



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107257805 A

(43)申请公布日 2017.10.17

(21)申请号 201580073766.5

(22)申请日 2015.11.19

(30)优先权数据

62/082,047 2014.11.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.07.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2015/058976 2015.11.19

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2016/079708 EN 2016.05.26

(83)生物保藏信息

PTA-122669 2015.11.17

PTA-122670 2015.11.17

PTA-122671 2015.11.17

(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 杨春刚 黄革生

(51)Int.Cl.

C07K 16/26(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

C12R 1/91(2006.01)

权利要求书3页 说明书40页

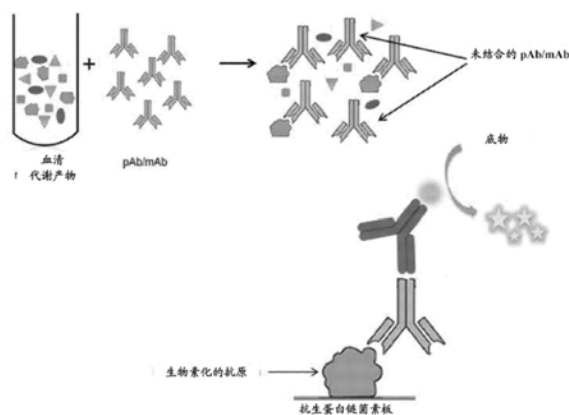
PCT/RO/134表3页 附图19页

(54)发明名称

抗血清素、色氨酸和犬尿氨酸代谢产物的抗体及其用途

(57)摘要

本发明提供针对血清素、色氨酸、犬尿氨酸途径中代谢产物例如5-羟基吲哚-3-乙酸(5-HIAA)、褪黑激素(MT)和犬尿烯酸(KYNA)的抗体和用于制备所述抗体的方法。所述特异性代谢产物抗体对结构相关的代谢产物具有低交叉反应性,并且是可用于特异性和灵敏免疫测定的试剂。本发明还提供将所述抗体用于测量人患者生物样品中5-HIAA、褪黑激素或犬尿烯酸水平的方法。



1. 分离的抗体或其抗体片段,其特异性地与5-羟基吲哚-3-乙酸(5-HIAA)结合,并具有低于1%的与一个或多个选自以下的成员的交叉反应性:色氨酸(Trp)、血清素(5-HT)、5-羟基色氨酸(5-HTP)、犬尿氨酸(KYN)、犬尿烯酸(KYNA)、3-羟基犬尿氨酸(3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA)、喹啉酸(QUIN)、邻氨基苯甲酸(ANA)、血清素-0-硫酸酯、血清素-0-磷酸酯和褪黑激素(MT)。

2. 权利要求1的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体是多克隆抗体或者单克隆抗体。

3. 权利要求1的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体是嵌合抗体或者人源化抗体。

4. 权利要求1的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体片段是Fab片段、Fab'片段或F(ab)'₂片段。

5. 权利要求1的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体或其抗体片段是由2015年11月17日以ATCC登录号_保藏并指定为1204-10G6F11H3的杂交瘤细胞系产生的。

6. 权利要求1的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体或其抗体片段是如下产生的:在动物免疫细胞产生特异性地与5-HIAA结合的抗体或其抗体片段的条件下,用包括缀合至载体蛋白的5-HIAA衍生物的免疫原免疫动物;并从动物分离抗体或其抗体片段。

7. 权利要求6的分离的抗体或其抗体片段,其中动物是山羊、兔子或小鼠。

8. 权利要求6的分离的抗体或其抗体片段,其中5-HIAA衍生物包括5-HIAA的苯并咪唑衍生物。

9. 分离的抗体或其抗体片段,其特异性地与褪黑激素(MT)结合,并具有低于1%的与一个或多个选自以下的成员的交叉反应性:色氨酸(Trp)、血清素(5-HT)、5-羟基色氨酸(5-HTP)、5-羟基吲哚-3-乙酸(5-HIAA)、犬尿氨酸(KYN)、犬尿烯酸(KYNA)、3-羟基犬尿氨酸(3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA)、喹啉酸(QUIN)、邻氨基苯甲酸(ANA)、血清素-0-硫酸酯和血清素-0-磷酸酯。

10. 权利要求9的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体是多克隆抗体或者单克隆抗体。

11. 权利要求9的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体是嵌合抗体或者人源化抗体。

12. 权利要求9的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体片段是Fab片段、Fab'片段或F(ab)'₂片段。

13. 权利要求9的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体或其抗体片段是由2015年11月17日以ATCC登录号_保藏并指定为1212-6C1E2F7的杂交瘤细胞系产生的。

14. 权利要求9的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体或其抗体片段是如下产生的:在动物免疫细胞产生特异性地与褪黑激素结合的抗体或其抗体片段的条件下,用包括缀合至载体蛋白的褪黑激素的免疫原免疫动物;并从动物分离抗体或其抗体片段。

15. 分离的抗体或其抗体片段,其特异性地与犬尿烯酸(KYNA)结合,并具有低于1%的与一个或多个选自以下的成员的交叉反应性:色氨酸(Trp)、血清素(5-HT)、5-羟基色氨酸(5-HTP)、5-羟基吲哚-3-乙酸(5-HIAA)、犬尿氨酸(KYN)、3-羟基犬尿氨酸(3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA)、喹啉酸(QUIN)、邻氨基苯甲酸(ANA)、血清素-0-硫酸酯、血清素-0-磷酸酯和褪黑激素。

16. 权利要求15的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体是多克隆抗体或者单克隆抗体。

17. 权利要求15的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体是嵌合抗体或者人源化抗体。

18. 权利要求15的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体片段是Fab片段、Fab'片段或F

(ab)'₂片段。

19. 权利要求15的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体或其抗体片段是由2015年11月17日以ATCC登录号_保藏并指定为1194-6H5B11A7的杂交瘤细胞系产生的。

20. 权利要求15的分离的抗体或其抗体片段,其中抗体或其抗体片段是如下产生的:在动物免疫细胞产生特异性地与KYNA结合的抗体或其抗体片段的条件下,用包括缀合至载体蛋白的犬尿烯酸(KYNA)的免疫原免疫动物;并从动物分离抗体或其抗体片段。

21. 权利要求1-20中任何一项的分离的抗体或其抗体片段,其具有可检测标记。

22. 权利要求1-21中任何一项的分离的抗体或其抗体片段,其被固定在固体基质上。

23. 杂交瘤细胞系,其产生和分泌选择性与5-HIAA结合的单克隆抗体,并已经于2015年11月17日以ATCC登录号_保藏并指定为1204-10G6F11H3。

24. 杂交瘤细胞系,其产生和分泌选择性与褪黑激素结合的单克隆抗体,并已经于2015年11月17日以ATCC登录号_保藏并指定为1212-6C1E2F7。

25. 杂交瘤细胞系,其产生和分泌选择性与犬尿烯酸结合的单克隆抗体,并已经于2015年11月17日以ATCC登录号_保藏并指定为1194-6H5B11A7。

26. 利用免疫测定来检测来自疑似患肠易激综合症的患者的样品中5-HIAA水平的方法,该方法包括:

(a) 在适当条件下,使权利要求1的分离的抗体或其抗体片段、从患者获得的样品和固定化的5-HIAA接触,以形成复合物,该复合物包含分离的抗体或其抗体片段和样品中存在的5-HIAA或固定化的5-HIAA;

(b) 检测结合至包含固定化的5-HIAA的复合物的抗体或其抗体片段的水平;和

(c) 基于步骤(b)的抗体或其抗体片段的水平,计算样品中5-HIAA的水平。

27. 权利要求26的方法,其中分离的抗体或其抗体片段、样品和固定化的5-HIAA同时接触。

28. 权利要求26的方法,其中分离的抗体或其抗体片段、样品和固定化的5-HIAA依次接触。

29. 权利要求26的方法,其中免疫测定是竞争性ELISA。

30. 利用免疫测定来检测来自疑似患肠易激综合症的患者的样品中褪黑激素水平的方法,该方法包括:

(a) 在适当条件下,使权利要求9的分离的抗体或其抗体片段、从患者获得的样品和固定化的褪黑激素接触,以形成复合物,该复合物包含分离的抗体或其抗体片段和样品中存在的褪黑激素或固定化的褪黑激素;

(b) 检测结合至包含固定化的褪黑激素的复合物的抗体或其抗体片段的水平;和

(c) 基于步骤(b)的抗体或其抗体片段的水平,计算样品中褪黑激素的水平。

31. 权利要求30的方法,其中分离的抗体或其抗体片段、样品和固定化的褪黑激素同时接触。

32. 权利要求30的方法,其中分离的抗体或其抗体片段、样品和固定化的褪黑激素依次接触。

33. 权利要求30的方法,其中免疫测定是竞争性ELISA。

34. 利用免疫测定来检测来自疑似患肠易激综合症的患者的样品中犬尿烯酸(KYNA)水

平的方法,该方法包括:

(a) 在适当条件下,使权利要求15的分离的抗体或其抗体片段、从患者获得的样品和固定化的KYNA接触,以形成复合物,该复合物包含分离的抗体或其抗体片段和样品中存在的KYNA或固定化的KYNA;

(b) 检测结合至包含固定化的KYNA的复合物的抗体或其抗体片的水平;和

(c) 基于步骤 (b) 的抗体或其抗体片的水平,计算样品中KYNA的水平。

35. 权利要求34的方法,其中分离的抗体或其抗体片段、样品和固定化的KYNA同时接触。

36. 权利要求34的方法,其中分离的抗体或其抗体片段、样品和固定化的KYNA依次接触。

37. 权利要求34的方法,其中免疫测定是竞争性ELISA。

抗血清素、色氨酸和犬尿氨酸代谢产物的抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年11月19日提交的美国临时申请号62/082,047的优先权,将其内容在此通过引用方式完整并入本文用于全部目的。

[0003] 发明背景

[0004] 肠易激综合征 (IBS) 是所有肠胃病的最常见的,影响10-20%的总人群并占据具有消化道疾患的全部患者的大于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,例如主要与排便相关的腹痛、腹泻、便秘或交替性腹泻和便秘、腹部膨胀、气体和粪便中有过多粘液。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患者根据其主要的肠症状划分成三类:便秘为主的IBS (IBS-C)、腹泻为主的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的、放射摄影的、内窥镜的或生理学的生物标志物。

[0006] 肠易激综合征是一种多样的胃肠道 (GI) 功能病症。其发病机理中指向与应激反应和免疫系统有关的证据日益增加。应激例如急性应激或慢性应激可影响肠道的几乎所有方面包括胃肠活动、内脏感觉、胃肠道分泌、肠通透性和肠微生物群。经常将IBS描述为“脑-肠轴病症”。血清素 (5-HT) 是脑-肠轴的中枢神经系统 (CNS) 和肠道神经系统 (ENS) 的重要神经递质和信号分子。经必需氨基酸色氨酸转化,血清素产生于CNS和ENS。大约95%的体内总血清素发现于肠道 (Keszthelyi等人,2015,Neurogastroenterol Motil,27 (8):1127-1137)。色氨酸被色氨酸羟基化酶转化为5-羟基色氨酸 (5-HTP),并且5-HTP被芳香氨基酸脱羧酶转化为血清素。色氨酸还可以沿犬尿氨酸途径代谢被免疫应答酶或应激应答酶代谢而产生神经毒性代谢产物和神经保护性代谢产物 (Kennedy等人,World J Gastroenterol,20 (39):14105-14125)。

[0007] 精确的IBS病理生理学仍待阐明。已提出血清素代谢产物褪黑激素具有强的抗氧化和抗炎活性,并可调控肠运动 (Konturek等人,J Physiol Pharmacol,2007,58:381-405; Siah等人,World J Gastroenterol,2014,20 (10):2492-2498)。其还显示对平滑肌运动活性具有抑制作用 (Bebeuik和Pang,J Pineal Res,1994,16:91-99)。研究已表明在患IBS-C的绝经后妇女中,肠道中褪黑激素水平降低 (Chojnacki等人,Endokrynol Pol,2013,64 (2):114-20)。

[0008] 犬尿烯酸 (KYNA) 是色氨酸、血清素和犬尿氨酸途径的另一种代谢产物,其可促进IBS。1%的摄入色氨酸转化为血清素,而大多数通过犬尿氨酸途径异化。患IBS的患者可具有降低水平的粘膜KYNA,这可促进功能、神经、代谢或炎症的变化,这种变化有助于IBS的形成 (Keszthelyi等人,J Psycho Res,2013,74:5001-504)。肠道中,KYNA具有神经保护、抗氧化和抗炎性质,并对肠运动和感觉功能有作用。

[0009] 对于IBS治疗,涉及血清素途径的治疗药物正在研究。用褪黑激素治疗可缓和与IBS-C相关的肠部疼痛(Elsenbruch,Gut,2005,54(10):1353-1354),并可改善具有睡眠障碍的IBS-D患者的腹部疼痛(Song等人,Gut,2005,54:1402-1407)。

[0010] 鉴于前述情况,本领域需要测量或定量个体生物样本中色氨酸、血清素和犬尿氨酸的代谢产物水平的方法。此外,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法。本发明满足了这些需求和其他需求。

[0011] 发明简述

[0012] 一方面,本文提供了分离的抗体或其抗体片段,其特异性结合至5-羟基吲哚-3-乙酸(5-HIAA),并具有低于1%的与一个或多个选自以下的成员的交叉反应性:色氨酸(Trp)、血清素(5-HT)、5-羟基色氨酸(5-HTP)、犬尿氨酸(KYN)、犬尿烯酸(KYNA)、3-羟基犬尿氨酸(3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA)、喹啉酸(QUIN)、邻氨基苯甲酸(ANA)、血清素-O-硫酸酯、血清素-O-磷酸酯和褪黑激素(MT)。分离的抗体或纯化的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。在一些实施方案中,分离的抗体或纯化的抗体是嵌合抗体或人源化抗体。其分离的或纯化的抗体片段可以是Fab片段、Fab'片段或F(ab)'₂片段。

[0013] 在一些实施方案中,抗5-HIAA抗体或其抗体片段是由2015年11月17日以ATCC登录号_保藏并指定为1204-10G6F11H3的杂交瘤细胞系产生的。

[0014] 在一实施方案中,抗体或其抗体片段如下生产:在动物免疫细胞产生特异性地与5-HIAA结合的抗体或其抗体片段的条件下,用包括缀合至载体蛋白的5-HIAA衍生物的免疫原免疫动物;并从动物分离抗体或其抗体片段。动物可以是山羊、兔子或小鼠。在一些实施方案中,5-HIAA衍生物包括5-HIAA的苯并噁唑衍生物。

[0015] 另一方面,本文提供了分离的抗体或其抗体片段,其特异性地与褪黑激素(MT)结合,并具有低于1%的与一个或多个选自以下的成员的交叉反应性:色氨酸(Trp)、血清素(5-HT)、5-羟基色氨酸(5-HTP)、5-羟基吲哚-3-乙酸(5-HIAA)、犬尿氨酸(KYN)、犬尿烯酸(KYNA)、3-羟基犬尿氨酸(3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA)、喹啉酸(QUIN)、邻氨基苯甲酸(ANA)、血清素-O-硫酸酯和血清素-O-磷酸酯。分离的抗体或纯化的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。在一些实施方案中,分离的抗体或纯化的抗体是嵌合抗体或人源化抗体。其分离的或纯化的抗体片段可以是Fab片段、Fab'片段或F(ab)'₂片段。

[0016] 在一些实施方案中,抗褪黑激素抗体或其抗体片段是由2015年11月17日以ATCC登录号_保藏并指定为1212-6C1E2F7的杂交瘤细胞系产生的。

[0017] 在一实施方案中,抗体或其抗体片段如下生产:在动物免疫细胞产生特异性地与褪黑激素结合的抗体或其抗体片段的条件下,用包括缀合至载体蛋白的褪黑激素的免疫原免疫动物;并从动物分离抗体或其抗体片段。动物可以是山羊、兔子或小鼠。

[0018] 还另一方面,本文提供了特异性地与犬尿烯酸(KYNA)结合的分离的抗体或其抗体片段,其具有低于1%的与一个或多个选自以下的成员的交叉反应性:色氨酸(Trp)、血清素(5-HT)、5-羟基色氨酸(5-HTP)、5-羟基吲哚-3-乙酸(5-HIAA)、犬尿氨酸(KYN)、3-羟基犬尿氨酸(3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA)、喹啉酸(QUIN)、邻氨基苯甲酸(ANA)、血清素-O-硫酸酯、血清素-O-磷酸酯和褪黑激素(MT)。分离的抗体或纯化的抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。在一些实施方案中,分离的抗体或纯化的抗体是嵌合抗体或人源化抗体。其分

离的或纯化的抗体片段可以是Fab片段、Fab'片段或F(ab)'₂片段。

[0019] 在一些实施方案中,抗犬尿烯酸抗体或其抗体片段是由2015年11月17日以ATCC登录号_保藏并指定为1194-6H5B11A7的杂交瘤细胞系产生的。

[0020] 在一实施方案中,抗体或其抗体片段如下生产:在动物免疫细胞产生特异性地与KYNA结合的抗体或其抗体片段的条件下,用包括缀合至载体蛋白的犬尿烯酸(KYNA)的免疫原免疫动物;并从动物分离抗体或其抗体片段。动物可以是山羊、兔子或小鼠。

[0021] 在一些实施方案中,文中所述的分离的抗体或其抗体片段中的任何一个含有可检测标记。

[0022] 在一些实施方案中,将文中所述的分离的抗体或其抗体片段中的任何一种固定于固体基质上。

[0023] 一方面,本文提供了产生和分泌选择性与5-HIAA结合的单克隆抗体的杂交瘤细胞系,并且其已在2015年11月17日以ATCC登录号_保藏并指定为1204-10G6F11H3。

[0024] 一些方面,本文提供了产生和分泌选择性与褪黑激素结合的单克隆抗体的杂交瘤细胞系,并且其已在2015年11月17日以ATCC登录号_保藏并指定为1212-6C1E2F7。

[0025] 一方面,本文提供了产生和分泌选择性与犬尿烯酸结合的单克隆抗体的杂交瘤细胞系,并且其已在2015年11月17日以ATCC登录号_保藏并指定为1194-6H5B11A7。

[0026] 本文还提供利用免疫测定来检测来自疑似患肠易激综合症的患者的样品中5-HIAA水平的方法。该方法包括:(a)在适当条件下,使上述分离的抗体或其抗体片段、从患者获得的样品和固定化的5-HIAA接触,以形成复合物,该复合物含有分离的抗体或其抗体片段和样品中存在的5-HIAA或固定化的5-HIAA;(b)检测结合至包含固定化的5-HIAA的复合物的抗体或其抗体片段的水平;和(c)基于步骤(b)中抗体或其抗体片段的水平,计算样品中5-HIAA的水平。

[0027] 在一些实施方案中,分离的抗体或其抗体片段、样品和固定化的5-HIAA同时接触。在其他实施方案中,分离的抗体或其抗体片段、样品和固定化的5-HIAA依次接触。免疫测定可以是ELISA例如竞争性ELISA。

[0028] 一方面,本文提供了利用免疫测定来检测来自疑似患肠易激综合症的患者的样品中褪黑激素水平的方法。该方法包括:(a)在适当条件下,使上述分离的抗体或其抗体片段、从患者获得的样品和固定化的褪黑激素接触,以形成复合物,该复合物含有分离的抗体或其抗体片段和样品中存在的褪黑激素或固定化的褪黑激素;(b)检测结合至包含固定化的褪黑激素的复合物的抗体或其抗体片段的水平;和(c)基于步骤(b)中抗体或其抗体片段的水平,计算样品中褪黑激素的水平。

[0029] 在一些实施方案中,分离的抗体或其抗体片段、样品和固定化的褪黑激素同时接触。在其他实施方案中,分离的抗体或其抗体片段、样品和固定化的褪黑激素依次接触。免疫测定可以是竞争性ELISA。

[0030] 一方面,本文提供了利用免疫测定来检测来自疑似患肠易激综合症的患者的样品中犬尿烯酸(KYNA)水平的方法。该方法包括:(a)在适当条件下,使上述分离的抗体或其抗体片段、从患者获得的样品和固定化的KYNA接触,以形成复合物,该复合物含有分离的抗体或其抗体片段和样品中存在的KYNA或固定化的KYNA;(b)检测结合至包含固定化的KYNA的复合物的抗体或其抗体片段的水平;和(c)基于步骤(b)中抗体或其抗体片段的水平,计算

样品中KYNA的水平。

[0031] 在一些实施方案中,分离的抗体或其抗体片段、样品和固定化的犬尿烯酸同时接触。在其他实施方案中,分离的抗体或其抗体片段、样品和固定化的犬尿烯酸依次接触。免疫测定可以是竞争性ELISA。

[0032] 本申请以全部内容引入国际专利申请公开W02014/188377和W02014/188378作为参考,用于全部目的。

[0033] 当连同下述发明详述和附图阅读时,这些和其他方面、优点和实施方案将变得显而易见。

[0034] 附图简述

[0035] 图1图示显示血清素、色氨酸和犬尿氨酸途径的代谢产物。代谢产物包括色氨酸(Trp,122)、5-羟基色氨酸(5-HTP,125)、血清素(5-HT,101)、褪黑激素(MT,120)、5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA或5HIAA,115)、犬尿氨酸(KYN,131)、犬尿烯酸(KYNA,135)、邻氨基苯甲酸(ANA,140)、3-羟基犬尿氨酸(3-HK,146)、3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA,149)、喹啉酸(QUIN;160)和黄尿酸(XA,148)。

[0036] 图2显示文中所述竞争性ELISA的示例性实施方案。

[0037] 图3A-3D显示用于产生文中所述抗体的免疫源性缀合物。免疫原包括5-HIAA的苯并噁唑衍生物(图3A)、褪黑激素(图3B)和犬尿烯酸(图3C)半抗原。半抗原通过连接体例如PEG连接体缀合至载体蛋白。图3D提供显示衍生化的代谢产物的分离的HPLC色谱图,所述衍生化的代谢产物包括衍生化的血清素(5HT-d)和衍生化的5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA-d)。

[0038] 图4A和4B提供利用免疫源性缀合物的抗体产生示意图。图4A显示免疫源性缀合物可用于单克隆抗体产生和多克隆抗体产生。图4B显示单克隆抗体产生的方法,其包括用指定抗原免疫小鼠,产生杂交瘤克隆,和分离指定抗原的特异性单克隆抗体。

[0039] 图5A和5B提供合成方式形成5-HIAA衍生物的化学流程图。图5A显示缀合至PEG连接体的5-HIAA的苯并噁唑衍生物。图5B显示经PEG连接体缀合至生物素的5-HIAA的苯并噁唑衍生物。

[0040] 图6A-6D显示杂交瘤克隆10G6F11H3产生的小鼠单克隆抗体的反应性。抗体特异性与5-HIAA结合(对5-HIAA是免疫反应的)。图6A显示未稀释抗体和1:200稀释的单克隆抗体类似地结合5-HIAA。图6B显示游离5-HIAA和固定化的5-HIAA的竞争性测定的数据。与当100ng/mL游离5-HIAA存在时相比,当未向孔中加入游离5-HIAA(0ng/mL)时,检测到更高的OD。高的OD对应于高水平的结合至固定化的5-HIAA的抗体。低的OD对应于低水平的结合至固定化的5-HIAA的抗体,以及在本次测试中高水平的结合至游离5-HIAA的抗体。图6C显示在不同游离5-HIAA浓度下,各种稀释的单克隆抗体的滴度。图6D显示抗5-HIAA单克隆抗体与血清素无交叉反应性,并且抗5HT单克隆抗体与5-HIAA无交叉反应性。

[0041] 图7A和7B显示源自杂交瘤克隆10G6F11H3的单克隆抗体对5-HIAA具有特异性,但是对色氨酸、血清素或犬尿氨酸代谢产物无特异性。图7A显示抗体与4-羟基喹啉、3-羟基-DL-犬尿氨酸和褪黑激素无交叉反应性。图7B显示与血清素(5-HT)、5-羟基-L-色氨酸和N-乙酰基-5-羟色胺无交叉反应性。杂交瘤克隆10G6F11H3产生的单克隆抗体是抗5-HIAA,一种IgG_{1k}抗体。

[0042] 图8显示抗5-HIAA单克隆抗体的标准曲线。浓度是0ng/mL~100ng/mL,稀释因子是

5。

[0043] 图9显示在放血前和放血1-9 (B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8和B9) 时来自兔#16401、#16402和#16403的抗血清中抗褪黑激素多克隆抗体的存在。将兔子用文中所述的褪黑激素免疫原性缀合物免疫。兔子#16401显示最高滴度的抗-褪黑激素抗体。

[0044] 图10A和10B显示亲和纯化的兔多克隆抗-褪黑激素抗体在竞争性ELISA中的反应性。在测定中,将褪黑激素(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)固定化至孔的表面。将游离(未固定化或未结合的)褪黑激素和亲和纯化的兔多克隆抗-褪黑激素抗体加入到孔中。加入的游离褪黑激素的量是0.00mM(图的右侧)至8.00mM(图的左侧)。OD测量值表示结合至固定化的褪黑激素的抗体量。在类似竞争性测定中,将结构上类似于褪黑激素的其他竞争(游离,未固定化或未结合的)化合物用抗体和固定化的褪黑激素孵育。图10B显示亲和纯化的兔抗体与血清素(Ser)、色氨酸(Tryp)或5-HIAA无交叉反应性。

[0045] 图11图示抗褪黑激素单克隆抗体的特异性。该图显示来自4个杂交瘤克隆(6C1E2F7、6C2H4C8、7C7F1G2和7C8A1D2)的抗体特异性地与褪黑激素结合,并缺少与血清素、色氨酸和5-HIAA的交叉反应性。产生自杂交瘤克隆6C1E2F7的单克隆抗体是抗-褪黑激素IgG_{3k}抗体。

[0046] 图12提供来自杂交瘤克隆6C1E2F7的抗褪黑激素单克隆抗体的标准曲线。

[0047] 图13A和13B显示抗犬尿烯酸(KYNA)的兔多克隆抗体的反应性。图13A显示用文中所述KYNA免疫原性缀合物免疫的兔的抗血清含有特异性地与KYNA结合的抗体。图13A显示竞争性ELISA测定结果,其中游离KYNA与固定化的KYNA就抗体结合竞争。在所述测定中,游离KYNA的量是0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (右侧)至500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (左侧)。OD测量值表示结合至固定化的KYNA的抗体量。当未加入游离KYNA时(0.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$),抗-KYNA抗体结合至固定化的KYNA抗原,如高的OD值所示。当加入游离KYNA抗原时,较少的抗体结合至固定抗原,如较低的OD值所示。图13B显示类似竞争性测定的结果。在本测试中,抗体的量还从1:250稀释至1:2500稀释变化。

