



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106164054 B

(45)授权公告日 2019.05.07

(21)申请号 201580019437.2

(22)申请日 2015.04.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106164054 A

(43)申请公布日 2016.11.23

(30)优先权数据
14164571.3 2014.04.14 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.10.12

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/057933 2015.04.13

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/158645 EN 2015.10.22

(73)专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 D·海因德尔 C·诺特迈耶

P·格鲍尔 S·亨特杜瓦尔

K·A·鲍尔埃斯平多拉

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 陈桢

(51)Int.Cl.
C07D 241/46(2006.01)
G01D 21/02(2006.01)

(56)对比文件
US 4683198 A,1987.07.28,
WO 2009118157 A1,2009.10.01,
H. Bttneemann等."Synthesis and
Properties of Acrylamide-Substituted Base
Pair Specific Dyes for Deoxyribonucleic
Acid Template Mediated Synthesis of Dye
Polymers".《Biochemistry》.1981,第20卷(第10
期),第2864-2874页.

审查员 旭昀

权利要求书1页 说明书17页 附图5页

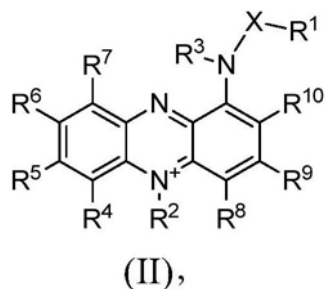
(54)发明名称

吩噻介导剂

(57)摘要

本发明涉及为1-氨基吩噻衍生物的化合物或其盐或溶剂合物并涉及其用途。本发明进一步涉及化学基质且涉及包含上述化合物的测试元件。此外,本发明涉及用于确定样品中分析物的量的方法,其包括将所述样品与本发明的化学基质接触,评估由在所述液体样品中存在的化学基质释放或消耗的的电子的量,并由此确定液体样品中分析物的量。

1. 一种化合物或其盐,其具有结构(II)



其中

X为-C(=O)-,

R¹为具有3-8个C原子的烷基,其包含取代基,所述取代基为羧基,

R²为-(CH₂)_n-CH₃,其中n为1-6;或苯基,

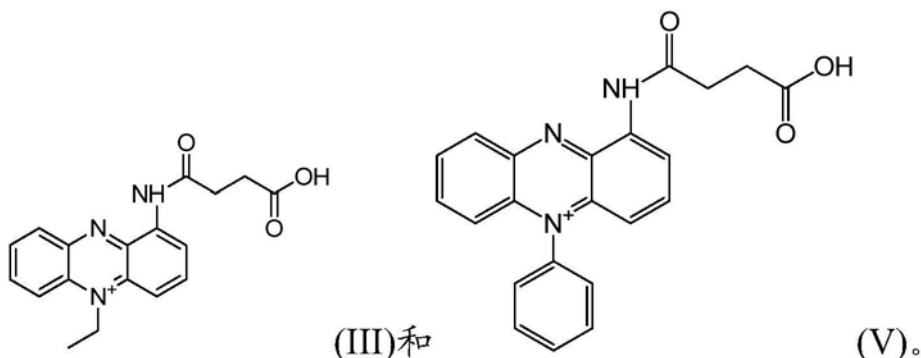
R³为H,且

R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰为H。

2. 权利要求1的化合物或其盐,其中n为1或2。

3. 权利要求1的化合物或其盐,其中R²为乙基。

4. 权利要求1的化合物或其盐,其具有选自下组的结构之一:



5. 一种化学基质,其包含权利要求1-4中任一项的化合物或其盐。

6. 一种测试元件,其包含权利要求1-4中任一项的化合物或其盐。

7. 一种测试元件,其包含权利要求5的化学基质。

8. 权利要求1-4中任一项的化合物或其盐在制备用于分析或诊断测试的化学基质中的用途。

9. 权利要求8的用途,其中所述分析或诊断测试包括确定测试样品中的葡萄糖浓度。

10. 权利要求1-4中任一项的化合物或其盐用于产生权利要求5的化学基质的用途。

11. 权利要求1-4中任一项的化合物或其盐用于产生权利要求6的测试元件的用途。

12. 权利要求1-4中任一项的化合物或其盐用于确定样品中分析物的量的用途。

13. 一种用于确定样品中分析物的量的方法,包括:

a) 将所述样品与权利要求5的化学基质接触,

b) 评估由所述样品中存在的化学基质释放或消耗的氧化还原当量的量,且

c) 由此确定样品中分析物的量。

14. 权利要求13的方法,其中在步骤b)中由所述化学基质释放或消耗的氧化还原当量的量通过光学或通过电化学传感器的方式评估。

吩嗪介导剂

发明领域

[0001] 本发明涉及为1-氨基吩嗪衍生物的化合物或其盐或溶剂合物并涉及其用途。本发明进一步涉及化学基质且涉及包含上述化合物的测试元件。此外,本发明涉及用于确定样品中分析物的量的方法,其包括将所述样品与本发明的化学基质接触,评估由在所述液体样品中存在的化学基质释放或消耗的电子的量,并由此确定液体样品中分析物的量。

[0002] 相关领域

[0003] 在医疗诊断领域,许多情况中,一种或多种分析物需要在体液诸如血液、间质液、尿液、唾液或其他类型的体液样品中进行检测。待检测的分析物的实例为通常存在于体液中的葡萄糖、甘油三酯、乳酸盐、胆固醇或其他类型的分析物。根据所述分析物的浓度和/或存在,酌情可选择适当的治疗。

[0004] 一般而言,本领域的技术人员已知的设备和方法利用包括一种或多种测试化学品的测试元件,在待检测的分析物存在下,其能够实施一种或多种可检测的检测反应,诸如光学或电化学可检测的检测反应。对于与其相关的这些测试化学品和方法,可参照例如J.Hoenes等人(The Technology Behind Glucose Meters:Test Strips,Diabetes Technology&Therapeutics,Volume 10,Supplement 1,2008,S-10 to S-26,US 2009/0246808 A1和Habermüller等人((2000),Fresenius J Anal Chem 366:560)。对于葡萄糖的电化学检测,提供了综述,例如在Heller&Feldman(2008),Chem.Rev.108:2482中。

[0005] 具体而言,在分析物的电化学检测中,已提出并评估吩嗪衍生物作为酶测定中的氧化还原介导剂(mediator)(Ghosh and Quayle(1979),Anal Biochem 99:112;Hisada等人(1981),J Appl Biochem 3:535;Yomo等人(1989)Eur J Biochem 179:293),且特别是在依赖于NAD作为辅助因子的酶测定中,这是由于吩嗪介导剂可在低超电位使用(Cooney等人(2008),Energy Environ.Sci.1:320)。然而,还原的吩嗪衍生物具有低溶解度,且因此倾向于在测量中使用的电极上形成难以再溶解的沉淀(Inzelt&Puskás(2004),Electrochimica Acta 49:969)。此外,本领域所述的吩嗪的氧化还原电位处于允许所述吩嗪由化合物如例如抗坏血酸盐(其频繁地施用于住院患者)还原的范围,导致系统性问题,例如在所述患者的血液葡萄糖确定中(Heller&Feldman,在上述引文中)。

[0006] 因此,本领域对于这样的吩嗪衍生物存在需求:即使在还原状态也具有良好溶解度,且对由用作药物的还原剂(特别是抗坏血酸盐)导致的还原可进行抵抗,且允许与还原的辅酶进行快速反应。

[0007] 解决的问题

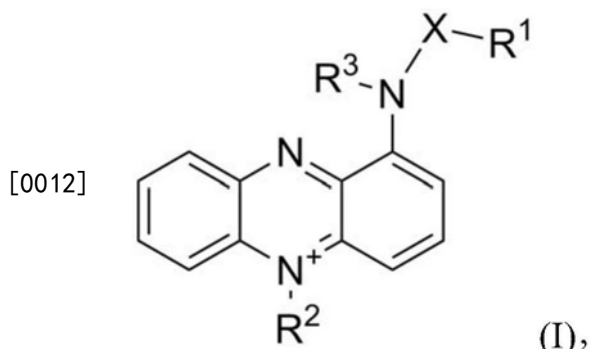
[0008] 因此本发明的目的是提供符合上述需求、至少部分避免本领域不足的方式和方法。

[0009] 发明概述

[0010] 该问题通过包含如本文公开的结构化合物或其盐或溶剂合物、通过包含所述化合物或其盐或溶剂合物的化学基质、通过包含所述化合物或其盐或溶剂合物的测试元件及通过如本文公开用于确定分析物的量的方法解决。可以独立的方式或以任何组合实现的优

选的实施方案在独立权利要求中列举且在本说明书中进行描述。

[0011] 因此,本发明涉及化合物或其盐或溶剂合物,其包含结构(I)



[0013] 其中

[0014] X为 $-C(=O)-$ 、 $-C(=S)-$ 或 $-S(=O)_2-$,

[0015] R^1 为有机侧链,如果X为 $C(=O)$,所述有机侧链包含至少2个C原子,且如果X为 $C(=S)$ 或 $S(=O)_2$,所述有机侧链包含至少1个C原子,

[0016] R^2 为包含至少2个C原子的有机侧链,

[0017] R^3 为H或有机侧链,且

[0018] 其中 R^1 、 R^2 和 R^3 的至少一者为亲水性侧链。

[0019] 下文使用的术语“具有”、“包含”或“包括”或其任何语法上的变化以非排他性的方式使用。因此,这些术语可既指其中除通过这些术语引入的特征外无其他特征存在于该背景所述的实体的情况,也指其中存在一种或多种其他特征的情况。举例来说,表述“A具有B”、“A包含B”和“A包括B”可既指其中除B外A中无其他要素存在的情况(即其中仅仅包含B且排他的情况),也指其中除B外实体A中存在一种或多种其他要素的情况,如要素C、要素C和D或甚至其他要素。

[0020] 此外,下文使用的术语“优选地”、“更优选地”、“更优选地”、“具体地”、“更具体地”、“特定地”、“更特定地”或相似的术语可与其他任选特征联用,而不限制备选的可能性。因此,由这些术语引入的特征是任选的特征且并非意在以任何方式限制权利要求的保护范围。如本领域的技术人员将认可,本发明可通过使用备选特征实施。相似地,由“本发明的实施方案”或相似的表述引入的特征目的在于任选的特征,而并非是对本发明备选实施方案的任何限制,并非是对本发明的范围的任何限制且并非是对以这种方式引入的特征与其他本发明任选的或非任选的特征的组合的可能性的任何限制。

[0021] 本文使用的术语“化合物”、“盐”和“溶剂合物”以本领域的技术人员已知的它们的通常含义使用。如果本发明的化合物的净电荷为正,优选的抗衡离子为三氟甲烷磺酸根(三氟甲磺酸根)、硫酸根、烷基磺酸根、甲苯磺酸根、磷酸根、四氟硼酸根、六氟磷酸根、三氟乙酸根、高氯酸根、氯离子或硝酸根离子。如果本发明的化合物的净电荷为负,优选的抗衡离子为锂、钠和/或钾离子,或四硫酸氢铵离子。优选地,本发明的化合物的净电荷是在如本文他处所述的标准条件下水性溶液中化合物的净电荷。

[0022] 术语“侧链”由本领域的技术人员理解且涉及与如本文所述化合物的核心部分共价连接的原子或化学基团,所述核心部分还指“主链”或“骨架”。优选地,侧链为如下文所述的有机侧链。术语“经取代的”侧链涉及在一个或多个位置取代的侧链,优选地,在位置1、2

