



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103890137 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 24

(21) 申请号 201280051442. 8

(22) 申请日 2012. 08. 17

(30) 优先权数据

PA201100630 2011. 08. 19 DK

PA201100996 2011. 12. 22 DK

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2014. 04. 18

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2012/066082 2012. 08. 17

(87) PCT国际申请的公布数据
W02013/026790 EN 2013. 02. 28

(73) 专利权人 DHR 芬兰公司
地址 芬兰图尔库

(72) 发明人 H. 塔卡洛 N. 梅尔托拉

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 王华芹

(51) Int. Cl.
C09K 11/06(2006. 01)
G01N 33/58(2006. 01)
C07D 213/40(2006. 01)

(56) 对比文件
EP 0967205 A1, 1999. 12. 29,
EP 1447666 A2, 2004. 08. 18,
US 2002/0188111 A1, 2002. 12. 12,
WO 2006/026038 A1, 2006. 03. 09,

审查员 张慧慧

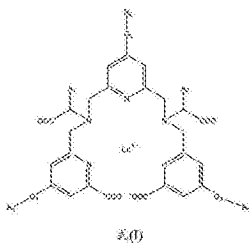
权利要求书7页 说明书40页 附图1页

(54) 发明名称

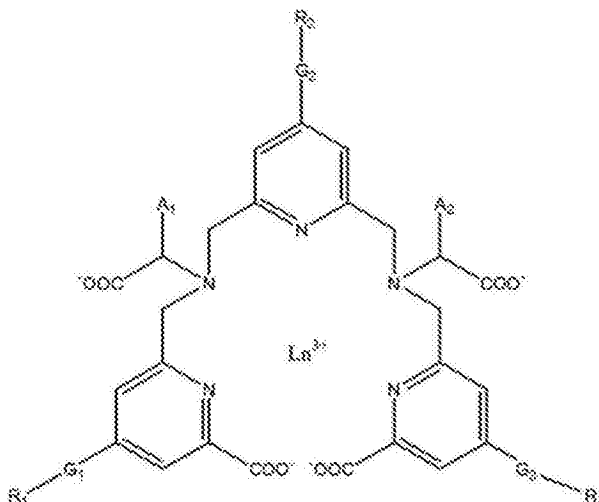
具有三个发色团的发光镧系元素螯合物及其用途

(57) 摘要

本申请公开了式 (I) 的具有镧系元素例如铕的发光镧系元素螯合物、以及相应的发光镧系元素螯合配体。本申请还公开了包含与所述发光镧系元素螯合物缀合的生物特异性结合反应物 (例如抗体) 的能检测的分子、以及进行生物特异性结合测定的方法、这样的能检测的分子在利用特异性发光的时间分辨荧光测定法测定的基于特异性生物亲和性的结合测定中的用途、以及缀合有所述发光镧系元素螯合物的固体载体材料。



1. 式(I)的发光镧系元素螯合物,



其中

G_1 、 G_2 和 G_3 各自独立地选自i)共轭基团和ii)单键,条件是 G_1 、 G_2 和 G_3 中的至少一个独立地是共轭基团;

R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地选自i)反应性基团Z、ii)亲水性基团、和iii)氢,或者各自的基团 R_1 、 R_2 和 R_3 不存在;

A_1 和 A_2 各自独立地选自i)反应性基团Z、ii)亲水性基团、和iii)氢或者 C_{1-6} -烷基;

并且其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 A_1 和 A_2 中的至少一个是反应性基团Z,和

Ln^{3+} 是镧系元素离子,

其中所述共轭基团由一个、两个或三个排列以彼此共轭的部分组成,各部分选自亚乙烯基($-CH=CH-$),亚乙炔基($-C\equiv C-$),羰基($-C(=O)-$),芳族环或者杂芳族环的二基,

其中所述亲水性基团包括单糖或二糖,和

其中所述镧系元素离子 Ln^{3+} 选自铈(III)、铽(III)、镱(III)和钐(III)。

2. 根据权利要求1的发光镧系元素螯合物,其中所述芳族环或者杂芳族环的二基为亚苯基、亚联苯基、亚萘基、亚吡啶基、亚吡嗪基、亚嘧啶基、亚哒嗪基、亚呋喃基、亚噻吩基、亚吡咯基、亚咪唑基、亚吡唑基、亚噻唑基、亚异噻唑基、亚噁唑基、亚异噁唑基、亚呋咱基、1,2,4-三唑-3,5-亚基和亚噁二唑基,其各自为未取代的、 R_4 -单取代的、 R_4 、 R_5 -二取代的、 R_4 、 R_5 、 R_6 -三取代的、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 -四取代的或者 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 -五取代的,其中取代基 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 C_{1-12} -烷基、 $-(CH_2)_{0-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{0-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{0-6}SO_3H$ 、 $-(CH_2)_{0-6}SO_3^-$ 、 $-NHC(=O)R_{10}$ 、 $-NCH_3C(=O)R_{10}$ 、 $-C(=O)NHR_{10}$ 、 $-C(=O)NCH_3R_{10}$ 、 $-NHC(=O)NHR_{10}$ 、 $-NHC(=S)NHR_{10}$ 、 $-C(=O)R_{10}$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、羟基($-OH$)、巯基($-SH$)、 $-OR_9$ 、 $-SR_9$ 和亲水性基团,并且其中 R_9 选自 $-CF_3$ 、 $-C_{1-12}$ -烷基、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3H$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ 、 $-NHC(=O)R_{10}$ 、 $-NCH_3C(=O)R_{10}$ 、 $-C(=O)NHR_{10}$ 、 $-C(=O)NCH_3R_{10}$ 、 $-NHC(=O)NHR_{10}$ 、 $-NHC(=S)NHR_{10}$ 、 $-C(=O)R_{10}$ 和亲水性基团,其中 R_{10} 选自 C_{1-12} -烷基、 $-(CH_2)_{1-6}COOH$ 、 $-(CH_2)_{1-6}COO^-$ 、 $-(CH_2)_{1-6}SO_3H$ 、和 $-(CH_2)_{1-6}SO_3^-$ 以及亲水性基团。

3. 根据权利要求1的发光镧系元素螯合物,其中 G_1 、 G_2 和 G_3 中的至少两个独立地是共轭基团。

4. 根据权利要求2的发光镧系元素螯合物,其中 G_1 、 G_2 和 G_3 中的至少两个独立地是共轭

基团。

5. 根据权利要求3的发光镧系元素螯合物, 其中 G_1 、 G_2 和 G_3 各自独立地是共轭基团。

6. 根据权利要求4的发光镧系元素螯合物, 其中 G_1 、 G_2 和 G_3 各自独立地是共轭基团。

7. 根据权利要求1的发光镧系元素螯合物, 其中所述反应性基团Z包括叠氮基($-N_3$)、炔基($-C\equiv CH$)、烯基($-CH=CH_2$)、氨基($-NH_2$)、氨基氧基($-O-NH_2$)、羧基($-COOH$)、醛基($-CHO$)、巯基($-SH$)、马来酰亚胺基、或者它们的活化的衍生物, 包括异氰酸酯基($-NCO$)、异硫氰酸酯基($-NCS$)、重氮基($-N^+N$)、溴代乙酰胺基、碘代乙酰胺基、反应性的酯基、吡啶基-2-二巯基、或者6-取代的4-氯-1,3,5-三嗪-2-基氨基。

8. 根据权利要求2的发光镧系元素螯合物, 其中所述反应性基团Z包括叠氮基($-N_3$)、炔基($-C\equiv CH$)、烯基($-CH=CH_2$)、氨基($-NH_2$)、氨基氧基($-O-NH_2$)、羧基($-COOH$)、醛基($-CHO$)、巯基($-SH$)、马来酰亚胺基、或者它们的活化的衍生物, 包括异氰酸酯基($-NCO$)、异硫氰酸酯基($-NCS$)、重氮基($-N^+N$)、溴代乙酰胺基、碘代乙酰胺基、反应性的酯基、吡啶基-2-二巯基、或者6-取代的4-氯-1,3,5-三嗪-2-基氨基。

9. 根据权利要求3的发光镧系元素螯合物, 其中所述反应性基团Z包括叠氮基($-N_3$)、炔基($-C\equiv CH$)、烯基($-CH=CH_2$)、氨基($-NH_2$)、氨基氧基($-O-NH_2$)、羧基($-COOH$)、醛基($-CHO$)、巯基($-SH$)、马来酰亚胺基、或者它们的活化的衍生物, 包括异氰酸酯基($-NCO$)、异硫氰酸酯基($-NCS$)、重氮基($-N^+N$)、溴代乙酰胺基、碘代乙酰胺基、反应性的酯基、吡啶基-2-二巯基、或者6-取代的4-氯-1,3,5-三嗪-2-基氨基。

10. 根据权利要求4的发光镧系元素螯合物, 其中所述反应性基团Z包括叠氮基($-N_3$)、炔基($-C\equiv CH$)、烯基($-CH=CH_2$)、氨基($-NH_2$)、氨基氧基($-O-NH_2$)、羧基($-COOH$)、醛基($-CHO$)、巯基($-SH$)、马来酰亚胺基、或者它们的活化的衍生物, 包括异氰酸酯基($-NCO$)、异硫氰酸酯基($-NCS$)、重氮基($-N^+N$)、溴代乙酰胺基、碘代乙酰胺基、反应性的酯基、吡啶基-2-二巯基、或者6-取代的4-氯-1,3,5-三嗪-2-基氨基。

