



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107003304 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201580068847.6

(22)申请日 2015.12.11

(30)优先权数据

62/093129 2014.12.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.06.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/065215 2015.12.11

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2016/100113 EN 2016.06.23

(71)申请人 西门子医疗保健诊断公司

地址 美国纽约州

(72)发明人 郑一枫 杨雅利 王国平

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 邵长准 罗文锋

(51)Int.Cl.

G01N 33/536(2006.01)

C07K 16/40(2006.01)

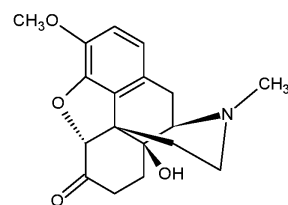
权利要求书4页 说明书24页 附图8页

### (54)发明名称

用于羟考酮和羟吗啡酮的测定法的缀合物

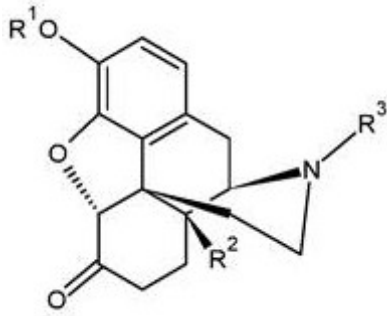
### (57)摘要

公开了针对羟考酮及其代谢物的半抗原、免疫原和免疫测定法的组合物、方法和试剂盒。所述化合物由式I化合物例举。所述方法包括在介质中组合提供(i)怀疑含有羟考酮和/或羟考酮代谢物的样品,式I化合物,其中R<sup>4</sup>或R<sup>5</sup>是标记,和羟考酮或其代谢物的抗体。检查介质中包含标记的式I化合物的复合物的存在,其中诸如复合物的存在指示样品中存在羟考酮或羟考酮代谢物。



羟考酮

1. 式I化合物:

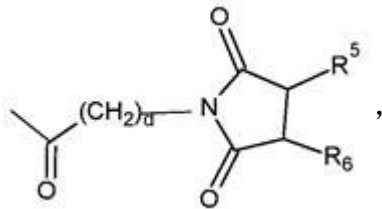


其中:

$R^1$  是H或低级烷基,

$R^2$  是H或OH, 且

$R^3$  是  $-C(O)-(CH_2)_a-(NH-C(O)-(CH_2)_b)_cR^4$ , 其中a是1至10的整数, b是1至10的整数, 且c是0或1至5的整数, 且其中 $R^4$ 是卤素、免疫原性载体或标记; 或者



其中 $R^5$ 是免疫原性载体或标记, 且 $R^6$ 是H, 或其中 $R^5$ 和 $R^6$ 一起形成碳-碳双键。

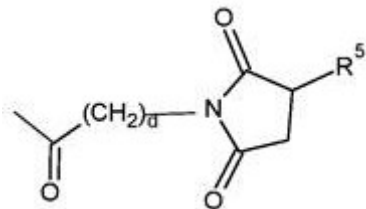
2. 根据权利要求1所述的化合物, 其中 $R^5$ 是酶标记。

3. 根据权利要求2所述的化合物, 其中所述酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶。

4. 根据权利要求3所述的化合物, 其中所述酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 且 $R^3$ 是  $-C(O)-(CH_2)_a-(NH-C(O)-(CH_2)_b)_cR^4$ , 其中a是1且c是0且所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的硫原子连接。

5. 根据权利要求3所述的化合物, 其中所述酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 且 $R^3$ 是  $-C(O)-(CH_2)_a-(NH-C(O)-(CH_2)_b)_cR^4$ , 其中a是1, b是1, 且c是1, 且所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的硫原子连接。

6. 根据权利要求3所述的化合物, 其中所述酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 且 $R^3$ 是



其中d是2且所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的硫原子连接。

7. 用于测定怀疑含有羟考酮或其代谢物的样品中的羟考酮或其代谢物的量的方法, 所述方法包括:

在介质中组合提供:

怀疑含有羟考酮或其代谢物的样品,

根据权利要求2所述的化合物,和  
羟考酮或其代谢物的抗体;

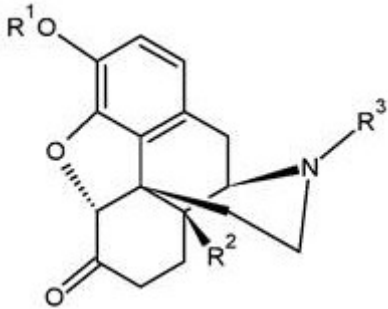
检查介质中包含所述抗体和根据权利要求2所述的化合物的复合物的量,所述复合物的量指示样品中羟考酮或其代谢物的量。

8. 用于测定怀疑含有羟考酮或其代谢物的样品中的羟考酮或其代谢物的量的方法,所述方法包括:

在介质中组合提供:

怀疑含有羟考酮或其代谢物的样品,

式I化合物:

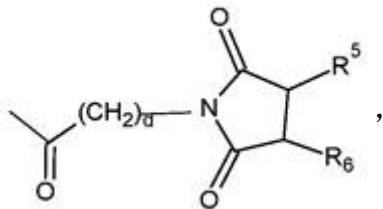


其中:

R<sup>1</sup>是H或低级烷基,

R<sup>2</sup>是H或OH,且

R<sup>3</sup> is  $-C(O)-(CH_2)_a-(NH-C(O)-(CH_2)_b)_cR^4$ , 其中a是1至10的整数,b是1至10的整数,且c是1至5的整数,且其中R<sup>4</sup>是标记;或者



其中R<sup>5</sup>是标记,且R<sup>6</sup>是H,和

羟考酮或其代谢物的抗体;和

检查所述介质中包含所述抗体和式I化合物的复合物的量,所述复合物的量指示样品中羟考酮或其代谢物的量。

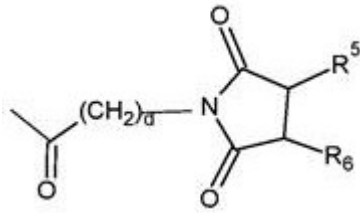
9. 根据权利要求8所述的方法,其中在式I化合物中,所述标记是酶。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中在式I化合物中,所述酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中在式I化合物中,所述酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶且R<sup>3</sup>是 $-C(O)-(CH_2)_a-(NH-C(O)-(CH_2)_b)_cR^4$ , 其中a是1且c是0且所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的硫原子连接。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中在式I化合物中,所述酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶且R<sup>3</sup>是 $-C(O)-(CH_2)_a-(NH-C(O)-(CH_2)_b)_cR^4$ , 其中a是1, b是1, 且c是1, 且所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的硫原子连接。

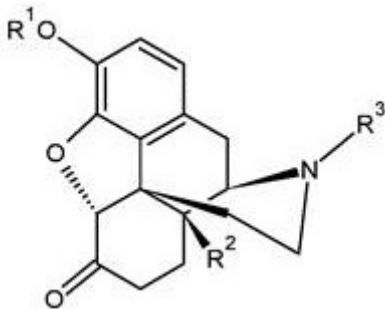
13. 根据权利要求9所述的方法, 其中在式I化合物中, 所述酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶且R<sup>3</sup>是



其中d是2且所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的硫原子连接。

14. 用于测定怀疑含有羟考酮或其代谢物的样品中的羟考酮或其代谢物的量的试剂盒, 所述试剂盒包含:

式I化合物:

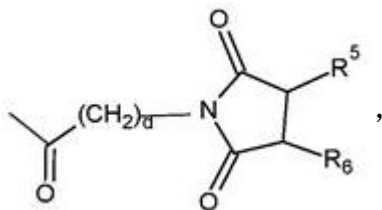


其中:

R<sup>1</sup>是H或低级烷基,

R<sup>2</sup>是H或OH, 且

R<sup>3</sup> is -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-(NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>)<sub>c</sub>R<sup>4</sup>, 其中a是1至10的整数, b是1至10的整数, 且c是1至5的整数, 且其中R<sup>4</sup>是标记; 或者



其中R<sup>5</sup>是标记, 且R<sup>6</sup>是H; 和

羟考酮或其代谢物的抗体。

15. 根据权利要求14所述的试剂盒, 其中在式I化合物中, 所述标记是酶。

16. 根据权利要求15所述的试剂盒, 其中在式I化合物中, 所述酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或辣根过氧化物酶。

17. 根据权利要求15所述的试剂盒, 其中在式I化合物中, 所述酶是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

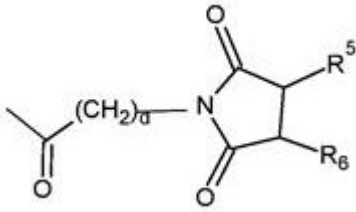
18. 根据权利要求15所述的试剂盒, 其中在式I化合物中, R<sup>3</sup>是

-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-(NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>)<sub>c</sub>R<sup>4</sup>, 其中a是1且c是0且所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的硫原子连接。

19. 根据权利要求15所述的试剂盒, 其中在式I化合物中, R<sup>3</sup>是

-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-(NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>)<sub>c</sub>R<sup>4</sup>,其中a是1,b是1,且c是1,且所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的硫原子连接。

20. 根据权利要求15所述的试剂盒,其中在式I化合物中,R<sup>3</sup>是



且其中d是2且R<sup>5</sup>是通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的硫原子连接的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶且R<sup>6</sup>是H。

## 用于羟考酮和羟吗啡酮的测定法的缀合物

[0001] 本申请根据35 USC § 119 (e) 主张2014年12月17日提交的美国临时申请号62/093,129的权益。上面引用的专利申请的全部内容在此通过引用明确并入本文。

[0002] 背景

本发明涉及用于检测怀疑含有某些麻醉止痛剂的样品中这些麻醉止痛剂的存在和/或量的组合物、方法和试剂盒。具体而言,本发明涉及可用于进行羟考酮及其代谢物诸如例如羟吗啡酮的免疫测定的均质免疫测定和物质组合物。均质免疫测定具有不需要分离步骤的优点。然而,此类测定受到难以提供将调节通常与抗体或分析物的类似物结合的标记的活性的抗体的限制。本发明克服了这些困难并提供了用于制备抗体的免疫原性缀合物和可用于羟考酮及其代谢物的免疫测定中的标记缀合物诸如例如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)缀合物。

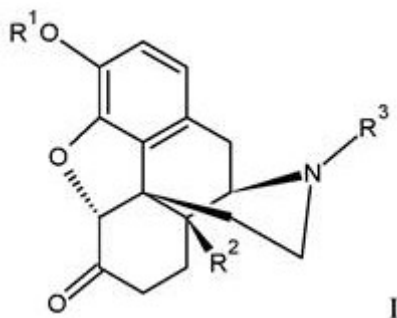
[0003] 多年来,临床诊断领域已经看到了广泛扩展,作为可以容易且准确地确定的多种目标材料以及用于确定的方法。在过去几十年中,治疗药物和滥用药物的检测已经变得司空见惯。这次检测不仅用于监测犯罪分子和吸毒者,而且雇主也将其用于筛选工人。为此目的,已经广泛研究了基于抗体与抗原的反应的免疫测定法。一些类别的免疫测定法包括使用放射性同位素的放射免疫测定法,使用酶的基于酶的免疫测定法(EIA),以及使用荧光标记例如荧光偏振和化学发光标记的发光测定法。

[0004] 临床上重要和有效的止痛剂羟考酮是通常适应于缓解中度至重度疼痛的麻醉止痛剂。羟考酮可作为立即释放和控制释放形式的单一成分药物。羟考酮也与非麻醉成分诸如非甾体抗炎药(NSAID)和对乙酰氨基酚和/或与减少羟考酮的副作用的其它材料一起配制。

[0005] 因此,需要用于检测羟考酮及其主要代谢物诸如例如羟吗啡酮的测定法。所述测定法应当能够检测这些药物,以监测和治疗患者。抗体根据所述原理结合标记缀合物,由此通过抗体与缀合物的结合提供来自缀合物标记的信号的必要调节。

[0006] 概述

根据本文所述的原理的一些实例涉及式I化合物:



其中:

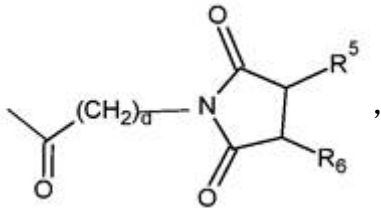
R<sup>1</sup>是H或低级烷基,

R<sup>2</sup>是H或OH,且

R<sup>3</sup>是

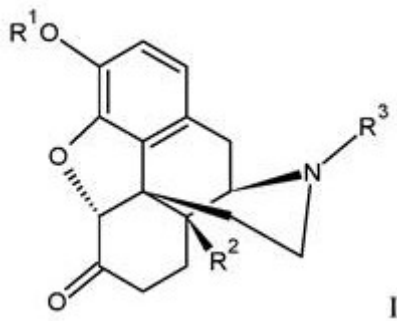
(i)  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_a-(\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_b)_c\text{R}^4$ , 其中a是1至10的整数, b是1至10的整数, 且c是0或1至5的整数, 且其中 $\text{R}^4$ 是卤素、免疫原性载体或标记; 或者

(ii)



其中 $\text{R}^5$ 是免疫原性载体或标记, 且其中 $\text{R}^6$ 是H或与 $\text{R}^5$ 一起形成碳-碳双键。

[0007] 根据本文所述的原理的一些实例涉及用于测定怀疑含有羟考酮或其代谢物的样品中的羟考酮或其代谢物的量的方法。在介质中提供组合。所述组合包含怀疑含有羟考酮或其代谢物的样品、羟考酮或其代谢物的抗体以及式I化合物:



其中:

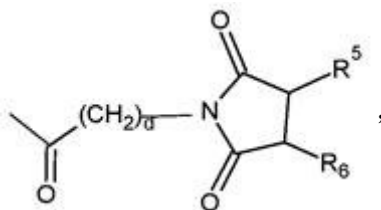
$\text{R}^1$ 是H或低级烷基,

$\text{R}^2$ 是H或OH, 且

$\text{R}^3$ 是

(i)  $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_a-(\text{NH}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_b)_c\text{R}^4$ , 其中a是1至10的整数, b是1至10的整数, 且c是0或1至5的整数, 且其中 $\text{R}^4$ 是标记; 或者

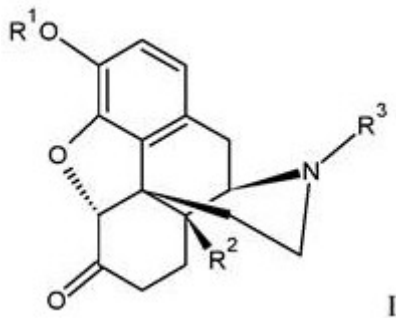
(ii)



其中 $\text{R}^5$ 是标记, 且其中 $\text{R}^6$ 是H。

[0008] 检查介质中包含所述抗体和式I化合物的复合物的量, 其中所述复合物的量指示样品中羟考酮或其代谢物的量。

[0009] 根据本文所述的原理的一些实例涉及用于测定怀疑含有羟考酮或其代谢物的样品中的羟考酮或其代谢物的量的试剂盒。所述试剂盒包含羟考酮或其代谢物的抗体和式I化合物:



其中：

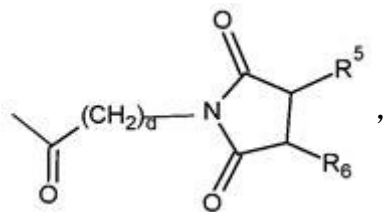
$R^1$ 是H或低级烷基，

$R^2$ 是H或OH，且

$R^3$ 是

(i)  $-C(O)-(CH_2)_a-(NH-C(O)-(CH_2)_b)_cR^4$ ，其中a是1至10的整数，b是1至10的整数，且c是0或1至5的整数，且其中 $R^4$ 是标记；或者

(ii)



