



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104203944 B

(45)授权公告日 2017.03.01

(21)申请号 201280049495.6

金成妍

(22)申请日 2012.03.05

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104203944 A

代理人 须一平 崔佳佳

(43)申请公布日 2014.12.10

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

*C07D 417/04*(2006.01)

10-2011-0101273 2011.10.05 KR

*C07D 417/14*(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

*G01N 33/533*(2006.01)

2014.04.08

*G01N 33/569*(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

(56)对比文件

PCT/KR2012/001619 2012.03.05

JP 特开2009-120626 A, 2009.06.04,

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/051769 KO 2013.04.11

KR 10-2010-0116287 A, 2010.11.01, (续)

审查员 王沙沙

(73)专利权人 点标生物股份有限公司

地址 韩国忠清南道

专利权人 北京林特医药科技有限公司

(72)发明人 朴铉 金学成 宋贤玉 郑点圭

权利要求书3页 说明书21页 附图6页

(54)发明名称

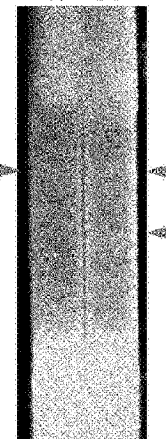
含香豆素衍生物的多荧光物质和使用其的诊断用LED光源显微荧光定量生物传感器

LED显微荧光定量生物传感器,可以快速定量地分析诸如疟疾等疾病。

(57)摘要

本发明涉及新型香豆素衍生物,其制备方法和包含多个该香豆素衍生物并能利用LED光源发光的多荧光物质。由于本发明含该新型香豆素衍生物的多荧光物质的最佳发射波长为512nm到590nm,其可利用LED光源发光,因此可改善信号强度和稳定性。与具有香豆素荧光的已知物质相比,由于本发明的具有香豆素荧光的物质中一分子具有多个荧光物质,该具有香豆素荧光的物质还显示高荧光反应。此外,由于能进行荧光检测,即便最少量荧光分子结合抗体,具有香豆素荧光的物质结合于抗体的抗原结合位点的问题得以解决。此外,由于本发明的含新型香豆素衍生物的多荧光物质适用于荧光连接免疫吸附测定(FLISA)和荧光免疫层析测试(FICT)作为诊断用

AA 负极 正极 BB  
(-) (+)



AA ... 负极  
BB ... 正极

CN 104203944 B

[接上页]

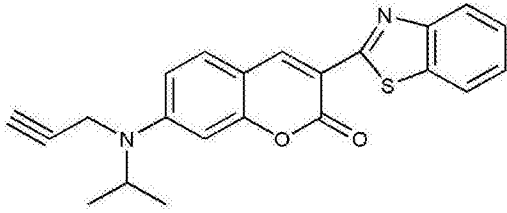
**(56)对比文件**

KR 10-2011-0097092 A, 2011.08.31,  
Eduardo Fernandez-Megia, 等.

“Clickable” PEG-Dendritic Block  
Copolymers.《Biomacromolecules》.2006, 第7卷  
(第11期), 第3104-3111页.

1. 一种以下化学式1所示化合物代表的香豆素衍生物或其盐：

[化学式1]



2. 一种制备以下化学式1所示香豆素衍生物的方法，包括以下步骤：

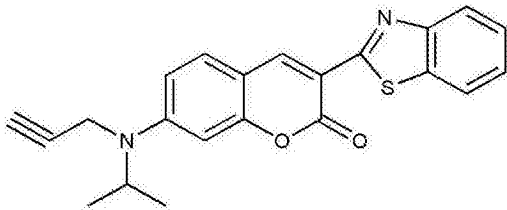
1) 将3-氨基苯酚与三乙酰氧基硼氢化钠和丙酮反应制备以下化学式2所示化合物；

2) 将以下化学式2所示化合物与N,N-二异丙基乙胺和炔丙基氯反应制备以下化学式3所示化合物；

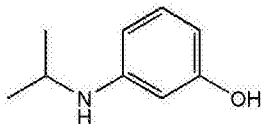
3) 将以下化学式3所示化合物与二甲基甲酰胺和磷酰氯反应制备以下化学式4所示化合物；和

4) 将以下化学式4所示化合物与2-(苯并[d]噻唑-2-基)乙酸乙酯和哌啶反应制备以下化学式1所示化合物，

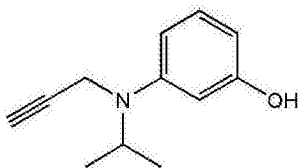
[化学式1]



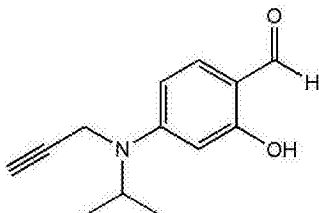
[化学式2]



[化学式3]



[化学式4]



3. 如权利要求2所述的方法，其特征在于，在步骤2)中，将化学式2所示化合物溶解于甲苯，然后将所得与N,N-二异丙基乙胺和炔丙基氯反应来制备化学式3所示化合物。

4. 如权利要求2所述的方法，其特征在于，在步骤3)中，将化学式3所示化合物溶解于二

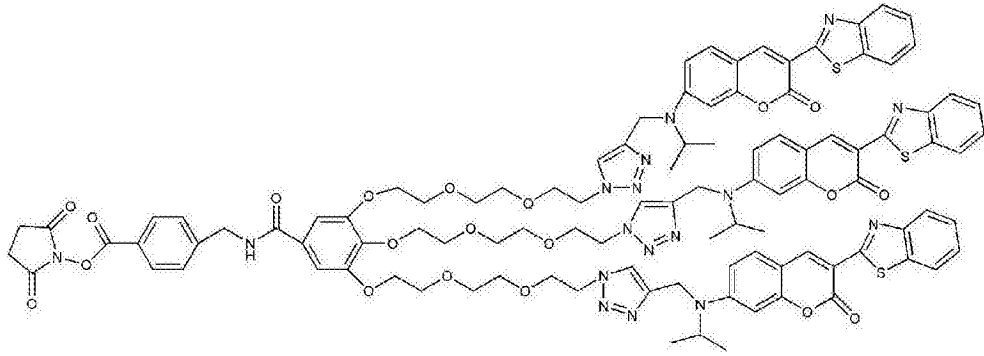
甲基甲酰胺,然后将所得与二甲基甲酰胺和磷酰氯反应来制备化学式4所示化合物。

5.如权利要求2所述的方法,其特征在于,在步骤4)中,将化学式4所示化合物溶解于乙醇,然后将所得与2-(苯并[d]噻唑-2-基)乙酸乙酯和哌啶反应来制备化学式1所示化合物。

6.一种多荧光物质,所述多荧光物质通过将权利要求1所述的化学式1所示香豆素衍生物与具有3个N<sub>3</sub>基团的接头进行反应来制备;

且所述多荧光物质是以下化学式6所示的香豆素树枝状大分子的琥珀酰亚胺酯:

[化学式6]

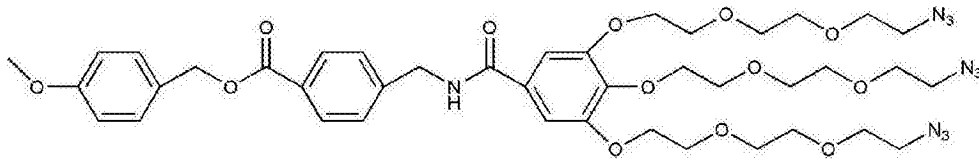


7.如权利要求6所述的多荧光物质,其特征在于,所述多荧光物质的最佳发射波长带为512nm到590nm。

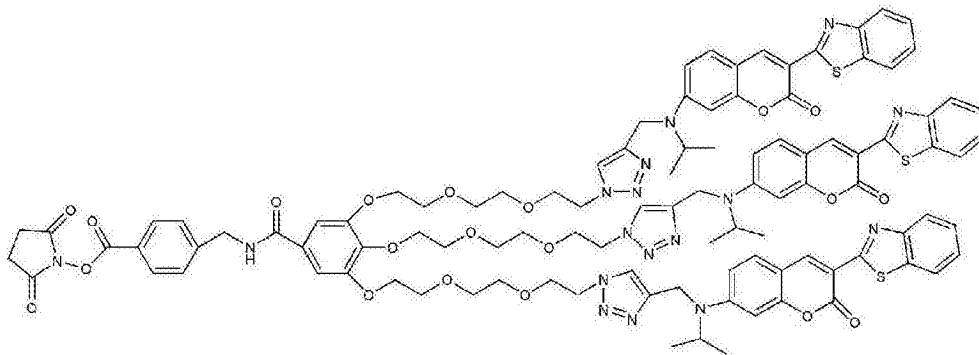
8.一种制备以下多荧光物质化学式6所示香豆素树枝状大分子的琥珀酰亚胺酯的方法,包括以下步骤:

- 1)将化学式5所示化合物与权利要求1所述的化学式1所示香豆素衍生物以及CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O和抗坏血酸钠反应来制备以下化学式16所示化合物;
- 2)将以下化学式16所示化合物与三氟乙酸反应来制备以下化学式17所示化合物;和
- 3)将以下化学式17所示化合物与N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺反应来制备以下化学式6所示化合物,

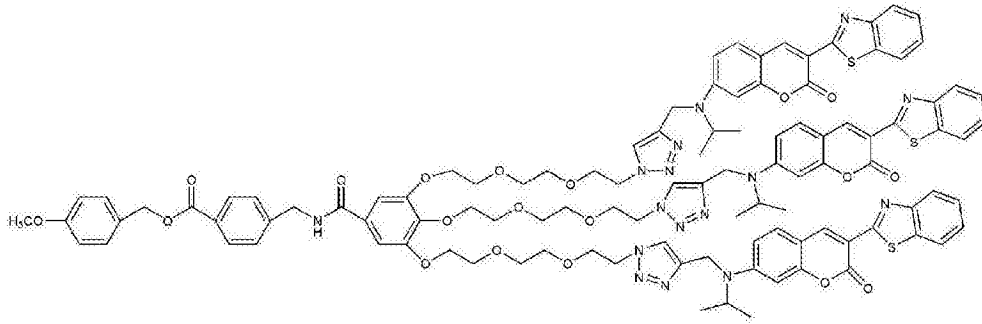
[化学式5]



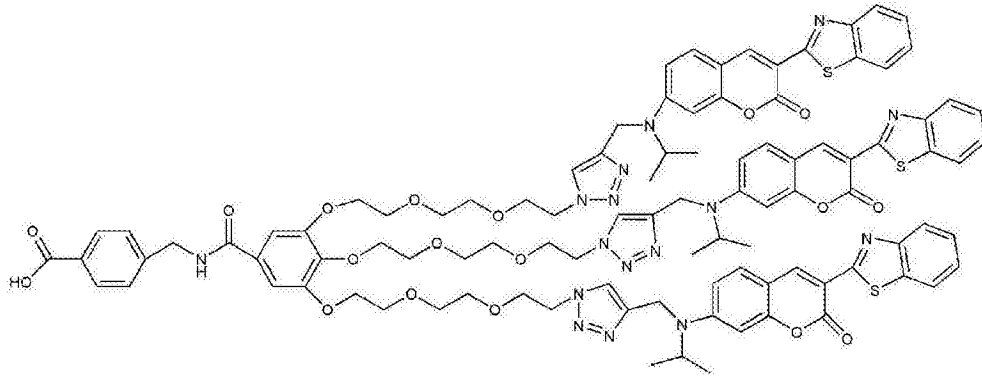
[化学式6]



[化学式16]



[化学式17]



9. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,在步骤1)中,将化学式5所示化合物与权利要求1所述的化学式1所示香豆素衍生物溶解于二氯甲烷和蒸馏水中,然后将所得与 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和抗坏血酸钠反应来制备化学式16所示化合物。

10. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,在步骤2)中,将化学式16所示化合物溶解于二氯甲烷,然后将所得与三氟乙酸反应来制备化学式17所示化合物。

11. 如权利要求8所述的方法,其特征在于,在步骤3)中,将化学式17所示化合物溶解于二氯甲烷,然后将所得与N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-3-(3-二甲基丙基)碳二亚胺反应来制备化学式6所示化合物。

12. 一种与权利要求6所述多荧光物质偶联的抗体。

13. 一种显微荧光定量生物传感器,其包含:

与权利要求6所述多荧光物质偶联的抗体。

14. 如权利要求13所述的生物传感器,其用于荧光连接免疫吸附测定(FLISA)和快速荧光免疫层析测试(FICT)。

15. 如权利要求13所述的生物传感器,其可利用LED光源发光。

16. 如权利要求13所述的生物传感器,其用于诊断疟疾抗原。

## 含香豆素衍生物的多荧光物质和使用其的诊断用LED光源显 微荧光定量生物传感器

### 技术领域

[0001] 本发明涉及新型香豆素衍生物,其制备方法,和多荧光物质(multi-fluorescent substance),所述多荧光物质包含多种所述香豆素衍生物并能利用LED光源发光。

### 背景技术

[0002] 精确而快速的诊断是疾病管理中的重要因素之一。特别是,快速诊断在感染性疾病,例如猪流感、禽流感、疟疾或登革热的早期预防中极其重要。例如,在2009年,全球有许多人罹患或死于猪流感或禽流感,而这是因为这些感染性病原体是高度传染性的并导致威胁生命的症状(Dawood FS等.,“人中新型猪源甲型流感(H1N1)病毒的出现”(Emergence of a novel swine-origin influenza A(H1N1)virus in human),N Engl J Med,360(25),第2605-2615页,2009;BeigeI JH等.,“人感染甲型禽流感(H5N1)”(Avian influenza A (H5N1)infection in human),N Engl J Med,353(13),第1374-1385页,2005)。为预先防止这些感染性疾病的蔓延,需要建立这样的系统,其能将现场快速诊断的结果传递到中心管理系统以便系统性监测这些结果。为在现场快速诊断疾病,需要开发提升诊断精度和灵敏度的生物传感器等器件。

