



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102498177 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201080040648. 1

(22) 申请日 2010. 07. 15

(30) 优先权数据

61/225, 985 2009. 07. 16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 03. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/042063 2010. 07. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/008912 EN 2011. 01. 20

(73) 专利权人 贝克曼考尔特公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 H·阿哈万·塔夫狄 R·德席尔瓦

王国平 R·A·艾克霍特

R·K·古普塔 L·S·卡阿努马利

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 傅强国 贾师英

(51) Int. Cl.

C09B 57/00 (2006. 01)

C12Q 1/66 (2006. 01)

G01N 33/535 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 5098828 A, 1992. 03. 24, 全文.

US 5424440 A, 1995. 06. 13, 全文.

CN 1742057 A, 2006. 03. 01, 全文.

CN 1934270 A, 2007. 03. 21, 全文.

CN 101270105 A, 2008. 09. 24, 全文.

US 6140051 A, 2000. 10. 31, 图 1A 中的化合物 1c 以及权利要求 1.

EMIL H. WHITE 等. "The Chemi- and Bioluminescence of Firefly Luciferin: An Efficient Chemical Production of Electronically Excited States". 《BIOORGANIC CHEMISTRY》. 1971, 第 1 卷 (第 1-2 期), 第 92-122 页.

审查员 潘成玉

权利要求书4页 说明书38页 附图4页

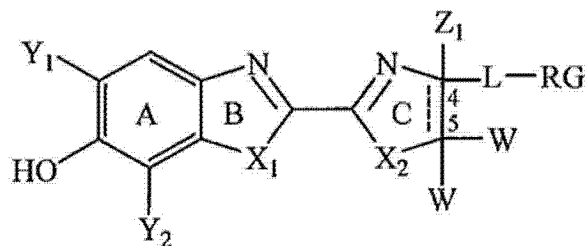
(54) 发明名称

新荧光染料及其用途

(57) 摘要

本发明提供了以萤火虫荧光素结构为基础的荧光染料。这些染料可在较短的波长处被最佳地激发, 并且具有至少 50nm 的斯托克斯频移。本发明的荧光染料可用于制备染料-共轭物, 该染料-共轭物能够用于样品中分析物的检测。

1. 一种荧光染料,具有如下通式:



其中,

X_1 和 X_2 独立地是 S 或者 O;

Y_1 和 Y_2 独立地是卤素,或者 Y_1 或 Y_2 中的一个为 H,而另一个是卤代烷基;

其中每个 W 独立地是 H 或烷基;

Z_1 是 H 或烷基;

其中 Z_1 和一个 W 基团可以缺失,并且如果缺失,它们就被环 C 中的 C_4 和 C_5 之间另外的键所替代;

L 独立地是化学键或连接基团;并且

RG 是反应基团,

其中,所述连接基团包含具有 1-50 个选自 C、N、O、S、P 和卤素原子的非氢原子的共价键,并且所述连接基团由单键、双键、三键、或芳香碳-碳键、碳-氧键、碳-硫键、碳-氮键、以及氮-氮键的任何组合所组成;并且

其中 RG 包含选自下组的反应基团:羧酸、羧酸的活化酯、酸酐、酰基氯、酰叠氮、酰卤、醛、氯甲酸酯、胺、羟基、肼、异氰酸酯、异硫氰酸酯、磺酰基、甲苯磺酰基、马来酰亚胺、N-羟基-琥珀酰亚胺酯、氮丙啶、亚胺、以及二硫基团。

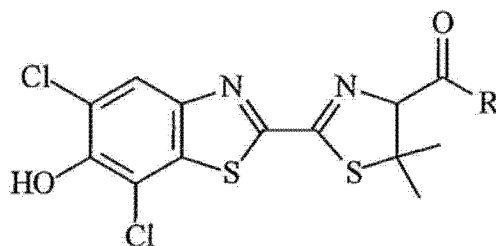
2. 如权利要求 1 所述的荧光染料,其特征在于,所述连接基团包含如下通式:

$R_1C(O)R_2$, 其中, R_1 是化学键或者附接于所述染料上的 C_{1-10} 亚甲基 $(CH_2)_n$; $C(O)$ 是羰基; R_2 是 OH 或者将羰基附接至反应基团 RG 上的化学键;或者

$R_1C(O)A_1R_3C(O)R_2$, 其中 R_1 是化学键或者 C_{1-10} 亚甲基; $C(O)$ 是羰基; A_1 或者是 NH、S, 或者是 O; R_3 是烯基 $(CH_2)_n$ 、具有至少一个不饱和键的五元环或六元环、或 C_{1-10} 亚甲基 $(CH_2)_n$ 与五元环或六元环的组合; R_2 是 OH 或者将末端羰基附接至反应基团 RG 上的化学键。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的荧光染料,其特征在于, RG 包含羧酸、羧酸的琥珀酰亚胺酯、酰肼、胺、异硫氰酸酯、或马来酰亚胺。

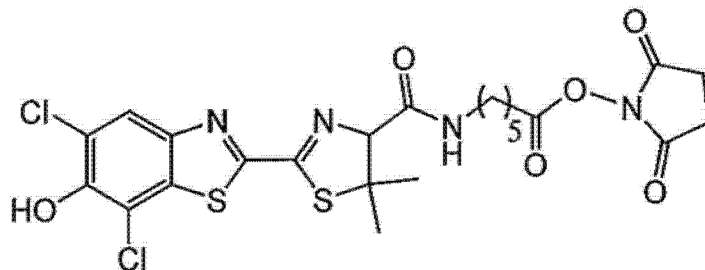
4. 如权利要求 1 所述的荧光染料,具有下述通式:



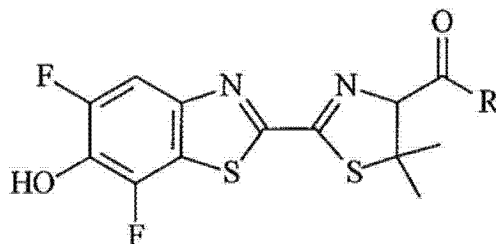
其中,

R 代表 OH、琥珀酰亚胺氧基、 $NH(CH_2)_nCOOH$ 、 $NH(CH_2)_nCO-$ 琥珀酰亚胺、或 $NH(CH_2)_n-$ 马来酰亚胺,其中 $n = 1-10$ 。

5. 如权利要求 1 所述的荧光染料,具有下述通式:



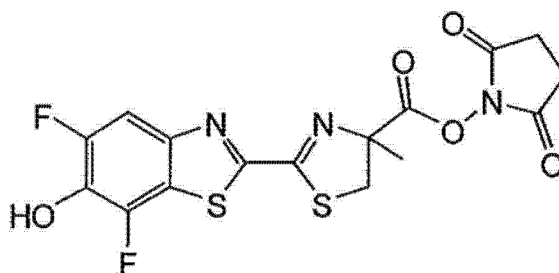
6. 如权利要求 1 所述的荧光染料,具有下述通式:



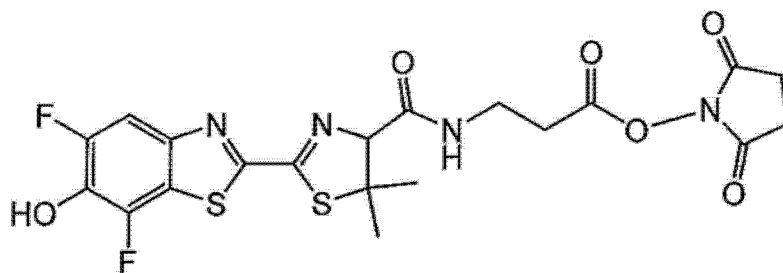
其中,

R 代表 OH、琥珀酰亚胺氧基、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO-}$ 琥珀酰亚胺、或 $\text{NH}(\text{CH}_2)_n-$ 马来酰亚胺,其中 $n = 1-10$ 。

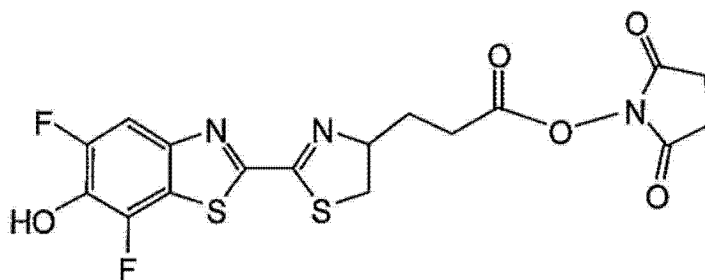
7. 如权利要求 1 所述的荧光染料,具有下述通式:



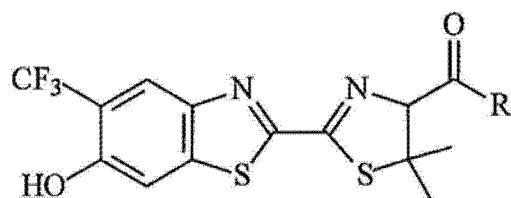
8. 如权利要求 1 所述的荧光染料,具有下述通式:



9. 如权利要求 1 所述的荧光染料,具有下述通式:



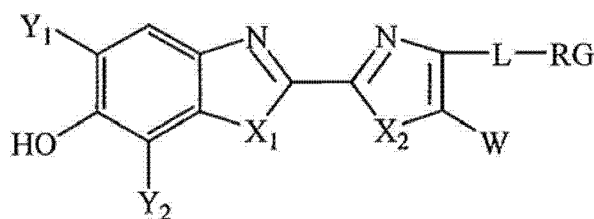
10. 如权利要求 1 所述的荧光染料,具有下述通式:



其中,

R 代表 OH、琥珀酰亚胺氧基、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ 、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO-}$ 琥珀酰亚胺、或 $\text{NH}(\text{CH}_2)_n-$ 马来酰亚胺, 其中 $n = 1-10$ 。

11. 如权利要求 1 所述的荧光染料, 具有下述通式:



其中,

X_1 和 X_2 独立地是 S 或者 0；

Y_1 和 Y_2 独立地是卤素, 或者 Y_1 或 Y_2 中的一个是 H、而另一个是卤代烷基;

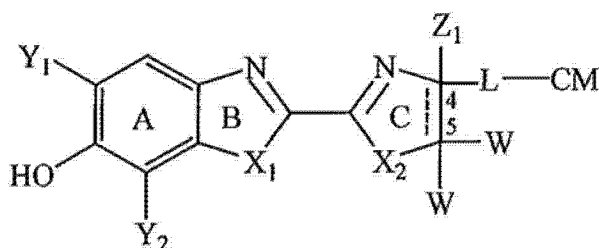
W 是 H 或烷基；

L 独立地是化学键或者连接基团,其中所述连接基团包含具有 1-50 个选自 C、N、O、S、P 和卤素原子的非氢原子的共价键,并且所述连接基团由单键、双键、三键、或芳香碳-碳键、碳-氧键、碳-硫键、碳-氮键、以及氮-氮键的任何组合所组成;并且

其中 RG 是选自下组的反应基团：羧酸、羧酸的活化酯、酸酐、酰基氯、酰叠氮、酰卤、醛、氯甲酸酯、胺、羟基、肼、异氰酸酯、异硫氰酸酯、磺酰卤、甲苯磺酰基、马来酰亚胺、N-羟基-琥珀酰亚胺酯、氮丙啶、亚胺、以及二硫基团。

12. 如权利要求 1 所述的荧光染料,其能以 340nm 至 450nm 的波长激发。

13. 一种染料-共轭物,具有如下通式:



其中,

X_1 和 X_2 独立地是 S 或者 0；

Y_1 和 Y_2 独立地代表卤素, 或者 Y_1 或 Y_2 中的一个为 H, 而另一个是卤代烷基;

其中每个 W 独立地是 H 或烷基；

Z_1 是 H 或烷基；

其中 Z_1 和一个 W 基团可以缺失, 并且如果缺失, 它们就被环 C 中的 C_4 和 C_5 之间另外的键所替代;

L 独立地是化学键或者连接基团,其中所述连接基团包含具有 1-50 个选自 C、N、O、S、P

和卤素原子的非氢原子的共价键,并且所述连接基团由单键、双键、三键、或芳香碳-碳键、碳-氧键、碳-硫键、碳-氮键、以及氮-氮键的任何组合所组成;并且

其中 CM 是包含肽、蛋白质、多糖、酶、脂质、核苷酸、寡核苷酸或者核酸聚合物的共轭分子。

14. 如权利要求 13 所述的染料-共轭物,其特征在于,所述共轭分子是肽或蛋白质。

15. 如权利要求 13 或 14 所述的染料-共轭物,其特征在于,所述共轭分子是抗体、或抗体片段。

16. 一种检测样品中特异性结合配对中的互补成员的方法,包括:

a) 将所述样品与如权利要求 13 至 15 中任一项所述的可特异性地结合于所述互补成员的染料-共轭物相混合;以及

b) 检测由所述混合物形成的复合物,以便检测出所述互补成员。

17. 如权利要求 16 所述的方法,其特征在于,所述互补成员是蛋白质或肽。

18. 如权利要求 16 或 17 所述的方法,其特征在于,所述互补成员存在于细菌、病毒或者动物细胞上。

19. 如权利要求 16 或 17 所述的方法,其特征在于,所述复合物通过其荧光响应而被检测。

20. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,所述荧光响应通过使用流式细胞仪、荧光计、荧光显微镜、或荧光板阅读器来检测。

21. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,还包括:将所述荧光响应从具有可检测的不同光学特性的第二荧光团的荧光响应中区分开来。

22. 如权利要求 19 所述的方法,其特征在于,还包括:基于所述荧光响应,将所述复合物与其他样品组分分离开来。

新荧光染料及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光染料,更具体地说,涉及紫外线可激发的荧光染料组合物、化合物和共轭物,以及它们的使用和制造方法。

背景技术

[0002] 荧光染料被广泛用于标记、检测、和 / 或定量样品中的组分。用于这样的检测和 / 或定量的多种方法包括荧光显微术、荧光免疫测定、细胞的流式细胞计数分析、以及多种其他应用。一般来讲,对于利用荧光染料作为检测工具的许多应用,有必要将荧光染料共轭于配体比如蛋白质、抗体、酶、核苷酸、核酸、以及其他生物学和非生物学分子来制备被染料标记的配体。被染料标记的配体是重要的可赋予特异性用于随后的生物化学反应的试剂,在所述生物化学反应中,荧光染料可提供一种用于检测和 / 或定量该反应的方法。

[0003] 荧光染料的选择在采用多重、多色分析的应用、以及多种其他应用中特别重要,比如该分析是荧光显微术、荧光免疫测定、流式细胞术。显著地,某些检测应用需要紫外线可激发的具有特定激发范围的荧光团。

[0004] 具体地说,需要这样一种荧光染料:其在多色流式细胞仪中能够被 405nm 紫色激光有效地激发。用于这些应用的标靶染料实质上应该具有下述特征:1) 在 405nm 附近其激发光谱有最大值,2) 有强的可光谱分辨的发射最大值,3) 有大的斯托克斯频移 (Stokes' shift), 优选至少 50nm, 以及 4) 荧光染料有通过反应基团偶联于生物分子的能力。迄今为止,一直缺乏一种紫外线可激发的荧光团,其能够被共轭于不同的配体从而提供被染料标记的试剂,所述试剂具有可光学和电子学分离的荧光光谱特性。

[0005] 本发明的荧光染料在结构上类似于萤火虫荧光素化合物。这些化合物此前已经用作化学发光试剂,借由该试剂通过荧光素的氧化催化而产生光。荧光素是荧光素酶这种酶的底物,其在荧光素酶存在的条件下被氧化从而产生氧化荧光素和能量,该能量以光的形式被释放。对于这些类型的测定,荧光素酶-荧光素反应为用于众多物质的简单、快速、敏感的测定法提供了基础 (Karicka, L.J., Analytical Biochemistry, 175, 14-21 (1988))。

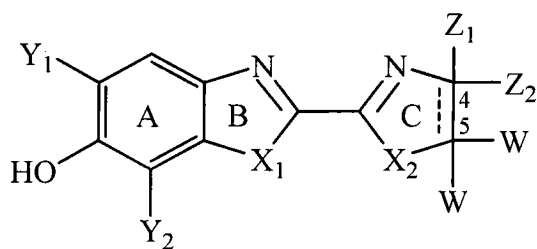
[0006] 虽然这些以萤火虫荧光素的结构为基础的化学发光染料已经获得广泛应用,但这样的使用并不能证明具有类似于萤火虫荧光素结构的化合物有如下能力:具有在特定部分的紫外光谱内可激发的荧光染料的功能。这样的紫外线可激发的荧光染料特别有利于大范围的应用,这些应用包括,但不限于,利用多重、多色荧光分析的那些应用。

发明内容

[0007] 本发明涉及新颖的紫外线可激发的大体以萤火虫荧光素结构为基础的荧光染料、包含该荧光染料的组合物、该荧光染料的中间体、和它们的使用方法。

[0008] 在一个方面,提供具有下述通式 (I) 的荧光染料的组合物:

[0009]



[0010] 其中,

[0011] X_1 和 X_2 独立地是 S 或者 O;

[0012] Y_1 和 Y_2 独立地是卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基, 或者 Y_1 或 Y_2 中的一个 H、而另一个是卤代烷基;

[0013] 其中每个 W 独立地是 H 或烷基;

[0014] Z_1 是 H 或烷基;

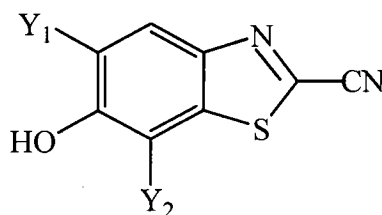
[0015] 其中 Z_1 和一个 W 基团可以缺失, 并且如果缺失, 它们就被环 C 中的 C_4 和 C_5 之间的附加键所替代, 该附加键被标示为虚线;

[0016] Z_2 包含化学式为 $-L-RG$ 的标记性取代基, 其中 L 是键或连接基团; 并且

[0017] RG 是能够使荧光染料结合于另一个分子上的反应基团。

[0018] 在另一个方面, 提供了用于合成本发明荧光染料的合成中间体。在一种实施方式中, 合成中间体由如下通式表示。

[0019]



[0020] 其中,

[0021] Y_1 和 Y_2 独立地是卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基,

[0022] 或者 Y_1 或 Y_2 中的一个 H、而另一个是卤代烷基。

[0023] 在另一个方面, 提供了包含共轭于生物分子的荧光染料的染料-共轭物。

[0024] 在另一个方面, 提供了使用荧光染料和染料-共轭物的方法, 用来定位或者检测样品中的分析物或者配体的存在或相互作用。在特定的实施方式中, 提供了使用染料-共轭物的方法, 用于检测结合于染料-共轭物的互补生物分子的存在。

[0025] 在其他的实施方式中, 提供了包含荧光染料、染料中间体、或染料-共轭物的试剂和试剂盒, 它们用于检测结合于本发明的染料-共轭物的互补生物分子的存在。

附图说明

[0026] 图 1 描绘了本发明的紫外线可激发的荧光染料的一般结构。

[0027] 图 2A-2D 描绘了荧光素衍生物的合成流程图。

[0028] 图 3A 和 3B 描绘了脱氢荧光素酸衍生物的合成流程图。

[0029] 图 4 描绘了使用双色流式细胞术的直方图, 该图显示了共轭于 CD4-Pacific Orange 共轭物的 CD4-Dye2 的相对性能。

[0030] 图 5 描绘了使用十色流式细胞术的直方图,该图显示了共轭于 CD4-Pacific Orange 共轭物的 CD4-Dye3 的相对性能。

具体实施方式

[0031] 定义

[0032] 在本申请中使用的所有科学和技术术语具有在本技术领域通常使用的意义,除非另作说明。如同本申请中使用的那样,下述文字或者术语具有限定的意义。

[0033] 在此使用的术语“活化酯”是指可自发地与氨基反应的酯。活化酯一般具有化学式 $-COR$,其中 R 是好的离去基团。活化酯包括,但不限于,琥珀酰亚胺氧基 ($-OC_6H_4O_2$),亦称 N-羟基-琥珀酰亚胺酯;磺基琥珀酰亚胺氧基 ($-OC_6H_3O_2-SO_3H$),-1-氧基苯并三唑基 ($-OC_6H_4N_3$)。