11. 根据权利要求5的发光镧系元素螯合物, 其中所述反应性基团Z包括叠氮基($-N_3$)、炔基($-C\equiv CH$)、烯基($-CH=CH_2$)、氨基($-NH_2$)、氨基氧基($-O-NH_2$)、羧基($-COOH$)、醛基($-CHO$)、巯基($-SH$)、马来酰亚胺基、或者它们的活化的衍生物, 包括异氰酸酯基($-NCO$)、异硫氰酸酯基($-NCS$)、重氮基($-N^+N$)、溴代乙酰胺基、碘代乙酰胺基、反应性的酯基、吡啶基-2-二巯基、或者6-取代的4-氯-1,3,5-三嗪-2-基氨基。

12. 根据权利要求6的发光镧系元素螯合物, 其中所述反应性基团Z包括叠氮基($-N_3$)、炔基($-C\equiv CH$)、烯基($-CH=CH_2$)、氨基($-NH_2$)、氨基氧基($-O-NH_2$)、羧基($-COOH$)、醛基($-CHO$)、巯基($-SH$)、马来酰亚胺基、或者它们的活化的衍生物, 包括异氰酸酯基($-NCO$)、异硫氰酸酯基($-NCS$)、重氮基($-N^+N$)、溴代乙酰胺基、碘代乙酰胺基、反应性的酯基、吡啶基-2-二巯基、或者6-取代的4-氯-1,3,5-三嗪-2-基氨基。

13. 根据权利要求1的发光镧系元素螯合物, 其中所述反应性基团Z包含间隔基, 所述间隔基是形成间距的二基, 所述间隔基由一至五个部分形成, 各部分选自: 亚苯基、含有1-10个碳原子的亚烷基、亚乙炔基($-C\equiv C-$)、醚基($-O-$)、硫醚基($-S-$)、二巯基($-S-S-$)、酰胺基、硫脲基($-NH-C(=S)-NH-$)和三唑基。

14. 根据权利要求2的发光镧系元素螯合物, 其中所述反应性基团Z包含间隔基, 所述间隔基是形成间距的二基, 所述间隔基由一至五个部分形成, 各部分选自: 亚苯基、含有1-10

个碳原子的亚烷基、亚乙炔基($-C\equiv C-$)、醚基($-O-$)、硫醚基($-S-$)、二硫基($-S-S-$)、酰胺基、硫脲基($-NH-C(=S)-NH-$)和三唑基。

15. 根据权利要求3的发光镧系元素螯合物, 其中所述反应性基团Z包含间隔基, 所述间隔基是形成间距的二基, 所述间隔基由一至五个部分形成, 各部分选自: 亚苯基、含有1-10个碳原子的亚烷基、亚乙炔基($-C\equiv C-$)、醚基($-O-$)、硫醚基($-S-$)、二硫基($-S-S-$)、酰胺基、硫脲基($-NH-C(=S)-NH-$)和三唑基。

16. 根据权利要求4的发光镧系元素螯合物, 其中所述反应性基团Z包含间隔基, 所述间隔基是形成间距的二基, 所述间隔基由一至五个部分形成, 各部分选自: 亚苯基、含有1-10个碳原子的亚烷基、亚乙炔基($-C\equiv C-$)、醚基($-O-$)、硫醚基($-S-$)、二硫基($-S-S-$)、酰胺基、硫脲基($-NH-C(=S)-NH-$)和三唑基。

17. 根据权利要求5的发光镧系元素螯合物, 其中所述反应性基团Z包含间隔基, 所述间隔基是形成间距的二基, 所述间隔基由一至五个部分形成, 各部分选自: 亚苯基、含有1-10个碳原子的亚烷基、亚乙炔基($-C\equiv C-$)、醚基($-O-$)、硫醚基($-S-$)、二硫基($-S-S-$)、酰胺基、硫脲基($-NH-C(=S)-NH-$)和三唑基。

18. 根据权利要求6的发光镧系元素螯合物, 其中所述反应性基团Z包含间隔基, 所述间隔基是形成间距的二基, 所述间隔基由一至五个部分形成, 各部分选自: 亚苯基、含有1-10个碳原子的亚烷基、亚乙炔基($-C\equiv C-$)、醚基($-O-$)、硫醚基($-S-$)、二硫基($-S-S-$)、酰胺基、硫脲基($-NH-C(=S)-NH-$)和三唑基。

19. 根据权利要求13的发光镧系元素螯合物, 其中所述酰胺基为 $-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NCH_3-$ 和 $-NCH_3-C(=O)-$ 。

20. 根据权利要求14的发光镧系元素螯合物, 其中所述酰胺基为 $-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NCH_3-$ 和 $-NCH_3-C(=O)-$ 。

21. 根据权利要求15的发光镧系元素螯合物, 其中所述酰胺基为 $-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NCH_3-$ 和 $-NCH_3-C(=O)-$ 。

22. 根据权利要求16的发光镧系元素螯合物, 其中所述酰胺基为 $-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NCH_3-$ 和 $-NCH_3-C(=O)-$ 。

23. 根据权利要求17的发光镧系元素螯合物, 其中所述酰胺基为 $-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NCH_3-$ 和 $-NCH_3-C(=O)-$ 。

24. 根据权利要求18的发光镧系元素螯合物, 其中所述酰胺基为 $-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NCH_3-$ 和 $-NCH_3-C(=O)-$ 。

25. 根据前述权利要求中任一项的发光镧系元素螯合物, 其中所述共轭基团独立地选自苯基乙炔基、苯基、噻吩基和呋喃基, 其各自可为取代的。

26. 根据权利要求1-24中任一项的发光镧系元素螯合物, 其中所述亲水性基团包含间隔基, 所述间隔基是形成间距的二基, 所述间隔基由一至五个部分形成, 各部分选自: 亚苯基、含有1-10个碳原子的亚烷基、亚乙炔基($-C\equiv C-$)、醚基($-O-$)、硫醚基($-S-$)、二硫基($-S-S-$)、酰胺基、硫脲基($-NH-C(=S)-NH-$)和三唑基。

27. 根据权利要求25的发光镧系元素螯合物, 其中所述亲水性基团包含间隔基, 所述间隔基是形成间距的二基, 所述间隔基由一至五个部分形成, 各部分选自: 亚苯基、含有1-10个碳原子的亚烷基、亚乙炔基($-C\equiv C-$)、醚基($-O-$)、硫醚基($-S-$)、二硫基($-S-S-$)、酰胺基、

硫脲基(-NH-C(=S)-NH-)和三唑基。

28. 根据权利要求26的发光镧系元素螯合物, 其中所述酰胺基为-C(=O)-NH-、-NH-C(=O)-、-C(=O)-NCH₃-和-NCH₃-C(=O)-。

29. 根据权利要求27的发光镧系元素螯合物, 其中所述酰胺基为-C(=O)-NH-、-NH-C(=O)-、-C(=O)-NCH₃-和-NCH₃-C(=O)-。

30. 根据权利要求1-24中任一项的发光镧系元素螯合物,

(i) 其中G₁和G₃各自是3,5-双(羧基甲氧基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(ii) 其中G₁、G₂和G₃各自是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是亲水性基团,且R₂是反应性基团;或者

(iii) 其中G₁、G₂和G₃各自是苯基乙炔基,-A₁和-A₂中的一个-H且-A₁和-A₂中的另一个是包含间隔基的反应性基团,且R₁、R₂和R₃各自是亲水性基团;或者

(iv) 其中G₁和G₃各自是4-(羧基甲硫基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(v) 其中G₁和G₃各自是2,4-双(羧基甲硫基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(vi) 其中G₁和G₃各自是2,4,6-三(羧基甲氧基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(vii) 其中G₁和G₃各自是呋喃-2-基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(viii) 其中G₁和G₃各自是噻吩-2-基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(ix) 其中R₁-G₁和R₃-G₃各自是(2,4-二(NaOOC-CH₂-O-)苯基)乙炔基,G₂是(2-(NaOOC-CH₂-O-)苯基)乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,且R₂是反应性基团。

31. 根据权利要求25的发光镧系元素螯合物,

(i) 其中G₁和G₃各自是3,5-双(羧基甲氧基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(ii) 其中G₁、G₂和G₃各自是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是亲水性基团,且R₂是反应性基团;或者

(iii) 其中G₁、G₂和G₃各自是苯基乙炔基,-A₁和-A₂中的一个-H且-A₁和-A₂中的另一个是包含间隔基的反应性基团,且R₁、R₂和R₃各自是亲水性基团;或者

(iv) 其中G₁和G₃各自是4-(羧基甲硫基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(v) 其中G₁和G₃各自是2,4-双(羧基甲硫基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(vi) 其中G₁和G₃各自是2,4,6-三(羧基甲氧基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(vii) 其中G₁和G₃各自是呋喃-2-基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(viii)其中G₁和G₃各自是噻吩-2-基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(ix)其中R₁-G₁和R₃-G₃各自是(2,4-二(NaOOC-CH₂-O-)苯基)乙炔基,G₂是(2-(NaOOC-CH₂-O-)苯基)乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,且R₂是反应性基团。