[0003] 荧光技术已广泛用于生物学和医学领域的研究和临床诊断中所用的各种分析/诊断设备(Lian W等.,“用荧光染料掺杂的纳米颗粒超灵敏地检测生物分子”(Ultrasensitive detection of biomolecules with fluorescent dye-doped nanoparticles),Anal Biochem,334(1),pp135-144,2004)。这是因为荧光测定技术是能检测分析物中相应有机物或无机物的最灵敏方法之一,即便在非常低的浓度下。通过简单化学反应制备的荧光物质-分子偶联产物(荧光生物偶联物)能灵敏而定量地检测分析物中的目标物。因此,现已开发了多种有机和无机荧光物质以便降低成本、确保稳定性并提高诊断灵敏度。然而,目前已开发的荧光物质或现有的荧光物质作为诊断用生物传感器的应用受限,因为它们仍未克服诸如荧光物质的亮度、荧光持续时间的稳定性或荧光信号的严重干扰等缺陷。特别是还有这样一种缺陷,即,这些荧光物质需要高能源来发光并且总要使用激光二极管(LD)。

[0004] 长久以来,激光二极管(LD)是用于包括诊断设备在内的各种分析设备的光源。然而,与发光二极管(LED)光源相比,激光二极管(LD)较为昂贵,操作不便,光源寿命较短,并且发射光波长范围相对较有限(波长范围约为600nm到780nm或800nm)(Imasaka T,“分析化学中的二极管激光”(Diode lasers in analytical chemistry),Talanta,48(2),第305-320页,1999)。相比之下,人们认为发光二极管(LED)是相较激光二极管(LD)更有效的光源,因为LED的成本较低、即便能量输入较低也有稳定的能量输出,寿命较长,发射光波长带非常宽(波长范围约为390nm到750nm,几乎包括了LD的完整波长范围)。因此,目前通过用发光二极管(LED)替换现有的诊断用荧光显微镜的光源来开发比现有的显微镜更经济,且诊断灵敏度提高的诊断用新型荧光显微镜(Marais BJ等.,“发光二极管显微术在检测痰液中抗

酸杆菌中的应用”(Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum), Clin Infect Dis, 47(2), 第203-207页, 2008; Miller AR等., “便携式、电池操作、低成本、亮视野的荧光显微镜”(Portable, battery-operated, low-cost, bright field and fluorescence microscope), Plos One, 5(8), e11890, 2010)。因此, 开发更有效、稳定和革新的现场诊断用LED生物传感器需要同时开发能利用LED光源发光, 并且信号强度和稳定性改善的新型荧光物质。

[0005] 鉴于上述情况, 本发明人开发了荧光亮度、信号强度和信号稳定性极大改善的新型香豆素衍生物多荧光物质。

[0006] 此外, 本发明人进行了疟疾的荧光免疫测定以便证实将所开发的新型香豆素衍生物多荧光物质应用于开发LED显微荧光定量生物传感器以供现场诊断的可能性, 即, 证实其诊断实用性, 而疟疾是世界卫生组织(WHO)重点指出的5种主要疾病之一和每年造成全球五百万人死亡的致命性疾病。

[0007] 良好适合快速现场诊断的诊断方法是免疫层析法(ICT), 大多数这些方法开发成试纸条试剂盒的形式。全球范围最广泛使用的疟疾诊断试纸条试剂盒采用在疟疾特异性抗原中检测疟原虫乳酸脱氢酶(pLDH)和疟原虫富含组氨酸蛋白-2(pHRP-2)抗原的方法。作为采用该方法的商品化产品, 主要使用三种产品, 包括ICTM疟疾Pf/Pv(AICT公司(Amrad ICT), 澳大利亚)、OptiMAL(流式公司(Flow Inc.), 美国)和ParaSight™ F(BD公司(Becton Dickinson), 美国), 这些产品均具有不同的靶抗原。Chansuda研究了种3商品化产品(Wongsrichana Iai, C, “疟疾控制的快速诊断技术”(Rapid diagnostic techniques for malaria control), Trends Parasitol, 17(7), 第307-309页, 2001), 发现虽然这些产品对恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)具有约88%到98%的高诊断灵敏度, 但其问题在于它们对间日疟原虫(*Plasmodium vivax*)的诊断灵敏度分别约为75%、83%和87%。与产品供应商的宣称不同, 由于诊断灵敏度低于现有方法的灵敏度, 因此需要补充手段, 特别是, 对间日疟原虫的诊断灵敏度仅有约70-80%(Cooke AH.等., “比较用于检测人血样中疟疾寄生虫的基于寄生虫乳酸脱氢酶的免疫层析抗原检测试验(OptiMAL)与显微术”(Comparison of a parasite lactate dehydrogenase-based immunochromatographic antigen detection assay(OptiMAL)with microscopy for the detection of malaria parasites in human blood samples), Am J Trop Med Hyg, 60(2), 第173-176页, 1999)。此外, 韩国间日疟原虫常具有6个月到1年, 甚至长达3年或更长的长潜伏期, 尽管有时其具有1个月或更短的短潜伏期。当这种长潜伏类型发生时, 就难以诊断, 因为可能由于未形成抗体, 或者抗原量非常低而成为无临床症状病例。因此, 除了开发能早期诊断疾病的新型抗体, 本领域还需要开发能诊断少量抗原的灵敏而精确的免疫学诊断方法。

[0008] 鉴于以上情况, 为制备恶性疟原虫的特异性抗原(PfMSP, PfLDH, PfHRP2)、间日疟原虫的特异性抗原(PvMSP, PvLDH, PvHRP2)和抗原决定簇的特异性单克隆抗体, 本发明人首先利用恶性疟原虫LDH基因编码的多肽制备了单克隆抗体, 研究了其特征并证实可以通过制备特异性抗原和抗原决定簇的单克隆抗体来提高诊断间日疟原虫和恶性疟原虫的诊断灵敏度(韩国专利申请公布号10-2006-0027803)。

[0009] 此外, 为改善疟疾感染迹象的诊断方法, 本发明人采用荧光免疫测定(FIA), 该方法具有高灵敏度, 能进行定量分析, 还能基于这些性能开发现场诊断用的生物传感器。

[0010] 本发明人制备香豆素系列的新型化合物作为荧光免疫测定中使用的荧光物质,而考虑到只有一个荧光物质结合于抗体时荧光检测(能力)低的问题,本发明人发明了本发明的新型香豆素衍生物多荧光物质,通过引入具有一个核心结构的接头将该物质设计成一个分子具有多个荧光物质,从而将多个荧光物质结合于一个抗体。

[0011] 此外,本发明人证实,当将多荧光物质偶联于疟疾特异性抗体并采用荧光免疫测定(FIA)时,可以有效诊断疟疾感染,基于此,完成了本发明。

[0012] 此外,本发明人证实,当将多荧光物质偶联于疟疾特异性抗体并采用快速荧光免疫层析测试(FICT)时,可以快速而定量地诊断疟疾感染,基于此,完成了本发明。

## 发明内容

[0013] 技术问题

[0014] 本发明的目的是提供化学式1所示的香豆素衍生物,或其盐。

[0015] 本发明的另一目的是提供制备化学式1所示香豆素衍生物的方法。

[0016] 本发明还有另一目的是提供将化学式1所示香豆素衍生物与具有3、9或27个 $N_3$ 基团的接头进行反应制备的多荧光物质。

[0017] 本发明还有另一目的是提供将化学式1所示香豆素衍生物与具有3、9或27个 $N_3$ 基团的接头进行反应制备多荧光物质的方法。

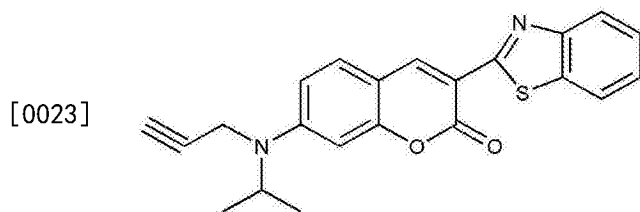
[0018] 本发明还有另一目的是提供与多荧光物质偶联的抗体,所述多荧光物质通过将化学式1所示香豆素衍生物与具有3、9或27个 $N_3$ 基团的接头进行反应来制备。

[0019] 本发明还有另一目的是提供包含与多荧光物质偶联的抗体的生物传感器,所述多荧光物质通过将化学式1所示香豆素衍生物与具有3、9或27个 $N_3$ 基团的接头进行反应来制备。

[0020] 技术方案

[0021] 为实现上述目的,本发明一方面提高化学式1所示香豆素衍生物及其盐。

[0022] 化学式1



[0024] 可采用相关领域的常规方法将本发明的化合物制备成该化合物的盐和可溶性化合物。

[0025] 就盐而言,可利用游离酸形成的酸加成盐。采用常规方法,例如将化合物溶解于过量的酸的水性溶液中,然后利用水可混溶的有机溶剂,例如甲醇、乙醇、丙酮或乙腈沉淀该盐来制备酸加成盐。将等摩尔量的该化合物和酸或醇(例如,乙二醇一甲醚)在水中加热,然后通过蒸发干燥混合物或者抽滤沉淀的盐。此时,有机酸和无机酸可用作游离酸。就无机酸而言,可利用盐酸、磷酸、硫酸、硝酸、锡酸等;就有机酸而言,可利用甲磺酸、对-甲苯磺酸、乙酸、三氟乙酸、柠檬酸、马来酸、琥珀酸、草酸、苯甲酸、酒石酸、延胡索酸、扁桃酸、丙酸、乳酸、乙醇酸、葡糖酸、半乳糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、葡糖醛酸、天冬氨酸、抗坏血酸、香草酸、

氢碘酸等,然而,所述有机酸和无机酸不限于此。

[0026] 此外,可利用碱制备药学上可接受的金属盐。通过,例如将化合物溶解于过量的碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物溶液中,过滤不溶的化合物盐,然后蒸发滤液并干燥获得碱金属或碱土金属盐。此时,制备钠、钾或钙盐作为金属盐尤其是药学上合适的,通过将碱金属或碱土金属盐与合适的银盐(例如,硝酸盐)反应来获得相应的银盐。

[0027] 除非另有规定,化学式1所示化合物的盐包括可在化学式1所示化合物中存在的酸性或碱性基团的盐。例如,所述盐包括羟基的钠、钾和钙盐,氨基的其它盐包括盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸氢盐、磷酸二氢盐、乙酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、乳酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐(甲磺酸盐)、对甲苯磺酸盐(对甲苯磺酸盐)等,可通过相关领域已知的制备方法或制备工艺制备这些盐。

[0028] 本发明的另一方面提供制备化学式1所示香豆素衍生物的方法。更具体地说,本发明提供了制备化学式1所示香豆素衍生物的方法,包括以下步骤:

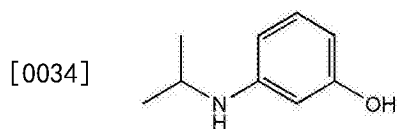
[0029] 1)将3-氨基苯酚与三乙酰氧基硼氢化钠和丙酮反应制备以下化学式2所示化合物;

[0030] 2)将以下化学式2所示化合物与N,N-二异丙基乙胺和炔丙基氯反应制备以下化学式3所示化合物;

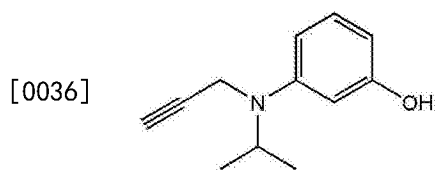
[0031] 3)将以下化学式3所示化合物与二甲基甲酰胺和磷酰氯反应制备以下化学式4所示化合物;和

[0032] 4)将以下化学式4所示化合物与2-(苯并[d]噻唑-2-基)乙酸乙酯和哌啶反应制备以下化学式1所示化合物。

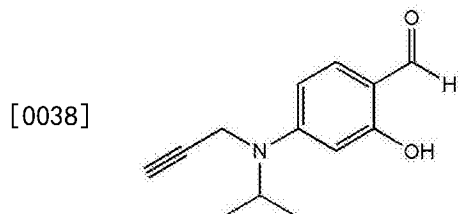
[0033] 化学式2



[0035] 化学式3



[0037] 化学式4



[0039] 实施例1的反应流程详细示出了制备化学式1所示香豆素衍生物的反应式。作为起始物质的3-氨基苯酚容易获得,因为可采用相关领域已知的各种方法制备或可商品化购得该化合物。

[0040] 在步骤2)中,将化学式2所示化合物溶解于甲苯,然后将所得产物与N,N-二异丙基

乙胺和炔丙基氯反应来制备化学式3所示化合物。

[0041] 在步骤3)中,将化学式3所示化合物溶解于二甲基甲酰胺,然后将所得产物与二甲基甲酰胺和磷酰氯反应来制备化学式4所示化合物。

[0042] 在步骤4)中,将化学式4所示化合物溶解于乙醇,然后将所得产物与2-(苯并[d]噻唑-2-基)乙酸乙酯和哌啶反应来制备化学式1所示化合物。

[0043] 由于化学式1所示香豆素衍生物具有炔丙基,其可与具有 $N_3$ 基团的接头结合。

[0044] 本发明的另一方面提供将化学式1所示香豆素衍生物与具有3、9或27个 $N_3$ 基团的接头进行反应来制备的多荧光物质。

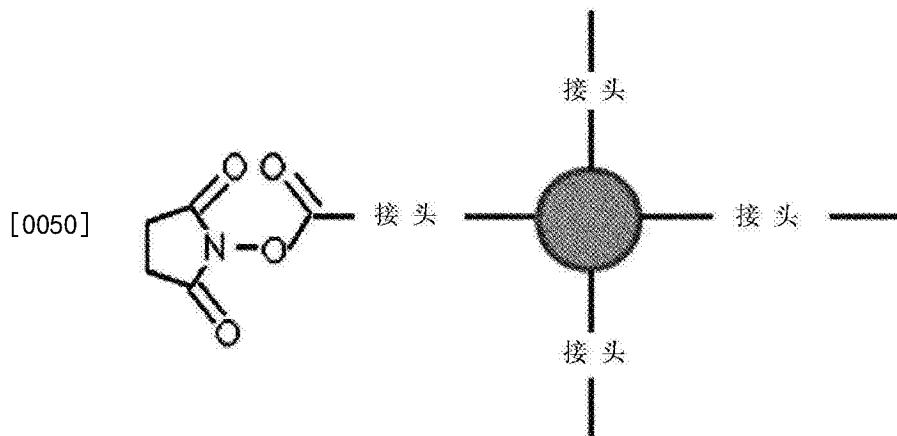
[0045] 更优选地,将化学式1所示香豆素衍生物与具有3、9或27个 $N_3$ 基团的接头进行反应,然后将所得产物与N-羟基琥珀酰亚胺反应来制备多荧光物质。

