



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103476761 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 03

(21) 申请号 201280015761. 3

(22) 申请日 2012. 03. 05

(30) 优先权数据

61/469, 355 2011. 03. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 09. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/027698 2012. 03. 05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/134724 EN 2012. 10. 04

(73) 专利权人 3M 创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 S·B·罗斯科 周世宏 S·J·莫勒

J·D·米勒 K·J·哈尔威森

J·W·比约克

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈长会

(51) Int. Cl.

C07D 311/16(2006. 01)

(56) 对比文件

US 5830912 A, 1998. 11. 03,

Wei-Chuan Sun, 等. Synthesis of Novel Fluorinated Coumarins: Excellent UV-Light Excitable Fluorescent Dyes. 《Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters》. 1998, 第 8 卷

宋丹梅, 等. 香豆素类荧光化合物的合成及表征. 《精细化工》. 2009, 第 26 卷 (第 6 期),

Chen, Kangyu, 等. Novel Coumarin-based Fluorescent Probe for Selective Detection of Bisulfite Anion in Water. 《Chin. J. Chem. 》. 2010, 第 28 卷 (第 1 期),

审查员 原静

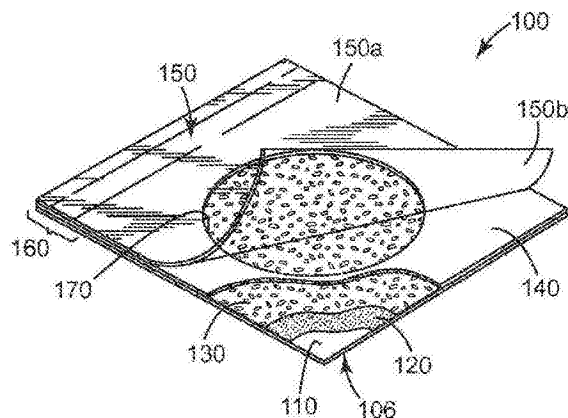
权利要求书4页 说明书32页 附图4页

(54) 发明名称

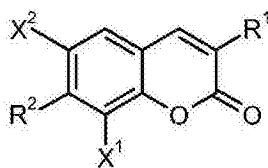
荧光原性化合物或荧光性化合物及其用途

(57) 摘要

本发明提供为荧光原性的或荧光性的化合物。还提供包含所述化合物的组合物和制品。另外, 还提供使用所述化合物检测微生物的方法。所述化合物是氟化的, 并且可以有利地在酸性条件下使用。



1. 一种式(I)化合物



(I)

其中

R^1 为 $-(CO)-OR^3$ 、 $-(CO)-NR^4R^5$ 、具有1至5个选自氧、硫或氮的杂原子和1至15个碳原子的杂环基团、具有6至20个碳原子的芳基、具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基或氰基；

R^3 为具有1至30个碳原子的烷基、具有2至30个碳原子的烯基、具有6至20个碳原子的芳基或具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基；

R^4 和 R^5 各自独立地为氢、具有1至30个碳原子的烷基、具有6至20个碳原子的芳基或具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基；并且

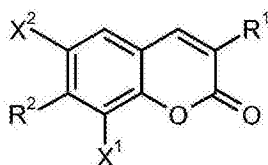
要么(a) X^1 为氢且 X^2 为氟，要么(b) X^1 为氟且 X^2 为氢，并且其中 R^2 为糖基，所述糖基为单糖基或二糖基。

2. 根据权利要求1所述的化合物，其中 R^1 为 $-(CO)-OR^3$ ，其中 R^3 为具有1至20个碳原子的烷基。

3. 根据权利要求1所述的化合物，其中 R^1 为具有1至3个选自氧、硫或氮的杂原子的五元杂环。

4. 根据权利要求1所述的化合物，其中 R^1 为稠合至苯环的具有1至3个选自氧、硫或氮的杂原子的五元杂环。

5. 一种包含可与水混溶的有机溶剂和式(I)化合物的组合物，



(I)

其中

R^1 为 $-(CO)-OR^3$ 、 $-(CO)-NR^4R^5$ 、具有1至5个选自氧、硫或氮的杂原子和1至15个碳原子的杂环基团、具有6至20个碳原子的芳基、具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基或氰基；

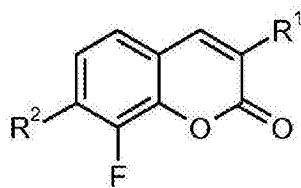
R^3 为具有1至30个碳原子的烷基、具有2至30个碳原子的烯基、具有6至20个碳原子的芳基或具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基；

R^4 和 R^5 各自独立地为氢、具有1至30个碳原子的烷基、具有6至20个碳原子的芳基或具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基，

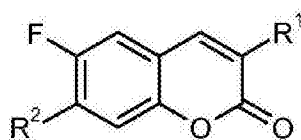
和其中 R^2 为糖基，所述糖基为单糖基或二糖基；并且

要么(a) X^1 为氢且 X^2 为氟，要么(b) X^1 为氟且 X^2 为氢。

6. 根据权利要求5所述的组合物, 其中所述组合物包含式(I-1)化合物和式(I-2)化合物的混合物



(I-1)

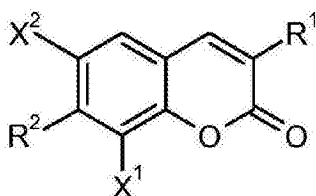


(I-2)。

7. 一种制品, 其包括:

a) 第一层, 其为支承层;

b) 与所述支承层相邻的第二层, 其中所述第二层包含式(I)化合物



(I)

其中

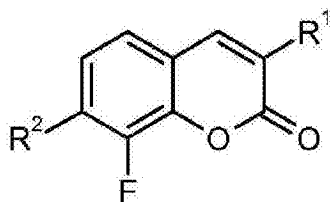
R^1 为 $-(CO)-OR^3$ 、 $-(CO)-NR^4R^5$ 、具有1至5个选自氧、硫或氮的杂原子和1至15个碳原子的杂环基团、具有6至20个碳原子的芳基、具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基或氰基;

R^3 为具有1至30个碳原子的烷基、具有2至30个碳原子的烯基、具有6至20个碳原子的芳基或具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基;

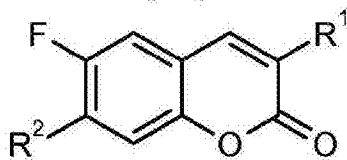
R^4 和 R^5 各自独立地为氢、具有1至30个碳原子的烷基、具有6至20个碳原子的芳基或具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基; 并且

要么(a) X^1 为氢且 X^2 为氟, 要么(b) X^1 为氟且 X^2 为氢, 并且其中 R^2 为糖基, 所述糖基为单糖基或二糖基。

8. 根据权利要求7所述的制品, 其中所述第二层包含式(I-1)化合物和式(I-2)化合物的混合物



(I-1)



(I-2)。

9. 根据权利要求7或8所述的制品, 其中所述第二层还包含胶凝剂、培养基或它们的组合。

10. 根据权利要求9所述的制品, 其中所述第二层为脱水的。

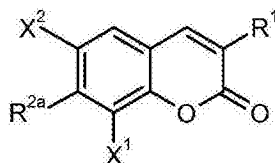
11. 根据权利要求9所述的制品, 其中所述第二层还包含聚合物粒子。

12. 根据权利要求11所述的制品, 其中所述聚合物粒子包含丙烯酸酯聚合物或共聚物、苯乙烯聚合物或共聚物、纤维素聚合物或共聚物、葡聚糖聚合物或共聚物、或它们的组合。

13. 根据权利要求11所述的制品, 其中所述聚合物粒子具有在0.01微米至1微米范围内的平均粒径。

14. 一种检测微生物的方法, 所述方法包括:

提供式(Ia)的荧光原性化合物



(Ia)

其中

R¹为-(CO)-OR³、-(CO)-NR⁴R⁵、具有1至5个选自氧、硫或氮的杂原子和1至15个碳原子的杂环基团、具有6至20个碳原子的芳基、具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基或氰基;

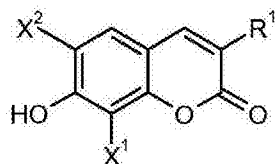
R³为具有1至30个碳原子的烷基、具有2至30个碳原子的烯基、具有6至20个碳原子的芳基或具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基;

R⁴和R⁵各自独立地为氢、具有1至30个碳原子的烷基、具有6至20个碳原子的芳基或具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基; 并且

要么(a)X¹为氢且X²为氟, 要么(b)X¹为氟且X²为氢;

并且其中R²ᵃ为糖基, 所述糖基为单糖基或二糖基; 以及

将测试样品与所述式(Ia)的荧光原性化合物一起温育, 其中所述测试样品含有裂解基团R²ᵃ的酶, 从而导致形成式(Ib)的荧光性化合物; 并且



(Ib)

用第一波长的光激发所述式(Ib)的荧光性化合物并检测以比第一光波长要长的第二光波长发出的光。

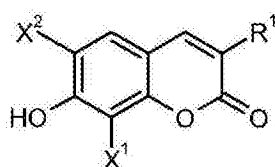
15. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述第一波长的光和所述第二波长的光均在紫外光、可见光或红外光区域中。

16. 根据权利要求14或15中任一项所述的方法, 其中将所述测试样品与所述荧光原性化合物一起温育的步骤包括将液体形式的所述测试样品添加至含有所述式(Ia)的荧光原性化合物和培养基的脱水层。

17. 根据权利要求14至15中任一项所述的方法, 其中所述方法还包括在聚合物粒子上螯合所述式(Ib)化合物。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述聚合物粒子具有在0.01微米至1微米范围内的平均粒径。

19. 一种制备式(Ib)化合物的方法,



(Ib)

其中

R^1 为 $-(CO)-OR^3$ 、 $-(CO)-NR^4R^5$ 、具有1至5个选自氧、硫或氮的杂原子和1至15个碳原子的杂环基团、具有6至20个碳原子的芳基、具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基或氰基;

R^3 为具有1至30个碳原子的烷基、具有2至30个碳原子的烯基、具有6至20个碳原子的芳基或具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基;

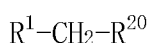
R^4 和 R^5 各自独立地为氢、具有1至30个碳原子的烷基、具有6至20个碳原子的芳基或具有含1至10个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子的芳基部分的芳烷基; 并且

要么(a) X^1 为氢且 X^2 为氟, 要么(b) X^1 为氟且 X^2 为氢;

所述方法包括:

利用直接氟化反应使2,4-二羟基苯甲醛与氟化剂反应以形成包含3-氟-2,4-二羟基苯甲醛、5-氟-2,4-二羟基苯甲醛或它们的混合物的氟化中间体;

使所述氟化中间体与式(III)化合物反应,



(III)

以形成所述式(Ib)化合物, 其中 R^{20} 为氰基、羧基 $(-COOH)$ 或式 $-COOR^1$ 基团。

荧光原性化合物或荧光性化合物及其用途

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2011年3月30日提交的美国临时专利申请No.61/469355的权益,该专利申请的公开内容全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及荧光原性(fluorogenic)化合物和荧光性(fluorophoric)化合物、包含这些化合物的组合物和制品、制备这些化合物的方法以及利用这些化合物检测微生物的方法。

背景技术

[0004] 多种基于7-羟基香豆素的化合物(也称为伞形酮)及其衍生物已被用作酶活性的荧光指示剂。伞形酮是发荧光的,但当用酶不稳定基团将7-羟基官能化时,所得化合物的荧光被猝灭。当与适当的酶接触时,该酶不稳定基团可通过水解释放,从而导致7-羟基重新形成且荧光恢复。

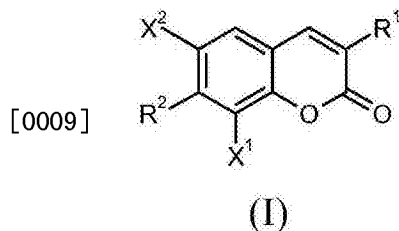
[0005] 一些已知的荧光指示剂包括(例如)美国专利No.5,830,912(Gee等人)、美国专利No.6,566,508(Bentsen等人)、Gee等人的论文Analytical Biochemistry(《分析生物化学》),273,41-48(1999)和Guo等人的论文Huaxue Shiji(《化学试剂》),32(8),673-676(2010)中所述的那些。

[0006] 一种示例性的荧光指示剂为称为4-MUG的4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸。当暴露于微生物如大肠菌群时,非荧光的4-MUG转化为称为4-MU的荧光化合物4-甲基伞形酮。当用作酶活性的荧光指示剂时,样品的pH通常必须是碱性的,以便使4-MU的荧光信号最大化。即,诸如4-MU之类的化合物能够以酸性和碱性形式存在,其中碱性形式在所关注的波长(如,最大吸收波长、最大发射波长或这二者)处具有显著更大的荧光。

发明内容

[0007] 需要的是用于检测多种微生物、在酸性条件下能够发出荧光的化合物。提供或者(a)在酸性条件下发出荧光,或者(b)在暴露于将酶不稳定基团转化为羟基的酶之后在酸性条件下发出荧光的化合物。还提供包含所述化合物的组合物和制品。另外,还提供制备所述化合物的方法以及用所述化合物检测微生物的方法。

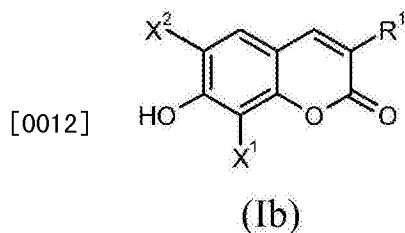
[0008] 在第一个方面,提供了式(I)化合物。



[0010] 在式(I)中,R¹为-(CO)-OR³、(CO)-NR⁴R⁵、杂环基团、芳基、芳烷基或氰基。基团R³为

烷基、烯基、芳基或芳烷基。基团 R^4 和 R^5 各自独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。基团 R^2 为羟基或酶不稳定基团。或者(a) X^1 为氢且 X^2 为氟,或者(b) X^1 为氟且 X^2 为氢。

[0011] 在第二个方面,提供了制备式(Ib)化合物的方法。



[0013] 在式(Ib)中, R^1 为 $-(CO)-OR^3$ 、 $-(CO)-NR^4R^5$ 、杂环基团、芳基、芳烷基或氰基。基团 R^3 为烷基、烯基、芳基或芳烷基。基团 R^4 和 R^5 各自独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。或者(a) X^1 为氢且 X^2 为氟,或者(b) X^1 为氟且 X^2 为氢。该方法包括用氟化剂将2,4-二羟基苯甲醛直接氟化而形成氟化中间体,即3-氟-2,4-二羟基苯甲醛、5-氟-2,4-二羟基苯甲醛或它们的混合物。然后让氟化中间体与式(III)化合物反应



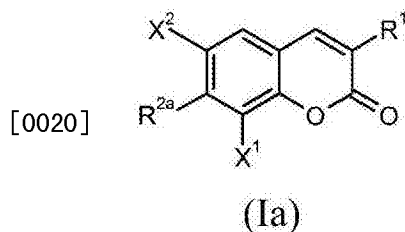
[0015] (III)

[0016] 以形成式(Ib)化合物。在式(III)中,基团 R^1 与式(Ib)所定义的相同,基团 R^{20} 为氰基、羧基 $(-COOH)$ 或式 $-COOR^1$ 基团。

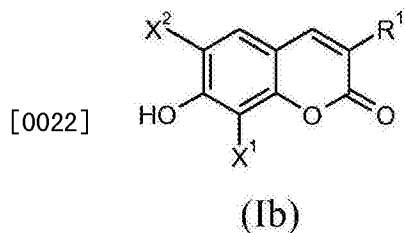
[0017] 在第三个方面,提供了包含式(I)化合物和可与水混溶的有机溶剂的组合物。

[0018] 在第四个方面,提供了包括为支承层的第一层和含有式(I)化合物的第二层的制品。第二层与支承层相邻。

[0019] 在第五个方面,提供了检测微生物的方法。该方法包括提供式(Ia)荧光原性化合物。



[0021] 在式(Ia)中, R^1 为 $-(CO)-OR^3$ 、 $-(CO)-NR^4R^5$ 、杂环基团、芳基、芳烷基或氰基。基团 R^3 为烷基、烯基、芳基或芳烷基。基团 R^4 和 R^5 各自独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。基团 R^{2a} 为酶不稳定基团。或者(a) X^1 为氢且 X^2 为氟,或者(b) X^1 为氟且 X^2 为氢。该方法还包括将测试样品与式(Ia)荧光原性化合物一起温育,其中测试样品含有来自微生物的酶,并且所述酶可水解基团 R^{2a} ,从而导致形成式(Ib)荧光性化合物。



[0023] 该方法还包括用第一波长的光激发式(Ib)荧光性化合物,并检测以比第一光波长

要长的第二光波长发出的光。

附图说明

[0024] 图1a和1b均为可包含式(I)化合物的制品的示例性示意图。

[0025] 图2为可包含式(I)化合物的薄膜制品的示例性示意图。

[0026] 图3示出了被称为FEHC的混合物较于3-羧酸乙酯-7-羟基香豆素(EHC)在450纳米(nm)处的发射(在400nm处激发)随pH的变化,其中该混合物FEHC含有6-氟-3-羧酸乙酯-7-羟基香豆素(6-FEHC)和8-氟-3-羧酸乙酯-7-羟基香豆素(8-FEHC)。

[0027] 图4示出了6-FEHC较于EHC在445纳米处的发射(在400nm处激发)随pH的变化。

[0028] 图5示出了3-苯并咪唑基伞形酮(BiU)和氟化的3-苯并咪唑基伞形酮在495nm处的发射(在450nm处激发)随pH的变化。

[0029] 图6示出了3-噻吩基伞形酮-吡喃半乳糖苷(TU-gal)、TU-gal+酶、氟化的3-噻吩基伞形酮-吡喃半乳糖苷(FTU-gal)以及FTU-gal+酶在495nm处的发射(在430nm处激发)随pH的变化。