[0048] 图14A和14B显示鼠单克隆抗体与犬尿烯酸(KYNA)的反应性。图14A显示来自杂交瘤克隆4B11H9A2和6H5B11A7的抗体特异性地与KYNA结合,并且与3-OH-DL-犬尿氨酸、血清素、色氨酸、N-乙酰基-5-羟基-色胺和5-OH-喹啉无交叉反应性。在竞争性ELISA中,结构式类似于KYNA的化合物不干扰抗体与KYNA的结合。图14B显示未稀释和稀释的小鼠单克隆抗KYNA抗体与KYNA结合。杂交瘤克隆6H5B11A7产生的单克隆抗体是抗-KYNA,一种IgG_{1k}抗体。

[0049] 图15A和15B显示特异性地与犬尿烯酸结合的杂交瘤克隆6H5B11A7产生的鼠单克隆抗体。如图15A中所示,在本文提供的竞争性ELISA中,游离KYNA抗原与固定化的KYNA抗原竞争性结合抗体。随着游离KYNA的量的增加,更少的抗体结合至固定化的抗原,并且OD值降低。图15B显示小鼠单克隆抗-KYNA抗体的标准曲线。

[0050] 图16A和16B显示本文公开的竞争性ELISA的示例性实施方案。在图16A中,将TMB底物用于比色反应。在图16B中,将发光底物用于检测反应。利用发光底物的测定提供比TMB底物测定更高的灵敏度。

[0051] 发明详述

[0052] I. 定义

[0053] 如本文所用的术语“a、an”或“该(the)”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(a polyamine compound)和赋形剂(an

excipient)”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。

[0054] 术语“抗原”指能特异性地与抗体结合的任何分子、化合物、组合物或颗粒物。抗原具有一个或多个与抗体相互作用的表位,尽管其不一定诱导抗体的产生。

[0055] 术语“抗体”指与特定抗原免疫性反应的免疫球蛋白分子,并包括多克隆和单克隆抗体。该术语还包括基因工程形式例如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)和杂缀合物抗体(例如双特异性抗体)。术语“抗体”还包括抗体的抗原结合形式,其包括具有抗原结合能力的片段例如Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、scFv和di-scFv(参见,例如Kuby, Immunology, 第三版, W.H.Freeman&Co., 纽约1998)。该术语还包括二价或双特异性分子、双抗体、三抗体和四抗体。二价和双特异性分子描述在例如Zhu等人(Protein Sci.1997;6:781-9和Hu等人(Cancer Res.1996;56:3055-61)中。虽然根据完整抗体的消化定义各种抗体片段,但是技术人员应该理解可以用化学方法或者利用重组DNA方法,从头合成片段。因此,文中所用的术语抗体还包括通过完整抗体的修饰产生的或者利用重组DNA方法合成的抗体片段。

[0056] 抗体可以由主要被免疫球蛋白基因或者免疫球蛋白基因片段编码的一种或多种多肽构成。公认的免疫球蛋白基因包括κ、λ、α、γ、δ、ε和μ恒定区基因以及无数的免疫球蛋白可变区基因。将轻链分类为κ或λ。将重链分类为γ、μ、α、δ或ε,所述依次分别定义免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。“抗体”起结合蛋白的功能,并且结构上定义为包含来自或衍生自产生抗体的动物的免疫球蛋白编码基因的框架区的氨基酸序列。

[0057] 典型的免疫球蛋白(抗体)结构单元已知包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链构成,每对有一个“轻链”(大约25kD)和一个“重链”(大约50-70kD)。每条链的N-末端定义主要负责抗原识别的约100~110或者更多氨基酸的可变区。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别指这些轻链和重链。

[0058] 抗体可包括V_H-V_L二聚体,其包括单链抗体(作为单一多肽链存在的抗体),例如单链Fv抗体(sFv或scFv),其中可变重区和可变轻区连接在一起(直接或通过肽连接体),形成连续多肽。单链Fv抗体是共价连接的V_H-V_L,其可从包括V_H-和V_L-编码序列的核酸表达,该序列直接连接或者通过肽-编码连接体连接(例如Huston等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883,1988)。尽管V_H和V_L作为单一多肽链互相连接,而V_H和V_L域非共价地联合。或者,抗体可以是另一个片段。例如利用重组技术,其他片段还可以作为可溶蛋白或者作为从显示方法(display methods)得到的片段产生。抗体还可以包括双抗体和微型抗体。本发明抗体还包括重链二聚体例如来自骆驼科动物的抗体。因此,在一些实施方案中,抗体是二聚的。在另一实施方案中,抗体可以是具有活性同种型的单体形式。在一些实施方案中,抗体是多价形式例如三价或四价形式,其可交联抗原。

[0059] 术语“抗体片段”或“抗原结合片段”指免疫球蛋白分子的至少一部分可变区,其结合其靶标,即抗原识别区或抗原结合区。可包括一些免疫球蛋白的恒定区。抗体片段的示例包括但是不限于线性抗体、单链抗体分子(scFv)、Fv片段、高变区或互补决定区(CDRs)、V_L(轻链可变区)、V_H(重链可变区)、Fab片段、F(ab)'₂片段、从抗体片段形成的多特异性抗体,及其任何组合或者能结合目标抗原的免疫球蛋白肽的任何其他部分。如同本领域技术人员理解的,可利用各种方法例如用酶如胃蛋白酶消化完整的抗体;或者从头合成,得到各种抗体片段。通常用化学方法或者利用重组DNA方法,从头合成抗体片段。

[0060] 术语“多克隆抗体”指由识别相同抗原上的多个表位的不同B细胞谱系分泌的抗体集合内的抗体。

[0061] 术语“单克隆抗体”指从基本同源的抗体群得到的抗体,即除了可能微量存在的可能天然发生的突变外,所述群包含的个体抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,靶向单一抗原位点或表位。此外,与通常包括靶向不同决定簇或表位的不同抗体的多克隆抗体制品相比,每个单克隆抗体靶向抗原上的单一决定簇。根据本发明的待使用的单克隆抗体可以通过杂交瘤方法制备,该方法首先由Kohler和Milstein,Nature,256:495 (1975) 描述,或者可以通过例如U.S.Pat.No.4,816,567中描述的重组DNA方法制备。在一些情况下,可以从利用McCafferty等人,Nature,348:552-554 (1990) 所述技术产生的噬菌体库,分离单克隆抗体。

[0062] 术语“嵌合抗体”指免疫球蛋白分子,其中(a) 恒定区或其一部分被改变、置换或交换,从而抗原结合位点(可变区)连接至不同或改变的种类、效应子功能和/或物种的恒定区或者为嵌合抗体提供新的性质的完全不同分子例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或(b) 可变区或其一部分被具有不同或改变的抗原特异性的可变区或其一部分改变、置换或交换;或者被来自另一物种或来自另一抗体种类或亚类的相应序列改变、置换或交换。

[0063] 术语“人源化抗体”指其中VH和VL区所含的抗原结合环即互补决定区(CDRs)被移植到人框架序列的抗体。通常,人源化抗体具有与文中所述的非人源化抗体相同的结合特异性。用于人源化抗体的技术是本领域众所周知的,并描述于例如Verhoyen等人,Science,239:1534 (1988) 与Winter和Milstein,Nature,349:293 (1991) 中。

[0064] 当涉及抗原或半抗原时,短语与抗体“特异性(或选择性)结合”或者“与…特异性(或选择性)免疫反应”是指,通常在异源抗原或半抗原群中或其他生物制品例如细胞混合物、细胞裂解物或者生物样品诸如血液、血浆或血清中,确定抗原或半抗原存在的结合反应。因此,在指定的免疫测定条件下,指定的抗体与特定的抗原或半抗原结合(至少是背景的两倍,且更通常是高于背景的10~100倍)。在此条件下,与抗体的特异性结合需要就其特异性对特定抗原或半抗原进行选择的抗体。例如,多克隆抗体可被选择,以仅获得与选择的抗原特异性免疫反应且不与其它蛋白免疫反应的那些多克隆抗体。可通过减去与其它分子交叉反应的抗体,实现所述选择。可使用各种免疫测定形式,以选择与特定蛋白特异性免疫反应的抗体。例如,常规使用ELISA免疫测定,以选择与蛋白质特异性免疫反应的抗体(参见,例如Harlow&Lane,描述可用于测定特异性免疫反应的免疫测定方式和条件的Using Antibodies,A Laboratory Manual (1998))。

[0065] 可以例如利用本领域已知的方法诸如利用与靶标类似的对照分子如过量非标记靶标的竞争性测定,测量特异性结合。特异性结合靶标抗原的抗体可以具有对于抗原的至少大约 10^{-4} M的 K_d ,或者至少大约 10^{-5} M的 K_d ,或者至少大约 10^{-6} M的 K_d ,或者至少大约 10^{-7} M的 K_d ,或者至少大约 10^{-8} M的 K_d ,或者至少大约 10^{-9} M的 K_d ,或者至少大约 10^{-10} M的 K_d ,或者至少大约 10^{-11} M的 K_d ,或者至少大约 10^{-12} M或更大的 K_d 。在一实施方案中,术语“特异性结合”指如下结合:在基本不与任何其他结构类似的半抗原或化合物结合的条件下,抗体与其特定半抗原结合。在此类实施方案中,非特异性结合的程度是例如通过荧光活化细胞分选(FACS)分析、酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫沉淀(RIA),以背景或低于背景的结合量,并将通常是低于大约10%,优选低于大约5%,并更优选低于大约1%。

[0066] 术语“交叉反应性”是指指定的(一级)抗原和次级抗原与所关注的纯化的抗体的相对结合,其中指定的或一级抗原用于产生关注的抗体。 C_{50} 次级是引起一级抗原和关注抗体之间的反应的50%抑制所需要的次级抗原的浓度。类似地, C_{50} 一级是引起一级抗原和抗体之间的反应的50%抑制(自我抑制)所需要的一级抗原的浓度。然后,变体抗原的相对平衡结合常数 C_{50} 一级/ C_{50} 次级测量交叉反应性(Benjamin和Perdue,Methods,1996,9(3):508-515)。换言之,相对于具体化合物X,针对化合物X产生的抗体的交叉反应百分比等于 $[(a/b) \times 100]$,其中a是置换50%的抗体结合的化合物Y需要的化合物X的量;b是置换50%的结合至抗体的化合物X需要的化合物Y的量。术语抗体的“交叉反应性”还可以指抗体与不同抗原上相似或不相似表位的相互作用。可以利用本领域技术人员已知的标准测定例如竞争性ELISA诸如直接竞争性ELISA或间接竞争性ELISA,测量“交叉反应性”。

[0067] 如文中所用,术语“分离的”或“纯化的”抗体指如下抗体,其实质上或基本上不含正常或天然伴随它的成分。通常利用分析化学技术例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱,测定纯度和同质性。其环境的污染物成分是将干扰抗体或其片段应用的物质,并可以包括酶、激素和其他蛋白质性或非蛋白质性的溶解物。在一些实施方案中,根据Lowry方法测定,分离的抗体被纯化至大于95%重量多肽,并优选地多于99%重量,或者在还原或非还原条件下,利用考马斯蓝或银染色通过SDS-page纯化至同质。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。在一些情况下,通过至少一步纯化步骤,制备分离的抗体。

[0068] 术语“杂交瘤细胞系”或“杂交瘤克隆”指用于产生单克隆抗体的杂交细胞系。在一些情况下,杂交瘤细胞是与骨髓瘤细胞融合的来自鼠脾脏的产生抗体的细胞,其中已将鼠注射特异性抗原。

[0069] 术语“半抗原”指当半抗原连接或缀合至载体分子例如载体蛋白,形成免疫原或免疫原性缀合物时,可引发动物体免疫应答的小分子。半抗原-载体蛋白复合物是免疫原性的(可引发免疫应答),并且半抗原单独(未结合的半抗原)不是免疫原性的。载体蛋白的非限制性示例包括牛血清白蛋白(BSA)、鼠血清白蛋白(MSA)、兔血清白蛋白(RSA)、卵白蛋白(OVA)、钉形贝血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)、牛或猪甲状腺球蛋白、破伤风类毒素、明胶或大豆胰蛋白酶抑制剂等。

[0070] 术语“免疫原”指刺激动物体内产生免疫应答的物质、化合物、肽或组合物。

[0071] 如文中所用,“连接体”或“间隔体”是将文中公开的半抗原与另一分子或部分结合(例如共价地)在一起的任何分子。连接体包括但不限于直链或支链碳连接体、杂环碳连接体、肽连接体、聚醚连接体和短的亲水分子。示例性连接体可包括但不限于 $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$ 和5-氨基-3-氧代戊酰基。例如,聚(乙二醇)连接体可从Quanta Biodesign, Powell, OH获得。所述连接体任选地具有酰胺链接(linkage)、巯基链接或杂官能链接。

[0072] 术语“标记”或“可检测标记”是通过波谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其他物理手段可检测的组合物。例如,可用的标记包括 ^{32}P 、荧光染料、高电子密度试剂、酶(例如,通常在ELISA中所用的)、生物素、洋地黄毒苷(digoxigenin)或肽和蛋白质,其可例如通过向肽中引入放射性标记可被检测。可检测标记可以是而限于荧光标记、发光标记、化学发光标记、生物发光标记、放射性标记或酶标记。

[0073] 术语“固体基质”或“固体支持物”指固体材料、膜、阵列、片、珠等。固体基质的表面可由与基质相同的材料构成。表面可以由多种材料例如聚合物、塑料、树脂、聚糖、硅石或基

于硅石的材料、碳、金属、无机玻璃、膜或上文所列基质材料中的任何材料构成。

[0074] 术语“免疫测定”指利用抗体、免疫球蛋白或其片段,检测或测量分析物(小分子、化学化合物、肽、多肽、生物分子、抗原、代谢产物等)的存在或浓度(水平或量)的测定。

[0075] 术语“受试者”、“患者”和“个体”可交换使用,并且除特别说明之外,指哺乳动物例如人和非人灵长类动物,以及兔、大鼠、小鼠、山羊、猪和其他哺乳动物种类。

[0076] 术语“样品”包括自个体获得的任何生物标本。所用的适当样品包括但不限于全血、血浆、血清、唾液、尿、粪便、眼泪、任何其他体液、组织样品(例如活组织检查)及其细胞提取物(例如红细胞提取物)。在优选实施方案中,样品是血清或血浆样品。样品例如血清、唾液和尿液用途是本领域众所周知的(参见,例如Hashida等人, *J. Clin. Lab. Anal.*, 11: 267-86 (1997))。本领域技术人员应该理解:完成文中公开的方法之前,可将样品例如血清样品稀释。

[0077] 如本文所用的“酰基”包括如本文定义的烷酰基、芳酰基、杂环酰基或杂芳酰基。代表性酰基包括乙酰基、苯甲酰基、烟酰基等。

[0078] 如本文所用的“烷酰基”包括烷基-C(O)-基团,其中烷基如本文定义。代表性烷酰基包含乙酰基、乙酰(ethanoyl)等。

[0079] 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个碳原子的直链或支链的脂族烃基团。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。

[0080] 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)可以替换为独立选自氟、羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、酰氨基、巯基(thio)和烷硫基的基团。

[0081] 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支链的双价烃链。优选的亚烯基在链中包括2个至约12个碳,并且更优选的亚烯基在链中包括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-CH=CH-、-CH₂-CH=CH-、-C(CH₃)=CH-、-CH₂CH=CHCH₂-、亚乙炔基、亚丙炔基、正-亚丁炔基等。

[0082] 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。

[0083] 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)可以替换为独立选自氟、羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、酰氨基、巯基和烷硫基的基团。

[0084] 如本文所用的“烷氧基烷基”包括烷基-O-亚烷基-,其中烷基和亚烷基如本文定义。代表性烷氧基烷基包括甲氧基乙基、乙氧基甲基、正丁氧基甲基和环戊基甲氧基乙基。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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“支链”包括连接至直链烷基链的一个或多个低级烷基如甲基、乙基或丙基。如本文所用的“低级烷基”在链中包括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支链的。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。

[0088] 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)可以替换为独立选自氟、羟基、烷氧基、氨基、烷基氨基、酰氨基、硫基和烷硫基的基团。

[0089] 如本文所用的“亚烷基”包括1个至约6个碳原子的直链或支链的二价烃链。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。

[0090] 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硫基、乙硫基、异丙硫基、庚硫基等。

[0091] 如本文所用的“烷硫基烷基”包括烷硫基-亚烷基-,其中在本文定义了烷硫基和亚烷基。代表性烷硫基烷基包括甲硫基甲基、乙硫基丙基、异丙硫基乙基等。

[0092] 如本文所用的“酰氨基”包括式 $Y_1Y_2N-C(O)-$ 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($H_2N-C(O)-$)、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 $-C(O)NRR'$ 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。

[0093] 如本文所用的“酰氨基烷基”包括酰氨基-亚烷基-,其中酰氨基和亚烷基如本文所定义。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。

[0094] 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,哌啶基)。任选地,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。代表性氨基包括伯氨基(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。

[0095] 如本文所用的“氨基烷基”包括氨基-亚烷基-基团,其中氨基和亚烷基如本文所定义。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。

[0096] 如本文所用的“芳酰基”包括芳基-CO-基团,其中芳基如本文所定义。代表性芳酰基包括苯甲酰基、萘-1-酰基和萘-2-酰基。

[0097] 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。

[0098] 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、咪唑、噻吩、咪唑、噻唑、三唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪、嘧啶、萘、苯并噻唑啉、苯并噻吩、苯并咪唑、吡啶、喹啉等。芳环基团可以在一个或多个位置被卤素、烷基、烷氧基、烷氧基羰基、卤代烷基、氰基、磺酸根合(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。

[0099] 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、抗生蛋白链菌素、碳水化合物、碳水化合物衍生物、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、抗生蛋白链菌素或生物素。

[0100] 如本文所用的“羧基”包括HOC(O)-基团(即,羧酸)或其盐。

[0101] 如本文所用的“羧烷基”包括HOC(O)-亚烷基-基团,其中亚烷基如本文所定义。代表性羧烷基包括羧甲基(即,HOC(O)CH₂-)和羧乙基(即,HOC(O)CH₂CH₂-)。

[0102] 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sp²-杂化的碳(例如,引入环内或环外烯烃的环)。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、降冰片基、金刚烷基等。

[0103] 如本文所用的“亚环烷基”包括具有约4个至约8个碳原子的二价环烷基。优选的环烯基包括1,2-、1,3-或1,4-顺-或反-环己烯。

[0104] 如本文所用的“卤代”或“卤素”包括氟、氯、溴或碘。

[0105] 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,杂原子具有至少两个至亚烷基碳原子的键(例如,-C₁-C₉亚烷基-O-C₁-C₉亚烷基-)。在一些实施方案中,杂原子进一步被酰基、烷基、芳基、环烷基、杂环基或杂芳基取代(例如,-N(Me)-;-N(Ac)-)。

[0106] 如本文所用的“羟基烷基”包括被一个或多个羟基取代的如本文定义的烷基。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。

[0107] “连接基团”即,L,包含使代谢产物衍生物与生物分子如载体蛋白、生物素或抗生蛋白链菌素连接的原子。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表示与蛋白质发生连接反应前的连接基团前体,并且R¹¹表示本发明化合物和蛋白质或生物素之间的得到的连接(attachment)(即,R¹¹是与生物分子连接的连接基之间的得到的连接)。优选的反应性官能团包括亚磷酰胺(phosphoramidite)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、羧酸或巯基。在某些情况下,显示末端氨基、羧酸或巯基并表示为-L-NH₂或-L-C(O)OH或-L-SH。

[0108] 如本文所用的“氧代”包括式>C=O基团(即,羰基-C(O)-)。

[0109] 如本文所用的“磺酸根合(sulfonato)”包括-SO₃⁻基团,优选地被阳离子如H⁺、Na⁺、K⁺等平衡。

[0110] 如本文所用的“磺酸根合烷基(Sulfonatoalkyl)”包括磺酸根合-亚烷基-,其中磺酸根合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。代表性磺酸根合烷基包括磺酸根合甲基、3-磺酸根合丙基、4-磺酸根合丁基、5-磺酸根合戊基、6-磺酸根合己基等。

[0111] I.实施方案详述

[0112] 在某些方面,本发明提供用于测量从受试者例如人受试者得到的样品中色氨酸、血清素和犬尿氨酸途径中代谢产物的水平、量或浓度的测定例如免疫测定。例如,参考图1,文中提供了用于测量或定量从疑似患有或患有肠易激综合征(IBS)的受试者得到的生物样品例如血液、血浆或血清中5-HIAA(5-羟基吲哚-3-乙酸) 115、褪黑激素和犬尿烯酸的量的组合物和方法。文中提供了抗体例如多克隆和单克隆抗体,其对特定色氨酸、血清素和犬尿氨酸途径的代谢产物是免疫反应的。如此,可使用所述组合物和方法,以助于IBS或者与色氨酸、血清素和犬尿氨酸途径相关的其他病理学情况例如类癌综合征、抑郁、高血压、孤独症、阿尔茨海默氏病和偏头痛的诊断或预后。

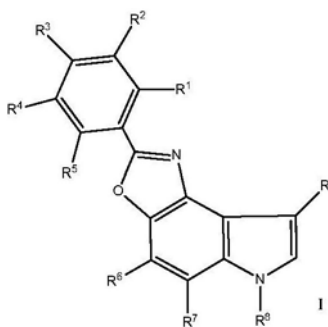
[0113] 检测或测量结构类似的代谢产物的现有技术方法不存在或缺少灵敏度、特异性和重现性。一般来讲,这些方法不能区别结构类似的化合物。对于一些方法,需要大约500 μ L的样品体积,以测量特定代谢产物的水平。并且,在一些情况下,进行方法前,样品必需进行处理例如提取、冷冻干燥和/或重构。

[0114] 本领域普通技术人员公认血清素和5-HIAA对氧敏感,且非常不稳定。在4 $^{\circ}$ C,从解冻大约7小时,所述化合物的降解发生。5-羟基吲哚不稳定的性质会产生不可靠的含量测定结果,即使当使用添加剂用于预防氧化破坏时。

[0115] A. 色氨酸和血清素途径代谢产物-5-HIAA半抗原

[0116] 在一个方面,本发明提供代谢产物衍生物和其缀合物、用于产生抗体的方法和血清素代谢产物的抗体。在某些方面,衍生化是优选的,因为代谢产物如5-HT和5-HIAA对氧敏感并且因此不稳定。血浆中血清素水平为从约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,本发明提供血清素代谢产物的稳定的苯并噁唑衍生物。可以通过HPLC以高灵敏度检测稳定的苯并噁唑衍生物,原因在于它们的荧光(图3D)。衍生化可以是缀合至生物分子例如载体蛋白,并与佐剂结合,以刺激免疫应答。衍生化还可以是缀合至其他生物分子包括肽。

[0117] 本发明提供血清素(5-HT)和5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)的稳定衍生物。在一个方面,本发明提供式I化合物:



[0118]

[0119] 其中R是选自烷基、烷氧基、烷氧基烷基、氨基烷基、酰氨基烷基、羧基烷基、取代的羧基烷基的成员;并且

[0120] 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、磺酸根合(sulfonato)、烷氧基烷基、羧基、羧基烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根合烷基(sulfonatoalkyl)、L和 R^{11} B的成员;

[0121] L是连接体;

[0122] R^{11} 是在化合物和生物分子之间的所得到的连接;并且

[0123] B是生物分子。

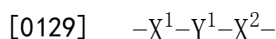
[0124] 在一个方面,R是选自氨基烷基、羧基烷基和取代的羧基烷基的成员。在另一个方面,R是选自 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ 的成员。

[0125] L表示用于连接至生物分子如载体蛋白或生物素的连接基团。在一些实施方案中,L包含聚乙二醇或PEG。例如,L可以包含与环共价连接的末端氨基、羧酸或巯基。在某些情况下,末端氨基、羧酸或巯基被显示并表示为 $-\text{L}-\text{NH}_2$ 或 $-\text{L}-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 或 $-\text{L}-\text{SH}$ 。

[0126] R^{11} 表示本发明化合物和生物分子如载体蛋白、肽或生物素之间的得到的连接(attachment)(即, R^{11} 包含与生物分子连接的连接基团)。

[0127] L是选自直接连接(link)或共价联接(linkage)的成员,其中共价联接是直链或支链的、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化合价,其中联接(linkage)含有以下的任何组合:醚、硫醚、胺、酯、氨基甲酸酯、脲、硫脲、氧基或酰胺键;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。在某些方面,L包含末端氨基、羧酸或巯基。

[0128] 在某些方面,L具有下式:



[0130] 其中: X^1 是选自二价基团、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间断的 C_1 - C_{10} 亚烷基的成员;并且 X^2 是选自二价基团、直接连接、氧、任选取代的氮和硫的成员。

[0131] 优选地, X^1 和 X^2 的二价基团各自独立地选自直接连接、任选取代的亚烷基、任选取代的亚烷基氧基羰基、任选取代的亚烷基氨甲酰基、任选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基羰基、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。

[0132] 在某些优选的方面,L是 $-(\text{CH}_2)_n-$,其中n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。

[0133] 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提高对于关注的代谢产物特异性的免疫原性反应。在某些情况下,苯并咪唑衍生物和连接臂(其中n是约1-20)可以用来附着载体蛋白至氨基(或巯基)末端。在一些实施方案中,连接臂是PEG。连接臂可包括PEG₁、PEG₂、PEG₃、PEG₄、PEG₅、PEG₆、PEG₇、PEG₈、PEG₉、PEG₁₀、PEG₁₁、PEG₁₂、PEG₁₃、PEG₁₄、PEG₁₅、PEG₁₆、PEG₁₇、PEG₁₈、PEG₁₉或PEG₂₀连接体。在一些实施方案中,5-HIAA衍生物半抗原是文中所述的。

[0134] 为了测试如此产生的抗体的亲和力和特异性,可以制备生物素化的半抗原。在一些情况下,苯并咪唑衍生物和连接臂(其中n是大约1-20)可用于将生物素分子附加至氨基(或巯基)末端。在一些实施方案中,连接臂是PEG。连接臂可包括PEG₁、PEG₂、PEG₃、PEG₄、PEG₅、PEG₆、PEG₇、PEG₈、PEG₉、PEG₁₀、PEG₁₁、PEG₁₂、PEG₁₃、PEG₁₄、PEG₁₅、PEG₁₆、PEG₁₇、PEG₁₈、PEG₁₉或PEG₂₀连接体。在一些实施方案中,将生物素分子替换为可用于将半抗原固定至固体基质或支持物的不同分子。