32.根据权利要求26的发光镧系元素螯合物,

(i)其中G₁和G₃各自是3,5-双(羧基甲氧基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(ii)其中G₁、G₂和G₃各自是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是亲水性基团,且R₂是反应性基团;或者

(iii)其中G₁、G₂和G₃各自是苯基乙炔基,-A₁和-A₂中的一个-H且-A₁和-A₂中的另一个是包含间隔基的反应性基团,且R₁、R₂和R₃各自是亲水性基团;或者

(iv)其中G₁和G₃各自是4-(羧基甲硫基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(v)其中G₁和G₃各自是2,4-双(羧基甲硫基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(vi)其中G₁和G₃各自是2,4,6-三(羧基甲氧基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(vii)其中G₁和G₃各自是呋喃-2-基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(viii)其中G₁和G₃各自是噻吩-2-基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(ix)其中R₁-G₁和R₃-G₃各自是(2,4-二(NaOOC-CH₂-O-)苯基)乙炔基,G₂是(2-(NaOOC-CH₂-O-)苯基)乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,且R₂是反应性基团。

33.根据权利要求27的发光镧系元素螯合物,

(i)其中G₁和G₃各自是3,5-双(羧基甲氧基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(ii)其中G₁、G₂和G₃各自是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是亲水性基团,且R₂是反应性基团;或者

(iii)其中G₁、G₂和G₃各自是苯基乙炔基,-A₁和-A₂中的一个-H且-A₁和-A₂中的另一个是包含间隔基的反应性基团,且R₁、R₂和R₃各自是亲水性基团;或者

(iv)其中G₁和G₃各自是4-(羧基甲硫基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(v)其中G₁和G₃各自是2,4-双(羧基甲硫基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(vi)其中G₁和G₃各自是2,4,6-三(羧基甲氧基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(vii)其中G₁和G₃各自是呋喃-2-基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(viii)其中G₁和G₃各自是噻吩-2-基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自

是-H,且R₂是反应性基团;或者

(ix)其中R₁-G₁和R₃-G₃各自是(2,4-二(NaOOC-CH₂-O-)苯基)乙炔基,G₂是(2-(NaOOC-CH₂-O-)苯基)乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,且R₂是反应性基团。

34.根据权利要求28的发光镧系元素螯合物,

(i)其中G₁和G₃各自是3,5-双(羧基甲氧基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(ii)其中G₁、G₂和G₃各自是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是亲水性基团,且R₂是反应性基团;或者

(iii)其中G₁、G₂和G₃各自是苯基乙炔基,-A₁和-A₂中的一个-H且-A₁和-A₂中的另一个是包含间隔基的反应性基团,且R₁、R₂和R₃各自是亲水性基团;或者

(iv)其中G₁和G₃各自是4-(羧基甲硫基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(v)其中G₁和G₃各自是2,4-双(羧基甲硫基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(vi)其中G₁和G₃各自是2,4,6-三(羧基甲氧基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(vii)其中G₁和G₃各自是呋喃-2-基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(viii)其中G₁和G₃各自是噻吩-2-基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(ix)其中R₁-G₁和R₃-G₃各自是(2,4-二(NaOOC-CH₂-O-)苯基)乙炔基,G₂是(2-(NaOOC-CH₂-O-)苯基)乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,且R₂是反应性基团。

35.根据权利要求29的发光镧系元素螯合物,

(i)其中G₁和G₃各自是3,5-双(羧基甲氧基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(ii)其中G₁、G₂和G₃各自是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是亲水性基团,且R₂是反应性基团;或者

(iii)其中G₁、G₂和G₃各自是苯基乙炔基,-A₁和-A₂中的一个-H且-A₁和-A₂中的另一个是包含间隔基的反应性基团,且R₁、R₂和R₃各自是亲水性基团;或者

(iv)其中G₁和G₃各自是4-(羧基甲硫基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(v)其中G₁和G₃各自是2,4-双(羧基甲硫基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(vi)其中G₁和G₃各自是2,4,6-三(羧基甲氧基)苯基乙炔基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(vii)其中G₁和G₃各自是呋喃-2-基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(viii)其中G₁和G₃各自是噻吩-2-基且G₂是苯基乙炔基,-A₁和-A₂各自是-H,R₁和R₃各自是-H,且R₂是反应性基团;或者

(ix) 其中 R_1-G_1 和 R_3-G_3 各自是(2,4-二($\text{NaOOC}-\text{CH}_2-\text{O}-$)苯基)乙炔基, G_2 是(2-($\text{NaOOC}-\text{CH}_2-\text{O}-$)苯基)乙炔基, $-A_1$ 和 $-A_2$ 各自是 $-\text{H}$,且 R_2 是反应性基团。

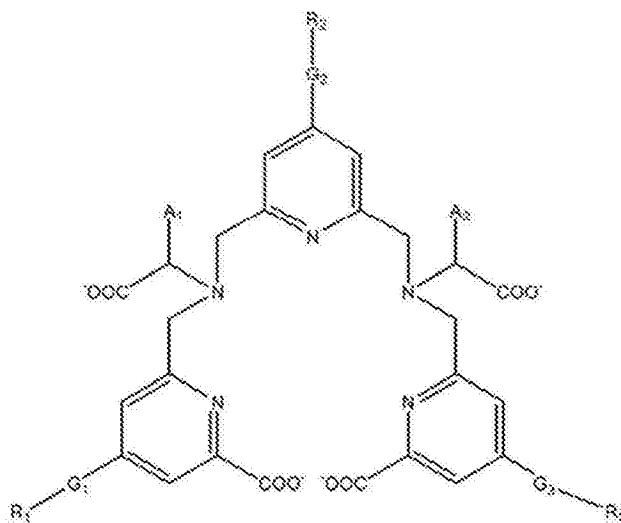
36. 根据权利要求1的发光镧系元素螯合物,其中所述镧系元素离子 Ln^{3+} 为铕(III)。

37. 能检测的分子,其包含与如权利要求1-36中任一项所定义的式(I)的发光镧系元素螯合物缀合的生物特异性结合反应物。

38. 根据权利要求37的能检测的分子,其中所述生物特异性结合反应物选自抗体、抗原、受体配体、特异性结合蛋白、DNA探针、RNA探针、寡肽、寡核苷酸、经修饰的寡核苷酸、经修饰的多核苷酸、蛋白质、寡糖、多糖、磷脂、PNA、类固醇、半抗原、药物、受体结合配体、和凝集素。

39. 根据权利要求37或38的能检测的分子,其中所述生物特异性结合反应物是抗体。

40. 式(II)的镧系元素螯合配体,



其中 G_1 、 G_2 、 G_3 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 A_1 和 A_2 各自表示如权利要求1-36中任一项定义的基团 G_1 、 G_2 、 G_3 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 A_1 和 A_2 。

41. 进行生物特异性结合测定的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 形成被分析物与通过根据权利要求1-36中任一项的镧系元素螯合物标记的生物特异性结合反应物之间的生物复合物;

b) 用具有激发波长的辐射激发所述生物复合物,由此形成激发的生物复合物;和

c) 检测由所述激发的生物复合物发出的发射辐射。

42. 根据权利要求37-39中任一项的能检测的分子在利用特异性发光的时间分辨荧光测定法测定的基于特异性生物亲和性的结合测定中的用途。

43. 缀合有根据权利要求1-36中任一项的式(I)的发光镧系元素螯合物或者根据权利要求40的式(II)的镧系元素螯合配体的固体载体材料。

具有三个发色团的发光镧系元素螯合物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及将连接至生物特异性反应物的新型的含有三个发色团的镧系元素螯合物以及其在各种测定(分析, assay)中的用途。

背景技术

[0002] 使用长寿命发射的发光镧系元素螯合物的时间分辨荧光测定法(TRF)已经被应用于许多特异性结合测定例如免疫测定、DNA杂交测定、受体结合测定、酶法测定、生物成像例如免疫细胞化学测定、免疫组织化学测定或者基于细胞的测定中,以测量非常低浓度的所需的被分析物。此外,镧系元素螯合物已经被用于磁共振成像(MRI)和正电子发射断层成像(PET)中。

[0003] 对于TRF应用,最佳的标记物必须满足若干要求。首先,它必须在基态和激发态两者中都是光化学稳定的,并且它必须是动力学和化学稳定的。激发波长必须是尽可能高的,优选超过300nm。它必须具有有效的阳离子发射,即,高的发光产额(yield)(激发系数 $\times$ 量子产率, $\epsilon \Phi$)。观察到的发光衰减时间必须是长的,并且螯合物必须具有良好的水溶性。为了标记的目的,它必须具有反应性基团以容许与生物特异性结合反应物的共价连接,并且经标记的生物分子的亲和性和非特异性结合性质必须得以保持。

