(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119654558 A
(43)申请公布日 2025.03.18

(21)申请号 202380057565.0
(22)申请日 2023.07.28
(30)优先权数据
63/369,879 2022.07.29 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.02.05
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/071231 2023.07.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/026467 EN 2024.02.01
(71)申请人 贝克曼库尔特有限公司
地址 美国
(72)发明人 王国平 卡莱杜·拉希德
胡马雍·卡比尔
巴里·A·舍恩费尔纳
克里斯托弗·R·克努特松
罗斯·康恩
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 陈九洲
(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
C09K 11/06(2006.01)
G01N 21/76(2006.01)

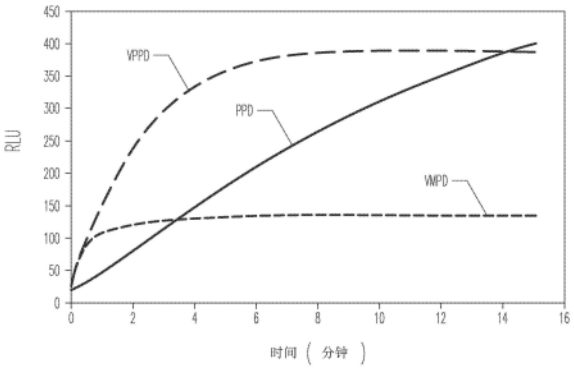
权利要求书7页 说明书32页 附图9页

(54)发明名称

用于检测碱性磷酸酶的化学发光试剂

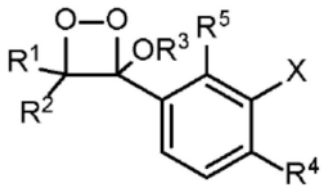
(57)摘要

本文中描述了可用作化学发光探针、诊断剂和成像剂的1,2-二氧杂环丁烷。本文中还描述了包含这样的化合物的组合物及其使用方法。



CN 119654558 A

1.组合物,其包含式I化合物及其盐、和至少一种磷表面活性剂:



(式 I)

其中R^1和R^2各自独立地是C_3-C_{10}烷基,或者R^1和R^2与它们所连接的碳一起提供C_5-C_{10}环烷基环;

R^3是C_1-C_{10}烷基、C_6-C_{10}芳基、或杂芳基;

R^4是C_2-C_{10}烯基;

R^5是H或C_1-C_{10}烷基;并且

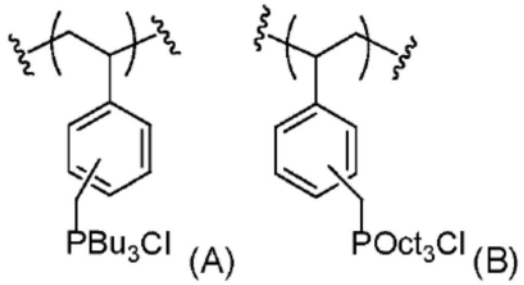
X是磷酸酯。

2.权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含一种表面活性剂。

3.权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含两种或更多种表面活性剂。

4.权利要求1或3所述的组合物,其中所述磷表面活性剂选自小分子磷表面活性剂和聚合磷表面活性剂。

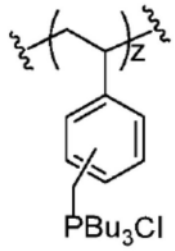
5.权利要求1或4所述的组合物,其中所述磷表面活性剂包含聚合磷表面活性剂,所述聚合磷表面活性剂包含重复单元(A)、重复单元(B)或二者:



其中"Bu_3"是指"三丁基",并且"Oct_3"是指"三辛基"。

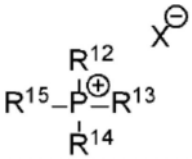
6.权利要求5所述的组合物,其中所述重复单元(A)与重复单元(B)的摩尔比为1:100至100:1。

7.权利要求1或4所述的组合物,其中所述聚合磷表面活性剂包含以下结构:



其中z是2至1000、或100至600的整数。

8.权利要求1或4所述的组合物,其中所述聚合鏻表面活性剂包含下式的小分子鏻表面活性剂:



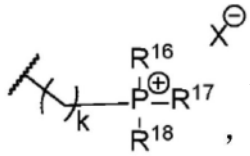
其中:

R^{12}至R^{14}各自独立地是C_1-C_{10}烷基;

R^{15}是芳基烷基;并且

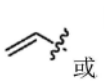
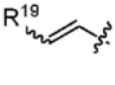
X^-是抗衡离子。

9.权利要求8所述的组合物,其中R^{15}是经C_2-C_8烯基或下式基团取代的芳基烷基:



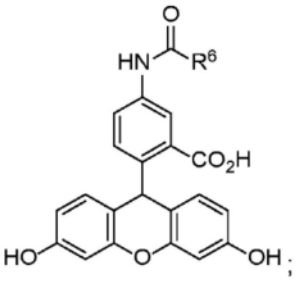
其中k是0、1或2;R^{16}至R^{18}各自独立地是C_1-C_{16}烷基。

10.权利要求9所述的组合物,其中R^{16}至R^{18}各自独立地是C_4-C_{10}烷基。

11.权利要求9所述的组合物,其中所述C_2-C_8烯基是下式基团:或,其中R^{19}是C_1-C_8烷基、C_2-C_8烯基或C_2-C_8炔基。

12.权利要求1所述的组合物,其中所述组合物还包含荧光素表面活性剂。

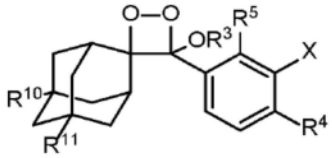
13.权利要求12所述的组合物,其中所述荧光素表面活性剂具有式(V):



其中R^6是C_6-C_{20}烷基,并任选地包含铵盐,例如十六烷基三甲基溴化铵;并且任选地,其中所述荧光素表面活性剂是5-十二烷酰氨基荧光素、5-十六烷酰氨基荧光素或5-硬脂酰氨基荧光素。

14.权利要求1所述的组合物,其中所述磷酸酯基团具有式-O-P(O)(ONa)(ONa)。

15.权利要求1所述的组合物,其中所述式I化合物是式II化合物或其盐:

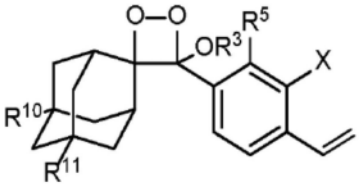


(式 II)

其中R^{10}和R^{11}各自独立地是H、卤素、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_6-C_{10}芳基。

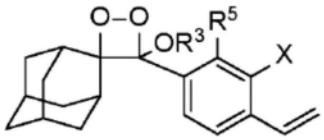
16.权利要求15所述的组合物,其中R^{10}和R^{11}各自独立地是H或卤素。

17.权利要求1至16中任一项所述的组合物,其中所述式I化合物是式III化合物或其盐:



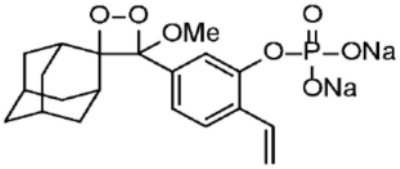
(式 III)。

18.权利要求1至16中任一项所述的组合物,其中所述式I化合物是式IV化合物或其盐:



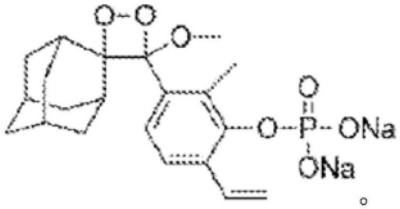
(式 IV)。

19.权利要求1至16中任一项所述的组合物,其中所述式I化合物是下式化合物或其盐:



。

20.权利要求1至16中任一项所述的组合物,其中所述式I化合物是下式化合物或其盐:



。

21.任一前述权利要求所述的组合物,其还包含胺缓冲剂。

22.任一前述权利要求所述的组合物,其为水性组合物形式。

23.任一前述权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含碱性磷酸酶,并且其中所述碱性磷酸酶在所述组合物中的浓度为至多1×10^{-18}mol/μL、1×10^{-19}mol/μL、1×10^{-20}mol/μL或1×10^{-21}mol/μL。

24.权利要求23所述的组合物,其中所述碱性磷酸酶在所述组合物中的浓度为至少1.2×10^{-22}mol/μL或至少1.2×10^{-23}mol/μL。

25.权利要求23或24所述的组合物,其中所述组合物包含至少1×10^{-22}或至少1×10^{-21}mol ALP。

26.权利要求23、24或25所述的组合物,其中所述组合物包含至多1×10^{-17}mol ALP、至多1×10^{-18}mol ALP、至多1×10^{-19}mol ALP或至多1×10^{-20}mol ALP。

27.检测样品中的碱性磷酸酶的方法,其包括使所述样品与任一前述权利要求所述的组合物接触从而产生混合物,以及监测所述混合物的发光。

28.权利要求27所述的方法,其中所述混合物中的碱性磷酸酶的浓度为至多1×10^{-18}mol/μL、至多1×10^{-19}mol/μL、至多1×10^{-20}mol/μL或至多1×10^{-21}mol/μL。

29.权利要求27或28所述的方法,其中所述混合物中的碱性磷酸酶的浓度为至少1×10^{-22}mol/μL或至少1×10^{-23}mol/μL。

30.权利要求27、28或29中任一项所述的方法,其中所述混合物包含至多1×10^{-17}mol ALP、至多1×10^{-18}molALP、至多1×10^{-19}molALP或至多1×10^{-20}mol ALP。

31.权利要求27、28、29或30中任一项所述的方法,其中所述混合物包含至少1×10^{-21}mol ALP或至少1×10^{-22}mol ALP。

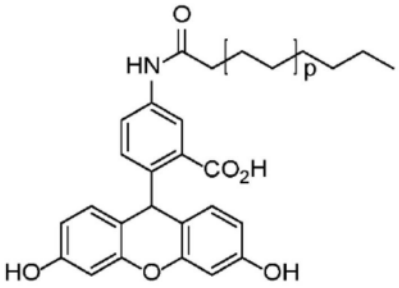
32.权利要求27、28、29、30或31中任一项所述的方法,其还包括测量所得发光的强度,并将所述强度与所述碱性磷酸酶的存在或所述碱性磷酸酶的浓度相关联。

33.权利要求27至32中任一项所述的方法,其中所述发光具有以下中的至少一者:大于8,000的峰RLU;和3分钟或更少的$T_{1/2}$。

34.权利要求27至33中任一项所述的方法,其中所述样品是pH为4至12的水性样品。

35.权利要求27所述的方法,其中所述样品是pH为8至12的水性样品。

36.权利要求27至35中任一项所述的方法,其中所述方法包括使所述样品与包含所述鏻表面活性剂的组合物接触,并且其中当与使所述样品与包含PPD和与十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)组合的具有下式的荧光素表面活性剂的组合物接触相比时,所述方法具有提高的信噪比:



其中p是2至10的整数,例如5至9或5至7的整数。

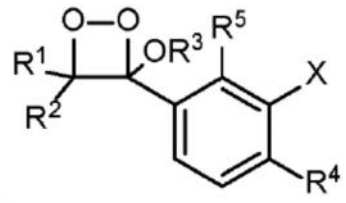
,

37.权利要求36所述的方法,其中所述提高的信噪比为至少50倍。

38.权利要求36所述的方法,其中在不存在所述样品的情况下,包含所述鏻表面活性剂的组合物的发光的RLU小于15。

39.权利要求36所述的方法,其中在不存在所述样品的情况下,包含所述鏻表面活性剂的组合物的发光的RLU大于1且小于15。

40.用于确定碱性磷酸酶的存在的试剂盒,所述试剂盒包含式I化合物及其盐、和至少一种鏻表面活性剂,以及任选地,其中所述组合物包含一种表面活性剂,所述式I为:



(式 I)

其中R^1和R^2各自独立地是C_3-C_{10}烷基,或者R^1和R^2与它们所连接的碳一起提供C_5-C_{10}环烷

基环;

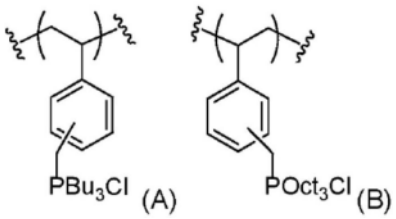
R^3是C_1-C_{10}烷基、C_6-C_{10}芳基、或杂芳基;

R^4是C_2-C_{10}烯基;

R^5是H或C_1-C_{10}烷基。

41.权利要求40所述的试剂盒,其中所述鏻表面活性剂选自小分子鏻表面活性剂和聚合鏻表面活性剂。

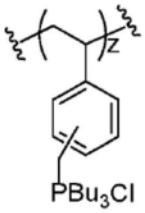
42.权利要求40或41所述的试剂盒,其中所述聚合鏻表面活性剂包含重复单元(A)、重复单元(B)或二者:



其中"Bu_3"是指"三丁基",并且"Oct_3"是指"三辛基"。

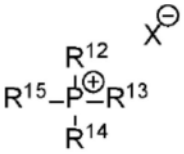
43.权利要求42所述的试剂盒,其中重复单元(A)与重复单元(B)的摩尔比为1:100至100:1。

44.权利要求40或41所述的试剂盒,其中所述聚合鏻表面活性剂包含以下结构:



其中z是2至1000、或100至600的整数。

45.权利要求40或41所述的试剂盒,其中所述小分子鏻表面活性剂具有下式:



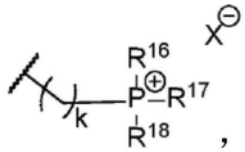
其中:

R^{12}至R^{14}各自独立地是C_1-C_{10}烷基;

R^{15}是任选经取代的芳基烷基;并且

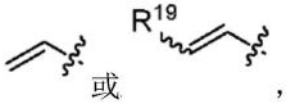
X-是抗衡离子。

46.权利要求45所述的试剂盒,其中R^{15}是经C_2-C_8烯基或下式基团取代的芳基烷基:



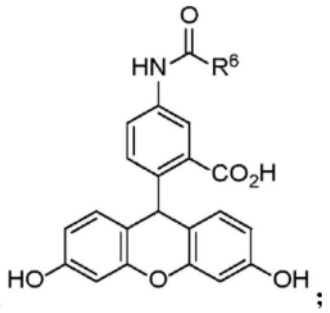
其中k是0、1或2;R^{16}至R^{18}各自独立地是C_1-C_{16}烷基。

47.权利要求46所述的试剂盒,其中R^{16}至R^{18}各自独立地是C_4-C_{10}烷基。

48.权利要求46所述的试剂盒,其中所述C_2-C_8烯基是下式基团：

,

其中R^{19}是C_1-C_8烷基、C_2-C_8烯基或C_2-C_8炔基。

49.权利要求40所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含荧光素表面活性剂,其中所述荧光素表面活性剂具有式(V)：

;

其中R^6是C_6-C_{20}烷基,并任选地包含铵盐,例如十六烷基三甲基溴化铵;并且任选地,其中所述荧光素表面活性剂是5-十二烷酰氨基荧光素、5-十六烷酰氨基荧光素或5-硬脂酰氨基荧光素。

50.权利要求49所述的试剂盒,其中所述表面活性剂是5-十二烷酰氨基荧光素、5-十六烷酰氨基荧光素或5-硬脂酰氨基荧光素。

51.权利要求40至50中任一项所述的试剂盒,其中所述式I化合物及其盐、和至少一种表面活性剂在单独的容器中。

52.权利要求40至50中任一项所述的试剂盒,其中所述式I化合物及其盐、和至少一种表面活性剂在单个容器中。

53.任一前述权利要求所述的组合物、方法或试剂盒,其中二氧杂环丁烷浓度为100mg/L至150mg/L。

54.任一前述权利要求所述的组合物、方法或试剂盒,其中表面活性剂浓度为200mg/L至300mg/L。

55.任一前述权利要求所述的组合物、方法或试剂盒,其中二氧杂环丁烷与表面活性剂的比例为1:1至1:3。

56.任一前述权利要求所述的组合物、方法或试剂盒,其中所述组合物包含50mg/L至500mg/L的镁(II)盐。

57.任一前述权利要求所述的组合物、方法或试剂盒,其中所述组合物包含50mg/L至500mg/L的$MgCl_2$。

58.检测样品中的碱性磷酸酶的方法,其包括：

a.提供二氧杂环丁烷化合物和磷表面活性剂的混合物;

b.使所述样品与所述二氧杂环丁烷化合物和磷表面活性剂的混合物接触,以产生包含所述样品的混合物;以及

c.监测包含所述样品的混合物的发光,其中监测所述发光包括检测大于8,000的峰RLU或者3分钟或更短的$T_{1/2}$。

59.权利要求58所述的方法,其中在不存在所述样品的情况下,所述二氧杂环丁烷化合物和所述磷表面活性剂的组合的发光的峰RLU小于15。

60.权利要求58所述的方法,其中在不存在所述样品的情况下,所述二氧杂环丁烷化合物和所述磷表面活性剂的组合的发光的峰RLU大于1且小于15。

61.权利要求58至60中任一项所述的方法,其中包含所述样品的混合物中的碱性磷酸酶的浓度为至多1×10^{-18}mol/μL、1×10^{-19}mol/μL、1×10^{-20}mol/μL或1×10^{-21}mol/μL。

62.权利要求58至61中任一项所述的方法,其中包含所述样品的混合物中的碱性磷酸酶的浓度为至少1×10^{-22}mol/μL或1×10^{-23}mol/μL。

63.权利要求58至62中任一项所述的方法,其中包含所述样品的混合物包含至多1×10^{-17}mol、1×10^{-18}mol、1×10^{-19}mol或1×10^{-20}mol ALP。

64.权利要求58至63中任一项所述的方法,其中所述混合物包含至少1×10^{-21}mol或1×10^{-22}mol ALP。

65.检测样品中的碱性磷酸酶的方法,其包括:

a.使所述样品与二氧杂环丁烷化合物和磷表面活性剂的第一混合物接触,以产生包含所述样品的第二混合物;以及

b.监测所述第二混合物的发光,其中监测所述发光包括检测大于8,000的峰RLU或者3分钟或更短的$T_{1/2}$。

66.权利要求65所述的方法,其中在不存在所述样品的情况下,所述二氧杂环丁烷化合物和所述磷表面活性剂的组合的发光的峰RLU小于15。

67.权利要求65所述的方法,其中在不存在所述样品的情况下,所述二氧杂环丁烷化合物和所述磷表面活性剂的组合的发光的峰RLU大于1且小于15。

68.权利要求65至67中任一项所述的方法,其中所述第二混合物中的碱性磷酸酶的浓度为至多1×10^{-18}mol/μL、1×10^{-19}mol/μL、1×10^{-20}mol/μL或1×10^{-21}mol/μL。

69.权利要求65至68中任一项所述的方法,其中所述第二混合物中的碱性磷酸酶的浓度为至少1×10^{-22}mol/μL或1×10^{-23}mol/μL。

70.权利要求65至69中任一项所述的方法,其中所述第二混合物包含至多1×10^{-17}mol、1×10^{-18}mol、1×10^{-19}mol或1×10^{-20}mol ALP。

71.权利要求65至70中任一项所述的方法,其中所述第二混合物包含至少1×10^{-21}mol或1×10^{-22}mol ALP。

72.权利要求65至70中任一项所述的方法,其中所述第二混合物包含:

至少10μL、至少50μL、至少100μL;和/或

最高100μL、最高110μL、最高150μL、最高200μL或最高500μL。

用于检测碱性磷酸酶的化学发光试剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年7月29日提交的美国临时申请No.63/369,879的权益,其通过引用并入,如同在本文中完整阐述一样。

背景技术

[0003] 化学发光二氧杂环丁烷是应变的环状过氧化物,其可以经历快速分解以产生激发的瞬态物质,该物质随后通过光发射衰变至基态。

[0004] 这样的化合物可用作一系列测定中的发光探针,所述测定包括酶活性测定、免疫测定和DNA检测测定。基于化学发光的测定可以提供优异的灵敏度,因为与基于荧光和吸收的测定不同,它不需要光激发。

[0005] 二氧杂环丁烷可以在其使用时原位产生或预先制备成稳定形式,并随后激活。当通过前体烯烃氧化原位产生时,化学发光二氧杂环丁烷还可以用作活性氧物质(reactive oxygen species,ROS)的检测或成像方法。稳定的化学发光二氧杂环丁烷的一些实例是4-甲氧基-4-(3-磷酸苯基)螺[1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-金刚烷]。该化合物,也称为LUMIGEN®PPD,可以在用碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)处理时激活。ALP是催化磷酸基团水解的酶。一旦被激活,所得化合物随后会经历1,2-二噁烷环的片段化并发射光,从而在ALP标记的测定中用作发光探针。

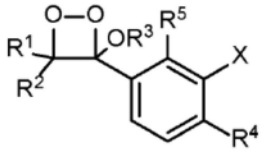
[0006] 已开发出在非水性条件下灵敏且强烈发射的二氧杂环丁烷化合物。然而,这样的化合物在水性介质中发射较弱,并且在与期望分析物接触之后可能需要很长时间才能达到最大发光。

