

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07C 49/813



[12] 发明专利申请公开说明书

C07C 49/84 C07C233/61

C07C225/22 C07C323/22

C07D233/60 G01N 33/533

[21] 申请号 02819964.2

[43] 公开日 2005 年 1 月 19 日

[11] 公开号 CN 1568298A

[22] 申请日 2002.10.10 [21] 申请号 02819964.2

[30] 优先权

[32] 2001.10.10 [33] JP [31] 312562/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/010511 2002.10.10

[87] 国际公布 WO2003/033447 日 2003.4.24

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.9

[71] 申请人 株式会社日立高新技术

地址 日本东京都

[72] 发明人 斋藤充弘 埃尔诺·普里施

[74] 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

司

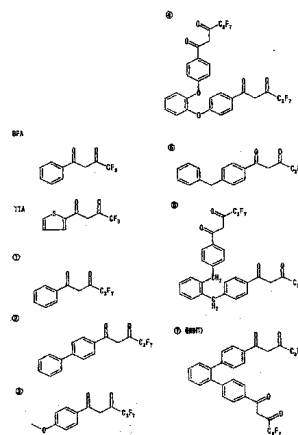
代理人 钟 晶

权利要求书 7 页 说明书 24 页 附图 11 页

[54] 发明名称 发光性化合物及使用它们的标识试剂

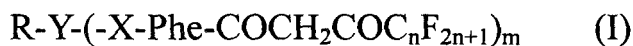
[57] 摘要

本发明涉及一般式(I)表示的化合物： $R - Y - (-X - \text{Phe} - \text{COCH}_2\text{COC}_n\text{F}_{2n+1})_m$ (I) (式中 R 是 H、烷基、苯基或能够结合蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的基团，Y 是 CH_2 、碳化或杂环，X 是 O、S、NH、 CH_2 、 OCH_2 、CONH 或 NHCO，Phe 是亚苯基，n 是 1~5 的整数，m 是 1、2 或 3)；含有上述化合物和稀土离子的发光络合物；含有上述的化合物或发光络合物的标识试剂；及使用上述标识试剂的蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的标识方法。



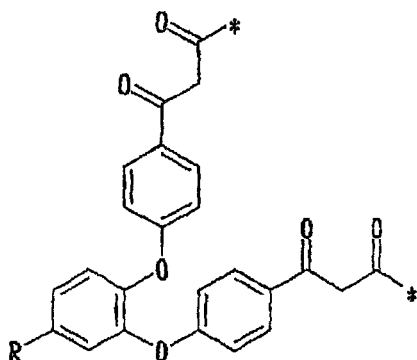
* TTA: 4,4,4-三氟-1-(2-萘基)-1,2-丁二醇
* BFA: 4,4,4-三氟-1-萘基-1,2-丁二醇
* BHTT: 4,4'-二(1',1',1',2',2',2'-六氟-4'-氧-5'-基)-0-三聚苯

1. 一种一般式(I)表示的化合物:



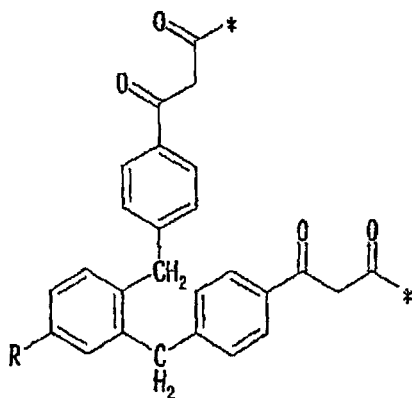
(式中 R 是氢、烷基、苯基或能够结合蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的基团; Y 是 CH₂、碳环或杂环; X 是 O、S、NH、CH₂、OCH₂、CONH 或 NHCO; Phe 是亚苯基; n 是 1~5 的整数; m 是 1, 2 或 3)

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 用下述一般式(1)表示:



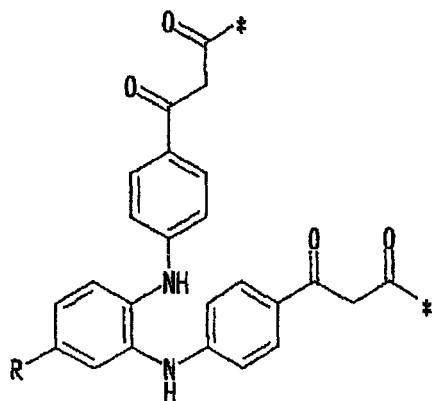
(式中*是 C_nF_{2n+1}(这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求 1 的定义相同)

3. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 用下述一般式(2)表示:



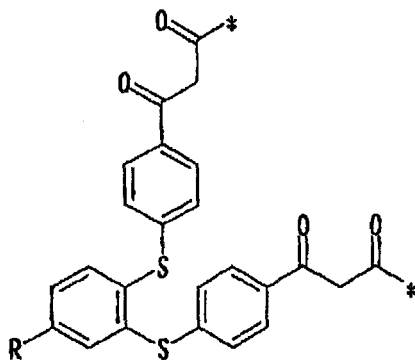
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求 1 的定义相同)

4. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 用下述一般式(3)表示:



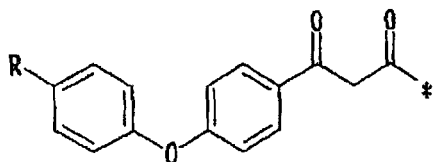
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求 1 的定义相同)

5. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 用下述一般式(4)表示:



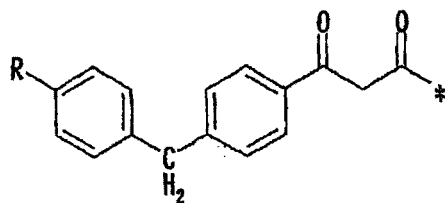
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求 1 的定义相同)

6. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 用下述一般式(5)表示:



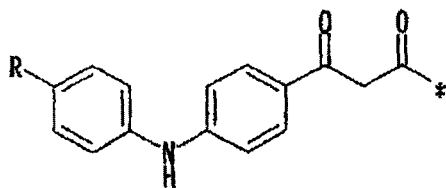
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求 1 的定义相同)

7. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 用下述一般式(6)表示:



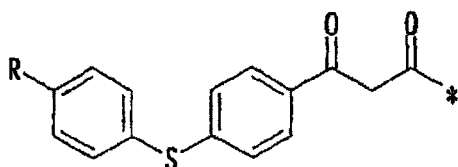
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求 1 的定义相同)

8. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 用下述一般式(7)表示:



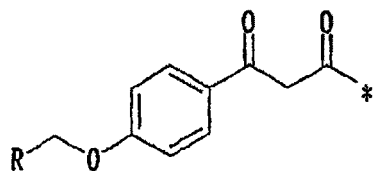
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求 1 的定义相同)

9. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 用下述一般式(8)表示:



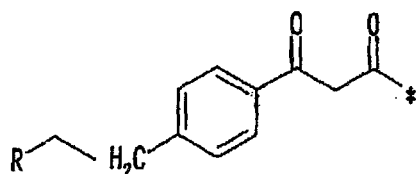
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求 1 的定义相同)

10. 根据权利要求1所述的化合物,其特征在于,用下述一般式(9)表示:



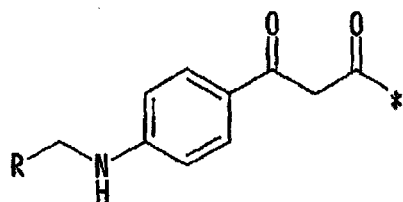
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求1的定义相同)

11. 根据权利要求1所述的化合物,其特征在于,用下述一般式(10)表示:



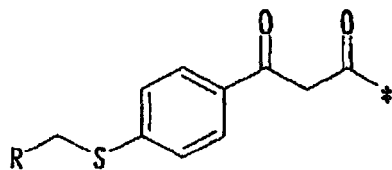
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求1的定义相同)

12. 根据权利要求1所述的化合物,其特征在于,用下述一般式(11)表示:



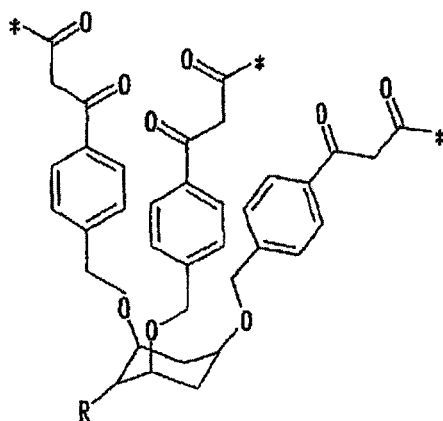
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求1的定义相同)

13. 根据权利要求1所述的化合物,其特征在于,用下述一般式(12)表示:



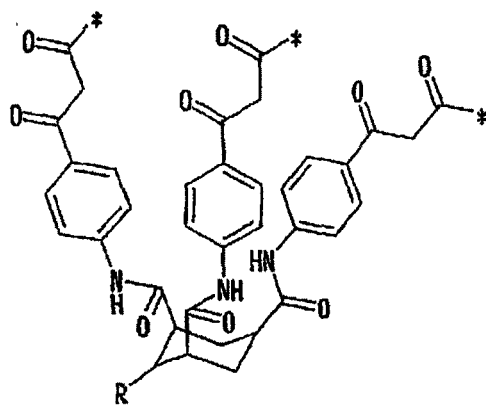
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求 1 的定义相同)

14. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 用下述一般式(13)表示:



(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和权利要求 1 的定义相同)

15. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 用下述一般式(14)表示:



-OSO₂-C₆H₄-CH₃; R^A 选自烷基、链烯基、芳基、芳烷基; R^B 选自亚烷基、亚芳基、亚芳烷基; p 是 0~5; q 是 2~10; n 是 1~20)

18. 含有权利要求 1~17 中任何一项记载的化合物和稀土离子的荧光性络合物。

19. 含有权利要求 1~17 中任何一项记载的化合物或权利要求 18 中记载的荧光性络合物的标识试剂。

20. 用于免疫测定或核酸检测的权利要求 19 中记载的标识试剂。

21. 使用权利要求 19 或 20 中记载的标识试剂的蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的标识方法。

发光性化合物及使用它们的标识试剂

技术领域

本发明涉及适于核酸检测法、免疫测定法和化学发光分析法中使用的时间分解荧光测定法、延迟磷光测定法或能量转移荧光检测法的标识试剂的化合物,特别是涉及在配位金属离子形成络合物时,能够产生荧光、延迟荧光或磷光的化合物。

背景技术

免疫测定法或核酸检测法根据包括可见的及放射活性测量的许多方法进行其测定,荧光体或荧光色素标识物的荧光强度测定因为其简单被广泛采用。该方法的实用性在于处于和激发光波长不同的波长区域的荧光或发光产生时,能够准确地将其检测出来,但是由于荧光或发光会在短时间内消失,因此存在的问题是:存在激发光的发生和荧光或发光的测定几乎被同时进行,由激发光产生的噪声被测定,背景高。

荧光或发光波长的峰和激发光波长峰比较在长波长区域的多,使用波长选择滤波器从激发光中分离出荧光或发光对其进行测定。激发光波长和发光或荧光波长的波长差一般称为斯托克斯频移,如果荧光测定中斯托克斯频移小,通过波长差准确地分离激发光和荧光或发光是困难的。

对于若丹明或荧光素等的荧光色素,其荧光的波长分布区域广,得到宽的荧光波形。在假设使用几个荧光体或荧光色素同时测定几个物质的场合,由于荧光波长区域叠加难以对各物质进行测定,为了得到各物质的量,必须适用换算式进行算法解析。

作为激发光不对发光产生干涉的方法,有时使用包括电化学发光法,化学发光法的化学发光法。其中,由于激发光没有照射到标识体或标识色素,因而可以仅测定发光。标识异鲁米诺或丙烯酸(ジウムウムエステル)测定对象物质的方法可以构筑高灵敏度测量体系,该高灵敏度测量体系是利用标识物质是酶并采用在基质中发生发光反应的过氧化物酶和