[0004] 挑战是制备在一个分子中满足所有要求的螯合物标记物,且因此,通常在适宜的标记物的开发中进行一些折衷。作为其结果,已经进行许多尝试(参见例如Bioconjugate Chem., 20(2009)404中的综述)以调节适合用于时间分辨荧光测定法应用的螯合物标记物的光物理性质。

[0005] 改善发光强度的一种通常采用的方法是制备在结构设计中具有组合的若干个独立的发色团部分的螯合物配体,这提供高的稳定性和发光量子产率。Takalo, H., et al., 1996, Helv. Chim. Acta., 79, 789公布了包含两个和三个单独的4-(苯基乙炔基)吡啶的螯合物。镧系元素螯合物和螯合配体的更新的实例是例如EP 1 447 666、WO 2010/055207、WO 2010/006605和WO 2008/020113中公开的那些。基于对环状氮杂大环(azamacrocyclic)(例如DOTA)的螯合物稳定性研究,观察到相对于开链螯合物(例如DPTA)更高的稳定性,且因此,关于公开的具有三个发色团的螯合物的主要焦点在于束缚至不同发色团的氮杂大环。

[0006] 最近,对于利用若干个1-羟基-2-吡啶酮和水杨酰胺基团的开链配体,已观察到高的镧系元素螯合物稳定性,尽管这些公开的螯合物通常是八齿的并且不包含用于与镧系元素离子配位的羧酸,但是已经得到了高的发光和稳定性。然而,那些镧系元素螯合物仅仅具有中等的总摩尔吸光系数,即,在4个发色团的情况下低于27,000,而例如,取决于发色团上的取代基,具有仅仅一个苯基乙炔基吡啶单元的螯合物通常具有25,000–35,000 cm⁻¹的吸光系数(Latva, M., et al., 1997, J. Luminescence, 75, 149)。

[0007] 关于具有许多发色团的螯合物和配体的众所周知的挑战是找到适宜的结构设计,其提供高的水溶性并同时对于任何可能的生物过程是惰性的。已知,发色团的加入降低配体和螯合物在水中的溶解性,增加在标记过程期间生物特异性结合反应物聚集体的形成和被

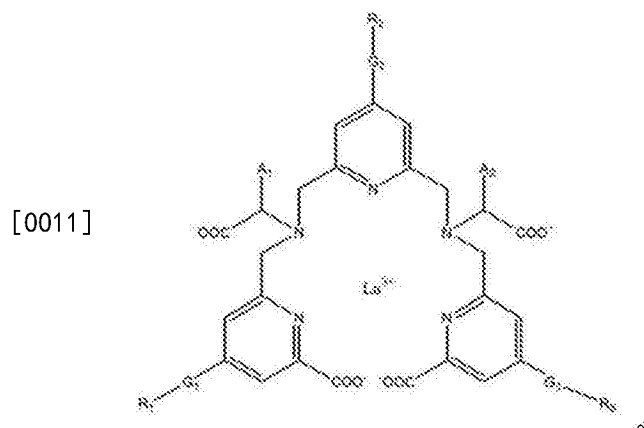
标记的生物分子的非特异性结合性质。聚集体将产生纯化问题并降低被标记的物质的产率。而且,被标记的生物分子的增加的非特异性结合将增强生物特异性测定的背景发光且因此降低测定灵敏度。

发明内容

[0008] 本发明涉及在发光的镧系元素离子周围具有三个单独的发色团并且给出格外高的信号水平的新型标记物螯合物设计。

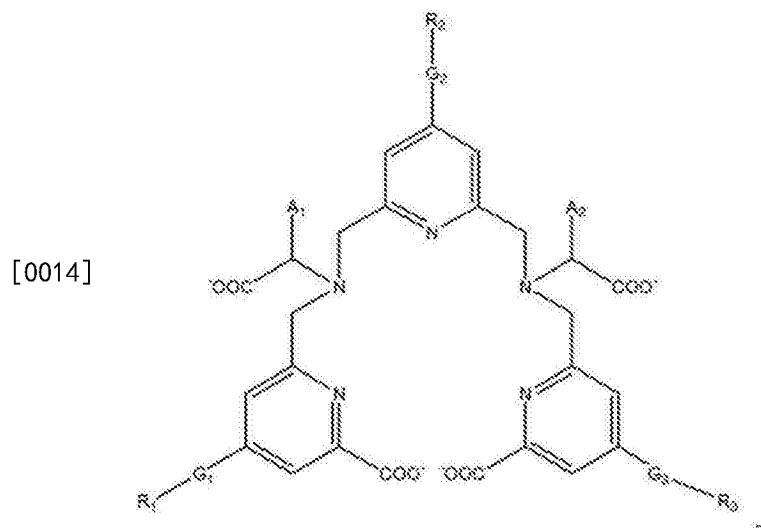
[0009] 使用本发明的螯合物,可降低标记程度而不损失信号,并且同时较低的标记程度改善生物分子的亲和性并减少在测定期间的非特异性结合。因此,较快的动力学是可能的,并且观察到较低的背景,其也可改善总体测定灵敏度。

[0010] 本发明的第一方面涉及式(I)的发光镧系元素螯合物,



[0012] 本发明的第二方面涉及能检测的分子,其包含与如本文中所定义的式(I)的发光镧系元素螯合物缀合(conjugate)的生物特异性结合反应物。

[0013] 本发明的第三方面涉及式(II)的发光镧系元素螯合配体,



[0015] 本发明的第四方面涉及进行生物特异性结合测定的方法,所述方法包括以下步骤:a)形成被分析物与通过如本文中所定义的镧系元素螯合物标记的生物特异性结合反应物之间的生物复合物;b)用具有激发波长的辐射激发所述生物复合物,由此形成激发的生物复合物;和c)检测由所述激发的生物复合物发出的发射辐射。

[0016] 本发明的第五方面涉及如本文中所定义的能检测的分子在利用特异性发光的时间分辨荧光测定法测定的基于特异性生物亲和性(bioaffinity)的结合测定中的用途。

[0017] 本发明的第六方面涉及缀合有如本文中所定义的式(I)的发光镧系元素螯合物的固体载体材料。

附图说明

[0018] 图1显示螯合物46、48和75的激发最大值。

[0019] 图2显示螯合物19、47、59和60的激发最大值。

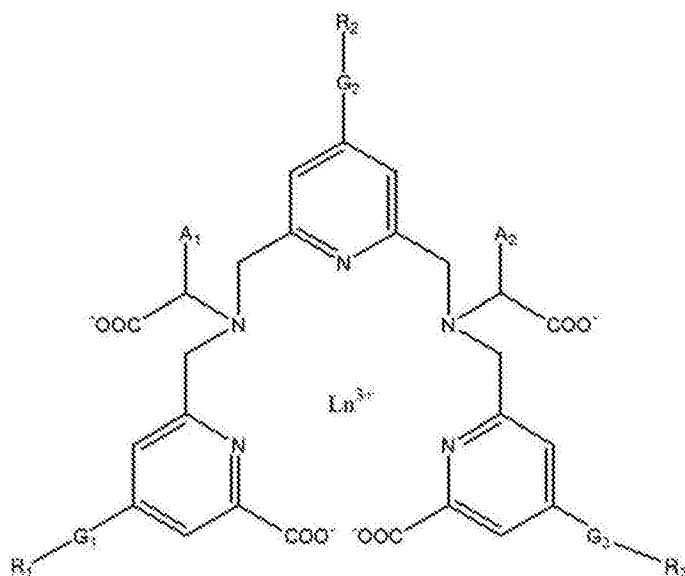
具体实施方式

[0020] 本发明的目的是提供用于获得改善的镧系元素螯合物标记物的手段(means),所述改善的镧系元素螯合物标记物将用在利用特异性发光的荧光测定法或者时间分辨荧光测定法测定的基于生物亲和性的结合测定中,所述基于生物亲和性的结合测定例如免疫测定(均相和非均相两者)、核酸杂交测定、受体结合测定、酶法测定、免疫细胞化学测定、免疫组织化学测定和基于细胞的测定。本发明的螯合物提供用于获得与例如测定灵敏度、动力学和背景有关的改善的基于生物亲和性的结合测定的手段。

[0021] 发光镧系元素螯合物

[0022] 本发明的一方面涉及式(I)的发光镧系元素螯合物,

[0023]



[0024] 其中

[0025] G_1 、 G_2 和 G_3 各自独立地选自i)共轭基团和ii)单键,条件是 G_1 、 G_2 和 G_3 中的至少一个独立地是共轭基团(conjugating group),特别地, G_1 、 G_2 和 G_3 中的两个或全部三个独立地是共轭基团;

[0026] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地选自i)反应性基团Z,ii)亲水性基团,和iii)氢,或者各自的(分别的,respective)基团 R_1 、 R_2 和 R_3 不存在;

[0027] A_1 和 A_2 各自独立地选自i)反应性基团Z,ii)亲水性基团,和iii)氢或者 C_{1-6} -烷基;

[0028] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 A_1 和 A_2 中的至少一个是反应性基团Z,以及

[0029] Ln^{3+} 是镧系元素离子。

[0030] 基团 G_1 、 G_2 和 G_3 中的至少一个是共轭基团。在这样的情况中,这样的共轭基团 G_1 、 G_2 和/或 G_3 是与吡啶共轭的基团。这些基团可以被各种基团取代以改善水溶性和/或使激发波长偏移和/或提高摩尔激发系数。 G_1 、 G_2 和 G_3 中不为共轭基团的任何基团仅表示分别在吡啶与 R_1 、 R_2 或 R_3 之间的单键。