[0046] 在本发明中,术语“具有3、9或27个 $N_3$ 基团的接头”表示这样一种形式,该形式具有芳环,例如苯环作为核心结构以及具有在该芳环上作取代的 $N_3$ 基团的取代基。

[0047] 在本发明中,引入“N-羟基琥珀酰亚胺”以促进多荧光物质与抗体结合,从而形成酰胺键,藉此促进抗体的 $NH_2$ 与多荧光物质反应。

[0048] 在本发明中,将具有 $N_3$ 基团的接头与N-羟基琥珀酰亚胺反应所得结构优选是以下结构式1所示结构。

[0049] 结构式1



[0051] 在本发明中,将三乙胺(TEA)与1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDAC)反应以形成具有 $N_3$ 基团的接头,将具有 $N_3$ 基团的接头与本发明的化学式1所示香豆素衍生物反应,然后除去O-对甲氧基苄基并将所得产物与N-羟基琥珀酰亚胺反应来制备香豆素树枝状大分子多荧光物质的琥珀酰亚胺酯(succinimidyI ester of coumarin dendrimer multi-fluorescent substance)。

[0052] 本发明的多荧光物质的最佳光吸收波长带是450nm到470nm,最佳发射波长带是512nm到590nm。因此,可能利用LED光源发出光。

[0053] 在本发明中,术语“激发波长”和“吸收波长”可互换使用。此外,在本发明中,术语“发射波长”和“荧光波长”也可互换使用。

[0054] 换言之,本发明多荧光物质的最佳光发射波长带属于发光二极管(LED)的波长带而非现有激光二极管(LD)的波长带,因此非常适合开发LED显微荧光定量生物传感器以供现场诊断。

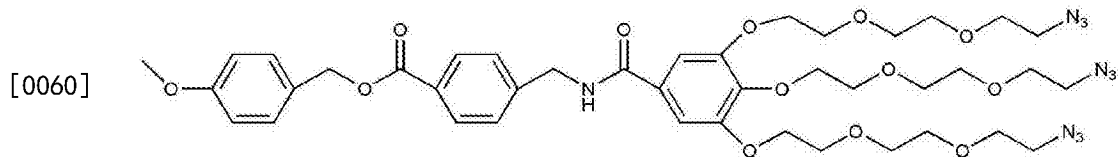
[0055] 本发明的多荧光物质可以有效用于各种诊断方法,特别是基于抗原-抗体结合的免疫学诊断方法,因为本发明的多荧光物质不仅具有量子点(QD)的所有优点(强荧光亮度和强度、稳定的连续荧光信号,等等),所述量子点是迄今为止开发的荧光物质中荧光效率最佳的无机荧光物质,本发明的多荧光物质还是有机荧光物质,仅通过简单的化学反应即可进行偶联,这与量子点(QD)不同,后者与生物分子(DNA、蛋白质、抗体等)的偶联过程较为不便和复杂。

[0056] 本发明的多荧光物质的优点在于可能进行高灵敏度荧光检测。香豆素染料是绿色系列荧光物质,而需要将多个荧光物质结合于某抗体从而可能利用低浓度抗体作荧光检测。然而,问题在于将香豆素染料加入抗体中时,香豆素染料可能结合的位点是抗体中与抗原相结合的位点,因为对于结合位点没有选择性,从而抗体可能丧失其功能。

[0057] 在本发明中,为解决以上问题,进行了图3所示实验,其中4、6、8和10个香豆素荧光物质各结合于一个抗体,最终,在结合6个香豆素荧光物质时获得最佳结果。因此,在本发明中,将一个分子设计成具有多个荧光物质,从而即便在最少数量的荧光物质分子与抗体结合时也能作荧光检测。此外,在本发明中,通过选择具有核心结构的接头来合成与香豆素荧光物质相连的大分子,所述接头连接于荧光物质。

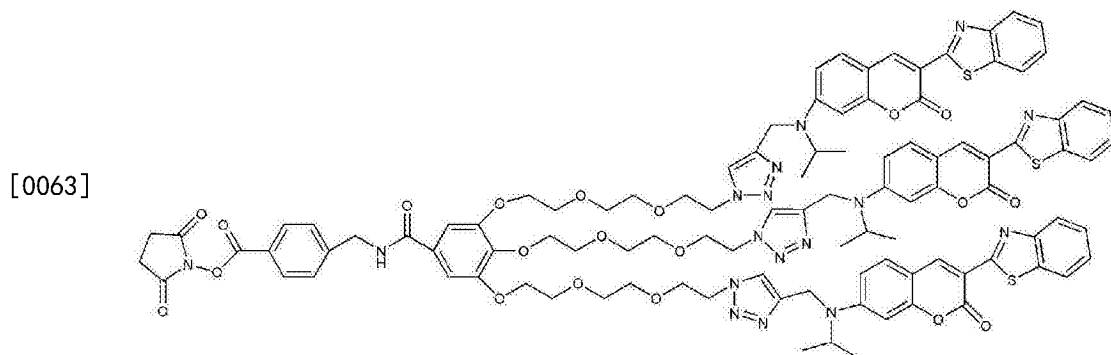
[0058] 在本发明中,具有3个N<sub>3</sub>基团的接头优选是以下化学式5所示化合物代表的接头。

[0059] 化学式5



[0061] 本发明的另一方面提供以下化学式6所示香豆素树枝状大分子多荧光物质的琥珀酰亚胺酯,其通过将化学式5所示化合物代表的接头与化学式1所示香豆素衍生物反应,然后除去O-对甲氧基苄基,并将所得与N-羟基琥珀酰亚胺反应来制备。

[0062] 化学式6



[0064] 本发明的另一方面提供制备化学式5所示具有3个N<sub>3</sub>基团的接头的方法。更具体地说,本发明提供了制备化学式5所示化合物的方法,包括以下步骤:

[0065] 1)将以下化学式7所示化合物与叠氮钠反应来制备以下化学式8所示化合物;

[0066] 2)将以下化学式8所示化合物与对甲苯磺酰氯、4-二甲基氨基吡啶和三乙胺反应来制备以下化学式9所示化合物;

[0067] 3)将以下化学式9所示化合物与以下化学式10所示化合物和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>及四丁基溴化铵

反应来制备以下化学式11所示化合物；

[0068] 4)将以下化学式11所示化合物与LiOH反应来制备以下化学式12所示化合物；

[0069] 5)将以下化学式12所示化合物与以下化学式13所示化合物和三乙胺及1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺反应来制备以下化学式14所示化合物；

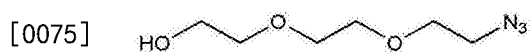
[0070] 6)将以下化学式14所示化合物与LiOH反应来制备以下化学式15所示化合物；和

[0071] 7)将以下化学式15所示化合物与对-甲氧基苄基溴和碳酸氢钠反应来制备化学式5所示化合物。

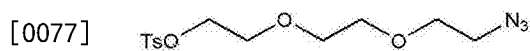
[0072] 化学式7



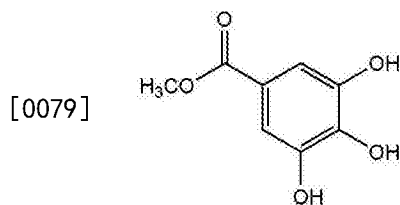
[0074] 化学式8



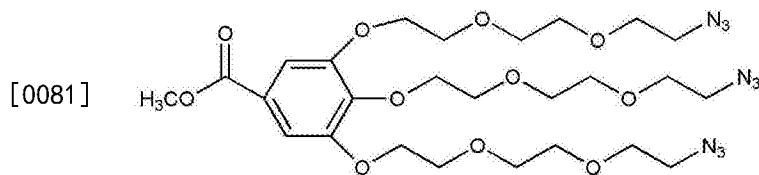
[0076] 化学式9



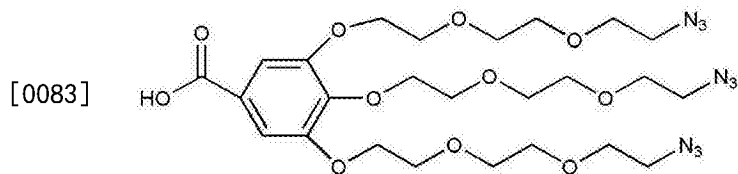
[0078] 化学式10



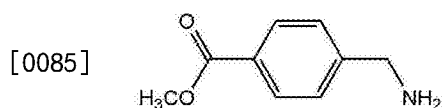
[0080] 化学式11



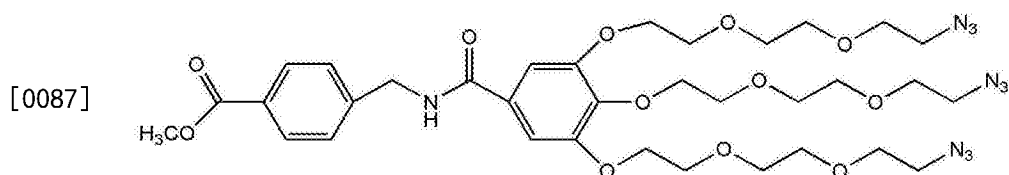
[0082] 化学式12



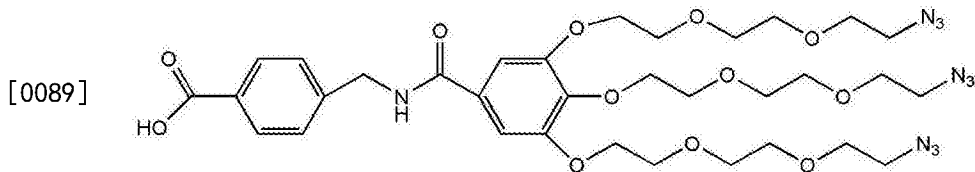
[0084] 化学式13



[0086] 化学式14



[0088] 化学式15



[0090] 实施例2的反应流程详细示出了制备具有3个N<sub>3</sub>基团的化学式5所示接头的反应式。作为起始物质的化学式7所示化合物容易获得,因为可采用相关领域已知的各种方法制备或可商品化购得该化合物。

[0091] 在步骤1)中,将化学式7所示化合物溶解于二甲基甲酰胺,然后将所得与叠氮钠反应来制备化学式8所示化合物。

[0092] 在步骤2)中,将化学式8所示化合物溶解于二氯甲烷,然后将所得与甲苯磺酰氯、4-二甲基氨基吡啶和三乙胺反应来制备化学式9所示化合物。

[0093] 在步骤3)中,将化学式9所示化合物溶解于丙酮,然后将所得与化学式10所示化合物、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>和四丁基溴化铵反应来制备化学式11所示化合物。

[0094] 在步骤4)中,将化学式11所示化合物溶解于四氢呋喃,然后将所得与LiOH反应来制备化学式12所示化合物。

[0095] 在步骤5)中,将化学式12所示化合物溶解于二氯甲烷,然后将所得与化学式13所示化合物、三乙胺(TEA)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDAC)反应来制备化学式14所示化合物。

[0096] 在步骤6)中,将化学式14所示化合物溶解于四氢呋喃,然后将所得与LiOH反应来制备化学式15所示化合物。

[0097] 在步骤7)中,将化学式15所示化合物溶解于二甲基甲酰胺,然后将所得与对-甲氧基苄基溴和碳酸氢钠反应来制备化学式5所示化合物。

[0098] 本发明的另一方面提供制备化学式6所示香豆素树枝状大分子的琥珀酰亚胺酯的方法。更具体地说,本发明提供了制备化学式6所示香豆素树枝状大分子的琥珀酰亚胺酯的方法,包括以下步骤:

[0099] 1)将化学式5所示化合物与权利要求1所述的化学式1所示香豆素衍生物以及CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O和抗坏血酸钠反应来制备以下化学式16所示化合物;

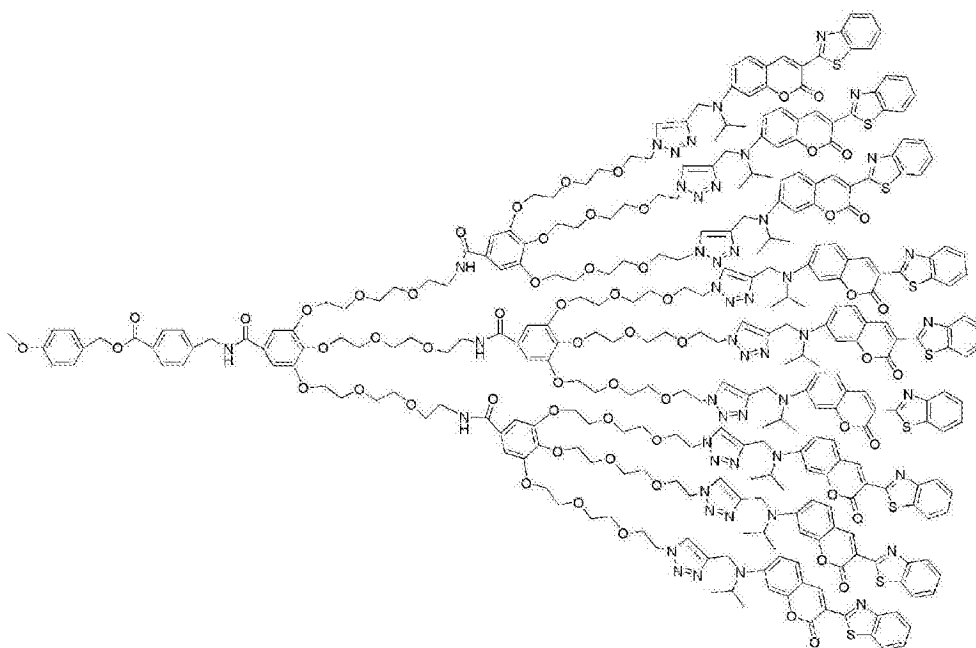
[0100] 2)将以下化学式16所示化合物与三氟乙酸反应来制备以下化学式17所示化合物;  
和