[0030] 图7示出了3-噻吩基伞形酮(TU)和氟化的3-噻吩基伞形酮(FTU)的集落荧光随时间的变化。

[0031] 图8示出了TU和FTU在背景噪声下的集落荧光随时间的变化。

具体实施方式

[0032] 提供了为荧光原性的或荧光性的化合物。还提供包含所述化合物的组合物和制品。另外,还提供了制备这些化合物的方法以及用所述化合物检测微生物的方法。所述化合物是氟化的,并且可有利地在酸性条件下使用。与不具有氟原子的类似化合物相比,氟化化合物通常具有提高的亲脂性。

[0033] 由端点表述的任何数值范围意在包括所述范围的端点、所述范围内的所有数以及所述范围内的任何较窄的范围。

[0034] 术语“一个”、“一种”和“该”可互换地使用,“至少一个(种)”指一个(种)或多个(种)所述要素。

[0035] 术语“和/或”意指两者之一或两者。例如,表达“A和/或B”指A、B或A和B的组合。

[0036] 术语“烷基”是指为烷烃基团的一价基团并包括直链基团、支链基团、环状基团、双环基团或它们的组合。所述烷基通常具有1至30个碳原子。在一些实施例中,所述烷基含有1至20个碳原子、1至10个碳原子、1至6个碳原子、1至4个碳原子或1至3个碳原子。应当理解,支链烷基可以具有最少3个碳原子,环状烷基可以具有最少3个碳原子。

[0037] 术语“亚烷基”是指为烷烃基团的二价基团并包括直链基团、支链基团、环状基团、双环基团或它们的组合。亚烷基通常具有1至30个或2至30个碳原子。在一些实施例中,亚烷基具有2至20个碳原子、2至10个碳原子、2至6个碳原子或2至4个碳原子。

[0038] 术语“烯基”是指为具有至少一个碳-碳双键的烯属烃基的一价基团,并包括直链基团、支链基团、环状基团、双环基团或它们的组合。烯基通常具有2至30个碳原子。在一些实施例中,烯基含有2至20个碳原子、2至12个碳原子、2至10个碳原子或2至6个碳原子。

[0039] 术语“芳基”是指芳族的和碳环的一价基团。芳基可具有稠合至芳环的一个或多个

碳环。任何另外的环可以为不饱和的、部分饱和的或饱和的。芳基通常具有6至20个碳原子、6至18个碳原子、6至16个碳原子、6至12个碳原子或6至10个碳原子。

[0040] 术语“亚芳基”是指芳族的和碳环的二价基团。亚芳基可以具有稠合至芳环的一个或多个碳环。任何另外的环可以为不饱和的、部分饱和的或饱和的。亚芳基通常具有6至20个碳原子、6至18个碳原子、6至16个碳原子、6至12个碳原子或6至10个碳原子。

[0041] 术语“芳烷基”是指为被芳基取代的烷基的一价基团。芳烷基通常具有含1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子、6至18个碳原子、6至16个碳原子、6至12个碳原子或6至10个碳原子的芳基部分。

[0042] 术语“亚芳烷基”是指为被芳基取代的亚烷基的二价基团。亚芳烷基通常具有含1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子的烷基部分和含6至20个碳原子、6至18个碳原子、6至16个碳原子、6至12个碳原子或6至10个碳原子的芳基部分。

[0043] 术语“羰基”是指式-(C=O)-二价基团，其中碳以双键连接至氧。

[0044] 术语“氰基”是指单价基团-C≡N。

[0045] 术语“杂环基团”是指具有带3至7个环元的第一环的单价基团，其中至少一个环元为杂原子，并且其中至少一个环元为碳。合适的杂原子选自氧、硫或氮。所有不是杂原子的环元为碳。第一环可以是饱和的、部分不饱和的或不饱和的。第一环任选可稠合至一个或多个碳环或杂环。杂环基团通常具有1至5个杂原子和1至15个碳原子，1至4个杂原子和1至10个碳原子，1至3个杂原子和1至10个碳原子，或1至3个杂原子和1至6个碳原子。一些示例性杂环基团在五元环中具有1至3个杂原子。其他示例性杂环基团在稠合至第二环的五元环中具有1至3个杂原子，所述第二环为碳环并且是饱和的、部分不饱和的或不饱和的。例如，具有1至3个杂原子的五元环可以稠合至苯环。

[0046] 术语“硝基”是指单价基团-NO₂。

[0047] 术语“荧光原性”是指不发荧光或仅发微弱荧光但能够转化成发荧光的荧光性化合物的化合物。荧光可以在电磁光谱的任何区域中，但通常在紫外光、可见光或红外光区域中。

[0048] 术语“荧光性”是指发荧光的化合物。荧光可以是电磁光谱的任何区域中，但通常在紫外光、可见光或红外光区域中。

[0049] 术语“亲脂性”是指化合物分配到有机相中的能力。亲脂性可以通过(例如)将所关注的化合物置于非极性有机溶剂(如，辛醇)和水的混合物中进行表征。亲脂性指数是所关注化合物在有机相中的浓度与所关注化合物在水相中的浓度的比率。该比率越高，化合物的亲脂性越大。

[0050] 诸如7-羟基香豆素(即，伞形酮)之类的化合物是已知的荧光指示剂。即，这些化合物为荧光性化合物。当香豆素类化合物上的7-羟基被酶不稳定基团(例如糖基团、磷酸酯基团或磺酸酯基团)取代时，化合物的荧光通常会猝灭。即，这些具有酶不稳定基团的化合物为荧光原性化合物。合适酶的反应可以使酶不稳定基团水解并将荧光原性化合物转化为荧光性化合物。酶不稳定基团转化成羟基。

[0051] 可以使用具有酶不稳定基团的香豆素类化合物检测是否存在指示某些微生物的存在的某些酶。如果分析中的样品含有可使荧光原性化合物的酶不稳定基团水解(如，裂解)的酶，则所得的具有7-羟基的荧光性化合物能够发荧光。为了有效地用作荧光指示剂，

分析中的样品的pH通常必须为碱性(优选pH为9至10)。需要对该pH进行调节,因为该荧光性化合物的7-羟基能够以酸性形式或碱性形式存在。碱性形式通常获得最大的荧光信号。

[0052] 此外,许多微生物(如,大肠杆菌)往往会生成酸,作为其代谢过程的一部分。含有此类微生物的样品的pH往往会随时间推移变得酸性更强。这种pH值下降可导致荧光强度随时间推移而减弱、可导致具有误导性的低荧光信号或者两种情况均出现。在极端情形中,荧光信号可降至与背景信号相当的水平。因此,需要的是可在酸性环境中使用并且能够在酸性环境中提供稳定荧光信号的荧光指示剂。

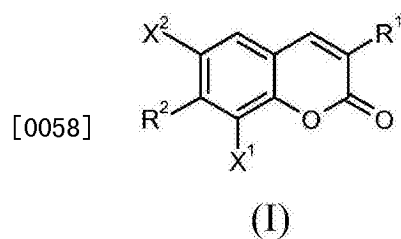
[0053] 已知的是,二氟化的香豆素基化合物可以在酸性范围内(例如,pH5至7的范围内)具有良好的荧光稳定性。然而,两个氟原子的强吸电子特性可能足以削弱香豆素核与酶不稳定基团之间的键合。6,8-二氟-4-甲基-7-羟基香豆素和6,8-二氟-3-羧酸乙酯-7-羟基香豆素的pKa(分别为4.2和3.8)证明了这一点(参见Bioorg.and Med.Chem.Lett.(《生物有机化学和药物化学快报》),8,3107-3110(1998))。

[0054] 为了克服已知的香豆素基荧光指示剂的难题,本文所述的化合物具有单个氟基团。即便在酸性环境中使用,它们往往也具有稳定的荧光信号。另外,它们往往不易受酶不稳定基团在酶存在下的水解的影响。

[0055] 某些已知的香豆素基荧光原性化合物的另一个难题是最大激发信号通常接近365纳米—这是可导致来自生物材料的相当大的背景荧光的激发波长。因此,对于含有生物材料的样品而言,可能有利的是使用具有更接近约400纳米或甚至更长波长的最大激发信号的荧光指示剂。即,所需的是具有红移荧光信号的荧光指示剂。许多低成本的激光二极管光源(例如InGaN)适于在接近400纳米或更长的波长处使用。提供的化合物中的一些适于在400纳米或更长的激发波长处使用。

[0056] 本文提供的氟化化合物往往较于它们的非氟化对应物具有增加的亲脂性。当使用聚合物材料来螯合该化合物时,这种增加的亲脂性可能是有利的。另外,增加的亲脂性可能有利于氟化化合物穿过细胞膜。当化合物的靶标酶被限制在微生物的细胞内时,该特性可能是有利的。

[0057] 在第一个方面,提供了式(I)氟化化合物。



[0059] 在式(I)中,基团R¹为-(CO)-OR³、-(CO)-NR⁴R⁵、杂环基团、芳基、芳烷基或氰基。基团R³为烷基、烯基、芳基或芳烷基。基团R⁴和R⁵各自独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。基团R²为羟基或酶不稳定基团。或者(a)X¹为氢且X²为氟,或者(b)X¹为氟且X²为氢。

[0060] 在一些实施例中,基团R¹具有式-(CO)-O-R³,其中R³为烷基、烯基、芳基或芳烷基。适合于R³的烷基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子、1至4个碳原子或1至3个碳原子。适合于R³的烯基通常具有2至12个碳原子、2至10个碳原子或2至6个碳原子。合适的芳基通常具有6至12个碳原子,并且合适的芳烷基通常具有7至12个碳原子。例如,芳基可以是苯基,芳烷基可具有被苯基取代的含1至6个碳原子的烷基。某些具体的R¹基团包括(但不限

于)羧酸乙酯($-(CO)-O-CH_2CH_3$)和羧酸苯酯($-(CO)-O-C_6H_5$)。

[0061] 在其他实施例中,基团 R^1 具有式 $-(CO)-NR^4R^5$,其中 R^4 和 R^5 各自独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。适合于 R^4 和/或 R^5 的烷基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子、1至4个碳原子或1至3个碳原子。适合于 R^4 和/或 R^5 的芳基通常具有6至12个碳原子。芳基可以是苯基。适合于 R^4 和/或 R^5 的芳烷基通常具有7至12个碳原子。芳烷基通常具有被苯基取代的含1至6个碳原子的烷基。

[0062] 在另有其他实施例中,基团 R^1 为杂环基团。可使用任何合适的具有至少一个杂环(即,第一杂环)的杂环基团。第一杂环包含至少一个杂原子环元,剩下的环元为碳。每个杂原子环元选自氧、硫或氮。第一杂环通常具有3至7个环元,并且可以稠合至或者为碳环或者为杂环的另外的环。

[0063] 某些杂环基团具有含3或4个环元的第一杂环。具有3个环元的杂环基团的例子包括(但不限于)氮丙啶基、环氧乙烷基和硫杂丙环基(thiiranyl)。具有4个环元的杂环基团的例子包括(但不限于)氮杂环丁基、氧杂环丁基和硫杂环丁基。

[0064] 某些杂环基团具有含5个环元的第一杂环。具有单个杂原子的饱和杂环基团的例子包括(但不限于)吡咯烷基、氧杂环戊基和四氢硫代苯基。具有单个杂原子的部分不饱和或不饱和杂环基团的例子包括(但不限于)吡咯基、呋喃基和噻吩基。具有不止一个杂原子的饱和杂环的例子包括(但不限于)二氧杂环戊基和三氧杂环己基。具有不止一个杂原子的部分不饱和或不饱和杂环基团的例子包括(但不限于)咪唑基、噁唑基、三唑基、四唑基、噻唑基、异噻唑基、异噻唑基和噁二唑基。具有稠合至碳环(例如苯环)的含有5个环元的第一杂环的示例性杂环基团包括(但不限于)吡啶基、异吡啶基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并咪唑基、N-取代的苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噁唑基和苯并异噻唑基。具有稠合至两个碳环(例如苯环或萘环体系)的含有5个环元的第一杂环的示例性杂环基团包括(但不限于)咔唑基和萘噻唑基。

[0065] 其他杂环基团具有的第一杂环含有6个环元。具有单个杂原子的饱和杂环基团的例子包括(但不限于)哌啶基、四氢吡喃基和硫化环戊基。具有单个杂原子的部分不饱和或不饱和杂环基团的例子包括(但不限于)吡喃基和噻喃基。具有多个杂原子的饱和杂环基团的例子包括(但不限于)哌嗪基、吗啉基和二氧杂环己基。具有多个杂原子的不饱和或部分不饱和杂环的例子包括(但不限于)二噻基、噁噻基、噻噻基、三噻基和四噻基。具有稠合至碳环(例如苯环)的含有6个环元的第一杂环的示例性杂环基团包括(但不限于)喹啉基和异喹啉基。具有稠合至另一个杂环的含有6个环元的第一杂环的示例性杂环基团包括(但不限于)萘啶基。

[0066] 另有其他杂环基团具有7个环元。此类基团包括(但不限于)吡庚因基、氧杂葑基(oxepinyl)、硫杂葑基(thiepinyl)、二氮杂葑基和硫氮杂葑基。

[0067] 任何合适的芳基都可用于 R^1 。某些示例性芳基具有6至20个碳原子、6至12个碳原子、或6至10个碳原子。芳基的例子包括(但不限于)苯基、萘基、苊基、菲基、蒽基、芘基、花基和茚基。

[0068] 任何合适的芳烷基都可用于 R^1 。某些示例性芳烷基具有含1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子的烷基部分加上含6至20个碳原子、6至12个碳原子或6至10个碳原子的芳基部分。一种更具体的示例性芳烷基具有被苯基取代的含1至10个碳原子、1至6个碳

原子或1至4个碳原子的烷基部分。

[0069] 用于 R^1 的芳基、芳烷基和杂环基团可任选被一个或多个选自烷基、烷氧基、芳基、芳烷基、卤素、硝基、氰基、胍基(即 $\text{-NH-C(NH}_2\text{)=NH}$)、 $\text{-SO}_3\text{H}$ 、 $\text{-N(R}^6\text{)}_2$ 、 $\text{-R}^7\text{-(O-R}^7\text{)}_n\text{-OR}^8$ 、 -(CO)-OR^9 或 $\text{-(CO)-(NR}^{10}\text{)}_2$ 的基团取代。换句话说,芳基、芳烷基和杂环基团可以是未取代的,或者可以被一个或多个取代基取代。合适的烷基和烷氧基取代基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。合适的芳基取代基通常具有6至12个碳原子。合适的芳烷基取代基通常具有7至12个碳原子。合适的卤素基团可以是氟、氯或溴。在式 $\text{-N(R}^6\text{)}_2$ 取代基中,每个 R^6 独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。适合于 R^6 的烷基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。适合于 R^6 的芳基和芳烷基分别具有6至12个碳原子和7至12个碳原子。在式 $\text{-R}^7\text{-(O-R}^7\text{)}_n\text{-OR}^8$ 取代基中,每个基团 R^7 独立地为亚烷基、亚芳基或亚芳烷基,且基团 R^8 为烷基、芳基或芳烷基。变量 n 为0至10的范围内、0至6的范围内、0至4的范围内或0至2的范围内的整数。合适的 R^7 和/或 R^8 亚烷基和烷基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。合适的 R^7 和/或 R^8 芳基和芳烷基分别具有6至12个以及7至12个碳原子。在式 -(CO)-O-R^9 取代基中,基团 R^9 可以是烷基、芳基或芳烷基。合适的烷基 R^9 基团通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。合适的芳基和芳烷基 R^9 基团分别通常具有6至12个碳原子以及7至12个碳原子。在式 $\text{-(CO)-(NR}^{10}\text{)}_2$ 的取代基中,每个基团 R^{10} 可独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。合适的 R^{10} 烷基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。合适的 R^{10} 芳基通常具有6至12个碳原子,且芳烷基通常具有7至12个碳原子。

[0070] 式(I)中的 R^2 基团为羟基或酶不稳定基团。酶不稳定基团通常具有键合至芳环上的氧基。换句话说,当酶不稳定基团通过酶的作用水解(如,裂解)时,反应产物为连接至芳环上的羟基。某些合适的酶不稳定基团包括(但不限于)糖基(如,单糖基、二糖基或多糖基)、糖酸基团(如,具有羧基(-COOH)基团的单糖或二糖)、氨基糖基(如,具有氨基(-NH_2)基团的单糖或二糖)、羧基封端的氨基酸基团、羧基封端的肽基、酯基、含酯基团、磷酸酯基团或硫酸酯基团。

[0071] 某些适合于 R^2 的酶不稳定糖基为单价基团,其等于糖分子减去氢(即,一个氢原子)后的残基。糖基通过氧基连接到式(I)化合物中的芳环上。合适的糖基可以是单糖基、二糖基、三糖基或多糖基。合适的单糖基包括(但不限于) α -吡喃半乳糖苷基、 β -吡喃半乳糖苷基、 α -吡喃葡萄糖苷基、 β -吡喃葡萄糖苷基、 α -吡喃甘露糖苷基、 β -吡喃甘露糖苷基、 α -吡喃艾杜糖苷基、 β -吡喃艾杜糖苷基、 α -吡喃木糖苷基、 β -吡喃木糖苷基、 α -呋喃阿拉伯糖苷基和 β -呋喃阿拉伯糖苷基。合适的二糖基包括(但不限于) β -吡喃纤维二糖苷基、 β -乳糖基、3- $\text{O-(}\alpha\text{-L-吡喃岩藻糖苷基)-}\beta\text{-D-吡喃半乳糖苷基}$ 、4- $\text{O-(}\alpha\text{-L-吡喃岩藻糖苷基)-}\beta\text{-D-吡喃半乳糖苷基}$ 、 β -木二糖基、 α -麦芽糖基、 β -麦芽糖基、海藻糖基和甘露二糖基。合适的三糖基包括(但不限于) β -纤维三糖基、 β -龙胆三糖基和麦芽三糖基。合适的多糖基包括(但不限于) β -纤维四糖基和 β -纤维戊糖基。

