



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101885761 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 17

(21) 申请号 201010175372. X

G01N 21/64 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 05. 14

(30) 优先权数据

61/178, 870 2009. 05. 15 US

(71) 申请人 密理博公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 A·德哈尼 K·泰格拉简

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 苏萌 钟守期

(51) Int. Cl.

C07K 14/405 (2006. 01)

C07K 14/36 (2006. 01)

C09K 11/06 (2006. 01)

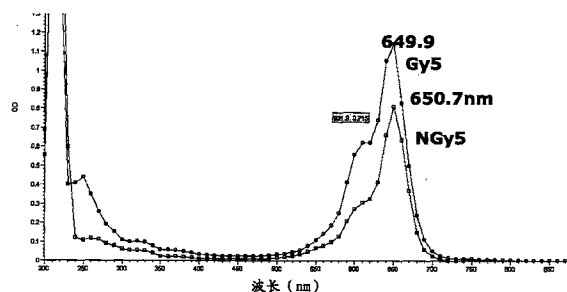
权利要求书 3 页 说明书 27 页 附图 4 页

(54) 发明名称

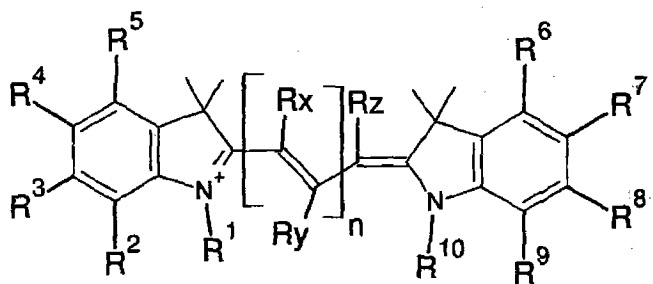
染料轭合物及使用方法

(57) 摘要

本发明涉及染料轭合物及使用方法,具体而言涉及花青化合物、包含该花青化合物的组合物、制品、及其制备和使用方法。有用的是,所述花青包含间接连接在烷基芳基花青取代基的芳环上的一个或多个羧基或其衍生物。还提供了所公开的花青与一种或多种其他物质的轭合物。还提供了所述花青的溶剂合物、溶液和衍生形式。所述花青用于多种生物测试中,包括直接的单一标签应用和能量转移形式。提供了利用所公开的花青针对靶标分析试样的方法。还公开了包含所公开的花青的检测复合物,以及包含通过例如直接激发或能量转移形成的激发态的花青的组合物和制品。所述花青可用作各种装置中的其他已知的光学活性物质的代替物。本文还描述了其他实施方案。



1. 一种钇合物, 包含下式的化合物



或其异构体、酯、酰胺、酰基卤、酸酐和 / 或盐 ;

其中 :

n 为 0、1、2 或 3 ;

R^1 和 R^{10} 独立地选自任选被取代的烷基、任选被取代的杂烷基和任选被取代的烷基芳基, 其中至少 R^1 和 R^{10} 之一为在芳基部分包含被取代的烷基或杂烷基取代基的被取代的烷基芳基, 所述被取代的烷基或杂烷基取代基包含羧酸取代基 ;

R^2 至 R^9 独立地选自 H、 $-SO_3H$ 、任选被取代的烷基、或任选被取代的杂烷基, 其中 R^2 至 R^9 中任何两个相邻的成员一起可形成任选被取代的 5-7 元单不饱和或多不饱和的稠环, 所述稠环任选包含一个或多个环杂原子 ;

R_z 和每个重复的 R_x 和 R_y 独立地选自 H、烷基、烷氧基、杂烷基、杂烷氧基、 $-CN$, 或其中 R_x 、 R_y 和 R_z 中任何两个相邻的成员可共价结合形成任选被取代的 4-7 元单不饱和或多不饱和环, 所述环任选包含一个或多个环杂原子 ;

其中所述化合物通过偶联对的一个成员在 R^1 至 R^{10} 中的任一个上结合至第二种物质, 所述第二种物质选自探针、连接剂、靶标、聚合物、生物分子、低亲和力伪靶、结合对的一个成员、光学活性物质和 / 或基质。

2. 权利要求 1 的钇合物, 其中所述第二种物质是所述化合物可与其交换能量的光学活性物质。

3. 权利要求 1 的钇合物, 其中所述第二种物质是生物分子。

4. 权利要求 1 的钇合物, 其中所述第二种物质是合成染料。

5. 权利要求 1 的钇合物, 其中所述第二种物质是半导体纳米晶体。

6. 权利要求 1 的钇合物, 其中所述钇合物包含基质。

7. 权利要求 6 的钇合物, 其中所述基质是珠粒。

8. 权利要求 6 的钇合物, 其中所述基质是不规则形状的颗粒。

9. 权利要求 1 的钇合物, 其中所述钇合物包含聚合物。

10. 权利要求 9 的钇合物, 其中所述聚合物是树枝状聚合物。

11. 权利要求 9 的钇合物, 其中所述聚合物是聚环氧烷。

12. 权利要求 1 的钇合物, 其中所述钇合物包含探针。

13. 权利要求 1 的钇合物, 其中所述钇合物包含结合对的一个成员。

14. 权利要求 13 的钇合物, 其中所述结合对的一个成员是抗体。

15. 权利要求 13 的钇合物, 其中所述结合对的一个成员是多核苷酸。

16. 权利要求 1 的钇合物, 其中所述钇合物包含探针和低亲和力伪靶。

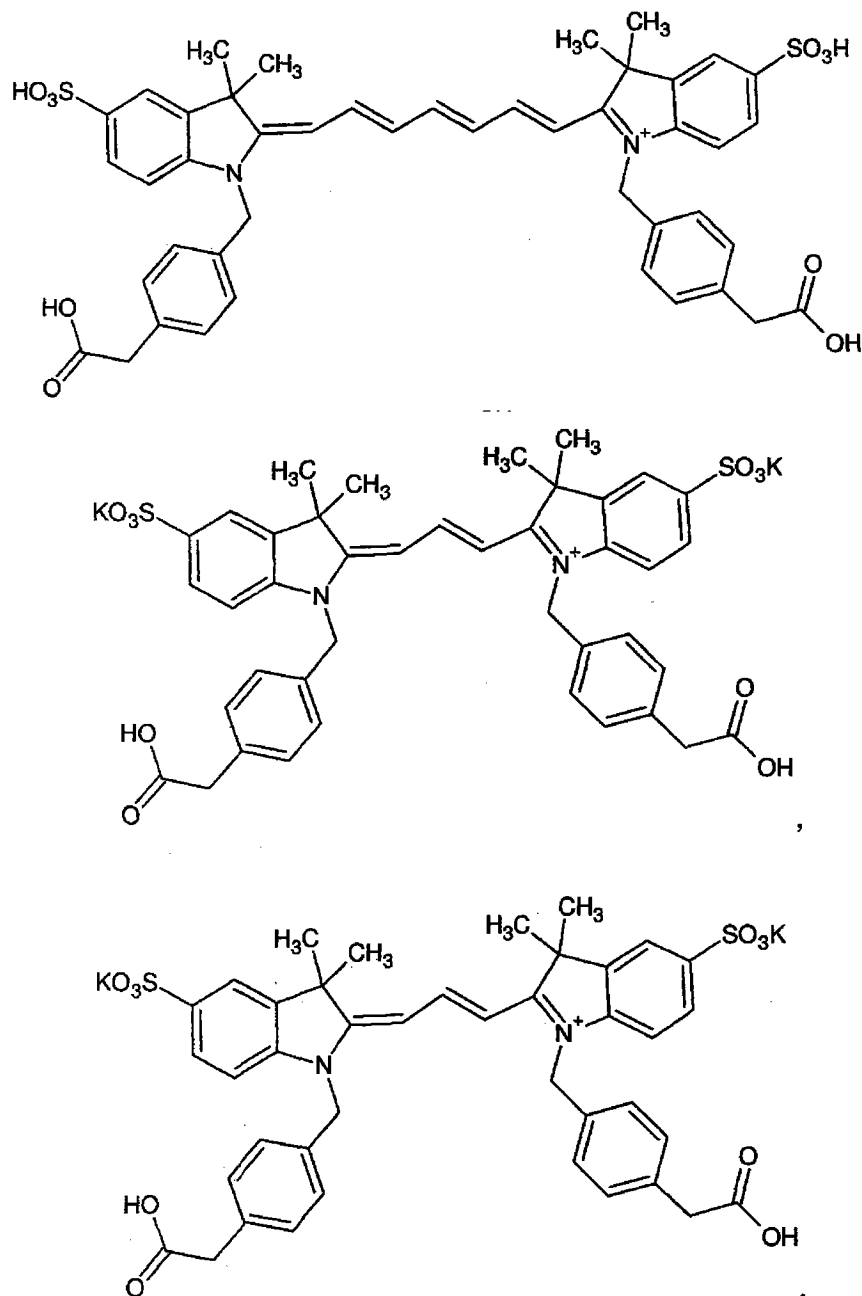
17. 权利要求 1 的钇合物, 或其异构体、酯、酰胺、酰基卤、酸酐和 / 或盐,

其中：

R^1 和 R^{10} 各自为在芳基部分包含被取代的低级烷基或低级杂烷基取代基的被取代的苯甲基或被取代的苯乙基，所述被取代的低级烷基或低级杂烷基取代基包含羧酸取代基；

R^4 和 R^7 各自为磺酸基。

18. 权利要求 1 的轭合物，其中所述轭合物由具有选自以下的结构的化合物形成：



及任何一种化合物的酯、酰胺、酰基卤、酸酐、异构体和 / 或盐，其中所示的化合物通过所述被取代的烷基芳基上的至少一个羧酸基团轭合至至少一个所述的第二种物质。

19. 一种针对靶标分析试样的方法，包括：

提供疑似包含靶标的试样；

使所述试样与权利要求 12 的轭合物在其中所述探针可以结合至所述靶标——如果存在——以形成检测复合物的条件下接触；

使疑似包含所述检测复合物的所述试样或其部分与可被所述化合物吸收或转移至所

述化合物的能量源接触 ; 以及

测定能量是否已被所述复合物吸收或转移至所述复合物。

20. 权利要求 19 的方法, 其中所述复合物还包含所述探针的低亲和力伪靶, 并且所述靶标——如果存在——会置换所述探针上的所述低亲和力伪靶。

21. 一种通过权利要求 19 的方法形成的检测复合物。

22. 权利要求 21 的检测复合物, 其中所述化合物通过所述复合物与被所述化合物吸收或转移至所述化合物的辐射接触而处于激发态。

染料轭合物及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及光学活性的花青化合物、包含此类材料的组合物、其制备和使用方法、以及包含所述花青化合物的制品。

背景技术

[0002] 花青化合物已被使用了一百多年。历史上,花青被用作照相乳剂的感光剂,在一些情况下被用作织物染色的感光剂。最近,花青被用于 CD-R 和 DVD-R 介质。

[0003] 最近发现花青在生物测试中作为荧光标签的特殊用途,其或者作为单一标签,或者作为能量转移方案中使用的多重标签。在过去的十年里,生物信息技术、阵列技术和基因组工程的蓬勃发展引起对环境容许型标签如荧光团的极大需求,所述环境容许型标签提供生物分子物理序列的信息,多核苷酸和蛋白质水平上基因表达的信息,以及生物分子在细胞、组织和生物体内实际位置的信息。荧光标签还可用于检测细胞专一性标记,并使用细胞计数方法表征和分离特定细胞群和亚群。这些技术通常使用荧光分子,例如与生物分子如抗体或核苷酸轭合的花青,或使用染料终止剂。

[0004] 能量转移方案常用于生物测试,且常使用花菁。能量转移包括用能量源激发一种物质,并将能量从被激发物质转移至第二种物质,然后第二种物质可发出可检测的能量或将其转移至后面的物质。已证实能量转移方案在荧光测序中特别有用,其中包含对四种末端核苷酸中的每一种特异的氟的光谱特异组合的染料终止剂用于给多核苷酸的每个残基提供单个反应测序信息。在一些方案中,不同的氟组合可使用可以全部由相同能量源激发的初始氟,但也与为每种不同组合提供独特发射波长的其他氟或氟组合偶联。这种方法可大幅扩大可由单个实验提供的信息的类型和量,也可扩大提供单一激发源的仪器的用途,从而可以在有效使用试剂和可得试样的同时得到更大量的信息。

[0005] 本领域需要光学活性花青、其制备和使用方法、以及包含此类化合物的组合物和制品。

发明内容

[0006] 本发明涉及花青化合物、包含该花青化合物的组合物和制品、及其制备和使用方法。所述花青通常包含间接连接在烷基芳基花青取代基的芳环上的一个或多个羧基或其衍生物。还提供了所公开的花青与一种或多种其他物质的轭合物。还提供了所述花青的溶剂合物、溶液和衍生形式。所述花青可以用于多种生物测试(直接的单一标签应用和能量转移这两种形式)中。提供了利用所公开的花青针对靶标分析试样的方法。还公开了包含所公开的花青的检测复合物,以及包含通过直接激发或能量转移形成的激发态的花青的组合物和制品。所述花青可用作各种装置中的其他已知的光学活性物质的代替物。本文还描述了其他实施方案。

附图说明

[0007] 图 1 描述了花青 NGy5 和 Gy5 的吸收光谱。

[0008] 图 2 描述了通过使花青与藻红素 (PE) 以不同比例反应形成的 PE-NGy5 轭合物的吸收光谱。

[0009] 图 3 描述了以不同偶联比例的花青与蛋白质形成的 PE-NGy5 轭合物的发射光谱 (532nm 激发)。

[0010] 图 4 描述了 PE-NGy5 和 PE-Gy5 花青轭合物的发射光谱 (532nm 激发)。

[0011] 图 5 描述了不同偶联比例的 PE-NGy7 轭合物的吸收光谱。

[0012] 图 6 描述了不同偶联比例的 PE-NGy7 轭合物的荧光发射光谱。

[0013] 图 7 描述了抗生蛋白链菌素 -NGy3 轭合物的荧光激发和发射光谱。

[0014] 图 8 描述了抗生蛋白链菌素 -Gy3 和抗生蛋白链菌素 -NGy3 轭合物的发射光谱。

具体实施方式

[0015] 本发明涉及花青化合物、包含该花青化合物的组合物、制品、以及其制备和使用方法。发现某些含有被羧基取代的烷基芳基取代基的花青没有表现出荧光发射,这一点令人意外。本发明得自于以下实验,其中使羧基不再直接连接至芳环显示出可改进荧光性质,同时保留有用的羧基官能。

[0016] 本发明的化合物可用于多种应用。所述化合物具有需要的光学活性并表现出吸收和 / 或发射性质。所述化合物因此可用于需要吸收特定波长的能量的应用中,用于需要发射能量的应用中,以及用于既需要吸收又需要发射的应用中。可通过偶联或吸纳该化合物至特殊物质和 / 或位置,从而将所述化合物用作包括生物分子在内的物质的标签。所述化合物可用于与其他物质形成轭合物。所述化合物可用于能量转移实验,可以以转移复合物的形式提供或以可被吸纳至与其一起表现出能量转移的其他光学活性物质的位置的形式提供。所述化合物可以用作染料激光器中的照相感光剂,用作被动 Q 开关激光器的可饱和吸收剂,以及用作膜电势的分子探针。所述化合物可用于多种其中使用生物分子标签的应用中,包括用于标记一级、二级 (或后面的) 抗体中,用于标记可被掺入被标记的多核苷酸中的核苷酸 -- 包括测序反应 (例如在被标记的核苷酸和染料终止剂中),用于用以确定两种光学活性物质在多种装置中的接近性的接近性测试中,用于凋亡测试中,用于光漂白恢复实验中,用于荧光关联光谱术中,用于微阵列实验中,用于转录组学中,以及用于蛋白质组学中。令人满意地,本发明的化合物在水性介质中显示出良好的溶解性。

[0017] 所述化合物可以以单独化合物、溶剂合物、溶液、轭合物、以及以所述的其他形式被提供。还提供了包含激发态的本发明的花青的组合物和制品,所述激发态的花青或者通过用电磁源直接激发或者通过另一种激发物质的能量转移获得。所述制品包括轭合的感应器以及使用被激发花青的检测复合物。