[0034] 在此使用的术语“烷基”是指支链、直链或环状的含有 1-20 个碳的烃基。术语“烷基”包括典型地含有至多 8 个碳的“低级烷基”基团。

[0035] 在此使用的术语“烯基”是指支链、直链或环状的含有至少一个 $C=C$ 双键并且含有 2-20 个碳的烃基。术语“烯基”包括典型地含有至多 8 个碳的“低级烯基”基团。

[0036] 在此使用的术语“炔基”是指支链或直链的含有至少一个 $C\equiv C$ 三键并且含有 2-20 个碳的烃基。术语“炔基”包括典型地含有至多 8 个碳的“低级炔基”基团。

[0037] 在此使用的术语“芳基”是指包含 1-5 个碳环芳香环的含芳香环基团,其能够用 1 个以上除 H 之外的取代基取代。

[0038] 在此使用的术语“分析物”是指这样的物质:其在样品中的存在或者含量将会通过测定法被测量。该分析物可以包括反应基团例如本发明的染料经由其能够被共轭于所述分析物的基团。分析物包括有机分子和生物分子,特异性结合伴侣 (specific binding partner) 对于该分子具有特异性结合亲和力。例举的分析物包括,但不限于:单链或双链 DNA、RNA、DNA-RNA 复合物,寡核苷酸、抗体、抗体片段、抗体-DNA 嵌合体、抗原、半抗原、蛋白质、凝集素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白和生物素。其他示例性的分析物还包括药物和激素。

[0039] 在此使用的术语“被共轭的分子 (conjugated molecule)”或者“CM”是指与本发明的至少一个染料相连接的生物学组分或者非生物学组分。这些组分包括,但不限于:抗原,抗体,碳水化合物 (例如,单糖、寡糖、以及多糖),蛋白质,肽,半抗原,核苷,核苷酸,寡核苷酸,核酸,聚合物,病毒,微生物、或者细胞或细胞组分。“被共轭的分子”还包括固体支持物 (例如,合成支持物、层析支持物、膜、或者珠子)。

[0040] 在此使用的术语“荧光染料”是指这样的化合物:其吸收电磁波谱中紫外线区域和紫色区域的光,并且再发射出位于蓝色区域的光,从而产生可检测信号。“荧光染料”还包括具有便于染料附着于被共轭的分子上的化学反应基团的荧光化合物。

[0041] 在此使用的术语“染料-共轭物”是指其中荧光染料与生物学组分或者非生物学组分相连接的一种分子。这样的生物学组分或者非生物学组分也被称作“被共轭的分子”。在一种实施方式中,荧光染料与被共轭的分子的连接是经由共价键 (covalent linkage) 实现的。染料-共轭物的例子包括,但不限于如下物质的共轭物:抗原、抗体、碳水化合物、蛋白质、肽、半抗原、核苷、核苷酸、寡核苷酸、核酸、聚合物、固体支持物 (例如,合成支持物、

层析支持物、膜、或者珠子)、病毒、微生物、或者细胞或细胞组分。

[0042] 在此使用的术语“荧光团”是指这样一种分子:其能够吸收在一个波长范围内的能量、并且释放在该吸收范围之外的另一波长范围内的能量。术语“激发波长”是指荧光团吸收能量的波长范围。术语“发射波长”是指该荧光团释放能量或者释出荧光的波长范围。

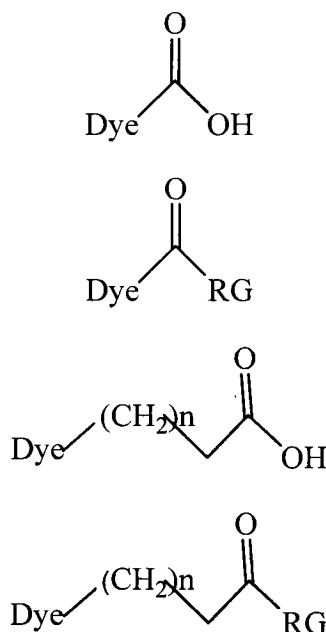
[0043] 在此使用的术语“卤素”是指氟、氯、溴或碘原子。类似地,术语“卤代”是指氟代、氯代、溴代、或碘代基团。

[0044] 在此使用的术语“卤代烷基”是指其上一个以上氢原子被一个以上卤素原子替代的烷基。在一种实施方式中,卤代烷基能够用 1、2、或 3 个卤代基取代。术语“卤代烷基”还包括全氟烷基。卤代烷基的例子包括三氟甲基、三氯甲基、五氟乙基、五氯乙基等。

[0045] 在此使用的术语“连接基团”或者“L”是指用于将染料连接至反应基团(或称 RG)的基团。该连接基团可能是化学键、原子、或者另一种二价或多价基团。该连接基团能够包含原子的直链或支链,所述原子中的一些能够是环状结构的一部分。该连接基团通常含有 1 至约 50 个非氢原子、更通常 1 至约 30 个非氢原子。包含所述链的原子选自于 C、O、N、S、P、Si、B、以及 Se 原子,优选选自于可将荧光染料共价连接至另一个部分比如化学反应基团的 C、O、N、P 和 S 原子。卤素原子可以作为链或环上的取代基存在。典型的包含连接取代基的官能团包括:烯基,亚烷基,亚芳基,亚链烯基,醚,过氧化物,羰基例如酮、酯、碳酸酯、硫酸酯,或者酰胺基,胺,脒,氨基甲酸酯,脲,亚胺,二酰亚胺,二酰亚胺盐,碳二亚胺,肼,重氮,磷酸二酯,磷酸三酯,磷酸酯,硫酸酯,二硫化物,亚砷,砷,磺酸酯,硫酸酯,以及硫脲基团。连接基团的例子包括被取代或未被取代的聚亚甲基、亚芳基、烷基亚芳基、亚芳烷基、或芳硫基。

[0046] 一个根据本发明的用于将染料连接至反应基团的连接基团具有通用结构 $R_1C(O)R_2$, 其中 R_1 是化学键或者附接于染料的 C_{1-10} 亚甲基 $(CH_2)_n$; $C(O)$ 是羰基; R_2 是 OH 或者将羰基附接至反应基团 RG 的化学键。该连接基团的例子包括:

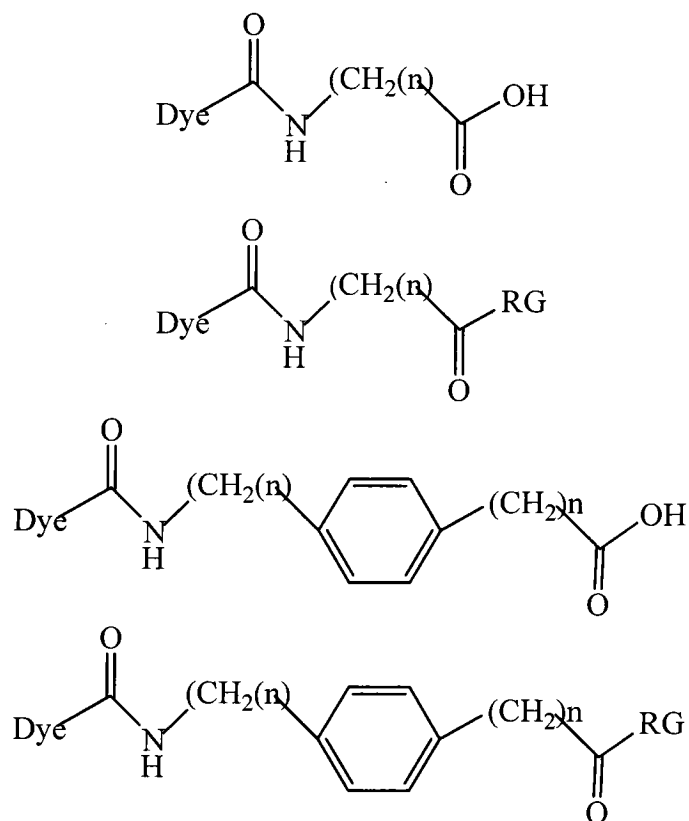
[0047]



[0048] 在另一个实施方式中,如下所示,连接基团具有通用结构 $R_1C(O)A_1R_3C(O)R_2$, 其中 R_1 是化学键或者如上所述的 C_{1-10} 亚甲基; A_1 或者是 NH、S、或者是 O; R_3 是烯基 $(CH_2)_n$ 、具有至少一个不饱和键的五元环或六元环、或 C_{1-10} 亚甲基 $(CH_2)_n$ 与五元环或六元环的组合; R_2 是

OH 或者将末端羰基附接至反应基团 RG 的化学键。该连接基团的例子包括：

[0049]



[0050] 在此使用的术语“反应基团”或者“RG”是这样的原子或基团：它的存在可以促进通过共价附接或者物理力而键合于另一个分子上。可选择反应基团的例子如表 1 所示。在一些实施方式中，例如，当反应基团是离去基团比如卤素原子或甲苯磺酸盐基团、并且荧光标记化合物通过亲核置换反应共价附接于另一种化合物上时，本发明的荧光化合物对另一化合物的附接将涉及从反应基团上丧失一个以上原子。在其他实施方式中，当发生加成反应例如 Michael 加成时、或者发生环化加成反应比如狄尔斯-阿尔德反应时，或者当反应基团是异氰酸酯或者异硫氰酸酯基团时，荧光标记化合物通过形成共价键来对另一化合物的附接将涉及反应基团内部化学键的重构。在另一些其他的实施方式中，附接不会涉及共价键形成，但涉及物理力，而在这样情况下反应基团保持不变。而物理力是指：吸引力，比如氢键吸引力、静电吸引力或者离子吸引力；疏水性吸引力比如碱基堆积；以及特异性亲和力交互作用比如生物素-链霉抗生物素蛋白交互作用、抗原-抗体交互作用、以及核苷酸-核苷酸交互作用。

[0051] 表 1

[0052] 用于将染料化学结合于被共轭的分子上的反应基团

[0053]

反应基团 (RG) (附接于反应性染料)	官能团 (附接于被共轭的分子)
羧酸	胺
羧基酯	胺
活化酯	胺
酸酐	胺
酰卤	胺
酰叠氮	胺
醛	胺
氯甲酸酯	胺
异氰酸酯	胺
异硫氰酸酯	胺
磺酰卤	胺/羟基
卤代烷	硫醇
烷基磺酸盐	硫醇
氮丙啶	硫醇
卤代乙酰胺	硫醇
马来酰亚胺	硫醇
胺	羧酸
碳二亚胺	羧酸
重氮烷	羧酸
酰卤	羟基
卤代三嗪	羟基
肼/酰肼	羟基
氨基磷酸酯	醇类

[0054] 当反应基团是一个部分比如羧酸或者羧酸的活化酯时,反应性染料对于使用含有一个以上氨基的分子比如蛋白质、肽、核苷酸、寡核苷酸、或者半抗原来制备染料共轭物是特别有用的。若反应基团是马来酰亚胺或者卤代乙酰胺,则反应性染料对于与含硫醇的分子的共轭是特别有用的。若反应基团是酰肼,则反应性染料对于共轭至高碘酸氧化的碳水化合物和糖蛋白是特别有用的。

[0055] 在一种实施方式中,反应基团包括羧酸、羧酸的琥珀酰亚胺酯、异硫氰酸酯、卤代乙酰胺、肼、脂肪胺、以及马来酰亚胺基团。制备这些反应基团中的每一个的方法为本领域技术人员所熟知,并且这些反应基团用于特定目的的应用也是在本领域技术人员的认知能

力之内。

[0056] 双功能偶联剂还可以用于用中等反应基团将标记偶联到有机分子和生物分子上（参见 L. J. Kricka, 配体-结合物测定法, Marcel Dekker 公司出版, 纽约, 1985 年, 第 18-20 页、表 2.2 ; 和 T. H. Ji, “双功能试剂”, 酶学方法, 91, 580-609 (1983)）。有两种类型的双功能试剂：并入最终结构中的双功能试剂, 以及不并入最终结构、并且仅用于偶联两种反应物的双功能试剂。

[0057] 在此使用的术语“样品”是指含有或者疑似含有一种以上待测定的分析物的液体。典型的利用荧光染料进行分析的样品是包括体液比如血液、血浆、血清、尿液、精液、唾液、细胞裂解液、组织提取液等的生物样品。该样品还可以包括稀释剂、缓冲剂、洗涤剂、掺合物 (contaminants)、以及其他通常存在于体液中的组分。

[0058] 在此使用的术语“特异性结合配对”是指显示出相互的结合亲合力的两个物质。其例子包括抗原-抗体配对、半抗原-抗体配对、抗体-抗体配对、互补性的寡核苷酸或多核苷酸、抗生物素蛋白-生物素、链霉抗生物素蛋白-生物素、酶-底物、激素-激素受体、凝集素-碳水化合物、IgG-蛋白质 A、IgG-蛋白质 G、核酸-核酸结合蛋白、以及核酸-抗核酸抗体（表 2）。

[0059] 表 2

[0060]

有代表性的特异性结合配对	
抗原	抗体
半抗原	抗体
生物素	抗生物素蛋白或者链霉抗生物素蛋白
碳水化合物	凝集素或者碳水化合物受体
DNA	互补链 DNA
RNA	互补链 RNA
药物	药物受体
IgG	蛋白质 A / 蛋白质 G
底物	酶
蛋白质/肽	蛋白质/肽受体
激素	激素受体
核酸	抗核酸抗体

[0061] 在此使用的术语“（被）取代的”是指基团上至少一个氢原子被另一个原子或者具有 1 到 50 个选自下组的原子的基团所替代：C、O、N、S、P、Si、F、Cl、Br、I。至于（被）取代的基团，本文中指的是可以存在多个取代位点的基团。

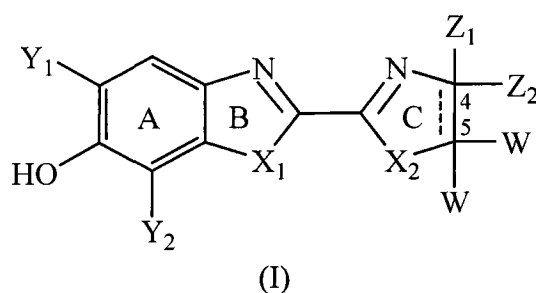
[0062] 本发明的组成

[0063] 本发明提供了一类荧光染料,其以萤火虫荧光素的结构为基础,并且具有特定的功能性优势。例如,本发明的荧光染料适用于在较短波长(在 340 和 450nm 之间)处进行激发,具有通常在 500 和 550nm 波长之间的发射最大值、较窄的发射带宽、至少大约 50nm 的大的斯托克斯频移(Stokes shift)、以及其他有利的荧光特性。

[0064] 本发明的荧光染料尤其可与紫色 405nm 激光一起使用。与现有的紫色激光可激发的染料(例如,Pacific Orange)相比,本发明的荧光染料尽管具有类似的吸光性,但仍然显示出令人惊讶和出乎意料的明亮的荧光。本发明的荧光染料可以很好地被用于通过反应基团而偶联至被共轭的分子上。另外,本发明的染料-共轭物,尤其是蛋白质共轭物,甚至在相对高程度的染料取代下也可显示出明亮的荧光。这些特性使得本发明的染料特别适合用于多色的、多重的应用。

[0065] 提供了下述通式的荧光染料:

[0066]



[0067] 其中,

[0068] X_1 和 X_2 独立地是 S 或者 O;

[0069] Y_1 和 Y_2 独立地是卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基,或者

[0070] Y_1 或 Y_2 中的一个为 H,而另一个是卤代烷基;

[0071] 其中每个 W 独立地是 H 或烷基;

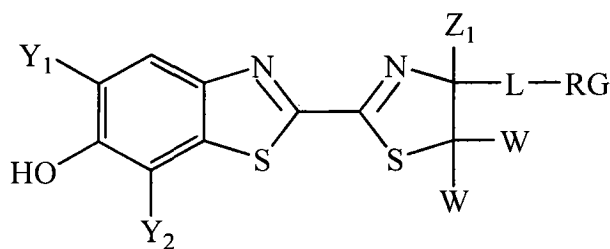
[0072] Z_1 是 H 或烷基;

[0073] 其中 Z_1 和一个 W 基团可以缺失,并且如果缺失,它们就被环 C 中的 C_4 和 C_5 之间的附加键所替代,该附加键被标示为虚线;

[0074] Z_2 包含化学式为 -L-RG 的标记性取代基,其中,L 是化学键或者可将染料连接至反应基团 RG 上的连接基团,其中该连接基团能够包含包括 1-50 个选自 C、N、O、S、P 和卤素原子的非氢原子的共价键,并且由下述任何化学键的任何组合所组成:单键、双键、三键、或芳香碳-碳键、碳-氧键、碳-硫键、碳-氮键、以及氮-氮键;并且其中,RG 包括羧酸、羧酸的活化酯、酸酐、酰基氯、酰基叠氮、酰基卤、醛、氯甲酸酯、胺、羟基、肼、异氰酸酯、异硫氰酸酯、磺酰基、甲苯磺酰基、马来酰亚胺、N-羟基-琥珀酰亚胺酯、氮丙啶、亚胺、以及二硫基团。

[0075] 在通式 (I) 的荧光染料的一种实施方式中, X_1 和 X_2 都是 S,通式为:

[0076]



(I-A)

[0077] 其中，

[0078] Y_1 和 Y_2 独立地是卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基，或者

[0079] Y_1 或 Y_2 中的一个为 H，而另一个是卤代烷基；

[0080] Z_1 是 H 或烷基；

[0081] 其中每个 W 独立地是 H 或烷基；

[0082] 在 L-RG 中，L 是化学键或者可将染料连接至反应基团 RG 上的连接基团，其中所述连接基团能够包含含有 1-50 个选自 C、N、O、S、P 和卤素原子的非氢原子的共价键，并且由单键、双键、三键、或芳香碳-碳键、碳-氧键、碳-硫键、碳-氮键、以及氮-氮键的任何组合所组成；并且

[0083] 其中 RG 能够包含羧酸、羧酸的活化酯、酸酐、酰基氯、酰叠氮、酰卤、醛、氯甲酸酯、胺、羟基、肼、异氰酸酯、异硫氰酸酯、磺酰基、甲苯磺酰基、马来酰亚胺、N-羟基-琥珀酰亚胺酯、氮丙啶、亚胺、以及二硫基团。

[0084] 通式 (I-A) 的染料的可选择的实施方式显示于表 3 中

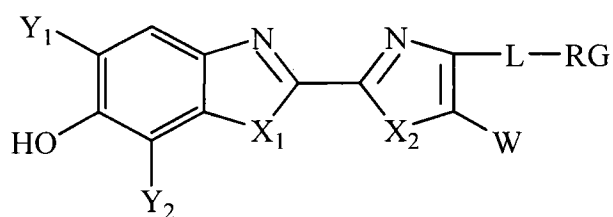
[0085] 表 3

[0086]

