(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105264377 B
(45)授权公告日 2017.09.08

(21)申请号 201480027784.5

(22)申请日 2014.05.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105264377 A

(43)申请公布日 2016.01.20

(30)优先权数据
61/823162 2013.05.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.11.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/037914 2014.05.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/186406 EN 2014.11.20

(73)专利权人 西门子医疗保健诊断公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 A.纳特拉延 温大伟

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 周铁 林森

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件
CN 102311731 A,2012.01.11,全文.
CN 101226200 A,2008.07.23,全文.
US 4927769 A,1990.05.22,全文.
方国桢等.表面活性剂在化学发光分析中的应用.《化学试剂》.1996,第18卷(第6期),第333-336页.
Dantoni,P等.Effect of some surfactants on the chemiluminescent reactions of bis(2,4,6-trichiorophenyl) oxalate and bis(2-nitrophenyl)oxalate with hydrogen peroxide.《CANADIAN JOURNAL OF CHEMISTRY-REVUE CANADIENNE DE CHIMIE》.2012,第90卷(第6期),第534-541页.

审查员 刘莉丹

权利要求书3页 说明书12页 附图6页

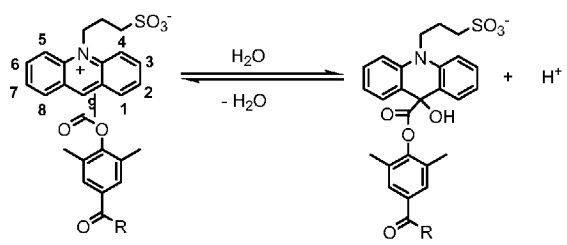
(54)发明名称

可降解的阳离子型表面活性剂及其在增强化学发光中的用途

(57)摘要

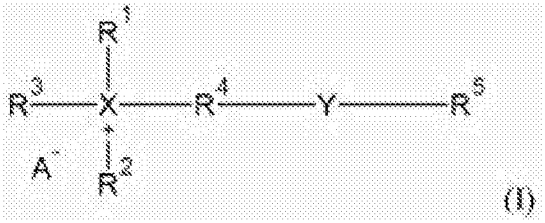
本发明涉及增强来自化学发光标记物的化学发光的方法,所述方法包括在可降解的阳离子型表面活性剂的存在下使化学发光标记物与酸和过氧化氢接触,随后加入碱。还提供了含有这样的可降解的阳离子型表面活性剂的相关试剂盒。所述可降解的阳离子型表面活性剂可以将所述化学发光标记物的光发射时间压缩至与常规表面活性剂相当或比其更短的程度。所述可降解的阳离子型表面活性剂还可以增强所述化学发光标记物的化学发光,提供与常规表面活性剂相当的光发射输出。

A



CN 105264377 B

1.增强来自化学发光标记物的化学发光的方法，所述方法包括在具有式I的可降解的阳离子型表面活性剂的存在下使化学发光标记物与酸和过氧化氢接触：



其中：

X是氮或磷；

R^1、R^2和R^3各自独立地选自氢和烷基、烯基、炔基、环烷基或芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子；

R^4和R^5各自独立地选自烷基、烯基、炔基、环烷基或芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子；

Y是可分裂的键并且在水解条件下是可降解的；和

A^-是对X^+的抗衡阴离子。

2.权利要求1的方法，其中所述化学发光标记物是吖啶鎓二甲基苯基酯、吖啶鎓磺酰胺、或其衍生物或缀合物。

3.权利要求1的方法，其进一步包括压缩所述化学发光标记物的光发射时间，从而提供相比不存在表面活性剂的标准发射时间得以压缩的光发射时间，其中所述压缩的发射时间与十六烷基三甲基氯化铵的压缩的发射时间相当。

4.权利要求3的方法，其中所述压缩的发射时间短于十六烷基三甲基氯化铵的压缩的发射时间。

5.权利要求3的方法，其中所述压缩的发射时间比十六烷基三甲基氯化铵的压缩的发射时间短约20%。

6.权利要求3的方法，其中所述压缩的发射时间比十六烷基三甲基氯化铵的压缩的发射时间短约30%。

7.权利要求3的方法，其中所述压缩的发射时间比十六烷基三甲基氯化铵的压缩的发射时间短约50%。

8.权利要求1的方法，其中所述表面活性剂在增强所述化学发光标记物的总光产额方面与十六烷基三甲基氯化铵同样有效。

9.权利要求1的方法，其进一步包括增强所述化学发光标记物的化学发光，从而提供相比不存在表面活性剂的标准光发射得以增强的光发射，其中所述增强的光发射与十六烷基三甲基氯化铵的增强的光发射相当。

10.权利要求9的方法，其中所述增强的光发射相比于所述不存在表面活性剂的标准光发射增强了至少约2.5倍。

11.权利要求9的方法，其中所述增强是十六烷基三甲基氯化铵的增强的至少约70%。

12.权利要求9的方法，其中所述增强是十六烷基三甲基氯化铵的增强的至少约80%。

13.权利要求9的方法，其中所述增强是十六烷基三甲基氯化铵的增强的至少约90%。

14.权利要求9的方法，其中所述表面活性剂在压缩所述化学发光标记物的发射时间方

面与十六烷基三甲基氯化铵至少同样有效。

15.权利要求1的方法，其中R^1、R^2和R^3各自独立地为C_{1-10}烷基、C_{2-10}烯基、C_{2-10}炔基、C_{3-10}环烷基或C_{4-10}芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子。

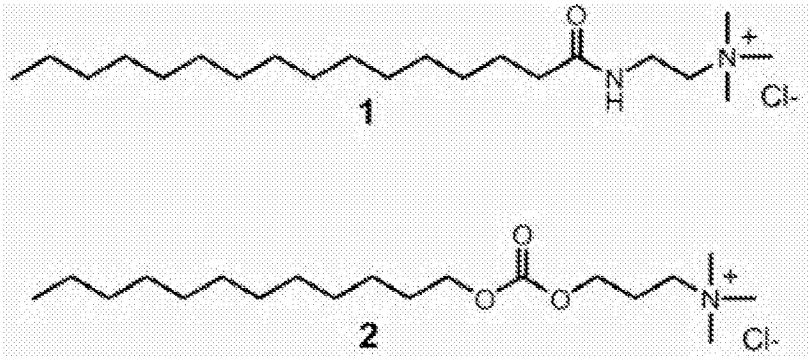
16.权利要求1的方法，其中R^4是C_{1-20}烷基、C_{2-20}烯基、C_{2-20}炔基、C_{3-20}环烷基或C_{4-20}芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子。

17.权利要求1的方法，其中R^5是C_{1-30}烷基、C_{2-30}烯基、C_{2-30}炔基、C_{3-30}环烷基或C_{4-30}芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子。

18.权利要求1的方法，其中Y选自碳酸酯键、酰胺键、酯键、或其任意组合。

19.权利要求1的方法，其中A^-是氯根、溴根、碘根、硫酸根、磺酸根或氢氧根离子。

20.权利要求1的方法，其中所述表面活性剂是化合物1或化合物2或其混合物：

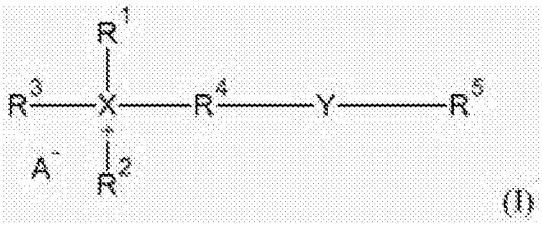


。

21.免疫检测试剂盒，其包含：

a) 化学发光标记物，其具有吖啶鎓二甲基苯基酯、吖啶鎓磺酰胺、或其衍生物或缀合物；

b) 酸化试剂，其包括酸、过氧化氢和具有式I的可降解的阳离子型表面活性剂：



其中：

R^1、R^2和R^3各自独立地选自氢和烷基、烯基、炔基、环烷基或芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子；

R^4和R^5各自独立地选自烷基、烯基、炔基、环烷基或芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子；

Y是可分裂的键并且在水解条件下是可降解的；和

A^-是对X^+的抗衡阴离子；和

c) 碱性试剂，其包括碱性氢氧化物。

22.权利要求21的试剂盒，其中所述化学发光标记物是吖啶鎓二甲基苯基酯、吖啶鎓磺酰胺、或其衍生物或缀合物。

23.权利要求21的试剂盒，其中R^1、R^2和R^3各自独立地为C_{1-10}烷基、C_{2-10}烯基、C_{2-10}炔基、C_{3-10}环烷基或C_{4-10}芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子。

24.权利要求21的试剂盒，其中R^4是C_{1-20}烷基、C_{2-20}烯基、C_{2-20}炔基、C_{3-20}环烷基或C_{4-20}芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子。

25.权利要求21的试剂盒，其中R^5是C_{1-30}烷基、C_{2-30}烯基、C_{2-30}炔基、C_{3-30}环烷基或C_{4-30}芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子。

