



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107003303 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201580068163.6

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司  
72002

(22)申请日 2015.10.16

代理人 区斌

(30)优先权数据

1460003 2014.10.17 FR

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.06.14

G01N 33/542(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2015/052779 2015.10.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/059351 FR 2016.04.21

(71)申请人 生物梅里埃公司

地址 法国迈合西-兰托阿嘞

(72)发明人 A·保罗希 A·萨内西

V·L·罗西 A·廷科 V·舒什尼

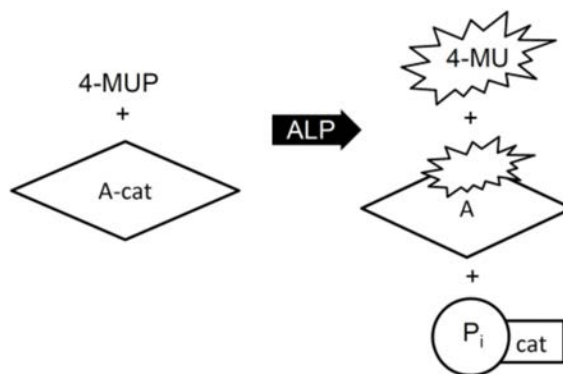
权利要求书2页 说明书30页 附图5页

(54)发明名称

用于利用免疫荧光的酶免疫测定的组合物及其用途

(57)摘要

本发明涉及利用免疫荧光的酶免疫测定的组合物。本发明的特征在于所述组合物包含(i)荧光生成酶促底物以及(ii)在荧光生成酶促底物(i)的水解之后形成荧光化合物的猝灭的荧光生成化合物。



1. 用于利用免疫荧光的酶免疫测定的组合物,其包含(i)荧光生成酶促底物以及(ii)在荧光生成酶促底物(i)水解之后形成荧光化合物的猝灭的荧光生成化合物。

2. 权利要求1的组合物,其特征在于所述荧光生成酶促底物选自4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP)、4-甲基伞形酮基半乳糖苷(4-MUG)、4-甲基伞形酮基硫酸酯(4-MUS)、荧光素二磷酸酯(FDP)、6,8-二氟-4-甲基伞形酮基磷酸酯(DiFMUP)、9H-(1,3-二氯-9,9-二甲基吡啶-2-酮-7-基)磷酸酯(DDAO磷酸酯)、2'-[2-苯丙噻唑]-6'-羟基苯丙噻唑磷酸酯、2-萘基磷酸酯和2-伞形酮基磷酸酯。

3. 权利要求2的组合物,其特征在于所述荧光生成酶促底物是4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP)。

4. 前述权利要求中任一项的组合物,其特征在于所述猝灭的荧光生成化合物是猝灭的化学传感器-阳离子复合物。

5. 权利要求4的组合物,其特征在于所述猝灭的化学传感器-阳离子复合物中的化学传感器选自亲水性香豆素和苯并咪唑衍生物,并且所述猝灭的化学传感器-阳离子复合物中的阳离子选自 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ 。

6. 权利要求5的组合物,其特征在于所述猝灭的化学传感器-阳离子复合物选自:

-钙黄绿素蓝-钴离子( $\text{Co}^{2+}$ )复合物和

-N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)-苯基]-N-[ (E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺-铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )复合物。

7. 权利要求4的组合物,其特征在于所述荧光生成酶促底物是4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP),并且所述猝灭的化学传感器-离子复合物是钙黄绿素蓝-钴离子( $\text{Co}^{2+}$ )复合物。

8. 用于利用免疫荧光的酶免疫测定的试剂盒,其包含权利要求1-7中任一项的组合物。

9. 用于免疫分析的自动化装置,其包含权利要求1-7中任一项的组合物或权利要求8中的试剂盒。

10. 前述权利要求中任一项的组合物、试剂盒或自动化装置在分析物的利用免疫荧光的酶免疫测定中的用途。

11. 通过可能包含分析物的液体测试样品的利用免疫荧光的酶免疫测定体外检测和/或定量所述分析物的方法,其包括以下步骤:

-使预先连接至或未连接至固体表面的捕获配对物与所述液体样品在一起以使所述分析物结合至所述捕获配对物;

-添加检测配对物以结合至所述捕获配对物-分析物复合物,所述检测配对物直接或间接偶联至能够裂解权利要求1-7中任一项的组合物中的所述荧光生成酶促底物的酶;

-使权利要求1-7中任一项的组合物和所述捕获配对物-分析物-检测配对物复合物在一起以形成反应介质;以及

-通过免疫荧光通过测量反应介质中发出的荧光检测分析物的存在和/或量。

12. 权利要求11的体外检测和/或定量分析物的方法,其包括至少一个以下步骤:

在添加所述检测配对物之前的漂洗步骤以便消除未结合至所述捕获配对物-分析物复合物的分析物;以及

在添加所述检测配对物之后的漂洗步骤以便消除所述未结合的检测配对物。

13. 通过利用可能包含分析物的液体测试样品的免疫荧光的酶免疫测定体外检测和/

或定量所述分析物的方法,其包括以下步骤:

-使预先连接至或未连接至固体表面的捕获配对物、偶联至能够裂解权利要求1-7中任一项的组合物中所述荧光生成酶促底物的酶的分析物类似物以及所述液体样品在一起,其竞争结合至所述捕获配对物;

-使权利要求1-7中任一项的组合物和所述捕获配对物-分析物和捕获配对物-分析物类似物复合物在一起以形成反应介质;以及

-通过免疫荧光通过测量反应介质中发出的荧光检测分析物的存在和/或量。

14. 权利要求13中的体外检测和/或定量分析物的方法,其包括至少一个以下步骤:

在添加所述样品之前的漂洗步骤以便消除未结合至所述捕获配对物-分析物复合物的分析物;以及

在添加所述样品之后的漂洗步骤以便消除所述未结合的分析物和分析物类似物。

15. 提高通过利用免疫荧光的酶免疫测定体外检测和/或定量测试样品中待检测的分析物的方法的灵敏度的方法,其特征在于包括在进行所述测定时使用权利要求1-7中任一项的组合物或权利要求8的试剂盒。

## 用于利用免疫荧光的酶免疫测定的组合物及其用途

[0001] 本发明涉及用于利用免疫荧光的酶免疫测定的组合物,包含这样的组合物的用于免疫分析的试剂盒和自动化装置,还有通过利用免疫荧光的酶免疫测定体外检测和/或定量所关注的分析物的相关方法。

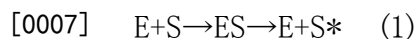
[0002] 利用免疫测定的检测方法广泛用于诊断领域。这些方法使得可以检测测试样品中的分析物,特别是蛋白质(抗原/抗体)、肽和半抗原的形式,例如类固醇或维生素。免疫测定是本领域技术人员公知的方法,包括待检测的分析物与这种分析物的一种或多种结合配对物之间的免疫反应。

[0003] 然后免疫测定的结果由实验室提供给医生,所述医生会解释它们以便例如诊断病理状况或不期望的微生物的存在,然后采取必要措施,例如向患者给予适当治疗或净化包含这些不期望的微生物的工业环境。因此对于这些测定,高度灵敏(在这个意义上,它们不给出假阴性)和高度特异性(在这个意义上,它们不给出假阳性)特别重要。

[0004] 酶免疫测定或EIA是在可能包含所关注的分析物的样品分析领域中广泛使用的一种类型的免疫测定。这些测定与酶催化的反应相关,使用酶促底物。根据所选的酶促底物,可以有比色信号(ELISA技术,酶联免疫吸附测定)(Rassasie, M.J., et al., 1992)、荧光信号(ELFA技术,酶联荧光测定)或化学发光信号(CLIA, 化学发光免疫测定)(Stabler T.V., et al., 1991)。

[0005] 这些方法是基于使得可以在测试样品分析期间将发出的信号定量的测量。检测的信号量一般与待测量的分析物量成比例(例如夹心测定期间)或与待测量的分析物量成反比(例如竞争性测定)。

[0006] 使得可以定量荧光信号并获得更灵敏的结果的“ELFA”技术使用将荧光生成酶促底物转化为荧光反应产物以及任选地转化为一种或多种其他反应产物的酶,根据本领域技术人员公知的一般方程(1):



[0008] 其中“E”为酶,“S”为荧光生成酶促底物,“ES”对应于酶-底物复合物,并且“S\*”对应于荧光生成酶促底物所致的荧光反应产物。

[0009] 反应介质中包含的反应产物S\*在通过特定波长的光激发时变成荧光。

[0010] 实际上,应用荧光的原理,暴露于对应于第一波长的光源或通过对应于第一波长的光源激发的反应产物将转而发射第二波长的光线或荧光信号。第一激发波长一般在250-450nm的范围中变化。就其本身而言,第二发射波长位于300-600nm的发射范围中。

[0011] 因此,荧光信号的检测(以相对荧光单位计)与源自反应介质的这些荧光信号的信号处理相组合(其本身源自待检测的样品且包含反应产物)使得可以确定例如样品内寻求的所关注的分析物的存在或浓度。

[0012] 尽管如此,即使ELFA技术比ELISA比色测定更灵敏,本领域技术人员仍然寻求使得可以进一步改进信号检测的解决方案。这是因为荧光测量存在非特异性地减少或增加信号输出的问题。

[0013] 因此,荧光的检测可以作为参数的函数变化,所述参数如pH、温度、离子浓度、干燥

度、与测试样品或固体基质相关的干扰的存在。这些参数特别影响光散射和背景噪声,其影响测定的灵敏度,特别是使用荧光(“Selecting the Detection System-Colorimetric, Fluorescent, Luminescent Methods” (Gibbs et al., Elisa Technical Bulletin-No.5, 2001))。

[0014] 鉴于上述情况,目前需要寻找新的方式或其他方式使得可以增加ELFA技术的特异性和灵敏度。

[0015] 因此,本发明旨在解决的技术问题是使利用免疫荧光的酶免疫测定更有效和更快速,特别是增加灵敏度,即当验证了假设时,特别是当分析物少量存在于测试样品中时,增加给出阳性结果的能力。

[0016] 本发明提出的对这个问题的解决方案的第一主题是用于利用免疫荧光的酶免疫测定的组合物,其包含(i)荧光生成(fluorogenic)酶促底物和(ii)在荧光生成酶促底物(i)水解之后形成荧光化合物(fluorescent compound)的猝灭的荧光生成化合物(fluorogenic compound)。

[0017] 更特别地,本发明的这种组合物包含或由以下组成:

[0018] -在一方面,荧光生成酶促底物,其使得能够在酶促水解之后形成荧光产物和优选为阴离子的第二反应产物;以及

[0019] -在另一方面,猝灭的荧光生成化合物,其使得能够在所述荧光生成酶促底物的酶促水解之后和通过释放的第二反应产物形成所述猝灭的荧光生成化合物所致的荧光化合物。

[0020] 实际上,如上文所示,在酶促反应期间,酶将荧光生成酶促底物转化为荧光反应产物,但是还导致第二反应产物的形成,一般认为没有特别的好处。这样的酶促反应的一般方程(2)可以如下书写:

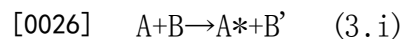


[0022] 其中“E”为酶,“S”为荧光生成酶促底物,并且“ES”对应于酶-底物复合物,“S\*”对应于荧光反应产物,而“B”对应于第二反应产物,两种化合物“S\*”和“B”存在于反应介质中。

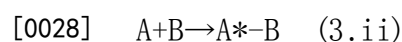
[0023] 令人惊讶的是,申请人能够证实可以使用来自酶促反应的所述第二、非荧光产物“B”,使其与猝灭的荧光生成化合物“A”反应。反应之后,所述产物“B”直接或间接与所述猝灭的荧光生成化合物“A”反应,使得能够产生荧光产物“A\*”或“A\*-B”。

[0024] 产物“B”与所述猝灭的荧光生成化合物“A”的直接反应旨在表示:

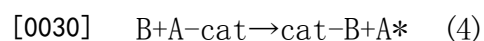
[0025] -根据以下方程(3.i),所述产物“B”与所述猝灭的荧光生成化合物“A”反应以在一方面释放荧光化合物“A\*”,以及在另一方面释放反应产物“B’”:



[0027] -或者根据以下方程(3.ii),所述产物“B”特异性地结合至所述猝灭的荧光生成化合物“A”以形成荧光化合物“A\*-B”,其关联所述猝灭的荧光生成化合物“A”与所述产物“B”:



[0029] 所述猝灭的荧光生成化合物优选包含会发出荧光“A”的部分和可释放的阳离子“cat”,然后其读作“A-cat”,并且直接化学反应的一般方程可以书写如下:



[0031] 其中“B”对应于上文的一般方程(2)中详细描述的第二反应产物,“A-cat”是

包含能够在释放其阳离子“cat”之后发出荧光“A\*”的部分的所述猝灭的荧光生成化合物，其中阳离子“cat”会与所述产物“B”关联以形成产物“cat-B”。

[0032] 所述产物“B”与所述猝灭的荧光生成化合物的间接反应旨在表示所述产物“B”用于一组反应，使得可以将所述猝灭的荧光生成化合物转化为荧光化合物，所述产物“B”没有结合至所述猝灭的荧光生成化合物“A”。然后所述产物“B”结合至所述一组反应中存在的另一化合物，然后其将会被用于使得可以使所述猝灭的荧光生成化合物发荧光的步骤。

[0033] 因此，以创新的方式，申请人使用通常被认为没有好处，由上文方程(2)中详细描述酶促反应所致的所述产物“B”，以便通过在反应介质中使所述反应产物“B”与猝灭的荧光生成化合物反应来增加荧光信号。通过重复使用之前没有兴趣的反应产物，申请人从而大幅增加荧光信号。

[0034] 非荧光反应产物的这种重复使用特别具有以下优点：

[0035] -其限制添加额外的物质，所述物质的合成是复杂的且难以复制的，例如用来放大信号的树状聚合物，从而使得可以增加灵敏度、原料的制备和测试的快速性；

[0036] -不改变反应时间实现获得的灵敏度的增加的；

[0037] -非荧光反应产物和所述猝灭的荧光生成化合物之间的额外反应，特别是在所述反应产物“B”和所述猝灭的荧光生成化合物之间的直接反应的情况下是简单、快速的，并且不需要许多步骤；

[0038] -其不需要检测信号的仪器的任何改动，因此一般是相对便宜的；

[0039] -其使得可以检测测试样品中以低浓度存在的分析物；

[0040] -其使得可以将所述猝灭的荧光生成化合物(“A-cat”)的浓度调整至仅增加弱信号的荧光；

[0041] -所述荧光反应产物(“S\*”)以及通过产物“B”发出荧光的所述猝灭的荧光生成化合物“A”或“A-cat”(“A\*”或“A\*-B”)的荧光信号在位于相同区间内的波长范围内被检测。

[0042] 本发明的第二主题是用于利用荧光的酶免疫测定的试剂盒，其包含根据本发明的组合物。

[0043] 其第三主题是用于免疫分析的自动化装置，其包含根据本发明的组合物。

[0044] 其第四主题是根据本发明的组合物、试剂盒或自动化装置在利用免疫荧光的酶免疫测定中的用途。

[0045] 其第五主题是在可能包含分析物的液体测试样品中通过夹心类型的利用免疫荧光的酶免疫测定在体外检测和/或定量所述分析物的方法，其包括或由以下步骤组成：

[0046] -使预先连接至或未连接至固体表面的捕获配对物与所述液体样品在一起以使分析物结合至所述捕获配对物；

[0047] -添加检测配对物以结合至所述捕获配对物-分析物复合物，其直接或间接偶联至能够裂解本发明的组合物的所述荧光生成酶促底物的酶；

[0048] -使本发明的组合物和所述捕获配对物-分析物-检测配对物复合物在一起以形成反应介质；以及

[0049] -通过免疫荧光通过测量反应介质中发出的荧光检测分析物的存在和/或量。

[0050] 其第六主题是在可能包含分析物的液体测试样品中通过利用免疫荧光的酶免疫测定在体外检测和/或定量所述分析物的方法，其包括或由以下步骤组成：

[0051] -使预先连接或未连接至固体表面的捕获配对物、偶联至能够裂解本发明的组合物的所述荧光生成酶促底物的酶的分析物类似物以及所述液体样品在一起,其竞争结合至所述捕获配对物;

[0052] -使本发明的组合物以及所述捕获配对物-分析物和捕获配对物-分析物类似物复合物在一起以形成反应介质;以及

[0053] -通过免疫荧光通过测量反应介质中发出的荧光检测分析物的存在和/或量。

[0054] 最后,其最后的主题是提高通过利用免疫荧光的酶免疫测定在体外检测和/或定量测试样品中所关注的分析物的方法的灵敏度的方法,其特征在于其包括在进行测定时使用根据本发明的组合物。

[0055] 阅读根据附图给出的以下非限制性描述会更好理解本发明,其中:

[0056] -图1示意性地示出通过酶碱性磷酸酶 (ALP) 激活荧光生成酶促底物4-甲基伞形酮基磷酸酯 (4-MUP) 以给出4-甲基伞形酮 (4-MU) 和磷酸氢根离子 $\text{HPO}_4^{2-}$  (Pi代表其所有形式的无机磷酸盐) 的已知反应;

[0057] -图2示意性地示出激活荧光生成酶促底物的反应,在该实例下是4-甲基伞形酮基磷酸酯 (4-MUP),通过猝灭的荧光生成化合物(猝灭的化学传感器-阳离子复合物(A-cat))优化;通过酶碱性磷酸酶 (ALP) 转化底物4-MUP以给出4-甲基伞形酮 (4-MU) 和磷酸氢根离子 $\text{HPO}_4^{2-}$  (Pi代表其所有形式的无机磷酸盐),所述所得的磷酸氢根离子 $\text{HPO}_4^{2-}$ 特异性地结合至所述猝灭的化学传感器-阳离子复合物A-cat以在一方面形成关联阳离子与磷酸盐离子的非荧光产物(Pi-cat),以及在另一方面形成荧光化合物(A\*);

[0058] -图3示意性地示出激活荧光生成酶促底物4-甲基伞形酮基磷酸酯 (4-MUP) 的特异性反应,通过关联钙黄绿素蓝与钴离子的猝灭的化学传感器-阳离子复合物(“CB-Co”)优化;通过酶碱性磷酸酶 (ALP) 转化底物4-MUP以给出4-甲基伞形酮 (4-MU) 和磷酸氢根离子 $\text{HPO}_4^{2-}$  (Pi代表其所有形式的无机磷酸盐),所述所得的磷酸氢根离子 $\text{HPO}_4^{2-}$ 特异性地结合至关联钙黄绿素蓝和钴离子的猝灭的化学传感器-阳离子产物(“CB-Co”)的阳离子,以便在一方面形成关联阳离子与磷酸盐离子的非荧光产物(Pi-Co),以及在另一方面释放荧光化合物钙黄绿素蓝(CB\*) 介质;

[0059] -图4说明猝灭的荧光生成化合物(关联钙黄绿素蓝和钴离子的猝灭的化学传感器-阳离子复合物(“CB-Co”))是通过增加无机磷酸盐Pi浓度激活的,并且使得可以形成荧光化合物钙黄绿素蓝(CB\*) 作为所述无机磷酸盐Pi浓度的函数[以nm计的波长 $\lambda$ /以任意单位(a.u.)计的发射强度];

[0060] -图5说明利用荧光分光光度计测量的以下两种溶液的发射谱基本上相似:

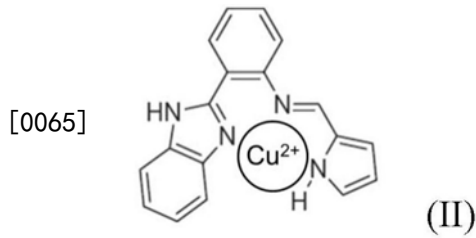
[0061] • 包含6410nm的钙黄绿素蓝、0.6mM的二乙醇胺(DEA);0.3mM的乙二胺四乙酸(EDTA)和0.5mM的 $\text{MgCl}_2$ 的pH 9.4的溶液;以及

[0062] • 包含6410nm的荧光生成酶促底物4-甲基伞形酮基磷酸酯 (4-MUP) 的VIDAS® OPT溶液[以nm计的波长 $\lambda$ /以任意单位(a.u.)计的发射强度]

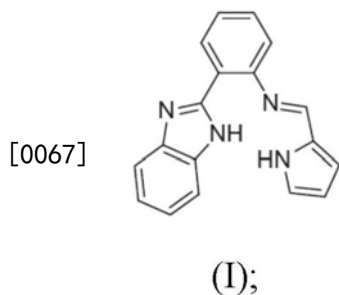
[0063] -图6说明钙黄绿素蓝的荧光在添加钴离子( $\text{Co}^{2+}$ )之后猝灭的事实。[以nm计的波长 $\lambda$ /以任意单位(a.u.)计的发射强度]。

[0064] -图7示意性地示出激活荧光生成酶促底物4-甲基伞形酮基磷酸酯 (4-MUP) 的特异性反应,通过关联苯并咪唑衍生物与铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )的式(II)的猝灭的化学传感器-阳离子复

合物优化:



[0066] 通过酶碱性磷酸酶 (ALP) 转化底物4-MUP以给出4-甲基伞形酮 (4-MU) 和磷酸氢根离子 $\text{HPO}_4^{2-}$  ( $\text{Pi}$ 代表其所有形式的无机磷酸盐), 所述所得的磷酸氢根离子 $\text{HPO}_4^{2-}$ 与猝灭的化学传感器-阳离子复合物(关联苯并咪唑衍生物与铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ ))的阳离子 $\text{Cu}^{2+}$ 关联, 以便在一方面形成关联阳离子 $\text{Cu}^{2+}$ 与磷酸盐离子的非荧光产物( $\text{Pi-Cu}$ ), 以及在另一方面释放以下式(I)的荧光苯并咪唑衍生物N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯基]-N-[ (E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺:



[0068] -图8示意性地示出实施例3中详细描述测试中的不同步骤, 特别使得可以确定本发明的荧光化合物产生的额外的荧光;

[0069] -图9示意性地示出PiPer™[PiPer™磷酸盐测定试剂盒 (Invitrogen™)] 的原理, 其中在无机磷酸盐的存在下, 麦芽糖磷酸化酶将麦芽糖转化为葡萄糖和葡萄糖-1-磷酸。然后葡萄糖氧化酶将葡萄糖转化为葡萄糖酸内酯和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 。最后, 用辣根过氧化物酶 (HRP),  $\text{H}_2\text{O}_2$ 与非荧光试剂Amplex Red反应以产生高荧光分子试卤灵;

[0070] -图10比较一方面利用包含仅一种荧光生成酶促底物(4-MUP)的免疫荧光的酶免疫测定的组合物以及另一方面根据本发明的利用包含荧光生成酶促底物(4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP))和猝灭的化学传感器-阳离子复合物(关联钙黄绿素蓝和钴离子) (“CB-Co”)的免疫荧光的酶免疫测定的组合物之间的平均荧光; 以及

[0071] -图11示出关联N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯基]-N-[ (E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]-胺与铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )的猝灭的化学传感器-阳离子复合物实际上不发出荧光, 并且荧光是在将无机磷酸盐 $\text{Pi}$ 引入介质之后获得的[以nm计的波长 $\lambda$ /以任意单位(a.u.)计的发射强度]。

[0072] 因此本发明涉及用于利用免疫荧光的酶免疫测定的组合物, 其包含(i) 荧光生成酶促底物以及(ii) 在底物(i)的酶促水解之后形成荧光化合物的猝灭的荧光生成化合物。

[0073] 更特别地, 根据本发明的这种组合物包含:

[0074] -在一方面(i), 荧光生成酶促底物, 其使得能够在酶促水解之后形成荧光产物(称作第一荧光产物)和优选为阴离子的第二反应产物; 以及

[0075] -在另一方面(ii), 猝灭的荧光生成化合物, 其使得能够特别通过第二反应产物的

释放形成荧光化合物(称作第二荧光产物),所述第二反应产物优选是底物(i)的酶促水解所致的阴离子。

[0076] 可以用于本发明的目的的所述荧光生成酶促底物(可以在本发明的上下文内被称作初级底物)是本领域技术人员已知的在酶促水解之后给出荧光产物和第二反应产物(优选阴离子)的所有底物。

[0077] 根据本发明的一个特定实施方案,初级荧光生成酶促底物选自4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP)、4-甲基伞形酮基半乳糖苷(4-MUG)、4-甲基伞形酮基硫酸酯(4-MUS)、荧光素二磷酸酯(FDP)、6,8-二氟-4-甲基伞形酮基磷酸酯(DiFMUP)、9H-(1,3-二氯-9,9-二甲基吡啶-2-酮-7-基)磷酸酯(DDAO磷酸酯)、2'-[2-苯丙噻唑]-6'-羟基苯丙噻唑磷酸酯、2-萘基磷酸酯和2-伞形酮基磷酸酯。

