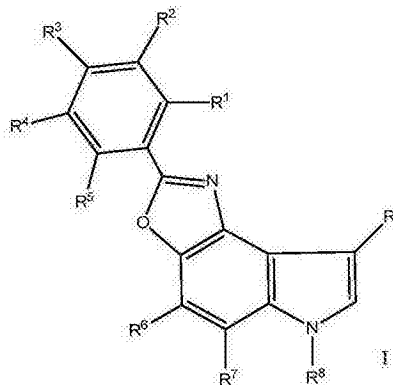
[0102] A. 用于 5-羟色胺途径代谢物的测定

[0103] 在一个方面, 本发明提供代谢物衍生物和其缀合物、用于产生抗体的方法和 5-羟色胺代谢物抗体。在某些方面, 衍生化是优选的, 因为代谢物如 5-HT 和 5-HIAA 对氧敏感并且因此不稳定。血浆中 5-羟色胺的水平范围从约 0.6nmol/L 至 179nmol/L 。在温和条件下 5-HT 和 5-HIAA 的化学衍生化稳定这些化合物。因此, 在一个方面, 本发明提供 5-羟色胺代谢物的稳定的苯并噁唑衍生物。可以通过 HPLC 以高灵敏度的检测到稳定的苯并噁唑衍生物, 原因在于它们的荧光。

[0104] 本发明提供 5-羟色胺 (5-HT) 和 5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA) 的稳定衍生物。

[0105] 在一个方面, 本发明提供式 I 化合物:

[0106]



[0107] 其中 R 是选自烷基、烷氧基、烷氧基烷基、氨烷基、酰氨基烷基、羧基烷基、取代的羧基烷基的成员；并且

[0108] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根 (sulfonato)、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基 (sulfonatoalkyl)、L 和 $R^{11}B$ 的成员；

[0109] L 是接头；

[0110] R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接；并且

[0111] B 是生物分子。

[0112] 在一个方面，R 是选自氨烷基、羧烷基，和取代的羧烷基的成员。在另一个方面，R 是选自 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ 的成员。

[0113] L 表示与生物分子如运载蛋白或生物素接合的连接基团。例如，L 可以包含与环共价连接的末端氨基、羧酸或硫氢基。在某些情况下，显示末端氨基、羧酸或硫氢基并表示为 $-\text{L}-\text{NH}_2$ 或 $-\text{L}-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 或 $-\text{L}-\text{SH}$ 。

[0114] R^{11} 表示本发明化合物和生物分子如运载蛋白、肽或生物素之间所得到的连接（即， R^{11} 包含与生物分子连接的连接基团）。

[0115] L 是选自直接连接或共价键的成员，其中共价键是直链或分枝的、环状或杂环的、饱和的或不饱和的、具有 1-60 个选自 C、N、P、O 和 S 的原子，其中 L 可以具有额外的氢原子以填充价态，其中键含有醚、硫醚、胺、酯、氨基甲酸酯、脲、硫脲、氧代或酰胺键；或单键、双键、叁键或芳族碳-碳键；或磷-氧、磷-硫、氮-氮、氮-氧或氮-铂键；或芳族键或杂芳族键的任何组合。在某些方面，L 包含末端氨基、羧酸或硫氢基。

[0116] 在某些优选的方面，L 具有下式：

[0117] $-\text{X}^1-\text{Y}^1-\text{X}^2-$

[0118] 其中： X^1 是选自双价原子团、直接连接、氧、任选取代的氮和硫的成员； Y^1 是选自直接连接和任选地被杂原子中断的 C_1 - C_{10} 亚烷基的成员；并且 X^2 是选自双价原子团、直接连接、氧、任选取代的氮和硫的成员。

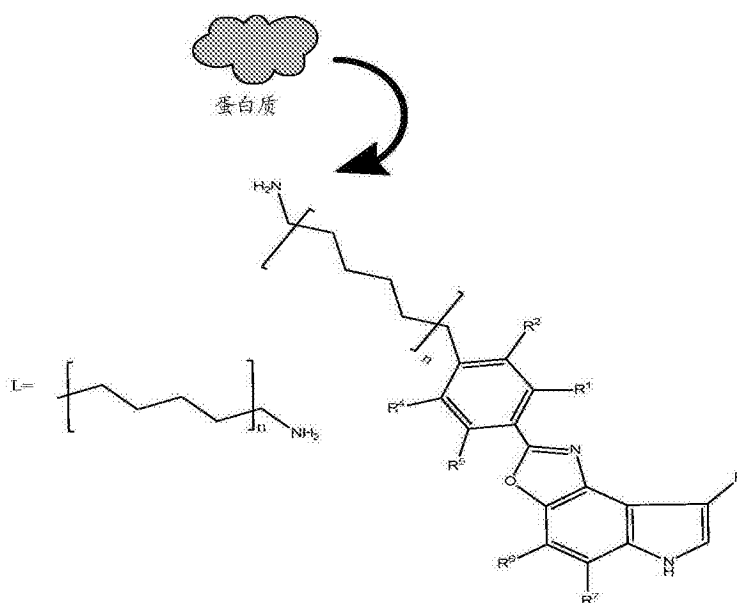
[0119] 优选地， X^1 和 X^2 的双价原子团各自独立地选自直接连接、任选地取代的亚烷基、任选地取代的亚烷基氧羰基、任选地取代的亚烷基氨甲酰基、任选地取代的亚烷基磺酰基、亚芳基磺酰基、任选地取代的亚芳基氧羰基、任选地取代的亚芳基氨甲酰基、任选地取代的硫羰基、任选地取代的磺酰基，和任选地取代的亚磺酰基。

[0120] 在某些优选的方面，L 是 $-(\text{CH}_2)_n-$ ，其中 r 是 1 至 10 的整数，优选地 n 是 1 至 5 的

整数,如 1 至 4,或 1、2、3、4 或 5。

[0121] 此外,苯并咪唑衍生物可以用来产生免疫原性缀合物。例如,在一个方面,本发明的缀合物用来产生目的代谢物特异性的免疫原性反应。在某些情况下,苯并咪唑衍生物和接头臂(其中 n 是约 1-4)可以用来附着运载蛋白如 BSA 至氨基(或硫氢基)末端。为了检验如此产生的抗体的亲和力和特异性,产生生物素化的半抗原。本发明提供 5-羟色胺途径中 5-羟色胺(5-HT)、5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)和其他代谢物的稳定衍生物。衍生物可以与生物分子如运载蛋白缀合并与佐剂组合以刺激免疫反应。衍生物也可以与其他生物分子缀合。在某些方面,一种用于进一步缀合的 5-羟色胺代谢物衍生具有以下结构:

[0122]

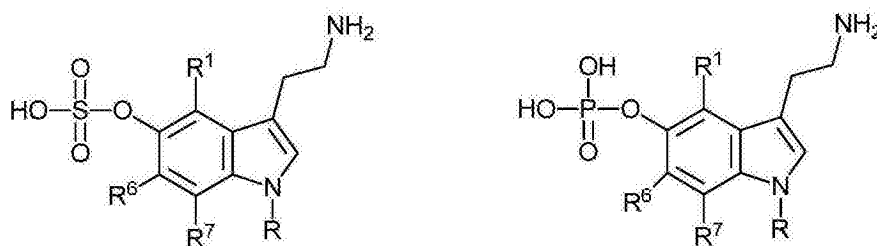


[0123] 使用本领域熟知的缀合化学,式 I 的化合物可以与运载分子反应。例如,活化的酯(NHS 酯)可以与伯胺反应以产生稳定的酰胺键。马来酰亚胺和巯基可以在一起反应并且产生硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应以分别产生烷基胺和硫醚。可以在本文中利用提供反应性部分的任何衍生物,所述反应性部分可以与蛋白质缀合。如本领域已知的,包含游离氨基、游离羧酸基或游离硫氢基的部分提供可用于蛋白质缀合的反应性基团。例如,游离氨基可以通过戊二醛交联至或通过碳二亚胺交联至蛋白质上的可用羧基部分,与蛋白质缀合。另外,具有游离硫氢基的半抗原可以通过马来酰亚胺激活蛋白质,例如,使用磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧化物(磺基-SMCC),随后连接至硫氢基,与蛋白质缀合。

[0124] 当连接具有羧酸基的运载蛋白以接合至含胺代谢物时,可以首先使用活化试剂,将羧酸转化为反应性更强的形式,以形成例如 N-羧琥珀酰亚胺(NHS)酯或混合酐。含胺代谢物用所产生的活化的酸处理以形成酰胺键。本领域技术人员会认识到备选地,NHS 酯可以在代谢物上并且胺可以在运载蛋白上。

[0125] 通过衍生化使代谢物稳定的过程允许产生针对免疫原性缀合物的抗体。采用这些抗体时,可以使用其中抗体对目的代谢物高度特异型的免疫测定如 ELISA。在其他情况下,如下文显示,衍生物包括 5-羟色胺-O-硫酸酯和 5-羟色胺-O-磷酸酯:

[0126]



[0127] 其中 R、R¹、R⁶和 R⁷各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 R¹¹B 的成员；

[0128] 如图 1 中所示,5- 羟色胺途径中的目的代谢物例如是 5- 羟色胺 101、5- 羟基吲哚乙醛 105 和 5- 羟基吲哚乙酸 115。因此,在一个方面,本发明提供与 5- 羟色胺 (5-HT) 101 特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对一种或多种代谢物如选自色氨酸 122,5- 羟基色氨酸 125 和 5- 羟基吲哚乙酸 115 的成员具有小于 1% 交叉反应性。在另一个方面,本发明提供与 5- 羟基吲哚乙酸 115 特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对选自色氨酸 122,5- 羟基色氨酸 125,和 5- 羟色胺 (5-HT) 101 的一种或多种代谢物具有小于 1% 交叉反应性。

[0129] 现在转向图 2,在一个方面,本发明提供针对代谢物缀合物的抗体。在步骤 201 中,制备代谢物或其稳定的衍生物。在步骤 222 中,运载蛋白如牛血清白蛋白 BSA 与衍生物缀合。在步骤 231 中,通过将缀合物注射至哺乳动物如兔、小鼠、羊、鸡、山羊等,产生抗体。此后,生物素化的半抗原 251 可以用来检验如此产生的抗体。

[0130] 在其他方面,本发明提供用于产生抗体的方法。该方法包括：

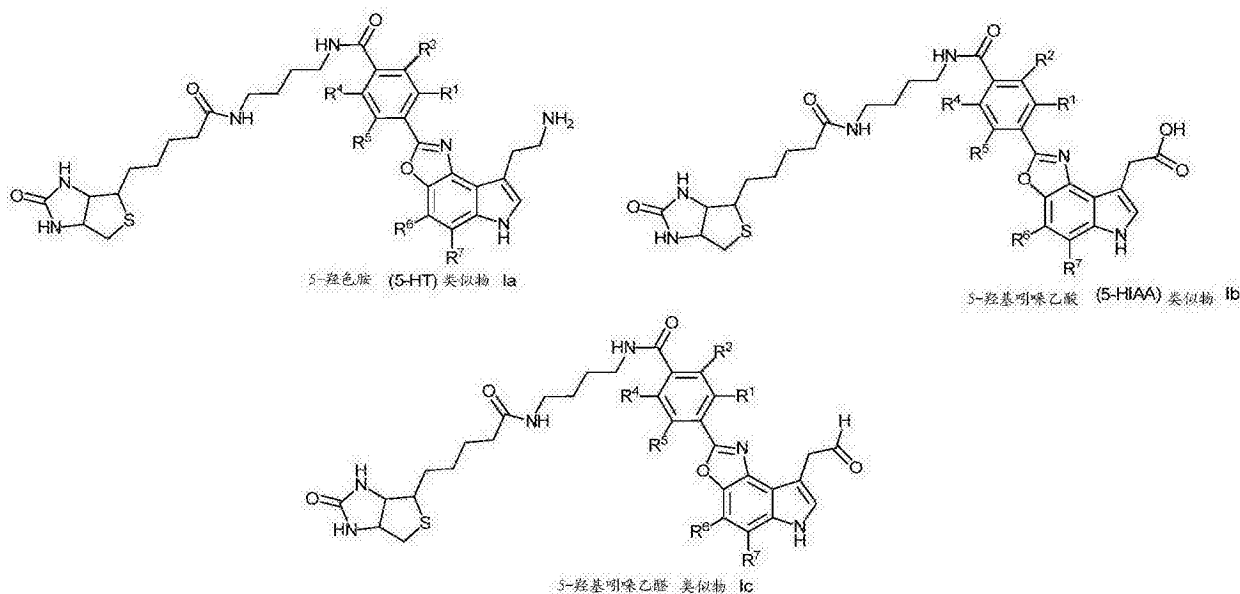
[0131] (a) 提供免疫原,所述免疫原包含选自 5- 羟色胺 (5-HT)、5- 羟基吲哚乙酸 (5-HIAA) 和 5- 羟基色氨酸 (5-HTP) 的衍生物,所述衍生物各自与运载蛋白缀合；

[0132] (b) 在使得动物的免疫系统产生抗体的如此条件下用免疫原免疫动物；并且

[0133] (c) 从动物取出抗体。

[0134] 在一个方面,可以使用本发明的缀合物从血清取出从哺乳动物生成的抗体。例如,在一个方面,式 Ia、Ib 和 Ic 的化合物可以用来从血清取出抗体,其缀合物具有以下结构：

[0135]



[0136] 生物素化的式 Ia、Ib 和 Ic 的化合物可以用来从哺乳动物（如兔、小鼠或山羊）取出它们的相应抗体。此后，第二抗体用来检测抗体缀合物。

[0137] 在另一个方面，通过使用免疫测定如 ELISA 或 CEER，使用本文所述的方法如此产生的抗体可以用来定量目的途径中代谢物的量或水平。

[0138] 在一个方面，本发明提供其中实施抗体-抗原反应的测定方法。例如，允许抗原或代谢物如 5-HT 与过氧化物酶标记的抗体反应以形成抗原-抗体复合物。随后允许如此形成的抗原-抗体复合物与固定的抗体反应，从而过氧化物酶的活性由化学发光度量，其中通过与例如充当底物的鲁米诺反应生成所述化学发光度。因而测量代谢物的存在、浓度和或水平。

[0139] 在某些情况下，本发明的抗体在免疫测定如酶联免疫吸附测定 (ELISA) 中使用，所述免疫测定利用酶标记物检测代谢物存在、水平和浓度。在一个方面，本发明的特异性抗体吸附至平板。非特异性位点用蛋白质溶液封闭，所述蛋白质在特定测定的特异性免疫化学反应中没有活性部分。目的代谢物由平板上的抗体捕获。此后，缀合物可以由具有酶标记物的另一种抗体检测。酶标记物与化学发光试剂反应并检出。

[0140] 在另一个 ELISA 实施方案中，代谢物或衍生物可以固定化。本发明的抗体可以用来与固定化的代谢物结合。此后，缀合物可以由具有酶标记物的另一种抗体检测。酶标记物随后与化学发光试剂反应并检出。

[0141] 检测本文所述的任何代谢物的测定方法可以包括本领域已知的任何免疫测定法。在一些方面，测定在液相中进行。在其他实施方案中，测定在固相上进行，例如，在珠或微量平板（例如 96 孔微量滴定板）上进行。可用于这些方法中的免疫测定的非限制性例子是放射免疫测定、微阵列测定、荧光偏振免疫测定、包含 FRET 的免疫测定、酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或 CEER。

[0142] 本领域中已知的作为可用于半抗原检测的任何 ELISA 可以用于本发明的测定。半抗原的 ELISA 通常利用竞争性样式，即，其中样品中的半抗原（代谢物）与经标记的半抗原（例如，生物素-半抗原或酶-半抗原缀合物）竞争抗-半抗原抗体结合位点，从而当样品中存在更多半抗原时，更少的经标记的半抗原结合。因此，在这些竞争性测定法中，样品中

渐增量的半抗原导致更少的酶与固相结合,并且因此导致有色信号更少。在这类竞争性测定中,样品可以随经标记的半抗原添加以直接竞争抗体结合位点,或样品和经标记的半抗原可以依次添加使得仅经标记的半抗原结合而样品半抗原不结合。

[0143] 在一些实施方案中,ELISA 是直接竞争性 ELISA,其中半抗原与发信号酶直接结合,或是间接竞争性 ELISA,其中酶与另一种分子(例如第二抗体或链霉亲和素)结合。

[0144] 在一个实施方案中,本文中产生的抗体直接或间接地与固相结合,间接结合是其中固相用抗-抗体(例如与兔 IgG 抗体结合的山羊抗体(山羊抗兔 IgG)包被并且抗体与抗-抗体结合。抗-抗体也称作“第二抗体”。在这些测定中,将样品和经标记的半抗原添加至固相以竞争经包被的固相上的抗体结合位点。在洗涤后,生成信号,所述信号测量与固相结合的经标记的半抗原的量。

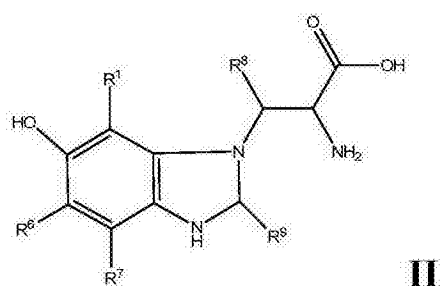
[0145] B. 用于色氨酸途径代谢物的测定

[0146] 在另一个方面,本发明提供抗原以产生色氨酸途径中代谢物的抗体。在某些情况下,肠易激综合征(IBS)中 5-羟色胺功能的不规律性归因于 5-羟色胺前体,L-色氨酸 122 代谢的变化。色氨酸 122 是充当 5-羟色胺前体的必需氨基酸、但是其可以备选地在犬尿氨酸途径内部代谢,导致其他神经活性物质产生。

[0147] 本发明提供针对 5-羟基色氨酸(5-HTP)的抗体和用于制备针对 5-羟基色氨酸(5-HTP)的抗体的方法。

[0148] 色氨酸代谢物衍生化成苯并咪唑(类似于 5-羟色胺代谢物)是任选的。色氨酸途径中的目的代谢物例如是 5-羟基色氨酸(5-HTP) 125 和色氨酸 122。在一个方面,色氨酸代谢物衍生物具有式 II 的结构:

[0149]



[0150] R^1 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^9 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 R^{11} B 的成员;

[0151] L 是接头;

[0152] R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接;并且

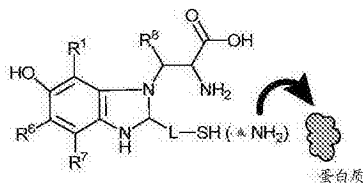
[0153] B 是生物分子。

[0154] 在另一个方面,使用本领域熟知的缀合化学,式 II 的化合物可以用来缀合运载蛋白,以产生抗体。活化的酯(NHS 酯)可以与伯胺反应以产生稳定的酰胺键。马来酰亚胺和巯基可以在一起反应并且产生硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应以分别产生烷基胺和硫醚。可以在本文中利用提供反应性部分的任何衍生物,所述反应性部分可以与蛋白质缀合。如本领域已知的,包含游离氨基、游离羧酸基或游离硫氢基的部分提供可用于蛋白质缀合的反应性基团。例如,游离氨基可以通过戊二醛交联至或通过碳二亚胺交联至蛋白质上

的可用羧基部分,与蛋白质缀合。另外,具有游离硫氢基的半抗原可以通过马来酰亚胺激活蛋白质(例如,使用磺基琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧化物(磺基-SMCC)),随后连接至硫氢基,与蛋白质缀合。

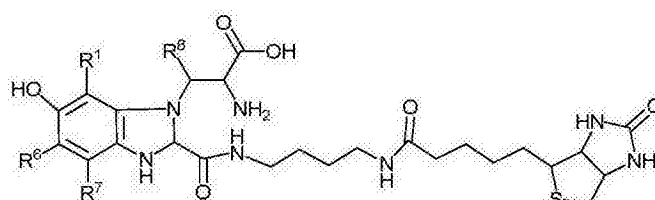
[0155] 一种缀合的示例性示意图如下:

[0156]



[0157] 可以使用本发明的缀合物从血清取出从哺乳动物生成的抗体。例如,在一个方面,式 II 的化合物具有式 IIa 的结构:

[0158]



5-羟基色氨酸 (5-HTP) 生物素衍生物 IIa

[0159] 本发明还提供 5-羟基色氨酸 (5-HTP) 的稳定的衍生物和用于产生抗体的方法。该方法包括:

[0160] (a) 提供包含 5-羟基色氨酸 (5-HTP) 的衍生物的免疫原;

[0161] (b) 在使得动物的免疫系统产生抗体的如此条件下用免疫原免疫动物;并且

[0162] (c) 从动物取出抗体。

[0163] 在另一个方面,本发明提供与 5-羟基色氨酸 (5-HTP) 125 特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其中抗体对选自色氨酸 122、5-羟色胺 (5-HT) 101 和 5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA) 125 的一种或多种成员具有小于 1% 交叉反应性。

[0164] 在某些其他方面,本发明提供测定来自哺乳动物(如人)的流体样品或组织样品中 5-羟基色氨酸 (5-HTP) 的方法。该方法包括将样品与本文所述的抗体组合,随后确定抗体是否与来自样品的 5-羟基色氨酸 (5-HTP) 特异性结合。例如,在这些方法中,特异性抗体与来自样品的 (5-HTP) 结合表示样品中存在 5-羟色胺 (5-HTP)。

[0165] 在某些情况下,本发明的抗体在免疫测定如酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或 CEER 中使用,所述免疫测定可以利用酶标记物检测代谢物水平和浓度。

[0166] C. 用于犬尿氨酸途径代谢物的测定

[0167] 在某些情况下,犬尿氨酸途径代谢物在内脏疼痛机理中发挥作用并且已经与 IBS 中的低水平免疫活化联系。仅 1% 的饮食色氨酸转化成 5-羟色胺并且超过 95% 代谢成犬尿氨酸。犬尿氨酸水平和“犬尿氨酸:色氨酸比率”在 IBS 中均显著升高。犬尿氨酸途径包括产生喹啉酸,一种牵涉神经退行性过程的 NMDA 受体兴奋性毒素。通常,IBS 患者显示犬尿烯酸 (N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体拮抗剂) 浓度降低和邻氨基苯甲酸和 3-羟基邻氨基苯甲酸(内源性 NMDA 受体激动剂的前体) 增加。色氨酸沿犬尿氨酸途径的代谢在 IBS-D

中被抑制。本发明提供免疫测定以确定色氨酸和犬尿氨酸途径代谢物的水平,所述水平对确定 IBS 患者状态具有诊断重要性。

[0168] 本发明还提供犬尿氨酸 (K)、犬尿烯酸 (KA)、3- 羟基犬尿氨酸 (3-HK)、3- 羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA)、喹啉酸和邻氨基苯甲酸的稳定衍生物。衍生物可以与生物分子如运载蛋白缀合并与佐剂组合以刺激免疫反应。衍生物也可以与其他生物分子缀合。

[0169] 在其他方面,本发明提供用于产生抗体的方法。该方法包括:

[0170] (a) 提供免疫原,所述免疫原包含选自犬尿氨酸 (K)、犬尿烯酸 (KA)、3- 羟基犬尿氨酸 (3-HK)、3- 羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA)、喹啉酸和邻氨基苯甲酸的衍生物,所述衍生物各自与运载蛋白缀合;

