



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110741007 A

(43)申请公布日 2020.01.31

(21)申请号 201880039121.3

(22)申请日 2018.06.15

(30)优先权数据

62/520292 2017.06.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2018/050729 2018.06.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/227306 EN 2018.12.20

(71)申请人 医学生命探索有限公司

地址 加拿大萨斯喀彻温省

(72)发明人 杜什曼希·加雅辛格 肖恩·里奇

丹尼尔·E·里维

(74)专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

代理人 徐舒

(51)Int.Cl.

C07F 7/18(2006.01)

A61K 49/00(2006.01)

C07C 57/13(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/483(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

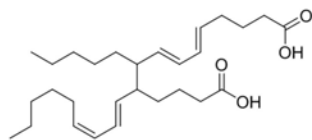
权利要求书11页 说明书42页 附图18页

(54)发明名称

作为生物样本中定量水平标准的二羧酸脂
肪酸二聚体及其衍生物

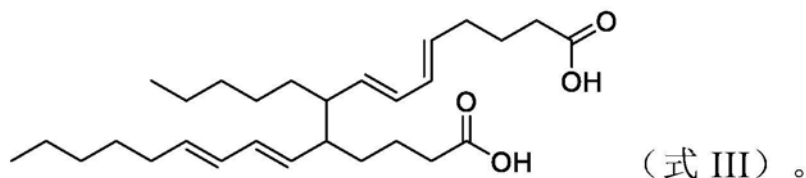
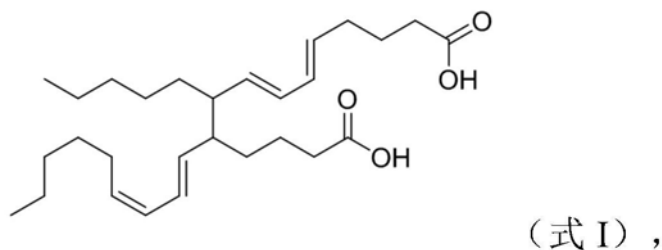
(57)摘要

提供了具有式I结构的胃酸(GTA)化合物及其盐、酯、前药或标记的衍生物。此类GTA化合物可以用于确定样品的GTA水平以用于将受试者诊断为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌的风险或用于产生抗体。描述了特异性结合GTA式I的抗体或其片段,以及此类抗体或片段在用于确定样品中GTA水平或用于将受试者诊断为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险中的用途。还提供了包含此类GTA化合物和/或抗体的试剂盒。



式 (I)

1. 一种具有式I或式III结构的化合物或其盐、酯、前药或标记的衍生物：

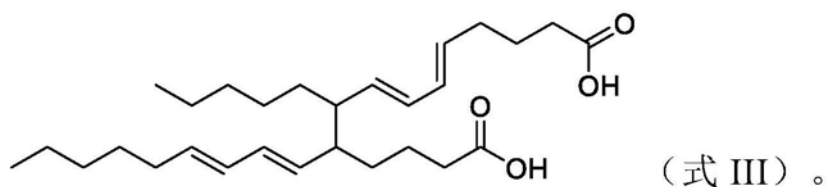
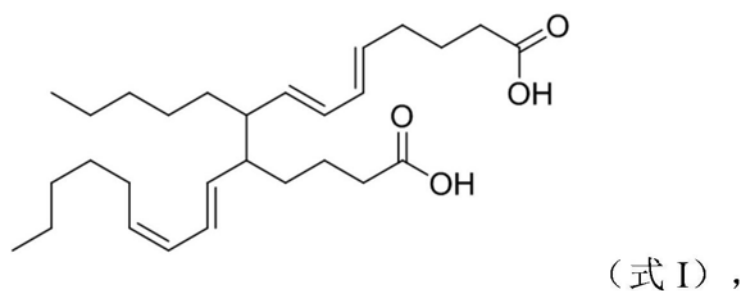


2. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物是分离的化合物。

3. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中所述化合物是合成制得的化合物。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的化合物,其中所述化合物是分析标准化合物。

5. 一种同位素标记的化合物或其盐、酯或前药,所述同位素标记的化合物包含掺入式I或式III结构内的一种或多种同位素标记：

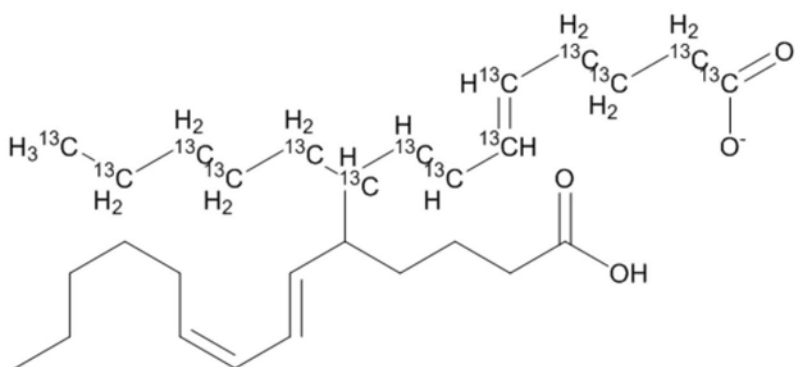


6. 根据权利要求5所述的同位素标记的化合物,其中,所述一种或多种同位素标记是稳定的同位素标记、放射性同位素标记或其组合。

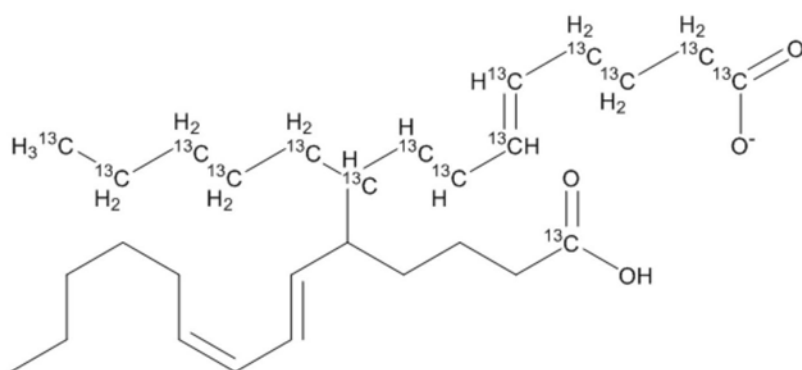
7. 根据权利要求5或6所述的同位素标记的化合物,其中所述一种或多种同位素标记选自氘(^2H)和 ^{13}C 组成的组。

8. 根据权利要求5或6所述的同位素标记的化合物,其中所述一种或多种同位素标记选自氚(^3H)和 ^{14}C 组成的组。

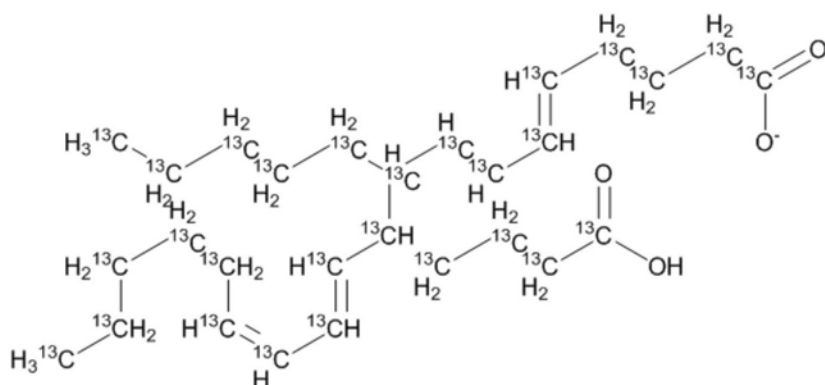
9. 根据权利要求5-7中任一项所述的同位素标记的化合物,其中所述同位素标记的化合物为：



,



,



或其所有碳-碳双键均处于反式构型的衍生物,或其盐、酯或前药。

10. 根据权利要求5-9中任一项所述的同位素标记的化合物,其中所述化合物是分析标准化合物。

11. 一种包含权利要求5-9中任一项所述的同位素标记的化合物的代谢示踪剂组合物。

12. 一种包含权利要求1-9中任一项所述的化合物和赋形剂、载体或稀释剂的组合物。

13. 一种包含权利要求5-9中任一项所述的同位素标记的化合物的体外或体内诊断剂。

14. 一种包含权利要求1-9中任一项所述的化合物和赋形剂、载体或稀释剂的组合物。

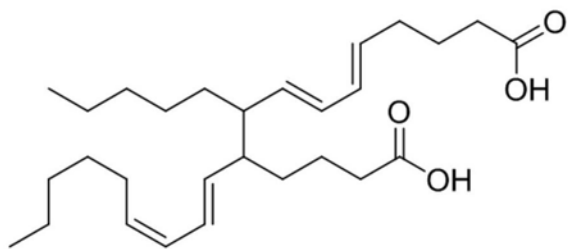
15. 一种用于确定样品中胃酸 (GTA) 水平的方法,所述方法包括:

测量来自所述样品的GTA检测信号,所述GTA检测信号代表所述样品中的所述GTA水平;

和

通过将测得的GTA检测信号与校准参考进行比较定量所述样品中的所述GTA水平。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述GTA是



(式 I)。

17. 根据权利要求15或16所述的方法, 其中通过质谱测量所述GTA检测信号。

18. 根据权利要求15-17中任一项所述的方法, 其中所述校准参考包含使用已知量的根据权利要求5-10中任一项所定义的化合物制得的标准曲线。

19. 根据权利要求15-17中任一项所述的方法, 其中所述校准参考通过以下方式获得:

用已知量的根据权利要求5-10中任一项所定义的同位素标记的化合物加标所述样品;

和

测量来自所述样品的内标信号, 所述内标信号代表加标到所述样品中已知量的同位素标记的化合物。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中通过质谱测量所述内标信号。

21. 根据权利要求19或20所述的方法, 进一步包括确定所述样品中的所述GTA水平与加标到所述样品中已知量的同位素标记的化合物的比例的步骤, 所述样品中的所述GTA水平如由测得的GTA检测信号表示, 加标到所述样品中已知量的同位素标记的化合物如由所述内标信号表示。

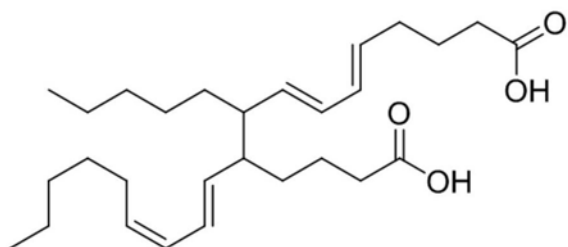
22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述校准参考包含由一系列变化的GTA/同位素标记的化合物比例和浓度的混合物产生的同位素稀释曲线 (IDC), 并将所述比例与所述曲线进行比较。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述IDC由一系列GTA含量随固定量的同位素标记的化合物而变化的混合物产生。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述固定量的同位素标记的化合物与加标到所述样品中已知量的同位素标记的化合物大致相同。

25. 权利要求1-10中任一项所述的化合物在确定样品中胃酸 (GTA) 水平中的用途。

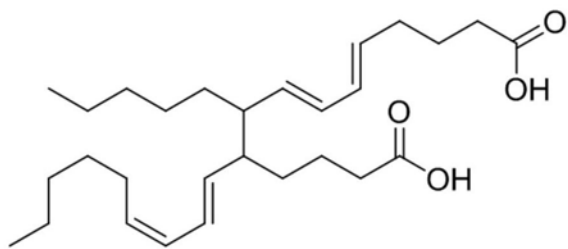
26. 根据权利要求25所述的用途, 其中所述GTA是:



(式 I)。

27. 权利要求1-10中任一项所述的化合物在产生用于确定样品中胃酸 (GTA) 水平的校准参考中的用途。

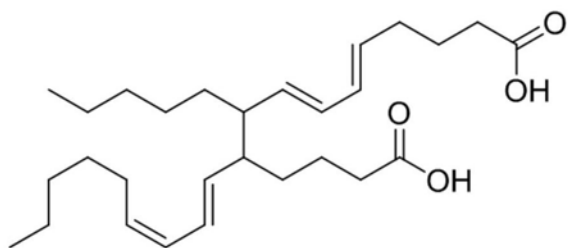
28. 根据权利要求27所述的用途, 其中所述GTA是:



(式 I)。

29. 权利要求5-9中任一项所述的化合物作为用于确定样品中胃酸 (GTA) 水平的内标的用途。

30. 根据权利要求29所述的用途, 其中所述GTA是:



(式 I)。

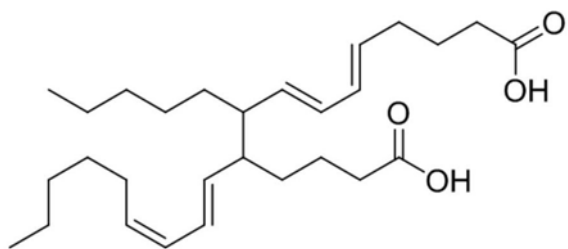
31. 一种用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法, 所述方法包含:

通过以下确定获自所述受试者的样品中的胃酸 (GTA) 水平:

测量来自所述样品的GTA检测信号, 所述GTA检测信号代表所述样品中的所述GTA水平, 和

通过将测得的GTA检测信号与校准参考进行比较定量所述样品中的所述GTA水平, 当与健康对照组相比, 所述样品中所确定的所述GTA水平降低时, 将所述受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌的风险,

其中所述GTA是:



(式 I)。

32. 根据权利要求31所述的方法, 其中通过质谱测量所述GTA检测信号。

33. 根据权利要求31或32所述的方法, 其中所述校准参考包含使用已知量的根据权利要求5-10中任一项所定义的化合物制得的标准曲线。

34. 根据权利要求31或32所述的方法, 其中确定获自所述受试者的所述样品中所述GTA水平的步骤包括:

用已知量的根据权利要求5-10中任一项所定义的同位素标记的化合物加标所述样品; 和

测量来自所述样品的内标信号, 所述内标信号代表加标到所述样品中已知量的同位素

标记的化合物。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中通过质谱测量所述内标信号。

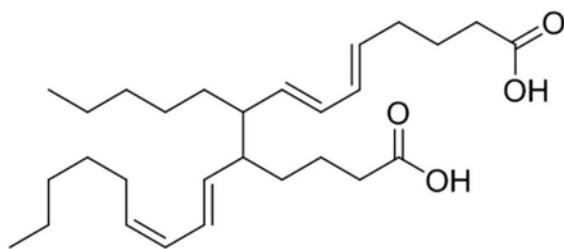
36. 根据权利要求34或35所述的方法,进一步包括确定所述样品中的所述GTA水平与加标到所述样品中已知量的同位素标记的化合物的比例的步骤,所述样品中的所述GTA水平如由测得的GTA检测信号表示,加标到所述样品中已知量的同位素标记的化合物如由所述内标信号表示。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述校准参考包含由一系列变化的GTA/同位素标记的化合物比例和浓度的混合物产生的同位素稀释曲线(IDC),并将所述比例与所述曲线进行比较。

38. 根据权利要求36所述的方法,其中所述IDC由一系列GTA含量随固定量的同位素标记的化合物而变化的混合物产生。

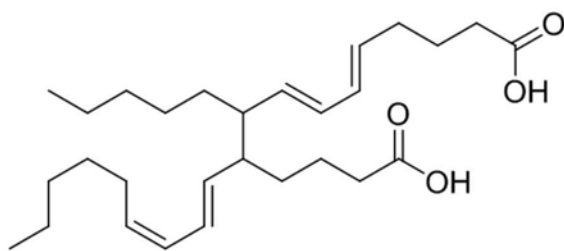
39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述固定量的同位素标记的化合物与加标到样品中已知量的同位素标记的化合物大致相同。

40. 权利要求1-10中任一项所述的化合物在用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法中的用途,所述结直肠癌与胃酸(GTA)水平改变相关,其中所述GTA是:



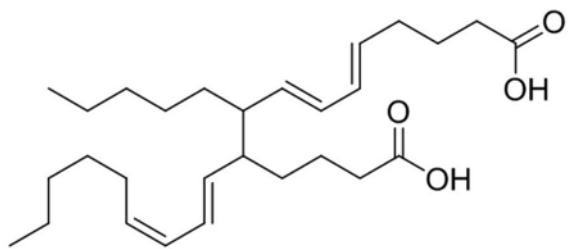
(式 I)。

41. 权利要求1-10中任一项所述的化合物在产生用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法中的校准参考中的用途,所述结直肠癌与胃酸(GTA)水平改变相关,其中所述GTA是:



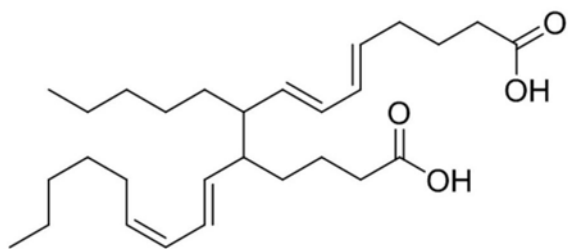
(式 I)。

42. 权利要求5-9中任一项所述的化合物在作为用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法中的内标中的用途,所述结直肠癌与胃酸(GTA)水平改变相关,其中所述GTA是:



(式 I)。

43. 一种特异性结合式I化合物的抗体或其抗原结合片段：

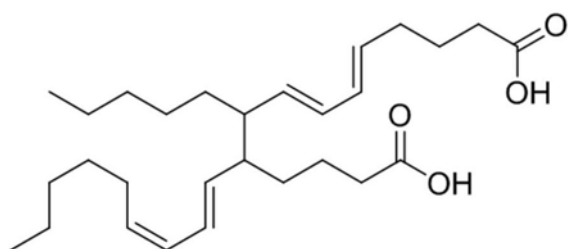


(式 I)。

44. 根据权利要求43所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是单克隆或多克隆抗体。

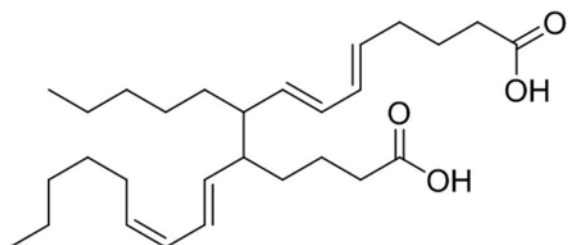
45. 权利要求1-3中任一项所述的化合物在作为用于制备抗体的抗原中的用途，所述抗体特异性结合所述化合物的抗原表位。

46. 权利要求43或44所述的抗体在用于通过免疫测定检测或定量样品中的胃酸 (GTA) 水平中的用途，其中，所述GTA是：



(式 I)。

47. 权利要求43或44所述的抗体在用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法中的用途，所述结直肠癌与胃酸 (GTA) 水平改变相关，其中所述GTA是：

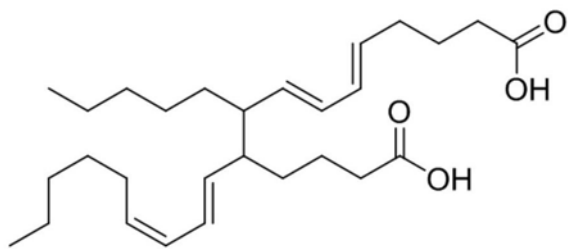


(式 I)。

48. 一种用于确定样品中胃酸 (GTA) 水平的方法，所述方法包括：

使用采用特异性结合GTA的抗体或其抗原结合片段的免疫测定来测量所述样品中的所述GTA水平；

其中，所述GTA是：



(式 I)。

49. 根据权利要求48所述的方法, 其中所述免疫测定包含酶联免疫吸附测定 (ELISA)。

50. 根据权利要求48或49所述的方法, 进一步包括在所述免疫测定中使用包含权利要求1-10中任一项所定义的化合物的对照样品作为阳性对照的步骤。

51. 根据权利要求48-49中任一项所述的方法, 进一步包括使用标准曲线推断所述样品中的所述GTA水平的步骤, 且使用多个已知量的权利要求1-10中任一项所定义的化合物产生所述标准曲线。

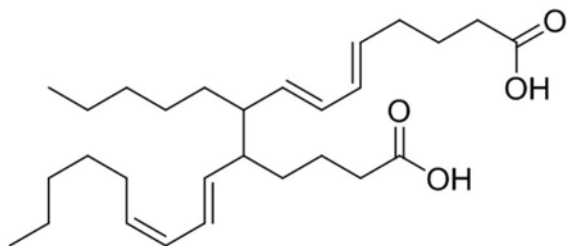
52. 一种用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法, 所述方法包括:

通过以下来确定获自受试者的样品中的胃酸 (GTA) 水平:

使用采用特异性结合GTA的抗体或其抗原结合片段的免疫测定来测量所述样品中的所述GTA水平; 和

当与健康对照组相比, 所述样品中所确定的所述GTA水平降低时, 将所述受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌的风险,

其中, 所述GTA是:



(式 I)。

53. 根据权利要求52所述的方法, 其中所述免疫测定包含酶联免疫吸附测定 (ELISA)。

54. 根据权利要求52或53所述的方法, 进一步包括在所述免疫测定中使用包含权利要求1-10中任一项所定义的化合物的对照样品作为阳性对照的步骤。

55. 根据权利要求52-54中任一项所述的方法, 其中确定所述样品中所述GTA水平的步骤进一步包括使用标准曲线推断所述样品中的所述GTA水平, 且使用多个已知量的权利要求1-10中任一项所定义的化合物产生所述标准曲线。

56. 一种用于定量样品中胃酸 (GTA) 水平的试剂盒, 所述试剂盒包含以下至少一种:

根据权利要求1-10中任一项所述的化合物;

根据权利要求11所述的代谢示踪剂;

根据权利要求12或14所述的组合物;

根据权利要求13所述的诊断剂; 和

根据权利要求43或44所述的抗体;

任选地,进一步包含一组用于进行权利要求15-24和48-51中任一项所定义的方法的说明书。

57.一种用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断试剂盒,所述试剂盒包含以下至少一种:

根据权利要求1-10中任一项所述的化合物;

根据权利要求11所述的代谢示踪剂;

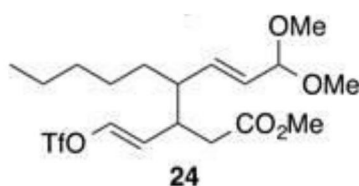
根据权利要求12或14所述的组合物;

根据权利要求13所述的诊断剂;和

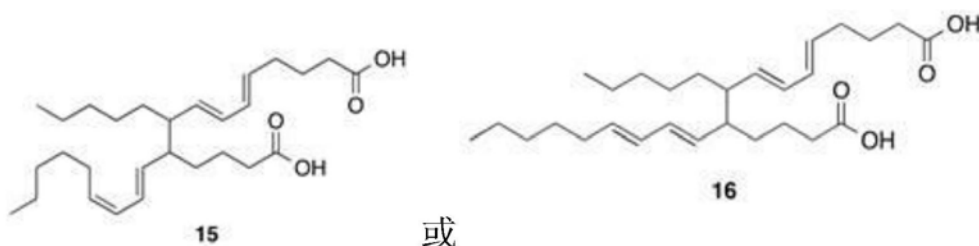
根据权利要求43或44所述的抗体;

任选地,进一步包含一组用于进行权利要求31-39和52-55中任一项所定义的方法的说明书。

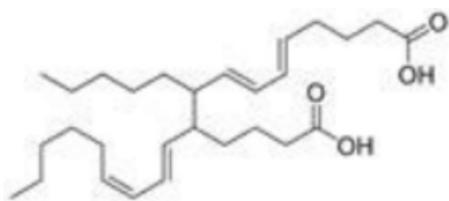
58.一种具有下式的化合物或其标记的衍生物:



59.权利要求58所述的化合物在合成具有下式的化合物或其盐、酯、前药或标记的衍生物中的用途:



60.一种合成具有式(I)的化合物或其同位素标记的衍生物的方法:



(式 I) ,

所述方法包括:

提供根据权利要求58所述的化合物;

进行所述化合物与1-庚炔的菌头偶联;

使用林德拉催化剂进行还原;

进行甲酯还原;

与甲磺酰氯进行反应;

用丙二酸二甲酯进行甲磺酸酯取代;

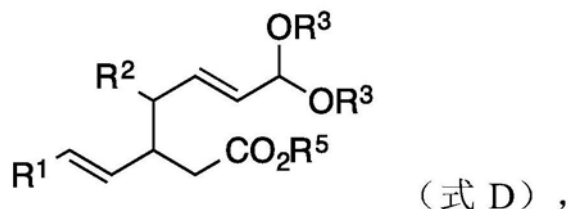
进行酸处理以同时进行缩醛裂解、酯水解和脱羧;和

进行维蒂希反应以得到式I化合物或其同位素标记的衍生物,

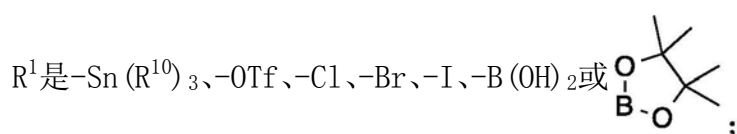
其中根据权利要求58所述的化合物或所述方法中的至少一种反应物包含至少一个同位素标记的原子,当合成式I的同位素标记的衍生物时,所述原子被掺入所得的式I化合物中。

61. 根据权利要求60所述的方法,其中所述维蒂希反应包含与(三苯基膦亚基)乙醛或(4-羧丁基)三苯基溴化膦的反应。

62. 一种具有式D的化合物或其标记的衍生物:



其中:



R²为任选取代的饱和或不饱和C₁-C₂₀烷基、饱和或不饱和C₂-C₂₀烯基、或饱和或不饱和C₂-C₂₀炔基;

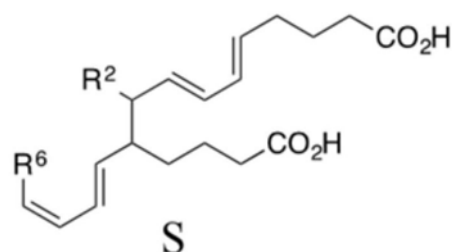
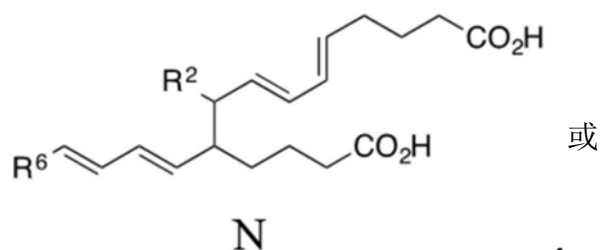
R³各自独立地为任选取代的C₁-C₆烷基,或R³基团一起形成任选取代的亚乙基或亚丙基,其桥接所连接的氧原子以形成五元环或六元环;

R⁵是任选取代的C₁-C₆烷基;并且

R¹⁰是任选取代的C₁-C₆烷基。

63. 权利要求62所述的化合物在胃酸(GTA)或其衍生物合成中的用途。

64. 根据权利要求63所述的用途,其中所述GTA或其衍生物是式N或S的化合物或其盐、酯、前药或标记的衍生物:



其中

R²为任选取代的饱和或不饱和C₁-C₂₀烷基、饱和或不饱和C₂-C₂₀烯基、或饱和或不饱和C₂-C₂₀炔基;并且

R^6 为任选取代的饱和或不饱和 C_1-C_{20} 烷基、饱和或不饱和 C_2-C_{20} 烯基、或饱和或不饱和 C_2-C_{20} 炔基。

65. 一种用于合成权利要求64所述的式N或S的化合物或其同位素标记的衍生物的方法,所述方法包括:

提供根据权利要求62所述的化合物;

进行偶联反应并任选进行还原以用任选取代的饱和或不饱和烷基、饱和或不饱和烯基、或饱和或不饱和炔基替代 R^1 基团;

将含 R^5 的酯转化为羟基;

将羟基转化为离去基团;

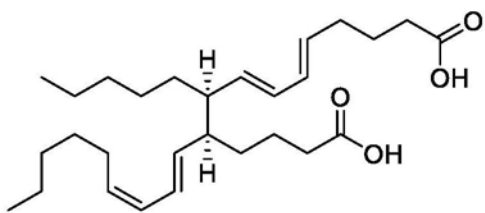
用丙二酸二烷基酯取代离去基团;

进行缩醛水解、酯水解和脱羧以形成醛;并且

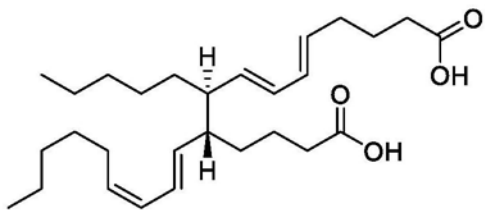
在醛上进行偶联反应以得到式N或S的化合物或其同位素标记的衍生物,

其中根据权利要求62所述的化合物或所述方法中的至少一种反应物包含至少一个同位素标记的原子,当合成式N或S的同位素标记的衍生物时,所述原子被掺入所得的式N或S化合物中。

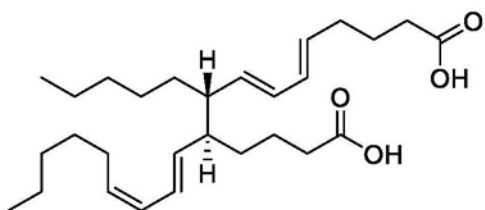
66. 根据权利要求1-10中任一项所述的化合物,其中所述化合物是以下化合物或其任何组合或其盐、酯、前药或标记的衍生物:



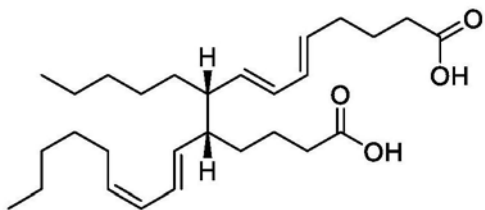
(式 Ia) ;



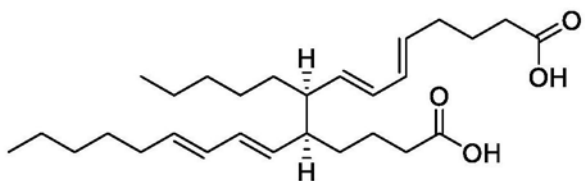
(式 Ib) ;



