(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112204020 B
(45)授权公告日 2023.11.14

(21)申请号 201980035311.2
(22)申请日 2019.05.24
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112204020 A
(43)申请公布日 2021.01.08
(30)优先权数据
18174403.8 2018.05.25 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/063418 2019.05.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/224338 EN 2019.11.28
(73)专利权人 尼米斯技术公司
地址 瑞士杜本多夫
专利权人 拉莫特特拉维夫大学有限公司
(72)发明人 D·沙巴特 M·E·罗斯康福特
N·哈纳尼亚 O·格林
U·斯皮茨 L·威克 J·伊森
R·沃伯格 R·柯瑞彪
Z·巴贾科娃 姚春妍
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
专利代理师 刘新宇 李茂家
(51)Int.Cl.
C07D 321/00(2006.01)
(56)对比文件
WO 2017130191 A1,2017.08.03
审查员 李占成

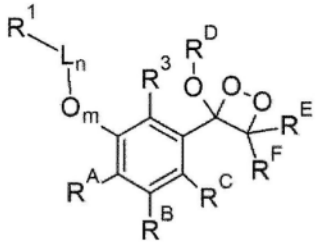
权利要求书13页 说明书70页 附图5页

(54)发明名称

二氧杂环丁烷化合物及其用于检测微生物的用途

(57)摘要

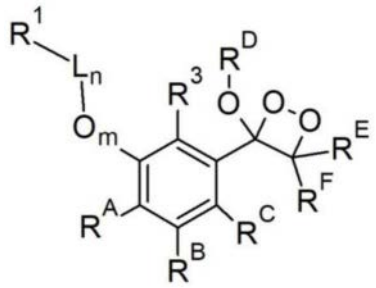
本发明涉及二氧杂环丁烷化合物,它们在借助化学发光来检测是否存在、定量和鉴定包括细菌、细菌碎片(例如,LPS、内毒素)、病毒、真菌以及其它病原体的微生物中的用途,以及相应的方法。



(I)

CN 112204020 B

1.一种式I的化合物



(式I)，

其中

R^1为选自酶不稳定基团和具有式-B(Z)(Z')或-B(Z″)$_3^-$Kat$^+$的含硼基团的分析物响应性基团，

所述酶不稳定基团选自乙酰基、丁酰基、辛酰基、壬酰基、肌醇磷酰基、磷酰基、氨基酸基、L-焦谷氨酸基、二肽基、三肽基、β-D-吡喃半乳糖苷基、α-D-吡喃半乳糖苷基、α-D-吡喃葡萄糖苷基、β-D-吡喃葡萄糖苷基、β-D-葡萄糖醛酸基、β-D-葡萄糖醛酸钠盐、N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基、N-乙酰基神经氨酸基、纤维二糖苷基、α-D-呋喃核糖苷基、β-D-呋喃核糖苷基、磷酰胆碱基、-NO_2、硬脂酰基、棕榈酰基、油酰基、亚油酰基、Tos-L-丙氨酰基、α-甘露糖基、β-甘露糖基、α-岩藻糖基、β-岩藻糖基、α-艾杜糖基、β-艾杜糖基、α-(低聚)麦芽糖基、草酰酯、SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基、β-内酰胺类抗生素、Ac-QLQ-、Ac-FQLQ-、Ac-EFQLQ-、和Ac-DEFQLQ-，

Z和Z'独立地选自R^4和OR^5，

其中R^4选自-OH、-O$^-$Kat$^+$、C1-C4烷基、C2-C4杂烷基、C2-C4烯基、C2-C4杂烯基、C2-C4炔基、C2-C4杂炔基、C5-C6芳基、C5-C6杂芳基、C6-C10芳烷基、和C6-C10杂芳烷基，

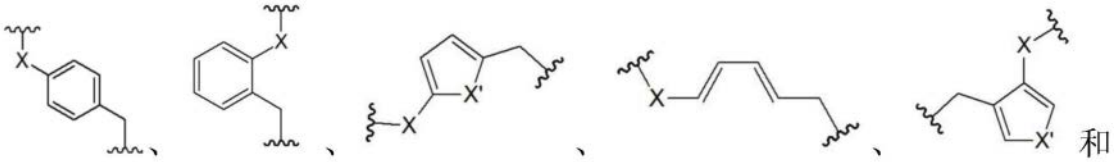
并且R^5选自-H、C1-C4烷基、C2-C4杂烷基、C2-C4烯基、C2-C4杂烯基、C2-C4炔基、C2-C4杂炔基、C5-C6芳基、C5-C6杂芳基、C6-C10芳烷基、和C6-C10杂芳烷基，或者

其中两个R^4、两个R^5或者一个R^4和一个R^5与介于它们之间的原子一起形成5元至7元杂环；

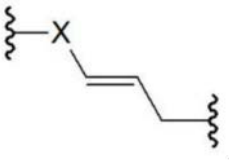
Z”选自F、Cl、Br、和I；

Kat$^+$为有机或无机阳离子；

L为在分析物作用于所述分析物响应性基团R^1时从所述式I的化合物的其余部分释放的自消除分解连接基团，所述自消除分解连接基团选自



和



，其中X连接至R^1且为不存在或选自-O-、-NH-和-N$^+$(R^G)$_2$-，条件是当R^1为-B

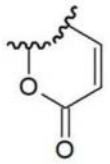
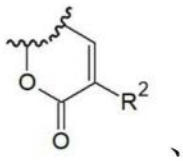
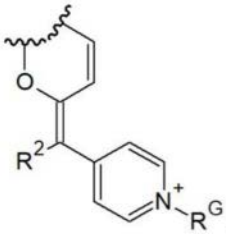
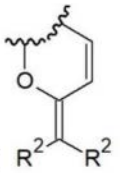
(Z)(Z')或-NO_2时,X不存在;X'选自S、O、NH和NR^G;和L任选用肽、内溶素或蛋白质来官能化;

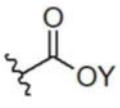
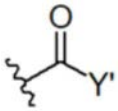
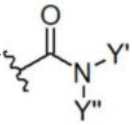
条件是:

当R^1为酶不稳定基团时,n为1且m为1或者n为0且m为1;和

当R^1为-B(Z)(Z')或-$B(Z'')_3$-Kat^+时,n和m均为0或者均为1;

R^A为H;

R^C与R^B一起形成6元环,所述6元环选自  、  、  、和  ;

R^2为选自氰基、硝基、苯基、萘基、菲基、联苯基、C2-C4烯基、  、具有结构  的羰基、和具有结构  的酰胺的基团,

其中Y为H、C1-C12烷基或碱金属离子,

其中Y'和Y"独立地选自H和C1-C12烷基,或者与氮原子一起形成杂环结构;并且

R^3为H、F、Cl、Br、I、CF_3或R^2-Q-;

Q为包含与所述式I的化合物的中心芳环的π体系共轭的π体系的基团;

R^D选自直链或支链C1-C18烷基或C3-C7环烷基;

R^E和R^F独立地选自支链C3-C18烷基或C3-C7环烷基,或者R^E和R^F与它们所连接的碳原子一起形成稠环、螺环、或桥环或多环;和

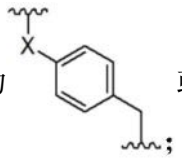
R^G各自独立地选自C1-C12烷基。

2.根据权利要求1所述的化合物,其中

(i)所述β-内酰胺类抗生素为青霉素、第1代至第5代头孢菌素、头孢霉素或碳青霉烯;

(ii)Z"为F;或

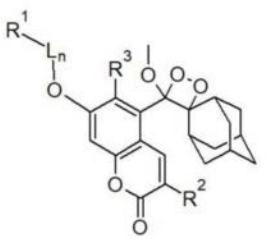
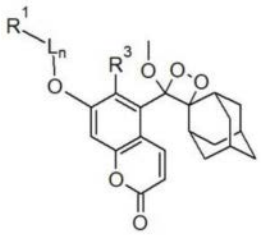
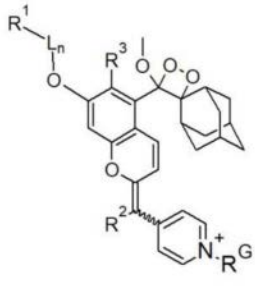
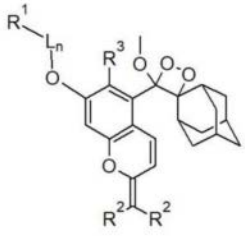
(iii)Kat^+为碱金属阳离子;或

(iv)L为  或 ;

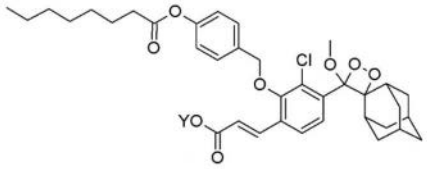
(v)X为-O-或-$N^+(CH_3)_2$-;或

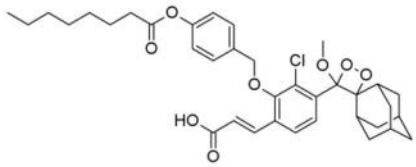
(vi)Y'和Y"与氮原子一起形成马来酰亚胺基。

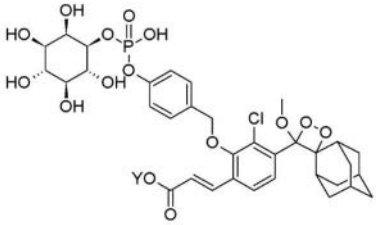
3.根据权利要求1或2所述的化合物,其选自以下化合物:

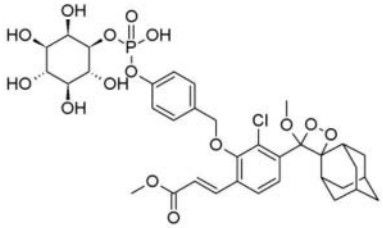

、

、

和

。

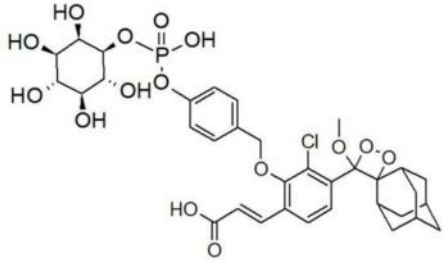
4.一种化合物，其选自式II、IIa、III、IIIa、IIIb、VII、VIIa、VIIb、VIII和VIIIa的化合物：

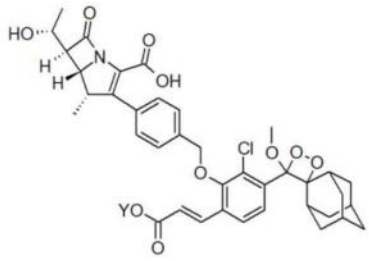

(式II)


(式IIa)

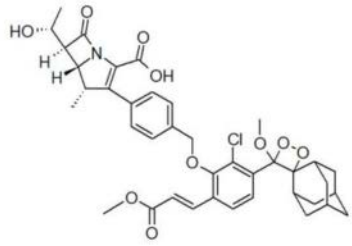

(式III)


(式IIIa)

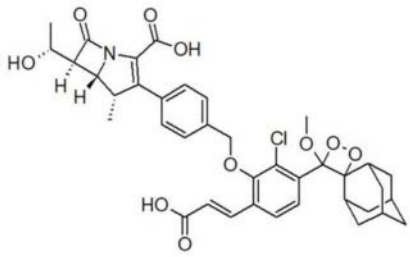

(式IIIb)



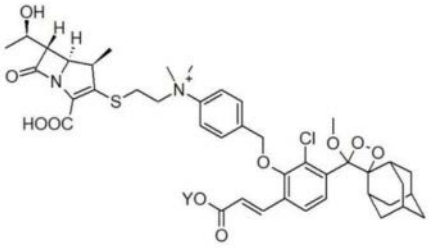
(式VII)



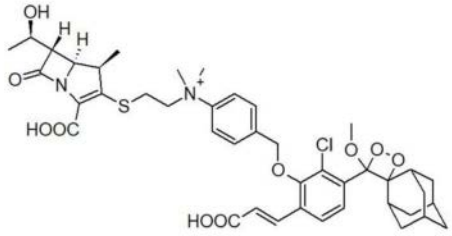
(式VIIa)



(式VIIb)



(式VIII)



(式VIIIa)，

其中Y为H、C1-C12烷基或碱金属离子。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的化合物在制备用于目标分析物或目标微生物的检测的试剂中的用途。

6.根据权利要求5所述的用途，其用于目标微生物的检测。

7.根据权利要求6所述的用途，其中所述目标微生物为细菌。

8.根据权利要求6所述的用途，其中所述目标微生物选自以下微生物：沙门氏菌；李斯特菌；碳青霉烯耐药性细菌；杆菌；葡萄球菌；梭菌；无乳链球菌；革兰氏阴性菌；酵母菌；霉菌；铜绿假单胞菌；肠球菌；酿脓链球菌；大肠菌；MRSA；VRE；产生肠道菌的ESBL；弧菌；普氏菌；含有腺苷三磷酸双磷酸酶的微生物；嗜肺军团菌；和杯状病毒科的病毒。

9.根据权利要求8所述的用途，其中所述沙门氏菌为肠道沙门氏菌；所述李斯特菌为单核细胞增生李斯特菌；所述碳青霉烯耐药性细菌为铜绿假单胞菌或肺炎克雷白杆菌；所述杆菌选自大肠杆菌、空肠弯曲杆菌、大肠弯曲杆菌、红嘴鸥弯曲杆菌、结核分支杆菌、柠檬酸杆菌、阪崎肠杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌；所述葡萄球菌为金黄色葡萄球菌；所述梭菌为产气荚膜梭菌或艰难梭菌；所述酵母菌为假丝酵母菌属；所述含有腺苷三磷酸双磷酸酶的微生物为志贺氏菌；或者所述杯状病毒科的病毒选自兔病毒、诺如病毒、札幌病毒、纽布病毒和

Recovirus。

10.根据权利要求5-9中任一项所述的用途，其中R^1和各目标分析物或目标微生物如下表所示来定义：

R^1	目标分析物/目标微生物
乙酰基	大多数微生物的通用底物；区分空肠弯曲杆菌和大肠弯曲杆菌与红嘴鸥弯曲杆菌
丁酰基	卡他莫拉菌；大多数微生物的通用底物
辛酰基	沙门氏菌
壬酰基	沙门氏菌
肌醇磷酰基	单核细胞增生李斯特菌；杆菌；葡萄球菌；梭菌；结核分支杆菌
磷酰基	金黄色酿脓葡萄球菌；产气荚膜梭菌；无乳链球菌；假丝酵母菌属；*MRSA*
L-丙氨酸基	革兰氏阴性菌； 酵母菌和霉菌
L-亮氨酰基	酵母菌和霉菌
β-丙氨酰基	铜绿假单胞菌
L-焦谷氨酸基	肠球菌；酿脓链球菌；柠檬酸杆菌
β-D-吡喃半乳糖苷基	大肠菌；大肠杆菌
α-D-吡喃半乳糖苷基	沙门氏菌
α-D-吡喃葡萄糖苷基	阪崎肠杆菌； 金黄色酿脓葡萄球菌； *MRSA*；*VRE*；嗜热脂肪芽孢杆菌，灭菌对照
β-D-吡喃葡萄糖苷基	李斯特菌属 产生肠道菌的 *ESBL*

	弧菌 肠球菌 *VRE* 假丝酵母菌属 艰难梭菌
β-D-葡萄糖醛酸基	大肠杆菌；无乳链球菌
β-D-葡萄糖醛酸钠盐	大肠杆菌；无乳链球菌
N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	白色念珠菌
N-乙酰基神经氨酸基	普氏菌
纤维二糖苷基	阪崎肠杆菌
呋喃核糖苷基	志贺氏菌
磷酰胆碱基	杆菌
-B(Z)(Z')、 $-B(Z'')_3^- Kat^+$	1)由多种微生物氧化酶释放的 H_2O_2 2)由在微生物代谢产物/底物上发生反应的氧化酶释放的 H_2O_2
$-NO_2$	微生物
草酰酯	腺苷三磷酸双磷酸酶
Boc-Val-Pro-精氨酰基	细菌内毒素
Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基	细菌内毒素
SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基	嗜肺军团菌
β-内酰胺类抗生素	抗生素耐药性微生物；
Ac-QLQ- Ac-FQLQ- Ac-EFQLQ- Ac-DEFQLQ-	诺如病毒的检测
5-取代的-邻氨基苯甲酸甲酯的酰胺	空肠弯曲杆菌
丙烯酸酯	半胱氨酸、总微生物计数

。

11.根据权利要求10所述的用途，其中所述β-内酰胺类抗生素为青霉素、第1代至第5代头孢菌素、头孢霉素或碳青霉烯。

12.根据权利要求5-9中任一项所述的用途，

(i)其用于通过生长底物、营养物质和代谢产物的酶促氧化来检测所述生长底物、营养物质和/或代谢产物；

(ii)其用于使用鲎C因子的检测来检测细菌内毒素；

(iii)其用于测试乳制品的巴氏灭菌；

(iv)其用于测试微生物中的抗生素耐药性；

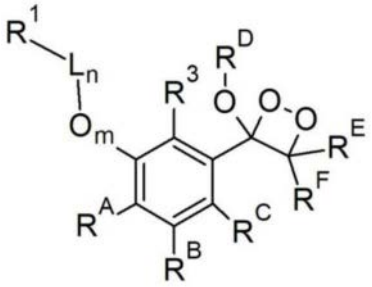
(v)其用于检测无机磷酸盐;

(vi)其用于监测灭菌过程;或

(vii)其用于细菌的抗生素耐药性的终点检测和在线检测,以及用于抗生素敏感性测试。

13.根据权利要求12所述的用途,其中所述乳制品为牛奶;或者所述灭菌过程的监测通过检测指示微生物嗜热脂肪芽孢杆菌的α-D-葡萄糖苷酶活性来进行。

14.化合物在制备用于检测目标微生物的试剂中的用途,其中所述化合物具有式I:



(式I),

其中

R^1为选自酶不稳定基团和具有式-B(Z)(Z')或-B(Z″)$_3^-Kat^+$的含硼基团的分析物响应性基团,

所述酶不稳定基团选自乙酰基、丁酰基、辛酰基、壬酰基、肌醇磷酰基、磷酰基、氨基酸基、L-焦谷氨酸基、二肽基、三肽基、β-D-吡喃半乳糖苷基、α-D-吡喃半乳糖苷基、α-D-吡喃葡萄糖苷基、β-D-吡喃葡萄糖苷基、β-D-葡萄糖醛酸基、β-D-葡萄糖醛酸钠盐、N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基、N-乙酰基神经氨酸基、纤维二糖苷基、α-D-呋喃核糖苷基、β-D-呋喃核糖苷基、磷酰胆碱基、-NO_2、硬脂酰基、棕榈酰基、油酰基、亚油酰基、Tos-L-丙氨酰基、α-甘露糖基、β-甘露糖基、α-岩藻糖基、β-岩藻糖基、α-艾杜糖基、β-艾杜糖基、α-(低聚)麦芽糖基、草酰酯、SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基、β-内酰胺类抗生素、Ac-QLQ-、Ac-FQLQ-、Ac-EFQLQ-、和Ac-DEFQLQ-,

Z和Z'独立地选自R^4和OR^5,

其中R^4选自由以下组成的组:-OH、-O^-Kat^+、C1-C4烷基、C2-C4杂烷基、C2-C4烯基、C2-C4杂烯基、C2-C4炔基、C2-C4杂炔基、C5-C6芳基、C5-C6杂芳基、C6-C10芳烷基、和C6-C10杂芳烷基,

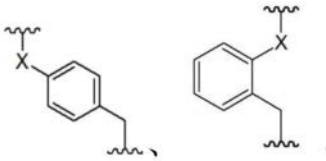
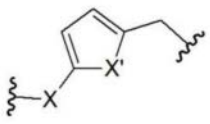
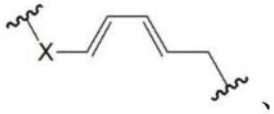
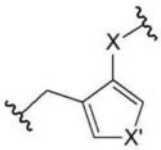
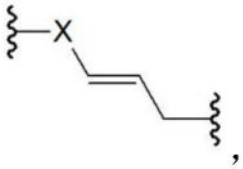
并且R^5选自-H、C1-C4烷基、C2-C4杂烷基、C2-C4烯基、C2-C4杂烯基、C2-C4炔基、C2-C4杂炔基、C5-C6芳基、C5-C6杂芳基、C6-C10芳烷基、和C6-C10杂芳烷基,或者

其中两个R^4、两个R^5或者一个R^4和一个R^5与介于它们之间的原子一起形成5元至7元杂环;

Z”选自由F、Cl、Br、和I组成的组;

Kat^+为有机或无机阳离子;

L为在分析物作用于所述分析物响应性基团R^1时从所述式I的化合物的其余部分释放的自消除分解连接基团,所述自消除分解连接基团选自

、、、、和，其中X连接至R^1且为不存在或选自-O-、-NH-和$-N^+(R^G)_2-$，条件是当R^1为$-B(Z)(Z')$或$-NO_2$时，X不存在；X'选自S、O、NH和NR^G；和L任选用肽、内溶素或蛋白质来官能化；

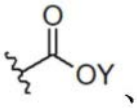
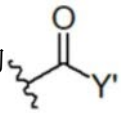
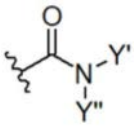
条件是：

当R^1为酶不稳定基团时，n为1且m为1或者n为0且m为1；和

当R^1为$-B(Z)(Z')$或$-B(Z'')_3^-Kat^+$时，n和m均为0或者均为1；

R^A和R^C独立地选自H和R^2-Q-；条件是R^A和R^C不同时为H；

R^B为H；

R^2为选自氰基、硝基、苯基、萘基、菲基、联苯基、C2-C4烯基、、具有结构的羰基、和具有结构的酰胺的基团，

其中Y为H、C1-C12烷基或碱金属离子，

并且Y'和Y"各自独立地选自H和C1-C12烷基，或者与氮原子一起形成杂环结构；

R^3为H、F、Cl、Br、I、CF_3或R^2-Q-；

Q为包含与所述式I的化合物的中心芳环的π体系共轭的π体系的基团；

R^D选自由直链或支链C1-C18烷基和C3-C7环烷基组成的组；

R^E和R^F各自独立地选自由支链C3-C18烷基和C3-C7环烷基组成的组，或者R^E和R^F与它们所连接的碳原子一起形成稠环、螺环、或桥环或多环；和

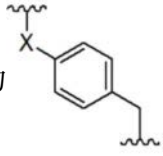
R^G各自独立地选自C1-C12烷基。

15.根据权利要求14所述的用途，其中

(i)所述β-内酰胺类抗生素为青霉素、第1代至第5代头孢菌素、头孢霉素或碳青霉烯；

(ii)Z"为F；或

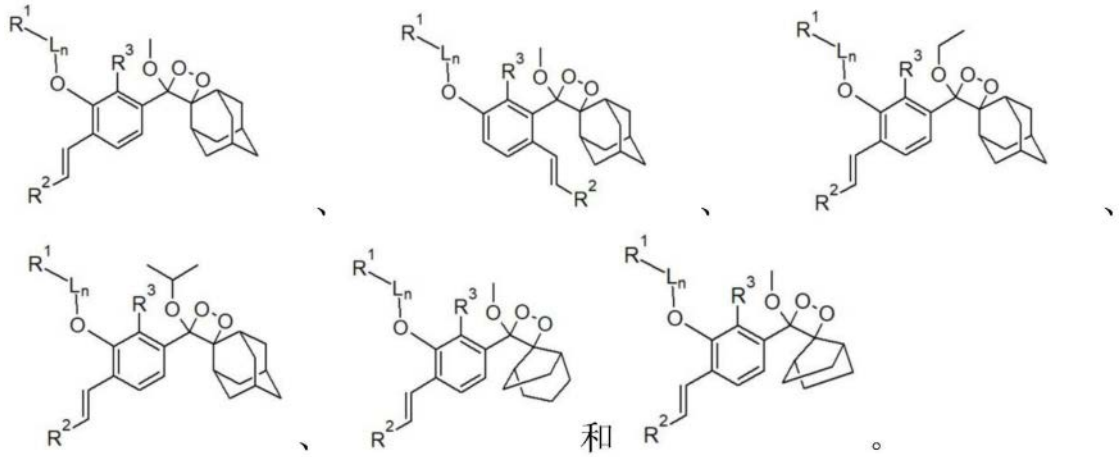
(iii)Kat^+为碱金属阳离子；或

(iv)L为或；

(v)X为-O-或$-N^+(CH_3)_2-$；或

(vi)Y'和Y"与氮原子一起形成马来酰亚胺基。

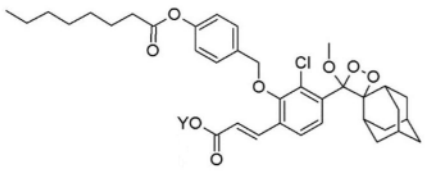
16.根据权利要求14所述的用途，其中所述化合物选自：



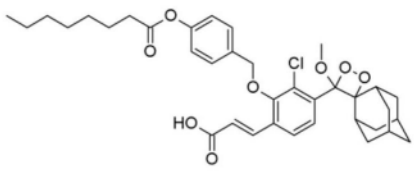
和

。

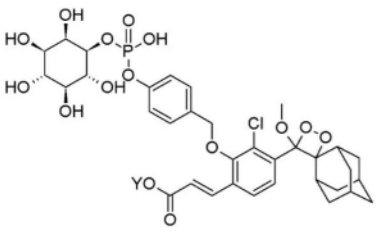
17.根据权利要求14所述的用途，其中所述化合物选自式II、IIa、III、IIIa、IIIb、IV、IVa、V、Va、Vb、VI、VIa、VIb、VIc、VII、VIIa、VIIb、VIII和VIIIa的化合物：



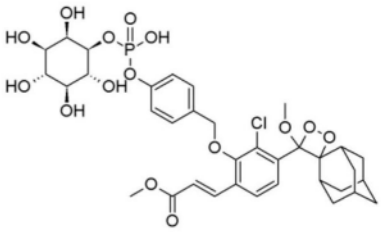
(式II)



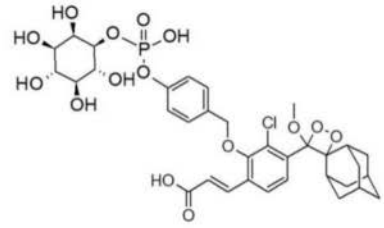
(式IIa)



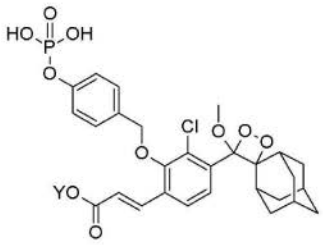
(式III)



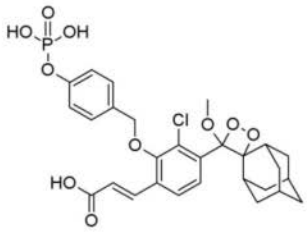
(式IIIa)



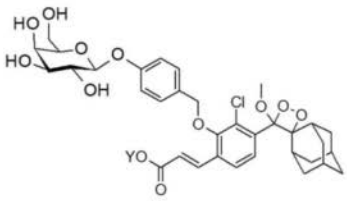
(式IIIb)



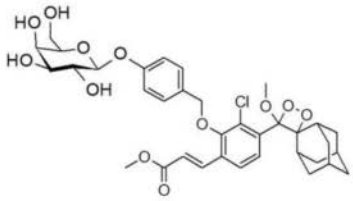
(式IV)



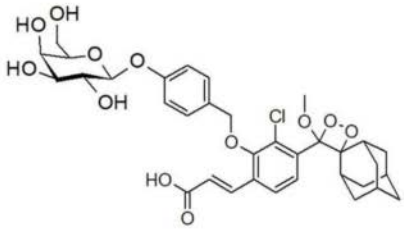
(式IVa)



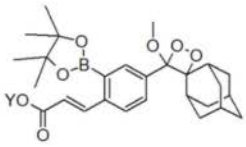
(式V)



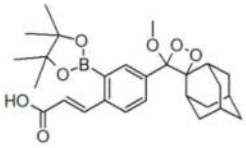
(式Va)



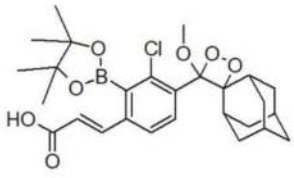
(式Vb)

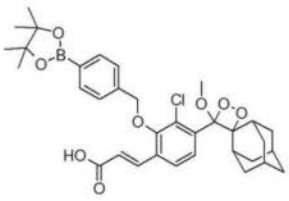


(式VI)

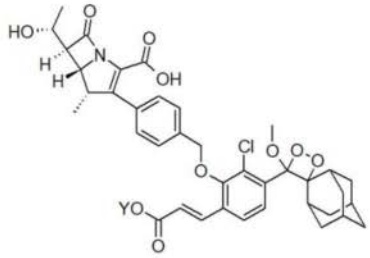


(式VIa)



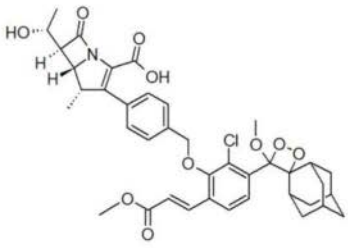


(式VIb)

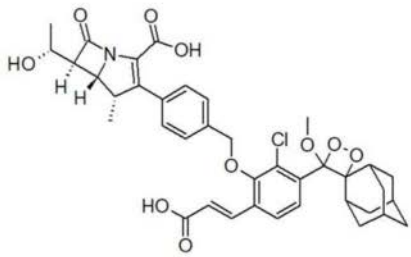


(式VII)

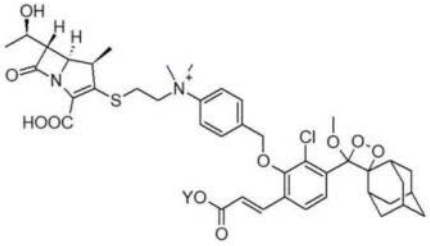
(式VIc)



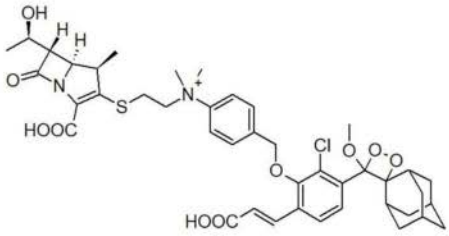
(式VIIa)



(式VIIb)



(式VIII)



(式VIIIa)，

其中Y为H、C1-C12烷基或碱金属离子。

18.根据权利要求14所述的用途，其中所述目标微生物选自以下微生物：沙门氏菌；李斯特菌；碳青霉烯耐药性细菌；杆菌；葡萄球菌；梭菌；无乳链球菌；革兰氏阴性菌；酵母菌；霉菌；铜绿假单胞菌；肠球菌；酿脓链球菌；大肠菌；MRSA；VRE；产生肠道菌的ESBL；弧菌；普氏菌；含有腺苷三磷酸双磷酸酶的微生物；嗜肺军团菌；和杯状病毒科的病毒。

19.根据权利要求18所述的用途，其中所述沙门氏菌为肠道沙门氏菌；所述李斯特菌为单核细胞增生李斯特菌；所述碳青霉烯耐药性细菌为铜绿假单胞菌或肺炎克雷白杆菌；所述杆菌选自大肠杆菌、空肠弯曲杆菌、大肠弯曲杆菌、红嘴鸥弯曲杆菌、结核分支杆菌、柠檬酸杆菌、阪崎肠杆菌和嗜热脂肪芽孢杆菌；所述葡萄球菌为金黄色葡萄球菌；所述梭菌为产气荚膜梭菌或艰难梭菌；所述酵母菌为假丝酵母菌属；所述含有腺苷三磷酸双磷酸酶的微生物为志贺氏菌；或者所述杯状病毒科的病毒选自兔病毒、诺如病毒、札幌病毒、纽布病毒和Recovirus。

20.根据权利要求14-19中任一项所述的用途，其中R^1和各目标微生物如下表所示来定

义：

R^1	目标微生物
乙酰基	大多数微生物的通用底物；区分空肠弯曲杆菌和大肠弯曲杆菌与红嘴鸥弯曲杆菌
丁酰基	卡他莫拉菌；大多数微生物的通用底物
辛酰基	沙门氏菌
壬酰基	沙门氏菌
肌醇磷酰基	单核细胞增生李斯特菌；杆菌；葡萄球菌；梭菌；结核分支杆菌
磷酰基	金黄色酿脓葡萄球菌；产气荚膜梭菌；无乳链球菌；假丝酵母菌属；*MRSA*
L-丙氨酸基	革兰氏阴性菌； 酵母菌和霉菌
L-亮氨酰基	酵母菌和霉菌
β-丙氨酰基	铜绿假单胞菌
L-焦谷氨酸基	肠球菌；酿脓链球菌；柠檬酸杆菌
β-D-吡喃半乳糖苷基	大肠菌；大肠杆菌
α-D-吡喃半乳糖苷基	沙门氏菌
α-D-吡喃葡萄糖苷基	阪崎肠杆菌； 金黄色酿脓葡萄球菌； *MRSA*；*VRE*；嗜热脂肪芽孢杆菌，灭菌对照
β-D-吡喃葡萄糖苷基	李斯特菌属 产生肠道菌的 *ESBL* 弧菌 肠球菌 *VRE* 假丝酵母菌属 艰难梭菌

β-D-葡萄糖醛酸基	大肠杆菌；无乳链球菌
β-D-葡萄糖醛酸钠盐	大肠杆菌；无乳链球菌
N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	白色念珠菌
N-乙酰基神经氨酸基	普氏菌
纤维二糖苷基	阪崎肠杆菌
呋喃核糖苷基	志贺氏菌
磷酰胆碱基	杆菌
-B(Z)(Z')、 $-B(Z'')_3^- Kat^+$	1)由多种微生物氧化酶释放的 H_2O_2 2)由在微生物代谢产物/底物上发生反应的氧化酶释放的 H_2O_2
$-NO_2$	微生物
草酰酯	腺苷三磷酸双磷酸酶
Boc-Val-Pro-精氨酰基	细菌内毒素
Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基	细菌内毒素
SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基	嗜肺军团菌
β-内酰胺类抗生素	抗生素耐药性微生物；
Ac-QLQ- Ac-FQLQ- Ac-EFQLQ- Ac-DEFQLQ-	诺如病毒的检测
5-取代的-邻氨基苯甲酸甲酯的酰胺	空肠弯曲杆菌
丙烯酸酯	半胱氨酸、总微生物计数

。

21.根据权利要求20所述的用途，其中所述β-内酰胺类抗生素为青霉素、第1代至第5代头孢菌素、头孢霉素或碳青霉烯。

二氧杂环丁烷化合物及其用于检测微生物的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及二氧杂环丁烷化合物和它们用于通过以下手段来检测是否存在、定量和鉴定包括细菌、细菌碎片(例如,LPS、内毒素)、病毒、真菌以及其它病原体的微生物的用途,所述手段为化学发光指示代谢酶、试剂酶或参比酶(reference enzyme)对适当的分子探针的作用,通过试剂酶指示由微生物代谢产物或营养物质的酶促氧化(enzymatic oxidation)产生的过氧化氢,或者通过试剂酶检测起到营养物质、底物、代谢产物或副产物的作用的无机磷酸盐。

背景技术

[0002] 例如食物、水和血液储备等的细菌污染造成主要的健康问题。根据世界卫生组织,水源性疾病,即由在水中传播的病原微生物引起的疾病,与世界各地的重大疾病负担有关。例如,水源性腹泻病(waterborne diarrheal disease)每年预计造成200万人死亡,其中大部分发生在5岁以下的儿童中。

[0003] 因此,非常需要用于检测微生物、特别是细菌的方法和手段。在这方面,发现可以使用在被由这些细菌产生的特定的酶裂解时产生可检测信号(例如,光)的化合物来特异性地检测细菌的属或种。由于与基于荧光或显色的方法相比优异的灵敏度和更高的信噪比,基于化学发光的检测方法对于微生物、特别是细菌的检测是特别有利的。特别地,已显示化学发光导致显著高的信噪比(S/N),其比使用荧光得到的信噪比高约100至1000倍。这继而导致化学发光相比于荧光的显著更高的灵敏度。

[0004] 用于微生物的检测的确立已久的系统为荧光素酶-荧光素系统。D-荧光素为生物发光化合物(bioluminogenic compound),其在分子氧、ATP和镁的存在下被荧光素酶(一种氧化还原酶)氧化成亚稳态的中间体,所述中间体继而衰变以发出蓝绿色的光。可以用酶不稳定基团(enzyme labile group)来遮蔽D-荧光素,将在荧光素酶存在下的发光限制为还存在作用于酶不稳定基团的酶的情况。例如,Masuda-Nishimura等人报道使用作为发光底物的D-荧光素-6-O-β-D-吡喃半乳糖苷来检测大肠菌群(coliform bacteria)(Masuda-Nishimura等人(2000),Letters in Applied Microbiology,30:130-135)。