发明内容

[0007] 存在提供对分析物的存在和分析物的浓度或者这二者的快速响应的二氧杂环丁烷的需要。还存在对强发射性并适合用于水性环境的二氧杂环丁烷的需要。本公开内容描述了包含二氧杂环丁烷和一种或更多种所选择的表面活性剂的组合的组合物,所述组合物在水性环境中提供了出乎意料的改善的发射结果。例如,某些组合可以提供在以相对光单位(relative light unit,RLU)计的亮度方面的显著相对差异(超过20倍高),这取决于二氧杂环丁烷和表面活性剂的组合。本文中所述组合物的一个显著益处是可以提高碱性磷酸酶的检测限。例如,使用本文中所述的组合物,可以检测到1×10^{-12}mol/μL至1×10^{-23}mol/μL的碱性磷酸酶浓度。例如,在一些方面中,本文中所述的组合物可用于检测组合物中的ALP,所述组合物的ALP浓度为至少1×10^{-23}mol/μL、至少1×10^{-22}mol/μL、至少1×10^{-21}mol/μL、至少1×10^{-20}mol/μL或至少1×10^{-17}mol/μL;作为补充或替代,本文中所述的组合物可用于检测组合物中的ALP,所述组合物的ALP浓度为至多(即,至高)1×10^{-21}mol/μL、至多1×10^{-20}mol/μL、至多1×10^{-19}mol/μL、至多1×10^{-18}mol/μL、至多1×10^{-15}mol/μL、至多1×10^{-10}mol/μL或至多1×10^{-5}mol/μL。在一些示例性方面中,本文中所述的组合物可用于检测:AP4,其ALP浓度为1.2×10^{-15}mol/μL;AP6,其ALP浓度为1.2×10^{-17}mol/μL;AP8,其ALP浓度为1.2×

10^{-19}mol/μL;和AP9,其ALP浓度为1.2×10^{-20}mol/μL。例如,使用本文中所述的组合物,可以例如在包含稀释在50μL至250μL(例如100μL)缓冲液中的5μL至50μL(例如,10μL AP9)的碱性磷酸酶组合物的组合物(例如包含1×10^{-11}mol至1×10^{-22}mol碱性磷酸酶的组合物)中,检测到1×10^{-11}mol至1×10^{-22}mol碱性磷酸酶(例如1×10^{-14}mol、1×10^{-15}mol、1×10^{-16}mol、1×10^{-17}mol、1×10^{-18}mol、1×10^{-19}mol、1×10^{-20}mol、1×10^{-21}mol、1×10^{-22}mol、1×10^{-23}mol;1×10^{-13}mol至1×10^{-22}mol、1×10^{-11}mol至1×10^{-20}mol、1×10^{-13}mol至1×10^{-18}mol、1×10^{-15}mol至1×10^{20}、或1×10^{-14}mol至1×10^{-17}mol碱性磷酸酶)。

[0008] 本公开内容提供了组合物,其包含式I化合物及其盐、和至少一种表面活性剂:

[0009] 

(式I)

[0010] 其中R^1和R^2各自独立地是C_3-C_{10}烷基,或者R^1和R^2与它们所连接的碳一起提供C_5-C_{10}环烷基环;

[0011] R^3是C_1-C_{10}烷基、C_6-C_{10}芳基或杂芳基;

[0012] R^4是C_2-C_{10}烯基;

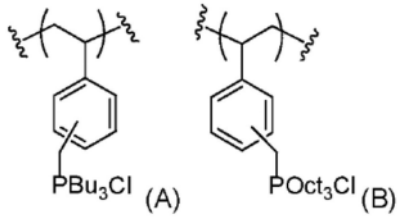
[0013] R^5是H或C_1-C_{10}烷基;

[0014] X是磷酸酯。

[0015] 术语“表面活性剂”和“增强剂”在本文中可互换使用。这样的表面活性剂的一些实例包括但不限于鏻表面活性剂,其在本文中也可互换地称为“鏻增强剂”。鏻表面活性剂包括聚合鏻表面活性剂和小分子鏻表面活性剂。聚合鏻表面活性剂的一些实例包括具有季鏻侧基的聚乙烯型聚合物,其公开于美国专利No.5,393,469。

[0016] 示例性聚合鏻增强剂包括聚乙烯基苄基三丁基氯化鏻与聚乙烯基苄基三辛基氯化鏻和聚乙烯基苄基三丁基氯化鏻的共聚物,以及具有两个季铵或鏻基团的双阳离子化合物,例如美国专利No.5,451,347中公开的那些。

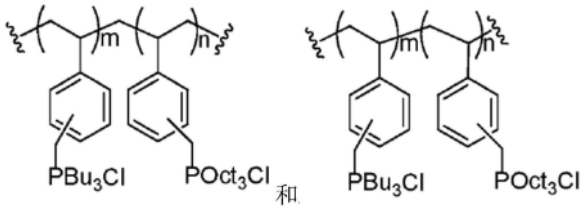
[0017] 聚合鏻增强剂的一些实例包括包含重复单元(A)、重复单元(B)或二者的聚合物:

[0018] 

[0019] 其中“Bu_3”是指“三丁基”,“Oct_3”是指“三辛基”。重复单元(A)与重复单元(B)的摩尔比可以在1:100至100:1的范围内(例如,100:1至1:1,包括例如80:1、70:1、60:1、50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、70:30、75:25、60:40或50:50的比)。重均分子量(weight average molecular weight,M_w)可以例如在100,000g/mol至400,000g/mol、150,000g/mol至350,000g/mol、200,000g/mol至300,000g/mol的范围内。例如,在示例

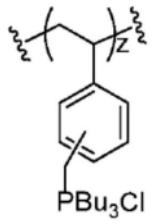
性方面中,M_w可以是100,000,120,000,140,000,160,000,180,000,200,000,220,000,240,000,260,000,280,000,300,000,320,000,340,000,360,000,380,000,或400,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为220,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为240,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为260,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为280,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为300,000g/mol。共聚物可以是无规共聚物、嵌段共聚物或无规嵌段共聚物。

[0020] 聚合鏻增强剂的一些实例包括以下通式的聚合物:

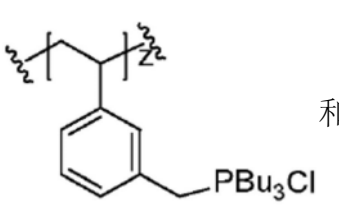
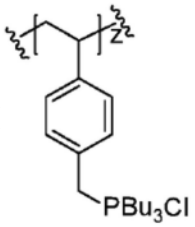
[0021] 

[0022] 其中m和n各自独立地为0至1000的整数(例如,1至500、250至1000、300至900、50至500、或250至750)。m:n的比可以是例如100:1至1:1,包括例如m:n的比是80:1、70:1、60:1、50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、70:30、75:25、60:40或50:50;m+n在100至1000的范围内(例如,m+n可以是100至600、200至500、或300至600);重均分子量(M_w)可以例如在100,000g/mol至400,000g/mol、150,000g/mol至350,000g/mol、200,000g/mol至300,000g/mol的范围内。例如,在示例性方面中,M_w可以是100,000、120,000、140,000、160,000、180,000、200,000、220,000、240,000、260,000、280,000、300,000、320,000、340,000、360,000、380,000或400,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为220,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为240,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为260,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为280,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为300,000g/mol。共聚物可以是无规共聚物、嵌段共聚物或无规嵌段共聚物。

[0023] 示例性聚合鏻增强剂/表面活性剂还包括包含以下结构的聚合鏻表面活性剂:

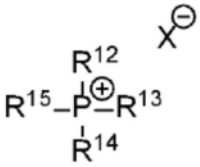
[0024] 

[0025] 其中z是2至1000的整数(例如,2至500、100至600、450至800、300至600、2至250、50至250、100至300、150至400、175至400、50至300、100至500、150至400、或10至200)。重均分子量(M_w)可以在例如500g/mol至500,000g/mol、500g/mol至100,000g/mol、50,000g/mol至100,000g/mol、150,000g/mol至350,000g/mol、或200,000g/mol至300,000g/mol的范围内。例如,在示例性方面中,M_w可以是50,000、60,000、70,000、100,000、120,000、140,000、160,000、180,000、200,000、220,000、240,000、260,000、280,000、300,000、320,000、340,000或350,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为70,000、80,000、100,000或220,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为240,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为260,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为280,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为300,000g/mol。这样的聚合鏻增强剂/表面活性剂的一些实例包括包含以下结构的那些:

[0026]  和/或 

[0027] 其中z是2至1000的整数(例如,2至500、100至600、450至800、300至600、2至250、50至250、100至300、150至400、175至400、50至300、100至500、150至400、或10至200)。重均分子量(M_w)可以在例如500g/mol至500,000g/mol、500g/mol至100,000g/mol、50,000g/mol至100,000g/mol、150,000g/mol至350,000g/mol、或200,000g/mol至300,000g/mol的范围内。例如,在示例性方面中,M_w可以是50,000、60,000、70,000、100,000、120,000、140,000、160,000、180,000、200,000、220,000、240,000、260,000、280,000、300,000、320,000、340,000或350,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为70,000、80,000、100,000或220,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为240,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为260,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为280,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为300,000g/mol。

[0028] 示例性小分子鏻增强剂/表面活性剂包括下式的小分子表面活性剂:

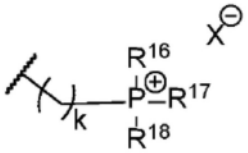
[0029] 

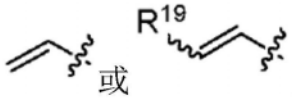
[0030] 其中:

[0031] R^{12}至R^{14}各自独立地是C_1-C_{10}烷基;

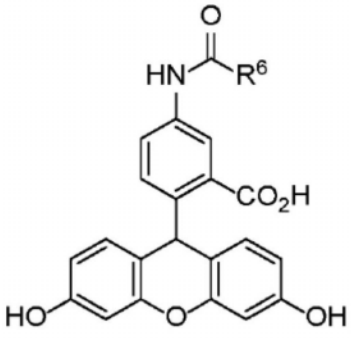
[0032] R^{15}是芳基烷基;并且

[0033] X^-是抗衡离子(例如氯)。R^{15}可以是经C_2-C_8烯基或下式基团取代的芳基烷基:

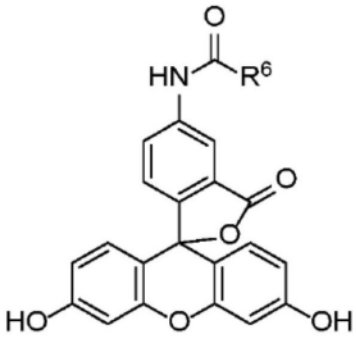
[0034]  其中k是0、1或2;R^{16}至R^{18}各自独立地是C_1-C_{16}烷基。R^{16}至R^{18}可以各自独立地是C_4-C_{10}烷基。C_2-C_8烯基可以是下式基团:

[0035]  其中R^{19}是C_1-C_8烷基、C_2-C_8烯基或C_2-C_8炔基。

[0036] 本文中考虑的与本文中描述的二氧杂环丁烷化合物一起使用的表面活性剂的一些实例还包括荧光素表面活性剂(本文也可互换地称为“荧光素增强剂”),例如具有式V/VI的那些:

[0037]  其通常与以下平衡：

（式 V），

[0038] 

（式 VI）；

[0039] 其中R^6是C_6-C_{20}烷基，例如C_6-C_{15}、C_8-C_{16}、C_{10}-C_{14}和C_{12}-C_{20}烷基。式V/VI化合物的一些实例包括5-十二烷酰氨基荧光素、5-十六烷酰氨基荧光素、5-硬脂酰氨基荧光素等。本公开内容还提供了包含一种或更多种化学发光二氧杂环丁烷化合物的水性组合物，所述化学发光二氧杂环丁烷化合物的峰RLU大于8,000(例如，在37℃下)和/或发射半衰期($T_{1/2}$)为3分钟或更短(例如，在37℃下)。

[0040] 任何上述表面活性剂/增强剂的组合(例如，两种或更多种小分子鏻、聚合鏻和荧光素表面活性剂/增强剂的组合)也在本文中考虑。但本文也考虑了仅使用一种表面活性剂。

[0041] 本公开内容还提供了用于确定样品中分析物(例如，ALP或与目的分析物缀合的ALP)的存在和浓度中的至少一者的方法，其包括使样品与式I化合物接触以及监测样品的发光。

[0042] 通过本公开内容的多个实施方案实现了一些优点，其中一些是出乎意料的。例如，在第一次开发式I化合物时，认为对于明亮的化学发光探针来说，R^4位处的吸电子基团是必需的。参见，例如ACS Cent.Sci.2017,3,349-358。基于这一认识，本领域技术人员不会预期式I化合物将是有效、明亮的化学发光探针，因为它们在R^4位处缺少吸电子基团。相反，式I化合物在R^4位处具有给电子乙烯基基团。

[0043] 本文中所述的多种化合物和组合物可以有利地在非水性介质、水性介质或二者中提供快速、高强度的发光信号。显著的优点是，涉及这样的化合物或组合物的测定可以比具有缺乏目前描述的化合物和组合物之特征的化合物的那些进行得更快，因为最大发光信号获得得更快。此外，本公开内容的化合物和组合物提供了提高的发光强度，包括在水性介质中。本公开内容的化合物和组合物还提供了提高的信噪比和降低的背景信号。由于这样的有利特性，本公开内容的多个实施方案可以提供方法或试剂盒，其可以在少于3分钟、少于1分钟、少于30秒或少于15秒内检测出水性或非水性样品中的分析物。

附图说明

[0044] 图1是使用LP530中使用的荧光素表面活性剂的化合物“VPPD”、“VMPD”和“PPD”的相对发光单位作为时间(分钟)的函数的图。LP530中使用的荧光素表面活性剂包含式V/VI的荧光素表面活性剂和十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide,CTAB)。“VPPD”、“VMPD”和“PPD”具有本文进一步描述的结构。

[0045] 图2A是使用“EXL表面活性剂”的化合物“VPPD”、“VMPD”和“PPD”的相对发光单位作为时间(分钟)的函数的图,其中EXL表面活性剂具有本文进一步描述的结构。

[0046] 图2B是在多种“VPPD”浓度(在50mg/L至500mg/L的范围内)下,同时保持EXL浓度恒定(在100mg/L至250mg/L的范围内)时,RLU作为时间的函数的图。

[0047] 图2C是在多种“EXL表面活性剂”浓度(在100mg/L至500mg/L的范围内)下,同时保持VPPD浓度恒定(在50mg/L至500mg/L的范围内)时,RLU作为时间的函数的图。

[0048] 图3是EXL表面活性剂中的化合物“VPPD”、“VMPD”和“PPD”,或用于LP530的荧光素表面活性剂中的“VPPD”,用于LP530的荧光素表面活性剂中的“VMPD”,或LP530(即,荧光素表面活性剂中的PPD)的相对发光单位作为时间(分钟)的函数的图,其相对于EXL表面活性剂中的VPPD的强度归一化。

[0049] 图4是多种鏻表面活性剂中VPPD的相对发光单位作为时间(分钟)的函数的图;还示出了LP530的作为时间(分钟)的函数的相对发光单位。

[0050] 图5是聚合鏻表面活性剂中“VPPD”的RLU作为摩尔ALP的函数的图。

[0051] 图6是“EXL表面活性剂”中“VPPD”的RLU和LP530的RLU作为时间(分钟)的函数的图。在该实验中,将VPPD和聚合鏻增强剂(EXL)的100μL溶液与10μLAP10(1.2×10^{-21}mol/μL ALP)混合,并在37℃下孵育;将100μLLP530溶液与10μLAP8(1.2×10^{-19}mol/μL ALP)混合,并在37℃下孵育。值得注意的是,AP8的ALP浓度是AP10的ALP浓度的100倍高。换言之,在LP530下需要100倍的ALP浓度才能获得与在VPPD和EXL下实现的几乎相同的光信号。

[0052] 图7是VPPD EXL和LP530背景的RLU作为时间(分钟)的函数的图,其中“背景”是指各自都不含任何ALP的包含EXL的VPPD组合物或LP530获得的信号。当二氧杂环丁烷在37℃下孵育时,信号由二氧杂环丁烷的热分解产生。

具体实施方式

[0053] 现在将详细参考所公开主题的某些实施方案,其实例部分地在附图中举例说明。虽然将结合所列举的权利要求来描述所公开的主题,但是应理解,示例性主题并不旨在将权利要求限制于所公开的主题。

[0054] 本公开内容的化合物可用于化学发光应用,例如如碱性磷酸酶(ALP)的测定和化学探针。本文中所述组合物的一个显著益处是可以提高ALP检测限。例如,使用本文中所述的组合物,可以检测到1×10^{-12}mol/μL至1×10^{-23}mol/μL的碱性磷酸酶浓度。例如,在一些方面中,本文中所述的组合物可用于检测组合物中的ALP,所述组合物的ALP浓度为至少1×10^{-23}mol/μL、至少1×10^{-22}mol/μL、至少1×10^{-21}mol/μL、至少1×10^{-20}mol/μL或至少1×10^{-17}mol/μL;作为补充或替代,本文中所述的组合物可用于检测组合物中的ALP,所述组合物的ALP浓度为至多1×10^{-21}mol/μL、至多1×10^{-20}mol/μL、至多1×10^{-19}mol/μL、至多$1\times10^{-}$

^{18}mol/μL、至多1×10^{-15}mol/μL、至多1×10^{-10}mol/μL或至多1×10^{-5}mol/μL。在一些示例性方面中,本文中所述的组合物可用于检测:AP4,其ALP浓度为1.2×10^{-15}mol/μL;AP6,其ALP浓度为1.2×10^{-17}mol/μL;AP8,其ALP浓度为1.2×10^{-19}mol/μL;和AP9,其ALP浓度为1.2×10^{-20}mol/μL。例如,使用本文中所述的组合物,可以例如在包含稀释在50μL至250μL(例如100μL)缓冲液中的5μL至50μL(例如,10μL AP9)的碱性磷酸酶组合物的组合物(例如包含1×10^{-11}mol至1×10^{-22}mol碱性磷酸酶的组合物)中检测到1×10^{-11}mol至1×10^{-22}mol碱性磷酸酶(例如1×10^{-14}mol、1×10^{-15}mol、1×10^{-16}mol、1×10^{-17}mol、1×10^{-18}mol、1×10^{-19}mol、1×10^{-20}mol、1×10^{-21}mol、1×10^{-22}mol、1×10^{-23}mol;1×10^{-13}mol至1×10^{-22}mol、1×10^{-11}mol至1×10^{-20}mol、1×10^{-13}mol至1×10^{-18}mol、1×10^{-15}mol至1×10^{20}或1×10^{-14}mol至1×10^{-17}mol碱性磷酸酶)。

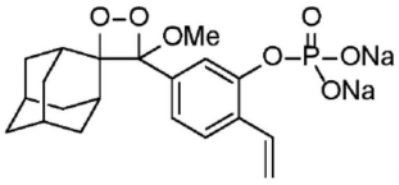
[0055] 在一些方面中,本公开内容的化合物的发光强度以相对光单位(RLU)来描述。术语"RLU"是指在存在碱性磷酸酶(ALP)的情况下,根据化学发光信号(S)的相对光单位。在一些方面中,可以在不存在ALP的情况下针对背景化学发光(B)来校正RLU,例如S减去B。

[0056] 特别地,本公开内容描述了包含二氧杂环丁烷和所选择表面活性剂的组合的组合物,其在水性环境中提供了出乎意料的发射结果。熟练的技术人员可以选择二氧杂环丁烷的浓度。可以使用的示例性二氧杂环丁烷浓度包括0.5mg/L至5000mg/L(例如,1mg/L至1000mg/L、1mg/L至500mg/L、25mg/L至2000mg/L、50mg/L至500mg/L、50mg/L至250mg/L、100mg/L至150mg/L、50mg/L至1,000mg/L、200mg/L至1200mg/L、50mg/L至500mg/L、50mg/L至150mg/L、100mg/L至200mg/L、100mg/L至500mg/L、和100mg/L至200mg/L)。在一些方面中,可以使用的二氧杂环丁烷浓度为至少0.5mg/L、至少1mg/L、至少25mg/L、至少50mg/L、至少100mg/L、至少200mg/L、至少500mg/L、至少1000mg/L、至少3000mg/L、或至少4000mg/L。在一些方面中,可以使用的二氧杂环丁烷浓度可以为至多5000mg/L、至多4000mg/L、至多3000mg/L、至多1000mg/L、至多500mg/L、至多200mg/L、100mg/L、至多25mg/L、或至多1mg/L。