鲁米诺的反应,或者利用金刚烷基 1,2-二氧六环芳基磷酸酯(AMPPD)和碱性磷酸酯酶的反应。

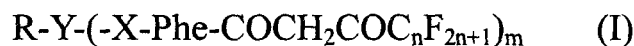
近年来,利用铈或钐等的稀土元素和它们的配位体、络合物的荧光或磷光消光时间长,开发了优越的时间分解荧光或磷光测定法。由于荧光或磷光的消光时间长、斯托克斯频移大以及荧光或磷光峰波形窄,因此不含有激发光产生的噪声,可以检测荧光或磷光的信号,提供高灵敏度的分析方法。通过氙闪光灯或激光等用脉冲照射激发光,激发光的装置或其它物质的荧光经过消失的时间以后,是所需的荧光或磷光的测定方法。由于配位体改良的进展,报道了化合物 4,7-二(氯磺酰基苯基)-1,10-菲咯啉-2,9-二羧酸(BCPDA)或 4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己烷二酮-6-基)氯磺酰基-邻-三联苯(BHHCT)。BHHCT 例如公开于特开平 9-241233 公报。虽然这些是优良的螯合物,但是仍然不能在免疫测定或核酸检测法中给出足够的最小检测灵敏度。

发明内容

本发明的目的是围绕在核酸检测法、免疫测定法和化学发光分析法中使用的时间分解荧光测定法、延迟磷光测定法或能量转移荧光检测法的标识试剂,提供可以高灵敏度地测定样品中的目标物质的有用的标识试剂,以及用于该标识试剂的化合物。

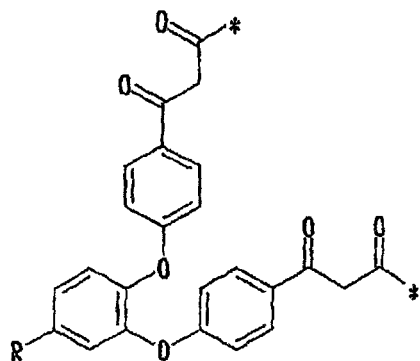
本发明包括以下的发明:

(1) 一般式(I)表示的化合物:



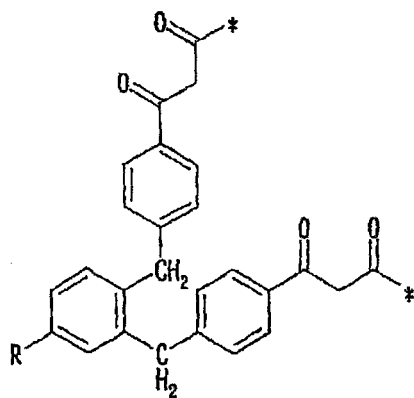
(式中 R 是氢、烷基、苯基或能够结合蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的基团; Y 是 CH₂、碳环或杂环; X 是 O、S、NH、CH₂、OCH₂、CONH 或 NHCO; Phe 是亚苯基; n 是 1~5 的整数; m 是 1, 2 或 3)

(2) 一般式(1)表示的上述 (1)中记载的化合物:



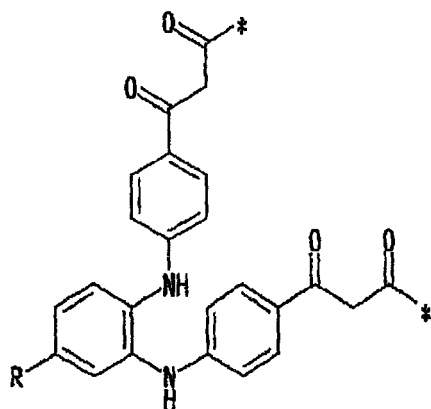
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(3) 一般式(2)表示的上述 (1)中记载的化合物:



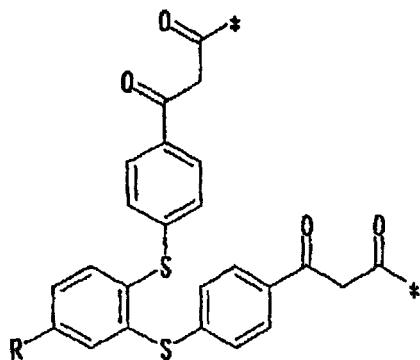
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(4) 一般式(3)表示的上述(1)中记载的化合物:



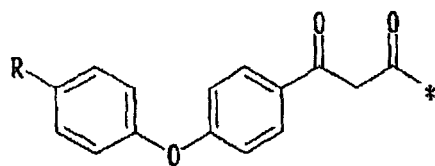
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(5) 一般式(4)表示的上述(1)中记载的化合物:



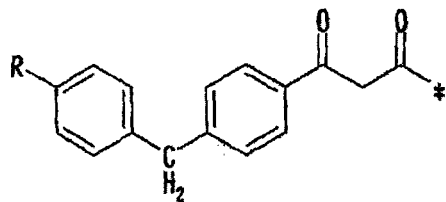
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(6) 一般式(5)表示的上述(1)中记载的化合物:



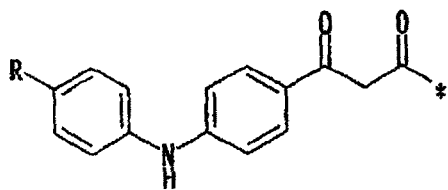
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(7) 一般式(6)表示的上述(1)中记载的化合物:



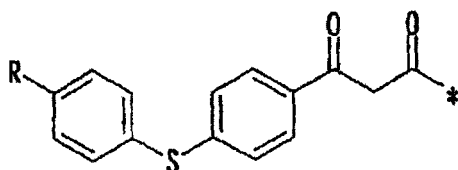
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(8) 一般式(7)表示的上述(1)中记载的化合物:



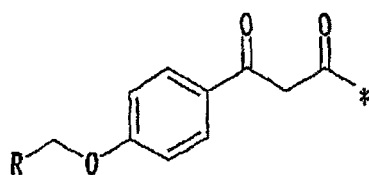
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(9) 一般式(8)表示的上述(1)中记载的化合物:



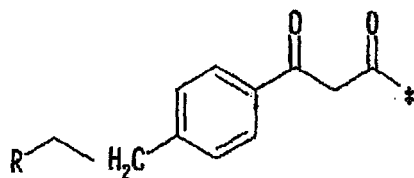
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(10) 一般式(9)表示的上述(1)中记载的化合物:



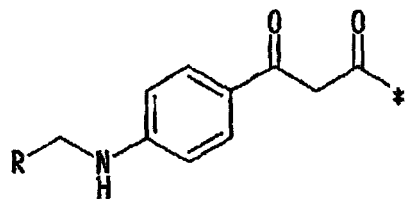
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(11) 一般式(10)表示的上述(1)中记载的化合物:



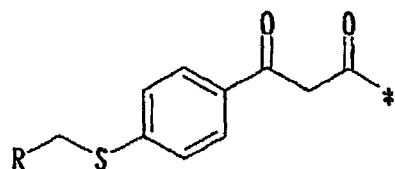
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(12) 一般式(11)表示的上述(1)中记载的化合物:



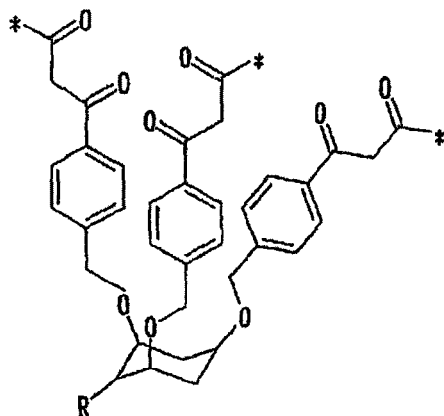
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(13) 一般式(12)表示的上述(1)中记载的化合物:



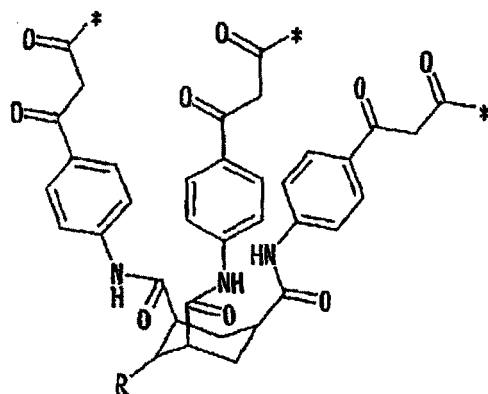
(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(14) 一般式(13)表示的上述(1)中记载的化合物:



(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

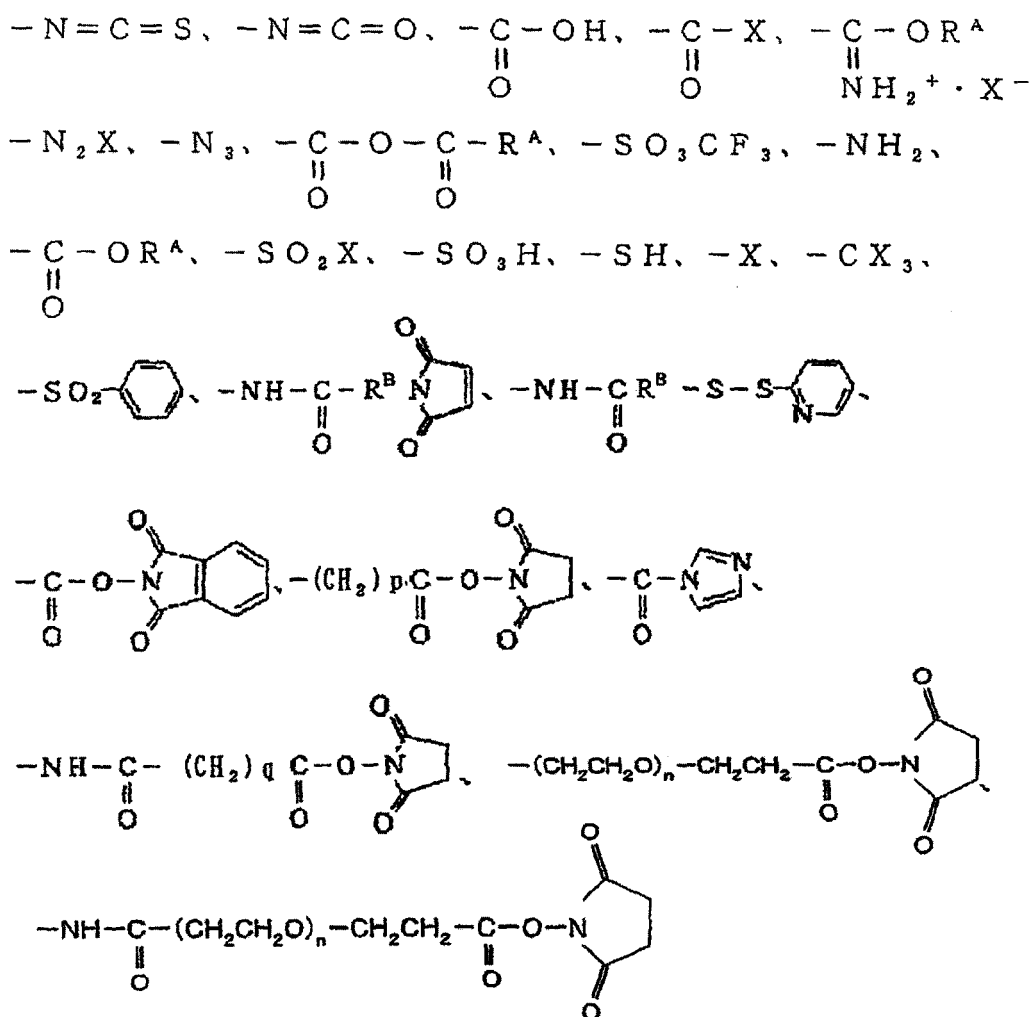
(15) 一般式(14)表示的上述(1)中记载的化合物:




(式中*是 C_nF_{2n+1} (这里, n 是 1~5 的整数); R 和上述(1)的定义相同)