[0078] 在这个特定实施方案中,形成的所述第一荧光产物“S\*”是4-甲基伞形酮(4-MU),并且所述第二反应产物“B”是阴离子或糖。

[0079] 所述初级荧光生成酶促底物优选选自4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP)、4-甲基伞形酮基硫酸酯(4-MUS)和4-甲基伞形酮基半乳糖苷(4-MUG)。因此,优选地,所述第二反应产物是选自磷酸氢根离子 $\text{HPO}_4^{2-}$ (或无机磷酸盐,表示Pi)和硫酸根离子 $\text{SO}_4^{2-}$ 的阴离子,或者是糖(半乳糖苷)。

[0080] 所述初级荧光生成酶促底物更优选仍选自4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP)和4-甲基伞形酮基硫酸酯(4-MUS)。因此,优选地,所述第二反应产物是磷酸氢根离子 $\text{HPO}_4^{2-}$ (或无机磷酸盐,表示Pi)或硫酸根离子 $\text{SO}_4^{2-}$ 。

[0081] 更优选地,所述初级荧光生成酶促底物是4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP),并且所述第二反应产物是磷酸氢根阴离子 $\text{HPO}_4^{2-}$ 。

[0082] 使得能够形成这样的第一荧光产物和第二反应产物的酶也是本领域技术人员已知的。在可用于利用免疫荧光的酶免疫测定的酶中,特别可以提到硫酸酯酶、碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶(GOx)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)和 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -gal)。

[0083] 使得能形成荧光产物和第二反应产物(阴离子)的酶优选选自硫酸酯酶、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶(ALP)。

[0084] 根据一个特定实施方案,所述初级荧光生成酶促底物是4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP),其使得能够在酶ALP的存在下形成4-甲基伞形酮(4-MU)和磷酸氢根离子 $\text{HPO}_4^{2-}$ 。

[0085] 酶促反应所致的所述第一荧光产物优选在250-450nm的波长激发,并且在300-600nm的波长发射。

[0086] 有利地,所述第一荧光产物在300-400nm的波长激发,并且在400-500nm的波长发射。

[0087] 更有利地,所述第一荧光产物在350-380nm的波长激发,并且在420-480nm的波长发射。

[0088] 在本发明的上下文内可以被称作第二底物的“猝灭的荧光生成化合物”旨在表示包含基团的化合物,当其包含结合的这个基团时,不能发出荧光(“荧光猝灭”),但是当所述基团从所述化合物分离时,所述化合物发出荧光信号。这可以被称作“猝灭”基团。

[0089] 作为这类猝灭的荧光生成化合物的实例,可以提到本领域技术人员习惯的荧光化

化合物的衍生物,如香豆素或试卤灵衍生物,其包含防止荧光发射的基团。通过这类基团的实例的方式,可以提到基团-C(O)-CH<sub>3</sub>,其如果结合至试卤灵,猝灭试卤灵的荧光。包含这样的基团的试卤灵衍生物是试剂Amplex® Red,其在无机磷酸盐的存在下产生荧光试卤灵(间接反应)的基团丢失机制描述于PiPer™磷酸盐测定试剂盒(Invitrogen™)说明书,并且在图9中示意性地示出。“猝灭”基团的丢失一般是通过酶的作用产生的,在前面的实例中这种酶是辣根过氧化物酶。荧光化合物的这些衍生物一般可以是荧光生成酶促底物,不同于所述初级荧光生成酶促底物,只要它们在通过所述初级底物的酶促水解释放的所述第二反应产物的存在下形成荧光化合物(据说它们被激活)。

[0090] 可以用于本发明的目的的猝灭的荧光生成化合物的其他实例包含与阳离子关联的选择性化学传感器,其在这种关联形式下是猝灭的。它们被称作猝灭的化学传感器-阳离子复合物。如图2中说明的,与阳离子关联的选择性化学传感器类型的这种第二底物“A-cat”能够被随后通过所述荧光生成酶促底物的酶促水解之后产生的所述第二反应产物直接激活,在图2中阴离子“Pi”的情况下,其使得能够直接产生额外的信号。

[0091] 使用这些化合物作为猝灭的荧光生成化合物具有这样的优势,图2中的反应产物“B”或“Pi”与猝灭的化学传感器-阳离子复合物的阳离子反应,并且使得能够:

[0092] -在一方面形成关联反应产物与阳离子的复合物(图2中的“Pi-cat”),以及

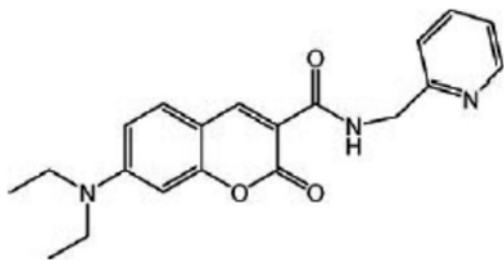
[0093] -形成荧光化合物(“A\*”),其使得可以产生第二荧光信号。所述第二荧光信号不需要添加额外的化合物以进行形成荧光形式的化合物所需要的一组反应,如在荧光化合物的常规衍生物的情况下,其构成本发明的一个特定实施方案。

[0094] 通过可以使用的化学传感器的非限制性实例的方式,可以提到以下荧光化合物:

[0095] (i) 亲水性香豆素,如Jung H.S.et al.,2009,Thomas F.and Serratrice G.,1999和Yao J.et al.,2009所述,例如:

[0096] -7-(二乙基氨基)-2-氧代-N-((吡啶-2-基)-甲基)-2H-色烯-3-羧酰胺:

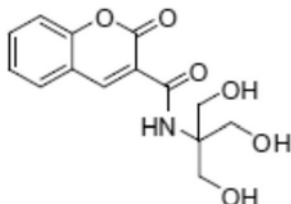
[0097]



;

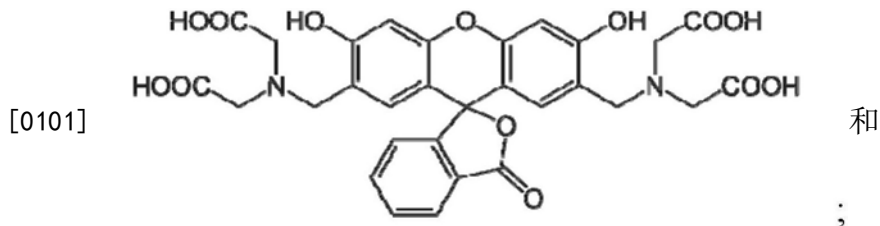
[0098] -N-(1,3-二羟基-2-(羟基甲基)丙烷-2-基)-2-氧代-2H-色烯-3-羧酰胺:

[0099]

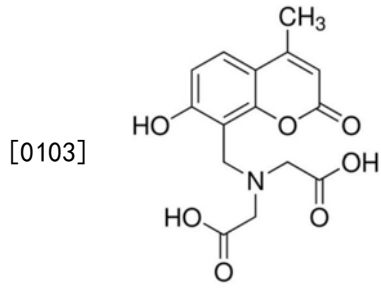


;

[0100] -钙黄绿素:



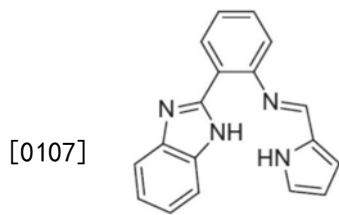
[0102] -钙黄绿素蓝:



[0104] (ii) 聚(9-氨基苻), 如Zhang G.et al., 2012所述;

[0105] (iii) 苯并咪唑衍生物, 如Alvaro M.et al., 2001, Henary M.M.et al., 2004和 Saluja P.et al., 2012所述, 例如:

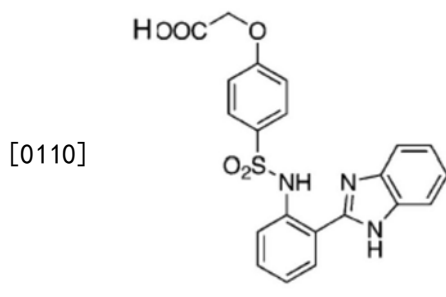
[0106] -以下式(I)的N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)-苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺:



(I);

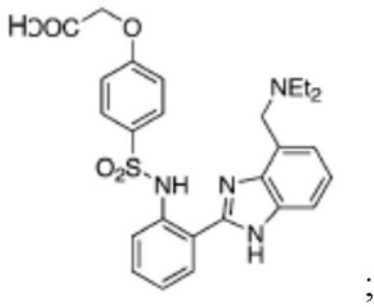
[0108] -双-苯并咪唑衍生物的N,S,-大环;

[0109] -{4-[2-(1H-苯并咪唑-2-基)苯基-氨磺酰]-苯氧基}乙酸:



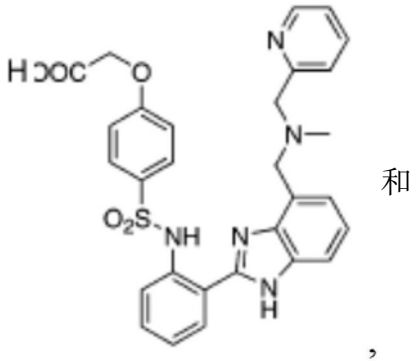
[0111] -{4-[2-[4-[(二乙基氨基)甲基]-1H-苯并咪唑-2-基]苯基-氨磺酰]苯氧基}乙酸:

[0112]



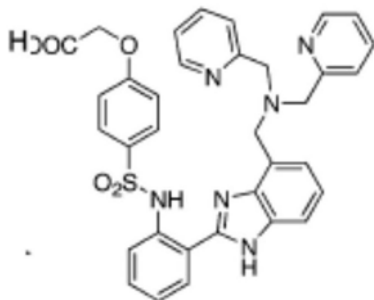
[0113] -{4-{2-{4-[(甲基吡啶-2-基甲基氨基)-甲基]-1H-苯并咪唑-2-基}苯基氨基磺酰}苯氧基}乙酸:

[0114]



[0115] -{4-{2-{4-[(双吡啶-2-基甲基氨基)甲基]-1H-苯并咪唑-2-基}苯基氨基磺酰}苯氧基}乙酸:

[0116]



[0117] 根据本发明的组合物中使用的所述化学传感器优选选自亲水性香豆素和苯并咪唑衍生物。

[0118] 更优选地,根据本发明的组合物中使用的所述化学传感器是钙黄绿素蓝或N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺。

[0119] 更优选地,根据本发明的组合物中使用的所述化学传感器是钙黄绿素蓝。

[0120] 所述选择性化学传感器与阳离子关联以形成猝灭的化学传感器-阳离子复合物。

[0121] 所述阳离子优选是过渡金属,优选选自 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 和 $\text{Pb}^{2+}$ 。

[0122] 更优选地,根据本发明的组合物中使用的所述阳离子是 $\text{Co}^{2+}$ 或 $\text{Cu}^{2+}$ 。

[0123] 所述猝灭的化学传感器-阳离子复合物优选选自:

[0124] (i) 通过金属离子猝灭的亲水性香豆素,如以下复合物:

[0125] -7-(二乙基氨基)-2-氧代-N-((吡啶-2-基)-甲基)-2H-色烯-3-羧酰胺-铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ );

[0126] -N-(1,3-二羟基-2-(羟基甲基)丙烷-2-基)-2-氧代-2H-色烯-3-羧酰胺-铁离子

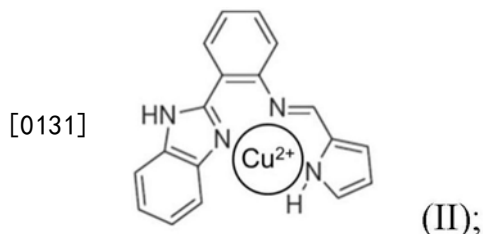
(Fe<sup>3+</sup>) ;

[0127] -钙黄绿素-铁离子 (Fe<sup>3+</sup>) ;

[0128] -钙黄绿素蓝-钴离子 (Co<sup>2+</sup>) ;

[0129] (ii) 通过金属离子猝灭的水溶性苯并咪唑衍生物, 如以下复合物:

[0130] -N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)-苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺-铜离子 (Cu<sup>2+</sup>), 具有以下式 (II) :



[0132] -双-苯并咪唑衍生物的N,S,-大环, 通过选自Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>的离子猝灭;

[0133] -{4-[2-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基-氨磺酰]苯氧基}乙酸, 通过选自Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>的离子猝灭;

[0134] -{4-{2-{4-[(二乙基氨基)甲基]-1H-苯并咪唑-2-基}苯基氨磺酰}苯氧基}乙酸, 通过选自Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>的离子猝灭;

[0135] -{4-{2-{4-[(甲基吡啶-2-基甲基氨基)甲基]-1H-苯并咪唑-2-基}苯基氨磺酰}苯氧基}乙酸, 通过选自Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>的离子猝灭; 以及

[0136] -{4-{2-{4-[(双吡啶-2-基甲基氨基)甲基]-1H-苯并咪唑-2-基}苯基氨磺酰}苯氧基}乙酸, 通过选自Cu<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>的离子猝灭。