[0018] 本发明的实施方案包括利用本发明的花青的制品。例如可以在一个阵列中同时使用多个包含花青的标记感应器。多重实施方案可使用 2、3、4、5、10、15、20、25、50、100、200、400、1000、5000、10000、50000 或更多个包含一个或多个本文描述的实施方案的不同制品。本文还讨论了本发明的其他方面。

[0019] 在进一步详细描述本发明之前,应理解本发明不限于所描述的具体方法、制品、组合物或装置,因为这些方法、制品、组合物或装置当然可以有所变化。还应理解本文使用的术语仅为描述具体实施方案,并非意欲限制本发明的范围。

[0020] 除非上下文明确指出,否则单数形式“一”、“一个”和“该”的使用包括复数个指代对象。因此,例如提及“一种花青”时,包括多种花青,提及“一种溶剂”时,包括多种溶剂,提及“一种酯”时,包括多种酯,如此类推。另外,除非上下文明确指出相反,否则使用具体的复数指代词例如“二”、“三”等时,公开了更多个该对象。除非指出相反,否则当术语“或”在本文被用作唯一的连词时,是指“和 / 或”。本文使用的术语“包括”和相关术语如“包括(其单数第三人称形式)”不是限制性的,允许存在除了具体列举的那些元件以外的元件。

[0021] 除非上下文明确指出相反,否则术语“连接”、“附着”和“联合”在本文可互换使用,包括直接以及间接的连接、附着、联合或耦合。

[0022] 在列举数值范围时,应理解在该范围述及的上限和下限之间的每个介于其间的整数及其每个分数、以及所述值之间的每个子范围均被具体公开。任何范围的上限和下限可以独立地包括在该范围内或排除在该范围之外,所有此类范围均包括在本发明内。在所讨论的值具有固有界限时,例如一组分可以以 0 至 100% 的浓度存在,或一水溶液的 pH 可以为 1 至 14,那些固有界限被具体公开,因为那些范围基于那些固有界限。在明确述及一数值时,应理解与所述及数值基本相同数量或量的数值也在本发明的范围内,本文描述的基于其与任何其他值的范围也如此。

[0023] 在公开元件的组合或一组元件时,那些元件的每个子集也是具体公开的,且在本发明的范围内。相反,在公开不同元件或元件组时,其组合也是公开的。

[0024] 在发明的任一元件被公开为具有多个备选元件时,该发明的实施例 -- 其中每个备选元件单独地或与其他备选元件任意组合地被排除 -- 也以此方式公开;发明的一个以上元件可具有此类排除,所有具有此类排除的元件组合以此方式公开。

[0025] 除非另外定义或在上下文中明确指出相反,否则所有本文使用的技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解相同的含义。尽管与本文描述的方法和材料相似或等价的任何方法和材料可用于实施或试验本发明,但现在描述优选的方法和材料。

[0026] 为公开和描述为其而引用参考文献的具体材料和方法,本文提及的所有出版物通过引用纳入。本文所讨论的出版物仅提供其在本发明的申请日之前的公开内容。本文没有任何信息可以被解释为承认现有发明的此类公开内容比本发明公开更早。

[0027] 定义

[0028] 在对本发明的描述中,下列术语将被使用,并意欲定义如下。

[0029] 本文使用的“活化的”或“活化”,例如与术语“基团”、“烷基”和“羧酸酯”有联系时,是指包含至少一个可用于附着至其他分子的活性部分(例如,具有可用的官能团,例如氨基、羟基和 / 或硫氢基基团)的基团。示例性活性部分包括含有以下基团的基团:异硫氰酸酯、异氰酸酯、一氯三嗪、二氯三嗪、单卤代或二卤代吡啶、单卤代或二卤代二嗪、马来酰亚胺、氮丙啶、磺酰卤、酰基卤、酸酐、羟基琥珀酰亚胺酯、羟基磺基琥珀酰亚胺酯、亚氨酸酯、肼、叠氮基硝基苯基 (azidonitrophenyl)、叠氮化物、3-(2-吡啶基二硫)-丙酰胺、乙二醛、醛、和可聚合基团。

[0030] “偶联对”是指可以反应形成键的两个化学部分。偶联对中的一个成员或两个成员可为活化基团。偶联对中的一个成员可为感兴趣的物质的一个官能团,且可在初始合成过程中形成或在随后加入;示例性官能团包括羧酸和磺酸、胺、羟基、硫醇、醛、氰基和酪氨酸。

偶联对可形成的示例性键包括酰胺键、胺键、酯键、硫醇键、硫酯键、二硫键、羰基键、醚键和聚合键。

[0031] “烷基”是指在一个或多个位置任选被取代的具有 1 至 24 个碳原子的支链、无支链或环状饱和烃基,包括多环化合物。烷基的实例包括任选被取代的甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、正庚基、正辛基、正癸基、己基辛基、十四烷基、十六烷基、二十烷基、二十四烷基等,以及环烷基如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、金刚烷基和降冰片基 (norbornyl)。术语“低级烷基”是指具有 1 至 6 个碳原子、优选 1 至 4 个碳原子的烷基。被取代的烷基上的示例性取代基包括羟基、氰基、烷氧基、 $=O$ 、 $=S$ 、 $-NO_2$ 、卤素、卤代烷基、杂烷基、羧基烷基、胺、酰胺、硫醚和 $-SH$ 。

[0032] “烷氧基”是指“ $-O-$ 烷基”基团,其中烷基如上定义。“低级烷氧基”是指包含 1 至 6、更优选 1 至 4 个碳原子的烷氧基。

[0033] “烯基”是指包含至少一个碳-碳双键且在一个或多个位置任选被取代的具有 2 至 24 个碳原子的支链、无支链或环状不饱和烃基。烯基的实例包括乙烯基、1- 丙烯基、2- 丙烯基 (烯丙基)、1- 甲基乙烯基、环丙烯基、1- 丁烯基、2- 丁烯基、异丁烯基、1,4- 丁二烯基、环丁烯基、1- 甲基丁-2- 烯基、2- 甲基丁-2- 烯-4- 基、异戊二烯基、戊-1- 烯基、戊-3- 烯基、1,1- 二甲基烯丙基、环戊烯基、己-2- 烯基、1- 甲基-1- 乙基烯丙基、环己烯基、庚烯基、环庚烯基、辛烯基、环辛烯基、癸烯基、十四碳烯基、十六碳烯基、二十碳烯基、二十四碳烯基等。本文优选的烯基包含 2 至 12 个碳原子。术语“低级烯基”是指具有 2 至 6 个碳原子、优选 2 至 4 个碳原子的烯基。术语“环烯基”是指具有 3 至 8 个碳原子、优选 5 或 6 个碳原子的环状烯基。被取代的烯基上的示例性取代基包括羟基、氰基、烷氧基、 $=O$ 、 $=S$ 、 $-NO_2$ 、卤素、卤代烷基、杂烷基、胺、硫醚和 $-SH$ 。

[0034] “烯氧基”是指“ $-O-$ 烯基”,其中烯基如上定义。

[0035] “烷基芳基”是指共价结合至芳基的烷基。优选地,所述烷基为低级烷基。烷基芳基可在烷基和芳基部分二者之一或二者上任选地被本文描述的取代基取代。示例性烷基芳基包括苯甲基、苯乙基、苯丙基、1- 苯甲基乙基、苯丁基、2- 苯甲基丙基、3- 萘基丙烯基等。

[0036] “烷基芳氧基”是指“ $-O-$ 烷基芳基”,其中烷基芳基如上定义。

[0037] “炔基”是指包含至少一个 $-C \equiv C-$ 三键且在一个或多个位置任选被取代的具有 2 至 24 个碳原子的支链或无支链的不饱和烃基。炔基的实例包括乙炔基、正丙炔基、异丙炔基、炔丙基、丁-2- 炔基、3- 甲基丁-1- 炔基、辛炔基、癸炔基等。本文优选的炔基包含 2 至 12 个碳原子。

[0038] 术语“低级炔基”是指具有 2 至 6 个碳原子、优选 2 至 4 个碳原子和一个 $-C \equiv C-$ 三键的炔基。被取代的炔基上的示例性取代基包括羟基、氰基、烷氧基、 $=O$ 、 $=S$ 、 $-NO_2$ 、卤素、卤代烷基、杂烷基、胺、硫醚和 $-SH$ 。

[0039] “酰胺”是指 $-C(O)NR'R''$ 和 $-S(O)_2NR'R''$,其中 R' 和 R'' 独立地选自氢、烷基、芳基和烷基芳基。

[0040] “胺”是指 $-N(R')R''$ 基团,其中 R' 和 R'' 独立地选自氢、烷基、芳基和烷基芳基。

[0041] “芳基”是指含有至少一个芳环的基团,所述芳环含有一个具有满足休克尔规则 (Huckel's rule) 的离域 π 电子的共轭 π 电子系统,所述基团包括碳环、杂环、桥连和 / 或多环芳基,并可任选地在一个或多个位置被取代。典型的芳基包含 1 至 5 个芳环,所述芳

环可为稠合的和 / 或连接的。示例性芳基包括苯基、呋喃基、吡咯基 (azolyl)、噻吩基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、联苯基、茛基、苯并呋喃基、咪唑基、萘基、喹啉基、异喹啉基、喹唑啉基、吡啶并吡啶基、吡咯并吡啶基、嘌呤基、四氢化萘基等。任选被取代的芳基上的示例性取代基包括烷基、烷氧基、烷基羧基、烯基、烯氧基、烯基羧基、芳基、芳氧基、烷基芳基、烷基芳氧基、任选被取代的饱和或不饱和稠环、卤素、卤代烷基、杂烷基、 $-S(O)R$ 、磺酰基、 $-SO_3R$ 、 $-SR$ 、 $-NO_2$ 、 $-NRR'$ 、 $-OH$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R$ 、 $-OC(O)R$ 、 $-NHC(O)R$ 、 $-(CH_2)_nCO_2R$ 或 $-(CH_2)_nCONRR'$ ，其中 n 为 0-4，且其中 R 和 R' 独立地为 H、烷基、芳基或烷基芳基。

[0042] “芳氧基”是指“-O-芳基”，其中芳基如上定义。

[0043] “碳环”是指包含至少一个环的任选被取代的化合物，其中所有环原子为碳，且可以是饱和的或不饱和的。

[0044] “碳环芳基”是指其中环原子为碳的任选被取代的芳基。

[0045] “轭合的”和“共轭系统”是指其中原子的基团或链携带有不参与单键形成且会改变彼此性质的价电子的分子实体。共轭聚合物是表现出此类离域键合的聚合物。典型的共轭系统可包括交替单键和双键或多键形式的共轭系统，并可间插包含非键合价电子的原子（例如杂原子）。在一些实施方案中，共轭聚合物可包含芳香族重复单元，其任选地包含杂原子键。

[0046] “卤素”是指氟、氯、溴或碘。“卤化物”、“氟化物”、“氯化物”等在用于提及非共价键合的卤素阴离子时，是指阴离子形式的卤素；“酰基卤”等是指其中相应的酸的羟基被卤素代替的部分，其通常形成可用于偶联反应的活化的物质。

[0047] “卤代烷基”是指在一个或多个位置被卤素取代的烷基，包括仅被一种卤原子取代的烷基以及被不同类的卤原子的混合物取代的烷基。示例性卤代烷基包括三卤代甲基，例如三氟甲基。

[0048] “杂烷基”是指其中一个或多个碳原子及相连氢原子被任选被取代的杂原子代替的烷基，包括仅被一类杂原子取代的烷基以及被不同类的杂原子的混合物取代的烷基。杂原子包括氧、硫和氮。本文使用的氮杂原子和硫杂原子包括任一氧化形式的氮和硫，以及任一形式的含有四个共价键的氮，包括质子化和烷基化形式。任选被取代的杂原子是指一个或多个所连的氢原子任选地被烷基、芳基、烷基芳基和 / 或羟基代替的杂原子。术语“低级杂烷基”是指具有 1 至 6 个碳和杂原子、优选 1 至 4 个碳和杂原子的杂烷基。

[0049] “杂环”是指包含至少一个具有至少一个杂原子的饱和或不饱和环且任选地在一个或多个位置被取代的化合物。典型的杂环基团包含 1 至 5 个环，所述环可以为稠合的和 / 或连接的，其中所述环各自包含五或六个原子。杂环基团的实例包括哌啶基、吗啉基和吡咯烷基。任选被取代的杂环基团的示例性取代基有如烷基和芳基在环碳上的取代基，以及杂烷基在杂原子上的取代基。

[0050] “杂环芳基”是指在至少一个芳环内具有至少 1 个杂原子的芳基。示例性杂环芳基包括呋喃基、噻吩基、吡啶基、哒嗪基、吡咯基、N- 低级烷基 - 吡咯、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、四嗪基、三唑基、四唑基、咪唑基、二吡啶基、三吡啶基、四吡啶基、吩嗪基、菲咯啉基、嘌呤基等。

[0051] “烃基”是指包含 1 至约 20 个碳原子的烃取代基，包括支链、无支链和环状物质以及饱和的和不饱和的物质，例如烷基、亚烷基、烯基、烷基芳基、芳基等。术语“低级烃基”是

指具有 1 至 6 个碳原子、优选 1 至 4 个碳原子的烃基。

[0052] “取代基”是指代替一个或多个连接在碳或氮上的氢的基团。示例性的取代基包括烷基、亚烷基、烷基羧基、烷氧基、烯基、烯基羧基、烯氧基、芳基、芳氧基、烷基芳基、烷基芳氧基、-OH、酰胺、羧酰胺、羧基、磺酰基、=O、=S、-NO₂、卤素、卤代烷基、任选被取代的饱和或不饱和稠环、-S(O)R、-SO₃R、-SR、-NRR'、-OH、-CN、-C(O)R、-OC(O)R、-NHC(O)R、-(CH₂)_nCO₂R 或 -(CH₂)_nCONRR'，其中 n 为 0-4，且其中 R 和 R' 独立地为 H、烷基、芳基或烷基芳基。取代基还包括用任选被取代的杂原子代替碳原子和一个或多个相连氢原子。

[0053] “磺酰基”是指 -S(O)₂R，其中 R 为烷基、芳基、-C(CN)=C- 芳基、-CH₂CN 或烷基芳基。

[0054] “硫代酰胺”是指 -C(S)NR'R''，其中 R' 和 R'' 独立地选自氢、烷基、芳基和烷基芳基。

[0055] “硫醚”是指 -SR，其中 R 为烷基、芳基或烷基芳基。

[0056] 本文使用的术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”包括聚合形式的任意长度的核苷酸，并且可包括核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、其类似物、或其混合物。该术语仅指所述分子的一级结构。因此，该术语包括三链、双链和单链的脱氧核糖核酸（“DNA”），以及三链、双链和单链的核糖核酸（“RNA”）。其也包括例如通过烷基化和 / 或通过加帽修饰和未修饰形式的多核苷酸。更具体地，术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”包括多脱氧核糖核苷酸（包含 2'-脱氧-D-核糖）；多核糖核苷酸（包含 D-核糖），包括剪接的或未剪接的 tRNA、rRNA、hRNA 和 mRNA；任何其他类型的多核苷酸，其为嘌呤碱基或嘧啶碱基的 N- 或 C-糖苷；以及其他包含非核苷酸骨架的聚合物，例如聚酰胺（例如肽核酸（PNA））和聚吗啉（可以作为 Neugene 从 Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oregon 购得）聚合物，和其他合成的序列特异性核酸聚合物——前提是所述聚合物包含允许碱基配对和碱基堆积的构型的核碱基（nucleobase），如存在于 DNA 和 RNA 中的核碱基。此处无意于区分术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”的长度，这些术语在本文中可交换使用。这些术语仅指所述分子的一级结构。因此，这些术语包括例如 3'-脱氧-2',5'-DNA、寡脱氧核糖核苷酸 N3' P5' 氨基磷酸酯、2'-O- 烷基取代的 RNA、双链 DNA 和单链 DNA、以及双链 RNA 和单链 RNA 及其杂合体（包括例如 DNA 和 RNA 之间或 PNA 和 DNA 或 RNA 之间的杂合体），还涵盖已知类型的修饰，例如标签、烷基化、“帽”、用类似物取代一个或多个核苷酸，核苷酸间修饰，例如采用不带电的键（例如膦酸甲酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等）、带负电的键（例如硫代磷酸酯（phosphorothioate）、二硫代磷酸酯（phosphorodithioate）等）以及带正电的键（例如氨基烷基氨基磷酸酯、氨基烷基磷酸三酯）的核苷酸间修饰、包含侧基部分例如蛋白质（包括酶（例如核酸酶）、毒素、抗体、信号肽、多聚-L-赖氨酸等）的核苷酸间修饰、采用嵌入剂（例如吡啶、补骨脂素等）的核苷酸间修饰、包含螯合物（例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等的螯合物）的核苷酸间修饰、包含烷基化剂的核苷酸间修饰、具有修饰键（例如 α 异构核酸等）的核苷酸间修饰，以及未修饰形式的多核苷酸或寡核苷酸。