其中 $R^5$ 是标记，且其中 $R^6$ 是H。

#### [0010] 附图简述

本文提供的附图不是按比例，并且为了便于理解根据本文所述的原理的某些实例的目的而提供，并且通过说明而非限制所附权利要求的范围的方式来提供。

[0011] 图1表示羟考酮的结构。

[0012] 图2表示羟吗啡酮的结构。

[0013] 图3表示去甲羟考酮的结构。

[0014] 图4表示去甲氢吗啡酮 (norhydromorphone) 的结构。

[0015] 图5是按照根据本文所述的原理的实施例的组合物和方法中采用的化合物的合成的一个实例的示意图。

[0016] 图6是按照根据本文所述的原理的实施例的组合物和方法中采用的化合物的合成的另一个实例的示意图。

[0017] 图7是按照根据本文所述的原理的实施例的组合物和方法中采用的化合物的合成的另一个实例的示意图。

[0018] 图8是按照根据本文所述的原理的实施例的组合物和方法中采用的化合物的合成的另一个实例的示意图。

[0019] 图9是按照根据本文所述的原理的实施例的组合物和方法中采用的化合物的合成的另一个实例的示意图。

[0020] 图10是按照根据本文所述的原理的实施例的组合物和方法中采用的化合物的合成的另一个实例的示意图。

## [0021] 具体实施方案的详述

### 总体讨论

根据本文所述的原理的一些实例涉及用于免疫测定分析物羟考酮和羟考酮代谢物诸如例如羟吗啡酮的方法。根据本文所述的原理的一个实例涉及羟考酮的衍生物或其代谢物之一的衍生物在信号产生系统中的用途。本发明还涉及羟考酮或其代谢物的免疫原在产生用于捕获此类分析物的抗体中的用途。

[0022] 根据本文所述的原理的一些实例涉及通过借助连接基团连接至羟考酮分子的氮原子或羟考酮代谢物分子的氮原子而合成羟考酮及其代谢物的半抗原、免疫原、信号缀合物和生物缀合物。

[0023] 术语“衍生物”是指与另一分子缀合的分子。

[0024] 术语“缀合物”是指由任选地通过连接基团结合在一起以形成单一结构的两个或多个亚结构构成的分子。可以通过亚单位之间的直接连接(例如化学键)或通过使用连接基团来进行结合。在本发明的上下文中,缀合物包含羟考酮或羟考酮代谢物和标记蛋白,诸如酶,诸如例如G6PDH、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和辣根过氧化物酶,或包含羟考酮或羟考酮代谢物和化学标记诸如荧光、发光或比色分子的缀合物。

[0025] 术语“缀合的”或“缀合”是指其中两个亚单位连接在一起以形成缀合物的任何过程。缀合过程可以由任何数量的步骤构成。

[0026] 短语“连接基团”是指化学部分,不计算氢,其可以包含,约2至约50个原子、或约2至约20个原子、或约2至约15个原子、或约2至约10个原子、或约2至约5个原子、或约3至约20个原子、或约3至约15个原子、或约3至约10个原子、或约3至约5个原子、或约5至约20个原子、或约5至约15个原子、或约5至约10个原子,例如每个原子独立地选自碳、氧、硫、氮和磷。所述连接基团可以包含2至约40个原子、或约2至约20个原子、或约2至约15个原子、或约2至约10个原子、或约2至约5个原子、或约3至约10个原子、或约3至约5个原子、或3至约30个原子的链,每个原子独立地选自碳、氧、硫、氮和磷。在一些实例中,部分或全部所述连接基团可以是连接的分子的一部分,诸如但不限于,例如聚(氨基酸)上的氨基酸残基。

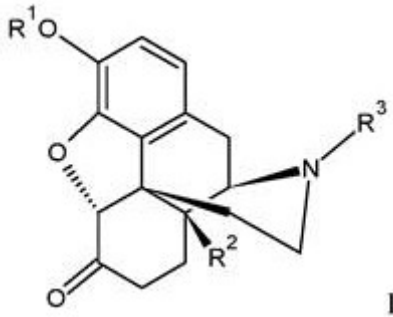
[0027] 连接基团中的杂原子的数目可以是0至约20、或1至约15、或约2至约10、或2至5。所述连接基团可以是脂族或芳族的。当存在杂原子时,氧通常作为键合至碳、硫、氮或磷的氧代或氧基存在,氮通常作为通常键合至碳、氧、硫或磷的硝基、亚硝基或氨基存在;硫与氧相似;而磷通常作为磷酸单或二酯和磷酸单或二酯键合至碳、硫、氧或氮。在连接基团和待缀合的分子之间形成共价键的常见官能团为烷基胺、脒、硫代酰胺、醚、脲、硫脲、胍、偶氮、硫醚和羧酸酯、磺酸酯和磷酸酯、酰胺和硫酯。

[0028] 在一些实例中,当连接基团具有连接官能团(用于与基团反应的官能团),诸如例如,包括氮和硫类似物的非氧代羰基基团、磷酸酯基团、氨基基团,烷基化剂诸如卤代或甲苯磺酰基烷基,氧基(羟基或硫类似物、巯基)氧代羰基(例如,醛或酮),或活性烯烃诸如乙烯基砜或 $\alpha$ -、 $\beta$ -不饱和酯时,这些官能团被连接至胺基团、羧基基团、活性烯烃、烷基化剂,例如溴乙酰基。当连接胺和羧酸或其氮衍生物或磷酸时,形成酰胺、脒和磷酰胺。当连接硫醇和活化烯烃时,形成硫醚。当连接硫醇和烷基化剂时,形成硫醚。当在还原条件下连接醛和胺时,形成烷基胺。当连接酮或醛和羟胺(包括其衍生物,其中取代基取代羟基基团的氢)时,形成肟官能团(=N-O-)。当连接羧酸或磷酸和醇时,形成酯。

[0029] 术语“羟考酮的代谢物”或“羟考酮代谢物”或“羟考酮或其代谢物”是指通过由多种代谢途径之一对羟考酮的代谢以产生一种或多种酮-代谢物而形成的化合物,所述酮-代谢物包括但不限于,例如去甲羟考酮、去甲羟吗啡酮、去甲氢可酮、去甲氢吗啡酮和羟吗啡酮。所得化合物可被进一步葡糖醛酸化;例如,羟吗啡酮被观察到为葡糖苷酸。去甲羟考酮(由羟考酮的N-去甲基化产生)和去甲羟吗啡酮是主要的循环代谢物。羟考酮的O-去甲基化产生羟吗啡酮。此外,羟考酮或酮-代谢物的酮基可以被还原成羟基。例如,羟考酮可以被代谢成 $\alpha$ -和 $\beta$ -羟考醇(oxycodol),羟吗啡酮可以被代谢成 $\alpha$ -和 $\beta$ -羟吗啡酚,且去甲羟考酮可以被代谢成 $\alpha$ -和 $\beta$ -去甲羟考醇(noroxycodol)。

[0030] 化合物

根据本文所述的原理的化合物的实例是式I化合物:



其中:

R<sup>1</sup>是H或低级烷基,

R<sup>2</sup>是H或OH,且

R<sup>3</sup>是

(i)  $-C(O)-(CH_2)_a-(NH-C(O)-(CH_2)_b)_cR^4$ , 其中

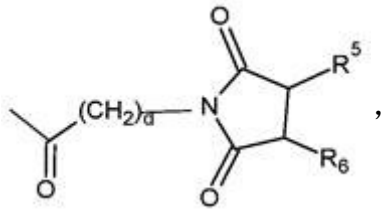
a是例如1至10、或1至9、或1至8、或1至7、或1至6、或1至5、或1至4、或1至3、或1至2、或2至10、或2至9、或2至8、或2至7、或2至6、或2至5、或2至4、或2至3、或3至10、或3至9、或3至8、或3至7、或3至6、或3至5、或3至4、或4至10、或4至9、或4至8、或4至7、或4至6、或4至5、或5至10、或5至9、或5至8、或5至7、或5至6、或6至10、或6至9、或6至8、或6至7、或7至10、或7至9、或7至8、或8至10、或8至9、或9至10的整数;

b是例如1至10、或1至9、或1至8、或1至7、或1至6、或1至5、或1至4、或1至3、或1至2、或2至10、或2至9、或2至8、或2至7、或2至6、或2至5、或2至4、或2至3、或3至10、或3至9、或3至8、或3至7、或3至6、或3至5、或3至4、或4至10、或4至9、或4至8、或4至7、或4至6、或4至5、或5至10、或5至9、或5至8、或5至7、或5至6、或6至10、或6至9、或6至8、或6至7、或7至10、或7至9、或7至8、或8至10、或8至9、或9至10的整数;且

c是例如0或1至5、或1至4、或1至3、或1至2、或2至5、或2至4、或2至3、或3至5、或3至4、或4至5的整数;且

其中R<sup>4</sup>是卤素、免疫原性载体或标记;或者

(ii)



其中R<sup>5</sup>是免疫原性载体或标记,且R<sup>6</sup>是H,或其中R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>一起形成碳-碳双键。

[0031] 术语“低级烷基”是指这样的烷基,其中有机基团中的碳原子数是1至10、或1至9、或1至8、或1至7、或1至6、或1至5、或1至4、或1至3、或1至2、或2至10、或2至9、或2至8、或2至7、或2至6、或2至5、或2至4、或2至3、或3至10、或3至9、或3至8、或3至7、或3至6、或3至5、或3至4、或4至10、或4至9、或4至8、或4至7、或4至6、或4至5、或5至10、或5至9、或5至8、或5至7、或5至6、或6至10、或6至9、或6至8、或6至7、或7至10、或7至9、或7至8、或8至10、或8至9、或9至10。低级烷基的实例,通过说明而非限制的方式,包括例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基和异戊基。

[0032] 术语“卤素”是指溴、氯、碘和氟中的一种或多种。

[0033] 短语“免疫原性载体”是指使得半抗原能够在宿主中诱导免疫应答的分子。免疫原性载体和半抗原的缀合物可以注射入能够引发免疫应答的生物体,诸如但不限于哺乳动物、禽类(例如鸡或鸽)、两栖动物或爬行动物;或者所述缀合物可用于接种体外样品(哺乳动物,包括人、禽类、两栖动物或爬行动物)或以其它方式可用于产生半抗原的结合配偶体的技术中。所述免疫原性载体包括聚(氨基酸)免疫原性化合物和非聚(氨基酸)免疫原性化合物以及支持物。

[0034] 术语“半抗原”是指可以与抗体特异性反应、但本身不能在宿主中引发免疫应答的物质。

[0035] 短语“结合配偶体”是指作为特异性结合对的成员的分子,其是特异性结合另一分子并因此被定义为与另一分子互补的两种不同分子之一。例如,特异性结合对的一个成员可以在表面上或在空腔中具有特异性结合特异性结合对的另一成员的特定空间和极性组织的区域。通过说明而非限制的方式,所述结合配偶体可以是例如抗体或适体(例如,核酸适体或肽适体)。

[0036] 在一个实例中,免疫原性载体可以用作免疫原以诱导免疫应答并引发半抗原的结合配偶体的产生。其它技术包括噬菌体展示和体外选择。免疫原性载体有时也被称为抗原载体。在根据本文所述的原理的一些实例中,合成包含免疫原性载体(包括聚(氨基酸)和非聚(氨基酸)免疫原性载体)的免疫原,并用于制备抗体。半抗原是能够特异性结合至相应抗体的化合物,但本身不充当用于制备所述抗体的免疫原(或抗原)。因此,将半抗原连接至可用于例如产生抗体的免疫原性载体。

[0037] 作为免疫原性载体的聚(氨基酸)的分子量范围(以道尔顿计)为例如约5,000至约10,000,000,或约20,000至约600,000,或约25,000至约250,000。“聚(氨基酸)免疫原性载体部分”包括蛋白诸如,例如,白蛋白、血清蛋白,例如球蛋白、眼晶状体蛋白和脂蛋白。说明性蛋白包括但不限于例如牛血清白蛋白(BSA)、匙孔蛾血蓝蛋白(KLH)、卵卵白蛋白和牛γ球蛋白(BGG)。“非聚(氨基酸)免疫原性载体部分”包括多糖、核酸和颗粒(生物材料和合成材料)。各种免疫原性载体公开于Davalian等人,美国专利号5,089,390,第4栏第57行至第5

栏第5行中,其通过引用并入本文。

[0038] 如上所提及,所述免疫原性载体部分可以是多糖,所述多糖是单糖的高分子量聚合物,其可以天然或合成制备并通常涉及单糖的重复缩合。多糖的实例是淀粉、糖原、纤维素、碳水化合物胶,诸如阿拉伯树胶、琼脂等等。所述多糖还可含有聚(氨基酸)残基和/或脂质残基。

[0039] 如本文所使用,术语“标记”包括聚(氨基酸)标记和非聚(氨基酸)标记。术语“聚(氨基酸)标记”包括作为蛋白的标记,例如但不限于例如酶、抗体、肽和免疫原。对于标记蛋白诸如,例如酶,重均分子量范围将为约10,000至约600,000,或约10,000至约300,000。例如,每约200,000分子量的蛋白通常存在至少一个根据本文所述的原理的化合物(类似物基团),或每约150,000分子量至少约1个,或每约100,000分子量至少约1个,或每约50,000的分子量至少约1个,或每40,000分子量至少约1个,或每30,000分子量至少约1个,或每20,000分子量至少约1个,或每10,000分子量至少约1个,或每5,000分子量至少约1个。在酶的情况下,类似物基团的数目通常为1至约20,约2至约15,约3至约12,或约6至约10。

[0040] 通过说明而非限制的方式,酶包括氧化还原酶诸如,例如脱氢酶,例如葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)和乳酸脱氢酶;涉及过氧化氢的产生和使用过氧化氢将染料前体氧化为染料的酶诸如,例如辣根过氧化物酶、乳过氧化物酶和微过氧化物酶;水解酶诸如,例如碱性磷酸酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶;荧光素酶诸如,例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶;转移酶;酶的组合,诸如但不限于糖氧化酶,例如葡萄糖和半乳糖氧化酶,或杂环氧化酶,诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,其与采用过氧化氢以氧化染料前体的酶(即过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶、乳过氧化物酶或微过氧化物酶)偶联。

[0041] 如本文所使用,术语“非聚(氨基酸)标记”包括不是蛋白的那些标记。所述非聚(氨基酸)标记能够直接被检测或可通过产生可检测信号的反应检测。所述非聚(氨基酸)标记可以是同位素的或非同位素的,并且通过说明而非限制的方式,可以是例如放射性同位素、发光化合物(其包括但不限于例如荧光化合物和化学发光化合物)、编码催化剂的多核苷酸、促进剂(promoter)、染料、辅酶、酶底物、放射性基团、小有机分子(分子量200至2,000)、颗粒和可扩增的多核苷酸序列。

[0042] 短语“小有机分子”是指具有约200至约2,000,或约200至约1,500,或约200至约1,000,或约200至约500的分子量的化合物。此类“小有机分子”包括但不限于例如生物素、荧光分子(诸如荧光素和罗丹明)、化学发光分子和二硝基苯酚。小有机分子的结合配偶体是特异性识别并结合至所述小分子的分子。小分子的结合配偶体由所述小分子的性质限定,并且包括但不限于,例如抗生物素蛋白、链菌抗生物素蛋白、小有机分子的抗体(其包括但不限于荧光分子的抗体(例如荧光素抗体和罗丹明抗体)、化学发光分子的抗体和二硝基苯酚的抗体)。

[0043] 如本文所使用,术语“非标记聚(氨基酸)”和“非免疫原性载体聚(氨基酸)”是指通常不被认为是标记或免疫原性载体的聚(氨基酸),尽管在某些情况下此类部分可以是标记或免疫原性载体。例如,抗体可以不被认为是标记,但如果抗体被修饰以包括信号产生部分或信号产生系统的一部分,则可以是标记。此外,抗体可以不被认为是免疫原性载体,但尽管如此在某些情况下能够是免疫原性载体,因为其分子量高。

[0044] 在一些实例中,非聚(氨基酸)标记可以选自支持物、磁性颗粒、吡啶酯、磁性颗粒

和吡啶酯(诸如例如,吡啶酯标记的顺磁性颗粒)的组合、化学发光颗粒和敏化剂颗粒。

[0045] 术语“共价”是指分子的连接,诸如通过直接连接,例如分子之间或分子和连接基团之间的化学键。术语“非共价”是指分子的连接,其涉及连接至分子的互补特异性结合对(sbp)成员之间的特异性结合。