或3,其中取代基可在任何可用的原子处连接以产生稳定的化合物。本领域的技术人员理解的是,术语“任选取代的”侧链涉及未经取代的或经取代的侧链。

[0023] 本文使用的术语“有机侧链”涉及任何任选取代的侧链,所述侧链包含至少一个碳原子。优选地,有机侧链为任选取代的烷基、烯基、炔基(alkynyl)、芳基、芳烷基、环烷基、杂环烷基或杂芳基侧链。优选地,经取代的有机侧链为取代有至少一种独立地选自下组的取代基的有机侧链: $-\text{COO}^-$ 、 $=\text{O}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CN}$ 、卤素、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}$ (烷基)、 $-\text{N}$ (烷基) $_2$ 、 $-\text{N}$ (烷基) $_3^+$ 、 $-\text{NH}$ (芳基)、 N (芳基) $_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{O}$ (烷基)、 $-\text{O}-$ (CH_2) $_n$ - OH 、 $-\text{O}-$ (CH_2) $_n$ - O (烷基)、 $-\text{O}$ (芳烷基)、 $-\text{O}$ (芳基)、 $-\text{OPo}_3^{2-}$ 、 $-\text{PO}_3^{2-}$ 、 $-\text{OSO}_3^-$ 和 $-\text{SO}_3^-$ 。优选地,所述取代基的烷基、芳基和芳烷基不被包含烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂环烷基或杂芳基的基团进一步取代。更优选地,所述取代基的烷基、芳基和芳烷基不进一步被取代。

[0024] 本文使用的“烷基”涉及直链或支链,其为饱和烃基,通过与其至少一个碳原子的至少一个的共价键连接至主链。优选的烷基为直链烷基,例如,优选甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基,或支链烷基,例如,优选 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 或 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 。因此,烷基包括伯烷基、仲烷基和叔烷基。术语“环烷基”涉及环状封闭的烃基,优选地具有3-12个碳原子。优选的环烷基为环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0025] 术语“烯基”侧链涉及这样的侧链:所述侧链包含至少一个 $\text{C}=\text{C}$ 双键且通过与其至少两个碳原子的至少一个的共价键连接至主链。因此,术语“炔基”侧链涉及包含至少一个 $\text{C}\equiv\text{C}$ 三键的侧链,所述侧链通过与其至少两个碳原子的至少一个的共价键连接至主链。

[0026] 术语“环烯基”涉及环状闭合烃基,优选具有5-12个碳原子,其包含至少一个 $\text{C}=\text{C}$ 双键且通过与其至少两个碳原子的至少之一的共价键连接至主链。术语“环炔基”涉及环状闭合烃基,优选具有8-12个碳原子,其包含至少一个 $\text{C}\equiv\text{C}$ 三键且通过其至少两个碳原子的至少一个的共价键连接至主链。

[0027] 本文使用的术语“烷氧基”侧链涉及 $-\text{O}-$ 烷基侧链,优选地具有所示数目的碳原子。优选地,烷氧基侧链为 $-\text{O}-$ 甲基、 $-\text{O}-$ 乙基、 $-\text{O}-$ 丙基、 $-\text{O}-$ 异丙基、 $-\text{O}-$ 丁基、 $-\text{O}-$ 仲丁基、 $-\text{O}-$ 叔丁基、 $-\text{O}-$ 戊基、 $-\text{O}-$ 异戊基、 $-\text{O}-$ 新戊基、 $-\text{O}-$ 己基、 $-\text{O}-$ 异己基或 $-\text{O}-$ 新己基。

[0028] 本文使用的术语“芳基”涉及芳香环或具有6-14个碳原子的环系统,优选包含一个、两个或三个芳香环。优选的芳基侧链为苯基、萘基、蒽基和菲基。术语“环”在本发明的化合物的背景中由本领域的技术人员理解;因此,术语“环系统”涉及包含分享至少一个共价键的至少两个环的化学结构。因此,优选地,“芳基”还包括与环烷基和/或杂环烷基环稠合的芳香环系统。

[0029] 本文使用的术语“芳烷基”涉及烷基侧链,其中至少一个氢由芳基侧链替换。优选地,芳烷基为苄基或苯乙基。

[0030] 本文使用的术语“杂环烷基”涉及饱和或部分未饱和的环或具有5-14个环原子的环系统,优选5-7个环原子,其中至少一个环原子为选自下组的杂原子: N 、 O 和 S ,所述环或环系统通过与所述环或环系统的 C 或 N 原子的共价键连接至主链。优选地,杂环烷基为氮杂草

基、二氢呋喃基、二氢吡喃基、咪唑烷基、咪唑啉基、异噻唑烷基、异噻唑啉基、吗啉基、噁唑烷基、哌嗪基、哌啶基、吡唑烷基、吡咯烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基、噻二唑烷基(thiadiazolydinyI)、噻唑烷基或硫吗啉基。

[0031] 本文使用的术语“杂芳基”涉及芳香环或具有5-14个环原子的环系统,优选5-7个环原子,其中至少一个环原子为选自下组的杂原子:N、O和S,所述环或环系统通过与所述环或环系统的C或N原子的共价键连接至主链。优选地,每环至多4个,更优选地至多3个,最优选地至多2个环原子为独立地选自下组杂原子的杂原子:N、O和S。优选地,杂芳基为吡啶基、哒嗪基、吡嗪基、喹喔啉基(quinaoxalyI)、吡嗪基、苯并[b]噻吩基、喹唑啉基、嘌呤基、吡咯基、喹啉基、嘧啶基、吡咯基、吡唑基、噁唑基、噻吩基、异噻唑基、氧杂噻二唑基、异噻唑基、四唑基、咪唑基、三唑基、呋喃基、苯并呋喃基或吡啶基。

[0032] 术语“亲水性”为本领域的技术人员已知且涉及化合物或化合物的部分的性质,所述性质具有溶解于极性溶剂尤其是水、与其混合或由其润湿的倾向性。如本发明的侧链的上下文中使用,术语“亲水性侧链”优选地涉及如本文所述的侧链,其在25℃、10⁸Pa和pH=7的标准条件下具有≤2的辛醇/水系数(logK_{OW}),更优选地≤1.5,仍更优选地≤1,或最优选地≤0.8。在本说明书的上下文中,认为侧链R^x(其中x=1、2或3)的logK_{OW}值与式H-R^x的化合物的logK_{OW}值相同。本领域的技术人员已知如何确定化合物的logK_{OW}值。优选地,亲水性侧链包含至少一个选自下组的亲水性官能团:-C(=Y¹)-OH、-C(OH)R¹¹R¹²、-C(=Y¹)-R¹¹、-C(=Y¹)-Y²-R¹¹、-Y¹-R¹¹、-NH₂、-NHR¹¹、-NMe³⁺、-NH-C(=Y¹)-R¹¹、-S(O)R¹¹、-SO₂R¹¹、-SO₂-OH-和-P(O)(OR¹¹)(OR¹²)-O-P(O)(OR¹¹)(OR¹²)-,其中Y¹和Y²独立地选自O或S且其中R¹¹和R¹²彼此独立地选自下组:H和未经取代或经取代的烷基和芳基。更优选地,亲水性侧链包含至少一个选自下组的亲水性官能团:C(=O)-和-C(=O)-OH。最优选地,亲水性侧链为在上述标准条件下包含至少一个带电荷(优选负电荷)的化学基团的侧链。

[0033] 在本发明结构式的背景中,侧链R¹为有机侧链,如果X为C(=O),所述有机侧链包含至少2个C原子,且如果X为C(=S)或S(=O)₂,所述有机侧链包含至少1个C原子。优选地,侧链R¹为任取代的有机侧链,优选地为烷基,具有与式(I)或(II)的基团X的C或S原子共价连接的3-20个C原子的连续链。更优选地,侧链R¹为具有与式(I)或(II)的基团X的C或S原子共价连接的3-8个C原子的连续链的烷基,其包含至少一个独立地选自下组的取代基:OH、OPo₃²⁻、PO₃²⁻、SO₃⁻和COO⁻。优选地,侧链R¹为接头,优选地为烷基接头,更优选地为非支链的烷基接头,共价连接化合物的一个分子和化合物的第二分子,即优选地,所述化合物为二聚体,其中两个分子经由接头连接。本发明的优选的二聚体示于本文实施例中,具体地,为具有根据式(XVII)、(XVIII)、(XIX)或(XX)的结构的化合物。优选地,所述接头具有至少3个C原子,更优选地3-20个C原子。优选地,R¹的碳原子的链由一个或多个-NHCO-和/或-O-实体间断,其中两个-NHCO-实体由最少一个C原子分离且-O-实体由最少两个C原子分离,例如,更优选地,所述接头包含多聚甘氨酸和/或聚乙二醇链。任选地,所述侧链额外地取代有-OH基团,其中所述-OH基团从不与连接至所述链的任选的O-原子的碳原子连接。

[0034] 如在式(I)和(II)的背景中使用,X为C(=Y),其中Y为O或S,或X为S(=O)₂。优选地,X为C(=O)。因此,式(I)或(II)的-X-R¹优选为富马酰基、戊二酰基、己二酰基,或最优选地为琥珀酰基。

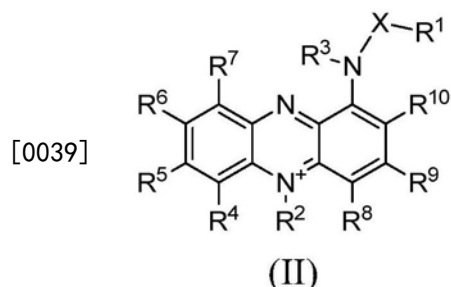
[0035] 在本发明结构式的背景中,侧链R²为包含至少2个C原子的有机侧链。优选地,侧链

R^2 为任选取代的烷基、芳基或芳烷基,在 R^2 的背景中,上述有机侧链的优选的取代基为-OH、 OPo_3^{2-} 、 PO_3^{2-} 、 SO_3^- ,且最优选地为 COO^- 。更优选地, R^2 具有结构 $-(CH_2)_n-CH_3$,其中n为0-6,更优选地n为0、1或2;最优选地, R^2 为乙基。优选地, R^2 的碳原子链由一个或多个-NHCO-和/或-O-实体间断,其中两个-NHCO-实体由最少一个C原子分离且-O-实体由最少两个C碳原子分离,例如,更优选地,所述接头包含多聚甘氨酸和/或聚乙二醇链。任选地,所述侧链额外地取代有-OH基团,其中所述-OH基团从不与连接至所述链的任选的O-原子的碳原子连接。在另一优选的实施方案中, R^2 为任选取代的烷基;更优选地 R^2 为苯基。

[0036] 在本说明书结构式的背景中,侧链 R^3 为如上文所述的侧链。优选地, R^3 为H。

[0037] 在本发明的化合物中, R^1 、 R^2 和 R^3 至少之一,优选 R^1 和 R^2 至少之一为如上文所述的亲水性侧链。优选地, R^1 、 R^2 和 R^3 的至少两者为亲水性侧链,更优选地,至少 R^1 和 R^2 为亲水性侧链或 R^2 和 R^3 为亲水性侧链。优选地,选择侧链 R^1 、 R^2 和 R^3 由此本发明的化合物的溶解度为至少15mmol/L,更优选地至少25mmol/L,最优选地至少50mmol/L,其中溶解度优选为在标准条件下(更优选地在如本文他处所述的标准条件下)确定的水中的溶解度。

[0038] 优选地,所述化合物或其盐或溶剂合物具有结构(II)



[0040] 其中 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 彼此独立地选自下组:H;经取代的或未经取代的烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂环烷基、杂芳基、卤素; $-NO_2$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-CN$ 、 $-CH=CH-COOH$ 和 $-Y^3-R^{13}$,其中 Y^3 为-O-、 $-C(=O)-$ 或 $-N(R^{14})-$,其中 R^{13} 和 R^{14} 彼此独立地选自下组:未经取代或经取代的烷基和芳基。优选地, R^5 和/或 R^9 为烷基或环烷基。更优选地, R^5 和/或 R^9 为-H、甲基、-F、-Cl、 $-C(=O)-$ 、 $-NO_2$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-CN$ 或 $-CH=CH-COOH$ 。更优选地, R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 和 R^{10} 为-H。