[0171] (b) 在使得动物的免疫系统产生抗体的如此条件下用免疫原免疫动物;并且

[0172] (c) 从动物取出抗体。

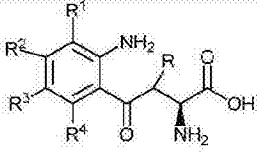
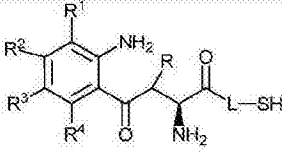
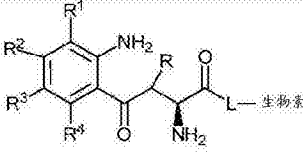
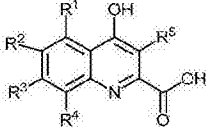
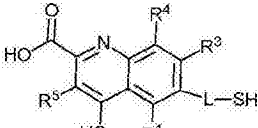
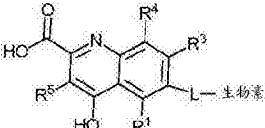
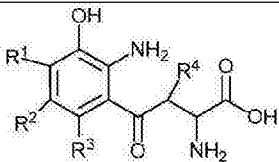
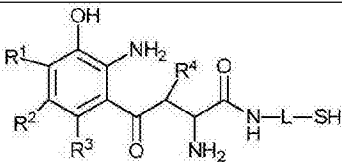
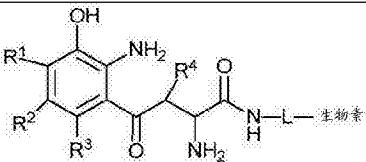
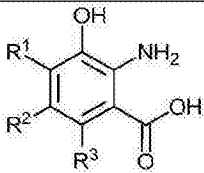
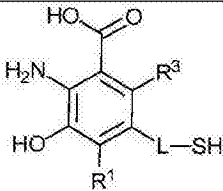
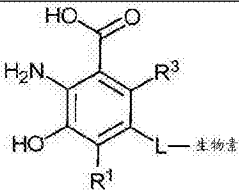
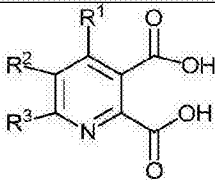
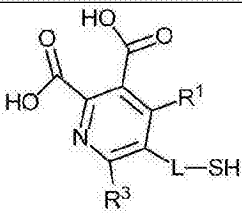
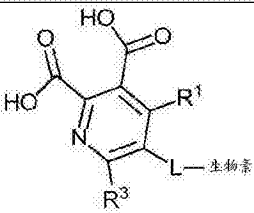
[0173] 在某些其他方面,本发明提供用于测定来自哺乳动物(如人)的流体样品或组织样品中选自犬尿氨酸 (K)、犬尿烯酸 (KA)、3- 羟基犬尿氨酸 (3-HK)、3- 羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA)、喹啉酸和邻氨基苯甲酸的代谢物的方法。该方法包括将与样品与本文所述的抗体组合,并且随后确定抗体是否与来自样品的 5- 羟色胺 (5-HT)、5- 羟基吲哚乙酸 (5-HIAA)、5- 羟基色氨酸 (5-HTP)、犬尿氨酸 (K)、犬尿烯酸 (KA)、3- 羟基犬尿氨酸 (3-HK)、3- 羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA)、喹啉酸和邻氨基苯甲酸特异性结合。例如,在这些方法中,特异性抗体与来自样品的犬尿氨酸结合表示样品中存在犬尿氨酸。

[0174] 在某些方面,本发明的免疫测定提供了监测的生物流体中代谢物的可靠和便利方式。本发明提供高特异性和高度灵敏的可靠免疫测定用于犬尿氨酸代谢物的检测和定量。

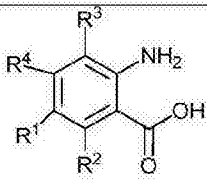
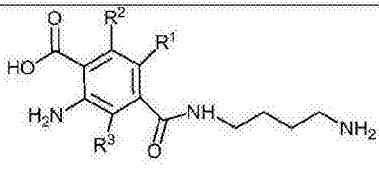
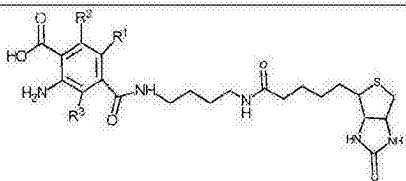
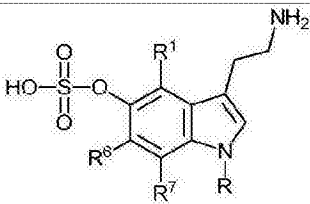
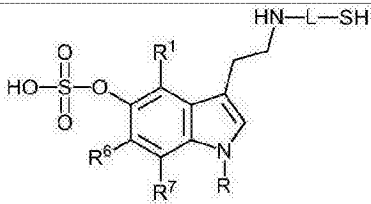
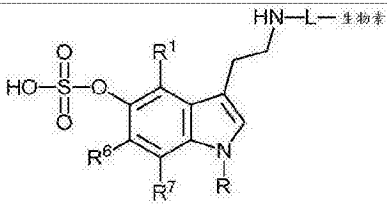
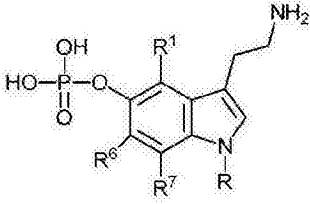
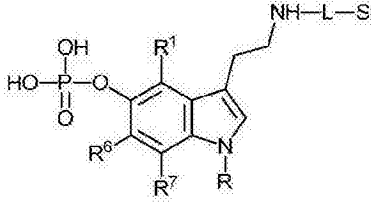
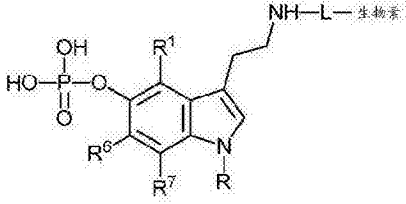
[0175] 如图 1 中所示,在某些情况下,犬尿氨酸途径的代谢物包括犬尿氨酸 131、犬尿烯酸 135、3- 羟基犬尿氨酸 146、3- 羟基邻氨基苯甲酸 149、喹啉酸 160、邻氨基苯甲酸 140 和黄尿酸 148。本发明提供对这些代谢物中每一者特异的抗体使得还提供高度特异和灵敏的免疫测定。

[0176] 表 I 显示特定目的代谢物、相对应的代谢物类似物和本发明的生物素化的类似物。

[0177]

	代谢物	具有接头的类似物	生物素化的类似物
1	 犬尿氨酸(K) (III)		
2	 犬尿烯酸(IV)		
3	 3-羟基犬尿氨酸 (3-HK) (V)		
4	 3-羟基邻氨基苯甲 酸(3-HAA) (VI)		
5			

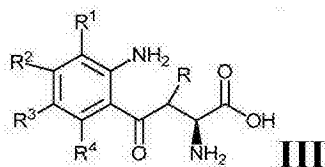
[0178]

	喹啉酸(VII)		
6	 邻氨基苯甲酸(AA) (VIII)		
7	 5-羟色胺-O-硫酸		
8	 5-羟色胺-O-磷酸		

[0179] 在上文L可以包含与环共价连接的末端氨基、羧酸或硫氢基。在某些情况下,显示末端氨基、羧酸或硫氢基并表示为 $-L-NH_2$ 或 $-L-C(O)OH$ 或 $-L-SH$ 。

[0180] 在又一个方面,本发明提供式 III 的化合物:

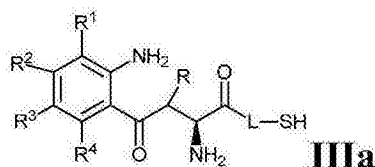
[0181]



[0182] 其中 R 、 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、 L 和 $R^{11}B$ 的成员, L 是接头;并且 R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接;并且 B 是生物分子。式 III 的化合物可用于产生对犬尿氨酸特异的抗体。

[0183] 在一个方面,式 III 的化合物具有式 IIIa 的结构,其中 L 包含末端 SH :

[0184]

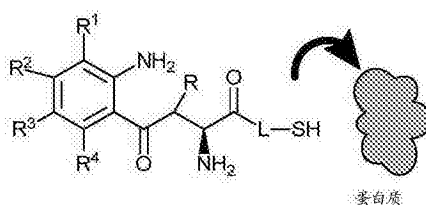


[0185] 其中在某些情况下,硫醇基可以用来结合运载蛋白、生物素或其他生物分子。

[0186] 在另一个方面,使用本领域熟知的缀合化学,式 III 的化合物可以用来缀合运载蛋白,以产生抗体。例如,活化的酯(NHS 酯)可以与伯胺反应以产生稳定的酰胺键。马来酰亚胺和巯基可以在一起反应以产生硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应以分别产生烷基胺和硫醚。可以在本文中利用提供反应性部分的任何衍生物,所述反应性部分可以与蛋白质缀合。如本领域已知的,包含游离氨基、游离羧酸基或游离硫氢基的部分提供可用于蛋白质缀合的反应性基团。例如,游离氨基可以通过戊二醛交联至或通过碳二亚胺交联至蛋白质上的可用羧基部分,与蛋白质缀合。另外,具有游离硫氢基的半抗原可以通过马来酰亚胺激活蛋白质(例如,使用磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧化物(磺基-SMCC)),随后连接至硫氢基,与蛋白质缀合。

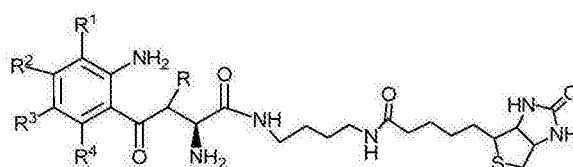
[0187] 缀合的示例性示意图如下,其中 L 包含末端 SH:

[0188]



[0189] 可以使用本发明的缀合物从血清取出从哺乳动物生成的抗体。例如,在一个方面,式 III 的化合物具有式 IIIa 的结构:

[0190]

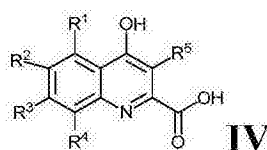


[0191] 其中 R、R¹、R²、R³和 R⁴各自是氢。

[0192] 在一个方面,本发明提供与犬尿氨酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,并且其中抗体对选自犬尿烯酸 135、3-羟基犬尿氨酸 146、3-羟基邻氨基苯甲酸 149、喹啉酸 160 和邻氨基苯甲酸 140 的一种或多种成员具有小于 1% 交叉反应性。

[0193] 在又一个方面,本发明提供式 IV 的化合物:

[0194]



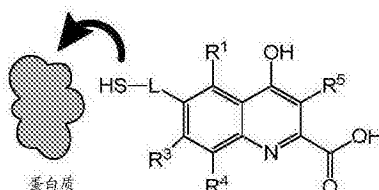
[0195] 其中 R¹、R²、R³、R⁴和 R⁵各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 R¹¹B 的成员; L 是接头; R¹¹是在化合物和生物分子之间所得

到的连接；并且 B 是生物分子。式 IV 的化合物可用于产生对犬尿烯酸 135 特异的抗体。

[0196] 在另一个方面，使用本领域熟知的缀合化学，式 IV 的化合物可以用来缀合运载蛋白，以产生抗体。例如，活化酯的（NHS 酯）可以与伯胺反应以产生稳定的酰胺键。马来酰亚胺和巯基可以在一起反应并且产生硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应以分别产生烷基胺和硫醚。可以在本文中利用提供反应性部分的任何衍生物，所述反应性部分可以与蛋白质缀合。如本领域已知的，包含游离氨基、游离羧酸基或游离硫氢基的部分提供可用于蛋白质缀合的反应性基团。例如，游离氨基可以通过戊二醛交联至或通过碳二亚胺交联至蛋白质上的可用羧基部分，与蛋白质缀合。另外，具有游离硫氢基的半抗原可以通过马来酰亚胺激活蛋白质（例如，使用磺基琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧化物（磺基-SMCC）），随后连接至硫氢基，与蛋白质缀合。

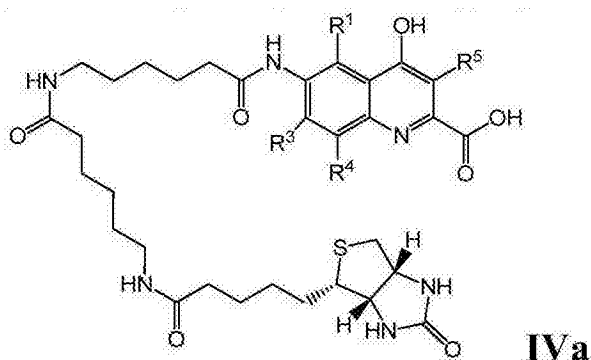
[0197] 缀合的示例性示意图如下，其中 L 包含末端 SH：

[0198]



[0199] 可以使用本发明的缀合物从血清取出从哺乳动物生成的抗体。例如，在一个方面，式 IV 的化合物具有式 IVa 的结构：

[0200]

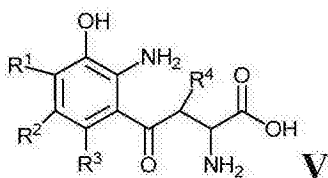


[0201] 其中 R¹、R³、R⁴和 R⁵各自是氢。

[0202] 在另一个方面，本发明提供与犬尿烯酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段，并且其中抗体对选自犬尿氨酸 131、3-羟基犬尿氨酸 146、3-羟基邻氨基苯甲酸 149、喹啉酸 160 和邻氨基苯甲酸 140 的一种或多种成员具有小于 1% 交叉反应性。

[0203] 在又一个方面，本发明提供式 V 的化合物：

[0204]



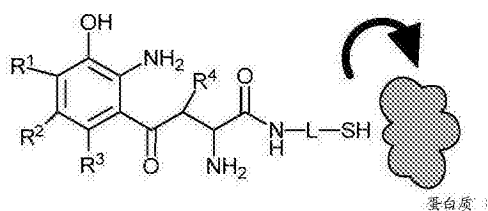
[0205] 其中 R¹、R²、R³和 R⁴各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷

氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 R^{11} 的成员；式 V 的化合物可用于制备针对 3- 羟基犬尿氨酸 (3-HK) 146 的抗体。

[0206] 在另一个方面,使用本领域熟知的缀合化学,式 V 的化合物可以用来缀合运载蛋白,以产生抗体。例如,活化的酯 (NHS 酯) 可以与伯胺反应以产生稳定的酰胺键。马来酰亚胺和巯基可以在一起反应并且产生硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应以分别产生烷基胺和硫醚。可以在本文中利用提供反应性部分的任何衍生物,所述反应性部分可以与蛋白质缀合。如本领域已知的,包含游离氨基、游离羧酸基或游离硫氢基的部分提供可用于蛋白质缀合的反应性基团。例如,游离氨基可以通过戊二醛交联至或通过碳二亚胺交联至蛋白质上的可用羧基部分,与蛋白质缀合。另外,具有游离硫氢基的半抗原可以通过马来酰亚胺激活蛋白质 (例如,使用磺基琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧化物 (磺基-SMCC)), 随后连接至硫氢基,与蛋白质缀合。

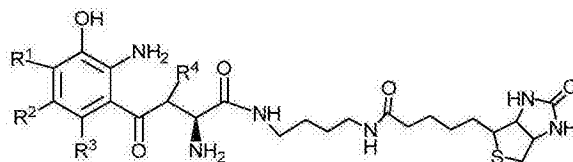
[0207] 缀合的示例性示意图如下,其中 L 包含末端 SH:

[0208]



[0209] 可以使用本发明的缀合物从血清取出从哺乳动物生成的抗体。例如,在一个方面,式 V 的化合物具有式 Va 的结构:

[0210]

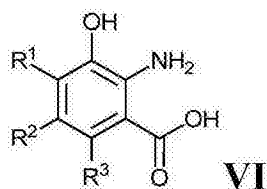


[0211] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自是氢。

[0212] 在又一个方面,本发明提供与 3- 羟基犬尿氨酸 (3-HK) 特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,并且其中抗体对选自犬尿氨酸 131、犬尿烯酸 135、3- 羟基邻氨基苯甲酸 149、喹啉酸 160 和邻氨基苯甲酸 140 的一种或多种成员具有小于 1% 交叉反应性。

[0213] 在又一个方面,本发明提供式 VI 的化合物:

[0214]



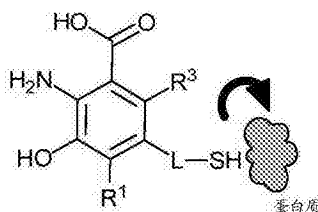
[0215] 其中 R^1 、 R^2 和 R^3 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 R^{11} 的成员;L 是接头;并且 R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接。式 VI 的化合物可用于产生针对 3- 羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA) 149 的抗体。

[0216] 在另一个方面,使用本领域熟知的缀合化学,式 VI 的化合物可以用来缀合运载蛋

白,以产生抗体。活化的酯(NHS 酯)可以与伯胺反应以产生稳定的酰胺键。马来酰亚胺和巯基可以在一起反应并且产生硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应以分别产生烷基胺和硫醚。可以在本文中利用提供反应性部分的任何衍生物,所述反应性部分可以与蛋白质缀合。如本领域已知的,包含游离氨基、游离羧酸基或游离硫氢基的部分提供可用于蛋白质缀合的反应性基团。例如,游离氨基可以通过戊二醛交联至或通过碳二亚胺交联至蛋白质上的可用羧基部分,与蛋白质缀合。另外,具有游离硫氢基的半抗原可以通过马来酰亚胺激活蛋白质(例如,使用磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧化物(磺基-SMCC)),随后连接至硫氢基,与蛋白质缀合。

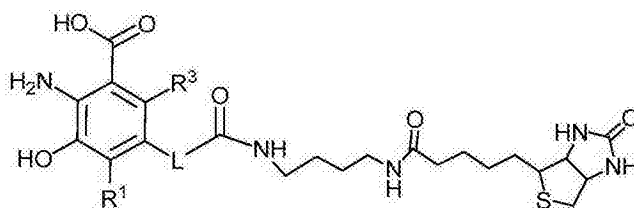
[0217] 缀合的示例性示意图如下,其中 L 包含末端 SH:

[0218]



[0219] 可以使用本发明的缀合物从血清取出从哺乳动物生成的抗体。例如,在一个方面,式 VI 的化合物具有式 VIa 的结构:

[0220]

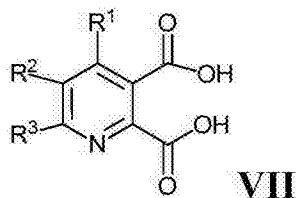


[0221] 其中 R^1 和 R^3 各自是氢。

[0222] 在又一个方面,本发明提供与 3-羟基邻氨基苯甲酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,并且其中抗体对选自犬尿氨酸 131、犬尿烯酸 135、3-羟基犬尿氨酸 146、喹啉酸 160 和邻氨基苯甲酸 140 的一种或多种成员具有小于 1% 交叉反应性。

[0223] 在又一个方面,本发明提供式 VII 的化合物:

[0224]



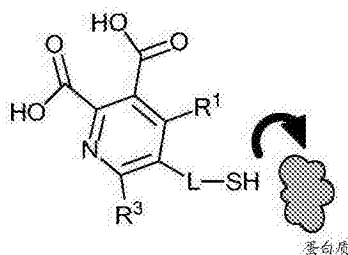
[0225] 其中 R^1 、 R^2 和 R^3 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 $R^{11}B$ 的成员, L 是接头; R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接;并且 B 是生物分子。这些化合物可用于制备喹啉酸的抗体。

[0226] 在另一个方面,使用本领域熟知的缀合化学,式 VII 的化合物可以用来缀合运载蛋白。例如,活化的酯(NHS 酯)可以与伯胺反应以产生稳定的酰胺键。马来酰亚胺和巯基可以在一起反应并且产生硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应以分别产生烷基胺和硫醚。

可以在本文中利用提供反应性部分的任何衍生物,所述反应性部分可以与蛋白质缀合。如本领域已知的,包含游离氨基、游离羧酸基或游离硫氢基的部分提供可用于蛋白质缀合的反应性基团。例如,游离氨基可以通过戊二醛交联至或通过碳二亚胺交联至蛋白质上的可用羧基部分,与蛋白质缀合。另外,具有游离硫氢基的半抗原可以通过马来酰亚胺激活蛋白质(例如,使用磺基琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧化物(磺基-SMCC)),随后连接至硫氢基,与蛋白质缀合。

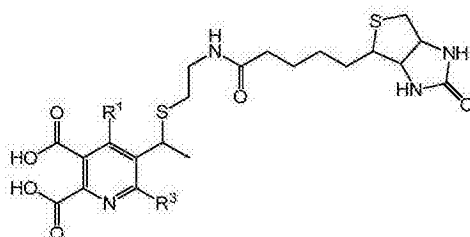
[0227] 缀合的示例性示意图如下,其中 L 包含末端 SH:

[0228]



[0229] 可以使用本发明的缀合物从血清取出从哺乳动物生成的抗体。例如,在一个方面,式 VII 的化合物具有式 VIIa 的结构:

[0230]

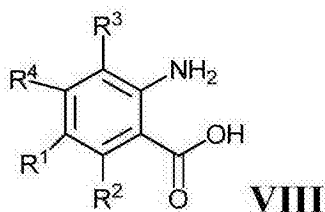


[0231] 其中 R^1 和 R^3 各自是氢。

[0232] 在一个方面,本发明提供与喹啉酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,并且其中抗体对选自犬尿氨酸、犬尿烯酸 3-羟基犬尿氨酸、3-羟基邻氨基苯甲酸和邻氨基苯甲酸的一种或多种成员具有小于 1% 交叉反应性。

[0233] 在又一个方面,本发明提供式 VIII 的化合物:

[0234]



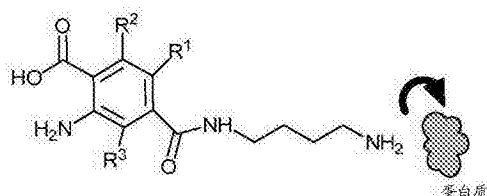
[0235] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 $R^{11}B$ 的成员, L 是接头; R^{11} 是在化合物和生物分子之间所得到的连接; 并且 B 是生物分子。式 VIII 的化合物可用于制造及产生针对邻氨基苯甲酸的抗体。

[0236] 在另一个方面,使用本领域熟知的缀合化学,式 VIII 的化合物可以用来缀合运载蛋白。例如,活化的酯(NHS 酯)可以与伯胺反应以产生稳定的酰胺键。马来酰亚胺和巯基可以反应并且产生硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应以分别产生烷基胺和硫醚。可以在本

文中利用提供反应性部分的任何衍生物,所述反应性部分可以与蛋白质缀合。如本领域已知的,包含游离氨基、游离羧酸基或游离硫氢基的部分提供可用于蛋白质缀合的反应性基团。例如,游离氨基可以通过戊二醛交联至或通过碳二亚胺交联至蛋白质上的可用羧基部分,与蛋白质缀合。另外,具有游离硫氢基的半抗原可以通过马来酰亚胺激活蛋白质(例如,使用磺基琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧化物(磺基-SMCC)),随后连接至硫氢基,与蛋白质缀合。

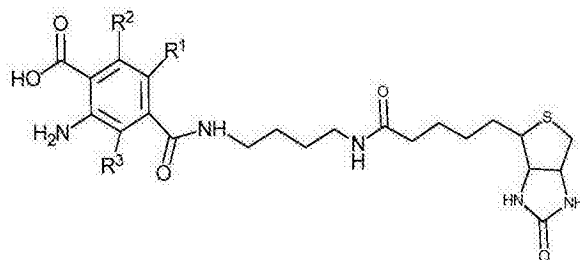
[0237] 缀合的示例性示意图如下,其中 L 包含末端 SH:

[0238]



[0239] 可以使用本发明的缀合物从血清取出从哺乳动物生成的抗体。例如,在一个方面,式 VII 的化合物具有式 VIIIa 的结构:

[0240]



[0241] 其中 R¹、R²和 R³各自是氢。

[0242] 在又一个方面,本发明提供与邻氨基苯甲酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,并且其中抗体对选自犬尿氨酸、犬尿烯酸 3-羟基犬尿氨酸、3-羟基邻氨基苯甲酸和喹啉酸的一种或多种成员具有小于 1% 交叉反应性。

[0243] 在另一个方面,本发明提供针对图 1 中每种代谢物的抗体,所述抗体对任何其他代谢物具有小于 1% 交叉反应性。

[0244] 在某些其他方面,本发明提供测定来自哺乳动物(如人)的流体样品或组织样品中选自犬尿氨酸(K)、犬尿烯酸(KA)、3-羟基犬尿氨酸(3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA)、喹啉酸、邻氨基苯甲酸及其组合的成员的方法。

[0245] 方法包括将样品与本文所述的抗体组合,并且随后确定抗体是否与来自样品的选自犬尿氨酸(K)、犬尿烯酸(KA)、3-羟基犬尿氨酸(3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA)、喹啉酸、邻氨基苯甲酸及其组合的成员特异性结合。例如,在这些方法中,特异性抗体与来自样品的 3-HK 结合表示样品中存在 3-HK。

[0246] D. 用于短链脂肪酸的测定

[0247] 在某些方面,本发明提供用于短链脂肪酸(SCFA)的测定。例如,具有 IBS-D 的儿科患者的粪便 SCFA 谱以低浓度的总 SCFA、乙酸盐和丙酸盐和高浓度和百分数的正丁酸盐为特征。具有 IBS-D 的患者中结肠细菌菌群产生 SCFA 的差异能够与胃肠道症状的发展相关。研究已经显示,已知韦荣球菌属(Veillonella)和乳杆菌属(Lactobacillus)的组合产生