[0057] 熟练的技术人员也可以选择表面活性剂的浓度。在示例性表面活性剂中,可以使用的浓度包括5mg/L至25,000mg/L(例如,1,000mg/L至10,000mg/L、500mg/L至5,000mg/L、50mg/L至10,000mg/L、100mg/L至5,000mg/mL、100mg/L至500mg/L、250mg/L至1,000mg/L、250mg/L至500mg/L、50mg/L至500mg/L、50mg/L至5,000mg/L、500mg/L至1,000mg/L、100mg/L至500mg/L、100mg/L至1,000mg/L、100mg/L至300mg/L、150mg/L至250mg/L、和200mg/L至300mg/L)。在一些方面中,可以使用的表面活性剂浓度可以为至少5mg/L、至少50mg/L、至少100mg/L、至少500mg/L、至少1000mg/L、至少3000mg/L、至少4000mg/L、至少5000mg/L、至少10,000mg/L、至少15,000mg/L、或至少20,000mg/L。在一些方面中,可以使用的表面活性剂浓度可以为至多25,000mg/L、至多20,000mg/L、至多15,000mg/L、至多10,000mg/L、至多5000mg/L、至多4000mg/L、至多3000mg/L、至多1000mg/L、至多500mg/L、至多100mg/L、或至多50mg/L。

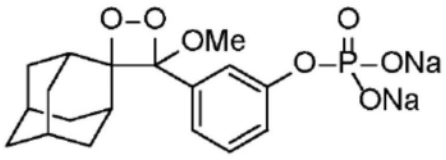
[0058] 二氧杂环丁烷化合物与表面活性剂的浓度比可以在5:1至1:10的范围内(例如,1:1至1:5,1:2至1:8;1:1至1:3,1:2至1:5;和1:3至1:9)。例如,二氧杂环丁烷化合物与表面活性剂的浓度比可以是5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10。

[0059] 如图1所示,当使用荧光素表面活性剂时(例如,如在LP530中),具有以下结构的二氧杂环丁烷化合物:

[0060] 

(VPPD)

[0061] 在相对短的时间内比具有以下结构的二氧杂环丁烷化合物显示出更高的RLU：

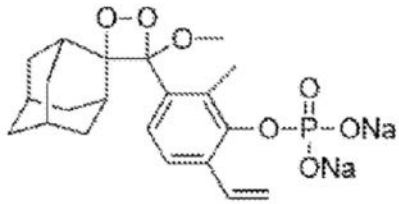
[0062] 

(PPD)。

[0063] 本文中使用的术语“LP530”是指Lumigen,Inc.的产品“Lumi-Phos 530”,其包含本文中称为“PPD”的二氧杂环丁烷化合物和荧光素表面活性剂。但是,如图2A和3所示,当与PPD或VMPD相比时,使用VPPD与聚合鏻表面活性剂/增强剂(EXL)的组合令人惊讶地导致亮度(如以相对光单位(RLU)所示)的显著差异。例如,与聚合鏻表面活性剂/增强剂组合的VPPD的亮度相对于与荧光素表面活性剂组合的VPPD的亮度是超过20倍高(EXL表面活性剂中的约9500RLU相对于荧光素表面活性剂中的约380进行比较)。参见图3。

[0064] 作为附加的益处,聚合鏻表面活性剂/增强剂提供了约50倍(和高至约100倍)的信噪比提高。例如,聚合鏻增强剂中的VPPD可以检测AP10(1.2×10^{-21}mol ALP),其使用添加至VPPD和增强剂的100μL溶液的10μLAP10。但是为了产生与LP530基本相同的信号,需要100倍的更多ALP(10μLAP8;AP8是指1.2×10^{-19}mol/μL ALP)。参见图6。图7是VPPD EXL和LP530背景的RLU作为时间的函数的图,其中“背景”是指各自都不含任何ALP的包含EXL的VPPD组合物或LP530获得的信号。当二氧杂环丁烷在37℃下孵育时,信号由二氧杂环丁烷的热分解产生。包含VPPD和EXL的组合物的背景信号是LP530获得的信号的约三分之一。如图7所示,没有ALP(背景)的较低信号意味着检测限也较低,所述检测限为可以可靠地检测到并与背景区分开的与ALP缀合的分析物的最低实际量。

[0065] 此外,如图2A和3所示,与聚合鏻表面活性剂/增强剂组合的VPPD的亮度大于与聚合鏻表面活性剂/增强剂组合的其他二氧杂环丁烷,包括例如与聚合鏻表面活性剂/增强剂组合的PPD或与聚合鏻表面活性剂/增强剂组合的VMPD,其中VMPD是具有以下结构的二氧杂环丁烷化合物：

[0066] 

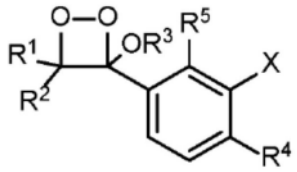
(VMPD)。

[0067] 例如,与聚合鏻表面活性剂/增强剂组合的VMPD具有大于LP530的亮度。实际上,如这些示例性附图所示,与聚合鏻表面活性剂/增强剂组合的VMPD给出了比LP530亮得多的信号。此外,聚合鏻表面活性剂中的VMPD比相同表面活性剂中的VPPD更快达到信号最大

值(少于1分钟)。

[0068] 这些结果表明,特定的二氧杂环丁烷化合物与磷表面活性剂/增强剂的组合提供了在水性环境中出乎意料的改善的发射结果。

[0069] 本公开内容提供了包含式I化合物及其盐和至少一种表面活性剂的组合物:

[0070] 

(式I)

[0071] 其中R^1和R^2各自独立地是C_3-C_{10}烷基,或者R^1和R^2与它们所连接的碳一起提供C_5-C_{10}环烷基环;

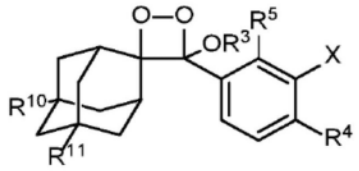
[0072] R^3是C_1-C_{10}烷基、C_6-C_{10}芳基、或杂芳基;

[0073] R^4是C_2-C_{10}烯基;

[0074] R^5是H或C_1-C_{10}烷基;

[0075] X是磷酸酯(例如,式-O-P(O)(ONa)(ONa)的磷酸酯基团)。

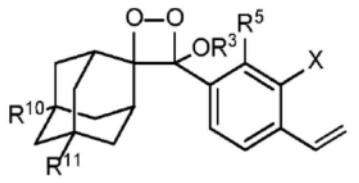
[0076] 例如,本公开内容提供了包含式II化合物或其盐和至少一种表面活性剂的组合物:

[0077] 

(式II)

[0078] 其中R^{10}和R^{11}各自独立地是H、卤素、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_6-C_{10}芳基;R^3是C_1-C_{10}烷基、C_6-C_{10}芳基、或杂芳基;R^4是C_2-C_{10}烯基;R^5是H或C_1-C_{10}烷基。在一些实施方案中,R^{10}和R^{11}独立地是H或卤素。

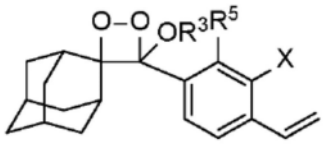
[0079] 本公开内容提供了包含式III化合物或其盐和至少一种表面活性剂的组合物:

[0080] ;

(式III)

[0081] 其中R^{10}和R^{11}各自独立地是H、卤素、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_6-C_{10}芳基;R^3是C_1-C_{10}烷基、C_6-C_{10}芳基、或杂芳基;R^4是C_2-C_{10}烯基;R^5是H或C_1-C_{10}烷基。在一些实施方案中,R^{10}和R^{11}独立地是H或卤素。

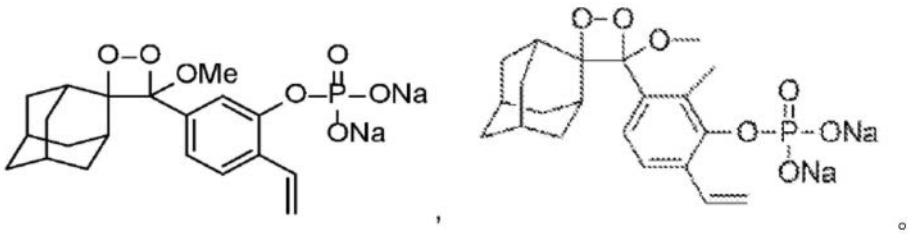
[0082] 本公开内容还提供了包含式IV化合物或其盐和至少一种表面活性剂的组合物:

[0083] 

（式IV）

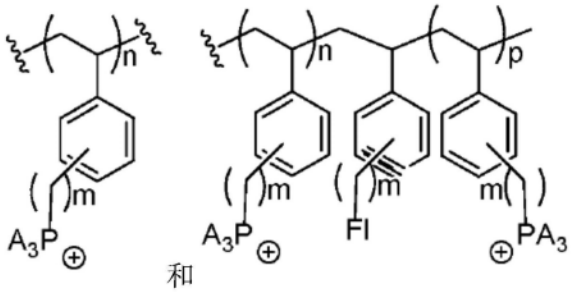
[0084] 其中R^{10}和R^{11}各自独立地是H、卤素、C_1-C_{10}烷基、C_2-C_{10}烯基、C_6-C_{10}芳基；R^3是C_1-C_{10}烷基、C_6-C_{10}芳基、或杂芳基；R^4是C_2-C_{10}烯基；R^5是H或C_1-C_{10}烷基。在一些实施方案中，R^{10}和R^{11}独立地是H或卤素。

[0085] 式I至IV的化合物可以是下式的化合物或其盐：

[0086] 

[0087] 包含式I至IV化合物的组合物可以是水性组合物或非水性组合物。所述组合物可以是水性和非水性溶剂二者的混合物，并且可以包含其他添加剂(例如，离子，包括镁离子，例如来源于镁盐例如氯化镁的镁离子，等)。如果包含式I至IV化合物的组合物包含镁离子，则它们可以包含50mg/L至500mg/L(例如，50mg/L至250mg/L、100mg/L至190mg/L、150mg/L至200mg/L、或150mg/L至190mg/L)氯化镁(II)($MgCl_2$)，但也可以使用其他镁(II)盐。在一个实例中，镁离子浓度可以是0mM至10mM、0mM至3mM、0.5mM至2mM、0.5mM至1mM、1mM至5mM、或2mM至5mM。

[0088] 在多个实施方案中，与包含式I至IV化合物的组合物一起使用的表面活性剂包括但不限于鏻表面活性剂，其在本文中也可互换地称为“鏻增强剂”。鏻表面活性剂包括聚合鏻表面活性剂和小分子鏻表面活性剂。聚合鏻表面活性剂的一些实例包括具有季鏻侧基的聚乙烯型聚合物，其公开于美国专利No.5,393,469。例如，美国专利No.5,393,469描述了以下通式的聚合鏻表面活性剂：

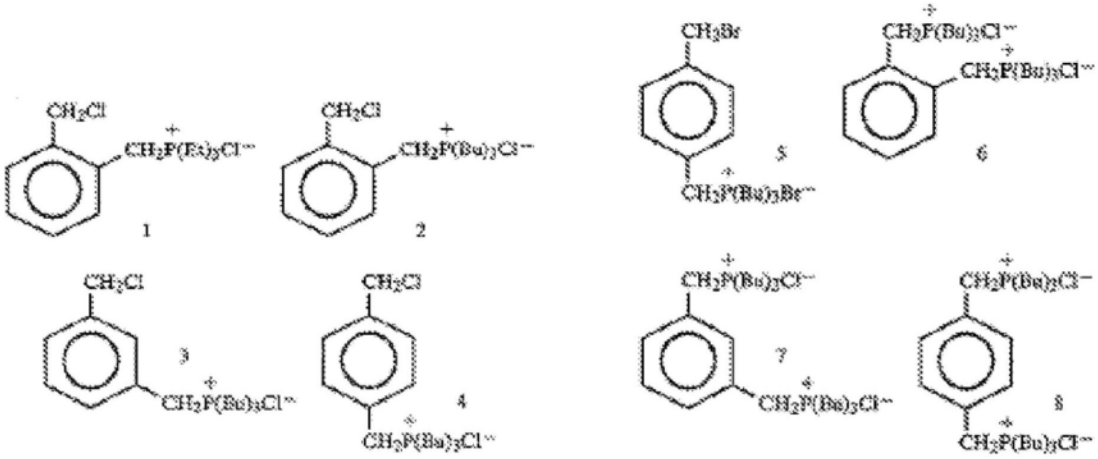
[0089] 

和

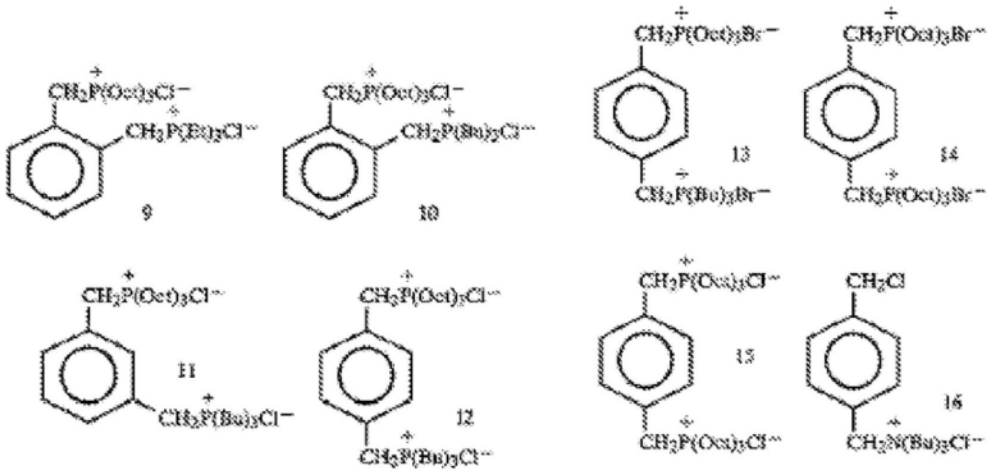
[0090] 其中每个A选自包含1至20个碳原子的低级烷基、芳基或芳基烷基，基团FI是荧光基团，m是1至14的整数，并且其中n和p是约10至1000的整数。特定磷原子上的每个A基团可以都是相同的基团，或者可以是两种不同的基团，或者所有三个可以不同。相邻磷原子上的A基团组可以是相同的组或可以是不同的组，其中组符合上面的描述。芳族环上取代基的相对位置可以是邻位、间位、对位或这三种类型的任意比例的混合。所连接的荧光基团可以是

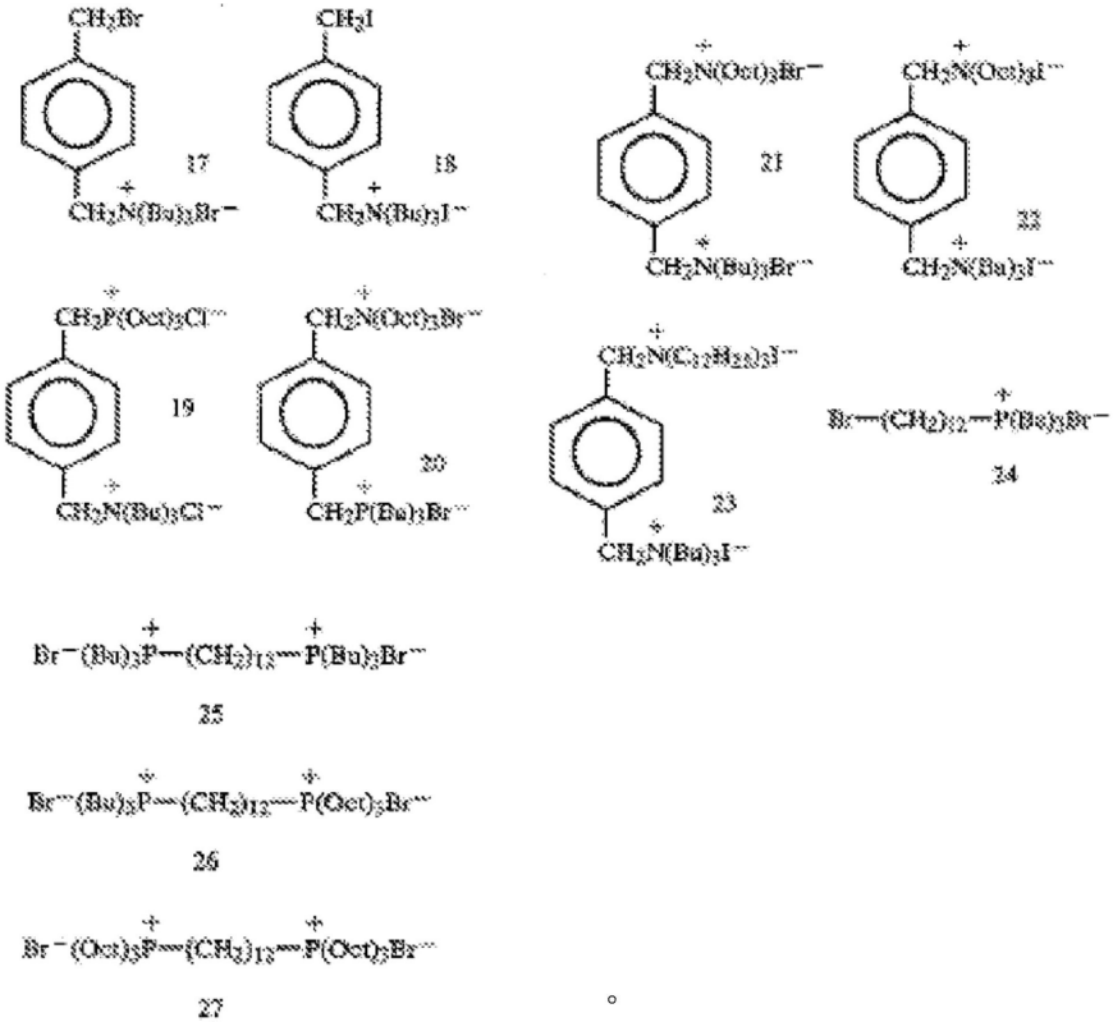
任何荧光剂,其可以与聚合物化学连接,并且与二氧杂环丁烷(例如,式I至IV化合物)的激发态相比,其单线态电子激发态具有更低的能量。荧光基团可以通过充当能量接受体来增强二氧杂环丁烷的化学发光效率,该能量接受体被激发并以光的形式释放激发能量。可用于实践本发明的荧光剂的一些实例包括但不限于:任何荧光染料;芳族化合物,包括多环芳族化合物、联苯、三联苯、萘、杂芳族和多环杂芳族化合物,例如吖啶、香豆素、酞菁、呋喃、噁唑、噁二唑、苯并噻唑、喹啉、呫吨、荧光素和荧光素衍生物,例如酰胺基荧光素、曙红和曙红衍生物、罗丹明和试卤灵(resorufin)。

[0091] 示例性聚合鏻增强剂包括聚乙烯基苄基三丁基氯化鏻与聚乙烯基苄基三辛基氯化鏻和聚乙烯基苄基三丁基氯化鏻的共聚物,以及具有两个季铵或鏻基团的双阳离子化合物,例如美国专利No.5,451,347中公开的那些。例如,美国专利No.5,451,347描述了具有两个式1至27的季铵或鏻基团的化合物:

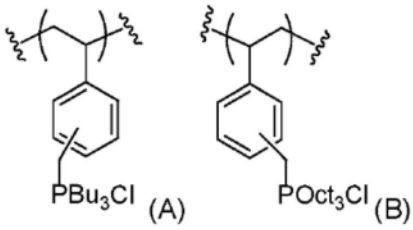


[0092]



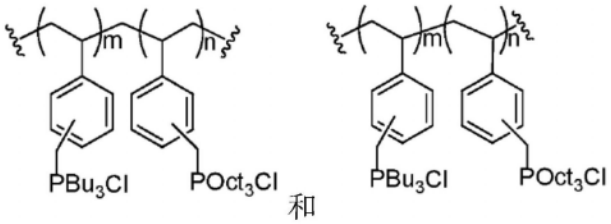
[0093] 

[0094] 聚合鏻增强剂的一些实例包括包含重复单元(A)、重复单元(B)或二者的聚合物：

[0095] 

[0096] 其中“Bu_3”是指“三丁基”，“Oct_3”是指“三辛基”。重复单元(A)与重复单元(B)的摩尔比可以在1:100至100:1的范围内(例如,如100:1至1:1,包括例如80:1、70:1、60:1、50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、70:30、75:25、60:40或50:50的比)。重均分子量(M_w)可以例如在100,000g/mol至400,000g/mol、150,000g/mol至350,000g/mol、200,000g/mol至300,000g/mol的范围内。例如,在示例性方面中,M_w可以是100,000,120,000,140,000,160,000,180,000,200,000,220,000,240,000,260,000,280,000,300,000,320,000,340,000,360,000,380,000,或400,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为220,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为240,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为260,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为280,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为300,000g/mol。共聚物可以是无规共聚物、嵌段共聚物或无规嵌段共聚物。

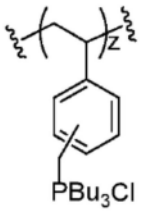
[0097] 聚合鏻增强剂的一些实例包括以下通式的聚合物：

[0098] 