染料	X1	X2	Y1	Y2	ZI	W	L	RG
I-A-1	S	S	H	H	H	Me	C(O)	OH
I-A-2	S	S	H	H	H	Me	C(O)	NHS
I-A-3	S	S	H	H	H	Me	C(O)	NHBSA
I-A-4	S	S	Cl	H	H	Me	C(O)	OH
I-A-5	S	S	H	Cl	H	Me	C(O)	OH
I-A-6	S	S	Cl	Cl	H	Me	C(O)	OH
I-A-7 (Dye1)	S	S	Cl	Cl	H	Me	C(O)	NHS
I-A-8	S	S	Cl	Cl	H	Me	C(O)	NHBSA
I-A-9 (Dye2)	S	S	Cl	Cl	H	Me	C(O)NH(CH ₂) ₅ C(O)	NHS
I-A-10	S	S	Cl	Cl	H	Me	C(O)NH(CH ₂) ₅ C(O)	NHBSA
I-A-11	S	S	Cl	Cl	H	Me	C(O)NH(CH ₂) ₂ NHCSNH Ph	NCS
I-A-12	S	S	Cl	Cl	H	Me	C(O)NH(CH ₂) ₂ NHCSNH Ph	NHCSNHBSA
I-A-13	S	S	F	F	H	Me	C(O)	OH
I-A-14 (Dye3)	S	S	F	F	H	Me	C(O)	NHS
I-A-15	S	S	F	F	H	Me	C(O)	NHBSA
I-A-16	S	S	Me	Me	H	Me	C(O)	OH
I-A-17	S	S	Me	H	H	Me	C(O)	OH
I-A-18	S	S	CF ₃	H	H	Me	C(O)	OH
I-A-19 (Dye7)	S	S	CF ₃	H	H	Me	C(O)	NHS
I-A-20	O	S	H	H	H	Me	C(O)	OH
I-A-21	S	S	F	F	H	Me	C(O)NH(CH ₂) ₂ C(O)	OH
I-A-22 (Dye5)	S	S	F	F	H	Me	C(O)NH(CH ₂) ₂ C(O)	NHS
I-A-23	S	S	F	F	H	Me	C(O)NHCH ₂ C(O)	OH
I-A-24	S	S	Cl	Cl	H	Me	C(O)NH(CH ₂) ₂ C(O)	OH
I-A-25	S	O	F	F	H	H	C(O)	OH
I-A-26	S	S	Cl	H	H	H	C(O)	OH
I-A-27	S	S	H	Cl	H	H	C(O)	OH
I-A-28	S	S	Cl	Cl	H	H	C(O)	OH
I-A-27	S	S	F	F	Me	H	C(O)	OH
I-A-29 (Dye4)	S	S	F	F	Me	H	C(O)	NHS
I-A-30	S	S	F	F	H	H	C(O)	OH
I-A-31	S	S	F	F	H	H	C(O)	NHS
I-A-32	S	S	H	H	H	H	C(O)	OH
I-A-33	S	S	F	F	H	H	(CH ₂) ₂ C(O)	OH
I-A-34 (Dye6)	S	S	F	F	H	H	(CH ₂) ₂ C(O)	NHS

[0087] 在其他实施方式中, 荧光染料具有下述通式:

[0088]



(I-B)

[0089] 其中，

[0090] X_1 和 X_2 独立地是 S 或者 O；

[0091] Y_1 和 Y_2 独立地是卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基；或者

[0092] Y_1 或 Y_2 中的一个为 H，而另一个是卤代烷基；

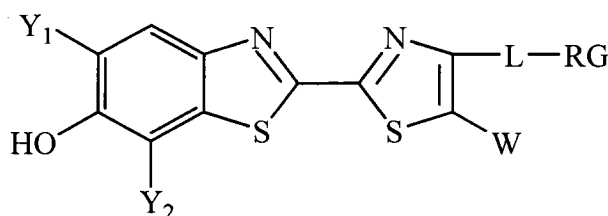
[0093] W 是 H 或烷基；

[0094] L 是化学键或者可将染料连接至反应基团 RG 上的连接基团，其中所述连接基团能够包含含有 1-50 个选自 C、N、O、S、P 和卤素原子的非氢原子的共价键，并且由单键、双键、三键、或芳香碳-碳键、碳-氧键、碳-硫键、碳-氮键、以及氮-氮键的任何组合所组成；并且

[0095] 其中 RG 能够包含羧酸、羧酸的活化酯、酸酐、酰基氯、酰叠氮、酰卤、醛、氯甲酸酯、胺、羟基、肼、异氰酸酯、异硫氰酸酯、磺酰卤、甲苯磺酰基、马来酰亚胺、N-羟基-琥珀酰亚胺酯、氮丙啶、亚胺、以及二硫基团。

[0096] 在通式 (I-B) 的荧光染料的一种实施方式中， X_1 和 X_2 是 S，此时通式为：

[0097]



[0098] 其中，

[0099] Y_1 和 Y_2 独立地是卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基；或者

[0100] Y_1 或 Y_2 中的一个为 H，而另一个是卤代烷基；

[0101] W 是 H 或烷基；

[0102] L 是化学键或者连接基团，其中所述连接基团包含含有 1-50 个选自 C、N、O、S、P 和卤素原子的非氢原子的共价键，并且由单键、双键、三键、或芳香碳-碳键、碳-氧键、碳-硫键、碳-氮键、以及氮-氮键的任何组合所组成；并且

[0103] RG 是反应基团，其中 RG 能够包含羧酸、羧酸的活化酯、酸酐、酰基氯、酰叠氮、酰卤、醛、氯甲酸酯、胺、羟基、肼、异氰酸酯、异硫氰酸酯、磺酰卤、甲苯磺酰基、马来酰亚胺、N-羟基-琥珀酰亚胺酯、氮丙啶、亚胺、以及二硫基团。

[0104] 通式 (I-B) 的染料的可选择的实施方式显示于表 4 中。

[0105] 表 4

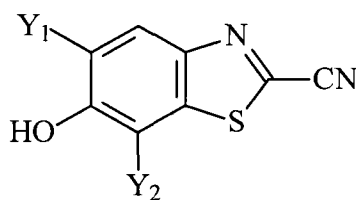
[0106]

染料	X_1	X_2	Y_1	Y_2	W	L	RG
I-B-1	S	S	Cl	Cl	H	C(O)	OH
I-B-2	S	S	Cl	Cl	H	C(O)	NHS
I-B-3	S	S	Cl	Cl	Me	C(O)	OH

I-B-4	S	S	Cl	Cl	Me	C(O)	NHS
I-B-5	S	S	F	F	Me	C(O)	OH
I-B-6	S	S	F	F	Me	C(O)	NHS
I-B-7	S	S	F	F	H	C(O)	OH
I-B-8	S	S	F	F	H	C(O)	NHS

[0107] 本发明进一步提供了可以用于合成本发明的荧光染料的合成中间体化合物。在一种实施方式中,中间体化合物由如下通式(II)表示:

[0108]



(II)

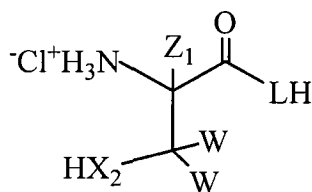
[0109] 其中,

[0110] Y_1 和 Y_2 独立地是卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基,或者

[0111] Y_1 或 Y_2 中的一个为 H,而另一个是卤代烷基。

[0112] 在另一个实施方式中,中间体化合物由如下通式(III)表示:

[0113]



(III)

[0114] 其中,

[0115] X_2 是 S 或者 O;

[0116] 其中每个 W 独立地是 H 或烷基;

[0117] Z_1 是 H 或烷基;并且

[0118] LH 是 OH 或者 $NH(CH_2)_nCOOH$ (n 是 1-10)。

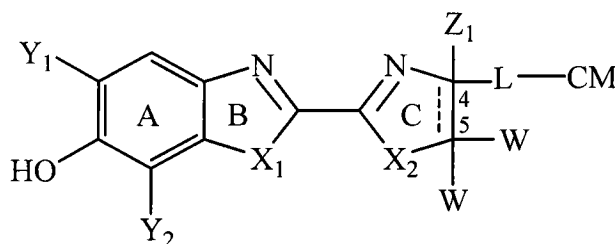
[0119] 本发明的荧光染料可以与一个以上被共轭的分子“CM”共价地或非共价地连接。共价连接可以通过各种机制进行,包括经由如上所述的连接基团 L 将被共轭的分子 CM 附接于荧光染料上,并且可以涉及共价键 (covalent linkage)。

[0120] 当染料与一个以上分子非共价连接时,该连接可以通过各种机制进行,包括将染料或者合成中间体化合物结合到固体或半固体基质比如珠子、或表面之内或者其上;或者通过非特异性的相互作用比如氢键键合、离子键合、或者疏水作用(比如范德华力)进行。被连接的分子可以选自下组:多肽、多核苷酸、多糖、珠子、微孔板孔表面、金属表面、半导

体表面和绝缘表面、纳米粒子、以及其他的固体表面。被连接的或者被共轭的分子可以被连接于或者共轭于一个以上荧光染料上,所述荧光染料可以相同也可以不同。一般来讲,用于制备生物学物质的染料-共轭物的方法是本技术领域众所周知的。参见,例如 (Greg T. Hermanson,《生物共轭技术》,1996 版,学术出版社,第 8 章,第 298-362 页;Nataliya Panchuk, et al., J. Histochemistry & Cytochemistry, 1179-1188 (1999); S Bhattacharya, et al. Bioconjugate Chemistry, Vol. 19, 1186-1193 (2008); B. Dworecki, et al., [http://www.piercenet.com/files/DyLight% 20Poster% 206-7-04. pdf](http://www.piercenet.com/files/DyLight%20Poster%206-7-04.pdf))。典型地,荧光团连接于或者共轭于染料-共轭物可将荧光团的光谱特性赋予该分子。

[0121] 在一种实施方式中,本发明的荧光染料经由共价键被附接于被共轭的分子 CM 上,染料-共轭物具有下述通式:

[0122]



[0123] 其中,

[0124] X_1 和 X_2 独立地是 S 或者 O;

[0125] Y_1 和 Y_2 独立地代表 H、卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基;

[0126] 其中每个 W 独立地是 H 或烷基;

[0127] Z_1 是 H 或烷基;

[0128] 其中 Z_1 和一个 W 基团可以缺失,并且如果缺失,它们就被环 C 中的 C_4 和 C_5 之间的附加键所替代,该附加键被标示为虚线;

[0129] L 独立地是化学键或者连接基团,其中所述连接基团包含含有 1-50 个选自 C、N、O、S、P 和卤素原子的非氢原子的共价键,并且由单键、双键、三键、或芳香碳-碳键、碳-氧键、碳-硫键、碳-氮键、以及氮-氮键的任何组合所组成;并且

[0130] 其中 CM 是被共轭的分子。

[0131] 可以用于制备根据本发明的染料-共轭物的被共轭的分子 CM 包括,但不限于:氨基酸、肽、蛋白质、核苷、核苷酸、核酸、碳水化合物、酶、脂质、非生物学聚合物、细胞、以及细胞组分。待被共轭的分子可以被保护在一个以上官能团上,以便便于共轭、或者保障随后的反应性。

[0132] 当该分子是肽时,肽可以是二肽或者更大的肽,典型地包括 5 至 50 个氨基酸。当被共轭的分子是蛋白质时,其可以是酶、抗体、催化抗体、激酶、凝集素、糖蛋白、组蛋白、白蛋白、脂蛋白、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、蛋白质 A、蛋白质 G、激素、毒素、生长因子。典型地,被共轭的蛋白质是抗体、抗体片段、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、凝集素、或者生长因子。

[0133] 被共轭的分子可以是核酸聚合物,比如 DNA 寡核苷酸、RNA 寡核苷酸(或者其杂化物)、或者单链 DNA、双链 DNA、三链 DNA、或者四链 DNA、或者单链 RNA 或双链 RNA。该被共轭的分子还可以包括碳水化合物多糖,比如葡聚糖。

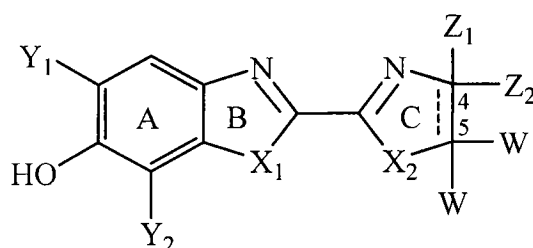
[0134] 被连接的或者被共轭的分子可以是特异性结合配对中的成员,因此可用作检测试剂而用于特异性结合配对中的互补成员。特异性结合配对成员的染料-共轭物可以通过本领域技术人员所熟知的方法而被用于检测、并且任选地定量样品中互补的特异性结合配对成员的存在。

[0135] 有代表性的特异性结合配对可以包括,但不限于,配体和受体,并且可以包括,但不限于,下述配对:抗原-抗体、生物素-抗生物素蛋白、生物素-链霉抗生物素蛋白、IgG-蛋白质 A、IgG-蛋白质 G、碳水化合物-凝集素、酶-酶底物、DNA-互补链 DNA、以及 RNA-互补链 RNA、激素-激素受体(表 2)。

[0136] 制备荧光染料化合物的方法

[0137] 在本发明的一个方面,提供了一种制备通式(I)的荧光染料的方法:

[0138]



[0139] 其中,

[0140] X_1 和 X_2 独立地是 S 或者 O;

[0141] Y_1 和 Y_2 独立地代表 H、卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基;

[0142] 其中每个 W 独立地是 H 或烷基;

[0143] Z_1 是 H 或烷基;

[0144] 其中 Z_1 和一个 W 基团可以缺失,并且如果缺失,它们就被环 C 中的 C_4 和 C_5 之间的附加键所替代,该附加键被标示为虚线;

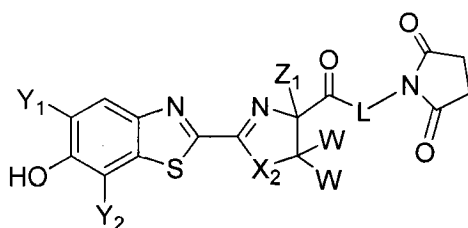
[0145] 其中 Z_2 包含化学式为 -L-RG 的标记性取代基,其中,

[0146] L 独立地是化学键或者连接基团,其中所述连接基团包含含有 1-50 个选自 C、N、O、S、P 和卤素原子的非氢原子的共价键,并且由单键、双键、三键、或芳香碳-碳键、碳-氧键、碳-硫键、碳-氮键、以及氮-氮键的任何组合所组成;并且

[0147] 其中 RG 是选自下组的反应基团:羧酸、羧酸的活化酯、酸酐、酰基氯、酰叠氮、酰卤、醛、氯甲酸酯、胺、羟基、肼、异氰酸酯、异硫氰酸酯、磺酰卤、甲苯磺酰基、马来酰亚胺、N-羟基-琥珀酰亚胺酯、氮丙啶、亚胺、以及二硫基团。

[0148] 在一种实施方式中,具有下述通式的本发明的荧光染料能够通过使用图 2A-2D 所示的合成流程图而被合成。

[0149]



[0150] 其中, Y_1 和 Y_2 独立地代表 H、卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基;

[0151] X_2 是 S 或者 0；

[0152] 其中每个 W 独立地是 H 或烷基；

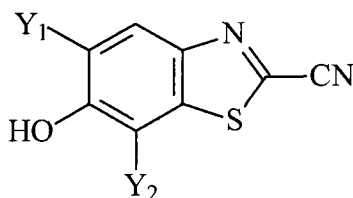
[0153] Z_1 是 H 或烷基;并且

[0154] L 是 0 或者 $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{COO}$ (n 是 1-10)。

[0155] 该方法包括下述步骤：

[0156] (a) 通过使用图 2B 中所示的方法, 形成染料的具有下述通式的氰基苯并噻唑中间
体:

[0157]

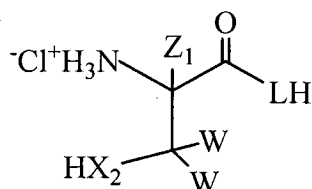


[0158] 其中，

[0159] Y₁ 和 Y₂ 独立地代表 H、卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基；

[0160] (b) 通过使氰基苯并噻唑中间体与下述通式所示的改性氨基酸发生反应：

[0161]



[0162] 其中,

[0163] X_0 是 S 或者 0；

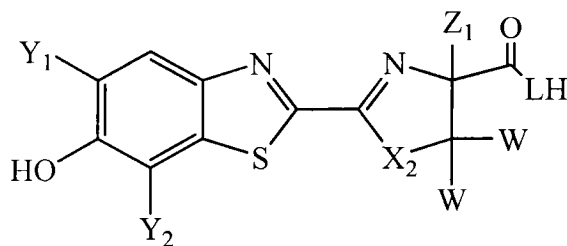
[0164] 其中每个 W 独立地是 H 或烷基；

[0165] Z_1 是 H 或烷基 ; 并且

[0166] LH 是 OH 或者 $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 是 1-10) ;

[0167] 形成染料的羧基衍生物,从而产生下述通式的荧光素衍生物:

[0168]



[0169] 其中,

[0170] X_2 是 S 或者 0；

[0171] Y_1 和 Y_2 独立地代表 H、卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基；

[0172] 其中每个 W 独立地是 H 或烷基；

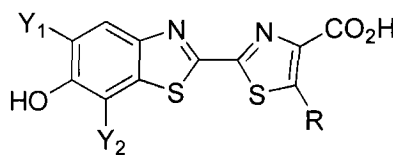
[0173] Z_1 是 H 或烷基;并且

[0174] LH 是 OH 或者 $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ (n 是 1-10) ;

[0175] (c) 用反应基团替代 LH 中羧基的羟基功能。

[0176] 在另一个实施方式中,具有下述通式的本发明的荧光染料通过使用图 3A 所示的合成流程图而被合成:

[0177]



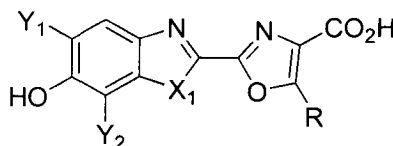
[0178] 其中,

[0179] Y_1 和 Y_2 独立地代表 H、卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基;并且

[0180] R 是 H 或烷基。

[0181] 在另一个实施方式中,具有下述通式的本发明的荧光染料能够通过使用图 3B 所示的合成流程图而合成 (Bagley, MC., et al., J. Am. Chem. Soc., 122, 3301-3313 (2000)):

[0182]



[0183] 其中,

[0184] Y_1 和 Y_2 独立地代表 H、卤素、烷基、卤代烷基、烷氧基、或烯基;并且

[0185] R 是 H 或烷基。

[0186] 在另一个方面,本发明提供了用于制造本发明的染料-共轭物的方法。该方法包括将包含反应基团的本发明的荧光染料与被共轭的分子相混合。所述被共轭的分子可以是氨基酸、蛋白质、肽、抗体、抗体片段、核苷、核苷酸、核酸聚合物。该被共轭的分子可以包括碳水化合物多糖,比如葡聚糖。典型地,荧光团共轭于被共轭的分子上可将荧光团的光谱特性赋予该分子。

[0187] 用于制备染料-共轭物的方法是本技术领域众所周知的。对于制备肽或蛋白质共轭物,该方法典型地包括:首先在室温以下(典型地为 4-25°C),将待被共轭的蛋白质以大约 1-10mg/ml 的浓度溶解在缓冲水溶液中。硼酸盐或碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液(pH 大约 8.0-9)尤其适合于与琥珀酰亚胺酯的反应,磷酸盐缓冲液(pH 大约 4.0-8)适合于与硫醇反应性官能团的反应,而碳酸盐或者硼酸盐缓冲液(pH 大约 9.0-9.8)适合于与异硫氰酸酯和二氯代三嗪的反应。将合适的反应性染料以足以提供合适程度共轭的含量溶于非水溶剂(通常为 DMSO 或者 DMF)中,并且加入到待被共轭的蛋白质的溶液中。待被用于任何蛋白质或者其他组分的反应性染料合适含量通常是通过实验预先确定,该实验中将可变含量的反应性染料加至待被共轭的蛋白质中。该反应性染料在使用时通常是 5-100 倍过量于待被共轭的蛋白质。在将反应性化合物添加至组分溶液中后,将混合物保温合适的时间周期(典型地为在室温下大约 1 小时至在冰上数小时),通过凝胶过滤、透析、HPLC(高效液相色谱)或者其他合适的方法将染料-共轭物与未被共轭的染料分离开来。染料-共轭物能够被储存在溶液中或者冷冻干燥,直至期望的应用中被测试。这种方法一般适用于使用抗体、抗体片段、抗生物素蛋白、凝集素、酶、蛋白质 A 和蛋白质 G、细胞蛋白质、白蛋白、组蛋白、生长因子、激素、以及其他蛋白质来制备染料-共轭物。