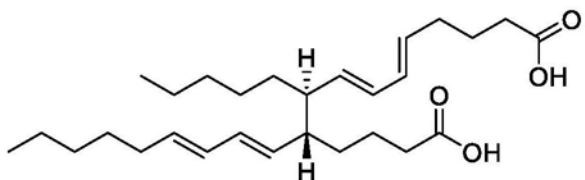
(式 Ic) ;



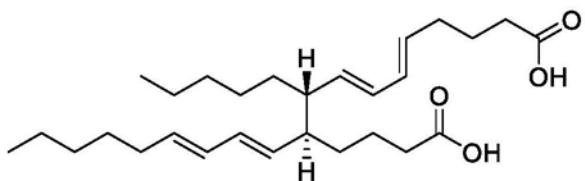
(式 Id) ;



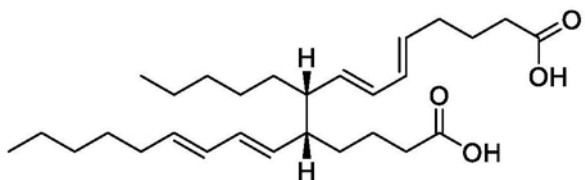
(式 IIIa) ;



(式 IIIb) ;



(式 IIIc) ; 或



(式 IIId) 。

67. 如本文所述的化合物或方法。

作为生物样本中定量水平标准的二羧酸脂肪酸二聚体及其衍生物

技术领域

[0001] 本发明一般涉及二羧酸及其衍生物。更具体地,本发明涉及用于诊断结直肠癌(colorectal cancer)的二羧酸化合物及其标记的衍生物。

背景技术

[0002] 胃酸(GTA)最初被发现并报道为28至36个碳多不饱和脂肪酸,相对于对照组其在结直肠癌(CRC)患者血清中降低。基于测量称为GTA-446的特异性28碳GTA,开发了商业筛查测定(Cologic®)以用于筛查CRC风险增加的平均风险群体。

[0003] 之前已使用串联质谱进行了Cologic®测试以通过由外部GTA-446标准曲线推断选择的GTA-446亲本/子代片段对的信号响应来定量样品中GTA-446的量,该标准曲线由连续稀释的已知浓度的GTA-446组成。然而,由于没有市售合成的GTA-446,校准曲线依赖于从大量人血清(通常为50升或更多)中纯化的GTA-446。这种方法的缺点是分离过程是劳动密集型的,仅产生少量(从40L的人血清中产生约5mg),并且仅提供内源的天然存在物种。因此,出现了某些测定限制,因为对于标记的内标,无法选择控制回收率和其他潜在的变异性来源,例如基质效应和/或仪器灵敏度的漂移。

[0004] 通常,分析方法有利于在此类应用中使用内部标准。优选的分析方法是将已知量的稳定的同位素标记形式的目标分析物加标到待测试的样品中,然后确定内源分析物与标记标准的比例。然后可以使用该比例来推断样品中靶标分析物的定量评估。

[0005] 除了即使少量也难以获得,胃酸GTA-446之前尚未得到充分表征、尚未合成制得且尚未产生标记的衍生物。此外,到目前为止,GTA-446($C_{28}H_{46}O_4$)被认为是含有四个不饱和度(unsaturation)、单个羧酸部分和两个羟基部分的单个长链脂肪酸。

[0006] 因为由于缺乏合适的抗体,尚未进行基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的定量测定,GTA-446的定量之前还主要限于串联质谱分析。尽管许多诊断平台均基于ELISA原理,但缺乏特异性抗GTA-446抗体代表了GTA-446检测和定量的限制因素。特异性抗体的产生需要足够量的纯复合抗原,这已经受到没有合成GTA-446的限制。

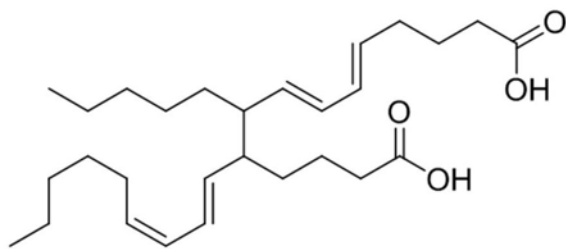
[0007] 期望GTA-446和/或其衍生物的替代、另外和/或改进的来源,和/或其在样品中的定量方法。

发明内容

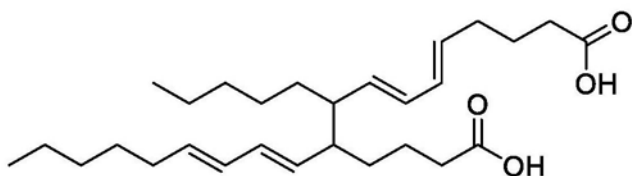
[0008] 本发明的一个目的是提供具有式I结构的化合物或其盐、酯、前药或标记的衍生物,或与其相关的化合物,其可以用于定量样品中GTA水平(例如GTA-446水平)的测定中和/或用于诊断受试者的结直肠癌的测定中。

[0009] 在某些实施方案中,本文提供了一种具有式I或式III结构的化合物或其盐、酯、前药或标记的衍生物:

[0010]



(式 I) ,



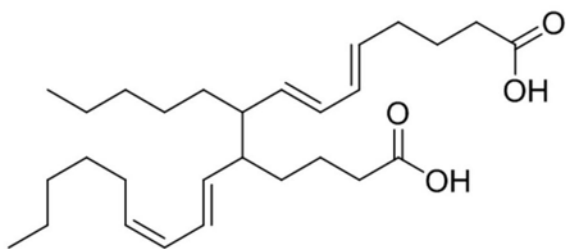
(式 III) 。

[0011] 在另一个实施方案中,该化合物可以是分离的化合物。

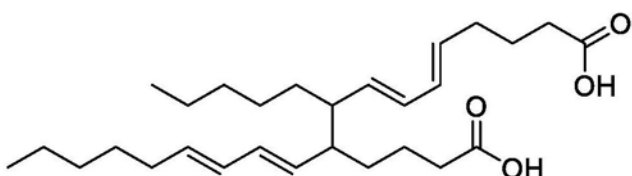
[0012] 在上述一种或多种化合物的另一个实施方案中,该化合物可以是合成制得的化合物、分析标准化合物或两者。

[0013] 在又一个实施方案中,本文提供了一种同位素标记的化合物或其盐、酯或前药,该同位素标记的化合物包含掺入式I或式III结构内的一种或多种同位素标记:

[0014]



(式 I) ,

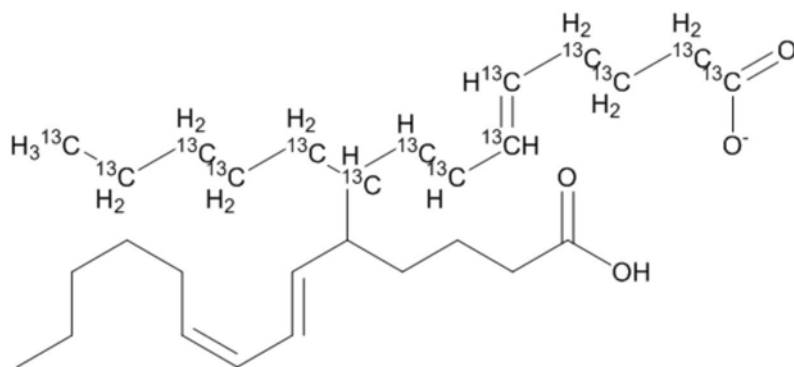


(式 III) 。

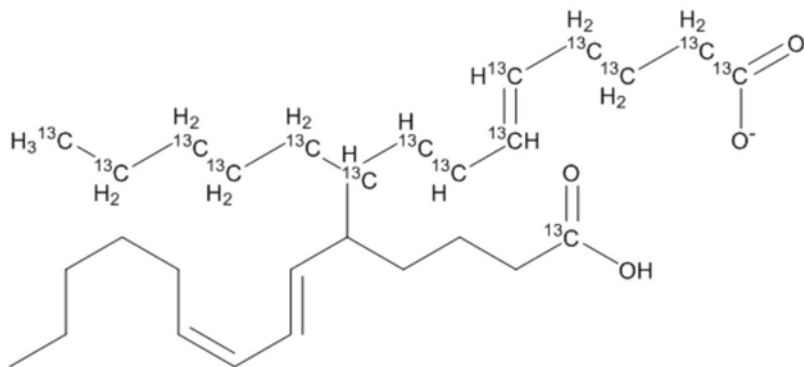
[0015] 在上述同位素标记的化合物的另一个实施方案中,一种或多种同位素标记可以是稳定的同位素标记、放射性同位素标记或其组合。

[0016] 在一种或多种上述同位素标记的化合物的又一个实施方案中,一种或多种同位素标记可以选自由氘 (^2H) 和 ^{13}C 组成的组。[0017] 在一种或多种上述同位素标记的化合物的又一个实施方案中,一种或多种同位素标记可以选自由氚 (^3H) 和 ^{14}C 组成的组。

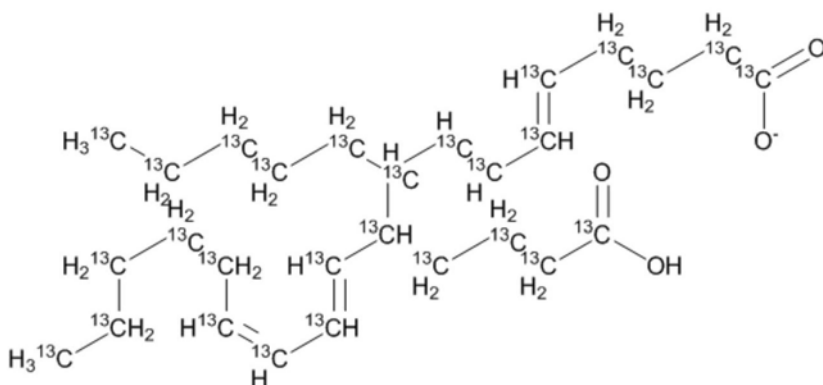
[0018] 在又一个实施方案中,该同位素标记的化合物可以是:



[0019]



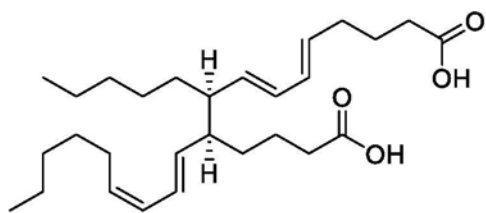
[0020]



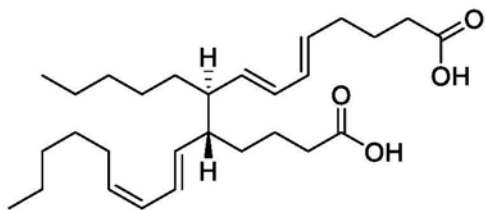
[0021] 或其所有碳-碳双键均处于反式构型的衍生物、或其盐、酯或前药。

[0022] 在另一个实施方案中,一种或多种上述同位素标记的化合物可以是分析标准化合物。

[0023] 在一种或多种上述化合物的另一个实施方案中,该化合物可以是以下化合物或其任何组合或其盐、酯、前药或标记的衍生物:

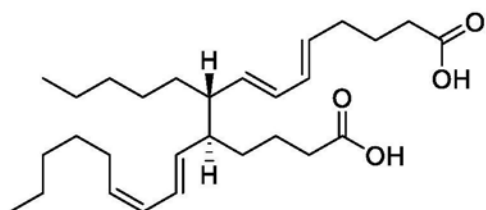


(式 Ia) ;

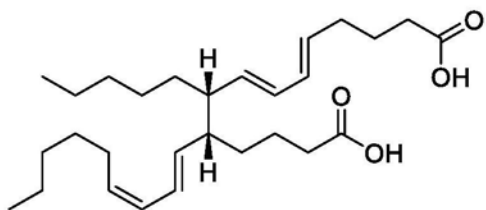


(式 Ib) ;

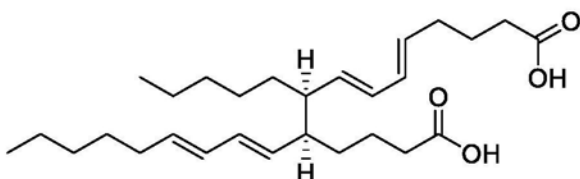
[0024]



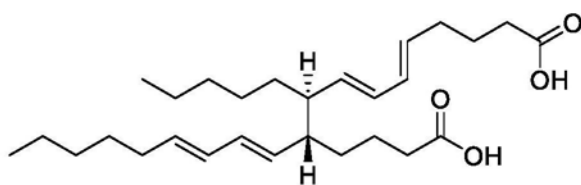
(式 Ic) ;



(式 Id) ;

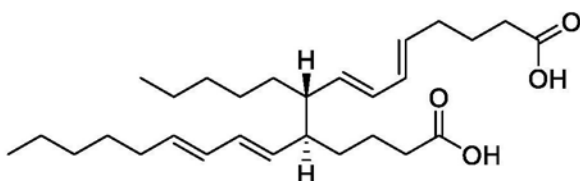


(式 IIIa) ;

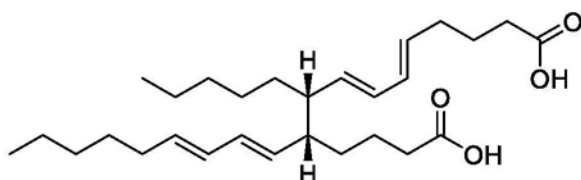


(式 IIIb) ;

[0025]



(式 IIIc) ; 或



(式 IIId) 。

[0026] 在另一个实施方案中,本文提供了一种包含一种或多种如上所述同位素标记的化合物的代谢示踪剂组合物。

[0027] 在又一个实施方案中,本文提供了一种包含任何一种或多种上述化合物以及赋形

剂、载体或稀释剂的组合物。

[0028] 在另一个实施方案中,本文提供了一种包含一种或多种如上所述同位素标记的化合物的体外或体内诊断剂。

[0029] 在另一个实施方案,本文提供了一种包含任何一种或多种上述化合物以及赋形剂、载体或稀释剂的组合物。

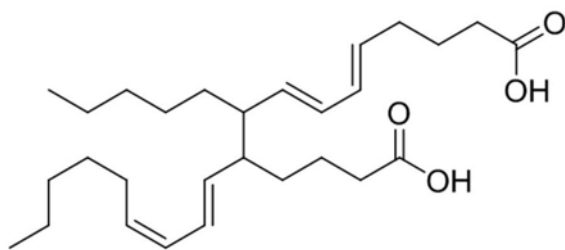
[0030] 在又一个实施方案中,本文提供了一种用于确定样品中胃酸 (GTA) 水平的方法,所述方法包含:

[0031] 测量来自样品的GTA检测信号,该GTA检测信号代表样品中的GTA水平;和

[0032] 通过将测得的GTA检测信号与校准参考进行比较定量样品中的GTA水平。

[0033] 在上述方法的另一个实施方案中,该GTA可以是:

[0034]



(式 I)。

[0035] 在一种或多种上述方法的另一个实施方案中,可以通过质谱测量GTA检测信号。

[0036] 在一种或多种上述方法的又一个实施方案中,该校准参考可以包含使用已知量的一种或多种如上所定义的化合物制得的标准曲线。

[0037] 在一种或多种上述方法的另一个实施方案中,可以通过以下获得校准参考:

[0038] 用已知量的一种或多种如上所定义的同位素标记的化合物加标样品;

[0039] 和

[0040] 测量来自样品的内标信号,该内标信号代表加标到样品中已知量的同位素标记的化合物。

[0041] 在一种或多种上述方法的另一个实施方案中,可以通过质谱测量内标信号。

[0042] 在一种或多种上述方法的另一个实施方案中,该方法可以进一步包含确定样品中的GTA水平(如测得的GTA检测信号所示)与加标到样品中已知量的同位素标记的化合物(如内标信号所示)的比例的步骤。

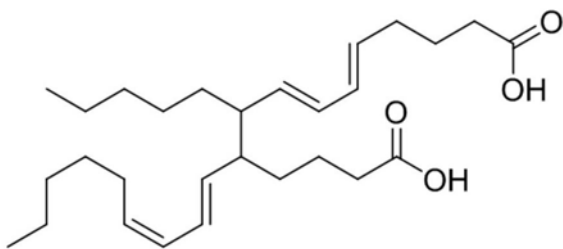
[0043] 在一种或多种上述方法的另一个实施方案中,该校准参考可以包含由一系列变化的GTA/同位素标记的化合物比例和浓度的混合物产生的同位素稀释曲线(IDC),将所述比例与该曲线进行比较。

[0044] 在一种或多种上述方法的又一个实施方案中,该IDC可以由一系列GTA含量随固定量的同位素标记的化合物而变化的混合物产生。

[0045] 在一种或多种上述方法的另一个实施方案中,固定量的同位素标记的化合物可以与加标到样品中已知量的同位素标记的化合物基本上相同。

[0046] 在另一个实施方案中,本文提供了一种或多种如上所定义的化合物在确定样品中胃酸 (GTA) 水平中的应用。在另一个实施方案中,该GTA可以是:

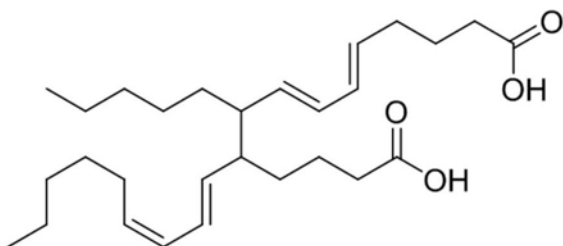
[0047]



(式 I)。

[0048] 在另一个实施方案中,本文提供了一种或多种如上所定义的化合物在产生用于确定样品中胃酸 (GTA) 水平的校准参考中的应用。在另一个实施方案中,该GTA可以是:

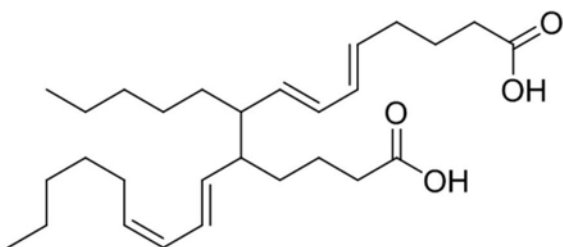
[0049]



(式 I)。

[0050] 在另一个实施方案中,本文提供了一种或多种如上所定义的化合物作为用于确定样品中胃酸 (GTA) 水平的内标的应用。在另一个实施方案中,该GTA可以是:

[0051]



(式 I)。

[0052] 在另一个实施方案中,本文提供了一种用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法,所述方法包含:

[0053] 通过以下确定获自受试者的样品中的胃酸 (GTA) 水平:

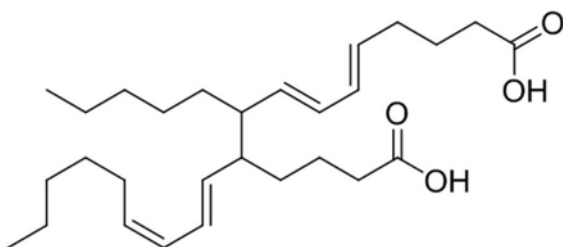
[0054] 测量来自样品的GTA检测信号,GTA检测信号代表样品中的GTA水平,和

[0055] 通过将测得的GTA检测信号与校准参考进行比较定量样品中的GTA水平,

[0056] 当与健康对照组相比,样品中所确定的GTA水平降低时,将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌的风险,

[0057] 其中,GTA是:

[0058]



(式 I)。

[0059] 在另一个实施方案中,可以通过质谱测量GTA检测信号。

[0060] 在一种或多种上述方法的另一个实施方案中,该校准参考可以包含使用已知量的一种或多种如上所定义的化合物制得的标准曲线。

[0061] 在一种或多种上述方法的另一个实施方案中,确定获自受试者的样品中的GTA水平的步骤可以包含:

[0062] 用已知量的一种或多种如上所定义的同位素标记的化合物加标样品;

[0063] 和

[0064] 测量来自样品的内标信号,该内标信号代表加标到样品中已知量的同位素标记的化合物。

[0065] 在另一个实施方案中,可以通过质谱测量内标信号。

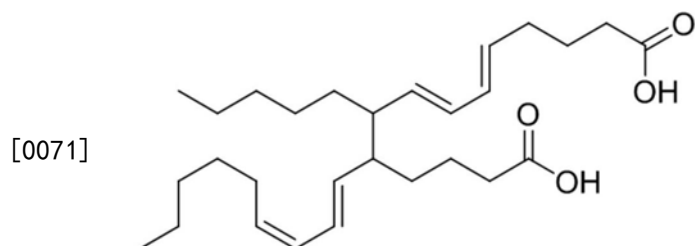
[0066] 在一种或多种上述方法的又一个实施方案中,该方法可以进一步包含确定样品中的GTA水平(如测得的GTA检测信号所示)与加标到样品中已知量的同位素标记的化合物(如内标信号所示)的比例的步骤。

[0067] 在一种或多种上述方法的又一个实施方案中,该校准参考可以包含由一系列变化的GTA/同位素标记的化合物比例和浓度的混合物产生的同位素稀释曲线(IDC),并将所述比例与该曲线进行比较。

[0068] 在另一个实施方案中,该IDC可以由一系列GTA含量随固定量的同位素标记的化合物而变化的混合物产生。

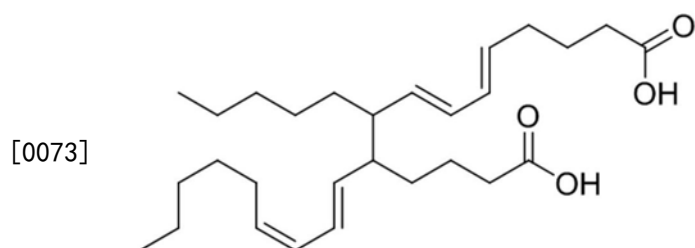
[0069] 在一种或多种上述方法的另一个实施方案中,固定量的同位素标记的化合物可以与加标到样品中已知量的同位素标记的化合物基本上相同。

[0070] 在另一个实施方案中,本文提供了一种或多种如上所定义的化合物在用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法中的应用,所述结直肠癌与胃酸(GTA)水平改变相关,其中:



(式 I)。

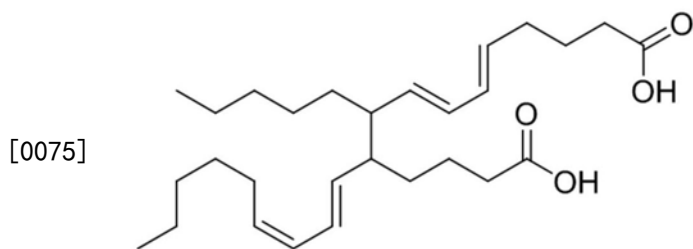
[0072] 在又一个实施方案中,本文提供了一种或多种如上所定义的化合物在产生用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法中的校准参考中的应用,所述结直肠癌与胃酸(GTA)水平改变相关,其中:



(式 I)。

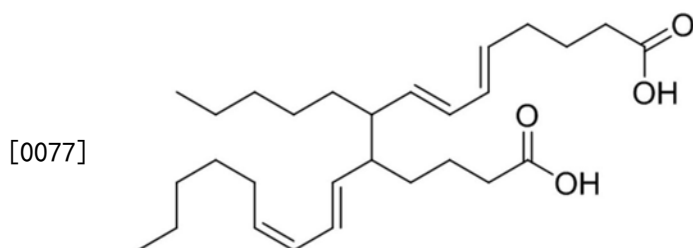
[0074] 在另一个实施方案中,本文提供了一种或多种如上所定义的化合物在作为用于将

受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法中的内标中的应用,所述结直肠癌与胃酸 (GTA) 水平改变相关,其中:



(式 I)。

[0076] 在另一个实施方案中,本文提供了一种特异性结合式I化合物的抗体或其抗原结合片段:

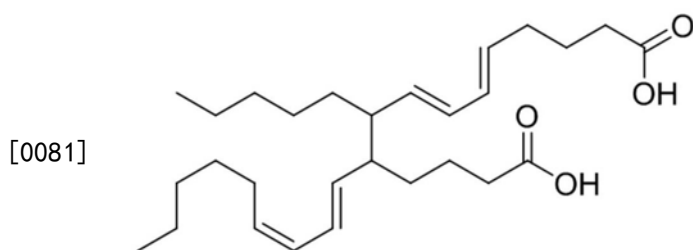


(式 I)。

[0078] 在另一个实施方案中,该抗体可以是单克隆或多克隆抗体。

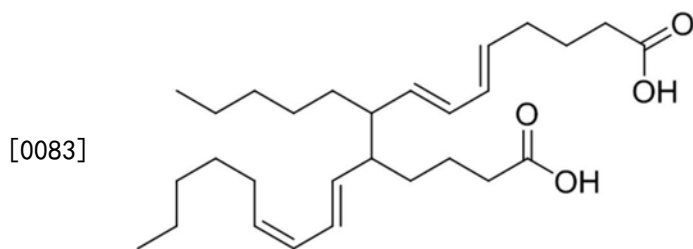
[0079] 在另一个实施方案中,本文提供了一种或多种如上所定义的化合物在作为用于制备抗体的抗原中的应用,该抗体特异性结合该化合物的抗原表位。

[0080] 在另一个实施方案中,本文提供了一种或多种如上所定义的抗体在用于通过免疫测定检测或定量样品中的胃酸 (GTA) 水平中的应用,其中,该GTA是:



(式 I)。

[0082] 在又一个实施方案中,本文提供了一种或多种如上所定义的抗体在用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法中的应用,所述结直肠癌与胃酸 (GTA) 水平改变相关,其中:



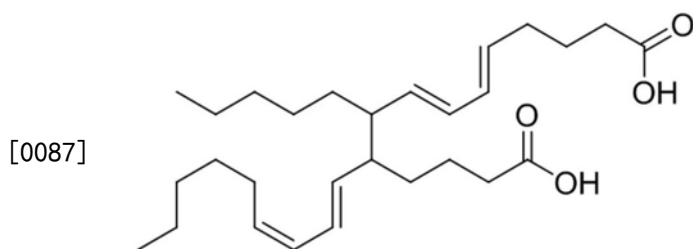
(式 I)。

[0084] 在另一个实施方案中,本文提供了一种用于确定样品中胃酸 (GTA) 水平的方法,所

述方法包含：

[0085] 使用采用特异性结合GTA的抗体或其抗原结合片段的免疫测定来测量样品中的GTA水平；

[0086] 其中，该GTA是：



(式 I)。

[0088] 在上述方法的另一个实施方案中，该免疫测定可以包含酶联免疫吸附测定 (ELISA)。

[0089] 在一种或多种上述方法的另一个实施方案中，该方法可以进一步包含在免疫测定中使用包含一种或多种如上所定义的化合物的对照样品作为阳性对照的步骤。

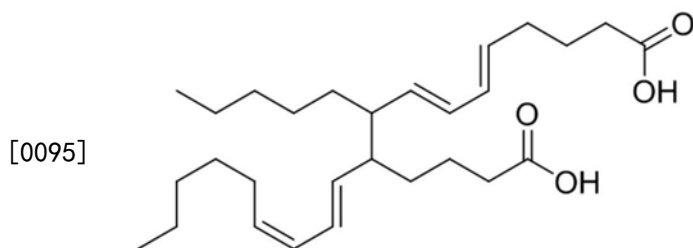
[0090] 在一种或多种上述方法的另一个实施方案中，该方法可以进一步包含使用标准曲线推断样品中的GTA水平的步骤，且使用多个已知量的一种或多种上述所定义的化合物产生该标准曲线。

[0091] 在另一个实施方案中，本文提供了一种用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法，所述方法包含：

[0092] 通过使用采用特异性结合GTA的抗体或其抗原结合片段的免疫测定来测量样品中的GTA水平而确定获自受试者的样品中的胃酸 (GTA) 水平；和

[0093] 当与健康对照组相比，样品中所确定的GTA水平降低时，将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌的风险，

[0094] 其中，该GTA是：



(式 I)。

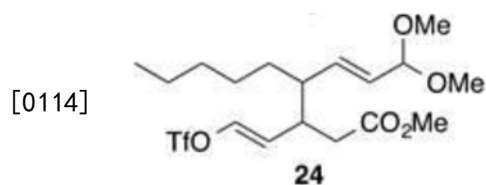
[0096] 在另一个实施方案中，该免疫测定可以包含酶联免疫吸附测定 (ELISA)。

[0097] 在一种或多种上述方法的另一个实施方案中，该方法可以进一步包含在免疫测定中使用包含一种或多种如上所定义的化合物的对照样品作为阳性对照的步骤。

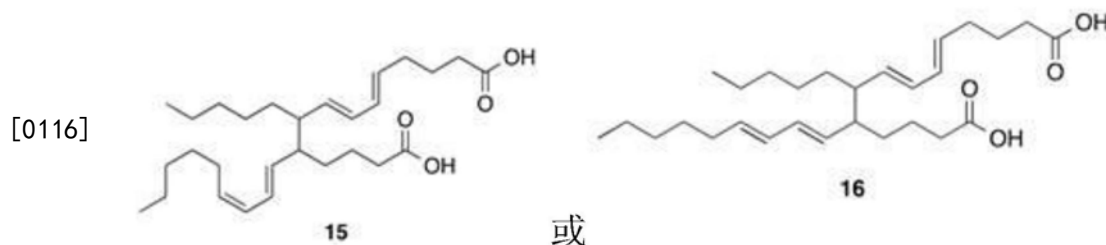
[0098] 在一种或多种上述方法的又一个实施方案中，确定样品中GTA水平的步骤可以进一步包含使用标准曲线推断样品中的GTA水平，使用多个已知量的一种或多种上述所定义的化合物产生该标准曲线。