[0137] 更优选地, 猝灭的化学传感器-阳离子复合物选自:

[0138] -钙黄绿素蓝-钴离子 (Co<sup>2+</sup>) 和

[0139] -N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)-苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺-铜离子 (Cu<sup>2+</sup>)。

[0140] 所述猝灭的化学传感器-阳离子复合物使得能够在酶促反应之后形成第二荧光产物“A\*”, 这由所述阳离子从所述荧光化学传感器分离所致, 所述阳离子通过离子键合结合至所述阴离子。

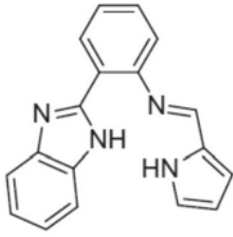
[0141] 如方程 (2) 中详述的酶促反应所致的荧光产物“S\*”, 这种第二荧光产物优选在250-450nm的波长激发, 并且在300-600nm的波长发射。

[0142] 有利地, 所述第二荧光产物也在300-400nm的波长激发, 并且在400-500nm的波长发射。

[0143] 更优选地, 所述第一荧光产物和所述第二荧光产物在基本上相同的波长激发和发射。

[0144] Saluja P. et al., 2012公开了以下式 (I) 的化合物N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺:

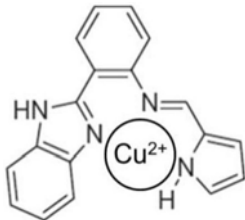
[0145]



(I)

[0146] 这种化合物 (I) 默认是荧光的。但是,当所述化合物 (I) 与阳离子如 $\text{Cu}^{2+}$ 关联时,其形成式 (II) 的猝灭的化学传感器-阳离子复合物:

[0147]



(II)

[0148] 最后,介质中阴离子如无机磷酸盐的存在会引起所述阳离子 $\text{Cu}^{2+}$ 结合至磷酸盐离子,再次释放荧光化合物 (I)。

[0149] 特别有利地,根据本发明的所述组合物关联荧光生成酶促底物(4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP))和猝灭的化学传感器-离子复合物(钙黄绿素蓝-钴离子( $\text{Co}^{2+}$ ))。

[0150] 本发明的所述组合物还可以包含可以在生物学测定的背景下使用的其他化合物,例如缓冲液。

[0151] 本发明的所述组合物中存在的所述荧光生成酶促底物(初级底物)和所述猝灭的荧光生成化合物(第二底物)可以被包含在固体介质中,例如固体粉末,或者被包含在液体介质中。

[0152] “固体或液体介质”旨在表示与待测试的样品相容的固体或液体形式的介质,所述样品可能包含至少一种待检测的代表性分析物。

[0153] 本发明的所述组合物中存在的所述荧光生成酶促底物和所述猝灭的荧光生成化合物优选被包含在用于酶免疫测定的液体介质中。

[0154] 待确定的分析物可以是蛋白质、肽或半抗原,即包含抗原和/或抗体、分析物的受体等作为结合配对物的反应。

[0155] 本发明的上下文内待测试的样品可以具有各种来源,例如食品、环境、生物、兽医、临床、药物或化妆品来源。

[0156] 在食品来源的样品中,可以以非详尽的方式提到乳制品(酸奶、奶酪等)、肉、鱼、蛋、水果、蔬菜、水或饮料(牛奶、果汁、汽水等)的样品。当然,食品来源的这些样品还可以源自调味汁或更精致的菜肴或者非转化或部分转化的起始材料。食品样品可以源自用于动物的食品,如油饼(oil cake)或动物餐。如果它们不是液体,将所有这些样品预先处理为液体形式。

[0157] 如上文所示,所述样品可以是环境来源的,并且可以例如由表面或水取样等组成。

[0158] 所述样品还可以由人或动物来源的生物样品组成,其可以对应于生物流体(尿、全

血或衍生物如血清或血浆、唾液、脓液、脑脊液等)的取样,粪便(例如霍乱样腹泻)的取样,鼻、咽喉、皮肤、伤口、器官、组织或分离的细胞取样,或者拭子样品。这个列表当然是不详尽的。

[0159] 一般来说,术语“样品”是指一部分或一定量,更特别是一小部分或少量,为了分析的目的采自一个或多个实体。这种样品可以任选地已经过预处理,包括例如混合、稀释或研磨的步骤,特别是如果起始实体为固体状态。

[0160] 分析的所述样品一般可能包含-或疑似包含-代表待分析、表征或监测的微生物或疾病的存在至少一种分析物。

[0161] 本发明的另一主题是用于利用可能被包含在测试样品中的分析物的免疫荧光的酶免疫测定的试剂盒,其包含如上文定义的组合物。

[0162] 当然,“免疫测定”中的术语“免疫”,例如,在本申请中并不认为严格表示结合配对物是免疫学配对物如抗体。实际上,本领域技术人员在结合配对物(也称作配体)不是免疫学配对物而是例如期望测定的分析物的受体时也广泛使用这个术语。因此,已知对使用非免疫学结合配对物的测定提到ELISA测定(“酶联免疫吸附测定”),更常称作“配体结合测定”,而术语“免疫”包括在首字母缩写词ELISA中。为了清楚的目的,申请人在整个申请中对使用结合配对物的任何测定均将会使用术语“免疫”,即使在其不是免疫学配对物时。

[0163] 本发明的另一主题是包含这样的组合物的用于免疫分析的自动化装置。用于免疫分析的自动化装置是用于生物学分析的自动化装置,其使得可以在有限时间内进行一定数量的生物学分析。根据本发明的用于免疫分析的自动化装置使得能够例如心脏标记的测定、甲状腺面板(thyroid panel)、贫血评价、肿瘤标记的测定、生育评价、病毒反应、细菌或细菌蛋白质的存在。通过自动化装置的非限制性实例的方式,可以提到以下自动化装置:

[0164] • **Access®**2、UniCel™DxI 600和UniCel™DxI 800,由Beckman Coulter销售;

[0165] • Advia Centaur™和Immulite™,由Siemens销售;

[0166] • Vitros™,由Ortho-Clinical-Diagnostics销售

[0167] • **VIDAS®**,由申请人销售;

[0168] • Architect™,由Abbott Diagnostics销售;以及

[0169] • Elecsys™,由Roche Diagnostics销售。

[0170] 自动化装置优选**VIDAS®**、**VIDAS®3**或**miniVIDAS®**,由申请人销售。

[0171] 本发明还涉及如上文所述的组合物、试剂盒或自动化装置在利用所关注的分析物的免疫荧光的酶免疫测定中的用途。

[0172] 通过酶免疫测定分析样品采用所关注的分析物与所述分析物特异性的一种或多种结合配对物之间的反应。这些结合配对物可以用作捕获配对物、检测配对物或者捕获和检测配对物,取决于使用的测定。

[0173] 作为分析物的结合配对物,可以提到抗体、抗体的片段、nanofitin、这种分析物的受体或已知与待研究的分析物相互作用的其他分子受体。

[0174] 结合配对物抗体是例如多克隆抗体或单克隆抗体。

[0175] 多克隆抗体可以通过这样获得,用分析物或分析物的免疫原性部分免疫动物,然后回收纯化形式的期望抗体,通过采集所述动物的血清,并且从其他血清组分分离所述抗体,特别是通过在抗体特异性识别的抗原的柱上亲和层析至,特别是所述分析物结合至柱。

[0176] 所述单克隆抗体可以通过杂交瘤技术获得,其一般原理回顾如下。

[0177] 首先,将动物(一般是小鼠)用所关注的所述分析物或所述分析物的免疫原性部分免疫,然后所述小鼠的B淋巴细胞能够产生抗这种抗原的抗体。然后将这些产生抗体的淋巴细胞与“永生的”骨髓瘤细胞(实例中是小鼠的)融合以产生杂交瘤。然后从这样获得的细胞的异质混合物选择能够产生特定抗体并无限增殖的细胞。将每个杂交瘤以克隆形式扩增,每个导致产生单克隆抗体,其中可以例如通过ELISA、一维或二维蛋白质印迹、免疫荧光或者使用生物传感器测试关于所述靶分析物的识别特性。随后纯化这样选择的单克隆抗体,特别是根据上文描述的亲和层析技术。

[0178] 所述单克隆抗体还可以是使用本领域技术人员公知的技术,通过遗传工程获得的重组抗体。

[0179] 通过抗体片段的实例的方式,可以提到Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>片段,还有scFv(单链可变片段)和dsFv(双链可变片段)链。这些功能性片段可以特别地通过遗传工程获得。

[0180] Nanofitin(商品名)是小蛋白,像抗体一样,其能够结合至生物学的靶标,因此使得可以检测它,捕获它或者在生物体内非常简单地靶向它。

[0181] 结合配对物可以是待检测的分析物特异性的或非特异性的。当它们能够专门地或几乎专门地结合至这些分析物时,则说它们是特异性的。当这些分析物的结合选择性低时以及当它们因此能够结合至其他配体如其他蛋白质或抗体时,则说它们是非特异性的。根据一个优选实施方案,使用特异性结合配对物。

[0182] 通过测量使分析物和结合配对物之间形成的复合物与根据本发明的组合物在一起之后产生的信号检测分析物。检测通过使荧光可见的方法进行,通过直接或间接标记检测配对物(夹心方法)或者标记分析物本身或其一个或多个片段(竞争方法)。

[0183] 标记旨在表示连接能够在合适的荧光生成酶促底物如4-MUP的水解之后在反应介质中产生通过荧光检测的信号,例如,碱性磷酸酶。

[0184] 本发明还涉及一种在可能包含所述分析物的液体测试样品中通过夹心类型的利用免疫荧光的酶免疫测定体外检测和/或定量所述分析物的方法,其包括以下步骤:

[0185] -使预先连接至或未连接至固体表面的捕获配对物与所述液体样品在一起以使所述分析物结合至所述捕获配对物;

[0186] -添加检测配对物以结合至捕获配对物-分析物复合物,其直接或间接偶联至能够裂解本发明的组合物的所述荧光生成酶促底物的酶;

[0187] -使本发明的组合物和所述捕获配对物-分析物-检测配对物复合物在一起以形成反应介质;以及

[0188] -通过免疫荧光通过测量反应介质(即包含如上文所述的第一和第二荧光产物的介质)中发出的荧光检测分析物的存在和/或量。

[0189] 所述酶直接或间接偶联至所述检测配对物旨在表示所述酶直接结合至识别所述分析物的所述检测配对物(直接偶联),或者所述酶偶联至识别所述检测配对物的结合配对物,所述检测配对物转而识别所述分析物(间接偶联)。

[0190] 因此,在直接偶联的上下文内,在测定结束时形成的所述复合物将由以下组成:

[0191] “捕获配对物/分析物/偶联至所述酶的检测配对物”。

[0192] 在间接偶联的上下文内,在测定结束时形成的所述复合物将由以下组成:

[0193] “捕获配对物/分析物/检测配对物/偶联至所述酶的结合配对物”。在后一实施方案的上下文内,所述结合配对物是本领域技术人员公知的,并且在所述检测配对物是识别所关注的所述分析物的IgG时可以是例如抗IgG(免疫球蛋白)抗体。

[0194] 本发明还涉及在可能包含分析物的液体测试样品中通过竞争类型的利用免疫荧光的酶免疫测定体外检测和/或定量所述分析物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0195] -使预先连接至或未连接至固体表面的捕获配对物、偶联至能够裂解本发明的组合物的荧光生成酶促底物的酶的分析物类似物以及所述液体样品在一起,其竞争结合至所述捕获配对物;

[0196] -使本发明的组合物以及所述捕获配对物-分析物和捕获配对物-分析物类似物复合物在一起以形成反应介质;以及

[0197] -通过免疫荧光检测分析物的存在和/或量,通过测量反应介质中发出的荧光,即包含如上文所述的第一和第二荧光产物的介质。

[0198] 除了本发明的组合物的使用之外,这些方法的步骤是本领域技术人员公知的常规步骤。

[0199] 此外,本发明的方法还可以在每步之后包括一个或多个额外的漂洗步骤,例如:

[0200] -在添加所述检测配对物之前的漂洗步骤以便消除未结合至所述捕获配对物-分析物复合物的所述分析物;以及

[0201] -在添加所述检测配对物之后的漂洗步骤以便消除所述未结合的检测配对物,

[0202] 这构成本发明的另一个实施方案。

[0203] 所述漂洗步骤是本领域技术人员公知的步骤。它们用与反应介质和荧光读取相容的缓冲液进行。

[0204] 最后,本发明涉及一种提高通过利用免疫荧光的酶免疫测定体外检测和/或定量可能包含分析物的测试样品中待检测的分析物的方法的灵敏度的方法,所述方法的特征在于其包括在进行测定时使用本发明的组合物或试剂盒。