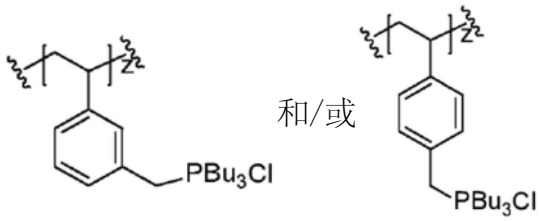
和

[0099] 其中m和n各自独立地为0至1000的整数(包括例如,1至500、250至1000、300至900、50至500、或250至750的整数)。m:n的比可以为100:1至1:1、4:1例如70:30、75:25、60:40或50:50;m+n在100至1000的范围内(例如,m+n可以是100至600、200至500、或300至600);重均分子量(M_w)可以例如在100,000g/mol至400,000g/mol、150,000g/mol至350,000g/mol、200,000g/mol至300,000g/mol的范围内。例如,在示例性方面中,M_w可以是100,000、120,000、140,000、160,000、180,000、200,000、220,000、240,000、260,000、280,000、300,000、320,000、340,000、360,000、380,000或400,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为220,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为240,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为260,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为280,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为300,000g/mol。共聚物可以是无规共聚物、嵌段共聚物或无规嵌段共聚物。

[0100] 示例性聚合鏻增强剂/表面活性剂还包括包含以下结构的聚合鏻表面活性剂：

[0101] 

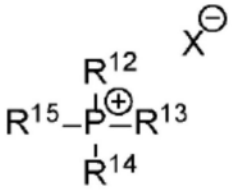
[0102] 其中z是2至1000范围内的整数(例如,2至500、100至600、450至800、300至600、2至250、50至250、100至300、150至400、175至400、50至300、100至500、150至400、或10至200)。重均分子量(M_w)可以在例如500g/mol至500,000g/mol、500g/mol至100,000g/mol、50,000g/mol至100,000g/mol、150,000g/mol至350,000g/mol、或200,000g/mol至300,000g/mol的范围内。例如,在示例性方面中,M_w可以是50,000、60,000、70,000、100,000、120,000、140,000、160,000、180,000、200,000、220,000、240,000、260,000、280,000、300,000、320,000、340,000、或350,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为70,000、80,000、100,000或220,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为240,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为260,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为280,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为300,000g/mol。这样的聚合鏻增强剂/表面活性剂的一些实例包括包含以下结构的那些：

[0103] 

[0104] 其中z是2至1000的整数(例如,2至500、100至600、450至800、300至600、2至250、50

至250、100至300、150至400、175至400、50至300、100至500、150至400、或10至200)。重均分子量(M_w)可以在例如500g/mol至500,000g/mol、500g/mol至100,000g/mol、50,000g/mol至100,000g/mol、150,000g/mol至350,000g/mol、或200,000g/mol至300,000g/mol的范围内。例如,在示例性方面中,M_w可以是50,000、60,000、70,000、100,000、120,000、140,000、160,000、180,000、200,000、220,000、240,000、260,000、280,000、300,000、320,000、340,000或350,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为70,000、80,000、100,000或220,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为240,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为260,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为280,000g/mol。在一些实施方案中,M_w为300,000g/mol。

[0105] 示例性小分子鏻增强剂/表面活性剂包括下式的小分子表面活性剂:

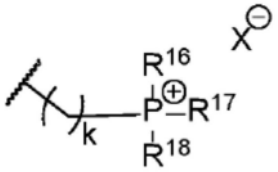
[0106] 

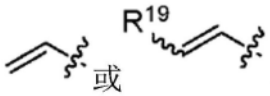
[0107] 其中:

[0108] R^{12}至R^{14}各自独立地是C_1-C_{10}烷基;

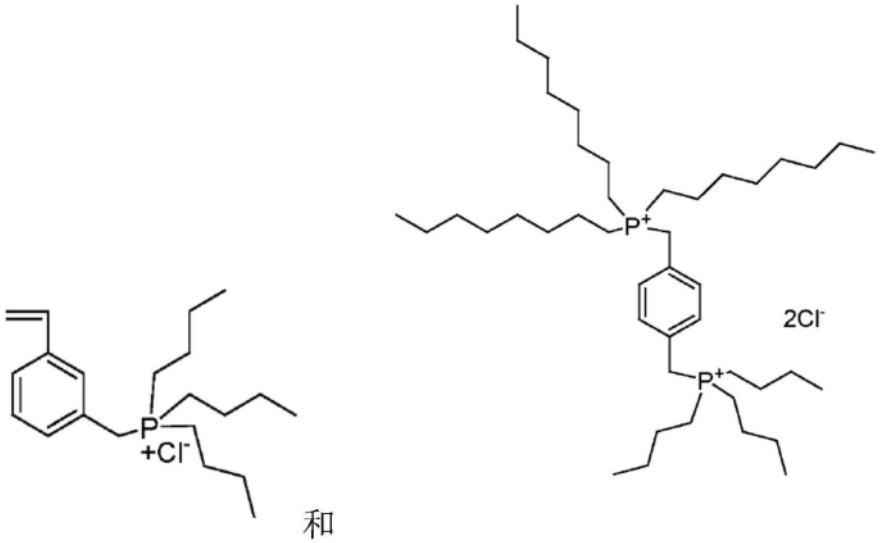
[0109] R^{15}是芳基烷基;并且

[0110] X^-是抗衡离子(例如氯)。R^{15}可以是经C_2-C_8烯基或下式基团取代的芳基烷基:

[0111]  其中k是0、1或2;R^{16}至R^{18}各自独立地是C_1-C_{16}烷基。R^{16}至R^{18}可以各自独立地是C_4-C_{10}烷基。C_2-C_8烯基可以是下式基团:

[0112]  其中R^{19}是C_1-C_8烷基、C_2-C_8烯基或C_2-C_8炔基。

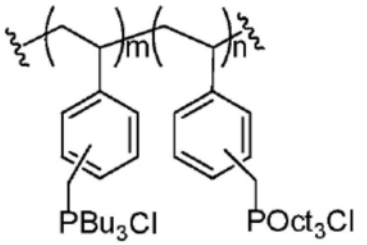
[0113] 小分子鏻增强剂/表面活性剂的一些实例包括:

[0114]  和 。

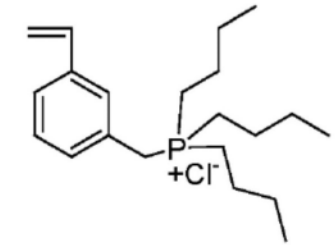
[0115] 本文中考虑的其他表面活性剂包括聚(乙烯基苄基三丁基氯化鏻)(TBE)(例如,分子量为175,000g/mol的TBE)、聚乙烯基吡啶鎓盐(例如,分子量为10,000g/mol至100,000g/mol的聚乙烯基吡啶鎓盐)、烷基铵盐(例如,$(C_8\text{-}C_{20}$烷基$)_2N(C_1\text{-}C_4$烷基$)_2Cl$(例如$(C_8H_{17})_3N(CH_3)Cl$,$(C_{12}H_{25})_2N(CH_3)_2Cl$和$(C_{18}H_{37})_2N(CH_3)_2$)))、烷基-乙二醇铵盐(例如,$(C_{12}\text{-}C_{20}$烷基$)_2N(C_1\text{-}C_4$烷基-O$)_2Cl$(例如$(C_{12}H_{25})_2N((CH_3CH_2O)_5)_2Cl$和$(C_{18}H_{37})_2N((CH_2CH_2O)_5)_2Cl$))、和芳烷基-烷基铵盐(例如,$(C_{18}H_{37})_2N(CH_3)(CH_2Ph)Cl$))。

[0116] 本文中也考虑了任何上述表面活性剂/增强剂的组合(例如,小分子鏻、聚合鏻和荧光素表面活性剂/增强剂中的两种或更多种的组合)。例如,组合物可以包含小分子鏻和聚合鏻。在一些情况下,组合物包含小分子鏻和荧光素表面活性剂/增强剂。在一些情况下,组合物包含小分子鏻、聚合鏻和荧光素表面活性剂/增强剂。例如,组合物可以包含如下的组合:

[0117] (a)下式的聚合鏻:

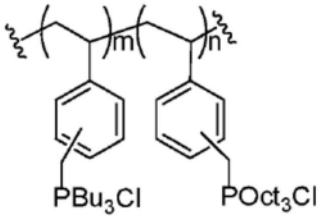
[0118] 

和下式的小分子鏻:

[0119] 

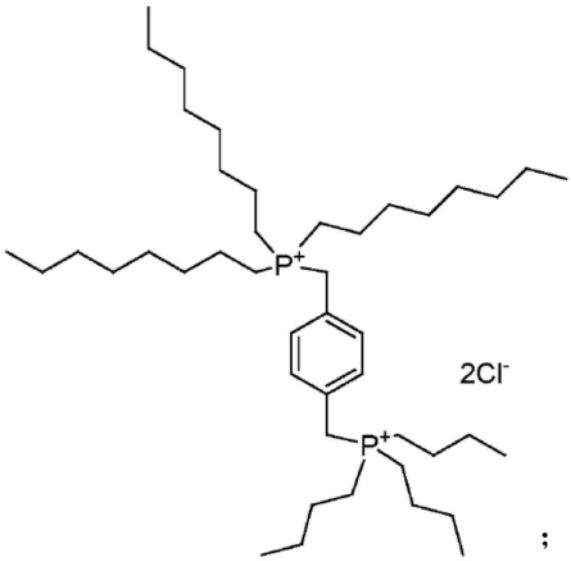
;

[0120] (b)下式的聚合鏻:

[0121] 

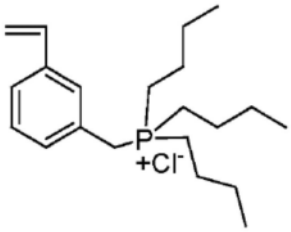
和下式的小分子鏻:

,

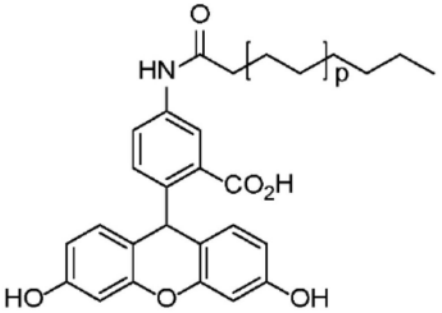


;

[0122] (c)下式的小分子鏻：

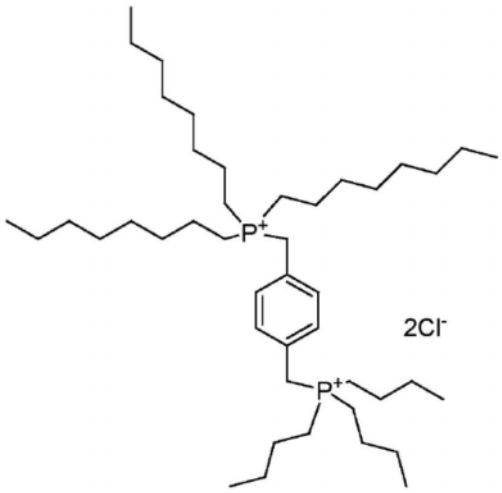
[0123]  和下式的荧光素表面活性剂/增强剂：

,

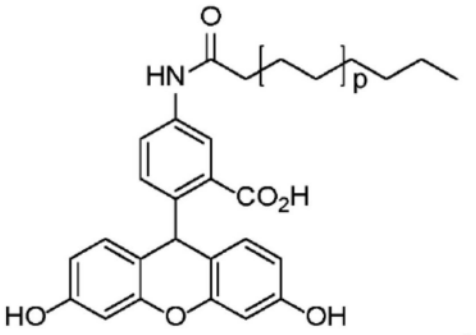
[0124] 

;

[0125] (d)下式的小分子鏻：

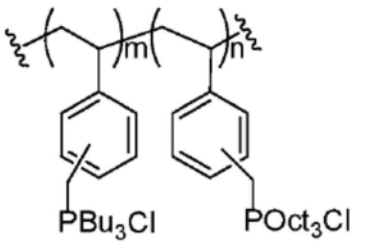
[0126]  和

[0127] 下式的荧光素表面活性剂/增强剂：

[0128] 

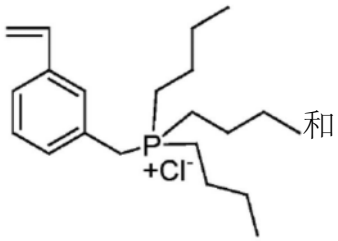
;

[0129] (e)下式的聚合鏻：

[0130] 

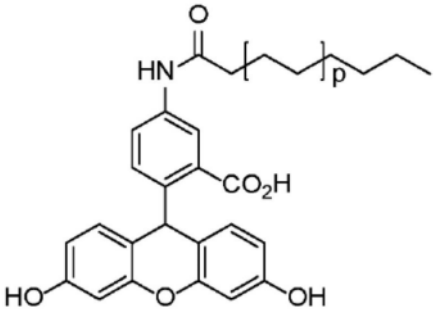
,

[0131] 下式的小分子鏻：

[0132] 

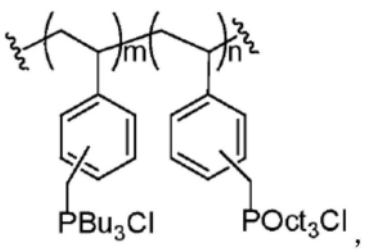
和

[0133] 下式的荧光素表面活性剂/增强剂：

[0134] 

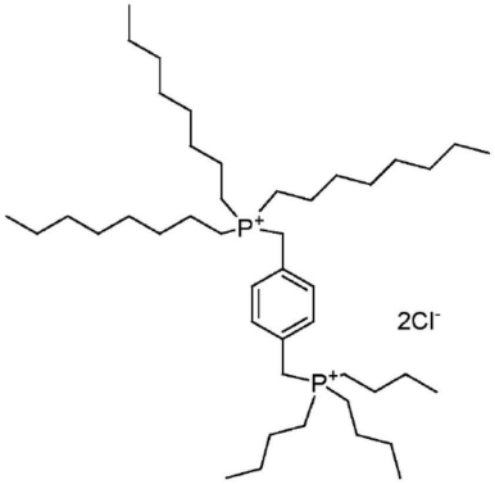
或
;

[0135] (f)下式的聚合鏻：

[0136] 

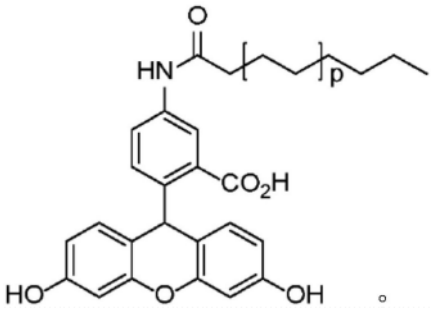
,

[0137] 下式的小分子鏻：

[0138] 

和

[0139] 下式的荧光素表面活性剂/增强剂：

[0140] 

。

[0141] 在多个实施方案中,组合物包含缓冲溶液。缓冲溶液可以但不一定必须是碱性缓冲溶液或基于胺的缓冲溶液。基于胺的缓冲液的一个实例是221缓冲液(基于2-氨基-2-甲基-1-丙醇(AMP)的缓冲液),其可从Sigma-Aldrich(St.Louis,MO)获得。因此,本文考虑的缓冲溶液包括基于胺的缓冲溶液,其包含2-氨基-2-甲基-1-丙醇(AMP)、2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇(AMPD)、三(2-氨基-2-(羟甲基)丙烷-1,3-二醇)、TAPS(3-{[1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基]氨基}丙烷-1-磺酸)、Bicine(N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸)和Tricine(N-[1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙烷-2-基]甘氨酸)及其组合,例如包含AMPD和AMP的缓冲溶液。同样,组合物可以但不一定必须具有碱性pH。在一些示例性实施方案中,组合物的pH可以为4至12、5至12、6至12、8至11、7至12、8至12、9至12、10至12、4至11、4至10、4至9、4至8、4至7、4至6、或4至5,例如,在0.1至1M、0.1至0.5M、0.2至0.5M、0.2至0.8M、0.1至0.25M、0.2至0.3M、或0.15M至0.3M的缓冲液浓度下。组合物的pH可基于是否旨在在分析物引发ALP去除本文所述化合物的X-基团之后立即引发发光来选择,如通常是碱性pH值的情况,或者组合物的pH值可以是酸性的使得用碱处理之后发光。

[0142] 在多个实施方案中,组合物在存在ALP或与目的分析物缀合的ALP的情况下具有/表现出的RLU大于2,000RLU、大于4,000RLU、大于6,000RLU、大于8,000RLU、大于9,000RLU;最多50,000RLU、最多30,000RLU、最多25,000RLU、最多20,000RLU、最多15,000RLU、最多10,000RLU、或最多5000RLU;2,000RLU至10,000RLU、4,000RLU至10,000RLU、2,000RLU至5,000RLU、2,500RLU至4,000RLU、或8,000RLU至10,000RLU。RLU可以通过任何合适的手段测量,包括例如使用Tuner TD-20光度计测量37℃下的光强度。在一些方面中,10μL的ALP溶液(例如AP8)可以与100μL的所配制试剂混合。作为补充或替代,组合物表现出的$T_{1/2}$为4分钟或更少、3分钟或更少、2分钟或更少、1分钟或更少、30秒至4分钟、30秒至2分钟、30秒至1分

钟、1分钟至3分钟、或1分钟至2分钟(例如在37℃下)。

[0143] 在多个实施方案中,组合物在不存在酶(例如ALP)的情况下具有/表现出的峰RLU为至多20、至多19、至多18、至多17、至多16、至多15、至多14、至多13、至多12或至多10。在多个实施方案中,组合物在不存在酶(例如ALP)的情况下具有/表现出的峰RLU为至少0.5、至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6或至少7。在多个实施方案中,组合物在不存在酶(例如ALP)的情况下具有/表现出的峰RLU为1至20、1至15、1至14、1至13、1至12、2至20、2至15、2至14、2至13、2至12、3至20、3至15、3至14、3至13、或3至12。

[0144] 本文中所述的包含二氧杂环丁烷和表面活性剂的组合物可包含以50mg/L至500mg/L(例如,50mg/L至250mg/L、100mg/L至190mg/L、150mg/L至200mg/L、或150mg/L至190mg/L)氯化镁(II)($MgCl_2$)的量的镁盐,但也可使用其他镁(II)盐。

[0145] 本公开内容还提供了检测样品中的分析物(例如,ALP或与目的分析物缀合的ALP)的方法,其包括使样品与本文中所述化合物或其盐中的一种或更多种或者包含本文中所述化合物或其盐中的一种或更多种的组合物接触,然后监测样品的发光。在多个实施方案中,所述方法包括测量所得发光的强度,并将该强度与分析物(例如,ALP或与目的分析物缀合的ALP)的存在和浓度中的至少一者相关联。在多个实施方案中,所述方法检测到的ALP浓度为至多1×10^{-18}、1×10^{-19}、1×10^{-20}或1×10^{-21}mol/μL。在多个实施方案中,所述方法检测到的ALP浓度为至少1×10^{-22}mol/μL或至少1×10^{-23}mol/μL。在多个实施方案中,所述方法检测到的ALP浓度在1×10^{-23}mol/μL至1×10^{-18}mol/μL的范围内(例如,1×10^{-23}mol/μL至1×10^{-19}mol/μL;1×10^{-22}mol/μL至1×10^{-18}mol/μL;或1×10^{-23}mol/μL至1×10^{-20}mol/μL)。在多个实施方案中,所述方法检测到至少1×10^{-22}mol ALP或至少1×10^{-21}mol ALP。在多个实施方案中,所述方法检测到最高1×10^{-17}、最高1×10^{-18}、最高1×10^{-19}或最高1×10^{-20}mol ALP。在多个实施方案中,所述方法检测到的ALP范围为1×10^{-22}mol ALP至1×10^{-17}mol ALP(例如,1×10^{-22}mol ALP至1×10^{-18}mol ALP;1×10^{-22}mol ALP至1×10^{-19}mol ALP;或1×10^{-21}mol ALP至1×10^{-17}mol ALP)。

[0146] 在一些实施方案中,所述方法还包括提高样品的pH。例如,可以将pH调节至7或更高、8或更高、9或更高、10或更高、或者11或更高。

[0147] 在多个实施方案中,分析物在10分钟或更少、6分钟或更少、4分钟或更少、2分钟或更少、1分钟或更少、55秒或更少、45秒或更少、或者30秒或更少内被检测到。

[0148] 本公开内容还提供了用于确定分析物的存在和浓度中的至少一者的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含本文中所述化合物中的任何一种或更多种的化合物、其烯烃前体、其盐、或包含它们的组合物。所述试剂盒可包含根据本文中所述方法的说明。

[0149] 本文中所述的化合物和组合物可以通过添加分析物直接触发,使得产生鉴定探针和分析物的存在和浓度中的至少一者的信号,或者可以在两步过程中触发,一步涉及接触分析物,并且另一步涉及升高pH。

[0150] 本公开内容的化合物可以被配置为探针,以检测ALP或与目的分析物缀合的ALP。

[0151] 期望的是,化合物在被分析物触发之后在尽可能短的时间段内发射光,以提供尽可能强的信号。当化学发光在一段时间内逐渐发射时,光强度(光子/秒)减弱并且检测灵敏度可受损。