[0031] 在一种令人感兴趣的实施方式中, G_1 、 G_2 和 G_3 中的至少两个独立地是共轭基团。

[0032] 在目前最令人感兴趣的实施方式中, G_1 、 G_2 和 G_3 各自独立地是共轭基团。

[0033] 在一些实施方式中,共轭基团由一个、两个或三个部分组成,各部分选自亚乙烯基($-\text{CH}=\text{CH}-$),亚乙炔基($-\text{C}\equiv\text{C}-$),羰基($-\text{C}(=\text{O})-$),以及(杂)芳族环或环体系的二基(biradical)($-\text{Het}/\text{Ar}-$)例如亚苯基、亚联苯基、亚萘基、亚吡啶基、亚吡嗪基、亚嘧啶基、亚哒嗪基、亚呋喃基、亚噻吩基、亚吡咯基、亚咪唑基、亚吡唑基、亚噻唑基、亚异噻唑基、亚噁唑基、亚异噁唑基、亚呋喃基(fyrazanylene)、1,2,4-三唑-3,5-亚基和亚噁二唑基。

[0034] 所述基团进行排列以彼此共轭,并以使得共轭基团与吡啶共轭的方式连接至各自的吡啶。

[0035] (杂)芳族环或环体系的二基($-\text{Het}/\text{Ar}-$)各自可以是未取代的、 R_4 -单取代的、 R_4 、 R_5 -二取代的、 R_4 、 R_5 、 R_6 -三取代的、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 -四取代的或者 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 -五取代的,其中这样的可能的取代基 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 C_{1-12} -烷基、 $-(\text{CH}_2)_{0-6}\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{0-6}\text{COO}^-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{0-6}\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{0-6}\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{R}_{10}$ 、 $-\text{NCH}_3\text{C}(=\text{O})\text{R}_{10}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NHR}_{10}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NCH}_3\text{R}_{10}$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NHR}_{10}$ 、 $-\text{NHC}(=\text{S})\text{NHR}_{10}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_{10}$ 、 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 、 $-\text{I}$ 、羟基($-\text{OH}$)、巯基($-\text{SH}$)、 $-\text{OR}_9$ 、 $-\text{SR}_9$ 和亲水性基团,并且其中 R_9 选自 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{C}_{1-12}$ -烷基、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COO}^-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{SO}_3^-$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{R}_{10}$ 、 $-\text{NCH}_3\text{C}(=\text{O})\text{R}_{10}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NHR}_{10}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NCH}_3\text{R}_{10}$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})\text{NHR}_{10}$ 、 $-\text{NHC}(=\text{S})\text{NHR}_{10}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}_{10}$ 和亲水性基团,其中 R_{10} 选自 C_{1-12} -烷基、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{COO}^-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-6}\text{SO}_3^-$ 和亲水性基团。

[0036] 使用不同的R基团,可使激发波长偏移至较长的波长,这与高的摩尔吸光系数(ϵ)一起意味着标记物可被便宜且小的LED代替目前使用的昂贵设备激发。

[0037] 在一种令人感兴趣的实施方式中, G_1 、 G_2 和 G_3 中的两个,特别地全部三个,独立地选自苯基乙炔基($\text{C}_6\text{H}_5-\text{C}\equiv\text{C}-$)、苯基、噻吩基和呋喃基,例如选自苯基乙炔基、噻吩基和呋喃基,特别地选自苯基乙炔基,其各自可以是取代的(参见上面对于(杂)芳族环或环体系的二基所描述的)。

[0038] R_1 、 R_2 和 R_3 各自独立地选自i)反应性基团Z,ii)亲水性基团,和iii)氢。在构成 G_1 、 G_2 和 G_3 或者 G_1 、 G_2 和 G_3 的一部分的(杂)芳族环或环体系的二基被完全取代的情况中,各自的基团 R_1 、 R_2 和 R_3 不存在。

[0039] A_1 和 A_2 各自独立地选自i)反应性基团Z,ii)亲水性基团,和iii)氢或者 C_{1-6} -烷基,特别地选自i)反应性基团Z,ii)亲水性基团,和iii)氢。

[0040] 在螯合物分子中需要至少一个反应性基团。典型地,螯合物分子中的Z基团的数目是1、2或3,特别地1或2,更优选只是1。

[0041] 反应性基团Z促进生物特异性结合反应物的标记,或者促进与固体载体材料形成共价键。如果螯合物具有聚合用基团作为反应性基团,则螯合物可引入固体载体例如颗粒中,这与所述颗粒的制备同时进行。

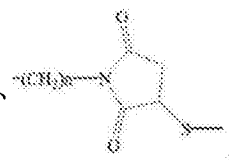
[0042] 所述反应性基团的实例是选自以下的那些:叠氮基($-\text{N}_3$)、炔基($-\text{C}\equiv\text{CH}$)、烯基

(alkylene、 $-\text{CH}=\text{CH}_2$)、氨基($-\text{NH}_2$)、氨基氧基($-\text{O}-\text{NH}_2$)、羧基($-\text{COOH}$)、醛基($-\text{CHO}$)、巯基($-\text{SH}$)、马来酰亚胺基或者它们的活化的衍生物、包括异氰酸酯基($-\text{NCO}$)、异硫氰酸酯基($-\text{NCS}$)、重氮基(diazonium、 $-\text{N}^+\text{N}$)、溴代乙酰胺基、碘代乙酰胺基、反应性的酯基、吡啶基-2-二巯基(pyridyl-2-dithio)、以及6-取代的4-氯-1,3,5-三嗪-2-基氨基。在两个实例中,所述反应性基团包括异硫氰酸酯基($-\text{NCS}$)基团。

[0043] 在6-取代的4-氯-1,3,5-三嗪-2-基氨基中的取代基可选自:氢、卤素、烷氧基、芳氧基、氨基、具有1-6个碳原子的烷基、取代的氨基或硫醚,且优选选自:氯、氟、乙氧基、2-甲氧基乙氧基、2-氰基乙氧基、2,2,2-三氟乙氧基、硫代苯氧基(thiophenoxy)或者乙氧基羰基-硫甲氧基。取代的氨基或硫醚是优选的单-或二-取代的,各取代基优选独立地选自:具有1-6个碳原子的烷基或烷氧基、苯基、羰基或羧基。

[0044] 遵循:在与生物特异性结合反应物反应(进一步参见下文)时,反应性基团Z建立与所述生物特异性结合反应物的连接(link),例如以下类型中的一种:硫脲基($-\text{NH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}-$)、氨基乙酰胺基($-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NH}-$)、酰胺基($-\text{NH}-\text{CO}-$ 、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NCH}_3-\text{CO}-$ 和 $-\text{CO}-\text{NCH}_3-$)

和脂族硫醚基($-\text{S}-$)、二巯基($-\text{S}-\text{S}-$)、6-取代的-1,3,5-三嗪-2,4-二胺、



其

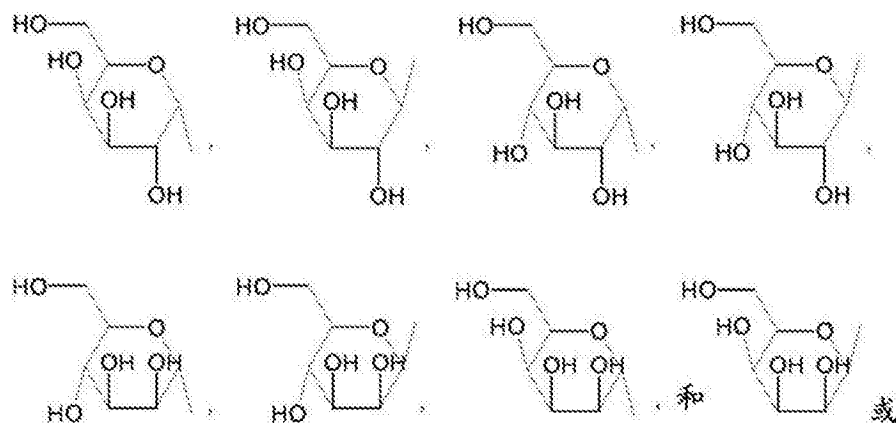
中 $n=1-6$;以及三唑基(例如通过所谓的“链接”化学形成)。

[0045] 当存在时,任意的亲水性基团存在以例如改善螯合物的水溶性。

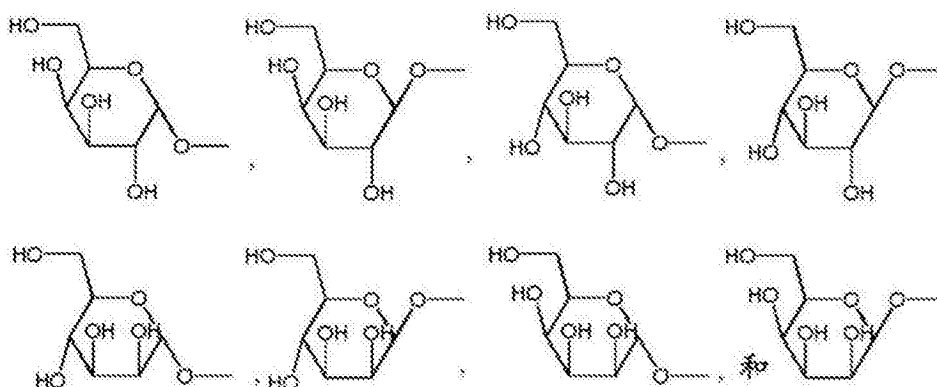
[0046] 亲水性基团的实例是单糖和寡糖例如单糖和二糖,低聚亚烷基二醇(例如含有1-20个重复单元的那些)例如低聚乙二醇和低聚丙二醇等。

