

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

C07F 15/00

C12Q 1/68

G01N 33/58 C07F 19/00

# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95190794.8

[45]授权公告日 1999年11月17日

[11]授权公告号 CN 1046531C

[22]申请日 95.7.24 [24]颁证日 99.8.21

[21]申请号 95190794.8

[30]优先权

[32]94.7.25 [33]DE [31]P4426276.0

[32]94.8.31 [33]DE [31]P4430998.8

[32]94.11.4 [33]DE [31]P4439347.4

[32]94.11.4 [33]DE [31]P4439345.8

[86]国际申请 PCT/EP95/02920 95.7.24

[87]国际公布 WO96/03409 德 96.2.8

[85]进入国家阶段日期 96.4.23

[73]专利权人 伯伦格·曼海姆有限公司

地址 联邦德国曼海姆

[72]发明人 H·P·约塞尔 E·霍斯

B·奥芬劳奇哈恩尔 C·塞德尔

B·阿普麦尔 U·H·威恩胡斯

[56]参考文献

WO86/2734 1986.5.9 C07F15/00

审查员 曾武宗

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

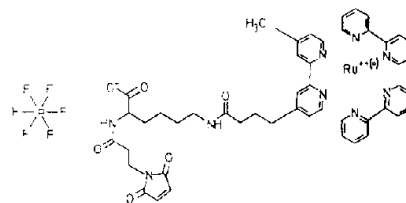
代理人 徐汝巽

权利要求书 5 页 说明书 20 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 带有带电连接基的金属配合物、螯合物及其用途和制备方法

[57]摘要

本发明涉及带有带电连接基的新型金属配合物以及它们在免疫测定中作为发光标记基的用途。

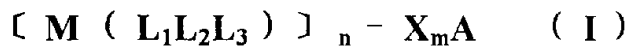


ISSN 1008-4274

# 权 利 要 求 书

---

1.通式 ( I ) 所示的 金属配合物:



其中 M 为选自稀土或过渡金属离子的二价或三价金属阳离子,

$L_1$ 、 $L_2$  和  $L_3$  相同或不同, 表示至少带有两个含氮杂环的配位体, 其中  $L_1$ 、 $L_2$  和  $L_3$  经由氮原子与金属阳离子相连,

X 为活性官能基团, 它至少与配位体  $L_1$ 、 $L_2$  和  $L_3$  中的一个共价相连,

n 为 1 - 10 的整数,

m 为 1 - 6 的整数, 和

A 表示可用来平衡电荷的反离子,

其特征在于该连接基至少含有一个正性和/或负性的电荷载体。

2.如权利要求 1 所述的配合物, 其特征在于金属阳离子 M 为钕离子、铈离子、镱离子、镱离子或铕离子。

3.如权利要求 1 或 2 所述的配合物, 其特征在于金属阳离子 M 为钕离子。

4.如权利要求 1 或 2 所述的配合物, 其特征在于配位体  $L_1$ 、 $L_2$  和  $L_3$  含有联吡啶和/或非咯啉环系。

5.如权利要求 1 或 2 所述的配合物, 其特征在于活性官能基团 X 为羧酰卤、羧酸酐、活性酯、马来酰亚胺或能光敏化的基团。

6.如权利要求1或2所述的配合物,其特征在于反离子A为六氟磷酸根、三氟乙酸根或四氟硼酸根。

7.如权利要求1或2所述的配合物,其特征在于连接基至少含有一个选自磷酸根、膦酸根、磺酸根和羧酸根的负电荷载体。

8.如权利要求7所述的配合物,其特征在于连接基含有至少一个羧酸根。

9.如权利要求1或2所述的配合物,其特征在于连接基至少含有一个选自氨基和取代氨基的正电荷载体。

10.根据权利要求9所述的配合物,其特征在于氨基和取代氨基可用作金属配合物的给电子体。

11.如权利要求1或2所述的配合物,其特征在于连接基含有10个以内的电荷载体。

12.如权利要求11所述的配合物,其特征在于连接基含有2-8个电荷载体。

13.如权利要求1或2所述的配合物,其特征在于连接基至少部分地由经肽键连在一起的氨基酸单元组成。

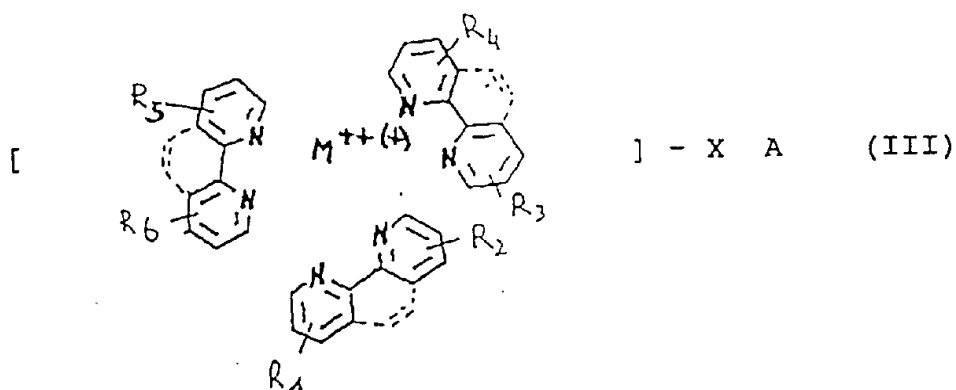
14.如权利要求13所述的配合物,其特征在于电荷载体来源于引入连接基中之后还含有至少一个游离电荷载体的多官能羧酸。

15.如权利要求14所述的配合物,其特征在于电荷载体来源于(a)含有一个氨基和两个羧酸根或(b)含有两个氨基和一个羧酸根

的三官能氨基酸。

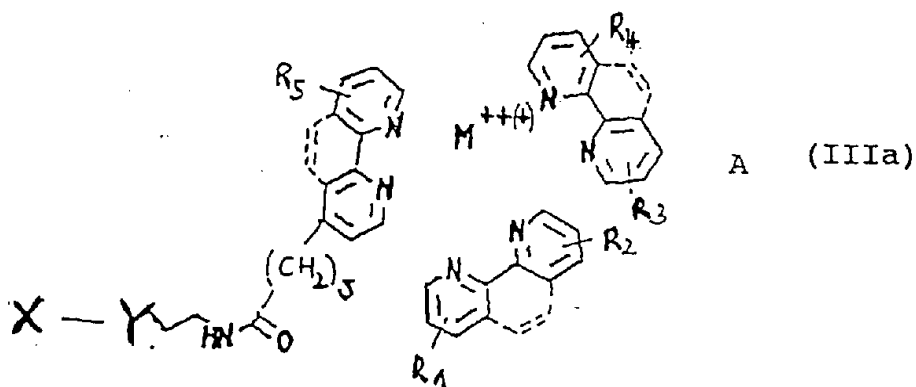
16.如权利要求15所述的配合物,其特征在于三官能氨基酸选自赖氨酸、鸟氨酸、羟基赖氨酸、在冬氨酸和谷氨酸。