[0099] 在另一个实施方案中，本文提供了一种用于定量样品中胃酸 (GTA) 水平的试剂盒，该试剂盒包含以下至少一种：

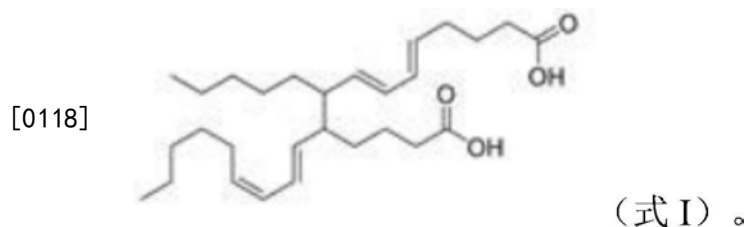
- [0100] 一种或多种如上所定义的化合物；
 [0101] 如上所定义的代谢示踪剂；
 [0102] 一种或多种如上所定义的组合物；
 [0103] 如上所定义的诊断剂；和
 [0104] 一种或多种如上所定义的抗体；
 [0105] 任选地，进一步包含一组用于进行一种或多种如上所定义的方法的说明书。
 [0106] 在另一个实施方案中，本文提供了一种用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断试剂盒，该诊断试剂盒包含以下至少一种：
 [0107] 一种或多种如上所定义的化合物；
 [0108] 如上所定义的代谢示踪剂；
 [0109] 如上所定义的组合物；
 [0110] 如上所定义的诊断剂；和
 [0111] 一种或多种如上所定义的抗体；
 [0112] 任选地，进一步包含一组用于进行一种或多种如上所定义的方法的说明书。
 [0113] 在另一个实施方案中，本文提供了一种具有下式的化合物或其标记的衍生物：



- [0115] 在又一个实施方案中，本文提供一种上述化合物在合成具有下式的化合物或其盐、酯、前药或标记的衍生物中的应用：

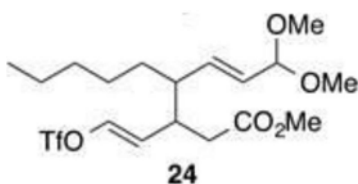


- [0117] 在另一个实施方案中，本文提供了一种合成具有式 (I) 的化合物或其同位素标记的衍生物的方法：



- [0119] 所述方法包含：
 [0120] 提供一种具有下式的化合物

[0121]



;

[0122] 进行所述化合物与1-庚炔的菌头 (Sonagashira) 偶联;

[0123] 使用林德拉 (Lindlar) 催化剂进行还原;

[0124] 进行甲酯还原;

[0125] 与甲磺酰氯进行反应;

[0126] 用丙二酸二甲酯进行甲磺酸酯取代;

[0127] 进行酸处理以同时进行缩醛裂解、酯水解和脱羧;和

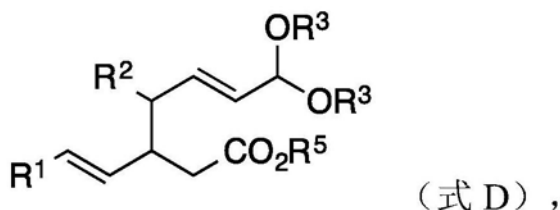
[0128] 进行维蒂希 (Wittig) 反应以得到式I化合物或其同位素标记的衍生物,

[0129] 其中,式24的化合物或该方法中的至少一种反应物包含至少一个同位素标记的原子,当合成式I的同位素标记的衍生物时,该原子被掺入所得的式I化合物中。

[0130] 在另一个实施方案中,维蒂希 (Wittig) 反应可以包含与 (三苯基磷亚基) 乙醛或 (4-羧丁基) 三苯基溴化磷的反应。

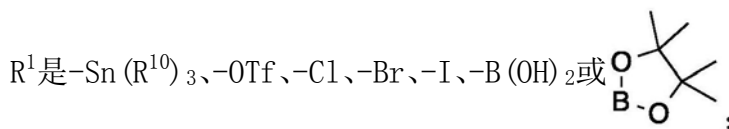
[0131] 在另一个实施方案中,本文提供了一种具有式D的化合物或其标记的衍生物:

[0132]

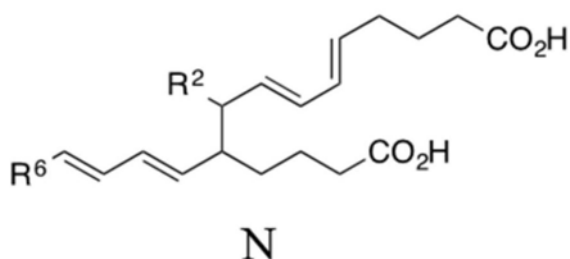


[0133] 其中:

[0134]

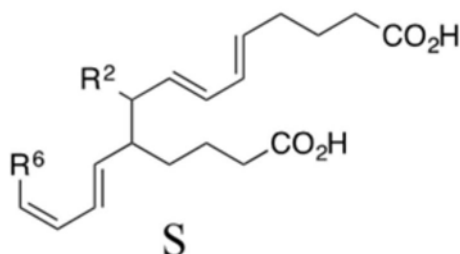
[0135] R^2 为任选取代的饱和或不饱和 C_1 - C_{20} 烷基、饱和或不饱和 C_2 - C_{20} 烯基、或饱和或不饱和 C_2 - C_{20} 炔基;[0136] R^3 各自独立地为任选取代的 C_1 - C_6 烷基,或 R^3 基团一起形成任选取代的亚乙基或亚丙基,其桥接所连接的氧原子以形成五元环或六元环;[0137] R^5 是任选取代的 C_1 - C_6 烷基;并且[0138] R^{10} 是任选取代的 C_1 - C_6 烷基。

[0139] 在又一个实施方案中,本文提供了一种式D的化合物在胃酸 (GTA) 或其衍生物合成中的应用。在某些实施方案中,该GTA或其衍生物可以是式N或S的化合物或其盐、酯、前药或标记的衍生物:



, 或

[0140]



[0141] 其中

[0142] R^2 为任选取代的饱和或不饱和 C_1 - C_{20} 烷基、饱和或不饱和 C_2 - C_{20} 烯基、或饱和或不饱和 C_2 - C_{20} 炔基；并且

[0143] R^6 为任选取代的饱和或不饱和 C_1 - C_{20} 烷基、饱和或不饱和 C_2 - C_{20} 烯基、或饱和或不饱和 C_2 - C_{20} 炔基。

[0144] 在另一个实施方案中,本文提供了一种用于合成如上所定义的式N或S的化合物或其同位素标记的衍生物的方法,所述方法包含:

[0145] 提供如上所定义的式D化合物;

[0146] 进行偶联反应并任选进行还原以用任选取代的饱和或不饱和烷基、饱和或不饱和烯基、或饱和或不饱和炔基替代 R^1 基团;

[0147] 将含 R^5 的酯转化为羟基;

[0148] 将羟基转化为离去基团(leaving group);

[0149] 用丙二酸二烷基酯取代离去基团;

[0150] 进行缩醛水解、酯水解和脱羧以形成醛;并且

[0151] 在醛上进行偶联反应以得到式N或S的化合物或其同位素标记的衍生物,

[0152] 其中,式D的化合物或该方法中的至少一种反应物包含至少一个同位素标记的原子,当合成式N或S的同位素标记的衍生物时,该原子被掺入所得的式N或S化合物中。

附图说明

[0153] 图1显示了在开发任何方法之前,阴性APCI中水饱和乙酸乙酯中的常规血清有机萃取物的典型总离子流注入色谱图(TIC)。该图显示了综合血清基质中的GTA-446多低;

[0154] 图2显示了水饱和乙酸乙酯中的常规血清有机萃取物的全扫描柱色谱图(RP-18),其显示了使用甲醇水梯度的16-18分钟的GTA洗脱窗口;

[0155] 图3显示了单相萃取(MeOH-1-MeOH-3)和双相萃取(N-1-N3)之间有机相中CRC 446(MRM 445/383)水平的比较。基于该数据进行了单相萃取;

[0156] 图4显示了使用单相萃取然后进行相分离的上有机相的总离子流注入色谱图。观察到GTA 446的 m/z 为445.3;

[0157] 图5显示了NAPCI中正相快速柱色谱级分3 (F3) 的全扫描流注入色谱图,其显示了与粗基质相比的GTA富集;

[0158] 图6显示了NAPCI中反相快速柱色谱级分5 (F5) 的全扫描流注入色谱图,其显示了进一步纯化的GTA 446;

[0159] 图7显示了NAPCI中反相快速柱色谱级分6 (F6) 的全扫描流注入色谱图,其显示了进一步纯化的GTA 446;

[0160] 图8显示了NAPCI中来自制备型HPLC-RP分离的富含GTA-446的样品的全扫描色谱图;

[0161] 图9显示了NAPCI中来自制备型HPLC-NP分离的全扫描色谱图,其显示了纯化的GTA 446;

[0162] 图10显示了在NAPCI CE=35v中分离的GTA-446的串联MS谱,其显示了与在综合血清基质中发现的其内源形式类似的指纹碎片(fragmentation fingerprint);

[0163] 图11显示了分离的GTA-446生物标记物_2 (在CDCl₃中) 的¹H-NMR,其显示了8个亚甲基质子(δ5.5至6.2pm)、2个末端甲基(-CH₂CH₃, δ0.84和0.89pm,每个3H, t), 以及来自作为主要官能团的2个-COOH基团的δ12.0ppm处的一个宽峰;

[0164] 图12显示了分离的GTA-446生物标记物_2 (在CDCl₃中) 的¹³C-NMR,其显示了8个亚甲基碳(δ126至136pm)、2个末端甲基(-CH₂CH₃, δ14.0和14.1pm) 以及来自2个-COOH基团的δ181.2、181.4ppm处的2个羰基碳、作为独特的结构实体的45.4、47.0ppm处的2个亚甲基碳;

[0165] 图13显示了GTA-446生物标记物_2 (在CDCl₃中) 的¹H-¹H COSY分析,其显示了2D质子相关性。由它们的偶联常数推导出E,E和E,Z构型;

[0166] 图14显示了分离的GTA-446生物标记物_2 (在CDCl₃中) 的直接¹H-¹³C (HMQC) 分析,其显示了直接的2D ¹³C-¹H相关性;

[0167] 图15显示了分离的GTA-446生物标记物_2 (在CDCl₃中) 的远程¹H-¹³C (HMBC) 分析,其显示了相邻的2D ¹³C-¹H相关性;

[0168] 图16显示了建议的用于GTA-446的¹³C稳定同位素形式及其基于天然存在形式预测的串联MS片段;

[0169] 图17显示了使用25种单个人血清样品对建议的GTA-446 ¹³C稳定同位素进行的血清干扰检查。这显示了预测的结构A和B具有最低的血清干扰,并且可以用作同位素稀释法中的内标的候选以测量GTA-446的内源水平;以及

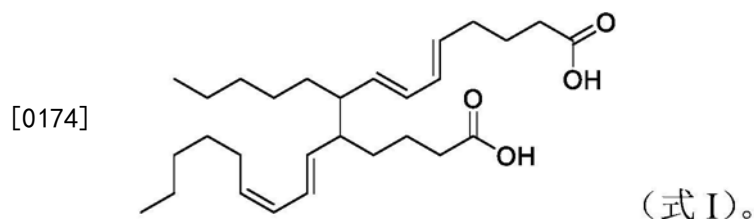
[0170] 图18显示了用于商业制造GTA-446的工艺实施方案概述的例子,该GTA-446用作CRC血液测试中的商业标准。

具体实施方式

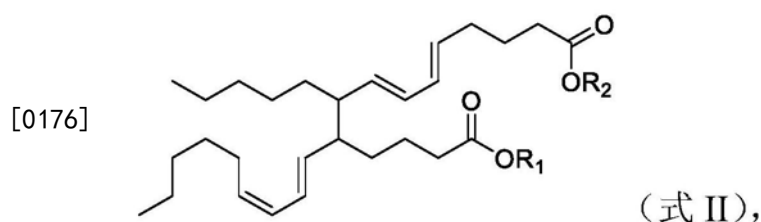
[0171] 本文所述的是具有式I结构的基于胃酸(GTA)的化合物以及其盐、酯、前药或标记的衍生物,以及与此相关的其他化合物。此类GTA化合物可以用于确定样品的GTA水平以用于将受试者诊断为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌的风险或用于产生抗体。描述了特异性结合式I (或相关化合物) 的GTA的抗体或其片段以及此类抗体或其片段用于确定样品中GTA水平或用于将受试者诊断为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的应用。还提供了包含此类GTA化合物和/或抗体的试剂盒。

[0172] 应当理解的是,用于本领域技术人员的说明性目的提供了实施方案和实施例,并不意味着以任何方式进行限制。

[0173] 在某些实施方案中,本文提供了一种具有式I结构的胃酸(GTA)化合物或其盐、酯、前药或标记的衍生物:

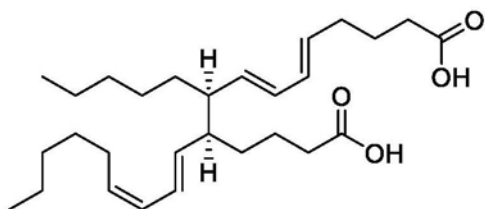


[0175] 在某些实施方案中,该GTA化合物可以包括具有式II结构的化合物:

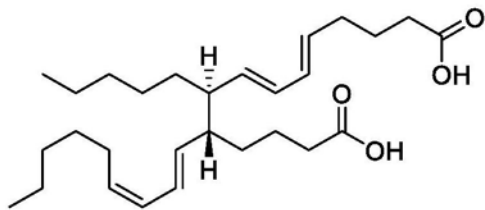


[0177] 其中, R_1 和 R_2 各自独立地为氢;反离子;直链或支链取代或未取代的烷烃,烯烃或炔烃;取代或未取代的环烷,环烯或环炔;取代或未取代的芳族基团;前药的载体(promoiety);荧光团;或保护基团;或其中, OR_1 和/或 OR_2 各自独立地被可生物裂解的官能团替代,该可生物裂解的官能团可在体外或体内被加工以形成 $-COOH$ 基团或其盐。

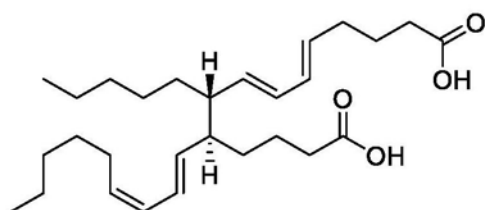
[0178] 应当理解的是,在某些实施方案中,式I和/或II的化合物可以以立体异构体的混合物(其通常可以是外消旋的,或者可以至少部分地富含一种或多种立体异构体)提供,或者可以以基本上立体异构纯的形式提供。式I和II的化合物包括两个手性碳,并且可以被配置为R/R、R/S、S/R和S/S非对映异构体。因此,在某些实施方案中,本文提供了一种具有以下结构的GTA化合物或其任何混合物:



(式 Ia);

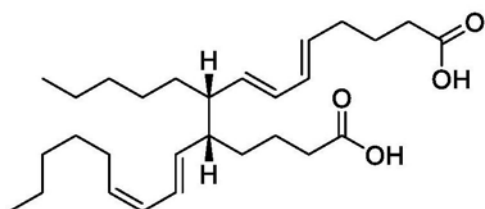


(式 Ib)

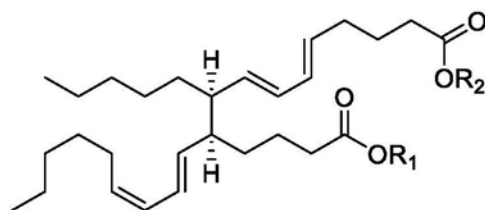


(式 Ic)

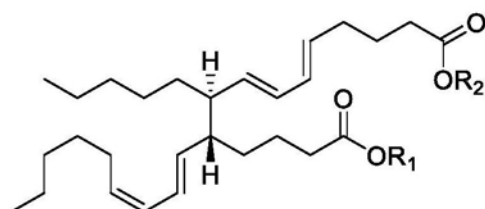
[0179]



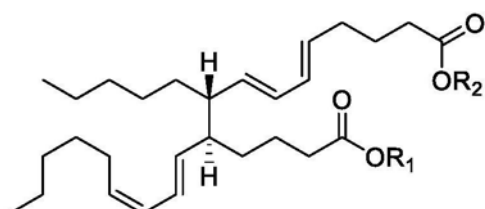
(式 Id)



(式 IIa)



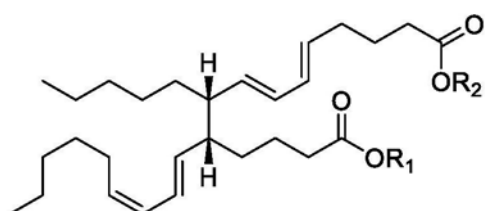
(式 IIb)



(式 IIc);

[0180]

或者



(式 IId)。

[0181]

[0182] 在某些实施方案中,举例来说,反离子可以包括任何合适的反离子以平衡-COO⁻基团上的负电荷,从而形成盐。非限制性例子可以包括例如钠、钾、锂、铵或烷基铵。

[0183] 前药载体的例子可以包括例如甲基、乙基、丙基或异丙基、疏水性基团、膜转运肽或信号、跨膜部分、细胞靶向部分或在体外或体内可生物裂解的其他合适的基团。

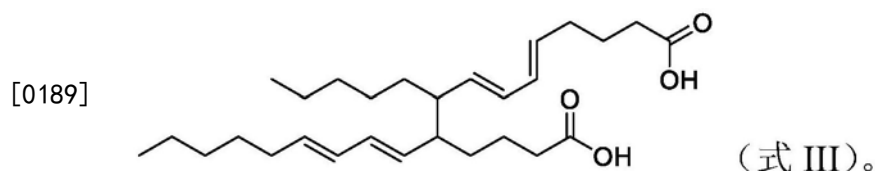
[0184] 荧光团的例子可以包括例如荧光素、花青(cyanine)、GFP、YFP、RFP或其他此类荧光团、染料或可商购的标记。

[0185] 保护基团的例子可以包括例如甲酯、苄酯、叔丁酯、恶唑啉或甲硅烷基酯。本领域技术人员将意识到多种保护基团,其中许多保护基团描述在Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, Fourth Ed., ISBN:9780471697541 (2007; John Wiley & Sons, Inc.) 中,其通过引用整体并入本。

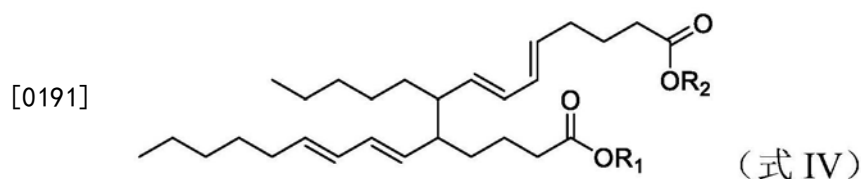
[0186] 可以在体内或体外加工以形成-COOH基团或其盐的可生物裂解的官能团的例子可以包括例如任何合适的碳酸盐、酯、酰胺或氨基甲酸酯基团(carbamate group)。

[0187] 在某些其他实施方案中,该GTA化合物可以包括上述任何化合物的同位素标记的衍生物。在某些实施方案中,该同位素标记的衍生物可以包括一种或多种整合在其中的同位素标记。在某些实施方案中,一种或多种同位素标记可以包括稳定的同位素标记、放射性同位素标记或其组合。该同位素标记可以例如包含氘(²H)或¹³C或两者。在某些实施方案中,该同位素标记可以例如包含氚(³H)、¹⁴C或两者。在某些实施方案中,该同位素标记可以包含至少一个氘或氚标记,例如在GTA结构内的饱和碳处其共价结合至碳原子。考虑了本文教导的技术人员将意识到可以与上述化合物掺入或连接以便适合特定应用的多种标记(同位素、放射性同位素、荧光或其他标记)。

[0188] 在某些实施方案中,本文还提供了与上述胃酸(GTA)化合物相关的化合物,其可以具有类似的性质。在某些实施方案中,本文提供了一种具有式III结构的化合物或其盐、酯、前药或标记的衍生物:

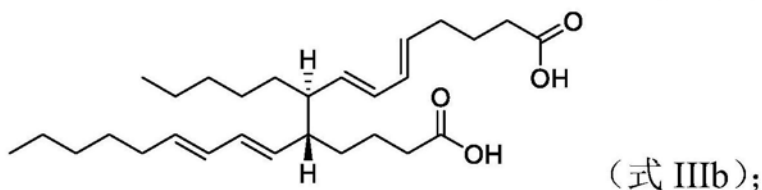
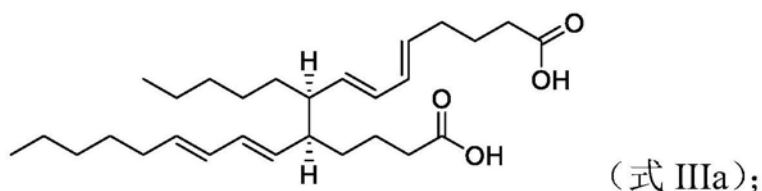


[0190] 在另一个实施方案中,本文提供了式IV的化合物:

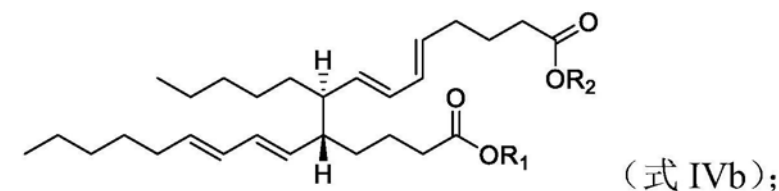
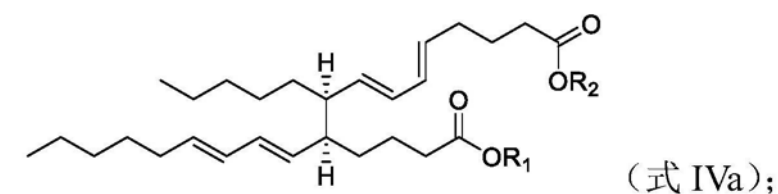
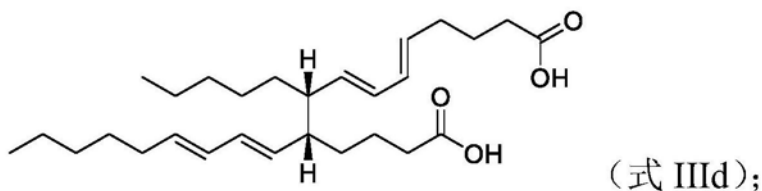
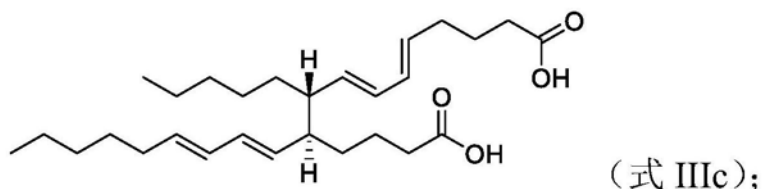


[0192] 其中,R₁和R₂如以上参考式II所定义。

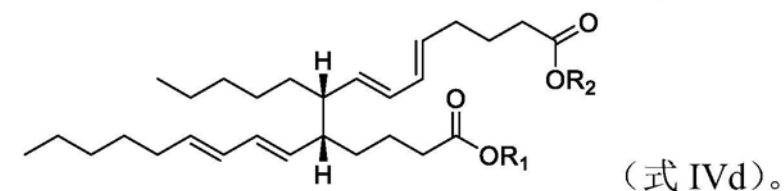
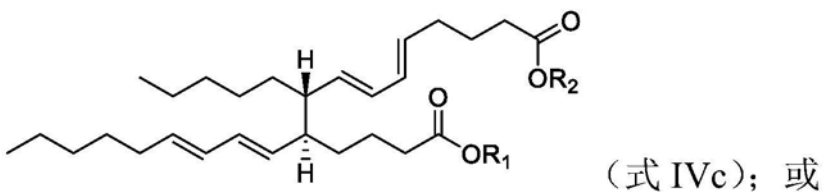
[0193] 应当理解的是,在某些实施方案中,式III和/或IV的化合物可以以立体异构体的混合物(其通常可以是外消旋的,或者可以至少部分地富含一种或多种立体异构体)提供,或者可以以基本上立体异构纯的形式提供。式III和IV的化合物包括两个手性碳,并且可以被配置为R/R、R/S、S/R和S/S非对映异构体。因此,在某些实施方案中,本文提供了一种具有以下结构的化合物或其任何混合:



[0194]



[0195]



[0196] 在某些其他实施方案中,式III或IV的化合物可以包括上述任何化合物的同位素标记的衍生物。在某些实施方案中,该同位素标记的衍生物可以包括一种或多种整合在其中的同位素标记。在某些实施方案中,一种或多种同位素标记可以包括稳定的同位素标记、放射性同位素标记或其组合。该同位素标记可以例如包含氘(^2H)或 ^{13}C 或两者。在某些实施方案中,该同位素标记可以例如包含氚(^3H)、 ^{14}C 或两者。在某些实施方案中,该同位素标记

可以包含至少一个氘或氚标记,例如在该结构内的饱和碳处其共价结合至碳原子。考虑了本文教导的技术人员将意识到可以与上述化合物掺入或连接以便适合特定应用的多种标记(同位素、放射性同位素、荧光或其他标记)。

[0197] 在下面进一步详细描述了此类化合物的其他实施方案及其预期应用。

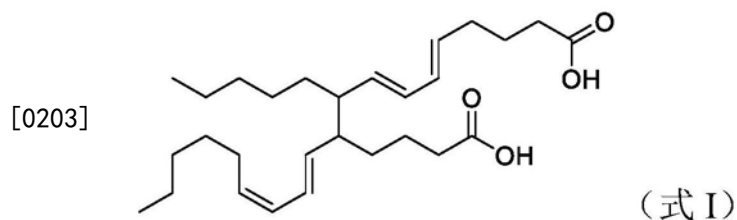
[0198] 胃酸和GTA-446

[0199] 本文提供了多不饱和28-碳二羧酸脂肪酸,包括胃酸GTA-446及其衍生物。此类化合物可以例如用于提高测定的准确性和/或特异性,该测定可以定量血清和/或其他生物基质中所述28-碳脂肪酸或其他GTA的水平。

[0200] 在某些实施方案中,本文所述的化合物可以例如用作相关分子定量中的参考标准或校准参考,所述相关分子包括例如样品中的胃酸GTA-446或其他此类GTA,例如在某些实施方案中该样品可以是人血清样品或其他此类样品的生物样本。

[0201] 胃酸GTA-446之前尚未得到充分表征、尚未合成制得且尚未产生标记的衍生物。此外,到目前为止,GTA-446 ($C_{28}H_{46}O_4$) 被认为是含有四个不饱和度(unsaturation)、单个羧酸部分和两个羟基部分的单个长链脂肪酸。

[0202] 然而,本文详细的实验研究现已表明了GTA-446实际上是包含2个共轭的14-碳不饱和脂肪酸的二羧酸脂肪酸二聚体(参见下式I)。具体地,GTA-446在9-和5'-位桥接并包含2个末端羧酸基团。基于这些结果,似乎可能GTA家族一般可以由桥接在其烷基骨架之间的长链(C_{14} - C_{22})多不饱和脂肪酸二聚体组成。据我们所知,这项工作代表了首次具有这种结构的分子已被报道,特别是在人血清中。



[0204] GTA-446的分子结构源自NMR(1H , ^{13}C , COSY, HMBC和HMQC)和质谱(FTICR和MS/MS)。化学式 $C_{28}H_{46}O_4$ 。精确质量:446.34

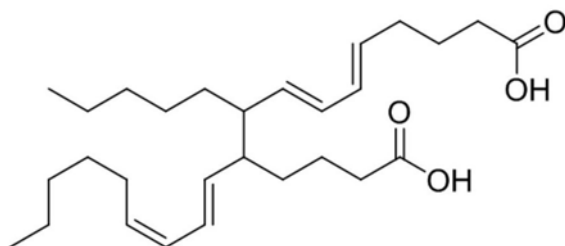
[0205] 因此,在某些实施方案中,本文提供了纯化的或分离的GTA-446化合物或组合物,其可以例如用作分析标准。本文还提供了用于从富含GTA-446的起始原料(例如人血清)中获得纯化的式I化合物的分离工艺,该工艺涉及多步骤过程,该过程可以包括靶标的沉淀、相分离、FCC和/或HPLC分离的步骤以实现高纯度。

[0206] 在另一个实施方案中,本文提供了通过将一种或多种标记掺入到纯化的GTA-446异构体中来产生GTA-446(和与之相关的其他化合物)的标记异构体的方法。举例来说,可以通过包含氘交换步骤或选自多种形式衍生化的其他合适的修饰步骤的方法掺入此类标记,所述衍生化可以包括使用合适的市售试剂(例如PTAD, 4-苯基-1,2,4-三唑啉-3,5-二酮)以及多种羧酸衍生物的共轭体系的Diels-Alder衍生化。在某些实施方案中,其中GTA-446的标记异构体用于质谱应用时,可以设计GTA-446的标记异构体使得亲代子代离子的质量与通过MS分析鉴定或定量的未标记的GTA-446分析物(或其他分析物)不同。在下面进一步详细描述了合理设计的同位素标记的化合物的例子。

[0207] 在某些实施方案中,本文提供了一种具有式I结构的化合物或其盐、酯、前药或标

记的衍生物:

[0208]



(式 I)。

[0209] 还提供了相关的化合物,例如上述式II、III和IV的那些化合物。

[0210] 在某些实施方案中,该化合物可以是分离的或纯化的化合物。该化合物可以是例如合成制得的化合物。在某些实施方案中,该化合物可以制备为用于分析的分析标准化合物。

[0211] 本文还提供了包含此类化合物和可接受的赋形剂、载体或稀释剂的组合物。

[0212] 从人血清中分离

[0213] 在下面实施例1和2中详细描述了从人血清中分离GTA-446工艺的例子。在某些实施方案中,这些工艺可以涉及评估大量商购的血清以鉴定具有高GTA-446浓度的那些血清,然后采购大量(50L)所选批次。在某些实施方案中,可以在水和用甲酸缓冲的乙酸乙酯之间萃取大量的测试血清(从而沉淀出蛋白)。在实施例1的研究中,观察到在所选方法下,在16.3至17.6分钟之间用九种其他类似的脂肪酸库洗脱GTA-446(参加下文)。可以基于GTA-446的起始萃取的清洁度和/或富集度来决定血清来源的选择,这可能有助于促进放大萃取,因为其他污染物可能会降低纯化效率。