[0188] 使用方法

[0189] 本发明提供了一种检测样品中特异性结合配对的互补成员的方法,包括:将所述样品与可特异性地结合于所述互补成员的本发明的染料-共轭物相混合;以及检测由所述混合物形成的复合物来检测所述互补成员。本发明的方法可以包括:使用荧光染料,包括本发明的反应性染料和染料-共轭物,来检测和/或定量样品中的分析物。在特定的实施方式中,样品包含组分的不均匀混合物,所述组分包括完整细胞、细胞抽提物、细菌、病毒、细胞器、及它们的混合物。在其他实施方式中,样品包含单一组分或者同类组的组分,例如生物聚合物比如氨基酸聚合物、核酸聚合物、碳水化合物聚合物、或类脂膜复合物。

[0190] 在特定的实施方式中,本发明的荧光染料,包括反应性染料和染料-共轭物,被用于染色或者标记样品中的分析物,以便使得分析物能够被识别或定量。例如,荧光染料,包括本发明的染料-共轭物,可以在对于标靶分析物的测定中被用作在生物学液体或者非生物学液体中可检测的示踪元素。

[0191] 在其他实施方式中,荧光染料,包括反应性染料和染料-共轭物,被用于检测包含配体的样品,所述配体对于被共轭的分子而言是特异性结合配对(例如,见表2)中的互补成员。因此,配体是特异性结合配对中的一个成员,而被共轭的分子是另一成员。荧光染料,包括染料-共轭物,还被用于识别在染料-共轭物和互补结合分子之间的相互作用。

[0192] 在该方法的第一个步骤中,荧光染料,包括本发明的反应性染料和染料-共轭物,一般在选取的条件下,通过将如上所述本发明的染料与所关注的样品相组合而进行使用,以产生可检测的光学反应。该染料-共轭物典型地与样品中的成分形成共价连接或者非共价连接关系、或者形成复合物,或者只是简单地存在于样品或者样品的一部分的束缚范围内。然后在选取的波长处照射该样品以引起光学反应。典型地,对样品进行染色,用于通过进一步将该光学反应与标准相比较来确定样品的特定特征。

[0193] 在本发明的一个方面,染料-共轭物是被标记的蛋白质,比如抗体、抗体片段、抗生物素蛋白或者链霉抗生物素蛋白等。在本实施方式中,染料-共轭物被用于检测互补的特异性结合配对,该配对典型地是抗原、半抗原或生物素。本发明的这些染料-共轭物能够用于通过采用多种应用来检测样品中的分析物。主要的应用包括免疫荧光、荧光原位杂交(FISH)、流式细胞术、受体的标记、以及追踪被标记的细胞。对于特定的检测方法,例如,基于固有地涉及被结合的共轭物相对于未被结合的共轭物的空间分离/分辨的细胞计数的检测方法,没有必要从分析混合物中除去未被结合的染料-共轭物。然而,对于其他检测方法,例如,不涉及被结合的共轭物相对于未被结合的共轭物的空间分离/分辨的免疫测定,在检测光学反应之前,可能有必要从分析混合物中除去未被结合的染料-共轭物。

[0194] 在另一个方面,本发明的荧光染料和染料-共轭物可以具有作为激光染料的应用。由于本发明的染料和染料-共轭物可被紫外线或者紫色激光所激发,所以这些染料和染料-共轭物尤其可以与其他在更长波长处被激发的染料一起用于多重分析。在一种实施方式中,这些染料和染料-共轭物在大约350-405nm处被激发,并且当与在更长波长处(例如480nm和更长)被激发的染料一起使用时,它们的发射光谱与在更长波长处被激发的染料可被区别开来。

[0195] 在本发明的另一个方面,本发明的染料-共轭物能够在多色方法中使用,用于检测样品中的一种以上分析物。在一种实施方式中,通过使用多色分析,多种染料-共轭物能

够被用于检测样品中的多种分析物。该方法包括将样品与本发明的包含多种染料-共轭物例如第一染料-共轭物和第二染料-共轭物的组合物一起温育。在该组合物中,第一染料-共轭物的组分对于第一分析物而言是结合伴侣,第二染料-共轭物的组分对于第二分析物而言是结合伴侣。在适合于诱导在第一分析物与第一染料-共轭物之间的相互作用的条件下继续温育。在该温育期间,一般优选在第二分析物和第二染料-共轭物之间发生类似的相互作用,然而,根据需要可在本发明的范围内改变温育条件来驱动在第二染料-共轭物和第二分析物之间形成染料-共轭物-分析物复合物。在至少有第一染料-共轭物-分析物复合物形成后,用波长适合于引起复合物发荧光的光照射样品,借此检测第一分析物。第二分析物按类似方式被检测并且可以与第一分析物一起同时被检测,或者通过用适合于诱导每个荧光染料-共轭物的荧光的波长依序照射样品来被检测。在一个特定的方面,照射和/或检测步骤包含流式细胞仪。

[0196] 可选地,能够使用多种染料-共轭物、优选可在不同波长处发荧光的染料-共轭物来检测分析物的不同特征。例如,能够用不同颜色的染料-共轭物来标记细胞或者分析物的表位,通过采用在每个标靶上每个颜色的共定位来检测标靶并且证实其一致性。

[0197] 本发明的染料和染料-共轭物可以用于诊断用途。例如,本发明的染料和染料-共轭物可以用于检测在个体中病原生物(例如,细菌病原生物、病毒病原生物、真菌病原生物)的存在。作为另一种选择,特定分析物的存在和/或特定分析物和/或特定分析物的变体的含量可以与个体内的病理条件有关。结合于这样的分析物的本发明的染料和染料-共轭物可以具有用于确定特定分析物和/或其变体的存在和/或含量的用途,因此可用于诊断病理条件的存在和/或程度。

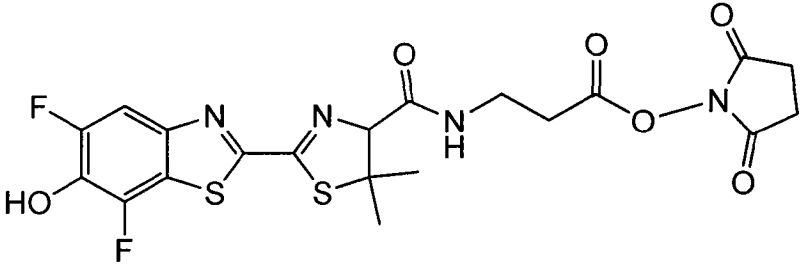
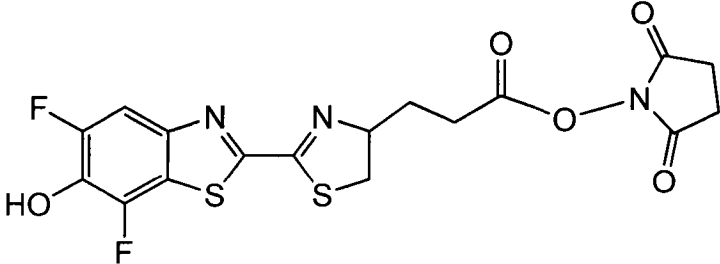
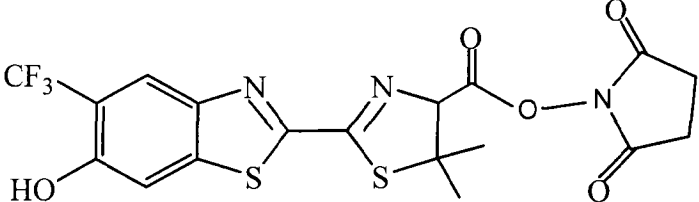
[0198] 本发明的试剂盒

[0199] 本发明的一个方面是使用如上所述本发明的任何一种染料来配制便于各种测定实践的试剂盒。本发明的试剂盒典型地包含本发明的荧光染料,该荧光染料或者作为可用于制备染料-共轭物的化学反应性标记而存在,或者作为其中被共轭的分子是特异性结合配对成员的染料-共轭物而存在。选取的被共轭的分子包括,但不限于,生物分子(例如蛋白质、核酸或者碳水化合物)的聚合物。在特定的实施方式中,列于表3和表4中的本发明的染料尤其适合于制备这样的试剂盒。

[0200] 优选地,试剂盒包含一种以上列于表5中的荧光染料。

[0201] 表5

[0202]

Dye5	
Dye6	
Dye7	

[0204] 试剂盒还可以包含一种以上染料-共轭物 Dye1、Dye2、Dye3、Dye4、Dye5、Dye6、或 Dye7。

[0205] 在一种示例性的实施方式中,试剂盒包括本发明的反应性染料和说明书,该说明书用于指导将所述染料共轭于具有合适官能团的分子上、并且任选地指导回收染料-共轭物。

[0206] 在另一个示例性的实施方式中,试剂盒包括用于指导对样品中的分析物或者配体进行检测的测定的说明书。例如,在一种实施方式中,提供的说明书用于指导检测细胞表面受体、或酶、或能够结合抗体的其他配体。

[0207] 试剂盒还任选地包含一种以上缓冲剂,该缓冲剂典型地作为水溶液存在。本发明的试剂盒任选地进一步包含附加的检测试剂、用于纯化得到的被标记分子的纯化介质、荧光标准、酶、酶抑制剂、有机溶剂、或用于指导进行本发明方法的说明书。

[0208] 下面通过下述示例性的实施例,来进一步阐述本发明的各种具体实施方式。提供的这些实施例是用于说明本发明,并不用于以任何方式限定本发明的范围或者权利。

[0209] 实施例 1

[0210] 下述实施例描述了一种用于合成萤火虫荧光素的二卤衍生物以及它们的各个 NHS 酯的一般方法。

[0211] 1. Appel 盐 (Appel salt) 的制备

[0212]

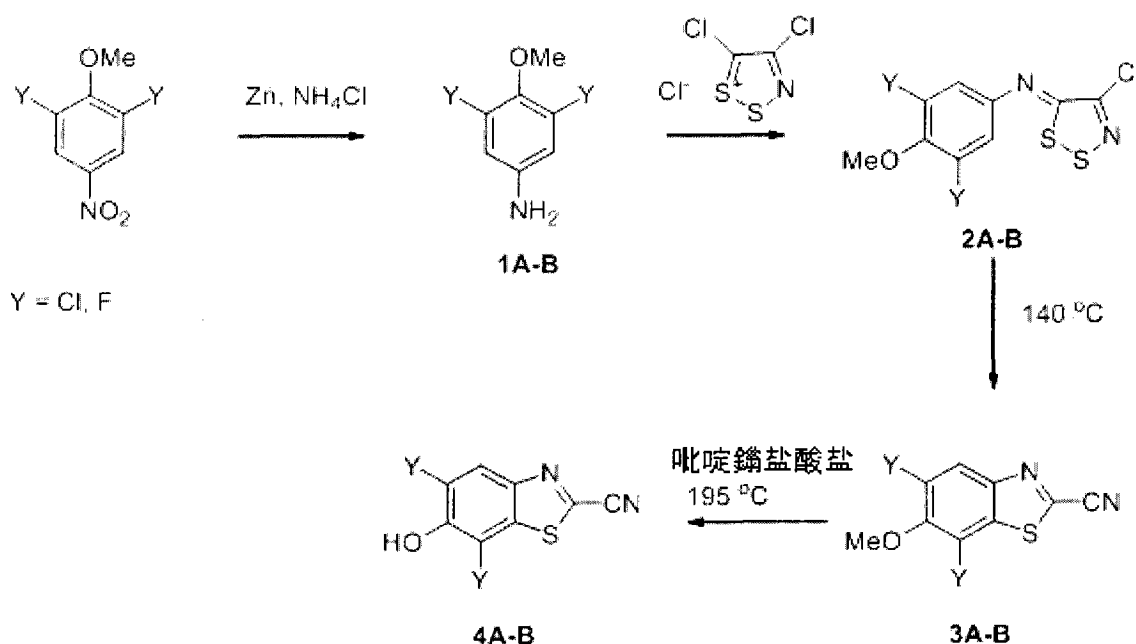


[0213] 在氩气保护下,在 500mL 圆底烧瓶中装入氯乙腈 (20mL)、一氯化硫 (120mL)、以及 CH_2Cl_2 (110mL)。在氩气保护下搅拌反应 3 天,同时形成棕色沉淀物。通过抽滤收集沉淀物,并且用 CH_2Cl_2 (300mL) 和己烷 (300mL) 洗涤。对洗涤后的固体进行真空干燥,得到棕色固体产物 (产率为 75%)。

[0214] 2. 制备 2- 氰基苯并噻唑

[0215] 下述工序用于制备 5,7- 二氯 -6- 羟基 -2- 氰基苯并噻唑。之后进行相同的工艺来制备 5,7- 二氟代 -6- 羟基 -2- 氰基苯并噻唑,具有非常类似的结果。

[0216]



[0217] 在 5L 圆底烧瓶中装入 1,3- 二氯 -2- 甲氧基硝基苯 (0.33 摩尔)、氯化铵 (3.3 摩尔)、以及乙醇 (1200mL)。快速地将锌粉 (3.3 摩尔) 加至搅拌的混合物中。在数分钟后,将反应混合物加温至接近回流,然后使其冷却至室温。在搅拌过夜后,过滤悬浮液,以便除去残留的锌和氯化铵。将滤液减压浓缩,并将得到的固体被再悬浮于 CH_2Cl_2 (1500mL) 中。过滤悬浮液,对滤液进行减压浓缩,得到作为白色固体的被取代的苯胺 (0.33 摩尔)。

[0218] 1A Y = Cl ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 6.601 (s, 2H), 3.811 (s, 3H), 3.6-3.7 (宽峰, s, 2H)

[0219] 1B Y = F ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 6.22 (m, 2H), 3.860 (s, 3H), 3.6-3.7 (宽峰, s, 2H)

[0220] 用炉子干燥 2L 的三颈圆底烧瓶,并且在氩气流下冷却。在该烧瓶中装入 1,3- 二氯 -2- 甲氧基苯胺 (0.33 摩尔)、吡啶 (75mL)、以及 CH_2Cl_2 (550mL)。分批加入 Appel 盐 (0.33 摩尔),历时 5 分钟,引起溶液回流。TLC 显示,15 分钟之后苯胺完全消失。反应混合物被浓缩,得到橙色固体。将该固体溶于 2.5L 乙酸乙酯中。用 type 1 水 (type 1 water) ($2 \times 1000\text{mL}$) 和盐水 (1000mL) 洗涤该有机溶液。洗涤后的有机层用无水 Na_2SO_4 干燥,并且被浓缩,得到作为固体的 Appel 盐加合物。

[0221] 2A Y = Cl ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 7.203 (s, 2H), 3.933 (s, 3H)

[0222] 2BY = F ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ 6.87 (m, 2H), 4.030 (s, 3H)

[0223] 在 500mL 三颈圆底烧瓶中安装氩气引入管线和具有与出口相连接的鼓泡器的水

冷凝器。在该烧瓶中装入 Appel 盐加合物 (0.134 摩尔), 并且加热至表面温度为 140℃, 保持 1 小时。加入甲苯 (50mL), 并且将反应物冷却至 90℃。加入 CH₂Cl₂ (100mL) 和二氧化硅 (50g)。过滤得到的浆液, 并且用 CH₂Cl₂ (200mL) 洗涤滤饼。合并的滤液和洗涤液被浓缩, 并通过快速柱色谱法 (flash chromatography) (CH₂Cl₂/ 己烷) 得到固体 5,7-二氯-6-甲氧基-2-氰基苯并噻唑 (0.031 摩尔)。

[0224] 3A Y = Cl ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : δ 8.194 (s, 1H), 4.027 (s, 3H)

[0225] 3B Y = F ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : δ 7.981 (dd, J = 10Hz & 1.6Hz, 1H), 4.156 (s, 3H)

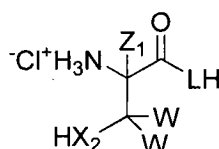
[0226] 在 250mL 圆底烧瓶中装入吡啶鎓盐酸盐 (160 毫摩尔) 和 5,7-二氯-6-甲氧基-2-氰基苯并噻唑 (8.2 毫摩尔)。在氩气保护下装填该反应物, 然后在 195℃ 下加热 3 小时。在冷却至室温后, 加入 type 1 水 (150mL), 并且对混合物进行超声处理以便溶解固体。用乙酸乙酯萃取该水溶液。乙酸乙酯用无水 Na₂SO₄ 干燥, 并且浓缩, 得到作为黄色固体的产物 (2.8 毫摩尔)。

[0227] 4A Y = Cl ¹H NMR (400MHz, 丙酮-d₆) : δ 8.313 (s)

[0228] 4B Y = F ¹H NMR (400MHz, 丙酮-d₆) : δ 8.385 (dd, J = 10.4Hz & 1.6Hz)

[0229] 3. 制备氨基酸

[0230]



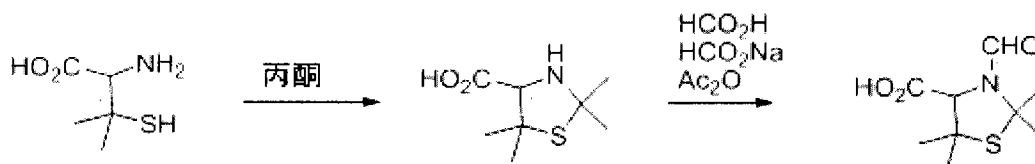
5A-F

[0231]

	W	Z ₁	LH	X ₂
5A	H	H	OH	O
5B	H	Me	OH	S
5C	Me	H	OH	S
5D	Me	H	NHCH ₂ CO ₂ H	S
5E	Me	H	NHCH ₂ CH ₂ CO ₂ H	S
5F	Me	H	NHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	S

[0232] 合成被修饰的青霉胺

[0233]

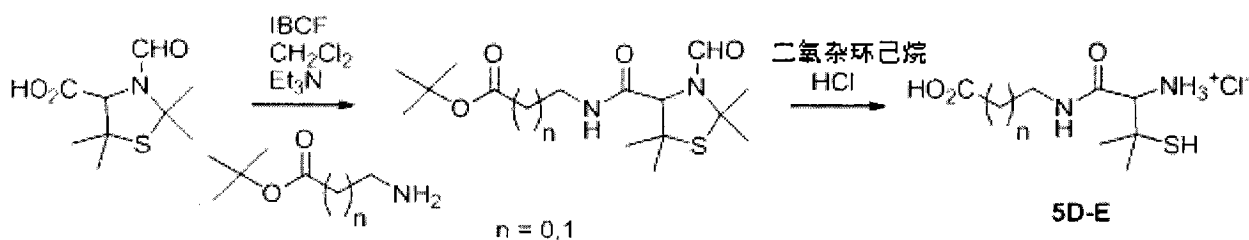


[0234] 在 2000mL 圆底烧瓶中装入 DL-青霉胺 (10g) 和丙酮 (1000mL)。反应物回流直至所有的固体都已溶解 (大约 24 小时)。反应混合物趁热过滤, 并且冷却至室温过夜。过夜已形成少量的晶体。反应混合物被保持在 -20℃ 下过夜。通过抽滤收集得到的固体, 并且用丙酮 (300mL) 洗涤。在氩气保护下干燥噻唑产物 (11.9g)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) : δ 3.750 (s, 1H), 1.556 (s, 6H), 1.438 (s, 3H), 1.185 (s, 3H)。