17.如权利要求1或2所述的通式(III)的配合物:



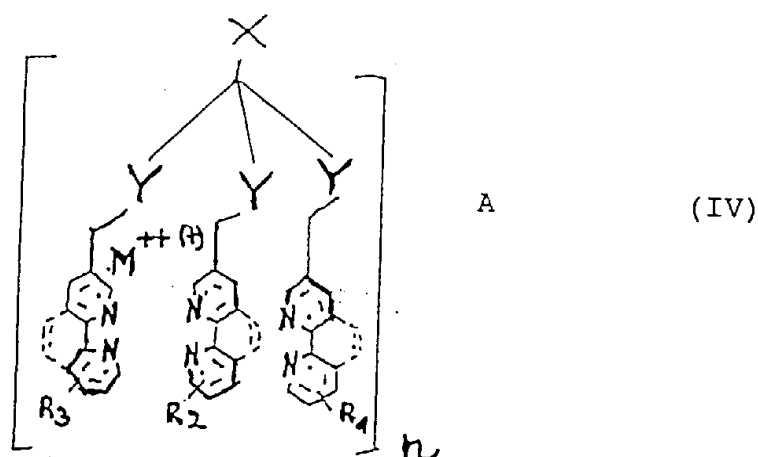
其中 M、X 和 A 如权利要求 1 中所定义， $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$  和  $R_6$  相同或不同，各自表示一个或几个取代基，条件是 X 经由作连接基的取代基  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$  和  $R_6$  中的一个与一个配位体相连。

18. 如权利要求 17 所述的通式 (IIIa) 的配合物:



其中 M、X 和 A 如权利要求 1 中所定义， $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  和  $R_5$  如权利要求 17 中所定义，S 为 0 - 6 的整数，Y 表示连接基。

19. 如权利要求 1 或 2 所述的通式 (IV) 的配合物:



其中 M、X、n 和 A 如权利要求 1 中所定义， $R_1$ 、 $R_2$  和  $R_3$  相同或不同，各自表示一个或几个取代基，Y 在各种情形中均表示至少带有一个电荷载体的连接基。

20. 轆合物，它包含一种与至少一种如权利要求 1 - 19 中任一项所述的金属配合物相偶合的生物物质。

21. 如权利要求 20 所述的轆合物，其特征在于生物物质为生物素、抗体或抗体片段、核酸、多肽抗原、免疫活性肽或半抗原。

22. 如权利要求 1 - 19 中任一项所述的金属配合物或如权利要求 20 或 21 所述的轆合物在免疫检测法或在核酸杂化法中的用途。

23. 如权利要求 22 所述的在发光法中的用途。

24. 如权利要求 22 或 23 所述的在电化学发光法中的用途。

25. 一种由权利要求 1 - 19 中任一项的金属配合物制备权利要求 20 所述的轆合物的方法，包括将权利要求 1 - 19 中的金属配合物连接基中具有游离氨基的肽或肽衍生物与辛二酸二（羧基琥珀酰亚胺）酯反应，使氨基官能基转化为 N - 羧基琥珀酰亚胺酯，随后将通过引入 N - 羧基琥珀酰亚胺酯基团而活化的金属配合物

连接基中的肽或肽衍生物与生物物质偶合，从而制得权利要求 20 的羧合物。

26. 根据权利要求 25 的方法，其特征在于肽或肽衍生物至少具有一个游离酸官能基。

27. 根据权利要求 25 或 26 的方法，其特征在于进行反应的肽衍生物至少带有一个标记基和/或固相结合基。

28. 根据权利要求 25 或 26 的方法，其特征在于反应在碱存在下于有机溶剂中进行。

# 说明书

## 有带电连接基的金属配合物、轭合物及其用途和制备方法

本发明涉及带有带电连接基的新型金属配合物、轭合物及它们在免疫测定中作发光标记基的用途,还涉及由金属配合物制备轭合物的方法。

在现有技术中已知发光的金属配合物。*EP-A-0178450*公开了与免疫活性物质相偶合的钆配合物,其中钆配合物含有三个相同或不同的带有至少两个含氮杂环的双环或多环配位体,这些配位体中至少一个被至少一个水溶性基团如 $-\text{SO}_3\text{H}$ 或 $-\text{COOH}$ 取代,至少一个被至少一个活性基团直接取代或经由一个间隔基而取代,并且所有配位体经由氮原子与钆相连。

能够偶合的基团通过活化和在配位体的加溶基上顺次反应而以非常复杂的方式引入。能与生物物质如抗体偶合但不交联的单活化化合物的生产也是特别复杂的。

*EP-A-0580 979*公开了铕和钆配合物作为电化学发光的标记基的用途。它提到将含氮杂环如联吡啶(*bipyridines*)作为这些配合物的配位体。*WO 87/06706*还公开了适于作为电化学发光测量的标记基的金属配合物。

现有技术中的已知金属配合物的其它缺点是由于氧猝灭和光解离作用引起电化学发光测量中量子产额差和/或与蛋白质的非特定结合高。

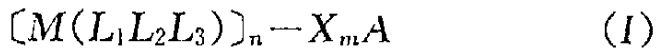
因此本发明的目的是至少部分地消除现有技术的缺点。

令人惊奇地发现,将游离的正性和/或负性电荷载体引入连接

合物的螯合物与免疫活性物质的吸附，因而也改进了这些螯合物在免疫测定中的稳定性和回收率。而且可以增加量子产额。

另外还发现，带有带电连接基的发光金属配合物可以令人惊奇的简单方式生产。

因此，本发明的一个主题是通式(I)的金属配合物：



其中  $M$  为选自稀土或过渡金属离子的二价或三价金属阳离子， $L_1$ 、 $L_2$  和  $L_3$  相同或不同，且表示至少带两个含氮杂环的配位体，其中  $L_1$ 、 $L_2$  和  $L_3$  经由氮原子键于金属阳离子上， $X$  为与配位体  $L_1$ 、 $L_2$  和  $L_3$  中至少一个共价键合的活性官能基， $n$  为 1—10 的整数， $m$  为 1—6 的整数且优选为 1—3， $A$  表示可用来平衡电荷的反离子，其中连接基含有至少一个正性和/或负性的电荷载体。

金属配合物优选为发光的金属配合物，即能产生可检测的发光反应的金属配合物。这一发光反应可用荧光或电化学发光测量检测。该配合物中的金属阳离子例如是过渡金属或稀土金属。该金属优选是钕、铈、镨、铕、铽、钐、铟、钇、钼、铟、铪、铜、铬或钨。特别优选钕、铕、镨、铈和铈。最优选钕。

配位体  $L_1$ 、 $L_2$  和  $L_3$  是含有至少两个含氮杂环的配位体。优选芳杂环如联吡啶、联吡唑(bipyrazyl)、三联吡啶和 1,10-菲咯啉。配位体  $L_1$ 、 $L_2$  和  $L_3$  优选选自联吡啶和菲咯啉环系。