[0214] 下面进一步详细描述的实验已经鉴定出用于分离用于生物流体的GTA-446的方法。因此,在某些实施方案中,本文提供了一种从人血清、血液或其他合适的生物流体中分离GTA-446的方法,该方法包含溶剂萃取/沉淀步骤以及随后的柱色谱分离步骤。

[0215] 在某些实施方案中,本文提供了一种从生物流体中纯化GTA-446的方法,所述方法包含:

[0216] 在单相萃取/蛋白沉淀步骤中处理生物流体,从而产生沉淀的蛋白固体和液相;

[0217] 从液相中分离出沉淀的蛋白固体;

[0218] 在相分离步骤中处理液相以获得有机血清萃取物;

[0219] 在柱分离步骤中处理有机血清萃取物,其包含:

[0220] 正相分离步骤;

[0221] 反相分离步骤;和

[0222] 两阶段HPLC分离步骤,其包含反相阶段以及随后的正相阶段;

[0223] 其中,在两阶段HPLC分离步骤的正相阶段之后洗脱纯化的GTA-446级分,从而提供纯化的GTA-446。

[0224] 在上述方法的某些实施方案中,单相萃取/蛋白沉淀步骤可以包含在甲醇存在下在水中使用乙酸乙酯萃取,其中,甲醇充当用于将乙酸乙酯在水中混合的介质。举例来说,单相萃取混合物包含具有约1:2:4比例的血清:甲醇(含1%甲酸):乙酸乙酯的溶剂混合物,该单相萃取混合物可以用于单相萃取/蛋白沉淀步骤,其可能涉及约5分钟的等待时间才能使沉淀发生。在某些实施方案中,该相分离步骤可以包含使用己烷相分离液相,从而获得有

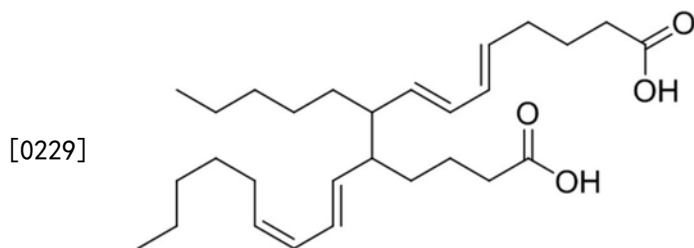
机血清萃取物。因此,在某些此类实施方案中,例如,相分离步骤中的溶剂比例可以为约1:2:4:4的血清:甲醇:乙酸乙酯:己烷。

[0225] 合理设计的标记衍生物

[0226] 式I结构的发现以及该结构与生物标记物GTA-446的连接还使得能够合理设计同位素标记的GTA-446衍生化合物。此类化合物可以例如被设计成促进生物样品中基于质谱的GTA-446 (或其他GTA) 的分析和/或定量。举例来说,可以设计同位素标记的GTA-446衍生化合物以便提供与在分析和/或定量方法中所用的亲本/子代GTA-446MS信号对应的内标信号。此类同位素标记的GTA-446衍生化合物可以例如被设计为提供与在分析和/或定量方法中所用的亲本/子代GTA-446 (或其他GTA) MS信号对应的内标信号,从而内标物信号与分析期间检测到的其他不相关血清信号基本上不重叠或不受其干扰。

[0227] 在设计此类同位素标记的化合物的例子时,使用血清和串联质谱分析进行了干扰研究以调查多种理论上¹³C掺入的GTA-446异构体的亲本子代离子组合而验证缺乏干扰信号。在某些例子中,分析了三种候选标准,这导致与对应的未标记的GTA-446串联MS对类似的理论MS/MS片段;水分和二氧化碳流失后的亲本子代片段。参见图16中的结构(A)、(B)和(C),每个结构均代表经合理设计的同位素标记的GTA-446衍生物。在25个单个血清萃取物样品中分析了这些衍生物。特别是分子A和B对未加标的血清萃取物的干扰均较低,这表明了这两种分子特别地都是潜在有用的内标候选物。如图16所示的同位素标记的化合物(A)、(B)、(C)以及片段A和B的干扰分析如图17所示。在某些实施方案中,此类同位素标记的化合物可用于掺入到稳定的同位素稀释方法中以定量血清中的GTA-446水平。

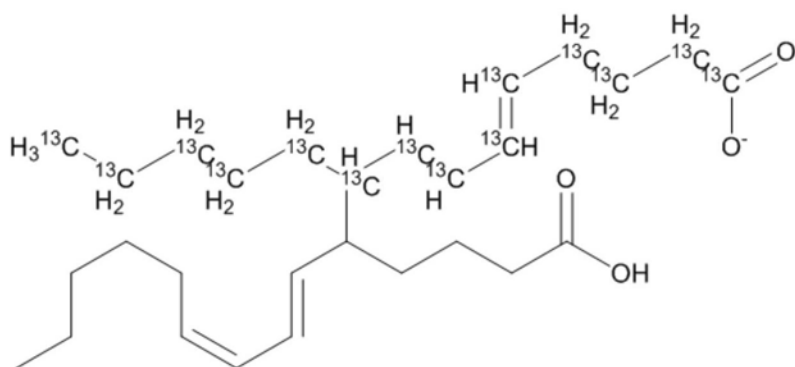
[0228] 在某些实施方案中,本文提供了一种同位素标记的化合物或其盐、酯或前药,该同位素标记的化合物包含掺入式I结构内的一个或多个同位素标记:



(式 I)。

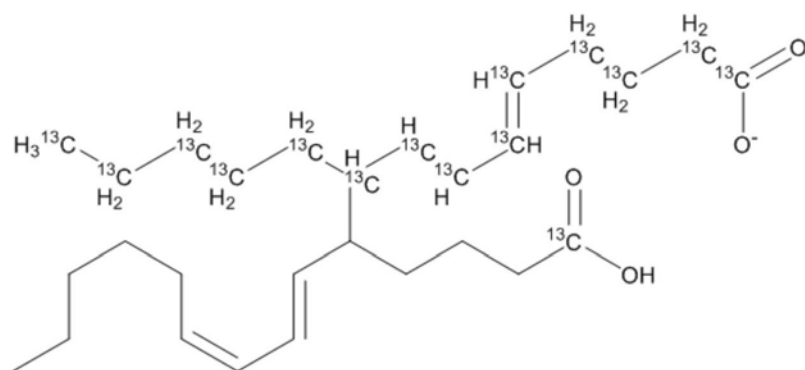
[0230] 在某些实施方案中,上述同位素标记的化合物可以包含一种或多种同位素标记,该同位素标记为稳定的同位素标记、放射性同位素标记或其组合。一种或多种同位素标记例如可以选自由氘(²H)和¹³C组成的组。在某些另外的实施方案中,一种或多种同位素标记可以选自由氚(³H)和¹⁴C组成的组。

[0231] 在某些例子中,同位素标记的化合物可以是或包含具有式(A)、(B)或(C)结构的化合物或其盐、酯或前药:

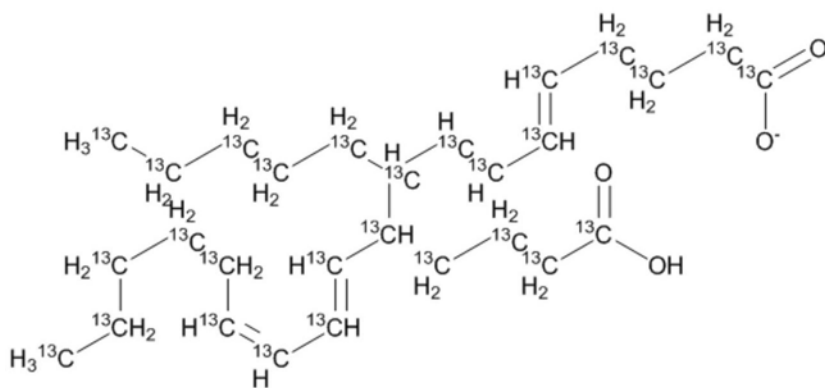


(A)

[0232]



(B) 或



(C)。

[0233] 在某些实施方案中,该同位素标记的化合物可以将式(A)、(B)或(C)中任何一项的标记策略应用于式II、III或IV的化合物。

[0234] 在某些实施方案中,该同位素标记的化合物可以用作分析标准化合物。在某些其他实施方案中,该同位素标记的化合物可以用于代谢示踪剂组合物、体外或体内诊断剂或其他组合物中。

[0235] 合成

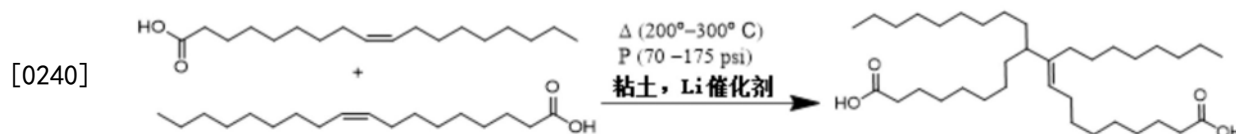
[0236] 在另一个实施方案中,考虑了如本文所述的合成制得的GTA-446相关化合物(或其盐、酯或标记的衍生物)或与其相关的其他化合物。在某些实施方案中,考虑了使用合成化学方法已制得的此类化合物或其衍生物。此类合成制得的化合物可以用于例如同位素稀释质谱检测方法中。

[0237] 由于难以从血清中分离GTA-446(纯GTA446的收率通常不到起始血清的1%),并且缺乏对应于GTA-446的天然来源的稳定同位素标记的化合物,因此,未标记和/或标记形式

的GTA-446或其衍生物的合成产生对于促进GTA-446测定(例如稳定的同位素测定)可能有用。

[0238] 之前,据我们所知,尚无已知或报道的分离或合成方案用于获得GTA-446或其衍生物。鉴于之前不知道GTA-446的结构,根本不会考虑用于制备式I化合物及其衍生物的合成方案。

[0239] 过去,已经报道了利用单体单不饱和脂肪酸工业规模制造二羧酸脂肪酸二聚体以用于产生润滑剂和聚合物。此类方法通常包括苛刻的反应条件,例如高温(200°C-300°C)、高压(70-175psi)并且经常使用粘土或粘土矿物作为催化剂以及长时间的混合和搅拌。这些反应的最终产物通常包含非特异性的聚合物混合物。基于此类过程的广义脂肪酸二聚化过程的典型示意性反应途径可以包含以下内容:



[0241] 硬脂酸和油酸二羧酸的10-9'桥接二聚体

[0242] 在二聚化过程期间,还可能发生其他副反应,例如顺式/反式异构化、双键移位、支化、成环和/或聚合,可能会导致多种副产物。通常采用分馏方法从其余副产物和未反应的原料中分离出所需的物质。

[0243] 上述方法对于GTA-446合成可能不是理想的方法,因为可能难以实现共轭点和饱和键位置的特异性。其次,GTA-446含有4个双键,这使二聚化复杂化(单不饱和脂肪酸如例子中所示)。

[0244] 因此,本文考虑了可以采用合成化学方法来产生本文所述的化合物。考虑到本文所提供的教导(包括对GTA-446结构的解析),可以通过对所提供的结构进行反合成分析来考虑多种合成方法。在某些实施方案中,合成方案可以涉及使用适当的原料和/或反应性官能团的阻断/保护,这基本上避免了合成期间不期望的副产物的重排。

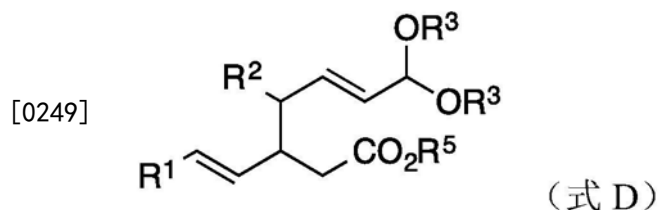
[0245] 在某些实施方案中,考虑了合成方法可以涉及例如2个C₁₄羧酸链之间的碳-碳(C-C)二聚化,通过使用适当的催化剂和/或通过阻断反应性位点而保留了特异性的烯烃立体化学以实现所需的最终产物。例如,也可以采用合适的不对称Heck偶联或粘土矿物催化的高温/高压二聚化来合成GTA-446。

[0246] 可以将同位素标记的GTA-446衍生物合成为例如氘(²H)或¹³C形式。在某些条件下氘可能会与溶剂进行氢交换,从而在氘代和非氘代形式之间达到平衡。¹³C是一种特别稳定的同位素形式,具有低天然丰度(约1%),由于它是通过C-C键共价掺入的,因此预计其¹²C形式不会进行实质性重排。包含至少一个氘、至少一个¹³C或两者的同位素标记的化合物均在本文中考虑内,并且可以被选择以适合特别的应用。例如,当需要高稳定性时,可以使用¹³C,然而,氘标记的衍生物也考虑用于某些应用。根据特别的应用,还考虑了本文所述化合物的放射性标记的衍生物。在某些实施方案中,可以通过在合成期间使用一种或多种标记的试剂/反应物来产生标记的衍生物,如下面进一步详细地描述的。

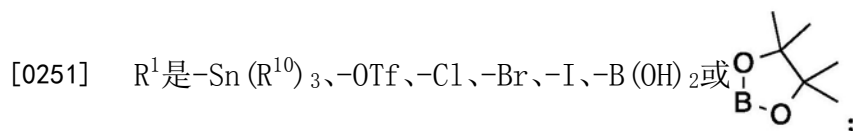
[0247] 下面列出了用于制备GTA化合物及其衍生物的合成策略,并且在下面的实施例4和5中进一步描述了用于制备式I和III化合物的更详细的建议合成路线。

[0248] 以下合成路线可以从式D的前体化合物或其标记的衍生物产生GTA化合物、其衍生

物和/或与之相关的化合物:



[0250] 其中:



[0252] R^2 为任选取代的饱和或不饱和 C_1 - C_{20} 烷基、饱和或不饱和 C_2 - C_{20} 烯基、或饱和或不饱和 C_2 - C_{20} 炔基;

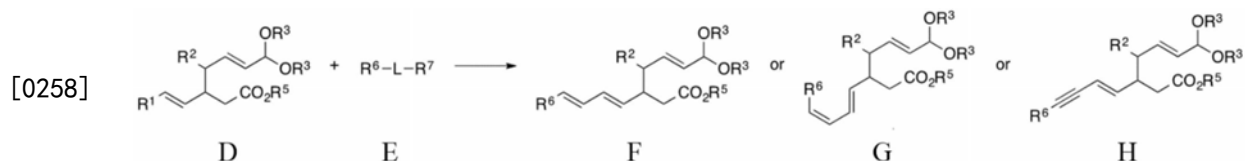
[0253] R^3 各自独立地为任选取代的 C_1 - C_6 烷基, 或 R^3 基团一起形成任选取代的亚乙基或亚丙基, 其桥接所连接的氧原子以形成五元环或六元环;

[0254] R^5 是任选取代的 C_1 - C_6 烷基; 并且

[0255] R^{10} 是任选取代的 C_1 - C_6 烷基。

[0256] 在某些实施方案中, 通过如下与式 E 化合物的反应可以将式 D 的化合物用于产生式化合物 F、G 或 H:

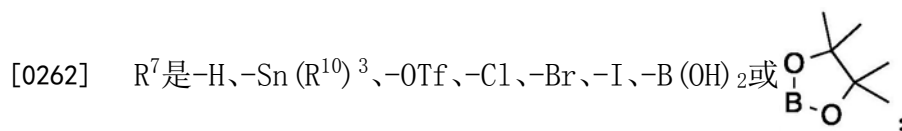
[0257] 方案 A



[0259] 应当理解的是, 可以使用施蒂勒 (Stille)、菌头 (Sonagashira)、铃木 (Suzuki) 或任何其他合适的金属介导的交叉偶联反应将化合物 D 和 E 偶联以便提供化合物 F、化合物 G 或化合物 H 中的至少一种。考虑了本文的教导的技术人员将认识到, 交替的交叉偶联反应可以用于将化合物 A 与化合物 B 偶联。可以选择式 E 的化合物 (以及同样的式 D 的 R^1 部分) 以便与此类偶联反应相容。

[0260] 在某些实施方案中, 式 E 化合物可以包括其中以下化合物:

[0261] R^6 是任选取代的饱和或不饱和 C_1 - C_{20} 烷基、饱和或不饱和 C_2 - C_{20} 烯基、或饱和或不饱和 C_2 - C_{20} 炔基;



[0263] L 是 、 或  ; 并且

[0264] R^{10} 是任选取代的 C_1 - C_6 烷基;

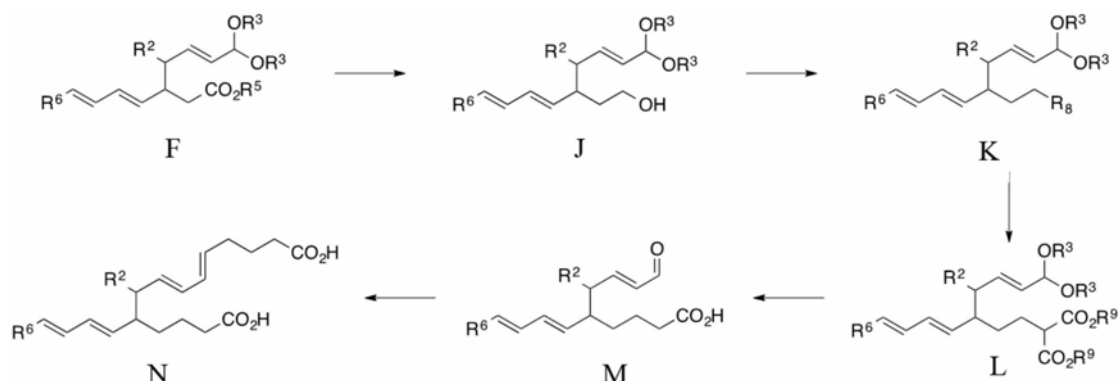
[0265] 其中, 选择 R^7 和 L 与式 D 的乙烯基 R^1 反应以产生式 F、G 或 H 化合物中的任何一种。

[0266] 考虑了式 F、G 或 H 化合物然后可以用于产生 GTA 化合物、其衍生物和/或与其相关的

化合物。

[0267] 当使用式F化合物时,考虑了可以如下制备GTA化合物、其衍生物和/或与其相关的化合物:

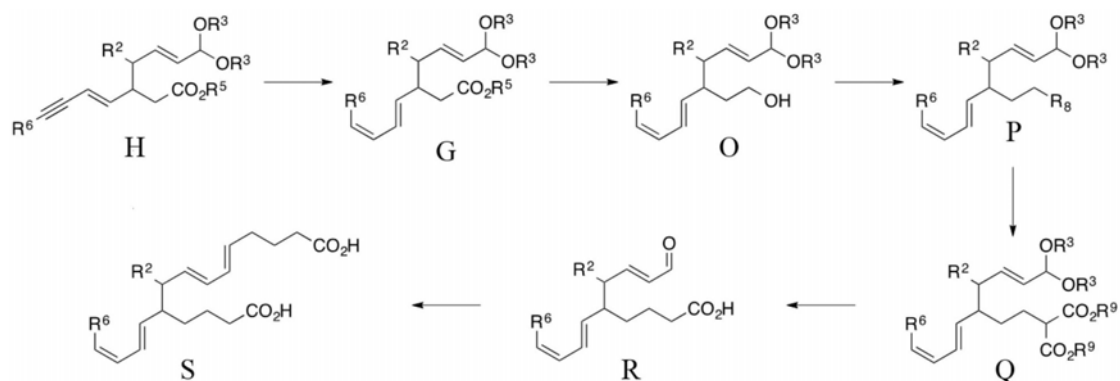
[0268] 方案B



[0270] 考虑了可以通过例如使用氢化锂铝,硼氢化锂或DIBAL还原化合物F的酯来制得化合物J。考虑到本文教导的本领域技术人员将认识到,存在可用于将酯还原为醇的替代试剂。例如,可以通过使化合物J与 $MsCl$ 、 $Ts-Cl$ 、 $Bs-Cl$ 、三氟甲磺酸酐、 CBr_4/PPh_3 、 N -碘琥珀酰亚胺/ PPh_3 或 CCl_4/PPh_3 反应来制得化合物K。考虑到本文教导的本领域技术人员将认识到,替代条件也可以适合于将醇转化为离去基团。在式K化合物中,根据特别的应用, R^8 可以是 $-OMs$ 、 $-OTf$ 、 $-OTs$ 、 $-OBs$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 或任何其他合适的离去基团。例如,可以通过使化合物K与丙二酸二烷基酯在碱性条件下反应来制得化合物L。考虑到本文教导的本领域技术人员将认识到,可能存在许多合适的用于用丙二酸二烷基酯代替离去基团的条件。在式L化合物中, R^9 可以各自独立地是例如任选取代的 C_1 - C_6 烷基。考虑了可以通过缩醛和酯的同时酸水解以及化合物L的串联脱羧来制得化合物M。考虑到本文教导的本领域技术人员将认识到,存在可用于该转化的多种试剂和催化剂。可以通过与化合物M的维蒂希(Wittig)反应来制得化合物N。考虑到本文教导的本领域技术人员将认识到,维蒂希反应替代可能是可用的,并且可以包括但不限于朱莉娅(Julia)偶联和霍纳尔-埃蒙斯偶联反应。

[0271] 当使用式G或H化合物时,考虑了如下制得的GTA化合物、其衍生物和/或与其相关的化合物:

[0272] 方案C



[0274] 考虑了可以通过使用例如林德拉(Lindlar)催化剂或硼烷(硼氢化)的试剂还原将化合物H转化为化合物G。考虑到本文教导的本领域技术人员将认识到,也可以使用影响三

键还原为顺式烯烃的合适替代试剂和方法。可以通过使用氢化铝锂、硼氢化锂或DIBAL还原化合物G的酯来制得化合物O。考虑到本文教导的本领域技术人员将认识到,替代的试剂可以用于将酯还原为醇。例如,可以通过使化合物O与MsCl、Ts-Cl、Bs-Cl、三氟甲磺酸酐、 $\text{CBr}_4/\text{PPh}_3$ 、N-碘琥珀酰亚胺/ PPh_3 或 $\text{CCl}_4/\text{PPh}_3$ 反应来制得化合物P。考虑到本文教导的本领域技术人员将认识到,可以使用可用于将醇转化为离去基团的替代条件。在式P化合物中,根据特别的应用, R^8 可以是-OMs、-OTf、-OTs、-OBs、-Cl、-Br、-I或任何其他合适的离去基团。可以通过使化合物P与丙二酸二烷基酯在碱性条件下反应来制得化合物Q。考虑到本文教导的本领域技术人员将认识到,可能存在许多可用的用于用丙二酸二烷基酯代替离去基团的条件。在式Q化合物中, R^9 可以各自独立地是例如任选取代的 C_1 - C_6 烷基。可以通过缩醛和酯的同时酸水解以及化合物Q的串联脱羧来制得化合物R。考虑到本文教导的本领域技术人员将认识到,可能存在可用于该转化的多种试剂和催化剂。考虑了可以通过与化合物R的维蒂希(Wittig)反应来制得化合物S。考虑到本文教导的本领域技术人员将认识到,维蒂希反应替代可能是可用的,并且可以包括但不限于朱莉娅(Julia)偶联和霍纳尔-埃蒙斯偶联反应。

[0275] 应当理解的是,例如上面列出的那些合成路线可以用于产生GTA化合物、其衍生物、其标记形式和/或与其相关的化合物。通过选择试剂、反应物和R基团,考虑了可以使用此类合成路线制得多种不同的GTA或类GTA化合物。在某些实施方案中,可以通过使用带有一个或多个标记的试剂/反应物将标记(例如同位素标记和/或放射性标记)掺入到此类GTA化合物和衍生物中,使得在合成期间将该标记掺入到化合物中。

[0276] 下面提供的实施例4和5进一步描述了用于制得式I和III化合物的更详细的建议合成路线。

[0277] 用于确定样品中GTA水平的方法

[0278] GTA-446化合物及其衍生物(包括同位素标记的衍生物)在GTA定量测定中可能特别有用。在某些实施方案中,例如,通过允许GTA-446定量(包括使用同位素稀释质谱法)可以将此类化合物用于增强商购Cologic®的结肠癌筛查测试。

[0279] 用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的GTA-446定量方法和测定以及诊断方法和测定的例子可以包括在PCT申请公开号WO 2007/030928中详细描述的那些,其通过引用整体并入本文。除此以外,该参考文献描述了446.34道尔顿的代谢标记,其对应于GTA-446和本文所述新解析的结构。

[0280] 应当理解的是,GTA-446化合物及其衍生物(包括本文所述的同位素标记的衍生物)可以用于GTA定量测定研究目标胃酸(GTA)的水平。将认识到胃脂肪酸(GTA)包含一个同族和异族的14至22个碳二聚脂肪酸家族,并且本文考虑了目前所述的GTA-446化合物及其衍生物可以用于定量这些GTA。

[0281] 一个典型的GTA家族成员GTA-446由2条如式I所示的14-碳链组成。GTA-446是用于结直肠癌筛查的商业Cologic™血液测试中测得的分析物,而在用于胰腺癌风险的PanaSee™血液测试中测定GTA PC-594,其为一种由2个二聚化的18-碳脂肪酸组成的36碳二羧酸脂肪酸。当前,由于缺乏此类标准,因此这两种方法均不掺入内标。缺乏此类标准使得难以在多个平台上运行测定,并且在某种程度上限制了测定结果。通过提供可能适合于与例如Cologic™和PanaSee™测定组合的 ^{12}C 和 ^{13}C 结构,当前所述的主体可以用于解决内标的

缺乏。

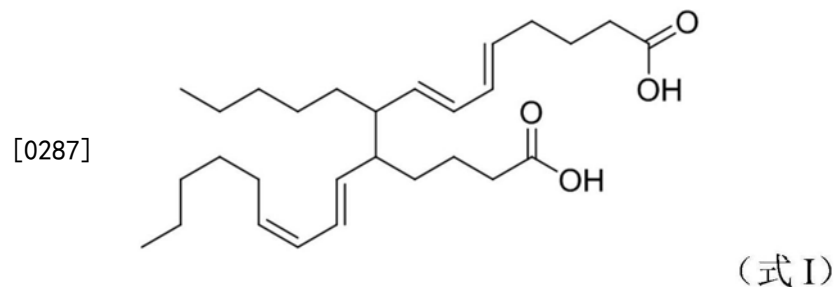
[0282] 尽管GTA-446特异性标准可能特别适合于测量GTA-446水平的Cologic™测定,但考虑了此类标准也可以用于定量任何其他合适的GTA。迄今为止,所有测得的GTA在碰撞诱导解离(CID)串联质谱下均显示出独特的碎片模式,特别是在水和二氧化碳流失的相对模式下。不希望受到理论的束缚,本领域技术人员将理解,可以使用替代参考标准来定量多种分子,只要该标准表现出与靶标分析物类似的性质即可。在GTA代谢体系的情况下,GTA-446在CID下的行为类似于其他GTA,因此,GTA-446的 ^{13}C 内标和 $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ GTA446的同位素稀释曲线可以用于提供多种GTA物种之间的相对定量,并具有适合的分析可信度。

[0283] 在某些实施方案中,本文所述的基于GTA-446的化合物可以与例如PanaSee™测定组合使用以研究GTA PC-594。举例来说,本文所述的基于GTA-446的化合物可用于研究W02011/038509中所述的GTA水平。因此,在某些实施方案中,本文提供了一种用于确定样品中胃酸(GTA)水平的方法,所述方法包含:

[0284] 测量来自样品的GTA检测信号,该GTA检测信号代表样品中的GTA水平;和

[0285] 通过将测得的GTA检测信号与校准参考进行比较定量样品中的GTA水平。

[0286] 在某些实施方案中,该GTA可以是:



[0288] 或其他合适的GTA家族成员。

[0289] 在某些实施方案中,可以通过质谱测量GTA检测信号。在某些其他实施方案中,可以根据商购的Cologic®测定和/或如PCT申请公开号5,119,235(其通过引用整体并入本文)中所述的技术通过质谱技术来测量GTA检测信号。

[0290] 在上述方法的某些实施方案中,该校准参考可以包含使用已知量的如上所定义的化合物制得的标准曲线。

[0291] 在某些实施方案中,该方法可以进一步包括以下步骤:

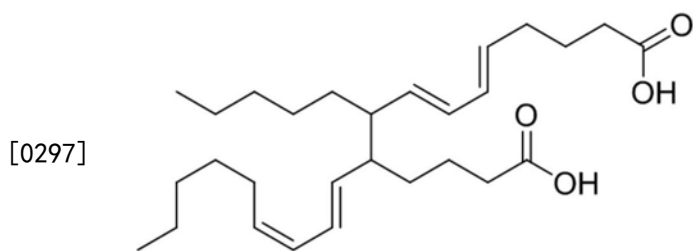
[0292] 用已知量的如上所定义的同位素标记的化合物加标样品;和测量来自样品的内标信号,该内标信号代表加标到样品中已知量的同位素标记的化合物。

[0293] 在某些实施方案中,该内标信号也可以通过质谱测得。

[0294] 在某些实施方案中,如上所述方法可以进一步包含确定样品中的GTA水平(如测得的GTA检测信号所示)与加标到样品中已知量的同位素标记的化合物(如内标信号所示)的比例的步骤。在某些实施方案中,该校准参考可以包含由一系列变化的GTA/同位素标记的化合物比例和浓度的混合物产生的同位素稀释曲线(IDC),将所述比例与该曲线进行比较。在某些实施方案中,该IDC可以由一系列GTA含量随固定量的同位素标记的化合物而变化的混合物产生。在某些实施方案中,固定量的同位素标记的化合物可以与加标到样品中已知量的同位素标记的化合物基本上相同。