(16) 上述(1)~(15)任何一项记载的化合物, 其中, R 是能够结合蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的官能团结合到可以在链原子中含有选自氧、氮和硫中的至少一个杂原子的碳链构成的间隔基团末端形成的基团。

(17) 上述(1)~(16)任何一项记载的化合物, 其中, R 具有下式表示的至少一个官能团:



(但是, X 选自卤化物原子、 $-\text{OSO}_3\text{CH}_3$ 、 $-\text{OSO}_2\text{F}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{C}_4\text{F}_9$ 、 $-\text{OSO}_2$ ; R^{A} 选自烷基、链烯基、芳基、芳烷基; R^{B} 选自亚烷基、亚芳基、亚芳烷基; p 是 0~5; q 是 2~10; n 是 1~20)

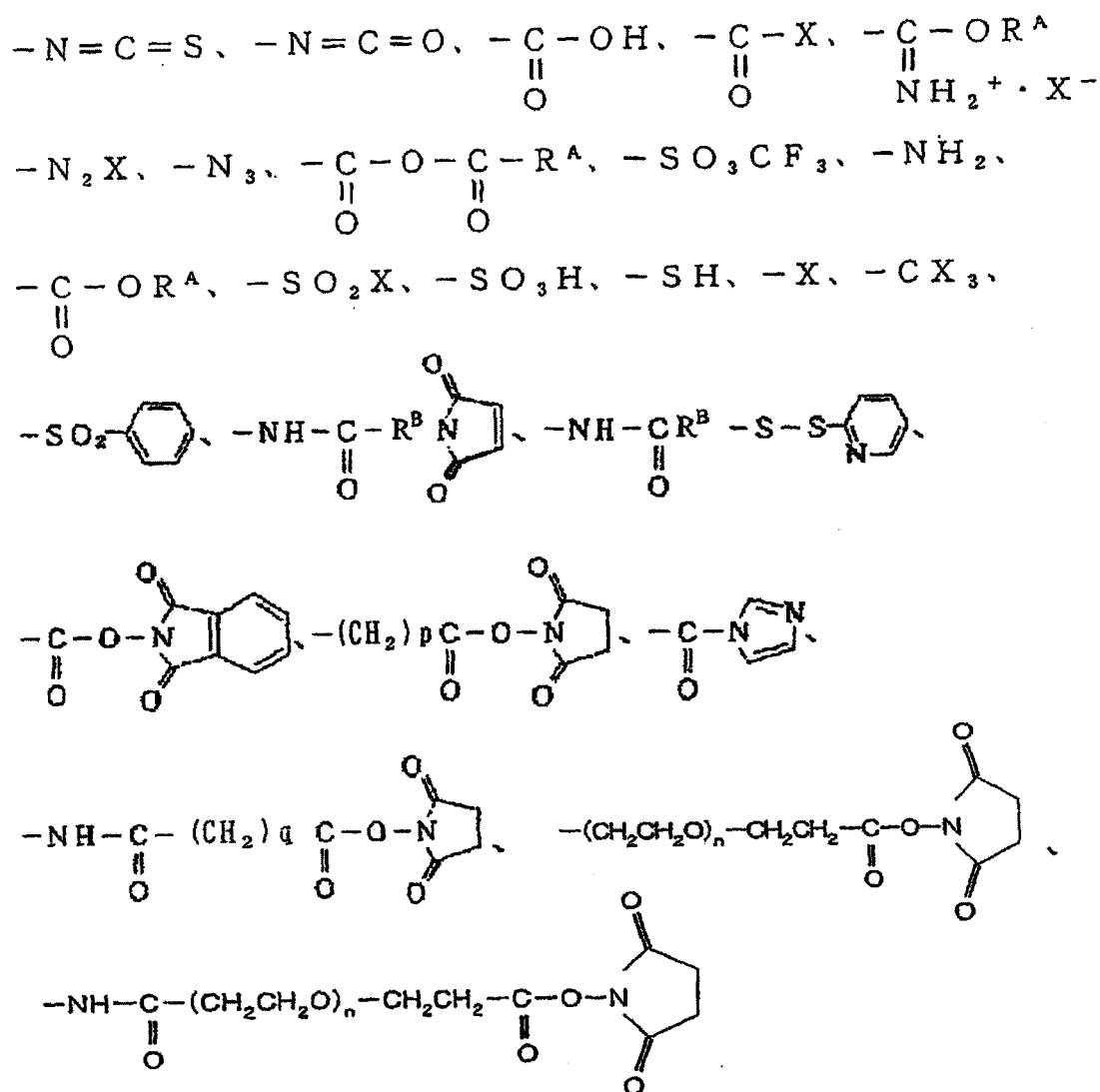
(18) 含有上述(1)~(17)中任何一项记载的化合物和稀土离子的荧光性络合物。

(19) 含有上述(1)~(17)中任何一项记载的化合物或上述(18)中记载的荧光性络合物的标识试剂。

(20) 用于免疫测定或核酸检测的上述(19)中记载的标识试剂。

(21) 使用上述(19)或(20)中记载的标识试剂的蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的标识方法。

在上述式(I)中 R 是氢、烷基、苯基或能够结合蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的基团。这里对于“可以结合蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的基团”, 只要是可以结合蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱中存在的氨基、羧基、巯基、羟基中的任何一个的基团, 没有特别的限制, 例如可以列举出具有用下式表示的至少一个官能团的基团:



(但是, X 选自卤化物原子、 $-\text{OSO}_3\text{CH}_3$ 、 $-\text{OSO}_2\text{F}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{C}_4\text{F}_9$ 、 $-\text{OSO}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$; R^{A} 选自烷基、链烯基、芳基、芳烷基; R^{B} 选自亚烷基、亚芳基、亚芳烷基; p 是 0~5; q 是 2~10; n 是 1~20)

上述式中, 作为用 X 表示的卤化物原子 (卤原子), 可以举出氟、氯、溴或碘; 作为用 R^{A} 表示的烷基, 例如可以举出碳原子数 1~6 的烷基 (例如甲基、乙基); 作为链烯基, 例如可以举出碳原子数 2~6 的链烯基 (例如乙烯基、丙烯基); 作为芳基, 例如可以举出苯基、萘基; 作为芳烷基, 例如可以举出苄基、苯乙基和萘甲基。作为用 R^{B} 表示的亚烷基, 例如可以举出碳原子数 1~6 的亚烷基 (例如 $-(\text{CH}_2)_n-$, n 是 1~6 的整

数); 作为亚芳基, 例如可以举出亚苯基、亚萘基; 作为亚芳烷基, 例如可以举出 $-\text{Ar}-(\text{CH}_2)_n-$ (这里 Ar 是亚苯基、亚萘基; n 是 1~6 的整数)。

在 R 是可以结合蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的基团的情况, 作为 R 结合对象的蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱, 没有特别的限制, 例如可以举出抗体类、标识抗体类、抗原类、生物素、卵白素、链抗生物素蛋白、牛血清白蛋白、半抗原、激素、多肽、多核苷酸。

作为用 Y 表示的碳环, 例如可以举出可以被取代的芳香族单环烃环 (例如苯环), 由可以被取代饱和单环烃组成的 3~8 元环 (例如环己烷环), 由可以被取代不饱和单环烃组成的 4~8 元环 (例如环己烯环、1, 3-环戊二烯环), 可以被取代的缩合多环烃环 (例如萘环、菲环、芴环), 烃环集合 (联苯、三联苯、菲环、芴环)。

作为用 Y 表示的杂环, 例如可以举出可以被取代的芳香族杂单环 (例如噻吩), 可以被取代的 3~8 元饱和杂单环 (例如四氢呋喃), 可以被取代的不饱和杂单环 (例如吡咯), 可以被取代的缩合杂环 (例如苯并噻吩、二苯并噻吩、苯并呋喃、二苯并呋喃)。

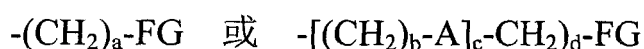
作为用 Phe 表示的亚苯基优选 1, 4-亚苯基。

作为本发明使用的稀土离子, 优选镧系元素离子, 例如可以举出镧 (Eu)、钐 (Sm)、铽 (Tb)、镝 (Dy) 等的离子。

含金属元素的螯合物的分子大小是较小的, 但在肽、氨基酸、特别是蛋白质或碱链的标识中, 通过以碳为主的链 (间隔基团) 有时有利于标识。蛋白质或碱链多数有复杂的 3 次结构, 对标识体具有的官能团的结合位置有时在结构的内部。在对它们标识时, 使用间隔基团是有效的。

作为上述间隔基, 例如可以使用在链原子中可以含有选自氧、氮及硫中的至少一个杂原子的碳链构成的间隔基团。

作为具有上述间隔基团的 R 的具体例可以举出:



(式中 a 是 1~40 的整数, b 是 1~20 的整数, c 是 1~10 的整数, d 是 0~20 的整数, A 是氧(O)、氮(N)或硫(S), FG 是官能团)

荧光是从第一激发态向基态迁移时产生的发光, 通过自旋多重度不同的状态间的迁移产生磷光。以往, 和重金属离子配位的络合物试剂有

具有 β -二酮结构的标识试剂和具有芳香族基团的标识试剂。对于酚酞不能观测到荧光和磷光，可是具有-O-(氧)桥的荧光素显示有强的荧光和磷光。另外，虽然吡啶也不能观测到荧光和磷光，但是具有一个苯环的喹啉可以观测到荧光和磷光。

在想加强荧光或磷光强度的情况，同时具有芳香族基团和-O-(氧)、并且稳定、合成收率还高的物质是有效的。

在免疫测定或核酸检测法中，将固相作为其反应平台，在固相上形成抗原抗体反应物、DNA或RNA杂交反应产物，对其进行测定。标识体或标识色素预先结合抗原、抗体、DNA或RNA构成反应生成物，或者利用卵白素和生物素的反应，在最后结合反应物，开始测定。

本发明的化合物及标识试剂具有 β -二酮结构和芳香基，而且在用Phe表示的亚苯基和用Y表示的 CH_2 、碳环和杂环之间存在用X表示O、S、NH、 CH_2 、 OCH_2 、CONH或NHCO，这样在桥接以镧为例的稀土元素的 β -二酮部位，其可移动区域变大，从而可以更有效地保持稀土类离子。这样，稀土类离子会更准确地配位到 β -二酮部位，其结果是，当被合适的激发光照射时，能够准确产生荧光或磷光。

本发明的化合物及标识试剂，如上述，由于在用Phe表示的亚苯基和用Y表示的碳环或杂环之间放置有用X表示的O、S、NH、 CH_2 、 OCH_2 、CONH或NHCO，所以芳香族基团(亚苯基)和碳环或杂环没有连接，亲水性没有受到很大损害，能够生成有效的螯合物。

另外，本发明的化合物及标识试剂通过用Phe表示的亚苯基和用Y表示的碳环或杂环之间放置有用X表示的O、S、NH、 CH_2 、 OCH_2 、CONH或NHCO，在 $\text{C}_n\text{F}_{2n+1}$ (在这里，n是1~5的整数)和 β -二酮部位相对的位置很难被它们的电子吸引作用所影响，容易导入活性基团。其结果是，能够更有效地得到与氨基酸、肽、蛋白质、核酸的结合体。

同样，本发明的化合物及标识试剂通过用Phe表示的亚苯基和用Y表示的碳环或杂环之间放置有用X表示的O、S、NH、 CH_2 、 OCH_2 、CONH或NHCO，在和以活性基团为媒介的氨基酸、肽、蛋白质、核酸或塑料粒子等的固相载体进行结合时，在 β -二酮部位难以受到它们的影响，能够更有效地保持稀土类离子。这样，稀土类离子能够准确地配位到 β -二酮