该配合物的活性官能基  $X$  是能偶合到免疫活性物质上的活性基团。该基团  $X$  优选是活化的羧酸基团如羧酰卤，羧酸酐或活性酯，例如  $N$ -羟基琥珀酰亚胺酯、对硝基苯酯、五氟苯酯、咪唑基酯或  $N$

该配合物优选只含有一个单官能基 X。

此外,该配合物可任选含有一个或几个反离子 A 以平衡电荷。合适的带负电荷的反离子是卤化物离子、 $\text{OH}^-$ 、碳酸根离子、烷基羧酸根离子(如三氟乙酸根离子)、硫酸根离子、六氟磷酸根离子和四氟硼酸根离子。特别优选六氟磷酸根离子、三氟乙酸根离子和四氟硼酸根离子。合适的带正电荷的反离子是一价阳离子如碱金属和铵离子。

本发明的金属配合物不同于现有技术中已知的金属配合物,这在于它在配位体和能偶合的活性基团 X 之间的连接基中含有至少一个电荷载体。本发明中术语“电荷载体”表示在 pH 值为 6—8 范围内主要以离子形式存在的基团。连接基优选含有 10 个以内,特别优选 2—8 个,最优选 2—4 个这种电荷载体。

该连接基特别优选含有至少一个负电荷载体。合适的负电荷载体是磷酸根离子、膦酸根离子、磺酸根离子和羧酸根离子,其中最优选羧酸根离子。

正电荷载体的实例是氨基和单取代或多取代的氨基如单、二或三烷基氨基,其中烷基表示 1—6 个碳原子的直链或支化烷基残基或 3—6 个碳原子的环烷基残基。特别优选正电荷载体选自基础氨基酸如赖氨酸或取代的氨基酸如二乙基赖氨酸。胺和取代胺也可在由电化学发光检测金属配合物中用作给电子体。

连接基优选具有 4—40 个原子的链长,且为通过引入杂原子如酰胺官能基而改性的亚烷基链。电荷载体在连接基中的放置优选应使亚烷基单元的 H 原子被带电基团如  $\text{NH}_2^+$  或  $\text{CO}_2^-$  取代。

含游离电荷载体的连接基优选至少部分地由经由肽键连在一起的氨基酸单元组成。在这样的连接基中,电荷载体可来源于总共至少含有三个带电基团(氨基加羧酸根)的多官能氨基酸的游离氨基和/或羧酸根,以使在引入连接基中且两个带电基团共同反应之后仍存在至少一个游离的电荷载体。例如,电荷载体可来源于含有(a)一个氨基和两个羧酸根或(b)两个氨基和一个羧酸根的二官能的氨基酸。此类二官能氨基酸的例子是赖氨酸、鸟氨酸、羟基赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。

本发明的金属配合物可额外含有至少一个选自  $C_2-C_3$  亚烷基氧基单元、 $C_2-C_3$  亚烷基硫基单元、 $C_2-C_3$  亚烷基氨基单元和多羟基单元的亲水基团。

多羟基单元优选选自式 (IIa) 或 (IIb) 所示的基团:

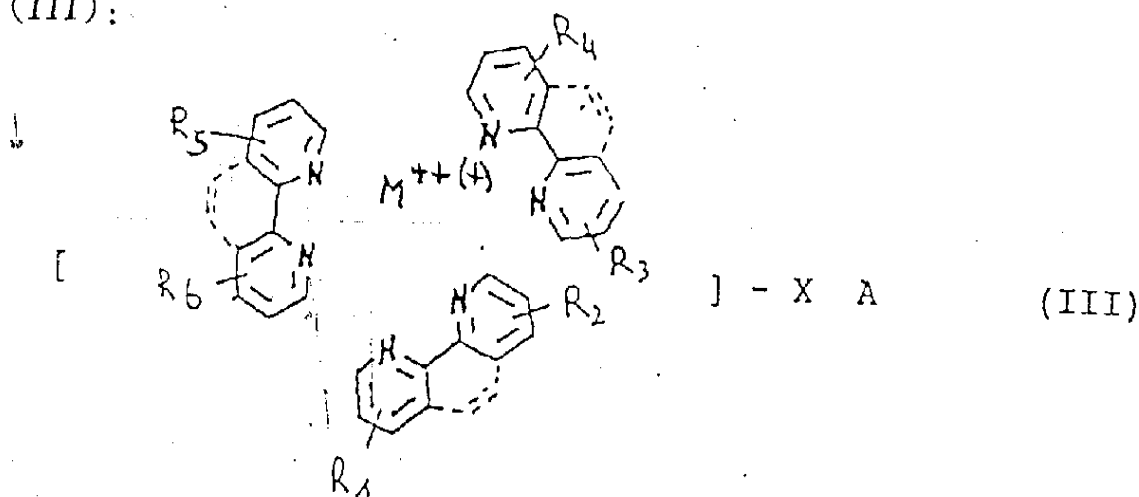


其中 W 表示带至少两个羟基的有机残基, R 表示氢或  $C_1-C_5$  烷基。有机残基 W 优选含有 2-6 个, 特别优选 2-4 个羟基。此外, W 优选应含有 2-10 个, 特别是 3-6 个碳原子。合适的多羟基单元的具体例子是多元醇如丙三醇或氨基多元醇的残基。优选的氨基多元醇是三(2-氨基-2-(羟甲基)-1,3-丙烷三醇)。此时多羟基单元的结构式为  $\text{NH—C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ 。多元醇或氨基多元醇优选以酯或酰胺的形式偶合于金属配合物上。多元醇或氨基多元醇的 OH 基团可任选由亲水基团如 dendrimeric (一种具有树状分枝结构的分子, 是通过重复合成从多功能分子合成的) 基团取代。

本发明的金属配合物的  $C_2-C_3$  亚烷基氧基、 $C_2-C_3$  亚烷基硫基和  $C_2-C_3$  亚烷基氨基单元优选为  $C_2$  单元, 特别是亚乙基氧基单

元。该配合物优选每个金属阳离子含有1—30个，特别优选2—20个C<sub>2</sub>—C<sub>3</sub>亚烷基氧基，C<sub>2</sub>—C<sub>3</sub>亚烷基硫基或C<sub>2</sub>—C<sub>3</sub>亚烷基氨基单元。这些单元是该金属配合物的杂环配位体的取代基上的组分。它们可以存在于一个配位体与活性官能基X之间的连接基中和/或存在于单取代基中。该亚烷基氧基、亚烷基硫基或亚烷基氨基单元还可经由一个可任意带有一个官能基团X的桥头而连在一起。另一方面，几个配合物单元地可经由该桥头连在一起。