[0135] 在一些实施方案中,苯并咪唑衍生物是咪唑并-吡啶-PEG-生物素-酯或咪唑并-吡啶-PEG-生物素-酸。

[0136] 在一些方面,如图1中所示的血清素途径的化合物或式I化合物可以利用本领域众所周知的缀合化学,与载体分子反应。例如,活化酯(NHS酯)可以与伯胺反应,形成稳定的酰胺键。马来酰亚胺和硫醇可一起反应,并制备硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应,以分别制备烷基胺和硫醚。本文中可使用提供能够缀合至蛋白质的反应基团的任何衍生物。如本领域已知的,含有游离氨基基团、游离羧酸基团或游离巯基基团的部分(moieties)提供用于蛋白缀合的反应基团。例如,通过戊二醛交联或者通过碳二亚胺交联至蛋白质上能用的羧酸基团,可以将游离氨基基团缀合至蛋白质。并且,通过例如利用磺基琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-甲酸酯(Sulfo-SMCC)的蛋白质的马来酰亚胺活化,然后连接至巯基基团,可将含游离巯基基团的半抗原缀合至蛋白质。

[0137] 当将含有用于连接的羧酸基团的载体蛋白连接至含有胺的代谢产物时,可以首先使用活化试剂,将羧酸转化为反应性更强的形式,形成例如N-羧琥珀酰亚胺(NHS)酯或混合酐。将含胺代谢产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酯可以在代谢产物上并且胺可以在载体蛋白上。

[0138] 通过衍生化使代谢产物稳定的方法使得能够产生针对免疫原性缀合物的抗体。采用这些抗体时,可以使用免疫测定如ELISA,其中抗体对关注的代谢产物是高度特异性的。

[0139] 如图1中所示,血清素途径中的关注的代谢产物例如是血清素(5-HT) 101、5-羟基吲哚乙醛105和5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA) 115。在一个方面,本发明提供与5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA) 115特异性结合的分选或纯化的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体对选自图1的色氨酸122、5-羟基色氨酸125、血清素101、褪黑激素120、犬尿氨酸131、犬尿烯酸135、邻氨基苯甲酸140、3-羟基犬尿氨酸146、3-羟基邻氨基苯甲酸149、喹啉酸160和黄尿酸148的一种或多种代谢产物具有小于1%交叉反应性例如0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或0%交叉反应性。

[0140] 在一个方面,本发明提供针对代谢产物缀合物的分离的或纯化的抗体。首先,可以制备代谢产物或其稳定的衍生物。下一步,使载体蛋白如BSA与衍生物缀合。通过将缀合物注射至哺乳动物如兔、小鼠、绵羊、鸡、山羊等,制备抗代谢产物或其稳定衍生物的抗体。此后,生物素化的半抗原可以用来测试如此产生的抗体的反应性、结合活性、特异性和/或敏感性。

[0141] 在其他方面,本发明提供用于制备特异性地与血清素代谢产物结合的抗体例如多克隆抗体或单克隆抗体的方法。该方法包括:(a)提供免疫原,所述免疫原包含选自血清素(5-HT)、5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)和5-羟基色氨酸(5-HTP)的衍生物,所述衍生物各自与载体蛋白缀合;(b)在使得动物的免疫系统产生抗体的条件下用免疫原免疫动物;和(c)从动物中移出抗体。

[0142] 在一个方面,可以使用本发明的缀合物,从血清或细胞培养上清液中移出或分离根据文中提供的方法生成的抗体。例如,在一个方面,5-HIAA化合物、其缀合物或其衍生物可以用来从被免疫的动物例如被免疫的山羊、兔或小鼠的血清移出抗体。可以通过从血清、腹水、细胞培养上清液或培养基等中选择性富集或特异性分离关注的抗体,来将抗体纯化。例如,可将亲和方法如抗原特异性亲和方法或免疫球蛋白类特异性亲和方法,用于分离关注的抗体。可将生物素化的5-HIAA化合物用于从哺乳动物(例如兔、小鼠或山羊)移出其相应抗体。

[0143] 在一些方面,本发明提供分离的或纯化的单克隆抗体,其是对5-HIAA免疫反应的,并由2015年11月17日以ATCC登录号_在美国典型培养物保藏中心(ATCC[®])保藏并指定为1204-10G6F11H3的杂交瘤细胞系产生。所述抗体与其他结构类似的代谢产物或色氨酸、血清素和犬尿氨酸途径的化合物(包括图1的色氨酸122、5-羟色氨酸125、血清素101、褪黑激素120、犬尿氨酸131、犬尿烯酸135、邻氨基苯甲酸140、3-羟基犬尿氨酸146、3-羟基邻氨基苯甲酸149、喹啉酸160和黄尿酸148)基本无交叉反应性。

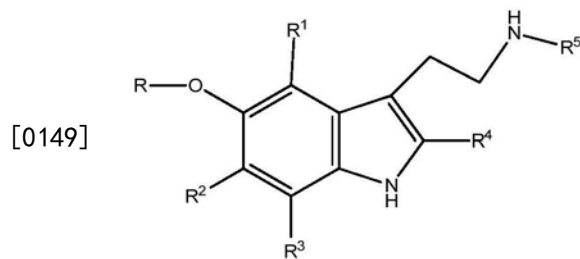
[0144] B. 色氨酸和血清素途径代谢产物-褪黑激素半抗原

[0145] 本文提供了稳定的褪黑激素半抗原、其变体或其衍生物,它们可以缀合至生物分子例如载体蛋白并与佐剂组合以刺激免疫应答。

[0146] 另一方面,本发明提供用于色氨酸途径的代谢产物的抗体产生的抗原。在某一情况下,肠易激综合征(IBS)中血清素功能的失调是由血清素代谢产物即褪黑激素120(图1)的代谢变化引起的。

[0147] 本发明提供抗体和制备褪黑激素(MT)的抗体的方法。

[0148] 一方面,本发明提供具有式II结构的褪黑激素衍生物:



[0150] R选自氢、烷基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、L和R¹¹B;

[0151] R¹、R²、R³、R⁴和R⁵各自是独立选自氢、烷基、卤素、羧基、羟基、烷氧基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、烷氧羰基、磺酸根合(sulfonato)、烷氧基烷基、羧基烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根合烷基、L和R¹¹B的成员;

[0152] L是连接体;

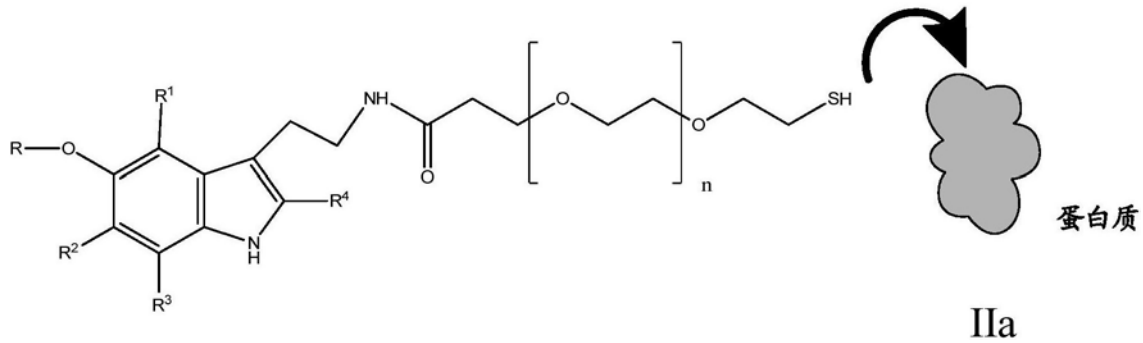
[0153] R¹¹是在化合物和生物分子之间的得到的连接;并且

[0154] B是生物分子。

[0155] 另一方面,利用本领域众所周知的缀合化学,可以将式II化合物与载体蛋白缀合,以制备抗体。活化酯(NHS酯)可以与伯胺反应,以形成稳定的酰胺键。马来酰亚胺和硫醇可一起反应,并制备硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应,以分别制备烷基胺和硫醚。可将提供能缀合至蛋白质的反应基团的任何衍生物用于本文中。如本领域已知的,含有游离氨基基团、游离羧酸基团或游离巯基基团的部分提供用于蛋白缀合的反应基团。例如,通过戊二醛交联或者通过碳二亚胺交联至蛋白质上能用的羧酸基团,可以将游离氨基基团缀合至蛋白质。并且,通过例如利用磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(Sulfo-SMCC)的蛋白质的马来酰亚胺活化,然后连接至巯基基团,可将含游离巯基基团的半抗原缀合至蛋白质。

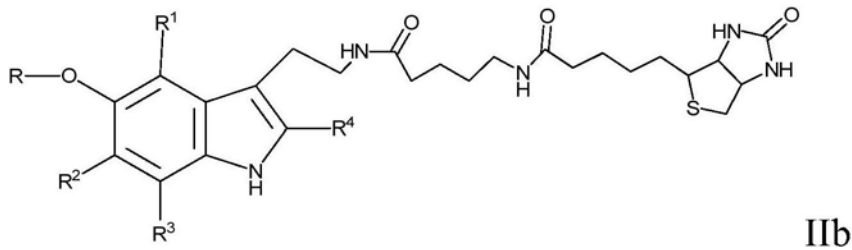
[0156] 一种缀合的示例性示意图如下,其中n是0-20的整数(1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20):

[0157]



[0158] 可以使用本发明的缀合物从血清移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IIb的结构:

[0159]



[0160] 本发明还提供稳定的衍生物褪黑激素和用于产生抗体的方法。该方法包括:

- [0161] (a) 提供包含褪黑激素 (MT) 衍生物的免疫原;
- [0162] (b) 在使得动物的免疫系统产生抗体的条件下用免疫原免疫动物;和
- [0163] (c) 从动物移出抗体。

[0164] 在另一个方面,本发明提供与褪黑激素 (MT) 特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其对选自色氨酸 (Trp)、血清素 (5-HT)、5-羟色氨酸 (5-HTP)、5-羟基吲哚-3-乙酸 (5-HIAA)、犬尿氨酸 (KYN)、犬尿烯酸 (KYNA)、3-羟基犬尿氨酸 (3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸 (3-HAA)、喹啉酸 (QUIN)、邻氨基苯甲酸 (ANA)、血清素-O-硫酸酯和血清素-O-磷酸酯的一种或多种成员具有小于1%的交叉反应性。

[0165] 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褪黑激素的方法。该方法包括将样品与本文所述的抗体合并,随后确定抗体是否与样品中的褪黑激素特异性结合。例如,在这些方法中,与来自样品的褪黑激素的特异性抗体结合表示样品中存在褪黑激素。

[0166] 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例如竞争性ELISA)或CEER中使用,所述免疫测定可以使用用于检测代谢产物水平和浓度的酶标记。

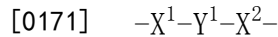
[0167] L表示用于连接至生物分子如载体蛋白或生物素的连接基团。在一些实施方案中,L包含聚乙二醇或PEG。例如,L可以包含与环共价连接的末端氨基、羧酸或巯基。在某些情况下,末端氨基、羧酸或巯基被显示并表示为-L-NH₂或-L-C(O)OH或-L-SH。

[0168] R¹¹表示本发明化合物和生物分子如载体蛋白、肽或生物素之间的得到的连接(即,R¹¹包含与生物分子连接的连接基团)。

[0169] L是选自直接连接或共价联接的成员,其中共价联接是直链或支链的、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化合价,其中联接含有以下的任何组合:醚、硫醚、胺、酯、氨基甲酸酯、脲、硫脲、氧基

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。在某些方面，L包含末端氨基、羧酸或巯基。

[0170] 在某些方面，L具有下式：



[0172] 其中： X^1 是选自二价基团、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间断的 C_1-C_{10} 亚烷基的成员；并且 X^2 是选自二价基团、直接连接、氧、任选取代的氮和硫的成员。

[0173] 优选地， X^1 和 X^2 的二价基团各自独立地选自直接连接、任选取代的亚烷基、任选取代的亚烷基氧基羰基、任选取代的亚烷基氨甲酰基、任选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基羰基、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。

[0174] 在某些优选的方面，L是 $-(CH_2)_n-$ ，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。

[0175] 在一些情况下，褪黑激素半抗原、其变体或其衍生物和连接臂L（其中n是大约1-20）可用于将载体蛋白附加至氨基（或巯基）末端。在一些实施方案中，连接臂是PEG。连接臂可包括PEG₁、PEG₂、PEG₃、PEG₄、PEG₅、PEG₆、PEG₇、PEG₈、PEG₉、PEG₁₀、PEG₁₁、PEG₁₂、PEG₁₃、PEG₁₄、PEG₁₅、PEG₁₆、PEG₁₇、PEG₁₈、PEG₁₉或PEG₂₀连接体。在一实施方案中，将稳定的褪黑激素半抗原缀合或连接至载体蛋白例如BSA、RSA、MSA、KLH、OVA等，以产生免疫原。在一些实施方案中，褪黑激素半抗原是文中所述的。半抗原还可以缀合至其他生物分子。例如，为了测试如此产生的抗体的亲和力和特异性，可以将半抗原缀合或连接至生物素，以产生生物素化的半抗原例如生物素化的褪黑激素。

[0176] 另一方面，利用本领域众所周知的缀合化学，可以将褪黑激素化合物、其变体或其衍生物与载体蛋白缀合，以制备抗体。例如，活化酯（NHS酯）可以与伯胺反应，以形成稳定的酰胺键。马来酰亚胺和硫醇可一起反应，并制备硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应，以分别制备烷基胺和硫醚。可将提供能缀合至蛋白质的反应基团的任何衍生物用于本文中。如本领域已知的，含有游离氨基基团、游离羧酸基团或游离巯基基团的部分提供用于蛋白缀合的反应基团。例如，通过戊二醛交联或者通过碳二亚胺交联至蛋白质上能用的羧酸基团，可以将游离氨基基团缀合至蛋白质。并且，通过例如利用磺基琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-甲酸酯（Sulfo-SMCC）的蛋白质的马来酰亚胺活化，然后连接至巯基基团，可将含游离巯基基团的半抗原缀合至蛋白质。

[0177] 当将含有用于连接的羧酸基团的载体蛋白连接至含有胺的代谢产物时，可以首先使用活化试剂，将羧酸转化为反应性更强的形式，形成例如N-羟琥珀酰亚胺（NHS）酯或混合酐。含胺代谢产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酯可以在代谢产物上并且胺可以在载体蛋白上。

[0178] 本公开书还提供用于产生特异性地与血清素代谢产物褪黑激素结合的抗体（例如抗体、其抗体片段，及其抗原结合片段）的方法。该方法包括：(a) 提供免疫原，所述免疫原包含缀合至载体蛋白的褪黑激素半抗原；(b) 在使得动物的免疫系统产生抗体的条件下用免疫原免疫动物；和(c) 从动物移出特异性地与褪黑激素结合的抗体。动物可以是绵羊、山羊、兔、大鼠、小鼠等。在一些实施方案中，抗体是单克隆抗体。在其他实施方案中，抗体是多克

隆抗体。褪黑激素半抗原可化学合成或者通过本领域技术人员已知的任何方法生产。

[0179] 在一实施方案中,通过文中公开的方法产生的、与褪黑激素特异性结合的分离或纯化的抗体或其抗原结合片段,对色氨酸、血清素和犬尿氨酸途径中的结构类似化合物具有小于1%交叉反应性例如0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或0%交叉反应性。在一些情况下,抗-褪黑激素抗体或其片段与结构上类似于褪黑激素的色氨酸、血清素和犬尿氨酸途径的代谢产物或化合物基本无交叉反应性,所述代谢产物或化合物包括图1的色氨酸122、5-羟基色氨酸125、血清素101、5-羟基吲哚乙酸115、犬尿氨酸131、犬尿烯酸135、邻氨基苯甲酸140、3-羟基犬尿氨酸146、3-羟基邻氨基苯甲酸149、喹啉酸160和黄尿酸148。文中提供了与褪黑激素特异性免疫反应的多克隆抗体和单克隆抗体。

[0180] 在一个方面,可以使用本发明的缀合物从血清移出或分离从哺乳动物生成的抗体或其抗原结合片段。在一些情况下,可将生物素化的褪黑激素或缀合至另一生物分子或化合物的褪黑激素用于从哺乳动物移出抗-褪黑激素抗体。纯化方法的详细描述在下文公开。

[0181] 在一些方面,本发明提供分离的或纯化的单克隆抗体,其是与褪黑激素免疫反应的,并由2015年11月17日以ATCC登录号_在美国典型培养物保藏中心(ATCC[®])保藏并指定为1212-6C1E2F7的杂交瘤细胞系产生。

[0182] C. 犬尿氨酸途径代谢产物-犬尿烯酸半抗原

[0183] 犬尿氨酸途径代谢产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血清素并且超过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患者中均显著升高。通常,IBS患者显示犬尿烯酸(KYNA)浓度降低和邻氨基苯甲酸(ANA)和3-羟基邻氨基苯甲酸增加。色氨酸沿犬尿氨酸途径的代谢在患IBS-D的患者中被抑制。本发明提供确定色氨酸和犬尿氨酸途径代谢产物的水平的免疫测定,所述水平对确定IBS患者状态具有诊断价值。

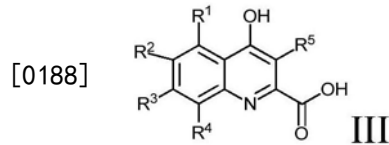
[0184] 本文提供了稳定的犬尿烯酸(KYNA)、3-羟基犬尿氨酸(3-HK)、3-羟基邻氨基苯甲酸(3-HAA)、喹啉酸和邻氨基苯甲酸半抗原,它们可以缀合至生物分子例如载体蛋白并与佐剂组合,以刺激免疫应答。半抗原还可以缀合至其他生物分子。在一实施方案中,缀合至或连接至载体蛋白的稳定的犬尿烯酸(KYNA)半抗原产生免疫原。在一些情况下,KYNA半抗原是文中所述的。

[0185] 本公开书还提供用于产生抗体的方法,该抗体特异性地与指定的犬尿氨酸途径代谢产物例如犬尿烯酸(KYNA)、其变体或其衍生物结合。该方法包括:(a)提供免疫原,所述免疫原包含与载体蛋白缀合的选自犬尿氨酸(K)、犬尿烯酸(KYNA)、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、其变体或其衍生物的半抗原,所述衍生物各自;(b)在使得动物的免疫系统产生抗体的条件下用免疫原免疫动物;和(c)从动物移出抗体。动物可以是绵羊、山羊、兔、大鼠、小鼠等。在一些实施方案中,抗体是单克隆抗体。在其他实施方案中,抗体是多克隆抗体。

[0186] 在一实施方案中,通过文中公开的方法产生的、与KYNA特异性结合的分离或纯化的抗体,对色氨酸、血清素和犬尿氨酸途径中的结构类似化合物具有小于1%交叉反应性例如0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或0%交叉反应性。在一些情况下,抗-KYNA抗体与结构上类似于KYNA的色氨酸、血清素和犬尿氨酸途径的代谢产物或化合物基本无交叉反应性,所述代谢产物或化合物包括图1的色氨酸122、5-羟基色氨酸

125、血清素101、褪黑激素120、5-羟基吲哚乙酸115、犬尿氨酸131、邻氨基苯甲酸140、3-羟基犬尿氨酸146、3-羟基邻氨基苯甲酸149、喹啉酸160和黄尿酸148。

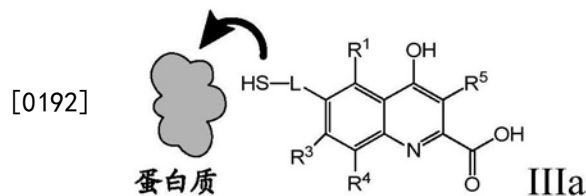
[0187] 还在另一方面,本发明提供式III化合物:



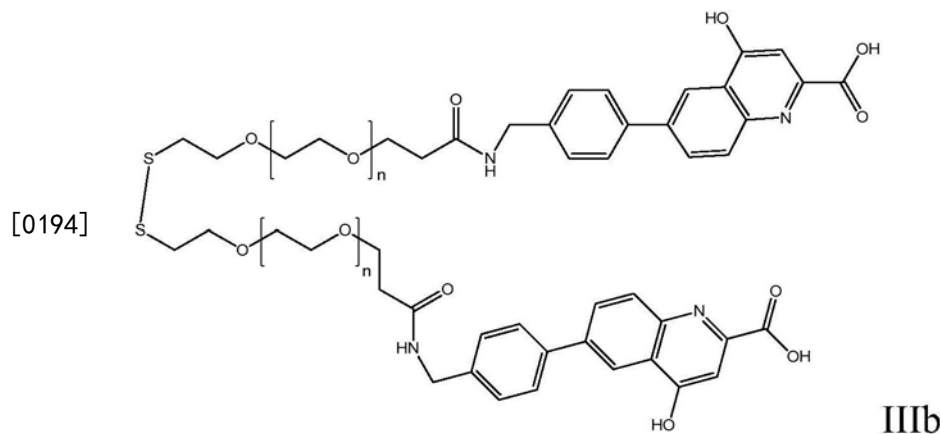
[0189] 其中, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 各自是独立选自氢、烷基、卤素、羟基、烷氧基、氨基、芳酰基、烷酰基、酰氨基、取代的酰氨基、氰基、羧基、烷氧羰基、磺酸根合(sulfonato)、烷氧基烷基、羧基、羧基烷基、烷氧羰基烷基、磺酸根合烷基(sulfonatoalkyl)、L和 R^{11} B;L是连接体; R^{11} 是在化合物和生物分子之间的得到的连接;并且B是生物分子。式III化合物可用于制备抗犬尿烯酸135的特异性抗体。

[0190] 另一方面,利用本领域众所周知的缀合化学,可以将式III化合物与载体蛋白缀合,以制备抗体。例如,活化酯(NHS酯)可以与伯胺反应,以形成稳定的酰胺键。马来酰亚胺和硫醇可一起反应,并制备硫醚。烷基卤化物与胺和硫醇反应,以分别制备烷基胺和硫醚。可将提供能缀合至蛋白质的反应基团的任何衍生物用于本文中。如本领域已知的,含有游离氨基基团、游离羧酸基团或游离巯基基团的部分提供用于蛋白缀合的反应基团。例如,通过戊二醛交联或者通过碳二亚胺交联至蛋白质上能用的羧酸基团,可以将游离氨基基团缀合至蛋白质。并且,通过例如利用磺基琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-甲酸酯(Sulfo-SMCC)的蛋白质的马来酰亚胺活化,然后连接至巯基基团,可将含游离巯基基团的半抗原缀合至蛋白质。

[0191] 一示例性缀合流程图如下,其中L包含末端SH:



[0193] 可缀合至载体蛋白的犬尿烯酸半抗原的示例性实施方案。得到的免疫原可用于产生抗犬尿烯酸单克隆或多克隆抗体。在一些实施方案中,利用包括下面化学结构的犬尿烯酸免疫原产生文中所述的单克隆抗体。在其他实施方案中,从包含下面化学结构的犬尿烯酸免疫原产生文中所述的多克隆抗体。



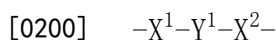
[0195] 连接臂L(其中n是大约1-20)可用于通过硫缀合附加至载体蛋白。

[0196] L表示用于与生物分子如载体蛋白或生物素连接的连接基团。在一些实施方案中, L包含聚乙二醇或PEG。例如, L可以包含与环共价连接的末端氨基、羧酸或巯基。在某些情况下, 末端氨基、羧酸或巯基被显示并表示为-L-NH₂或-L-C(O)OH或-L-SH。

[0197] R¹表示本发明化合物和生物分子如载体蛋白、肽或生物素之间的得到的连接(即, R¹包含与生物分子连接的连接基团)。

[0198] L是选自直接连接或共价联接的成员, 其中共价联接是直链或支链的、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化合价, 其中联接含有以下的任何组合: 醚、硫醚、胺、酯、氨基甲酸酯、脲、硫脲、氧基或酰胺键; 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。在某些方面, L包含末端氨基、羧酸或巯基。

[0199] 在某些方面, L具有下式:

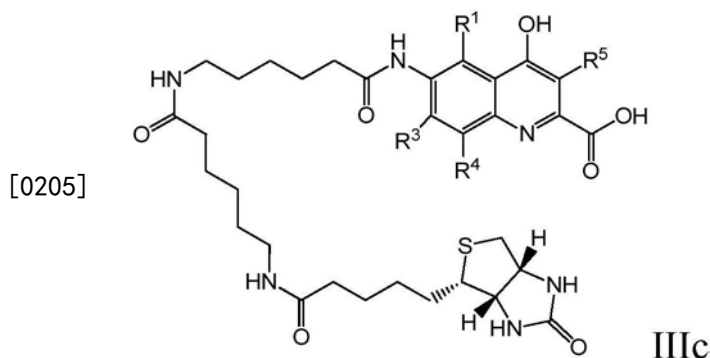


[0201] 其中: X¹是选自二价基团、直接连接、氧、任选取代的氮和硫的成员; Y¹是选自直接连接和任选地被杂原子间断的C₁-C₁₀亚烷基的成员; 并且X²是选自二价基团、直接连接、氧、任选取代的氮和硫的成员。

[0202] 优选地, X¹和X²的二价基团各自独立地选自直接连接、任选取代的亚烷基、任选取代的亚烷基氧基羰基、任选取代的亚烷基氨甲酰基、任选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基羰基、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。

[0203] 在某些优选的方面, L是-(CH₂)_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。

[0204] 可以使用本发明的缀合物从血清移出从哺乳动物生成的抗体。例如, 在一个方面, 式IIIc的化合物, 具有式III的结构:



[0206] 其中R¹、R³、R⁴和R⁵各自是氢。

[0207] 本文提供了稳定的KYNA半抗原、其变体或其衍生物, 它们可以缀合至生物分子例如载体蛋白并与佐剂组合, 以刺激免疫应答。在一些情况下, KYNA半抗原、其变体或其衍生物和连接臂L(其中n是大约1-20)可用于将载体蛋白附加至氨基(或巯基)末端。在一些实施方案中, 连接臂是PEG。连接臂可包括PEG₁、PEG₂、PEG₃、PEG₄、PEG₅、PEG₆、PEG₇、PEG₈、PEG₉、PEG₁₀、PEG₁₁、PEG₁₂、PEG₁₃、PEG₁₄、PEG₁₅、PEG₁₆、PEG₁₇、PEG₁₈、PEG₁₉或PEG₂₀连接体。在一实施方案中, 稳定的KYNA半抗原缀合或连接至载体蛋白例如BSA、RSA、MSA、KLH、OVA等, 产生免疫