乙酸和丙酸。高水平的乙酸和丙酸可与腹部症状和受损的生活质量相关（参见，Treem WR, J Pediatr Gastroenterol Nutr., 1996Oct;23(3):280-6; Le Gall等人, J Proteome Res., 2011Sep 2;10(9):4208-1; 和 Tana C., Neurogastroenterol Motil., 2010May;22(5):512-9）。

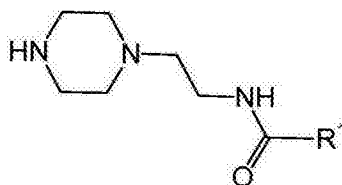
[0248] 本发明提供免疫测定如 ELISA 和 CEER 以测量 SCFA 水平和浓度以确定 IBS 易感性或辅助诊断 IBS。

[0249] 本发明提供针对短链脂肪酸的抗体和产生针对短链脂肪酸的抗体的方法。制备的抗体对相关的代谢物具有低交叉反应性,并且是用于丙酸和丁酸的特异性和灵敏的免疫测定的试剂。

[0250] 本发明还提供短链脂肪酸 (SCFA) (如丙酸和丁酸) 的稳定衍生物。衍生物可以与生物分子如运载蛋白缀合并与佐剂组合以刺激免疫反应。衍生物也可以与其他生物分子缀合。

[0251] 归因于乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐的分子尺寸小,接头可以用来缀合 SCFA 以产生免疫原性半抗原。例如,在某些情况下,可以使用以下接头:

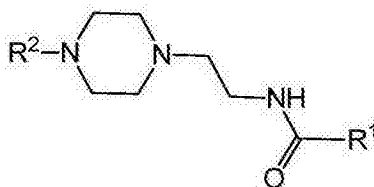
[0252]



[0253] 其中 R¹是短链烷基 (C₂、C₃、C₄、C₅或 C₆)。

[0254] 在另一个例子中, 化合物具有式 IX:

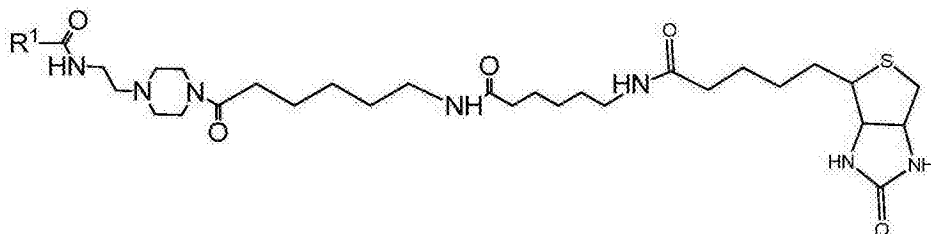
[0255]



[0256] R^2 是 L 或 $R^{11}B$; 其中 B 是生物分子。

[0257] 可以使用本发明的缀合物从血清取出利用这些化合物从哺乳动物生成的抗体。例如,在一个方面,这种缀合物具有以下结构:

[0258]



[0259] 在其他方面,本发明提供用于产生短链脂肪酸的抗体的方法。该方法包括:

[0260] (a) 提供免疫原, 所述免疫原包含与运载蛋白缀合的短链脂肪酸衍生物;

[0261] (b) 在使得动物的免疫系统产生抗体的如此条件下用免疫原免疫动物;并且

[0262] (c) 从动物取出抗体。

[0263] 在一个方面,本发明提供与丙酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,并且其中抗体对丁酸具有小于 1% 交叉反应性。

[0264] 在另一个方面,本申请提供与丁酸特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,并且其中抗体对丙酸具有小于 1% 交叉反应性。

[0265] 在某些其他方面,本发明提供测定来自哺乳动物(如人)的流体样品或组织样品中短链脂肪酸的方法。流体可以是任何生物学流体,如血液、尿、血浆、汗、唾液、抽吸物、泪等。该方法包括将样品与本文所述的抗体组合,随后确定抗体是否与来自样品的短链脂肪酸特异性结合。例如,在这些方法中,特异性抗体与来自样品的丙酸结合表示样品中存在丙酸。

[0266] E. 用于测量胆汁酸吸收不良的测定

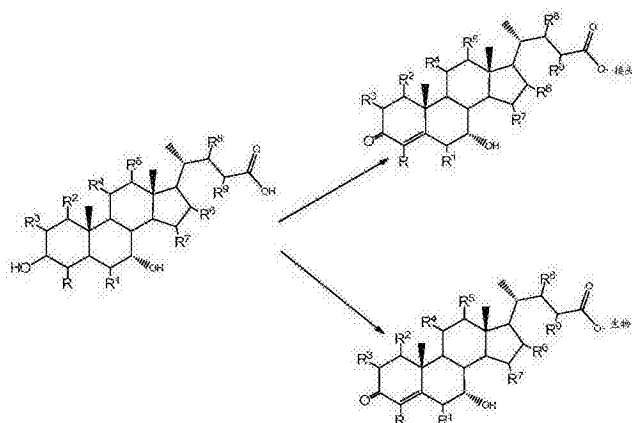
[0267] 胆汁酸吸收不良(BAM)可以促成慢性腹泻和 IBS-D 的发展。血清 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮已经成为一个确定胆汁酸(肝)合成的试验,所述胆汁酸合成与从胆固醇合成胆汁酸的胆固醇 7- α -羟化酶(其是限速酶)的活性相关。

[0268] 本发明还提供针对胆汁酸代谢物的抗体和用于制备针对胆汁酸代谢物的抗体的方法。制备的抗体对相关的代谢物具有低交叉反应性,并且是用于 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮的特异性和灵敏的免疫测定的试剂。

[0269] 本发明还提供 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮的稳定衍生物。衍生物可以与生物分子如运载蛋白缀合并与佐剂组合以刺激免疫反应。衍生物也可以与其他生物分子缀合。

[0270] 本发明提供具有接头并保留生物学重要官能团的 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮的合成。在一个方面,本发明提供 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮衍生物和其生物素类似物的合成,如下文显示:

[0271]

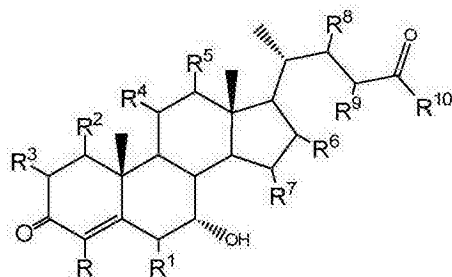


[0272] 在另一个方面,使用本领域熟知的缀合化学,式 XI 的化合物可以用来缀合运载蛋白。例如,活化的酯(NHS 酯)可以与伯胺反应以产生稳定的酰胺键。马来酰亚胺和巯基可以在一起反应并且产生硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应以分别产生烷基胺和硫醚。可以在本文中利用提供反应性部分的任何衍生物,所述反应性部分可以与蛋白质缀合。如本领域已知的,包含游离氨基、游离羧酸基或游离硫氢基的部分提供可用于蛋白质缀合的反应性基团。例如,游离氨基可以通过戊二醛交联至或通过碳二亚胺交联至蛋白质上的可用羧基部分,与蛋白质缀合。另外,具有游离硫氢基的半抗原可以通过马来酰亚胺激活蛋白质(例如,使用磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧化物(磺基-SMCC)),随

后连接至硫氢基,与蛋白质缀合。

[0273] 就这一点而论,在一个方面,本发明提供式 X 的化合物:

[0274]



[0275] 其中 R、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和 R¹⁰各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根、烷氧烷基、羧基、羧烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根烷基、L 和 R¹¹B 的成员;L 是接头;R¹¹是在化合物和生物分子之间所得到的连接;并且 B 是生物分子。

[0276] 在其他方面,本发明提供用于产生 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮的抗体的方法。该方法包括:

[0277] (a) 提供免疫原,所述免疫原包含与运载蛋白缀合的 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮的衍生物;

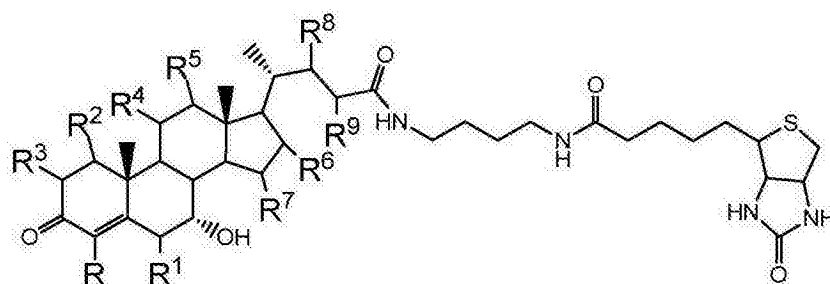
[0278] (b) 在使得动物的免疫系统产生抗体的如此条件下用免疫原免疫动物;并且

[0279] (c) 从动物取出抗体。

[0280] 在某些其他方面,本发明提供测定来自哺乳动物(如人)的流体样品或组织样品中 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮的方法。该方法包括将样品与本文所述的抗体组合,随后确定抗体是否与来自样品的 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮特异性结合。例如,在这些方法中,特异性抗体与来自样品的 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮结合表示样品中存在 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮。

[0281] 可以使用本发明的缀合物从血清取出从哺乳动物生成的抗体。例如,在一个方面,式 Xa 的化合物具有式 Xa 的结构:

[0282]



[0283] 其中 R、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和 R¹⁰各自是氢。

[0284] 在另一个方面,本申请提供与 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮衍生物特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,并且其中抗体对选自胆固醇和 7- α -胆固醇的成员具有小于 1%交叉反应性。

[0285] F. 抗体

[0286] 一般而言,为了产生针对小分子(半抗原)的抗体,将半抗原与运载蛋白(CP)交

联以使其具有免疫原性。在某些情况下,将含胺的神经递质和生物胺(即,胺化的半抗原)借助戊二醛通过单步骤连接而与合适的运载蛋白(CP)连接并且通过 Mannich 缩合反应将不含胺的半抗原(例如,5-HIAA、多巴、褪黑激素等)与 CP 缀合。在某些情况下,半抗原由所需的骨架分子结构组成,其中所述骨架分子结构在远离由免疫系统识别的关键分子特征的位点与间隔子基团连接。在接头的另一个末端上的官能团可以轻易地与抗原性运载蛋白形成共价连接。接头臂还起到以下作用:将半抗原与运载蛋白以最佳距离隔开,以最大化对目的化合物的亲和力和特异性。在接头的两个末端形成的化学键和这种间隔子臂的长度(3个至9个碳原子)对就亲和力和特异性而言的免疫反应的质量和量(抗体量)至关重要。(Meyer 等人,1991J. Histochem. Cytochem. 39,749-760;Singh, Suri 等人, Bioconjugate Chem., 第15卷, No. 1, 2004;Ivy Carroll 等人, J. Med. Chem., 2011, 54(14), 第5221-5228页)。

[0287] III. 抗体的产生

[0288] 可以按照几种方式完成抗体的产生和选择。将合成和纯化的与目的代谢物相对应的抗原例如注射至小鼠或兔或另一种哺乳动物中,以产生多克隆或单克隆抗体。本领域技术人员会认识到许多方法可用于抗体的产生,例如,如 Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow 和 Lane 编著, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988) 中所述。本领域技术人员将也理解,也可以通过多种方法从遗传信息制备模拟抗体(例如,保留其功能性结合区)的结合片段或 Fab 片段。参见,例如, Antibody Engineering: A Practical Approach, Borrebaeck 编著, Oxford University Press, Oxford (1995); 和 Huse 等人, J. Immunol., 149:3914-3920 (1992)。

[0289] 随后可以通过以下方式选择通过这些方法产生的抗体:首先用纯化的目的抗原(如本文所述的生物素化的抗原)筛选亲和力和特异性并且,如果需要,将抗体的亲和力和特异性的结果与需要从结合作用中排除的其他抗原的结果比较。筛选方法可以包括在微量滴定平板的独立孔中固定纯化的抗原。平板可以具有固定在其上的链霉亲和素并且随后将含有潜在抗体或抗体群组的溶液置于各个微量滴定孔中并且孵育约30分钟至2小时。随后洗涤微量滴定孔并且将经标记的第二抗体(例如,与碱性磷酸酶缀合的抗小鼠抗体如果生成的抗体是小鼠抗体)添加至孔并且孵育约30分钟并且随后洗涤。将底物添加至孔并且其中针对固定化的抗原(如生物素化的抗原)的抗体存在时,颜色反应将出现。

[0290] 随后可以对如此鉴定的抗体进一步分析亲和力和特异性。在开发针对靶代谢物的免疫测定时,纯化的靶代谢物充当标准物,以其判断免疫测定的灵敏度和特异性并使用已经选出的抗体。因为多种抗体的结合亲和力可以不同,例如某些抗体组合可能在空间上彼此干扰,抗体的测定性能可以是比该抗体的绝对亲和力和特异性更重要的量度。

[0291] 本领域技术人员会认识到,可以在产生抗体或结合性片段并且筛选和选择多种目的代谢物的亲和力及特异性时采用许多方案,但是这些方案不改变本发明的范围。

[0292] A. 多克隆抗体

[0293] 优选地在动物中通过多次皮下(sc)或腹内(ip)注射本发明的抗原和佐剂,产生多克隆抗体。可能有用的是,使用双官能或衍生化剂,使目的抗原与蛋白质运载体缀合,所述蛋白质运载体是在待免疫的物种中是免疫原性的,例如,匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。双官能或衍生化剂的非限制性例子包括马来酰亚

胺苯甲酰硫代琥珀酰亚胺酯（经半胱氨酸残基缀合）、N-羟琥珀酰亚胺（经赖氨酸残基缀合）、戊二醛、琥珀酐、 SOCl_2 和 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ ，其中 R 和 R^1 是不同的烷基。

[0294] 通过以下方式将动物针对本发明的抗原或其免疫原性缀合物或衍生物免疫：将例如 $100\ \mu\text{g}$ （对于兔）或 $5\ \mu\text{g}$ （对于小鼠）的抗原或缀合物与 3 体积的弗氏完全佐剂组合并且在多个部位皮内注射该溶液。一个月后，通过在多个部位用弗氏不完全佐剂中约 1/5 至 1/10 的原始量的缀合物通过皮下注射，强化免疫该动物。7 至 14 日后，将动物放血并且对血清测定抗体滴度。通常将动物强化免疫直至滴度平台期。优选地，将动物用相同抗原的缀合物强化免疫，但是可以使用与不同免疫原性抗原的缀合和 / 或通过不同交联试剂的缀合。在某些情况下，聚集剂如明矾可以用来增强免疫反应。

[0295] B. 单克隆抗体

[0296] 单克隆抗体通常从基本上均质的抗体群体中获得，即，构成该群体的单个抗体是相同的，除了可能以微量出现的可能天然存在的突变之外。因此，修饰语“单克隆”表明该抗体的特征为不是独立抗体的混合物。例如，单克隆抗体可以使用首先由 Kohler 等人，Nature, 256 :495 (1975) 描述的杂交瘤方法产生，或可以通过本领域已知的任何重组 DNA 方法产生（参见，例如，美国专利号 4,816,567）。

[0297] 在杂交瘤方法中，使小鼠或其他适宜的宿主动物（例如仓鼠）如上所述那样免疫，以激发出产生或能够产生抗体的淋巴细胞，所述抗体与用于免疫的目的多肽特异性结合。可选地，在体外免疫淋巴细胞。随后使用合适的融合剂如聚乙二醇，使经免疫的淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞（见，例如，Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第 59-103 页 (1986)）。将如此制备的杂交瘤细胞铺种并且在合适的培养基中培育，所述培养基优选地含有一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如，如果亲本骨髓瘤细胞缺少酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT)，则用于杂交瘤细胞的培养基通常将包含防止 HGPRT 缺陷型细胞生长的次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷 (HAT 培养基)。

[0298] 优选的骨髓瘤细胞是这些细胞，它们高效融合、支持由所选择的抗体产生细胞稳定高水平地产生抗体，和 / 或对培养基（如 HAT 培养基）敏感。用于产生人单克隆抗体的这类优选的骨髓瘤细胞系的例子包括，但不限于，鼠骨髓瘤系，如源自 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的那些（从 Salk Institute Cell Distribution Center ;San Diego, CA 可获得）、SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞（从美国典型培养物保藏中心 ;Rockville, MD 可获得），和人骨髓瘤或小鼠-人杂合骨髓瘤细胞系（参见，例如，Kozbor, J. Immunol., 133 :3001 (1984) ;和 Brodeur 等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, 第 51-63 页 (1987)）。

[0299] 可以测定其中杂交瘤细胞正在生长的培养基的针对目的多肽的单克隆抗体的产生。优选地，通过免疫沉淀或通过体外结合测定如放射免疫测定 (RIA) 或酶-联免疫吸附测定 (ELISA) 确定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。可以使用例如 Munson 等人, Anal. Biochem., 107 :220 (1980) 的斯卡查德分析确定单克隆抗体的结合亲和力。

[0300] 在鉴定到产生具有所需特异性、亲和力和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后，所述克隆可以通过有限稀释法亚克隆并且通过标准方法培育（参见，例如，Goding, Brodeur 等人, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 第 59-103 页

(1986))。用于此目的的合适培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外,杂交瘤细胞可以作为腹水肿瘤在动物中体内培育。可以通过常规的抗体纯化方法,例如,蛋白 A- 琼脂糖凝胶、羟基磷灰石层析法、凝胶电泳法、透析或亲和层析法,将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水液或血清分开。

[0301] 使用常规方法(例如,通过使用能够与编码鼠抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针),可以轻易地分离出编码所述单克隆抗体的 DNA 并测序。杂交瘤细胞充当此 DNA 的优选来源。一旦分离,则可以将 DNA 置入表达载体中,随后将所述表达载体转染至否则不产生抗体的宿主细胞如大肠杆菌细胞、猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中,以诱导单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。参见,例如,Skerra 等人,Curr. Opin. Immunol., 5 :256-262(1993);和 Pluckthun, Immunol Rev., 130 :151-188(1992)。也可以例如通过以下方式修饰这种 DNA:将人重链恒定结域和轻链恒定结域的编码序列替换同源性鼠序列(参见,例如,美国专利号 4,816,567;和 Morrison 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :6851(1984))或将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分与免疫球蛋白编码序列共价接合。

[0302] 在又一个实施方案,单克隆抗体或抗体片段可以从抗体噬菌体文库分离,使用例如 McCafferty 等人, Nature, 348 :552-554(1990);Clackson 等人, Nature, 352 :624-628(1991);和 Marks 等人, J. Mol. Biol., 222 :581-597(1991)中描述的技术。在 Marks 等人, BioTechnology, 10 :779-783(1992)中描述了通过链改组产生高亲和力(nM 范围)人单克隆抗体。在 Waterhouse 等人, Nuc. Acids Res., 21 :2265-2266(1993)中描述了组合型感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略的用途。因而,这些技术是用于产生单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤方法的有效备选。

[0303] C. 抗体片段

[0304] 已经开发了用于产生抗体片段的多种技术。传统上,这些片段通过蛋白酶解消化完整抗体来衍生(参见,例如, Morimoto 等人, J. Biochem. Biophys. Meth., 24 :107-117(1992);和 Brennan 等人, Science, 229 :81(1985))。然而,现在可以使用重组宿主细胞直接产生这些片段。例如,抗体片段可以从上文讨论的抗体噬菌体文库分离。备选地, Fab' -SH 片段可以从大肠杆菌细胞直接回收并且化学地偶联以形成 F(ab')₂ 片段(参见,例如 Carter 等人, BioTechnology, 10 :163-167(1992))。根据另一种方法, F(ab')₂ 片段可以从重组宿主细胞培养物直接分离。用于产生抗体片段的其他技术将是本领域技术人员显而易见的。在其他实施方案中,选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。参见,例如, PCT 公开号 WO 93/16185;和美国专利号 5,571,894 和 5,587,458。抗体片段也可以是线性抗体,如美国专利号 5,641,870 中所描述。此类线型抗体片段可以是单特异性或双特异性的。

[0305] D. 双特异性抗体

[0306] 双特异性抗体是对至少两个不同表位具有结合特异性的抗体。示例性双特异性抗体可以与相同目的多肽的两个不同表位结合。其他双特异性抗体可以将目的多肽的结合位点与一种或多种额外抗原的(一个或多个)结合位点组合。可以将双特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段(例如, F(ab')₂ 双特异性抗体)。

[0307] 用于产生双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产基于共表达两个免疫球蛋白重链-轻链对,其中两种链具有不同特异性(见,例如, Millstein

等人, *Nature*, 305 :537-539 (1983))。因为免疫球蛋白重链和轻链的随机分配, 这些杂交瘤 (四合瘤 (quadroma)) 产生 10 种不同抗体分子的可能混合物, 其中仅一种分子具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析进行正确分子的纯化。PCT 公开号 WO 93/0882 和 Traunecker 等人, *EMBO J.*, 10 :3655-3659 (1991) 中公开了相似的方法。

[0308] 根据不同方案, 具有所需结合特异性的抗体可变结构域 (抗体-抗原结合位点) 与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。融合物优选地具有免疫球蛋白重链恒定结构域, 包括铰链区、CH2 区和 CH3 区的至少部分。优选的是使得第一重链恒定区 (CH1) 含有对于所述融合物至少之一中存在轻链结合必需的位点。将编码免疫球蛋白重链融合物和, 如果所需, 免疫球蛋白轻链的 DNA 插入单独的表达载体中并且共转染至合适的宿主生物中。在构建中所用的比率不等的 3 条多肽链提供最佳产率时的实施方案中, 这在调节 3 种多肽片段的相互比例方面提供灵活性。然而, 当至少两条多肽链以等比率的表达导致高产率时或当该比率没有特定意义时, 能够将 2 条或全部 3 条多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0309] 在这种方案的优选实施方案中, 双特异性抗体由在一条臂中具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和在另一条臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对 (提供第二结合特异性) 组成。这种非对称结构促进所需的双特异性化合物与不想要的免疫球蛋白链组合分离, 因为免疫球蛋白轻链在双特异性分子的仅一半中的存在提供了便利的分离方式。参见, 例如, PCT 公开号 WO 94/04690 和 Suresh 等人, *Meth. Enzymol.*, 121 :210 (1986)。

[0310] 根据美国专利号 5, 731, 168 中描述的另一个方案, 可以将一对抗体分子之间的界面工程化以最大化从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分数。优选的界面包含抗体恒定结构域的 CH3 结构域的至少一部分。在这种方法中, 来自第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链由较大侧链 (例如, 酪氨酸或色氨酸) 替换。通过将大氨基酸侧链替换为较小侧链 (例如, 丙氨酸或苏氨酸), 在第二抗体分子的界面上产生与 (一条或多条) 大侧链具有相同或相似尺寸的代偿性“空穴”。这提供了相对于其他不想要的终产物 (如同型二聚体) 而言增加异二聚体产率的机制。

[0311] 双特异性抗体包括交联的或“异质缀合”抗体。例如, 异质缀合物中的抗体之一可以偶联至抗生物素蛋白, 另一种偶联至生物素。可以使用任何便利的交联方法产生异质缀合抗体。合适的交联剂和技术是本领域熟知的, 并且在例如, 美国专利号 4, 676, 980 中公开。

[0312] 用于从抗体片段产生双特异性抗体的合适技术也是本领域已知的。例如, 可以利用化学连接制备双特异性抗体。在某些情况下, 双特异性抗体可以通过其中以蛋白酶解方式切割完整抗体以产生 $F(ab')_2$ 片段的方法产生 (参见, 例如, Brennan 等人, *Science*, 229 :81 (1985))。这些片段在二硫醇络合剂亚砷酸钠存在下还原以稳定邻位二硫醇并防止分子间二硫化物形成。产生的 Fab' 片段随后转化成硫代硝基苯甲酸酯 (TNB) 衍生物。随后将 Fab' -TNB 衍生物之一通过用巯基乙胺还原再转化成 Fab' -巯基并且与等摩尔量的其他 Fab' -TNB 衍生物混合以形成双特异性抗体。

[0313] 在一些实施方案中, Fab' -SH 片段可以从大肠杆菌直接回收并且化学地偶联以形成双特异性抗体。例如, 完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子可以通过 Shalaby 等人, *J. Exp. Med.*, 175 :217-225 (1992) 中所述的方法产生。每种 Fab' 片段单独从大肠杆菌分泌并经历体外定向化学偶联以形成双特异性抗体。