26.权利要求21的试剂盒，其中Y选自碳酸酯键、酰胺键、酯键、或其任意组合。

27.权利要求21的试剂盒，其中A^-是氯根、溴根、碘根、硫酸根、磺酸根或氢氧根离子。

28.权利要求21的试剂盒，其中当使用时，所述表面活性剂提供了相比不存在表面活性剂的标准发射时间得以压缩的所述化学发光标记物的发射时间，其中所述压缩的发射时间与十六烷基三甲基氯化铵的压缩的发射时间相当。

29.权利要求21的试剂盒，其中当使用时，所述表面活性剂展现出相比于不存在表面活性剂的标准光发射得以增强的所述化学发光标记物的光发射，其中所述增强的光发射与十六烷基三甲基氯化铵的增强的光发射相当。

30.权利要求21的试剂盒，其中所述酸是硝酸并且所述碱性氢氧化物是氢氧化钠。

可降解的阳离子型表面活性剂及其在增强化学发光中的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年5月14日提交的美国临时申请序列号61/823,162的优先权，其通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于增强吖啶鎓化合物的化学发光的环境友好、可降解的阳离子型表面活性剂。还提供了相关方法和试剂盒。

背景技术

[0004] 化学发光的吖啶鎓二甲基苯基酯是用于在自动化免疫检测(诸如Siemens Healthcare Diagnostics的ADVIA:Centaur®系统)中测量广泛的临床上重要的分析物的高灵敏度的标记物(图1B)。在每个检测结束时，来自吖啶鎓酯标记物的光发射通过依次加入两种试剂来引发。采用0.3毫升的0.1摩尔硝酸(还含有0.5%过氧化氢)的初始处理将所述吖啶鎓酯的非化学发光的假碱(图1A)转化成所述标记物的化学发光的吖啶鎓形式。随后加入0.3毫升的0.25摩尔氢氧化钠(还含有7毫摩尔的阳离子型表面活性剂十六烷基三甲基氯化铵(CTAC))使过氧化氢离子化并引发光发射。所述表面活性剂CTAC在吖啶鎓酯的化学发光过程中起着非常重要的作用(Natrajan等人，Org.Biomol.Chem.,2011, 9, 5092-5103)。CTAC将所述标记物的发射时间从约60秒压缩至<5秒。CTAC还使来自吖啶鎓酯标记物及其缀合物的整体光输出增强了3-4倍。更快的光发射和增强的光输出实现了在自动化仪器(诸如Siemens Healthcare Diagnostics的ADVIA:Centaur®系统)中的快速且灵敏的检测。

[0005] 在所述ADVIA:Centaur®系统上执行的每个免疫检测试验消耗约0.7毫克的CTAC。世界范围内在所述ADVIA:Centaur®系统上执行的非常大量的免疫检测试验(在仅2012年基于一项估量就有>500,000,000次试验)导致这种阳离子型表面活性剂的相当大的年使用量(>350 kg)。当阳离子型表面活性剂(诸如CTAC)被排放到环境中时，人们认为其对水生生物的毒性是相当大的(Nałęcz-Jawecki等人，Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003, 54, 87-91;Pantani等人, Bull. Environ. Contamin. Toxicol., 1995, 55, 179-186;Kümmurer等人，J. Chromatogr. A, 1997, 774, 281-286;Sütterlin等人, Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008, 71, 498-505;Roberts和Costello, QSAR, 2003, 22, 220-225;Leeuwen 等人, Chemosphere, 1992, 24, 629-639)。虽然阳离子型表面活性剂在有氧条件下通过微生物降解，但是在缺氧条件下它们是持久存在的，并显示出极少的生物降解，从而给水生生物带来了严重的环境风险(Ying,Environment International, 2006, 32, 417-431;Maden在Biodegradability and Toxicity of Surfactants中, Handbook of Detergents Part B: Environmental Impact, U. Zoller, Editor, Marcel Dekker, 2004, 第211-248页;Ying在Distribution, Behavior, Fate and Effects of Surfactants and their Degradation Products in the Environment中, Handbook of Detergents Part B: Environmental Impact, U.

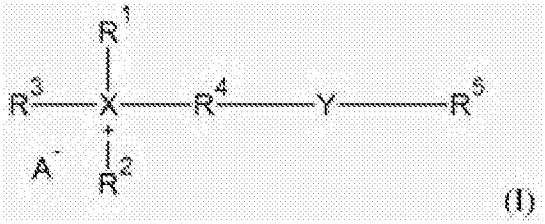
Zoller, Editor, Marcel Dekker, 2004, 第77-109页)。

[0006] 因此,一直以来都保有对采用可降解且环境友好(“绿色”)的表面活性剂来替代CTAC,同时保持增强化学发光效率的需要。因此,本发明的一个目的是提供在增强化学发光方面至少与CTAC同样有效的绿色表面活性剂。

发明内容

[0007] 根据上述和其它目的,已经令人惊讶地发现,通过将可降解的表面活性剂并入光引发试剂中以将化学发光的吖啶鎓化合物的化学发光增强至与常规表面活性剂(诸如CTAC)的化学发光至少相当的程度。在针对广泛使用的吖啶鎓标记物的光引发试剂中使用这些环境友好的表面活性剂是对常规阳离子型表面活性剂CTAC的绿色替代,且在一些实施方案中是意外地更有效的替代。

[0008] 在一个方面,提供了一种增强来自化学发光标记物的化学发光的方法,所述方法包括在具有式I的可降解的阳离子型表面活性剂的存在下使化学发光标记物与酸和过氧化氢接触:

[0009] 

[0010] 其中:

[0011] X是氮或磷;

[0012] R^1、R^2和R^3各自独立地选自氢和烷基、烯基、炔基、环烷基或芳烷基,其任选地具有一个或多个杂原子;

[0013] R^4和R^5各自独立地选自烷基、烯基、炔基、环烷基或芳烷基,其任选地具有一个或多个杂原子;

[0014] Y是可分裂的键;和

[0015] A^-是对X^+的抗衡阴离子。

[0016] 在一些实施方案中,所述化学发光标记物可以是吖啶鎓二甲基苯基酯、吖啶鎓磺酰胺、或其衍生物或缀合物。所述酸可以是硝酸。

[0017] 在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括压缩所述化学发光标记物的光发射时间,从而提供相比不存在表面活性剂的标准发射时间得以压缩的发射时间,其中所述压缩的发射时间与十六烷基三甲基氯化铵的压缩的发射时间相当。例如,所述压缩的发射时间可以短于(例如,短约20%、约30%或约50%)十六烷基三甲基氯化铵的压缩的发射时间。在一个实施方案中,本发明的表面活性剂在增强所述化学发光标记物的总光产额方面与十六烷基三甲基氯化铵同样有效。

[0018] 在一些实施方案中,所述方法可以进一步包括增强所述化学发光标记物的化学发光,从而提供比不存在表面活性剂的标准光发射增强的光发射,其中所述增强的光发射与十六烷基三甲基氯化铵的增强的光发射相当。例如,所述增强的光发射相比于不存在表面活性剂的标准光发射可以增强至少约2.5倍。在某些实施方案中,所述增强可以是十六烷基

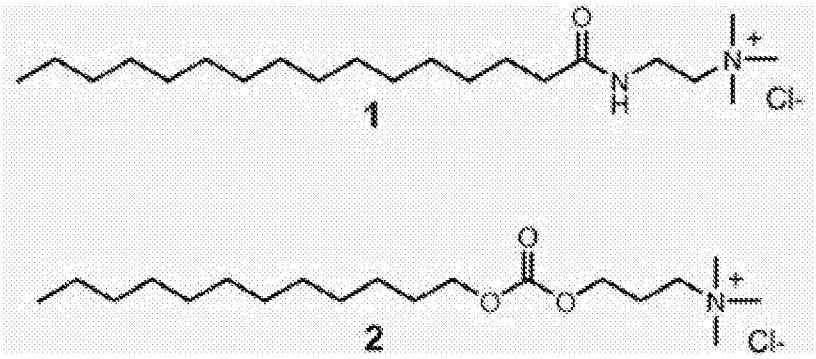
三甲基氯化铵的增强的至少约70%、至少约80%或至少约90%。在一个实施方案中，本发明的表面活性剂在压缩所述化学发光标记物的发射时间方面与十六烷基三甲基氯化铵至少同样有效。

[0019] 在各种实施方案中，R^1、R^2和R^3可以各自独立地为C_{1-10}烷基、C_{2-10}烯基、C_{2-10}炔基、C_{3-10}环烷基或C_{4-10}芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子。R^4可以是C_{1-20}烷基、C_{2-20}烯基、C_{2-20}炔基、C_{3-20}环烷基或C_{4-20}芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子。R^5可以是C_{1-30}烷基、C_{2-30}烯基、C_{2-30}炔基、C_{3-30}环烷基或C_{4-30}芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子。