[0057] 应认识到，本文使用的术语“核苷”和“核苷酸”所包括的部分不仅包含已知的嘌呤和嘧啶碱基，还包含其他被修饰的杂环碱基。这样的修饰物包括甲基化的嘌呤或嘧啶、酰基化的嘌呤或嘧啶、或其他杂环。经修饰的核苷或核苷酸还可包括糖部分上的修饰，例如，

其中一个或多个羟基被卤素、脂肪族基团代替,或被官能化为醚、胺等。术语“核苷酸单元”意欲涵盖核苷和核苷酸。

[0058] 此外,对核苷酸单元的修饰包括重排、追加、取代或改变与各自互补的嘧啶或嘌呤形成氢键的嘌呤或嘧啶碱基上的官能团。形成的经修饰核苷酸单元可任选地与其他此类经修饰核苷酸单元形成碱基对,但不与 A、T、C、G 或 U 形成碱基对。可包含不会妨碍多核苷酸功能的脱碱基位点。所述多核苷酸中的部分或全部残基可任选地以一种或多种方式被修饰。

[0059] 标准 A-T 和 G-C 碱基对在以下条件下形成:其可以使胸苷的 N3-H 和 C4-氧和腺苷的 N1 和 C6-NH₂ 之间分别形成氢键,并可以使胞苷的 C2-氧、N3 和 C4-NH₂ 和鸟苷的 C2-NH₂、N'-H 和 C6-氧之间分别形成氢键。因此,例如鸟苷(2-氨基-6-氧-9-β-D-呋喃核糖基-嘌呤)可被修饰形成异鸟苷(2-氧-6-氨基-9-β-D-呋喃核糖基-嘌呤)。此修饰得到不再与胞嘧啶有效地形成标准碱基对的核苷碱基。但将胞嘧啶(1-β-D-呋喃核糖基-2-氧-4-氨基-嘧啶)修饰形成异胞嘧啶(1-β-D-呋喃核糖基-2-氨基-4-氧-嘧啶)得到将不再与鸟苷有效地进行碱基配对、而将与异鸟苷形成碱基对的经修饰核苷酸。异胞嘧啶可从 SigmaChemical Co. (St. Louis, MO) 获得;异胞苷可通过 Switzer 等 (1993) *Biochemistry* 32:10489-10496 及其中引用的参考文献中描述的方法制备;2'-脱氧-5-甲基-异胞苷可通过 Tor et al., (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115:4461-4467 及其中引用的参考文献中的方法制备;异鸟嘌呤核苷酸可使用上述的 Switzer et al., (1993) 和 Mantsch et al., (1993) *Biochem.* 14:5593-5601 中描述的方法制备,或通过 Collins 等的美国专利 No. 5,780,610 中描述的方法制备。其他非天然碱基对可通过 Piccirilli et al., (1990) *Nature* 343:33-37 中所描述的合成 2,6-二氨基嘧啶及其互补物(1-甲基吡唑并-[4,3]嘧啶-5,7-(4H,6H)-二酮)的方法合成。已知其他形成独特碱基对的此类经修饰核苷酸单元,如 Leach et al., (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:3675-3683 和上述的 Switzer 等描述的那些经修饰核苷酸单元。

[0060] “核酸探针”和“探针”可交换使用,是指包含如上定义的多核苷酸的结构,所述多核苷酸包含可结合至相应被测物的核酸序列。探针的多核苷酸区域可由 DNA 和 / 或 RNA 和 / 或合成的核苷酸类似物构成。

[0061] “互补的”或“基本互补的”是指在核苷酸或核酸之间(例如在双链 DNA 分子的两条链之间或在多核苷酸引物和待测序或扩增的单链核酸上的引物结合位点之间)的杂交或碱基配对。互补核苷酸通常是 A 和 T(或 A 和 U)或 C 和 G。当两个单链 RNA 或 DNA 分子中的一条链的核苷酸——最好经过对齐和比较并具有适当的核苷酸插入或缺失——与另一条链的至少约 80%、通常至少约 90%至 95%、更优选约 98 至 100%的核苷酸配对时,就称这两个单链 RNA 或 DNA 分子是基本互补的。

[0062] 或者,当 RNA 或 DNA 链在选择性杂交条件下与其互补物杂交时,存在基本互补。通常,当在至少 14 至 25 个核苷酸的核苷酸段上,至少约 65%是互补的,优选至少约 75%,更优选至少约 90%是互补的时,将发生选择性杂交。见 M. Kanehisa *Nucleic Acids Res.* 12:203(1984)。

[0063] 严格杂交条件通常包括盐浓度低于约 1M,更通常低于约 500mM,优选低于约 200mM。杂交温度可以低至 5℃,但通常高于 22℃,更通常高于约 30℃,优选超过约 37℃。对

于特异性杂交,更长的片段要求更高的杂交温度。其他因素可影响杂交的严格度,包括互补链的碱基组成和长度、有机溶剂的存在与否和碱基错配程度,并且所使用的参数的组合比任何一个参数单独的绝对量度更重要。

[0064] 本文中“适体”(或“核酸抗体”)指借助其形状识别并结合至感兴趣的分子的单链或双链多核苷酸。见例如PCT公开文本No. WO 92/14843、WO 91/19813和WO 92/05285。

[0065] “多肽”和“蛋白质”在本文中可交换使用,包括通过肽键连接的氨基酸的分子链。该术语不是指一种具体长度的产物。因此,“肽”、“寡肽”和“蛋白质”也包括在多肽的定义内。该术语包括的多肽包含多肽的[翻译后]修饰,所述修饰例如糖基化、乙酰化、磷酸化和硫酸化。另外,蛋白质片段、类似物(包括不由遗传密码子编码的氨基酸,例如高半胱氨酸、鸟氨酸、D-氨基酸和肌酸)、其天然或人工突变体或变体或其结合物、融合蛋白、衍生残基(例如胺基团的烷基化、羧基基团的乙酰化或酯化)等包括在多肽的含义内。在述及蛋白质(包括抗体)和其他生物分子时,“修饰的”是指对一个或多个官能团(例如氨基酸的任一部分、糖或其他碳水化合物的结构和/或位置、或生物分子的其他取代基)的修饰,并且可没有限制地包括化学修饰(例如琥珀酰基化、酰基化、二硫键的结构和/或位置),以及(例如小分子包括药物的)非共价结合。

[0066] “氨基酸”既包括天然氨基酸又包括取代的氨基酸。“天然氨基酸”是指在肽领域中普遍接受的任一通常存在的氨基酸,除非另外指明,否则其代表L-氨基酸(除了非手性氨基酸如甘氨酸之外),包括由遗传密码子直接编码的20种典型的氨基酸,以及硒代胱氨酸、硒代甲硫氨酸和鸟氨酸。“被取代的氨基酸”是指包含一个或多个通常不是氨基酸的一部分的另外的化学部分的氨基酸。此类取代可通过能够与所选侧链或端位残基反应的目标衍生剂并通过其他本领域接受的方法引入。例如,半胱氨酰残基最通常与 α -卤代乙酸酯(和相应的胺)如氯乙酸或氯乙酰胺反应得到羧甲基衍生物或羧基酰胺基甲基衍生物。半胱氨酰残基也可通过与溴三氟丙酮、 α -溴- β -(5-咪唑基(imidazolyl))丙酸、磷酸氯乙酰胺、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶基二硫化物、甲基2-吡啶基二硫化物、对氯汞苯甲酸酯、2-氯汞-4-硝基苯酚或氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑反应被衍生化。羧基侧基(天冬氨酰基或谷氨酰基)可通过与碳二亚胺如1-环己基-3-(2-吗啉基-(4-乙基)碳二亚胺或1-乙基-3-(4-氮阳离子-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺反应被选择性修饰。天冬氨酰基和谷氨酰基残基可通过与铵离子反应被转化为天冬酰胺酰基和谷氨酰胺酰基。谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基可被脱酰胺基生成相应谷氨酰基和天冬氨酰基残基。或者,这些残基可以在温和酸性条件下被脱酰胺基。其他修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酰基或苏氨酰基残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(见例如T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecule Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), N末端的胺的乙酰化,和C末端的羧基的酰胺化。还可包含嵌段基团和/或活化基团。

[0067] 本文使用的术语“结合对”是指彼此特异性结合的第一和第二分子,其结合亲和力比与试样中的其他组分的结合亲和力更大。所述结合对的成员之间的结合通常是非共价的。示例性结合对包括免疫学上的结合对(如任何半抗原化合物或抗原化合物与相应抗体或其结合部分或片段的结合,例如地高辛和抗地高辛、荧光素和抗荧光素、二硝基苯酚和抗二硝基苯酚、溴脱氧尿苷和抗溴脱氧尿苷、小鼠免疫球蛋白和羊抗小鼠免疫球蛋白)、IgG

和蛋白质 A、IgG 和蛋白质 G、IgG 和蛋白质 L、以及非免疫学上的结合对（如生物素和生物素结合物质 [包括抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素、或其中之一的衍生物]、核苷酸和核苷酸结合蛋白质、激素 [例如甲状腺素和皮质醇] - 激素结合蛋白质、受体 - 受体激动剂或拮抗剂（例如乙酰胆碱受体 - 乙酰胆碱或其类似物）、IgG - 蛋白质 A、外源凝集素 - 碳水化合物、酶 - 酶辅助因子、酶 - 酶抑制剂、有机或无机分子和结合至该分子的生物分子、以及能够形成核酸双链体和 / 或更高级结构的两个多核苷酸）等。所述结合对的一个或两个成员可以与另外的分子结合。

[0068] 本文使用的术语“抗体”包括从多克隆和单克隆制剂得到的抗体，以及：杂合（嵌合）抗体分子（见例如 Winter et al. (1991) Nature 349 :293-299；和美国专利 No. 4, 816, 567）；F(ab')₂ 和 F(ab) 片段；Fv 分子（非共价异源二聚体，见例如 Inbar et al. (1972) Proc Natl Acad Sci

[0069] USA 69 :2659-2662；和 Ehrlich et al. (1980) Biochem 19 :4091-4096）；单链 Fv 分子 (sFv)（见例如 Huston et al (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85 :5879-5883）；二聚和三聚抗体片段构建体；微型抗体 (minibody)（见例如 Pack et al. (1992) Biochem 31 :1579-1584；Cumber et al. (1992) J Immunology 149B :120-126）；人源化抗体分子（见例如 Riechmann et al (1988) Nature 332 :323-327；Verhoeyan et al (1988) Science 239 :1534-1536；和英国专利公开文本 No. GB 2, 276, 169, 1994 年 9 月 21 日出版）；以及从此类分子得到的任何功能片段，其中此类片段保留了亲本抗体分子的特异性结合属性。

[0070] 本文使用的术语“单克隆抗体”是指具有同质抗体群的抗体组合物。该术语在抗体的种类和来源方面并不受限，也无意于受其制备方式的限制。因此，该术语囊括了从鼠科杂交瘤得到的抗体，以及使用人类杂交瘤或从由人类免疫球蛋白链基因或其部分的小鼠表达制备的鼠科杂交瘤得到的人类单克隆抗体。见例如 Cote et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 1985, p. 77。

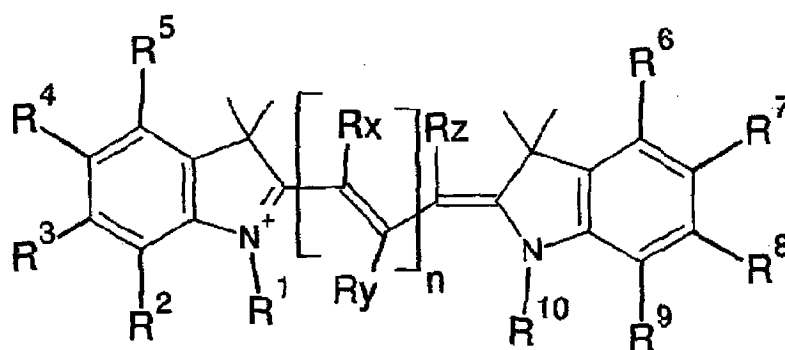
[0071] “多重”在本文中指多个被测物可被同时检测的检测法或其他分析方法。

[0072] “任选的”或“任选地”是指随后描述的事项或情况可以发生也可以不发生，并且该描述包括所述事项或情况单独或多个一起发生的情形，以及所述事项或情况根本不发生的情形。例如，表述“任选被取代的烷基”是指可以被取代也可以不被取代的烷基部分，并且该描述包括未被取代的、单取代的和多取代的烷基。

[0073] 光学活性花青

[0074] 提供了具有以下通式的光学活性花青，

[0075]



[0076] 或其异构体、酯、酰胺、酰基卤、酸酐和 / 或盐；

[0077] 或这些物质的混合物；

[0078] 其中：

[0079] n 为 0、1、2 或 3；

[0080] R^1 和 R^{10} 独立地选自任选被取代的烷基、任选被取代的杂烷基和任选被取代的烷基芳基，其中至少 R^1 和 R^{10} 之一为在芳基部分包含被取代的烷基或杂烷基取代基的被取代的烷基芳基，所述被取代的烷基或杂烷基取代基包含羧酸取代基；

[0081] R^2 至 R^9 独立地选自 H、 $-SO_3H$ 、任选被取代的烷基、或任选被取代的杂烷基，其中 R^2 至 R^9 中任何两个相邻的成员一起可形成一个任选被取代的 5-7 元单不饱和或多不饱和的稠环，所述稠环任选包含一个或多个环杂原子；

[0082] 其中 R^1 至 R^{10} 中的任一个可被偶联对中的成员另外任选取代；

[0083] R_z 和每个重复的 R_x 和 R_y 独立地选自 H、烷基、烷氧基、杂烷基、杂烷氧基、 $-CN$ ，或其中 R_x 、 R_y 和 R_z 中任何两个相邻的成员可共价结合形成任选被取代的 4-7 元单不饱和或多不饱和环，所述环任选包含一个或多个环杂原子。

[0084] 所述分子具有光学活性，表现为吸收和 / 或发射电磁能量。理想的是，所述分子可发荧光，并可参与多种形式的能量交换反应。

[0085] 理想的是，本发明的化合物可表现对多种应用有用的性质，包括在水性或基本呈水性的介质中良好的溶解性、良好的纯化特性、易于与其他物质轭合、以及如此制备的轭合物的良好的溶解性和纯化性质。

[0086] 应理解，尽管可示出所述化合物的具体异构体，但是所述化合物的所有异构体和所述异构体的混合物均落在本发明的范围内。

[0087] 特别感兴趣的是这样的实施方案，其中 R^1 和 R^{10} 之一或二者为在芳基部分包含被取代的烷基或杂烷基取代基的被取代的烷基芳基，所述被取代的烷基或杂烷基取代基包含羧酸取代基或其衍生物。以前发现，在烷基芳基取代基的相应于 R^1 和 R^{10} 的位置进行对羧基取代可导致花青发射下降。因为羧基赋予这些化合物需要的溶解性和偶联性质，因此可以合成实施方案使羧基不与芳环直接连接，从而干扰羧基部分与芳环轭合所引起的任何效应。发现使羧基不与芳基直接连接可赋予羧基直接结合在芳基上时没有荧光的相应结构以荧光发射。

[0088] 因此，感兴趣的还有这样的实施方案，其中所述羧酸取代基所连接的被取代的烷基或杂烷基取代基选自被取代的低级烷基和低级杂烷基。特别感兴趣的为 C1-2 烷基。