[0047] 在一种实施方式中,亲水性基团选自单糖、二糖、 $-(\text{CH}_2)_{1-3}-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{0-5}-\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_{1-3}-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{0-5}-\text{C}_{1-4}-$ 烷基、 $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-6}-\text{H}$ 和 $-\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{1-6}-\text{C}_{1-4}-$ 烷基,特别是单糖。

[0048] 在当前的上下文中,术语“单糖”意图指无环或环状形式的 C_5-C_7 碳水化合物。单糖的实例是 C_6 碳水化合物,例如选自以下的那些



[0049]



[0050] 在当前的上下文中,术语“二糖”意图指连接在一起的两个单糖(参见上文),所述连接优选经由糖苷键进行。

[0051] 应理解,当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 A_1 和 A_2 中的任一个指定为反应性基团Z时,基团Z可包含间隔基(即,形成间距的二基),从而-若有必要或期望的话-使反应性基团Z定位于对于与生物特异性结合反应物的反应是可到达的位置。类似地,当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 A_1 和 A_2 中的任一个指定为亲水性基团时,所述亲水性基团可包含间隔基。在这两种情况中,间隔基可在合成配体或螯合物的过程中容易地引入。作为可容易地普及的实例(并参考实施例3),化合物4与甘氨酸乙酯之间的反应,可使用具有官能侧链的另一种 α -氨基酸(例如(经保护的)谷氨酸或天冬氨酸或者经保护的鸟氨酸或赖氨酸)以提供间隔基的一部分以用于建立已经包含间隔基的亲水性基团或反应性基团。在方案9中给出了一个实例。

[0052] 术语“间隔基”意图指在例如核心结构的吡啶部分或共轭基团与例如反应性基团Z或亲水性基团之间形成间距的基团。间隔基在连接点与反应性基团(或亲水性基团)之间典型地具有1-20个键,例如3-15个键、或者5-12个键的长度。所述间隔基由1至5个部分形成,各部分选自:亚苯基、含有1-10个碳原子的亚烷基、亚乙炔基($-C\equiv C-$)、醚基($-O-$)、硫醚基($-S-$)、二硫基($-S-S-$)、酰胺基($-C(=O)-NH-$ 、 $-NH-C(=O)-$ 、 $-C(=O)-NCH_3-$ 和 $-NCH_3-C(=O)-$)、硫脲($-NH-C(=S)-NH-$)和三唑。具有11个键的这样的间隔基的实例说明于方案9中。

[0053] 在一种实施方式中,亲水性基团(若存在)包含作为形成间距的基团的间隔基,其中间隔基如上定义。

[0054] 在另一实施方式中,反应性基团Z包含作为形成间距的基团的间隔基,其中间隔基如上定义。

[0055] 在一些实施方式中, $-A_1$ 和 $-A_2$ 中的至少一个是 $-H$,特别地, $-A_1$ 和 $-A_2$ 两者都是 $-H$ 。

[0056] 在其它实施方式中, $-A_1$ 和 $-A_2$ 中的至少一个不是 $-H$,特别地, A_1 和 A_2 中的一个是由间隔基连接的反应性基团(Z), 例如 $-(CH_2)_2-CO-NH-(CH_2)_2-C_6H_4-NCS$ 。

[0057] 在又一实施方式中, $-A_1$ 和 $-A_2$ 中的至少一个不是 $-H$,特别地, A_1 和 A_2 中的一个亲水性基团, 其任选地经间隔基连接。

[0058] 术语“镧系元素离子”或“ Ln^{3+} ”意图指元素周期表的镧系元素系列的三价离子, 例如铈(III)、铽(III)、钐(III)和镝(III), 即 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Sm^{3+} 或 Dy^{3+} 。在许多实施方式中, 铈(III)(Eu^{3+})和铽(III)(Tb^{3+})是优选的。

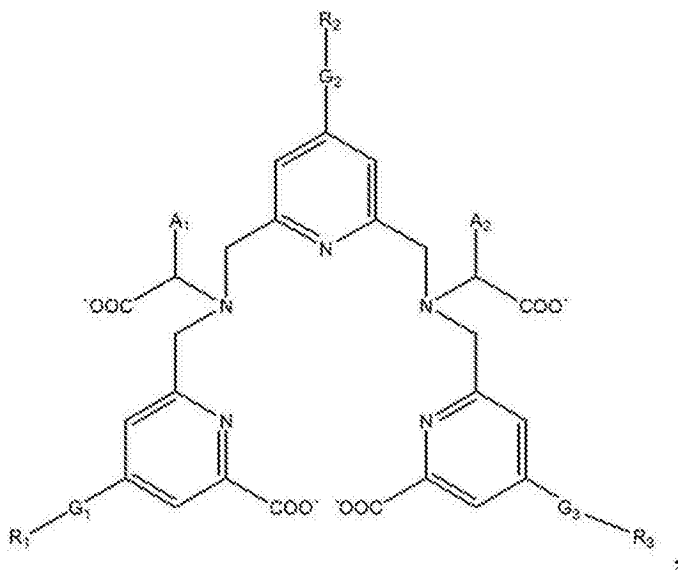
[0059] 应理解, 式(I)的镧系元素螯合物(以及式(II)的镧系元素螯合配体; 进一步参见下文)的基础结构包含至少四个负电荷、甚至更多的负电荷, 如果一些取代基是 $-COO^-$ 或 $-SO_3^-$ 类型的话。因此, 应理解, 除了式(I)和式(II)中所说明的之外, 镧系元素螯合物和镧系元素螯合配体分别还与一个或多个作为反离子的阳离子结合。这样的反离子的实例为 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 K^+ 。 Na^+ 和 K^+ 是尤其优选的。优选地, 反离子是来自元素周期表的IA族和IIA族的那些。

[0060] 此外, 本发明为所有的镧系元素提供高度发光的标记物, 这提供了多重标记的可能性。

[0061] 镧系元素螯合配体

[0062] 因此, 本发明的另一方面涉及式(II)的镧系元素螯合配体,

[0063]



[0064] 并且其中 G_1 、 G_2 、 G_3 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 A_1 和 A_2 各自表示如对于式(I)所定义的基团 G_1 、 G_2 、 G_3 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 A_1 和 A_2 。

[0065] 若所述配体将用在肽或寡核苷酸的合成中作为用于制备被标记的肽或被标记的寡核苷酸的手段, 如例如US 2005/0181393中所描述的, 则在 R_1 、 R_2 、 R_3 、 A_1 或 A_2 中优选使用一个官能团以在合成期间将配体连接至肽或寡核苷酸的骨架, 如US 2005/0181393中所描述的。

[0066] 优选的实施方式

[0067] 在一些优选的实施方式中, 螯合物分子包含单个反应性基团Z, 特别地作为取代基 R_2 , 例如 $-NCS$ 。

[0068] 在另外的实施方式中, $-G_2-R_2$ 是 $-$ 亚乙炔基 $-$ 亚苯基 $-R_2$, 其中 R_2 是反应性基团, 例

如-NCS。

[0069] 在一些优选的实施方式中,式(I)的镧系元素螯合物是这样的:其中 G_1 、 G_2 和 G_3 各自是苯基乙炔基, $-A_1$ 和 $-A_2$ 各自是-H, R_1 和 R_3 各自是亲水性基团,例如单糖,例如



且 R_2 是反应性基团,例如-NCS。

[0070] 在另一实施方式中,式(I)的镧系元素螯合物是这样的:其中 G_1 和 G_3 各自是3,5-双(羧基甲氧基)苯基乙炔基且 G_2 是苯基乙炔基, $-A_1$ 和 $-A_2$ 各自是-H, R_1 和 R_3 各自是-H, 且 R_2 是反应性基团,例如-NCS。

[0071] 在又一实施方式中,式(I)的镧系元素螯合物是这样的:其中 G_1 、 G_2 和 G_3 各自是苯基乙炔基, $-A_1$ 和 $-A_2$ 中的一个是-H, 且 $-A_1$ 和 $-A_2$ 中的另一个是包含间隔基的反应性基团,例如-

$(CH_2)_2-CO-NH-(CH_2)_2-C_6H_4-NCS$, 且 R_1 、 R_2 和 R_3 各自是亲水性基团,例如单糖,例如



[0072] 在又一实施方式中,式(I)的镧系元素螯合物是这样的:其中 G_1 和 G_3 各自是4-(羧基甲硫基)苯基乙炔基且 G_2 是苯基乙炔基, $-A_1$ 和 $-A_2$ 各自是-H, R_1 和 R_3 各自是-H, 且 R_2 是反应性基团,例如-NCS。