在本发明的一个实施方案中，本发明的金属配合物具有通式(III)：

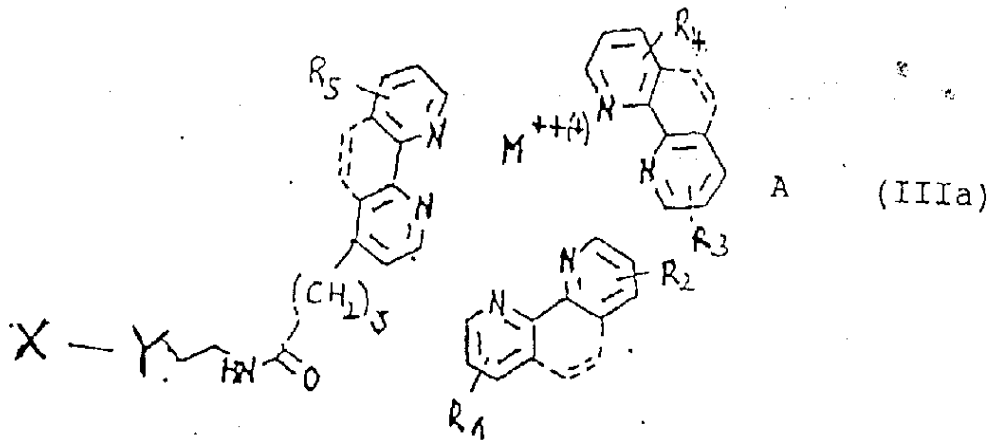


其中M、X和A如上所定义，R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>相同或不同且各自表示一个或几个取代基，条件是X是经由作为连接基的取代基R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>中的一个与配位体相连。

根据虚线所示的基团的存在与否，该配合物的配位体也可以是取代的菲咯啉或联吡啶体系。

配位体上的取代基R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>只要不含连接基的基团X，则优选为氢、C<sub>1</sub>—C<sub>5</sub>烷基，特别是C<sub>1</sub>—C<sub>3</sub>烷基或上面定义的亲水基团。

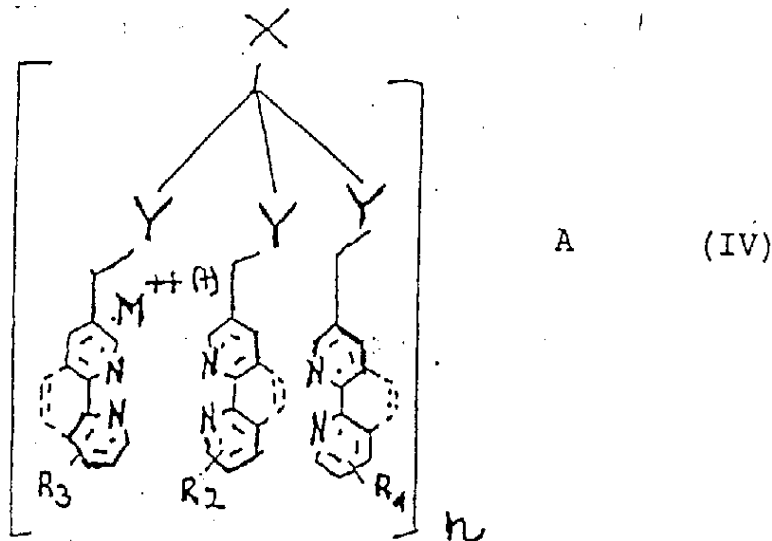
在一个特别优选的实施方案中，该金属配合物具有通式(IIIa)：



其中  $M$ 、 $X$  和  $A$  如上所定义,  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$  和  $R_5$  如上所定义,  $S$  为 0—6、优选 1—4 的整数,  $Y$  表示带有游离的电荷载体的连接基。

式 (III) 和 (IIIa) 的化合物的实例示于图 1—3 中。图 1 和 2 表示带有连接基的配合物, 在每一情形中该连接基带有一个游离的负电荷载体。在每一情形中, 该连接基含有一个三官能氨基酸, 即赖氨酸; 其氨基用于在连接基中形成肽键, 而其羧酸根形成游离的电荷载体。图 3 表示一个由 4 个氨基酸单元, 即  $\beta$ -氨基丙酸、赖氨酸和两个谷氨酸残基组成的连接基。该连接基含有三个负电荷载体, 即两个来自两个谷氨酸残基的羧酸根和一个来自赖氨酸残基的羧酸根。图 1 和 3 中的官能基  $X$  为适于与  $SH$  基团偶合的马来酰亚胺, 而在图 2 中它为适于与  $NH_2$  基团偶合的  $N$ -羟基琥珀酰亚胺酯。

本发明的金属配合物的配位体还可连在一起, 以使该金属配合物以半笼状或笼状形式存在。本发明的半笼状或笼状形式的金属配合物的一个优选实施方案具有通式 (IV):



其中  $M$ 、 $X$ 、 $n$  和  $A$  如上所定义,  $R_1$ 、 $R_2$  和  $R_3$  相同或不同, 且各自表示联吡啶或菲咯啉配位体上的一个或几个如上所定义的取代基,  $Y$  在每一情形中均表示带有至少一个电荷载体的连接基。

如果式(IV)中的取代基  $R_1$ 、 $R_2$  和  $R_3$  任选地经由连接基共价地连在一起, 那么式(IV)的配合物为笼形。

式(IV)的配合物不仅可以单体存在, 还可以优选由 5 个以内的单个金属配合物组成的低聚体存在。此时能偶合的官能基  $X$  例如可以是芳核如苯核上的一个取代基, 在此情况下该芳核的剩余取代位置的两个或多个可由一个半笼状或笼状形式的金属配合物取代。

本发明的金属配合物可通过使金属盐和金属卤化物与合适的配位体反应, 然后任选地用六氟磷酸根、三氟乙酸根或四氟硼酸根阴离子代替卤化物离子而制备。这些方法在现有技术如 EP-B-0178450 和 EP-B-0255534 中有描述, 这一公开在此引作参考文献。

带有带电连接基的  $N$ -杂环配位体上的带电连接基的合成一方面可通过溶剂中的偶合反应达到, 其中一个任选地部分受保护的氨基羧酸与配位体的一个活性基团如羧酸偶合。如果需要, 这一偶合链节再次重复; 直至合成出预期长度的连接基。在该方法中, 导入至少一个含有一个或几个带电侧基的多官能氨基羧酸基。

然后导入活性基团  $X$  并除去可能存在于氨基羧酸侧基上的保护基团。通过在溶液中连续偶合氨基酸而合成配位体的方法一方面可以在单个配位体上进行, 另一方面也可在已与金属配合物相连的原料配位体上进行。合适的原料例如是含有一个游离羧酸根的发

光的金属配合物。这类配合物在上述文献中是已知的且可从 Igen Inc. Co., Rockville, MD, USA 购得。

另一方面,这些配合物也可通过固相肽合成而合成。在固相合成的第一实施方案中,氨基酸经由其羧酸根与固相载体偶合,然后通过顺次偶合其他氨基酸而合成出预期的连接基。为了制备本发明的连接基,在本方法中使用至少一种含有任选受保护的带电基团如氨基或羧酸根作侧基的氨基酸。完成预期的连接基序列后,活化的金属配合物(如活性酯形式)可与固相结合肽的游离 N-端氨基偶合。从固相分离之后,活性基团 X 可与肽连接基的端羧基偶合,并除去可能存在的保护基团。