[0005] 近年来,开发了化学探针,与大多数目前使用的化学发光探针和生物发光探针不同,化学探针不需要氧化步骤来引起其(化学)发光,并且因此可以检测宽范围的化学活性和生物学活性。这些化学发光探针包含稳定的二氧杂环丁烷部分。WO2017/130191公开了此类基于二氧杂环丁烷的化学发光探针和它们用于诊断目的和体内成像的用途。此外,Green等人(Green,O.,Eilon,T.,Hananya,N.,Gutkin,S.,Bauer,CR.,Shabat,D.,ACS Central Sci.,2017,4,349-58)公开了适用于水性条件下的化学发光的二氧杂环丁烷探针,所述探针被酶不稳定基团遮蔽并且适用于酶活性的检测。

[0006] 然而,迄今为止尚未报道化学发光的二氧杂环丁烷探针在微生物学的领域用于检测特定微生物的成功应用。事实上,由于探针之间复杂的相互作用、除去酶不稳定保护基团所需的微生物的酶、和化学发光反应的环境(即包含微生物的介质)而导致用于在“现实

(real-life)”条件下检测微生物的化学发光探针的开发是特别困难的挑战。用于检测微生物的适当的化学发光探针必须(i)对要检测的微生物无毒,(ii)在水性介质中具有高的稳定性,(iii)能够在给定的介质中产生强的化学发光信号,并且(iv)能够到达除去酶不稳定保护基团的酶的位点(例如,周质空间(periplasmic space)、革兰氏阴性菌的内膜的外表面或内表面、胞质溶胶(cytosol)等)。此外,出于明显的原因,用于微生物的检测的化学发光探针应当廉价并且方便使用。

[0007] 由于以上要求,化学发光的二氧杂环丁烷探针是否适合于微生物(在水性介质中)的“现实”检测的问题不能从其化学结构得出或预测。即使探针在“实验室”条件下显示良好的性能,其也可能不适合于“现实”应用。因此,需要大量实验来确定特定的探针是否适合于在“现实”条件下检测微生物。

[0008] 目前,荧光素酶-荧光素系统是可用于微生物的检测的唯一有效的“现实”的(生物)发光手段。然而,尽管是目前的行业标准,但是该系统具有许多缺点。例如,该系统为复杂的多组分系统(标准组成:1.前荧光素酶底物(pro-luciferin enzyme substrate)(例如,荧光素-β-D-吡喃半乳糖苷),2.荧光素酶,3.牛血清白蛋白,4.ATP,5.EDTA,6.D/L-半胱氨酸,7.$MgSO_4$,8.焦磷酸钠),其通常比单组分系统更复杂。此外,荧光素酶-荧光素系统需要使用荧光素酶,这使得其使用成本非常高并且由于商购可得的荧光素酶众所周知的不稳定性而限制了保存期限。此外,荧光素酶-荧光素系统的灵敏度是有限的,因此留下了改进的空间。通常,化学发光优于生物发光,这是因为化学发光显示比使用生物发光、特别是生物发光的荧光素酶-荧光素系统得到的灵敏度高约10至100倍的灵敏度,并且,特别重要的是,允许非常简单且直接的应用,特别是与非常复杂的生物发光的荧光素酶-荧光素系统相比。

发明内容

[0009] 发明要解决的问题

[0010] 鉴于上述情况,本发明的目的在于提供用于检测是否存在、定量和鉴定包括细菌、细菌碎片(例如,LPS、内毒素)、病毒、真菌以及其它病原体的微生物的探针以及方法,所述探针和方法克服了通常应用的荧光素酶-荧光素系统的缺点,特别是具有显著提高的灵敏度并且比基于荧光素酶-荧光素的系统更易于使用。

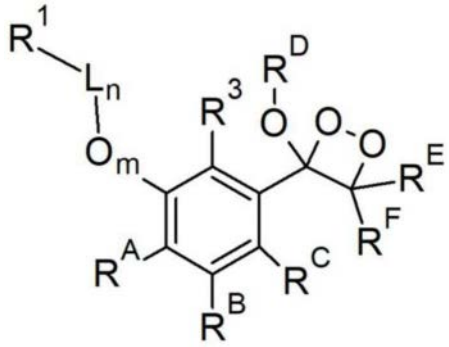
[0011] 特别地,应当提供可以用于通过化学发光指示的手段来检测是否存在、定量和鉴定包括细菌、细菌碎片(例如,LPS、内毒素)、病毒、真菌以及其它病原体的微生物的化学发光探针(和方法),所述手段例如为化学发光指示代谢酶、试剂酶或参比酶对适当的分子探针的作用,通过试剂酶指示由微生物代谢产物或营养物质的酶促氧化产生的过氧化氢,或者通过试剂酶检测起到营养物质、底物、代谢产物或副产物的作用的无机磷酸盐。

[0012] 用于解决问题的方案

[0013] 通过适用于借助化学发光的手段来检测是否存在、定量和鉴定包括细菌、细菌碎片(例如,LPS、内毒素)、病毒、真菌以及其它病原体的微生物的特定的二氧杂环丁烷化合物来实现以上目的。如以下更详细地阐述的,令人惊讶地发现根据本发明的二氧杂环丁烷化合物是使得能够以与通常应用的荧光素酶-荧光素系统相比更灵敏且更简单的方式检测是否存在、定量和鉴定包括细菌、细菌碎片(例如,LPS、内毒素)、病毒、真菌以及其它病原体的

微生物的高效的探针。

[0014] 在第一方面，本发明提供式I的化合物

[0015] 

(式I)，

[0016] 其中

[0017] R^1为选自酶不稳定基团和具有式-B(Z)(Z')或-B(Z″)$_3^-Kat^+$的含硼基团的分析物响应性基团(analyte-responsive group)；

[0018] Z和Z'独立地选自R^4和OR^5，

[0019] 其中R^4选自由-OH、-O^-Kat^+、任选取代的C1-C4烷基、任选取代的C2-C4杂烷基、任选取代的C2-C4烯基、任选取代的C2-C4杂烯基、任选取代的C2-C4炔基、任选取代的C2-C4杂炔基、任选取代的C5-C6芳基、任选取代的C5-C6杂芳基、任选取代的C6-C10芳烷基、和任选取代的C6-C10杂芳烷基组成的组，

[0020] 并且R^5选自由-H、任选取代的C1-C4烷基、任选取代的C2-C4杂烷基、任选取代的C2-C4烯基、任选取代的C2-C4杂烯基、任选取代的C2-C4炔基、任选取代的C2-C4杂炔基、任选取代的C5-C6芳基、任选取代的C5-C6杂芳基、任选取代的C6-C10芳烷基、和任选取代的C6-C10杂芳烷基组成的组，或者

[0021] 其中两个R^4、两个R^5或者一个R^4和一个R^5与介于它们之间的原子一起形成5元至7元任选取代的杂环，优选饱和的任选取代的杂环；

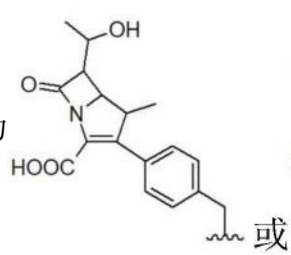
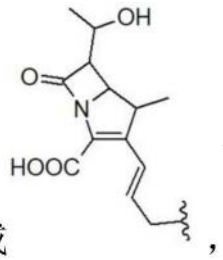
[0022] Z”选自F、Cl、Br、I，优选Z”为F；

[0023] Kat^+为有机或无机阳离子，优选碱金属阳离子；

[0024] L为在分析物作用于分析物响应性基团R^1时从式I的化合物的其余部分释放的自消除分解(self-immolative)连接基团，其中L任选用肽、优选细胞穿透肽(cell penetrating peptide)、内溶素(endolysine)或蛋白质来官能化；

[0025] 如果R^1为酶不稳定基团，则n为1且m为1或者n为0且m为1，并且

[0026] 如果R^1为-B(Z)(Z')或-B(Z″)$_3^-Kat^+$，则n和m均为0或者均为1；

[0027] 如果R^1为  或  ，则n为0且m为1；

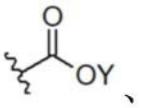
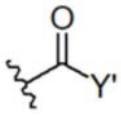
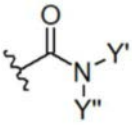
[0028] R^A和R^C独立地选自H、F、Cl、Br、I、CF_3和R^2-Q-，优选选自H、Cl和R^2-Q-，或者R^A和R^C中

的一者与R^B一起形成延伸中心芳环的π体系的任选取代的环状结构或杂环结构并且另一者为H或R^2-Q-；

[0029] 条件是R^A和R^C不同时为H；

[0030] R^B为H或者与R^A和R^C中的一者一起形成所述任选取代的环状结构或杂环结构；

[0031] Q为包含与式I的化合物的中心芳环的π体系共轭的π体系的基团；

[0032] R^2为选自氰基、硝基、亚砜、砜(sulfon)、任选取代的芳基、任选取代的烯基、、羰基、具有结构的羰基、酰胺、具有结构的酰胺的基团，

[0033] 其中Y为H、任选取代的C1-C12烷基或碱金属离子，

[0034] 其中Y'和Y"独立地选自H和任选取代的C1-C12烷基，或者与氮原子一起形成任选取代的杂环结构，优选任选取代的马来酰亚胺基；并且

[0035] R^3为H、F、Cl、Br、I、CF_3或R^2-Q-；

[0036] 条件是，如果R^3为R^2-Q-，则R^A和R^C中的至少一者、优选R^A为H、F、Cl、Br、I或CF_3，优选Cl；

[0037] R^D选自直链或支链C1-C18烷基或C3-C7环烷基；

[0038] R^E和R^F独立地选自支链C3-C18烷基或C3-C7环烷基，或者R^E和R^F与它们所连接的碳原子一起形成任选取代的稠环、螺环或多环。

[0039] 在第二方面，本发明涉及式I的化合物用于检测目标分析物(例如，过氧化氢)、目标微生物或目标代谢产物、优选微生物例如细菌的用途，并且涉及用于检测目标分析物、目标微生物或目标代谢产物的方法。

[0040] 在第三方面，本发明涉及式I的化合物用于通过生长底物(growth substrates)、营养物质和代谢产物的酶促氧化来检测所述生长底物、营养物质和/或代谢产物的用途，并且涉及用于通过生长底物、营养物质和代谢产物的酶促氧化来检测所述生长底物、营养物质和/或代谢产物的方法。

[0041] 在第四方面，本发明涉及式I的化合物用于使用鲎C因子(limulus factor C)来检测细菌内毒素的用途，并且涉及使用鲎C因子来检测细菌内毒素的方法。

[0042] 在第五方面，本发明涉及式I的化合物用于测试乳制品的巴氏灭菌的用途，并且涉及测试乳制品的巴氏灭菌的方法。

[0043] 在第六方面，本发明涉及式I的化合物用于测试微生物中的抗生素耐药性的用途，并且涉及用于测试微生物中的抗生素耐药性的方法。

[0044] 在第七方面，本发明涉及式I的化合物用于检测无机磷酸盐的用途，并且涉及用于检测无机磷酸盐的方法。

[0045] 在第八方面，本发明涉及式I的化合物用于监测灭菌过程、特别是通过检测指示微生物嗜热脂肪芽孢杆菌的α-D-葡萄糖苷酶活性来监测灭菌过程的用途，并且涉及用于监测灭菌过程、特别是通过检测指示微生物嗜热脂肪芽孢杆菌的α-D-葡萄糖苷酶活性来监测灭菌过程的方法。

[0046] 在第九方面，本发明涉及式I的化合物用于细菌的抗生素耐药性的终点检测和在线检测和用于抗生素敏感性测试的用途以及涉及用于细菌的抗生素耐药性的终点检测和在线检测和用于抗生素敏感性测试的方法。

[0047] 本发明的优选实施方案在所附权利要求中列出。本发明的进一步的实施方案以及其它目的、优点和特征将从以下本发明的详细描述和实施例变得显而易见。

附图说明

[0048] 图1示出在不同浓度的猪肝酯酶存在下化合物IIa的发光(20分钟测量时间段内的最大RLU值)。

[0049] 图2示出使用发光化合物IIa(空心符号)或荧光底物4-甲基伞形酮辛酯MUCAP(实心符号)的肠道沙门氏菌的检测限。

[0050] 图3示出使用化合物IVa的巴氏灭菌对牛奶中碱性磷酸酶(AP)活性的影响的化学发光计量分析。n＝3重复实验的平均值和标准偏差。

[0051] 图4示出在存在和不存在抗生素苯唑西林的情况下，甲氧西林耐药性金黄色酿脓葡萄球菌(MRSA)和甲氧西林敏感性金黄色酿脓葡萄球菌ATCC 29213(MSSA)的培养物中的发光情况。

[0052] 图5示出将由过氧化氢引发化学发光的底物化合物VIa与葡萄糖氧化酶(GOX)组合使用来直接在大肠杆菌培养物上清液中检测葡萄糖。

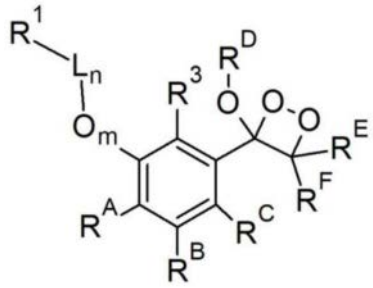
[0053] 图6A-6B示出化合物A和B的化学发光动力学曲线(6A；插图：前2小时的放大图)；以及化合物A和B的总发光(6B)。

[0054] 图7A-7B示出化合物A和C的化学发光动力学曲线(7A)；以及化合物A和C的总发光(7B)。

具体实施方式

[0055] 本发明基于以下令人惊讶的发现：虽然基于荧光素酶-荧光素的系统表现出许多缺点(如上所述)，但是此类系统目前是可用于微生物的检测的唯一“现实”的生物发光或化学发光系统。在这方面，本发明的发明人惊讶地发现式I的二氧杂环丁烷化合物是用于检测微生物的高效的探针。特别地，发现式I的二氧杂环丁烷化合物即使在水性介质中也是化学发光的，并且当用于微生物的检测时显示显著高的灵敏度，其显著地高于通常应用的荧光素酶-荧光素系统的灵敏度。此外，可以通过改变取代基R^2(如果存在)来改变本发明的化合物的重要性质，例如膜渗透性和/或溶解性。此外，发现式I的二氧杂环丁烷化合物在水性介质中是稳定的，并且特别是在微生物生长介质中是稳定的。特别地，发现式I的二氧杂环丁烷系化合物允许简单、直接、廉价且可靠地检测微生物。可以将化合物简单地原样添加至包含微生物的介质而不需要任何其它化合物。特别地，发现式I的二氧杂环丁烷化合物优于通常使用的基于荧光素酶-荧光素的系统。

[0056] 在第一方面，本发明涉及式I的化合物

[0057] 

(式I)，

[0058] 其中

[0059] R^1为选自酶不稳定基团和具有式-B(Z)(Z')或-B(Z″)$_3^-Kat^+$的含硼基团的分析物响应性基团；

[0060] Z和Z'独立地选自R^4和OR^5，

[0061] 其中R^4选自由-OH、-O^-Kat^+、任选取代的C1-C4烷基、任选取代的C2-C4杂烷基、任选取代的C2-C4烯基、任选取代的C2-C4杂烯基、任选取代的C2-C4炔基、任选取代的C2-C4杂炔基、任选取代的C5-C6芳基、任选取代的C5-C6杂芳基、任选取代的C6-C10芳烷基、和任选取代的C6-C10杂芳烷基组成的组，

[0062] 并且R^5选自由-H、任选取代的C1-C4烷基、任选取代的C2-C4杂烷基、任选取代的C2-C4烯基、任选取代的C2-C4杂烯基、任选取代的C2-C4炔基、任选取代的C2-C4杂炔基、任选取代的C5-C6芳基、任选取代的C5-C6杂芳基、任选取代的C6-C10芳烷基、和任选取代的C6-C10杂芳烷基组成的组，或者

[0063] 其中两个R^4、两个R^5或者一个R^4和一个R^5与介于它们之间的原子一起形成5元至7元任选取代的杂环，优选饱和的任选取代的杂环；

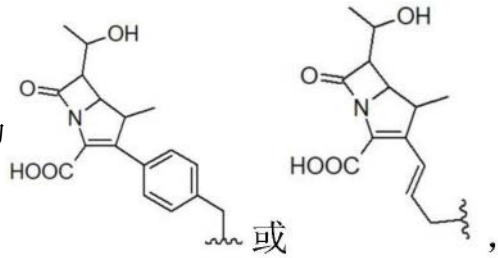
[0064] Z”选自F、Cl、Br、I，优选Z”为F；

[0065] Kat^+为有机或无机阳离子，优选碱金属阳离子；

[0066] L为在分析物作用于分析物响应性基团R^1时从式I的化合物的其余部分释放的自消除分解连接基团，其中L任选用肽、优选细胞穿透肽、内溶素或蛋白质来官能化；

[0067] 如果R^1为酶不稳定基团，则n为1且m为1或者n为0且m为1，并且

[0068] 如果R^1为-B(Z)(Z')或-B(Z″)$_3^-Kat^+$，则n和m均为0或者均为1；

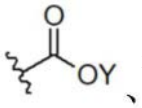
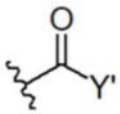
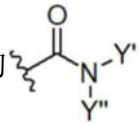
[0069] 如果R^1为  则n为0且m为1；

[0070] R^A和R^C独立地选自H、F、Cl、Br、CF_3和R^2-Q-，优选选自H、Cl和R^2-Q-，或者R^A和R^C中的一者与R^B一起形成延伸中心芳环的π体系的任选取代的环状结构或杂环结构并且另一者为H或R^2-Q-；

[0071] 条件是RA和R^C不同时为H；

[0072] R^B为H或者与R^A和R^C中的一者一起形成所述任选取代的环状结构或杂环结构；

[0073] Q为包含与式I的化合物的中心芳环的π体系共轭的π体系的基团；

[0074] R^2为选自氰基、硝基、亚砜、砜、任选取代的芳基、任选取代的烯基、羰基、具有结构的羰基、酰胺、具有结构的酰胺的基团，

[0075] 其中Y为H、任选取代的C1-C12烷基或碱金属离子，

[0076] 其中Y'和Y"独立地选自H和任选取代的C1-C12烷基，或者与氮原子一起形成任选取代的杂环结构，优选任选取代的马来酰亚胺基；并且

[0077] R^3为H、F、Cl、Br、I、CF_3或R^2-Q-；

[0078] 条件是，如果R^3为R^2-Q-，则R^A和R^C中的至少一者、优选R^A为H、F、Cl、Br、I或CF_3，优选Cl；

[0079] R^D选自直链或支链C1-C18烷基或C3-C7环烷基；

[0080] R^E和R^F独立地选自支链C3-C18烷基或C3-C7环烷基，或者R^E和R^F与它们所连接的碳原子一起形成任选取代的稠环、螺环或多环。

[0081] 如本文中所使用的，术语“烷基”是指直链或支链烃基并且包括例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基等。因此，例如，如本文中所使用的，术语“C_1-C_{12}烷基”(或“C1-C12烷基”)是指具有1至12个碳原子的“烷基”。

[0082] 如本文中所使用的，术语“烯基”是指具有一个或多个碳-碳双键的直链或支链烃基。

[0083] 如本文中所使用的，术语“炔基”是指具有一个或多个碳-碳三键的直链或支链烃基。

[0084] 如本文中所使用的，术语"杂烷基"、"杂烯基"和"杂炔基"是指在骨架残基中包含一个或多个O、S或N杂原子或者其组合的相应的烃基(烷基、烯基和炔基)；因此，相应的烷基、烯基或炔基的至少一个碳原子被指定的杂原子中的一者代替以形成杂烷基、杂烯基或杂炔基。

[0085] 如本文中所使用的，术语“芳基”是指由单环或稠合的多个环构成的芳香族碳环基团，例如但不限于苯基、萘基、菲基和联苯基。“芳基”可以是取代的或未取代的。

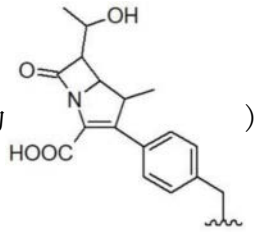
[0086] 如本文中所使用的，术语“杂芳基”是指包含至少一个杂原子(即与碳或氢不同的原子，例如N、S、O、P、Se、Te，优选N、S、O、P)作为环成员的芳香族基团。

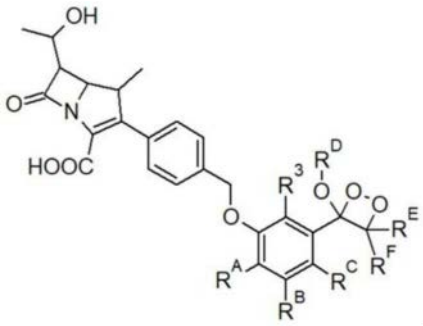
[0087] “任选取代的”或“取代的”基团上的适当的取代基独立地为：卤素；-$(CH_2)_{0-4}R^o$；-$(CH_2)_{0-4}OR^o$；-O$(CH_2)_{0-4}R^o$、-O-$(CH_2)_{0-4}C(O)OR^o$；-$(CH_2)_{0-4}CH(OR^o)_2$；-$(CH_2)_{0-4}SR^o$；-$(CH_2)_{0-4}$Ph，其可以被R^o取代；-$(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$Ph，其可以被$R^o$取代；-CH=CHPh，其可以被$R^o$取代；-$(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}$-吡啶基，其可以被$R^o$取代；-$NO_2$；-CN；-$N_3$；-$(CH_2)_{0-4}N(R^o)_2$；-$(CH_2)_{0-4}N(R^o)C(O)R^o$；-$N(R^o)C(S)R^o$；-$(CH_2)_{0-4}N(R^o)C(O)NR^o_2$；-$N(R^o)C(S)NR^o_2$；-$(CH_2)_{0-4}N(R^o)C(O)OR^o$；-$N(R^o)N(R^o)C(O)R^o$；-$N(R^o)N(R^o)C(O)NR^o_2$；-$N(R^o)N(R^o)C(O)OR^o$；-$(CH_2)_{0-4}C(O)R^o$；-C(S)$R^o$；-$(CH_2)_{0-4}C(O)OR^o$；-$(CH_2)_{0-4}C(O)SR^o$；-$(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^o_3$；-$(CH_2)_{0-4}OC(O)R^o$；-OC(O)$(CH_2)_{0-4}SR^o$-；-$(CH_2)_{0-4}SC(O)R^o$；-$(CH_2)_{0-4}C(O)NR^o_2$；-C(S)$NR^o_2$；-C(S)$SR^o$；-SC(S)$SR^o$、-$(CH_2)_{0-4}OC(O)$

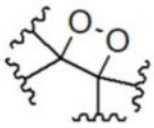
NR^o_2;-C(O)N(OR^o)R^o;-C(O)C(O)R^o;-C(O)CH_2C(O)R^o;-C(NOR^o)R^o;-$(CH_2)_{0-4}$SSR^o;-$(CH_2)_{0-4}$S(O)$_2R^o$;-$(CH_2)_{0-4}$S(O)$_2OR^o$;-$(CH_2)_{0-4}O$S(O)$_2R^o$;-S(O)$_2NR^o_2$;-$(CH_2)_{0-4}$S(O)R^o;-N(R^o)S(O)$_2NR^o_2$;-N(R^o)S(O)$_2R^o$;-N(OR^o)R^o;-C(NH)NR^o_2;-P(O)$_2R^o$;-P(O)R^o_2;-OP(O)R^o_2;-OP(O)(OR^o)$_2$;SiR^o_3;-(C_{1-4}直链或支链亚烷基)O-N(R^o)$_2$;或-(C_{1-4}直链或支链亚烷基)C(O)O-N(R^o)$_2$,其中各R^o独立地为氢、C_{1-6}烷基、-CH_2Ph、-O$(CH_2)_{0-1}$Ph、-CH_2-(5-6元杂芳环)、或者具有0-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的5-6元饱和环、部分不饱和环或芳环,或者,尽管有上述定义,两个独立出现的R^o与介于它们之间的原子一起形成具有0-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的3-12元饱和环、部分不饱和环或者芳基单环或双环;或者

[0088] =O、=S、=NNR^o_2、=NNHC(O)R^o、=NNHC(O)OR^o、=NNHS(O)$_2R^o$、=NR^o、=NOR^o、-O(C(R^o_2))$_{2-3}$O-、或-S(C(R^o_2))$_{2-3}$S-,其中各自独立出现的R^o选自氢、C_{1-6}烷基、或者具有0-4个独立地选自氮、氧或硫的杂原子的未取代的5-6元饱和环、部分不饱和环或者芳环。

[0089] 当n或m为0时,这意味着不存在相应的取代基。因此,当m为0时,连接基团L直接结合至中心芳环(即式I中示出的芳环)。另外,当n为0时,R^1结合至氧原子(如果m为1)或结合至中心芳环(如果m为0)。

[0090] 如本文中所使用的,终止化学部分的键的符号"~~~~"表示与另一部分的连接。例如,式I的化合物(其中n为0,m为1并且R^1为)表示以下结构的化合物:

[0091] .

[0092] 如本文中所使用的,术语"二氧杂环丁烷化合物"是指包含部分的化合物,更具体地是指式I的化合物。

[0093] 如本文中所使用的,术语"分析物响应性基团"是指可以借助特定的分析物来除去(至少部分除去)或修饰的基团,其中除去或修饰使得引起发光。优选地,当n为1(即,存在连接基团L)时,分析物对分析物响应性基团的作用使分析物响应性基团R^1转化为-OH或-NH_2部分(当L包含基团X时,优选使"X-R^1"部分转化为-OH或-NH_2部分)以使引起连接基团"L"的消除,例如1,6-消除。当n为0(即,不存在连接基团L)时,优选的是分析物对分析物响应性基团R^1的作用使分析物响应性基团R^1转化为-OH或另一酸性基团(当m为1时,使"O-R^1"部分转化为-OH或另一酸性基团)。

[0094] 如本文中所使用的,术语"酶不稳定基团"是指可以借助特定的酶来除去(至少部

分除去)或修饰的基团。

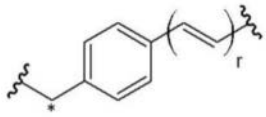
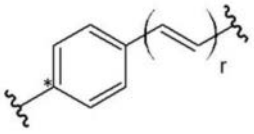
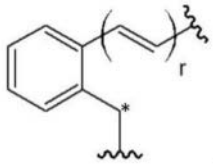
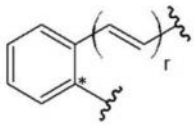
[0095] 如本文中所使用的,术语目标分析物、目标微生物或目标代谢产物是指要借助式I的化合物来检测的分析物、微生物或代谢产物。

[0096] 优选地,R^A和R^C独立地选自H和R^2-Q-,或者R^A和R^C中的一者与R^B一起形成延伸中心芳环的π体系的任选取代的环状结构或杂环结构并且另一者为H或R^2-Q-,并且R^3为H、F、Cl、Br、I。

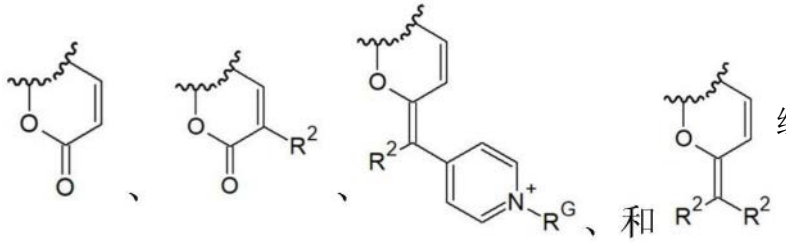
[0097] 根据优选的实施方案,R^A和R^C中的一者与R^B一起形成延伸中心芳环的π体系的任选取代的环状结构或杂环结构并且另一者为H或R^2-Q-。

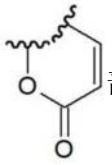
[0098] 根据另一优选的实施方案,R^A和R^C中的一者为R^2-Q-并且另一者为H。根据特别优选的实施方案,R^A为R^2-Q-并且R^C为H。根据另一优选的实施方案,R^C为R^2-Q-并且R^A为H。

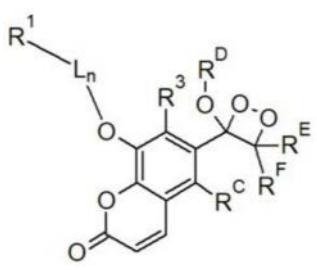
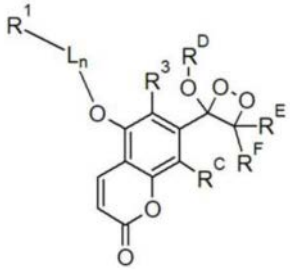
[0099] Q为包含与式I的化合物的中心芳环的π体系共轭的π体系的基团。已显示,由于所述共轭,基团Q(可能和与其连接的基团R^2一起)可以用于定制设计式I的化合物的发光。例如,已显示基团Q会影响发射波长、发光(闪光发光(flash emission)对辉光发光(glow emission))的动力学和量子产率。

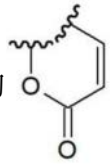
[0100] 根据优选的实施方案,Q选自由-$(H_2C=CH_2)_q$-、、、和组成的组,其中星号(*)表示连接至R^2的原子。q和r选自由1、2、3、4、5和6组成的组,优选q和r为1。根据特别优选的实施方案,Q为-$(H_2C=CH_2)_q$-,更优选Q为-$H_2C=CH_2$-。

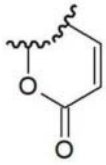
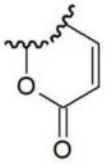
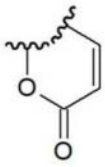
[0101] 根据另一优选的实施方案,R^A和R^C中的一者与R^B一起形成延伸中心芳环的π体系的任选取代的环状结构或杂环结构。在该情况下,R^A和R^C中的另一者为R^2-Q-或H,优选H。"延伸中心芳环的π体系"意味着任选取代的环状结构或杂环结构包含与中心芳环的π体系共轭的π体系。

[0102] 优选地,由R^A和R^C中的一者与R^B一起形成的任选取代的环状结构或杂环结构为6元环。更优选地,所述6元环选自由组成的组,其中R^G选自取代的或未取代的C1-C12烷基并且其中R^2如以上和以下所定义。应当理解以上部分可以以任意方式连接至R^A和R^B或者R^C和R^B。这意味着式I的化合物(其中R^A与R^B一

起形成  部分)包括以下两项：

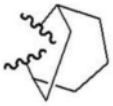
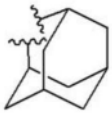
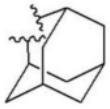
[0103]  和  。

[0104] 特别优选的是由R^A和R^C中的一者与R^B一起形成的任选取代的环状结构或杂环结构为未取代的  。

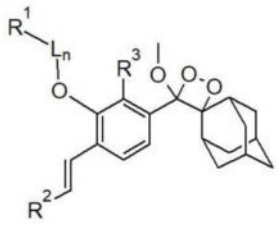
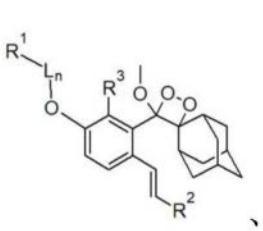
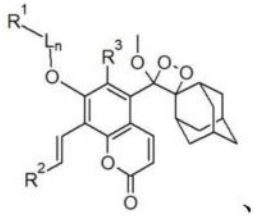
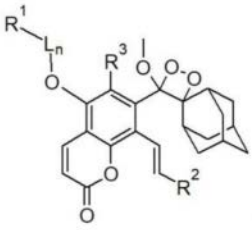
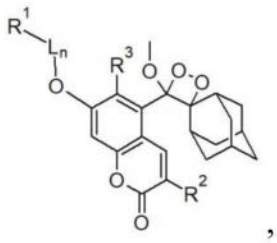
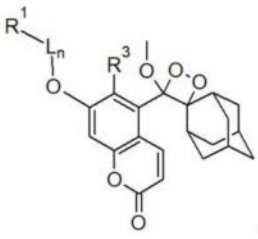
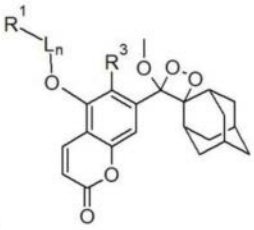
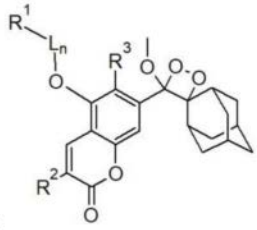
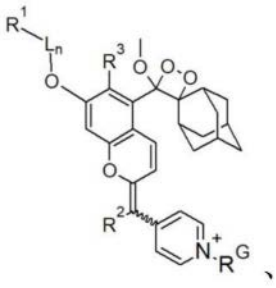
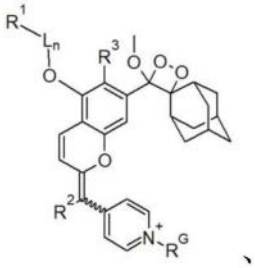
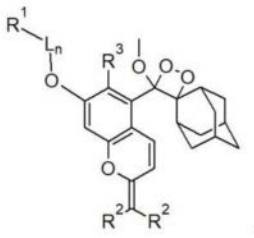
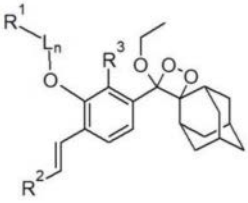
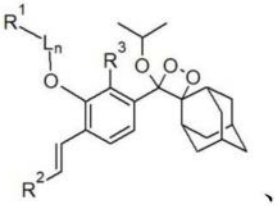
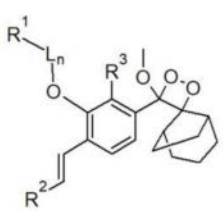
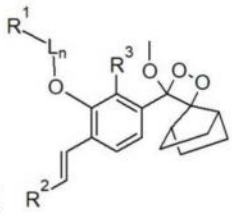
[0105] 令人惊讶地，发现包含由R^A和R^C中的一者与R^B一起形成、特别是R^C与R^B一起形成的所述环状结构  的式I的化合物在借助与分析物的相互作用除去(至少部分除去)或修饰R^1基团时显示非常持久的发光(辉光发光)。相比之下，其中R^A和R^C中的一者为R^2-Q-、特别是MeOOC-CH＝CH-的式I的化合物显示短暂但是强烈的发光(闪光发光)(参见实施例13)。此外，令人惊讶地发现包含由R^A和R^C中的一者与R^B一起形成、特别是R^C与R^B一起形成的环状结构  的式I的化合物显示超过50％的非常高的发光量子产率，这是迄今为止尚未达到的。因此，包含由R^A和R^C中的一者与R^B一起形成的、特别是R^C与R^B一起形成的环状结构  的式I的化合物显示比式I的化合物高约20倍的发光强度，其中R^A和R^C中的一者为R^2-Q-，特别是MeOOC-CH＝CH-(参见实施例13)。

[0106] 进一步发现可以借助取代基R^3来进一步微调发光特性(参见实施例13)。根据优选的实施方案，R^E和R^F与它们所连接的碳原子一起形成任选取代的稠环、螺环或桥环或者多环。基团R^E和R^F的主要功能为在空间上保护式I的化合物的二氧杂环丁烷部分。

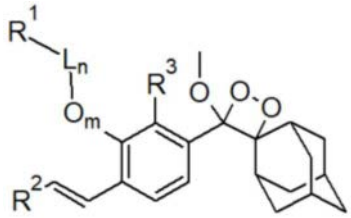
[0107] 优选地，所述任选取代的稠环、螺环或桥环或者多环选自任选取代的螺桨烷；由式[A.B.1]戊烷、[A.B.1]己烷、[A.B.1]庚烷、[A.B.1]辛烷、[A.B.1]壬烷、[A.B.1]癸烷、[A.B.1]十一烷、[A.B.1]十二烷限定的任选取代的双环，其中A和B独立地选自1、2、3、4和5；或者任选取代的金刚烷。更优选地，R^E和R^F与它们所连接的碳原子一起优选形成任选取代的

部分、任选取代的部分、或任选取代的部分。甚至更优选地，R^E和R^F与它们所连接的碳原子一起形成任选取代的部分。特别优选地，R^E和R^F与它们所连接的碳原子一起形成未取代的部分。