[0020] 在某些实施方案中，Y在水解条件下可以是可降解的。例如，Y可以选自碳酸酯键、酰胺键、酯键、或其任意组合。

[0021] 在一些实施方案中，A^-可以是氯根、溴根、碘根、硫酸根、磺酸根或氢氧根离子。

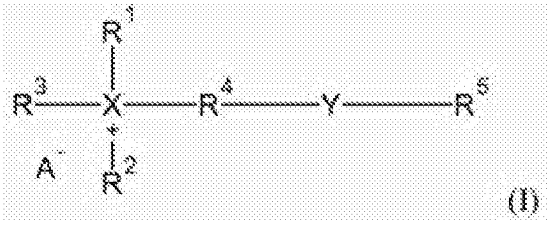
[0022] 在一些情况下，本发明的表面活性剂可以是化合物1或化合物2或其混合物：

[0023] 

[0024] 在本发明的另一个方面，提供了一种免疫检测试剂盒，所述试剂盒包含：

[0025] a) 化学发光标记物，其具有吖啶鎓二甲基苯基酯、吖啶鎓磺酰胺、或其衍生物或缀合物；

[0026] b) 酸化试剂，其包括酸、过氧化氢和具有式I的可降解的阳离子型表面活性剂：

[0027] 

[0028] 其中：R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、Y 和A^-基团如本文中描述来定义；和

[0029] c) 碱性试剂，其包括碱性氢氧化物。

[0030] 在一些实施方案中，所述化学发光标记物可以是吖啶鎓二甲基苯基酯、吖啶鎓磺酰胺、或其衍生物或缀合物。

[0031] 在各种实施方案中，当使用时，本发明的表面活性剂可以提供相比不存在表面活性剂的标准发射时间得以压缩的所述化学发光标记物的发射时间，其中所述压缩的发射时间与十六烷基三甲基氯化铵的压缩的发射时间相当(例如大致相同、或比其短约20%、约30%或约50%)。

[0032] 在某些实施方案中，当使用时，本发明的表面活性剂可以展现出相比于不存在表面活性剂的标准光发射增强的所述化学发光标记物的光发射，其中所述增强的光发射与十六烷基三甲基氯化铵的增强的光发射相当(例如，至少约70%、至少约80%或至少约90%)。

[0033] 在一些实例中，所述酸可以是硝酸。所述碱性氢氧化物可以是氢氧化钠。

[0034] 参考以下详细描述(包括所附权利要求)将更好地理解本发明的这些和其它方面。

附图说明

[0035] 图1A:N-磺丙基吖啶鎓二甲基苯基酯的吖啶鎓-假碱平衡。

[0036] 图1B:用于Siemens Healthcare Diagnostics 的ADVIA:Centaur®系统中自动化免疫检测中的在吖啶鎓环中含有N-磺丙基基团的化学发光吖啶鎓二甲基苯基酯标记物的结构。

[0037] 图2A:含有可分裂的键的示例性阳离子型表面活性剂(1和2)的结构 (CMC = 临界胶束浓度)。

[0038] 图2B:在当前的研究中用于制备抗TSH抗体缀合物的示例性吖啶鎓酯(3a、3b和3c)的结构(TSH =促甲状腺激素)。

[0039] 图3:针对具有可分裂的酰胺键的阳离子型表面活性剂1的示例性合成方案。

[0040] 图4:针对具有可分裂的碳酸酯键的阳离子型表面活性剂2的示例性合成方案。

[0041] 图5:在不存在和存在阳离子型表面活性剂下的吖啶鎓酯3a的抗TSH抗体缀合物的化学发光发射曲线。(RLU =相对光单位)。

[0042] 图6:在不存在和存在阳离子型表面活性剂下的吖啶鎓酯3b的抗TSH抗体缀合物的化学发光发射曲线。

[0043] 图7:在不存在和存在阳离子型表面活性剂下的吖啶鎓酯3c的抗TSH抗体缀合物的化学发光发射曲线。

[0044] 详细说明

[0045] 本发明涉及增强来自化学发光标记物的化学发光的方法，所述方法包括在可降解的阳离子型表面活性剂的存在下使化学发光标记物与酸和过氧化氢接触。还提供了含有这样的可降解的阳离子型表面活性剂的相关试剂盒。所述可降解的阳离子型表面活性剂可以将所述化学发光标记物的光发射时间压缩至与常规表面活性剂相当或比其更短的程度。所述可降解的阳离子型表面活性剂还可以增强所述化学发光标记物的化学发光，提供与常规表面活性剂相当的增强的光发射。

[0046] 为了解决常规阳离子型表面活性剂的生物降解性差(特别是在缺氧条件下)的问题，本发明在阳离子型表面活性剂的四价头基和烷基链之间引入了可分裂的键。在本发明中，令人惊讶地发现，含有可分裂的键(例如，碳酸酯或酰胺)的阳离子型表面活性剂在增强来自吖啶鎓酯的化学发光方面与CTAC至少同样有效。在针对广泛使用的吖啶鎓标记物的光引发试剂中使用这些环境友好的表面活性剂是对常规阳离子型表面活性剂CTAC的绿色替代。

[0047] 定义

[0048] 为了方便起见，将在本说明书、实施例和所附权利要求书中采用的某些术语收集在这里。除非另有定义，否则本文中使用的所有技术术语和科学术语具有与由本发明所属领域中的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0049] 如本文所用，下面的术语和短语旨在具有以下含义：

[0050] 冠词“一个”和“一种”在本文中用于指一个或多于一个(即，至少一个)的该冠词的

语法对象。例如，“一个元件”是指一个元件或多于一个元件。

[0051] 如本文所用，术语“约”是指在20%以内、在10%以内、或在5%以内。

[0052] 如本文所用的术语“相当”是指第一化合物(例如，第一表面活性剂)的性能与第二化合物(例如，第二表面活性剂)的性能大致相同、或类似、或等同。例如，当本发明的绿色表面活性剂的性能(例如，压缩的发射时间或增强的光发射)被称为“与十六烷基三甲基氯化铵的性能相当”时，是指这样的性能与十六烷基三甲基氯化铵大致相同、差别在20%以内、在10%以内、或在5%以内。在一些实例中，本发明的绿色表面活性剂可以在光发射方面展现出比十六烷基三甲基氯化铵更好的特性。

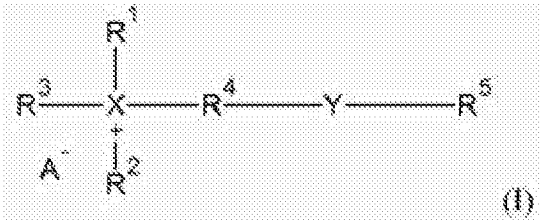
[0053] 一般地，术语“表面活性剂”是指降低液体的表面张力、两种液体之间的界面张力、或液体和固体之间的界面张力的化合物。表面活性剂通常是两亲性的化学物质，这意味着它们同时包含疏水性的“头”基和亲水性的“尾”基。最常见地，根据极性头基来给表面活性剂分类。非离子型表面活性剂在其头部中不具有电荷基团。离子型表面活性剂的头部携带净电荷。如果所述电荷是负的，则所述表面活性剂被更具体地称为阴离子型表面活性剂；如果所述电荷是正的，则它被称为阳离子型表面活性剂。如果表面活性剂含有具有两个带相反电荷基团的头部，则它被称为两性离子型表面活性剂。

[0054] “胶束”是分散在液体胶体中的表面活性剂分子的聚集体。水性溶液中典型的胶束形成具有与周围溶剂接触的亲水性头部区域，在胶束中心截存着疏水性尾部区域的聚集体。这种类型的胶束被称为正相胶束(水包油型胶束)。反相胶束在中心具有头基，而尾部伸出(油包水型胶束)。当表面活性剂的浓度大于临界胶束浓度(CMC)时可以形成胶束。胶束可以以不同的形状存在，包括球形、圆柱形和盘状。

[0055] 绿色表面活性剂

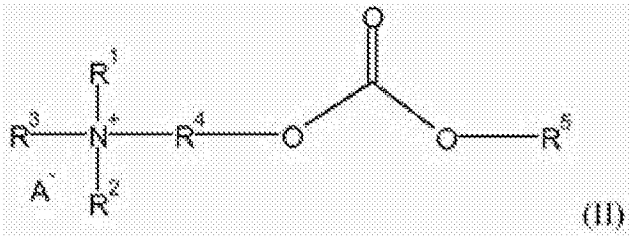
[0056] 本发明的主要目的是消除阳离子型表面活性剂CTAC并采用针对化学发光的吖啶鎓标记物的光引发试剂中的更环境友好的阳离子型表面活性剂代替CTAC。

[0057] 在一些实施方案中，用于增强吖啶鎓酯标记物的化学发光的可降解的阳离子型表面活性剂的结构可以由下式(I)表示：

[0058] 

[0059] 其中X是氮或磷；R^1、R^2和R^3各自独立地选自氢和烷基、烯基、炔基、环烷基或芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子；R^4和R^5各自独立地选自烷基、烯基、炔基、环烷基或芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子；Y是可分裂的键；和A^-是抗衡阴离子。

[0060] 在一些实施方案中，用于增强吖啶鎓酯标记物的化学发光的可降解的阳离子型表面活性剂的结构可以由下式(II)表示：

[0061] 