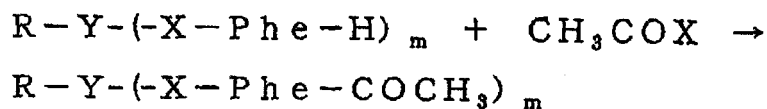
部位上，其结果是，当被合适的激发光照射时，能够准确产生荧光或磷光。

而且，对于本发明的标识试剂及化合物，要是在 R 中使用间隔基团，R 的基团更容易结合到蛋白质或碱链上，其结果是，能够增加每 1 分子被标识体的标识体标记数。

本发明的化合物例如可以按照以下方法制造。

制造方法 1

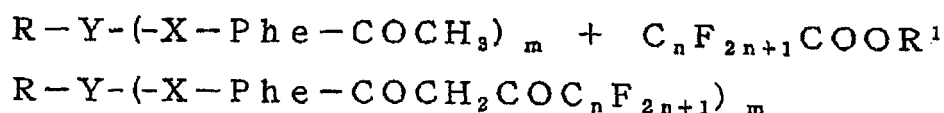
第 1 步骤



(式中 X 是卤原子，例如氯原子，R、Y、X 及 Phe 和上述式(I)定义相同)

该反应是所谓的付瑞德-克莱福特反应，可以按照常规方法进行。作为溶剂，可以使用二氯甲烷、氯仿等，在氯化铝等的路易斯酸存在下进行反应。

第 2 步骤



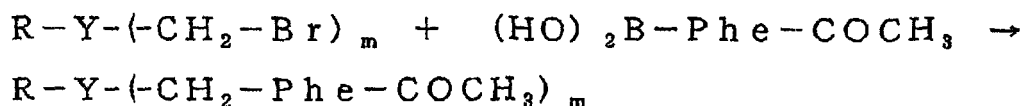
(式中 R¹ 是低级烷基，例如甲基、乙基，R、Y、X、Phe、n 和 m 与上述式(I)定义相同)

该反应是酮化合物和酯化合物的缩合反应，可以按照常规方法进行。作为溶剂，可以使用环己烷、正己烷、二乙醚等，在氢化钠、金属醇化物等存在下进行反应。

制造方法 2

这种制造方法是 X 为 CH₂ 时的制造方法。

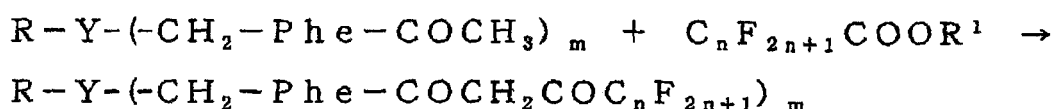
第 1 步骤



(式中 R、Y、Phe 和 m 与上述式(I)定义相同)

该反应在四氢呋喃-水的混合溶剂等溶剂中进行，在 PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂ (dppf=1, 1'-二(二苯基膦)二茂铁)的存在下进行反应。

第 2 步骤



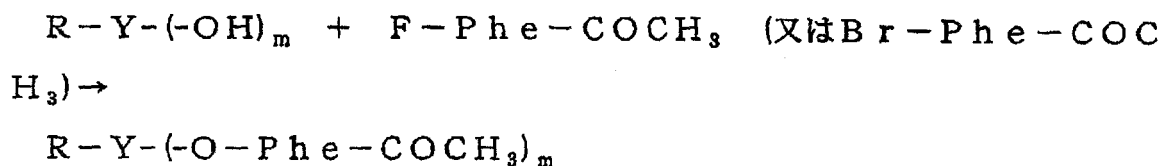
(式中 R¹ 是低级烷基，例如甲基、乙基，R、Y、Phe、n 和 m 与上述式(I)定义相同)

该反应可以和制造方法 1 的第 2 步骤同样地进行。

制造方法 3

该制造方法是 X 为 O 时的制造方法。

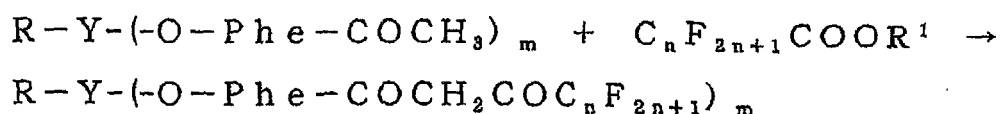
第 1 步骤



(式中 R、Y、Phe 和 m 与上述式(I)定义相同)

该反应是在溶剂中加入 K₂CO₃、NaOH 或 NaH 等下进行。

第 2 步骤



(式中 R^1 是低级烷基, 例如甲基、乙基, R 、 Y 、 Phe 、 n 和 m 与上述式(I)定义相同)

该反应可以和制造方法 1 的第 2 步骤同样地进行。

通过上述得到的化合物作为标识试剂, 可以用于蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的标识, 或者在塑料粒子等的载体表面固化使用, 而且还可以内封于具有微脂粒等的中空封闭体中使用。

使用本发明化合物的标识反应, 可以根据该化合物中的官能团和蛋白质、核酸中的官能团的关系选择适当的反应进行。例如, 可以通过本发明化合物中的氯磺酰基、羧基和蛋白质中的氨基形成酰胺的反应来进行标识反应。在室温下这种形成酰胺的反应在碳酸缓冲液、Tris-HCl 缓冲液(pH=9.0~9.5)中容易进行反应。

作为使用本发明标识试剂的免疫测定法, 例如可以举出利用时间分解荧光免疫测定法、抗原抗体反应的特别结合试验。这里, 时间分解荧光免疫测定法是指在使用长寿命的荧光标识体(E-螯合物), 短寿命的背景荧光消失以后, 仅对标识体的荧光信号进行时间分解荧光测定的高灵敏度的荧光免疫测定法。特别结合试验是指利用抗原抗体反应的免疫测定, 利用受体·接受体的结合反应的试验, 利用核酸的杂交的试验等。

附图说明

图 1 表示实施例 1 的化合物(b)的凝胶色谱分析数据;

图 2 表示实施例 2 的化合物(b)的 HPLC 分析数据;

图 3 表示实施例 2 的化合物(b)的 NMR 光谱分析数据;

图 4 表示实施例 2 的化合物(b)的 TOF/MS 光谱分析数据;

图 5 表示实施例 5~7 中使用的本发明的化合物和它的 β -二酮(1,3-二酮)化合物;

图 6 是表示使用时间分解测定装置中的本发明化合物的荧光信号、荧光分光计激发光谱的最大激发波长以及分光光度计吸收光谱的最大吸收波长的一览表和图;

图 7 表示本发明的化合物的荧光衰减曲线;

图 8 表示使用本发明的化合物作为标识体的 α -检甲胎蛋白试剂

(AFP)的标准曲线;

图 9 是使用本发明化合物的 1 例, 显示本发明的特征;

图 10 表示本发明的销标识的牛血清白蛋白(BSA)的标准曲线;

图 11 表示本发明的热 C 反应性蛋白(CRP)的测定结果。

具体实施方式

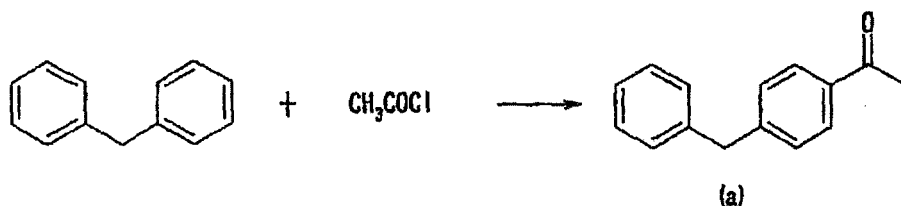
下面用实施例说明本发明, 但是这些实施例并不以任何方式限制本发明的范围。

实施例 1

以下是用一般式(6)表示的化合物的合成方法的 1 例。

第 1 步骤

以下是第 1 步骤:



材料

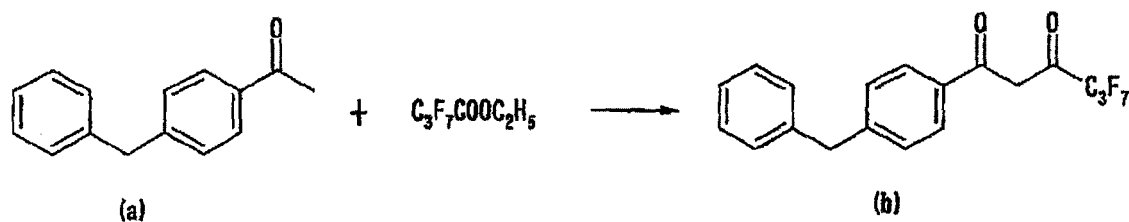
- | | |
|------------|-------|
| (1)无水氯化铝: | 2.18g |
| (2)无水二氯甲烷: | 35mL |
| (3)乙酰氯: | 1.29g |
| (4)二苯基甲烷: | 2.5g |

合成方法

在烧瓶中加入(1)和(2), 冷却到 0℃。再加入材料(3), 在冷却条件下慢慢滴加材料(4)的二氯甲烷溶液 15 mL, 室温下搅拌 2 小时。往混合物中加入 15 g 左右的冰, 再加入 1 当量浓度盐酸溶液 20mL, 溶解析出的氧化铝, 分离有机层。水层用 20mL 二氯甲烷萃取 3 次。混合有机层, 水洗, 加入无水硫酸镁, 在减压条件下馏去溶剂, 残留物用硅胶色谱法精制(溶剂: 正己烷:乙酸乙酯=3:2), 得到化合物(a)。(收率 96%)

第 2 步骤

以下是第 2 步骤:



材料

- | | |
|-------------------------|-------|
| (1)氢化钠(60% 油分散): | 60mg |
| (2)无水环己烷: | 5mL |
| (3) $C_3F_7COOC_2H_5$: | 460mg |
| (4)化合物(a): | 200mg |

合成方法

在烧瓶中加入材料(1)和(2),一边加热搅拌一边加入材料(3)和材料(4)的环己烷溶液 3mL, 再在室温下搅拌 30 分钟。往混合物中加入 15 %的乙酸水溶液, 加入到冰水 10 mL 中。通过分液漏斗分离有机层, 水层用 20mL 乙醚萃取 3 次。混合有机层, 再水洗, 加入无水硫酸镁干燥, 在减压条件下馏去溶剂, 残留物用硅胶色谱法精制(溶剂 正己烷:乙酸乙酯 =3:2), 得到淡黄色化合物(b)。(收率 99%)

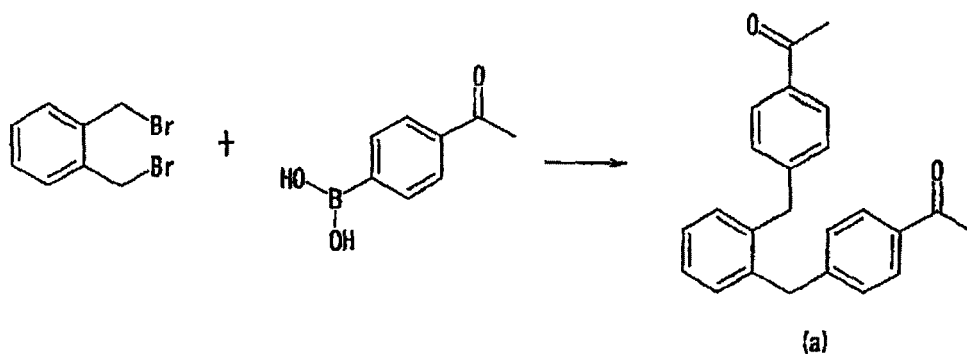
化合物(b)的凝胶色谱分析数据表示在图 1 中。另外, 用 TOF/MS 光谱分析确认 m/z 406。

实施例 2

以下是用一般式(2)表示的化合物的合成方法的 1 例。

第 1 步骤

以下是第 1 步骤:



材料

- (1) 1, 2-二(溴甲基)苯: 5.0g
 (2) 4-乙酰基苯基硼酸: 13.6 g
 (3) 四氢呋喃(THF): 50mL 和 5 mL 蒸馏水的混合液
 (4) 碳酸铯: 18.5g
 (5) PdCl₂(dppf) · CH₂Cl₂: 1.5 g (dppf=1, 1'-二(二苯基膦)二茂铁)