[0295] 考虑了本文教导的技术人员将意识到IDC质谱技术、同位素稀释质谱技术和用于产生IDC曲线的方法,并且能够根据需要进行选择和/或修改此类技术以适合特别的应用。

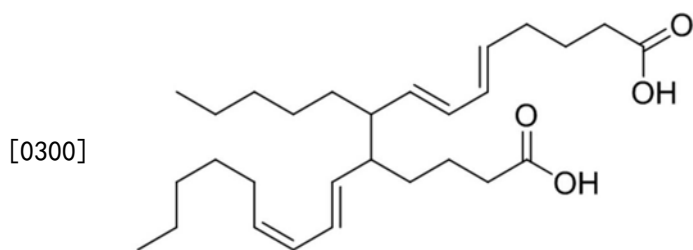
[0296] 本文提供了一种如本文所述的化合物在产生用于确定样品中胃酸 (GTA) 水平的校准参考中的应用。在某些实施方案中,该GTA可以是:



(式 I),

[0298] 或其他合适的GTA家族成员。

[0299] 同样,本文提供了一种如上所定义的同位素标记化合物作为用于确定样品中胃酸 (GTA) 水平的内标的应用。在某些实施方案中,该GTA可以是:



(式 I),

[0301] 或其他合适的GTA家族成员。

[0302] 如本文所述的,定量 (quantifying) 或定量 (quantification) 旨在涉及确定以相对或定量的形式存在于样品或体液中的特别分子 (例如GTA) 的量。例如,这可能意味着以摩尔/L、重量百分比或其他标准计量单位确定分子浓度。可替代地,这些术语可以涉及相对于内标或对照的分子水平的相对确定 (例如不计算浓度)。例如,分子的相对定量可以涉及确定与内标或对照相比受试者中的增加或减少,例如与之前时间点相比随时间推移以测量疾病或治疗的进展。

[0303] 用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法

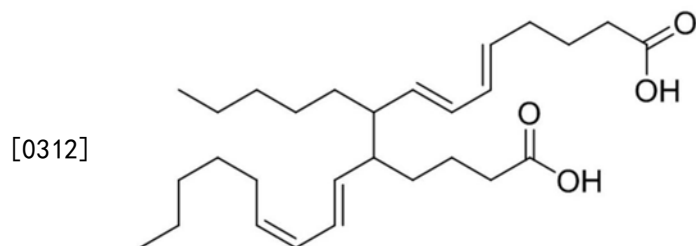
[0304] GTA-446化合物及其衍生物 (包括同位素标记的衍生物) 在用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法中特别有用,该结直肠癌与GTA-446水平相关。在某些实施方案中,例如,通过允许GTA-446定量 (包括使用同位素稀释质谱法) 可以将此类化合物用于增强商购Collogic®的结肠癌筛查测试。

[0305] 用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的GTA-446定量方法和测定以及诊断方法和测定的例子可以包括在PCT申请公开号WO 2007/030928中详细描述的那些,其通过引用整体并入本文。除此以外,该参考文献描述了446.34道尔顿的代谢标记,其对应于GTA-446和本文所述新解析的结构。

[0306] 在某些实施方案中,本文提供了一种用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法,所述方法包含:

[0307] 通过以下确定获自受试者的样品中的胃酸 (GTA) 水平:

- [0308] 测量来自样品的GTA检测信号,GTA检测信号代表样品中的GTA水平,和
- [0309] 通过将测得的GTA检测信号与校准参考进行比较定量样品中的GTA水平,
- [0310] 当与健康对照组相比,样品中所确定的GTA水平降低时,将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌的风险,
- [0311] 其中,该GTA是:



(式I)。

[0313] 在某些实施方案中,可以通过质谱测量GTA检测信号。在某些其他实施方案中,可以根据商购的**Cologic®**测定和/或如PCT申请公开号5,119,235(其通过引用整体并入本文)中所述的技术通过质谱技术来测量GTA检测信号。

[0314] 在上述方法的某些实施方案中,该校准参考可以包含使用已知量的如上所定义的化合物制得的标准曲线。

[0315] 在某些实施方案中,确定获自受试者的样品中的GTA水平的步骤可以进一步包含:

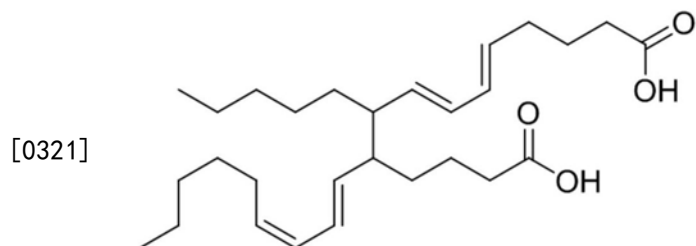
[0316] 用已知量的本文所述的同位素标记的化合物加标样品;和测量来自样品的内标信号,该内标信号代表加标到样品中已知量的同位素标记的化合物。

[0317] 在某些实施方式中,也可以通过质谱法测量该内标信号。

[0318] 在某些实施方案中,此类方法可以进一步包含确定样品中的GTA水平(如测得的GTA检测信号所示)与加标到样品中已知量的同位素标记的化合物(如内标信号所示)的比例的步骤。在某些实施方案中,该校准参考可以包含由一系列变化的GTA/同位素标记的化合物比例和浓度的混合物产生的同位素稀释曲线(IDC),将所述比例与该曲线进行比较。在某些实施方案中,该IDC可以由一系列GTA含量随固定量的同位素标记的化合物而变化的混合物产生。在某些实施方案中,固定量的同位素标记的化合物可以与加标到样品中已知量的同位素标记的化合物基本上相同。

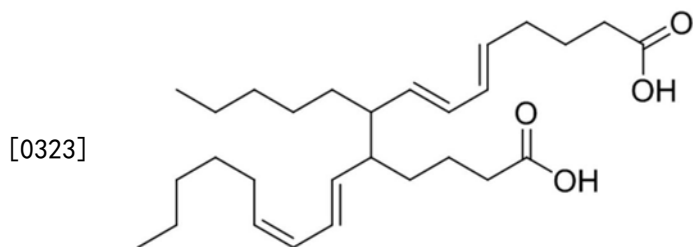
[0319] 考虑了本文教导的技术人员将意识到IDC质谱技术、同位素稀释质谱技术和用于产生IDC曲线的方法,并且能够根据需要进行选择和/或修改此类技术以适合特别的应用。

[0320] 在某些实施方案中,本文提供了一种如本文所述的化合物在用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法中的应用,该结直肠癌与胃酸(GTA)水平改变相关,其中:



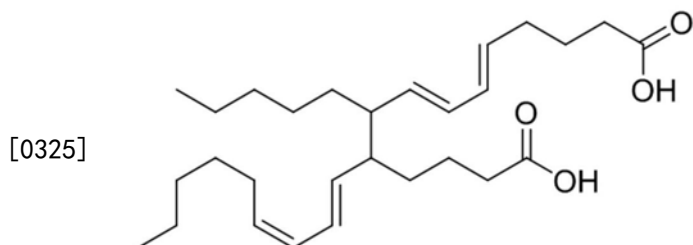
(式I)。

[0322] 在另一个实施方案中,本文提供了一种如本文所述的化合物在产生用于诊断方法中的校准参考中的应用,该方法用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌的风险,该结直肠癌与胃酸 (GTA) 水平改变相关,其中:



(式 I)。

[0324] 在另一个实施方案中,本文提供了一种如本文所述的同位素标记的化合物在作为用于诊断方法中的内标中的应用,该方法用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌的风险,该结直肠癌与胃酸 (GTA) 水平改变相关,其中:



(式 I)。

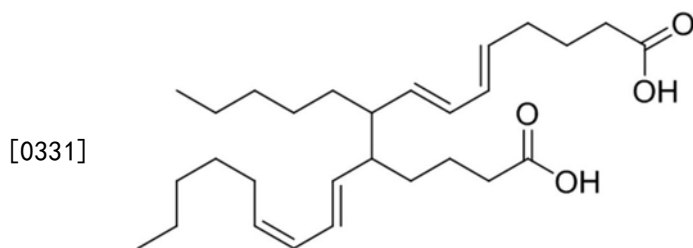
[0326] 免疫测定-抗体产生

[0327] 在另一个实施方案中,本文提供了一种如本文所述的GTA-446化合物用于产生特异性结合GTA-446的抗体或其片段的应用。此类抗体在检测和/或定量GTA-446中可以具有多种应用。在某些实施方案中,此类抗体可以用于免疫测定(例如酶联免疫吸附测定(ELISA))以检测和/或定量样品中的GTA-446水平。

[0328] 之前,由于缺乏合适的抗体,GTA-446的定量限于串联质谱,且尚未通过酶联免疫吸附测定(ELISA)进行。特异性抗体的产生一般需要足够量的纯化合物,这之前已经受到没有合成GTA-446的限制。

[0329] 在某些实施方案中,本文提供了一种分离的、纯化的或合成的GTA-446在抗GTA-446抗体产生中的应用。在某些其他实施方案中,本文提供了采用此类抗GTA-446抗体的GTA-446检测和/或定量免疫测定。

[0330] 在一个实施方案中,本文提供了一种特异性结合式I化合物的抗体或其抗原结合片段:



(式 I)。

[0332] 在某些实施方案中,该抗体可以是或包含单克隆或多克隆抗体。

[0333] 在另一个实施方案中,本文提供了了一种如本文所述的化合物在作为用于制备抗体的抗原中的应用,该抗体特异性结合所述化合物的抗原表位。

[0334] 考虑了本文教导的本领域技术人员将意识到用于产生本文所述的抗GTA-446抗体或其片段的多种合适技术。此类技术的例子可以包括Antibodies:A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014, ISBN: 978-1-936113-81-1中所述的那些技术;其通过引用整体并入本文。

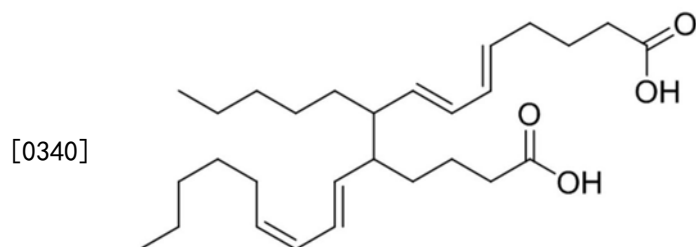
[0335] 用于确定样品中GTA水平的免疫测定

[0336] 如本文所述的抗GTA-446抗体可以用于免疫测定(例如但不限于基于ELISA的测定)中以用于检测和/或定量样品中的GTA水平。

[0337] 在某些实施方案中,本文提供了一种用于确定样品中胃酸(GTA)水平的方法,所述方法包含:

[0338] 使用采用特异性结合GTA的抗体或其抗原结合片段的免疫测定来测量样品中的GTA水平;

[0339] 其中,该GTA是:



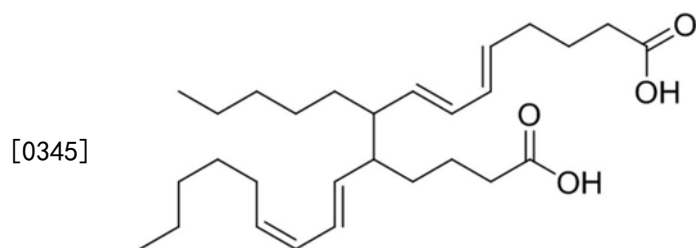
(式 I)。

[0341] 在某些实施方案中,该免疫测定可以包含酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0342] 在某些实施方案中,该方法可以进一步包含在免疫测定中使用包含如本文所定义的化合物的对照样品作为阳性对照的步骤。

[0343] 在另一个实施方案中,该方法可以进一步包含使用标准曲线推断样品中的GTA水平的步骤,使用多个已知量的如本文所定义的化合物产生该标准曲线。

[0344] 在另一个实施方案中,本文提供了一种抗GTA-446抗体或其片段在用于通过免疫测定检测或定量样品中的胃酸(GTA)水平中的应用,其中,该GTA是:



(式 I)。

[0346] 用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的免疫测定

[0347] 如本文所述的抗GTA-446抗体可以用于免疫测定(例如但不限于基于ELISA的测定)中以用于检测和/或定量样品中的GTA水平,该免疫测定可以作为将受试者鉴定为患有结直肠癌(CRC)或有发展成结直肠癌(CRC)风险的诊断方法的一部分。

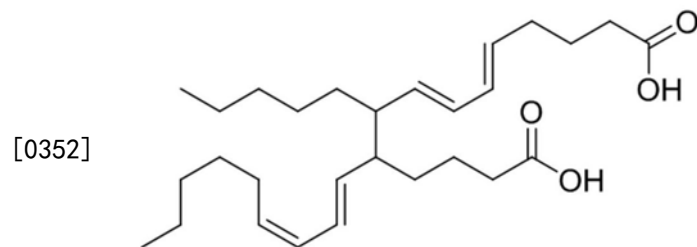
[0348] 在某些实施方案中,本文提供了一种用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展

成结直肠癌风险的诊断方法,所述方法包含:

[0349] 通过使用采用特异性结合GTA的抗体或其抗原结合片段的免疫测定来测量样品中的GTA水平而确定获自受试者的样品中的胃酸 (GTA) 水平;和

[0350] 当与健康对照组相比,样品中所确定的GTA水平降低时,将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌的风险,

[0351] 其中,该GTA是:



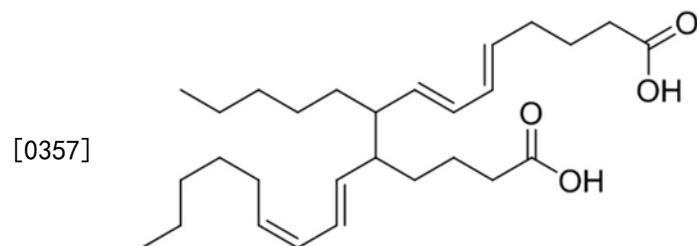
(式 I)。

[0353] 在某些实施方案中,该免疫测定可以包含酶联免疫吸附测定 (ELISA) 。

[0354] 在另一个实施方案中,该方法可以进一步包含在免疫测定中使用包含本文所述化合物的对照样品作为阳性对照的步骤。

[0355] 在另一个实施方案中,确定样品中GTA水平的步骤可以进一步包含使用标准曲线推断样品中的GTA水平,使用多个已知量的如本文所述的化合物产生该标准曲线。

[0356] 在另一个实施方案中,本文提供了一种如本文所述的抗GTA-446抗体或其抗原结合片段在用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险的诊断方法中的应用,该结直肠癌与胃酸 (GTA) 水平改变相关,其中:



(式 I)。

[0358] 定量和/或诊断试剂盒

[0359] 在某些实施方案中,本文提供了与样品中GTA水平的检测和/或定量相关的试剂盒。

[0360] 在一个实施方案中,本文提供了一种用于定量样品中胃酸 (GTA) 水平的试剂盒,所述试剂盒包含以下至少一种:

[0361] 如本文所述的化合物;

[0362] 如本文所述的代谢示踪剂;

[0363] 如本文所述的组合物;

[0364] 如本文所述的诊断剂;和

[0365] 如本文所述的抗体或其抗原结合片段;

[0366] 任选地,进一步包含一组用于进行如本文所述的方法的说明书。

[0367] 在另一个实施方案中,本文提供了一种用于将受试者鉴定为患有结直肠癌或有发

展成结直肠癌风险的诊断试剂盒,该试剂盒包含以下至少一种:

[0368] 如本文所述的化合物;

[0369] 如本文所述的化合物;

[0370] 如本文所述的代谢示踪剂;

[0371] 如本文所述的组合物;

[0372] 如本文所述的诊断剂;和

[0373] 如本文所述的抗体或其抗原结合片段;

[0374] 任选地,进一步包含一组用于进行如本文所述的方法的说明书。

[0375] 实施例1-用于从人血清中分离GTA-446的方法

[0376] 从人血清中分离GTA-446的一般过程(例如参见图18)可以涉及评估具有高浓度GTA-446批次的大量商购血清,然后采购大量(50L)所选批次。在该实施例中,将测试批次的血清在水和用甲酸缓冲的乙酸乙酯之间萃取。在所选方法下,在16.3至17.6分钟之间用九种其他类似的脂肪酸库洗脱GTA-446(参见图2)。可以基于GTA-446的起始萃取的清洁度和富集度来决定血清来源的选择以用于放大萃取,因为其他污染物可能会降低过程中的纯化效率。

[0377] 由于血清中内源GTA-446的丰度较低(图1),因此,本文设计了血清萃取方案。人血清基质由具有一定溶解度范围的多种组分组成。除复杂分子(例如蛋白、脂质和碳水化合物)外,血清还含有非常小的分子(例如氨基酸、维生素和其他小代谢物)。它们的结构功能导致不同程度的溶解度,范围从极性极强的(水/甲醇介质中的碳水化合物和蛋白以及其他亲水性组分)到中等极性的(乙酸乙酯、氯仿和二氯甲烷中的磷脂和脂肪酸及其他杂原子小代谢物)到非极性的(正己烷中的甘油三酯和甘油二酯以及较大的糖脂)溶剂组合。因此,为初始分离步骤进行选择适当的溶剂方案以获得安全且便于处理和蒸发的富含GTA-446的馏分。串联MS/MS碎片以及低分子量(<500amu)表明了靶标分子是具有羧基和羟基官能团的小代谢物(如上所述),并且很容易溶解在乙酸乙酯/甲醇溶剂组合中。这种溶剂组合便于萃取,因为甲醇会导致蛋白在基质中沉淀。

[0378] 由于乙酸乙酯在甲醇存在下与水的混溶性(后者充当将乙酸乙酯在水中混合的介质),因此,设计了单相沉淀步骤以在初步GTA-446富集步骤中获得良好的GTA-446浓度。与双相沉淀不同,当由于较弱的静电吸引力和与水相的分子间氢键可能会阻止CRC标记完全迁移到有机相中时,单相沉淀步骤降低了此类风险,因为没有任何初始的相分离。为了验证该假设,使用质谱(MS)分析比较了单相(MeOH-1至MeOH-2)和双相(N1-N3)分离之间的萃取物,这检测到前者显示出比后者高20%的萃取效率(图3)。

[0379] 研究了选择具有适当酸强度的甲醇/乙酸乙酯比例以及沉淀的等待时间以努力改善GTA-446的萃取。方法开发期间该步骤的重点是使用低溶剂体积获得良好的萃取效率(这也将减少蒸发时间以及溶剂浪费)并使用低酸强度。选择具有1:2:4比例的血清:甲醇(含1%甲酸):乙酸乙酯的溶剂混合物进行沉淀步骤,允许5分钟的等待时间使沉淀。

[0380] 通过离心和倾析均质化的液体将沉淀出的蛋白固体从液体中分离出来,现在在血清中具有所有极性和非极性可溶物。分离过程的下一个阶段是将GTA-446相分离到挥发性溶剂体系中以促进减压下的低温蒸发并获得含有GTA-446的血清粗有机萃取物。在单相溶液中,有机相和水相都是不可分离的,因为甲醇充当了将水和乙酸乙酯混合的中间体。

[0381] 由于在蒸发步骤期间萃取介质中存在水会产生更长的时间和更高的温度,因此,使用小规模旋转蒸发仪不便于有效地蒸发大量溶剂混合物(H₂O:甲醇:乙酸乙酯,1:2:4)。同样,由于可能形成内酯,所以GTA-446在酸性水相中的稳定性令人担忧。因此,通过在单相沉淀步骤之后将相分离步骤引入到萃取序列中设计了将GTA-446从水相快速有效分离到中性、极性较小的有机相中。离到中性、极性较小的有机相中。

[0382] 这也将大多数不想要的被萃取到水相中的极性物质从目标分析物中分离出来。通过调节水和乙酸乙酯之间的溶剂比例或通过添加不可混溶的非极性溶剂(例如正己烷)来实现相分离;水中较大体积的乙酸乙酯很容易将溶剂分为两相;所述非极性溶剂将有机可溶物分散在上层有机相中。设计了一系列实验以将不同体积的水、乙酸乙酯和正己烷以不同的组合添加到获自沉淀步骤的溶剂混合物中(表1)。

[0383] 表1:用于研究相分离步骤中的溶剂比例的不同测试批次

实验 编号	沉淀步骤中所用的溶剂/ml			相分离中所用的溶剂/ml		
	血清	0.5%FA的甲醇	乙酸乙酯 (EtOAc)	水	乙酸乙酯 (EtOAc)	正己烷
[0384]	1	5	10	20	40	20
	2	5	10	20	40	-
	3	5	10	20	-	20

[0385] 收集有机相和水相并通过飞行质谱时间分析以确定每个实验中的GTA-446萃取效率。在所有类型测试萃取物的有机相中检测到GTA标记板,显示了萃取效率没有明显差异。由于在三种溶剂组合中对GTA-446的萃取没有区别,因此,由于相分离的清晰度较高而选择了正己烷。在添加水以获得相分离的两个实验中,形成了乳液,该乳液花费更长的时间以得到清晰的分离。同样,在批量萃取中,与其他两个相比,水相的总体积要小很多且易于处理。因此,鉴定的最终溶剂比例为1:2:4:4的血清:甲醇:乙酸乙酯:正己烷。然后将有机上层蒸发至干以获得富含GTA-446的粗提物,在其原始基质中不含大多数极性杂质(参见图4)。

[0386] 分离过程的下一步骤是使用正相和反相高效液相色谱(HPLC)以及快速柱色谱从粗基质中的其他杂质中分离和纯化GTA-446,并依赖于柱分离顺序。具体地,首先进行正相色谱以从粗混合物中消除大多数非极性物质(例如酰基甘油三酯和酰基甘油二酯以及类似物)。由于GTA-446与其他常见的血清脂肪酸和中等至长链长度的衍生物之间具有相容的极性,因此,它们往往会以多种脂肪化合物的形式一起洗脱。因此,从血清中的相容组分中分离和离析GTA-446以获得大于95%的纯度具有挑战性,即使在精细的HPLC纯化后,脂肪酸及其类似物的痕量杂质水平也常常会残留在纯化的GTA-C₂₈馏分中。由于干扰信号,因此,难以使用NMR数据获得完整的结构解析。为了克服这个困难,开发了一种方法,该方法采用使用初始正相快速柱分离,然后进行反相FC,然后注入到HPLC中,以消除大多数杂质并将GTA-446和紧密相关的分子分离成一个馏分以用于随后HPLC纯化。

[0387] 初始正相快速柱分离使用硅胶并采用从低极性到极高性的溶剂梯度。将粗血清萃取物上样到硅胶柱上,并用溶剂洗脱,从乙酸乙酯中较高正己烷浓度开始到甲醇中较高二氯甲烷浓度时结束。将洗脱液收集为6个不同的馏分并在减压下蒸发至干以获得每个馏分

的粗样品。干燥的馏分可以在负大气压化学电离 (NAPCI) 下通过飞行时间或其他类似的质谱技术进行分析。全扫描流注入色谱图显示了GTA-446生物标记物通常与其他C₃₆-GTA类似物 (m/z : 550-600amu) 一起用60:40的己烷/乙酸乙酯溶剂组合在F3中洗脱 (20mg, 回收率2.2%) (参见图5)。在负APCI模式下对馏分1和2的色谱分析表明了大多数脂肪酸杂质 [m/z : 255.2 (16:0), 279.2 (18:2), 281.2 (18:1), 303.2 (20:4)] 被洗脱。对馏分4的粗干物的分析表明了存在更多极性的C₃₆-GTA, 馏分4之后没有相关分子洗脱。

[0388] 反相快速柱分离依赖于C-18键合的二氧化硅, 以60%的乙腈水溶液开始, 逐渐增加至95%, 最后以100%甲醇洗涤结束, 收集15份每份100ml的馏分。然后将干燥馏分的全扫描流注入色谱图用于鉴定含有GTA-446的馏分, 该馏分通常与其他C₂₈-GTA类似物一起出现在F5和6中, 其溶剂组合为75:25和80:20的AcCN:H₂O (图6和7)。后馏分F7和12含有其他C₂₈-C₃₆-GTA类似物的组合。然后将富含GTA-446的馏分 (F5和F6) 组合以获得另一个富含GTA-446的馏分 (含超过60%的GTA-446), 但样品中还含有其他C₂₈和C₃₆-GTA类似物。为了进一步提高纯度, 进行了可有效拆分GTA-446结构异构体的调整的两步骤HPLC分离。

[0389] 类似于FCC分离, 两步骤HPLC分离包括使用制备型HPLC的初始反相步骤以及随后的正相 (氰基 (CN) 柱) 步骤。将来自反相FCC分离的富含GTA-446的馏分溶于适合于制备型HPLC分离的适当溶剂 (1:1的CH₂Cl₂:CH₃CN) 中, 该制备型HPLC分离使用具有二极管阵列检测器和紫外/可见光吸收的反相柱。然后使用两种溶剂系统在35分钟内进行梯度洗脱并在14-29分钟之间收集30秒洗脱馏分, 这两种溶剂系统是通过将不同比例的水:乙腈:甲酸混合而制成的。对收集馏分的分析显示了GTA-446富集超过75%, 但其他C₂₈-GTA类似物作为杂质。

[0390] 然后将来自反相制备型HPLC的富含GTA-446的馏分合并, 并使用氰基结合的正相制备型HPLC柱进行进一步纯化, 该HPLC柱用包含正己烷、乙酸乙酯和甲酸的等度溶剂洗脱。将紫外线截止波长设置为值 $\lambda = >256\text{nm}$ 以克服来自乙酸乙酯的信号干扰。可替代地, 可以用MS检测器替代紫外线检测器以避免溶剂的光谱干扰, 并且每次可以使用MS数据测试少量洗脱液以检测GTA-446的存在, 这可以提供可靠的检测方法。通过LCMS对从第二次制备型HPLC纯化中收集馏分的分析通常表明了GTA-446纯度>95%的多种立体异构体形式, 显示了类似的串联MS模式。根据血清中的初始起始浓度, 从40L人血清中可以获得多种馏分中约5mg的纯化GTA-446。

[0391] 图8显示了NAPCI中来自制备型HPLC-RP分离的富含GTA-446的样品的全扫描色谱图。

[0392] 实施例2-从人血清中分离GTA-446的实验方案

[0393] 在该实施例中, 将120ml融化并充分混合的Seracare血清添加到2000ml刻度玻璃瓶中。缓慢地向相同瓶中添加240ml用0.1%甲酸酸化的甲醇, 同时使内容物回旋。使混合物静置5分钟以完成蛋白沉淀。然后将480ml乙酸乙酯溶液缓慢添加到相同烧瓶中。使混合物再静置5分钟。然后将溶液手动搅拌以获得均质化的混合物, 并将其均匀分配到16个50ml falcon管中 (约52.5ml/管)。将它们离心10分钟 (3500rpm/4°C) 以迫使沉淀物进入到紧密的托盘中, 该托盘位于与液体充分分离的管的底部。将上清液转移至充分摇动的含有480ml正己烷的分液漏斗中并使各相分离。通过质谱分析有机相中是否存在GTA-446。收集底部水相并转移至第二漏斗的正己烷中以进一步萃取。将顶层有机层在无水硫酸钠下干燥, 过滤并在减压下干燥以获得人血清的粗有机萃取物 (来自处理45L血清的总计208.05g的粗有机萃

取物)。

[0394] 将获自上述沉淀方法的总计208g的粗有机萃取物进行正相快速柱分离。柱条件和溶剂梯度总结于表2中。相对于所用的粗有机萃取物的重量,放大柱直径、硅胶重量和洗脱液体积。

[0395] 表2:用于正相快速柱分离30g粗有机血清萃取物的柱规格

[0396]	每 30-40g 粗制有机血清萃取物	
	柱内径	5 cm
	二氧化硅重量	100g (60 Å; 230-400 目硅胶)
	正己烷: 乙酸乙酯体积 (90:10)	1000ml (F1, F2) 每个 500ml
	正己烷: 乙酸乙酯体积 (80:20)	1000ml (F3-F7) 每个 200ml
	正己烷: 乙酸乙酯体积 (60:40)	1000ml (F8-F12) 每个200ml
	DCM: 甲醇体积 (90:10)	500ml (F13)

[0397] 使用正己烷固定柱,同时闪蒸压缩空气以避免捕集气泡,使填料均匀。将30g粗萃取物溶于最小体积的DCM中并固定在柱上。收集馏分并基于每个馏分的LCMS分析,将含有GTA (F8-F13) 的馏分减压蒸发至干,并将干燥物用于进一步分离。丢弃其他馏分。从加工的208g粗有机萃取物中收集了总计约3g。

[0398] 在FCC-RP中将含有FCC-NP馏分库(基于Q-Star数据,从F8-F13)的总计2.5g的GTA-446进一步分离。柱条件和溶剂梯度总结于表3中。相对于所用的粗有机萃取物的重量,放大柱直径、硅胶重量和洗脱液体积。

[0399] 表3:用于反相快速柱分离约1g粗有机血清萃取物的柱规格

[0400]

每 1g 装载的粗 FCC_NP 干燥样品	
柱内径	3 cm
二氧化硅重量 (C-18)	20 g
AcCN: H ₂ O 体积 (60:40)	1000ml (F1, F2) 每个 500ml
AcCN: H ₂ O 体积 (65:35)	2000ml (F3-F4) 每个 200ml (F5-F8) 每个 250ml
AcCN: H ₂ O 体积 (70:30)	2000ml (F9-F16) 每个 250ml
AcCN: H ₂ O 体积 (75:25)	1000ml (F17-F20) 每个 250ml
AcCN: H ₂ O 体积 (80:20)	1000ml (F21, F22) 每个 500ml
AcCN: H ₂ O 体积 (90:10)	1000ml (F23, F24) 每个 500ml
AcCN 体积 100%	1000ml (F25-F27) 每个约 300ml
甲醇体积 100%	2000ml (F28)