[0072] 酶不稳定的 R^2 基团也可以是通过羰氧基连接至式(I)化合物中的芳环上的糖酸基团。糖酸基团为单价基团,等于糖酸减去氢(即,一个氢原子)后的残基。合适的糖酸基团包括(但不限于) β -葡糖苷酸基、 α -艾杜糖醛酸基和半乳糖醛酸基。

[0073] 其他酶不稳定的 R^2 基团为通过氧基连接至式(I)化合物中的芳环上的氨基糖基。氨基糖基为单价基团,等于氨基糖减去氢(即,一个氢原子)后的残基。合适的氨基糖基包括

(但不限于)氨基葡萄糖基、氨基半乳糖基、壳二糖基和壳三糖基。

[0074] 另有其他酶不稳定的 R^2 基团为羧基封端的氨基酸基团或羧基封端的肽基团。这些基团通过羰氧基连接至式(I)化合物中的芳环上。示例性的羧基封端的氨基酸基团包括(但不限于)L-丙氨酰基、L-精氨酰基、L-天冬氨酰基、L-瓜氨酰基、L-谷氨酰基、L-谷氨酰胺酰基、L-甘氨酰基、L-组氨酰基、L-羟脯氨酰基、L-异亮氨酰基、L-亮氨酰基、L-赖氨酰基、L-甲硫氨酰基、L-鸟氨酰基、L-苯丙氨酰基、L-脯氨酰基、L-丝氨酰基、L-苏氨酰基、L-色氨酰基、L-酪氨酰基和L-缬氨酰基。示例性的羧基封端的肽基团包括(但不限于)7-戊二酰基-苯丙氨酰基、L-精氨酰基-L-精氨酰基、L-戊二酰基-甘氨酰基-精氨酰基、甘氨酰基-甘氨酰基、甘氨酰基-L-苯丙氨酰基、甘氨酰基-L-脯氨酰基和L-丝氨酰基-L-酪氨酰基、L-脯氨酰基-L-苯丙氨酰基-精氨酰基以及N-戊二酰基-甘氨酰基-精氨酰基。

[0075] 另外的合适的酶不稳定的 R^2 基团具有式 $-O-(CO)-R^{12}$, 其中 R^{12} 为烷基、烯基、芳基或芳烷基。该基团通过氧基连接至式(I)化合物中的芳环上。适合于 R^{12} 的烷基通常具有1至20个碳原子、1至12个碳原子、1至10个碳原子、6个碳原子或1至4个碳原子。适合于 R^{12} 的烯基通常具有2至20个碳原子、2至12个碳原子、2至10个碳原子或2至6个碳原子。适合于 R^{12} 的芳基和芳烷基通常分别具有6至12个碳原子以及7至12个碳原子。具体的 R^2 基团包括(但不限于)乙酸酯、丙酸酯、2-甲基丙酸酯、丁酸酯、3-甲基丁酸酯、戊酸酯、己酸酯、庚酸酯、辛酸酯、壬酸酯、癸酸酯、十一酸酯、十二酸酯、十三酸酯、十四酸酯、十五酸酯、十六酸酯、十七酸酯、十八酸酯、反油酸酯、油酸酯以及对胍基苯甲酸酯(芳基被胍基取代)。

[0076] 另有其他合适的酶不稳定的 R^2 基团为式 $-O-CH_2-O-(CO)-R^{13}$ 含酯基团, 其中 R^{13} 为烷基。适合于 R^{13} 的烷基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。含酯基团通过氧基连接到式(I)化合物中的芳环上。例子包括(但不限于)乙酰氧基甲氧基、丙酰氧基甲氧基、异丁酰氧基甲氧基和新戊酰氧基甲氧基。

[0077] 其他合适的酶不稳定的 R^2 基团为式 $-O-CH_2-(CO)-CH_2-O-(CO)-R^{14}$ 含酯基团, 其中每个 R^{14} 为烷基。适合于 R^{14} 的烷基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。含酯基团通过氧基连接到式(I)化合物中的芳环上。例子包括(但不限于)3-(辛酰氧基)-2-氧代丙氧基、3-(癸酰氧基)-2-氧代丙氧基、3-(十二烷酰氧基)-2-氧代丙氧基、3-(丁酰氧基)-2-氧代丙氧基和3-(乙酰氧基)-2-氧代丙氧基。

[0078] 其他酶不稳定基团为式 $-O-SO_2-(OR^{15})$ 硫酸酯基团或式 $-O-(PO)-(OR^{16})_2$ 磷酸酯基团, 其中每个 R^{15} 和 R^{16} 可以各自独立地为氢或烷基。硫酸酯基团和磷酸酯基团通过氧基连接至式(I)化合物中的芳环上。适合于 R^{15} 和 R^{16} 的烷基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。

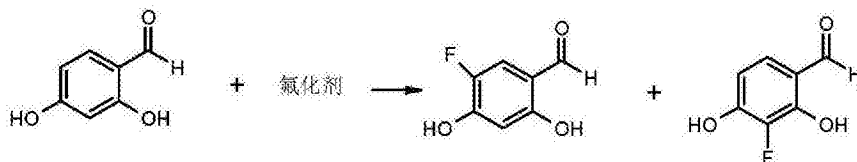
[0079] R^2 中包含的任何芳基或芳烷基可任选被一个或多个选自烷基、烷氧基、芳基、芳烷基、卤素、硝基、氰基、胍基(即 $-NH-C(NH_2)=NH$)、 $-SO_3H$ 、 $-N(R^6)_2$ 、 $-R^7-(O-R^7)_n-OR^8$ 、 $-(CO)-OR^9$ 或 $-(CO)-(NR^{10})_2$ 的取代基取代。换句话说, 芳基或芳烷基可以是未取代的, 或者可以被一个或多个取代基取代。合适的烷基和烷氧基取代基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。合适的芳基取代基通常具有6至12个碳原子。合适的芳烷基取代基通常具有7至12个碳原子。合适的卤素基团可以是氟、氯或溴。在式 $-N(R^6)_2$ 取代基中, 每个 R^6 独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。适合于 R^6 的烷基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。适合于 R^6 的芳基和芳烷基分别具有6至12个碳原子和7至12个碳原子。在式 $-R^7-$

(O-R⁷)_n-OR⁸取代基中,每个基团R⁷独立地为亚烷基、亚芳基或亚芳烷基,且基团R⁸为烷基、芳基或芳烷基。变量n为0至10的范围内、0至6的范围内、0至4的范围内或0至2的范围内的整数。合适的R⁷和/或R⁸亚烷基和烷基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。合适的R⁷和/或R⁸芳基和芳烷基分别具有6至12个以及7至12个碳原子。在式-(CO)-O-R⁹取代基中,基团R⁹可以是烷基、芳基或芳烷基。合适的烷基R⁹基团通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。合适的芳基和芳烷基R⁹基团分别通常具有6至12个碳原子以及7至12个碳原子。在式-(CO)-(NR¹⁰)₂的取代基中,每个基团R¹⁰可独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。合适的R¹⁰烷基通常具有1至10个碳原子、1至6个碳原子或1至4个碳原子。合适的R¹⁰芳基通常具有6至12个碳原子,且芳烷基通常具有7至12个碳原子。

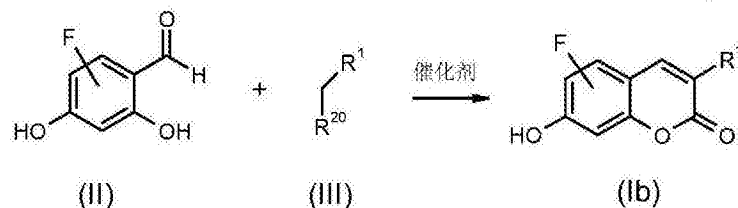
[0080] 具有羟基R²基团的具体的示例性式(I)化合物包括(但不限于)3-羧酸乙酯-6-氟-7-羟基香豆素、3-羧酸乙酯-8-氟-7-羟基香豆素、3-噻吩基-6-氟-7-羟基香豆素、3-噻吩基-8-氟-7-羟基香豆素、3-(2-(5-羧乙基呋喃基))-6-氟-7-羟基香豆素、3-(2-(5-羧乙基呋喃基))-8-氟-7-羟基香豆素、3-氰基-6-氟-7-羟基香豆素、3-氰基-8-氟-7-羟基香豆素、3-苯并噻唑基-6-氟-7-羟基香豆素、3-苯并噻唑基-8-氟-7-羟基香豆素、3-苯并噻唑基-6-氟-7-羟基香豆素、3-苯并噻唑基-8-氟-7-羟基香豆素、3-(4-咪唑基)-6-氟-7-羟基香豆素、3-(4-咪唑基)-8-氟-7-羟基香豆素、3-(1-咪唑基)-6-氟-7-羟基香豆素、3-(1-咪唑基)-8-氟-7-羟基香豆素、3-(2-吡咯基)-6-氟-7-羟基香豆素、3-(2-吡咯基)-8-氟-7-羟基香豆素、3-苯并咪唑基-6-氟-7-羟基香豆素、3-苯并咪唑基-8-氟-7-羟基香豆素、3-(1-甲基苯并咪唑基)-6-氟-7-羟基香豆素、3-(1-甲基苯并咪唑基)-8-氟-7-羟基香豆素、3-苯并咪唑基-6-氟-7-羟基香豆素、3-苯并咪唑基-8-氟-7-羟基香豆素、3-苯并呋喃基-6-氟-7-羟基香豆素和3-苯并呋喃基-8-氟-7-羟基香豆素。其他示例性化合物的羟基被酶不稳定基团取代,所述酶不稳定基团即为糖基(如,单糖基、二糖基或多糖基)、糖酸基团(如,具有羧基(-COOH)基团的单糖或二糖)、氨基糖基(如,具有氨基(-NH₂)基团的单糖或二糖)、羧基封端的氨基酸基团、羧基封端的肽基、酯基、磷酸酯基团或硫酸酯基团。在一些具体例子中,酶不稳定基团为单糖基,例如α-吡喃半乳糖苷基、β-吡喃半乳糖苷基、α-吡喃葡萄糖苷基、β-吡喃葡萄糖苷基或β-葡糖苷酸基。

[0081] 对应于其中R²为羟基的式(I)的式(Ib)化合物可以用任何已知的合成方法进行制备。一种特别可用的合成方法为如反应方案A中所示的直接氟化法。

[0082] 反应方案A



[0083]



[0084] 在反应方案A中,2,4-二羟基苯甲醛与氟化剂反应。首先制备式(II)氟化二羟基苯甲醛中间体。氟化二羟基苯甲醛可以是3-氟-2,4-二羟基苯甲醛、5-氟-2,4-二羟基苯甲醛

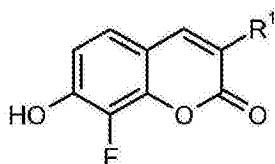
或它们的混合物。然后采用Knoevenagel缩合反应使式(II)中间体化合物与式(III)化合物反应。式(III)化合物具有与上文针对式(I)化合物所述相同的基团 R^1 和为吸电子基团的基团 R^{20} ,所述吸电子基团选自氰基、羧基($-COOH$)或式 $-COOR^1$ 基团。对于每种特定的反应而言,用于第二个反应的催化剂可以有所不同,但可以是(例如)乙酸铵、氢氧化钠、三乙胺与乙酸酐的混合物或吗啉与乙酸的混合物。

[0085] 反应方案A可以使用任何合适的氟化剂。某些合适的氟化剂具有连接至氮原子上的氟原子(即,N-F氟化剂)。示例性的N-F氟化剂包括(但不限于)SELECTFLUOR,其为得自美国宾夕法尼亚州艾伦镇空气产品公司(Air Products, Allentown, PA)的化合物1-氯甲基-4-氟-1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷双(四氟硼酸盐)的商品名;ACCUFLUOR,其为得自德国塞尔策霍尼韦尔有机精细化工公司(Honeywell Organic Fine Chemicals, Seelze, Germany)的化合物1-羟基-4-氟-1,4-二氮双环[2.2.2]辛烷双(四氟硼酸盐)的商品名;N-氟苯磺酰亚胺;1-氟吡啶三氟甲磺酸盐;和2,6-二氯-1-氟吡啶四氟硼酸盐。另外的其他氟化剂包括四正丁基二氟化铵氢氟酸盐、三氟化二乙氨基硫、三氟化硫吗啉、二氟化氙和氟。

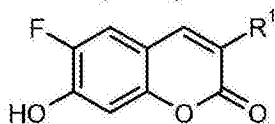
[0086] 在一个示例性的直接氟化反应中,可以将氟化剂(如SELECTFLUOR)和2,4-二羟基苯甲醛在室温(如,20℃至25℃)下混合若干天(如5至10天),以形成比率为5:1且转化率为约60%的5-氟-2,4-二羟基苯甲醛和3-氟-2,4-二羟基苯甲醛的混合物。可以通过再结晶进一步纯化该混合物。

[0087] 用于反应方案A的示例性式(III)化合物包括(例如)用于制备苯硫基作为 R^1 的式(Ib)化合物的2-噻吩乙酸、用于制备苯并咪唑基作为 R^1 的式(Ib)化合物的2-氰甲基苯并咪唑,以及用于制备羰氧基乙基(即,羧酸乙酯基)作为 R^1 的式(Ib)化合物的乙酰乙酸乙酯。如果需要,可以通过过滤直接分离产物,可以将反应溶液与非溶剂(例如水)混合并可以滤除产物,或者可以通过溶剂提取分离产物。

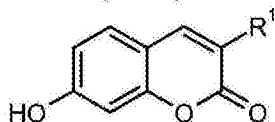
[0088] 反应方案A中示出的第二个反应的产物为式(Ib)化合物。在多个实施例中,该产物为式(Ib-1)和(Ib-2)的两种氟化物质的混合物。该产物可能含有一些式(IV)非氟化物质。



(Ib-1)



(Ib-2)



(IV)

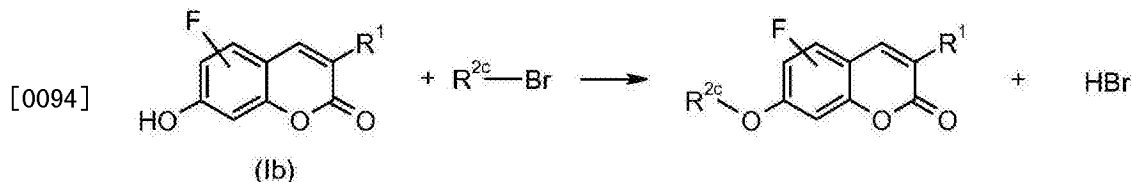
[0090] 可以使用(例如)多种层析法将氟化物质(即式(Ib-1)和(Ib-2)化合物)与非氟化物质(即式(IV)化合物)分离。所得的纯化混合物通常含有重量比在60:40至99:1的范围内、

70:30至99:1的范围内、80:20至99:1的范围内或90:10至99:1的范围内的式(Ib-2)化合物和式(Ib-1)化合物。即,混合物中的主要组分通常为式(Ib-2)化合物。

[0091] 然后可对式(Ib)化合物进行处理,以用酶不稳定基团取代羟基。合适的酶不稳定基团为针对式(I)中的基团 R^2 所述的那些。

[0092] 在一些实施例中, R^2 基团为糖基。可以通过与溴化化合物 $R^{2c}-Br$ 反应而将该基团引入式(I)化合物中,如反应方案B中所示。基团 $-OR^{2c}$ 等于式(I)中的基团 R^2 。

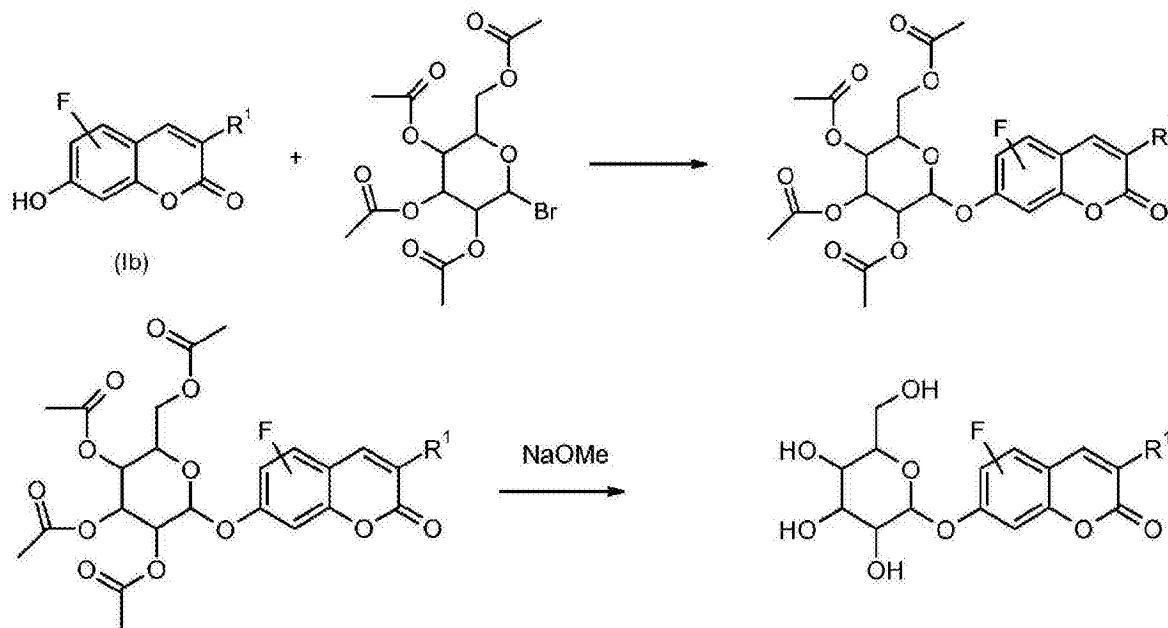
[0093] 反应方案B



[0095] 反应方案B-1中示出了添加糖基吡喃半乳糖的更具体的例子。溴化化合物为 α -溴乙酰吡喃半乳糖,其中羟基被乙酰基保护。当基团 R^{2c} 连接至芳环上之后,通过用甲醇钠进行处理而移除乙酰基。多种溴化且受保护的糖可从(例如)美国俄亥俄州克利夫兰的Research Organics公司(Research Organics, Cleveland, OH)商购获得。