[0062] 其中：

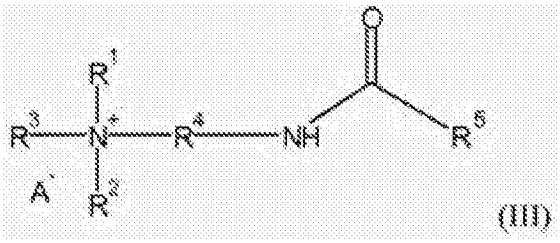
[0063] $-R^1$、R^2和R^3可以相同或不同。例如，R^1、R^2和R^3可以各自独立地为C_{1-10}烷基、C_{2-10}烯基、C_{2-10}炔基、C_{3-10}环烷基或C_{4-10}芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子(例如，甲基、乙基、丙基或丁基)；

[0064] $-R^4$可以是C_{1-20}烷基、C_{2-20}烯基、C_{2-20}炔基、C_{3-20}环烷基或C_{4-20}芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子。例如，R^4可以是包含2-4个碳的烷基链；

[0065] $-R^5$可以是C_{1-30}烷基、C_{2-30}烯基、C_{2-30}炔基、C_{3-30}环烷基或C_{4-30}芳烷基，其任选地具有一个或多个杂原子。例如，R^5可以是直链或支链的烷基链(例如，10-16个碳)；和

[0066] $-A^-$可为选自氯根、溴根、碘根、硫酸根、磺酸根或氢氧根离子的阴离子。

[0067] 在另一个实施方案中，用于增强吖啶鎓酯标记物的化学发光的可降解的阳离子型表面活性剂的结构可以由下式(III)表示：

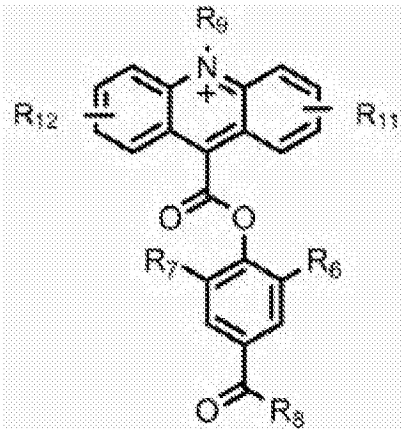
[0068] 

[0069] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^5和A^-可以具有与上述相同的定义。

[0070] 其它合适的作为相对常规表面活性剂更绿色的替代物的具有可分裂的键的表面活性剂已在别处描述并通过引用并入本文(例如，Tatsumi等人，Journal of Surfactants and Detergents, 2000, 3, 167-172；Tatsumi 等人，Journal of Surfactants and Detergents，2001, 4, 279-285；Banno 等人 Journal of Surfactants and Detergents, 2009, 12, 249-259；Banno 等人，Journal of Surfactants and Detergents, 2010, 13, 387-398；Banno 等人, Journal of Oleo Science, 2011, 60, 117-126；Banno 等人, Journal of Oleo Science, 2007, 56, 493-499；Stjerndahl和Holmberg，J. Colloid and Interface Sci., 2005, 291, 570-576)。制备上述表面活性剂的方法是本领域中已知的。

[0071] 吖啶鎓化合物

[0072] 其化学发光可通过可降解的阳离子型表面活性剂来增强的吖啶鎓酯可以由下式表示：

[0073] 

[0074] 其中R_6、R_7、R_8和R_9可以是含有0-20个杂原子的烷基、烯基、炔基或芳烷基；R_{10}和R_{11}可以是氢、含有0-20个杂原子的烷基、烯基、炔基或芳烷基。

[0075] 其它合适的吖啶鎓化合物(例如,吖啶鎓磺酰胺)包括在美国专利号8,293,908;8,119,422;7,875,467;7,785,904;7,611,909;和7,459,284;以及美国公开号2012/0225497、2010/0256380和2010/0099077中描述的那些;其全部由此通过引用以其整体并入本文。

[0076] 绿色表面活性剂的使用

[0077] 相比于常规阳离子型表面活性剂,例如十六烷基三甲基氯化铵(CTAC),使用可降解的阳离子型表面活性剂是有利的,因为它们在有氧和缺氧两种条件下都迅速降解,因此当排放到环境中时带来显著降低的风险。这些阳离子型表面活性剂也可用于增强其它标记物(诸如吖啶鎓磺酰胺)的化学发光,所述其它标记物的光发射路径与吖啶鎓酯的光发射路径相同。

[0078] 因此,本发明的一个方面涉及增强来自化学发光标记物的化学发光的方法,所述方法包括在本文中所述的可降解的阳离子型表面活性剂的存在下使化学发光标记物与酸和过氧化氢接触。在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括压缩所述化学发光标记物的光发射时间,从而提供相比不存在表面活性剂的标准发射时间得以压缩的发射时间。这样的压缩的发射时间可以与十六烷基三甲基氯化铵的压缩的发射时间相当。例如,所述压缩的发射时间可以短于(例如,短约20%、约30%或约50%)十六烷基三甲基氯化铵的压缩的发射时间。在一个实施方案中,本发明的表面活性剂可以在增强所述化学发光标记物的总光产额方面与十六烷基三甲基氯化铵同样有效。

[0079] 在一些实施方案中,所述方法可以进一步包括增强所述化学发光标记物的化学发光,从而提供相比不存在表面活性剂的标准光发射得以增强的光发射。这样的增强的光发射可以与十六烷基三甲基氯化铵的增强的光发射相当。例如,所述增强的光发射可以相比于所述不存在表面活性剂的标准光发射增强了至少约2.5倍。在某些实施方案中,这样的增强可以是十六烷基三甲基氯化铵的增强的至少约70%、至少约80%或至少约90%。在一个实施方案中,本发明的表面活性剂在压缩所述化学发光标记物的发射时间方面可以与十六烷基三甲基氯化铵至少同样有效。

[0080] 在本发明的另一个方面中,提供了一种免疫检测试剂盒,所述试剂盒包含:

[0081] a) 化学发光标记物,其具有吖啶鎓二甲基苯基酯、吖啶鎓磺酰胺、或其衍生物或缀合物;

[0082] b) 酸化试剂,其包括酸及本文中所描述的可降解的阳离子型表面活性剂;和

[0083] c) 氧化试剂，其包括碱性过氧化氢。

[0084] 在各种实施方案中，当使用时，本发明的表面活性剂可以提供相比不存在表面活性剂的标准发射时间得以压缩的所述化学发光标记物的发射时间。这样的压缩的发射时间可以与(例如大致相同、或比其短约20%、约30%或约50%)十六烷基三甲基氯化铵的压缩的发射时间相当。在某些实施方案中，当使用时，本发明的表面活性剂可以替代地或另外地展现出相比于不存在表面活性剂的标准光发射得以增强的所述化学发光标记物的光发射，从而使得所述增强的光发射可以与十六烷基三甲基氯化铵的光发射相当(例如，至少约70%、至少约80%或至少约90%)。

[0085] 总之，已经有利地发现，可降解的阳离子型表面活性剂(诸如含有可分裂的酰胺键和碳酸酯键的那些)在增强广泛使用的吖啶鎓酯标记物的化学发光方面与常规阳离子型表面活性剂(诸如CTAC)至少同样有效。还令人惊讶地发现，可降解的阳离子型表面活性剂可以在加速光发射方面比CTAC更有效。所述可降解的表面活性剂在酸性溶液中表现出优异的稳定性，并且是对CTAC的环境友好的替代物。这些表面活性剂还可用于增强其它标记物(诸如吖啶鎓磺酰胺)的发光。由于化学反应的扰动作用依赖于表面活性剂增加反应物的局部浓度和/或改变反应介质的极性的能力，因此可降解的表面活性剂可以用作对用于此类应用的常规表面活性剂的良性替代物。

实施例

[0086] 实施例1：阳离子型酰胺表面活性剂1的合成(图3)

[0087] 化合物ii

[0088] 将棕榈酸(i，2.564克，10.00毫摩尔)、甲苯(100毫升)和N,N-二甲基乙二胺(1.147毫升，10.50毫摩尔)混合并回流20小时。将反应混合物浓缩至干，得到3.21克的浅黄色固体。从无水丙酮(75毫升)中重结晶粗固体。获得为白色针状晶体形式的所需产物ii(1.83克)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$), 0.87 (t, 3H, J = 6.5), 1.20-1.35 (m, 24H), 1.55-1.70 (m, 2H), 2.17 (t, 2H, J = 7.5), 2.30 (s, 6H), 2.49 (t, 2H, J = 5.5), 3.36 (dt, 2H, J = 5.5, 5.5), 6.25 (br s, 1H)。MALDI-TOF MS m/z 327.4 ($M+H^+$)；HRMS m/z 327.3376 ($M+H^+$) (计算为327.3375)。

[0089] 化合物iii

[0090] 将化合物ii(1.41克，4.32毫摩尔)、丙酮(50毫升)和碘甲烷(0.309毫升，4.97毫摩尔)在氩气气氛下于80℃回流6小时。将反应混合物冷却至室温，并通过过滤收集沉淀出的白色固体。用无水丙酮(10毫升×4)洗涤滤饼并在高真空下经P_2O_5干燥。获得为白色固体形式的所需产物iii(1.904克)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 0.88 (t, 3H, J = 6.5), 1.21-1.38 (m, 22H), 1.57-1.70 (m, 4H), 2.29 (t, 2H, J = 7.3), 3.42 (s, 9H), 3.78-3.89 (m, 4H), 7.96 (br s, 1H)。MALDI-TOF MS m/z 282.36 ($M-NMe_3^+$)；HRMS m/z 341.3528 (M^+) (计算为341.3532)。