在固相合成的另一实施方案中,含有一个被保护氨基和一个羧酸根的氨基酸-金属配合物衍生物如  $Fmoc-Lys(BRu)-OH$ (图 4)可通过一游离羧酸根与固相结合,并且可在释放被保护的氨基之后合成出肽连接基。完成预期的连接基序列之后,从固相分离该配合物,得到至少含有原羧酸根结合基团作游离电荷载体的连接基。活性基团 X 可与所产生的肽连接基的端氨基偶合。

在固相合成的第三实施方案中,带有电荷载体的连接基序列还可直接在选定的肽抗原决定基上合成。

也可将上述合成方式组合起来生产本发明的金属配合物。适于本发明的带有带电连接基的配合物的固相合成的氨基酸-金属配合物共轭物在 DE-A-4430 998.8 中有描述。这一公开在此引入作参考。

具有半笼形或笼形结构的式(IV)金属配合物的制备可通过将带电连接基与联吡啶或菲咯啉配位体相连并使这些单元经由一酰胺

键与桥头相连而进行。若使用两个桥头,则可得到完整的笼形结构。优选三个配位体与三价桥头如三(羟甲基)一氨基甲烷相连。

本发明的另一主题物是包含一种至少一种本发明的金属配合物与其相偶合的生物物质的衍生物。合适的生物物质是细胞、病毒、亚细胞颗粒、蛋白质、脂蛋白、糖蛋白、肽、多肽、核酸、肽核酸(PNA)、低聚糖、多糖、脂多糖、细胞代谢物、半抗原、激素、药理活性物质、生物碱、类固醇、维生素、氨基酸和糖类。

金属配合物经由可与生物物质的官能基团共价偶合的金属配合物的活性官能基团与该生物物质偶合。若该官能基团为活性酯,则它可与该生物物质的游离氨基偶合。若该官能基团为马来酰亚胺残基,则它可与该生物物质的游离SH基团偶合。

在本发明的一个特别优选的实施方案中,金属配合物与优选具有最大长度为50个氨基酸,特别优选为30个氨基酸的肽偶合。这些用金属配合物标记的肽的生产优选通过在固相上合成具有预期氨基酸序列的肽而进行,其中a)在合成之后,将活化的金属配合物,优选金属配合物—活性酯衍生物,与肽的N—端氨基偶合和/或b)在合成过程中,在肽的至少一个位置导入与金属配合物共价偶合的氨基酸衍生物。金属配合物与肽的N—端氨基酸的偶合优选在从固相分离该肽之前和在除去用于肽合成的氨基酸衍生物的活性侧基上的保护基团之前进行。

这些肽优选含有一个免疫活性抗原决定基区和一个间隔基区,其中至少一个金属配合物标记基与该间隔基区偶合。间隔基区优选具有1—10个氨基酸长度且位于该肽的端氨基和/或端羧基处。

间隔基区优选含有带电荷和/或可形成氢桥的氨基酸、间隔基

区的氨基酸优选由如下化合物形成：甘氨酸、 $\beta$ -氨基丙酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、 $\epsilon$ -氨基己酸、赖氨酸和结构式  $\text{NH}_2 - [(\text{CH}_2)_y\text{O}]_x - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$  (其中  $y$  为 2 或 3 和  $x$  为 1—10) 的化合物。

肽的抗原决定基区优选衍生于致病的生物体，例如细菌、病毒和原生动物，或衍生于自身免疫抗原。特别优选该抗原决定基区衍生于病毒抗原，例如 HIVI、HIVII 或丙肝病毒 (HCV) 的氨基酸序列。

生物物质的更优选实例是生物素，核酸，抗体或抗体片段，多肽抗原即免疫活性多肽或半抗原即分子量为 150—2000 的有机分子，特别是具有类固醇骨架的分子，如卡烯内酯、卡烯内酯一苷 (例如地谷新、毛地黄毒苷)，类固醇生物碱，性激素 (例如黄体酮)，糖皮质激素等。半抗原的其它实例是前列腺素，白三烯，*leuco-en-diines* (具有两个三键的白三烯衍生物)，*thromboxanes* (可作为组织激素的花生四烯酸的代谢衍生物) 等。

本发明的再一主题物是本发明的金属配合物或本发明的轭合物在免疫检测法或核酸杂化法中的作用，尤其是在发光测定中的用途。

在这些方法中，该金属配合物用作标记基，借助它可定性和/或定量测定样品溶液中的被分析物。该金属配合物优选通过电化学发光法检测，此时发光样品在电极的表面上通过电化学作用产生。用现有技术中的金属配合物进行发光测定的实例可在 EP-A-0 580 979、WO 90/05301、WO 90/11511 和 WO 92/14138 中找到。这些文献中所公开的用于发光测定的方法和装置在此引作参考。电化学发光测定在一固相存在下进行，该固相优选由微粒组成，特别是由涂有活性涂层如抗生蛋白链菌素的磁性微粒组成。以此方式可以检测出

含有金属配合物作标记基的免疫或杂化配合物与固相相连。

电化学发光测量优选在用于该金属配合物的还原剂如胺的存在下进行。优选脂族胺，特别是其中烷基各具有1—3个碳原子的伯、仲和叔烷基胺特别优选三丙基胺。然而，胺也可以是芳族胺如苯胺或杂环胺。还原剂可以结合到该配合物的配位体球中。

此外，非离子表面活性剂如乙氧基化苯酚也可以作为增强剂存在。此类物质可以 *Triton X100* 或 *Triton N401* 的商品名从市场上购得。

另一方面，发光的金属配合物也可通过荧光法检测，此时可通过用合适波长的光照射来激发金属螯合并测量所产生的荧光辐射。进行荧光测定的例子可在 *EP—A—0178450* 和 *EP—A—0255534* 中找到。这些公开物在此引作参考。

此外，使用带有带电连接基的金属配合物的前述原理也可应用于其他标记基和/或固相结合基。因此本发明还涉及带有经连接基共价键合的活性官能基 *X* 的标记基和/或固相结合基，其中该连接基至少含有一个正性和/或负性的电荷载体。该连接基优选至少部分地由经肽键连接在一起的氨基酸单元组成。

标记基和/或固相结合基优选选自荧光标记基如荧光黄、香豆素、若丹明、试卤灵、花青及其衍生物，以及生物素和生物素类似物，如亚氨基生物素或脱硫生物素。

本发明还涉及上述标记基和/或固相结合基与前面所定义的生物物质的轭合物。该标记基和/或固相结合基或其轭合物可用于免疫检测法或核酸杂化法中。在这些方法中，由于形成了二聚体或更大的聚集体，所以可以改进溶解性并降低或防止信号骤灭。