反应温度: 70℃

反应时间: 1 天

合成方法

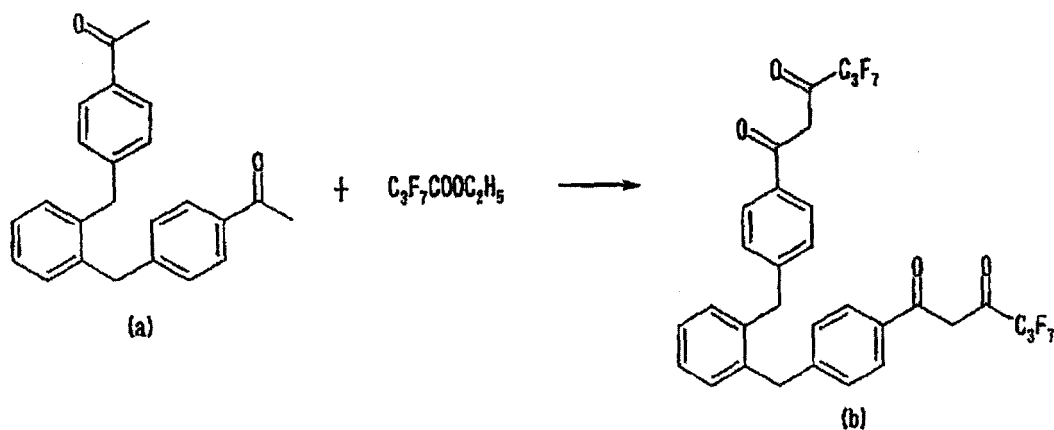
在反应容器中混合材料(1)、(2)、(3)和(4), 在 70℃ 加热搅拌。30 分钟后, 加入材料(5)。24 小时后, 停止加热, 将反应溶液加入到 60 mL 蒸馏水中, 用 80 mL 氯仿萃取。依次用 5% 盐酸水溶液 40 mL 和蒸馏水 40 mL 洗涤有机层, 用硫酸镁干燥。减压馏去溶剂得到 6 g 粗产物。用硅胶色谱法分离精制后, 用凝胶色谱分离精制, 得到 1.0 g 化合物 (a)。(HPLC 纯度 99%, 收率 15%)

¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 2.56 (6H, s), 3.96 (4H, s), 7.10-7.15 (6H, m), 7.3-7.27 (2H, m), 7.81-7.84 (4H, m)

MS (MALDI TOF) m/z 344 (M+H⁺)

第 2 步骤

以下是第 2 步骤:



材料

- | | |
|-------------------------|--------|
| (1) 化合物 (a): | 300mg |
| (2) $C_3F_7COOC_2H_5$: | 440 mg |
| (3) 脱水乙醚: | 12 mL |
| (4) 甲醇钠: | 99mg |

反应温度: 室温

反应时间: 1 天

合成方法

在反应容器中混合材料(1)、(2)、(3)和(4)。24 小时以后, 加入 10% 硫酸水溶液 12mL。搅拌 15 分钟后, 减压馏去有机层, 过滤析出的结晶。充分水洗后, 将结晶投入到 10 mL 乙醇中, 加热搅拌。减压馏去乙醇至 5 mL 左右, 加入石油醚 20 mL, 加热搅拌。过滤不溶物, 馏去溶剂得到 300 mg 化合物(b)。用凝胶色谱法精制, 得到化合物(b)100 mg。

MS(MALDI TOF) m/z 735($M+H^+$)

化合物(b)的 HPLC 分析数据表示在图 2 中, 化合物(b)的 NMR 分析数据表示在图 3 中, 化合物(b)的 TOF/MS 光谱分析数据表示在图 4 中。

实施例 3

以下是用一般式(1)表示的化合物的合成方法的 1 例。

第 1 步骤

以下是第 1 步骤:

合成方法

将材料(1)和(2) 混合冷却, 加入材料(3)。再滴加材料(4)的乙醚溶液 10mL。冷却 1 小时搅拌后, 加入乙醚用稀盐酸调节到 pH4, 用水、饱和食盐水依次洗涤。用无水硫酸钠干燥, 在减压条件下除去溶剂, 得到红褐色的膏状物 3.87 g。用湿柱精制(溶剂 己烷:乙酸乙酯=4:1), 得到红褐色的膏状物 2.69g。

实施例 4

准备含有本发明化合物的发光性化合物。另外 TTA(4,4,4-三氟-1-(2-噻吩基)-1,3-丁烷二酮)和 BFA(4,4,4-三氟-1-苯基-1,3-丁烷二酮)由(株)同人化学研究所购入, BHHT(4,4'-二(1'',1'',1'',2'',2'',3'',3''-七氟-4'',6''-己烷二酮-6''-基)-O-三联苯)的合成参考特开平 9-241233 及 Yuan & Matsumoto(*Analytical Chemistry*,1998,70,596-601)。

它们的化学结构式表示在图 5 中。

实施例 5

将含有本发明化合物的图 5 中的化合物溶解于乙腈(和光纯药制造)中,达到 10^{-4} mol/mL 或 10^{-5} mol/mL,再以 10 倍等级稀释至 10^{-10} mol/mL。使用其 10^{-7} mol/mL 的溶液,用分光光度计(日立ハイテクノロジーズ制造)进行吸收光谱分析。进而,将化合物的 10^{-10} mol/mL 溶液和含 0.2mM 的氯化铕 6 水合物($\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 和光纯药制造)、0.2 mM TOPO(三正辛基磷氧化物, 同仁化学研究所)、1%三硝基甲苯 X-100(シグマ制造)的水溶液以 1:9 混合,在 42°C 培养 2 小时。将其 0.1 mL 分别注于 96 槽平底微培养皿(Nunc 制造)的槽中,用时间分解测定装置(日立ハイテクノロジーズ制造)照射 340nm 附近的激发光,测定通过激发光照射从 0.2 微秒后到 0.8 微秒具有 615nm 附近波长的荧光。进而,使用同样的溶液,用荧光分光计 F-4010(日立ハイテクノロジーズ制造)进行激发光谱分析。

其结果表示在图 6。对于化合物 4,在时间分解测定装置中显示最高的信号强度,在荧光光谱分析和吸收光谱分析中峰强度也最大,从而确认其是作为荧光体的有用的化合物。对于化合物 6,通过在亚苯基和用 Y 表示的碳环之间放置有用 X 表示的 CH_2 ,难以形成跨过 3 个碳环的共轭体系,结果是,被认为可以观察到同化合物 1 的结构的个数对应的信

号。

实施例 6

将实施例 5 的 10^{-11} mol/mL 化合物溶液 0.1 mL 分别注于微培养皿的槽中,用时间分解测定装置照射 340nm 附近的激发光,通过激发光照射在 0.1、0.2、0.3...0.8、0.9 及 1.0 微秒后开始测定,然后将在 0.1 微秒间观察的发光信号各自在图上记下点,用线连接。

结果表示在图 7 中。本发明的化合物具有足够长的荧光持续得到确认。特别是化合物 4,显示出最长的半衰期时间。

实施例 7

α 检甲胎蛋白试剂(AFP)的测定

参考 Yuan & Matsumoto (Analytical Chemistry,1998,70,596-601)。

(1)AFP 抗体的生物素标识(按照 Pierce 社,磺化-NHS-LC-生物素操作说明书)

抗热 AFP 抗体(DACO Immunoglobulins 制造)1mg 用 1mL 磷酸缓冲食盐水中(PBS, pH7.4)溶解。混合磺化-NHS-LC-生物素 0.062mg,在冰浴中静置 2 小时。然后,使用 PD-10 柱(ファルマシア制造),通过 PBS 洗提出抗体部分,除去未结合的磺化-NHS-LC-生物素。生物素标识抗体液中加入的叠氮化钠至 0.1%,在 4°C 保存。

(2)实施例 4 的化合物的氯磺酰基的导入

每 0.1mmol 图 5 的化合物加 0.2mL 氯代硫酸(和光纯药制造),在室温搅拌 7 小时以后,将反应溶液滴加到搅拌下的纯水(冰浴)4mL 中。离心分离生成的沉淀,用纯水洗涤 3 次。然后真空干燥沉淀 45 小时。

(3)化合物的链霉卵白素标识

将 10^{-5} mmol 链霉卵白素(SA, Chemicon International 制造)溶解在 0.1M 的碳酸缓冲液(pH9.1)4mL 中。将 10^{-3} mmol 上述(2)的化合物溶解在 40 μL 乙醇中,滴加到 SA 液中。混合液在室温搅拌 1 小时后,用 0.05% 的叠氮化钠加 0.1M 碳酸氢钠水溶液充分透析。透析后,用 1M HCl 调整 pH 为 6.8 且总量为 6mL,加 BSA 至 0.1%。再将其用含有 10^{-7} M $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1% BSA、0.1%叠氮化钠的 0.05M tris-HCl 缓冲液(pH7.8)稀释 300 倍,在 56°C 加热 2 小时后,用于反应。

(4)抗 AFP 抗体的微培养皿涂层

将用 0.1M 碳酸缓冲液(pH9.6) 稀释至 5 μ g/mL 的抗热 AFP 抗体(日本 バイオテスト研究所制造) 100 μ L 分别注于微培养皿中, 在 4 $^{\circ}$ C 静置一夜进行涂布。然后, 用 0.05%吐温 20 加生理食盐水洗涤, 再加入 1%BSA、2%蔗糖加碳酸缓冲液(pH9.1)100 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 静置。1 小时后, 用 0.05%吐温 20(シグマ制造)加生理食盐水洗涤, 在-20 $^{\circ}$ C 保存。

(5)免疫测定的实施

用 1%BSA 加 PBS 以 10 倍等级稀释热 AFP 标准品(DACO Immunoglobulins 制造), 将其 50 μ L 加入到微培养皿各槽中。在 37 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时后, 用 0.05%吐温 20 加生理食盐水洗涤。然后, 用 1%BSA 加生理食盐水将上述(1)得到的生物素标识抗 AFP 抗体稀释到 1 μ g/mL, 将其 50 μ L 分别注于各槽中。在 37 $^{\circ}$ C 振荡 1 小时, 用 0.05%吐温 20 加生理食盐水洗涤。然后, 将上述(3)的链霉卵白素标识化合物 50 μ L 分别注于各槽中。

在室温静置 30 分钟后, 用 0.05%吐温 20 加生理食盐水洗涤。使用时间分解测定装置对微培养皿测定发光量。

结果表示在图 8 中。由此可知, 本发明化合物可以性能良好地用于免疫测定。特别是化合物 4 描出了良好的标准曲线, 其最小检测灵敏度和同时检测的其它化合物比较是最好的。对于化合物 6 也得到比较好的标准曲线和最小检测灵敏度。虽然在实施例 6 中没有显示大的信号, 但是氯磺酰基活性基团的结合良好, 并且加上 β -二酮部位的镱粒子的捕捉, 其稳定性高, 可以认为在抗原抗体反应中得到相对良好的结果。

在具有一个碳环或杂环的化合物 1、TTA、BFA 的情况, 氯磺酰基活性基团没有结合, 处于 β -二酮部位的镱粒子不能够保持稳定, 结果是得不到抗原抗体反应的信号。

实施例 8

用作为本发明化合物的 1 例的图 5 的化合物 4 进行研究。

通过在亚苯基和用 Y 表示的碳环之间放置有用 X 表示的 O, C_3F_7 及 β -二酮部位和 R 的部位之间的距离大, 由于难以被 C_3F_7 和 β -二酮部位的电子吸引效果影响, 活性基团的导入容易。结果是, 能够更有效

地得到与氨基酸、肽、蛋白质或核酸的结合体。

同样,通过放置有用 X 表示的 O,在与以活性基团为媒介的氨基酸、肽、蛋白质、核酸或塑料粒子等的固相载体进行结合的情况,在 β -二酮部位难以受到它们影响,能够有效并且稳定地保持稀土类离子。这样,稀土类离子更准确地配位到 β -二酮部位,结果是当被照射合适的激发光时,能够准确地发出荧光或磷光。