[0152] 发光提高的速率或上升时间可以根据达到最大发射的时间(t_{max})或发射半衰期

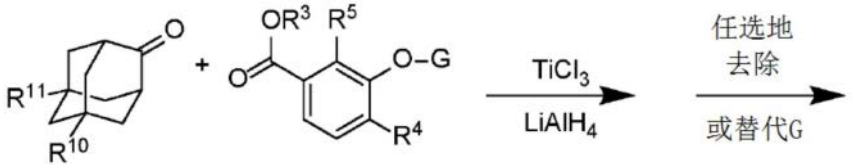
($T_{1/2}$)来描述。

[0153] 本文中所述的化合物可用作碱性磷酸酶(ALP)等的酶底物。不受理论的限制,一个示例性机制涉及ALP酶水解X,其中X是磷酸酯基团,以提供由于溶液的碱性环境(例如,pH 9.7缓冲液)而立即去质子化的酚。含氧阴离子的形成触发1,2-二氧杂环丁烷分解成两种化合物:2-金刚烷酮和处于激发态的苯基酯。激发的苯基酯然后通过释放光立即衰变到基态。

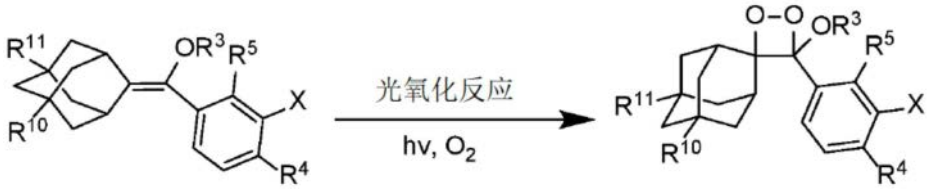
[0154] 所得光强度是酶量的线性函数。因此,本文中所述的化合物可用于检测测定中使用的标记酶。例如,其中二氧杂环丁烷提供光的化学过程的步骤可以根据以下步骤描述:(i)X+S→X+S′(ii)S′→P^*和(iii)P^*→P+光。步骤(i)表示底物的催化转换,其中X是将底物(S)转化成其激活形式(S')的酶或其他组分,步骤(ii)表示经激活底物降解成瞬时激发物质(P*),以及步骤(iii)表示经激发物质衰变至基态(P)并发射光。光强度是步骤(i)中底物的催化转换和步骤(ii)中所得光产生化合物P*的寿命的乘积。步骤(ii)通常是一级的,具有速率常数k,并且可以通过其半衰期来表征:$T_{1/2}=(\ln 2)/k$。与其他步骤相比,步骤(iii)非常短,并且通常对反应动力学没有有意义的作用。

[0155] 化学发光强度/时间曲线包括发射强度初始上升的时期和随后的稳态强度时期。S′→P^*的缓慢一级反应对应于延长的上升时间,因为达到S'的稳态浓度需要更长的时间。S′→P^*的快速反应对应于较短的初始上升期,并因此提供了快速上升。对于酶促化学发光反应,强度通常保持处于高水平。缺乏稳定的强度表明底物耗尽或随后的酶失活。酶产生的化学发光的检测为测量过程提供了灵活性,因为任何时间点的光强度都可以与酶的量相关,然而酶产生的过程可能具有缺点,例如,由于酶标记的尺寸和"黏性"性质。然而,对于最大灵敏度,在稳态强度期期间在最大强度(I_{max})处或其附近进行测量是最佳的。

[0156] 本公开内容的化合物通常可以例如根据方案1中描述的合成方法来制备。



[0157]



[0158] 方案1

[0159] 其中G是任何合适的氧保护基。

[0160] 简而言之,2-金刚烷酮和3-取代的苯甲酸酯可以通过使它们经历涉及亲氧钛和还原剂的McMurry反应条件而偶联在一起。所得烯烃可以进一步修饰,例如通过去除或取代保护基G或进一步使R^4位官能化。接下来,使烯烃经受光氧化反应条件以提供1,2-二氧杂环丁烷产物。在多个实施方案中,R^4和X如本申请的多个实施方案中的任一个所述。在一些实施方案中,R^{10}和R^{11}是H。在一些实施方案中,R^3是经取代或未经取代的烷基。

[0161] 本文中使用的术语"强度"(例如,光强度或发光强度)是指以光子/秒计的发射速率。强度可以通过使用光度计来测量。光度计是壳中的光电探测器,它排除了环境光。可以使用任何合适的光度计,包括光电倍增管和/或光电二极管。

[0162] 术语“发光速度”是指发光增加的速率,即光强度随时间的变化。

[0163] 本文中使用的术语“灵敏度”是指可再现地检测所测量的分析物或产物的信号的最低水平。

[0164] 本文中使用的术语“烷基”是指经取代或未经取代的直链、支链或环状、饱和的一价或二价基团,其具有1至20个碳原子、10至20个碳原子、12至18个碳原子、6至10个碳原子、1至10个碳原子、1至8个碳原子、2至8个碳原子、3至8个碳原子、4至8个碳原子、5至8个碳原子、1至6个碳原子、2至6个碳原子、3至6个碳原子或1至3个碳原子。直链一价(C_1-C_{20})烷基的一些实例包括具有1至8个碳原子的那些,例如甲基(即CH_3)、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基。支链一价(C_1-C_{20})烷基的一些实例包括异丙基、异丁基、仲丁基、叔丁基、新戊基和异戊基。直链二价(C_1-C_{20})烷基的一些实例包括具有1至6个碳原子的那些,例如-CH_2-、-CH_2CH_2-、-$CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、和-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-。支链二价烷基的一些实例包括-CH(CH_3)CH_2-和--CH_2CH(CH_3)CH_2-。环状烷基的一些实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环辛基、双环[1.1.1]戊基、双环[2.1.1]己基、双环[2.2.1]庚基和金刚烷基。环烷基还包括经取代和未经取代的多环环烷基,例如但不限于降莰基、金刚烷基、莰基、莰烯基、异莰烯基和蒈烯基,以及稠环,例如但不限于十氢萘基等。例如,环烷基包括经一个、两个、三个、四个或更多个取代基取代的金刚烷基,例如在亚甲基桥的叔桥头(tertiary bridgehead)位。在一些实施方案中,烷基包括经取代和未经取代烷基的组合。作为一个实例,烷基以及(C_1)烷基包括甲基和经取代的甲基。作为一个具体实例,(C_1)烷基包括苄基。作为另一个实例,烷基可以包括甲基和经取代的(C_2-C_8)烷基。烷基还可以包括经取代的甲基和未经取代的(C_2-C_8)烷基。在一些实施方案中,烷基可以是甲基和C_2-C_8直链烷基。在一些实施方案中,烷基可以是甲基和C_2-C_8支链烷基。术语甲基被理解为-CH_3,其是未经取代的。术语亚甲基被理解为-CH_2-,其是未经取代的。为了比较,术语(C_1)烷基被理解为经取代或未经取代的-CH_3或经取代或未经取代的-CH_2-。代表性的经取代烷基可以经本文列出的任何基团取代一次或更多次,所述本文列出基团例如环烷基、杂环基、芳基、氨基、卤代烷基、羟基、氰基、羧基、硝基、硫基、烷氧基和卤素。作为另一个实例,代表性的经取代烷基可以经以下取代:一个或更多个氟、氯、溴、碘、氨基、酰胺基、烷基、烷氧基、烷基酰胺基、烯基、炔基、烷氧基羰基、酰基、甲酰基、芳基羰基、芳基氧基羰基、芳基氧基、羧基、卤代烷基、羟基、氰基、亚硝基、硝基、叠氮基、三氟甲基、三氟甲氧基、硫基、烷基硫基、芳硫醇、烷基磺酰基、烷基亚磺酰基、二烷基氨基磺酰基、磺酸、羧酸、二烷基氨基和二烷基氨酰基。在一些实施方案中,代表性的经取代烷基可以从一组基团中取代,所述一组基团包括氨基、羟基、氰基、羧基、硝基、硫基和烷氧基,但不包括卤素基团。因此,在一些实施方案中,烷基可以经非卤素基团取代。例如,代表性的经取代烷基可以经氟基取代、经溴基取代、经溴之外的卤素取代、或者经氟之外的卤素取代。在一些实施方案中,代表性的经取代烷基可以经一个、两个、三个或更多个氟基取代,或者它们可以经一个、两个、三个或更多个非氟基取代。例如,烷基可以是三氟甲基、二氟甲基或氟甲基,或者烷基可以是除三氟甲基、二氟甲基或氟甲基之外的经取代烷基。烷基可以是卤代烷基,或者烷基可以是卤代烷基之外的经取代烷基。

[0165] 本文中使用的术语“烯基”是指经取代或未经取代的直链、支链或环状饱和一价或二价基团,其具有至少一个碳-碳双键和2至20个碳原子、10至20个碳原子、12至18个碳原子、6至10个碳原子、2至10个碳原子、2至8个碳原子、3至8个碳原子、4至8个碳原子、5至8个

碳原子、2至6个碳原子、3至6个碳原子、4至6个碳原子、2至4个碳原子、或2至3个碳原子。双键可以是反式或顺式取向。双键可以是末端的或内部的。烯基可以通过包含双键的烯基部分(例如乙烯基、丙烯-1-基和丁烯-1-基)连接,或者烯基可以通过不含双键的烯基部分(例如戊烯-4-基)连接。在指定的情况下,母体部分应理解为在双键的乙烯位而不是非乙烯位处与烯基连接。例如,当芳环经π-共轭烯基取代时,应理解为在乙烯位而不是非乙烯位上取代。作为另一个实例,经π-共轭丙烯基取代的芳环将被理解为丙烯1-基或丙烯-2-基而不是丙烯-3-基。一价(C_2-C_{20})烯基的一些实例包括具有1至8个碳原子的那些,例如乙烯基、丙烯基、丙烯-1-基、丙烯-2-基、丁烯基、丁烯-1-基、丁烯-2-基、仲丁烯-1-基、仲丁烯-3-基、戊烯基、己烯基、庚烯基和辛烯基。支链一价(C_2-C_{20})烯基的一些实例包括异丙烯基、异丁烯基、仲丁烯基、叔丁烯基、新戊烯基和异戊烯基。直链二价(C_2-C_{20})烯基的一些实例包括具有2至6个碳原子的那些,例如-CHCH-、-$CHCHCH_2$-、-$CHCHCH_2CH_2$-和-$CHCHCH_2CH_2CH_2$-。支链二价烷基的一些实例包括-C(CH_3)CH-和-CHC(CH_3)CH_2-。环状烯基的一些实例包括环戊烯基、环己烯基和环辛烯基。例如,烯基可以是乙烯基和经取代的乙烯基。例如,烯基可以是乙烯基和经取代的(C_3-C_8)烯基。烯基也可以包括经取代的乙烯基和未经取代的(C_3-C_8)烯基。代表性的经取代烯基可以被本文列出的任何基团取代一次或更多次,所述基团例如单烷基氨基、二烷基氨基、氰基、乙酰基、酰胺基、羧基、硝基、烷基硫基、烷氧基和卤素基团。作为另一个实例,代表性的经取代烯基可以经以下取代:一个或更多个氟、氯、溴、碘、氨基、酰胺基、烷基、烷氧基、烷基酰胺基、烯基、炔基、烷氧基羰基、酰基、甲酰基、芳基羰基、芳基氧基羰基、芳基氧基、羧基、卤代烷基、羟基、氰基、亚硝基、硝基、叠氮基、三氟甲基、三氟甲氧基、硫基、烷基硫基、芳基硫醇、烷基磺酰基、烷基亚磺酰基、二烷基氨基磺酰基、磺酸、羧酸、二烷基氨基和二烷基酰胺基。在一些实施方案中,代表性的经取代烯基可以从一组基团中取代,所述一组基团包括单烷基氨基、二烷基氨基、氰基、乙酰基、酰胺基、羧基、硝基、烷基硫基和烷氧基,但不包括卤素基团。因此,在一些实施方案中,烯基可以经非卤素基团取代。在一些实施方案中,代表性的经取代烯基可以经氟基取代、经溴基取代、经除溴之外的卤素取代、或经除氟之外的卤素取代。例如,烯基可以是1-氟乙烯基、2-氟乙烯基、1,2-二氟乙烯基、1,2,2-三氟乙烯基、2,2-二氟乙烯基、三氟丙烯-2-基、3,3,3-三氟丙烯基、1-氟丙烯基、1-氯乙烯基、2-氯乙烯基、1,2-二氯乙烯基、1,2,2-三氯乙烯基或2,2-二氯乙烯基。在一些实施方案中,代表性的经取代烯基可以经一个、两个、三个或更多个氟基取代,或者它们可以经一个、两个、三个或更多个非氟基取代。

[0166] 本文中使用的术语“炔基”是指经取代或未经取代的直链和支链烷基基团,除了至少一个三键存在于两个碳原子之间。因此,炔基具有2至50个碳原子、2至20个碳原子、10至20个碳原子、12至18个碳原子、6至10个碳原子、2至10个碳原子、2至8个碳原子、3至8个碳原子、4至8个碳原子、5至8个碳原子、2至6个碳原子、3至6个碳原子、4至6个碳原子、2至4个碳原子、或2至3个碳原子。实例包括但不限于乙炔基、丙炔基、丙炔-1-基、丙炔-2-基、丁炔基、丁炔-1-基、丁炔-2-基、丁炔-3-基、丁炔-4-基、戊炔基、戊炔-1-基、己炔基,实例包括但不限于

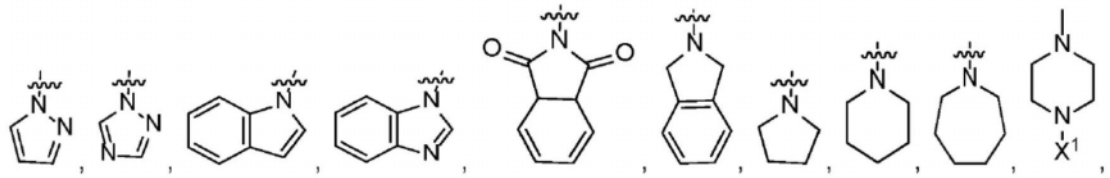
[0167] -C≡CH,-C≡C(CH_3),-

[0168] C≡C(CH_2CH_3),-CH_2C≡CH,-CH_2C≡C(CH_3),和-CH_2C≡C(CH_2CH_3)等。

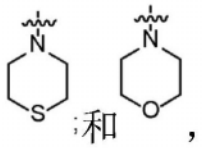
[0169] 本文中使用的术语“芳基”是指通过从芳烃中去除氢原子而衍生的经取代或未经

取代的单价基团,所述芳烃是具有6至20个碳原子、10至20个碳原子、12至20个碳原子、6至10个碳原子或6至8个碳原子的环状芳烃。(C_6-C_{20})芳基的一些实例包括苯基、萘基、蒽基、联苯基、引达省基(indacenyl)、茚基、菲基、三亚苯基、芘基、并四苯基、苯并菲基、䓛基。实例包括经取代的苯基、经取代的萘基、经取代的蒽基、经取代的联苯基、经取代的茚满基、经取代的茚基、经取代的菲基、经取代的三亚苯基、经取代的芘基、经取代的并四苯基、经取代的苯并菲基和经取代的䓛基。实例还包括未经取代的苯基、未经取代的萘基、未经取代的蒽基、未经取代的联苯基、未经取代的茚满基、未经取代的茚基、未经取代的菲基、未经取代的三亚苯基、未经取代的芘基、未经取代的并四苯基、未经取代的苯并菲基和未经取代的䓛基。芳基包括苯基以及非苯基芳基。从这些实例中清楚地看出,术语(C_6-C_{20})芳基涵盖单环和多环(C_6-C_{20})芳基,包括稠合和非稠合多环(C_6-C_{20})芳基。

[0170] 本文中使用的术语“杂环基”是指在环中含有3个或更多个原子的经取代的芳族、未经取代的芳族、经取代的非芳族和未经取代的非芳族环,在所述原子中一个或更多个是杂原子,例如但不限于N、O和S。术语“杂芳基”是完全芳族杂环基,并因此是术语杂环基的子集。术语“杂环烯基”是指在非芳族环内含有烯烃的杂环基,使得烯烃是与母体部分的连接点。因此杂环基可以是杂环烷基、杂环烯基或杂芳基,或者如果是多环的,则可以是它们的任何组合。在一些实施方案中,杂环基包含3至20个环成员,而另一些这样的基团具有3至15个环成员。在一些实施方案中,杂环基包括包含3至8个碳原子(C_3-C_8)、3至6个碳原子(C_3-C_6)或6至8个碳原子(C_6-C_8)的杂环基。称为C_2杂环基的杂环基可以是具有两个碳原子和三个杂原子的5元环、具有两个碳原子和四个杂原子的6元环等。同样,C_4杂环基可以是具有一个杂原子的5元环、具有两个杂原子的6元环等。碳原子数加上杂原子数等于环原子的总数。杂环基环还可以包含一个或更多个双键。杂芳基环是杂环基的一个实施方案。短语杂环基包括稠环物质,包括包含稠合芳族和非芳族基团的那些物质。代表性的杂环基包括但不限于哌啶基、吡咯烷基、哌嗪基和吗啉基。例如,杂环基包括但不限于:



[0171]



;和 ,

[0172] 其中X^1代表H、(C_1-C_{20})烷基、(C_6-C_{20})芳基或胺保护基(例如叔丁氧羰基基团),并且其中杂环基基团可以是经取代或未经取代的。代表性的杂芳基包括呋喃基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、三嗪基、噻吩基、四氢呋喃基、吡咯基、噁唑基、咪唑基、三唑基、四唑基、苯并噁唑啉基和苯并咪唑啉基。在一些实施方案中,杂芳基是5元杂芳基。在一些实施方案中,杂芳基不是吡啶、嘧啶、哒嗪、吡嗪或其稠合衍生物。π-过量杂芳基是富含电子的杂芳基,使得它可以用作给电子基团。π-过量杂芳基的一些实例是呋喃、噻吩、吲哚、吡咯、苯并呋喃和

苯并噻吩。

[0173] 本文中使用的术语“烷氧基”是指与本文中所限定的烷基(包括环烷基)连接的氧原子。直链烷氧基的一些实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基、己氧基等。支链烷氧基的一些实例包括但不限于异丙氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、异戊氧基、异己氧基等。环状烷氧基的一些实例包括但不限于环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基等。烷氧基可包含与氧原子键合的1到12至20或12至40个碳原子,并且还可包含双键或三键,并且还可包含杂原子。因此,烷氧基还包括与炔基(alkyenyl)基团连接的氧原子和与炔基基团连接的氧原子。例如,烯丙氧基是本文含义内的烷氧基。甲氧基乙氧基也是本文含义内的烷氧基,在结构的两个相邻原子被其取代的情况下的亚甲二氧基也是如此。

[0174] 本文中使用的术语“芳基氧基”是指与本文定义的芳基基团连接的氧原子。母体部分的取代点在氧原子处。

[0175] 本文中使用的术语“芳基羰基”是指与本文定义的芳基连接的羰基(CO)基团。母体部分的取代点在羰基处。

[0176] 本文中使用的术语“杂芳基羰基”是指与如本文定义的杂芳基连接的羰基(CO)基团。母体部分的取代点在羰基处。

[0177] 本文中使用的术语“芳基烷基”是指如本文所定义的烷基,其中烷基的氢或碳键用与如本文所定义的芳基的键所取代。代表性的芳基烷基包括苄基、联苯基甲基和苯基乙基以及稠合的(环烷基芳基)烷基,例如4-乙基-茚满基。芳基烯基是如本文定义的烯基,其中烯基的氢或碳键用与如本文定义的芳基的键取代。母体部分的取代点在烷基处。

[0178] 除非另有说明,否则本文中使用的术语“卤代”、“卤素”或“卤化物”基团本身或作为另一取代基的一部分意指氟、氯、溴或碘原子。

[0179] 本文中使用的术语“氨基”是指-NH_2、-NHR、-NR_2、-NR_3^+形式的取代基,其中每个R是独立选择的,并且每个的质子化形式(除了-NR_3^+),其不能被质子化。因此,经氨基取代的任何化合物都可以被视为胺。本文含义内的“氨基”可以是伯氨基、仲氨基、叔氨基或季氨基。“烷基氨基”基团包括单烷基氨基、二烷基氨基和三烷基氨基。

[0180] 本文中使用的术语“酰基”是指包含羰基部分的基团,其中所述基团通过羰基碳原子键合。羰基碳原子还与另一个碳原子键合,其可以是经取代或未经取代的烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、环烷基、杂环基等的部分。

[0181] 本文中使用的术语“甲酰基”是指含有醛部分的基团。母体部分的取代点在羰基处。

[0182] 本文中使用的术语“烷氧基羰基”是指含有羰基部分的基团,其中所述基团通过羰基碳原子键合。羰基碳原子也与氧原子键合,所述氧原子进一步与烷基键合。烷氧基羰基也包括其中羰基碳原子也与氧原子键合的基团,氧原子进一步与炔基基团(alkyenyl group)键合。烷氧基羰基也包括其中羰基碳原子也与氧原子键合的基团,氧原子进一步与炔基基团键合。在另一情况下,其包括在如本文所定义的术语的烷氧基羰基的定义中,并且也包括在术语“芳基氧基羰基”中,羰基碳原子与氧原子键合,氧原子与芳基键合而不是与烷基键合。