[0101] 3)将以下化学式17所示化合物与N-羟基琥珀酰亚胺和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺反应来制备化学式6所示化合物。

[0102] 化学式16



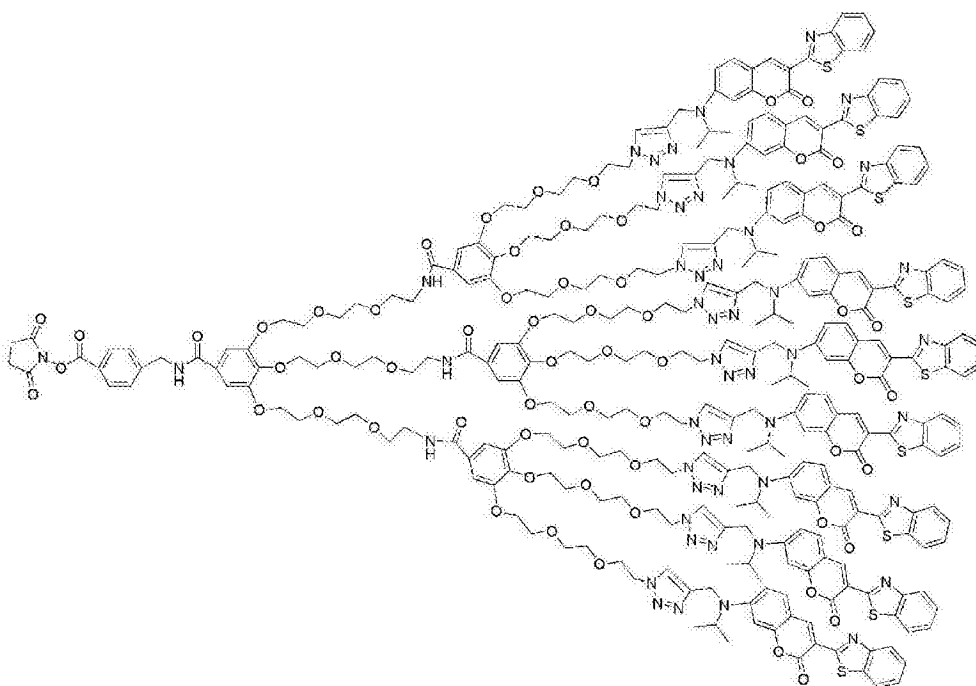
[0112]



[0113] 本发明的另一方面提供以下化学式19所示香豆素树枝状大分子多荧光物质的琥珀酰亚胺酯,其通过将化学式18所示化合物代表的接头与化学式1所示香豆素衍生物反应,然后除去0-对甲氧基苄基,并将所得产物与N-羟基琥珀酰亚胺反应来制备。

[0114] 化学式19

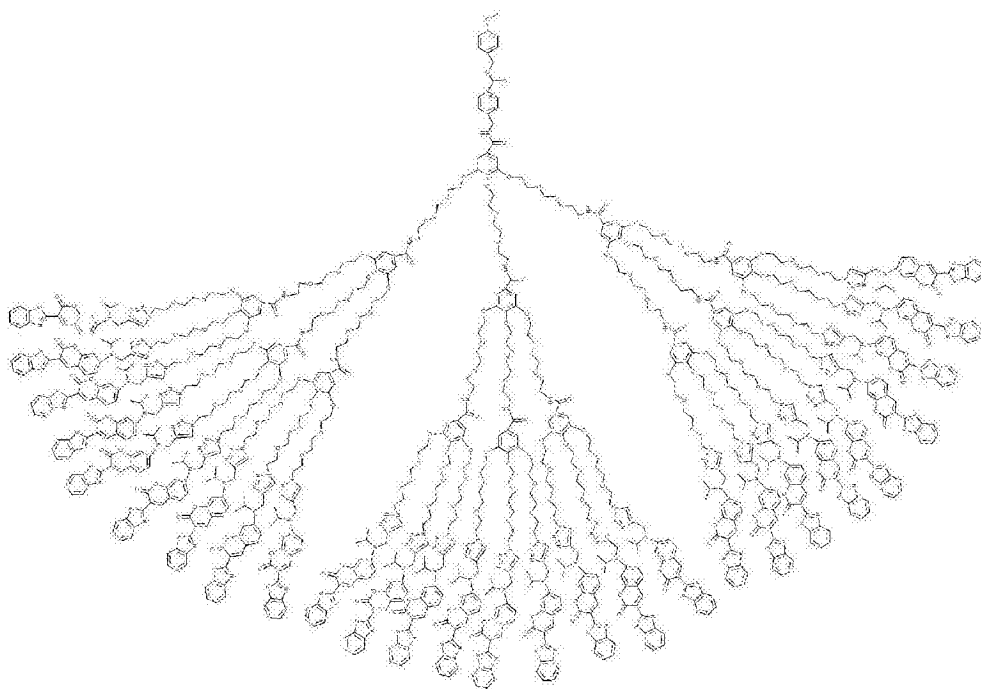
[0115]



[0116] 在本发明中,具有27个N<sub>3</sub>基团的接头优选是以下化学式20所示接头。

[0117] 化学式20

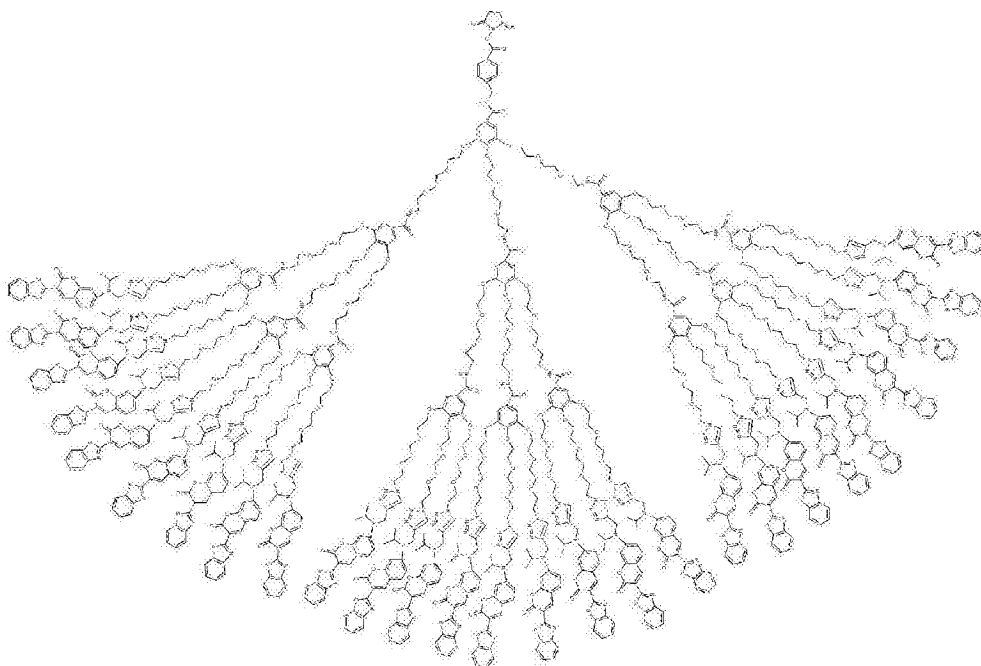
[0118]



[0119] 本发明的另一方面提供以下化学式21所示香豆素树枝状大分子多荧光物质的琥珀酰亚胺酯,其通过将化学式20所示化合物代表的接头与化学式1所示香豆素衍生物反应,然后除去O-对甲氧基苄基,并将所得产物与N-羟基琥珀酰亚胺反应来制备。

[0120] 化学式21

[0121]



[0122] 本发明的另一方面提供与新型香豆素衍生物多荧光物质偶联的抗体。本发明的香豆素树枝状大分子多荧光物质的琥珀酰亚胺酯可通过偶联反应与抗体形成结合物质。在该偶联反应中,抗体的赖氨酸(包含-NH<sub>2</sub>基团)与酯基偶联并结合形成酰胺键。免疫物质与荧光物质经由偶联反应形成结合物质是利用显微荧光定量生物传感器所必需的。

[0123] 本发明的另一方面提供包含与多荧光物质偶联的抗体的显微荧光定量生物传感器。化学式1所示香豆素衍生物是具有香豆素骨架的荧光物质,可用于酶联免疫吸附测定

(ELISA)和快速荧光免疫层析测试(FICT),因为可能利用发光二极管(LED)光源进行有效检测。

[0124] 在本发明中,显微荧光定量生物传感器指的是通过分析荧光信号能感知人类生物信号的传感器。通过实施与体内反应相同的反应,生物传感器是利用对机体中存在的生物材料中特定化学物质具有优秀识别功能的物质而在室温和大气压下直接测量所产生物质的装置。在本发明中,显微荧光定量生物传感器的概念包括荧光免疫测定试剂盒。

[0125] 具体地说,在本发明的实施例中,实施荧光-连接免疫吸附测定(FLISA)以证实单克隆抗体-荧光物质偶联产物的反应活性。

[0126] 与酶联免疫吸附测定(ELISA)相似,荧光-连接免疫吸附测定(FLISA)利用荧光计,从而具有较短的分析时间,并可大量检测待诊断的物质。此外,与酶联免疫吸附测定(ELISA)相比,一般知晓荧光-连接免疫吸附测定具有更佳的灵敏度和特异性。

[0127] 快速荧光免疫层析测试(FICT)是具有高精度度的技术,其是这样一种方法,其中免疫物质(例如,抗原或抗体)固定于固相,例如膜上,荧光物质-免疫物质用作流动相,反应完成后,利用经过荧光物质的信号定量检测靶物质。该方法可用于急诊现场诊断,因为可以快速获得结果,使用说明简单,还可能对输出值进行定量;然而,该系统可用的荧光物质的类型有限,还有不利之处在于需要根据激发和光发射波长带(波长)使用相当昂贵的光源。

[0128] 本发明的新型香豆素衍生物多荧光物质是适合于荧光-连接免疫吸附测定和快速荧光免疫层析测试的荧光物质,其表现出高荧光反应活性,因为一个分子具有多个荧光物质。

[0129] 利用包含本发明新型香豆素衍生物多荧光物质的生物传感器可以快速而定量地分析各种疾病。更优选地,可以快速而定量地分析疟疾。按照本发明的具体实施例,利用化学式6所示香豆素树枝状大分子多荧光物质的琥珀酰亚胺酯对疟疾抗原 实施荧光-连接免疫吸附测定(FLISA)。因此,本发明的新型香豆素衍生物多荧光物质-抗体偶联产物对疟疾抗原表现出高反应活性。

[0130] 有利效果

[0131] 本发明的新型香豆素衍生物多荧光物质的最佳发射波长带为512nm到590nm,藉此可有效改善信号强度和稳定性,因为可能利用LED光源实施光发射。

[0132] 此外,与相关领域已知的香豆素荧光物质相比,表现出更高的荧光反应活性是因为一个分子具有多个荧光物质,而香豆素荧光物质可能结合于抗体的抗原结合位点的问题得到解决,因为可以在即便最少量的荧光物质结合于抗体的情况下进行荧光检测。

[0133] 此外,本发明的新型香豆素衍生物多荧光物质适用于荧光-连接免疫吸附测定(FLISA)和荧光免疫层析测试(FICT),因此,可快速而定量地分析诸如疟疾等疾病。

## 附图说明

[0134] 图1是显示抗体与具有3个香豆素荧光物质的多荧光物质的结合方法的示意图。

[0135] 图2显示测量香豆素-三分子荧光物质的最佳波长的结果。

[0136] 图3显示通过优化FLISA(测得)的香豆素-三分子荧光物质-抗体偶联产物的最佳偶联比。

[0137] 图4显示香豆素-三分子荧光物质-抗体偶联产物的最佳波长的检测结果。

[0138] 图5显示利用荧光物质-抗体偶联产物,在香豆素-3分子荧光物质的最佳波长下对疟疾感染患者的血液进行FLISA测试的结果。

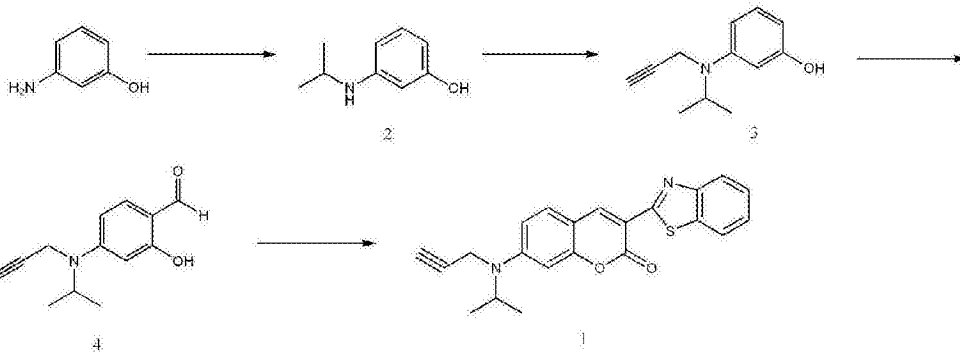
[0139] 图6显示利用香豆素-三分子荧光物质-抗体偶联产物进行快速荧光免疫层析测试(FICT)的示意图。图中所述的附图标记为①吸附垫,②偶联垫,③硝酸纤维素膜,④塑料支持件,⑤吸收垫,⑥测试线和⑦控制线。