[0096] 反应方案B-1

[0097]



[0098] 在式(I)化合物的其他实施例中, R^2 为磷酸酯基。磷酸酯基可通过式(Ib)化合物与三氯氧磷的反应引入。在式(I)化合物的另有其他实施例中, R^2 为硫酸酯基。硫酸酯基可以通过式(Ib)化合物与氯磺酸的反应引入。这些反应的其他细节在(例如)Monatshefte für Chemie(《化学月刊》),116,65-75(1985)中提供。

[0099] 因此,在第二个方面,提供了制备式(I)化合物的方法。该方法包括用氟化剂将2,4-二羟基苯甲醛直接氟化而形成氟化中间体,即3-氟-2,4-二羟基苯甲醛、5-氟-2,4-二羟基苯甲醛或它们的混合物。然后让氟化中间体与式(III)化合物反应

[0100] $R^1-CH_2-R^{20}$

[0101] (III)

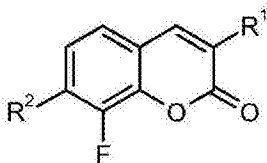
[0102] 以形成式(Ib)化合物。在式(III)中,基团 R^1 为 $-(CO)-OR^3$ 、 $-(CO)-NR^4R^5$ 、杂环基团、芳基、芳烷基或氰基,且基团 R^{20} 为氰基、羧基 $(-COOH)$ 或式 $-COOR^1$ 基团。

[0103] 在第三个方面,提供了组合物。该组合物含有式(I)化合物和可与水混溶的有机溶剂。这些组合物可包含一种或多种式(I)化合物,并任选还可包含不具有式(I)的其他化合物。所述组合物通常为溶液。

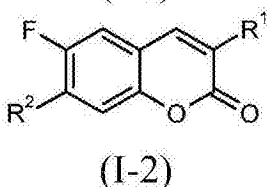
[0104] 适用于组合物的可与水混溶的有机溶剂通常为能够使式(I)化合物溶解的那些。通常,将可与水混溶的有机溶剂选择为能够用于制备具有一定浓度的式(I)化合物的溶液,该浓度等于至少10毫摩尔/升(mM)、至少25mM、至少50mM、至少100mM、至少200mM或至少500mM。示例性的可与水混溶的有机溶剂包括(但不限于)二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮和醇类(如,具有1至6个碳原子、1至4个碳原子或1至3个碳原子的醇类)。该溶液通常可以用水或其他极性有机溶剂进行稀释,使得式(I)化合物保留在溶液中。

[0105] 含有式(I)化合物的溶液可任选包含缓冲剂以调节或保持某个所需的pH或pH范围。在一些实施例中,pH缓冲剂在酸性范围内。例如,pH可以在3至10、4至10、4至8或4至7的范围内。一些示例性的缓冲剂包括多种磷酸盐缓冲剂、碳酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂或它们的混合物。

[0106] 在多个实施例中,组合物包含式(I-1)化合物和式(I-2)化合物的混合物。

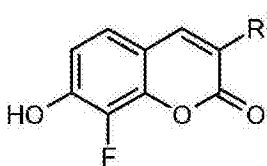


[0107] (I-1)

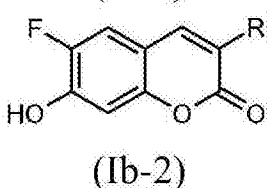


(I-2)

[0108] 例如,一些组合物既含有式(Ib-1)化合物,又含有式(Ib-2)化合物。

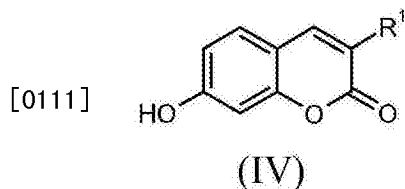


[0109] (Ib-1)



(Ib-2)

[0110] 组合物中的一些还可包含非氟化的式(IV)化合物。



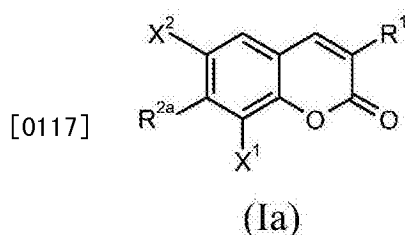
[0112] 基团R¹和R²与此前针对式(I)所定义的相同。

[0113] 在第四个方面,本发明提供了制品。该制品包括为支承层的第一层以及包含式(I)化合物的第二层。第二层与第一层相邻。如本文所用,术语“相邻”是指两个层彼此接触或通过一个或多个居间层彼此分离。图1a和图1b示出了制品的两个示意图。图1a的制品10包括支承层20以及与支承层20接触的第二层30。图1b的制品50包括支承层20、粘合剂层25和第二层30。在图1b中,粘合剂层设置在支承层与第二层30之间。此类制品可用于检测多种微生物的存在与否。

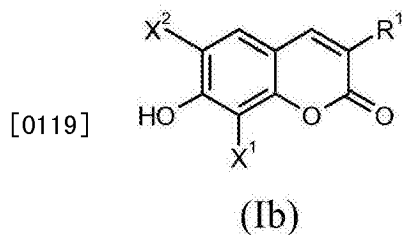
[0114] 可以使用任何合适的支承层20。通常将支承层选择为不会吸水或者说是不会受水的影响。合适的支承层可以为(例如)聚合物材料、玻璃、陶瓷材料等。支承层可以是透明的或不透明的,这取决于是否希望通过支承层观察多种微生物集落。某些支承层包括印刷的网格图案(如,正方形),以便于对微生物集落进行计数。支承层可以是平坦的,或者可以包括多个凹槽。所述凹槽可以具有任何合适的形状和尺寸。在一些实施例中,支承层为常规的培养皿。

[0115] 对于某些应用而言,聚合物材料作为支承层可能是特别有利的。聚合物材料通常为相对刚性的自支承型膜的形式。示例性的聚合物材料包括(但不限于)聚酯、聚碳酸酯、聚烯烃(如,聚乙烯、聚丙烯以及它们的共聚物)和聚苯乙烯。其他合适的基材包括(例如)涂有聚烯烃或耐水涂层的纸材。

[0116] 第二层包含式(I)化合物。在多个实施例中,在制品被用于检测多种微生物存在与否之前,其包含式(Ia)化合物。



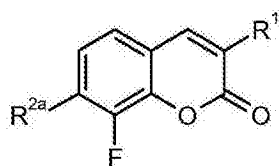
[0118] 基团R²ᵃ是指酶不稳定基团。式(Ia)化合物为荧光原性化合物,其不发荧光,但在酶不稳定基团R²ᵃ被水解为羟基时,可以转化成发荧光的荧光性化合物。所得的荧光性化合物具有式(Ib)。



[0120] 式(Ia)和(Ib)中的基团X¹、X²和R¹与此前针对式(I)化合物所定义的相同。

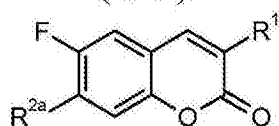
[0121] 在制品的一些实施例中,在第二层被用于检测多种微生物存在与否之前,其包含

式(Ia-1)化合物和式(Ia-2)化合物的混合物。



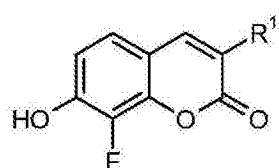
[0122]

(Ia-1)



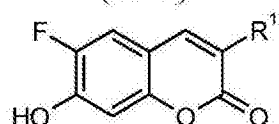
(Ia-2)

[0123] 在与合适的酶反应之后,第二层包含式(Ib-1)化合物和式(Ib-2)化合物的混合物。



[0124]

(Ib-1)



(Ib-2)

[0125] 可以使用任何合适的方法将第二层施加到第一层上。可以使用任何合适的方法将含有式(I)化合物(如式(Ia)化合物)的溶液施加至支承层上。例如,可以施加式(I)化合物的溶液,然后干燥,从而在支承层的表面上提供式(I)化合物的粉末(即,脱水形式或脱水层)。第二层在支承层的整个表面上可以是连续或不连续的。第二层可以(例如)支承层的凹槽或区域的图案沉积。

[0126] 在一些实施例中,粘合剂层接触支承层的表面,并且将式(I)化合物添加至粘合剂层的外表面上。即,制品包括布置在支承层与含有式(I)化合物的第二层之间的粘合剂层。式(I)化合物可以是使用粘合剂层粘附接至支承层的粉末或涂层的形式。粉末或涂层可以均匀地沉积在粘合剂层上,或者可以以图案的形式沉积在粘合剂层上。合适的粘合剂通常不溶于水或水性介质,并且不抑制微生物生长。优选地,将粘合剂选择为在润湿时提供足够的透明性以看到可能位于支承层表面上的网格图案。

[0127] 如果式(I)化合物以粉末形式(如,脱水形式)存在,则通常将粘合剂层的厚度选择为小于附接至其外表面上的任何粉末的直径。如果粘合剂层太薄,则可能难以将粉末充分粘附至支承层上。然而,如果粘合剂层太厚,则粉末可能会完全嵌入粘合剂层内。

[0128] 粘合剂层通常为压敏粘合剂,但也可以使用其他类型的粘合剂。在一些实施例中,粘合剂可以是有机硅基粘合剂,例如美国专利No.6,703,120(Ko等人)中所述的那些,该专利以引用方式并入本文中。在其他实施例中,粘合剂层含有丙烯酸类共聚物,例如,丙烯酸

异辛酯和丙烯酰胺的共聚物(如,二者的摩尔比为90:10至98:2,或摩尔比为92:8至96:4)或丙烯酸异辛酯和丙烯酸的共聚物(如,二者的摩尔比为90:10至98:2,或摩尔比为92:8至96:4,或摩尔比为94:6至96:4)。合适的丙烯酸类共聚物粘合剂在美国专利No.5,681,712(Nelson)中有进一步描述,该专利以引用方式并入本文中。可以使用任何已知的方法将粘合剂层施加至支承层上,所述方法例如刀涂、挤出、从隔离衬片层压转印等。

[0129] 除式(I)化合物之外,第二层任选还可包含一种或多种另外的组分,例如胶凝剂、用于培养微生物的培养基、pH缓冲剂、表面活性剂、聚合物粒子等。通常将这些组分选择为例如在室温或接近室温下是水溶性的。可将这些另外的组分作为液体与式(I)化合物混合,然后直接施加至支承层或粘合剂层上。如果需要,可在施加液体后使用任何合适的干燥方法将该液体干燥。或者,可以在施加作为第二层的一部分的任何另外的组分之前或之后将式(I)化合物施加至支承层或粘合剂层上。在一些实施例中,将另外的组分与式(I)化合物混合,然后喷雾干燥为支承层或粘合剂层的表面上的粉末。在其他实施例中,可以一系列液体组合物的形式添加多种组分,然后干燥以形成第二层。在一些实施例中,无论采用哪种施加方法,第二层均含有极少(如果有的话)的水。即,第二层基本上为脱水层或为脱水形式(即,第二层只含有与第二层和周围环境中存在的水分的平衡相关的水量)。

[0130] 在一些实施例中,制品的第二层包含任选的胶凝剂。可以使用本领域已知的任何合适的胶凝剂。合适的胶凝剂通常可溶于水(如,室温或接近室温的水),并且包括(但不限于)甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、刺槐豆胶、瓜耳胶、羟丙基瓜耳胶、阿拉伯树胶(金合欢胶)、黄原胶、卡拉胶、葡甘露聚糖或这些材料的组合。其他合适的胶凝剂可以为聚丙烯酰胺或超吸收材料,例如二醇改性的多糖和淀粉-接枝-聚(丙烯酸钠-共-丙烯酰胺)。某些胶凝剂可与水反应而形成水凝胶。

[0131] 第二层可任选包含表面活性剂。通常添加表面活性剂以有利于使选择的胶凝剂分散在水中。表面活性剂可以是阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂或非离子表面活性剂。例子包括(但不限于)十二烷基硫酸钠、十二烷基苯磺酸钠、聚氧化烯衍生物和聚山梨醇酯。聚山梨醇酯的例子包括(但不限于)聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯、以商品名PLURONIC从巴斯夫公司(BASF)(美国新泽西州弗洛勒姆帕克(Florham Park,NJ))商购获得的那些、以商品名TRITON(如,TRITON X-100)从陶氏化学公司(Dow Chemical)(美国密歇根州米德兰市(Midland,MI))商购获得的那些、以商品名TWEEN(如,TWEEN20和TWEEN80)从罗氏公司(Roche)(德国曼海姆(Mannheim,Germany))商购获得的那些,等等。

[0132] 第二层可包含任选的用于培养微生物的培养基。可以使用本领域已知的任何合适的培养基。合适的培养基通常为可溶于水(如,室温或接近室温的水)的肉汤的形式。可对培养基进行特别地选择以优化所关注的特定微生物的生长。例子包括(但不限于)发酵性碳水化合物、氨基酸、肉提取物、酵母提取物、缓冲盐等等。

[0133] 第二层可任选包含pH缓冲剂。可使用任何合适的pH缓冲剂。因为式(I)化合物可有利地在酸性条件下使用,所以在很多情况下将pH缓冲剂选择为处于酸性范围内。合适的pH缓冲剂通常为磷酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、碳酸盐缓冲剂或它们的混合物。pH通常为至少4。在一些实施例中,pH在3至10、4至10、4至8、4至7或5至8的范围内。

[0134] 第二层可任选包含多种聚合物粒子。即,制品的第二层可包含式(I)化合物和聚合物粒子。在对应的式(Ia)化合物与样品中存在的酶反应之后,聚合物粒子可用于增强式

(Ib)化合物的荧光强度。聚合物粒子通常螯合溶液中的亲脂荧光原性化合物和/或荧光性化合物。如本文所用,术语“螯合”是指扩散性化合物在固相(如,聚合物粒子)上或内部积聚。螯合往往会限制式(I)化合物的扩散,并可能将因稀释效应而导致的荧光损失降至最低。当检测与在固体或半固体(如,水凝胶)介质中培养的微生物相关的酶活性时,聚合物粒子可特别用于使式(I)化合物的扩散(稀释)降至最低。

[0135] 合适的聚合物粒子通常由丙烯酸酯聚合物或共聚物、苯乙烯聚合物或共聚物、纤维素聚合物或共聚物、葡聚糖聚合物或共聚物、它们的衍生物或它们的组合制备而成。合适的聚合物粒子包括(但不限于)以商品名MX(如MX-180)、MR、MP、SGP和SX-500从日本大阪的综研化学工程株式会社(Soken Chemical and Engineering, Osaka, Japan)商购获得的那些、以商品名EUDRAGIT(如RLPO和S-1000)从美国特拉华州纽瓦克的赢创工业集团(Evonik Industries, Newark, DE)商购获得的那些、以商品名AMBERLITE(如,非离子吸收剂和离子交换树脂)从美国密苏里州圣路易斯市西格玛化学公司(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)商购获得的那些、以商品名AMBERLYST(如离子交换树脂)从美国马萨诸塞州沃德希尔的阿法埃莎公司(Alfa Aesar, Ward Hill, MA)商购获得的那些,以及以商品名WHATMAN(如WHATMAN QA52和WHATMAN DE53)和SEPHADEX从美国新泽西州皮斯卡塔韦的通用电气医疗集团(GE Healthcare, Piscataway, NJ)商购获得的那些。

[0136] 适用于螯合式(I)荧光性化合物的聚合物粒子通常具有在0.01微米至1毫米的范围内、在0.05微米至20微米的范围内、在0.1微米至5微米的范围内、或在0.2微米至2微米的范围内的平均粒径。

[0137] 制品中可包括任何合适量的第二层。当第二层为粉末形式时,第二层通常具有等于至少0.4毫克/平方厘米(mg/cm^2)的涂层重量。例如,涂层重量可为至少0.5 mg/cm^2 、至少1 mg/cm^2 、至少2 mg/cm^2 。

[0138] 在一些实施例中,制品为薄膜培养装置,例如美国专利No. 4,565,783(Hansen等人)、No. 5,089,413(Nelson等人)和No. 5,681,712(Nelson)中所述的那些。这些专利中所述的薄膜培养装置以引用方式并入本文中。图2中示出了这种制品的一个例子。制品100包括支承层110、粘合剂层120、包含式(I)化合物的第二层130、隔层140和覆盖片150。在铰合区域160中,覆盖片150连接至支承层110。

[0139] 支承层110通常为相对刚性的膜,例如,聚酯膜(如,厚度为至少约100微米的膜)、聚碳酸酯膜(如,厚度为至少约100微米的膜)、聚丙烯或聚乙烯膜(如,厚度为至少约100微米的膜)、聚苯乙烯膜(厚度为至少约300微米的膜)或涂有防水涂层(例如聚乙烯涂层)的纸材。支承层涂覆有粘合剂层120。粘合剂层120可与针对图1b中的粘合剂层25所述的相同。粘合剂层120布置在支承层110与第二层130之间。第二层130与针对图1a和1b中的第二层30所述的相同。