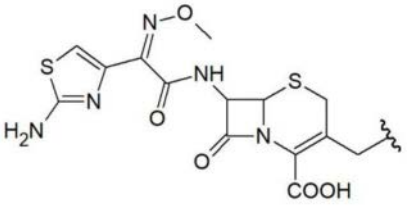
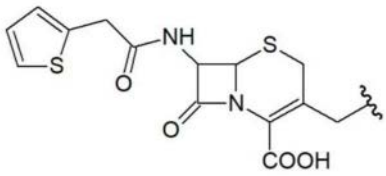
[0108] 根据优选的实施方案，R^D为甲基、乙基或异丙基。优选地，R^D为甲基。

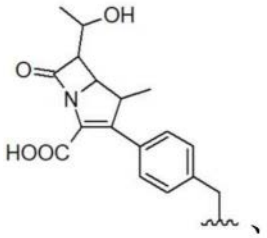
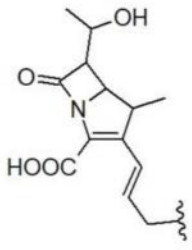
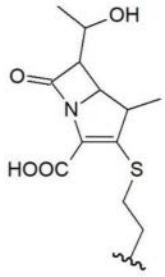
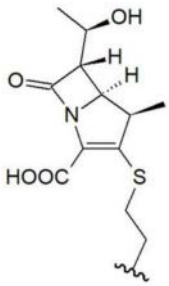
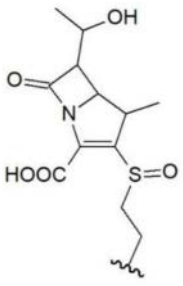
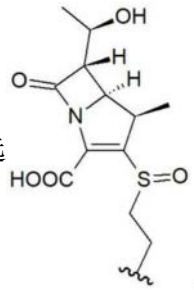
[0109] 特别优选的化合物选自由以下化合物组成的组：、、、、，、、、、、、、、、和。

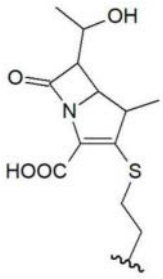
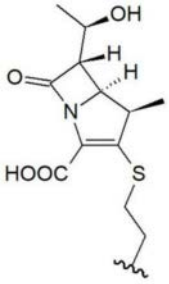
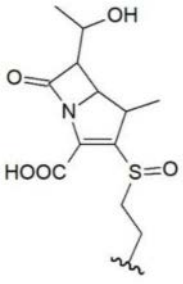
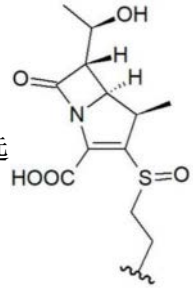
[0110] 根据优选的实施方案，式I的化合物由式I'表示。

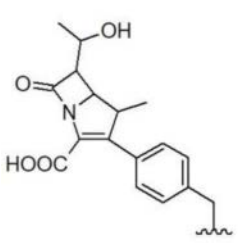
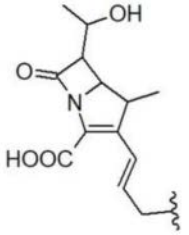
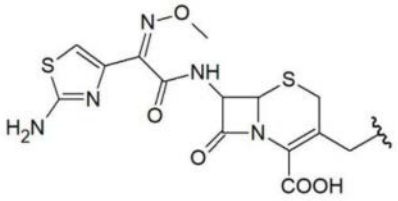
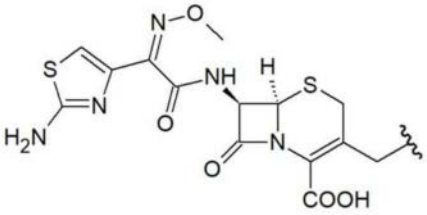
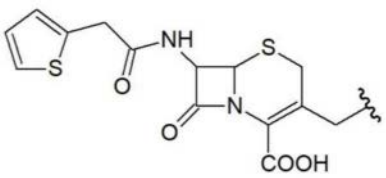
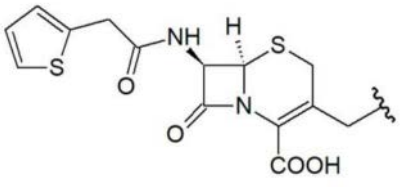
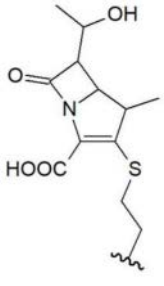
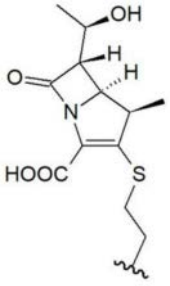
[0111] 
(式I')

[0112] 根据优选的实施方案，R^1为酶不稳定基团。优选地，R^1选自由以下基团组成的组：乙酰基、丁酰基、辛酰基、壬酰基、肌醇磷酰基、磷酰基、氨基酸基、L-焦谷氨酸基、二肽基、三肽基、β-D-吡喃半乳糖苷基、α-D-吡喃半乳糖苷基、α-D-吡喃葡萄糖苷基、β-D-吡喃葡萄糖苷基、β-D-葡萄糖醛酸基、β-D-葡萄糖醛酸钠盐、N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基、N-乙酰基神经氨酸基、纤维二糖苷基、α-D-呋喃核糖苷基、β-D-呋喃核糖苷基、磷酰胆碱基、$-NO_2$、硬脂酰基、棕榈酰基、油酰基、亚油酰基、Tos-L-丙氨酰基、α-甘露糖基、β-甘露糖基、α-岩藻糖基、β-岩藻糖基、α-艾杜糖基(ideuronosyl)、β-艾杜糖基、α-(低聚)麦芽糖基、具有式-B(Z)(Z')的基团(其中Z和Z'如上所定义)、$-B(Z'')_3^-Kat^+$、草酰酯、SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基、β-内酰胺酶不稳定基团(优选β-内酰胺类抗生素，更优选青霉素、第1代至第5代头孢菌素、头孢霉素、或碳青霉烯)、Ac-QLQ-、Ac-FQLQ-、Ac-EFQLQ-、Ac-DEFQLQ-。

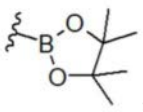
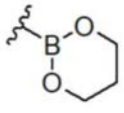
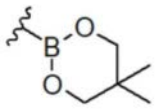
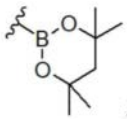
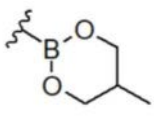
[0113] 优选的第1代至第5代头孢菌素选自cefacteril、头孢拉定、头孢沙定、头孢来星、头孢克洛、头孢氨苄、头孢羟氨苄、头孢曲嗪(cefatrizin)、头孢西酮(cefazedon)、头孢匹林、头孢替唑(ceftezol)、头孢唑啉、头孢氮氟(cefezaflur)、头孢噻吩、头孢噻啶(cefaloridin)、头孢洛宁(cefalonium)，其中与羧酸基团所连接的碳原子相邻的碳原子用于将头孢菌素结合至式I的化合物，
和
。

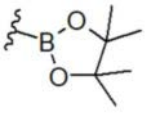
[0114] 优选的碳青霉烯选自
、
、
，优选
和
，优选
。

[0115] 特别优选的碳青霉烯为部分，优选或，优选。令人惊讶地发现这些部分比本文中所述的其它碳青霉烯部分更稳定并且显示显著更低的本底(background)，认为这是由于β-内酰胺使硫化物或亚砜基团稳定。

[0116] 特别优选的β-内酰胺酶不稳定基团选自由以下基团组成的组：、、，优选、，优选、，优选。

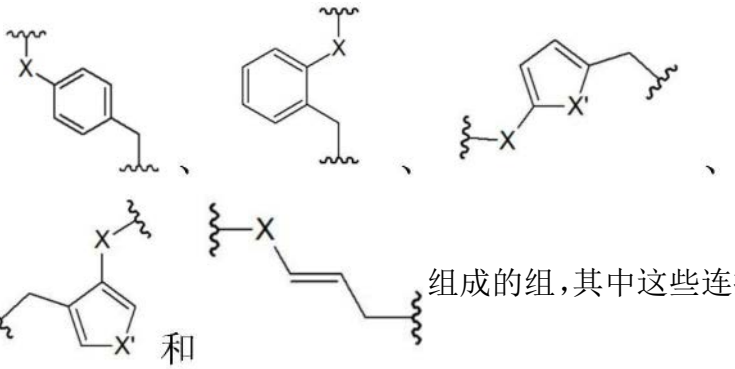
[0117] 根据优选的实施方案，R^1为Ac-QLQ-、Ac-FQLQ-、Ac-EFQLQ-、或Ac-DEFQLQ-。这些基团适合于诺如病毒的检测。

[0118] 根据另一优选的实施方案，R^1为具有式-B(Z)(Z')或$-BF_3^-Kat^+$的基团，其中优选Z和Z'中的至少一者为OR^5，更优选Z和Z'二者均为OR^5，或者其中具有式-B(Z)(Z')的基团优选选自由$-B(OH)_2$、$-BF_3^-Kat^+$、、、、和组

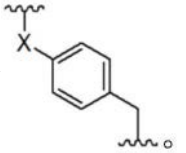
成的组，并且更优选为 -B(OH)$_2$或-BF$_3^-$Kat$^+$。

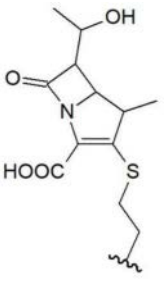
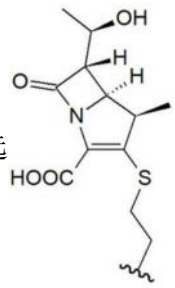
[0119] 连接基团“L”具有在作出本发明之前未知的几个优点。一方面，其导致式I的化合物的更好的水解稳定性，这是特别重要的，因为优选在水性介质中使用式I的化合物。另一方面，其通过在空间上使基团R^{1}与式I的化合物的其余部分隔开而导致基团R^{1}的良好的可用性。更好的(水解)稳定性导致更少的非特异性水解，由此导致更低的本底，这导致更好的信噪比并且因此导致更高的灵敏度。提高基团R^{1}的可用性导致与目标分析物、特别是酶更好地结合，并且由此导致更高的周转率(turnover)，这导致提高的信噪比并且因此导致更高的灵敏度。此外，改善的生物利用度改善了膜结合酶的检测。

[0120] 优选地，L为在分析物作用于分析物响应性基团R^1(由此导致分析物响应性基团R^{1}的至少部分除去或修饰)时从式I的化合物的其余部分释放的自消除分解基团。L为用于将肽(优选细胞穿透肽)、内溶素或蛋白质连接至式I的化合物的优选部分。特别地，发现用这些基团将L官能化不会猝灭式I的化合物的发光。在不希望受到任何理论约束的情况下，认为该令人惊讶的现象的原因在于连接基团L通常在引起发光之前从式I的化合物的其余部分裂解下来的事实。因此，在一个实施方案中，使用肽(优选细胞穿透肽)、内溶素或蛋白质将L官能化。在另一实施方案中，没有用肽(优选细胞穿透肽)、内溶素或蛋白质将L官能化。

[0121] 优选地，L选自由组成的组，其中这些连接基团中的每一者均可以用肽，优选细胞穿透肽，内溶素或蛋白质来官能化，并且其中

[0122] X为-O-，-N$^+$(R^G)$_2$-、优选-N$^+$(CH$_3$)$_2$-，或者-NH-，其中如果R^{1}为-B(Z)(Z')或-NO$_2$，则X不存在，X'选自S、O、NH和NR^G；并且X连接至R^1。

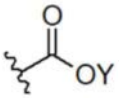
[0123] 优选地，L为。

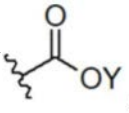
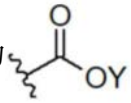
[0124] 优选地，当R^{1}为、优选时，X为-N$^+$(CH$_3$)$_2$-。

[0125] 根据优选的实施方案，X为-O-。根据另一优选的实施方案，X为-NH-。

[0126] 根据优选的实施方案，n为1且m为1。根据另一优选的实施方案，n为0且m为1。

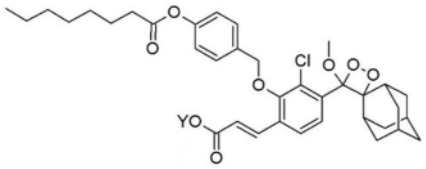
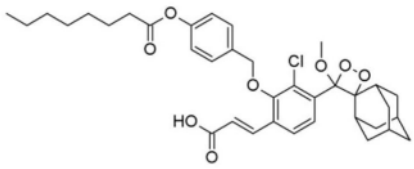
[0127] 根据优选的实施方案，R^2为水溶性基团。

[0128] 优选地，R^2选自由氰基和组成的组，其中Y为H或任选取代的C1-C12烷基或碱金属离子，其中碱金属离子优选为钠或钾并且任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。

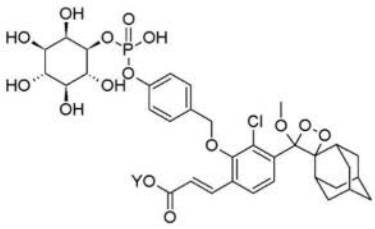
[0129] 优选地，R^2为。在其中R^2为的实施方案中，Y为-H、任选取代的C_1-C_{12}烷基或碱金属离子，其中碱金属离子优选为钠或钾，并且任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。优选地，Y为-H或任选取代的C_1-C_{12}烷基，其中C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。更优选地，Y为-H或甲基。甚至更优选地，R^2为-COOH或-COO^-。

[0130] 根据优选的实施方案，R^3选自由H和Cl组成的组，优选Cl。

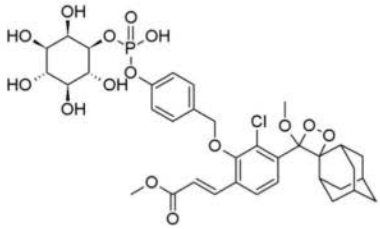
[0131] 优选的式I的化合物选自由式II、IIa、III、IIIa、IV、IVa、V、Va、VI、VIa、VIb、VIc、VII和VIIa的化合物组成的组：

[0132]  

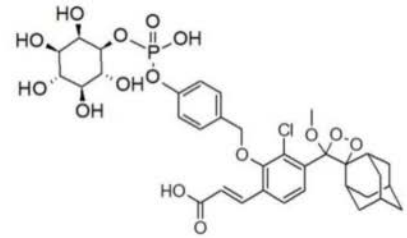
(式II)



(式IIa)

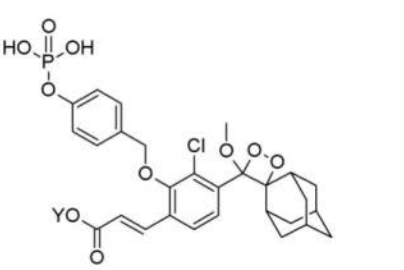


(式III)



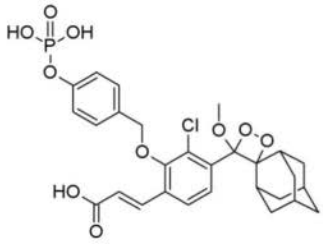
(式IIIa)

(式IIIb)

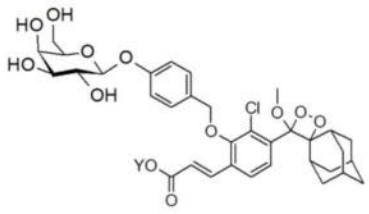


[0133]

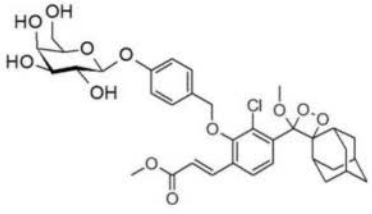
(式IV)



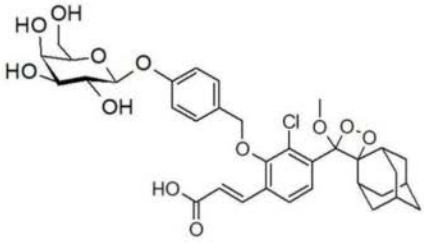
(式IVa)



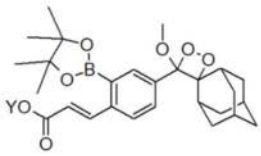
(式V)



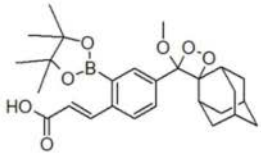
(式Va)



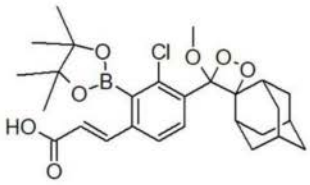
(式Vb)



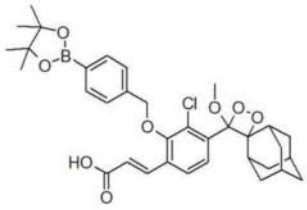
(式VI)



(式VIa)

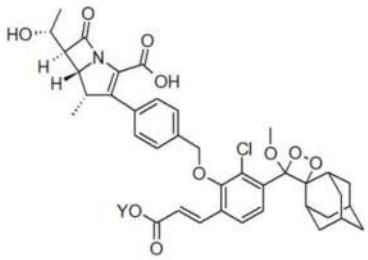


(式VIb)

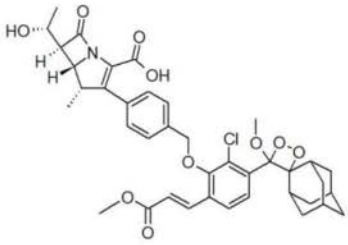


(式VIc)

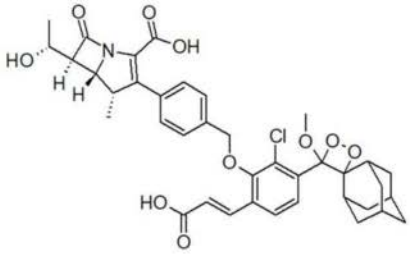
[0134]



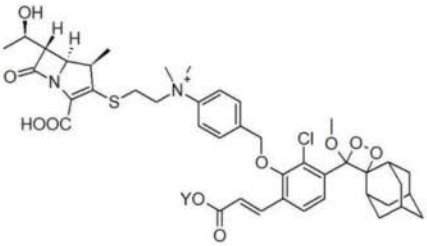
(式VII)



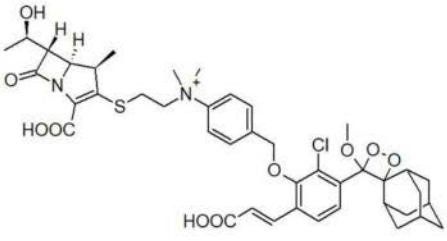
(式VIIa)



(式VIIb)



(式VIII)



(式VIIIa)，

[0135] 其中Y为H、任选取代的C1-C12烷基或碱金属离子。特别优选的化合物为其中Y为H的那些。

[0136] 已证明式II、特别是式IIa的化合物特别适合于沙门氏菌、特别是肠道沙门氏菌的检测。

[0137] 已证明式III、特别是式IIIb的化合物特别适合于李斯特菌、特别是单核细胞增生李斯特菌的检测。

[0138] 已证明式IV、特别是式IVa的化合物特别适合于金黄色酿脓葡萄球菌的检测。

[0139] 已证明式V、特别是式Vb的化合物特别适合于大肠菌(coliform)和大肠杆菌(E.coli)的检测。

[0140] 已证明式VI、特别是式VIc的化合物特别适合于H_2O_2的检测,无论其来源如何。

[0141] 已显示式VII和VIII、优选式VIIb和VIIIa的化合物特别适合于区分碳青霉烯耐药性细菌和碳青霉烯敏感性细菌。

[0142] 通常,发现当存在基团R^1时,式I的化合物即使在水性介质中也是稳定的并且不发射光子。借助与分析物的相互作用来除去(至少部分除去)或修饰R^1基团生成不稳定的物质,所述物质通过化学激发过程分解以产生被激发的中间体,所述中间体继而通过发射光子衰减至其基态。因此,分析物响应性基团R^1将发光限制至其中还存在作用于分析物响应性基团R^1的分析物的情况。

[0143] 当R^1为酶不稳定基团时,式I的化合物适合于酶的检测并且因此适合于表达该酶的微生物的检测。在与酶接触时,所述酶不稳定基团R^1被除去(至少部分除去)或者被修饰,接着使自消除分解连接基团(如果存在)从式I的化合物的其余部分除去并且形成不稳定的物质,然后所述物质通过化学激发过程分解以产生被激发的中间体,所述中间体继而通过发射光子衰减至其基态。

[0144] 当R^1为酶不稳定基团时,优选R^1仅对一种特定的酶有响应,以使可以在不表达该酶的其它微生物的存在下检测表达该酶的微生物。以此方式,例如可以在例如弗氏柠檬酸杆菌(Citrobacter freundii)和大肠杆菌(Escherichia coli)等其它细菌的存在下特异性地检测沙门氏菌(例如鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella Typhimurium)和肠炎沙门氏菌(Salmonella Enteritidis))。

[0145] (除了其它之外)可以用于本发明的示例性分析物响应性基团R^1和各自的目标分析物、目标微生物和目标代谢产物在表1中示出。此外,分析物响应性基团R^1、各自的分析物、目标分析物/目标微生物/目标代谢产物可从例如,Orenga等人,Journal of Microbiological Methods,79,2009,139-155和Varadi等人,Che.Soc.Rev.,2017,46,4818-4832辨别。

[0146] 表1

[0147]

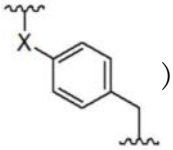
R^1	分析物	目标分析物/目标微生物/目标代谢产物
乙酰基	酯酶	大多数微生物的通用底物；区分空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)和大肠弯曲杆菌(*C. coli*)与红嘴鸥弯曲杆菌(*C. lari*)
丁酰基	酯酶	卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)；大多数微生物的通用底物
辛酰基	C8 酯酶	沙门氏菌(*Salmonella*)
壬酰基	C9 酯酶	沙门氏菌
肌醇磷酰基	磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C(PI-PLC)	单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)；杆菌(*Bacillus*)；葡萄球菌(*Staphylococcus*)；梭菌(*Clostridium*)；结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)
磷酰基	磷酸酶	金黄色酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)；产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)；无乳链球菌(*S. agalactiae*)；假丝酵母菌属(*Candida spp.*)；*MRSA*
L-丙氨酰基(A-)	L-丙氨酸氨基肽酶	革兰氏阴性菌； 酵母菌和霉菌
L-亮氨酰基(L-)	L-亮氨酸氨基肽酶	酵母菌和霉菌
β-丙氨酰基	β-丙氨酰基氨基肽酶	铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)
L-焦谷氨酸基	PYRase	肠球菌(*Enterococci*)；酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)；柠檬酸杆菌(*Citrobacter*)
β-D-吡喃半乳糖苷基	β-D-半乳糖苷酶	大肠菌；大肠杆菌
α-D-吡喃半乳糖苷基	α-D-半乳糖苷酶	沙门氏菌
α-D-吡喃葡萄糖苷基	α-D-葡萄糖苷酶	阪崎肠杆菌(*Cronobacter sakazakii*)； 金黄色酿脓葡萄球菌； MRSA；VRE；嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)(灭菌对照)
β-D-吡喃葡萄糖苷基	β-D-葡萄糖苷酶	李斯特菌属(*Listeria spp*) 产生肠道菌(*enterobacteria*)的ESBL 弧菌(*Vibrio*)

[0148]

		肠球菌(*Enterococci*) VRE 假丝酵母菌属 艰难梭菌
β-D-葡萄糖醛酸基	β-D-葡萄糖醛酸酶	大肠杆菌；无乳链球菌
β-D-葡萄糖醛酸钠盐	β-D-葡萄糖醛酸酶	大肠杆菌；无乳链球菌
N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	氨基半乳糖苷酶(Galactosamidase)	白色念珠菌(*Candida albicans*)
N-乙酰基神经氨酸基	N-乙酰神经氨酸苷酶	普氏菌(*Prevotella*)
纤维二糖苷基	纤维二糖苷酶(Cellobiosidase)	阪崎肠杆菌
呋喃核糖苷基	核糖苷酶(Ribosidase)	志贺氏菌(*Shigella*)
磷酰胆碱基	磷脂酶 C	杆菌
-B(Z)(Z')、 $-B(Z'')_3^- Kat^+$	H_2O_2	1)由多种微生物氧化酶释放的H_2O_2 2)由在微生物代谢产物/底物上发生反应的氧化酶(例如在葡萄糖上发生反应的葡萄糖氧化酶；或被二氨基氧化酶氧化的组胺)释放的H_2O_2
$-NO_2$	硝基还原酶	通用微生物活性
草酰酯	无机磷酸盐	腺苷三磷酸双磷酸酶(例如志贺氏菌)
Boc-Val-Pro-精氨酰基	鲎凝血因子 C	细菌内毒素
Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基	鲎凝血因子 C	细菌内毒素
SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基(SucOMe-RPY-)	氨基肽酶	嗜肺军团菌
β-内酰胺酶不稳定基团，优选 β-内酰胺类抗生素，更优选青霉素、第 1 代至第 5 代头孢菌素、头孢霉素或碳青霉烯	β-内酰胺酶	抗生素耐药性微生物； 例如适合于区分 β-内酰胺敏感性细菌和 β-内酰胺耐药性细菌
Ac-QLQ- Ac-FQLQ- Ac-EFQLQ- Ac-DEFQLQ-	3C 半胱氨酸蛋白酶	诺如病毒的检测
5-取代的-邻氨基苯甲酸甲酯的酰胺	马尿酸酶	空肠弯曲杆菌

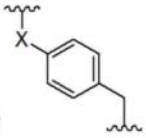
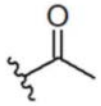
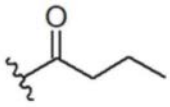
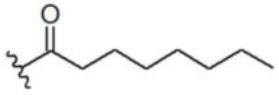
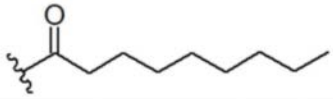
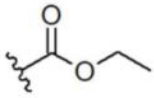
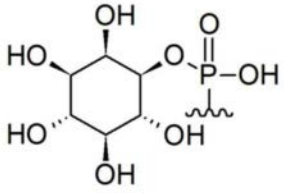
[0149]

丙烯酸酯	丝氨酸乙酰转移酶、半胱氨酸脱巯基酶、半胱氨酸双加氧酶	半胱氨酸、总微生物计数

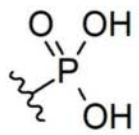
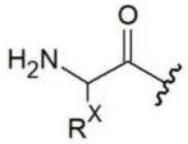
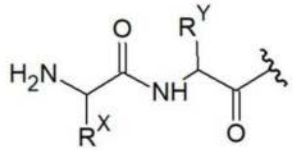
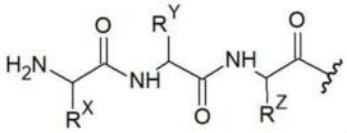
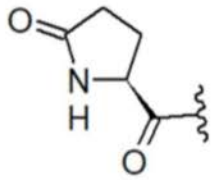
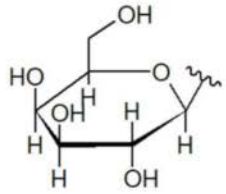
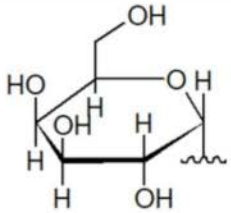
[0150] 示例性优选的R^1基团和它们的结构示意图以及各自的优选的X基团(如果L为)在表2中示出。然而,应当理解,表2中示出的基团R^1也可以在有其它连接基团部分的情况下使用或者可以在没有连接基团部分的情况下使用。

[0151] 表2

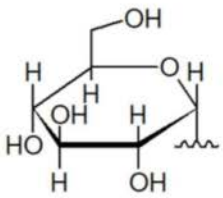
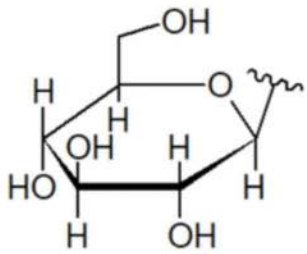
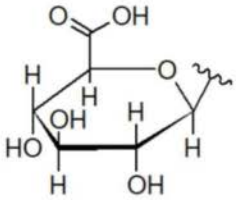
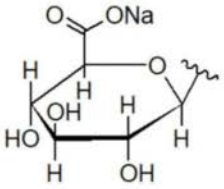
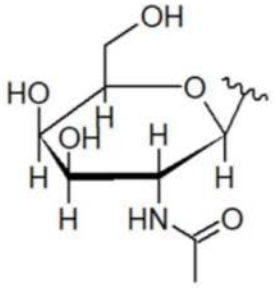
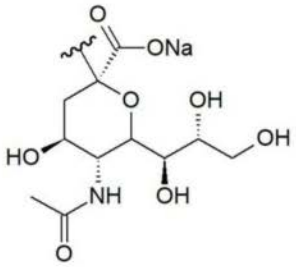
[0152]

R^1	**结构示意图**	**优选的基团 X，如果 L 为** 
乙酰基		-O-
丁酰基		-O-
辛酰基		-O-
壬酰基		-O-
乙基乙酰基		-NH-
肌醇磷酰基		-O-

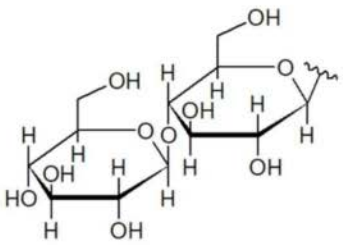
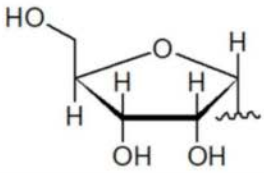
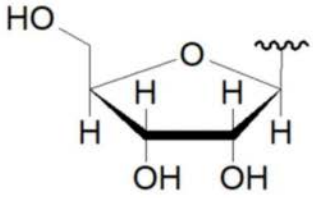
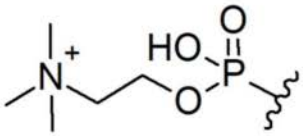
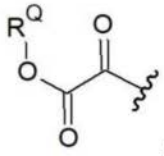
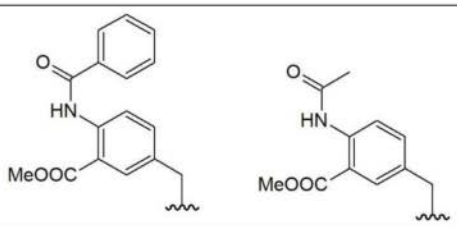
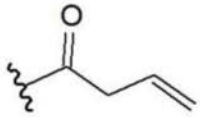
[0153]

磷酰基		-O-
氨基酸基	 ，其中 R^X 为取决于各氨基酸的侧基。	-NH-
二肽基	 ，其中 R^X 和 R^Y 为取决于构成二肽基的各氨基酸的侧基。	-NH-
三肽基	 ，其中 R^X、R^Y 和 R^Z 为取决于构成三肽基的各氨基酸的侧基。	-NH-
L-焦谷氨酸基		-NH-
β-D-吡喃半乳糖苷基		-O-
α-D-吡喃半乳糖苷基		-O-

[0154]

α-D-吡喃葡萄糖苷基		-O-
β-D-吡喃葡萄糖苷基		-O-
β-D-葡萄糖醛酸基		-O-
β-D-葡萄糖醛酸钠盐		-O-
N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基		-O-
N-乙酰基神经氨酸基		-O-

[0155]

纤维二糖苷基		-O-
α-D-呋喃核糖苷基		-O-
β-D-呋喃核糖苷基		-O-
磷酰胆碱基		-O-
-B(Z)(Z')	-B(Z)(Z')	不存在
$-NO_2$	$-NO_2$	不存在
草酰酯	 ，其中 R^Q 为任选取代的 C_1-C_{12} 烷基。	-NH-
β-内酰胺酶不稳定基团	上文公开了优选的β-内酰胺酶不稳定基团。	取决于特定的β-内酰胺酶不稳定基团，连接基团 L 可以存在或不存在
5-取代的-邻氨基苯甲酸甲酯的酰胺		不存在
丙烯酸酯		-O-

[0156] 如本文中所使用的，术语“氨基酸基”是指借助其羧酸基团结合至二氧杂环丁烷化合物的其余部分的氨基酸部分。当氨基酸包含超过一个羧酸基团时，所述羧酸基团中的每一者均可以将氨基酸结合至二氧杂环丁烷化合物的其余部分。优选地，当氨基酸包含超过

一个羧酸基团时，所述氨基酸借助其α-羧酸基团结合至二氧杂环丁烷化合物的其余部分。

[0157] 因此，当R^1为氨基酸基或者二肽基或三肽基并且X为-NH-时，氨基酸基或者二肽基或三肽基的羧酸基团(参与键形成)与-NH-基团一起形成酰胺基团(-CONH-)。

[0158] 优选的氨基酸基为：丙氨酰基(A-)、优选L-丙氨酰基，焦谷氨酸基、优选L-焦谷氨酸基，精氨酰基(R-)，天冬酰胺酰基(N-)，天冬氨酸基(D-)，半胱氨酰基(C-)，谷氨酰胺酰基(Q-)，谷氨酸基(E-)，甘氨酰基(G-)，组氨酰基(H-)，异亮氨酰基(I-)，亮氨酰基(L-)，赖氨酰基(K-)，甲硫氨酰基(M-)，苯丙氨酰基(F-)，脯氨酰基(P-)，丝氨酰基(S-)，苏氨酰基(T-)，色氨酰基(W-)，酪氨酰基(Y-)，和缬氨酰基(V-)。

[0159] 特别优选的氨基酸基为L-丙氨酰基、L-焦谷氨酸基、L-亮氨酰基、或β-丙氨酰基。

[0160] 优选的三肽基为Boc-Val-Pro-精氨酰基、Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基、和SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基(SucOMe-RPY-)。

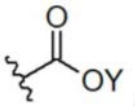
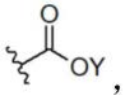
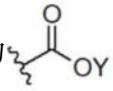
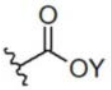
[0161] 当R^1为肌醇磷酰基时，式I的化合物特别适合于检测表达磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C(PI-PLC)的微生物，例如李斯特菌，特别是单核细胞增生李斯特菌。

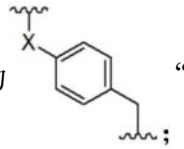
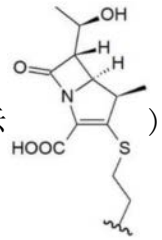
[0162] 当R^1为辛酰基时，式I的化合物特别适合于检测表达C8酯酶的微生物，例如沙门氏菌，特别是肠道沙门氏菌。

[0163] 当R^1为磷酰基时，式I的化合物特别适合于检测表达磷酸酶的微生物，例如作为抗生素耐药性的主要载体的金黄色葡萄球菌。因此，该底物理想地适合于检测金黄色葡萄球菌的耐药菌株(通过向生长培养基中添加抗生素：光＝耐药性)(参见实施例8)。

[0164] 根据优选的实施方案，R^1为氨基酸基，优选L-丙氨酰基或L-焦谷氨酸基、二肽基或三肽基(在该情况下，X优选为-NH-)。

[0165] 根据优选的实施方案，R^1为氨基酸基。

[0166] 根据优选的实施方案，R^1为肌醇磷酰基、磷酰基或辛酰基并且R^2为，其中Y为-H或如以上所定义的任选取代的C_1-C_{12}烷基，其中C_1-C_{12}烷基优选为甲基。根据特别优选的实施方案，R^1为肌醇磷酰基并且R^2为，其中Y为甲基。根据另一特别优选的实施方案，R^1为辛酰基并且R^2为，其中Y为-H。根据另一特别优选的实施方案，R^1为磷酰基并且R^2为，其中Y为-H。

[0167] 特别优选的化合物为如下式I的化合物，其中取代基和变量如以下所定义(其它取代基如以上所定义)(参见表A；如果存在L，则L为；“Carb”表示)：

[0168] 表A

[0169]

n	m	L	X	R^1	R^2	R^3
1	1	存在	-O-	辛酰基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	辛酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	辛酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	辛酰基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	辛酰基	-CN	H
1	1	存在	-O-	辛酰基	-CN	Cl
0	1	-	-	辛酰基	-COOH	H
0	1	-	-	辛酰基	-COOH	Cl
0	1	-	-	辛酰基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	辛酰基	-COOMe	H
0	1	-	-	辛酰基	-CN	H
0	1	-	-	辛酰基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	乙酰基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	乙酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	乙酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	乙酰基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	乙酰基	-CN	H
1	1	存在	-O-	乙酰基	-CN	Cl
0	1	-	-	乙酰基	-COOH	H
0	1	-	-	乙酰基	-COOH	Cl
0	1	-	-	乙酰基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	乙酰基	-COOMe	H
0	1	-	-	乙酰基	-CN	H
0	1	-	-	乙酰基	-CN	Cl