[0140] 图7显示利用香豆素-三分子荧光物质-抗体偶联产物,对疟疾感染患者的血液进行快速荧光免疫层析测试(FICT)的结果。

[0141] 发明实施方式

[0142] 下文将参考实施例更详细地描述本发明。然而,这些实施例仅仅是处于说明目的,本发明的范围不限于此。

[0143] 实施例1:合成化学式1所示香豆素衍生物



[0144]

[0145] 新型香豆素衍生物的合成途径如下所示。

[0146] 1-1. 合成化学式2所示3-(异丙基氨基)苯酚化合物

[0147] 将硼氢化钠(2.70g, 71.37mmol)的THF(50mL)混悬液冷却至0℃,向其中缓慢加入冰醋酸(12.46mL, 115.3mmol),搅拌混合物,升温至室温,然后搅拌过夜。向上述制备的三乙酰氧基硼氢化钠溶液中连续加入3-氨基苯酚(2.0g, 18.32mmol)和丙酮(13.42mL, 183.2mmol),将所得搅拌12小时。用饱和碳酸氢钠溶液(30mL)、蒸馏水(30mL)和饱和盐水(20mL)连续清洗反应混合物。无水硫酸钠干燥有机层,过滤并真空蒸馏,获得的残留物经硅胶柱层析纯化(己烷/乙酸乙酯(4:1))得到3-(异丙基胺)苯酚(2.16g, 78%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ6.99(t, 1H, J=8.25Hz), 6.12-6.17(m, 2H), 6.07(t, 1H, J=2.3Hz), 3.54-3.61(m, 1H), 1.19(d, 6H, J=6.4Hz); <sup>13</sup>C NMR(125MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ156.7, 149.1, 130.2, 106.5, 103.9, 99.9, 44.3, 23.0(2)。

[0148] 1-2. 合成化学式3所示3-(异丙基(丙-2-炔基)氨基)苯酚化合物

[0149] 室温下,向化学式2所示3-(异丙基胺)苯酚(2.0g, 13.22mmol)化合物溶解于甲苯(15mL)的溶液中依次加入作为Hunig碱(Hunig's base)的N,N-二异丙基乙胺(5.75mL, 33.05mmol)和炔丙基氯(2.36mL, 33.05mmol)。50℃下,搅拌反应混合物10小时,然后冷却至室温。以上得到的反应后混合物在乙酸乙酯(30mL)和蒸馏水(30mL)分配。分离有机层,用饱和的盐水(10mL)清洗,无水硫酸钠干燥,过滤并真空蒸馏,获得的残留物经硅胶柱层析纯化(己烷/乙酸乙酯(6:1))得到3-(异丙基(丙-2-炔基)氨基)苯酚(2.22g, 89%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ7.03(t, 1H, J=8.2Hz), 6.40(dd, 1H, J=8.2Hz), 6.32(s, 1H), 6.16(dd, 1H, J=7.7Hz), 3.98-4.07(m, 1H), 3.85(d, 2H, J=2.2Hz), 2.10(t, 1H, J=2.3Hz), 1.18(d, 6H, J=

6.9Hz);  $^{13}\text{C}$ NMR(125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )d156.7, 149.8, 130.1, 106.4, 104.3, 100.7, 82.2, 71.1, 48.8, 33.6, 20.1(2)。

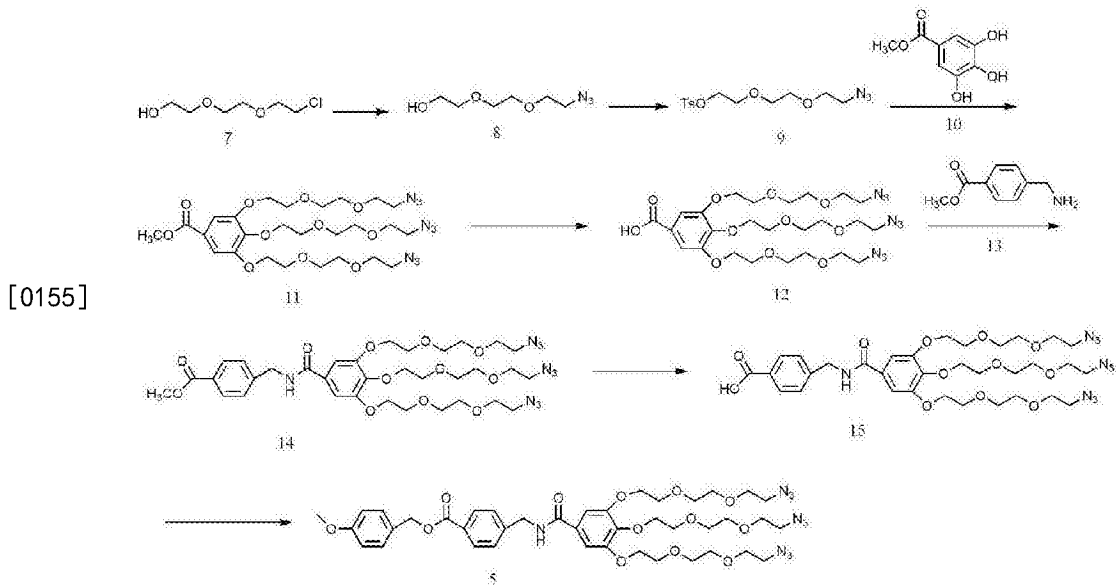
[0150] 1-3. 合成化学式4所示2-羟基-4-(异丙基(丙-2-炔基)氨基)苯甲醛化合物

[0151] 将DMF(13.30mL, 172.6mmol)冷却至0℃, 向其中滴加 $\text{POCl}_3$ (2.68mL, 28.79mmol), 搅拌混合物20min, 升温至室温, 然后搅拌1小时。向该反应物中加入化学式3所示3-(异丙基(丙-2-炔基)氨基)苯酚化合物(2.18g, 11.51mmol)溶解于DMF(10mL)的溶液, 然后将混合物搅拌12小时。向反应后的混合物中加入蒸馏水(30mL), 加入碳酸氢钠固体将所得中和至pH7-8。该混合物在乙酸(100mL)和蒸馏水(30mL)中分配后, 分离有机层, 用饱和的盐水(10mL)清洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤并真空蒸馏, 获得的残留物经硅胶柱层析纯化(己烷/乙酸乙酯(7:1))得到2-羟基-4-(异丙基(丙-2-炔基)氨基)苯甲醛(2.05g, 82%)。  $^1\text{H}$  NMR(500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )d11.52(s, 1H), 9.55(s, 1H), 7.33(d, 1H, J=8.7Hz), 6.46(dd, 1H, J=2.3, 8.7Hz), 6.29(d, 1H, J=2.3Hz), 4.19-4.22(m, 1H), 3.98(d, 2H, J=2.7Hz), 2.23(t, 1H, J=2.7Hz), 1.29(d, 6H, J=6.9Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR(125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )d192.7, 164.2, 154.7, 135.3, 112.4, 105.4, 98.5, 80.4, 72.0, 49.1, 33.3, 20.2(2)。

[0152] 1-4. 合成化学式1所示3-(苯并[d]噻唑-2-基)-7-(异丙基(丙-2-炔基)氨基)-2H-色烯-2-酮化合物

[0153] 室温下, 向化学式4所示2-羟基-4-(异丙基(丙-2-炔基)氨基)苯甲醛(1.8g, 8.28mmol)化合物溶解于乙醇(15mL)的溶液中连续加入2-(苯并[d]噻唑-2-基)乙酸乙酯(1.83g, 8.28mmol)和哌啶(1.63mL, 16.56mmol)。将反应混合物加热回流2小时, 冷却至室温, 过滤沉淀的固体得到3-(苯并[d]噻唑-2-基)-7-(异丙基(丙-2-炔基)氨基)-2H-色烯-2-酮(1.54g, 50%)。  $^1\text{H}$  NMR(500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )d8.94(s, 1H), 8.02(d, 1H, J=8.2Hz), 7.94(d, 1H, J=7.8Hz), 7.54(d, 1H, J=8.7Hz), 7.47-7.50(m, 1H), 7.35-7.38(m, 1H), 6.88(dd, 1H, J=2.3, 8.7Hz), 6.80(d, 1H, J=2.3Hz), 4.21-4.26(m, 1H), 4.04(d, 2H, J=2.3Hz), 2.26(t, 1H, J=2.2Hz), 1.34(d, 6H, J=6.4Hz);  $^{13}\text{C}$ NMR(125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )d161.5, 161.0, 156.7, 152.6, 152.4, 142.0, 136.4, 130.6, 126.2, 124.7, 122.3, 121.7, 113.9, 111.0, 109.8, 98.8, 80.0, 72.3, 49.5, 33.5, 20.2(2)。

[0154] 实施例2: 合成能结合3个香豆素衍生物的化学式5所示具有反应活性基团的接头



[0156] 能结合3个香豆素衍生物的具有反应活性基团的接头的合成过程如下所示。

[0157] 2-1. 合成化学式8所示2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙醇化合物

[0158] 室温下,向化学式7所示2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙醇(3.48g, 20.63mmol)溶解于DMF(15mL)的溶液中加入叠氮钠(4.02g, 61.89mmol),将混合物加热至100℃,并搅拌12小时。反应后,真空蒸馏除去DMF,残留物在蒸馏水(40mL)和乙酸乙酯(150mL)分配。分离有机层,用饱和的盐水(15mL)清洗,无水硫酸钠干燥,真空蒸馏,获得的残留物经硅胶柱层析纯化(己烷/乙酸乙酯(2:1))得到2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙醇(3.05g, 84%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ3.72-3.74(m, 2H), 3.65-3.69(m, 6H), 3.60-3.62(m, 2H), 3.39(t, 2H, J=5.0Hz)。

[0159] 2-2. 合成化学式9所示2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙基4-甲基苯磺酸酯化合物

[0160] 室温下,向化学式8所示2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙醇(3.05g, 17.40mmol)化合物溶解于二氯甲烷(15mL)的溶液中连续加入4-二甲基氨基吡啶(DMAP)(212.6mg, 1.74mmol)、三乙胺(TEA)(7.28mL, 52.20mmol)和对甲苯磺酰氯(3.98g, 20.88mmol)。室温下搅拌反应混合物12小时,然后将反应后的混合物在蒸馏水(40mL)和乙酸乙酯(120mL)中分配。分离有机层,用饱和的盐水(15mL)清洗,无水硫酸钠干燥,真空蒸馏得到2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)乙基4-甲基苯磺酸酯(5.15g, 90%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ7.79(d, 2H, J=8.2Hz), 7.33(d, 2H, J=8.2Hz), 4.15(t, 2H, J=5.0Hz), 3.69(t, 2H, J=5.0Hz), 3.63(t, 2H, J=5.5Hz), 3.59(s, 4H), 3.36(t, 2H, J=5.0Hz), 2.44(s, 3H); <sup>13</sup>C NMR(125MHz, CDCl<sub>3</sub>)δ144.9, 133.0, 129.9(2), 128.0(2), 70.8, 70.7, 70.1, 69.3, 68.8, 50.7, 21.7。

[0161] 2-3. 合成化学式10所示没食子酸甲酯化合物

[0162] 室温下,向没食子酸(5.0g, 29.39mmol)溶解于甲醇(25mL)的溶液中连续加入浓硫酸(0.5mL)和原甲酸三甲酯(3.21mL, 88.17mmol)。将反应混合物加热回流10小时,冷却至室温,真空蒸馏除去甲醇。向以上获得的残留物中加入蒸馏水(10mL),过滤沉淀的固体得到没食子酸甲酯(5.15g, 95%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, DMSO-D<sub>6</sub>)δ9.29(s, 2H), 8.96(s, 1H), 6.92(s, 2H), 3.73(s, 3H)。

[0163] 2-4.合成化学式11所示3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酸甲酯化合物

[0164] 室温下,向化学式9所示2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙基4-甲基苯磺酸酯(4.80g,14.57mmol)化合物溶解于丙酮(15mL)的溶液中连续加入K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(2.05g,14.85mmol)、化学式10所示没食子酸甲酯(650.9mg,3.53mmol)化合物和四丁基溴化铵(25mg)。将反应混合物加热回流17小时,冷却至室温,在蒸馏水(40mL)和乙酸乙酯(150mL)中分配。分离有机层,用饱和的盐水(15mL)清洗,无水硫酸钠干燥,过滤并作真空蒸馏,所得残留物经硅胶柱层析纯化(己烷/乙酸乙酯(1:1.5))得到3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酸甲酯(2.18g,94%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ 7.29(s,2H),4.18-4.23(m,6H),3.86-3.88(m,7H),3.81(t,2H,J=5.0Hz),3.70-3.74(m,6H),3.63-3.67(m,12H),3.36-3.39(m,6H)。

[0165] 2-5.合成化学式12所示3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酸化合物

[0166] 室温下,向化学式11所示3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酸甲酯(2.18g,3.32mmol)溶解于THF的溶液中加入水溶性LiOH(1M)(9.96mL,9.96mmol),将混合物加热回流4小时。将反应后混合物冷却至室温,通过加入0.1N HCl酸化至pH4。将该混合物在蒸馏水(40mL)和乙酸乙酯(100mL)中分配,分离有机层,用饱和的盐水(15mL)清洗,无水硫酸钠干燥,然后过滤,得到的滤液经真空蒸馏得到3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酸(2.90g,98%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ 7.35(s,2H),4.18-4.29(m,6H),3.81-3.88(m,6H),3.73(m,6H),3.65-3.68(m,12H),3.38(m,6H);<sup>13</sup>C NMR(125MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ 170.9,152.4,143.3,124.0,109.6,72.5,70.9(3),70.8(3),70.6,70.1(3),69.8(2),68.9(2),50.7(3)。

[0167] 2-6.合成化学式13所示4-(氨基甲基)苯甲酸甲酯化合物

[0168] 室温下,将4-(氨基甲基)苯甲酸(1.0g,6.61mmol)和三甲基氯硅烷(3.35mL,26.44mmol)的混合物搅拌30分钟,向其中加入无水甲醇(20mL)。反应混合物搅拌48小时,然后真空蒸馏得到4-(氨基甲基)苯甲酸甲酯(1.25g,94%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,D<sub>2</sub>O) $\delta$ 8.02(d,2H,J=6.4Hz),7.51(d,2H,J=8.2Hz),4.20(s,2H),3.88(s,3H)。