[0140] 图2中的隔层140可由疏水的(即,不会被水性介质润湿的)、对微生物惰性且能够经受灭菌的聚合物材料形成。合适的材料包括(但不限于)闭孔聚乙烯泡沫。隔层140可包括孔,该孔穿过中心区域以使第二层130暴露以及提供预定尺寸和形状(如,圆形、正方形、椭圆形或矩形)的凹槽170。孔的尺寸确定可暴露于液体样品的第二层130的面积。在一些实施例中,凹槽170具有圆柱形形状。垫片140的厚度和孔的尺寸一起确定凹槽170的体积以及可暴露于第二层130的液体样品的最大体积。垫片140的厚度通常为至少0.5毫米(mm)、至少

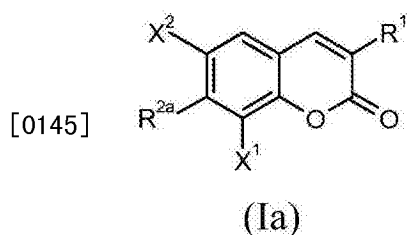
1mm、至少1.5nm或至少2mm。

[0141] 尽管图2只示出了单个凹槽170,但可在垫片中切出多个孔以提供多个凹槽。例如,制品可包括最多20或更多个凹槽,并且可以用每个凹槽分析不同的样品,以确定目标微生物存在与否。

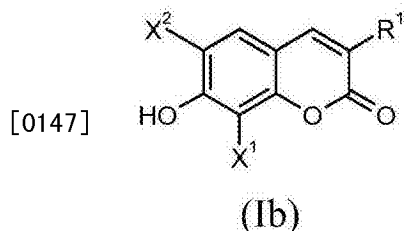
[0142] 覆盖片150附接至隔层140的一个边缘上。覆盖片具有外表面150a和内表面150b。可使用任何已知类型的附接手段附接覆盖片150,例如U形钉、缝针、粘合剂、胶带等。通常将覆盖片150选择为对人眼透明、微生物不可渗透以及水蒸气不可渗透、空气可渗透或它们的组合。透明有利于对微生物集落进行计数。覆盖片150可起到防止或尽量减少第二层130出现不期望的污染。另外,覆盖片150与支承层110结合可用于提供将在任何温育期过程中支持微生物生长的封闭环境。覆盖片150可由聚乙烯、聚丙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚偏二氟乙烯等制备而成。在一些制品中,覆盖片为双轴取向的聚丙烯。覆盖片150任选还可以包括粘合剂层(未示出)和至少一个包含胶凝剂、培养基或它们的组合的另外的层(未示出)。这些任选的层中的任何一个通常位于覆盖凹槽170的覆盖片的内表面150b上。

[0143] 图2的制品可用于检测测试样品中的微生物。可以将测试样品引入凹槽170中,在此处测试样品暴露于凹槽170底部的第二层130。温育时,测试样品中的微生物可以生长。如果微生物含有可水解式(I)化合物的酶不稳定基团 R^2 (如,式(Ia)化合物中的基团 R^{2a})的酶,则可使用荧光光谱法检测所得的式(Ib)荧光性化合物。可以将荧光信号的强度与酶的浓度和微生物的浓度关联起来。

[0144] 在第五个方面,提供了检测微生物的方法。该方法包括提供式(Ia)荧光原性化合物。



[0146] 在式(Ia)中, R^1 为 $-(CO)-OR^3$ 、 $-(CO)-NR^4R^5$ 、杂环基团、芳基、芳烷基或氰基。基团 R^3 为烷基、烯基、芳基或芳烷基。基团 R^4 和 R^5 各自独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。基团 R^{2a} 为酶不稳定基团。或者(a) X^1 为氢且 X^2 为氟,或者(b) X^1 为氟且 X^2 为氢。该方法还包括将测试样品与式(Ia)化合物温育,其中测试样品含有裂解基团 R^{2a} 的酶,从而导致形成式(Ib)荧光性化合物。



[0148] 该方法还包括用第一波长的光激发式(Ib)荧光性化合物,并检测以比第一光波长要长的第二光波长发出的光。该方法任选还可包括使用聚合物粒子(例如上文所述的用于制品的第二层中的那些)螯合式(Ib)荧光性化合物。

[0149] 在多个实施例中,式(I)化合物存在于制品,例如所述的包括图1a、1b和2中举例说明的那些制品中。所述制品通常任选包含在制品的第二层中的胶凝剂、培养基、pH缓冲剂、表面活性剂或它们的混合物。

[0150] 可以检测的微生物为含有或产生可水解式(Ia)荧光原性化合物上的酶不稳定基团R^{2a}的酶的那些微生物。合适的酶包括(例如)糖苷酶、酯酶、磷酸酶、硫酸酯酶、肽酶、脂肪酶等。

[0151] 特别关注的一些可能含有可水解酶不稳定基团(即,式(Ia)中的基团R^{2a})的酶的微生物包括原核和真核生物。例子包括(但不限于)革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、真菌、原生动物、支原体、酵母和病毒。示例性的真菌包括例如酵母(包括例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、热带念珠菌(*Candida tropicalis*)、类星形念珠菌(*Candida stellatoidea*)、光滑念珠菌(*Candida glabrata*)、克鲁斯念珠菌(*Candida krusei*)、近平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*)、吉利蒙念珠菌(*Candida guilliermondii*)、维斯念珠菌(*Candida viswanathii*)、葡萄牙念珠菌(*Candida lusitaniae*)以及胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*))和霉菌(包括例如枝顶孢属(*Acremonium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、枝孢属(*Cladosporium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、毛霉属(*Mucor*)、青霉属(*Penicillium*)、根霉属(*Rhizopus*)、葡萄穗霉属(*Stachybotrys*)和木霉属(*Trichoderma*))。示例性的细菌包括如下微生物:鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)、脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)、中间型类杆菌(*Bacteroides intermedius*)、弗氏柠檬细菌(*Citrobacter freundii*)、产气荚膜梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、变异库克菌(*Kocuria varians*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、无害李斯特菌(*Listeria innocua*)、酯香微杆菌(*Mirobacterium esteraromaticum*)、偶发分枝杆菌(*Mycobacterium fortuitum*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、摩氏摩根菌(*Organella morganii*)、厌氧消化链球菌(*Peptostreptococcus anaerobius*)、大消化球菌(*Peptococcus magnus*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) (例如绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*))、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、人葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*)、模仿葡萄球菌(*Staphylococcus simulans*)、无乳链球菌B(*Streptococcus agalactiae* B)、咽峡炎链球菌(*Streptococcus*

anginosus)、星座链球菌(*Streptococcus constellatus*)、粪链球菌D(*Streptococcus faecalis* D)、变异链球菌(*Streptococcus mutans*)、酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、乳房链球菌(*Streptococcus uberis*)和嗜麦芽黄单胞菌(*Xanthomonas maltophilia*)。

[0152] 合适的测试样品可获自或源自多种来源。所述来源可以是固体、液体、半固体、凝胶状材料、分散体、乳状液、悬浮液、气体(如空气)等。示例性的测试样品可以是临床样品、环境样品、食物样品、化妆品样品、饮料样品、水样品和土壤样品。在一些实施例中,可以使用样品收集装置和采样技术来浓缩测试样品或将测试样品转变成更适于分析的形式。一些示例性样品收集装置包括(但不限于)过滤器、膜、吸附介质、海绵、擦拭物和拭子。

[0153] 可以通过使多种表面(如,墙壁、地板、外科手术设备、仪器、食品加工设备)与样品收集装置(例如,擦拭物、海绵、拭子等)接触来测试所述表面是否存在微生物。示例性的样品收集装置以商品名3M QUICK SWAB从美国明尼苏达州圣保罗市的3M公司(3M Company, St. Paul, MN)商购获得、以商品名PURE-WRAPS从美国缅因州吉尔福特的普瑞坦医疗产品有限责任公司(Puritan Medical Products Co. LLC, Guilford, ME)商购获得、以商品名ESWA从美国加利福尼亚州科洛纳的科潘恩诊断有限公司(Copan Diagnostics, Inc., Corona, CA)商购获得以及以商品名FLOCKEDSWAB从意大利布雷西亚的微流变股份责任有限公司(microRheologics, S.r.l., Brescia, IT)商购获得。

[0154] 然后可以对擦拭物、海绵、拭子等直接进行分析,或通过使用合适的溶剂或溶液进行洗涤、提取等而将其转移至液体介质中。液体介质通常可以包含(例如)水、有机溶剂、缓冲剂、表面活性剂或它们的组合。然后可以直接分析液体样品,或者可以用另外的方法对其进行处理,这些方法包括浓缩、沉淀、过滤、离心、渗析、稀释、对可能会妨碍分析的某些组分进行灭活、添加试剂、化学处理等。

[0155] 其他采样技术包括使用膜过滤器浓缩微生物。例如,可以使用微孔膜过滤器从液体样品或空气样品中收集微生物。合适的膜过滤器的平均孔径通常小于1微米、小于0.8微米、小于0.45微米或小于0.2微米。可以使液体样品或空气样品通过孔径足够小的膜以截留微生物。微生物通常可以通过(例如)物理俘获、特异性相互作用(如,抗原-抗体或受体-配体相互作用)或非特异性化学相互作用(如,疏水吸附或离子交换)进行截留。通常可以通过将一些膜和过滤器(例如相对较薄的那些)紧邻本文所述制品的第二层放置,而对其直接进行分析。换句话说,可以将所述膜和过滤器放置为与式(I)化合物以及任选的胶凝剂、缓冲剂、培养基等接触。在某些情况下,在引入过滤器或膜之前,加入液体以使第二层复原(水合)。

[0156] 无论何种形式的测试样品通常均在存在式(I)化合物的情况下进行温育。可简单地通过将各种组分混合在一起而实现测试样品与式(Ia)荧光原性化合物或与该荧光原性化合物加上培养基的温育。如果需要,可以对混合物进行搅动和/或加热。温育步骤可以进行任何时间量。在实施例中,让测试样品和酶底物进行温育。温育可以使用任何合适的时间和温度。如果需要,可以在有氧条件下进行温育。例如,可以将与可能含有微生物的测试样品接触的制品置于25℃至45℃的范围内、25℃至40℃的范围内或30℃至40℃的范围内的培养箱中温育12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、72小时、96小时或甚至比96小时长的时间。

[0157] 可以用具有第一波长的光照射温育的样品一定量的时间,该时间量足以使式(Ib)荧光性化合物发出比第一波长要长的第二波长的光。第一和第二波长的光通常均在电磁光谱的紫外光、可见光或红外光区域中。通常用第一波长的光对温育样品进行每次持续一秒至几十秒的多次照射。

[0158] 式(I)化合物可以有利地用于检测pH在酸性区域内的测试样品中是否存在微生物。不受理论的束缚,式(I)化合物上存在氟化物基团扩大了可以使用所述化合物的可用的pH范围。也就是说,令人惊奇的是,式(Ib)化合物在包括酸性范围在内的扩大的pH范围内均为荧光团。与多种其他非氟化香豆素型荧光指示剂相比,所述荧光强度在酸性环境中随着时间推移往往保持相对恒定。

[0159] 在一些实施例中,式(Ib)化合物可以用波长接近400纳米或更长的光激发。例如,该化合物可以在接近410nm、420nm、430nm、440nm或450nm的波长处激发。这对某些样品可能是有利的,例如含有生物材料的那些样品。含有生物材料的样品在约365纳米处激发时通常具有显著的背景信号,但在约400纳米或更长波长处激发时则不这样。在这些波长处激发可能允许使用多种低成本的激光二极管光源,例如InGaN。

[0160] 在约400纳米或更长波长处激发时特别有用的式(Ib)化合物为具有为杂环化合物的R¹基团的那些。更具体地讲,合适的R¹基团通常具有五元杂环,其中环中有两个双键。此类杂环可以具有一个或两个杂原子。示例性的杂环基团包括(但不限于)噻吩基、吡咯基、咪唑基、咪唑基、噻唑基、噻唑基、异噻唑基和异噻唑基。其他示例性的杂环基团包括(但不限于)吡啶基、异吡啶基、苯并咪唑基、苯并噻吩基、苯并咪唑基、N-取代的苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噻唑基和苯并异噻唑基。

[0161] 可以使用任何已知的检测器检测由激发的式(Ib)荧光性化合物发出的光。可以利用例如光电倍增管、雪崩光电二极管、电荷耦合装置(CCD)、光电二极管和其他有源器件之类的检测器。检测器还可以与多种常用的滤波器和光学元件一起使用。

[0162] 一旦已检测到所发射光,则可任选进行各种附加步骤。一个任选步骤为可以定量所发射光以便估计测试样品中的微生物量。这可以通过将来自测试样品的发射光的累积强度与来自一个或不止一个标准样品的发射光(在相同条件下)的累积强度比较而实现。还可以进行相对比较,例如在两个不同时间(例如在灭菌程序之前和之后)比较荧光强度。

[0163] 可以任选进行的另一个附加步骤是形成所检测光的图像。在实施例中,具有多个可单独寻址的光敏检测器元件的CCD(或其他检测器)可以允许逐个像素地从传感器或传感器阵列收集荧光数据。这种阵列可以与照明源和适当的收集光学器件联合使用以获得(例如)接种的二维表面(例如,使用与图2所示类似但具有多个凹槽的制品)上的生长微生物集落的位点的图像。所得的电子图像可以传输到处理器组件,在其中可以使用图像分析软件增强图像对比度并自动地计算荧光区域数量(或用户可以手动计算区域的数量)。

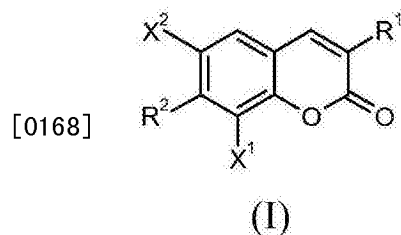
[0164] 合适的测量装置包括以商品名3M ATTEST生物监测系统(3M ATTEST BIOLOGICAL MONITORING SYSTEM)从美国明尼苏达州圣保罗的3M公司(3M Company, Saint Paul, MN)商购获得的那些。使用该测量装置时,可以用第一波长的光照射温育样品约1秒。该照射时间通常足以获得稳定的激发态并累积发射强度。在可以利用的使用如图2中所示制品的实施例中,可以照射温育的制品最长至几十秒。

[0165] 本文还公开了套件。如本文所公开的套件可包括式I荧光原性化合物和其他组分。

套件还可以包括被构造用于至少将荧光原性化合物与待测试的样品混合的容器。在实施例中,任选的容器可以预装有荧光原性化合物;或者在实施例中,任选的容器可以预装有含有荧光原性化合物的培养基。可以预装有含有荧光原性化合物的培养基的容器的例子为图2中所示的制品。例如,式(Ia)荧光原性化合物可用于例如以商品名3M PETRIFILM得自美国明尼苏达州圣保罗3M公司(3M, Saint Paul, MN)的制品中。

[0166] 提供了多个项目,例如化合物、组合物、制品、检测微生物的方法以及合成化合物的方法。

[0167] 第一项为式(I)化合物。



[0169] 在式(I)中,基团 R^1 为 $-(CO)-OR^3$ 、 $-(CO)-NR^4R^5$ 、杂环基团、芳基、芳烷基或氰基。基团 R^2 为羟基或酶不稳定基团。基团 R^3 为烷基、烯基、芳基或芳烷基。基团 R^4 和 R^5 各自独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。或者(a) X^1 为氢且 X^2 为氟,或者(b) X^1 为氟且 X^2 为氢。

[0170] 第二项为第1项的化合物,其中 R^2 为糖基、糖酸基、氨基糖基、羧基封端的氨基酸基团、羧基封端的肽基、酯基、含酯基团、磷酸酯基或硫酸酯基。

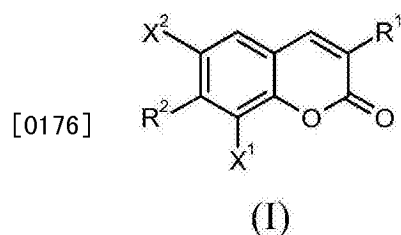
[0171] 第三项为第1项或第2项的化合物,其中 R^2 为糖基,该糖基为单糖基或二糖基。

[0172] 第四项为第1至3项中任一项的化合物,其中 R^1 为 $-(CO)-OR^3$,其中 R^3 为烷基。

[0173] 第五项为第1至4项中任一项的化合物,其中 R^1 为具有五元杂环的杂环基团。

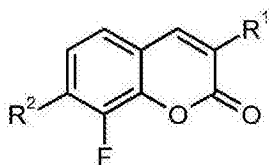
[0174] 第六项为第1至5项中任一项的化合物,其中 R^1 为具有稠合至苯环的五元杂环的杂环基团。

[0175] 第七项为包含可与水混溶的有机溶剂和式(I)化合物的组合物。



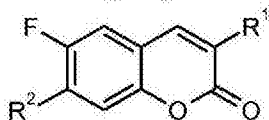
[0177] 在式(I)中,基团 R^1 为 $-(CO)-OR^3$ 、 $-(CO)-NR^4R^5$ 、杂环基团、芳基、芳烷基或氰基。基团 R^2 为羟基或酶不稳定基团。基团 R^3 为烷基、烯基、芳基或芳烷基。基团 R^4 和 R^5 各自独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。或者(a) X^1 为氢且 X^2 为氟,或者(b) X^1 为氟且 X^2 为氢。

[0178] 第八项为第7项的组合物,其中所述组合物包含式(I-1)化合物和式(I-2)化合物的混合物。



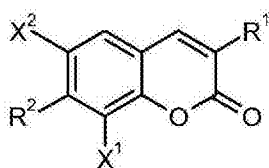
[0179]

(I-1)



(I-2)

[0180] 第九项为制品,其包括a)为支承层的第一层以及b)与所述支承层相邻的第二层,其中第二层包含式(I)化合物。

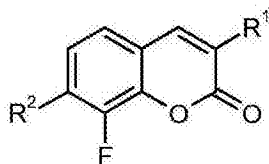


[0181]

(I)