本发明的又一主题物是一种将 *N*-羧基琥珀酰亚胺酯基团引入肽或肽衍生物中的方法,其特征在于具有游离氨基官能基,优选脂族、特别优选脂族伯氨基官能基的肽或肽衍生物与辛二酸二(羧基琥珀酰亚胺)酯(DSS)反应,从而将氨基官能基转化成 *N*-羧基琥珀酰亚胺酯。随后可将通过引入 *N*-羧基琥珀酰亚胺酯基团而活化的肽或肽衍生物与上述生物物质偶合。

该方法的一个特殊优点是可使用至少具有一个游离酸官能基、特别是一个羧酸官能基的肽或肽衍生物。与已知方法相反,本方法不需封阻酸官能基。

除肽以外,还可以活化那些至少带有一个标记基和/或固相结合基如金属配合物、荧光基团或生物素基团的肽衍生物。

活化反应优选在有机溶剂如二甲基甲酰胺中在碱如叔胺(例如三乙胺)存在下进行。相对于肽或肽衍生物来说,辛二酸二-*N*-羧基琥珀酰亚胺酯优选以 2:1 至 10:1 的过量摩尔比使用。

通过如下实施例和附图进一步说明本发明。

图 1-3 说明本发明的金属配合物。

图 4 说明适用于合成本发明金属配合物的氨基酸金属配合物衍生物。

图 5 说明活化的肽-金属配合物衍生物。

#### 实施例 1

带有带电连接基的金属配合物的制备

将 6mmol EP-A-0580 979 的金属配合物  $Ru(2,2'-联吡啶) $_2$ -(2,2'-联吡啶-CO-N-羧基琥珀酰亚胺酯)溶于 50ml 二甲基甲酰胺中,滴加 Fmoc-赖氨酸的二甲基甲酰胺溶液,在高真$

空下除去溶剂。将残余物溶于少量丙酮,与 300ml 氯仿混合并快速加热到沸点。冷却并从溶剂中分离出分开的油。通过干燥得到固态的预期化合物  $Ru(bpy)_2(bpy-CO-(Fmoc-Lys))$ 。

通过在二噁烷/丙酮中于  $80^{\circ}C$  下以过量 4 倍的哌啶反应 2 小时而除去 *Fmoc* 保护基团。冷却后分离油状残余物,并进行氯仿/水萃取。分离水相,得到红色固体化合物  $Ru(bpy)_2(bpy-CO-Lys)$ 。

将 60mg 该化合物溶于 10ml 丙酮中,加入马来酰亚氨基丙酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯,室温搅拌 4 小时。用制备型 HPLC 纯化该残余物。得到 17mg 化合物  $Ru(bpy)_2(bpy-CO-Lys-MP)$ 。该化合物示于图 1 中。

### 实施例 2

#### 带有带电连接基的金属配合物的制备

将实施例 1 的  $Ru(bpy)_2(bpy-CO-Lys)$  和摩尔量过量 10 倍的辛二酸-二-N-羟基琥珀酰亚胺酯溶于二甲基甲酰胺中并室温搅拌 2 小时。在高真空下除去溶剂,用水萃取残余物,并在用己烷处理后冻干。用 HPLC 纯化之 (100%  $H_2O$ , 在 20 分钟内变成 100% 乙腈,  $C_{18}$ , 3 $\mu m$  柱, 流速: 1ml/min, 停留时间: 10min)。所得化合物示于图 2。

### 实施例 3

#### 用固相肽合成制备金属配合物

通过在购自 Applied Biosystems A431 或 A433 的间歇式肽合成器上合成苄基甲氧基羰基-(*Fmoc*)-固相肽来制备带有带电连接基的金属配合物。为此在每一情形中使用 4 当量的表 1 所示氨基

表 1

A	Fmoc-Ala-OH
C	Fmoc-Cys(Trt)-OH
D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH
E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH
F	Fmoc-Phe-OH
G	Fmoc-Gly-OH
H	Fmoc-His(Trt)-OH
I	Fmoc-Ile-OH
K1	Fmoc-Lys(Boc)-OH
K2	Boc-Lys(Fmoc)-OH
K3	Fmoc-Lys(BPRu)-OH
L	Fmoc-Leu-OH
M	Fmoc-Met-OH
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH
P	Fmoc-Pro-OH
Q	Fmoc-Gln(Trt)-OH
R	Fmoc-Arg(Pmc)-OH
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH
T	Fmoc-Thr(tBu)-OH
U	Fmoc-β-氨基丙酸

V	Fmoc-Val-OH
W	Fmoc-Trp-OH
Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH

Z	Fmoc- $\epsilon$ -氨基己酸 -OH
Nle	Fmoc- $\epsilon$ -正亮氨酸 -OH
Abu	Fmoc- $\gamma$ -氨基丁酸 -OH

在方法(a)一金属配合物在固相合成后的引入中,活化的钌(2, 2'-联吡啶)<sub>3</sub>配合物(BPRu)如  $Ru(bpy)_2(bpy-CO-NHS)$ (参照实施例1)与肽的N-端氨基酸偶合。

根据方法(b),金属螯合基团通过如下方式引入肽序列中:经由用金属螯合物活性酯如赖氨酸衍生物K3(图4) $\epsilon$ -衍生物的赖氨酸残基在该序列的端羧基处直接引入与金属螯合物偶合的氨基酸衍生物。

将氨基酸或氨基酸衍生物溶于N-甲基吡咯烷酮中。在400-500mg(4-(2', 4'-二甲氧苄基-Fmoc-氨基)苄氧基树脂(Tetrahedron Letters 28 (1987), 2107)上以0.4-0.7mmol/g的比例合成肽(JACS 95(1973), 1328)。用相对于Fmoc-氨基酸衍生物来说为4当量的二环己基碳化二亚胺和4当量的N-羟基苯并三唑在反应介质二甲基甲酰胺中进行20分钟的偶合反应。各合成步骤之后使用在二甲基甲酰胺中的20%哌啶在20分钟内除去Fmoc基团。

当肽序列中存在半胱氨酸残基时,在完成合成后立即在六氟异丙醇/二氯甲烷中用碘氧化固相。

将肽从载体上分离并使用20ml三氟乙酸、0.5ml乙二硫醇、1ml茴香硫醚、1.5ml苯酚和1ml水于室温下在40分钟内除去对酸不稳定的保护基团。然后将反应溶液与300ml冷却的二异丙醚混合,并在0℃下保持40分钟,直到肽沉淀完全。过滤沉淀,再用二异丙醚洗涤,溶于少量50%乙醇中并冻干。通过Delta-PAKRP C18材料上的制备型HPLC(50×300mm柱, 100Å, 15u)在相应的梯度

内(洗脱液 A:水, 0.1%三氟乙酸, 洗脱液 B:乙腈, 0.1%三氟乙酸)在约120分钟内提纯所得到的粗产物。用离子喷射质谱检测洗脱物。

经由合适的活性酯衍生物将金属螯合物标记引入到方法(a)的与载体相连的肽的游离N—端氨基上。为此,用溶于少量DMSO中的N—羟基苯并三唑/二环己基碳化二亚胺在滴加和室温下搅拌的条件下活化每当量游离伯氨基官能基4当量的钆(2,2'-联吡啶)<sub>3</sub>配合物(BPRu)。用分析型HPLC监测反应。产品与载体分离后,用制备型HPLC提纯。用离子喷射质谱检测洗脱物。