[0314] 也已经描述了用于从重组细胞培养物直接产生并分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已经使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体。参见,例如,Kostelny 等人, *J. Immunol.*, 148 :1547-1553 (1992)。来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两个不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同型二聚体在铰链区经还原以形成单体和随后再氧化以形成抗体异二聚体。也可以将这种方法用于抗体同型二聚体的产生。Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 :6444-6448 (1993) 描述的“双体抗体 (diabody)”技术已经为产生双特异性抗体片段提供替代性机制。片段包含通过接头与轻链可变结构域 (VL) 连接的重链可变结构域 (VH), 其中所述接头太短,以至于不允许相同链上的这两个结构域之间配对。因而,迫使一个片段的 VH 和 VL 结构域与另一个片段的互补性 VL 和 VH 结构域配对,因而形成两个抗原结合位点。在 Gruber 等人, *J. Immunol.*, 152 :5368 (1994) 中描述了通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体产生双特异性抗体片段的另一种策略。

[0315] 也构思了大于二价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。参见,例如,Tutt 等人, *J. Immunol.*, 147 :60 (1991)。

[0316] E. 抗体纯化

[0317] 当使用重组技术时,抗体可以在分离的宿主细胞内部、在宿主细胞的周质空间中产生或从宿主细胞直接分泌至培养基中。如果抗体在胞内产生,首先移除颗粒状碎片,例如,通过离心或超滤。Carter 等人, *BioTech.*, 10 :163-167 (1992) 描述了用于分离分泌至大肠杆菌周质空间的抗体的方法。简而言之,将细胞糊状物在乙酸钠 (pH3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 存在下融化约 30 分钟。通过离心移除细胞碎片。在抗体分泌入培养基的情况下,通常使用市售的蛋白浓度滤器,例如,Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单元,浓缩来自这类表达系统的上清液。可以在前述任意步骤中包含蛋白酶抑制剂如 PMSF 以抑制蛋白水解,并且可以包含抗生素以防止外来污染物增长。

[0318] 例如,使用羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析,可以纯化从细胞制备的抗体组合物。蛋白 A 作为亲和力配体的适用性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。蛋白 A 可以用来纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(见,例如,Lindmark 等人, *J. Immunol. Meth.*, 62 :1-13 (1983))。推荐蛋白 G 用于全部小鼠同种型和用于人 $\gamma 3$ (见,例如,Guss 等人, *EMBO J.*, 5 :1567-1575 (1986))。亲和力配体与之连接的基质最经常是琼脂糖,但是其他基质是可用的。力学稳定的基质如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯)苯允许比可以用琼脂糖所实现的更快的流速和更短的处理时间。在抗体包含 CH3 结构域的情况下,Bakerbond ABX™树脂(J. T. Baker ;Phillipsburg, N. J.) 可用于纯化。取决于回收待的抗体,用于蛋白纯化的其他技术如在离子交换柱上分级、乙醇沉淀、反相 HPLC,在二氧化硅上层析、在肝素 SEPHAROSE™上层析、在阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上层析、层析聚焦,SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀也是可用的。

[0319] 在任何(一个或多个)初步纯化步骤后,包含目的抗体和杂质的混合物可以经历低 pH 疏水相互作用层析,使用 pH 在约 2.5-4.5 之间的洗脱缓冲液,优选地以低盐浓度(例如,从约 0-0.25M 盐)进行。

[0320] 本领域技术人员将理解,也可以在本发明的方法和组合物中使用与抗体具有相似功能的任何结合分子,例如,对样品中一种或多种目的分析物特异的结合分子或结合配偶物。合适的抗体样分子的例子包括但不限于结构域抗体、单一抗体(unibody)、纳米体、鲨

鱼抗原反应性蛋白、avimer、adnectin、anticalm、亲和力配体、phylomer、适配体、亲和体、trinectin 等。

[0321] IV. 使用方法

[0322] 本发明还提供使用本文中的代谢物的存在或浓度确定对象中肠易激综合征 (IBS) 诊断的方法。该方法包括通过本文所述的测定方法测量患者的血液, 血浆或血清中的一种或多种代谢物。

[0323] 本发明还提供确定 IBS 的治疗是否在患者中有效的方法。该方法包括通过本文所述的测定方法测量患者的血液, 血浆或血清中的一种或多种代谢物。

[0324] 在某些其他方面, 本发明提供评价先前诊断患有 IBS 的患者的方法。该方法包括通过本文所述的测定方法测量患者的血液, 血浆或血清中的一种或多种代谢物。

[0325] V. 实施例

[0326] 提供以下实例旨在说明, 但不限制要求保护的本发明。

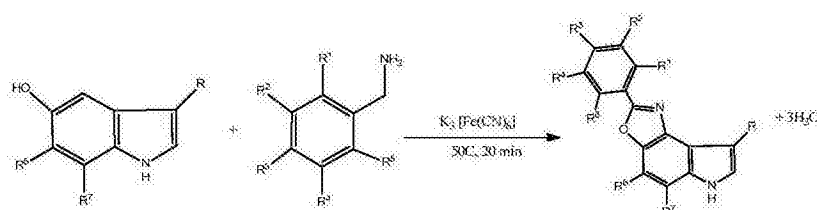
[0327] 实施例 1

[0328] A. 5-羟色胺 (5-HT) 和 5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA) 对氧敏感

[0329] 5-HT 和 5-HIAA 对氧敏感并且非常不稳定。这些化合物的降解在 4°C 自解冻起约 7 小时内发生。图 3 是显示 5-HT 和 5-HIAA 降解的薄层色谱图 (TLC)。5-羟基吲哚的不稳定性质导致测量其浓度的测定的不可靠性。图 4 显示 5-HT 在 1 周时间期间不稳定。

[0330] B. 衍生化 5-羟色胺以产生苯并噁唑

[0331]



[0332] 将以上的反应物与等体积的含有 0.1M CAPS 缓冲液 (pH 11.0)、0.1M 对 (氨基甲基) 苄基化合物、氧化剂 (例如, 0.05M 六氰合铁酸钾 (III) 或 MnO_2), 和甲醇 (10/11/22/23, v/v/v/v) 的衍生化混合物混合。衍生化可以在室温 (RT) 至约 37°C 实施约 5 分钟至约 30 分钟。如此产生的荧光性苯并噁唑衍生物稳定并且可以在 UV 下在 TLC 平板上可视化。

[0333] 在另一个方面, 可以使用以下条件: 0.3M CAPS (pH 12), 0.1M 对 (氨基甲基) 苄基化合物, 50mM 六氰合铁酸钾 (III) 和甲醇 (1/1/2/2v/v/v/v)。在某些方面, v/v/v/v 比例在 1-10/1-11/2-22/2-23 的范围内。衍生化可以在室温 (RT) 至约 37°C 实施 5 分钟至约 30 分钟。

[0334] C. 稳定的苯并噁唑衍生物有荧光并且可以通过 HPLC 检测

[0335] 苯并噁唑衍生物是稳定的, 有荧光并且并且可以在 UV 下在 TLC 平板上可视化 (图 5)。可以通过具有高灵敏度的 HPLC 检测到稳定的苯并噁唑衍生物。样品制备: 将 50 μ l 血清与 50 μ l 衍生化混合物在约 20°C (室温) 至约 37°C 的温度孵育 5-30 分钟。用乙腈 (ACN) (1 : 2v/v 血清 : ACN) 脱蛋白; 以 14,000 转 / 分钟离心 20 分钟。经 0.2 μ m 过滤并注射 50 μ l; HPLC 方法: 柱: 反相 C18 柱: 图 6 显示 5-HT 分离的 HPLC 色谱图。

[0336] 图 7 显示 5-HIAA 的 HPLC。

[0337] 实施例 2:合成 5-HT 的苯并咪唑衍生物及其生物素化的衍生物

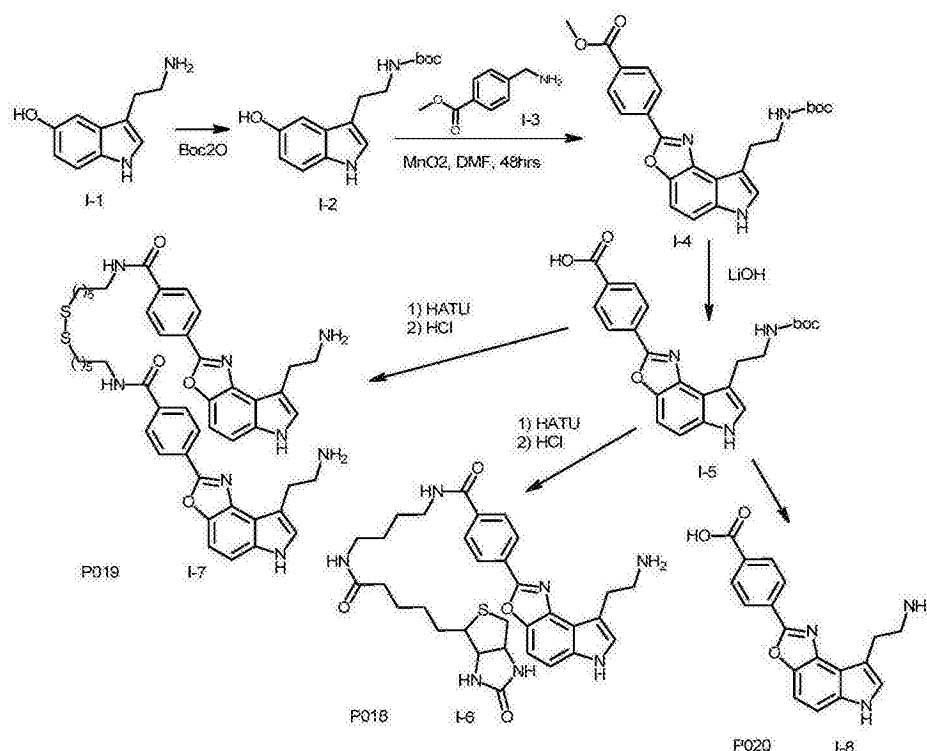
[0338] 以下方案显示 I6、I7 和 I8 的合成：

[0339] I6 :4-(8-(2-氨基乙基)-6H-咪唑并[4,5-e]吲哚-2-基)-N-(4-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁基)苯甲酰胺；

[0340] I7 :4-(8-(2-氨基乙基)-6H-咪唑并[4,5-e]吲哚-2-基)-N-(4-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁基)苯甲酰胺化合物,与 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(4-(8-(2-氨基乙基)-6H-咪唑并[4,5-e]吲哚-2-基)苯甲酰胺)(1 : 1)；

[0341] I8 :4-(8-(2-氨基乙基)-6H-咪唑并[4,5-e]吲哚-2-基)-N-(4-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁基)苯甲酰胺。

[0342]



[0343] 步骤 1: 在 0 °C 向 MeOH(30ml) 中的化合物 I-1 (2.3g, 10.8mmol) 添加三乙胺 (3.3ml, 23.4mmol), 随后逐滴添加 MeOH 中的 Boc₂O (3.47ml, 16.2mmol)。将混合物加温至室温并搅拌另外 2 小时, 随后浓缩并通过硅胶色谱法纯化以产生作为黄色油的所需 boc 产物 I-2 (2.88)。

[0344] 步骤 2: 将化合物 I-2 (2.36g, 8.55mmol) 和化合物 I-3 (2.82g, 17.1mmol) 用 DMF (30ml) 中的 MnO₂ (5.98g, 68.4mmol) 搅拌 1 天。将混合物过滤并且在水和乙酸乙酯之间分配。将有机层分离并纯化以提供作为黄色固体的 I-4 (510mg)。MS : 436.0 (M+H)⁺。

[0345] 步骤 3: 将 I-5 (510mg, 1.15mmol) 用 THF (10ml) 和水 (4ml) 中的 LiOH·H₂O (0.98g, 23.4mmol) 搅拌 1 天, 由饱和 NaHSO₄ 酸化, 用乙酸乙酯提取, 浓缩以产生黄色固体 (0.5g)。

[0346] 步骤 4: 向干燥 DMF (1.5ml) 中的化合物 I-5 (71mg, 0.17mmol) 添加化合物

38(62mg, 0.26mmol)、TEA(0.04ml, 0.26mmol) 和 HATU(103mg, 0.26mmol)。将混合物搅拌 3 小时,随后在乙酸乙酯和水之间分配。随后将有机层分离并浓缩。将粗制物通过 DCM/MeOH(90/10) 洗脱的硅胶柱色谱纯化,以产生所需产物 (35mg),所述产物用 MeOH(2ml) 中的 6N HCl 处理 4 小时并且随后浓缩以产生所需的化合物 I-6(30mg)。MS :618.0 (M+H)⁺, 4-(8-(2-氨基乙基)-6H-噻唑并[4,5-e]吡啶-2-基)-N-(4-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁基)苯甲酰胺。

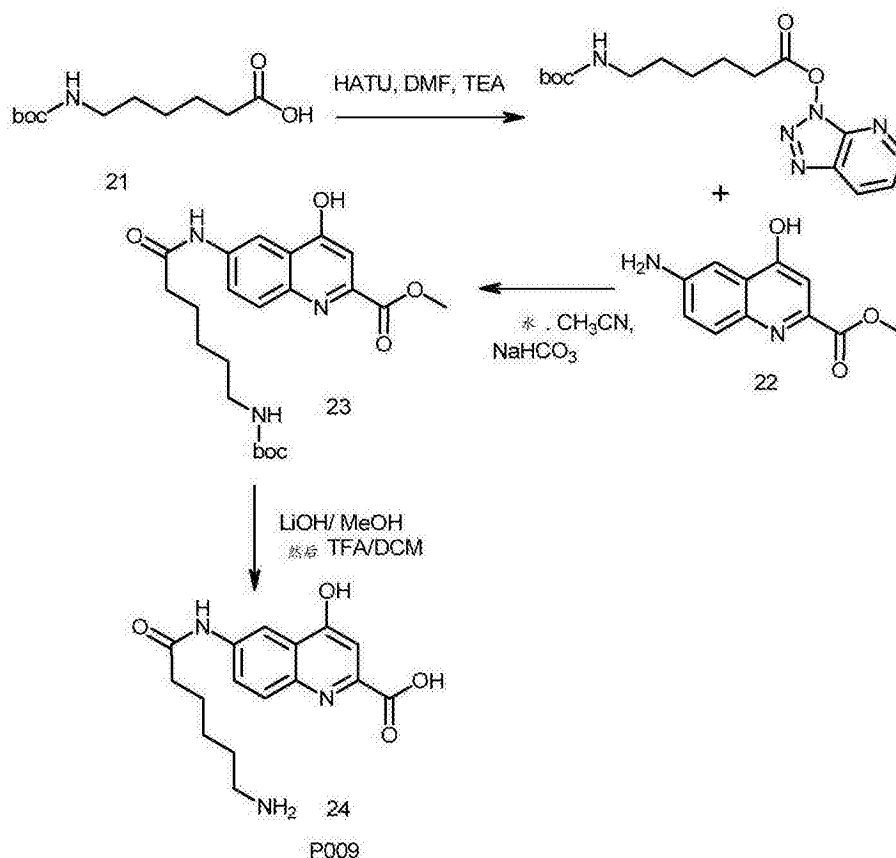
[0347] 步骤5:向干燥 DMF(2ml) 中的化合物 I-5(100mg, 0.23mmol) 添加化合物 32(53mg, 0.16mmol)、TEA(0.11ml, 0.8mmol) 和 HATU(180mg, 0.48mmol)。将混合物搅拌过夜,随后在乙酸乙酯和水之间分配。随后将有机层分离并浓缩。将粗制物用通过 DCM/ 乙酸乙酯 (10/1) 洗脱的硅胶柱色谱纯化,以产生所需产物 (30mg),所述产物用二噁烷 (2ml) 中的 4N HCl 处理过夜并且随后浓缩以产生所需的化合物 I-7(12.4mg)。MS :872.2 (M+H)⁺, 4-(8-(2-氨基乙基)-6H-噻唑并[4,5-e]吡啶-2-基)-N-(4-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁基)苯甲酰胺化合物,与 N,N'-(二硫烷二基双(乙烷-2,1-二基))双(4-(8-(2-氨基乙基)-6H-噻唑并[4,5-e]吡啶-2-基)苯甲酰胺)(1 : 1)。

[0348] 步骤6:将 I-5(50mg, 0.12mmol) 用二噁烷 (2ml) 和 DCM(2ml) 中的 4N HCl 搅拌过夜,随后浓缩以产生所需的产物 I-8(26mg)。MS :322.0 (M+H)⁺, 4-(8-(2-氨基乙基)-6H-噻唑并[4,5-e]吡啶-2-基)-N-(4-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁基)苯甲酰胺。

[0349] 实施例 3:合成具有接头并生物素化的犬尿烯酸

[0350] 化合物 24 :6-(6-氨基己酰氨基)-4-羟基喹啉-2-羧酸

[0351]



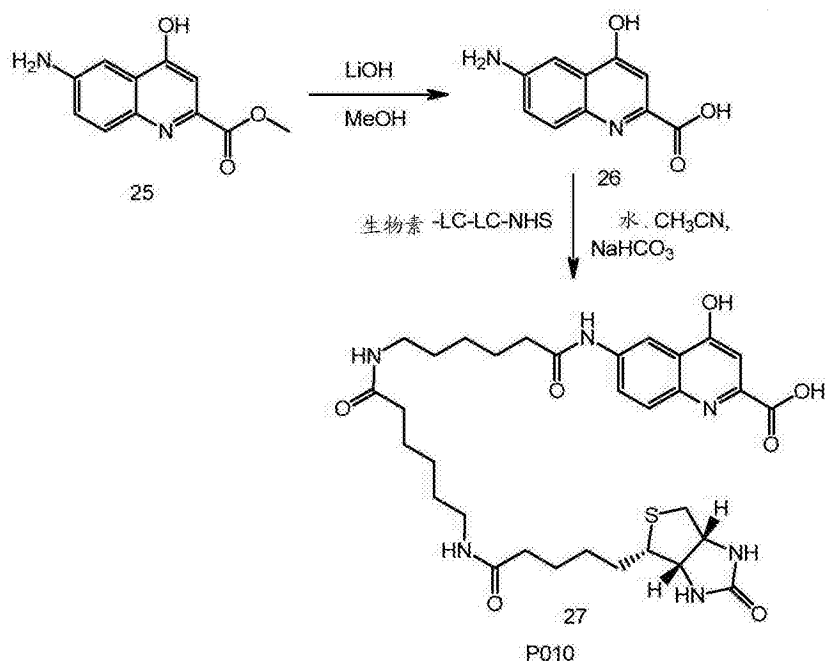
[0352] **步骤1:** 将 boc-氨基-己酸 (21, 277mg, 1.2mmol)、DIPEA (0.21ml, 1.2mmol) 和 HATU (456mg, 1.2mmol) 的混合物在 DCM (5ml) 和乙腈 (5ml) 中搅拌 30 分钟。

[0353] **步骤2:** 向水 (5ml) 和乙腈 (5ml) 的混合物中的化合物 22 (218mg, 1mmol) 添加 NaHCO_3 (840mg, 10mmol), 随后缓慢添加来自步骤 1 的反应混合物, 伴以剧烈搅拌。此后, 将混合物搅拌额外 4 小时, 随后由饱和 NaHSO_4 酸化, 这导致沉淀。过滤固体以产生中间体 23。

[0354] **步骤3:** 将来自步骤 2 的固体 23 在 60 °C 用 MeOH (10ml) 中的 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (410mg, 10mmol) 搅拌 4 小时, 随后由饱和 NaHSO_4 溶液酸化至 pH 3, 浓缩。将所得到的固体过滤、用水洗涤、干燥。随后将它悬浮在 DCM (2ml) 中, 之后添加 TFA (2ml)。将浆液在室温搅拌 4 小时并且随后浓缩。将所得的固体用乙酸乙酯 (30ml) 搅拌 5 分钟, 将不溶性物质过滤并用乙酸乙酯洗涤并且干燥, 以产生灰色固体作为所需产物 24 (120mg)。MS : 318.0 (M+H)⁺ 6-(6-氨基己酰氨基)-4-羟基喹啉-2-羧酸。

[0355] 合成化合物 27 : 4-羟基-6-(6-(6-(5-((3aS, 4S, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酰氨基)己酰氨基)喹啉-2-羧酸。

[0356]

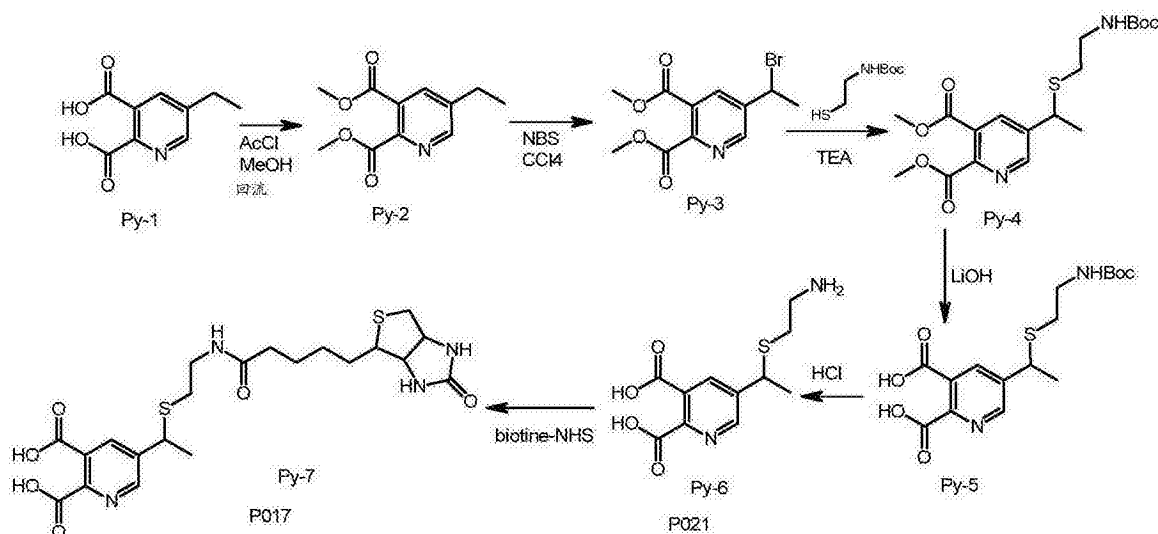


[0357] 将化合物 25(327mg, 1.5mmol) 和 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (430mg, 10mmol) 的混合物在 MeOH(10ml) 中搅拌过夜, 随后小心地用 6N HCl 酸化至 pH 7, 浓缩以移除 MeOH。随后将粗制物用乙腈和水 (10ml/10ml) 稀释, 并添加 NaHCO_3 (1.26g), 随后添加生物素-LC-LC-NHS(852mg, 1.5mmol)。将混合物剧烈搅拌 1 天, 由 6N HCl 酸化, 将所产生的固体过滤并用 MeOH 洗涤, 随后用水洗涤, 之后干燥以产生纯化合物 27(140mg)。MS: 657.2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 4-羟基-6-(6-(6-(5-((3aS, 4S, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酰氨基)己酰氨基)喹啉-2-羧酸。

[0358] 实施例 4: 合成具有接头并生物素化的喹啉酸

[0359] 合成 Py-6: 5-(1-((2-氨基乙基)硫代)乙基)吡啶-2,3-二羧酸; 和 Py7: 5-(1-((2-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)乙基)硫代)乙基)吡啶-2,3-二羧酸

[0360]



[0361] 步骤 1: 向 MeOH(100ml) 中的 py-1(5.0g, 25.6mmol) 经 30 分钟小心添加 AcCl (20ml, 230mmol)。随后将混合物回流过夜, 之后浓缩并重溶于 MeOH(100ml) 中, 并且添

加 AcCl (20ml)。将混合物再次回流 1 天并浓缩并且在水和乙酸乙酯中分配。将有机层用饱和 NaHCO_3 洗涤,干燥并浓缩以产生二甲基酯 py-2 (3.1g)。

[0362] **步骤 2:** 将 py-2 (3g, 13.4mmol) 在含 NBS (2.4g, 13.5mmol) 的 CCl_4 (50ml) 中在 AIBN (100mg) 存在下回流 8 小时。将固体过滤并浓缩溶液以产生淡黄色油 (py-3)。MS : 301.9 (M+H)⁺。该物质在不作进一步纯化的情况下用于下一个步骤中。

[0363] **步骤 3:** 向 DCM (30ml) 中的上述油添加 $\text{BocNHCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ (2.74g, 15mmol), 同时添加三乙胺 (2.1ml, 15mmol) 和 DBU (2.28g, 15mmol)。将混合物在室温搅拌过夜并且在水和乙酸乙酯之间分配。将有机层分离和通过柱色谱用己烷和乙酸乙酯的混合溶剂纯化以产生所需的化合物 py-4 (2.9g)。MS : 399.0 (M+H)⁺。