[0091] 化合物1

[0092] 在室温下将化合物iii(1.50克，3.20毫摩尔)溶解于无水乙醇(400毫升)中并加入IR-900氯树脂(76.2克，3.20毫摩尔)，并在室温下搅拌1小时。然后，使混合物通过IR-900氯树脂柱(80克用无水乙醇预洗涤)。将该柱用无水乙醇(600毫升)洗脱。将洗脱液在减压下浓

缩，得到1.51克的浅棕色固体。从无水丙酮/乙醇中重结晶该物质。得到为白色固体形式的所需产物，表面活性剂1(0.895克)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 0.86 (t, 3H, J = 6.3), 1.17-1.38 (m, 22H), 1.55-1.68 (m, 4H), 2.27 (t, 2H, J = 7.3), 3.43 (s, 9H), 3.70-3.85 (m, 4H), 8.72 (br s, 1H)。MALDI-TOF MS m/z 282.36 ($M-NMe_3^+$)；HRMS m/z 341.3529 (M^+) (计算为341.3532)。

[0093] 实施例2：阳离子型碳酸酯表面活性剂2的合成(图4)

[0094] 化合物v

[0095] 将十二烷醇(iv，2.236毫升，10.00毫摩尔)、三乙胺(1.394毫升，10.00毫摩尔)和碳酸二苯酯(2.142克，10.00毫摩尔)的混合物加热至80℃，维持16小时。然后，加入3-二甲基氨基-1-丙醇(2.366毫升，20.00毫摩尔)，并加热至80℃，再维持16小时。然后在减压下浓缩反应混合物，得到3.92克的深黄色油状物。使用甲醇/乙酸乙酯作为洗脱液(1 : 9)通过硅胶柱色谱法将其纯化。获得为黄色油状物形式的所需产物v(2.63克)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 0.88 (t, 3H, J = 6.5), 1.20-1.42 (m, 18H), 1.61-1.71 (m, 2H), 1.87-1.98 (m, 2H), 2.33 (s, 6H), 2.49 (br t, 2 H, J = 7.0), 4.12 (t, 2H, J = 6.5), 4.19 (t, 2H, J = 6.3)。MALDI-TOF MS m/z 316.3 ($M+H^+$)；HRMS m/z 316.2855 ($M+H^+$) (计算为316.2852)。

[0096] 化合物vi

[0097] 将化合物v(1.500克，4.75毫摩尔)、丙酮(50毫升)和碘甲烷(0.340毫升，5.47毫摩尔)混合并回流6小时。在冷却至室温后，沉淀出为白色固体形式的所需产物。通过过滤将其收集并用乙酸乙酯(10毫升×4)洗涤。将固体在高真空下经P_2O_5干燥。获得为白色固体形式的所需产物vi(1.988克)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 0.87 (t, 3H, J = 7.0), 1.60-1.72 (m, 18H), 2.05-2.34 (m, 2H), 3.49 (s, 9H), 3.76 (t, 2H, J = 7.3), 4.12 (t, 2H, J = 6.5), 4.29 (m, 2H)。MALDI-TOF MS m/z 316.3 ($M+H^+$)；HRMS m/z 316.2855 ($M+H^+$) (计算为316.2852)。

[0098] 化合物2

[0099] 在室温下将化合物vi(1.50克，3.28毫摩尔)溶解于无水乙醇(200毫升)中并加入IR-900氯树脂(78克，328毫摩尔)，并在室温下搅拌1小时。然后，使混合物通过IR-900氯树脂柱 (80克用无水乙醇预洗涤)。用无水乙醇(400毫升)洗脱该柱。在减压下浓缩洗脱液，得到1.5克的白色固体。从无水丙酮中重结晶粗产物。获得为白色固体形式的所需产物2(0.637克)。^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 0.86 (t, 3H, J = 6.5) 1.60-1.70 (m, 18H), 2.18-2.30 (m, 2H), 3.49 (s, 9H), 3.72 (t, 2H, J = 7.8), 4.11 (t, 2H, J = 6.8), 4.25 (m, 2H)。HRMS m/z 330.3013 (M^+) (计算为330.3008)。

[0100] 实施例3：化学发光测量

[0101] 为了研究可降解的阳离子型表面活性剂对吖啶鎓酯化学发光的影响，选择两种含有可分裂的键的示例性阳离子型表面活性剂(图2A)。所述两种表面活性剂的临界胶束浓度(CMC)示于图2A中。对于所述两种表面活性剂的合成方案示于图3-4中并描述在上述实施例1和实施例2中。将两种表面活性剂均以五倍于所报道的它们在水中的CMC的浓度溶解在试剂1(含有0.5%过氧化氢的0.1摩尔硝酸)中。溶解在试剂2(0.25 摩尔 NaOH)中的CTAC用作对照表面活性剂。将所述两种碳酸酯阳离子型表面活性剂和酰胺阳离子型表面活性剂(图

2A)溶解在试剂1中以保持稳定性，尤其是在长期储存的过程中(Stjerndahl和Holmberg, J. Colloid and Interface Sci., 2005, 291, 570-576)。三种吖啶鎓酯(图2B，化合物3a、3b和3c)用于制备如在文献(Natrajan 等人, Org. Biomol. Chem., 2011, 9, 5092-5103;Natrajan等人, Org. Biomol. Chem., 2012, 10, 3432-3447)中描述的抗TSH抗体(TSH =促甲状腺激素)的蛋白质缀合物。所述缀合物含有约5种标记物。将所述缀合物储存在4℃下的缓冲液中，并且在不存在表面活性剂以及在存在CTAC及阳离子型表面活性剂1和阳离子型表面活性剂2下测量来自每种缀合物的化学发光(表1-3，图5-7)。在80天的时间段内评估每种表面活性剂(a)增强总光输出和(b)加速发射动力学的能力。

[0102] 在来自Berthold Technologies的Autolumat LB953 Plus光度计上测量吖啶鎓酯3a、3b和3c(图2B)的抗TSH抗体缀合物的化学发光。将含有约5种标记物的所述缀合物(~2毫克/毫升)一系列地稀释10^5倍，用于在10毫摩尔磷酸氢二钠、0.15摩尔 NaCl和8毫摩尔叠氮化钠和0.015毫摩尔牛血清白蛋白(BSA)的pH为8.0的水性缓冲液中测量化学发光。将0.010毫升体积的每种稀释的吖啶鎓酯样品分散在试管的底部。将试管放入准备好的LB953中并且通过依次加入0.3毫升的试剂1、0.5%过氧化氢在0.1摩尔硝酸中的溶液，随后加入0.3毫升的试剂2、0.25摩尔氢氧化钠的溶液来引发化学发光反应。对于在CTAC存在下的测量而言，表面活性剂(7毫摩尔)被包含在试剂2中。对于在阳离子型酰胺表面活性剂1或阳离子型碳酸酯表面活性剂2存在下的测量而言，将每种表面活性剂以3.2毫摩尔(表面活性剂1)和2.15毫摩尔(表面活性剂2)溶解在试剂1中。以240个0.5秒的间隔(120秒的总时间)测量每个化学发光闪光曲线。每个化学发光反应进行至少三次，取平均并转换为积聚到每个时间间隔的化学发光的百分数。将来自光度计仪器的输出表示为R.L.U(相对光单位)。

[0103] 表1-3中的结果说明了分别含有可分裂的酰胺键和碳酸酯键的两种阳离子型表面活性剂1和阳离子型表面活性剂2不仅在增强来自吖啶鎓酯缀合物的总光产额方面而且在压缩发射时间方面与CTAC至少同样有效。例如，对于所有三种吖啶鎓酯缀合物而言，相比于指定相对高光产额的不含表面活性剂的对照，针对CTAC以及表面活性剂1和表面活性剂2，对于3a而言总的光产额增强了约2.5-4倍，对于3b 而言增强了3-5倍，且对于3c而言增强了3-4.5倍(表1a、2a和3a)。具体地，表1a显示表面活性剂2在至少前10天内在增强化学发光方面与CTAC同样有效(即通过表面活性剂2增强的光发射的倍数与CTAC相同)。甚至在第80天时，使用表面活性剂2增强的光发射的倍数仍为CTAC的约80%(2.8/3.5)。类似地，使用表面活性剂1在第1天增强的光发射的倍数相比于CTAC是约89%(3.1/3.5)，并且在第80天是74%(2.6/3.5)。因此，表面活性剂1和表面活性剂2两者在增强化学发光方面均与CTAC相当。此外，所述两种阳离子型表面活性剂1和阳离子型表面活性剂2被证明为在试剂1(0.5%过氧化物在0.1摩尔硝酸中)中是相当稳定的，如通过即使在80天后在室温下其增强来自吖啶鎓酯抗体缀合物的化学发光的能力中几乎没有损失所证明。