[0170]

1	1	存在	-O-	丁酰基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	丁酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	丁酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	丁酰基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	丁酰基	-CN	H
1	1	存在	-O-	丁酰基	-CN	Cl
0	1	-	-	丁酰基	-COOH	H
0	1	-	-	丁酰基	-COOH	Cl
0	1	-	-	丁酰基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	丁酰基	-COOMe	H
0	1	-	-	丁酰基	-CN	H
0	1	-	-	丁酰基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	壬酰基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	壬酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	壬酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	壬酰基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	壬酰基	-CN	H
1	1	存在	-O-	壬酰基	-CN	Cl
0	1	-	-	壬酰基	-COOH	H
0	1	-	-	壬酰基	-COOH	Cl
0	1	-	-	壬酰基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	壬酰基	-COOMe	H
0	1	-	-	壬酰基	-CN	H

[0171]

0	1	-	-	壬酰基	-CN	Cl
1	1	存在	-NH-	乙基乙酰基	-COOH	H
1	1	存在	-NH-	乙基乙酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-NH-	乙基乙酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-NH-	乙基乙酰基	-COOMe	H
1	1	存在	-NH-	乙基乙酰基	-CN	H
1	1	存在	-NH-	乙基乙酰基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	肌醇磷酰基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	肌醇磷酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	肌醇磷酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	肌醇磷酰基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	肌醇磷酰基	-CN	H
1	1	存在	-O-	肌醇磷酰基	-CN	Cl
0	1	-	-	肌醇磷酰基	-COOH	H
0	1	-	-	肌醇磷酰基	-COOH	Cl
0	1	-	-	肌醇磷酰基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	肌醇磷酰基	-COOMe	H
0	1	-	-	肌醇磷酰基	-CN	H
0	1	-	-	肌醇磷酰基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	磷酰基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	磷酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	磷酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	磷酰基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	磷酰基	-CN	H
1	1	存在	-O-	磷酰基	-CN	Cl
0	1	-	-	磷酰基	-COOH	H
0	1	-	-	磷酰基	-COOH	Cl
0	1	-	-	磷酰基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	磷酰基	-COOMe	H
0	1	-	-	磷酰基	-CN	H
0	1	-	-	磷酰基	-CN	Cl
1	1	存在	-NH-	L-丙氨酰基	-COOH	H
1	1	存在	-NH-	L-丙氨酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-NH-	L-丙氨酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-NH-	L-丙氨酰基	-COOMe	H
1	1	存在	-NH-	L-丙氨酰基	-CN	H
1	1	存在	-NH-	L-丙氨酰基	-CN	Cl
1	1	存在	-NH-	L-亮氨酰基	-COOH	H
1	1	存在	-NH-	L-亮氨酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-NH-	L-亮氨酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-NH-	L-亮氨酰基	-COOMe	H
1	1	存在	-NH-	L-亮氨酰基	-CN	H
1	1	存在	-NH-	L-亮氨酰基	-CN	Cl

[0172]

1	1	存在	-NH-	β-丙氨酰基	-COOH	H
1	1	存在	-NH-	β-丙氨酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-NH-	β-丙氨酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-NH-	β-丙氨酰基	-COOMe	H
1	1	存在	-NH-	β-丙氨酰基	-CN	H
1	1	存在	-NH-	β-丙氨酰基	-CN	Cl
1	1	存在	-NH-	L-焦谷氨酸基	-COOH	H
1	1	存在	-NH-	L-焦谷氨酸基	-COOH	Cl
1	1	存在	-NH-	L-焦谷氨酸基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-NH-	L-焦谷氨酸基	-COOMe	H
1	1	存在	-NH-	L-焦谷氨酸基	-CN	H
1	1	存在	-NH-	L-焦谷氨酸基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	β-D-吡喃半乳糖苷基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	β-D-吡喃半乳糖苷基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	β-D-吡喃半乳糖苷基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	β-D-吡喃半乳糖苷基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	β-D-吡喃半乳糖苷基	-CN	H
1	1	存在	-O-	β-D-吡喃半乳糖苷基	-CN	Cl
0	1	-	-	β-D-吡喃半乳糖苷基	-COOH	H
0	1	-	-	β-D-吡喃半乳糖苷基	-COOH	Cl
0	1	-	-	β-D-吡喃半乳糖苷基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	β-D-吡喃半乳糖苷基	-COOMe	H
0	1	-	-	β-D-吡喃半乳糖苷基	-CN	H
0	1	-	-	β-D-吡喃半乳糖苷基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	α-D-吡喃半乳糖苷基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	α-D-吡喃半乳糖苷基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	α-D-吡喃半乳糖苷基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	α-D-吡喃半乳糖苷基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	α-D-吡喃半乳糖苷基	-CN	H
1	1	存在	-O-	α-D-吡喃半乳糖苷基	-CN	Cl
0	1	-	-	α-D-吡喃半乳糖苷基	-COOH	H
0	1	-	-	α-D-吡喃半乳糖苷基	-COOH	Cl
0	1	-	-	α-D-吡喃半乳糖苷基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	α-D-吡喃半乳糖苷基	-COOMe	H
0	1	-	-	α-D-吡喃半乳糖苷基	-CN	H
0	1	-	-	α-D-吡喃半乳糖苷基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	α-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	α-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	α-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	α-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	α-D-吡喃葡萄糖苷基	-CN	H
1	1	存在	-O-	α-D-吡喃葡萄糖苷基	-CN	Cl
0	1	-	-	α-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOH	H

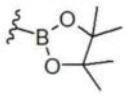
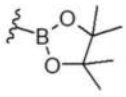
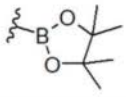
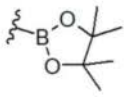
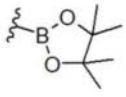
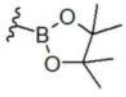
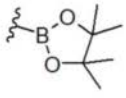
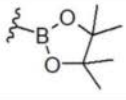
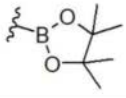
[0173]

0	1	-	-	α-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOH	Cl
0	1	-	-	α-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	α-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOMe	H
0	1	-	-	α-D-吡喃葡萄糖苷基	-CN	H
0	1	-	-	α-D-吡喃葡萄糖苷基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	β-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	β-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	β-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	β-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	β-D-吡喃葡萄糖苷基	-CN	H
1	1	存在	-O-	β-D-吡喃葡萄糖苷基	-CN	Cl
0	1	-	-	β-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOH	H
0	1	-	-	β-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOH	Cl
0	1	-	-	β-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	β-D-吡喃葡萄糖苷基	-COOMe	H
0	1	-	-	β-D-吡喃葡萄糖苷基	-CN	H
0	1	-	-	β-D-吡喃葡萄糖苷基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	β-D-葡萄糖醛酸基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	β-D-葡萄糖醛酸基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	β-D-葡萄糖醛酸基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	β-D-葡萄糖醛酸基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	β-D-葡萄糖醛酸基	-CN	H
1	1	存在	-O-	β-D-葡萄糖醛酸基	-CN	Cl
0	1	-	-	β-D-葡萄糖醛酸基	-COOH	H
0	1	-	-	β-D-葡萄糖醛酸基	-COOH	Cl
0	1	-	-	β-D-葡萄糖醛酸基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	β-D-葡萄糖醛酸基	-COOMe	H
0	1	-	-	β-D-葡萄糖醛酸基	-CN	H
0	1	-	-	β-D-葡萄糖醛酸基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	β-D-葡萄糖醛酸钠盐	-COOH	H
1	1	存在	-O-	β-D-葡萄糖醛酸钠盐	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	β-D-葡萄糖醛酸钠盐	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	β-D-葡萄糖醛酸钠盐	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	β-D-葡萄糖醛酸钠盐	-CN	H
1	1	存在	-O-	β-D-葡萄糖醛酸钠盐	-CN	Cl
0	1	-	-	β-D-葡萄糖醛酸钠盐	-COOH	H
0	1	-	-	β-D-葡萄糖醛酸钠盐	-COOH	Cl
0	1	-	-	β-D-葡萄糖醛酸钠盐	-COOMe	Cl
0	1	-	-	β-D-葡萄糖醛酸钠盐	-COOMe	H
0	1	-	-	β-D-葡萄糖醛酸钠盐	-CN	H
0	1	-	-	β-D-葡萄糖醛酸钠盐	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	-COOH	Cl

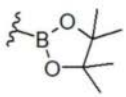
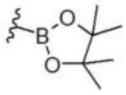
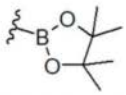
1	1	存在	-O-	N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	-CN	H
1	1	存在	-O-	N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	-CN	Cl
0	1	-	-	N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	-COOH	H
0	1	-	-	N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	-COOH	Cl
0	1	-	-	N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	-COOMe	H
0	1	-	-	N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	-CN	H
0	1	-	-	N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	N-乙酰基神经氨酸基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	N-乙酰基神经氨酸基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	N-乙酰基神经氨酸基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	N-乙酰基神经氨酸基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	N-乙酰基神经氨酸基	-CN	H
1	1	存在	-O-	N-乙酰基神经氨酸基	-CN	Cl
0	1	-	-	N-乙酰基神经氨酸基	-COOH	H
0	1	-	-	N-乙酰基神经氨酸基	-COOH	Cl
0	1	-	-	N-乙酰基神经氨酸基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	N-乙酰基神经氨酸基	-COOMe	H
0	1	-	-	N-乙酰基神经氨酸基	-CN	H
0	1	-	-	N-乙酰基神经氨酸基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	纤维二糖苷基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	纤维二糖苷基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	纤维二糖苷基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	纤维二糖苷基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	纤维二糖苷基	-CN	H
1	1	存在	-O-	纤维二糖苷基	-CN	Cl
0	1	-	-	纤维二糖苷基	-COOH	H
0	1	-	-	纤维二糖苷基	-COOH	Cl
0	1	-	-	纤维二糖苷基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	纤维二糖苷基	-COOMe	H
0	1	-	-	纤维二糖苷基	-CN	H
0	1	-	-	纤维二糖苷基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	呋喃核糖苷基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	呋喃核糖苷基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	呋喃核糖苷基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	呋喃核糖苷基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	呋喃核糖苷基	-CN	H
1	1	存在	-O-	呋喃核糖苷基	-CN	Cl
0	1	-	-	呋喃核糖苷基	-COOH	H
0	1	-	-	呋喃核糖苷基	-COOH	Cl
0	1	-	-	呋喃核糖苷基	-COOMe	Cl

[0174]

[0175]

0	1	-	-	呋喃核糖苷基	-COOMe	H
0	1	-	-	呋喃核糖苷基	-CN	H
0	1	-	-	呋喃核糖苷基	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	磷酰胆碱基	-COOH	H
1	1	存在	-O-	磷酰胆碱基	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	磷酰胆碱基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	磷酰胆碱基	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	磷酰胆碱基	-CN	H
1	1	存在	-O-	磷酰胆碱基	-CN	Cl
0	1	-	-	磷酰胆碱基	-COOH	H
0	1	-	-	磷酰胆碱基	-COOH	Cl
0	1	-	-	磷酰胆碱基	-COOMe	Cl
0	1	-	-	磷酰胆碱基	-COOMe	H
0	1	-	-	磷酰胆碱基	-CN	H
0	1	-	-	磷酰胆碱基	-CN	Cl
1	1	存在	-		-COOH	H
1	1	存在	-		-COOH	Cl
1	1	存在	-		-COOMe	Cl
1	1	存在	-		-COOMe	H
1	1	存在	-		-CN	H
1	1	存在	-		-CN	Cl
0	0	-	-		-COOH	H
0	0	-	-		-COOH	Cl
0	0	-	-		-COOMe	Cl

[0176]

0	0	-	-		-COOMe	H
0	0	-	-		-CN	H
0	0	-	-		-CN	Cl
1	1	存在	-	$-NO_2$	-COOH	H
1	1	存在	-	$-NO_2$	-COOH	Cl
1	1	存在	-	$-NO_2$	-COOMe	Cl
1	1	存在	-	$-NO_2$	-COOMe	H
1	1	存在	-	$-NO_2$	-CN	H
1	1	存在	-	$-NO_2$	-CN	Cl
1	1	存在	-O-	草酰酯	-COOH	H
1	1	存在	-O-	草酰酯	-COOH	Cl
1	1	存在	-O-	草酰酯	-COOMe	Cl
1	1	存在	-O-	草酰酯	-COOMe	H
1	1	存在	-O-	草酰酯	-CN	H
1	1	存在	-O-	草酰酯	-CN	Cl
0	1	-	-	草酰酯	-COOH	H
0	1	-	-	草酰酯	-COOH	Cl
0	1	-	-	草酰酯	-COOMe	Cl
0	1	-	-	草酰酯	-COOMe	H
0	1	-	-	草酰酯	-CN	H
0	1	-	-	草酰酯	-CN	Cl
1	1	存在	-NH-	Boc-Val-Pro-精氨酰基	-COOH	H
1	1	存在	-NH-	Boc-Val-Pro-精氨酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-NH-	Boc-Val-Pro-精氨酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-NH-	Boc-Val-Pro-精氨酰基	-COOMe	H
1	1	存在	-NH-	Boc-Val-Pro-精氨酰基	-CN	H
1	1	存在	-NH-	Boc-Val-Pro-精氨酰基	-CN	Cl
1	1	存在	-NH-	Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基	-COOH	H
1	1	存在	-NH-	Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-NH-	Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-NH-	Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基	-COOMe	H
1	1	存在	-NH-	Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基	-CN	H
1	1	存在	-NH-	Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基	-CN	Cl
1	1	存在	-NH-	SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基	-COOH	H
1	1	存在	-NH-	SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基	-COOH	Cl
1	1	存在	-NH-	SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基	-COOMe	Cl
1	1	存在	-NH-	SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基	-COOMe	H

[0177]

1	1	存在	-NH-	SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基	-CN	H
1	1	存在	-NH-	SucOMe-Arg-Pro-酪氨酰基	-CN	Cl
1	1	存在	-	Carb	-COOH	H
1	1	存在	-	Carb	-COOH	Cl
1	1	存在	-	Carb	-COOMe	Cl
1	1	存在	-	Carb	-COOMe	H
1	1	存在	-	Carb	-CN	H
1	1	存在	-	Carb	-CN	Cl

[0178] 通常,下文中讨论的所有用途和方法应当理解为体外用途和方法。

[0179] 在第二方面,本发明涉及如第一方面所述的式I的化合物用于检测目标分析物(例如过氧化氢)/目标微生物/目标代谢产物(无论其来源如何)的用途。更优选地,本发明涉及如第一方面所述的式I的化合物用于检测目标微生物、更优选病原微生物、甚至更优选细菌、病毒或真菌的用途。

[0180] 特别地,本发明涉及如第一方面所述的式I的化合物用于检测是否存在、定量和鉴定包括细菌、细菌碎片(例如,LPS、内毒素)、病毒、真菌以及其它病原体的微生物的用途。更特别地,本发明涉及如第一方面所述的式I的化合物用于借助以下手段来检测是否存在、定量和鉴定包括细菌、细菌碎片(例如,LPS、内毒素)、病毒、真菌以及其它病原体的微生物的用途,所述手段为化学发光指示代谢酶、试剂酶或参比酶对适当的分子探针的作用,通过试剂酶指示由微生物代谢产物或营养物质的酶促氧化产生的过氧化氢,或者通过试剂酶检测起到营养物质、底物、代谢产物或副产物的作用的无机磷酸盐。

[0181] 优选地,微生物选自由以下微生物组成的组:沙门氏菌;肠道沙门氏菌;李斯特菌,优选单核细胞增生李斯特菌;金黄色葡萄球菌;大肠杆菌;碳青霉烯耐药性细菌,优选铜绿假单胞菌和肺炎克雷白杆菌;空肠弯曲杆菌;大肠弯曲杆菌;红嘴鸥弯曲杆菌;杆菌;葡萄球菌;梭菌;结核分支杆菌;产气荚膜梭菌;无乳链球菌;假丝酵母菌属;革兰氏阴性菌;酵母菌;霉菌;铜绿假单胞菌;肠球菌;酿脓链球菌;柠檬酸杆菌;大肠菌;阪崎肠杆菌;MRSA;VRE;嗜热脂肪芽孢杆菌;李斯特菌属;产生肠道菌的ESBL;弧菌;艰难梭菌;白色念珠菌;普氏菌;志贺氏菌(一种含有腺苷三磷酸双磷酸酶的微生物),优选志贺氏菌;嗜肺军团菌;和杯状病毒科的病毒,优选兔病毒、诺如病毒、札幌病毒、纽布病毒、Recovirus,更优选诺如病毒。

[0182] 优选地,微生物选自由以下微生物组成的组:沙门氏菌;肠道沙门氏菌;李斯特菌,优选单核细胞增生李斯特菌;金黄色葡萄球菌;大肠杆菌;碳青霉烯耐药性细菌,优选铜绿假单胞菌和肺炎克雷白杆菌。

[0183] 式I的化合物的何种取代基R^1适合于检测何种目标分析物(例如过氧化氢)/目标微生物/目标代谢产物从第一方面、特别是从表1中显而易见,其中其它取代基可以如第一方面中所定义的来选择(这适用于本发明的所有方面和实施方案)。

[0184] 如上所述,令人惊讶地发现,式I的化合物在用于微生物的检测时显示许多优点。特别地,式I的化合物使得微生物的检测非常简单、直接且可靠,这是因为可以将式I的化合物简单地原样添加至含微生物的介质而无需任何其它化合物或者介质的额外准备。这是优于通常应用的荧光素酶-荧光素系统的巨大优势,所述荧光素酶-荧光素系统需要使用多种化合物,其中之一,即荧光素酶,是非常昂贵的并且由于众所周知的不稳定性而限制了保存期限。此外,已显示式I的化合物在水性介质中是稳定的并且具有显著高于荧光素酶-荧光

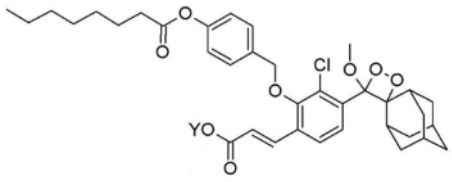
素系统的灵敏度(参见实施例9和10)。

[0185] 当用于微生物的检测时,可以将式I的化合物以固体形式或以溶液添加至微生物(一种或多种)中、特别是添加至含微生物的介质(优选水性介质)。然而,由于以下原因优选使用在溶液中、优选在DMSO溶液中的式I的化合物。由于高的灵敏度(显著高于荧光素酶-荧光素系统的灵敏度),因此仅需要非常少量的式I的化合物。通常,以小于0.1μg、优选小于0.09μg、更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的量使用式I的化合物。因此,使用在溶液中、特别是在DMSO溶液中的式I的化合物使得借助从已知浓度的储备溶液等分(aliquotation)容易确定添加至含微生物的介质的正确的量。此外,发现式I的化合物在DMSO溶液中是高度稳定的(在室温下数月和在4℃下数年)。

[0186] 根据优选的实施方案,式I的化合物用于检测目标分析物(例如过氧化氢)/目标微生物/目标代谢产物,优选微生物,其中基团R^1响应于分析物、特别是由所述微生物表达的酶。可以通过将包含所述基团R^1的式I的化合物添加至各自的分析物(或者反之亦然)并且检测所发射的光子(即光)(如果存在)来简单地确定基团R^1是否对特定的分析物例如酶有响应。

[0187] 根据优选的实施方案,微生物为沙门氏菌优选肠道沙门氏菌、李斯特菌优选单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌、或大肠杆菌。

[0188] 根据优选的实施方案,微生物为沙门氏菌,优选肠道沙门氏菌,并且该化合物为式II的化合物:

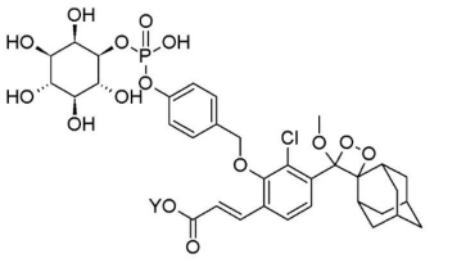
[0189] 

(式II),

[0190] 其中Y为-H、任选取代的C_1-C_{12}烷基或碱金属离子,其中碱金属离子优选为钠或钾并且任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。优选地,Y为-H或任选取代的C_1-C_{12}烷基,其中任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。更优选地,Y为-H或甲基。优选地,使用式IIa的化合物。

[0191] 根据特别优选的实施方案,微生物为沙门氏菌,优选肠道沙门氏菌,并且该化合物为式IIa的化合物。

[0192] 根据另一优选的实施方案,微生物为李斯特菌,优选单核细胞增生李斯特菌,并且该化合物为式III的化合物:

[0193] 

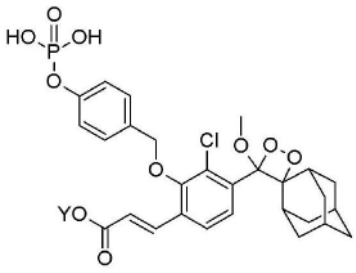
(式III),

[0194] 其中Y为-H、任选取代的C_1-C_{12}烷基或碱金属离子,其中碱金属离子优选为钠或钾并且任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。优选

地，Y为-H或任选取代的C_1-C_{12}烷基，其中任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。更优选地，Y为-H或甲基。优选地，使用式IIIa或IIIb、更优选式IIIb的化合物。

[0195] 根据特别优选的实施方案，微生物为李斯特菌，优选单核细胞增生李斯特菌，并且该化合物为式IIIb的化合物。

[0196] 根据另一优选的实施方案，微生物为金黄色葡萄球菌并且该化合物为式IV的化合物：

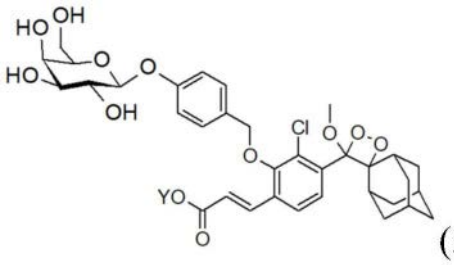
[0197] 

(式IV)

[0198] 其中Y为-H、任选取代的C_1-C_{12}烷基或碱金属离子，其中碱金属离子优选为钠或钾并且任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。优选地，Y为-H或任选取代的C_1-C_{12}烷基，其中任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。更优选地，Y为-H或甲基。优选地，使用式IVa的化合物。

[0199] 根据特别优选的实施方案，微生物为金黄色葡萄球菌并且该化合物为式IVa的化合物。

[0200] 根据另一优选的实施方案，微生物为大肠杆菌并且该化合物为式V的化合物：

[0201] 

(式V)

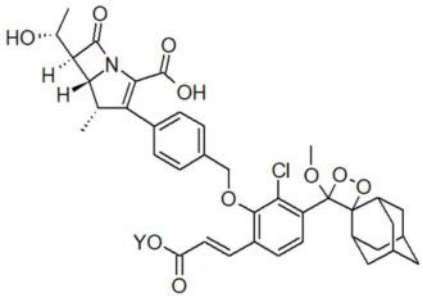
[0202] 其中Y为-H、任选取代的C_1-C_{12}烷基或碱金属离子，其中碱金属离子优选为钠或钾并且任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。优选地，Y为-H或任选取代的C_1-C_{12}烷基，其中任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。更优选地，Y为-H或甲基。优选地，使用式Va或Vb、更优选式Vb的化合物。

[0203] 根据特别优选的实施方案，微生物为大肠杆菌并且该化合物为式Vb的化合物。

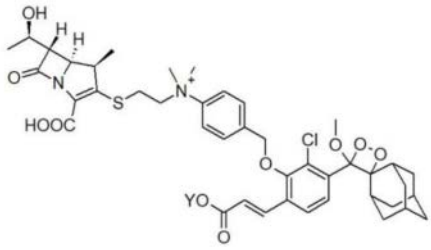
[0204] 根据优选的实施方案，目标分析物/目标微生物/目标代谢产物为过氧化氢并且式I的化合物为式VI、VIa、VIb或VIc的化合物。特别地，当将式I的化合物(其中R^1为如第一方面中所定义的-B(Z)(Z')并且其它取代基如第一方面中所定义(优选式VI、VIa、VIb或VIc的化合物))与适当的释放过氧化氢的酶(例如氧化酶)组合使用时，可以通过化学发光在微生物培养物的上清液中直接检测生长底物和代谢产物例如葡萄糖。优选地，使用式VI的化合物，特别是式VIa、VIb或VIc的化合物，最优选式VIc的化合物，或者相关化合物。

[0205] 根据另一优选的实施方案，微生物为碳青霉烯耐药性细菌，例如，铜绿假单胞菌或

肺炎克雷白杆菌，并且该化合物为式VII或VIII的化合物。

[0206] 

(式VII)，



(式VIII)

[0207] 其中Y为-H、任选取代的C_1-C_{12}烷基或碱金属离子，其中碱金属离子优选为钠或钾并且任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。优选地，Y为-H或任选取代的C_1-C_{12}烷基，其中任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。更优选地，Y为-H或甲基。优选地，使用式VIIa、VIIb或VIIIa的化合物，更优选式VIIb或VIIIa的化合物，甚至更优选式VIIIa的化合物。

[0208] 根据特别优选的实施方案，微生物为碳青霉烯耐药性铜绿假单胞菌和肺炎克雷白杆菌并且该化合物为式VIIb或VIIIa的化合物。

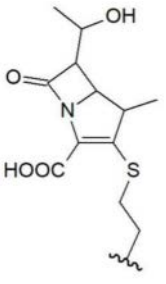
[0209] 其它目标分析物/目标微生物/目标代谢产物以及适合于它们的检测的特定的式I的化合物、特别是基团R^1可从本发明的第一方面辨别。

[0210] 此外，本发明涉及用于目标分析物(例如过氧化氢)/目标微生物/目标代谢产物的检测的方法。

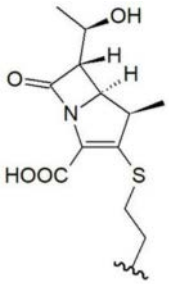
[0211] 优选地，本发明涉及用于目标微生物的检测的方法。特别地，本发明涉及用于检测是否存在、定量和鉴定包括细菌、细菌碎片(例如，LPS、内毒素)、病毒、真菌以及其它病原体的微生物的方法。更特别地，本发明涉及用于通过以下手段来检测是否存在、定量和鉴定包括细菌、细菌碎片(例如，LPS、内毒素)、病毒、真菌以及其它病原体的微生物的方法，所述手段为化学发光指示代谢酶、试剂酶或参比酶对适当的分子探针的作用，通过试剂酶指示由微生物代谢产物或营养物质的酶促氧化产生的过氧化氢，或者通过试剂酶检测起到营养物质、底物、代谢产物或副产物的作用的无机磷酸盐。

[0212] 所述方法包括以下步骤：a)提供包含一种或多种目标分析物(例如过氧化氢)/目标微生物/目标代谢产物的介质，b)将如第一实施方案中所述的式I的化合物添加至介质以使式I的化合物发光，和c)检测发出的光。

[0213] 如果式I的化合物包含借助-$N^+(CH_3)_2$-部分(参见以上)连接至连接基团的作为



优选



的基团R^1，则也优选在步骤b)中添加氧化剂(优选过氧化氢)。这是因为借助碳青霉烯酶使β-内酰胺环开环不会直接导致发光物质(emissive

species)的产生,而是需要硫化物部分的氧化来引发最终导致连接基团的自消除分解并且由此导致发光物质的产生的霍夫曼消除反应。

[0214] 根据优选的实施方案,所述方法包括额外的裂解步骤,所述裂解步骤可以在步骤a)和b)之间进行、或者在步骤b)中在将式I的化合物添加至介质时或之后进行。在一个实例中,可以将非特异性裂解试剂例如乙醇或其它适当的溶剂混合物(优选以15%的量)添加至介质。以此方式,细胞内酶被释放至介质中并且可以借助式I的化合物来检测。在另一实例中,可以将选择性裂解试剂例如噬菌体、肽、蛋白质(特别是内溶素及其衍生物)添加至介质。所述选择性裂解试剂导致仅特定细胞(即,对各自的选择性裂解试剂有响应的细胞)的细胞内酶的释放。因此,所述选择性裂解试剂除了检测到的酶以外还代表防止假阳性结果并且提高特异性的进一步的选择标准。原则上,这也适用于本文中公开的所有其它方面。

[0215] 提高特异性的另一实例为使用基于抗体的捕获方法。例如,可以在步骤a)和b)之后添加抗体官能化的磁珠。因此,可以将特定细胞从其它细胞中收集/分离,这提高了特异性。以此方式,抗体的高特异性可以与式I的化合物以高的灵敏度检测代谢活性细菌(metabolically active bacteria)的能力结合。原则上,这也适用于本文中公开的所有其它方面。

[0216] 优选地,介质为水性介质。

[0217] 优选地,目标分析物/目标微生物/目标代谢产物为微生物。

[0218] 优选地,微生物为表1中公开的微生物。

[0219] 优选地,微生物选自由以下微生物组成的组:沙门氏菌;肠道沙门氏菌;李斯特菌,优选单核细胞增生李斯特菌;金黄色葡萄球菌;大肠杆菌;碳青霉烯耐药性细菌,优选铜绿假单胞菌和肺炎克雷白杆菌;空肠弯曲杆菌;大肠弯曲杆菌;红嘴鸥弯曲杆菌;杆菌;葡萄球菌;梭菌;结核分支杆菌;产气荚膜梭菌;无乳链球菌;假丝酵母菌属;革兰氏阴性菌;酵母菌;霉菌;铜绿假单胞菌;肠球菌;酿脓链球菌;柠檬酸杆菌;大肠菌;阪崎肠杆菌;MRSA;VRE;嗜热脂肪芽孢杆菌;李斯特菌属;产生肠道菌的ESBL;弧菌;艰难梭菌;白色念珠菌;普氏菌;志贺氏菌(一种含有腺苷三磷酸双磷酸酶的微生物),优选志贺氏菌;嗜肺军团菌;和杯状病毒科的病毒,优选兔病毒、诺如病毒、札幌病毒、纽布病毒、Recovirus,更优选诺如病毒。

[0220] 优选地,微生物选自由以下微生物组成的组:沙门氏菌;肠道沙门氏菌;李斯特菌,优选单核细胞增生李斯特菌;金黄色葡萄球菌;大肠杆菌;和碳青霉烯耐药性细菌,优选铜绿假单胞菌和肺炎克雷白杆菌。

[0221] 优选地,在步骤b)中添加小于0.1μg、更优选小于0.09μg、甚至更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的式I的化合物。

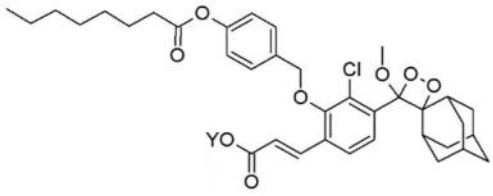
[0222] 优选地,在步骤b)中添加至介质的化合物存在于DMSO溶液中。在该情况下,在步骤b)中添加的式I的化合物的总量可以借助从已知浓度的储备溶液等分来简单地确定。

[0223] 优选地,在步骤b)之后,介质中的化合物的最终浓度为2-50μM,优选2-40μM,更优选2-30μM,更优选5-20μM,更优选8-15μM,甚至更优选9-11μM,最优选约10μM。

[0224] 优选地,微生物为病原微生物,更优选细菌,甚至更优选沙门氏菌、李斯特菌或金黄色葡萄球菌。

[0225] 根据优选的实施方案,微生物为沙门氏菌,优选肠道沙门氏菌,并且该化合物为式

II的化合物：

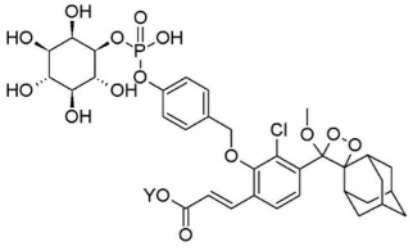
[0226] 

(式II)，

[0227] 其中Y为-H、任选取代的C_1-C_{12}烷基或碱金属离子，其中碱金属离子优选为钠或钾并且任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。优选地，Y为-H或任选取代的C_1-C_{12}烷基，其中任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。更优选地，Y为-H或甲基。

[0228] 根据特别优选的实施方案，微生物为沙门氏菌，优选肠道沙门氏菌，并且该化合物为式IIa的化合物。

[0229] 根据另一优选的实施方案，微生物为李斯特菌，优选单核细胞增生李斯特菌，并且该化合物为式III的化合物：

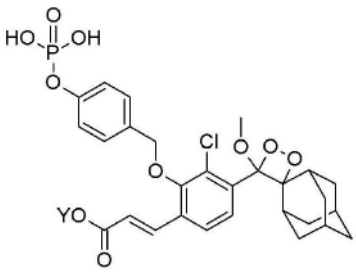
[0230] 

(式III)，

[0231] 其中Y为-H、任选取代的C_1-C_{12}烷基或碱金属离子，其中碱金属离子优选为钠或钾并且任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。优选地，Y为-H或任选取代的C_1-C_{12}烷基，其中任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。更优选地，Y为-H或甲基。

[0232] 根据特别优选的实施方案，微生物为李斯特菌，优选单核细胞增生李斯特菌，并且该化合物为式IIIa或IIIb、优选式IIIb的化合物。

[0233] 根据另一优选的实施方案，微生物为金黄色葡萄球菌并且该化合物为式IV的化合物：

[0234] 

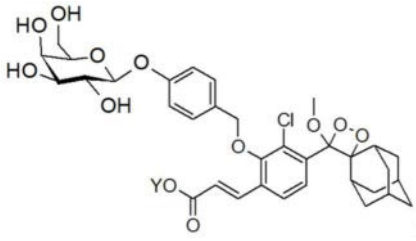
(式IV)

[0235] 其中Y为-H、任选取代的C_1-C_{12}烷基或碱金属离子，其中碱金属离子优选为钠或钾并且任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。优选地，Y为-H或任选取代的C_1-C_{12}烷基，其中任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。更优选地，Y为-H或甲基。

[0236] 根据特别优选的实施方案，微生物为金黄色葡萄球菌并且该化合物为式IVa的化

合物。

[0237] 根据另一优选的实施方案，微生物为大肠杆菌并且该化合物为式V的化合物：

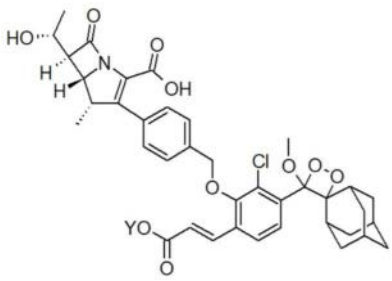
[0238] 

(式V)

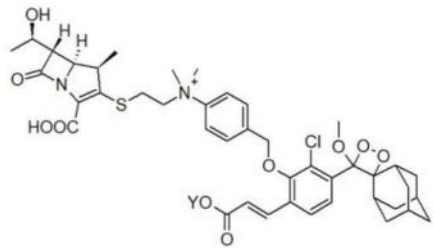
[0239] 其中Y为-H、任选取代的C_1-C_{12}烷基或碱金属离子，其中碱金属离子优选为钠或钾并且任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。优选地，Y为-H或任选取代的C_1-C_{12}烷基，其中任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。更优选地，Y为-H或甲基。

[0240] 根据特别优选的实施方案，微生物为大肠杆菌并且该化合物为式Va或Vb、优选式Vb的化合物。

[0241] 根据另一优选的实施方案，微生物为碳青霉烯耐药性细菌，优选铜绿假单胞菌和肺炎克雷白杆菌，并且该化合物为式VII或VIII的化合物

[0242] 

(化合物VII)



(化合物VIII)

[0243] 其中Y为-H、任选取代的C_1-C_{12}烷基或碱金属离子，其中碱金属离子优选为钠或钾并且任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。优选地，Y为-H或任选取代的C_1-C_{12}烷基，其中任选取代的C_1-C_{12}烷基优选为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基或叔丁基。更优选地，Y为-H或甲基。

[0244] 根据特别优选的实施方案，微生物为碳青霉烯耐药性铜绿假单胞菌和肺炎克雷白杆菌并且该化合物为式VIIa、VIIb或VIIIa、优选式VIIIa的化合物。

[0245] 其它目标分析物/目标微生物/目标代谢产物以及适合于它们的检测的特定的式I的化合物、特别是基团R^1可从本发明的第一方面辨别。

[0246] 此外，优选的是介质包含超过一种微生物，并且所述微生物中的一种导致比一种或多种存在于介质中的其它所述微生物高至少10倍、优选至少20倍的发光。

[0247] 在可以认为是第二方面的子方面(sub-aspect)的第三方面，本发明涉及如第一方面所述的式I的化合物用于通过生长底物、营养物质和代谢产物的酶促氧化来检测所述生长底物、营养物质和/或代谢产物的用途。