[0169] 2-7.合成化学式14所示4-((3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸甲酯化合物

[0170] 室温下,向化学式12所示3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酸(1.29g,2.01mmol)溶解于二氯甲烷(10mL)的溶液中依次加入化学式13所示4-(氨基甲基)苯甲酸甲酯(810mg,4.02mmol)、三乙胺(1.17mL,8.4mmol)和EDAC(770.6mg,4.02mmol)。室温下搅拌反应混合物36小时后,向其中加入乙酸乙酯(100mL),用0.5N HCl(20mL)酸化所得,然后通过引入蒸馏水(20mL)来分离有机层。用饱和的盐水(10mL)清洗有机层,无水硫酸钠干燥,然后过滤,得到的滤液作真空蒸馏。所得残留物经硅胶柱层析纯化(己烷/乙酸乙酯/甲醇(4:4:1))得到4-((3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸甲酯(941mg,60%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ 8.01(d,2H,J=8.2Hz),7.40(d,2H,J=8.2Hz),7.08(s,2H),6.57(bs,1H),4.67(d,2H,J=5.5Hz),4.20(m,6H),3.90(s,3H),3.84(m,4H),3.80(t,2H,J=5.0Hz),3.68-3.71(m,6H),3.63-3.65(m,12H),3.33-3.38(m,

6H);  $^{13}\text{C}$  NMR(125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 166.9(2), 152.6(2), 143.6, 141.8, 130.1(2), 129.4, 129.3, 127.7(2), 107.3(2), 72.4, 70.8(3), 70.7(3), 70.6, 70.1, 70.0(2), 69.8(2), 69.2(2), 52.2, 50.7(3), 43.8。

[0171] 2-8. 合成化学式15所示4-((3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸化合物

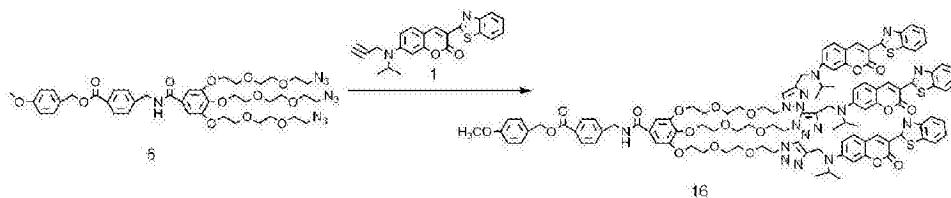
[0172] 室温下,向化学式14所示4-((3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸甲酯(930mg, 1.17mmol)溶解于THF(10mL)的溶液中加入LiOH(1M)(7.02mL, 7.02mmol),然后将混合物在相同温度下搅拌4小时。利用0.1N HCl酸化反应后混合物, pH降低至4。将该混合物在蒸馏水(30mL)和乙酸乙酯(100mL)中分配。分离有机层,用饱和的盐水(15mL)清洗,无水硫酸钠干燥,然后过滤,得到的滤液经真空蒸馏得到4-((3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸(897mg, 99%)。  $^1\text{H}$  NMR(500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 8.04(d, 2H, J=8.2Hz), 7.42(d, 2H, J=8.2Hz), 7.10(s, 2H), 6.65(bs, 1H), 4.68(d, 2H, J=4.6Hz), 4.22(m, 6H), 3.85(t, 4H, J=4.6Hz), 3.80(t, 2H, J=5.0Hz), 3.70-3.71(m, 6H), 3.63-3.66(m, 12H), 3.33-3.38(m, 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR(125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 170.3, 167.1, 152.6(2), 144.4, 141.8, 130.6(2), 129.2, 128.6, 127.7(2), 107.4(2), 72.4, 70.8(3), 70.7(3), 70.6, 70.1, 70.0(2), 69.8(2), 69.2(2), 50.7(3), 43.8。

[0173] 2-9. 合成化学式5所示4-甲氧基苄基4-((3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸酯化合物

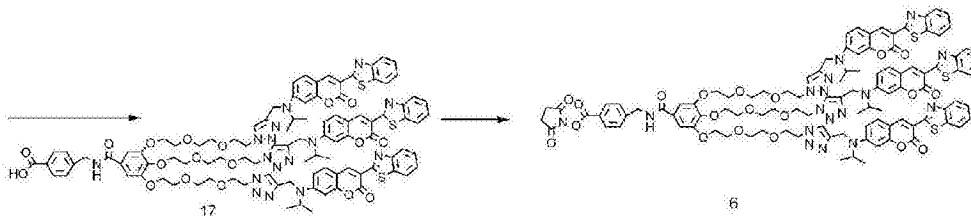
[0174] 向化学式15所示4-((3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸(800mg, 1.03mmol)溶解于DMF(8mL)的溶液中依次加入对-甲氧基苄基溴(0.22mL, 1.54mmol)和碳酸氢钠(346.1mg, 4.12mmol),然后搅拌混合物10小时。将反应后混合物在蒸馏水(50mL)和乙酸乙酯(100mL)中分配,然后分离有机层。分离的有机层用饱和的盐水(10mL)清洗,无水硫酸钠干燥,然后过滤,真空蒸馏得到的滤液。所得残留物经硅胶柱层析纯化(己烷/乙酸乙酯/甲醇(6:6:1))得到4-甲氧基苄基4-((3,4,5-三(2-(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸酯(755.8mg, 82%)。  $^1\text{H}$  NMR(500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 8.02(d, 2H, J=8.7Hz), 7.37(t, 4H, J=8.2Hz), 7.07(s, 2H), 6.90(m, 2H), 6.59(t, 1H, J=5.9Hz), 5.28(s, 2H), 4.65(d, 2H, J=5.9Hz), 4.19(t, 6H, J=5.0Hz), 3.84(t, 4H, J=5.0Hz), 3.80(s, 3H), 3.79(m, 2H), 3.69-3.71(m, 6H), 3.62-3.65(m, 12H), 3.32-3.37(m, 6H)。

[0175]  $^{13}\text{C}$  NMR(125MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 166.9, 166.3, 159.7, 152.6(2), 143.7, 141.7, 130.2(2), 130.1(2), 129.5, 129.3, 128.1, 127.7(2), 114.0(2), 107.3(2), 72.4, 70.8(3), 70.7(3), 70.6, 70.1, 70.0(2), 69.8(2), 69.2(2), 66.6, 55.3, 50.7(3), 43.8。

[0176] 实施例3:合成化学式6所示香豆素树枝状大分子多荧光物质的琥珀酰亚胺酯(香豆素-三分子荧光物质)



[0177]



[0178] 香豆素树枝状大分子多荧光物质的琥珀酰亚胺酯的合成过程如下所示。

[0179] 3-1. 合成化学式16所示4-甲氧基苄基4-((3,4,5-三(2-(2-((4-(((3-(苯并[d]噻唑-2-基)-2-氧代-2H-色烯-7-基)(异丙基)氨基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)甲氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸酯化合物

[0180] 室温下,将化学式1所示3-(苯并[d]噻唑-2-基)-7-(异丙基(丙-2-炔基)氨基)-2H-色烯-2-酮(164.7mg, 0.44mmol)化合物和化学式5所示4-甲氧基苄基4-((3,4,5-三(2-(2-叠氨基乙氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸酯(100mg, 0.11mmol)化合物与二氯甲烷(2mL)和蒸馏水(1mL)混合,向其中加入CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O(4.2mg, 15μmol)和抗坏血酸钠(9.9mg, 45μmol),然后将混合物搅拌8小时。将反应后混合物在蒸馏水(30mL)和二氯甲烷(50mL)中分配,并分离有机层。有机层用饱和的盐水(10mL)清洗,无水硫酸钠干燥,过滤,真空蒸馏得到的滤液。所得残留物经硅胶柱层析纯化(氯仿/甲醇(20:1))得到4-甲氧基苄基4-((3,4,5-三(2-(2-((4-(((3-(苯并[d]噻唑-2-基)-2-氧代-2H-色烯-7-基)(异丙基)氨基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)甲氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸酯(130.4mg, 60%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz), CDCl<sub>3</sub>) δ9.17(s, 3H), 8.06(d, 2H, J=7.3Hz), 7.86(d, 3H, J=7.8Hz), 7.76(d, 3H, J=7.7Hz), 7.48(m, 4H), 7.35-7.39(m, 9H), 7.30(d, 3H, J=7.8Hz), 7.18(s, 2H), 6.89(d, 2H, J=8.7Hz), 6.71(d, 3H, J=7.8Hz), 6.58(s, 3H), 5.22(s, 2H), 4.47-4.61(m, 14H), 4.23(m, 3H), 4.01-4.03(m, 6H), 3.79(m, 9H), 3.62(m, 6H), 3.48-3.52(m, 12H), 1.25(d, 18H, J=6.4Hz)。

[0181] 3-2. 合成化学式17所示4-((3,4,5-三(2-(2-((4-(((3-(苯并[d]噻唑-2-基)-2-氧代-2H-色烯-7-基)(异丙基)氨基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)甲氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸化合物

[0182] 室温下,向化学式16所示4-甲氧基苄基4-((3,4,5-三(2-(2-((4-(((3-(苯并[d]噻唑-2-基)-2-氧代-2H-色烯-7-基)(异丙基)氨基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)甲氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸酯(120mg, 0.06mmol)溶解于二氯甲烷(2mL)的溶液中加入三氟乙酸(1mL),相同温度下搅拌该混合物36小时。在对反应后混合物进行真空蒸馏同时加入乙醇(10mL),以除去三氟乙酸。该真空蒸馏重复6次得到4-((3,4,5-三(2-(2-((4-(((3-(苯并[d]噻唑-2-基)-2-氧代-2H-色烯-7-基)(异丙基)氨基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)甲氧基)乙氧基)乙氧基)苯甲酰胺基)甲基)苯甲酸(105.7mg, 95%),该产物无需进一步纯化即可立即用于下一步反应。

[0183] 3-3.合成化学式6所示2,5-二氧代吡咯烷-1-基4-((3,4,5-三(2-(2-((4-((3-(苯并[d]噻唑-2-基)-2-氧代-2H-色烯-7-基)(异丙基)氨基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)甲氧基)乙氧基)乙氧基)苯并酰胺基)甲基)苯甲酸酯化合物

[0184] 0℃,向化学式17所示4-((3,4,5-三(2-(2-((4-((3-(苯并[d]噻唑-2-基)-2-氧代-2H-色烯-7-基)(异丙基)氨基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)甲氧基)乙氧基)乙氧基)苯并酰胺基)甲基)苯甲酸(100mg,0.053mmol)化合物溶解于二氯甲烷(2mL)的溶液中依次加入N-羟基琥珀酰亚胺(243.9mg,2.12mmol)和EDAC(406.4mg,2.12mmol),混合物在室温下搅拌过夜。将反应后混合物在二氯甲烷(20mL)和蒸馏水(20mL)中分配后,用饱和的盐水(10mL)清洗分离的有机层,无水硫酸钠干燥,然后过滤,真空蒸馏得到的滤液。所得残留物经硅胶柱层析纯化(氯仿/甲醇(20:1))得到2,5-二氧代吡咯烷-1-基4-((3,4,5-三(2-(2-((4-((3-(苯并[d]噻唑-2-基)-2-氧代-2H-色烯-7-基)(异丙基)氨基)甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基)甲氧基)乙氧基)乙氧基)苯并酰胺基)甲基)苯甲酸酯(96mg,92%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,CDCl<sub>3</sub>)δ10.04(s,3H),8.32(d,2H,J=8.2Hz),8.11(d,3H,J=9.6Hz),7.93(d,4H,J=7.3Hz),7.74(d,3H,J=7.3Hz),7.45-7.60(m,9H),7.37(m,3H),6.82(m,3H),6.65(s,3H),4.53-4.70(m,14H),4.34(m,3H),4.01-4.13(m,6H),3.82(m,9H),3.65(m,6H),3.52(m,12H),2.91(s,4H),1.25(d,18H,J=6.4Hz)。

[0185] 实施例4:分析香豆素多荧光物质(香豆素-三分子荧光物质)的最佳波长

[0186] 分析了合成香豆素多荧光物质的最佳激发和光发射波长。将香豆素多荧光物质溶解于浓度为1mg/ml的DMSO溶液,分析光发射和激发光谱。分析结果显示香豆素多荧光物质(香豆素-三分子荧光物质)的激发波长为455nm,光发射波长为512nm,如图2所示。

[0187] 实施例5:通过荧光-连接免疫吸附测定(FLISA)分析香豆素-三分子荧光物质-抗体偶联产物的最佳合成条件

[0188] 将0.5ml(0.5mg/ml)单克隆抗体(maI-D2H)与0.5ml0.1M NaHCO<sub>3</sub>(pH9.2)缓冲溶液混合以形成合适的pH,室温下稳定该混合物4小时。以浓度梯度的方式混合1ml混合液与香豆素-三分子荧光物质,结果是实施例3所制备的香豆素-三分子荧光物质(1mg/ml)的摩尔数是各自抗体的10倍(66μl)、8倍(53μl)、6倍(40μl)和4倍(26μl),并且通过在4℃将它们反应10小时来诱发偶联。在反应溶液中,通过透析除去未反应的荧光物质分子,并纯化荧光物质-抗体偶联产物。通过检测蛋白质浓度来测量洗脱液的抗体-荧光物质偶联产物的浓度。