[0183] 本文中使用的术语“烷基酰胺基”是指含有羰基部分的基团,其中所述基团通过羰基碳原子键合。羰基碳原子还与氮基团键合,氮基团与一个或更多个烷基键合。在另一也是

如本文所定义的术语烷基酰胺基的情况下,羰基碳原子与氮原子键合,氮原子与一个或更多个芳基键合,而不是与一个或更多个烷基键合,或者除了与一个或更多个烷基键合之外还与一个或更多个芳基键合。在另一也是如本文定义的术语烷基酰胺基的情况下,羰基碳原子与氮原子键合,氮原子与一个或更多个烯基键合而不是与一个或更多个烷基和/或芳基键合,或者除了与一个或更多个烷基和/或芳基键合之外还与一个或更多个烯基键合。在另一也是如本文定义的术语烷基酰胺基的情况下,羰基碳原子与氮原子键合,氮原子与一个或更多个炔基基团键合而不是与一个或更多个烷基、烯基和/或芳基键合,或者除了与一个或更多个烷基、烯基和/或芳基键合之外还与一个或更多个炔基基团键合。

[0184] 本文中使用的术语“羧基”是指含有羰基部分的基团,其中所述基团通过羰基碳原子键合。羰基碳原子也与羟基或含氧阴离子键合以产生羧酸或羧酸盐。羧基也包括羧酸的质子化形式和盐形式二者。例如,羧基可以理解为COOH或CO_2H。

[0185] 本文中使用的术语“烷基硫基”是指与如本文定义的烷基、烯基或炔基连接的硫原子。母体部分的取代点在硫原子处。

[0186] 本文中使用的术语“芳基硫基”是指与如本文定义的芳基连接的硫原子。母体部分的取代点在硫原子处。

[0187] 本文中使用的术语“烷基磺酰基”是指与如本文所定义的烷基、烯基或炔基连接的磺酰基。母体部分的取代点在磺酰基处。

[0188] 本文中使用的术语“烷基亚磺酰基”是指与如本文所定义的烷基、烯基或炔基连接的亚磺酰基。母体部分的取代点在亚磺酰基处。

[0189] 本文中使用的术语“二烷基氨基磺酰基”是指与氮连接的磺酰基,氮进一步与如本文所定义的两个烷基连接,并且其可任选地连接在一起以与氮形成环。该术语还包括其中氮进一步与一个或两个烯基而非烷基连接的基团。母体部分的取代点在磺酰基处。

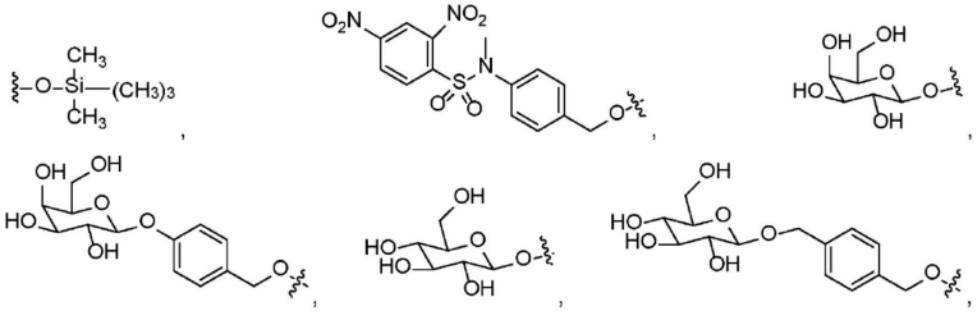
[0190] 本文中使用的术语“二烷基氨基”是指与两个如本文所定义的烷基连接的氨基,并且其可任选地连接在一起以与氮形成环。该术语还包括其中氮进一步与一个或两个烯基而非烷基连接的基团。母体部分的取代点在氮原子处。

[0191] 本文中使用的术语“二烷基酰胺基”是指与两个如本文定义的烷基连接的酰胺基,并且其可以任选地连接在一起以与氮形成环。该术语还包括其中氮进一步与一个或两个烯基而非烷基连接的基团。母体部分的取代点在酰胺基处。

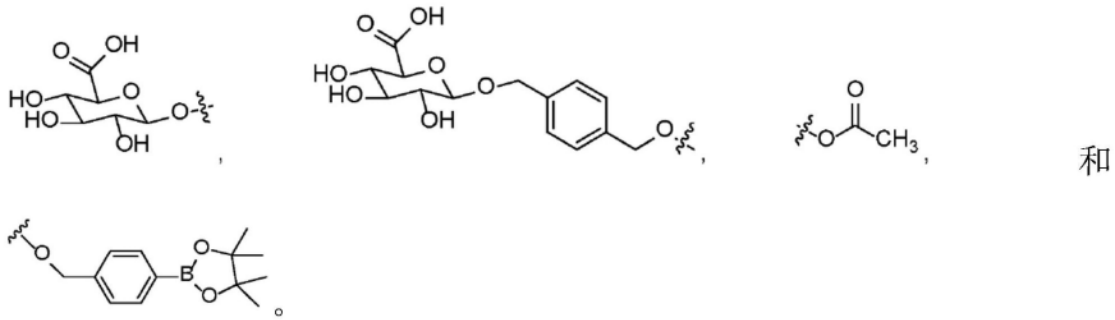
[0192] 本文中所述的多个取代基中的每一个都可以是经取代或未经取代的。本文中使用的术语“经取代”(例如,在“任选地经取代的芳基烷基”的背景下)是指经一个或更多个包括但不限于以下基团的基团(取代基)取代的基团:氘(D)、卤素(例如,F、Cl、Br和I)、R、OR、OC(O)N(R)$_2$、CN、NO、NO_2、ONO_2、叠氮基、CF_3、OCF_3、亚甲基二氧基、亚乙基二氧基、(C_3-C_{20})杂芳基、N(R)$_2$、Si(R)$_3$、SR、SOR、SO_2R、$SO_2N(R)_2$、SO_3R、P(O)(OR)$_2$、OP(O)(OR)$_2$、C(O)R、C(O)C(O)R、C(O)CH_2C(O)R、C(S)R、C(O)OR、OC(O)R、C(O)N(R)$_2$、C(O)N(R)OH、OC(O)N(R)$_2$、C(S)N(R)$_2$、$(CH_2)_{0-2}$N(R)C(O)R、$(CH_2)_{0-2}$N(R)N(R)$_2$、N(R)N(R)C(O)R、N(R)N(R)C(O)OR、N(R)N(R)CON(R)$_2$、N(R)SO_2R、N(R)SO_2N(R)$_2$、N(R)C(O)OR、N(R)C(O)R、N(R)C(S)R、N(R)C(O)N(R)$_2$、N(R)C(S)N(R)$_2$、N(COR)COR、N(OR)R、C(=NH)N(R)$_2$、C(O)N(OR)R或C(=NOR)R,其中R可以是氢、(C_1-C_{20})烷基或(C_6-C_{20})芳基。经取代的还包括经一个或更多个基团取代的基团,所述一个或更多个基团包括但不限于以下基团:氟、氯、溴、碘、氨基、酰胺基、烷基、烷氧基、烷基酰胺

基、烯基、炔基、烷氧基羰基、酰基、甲酰基、芳基羰基、芳基氧基羰基、芳基氧基、羧基、卤代烷基、羟基、氰基、亚硝基、硝基、叠氮基、三氟甲基、三氟甲氧基、硫基、烷基硫基、芳基硫醇、烷基磺酰基、烷基亚磺酰基、二烷基氨基磺酰基、磺酸、羧酸、二烷基氨基和二烷基酰胺基。当有两个或更多个相邻的取代基时,取代基可以连接形成碳环或杂环。这样的相邻的基团可以具有邻位或生发关系,或者它们可以在例如邻位排列的环上相邻。每个经取代的实例都被理解为是独立的。例如,经取代的芳基可以经溴取代,并且同一化合物上的经取代杂环可以经烷基取代。考虑了经取代基团可以经一个或更多个非氟基取代。作为另一个实例,经取代基团可以经一个或更多个非氰基取代。作为另一个实例,经取代基团可以经除卤代烷基之外的一个或更多个基团取代。作为又一个实例,经取代基团可以经除叔丁基之外的一个或更多个基团取代。作为又一个实例,经取代基团可以经除三氟甲基之外的一个或更多个基团取代。作为另一些实例,经取代基团可以被除硝基之外、除甲基之外、除甲氧基甲基之外、除二烷基氨基磺酰基之外、除溴之外、除氯之外、除酰胺基之外、除卤素之外、除苯并二氧杂环庚烯基之外、除多环杂环基之外、除多环经取代芳基之外、除甲氧基羰基之外、除烷氧基羰基之外、除噻吩基之外或除硝基苯基之外的一个或更多个基团取代,或被满足这样的描述组合的基团取代。此外,经取代的还应理解为包括氟、氰基、卤代烷基、叔丁基、三氟甲基、硝基、甲基、甲氧基甲基、二烷基氨基磺酰基、溴、氯、酰胺基、卤素、苯并二氧杂环庚烯基、多环杂环基、多环经取代芳基、甲氧基羰基、烷氧基羰基、噻吩基、和硝基苯基。在多个实施方案中,经取代基团可以经除含羰基的基团、硝基、氰基、亚磺酰基、磺酰基或含卤素基团之外的基团取代。在多个实施方案中,经取代基团可以经除吸电子基团之外的基团取代。某些实施方案中的一些经取代基团可以仅经一个或更多个给电子基团取代。

[0193] 本文中使用的术语醇保护基是指氧基基团上的取代基,其使氧对其中醇通常反应的多种条件呈惰性,但在经受某些条件时容易去除。如本文中所述的醇保护基通常会提高二氧杂环丁烷部分的稳定性,并且在它们去除之后将促进二氧杂环丁烷的分解。因此,醇保护基包括磷酸盐如PO_3Na_2、PO_3Cl_2和PO_3H_2、糖基基团、二硝基苯磺酰基氨基苄基基团和可酶水解以提供未保护醇的其他基团。一些醇保护基描述于Theodora W.Greene,Peter G.M.Wuts(1999).Protecting Groups in Organic Synthesis(3ed.).J.Wiley。醇保护基包括乙酰基、苯甲酰基、苄基、甲氧基乙氧基甲基、二甲基三苯甲基、甲氧基甲基、甲基硫基甲基、新戊酰基、四氢吡喃基、四氢呋喃基、三苯甲基、三烷基甲硅烷基、三烷基甲硅烷氧基甲基、二烷基芳基甲硅烷基、糖基、吡喃基、半乳糖基和乙氧基乙基。醇保护基也包括其中醇被进一步经保护基取代的可片段化接头取代的基团,其中在这样的保护基去保护时,接头片段化并从醇中消除。以下化合物是经醇保护基取代的醇的另一些实例:



[0194]



和

。

[0195] 在多个实施方案中,保护基G可以是酶可切割基团,其中通过目的分析物去除所述可切割基团,例如在存在能够切割所述酶可切割基团的酶的情况下,提供不稳定的随后分解并发光的酚盐-二氧杂环丁烷物质。例如,G可以是由两个或更多个可被特定酶切割的氨基酸残基组成的肽部分。

[0196] 在一些情况下,本文中所述的化合物(例如,式I至IV化合物)可以包含手性中心。本文中考虑了本文中所述化合物的所有非对映体以及外消旋体。

[0197] 本文中使用的术语“盐”是指所公开化合物的衍生物,其中母体化合物通过制备其酸或碱盐来修饰。盐的一些实例包括所公开化合物的离子化形式的碱盐和碱土盐。例如,锂盐、钠盐、钾盐、钙盐或镁盐。所公开化合物可以是包含阳离子金属和阴离子有机化合物的盐,例如具有含氧阴离子和钠阳离子的化合物。可药用盐的一些实例包括但不限于碱性基团(例如胺)的无机或有机酸盐;以及酸性基团(例如羧酸)的碱性盐或有机盐。可药用盐包括由例如无毒性无机或有机酸形成的母体化合物的常规无毒性盐或季铵盐。例如,这样的常规无毒性盐包括来源于无机酸的那些,所述无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸和硝酸;以及由有机酸制备的盐,所述有机酸例如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、双羟萘酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、草酸和羟乙基磺酸等。

[0198] 盐可以由包含碱性或酸性部分的母体化合物通过常规化学方法合成。在一些情况下,这样的盐可通过使这些化合物的游离酸或游离碱形式与化学计量(或更大)量的合适碱或酸在水中或在有机溶剂中或在二者的混合物中反应来制备;通常来说,优选非水性介质,如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。合适盐的列表见于Remington's Pharmaceutical Sciences,17th ed.,Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1985中。

[0199] 除非另有说明,否则在本说明书和权利要求书中使用的表示组分的量、分子量等的所有数字在所有情况下应被理解为由术语“约”修饰。本文中使用的与测量量相关的术语

“约”是指该测量量的变化,如本领域技术人员在进行测量并且进行与测量目的和所用测量设备的精度相称的护理水平时所将预期的。因此,除非另有相反指示,否则本说明书和权利要求书中阐述的数值参数是近似值,其可以根据通过本发明试图获得的期望特性而变化。至少,并且不试图将等同原则限制在权利要求书的范围内,每个数值参数应当至少根据报道的有效数字的数值并通过应用一般的舍入技术来解释。

[0200] 以范围形式表示的值应以灵活的方式解释,以不仅包括明确记载为范围界限的数值,而且还包括涵盖在该范围内的所有单独数值或子范围,如同每个数值和子范围被明确记载一样。例如,“0.1%至5%”或“0.1%至5%”的范围应解释为不仅包括如0.1%至5%,而且还包括单独值(例如,1%、2%、3%和4%)和在所示范围内的子范围(例如,0.1%至0.5%、1.1%至2.2%、3.3%至4.4%)。另外,术语“……范围”或“在……范围内”(以及类似的表述)包括所述范围的端点。在此,例如,“最多”数字(例如,“最多50”)包括该数字(例如,50)。

[0201] 在本文件中,除非上下文另有明确规定,否则没有数量词修饰的名词用于包括一个/种或者多于一个/种。除非另有说明,否则术语“或”用于是指非排他性的“或”。此外,术语“和/或”意指列出的要素中的一个或全部、或者列出的要素中的任何两个或更多个的组合。

[0202] 另外,应当理解,本文中采用的并且没有另外定义的措词或术语仅出于描述的目的而非限制性的。章节标题的任何使用旨在帮助阅读文件,而不应被解释为限制。此外,与章节标题相关的信息可在该特定章节之内或之外出现。此外,本文件中提及的所有出版物、专利和专利文件均通过引用整体并入本文,如同通过引用单独并入一样。如果本文件与通过引用并入的那些文件之间的使用不一致,则在并入的参考文献中的用法应被考虑为对本文件的用法的补充;对于相互矛盾的不一致情形,则应以本文件中的用法为准。

[0203] 在本文中描述的方法中,除了当明确记载时间或操作顺序时之外,可以在不脱离本发明的原理的情况下以任何顺序进行步骤。此外,除非明确的权利要求语言记载单独进行特定步骤,否则可以同时进行特定步骤。例如,要求保护的进行X的步骤和要求保护的进行Y的步骤可以在单个操作中同时进行,并且所得过程将落入要求保护的方法的文字范围内。

[0204] 术语“包含”及其变体在这些术语出现在本说明书和权利要求书中的情况下不具有限制性含义。这样的术语将被理解为暗指包括所述步骤或要素、或者步骤或要素的组,而不排除任何其他步骤或要素、或者步骤或要素的组。

[0205] “由……组成”意指包括并限于短语“由……组成”之后的任何内容。因此,短语“由……组成”表明所列出的要素是必需的或强制性的,并且不可能存在其他要素。“基本上由……组成”意指包括在该短语之后列出的任何要素,并且限于不干扰或有助于在本公开内容中所列出的要素的指定的活动或动作的其他要素。因此,短语“基本上由……组成”表明所列出的要素是必需的或强制性的,但其他要素是任选的并且可存在或可不存在,这取决于其是否实质上影响所列出的要素的活动或动作。

[0206] 除非另有说明,否则“一个(a)”、“一种(an)”、“该(the)”和“至少一个/种”可互换使用,并意指一个或多于一个。

[0207] 本领域的技术人员将理解,在不脱离本公开内容的精神和范围的情况下,对本文

中所述的实施方案的许多修改是可以的。因此,描述并非旨在并且也不应被解释为限于给出的示例,而是应被授予由所附权利要求书及其等同方案提供的全部保护范围。另外,可使用本公开内容的一些特征而不相应地使用其他特征。因此,提供前述描述或举例说明性实施方案的目的是为了举例说明本公开内容的原理而不是对其进行限制,并且可包括对其的修改和排列。

[0208] 实施例

[0209] 通过参照以举例说明的方式提供的以下实施例可以更好地理解本发明。本发明不限于本文给出的实例。

[0210] 一般性方法

[0211] 本公开内容的多种化合物可以根据多种方法合成,包括但不限于PCT国际申请WO1996/015122A1、美国专利No.4,962,192或美国专利No.5,004,565中描述的合成方法。

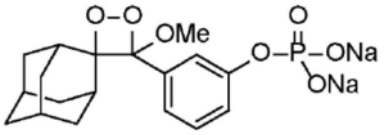
[0212] 化学发光(发射)强度可以使用Turner Designs(Sunnyvale,CA)型号TD-20e光度计、BMG Labtech发光板阅读器或电荷耦合装置(charge-coupled device,CCD)照相机光度计或任何其他合适的光强度测量装置来测量。在下面列出的实施例中,使用了包含不同浓度碱性磷酸酶的溶液(例如,AP4,其ALP浓度为1.2×10^{-15}mol/μL;AP6,其ALP浓度为1.2×10^{-17}mol/μL;AP8,其ALP浓度为1.2×10^{-19}mol/μL;和AP9,其ALP浓度为1.2×10^{-20}mol/μL)。化合物和表面活性剂在其近似最佳浓度下进行测试。如图5所示,作为ALP浓度的函数,聚合鏻表面活性剂中VPPD的RLU基本上是线性的(100μL的初始溶液与10μL ALP的溶液组合,数据在240秒内收集)。

[0213] 使用400MHz光谱仪在D_2O和$CDCl_3$的溶液中获得核磁共振(nuclear magnetic resonance,NMR)谱。

[0214] 基于胺的缓冲液“221”或“Sigma-221”可以从Sigma-Aldrich(St.Louis,MO)获得。但是在本文中所述的组合物中可以使用其他市售缓冲剂。

[0215] 实施例1

[0216] 二氧杂环丁烷化合物[Lumigen®PPD]获自Lumigen,Inc.,其具有以下结构:

[0217] 

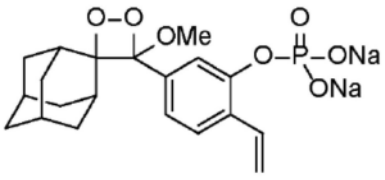
(PPD),

[0218] 在WO2021/086977中描述了PPD的合成(实施例12)。

[0219] ^1H NMR(400MHz,D_2O)δppm7.40-7.15(m,4H),3.24(s,3H),2.89(s,1H),2.28(s,1H),1.90-1.50(m,10H),1.28(d,J=13.2Hz,1H),0.99(d,J=10Hz,1H).

[0220] 实施例2

[0221] VPPD,其具有以下结构:

[0222] 

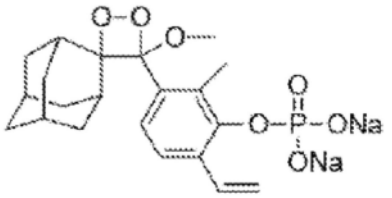
,

[0223] 是使用WO2021/086977中描述的方法获得的(实施例16)。

[0224] ^{1}H NMR(400MHz,D_2O)δppm7.67(d,J＝8.4Hz,1H),7.66(br,1H),7.26(br,1H),7.16-6.06(m,1H),5.88(d,J＝16Hz,1H),5.37(d,J＝12.4Hz,1H),3.27(s,3H),2.88(s,1H),2.30(s,1H),1.84-1.56(m,10H),1.28(d,J＝9.2Hz,1H),1.05(d,J＝12.8Hz,1H).

[0225] 实施例3

[0226] VMPD,其具有以下结构:

[0227] 

,

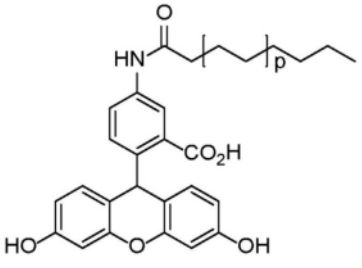
[0228] 是使用WO2021/086977中描述的方法获得的(实施例18)。

[0229] ^{1}H NMR(400MHz,D_2O)δppm(D_2Oppm):7.51-7.41(m,2H),7.29-7.20(m,1H),5.66(d,J＝17.2Hz,1H),5.19(d,J＝11.2Hz,1H),3.07(s,3H),2.72(s,1H),2.36(s,3H),1.99(s,1H),1.95-1.38(m,10H),1.19-1.15(m,1H),0.92-0.88(m,1H).