[0073] 在又一实施方式中,式(I)的镧系元素螯合物是这样的:其中 G_1 和 G_3 各自是2,4-双(羧基甲硫基)苯基乙炔基且 G_2 是苯基乙炔基, $-A_1$ 和 $-A_2$ 各自是-H, R_1 和 R_3 各自是-H, 且 R_2 是反应性基团,例如-NCS。

[0074] 在另一实施方式中,式(I)的镧系元素螯合物是这样的:其中 G_1 和 G_3 各自是2,4,6-三(羧基甲氧基)苯基乙炔基且 G_2 是苯基乙炔基, $-A_1$ 和 $-A_2$ 各自是-H, R_1 和 R_3 各自是-H, 且 R_2 是反应性基团,例如-NCS。

[0075] 在另一实施方式中,式(I)的镧系元素螯合物是这样的:其中 G_1 和 G_3 各自是呋喃-2-基且 G_2 是苯基乙炔基, $-A_1$ 和 $-A_2$ 各自是-H, R_1 和 R_3 各自是-H, 且 R_2 是反应性基团,例如-NCS。

[0076] 在另一实施方式中,式(I)的镧系元素螯合物是这样的:其中 G_1 和 G_3 各自是噻吩-2-基且 G_2 是苯基乙炔基, $-A_1$ 和 $-A_2$ 各自是-H, R_1 和 R_3 各自是-H, 且 R_2 是反应性基团,例如-NCS。

[0077] 在另一实施方式中,式(I)的镧系元素螯合物是这样的:其中 R_1-G_1 和 R_3-G_3 各自是(2,4-二(NaOOC-CH₂-O-)苯基)乙炔基, G_2 是(2-(NaOOC-CH₂-O-)苯基)乙炔基, $-A_1$ 和 $-A_2$ 各自是-H, 且 R_2 是反应性基团,例如-NCS。

[0078] 在这些实施方式中,镧系元素离子(Ln^{3+})优选选自 Sm^{3+} 和 Eu^{3+} ,特别是 Eu^{3+} 。

[0079] 相应的式(II)的镧系元素螯合配体是同样地令人感兴趣的。镧系元素螯合配体尤其适用于肽合成、寡核苷酸合成中和用于固体载体。

[0080] 能检测的分子

[0081] 本发明的又一方面涉及能检测的分子,其包含与如上文所定义的发光镧系元素螯合物缀合的生物特异性结合反应物。缀合典型地通过所述螯合物的反应性基团获得。

[0082] 所述生物特异性结合反应物应能够特异性结合感兴趣的被分析物,以用于样品中的所述被分析物的定量或定性分析的目的。

[0083] 生物特异性结合反应物的实例是选自以下的那些:抗体、抗原、受体配体、特异性

结合蛋白、DNA探针、RNA探针、寡肽、寡核苷酸、经修饰的寡核苷酸(例如经LNA修饰的寡核苷酸)、经修饰的多核苷酸(例如经LNA修饰的多核苷酸)、蛋白质、寡糖、多糖、磷脂、PNA、类固醇、半抗原、药物、受体结合配体和凝集素。

[0084] 在优选的实施方式中,所述生物特异性结合反应物选自抗体,例如肌钙蛋白I抗体(anti-TnI)。

[0085] 用于进行生物特异性结合测定的方法

[0086] 本发明的还进一步的方面涉及进行生物特异性结合测定的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0087] a)形成被分析物与通过如本文中所定义的镧系元素螯合物标记的生物特异性结合反应物之间的生物复合物;

[0088] b)用具有激发波长的辐射激发所述生物复合物,由此形成激发的生物复合物;以及

[0089] c)检测由所述激发的生物复合物发出的发射辐射。

[0090] 所述方法遵循常规的测定步骤,其对于本领域技术人员是明晰的。

[0091] 在说了这的情况下,本发明的进一步方面涉及如上定义的能检测的分子在利用特异性发光的时间分辨荧光测定法测定的基于特异性生物亲和性的结合测定中的用途。在一种实施方式中,基于特异性生物亲和性的结合测定是非均相免疫测定、均相免疫测定、DNA杂交测定、受体结合测定、免疫细胞化学测定或免疫组织化学测定。

[0092] 固体载体

[0093] 本发明的又一方面涉及缀合有如上所定义的发光镧系元素螯合物的固体载体材料。所述发光镧系元素螯合物典型地共价地或者非共价地固定至所述固体载体材料。

[0094] 在一些令人感兴趣的实施方式中,所述固体载体材料选自纳米粒子、微粒(microparticle)、载玻片(slide)、板(plate)和固相合成树脂。

[0095] 新型的九齿镧系元素螯合物配体以及相应的发光镧系元素螯合物和被标记的生物特异性结合反应物基于具有三个发色团的开链(即无环的)配体结构,其提供螯合的镧系元素离子的意想不到地高效率的激发。同时,发光镧系元素螯合物和被标记的生物特异性结合反应物的所有重要的特征能够得以保持,而没有纯化问题和聚集体的任何额外的形成。

[0096] 本发明的螯合物旨在于单个标记物中结合若干种重要的特征,所述特征例如:

[0097] (a)在适宜的波长、优选超过300nm的波长下高的吸光系数、优选超过50,000cm⁻¹,

[0098] (b)在同一个配体结构中具有三个单独的UV吸收部分(发色团,三重态敏化剂)以容许反应物的高的吸光系数,

[0099] (c)从发色团到镧系元素离子的有效的能量转移,

[0100] (d)九齿螯合彻底地保护被螯合的离子免遭众所周知的水分子的发光猝灭,

[0101] (e)强的螯合部分,其产生i)长期存储被标记的反应物所需的热力学稳定性、以及ii)容许被标记的反应物在其中可能存在竞争性的金属离子或螯合剂的环境中使用的的动力学稳定性,

[0102] (f)官能团,其容许高的水溶性以防止在生物分子的标记期间形成聚集体和被标记的生物分子的非特异性结合,并且容许超过300nm的UV激发和高的吸光系数,

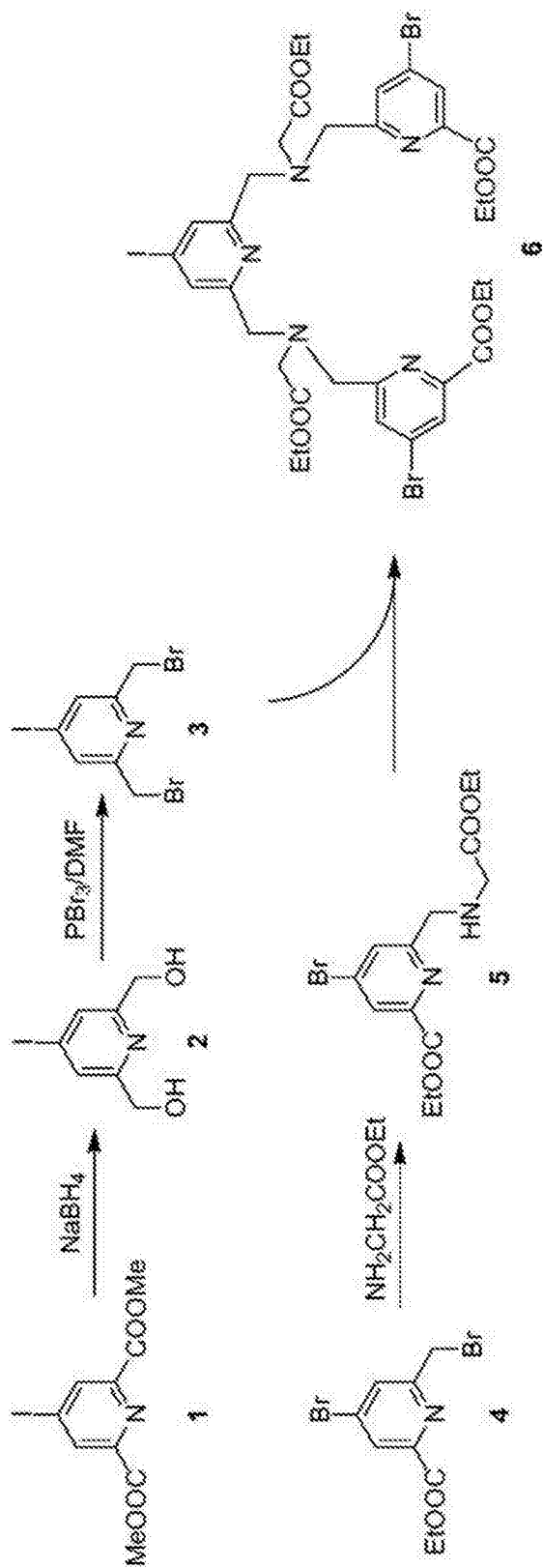
[0103] (g)在发光镧系元素离子的紧邻处具有最佳量的CH₂基团。因此,离子发光通过C-H键振动能量簇(manifold)的非辐射猝灭是不太显著的,以提供增强的发光,以及