另外,通过放置有用 X 表示的 O,可以认为形成了 C_3H_7 、 β -二酮部位及同其连接的碳环更柔韧地配置配位基、同时稀土离子更稳定的络合物。

实施例 9

进行图 5 的化合物 4 的 BSA 标识。按照实施例 7(2)导入氯磺酰基。另外,对于标识,参考 Yuan & Matsumoto(*Analytical Chemistry*, 1998, 70, 596-601)。

含有 1.5mg 导入氯磺酰基的化合物 4 的 0.8mL DMF(N,N-二甲基甲酰胺)溶液,搅拌同时加入到含有 2mg BSA 的 0.4mL 0.1M 碳酸缓冲液(pH9.3)中。在室温搅拌后,使用 PD-10 柱,得到由化合物标识的 BSA 部分。这时,将 0.05M 碳酸氢铵水溶液(pH8.0)作为洗提液。

用含有 $10^{-7}M$ $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ 、1%BSA 及 0.1%叠氮化钠的 0.05M tris-HCl 缓冲液(pH7.8)将其稀释,在 $56^\circ C$ 加热 2 小时。

用含有 0.05%吐温 20 和 0.05%的叠氮化钠的 0.1M tris-HCl 缓冲液(pH9.1)将标识的 BSA 以 10 倍等级稀释,用时间分解测定装置测定发光量。结果如图 10 所示,表明本发明化合物能够作为性能良好的标识体使用。

实施例 10

下面以实例说明使用本发明化合物(图 5 的化合物 4)的免疫测定。

(1)抗热 CRP(C 反应性蛋白)抗体的生物素标识

按照实施例 7 (1),对抗热 CRP 抗体进行生物素标识。

(2)SA 标识体的制作

按照实施例 7(3),制作图 5 的化合物 4 的 SA 标识体,并且混合铕。

(3)抗热 CRP 抗体的微培养皿涂层

按照实施例 7(4)，准备抗热 CRP 抗体固化的微培养皿。

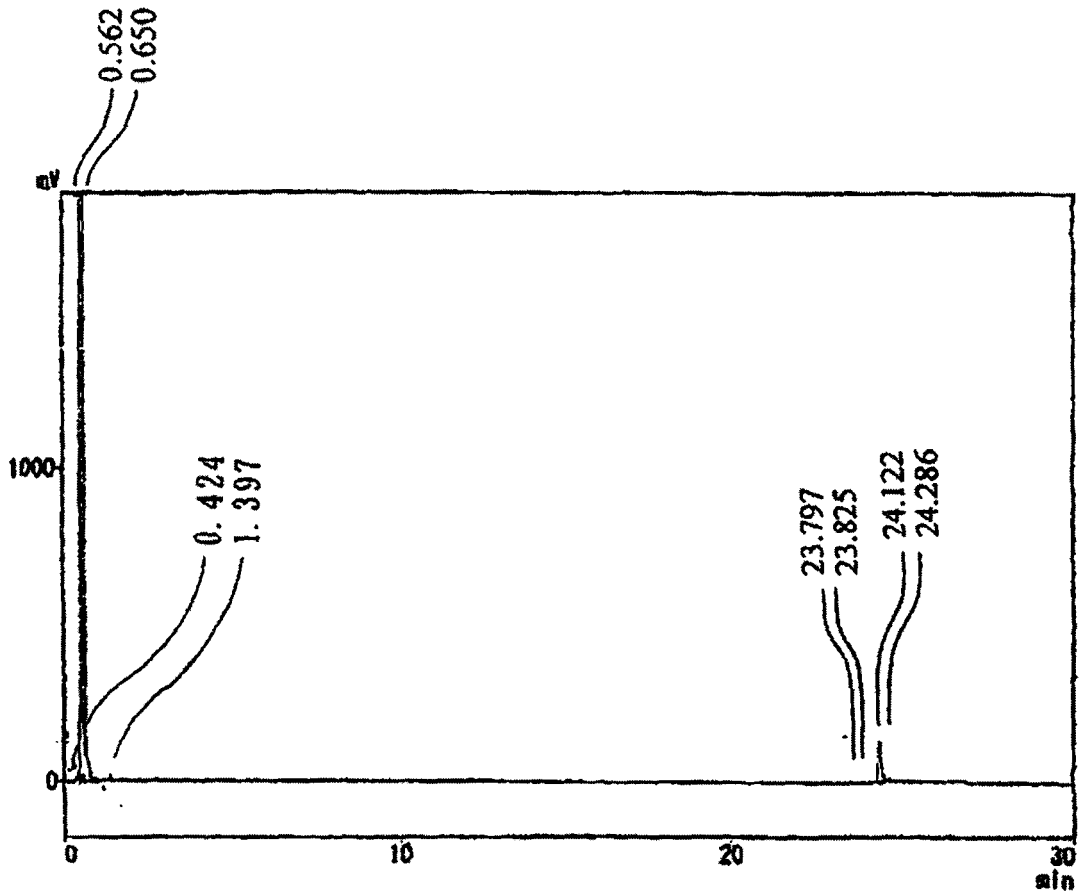
(4)免疫测定的实施

用 1%BSA 加生理食盐水以 10 倍等级稀释热 CRP 标准品，将其 50 μ L 加入到微培养皿各槽中。在 37°C 振荡 1 小时后，用 0.05%吐温 20 加生理食盐水洗涤。然后，用 1%BSA 加生理食盐水稀释上述(1)的生物素标识抗热 CRP 抗体至 1 μ g/L，将其 50 μ L 分别注于各槽中。在 37°C 振荡 1 小时后，用 0.05%吐温 20 加生理食盐水洗涤。然后，用 1%BSA 加生理食盐水稀释(2)的销标识 SA，将其 50 μ L 分别注于各槽中。

在室温静置 30 分钟后，用 0.05%吐温 20 加生理食盐水洗涤。使用时间分解测定装置对微培养皿测定发光量。

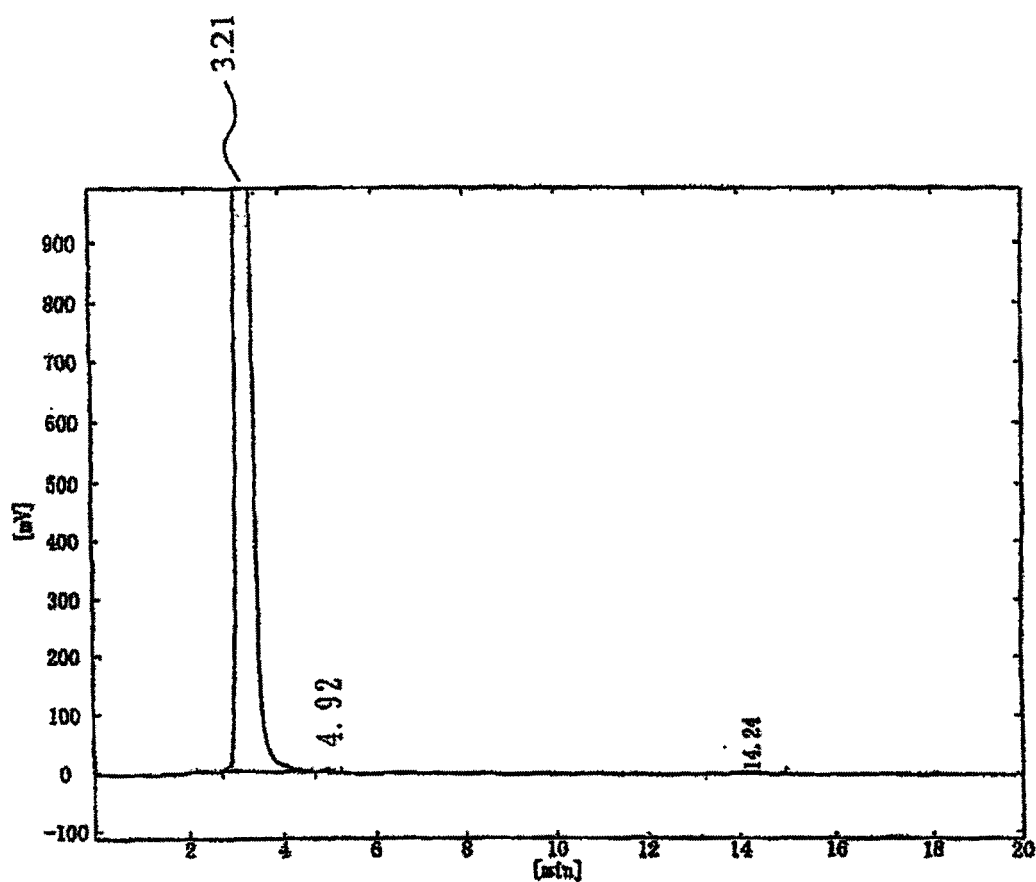
结果如图 11 所示。表明图 5 的化合物 4 作为标识体能够以性能良好地用于免疫测定。

通过本发明，能够得到(1)容易形成络合物的新的化合物以及(2)和蛋白质等容易反应的新的化合物。而且，在免疫测定法或核酸检测法等中可以作为有用的标识体使用。



| PKNO | TIME | AREA | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|------|--------|-----------|-----------|----|------|----------|------|
| 1 | 0.424 | 48189 | 22460 | V | | 0.0128 | |
| 2 | 0.562 | 52531212 | 33661866 | V | | 13.9575 | |
| 3 | 0.650 | 322889262 | 84899192 | SV | | 85.7912 | |
| 4 | 1.397 | 51926 | 17974 | TV | | 0.0138 | |
| 5 | 23.797 | 5337 | 689 | | | 0.0014 | |
| 6 | 23.825 | 5295 | 642 | V | | 0.0014 | |
| 7 | 24.122 | 8530 | 1337 | | | 0.0023 | |
| 8 | 24.286 | 826844 | 135538 | V | | 0.2197 | |
| | | 376366595 | 118739699 | | | 100.0000 | |

图1



注入料 2ul
 流量 150 ul/min
 柱子 CAPCELL PAK C18 UG120 3um 1.5mm*150mm
 检测器 254 nm
 洗提液 CH3CN:H2O=3:1

| PKNO | NAME | TIME MARK | CONC | AREA | HEIGHT |
|-------|------|-----------|---------|-------------|-----------|
| 1 | | 3.21 | 99.331 | 33312302.99 | 1243512.4 |
| 2 | | 4.92 | 0.217 | 72919.00 | 5414.5 |
| 3 | | 14.24 | 0.452 | 151485.32 | 4364.7 |
| TOTAL | | | 100.000 | 33536707.31 | 1253291.6 |