[0205] 现在通过以下非限制性实施例说明本发明。

[0206] 实施例1:通过激活与无机磷酸盐Pi的选择性检测偶联的荧光生成酶促底物4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP)增加荧光。

[0207] 1.一般原理:

[0208] 1.1.标准反应:

[0209] 如图1中示意性示出的,在VIDAS®(bioMérieux)仪器中进行的通过免疫荧光检测免疫测定中分析物的存在的当前步骤是基于VIDAS®带的最后容器(孔10或XA)中包含的荧光生成酶促底物4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP)的激活。

[0210] 在当前配置中,在VIDAS®仪器中进行的每个测定的最后混合期间,酶碱性磷酸酶(ALP或AP)产生的信号与待测定的分析物的量成比例(夹心方法)或与这样的量成反比(竞争方法)。通过形成捕获配对物/分析物/检测配对物结合至ALP的复合物或捕获配对物/分析物类似物结合至ALP的复合物,所述酶间接结合至固相容器(SCR®)的壁,这取决于所选的免疫测定类型,并且与荧光生成酶促底物4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP)反应以产生两种产物:

[0211] -4-甲基伞形酮(4-MU),其是高荧光分子,通过VIDAS®仪器的光学扫描仪测量

其荧光;以及

[0212] -磷酸氢根离子 $\text{HPO}_4^{2-}$  (或者其所有形式的无机磷酸盐Pi),其留在溶液中,没有特定作用。

[0213] 图1示意性地示出这个已知的反应。

[0214] 1.2.改进的反应:

[0215] 图2示意性地示出通过根据本发明的免疫荧光检测的改进的反应。这个反应在一方面由荧光生成酶促底物的常规激活组成,在这种情况下是4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP)。此外,这个反应通过猝灭的化学传感器-阳离子复合物(图2中示意性示出的“A-cat”菱形)优化。

[0216] 关于图1中示意性示出的反应,通过酶碱性磷酸酶(ALP)将初级荧光生成酶促底物4-MUP转化为4-甲基伞形酮(4-MU)和磷酸氢根离子 $\text{HPO}_4^{2-}$ (Pi,其所有形式的无机磷酸盐)。这种所得的磷酸盐离子(Pi)与猝灭的化学传感器-阳离子复合物(第二底物)反应以在一方面释放荧光化合物“A\*”至介质中,并且在另一方面形成关联磷酸盐离子(Pi)与阳离子“cat”的产物。

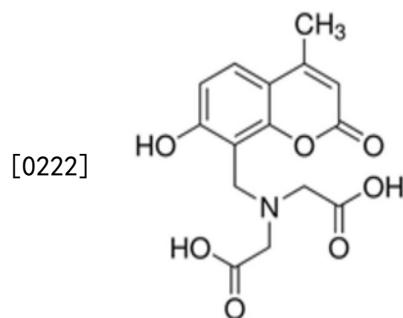
[0217] 因此,这里提出的方法由添加第二底物(猝灭的化学传感器-阳离子复合物)至第一底物组成,在这个实施例中所述第一底物是荧光生成酶促底物4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP)。这种第二底物能够随后通过阴离子激活,在这个实施例中所述阴离子是无机磷酸盐Pi,并且其使得可以产生额外的信号(参见图2的图示)。

[0218] 以这种方式形成的关联选择性化学传感器与无机磷酸盐的荧光复合物有助于加强4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP)的初级反应产生的总信号。

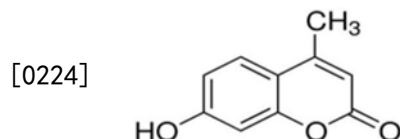
[0219] 2.进行与荧光团“钙黄绿素蓝”的反应:

[0220] 如图3中说明的,申请人使用关联钴阳离子( $\text{Co}^{2+}$ )猝灭的化学传感器“钙黄绿素蓝”(CB)的复合物作为第二底物进行上文1.2节中详细描述改进的反应。

[0221] 钙黄绿素蓝或4-甲基伞形酮-8-甲基亚氨基乙酸是一种化合物,其通式复制如下:



[0223] 钙黄绿素蓝是香豆素荧光团,其具有与以下通式的4-甲基伞形酮(4-MU)相似的特征:



[0225] 这表示钙黄绿素蓝与VIDAS®系统相容。

[0226] 为了以下原因选择关联钙黄绿素蓝和钴离子的猝灭的化学传感器-阳离子复合物(“CB-Co”)作为潜在候选物:

[0227] -其对无机磷酸盐Pi是选择性的；

[0228] -如图4中说明的，其通过增加无机磷酸盐Pi的浓度良好激活。实际上，图4说明关联钙黄绿素蓝和钴离子的猝灭的化学传感器-阳离子复合物(“CB-Co”)通过增加无机磷酸盐Pi的浓度激活，并且使得能够释放荧光钙黄绿素蓝作为无机磷酸盐Pi的所述浓度的函数；

[0229] -其是水溶性的；

[0230] -其在 $370 \pm 5\text{nm}$ 的波长被激发，并且在 $450 \pm 20\text{nm}$ 的波长发射。

[0231] -如图5中说明的，其具有与4-甲基伞形酮(4-MU)可比的荧光强度。图5比较以下两种溶液的发射谱，所述溶液在第一种情况下包含钙黄绿素蓝(CB)，在第二种情况下包含4-甲基伞形酮(4-MU)：

[0232] • pH 9.4的溶液，其包含6410nM的钙黄绿素蓝、0.6mM的二乙醇胺(DEA)；0.3mM的乙二胺四乙酸(EDTA- $\text{Na}_2$ )和0.5mM的 $\text{MgCl}_2$ ；以及

[0233] • VIDAS® OPT溶液，其包含6410nM(6.4 $\mu\text{M}$ )的荧光生成酶促底物4-甲基-伞形酮基磷酸酯(4-MUP)；

[0234] -钙黄绿素蓝和钴离子( $\text{Co}^{2+}$ )之间的键在不同pH下是稳定的，包括在pH 9.2下，对应于VIDAS XA的pH；

[0235] -如图6中说明的，关联钙黄绿素蓝和钴离子的化学传感器-阳离子复合物(“CB-Co”)是猝灭的，即在钴离子( $\text{Co}^{2+}$ )分离之前不是荧光的。

[0236] 此外，申请人能够证实在钴离子( $\text{Co}^{2+}$ )分离之后，荧光强度保持恒定至少20分钟的时间。

[0237] 实施例2:利用本发明的组合物提高荧光发射

[0238] 1. 待测试的溶液的制备

[0239] 用以下化合物制备pH 8.2缓冲液：

[0240] • Tris-碱+HCl(8.2的最终pH)

[0241] • 0.7mM[ $\text{Mg}^{2+}$ ]

[0242] • 0.03mM[EDTA- $\text{Na}_2$ ]

[0243] • 0.03mM[ $\text{Co}^{2+}$ ]

[0244] 添加荧光生成酶促底物4-甲基伞形酮基磷酸酯(4-MUP)和/或关联钙黄绿素蓝和钴离子的猝灭的化学传感器-阳离子复合物(“CB-Co”)制备3种不同溶液。这些是以下溶液A、B和C：

[0245] 溶液A:0.64 $\mu\text{M}$ 的4-MUP(游离酸形式)

[0246] 溶液B:6.4 $\mu\text{M}$ 的CB-Co

[0247] 溶液C:0.64 $\mu\text{M}$ 的4-MUP+6.4 $\mu\text{M}$ 的CB-Co

[0248] 2. 溶液A和B的稳定性的测试：

[0249] 通过随着时间监测它们的荧光来测试溶液A和B的稳定性，以便验证防止荧光生成酶促底物4-MUP的自发水解和从钙黄绿素蓝CB置换钴离子( $\text{Co}^{2+}$ )。

[0250] 下文表1a.和1b.给出通过VIDAS® 3仪器的扫描仪头测量的以相对荧光单位(RFU)计的结果，通过将装有溶液A的3条带和装有溶液B的3条带置于仪器中获得。

[0251] 利用运行控制VIDAS®仪器的扫描仪头的VN测试套件SW软件的外部便携式计算

机读取结果。

[0252] 表1a.:对溶液A(0.64 $\mu$ M 4-MUP)获得的结果:

[0253]

Tris-碱 + HCl 8.2, [Mg] 0.7 mM, [EDTA] 0.03 mM, [Co] 0.03 mM							
溶液 A (0.64 $\mu$ M 4-MUP)							
	t 0 (RFU)	t 5 min (RFU)	t 10 min (RFU)	t 15 min (RFU)	t 20 min (RFU)	t 25 min (RFU)	t 30 min (RFU)
带 1	34	32	33	33	32	33	33
带 2	30	29	29	29	29	30	30
带 3	33	32	31	31	32	32	32

[0254] 表1b.:对溶液B(0.64 $\mu$ M CB-Co)获得的结果:

[0255]

Tris-碱 + HCl 8.2, [Mg] 0.7 mM, [EDTA] 0.03 mM, [Co] 0.03 mM							
---	--	--	--	--	--	--	--

[0256]

溶液 B (0.64 $\mu$ M CB-Co)							
	t 0 (RFU)	t 5 min (RFU)	t 10 min (RFU)	t 15 min (RFU)	t 20 min (RFU)	t 25 min (RFU)	t 30 min (RFU)
带 1	34	34	34	34	34	34	33
带 2	41	43	43	43	43	43	42
带 3	36	43	44	45	45	44	43

[0257] 结果表明组合物的荧光保持恒定且低。因此,两种溶液A和B随时间稳定,这证明荧光生成酶促底物4-MUP不自发水解且避免了钴离子( $\text{Co}^{2+}$ )的置换。

[0258] 3. 溶液A和C的荧光的比较:

[0259] 在这个稳定测试之后,进行以下测试3次:

[0260] 步骤1:将3条带(XA孔)装300 $\mu$ l的溶液A,并且将3条带装300 $\mu$ l的溶液C。将带装入VIDAS®3仪器;

[0261] 步骤2:通过VIDAS®仪器的扫描仪头在时间t0对每条带测量背景值(BKG);

[0262] 步骤3:将酶碱性磷酸酶(ALP)添加至每个比色杯中(500 $\mu$ g/ml的10 $\mu$ l);

[0263] 步骤4:在15分钟内的确定的时间点测量每个比色杯的荧光;

[0264] 步骤5:计算荧光的增加。通过从t=15分钟的最终读数值减去背景值(BKG)确定相对荧光值(RFV)。

[0265] 选择15分钟以便确保溶液A中包含的荧光生成酶促底物4-MUP完全激活以给出4-MU。

[0266] 此外,用溶液A在15分钟之后获得的荧光与通过在相同缓冲液中稀释1/10的

VIDAS® OPT溶液 (在6.41 $\mu$ M) 获得的0.6410 $\mu$ M的4-甲基伞形酮 (4-MU) 浓度的荧光是同质的。

[0267] 来自进行3次的测试的原始结果复制于下文表2a. 和2b. 中:

[0268] 表2a.: 对溶液A (0.64 $\mu$ M 4-MUP) 获得的结果

[0269]

Tris-碱 + HCl 8.2, [Mg] 0.7 mM, [EDTA] 0.03 mM, [Co] 0.03 mM					
0.64 $\mu$ M 4-MUP					
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 $\mu$ l 500 $\mu$ g/ml	t 5 min (RFU)	t 10 min (RFU)	t 15 min (RFU)
带 1.1	45	330	321	318	317
带 1.2	45	302	295	291	291
带 1.3	58	258	251	249	250
带 2.1	46	295	291	289	288
带 2.2	68	297	282	280	280
带 2.3	46	291	284	285	286
带 3.1	45	321	311	309	309
带 3.2	45	338	330	330	333
带 3.3	43	329	321	319	319

[0270] 表2b.: 对溶液C (6.4 $\mu$ M CB-Co+0.64 $\mu$ M 4-MUP) 获得的结果

Tris-碱 + HCl 8.2, [Mg] 0.7 mM, [EDTA] 0.03 mM, [Co] 0.03 mM					
6.4 $\mu$ M CB-Co + 0.64 $\mu$ M 4-MUP					
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 $\mu$ l 500 $\mu$ g/ml	t 5 min (RFU)	t 10 min (RFU)	t 15 min (RFU)
带 1.1	109	387	463	501	516
带 1.2	107	381	443	489	513
带 1.3	110	386	458	503	523
带 2.1	97	335	404	471	526
带 2.2	95	333	390	454	525
带 2.3	95	324	388	426	477
带 3.1	99	364	460	529	579
带 3.2	96	378	441	489	529
带 3.3	94	369	475	524	527

[0271]

[0272] 最后,下文表2c.复制进行的所有测试的相对荧光值 (RFV) 和相应的荧光增加百分比。

[0273] 表2c.