[0235] 在氩气保护下, 在 250mL 圆底烧瓶中装入噻唑酸 (11.9g) 和甲酸钠 (4.3g)。加入甲

酸 (98%, 100mL), 并且在氩气保护下搅拌反应混合物。反应混合物在冰水浴中冷却至 0℃。逐滴加入醋酸酐 (33.3mL), 历时 45 分钟, 同时将温度小心保持在低于 5℃。移去冰水浴, 并且在室温下将反应物搅拌过夜。在 35℃ 下在真空下除去溶剂, 产生白色固体。将该固体在 type 1 水 (200mL) 中进行搅拌, 并且通过抽滤进行收集。固体用 type 1 水 (100mL) 洗涤, 空气干燥 (7.4g)。用乙酸乙酯 (3×300mL) 萃取合并的滤液和洗涤液。合并萃取液, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤。滤液被浓缩, 得到浅黄色固体 (6.8g)。¹H NMR 显示, 两种固体是目标化合物的同分异构体混合物 (约 85 : 15)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) 12.916 (s, 1H), 8.446 (s, 0.86H), 8.195 (s, 0.14H), 4.641 (s, 0.15H), 4.502 (s, 0.85H), 1.828 (s, 6H), 1.590 (s, 3H), 1.362 (s, 3H)。

[0236]



[0237] 在圆底烧瓶中装入甲酰化的噻唑酸 (1 当量)、三乙胺 (2 当量)、以及 CH₂Cl₂。在氩气保护下、在冰水浴中、于 0℃ 下搅拌反应混合物。经由注射器加入异丁基氯甲酸酯 (1 当量)。在反应混合物已搅拌 1 小时后, 加入氨基酯 (1 当量)。移去冰水浴, 并且在室温下将反应混合物搅拌过夜。反应混合物用 1.0M HCl (75mL)、5% NaHCO₃ (75mL)、以及 type 1 水 (75mL) 洗涤。有机层被减压浓缩, 并且通过快速柱色谱法 (50 : 50 乙酸乙酯 : 正己烷), 得到目标产物 (产率为 60-70%)。¹H NMR 显示了产物的异构体混合物。

[0238] $n = 0$ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : 8.389 (s, 0.88H), 8.328 (s, 0.12H), 6.932 (m, 0.15H), 6.383 (m, 0.82), 4.620 (s, 0.82H), 4.367 (s, 0.15H), 4.030 (dd, $J = 18.4\text{Hz} \ \& \ 5.2\text{Hz}$, 1H), 3.91 (m, 1H), 2.00-1.94 (m, 6H), 1.70-1.59 (m, 3H), 1.47 (m, 12H)

[0239] $n = 1$ ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : 8.358 (s, 0.79H), 8.291 (s, 0.15H), 6.973 (m, 0.15H), 6.486 (m, 0.78), 4.418 (s, 0.80H), 4.313 (s, 0.13H), 3.6-3.4 (m, 2H), 2.43 (m, 2H), 2.00-1.94 (m, 6H), 1.68-1.60 (m, 3H), 1.44 (m, 12H)

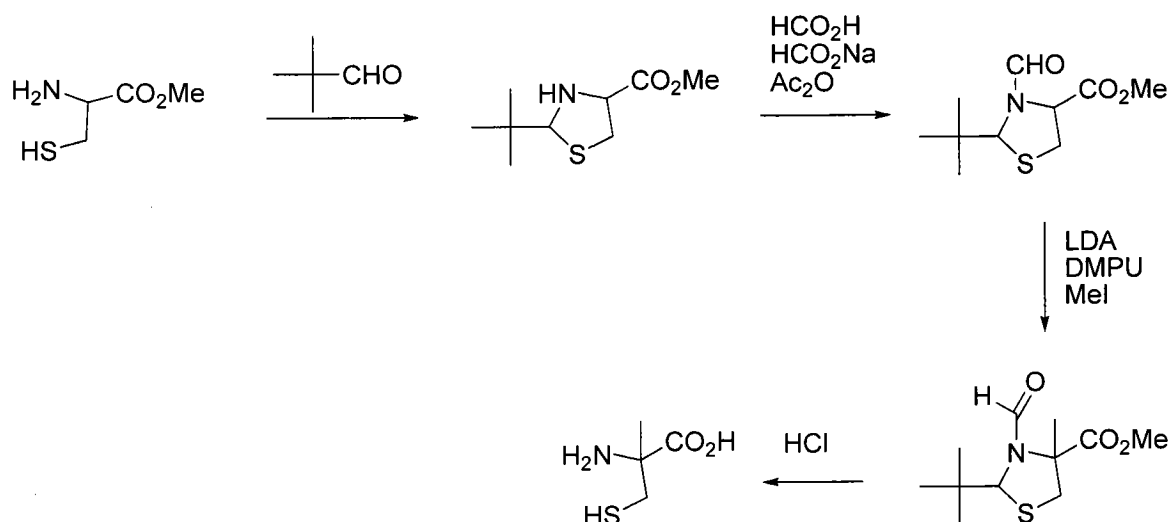
[0240] 在圆底烧瓶中装入甲酰化噻唑酯、以及二氧杂环己烷 : 2.0M HCl (50 : 50)。在氩气保护下在 85℃ 下加热反应混合物过夜。在冷却至室温后, 反应混合物被减压浓缩, 得到呈胶粘状固体的修饰后的青霉胺。

[0241] $n = 0$ ¹H NMR 显示了产物的同分异构体混合物。¹H NMR (400MHz, D₂O) : 4.128 & 4.083 (s, 1H), 4.043 & 4.000 (s, 2H), 1.557 (s, 3H), 1.481 (s, 3H)

[0242] $n = 1$ ¹H NMR (400MHz, D₂O) : 3.702 (s, 1H), 3.45-3.38 (m, 1H), 3.27-3.19 (m, 1H), 2.441 (m, 2H), 1.295 (s, 3H), 1.233 (s, 3H)

[0243] 甲基化半胱氨酸的合成

[0244]



[0245] 在戊烷中搅拌半胱氨酸甲酯 (8.6g)、新戊醛 (11mL)、以及三乙胺 (8mL)。反应混合物进行回流,同时经由迪安-斯脱克分水器 (Dean-Stark trap) 将水除去。在 36 小时后,将反应物冷却至室温,从而形成固体。通过抽滤收集固体,并且用乙醚洗涤。

[0246] 在 100mL 圆底烧瓶中装入噻唑酯 (4.0g)、甲酸 (98%、30mL) 和甲酸钠 (1.5g)。在氩气保护下搅拌反应混合物,并且在冰水浴中冷却至 0℃。逐滴加入醋酸酐 (5.7mL),历时 30 分钟,同时小心保持温度低于 5℃。移去冰水浴,并且在室温下将反应物搅拌过夜。在真空下除去溶剂,并且将得到的固体在 type 1 水 (100mL) 中搅拌。通过添加固体 NaHCO₃,调节 pH 至 7-8。水溶液用乙醚 (3×100mL) 萃取。合并萃取液,用 Na₂SO₄ 干燥,过滤。浓缩滤液,得到固体。该固体用乙酸乙酯/己烷重结晶。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 8.317 (s, 1H), 4.858 (t, J = 8.8Hz, 1H), 4.708 (s, 1H), 3.739 (s, 3H), 3.258 (m, 2H), 1.000 (s, 9H)。

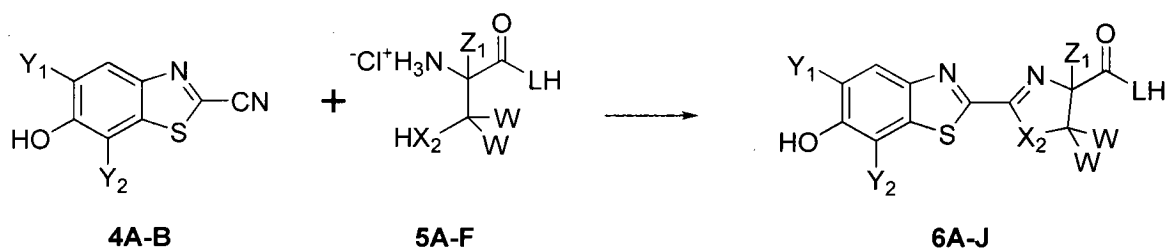
[0247] 在氩气保护下,在 -78℃ 下搅拌二异丙胺锂 (12 毫摩尔) 在无水 THF (四氢呋喃) (100mL) 中的溶液。加入 1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2(1H)-嘧啶酮 (DMPU, 10mL), 并且搅拌反应混合物 90 分钟。加入甲酰化噻唑酯 (10 毫摩尔), 并且在 -78℃ 下搅拌反应混合物 1 小时。加入 MeI (15 毫摩尔), 并且在 -78℃ 下搅拌反应混合物 2 小时。移去干冰丙酮浴, 并且在室温下将反应混合物搅拌过夜。反应混合物被减压浓缩, 并且残留物被保持在盐水中。水溶液用乙醚 (100mL) 萃取。用 Na₂SO₄ 干燥萃取液, 过滤。浓缩滤液, 得到固体。用 10% 乙酸乙酯/己烷通过快速柱色谱法纯化固体。¹H NMR 显示了产物的非对映体混合物。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 主要产物: 8.252 (s, 1H), 5.263 (s, 1H), 3.738 (s, 3H), 3.293 (d, J = 11.6Hz, 1H), 2.695 (d, J = 11.2Hz, 1H), 1.038 (s, 9H); 次要产物: 8.377 (s, 0.4H), 5.274 (s, 0.4H), 3.790 (s, 1.3H), 3.612 (d, J = 12Hz, 0.5H), 2.831 (d, J = 12Hz, 1H), 0.929 (s, 4.6H)。

[0248] 甲基化噻唑酯 (1.8g) 和 5M HCl (30mL) 在 105℃ 下加热 3 天。将反应混合物冷却至室温, 并且用乙酸乙酯 (2×100mL) 萃取。减压浓缩水相, 得到胶粘状固体。

[0249] 4. 制备 6-羟基荧光素酸

[0250] 这是一个制备基本的荧光素结构的典型工艺。

[0251]



[0252]

	W	Z ₁	LH	X ₂	Y ₁ /Y ₂
6A	H	H	OH	O	F
6B	H	Me	OH	S	F
6C	Me	H	OH	S	F
6D	Me	H	NHCH ₂ CO ₂ H	S	F
6E	Me	H	NHCH ₂ CH ₂ CO ₂ H	S	F
6F	Me	H	NHCH ₂ CH ₂ CO ₂ H	S	Cl
6G	H	H	OH	S	F
6H	Me	H	OH	S	Cl
6I	H	H	OH	S	Cl

[0253] 在 100mL 圆底烧瓶中装入氰基苯并噻唑 (0.5 毫摩尔) 和甲醇 (25mL)。将经搅拌的反应混合物用氩气鼓泡 1 小时。制备并加入 pH 为 9 (通过添加 Na₂CO₃ 调节 pH) 的经氩气鼓泡的氨基酸 (1 毫摩尔) 的水溶液。在氩气保护下将反应混合物搅拌 2 小时, 并且 TLC (薄层色谱) 指示反应完成。反应物被减压浓缩至大约 10mL, 并且用 type 1 水 (40mL) 稀释。水溶液用乙酸乙酯 (3×75mL) 萃取, 并且留出萃取液。通过滴加高浓度的 HCl, 将该水溶液酸化至 pH 2。再次用乙酸乙酯 (3×75mL) 萃取酸化的水溶液。合并这 6 次萃取液, 用无水 Na₂SO₄ 干燥, 接着浓缩, 得到固体产物 (产率为 40-90%)。

[0254] 6A ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) : 7.688 (dd, J = 11Hz & 1.4Hz, 1H), 5.017 (dd, J = 10.2Hz & 8.2Hz, 1H), 4.774 (m, 2H)

[0255] 6B ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : 7.795 (dd, J = 10Hz & 1.6Hz, 1H), 3.932 (d, J = 11.8Hz, 1H), 3.434 (d, J = 11.8Hz, 1H), 1.688 (s, 3H)

[0256] 6C ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) : 7.646 (dd, J = 10.4Hz & 1.2Hz, 1H), 4.935 (s, 1H), 1.778 (s, 3H), 1.488 (s, 3H)

[0257] 6D ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) : 8.379 (宽峰, s, 1H), 7.658 (d, J = 10Hz, 1H), 4.758 (s, 1H), 4.000 (d, J = 6Hz, 2H), 1.829 (s, 3H), 1.448 (s, 3H)

[0258] 6E ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) : 8.190 (宽峰, s, 1H), 7.647 (d, J = 10.4Hz, 1H), 4.705 (s, 1H), 3.56-3.50 (m, 2H), 2.558 (t, J = 6.6Hz, 2H), 1.814 (s, 3H), 1.395 (s, 3H)

[0259] 6F ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) : 8.271 (宽峰, s, 1H), 8.093 (s, 1H), 4.794 (s, 1H), 3.610 (m, 2H), 2.640 (t, J = 6.6Hz, 2H), 1.898 (s, 3H), 1.478 (s, 3H)

[0260] 6G ¹H NMR (400MHz, 丙酮-d₆) : 9.838 (s, 1H), 7.810 (dd, J = 10.8Hz, & 1.6Hz, 1H), 5.504 (t, J = 9.2Hz, 1H), 3.860 (m, 2H)

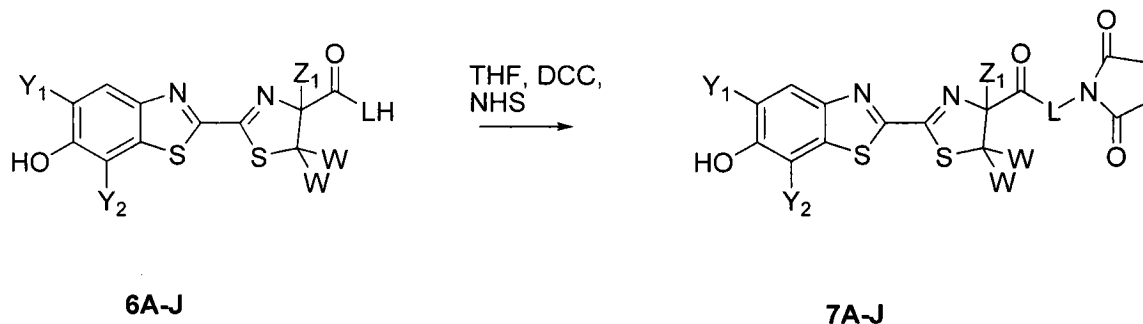
[0261] 6H ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) : 8.266 (s, 1H), 5.007 (s, 1H), 1.725 (s, 1H), 1.447 (s, 1H)

[0262] 6I ^1H NMR(400MHz, 丙酮- d_6): 8.149(s, 1H), 5.505(t, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 3.855(m, 2H)

[0263] 由化合物 6H 开始, 经三个步骤制备出化合物 6J($\text{L} = \text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$)。羧酸 6H 与 N-羟基琥珀酰亚胺和 DCC 的反应产生与 6-氨基己酸甲酯偶联的 NHS 酯 7H。用碱水解得到的甲酯, 从而产生 6J。

[0264] 5. 荧光素 NHS 酯的制备

[0265]



[0266]

	W	Z ₁	L	Y ₁ /Y ₂
7A	H	H	O	F
7B	H	Me	O	F
7C	Me	H	O	F
7D	Me	H	NHCH ₂ CO ₂	F
7E	Me	H	NHCH ₂ CH ₂ CO ₂	F
7F	Me	H	NHCH ₂ CH ₂ CO ₂	Cl
7G	H	H	O	F
7H	Me	H	O	Cl
7J	Me	H	NH(CH ₂) ₅ CO ₂	Cl

[0267] 这是典型的用于制备荧光素 NHS 酯的工艺。

[0268] 10mL 的圆底烧瓶用氩气吹扫, 并且装入荧光素 (0.3 毫摩尔)、N-羟基琥珀酰亚胺 (0.3 毫摩尔)、以及 DCC (0.305 毫摩尔)。加入无水 THF (4mL), 并且反应混合物搅拌 3 小时。减压下除去溶剂, 并且加入小体积的 CH_2Cl_2 。形成有白色沉淀物, 并且通过过滤除去。减压浓缩滤液, 从而形成胶粘状固体。将该固体溶于最少量的 THF 中, 通过添加己烷导致固体再形成。轻轻倒出溶剂, 该工序额外重复 2 次, 得到黄色固体产物 (产率为 60%)。

[0269] 7B ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): 7.650(m, 1H), 4.093(d, $J = 11.4\text{Hz}$, 1H), 3.481(d, $J = 11.4\text{Hz}$, 1H), 1.814(s, 3H)

[0270] 7C ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): 7.660(dd, $J = 10.2\text{Hz}$ & 1.4Hz , 1H), 5.153(s, 1H), 2.858(s, 4H), 1.874(s, 3H), 1.653(s, 3H)

[0271] 7D ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): 7.678(d, $J = 10\text{Hz}$, 1H), 7.608(宽峰, s, 1H), 4.713(s, 1H), 4.614(dd, $J = 18\text{Hz}$ & 6.6Hz , 1H), 4.389(dd, $J = 18\text{Hz}$ & 5.4Hz , 1H), 2.829(s, 4H), 1.907(s, 3H), 1.447(s, 3H)

[0272] 7E ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): 7.670(d, $J = 10\text{Hz}$, 1H), 7.616(宽峰, s, 1H), 4.660(s, 1H), 3.82-3.65(m, 2H), 2.899(t, $J = 6\text{Hz}$, 2H), 2.789(s, 4H), 1.899(s, 3H), 1.412(s, H)

[0273] 7F ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): 8.073(s, 1H), 7.653(宽峰, s, 1H), 4.699(s, 1H),

3.9-3.7 (m, 2H), 2.932 (t, $J = 6.0\text{Hz}$, 2H), 2.820 (s, 4H), 1.940 (s, 3H), 1.451 (s, 3H)

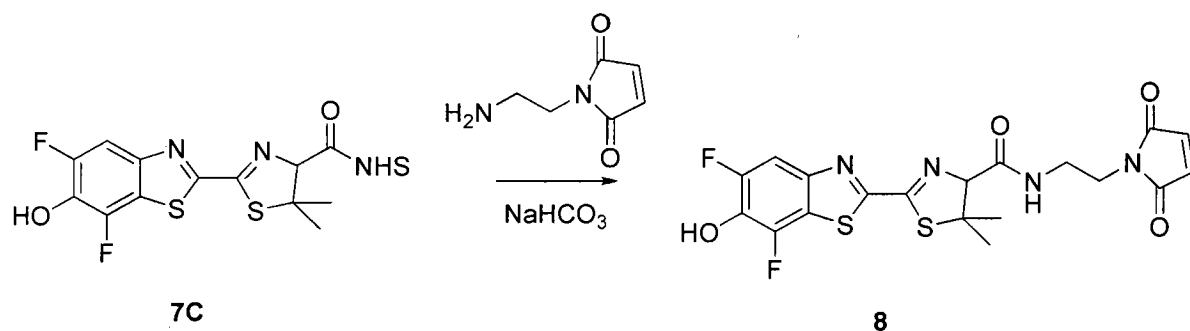
[0274] 7G ^1H NMR (400MHz, 丙酮- d_6): 7.840 (dd, $J = 10.0\text{Hz}$ & 1.6Hz, 1H), 5.962 (dd, $J = 10.2\text{Hz}$ & 8.2Hz, 1H), 4.127 (t, $J = 10.8\text{Hz}$, 1H), 3.914 (dd, $J = 11.6\text{Hz}$ & 8Hz, 1H), 2.935 (s, 4H)