[0189] 为确立最佳偶联条件,利用纯化的香豆素-三分子荧光物质-抗体偶联产物对普通患者和疟疾感染患者进行荧光连接免疫吸附测定。将单克隆抗体(maI-D7E)与碳酸盐缓冲溶液(碳酸盐/碳酸氢盐包被缓冲液)混合,将0.5μg或1μg抗体置于FLISA的96-孔黑色板的各孔中,4℃下固定18小时。用磷酸缓冲溶液(PBS,0.1%吐温-20)清洗所得平板,用封闭缓冲液处理,所得在37℃下反应1小时。用磷酸缓冲溶液(PBS,0.1%吐温-20)清洗所得平板,将预先制备的间日疟原虫(Pv)患者和普通患者的各2μl血液与200μl磷酸缓冲溶液(PBS)混合(1:100稀释),然后置于各板孔中,混合物在37℃下反应1小时。用磷酸缓冲溶液(PBS,0.1%吐温-20)清洗所得平板,向其中加入100μl的各荧光物质-抗体(maI-D2H)偶联产物(10当量、8当量、6当量、4当量),所得在37℃下反应1小时。用磷酸缓冲溶液(PBS,0.1%吐温-20)清洗所得平板后,采用激发波长(激发460nm,带宽20nm)和光发射波长(发射505nm,带宽10nm)测量荧光。通过分析荧光强度(相对荧光)来分析单克隆抗体-荧光物质偶联产物的最佳偶

联条件。

[0190] 如图3所示,香豆素-三分子荧光物质-抗体偶联产物对疟疾抗原表现出高反应活性;具体地说,当偶联是6x当量,并且1 $\mu$ g抗体(maI-D7E)包被在孔上时,普通患者和疟疾感染患者几乎完全不同。

[0191] 实施例6:分析香豆素多荧光物质-单克隆抗体偶联产物的最佳波长

[0192] 采用实施例4所述的方法分析香豆素多荧光物质偶联于单克隆抗体时的最佳光发射和激发光谱。如实施例5所示,在抗体的6x当量下进行偶联。如图4所示,从荧光物质-抗体偶联产物的最佳光谱的分析结果可知,光激发波长未变,然而,发射波长显著改变为590nm(图4)。

[0193] 实施例7:评估荧光连接免疫吸附测定在荧光物质-抗体的最佳波长下的临床有用性

[0194] 在荧光物质-抗体偶联产物的最佳光发射波长下,利用患者血液进行荧光连接免疫吸附测定(FLISA)可用来评估单克隆抗体-荧光物质偶联产物反应活性的临床有用性。将单克隆抗体(maI-D7E)与碳酸盐缓冲溶液(碳酸盐/碳酸氢盐包被缓冲液)混合,将1 $\mu$ g抗体置于FLISA的96-孔黑色板的各孔中,4 $^{\circ}$ C下固定18小时。用磷酸缓冲溶液(PBS,0.1%吐温-20)清洗所得平板,用200 $\mu$ l封闭缓冲液处理,所得在37 $^{\circ}$ C下反应1小时。用磷酸缓冲溶液(PBS,0.1%吐温-20)清洗所得平板后,将制备的间日疟原虫(Pv)患者、恶性疟原虫(Pf)患者和普通患者的各2 $\mu$ l血液与200 $\mu$ l磷酸缓冲溶液(PBS)混合(1:100稀释),然后置于各板孔中,混合物在37 $^{\circ}$ C下反应1小时。用磷酸缓冲溶液(PBS,0.1%吐温-20)清洗所得平板,向其中加入100 $\mu$ l的各荧光物质-抗体(maI-D2H)偶联产物(6x当量),所得在37 $^{\circ}$ C下反应1小时。用磷酸缓冲溶液(PBS,0.1%吐温-20)清洗所得平板后,采用激发波长(激发460nm,带宽20nm)和光发射波长(发射505nm,带宽10nm)测量荧光。通过分析疟疾感染患者的血液相对于普通患者血液的单克隆抗体-荧光物质偶联产物的荧光强度(相对荧光)来分析感染状况。

[0195] 香豆素-三分子荧光物质抗体偶联产物对疟疾患者的血液表现出高反应活性(图5)。通过显微镜检查、基因诊断(PCR)和快速诊断试剂盒诊断来确认疟疾感染患者的感染状况,荧光-连接免疫吸附测定的结果是:基于34位普通患者的相对荧光值的平均值,50位间日疟原虫患者、4位恶性疟原虫患者均证实为诊断阳性,因此,获得100%的诊断灵敏度(图5)。

[0196] 34位普通患者样品的相对荧光值经检测为 $2079.5 \pm 628$ (平均值 $\pm$ 标准偏差),因此,在开发诊断用显微荧光定量生物传感器时,该值可用作区分感染阳性和阴性的数量算法(number algorithm)。

[0197] 实施例8:进行快速荧光免疫层析测试(FICT)

[0198] 为验证可用于开发生物传感器以供现场诊断的单克隆抗体-荧光物质偶联产物对于快速荧光免疫吸附测试(FICT)的适用性,进行快速荧光免疫层析测试(FICT)。如图6所示,单克隆抗体(maI-D7E)与磷酸缓冲溶液(磷酸缓冲盐水)混合,将2.0mg/ml浓度的该混合物置于硝酸纤维素膜的测试线位置。将1.5mg/ml浓度的山羊抗小鼠IgG抗体分到对照线区域,然后将该膜在37 $^{\circ}$ C下固定两天。将棉花制成的垫在该膜的顶部区域部分重叠,偶联垫和样本垫部分在底部区域部分重叠,然后装配。

[0199] 将10 $\mu$ l制备的疟疾辅助剂置于样本注射区,另向其中加入100 $\mu$ l样本展开液(磷酸

缓冲溶液,0.1%吐温20,0.02%酪蛋白),从而使得样本在膜相上展开,15分钟后进行读数。对于读数,与条带反应的香豆素吸收激发波长(激发460nm,带宽20nm)的光后,需要在光发射波长(发射560nm,带宽20nm)下检测荧光。然而,在本例中,反应后香豆素的荧光足够强,从而可从外部凭肉眼观察到,因此,单克隆抗体-荧光物质偶联产物对疟疾辅助剂的反应活性可用肉眼观察。

[0200] 如图7所示,香豆素-三分子荧光物质-抗体偶联产物对疟疾抗原表现出高反应活性。换言之,在注射疟疾阴性样本的区域,测试线位置未显示荧光,而在注射疟疾阳性样本的区域,在测试线位置用肉眼即观察到强烈的荧光信号。