[0041] 更优选地,所述化合物或其盐或溶剂合物具有结构(II),其中 R^3 、 R^4 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^{10} 为H;

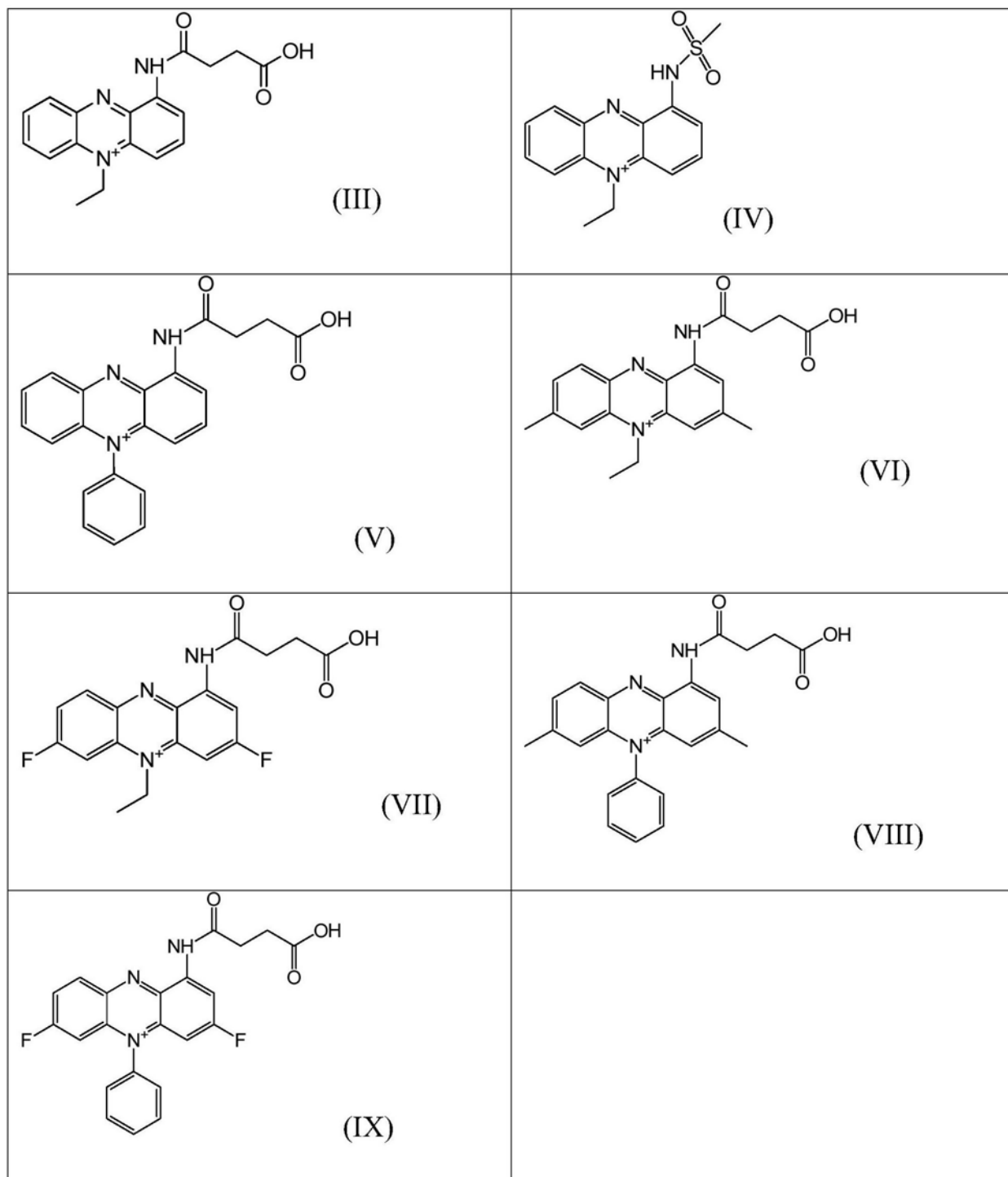
[0042] X为 $C=O$;且

[0043] R^1 和/或 R^2 为亲水性烷基、芳基或芳烷基侧链,优选地包含带负电的基团,更优选为 COO^- 、 SO_3^- 、 $-OPo_3^{2-}$ 或 PO_3^{2-} 。

[0044] 更优选地,所述化合物或其盐或溶剂合物具有选自表1中所示的结构式。

[0045] 表1:优选的本发明的化合物

[0046]



[0047] 更优选地,所述化合物或其盐或其溶剂合物具有式(III)的结构。

[0048] 有利的是,发现了本发明潜在的工作是:向1-氨基吩嗪化合物添加体积大的侧链减少了所述化合物与生物样品中潜在存在的还原剂(如例如抗坏血酸盐)经历氧化还原反应的倾向性,且所述效果在当体积大的侧链引入式(I)和(II)中标记为 R^1 、 R^2 和 R^3 的至少一个位置时最明显。此外,发现了化合物的溶解度特别是其还原时沉淀的倾向性可通过在式(I)和(II)中标记为 R^1 、 R^2 和 R^3 的至少一个位置包括至少一个亲水性侧链改善。此外,发现了当包括于化学基质中时,具有上述结构之一的化合物稳定超过半年。全部上述效果当使用

体积大且带负电的侧链时最明显。不希望受理论所限,侧链带负电的基团还与带正电的吩嗪鎓(phenazinium)环相互作用,其可导致氧化型的稳定化。

[0049] 上述定义比照适用于下文。下文进一步做出的其他定义和阐释还比照适用于本说明书中所述的全部实施方案。

[0050] 本发明进一步涉及包含本发明的化合物的化学基质。

[0051] 术语“化学基质”为本领域的技术人员已知。优选地,本发明的化学基质除本发明的化合物外包含如下文所述的氧化还原酶和氧化还原辅助因子。本领域的技术人员所理解的是,所述组合物可包含其他组分,例如,优选地,缓冲剂组分(例如,磷酸盐缓冲盐水、Tris缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、甘油磷酸盐缓冲剂或Good's缓冲剂)或其他盐、洗涤剂等,包括如下文所述的组分。

[0052] 本发明的化学基质可优选通过将本发明组合物的组分首先溶于溶剂和溶剂混合物中提供。更优选地,所述溶剂或溶剂混合物随后通过适当处理去除,由此剩余的组合物基本上无所述溶剂或溶剂混合物。本发明优选预期的适当的处理包括热处理、蒸发技术、冷冻干燥等。优选地,预期的处理为热处理且具体地,为在下列条件下的热处理:用热循环在约60°C或更高温度热处理约20-45分钟或在约95°C约1-2分钟;20-200微米或更少的化学基质厚度;在1巴或0.1巴的压力。此外,可以理解的是,为保持化学基质在干燥条件下,保存优选在干燥剂即除湿剂存在下实施。适当的干燥剂优选涵盖硅胶、沸石分子筛(zeolite)、碳酸钙或硫酸镁。

[0053] 本文使用的术语“氧化还原酶”指能够通过向或从如本文他处所述的氧化还原辅助因子转移氢化物(H⁻)作为氧化还原当量,进而催化优选特定底物的氧化或还原的多肽。优选地,所述氧化还原酶为脱氢酶,即能够通过向受体分子优选向如本文他处所述的氧化还原辅助因子转移氢化物(H⁻)作为氧化还原当量催化底物氧化的多肽。本发明预想的脱氢酶优选为依赖型氧化还原辅助因子(或有时指辅酶)的那些,诸如吡咯喹啉醌(PQQ)或其衍生物,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)或其衍生物,或黄素辅助因子诸如黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)或黄素单核苷酸(FMN)或其衍生物。优选地脱氢酶具体为乳酸脱氢酶(EC编号1.1.1.27或1.1.1.28)、葡萄糖脱氢酶(见下文)、乙醇脱氢酶(EC编号1.1.1.1或1.1.1.2)、L-氨基酸脱氢酶(EC编号1.4.1.5)、甘油脱氢酶(EC编号1.1.1.6)、苹果酸脱氢酶(EC编号1.1.1.37)、3-羟基丁酸酯脱氢酶(EC编号1.1.1.30)或山梨醇脱氢酶(EC编号1.1.1.14)。

[0054] 更优选地,所述氧化还原酶为葡萄糖脱氢酶。最优选地,所述葡萄糖脱氢酶选自下组:葡萄糖脱氢酶(EC编号1.1.1.47)、醌蛋白(quinoprotein)葡萄糖脱氢酶(EC编号1.1.5.2),特别是吡咯喹啉醌(PQQ)-依赖型葡萄糖脱氢酶(EC编号1.1.5.2)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(EC编号1.1.1.49)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)-依赖型葡萄糖脱氢酶(EC编号1.1.1.119)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)-依赖型葡萄糖脱氢酶(EC编号1.1.99.10)或其酶活性突变体。

[0055] 上述酶的酶活性突变体可通过从如之前所记载的本领域上述野生型酶所报导的氨基酸序列取代、添加或缺失一个或多个氨基酸获得。优选的突变体为PQQ-依赖型葡萄糖脱氢酶突变体,其相比如US 7,132,270或US 7,547,535所公开的其野生型对照具有改进的底物特异性。上述两文件关于突变体通过提述并入本文。其他突变体为公开于Baik等人(Baik 2005,Appl Environ Microbiol 71:3285),Vasquez-Figuera等人(Vasquez-

Figuera 2007, Chem BioChem 8:2295) 和 WO 2005/045016 的那些。

[0056] 对应本发明优选的为 WO2009/103540A1 (p.21) 或 EP1660648 中所公开的葡萄糖脱氢酶 (E.C.1.1.1.47) 突变体, 其具有至少在氨基酸位置 96、170 和/或 252 的突变, 通过提述并入本文。在这些氨基酸位置预期的优选突变为 Glu96Gly、Glu170Arg 或 Lys 和/或 Lys252Leu 的取代, Glu170Lys/Lys252Leu 的组合为更优选。最优选地, 所述突变为来自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的葡萄糖脱氢酶中的突变 Glu170Arg 和 Gln252Leu。

[0057] 本文使用的术语“氧化还原辅助因子”涉及氧化还原活性黄素、烟酰胺或吡咯喹啉醌 (PQQ) 辅酶。本领域的技术人员已知如何依赖所选的氧化还原酶适当地选择上述辅酶。优选地, 黄素、烟酰胺或 PQQ 辅酶为黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)、黄素单核苷酸 (FMN) 或 PQQ 或上述化合物之一的衍生物。更优选地, 黄素、烟酰胺或 PQQ 辅酶为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD^+)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP^+) 或其衍生物。优选的 NAD^+ 或 NADP^+ 衍生物为稳定化的 NAD^+ 或 NADP^+ 衍生物, 即优选地碳环 (carbacyclic) 衍生物, 包括更优选地碳代 NAD^+ (carba NAD^+) 或碳代 NADP^+ (carba NADP^+), 如优选在 Slama (Biochemistry 27:183 (1988)), Hutchinson 等人 (Chem. Comm. 24:2765 (1996))、US 5,801,006、WO98/33936、WO01/49247 和 WO2007/012494 中所公开的那些。最优选地, 所述氧化还原辅助因子为 NAD^+ 、 NADP^+ 、碳代 NAD^+ 或碳代 NADP^+ 。