[0248] 生长底物、营养物质和代谢产物的检测允许病原体的间接检测。

[0249] 在该方面，通过使生长底物、营养物质和/或代谢产物与将生长底物、营养物质和/或代谢产物氧化并且由此产生过氧化氢的酶接触来检测它们。因此，通过检测由作用于生

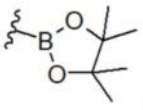
长底物、营养物质或代谢产物的酶产生的过氧化氢来间接地检测生长底物、营养物质或代谢产物。

[0250] 在一个实施方案中，营养物质为碳水化合物或氨基酸，并且酶为相应的氧化酶。例如，营养物质为葡萄糖并且酶为葡萄糖氧化酶；或者营养物质为D-氨基酸并且酶为D-氨基酸氧化酶(DAO)；或者营养物质为D-天冬氨酸并且酶为D-天冬氨酸氧化酶。

[0251] 在优选的实施方案中，代谢产物为组胺并且酶为二氨基氧化酶。

[0252] 在该方面，R^1优选为如第一方面中所定义的-B(Z)(Z')或-$BF_3^-Kat^+$并且其它取代基也如第一方面中所定义。

[0253] 在一个实施方案中，n为0。在另一实施方案中，n为1。

[0254] 特别优选的化合物为表A中公开的那些，其中R^1为。

[0255] 可以以固体形式或以溶液使用式I的化合物。然而，出于以上阐述的原因，优选使用在溶液中、优选在DMSO溶液中的式I的化合物。优选地，以小于0.1μg、优选小于0.09μg、更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的量使用式I的化合物。

[0256] 根据优选的实施方案，以1至100μM、优选5至80μM、更优选10至70μM、更优选20至60μM、更优选30至50μM、甚至更优选35至45μM的最终浓度使用该化合物。

[0257] 根据另一优选的实施方案，以10至500μM、优选10至250μM、更优选10至50μM的最终浓度使用该化合物。

[0258] 优选地，介质为包含原核细胞的介质、原核培养物上清液、包含真核细胞的介质、真核培养物上清液、血清或全血。

[0259] 此外，本发明涉及用于通过生长底物、营养物质和代谢产物的酶促氧化来检测所述生长底物、营养物质和/或代谢产物的方法。

[0260] 所述方法包括以下步骤：a)提供包含能够被酶氧化的生长底物、营养物质和/或代谢产物的介质，b)(b1)添加能够将生长底物、营养物质和/或代谢产物氧化并且由此产生过氧化氢的酶，(b2)将其中R^1为-B(Z)(Z')并且其它取代基如第一方面中所述的式I的化合物添加至介质以使式I的化合物在与过氧化氢接触时发光，其中步骤(b1)和(b2)可以同时或先后进行，和c)检测发出的光。

[0261] 优选地，介质为水性介质。

[0262] 更优选地，介质为包含原核细胞的介质、原核培养物上清液、包含真核细胞的介质、真核培养物上清液、血清或全血。

[0263] 在一个实施方案中，营养物质为碳水化合物或氨基酸并且酶为相应的氧化酶。例如，营养物质为葡萄糖并且酶为葡萄糖氧化酶；或者营养物质为D-氨基酸并且酶为D-氨基酸氧化酶(DAO)；或者营养物质为D-天冬氨酸并且酶为D-天冬氨酸氧化酶。

[0264] 在优选的实施方案中，代谢产物为组胺并且酶为二氨基氧化酶。

[0265] 可以在步骤a)和b)(包括子步骤b1和b2)中的任一者中、或者在步骤a)和b)之间或之后优选以15％的量添加乙醇或其它适当的溶剂或者溶剂混合物。如上所述，可选地，可以使用其它裂解试剂。

[0266] 可以以固体形式或以溶液使用式I的化合物。然而，出于以上阐述的原因，优选使用在溶液中、优选在DMSO溶液中的式I的化合物。

[0267] 优选地，以小于0.1μg、优选小于0.09μg、更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的量添加式I的化合物。

[0268] 优选地，添加式I的化合物以使介质中的化合物的最终浓度为2-50μM，优选2-40μM，更优选2-30μM，更优选5-20μM，更优选8-15μM，甚至更优选9-11μM，最优选约10μM。

[0269] 可选地，并且也是优选地，添加式I的化合物以使介质中的化合物的最终浓度为1至100μM，优选5至80μM，更优选10至70μM，更优选20至60μM，更优选30至50μM，甚至更优选35至45μM。

[0270] 在可以认为是第二方面的子方面的第四方面，本发明涉及如第一方面中所定义的式I的化合物用于通过检测蛰C因子来检测细菌内毒素的用途。

[0271] 在该方面，基团R^1对蛰C因子有响应/不稳定。优选地，R^1为Boc-Val-Pro-精氨酰基或Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基并且其它取代基如第一方面中所定义。

[0272] 可以以固体形式或以溶液、优选DMSO溶液使用式I的化合物。优选地，以溶液、优选以DMSO溶液使用式I的化合物。

[0273] 优选地，以小于0.1μg、优选小于0.09μg、更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的量使用式I的化合物。

[0274] 此外，本发明涉及通过检测蛰C因子来检测细菌内毒素的方法，其中将式I的化合物和蛰C因子添加至含有内毒素的介质。

[0275] 优选地，R^1为Boc-Val-Pro-精氨酰基或Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基并且其它取代基如第一方面中所定义。特别优选地，化合物为如表A中所公开的式I的化合物，其中R^1为Boc-Val-Pro-精氨酰基或Boc-Asp(OBzl)-Pro-精氨酰基。

[0276] 在相应的内毒素的存在下，蛰C因子的肽酶活性被激活并且该肽酶活性使R^1从式I的化合物的其余部分裂解，导致化学发光。在没有相应的内毒素的情况下，没有肽酶活性。

[0277] 优选地，用于该方法的介质为水性介质。

[0278] 可以将乙醇或其它适当的溶剂或者溶剂混合物优选以15％的量添加至介质。如上所述，可选地，可以使用其它裂解试剂。

[0279] 可以以固体形式或以溶液使用式I的化合物。然而，出于以上阐述的原因，优选使用在溶液中、优选在DMSO溶液中的式I的化合物。

[0280] 优选地，以小于0.1μg、优选小于0.09μg、更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的量使用式I的化合物。

[0281] 优选地，介质中的式I的化合物的最终浓度为2-50μM，优选2-40μM，更优选2-30μM，更优选5-20μM，更优选8-15μM，甚至更优选9-11μM，最优选约10μM。

[0282] 在可以认为是第二方面的子方面的第五方面，本发明涉及如第一方面所述的式I的化合物用于测试乳制品例如牛奶的巴氏灭菌的用途。

[0283] 优选地，所使用的化合物为式I的化合物，其中R^1为磷酰基并且其它取代基如第一

方面中所述。

[0284] 优选地，以小于0.1μg、优选小于0.09μg、更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的量使用式I的化合物。

[0285] 优选地，以1至100μM、优选5至80μM、更优选10至70μM、更优选20至60μM、更优选30至50μM、甚至更优选35至45μM的最终浓度使用该化合物。

[0286] 在另一实施方案中，以1至50μM、优选5至40μM、更优选10至30μM、更优选15至25μM、更优选18至22μM、更优选19至21μM的最终浓度使用式I的化合物。

[0287] 此外，本发明涉及测试乳制品、优选牛奶的巴氏灭菌的方法。

[0288] 所述方法包括以下步骤：a)提供乳制品介质，优选牛奶，b)巴氏灭菌，c)将其中R^1为磷酰基的如第一实施方案中所述的式I的化合物任选与缓冲液组合添加至介质，以使式I的化合物发光，和d)检测发出的光。

[0289] 天然存在于乳制品中的磷酸酶在灭菌期间降解。因此，如果灭菌是成功的，则不会检测到发光，这是因为在乳制品中不存在活性磷酸酶。

[0290] 优选地，在步骤b)中添加至介质的化合物存在于DMSO溶液中。

[0291] 优选地，将式I的化合物添加至介质以使其以2-50μM、优选2-40μM、更优选2-30μM、更优选5-20μM、更优选8-15μM、甚至更优选9-11μM、最优选约10μM的最终浓度存在。

[0292] 在另一实施方案中，将式I的化合物添加至介质以使其以1至50μM、优选5至40μM、更优选10至30μM、更优选15至25μM、更优选18至22μM、更优选19至21μM的最终浓度存在。

[0293] 优选地，将小于0.1μg、更优选小于0.09μg、甚至更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的式I的化合物添加至介质。

[0294] 优选地，在步骤b)中添加至介质的化合物存在于DMSO溶液中。在该情况下，在步骤b)中添加的式I的化合物的总量可以借助从已知浓度的储备溶液等分来简单地确定。

[0295] 在可以认为是第二方面的子方面的第六方面，本发明涉及式I的化合物用于测试微生物中的抗生素耐药性的用途。

[0296] 优选地，R^1为如第一方面中所定义的β-内酰胺酶不稳定基团，优选β-内酰胺类抗生素，更优选青霉素、第1代至第5代头孢菌素、头孢霉素或碳青霉烯，并且其它取代基如第一方面中所定义。

[0297] 优选地，式I的化合物如表A中所定义，其中R^1为优选的所示碳青霉烯部分。

[0298] 优选地，微生物选自由以下微生物组成的组：沙门氏菌；肠道沙门氏菌；李斯特菌，优选单核细胞增生李斯特菌；金黄色葡萄球菌；大肠杆菌；碳青霉烯耐药性细菌，优选铜绿假单胞菌和肺炎克雷白杆菌；空肠弯曲杆菌；大肠弯曲杆菌；红嘴鸥弯曲杆菌；杆菌；葡萄球菌；梭菌；结核分支杆菌；产气荚膜梭菌；无乳链球菌；假丝酵母菌属；革兰氏阴性菌；酵母菌；霉菌；铜绿假单胞菌；肠球菌；酿脓链球菌；柠檬酸杆菌；大肠菌；阪崎肠杆菌；MRSA；VRE；嗜热脂肪芽孢杆菌；李斯特菌属；产生肠道菌的ESBL；弧菌；艰难梭菌；白色念珠菌；普氏菌；志贺氏菌、嗜肺军团菌；和杯状病毒科的病毒，优选兔病毒、诺如病毒、札幌病毒、纽布病毒、Recovirus，更优选诺如病毒。

[0299] 更优选地，微生物选自由以下微生物组成的组：沙门氏菌；肠道沙门氏菌；李斯特

菌,优选单核细胞增生李斯特菌;金黄色葡萄球菌;大肠杆菌;碳青霉烯耐药性细菌,优选铜绿假单胞菌和肺炎克雷白杆菌;空肠弯曲杆菌;大肠弯曲杆菌;红嘴鸥弯曲杆菌;杆菌;葡萄球菌;梭菌;结核分支杆菌;产气荚膜梭菌;无乳链球菌;假丝酵母菌属;革兰氏阴性菌;酵母菌;霉菌;铜绿假单胞菌;肠球菌;酿脓链球菌;柠檬酸杆菌;大肠菌;阪崎肠杆菌;MRSA;VRE;嗜热脂肪芽孢杆菌;李斯特菌属;产生肠道菌的ESBL;弧菌;艰难梭菌;白色念珠菌;普氏菌;志贺氏菌;和嗜肺军团菌。

[0300] 甚至更优选地,微生物选自铜绿假单胞菌和肺炎克雷白杆菌。

[0301] 可以以固体形式或以溶液使用该化合物。然而,优选使用在溶液中、优选在DMSO溶液中的式I的化合物。

[0302] 优选地,以小于0.1μg、优选小于0.09μg、更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的量使用式I的化合物。

[0303] 优选地,以1至100μM、优选5至80μM、更优选10至70μM、更优选20至60μM、更优选30至50μM、甚至更优选35至45μM的最终浓度使用该化合物。

[0304] 在另一实施方案中,以约1至50μM、优选2至40μM、更优选3至30μM、更优选4至20μM、更优选5至15μM、更优选7至13μM、更优选9至11μM的最终浓度使用该化合物。

[0305] 此外,本发明涉及用于测试微生物中的抗生素特别是例如青霉素、头孢菌素、头孢霉素或碳青霉烯等β-内酰胺类抗生素耐药性的方法。

[0306] 所述方法包括以下步骤:a)提供包含一种或多种微生物的介质,b)将式I的化合物添加至介质,其中R^1为β-内酰胺酶不稳定基团,优选例如青霉素、第1代至第5代头孢菌素、头孢霉素或碳青霉烯等β-内酰胺类抗生素并且其它取代基如第一方面中所定义,以使当介质中存在抗生素、优选例如青霉素、头孢菌素、头孢霉素或碳青霉烯等β-内酰胺类抗生素耐药性微生物时,式I的化合物发光,和c)检测发出的光。

[0307] 优选地,式I的化合物如表A中所定义,其中R^1为碳青霉烯基。

[0308] 优选地,介质为水性介质。

[0309] 可以在步骤a)和b)中的任一者中或者在步骤a)和b)之间或之后优选以15%的量添加乙醇或其它适当的溶剂或者溶剂混合物。如上所述,可选地,可以使用其它裂解试剂。

[0310] 优选地,将式I的化合物添加至介质以使其以2-50μM、优选2-40μM、更优选2-30μM、更优选5-20μM、更优选8-15μM、甚至更优选9-11μM、最优选约10μM的最终浓度存在。

[0311] 在另一实施方案中,将式I的化合物添加至介质以使其以1至50μM、优选2至40μM、更优选3至30μM、更优选4至20μM、更优选5至15μM、更优选7至13μM、更优选9至11μM的最终浓度存在。

[0312] 优选地,将小于0.1μg、更优选小于0.09μg、甚至更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的式I的化合物添加至介质。

[0313] 优选地,在步骤b)中添加至介质的化合物存在于DMSO溶液中。在该情况下,在步骤b)中添加的式I的化合物的总量可以借助从已知浓度的储备溶液等分来简单地确定。

[0314] 特别地,该方法适合于区分抗生素耐药性微生物和抗生素敏感性微生物,这是因为仅对于抗生素耐药性微生物发生发光。

[0315] 在可以认为是第二方面的子方面的第七方面，本发明涉及式I的化合物用于检测无机磷酸盐、优选通过酶促反应产生的无机磷酸盐的用途。

[0316] 优选地，R^1为草酰酯并且其它取代基如第一方面中所定义。

[0317] 优选地，无机磷酸盐由腺苷三磷酸双磷酸酶、优选志贺氏菌腺苷三磷酸双磷酸酶产生。在该情况下，该化合物适合于检测志贺氏菌，其为世界各地腹泻的主要细菌原因之一。

[0318] 优选地，以小于0.1μg、优选小于0.09μg、更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的量使用式I的化合物。

[0319] 可以以固体形式或以溶液使用该化合物。然而，优选使用在溶液中、优选在DMSO溶液中的式I的化合物。

[0320] 优选地，以1至100μM、优选5至80μM、更优选10至70μM、更优选20至60μM、更优选30至50μM、甚至更优选35至45μM的最终浓度使用该化合物。

[0321] 此外，本发明涉及用于检测无机磷酸盐、优选通过酶促反应产生的无机磷酸盐的方法。

[0322] 所述方法包括以下步骤：a)提供包含无机磷酸盐的介质，b)将式I的化合物添加至介质，其中R^1为草酰酯并且其它取代基如第一方面中所定义，以使式I的化合物发光，和c)检测发出的光。

[0323] 优选地，式I的化合物如表A中所定义，其中R^1为草酰酯。

[0324] 优选地，介质中包含的无机磷酸盐由腺苷三磷酸双磷酸酶、优选志贺氏菌腺苷三磷酸双磷酸酶产生。因此，优选的是步骤a)中的介质包含腺苷三磷酸双磷酸酶，优选志贺氏菌腺苷三磷酸双磷酸酶。特别优选的是步骤a)中的介质包含志贺氏菌。

[0325] 优选地，介质为水性介质。

[0326] 可以在步骤a)和b)中的任一者中或者在步骤a)和b)之间或之后优选以15％的量添加乙醇或其它适当的溶剂或者溶剂混合物。如上所述，可选地，可以使用其它裂解试剂。

[0327] 优选地，将小于0.1μg、更优选小于0.09μg、甚至更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的式I的化合物添加至介质。

[0328] 优选地，在步骤b)中添加至介质的化合物存在于DMSO溶液中。

[0329] 优选地，介质中的化合物的最终浓度为2-50μM，优选2-40μM，更优选2-30μM，更优选5-20μM，更优选8-15μM，甚至更优选9-11μM，最优选约10μM。

[0330] 在可以认为是第二方面的子方面的第八方面，本发明涉及式I的化合物用于优选通过检测指示微生物嗜热脂肪芽孢杆菌的α-D-葡萄糖苷酶活性来监测灭菌过程的用途。嗜热脂肪芽孢杆菌产生α-葡萄糖苷酶，然而α-葡萄糖苷酶在灭菌时失活。

[0331] 优选地，R^1为α-D-吡喃葡萄糖苷基并且其它取代基如第一方面中所定义。因此，如果由于灭菌而使嗜热脂肪芽孢杆菌和α-葡萄糖苷酶失活，则不能使α-D-吡喃葡萄糖苷基部分裂解下来，并且因此不发光。

[0332] 优选地，以小于0.1μg、优选小于0.09μg、更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优

选约0.05μg的量使用式I的化合物。

[0333] 另外，在该方面，可以以固体形式或以溶液使用式I的化合物。然而，优选使用在溶液中、优选在DMSO溶液中的式I的化合物。

[0334] 优选地，以1至100μM、优选5至80μM、更优选10至70μM、更优选20至60μM、更优选30至50μM、甚至更优选35至45μM的最终浓度使用该化合物。

[0335] 此外，本发明涉及用于优选通过检测指示微生物嗜热脂肪芽孢杆菌的α-D-葡萄糖苷酶活性来监测灭菌过程的方法。

[0336] 所述方法包括以下步骤：a1)提供包含在正常条件下产生α-葡萄糖苷酶的微生物、优选嗜热脂肪芽孢杆菌的介质，a2)将介质灭菌，b)将式I的化合物添加至介质，其中R^1为α-D-吡喃葡萄糖苷基并且其它取代基如第一方面中所定义，和c)如果有发出的光，则检测发出的光。

[0337] 优选地，式I的化合物如表A中所定义，其中R^1为α-D-吡喃葡萄糖苷基并且其它取代基如第一方面中所定义。

[0338] 优选地，介质为水性介质。

[0339] 可以在步骤b)中或之后优选以15％的量添加乙醇或其它适当的溶剂或者溶剂混合物。如上所述，可选地，可以使用其它裂解试剂。

[0340] 优选地，将小于0.1μg、更优选小于0.09μg、甚至更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg，最优选约0.05μg的式I的化合物添加至介质。

[0341] 优选地，添加至介质的化合物存在于DMSO溶液中。

[0342] 优选地，介质中的化合物的最终浓度为2-50μM，优选2-40μM，更优选2-30μM，更优选5-20μM，更优选8-15μM，甚至更优选9-11μM，最优选约10μM。

[0343] 在可以认为是第二方面的子方面的第九方面，本发明涉及如第一方面所述的式I的化合物用于细菌的抗生素耐药性的终点检测和在线检测、以及用于抗生素敏感性测试的用途。

[0344] 在该方面，可以在培养开始时或在测量时将该化合物添加至含有细菌和抗生素的介质。抗生素耐药性细菌即使在抗生素的存在下也会繁殖，这会借助基团R^1与相应的细菌(特别是其酶等)的相互作用而导致式I的化合物的发光(参见，实施例8)。

[0345] 何种基团R^1可以用于所述细菌的抗生素耐药性的终点检测和在线检测以及用于抗生素敏感性测试可从表1辨别。例如，其中R^1为磷酰基的式I的化合物可以用于金黄色酿脓葡萄球菌特别是MRSA、产气荚膜梭菌、无乳链球菌或假丝酵母菌(Candida)的抗生素耐药性的终点检测和在线检测以及用于所述细菌的抗生素敏感性测试。在另一实例中，其中R^1为L-焦谷氨酸基的式I的化合物可以用于肠球菌、酿脓链球菌或柠檬酸杆菌的抗生素耐药性的终点检测和在线检测以及用于所述细菌的抗生素敏感性测试。在另一实例中，其中R^1为β-D-吡喃半乳糖苷基的式I的化合物可以用于大肠菌或大肠杆菌的抗生素耐药性的终点检测和在线检测以及用于所述细菌的抗生素敏感性测试。

[0346] 优选地，以小于0.1μg、优选小于0.09μg、更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的量使用式I的化合物。

[0347] 另外，在该方面，可以以固体形式或以溶液使用式I的化合物。然而，优选使用在溶液中、优选在DMSO溶液中的式I的化合物。

[0348] 优选地，以1至100μM、优选5至80μM、更优选10至70μM、更优选20至60μM、更优选30至50μM、甚至更优选35至45μM的最终浓度使用该化合物。

[0349] 此外，本发明涉及用于细菌的抗生素耐药性的终点检测和在线检测以及用于抗生素敏感性测试的方法。

[0350] 所述方法包括以下步骤：a)提供包含微生物、优选细菌的介质，b)添加抗生素，c)添加式I的化合物，其中R^1对所述微生物、特别是由其产生的酶有响应，其中可以在步骤b)之前、与步骤b)一起或在步骤b)之后进行步骤c)，d)如果有发出的光，则检测发出的光。

[0351] 何种基团R^1可以用于所述细菌的抗生素耐药性的终点检测和在线检测以及用于抗生素敏感性测试可从表1辨别。

[0352] 优选地，将小于0.1μg、更优选小于0.09μg、甚至更优选小于0.08μg、甚至更优选小于0.07μg、甚至更优选小于0.065μg、甚至更优选0.04至0.06μg、甚至更优选0.045至0.055μg、最优选约0.05μg的式I的化合物添加至介质。

[0353] 优选地，添加至介质的化合物存在于DMSO溶液中。

[0354] 优选地，介质中的化合物的最终浓度为2-50μM，优选2-40μM，更优选2-30μM，更优选5-20μM，更优选8-15μM，甚至更优选9-11μM，最优选约10μM。

[0355] 优选地，介质为水性介质。

[0356] 可以在步骤b)中或之后优选以15％的量添加乙醇或其它适当的溶剂或者溶剂混合物。如上所述，可选地，可以使用其它裂解试剂。

[0357] 现在将通过以下非限制性实例进一步说明本发明。

[0358] 实施例

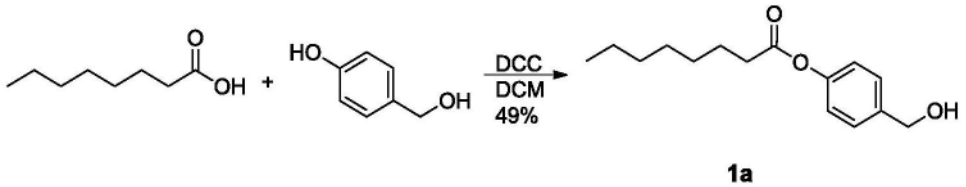
[0359] 通用方法：

[0360] 除非另有说明，所有反应均在室温下进行。化学品和溶剂为A.R.级或者通过标准技术来纯化。薄层色谱法(TLC)：硅胶板Merck 60F254：通过用UV光照射使化合物显现。柱色谱法(FC)：硅胶Merck 60(粒径0.040-0.063mm)，洗脱液在括号中给出。反相高压液相色谱法(RP-HPLC)：C18 5μm，250×4.6mm，洗脱液在括号中给出。制备型RP-HPLC：C18 5μm，250×21mm，洗脱液在括号中给出。荧光和化学发光记录在Molecular Devices Spectramax i3x上。

[0361] 如果没有另外说明，所有化学品均购自Merck和Biosynth AG并且按原样使用。

[0362] 缩写.AcOH-乙酸，MeCN-乙腈，DCM-二氯甲烷，DMF-N,N'-二甲基甲酰胺，EtOAc-乙酸乙酯，Hex-己烷，MeOH-甲醇，TFA-三氟乙酸，THF-四氢呋喃，TIPSCl-三异丙基氯硅烷。

[0363] 合成例1：化合物IIa的合成

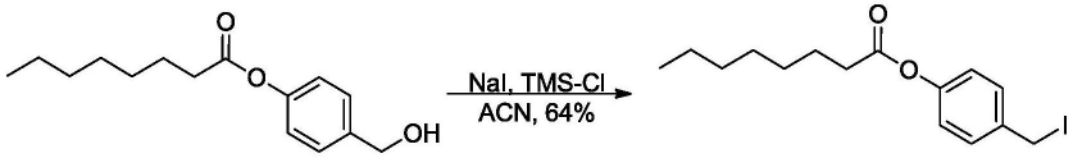
[0364] 

1a

[0365] 将DCC(457mg，2.21mmol，1.1eq)添加至辛酸(350μl，2.21mmol，1.1eq)和4-羟基苯甲醇(250mg，2.01mmol，1eq)在DCM(2ml)中的混合物中。将反应混合物在室温下搅拌并且通

过TLC(40:60EtOAc:Hex)来监测。完成后,将DCC滤除并且将粗产物通过在硅胶上的柱色谱(30:70EtOAc:Hex)来纯化以得到作为浅黄色固体的化合物1a(246mg,产率49%)。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ7.35(d,J=8.5Hz,2H),7.05(d,J=8.5Hz,2H),4.63(s,2H),2.55(t,J=7.5Hz,2H),1.76(dt,J=15.1,7.5Hz,2H),1.50-1.18(m,8H),0.97-0.82(m,3H)。^{13}C NMR(101MHz,$CDCl_3$)δ173.75,150.68,133.71,129.49,121.78,65.50,34.48,31.72,29.16,29.14,29.11,28.98,25.01,22.67,14.13。

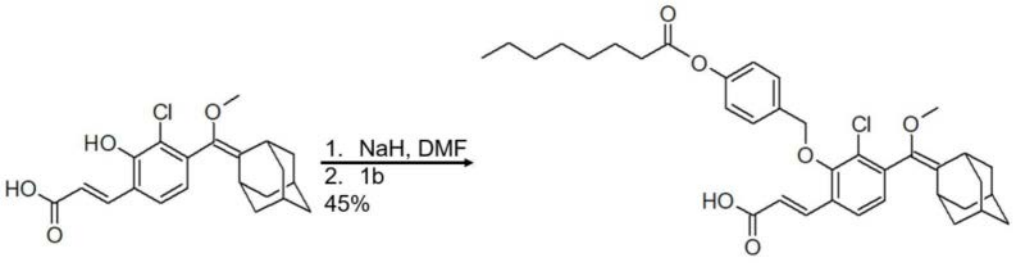
[0366]



1a 1b

[0367] 将化合物1a(200mg,0.8mmol,1eq)溶解于4mL ACN中并且冷却至0℃。添加碘化钠(360mg,2.4mmol,3eq),然后快速添加TMS-Cl(306μl,2.4mmol,3eq)。使反应升温至室温并且通过TLC(30:70EtOAc:Hex)来监测。完成后,将反应混合物用EtOAc稀释,并且用饱和$Na_2S_2O_3$洗涤,然后用盐水来洗涤。将有机层分离、经Na_2SO_4干燥、过滤,并且在减压下将溶剂蒸发以得到作为灰白色固体的化合物1b(185mg,产率64%)。使该化合物反应而无需进一步纯化。^{1}H NMR(400MHz,$CDCl_3$)δ7.38(d,J=8.0Hz,2H),7.00(d,J=8.0Hz,2H),4.45(s,2H),2.54(t,J=5.6Hz,2H),1.74(dt,J=15.1,7.5Hz,2H),1.44-1.24(m,8H),0.90(t,J=6.9Hz,3H)。^{13}C NMR(101MHz,$CDCl_3$)δ172.35,150.33,133.73,129.82,129.40,121.93,121.68,43.20,34.36,34.28,31.62,30.71,29.03,28.88,24.90,22.57,14.04。

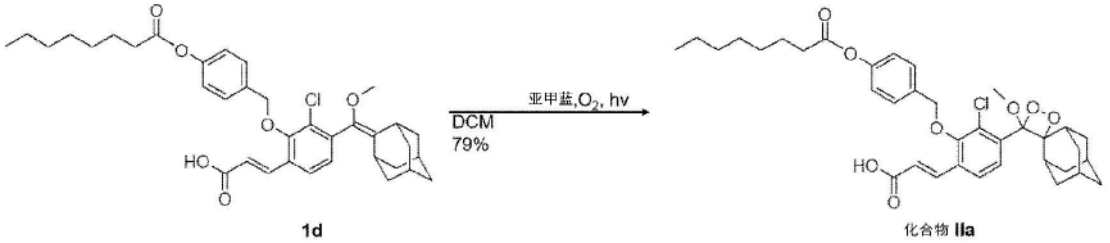
[0368]



1c 1d

[0369] 在氩气氛下将化合物1c(按照Green,O.,Eilon,T.,Hananya,N.,Gutkin,S.,Bauer,CR.,Shabat,D.,ACS Central Sci.,2017,4,349-58来制备)(30mg,0.08mmol,1.1eq)溶解于干燥的DMF中并且冷却至0℃。添加氢化钠(6.4mg,0.16mmol,2.2eq),并且使反应升温至室温。在搅拌15分钟之后,添加化合物1b(26mg,0.07mmol,1eq)并且通过RP-HPLC(在水中的90-100%ACN,20min)来监测反应。完成后,将反应混合物通过减压蒸发来浓缩并且将粗产物通过制备型RP-HPLC(在水中的95-100%ACN,20min)来纯化以得到作为白色固体的化合物1d(18mg,产率45%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ7.78(d,J=2.3Hz,1H),7.75(d,J=10.5Hz,1H),7.48(d,J=8.5Hz,1H),7.17-7.05(m,3H),6.58(d,J=16.1Hz,1H),4.96(d,J=12.9Hz,2H),3.21(s,3H),3.17(s,2H),2.56(t,J=7.4Hz,2H),1.92(dd,J=34.0,9.0Hz,4H),1.82-1.55(m,10H),1.37-1.14(m,8H),0.89-0.80(m,3H)。^{13}C NMR(101MHz,DMSO)δ172.09,159.35,153.04,150.78,139.79,137.52,133.86,130.71,130.06,129.93,129.00,128.20,126.30,122.28,75.34,56.92,36.88,33.89,32.83,31.53,29.46,

28.78,28.12,27.98,24.75,22.51,14.31。

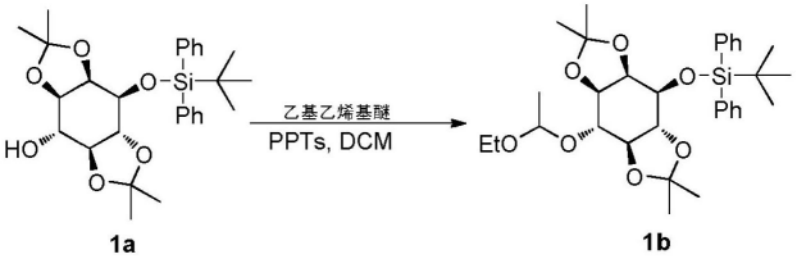
[0370] 

[0371] 将化合物1d(18mg,0.03mmol)和几毫克亚甲蓝溶解于5mL DCM和几滴DMF(以提高溶解度)中。在用黄光照射的同时,将氧气鼓泡通过溶液。通过RP-HPLC(在水中的90-100%ACN,20min)来监测反应。完成后,将反应混合物通过减压蒸发来浓缩。将粗产物通过制备型RP-HPLC(在水中的90-100%ACN,20min)来纯化以得到作为灰白色固体的化合物IIa(15mg,产率79%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO)δ7.94(d,J=8.4Hz,1H),7.79(d,J=8.4Hz,1H),7.73(d,J=16.1Hz,1H),7.49(d,J=8.5Hz,2H),7.13(d,J=8.5Hz,2H),6.63(d,J=16.1Hz,1H),4.92(q,J=10.9Hz,2H),3.11(s,3H),2.88(s,1H),2.56(t,J=7.4Hz,2H),2.22(d,J=11.5Hz,1H),1.89(d,J=3.8Hz,1H),1.77-1.50(m,19H),1.46(d,J=11.8Hz,1H),1.40-1.16(m,8H),0.90-0.80(m,3H)。^{13}CNMR(126MHz,DMSO)δ172.35,167.74,154.08,151.18,136.97,134.67,133.84,132.01,130.34,129.10,127.38,126.70,123.90,122.50,111.79,96.02,75.65,50.03,36.48,34.07,33.89,33.68,32.44,32.26,31.71,31.48,30.43,29.60,26.10,25.77,22.64,14.54。

[0372] 合成例2:化合物IIIa的合成

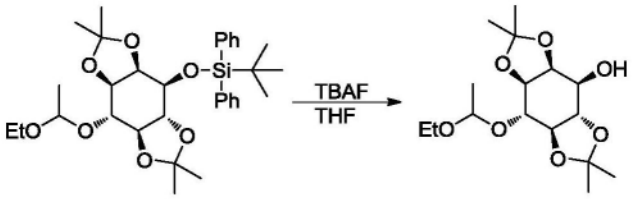
[0373] 

[0374] 将1,2:4,5-二-O-异亚丙基-肌醇(250mg,0.96mmol,1eq)和咪唑(98mg,1.44mmol,1.5eq)溶解于干燥的吡啶(3ml)中并且冷却至-10℃。通过注射器缓慢地添加叔丁基二苯基氯硅烷(275μl,1.06mmol,1.1eq)。使反应升温至室温并且通过TLC(50:50EtOAc:Hex)来监测。完成后,将反应混合物用EtOAc稀释,并且用饱和NH_4Cl洗涤。将有机层分离、经Na_2SO_4干燥、过滤,并且在减压下将溶剂蒸发。将粗产物通过在硅胶上的柱色谱(50:50EtOAc:Hex)来纯化以得到作为白色泡沫的化合物1a(350mg,产率73%)。MS(ES+):$C_{28}H_{38}O_6Si$的m/z计算值:498.24;发现:499.4$[M+H]^+$。

[0375] 

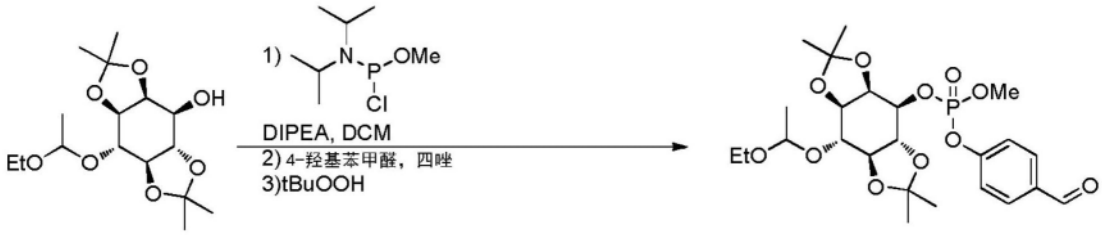
[0376] 将化合物1a(170mg,0.341mmol,1eq)溶解于DCM中,并且添加乙基乙烯基醚(652μ

1,6.8mmol,20eq),然后添加吡啶对甲苯磺酸盐(39mg,0.153mmol,0.45eq)。通过TLC(20:80EtOAc:Hex)来监测反应,并且完成后,将反应用Et_2O稀释。将有机层用5%$NaHCO_3$洗涤,然后用盐水洗涤。将有机层分离、经Na_2SO_4干燥、过滤,并且在减压下将溶剂蒸发。将粗产物通过在硅胶上的柱色谱(15:85EtOAc:Hex)来纯化以得到作为透明油状物的化合物1b(150mg,产率77%)。

[0377] 

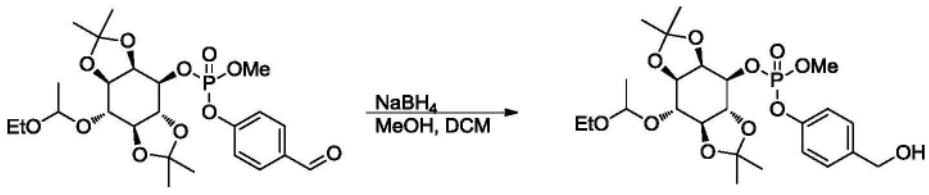
1b 1c

[0378] 将化合物1b(90mg,0.16mmol,1eq)溶解于THF(1ml)中并且添加四丁基氟化铵(在THF中为1M,240μl,0.24mmol,1.5eq)。将反应在室温下搅拌过夜。完成后,在减压下将溶剂除去。将粗品溶解于Et_2O中并且用水洗涤。将水相用Et_2O再洗涤两次。将有机层合并、用盐水洗涤、经Na_2SO_4干燥、过滤,并且在减压下将溶剂蒸发。将粗产物通过在硅胶上的柱色谱(EtOAc)来纯化以得到作为白色粉末的化合物1c(42mg,产率80%)。