[0104] 此外，表面活性剂1和表面活性剂2两者在加速来自吖啶鎓酯抗体缀合物的光发射方面都是非常有效的(表1b、2b和3b，图5-7)。在不存在表面活性剂下，观察到来自3a、3b和3c的缀合物的> 90%光的发射时间分别为57.5秒、49.5秒和62.5秒。在CTAC或所述两种阳离子型表面活性剂1和阳离子型表面活性剂2的存在下，对于所有三种吖啶鎓酯标记物的缀合物的发射时间被压缩至<3秒。令人惊讶的是，表面活性剂1和表面活性剂2在加速光发射方面比CTAC更有效。例如，如表1b所示，表面活性剂1和表面活性剂2两者均将吖啶鎓酯3a的发

射动力学从57.5秒加速至1.0秒，而CTAC为1.5秒。所述两种阳离子型表面活性剂1和阳离子型表面活性剂2加速光发射的能力即使在80天后在室温下并未减少，也如所述缀合物的化学发光发射曲线中所说明的那样(图5-7)。

[0105] 等同物

[0106] 本发明提供了除其它事项外的绿色表面活性剂和它们在增强化学发光中的用途。尽管已经对本主题发明的特定实施方案进行了讨论，但是以上说明书是说明性的而非限制性的。本发明的许多变型对于评阅本说明书后的本领域技术人员而言将变得明显。本发明的全部范围应当参照权利要求连同其等同物的全部范围以及本说明书连同此类变型来确定。

[0107] 通过引用并入

[0108] 本文中提及的所有出版物、专利和序列数据库条目在此通过引用以其整体并入，如同各个单独的出版物或专利被具体且单独地指出通过引用并入。

[0109] 表1a．观察到的吖啶鎓酯3a的抗TSH抗体缀合物的化学发光增强(倍)(无表面活性剂的对照指定为值1)。

[0110]

天	CTAC	酰胺阳离子型表面活性剂1	碳酸酯阳离子型表面活性剂2
1	3.5	3.1	3.5
10	3.6	3.1	3.6
20	4.0	3.4	3.7
40	3.4	2.6	3.2
80	3.5	2.6	2.8

[0111] 表1b．观察到的吖啶鎓酯3a的抗TSH抗体缀合物的发射动力学加速(至>90%发射的时间(以秒计))(在不存在表面活性剂下，至>90%发射的时间为57.5秒)。

[0112]

天	CTAC	酰胺阳离子型表面活性剂1	碳酸酯阳离子型表面活性剂 2
1	1.5	1.0	1.0
10	1.5	1.0	1.0
20	1.5	1.0	1.0
40	1.5	1.0	1.0
80	1.5	1.0	1.0

[0113] 表2a．观察到的吖啶鎓酯3b的抗TSH抗体缀合物的化学发光增强(倍)(无表面活性剂的对照指定为值1)。

[0114]

天	CTAC	酰胺阳离子型表面活性剂1	碳酸酯阳离子型表面活性剂 2
1	5.3	4.5	5.0
10	5.2	4.4	5.2
20	5.5	4.7	5.2
40	4.2	3.4	3.9
80	4.6	3.4	4.1

[0115] 表2b．观察到的吖啶鎓酯3b的抗TSH抗体缀合物的发射动力学加速(至>90%发射的时间(以秒计))(在不存在表面活性剂下,至>90%发射的时间为49.5秒)。

[0116]

天	CTAC	酰胺阳离子型表面活性剂1	碳酸酯阳离子型表面活性剂2
1	1.0	1.0	0.5
10	1.0	0.5	0.5
20	1.0	0.5	0.5
40	1.0	0.5	0.5
80	1.0	0.5	0.5

[0117] 表3a．观察到的吖啶鎓酯3c的抗TSH抗体缀合物的化学发光增强(倍)(无表面活性剂的对照指定为值1)。

[0118]

天	CTAC	酰胺阳离子型表面活性剂1	碳酸酯阳离子型表面活性剂 2
1	4.1	3.8	4.2
10	4.3	3.8	4.2
20	4.6	4.1	4.4
40	3.9	3.2	3.7
80	4.0	3.0	3.5

[0119] 表3b．观察到的吖啶鎓酯3c的抗TSH抗体缀合物的发射动力学加速(至>90%发射的时间(以秒计))(在不存在表面活性剂下,至>90%发射的时间为62.5秒)。

[0120]

天	CTAC	酰胺阳离子型表面活性剂1	碳酸酯阳离子型表面活性剂2
1	2.0	2.0	1.0
10	2.0	2.0	1.0
20	2.5	2.0	1.5
40	2.5	2.0	1.5
80	2.5	2.0	1.5

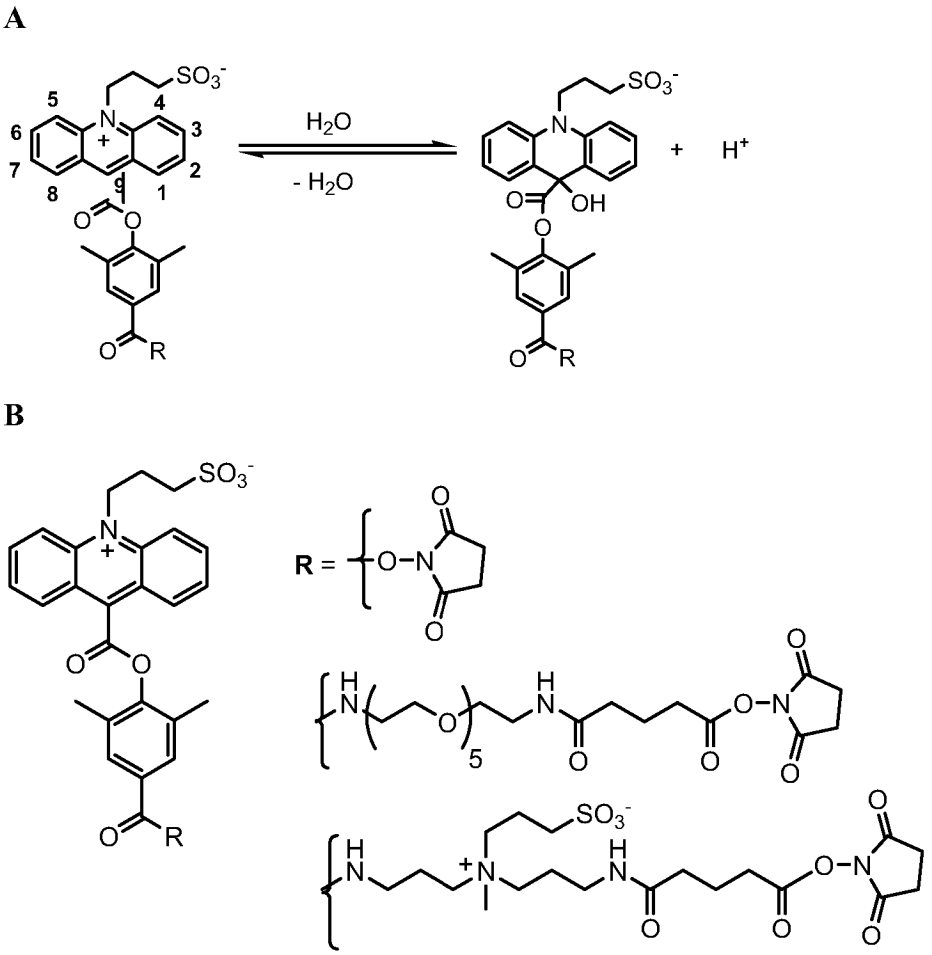
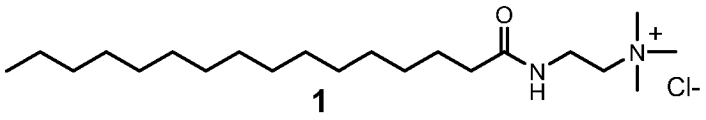