[0058] 本文使用的术语“氧化还原当量”涉及本领域的技术人员熟知的氧化还原化学中通常使用的概念。优选地, 术语涉及从氧化还原酶的底物转移至氧化还原辅助因子, 和/或从所述氧化还原辅助因子转移至氧化还原介导剂和/或从所述氧化还原介导剂转移至指示化合物和/或电极的电子。

[0059] 在优选的本发明化学基质的实施方案中, 所述组合物进一步包含至少一种清洁剂、溶胀剂、成膜剂和/或固体颗粒。将在本发明的组合物中使用的适当的稳定剂、清洁剂、溶胀剂、膜形成剂、氧化剂和/或固体颗粒为本领域的技术人员已知。优选地, 所述至少一种清洁剂选自下组: N-甲基-N-油酰基牛磺酸钠、N-辛酰基-N-甲基-葡糖胺、Mega 8 (N-甲基-N-辛酰基葡糖胺)、二辛酯磺基琥珀酸钠 (DONS)、Rhodapex® (优选 CO-433 或 CO-436)。优选地, 所述至少一种溶胀剂选自下组: 甲基乙烯基醚马来酸酐共聚物、黄原胶和甲基乙烯基醚马来酸共聚物。优选地, 所述至少一种膜形成剂选自下组: 聚乙烯丙酸酯分散体、聚乙烯酯、聚乙烯乙酸酯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸、聚乙烯酰胺、聚酰胺、聚苯乙烯且混合的聚合产物也是适当的, 诸如丁二烯、苯乙烯或马来酸酯。优选地, 所述至少一种固体颗粒选自下组: 二氧化硅颗粒特别是二氧化硅、硅酸钠或硅酸铝、硅藻土, 金属氧化物特别是氧化钛和/或氧化铝, 合成的氧化物材料特别是氧化物材料的纳米颗粒诸如二氧化硅、氧化铝的纳米颗粒, 或氧化钛、高岭土、玻璃粉 (powder glass)、无定形二氧化硅、硫酸钙和硫酸钡。

[0060] 此外, 本发明涉及包含本发明的化合物和/或本发明的化学基质的测试元件。

[0061] 本文使用的术语“测试元件”涉及在固体支持物上包含测试化学组合物 (优选干燥的测试化学组合物) 的单元。优选地, 所述测试化学组合物包括在如下文所述的测试场中。还为优选的是, 所述测试元件进一步包括毛细管元件, 适于通过毛细管作用占用和/或转运液体, 优选至测试场。优选地, 所述测试元件选自光学测试元件和电化学测试元件。所述测试元件可进一步任选地包含至少一个穿刺元件, 诸如采血元件, 其优选相对测试场可移动地固定, 进而实施穿刺动作、取样动作或采血动作, 由此在皮肤表面生成切口。优选地, 所述

测试场在穿刺、取样或采血动作过程中保持固定位置,其中体液样品转移至测试场上,诸如在穿刺、取样或采血动作后通过毛细管作用和/或通过按压穿刺元件或其部分转移至测试场上。优选地,所述测试元件为测试条、测试带或测试盘。

[0062] 术语“测试场”涉及测试化学组合物连续或非连续的量,其优选通过至少一种载体诸如通过至少一种载体膜保持。因此,所述测试化学可形成或可包含于测试场的一种或多种膜或层中,且/或所述测试场可包含具有一个或多个层的层设置,其中层的至少之一包含测试化学品。因此,所述测试场可包含置于载体上的层设置,其中体液样品可应用于来自至少一个应用端的层设置,诸如来自测试场边缘和/或来自测试场的应用表面。优选地,所述测试场具有多层设置,所述多层设置包含至少一个具有至少一种测试材料的检测层且进一步包含至少一个适于分离开包含于体液中的至少一种颗粒组分的分离层,其中所述分离层位于检测层和毛细管元件间。本领域的技术人员理解的是,选择任选存在于体液和测试场间的全部层进而允许至少分析物的通过。

[0063] 优选地,所述测试元件为光学测试元件,即在分析物存在下适于改变至少一种光学特性的测试元件。更优选地,包括在测试元件中的至少一种化学基质在分析物存在下实施至少一种光学上可检测的检测反应。甚至更优选地,所述检测反应为氧化还原反应。最优选地,所述检测反应产生氧化还原当量和/或电子作为中间体和/或产物。优选地,由检测反应产生的光学上可检测的信号与样品中分析物的量和/或浓度成比例。

[0064] 优选地,在分析物存在下适于改变至少一种光学特性的测试元件(优选化学基质包含在所述测试元件中)包含至少一种指示试剂,所述指示试剂在除下文详述的组分外的氧化还原当量存在下改变至少一种光学特性。本文使用的术语“指示试剂”优选涉及化合物,所述化合物取决于本发明的酶活性改变至少一种光学特性(优选与本发明的酶活性成比例)。优选地,所述指示试剂为光学指示物质,当至少一种酶或当包含在化学基质中的酶与分析物反应时,其实施至少一种光学上可检测的特性变化。因此,所述至少一种指示试剂优选包含一种或多种染料,所述染料实施光学特性中的改变,其对至少一种酶和分析物的酶学反应为指示性的。

[0065] 本文使用的术语“光学特性”涉及可通过光学仪器检测的特性。具体而言,光学特性可为或可包含至少一种选自下组的特性:反射特性、传递特性、发射特性、散射特性、荧光特性、磷光特性、衍射特性和偏振特性。优选地,本文所述的光学特性是指指示试剂的可光学检测的特性,诸如光吸收、光发射、光再发射(remission)或与其相关。将理解的是,本文使用的至少一种光学特性的此种变化涵盖之前未检测到的特性存在的检测、之前已检测的特性不存在的检测和特性量变的检测,即与至少一种光学特性的变化程度相关的信号强度变化的检测。本发明预期的优选的光学特性为颜色、荧光、发光或折光。取决于在化学基质中待检测的期望的光学特性,本领域的技术人员处于选择的立场而无需为适当的指示试剂花费精力。将如上文定义的光学特性转化为可作为测量值读取的物理信号的方法为本领域已知且描述于例如EP 0 821 234、EP 0 974 303和US 2005/0023152中。

[0066] 本发明的指示试剂的光学特性取决于本发明的酶的活性改变。因此,优选地,光学特性的改变仅在酶催化检测反应时发生。更优选地,光学特性的变化与通过化学基质中存在的酶经历的催化循环的数目成比例。因此,最优选地,光学特性的改变与由酶转化的分析物分子的数目成比例。

[0067] 更优选地,所述测试元件为电化学测试元件。因此,所述测试元件优选包含至少两个直接或间接接触化学基质的电极,如下文所述。适当的电极、电极设置和操作模式为本领域的技术人员已知且描述于例如W0 2007/071562 A1、W0 2014/001382 A1、US 2005/0023152和本文引用的参考文献中。此外,本发明预期的是化学基质包括一种或多种化学试剂,其用于与分析物反应以产生代表样品流体中分析物存在的电化学信号。优选地,用于与分析物反应以产生代表样品流体中分析物存在的电化学信号的一种或多种化学试剂包含本发明的化合物。更优选地,用于与分析物反应以产生电化学信号的化学试剂除本发明的化合物还进一步包含至少一种如上文所述的氧化还原酶。最优选地,用于与分析物反应以产生电化学信号的化学试剂除本发明的化合物和至少一种氧化还原酶还进一步包含至少一种如上文所述的氧化还原辅助因子。优选地,电化学特性包括安培或库仑响应,其对分析物的浓度具有指示性。参见例如美国专利号5,108,564,4,919,770和6,054,039。

[0068] 优选地,所述电化学测试元件包含至少两个接触包含于所述测试元件中的化学基质的电极,或与所述测试化学品导电连接的接触装置。优选地,所述与化学基质导电连接的装置为与化学基质连接的测试条的层,其允许氧化还原辅助因子和/或氧化还原介导剂通过所述层扩散。更优选地,所述与化学基质导电连接的装置为至少部分叠加和/或在所述化学基质以下的测试条的层,其允许氧化还原辅助因子和/或氧化还原介导剂通过所述层扩散。

[0069] 本发明的电化学特性依赖于本发明的氧化还原酶的活性变化。因此,优选地,电化学特性的变化仅当氧化还原酶催化检测反应时发生。更优选地,光学特性的变化与化学基质中存在的通过氧化还原酶经历的催化循环的数目成比例。因此,最优选地,光学特性的变化与由氧化还原酶转化的分析物分子的数目成比例。

[0070] 本发明还涉及用于确定液体样品中分析物的量的装置,其包含本发明的化合物和/或本发明的测试元件。优选地,所述装置进一步包括光学和/或电化学传感器。

[0071] 此外,本发明涉及本发明的化合物在分析或诊断测试中的用途。

[0072] 优选地,所述分析或诊断测试包括可通过光学或电化学的方式检测的任何生物或化学分析物的定性和/或定量测定。优选地,所述分析物包含在受试者的测试样品中,更优选地,在体液的测试样品中。更优选地,所述分析或诊断测试包括确定测试样品中的葡萄糖浓度。最优选地,所述分析或诊断测试包括确定来自患有糖尿病或疑似患有糖尿病的受试者的测试样品中的葡萄糖浓度。还为优选的是,所述分析或诊断测试为用于监测血液葡萄糖浓度的测试,优选地在患有糖尿病或疑似患有糖尿病的受试者中。所述分析或诊断测试优选在体外测试。

[0073] 本文使用的术语“分析物”涉及存在于体液中的化合物。优选地,所述分析物为小分子,即优选地,所述分析物并非为生物大分子。更优选地,所述分析物为有机分子,最优选地,是能够在本发明的测试化学品存在下经历氧化还原反应的有机分子。优选地,所述分析物为受试者的代谢分子。还为优选的是,所述分析物为低分子量化合物,更优选地具有小于1000u (1000Da; 1.66×10^{-24} kg) 的分子量的化合物。更优选地,所述分析物选自下组:苹果酸、乙醇、抗坏血酸、胆固醇、甘油、尿素、3-羟基丁酸酯、乳酸盐、丙酮酸盐、甘油三酯、酮、肝参数、肌酸酐、HDL等;更优选地,所述分析物为血液葡萄糖。

[0074] 本文使用的术语“受试者”涉及脊椎动物。优选地,所述受试者为哺乳动物,更优选

地,小鼠、大鼠、猫、犬、仓鼠、豚鼠、绵羊、山羊、猪、牛或马。更优选地,所述受试者为灵长类。最优选地,所述受试者为人。优选地,所述受试者患有或疑似具有与偏离于正常的至少一种分析物相关的疾病或病况。更优选地,所述受试者患有糖尿病。优选地,所述受试者优选地使用还原剂接受全身性治疗,优选地适于抗坏血酸盐(维生素C)的治疗。

[0075] 本文使用的术语“体液”涉及已知包含或疑似包含本发明分析物的受试者的全部体液,包括血液、血浆、血清、泪液、尿液、淋巴液、脑脊髓液、胆汁、粪便、汗液、间质液和唾液。优选地,所述体液为血液、血浆或血清。

[0076] 术语“测试样品”为本领域的技术人员所理解且涉及任何适当尺寸的组织或优选地受试者的体液的亚部分。体液测试样品可通过已知的技术获得,包括例如静脉或动脉穿刺、表皮穿刺等。