[0274]

	溶液 A (4-MUP)	溶液 C (4-MUP + CB-Co)	增加(%)
	t 15 min – BKG		
	RFV	RFV	
带 1.1	272	407	
带 1.2	246	406	
带 1.3	192	413	
<b>平均 RFV 测试 1</b>	<b>237</b>	<b>409</b>	<b>72%</b>
带 2.1	242	429	
带 2.2	212	430	
带 2.3	240	382	
<b>平均 RFV 测试 2</b>	<b>231</b>	<b>414</b>	<b>79%</b>
带 3.1	264	480	
带 3.2	288	433	
带 3.3	276	433	
<b>平均 RFV 测试 3</b>	<b>276</b>	<b>449</b>	<b>62%</b>

[0275] 如上文表2c.中详述的,在溶液A和溶液C之间平均荧光增加约70%,所述溶液C包含根据本发明的荧光生成酶促底物4-MUP和猝灭的化学传感器-阳离子复合物CB-Co的关联。

[0276] 因此,添加猝灭的化学传感器-阳离子使得可以显著增加荧光信号。

[0277] 实施例3:本发明的组合物中不同浓度的初级底物的用途:

[0278] 关联钙黄绿素蓝和钴离子的猝灭的化学传感器-阳离子复合物(“CB-Co”)的初步测试:

[0279] 申请人希望评价在相同条件下,与仅包含荧光生成酶促底物4-MUP的溶液相比,通过将猝灭的化学传感器-阳离子复合物CB-Co添加至包含不同浓度的荧光生成酶促底物4-MUP的溶液中荧光的增加。

[0280] 1.待测试的溶液的制备

[0281] 如上文实施例2中所述制备pH 8.2缓冲液。

[0282] 考虑3种不同浓度的4-MUP;这些是以下浓度:

[0283] (1) 0.64 $\mu$ M

[0284] (2) 0.43 $\mu$ M

[0285] (3) 0.32 $\mu$ M。

[0286] 对于每个浓度,制备3种不同溶液:

[0287] (1) 0.64 $\mu$ M浓度:

[0288] -溶液A1:0.64 $\mu$ M的4-MUP (游离酸形式)

[0289] -溶液B1:6.4 $\mu$ M的CB-Co

[0290] -溶液C1:0.64 $\mu$ M的4-MUP+6.4 $\mu$ M的CB-Co

[0291] (2) 0.43 $\mu$ M浓度:

[0292] -溶液A2:0.43 $\mu$ M的4-MUP (游离酸形式)

[0293] -溶液B2:6.4 $\mu$ M的CB-Co

[0294] -溶液C2:0.43 $\mu$ M的4-MUP+6.4 $\mu$ M的CB-Co

[0295] (3) 0.32 $\mu$ M浓度:

[0296] -溶液A3:0.32 $\mu$ M的4-MUP (游离酸形式)

[0297] -溶液B3:6.4 $\mu$ M的CB-Co

[0298] -溶液C3:0.32 $\mu$ M的4-MUP+6.4 $\mu$ M的CB-Co。

[0299] 2. 实验部分:

[0300] 对测试的每个浓度的4-MUP,每个实验一式三份进行并重复3次。下文表3重现浓度0.64 $\mu$ M的4-MUP的VIDAS™的装载计划:

[0301] 表3

[0302]

样品	部分 A		
	位置 1	位置 2	位置 3
	6.4 $\mu$ M CB-Co	空	空
	部分 B		
	位置 1	位置 2	位置 3

[0303]

	0.64 $\mu$ M 4-MUP	0.64 $\mu$ M 4-MUP	0.64 $\mu$ M 4-MUP
	部分 C		
	位置 1	位置 2	位置 3
	0.64 $\mu$ M 4-MUP + 6.4 $\mu$ M CB-Co	0.64 $\mu$ M 4-MUP + 6.4 $\mu$ M CB-Co	0.64 $\mu$ M 4-MUP + 6.4 $\mu$ M CB-Co

[0304] 溶液B1、B2和B3构成猝灭的化学传感器-阳离子复合物CB-Co的稳定性的对照。它们使得可以确保观察到的荧光的增加的确与磷酸盐离子(Pi)对Co阳离子的作用有关,并且不是与EDTA对猝灭的化学传感器-阳离子复合物CB-Co的螯合作用有关。

[0305] 对每个浓度的4-MUP进行以下测试各3次(部分1、部分2、部分3)。图8总结了进行的测试的主要步骤。图8示意性地示出测试的不同步骤,使得可以确定根据本发明的荧光化合物产生的额外荧光。

[0306] 测试的各种步骤总结如下:

- [0307] (i) 利用VIDAS®3仪器的扫描仪头测量每个空带的塑料；
- [0308] (ii) 将带填充(XA孔)如下：
- [0309] a. 部分A→1个带装有300μl的溶液B(B1、B2或B3)；
- [0310] b. 部分B→3个带装有300μl的溶液A(A1、A2或A3)；
- [0311] c. 部分C→3个带装有300μl的溶液C(C1、C2或C3)；
- [0312] (iii) 将带装入VIDAS®3EP VN 1015；
- [0313] (iv) 在T0通过相同的扫描仪头对每个带采集背景读数(BKG)；
- [0314] (v) 将酶碱性磷酸酶(ALP)过量添加至每个比色杯中(500μg/ml的10μl)；
- [0315] (vi) 每5分钟测量每个比色杯的荧光,持续15分钟；
- [0316] (vii) 通过从t=15分钟的最终读数减去背景值(T0)确定相对荧光值(RFV)。
- [0317] 在不同浓度的4-MUP(0.64μM、0.43μM和0.32μM)下进行3次不同测试的结果在下文表中重现：

[0318] I. 部分1、2和3期间对0.64μM的4-MUP浓度的测试：

[0319] 表4a.:对溶液A1(0.64μM4-MUP)获得的结果

0.64 μM 4-MUP			
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 μl 500 μg/ml	t 15 min (RFU)
带 1.1	45	330	317
带 1.2	45	302	291
带 1.3	58	258	250
带 2.1	46	295	288
带 2.2	68	297	280
带 2.3	46	291	286
带 3.1	45	321	309
带 3.2	45	338	333
带 3.3	43	329	319

[0320] 表4b.:对溶液B1(6.4μM CB-Co)获得的结果

6.4 $\mu$ M CB-Co			
	T0 (RFU) BKG	T 30 sec (RFU)	t 15 min (RFU)
[0322] 带 1.1	68	68	67
带 2.1	62	64	63
带 3.1	86	87	86

[0323] 表4c.:对溶液C1 (6.4 $\mu$ M CB-Co+0.64 $\mu$ M 4-MUP) 获得的结果

6.4 $\mu$ M CB-Co + 0.64 $\mu$ M 4-MUP			
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 $\mu$ l 500 $\mu$ g/ml	t 15 min (RFU)
[0324] 带 1.1	109	387	516
带 1.2	107	381	513
带 1.3	110	386	523
带 2.1	97	335	526
带 2.2	95	333	525
带 2.3	95	324	477
[0325] 带 3.1	99	364	579
带 3.2	96	378	529
带 3.3	94	369	527

[0326] 表4d:在0.64 $\mu$ M的4-MUP浓度下进行的所有测试的相对荧光值 (RFV)。

	溶液 A1 (4-MUP)	溶液 C1 (4-MUP + CB-Co)
	t 15 min – BKG	
	RFV	RFV
带 1.1	272	407
带 1.2	246	406
[0327] 带 1.3	192	413
带 2.1	242	429
带 2.2	212	430
带 2.3	240	382
带 3.1	264	480
带 3.2	288	433
带 3.3	276	433

[0328] II. 部分1、2和3期间对0.43 $\mu$ M的4-MUP浓度的测试:

[0329] 表5a.:对溶液A2 (0.43 $\mu$ M 4-MUP) 获得的结果

0.43 $\mu$ M 4-MUP			
	T0 (RFU)BKG	+AP 10 $\mu$ l 500 $\mu$ g/ml	t 15 min (RFU)
带 1.1	52	218	211
[0330] 带 1.2	44	191	184
带 1.3	44	192	184
带 2.1	50	224	213
带 2.2	50	228	217
带 2.3	57	211	200
带 3.1	51	227	224
[0331] 带 3.2	55	222	219
带 3.3	52	231	229

[0332] 表5b.:对溶液B2 (6.4 $\mu$ M CB-Co) 获得的结果

6.4 $\mu\text{M}$ CB-Co			
	T0 (RFU) BKG	T 30 sec (RFU)	t 15 min (RFU)
[0333] 带 1.1	62	62	61
带 2.1	61	62	62
带 3.1	63	61	61

[0334] 表5c.:对溶液C2 (6.4 $\mu\text{M}$  CB-Co+0.43 $\mu\text{M}$ 4-MUP) 获得的结果

6.4 $\mu\text{M}$ CB-Co + 0.43 $\mu\text{M}$ 4-MUP			
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 $\mu\text{l}$ 500 $\mu\text{g/ml}$	t 15 min (RFU)
[0335] 带 1.1	76	273	282
带 1.2	79	260	270
带 1.3	70	264	275
带 2.1	86	312	350
带 2.2	84	316	359
带 2.3	79	286	328
带 3.1	78	338	368
带 3.2	83	344	361
带 3.3	82	332	362

[0336] 表5d.:在0.43 $\mu\text{M}$ 的4-MUP浓度下进行的所有测试的相对荧光值 (RFV)。

[0337]

	溶液 A2 (4-MUP)	溶液 C2 (4-MUP + CB-Co)
	t 15 min – BKG	
	RFV	RFV
带 1.1	159	206
带 1.2	140	191
带 1.3	140	205
带 2.1	163	264
带 2.2	167	275
带 2.3	143	249
带 3.1	173	290
带 3.2	164	278
带 3.3	177	280

[0338] III. 部分1、2和3期间对0.32 $\mu$ M的4-MUP浓度的测试:[0339] 表5a.:对溶液A3 (0.32 $\mu$ M4-MUP) 获得的结果

[0340]

0.32 $\mu$ M 4-MUP			
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 $\mu$ l 500 $\mu$ g/ml	t 15 min (RFU)
带 1.1	50	138	134
带 1.2	60	146	142
带 1.3	52	139	134
带 2.1	42	132	129
带 2.2	48	130	127
带 2.3	46	137	135
带 3.1	42	123	121
带 3.2	47	128	126
带 3.3	44	123	122

[0341] 表5b.:对溶液B3 (6.4 $\mu$ M CB-Co) 获得的结果:

[0342]

6.4 $\mu$ M CB-Co			
	T0 (RFU) BKG	T 30 sec (RFU)	t 15 min (RFU)
带 1.1	56	55	55
带 2.1	65	65	64
带 3.1	73	72	71

[0343] 表5c.:对溶液C3 (6.4 $\mu$ M CB-Co+0.32 $\mu$ M4-MUP) 获得的结果:

[0344]

6.4 $\mu$ M CB-Co + 0.32 $\mu$ M 4-MUP			
	T0 (RFU) BKG	+AP 10 $\mu$ l 500 $\mu$ g/ml	t 15 min (RFU)
带 1.1	66	165	179
带 1.2	72	169	183
带 1.3	65	161	175
带 2.1	61	184	191
带 2.2	66	191	200
带 2.3	67	194	203
带 3.1	67	167	178
带 3.2	64	167	180
带 3.3	68	167	180

[0345] 表5d.:在0.32 $\mu$ M的4-MUP浓度下进行的所有测试的相对荧光值 (RFV)。

	<b>Solution A3</b>	<b>Solution C3</b>
	<b>(4-MUP)</b>	<b>(4-MUP + CB-Co)</b>
	<b>t 15 min – BKG</b>	
	<b>RFV</b>	<b>RFV</b>
带 1.1	84	113
带 1.2	82	111
[0346] 带 1.3	82	110
带 2.1	87	130
带 2.2	79	134
带 2.3	89	136
带 3.1	79	111
带 3.2	79	116
带 3.3	78	112

[0347] 这些不同实验之后,对每个4-MUP浓度,对每个溶液A1、A2、A3以及C1、C2和C3计算平均RFV值。

[0348] 这些平均值在图10中的图中重现。

[0349] 如图10所示,溶液A (A1、A2、A3) 和C (C1、C2、C3) 之间平均荧光的增加为大约50%。荧光的这种增加是由于钙黄绿素蓝产生的信号。

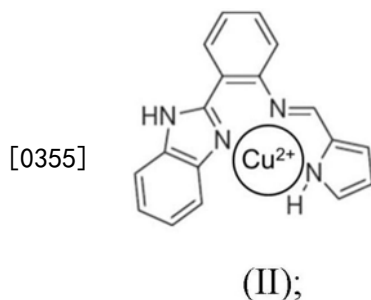
[0350] 实施例5:初步稳定性测试:

[0351] 通过随时间监测它们的荧光来评价复合物CB-Co、荧光生成酶促底物4-MUP和它们的混合物的稳定性。这是为了验证荧光生成酶促底物4-MUP的自发水解以及从钙黄绿素蓝(CB)置换阳离子 $\text{Co}^{2+}$ 的避免。

[0352] 申请人获得的结果使得可以证实没有自发相互作用,并且荧光随时间保持稳定(特别是在0和25分钟之间)。

[0353] 实施例6:N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺-铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )复合物作为猝灭的化学传感器-阳离子复合物的用途

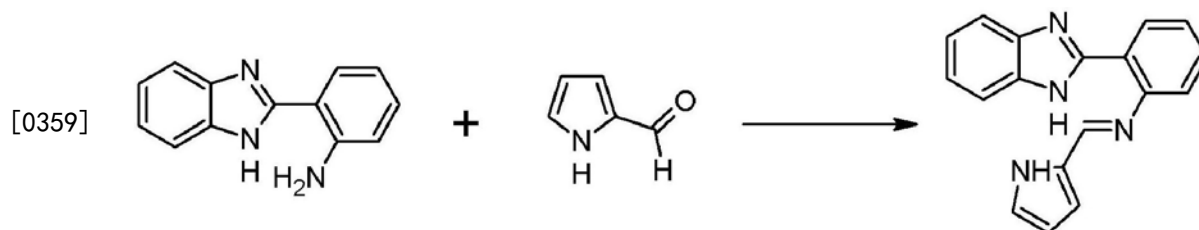
[0354] 以下式(II)的N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)-苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺-铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )复合物:



[0356] 是特异性地与无机磷酸盐Pi相互作用并且可以被用作第二底物的化学传感器-阳离子复合物的另一实例。

[0357] 1. N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)-苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺的合成:

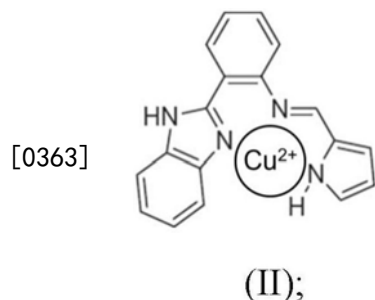
[0358] 根据以下反应获得化合物N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)-苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺:



[0360] 使2-(2-氨基苯基)-1H-苯并咪唑 (209mg, 1.0mmol) 的溶液与50ml无水甲醇中的吡咯-2-甲醛 (142mg, 1.5mmol) 反应, 并且在回流下加热10小时。反应之后, 将溶剂蒸发至25ml并保持在50°C下缓慢蒸发。然后将获得的白色沉淀过滤并用冷甲醇洗涤3次。

[0361] 2. 化学传感器-阳离子复合物的合成:

[0362] 以下式(II)的N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)-苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺-铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )复合物:



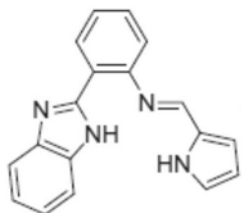
[0364] 是通过使N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)-亚甲基]胺 (286mg, 1.0mmol) 与 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (295mg, 1.0mmol) 在THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (30ml, 1/1, v/v) 中反应获得的。将混合物在回流下加热8小时。在反应结束时, 通过二乙醚在反应混合物中的缓慢扩散分离产物。将获得的固体在冷甲醇中洗涤并获得深绿色产物。

[0365] 3. 猝灭的化学传感器-阳离子复合物的激活:

[0366] 如图7中说明的, 这种猝灭的化学传感器-阳离子复合物通过无机磷酸盐Pi激活, 并且使得可以在一方面形成关联阳离子 $\text{Cu}^{2+}$ 与磷酸氢根离子的非荧光产物(Pi-Cu)以及在另一方面释放荧光化合物[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺。图11比较了包含猝灭的化学传感器-阳离子复合物(N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺-铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ ))没有无机磷酸盐的组合物的发射谱与来自包含猝灭的化学传感器-阳离子复合物(N-[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺-铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ ))和无机磷酸盐Pi的组合物的发射谱。如图11所示, 无机磷酸盐的存在使得能够在一方面形成关联阳离子 $\text{Cu}^{2+}$ 与磷酸氢根离子的非荧光产物(Pi-Cu)以及在另一方面释放荧光化合物[2-(1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯基]-N-[(E)-1-(1H-吡咯-2-基)亚甲基]胺。

[0367] 以这种方式获得的荧光化合物：

[0368]



[0369] 通过波长大约 $370 \pm 5\text{nm}$ 的光源暴露或激发，在大约 $425 \pm 20\text{nm}$ 的第二波长发射光线或荧光信号。