[0089] 感兴趣的还有其中 R^1 和 / 或 R^{10} 上的被取代的烷基芳基之一或二者为苯甲基、苯乙基或 3- 萘基丙烯基的实施方案。

[0090] 所述被取代的烷基芳基在其烷基和芳基部分的其他位置任选被取代。此类基团的被取代的芳基部分上的其他感兴趣的取代基包括选自以下的 1-4 个另外的基团： $=O$ 、 $=S$ 、酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基、杂烷基、任选被取代的烷氧基、任选被取代的氨基、任选被取代的芳基、任选被取代的芳氧基、叠氮基、羧基、（任选被取代的烷氧基）羰基、（任选被取代的氨基）羰基、氰基、卤素、任选被取代的杂芳基、任选被取代的杂芳氧基、任选被取代的杂环基、任选被取代的杂环氧基、羟基、硝基、硫烷基（sulfanyl）、亚硫酰基、磺酰基、磺酸基和偶联对的一个成员。特别感兴趣的有选自烷基、杂烷基、烷氧基、氨基烷基、卤素、三卤甲基和偶联对的一个成员的那些芳基取代基。

[0091] 感兴趣的还有其中 R^2 至 R^9 中的至少一个或至少两个为 SO_3H 或其衍生物的那些实施方案。特别感兴趣的实施方案包括其中 $R4$ 和 $R7$ 之一或二者为 $-SO_3H$ 或其衍生物的那些实施方案。示例性衍生物包括酯、酰胺和酰基卤, 以及盐。

[0092] 感兴趣的还有其中 n 为 1、2 或 3 的那些实施方案。

[0093] 感兴趣的还有以上感兴趣的实施方案、其衍生物、其混合物的组合和亚组合。一个此类感兴趣的实施方案的组合为其中:

[0094] R^1 和 R^{10} 各自为在芳基部分包含被取代的低级烷基或低级杂烷基取代基的被取代的苯甲基或被取代的苯乙基, 所述被取代的低级烷基或低级杂烷基取代基包含羧酸取代基;

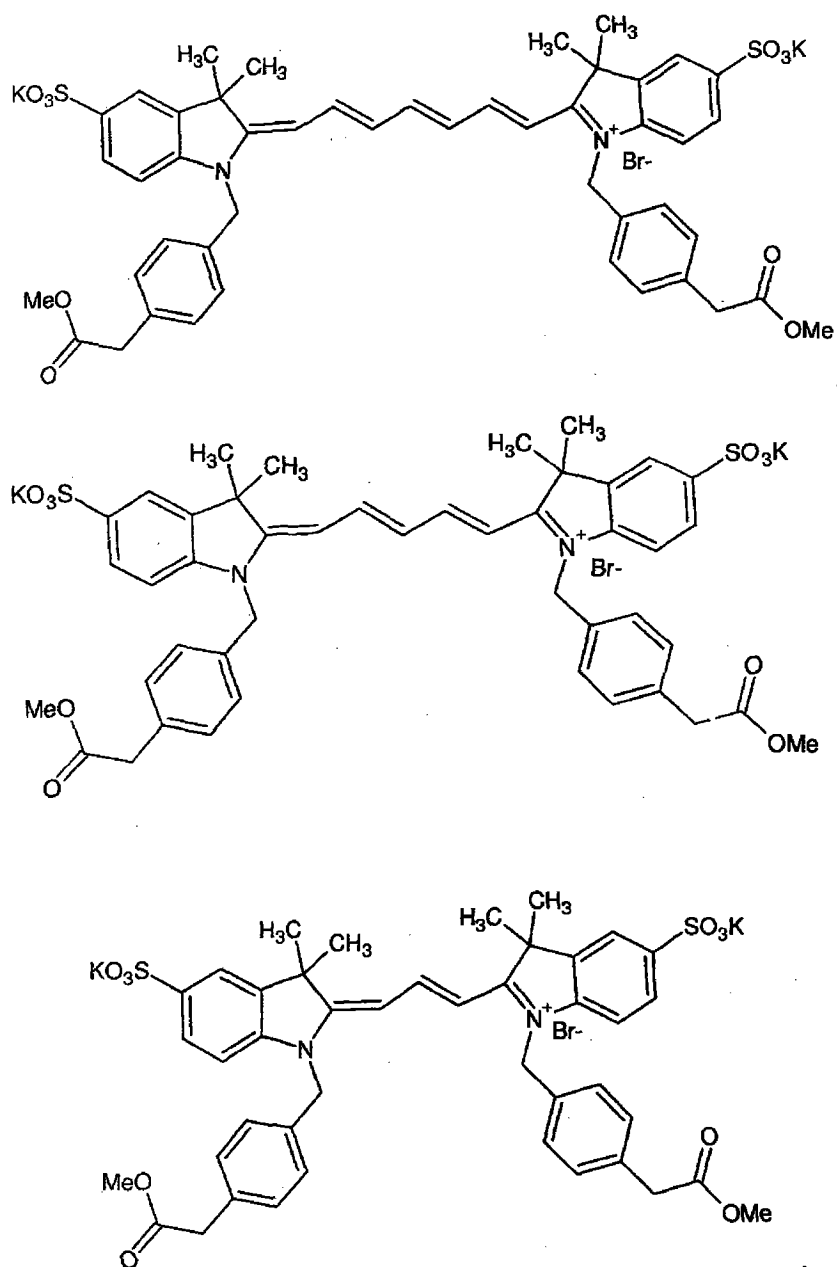
[0095] R^4 和 R^7 各自为磺酸基;

[0096] 或其异构体、酯、酰胺、酰基卤、酸酐和 / 或盐;

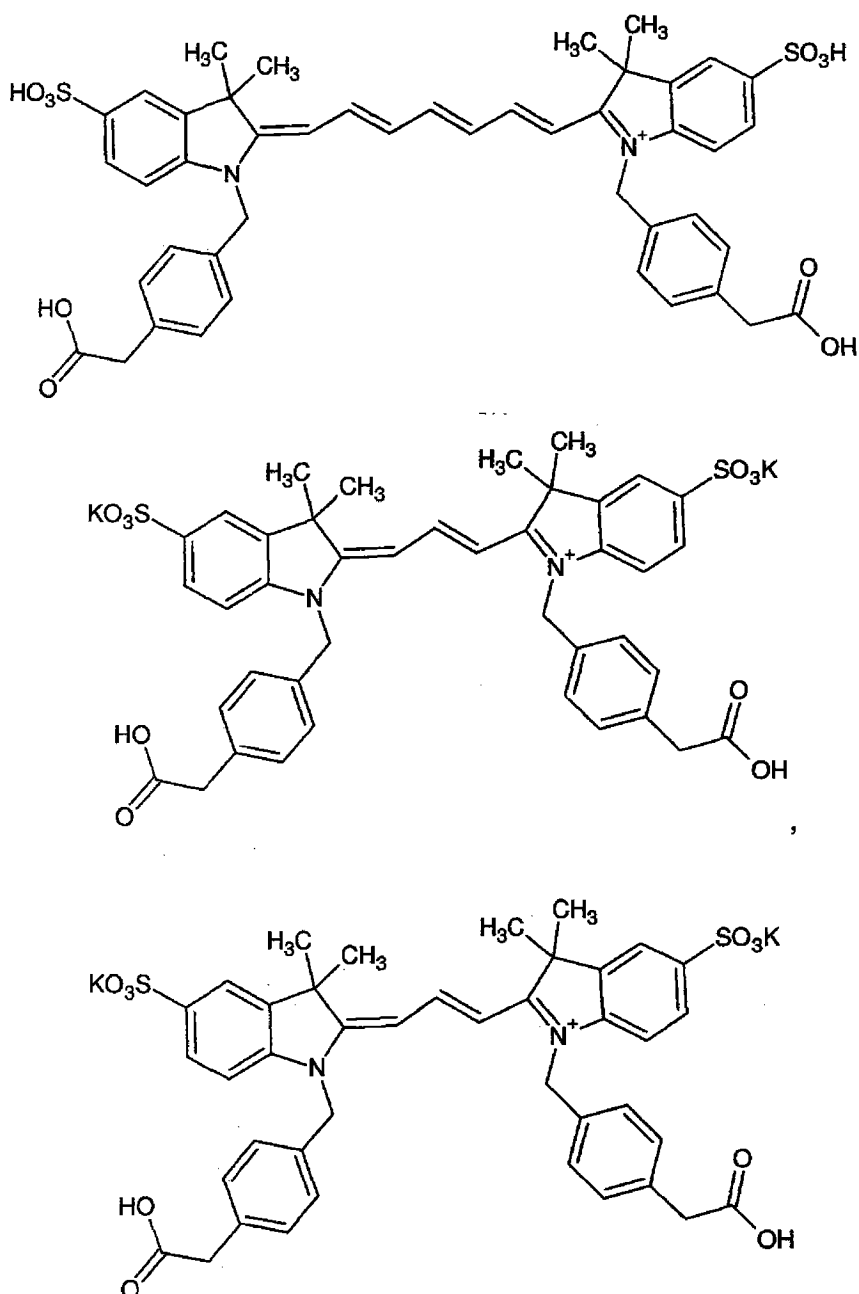
[0097] 或其中任何物质的混合物。

[0098] 感兴趣的还有本文描述的具体的实施方案 (通过通用名 nGy3、nGy5 和 nGy7 述及) 及其衍生物, 包括其异构体、酯、酰胺、酰基卤、酸酐和 / 或盐, 以及特别是含任何这些花青的混合物。感兴趣的具体化合物包括:

[0099]



[0100]



[0101] 及其中任何一种物质的酯、酰胺、酰基卤、酸酐、异构体和 / 或盐。

[0102] 所述化合物的盐可通过本领域已知的技术制备。关于与花青缔合的抗衡离子，“交换”、“代替”“取代”等是指在期望的位置交换至少 80% 的缔合抗衡离子。优选至少 85% 的抗衡离子被交换，更优选至少 90%，最优选 95% 或更多的抗衡离子被交换。在一些情况下，可能没有可测水平的与所述化合物缔合的原始抗衡离子。抗衡离子缔合可通过任何合适的技术例如通过 XPS 光谱和 / 或质谱测定。抗衡离子可通过本领域中已知的或可发现的任何合适的方法交换。示例性离子交换方法包括质量作用、渗析、色谱法和电泳法。抗衡离子交换后，花青的新盐形式可任选地被纯化和 / 或分离。可使用使感兴趣的盐被纯化和 / 或分离的任何合适的方法。示例性方法包括结晶、色谱法（例如排斥、HPLC、FPLC）、沉淀和萃取。类似地，酯、酰胺和酰基卤可由所述化合物形成，并且如果需要，使用已知技术来纯化和 / 或表征。

[0103] 感兴趣的还有通过将本发明的化合物溶于溶剂或溶剂混合物中制备的溶剂合物

和溶液。在一些实施方案中,本文描述的花青溶于水性溶液和其他高极性溶剂,也可溶于水。“水溶性”是指物质在基本呈水性的溶液中展现出溶解性,所述基本呈水性的溶液尽管包含大于 50 体积%的水,但并不排除所述溶液中含有其他物质,所述其他物质非限制性地包括缓冲剂、封端剂、共溶剂、盐、金属离子和清洁剂。可以单独地或者联合用于形成溶液的另外的溶剂包括 DMSO、DMF 和低级醇。可在任何合适形式的容器中提供溶液。溶液可包装在被设计用于被包含在溶液操作装置例如打印机中的容器中。在一些实施方案中,所述溶液可在被设计以与印刷设备一起使用的喷墨盒中提供。

[0104] 轭合物

[0105] 还提供了通过将本发明的一种或多种花青与一种或多种其他物质偶联形成的所公开的花青的轭合物。示例性的感兴趣的轭合物包括包含本发明的花青和生物分子、基质、探针、连接剂、靶标、低亲和力伪靶、小分子、结合对的一个成员、聚合物和 / 或光学活性物质 (特别是所述花青可与其交换能量的物质)、或这些物质的任何结合物的那些轭合物。

[0106] 探针和靶标形成如所述的结合对的成员。靶标包括细胞、细胞碎片和细胞表面分子,例如免疫系统分子、受体和指示特定细胞群或亚群的标记物。生物分子包括可通过活体制备或由活体获得的任何物质或物质的混合物,所述活体包括细胞或细菌培养物;示例性生物分子包括蛋白质、肽、多核苷酸、多糖、抗体、甘油三酯、脂蛋白和凝集素。

[0107] 可采用结合特定种类靶标的一种或多种探针。所述探针和所述靶标可形成彼此特异性结合的结合对。生物分子感应器可用作结合靶标生物分子的探针。多核苷酸感应器可以是带支链的、多聚的或环形的,但通常是直链的,并可包含非天然碱基。所述感应器可以是肽核酸,其分子结构是熟知的。

[0108] 任何聚合物均可用于形成轭合物,无论是以分立实体形式还是通过掺入另一种感兴趣的材料 (包括掺入基质之上或之内)。示例性的感兴趣聚合物包括:烃类聚合物 (例如由任选被取代的烯和 / 或任选被取代的炔形成);亲水聚合物;杂烷基聚合物,包括聚环氧烷 (包括聚环氧乙烷和聚环氧丙烷);聚胺;和树枝状聚合物 (dendrimer)。聚合物可以是光学活性物质,或可以并入其他光学活性物质。

[0109] 在一些实例中,所述聚合物和 / 或生物分子可用作本发明的花青的载体,且在用于生理环境时,可延长其半衰期。例如,花青可以与血清白蛋白 (例如牛、兔、小鼠、人)、球蛋白 (例如 α 、 β 、 γ 或免疫球蛋白)、或亲水聚合物 (例如聚环氧烷如聚乙二醇、聚丙二醇或其共聚物) 偶联。

[0110] 感兴趣的光学活性物质包括所述花青可与其 -- 无论是直接地还是通过中间物质 -- 交换能量的那些光学活性物质。光学活性物质可包括合成染料、半导体纳米晶体、镧系元素螯合物、聚合物蛋白质和 / 或其光学活性片段。示例性蛋白质包括绿色荧光蛋白,可作为替换物的其有色衍生物,海肾 (Renilla) 荧光素酶,藻红素 (PE),藻红素 B,藻红素 R、B 或 Y,藻青素和别藻蓝蛋白 (APC),以及其中任何一种物质的衍生物。一些具体的感兴趣的轭合物包括 PE-APC-NGy7、PE-NGy5 和 NGy3-APC。轭合物可包含多于一种另外的光学活性物质。

[0111] 轭合物可通过其组分上的部分的反应形成,可包含用于偶联和 / 或适当隔离所述组分的连接基团。用作轭合物的前体的组分包含或被衍生来包含可与其他轭合物组分上的偶联对的相应成员反应的偶联对的一个或多个成员。正如本领域已知的那样,可根据需要

使用适当的封闭策略,以保护不用于铎合物形成的官能团。

[0112] 示例性偶联方案包括胺偶联(amine coupling)、硫醇偶联(thiolcoupling)、醛偶联(aldehyde coupling)、酪氨酸偶联、聚合偶联和双官能(或多官能)交联剂。胺偶联可通过一个组分上的氨基与另一个组分上的活化的酯(例如 N-羟基琥珀酰亚胺酯)的反应完成。硫醇偶联可通过一个组分上的活化的硫醇基(例如 2-吡啶基二硫基部分)与另一个组分上的硫醇基反应完成。或者,一个组分上的硫醇基可与另一个组分上的马来酰亚胺或碘乙酰基反应。醛偶联可通过一个组分上的醛基与另一个组分上的酰肼基反应完成。酪氨酸基团可与重氮基偶联。聚合偶联可通过制备连接在感兴趣的组分上的衍生单体或重复单元,然后进行掺入所述衍生单体的聚合反应完成。偶联成员可以是待偶联的物质上本来存在的,也可以是引入的;引入此类基团的化学方案是已知的。例如,醛基可通过用偏高碘酸钠氧化顺式二醇(如在多种多元醇包括糖、多糖和糖铎合物中发现的)引入。双官能和杂双官能交联剂也可用以连接原本不能直接连接的官能团;例如,戊二醛可用以交联两个氨基,马来酰亚胺酰肼可用以连接硫醇基和甲酰基(Heindel et al., Bioconj. Chem. 2(6): 427-30, 1997, Nov. -Dec.)。