[0077] 本文使用的术语“糖尿病”或“糖尿病”指其中葡萄糖代谢损伤的疾病状况。所述损伤导致高血糖。根据世界卫生组织(WHO),糖尿病可细分为四类。1型糖尿病由胰岛素的缺乏导致。胰岛素由称为胰岛的细胞产生。在1型糖尿病中所述细胞可由自身免疫反应摧毁(1a型)。此外,1型糖尿病还涵盖特发性变异(1b型)。2型糖尿病由胰岛素抗性导致。3型糖尿病根据目前的分类包括全部其他特性类型的糖尿病。例如, β 细胞可具有影响胰岛素产生的基因缺陷,胰岛素抗性可基因或由于胰岛的摧毁或损伤引发。此外,激素异常调节或药物也可导致3型糖尿病。4型糖尿病可在妊娠过程中发生。优选地,本文使用的糖尿病指1型糖尿病或更优选地,2型糖尿病。根据德国糖尿病协会,糖尿病由空腹状态高于110mg/dl或餐后高于220mg/dl的血浆葡萄糖水平确诊。其他可与本发明的分析或诊断测试组合或除本发明的分析或诊断测试外的用于诊断糖尿病的优选诊断技术为本领域已知,且描述于标准医学教科书中,诸如Stedman或Pschyrembl。

[0078] 本领域的技术人员理解的是,在糖尿病中,血液葡萄糖水平必需常规检查,进而避免高血糖和/或采取措施对抗高血糖,例如在餐后,或避免低血糖和/或采取措施对抗低血糖,例如在施用胰岛素后。因此,本发明还涉及用于确定血液葡萄糖水平,更优选地,用于在诊断高血糖、低血糖或正常葡萄糖水平中使用的本发明的化合物。

[0079] 本发明还涉及本发明的化合物在制备本发明的化学基质或制备本发明的装置中的用途。

[0080] 此外,本发明涉及用于确定样品中分析物的量的方法,包括:

[0081] a) 将所述样品与本发明的化学基质接触,

[0082] b) 评估由所述液体样品中存在的化学基质释放或消耗的氧化还原当量的量,且

[0083] c) 由此确定液体样品中分析物的量。

[0084] 用于确定分析物的量的方法优选为体外方法。此外,其除上文所述那些外还可包括步骤。例如,其他步骤可涉及例如处理和/或调理用于步骤a)的样品,或在步骤b)中的所述化学基质内应用电压和/或测量电流。此外,一个或多个所述步骤可通过自动化设备实施。本领域的技术人员还理解的是,可重复所述方法的一个或多个步骤,例如评估由所述化学基质释放或消耗的氧化还原当量的量的步骤。

[0085] 术语“确定”涉及测量样品中分析物的量,优选半定量或更优选定量地测量。

[0086] 评估氧化还原当量的量(优选在化学基质中释放或消耗的电子)的方法为本领域已知。优选地,释放或消耗的氧化还原当量的量通过光学或通过电化学测试元件的方式评

估。优选地,评估释放或消耗的氧化还原当量的量包括使至少两个电极与化学基质接触,或以导电连接的方式与所述测试化学品连接,将电压应用至所述电极并测量流通接触化学基质的所述电极的电流。

[0087] 本发明进一步涉及用于确定样品中分析物的量的试剂盒,其包含:

[0088] a) 本发明的测试元件和

[0089] b) 用于在受试者的机体表面产生切口的装置。

[0090] 用于在机体表面产生切口的装置为本领域的技术人员已知,且优选包括手术刀(scalpel)、刀或针。用于在机体表面上产生切口的更优选的方式为柳叶刀(lancet)。

[0091] 本说明书引用的全部参考文献以其整体公开内容和在本说明书中具体提及的公开内容在此处通过提述并入。

[0092] 下列实施例仅阐述本发明。它们无论如何都不应理解为是对本发明保护范围的限制。

[0093] 本发明的其他任选的特征和实施方案将以更详细的方式在优选实施方案的下述说明中公开,优选地结合独立权利要求。其中,相应的任选特征将以本领域的技术人员将实现的独立的方式以及以任意可获得的组合的方式实现。本发明的保护范围不受优选的实施方案的限制。

[0094] 在附图中:

[0095] 图1:1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪(式(III)的化合物)的循环伏安曲线。A:缓冲剂pH 7.0(空白电流),B:缓冲剂中的2mM 1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪,C:缓冲剂中的2mM 1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪+1.2mM抗坏血酸,D:缓冲剂中的1.2mM抗坏血酸。

[0096] 图2:A)抗坏血酸干扰(interference)的剂量响应曲线;在-100mV,pH 7.0的计时安培法;5mM 1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪、35mM cNAD和1.5kU/g葡萄糖脱氢酶(GDH)的溶液与所示葡萄糖浓度温育。A:0mg/mL抗坏血酸,B:30mg/mL抗坏血酸,C:100mg/mL抗坏血酸;线性:线性回归;B)抗坏血酸干扰的剂量响应曲线;在+650mV,pH 7.0的计时安培法;5mM 1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪、35mM cNAD和1.5kU/g葡萄糖脱氢酶(GDH)的溶液与所示葡萄糖浓度温育。A:0mg/mL抗坏血酸,B:30mg/mL抗坏血酸,C:100mg/mL抗坏血酸;线性:线性回归。

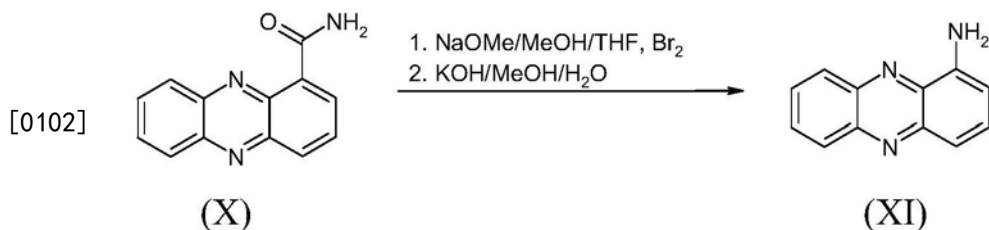
[0097] 图3:介导剂制剂的适用期。介导剂1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪和1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩噻嗪在适用期实验中进行了比较。显示了1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪(A:0h,B:48h)和1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩噻嗪(C:=0h,D:48h)的适用期;线性:线性回归。

[0098] 图4:A)1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪(CPEP)和1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩噻嗪(CEPES)在葡萄糖测量条中的剂量响应曲线。显示的是抗坏血酸不存在下(实线)和抗坏血酸存在下(虚线)的五次重复的线性回归曲线。1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪的 R^2 在抗坏血酸不存在下为0.9962且在抗坏血酸存在下为0.9834。1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩噻嗪的 R^2 在抗坏血酸不存在下为0.9728且在抗坏血酸存在下为0.999。B)在葡萄糖测量条中于低葡萄糖浓度用1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩噻嗪(CEPES)通过抗坏血酸引起的电流抵消;在(A)中数据相同,在低葡萄糖浓度用CEPES测量的值的详细视图。

[0099] 实施方案的详述(实施例)

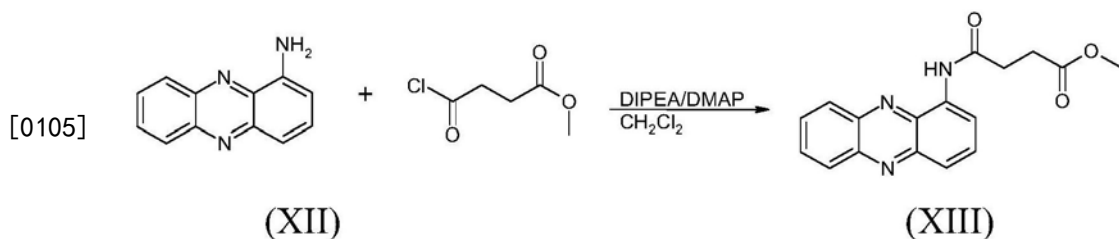
[0100] 用于本发明的化合物的合成的关键中间体为1-氨基吩嗪,其可通过多种方法合成(参见Urleb,U.and Gobec,S.,Science of Synthesis,2004,16,913-943)。1-氨基吩嗪随后与酰基氯或磺酰氯反应并任选地在去除保护基团后烷基化。对于在吩嗪鎓的氮上具有芳基吩嗪鎓盐而言,可使用不同的合成方法,参见Kehrmann and Masslenikow;Chemische Berichte,1911,44,2629。

[0101] 实施例1:1-氨基吩嗪的合成



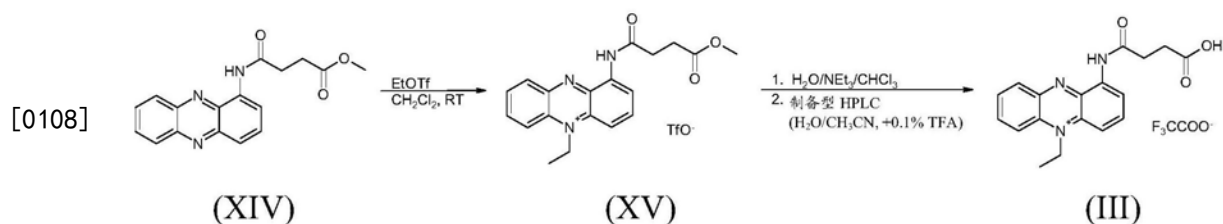
[0103] 将于100ml MeOH中的甲醇钠溶液(25%于MeOH中,24.6ml,107mmol)冷却至-78℃并历时2分钟添加于10.0ml MeOH中的溴溶液(2.10ml,40.9mmol)的时间段。在进一步冷却下,首先搅拌溶液5分钟,随后历时1小时经由滴液漏斗添加于200ml无水甲醇和400ml无水THF中的吩嗪-1-甲酰胺(4.00g,17.9mmol)。完成添加后,获得清澈的橙色溶液,将其温热至室温并进一步在55℃搅拌2小时。随后将混合物冷却下降至室温并进一步搅拌72小时。减压蒸发后,将残留物溶于甲醇(300ml)和NaOH水溶液(40%,150ml)并在90℃回流4小时。随后将溶液冷却下降至0℃并用浓HCl设置至pH 8.5,获得暗红色混悬液。减压浓缩至约200ml后,添加500ml水。用CHCl₃提取混合物3次。将合并的有机层经Na₂SO₄干燥并减压浓缩。粗产物通过硅胶色谱(正己烷/乙酸乙酯,80:20→75:25)纯化,获得为暗红色固体的2.86g标题化合物(82%)。

[0104] 实施例2:N-吩嗪-1-基-琥珀酰胺酸甲酯的合成



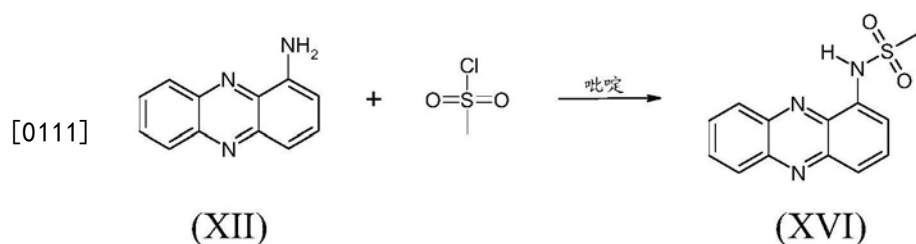
[0106] 将1-氨基吩嗪(1.00g,5.12mmol)溶于40.0ml CH₂Cl₂和N,N-二异丙基乙胺(957μl,5.63mmol)中。添加4-N,N-二甲氨基吡啶(31.3mg,0.256mmol)后,将混合物冷却至0℃,随后历时5分钟添加4-氯-4-氧代丁酸(693μl,5.63mmol)。将所得溶液在室温再搅拌16小时。用50.0ml CH₂Cl₂稀释后,将混合物用50.0ml NaOH水溶液(0.5%)洗涤一次。将有机层经Na₂SO₄干燥并减压浓缩。粗产物通过硅胶色谱(正己烷/丙酮80:20)纯化,获得为黄色固体的1.45g(92%)的标题化合物。