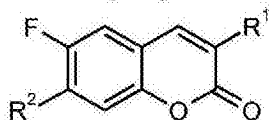
[0182] 在式(I)中,基团R¹为-(CO)-OR³、-(CO)-NR⁴R⁵、杂环基团、芳基、芳烷基或氰基。基团R²为羟基或酶不稳定基团。基团R³为烷基、烯基、芳基或芳烷基。基团R⁴和R⁵各自独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。或者(a)X¹为氢且X²为氟,或者(b)X¹为氟且X²为氢。

[0183] 第十项为第9项的制品,其中第二层包含式(I-1)化合物和式(I-2)化合物的混合物。



[0184]

(I-1)



(I-2)

[0185] 第十一项为第9项或第10项的制品,其中第二层还包含胶凝剂、培养基或它们的组合。

[0186] 第十二项为第9至11项中任一项的制品,其中第二层是脱水的。

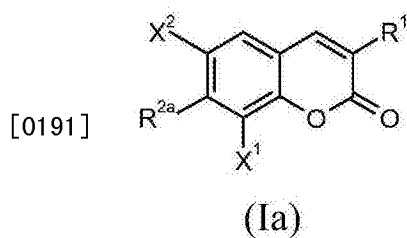
[0187] 第十三项为第9至12项中任一项的制品,其中第二层还包含聚合物粒子。

[0188] 第十四项为第13项的制品,其中聚合物粒子包含丙烯酸酯聚合物或共聚物、苯乙烯聚合物或共聚物、纤维素聚合物或共聚物、葡聚糖聚合物或共聚物、它们的衍生物或它们的组合。

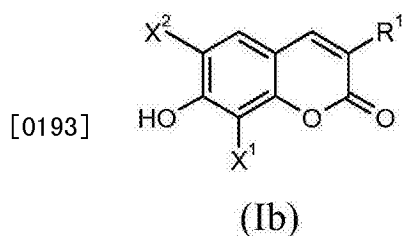
[0189] 第十五项为第13或14项的制品,其中聚合物粒子具有在0.01微米至1微米的范围

内的平均粒径。

[0190] 第十六项为检测微生物的方法,所述方法包括提供式(Ia)荧光原性化合物。



[0192] 在式(Ia)中,基团R¹为-(CO)-OR³、-(CO)-NR⁴R⁵、杂环基团、芳基、芳烷基或氰基。基团R²ᵃ为酶不稳定基团。基团R³为烷基、烯基、芳基或芳烷基。基团R⁴和R⁵各自独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。或者(a)X¹为氢且X²为氟,或者(b)X¹为氟且X²为氢。所述方法还包括将测试样品与式(Ia)荧光原性化合物一起温育,其中测试样品含有来自微生物的酶,并且所述酶可裂解(即水解)基团R²ᵃ,从而导致形成式(Ib)荧光性化合物。



[0194] 所述方法还包括用第一波长范围的光激发式(Ib)荧光性化合物,并检测以比第一光波长要长的第二光波长发出的光。

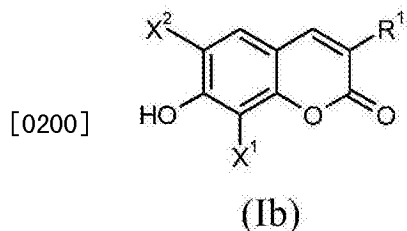
[0195] 第十七项为第16项的方法,其中第一波长的光和第二波长的光均在紫外光、可见光或红外光区域内。

[0196] 第十八项为第16项或第17项的方法,其中将测试样品与荧光原性化合物一起温育的步骤包括将液体形式的测试样品添加至含有式(Ia)荧光原性化合物和培养基的脱水层。

[0197] 第十九项为第16至18项中任一项的方法,其中所述方法还包括在聚合物粒子上螯合式(Ib)化合物。

[0198] 第二十项为第19项的方法,其中聚合物粒子具有在0.01微米至1微米范围内的平均粒径。

[0199] 第二十一项为制备式(Ib)化合物的方法。



[0201] 在式(Ib)中,基团R¹为-(CO)-OR³、-(CO)-NR⁴R⁵、杂环基团、芳基、芳烷基或氰基。基团R³为烷基、烯基、芳基或芳烷基。基团R⁴和R⁵各自独立地为氢、烷基、芳基或芳烷基。或者(a)X¹为氢且X²为氟,或者(b)X¹为氟且X²为氢。该方法包括用氟化剂将2,4-二羟基苯甲醛直接氟化而形成氟化中间体,即3-氟-2,4-二羟基苯甲醛、5-氟-2,4-二羟基苯甲醛或它们的混合物。然后让氟化中间体与式(III)化合物反应

[0202] $R^1-CH_2-R^{20}$

[0203] (III)

[0204] 以形成式(Ib)化合物。在式(III)中,基团 R^1 与式(Ib)所定义的相同,基团 R^{20} 为氰基、羧基($-COOH$)或式 $-COOR^1$ 基团。

[0205] 实例

[0206] 除非另外指明,否则以下实例中使用的所有份数、百分数、比率等均按重量计。

[0207] SELECTFLUOR为美国宾夕法尼亚州艾伦镇空气产品公司的氟化试剂的商品名,其包含(1-氯甲基-4-氟-1,4-二氮杂双环[2.2.2]辛烷双(四氟硼酸盐))、丙二酸二乙酯和甲醇钠。

[0208] 乙腈、乙酸、硅胶、乙酸乙酯、己烷、三乙胺、乙酸酐、浓盐酸、硫酸镁、DMSO(二甲基亚砷)、右旋糖、硅胶、酵母提取物和酪蛋白胰酶消化物均获自美国新泽西州吉布斯敦的EMD公司(EMD,Gibbstown,NJ)。

[0209] 2,4-二羟基苯甲醛获自美国田纳西州金仕堡的伊士曼化工公司(Eastman Chemical Company,Kingsport,TN)。

[0210] 吗啉购自美国俄亥俄州诺伍德的梅斯森科尔曼和贝尔公司(Matheson,Coleman and Bell,Norwood,OH)。

[0211] 2-噻吩乙酸、丙酮酸钠、磷酸氢二钾和磷酸二氢钾均获自美国威斯康星州密尔沃基的西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich,Milwaukee,WI)。

[0212] 无水甲醇获自美国纽约州菲利普斯堡的杰帝贝柯公司(J.T.Baker,Phillipsburg,NY)。

[0213] α -溴乙酰吡喃半乳糖获自美国俄亥俄州克利夫兰的Research Organics公司(Research Organics,Cleveland,OH)。

[0214] 氢氧化钠(1N)获自美国宾夕法尼亚州西切斯特的VWR公司(VWR,West Chester,PA)。

[0215] MX-180为获自日本大阪综研化学工程株式会社(Soken Chemical and Engineering,Osaka Japan)的单分散丙烯酸酯粒子的商品名。

[0216] 刺槐豆胶获自美国佐治亚州亚特兰大的斯比凯可公司(CP Kelco,Atlanta,GA)。

[0217] 黄原胶获自美国佐治亚州亚特兰大的斯比凯可公司。

[0218] 隔离衬片可得自美国威斯康星州哈蒙德的耐恒有限责任公司(Loparex LLC,Hammond,WI)。

[0219] 化合物3-羧乙基-7-羟基香豆素根据Chilvers等人,J.Appl.Microbio.,(《应用微生物学杂志》)91,1118-1130(2001)制备。

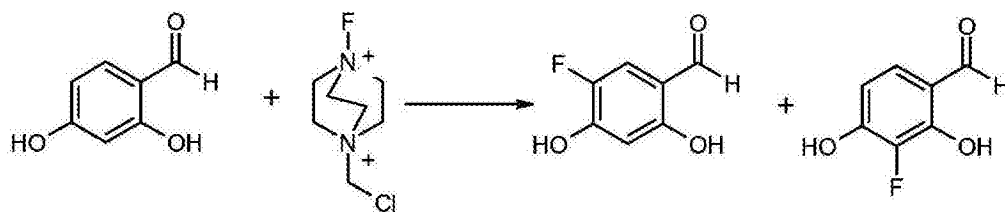
[0220] 化合物3-噻吩基伞形酮和3-噻吩基伞形酮-吡喃半乳糖苷(TU-gal)如美国专利No.6,566,508(Bentsen等人)中所述制备。制备工序以引用方式并入本文中。

[0221] 化合物2-氰甲基苯并咪唑根据Copeland和Day,Journal of the American Chemical Society(《美国化学学会志》),1943,65,1072(1943)制备。

[0222] 化合物3-苯并咪唑基-7-羟基香豆素(BiU)根据Elnagdi等人,Journal of Chemical Research(M)(《化学研究杂志(M)》),375(1997)制备。

[0223] 实例1:氟化的2,4-二羟基苯甲醛的制备

[0224]



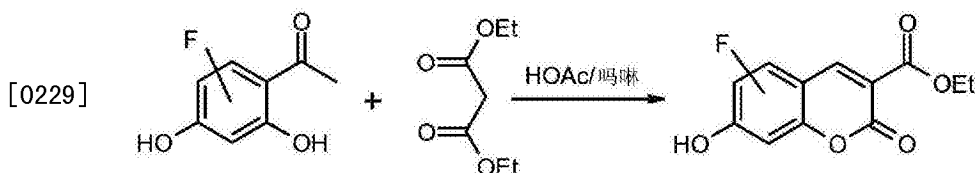
(DHBz) (SELECTFLUOR) (5-氟代 DHBz) (3-氟代 DHBz)

[0225] 按照如下方式制备溶液:将12.230g(34.5毫摩尔)氟化试剂(SELECTFLUOR试剂)溶解在圆底烧瓶中的400毫升(mL)来自新开瓶的乙腈(0.0027重量%的H₂O)中。在氟化试剂完全溶解之后,加入7.00g(50.6毫摩尔)2,4-二羟基苯甲醛(DHBz),用具有氮气入口的塞子封闭烧瓶,随后在室温(约22℃)下用磁性搅棒搅拌内容物。两天后,NMR谱指示约29摩尔%的DHBz转化,并消耗了95摩尔%的SELECTFLUOR试剂。用氮气将溶液鼓泡约30分钟,然后添加另一份12.29g(34.7毫摩尔)的SELECTFLUOR试剂。将溶液置于冰箱中连续搅拌2天,然后在室温下搅拌3天。

[0226] 七天后,过滤浑浊的悬浮液,获得黄色溶液和白色沉淀。使沉淀在过滤器上干燥,并使滤液真空干燥。将来自滤液的干燥残余物与200mL二乙醚一起搅拌约1小时,然后过滤,获得黄色固体和黄色滤液。干燥的白色和黄色固体的重量分别为6.05g和15.72g。每种固体的NMR(DMSO-d₆)与SELECTFLUOR产物相符,没有出现苯甲醛衍生物的指示。固体的总量为21.77g。完全回收的SELECTFLUOR试剂(假定活性F被H取代)应当为约23.3g。

[0227] 将黄色二乙醚溶液在真空条件下干燥。NMR结果指示DHBz、5-氟-DHBz(5-F)和3-氟-DHBz(3-F)的混合物的比率为0.41:0.48:0.11,且具有微量的杂质。黄色固体的质量为7.52g。根据这些比率的理论收率为7.53g,指示苯甲醛产物被完全回收。通过将黄色固体溶解在热水中并在环境温度下缓慢冷却而将其重结晶,然后过滤并干燥。

[0228] 实例2:部分氟化的3-羧酸乙酯-7-羟基香豆素(FEHC)的制备



[0230] 按照如下方式制备溶液:将2.804g来自实例1的氟化二羟基苯甲醛的可溶于醚的混合物(大约19毫摩尔)添加至配有氮气入口的圆底烧瓶中的15mL来自新开瓶的甲醇(0.002重量%的水)中,并在氮气下搅拌。添加3.3mL(22毫摩尔)体积的丙二酸二乙酯,并将溶液加热至回流30分钟。添加200微升(μL)吗啉和50μL乙酸的固化混合物,反应溶液立即变成棕色。将溶液加热2小时,之后使溶液在环境温度下简单冷却约30分钟,然后冷藏过夜。

[0231] 过滤形成的少量白-黄色针状晶体,并使其在过滤器上干燥。¹H和¹⁹F NMR谱(DMSO-d₆)与具有比率1:0.7:0.3的3-羧酸乙酯-7-羟基香豆素(EHC)、6-氟-EHC(6-FEHC)和8-氟-EHC(8-FEHC)的混合物相符,其结构在上文示出。



[0233] 再次将混合物加热至回流3小时,然后让其冷却过夜,导致结晶。用二乙醚将晶体从烧瓶中冲洗出来,这导致出现相当多的另外的沉淀。

[0234] 将称为FEHC的部分氟化的EHC(比率为1:0.7:0.3的EHC、6-FEHC和8-FEHC的混合物)溶解于DMSO中,浓度为1毫克/毫升(mg/mL)。准备96孔板,使每个孔容纳有100微升的100mM磷酸盐缓冲液,其pH值在8.0至2.5的范围内,单位增量为0.5。将10微升体积的FEHC溶液添加至每个孔中。还制备一组10倍稀释的孔以消除由于高浓度荧光团的自猝灭所致的假象。10倍稀释液通过如下方式制备:在DMSO中将1mg/mL溶液稀释为0.1mg/mL,然后将10微升的该溶液加至各个孔中的100微升的100mM磷酸盐缓冲液中。

[0235] 使用SPECTRAMAX M5荧光读板机(可得自美国加利福尼亚州森尼韦尔分子器件公司(Molecular Devices, Sunnyvale CA))记录每个pH值下从250纳米(nm)至500nm的吸收光谱。

[0236] 还在SPECTRAMAX M5荧光读板机上记录在板中的pH值范围内,在400nm的激发波长下,在410nm至700nm波长处的发射光谱。最大发射发生在波长450nm处。图3示出了EHC和FEHC在450nm处的荧光计数(在400nm处激发)与pH的关系曲线图。FEHC的吸收和发射最大值随pH的变化与标准EHC相同。然而,在介于4.5与6.5之间的pH值处,FEHC在400nm处的吸收(以及在450nm处的发射)高于EHC。在略低于7降至约2.5的pH值处,FEHC显示出荧光增强。

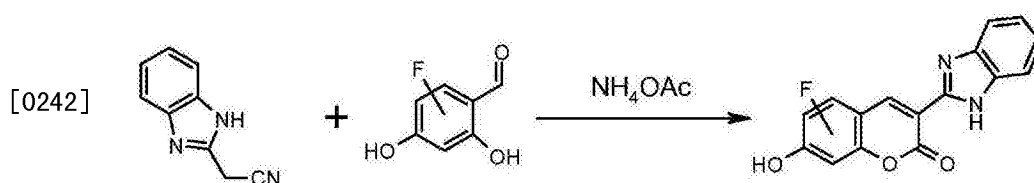
[0237] 实例3:通过色谱法分离FEHC

[0238] 在色谱柱中用乙酸乙酯与己烷的60/40混合物将来自实例1的部分氟化的EHC(1.5g FEHC)在硅胶上分离。总共收集了20个30mL级分,用薄层色谱法检查,在可能的情况下将其合并。洗脱液的级分6在收集后立刻开始沉淀,并且最终级分4至8显示沉淀的迹象。再用两个体积的约200mL乙酸乙酯/己烷的80/20混合物洗涤柱子,然后用200mL乙酸乙酯洗涤。使用旋转蒸发仪移除最后这两个级分中的每一者的溶剂。分离具有95:5重量比的6-FEHC与8-FEHC的混合物。

[0239] 根据实例2中所述的工序制备96孔板,不同的是将10微升体积的溶解在DMSO中的该95:5混合物的1mg/mL溶液添加至具有磷酸盐缓冲液的每个孔中。

[0240] 在SPECTRAMAX M5荧光读板机上记录在pH值范围内在400nm处的吸收和在450nm处的发射。图4中将重量比为95:5的6-FEHC和8-FEHC的混合物(其称为6-FEHC)的光谱与单独的EHC的光谱进行了比较。图4显示,通过添加氟,pKa从约6.5降至约4.5。这是荧光计数图线约中点处的pH。

[0241] 实例4:部分氟化的3-苯并咪唑基伞形酮(FBiU)的制备和光谱



[0243] 通过将0.215g 2-氰甲基苯并咪唑(1.4毫摩尔)与来自实例1的0.213g 氟化二羟基苯甲醛(1.4毫摩尔)、0.226g 乙酸铵(2.9毫摩尔)和乙醇(2mL)混合而制备溶液。将该溶液加热至回流持续1.5小时。然后让其冷却,再搅拌1小时,然后过滤,在过滤器上用大约20mL 乙醇洗涤,并在真空烘箱中在室温下干燥过夜。干燥的橙色固体的收率为332毫克。

[0244] 将所得的部分氟化的3-苯并咪唑基伞形酮(称为FBIU)以1毫克/毫升(mg/mL)的浓度溶解在DMSO中。准备96孔板,使每个孔容纳有100微升的100mM磷酸盐缓冲液,其pH值在8.0至2.5的范围内,单位增量为0.5。将10微升体积的FBIU溶液添加至每个孔中。还制备一组10倍稀释的孔以消除由于高浓度荧光团的自猝灭所致的假象。10倍稀释液通过如下方式制备:在DMSO中将1mg/mL溶液稀释为0.1mg/mL,然后将10微升的该溶液加至各个孔中的100微升的100mM磷酸盐缓冲液中。

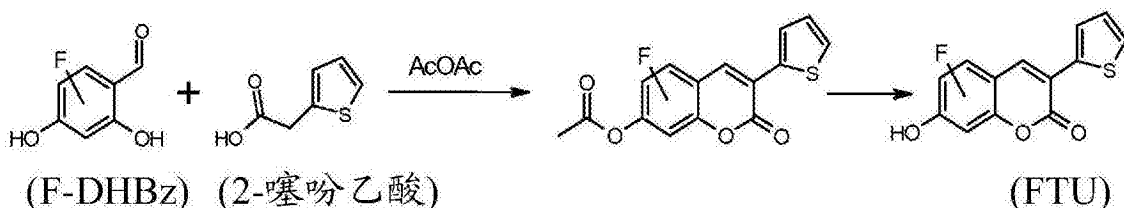
[0245] 使用SPECTRAMAX M5荧光读板机(可得自美国加利福尼亚州森尼韦尔的分子器件公司)记录每个pH值下10倍稀释孔的从300纳米(nm)至700nm的吸收光谱。