[0113] “连接基团”或“连接剂”可被铎合至本发明的花青,并可用以使任何种类的铎合物彼此铎合。所述连接基团的具体组成并不重要。示例性连接基团包括烷基、杂烷基(例如,聚醚、烷基胺、聚胺)、芳基、杂芳基、烷基芳基、合成聚合物、天然聚合物、氨基酸、碳水化合物、多肽、或其结合物,每个如本文关于连接基团的组分所述一样任选地被取代。在一些实施方案中,连接基团可以是对称的、刚性的和/或立体位阻的,或可包含具有一种或多种所述性质的区域。连接剂可被设计来在其偶联的两种物质之间引入适合能量转移的间隔距离,例如赋予约 10 至约 100 埃的间距。所述连接剂可引入小于约 100 埃、小于约 70 埃、小于约 30 埃或小于约 20 埃的距离。所述连接基团可包含偶联对的一个或多个不同成员,通常包含偶联对的至少两个成员以允许连接至少两种物质。

[0114] 在一些实施方案中,所述花青可沉积于基质之上、与之偶联或连接。所述基质可包含宽范围的材料,无论是生物的、非生物的、有机的、无机的,还是这些物质的结合物。在一些实施方案中,所述基质可以是透明的。所述基质可以是刚性材料,例如一种刚性塑料或一种刚性无机氧化物。所述基质可以是柔性材料,例如透明的有机聚合物如聚对苯二甲酸乙二醇酯或柔性聚碳酸酯。所述基质可以是传导性的或非传导性的。

[0115] 所述花青可以以多种形式中的任一种沉积在基质上。例如,所述基质可以是聚合的 L-B 膜、功能化玻璃、Si、Ge、GaAs、铟掺杂的 GaN、GaP、SiC(Nature 430:1009, 2004)、SiO₂、SiN₄、半导体纳米晶体、改性硅,或多种凝胶或聚合物中的任一种,如(聚)四氟乙烯、(聚)偏 1,1-二氟乙烯、聚苯乙烯、交联的聚苯乙烯、聚丙烯酸、聚乳酸、聚甘醇酸、聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚酐、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚硅氧烷、聚合二氧化硅、乳胶、葡聚糖聚合物、环氧化物、聚碳酸酯、琼脂糖、聚(丙烯酰胺)或其结合物。可使用传导聚合物和光导材料。所述基质可以采取光二极管、光电子感应器如光电子半导体芯片或光电子薄膜半导体、或生物芯片的形式。

[0116] 在一些实施方案中,所述基质可以是形状不均匀/不规则的颗粒。所述颗粒可具有至少两个不同(X-、Y-和/或Z-)维度,可具有三个(或更多个,对于具有罕见形状的颗粒)不同维度。因此所述颗粒是非球形的,具有不是实心球形的形状。在一些实施方案中,

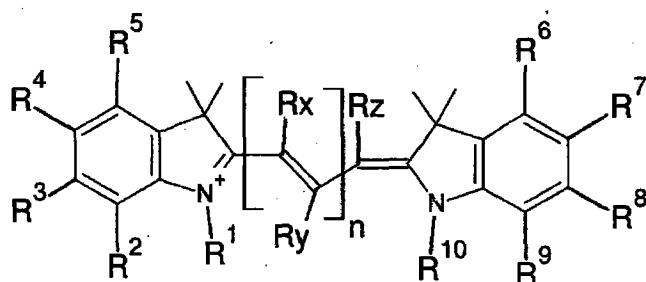
所述颗粒具有比球形或占据相同体积的其他实心形状更多的表面积。理想的是,所述不均匀颗粒具有使表面积大幅增加的不规则表面(在宏观和微观上)。所述颗粒理想地展现出至少增加 2 倍的表面积,并且可展现出至少增加 3 倍、5 倍、10 倍或 20 倍的表面积。所述颗粒可展现出比类似大小的光滑球形颗粒增加最高达 30 倍、40 倍、50 倍、100 倍或 200 倍的表面积。所述颗粒可展现出比类似大小的球形颗粒增加的结合能力,这可由表面积的增加和/或由用于结合被测物的俘获部分(或可衍生的官能度)密度的增加所引起。理想的是,所述颗粒的至少一个、两个或三个(或全部)维度可小于约 30 或 40 微米,这与流式细胞计数系统是相容的,且这些维度可以小于约 20 微米,小于约 10 微米,或小于约 2 微米。关于这些维度,应理解此类颗粒通常以不同大小的分布提供,且所述颗粒将展现出满足该限制的平均分布,因此一个群中的平均颗粒将满足此类限制。所述颗粒通常是珠粒状的,但没有均匀球形表面,并可以是多孔的——多微孔的或多大孔的,也可以是无孔的。

[0117] 平均直径小于 2 微米的颗粒可能是理想的,因为它们可表现出改进的悬浮性质,所述改进的悬浮性质可导致与试样接触增加和/或结合能力更高。

[0118] 除了所述花青之外,轭合物还可包含多于一种的其他的物质。例如,轭合物可包含花青、所述花青可与其交换能量的光学活性物质、以及针对感兴趣的靶标的探针或感应器。此类轭合物还可包含低亲和力伪靶,其在不存在感兴趣的靶标时封闭所述探针/感应器组分,并以比所述靶标更低的亲和力进行结合,从而可降低或消除由在靶标不存在时探针/感应器区域的非真实结合所形成的背景信号。

[0119] 具体的感兴趣的花青轭合物包括包含下式的化合物的轭合物

[0120]



[0121] 或其异构体、酯、酰胺、酰基卤、酸酐和/或盐;

[0122] 其中:

[0123] n 为 0、1、2 或 3;

[0124] R^1 和 R^{10} 独立地选自任选被取代的烷基、任选被取代的杂烷基和任选被取代的烷基芳基,其中至少 R^1 和 R^{10} 之一为在芳基部分包含被取代的烷基或杂烷基取代基的被取代的烷基芳基,所述被取代的烷基或杂烷基取代基包含羧酸取代基;

[0125] R^2 至 R^9 独立地选自 H、 $-SO_3H$ 、任选被取代的烷基、或任选被取代的杂烷基,其中 R^2 至 R^9 中任何两个相邻的成员一起可形成任选被取代的 5-7 元单不饱和或多不饱和的稠环,所述稠环任选包含一个或多个环杂原子;

[0126] R_z 和每个重复的 R_x 和 R_y 独立地选自 H、烷基、烷氧基、杂烷基、杂烷氧基、 $-CN$,或其中 R_x 、 R_y 和 R_z 中任何两个相邻的成员可共价结合形成任选被取代的 4-7 元单不饱和或多不饱和环,所述环任选包含一个或多个环杂原子;

[0127] 其中所述化合物通过偶联对的一个成员在 R^1 至 R^{10} 中的任一个上结合至第二种物

质,所述第二种物质选自探针、连接剂、靶标、聚合物、生物分子、低亲和力伪靶、结合对的一个成员、光学活性物质和 / 或基质。

[0128] 感兴趣的花青甾合物包括其中所述花青甾合至基质(包括珠粒)的那些甾合物。所述花青可单独或联合用于标记感兴趣的任何甾合物,并可包含在涉及光学标记和 / 或能量转移的编码方案中。在一些实施方案中,所述花青被甾合至不规则形状的颗粒。

[0129] 感兴趣的还有这样的甾合物,其包含具有上述结构的花青,或其异构体、酯、酰胺、酰基卤、酸酐和 / 或盐;

[0130] 或其中任何一种的混合物;

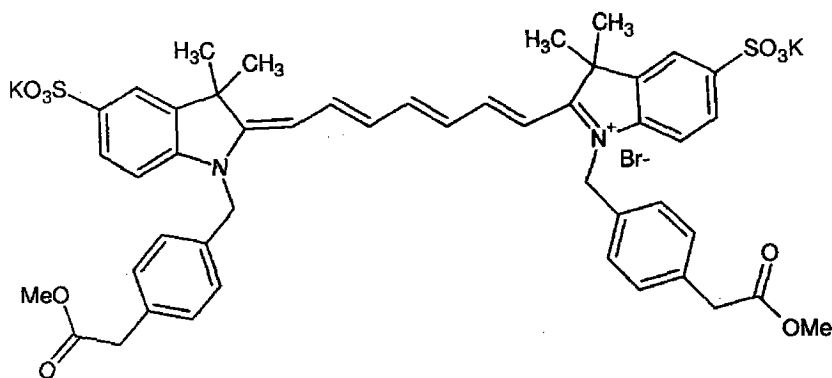
[0131] 其中:

[0132] R^1 和 R^{10} 各自为在芳基部分包含被取代的低级烷基或低级杂烷基取代基的被取代的苯甲基或被取代的苯乙基,所述被取代的低级烷基或低级杂烷基取代基包含羧酸取代基;

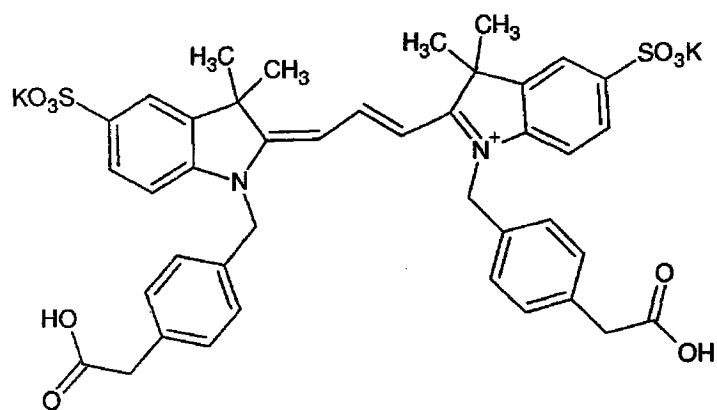
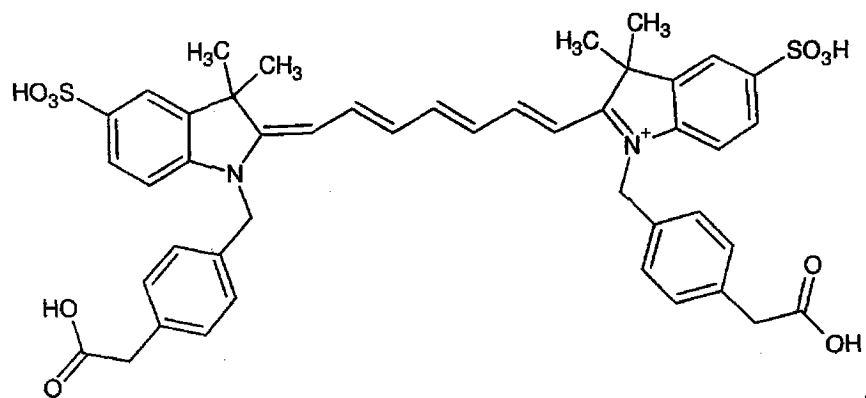
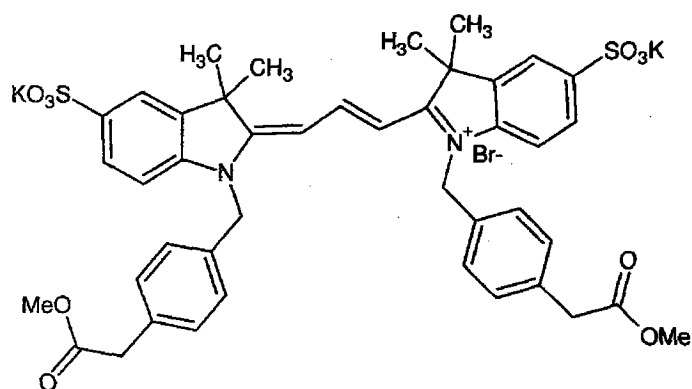
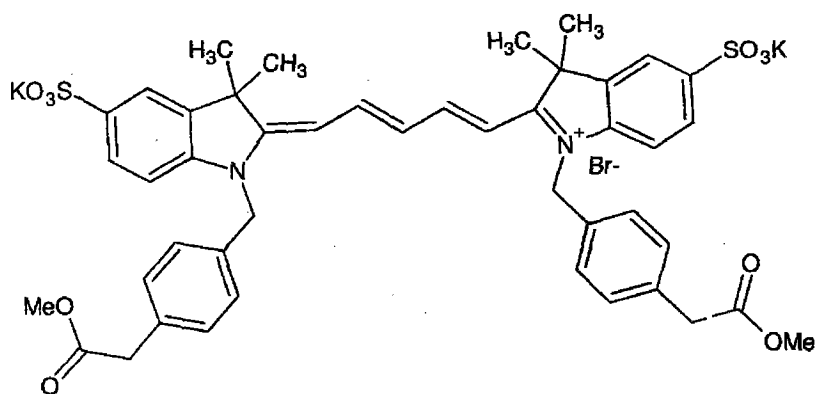
[0133] R^4 和 R^7 各自为磺酸基。

[0134] 感兴趣的还有这样的甾合物,其中所述化合物具有选自以下的结构:

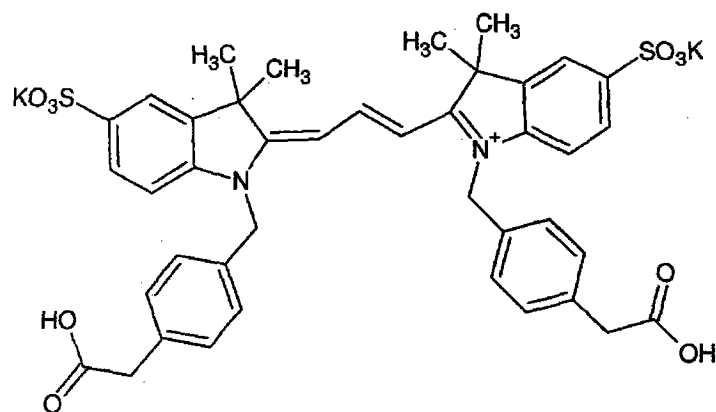
[0135]



[0136]



[0137]



[0138] 及其中任何一种的酯、酰胺、酰基卤、酸酐、异构体和 / 或盐,其中所示的化合物通过所述被取代的烷基芳基上的羧酸基团中的至少一个铈合至至少一个第二种物质。

[0139] 制品

[0140] 本发明的花青可被掺入本文描述的制品以及之前已使用花青的制品中。示例性制品包含铈合物如衍生颗粒或珠粒、结合对的衍生成员、抗体铈合物、衍生小分子、生物感应器、染色剂,并可以以阵列或微阵列形式使用。所述花青可在信息存储设备例如 CD-R 和 DVD-R 介质中与合成聚合物(例如乙烯基聚合物)联合用于全息光栅。

[0141] 花青标记的物质(探针和 / 或靶标)可形成掺入所述探针、其靶标以及一种或多种铈合的花青的检测复合物。还提供了包含激发态的本发明的花青的组合物和制品,所述激发态的花青或者通过用电磁源直接激发,或者通过从一个或一系列不同分子能量转移获得。这些制品包含铈合的感应器以及包含被激发花青的检测复合物。

[0142] 溶液加工方法可用以将花青掺入合适的制品中。有利的是,印刷技术可用于在某些环境例如喷墨印刷、胶版印刷等中沉积所述花青。如果需要,在包含花青的溶液被沉积之后,可除去溶剂。任何可用的方法或方法的组合可用于除去溶剂。示例性溶剂除去方法包括蒸发、加热、萃取、和将溶液置于真空下,以及包含上述方法的组合。

[0143] 使用方法

[0144] 本文描述的花青可用于多种方法,如已知使用其他花青和其他荧光化合物的方法。所述花青可用于感兴趣的物质的直接标记、检测和 / 或定量。所述花青可通过用花青标记结合对的一个成员用于结合试验,包括竞争性结合试验。所述花青可直接地或通过一种或多种中间物质结合至基质。铈合的物质(包括铈合的颗粒)可用于目标被测物的检测和 / 或定量。

[0145] 示例性使用方法包括细胞计数装置、使用例如单标记或多标记的核苷酸和 / 或染料终止剂的多核苷酸测序、微阵列和纳米阵列标记、编码法和能量转移实验。所述花青可用于基于珠粒的测试和 / 或细胞测试。可使用所述花青的其他生物学应用包括竞争性基因组杂交、转录组学和蛋白质组学、以及作为标记物用于微观应用。本发明的花青可用作供体、受体、或既作供体又作受体,包括在多重能量转移方案中,其中本发明的花青形成一个或多个组分。