通过方法(a)和(b)的组合,即在序列中引入与金属螯合物偶合的氨基酸衍生物,除去N—端Fmoc基团和使游离N—端氨基与金属螯合物活性酯衍生物反应来合成肽。

当在方法(b)的固相合成过程中仅直接引入与金属螯合物偶合的氨基酸衍生物时,以后就不再需要引入金属螯合物活性酯。

由固相合成所制备的一个金属配合物的例子示于图3。

为了引入马来酰亚胺官能基,将肽溶于pH7.0的0.1M磷酸钾缓冲液中并与1当量的溶于DMSO中的马来酰亚胺丙酸—N—羟基琥珀酰亚胺酯混合,在25℃下搅拌16小时。用制备型HPLC(见上文)纯化混合物。用离子喷射质谱检测洗脱物。根据DE—A—4302241,引入了一个活性N—羟基琥珀酰亚胺酯官能基。

#### 实施例4

带有带电连接基的金属配合物在免疫试验中的应用

进行双抗原桥试验,以检测抵抗丙肝病毒(HCV)的特殊抗体。为此,将样品液在涂覆有抗生蛋白链菌素的固相存在下用钆标记的抗原和抵抗待测抗体的生物素化抗原培育。根据Flash System用电

化学发光法测定固相中的标记来检测样品液中存在抵抗 HCV 的抗体。

将 HCV 多肽用作含有 HCV 的氨基酸 1207—1488 的抗原。该多肽的氨基酸序列和合成描述于 DE—A—4428 705.4 中。

为了用被琥珀酰亚胺酯活化的钆配合物来衍生 HCV 多肽，将多肽以 10mg/ml 的蛋白质浓度溶于 pH6.5、0.1%SDS 的 100mM 磷酸钠缓冲液中。加入 5M NaOH 使 pH 值变 8.5，用二硫苏糖醇将该溶液补充至最终浓度为 2mM。将在 DMSO 中用琥珀酰亚胺酯活化的钆配合物加到该溶液中，其量相应于预期提供的化学计算量，然后在搅拌的同时于 65℃ 培育 60 分钟。用赖氨酸将反应混合物补充至最终浓度为 10mM 并再培育 30 分钟，终止反应。然后使该混合物以 pH6.5、0.1%SDS 的 100mM 磷酸钠缓冲液渗析。将所得蛋白质溶液与蔗糖（最终浓度为 6.5% (W/V)）混合并分批冻干。

为了制备用被马来酰亚胺活化的钆配合物衍生的 HCV 多肽，将该多肽溶于 pH6.5、0.1%SDS 的 100mM 磷酸钠缓冲液中（蛋白质浓度 10mg/ml）。向该溶液中加入在 DMSO 中用马来酰亚胺活化的钆配合物，其量相应于预期提供的化学计算量，在搅拌下于 25℃ 培育 60 分钟。用半胱氨酸将反应混合物补充至最终浓度为 10mM 并再培育 30 分钟，终止反应。之后如上所述渗析该反应混合物，与蔗糖混合并分批冻干。

进行三次试验，每次试验使用不同的钆化抗原。对试验 A（对比），多肽以 1:3 的化学计量比与在实施例 1 和 2 中用作原料的 EP—A—0580 979 的钆配合物偶合。对试验 B，多肽以 1:1 的化学计量比与在实施例 1 中制备的本发明钆配合物（图 1）偶合。对试验 C，多

肽以 1:1 的化学计量比与在实施例 3 中制备的钆化合物 (图 3) 偶合。在所有的三个试验中, 多肽用作已与与马来酰亚胺活化的生物素以 1:6 的化学计量比偶合的生物素化抗原。每一情况中钆化抗原和生物素化抗原的使用浓度为 400ng/ml 试验液。

试验 A、B 和 C 的结果以 ECL 计数示于表 2。从表中可见, 只有在使用本发明的带有带电连接基的金属配合物作标记基时才能在阴性血清样品和明显的阳性血清样品之间达到可靠的差别。这一点由较高的正/负比说明。

表 2

试验	A ( 对比 )	B	C
负样品	323317	132288	14467
正样品	465769	1323338	319752
正/负比	1.4	10	22

#### 实施例 5

带有带电连接基的金属配合物和生物素群在免疫试验中的用途进行双抗原桥试验, 以按实施例 4 的程序检测抵抗 HIV I 的特殊抗体。

将 HIV 多肽 gp32 用作抗原。

在抗原和钆配合物和/或生物素之间引入肽连接基序列“EEE”和“EEEUZU”导致 HIV 阳性样品中不特定信号与没有连接基序列的抗原相比显著降低, 而特定信号基本得以保持。因而可通过使用带有带电连接基的标记基和/或固相结合基来显著改进被分析物测定中的动力学。

## 实施例 6

将 *N*-羟基琥珀酰亚胺酯基团引入肽衍生物中

将 250mg 辛二酸二(*N*-羟基琥珀酰亚胺)酯(DSS)和 50ul 三乙胺一起溶于二甲基甲酰胺中。往其中滴加按实施例 3 所述标准方法制备的肽衍生物 BPRu-UEEK 的溶液(100mg 溶于 DMF 中)。约 15 分钟后,以高真空除去 DMF,残余物溶于水,过滤除去不溶的 DSS。冻干滤液。

得到示于图 5 的产物。纯度按 HPLC 为 91%。NMR 和 MS 分析与期望产物一致。

以相似方式制备一种两次钆化的肽衍生物,它具有 Ac-K(BPRu)UEUEUK-(DSS)-UEUEUK(BPRu)UE 序列。可用 DSS 以相似方式活化生物素化肽或带有其他标记基的肽或未标记的肽而不是钆化肽。令人惊奇的是,在游离羧酸官能基存在下该反应顺利进行。