[0275] 7H ^1H NMR (400MHz, 丙酮- d_6): 8.13 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 2.33 (s, 4H), 1.89 (s, 3H), 1.64 (s, 3H)

[0276] 7J ^1H NMR (400MHz, 丙酮- d_6): 9.53 (宽峰, s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.78 (m, 1H), 4.69 (s, 1H), 3.22-3.42 (m, 2H), 2.81 (s, 4H), 2.62 (t, 2H), 1.86 (s, 3H), 1.76-1.69 (m, 2H), 1.63-1.56 (m, 2H), 1.50-1.44 (m, 2H), 1.42 (s, 3H)

[0277] 6. 荧光素马来酰亚胺衍生物的制备

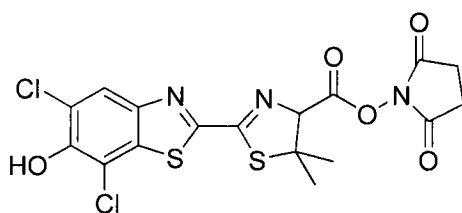
[0278]



[0279] 在无水 THF 中搅拌荧光素 NHS 酯 (22mg)。加入 N-(2-氨基乙基)马来酰亚胺-三氟乙酸 (13mg), 接着加入 NaHCO_3 水溶液。混合物搅拌 4 小时, 然后减压浓缩。将混合物溶于 5mL 水中, 并且用乙酸乙酯萃取。萃取液用无水 Na_2SO_4 干燥, 并且减压浓缩。将固体溶于丙酮, 加入己烷, 产生经空气干燥的沉淀物 (13mg)。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 8.118 (m, 1H), 7.886 (d, $J = 10.8\text{Hz}$, 1H), 6.972 (s, 2H), 4.670 (s, 1H), 3.38 (m, 2H), 3.33 (m, 2H), 1.678 (s, 3H), 1.264 (s, 3H)

[0280] 制备荧光染料 Dye1 (7H):

[0281]

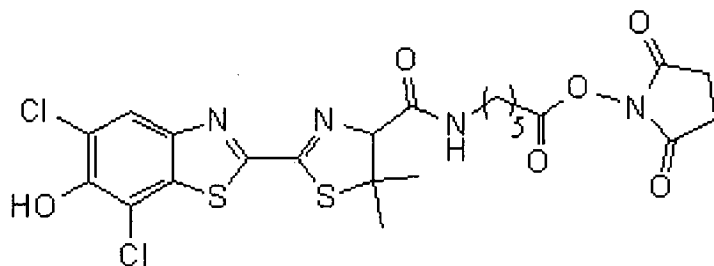


[0282] 采用如上所述合成流程, 合成荧光染料 Dye1 (LD1; 7H)。简言之, 在上文详细描述的条件下, 使通过采用上述方法合成的 2-氨基-5,7-二氯-6-羟基苯并噻唑 (4A) 与 D, L-青霉胺 (5C) 发生反应, 从而得到 5,7-二氯-6-羟基荧光素酸 (6H)。

[0283] 为了合成 5,7-二氯-6-羟基荧光素 NHS 酯, 在如上所述的 DCC 存在的条件下, 使二氯-6-羟基荧光素酸 (6H) 与 N-羟基琥珀酰亚胺发生反应。如上所述, 得到的 NHS 酯 (7H) 被纯化, 并且通过 NMR 进行表征。

[0284] 制备荧光染料 Dye2 (7J):

[0285]

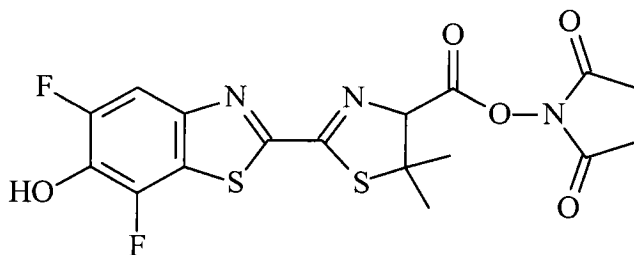


[0286] 通过采用如上所述的合成流程来合成荧光染料 Dye2 (LD2 ; 化合物 7J), 不同的是在上文详细描述的条件下使 2- 氨基 -5,7- 二氯 -6- 羟基苯并噻唑 (4A) 与化合物 5F 发生反应以制备 5,7- 二氯 -6- 羟基荧光素酸 (6J)。

[0287] 紧接着, 在如上所述的 DCC 存在的条件下使二氯 -6- 羟基荧光素酸 (6J) 与 N- 羟基琥珀酰亚胺发生反应, 生产出 NHS 酯 (7J), 按如上所述方法对其进行纯化并且通过 NMR 进行分析。

[0288] 制备荧光染料 Dye3 (7C) :

[0289]

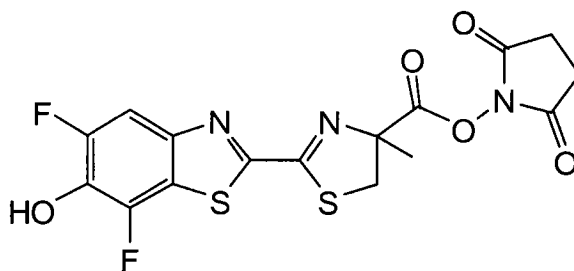


[0290] 通过采用如上所述的合成流程来合成荧光染料 Dye3 (LD3 ; 7C), 不同的是在上文详细描述的条件下使 2- 氨基 -5,7- 二氟 -6- 羟基苯并噻唑 (4B) 与 D,L- 青霉胺 (5C) 发生反应以制备 5,7- 二氟 -6- 羟基荧光素酸 (6C)。

[0291] 紧接着, 在如上所述的 DCC 存在的条件下使二氟 -6- 羟基荧光素酸 (6C) 与 N- 羟基琥珀酰亚胺发生反应, 生产出 5,7- 二氟 -6- 羟基荧光素 NHS 酯 (7C), 按如上所述方法对其进行纯化并且通过 NMR 进行分析。

[0292] 制备荧光染料 Dye4 (7B) :

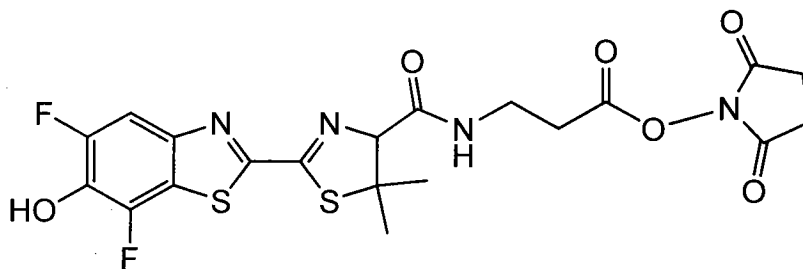
[0293]



[0294] 通过采用如上所述的合成流程来合成荧光染料 Dye4 (LD4 ; 7B), 不同的是在上文详细描述的条件下使 2- 氨基 -5,7- 二氟 -6- 羟基苯并噻唑 (4B) 与化合物 5B 发生反应以制备 5,7- 二氟 -6- 羟基荧光素酸 (6C)。紧接着, 在如上所述的 DCC 存在的条件下使 5,7- 二氟 -6- 羟基荧光素酸 (6C) 与 N- 羟基琥珀酰亚胺发生反应, 生产出 5,7- 二氟 -6- 羟基荧光素 NHS 酯 (7C), 按如上所述方法对其进行纯化并且通过 NMR 进行分析。

[0295] 制备荧光染料 Dye5 (7E)

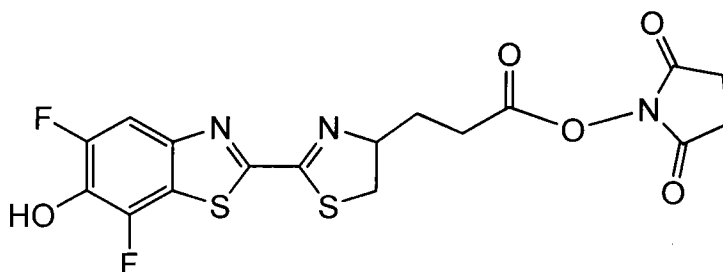
[0296]



[0297] 通过采用如上所述的合成流程来合成荧光染料 Dye5 (LD5 ; 7E), 不同的是在上文详细描述的条件下使 2- 氰基 -5,7- 二氟 -6- 羟基苯并噻唑 (4B) 与化合物 5E 发生反应以制备 5,7- 二氟 -6- 羟基荧光素酸 (6E)。紧接着, 在如上所述的 DCC 存在的条件下使 5,7- 二氟 -6- 羟基荧光素酸 (6E) 与 N- 羟基琥珀酰亚胺发生反应, 生产出 5,7- 二氟 -6- 羟基荧光素 NHS 酯 (7E), 按如上所述方法对其进行纯化并且通过 NMR 进行分析。

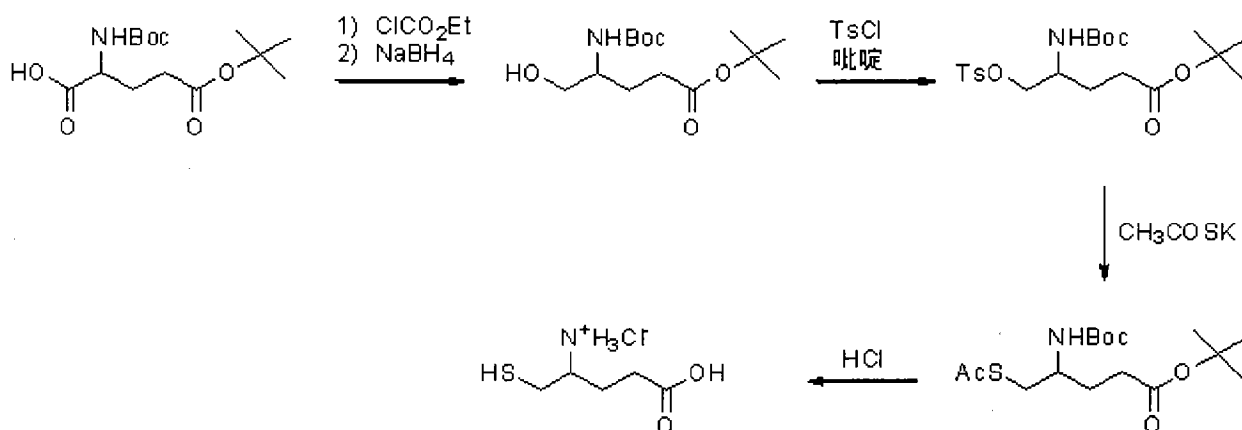
[0298] 制备荧光染料 Dye6 (9B)

[0299]



[0300] 通过使用如下所述工艺流程图来合成荧光染料 Dye6 (LD6)。

[0301]



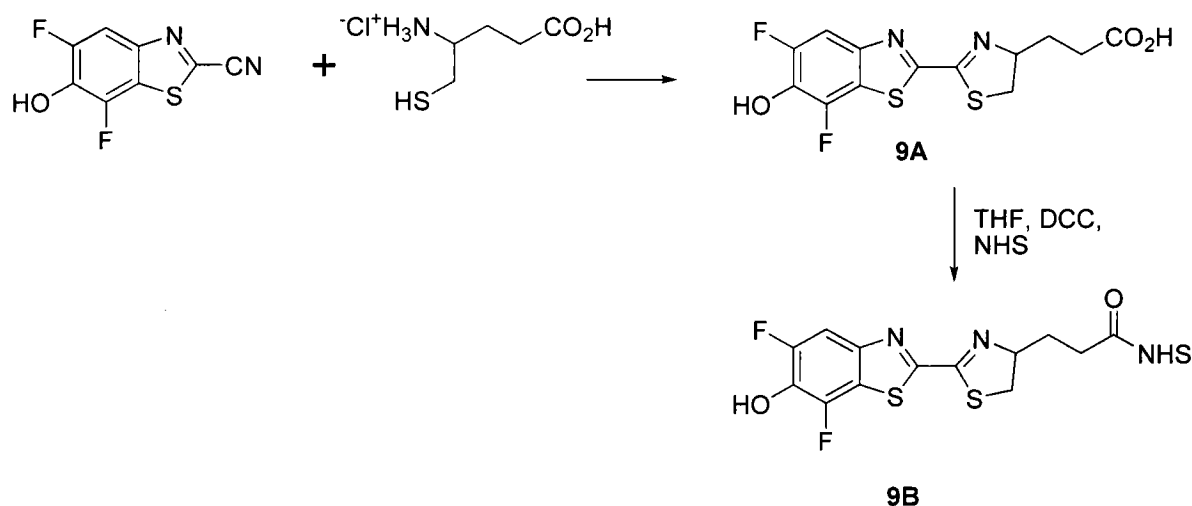
[0302] N-Boc-L- 谷氨酸 γ - 叔丁酯 (4.3g) 在 CH_2Cl_2 中在 0°C 下搅拌。经由注射器加入三乙胺 (2mL), 接着添加氯甲酸乙酯 (1.4mL)。反应混合物搅拌 60 分钟, 过滤, 并且固体用无水 THF 洗涤。合并滤液和洗涤液, 转移至加料漏斗。在 0°C 下, 将该溶液逐滴加入搅拌着的 NaBH_4 在 H_2O 中 (20mL) 的溶液中, 历时 30 分钟。在室温下搅拌过夜之前, 将反应混合物在 0°C 下搅拌 5 小时。反应混合物被减压浓缩, 并且残留物用乙酸乙酯稀释。该溶液用水和盐水清洗、用无水 Na_2SO_4 干燥, 并且减压浓缩。通过快速柱色谱法 (20 : 80 的乙酸乙酯 : 正己烷), 得到油状产物。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : 4.814 (宽峰, s, 1H), 3.62-3.49 (m, 3H), 2.496 (宽峰, s, 1H), 2.290 (q, $J = 6.8\text{Hz}$, 2H), 1.83-1.69 (m, 2H), 1.406 (s, 18H)。

[0303] 在氩气保护下,氨基醇 (3.5g) 在吡啶 (25mL) 中于 0℃ 下搅拌。加入甲苯磺酰氯 (3.0g), 并且将反应混合物在 0℃ 下搅拌 6 小时。将溶液加温至室温, 并且搅拌过夜。反应混合物被减压浓缩, 并且将得到的固体溶于乙酸乙酯。用饱和 NaHCO_3 洗涤该溶液, 接着用盐水洗涤。洗涤后的溶液用无水 Na_2SO_4 干燥, 并且减压浓缩。通过快速柱色谱法, 得到油状产物。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : 7.744 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 7.311 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H), 4.623 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H), 4.00–3.91 (m, 2H), 3.739 (宽峰, s, 1H), 2.411 (s, 3H), 2.224 (m, 2H), 1.719 (m, 2H), 1.390 (s, 9H), 1.350 (s, 9H)。

[0304] 甲苯磺酸酯 (3.9g) 和硫代醋酸钾 (2.9g) 在无水 DMF 中的溶液在室温下被搅拌 3 天。该反应混合物用乙酸乙酯 (300mL) 稀释, 并且用盐水 ($3 \times 100\text{mL}$) 洗涤。洗涤后的溶液用无水 Na_2SO_4 干燥, 并且减压浓缩。通过快速柱色谱法 (15 : 85 的乙酸乙酯 : 正己烷), 得到油状产物。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : 4.522 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H), 3.704 (宽峰, s, 1H), 3.07–2.94 (m, 2H), 2.311 (s, 3H), 2.264 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 1.80–1.60 (m, 2H), 1.404 (s, 9H), 1.386 (s, 9H)。

[0305] 将硫代乙酸酯 (2.5g) 在脱气 6N HCl 中于 105℃ 下加热过夜。将反应混合物冷却至室温, 减压浓缩, 得到红色油状物。 ^1H NMR (400MHz, D_2O) :

[0306]



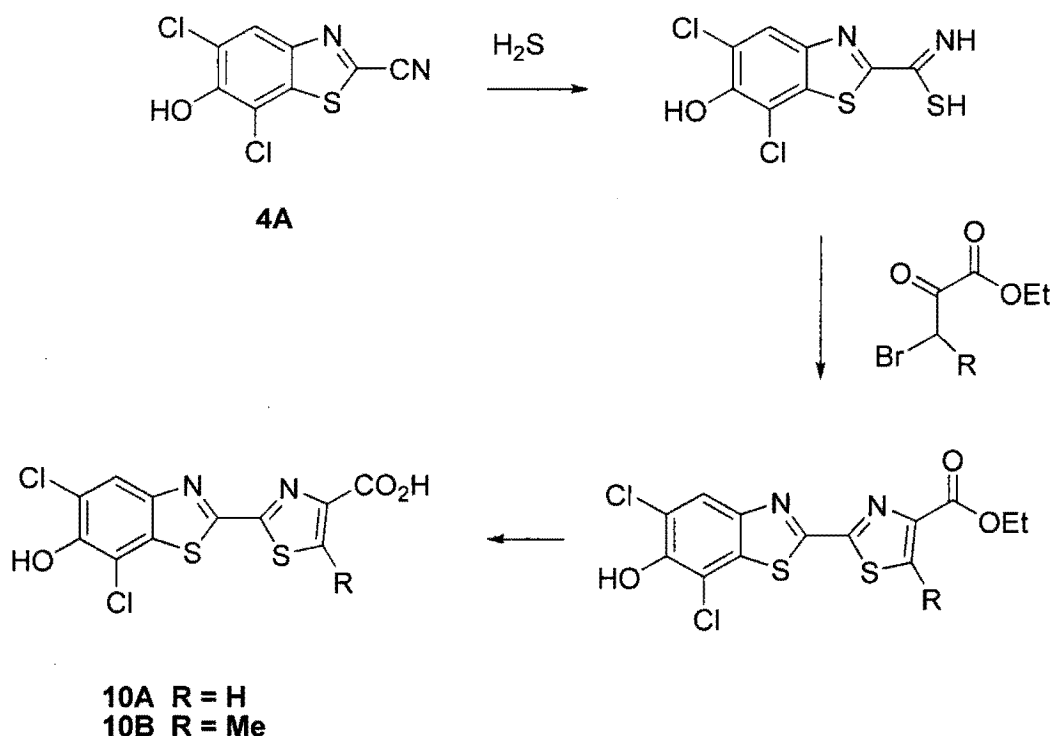
[0307] 在烧瓶中装入 2-氰基-5,7-二氟-6-羟基苯并噻唑 (110mg) 和甲醇 (25mL)。搅拌中的反应混合物用氩气鼓泡 1 小时。制备 pH 为 9 (通过添加 Na_2CO_3 调节 pH) 的经氩气鼓泡的氨基酸 (300mg) 的水溶液, 并且以 1 小时的间隔分三次将其加入反应混合物中。反应混合物被搅拌过夜。反应物被减压浓缩至大约 10mL, 并且用 type 1 水 (40mL) 稀释。水溶液用乙酸乙酯 (50mL) 萃取, 并且留出萃取液。通过滴加高浓度的 HCl, 将该水溶液酸化至 pH 2。再次用乙酸乙酯 ($2 \times 50\text{mL}$) 萃取经酸化的水溶液。合并这 2 次萃取液, 用无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩, 得到固体产物 (130mg)。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) : 7.641 (d, $J = 10.4\text{Hz}$, 1H), 4.694 (m, 1H), 3.612 (t, $J = 8.8\text{Hz}$, 1H), 3.179 (t, $J = 9.4\text{Hz}$, 1H), 2.550 (m, 2H), 2.037 (m, 2H)