[0046] 在一些实例中,根据本文所述的原理的化合物可以与支持物结合,例如通过共价或非共价结合。如上所提及,在根据本文所述的原理的一些实例中, $R^4$ 或 $R^5$ 可以是支持物,其可以由有机或无机的、固体或液体的水不溶性材料构成,并且其可以是透明的或部分透明的。所述支持物可具有例如许多形状的任一种,诸如但不限于颗粒(颗粒状支持物),包括珠粒,薄膜、膜、管、孔、条、棒、纤维或平坦表面,诸如例如板或纸。所述支持物可以或可以不在其中采用它的介质中可悬浮。可悬浮支持物的实例是例如聚合物材料,诸如胶乳、脂质双层或脂质体、油滴、细胞和水凝胶以及磁性颗粒。其它支持物组合物包括聚合物,通过说明而非限制的方式,诸如硝化纤维素、醋酸纤维素、聚(氯乙烯)、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚乙烯、聚丙烯、聚(4-甲基丁烯)、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚(对苯二甲酸乙二醇酯)、尼龙、聚(丁酸乙烯酯),例如其可以本身使用或与其它材料结合使用。所述支持物可以用或可以不用例如染料、催化剂或其它可检测基团进一步标记。

[0047] 在根据本文所述的原理的一些实例中,所述支持物可以是颗粒。所述颗粒具有至少约0.02微米且不大于约100微米的平均直径。在一些实例中,所述颗粒具有约0.05微米至约20微米,或约0.3微米至约10微米的平均直径。所述颗粒可以是有机或无机的、可溶胀的或不可溶胀的、多孔的或非多孔的,优选具有通常为约0.7 g/mL至约1.5 g/mL的接近于水的密度,并且由可以是透明的、部分透明的或不透明的材料构成。所述颗粒可以是例如生物材料,诸如细胞和微生物,例如红细胞,白细胞,淋巴细胞,杂交瘤,链球菌,金黄色葡萄球菌和大肠杆菌,病毒。所述颗粒也可以是由有机和无机聚合物、脂质体、胶乳颗粒、磁性或非磁性颗粒、磷脂囊泡、乳糜微粒、脂蛋白等构成的颗粒。在一些实例中,所述颗粒是二氧化铬(chrome)颗粒或胶乳颗粒。

[0048] 磁性颗粒包括顺磁性颗粒、铁磁性颗粒和抗磁性颗粒。此类颗粒包括但不限于例如周期表的周期4-7的过渡金属,包括铬、铜、钴、铝、锰、铁和镍。

[0049] 化学发光颗粒是具有与之缔合的化学发光化合物的颗粒。如本文所使用,短语“与之缔合”意味着化合物诸如例如化学发光化合物和颗粒可以通过例如直接或间接键合、吸附、吸收、并入或溶解来缔合。可以利用的化学发光化合物的实例是美国专利号5,340,716和6,251,581中阐述的那些,其相关公开内容通过引用并入本文。在根据本文所述的原理的一些实例中,化学发光化合物是可光活化物质,其直接或由光敏化激发后,或与单线态氧反应后,经历化学反应以形成亚稳态反应产物,其能够分解,同时或随后发射光(通常在250-1200 nm的波长范围内)。术语“可光活化的”包括“可光化学活化的”。在一些实例中,所述化学发光化合物是与单线态氧反应以形成二氧杂环丁烷或二氧杂环丁酮的那些。后者通常是富电子烯烃。此类富电子烯烃的示例是烯醇醚、烯胺、9-亚烷基-N-烷基-9,10-二氢吡啶(alkylacridan)、芳基乙烯基醚、二噁烯(dioxenes)、芳基咪唑、9-亚烷基-苍耳烷和光泽精。其它化合物包括鲁米诺(luminol)和其它邻苯二甲酰肼,以及借助于通过光化学不稳定保护基团保护它们而被保护免于经历化学发光反应的化学发光化合物,此类化合物包括,例如,萤火虫荧光素、水通道蛋白(aquaporin)和鲁米诺。可以利用的此类化学发光化合物

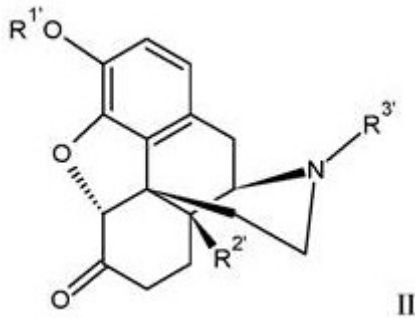
的实例是美国专利号5,709,994 (其相关公开内容通过引用并入本文) 中阐述的那些。

[0050] 敏化剂颗粒是具有与之缔合的敏化剂化合物的颗粒,其包括但不限于光敏剂化合物。可以利用的敏化剂化合物的实例是美国专利号5,340,716和6,251,581 (其相关公开内容通过引用并入本文) 中阐述的那些。

[0051] 光敏剂是通常通过用光激发产生单线态氧的敏化剂。在一些实例中,所述光敏剂比所述化学发光化合物吸收更长的波长且具有比所述化学发光化合物更低的能量三重态。所述光敏剂可以是可光活化的(例如,染料和芳族化合物)。所述光敏剂通常是由共价键合的原子构成的化合物,其通常具有多个共轭双键或三键。所述化合物应当吸收在200-1100 nm,通常300-1000 nm,优选450-950 nm的波长范围内的光。典型的光敏剂包括但不限于例如丙酮、二苯甲酮、9-噻吨酮、曙红、9,10-二溴蒽、亚甲基蓝、金属卟啉(例如血卟啉)、酞菁、叶绿素、玫瑰红、勃克明斯特富勒烯(buckminsterfullerene),以及这些化合物的衍生物。其它光敏剂的实例列举于N.J. Turro, "Molecular Photochemistry", 第132页, W. A. Benjamin Inc., N.Y. 1965中。所述光敏剂有助于其中通过单线态氧活化的光活化。通常,所述光敏剂吸收光且因此形成的经激发的光敏剂使氧活化以产生单线态氧,所述单线态氧与化学发光化合物反应以产生亚稳定发光中间体。

[0052] 在本文阐述的式中,作为键的波形线指示未定义键的立体化学。

[0053] 根据本文所述的原理的一些实例涉及式II化合物,其为式I化合物,其中c是0:



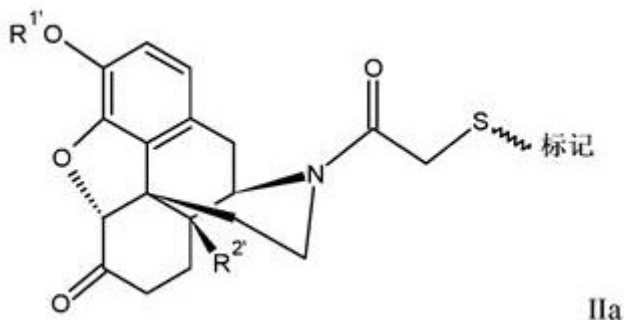
其中:

$R^{1'}$  是H或甲基,

$R^{2'}$  是H或OH,且

$R^{3'}$  是  $-C(O)-(CH_2)_{a'}-R^{4'}$ , 其中  $a'$  是1至10、或1至5、或1至3的整数,且其中  $R^{4'}$  是卤素、免疫原性载体或标记。

[0054] 根据本文所述的原理的式II化合物的一个实例包括,通过说明而非限制的方式,式IIa化合物:



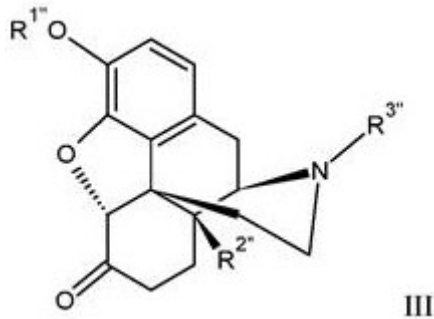
其中：

$R^{1'}$  是H或甲基，

$R^{2'}$  是H或OH，且

标记例如选自脱氢酶，例如，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH) 和乳酸脱氢酶；涉及产生过氧化氢和使用过氧化氢将染料前体氧化成染料的酶，诸如例如辣根过氧化物酶、乳过氧化物酶和微过氧化物酶；水解酶，诸如例如碱性磷酸酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶；荧光素酶，诸如例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶；转移酶；酶，诸如但不限于糖氧化酶，例如葡萄糖和半乳糖氧化酶，或杂环氧化酶，诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶，与利用过氧化氢以氧化染料前体的酶、即过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶、乳过氧化物酶或微过氧化物酶偶联的组合。在一个实例中， $R^{1'}$  是甲基， $R^{2'}$  是OH，且标记是G6PDH。在一个实例中， $R^{1'}$  是H， $R^{2'}$  是OH，且标记是G6PDH。在一个实例中， $R^{1'}$  是甲基， $R^{2'}$  是H，且标记是G6PDH。在一个实例中， $R^{1'}$  是H， $R^{2'}$  是OH，且标记是G6PDH。在一个实例中， $R^{1'}$  是H， $R^{2'}$  是H，且标记是G6PDH。

[0055] 根据本文所述的原理的一些实例涉及式III化合物，其为式I化合物，其中c是1：



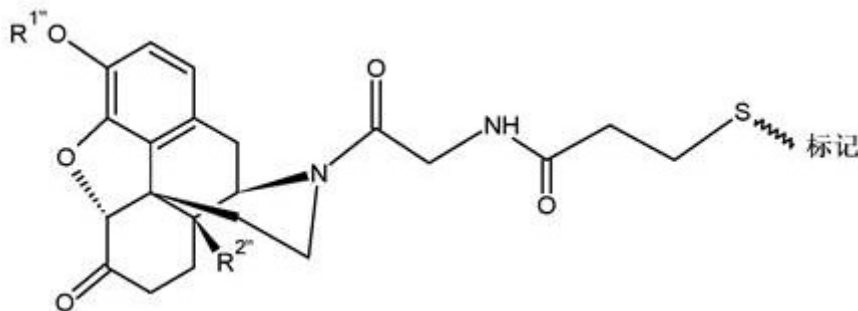
其中：

$R^{1''}$  是H或甲基，

$R^{2''}$  是H或OH，且

$R^{3''}$  是  $-C(O)-(CH_2)_{a''}-NH-C(O)-(CH_2)_{b''}-R^{4''}$ ，其中 $a''$  是1至10、或1至5、或1至3的整数， $b''$  是1至10、或1至5、或1至3的整数，且其中 $R^{4''}$  是卤素、免疫原性载体或标记。

[0056] 根据本文所述的原理的式III化合物的一个实例包括，通过说明而非限制的方式，式IIIa化合物：



其中：

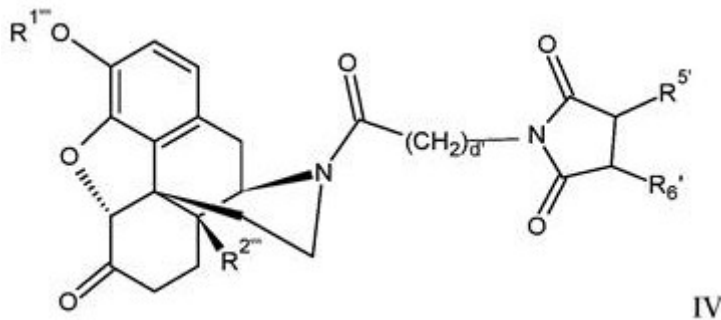
$R^{1''}$  是H或甲基，

$R^{2''}$  是H或OH，且

标记例如选自脱氢酶，例如，葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH) 和乳酸脱氢酶；涉及产生过氧化氢和使用过氧化氢将染料前体氧化成染料的酶，诸如例如辣根过氧化物酶、乳过氧化物

物酶和微过氧化物酶;水解酶,诸如例如碱性磷酸酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶;荧光素酶,诸如例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶;转移酶;酶,诸如但不限于糖氧化酶,例如葡萄糖和半乳糖氧化酶,或杂环氧化酶,诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,与利用过氧化氢以氧化染料前体的酶、即过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶、乳过氧化物酶或微过氧化物酶偶联的组合。在一个实例中, $R^{1''}$ 是甲基, $R^{2''}$ 是OH,且标记是G6PDH。在一个实例中, $R^{1''}$ 是H, $R^{2''}$ 是OH,且标记是G6PDH。在一个实例中, $R^{1''}$ 是甲基, $R^{2''}$ 是H,且标记是G6PDH。在一个实例中, $R^{1''}$ 是H, $R^{2''}$ 是OH,且标记是G6PDH。在一个实例中, $R^{1''}$ 是H, $R^{2''}$ 是H,且标记是G6PDH。

[0057] 根据本文所述的原理的一些实例涉及式IV化合物,其为式I化合物,其中:



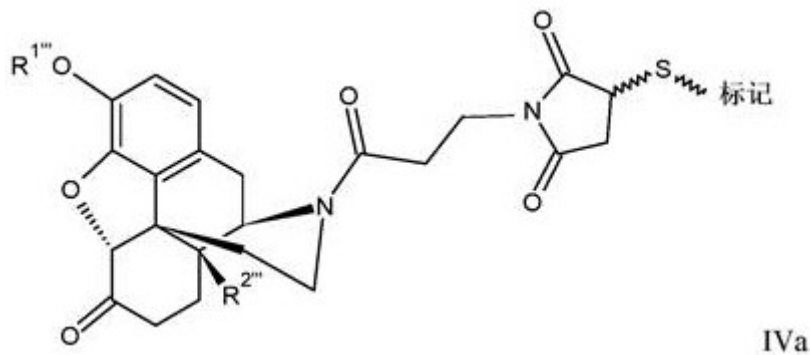
其中:

$R^{1''}$ 是H或甲基,

$R^{2''}$ 是H或OH,且

其中 $R^5$ 是卤素、免疫原性载体或标记,且 $R^6$ 是H。

[0058] 根据本文所述的原理的式IV化合物的一个实例包括,通过说明而非限制的方式,式IVa化合物:



其中:

$R^{1''}$ 是H或甲基,

$R^{2''}$ 是H或OH,且

标记例如选自脱氢酶,例如,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)和乳酸脱氢酶;涉及产生过氧化氢和使用过氧化氢将染料前体氧化成染料的酶,诸如例如辣根过氧化物酶、乳过氧化物酶和微过氧化物酶;水解酶,诸如例如碱性磷酸酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶;荧光素酶,诸如例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶;转移酶;酶,诸如但不限于糖氧化酶,例如葡萄糖和半乳糖氧化酶,或杂环氧化酶,诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶,与利用过氧化氢以氧化染料前体的酶、即过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶、乳过氧化物酶或微过氧化物酶偶联的组合。在一个实例中, $R^{1''}$ 是甲基, $R^{2''}$ 是OH,且标记是G6PDH。在一个实例中, $R^{1''}$ 是H, $R^{2''}$ 是OH,且标记

是G6PDH。在一个实例中, R<sup>1''</sup>是甲基, R<sup>2''</sup>是H, 且标记是G6PDH。在一个实例中, R<sup>1''</sup>是H, R<sup>2''</sup>是OH, 且标记是G6PDH。在一个实例中, R<sup>1''</sup>是H, R<sup>2''</sup>是H, 且标记是G6PDH。

#### [0059] 化合物的制备

通过说明而非限制的方式, 下文讨论制备作为根据本文所述的原理的化合物的方法的实例。可以采用其它方法以形成上述化合物和与本文所述的原理一致的其它化合物。

[0060] 通过说明而非限制的方式, 下文参考图5阐述根据本文所述的原理的化合物的制备的一个实例。在一种或多种极性有机溶剂, 诸如例如醚, 诸如例如四氢呋喃 (THF) 或1,4-二氧杂环己烷; 酰胺, 诸如例如二甲基甲酰胺 (DMF); 和胺, 诸如例如三乙胺或N,N-二异丙基乙胺存在的情况下, 使去甲羟考酮的HCl衍生物 (X) 与琥珀酰亚胺乙酸酯溴化物 (XI) 反应。反应组分经受用于形成式XII化合物的条件。在一些实例中, 反应期间的温度是约15°C至约25°C, 或室温。反应时间段是约1小时至约4小时或约1.5小时至约2小时。所述反应在惰性气氛诸如例如氮气或氩气或两种或更多种惰性气体的混合物中实施。所得产物 (其为去甲羟考酮溴乙酰胺 (XII) 和去甲羟考酮氯乙酰胺 (XIII) 的混合物) 可以经受一种或多种色谱技术诸如例如薄层色谱法 (TLC)、柱色谱法或制备型高效液体色谱法 (HPLC), 并且用金属溴化物盐诸如钠、钾或锂的溴化物盐, 例如在极性有机溶剂诸如例如一种或多种酮诸如例如丙酮或丁酮中, 在用于形成所需去甲羟考酮溴乙酰胺 (XII) 的条件下, 处理所述产物。在一些实例中, 反应期间的温度为约45°C至约65°C或约50°C至约60°C。反应时间段为约20小时至约40小时, 或约24小时至约30小时。所述反应在惰性气氛诸如例如氮气或氩气或两种或更多种惰性气体的混合物中实施。所得产物, 去甲羟考酮溴乙酰胺 (XII), 可以经受一种或多种色谱技术诸如例如薄层色谱法 (TLC)、柱色谱法或制备型HPLC。