[0401] 使用乙腈固定柱并用60:40的AcCN:H₂O平衡,同时闪蒸压缩空气以避免捕集气泡,使填料均匀。使用1:1的AcCN:DCM溶解1g粗萃取物,并固定在柱上。收集馏分并通过LCMS分析。使用70/30的AcCN/H₂O组合洗脱大多数GTA-446,而使用65/35的ACCN/H₂O洗脱的最终馏分的量较少。将这些级分在减压下干燥并确定重量。从加工的2.5g粗有机萃取物中收集了总计约1.6g。随后将它们在HPLC中进行进一步纯化。

[0402] 将来自FCC_RP的GTA-446富集库(140mg)溶于1:1的CH₂Cl₂:ACN以产生180mg/mL溶液,该溶液可用作如下反相条件下PrepLC纯化的负载:溶剂A=H₂O:ACN:甲酸(95:5:0.05),溶剂B=含0.05%甲酸的ACN,流速=25.5mL/min,温度=环境温度,λ=210nm柱=21.2mm x 150mm,5μm,PrepHT XDB-C18 (Agilent, 970150-902, SN.USMQ001200) 溶剂组合物=75%B持续35分钟馏分=30个馏分总计持续14-29分钟(30秒切片)。如表4所示,基于紫外线吸收和保留时间窗口将各个馏分合并。

[0403] 表4获自反相制备型HPLC分离的馏分

[0404]

t _R 窗口 (分钟)	小瓶数量/s	样品库名称	重量/mg
14.5-15.5	2-5	库2	21.7
15.5-16.2	6	库3	7.8
16.2-20.0	7-12	库4	4.7
20.0-23.0	13-18	库5	11
23.0-23.5	19	库5B	1.2
23.5-25.5	20-25	库6	0.9
25.5-29	26-30	库7	6.8

[0405] 然后使用反相色谱和正相色谱在LCMS中分析7个合并样品以可视化GTA-446分离度和其他可能的杂质干扰。合并样品5、5B和7均显示出离析的GTA-446水平。样品库5和5a的

反相LCMS显示了GTA-446几乎完全离析,而正相LCMS光谱显示了需要在正相中进一步纯化以拆分不同的异构体和其他少量杂质。

[0406] 将25.7mg反相制备型HPLC纯化的富集GTA-446的样品溶于150u1 CH₂Cl₂中并使用以下LC条件在正相制备型HPLC (SBCN) 中进一步纯化。流速=4ml/min,温度=环境温度,柱=9.4mm x 300mm,5μm,Zorhax SB-CN(安捷伦),注入体积40u1。LC梯度如表5所示:

[0407] 表5 LC梯度

	时间 (分钟)	%A (正己烷)	%B (1%FA 的乙酸乙酯溶液)
[0408]	0-15	95	5
	15-20	50	50
[0409]	20-30	95	5

[0410] 如表6所示,基于保留时间窗口将馏分合并:

[0411] 表6基于保留时间窗口合并的馏分

[0412]	t _R 窗口 (分钟)	小瓶数量/s	样品库名称
	4.6-5.0	10	库1
	5.0-5.4	11,12	库2
	5.4-5.8	13,14	库3
	5.8-6.2	15-17	库4
	6.2-6.8	18	库5

[0413] 在LCMS中分析每个合并的样品,并显示了可接受的纯化(>95%GTA-446)。在库1、2和4中,分别在2.2、3.2和3.8分钟的不同t_R下鉴定了三种GTA-446异构体。库3可以忽略不计,库5大部分含有柱洗液,该柱洗液可以在相同条件下将其再次纯化以进一步回收靶标。将合并的样品干燥,称重并在NMR光谱分析中进行完整的结构解析。每种异构体的最终重量如表7所示:

[0414] 表7每种异构体的最终重量

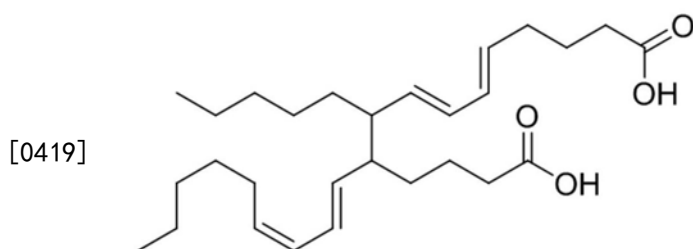
[0415]	库	t _R	重量/mg
	1	2.2	1.8
	2	3.2	1.4
	4	3.8	2.3

[0416] 实施例3-GTA-446的结构表征

[0417] 在1D NMR实验(例如¹H, ¹³C)以及2D实验类(例如H-H (COSY)、H-C (HMQC)和长距离C-H (HMBC) 偶联)中对纯化的异构体进行了分析以获得GTA-446的完整结构解析。使用MS(图9、10)和NMR光谱(图11-14)并使用获得的光谱信息解析了最丰富的异构体结构。对GTA-446(m/z 445.3 (M⁻))的串联MS谱的评估表明了H₂O (M--18)、CO₂ (M--44)、2xH₂O (M--36)和CO₂+H₂O (M--62)的流失强度不同。对于任何血清来源的GTA-446的MS/MS碎片,该强度模式都是唯一且一致的。CO₂的流失得出结论,这些碎片可能是羧酸。水的流失最初表明了它们含有羟基,而水和二氧化碳的流失则一起表明了羧基和羟基官能团应彼此分离,而不是与单个

羧基分离。另外,MS/MS表明了存在两个羟基,而片段m/z 223表明了将该结构裂解成两个类似的实体,这表明了两个类似结构组分之间可能存在桥接体系。然而,仅使用MS/MS信息来解释完整的结构具有挑战性。

[0418] 因此,进行了纯化GTA-446的¹H NMR,这显示了来自8个亚甲基质子(δ5.5至6.2pm)、两个末端甲基(-CH₂CH₃,δ0.84和0.89pm,每个3H,t)和来自两个-COOH基团δ12.0ppm处宽峰的信号以及CH₂和CH基团δ0.98至2.48ppm处的其他34个信号(参见图11)。¹³C-NMR光谱显示了来自8个亚甲基碳(δ126至136pm),两个末端甲基(-CH₂CH₃,δ14.0和14.1pm),来自两个-COOH基团δ181.2、181.4ppm处的两个羧基碳,45.9、47.0ppm处的两个亚甲基碳的信号,以及CH₂基团δ22.1至34.1ppm处的14个次级碳信号(参见图12)。¹H-¹H COZY分析显示了两个共轭体系(图13)。从它们的偶联常数推导出E,E和E,Z构型。详细的结构信息获自HMQC和HMBC分析,这些信息清楚地显示了9-和5'位的两条链之间的连接(图14、图15)。使用这些光谱信息,将GTA-446的结构解析为9-(5'-(6'E,8'Z)-十四碳-二烯酸)-(5E,7E)-十四碳-二烯酸((5E,7E,11E,13Z)-9-戊基-10-(4'-丁酸))-十九碳四烯酸(如式I所示):

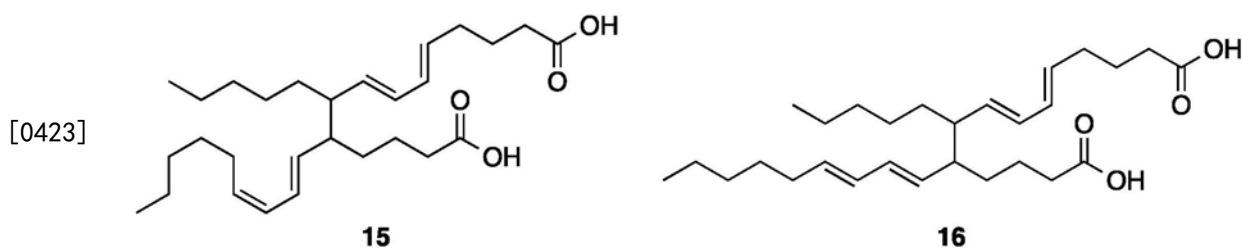


(式 I)。

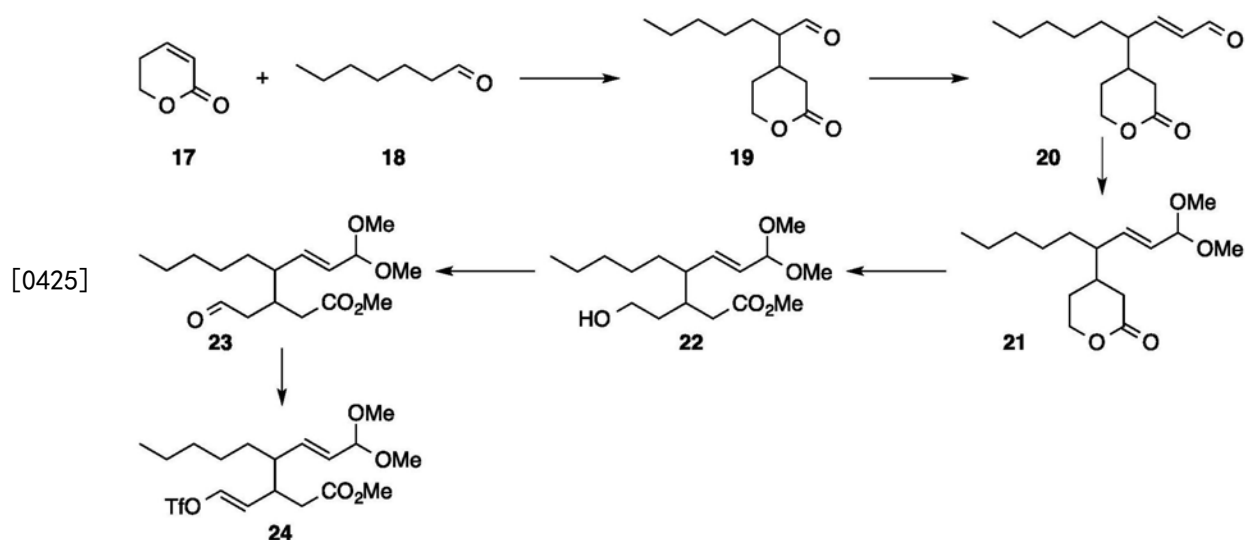
[0420] 实施例4-建议的GTA-446合成路线

[0421] 下面描述了用于制备合成的GTA-446和相关化合物的建议的合成路线的实施方案。将理解的是,该实施例旨在用于本领域技术人员,并且可以进行多种修改、替代、添加、缺失和/或取代。

[0422] 可以如下提出化合物15和化合物16(作为参考标准)的合成。



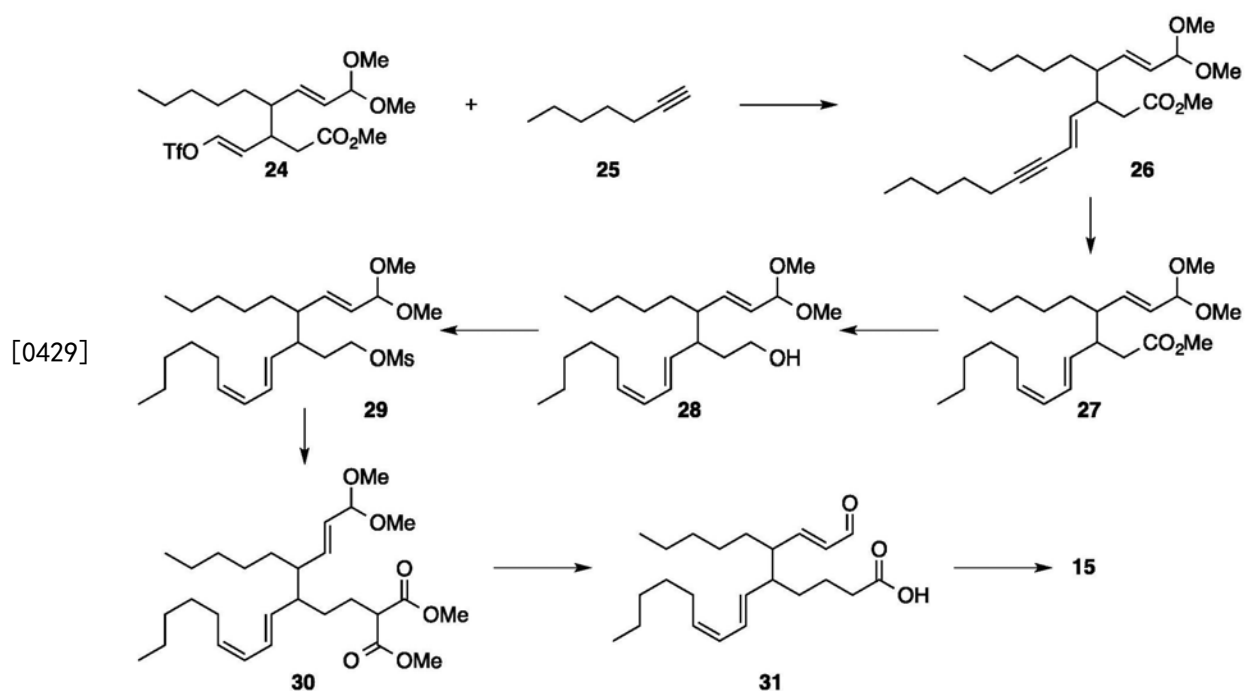
[0424] 方案1



[0426] 如方案1所示,化合物17与化合物18之间的迈克尔加成 (Michael addition) 可以得到化合物19[1]。应用于化合物19的维蒂希 (Wittig) 反应可以得到化合物20。用甲醇[2]或原甲酸三甲酯[3]和酸处理化合物20可以得到二甲基乙缩醛化合物21。化合物20的甲醇分解可以产生羟基酯化合物22。化合物22的剧烈氧化可以产生醛化合物23。醛与三氟甲磺酸酐反应可以产生三氟甲磺酸乙烯酯化合物24[4,5]。

[0427] 如方案2所示,化合物24与化合物25的菌头 (Sonagashira) 偶联可以得到化合物26[6]。随后使用林德拉 (Lindlar) 催化剂进行还原可以得到顺式烯烃化合物27。甲酯的还原可以得到醇化合物28。与甲磺酰氯反应可以将化合物28转化为甲磺酸酯化合物29。用丙二酸二甲酯代替甲磺酸酯可以产生化合物30。用酸处理化合物30时,同时进行缩醛裂解,酯水解和脱羧反应可以得到醛化合物31。与例如 (三苯基正膦亚基) 乙醛或 (4-羧丁基) 三苯基溴化磷的最终维蒂希 (Wittig) 反应可以完成化合物15的合成。

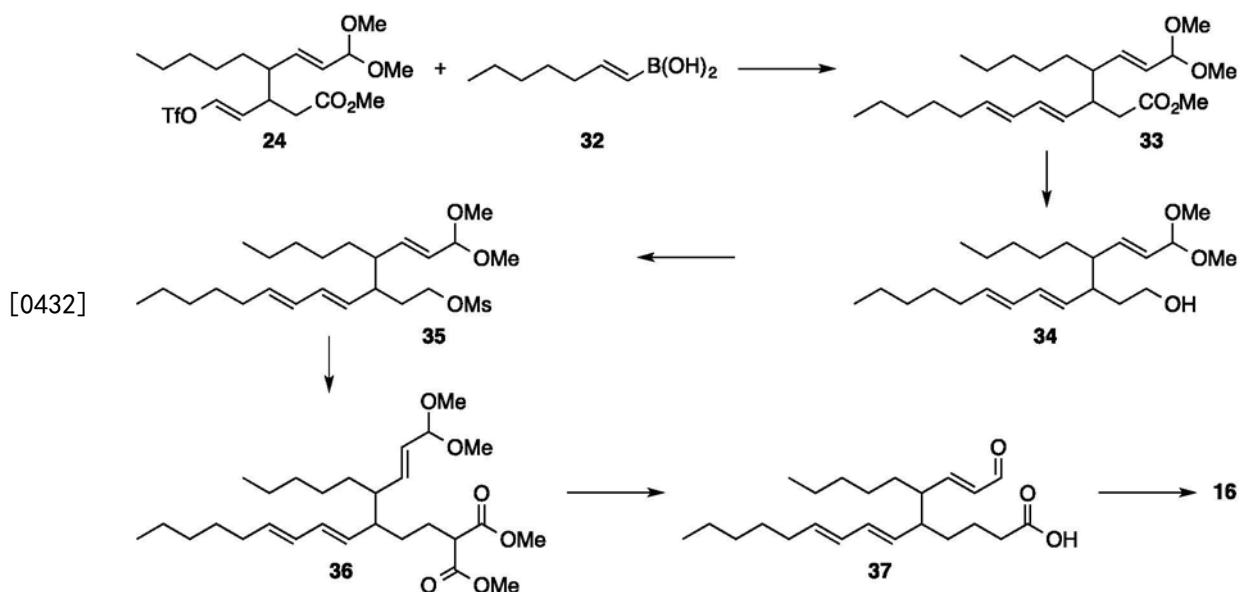
[0428] 方案2



[0430] 如方案3所示,化合物24与化合物32之间的铃木 (Suzuki) 反应可以得到化合物33

[7]。化合物16的完成遵循方案2所示的相同策略以将化合物28转化为化合物15。

[0431] 方案3



[0433] 化合物17可购自Sigma Aldrich;化合物18可购自Sigma Aldrich;化合物25可购自Sigma Aldrich和化合物32可购自Sigma Aldrich。所有维蒂希 (Wittig) 试剂均可购自Sigma Aldrich。

[0434] 合成参考文献 (每个文献均通过引用整体并入本文) :

[0435] [1]Schneiderman,Deborah K.and Hillmyer,Marc A.;Aliphatic Polyester Block Polymer Design;Macromolecules,49 (7) ,2419-2428;2016

[0436] [2]Andrade,Juan et al;Acetals;Ger.Offen.,3403426,01Aug 1985

[0437] [3]Yan,Jingqi et al;Method for preparing acetal by using acraldehyde;Faming Zhuanli Shenqing,102276427,14Dec 2011

[0438] [4]Gracia Martinez,Antonio et al;Synthesis of gem-bistriflates: reaction of aliphatic aldehydes with trifluoromethanesulfonic acid anhydride;Synthesis, (1) ,49-51;1987

[0439] [5]Sartori,G.and Maggi,R.;Product subclass 4:synthesis of enol sulfonates;Science of Synthesis,32,757-781;2008

[0440] [6]Suffert,Jean and Brueckner,Reinhard;Palladium catalyzed couplings of enol triflates with alkynes under very mild conditions.The stereoselective synthesis of dienediynes from bis(enol triflates);Tetrahedron Letters,32(11) , 1453-6;1991

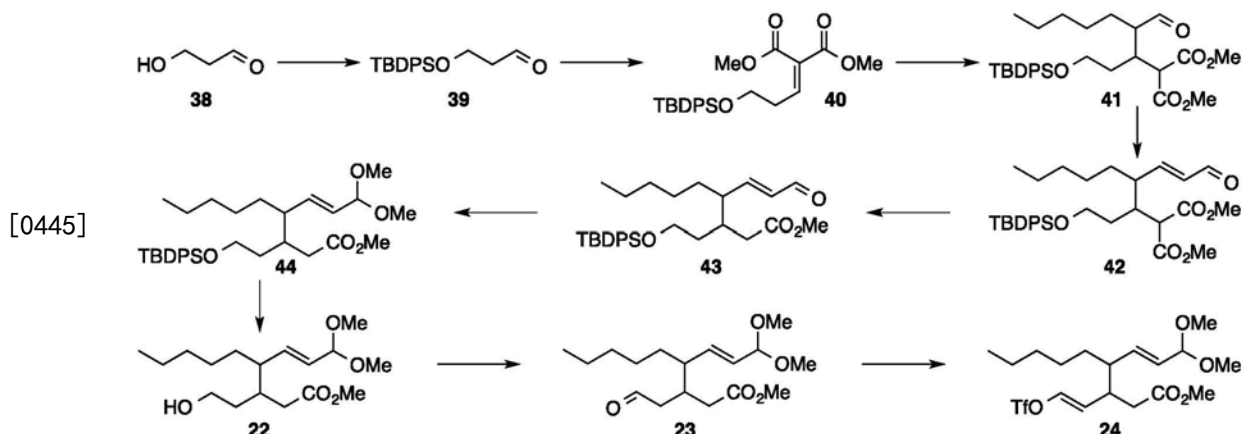
[0441] [7]Pirovano,Valentina et al;Gold-catalyzed synthesis of tetrahydrocarbazole derivatives through an intermolecular cycloaddition of vinyl indoles and N-allenamides;Chemical Communications,49 (34) ,3594-3596;2013

[0442] 实施例5-GTA-446中间化合物24的其他建议的合成路线

[0443] 实施例4中描述了用于制得合成GTA-446和相关化合物的建议的合成路线的实施方案,其通过中间体化合物24进行。在该实施例中,提出了制得化合物24的另一个实施方

案。将理解的是,该实施例旨在用于本领域技术人员,并且可以进行多种修改、替代、添加、缺失和/或取代。

[0444] 方案4



[0446] 如方案4所示,可以将3-羟基丙醛化合物38保护为甲硅烷基醚(例如叔丁基二苯基甲硅烷基(TBDPS)醚)以得到化合物39。随后的醛醇缩合脱水缩合可以得到化合物40。化合物40与庚醛(化合物18,方案1)之间的迈克尔加成可以得到化合物41。应用于化合物41的维蒂希(Wittig)反应可以得到化合物42。用DMSO和NaCl处理化合物42可以得到化合物43。化合物43与甲醇或原甲酸三甲酯和酸反应可以得到二甲基乙缩醛化合物44。化合物44与四丁基氟化铵(TBAF)反应可以得到化合物22。化合物22升级为化合物24可以按实施例4中所述进行。

[0447] 已经通过示例描述了一个或多个说明性实施方案。本领域技术人员将理解,在不脱离权利要求书所限定的本发明的范围的情况下,可以进行多种变型和修改。

[0448] 参考文献

[0449] 1.Ritchie SA,Tonita J,Alvi R,et al.Low-serum GTA-446anti-inflammatory fatty acid levels as a new risk factor for colon cancer.Int J Cancer.2013;132:355-362.

[0450] 2.Ritchie SA,Jayasinghe D,Davies GF,Ahiahonu P,Ma H,Goodenowe DB.Human serum-derived hydroxy long-chain fatty acids exhibit anti-inflammatory and anti-proliferative activity.J Exp Clin Cancer Res.2011;30:59.

[0451] 3.Ritchie SA,Heath D,Yamazaki Y,et al.Reduction of novel circulating long-chain fatty acids in colorectal cancer patients is independent of tumor burden and correlates with age.BMC Gastroenterol.2010;10:140.

[0452] 4.Ritchie SA,Chitou B,Zheng Q,et al.Pancreatic cancer serum biomarker PC-594:Diagnostic performance and comparison to CA19-9.World J Gastroenterol.2015;21:6604-6612.

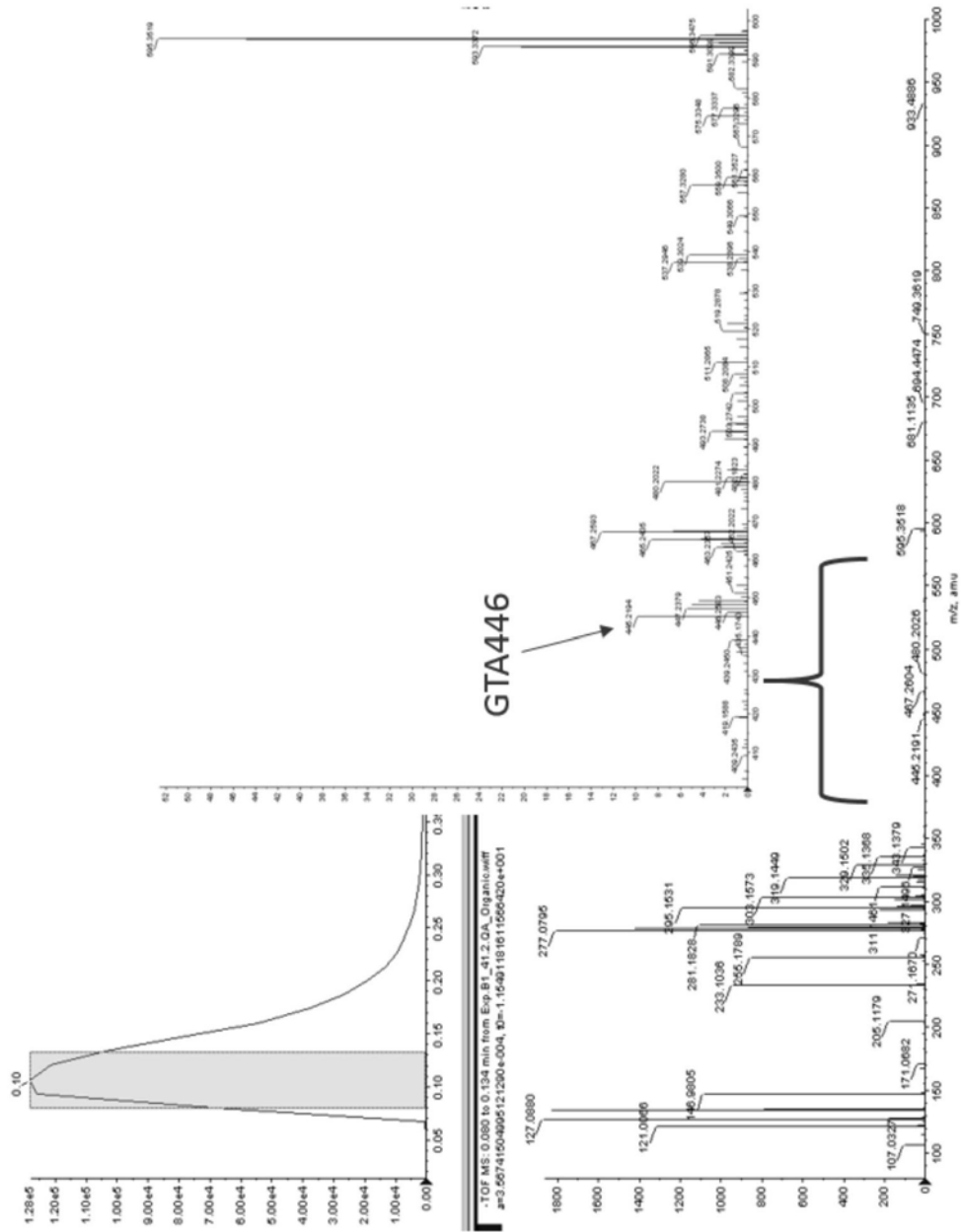
[0453] 5.Ritchie SA,Akita H,Takemasa I,et al.Metabolic system alterations in pancreatic cancer patient serum:potential for early detection.BMC Cancer.2013;13:416.

[0454] 6.Ritchie S,Heath D,Yamazaki Y,et al.Reduction of novel circulating

long-chain fatty acids in colorectal cancer patients is independent of tumor burden and correlates with age.BMC gastroenterology.2010;10.

[0455] 7.Ritchie S,Ahiahonu P,Jayasinghe D,et al.Reduced levels of hydroxylated,polyunsaturated ultra long-chain fatty acids in the serum of colorectal cancer patients:implications for early screening and detection.BMC medicine.2010;8.