图.1

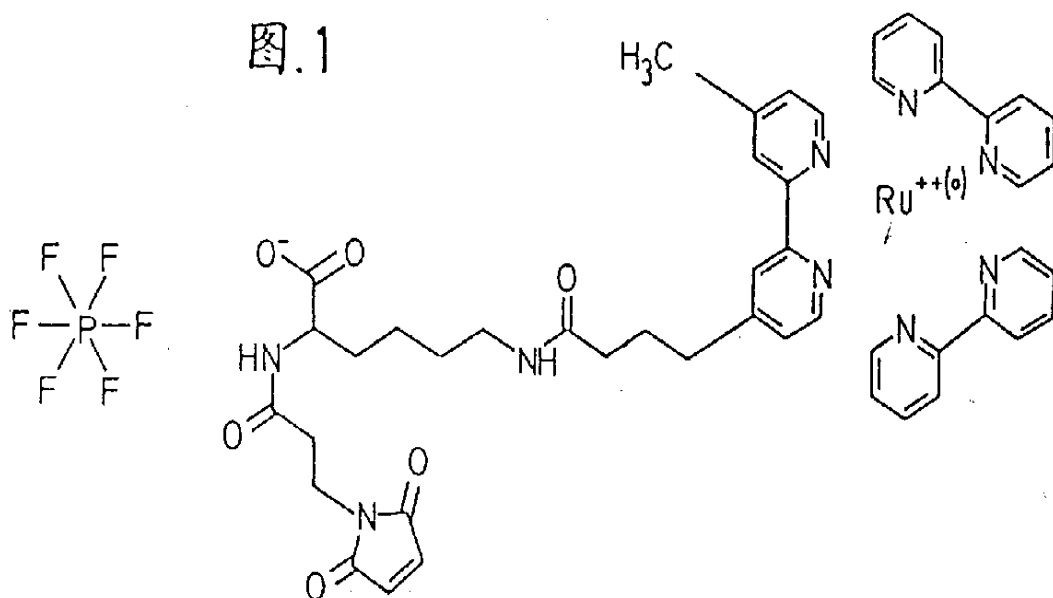


图 2

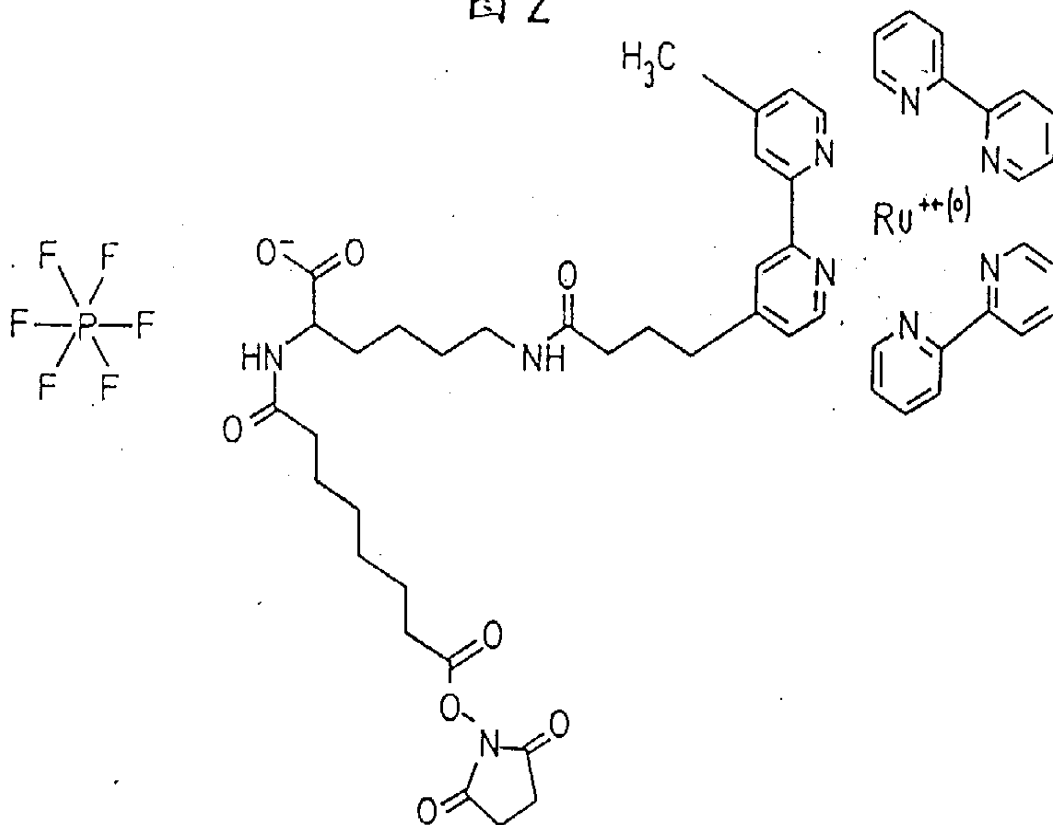


图.3

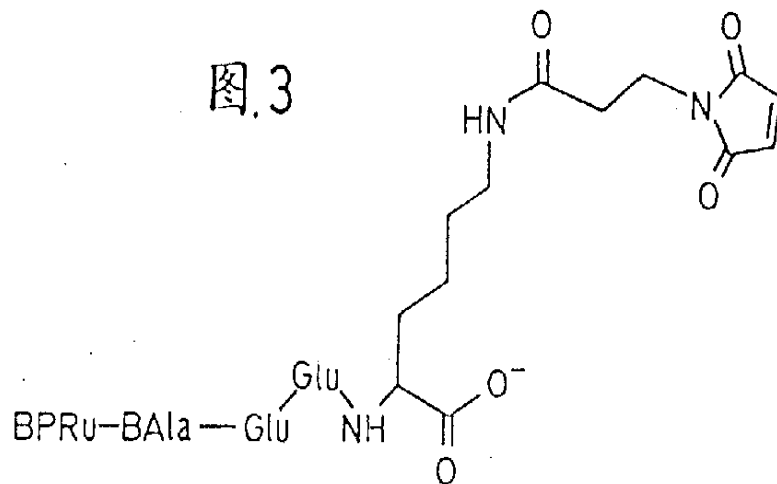


图.4

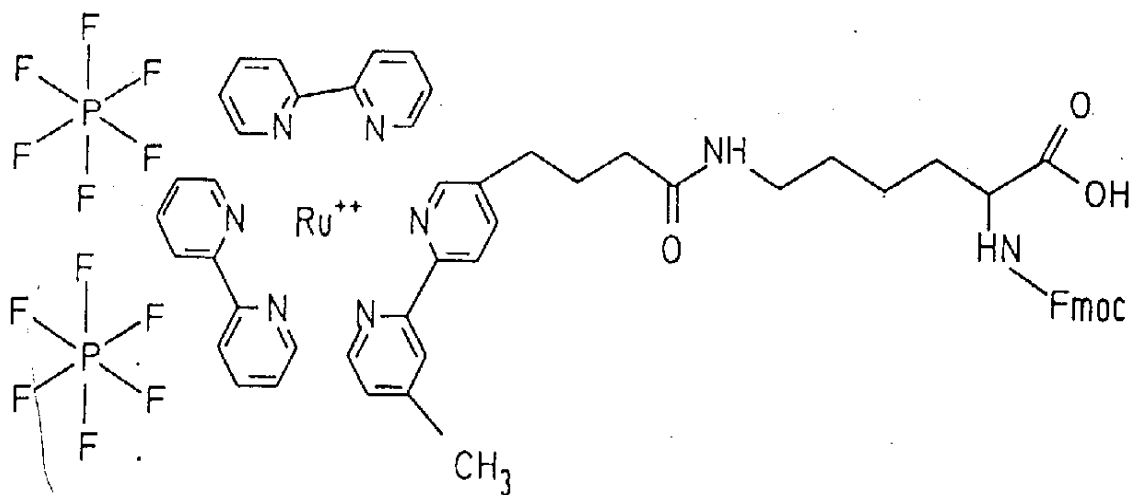


图.5