原。半抗原还可以缀合至其他生物分子。例如,为了测试如此产生的抗体的亲和力和特异性,可以将半抗原缀合或连接至生物素,以产生生物素化的半抗原例如生物素化的KYNA。

[0208] 在又一个方面,本发明提供与犬尿烯酸特异性结合的分离或纯化的抗体或其抗原结合片段,并且其中抗体对选自图1的色氨酸122、5-羟色氨酸125、血清素101、5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA) 115、犬尿氨酸131、邻氨基苯甲酸140、3-羟基犬尿氨酸146、3-羟基邻氨基苯甲酸149、喹啉酸160、黄尿酸148和褪黑激素120的一种或多种成员具有小于1%的交叉反应性。

[0209] 在一些方面,本发明提供分离的或纯化的单克隆抗体,其是与KYNA免疫反应的,并由2015年11月17日以ATCC登录号_在美国典型培养物保藏中心(ATCC[®])保藏并指定为1194-6H5B11A7的杂交瘤细胞系产生。所述抗体与色氨酸、血清素和犬尿氨酸途径的其他结构类似的代谢产物或化合物基本无交叉反应性。

[0210] D. 利用免疫测定检测生物样品中的代谢产物

[0211] 在某些其他方面,本公开书提供用于检测、测量或定量来自受试者(如人受试者)的生物样品中褪黑激素水平的测定方法和试剂盒。在一些实施方案中,与正常受试者相比,所述人受试者患与较高或较低水平的褪黑激素、5-HIAA和/或犬尿烯酸相关的病症。在一些情况下,病症是肠易激综合征,其包括下述亚型中的任何一种:具有便秘的IBS (IBS-C)、具有腹泻的IBS (IBS-D)、混合的IBS (IBS-M)以及未分型的IBS (IBS-U)。方法可包括利用抗5-HIAA、生物素化的5-HIAA的抗体、抗犬尿烯酸、生物素化的犬尿烯酸的抗体、抗褪黑激素、生物素化的褪黑激素的抗体及其任何组合。

[0212] 在某些其他方面,本发明提供用于测定、测量或检测来自哺乳动物(如人)的生物样品例如流体样品或组织样品中的血清素代谢产物的存在或水平的方法。在一些实施方案中,血清素代谢产物是5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)。在一些情况下,所述方法包括测量或定量从人受试者获得的生物样品中5-HIAA的量或浓度。所述方法可包括在形成抗体和5-HIAA(如果样品中存在)的复合物的条件下,将样品与特异性地与5-HIAA结合的抗体合并。抗体可以是文中所述的抗-5HIAA抗体中的任何一种。在一些实施方案中,样品和抗-5HIAA抗体还与固定化的5-HIAA衍生物合并。固定化的5-HIAA衍生物可以是文中所述的生物素化的5-HIAA,其已经连接或结合至抗生蛋白链菌素包被的固体基质例如抗生蛋白链菌素-包被的多孔板。在一些实施方案中,样品、抗-5HIAA抗体和固定化的5-HIAA衍生物同时接触或添加在一起。在一些情况下,样品和抗-5-HIAA抗体一起孵育一段预选时间,然后和固定化的5-HIAA或生物素化的5-HIAA一起孵育。在其他情况下,将固定化的或生物素化的5-HIAA衍生物与抗-5-HIAA抗体一起孵育一段预选时间,然后与样品一起孵育。还在其他情况下,样品、抗-5HIAA抗体和固定化的5HIAA以任何顺序依次接触在一起。可通过测量结合至固定化5-HIAA衍生物的抗-5-HIAA抗体水平,并计算样品中相应的5-HIAA水平,测定样品中5-HIAA的水平。换言之,可以直接测量与固定化5-HIAA衍生物复合的抗-5HIAA抗体水平,且间接定量样品中5-HIAA的水平。在一些情况下,与结合至固定化5-HIAA衍生物的抗-5-HIAA抗体水平相比,样品中存在反比例的5-HIAA。

[0213] 另一方面,本发明提供用于测定来自哺乳动物(如人受试者)的生物样品例如流体样品或组织样品中的血清素代谢产物例如褪黑激素的存在或水平的方法。在一些实施方案中,该方法包括在形成抗体和褪黑激素(如果样品中存在)复合物的条件下,将从受试者获

得的样品与特异性地与褪黑激素结合的抗体合并。抗体可以是文中公开的任何抗-褪黑激素抗体。在一些实施方案中,样品和抗-褪黑激素抗体还与固定化的褪黑激素合并。固定化的褪黑激素可以是文中所述的生物素化的褪黑激素,其已经连接或结合至抗生蛋白链菌素包被的固体基质例如抗生蛋白链菌素-包被的多孔板。在一些实施方案中,样品、抗-抗体和固定化的褪黑激素同时接触或添加在一起。在一些情况下,样品和抗-褪黑激素抗体一起孵育一段预选时间,然后和固定化的褪黑激素或生物素化的褪黑激素一起孵育。在其他情况下,将固定化的褪黑激素或生物素化的褪黑激素与抗-褪黑激素抗体一起孵育一段预选时间,然后与样品一起孵育。还在其他情况下,样品、抗-褪黑激素抗体和固定化的褪黑激素以任何顺序依次接触在一起。可通过测量结合至固定化褪黑激素的抗-褪黑激素抗体水平,并计算样品中相应的褪黑激素水平,测定样品中褪黑激素的水平。例如,可以直接测量与固定化褪黑激素复合的抗-褪黑激素抗体水平,且间接定量样品中的褪黑激素水平。在一些情况下,与结合至固定化褪黑激素的抗-褪黑激素抗体水平相比,样品中存在反比例的褪黑激素。

[0214] 在其它方面,本发明提供用于测定来自哺乳动物(如人受试者)的生物样品例如流体样品或组织样品中的犬尿氨酸代谢产物例如犬尿烯酸(KYNA)的存在或水平的方法。在一些实施方案中,所述方法包括在形成抗体和褪黑激素(如果样品中存在)复合物的条件下,将从受试者获得的样品与特异性地与KYNA结合的抗体合并。抗体可以是文中公开的任何抗KYNA抗体。在一些实施方案中,样品和抗-KYNA抗体还与固定化的KYNA合并。固定化的KYNA可以是文中所述的生物素化的KYNA,其已经连接或结合至抗生蛋白链菌素包被的固体基质例如抗生蛋白链菌素-包被的多孔板。在一些实施方案中,样品、抗体和固定化的KYNA同时接触或添加在一起。在一些情况下,样品和抗-KYNA抗体一起孵育一段预选时间,然后和固定化的KYNA或生物素化的KYNA一起孵育。在其他情况下,将固定化的或生物素化的KYNA与抗-KYNA抗体一起孵育一段预选时间,然后与样品一起孵育。还在其他情况下,样品、抗-KYNA抗体和固定化的KYNA以任何顺序依次接触在一起。可通过测量结合至固定化的KYNA的抗-KYNA抗体水平,并计算样品中相应的KYNA水平,测定样品中的KYNA水平。在一些实施方案中,可以直接测量与固定化KYNA复合的抗-KYNA抗体水平,且间接定量样品中的KYNA水平。在一些情况下,与结合至固定化KYNA的抗-KYNA抗体水平相比,样品中存在反比例的KYNA。

[0215] 在一些实施方案中,样品是全血样品、血浆样品或血清样品。可以从受试者例如人受试者分离或获得所述样品。在一些情况下,已诊断受试者患IBS。在其他情况下,受试者未被诊断患IBS。在一些情况下,受试者疑似患IBS。在其他情况下,受试者正在经受或者显示IBS的一种或多种症状。在一些实施方案中,用于测定方法的样品是稀释的样品。样品可以是未处理的样品。在一些情况下,用于本方法的样品体积是少于大约100 μ L,例如大约99 μ L、90 μ L、85 μ L、80 μ L、75 μ L、70 μ L、65 μ L、60 μ L、55 μ L、50 μ L、45 μ L、40 μ L、35 μ L、30 μ L、25 μ L、20 μ L、15 μ L、10 μ L、5 μ L或更少。样品体积可以是少于大约50 μ L,例如大约50 μ L、45 μ L、40 μ L、35 μ L、30 μ L、25 μ L、20 μ L、15 μ L、10 μ L、5 μ L或更少。

[0216] 在一些实施方案中,测定方法需要少于24小时来完成,例如需要23hrs、22hrs、21hrs、20hrs、19hrs、18hrs、17hrs、16hrs、15hrs、14hrs、13hrs、12hrs、11hrs、10hrs、9hrs、8hrs、7hrs、6hrs、5hrs、4hrs、3hrs、2hrs、1hr、30分钟或更少时间完成。

[0217] 在一些方面,利用免疫测定,完成结合的抗-代谢产物抗体水平或代谢产物水平的测量步骤。免疫测定提供检测生物液体中代谢产物的可靠的且灵活的方法。本发明提供高特异性和灵敏度的可信的免疫测定,其用于检测和定量一种或多种色氨酸、血清素、犬尿氨酸代谢产物。在一些实施方案中,免疫测定是酶联免疫吸附测定(ELISA)例如竞争性ELISA或接近免疫测定例如CEER™。

[0218] 在一些实施方案中,文中所述的抗体可缀合至任何可检测标记或部分,该标记或部分可用于测量形成的抗原-抗体复合物。在一些情况下,抗体直接缀合至可读信号例如生色团、胶体金、有色乳胶、荧光团等。在其他情况下,抗体缀合至酶、肽或其他生物分子。

[0219] 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。在一个ELISA实施方案中,从受试者获得的样品中存在的抗原或代谢产物如5-HIAA、褪黑激素或KYNA允许与对待测试代谢产物特异性的酶标记的例如过氧化物酶标记的抗体反应,形成抗原-抗体复合物。随后如此形成的抗原-抗体复合物允许与检测底物反应,从而测量酶例如过氧化物酶或磷酸酶的活性。在一些实施方案中,代谢产物特异性抗体不是酶标记的,而使用识别代谢产物特异性抗体的酶标记的第二抗体。可将检测底物用于与第二抗体的酶标记反应,以便测量酶的活性。酶标记抗体可以是碱性磷酸酶-、 β -半乳糖苷酶-或HRP-标记的抗体。

[0220] 可使用本领域技术人员公认的任何检测底物。例如,对于化学发光法,底物可以是鲁米诺、Supersignal[®] ELISA Pico化学发光底物(Thermo Fisher)和DynaLight™化学发光底物(Thermo Fisher)。对于比色反应,可以使用底物例如4-氯-1-萘酚、p-硝基苯基磷酸酯(PNPP)、OPD、ONPG或TMB。对于荧光反应,可以使用底物例如4-甲基umbelliferyl磷酸酯二钠盐(MUP)、QuantaBlu™荧光底物(Thermo Fisher)和Amplex[®] Red试剂(Thermo Fisher)。因此,利用例如分光计或其他检测设备,可以测量代谢产物的存在、浓度和或水平。

[0221] 在另一ELISA实施方案中,可将代谢产物或其衍生物固定。本发明的抗体可以用来与固定化的代谢产物结合,形成抗原-抗体复合物。含有代谢产物的样品可以用于就抗体-抗原结合而言竞争。此后,缀合物可以由具有酶标记的另一种抗体(第二抗体)检测。酶标记随后与检测试剂或底物反应然后被监测。在其他情况下,本发明的抗体缀合至可检测部分或标记,并可以在不利用第二抗体的条件下,反应和/或被检测。

[0222] 检测本文所述的任何代谢产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,测定在固相或固体支持物上进行,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™。

[0223] 本领域中已知的可用于半抗原检测的任何ELISA可以用于即时测定。半抗原的ELISA通常利用竞争性样式,即,其中样品中的半抗原(代谢产物)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,样品中增加量的半抗原导致更少的酶与固相结合,并且因此导致更少的可检测信号。在这类竞争性测定中,样品可以与经标记的半抗原一起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,从而仅经标记的半抗原简单结合而样品半抗原不结合。在一些实施方案中,ELISA是直接竞争性ELISA或间接竞争性ELISA。

[0224] 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,间接结合是其中国相用抗-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,其测量与固相结合的经标记的半抗原的量。

[0225] 文中提供了完成上文所述测定方法的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含特异性地与5-HIAA结合的抗体,例如抗-5HIAA单克隆抗体或多克隆抗体和任选生物素化的5-HIAA衍生物。抗5-HIAA单克隆抗体可以由杂交瘤克隆产生,所述杂交瘤克隆具有2015年11月17日保藏的ATCC登录号_并指定为1204-10G6F11H3。

[0226] 在其他实施方案中,试剂盒包含特异性地与褪黑激素结合的抗体,例如抗-褪黑激素单克隆抗体或多克隆抗体和任选生物素化的褪黑激素。单克隆抗体可以由杂交瘤克隆产生,所述杂交瘤克隆具有2015年11月17日保藏的ATCC登录号_并指定为1212-6C1E2F7。

[0227] 还在其他实施方案中,试剂盒包含特异性地与犬尿烯酸结合的抗体,例如抗-犬尿烯酸单克隆抗体或多克隆抗体和任选生物素化的犬尿烯酸。单克隆抗体可以由杂交瘤克隆产生,所述杂交瘤克隆具有2015年11月17日保藏的ATCC登录号_并指定为1194-6H5B11A7。

[0228] 在一些情况下,试剂盒还包括完成文中所讨论测定方法的操作说明书。试剂盒可包括标准对照代谢产物例如5-HIAA标准对照、褪黑激素标准对照或犬尿烯酸标准对照。在一些实施方案中,标准对照代谢产物包含预选或已知浓度的关注的代谢产物。

[0229] E. 多克隆抗体

[0230] 文中提供的多克隆抗体可以是任何同种型例如主要抗体同种型IgA、IgD、IgE、IgG和IgM中的一种。在一些实施方案中,抗体可以分类为IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁或IgA₂抗体。在一些情况下,抗体具有κ轻链或λ轻链。

[0231] 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。使用双官能或衍生化剂,使关注的抗原与载体蛋白缀合可能是有用的,所述载体蛋白在待免疫的物种中是免疫原性的。双官能或衍生化剂的非限制性例子包括马来酰亚氨基苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(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、SOCl₂和R¹N=C=NR,其中R和R¹是不同的烷基。

[0232] 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100μg(对于兔)或5μg(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的约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。产生多克隆抗体的方法的详细描述可见于Antibody, A Laboratory Manual, Harlow和Lane编, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988)。

[0233] F. 单克隆抗体

[0234] 文中提供的单克隆抗体可以是任何同种型例如主要抗体同种型IgA、IgD、IgE、IgG和IgM中的一种。在一些实施方案中,抗体可以分类为IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁或IgA₂抗体。在一些情况下,抗体具有κ轻链或λ轻链。在一些实施方案中,抗5-HIAA单克隆抗体或具有2015年11月17日保藏的ATCC登录号_并指定为1204-10G6F11H3的杂交瘤克隆产生的单克隆抗体是IgG1κ抗体。在其他实施方案中,抗褪黑激素单克隆抗体或具有2015年11月17日保藏的ATCC登录号_并指定为1212-6C1E2F7的杂交瘤克隆产生的单克隆抗体是IgG₃κ抗体。还在其他实施方案中,抗KYNA单克隆抗体或具有2015年11月12日保藏的ATCC登录号_并指定为1194-6H5B11A7的杂交瘤克隆产生的单克隆抗体是IgG1κ抗体。

[0235] 单克隆抗体通常从基本上均质的抗体群体中获得,即,该群体含有的个体抗体是相同的,除了可能以微小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(discrete)抗体的混合物。例如,单克隆抗体可以使用由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)。

[0236] 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关注多肽特异性结合。可选地,在体外免疫淋巴细胞。随后使用合适的融合剂(fusing agent)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)。

[0237] 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,如来自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))。

[0238] 可以测定其中杂交瘤细胞正在生长的培养基的针对关注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(Scatchard)分析确定单克隆抗体的结合亲和力。

[0239] 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。

[0240] 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(simian)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。

[0241] 在又一个实施方案,单克隆抗体或其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应用。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。

[0242] G. 抗体片段

[0243] 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W0 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。

[0244] H. 双特异性抗体

[0245] 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的关注多肽的两个不同表位结合。其他双特异性抗体可以将关注多肽的结合位点与一种或多种另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其抗体片段(例如, F(ab')₂双特异性抗体)。

[0246] 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,其中两个链具有不同特异性(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W0 93/0882和Traunecker等人,EMBO J.,10:3655-3659(1991)中公开了相似的方法。

[0247] 根据不同方法,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)与免疫球蛋白恒定域序列融合。融合物优选地具有免疫球蛋白重链恒定结域,包括较链区、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条多肽片段的相互比例方面提供大的灵活性。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。

[0248] 在这种方法的优选实施方案中,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。这种非对称结构有利于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W0 94/04690和Suresh等人,Meth.Enzymol.,121:210(1986)。

[0249] 根据美国专利号5,731,168中描述的另一个方法,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互补性“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。

[0250] 双特异性抗体包括交联的或“杂缀合物”抗体。例如,杂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杂缀合物抗体。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。

[0251] 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完整抗体被蛋白酶解以产生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'-硫醇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。

[0252] 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。

[0253] 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。所述片段包含通过连接体与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH), 其中所述连接体太短, 以至于不允许相同链上的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。

[0254] I. 抗体纯化

[0255] 通过技术人员已知的方法可以纯化的抗体。纯化方法尤其包括选择性沉淀、液相色谱、HPLC、凝胶电泳、色谱聚集、凝胶电泳、透析和各种亲和技术。选择性沉淀可以利用硫酸铵、乙醇(Cohn沉淀)、聚乙二醇或本领域可用的其他物质。液相色谱基质尤其包括离子交换基质DEAE、聚天冬氨酸)、羟基磷灰石、分子排阻基质(例如基于交联琼脂糖、丙烯酰胺、葡聚糖等的那些)、疏水基质(例如蓝色琼脂糖)。亲和技术通常取决于与免疫球蛋白Fc域相互作用的蛋白质。来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白A可以用来纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体(Lindmark等人, J. Immunol. Meth., 62:1-13 (1983))。来自C和G链球菌的蛋白G可用于全部小鼠同种型和人 $\gamma 3$ (Guss等人, EMBO J., 5:1567-1575 (1986))。通过k轻链相互作用结合免疫球蛋白(Ig)的大消化链球菌(*Peptostreptococcus magnus*)细胞壁蛋白质蛋白(BD Bioscience/ClonTech, Palo Alto, CA.)可用于Ig亚型IgM、IgA、IgD、IgG、IgE和IgY的亲亲和纯化。所述蛋白质的重组形式还是市售的。如果抗体含有金属结合残基例如构建的含有组氨酸标签(tag)的噬菌体显示抗体, 可以使用金属亲和色谱。

[0256] 当充足的量的特异性细胞群是可用的时, 可以用细胞制备抗原亲和基质, 以提供用于纯化的抗体的亲和方法。亲和性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。机械稳定的基质如控制孔度玻璃或聚(苯乙烯-二乙烯)苯允许比用琼脂糖可以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。取决于待回收的抗体, 可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。

[0257] 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缩过滤器, 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。

[0258] 在任何一个或多个初步纯化步骤后, 包含关注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。

[0259] 本领域技术人员将理解,在本发明的方法和组合物中也可以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关注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、单抗体(unibody)、纳米体、鲨鱼抗原反应性蛋白、avimer、adnectin、anticalm、亲和性配体、phylomer、适配体、亲和体、trinectin等。

[0260] J. 评价分离的抗体反应性的方法

[0261] 数种方法可实现抗体的产生和选择性。例如,向小鼠或兔子或其他哺乳动物,注射对应于关注的代谢产物的合成和纯化的抗原,以产生多克隆或单克隆抗体。本领域技术人员应该理解许多方法可用于抗体的产生,例如,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)。

[0262] 随后可以通过以下方式选择通过这些方法产生的抗体:首先用纯化的关注抗原(如本文所述的生物素化的半抗原)就亲和力和特异性筛选并且,如果需要,将结果与抗体和需要从结合作用中排除的其他抗原的亲和力和特异性比较。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抗生蛋白链菌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。

[0263] 随后可以对如此鉴定的抗体进一步分析亲和力和特异性。在开发针对靶代谢产物的免疫测定时,纯化的靶代谢产物充当标准物,以其判断使用已经选出的抗体的免疫测定的灵敏度和特异性。因为各种抗体的结合亲和力可能不同,例如某些抗体组合可能在空间上彼此干扰,抗体的测定性能可能是比该抗体的绝对亲和力和特异性更重要的量度。

[0264] 本领域技术人员会认识到,可以采用许多方案产生抗体或结合性片段并且就关注的代谢产物的亲和力及特异性筛选和选择,但是这些方案不改变本发明的范围。

[0265] III. 使用方法

[0266] 本发明还提供使用本文中的代谢产物的存在或浓度(量或水平)确定受试者中肠易激综合征(IBS)的诊断的方法。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产物。

[0267] 本发明还提供确定患者是否对例如IBS的治疗响应的方法。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产物。在一些实施方案中,基于治疗施用之前或之后,IBS患者的生物样品中5-HIAA、褪黑激素和/或犬尿烯酸水平预测治疗的效力。本方法可用于测定IBS患者是否对治疗已经具有临床响应。

[0268] 在某些其他方面,本发明提供评价先前诊断患有IBS的患者或者预后IBS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产物。在一些实施方案中,方法包括在一个时间点测量IBS患者的生物样品中5-HIAA、褪黑激素和/或犬尿烯酸的水平,在第二个时间点测量患者的第二个生物样品中5-HIAA、褪黑激素和/或犬尿烯酸的水平,并计算两个时间点水平之间的变化或差异。该方法还可以包括利用统计学算法,以预测与先前(例如,IBS的初次诊断)相比,患者患更不严重或更严重IBS的可能性。在一些情况下,统计学算法可用于预测患者的IBS亚型。

[0269] 提供以下实施例旨在说明,但不限制要求保护的本发明。

[0270] 途径代谢产物的间接竞争性ELISA测定

[0271] 这个实施例描述了与本文提供的代谢产物如色氨酸、血清素和犬尿氨酸途径中的代谢产物(图1)特异性结合的分离的抗体的应用。这个实施例还显示这些抗体可以用于竞争性ELISA测定中,以精确和有效地检测、测量和定量样品(例如,患者血清)中的特异性代谢产物(图2)。抗体显示无交叉反应性(或者基本无交叉反应性)检测。竞争性ELISA提供代谢产物浓度的准确、定量的测量。

[0272] 竞争性ELISA是针对充当免疫原性缀合物(例如,抗原)的合成产生的代谢产物类似物(半抗原)产生的新抗体。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连接体。

[0273] 生物素化的半抗原

[0274] 对于各途径代谢产物或其衍生物,产生生物素化的半抗原。代替用连接臂缀合至载体蛋白,连接体被缀合至生物素。例如,化学合成5-HIAA的生物素化苯并咪唑衍生物,以含有在衍生物苯基末端的连接臂和在连接体另一端的生物素。

[0275] 竞争性ELISA

[0276] 图2提供了用来检测患者血清中途径代谢产物的竞争性ELISA的示例性实施方案。通过用生物素化的关注半抗原(例如,生物素化的5-HIAA、褪黑激素或犬尿烯酸)包被抗生蛋白链菌素平板,产生测定平板。患者血清或血清稀释液与针对关注的代谢产物(半抗原)的抗体(例如,抗-5-HIAA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。选择孵育条件,以为抗体结合至生物素化的半抗原或至血清中的代谢产物提供足够的时间。将平板用洗涤缓冲液例如PBS缓冲液洗涤几次。添加第二抗体例如山羊抗-兔抗体-HRP缀合物或者山羊抗-鼠抗体-HRP缀合物,并平板在室温孵育1小时。将平板用洗涤缓冲液洗涤几次。添加底物溶液用于检测反应,例如颜色反应、荧光反应、化学发光反应或发光反应。添加终止溶液以停止底物反应。随后,在分光光度计中适当波长处,读取平板,监测检测反应。基于结合至生物素化的半抗原的抗体的测量浓度,可以计算关注的代谢产物的浓度。在所述类型的测定中,样品中代谢产物量和结合抗体的测量水平之间存在反相关。

[0277] 特异性地与5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)结合的抗体的产生

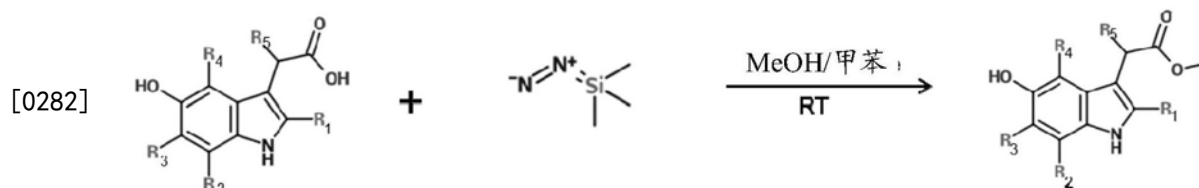
[0278] 本实施例描述特异性地与稳定的5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)苯并咪唑衍生物结合的抗体的产生。该衍生物包括PEG连接体和载体蛋白例如BSA。本实施例还显示所述抗体可用于免疫测定,例如竞争性ELISA中,以检测样品例如患者血清中的代谢产物。

[0279] A. 合成含有PEG连接体和载体蛋白或生物素的稳定的5-HIAA苯并咪唑衍生物

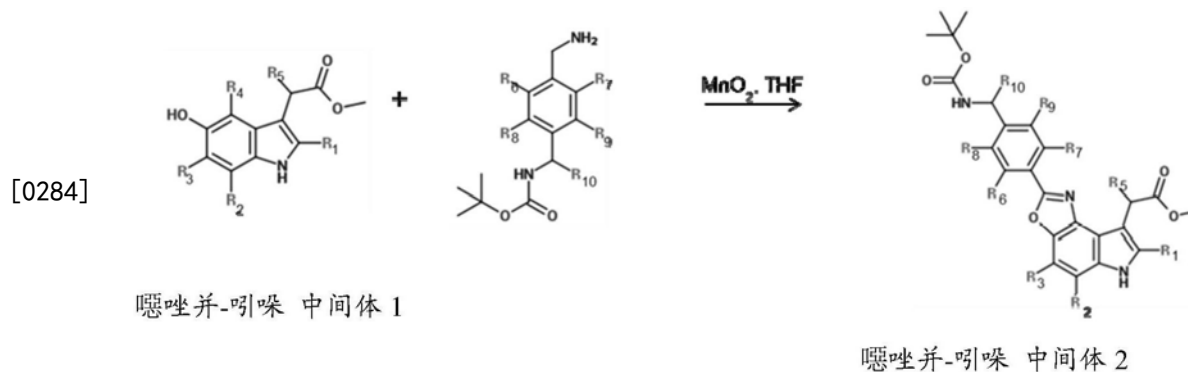
[0280] 下面的流程图解释说明咪唑-吲哚中间体1、咪唑-吲哚中间体2、咪唑-吲哚中间