[0230] 实施例4

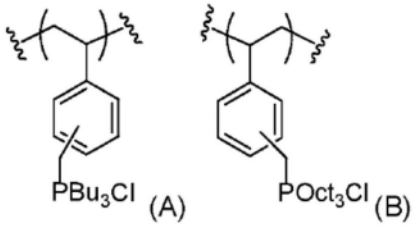
[0231] 在合适的缓冲液(例如221缓冲液)中制备实施例1至3的二氧杂环丁烷化合物与表面活性剂的初始溶液。对于每个实施例,所使用的二氧杂环丁烷浓度是在50mg/L至500mg/L范围内的浓度。下面进一步讨论的图2B示出了二氧杂环丁烷VPPD的不同浓度(在50mg/L至500mg/L的范围内),同时保持表面活性剂EXL浓度恒定。所使用的表面活性剂浓度在100mg/L至500mg/L的范围内。以下进一步讨论的图2C示出了表面活性剂EXL的不同浓度(在100mg/L至500mg/L的范围内),同时保持二氧杂环丁烷VPPD浓度恒定。二氧杂环丁烷化合物与表面活性剂的浓度比是在5:1至1:10范围内的单一比率。在一个实例中,二氧杂环丁烷浓度(例如VPPD)是100mg/L至150mg/L的浓度;表面活性剂浓度(例如,EXL)是200mg/L至300mg/L的浓度;二氧杂环丁烷(例如VPPD)与表面活性剂(例如EXL)的浓度比是在1:1至1:3范围内的比。测试的组合物包含50mg/L至500mg/L的氯化镁(II)($MgCl_2$),但也可以使用其他镁(II)盐。

[0232] 接下来,将100μL的初始溶液与10μL碱性磷酸酶(AP8)溶液在37℃下组合。在将化合物与碱性磷酸酶溶液组合之后,测量化学发光随时间的强度。图1和2A提供了示出特别地100μL初始溶液与10μL AP8溶液的组合的光发射强度(随时间的相对发光单位(RLU))的图,其中图1示出了LP530的RLU数据作为时间的函数。LP530中的与十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)组合的荧光素表面活性剂具有下式:

[0233] 

其中p是2至10的整数,例如5至9、或5至7的整数。

[0234] 在单独的实验中,使用了EXL表面活性剂。图2A提供了示出光发射强度(相对发光单位(RLU))随时间的图。EXL表面活性剂包含重复单元(A)、重复单元(B)或二者:

[0235] 

[0236] 其中“Bu_3”是指“三丁基”,“Oct_3”是指“三辛基”。所使用的重复单元(A)与重复单元(B)的摩尔比为4:1。图2B和2C是在多种VPPD浓度(50mg/L至500mg/L)和多种EXL表面活性剂浓度(100mg/L至500mg/L)下RLU随时间的图。在两个实验中,VPPD和表面活性剂的溶液与6μL AP8混合,然后在37℃下孵育。图2B和2C示出了与EXL和PPD相比,不同浓度的二氧杂环丁烷VPPD(同时保持表面活性剂EXL浓度恒定)或不同浓度的表面活性剂EXL(同时保持二氧杂环丁烷VPPD浓度恒定)提供了提高的发光(如以RLU测量的)。此外,注意,在图2B和2C中使用了6μL的AP8,在图2A中使用了10μL的AP8。使用10μL的AP8(未示出)观察到的RLU更高、变化更小,并且相对于EXL和PPD比使用6μL的AP8甚至提高更多。

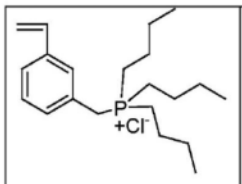
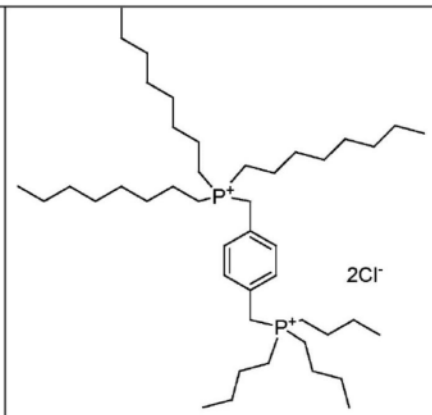
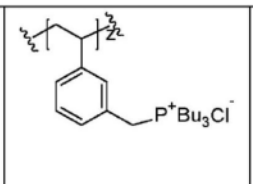
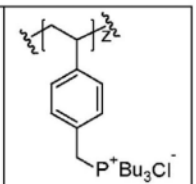
[0237] 图3示出了针对使用EXL表面活性剂的VPPD与VPPD、PPD和LP530相比观察到的发光的比较,其相对于EXL表面活性剂中的VPPD的强度归一化。

[0238] 从图1、2A至2C和3中观察到,相对于PPD和VMPD,VPPD在相对短的时间内(例如约4分钟)表现出更高的RLU,而与表面活性剂体系(LP530 vs.EXL表面活性剂)无关。但图3强调了在EXL中的VPPD相比于LP530之间在亮度上以RLU计的显著相对差异。例如,VPPD在EXL中的亮度是LP530的超过20倍高(在EXL表面活性剂中的约9,500RLU相对于LP530中的约380进行比较)。本文中所述组合物的一个益处是可以提高碱性磷酸酶的检测限。使用本文中所述的组合物,不仅可以检测AP10中的ALP(1.2×10^{-21}mol/μL ALP),还可以检测AP11和AP12中的ALP(分别为1.2×10^{-22}mol/μL和1.2×10^{-23}mol/μL ALP浓度)。

[0239] 实施例5

[0240] 使用以下表面活性剂/增强剂(1)至(4)制备了包含实施例4中描述的二氧杂环丁烷浓度、表面活性剂/增强剂浓度、氧杂环丁烷:表面活性剂比率和镁量的二氧杂环丁烷组合物:

[0241]

(1)	(2) *	(3)	(4)
			

[0242] *注意表面活性剂/增强剂2是1,4-和1,3-异构体的混合物。

[0243] 用于产生图4中数据的氧杂环丁烷和增强剂组合列于下表1中。

[0244]

	氧杂环丁烷	增强剂
A	VPPD	(1)
B	VPPD	(1)
C	VPPD	(2)
D	VPPD	(3)
E	VPPD	(4)
F	PPD	荧光素

[0245] 图4示出了相比于LP530,当与AP8混合时针对使用表面活性剂/增强剂(1)至(4)的VPPD观察到的发光的比较。特别地,将100μL包含VPPD和表面活性剂/增强剂的溶液与10μL AP8混合,然后在37℃下孵育。

[0246] 从图4中观察到,相比于LP530,鏻表面活性剂/增强剂(不管它们是聚合物还是小分子鏻表面活性剂/增强剂)中的VPPD在相对短的时间(例如,约4分钟)内产生显著更高的RLU。另一个观察结果是小分子鏻表面活性剂(2)和聚合鏻表面活性剂/增强剂(4)在4分钟时具有约相同的RLU。并且异构聚合表面活性剂/增强剂(3)和(4)之间在4分钟时(及以后)的RLU似乎有差异,其中(3)比(4)更亮。

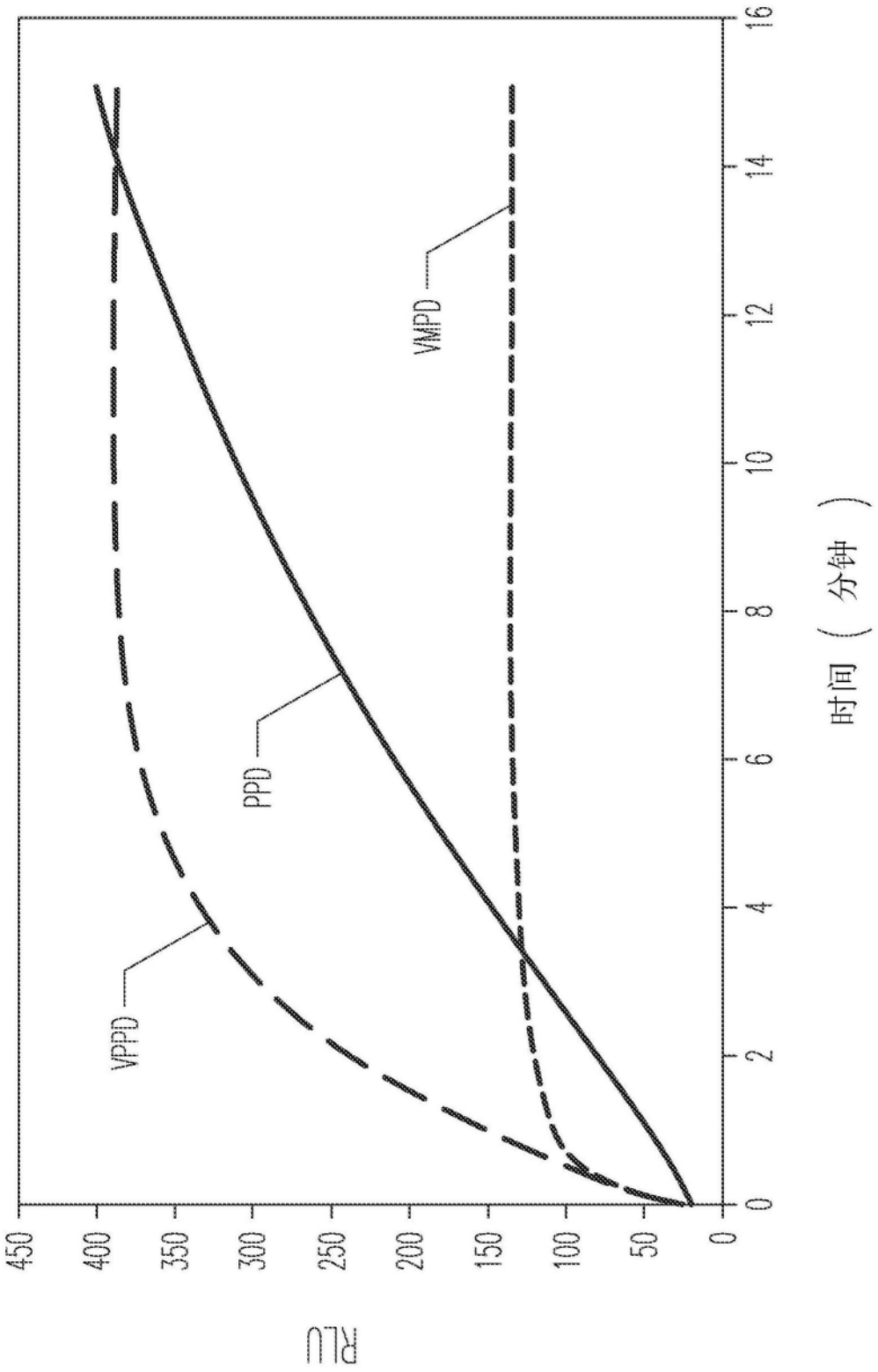

RLU
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
时间（分钟）
VPPD
PPD
VMPD

图1

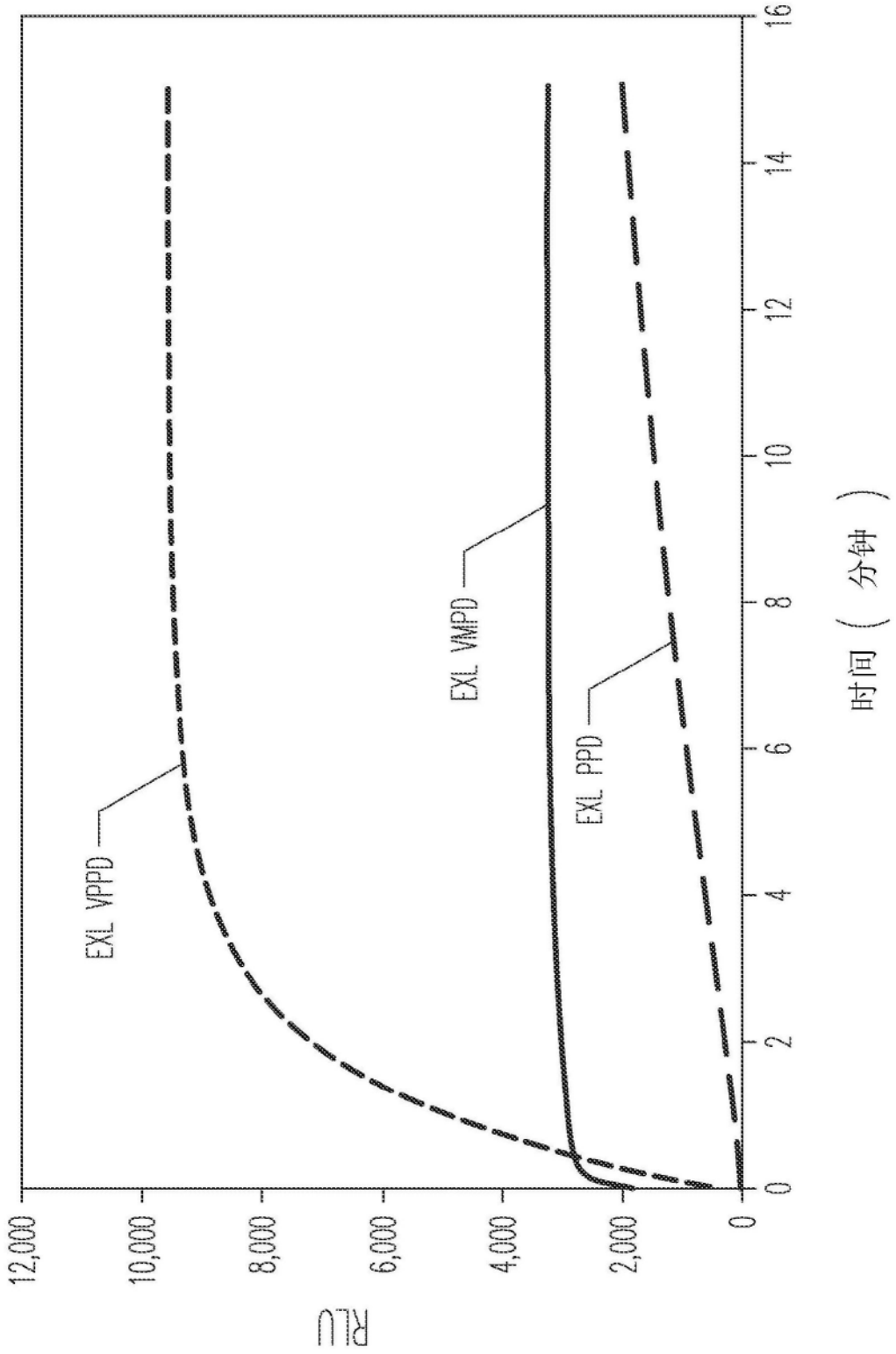

RLU
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
时间（分钟）
EXL VPPD
EXL VMPD
EXL PPD