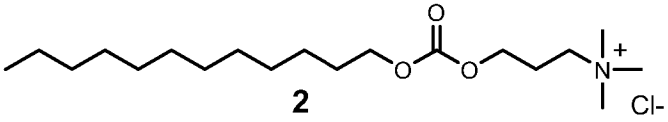
图 1

A



1

具有可分裂的酰胺键的阳离子型表面活性剂,CMC=0.64mM



2

具有可分裂的碳酸酯键的阳离子型表面活性剂,对于碘化物盐CMC=0.43mM

B

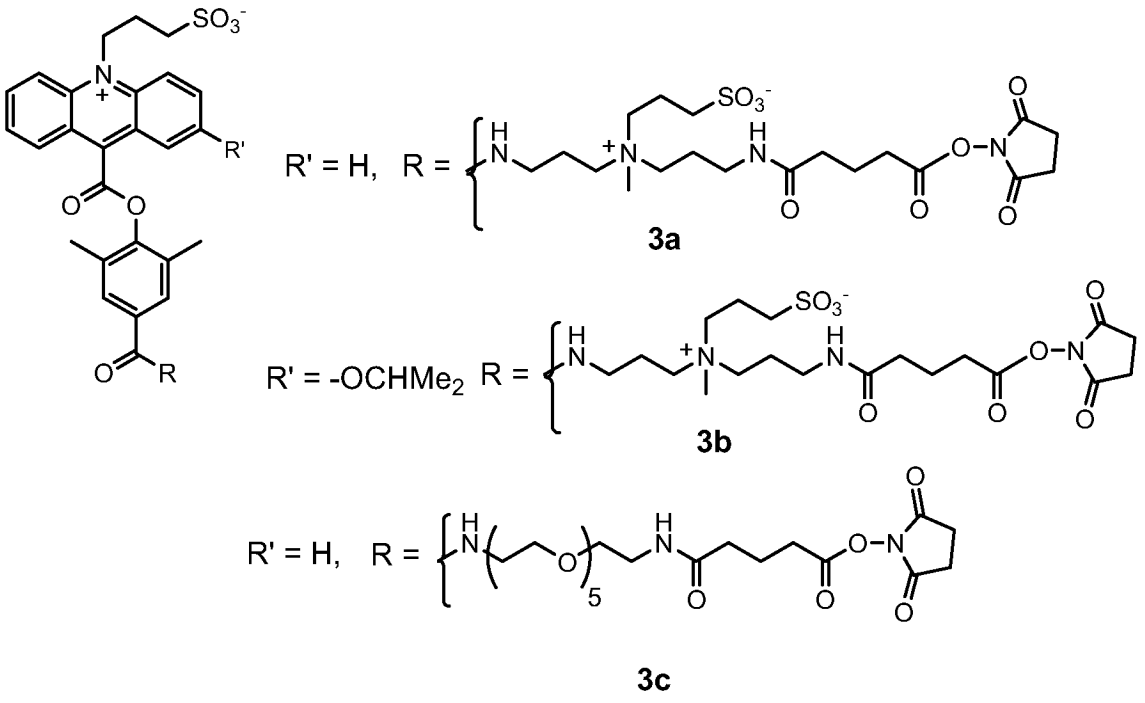


图 2

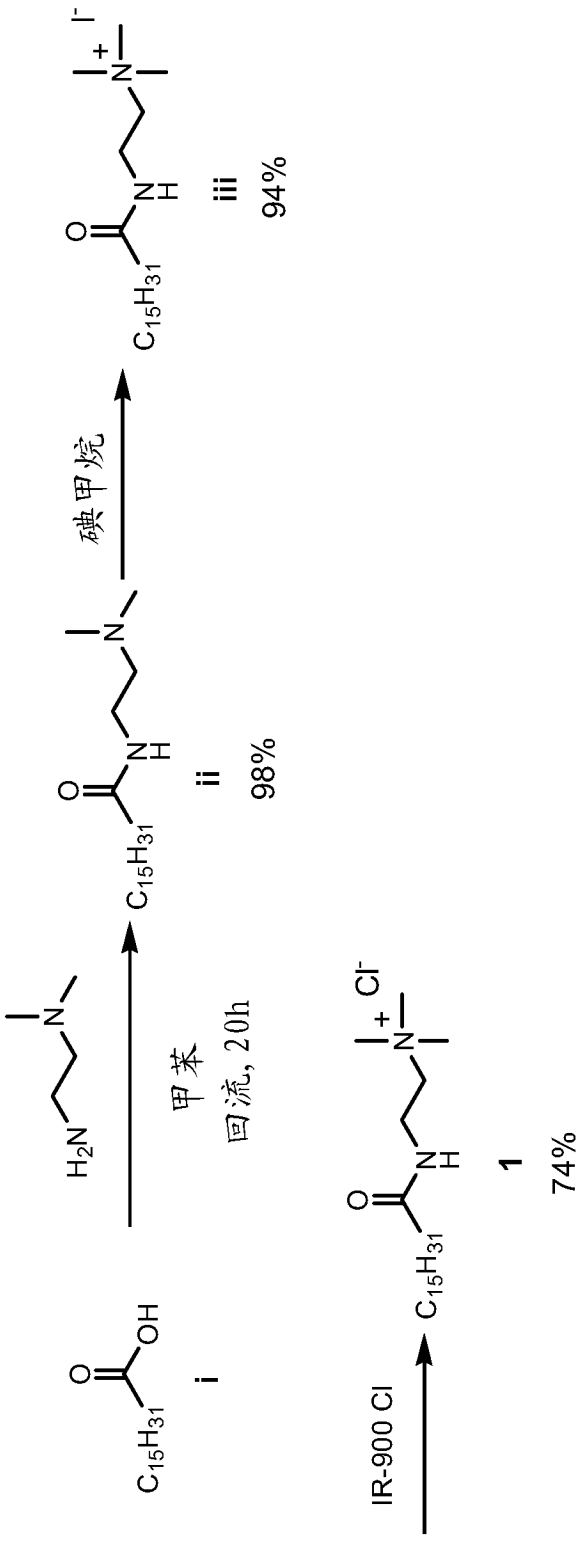


图 3

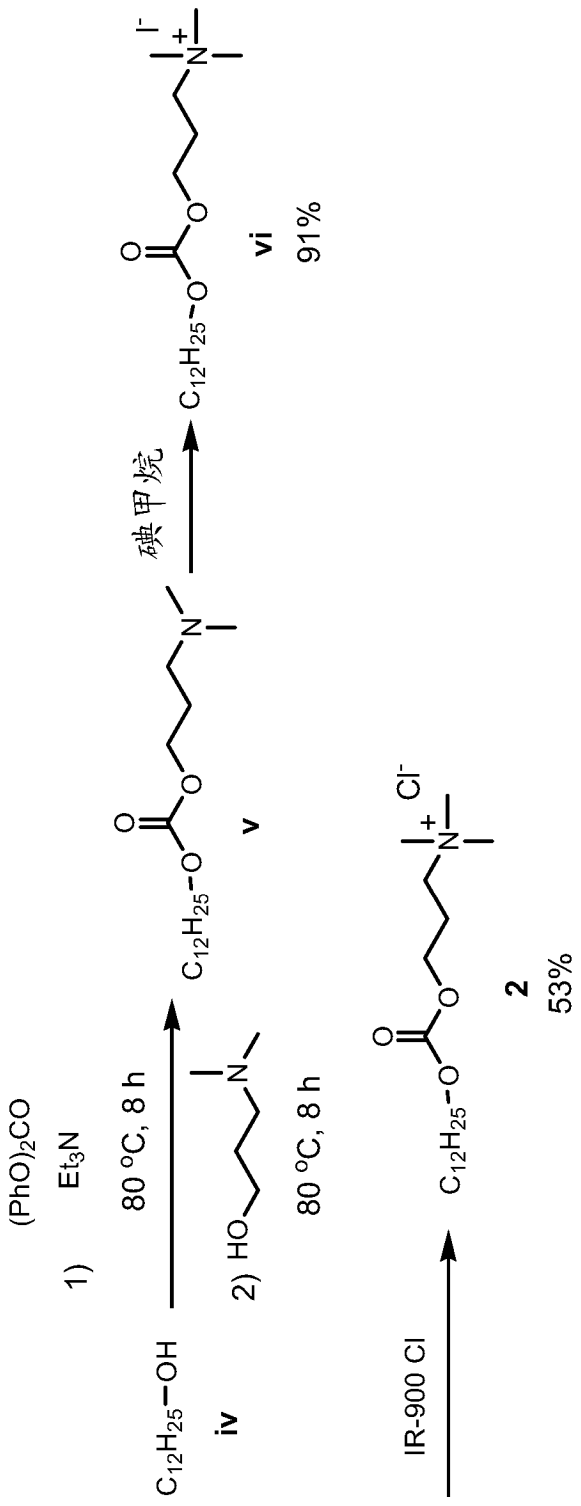

(PhO)2CO
Et3N
1)
80 °C, 8 h
C12H25–OH
iv
2) HO
80 °C, 8 h
v
碘甲烷
vi
91%
IR-900 Cl
2
53%