体3、A-5、A-8、**噁唑并-吡啶**-PEG-SS-酸、**噁唑并-吡啶**-PEG-生物素-酯和**噁唑并-吡啶**-PEG-生物素-酸的合成。

[0281] 步骤1-噁唑并-吡啶中间体1:将5-羟基-1H-吡啶-3-基)-乙酸(2.0g,10.46mmol)溶解于无水甲醇(21mL)中,加入无水甲苯(42mL),以得到溶液。在搅拌下,于室温滴加2M TMS-重氮甲烷己烷溶液(5.2mL,10.46mmol),以释放气体。历经两个小时的一段时间,在室温加入另外两份2M TMS-重氮甲烷己烷溶液(2.6mL,5.23mmol)。将溶剂浓缩至10mL体积,加入甲苯(20mL),将溶剂浓缩,以得到油状物,将其经利用己烷/乙酸乙酯的SiO₂快速色谱纯化,得到作为油状物的中间体1(2.15g,95%)。步骤1如下文所示。

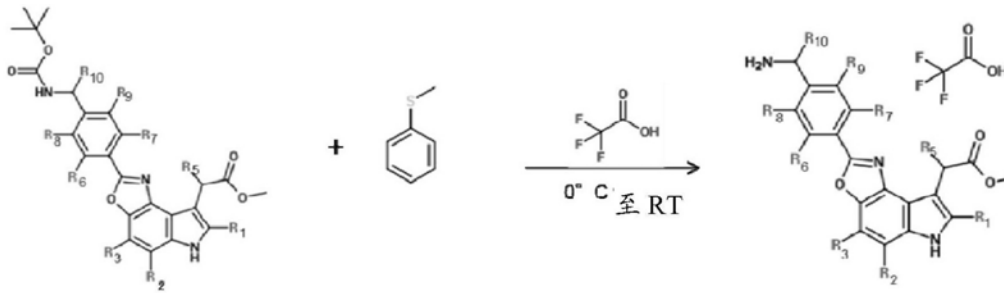


[0283] 步骤2-噁唑并-吡啶中间体2:将**噁唑并-吡啶**中间体1(1000mg,4.87mmol)溶解于无水二甲氧基乙烷(DME)(92mL)中,得到溶液,将其冷却至5℃。加入(4-氨基甲基-苄基)-氨基甲酸叔丁酯(1.267g,5.36mmol),然后加入MnO₂(4.24g,48.7mmol),以得到黑色混悬液,将其升温至室温,并搅拌16小时。将反应混合物冷却至5℃,并加入另外的MnO₂(461mg,1.95mmol)。将反应混合物升温至室温,搅拌5小时,然后经硅藻土垫过滤(1cm)。将黑色的滤液浓缩,经利用己烷/乙酸乙酯的SiO₂快速色谱纯化,得到作为浅黄色固体物的中间体2(442mg,21%)。步骤2如下所示,其中R₁-R₁₀=X、H、烷基、酸基团、芳基酯、烷基酯或磺酸酯,以及所述基团的任何组合。



[0285] 步骤3-噁唑并-吡啶中间体3:将**噁唑并-吡啶**中间体2(442mg,1.02mmol)悬浮于DCM(4.0mL)中,在室温滴加茴香硫醚(0.404mL,3.44mmol),然后滴加TFA(1.9mL,24.6mmol),以得到溶液。1.5小时后,将反应混合物用甲苯(20mL)稀释,得到油状物,将溶剂浓缩,得到绿色混悬液,将其与甲苯(20mL)共-蒸发至10mL体积,得到混悬液。将固体物滤出,用甲苯洗涤5次,用己烷洗涤5次,得到绿色固体物,将其在真空干燥箱(0.1mm Hg)中干燥,得到不吸潮的绿色固体物(557mg,50wt%假定的纯度)。步骤3如下所示。

[0286]



噁唑并-吡啶中间体 2

噁唑并-吡啶中间体 3

[0287] 步骤4-噁唑并-吡啶-PEG-SS-酸: 通过温和加热, 将噁唑并-吡啶-PEG-SS-酯 (68mg, 0.0439mmol) 溶解于二氧杂环己烷 (1.4mL) 中, 得到溶液, 将其冷却至RT。在搅拌下, 于RT滴加1.0M LiOH水溶液 (0.351mL, 0.351mmol), 得到溶液, 将其在室温搅拌4h。浓缩溶剂, 得到油状物, 将其悬浮于二氧杂环己烷 (1.4mL) 中, 并将混合物用1N HCl (0.351mL, 0.351mmol) 酸化至pH 1, 得到溶液。浓缩溶剂, 得到残留物, 将其大部分溶解于MeOH (25mL) 中。过滤混合物, 并将滤液浓缩, 得到油状物, 将其经HPLC纯化 (CH₃CN-H₂O, 0.1% TFA), 得到标题化合物, 为油状物 (20mg, 30%)。

[0288] 噁唑并-吡啶-PEG-生物素-酯. 本步骤描述5HIAA的噁唑并-吡啶-PEG-生物素-酯衍生物的合成。将PEG-生物素-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (100mg, 0.106mmol) 溶解于无水DMF (0.35mL) 中, 在室温下加入噁唑并-吡啶中间体3 (95.5mg, 0.212mmol, 93%纯度), 然后加入DIEA (0.148mL, 0.850mmol), 得到溶液, 将其在RT下搅拌2天。浓缩溶剂, 得到油状物 (246mg), 将其经HPLC (CH₃CN-H₂O, 0.1% TFA) 纯化, 得到标题化合物, 为油状物 (123mg, 100%)。该步骤显示于图5A中。

[0289] 噁唑并-吡啶-PEG-生物素-酸. 本步骤描述5HIAA的噁唑并-吡啶-PEG-生物素-酸衍生物的合成。将噁唑并-吡啶-PEG-生物素-酯 (160mg, 0.138mmol) 溶解于二氧杂环己烷 (2.2mL) 中, 得到溶液。在搅拌下, 于室温滴加1.0M LiOH水溶液 (0.551mL, 0.551mmol), 得到浑浊溶液, 将其在室温搅拌6小时。浓缩溶剂, 得到残留物, 将其溶解于H₂O (2.8mL) 中, 并用1N HCl (0.414mL, 0.411mmol), 在4°C将混合物酸化至pH 1, 得到浑浊溶液。在30-40°C下, 真空 (1mm Hg) 浓缩溶剂, 得到残留物 (120mg), 将其经HPLC纯化 (CH₃CN-H₂O, 0.1% TFA), 得到标题化合物, 为油状物 (61mg, 50%)。该步骤显示于图5B中。

[0290] B. 生产抗5-HIAA苯并噁唑衍生物的抗体

[0291] 生产抗文中所述的5-HIAA苯并噁唑衍生物的单克隆抗体。例如, 使噁唑并-吡啶-PEG-SS-酸通过胺或硫醇活化与载体蛋白连接 (图3A)。将免疫原注射到小鼠, 以产生单克隆抗体, 或者注射到兔中, 以产生多克隆抗体 (图4A和4B)。将本领域技术人员已知的标准方法用于抗体产生, 例如Antibody, A Laboratory Manual, Harlow和Lane编, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988) 中所述的技术。

[0292] 还将5HIAA苯并噁唑衍生物连接至生物素, 而不是载体蛋白 (图3A)。使用以下测定法, 将所述生物素化的半抗原用于测试所生成抗体的有效性和特异性。将生物素化的关注半抗原 (2μg/ml) 在室温包被到抗生蛋白链菌素平板上1小时。在大约4°C, 将抗原包被在板

上大约2小时。为了评价针对衍生化抗原产生的小鼠单克隆抗体的特异性或灵敏度,将抗体加入到孔中,并在室温下孵育大约1小时。将平板用冲洗缓冲液例如PBS等洗涤几次。加入山羊抗-鼠抗体-HRP缀合物,并在室温下孵育大约1小时。将平板用缓冲液洗涤几次。添加颜色底物,用于颜色反应。在大约405nm处读取平板之前,添加终止溶液。图6A显示小鼠单克隆抗体的滴度试验。在1:200稀释时,抗体的滴度是非常高的,并可进一步稀释。

[0293] 在文中所述的5-HIAA的竞争性ELISA测定中,对于单克隆抗体,游离5-HIAA与结合至的测定平板的生物素化的5-HIAA竞争。图6B显示游离5-HIAA量的增加(0ng/mL至100ng/mL;右侧至左侧)致使更少的单克隆抗体结合至生物素化的5-HIAA(或者更低的OD)。图6C显示在不同浓度5-HIAA(0ng/mL至80mg/mL),不同稀释(1:100-1:800)的抗-5HIAA单克隆抗体的滴度。图6D显示5-HIAA特异性单克隆抗体对衍生化的血清素(5-HT)不是免疫反应性的。该图还显示抗血清素的单克隆抗体不与衍生化的5-HIAA结合。

[0294] 抗体特异性测试显示抗5-HIAA的单克隆抗体是特异性的,并且不与类似化合物例如血清素、褪黑激素、5-羟色氨酸或色氨酸结合。事实上,这些其他化合物显示与单克隆抗体0至<0.5%的交叉反应性(图7A和7B)。图8显示在基于免疫的测定中,用抗5-HIAA单克隆抗体可产生标准曲线。

[0295] 特异性地与褪黑激素结合的抗体的产生

[0296] 本实施例描述特异性地与褪黑激素结合的抗体的产生。实施例显示该抗体可用于免疫测定例如竞争性ELISA中,以检测患者样品中的褪黑激素。

[0297] 褪黑激素(5-甲氧基-N-乙酰基色胺)是衍生自血清素的化合物。血清素N-乙酰基转移酶将血清素转化为N-乙酰血清素,其被羟基吲哚-O-甲基转移酶转化为褪黑激素。

[0298] 褪黑激素在IBS的发病机制中可能起重要作用(Konturek等人,J Physiol Pharmacol,2007,58:381-405;Bebeuk等人,J Pineal Res,1994,16:91-99)。褪黑激素显示强的抗氧化和抗炎活性。褪黑激素还调控肠能动性。研究已表明褪黑激素对平滑肌的运动活性具有抑制作用。IBS一直与异常的胃肠道运动功能、内脏超敏反应、社会心理因素、自主神经功能障碍和粘膜炎症相关。

[0299] A. 产生含有褪黑激素的免疫原

[0300] 褪黑激素是合成产生的。将PEG(PEG₁-PEG₂₀)连接体连接(缀合)至褪黑激素。然后,将载体蛋白例如BSA通过氨基或硫醇活化,连接至连接体的游离末端(图3B)。将所述褪黑激素抗原用于产生特异性地与褪黑激素结合的多克隆和单克隆抗体。

[0301] 根据本领域技术人员已知的标准方法,产生抗体。根据例如诸如Greenfield,EA. "Generating Monoclonal Antibody" in Antibody: A Laboratory Manual, 第1版, CSHL Press, 纽约, 1988中所述的那些方法, 产生单克隆抗体。用褪黑激素抗原和佐剂免疫兔子, 产生多克隆抗体。兔子接受褪黑激素抗原的增强免疫接种, 以增加其免疫应答和抗体滴度。图9显示放血前三只免疫兔子和放血1-9的抗体滴度。该图显示兔子#16401(1)产生特异性地与褪黑激素结合的抗体。

[0302] 还合成产生生物素化的褪黑激素缀合物。将PEG(PEG₁-PEG₁₂)连接体连接(缀合)至褪黑激素。然后,将生物素通过氨基或硫醇活化,连接至连接体的游离末端。将所述缀合物用于免疫测定,以测试文中所述抗-褪黑激素抗体的亲和力和特异性(图10A和10B)。

[0303] B. 测定抗褪黑激素抗体

[0304] 为了测试所生成的抗-褪黑激素抗体的有效性和特异性,使用以下测定。将生物素化的褪黑激素在室温包被到抗生蛋白链菌素平板上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。在竞争性免疫测定中,将竞争(测试)化合物加入到孔中,并在室温下孵育大约1小时。在一些情况下,测试化合物是褪黑激素或者结构上类似的化合物例如血清素、色氨酸、5-HIAA等。在一些孔中,未加入测试化合物。

[0305] 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,PBST)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进行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。在大约405nm或用于检测反应的适当波长处读取平板。

[0306] 将测定用于测量文中所述多克隆抗体的结合活性和特异性。还将测定进行调整,以便利用山羊抗-鼠抗体-HRP缀合物代替识别兔抗体的第二抗体,测试针对褪黑激素产生的单克隆抗体。

[0307] 为了测定抗褪黑激素抗体对抗原是否是特异性的,测试竞争性化合物例如褪黑激素、血清素、色氨酸和5-HIAA。图10A显示随着褪黑激素的量减少(8.00mM至0mM),检测到更多的多克隆抗体,由于结合至固定化的生物素化褪黑激素。图10B显示在竞争性测试中1mM褪黑激素的加入,降低结合至生物素化褪黑激素的抗体的量。相反,血清素、色氨酸或5-HIAA的加入不改变结合至固定化抗原的抗-褪黑激素抗体的量。所述数据显示对于褪黑激素,所述抗-褪黑激素多克隆抗体是高度特异性的,并且与结构上类似于褪黑激素的化合物无交叉反应性。

[0308] 完成类似的竞争性ELISA,以测试来自不同杂交瘤克隆(2F1D11H4、6C1E2F7、6C2H4C8、7C7F1G2、7C8A1D2和7F8H9G5)的单克隆抗体的特异性。加入到用固定化褪黑激素包被的孔中之前,将单克隆抗体用测试化合物(1mM褪黑激素、1mM血清素、1mM色氨酸或1mM 5-HIAA)孵育。图11显示来自克隆6C1E2F7、6C2H4C8、7C7F1G2和7C8A1D2的抗体是对褪黑激素特异性的,并不与具有与褪黑激素类似的结构代谢产物结合。

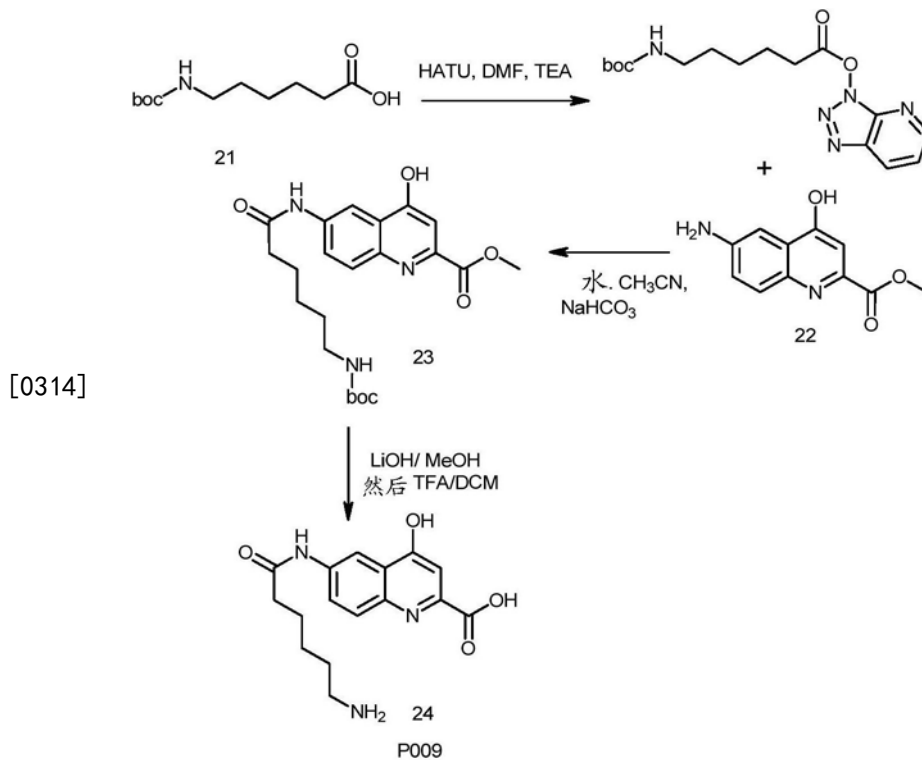
[0309] 利用标准ELISA,测定抗-褪黑激素单克隆抗体的灵敏度。将生物素化的褪黑激素固定至抗生蛋白链菌素包被的多孔板中。向板中,加入系列稀释的单克隆抗体,以能产生标准曲线。将板在室温下孵育大约1小时。将孔用冲洗缓冲液洗涤几次。加入HRP缀合的第二抗体(山羊抗-小鼠IgG),并在室温下孵育大约1小时。将板用冲洗缓冲液洗涤几次。添加比色检测试剂。添加终止试剂,以终止反应。在适当波长处读取板。图12显示特异性地与褪黑激素结合的单克隆抗体(来自克隆6C1E2F7)的标准曲线。抗体的特异性是7.26ng/ml。

[0310] 特异性地与犬尿烯酸(KYNA)结合的抗体的产生

[0311] A. 用于制备多克隆抗体的犬尿烯酸免疫原的合成

[0312] 化合物24:6-(6-氨基己酰氨基)-4-羟基喹啉-2-甲酸。

[0313] 下面的流程图解释说明化合物24的合成。



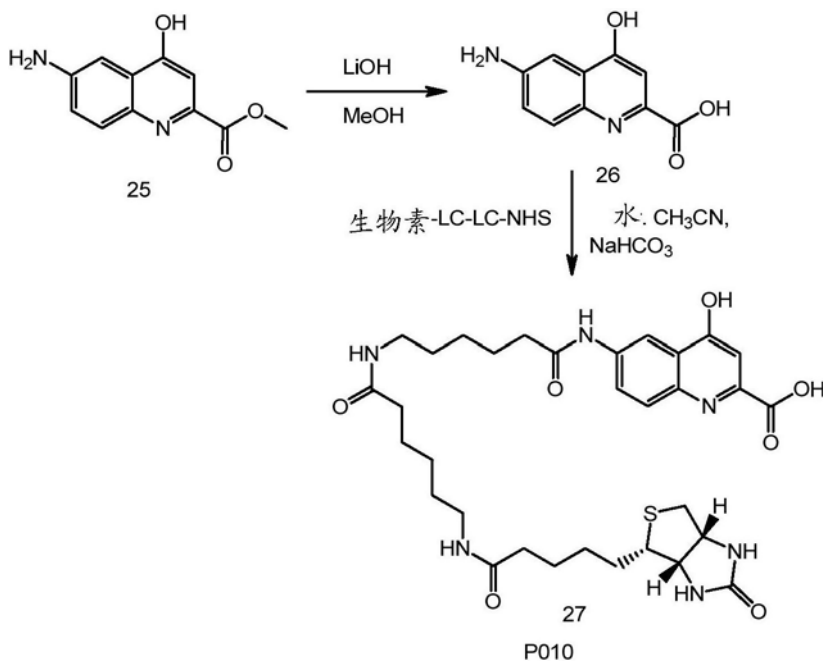
[0315] 步骤1:将**6-氨基己酸** (21, 277mg, 1.2mmol)、DIPEA (0.21ml, 1.2mmol) 和HATU (456mg, 1.2mmol) 的混合物在DCM (5ml) 和乙腈 (5ml) 中搅拌30min。

[0316] 步骤2:向化合物22 (218mg, 1mmol) 在水 (5ml) 和乙腈 (5ml) 的混合物中, 加入NaHCO₃ (840mg, 10mmol), 随后在剧烈搅拌下, 缓慢加入步骤1的反应混合物。此后, 将混合物再搅拌4hrs, 然后通过饱和NaHSO₄酸化, 这产生沉淀。将固体物滤出, 以得到中间体23。

[0317] 步骤3:在60℃下, 将步骤2的固体23与LiOH-H₂O (410mg, 10mmol) 于MeOH (10ml) 中搅拌4hrs, 然后用饱和NaHSO₄溶液酸化至pH 3, 浓缩。将产生的固体物过滤, 用水洗涤, 干燥。然后, 将其悬浮于DCM (2ml) 中, 随后加入TFA (2ml)。将浆状物在室温搅拌4hrs, 然后浓缩。产生的固体物用乙酸乙酯 (30ml) 搅拌5min, 将不溶解的滤出, 并用乙酸乙酯洗涤, 并干燥得到灰色固体物, 为需要的化合物24 (120mg)。MS: 318.0 (M+H)⁺6- (6-氨基己酰氨基)-4-羟基喹啉-2-甲酸。

[0318] 为了产生KYNA的免疫原性缀合物, 将PEG (PEG₁-PEG₂₀) 连接体连接 (缀合) 至化学合成的KYNA半抗原, 然后, 将载体蛋白例如BSA通过氨基或硫醇活化, 连接至连接体的游离末端 (图3C)。将文中所述的KYNA抗原用于产生特异性地与KYNA结合的多克隆抗体。

[0319] 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-甲酸的合成。



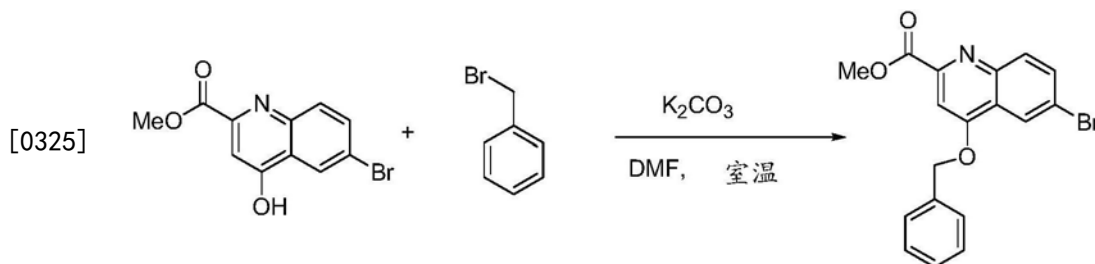
[0320]

[0321] 将化合物25 (327mg, 1.5mmol) 和LiOH-H₂O (430mg, 10mmol) 的混合物在MeOH (10ml) 中搅拌过夜, 然后用6N HCl小心酸化至pH 7, 浓缩, 以除去MeOH。然后, 将粗产物用乙腈和水 (10ml/10ml) 稀释, 并加入NaHCO₃ (1.26g), 随后加入生物素-LC-LC-NHS (852mg, 1.5mmol)。将混合物剧烈搅拌1天, 经6N HCl酸化, 将产生的固体物过滤, 并用MeOH冲洗, 随后用水冲洗, 然后干燥, 产生纯的化合物27 (140mg)。MS: 657.2 (M+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-甲酸。

[0322] 还合成产生生物素化的KYNA缀合物。将PEG (PEG₁-PEG₁₂) 连接体连接(缀合)至KYNA半抗原。然后, 将生物素通过氨基或硫醇活化, 连接至连接体的游离末端。将所述缀合物用于免疫测定, 以测试文中所述抗-KYNA抗体的亲和力和特异性(图13A、13B、14A、14B、15A、16A和16B)。

[0323] B. 用于制备单克隆抗体的犬尿烯酸免疫原的合成

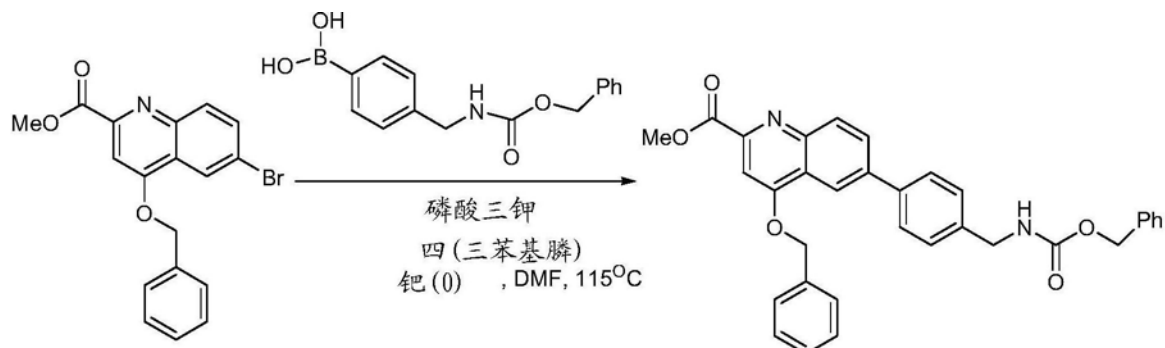
[0324] 文中提供了合成犬尿烯酸的方法。



[0326] 在100mL的圆底烧瓶中, 将6-溴-4-羟基-喹啉-2-甲酸甲酯(犬尿烯酸甲酯) (564mg, 2.0mmol) 溶解于干燥的DMF (12mL) 中, 然后向反应烧瓶中加入K₂CO₃粉末 (691mg, 5.0mmol)。5min后, 利用注射器, 加入溴苄 (0.285mL, 2.4mmol)。反应在室温持续4小时。利用TLC (用20%EtOAc的己烷溶液) 检测反应, 观察到完全转化为产物。然后, 向反应混合物中加入水 (15mL), 并用EtOAc (3x 20mL) 萃取。将有机层合并并用水 (20mL) 和1.0N HCl (20mL) 和盐水 (20mL) 洗涤。将有机层经硫酸干燥并蒸发。然后, 将产品经真空柱色谱 (VCC) 利用10-

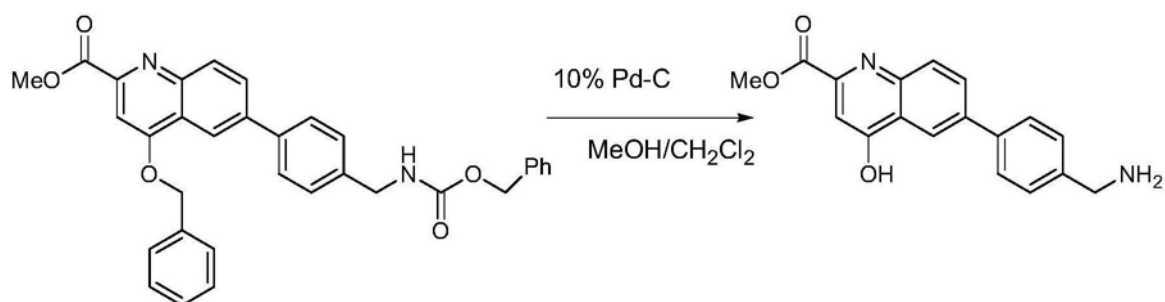
50%EtOAc-己烷纯化。将纯的产品级分合并，并蒸发，得到为纯态的黄褐色固体物的需要的产物4-苄氧基-6-溴-喹啉-2-甲酸甲酯(285mg)，和具有一定杂质的420mg。¹H NMR (499MHz，氯仿-d) δ 8.43 (d, J=2.2Hz, 1H), 8.10 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.83 (dd, J=9.0, 2.3Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.57-7.50 (m, 2H), 7.49-7.38 (m, 3H), 5.37 (s, 2H), 4.08 (s, 3H)。

[0327]