图2

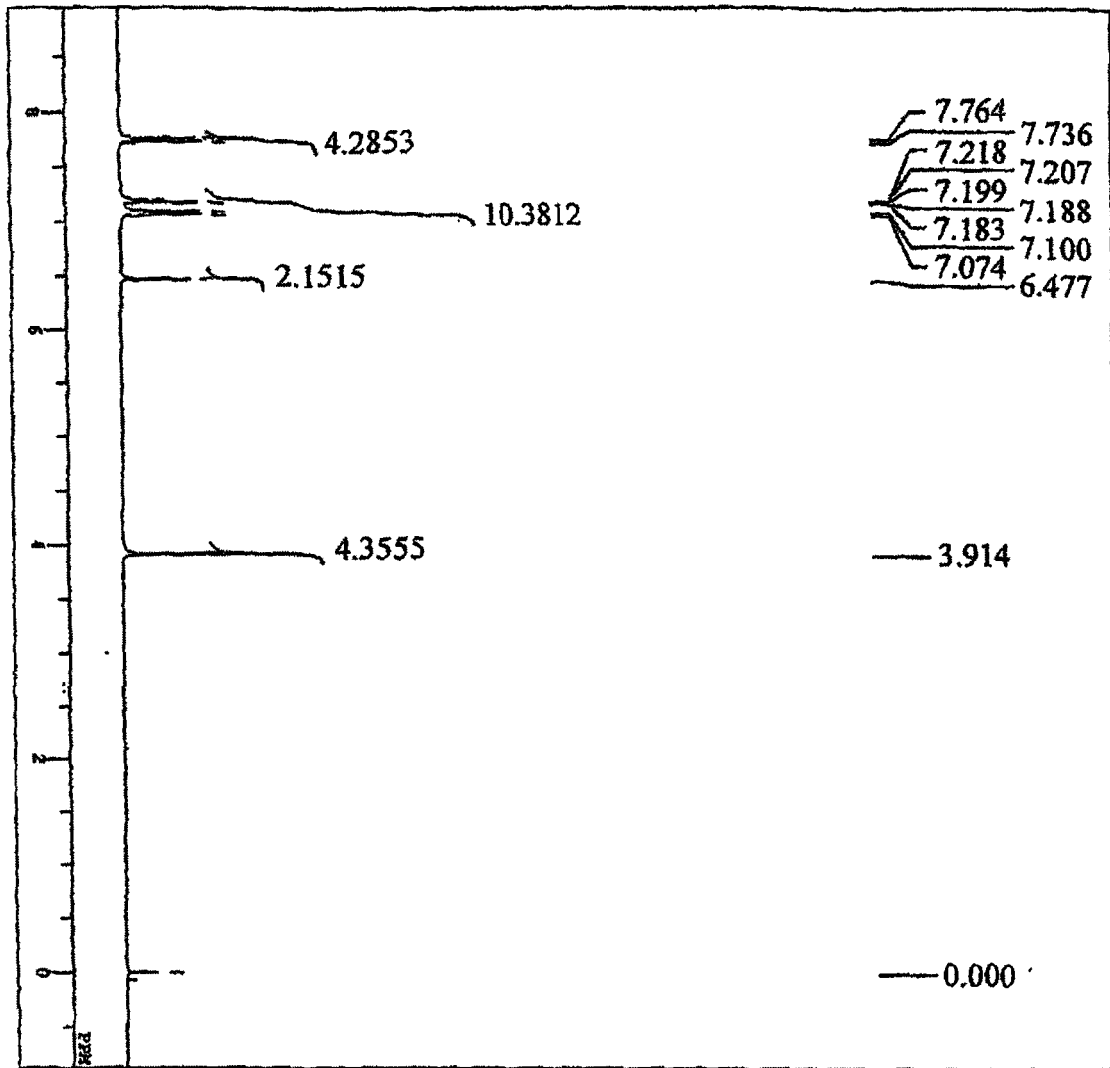


图3

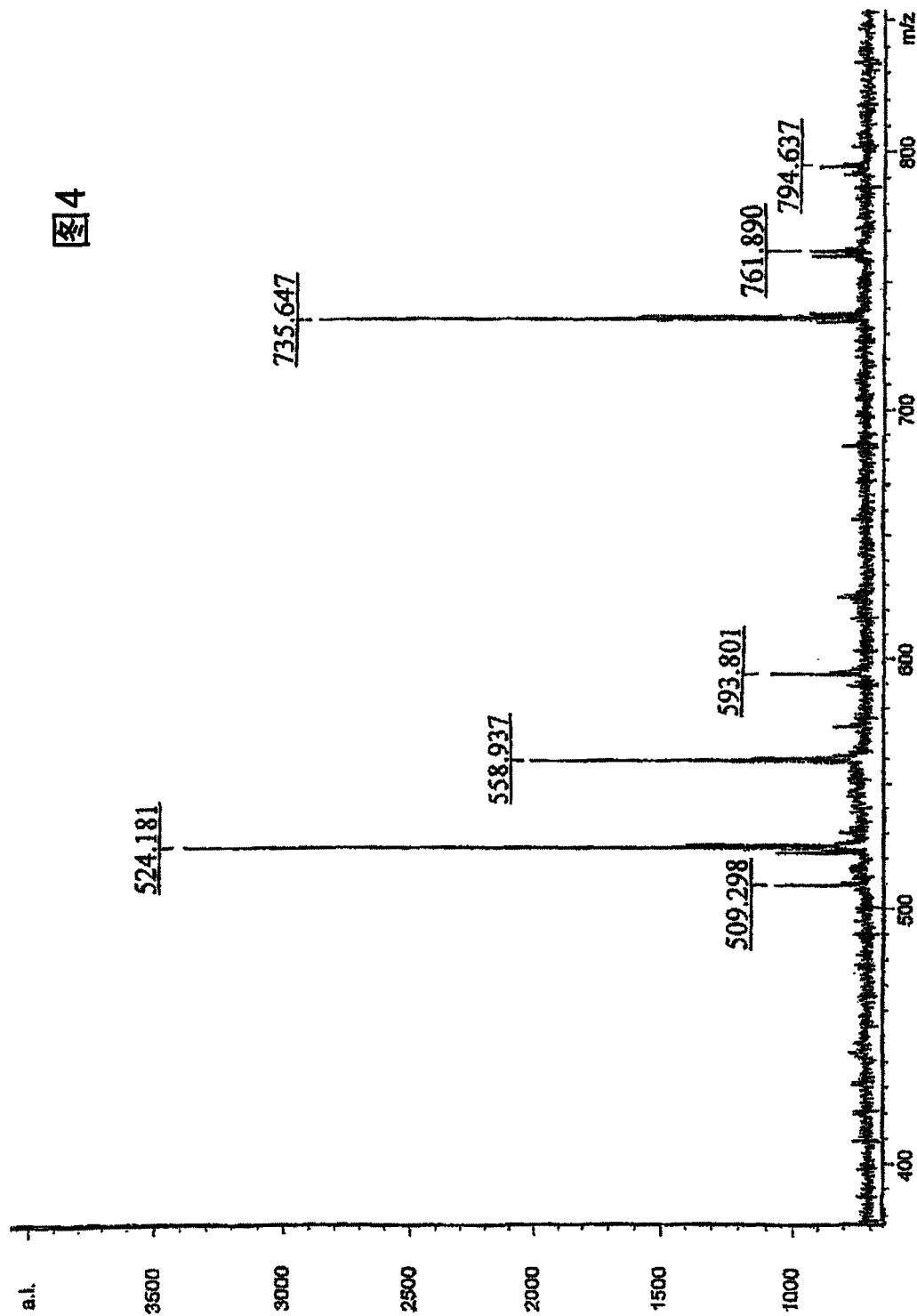
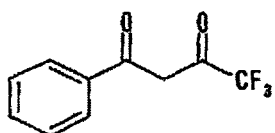


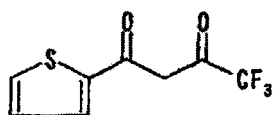
图4

图5

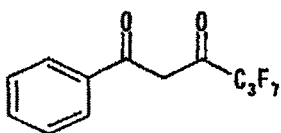
BFA



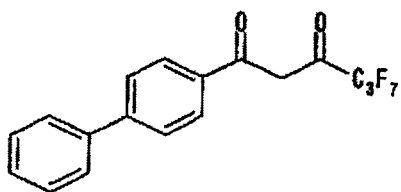
TTA



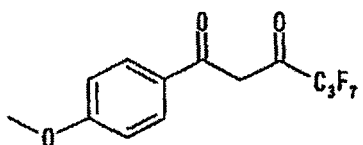
①



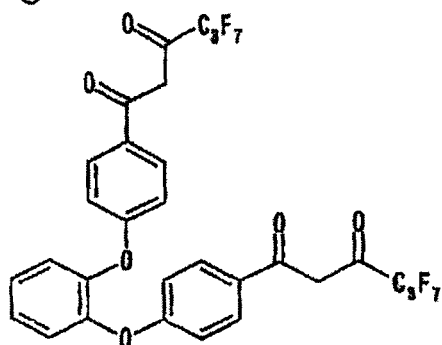
②



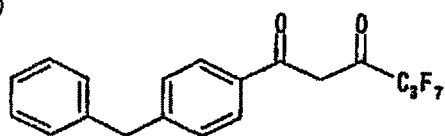
③



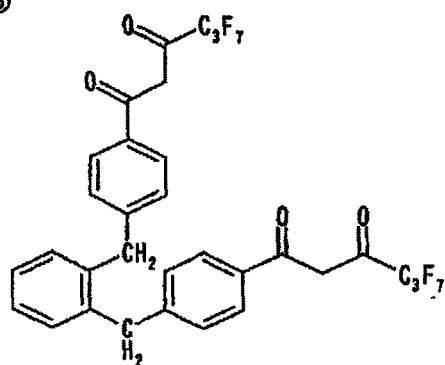
④



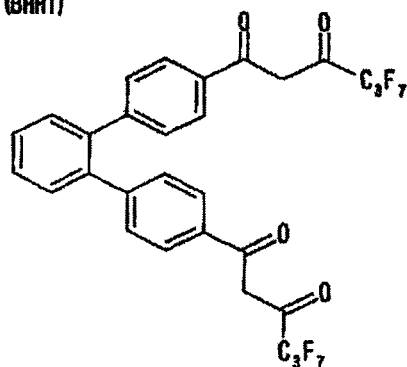
⑤



⑥



⑦ (BHHT)



* TTA : 4,4,4- 三氟 -1-(2- 噻吩基)-1,3- 丁烷=酮

* BFA : 4,4,4- 三氟 -1- 苯基 -1,3- 丁烷=酮

* BHHT : 4,4'- 二 (1'',1'',1'',2'',2'' 3'',3''- 七氟 -4'',6''- 己烷=酮-6''- 基) -o- 三联苯

| | TRF #D1 | F-4010 | U-3300 | | | |
|---------|-------------------|-----------|------------|-------|-------------|-------|
| | 10^{-11} mol/mL | % vs BHHT | max Ex(nm) | 峰强度 | max Abs(nm) | 峰强度 |
| TTA | 346,464 | 34 | 348.8 | 1.458 | 329.0 | 0.381 |
| BFA | 228,316 | 22 | 337.6 | 1.278 | 323.5 | 0.254 |
| 1 | 256,477 | 25 | 336.0 | 1.250 | 333.5 | 0.235 |
| 2 | 543,166 | 53 | 347.2 | 3.192 | nd | nd |
| 3 | 264,518 | 26 | nd | nd | nd | nd |
| 4 | 1,268,801 | 123 | 336.0 | 6.009 | 348.5 | 1.274 |
| 5 | 291,146 | 28 | 337.2 | 1.822 | 341.0 | 0.476 |
| 6 | 557,028 | 54 | 329.0 | 2.108 | 337.5 | 1.036 |
| 7(BHHT) | 1,028,165 | 100 | 344.8 | 5.723 | 340.0 | 1.104 |