图2A

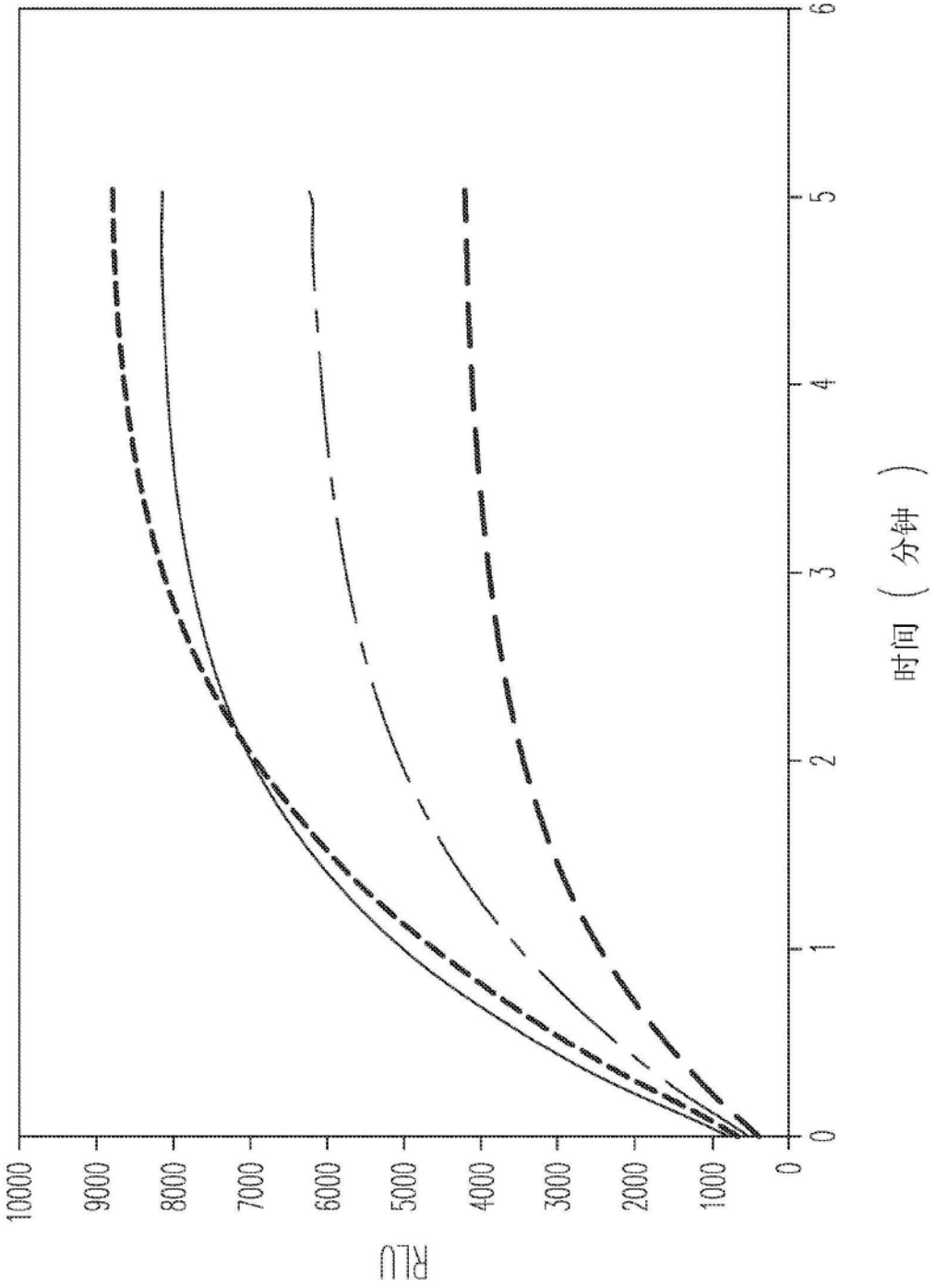

RLU
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
1
2
3
4
5
6
时间（分钟）

图2B

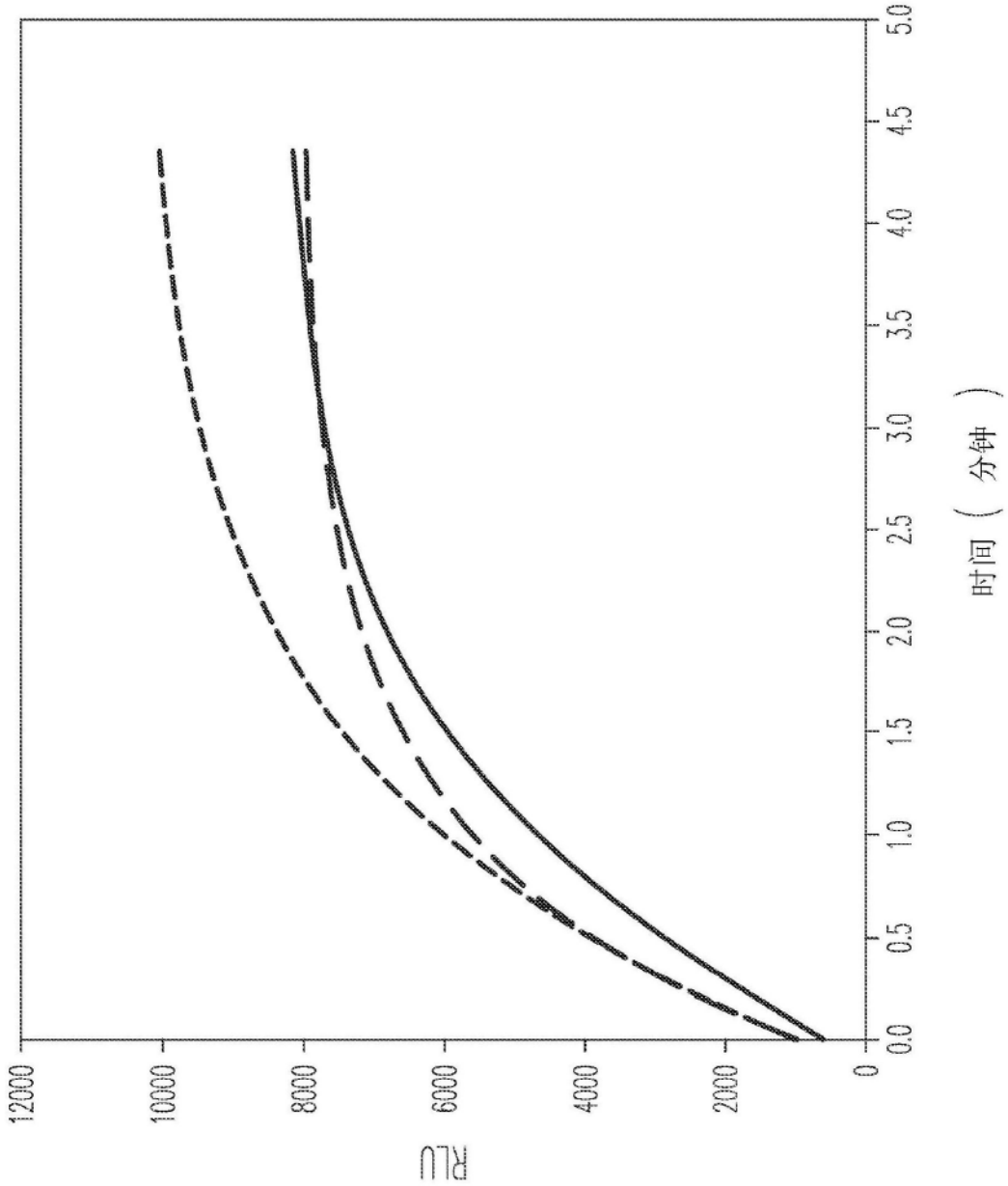

RLU
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
时间（分钟）

图2C

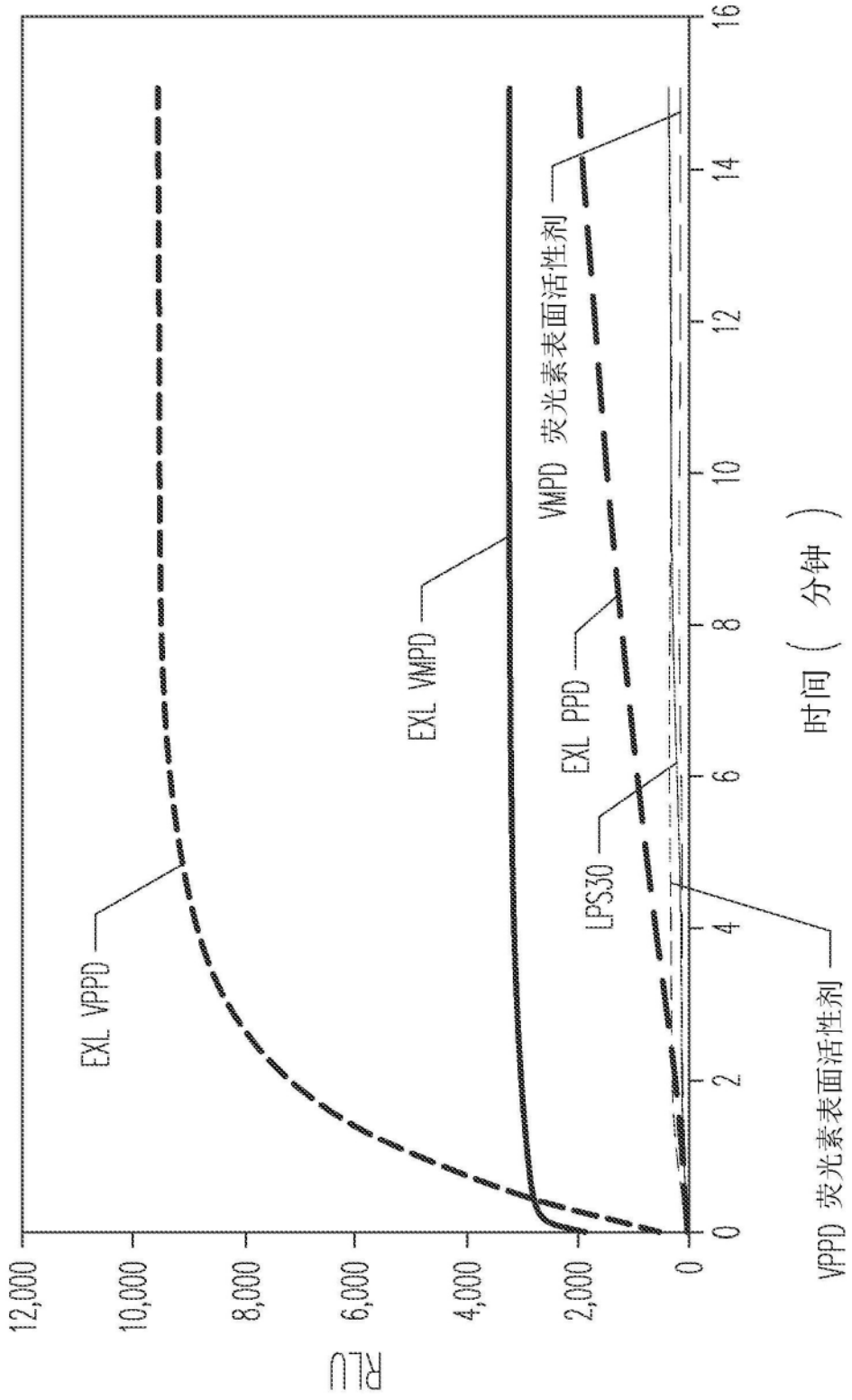

RLU
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
时间（分钟）
EXL VPPD
EXL VMPD
VMPD 荧光素表面活性剂
EXL PPD
LPS30
VPPD 荧光素表面活性剂

图3

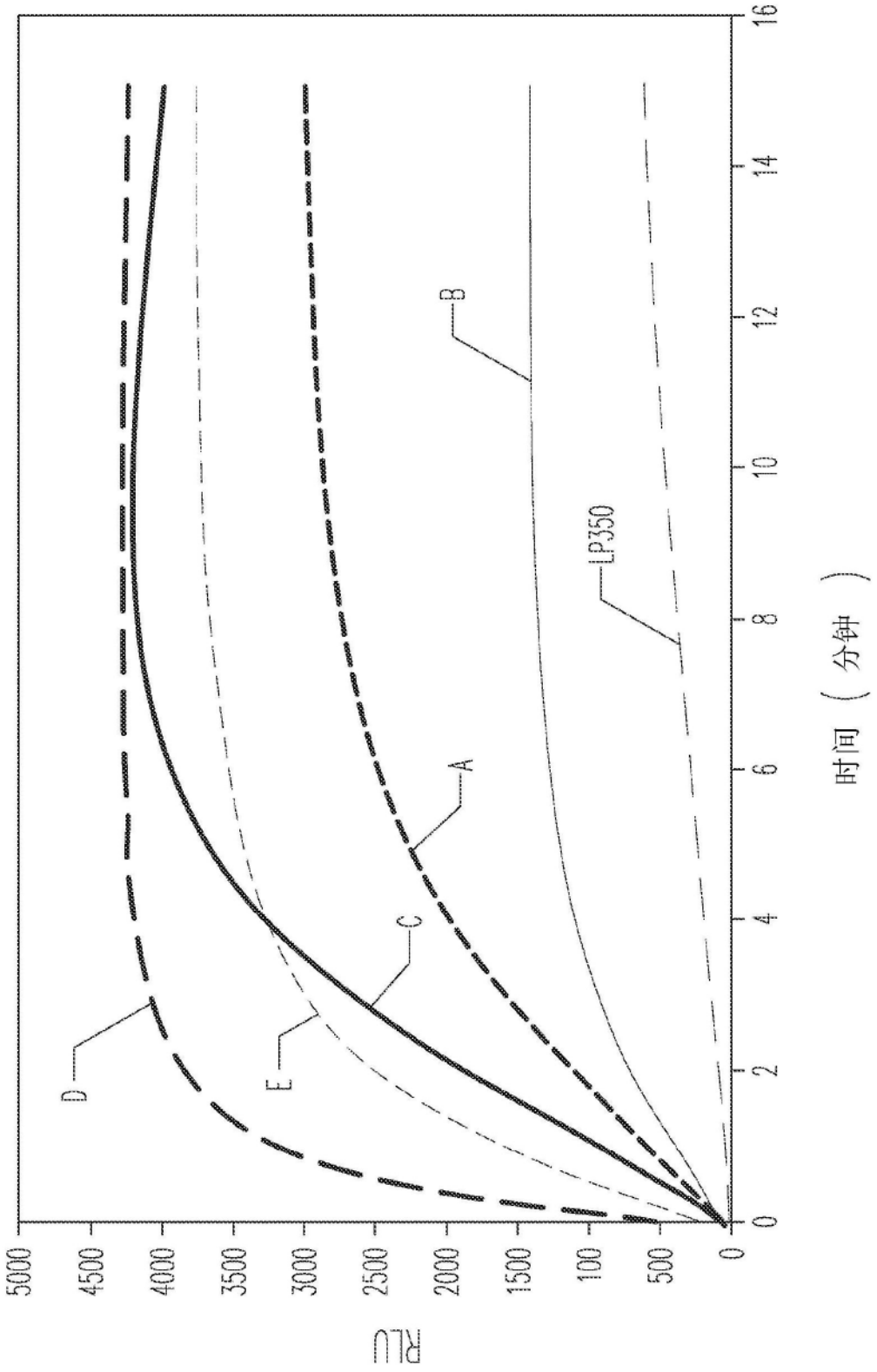

RLU
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
100
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
时间（分钟）
A
B
C
D
E
LP350

图4

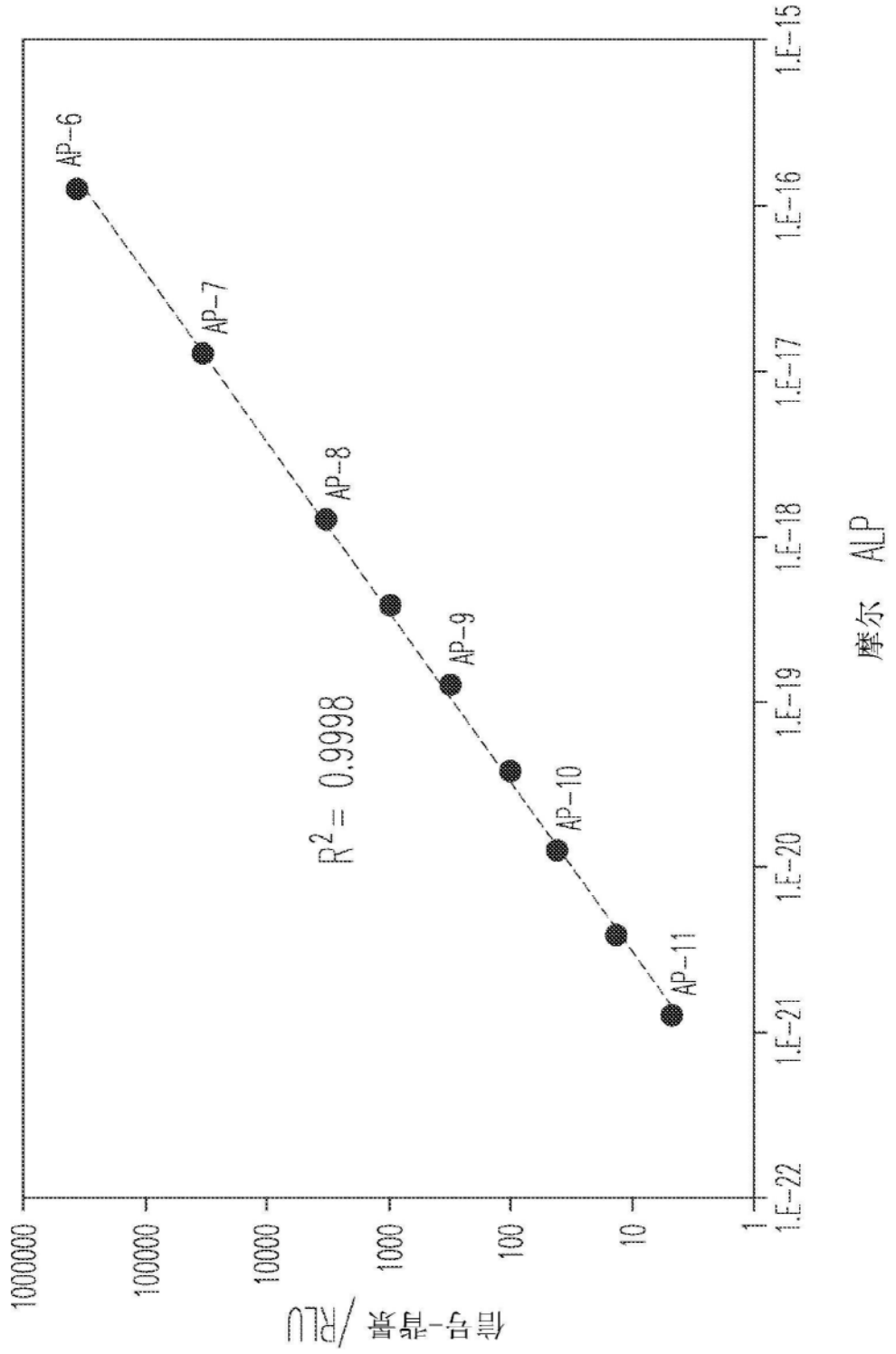

AP-6
AP-7
AP-8
AP-9
AP-10
AP-11
R^2 = 0.9998
信号-背景 /RLU
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
1.E-22
1.E-21
1.E-20
1.E-19
1.E-18
1.E-17
1.E-16
1.E-15
摩尔 ALP

图5

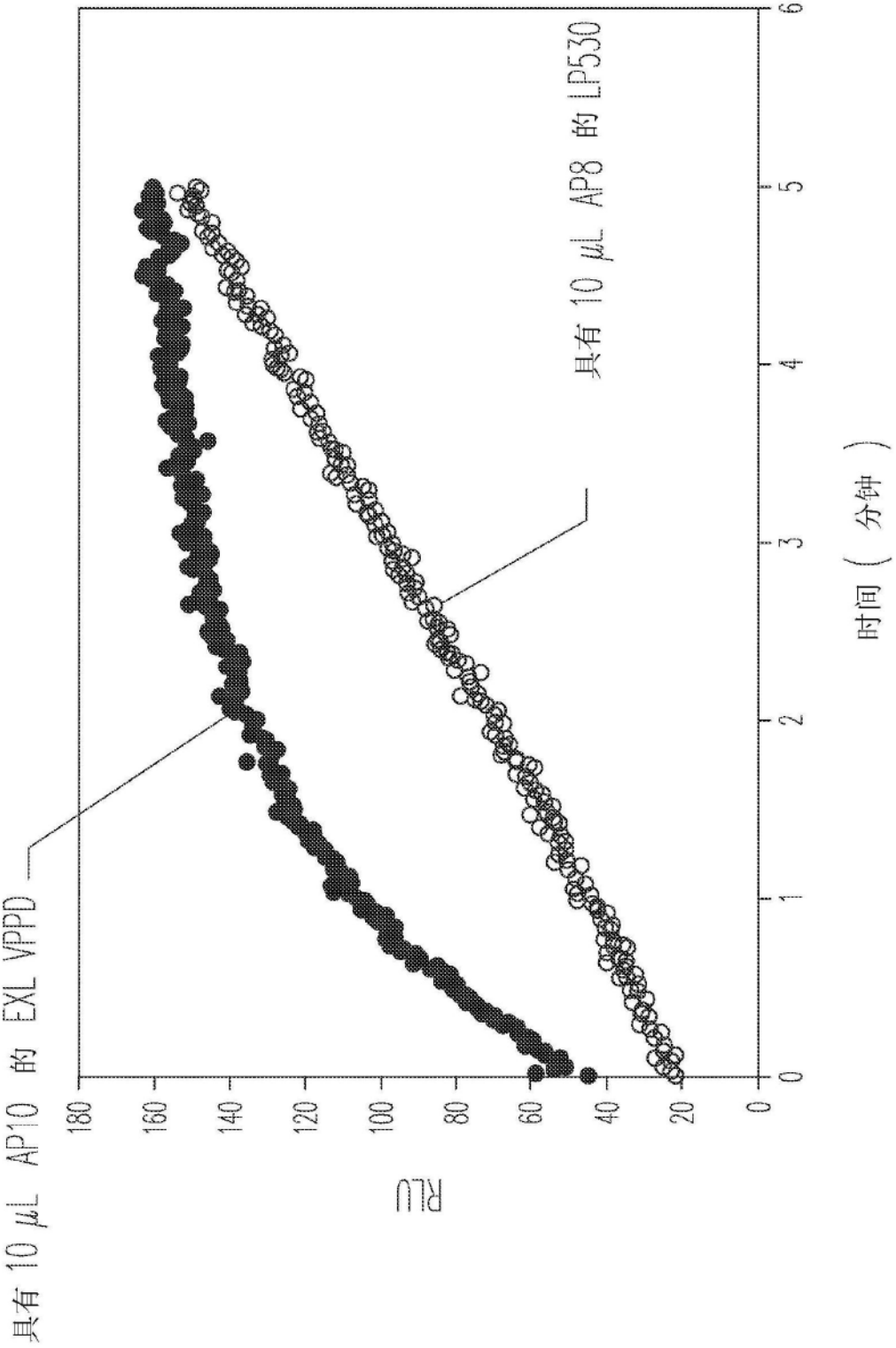

具有 10 μL AP10 的 EXL VPPD
具有 10 μL AP8 的 LP530
RFU
时间（分钟）
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
0
1
2
3
4
5
6

图6

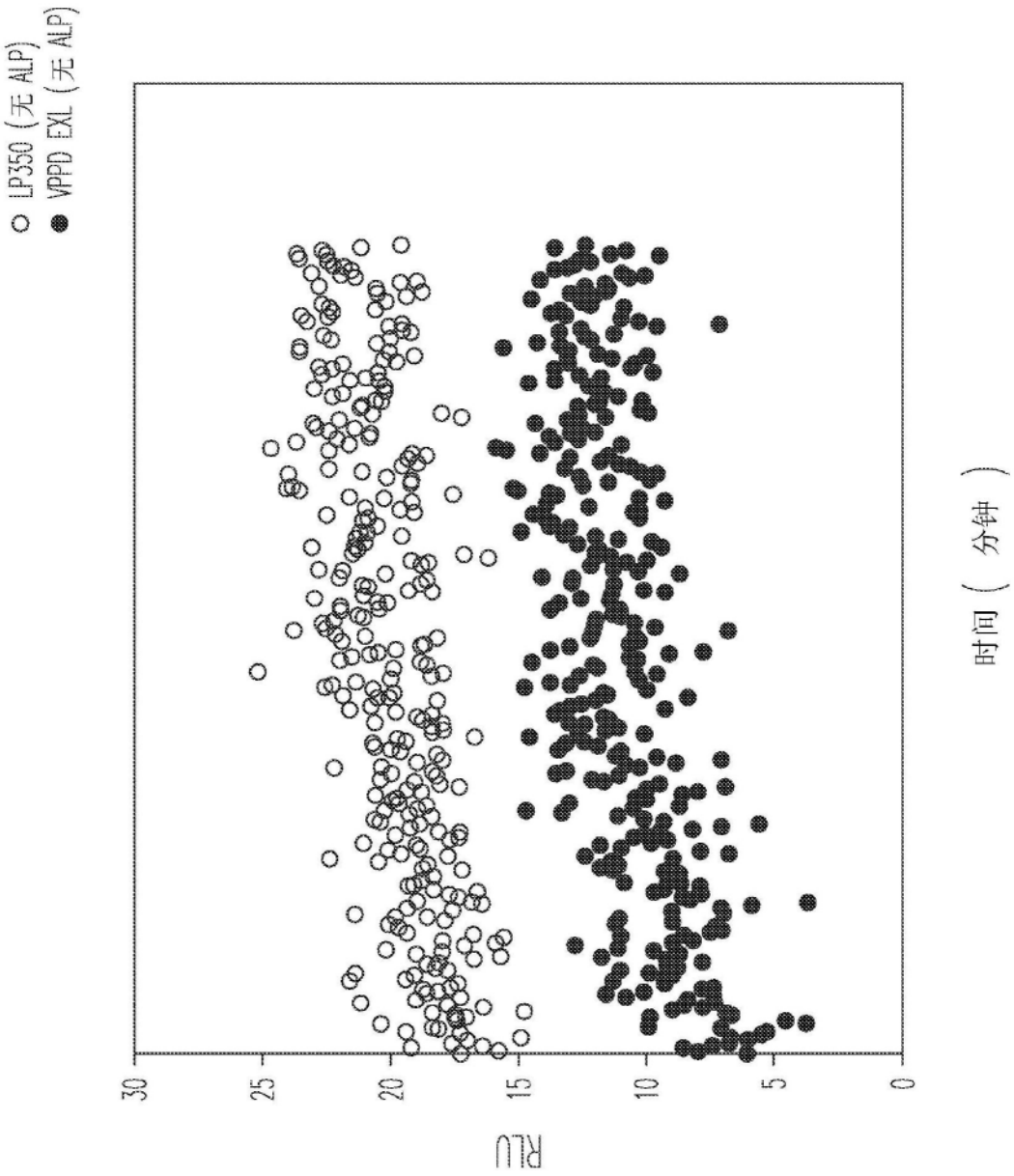


图7