[0379] 

1c 1d

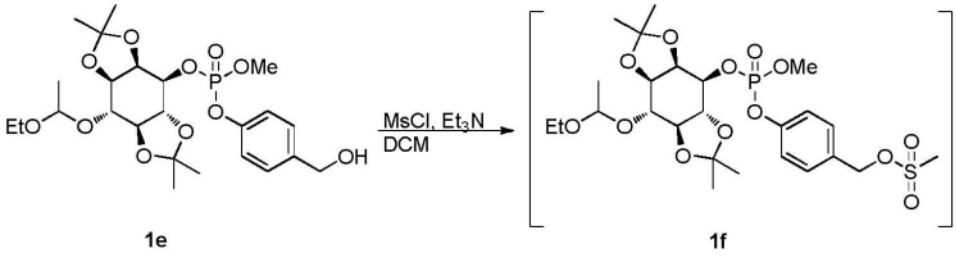
[0380] 将化合物1c(39mg,0.117mmol,1eq)溶解于干燥的DCM中。添加二异丙基乙胺(63μl,0.351mmol,3eq),然后滴加氯(N,N-二异丙基氨基)甲氧基膦(45μl,0.234mmol,2eq)。将反应在室温下放置过夜。此后,在减压下将溶剂除去。将粗品再溶解于DCM中,然后添加4-羟基苯甲醛(20mg,0.164mmol,1.4eq)和四唑(在ACN中为0.45M,780μl,0.351mmol,3eq)。通过TLC(20:80EtOAc:Hex)来监测反应。在2小时之后,在0℃下缓慢地滴加叔丁基氢过氧化物(在癸烷中为5.5M,43μl,0.234mmol,2eq)。通过TLC(30:70EtOAc:Hex)来监测反应。完成后,将反应混合物用DCM稀释,并且用5%$NaHCO_3$洗涤,然后用盐水洗涤。将有机层分离、经Na_2SO_4干燥、过滤,并且在减压下将溶剂蒸发。将粗产物通过在硅胶上的柱色谱(70:30EtOAc:Hex)来纯化以得到作为白色固体的化合物1d(37mg,产率60%)。MS(ES+):$C_{24}H_{35}ClO_{11}P$的m/z计算值:530.19;发现:553.5$[M+Na]^+$。

[0381] 

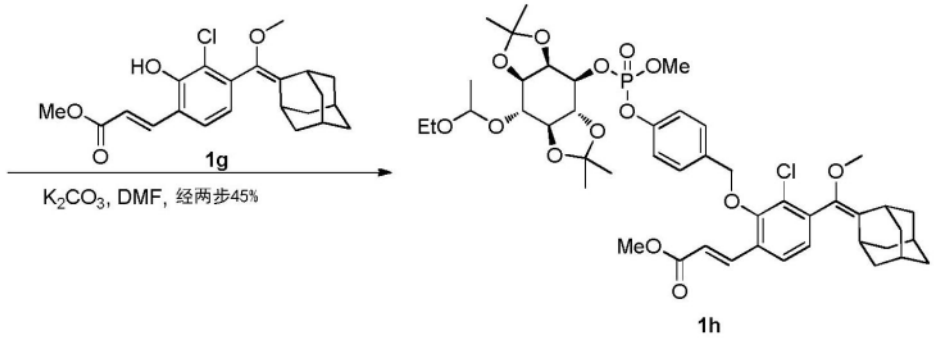
1d 1e

[0382] 将化合物1e(95mg,0.18mmol,1eq)溶解于MeOH和几滴DCM中。缓慢地添加$NaBH_4$(14mg,0.36mmol,2eq)。通过TLC(60:40EtOAc:Hex)来监测反应。完成后,将反应混合物用DCM稀释,并且用盐水洗涤。将水相用DCM再洗涤两次。将有机层合并、经Na_2SO_4干燥、过滤,并

且在减压下将溶剂蒸发以得到作为灰白色粉末的化合物1e(75mg,产率80%)。MS(ES+):$C_{24}H_{37}ClO_{11}P$的m/z计算值:532.21;发现:555.3[M+Na]$^+$。



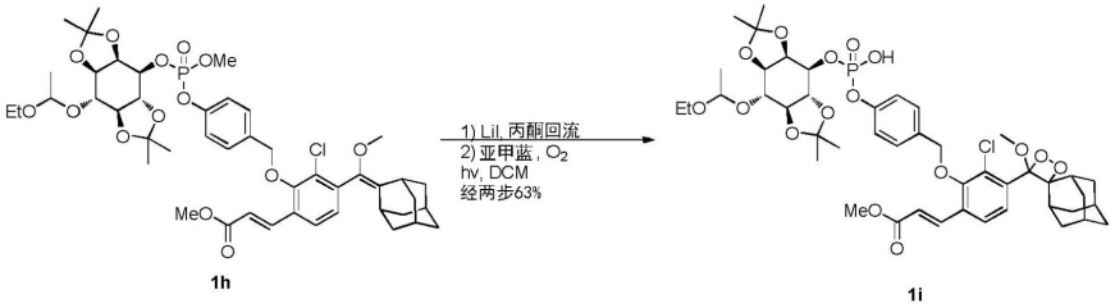
[0383]



1h

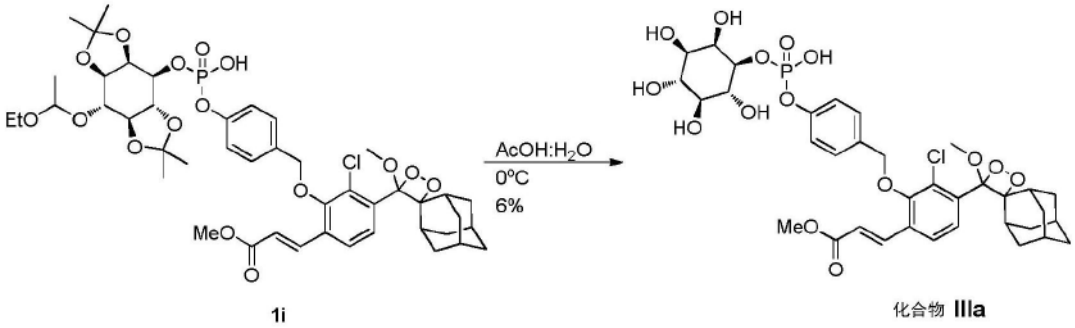
[0384] 将化合物1e(305mg,0.57mmol,1eq)溶解于DCM中。滴加甲磺酰氯(54μl,0.68mmol,1.2eq)和三甲胺(97μl,0.68mmol,1.2eq)。通过TLC(30:70EtOAc:Hex)来监测反应。完成后,将反应混合物用DCM稀释,并且用饱和$NaHCO_3$洗涤。将有机层分离、经Na_2SO_4干燥、过滤,并且在减压下将溶剂蒸发,以产生化合物1f,使用化合物1f而无需进一步纯化。MS(ES+):$C_{25}H_{39}ClO_{13}PS$的m/z计算值:610.18;发现:633.26[M+Na]$^+$。将化合物1f和化合物1g(按照Green,O.,Eilon,T.,Hananya,N.,Gutkin,S.,Bauer,CR.,Shabat,D.,ACS Central Sci.,2017,4,349-58来制备)(288mg,0.74mmol,1.3eq)溶解于干燥的DMF中并且添加K_2CO_3(197mg,1.43mmol,2.5eq)。通过TLC(30:70EtOAc:Hex)和RP-HPLC(在水中的70-100%ACN,20min)来监测反应。完成后,在减压下将溶剂除去。将粗产物通过在硅胶上的柱色谱(75:25EtOAc:Hex)来纯化以得到作为白色泡沫的化合物1h(231mg,经两步后产率为45%)。MS(ES+):$C_{46}H_{60}ClO_{14}P$的m/z计算值:902.34;发现:925.60[M+Na]$^+$。

[0385]



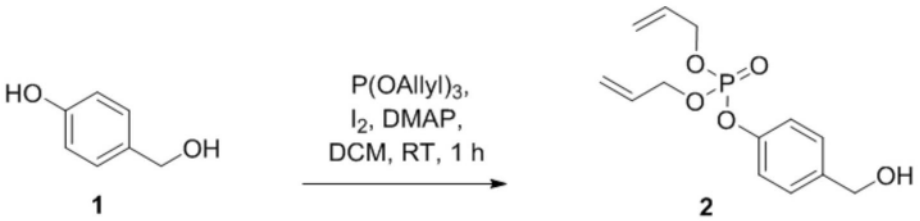
[0386] 将化合物1h(20mg,0.022mmol,1eq)溶解于丙酮中并且添加碘化锂(6mg,0.044mmol,2eq)。将反应加热至回流并且通过RP-HPLC(10-60%ACN,碳酸铵15mM缓冲液,20min)来监测。将溶剂除去并且将粗品溶解于DCM。添加几毫克亚甲蓝,并且在用黄光照射的同时,将氧气鼓泡通过溶液。通过RP-HPLC(15-70%ACN,碳酸铵15mM缓冲液,20min)来监测反应。完成后,将反应混合物通过减压蒸发来浓缩。将粗产物通过制备型RP-HPLC(15-

70％ACN,碳酸铵15mM缓冲液,20min)来纯化以得到作为灰白色固体的化合物1i(13mg,经两步后的产率为63％)。MS(ES-):$C_{45}H_{58}ClO_{16}P$的m/z计算值:920.32;发现:919.67[M-H]$^-$。

[0387] 

[0388] 将化合物1i(13mg,0.041mmol)添加至冷却的(0℃)AcOH:H_2O(1:4)并且将所得悬浮液在0℃下搅拌。在24小时之后,通过用乙醇蒸发来除去溶剂。将粗产物通过制备型RP-HPLC(15-70％ACN,碳酸铵15mM缓冲液,20min)来纯化以得到作为灰白色固体的化合物IIIa(0.7mg,产率6％)。MS(ES-):$C_{35}H_{42}ClO_{15}P$的m/z计算值:768.19;发现:767.5[M-H]$^-$。

[0389] 合成例3:化合物IVa的合成

[0390] 

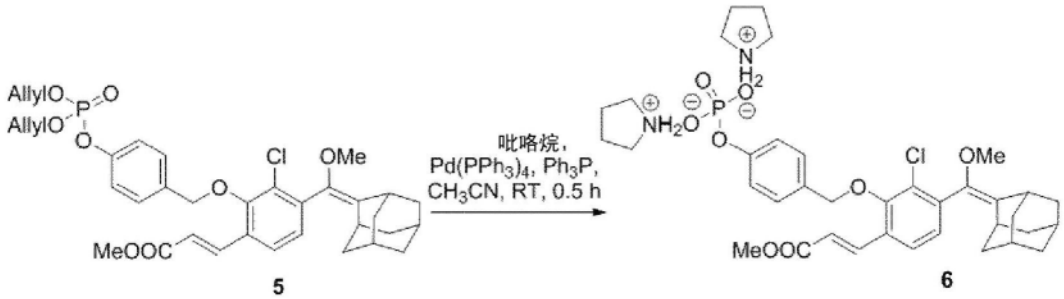
[0391] 将4-羟基苯甲醇(1)(0.0400mol,4.97mol)溶解于DCM(80ml)中并且添加DMAP(2eq.,0.0800mol,9.77g)。在另外的烧瓶中,将亚磷酸三烯丙酯(2.2eq.,0.0880mol,17.8g,17.8mL)溶解于DCM(80mL)中,将混合物冷却至0℃并且分批添加碘(2eq.,0.080mol,20.3g),并且在0℃下搅拌混合物直至所有碘消失(约20min),导致形成无色溶液。将该溶液(包含鏻盐)分批添加至酯1和DMAP的溶液。将所得混合物在室温下搅拌。在1h之后向反应混合物(黄色溶液)中添加盐水(80mL),将分离的有机物干燥($MgSO_4$)并且在真空中浓缩,产生淡黄色油状物。将该残余物通过柱色谱(硅胶,洗脱液:己烷:EtOAc:2:1至1:1至2:1)来纯化,产生作为无色油状物的醇2,2.0g,18％。

[0392] 

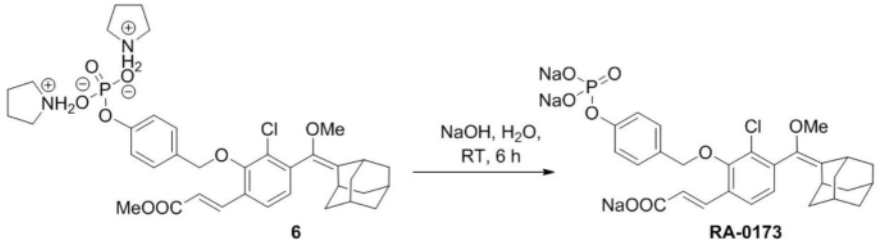
[0393] 将醇2(2.00g,0.00700mol)在DCM(100mL)中的溶液冷却至0℃。添加NBS(2eq.,0.014mol,2.5g)和Ph_3P(2eq.,0.014mol,3.67g)(淡黄色溶液)。在0.5h之后,将混合物(淡黄色溶液)在真空中浓缩,产生淡黄色油状物。将该残余物通过柱色谱(硅胶,洗脱液:己烷:Et_2O:1:1至1:2)来纯化,得到作为淡黄色油状物的溴化物3,1.2g,49％。

[0394] 

[0395] 将酯4(1.34g,0.00345mol)在DMF(9mL)中的溶液(无色溶液)冷却至0℃(黄色悬浮液),添加K_2CO_3(1.2eq.,0.00413mol,0.57g)并且将混合物在0℃下搅拌。在10min之后,添加溴化物3(1eq.,0.00345mol,1.20g)在DMF(8mL)中的溶液,并且将所得混合物(橙黄色悬浮液)在室温下搅拌。在3h之后,向混合物中添加NH_4Cl(50mL)并且将所得混合物用EtOAc(3次,20mL)萃取,将合并的有机物干燥($MgSO_4$)并且在真空中浓缩,产生淡黄色油状物(3.8g)。将该残余物通过柱色谱(硅胶,洗脱液:Et_2O:己烷1:1至Et_2O)来纯化,得到作为淡黄色油状物的酯5,1.9g,84%;^1H NMR(300MHz,$CDCl_3$)δppm 1.60-2.03(m,12H)2.12(br s,1H)3.33(br s,1H)3.37(s,3H)3.86(s,3H)4.70(ddq,J=8.5,5.7,1.3,Hz,4H)5.02(m,2H)5.28-5.47(m,4H)5.93-6.06(m,2H)6.51(d,J=16.2Hz,1H)7.13(dd,J=8.1,0.5Hz,1H)7.27-7.31(m,2H)7.49(d,J=8.1Hz,1H)7.53(d,J=8.3Hz,2H)7.98(d,J=16.2Hz,1H)。

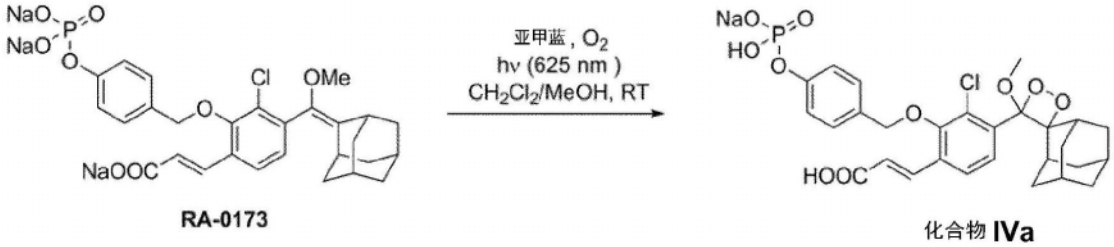
[0396] 

[0397] 向酯5(1.9g,0.0029mol)在CH_3CN(29mL)中的溶液添加吡咯烷(6.2eq.,0.0018mol,1.28g,1.5mL)、Ph_3P(0.20eq.,0.00059mol,0.15g)和$Pd(PPh_3)_4$(0.05eq.,0.000145mol,0.168g)并且将所得混合物在室温下搅拌。在0.5h之后,将反应混合物在真空中浓缩,产生淡黄色油状物。取含有酯6的粗制混合物用于下一步骤(Me-酯水解)而无需进一步纯化。

[0398] 

[0399] 将水(28mL)和NaOH(3eq.,0.0087,0.35g)添加至酯6(0.0029mol,来自上一步的理论摩尔数),将混合物用Et_2O(2次,30mL)萃取,将合并的有机物弃去并且将水层(浑浊的黄色溶液)在室温下搅拌。在6h之后,将反应混合物(黄色溶液)用Et_2O(5mL)萃取并且将分离的水层在真空中浓缩,产生黄绿色油状物。将该残余物通过柱色谱(硅胶,洗脱液:EtOAc:MeOH:50:50至40:60)来纯化,产生RA-0173(一种灰白色固体),0.81g,46%。

[0400] ^{1}H NMR(300MHz,D_2O)δppm 1.53-1.95(m,13H)3.05(br s,1H)3.25(br s,3H)4.98(br s,2H)6.44(br d,J＝16.0Hz,1H)7.10(br d,J＝7.8Hz,3H)7.37(br d,J＝8.0Hz,2H)7.45-7.63(m,2H)。

[0401] 

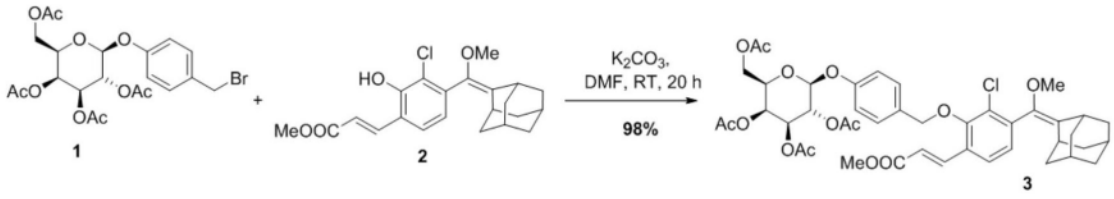
RA-0173 化合物 IVa

[0402] 向RA-0173(0.1g,0.00016mol)在DCM(30mL)和MeOH(30mL)中的溶液中添加亚甲蓝三水合物(0.04eq.,0.0065mmol,2.4mg),并且将所得混合物通过注射器式过滤器(25mm,0.45μm)来过滤。用LED灯(Peschl Ultraviolet,100W,625nm)以均相流(homogeneous flow)(0.9-1.1mL min^{-1})照射溶液并且将氧气压力设定为1.0bar。将反应混合物收集在250mL烧瓶中并且借助将氮气鼓泡通过溶液来连续脱气。在60分钟之后,使流动停止并且将反应混合物用EtOAc(20mL)稀释,通过二氧化硅塞过滤,并且用MeOH/EtOAc 9:1(120mL)洗涤。将第一滤液弃去,同时在不加热的情况下将MeOH/EtOAc滤液减压浓缩。获得作为灰白色固体的化合物IVa,91mg,93%。

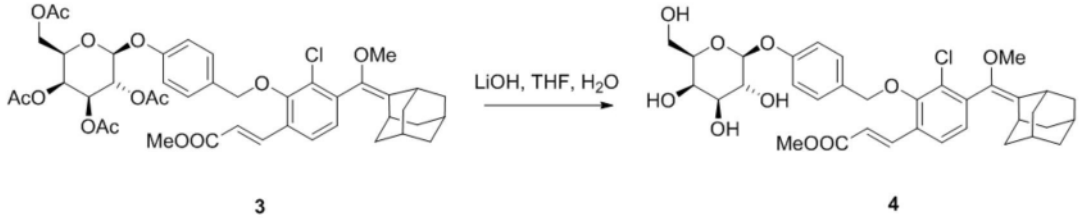
[0403] 可以通过本领域技术人员已知的手段例如离子交换用氢来交换钠原子以产生“OH”基团。

[0404] ^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δppm 1.40(br.s.,2H)1.52(d,J＝10.8Hz,1H)1.62-1.89(m,7H)2.00(br.s.,2H)2.40(d,J＝12.5Hz,1H)2.96(br.s.,1H)3.18(s,3H)6.58(d,J＝16.1Hz,1H)7.24(d,J＝7.8Hz,2H)7.40(d,J＝8.4Hz,2H)7.72(d,J＝8.3Hz,1H)7.78(d,J＝15.9Hz,1H)7.84(d,J＝8.4Hz,1H)。[注解:在CD_3OD中,苄基的2H峰隐藏在H_2O峰下方]

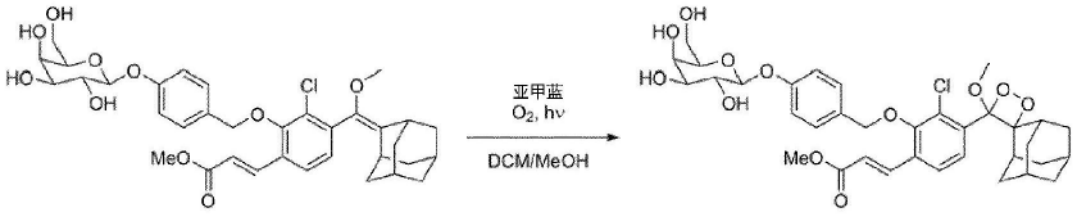
[0405] 合成例4:化合物Va的合成

[0406] 

[0407] 将酯2(0.00644mol,2.51g)溶解于DMF(50mL)中并且将所得混合物冷却至0℃。在0℃下添加K_2CO_3(1.2eq.,0.00773mol,1.07g)并且将混合物在0℃下搅拌。在10min之后,添加溴化物1(1.2eq.,0.00773mol,4.00g)在DMF(14mL)中的溶液,并且将所得混合物在室温下搅拌。在20h之后,向混合物中添加NH_4Cl的饱和溶液(200mL)并且将所得混合物用Et_2O(3次,60mL)萃取。将合并的有机物用盐水(60mL)洗涤、干燥($MgSO_4$)并且在真空中浓缩,产生淡黄色油状物。将该残余物通过柱色谱来纯化,产生作为白色固体的酯3(5.2g,98%)。

[0408] 

[0409] 将酯3(0.00300mol,2.48g)溶解于THF(60mL)和H_2O(15mL)的混合物中并且添加LiOH(3.9eq.,0.0117mol,0.280g)。将所得混合物在室温下搅拌。在24h之后,向混合物中添加饱和NH_4Cl(80mL)并且将混合物用EtOAc(3次,60mL)萃取。将合并的有机物用盐水(60mL)洗涤、干燥($MgSO_4$)并且在真空中浓缩,产生淡黄色油状物。将该残余物通过柱色谱(洗脱液:EtOAc至EtOAc-MeOH 8:1)来纯化,得到作为灰白色固体的酯4(1.33g,70%)。

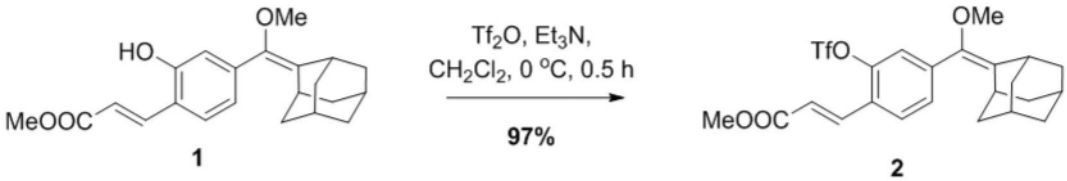
[0410] 

4 化合物 Va

[0411] 将4(50mg,0.076mmol)和亚甲蓝(1.2mg,3.2mmol)溶解于DCM/MeOH混合物(30mL,5:1)中,并且使溶液通过注射器式过滤器(0.45mm)。将澄清的溶液用MPLC泵(Labomatic MD 80/100)泵入至气-液混合室(gas-liquid mixing cell)(Peschl Ultraviolet)中并且与氧气(1.0bar)混合。然后在室温下用LED灯(625nm,novaLIGHT FLED 100-625,Peschl Ultraviolet)以连续流照射氧饱和溶液。将混合物收集在250mL圆底烧瓶中并且用氮气连续吹扫溶液。将获得的反应混合物用20mL EtOAc稀释、通过二氧化硅短垫(short pad)过滤并且用EtOAc/MeOH(120mL,9:1)洗涤。将滤液在室温下在避光下浓缩,并且将获得的固体残余物与Et_2O一起研磨。分离作为灰白色固体的产物化合物Va(32mg,0.046mmol,61%)。

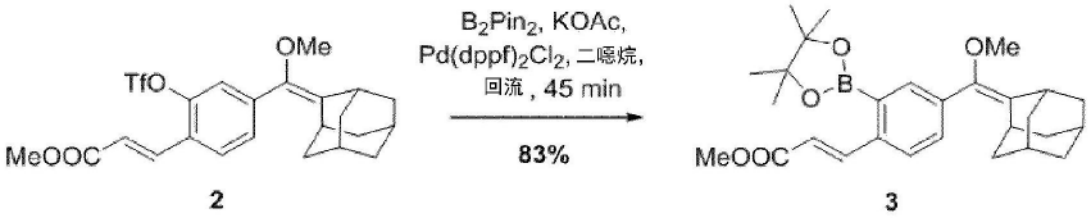
[0412] ^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$)ppm 1.29-1.39(m,3H),1.46(d,J=13.1Hz,1H),1.57-2.1(m,12H),2.32(d,J=13.1Hz,1H),3.02(br.s,1H),3.21(s,3H),3.68(br.s,1H),3.72-3.80(m,4H),3.83-4.07(m,3H),4.13(br.s,1H),4.80-4.91(m,2H),4.93(d,J=7.5Hz,1H),6.36(dd,J=16.2,5.2Hz,1H),7.02(d,J=8.7,2H),7.32(d,J=6.4Hz,2H),7.52(dd,J=7.9,3.4Hz,1H),7.74(dd,J=16.1,5.4Hz,1H),7.89(d,J=8.5Hz,1H)。

[0413] 合成例5:化合物VIa的合成

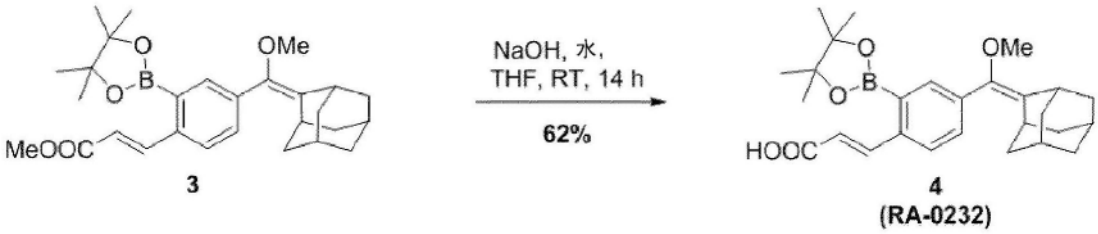
[0414] 

1 2

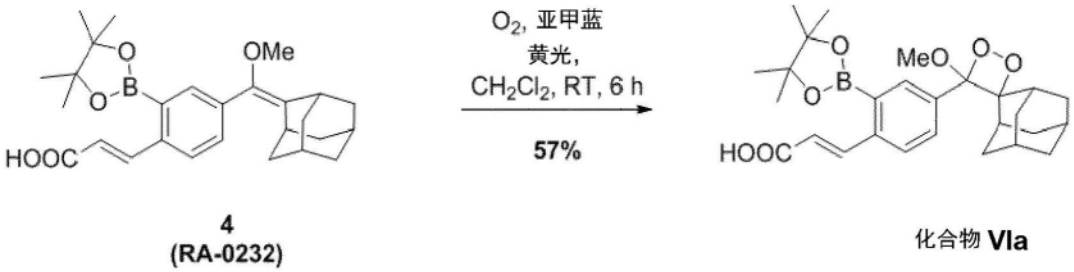
[0415] 将酚1(0.00100mol,3.54g)在DCM(40mL)中的溶液冷却至0℃,并且在氩气下添加Tf_2O(1.2eq.,0.0012mol,3.4g,2.0mL),然后滴加Et_3N(2.5eq.,0.0025mol,2.5g,3.5mL)。将所得混合物在0℃下搅拌。在30min之后,向反应混合物中添加盐水(50mL),将分离的水层用DCM(60mL)萃取,将合并的有机物干燥($MgSO_4$)并且在真空中浓缩,产生棕色油状物。将混合物通过柱色谱(己烷至己烷:EtOAc(9:1))来纯化,得到作为无色油状物的三氟甲磺酸酯2(5.05g,97%)。

[0416] 

[0417] 将三氟甲磺酸酯2(0.00925mol,4.50g)、B_2Pin_2(2eq.,0.0185mol,4.96g)、KOAc(3eq.,0.0278mol,2.72g)和$Pd(dppf)_2Cl_2$(0.2eq.,0.00185mol,1.35g)置于圆底烧瓶中,将内容物置于氩气(2个真空-氩气循环)下并且添加干燥的二噁烷(40mL)。将所得混合物脱气(2个真空-氩气循环)并且在氩气下回流搅拌。在45min之后,将反应混合物(深棕色混合物)在真空中浓缩。将该混合物通过柱色谱来纯化,得到作为灰白色固体的硼酸酯3(3.83g,83%)。

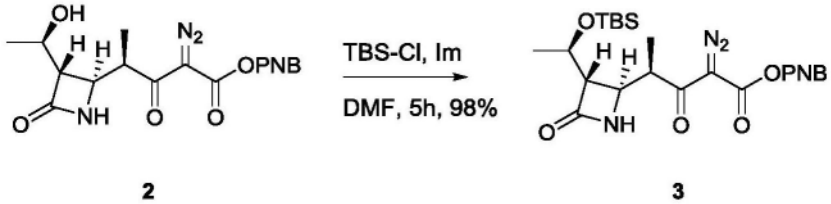
[0418] 

[0419] 向硼酸酯3(0.00500mol,2.30g)和THF(20mL)的混合物中添加水(5mL)和NaOH(3eq.,0.0150mol,0.600g),并且将所得混合物在40℃下搅拌。在14h之后,向混合物中添加0.5M HCl(200ml)并且将混合物用EtOAc(3次,50ml)萃取。将合并的有机物用盐水(50mL)洗涤、干燥($MgSO_4$)并且在真空中浓缩,产生淡黄色油状物。将该残余物通过柱色谱来纯化,得到作为白色固体的酸4(RA-0232),1.4g,62%。

[0420] 

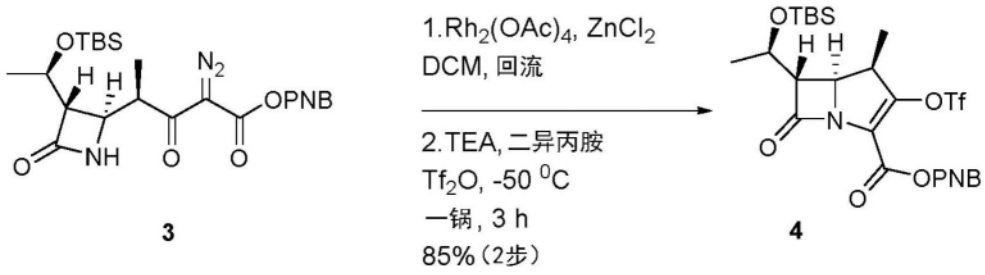
[0421] 向酸4(0.00019mol,0.085g)在DCM(18mL)中的溶液中添加亚甲蓝(9mg),将反应烧瓶用橡胶隔片来密封并且连接填充有氧气的气球(深蓝色溶液)。用黄光(589nm)照射所得混合物。在6h之后,将反应混合物在真空中浓缩,产生蓝色油状物。将该残余物通过柱色谱来纯化,产生作为淡黄色固体的化合物VIa,0.052g,57%。

[0422] 合成例6:化合物VIIa的合成

[0423] 

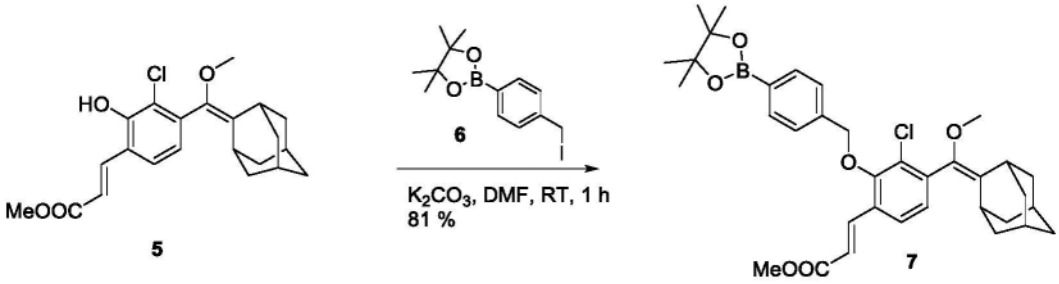
[0424] 4-((2R,3S)-3-((R)-1-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)-4-氧代氮杂环丁-2-基)-2-重氮-3-氧代戊酸(R)-4-硝基苄酯(3)

[0425] 在氩气氛下,向商购可得的美罗培南中间体2(2.6g,6.8mmol)在无水DMF(15mL)中的溶液中添加TBDMSCl(4.0g,27.1mmol)和咪唑(2.8g,40.8mmol)。将所得混合物在室温下搅拌5h。在用乙酸乙酯(50mL)稀释之后,将溶液用水(20mL×3)洗涤并且随后用盐水(20mL×1)洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥并且浓缩。将残余物通过在硅胶柱上的色谱来纯化以得到作为白色固体的标题化合物3(3.3g,98%)。MS(ES$^+$):$C_{23}H_{32}N_4NaO_7Si[M+Na]^+$的计算的m/z:527.2,发现:527.4。

[0426] 

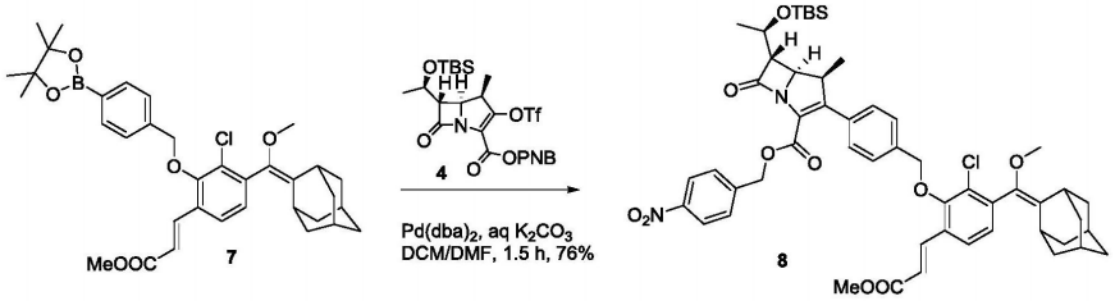
[0427] (4R,5R,6S)-4-硝基苄基-6-((R)-1-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)-4-甲基-7-氧代-3-(((三氟甲基)磺酰基)氧基)-1-氮杂双环[3.2.0]庚-2-烯-2-羧酸酯(4)

[0428] 在氩气下,向圆底烧瓶中添加$ZnCl_2$(无水,20mg,0.15mmol)、化合物3(2.4g,4.8mmol)、$Rh_2(OAc)_4$(21.5mg,0.05mmol)和CH_2Cl_2(无水,15ml),然后加热至回流90min直至化合物3消失(通过TLC来监测)。将所得混合物冷却至-50℃,并且滴加三乙胺(235μl,1.7mmol)和二异丙胺(680μl,4.8mmol)的混合物,然后缓慢添加Tf_2O(850μl,5.0mmol)。将悬浮液在-50℃下搅拌60min并且通过在短硅胶柱上的色谱、使用二氯甲烷作为洗脱液来纯化,以得到期望的作为白色固体的化合物4(2.5g,85%)。MS(ES+):$C_{24}H_{32}F_3N_2O_9SSi[M+Na]^+$的计算的m/z:609.1,发现:609.4。

[0429] 

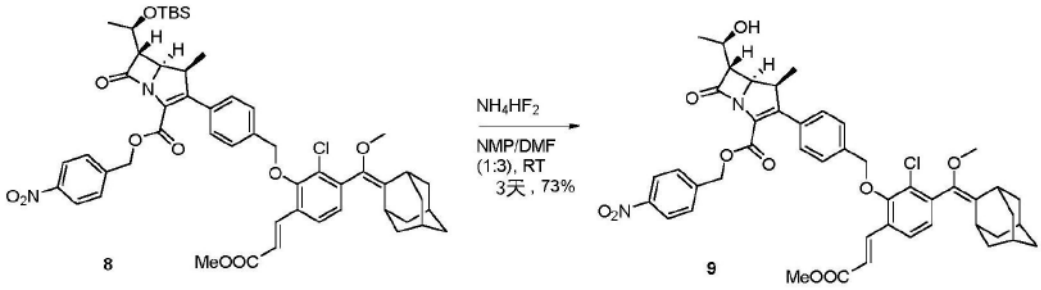
[0430] (E)-3-(4-(((1r,3r,5R,7S)-金刚烷-2-叉基)(甲氧基)甲基)-3-氯-2-((4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)苄基)氧基)苯基)丙烯酸甲酯(7)