[0308] 烧瓶用氩气吹扫, 并且装入脱氧荧光素酸 (41mg)、N-羟基琥珀酰亚胺 (15mg)、以及 DCC (26mg)。加入无水 THF (4mL), 并且反应混合物搅拌 3 小时。过滤反应溶液, 以便除去固体。将正己烷加至通过抽滤收集的沉淀物固体。将固体再溶解于 THF 中, 并且将正己烷加至沉淀物固体中。通过抽滤收集固体, 并且进行空气干燥。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : 7.666 (dd,

$J = 10.4\text{Hz} \ \& \ 1.6\text{Hz}, 1\text{H}), 4.772(\text{m}, 1\text{H}), 3.612(\text{m}, 1\text{H}), 3.158(\text{dd}, J = 11\text{Hz} \ \& \ 8.6\text{Hz}, 1\text{H}), 3.00\text{--}2.86(\text{m}, 2\text{H}), 2.821(\text{s}, 4\text{H}), 2.188(\text{m}, 2\text{H})$ 。

[0309] 脱氢荧光素(10)的制备

[0310]



[0311] 下面的反应描述是用于实施例 10A, 并且在情况 10B 中使用类似的反应条件。给出了这两种情况的 ^1H NMR 数据。

[0312] 在吡啶 (20mL) 和三乙胺 (0.3mL) 中搅拌 2-氰基-5,7-二氯-6-羟基苯并噻唑 (2.8 毫摩尔)。向溶液中鼓泡硫化氢 4.5 小时。停止添加硫化氢, 并且在室温下将反应混合物搅拌过夜。在减压下汽提该反应混合物, 并且将得到的固体用甲醇重结晶。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): 8.000 (s, 1H)。

[0313] 将上述苯并噻唑产物 (55mg) 悬浮于甲醇 (5mL) 中。加入溴代丙酮酸乙酯 (100mg), 并且将反应混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物在 80°C 下加热 7 小时。将反应混合物冷却至室温, 从而形成固体。通过抽滤收集固体, 用甲醇洗涤, 并且进行空气干燥 (35mg)。

[0314] $\text{R} = \text{H}$ ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 8.295 (s, 1H), 7.992 (s, 1H), 4.436 (q, $J = 7\text{Hz}$, 2H), 1.414 (t, $J = 7\text{Hz}$, 3H)

[0315] $\text{R} = \text{Me}$ 甲酯的 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 7.964 (s, 1H), 3.951 (s, 3H), 2.837 (s, 3H)

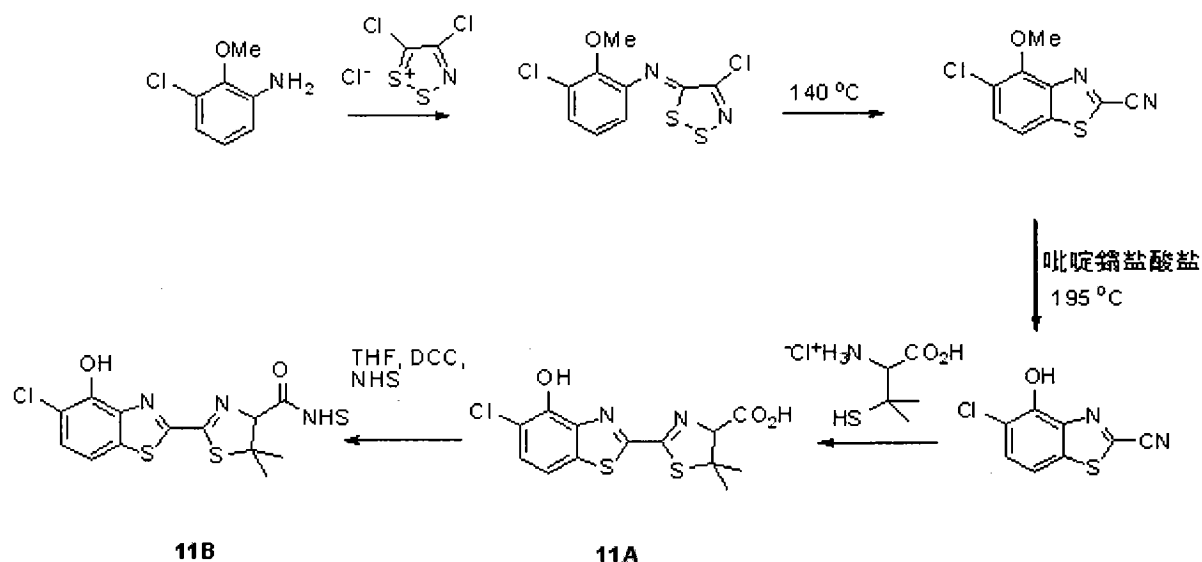
[0316] 脱氢荧光素乙酯 (30mg) 被悬浮于甲醇和 1N NaOH 中。将反应物在室温下搅拌 2 天。用 1N HCl 将反应混合物酸化至 pH 2, 并且用乙酸乙酯 ($2 \times 50\text{mL}$) 萃取。合并的萃取液用无水 Na_2SO_4 干燥, 减压浓缩, 得到固体产物。

[0317] 10A ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): 8.518 (s, 1H), 8.001 (s, 1H)

[0318] 10B ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): 7.965 (s, 1H), 2.810 (s, 3H)

[0319] 8.5-氯-4-羟基荧光素酸(11A)和NHS酯(11B)的制备

[0320]



[0321] 4-羟基荧光素酸和 NHS 酯的合成路线与用于制备 6-羟基荧光素酸和 NHS 酯的合成路线相同。给出了上述化合物的 NMR 数据。

[0322] 3-氯-2-甲氧基苯胺 Appel 盐：¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : 7.224 (m, 1H), 7.068 (t, J = 8.2Hz, 1H), 6.988 (d, J = 8Hz, 1H), 3.809 (s, 3H)

[0323] 2-氰基-5-氯-4-甲氧基苯并噻唑：¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : 7.591 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.521 (d, J = 8.8Hz, 1H), 4.349 (s, 3H)

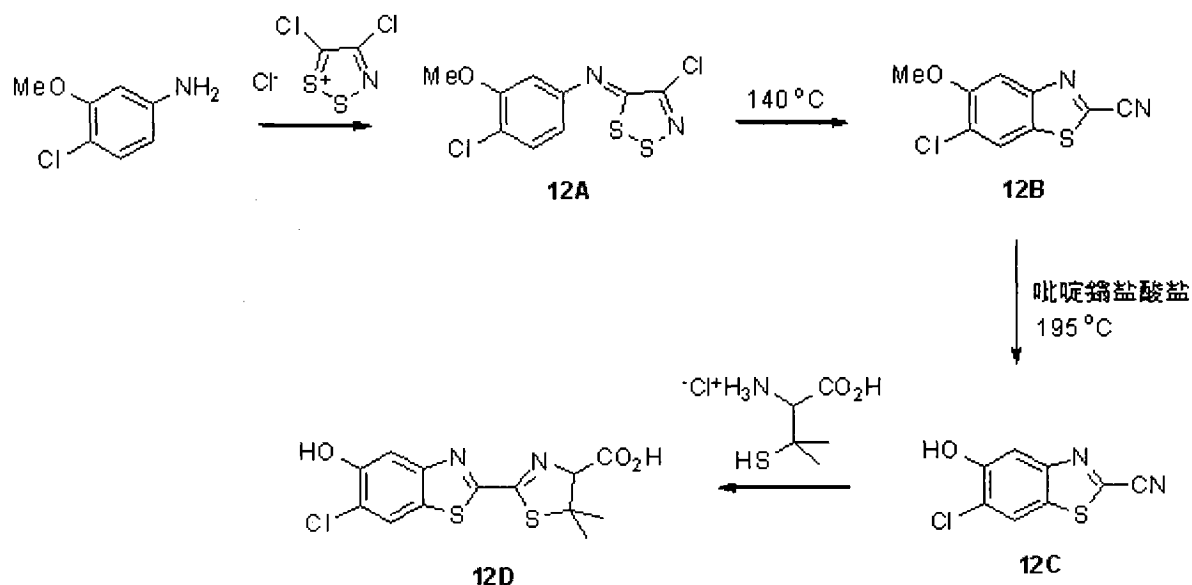
[0324] 2-氰基-5-氯-4-羟基苯并噻唑：¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : 7.576 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.416 (d, J = 8.4Hz, 1H), 6.702 (s, 1H)

[0325] 5-氯-4-羟基二甲基荧光素酸 (11A)：¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : 7.451 (d, J = 8.4Hz, 1H), 7.370 (d, J = 9.2Hz, 1H), 6.689 (s, 1H), 4.903 (s, 1H), 1.886 (s, 3H), 1.528 (s, 3H)

[0326] 5-氯-4-羟基二甲基荧光素 NHS 酯 (11B)：¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : 7.425 (d, J = 8.8Hz, 1H), 7.354 (d, J = 8.4Hz, 1H), 6.707 (s, 1H), 5.157 (s, 1H), 2.855 (s, 4H), 1.882 (s, 3H), 1.659 (s, 3H)

[0327] 9.6-氯-5-羟基荧光素酸 (12D) 的制备

[0328]



[0329] 5-羟基荧光素酸的合成路线与用于制备 6-羟基荧光素酸的合成路线相同。给出了上述化合物的 NMR 数据。

[0330] 4-氯-3-甲氧基苯胺 Appel 盐 (12A) : ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : 7.396 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 1H), 6.78-6.76 (m, 2H), 3.882 (s, 3H)

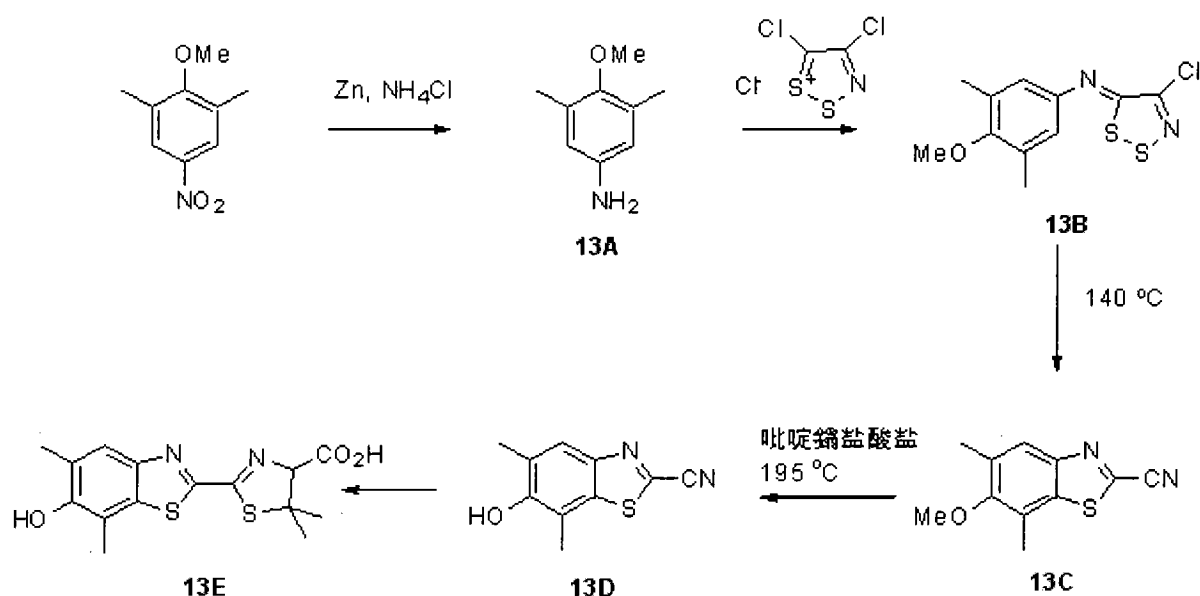
[0331] 2-氰基-6-氯-5-甲氧基苯并噻唑 (12B) : ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : 7.929 (s, 1H), 7.636 (s, 1H), 3.988 (s, 3H)

[0332] 2-氰基-6-氯-5-羟基苯并噻唑 (12C) : ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : 7.927 (s, 1H), 7.792 (s, 1H), 5.852 (s, 1H)

[0333] 6-氯-5-羟基二甲基荧光素酸 (12D) : ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) : 7.980 (s, 1H), 7.511 (s, 1H), 4.927 (s, 1H), 1.778 (s, 3H), 1.489 (s, 3H)

[0334] 10. 5,7-二甲基-6-羟基二甲基荧光素酸 (13E) 的制备

[0335]



[0336] 5,7-二甲基-6-羟基二甲基荧光素酸的合成路线与用于制备 6-羟基荧光素酸的合成路线相同。给出了上述化合物的 NMR 数据。

[0337] 3,5-二甲基-4-甲氧基苯胺 (13A) : ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : 6.320 (s, 2H), 3.615 (s, 3H), 2.167 (s, 6H)

[0338] 3,5-二甲基-4-甲氧基苯胺 Appel 盐 (13B) : ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : 6.905 (s, 2H), 3.711 (s, 3H), 2.278 (s, 6H)

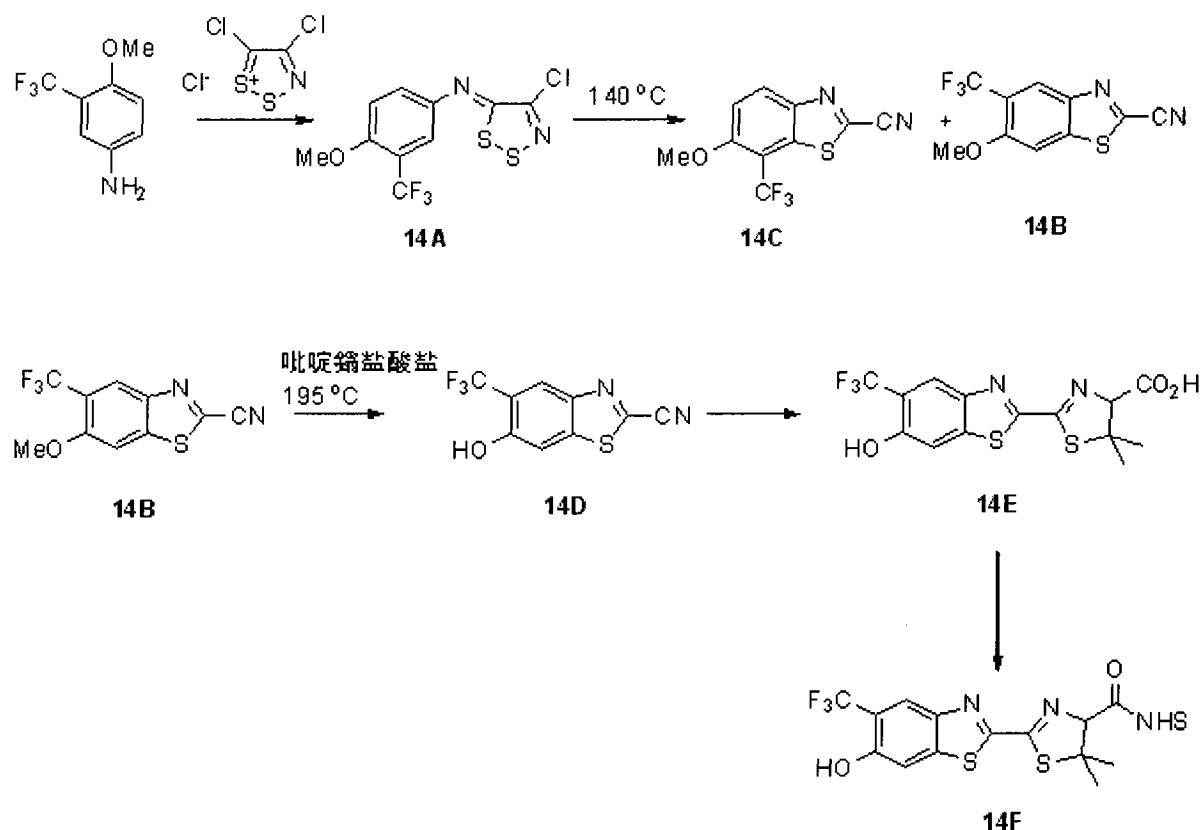
[0339] 2-氰基-5,7-二甲基-6-甲氧基苯并噻唑 (13C) : ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : 7.845 (s, 1H), 3.782 (s, 3H), 2.488 (s, 3H), 2.429 (s, 3H)

[0340] 2-氰基-5,7-二甲基-6-羟基苯并噻唑 (13D) : ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : 7.805 (s, 1H), 5.2 (宽峰, s, 1H), 2.443 (s, 3H), 2.401 (s, 3H)

[0341] 5,7-二甲基-6-羟基二甲基荧光素酸 (13E) : ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) : 7.641 (s, 1H), 4.905 (s, 1H), 2.401 (s, 3H), 2.333 (s, 3H), 1.777 (s, 3H), 1.491 (s, 3H)

[0342] 11. 用三氟甲基取代的荧光素酸 (14E) 和 NHS 酯 (荧光染料 Dye7 ; 14F) 的制备 :

[0343]



[0344] 用三氟甲基取代的荧光素酸和 NHS 酯的合成路线与用于制备 6-羟基荧光素酸和 NHS 酯的合成路线相同。给出了上述化合物的 NMR 数据。

[0345] 4-甲氧基-3-三氟甲基苯胺 Appel 盐 (**14A**): ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 7.522(d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 7.424(dd, $J = 8.6\text{Hz}$ & 2.6Hz , 1H), 7.064(d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 3.916(s, 3H)

[0346] 2-氰基-5-三氟甲基-6-甲氧基苯并噻唑 (**14B**): ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 8.384(s, 1H), 7.451(s, 1H), 4.033(s, 3H)

[0347] 2-氰基-7-三氟甲基-6-甲氧基苯并噻唑 (**14C**): ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 8.313(d, $J = 8.8\text{Hz}$, 1H), 7.374(d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 3.997(s, 3H)

[0348] 2-氰基-5-三氟甲基-6-羟基苯并噻唑 (**14D**): ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 8.368(s, 1H), 7.492(s, 1H)

[0349] 5-三氟甲基-6-羟基二甲基荧光素酸 (**14E**): ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): 8.168(s, 1H), 7.479(s, 1H), 4.927(s, 1H), 1.779(s, 3H), 1.492(s, 3H)

[0350] 5-三氟甲基-6-羟基二甲基荧光素 NHS 酯 (**14F**): ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): 8.278(s, 1H), 7.445(s, 1H), 5.148(s, 1H), 2.861(s, 4H), 1.874(s, 3H), 1.653(s, 3H)

[0351] 荧光素化合物的荧光测量

[0352] 在 HORIBA Jobin Yvon **Fluoromax**®-3 分光光度计上进行荧光测量实验。典型地, 激发波长被设定为 405nm, 除非另有说明。激发和发射狭缝是 1nm。染料在 25mM Tris pH 8.0 缓冲液中浓度为 20 μM 的溶液被用于获得荧光光谱和确定在表 6 中显示的最大发射波长处的强度。

[0353] 表 6

[0354]

荧光素化合物	在荧光最大值处的荧光强度
化合物 6H	530 nm = 1.1e6 (激发波长 = 405 nm)
化合物 6J	542 nm = 1.75e6 (激发波长 = 405 nm)
化合物 6C	530 nm = 1.1e6 (激发波长 = 405 nm)
化合物 6B	527 nm = 935490 (激发波长 = 405 nm)
化合物 6E	541 nm = 1.3e6 (激发波长 = 405 nm) 541 nm = 4.5e6 (激发波长 = 396 nm)
化合物 9A	532 nm = 964121(激发波长 = 405nm) 532 nm = 1.2e6 (激发波长 = 396 nm)
化合物 14E	532 nm = 570975(激发波长 = 405 nm) 532 nm = 774112(激发波长 = 396 nm)
化合物 10A	546 nm = 1.6e6 (激发波长 = 405 nm)