[0107] 实施例3:1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩嗪鎓三氟乙酸盐的合成



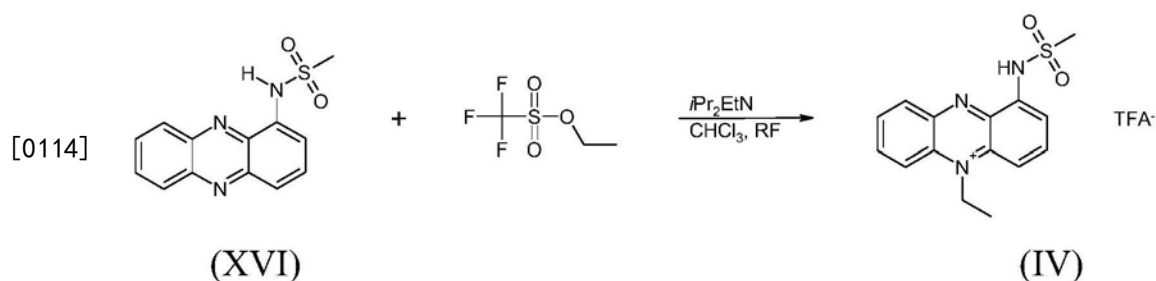
[0109] 将三氟甲磺酸乙酯 (542 μ l, 4.18mmol) 滴加至于 2.00ml CH_2Cl_2 中的 N-吩嗪-1-基-琥珀酰胺酸甲酯 (64.6mg, 0.208mmol) 溶液中。随后将混合物在 50 $^\circ\text{C}$ 回流 3.5h 并在室温搅拌 16h。随后添加 50.0ml CH_2Cl_2 和 2.00ml NEt_3 并用水提取所得溶液两次。将合并的水层用 CHCl_3 洗涤一次并冻干以获得 42.0mg 粗产物。粗产物通过制备型 HPLC (Chromolith, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 梯度 +0.1% TFA) 纯化, 获得为暗紫色晶体的 28.9mg (43%) 标题化合物。

[0110] 实施例 4: N-吩嗪-1-基-甲磺酰胺的合成



[0112] 将 1-氨基吩嗪 (50.0mg, 0.256mmol) 在吡啶 (1.00ml) 中稀释并冷却至 0 $^\circ\text{C}$ 。在进一步冷却下添加甲磺酰氯 (23.8 μ l, 0.307mmol)。将混合物在 0 $^\circ\text{C}$ 搅拌 5 分钟, 随后在室温搅拌 16 小时。减压浓缩后, 粗产物通过硅胶色谱 (正己烷/丙酮 80:20) 纯化, 获得为黄色固体的 66.0mg (94%) 标题化合物。

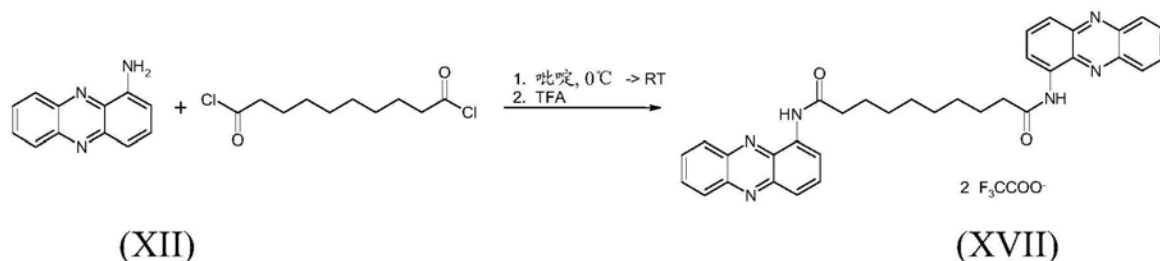
[0113] 实施例 5: 5-乙基-1-甲磺酰基氨基-吩嗪鎓三氟乙酸盐的合成



[0115] 将 N-吩嗪-1-基-甲磺酰胺 (20.0mg, 0.073mmol) 稀释于 CHCl_3 (2.00ml) 中并添加三氟甲磺酸乙酯 (1.00ml, 7.70mmol), 使混合物立即变红。将混合物在 70 $^\circ\text{C}$ 回流 7 小时并在室温搅拌 16 小时。随后添加 N-乙基二异丙胺 (250 μ l, 1.46mmol), 使颜色从暗红色变为褐色。该混合物再回流 8 小时并在室温搅拌 16 小时。将减压浓缩后获得的粗产物稀释于 10.0ml CHCl_3 和 10.0ml 水中。将有机层用水提取四次。将合并的水性层浓缩至干并在制备型 HPLC (Chromolith; $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ -梯度 +0.1% TFA) 上纯化, 获得为暗蓝色固体的 2.2mg (7%)。

[0116] 实施例 6: 癸二酸二-N-吩嗪-1-基酰胺二-三氟乙酸盐的合成

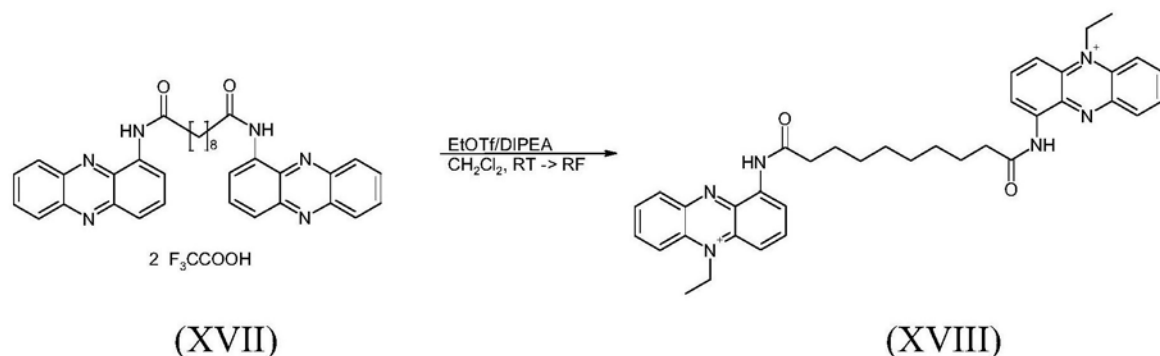
[0117]



[0118] 将1-氨基吩嗪 (25.0mg, 0.128mmol) 溶于吡啶 (1.30ml) 中并冷却至0℃。历时30分钟向该溶液中缓慢添加在0.50ml CH₂Cl₂中的癸二酰氯 (13.7μl, 0.064mmol)。将所得混悬液在室温再搅拌48小时。随后将混合物用三乙基铵乙酸盐缓冲剂 (pH 7, 1M, 5.00ml) 稀释, 并用CH₂Cl₂提取三次。将合并的有机层经Na₂SO₄干燥并减压浓缩。将所得粗产物混悬于3.00ml H₂O/CH₃CN (1:1+0.1% TFA) 中并过滤。未经进一步纯化使用主要包含标题化合物的残留物。产量: 12.3mg (34%), 其为黄色固体。

[0119] 实施例7: 癸二酸二-[(5-乙基-吩嗪-1-基)-酰胺]的合成

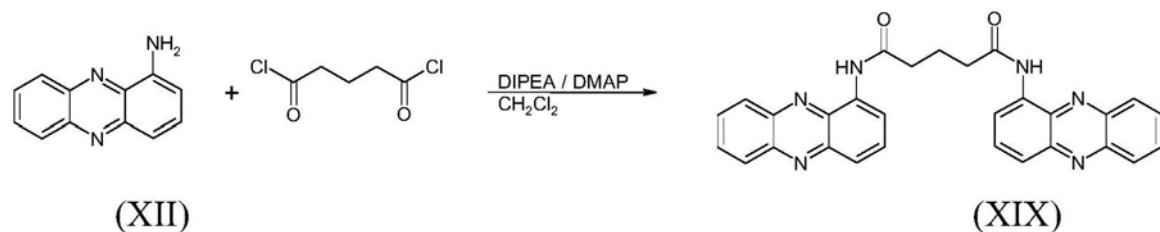
[0120]



[0121] 向于CH₂Cl₂ (3.00ml) 中的癸二酸二-吩嗪-1-基酰胺三氟乙酸盐 (12.3mg, 0.016mmol) 的混悬液中添加二异丙基乙胺 (37.4μl, 0.22mmol) 和三氟甲磺酸乙酯 (300μl, 2.31mmol)。将所得褐色溶液在55℃回流3小时并在室温再搅拌16小时。减压蒸发后, 所得粗产物通过制备型HPLC (XTerra, H₂O/CH₃CN梯度+0.1% TFA) 纯化, 获得为暗紫色晶体的0.9mg (9%) 标题化合物。

[0122] 实施例8: 戊二酸二-吩嗪-1-基酰胺的合成

[0123]

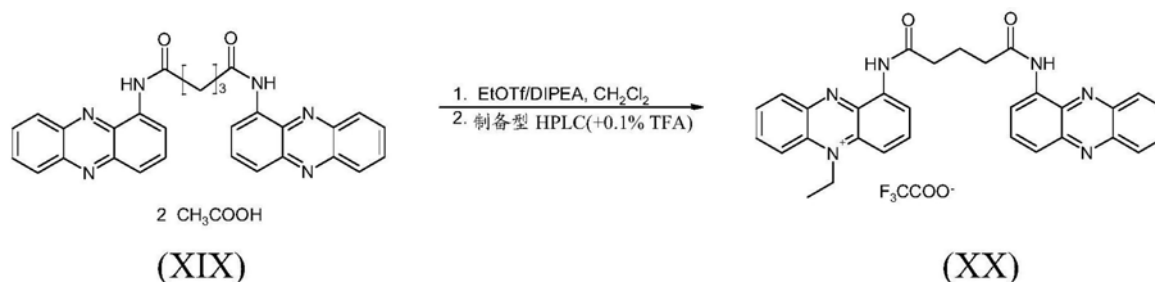


[0124] 向1-氨基吩嗪 (50.0mg, 0.256mmol) 的溶液中添加二异丙基乙胺 (87.0μl, 0.512mmol) 和催化量的二甲氨基吡啶。向所得红色溶液中添加戊二酰氯 (16.3μl, 0.128mmol) 并在室温搅拌16小时。将所得橙色混悬液用水稀释并用CH₂Cl₂提取两次。将合并的有机层经Na₂SO₄干燥并减压浓缩。将所得粗产物混悬于乙酸中并过滤。所得残留物进一步

通过硅胶色谱(CHCl_3 /丙酮, 9:1)纯化, 获得为黄色固体的15.8mg (13%) 标题化合物。

[0125] 实施例9: 5-乙基-1-[4-(吩噻-1-基氨甲酰基)-丁酰基氨基]-吩噻鎓三氟乙酸盐的合成

[0126]



[0127] 将戊二酸二-吩噻-1-基酰胺二乙酸盐(15.8mg, 0.032mmol)混悬于 CH_2Cl_2 (3.00ml)中并添加三氟甲磺酸甲酯(500 μl , 3.86mmol)。将二异丙基乙胺(48.9 μl , 0.288mmol)添加至所得红褐色混悬液中, 随后在50 $^\circ\text{C}$ 回流1.5小时。在室温搅拌16小时后, 再次回流混合物7小时随后进一步在室温搅拌16小时。将所得澄清紫色溶液减压浓缩。获得的粗产物混悬于3.00ml $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1+0.1% TFA) 并过滤。残留物进一步通过制备型HPLC (XTerra, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ 梯度+0.1% TFA) 纯化, 获得为红褐色固体的1.0mg (6%) 标题化合物。