[0328] 在25mL圆底烧瓶中，将4-苄氧基-6-溴-喹啉-2-甲酸甲酯(372mg, 1.0mmol)溶解于DMF (5.0mL)中，并脱气。然后，向烧瓶中，加入磷酸钾(467mg, 2.2mmol)和四(三苯基磷)钯(0) (57.75mg, 0.05mmol)，并在115°C继续加热16小时。完成后，蒸发挥发物，并加入水(5.0mL)，并用EtOAc (3x 20mL)萃取。合并的有机层经硫酸钠干燥并蒸发。然后，在利用己烷-EtOAc (0-100%)的真空柱色谱上纯化。用50%EtOAc洗脱需要的产物。将纯的产物级分合并，并蒸发，得到4-苄氧基-6-[4-(苄氧基羰基氨基-甲基)-苯基]-喹啉-2-甲酸甲酯(255mg, 48%产率)，为淡黄绿色固体物，经LCMS和NMR确证。¹H NMR (499MHz, DMSO-d₆) δ 8.38 (d, J=1.8Hz, 1H), 8.22-8.11 (m, 2H), 7.88 (t, J=6.1Hz, 1H), 7.76 (d, J=7.9Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.65-7.58 (m, 4H), 7.58-7.51 (m, 1H), 7.49-7.26 (m, 6H), 5.55 (s, 2H), 5.06 (s, 2H), 4.27 (d, J=6.3Hz, 2H), 3.96 (s, 3H)。MS: 533.5 [M+H] 对于C₃₃H₂₈N₂O₅计算的。

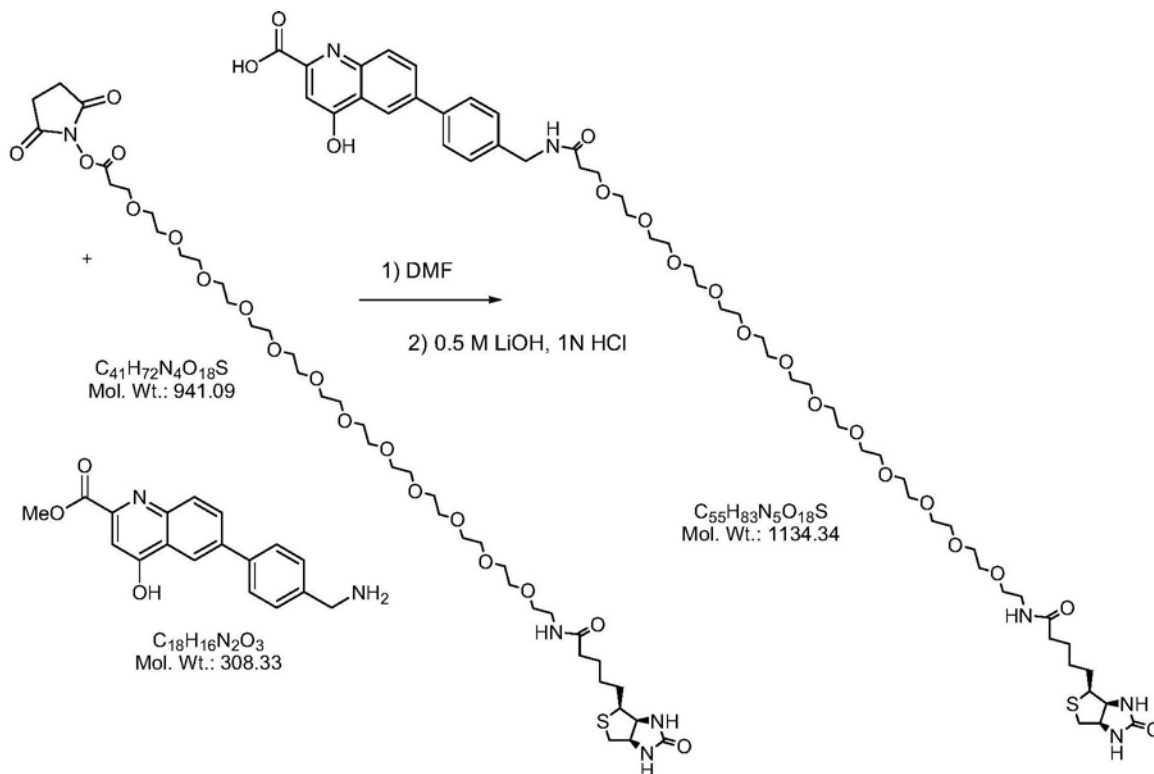
[0329]



[0330] 文中提供了合成生物素化的犬尿烯酸的方法。

[0331] 在250mL圆底烧瓶中，将4-苄氧基-6-[4-(苄氧基羰基氨基-甲基)-苯基]-喹啉-2-甲酸甲酯(532mg, 1.0mmol)溶解于MeOH (40mL)和CH₂Cl₂ (30mL)中。然后，将溶液脱气并加入10%Pd-C (85mg)。然后，利用气球，将溶液氢化过夜，随后在LC-MS和TLC上分析。将反应溶液经硅藻土床过滤，并用甲醇洗涤硅藻土层。然后，利用浓HCl，酸化得到的透明溶液，以使黄色沉淀可视化。然后，将溶液蒸发，得到黄色固体物。LC MS: 309 [M+H]，对于C₁₈H₁₆N₂O₃计算的。

[0332]



[0333] 本文提供了合成犬尿烯酸-PEG-二硫化物的方法。

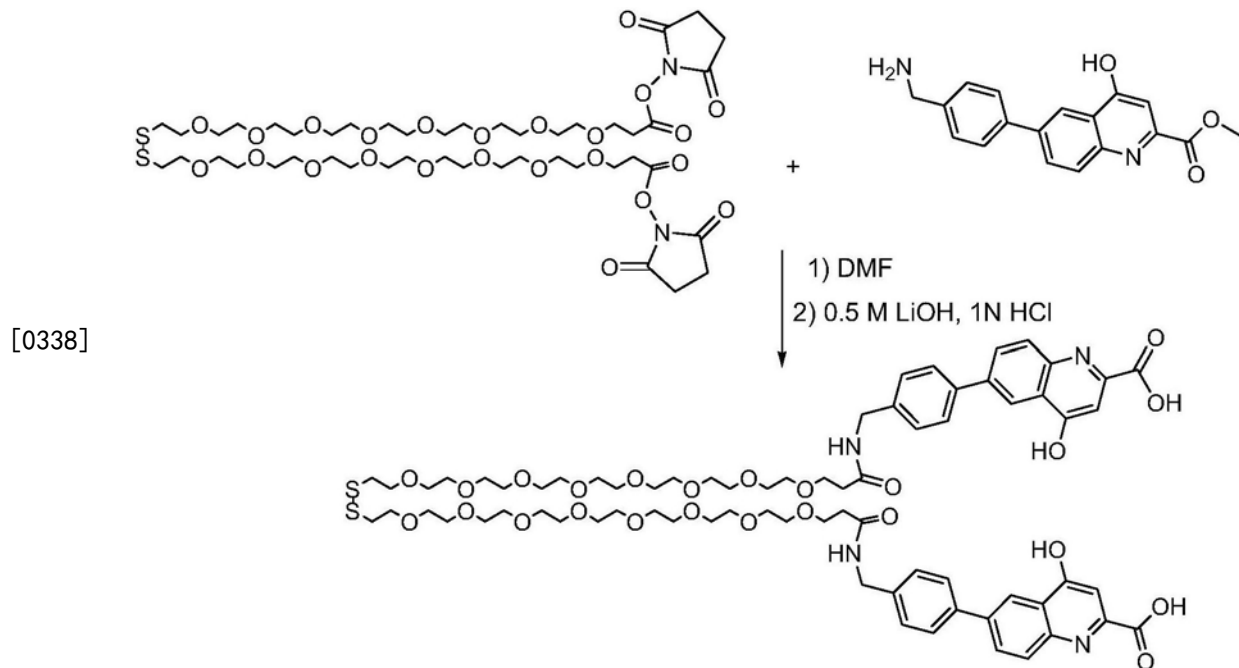
[0334] 在4.0mL棕色玻璃瓶中,将犬尿喹啉胺(kynurenic amine)盐酸盐(68mg,0.2mmol)和PEG₁₂-生物素-NHS酯(94.1mg,0.1mmol)悬浮于DMF(1.0mL)中,并在室温下搅拌16小时。利用LCMS,确证本反应混合物中产物的存在。将产物在硅胶真空柱色谱上纯化,用CH₂Cl₂-MeOH(0-20%)梯度洗脱。将纯产物级分合并,并蒸发,得到浅黄色固体物(42mg)。¹H NMR(499MHz,甲醇-d₄) δ8.49(d,J=2.2Hz,1H),8.10(dd,J=8.8,2.2Hz,1H),7.96(t,J=9.4Hz,2H),7.78-7.67(m,2H),7.45(d,J=7.9Hz,2H),6.97(s,1H),4.57(s,1H),4.47(d,J=4.3Hz,3H),4.29(dd,J=7.9,4.4Hz,1H),4.06(s,3H),3.79(t,J=5.9Hz,2H),3.70-3.45(m,54H),3.35(t,J=5.4Hz,2H),3.24-3.12(m,1H),2.92(dd,J=12.7,5.0Hz,1H),2.68(d,J=4.4Hz,1H),2.53(t,J=6.0Hz,2H),2.21(t,J=7.3Hz,2H),1.79-1.53(m,4H),1.44(q,J=7.6Hz,2H)。MS:1133.3[M-H],对于C₅₅H₈₃N₅O₁₈S计算的。

[0335] 甲基酯的水解:将上述得到的产物溶解于THF(1.5mL)中,并加入0.5M LiOH溶液(0.4mL)。反应在室温持续2小时,然后用1N HCl(0.3mL)酸化。将样品在LCMS上检测。观察具有足够纯度(>85%)的需要的产物。通过将样品连接至高真空过夜,将样品充分干燥。

[0336] 在4.0mL棕色玻璃瓶中,将犬尿喹啉胺盐酸盐(68mg,0.2mmol)和SS-PEG-NHS酯(111mg,0.1mmol)悬浮于DMF(1.0mL)中,并在室温下搅拌16小时。利用LCMS,确证本反应混合物中产物的存在。将产物在硅胶真空柱色谱上纯化,用CH₂Cl₂-MeOH(0-15%)梯度洗脱。将纯的产物级分合并,并蒸发,得到胶状固体物(28mg)。¹H NMR(499MHz,甲醇-d₄) δ8.48(dd,J=21.2,2.2Hz,1H),8.13-8.02(m,1H),7.93(dd,J=19.9,8.8Hz,1H),7.71(dd,J=16.0,8.2Hz,2H),7.44(t,J=9.4Hz,2H),6.96(d,J=16.4Hz,1H),4.54(s,3H),4.46(d,J=5.7Hz,2H),4.05(d,J=7.3Hz,4H),3.83-3.66(m,8H),3.66-3.47(m,50H),3.23(q,J=7.4Hz,2H),2.92-2.82(m,3H),2.67(s,4H),2.53(t,J=5.9Hz,2H),1.37(d,J=6.6Hz,

17H) .MS:1494.6 [M-H], 对于 $C_{74}H_{102}N_4O_{24}S_2$ 计算的。

[0337] 甲基酯的水解:将上述得到的产物溶解于THF (1.5mL) 中, 并加入0.5M LiOH溶液 (0.4mL)。反应在室温持续2小时, 然后用1N HCl (0.3mL) 酸化。将样品的等分试样在LCMS上检测。观察具有足够纯度 (>85%) 的需要的产物。通过将样品连接至高真空过夜, 将样品充分干燥。



[0339] C. 抗犬尿烯酸抗体

[0340] 根据本领域技术人员已知的标准方法, 产生抗体。根据例如Greenfield, EA. "Generating Monoclonal Antibody" in *Antibody: A Laboratory Manual*, 第1版, CSHL Press, 纽约, 1988中所述的那些方法, 产生单克隆抗体。用褪黑激素抗原和佐剂免疫兔子, 产生多克隆抗体。兔子接受褪黑激素抗原的增强免疫接种, 以增加其免疫应答和抗体滴度。

[0341] 为了测试所生成抗-褪黑激素抗体的有效性和特异性, 使用以下测定。将生物素化的犬尿烯酸在室温包被到蛋白链菌素板上1小时。将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并转移至板的各个孔。在竞争性免疫测定中, 将竞争 (测试) 化合物加入到孔中, 并在室温下孵育大约1小时。在一些情况下, 测试化合物是褪黑激素或者结构上的类似化合物例如血清素、色氨酸、5-HIAA、犬尿氨酸等。在一些孔中, 未加入测试化合物。

[0342] 将板在室温 (RT) 孵育约1小时, 伴以回转振摇。将板用洗涤缓冲液 (例如, PBST) 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板在室温孵育, 进行HRP催化的反应, 以产生可检测的颜色 (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。在大约405-450nm或用于检测反应的适当波长处读取板。

[0343] 图13A显示用KYNA免疫原免疫的兔血清中抗KYNA多克隆抗体的反应性。该图显示竞争性ELISA测定的结果, 其中将生物素化的KYNA包被至多孔板的表面。图13B显示亲和纯化的兔抗KYNA多克隆抗体的结合灵敏度。利用标准方法, 将抗体纯化。在竞争性ELISA中, 将

多克隆抗体的量稀释1:250-1:2500,并且评价不同浓度的游离KYNA。

[0344] 将类似的竞争性ELISA用于评价根据文中所述产生的单克隆抗体的特异性和灵敏度。结果显示来自杂交瘤克隆4B11H9A2和6H5B11A7的抗体特异性地与KYNA结合,并且对3-OH-DL-犬尿氨酸、血清素、色氨酸、n-乙酰基-5-羟基-色胺和5-OH-喹啉无交叉反应性(图14A)。结构类似于KYNA的化合物不干扰抗体与KYNA的结合。图14B显示小鼠单克隆抗-KYNA抗体的滴定。即使当稀释时,抗体保持对KYNA的免疫反应性。

[0345] 图15A和15B显示杂交瘤克隆6H5B11A7产生的小鼠单克隆抗体特异性地与犬尿烯酸结合。如图15A中所示,在本文提供的竞争性ELISA中,游离KYNA抗原与固定化的KYNA抗原就对抗体的结合竞争。随着游离KYNA量的增加,更少的抗体结合至固定化抗原,且OD值降低。图15B显示小鼠单克隆抗-KYNA抗体的标准曲线。

[0346] 图16A和16B显示文中公开的竞争性ELISA的示例性实施方案的结果。在图16A中,将TMB底物用于比色反应。在图16B中,将发光底物用于检测反应。利用发光底物的测定提供比TMB底物测定更高的灵敏度。

[0347] 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包括在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、专利和专利申请在此通过引用的方式完整并入用于所有目的。

[0001]

20170718



2015800737665

关于微生物保藏の説明

申请人或代理人档案号 PN 171329	国际申请号 PCT/IB2015/058976
----------------------	-------------------------

关于微生物保藏の説明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

微生物保藏の説明	
A.对说明书第 3 页, 第 14 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的説明	
B. 保藏事項	更多的保藏在附加页説明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称ATCC-美国典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 10801 Boulevard 大学, 马纳萨斯,弗吉尼亚,20110,美国	
保藏日期 2015-11-17	保藏号 PTA-122671
C.补充説明 (必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
无	
D.本説明是为下列指定国作的 (如果説明不是为所有指定国而作的)	
所有指定国	
E.补充説明 (必要时)	
下列説明将随后向国际局提供 (写出説明的类别, 例如: “保藏的编号”)	
无	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
授权官员

[0002]

20170718



2015800737665

附页

微生物保藏(2)	
A.对说明书第 4 页, 第 3 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>	
保藏单位名称ATCC-美国典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 10801 Boulevard 大学, 马纳萨斯,弗吉尼亚,20110,美国	
保藏日期 2015-11-17	保藏号 PTA-122669
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>	
无	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的) 所有指定国	
E.补充说明(必要时) 下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”) 无	
微生物保藏(3)	
A.对说明书第 4 页, 第 19 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>	
保藏单位名称ATCC-美国典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 10801 Boulevard 大学, 马纳萨斯,弗吉尼亚,20110,美国	
保藏日期 2015-11-17	保藏号 PTA-122670
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>	

[0003]

20170718



附页

无
D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的） 所有指定国
E.补充说明（必要时） 下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） 无

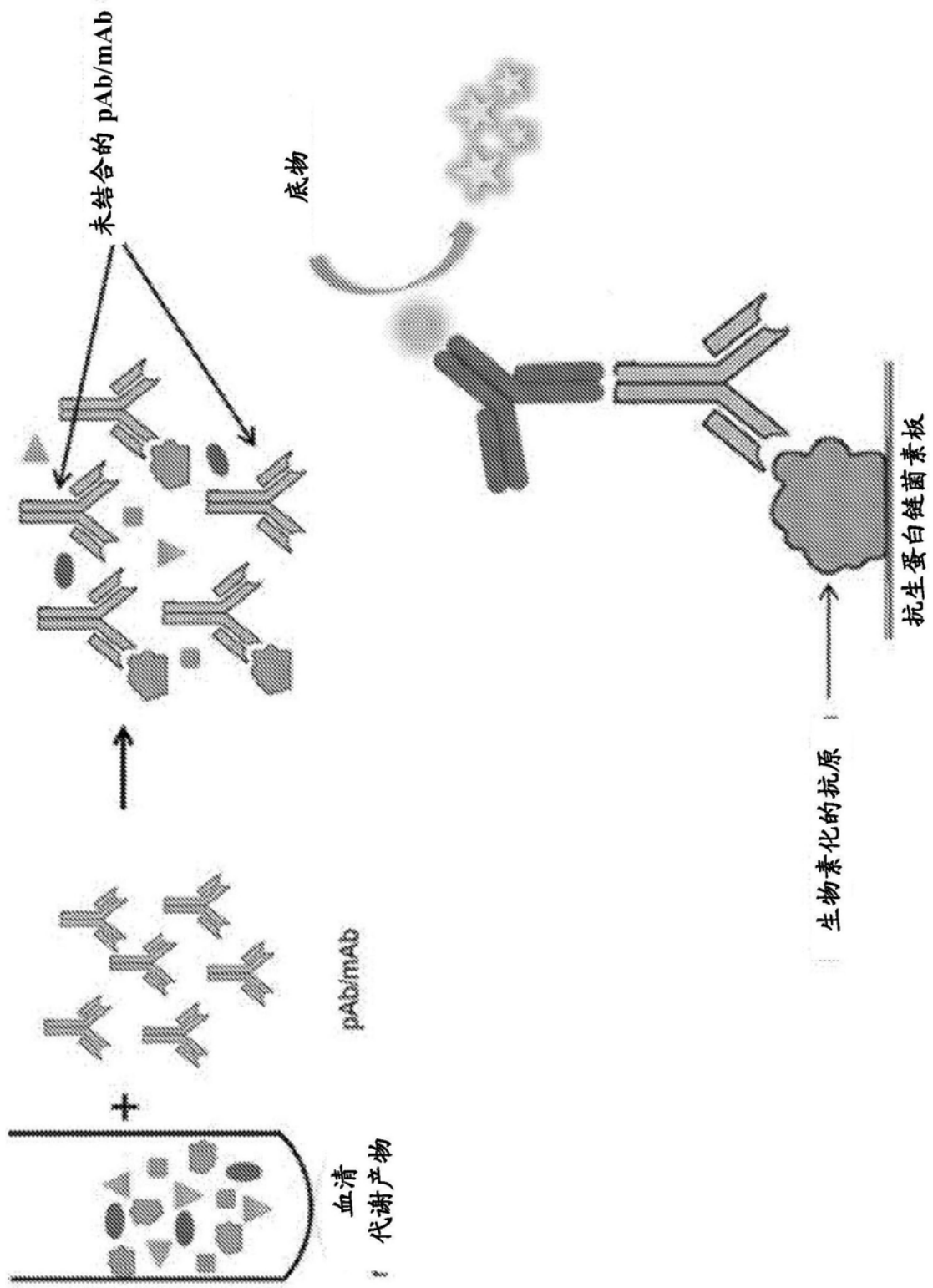


图2

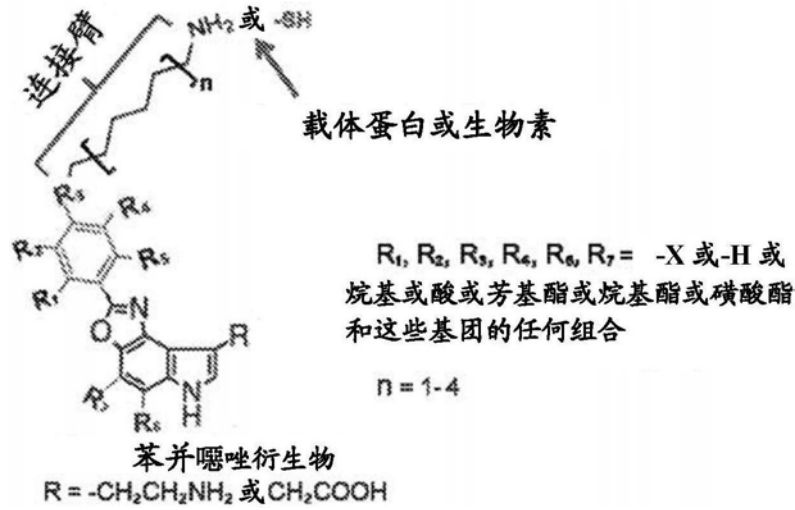


图3A

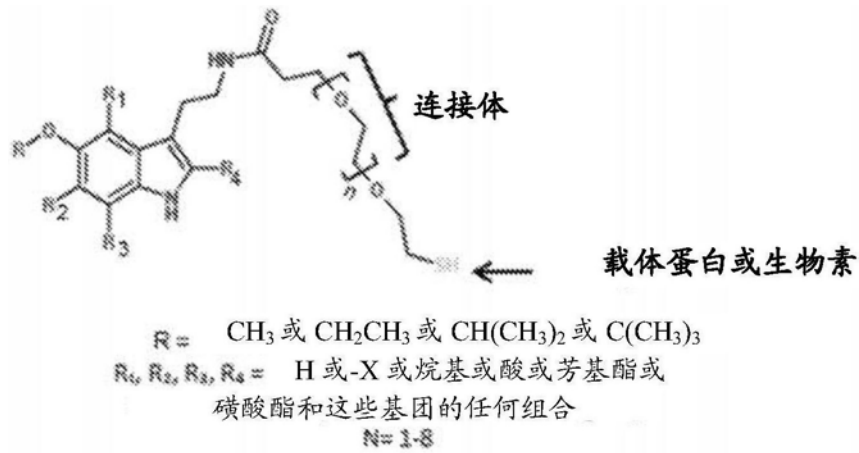


图3B

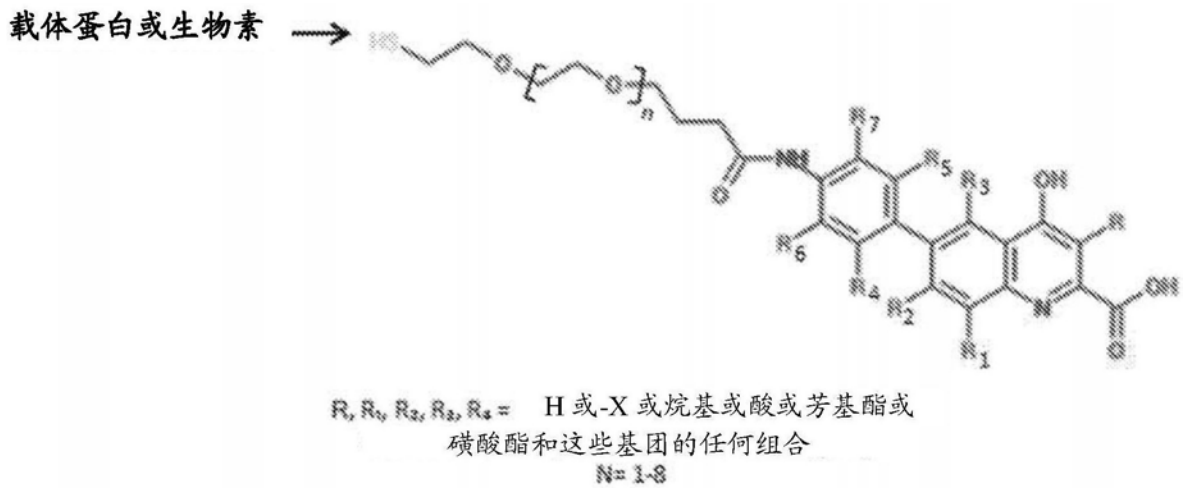
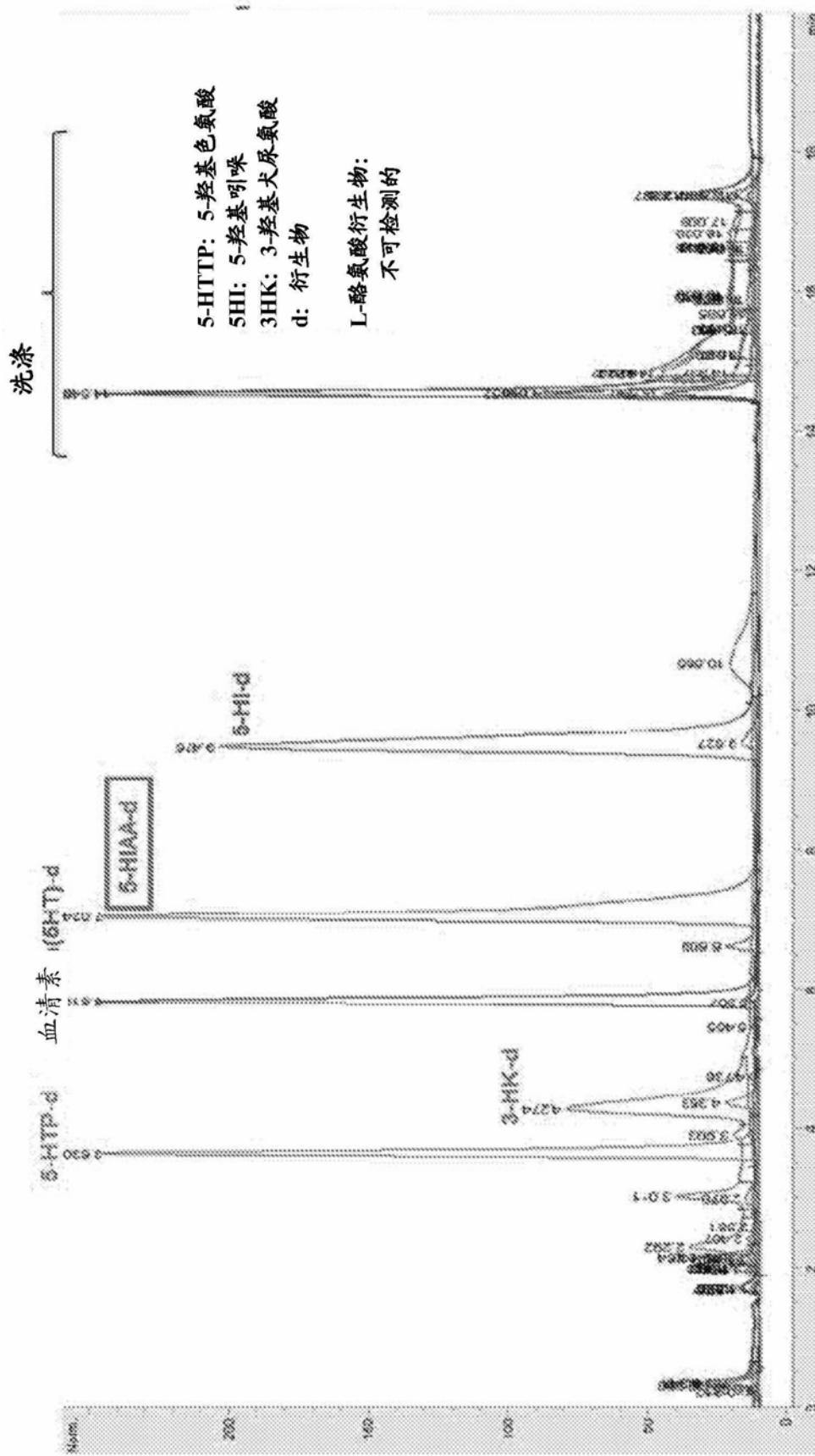