[0146] 所述花青可用于筛选感兴趣的性质的方法中。例如,可检测材料的增加的荧光效率、吸收波长、发射波长、传导性质和本文描述的其他性质。花青可用以增加照相乳剂的感光范围。

[0147] 在一些实施方案中,提供了针对靶标分析试样的方法,包括提供疑似包含靶标的试样,使所述试样与包含花青和探针或感应器的轭合物在其中所述探针可以结合至所述靶标——如果存在——以形成检测复合物的条件下接触,使疑似包含所述检测复合物的所述试样或其部分与可被所述化合物吸收或转移至所述化合物的能量源接触,以及测定能量是否已被所述复合物吸收或转移至所述复合物。此类测试还可包括所述轭合物和/或检测复合物中的低亲和力伪靶,其可通过使所述轭合物与真正的靶标结合而被移离探针区域。

[0148] 此类测试中的靶标被测物可以是生物分子,例如肽或蛋白质、多核苷酸如 DNA 或 RNA、抗体、糖类、寡糖、多糖等。或者,所述靶标被测物可以是小分子,且可以是有机或无机的。

[0149] 在一些实施方案中,包含或疑似包含被测物的试样或试样的部分可以是任何来源的生物材料,包括细胞、组织或液体(包括体液),以及生物体(包括病毒、支原体)留下的沉积物,和化石。通常,所述试样以基本呈水性的介质形式获得或分散于基本呈水性的介质中。所述试样的非限制性实例包括血液,尿液,精液,奶,痰,粘液,口腔黏膜拭子,灌洗物,阴道拭子,直肠拭子,呼出气,针刺活检组织,通过例如外科手术或尸体解剖得到的组织切片,血浆,血清,脊髓液,脑脊髓液,羊水,淋巴液,皮肤、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的外分泌物,眼泪,唾液,瘤,器官,体外细胞培养成分试样(包括但不限于细胞在细胞培养基中生长得到的条件培养基、推定受病毒感染的细胞、重组细胞和细胞组分(非限制性地包括产生人或鼠科抗体的杂交瘤上清液,以及从产生片段或修饰形式的抗体或其他免疫学上的蛋白或分泌蛋白质的细胞得到的上清液),溶胞产物和包含多核苷酸序列的重组文库。

[0150] 所述试样可以是已知包含所述被测物的阳性对照试样。可也使用阴性对照试样,尽管预期所述阴性对照试样不包含所述被测物,但其被怀疑包含所述被测物,并对其进行试验以证实没有被指定测试中使用的试剂的靶标被测物污染,以及确定是否给定系列的测试条件产生假阳性(甚至在所述试样中不存在被测物的情况下也具有阳性信号)。

[0151] 所述试样可被稀释、溶解、悬浮、纯化、萃取或以其他方式处理以溶解或再悬浮存在的任何靶标被测物,或使其可接触到试剂。

[0152] 激发和检测

[0153] 提供可激发所述花青和/或所述花青可与其交换能量的物质并且比待检测的发射波长短的波长的任何仪器均可用于激发。市售可得的设备可提供合适的激发波长和合适的检测组件。可使用任何可被产生和检测的电磁发射波长。

[0154] 示例性激发源包括宽频紫外线光源,如具有适当滤光片的氙灯、穿过单色器以分离出需要波长后的白光光源如氙灯或氙灯的输出、连续波(cw)气体激光器、固态二极管激光器、或任何脉冲激光器。发射光可通过任何合适的设备或技术检测;多种合适的方法是本领域中已知的。

[0155] 用于激发的入射光波长可包括 300nm 至 1000nm 波长的光。示例性的有用入射光波长包括,但不限于,至少约 300、350、400、450、500、550、600、700、800 或 900nm 的波长,且可以小于约 1000、900、800、700、600、550 或 500nm。示例性的有用入射光在 450nm 至 500nm、500nm 至 550nm、550nm 至 600nm、600nm 至 700nm 和 700nm 至 1000nm 的区域。在一些实施方案中,所述复合物在用包括波长约为 488nm、约 532nm、约 594nm 和/或约 633nm 的入射光照射时成为激发态。另外,有用的入射光波长可包括,但不限于,488nm、532nm、594nm 和 633nm

波长的光。

[0156] 可使用可检测由花青或能量已转移至其的物质产生的发射光的任何装置,非限制性地包括显微镜、分光光度计、流式细胞仪(其可为流体力学聚焦)、成像系统、成像流式细胞仪和基于板的成像系统。对本发明方法有用的系统的非限制性的实例包括 **Guava**[®] EasyCyte[™]、**Guava**[®] EasyCyte[™] Mini、**Guava**[®] PCA[™]、**Guava**[®] PCA[™]-96、**Guava**[®] EasyCyte[™] Plus、FACS[™] Aria、FACS[™] Canto、Beckman Coulter Quanta[™]、Amnis ImageStream[™]、MolecularDevices ImageXpress[™] 装置和类似设备。可使用其他装置,包括板负载设备、板冲洗设备、板摇摆设备和对处理任何测试成分有用的类似设备。

[0157] 实施例

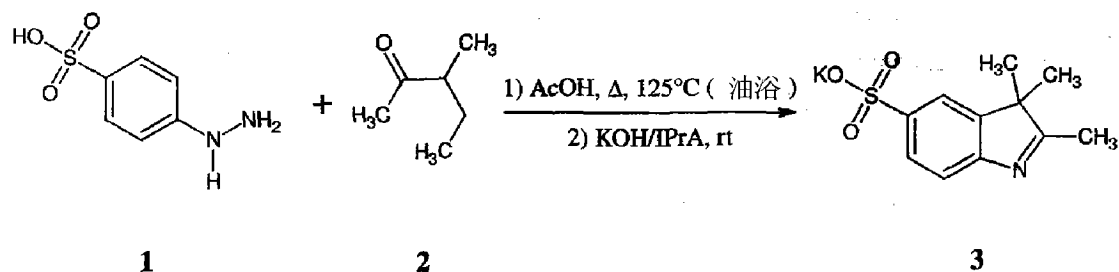
[0158] 阐明下列实施例以给本领域的普通技术人员提供如何做出并使用本发明的完整描述,但不打算限制本发明的范围。已努力确保所使用的数值(例如量、温度等)的准确性,但仍需考虑到一些实验误差和偏差。除非另外指出,否则份为重量份、温度为摄氏度,并且压力为大气压或接近大气压,且所有材料是市售可得的。

[0159] 实验

[0160] 下列实施例说明了本发明的某些实施方案,包括光学活性化合物、其含有偶联用活化物质的衍生物、包含所述光学活性物质的偶联产物的合成,以及所制备材料的表征。在一些实例中,尽管反应表现为制备具体形式的化合物,但是所述化合物可在一个或多个酸性位置被质子化,作为一种或多种盐,或作为其混合物。

[0161] 实施例 1. 初始材料的合成

[0162]

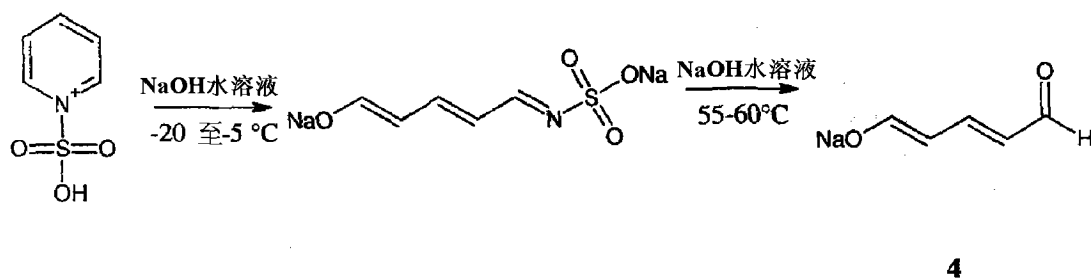


[0163] 步骤:将化合物 1(10.02g) 和 2(18mL) 在冰乙酸中的混合物加热回流(125℃, 油浴)3 小时。在该反应过程中,固体成为溶液且变为深红色。将反应混合物冷却至室温以形成粉红色沉淀物。过滤该沉淀物以除去乙酸,然后在高真空度下干燥得到 9.90g 浅粉红色固体(收率为 67%)。将该固体部分溶于甲醇(50mL)中,然后分批加入 KOH/ 异丙醇(40mL)直至所述混合物变为碱性,得到一种黄色沉淀物,将其通过过滤收集并在高真空度下干燥。产量为 9.15g,62.2%。

[0164] 实施例 2. 吡啶鎓-1-磺酸盐水解形成戊烯二醛钠盐。

[0165] [2- 戊烯二醛, ION(i-), 钠]

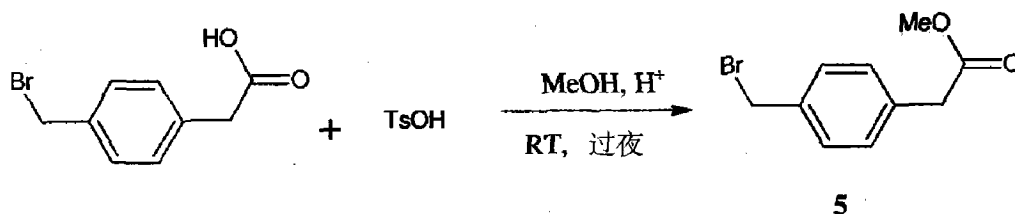
[0166]



[0167] 步骤:将 NaOH(4.3g) 水溶液混合物冷却至 -20°C , 并一次性加入吡啶鎓-1-磺酸盐(4.8g, 在 20mL 水中) 溶液。在 -20°C 至 -5°C 下搅拌所述混合物 50 分钟。将所述混合物升温至室温, 然后加热至 $50-60^{\circ}\text{C}$ 1 小时(深橙色)。将所述反应混合物冷却至室温, 然后冷却至 -10 至 -5°C 以形成一种褐色沉淀物。所述褐色沉淀物通过抽滤过滤, 并用丙酮($3 \times 30\text{mL}$) 冲洗。形成的黄褐色固体在 50°C 下高真空度过夜干燥, 得到 2.43g 需要的产物(Org. Syntheses Collective 第 6 卷, 640 页)。

[0168] 实施例 3. 溴甲基苯基乙酸甲酯的合成。

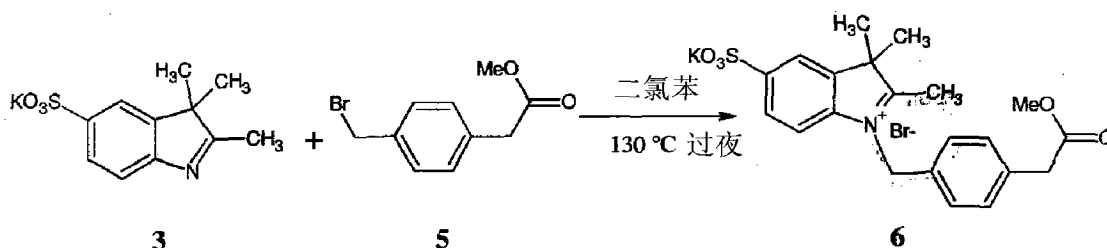
[0169]



[0170] 步骤:将溴甲基苯基乙酸和 TsOH 在甲醇中的混合物在室温下搅拌过夜。使用薄层色谱(TLC)(20%乙酸乙酯)证明新点的形成及起始材料的消失。真空浓缩所述反应混合物得到为浓稠无色油状的粗产物 5。该粗产物无需另外纯化即可用于后面的反应。

[0171] 实施例 4. 被取代的烷芳基前体(AD-143-91)的合成

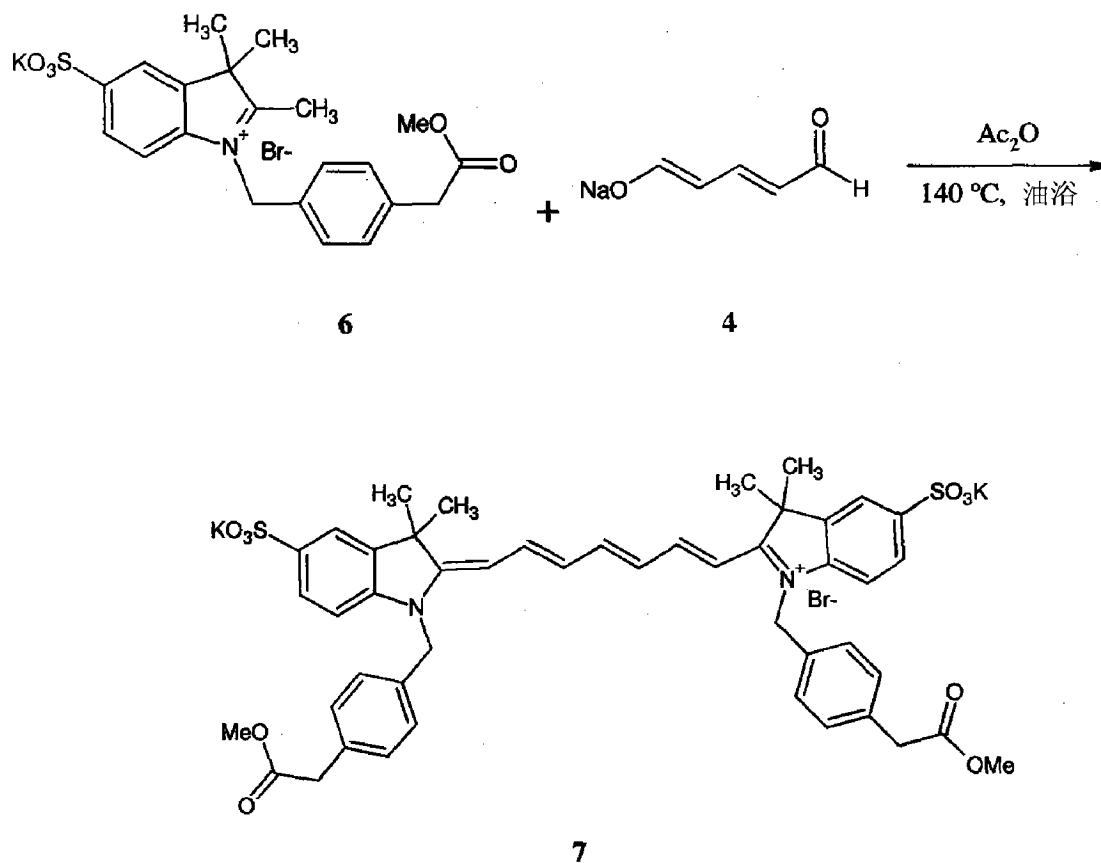
[0172]



[0173] 步骤:将 1.52g 化合物 3 和 2.0g 粗化合物 5 在 30ml 二氯苯中的混合物加热至 130°C (油浴)过夜。形成一种紫色固体 6(AD-143-91) 沉淀物, 通过过滤将其收集并在高真空度下干燥。

[0174] 实施例 5. NGy7-OMe 的合成。

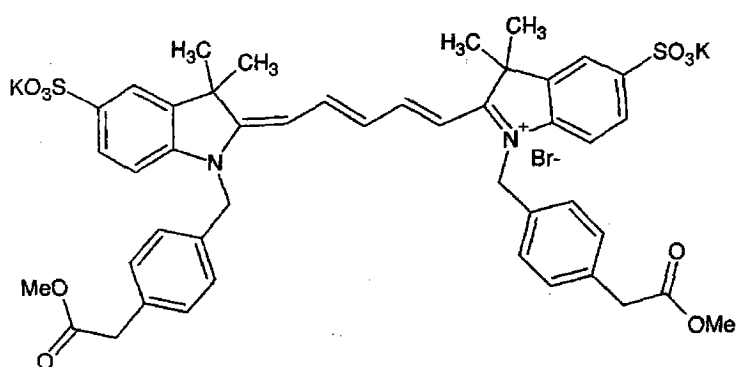
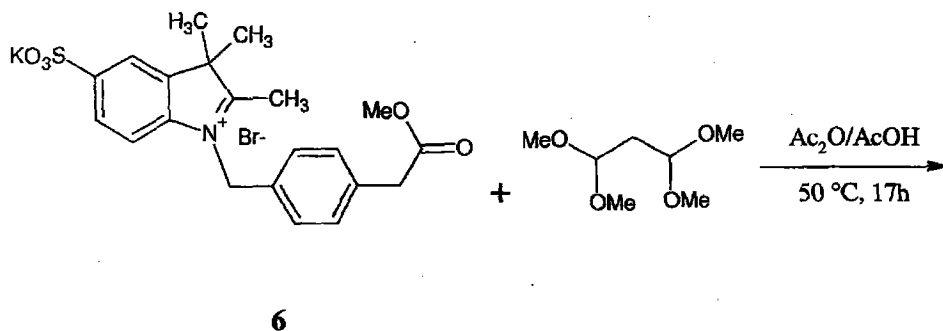
[0175]