[0364] **步骤 4:** 将 py-4 (2.1g, 5.3mmol) 混合物用 MeOH (20ml) 中的 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.22g, 10 当量) 搅拌 1 天, 由饱和 NaHSO_4 酸化至 pH 3, 用乙酸乙酯提取。将有机层分离, 浓缩以产生所需的产物 (py-5, 1.7g)。MS : 371.1 (M+H)⁺。

[0365] **步骤 5:** 将 py-5 (0.5g, 1.35mmol) 用二噁烷 (4N, 10ml) 中的 HCl 搅拌 2 小时, 浓缩以形成油 (HCl 盐) 作为 py-6。MS : 271.0 (M+H)⁺, 5-(1-((2-氨基乙基)硫代)乙基)吡啶-2,3-二羧酸。

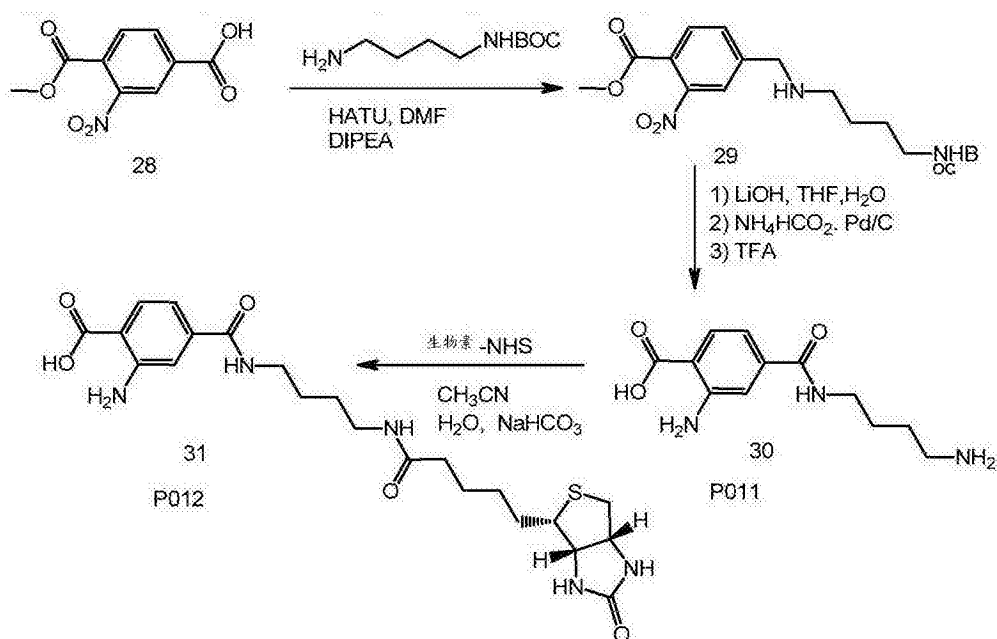
[0366] **步骤 6:** 向 MeOH (3ml) 中 HCl 盐形式的 py-6 (200mg, 0.88mmol) 添加 DIPEA (1ml, 5.5mmol), 随后添加生物素-NHS (341mg, 1.0mmol)。将混合物在室温搅拌 12 小时, 随后浓缩并通过 HPLC 纯化以产生所需的产物 py-7 (85mg)。MS : 497.1 (M+H)⁺, 5-(1-((2-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)乙基)硫代)乙基)吡啶-2,3-二羧酸。

[0367] **实施例 5: 合成具有接头的邻氨基苯甲酸和生物素酰化衍生物**

[0368] 合成化合物 30 : 2-氨基-4-((4-氨基丁基)氨甲酰基)苯甲酸 ; 和

[0369] 化合物 31 : 2-氨基-4-((4-(5-((3aS,4S,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁基)氨甲酰基)苯甲酸

[0370]



[0371] 步骤 1: 将 Boc-4-氨基丁胺 (564mg, 3mmol)、化合物 28 (675mg, 3mmol)、DIPEA (0.8ml, 4.5mmol)、HATU (1.52g, 4mmol) 在干燥 DMF (12ml) 中的混合物在室温搅拌 12 小时。随后将它在水和乙酸乙酯之间分配。将有机层分离, 用饱和 NaHSO_4 和 6N NaOH 洗涤, 随后浓缩以产生作为油的化合物 29。

[0372] 步骤 2: 将该油用 THF (20ml) 和水 (0.5ml) 的混合物中的 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.4g, 30mmol) 搅拌 2 天, 由饱和 NaHSO_4 酸化, 用乙酸乙酯提取, 浓缩并且在不作进一步纯化的情况下用于下一个步骤。

[0373] 步骤 3: 来自步骤 2 的材料溶解于乙醇 (30ml) 中, 并且添加 Pd/C (200mg) 和 NH_4HCO_3 (3.78g, 60mmol)。将浆液在回流下搅拌 3 小时, 随后过滤, 浓缩以产生固体。将副产品从 DCM/MeOH 进一步沉淀并滤除, 将母液浓缩以产生黄色固体。

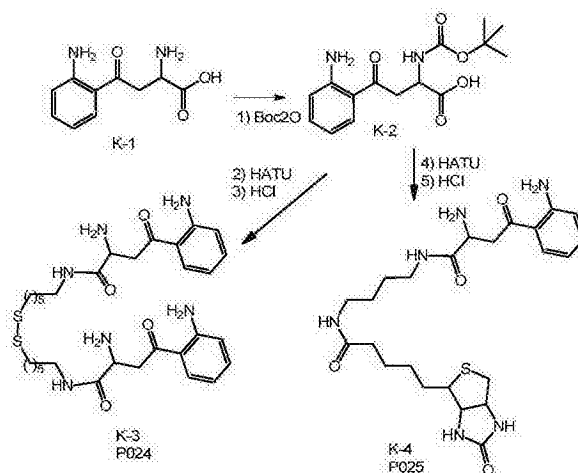
[0374] 步骤 4: 将来自步骤 3 的黄色固体用 DCM (10ml) 中的 50% TFA 搅拌 2 小时。将混合物浓缩并且通过 HPLC 纯化以产生作为黄色粉末的所需产物 30 (500mg)。MS: 252.0 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 2-氨基-4-((4-氨基丁基)氨甲酰基)苯甲酸。

[0375] 步骤 5: 向水 (4ml) 中 50% 乙腈中的化合物 30 (250mg, 0.68mmol) 添加 NaHCO_3 (172mg, 1.5 当量), 随后添加生物素-NHS (232mg, 0.68mmol)。将混合物在室温搅拌过夜, 随后由 4N HCl 酸化, 浓缩, 并且通过 HPLC 纯化以产生所需的产物 31 (158mg), 2-氨基-4-((4-(5-((3aS, 4S, 6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁基)氨甲酰基)苯甲酸。

[0376] 实施例 6: 合成犬尿氨酸生物素化的衍生物

[0377] 合成 K4: N-(4-(2-氨基-4-(2-氨基苯基)-4-氧代丁酰氨基)丁基)-5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺

[0378]



[0379] 步骤 1: 向乙腈和水 (10ml/20ml) 混合物中的 DL-犬尿氨酸 (K-1, 1.0g, 4.8mmol) 添加二碳酸二叔丁酯 (2.18g, 10mmol), 随后添加碳酸氢钠 (1.2g, 20mmol)。将浆液在室温搅拌 1 小时, 由饱和 NaHSO_4 溶液酸化至 pH 3。粗制物由乙酸乙酯提取出并通过使用己烷和乙酸乙酯的色谱纯化以产生所需的产物 (1.5g)。

[0380] 步骤 2: 向 DMF (2ml) 中 K-1 (330mg, 1.3mmol)、化合物 32 (219mg, 0.65mmol) 的混合物添加 HATU (760mg, 2mmol) 和 TEA (0.278ml, 2.0mmol)。将混合物在室温搅拌 24 小时, 并且通过使用己烷和乙酸乙酯的色谱纯化以提供 220mg 所需的产物。

[0381] 步骤3:将来自步骤2的材料用二噁烷 (10ml) 中的 4N HCl 搅拌 2 小时,随后浓缩并通过 HPLC 纯化以产生作为 HCl 盐的所需产物 K-3 (118mg)。MS :645. 1 (M+H)⁺。

[0382] 步骤4:向 DMF (5ml) 中 K-1 (650mg, 1.6mmol), 化合物 38 (500mg, 1.6mmol) 的混合物添加 HATU (1.14g, 3mmol) 和 TEA (0.418ml, 3.0mmol)。将混合物在室温搅拌 24 小时,并用乙酸乙酯提取,随后用水洗涤以提供 760mg 油作为粗产物。

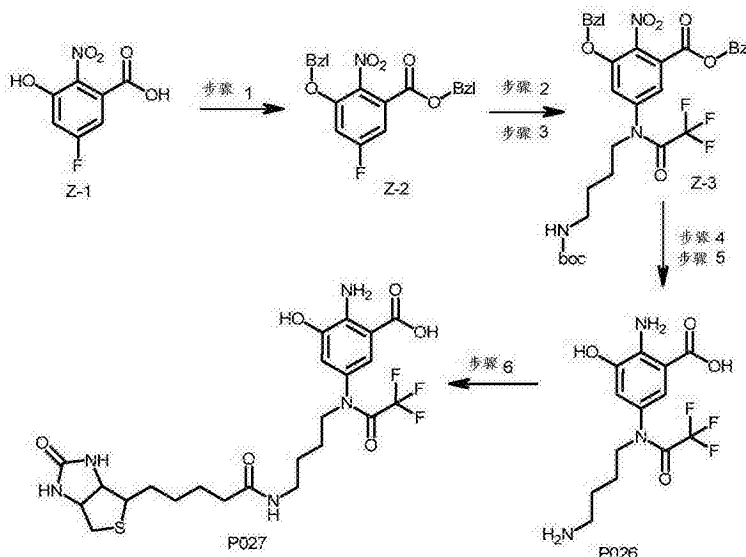
[0383] 步骤5:将来自步骤4的材料用 DCM (10ml) 中的 50% TFA 搅拌 8 小时,随后浓缩并且通过 HPLC 纯化以产生作为 TFA 盐的所需产物 K-4 (200mg)。MS :505. 1 (M+H)⁺, N-(4-(2-氨基-4-(2-氨基苯基)-4-氧代丁酰氨基)丁基)-5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰胺。

[0384] 实施例7:合成具有接头的3-羟基邻氨基苯甲酸

[0385] 合成 P026 :2-氨基-5-(N-(4-氨基丁基)-2,2,2-三氟乙酰氨基)-3-羟基苯甲酸;

[0386] 化合物 P027 :2-氨基-3-羟基-5-(2,2,2-三氟-N-(4-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁基)乙酰氨基)苯甲酸

[0387]



[0388] 步骤1:向干燥 DMF (16ml) 中的 Z-1 (1.45g, 7.2mmol) 添加苄基溴 (1.9ml, 15.9mmol) 和 K₂CO₃ (2.51g, 18.1mmol)。将混合物在 60℃ 搅拌 4 小时。粗制物随后用乙酸乙酯和水稀释。将有机层分离并用盐水洗涤,浓缩,并且通过柱色谱纯化,用己烷/乙酸乙酯洗脱以提供 Z-2 (2.2g)。

[0389] 步骤2:将 Z-2 (1.5g, 4mmol) 和 BocNH-(CH₂)₄NH₂ (0.9g, 4.8mmol) 和三乙胺 (1.3ml, 9.6mmol) 的混合物在 100℃ 在乙腈 (20ml) 中加热 1 天。将粗制物浓缩并且通过用己烷/乙酸乙酯洗脱的柱色谱纯化以提供 1.0g 取代产品。MS :450. 1 (M-Boc+H)⁺。

[0390] 步骤3:向 DCM (10ml) 中的上述产物 (1g, 1.8mmol) 添加三乙胺 (1.0ml, 4 当量) 和三氟乙酸酐 (0.5ml, 3.6mmol)。将混合物在室温搅拌 30 分钟。将粗制物浓缩并且通过柱色谱纯化以提供所需的产物 Z-3 (1.2g)。

[0391] 步骤4:向乙醇 (10ml) 中的 tpZ-3 (1.17g, 1.8mmol) 添加 Pd/C (380mg) 和甲酸铵 (0.7g, 11mmol)。将混合物回流 1 小时,随后过滤以除去催化剂。随后将溶液浓缩并且通过

柱色谱纯化以提供所需的中间体 (480mg)。MS :436.0 (M+H)⁺。

[0392] 步骤 5: 将以上中间体在二噁烷中 (3ml) 的 4N HCl 内搅拌 1 小时。固体形成并将其过滤并用醚洗涤, 干燥以提供 CRN-P026 (260mg)。MS :336.0 (M+H)⁺, 2-氨基-5-(N-(4-氨基丁基)-2,2,2-三氟乙酰氨基)-3-羟基苯甲酸;

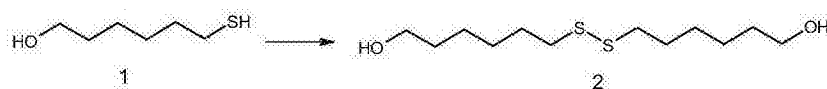
[0393] 步骤 6: 向 DMF (5ml) 中的 CRN-P026 (130mg, 0.35mmol) 添加三乙胺 (0.19ml, 1.4mmol) 和生物素-NHS (120mg)。将混合物在室温搅拌 1 天。将反应混合物浓缩并且粗制物通过 LC 纯化以提供 CRN-P027 (150mg)。MS :562.0 (M+H)⁺, 2-氨基-3-羟基-5-(2,2,2-三氟-N-(4-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁基)乙酰氨基)苯甲酸

[0394] 实施例 8: 合成具有接头的短链脂肪酸

[0395] 合成 P002 : 6,6'-二硫烷二基双(己-1-醇)

[0396] 1) 二硫化物类似物

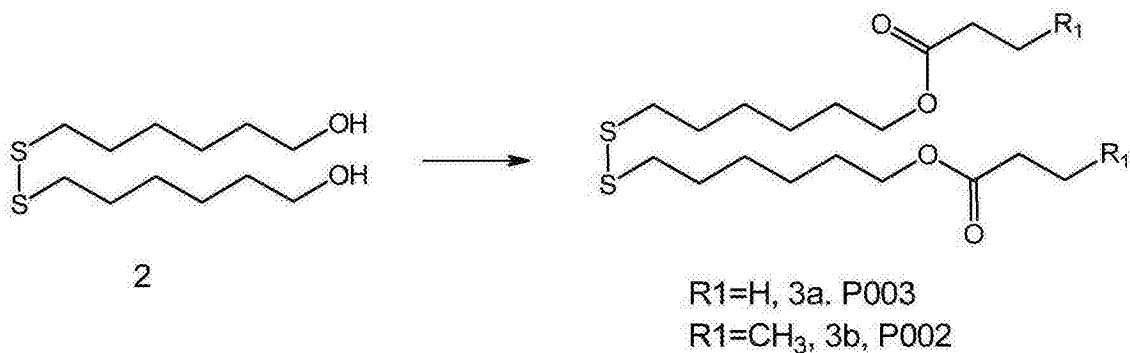
[0397]



[0398] 向乙酸乙酯 (100ml) 中的化合物 1 (5g, 37mmol) 添加 8 粒 I2, 随后缓慢添加过氧化氢 (31%) 直至 I2 的红色持续存在。随后将溶液用饱和 Na₂S₂O₃ 洗涤, 干燥并浓缩以产生黄色油, 其在室温静置时逐渐固化 (4.4g)。TLC 显示该产物比起始材料极性更小并略微呈 UV 阳性。

[0399] 2) 酯形成

[0400]



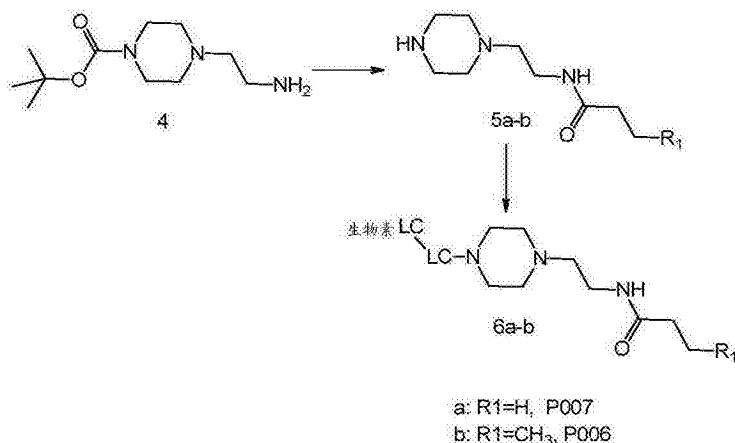
[0401] 向 DCM (5ml) 中的化合物 2 (470mg, 1.77mmol) 添加丙酰氯 (0.337ml, 2.4 当量), 随后添三乙胺 (0.511ml, 2.4 当量) 和 10mg DMAP。将混合物在室温搅拌 1 小时, 浓缩。随后将粗制物直接通过用乙酸乙酯/己烷 (1/9) 洗脱的硅胶柱色谱纯化以提供所需的产物 3a (620mg)。NMR 与结构一致。

[0402] 向 DCM (5ml) 中的化合物 2 (266mg, 1mmol) 添加 10mg DMAP, 随后添加三乙胺 (0.278ml, 2mmol), 随后添加 n-丁酸酐 (0.326ml, 2mmol)。随后将混合物在室温搅拌 1 小时, 之后用更多乙酸乙酯稀释。将有机层用饱和 NaHCO₃, NaHSO₄ 洗涤, 干燥并浓缩以产生所需产物 3b (380mg)。NMR :合格。

[0403] 合成 P006 : (N-(6-(4-(2-乙酰氨基乙基)哌嗪-1-基)-6-氧代己基)-6-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酰胺;

[0404] P007 :N-(6-(4-(2-甲酰氨基乙基)哌嗪-1-基)-6-氧代己基)-6-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)己酰胺

[0405]



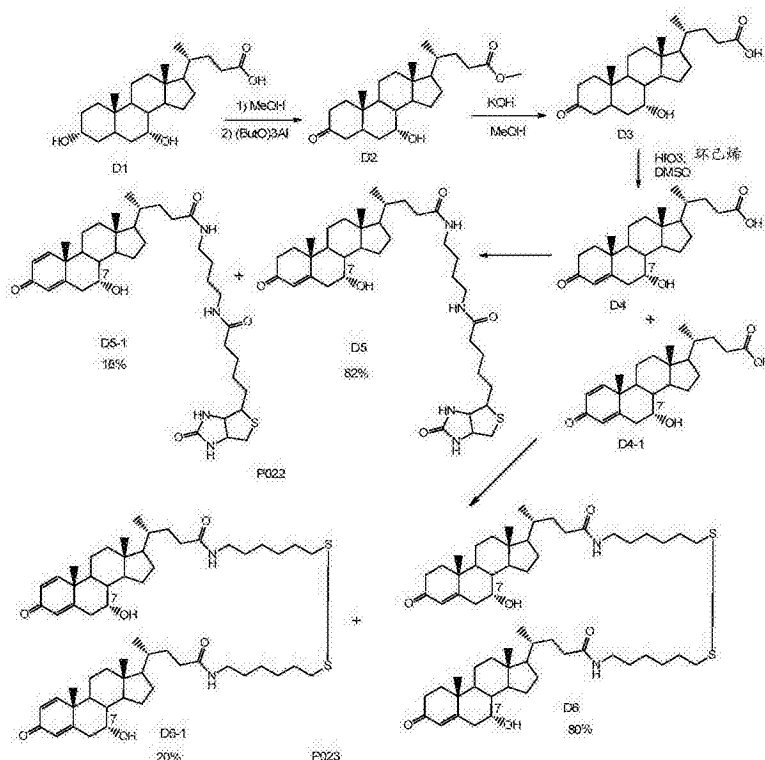
[0406] 向 DCM(3ml) 中的化合物 4(183mg, 0.8mmol) 添加 DIPEA(0.278ml, 2 当量) 并且随后添加丙酰氯(130mg, 1mmol)。该反应在室温搅拌 1 小时。将混合物浓缩并在乙酸乙酯和水之间分配, 将乙酸乙酯层分离并干燥, 浓缩, 随后添加在二噁烷中的 HCl(4N, 2ml)。将混合物在室温搅拌 1 小时, 浓缩以提供粗制物 5a。随后将它用干燥 DMF(5ml) 稀释, 添加, 随后添加 DIPEA(0.278ml, 1.6mmol) 并且随后添加(生物素-LC-LC-NHS(454mg, 0.8mmol))。将混合物在室温搅拌 12 小时。将混合物用水稀释, 用乙酸乙酯提取。将有机物浓缩并且随后通过 HPLC 纯化以产生所需的产物 6a(390mg)。NMR :合格。

[0407] 相同程序用于制备 6b, 除了使用正丁酸酐外, 所需产物 6a(390mg)。NMR :合格。

[0408] 实施例 9 :合成 7-α-羟基-4-胆甾烯-3-酮衍生物(Cho-D)

[0409] 合成 P022 : (4R)-4-((7R, 10R, 13R)-7-羟基-10, 13-二甲基-3-氧代-2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-十四氢-1H-环戊并[a]菲-17-基)-N-(4-(5-(2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基)戊酰氨基)丁基)戊酰胺

[0410]



[0411] **步骤 1:**向 MeOH(90ml) 中的化合物 D1(9.0g, 23.0mmol) 添加 H₂SO₄(3.0ml)。使所得到的反应混合物在 95℃回流 4 小时。将反应溶液浓缩, 溶解于 EtOAc 中, 并用饱和 NaHCO₃ 溶液洗涤。将有机层用 MgSO₄ 干燥, 过滤并浓缩以产生的所需的甲基酯产物(9.2g)。将该材料(6.0g, 14.8mmol) 随后与甲苯(180ml) 和丙酮(78ml) 中的 Al(Ot-Bu)₃(7.3g, 29.7mmol) 组合。将所得到的混合物在 95-100℃回流 17 小时。将反应混合物用 2.0M H₂SO₄(100mL) 处理并用水和饱和的 NaHCO₃ 溶液洗涤。将有机层用 MgSO₄ 干燥, 过滤并浓缩。通过硅胶柱纯化残余物以提供化合物 D2(3.0g)。

[0412] **步骤 2:**将化合物 D2(2.5g, 6.2mmol) 与 KOH(50mL MeOH 中 5.6g) 组合, 并且允许所产生的混合物在环境温度搅拌 17 小时。将反应混合物用 2.0HCl 处理直至 PH 大约为 3, 随后用 EtOAc 提取。将有机层用盐水洗涤, 干燥并浓缩。通过硅胶柱纯化获得的残余物以产生作为黄色固体的所需产物 D3(2.16g)。

[0413] **步骤 3:**HIO₃(3.52g) 与 DMSO(20mL) 组合, 并且将所产生的混合物在 80℃在暗处加热 1 小时。向 DMSO(5.6mL) 中的化合物 D3(2.16g, 5.56mmol) 和环己烯(1.44mL) 的混合物添加先前制备的 HIO₃ 溶液, 并且将所产生的混合物在 45℃在暗处加热 17 小时。反应混合物溶解于 50mL 水并用 EtOAc 提取。将有机层干燥, 过滤并浓缩。通过硅胶柱纯化获得的残余物以产生伴有不可分性副产物 D4-1 的所需产物 D4(0.58g)。

[0414] **步骤 4:**将 D4 和 D4-1(0.64mmol, 250mg), HATU(0.64mmol, 243mg) 和化合物 38 的混合物与 DMF(5mL) 组合。逐滴添加三乙胺(0.71mmol, 0.097mL)。允许所得到的混合物在环境温度搅拌 2 小时。将反应混合物溶解于饱和 NaHCO₃ 溶液并用 EtOAc 提取, 用 MgSO₄ 干燥, 过滤和浓缩。随后通过硅胶柱纯化残余物以产生伴有不可分性副产物 D5-1 的所需产物 D5(95mg, 如通过 ¹H NMR 测定比例 82 : 18)。MS :685.4 (M+H)⁺。

[0415] **步骤 5:**将 D4 和 D4-1(0.73mmol, 284mg), HATU(0.73mmol, 277mg) 和化合物 32 的混合物与 DMF(5mL) 组合。逐滴添加三乙胺(1.46mmol, 0.25mL)。允许所得到的混合物在环