[0246] 还在SPECTRAMAX M5荧光读板机上记录在板中的pH值范围内,在450nm的激发波长下,在470nm至655nm波长处的发射光谱。最大发射发生在波长495nm处。相似地记录未氟化的3-苯并咪唑基全形酮(BiU)的吸收和发射光谱。

[0247] 图5示出了FBiU和BiU在495nm处的荧光计数(在450nm处激发)与pH的关系曲线图。在该pH范围内,FBiU的吸收和发射最大值随pH的变化与标准BiU相同。然而,在高于6降至约2.5的pH值处,FBiU显示出荧光增强。

[0248] 实例5:氟化的3-噻吩基伞形酮(FTU)的制备

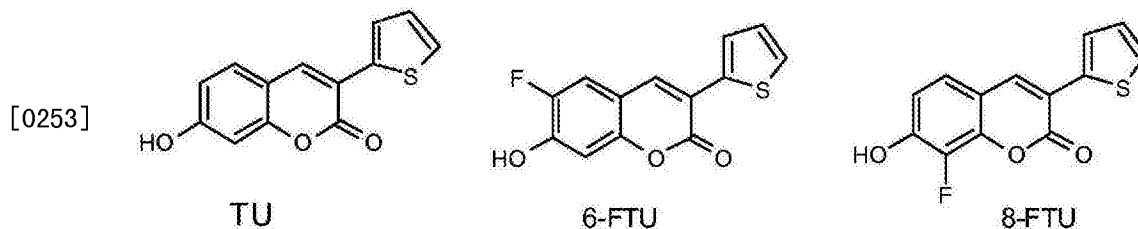
[0249]



[0250] 按照如下方式制备溶液：用磁性搅棒将2.006g(13.5毫摩尔)来自实例1的氟化二羟基苯甲醛与1.93g(13.5毫摩尔)2-噻吩乙酸在圆底烧瓶中搅拌。然后加入2.4mL三乙胺，再加入12mL乙酸酐。用配有氮气入口的塞子密封烧瓶，在约120℃的油浴中在氮气下加热约2小时。薄层色谱法(TLC, 60:40乙酸乙酯和己烷)分析显示，两个亮蓝色的荧光斑点相当接近，并且几乎没有残余起始物质的指示。让溶液冷却至约室温。将形成的棕色固体添加至约100mL去离子水中并搅拌约1小时，然后过滤，从而产生具有一点点荧光的黄色滤液和赭色固体。该固体的¹⁹F NMR显示在-132.9ppm(dd; 9.9, 6.6Hz)和-149.9ppm(d, 6.6Hz)处具有以5:1比率分裂的两个峰，这与反应产物的预期结构相符。

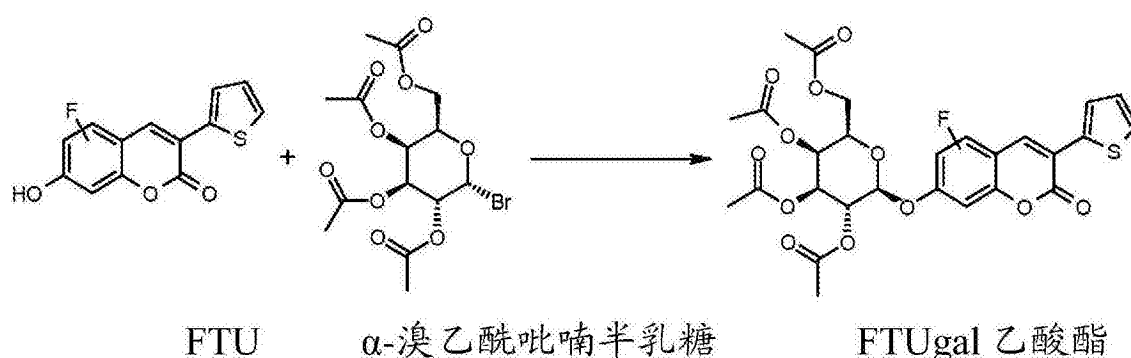
[0251] 将该固体材料在真空烘箱中于室温下干燥过夜,收率为3.54g。理论收率为3.87g (收率超过91%)。留出小样品,将剩余物在50mL甲醇中搅拌。加入约30mL HCl在30mL去离子(DI)水中的混合物,并将该悬浮液加热至回流约2小时;回流的第一个30分钟后,悬浮液变为绿色。让该悬浮液在搅拌的同时冷却1.5小时,然后加入200mL去离子水并搅拌约15分钟。过滤悬浮液而产生深绿色固体和淡黄色滤液。将固体于真空烘箱中的过滤器上在室温下干燥过夜。

[0252] 真空干燥之前提取的样品的¹H NMR谱显示尖锐且明显的苯酚峰,其中在10.6-11.2ppm处具有预期的积分(相对于乙烯基)。芳族区域非常复杂,但总积分与预期的所需产物混合物相符。¹⁹F NMR在-139.5ppm(dd,10.5,7.6Hz)和-160.3ppm(d,7.5Hz)处具有比率为5:1的两个峰,这与氟化的噻吩基伞形酮(FTU)相符,其为6-氟-FTU(6-FTU)和8-氟-FTU(8-FTU)的混合物。脱乙酰化的收率为2.82g(93%收率)。



[0254] 实例6:乙酰化的FTU-吡喃半乳糖苷(FTU-gal)的制备

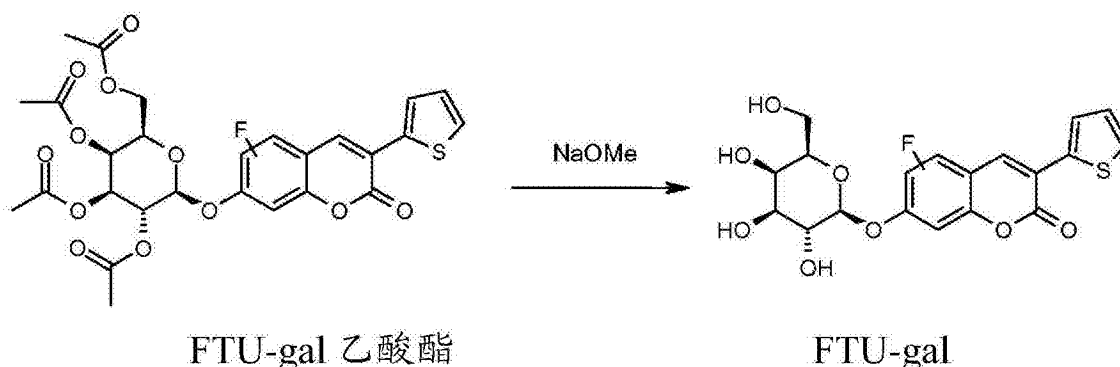
[0255]



[0256] 在室温下用磁性搅棒将稍过量的来自实例5的氟化香豆素混合物(1.52克,6毫摩尔)与2.06克(5毫摩尔)α-溴乙酰吡喃半乳糖、10mL1N NaOH和20mL丙酮在圆底烧瓶内搅拌5天。真空移除丙酮之后,用约100mL氯仿提取残余物。用1N NaOH溶液提取残余的未反应产物,用三份100mL体积的去离子水洗涤氯仿中的残余物。在MgSO₄上干燥有机相,过滤,然后真空移除溶剂,得到乙酰化的FTU-吡喃半乳糖苷(FTU-gal乙酸酯)。¹H和¹⁹F NMR分析均与重量比为0.53:0.11:0.37的6-FTU-gal乙酸酯、8-FTU-gal乙酸酯和非氟化产物的混合物相符。

[0257] 实例7:乙酰化的FTU-吡喃半乳糖苷的去保护

[0258]



[0259] 通过将1.2g来自实例6的FTU-gal乙酸酯添加至15mL甲醇中来制备混合物。大部分FTU-gal乙酸酯溶解。当加入100毫克NaOMe时,其完全溶解并形成黄色。在室温和氮气下将

溶液搅拌1至2小时,缓慢形成黄色沉淀。过滤该溶液,并将黄色固体在过滤器上干燥。然后将黄色固体溶解于约500mL温热甲醇中,并让其在冰箱中冷却,然后在冷冻箱(-20℃)中进一步冷却三天。

[0260] 通过依次过滤、减小体积和在冰箱中冷却,而从四个级分中总共回收得到0.58g。乙酸酯的移除通过¹H NMR确认。通过¹H和¹⁹F NMR确认第一级分具有重量比为0.69:0.03:0.28的6-FTU-gal、8-FTU-gal和非氟化产物的混合物。6-FTU-gal表现出首先从溶液出来,然后是8-FTU-gal,再然后是非氟化产物。

[0261] 记录在存在和不存在β-D-半乳糖苷酶的情况下在pH2.5至8.0处FTU-gal的第一级分的吸收和发射光谱,然后与相同条件下的TU-gal(根据美国专利No.6,566,508(Bentsen等人)制备)的光谱进行对比。

[0262] 记录在430nm处激发时的发射光谱(495nm处)以将来自未反应的FTU-gal在反应的阴离子最大吸收处(405nm)的明显吸收降至最低,如图6所示。曲线图显示,与未氟化的TU相比pH5至7处的强度增大到超过2倍。约三分之二的测试样品被氟化。

[0263] 实例8和比较例C1:微生物集落的检测

[0264] 细菌培养平板的制备

[0265] 将50g黄原胶粉末和50g刺槐豆胶粉末的混合物置于500mL瓶中,手动振摇约5分钟。通过将混合物撒到以商品名9795R高级密封胶带(9795R ADVANCED SEALING TAPE)从美国明尼苏达州圣保罗的3M公司商购获得的涂有压敏粘合剂的片材的粘合剂上而制备覆盖膜。使涂有粘合剂的片材倾斜,以移除过量的粉末。胶的涂层重量为大约85毫克/24平方英尺(即,0.55毫克/平方厘米)。

[0266] 通过混合22.8份酪蛋白胰酶消化物、15.9份酵母提取物、45.5份丙酮酸钠、4.1份右旋糖、9.0份磷酸氢二钾和2.8份磷酸二氢钾,制备培养基混合物。通过如下制备培养基肉汤:在烧杯中用气动搅拌机将500mL去离子水与14.78g培养基混合物混合,然后以小增量加入5g刺槐豆胶并混合数分钟,。将烧杯用箔覆盖并且将混合物加热至80℃,混合约6分钟,然后在不加热下混合的同时让其冷却约十分钟。然后将肉汤倾注进灭菌的烧杯中,用塑料袋覆盖并冷藏。用刮刀小心地搅拌冷却的肉汤以避免形成气泡,然后将其刮涂至4密耳厚的聚对苯二甲酸乙二醇酯膜(可以商品名MELINEX453从美国弗吉尼亚州霍普韦尔的杜邦帝人薄膜公司(DuPont Teijin Films,Hopewell VA)商购获得)的24.4cm宽片材上。使涂有肉汤的膜在温度设定为210℃的烘箱中干燥约10分钟。干燥的涂层重量为约1毫克/平方厘米。

[0267] 将4密耳(1密耳等于0.001英寸)厚的闭孔聚苯乙烯泡沫(可从美国肯塔基州巴兹敦的美国富士密封剂有限公司(American Fuji Seal,Inc.,Bardstown,KY)商购获得)的20.3厘米(cm)宽片材层合至隔离衬片上的压敏粘合剂无基材胶带上。使用的特定转移胶带具有丙烯酸类压敏粘合剂,并可以商品名3M TRANSFER ADHESIVE927从美国明尼苏达州圣保罗3M公司商购获得。冲切出测量直径为5cm的圆片,并将其从层合物上移除,形成位于来自7.6cm×10.16cm矩形的一端的7.6cm边长正方形中心的圆形开口。将衬片移除并将聚苯乙烯泡沫的涂布粘合剂的表面粘附至涂布肉汤的膜以提供基础构件,所述基础构件具有涂布肉汤的自支承基材和粘附于该支承基材的涂布肉汤的表面的疏水性间隔元件(即,“泡沫挡板”)。从层合物上切割尺寸为7.6cm×10.16cm的矩形板,其圆形开口位于10.16cm长度一端上的7.6cm边长正方形的中央。使用双面压敏胶带将覆盖膜附接至基础构件上,使涂有粉

末的一侧朝向泡沫挡板,以形成培养平板。

[0268] 指示剂溶液的制备

[0269] 对于实例8而言,通过将来自实例6的FTU-gal以50mM(毫摩尔)的浓度溶解在DMSO中而制备指示剂溶液(指示剂1)。将该溶液稀释20倍,从而得到2.5mM溶液(指示剂2)。

[0270] 对于比较例C1而言,通过将TU-gal以20mM的浓度溶解在DMSO中而制备指示剂溶液(指示剂3)。将该溶液进一步稀释,从而得到2.5mM溶液(指示剂4)。

[0271] 聚合物粒子悬浮液的制备

[0272] 将600mg丙烯酸酯粒子(MX-180)在12mL Butterfield缓冲液(可获自美国明尼苏达州圣保罗的3M公司)中的悬浮液涡旋直至均匀,然后在40℃下进行50分钟的超声处理。

[0273] 细菌样品的制备

[0274] 根据制造商的说明制备3重量%的胰酶大豆琼脂平板(可以商品名BACTO胰酶大豆琼脂从美国马里兰州斯帕克斯的BD公司(Becton Dickinson in Sparks,MD)商购获得)。用大肠杆菌(ATCC29425,得自美国弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(The American Type Culture Collection,Manassas,VA))在平板上划线接种,并在37℃下温育过夜。将从划线接种平板上分离的集落接种进9mL胰酶大豆肉汤(可以商品名BD BACTO胰酶大豆琼脂从美国马里兰州斯帕克斯的BD公司商购获得)中,并在37℃下温育过夜(18-20小时)。用Butterfield缓冲液稀释所得的肉汤,得到具有估计为 10^3 个生物体/mL的细菌悬浮液。

[0275] 在十支1.5mL无菌埃彭道夫管中制备各个样品,其中6支管中具有1mL聚合物粒子悬浮液,4支管中具有1mL Butterfield缓冲液。向每支管中加入10微升指示剂2、指示剂3或指示剂4,或者4微升指示剂1,然后将10微升 10^3 大肠杆菌悬浮液添加至每支管中。表1汇总了实例8-1至8-5和比较例C1-C5。样品指示剂浓度(荧光原性化合物的样品浓度)以纳摩尔/升浓度(nM)为单位。

[0276] 将1mL样品接种进如上所述制备的细菌培养平板中。对每个样品的说明在表1中示出。

[0277] 表1:实例7-1至7-5和比较例C-1至C-5的组成

[0278]

实例	化合物	荧光原性化合物的浓度	荧光原性化合物的样品浓度	MX-180 粒子
8-1	FTU-gal	50mM	200nM	有
8-1	FTU-gal	50mM	200nM	有
8-3	FTU-gal	2.5mM	25nM	有
8-4	FTU-gal	50mM	200nM	无
8-5	FTU-gal	2.5mM	25nM	无

[0279]

C-1	TU-gal	20mM	200nM	有
C-2	TU-gal	20mM	200nM	有
C-3	TU-gal	2.5mM	25nM	有
C-4	TU-gal	20mM	200nM	无
C-5	TU-gal	2.5mM	25nM	无

[0280] 平板8-1和C-1

[0281] 在成像/温箱系统(体外成像系统FX Pro,得自美国纽约州罗切斯特市的锐珂医疗公司(Carestream Health,Rochester,NY))中温育平板8-1和C-1,该系统被设置为每2小时拍摄3张图像。在白光下拍摄第一图像;在荧光条件下(在420nm处发射,在535nm处激发)拍摄第二图像,持续5秒;并且在相同的荧光条件下拍摄第三图像,持续30秒。温箱中的温度在约20℃至27℃之间变化。

[0282] 14小时后,平板8-1和C-1的图像中出现明显的集落。出现的集落呈现类似的强度。限定6个集落的所关注区域,并限定6个没有集落的类似面积的附近点的所关注区域以表示每个平板的背景。在30秒荧光照明条件下针对每个平板绘制所限定区域的平均强度(6个集落的平均值)与时间的关系图线,如图7所示。该图线显示,含有FTU-gal1的样品和含有TU-gal1的样品的荧光在早期阶段是类似的;然而,含有TU-gal1的样品的荧光随时间推移趋于达到稳定,而含有FTU-gal1的样品的荧光继续增大。该观察结果与来自细菌代谢的酸性副产物积聚是一致的,该积聚使得来自含有TU-gal1的样品的发射相对于含有FTU-gal1的样品有所下降。

[0283] 通过将来自6个集落和6个背景点的信号进行平均并绘制如图7中可见的信号与背景之比与时间的关系图线,而将数据归一化。含有FTU-gal1的样品的信号与噪声(背景)比率总是高于含有TU-gal1的样品的该比率,并且差值随时间增大。

[0284] 平板8-2至8-5和C-2至C-5

[0285] 将平板8-2至8-5和C-2至C-5在30℃下温育。将平板从温箱中取出并在1和2天后成像。在暗室中使用Canon40D相机在365nm紫外照明下记录图像。所有平板上的集落都可见,并且当荧光团浓度较低时(平板8-3与平板8-2相比,平板C-3与平板C-2相比)更容易用相机看到。在存在MX-180粒子的情况下来自所有集落的荧光都比没有MX-180粒子的那些集落的荧光亮得多。