图3C



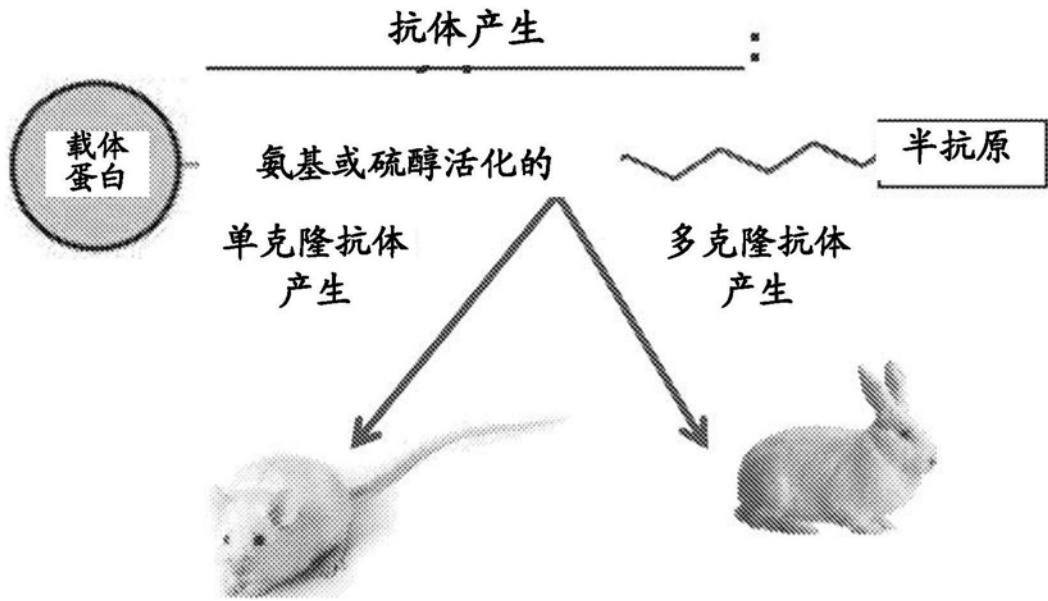


图4A

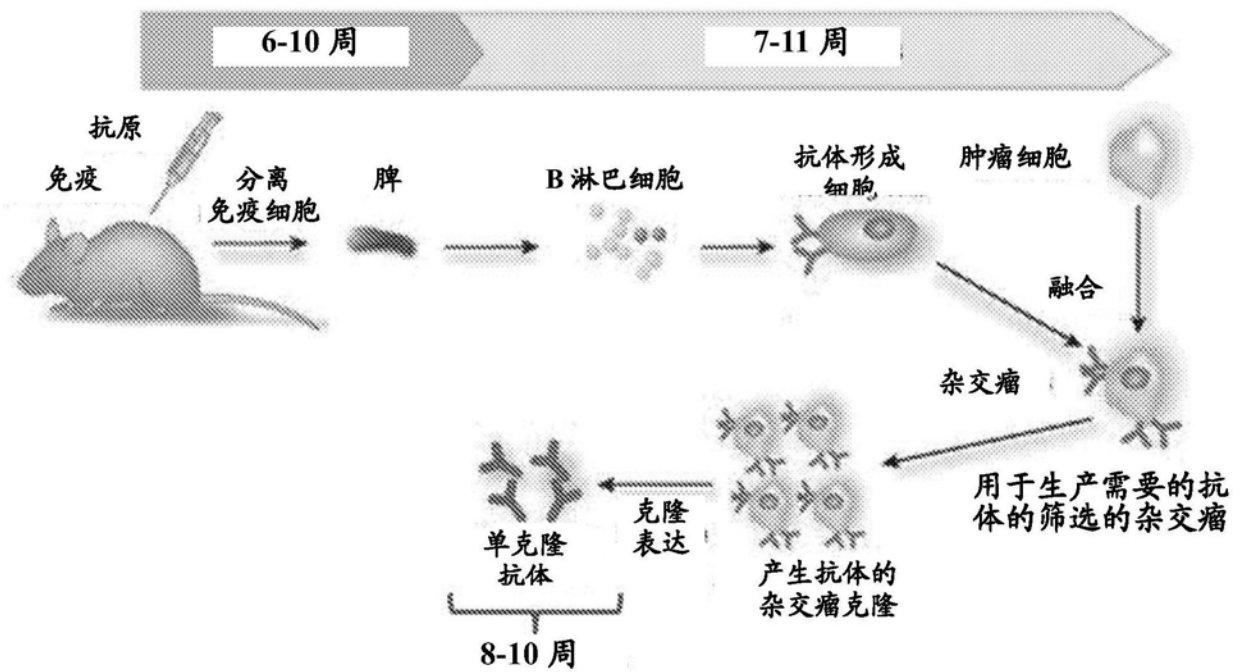


图4B

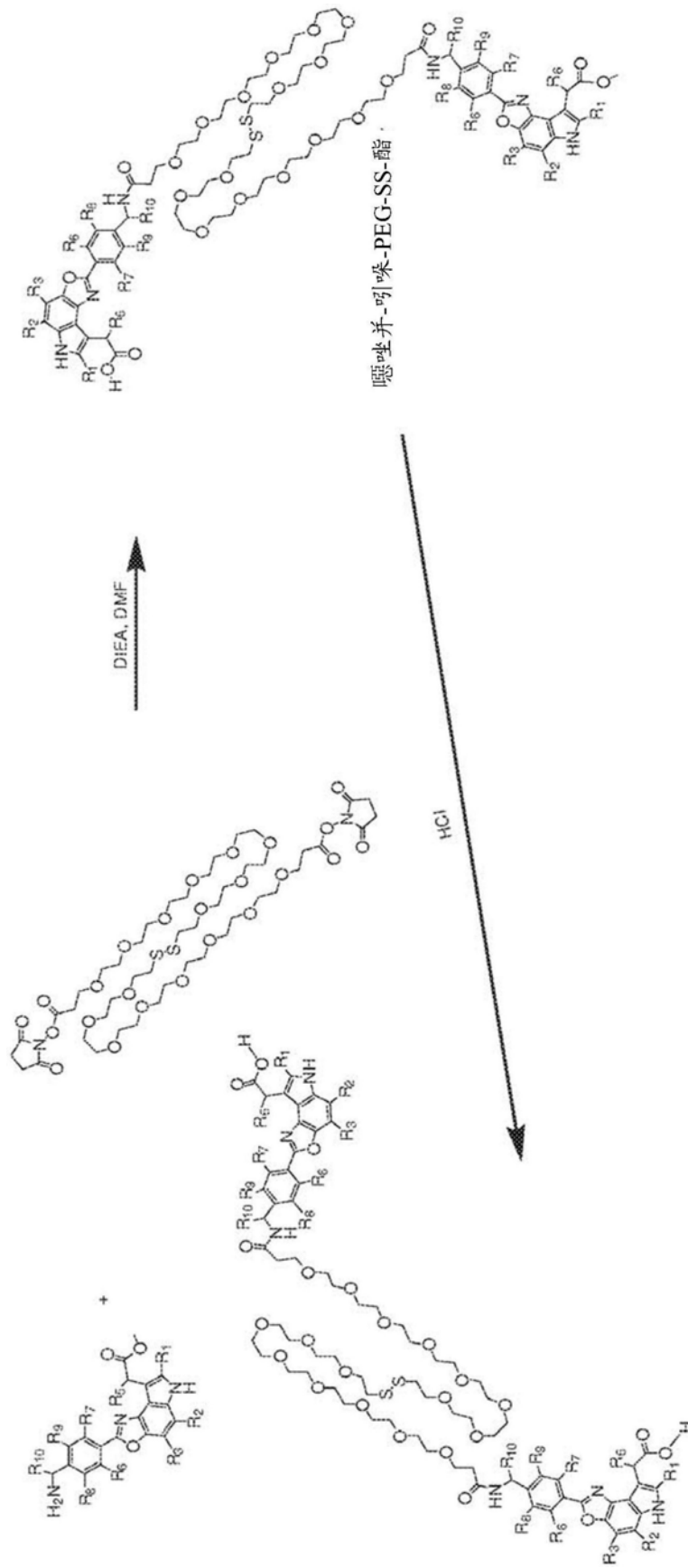


图5A

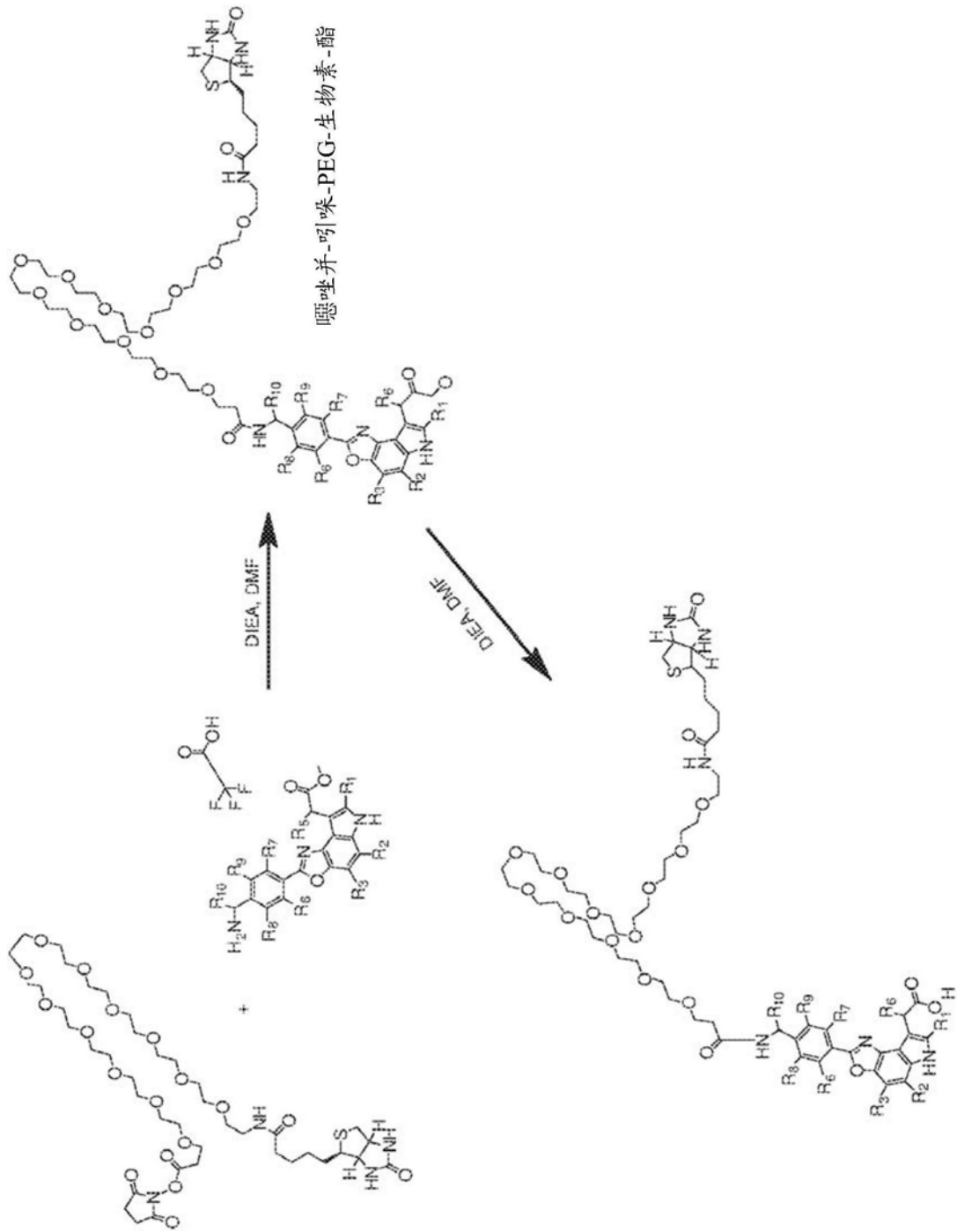


图5B

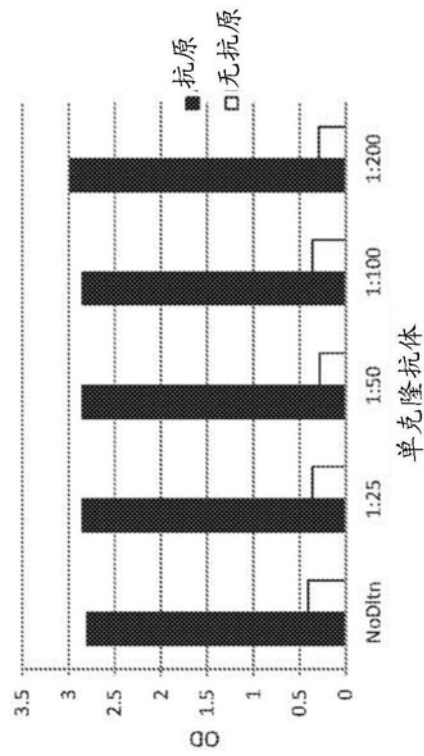


图6A

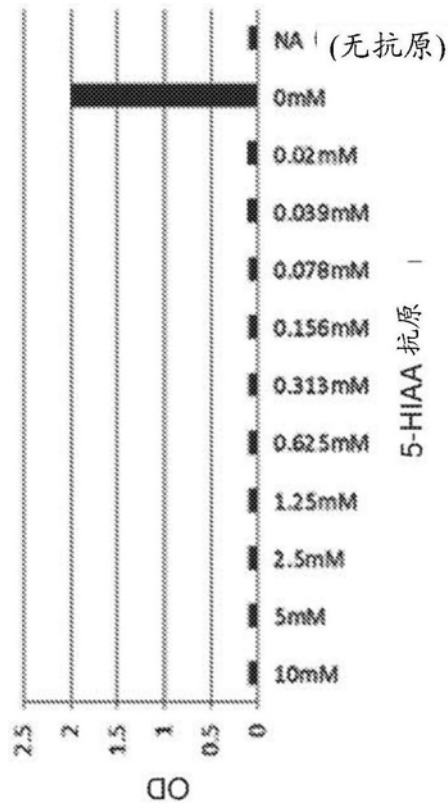


图6B

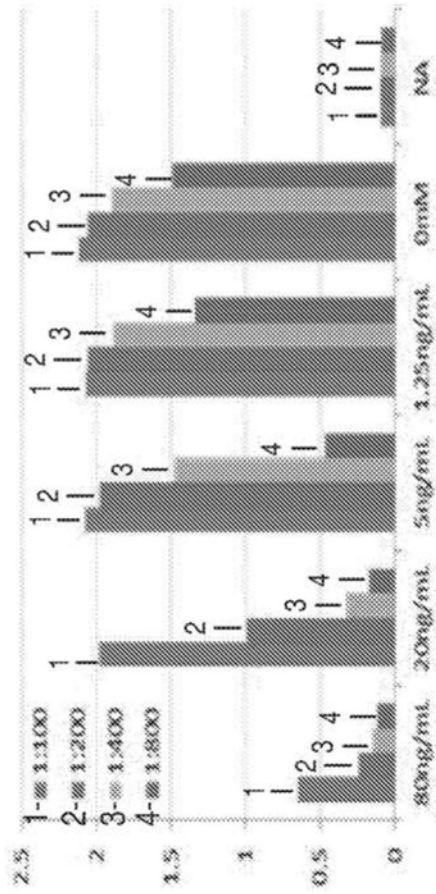


图6C

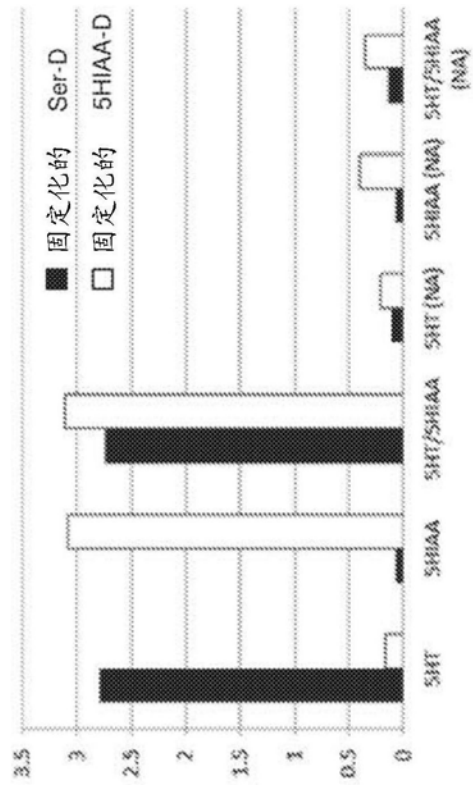


图6D

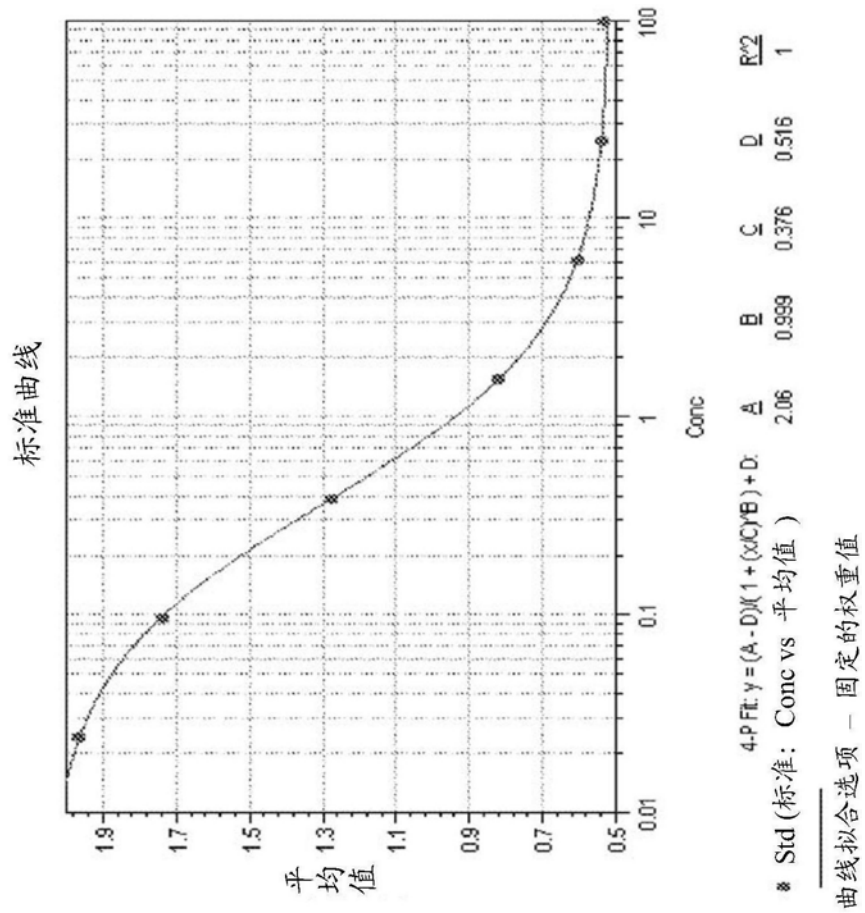


图8

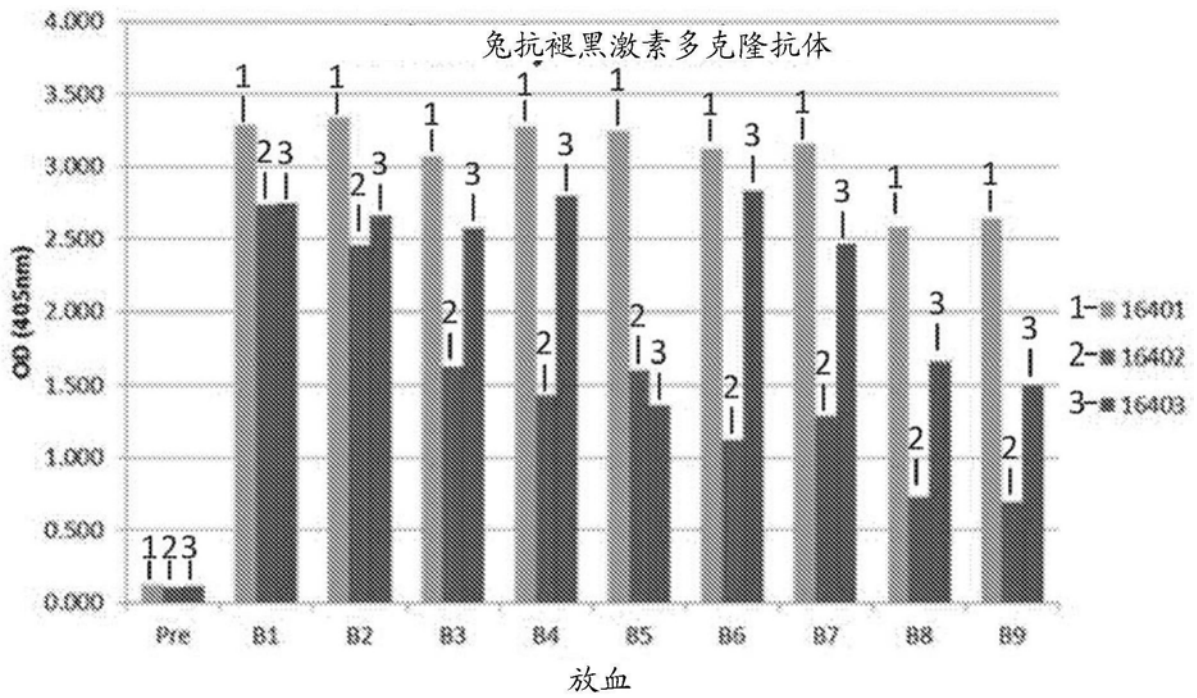


图9

亲和纯化的兔抗褪黑激素多克隆抗体的反应性

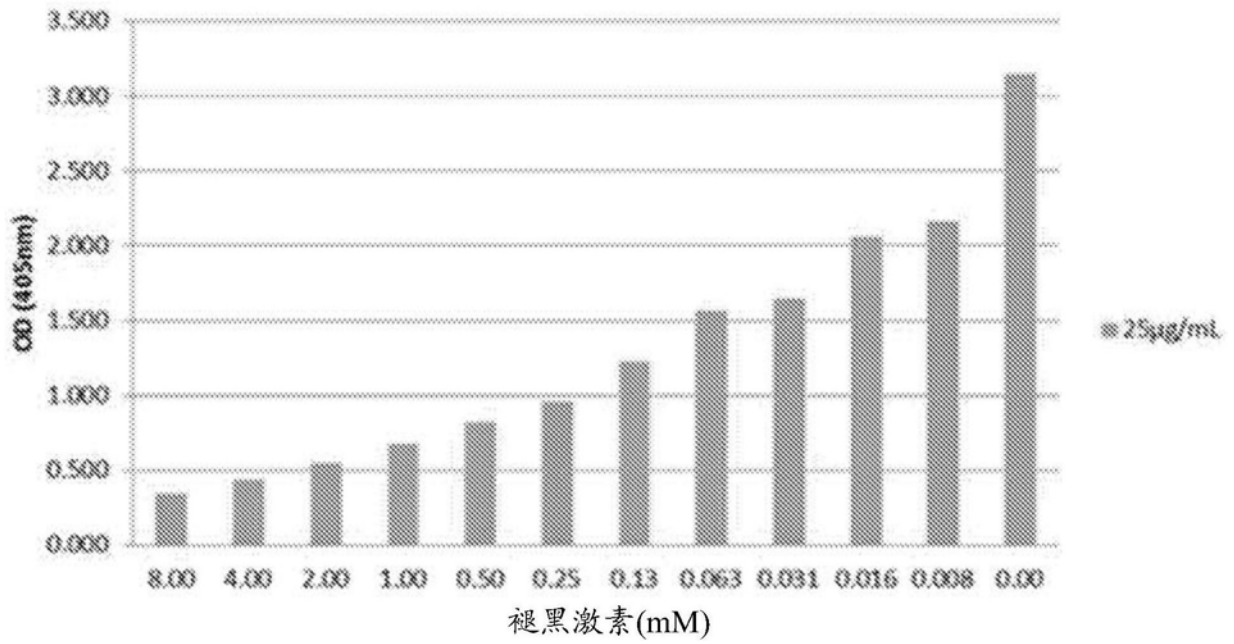


图10A

亲和纯化的兔抗褪黑激素多克隆抗体的结合特异性

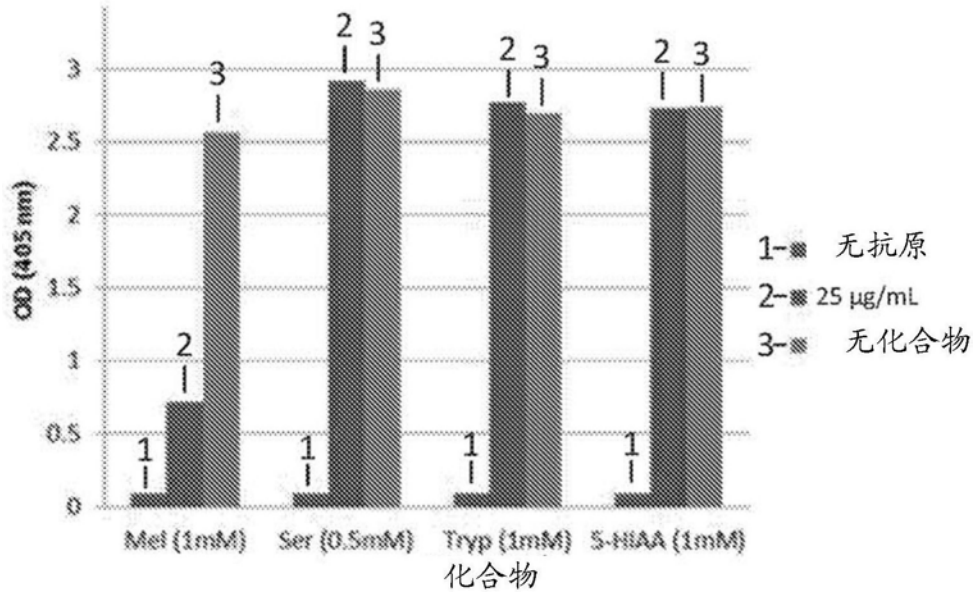


图10B

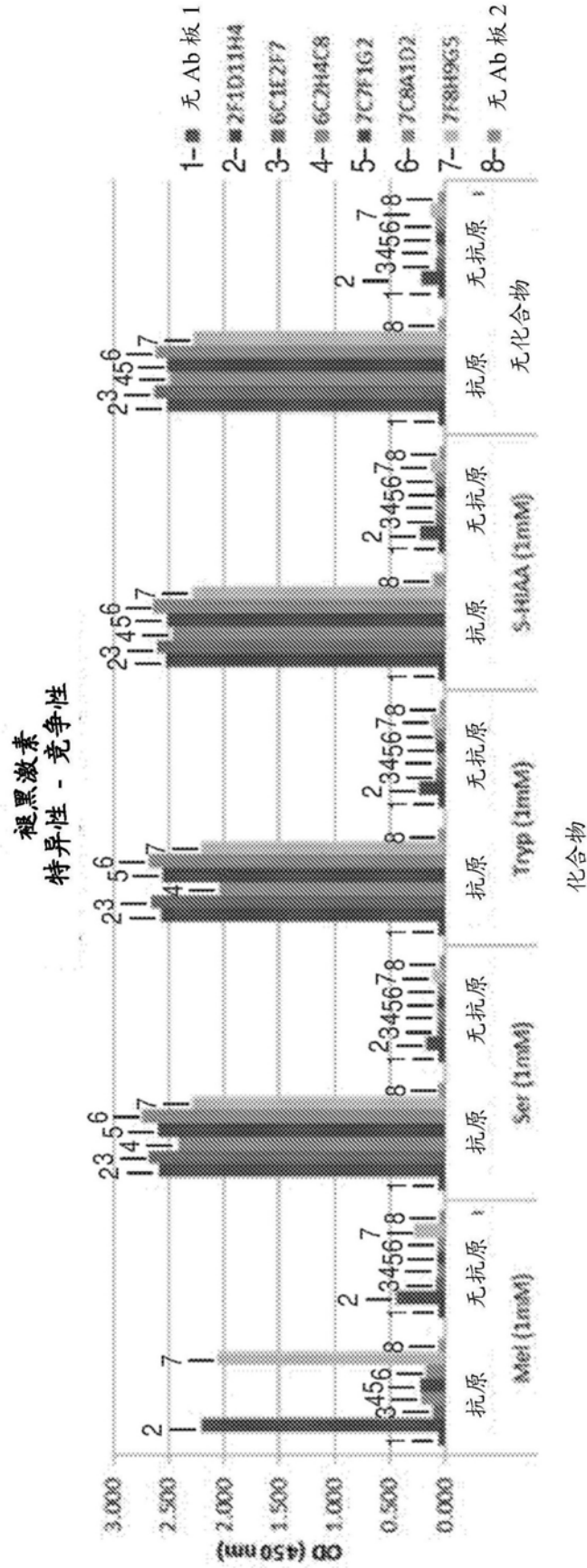


图11

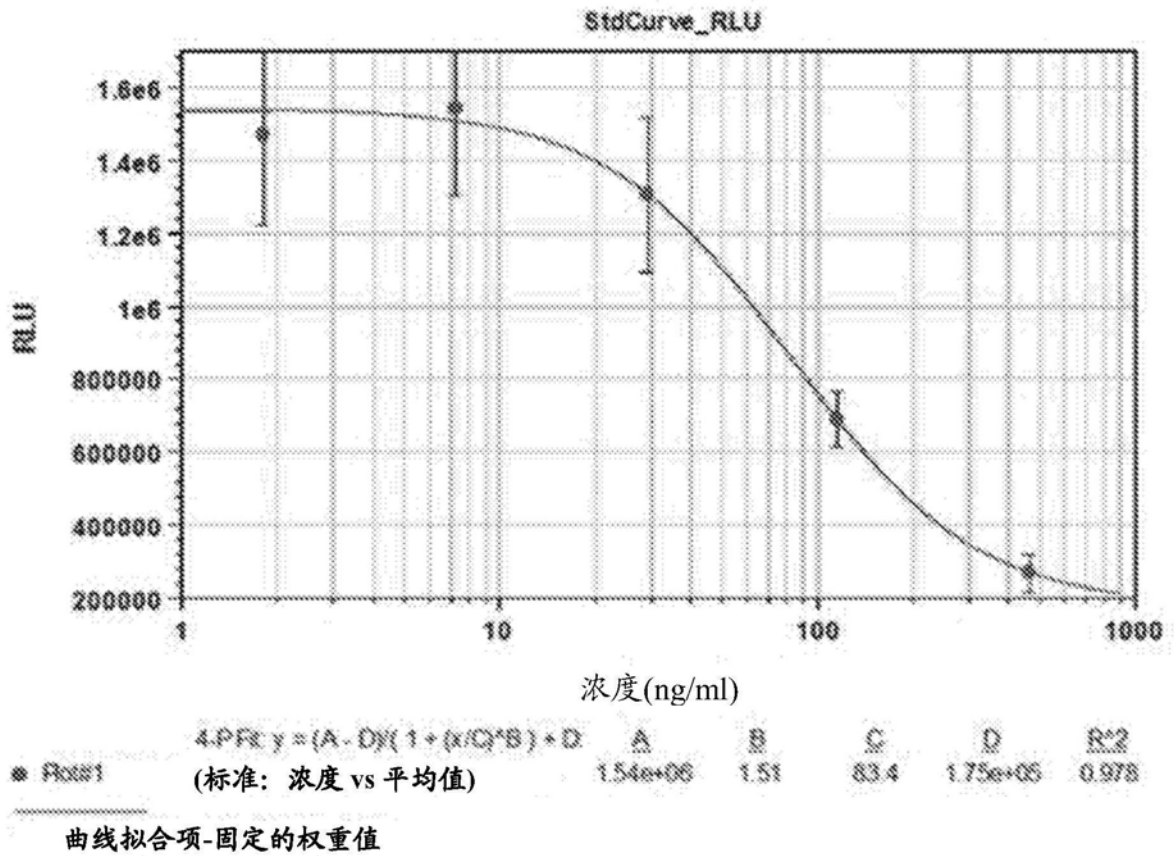


图12

检测兔抗犬尿烯酸多克隆抗体

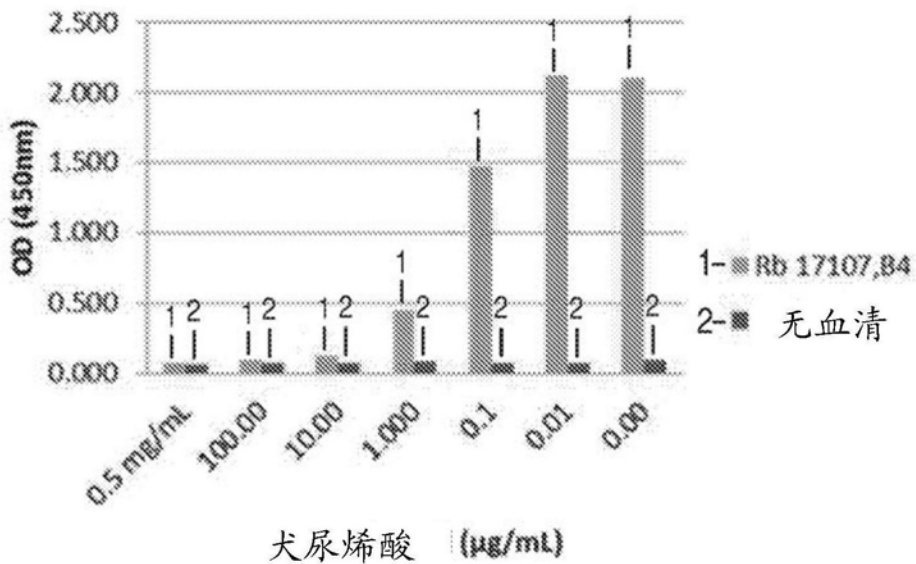


图13A

亲和纯化的兔抗犬尿烯酸多克隆抗体的反应性
竞争性 ELISA

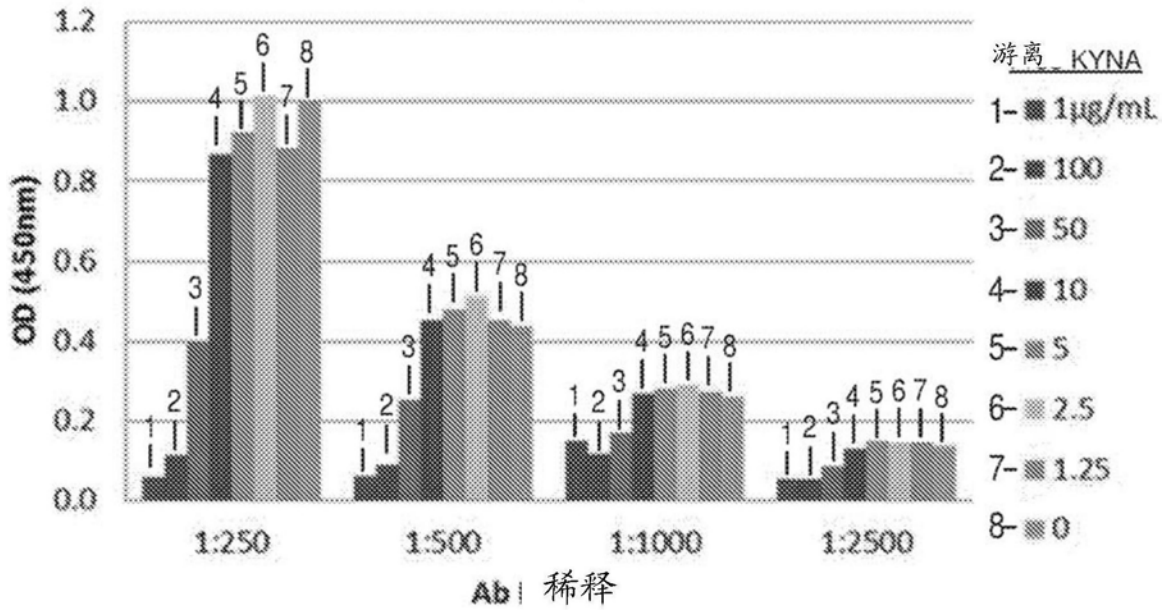


图13B

小鼠抗犬尿烯酸单克隆抗体的反应性

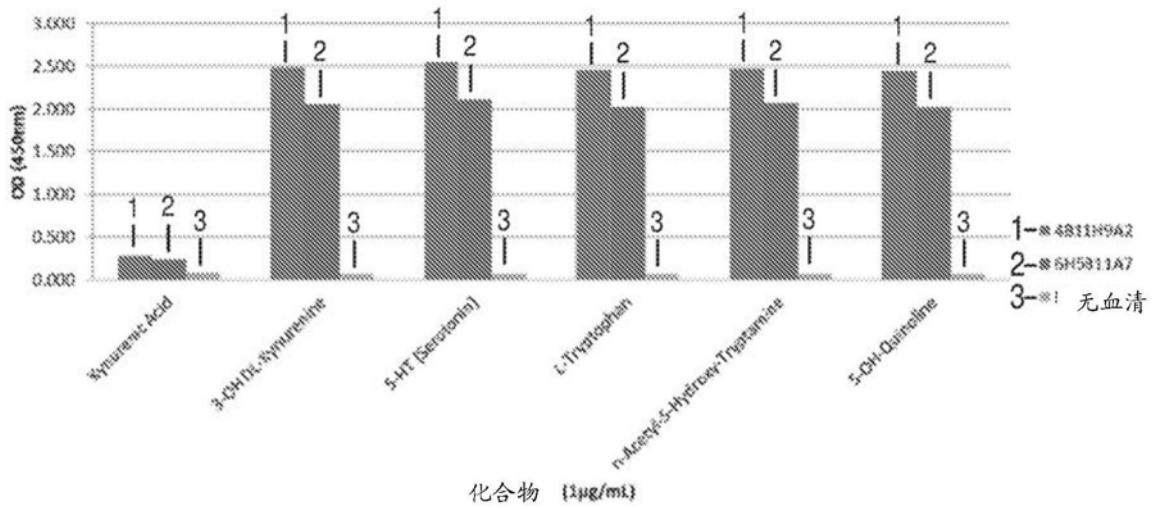


图14A

小鼠抗犬尿烯酸单克隆抗体的系列稀释

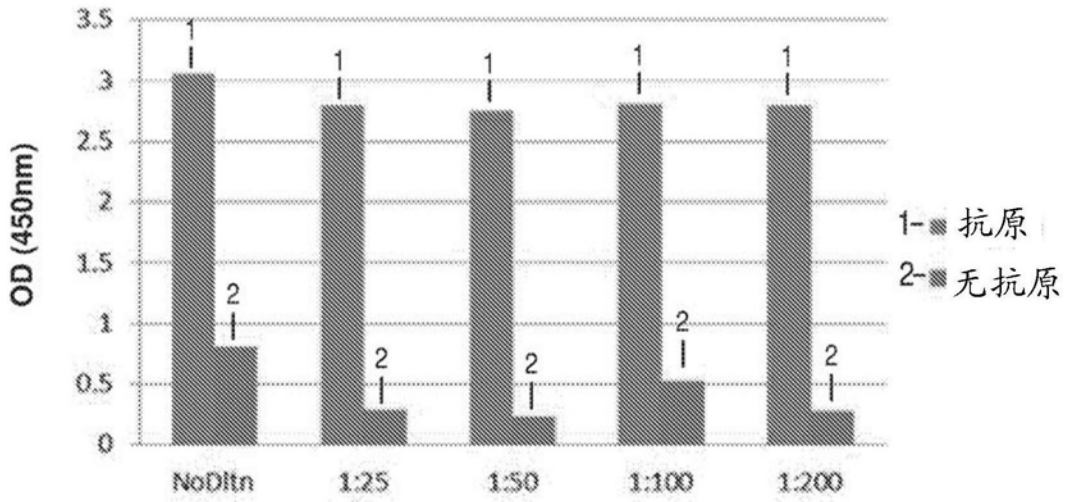