境温度搅拌 1 小时。将反应混合物溶解于水并用 EtOAc 提取,用 MgSO_4 干燥,过滤和浓缩。随后通过硅胶柱纯化残余物以产生伴有不可分性副产物 D6-1 的所需产物 D6 (165mg, 如通过 ^1H NMR 测定比例 80 : 20)。MS : 503.2 (M+H)⁺。

[0416] 实施例 10 : 途径代谢物的 ELISA 测定

[0417] 这个实施例描述了产生与本文提供的代谢物,如色氨酸途径、5-羟色胺途径、犬尿氨酸途径、胆汁酸代谢途径和短链脂肪酸途径中的代谢物特异性结合的抗体。这个实施例还显示这些抗体可以用于测定中,如基于免疫的测定以检测样品(例如,患者血清)中的代谢物。

[0418] 本文提供了基于新抗体的竞争性 ELISA,所述新抗体是针对充当免疫原性缀合物(例如,抗原)的合成产生的代谢物类似物(半抗原)产生的。专门设计类似物具有投射小分子并且激发对半抗原特异的免疫反应的接头。图 8 提供了用来检测患者血清中途径代谢物的竞争性 ELISA 的示例性实施方案。通过用生物素化的目的半抗原(例如,生物素化的 Ser-D) 包被链霉亲和素平板,产生测定平板。患者样品用衍生化混合物衍生化以使代谢物如 5-羟色胺及其衍生物稳定。衍生化的患者血清随后与针对目的代谢物(半抗原)的抗体(例如,抗 Ser-D 抗体)混合,并且随后转移至该平板。将平板在室温孵育 1 小时。将平板用洗涤缓冲液洗涤几次。添加第二抗体,如山羊抗兔抗体-HRP 缀合物并且将平板在室温孵育 1 小时。将平板用洗涤缓冲液洗涤几次。添加底物溶液以进行颜色反应。添加终止溶液以停止底物反应。随后,在分光光度计中 405nm 处读取平板。

[0419] 免疫原性的缀合物基于上文所述实施例中描述的半抗原产生。简而言之,途径代谢物或其衍生物用接头臂缀合。接头臂的游离末端经由氨基或巯基活化与运载蛋白连接。随后使用所得到的半抗原作为产生针对途径代谢物或其衍生物的抗体的抗原。根据本领域技术人员已知的标准方法产生多克隆抗体,例如,如 Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow 和 Lane 编著, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988) 中所述。

[0420] 还对每种途径代谢物或其衍生物生成生物素化的半抗原。不使接头臂与运载蛋白缀合,而是接头与生物素缀合。例如,化学合成 5-羟色胺的生物素化的苯并噁唑衍生物以在衍生物的苯基末端含有接头臂并且在接头的另一端含有生物素。

[0421] 为了检验所生成抗体的有效性和特异性,使用以下测定。将生物素化的目的半抗原 ($2\text{ }\mu\text{g/ml}$) 在室温包被到链霉亲和素平板上 1 小时。将平板洗涤并且用封闭缓冲液(例如, SuperBlock 缓冲液) 封闭以最小化非特异性结合。将兔抗血清系列稀释 (1 : 100、1 : 125、1 : 250、1 : 500、1 : 1000) 并转移至平板的各个孔。将平板在室温 (RT) 孵育约 1 小时, 伴以回转振摇。将平板用洗涤缓冲液(例如, PBS) 洗涤几次。将山羊抗兔抗体-辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合物稀释 (1 : 5000)、添加至每个孔并在室温孵育 1 小时。将平板在洗涤缓冲液(例如, PBST) 中洗涤几次以除去过量的 HRP 缀合物。添加显色底物并且将平板在室温孵育使得 HRP 催化的反应产生可检测的颜色(例如, 在暗处 15 分钟)。在显色后, 添加终止溶液(例如, 4N NaOH) 以终止底物反应。在 405nm 读取平板。吸光度与样品中抗体的量完全成正比。

[0422] I. 针对 5-羟色胺的苯并噁唑衍生物 (Ser-D) 的抗体

[0423] 针对 5-羟色胺的苯并噁唑衍生物（例如，实施例 2 中描述的 Ser-D）的抗体成功地在用该衍生物免疫的兔中产生。针对苯并噁唑衍生物的抗体在放血 1-5 (B1、B2、B3、B4 和 B5) 时来自兔 A 和兔 B 的抗血清中检出。参见图 9。进行滴定实验以评估兔 A 和兔 B 中产生的针对 Ser-D 的抗体的亲和力（图 10）。

[0424] 使用如图 11B 中简述的直接测定检验抗血清的交叉反应性。简而言之，将人血清中的 5-羟色胺 (5-HT) 或其途径代谢物（例如，5-OH Tryp 或 5-HIAA）衍生化并在 4℃ 包被到多孔板上过夜。将平板用洗涤缓冲液洗涤几次。将针对 Ser-D 抗原产生的抗血清在室温在平板上孵育 1 小时。将平板用洗涤缓冲液洗涤几次。将山羊抗兔抗体-HRP 缀合物溶液添加至平板并在室温孵育 1 小时。将平板在洗涤缓冲液中洗涤几次。添加颜色底物用于比色反应并且添加终止溶液，之后在 405nm 读取平板。抗血清对 5-HT（图 11A）特异并且对结构上相似的化合物如 5-羟基色氨酸 (5-OH Tryp；图 11C) 和 5-羟基吲哚乙酸 (5-HIAA；图 11D) 未显示交叉反应性。

[0425] 另外，使用如图 12B 中简述的竞争性测定检验抗血清的交叉反应性。将生物素化的抗原（例如，生物素化的 Ser-D）包被到链霉亲和素平板上。将人血清中的 5-羟色胺 (5-HT) 或其途径代谢物（例如，Tryp、5-OH Tryp 或 5-HIAA）衍生化并添加至抗血清。将混合物添加至平板并在室温孵育 1 小时。将平板用洗涤缓冲液洗涤几次。添加山羊抗兔抗体-HRP 缀合物溶液并在室温孵育 1 小时。将平板在洗涤缓冲液中洗涤几次。添加颜色底物用于比色反应并且添加终止溶液，之后在 405nm 读取平板。人血清中 Ser-D 的存在抑制抗 Ser-D 抗体与生物素化的 Ser-D 的结合（图 12A）。随着游离 Ser-D 的量增加，检出更少的抗体。相反，当存在色氨酸（图 12C）、5-羟基色氨酸（图 12D）、和 5-羟基吲哚乙酸（图 12E）衍生物时，与生物素化的 Ser-D 结合的抗体的量不改变或稍微改变。

[0426] II. 5-羟色胺 ELISA

[0427] 在如上文所述的竞争性 ELISA 中使用抗 5-羟色胺抗体以确定血清中 5-羟色胺的水平是否在 IBS-D 患者与健康对照中不同。所研究的 IBS-D 患者中 5-羟色胺的平均量是 50 ± 20 nM，相比之下，健康对照中是 23 ± 10 nM（图 13）。四分位数分析还显示与健康对照相比，处于四分位数 3 和 4 的患者具有高水平，因此表明这些患者显示 5-羟色胺功能障碍。

[0428] 当 5-羟色胺测定在多日进行时，该方法显示稳定性和重现性。标准曲线的比较显示各实验日之间值的差异甚微。图 14 显示在 4 天中生成的不同标准曲线。在实验中，5-羟色胺的检测上限是约 1mM 或 0.213mg/ml 并且检测下限是约 1×10^{-10} M (21.3ng/ml)。与具有 50-220ng/ml 范围的其他方法如 HPLC (ARUP Labs) 相比，本文提供的 5-羟色胺 ELISA 具有较宽的检测范围。

[0429] 5-羟色胺 ELISA 用来检测处于其他疾病状态下的 5-羟色胺功能障碍。尤其，测试了来自类癌瘤、阿尔茨海默病或自闭症患者的样品。与健康对照相比，类癌瘤患者具有更高水平的 5-羟色胺，而阿尔茨海默病或自闭症患者具有较低的水平（图 15）。

[0430] II. FGF19 ELISA

[0431] 胆汁酸代谢促成慢性腹泻和 IBS-D 的发展。用于评估胆汁酸合成的方法包括检测与限速酶胆固醇 7- α -羟化酶的活性相关的血清 7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮。7- α -羟基-4-胆甾烯-3-酮可以通过灵敏但昂贵且易于出现重现性问题的 HPLC 测量。胆汁酸激活 FGF19 信号传导，后者转而调节胆汁酸代谢（图 16A）。开发了测量血清样品中 FGF19 水

平的 FGF19ELISA 方法。这种测定用来显示,与健康对照和 IBD 患者相比,IBS-D 或 IBS-C 患者具有更高的 FGF19 水平(图 16B)。

[0432] III. 针对犬尿烯酸的抗体

[0433] 针对具有接头类似物的犬尿烯酸(例如,实施例 3 中描述的 KYA-L)的多克隆抗体在用该类似物免疫的兔中生成。进行滴定实验以评价抗体的有效性。图 17A 显示来自 500ng/ml 至 31.3ng/ml 的抗原(例如,KYA-L)范围的数据。图 17B 显示 31.3ng/ml 至 0 的 KYA-L 范围。数据显示,抗体特异性结合犬尿烯酸。

[0434] 使用上文描述的竞争性测定,测试抗 KYA-L 抗体的交叉反应性。简而言之,犬尿烯酸代谢物如 L-犬尿氨酸(Ky)、3-羟-DL-犬尿氨酸(H-Ky)和 L-色氨酸(Tryp)用来与生物素化的犬尿烯酸竞争抗体结合。图 18A 显示 KYA-L 抗原与生物素化的抗原竞争。与之相反,渐增量的 Ky(图 18B)、H-Ky(图 18C)和 Trypt(图 18D)的存在不改变测定中检测到的抗 KYA-L 的水平。结果显示,抗 KYA-L 抗体不与犬尿氨酸代谢物交叉反应并且对犬尿烯酸是特异性的。

[0435] III. 针对丙酸的抗体

[0436] 合成实施例 8 中描述的具有接头类似物的丙酸(PropL)。根据产生多克隆抗体的标准方法生成针对 PropL 的抗体。对来自经免疫的兔的抗血清检验丙酸特异性抗体的存在(图 19)。抗 PropL 抗体在放血 10-12 时检出。

[0437] 使用上文描述的竞争性测定法,测试抗 PropL 抗体的交叉反应性。抗体对丙酸是特异性的(图 20A)并且不与丁酸或 5-羟色胺显示交叉反应性。

[0438] 应当理解本文所述的实施例和实施方案的目的仅在于说明,并且在其教导下的多种修改或改变将会提示给本领域技术人员并且将纳入本申请的主旨与范围内和所附权利要求书的范围内。本文中引用的全部出版物、专利和专利申请因而通过引用的方式完整并入用于全部目的。