[0286] 因此,公开了荧光原性化合物、荧光性化合物、含有这些化合物的制品、使用这些化合物检测微生物的方法,以及制备这些化合物的方法的实施例。本领域的技术人员将会知道,本发明可以通过除所公开的那些实施例之外的实施例进行实施。所公开的实施例用于举例说明而非限制,并且本发明仅由随后的权利要求书限制。

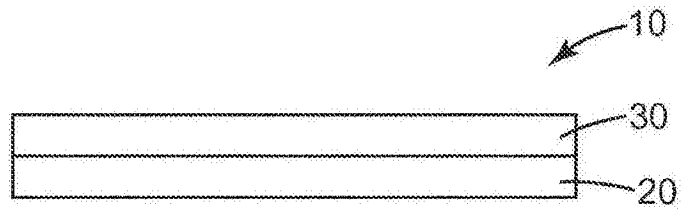


图1a

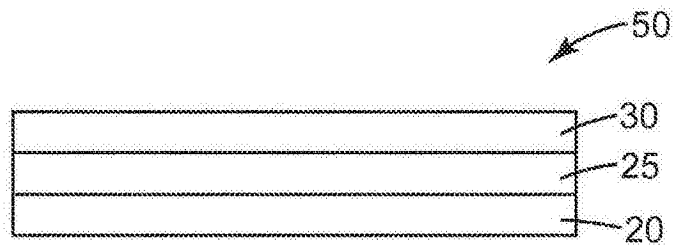


图1b

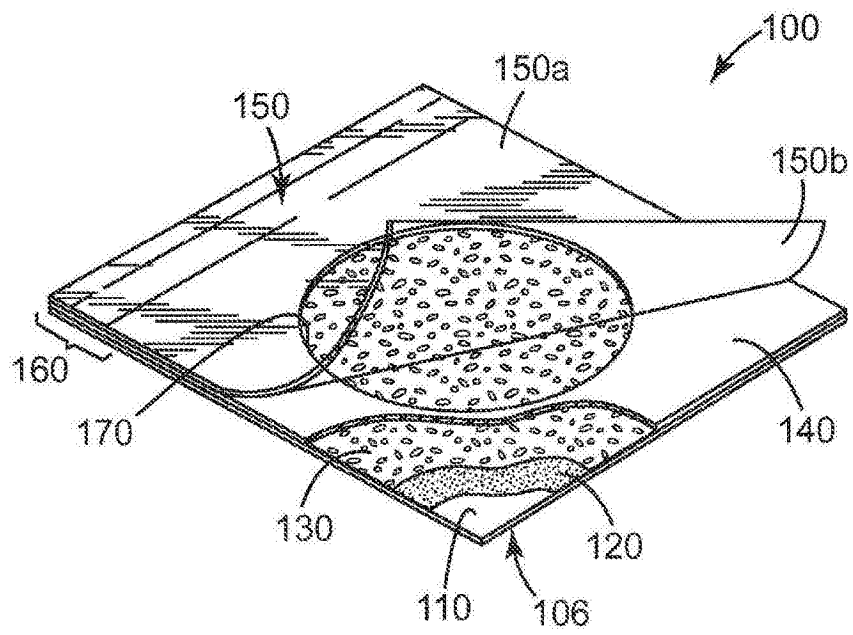


图2

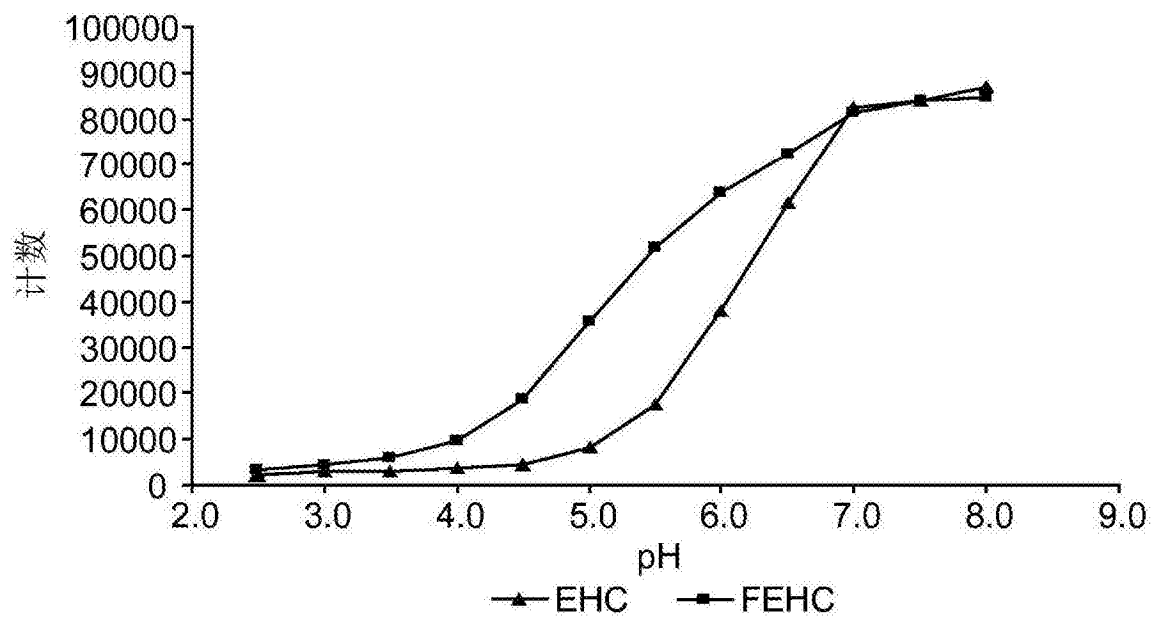


图3

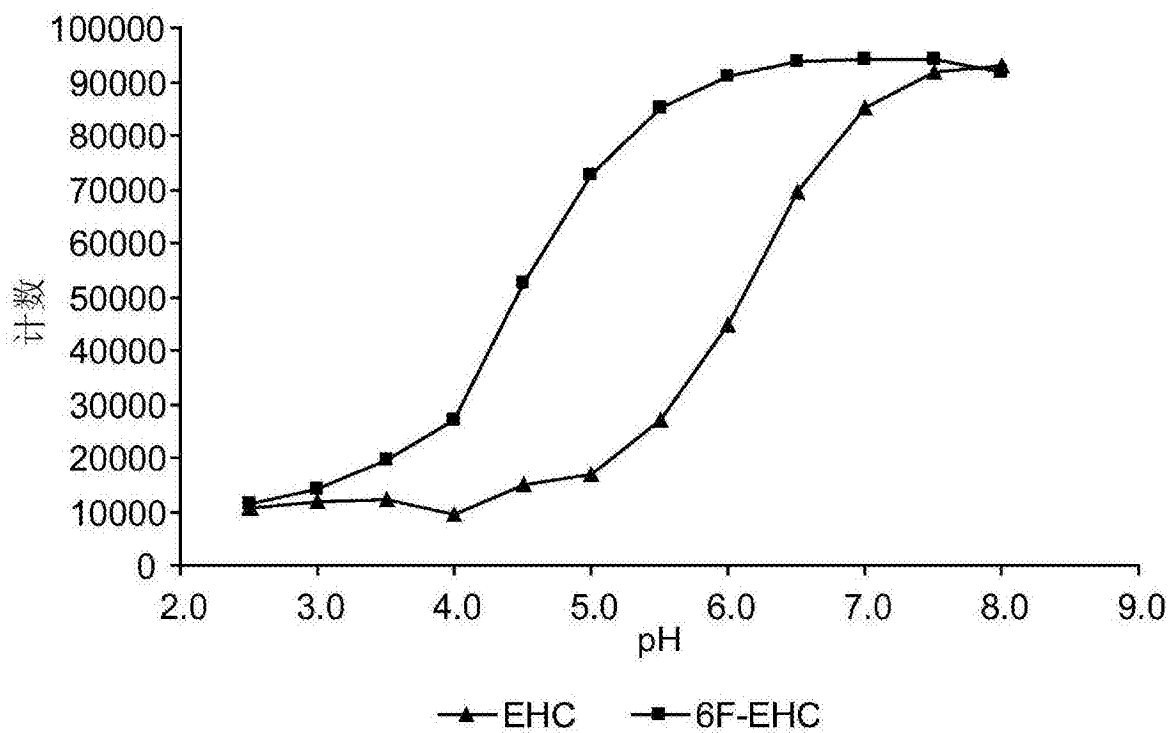


图4

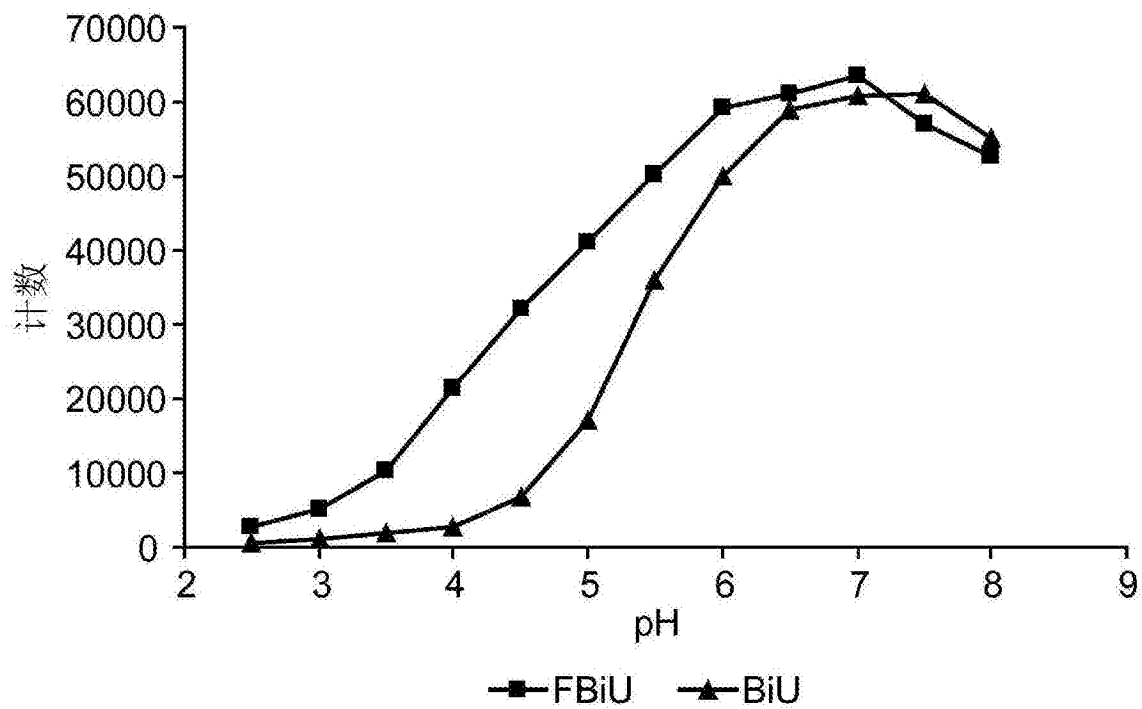


图5

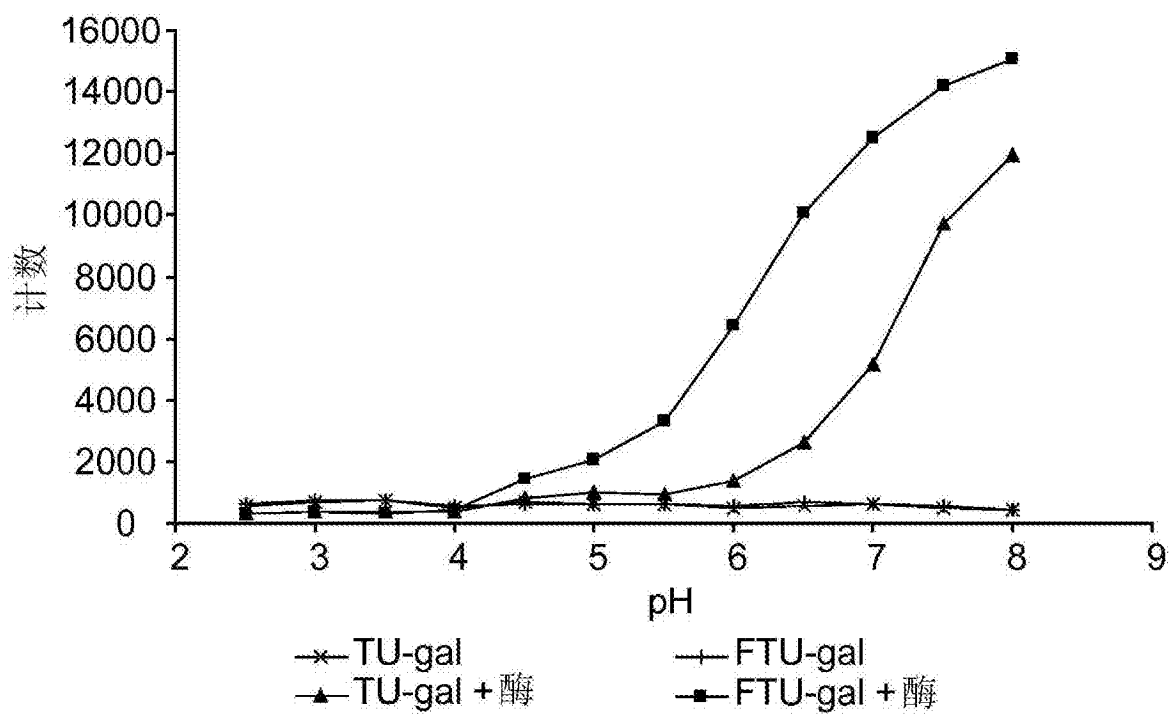


图6

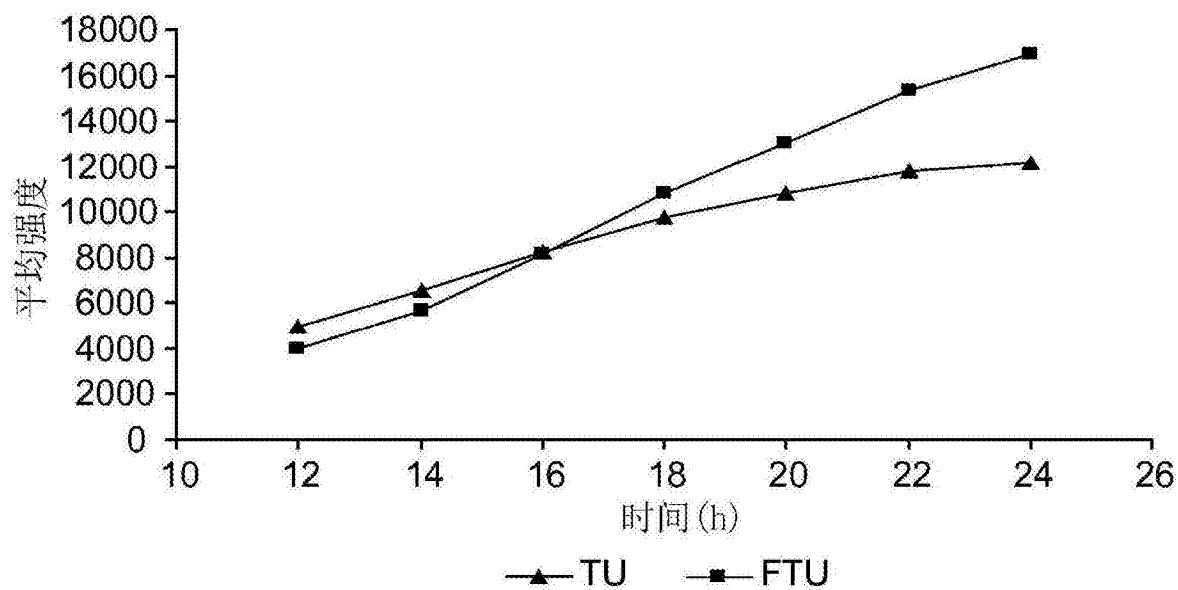


图7

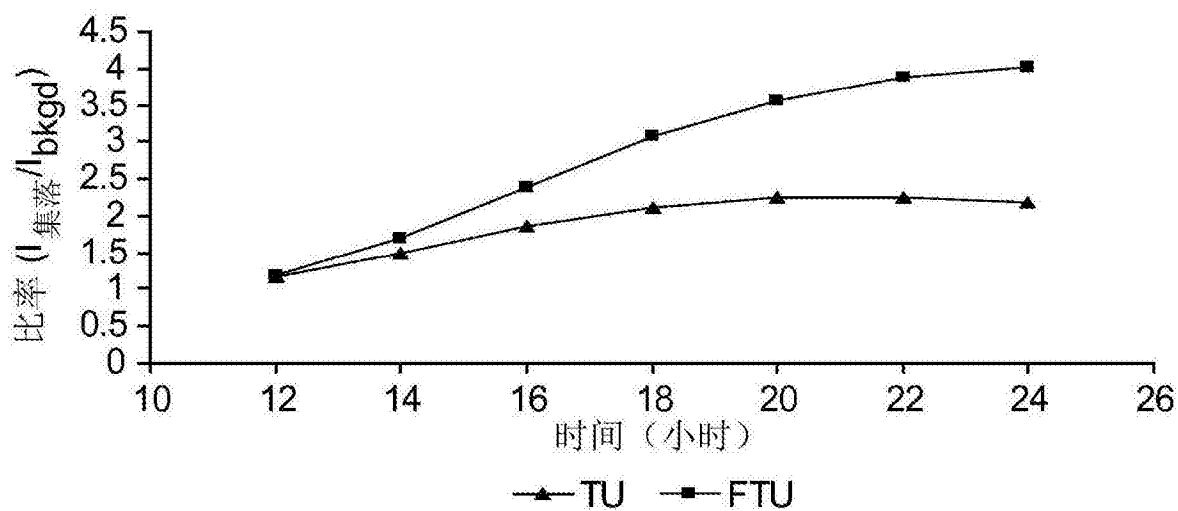


图8