[0456] 本文中和本说明书中其他地方引用的所有参考文献通过引用并入本文。



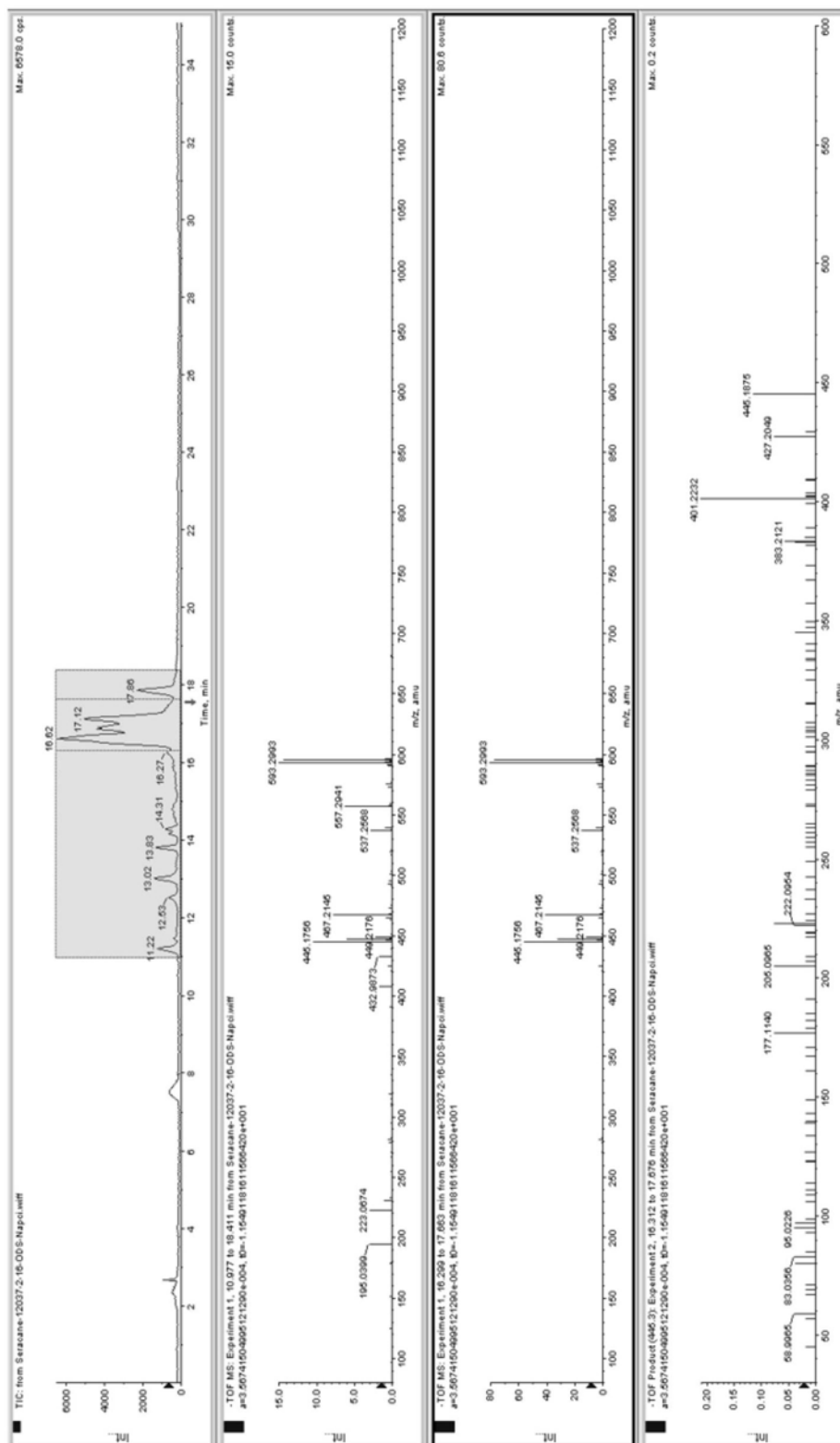


图2

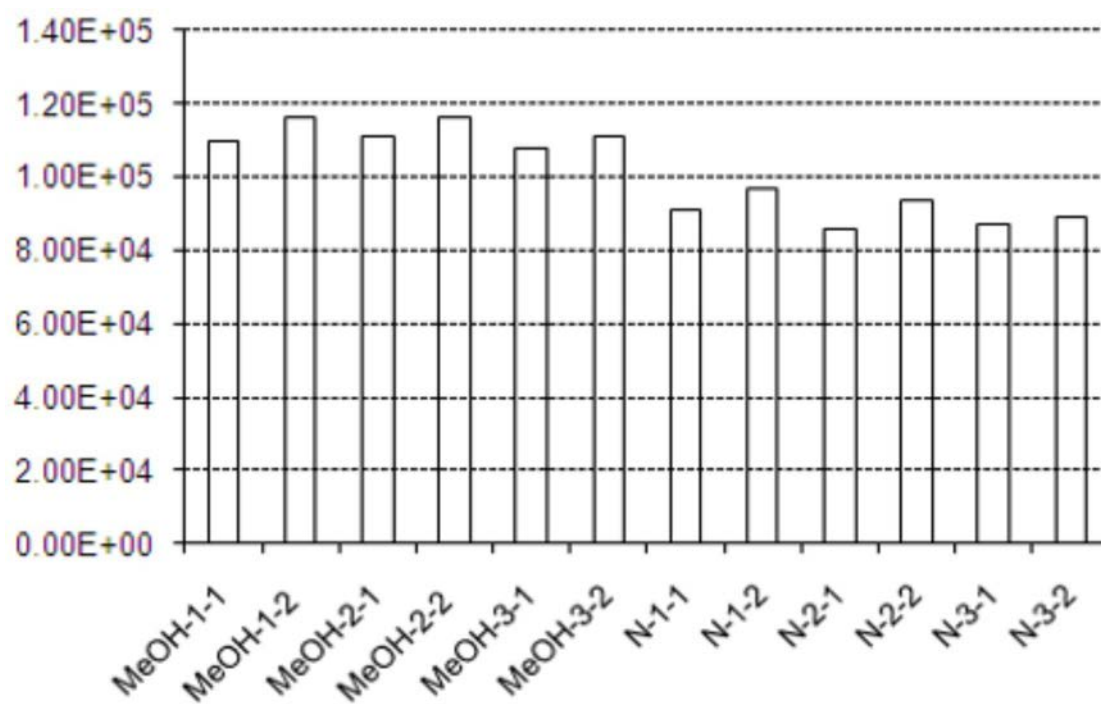


图3

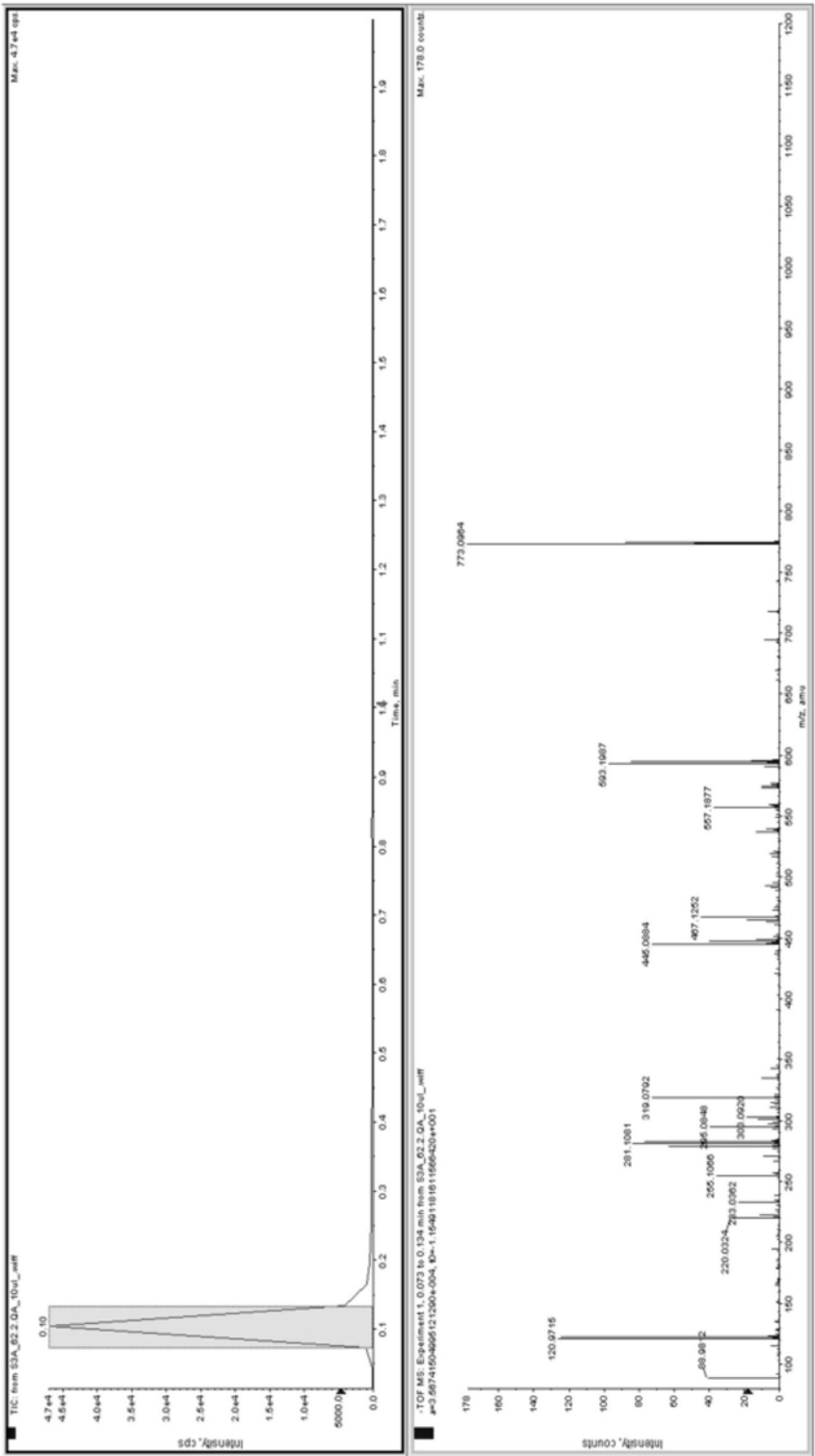


图4

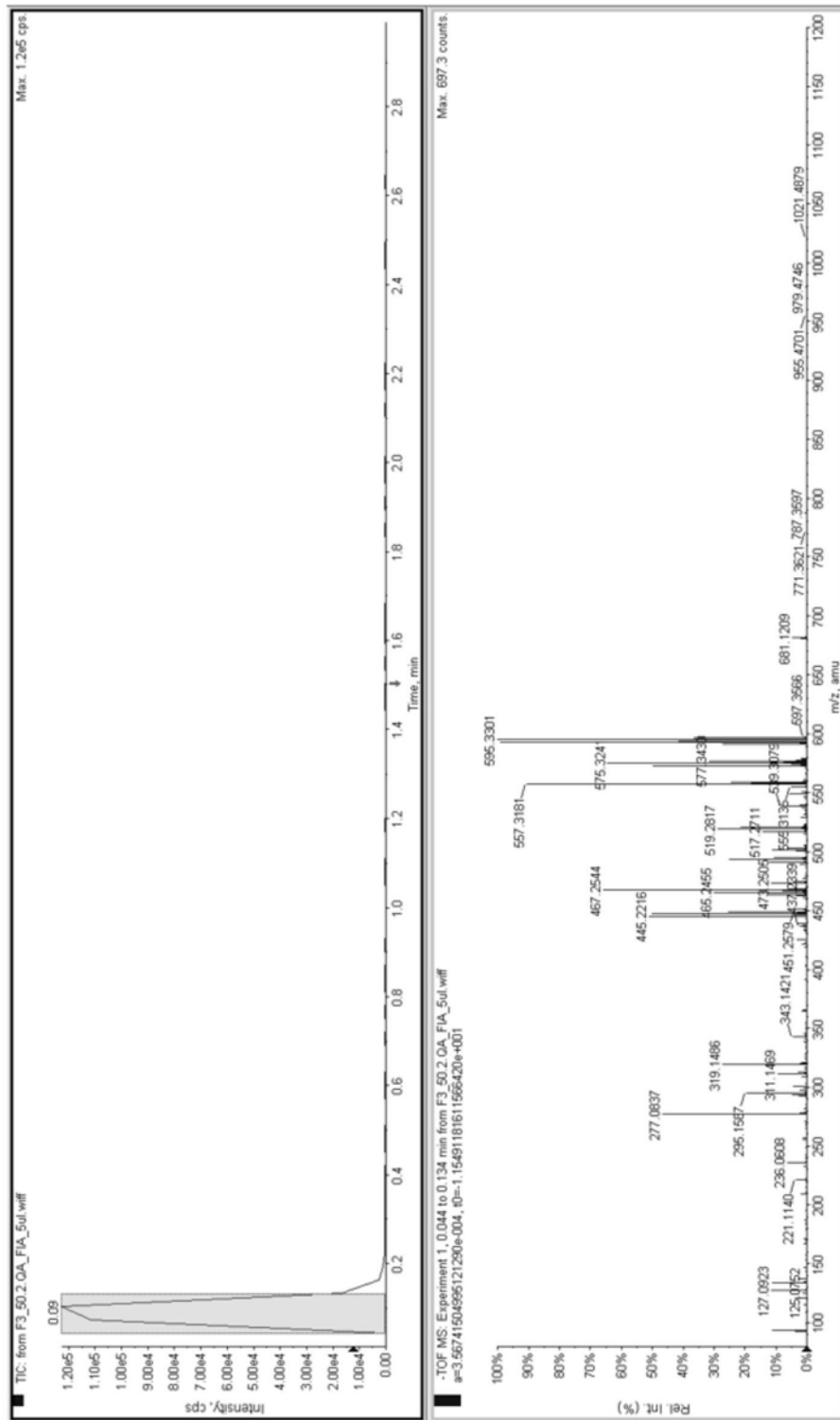


图5

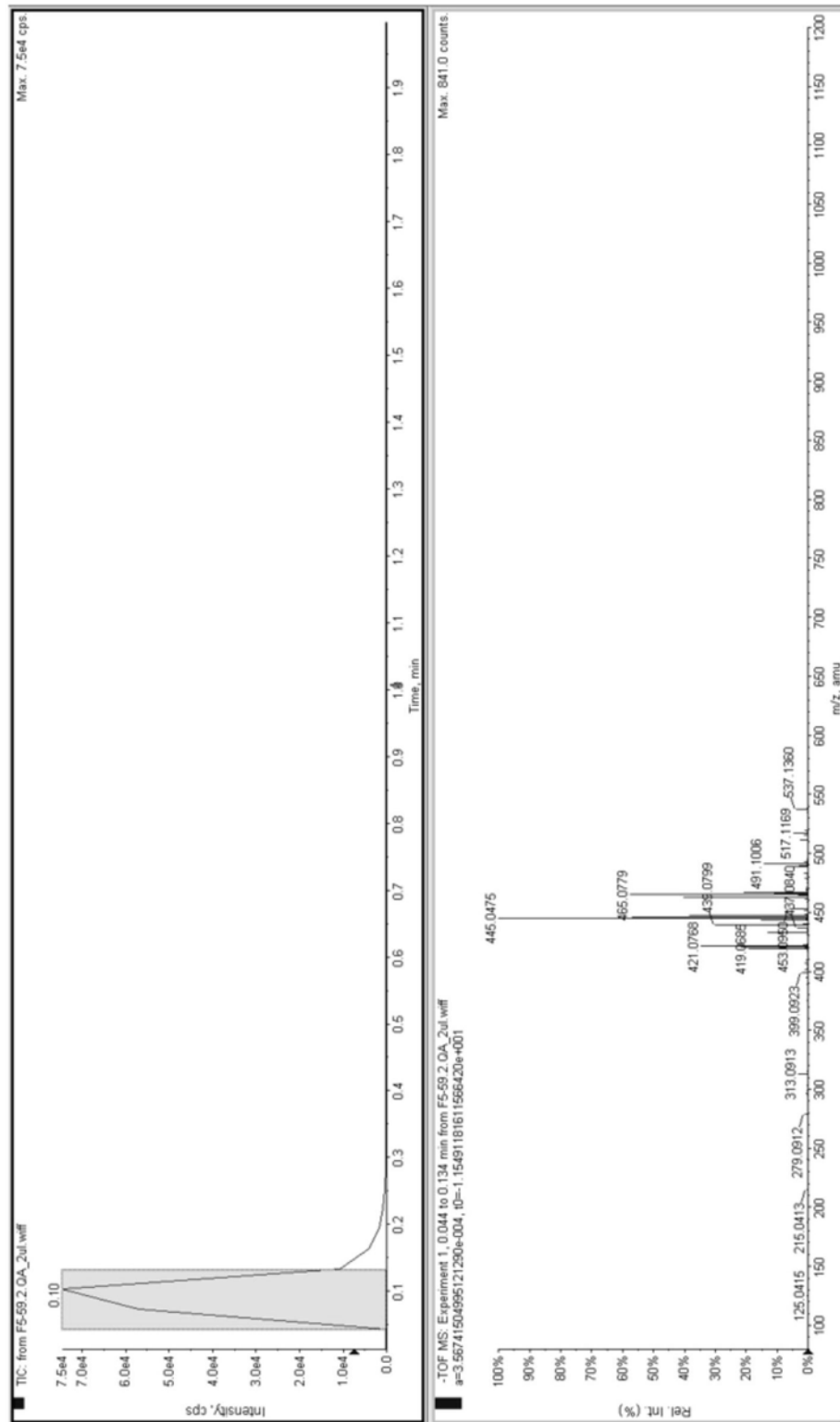


图6

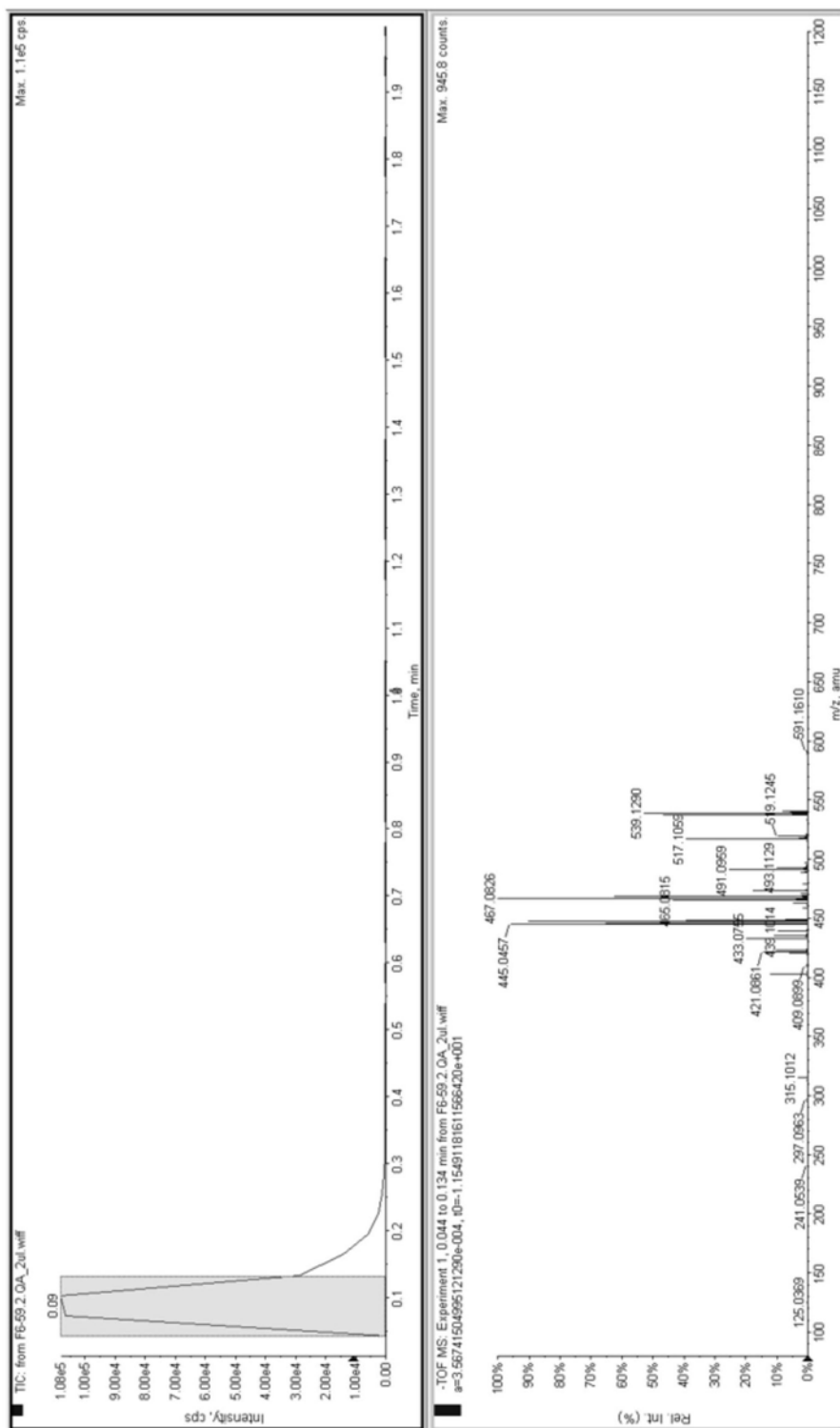


图7

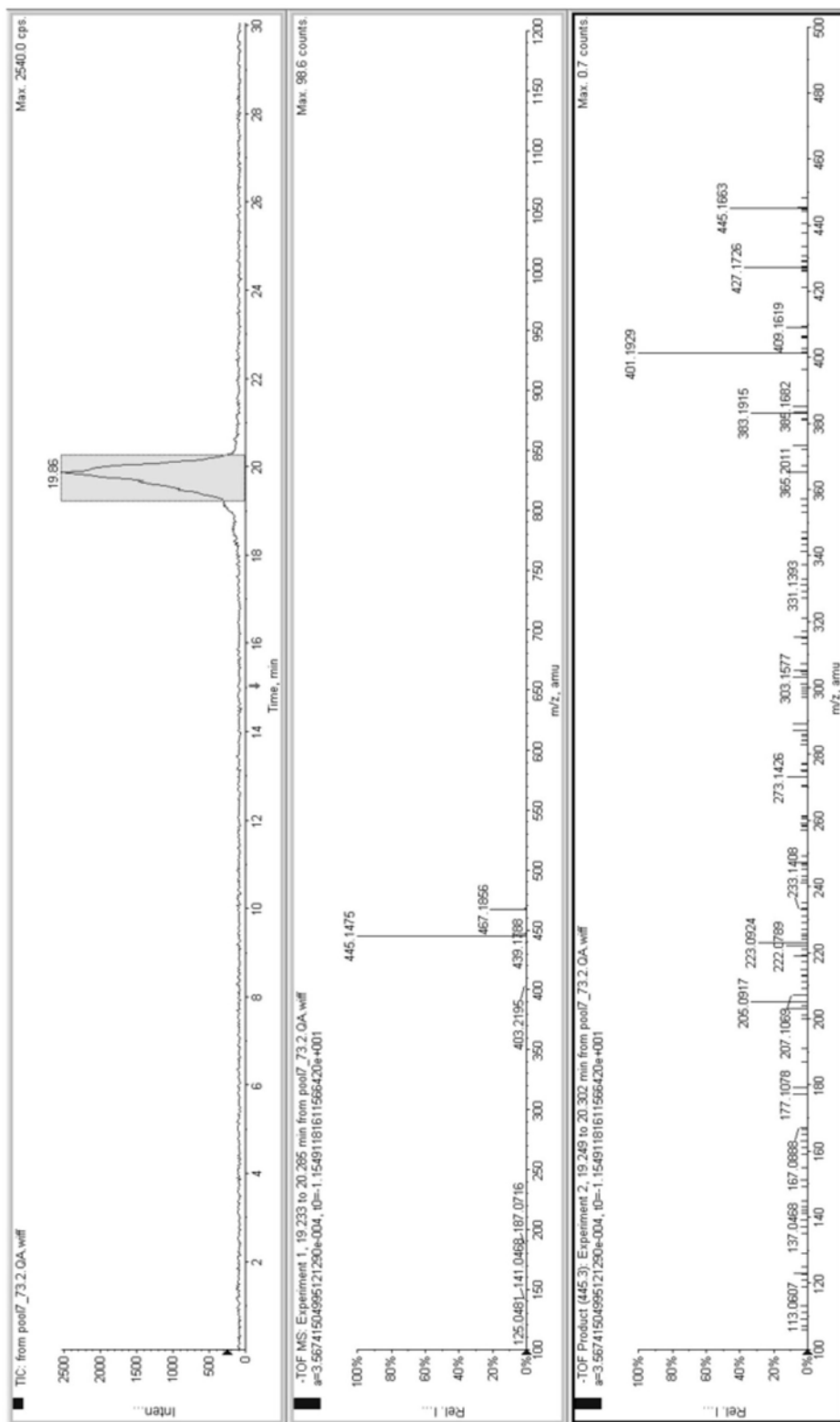


图8

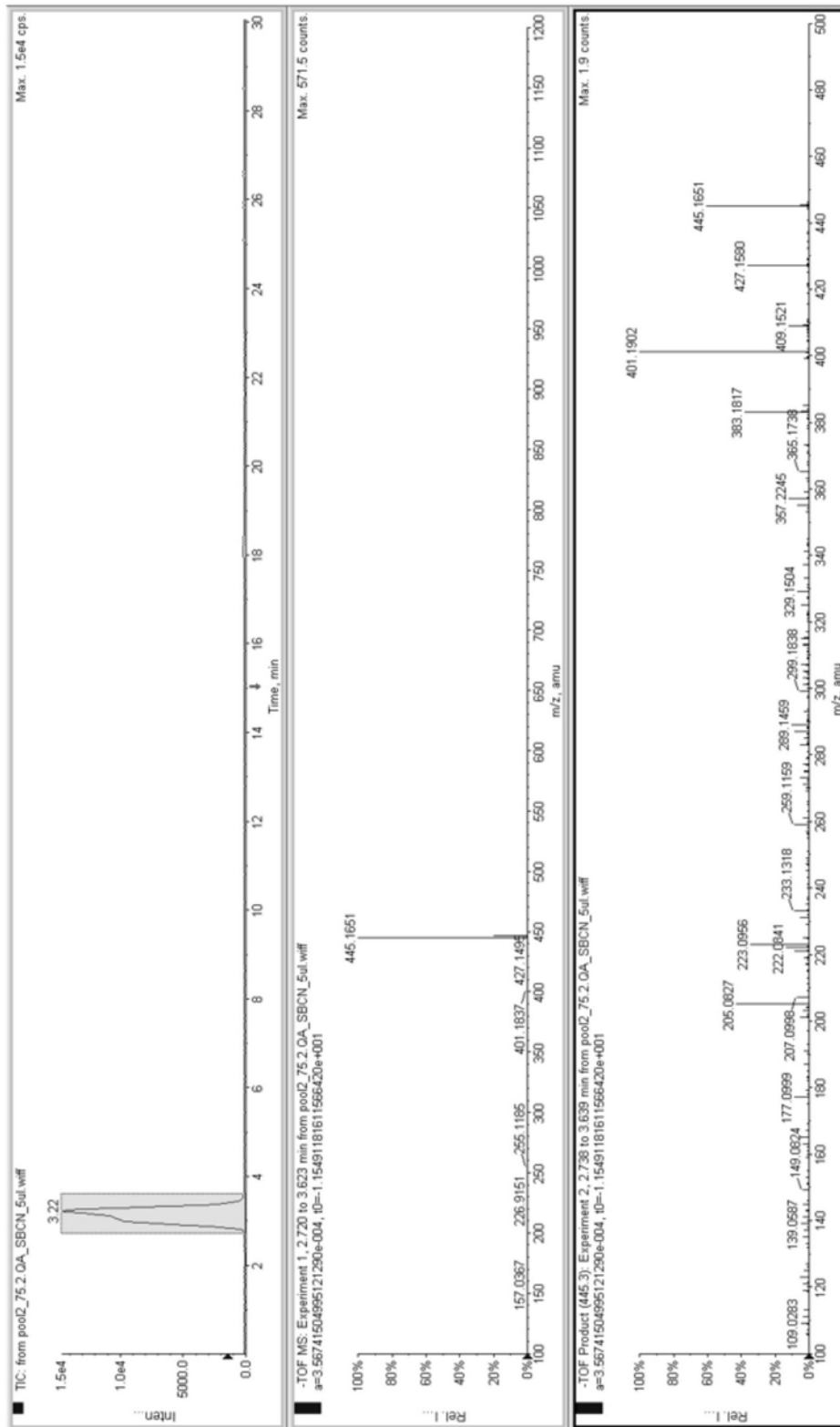


图9

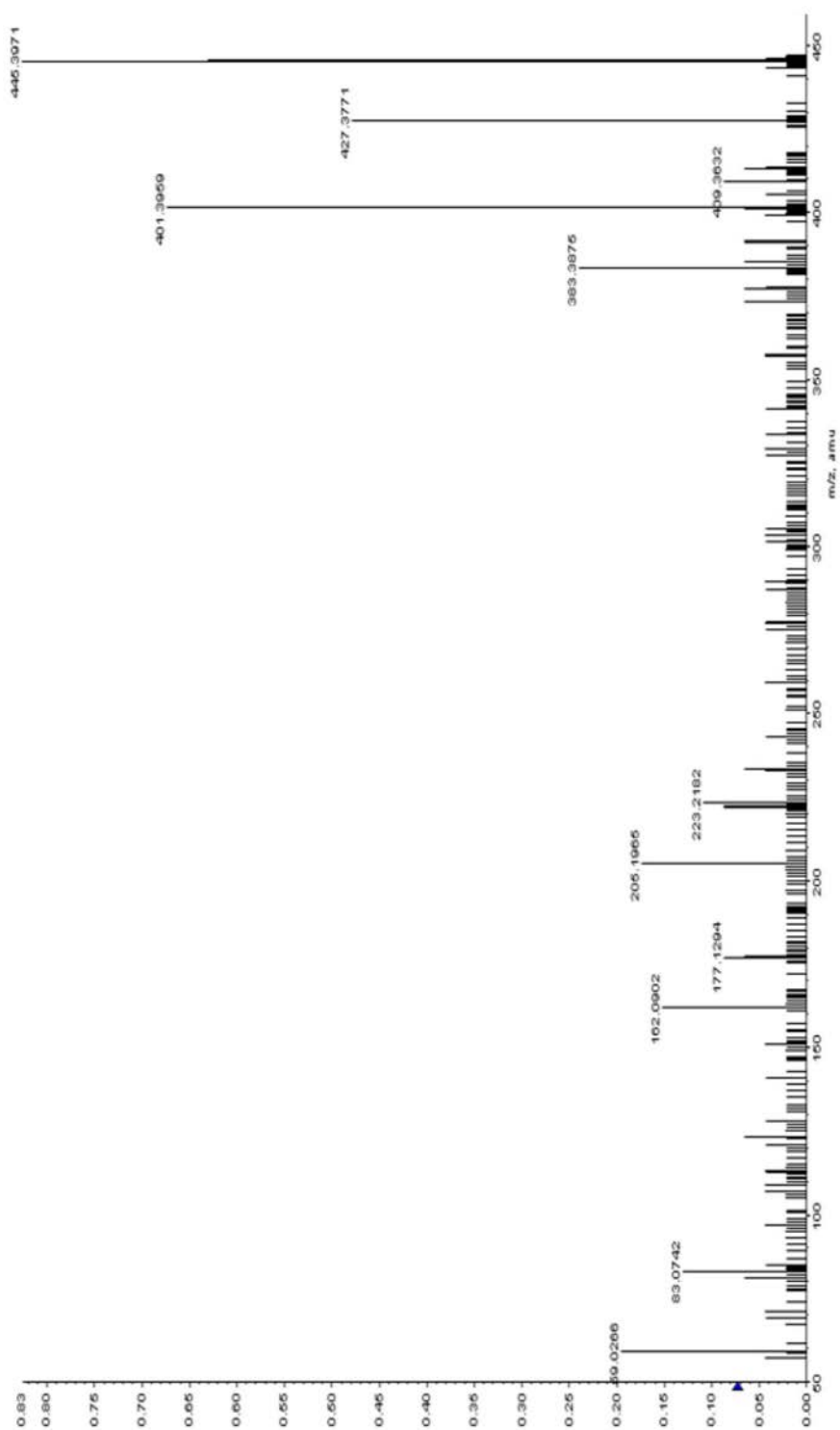


图10

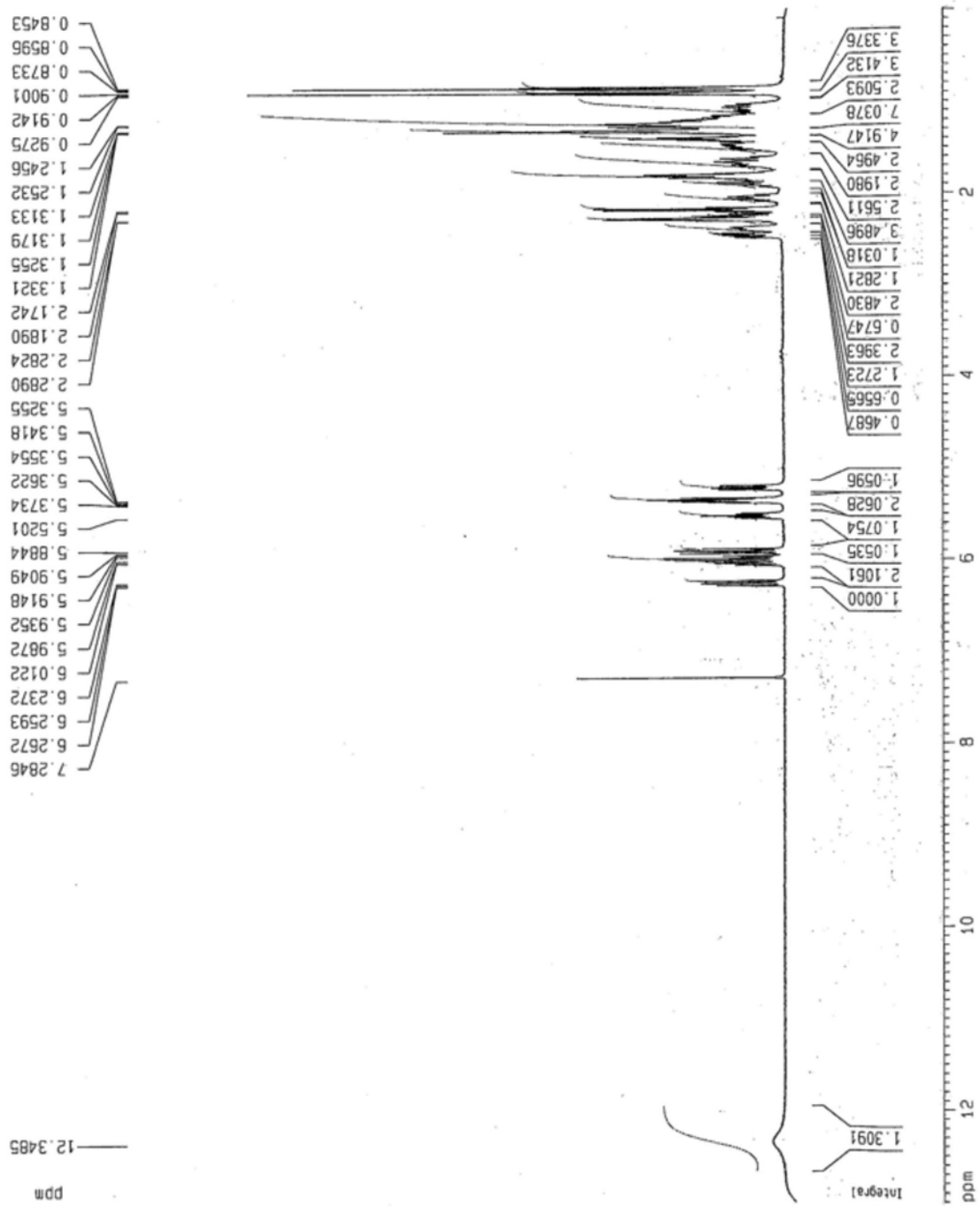


图11

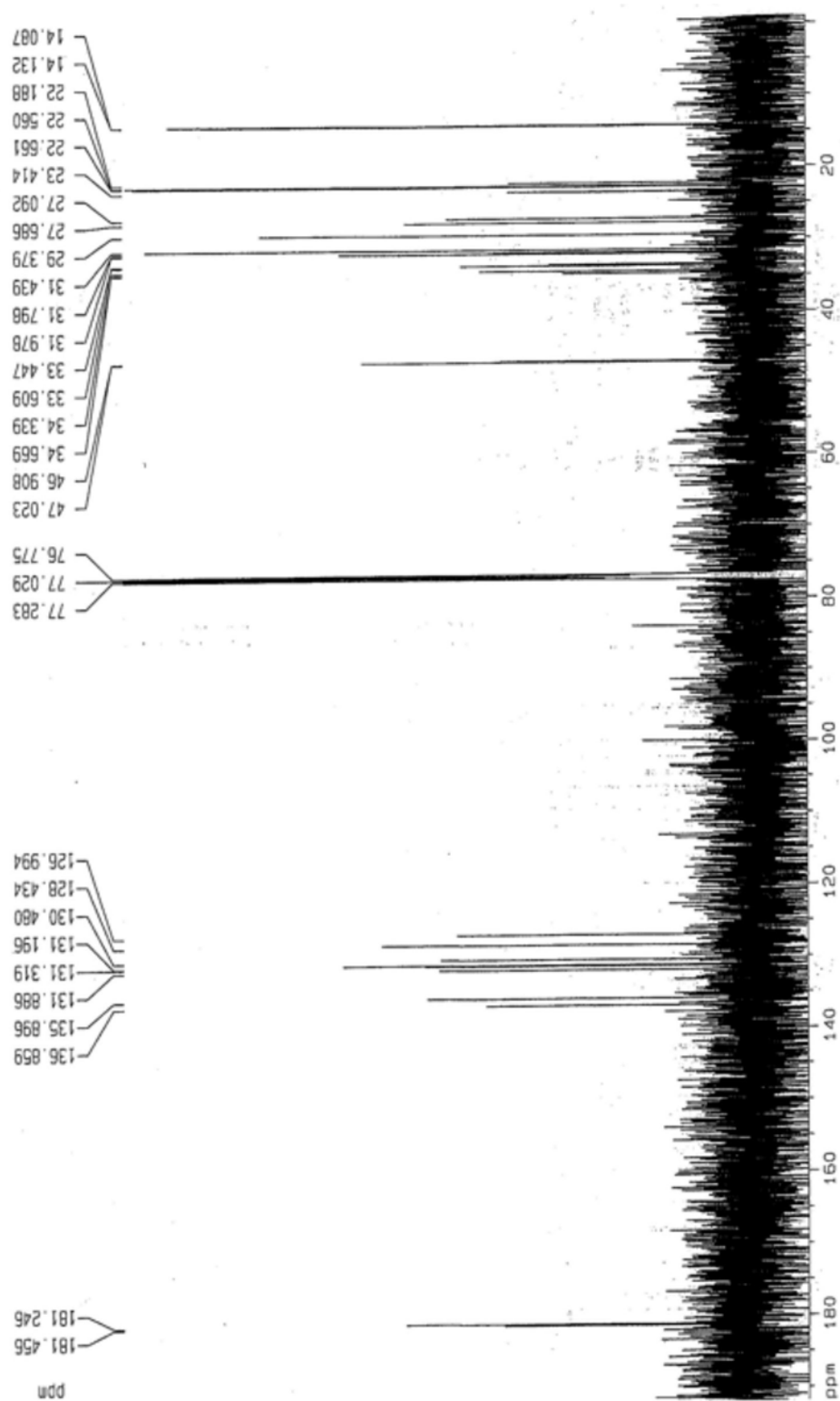


图12

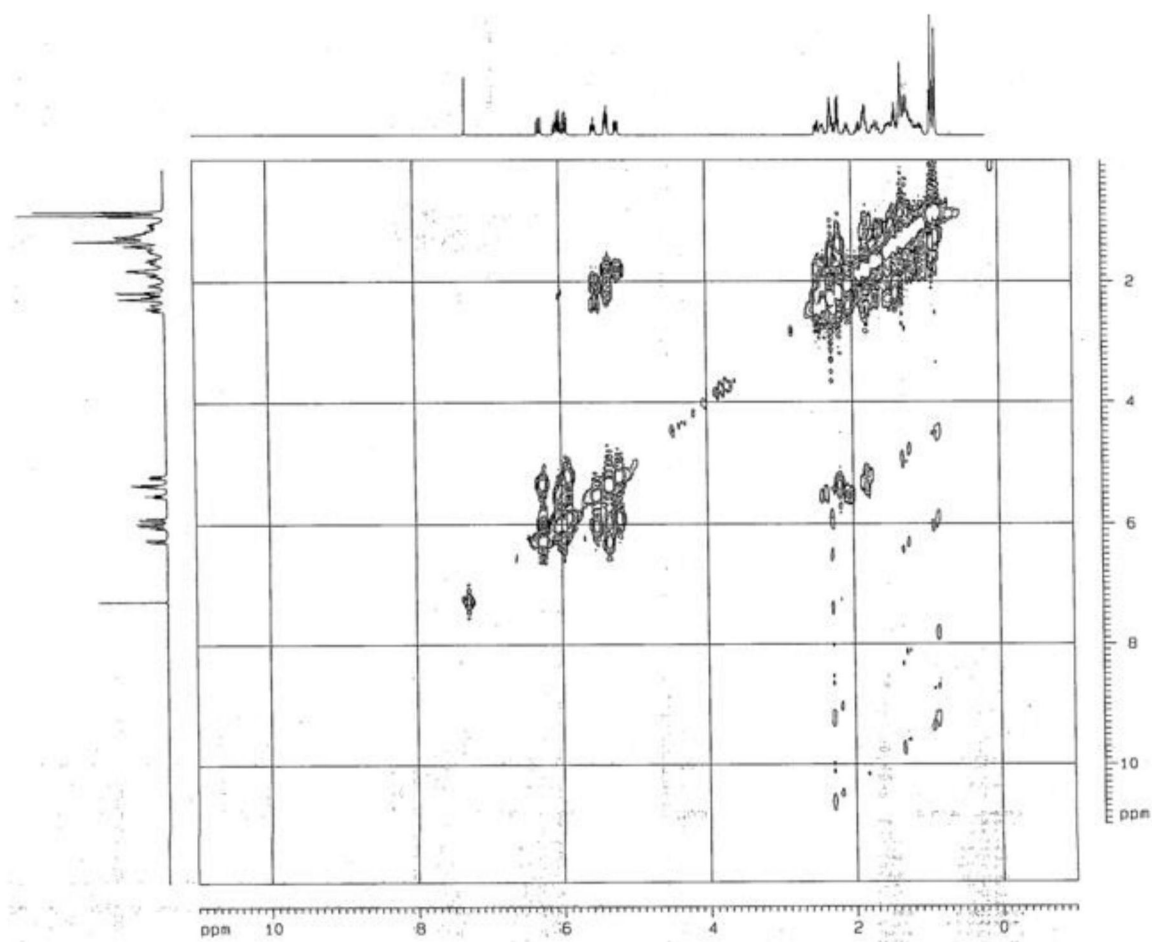


图13

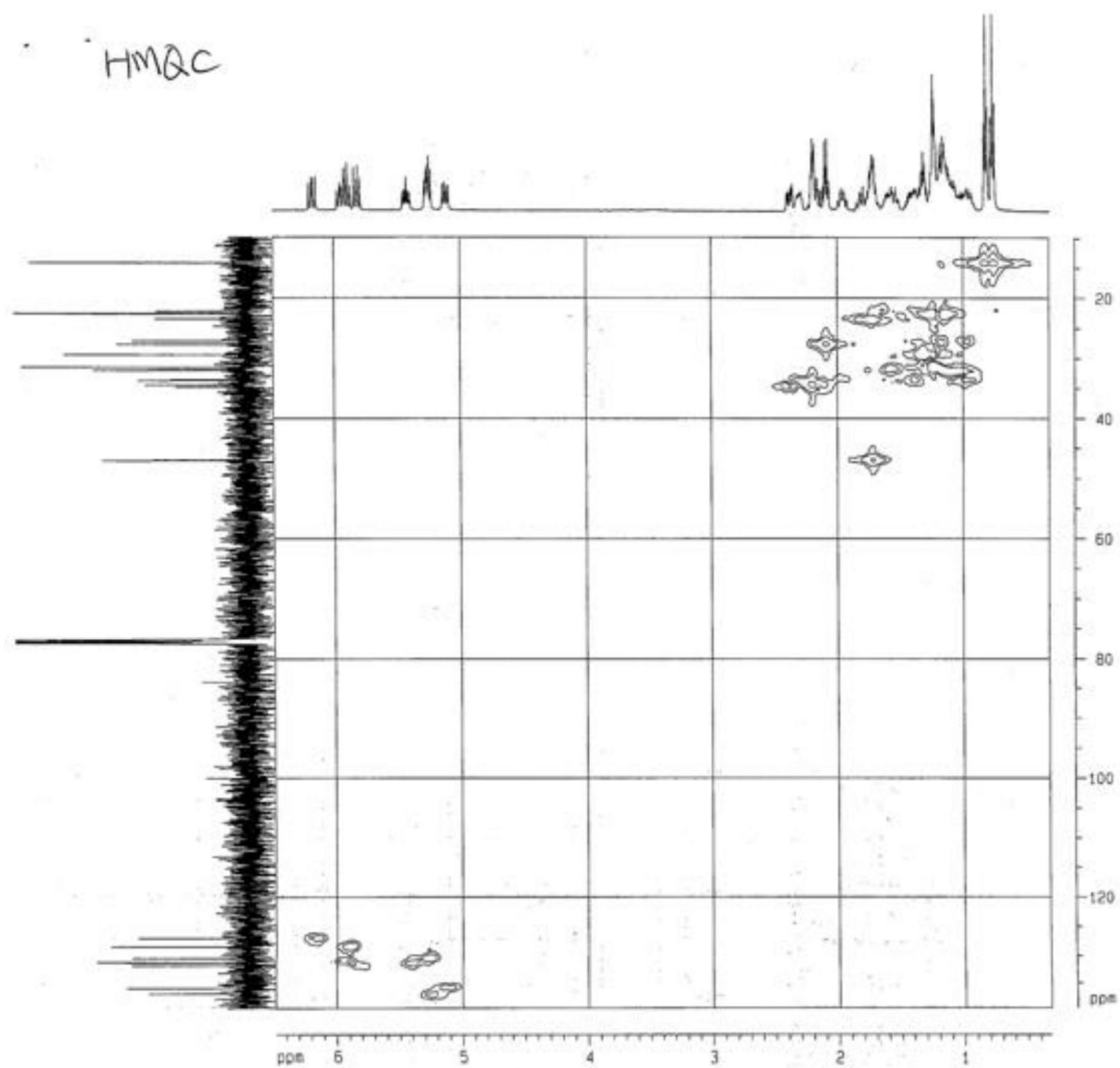


图14

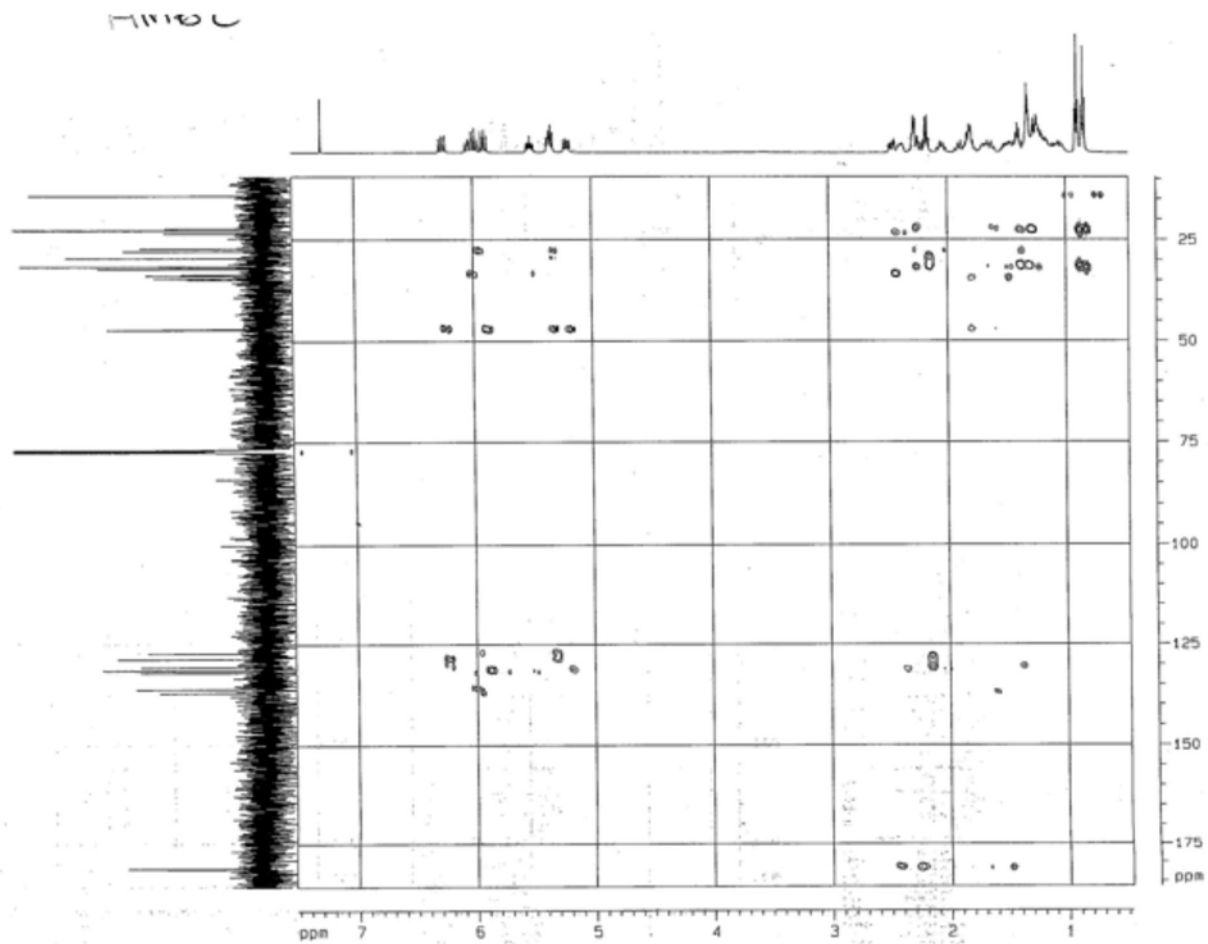


图15

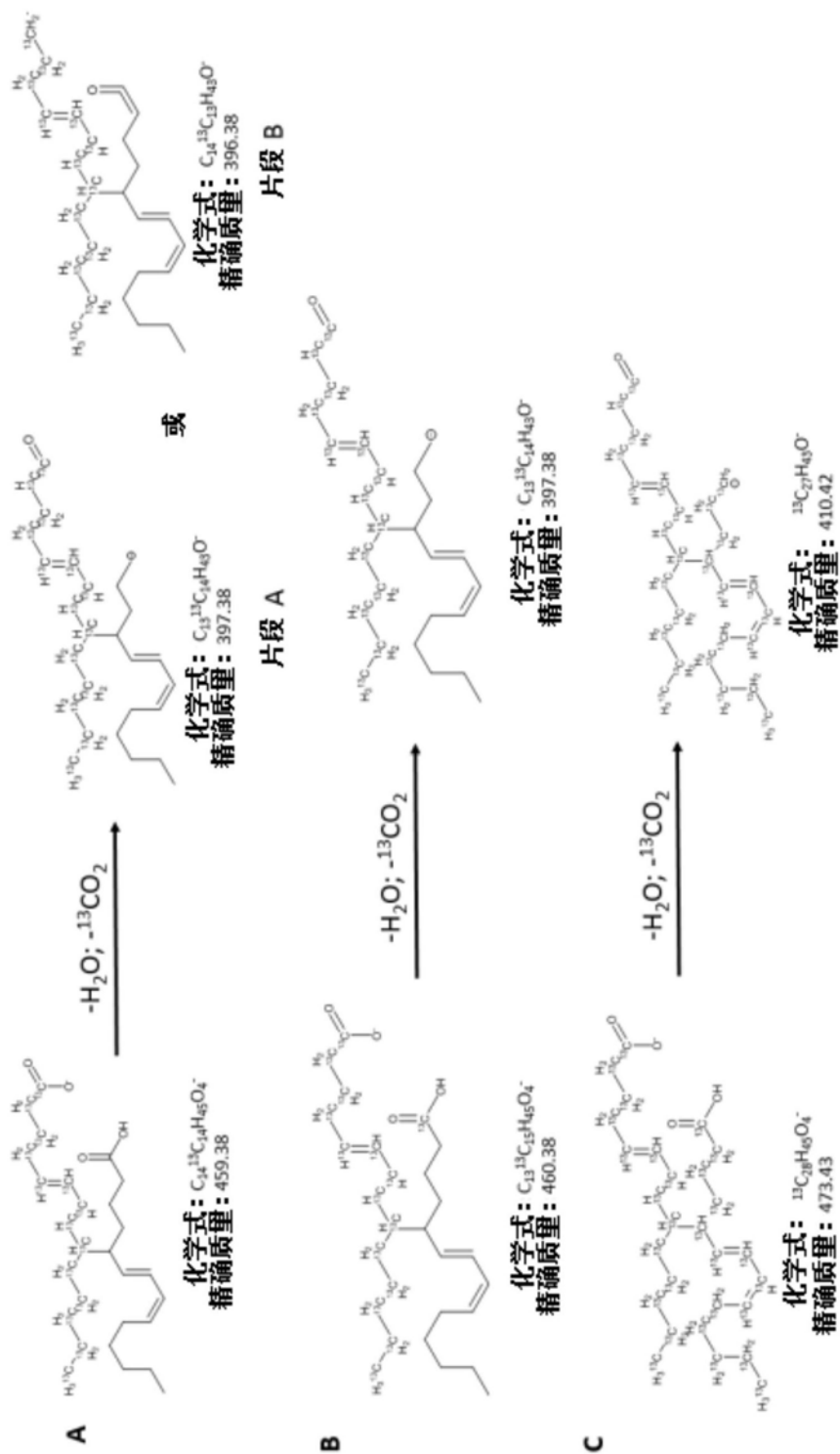


图16