nd: not-done

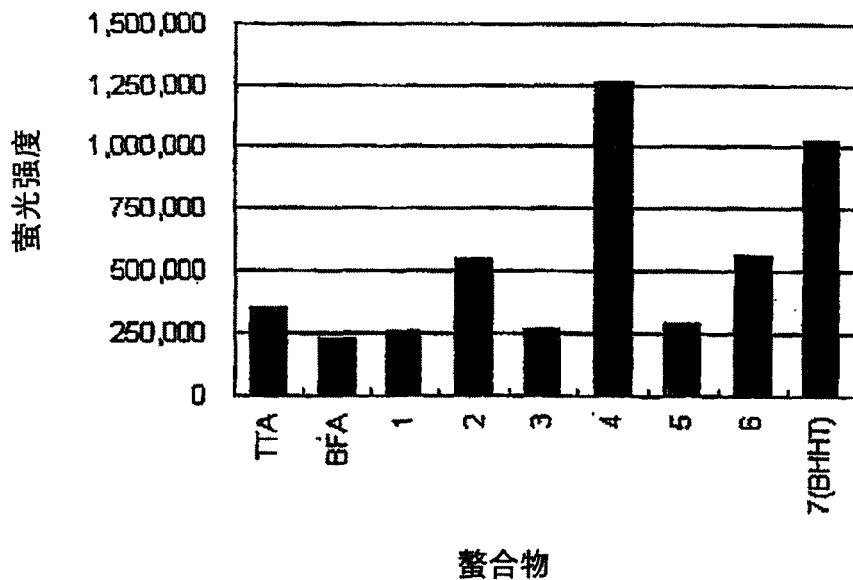
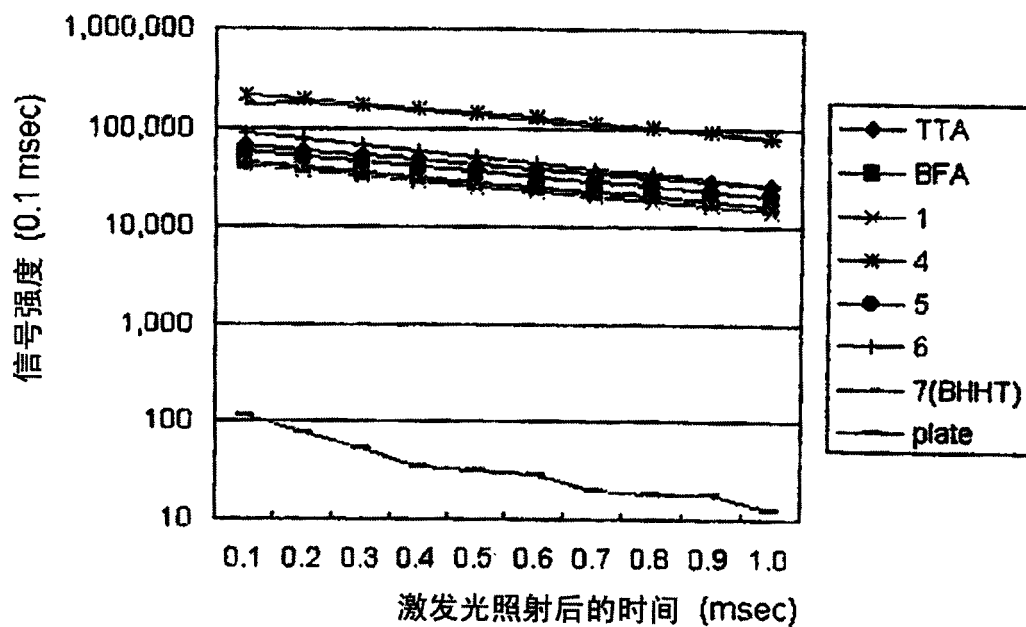
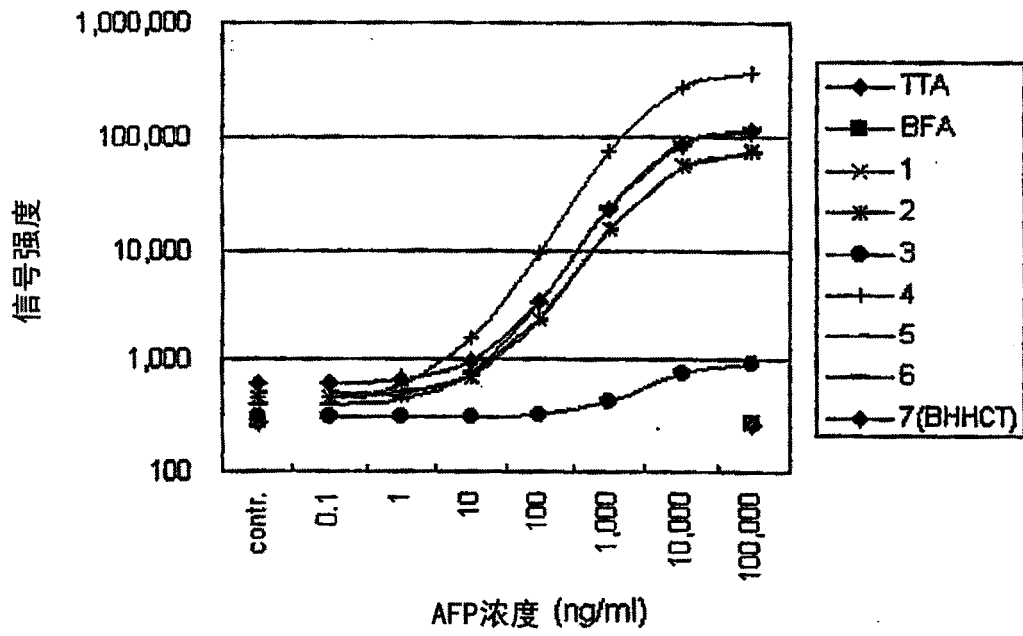


图6



| 半衰期 | |
|---------|--------|
| chelate | (msec) |
| TTA | 0.69 |
| BFA | 0.66 |
| 1 | 0.62 |
| 4 | 0.69 |
| 5 | 0.65 |
| 6 | 0.56 |
| 7(BHHT) | 0.67 |
| Plate | 0.33 |

图7



最小检测灵敏度

| LDL (3SD) | pg/mL |
|-----------|-------|
| TTA | NA |
| BFA | NA |
| 1 | NA |
| 2 | 3.3 |
| 3 | 490.4 |
| 4 | 0.5 |
| 5 | 3.6 |
| 6 | 1.9 |
| 7(BHHCT) | 2.6 |

NA: not-available

图8

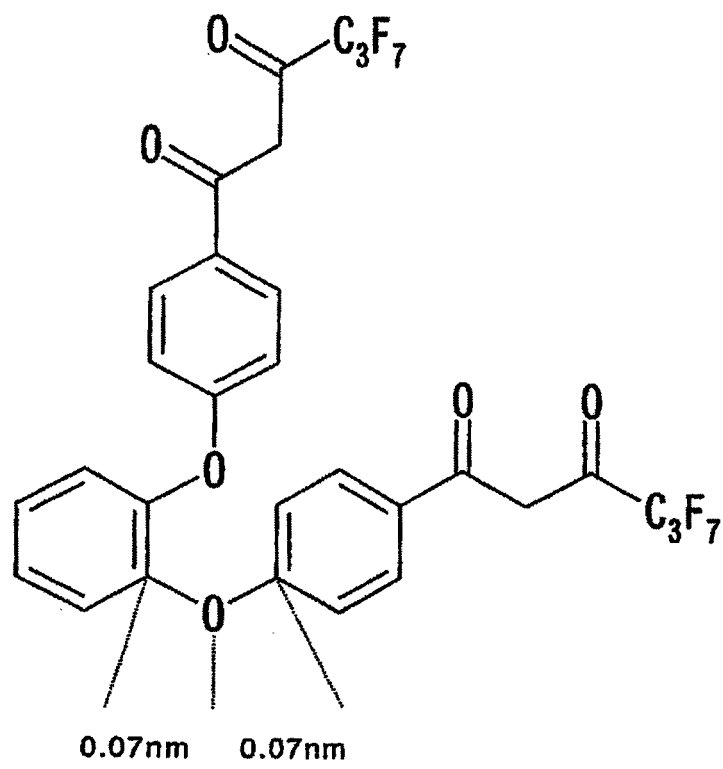


图9

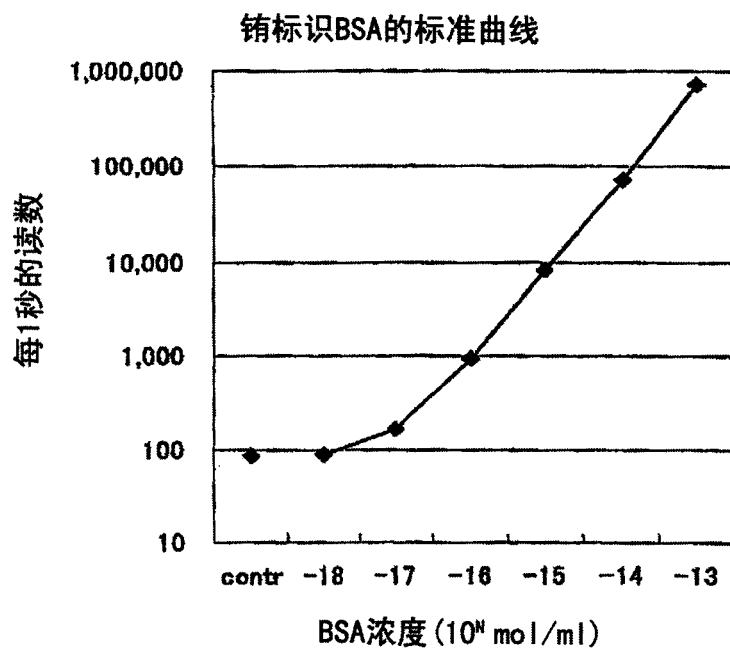


图10

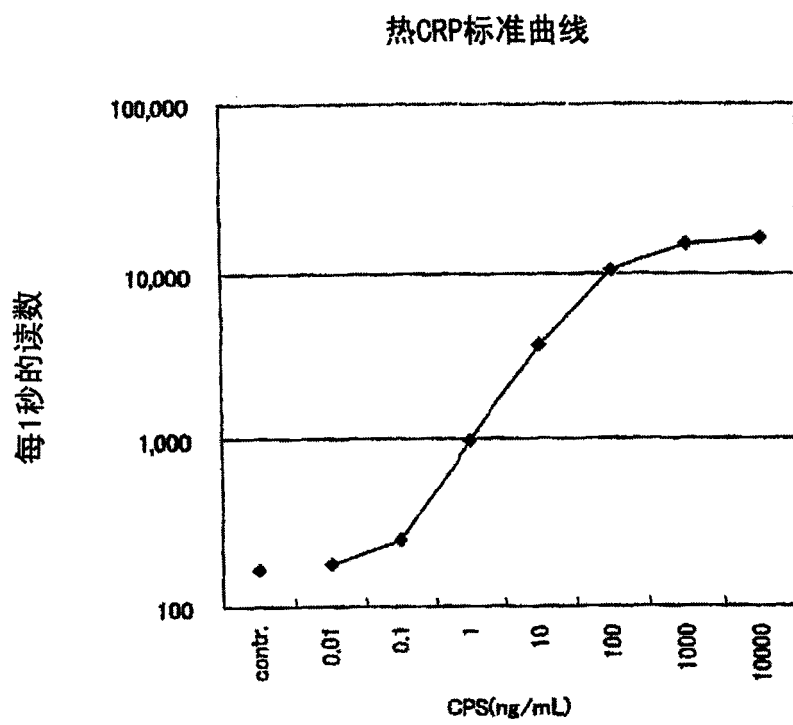


图11

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 发光性化合物及使用它们的标识试剂 | | |
| 公开(公告)号 | CN1568298A | 公开(公告)日 | 2005-01-19 |
| 申请号 | CN02819964.2 | 申请日 | 2002-10-10 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 株式会社日立高新技术 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 株式会社日立高新技术 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 株式会社日立高新技术 | | |
| [标]发明人 | 斋藤充弘 埃尔诺普里施 | | |
| 发明人 | 斋藤充弘 埃尔诺·普里施 | | |
| IPC分类号 | C07C45/45 C07C45/46 C07C45/68 C07C45/71 C07C49/80 C07C49/813 C07C49/84 C07C225/22 C07C323/22 C07D233/60 C07D333/24 C07C233/61 G01N33/533 | | |
| CPC分类号 | C07C225/22 C07C45/68 G01N2458/40 C07C49/84 C07C49/813 C07C45/71 C07C45/455 C07C2101 /14 C07C323/22 C07C45/46 C07D333/24 C07C49/80 C07C2601/14 | | |
| 代理人(译) | 钟晶 | | |
| 优先权 | 2001312562 2001-10-10 JP | | |
| 其他公开文献 | CN100378056C | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明涉及一般式(I)表示的化合物： $R - Y - (-X - Phe - COCH_2COC_nF_{2n+1})_m$ (I) (式中R是H、烷基、苯基或能够结合蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的基团，Y是CH₂、碳化或杂环，X是O、S、NH、CH₂、OCH₂、CONH或NHCO，Phe是亚苯基，n是1~5的整数，m是1、2或3)；含有上述化合物和稀土离子的发光络合物；含有上述的化合物或发光络合物的标识试剂；及使用上述标识试剂的蛋白质、肽、氨基酸、核酸或碱的标识方法。