[0431] 将烯醇醚5(按照Green,O.,Eilon,T.,Hananya,N.,Gutkin,S.,Bauer,CR.,Shabat,D.,ACS Central Sci.,2017,4,349-58来制备)(500mg,1.3mmol)溶解于3mL干燥的DMF中并且冷却至0℃。在添加化合物6(参见,Karton-Lifshin N.,Albertazzi L.,Bendikov M.,Baran PS.,Shabat D.,J Am Chem Soc.,2012,134(50),20412-20)(536.6mg,1.6mmol)之前,添加K_2CO_3(195mg,1.4mmol)并且将溶液在0℃下搅拌10分钟。将反应混合物在室温下搅拌30分钟并且通过TLC来监测。完成后,将反应混合物用EtOAc(30ml)稀释并且用饱和NH_4Cl(10ml)洗涤。将有机层分离、用盐水洗涤、经Na_2SO_4干燥并且在减压下蒸发。将粗产物通过在硅胶上的柱色谱来纯化以得到作为白色固体的标题化合物7(661mg,81%)。MS(ES+):$C_{35}H_{42}BClNaO_6[M+Na]^+$的计算的m/z:627.2,发现:627.5。

[0432] 

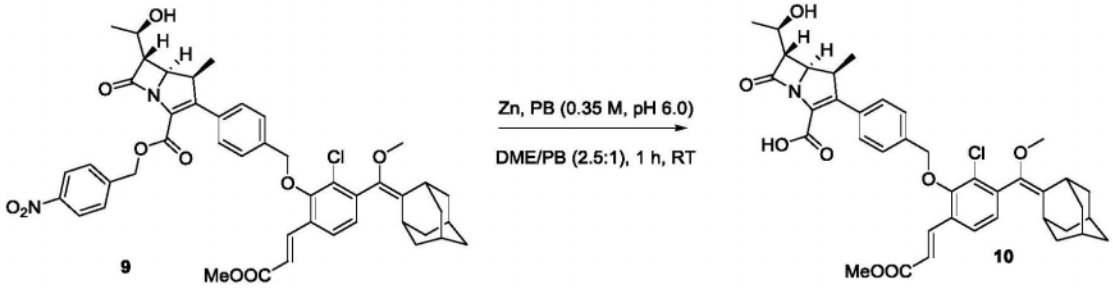
[0433] (4S,5R,6S)-3-(4-((3-(((1r,3r,5R,7S)-金刚烷-2-叉基)(甲氧基)甲基)-2-氯-6-((E)-3-甲氧基-3-氧代丙-1-烯-1-基)苯氧基)甲基)苯基)-6-((R)-1-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)乙基)-4-甲基-7-氧代-1-氮杂双环[3.2.0]庚-2-烯-2-羧酸-4-硝基苄酯(8)

[0434] 向频哪醇硼酸酯7(304mg,0.50mmol)和三氟甲磺酸乙烯酯4(304mg,0.50mmol)在CH_2Cl_2(2mL)和DMF(1.1mL)的混合物中的溶液中添加Pd(dba)$_2$(14mg,0.02mmol)和3M K_2CO_3水溶液(0.5mL,1.5mmol)。将混合物在37℃下搅拌2.5h并且通过TLC来监测。完成后,将反应混合物用EtOAc(20ml)稀释并且用饱和NH_4Cl(10ml)洗涤。将有机层分离、用盐水洗涤、经Na_2SO_4干燥并且在减压下蒸发。将粗产物通过在硅胶上的柱色谱来纯化以得到标题化合物8(358mg,76%)。MS(ES+):$C_{52}H_{62}ClN_2O_{10}Si[M+Na]^+$的计算的m/z:937.4,发现:937.8。

[0435] 

[0436] (4S,5R,6S)-3-(4-((3-(((1r,3r,5R,7S)-金刚烷-2-叉基)(甲氧基)甲基)-2-氯-6-((E)-3-甲氧基-3-氧代丙-1-烯-1-基)苯氧基)甲基)苯基)-6-((R)-1-羟基乙基)-4-甲基-7-氧代-1-氮杂双环[3.2.0]庚-2-烯-2-羧酸-4-硝基苄酯(9)

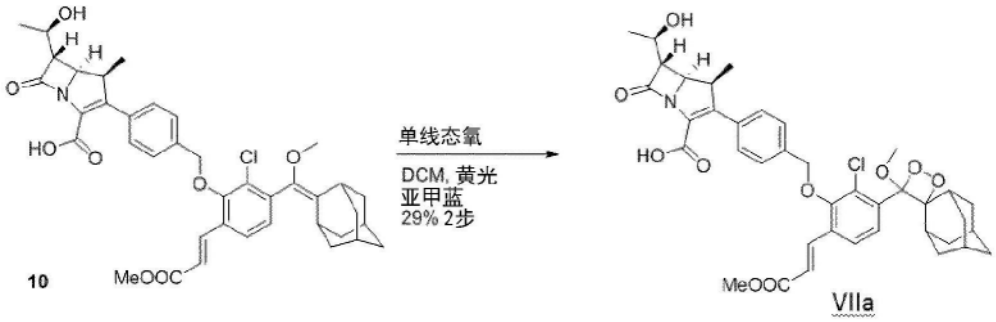
[0437] 在室温下,向8(350mg,0.4mmol)在N-甲基吡咯烷酮/DMF(1:3,0.7ml)中的溶液中添加二氟化氢铵(150mg,2.8mmol),并且将所得反应混合物在室温下搅拌72h(通过TLC来监测)。然后将反应用乙酸乙酯(40mL)稀释并且用水和盐水洗涤。在经Na_2SO_4干燥和在减压浓缩之后,将残余物通过在硅胶柱上的色谱来纯化以得到标题化合物9(290.6mg,73%)。MS(ES+):$C_{46}H_{48}ClN_2O_{10}[M+Na]^+$的计算的m/z:823.4,发现:823.6。

[0438] 

[0439] (4S,5R,6S)-3-(4-((3-(((1r,3r,5R,7S)-金刚烷-2-叉基)(甲氧基)甲基)-2-氯-

6-((E)-3-甲氧基-3-氧代丙-1-烯-1-基)苯氧基)甲基)苯基)-6-((R)-1-羟基乙基)-4-甲基-7-氧代-1-氮杂双环[3.2.0]庚-2-烯-2-羧酸(10)

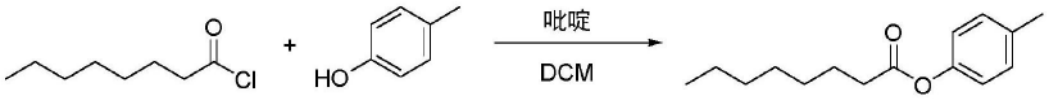
[0440] 在20℃下,向化合物7(20mg,0.02mmol)在0.5mL DME的溶液中添加0.2mL磷酸盐缓冲液(0.35M,pH 6.0)和活化的锌粉。然后将反应混合物在相同的温度下搅拌1h。用0.22μM PTFE注射器式过滤器将沉淀物除去并且使用制备型RP-HPLC、使用CH_3CN-H_2O(30mmol NH_4HCO_3缓冲的水,CH_3CN包含30%缓冲的水)作为流动相来纯化滤液。MS(ES+):$C_{39}H_{42}ClNNaO_8$ $[M+Na]^+$的计算的m/z:710.2,发现:710.5。

[0441] 

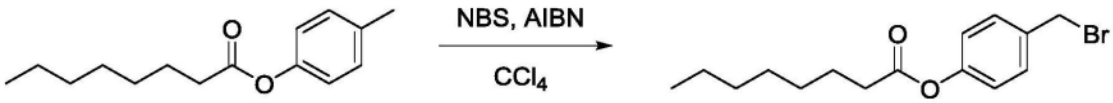
[0442] (4S,5R,6S)-3-(4-((2-氯-6-((E)-3-甲氧基-3-氧代丙-1-烯-1-基)-3-((1r,3r,5S,7S)-4'-甲氧基螺[金刚烷-2,3'-[1,2]二氧杂环丁烷]-4'-基)苯氧基)甲基)苯基)-6-((R)-1-羟基乙基)-4-甲基-7-氧代-1-氮杂双环[3.2.0]庚-2-烯-2-羧酸(1)

[0443] 将烯醇醚10和几毫克亚甲蓝溶解于15mL DCM中。在用黄光照射20分钟的同时,将氧气鼓泡通过溶液。通过RP-HPLC来监测反应。完成后,将反应混合物通过减压蒸发来浓缩。通过制备型RP-HPLC、使用CH_3CN-H_2O(30mmol NH_4HCO_3缓冲的水,CH_3CN包含30%缓冲的水)作为流动相来纯化粗产物,以得到作为白色固体的化合物VIIa(3mg,30%)。MS(ES+):$C_{39}H_{42}ClNNaO_{10}$ $[M+Na]^+$的计算的m/z:742.2,发现:742.5。

[0444] 合成例7:D-荧光素-间隔基团-辛酸酯的合成

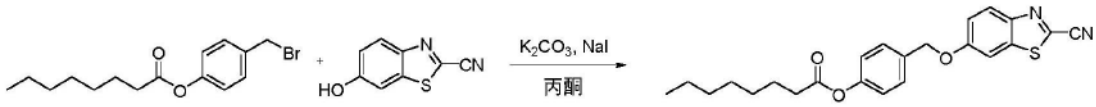
[0445] 

[0446] 向500ml三颈烧瓶中加入10g对甲酚(92.5mmol/1eq.),然后加入干燥的DCM(200mL)。使混合物在冰水冷却浴中冷却。向该溶液中添加吡啶(10.24g/12.9mmol/1.4eq.)。在保持反应混合物的温度低于12℃的情况下,从滴液漏斗滴加辛酰氯(18g/110.7mmol/1.2eq.)(溶解于50mL干燥的DCM中)。在15分钟之后,将冷却浴移除并且在环境温度下搅拌混合物。反应在50分钟后完成(通过TLC(石油醚/AcOEt=2/1)来控制)。将反应混合物用200mL水洗涤,然后用2×200mL 0.2M NaOH溶液洗涤。将有机相经Na_2SO_4干燥、过滤并且在旋转蒸发仪上浓缩。将残余物(约23g)在用DCM洗脱的硅胶短塞(h=45mm,d=100mm)上纯化。将无色的果味油状物形式的产物(20.9g/产率96%)用于下一合成步骤而无需进一步纯化。

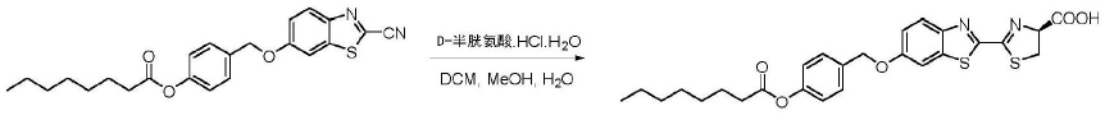
[0447] 

[0448] 向装有CCl_4(140mL)的250mL反应烧瓶中添加对甲酚-辛酸酯(20.9g/92.5mmol/1eq.),然后添加NBS(19.84g/111.5mmol/1.25eq.)。将悬浮液在油浴(100℃)中搅拌15min。

将油浴移除并且一次性添加AIBN(915mg/5.6mmol/5mol%)。反应开始,伴有强烈的回流,在约2分钟之后,当回流更温和时,将混合物再次浸没在热的加热浴中。20min后,TLC(石油醚/AcOEt=10/1)显示完全转化。将反应混合物在冷水中冷却至15℃。在该温度下,将混合物通过S3 fritt过滤,用10mL DCM洗涤,并且将滤液在真空中浓缩。将粗制产物(27.7g/产率99%)用于下一合成步骤而无需纯化。

[0449] 

[0450] 将4-溴甲基-苯基-辛酸酯(27.7g/88mmol/1.2eq.)和2-氰基-6-羟基-苯并噻唑(13.07g/7mmol/1eq)溶解在干燥的丙酮(120mL)中并且在加热油浴(80℃)中搅拌。一次性添加K_2CO_3(25.6g/185.2mmol/2.5eq)和碘化钠(220mg/1.5mmol/2mol%)。反应混合物立即变为橙黄色。在回流温度下搅拌100min之后,TLC控制(石油醚/AcOEt=2/1)显示完全转化。将反应混合物缓慢地冷却,通过S3 fritt过滤,用30mL丙酮洗涤并且在真空中浓缩。将残余物溶解于200mL中并且用100mL H_2O和盐水洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥、通过S3 fritt过滤并且在真空中浓缩。使残余物从MTBE中结晶,然后从EtOH中结晶。分离作为白色粉末的产物(13.3g/产率37%)。

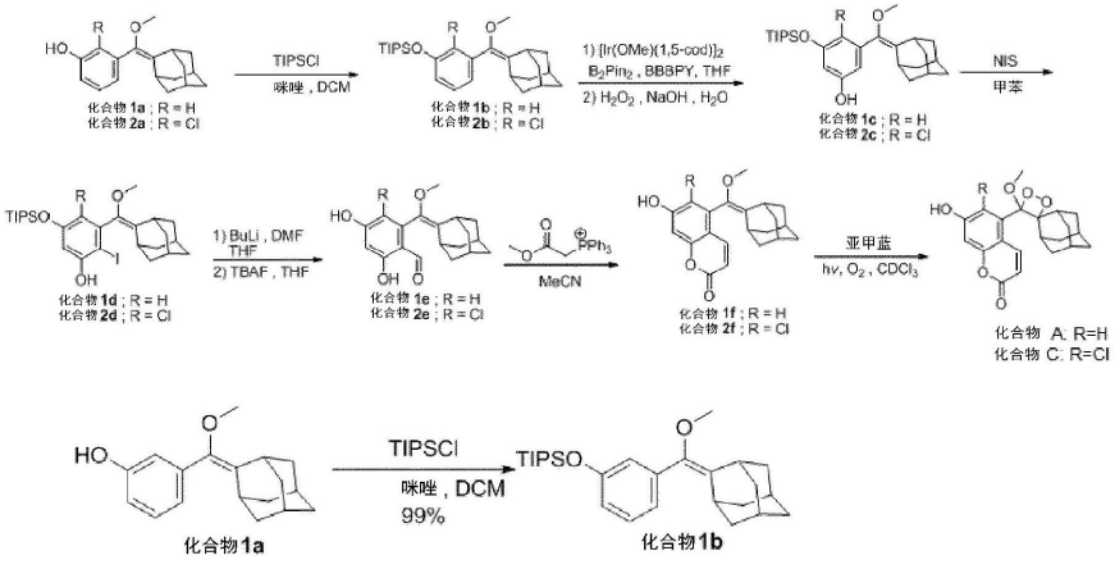
[0451] 

[0452] 将1.3g起始物料(1.3g/3.18mmol/1eq)溶解于DCM(30mL)和MeOH(30mL)的混合物中。在将固体溶解之后,添加10mL水。将获得的溶液用氩气鼓泡15分钟。添加半胱氨酸盐酸盐一水合物(592mg/3.37mmol/1.06eq)并且使其在约3min内溶解。将K_2CO_3(474mg/3.43mmol/1.06eq)溶解于5mL脱矿物质水(demi water)中并且用氩气鼓泡15分钟。将K_2CO_3的溶液一次性添加至苯并噻唑衍生物的溶液中。所得浅黄色溶液变浑浊。在氩气下、在室温下搅拌混合物。90分钟后,TLC(石油醚/AcOEt=2/1)控制显示起始物料的完全转化。将反应混合物在旋转蒸发仪上部分蒸发直至形成一些浅黄色固体。使用1MHCl来将所得混合物的pH设定为1-2。向残余物中添加水(200mL)并且将所得溶液用DCM(3×150mL)萃取。将有机层经Na_2SO_4干燥、通过S3 fritt过滤并且在真空中浓缩。使所得黄色无定形固体从EtOH中结晶。分离浅黄色粉末形式的结晶产物(1.16g/产率71%)。

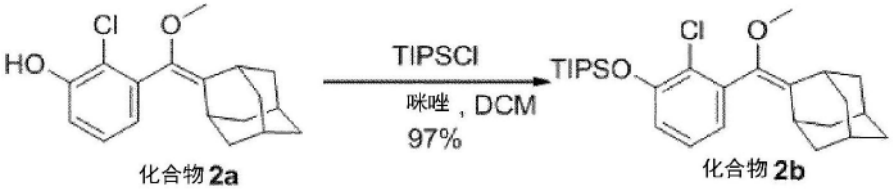
[0453] 通过分别选择起始物料根据如以上阐述的过程来合成本文中公开的其它化合物。

[0454] 合成例8:用于实施例13的化合物A和C的合成

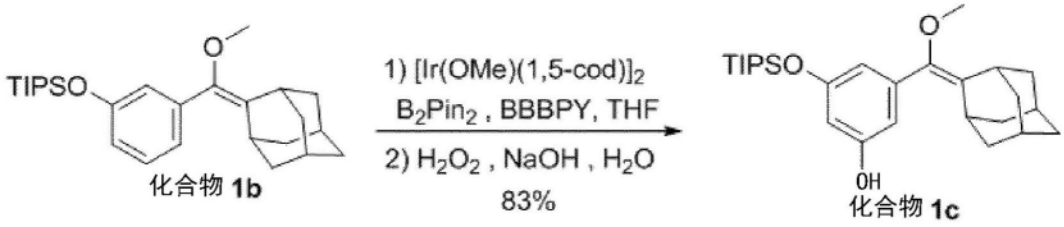
[0455] 通用合成方案

[0456] 

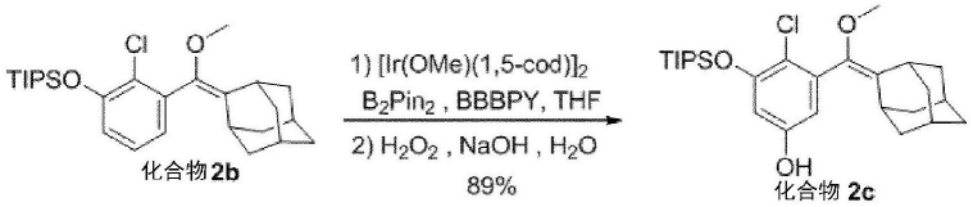
[0457] 将化合物1a(根据Green,O.;Eilon,T.;Hananya,N.;Gutkin,S.;Bauer,C.R.;Shabat,D.ACS Cent.Sci.2017,3,349来合成)(2.0g,7.4mmol)和咪唑(756mg,11.1mmol)溶解于20mL DCM中。添加三异丙基氯硅烷(1.7mL,8.1mmol)并且在室温下搅拌溶液。通过TLC来监测反应。完成后,将白色沉淀物滤除并且在减压下将溶剂蒸发。通过柱色谱(Hex:EtOAc 95:5)的纯化得到3.1g(产率99%)的无色油状物。

[0458] 

[0459] 将化合物2a(根据Green,O.;Eilon,T.;Hananya,N.;Gutkin,S.;Bauer,C.R.;Shabat,D.ACS Cent.Sci.2017,3,349来合成)(2.0g,6.6mmol)和咪唑(671mg,9.7mmol)溶解于20mL DCM中。添加三异丙基氯硅烷(1.5mL,7.2mmol)并且在室温下搅拌溶液。通过TLC来监测反应。完成后,将白色沉淀物滤除并且在减压下将溶剂蒸发。通过柱色谱(Hex:EtOAc 95:5)的纯化得到2.9g(产率97%)的无色油状物。

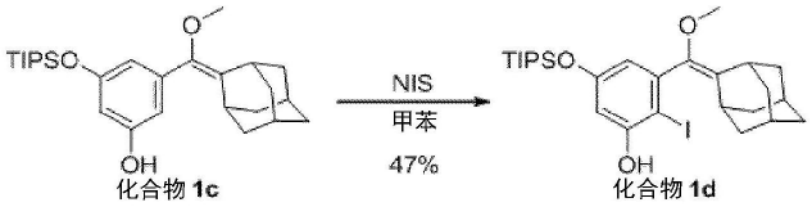
[0460] 

[0461] 将化合物1b(2.00g,4.7mmol)、双(频哪醇合)二硼(2.14g,8.44mmol)、(1,5-环辛二烯)(甲氧基)铱(I)二聚体(63mg,0.93mmol)和4,4′-二-叔丁基-2,2′-联吡啶(51mg,0.189mmol)溶解于密封管中的20mL无水THF中。将反应混合物在80℃下搅拌2小时并且监测。完成后,在减压下将溶剂蒸发。使粗产物通过硅胶柱(Hex:EtOAc 65:35)以得到1.73g(产率83%)的白色固体,其用于下一步骤而无需进一步纯化。

[0462] 

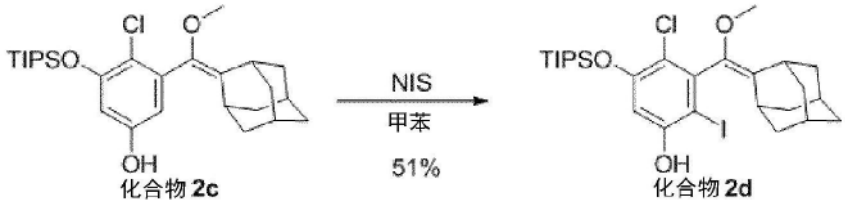
化合物2b 化合物 2c

[0463] 将化合物2b(2.00g,4.3mmol)、双(频哪醇合)二硼(1.97g,7.76mmol)、(1,5-环辛二烯)(甲氧基)铱(I)二聚体(58mg,0.856mmol)和4,4′-二-叔丁基-2,2′-联吡啶(47mg,0.173mmol)溶解于在密封管中的20mL无水THF中。将反应混合物在80℃下搅拌2小时并且监测。完成后,在减压下将溶剂蒸发。使粗产物通过硅胶柱(Hex:EtOAc 70:30)以得到1.84g(产率89%)的白色固体,其用于下一步骤而无需进一步纯化。

[0464] 

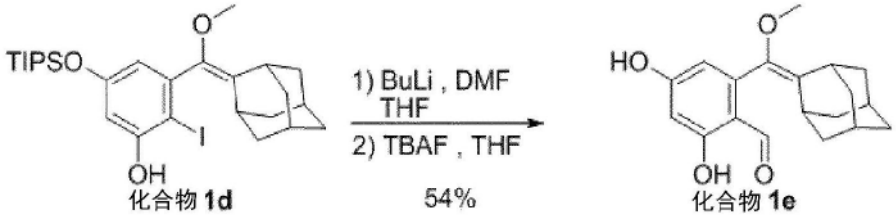
化合物 1c 化合物 1d

[0465] 将化合物1c(1.5g,3.40mmol)溶解于150mL甲苯中并且冷却至0℃。分批添加N-碘代琥珀酰亚胺(635mg,2.81mmol)。通过TLC来监测反应。完成后,在减压下将溶剂蒸发。通过柱色谱(Hex:EtOAc 90:10)的纯化得到900mg(产率47%)的白色固体。

[0466] 

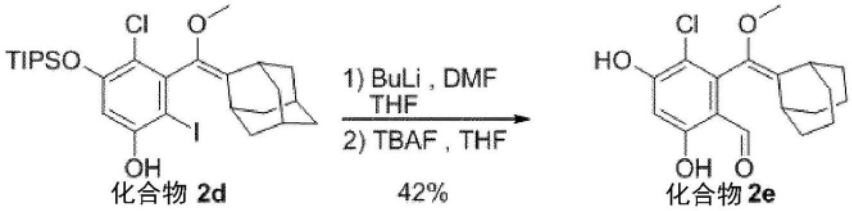
化合物 2c 化合物 2d

[0467] 将化合物2c(1.5g,3.16mmol)溶解于150mL甲苯中并且冷却至0℃。分批添加N-碘代琥珀酰亚胺(592mg,2.63mmol)。通过TLC来监测反应。完成后,在减压下将溶剂蒸发。通过柱色谱(Hex:EtOAc 90:10)的纯化得到967mg(产率51%)的白色固体。

[0468] 

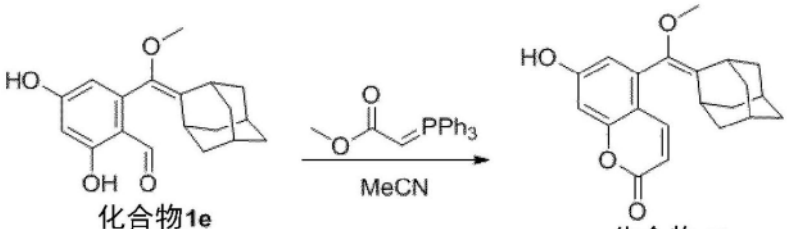
化合物 1d 化合物 1e

[0469] 在N_2气氛下,将化合物1d(900mg,1.58mmol)溶解于THF(5mL)中。将溶液冷却至-78℃并且添加n-BuLi(2.54mL,在己烷中为2.5M)。在搅拌15min之后,添加DMF(440μL)。将反应混合物在搅拌下加热至室温30min并且通过TLC来监测。完成后,添加氯化铵的饱和溶液(5mL)。将混合物用EtOAc(3×30mL)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤、经Na_2SO_4干燥并且在减压下蒸发。然后,将粗制残余物溶解于THF(10mL)中并且添加TBAF(3.2mL,在THF中为2.5M)。在完全转化后,添加氯化铵的饱和溶液(5mL)。将混合物用EtOAc(3×30mL)萃取。将合并的有机层用盐水(25mL)洗涤、经Na_2SO_4干燥并且在减压下蒸发。将产物通过柱色谱来纯化以得到269mg(产率54%)的黄色固体。

[0470] 

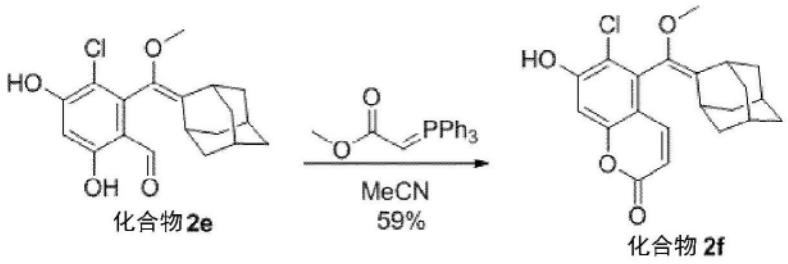
化合物 2d 化合物 2e

[0471] 在N_2气氛下,将化合物2d(900mg,1.50mmol)溶解于THF(5mL)中。将溶液冷却至-78℃并且添加n-BuLi(2.41mL,在己烷中为2.5M)。在搅拌15min之后,添加DMF(418μL)。将反应混合物在搅拌下加热至室温30min并且通过TLC来监测。完成后,添加氯化铵的饱和溶液(5mL)。将混合物用EtOAc(3×30mL)萃取。将合并的有机层用盐水(50mL)洗涤、经Na_2SO_4干燥并且在减压下蒸发。然后,将粗制残余物溶解于THF(10mL)中并且添加TBAF(3.0mL,在THF中为2.5M)。在完全转化后,添加氯化铵的饱和溶液(5mL)。将混合物用EtOAc(3×30mL)萃取。将合并的有机层用盐水(25mL)洗涤、经Na_2SO_4干燥并且在减压下蒸发。将产物通过柱色谱来纯化以得到218mg(产率42%)的黄色固体。

[0472] 

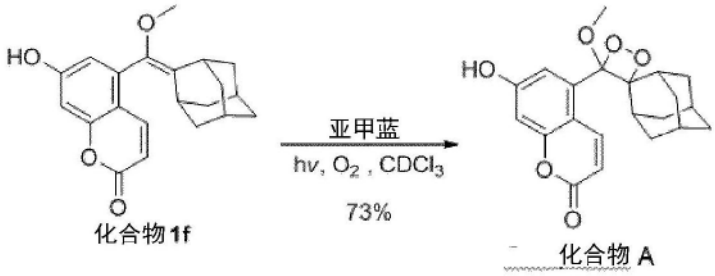
化合物1e 化合物 1f

[0473] 将化合物1e(150mg,0.48mmol)和(三苯基亚正膦基)乙酸甲酯(191mg,0.57mmol)溶解于MeCN(3mL)中,并且将混合物加热至回流,同时通过RP-HPLC(梯度为在水中的ACN,0.1%TFA)来监测。在起始物料完全消耗后,将反应混合物冷却,用EtOAc(100mL)稀释,用盐水(50ml)洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥并且在减压下蒸发。将产物通过柱色谱来纯化以得到111mg(产率69%)的黄色固体。

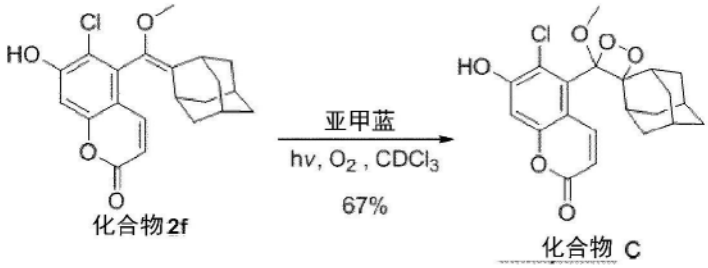
[0474] 

化合物2e 化合物 2f

[0475] 将化合物2e(150mg,0.43mmol)和(三苯基亚正膦基)乙酸甲酯(172mg,0.51mmol)溶解于MeCN(3mL)中,并且将混合物加热至回流,同时通过RP-HPLC(梯度为在水中的ACN,0.1%TFA)来监测。在起始物料完全消耗后,将反应混合物冷却,用EtOAc(100mL)稀释,用盐水(50ml)洗涤。将有机层经Na_2SO_4干燥并且在减压下蒸发。将产物通过柱色谱来纯化以得到94mg(产率59%)的黄色固体。

[0476] 

[0477] 将化合物1f(50mg,0.15mmol)和催化量的亚甲蓝溶解于20mL DCM中。然后,在用黄光照射的同时,将氧气鼓泡通过溶液。通过RP-HPLC来监测反应。完成后(10min),将溶剂减压浓缩并且将产物通过制备型RP-HPLC(梯度为在水中的ACN,0.1%TFA)来纯化。获得作为白色固体的产物(40mg,73%)。

[0478] 

[0479] 将化合物2f(50mg,0.13mmol)和催化量的亚甲蓝溶解于20mL DCM中。然后,在用黄光照射的同时,将氧气鼓泡通过溶液。通过RP-HPLC来监测反应。完成后(10min),将溶剂减压浓缩并且将产物通过制备型RP-HPLC(梯度为在水中的ACN,0.1%TFA)来纯化。获得作为白色固体的产物(36mg,67%)。

[0480] 实施例1:

[0481] 使用化合物IIa的猪肝酯酶活性的酶学分析

[0482] 将化合物IIa添加至包含10%v/v二甲亚砜的磷酸盐缓冲生理盐水(pH 7.4)中,达到最终浓度为62.5μM。将分析混合物在室温下预温育20min,然后添加1:5v/v的包含不同酶浓度的猪肝酯酶溶液,并且在室温下使用SpectraMax M5酶标仪以发光模式记录发光20min。在黑色微量滴定板中以0.25mL的总液体体积进行分析。在20min测量周期内的猪肝酯酶的浓度和最大RLU(相对光单位)值在两个数量级上显示正线性相关。图1示出该实施例的结果。

[0483] 实施例2:

[0484] 用化合物IIa检测肠道沙门氏菌

[0485] 将弗氏柠檬酸杆菌ATCC 8090(C.f.,C8E阴性)、大肠杆菌ATCC 25922(E.c.,C8E阴性)、鼠伤寒沙门氏菌(D)ATCC 14028(S.T.,肠道沙门氏菌属I型鼠伤寒(Salmonella enterica ssp.I ser.Typhimurium),C8E阳性)、肠炎沙门氏菌(D)ATCC 13076(S.E.1,肠道沙门氏菌属肠道型肠炎(Salmonella enterica ssp.enterica ser.Enteritidis),C8E阳性)和肠炎沙门氏菌RKI 05/07992(S.E.2,肠道沙门氏菌属肠道型肠炎(Salmonella enterica ssp.enterica ser.Enteritidis),C8E阳性)在营养肉汤(5g/L蛋白胨,5g/L NaCl,2g/L酵母提取物,1g/L牛肉膏,pH 7.4)中培养17h然后在无菌生理盐水(0.9% NaCl)中连续稀释。将类似细胞浓度的所有菌株用营养肉汤接种在一式三份的试管中。此外,将S.E.2细胞在无菌生理盐水中的进一步的稀释物接种在一式三份的试管中。将无菌生理盐

水添加至阴性对照管中。在37℃和150rpm下培养6h之后，将样品从培养物(0.205mL)中取出并且在白色微量滴定板中与45μL在二甲亚砜中的化合物IIa溶液混合。化合物IIa的最终浓度为10μM，二甲亚砜的最终浓度为15％v/v。用装配有发光检测系统的平板酶标仪(plate reader)来记录发光。比较了在添加化学发光底物后27-30min时间段的平均RLU(相对光单位)值(表3)。在类似的接种密度(10^5CFU/mL)下，所测试的沙门氏菌菌株显示比弗氏柠檬酸杆菌高35至60倍的发光和比大肠杆菌高65至111倍的发光。如由相对于无菌对照为2的信噪比所表明的，在6h的温育后可以检测到10CFU/mL的肠炎沙门氏菌。

[0486] 表3:在添加化合物IIa之后，肠道沙门氏菌培养物样品相比于其它细菌种类的发光

[0487]

接种密度(CFU/mL)	生物体	平均RLU (n=3)	标准误差 (%，n=3)	信噪比(相对于无菌)
10^5	*C.f.*	6480	7	12
10^5	*E.c.*	3504	11	6
10^5	*S.T.*	228202	13	283
10^5	*S.E.* 1	158262	6	408
10^5	*S.E.* 2	387911	19	693
10^4	*S.E.* 2	154011	8	275
10^3	*S.E.* 2	40236	9	72
10^2	*S.E.* 2	5100	5	9
10^1	*S.E.* 2	1041	3	2
0	无菌	560	13	1

[0488] 实施例3：

[0489] 用化合物IIIa进行PI-PLC活性的酶学分析

[0490] 将化合物IIIa添加至包含1％v/v二甲亚砜的磷酸盐缓冲生理盐水(pH 7.4)中，达到最终浓度为10μM。添加不同浓度的磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C(PI-PLC)并且在室温下记录发光(表4)。在白色微量滴定板中以0.25mL的总液体体积进行分析。在20min测量周期内的PI-PLC的浓度和最大RLU(相对光单位)值在两个数量级上显示正相关。

[0491] 表4:用化合物IIIa测量PI-PLC活性

[0492]

添加的PI-PLC(U/mL)	RLU	信噪比
$5 \cdot 10^{-1}$	60265	862
$5 \cdot 10^{-2}$	35822	512
$5 \cdot 10^{-3}$	10369	148
$5 \cdot 10^{-4}$	1191	17
不含有酶	70	1

[0493] 实施例4：

[0494] 用化合物IIIa检测单核细胞增生李斯特菌

[0495] 将单核细胞增生李斯特菌ATCC 7644(L.m.1,PI-PLC阳性)、单核细胞增生李斯特菌(4b)ATCC 19115(L.m.2,PI-PLC阳性)、无害李斯特菌(Listeria innocua)(6a)ATCC 33090(L.i.,PI-PLC阴性)和大肠杆菌ATCC 25922(E.c.,PI-PLC阴性)在M52肉汤(1.35g/L磷酸二氢钾，9.6g/L磷酸氢二钠，1.11g/L丙酮酸钠，6g/L酵母提取物，17g/L胰蛋白胨，3g/L

植物蛋白胨,5g/L氯化钠,2.5g/L葡萄糖,pH 7.3)中培养19h然后在无菌生理盐水(0.9% NaCl)中连续稀释。将类似细胞浓度的所有菌株用M52肉汤接种在一式三份的试管中。此外,将L.m.2细胞在无菌生理盐水中的进一步稀释物接种在一式三份的试管中。将无菌生理盐水添加至阴性对照管中。在37℃和150rpm下培养6h之后,将样品从培养物(0.99mL)中取出并且在白色微量滴定板中与1μL在二甲亚砜中的化合物IIIa溶液混合。化合物IIIa的最终浓度为10μM,二甲亚砜的最终浓度为1%v/v。用装配有发光检测系统的平板酶标仪来记录发光。比较了在添加化学发光底物后16-20min时间段的平均RLU(相对光单位)值(表5)。在类似的接种密度(10^5CFU/mL)下,所测试的单核细胞增生李斯特菌菌株显示比无害李斯特菌高311至361倍的发光和比大肠杆菌高1465至1702倍的发光。如由相对于无菌对照为2的信噪比所表明的,在6h的温育后可以检测到10^3CFU/mL单核细胞增生李斯特菌。