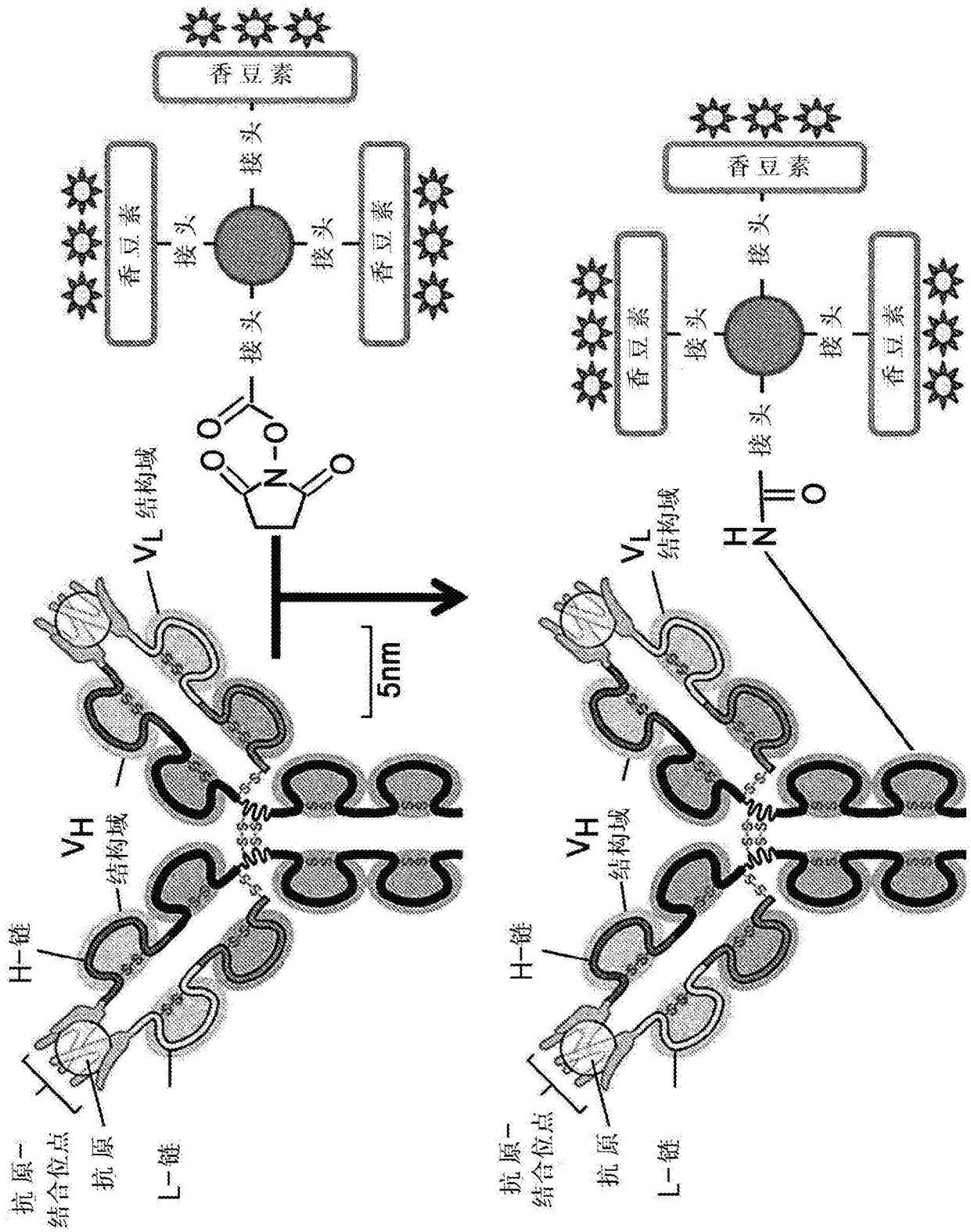


图1

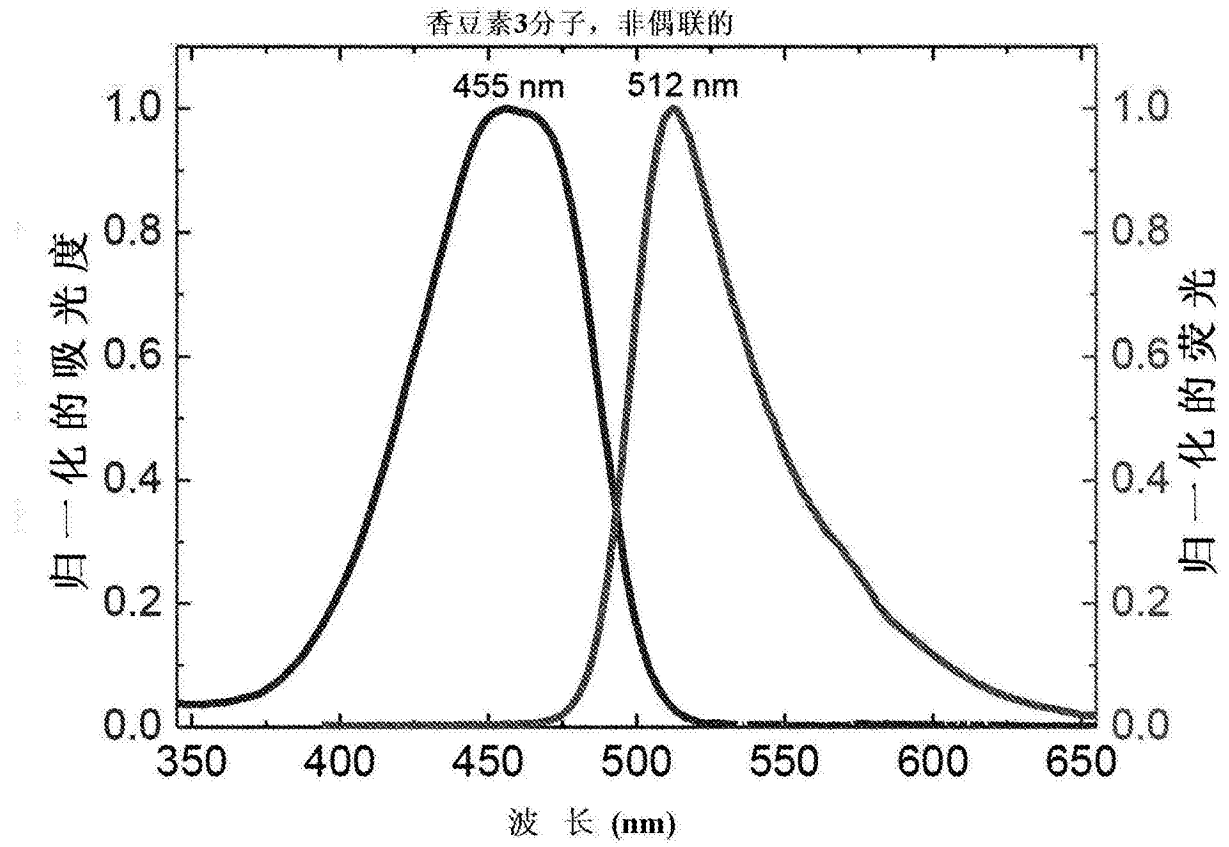


图2

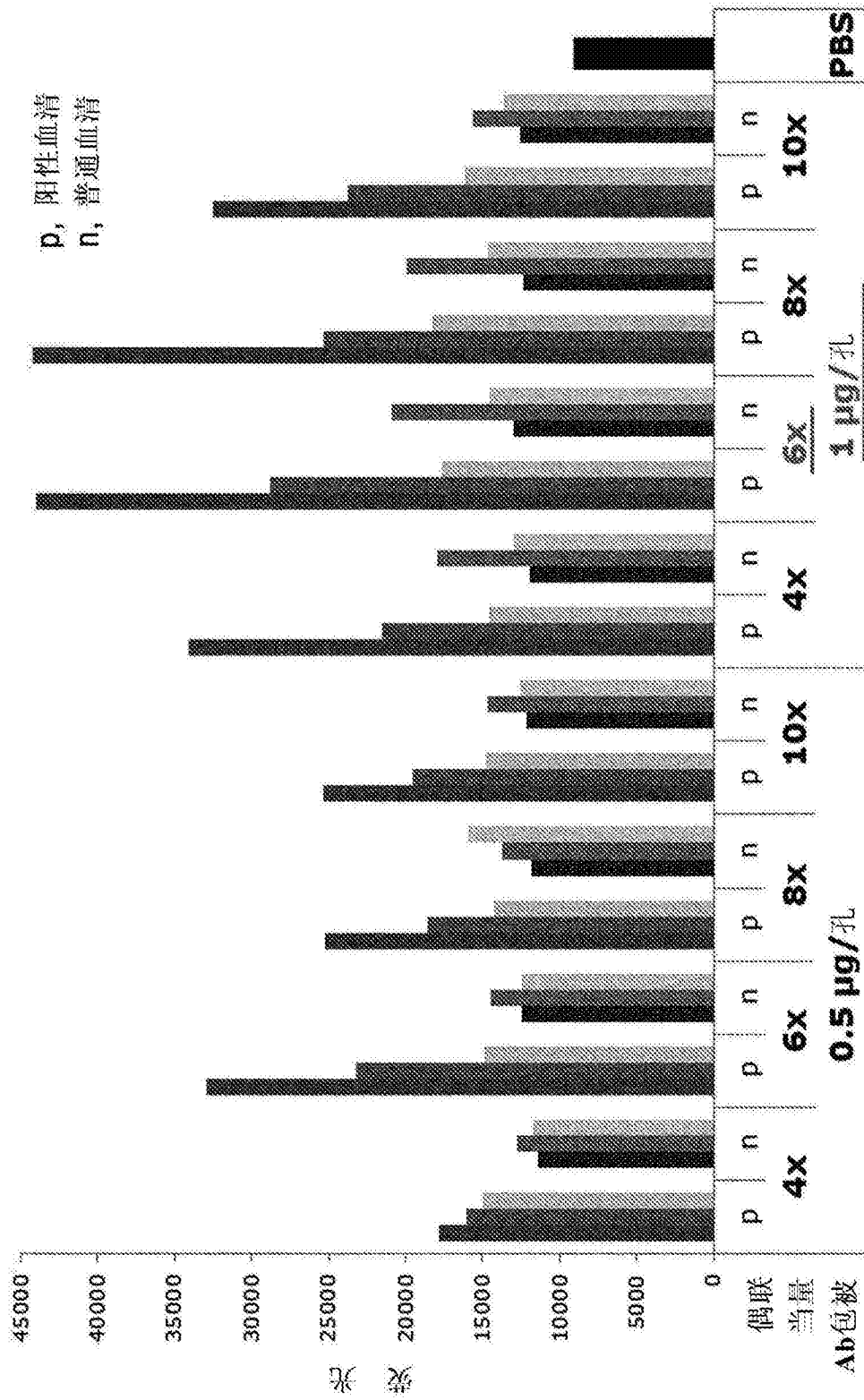


图3

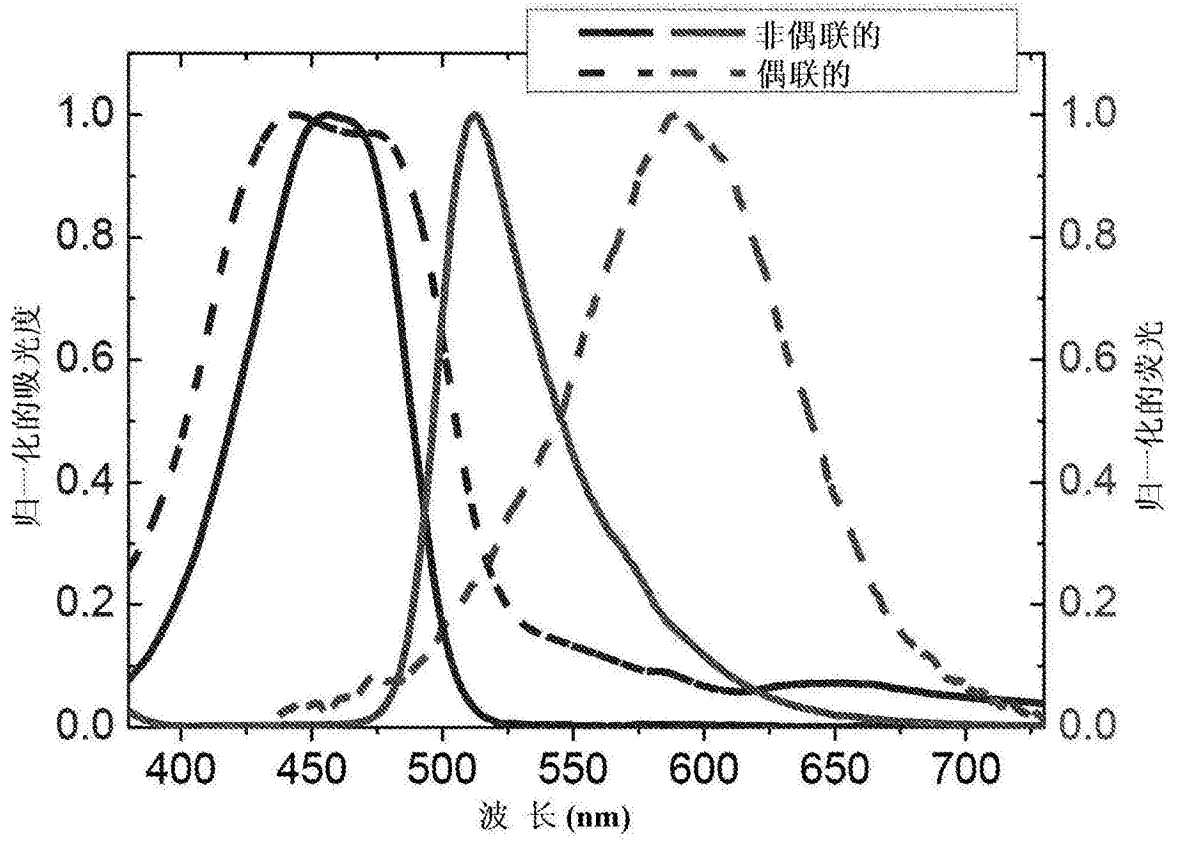


图4

香豆素3分子  
荧光物质-抗体, FLISA

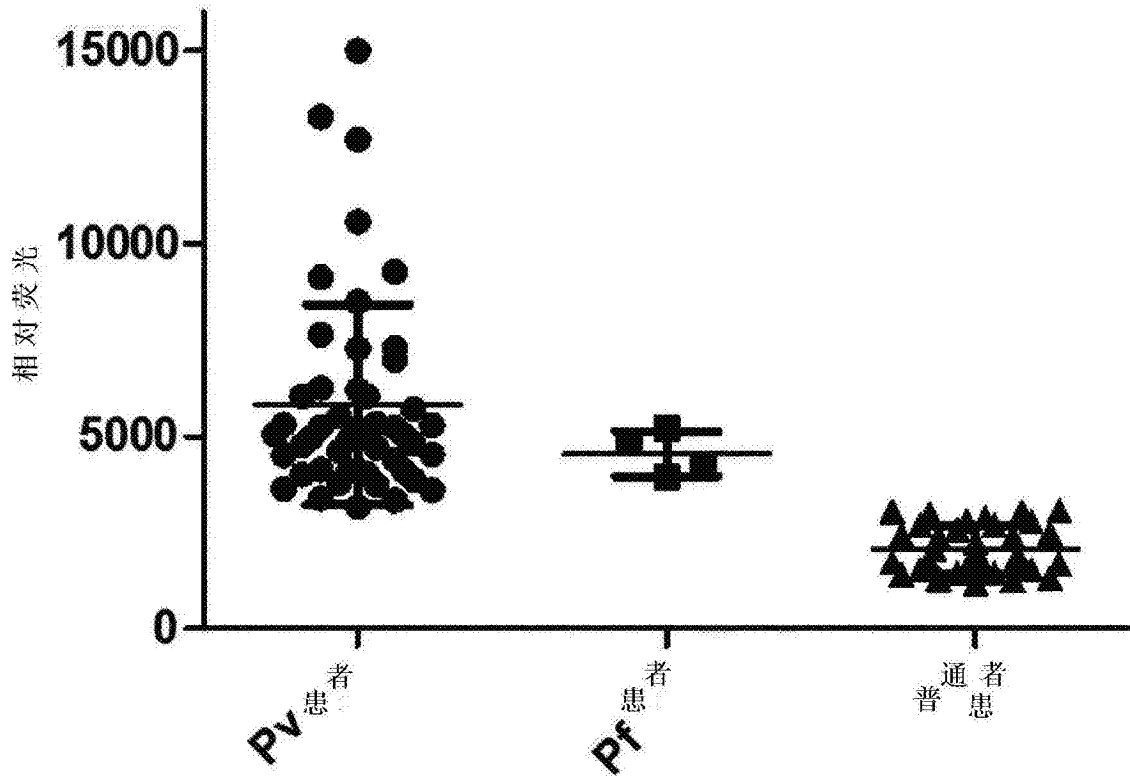


图5

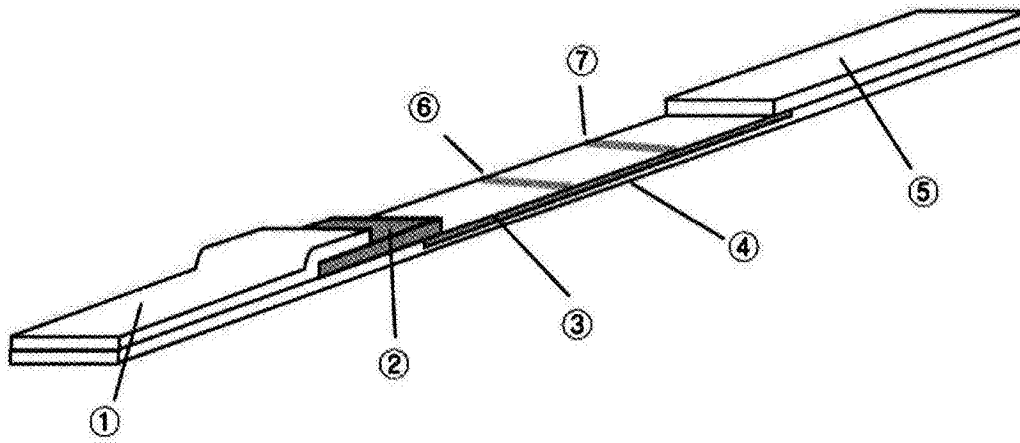


图6

负极 正极  
(-) (+)

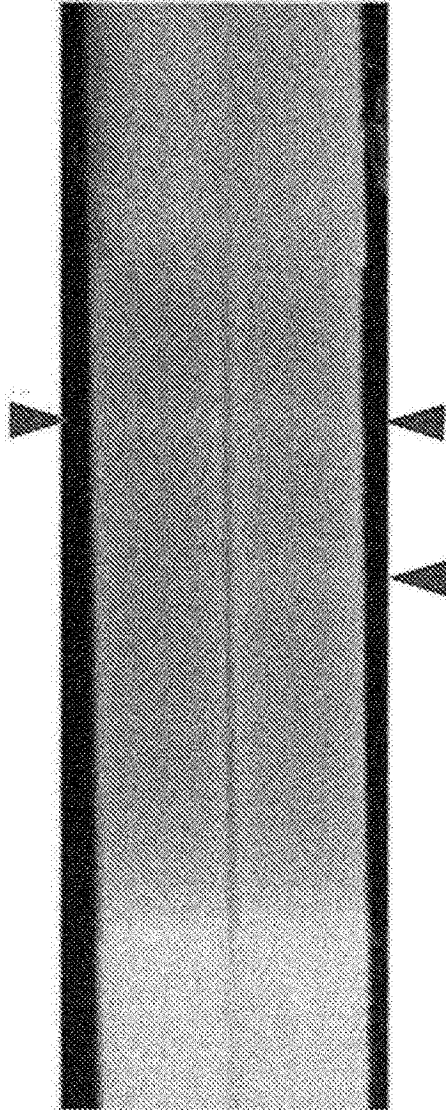


图7

专利名称(译)	含香豆素衍生物的多荧光物质和使用其的诊断用LED光源显微荧光定量生物传感器		
公开(公告)号	<a href="#">CN104203944B</a>	公开(公告)日	2017-03-01
申请号	CN201280049495.6	申请日	2012-03-05
[标]申请(专利权)人(译)	点标生物股份有限公司 北京林特医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	点标生物股份有限公司 北京林特医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	点标生物股份有限公司 北京林特医药科技有限公司		
[标]发明人	朴铉 金学成 宋贤玉 郑点圭 金成妍		
发明人	朴铉 金学成 宋贤玉 郑点圭 金成妍		
IPC分类号	C07D417/04 C07D417/14 G01N33/533 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/582 C07D277/66 C07D417/04 C07D417/14 G01N33/558 G01N33/56905 G01N2333/445 G01N2458/00 Y02A50/58		
代理人(译)	崔佳佳		
审查员(译)	王沙沙		
优先权	1020110101273 2011-10-05 KR		
其他公开文献	CN104203944A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及新型香豆素衍生物，其制备方法和包含多个该香豆素衍生物并能利用LED光源发光的多荧光物质。由于本发明含该新型香豆素衍生物的多荧光物质的最佳发射波长为512nm到590nm，其可利用LED光源发光，因此可改善信号强度和稳定性。与具有香豆素荧光的已知物质相比，由于本发明的具有香豆素荧光的物质中一分子具有多个荧光物质，该具有香豆素荧光的物质还显示高荧光反应。此外，由于能进行荧光检测，即便最少量荧光分子结合抗体，具有香豆素荧光的物质结合于抗体的抗原结合位点的问题得以解决。此外，由于本发明的含新型香豆素衍生物的多荧光物质适用于荧光连接免疫吸附测定(FILISA)和荧光免疫层析测试(FICT)作为诊断用LED显微荧光定量生物传感器，可以快速定量地分析诸如疟疾等疾病。