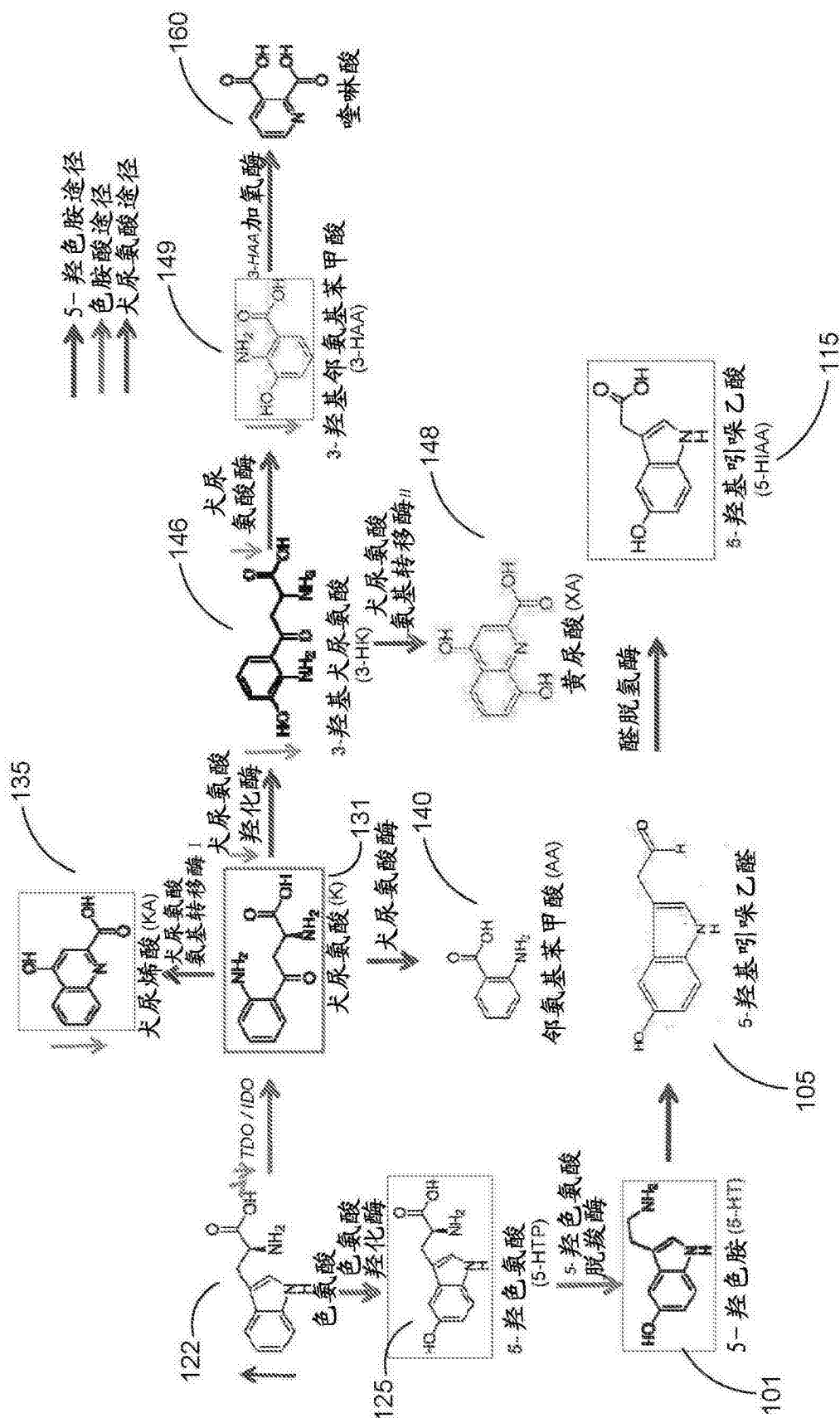


图 1

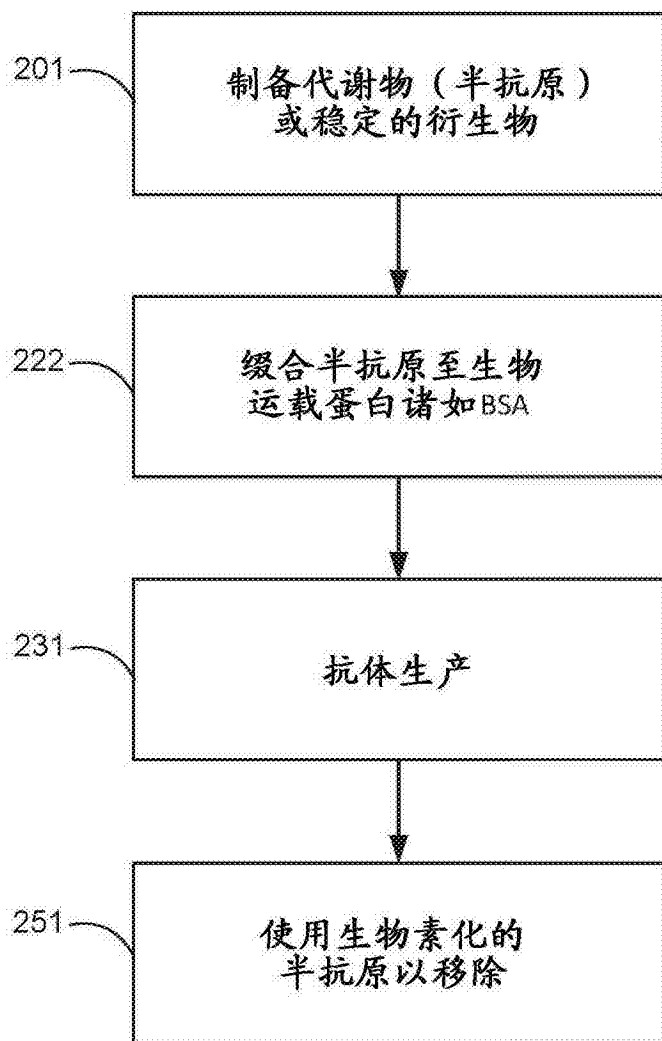


图 2

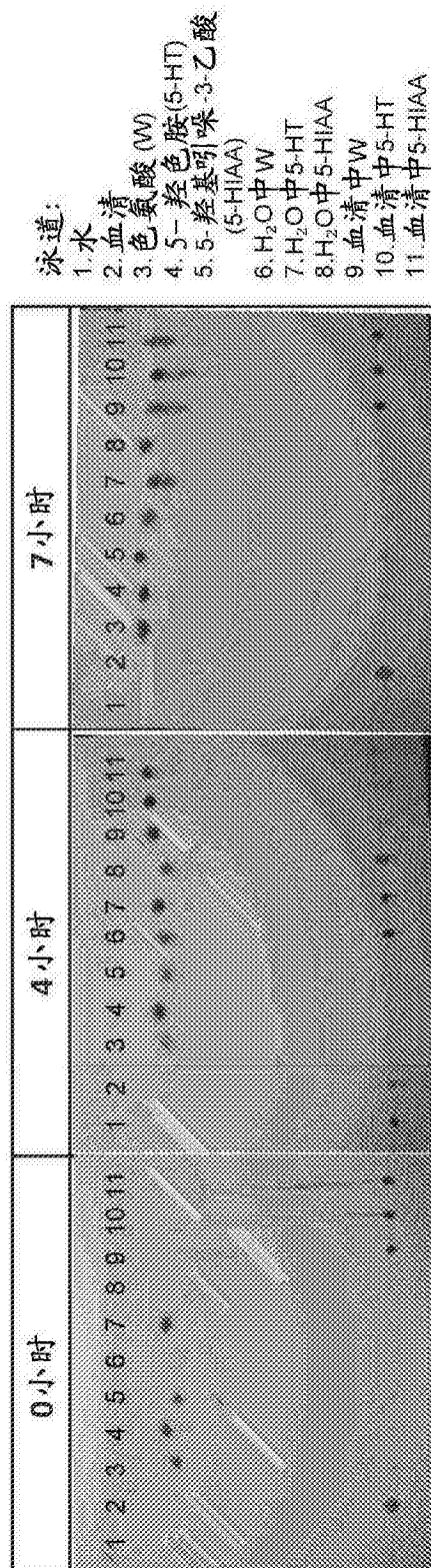


图 3

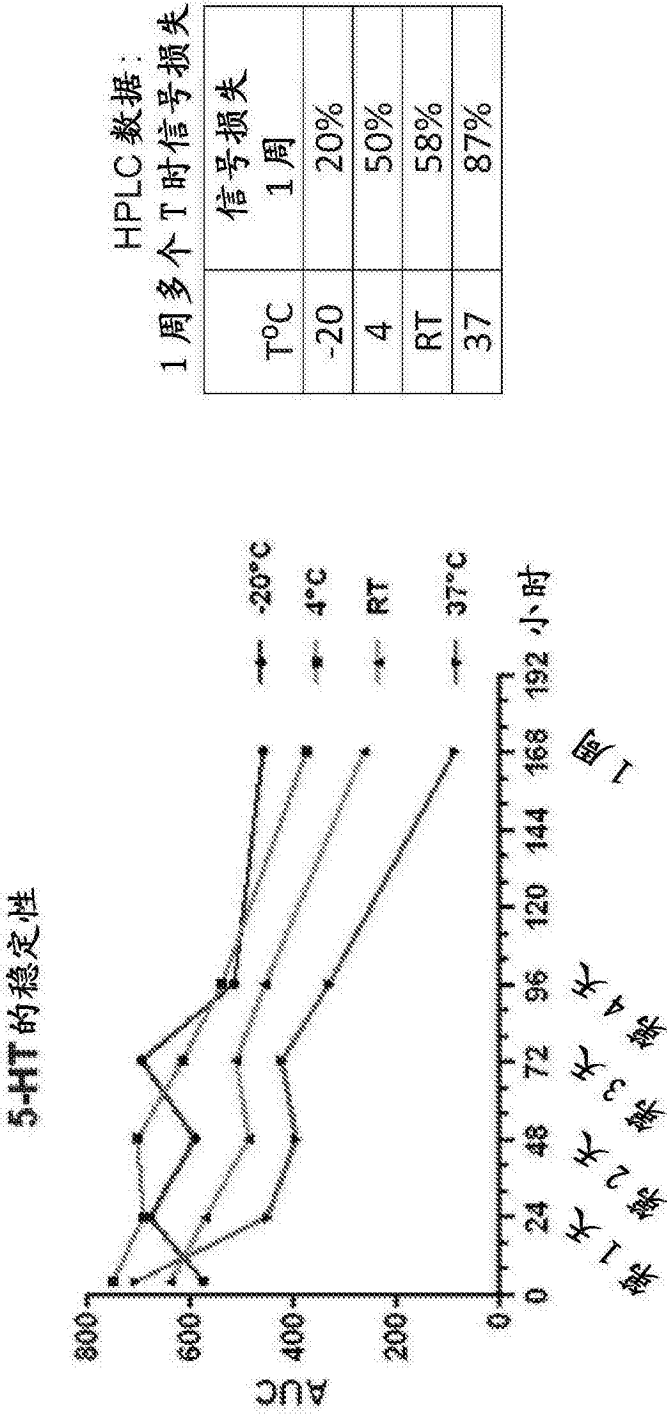


图 4

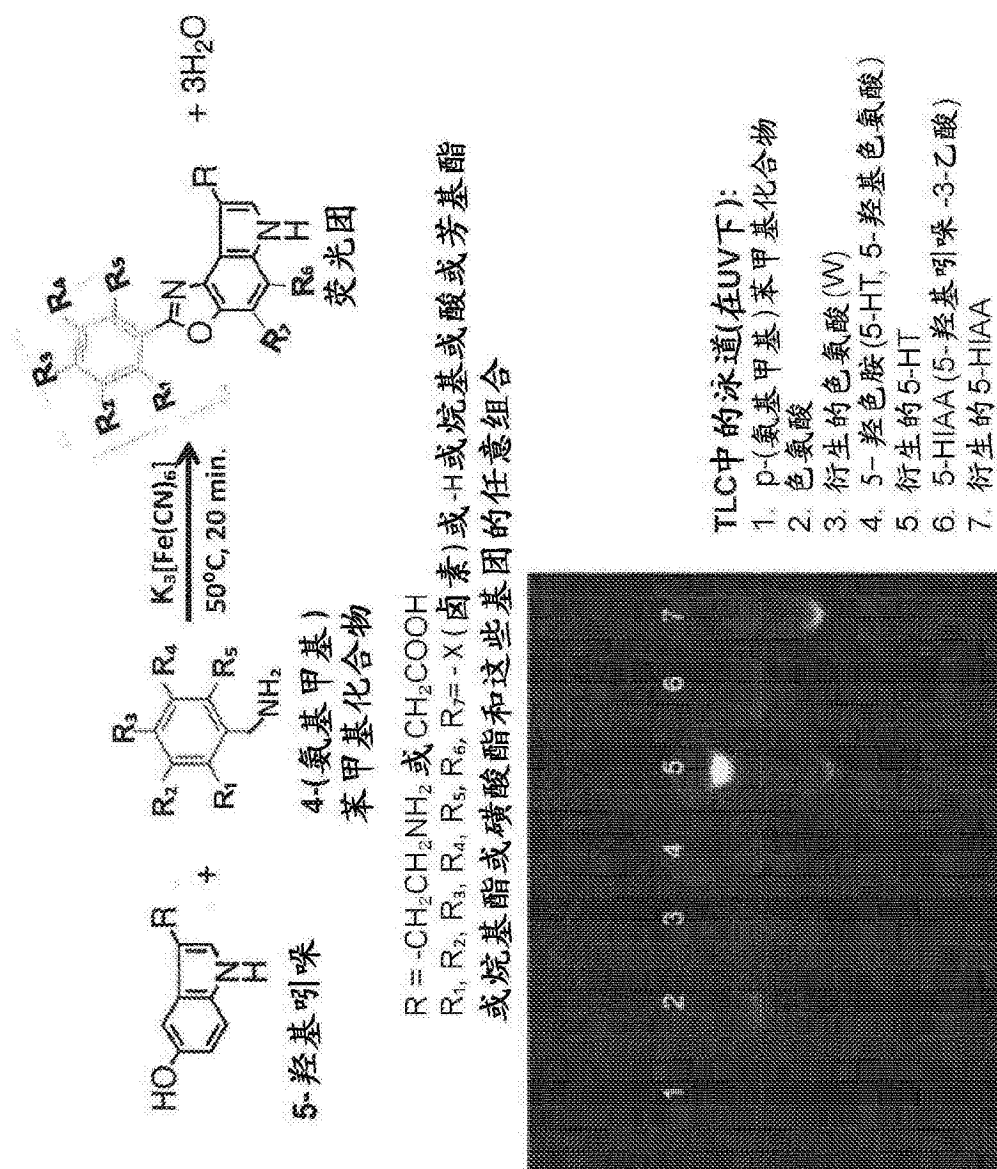


图 5

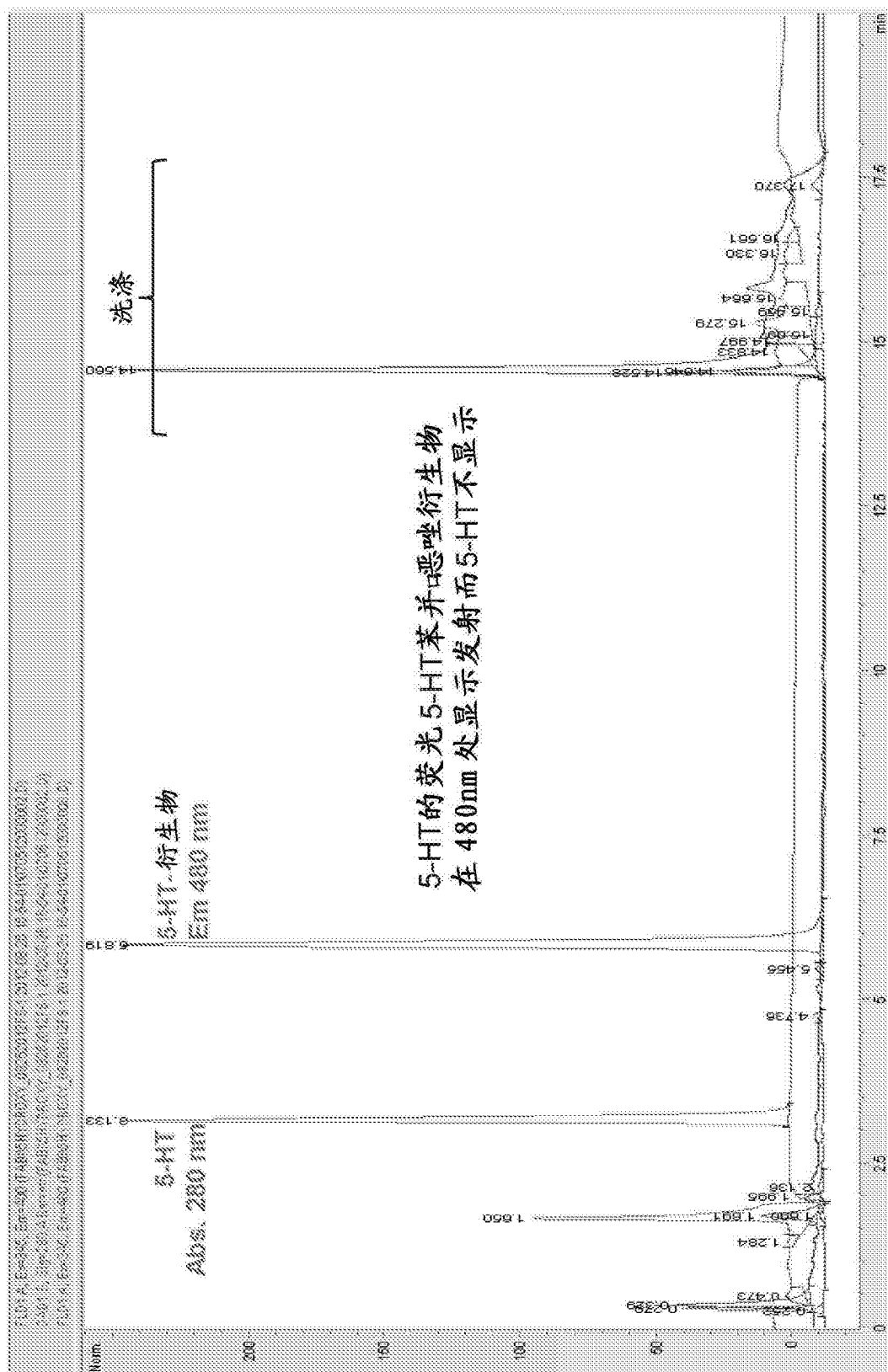


图 6

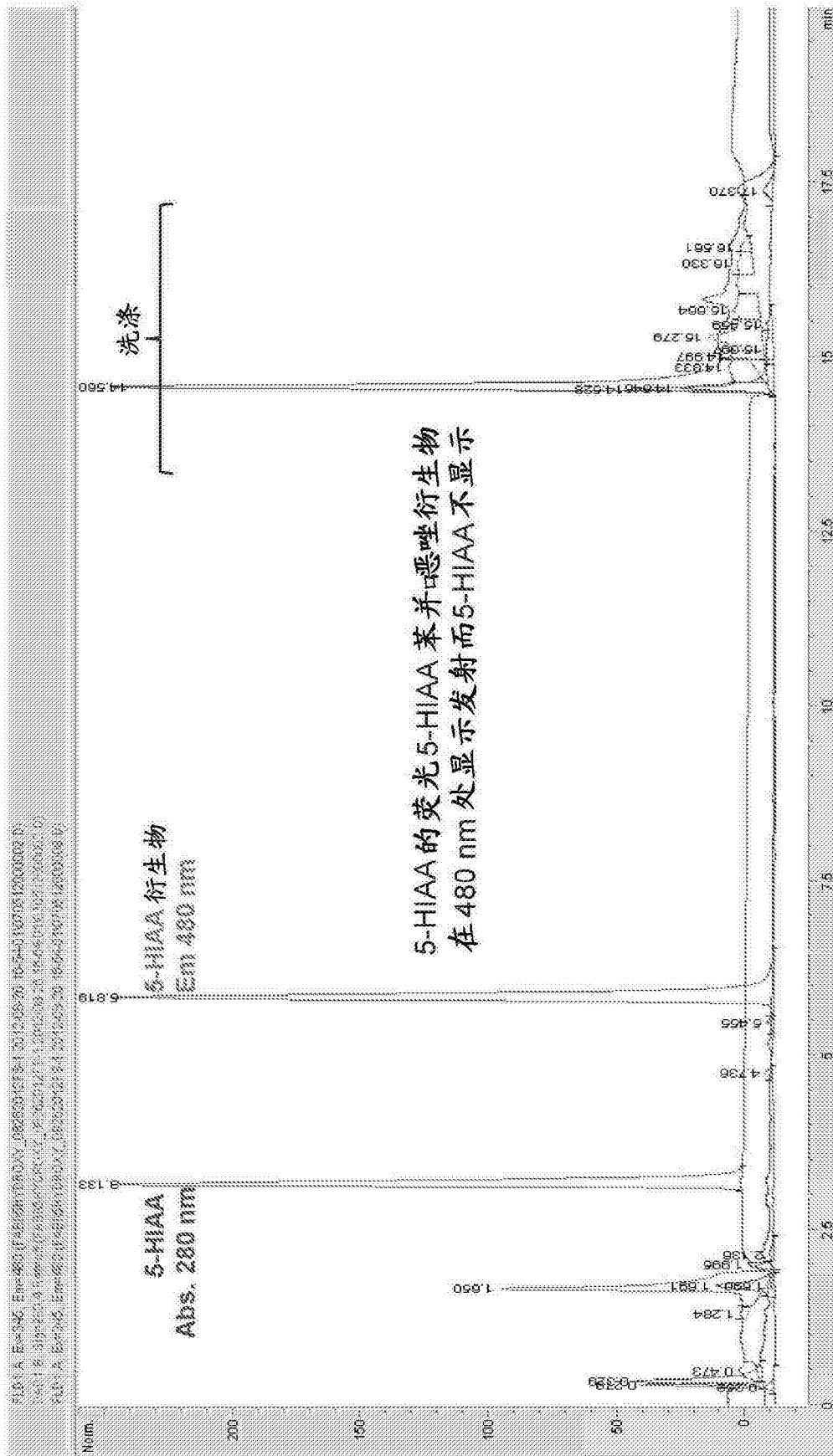


图 7

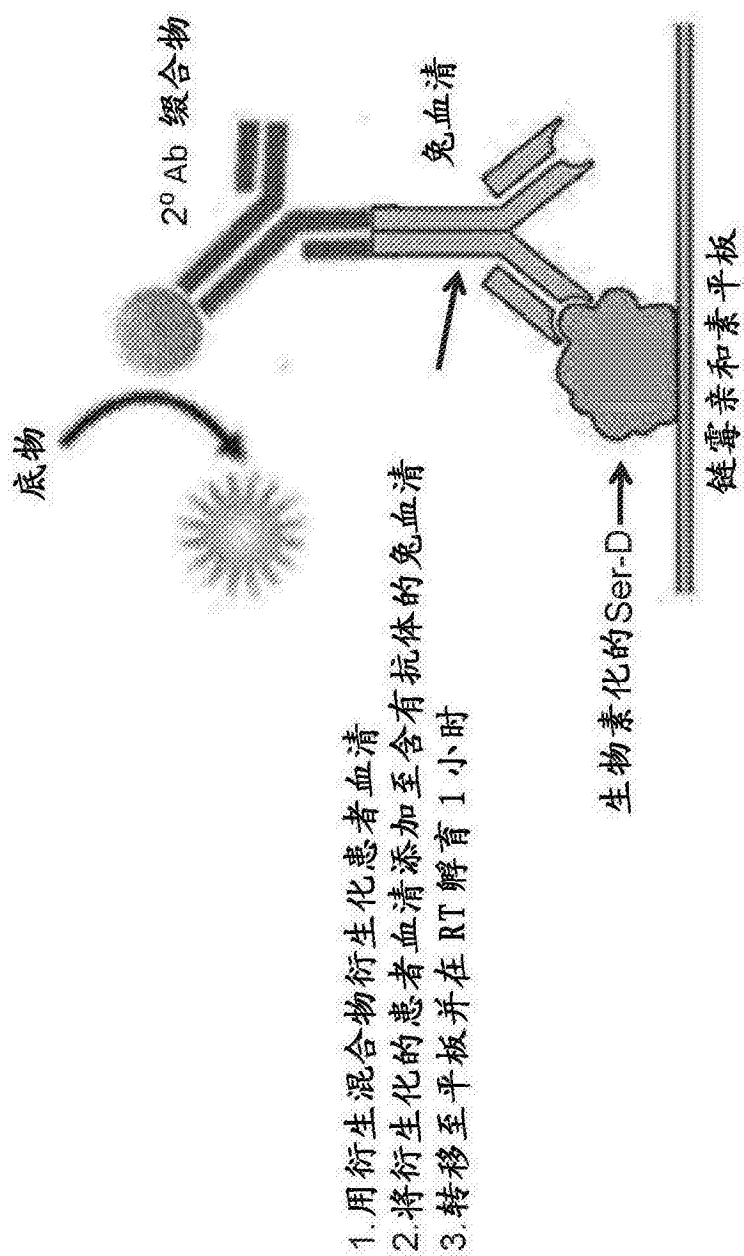


图 8

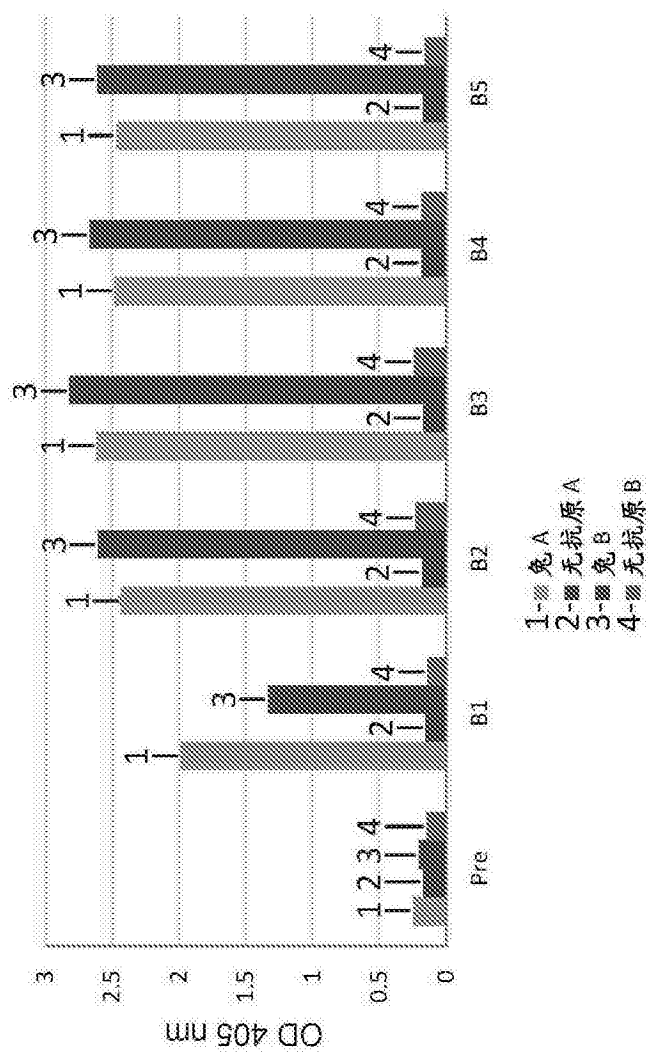


图 6

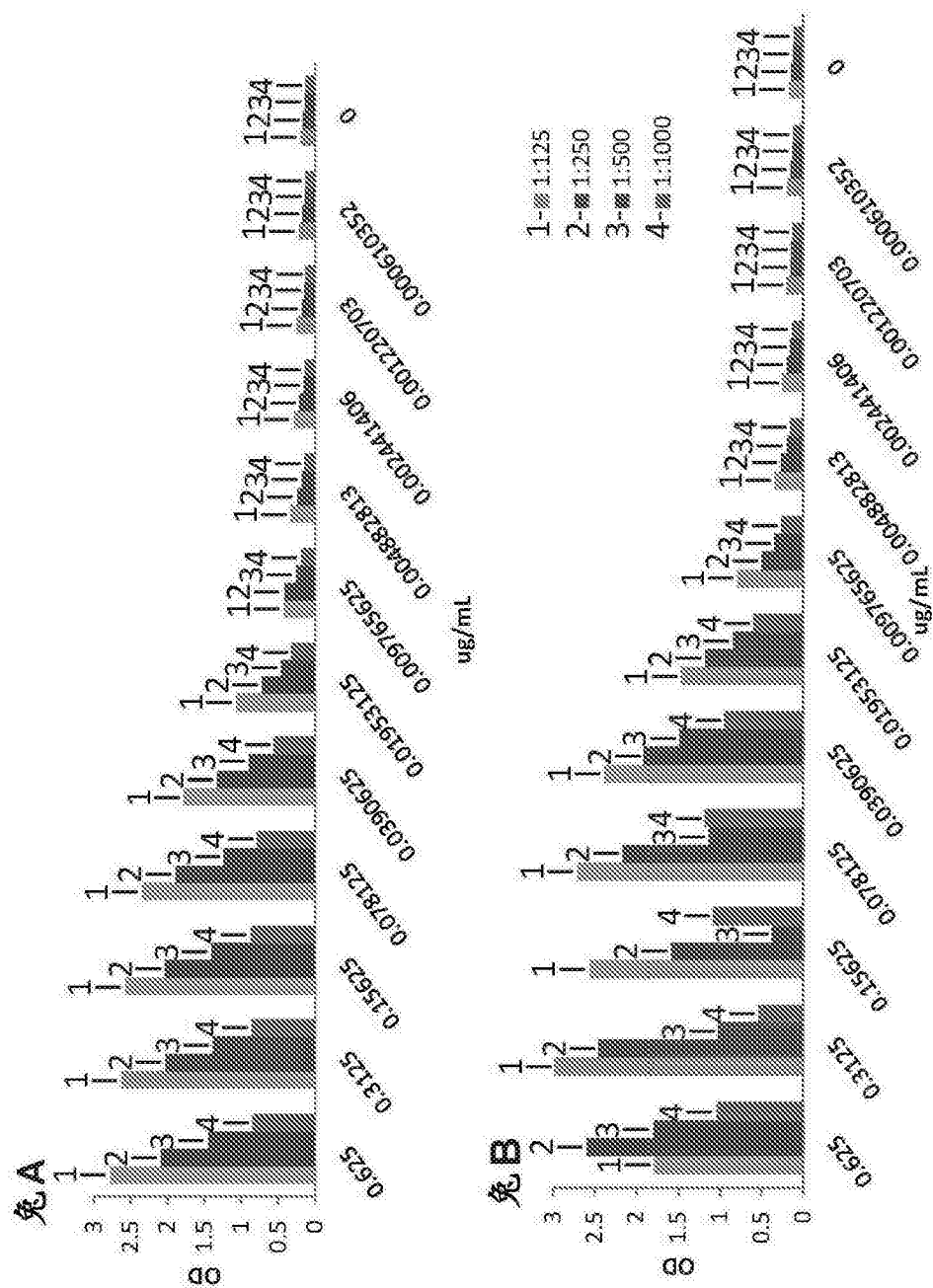


图 10

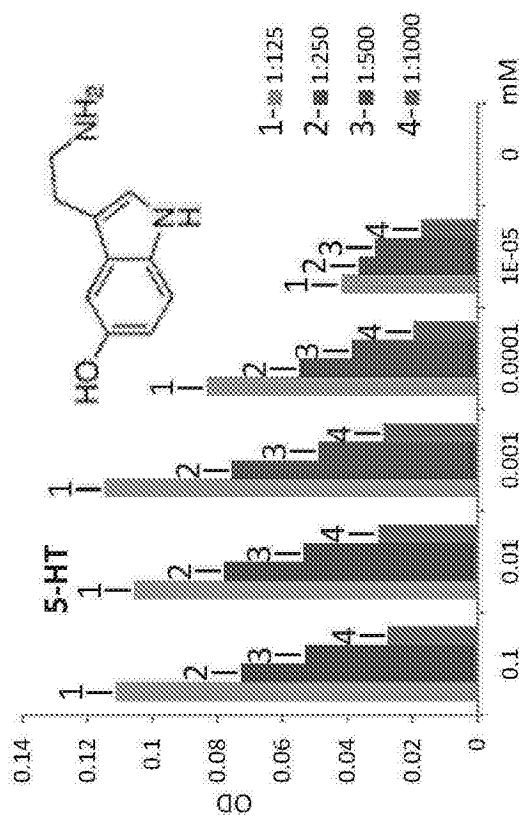


图 11A

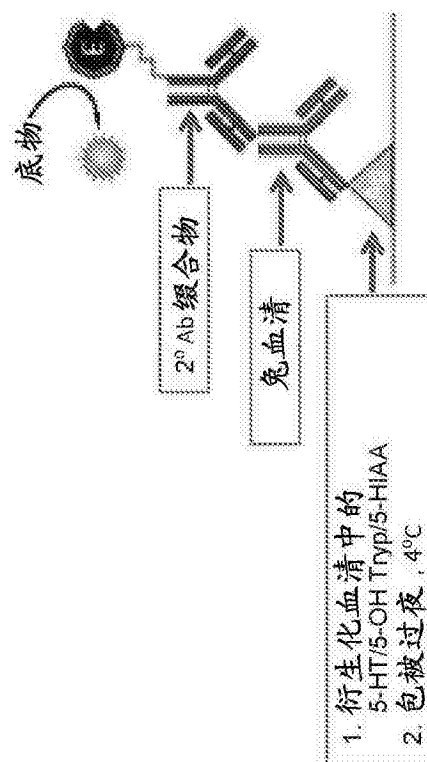


图 11B

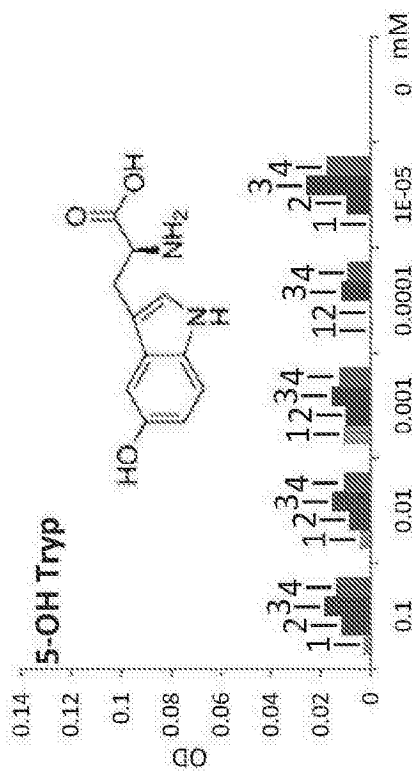


图 11C

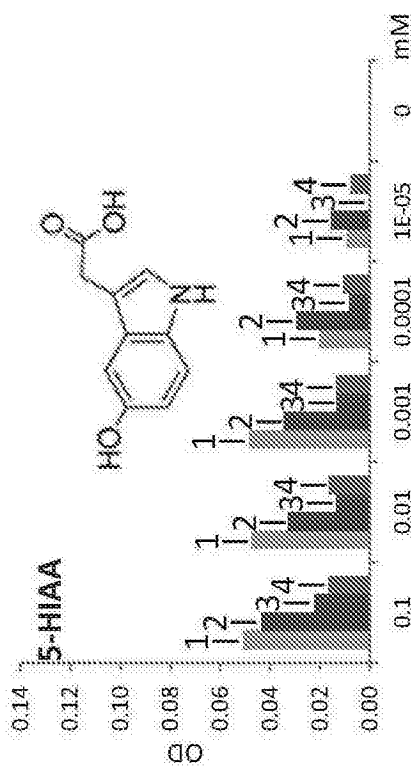


图 11D

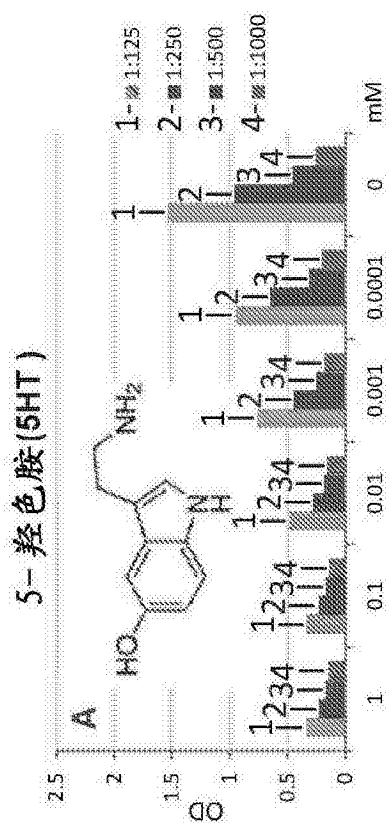


图 12A

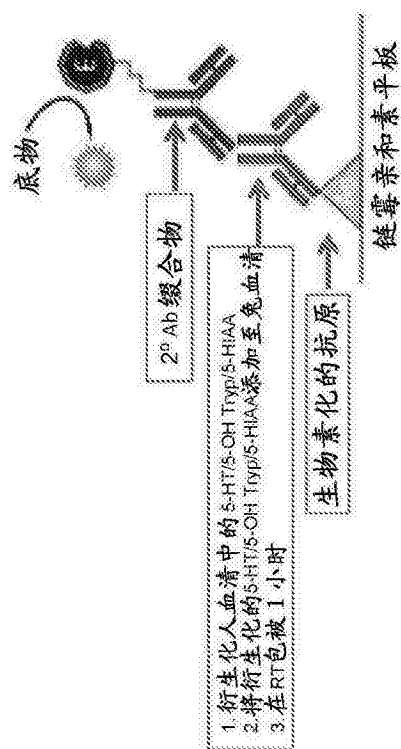


图 12B

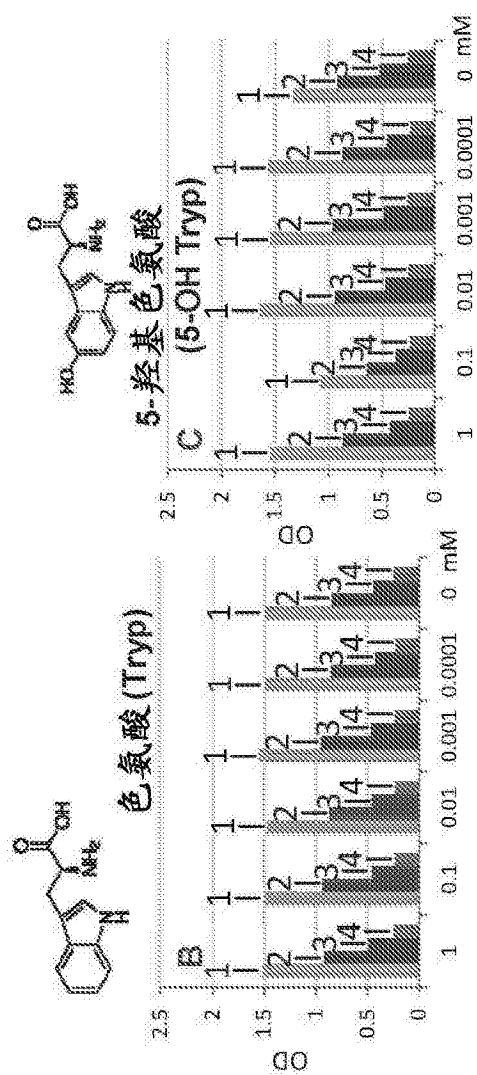


图 12C

图 12D

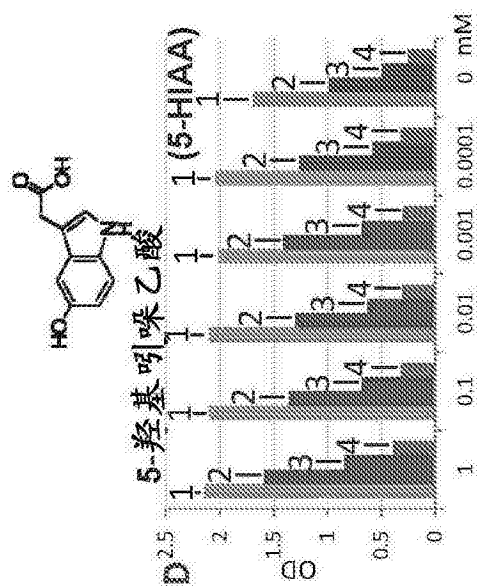


图 12E

ELISA:

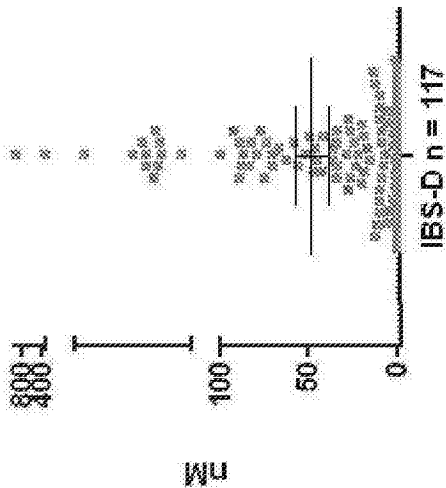


图 13A

	对象数	以 nm 计的 平均 5-HT
健康	122	23 ± 10
IBS-D	117	50 ± 20

图 13B

IBS - D	以 nm 计的 5-HT
Q 1	10.34
Q 2	33.96
Q 3	76.32
Q 4	138.64

提示 5-羟色胺功能障碍

图 13C

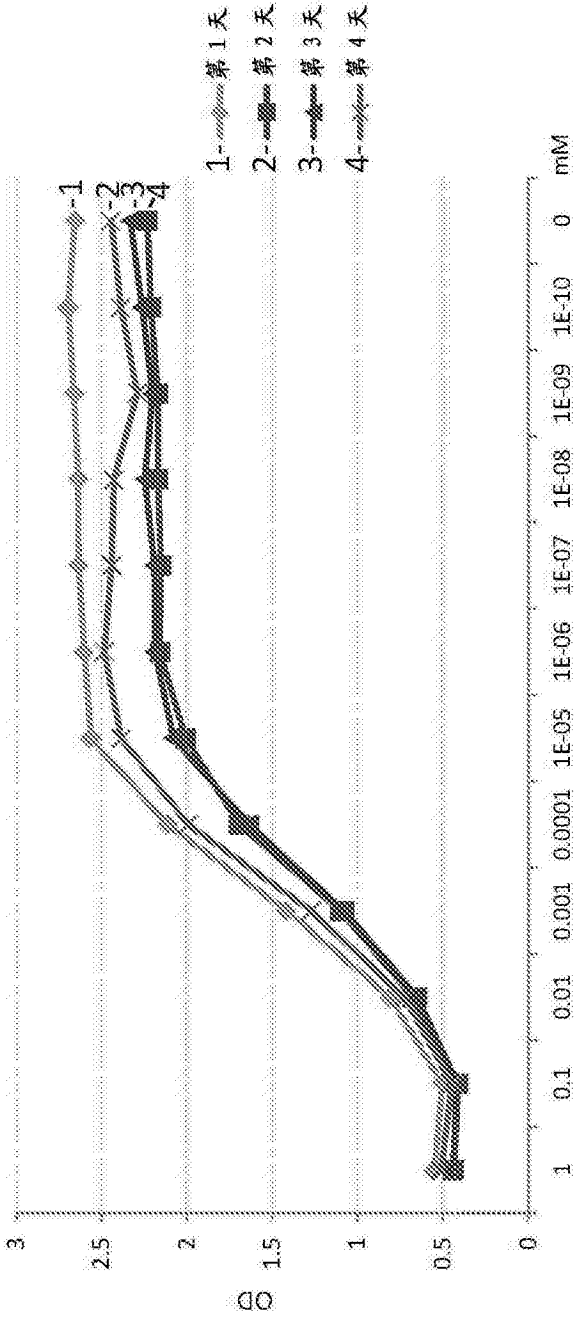


图 14

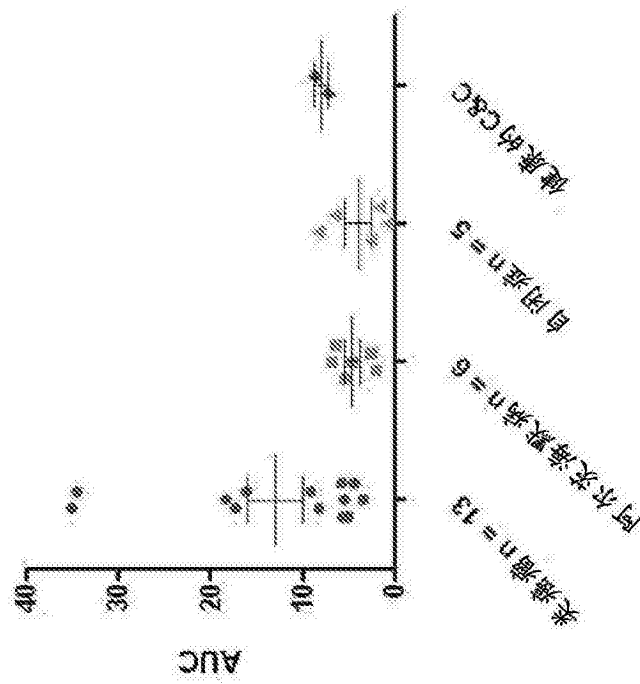


图 15

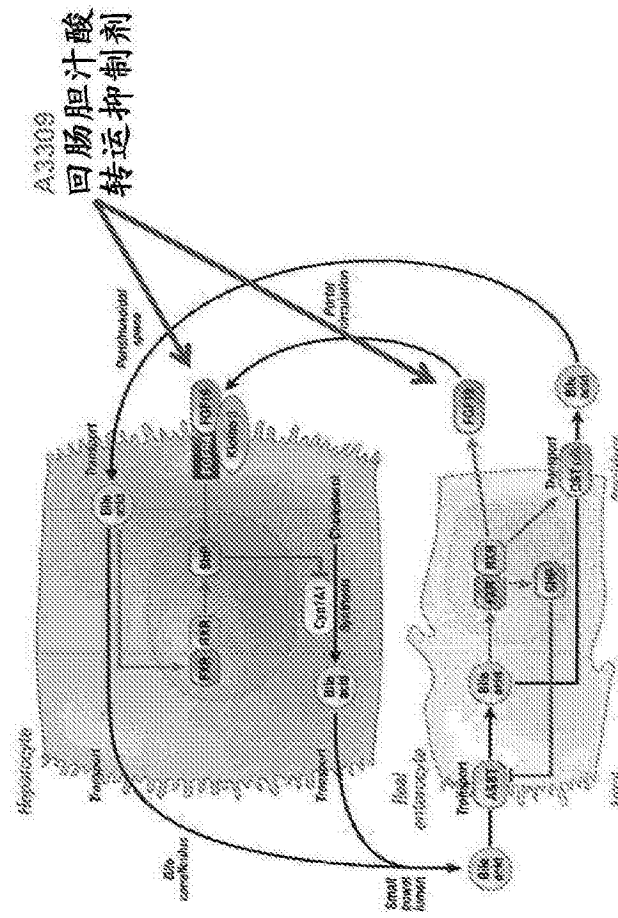


图 16A

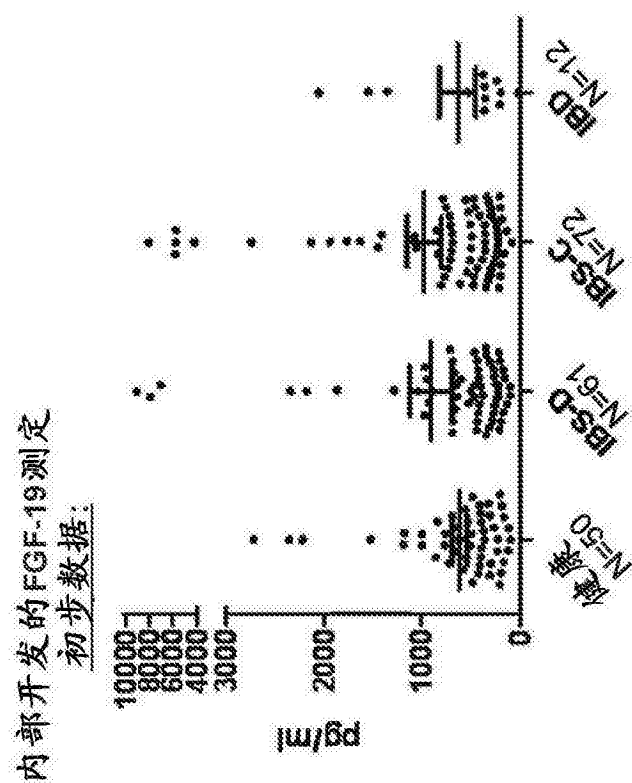


图 16B

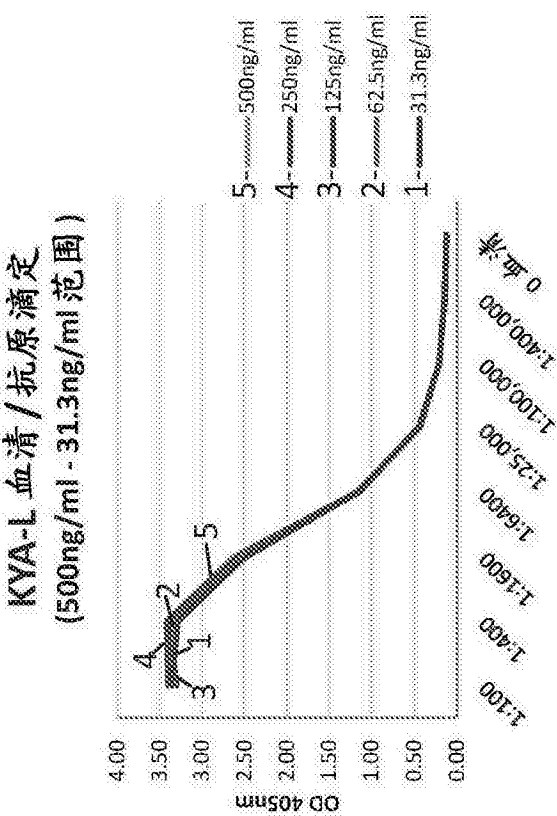


图 17A

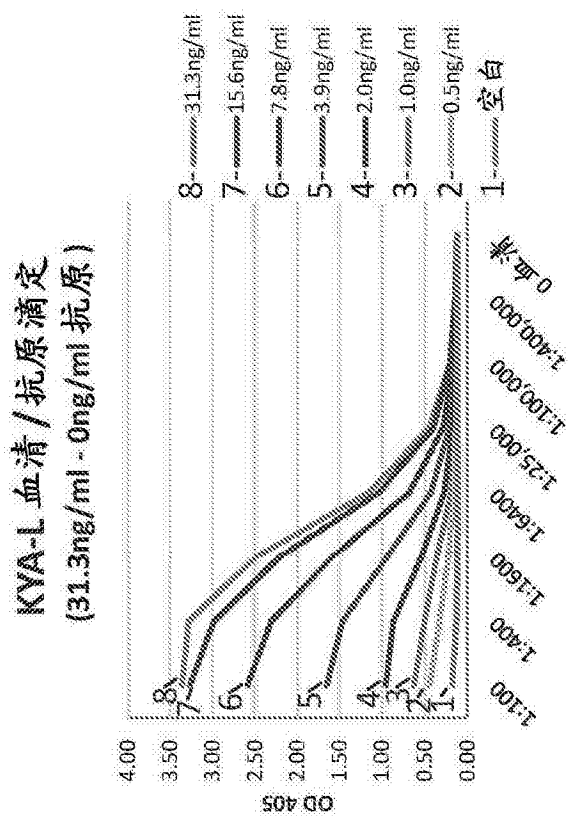


图 17B

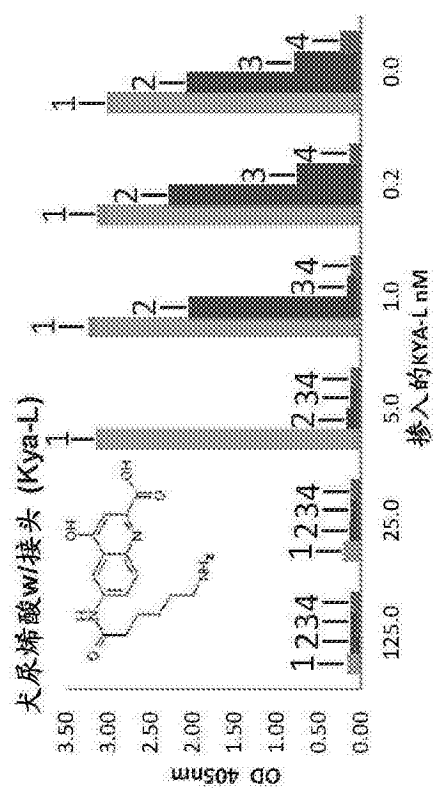


图 18A

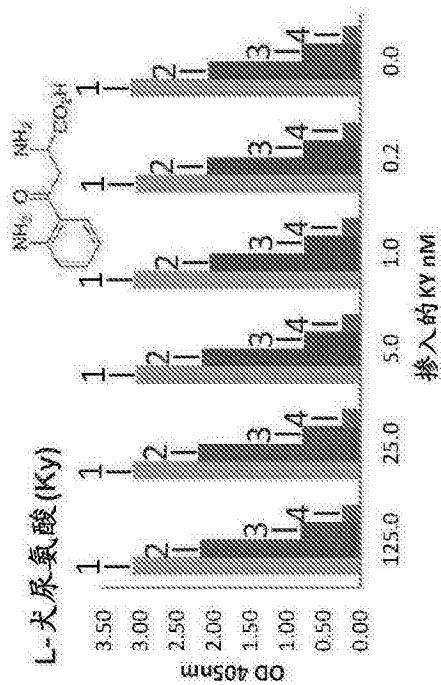


图 18B

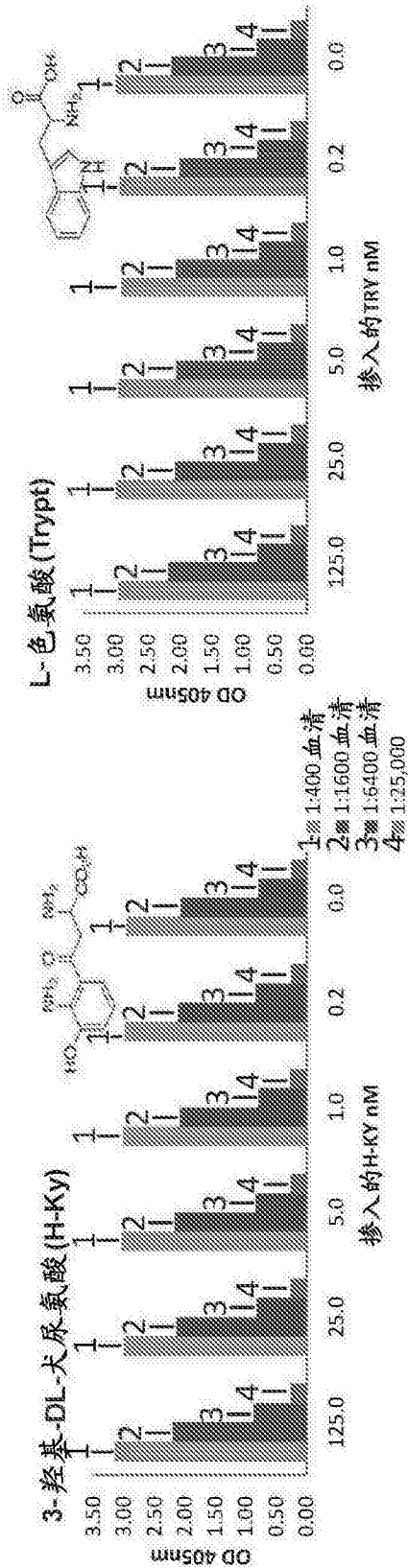


图 18C

图 18D

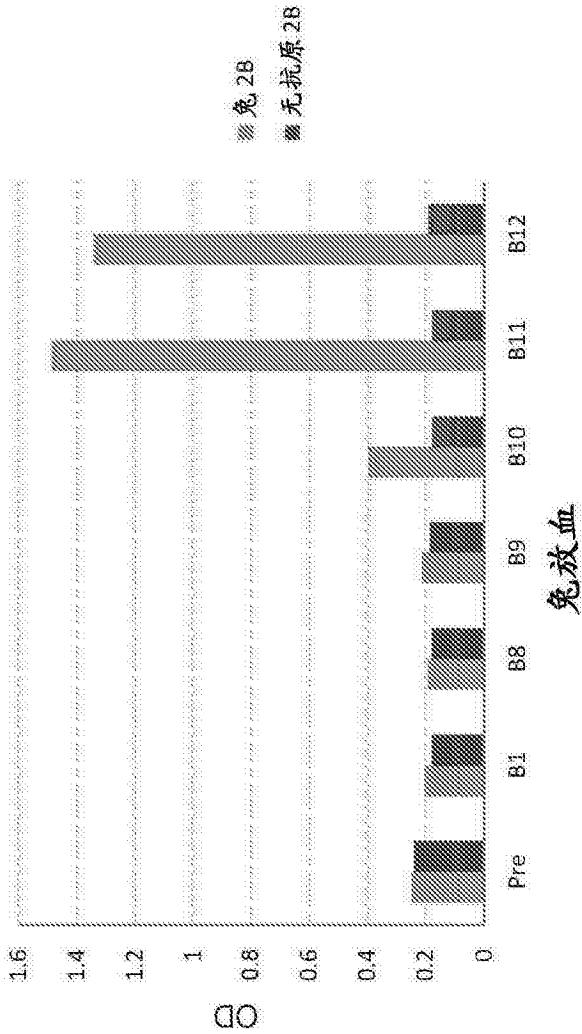


图 19

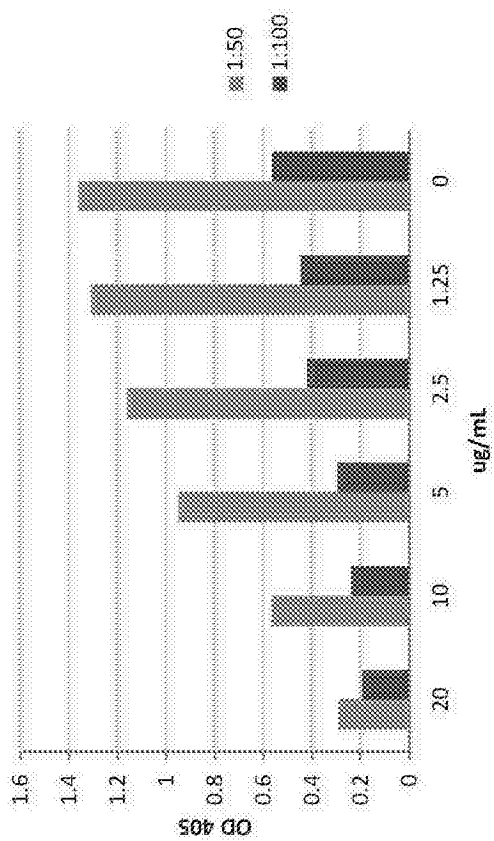


图 20A

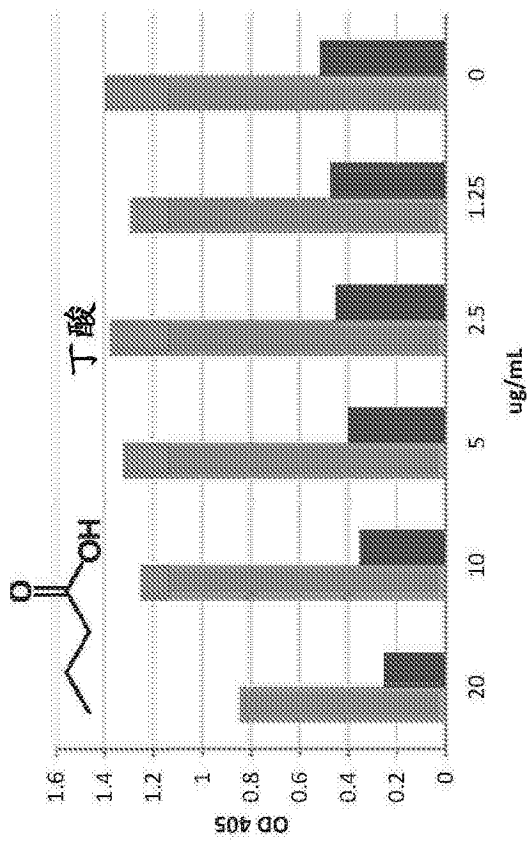


图 20B

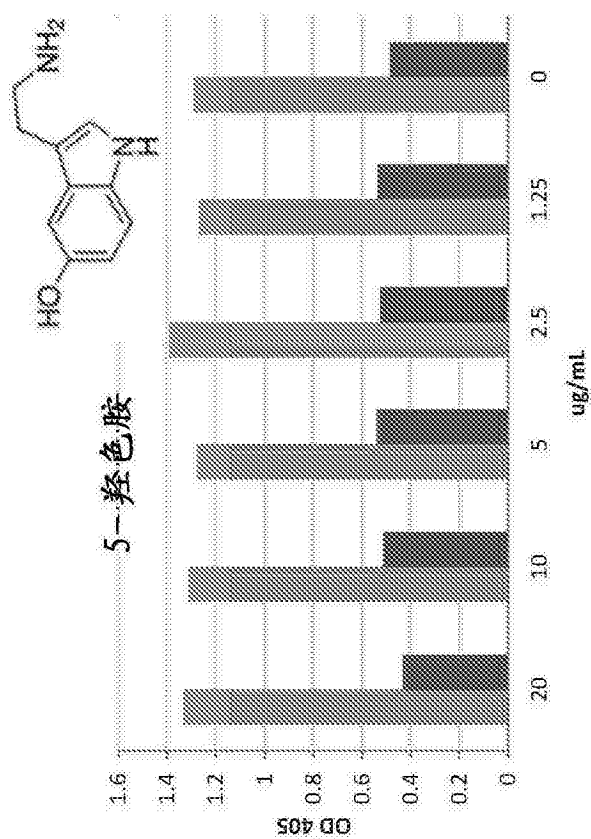


图 20C