[0061] 通过与活化的G6PDH反应由化合物XII形成G6PDH缀合物 (XIV)。使用合适的柱诸如例如SEPHADEX®柱且使用缓冲液诸如例如磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES) 缓冲液或三(羟甲基) 氨基甲烷 (Tris) 缓冲液交换G6PDH溶液。用活化剂诸如例如用于还原酶的二硫化物基团的试剂处理G6PDH以形成游离的巯基或硫醇。用于还原二硫化物基团的试剂包括但不限于例如含硫还原剂, 诸如例如二硫苏糖醇 (DTT) 和2-巯基乙醇 (2ME)、二硫赤藓糖醇 (DTE)、半胱氨酸、巯基乙酸、2-氨基乙硫醇、N-乙酰半胱氨酸, 或其它还原剂, 诸如例如硼氢化物, 例如硼氢化钠或吡啶硼烷, 或磷, 例如三-(2-羧乙基) 膦盐酸盐和亚硫酸氢盐溶液, 特别是偏亚硫酸氢盐溶液 (MBS) 或亚硫酸氢钠, 且包括彼此相容的两种或更多种上述还原剂的组合。将活化的G6PDH与化合物XII组合以得到化合物XIV。反应组分经受用于形成式XIV化合物的条件。在一些实例中, 反应期间的温度为约0°C至约10°C, 或约2°C至约8°C。反应时间段为约12小时至约24小时, 或约15小时至约20小时。所得酶缀合物XIV可以经受一种或多种色谱技术, 诸如例如柱色谱法、TLC、Sephadex®凝胶色谱法、疏水色谱法、亲和色谱法、离子交换色谱法、凝胶过滤色谱法或反相色谱法。

[0062] 通过说明而非限制的方式, 下文参考图6阐述根据本文所述的原理的化合物的制备的另一个实例。在如上面对于图5的实例描述的条件下, 使去甲羟吗啡酮的HCl衍生物 (XV) 与琥珀酰亚胺乙酸酯溴化物 (XI) 反应。所得产物 (其为去甲羟吗啡酮溴乙酰胺 (XVII) 和去甲羟吗啡酮氯乙酰胺 (XVIII) 的混合物) 可以经受如上所讨论的一种或多种色谱技术, 并且在极性有机溶剂中在如上面对于图5的实例描述的用于形成所需去甲羟吗啡酮溴乙酰胺 (XVII) 的条件下, 用金属溴化物盐处理所述产物。

[0063] 如上面对于图5的实例所讨论,通过与活化的G6PDH反应,由化合物XVII形成G6PDH缀合物(XIX)。G6PDH经受缓冲液交换,然后如上所述用活化剂处理。将活化的G6PDH与化合物XVII组合以得到化合物XIX。如上面对于图5中的实例所述,反应组分经受用于形成式XIX化合物的条件。如上所讨论,所得酶缀合物XIX可以经受一种或多种色谱技术。

[0064] 通过说明而非限制的方式,下文参考图7阐述根据本文所述的原理的化合物的制备的另一个实例。使去甲羟吗啡酮的HCl衍生物(XV)与BA甘氨酸NHS酯(XX)(BA甘氨酸NHS酯是溴乙酰甘氨酸N-羟基琥珀酰亚胺酯)反应。在极性有机溶剂诸如例如,一种或多种醚诸如例如THF,酰胺诸如例如DMF,酮诸如例如丙酮或丁酮中,在用于形成所需去甲羟吗啡酮溴乙酰胺(XXI)的条件下,实施反应。在一些实例中,反应期间的温度为约15°C至约35°C,或约20°C至约25°C。反应时间段为约15分钟至约4小时,或约20分钟至约2小时。所述反应在惰性气氛诸如例如氮气或氩气或两种或更多种惰性气体的混合物中实施。如上面对于图5的实例所讨论,所得产物去甲羟吗啡酮溴乙酰胺(XXI)可以经受一种或多种色谱技术。

[0065] 如上面对于图5的实例所讨论,通过与活化的G6PDH反应,由化合物XXI形成G6PDH缀合物(XXIII)。G6PDH经受缓冲液交换,然后如上所述用活化剂处理。将活化的G6PDH与化合物XXI组合以得到化合物XXIII。如上面对于图5中的实例所述,反应组分经受用于形成式XXIII化合物的条件。如上所讨论,所得酶缀合物XXIII可以经受一种或多种色谱技术。

[0066] 通过说明而非限制的方式,下文参考图8阐述根据本文所述的原理的化合物的制备的另一个实例。使去甲氢吗啡酮的HCl衍生物(XXV)与BA甘氨酸NHS酯(XX)反应。在极性有机溶剂诸如例如,一种或多种醚诸如例如THF,酰胺诸如例如DMF,酮诸如例如,氮气或氩气或两种或更多种惰性气体的混合物中,在用于形成所需去甲羟吗啡酮溴乙酰胺(XXVI)的条件下,实施反应。在一些实例中,反应期间的温度为约15°C至约35°C,或约20°C至约25°C。反应时间段为约10分钟至约4小时,或约20分钟至约2小时。所述反应在惰性气氛诸如例如氮气或氩气或两种或更多种惰性气体的混合物中实施。如上面对于图5的实例所讨论,所得产物去甲氢吗啡酮溴乙酰胺(XXVI)可以经受一种或多种色谱技术。

[0067] 如上面对于图5的实例所讨论,通过与活化的G6PDH反应,由化合物XXVI形成G6PDH缀合物(XXVIII)。G6PDH经受缓冲液交换,然后如上所述用活化剂处理。将活化的G6PDH与化合物XXVI组合以得到化合物XXVIII。如上面对于图5中的实例所述,反应组分经受用于形成式XXVIII化合物的条件。如上所讨论,所得酶缀合物XXVIII可以经受一种或多种色谱技术。

[0068] 通过说明而非限制的方式,下文参考图9阐述根据本文所述的原理的化合物的制备的另一个实例。在如上面对于图7的实例描述的条件下,使去甲羟考酮的HCl衍生物(X)与3-马来酰亚胺丙酸N-羟基琥珀酰亚胺(XXX)反应。如上面对于图5的实例所讨论,所得产物(其为去甲羟考酮马来酰亚胺(XXXI))可以经受一种或多种色谱技术。

[0069] 如上面对于图5的实例所讨论,通过与活化的G6PDH反应,由化合物XXXI形成G6PDH缀合物(XXXII)。G6PDH经受缓冲液交换,然后如上所述用活化剂处理。将活化的G6PDH与化合物XXXI组合以得到化合物XXXII。如上面对于图5中的实例所述,反应组分经受用于形成式XXXII化合物的条件。如上所讨论,所得酶缀合物XXXII可以经受一种或多种色谱技术。

[0070] 通过说明而非限制的方式,下文参考图10阐述根据本文所述的原理的化合物的制备的另一个实例。在如上面对于图7的实例描述的条件下,使去甲羟吗啡酮的HCl衍生物(XV)与3-马来酰亚胺丙酸N-羟基琥珀酰亚胺(XXX)反应。如上面对于图5的实例所讨论,所

得产物(其为去甲羟吗啡酮马来酰亚胺(XXXV))可以经受一种或多种色谱技术。

[0071] 如上面对于图5的实例所讨论,通过与活化的G6PDH反应,由化合物XXXV形成G6PDH缀合物(XXXVI)。G6PDH经受缓冲液交换,然后如上所述用活化剂处理。将活化的G6PDH与化合物XXXV组合以得到化合物XXXVI。如上面对于图5中的实例所述,反应组分经受用于形成式XXXVI化合物的条件。如上所讨论,所得酶缀合物XXXVI可以经受一种或多种色谱技术。

[0072] 根据本文所述的原理的其它化合物可以以与上述的方式类似的方式制备。

[0073] 结合配偶体的制备

根据本文所述的原理的化合物的实例(其中R<sup>4</sup>或R<sup>5</sup>是免疫原性载体)可以用于制备羟考酮和/或羟考酮代谢物中的一种或多种的结合配偶体。结合配偶体例如包括但不限于,羟考酮和/或其代谢物中的一种或多种的适体,其包括但不限于对羟考酮特异性的抗体、对羟吗啡酮特异性的抗体、对去甲羟考酮特异性的抗体和对去甲氢吗啡酮特异性的抗体。

[0074] 抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体,且可以包括完整免疫球蛋白或其片段,所述免疫球蛋白例如包括但不限于各种类别和同种型诸如IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。其片段可以包括Fab、Fv和F(ab')<sub>2</sub>、Fab'等。另外,适当时,可以使用免疫球蛋白或其片段的聚集物、聚合物和缀合物,只要维持对于特定分子的结合亲和力。

[0075] 根据本文所述的原理的抗体可以通过以下技术制备,包括但不限于例如免疫宿主并收集血清(多克隆),制备连续杂交细胞系并收集分泌的蛋白(单克隆),或克隆和表达至少编码特异性结合天然抗体所需的氨基酸序列的核苷酸序列或其诱变版本。

[0076] 可以通过技术诸如制备连续杂交细胞系并收集分泌的蛋白(体细胞杂交技术)来制备单克隆抗体。可以根据Köhler和Milstein, *Nature* 265:495-497, 1975的标准技术来产生单克隆抗体。单克隆抗体技术的综述见于Lymphocyte Hybridomas,编辑Melchers等人, Springer-Verlag (New York 1978), *Nature* 266: 495 (1977), *Science* 208: 692 (1980)和Methods of Enzymology 73 (Part B): 3-46 (1981)。

[0077] 在用于制备抗体的另一种方法中,可以从染色体DNA切出编码抗体结合位点的序列,并插入克隆载体,其可以在细菌中表达,以产生具有相应的抗体结合位点的重组蛋白。该方法涉及克隆和表达至少编码特异性结合天然抗体所需的氨基酸序列的核苷酸序列或其诱变版本。

[0078] 在用于生产单克隆抗体的一种方法中,第一步骤例如包括用免疫原免疫产生抗体的动物,诸如小鼠、大鼠、山羊、绵羊或牛,所述免疫原包含式I化合物,其中Z为免疫原性载体。免疫可在使用或不使用佐剂下进行,所述佐剂诸如完全弗氏佐剂或其它佐剂,诸如单磷酸脂质A和合成的海藻糖二棒杆菌分枝菌酸酯(trehalose dicorynomycolate)佐剂。下一步骤包括将脾细胞与产生抗体的动物分离,并诸如通过使用聚乙二醇或其它技术使所述产生抗体的脾细胞与适当的融合配偶体,通常是骨髓瘤细胞融合。通常,所使用的骨髓瘤细胞是通常在次黄嘌呤-胸苷(HT)培养基中生长、但不能在次黄嘌呤-氨基嘌呤-胸苷(HAT)培养基中生长、用于选择融合细胞的那些。下一步骤包括选择融合细胞,通常通过在HAT培养基中选择。下一步骤包括使用免疫测定诸如例如酶联免疫吸附测定法(ELISA)或其它适于筛选的免疫测定法来筛选用于产生适当的抗体的克隆杂合体。

[0079] 可以通过筛选方法来选择具有必需特异性的抗体(根据本文所述的原理由免疫原制备),所述筛选方法,通过说明而非限制的方式,例如包括ELISA、斑点印迹、Western分析

和表面等离子体共振。以该方式,获得抗体,其在特定测定中结合羟考酮或羟考酮的代谢物并且不在任何可检测程度上结合非目标的其它分子。在根据本文所述的原理的一些实例中,结合羟考酮或羟考酮的代谢物的抗体对于羟考酮或羟考酮的代谢物具有以下结合亲和力:例如,约 $10^7$ 至约 $10^{14}$ 升/摩尔,或约 $10^7$ 至约 $10^{11}$ 升/摩尔,或约 $10^7$ 至约 $10^{12}$ 升/摩尔,或约 $10^8$ 至约 $10^{14}$ 升/摩尔,或约 $10^8$ 至约 $10^{11}$ 升/摩尔,或约 $10^8$ 至约 $10^{12}$ 升/摩尔。短语“任何可检测的程度”意指特异性结合羟考酮或羟考酮的代谢物的抗体对于非目标分子具有以下结合亲和力:例如,小于约 $10^4$ 升/摩尔,或小于约 $10^3$ 升/摩尔,或小于约 $10^2$ 升/摩尔,或小于约10升/摩尔。

[0080] 在一个实例中,通过说明而非限制的方式,根据本文所述的原理,从上述式I化合物(其中 $R^1$ 是甲基, $R^2$ 是OH且 $R^4$ 或 $R^5$ 是免疫原性载体)制备的免疫原用于制备对例如羟考酮特异性的抗体。

[0081] 在另一个实例中,通过说明而非限制的方式,根据本文所述的原理,从上述式I化合物(其中 $R^1$ 是H, $R^2$ 是OH且 $R^4$ 或 $R^5$ 是免疫原性载体)制备的免疫原用于制备对例如羟吗啡酮特异性的抗体。

[0082] 在另一个实例中,通过说明而非限制的方式,根据本文所述的原理,从上述式I化合物(其中 $R^1$ 是H, $R^2$ 是H且 $R^4$ 或 $R^5$ 是免疫原性载体)制备的免疫原用于制备对例如去甲氢吗啡酮特异性的抗体。

#### [0083] 羟考酮和羟考酮的代谢物的测定的一般描述

根据本文所述的原理的一些实例涉及测定怀疑含有分析物的样品中的分析物的存在和量的一者或两者的方法,其中所述分析物是羟考酮或羟考酮代谢物。此测定在本文中可以被称为“羟考酮或羟考酮代谢物的测定”。

[0084] 通过说明而非限制的方式,在用于测定羟考酮或羟考酮的代谢物的方法的一个实例中,提供了包含样品、羟考酮或羟考酮的代谢物的结合配偶体(诸如例如抗体)和式I化合物(其中 $R^4$ 或 $R^5$ 是标记)的缀合物的组合。

[0085] 如上所提及,“在介质中以组合”提供样品和试剂。尽管添加至介质以形成组合的顺序可以变化,但对于本文所述的测定形式的一些实施方案,将存在特定优先性。通过说明而非限制的方式,在一个实例中,添加顺序是同时添加所有材料,并测定测定介质对来自标记的信号具有的影响,如在均质测定法中。通过说明而非限制的方式,在另一个实例中,可以依次组合各试剂,或各试剂组。在一些实施方案中,在如上所讨论的各添加之后,可以涉及孵育步骤。在非均质测定法中,在一个或多个孵育步骤之后还可以采用分离和洗涤步骤。

[0086] 待分析的样品是怀疑含有作为羟考酮或羟考酮的代谢物的分析物的样品。所述样品可以是生物样品或非生物样品。生物样品可以来自哺乳动物受试者或非哺乳动物受试者。哺乳动物受试者可以是,例如,人或其它动物物种。生物样品包括但不限于生物体液,诸如例如全血、血清、血浆、痰、淋巴液、精液、阴道粘液、排泄物、尿、脊髓液、唾液、粪便、脑脊液、泪液和粘液,和生物组织,诸如例如毛发、皮肤、来自器官或其它机体部分的切片或切除组织。在许多情况下,所述样品是全血、血浆或血清。非生物样品包括但不限于,例如废物流,其也可以使用根据本文所述的原理的化合物进行分析。

[0087] 可以在任何适宜的介质中制备样品,所述介质可以是例如,测定介质,其在下文中更充分地讨论。在一些情况下,可以对样品施加预处理,诸如以裂解血细胞。在一些实例中,