图 4

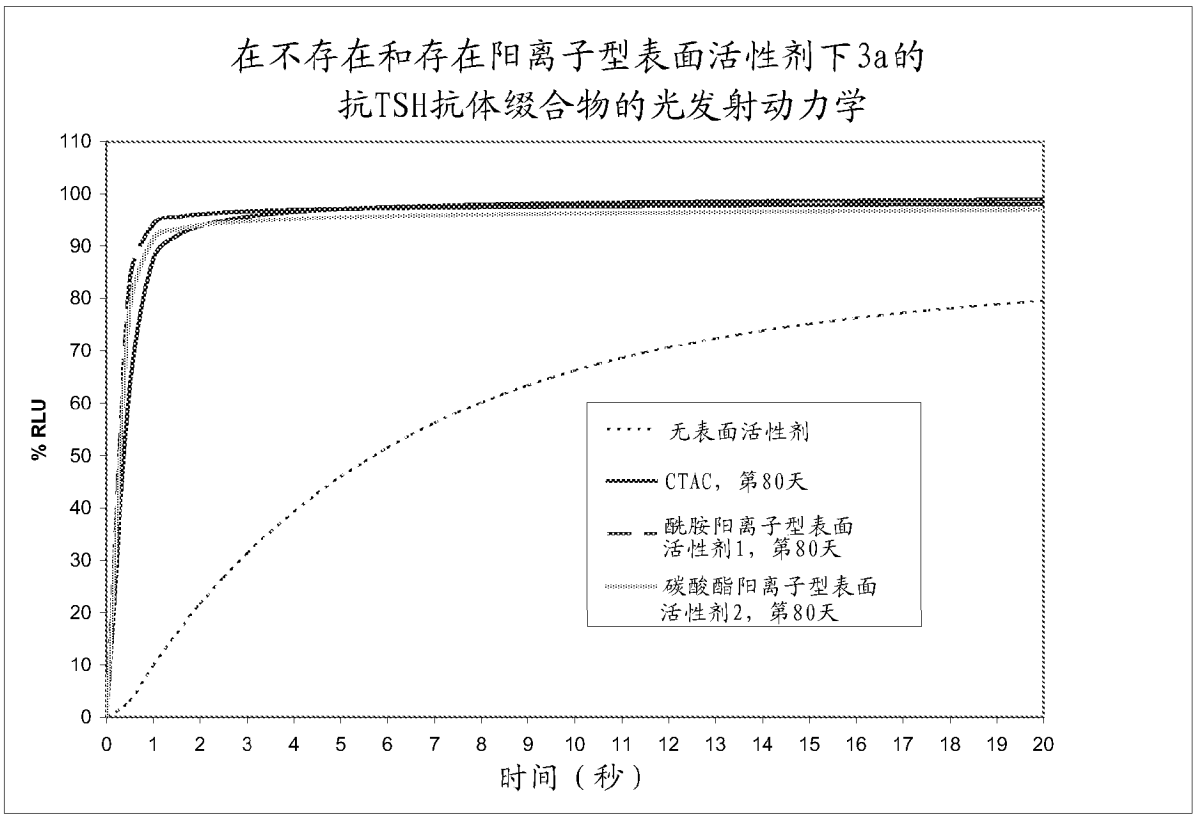

在不存在和存在阳离子型表面活性剂下3a的
抗TSH抗体缀合物的光发射动力学
% RLU
时间（秒）
无表面活性剂
CTAC，第80天
酰胺阳离子型表面活性剂1，第80天
碳酸酯阳离子型表面活性剂2，第80天

图 5

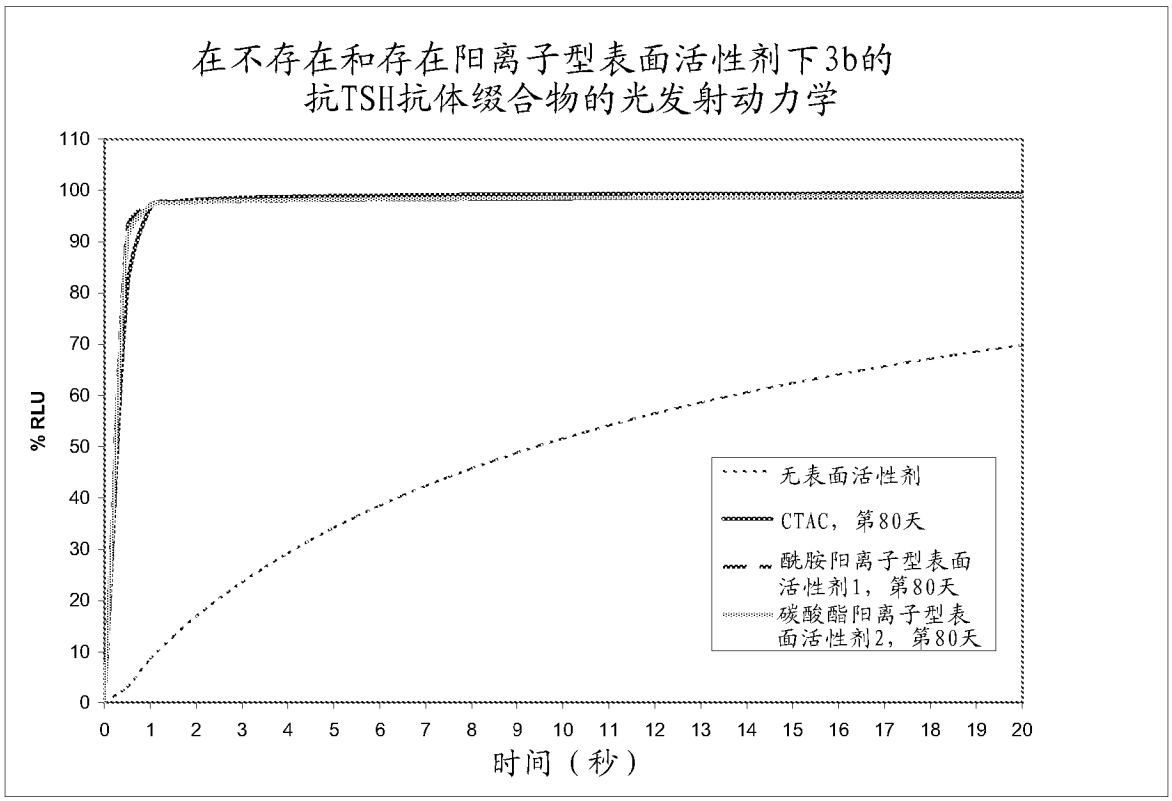

在不存在和存在阳离子型表面活性剂下3b的
抗TSH抗体缀合物的光发射动力学
% RLU
时间（秒）
无表面活性剂
CTAC，第80天
酰胺阳离子型表面活性剂1，第80天
碳酸酯阳离子型表面活性剂2，第80天

图 6

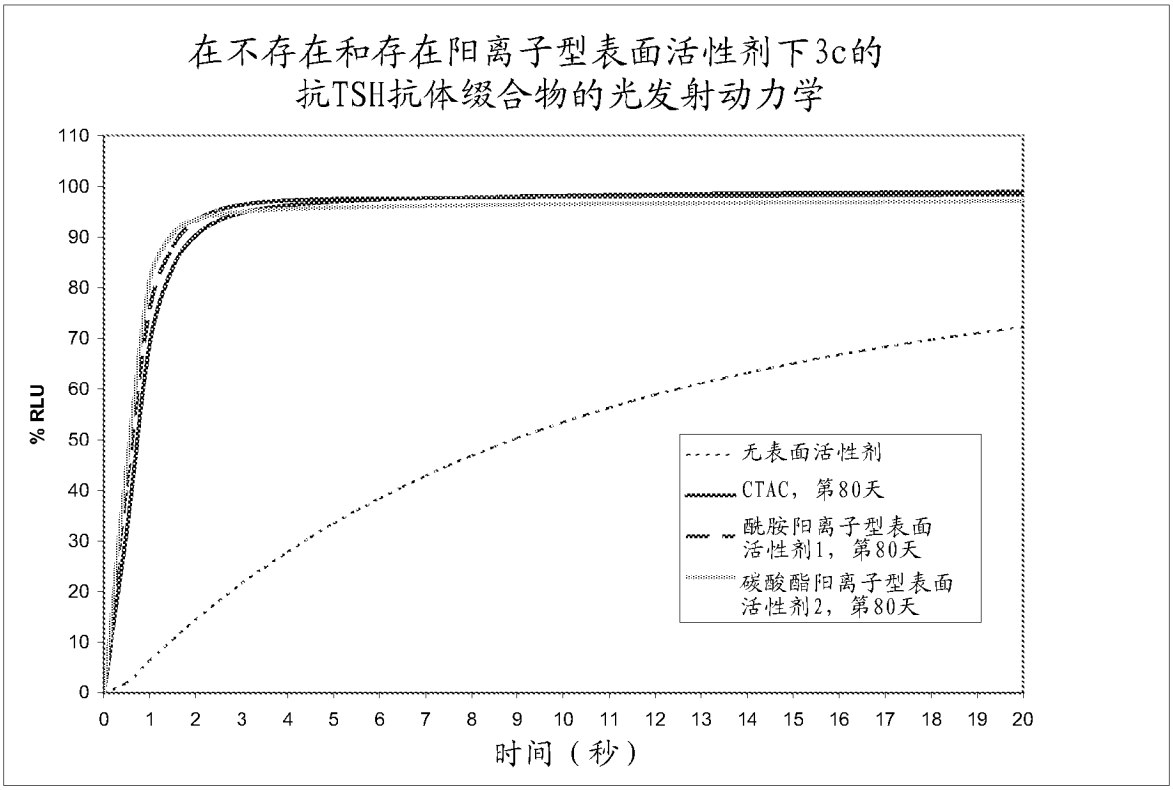

在不存在和存在阳离子型表面活性剂下3c的
抗TSH抗体缀合物的光发射动力学
% RLU
时间（秒）
无表面活性剂
CTAC，第80天
酰胺阳离子型表面活性剂1，第80天
碳酸酯阳离子型表面活性剂2，第80天

图 7