[0176] 步骤：向 5mL 乙酸酐的回流溶液中一次性添加 0.74g 化合物 6 和 85mg 化合物 4 的固体混合物。将所述反应混合物冷却至室温，并再搅拌 1.5 小时。加入 80mL 乙酸乙酯，通过过滤收集为深绿色固体的产物。通过柱色谱（反相 $H_2O \rightarrow 30\%$ 乙腈水溶液）纯化得到需要的产物 7 (NGyOMe)。

[0177] 实施例 6. NGy5-OMe 的合成。

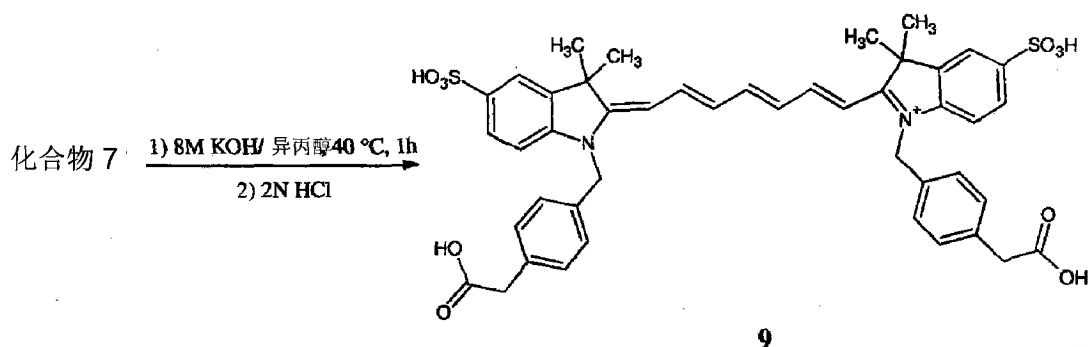
[0178]



[0179] 步骤:将 521mg 化合物 6、566 μ l 的 Ac_2O 、117 μ l 的 AcOH 、2mL 的 N-甲基-2-吡咯烷酮和 165 μ l 的 1,1,3,3-四甲氧基丙烷的混合物加热至 50 $^{\circ}\text{C}$ 17 小时。使用 TLC(25% $\text{AcCN}/\text{H}_2\text{O}$) 证明需要的产物的形成。将所述混合物在真空中浓缩得到粗产物 8。通过制备 TLC(1mm 硅胶板,反相 25%乙腈/ H_2O) 纯化所述粗产物。

[0180] 实施例 7. NGy7-OH 的合成。

[0181]



[0182] 步骤:将 44mg 化合物 7(AD-143-93) 和 200 μ l 的 8M KOH 在异丙醇中的混合物加热至 40 $^{\circ}\text{C}$ 1 小时。使用 TLC(25%乙腈/ H_2O) 证明水解成需要的酸的完成。混合物用 850 μ l 的 HCl (2N) 酸化,在真空下干燥得到需要的产物 9(AD-143-99, NGy7-OH) 或其盐或混合物。

[0183] 实施例 8. NGy7-Bis NHS 酯的合成。

[0184] 步骤:将 80mg 的 9 (AD-143-99, NGy7-OH)、90mg DSC (二 (N-琥珀酰亚胺基) 碳二亚胺) 和 50 μ l 吡啶在 1mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中的混合物加热至 55°C (油浴) 过夜, 以制备 NGy7 的二-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (10)。所述反应可以用 TLC (反相, 25% 乙腈水溶液) 监测; 如果存在未反应的起始材料, 可再加入 90mg 的 DSC 和 50ml 吡啶, 并继续加热 5 小时。将所述混合物冷却至室温, 并用无水乙酸乙酯冲洗两次, 再用无水二氯甲烷冲洗两次。将产物 10 转移至几个小瓶中。

[0185] 实施例 9. NGy5-OH 的合成。

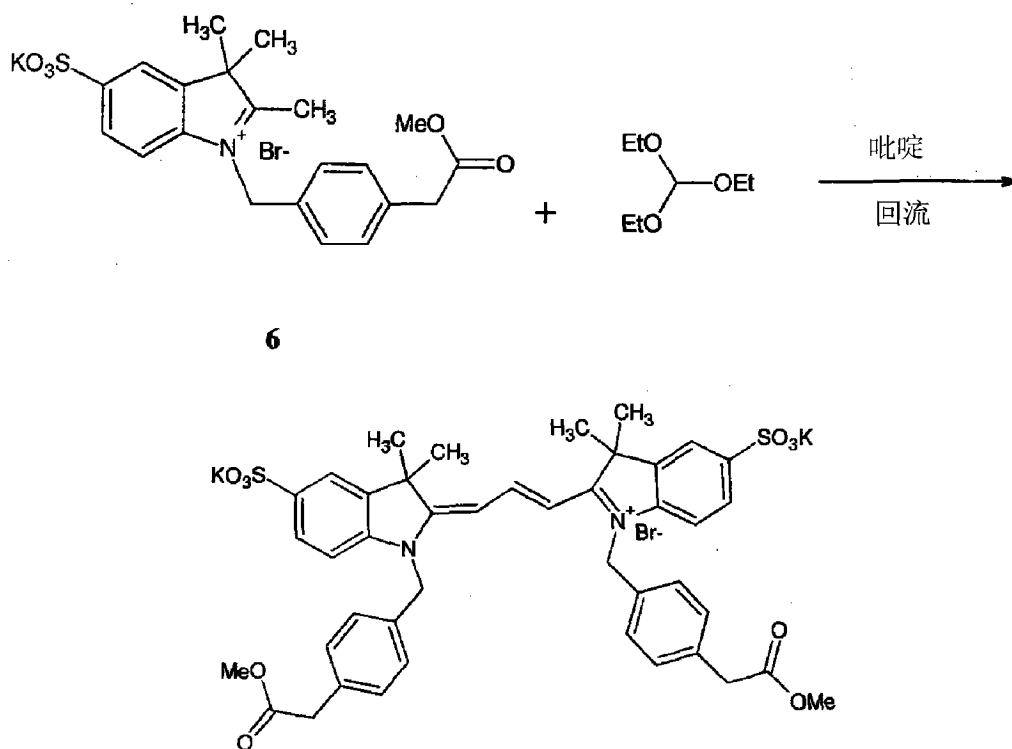
[0186] 步骤:将 227mg 化合物 8 (AD-143-97) (NGy5-OMe) 和 0.625mL 的 KOH/ 异丙醇在 3mL 水中的混合物加热至 40°C 1 小时。通过加入 HCl 中和反应混合物。通过反相制备 TLC 1mm 板 (25% AcCN/H₂O) 纯化粗产物得到需要的产物 11, NGy5-OH。

[0187] 实施例 10. NGy5-Bis NHS 酯的合成。

[0188] 步骤:将 60mg 的 11 (AD-155-5A, NGy5-OH) 和 121mg 的 DSC 在 75 μ l 吡啶和 2mL DMF 中的混合物加热至 55°C 过夜。用无水二氯甲烷冲洗反应混合物两次并干燥得到需要的产物 12, NGy5-bis NHS 酯。

[0189] 实施例 11. NGy3-OMe 的合成。

[0190]

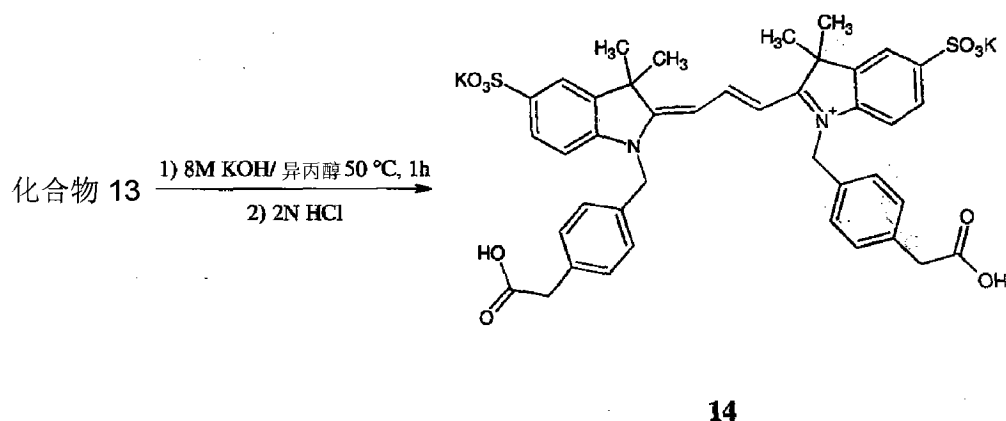


13

[0191] 步骤:将 521mg 化合物 6 和 832 μ l 原甲酸三乙酯的混合物在 2ml 吡啶中加热回流以制备需要的产物 13, NGy3-OMe (AD-155-9)。

[0192] 实施例 12. NGy3-OH 的合成。

[0193]



[0194] 步骤:将 140mg 的 13 (NGy3-OMe, AD-155-9) 和 0.3ml 8M 的 KOH/ 异丙醇在 2mL 水中的混合物加热至 50°C 1 小时。如果水解没有完全,再添加额外的 KOH/ 异丙醇。然后向所述混合物中加入 HCl,然后在真空下将其浓缩得到需要的产物 14, NGy3-OH (AD-155-11C)。可能需要进一步纯化。

[0195] 实施例 13. NGy3-bis NHS 酯的合成。

[0196] 步骤:将 0.10g 的 14 (NGy3-OH, AD-155-11) 和 150mg DSC 在 DMF/PY 中的混合物加热至 55°C 5 小时。用无水二氯甲烷冲洗所述混合物并在真空中浓缩得到需要的产物 15, NGy3-Bis NHS 酯。

[0197] 实施例 14. 染料铈合物的合成和表征。

[0198] 藻红素铈合物:再悬浮 NGy5、NGy7 和 Gy5 染料原料,测定其吸光度并计算其浓度。藻红素 (PE) 等份试样 (2nmol) 在 0.5M 碳酸钠 (pH 9.0) 中、在室温下用以下物质处理 1.5 小时:

[0199] a) 1 : 15、1 : 30、1 : 50 或 1 : 80 倍摩尔过量的 NGy5 ; b) 1 : 15 或 1 : 30 倍摩尔过量的 NGy7 ; 或 c) 1 : 30 或 1 : 50 摩尔过量的 Gy5。铈合后,将每种反应混合物上样至 PD-10 柱,并用 PBS 洗脱。对每种混合物,将包含蛋白质的级分合并在一起。得到产物的吸收光谱和荧光光谱,并评价能量转移效率。

[0200] 抗生蛋白链菌素铈合物:通过适当的染料稀释物的吸光度解析 (absorbance readings) 确定染料溶液的浓度。用摩尔过量 (例如过量 20 倍) 的染料在碳酸钠缓冲液 (pH 9.0) 中处理抗生蛋白链菌素 1 小时。铈合后,使用 PBS 作洗脱缓冲液在 PD-10 柱上纯化所述混合物,并以 0.5mL 收集级分。合并包含抗生蛋白链菌素-染料铈合物的主要级分,得到吸收光谱和发射光谱。

[0201] NGy5 铈合物

[0202] NGy5 表现出与 Gy5 (USPN 7,091,348,Guava Technologies) 和 Cy5 极相似的光谱特征。NGy5 的最大吸收在 650.7nm 处,而 Gy5 在 649.9nm 处 (图 1)。所述染料表现出极好的溶解性,且在将其铈合至蛋白质后没有观察到铈合物沉淀。NGy5 可成功铈合至藻红素。当在 PD-10 柱上纯化时,游离的未反应 NGy5 表现出与 PE-NGy5 铈合物的良好分离,且所述铈合物没有沉淀,表明具有对蛋白质和其他生物分子衍生化有用的性质。

[0203] 能量转移铈合物:PE 显示了良好的与 NGy5 的铈合和衍生化,证据为当与不同比例的 NGy5 偶联时,646nm 处的吸收光谱增加 (图 2)。当检测相同 PE-NGy5 铈合物的荧光光谱时,观察到良好的能量转移特征,发生接近 90% 的能量转移 (图 3)。形成的 PE-NGy5 铈

合物可在 488nm 或 532nm 被激发,得到在约 676nm 发射的能量转移轭合物。在加入比例为 1 : 50 或更大时以及在 1 : 80 比例时观察到最佳转移特征,比例为 1 : 50 或更大时观察到约 88% 的能量转移,在 1 : 80 比例时观察到约 92% 的能量转移。当用更多的 NGy5 进行轭合时,有一定程度的抑制,但是荧光并没有大幅降低。

[0204] 在类似的染料 / 蛋白质比例下,在 PE-Gy5 轭合物中观察到降低的荧光 (图 4)。数据表明 NGy5 是比 Gy5 更亮的染料。

[0205] 除了形成可使用蓝光或绿光激光器并发射红光的能量转移轭合物,NGy5 也可用于直接轭合至生物分子如蛋白质、抗体、寡核苷酸和寡糖,包括可用红光激光器激发的轭合物。

[0206] NGy7 轭合物

[0207] 将 NGy7 与 Cy7 的吸收光谱相比。NGy7 具有 752nm 的最大吸收,与 Cy7 在 751.8nm 的最大吸收相似。

[0208] 能量转移轭合物:吸收光谱证明 NGy7 可成功轭合至 PE。NGy7 在轭合至蛋白质中表现出良好的实用性,原因在于 NGy7 可溶于缓冲溶液,其轭合物显示出良好的溶解性,且 NGy7 可与其蛋白质轭合物在 PD-10 柱上良好地分离。图 5 所示的 PE-NGy7 的吸收光谱表明,增加量的 NGy7 可被成功轭合至 PE。PE-NGy7 轭合物的荧光光谱表明,所述复合物可在 532nm 处被激发,并在 778nm 处发射,表明发生了能量转移。该光谱表明,部分 PE 能量被转移至 NGy7 (图 6)。应该从红敏荧光检测器得到数据,以真实评价在 778nm 的荧光强度并确定转移百分比。NGy7 的进一步轭合并没有抑制所述 NGy7 荧光。

[0209] NGy3 轭合物

[0210] 得到 NGy3 吸收光谱和荧光光谱,然后与 Cy3 比较。NGy3 具有 556nm 的最大吸收并在 572nm 发射最大。其特征与 Cy3 极相似。

[0211] 抗生蛋白链菌素 -NGy3 轭合物:将 5nmole 抗生蛋白链菌素用 1 : 20 摩尔过量的 NGy3 染料在碳酸钠缓冲溶液 (pH 9.0) 中处理 1 小时。轭合后,将所述反应混合物上样至 PD-10 柱,轭合的蛋白质用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗脱。合并包含蛋白质的级分。得到抗生蛋白链菌素 -NGy3 轭合物的吸收光谱 (图 7) 和荧光光谱 (图 8)。该荧光光谱清楚地表明,抗生蛋白链菌素 -NGy3 的光谱特征与抗生蛋白链菌素 -Cy3 极相似,应可用绿光激光器激发。

[0212] 尽管已参考优选的实施方案详细描述了本发明,本领域的技术人员将认识到,根据本文的教导,可在不背离本发明的精神和范围内做出某些改变和修正。因此,本发明仅受权利要求限制。