此类预处理在随后不干扰测定的介质中进行。

[0088] 介质中的组合经受使作为羟考酮或羟考酮的代谢物和式I化合物(其中R<sup>4</sup>或R<sup>5</sup>是标记)的分析物与分析物的抗体结合以形成复合物的条件。测量复合物的量,其中复合物的量与样品中羟考酮或其代谢物的存在和量中的一者或两者相关。

[0089] 羟考酮或羟考酮的代谢物的测定可以在不分离(均质)或分离(非均质)任何测定组分或产物的情况下进行。非均质测定通常涉及一个或多个分离步骤,并且可以是竞争性或非竞争性的。免疫测定可以涉及标记或未标记的试剂。涉及未标记的试剂的免疫测定通常包括形成相对大复合物,所述相对大复合物涉及由根据本文所述的原理的免疫原性缀合物制备的一种或多种抗体。对于抗体复合物的检测,此类测定包括例如免疫沉淀法和凝集法,以及相应的光散射技术,例如浊度测定法(nephelometry)和比浊法(turbidimetry)。标记免疫测定包括但不限于例如化学发光免疫测定、酶免疫测定、荧光偏振免疫测定、放射免疫测定、抑制测定、诱导发光测定以及荧光氧通道测定。

[0090] 一组通常的免疫测定包括使用有限浓度的根据本文所述的原理的化合物的免疫测定。另一组免疫测定涉及使用过量的一种或多种主要试剂,诸如例如过量的根据本文所述的原理的化合物。另一组免疫测定包括无分离的均质测定,其中在羟考酮或羟考酮的代谢物分析物与羟考酮或羟考酮的代谢物的抗体结合后,来自标记的式I化合物的信号被调节。可以根据本文所述的原理产生抗体。标记的式I化合物和可存在于样品中的分析物竞争结合抗体。

[0091] 如上所提及,所述测定可以在不分离(均质)或分离(非均质)任何测定组分或产物的情况下进行。均质免疫测定由以下例举:Rubenstein等人,美国专利号3,817,837,第3栏,第6行至第6栏,第64行中公开的EMIT<sup>®</sup>测定(Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL);免疫荧光法,诸如Ullman等人,美国专利号3,996,345,第17栏,第59行至第23栏,第25行中公开的那些;酶通道免疫测定(“ECIA”),诸如Maggio等人,美国专利号4,233,402,第6栏,第25行至第9栏,第63行中公开的那些;荧光偏振免疫测定(“FPIA”),如例如尤其是美国专利号5,354,693中公开的那些;和酶免疫测定,诸如酶联免疫吸附测定(“ELISA”)。非均质测定的示例为放射免疫测定,其公开于Yalow等人, J. Clin. Invest. 39:1157 (1960)中。上述公开内容的相关部分全部通过引用并入本文。

[0092] 其它酶免疫测定是由Ngo和Lenhoff, FEBS Lett. (1980) 116:285-288讨论的酶调节介导的免疫测定(“EMMIA”);由Oellerich, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1984) 22:895-904公开的底物标记的荧光免疫测定(“SLFIA”);由Khanna等人, Clin. Chem. Acta (1989) 185:231-240公开的组合酶供体免疫测定(“CEDIA”);均质颗粒标记的免疫测定,诸如颗粒增强的比浊抑制免疫测定(“PETINIA”),颗粒增强的比浊免疫测定(“PETIA”);亲和力二氧化铬介导免疫测定(“ACMIA”)测定形式,其描述于美国专利号7,186,518、5,147,529、5,128,103、5,158,871、4,661,408、5,151,348、5,302,532、5,422,284、5,447,870和5,434,051中。上述公开内容的相关部分都通过引用并入本文。

[0093] 其它测定包括吡啶酯标记测定,诸如美国专利号6,355,803;6,673,560;7,097,995和7,319,041中讨论的那些,其相关公开内容通过引用并入本文。吡啶酯标记测定的一个具体实例为使用顺磁性颗粒作为固相的吡啶酯标记免疫测定(“ADVIA”免疫测定)。其它测定包括溶胶颗粒免疫测定(“SPIA”),分散染料免疫测定(“DIA”);金属免疫测定(“MIA”);

酶膜免疫测定(“EMIA”);和发光免疫测定(luminoimmunoassay) (“LIA”)。其它测定类型包括免疫传感器测定,其涉及在结合羟考酮分析物或羟考酮代谢物分析物后,监测存在的缀合物的光学、声学 and 电学特性的变化。此类测定包括例如光学免疫传感器测定、声学免疫传感器测定、半导体免疫传感器测定、电化学换能器免疫传感器测定、电位型免疫传感器测定、电流型电极测定。

[0094] 非均质测定通常涉及一个或多个分离步骤,并且可以是竞争性或非竞争性的。各种竞争性和非竞争性非均质测定形式公开于Davalian等人,美国专利号5,089,390,第14栏,第25行至第15栏,第9行,其通过引用并入本文。在竞争性非均质测定的一个实例中,使具有与之结合的羟考酮或羟考酮的代谢物分析物的抗体的支持物与介质接触,所述介质含有怀疑含有分析物的样品和标记的根据本文所述的原理的化合物。样品中的分析物与标记的化合物竞争结合分析物的抗体。将支持物和介质分离之后,支持物或介质的标记活性通过常规技术测定,并且与样品中的羟考酮或羟考酮的代谢物分析物的量相关。在上述竞争性非均质测定的一个变型中,所述支持物包含式I化合物,且羟考酮或羟考酮代谢物的抗体包含标记。

[0095] 在一些实例中,待分析的样品在测定介质中与羟考酮或羟考酮代谢物的抗体和标记的式I化合物组合。检查介质中包含标记的式I化合物和羟考酮或羟考酮代谢物分析物的抗体的复合物的存在和量中的一者或两者,其中此类复合物的存在和/或量指示样品中羟考酮或羟考酮代谢物分析物的存在和/或量。

[0096] 进行测定的条件包括在通常提供最佳测定灵敏度的适度pH下在水性缓冲介质中进行测定。水性介质可以仅为水,或可以包括0.1至约40体积%的助溶剂。介质的pH将在例如约4至约11的范围内,或约5至约10的范围内,或约6.5至约9.5的范围内。pH将通常为任何特异性结合对的结合成员的最佳结合,该测定的其它试剂诸如信号产生系统的成员等等的pH最佳值之间的折中。各种缓冲剂可用来实现所需pH和在测定期间保持pH。通过说明而非限制的方式,说明性缓冲剂包括例如硼酸盐、磷酸盐、碳酸盐、TRIS、巴比妥、PIPES、HEPES、MES、ACES、MOPS和BICINE。所采用的具体缓冲剂不是关键的,但在个别测定中,可以优选一种或另一种缓冲剂。

[0097] 测定方法中可以使用各种辅助材料。例如,除缓冲剂之外,介质可以包含采用的介质和试剂的稳定剂。在一些实施方案中,除这些添加剂之外,可以包括蛋白诸如,例如白蛋白;有机溶剂诸如,例如甲酰胺;季铵盐;聚阴离子诸如,例如硫酸葡聚糖;结合增强剂,例如聚烷二醇;多糖诸如,例如葡聚糖或海藻糖。介质也可以包含用于防止形成血块的试剂。此类试剂是本领域中众所周知的,且包括但不限于例如EDTA、EGTA、柠檬酸盐、肝素。介质也可以包含一种或多种防腐剂,诸如但不限于例如叠氮化钠、硫酸新霉素、PROCLIN® 300、链霉素。介质可以另外包含一种或多种表面活性剂。如果采用,任何上述材料以足以获得所需效果或功能的浓度或量存在。

[0098] 可以以一个或多个时间间隔向介质施加一个或多个孵育时段,所述时间间隔包括添加测定中采用的各种试剂(包括上述那些)之间的任何时间间隔。介质通常在足以发生各种试剂组分的结合以及样品中的羟考酮或羟考酮代谢物的结合的温度和时间下孵育。适度的温度通常用于实施该方法,且测量时段期间通常为恒温,优选为室温。在一些实例中,孵育温度范围例如约5°C至约99°C,或约15°C至约70°C,或约20°C至约45°C。在一些实例中,

孵育的时间段为例如约0.2秒至约24小时,或约1秒至约6小时,或约2秒至约1小时,或约1分钟至约15分钟。时间段取决于介质的温度和各種试剂結合的速率,这通过締合速率常数、浓度、結合常数和解离速率常数測定。

[0099] 在用于測定怀疑含有羟考酮或羟考酮代谢物分析物的样品中的羟考酮或羟考酮代谢物分析物的方法的实例中,在介质中提供組合,其中該組合包括样品、羟考酮或羟考酮代谢物的抗体,和标记的式I化合物,其中該标记为聚(氨基酸)标记或非聚(氨基酸)标记。检查該介质中包含羟考酮或羟考酮代谢物和羟考酮或羟考酮代谢物的抗体的复合物或包含标记的式I化合物和羟考酮或羟考酮代谢物的抗体的复合物中的一者或两者的存在和量的一者或两者。复合物中的一者或两者的存在和/或量指示样品中羟考酮或羟考酮代谢物分析物的存在和/或量。

[0100] 一些已知的測定法利用信号产生系统(sps),其采用第一和第二sps成员。名称“第一”和“第二”是完全任意的,且并不意在暗示sps成员间的任何顺序或排序,或在本方法中添加sps成员的任何顺序。sps成员可以是关联的,因为sps的一个成员的活化产生产物(诸如,例如光或活化产物),其导致sps的另一个成员的活化。通过说明而非限制的方式,此类sps成员包括例如第一和第二酶、第一和第二化学发光化合物以及第一和第二荧光化合物。在一个具体实例中,可以采用诱导发光免疫測定法。诱导发光免疫測定法在美国专利号5,340,716 (Ullman) (其公开内容通过引用并入本文)中提及。

[0101] 可以測定的样品中羟考酮或羟考酮代谢物分析物的浓度通常为例如约 $10^{-5}$ 至约 $10^{-17}$  M,或约 $10^{-6}$ 至约 $10^{-14}$  M。考量诸如測定法是定性、半定量还是定量的(相对于样品中存在的羟考酮或羟考酮代谢物分析物的量),具体检测技术和羟考酮或羟考酮代谢物分析物的预期浓度通常决定各种试剂的浓度。

[0102] 測定介质中各种试剂的浓度将通常由例如羟考酮或羟考酮代谢物分析物的目标浓度范围和測定的性质决定。然而,试剂各自的最终浓度通常凭经验确定,以优化測定法在目标范围的灵敏度。也就是说,显著的羟考酮或羟考酮代谢物分析物的浓度变化应当提供可精确测量的信号差异。考量诸如信号产生系统的性质和分析物的性质通常决定各种试剂的浓度。

[0103] 如上所提及,可以使用式I化合物(其中 $R^4$ 和 $R^5$ 是聚(氨基酸)标记或非聚(氨基酸)标记或支持物)进行羟考酮或羟考酮代谢物分析物的測定。

[0104] 通过说明而非限制的方式,在用于检测羟考酮和/或羟考酮代谢物的測定法的一个实例中,采用EMIT<sup>®</sup>測定形式。所述測定法采用羟考酮或羟考酮代谢物的抗体和上述式I化合物,其中 $R^4$ 或 $R^5$ 是酶标记诸如,通过说明而非限制的方式,G6PDH或突变型G6PDH。在含水測定介质中将这些试剂与怀疑含有羟考酮或羟考酮代谢物的样品組合。来自样品的羟考酮或羟考酮代谢物与酶标记的式I化合物竞争結合羟考酮或羟考酮代谢物的抗体。样品中的羟考酮或羟考酮代谢物越多,变得与抗体結合的标记的式I化合物的量越少。因此,来自酶标记的信号的增加意味着样品中存在更多分析物。在合适的孵育期后,检查介质中来自酶的信号的存在。在一个实例中,G6PDH将氧化的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸( $NAD^+$ )转化为NADH,导致通过分光光度法测量的吸光度变化。可将所述信号与来自使用含有已知量的羟考酮或羟考酮代谢物的校准物的測定的信号相关联,以測定样品中羟考酮或羟考酮代谢物的量。

[0105] 通过说明而非限制的方式,在用于检测羟考酮或羟考酮代谢物分析物的測定法的

另一个实例中,采用ACMIA测定形式。采用涂覆有标记的式I化合物(其中标记是非聚(氨基酸)标记)的作为二氧化铬颗粒(二氧化铬颗粒试剂)的二氧化铬颗粒作为第一组分。第二组分是羟考酮或羟考酮代谢物分析物的抗体。将交联至报告酶(例如, $\beta$ -半乳糖苷酶)以形成抗体-酶缀合物的该抗体以过量(即大于结合样品中可能存在的全部羟考酮或羟考酮代谢物分析物所需的量的量)添加至反应容器。怀疑含有羟考酮或羟考酮代谢物的样品用羟考酮或羟考酮代谢物的抗体处理,所述羟考酮或羟考酮代谢物的抗体结合样品中的羟考酮或羟考酮代谢物分析物。在介质中将所述抗体-酶缀合物与样品混合,以允许羟考酮或羟考酮代谢物分析物结合至所述抗体。接下来,添加二氧化铬颗粒试剂以结合尽任何过量抗体-酶缀合物。然后,施加磁体,所述磁体从悬浮液中拉出所有二氧化铬颗粒和过量的抗体-酶,并且将上清液转移至最终反应容器。将所述报告酶的底物添加至所述最终反应容器,并且将酶活性分光光度测量为吸光度随时间的变化。使用如上所讨论的校准物,该信号的量与样品中的羟考酮或羟考酮代谢物分析物的量相关。

#### [0106] 检查步骤

如上所讨论,在测定方法的一个步骤中,检查介质中包含羟考酮或羟考酮代谢物分析物和羟考酮或羟考酮代谢物的抗体的复合物和/或包含标记的式I化合物和羟考酮或羟考酮代谢物的抗体的复合物的存在。复合物中的一者或两者的存在和/或量指示样品中羟考酮或羟考酮代谢物分析物的存在和/或量。

[0107] 短语“测量羟考酮或羟考酮代谢物分析物的量”是指羟考酮或羟考酮代谢物的定量、半定量和定性测定。定量、半定量和定性的方法,以及用于测定羟考酮或羟考酮代谢物分析物的所有其它方法,都被认为是测量羟考酮或羟考酮代谢物分析物的量的方法。例如,仅检测怀疑含有羟考酮或羟考酮代谢物分析物的样品中羟考酮或羟考酮代谢物分析物的存在或不存在的方法被认为包括在本发明范围内。术语“检测”和“测定”以及测量的其它常见同义词被考虑在本发明范围内。

[0108] 在许多实施方案中,介质的检查涉及从介质检测信号。信号的存在和/或量与样品中羟考酮或羟考酮代谢物分析物的存在和/或量相关。检测的特定模式取决于信号产生系统的性质。如上所讨论,存在许多方法,通过该方法,产生信号的信号的标记可以产生可通过外部装置检测的信号。信号产生系统的活化取决于信号产生系统成员的性质。

[0109] 测量期间的温度通常为例如约 $10^{\circ}\text{C}$ 至约 $70^{\circ}\text{C}$ ,或约 $20^{\circ}\text{C}$ 至约 $45^{\circ}\text{C}$ ,或约 $20^{\circ}\text{C}$ 至约 $25^{\circ}\text{C}$ 。在一种方法中,使用已知浓度的羟考酮或羟考酮代谢物分析物形成标准曲线,所述已知浓度的羟考酮或羟考酮代谢物分析物有时也被称为校准物。除了校准物以外,也可以使用其它对照。

[0110] 由任何标记产生的发光或光可以目测、摄影、光量测定、分光光度测量,诸如通过使用光电倍增器或光电二极管,或通过测定其与介质中羟考酮或羟考酮代谢物分析物的量相关的量的任何其它适宜装置。信号的存在和/或量的检查还包括信号的检测,这通常仅是其中阅读信号的一个步骤。通常使用仪器阅读信号,所述仪器的性质取决于信号的性质。所述仪器可以是但不限于例如分光光度计、荧光计、吸收分光计、光度计和化学光度计(chemiluminometer)。