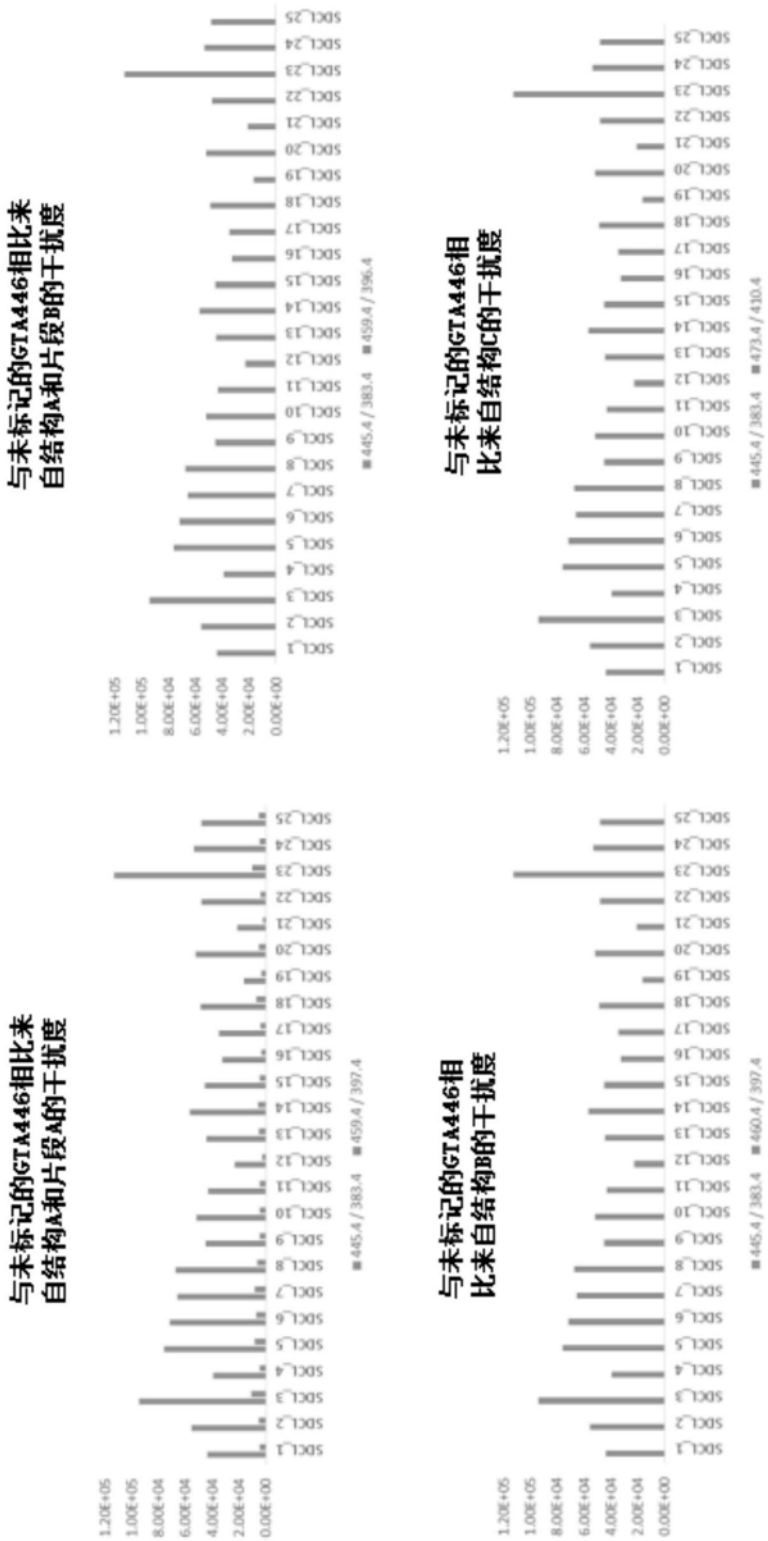


图17

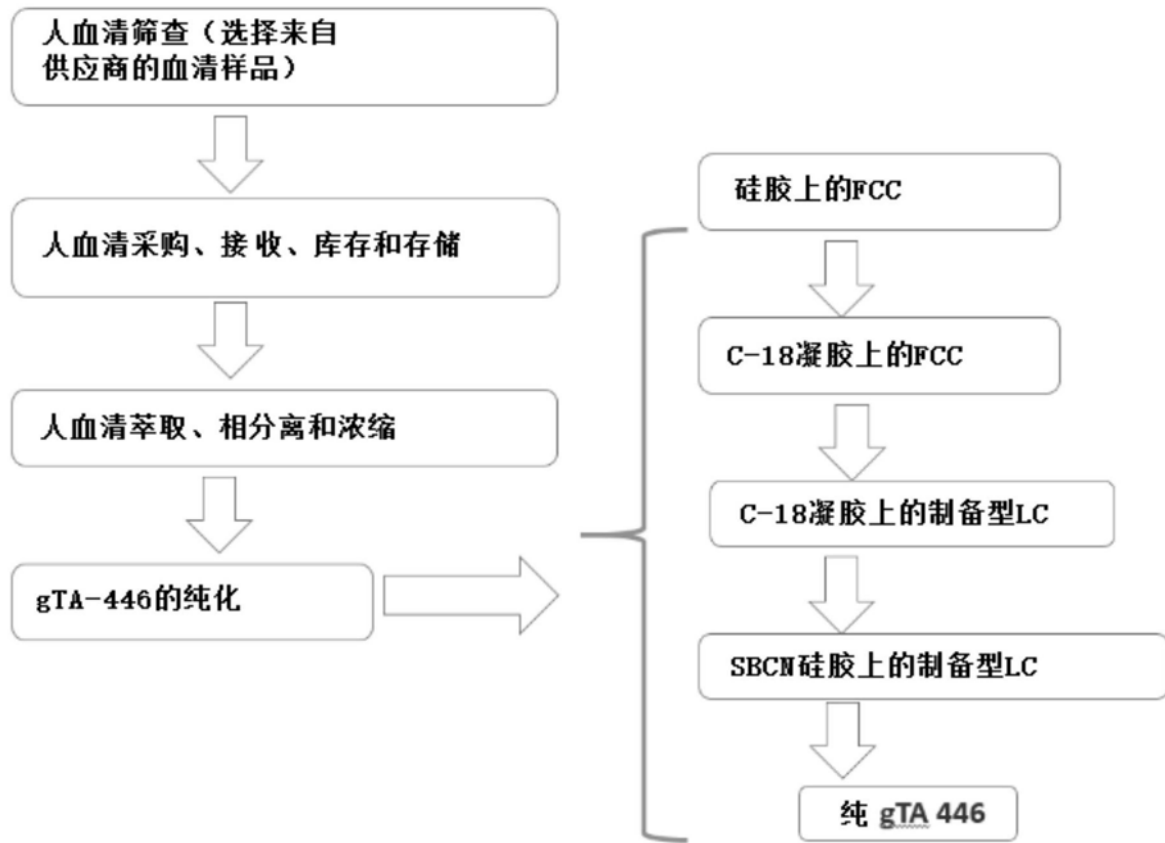


图18

专利名称(译)	作为生物样本中定量水平标准的二羧酸脂肪酸二聚体及其衍生物		
公开(公告)号	CN110741007A	公开(公告)日	2020-01-31
申请号	CN201880039121.3	申请日	2018-06-15
[标]发明人	肖恩里奇		
发明人	杜什曼希·加雅辛格 肖恩·里奇 丹尼尔·E·里维		
IPC分类号	C07F7/18 A61K49/00 C07C57/13 C07K16/44 G01N33/48 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	C07B59/001 C07B2200/05 C07C57/13 C07F7/1804 C07K16/44 G01N33/534 G01N33/57419 G01N33/92		
代理人(译)	徐舒		
优先权	62/520292 2017-06-15 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了具有式I结构的胃酸(GTA)化合物及其盐、酯、前药或标记的衍生物。此类GTA化合物可以用于确定样品的GTA水平以用于将受试者诊断为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌的风险或用于产生抗体。描述了特异性结合GTA式I的抗体或其片段,以及此类抗体或片段在用于确定样品中GTA水平或用于将受试者诊断为患有结直肠癌或有发展成结直肠癌风险中的用途。还提供了包含此类GTA化合物和/或抗体的试剂盒。