[0128] 实施例10: 1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻鎓的氧化还原电位

[0129] 在测试条中的金工作电极相对Ag/AgCl对典型的1-乙酰化氨基吩噻鎓乙基硫酸盐、1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻鎓(式(III)的化合物)的表观氧化还原电位进行测量。我们在生理条件下(0.9% NaCl)通过循环伏安法获得了相对Ag/AgCl的-236mV, 示于图1。循环伏安法显示相对Ag/AgCl的-100mV的相对低的电位足以氧化物质。

[0130] 相对Ag/AgCl, 经由两个电子转移的介导剂1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻鎓的准可逆氧化和还原在0mV至-500mV电位间发生。抗坏血酸在该电位窗口不能氧化且电流与纯缓冲溶液的空白电流相似。将抗坏血酸添加至介导剂1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻鎓不显著改变阳极和阴极的电流且氧化还原电位相对Ag/AgCl恰好转移至-231mV。因此, 添加抗坏血酸不显著还原所述氧化还原介导剂。

[0131] 实施例11: 抗坏血酸盐干扰1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻鎓

[0132] 图2显示相比cNADH在+650mV的直接氧化, 使用氧化还原介导剂1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻鎓的-100mV低氧化电位的优势。在cNADH的电位, 抗坏血酸也将氧化且空白电流取决于抗坏血酸的浓度将迅速增加。因此, -100mV相对低的电位在避免干扰物质的直接氧化中十分有效且即使样品包含高浓度的抗坏血酸, 空白电流也保持在非常接近于0。在不同浓度的抗坏血酸盐和葡萄糖, 于便利条件(pH 7.0)下, 在cNAD(35mM)、葡萄糖脱氢酶(1.5kU/g)存在下测量电流。

[0133] 实施例12: 1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻鎓和1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩噻鎓的适用期

[0134] 介导剂1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻鎓和1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩噻鎓在适用期实验中进行了比较。制备反应混合物后($t=0$)即刻和48小时后测量介导剂的表现。如图3中所示, 两种氧化还原介导剂在48小时适用期后都未显示电流的显著增加。因此, 两种介导剂看来在制剂中都非常稳定。在葡萄糖浓度的整个范围, 介导剂1-(3-羧基-丙

酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪比介导剂1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩噻嗪显示更高的电流。

[0135] 实施例13:抗坏血酸干扰其他1-氨基-吩噻嗪衍生物

[0136] 对1-乙酰氨基-5-甲基-吩噻嗪三氟甲磺酸盐、1-乙酰氨基-5-乙基-吩噻嗪三氟乙酸盐和1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪(式III),比较了关于其与抗坏血酸盐的反应性。为此,分别将每种0.23mM化合物在三乙基乙酸铵缓冲剂(pH 7)中在5倍摩尔过量的抗坏血酸盐存在下于室温温育。随时间记录在517nm(1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪)或512nm(其他两组化合物)的吸收的减少。而使用1-乙酰氨基-5-甲基-吩噻嗪时,吸收每分钟减少12%,对于1-乙酰氨基-5-乙基-吩噻嗪,减少减缓至7%每分钟,且对于1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪减少减缓至5%。

[0137] 实施例14:使用1-羟基-吩噻嗪衍生物的表现和抗坏血酸盐干扰

[0138] 对1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩噻嗪和1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪比较了其在葡萄糖测试条中抗坏血酸存在或不存在下作为氧化还原介导剂的表现。为此,使用0mg/dL、10mg/dL(0.5mM)、30mg/dL(1.5mM)和80mg/dL(4.0mM)的葡萄糖浓度且在1.48mM各氧化还原介导剂存在下记录剂量响应曲线。如果抗坏血酸存在,使用15mg/dL(0.85mM)的浓度。如图4A)中所示,与1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩噻嗪(CEPES)相比,使用1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪(CPEP)在给定葡萄糖浓度的剂量响应更高。此外,对于1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪,与1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩噻嗪相比,斜率剂量响应为约两倍(34nA*dL/mg相对于16.7nA*dL/mg)。此外,抗坏血酸盐对1-(3-羧基-丙酰基氨基)-5-乙基-吩噻嗪存在下测量的电流仅具有小的影响。相反,当使用1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩噻嗪作为氧化还原介导剂时,抗坏血酸盐在低葡萄糖浓度引起电流抵消,特别是低于30mg/dL时(图4B))。

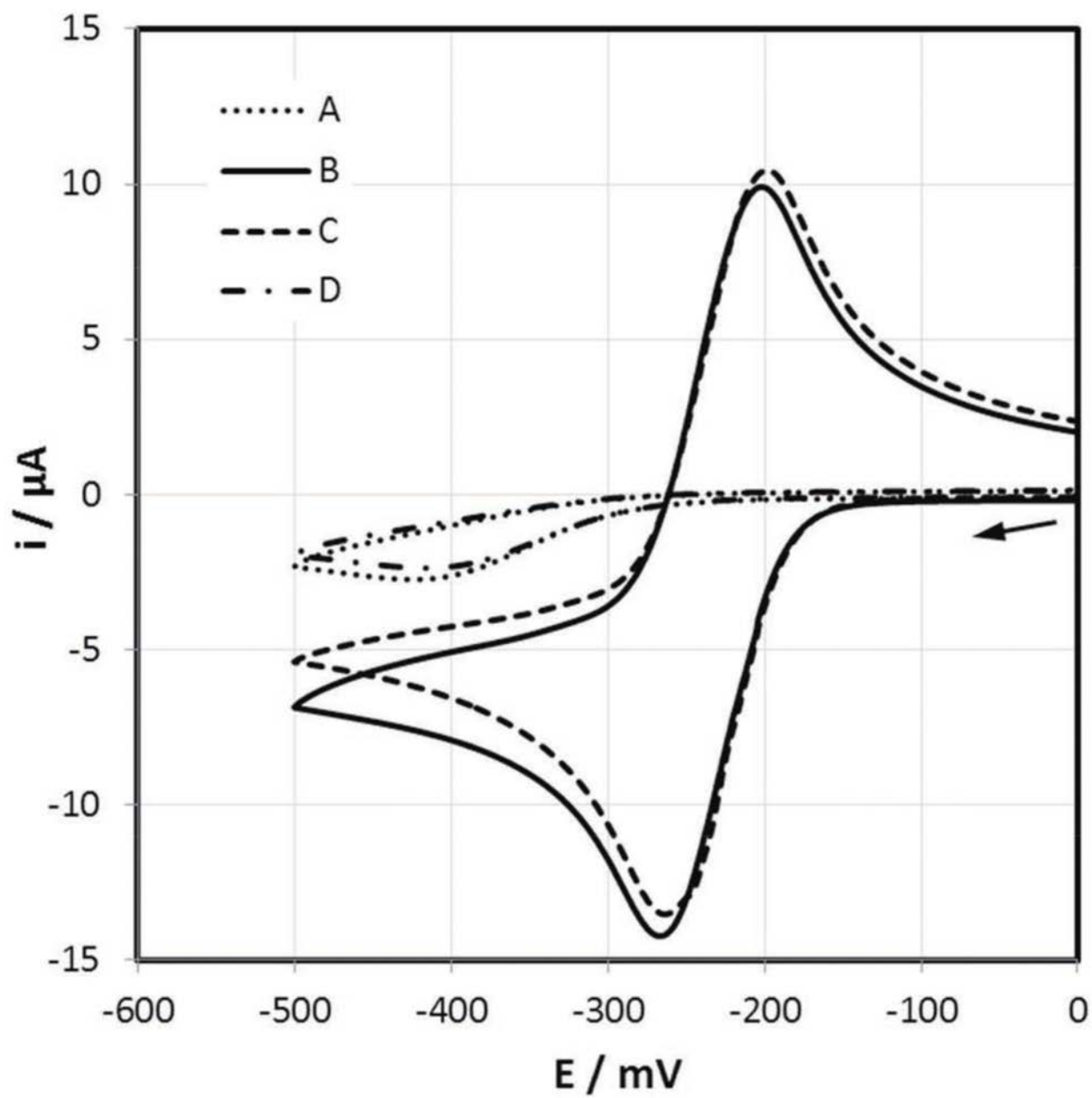


图1

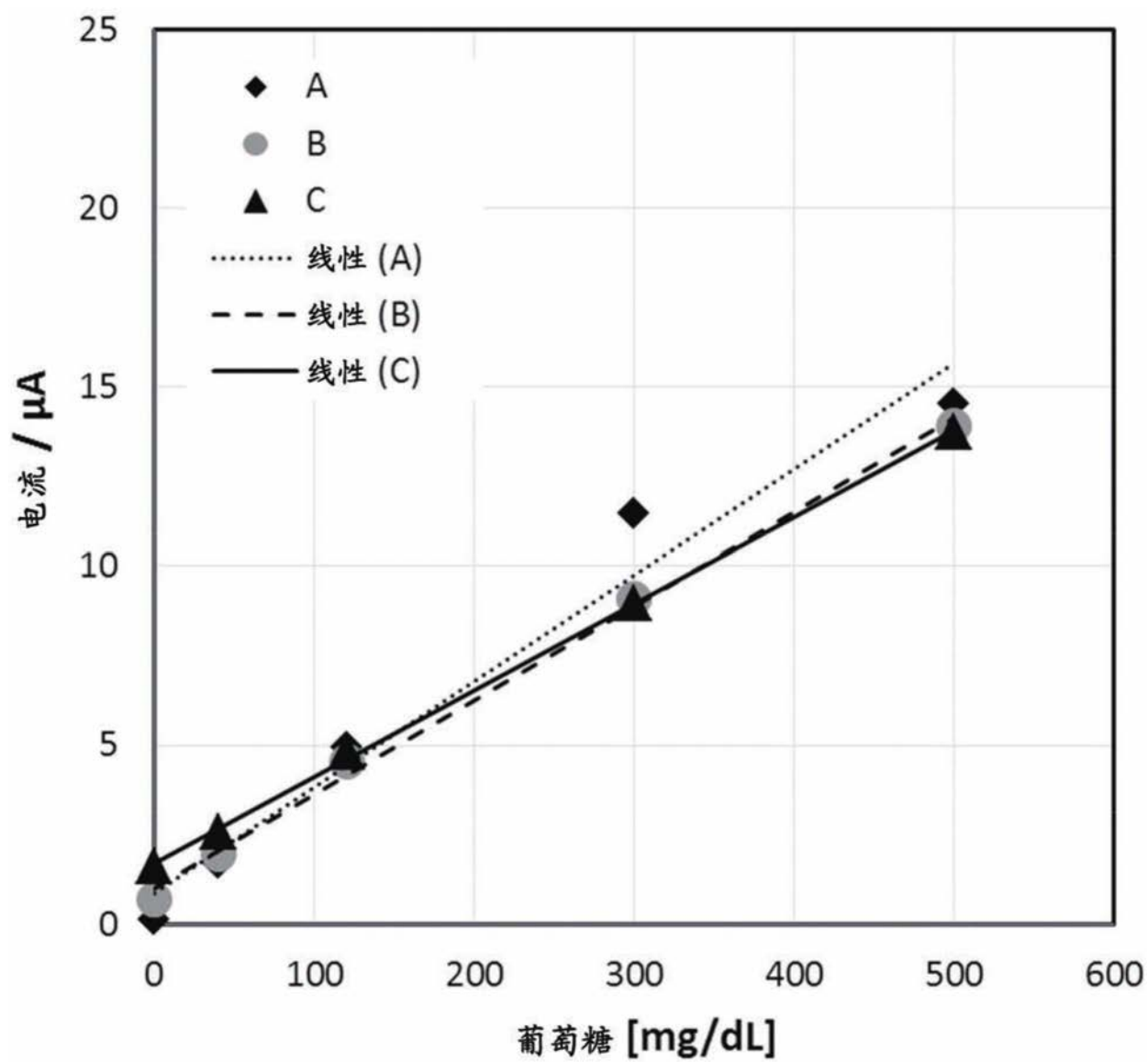


图2 (A)