#### [0111] 用于进行测定法的包含试剂的试剂盒

可以基于特定测定法的性质配制包含用于进行测定法的试剂的试剂盒。在根据本文所

述的原理的一些实例中,试剂盒可以包含结合配偶体诸如,例如,针对免疫原产生的抗体,所述免疫原是式I化合物,其中R<sup>4</sup>或R<sup>5</sup>是免疫原性载体。在根据本文所述的原理的一些实例中,试剂盒可以包含试剂,所述试剂是式I化合物,其中R<sup>4</sup>或R<sup>5</sup>是聚(氨基酸)标记部分或非聚(氨基酸)标记部分,其包括支持物。试剂盒还可以包括用于进行羟考酮或羟考酮代谢物分析物的特定测定法的其它试剂。该试剂盒可以进一步包括用于进行测定的其它试剂,其性质取决于具体测定形式。

[0112] 所述试剂可以各自在分开容器中,或者各种试剂可以组合于一个或多个容器中,这取决于试剂的交叉反应性和稳定性。该试剂盒可以进一步包括用于进行测定的其它分别包装的试剂,诸如例如额外的特异性结合对成员,信号产生系统成员,和辅助试剂。

[0113] 试剂盒中各种试剂的相对量可以在很大程度上变化,以提供显著优化本发明方法期间需要发生的反应和进一步显著优化测定灵敏度的试剂浓度。在适当情形下,试剂盒中的一种或多种试剂可以作为通常冻干的干燥粉末(包括赋形剂)提供,其在溶解后将提供用于使用根据本文所述的原理的化合物试剂进行方法或测定的适当浓度的试剂溶液。该试剂盒可以进一步包括利用试剂(其包括根据本文所述的原理的化合物试剂)的方法的书面说明书。

## 实施例

[0114] 除非另有说明,以下实验中的材料可以购自Sigma-Aldrich Inc. (Milwaukee WI)。本文公开的份数和百分数以重量/体积计,除非另有说明。使用LC-8A (Shimadzu Precision Instruments, Inc., Torrance CA)进行HPLC纯化。使用Cary 60 (Agilent Technologies, Palo Alto CA)进行紫外-可见(UV-Vis)光谱分析。使用来自Analtech (Newark DE)的TLC板(20cm x 20cm, 2000 $\mu$ m)进行制备型TLC纯化。在Bruker Ultrashiel<sup>TM</sup>-400 (400 MHz)和Bruker Ultrashiel<sup>TM</sup>-600 (600 MHz)光谱仪(Bruker Instruments, Billerica, MA)上记录<sup>1</sup>H-NMR光谱。化学位移以百万分之份数(ppm,  $\delta$ )报告;四甲基硅烷(TMS)或其它氘代溶剂用作内部参照。

[0115] 定义:

mg = 毫克

g = 克

ng = 纳克

mL = 毫升

$\mu$ L = 微升

mmol = 毫摩尔

$\mu$ mol = 微摩尔

$^{\circ}$ C = 摄氏度

min = 分钟

sec = 秒

hr = 小时

w/v = 重量/体积

TLC = 薄层色谱法

HPLC = 高效液相色谱法

DMF = 二甲基甲酰胺

THF = 四氢呋喃

DTT = 二硫苏糖醇

EDTA = 乙二胺四乙酸盐

DI = 去离子

ELISA = 酶联免疫吸附测定法

LOCI = 发光氧通道免疫测定法

mIgG = 小鼠免疫球蛋白

MS = 质谱分析法。

[0116] 式XII化合物的制备(图5)。向去甲羟考酮(X) (15 mg, 0.0445 mmol)于THF (9 mL)和DMF (1 mL)中的搅拌溶液中添加二异丙基乙胺(DIPEA) (45  $\mu$ L, 0.26 mmol)。将该反应在室温下搅拌10分钟。在氮气下将琥珀酰亚胺乙酸酯溴化物(XI) (21 mg, 0.089 mmol)添加至反应混合物。将反应混合物在室温下搅拌90分钟。混合物的TLC分析显示,起始材料去甲羟考酮(X)消失,且显示出新的和极性较小的点。通过在减压下旋转蒸发来除去大部分THF和DMF。通过制备型TLC方法纯化残余物,使用二氯甲烷/乙酸乙酯/甲醇= 5/4/1作为洗脱剂,以得到去甲羟考酮氯乙酰胺(XIII)和去甲羟考酮溴乙酰胺(XII)的混合物(15mg)。

[0117] 在氮气下向XII和XIII(15mg)于丙酮(20mL)中的搅拌溶液中添加溴化钠(103 mg, 1 mmol)。将该反应在56 $^{\circ}$ C下搅拌24小时。将该反应冷却至室温,通过过滤来除去固体,并通过在减压下旋转蒸发来浓缩滤液。通过制备型TLC方法纯化残余物,使用二氯甲烷/乙酸乙酯/甲醇= 5/4/1作为洗脱剂,以得到所需去甲羟考酮溴乙酰胺(XII) (9.7 mg, 51%产率, 两个步骤)。FAB-MS:  $MH^+$  (422, 424);  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 6.77 (d, J = 6 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 6Hz, 1H), 5.0 (d, J = 6Hz, 1H), 4.69 (s, 1H), 3.93 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.58 (m, 1H), 3.16 (m, 2H), 3.05 (m, 1H), 2.90 (m, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.27 (m, 2H)。

[0118] 式XIV化合物的制备(图5)。将G6PDH酶溶液(0.53 mL, 19 mg/mL)通过G-25 Sephadex $^{\circ}$ 柱(C16 x 35)与PBS缓冲液(50mM磷酸钠,1mM EDTA,pH 7.25)进行缓冲液交换。然后通过280nm处的吸光度测量酶的浓度,并用相同的缓冲溶液调节至5.0 mg/mL (1.87 mL)。添加DTT (18.7  $\mu$ L, 0.5 M)。将反应混合物在2-8 $^{\circ}$ C下孵育16小时。用50mM磷酸盐、1.0 mM EDTA和25  $\mu$ M DTT (pH 7.25)通过G-25 Sephadex $^{\circ}$ 柱(C16 x 35)纯化蛋白混合物。将洗脱的蛋白通过Amicon超离心过滤器(MW截止值30,000)浓缩至具有50 mM磷酸盐、1.0 mM EDTA和25  $\mu$ M DTT (pH 7.25)缓冲液的3.0 mg/mL溶液。向上述活化蛋白(1.28 mL, 3 mg/mL)溶液中添加0.742 mg半抗原(如上所述制备的化合物XII)于DMF中的溶液(128  $\mu$ L)。将略微浑浊的反应混合物在2-8 $^{\circ}$ C下摇动16小时。将游离半抗原(化合物XII)通过穿过Sephadex $^{\circ}$  G-50柱而与半抗原-酶缀合物分离,并用50mM磷酸盐(pH7.0)缓冲液洗脱。合并含有酶缀合物的级分(3.6 mg, 0.34 mg/mL),以得到所需酶缀合物XIV。

[0119] 式XVII化合物的制备(图6)。向去甲羟吗啡酮(XV) (22.5 mg, 0.0695 mmol)于THF (9 mL)和DMF (1 mL)中的搅拌溶液中添加DIPEA (60  $\mu$ L, 0.34 mmol)。将该反应在室

温下搅拌5分钟。在氮气下将琥珀酰亚胺乙酸酯溴化物 (XVI) (19 mg, 0.081 mmol) 添加至反应混合物。将反应混合物在室温下搅拌60分钟。混合物的TLC分析显示,起始材料去甲羟吗啡酮 (XV) 消失,且显示出新的和极性较小的点。通过在减压下旋转蒸发来除去大部分THF和DMF。通过制备型TLC纯化残余物,使用二氯甲烷/乙酸酯/甲醇= 5/4/1作为洗脱剂,以得到去甲羟吗啡酮氯乙酰胺 (XVIII) 和去甲羟吗啡酮溴乙酰胺 (XVII) 的混合物 (8.7 mg)。

[0120] 在氮气下向XVII和XVIII (8.7 mg) 于丙酮 (20mL) 中的搅拌溶液中添加溴化钠 (103 mg, 1 mmol)。将该反应在56°C下搅拌24小时。将该反应冷却至室温,通过过滤来除去固体,并通过在减压下旋转蒸发来浓缩滤液。通过制备型TLC纯化残余物,使用二氯甲烷/乙酸酯/甲醇= 5/4/1作为洗脱剂,以得到所需去甲羟吗啡酮溴乙酰胺 (XVII) (1.3 mg, 5% 产率,两个步骤)。FAB-MS:  $MH^+$  (408, 410)  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz);  $\delta$ : 6.81 (d, J = 6 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 6Hz, 1H), 6.05 (br, 1H), 5.03 (d, J = 6, 1H), 4.71 (s, 1H), 3.92 (m, 2H), 3.72 (m, 1H), 3.16 (m, 1H), 3.10 (m, 2H), 2.90 (m, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.35 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.27 (m, 2H)。

[0121] 式XIX化合物的制备 (图6)。将G6PDH酶溶液 (0.63 mL, 19 mg/mL) 通过G-25 Sephadex® 柱 (C16 x35) 与PBS缓冲液 (50mM磷酸钠, 1mM EDTA, pH 7.25) 进行缓冲液交换。然后通过280nm处的吸光度测量酶的浓度,并用相同的缓冲溶液调节至5.0 mg/mL (2.1 mL)。添加DTT (21  $\mu$ L, 0.5 M)。将反应混合物在2-8°C下孵育16小时。用50mM磷酸盐、1.0 mM EDTA和25  $\mu$ M DTT (pH 7.25) 通过G-25 Sephadex® 柱 (C16 x 35) 纯化蛋白混合物。将洗脱的蛋白通过Amicon超离心过滤器 (MW截止值30,000) 浓缩至具有50 mM磷酸盐、1.0 mM EDTA和25  $\mu$ M DTT (pH 7.25) 缓冲液的3.0 mg/mL溶液。向上述活化蛋白 (1.66 mL, 3 mg/mL) 溶液中添加0.93 mg半抗原化合物XVII于DMF中的溶液 (93  $\mu$ L)。将略微浑浊的反应混合物在2-8°C下摇动16小时。将游离半抗原XVII通过穿过Sephadex® G-50柱而与半抗原-酶缀合物XIX分离,用50mM磷酸盐 (pH7.0) 缓冲液洗脱。合并含有酶缀合物XIX的级分 (4.2 mg, 0.37 mg/mL), 以得到所需酶缀合物XIX。

[0122] 式XXI化合物的制备 (图7)。向高真空干燥的去甲羟吗啡酮盐酸盐 (XV) (20.0 mg, 0.061 mmol) 于THF (3 mL) 和DMF (0.5 mL) 中的溶液中添加DIPEA (53.25  $\mu$ L, 0.305 mmol, 5当量)。将反应混合物在氮气气氛下搅拌30分钟,然后添加BA甘氨酸NHS酯XX (35.8 mg, 0.122 mmol, 2当量)。将该反应在室温下在氮气气氛下搅拌80分钟。用TLC使用二氯甲烷中的20%甲醇监测反应进程,且产物是极性比BA甘氨酸NHS酯XX更小的点。通过旋转蒸发器在减压下除去大部分溶剂。通过HPLC用SB-C18 (250 x 21.2, Agilent Technologies) 柱纯化粗产物,使用水中的0.1%甲酸/甲醇中的0.1%甲酸作为洗脱溶剂体系,以得到所需产物去甲羟吗啡酮溴乙酰胺XXI (16.2 mg, 19.3%产率)。质谱, ES, m/e:  $MH^+$ , 465, 467。

[0123] 式XXIII化合物的制备 (图7)。将G6PDH酶溶液 (0.6 mL, 21.1 mg/mL) 通过Amicon超离心过滤器 (Ultracel-30K, EMD Millipore, Billerica MA) 与PBS缓冲液 (50mM磷酸钠, 1mM EDTA, pH 7.25) 进行缓冲液交换。然后通过280nm处的吸光度测量酶的浓度,并用相同的缓冲溶液调节至5.0 mg/mL (1.55 mL)。将DTT (0.5 M, 15.5  $\mu$ L) 添加至酶溶液中,并将混合物在2-8°C下摇动16小时。通过用50mM磷酸钠、1 mM EDTA、25  $\mu$ M DTT (pH 7.25) 缓冲液预平衡的G-25 Sephadex® 柱除去过量DTT。通过280nm处的吸光度测量纯化蛋白的浓度,

并用PBS缓冲液(50mM磷酸钠,1mM EDTA,25 $\mu$ M DTT,pH 7.25)调节至3 mg/mL (2.52 mL)。将如上所述制备的去甲羟吗啡酮溴乙酰胺XXI (4.0mg)/DMF (0.267 mL)添加至活化酶(1.26 mL, 3 mg/mL),并将溶液在冷室(4 $^{\circ}$ C)中摇动16小时。通过用磷酸钠缓冲液(50mM磷酸钠,pH7.0)洗脱的预平衡柱(Sephadex<sup>®</sup> G-50)纯化G6PDH缀合物XXIII。合并含有酶缀合物XXIII的级分(3.9 mg, 0.36 mg/mL),以得到所需酶缀合物XXIII。

[0124] 式XXVI化合物的制备(图8)。向高真空干燥的去甲氢吗啡酮盐酸盐(50.0 mg, 0.147 mg)于THF (4.5 mL)和DMF (2 mL)中的溶液中添加DIPEA (154  $\mu$ L, 0.882 mmol, 6当量)。将反应混合物在氮气气氛下搅拌20分钟,然后添加BA甘氨酸NHS酯XX (86.2 mg, 0.294 mmol, 2当量)。将该反应在室温下在氮气气氛下搅拌100分钟。用TLC使用二氯甲烷中的20%甲醇监测反应进程,且产物是极性比XX更小的点。使用旋转蒸发器浓缩反应混合物以除去大部分溶剂。通过HPLC用SB-C18 (250x21.2, Agilent Technologies)柱纯化粗(210.3 mg)产物,使用DI水中的0.1%甲酸/甲醇中的0.1%甲酸作为溶剂体系,以得到所需产物(XXVI) (3.3 mg, 4%产率)。质谱, ES, m/e: MH<sup>+</sup>, 449, 451。

[0125] 式XXVIII化合物的制备(图8)。将G6PDH酶溶液(0.6 mL, 21.1 mg/mL)通过Amicon超离心过滤器(EMD Millipore, Ultracel-30K)与PBS缓冲液(50mM磷酸钠,1mM EDTA,pH 7.25)进行缓冲液交换。然后通过280nm处的吸光度测量酶的浓度,并用相同的缓冲溶液调节至5.0 mg/mL (1.55 mL)。将DTT (0.5 M, 15.5  $\mu$ L)添加至酶溶液中,并将混合物在2-8 $^{\circ}$ C下摇动16小时。通过用50mM磷酸钠、1 mM EDTA、25  $\mu$ M DTT (pH 7.25)缓冲液预平衡的G-25 Sephadex<sup>®</sup>柱除去过量DTT。通过280nm处的吸光度测量纯化蛋白的浓度,并用PBS缓冲液(50mM磷酸钠,1mM EDTA,25 $\mu$ M DTT,pH 7.25)调节至3 mg/mL (2.52 mL)。将去甲氢吗啡酮溴乙酰胺(XXVI) (3.3 mg)/DMF (0.20 mL)添加至活化酶(0.9 mL, 3 mg/mL),并将溶液在冷室(4 $^{\circ}$ C)中摇动16小时。通过用磷酸钠缓冲液(50mM磷酸钠,pH7.0)洗脱的预平衡柱(Sephadex<sup>®</sup> G-50)纯化G6PDH缀合物。合并含有酶缀合物XXVIII的级分(2.53 mg, 0.24 mg/mL),以得到所需酶缀合物XXVIII。