[0355] 实施例 2

[0356] 下述实施例描述了用于将本发明的荧光染料共轭至抗体分子的方法。

[0357] 在典型的实验中,按如下所述方法制备荧光素衍生物的抗体共轭物。在 50mM 硼酸盐 pH 9.0 缓冲液中以 4mg/mL 的浓度制备所关注的抗体。将染料试剂溶于无水的 DMSO 中,浓度为 5mg/mL。慢慢地将预定含量的在 DMSO 中的染料加入抗体溶液中,进行混合。将反应物在室温下保温 60 分钟。此后通过添加在 PBS、2mM EDTA 中浓度为 75mg/mL 的甘氨酸(200 摩尔过量于使用的染料)溶液来猝灭该反应。通过在用 PBS 平衡后的 Sephadex G-50 柱子上脱盐,分离出染料-抗体共轭物。监控洗脱过程于 280nm 下的吸光度,并且从柱子上收集含有抗体的区带。通过测量染料-共轭物在 280nm 处和在染料峰值的吸收最大值处的吸光度值,来确定取代度(F/P 值)。通过使用被用于共轭的染料的消光系数,计算出取代度,如表 7 所示。

[0358] 表 7

[0359]

本发明的染料	在染料最大吸收值处的消光系数 $M^{-1}cm^{-1}$
5,7 - 二氯荧光素 NHS 酯 (Dye1)	14662
5,7 - 二氯荧光素-连接物- NHS 酯 (Dye2)	18174
二甲基二氯荧光素 NHS 酯 (Dye3)	17665
一甲基二氯荧光素 NHS 酯 (Dye4)	14665
二氯二亚甲基荧光素 NHS 酯 (Dye5)	11532
二氯酰胺荧光素 NHS 酯 (Dye6)	14990

[0360] 下面的表 (表 8) 提供了本发明的染料中的 6 种染料共轭于有代表性的抗体的各种共轭物的数据。

[0361] 表 8

[0362]

抗体	染料	使用的染料对抗体的比率	共轭物的最大吸收值	取代度	共轭物的发射最大值
CD4	Dye1	100	400nm	13.5	525nm
CD4	Dye2	60	399nm	30.4	516nm
CD3	Dye2	10	399nm	5.91	516nm
CD45	Dye2	5	399nm	4.2	516nm
CD4	Dye3	100	398nm	11.4	528nm
CD3	Dye3	20	398nm	4.8	528nm
CD45	Dye3	40	398nm	8.24	528nm
CD3	Dye4	30	390nm	2.89	528nm
CD4	Dye5	60	390nm	20.8	527nm
CD3	Dye5	20	390nm	6.2	527nm
CD45	Dye5	15	390nm	8.31	527nm
CD4	Dye6	80	382nm	27.6	517nm
CD3	Dye6	15	382nm	6.8	517nm
CD45	Dye6	10	382nm	6.8	517nm
CD4	Dye7	100	391nm	ND ^a	524nm
CD4	Dye8	100	420nm	ND	465nm
CD4	Dye8	100	420nm	ND	465nm

[0363] ^aND 是指未测定

[0364] 实施例 3 :

[0365] 下述实施例提供了在流式细胞仪中使用抗体 - 染料共轭物的方法。

[0366] 流式分析

[0367] 最佳数量的本发明的抗体 - 染料共轭物的各种组合 (单独地通过滴定法确定的) 被独立地与含有全血的生物样本 (0.1mL) 相组合, 温育 10-15 分钟, 通过使用 VersaLyse™

溶细胞试剂而采用标准工序进行处理,并且通过使用流式细胞仪进行分析。简言之,将处理后的生物样本与 VersaLyse™ 试剂 /0.2% 甲醛 (1mL) 合并 10 分钟,旋降处理后的样品,吸出上清液,团粒在 PBS (2mL) 中再悬浮,旋降细胞悬液,并且团粒在 PBS/0.1% 甲醛 (1mL) 中再悬浮,用于分析。通过流式细胞仪,基于前向散射和侧向散射特征,选出淋巴细胞群。通过使用特异性的单克隆抗体,鉴别各亚群。通过使用基于共轭物荧光发射光谱而选择的合适的带通滤波器,收集荧光信号。

[0368] 类似地,评估抗体 -Pacific Orange™ 共轭物。在选取的情况中,将各种荧光素衍生物染料 - 抗体共轭物的流式数据结果与对应的抗体 -Pacific Orange 染料 - 共轭物进行比较。下表总结了这些结果 (表 9)。与抗体 -Pacific Orange 共轭物相比,本发明的抗体 - 荧光染料共轭物显示出更高的信 / 噪值。

[0369] 表 9

[0370]	共轭物	信/噪值
	CD4-Pacific Orange	8.7
	CD4-Dye1	20.5
	CD4-Dye2	26.8
	CD4-Dye3	26.4
	CD4-Dye4	27.4
	CD4-Dye5	31.0
	CD4-Dye7	9.2

[0371] 双色流式分析:

[0372] 在选取的情况中,使用 405nm 激光谱线、本发明的 CD8-Pacific Blue™ 染料 - 共轭物和 CD4- 荧光素衍生物染料,进行类似地双色流式分析。将结果与 CD8-Pacific Blue 染料共轭物和 CD4-Pacific Orange 染料 (Invitrogen 公司) 的对应性能进行比较。如图 4 所示,当与抗体 -Pacific Orange™ 共轭物相比时,抗体 -Dye2 共轭物显示出更亮的信号。

[0373] 多色流式分析:

[0374] 对于本发明的染料之一 (Dye3),还显示了在配备有 405nm 激光、488nm 激光和 635nm 激光的 3 激光 10 色 PMT 仪上的十色应用。将 550/40nm 带通滤波器用于收集进入光电倍增管的荧光输出。使用以下抗体试剂:

[0375] 1. CD45 (RA) -FITC

[0376] 2. CD56-PE

[0377] 3. CD45 (R0) -ECD

[0378] 4. CD25-PC5

[0379] 5. CD19-PC7

[0380] 6. CD3-APC

[0381] 7. CD27-APCA700

[0382] 8. CD5-APCCy7

[0383] 9. CD8-Pacific Blue

[0384] 10. CD4-Pacific Orange/CD4-Dye3.

[0385] 图 5 所示的直方图显示,在十色流式测定中,当与 CD4-Pacific Orange 共轭物相比

时, CD4-Dye3 共轭物给出了更亮的信号。

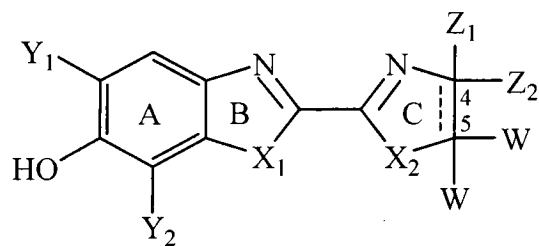


图 1



图 2A

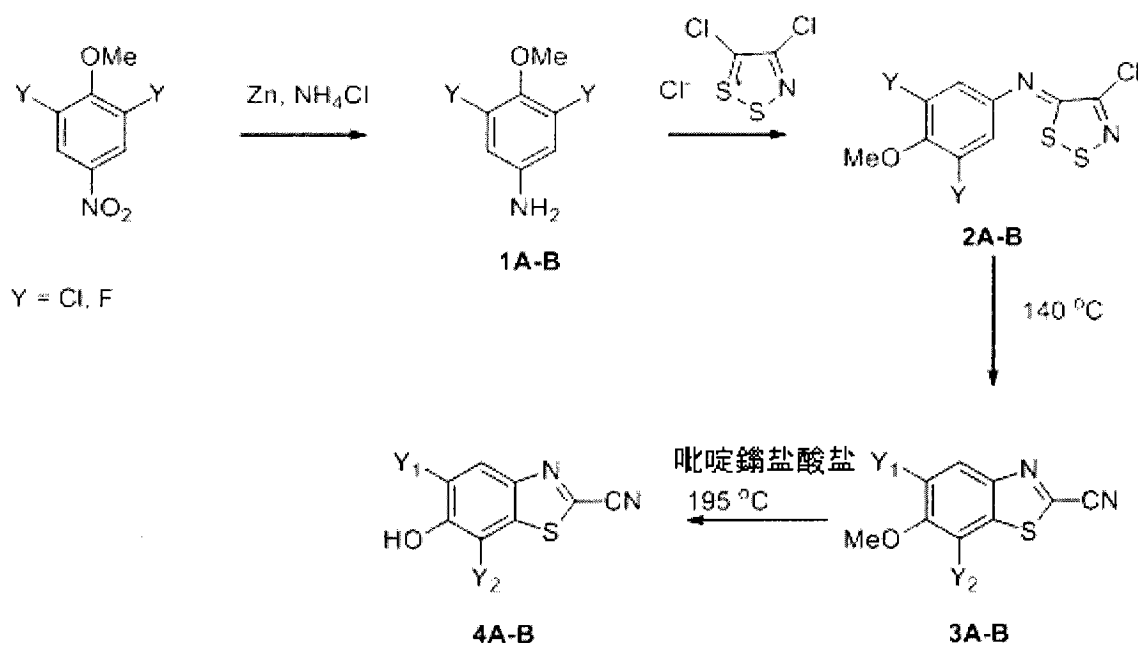


图 2B

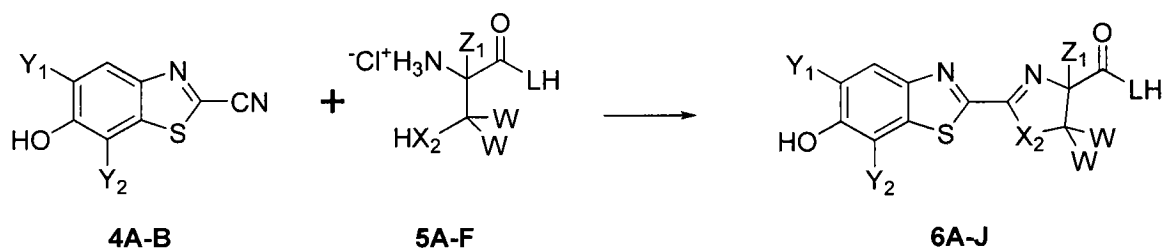


图 2C

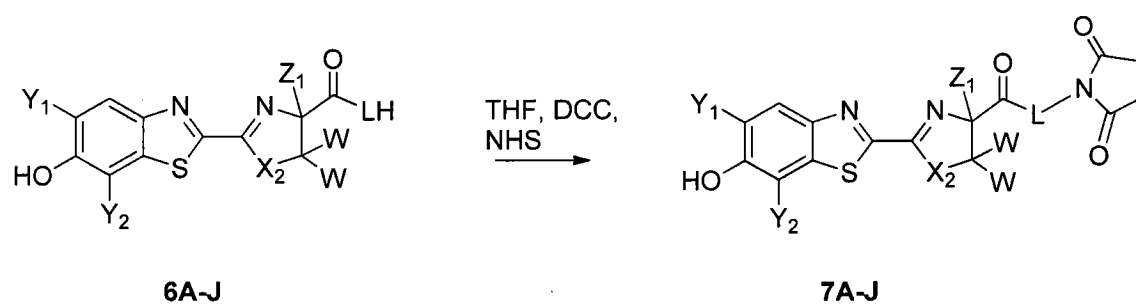


图 2D

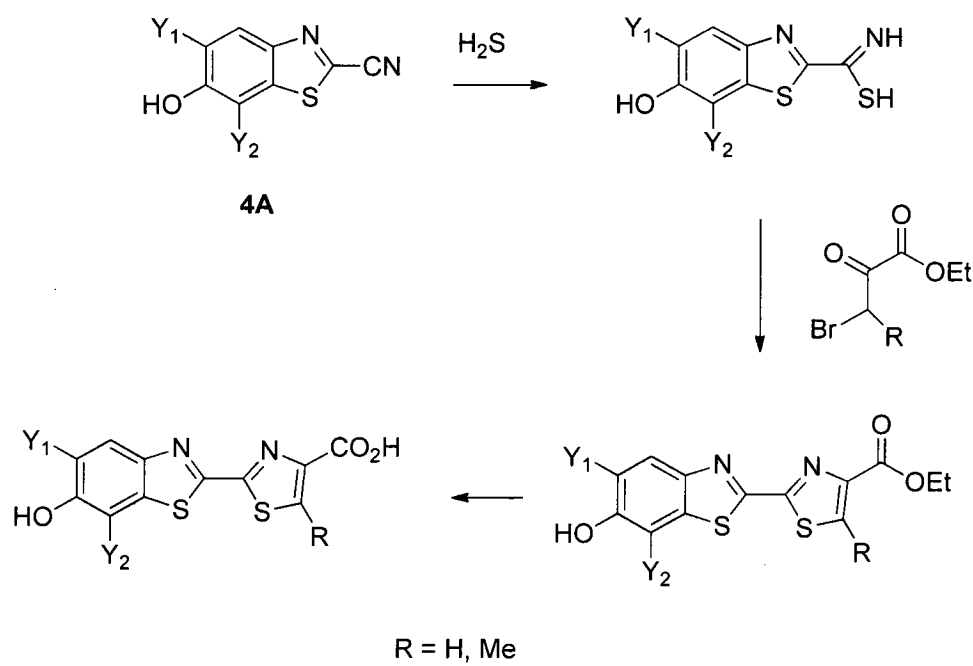


图 3A

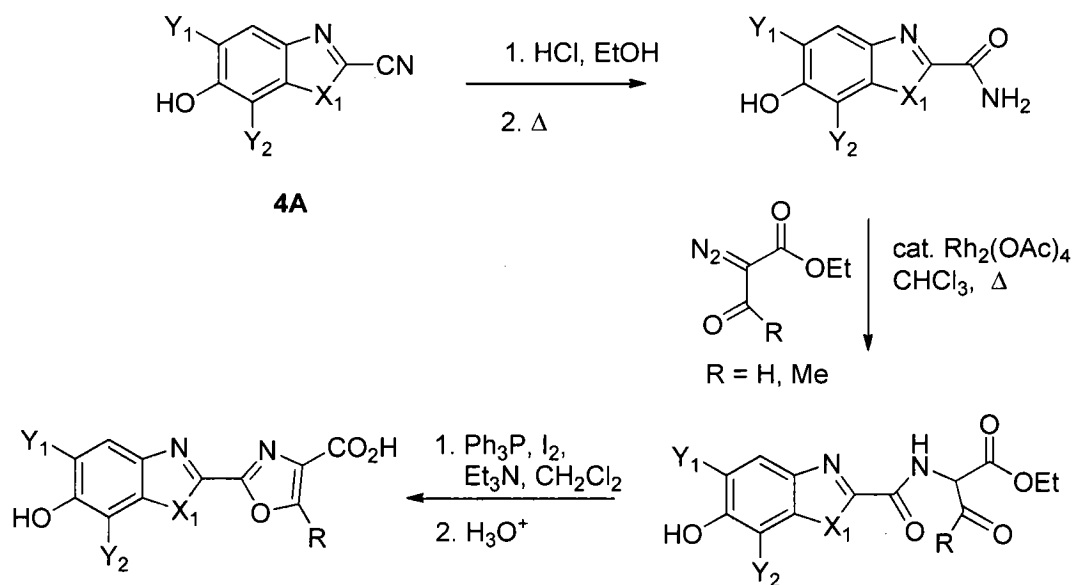


图 3B

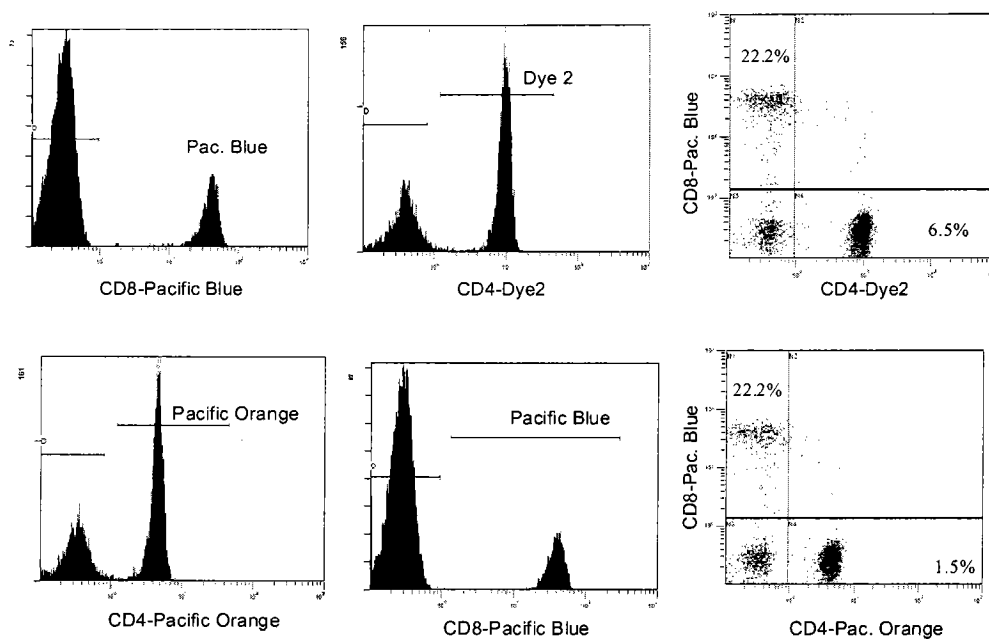


图 4

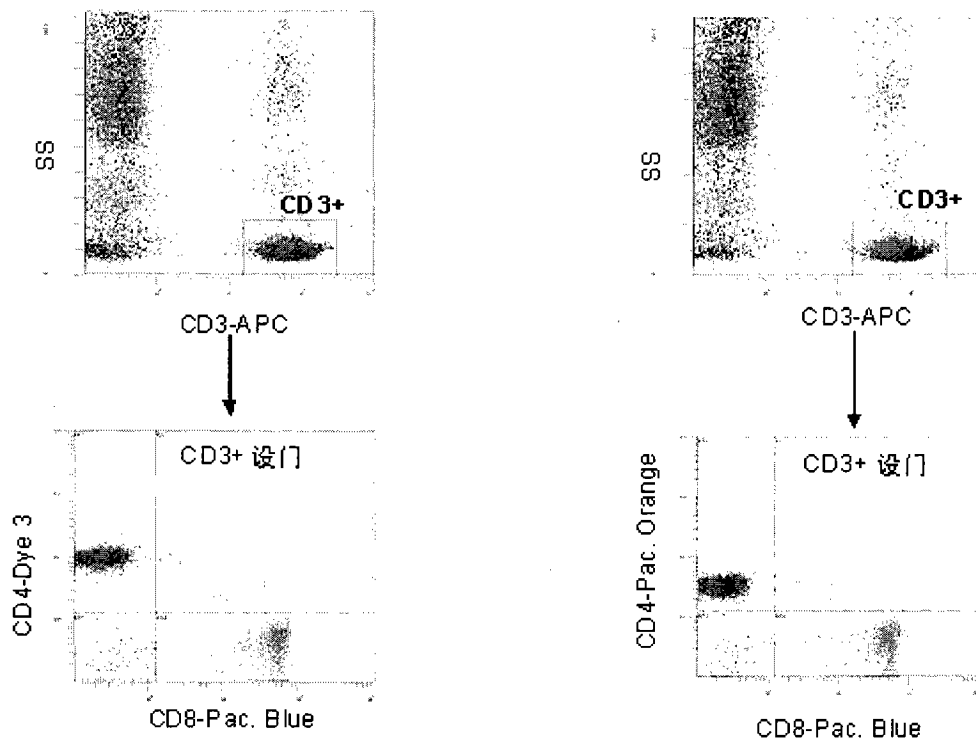


图 5