[0496] 表5:用化合物IIIa检测单核细胞增生李斯特菌

[0497]

接种密度(CFU/mL)	生物体	平均RLU (n=3)	标准误差 (%, n=3)	信噪比(相对于无菌)
10^5	*L.i.*	33	8.3	2.3
10^5	*E.c.*	7	5.7	0.5
10^5	*L.m.*1	11913	1.7	832
10^5	*L.m.*2	10258	9.0	716
10^4	*L.m.*2	242	9.0	17
10^3	*L.m.*2	31	2.7	2.2
10^2	*L.m.*2	12	2.9	0.9
0	无菌	14	6.9	1

[0498] 实施例5:

[0499] 用化合物IIa和4-甲基伞形酮辛酯检测肠道沙门氏菌的比较

[0500] 将肠炎沙门氏菌RKI 05/07992在营养肉汤(5g/L蛋白胨,5g/L NaCl,2g/L酵母提取物,1g/l牛肉膏,pH 7.4)中培养20h(37℃,150rpm),然后在磷酸盐缓冲生理盐水中连续稀释。将细胞悬浮液与包含二甲亚砜(在分析中的最终浓度为15%)的磷酸盐缓冲生理盐水和化合物IIa(最终浓度10μM)或4-甲基伞形酮辛酯(MUCAP,最终浓度0.1mM)以1:1v/v混合。在微孔板中进行分析,总液体体积为0.2mL。用SpectraMax M5(Molecular Devices,Sunnyvale,CA,USA)平板酶标仪来记录发光和荧光(激发360nm,发射455nm)。由光密度(600nm)来估计未稀释的培养物的细胞浓度。结论:当使用化合物IIa代替MUCAP时,肠道沙门氏菌的检测限低625倍。

[0501] 图2显示使用发光化合物IIa(空心符号)或荧光底物MUCAP(实心符号)的肠道沙门氏菌的检测限。

[0502] 实施例6:

[0503] 用化合物IVa检测金黄色酿脓葡萄球菌

[0504] 将金黄色酿脓葡萄球菌ATCC 29213(S.a.,磷酸酶阳性)和溶血性葡萄球菌(Staphylococcus haemolyticus)RKI 06-01354(S.h.,弱磷酸酶活性)在营养肉汤(5g/L蛋白胨,5g/L NaCl,2g/L酵母提取物,1g/L牛肉膏,pH 7.4)中培养17h,然后在无菌生理盐水(0.9% NaCl)中连续稀释。将类似细胞浓度的S.a.和S.h.用营养肉汤接种在一式三份的试

管中。此外，将S.a.细胞在无菌生理盐水中的四种进一步连续稀释物接种在一式三份的试管中。将无菌生理盐水添加至阴性对照管中。在37℃和150rpm下培养6h之后，将样品从培养物(0.196mL)中取出并且在白色微量滴定板中与4μL在二甲亚砜中的化合物IVa溶液混合。化合物IVa的最终浓度为10μM，二甲亚砜的最终浓度为2％v/v。用装配有发光检测系统的平板酶标仪来记录发光。比较了在添加化学发光底物后15-20min时间段的平均RLU(相对光单位)值(表6)。结论：可以使用化合物IVa以高的灵敏度检测金黄色酿脓葡萄球菌。

[0505] 表6：在添加化合物IVa之后葡萄球菌培养物样品的发光

[0506]

接种密度(CFU/mL)	生物体	平均RLU，6h (n=3)	标准误差(%，n=3)	信噪比(相对于无菌)
10^5	*S.h.*	9550	10	20
10^5	*S.a.*	53190	18	112
10^4	*S.a.*	407697	4	859
10^3	*S.a.*	95498	4	201
10^2	*S.a.*	7563	2	16
10^1	*S.a.*	1439	15	3
0	无菌	474	4	1

[0507] 实施例7：

[0508] 用化合物IVa监测牛奶的巴氏灭菌

[0509] 从瑞士超市获得UHT全脂牛奶(牛奶1)和巴氏灭菌的全脂牛奶(牛奶2)。将来自牛小肠的碱性磷酸酶(AP)以0.5U/mL的最终浓度添加至牛奶样品中。将一式三份的在聚丙烯试管中的牛奶样品(添加有(spiked with)碱性磷酸酶)在水浴中在70℃下加热20min，将类似的参比样品保持在室温下。在白色微量滴定板中通过添加2:1(v/v)检测混合物(20μM化合物IVa，100mM三(羟甲基)-氨基甲烷盐酸盐pH 9.7，1mM氯化镁，在室温下预温育20min)来分析加热和未加热的牛奶样品的碱性磷酸酶活性。用SpectraMax M5平板酶标仪来记录发光，总分析体积为0.3mL。与保持在室温下的样品相比，巴氏灭菌的牛奶样品的平均RLU(相对光单位)值低8至10倍(图3：使用化合物IVa的巴氏灭菌对牛奶中碱性磷酸酶活性的影响的化学发光计量分析。n＝3重复实验的平均值和标准偏差)。还可以检测未添加的牛奶(non-spiked milk)中的残余的碱性磷酸酶活性，并且测得的RLU值表明UHT牛奶(牛奶1)中的碱性磷酸酶活性低于巴氏灭菌的牛奶(牛奶2)。

[0510] 结论：化合物IVa和相关化合物适合于监测牛奶巴氏灭菌和类似过程。

[0511] 实施例8：

[0512] 用化合物IVa检测甲氧西林耐药性金黄色酿脓葡萄球菌(MRSA)

[0513] 将甲氧西林耐药性金黄色酿脓葡萄球菌ATCC 33592(MRSA)(一种对例如甲氧西林和苯唑西林等青霉素衍生物耐药的菌株)和甲氧西林敏感性金黄色酿脓葡萄球菌ATCC 29213(MSSA)在37℃下、在营养肉汤(5g/L蛋白胨，5g/L氯化钠，2g/L酵母提取物，1g/L肉膏，pH 7.4)中培养过夜，并且在无菌生理盐水中稀释。将MRSA和MSSA菌株以约10^6CFU/mL接种在以10μM的最终浓度包含化合物IVa的营养肉汤中。对于各菌株，一种培养物补充有苯唑西林(最终浓度20mg/L)并且一种培养物中没有抗生素。在37℃和150rpm下温育试管培养物。平行地温育无菌对照(含有10μM化合物IVa的营养肉汤)。用SpectraMax M5平板酶标仪定期

记录培养物样品(在白色微量滴定板中为0.2mL)的发光6h(图4:在存在和不存在抗生素苯唑西林的情况下,MRSA和MSSA的培养物中的发光情况)。发光强度的经时过程表明MRSA菌株在存在和不存在苯唑西林的两种情况下均繁殖,而MSSA菌株仅在没有抗生素的培养物中显示发光的增加。在1h的温育之后,可以区分生长的培养物和不生长的培养物。

[0514] 结论:化合物IVa和相关化合物适合于在短时间(1至2h)检测甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌(MRSA)。

[0515] 实施例9:

[0516] 用化合物Va检测大肠杆菌和与D-荧光素-6-O-β-D-吡喃半乳糖苷的比较

[0517] 将大肠杆菌ATCC 25922(E.c.,β-半乳糖苷酶阳性)和肠炎沙门氏菌RKI 05/07992(S.E.,β-半乳糖苷酶阴性)在营养肉汤中培养17h然后在无菌生理盐水(0.9% NaCl)中连续稀释。将经稀释的细胞悬浮液以1:100(v/v)接种在含有LB全营养培养基(full-strength LB medium)(10g/L胰蛋白胨,5g/L酵母提取物,5g/L NaCl)或者用超纯水以1:20(v/v)稀释的LB培养基(LB 1:20)的试管中。所有培养基均含有用于诱导β-半乳糖苷酶的1mM IPTG。将无菌生理盐水添加至阴性对照管中。在37℃和150rpm下培养6h之后,将样品(0.255mL)从培养物中取出并且在白色微量滴定板中与45μL化合物Va在乙醇中的储备溶液混合。化合物Va的最终浓度为20μM,乙醇的最终浓度为15%v/v。用SpectraMax M5平板酶标仪来记录发光。比较了在添加化学发光底物后9-10min时间段的平均RLU(相对光单位)值(表VIa)。为了比较,将相同的大肠杆菌菌株以类似的方式预培养并且稀释,然后接种在经稀释的Mueller-Hinton肉汤(MH 1:20,用20mM磷酸盐缓冲液(pH 7.2)以1:20(v/v)稀释的全营养培养基)中。培养基补充有1mM IPTG。在37℃和150rpm下培养6h之后,将培养物样品(45μL)转移至微量滴定板,并且与5μL 10×裂解试剂混合,所述裂解试剂包含2%w/v十二烷基-三甲基溴化铵、1mM D-荧光素-6-O-β-D-吡喃半乳糖苷(商购可得,Biosynth Cat.No.L-8600)和10mM氯化镁。裂解和与D-荧光素-6-O-β-D-吡喃半乳糖苷的反应在37℃下进行1h。然后,添加0.2mL荧光素酶分析混合物(5:1v/v)。分析混合物包含62.5mM Tris乙酸盐(pH 7.8)、12.5mM硫酸镁、2.5g/L牛血清白蛋白、7.5mM D/L-半胱氨酸、1.25mM乙二胺四乙酸盐、25μM焦磷酸钠、10g/L环糊精、1.25mM 5-三磷酸腺苷和13.1μg/mL商购可得的萤火虫荧光素酶(Photinus pyralis luciferase)(重组)。用SpectraMax M5平板酶标仪来记录发光。测量的前两分钟的平均相对光单位(RLU)在表VIb中示出。

[0518] 结论:当依靠化合物Va而不是D-荧光素-6-O-β-D-吡喃半乳糖苷来检测β-半乳糖苷酶时,尽管使用降低了5倍的工作浓度,但是对于大肠杆菌的最低测试接种密度所达到的信噪比高9倍。

[0519] 表VIa:在添加15%v/v乙醇与化合物Va的组合后大肠杆菌培养物样品的发光

[0520]

接种密度 (CFU/mL)	生物体	RLU, 6h LB	RLU，6h LB 1:20	信噪比, LB 1:20 (相对于无菌)
10^6	*S.E.*	66	125	1
10^6	*E.c.*	18830	84511	871
10^5	*E.c.*	43412	164721	1698
10^4	*E.c.*	49434	105252	1085
10^3	*E.c.*	3317	7690	79
10^2	*E.c.*	551	1369	14
0	无菌	62	97	1

[0521] 表VIb:在荧光素-6-O-β-D-吡喃半乳糖苷的存在下裂解和添加荧光素酶分析混合物后大肠杆菌培养物样品的发光

[0522]

[0523]

接种密度 (CFU/mL)	生物体	RLU，6h MH 1:20	信噪比 (相对于无菌)
10^6	*E.c.*	4777613	544
10^4	*E.c.*	3306967	377
10^2	*E.c.*	13367	1.5
0	无菌	8780	1

[0524] 实施例10:

[0525] 用D-荧光素-6-O-苯基-辛酸酯检测肠道沙门氏菌

[0526] 根据本领域技术人员已知的方法来合成D-荧光素-6-O-苯基-辛酸酯。将肠炎沙门氏菌RKI 05/07992(S.E.,肠道沙门氏菌属肠道型肠炎,C8酯酶阳性)在营养肉汤(5g/L蛋白胨,5g/L NaCl,2g/L酵母提取物,1g/L酵母提取物,pH7.4)中培养16h,然后在无菌生理盐水(0.9% NaCl)中连续稀释。将经稀释的细胞悬浮液以1:100(v/v)接种在包含含有0.1mM D-荧光素-6-O-苯基-辛酸酯的营养肉汤的试管中。在37℃和150rpm下培养6.5h之后,将样品(50μL)从培养物中取出并且在微量滴定板中与0.2mL荧光素酶分析混合物(实施例9中描述的组合物)混合。不需要使用例如十二烷基三甲基溴化铵等细胞裂解试剂(数据未示出)。用装配有发光检测系统的平板酶标仪来记录发光。比较了在添加荧光素酶分析混合物后前3min的平均RLU(相对光单位)值(表VII)。

[0527] 结论:在类似的肠道沙门氏菌浓度下,与D-荧光素-6-O-辛酸酯相比,使用化合物IIa达到的信噪比高9至170倍,有利于降低检测限(参见实施例2)。

[0528] 表VII:在与荧光素酶分析混合物混合后包含D-荧光素-6-O-苯基-辛酸酯的肠道沙门氏菌培养物样品的发光

[0529]

接种密度 (CFU/mL)	生物体	RLU，6h	信噪比 (相对于无菌)
10^6	*S.E.*	417195	24
10^4	*S.E.*	27783	1.6
10^2	*S.E.*	18354	1.1
0	无菌	17154	1

[0530] 实施例11：

[0531] 将化合物VIa与葡萄糖氧化酶组合使用来检测大肠杆菌的培养物上清液中的葡萄糖

[0532] 将大肠杆菌ATCC 25922在营养肉汤(5g/L蛋白胨,5g/L NaCl,2g/L酵母提取物,1g/L酵母提取物,pH 7.4)中培养16h。通过离心(13000×g,2min)将细胞从培养物上清液中分离。从在水中的100倍浓缩的储备溶液将不同浓度的葡萄糖添加至培养物上清液中,将类似量的水添加至阴性对照。第二阴性对照也包含5mM葡萄糖,但是不包含葡萄糖氧化酶。将含有和不含有葡萄糖的培养物上清液(0.1mL)在白色微量滴定板中与包含40μM化合物VIa(与过氧化氢反应)和1mg/mL商购可得的来自黑曲霉(Aspergillus niger)的葡萄糖氧化酶的0.1mL的HEPES缓冲液(100mM,pH 7.0)混合。用SpectraMAx M5平板酶标仪来记录发光的经时过程20min,结果在图5(将由过氧化氢引发化学发光的底物化合物VIa与葡萄糖氧化酶(GOX)组合使用来直接在大肠杆菌培养物上清液中检测葡萄糖)中示出。当还存在化合物VIa和葡萄糖氧化酶时,葡萄糖的存在导致发光持续增加。增加的速率与葡萄糖浓度呈正相关。

[0533] 结论:当将化合物VIa或相关化合物与适当的释放过氧化氢的酶(例如氧化酶)组合使用时,可以通过化学发光直接在微生物培养物的上清液中检测生长底物和代谢产物例如葡萄糖。

[0534] 实施例12：

[0535] 用化合物VIIa检测碳青霉烯耐药性细菌

[0536] 分别在补充有8mg/L和4mg/mL亚胺培南的胰酪胨大豆琼脂(trypticase soy agar)上培养碳青霉烯耐药性细菌菌株铜绿假单胞菌RKI 48/09(IMP-2)(P.a.-Imp^R)和肺炎克雷白杆菌RKI 92/08(KPC-2)(K.p.-Imp^R)。在胰酪胨大豆琼脂上培养碳青霉烯敏感性菌株大肠杆菌ATCC 25922(E.c.)。使含有和不含有亚胺培南的营养肉汤(关于组成和pH,参见前面的实施例,在15mL管中为3mL)接种有来自琼脂平板的亚胺培南耐药性和敏感性细菌。将试管培养物在37℃和150rpm下温育6h。将培养物样品(0.255mL)转移至白色微量滴定板的孔并且与45μL化合物VIIa在乙醇中的储备溶液混合。化合物VIIa、乙醇和二甲亚砜的最终浓度分别为10μM、14％v/v和1％v/v。在添加化合物VIIa 30min后用平板酶标仪来记录发光。测量周期的最大发光信号(相对光单位)在表VII中示出。

[0537] 结论:可以通过将化合物VIIa添加至培养物样品并且记录发光来将碳青霉烯耐药性细菌与碳青霉烯敏感性细菌相区分。

[0538] 表VII:在添加化合物VIIa后碳青霉烯耐药性和敏感性细菌的培养物样品的发光

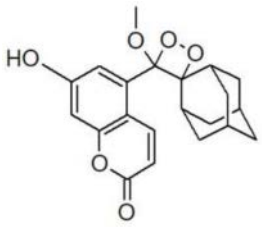
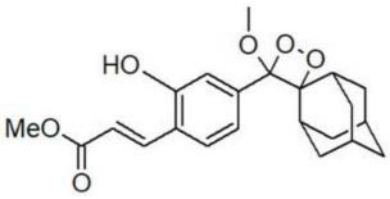
[0539]

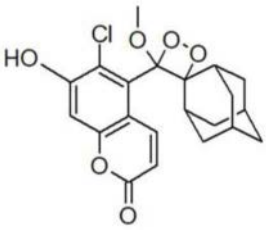
菌株	亚胺培南 (mg/L)	OD_{600} 6h	最大 RLU (含有 10μM VI)	信噪比(相对于 E.c.)
P.a.-Imp^R	8	0.48	21028	2.6
P.a.-Imp^R	0	0.67	19940	2.4
K.p.-Imp^R	4	0.50	72272	8.8
K.p.-Imp^R	0	0.66	72951	8.9
E.c.	4	0.01	7992	n.a.
E.c.	0	0.73	8181	n.a.
无菌	0	0	8812	n.a.

[0540] 实施例13：

[0541] 包含不同取代基R^A、R^B和R^C的化合物的发光特性

[0542] 已经在pH为7.4的PBS缓冲溶液(10％ DMSO)[1μM]中测定了化合物A、化合物B和化合物C的化学发光动力学曲线以及总发光。

[0543] 化合物A：；化合物B：；化合物C：



[0544] 化合物A、B和C表示在R^1与分析物相互作用时从相应的式I的化合物形成的(发光)物质。

[0545] 在图6A(插图：前2小时的放大图)中比较化合物A和B的化学发光动力学曲线；在图6B中比较化合物A和B的总发光。

[0546] 在图7A中比较化合物A和C的化学发光动力学曲线；在图7B中比较化合物A和C的总发光。

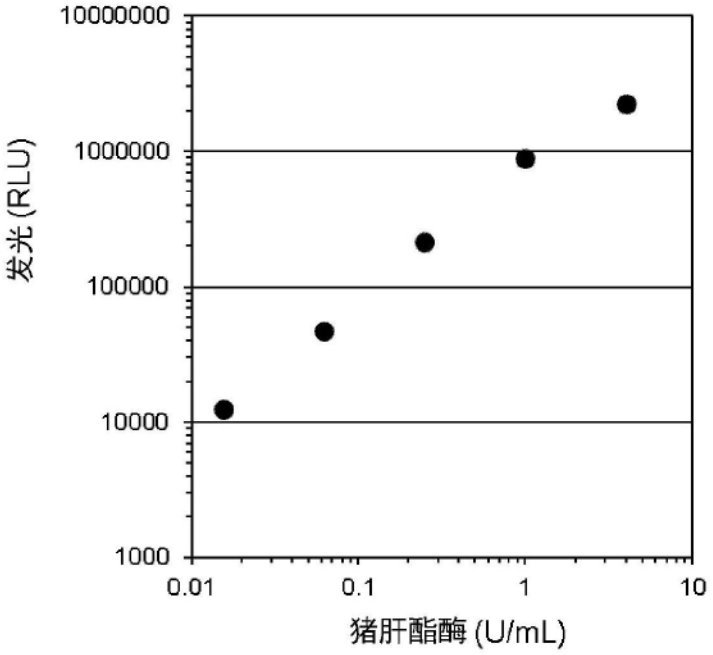

10000000
1000000
100000
10000
1000
发光 (RLU)
0.01
0.1
1
10
猪肝酯酶 (U/mL)

图1

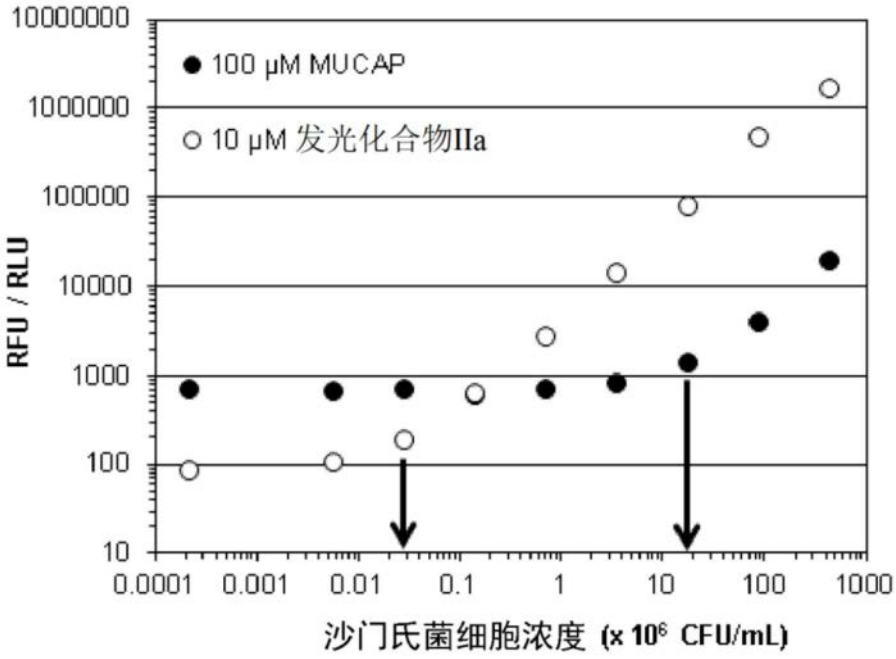

10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
RFU / RLU
100 μM MUCAP
10 μM 发光化合物IIa
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
沙门氏菌细胞浓度 (x 10⁶ CFU/mL)

图2

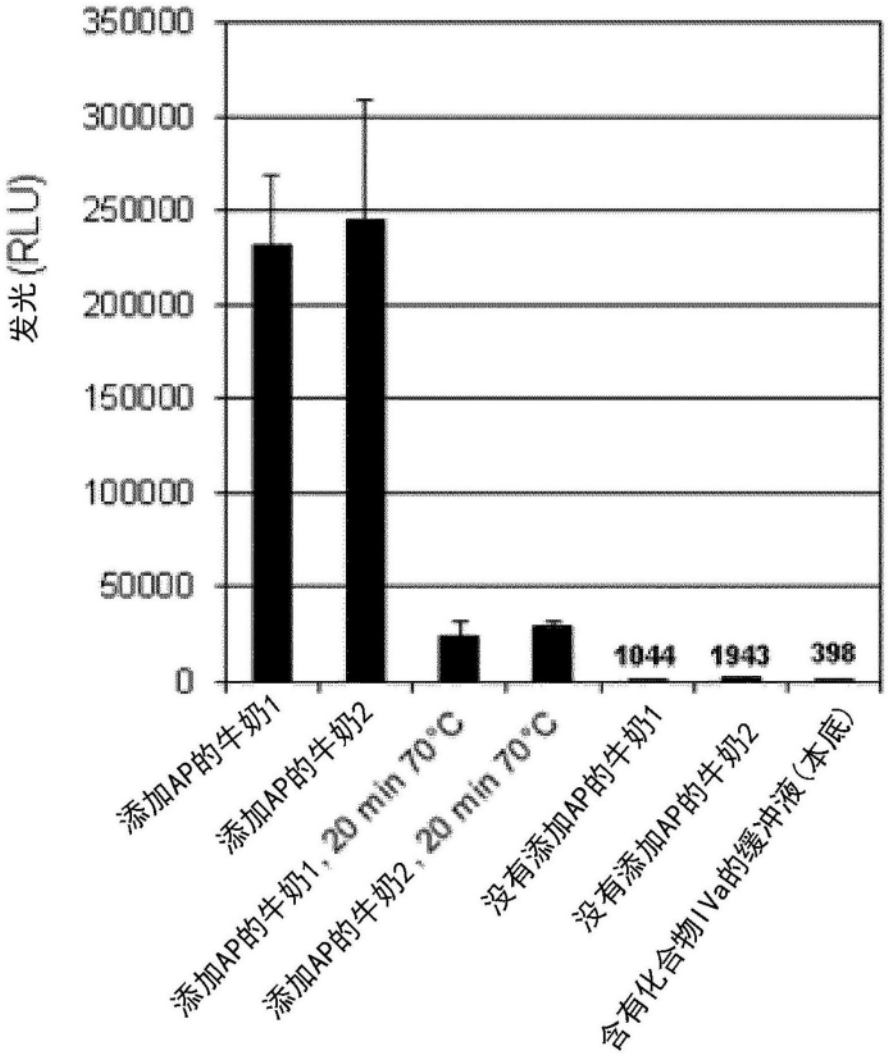

350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
发光(RLU)
1044
1943
398
添加AP的牛奶1
添加AP的牛奶2
添加AP的牛奶1，20 min 70°C
添加AP的牛奶2，20 min 70°C
没有添加AP的牛奶1
没有添加AP的牛奶2
含有化合物IVa的缓冲液(本底)

图3

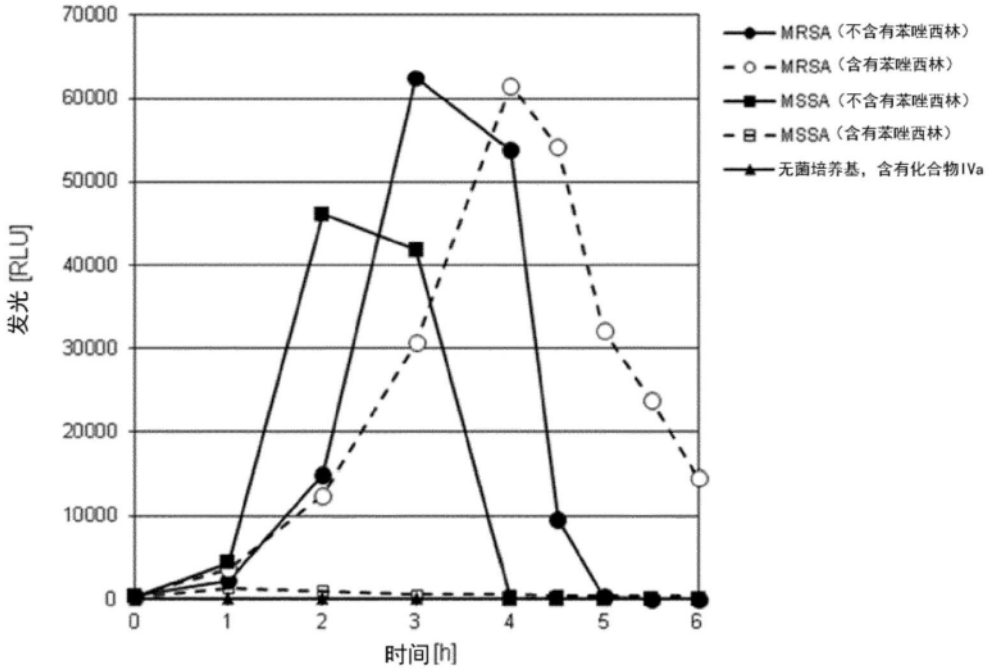

70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
发光 [RLU]
0
1
2
3
4
5
6
时间 [h]
MRSA（不含有苯唑西林）
MRSA（含有苯唑西林）
MSSA（不含有苯唑西林）
MSSA（含有苯唑西林）
无菌培养基，含有化合物IVa

图4

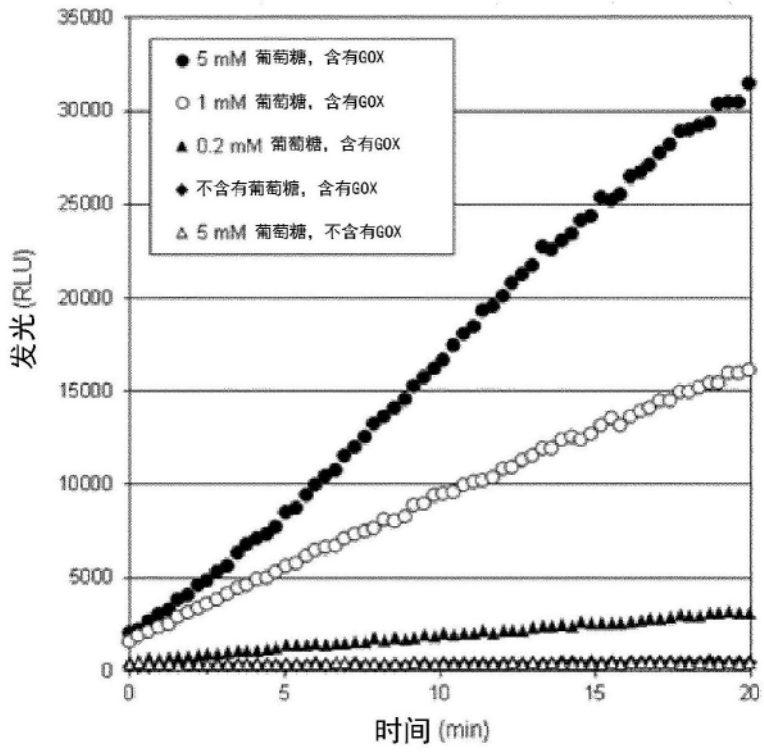

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
发光 (RLU)
0
5
10
15
20
时间 (min)
5 mM 葡萄糖，含有GOX
1 mM 葡萄糖，含有GOX
0.2 mM 葡萄糖，含有GOX
不含有葡萄糖，含有GOX
5 mM 葡萄糖，不含有GOX

图5

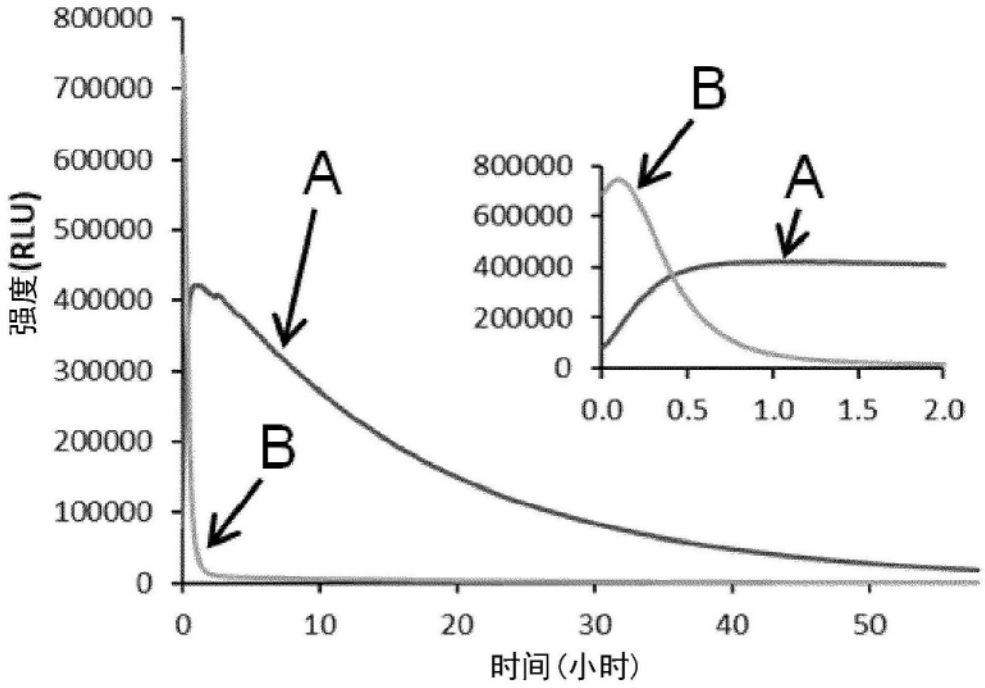

800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
强度(RLU)
A
B
0
10
20
30
40
50
时间(小时)
800000
600000
400000
200000
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0

图6A

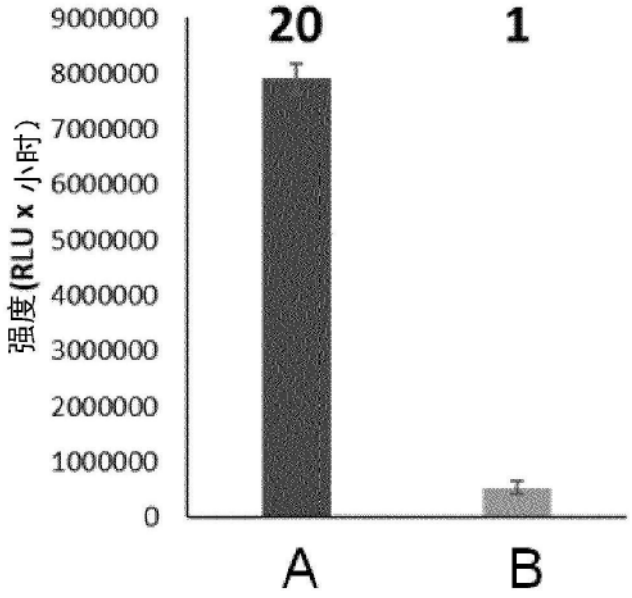

9000000
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
强度(RLU x 小时)
20
1
A
B

图6B

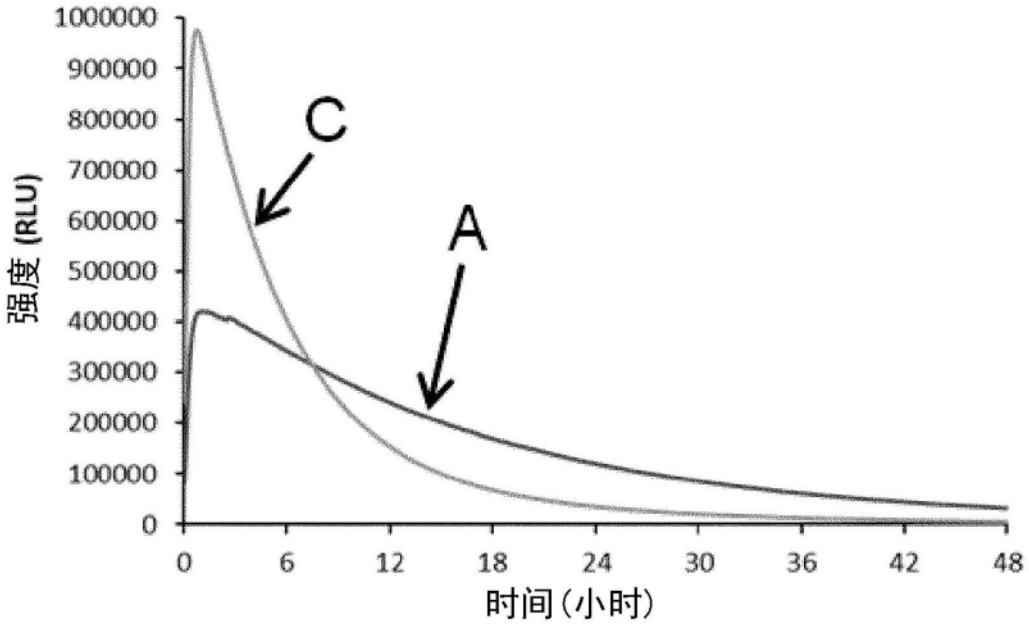

1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
强度 (RLU)
C
A
0
6
12
18
24
30
36
42
48
时间（小时）

图7A

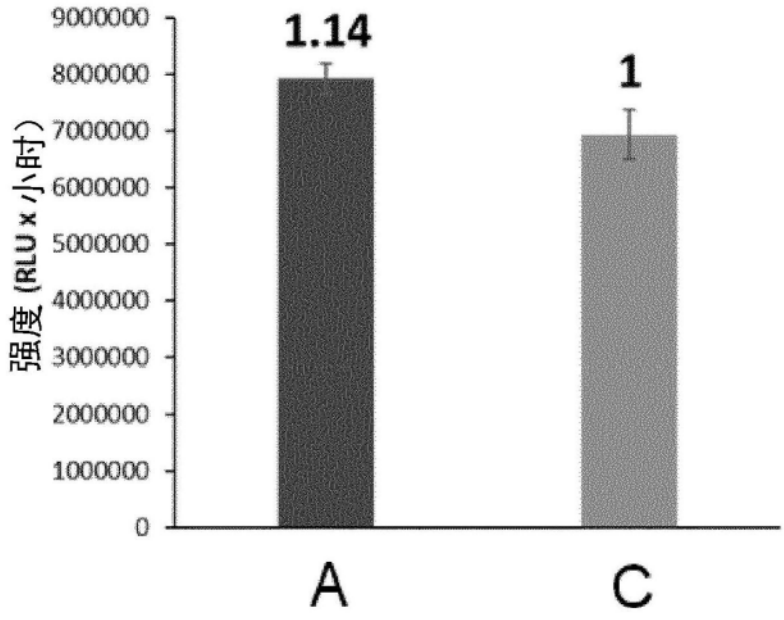

9000000
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
强度 (RLU x 小时)
1.14
1
A
C

图7B