[0126] 式XXXI化合物的制备(图9)。向去甲羟考酮盐酸盐(X) (10.7 mg, 0.0317 mmol)于THF (9 mL)和DMF (1 mL)中的搅拌溶液中添加DIPEA (35  $\mu$ L, 0.2 mmol)。将该反应在室温下搅拌5分钟,并在氮气下将3-马来酰亚胺丙酸N-羟基琥珀酰亚胺(13 mg, 0.049 mmol)添加至反应混合物。将反应混合物在室温下搅拌90分钟。混合物的TLC分析显示,起始材料去甲羟考酮X消失,且显示出新的和极性较小的点。通过在减压下旋转蒸发来除去大部分THF和DMF。通过制备型TLC方法纯化残余物,使用二氯甲烷/乙酸乙酯/甲醇= 5/4/1作为洗脱剂,以得到所需产物去甲羟考酮马来酰亚胺XXXI (10.0 mg, 70%产率);FAB-MS: MH<sup>+</sup> (453); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)  $\delta$ : 6.74 (m, 1H), 6.72 (s, 2H), 6.65 (m, 1H), 5.02 (m, 1H), 4.69 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.90 (m, 2H), 3.63 (m, 1H), 3.05 (m, 4H), 2.83 (m, 1H), 2.64 (m, 1H), 2.53 (m, 1H), 2.31 (m, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.72 (m, 1H), 1.27 (m, 2H)。

[0127] 式XXXII化合物的制备(图9)。将G6PDH酶溶液(0.53 mL, 19 mg/mL)通过G-25 Sephadex<sup>®</sup>柱(C16 x 35)与PBS缓冲液(50mM磷酸钠,1mM EDTA,pH 7.25)进行缓冲液交换。然后通过280nm处的吸光度测量酶的浓度,并用相同的缓冲溶液调节至5.0 mg/mL (1.87 mL)。添加DTT (18.7  $\mu$ L, 0.5 M)。将反应混合物在2-8 $^{\circ}$ C下孵育16小时。用50mM磷酸盐、1.0

mM EDTA和25  $\mu$ M DTT (pH 7.25)通过G-25 Sephadex<sup>®</sup>柱(C16 x 35)纯化蛋白混合物。将洗脱的蛋白通过Amicon超离心过滤器(MW截止值30,000)浓缩至具有50 mM磷酸盐、1.0 mM EDTA和25  $\mu$ M DTT (pH 7.25)缓冲液的3.0 mg/mL溶液。向上述活化蛋白(1.3 mL, 3 mg/mL)溶液中添加0.80 mg去甲羟考酮马来酰亚胺半抗原XXXI(如上所述制备)于DMF中的溶液(130  $\mu$ L)。将略微浑浊的反应混合物在2-8 $^{\circ}$ C下摇动16小时。将游离半抗原XXXI通过穿过Sephadex<sup>®</sup> G-50柱而与半抗原-酶缀合物XXXII分离,用50mM磷酸盐(pH7.0)缓冲液洗脱。合并含有酶缀合物XXXII的级分(3.5 mg, 0.33 mg/mL),以得到所需缀合物XXXII。

[0128] 式XXXV化合物的制备(图10)。向去甲羟吗啡酮盐酸盐(XV) (15.5 mg, 0.048 mmol)于THF (9 mL)和DMF (1 mL)中的搅拌溶液中添加DIPEA (50  $\mu$ L, 0.287 mmol)。将该反应在室温下搅拌10分钟。在氮气下将3-马来酰亚胺丙酸N-羟基琥珀酰亚胺XXX (19.8 mg, 0.075 mmol)添加至反应混合物。将反应混合物在室温下搅拌90分钟。混合物的TLC分析显示,起始材料去甲羟吗啡酮XV消失,且显示出新的和极性较小的点。通过在减压下旋转蒸发来除去大部分THF和DMF。通过制备型TLC方法纯化残余物,使用二氯甲烷/乙酸乙酯/甲醇= 5/4/1作为洗脱剂,以得到所需产物去甲羟吗啡酮马来酰亚胺(XXXV) (17.2 mg, 82%产率)。FAB-MS:  $MH^+$  (439);  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , 600 MHz)  $\delta$ : 6.76 (m, 1H), 6.72 (m, 2H), 6.64 (m, 1H), 6.07 (m, 1H), 5.02 (m, 1H), 4.70 (m, 1H), 3.91 (m, 2H), 3.62 (m, 1H), 3.06 (m, 3H), 2.82 (m, 2H), 2.62 (m, 1H), 2.57 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.26 (m, 2H)。

[0129] 式XXXVI化合物的制备(图10)。将G6PDH酶溶液(0.63 mL, 19 mg/mL)通过G-25 Sephadex<sup>®</sup>柱(C16 x35)与PBS缓冲液(50mM磷酸钠,1mM EDTA,pH 7.25)进行缓冲液交换。然后通过280nm处的吸光度测量酶的浓度,并用相同的缓冲溶液调节至5.0 mg/mL (2.1 mL)。添加DTT (21  $\mu$ L,0.5 M)。将反应混合物在2-8 $^{\circ}$ C下孵育16小时。用50mM磷酸盐、1.0 mM EDTA和25  $\mu$ M DTT (pH 7.25)通过G-25 Sephadex<sup>®</sup>柱(C16 x 35)纯化蛋白混合物。将洗脱的蛋白通过Amicon超离心过滤器(MW截止值30,000)浓缩至具有50 mM磷酸盐、1.0 mM EDTA和25  $\mu$ M DTT (pH 7.25)缓冲液的3.0 mg/mL溶液。向上述活化蛋白(1.66 mL, 3 mg/mL)溶液中添加1.0 mg去甲羟吗啡酮马来酰亚胺半抗原(XXXV)于DMF中的溶液(100  $\mu$ L)。将略微浑浊的反应混合物在2-8 $^{\circ}$ C下摇动16小时。将游离半抗原XXXV通过穿过Sephadex<sup>®</sup> G-50柱而与半抗原-酶缀合物XXXVI分离,用50mM磷酸盐(pH7.0)缓冲液洗脱。合并含有酶缀合物XXXVI的级分(4.4 mg, 0.36 mg/mL),以得到所需酶缀合物XXXVI。

[0130] 本领域技术人员应当容易地理解,本发明易于广泛实用和应用。除了本文所述的实施方案和改编以外的本发明的许多实施方案和改编以及许多变化、修改和等效安排将由本发明及其前述描述显而易见或通过其合理地表明,而不脱离本发明的实质或范围。

[0131] 因此,尽管本文已经关于具体实施方案详细描述了本发明,但应当理解,本公开仅仅说明和例举本发明,并且仅仅为了提供本发明的完全和有效的公开内容的目的而进行。前述公开内容不旨在或被解释为限制本发明或以其它方式排除任何此类其它实施方案、改编、变化、修改和等效安排,本发明仅受所附权利要求及其等同方案的限制。