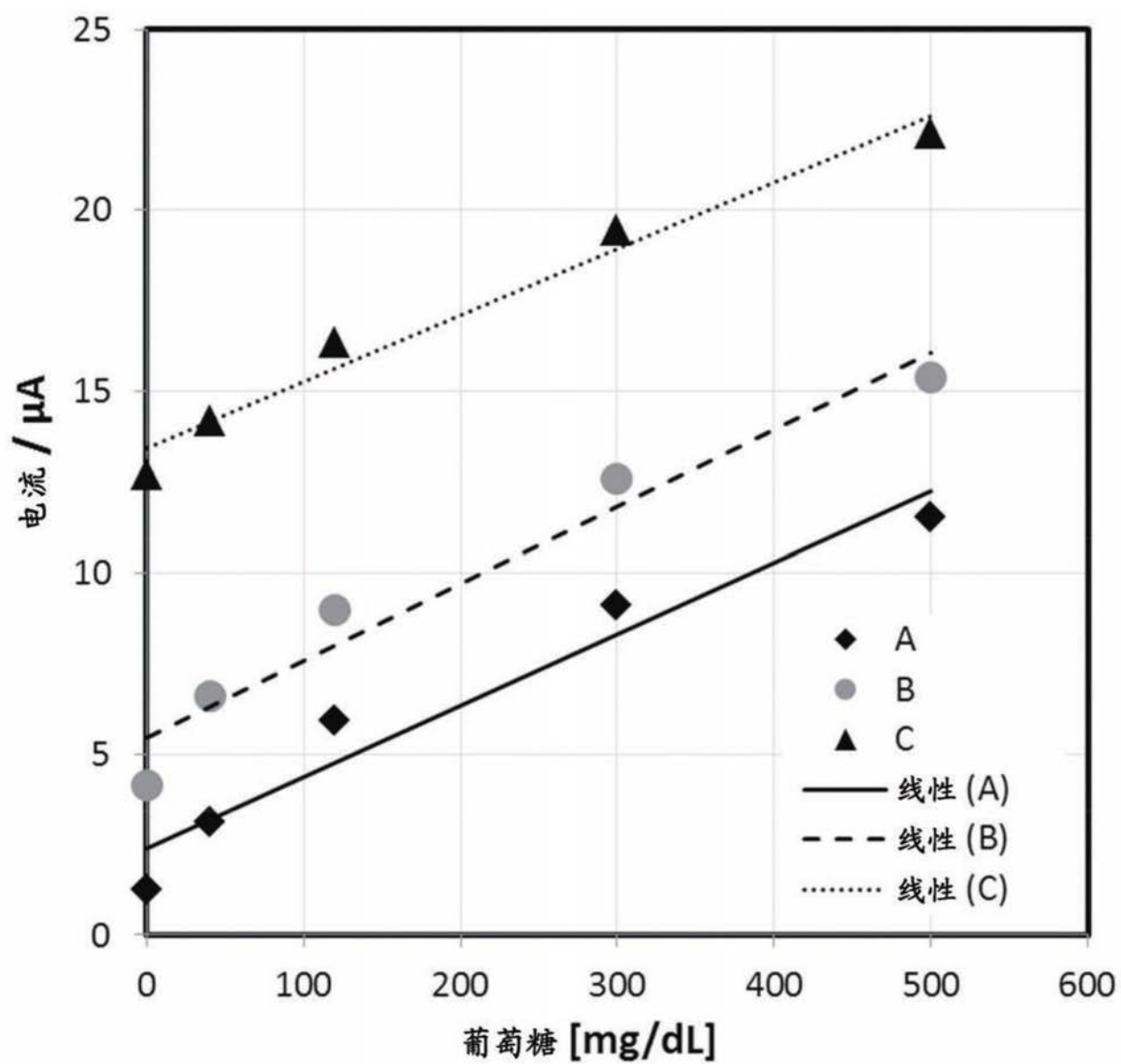


图2 (B)

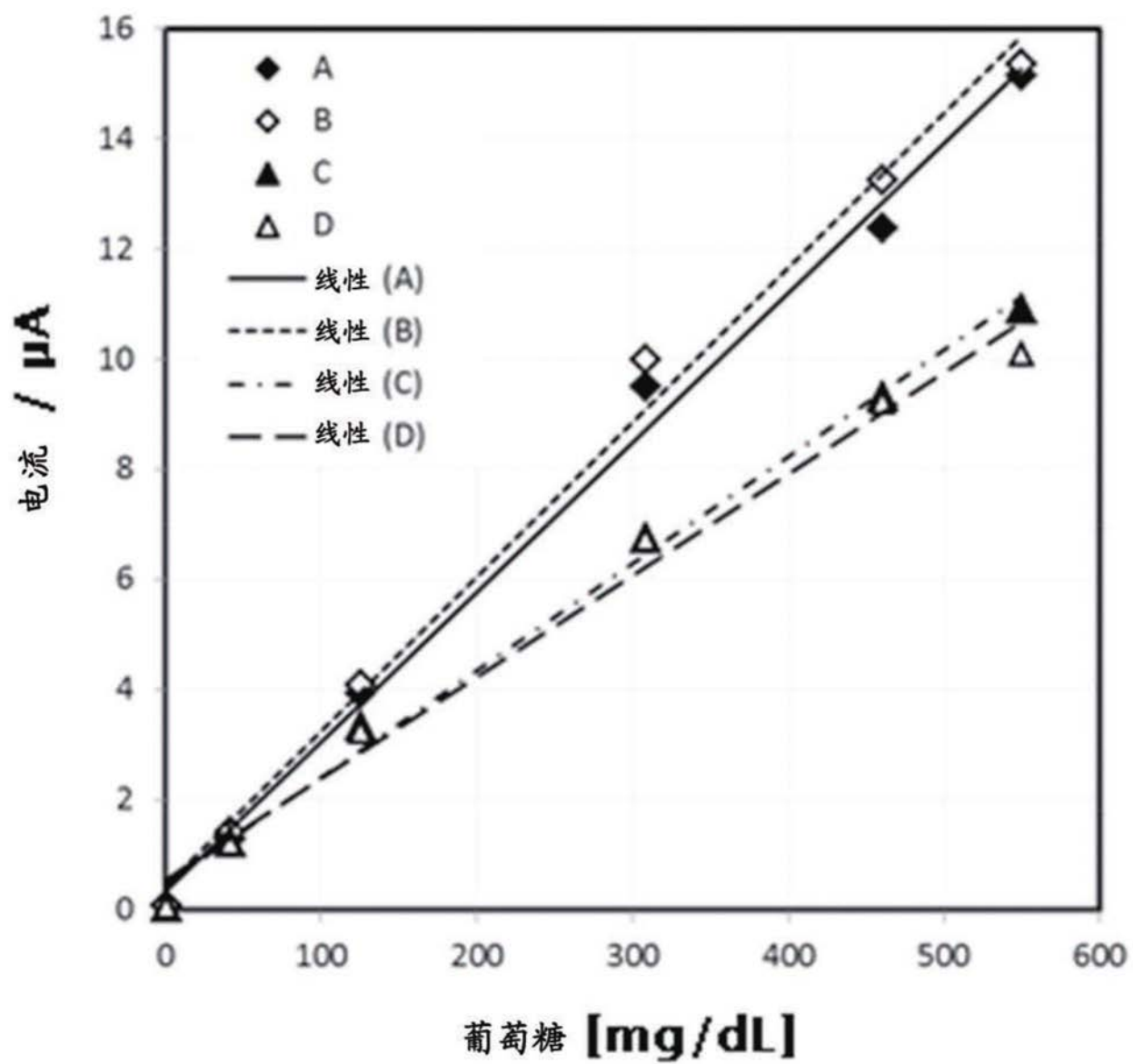


图3

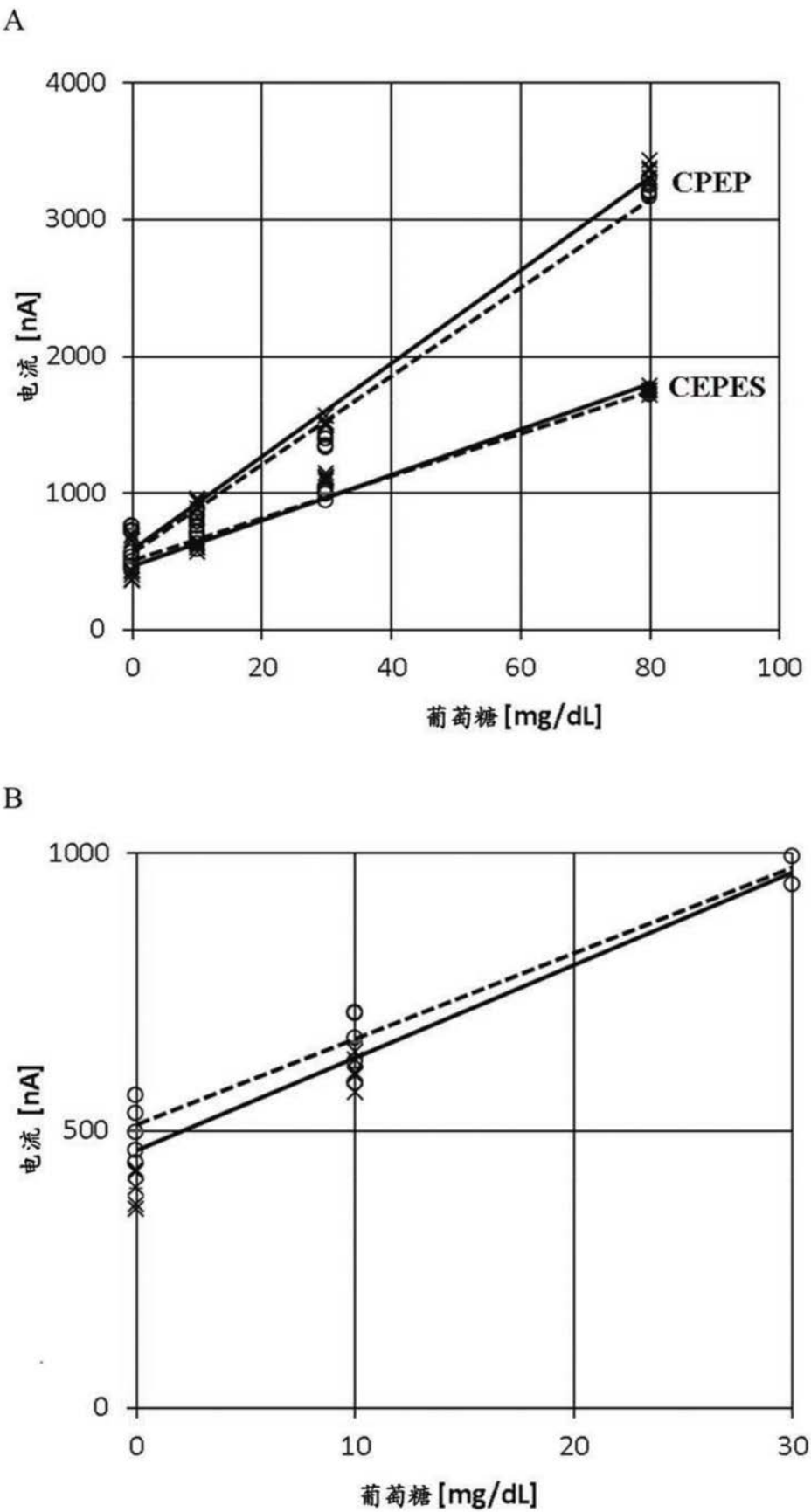


图4