[0370] 因此，荧光产物在与4-甲基伞形酮(4-MU)基本上相容的波长下被激发和发射。

[0371] 这种猝灭的化学传感器-阳离子复合物还与大约pH9.2的VIDAS XA相容。

[0372] 参考文献

[0373] -Alvaro M.et al.,2001,Chem.Phys.Lett.,350:240-246

[0374] -Henary M.M.et al.,2004,Chem.Eur.J.,10:3015-3025

[0375] -Jung H.S.et al.,2009,J.Am.Chem.Soc.,131:2008-2012

[0376] -Leong W.L.and Vittal J.J.,2007,Cryst.Growth Des,7(10):2112-2116

[0377] -Rassasie M.J.et al.,1992,Steroids,57:112

[0378] -Saluja P.et al.,2012,Tetrahedron Lett.,53:3292-3295

[0379] -Stabler T.V.,et al.,1991,Clin.Chem.,37(11):1987

[0380] -Thomas F.et al.,1999,J.Biol.Chem.,274:13375-13383

[0381] -Yao J.et al,2009,Inorg.Chem Commun.,12:116-118

[0382] -Zhang G.et al.,2012,Sensor Actuat.B-Chem.,171-172:786-794



图1

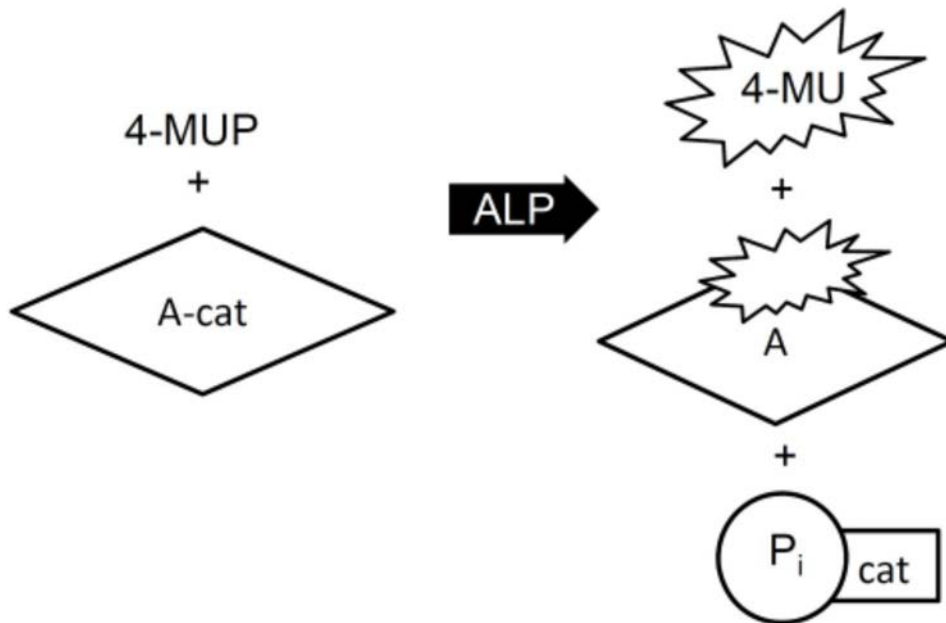


图2

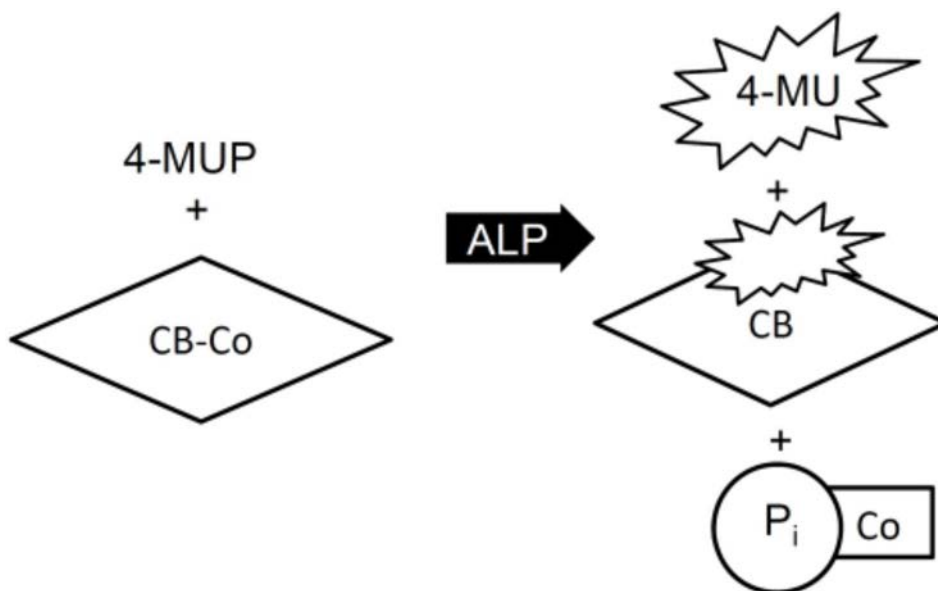


图3

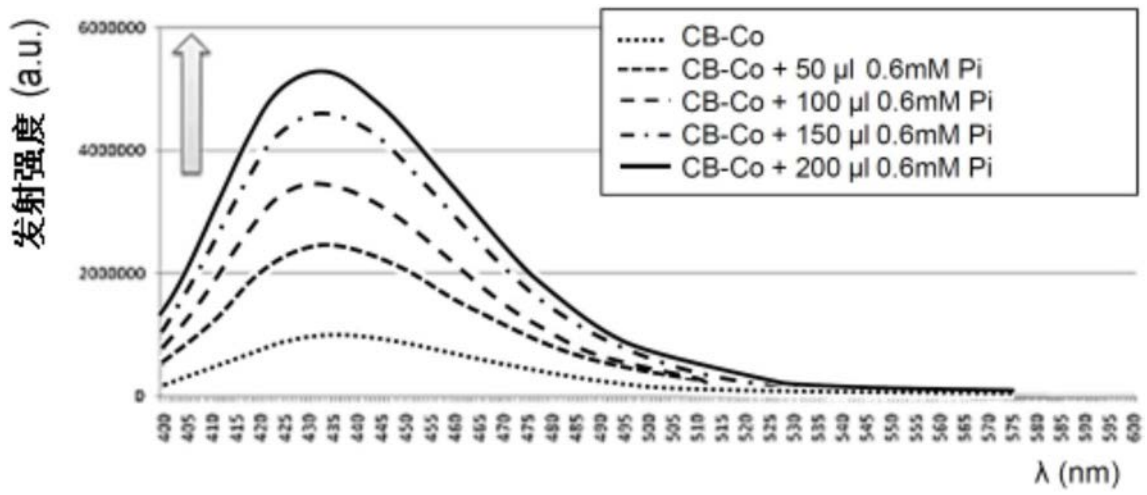


图4

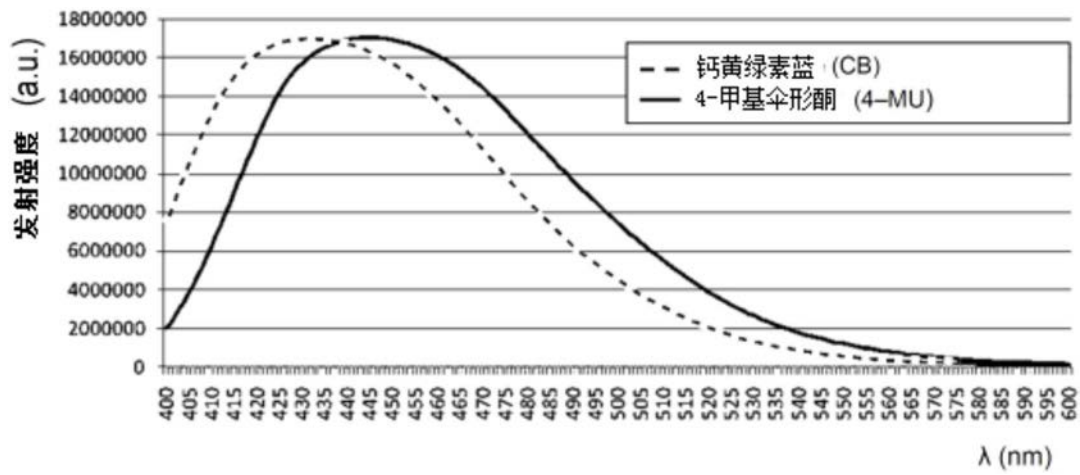


图5

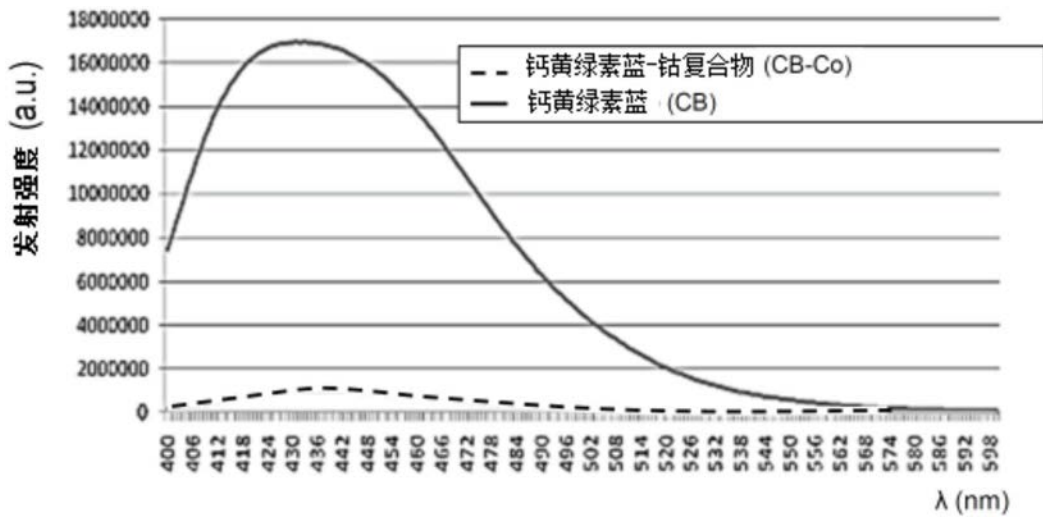


图6

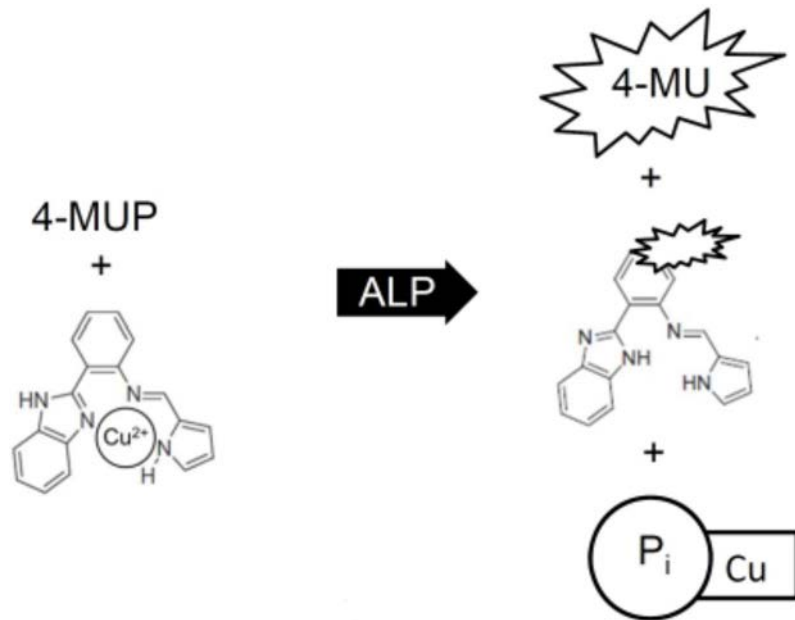


图7

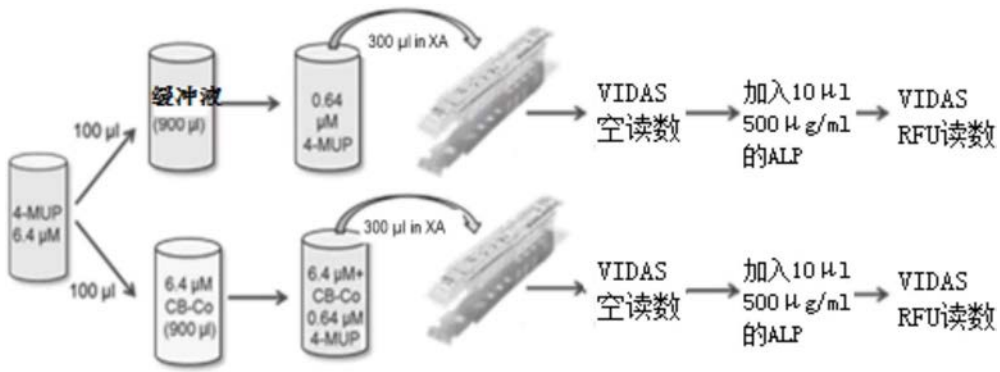


图8

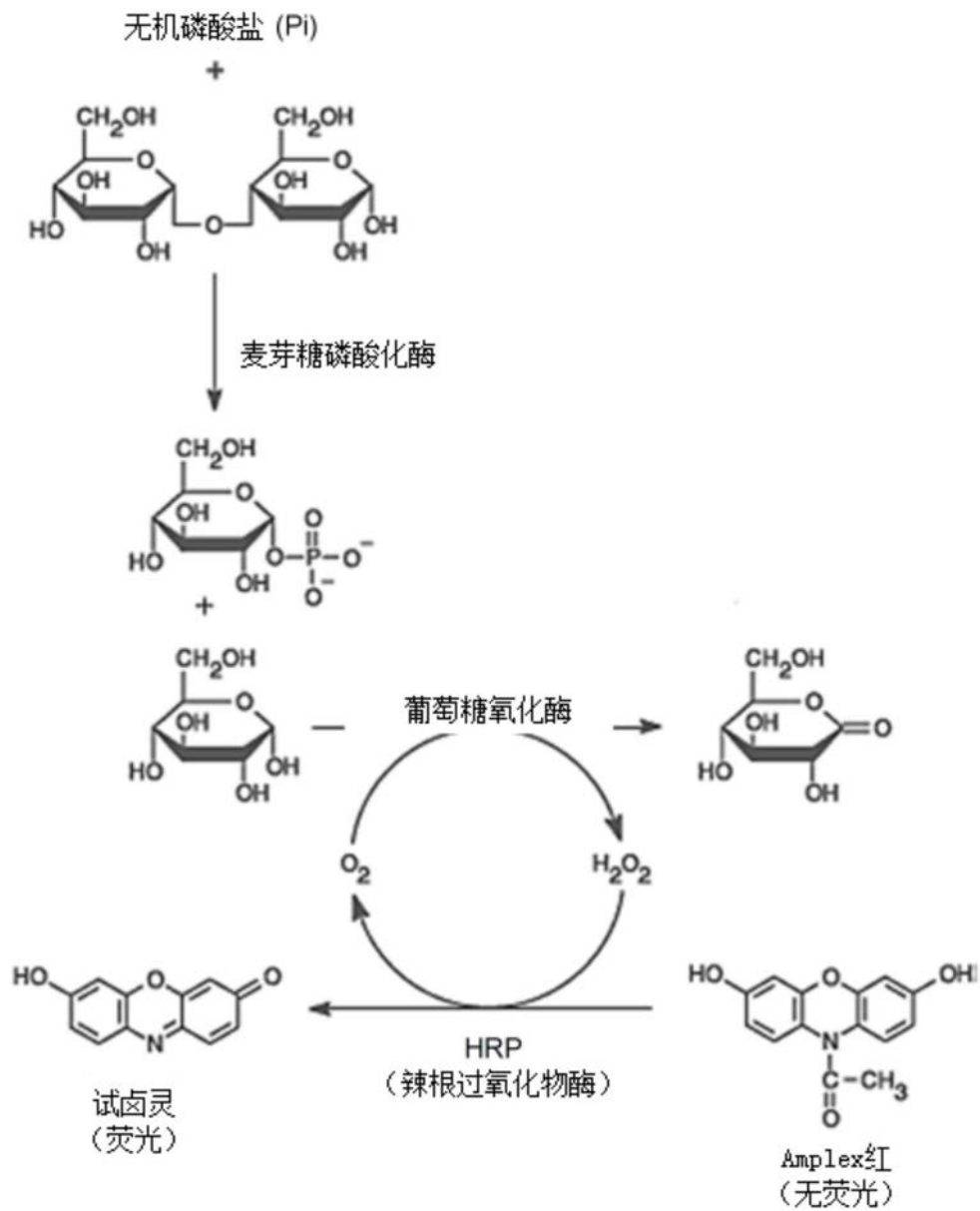


图9

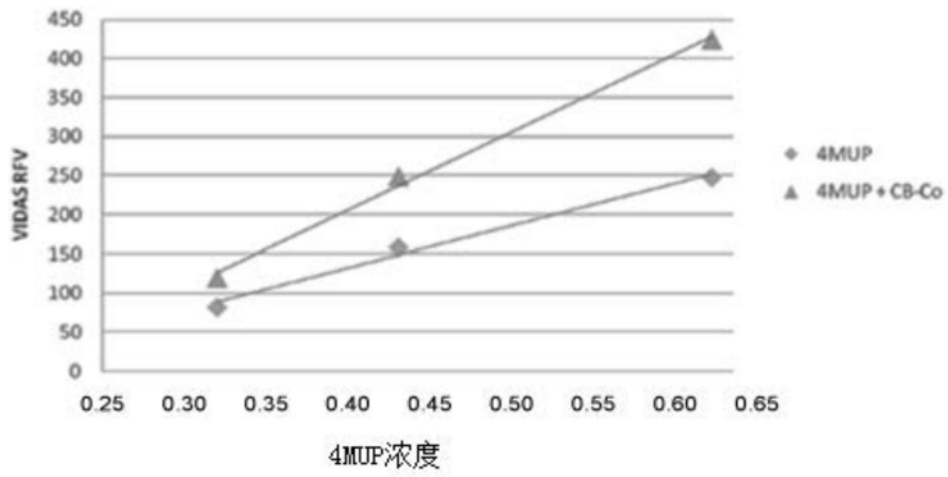


图10

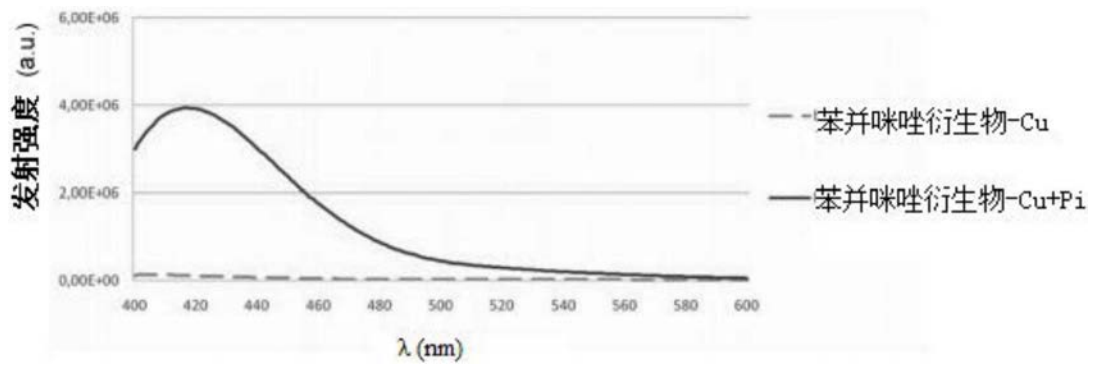


图11

专利名称(译)	用于利用免疫荧光的酶免疫测定的组合物及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN107003303A</a>	公开(公告)日	2017-08-01
申请号	CN201580068163.6	申请日	2015-10-16
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司		
[标]发明人	A 保罗希 A 萨内西 V L 罗西 A 廷科 V 舒什尼		
发明人	A·保罗希 A·萨内西 V·L·罗西 A·廷科 V·舒什尼		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/542		
代理人(译)	区斌		
优先权	2014060003 2014-10-17 FR		
其他公开文献	CN107003303B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及利用免疫荧光的酶免疫测定的组合物。本发明的特征在于所述组合物包含(i)荧光生成酶促底物以及(ii)在荧光生成酶促底物(i)的水解之后形成荧光化合物的猝灭的荧光生成化合物。