图 1

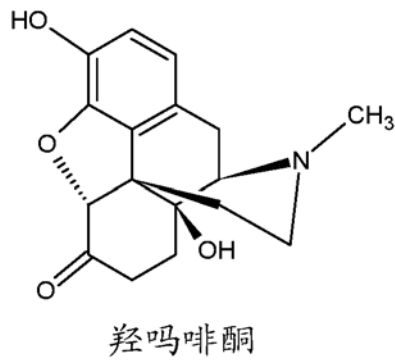


图 2

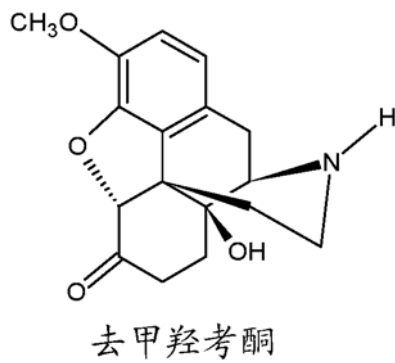


图 3

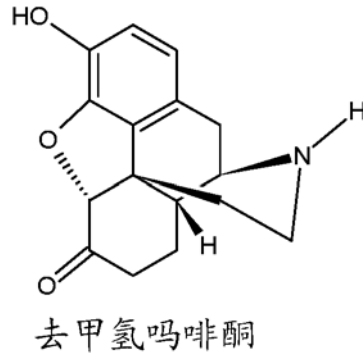


图 4

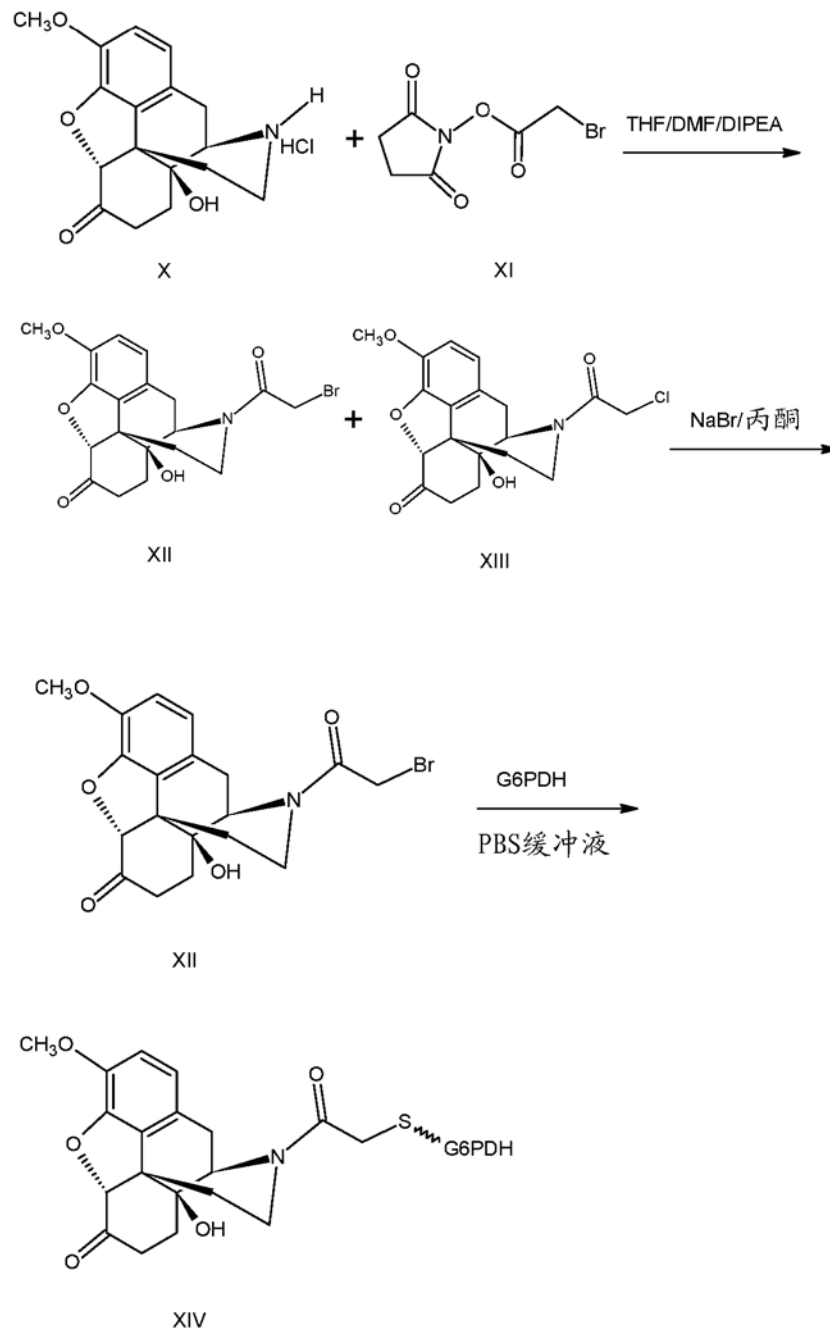


图 5

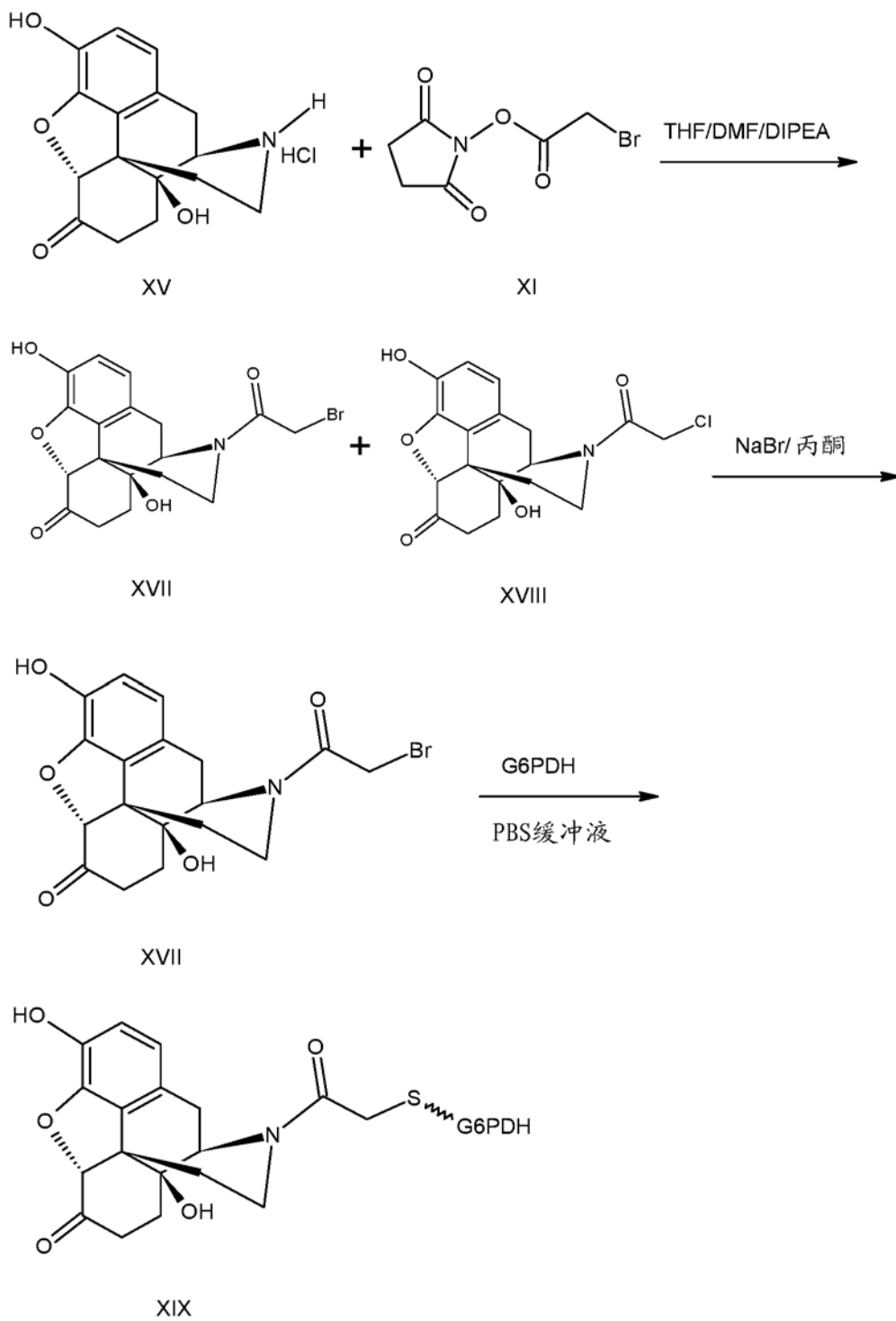


图 6

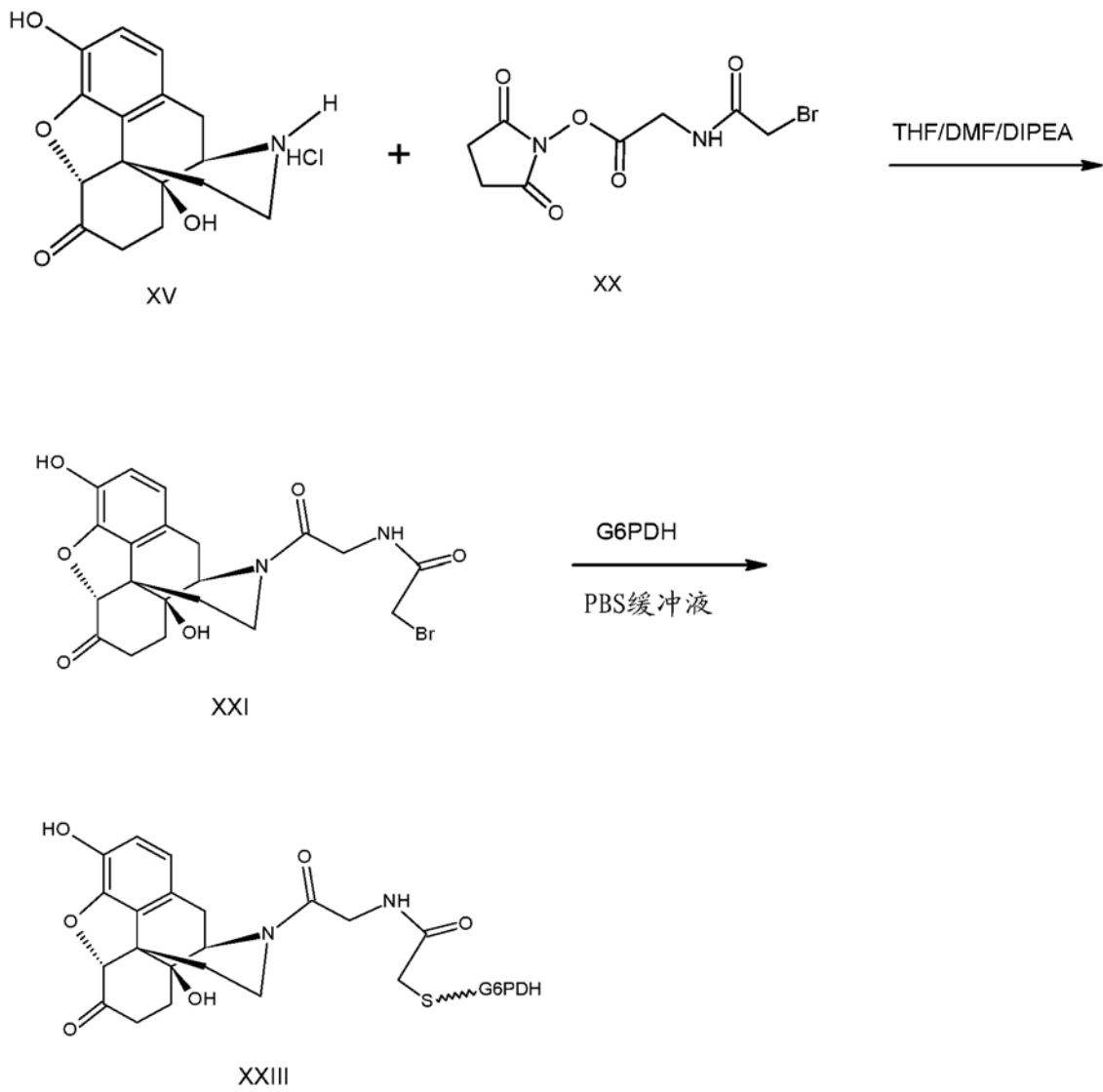


图 7

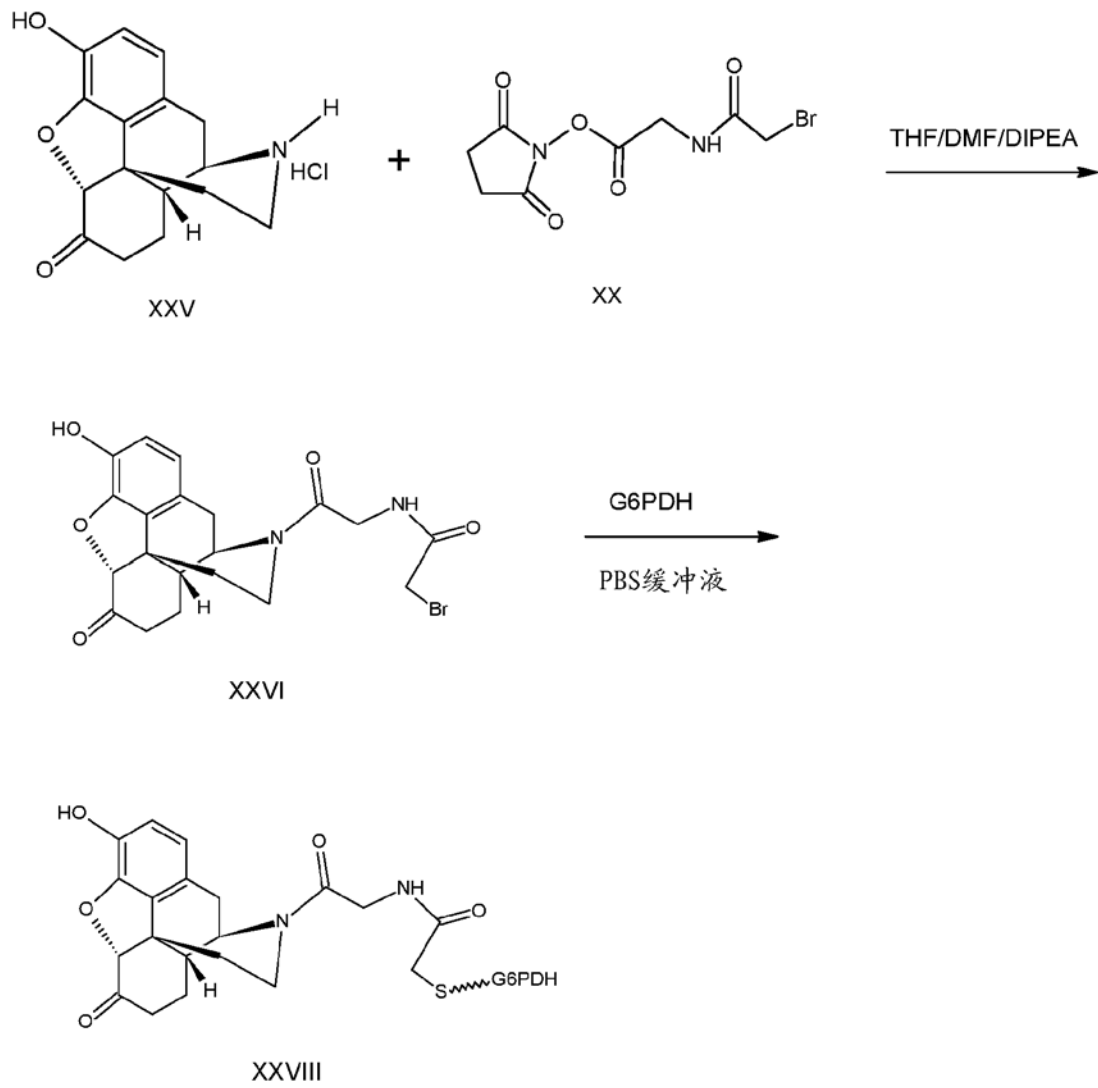


图 8

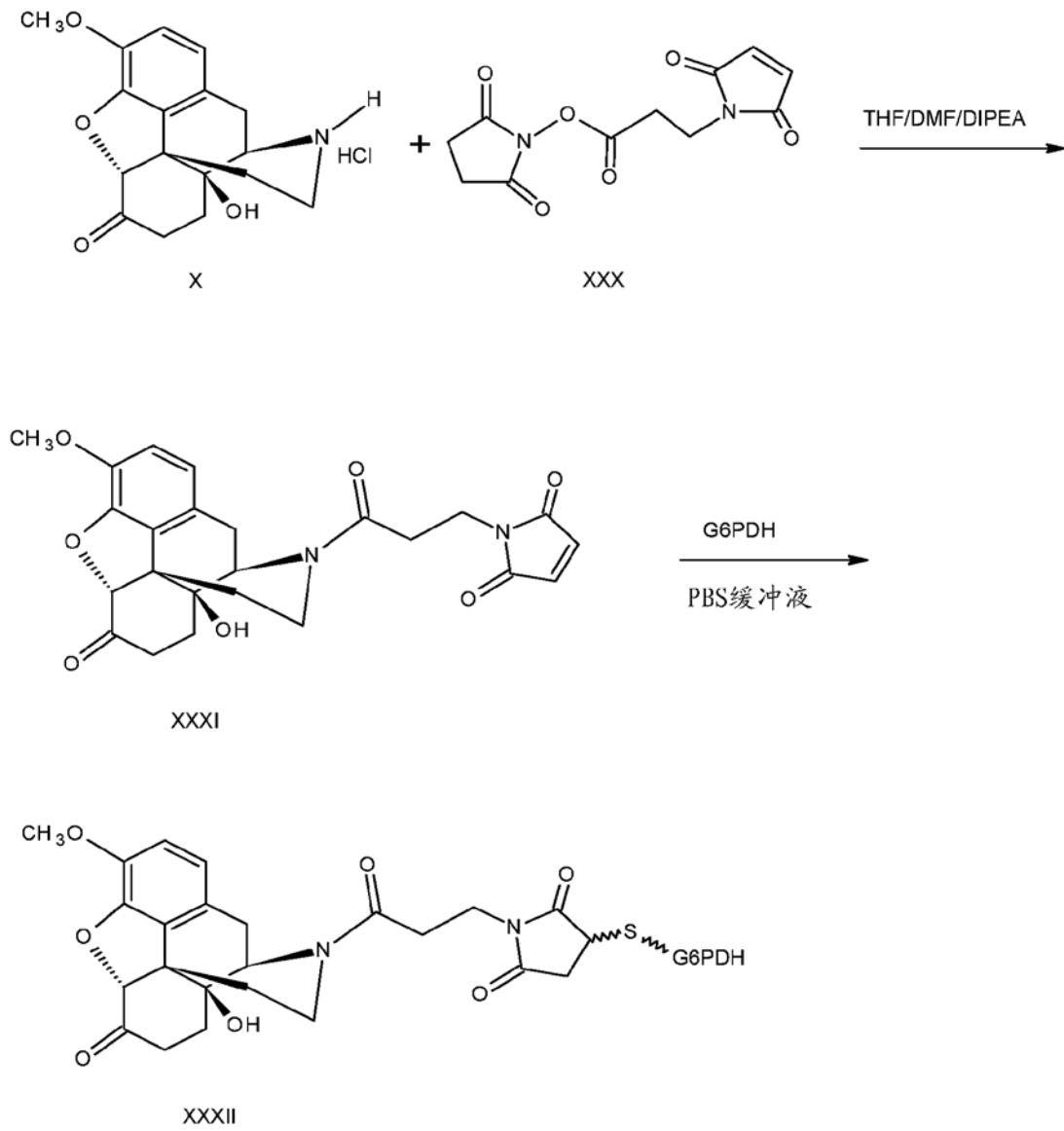


图 9

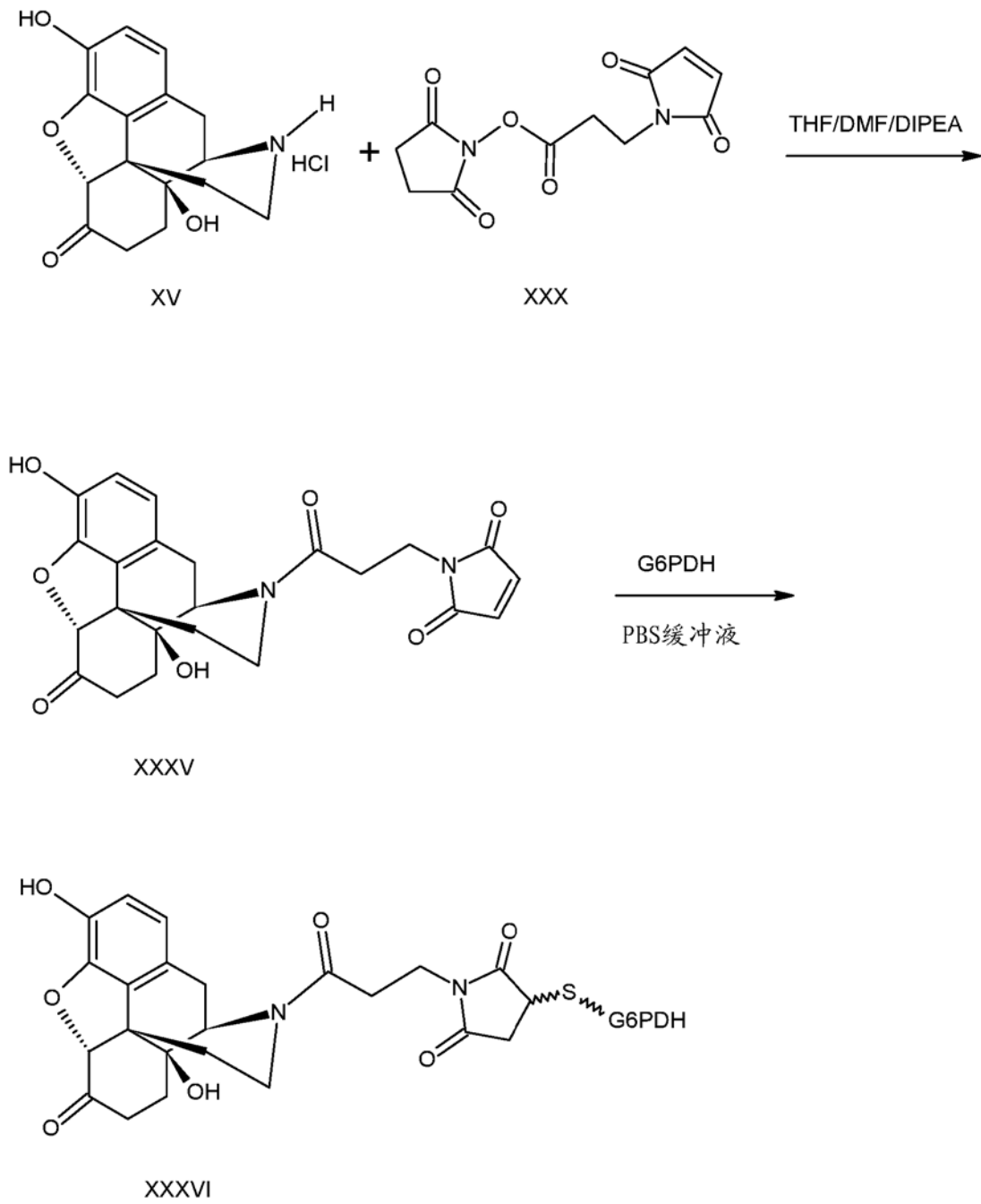
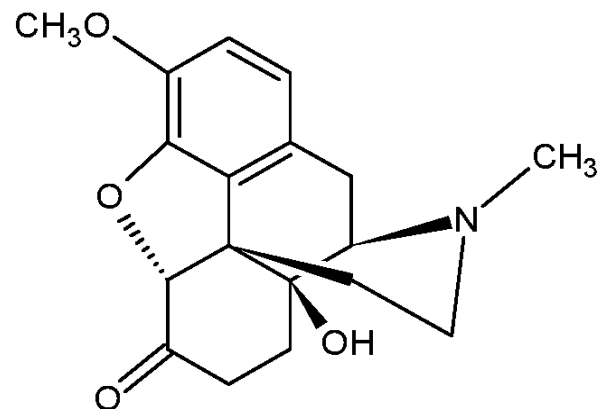


图 10

专利名称(译)	用于羟考酮和羟吗啡酮的测定法的缀合物		
公开(公告)号	<a href="#">CN107003304A</a>	公开(公告)日	2017-08-01
申请号	CN201580068847.6	申请日	2015-12-11
[标]申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
当前申请(专利权)人(译)	西门子医疗保健诊断公司		
[标]发明人	郑一枫 杨雅利 王国平		
发明人	郑一枫 杨雅利 王国平		
IPC分类号	G01N33/536 C07K16/40		
CPC分类号	C12N9/0006 C07D317/58 C07D405/12 C07D489/02 C07D489/08 C07K16/44 C12Q1/28 G01N33/535 G01N33/56911 G01N33/581 G01N33/94 G01N33/9486		
代理人(译)	罗文锋		
优先权	62/093129 2014-12-17 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

公开了针对羟考酮及其代谢物的半抗原、免疫原和免疫测定法的组合、方法和试剂盒。所述化合物由式I化合物例举。所述方法包括在介质中组合提供(i)怀疑含有羟考酮和/或羟考酮代谢物的样品，式I化合物，其中R4或R5是标记，和羟考酮或其代谢物的抗体。检查介质中包含标记的式I化合物的复合物的存在，其中诸如复合物的存在指示样品中存在羟考酮或羟考酮代谢物。



羟考酮