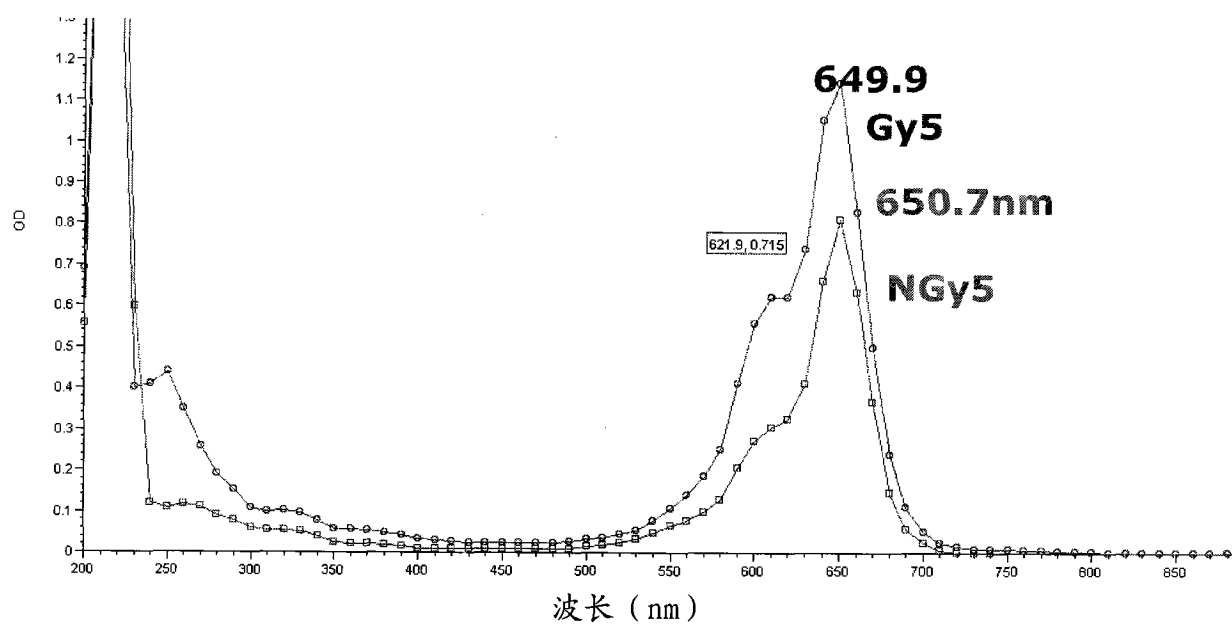


图 1

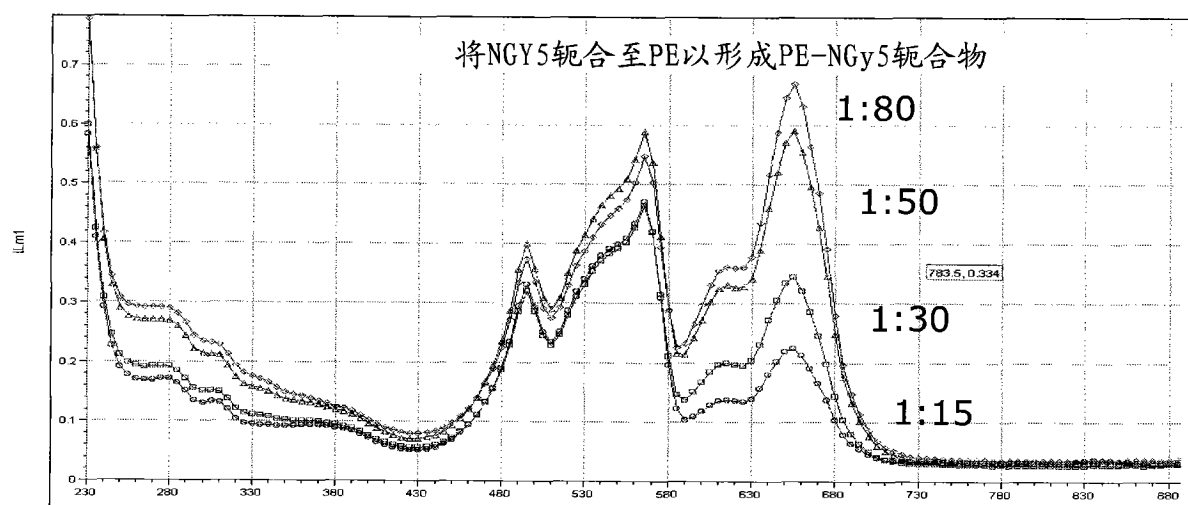


图 2

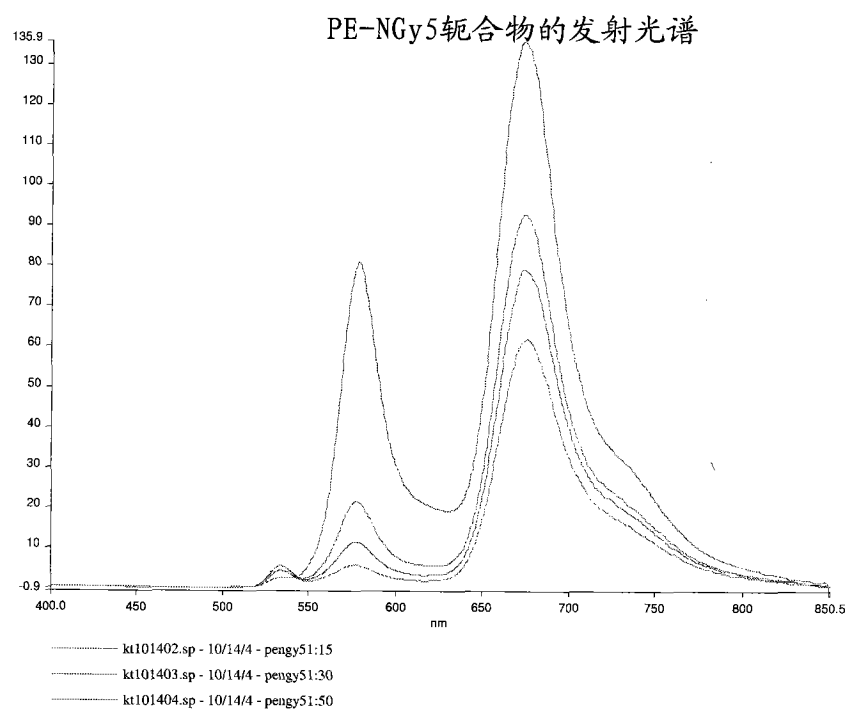


图 3

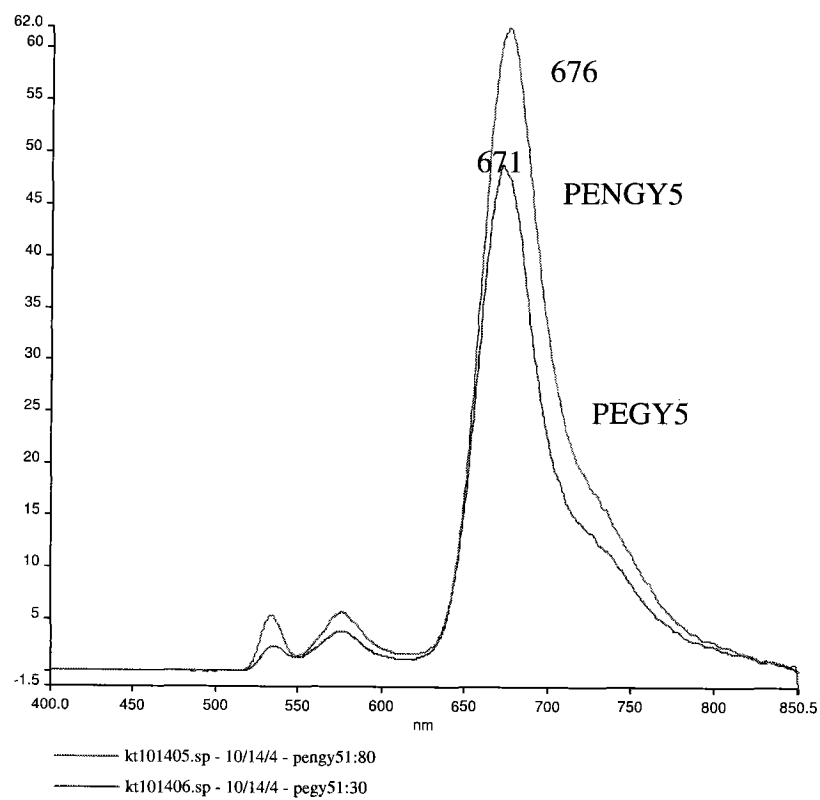


图 4

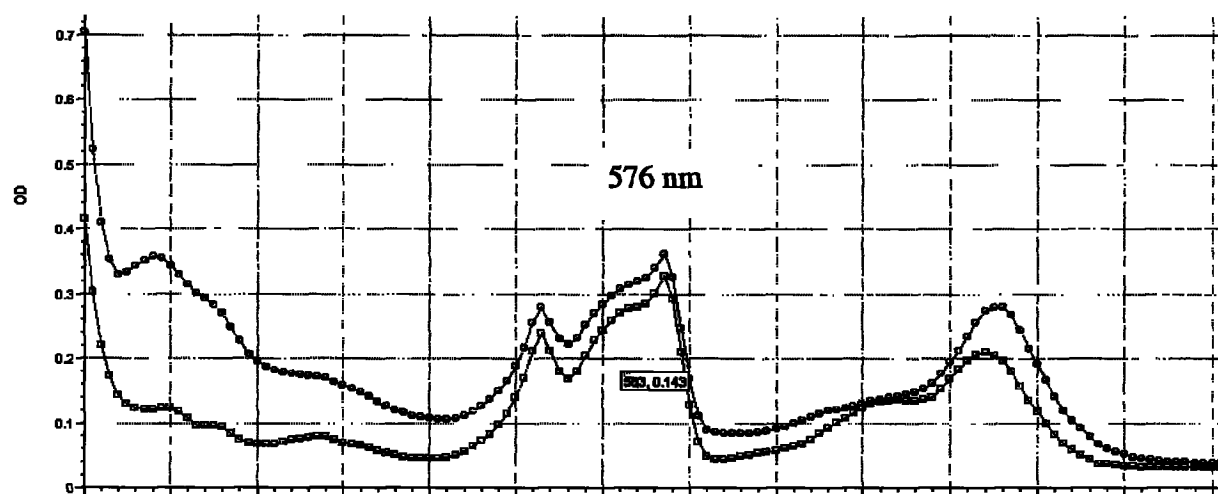


图 5

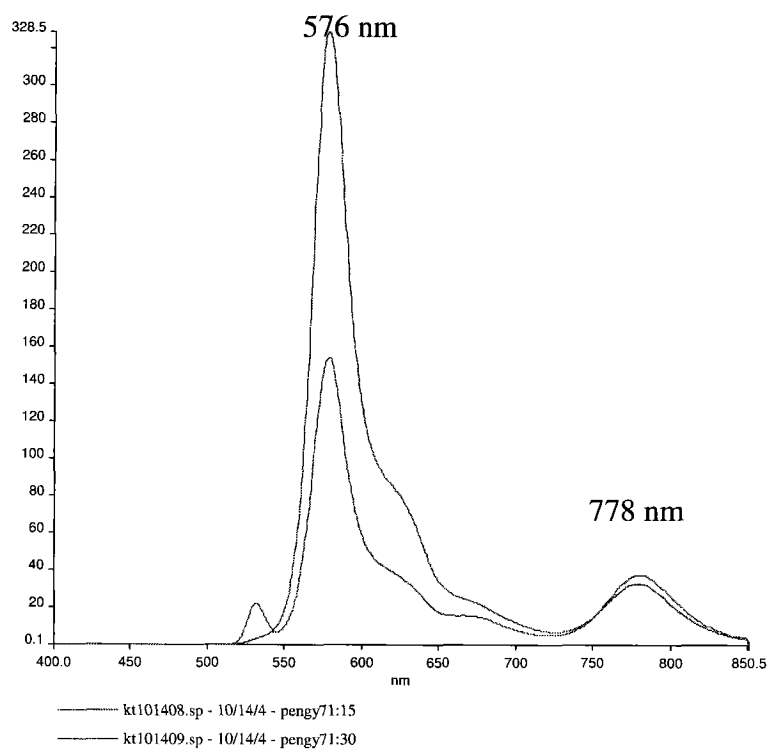


图 6

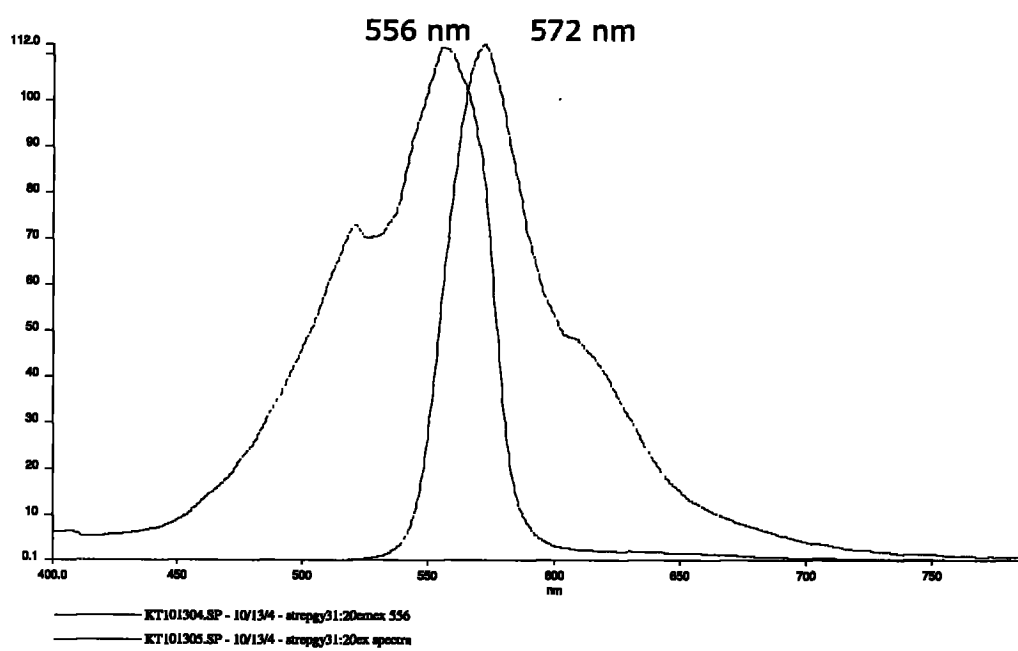


图 7

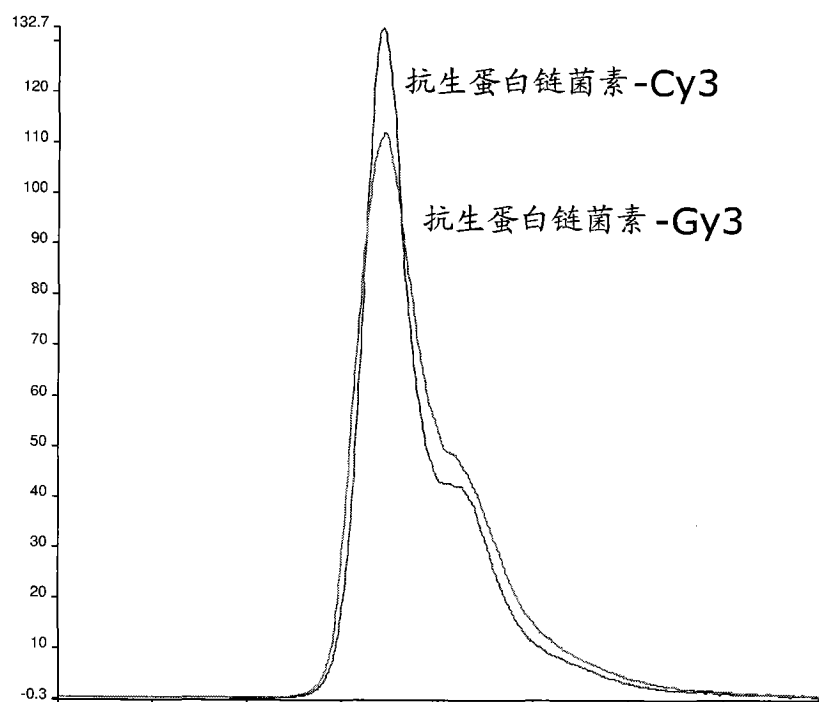


图 8