图14B

采用小鼠抗犬尿烯酸单克隆抗体的竞争性 ELISA

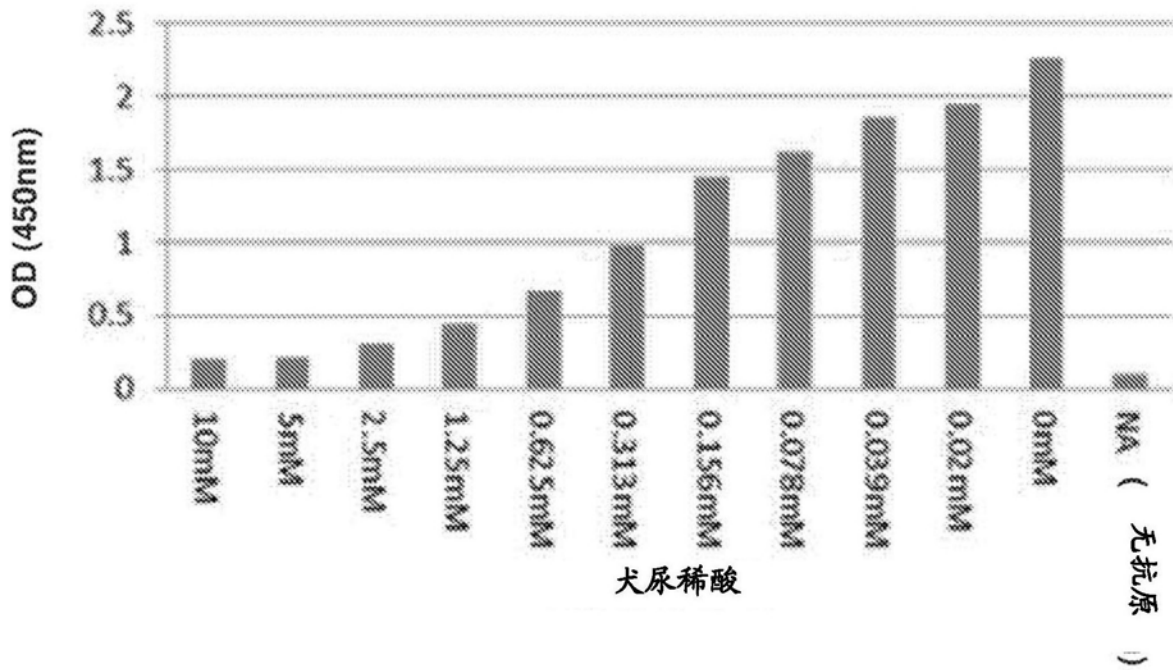


图15A

小鼠抗犬尿烯酸单克隆抗体的反应性

标准曲线

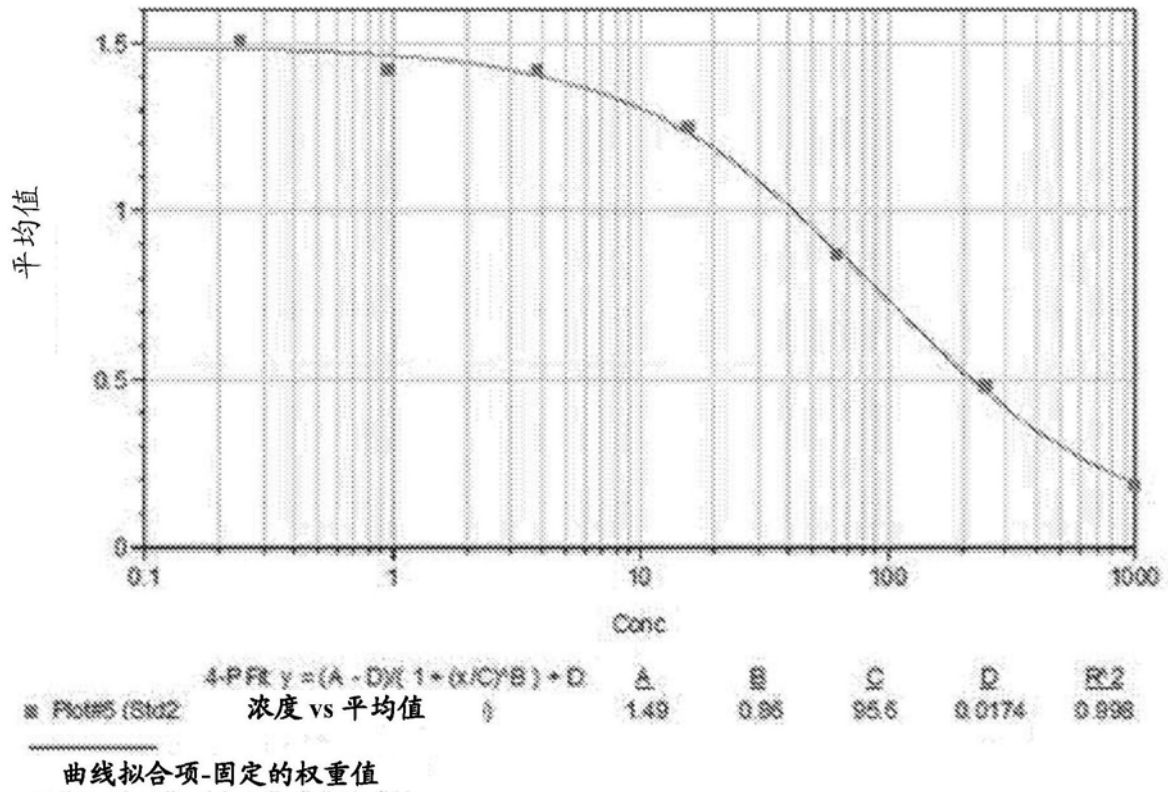


图15B

TMB 底物

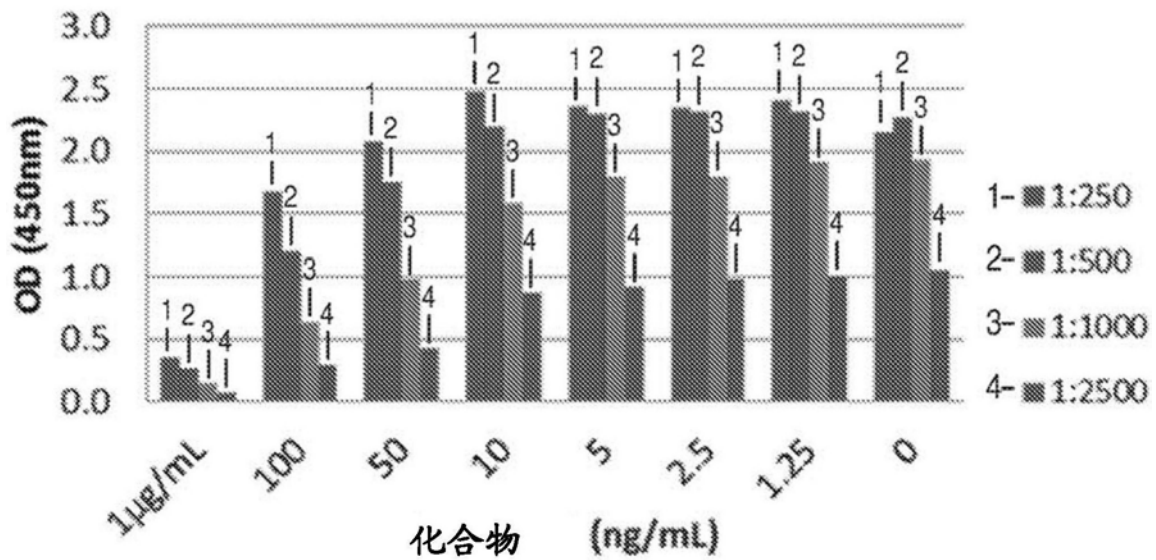


图16A

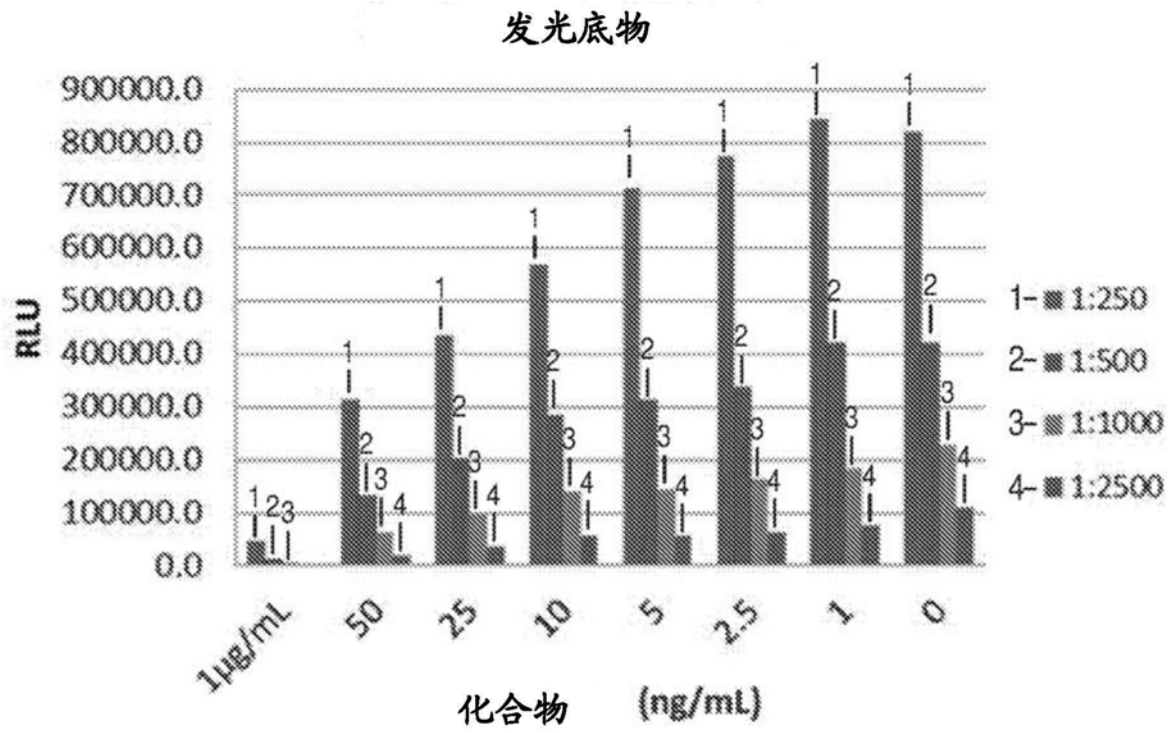


图16B

专利名称(译)	抗血清素、色氨酸和犬尿氨酸代谢产物的抗体及其用途		
公开(公告)号	CN107257805A	公开(公告)日	2017-10-17
申请号	CN201580073766.5	申请日	2015-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	雀巢产品技术援助有限公司		
申请(专利权)人(译)	雀巢产品技术援助有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	雀巢产品技术援助有限公司		
[标]发明人	F塞尔瓦拉 F普林森 S辛格		
发明人	F·塞尔瓦拉 F·普林森 S·辛格		
IPC分类号	C07K16/26 C07K16/44 C12N5/20 G01N33/53 G01N33/68 C12R1/91		
CPC分类号	C07K16/44 C07K16/26 C07K2317/33 G01N33/5308 G01N33/6893 G01N2800/065		
代理人(译)	杨春刚		
优先权	62/082047 2014-11-19 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供针对血清素、色氨酸、犬尿氨酸途径中代谢产物例如5-羟基吲哚-3-乙酸(5-HIAA)、褪黑激素(MT)和犬尿烯酸(KYNA)的抗体和用于制备所述抗体的方法。所述特异性代谢产物抗体对结构相关的代谢产物具有低交叉反应性，并且是可用于特异性和灵敏免疫测定的试剂。本发明还提供将所述抗体用于测量人患者生物样品中5-HIAA、褪黑激素或犬尿烯酸水平的方法。