[0104] (h)使用铈螯合物,本发明的螯合物的配位场与其它发射线相比突出了在约615nm处的发射线强度,从而提供增强的发光。

[0105] 实施例

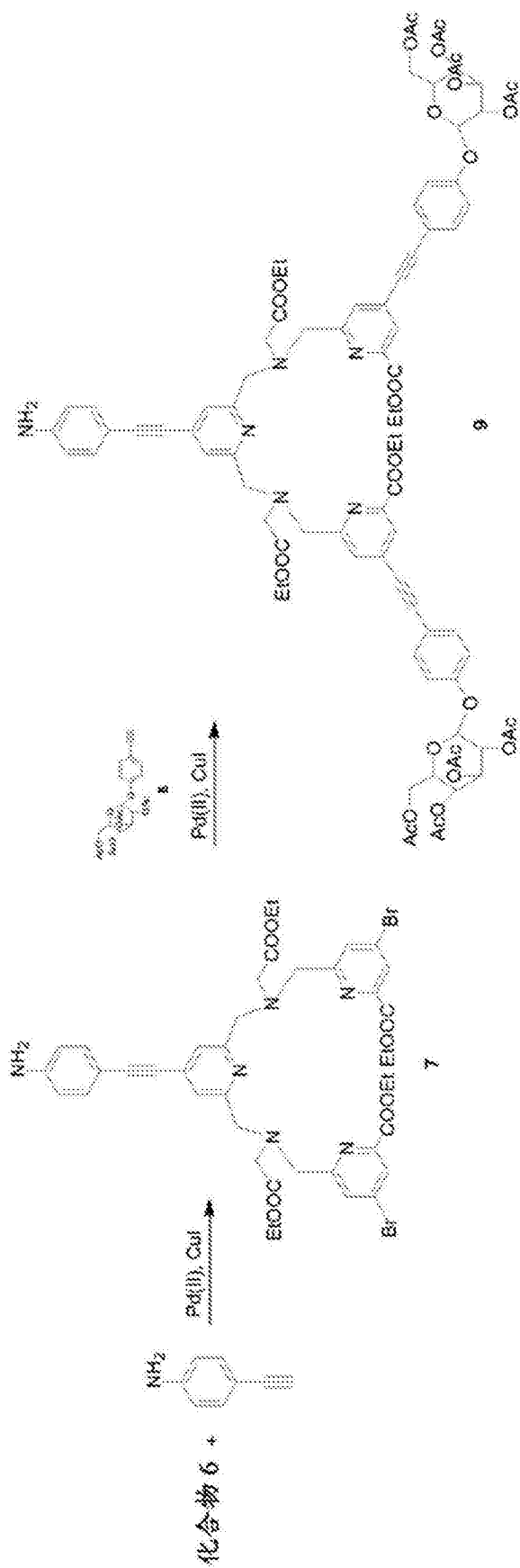
[0106] 以下非限制性实施例旨在进一步说明本发明。在方案1-19中提供了所采用的结构和合成路线。一个关键合成步骤是使用所谓的Sonogashira反应来制备共轭的三键结构。对于本领域技术人员而言,使用已知的Stille和Suzuki合成方法(其描述于例如Bioconjugate Chem.,20(2009)404及位于其中的参考文献)来制备根据本发明的基于例如苯基、噻吩基或呋喃基的镧系元素螯合物是明晰的。

[0107]



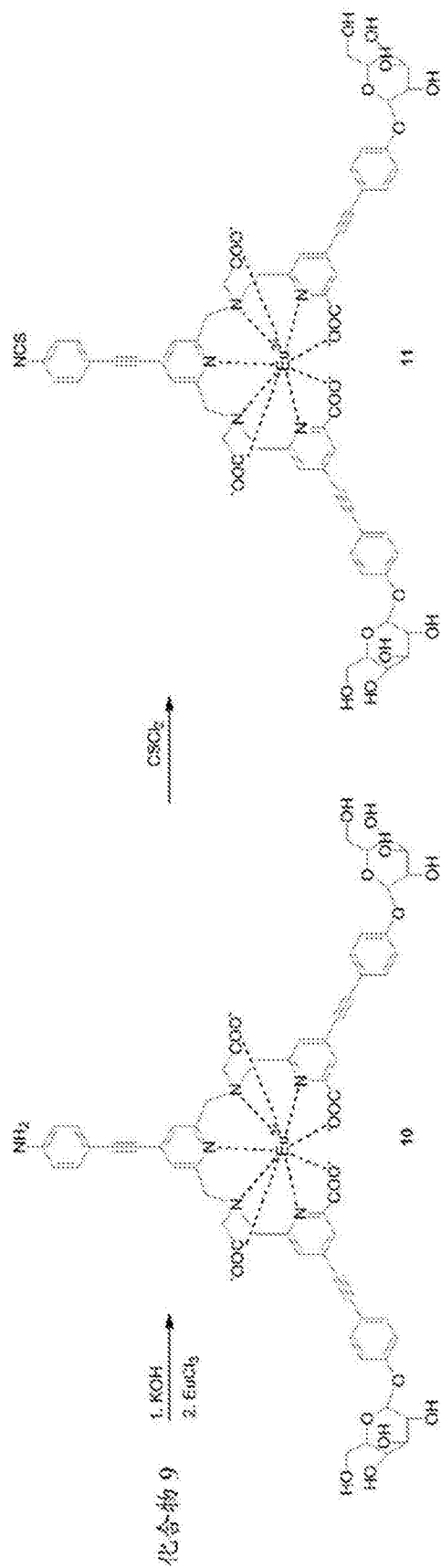
方案1. 化合物6的合成

[0108]

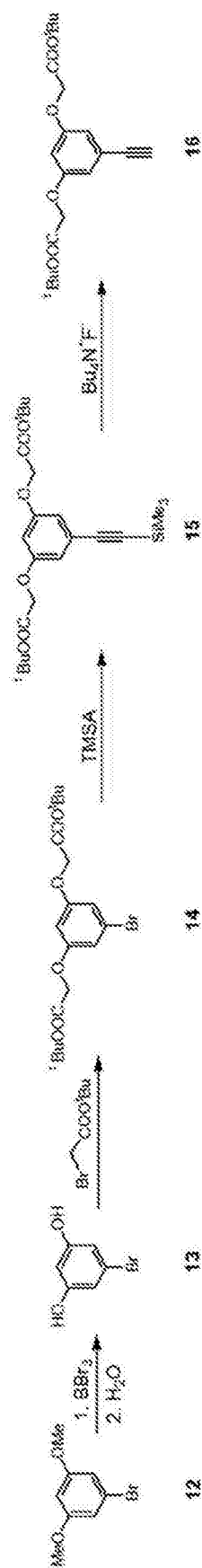


方案 2. 化合物 9 的合成

[0109]

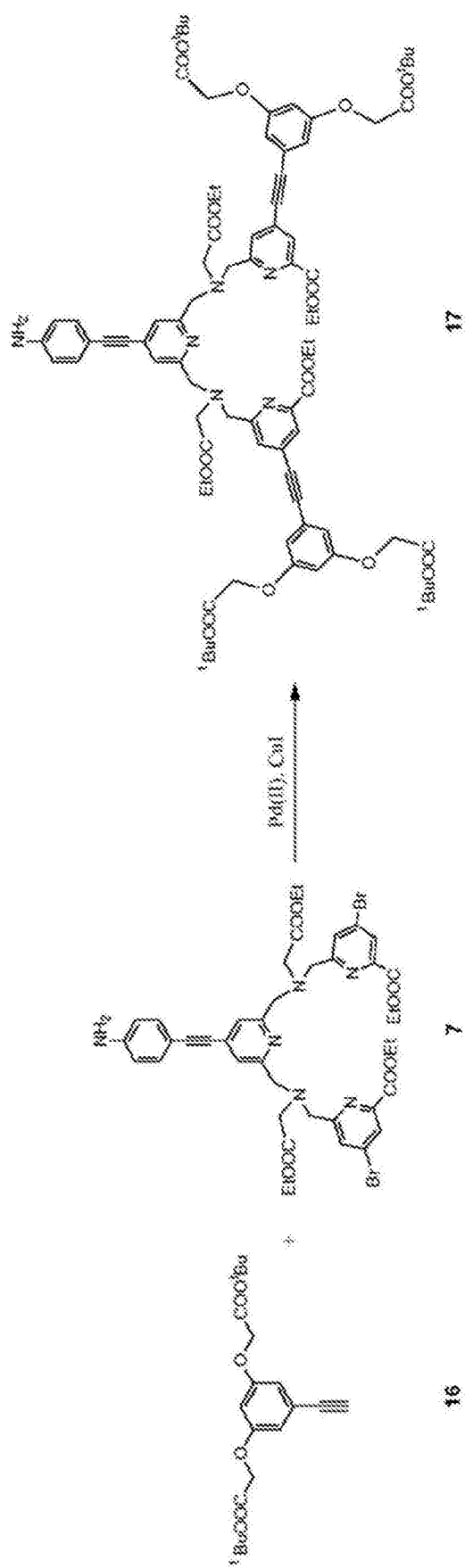


方案 3. 化合物 11 的合成



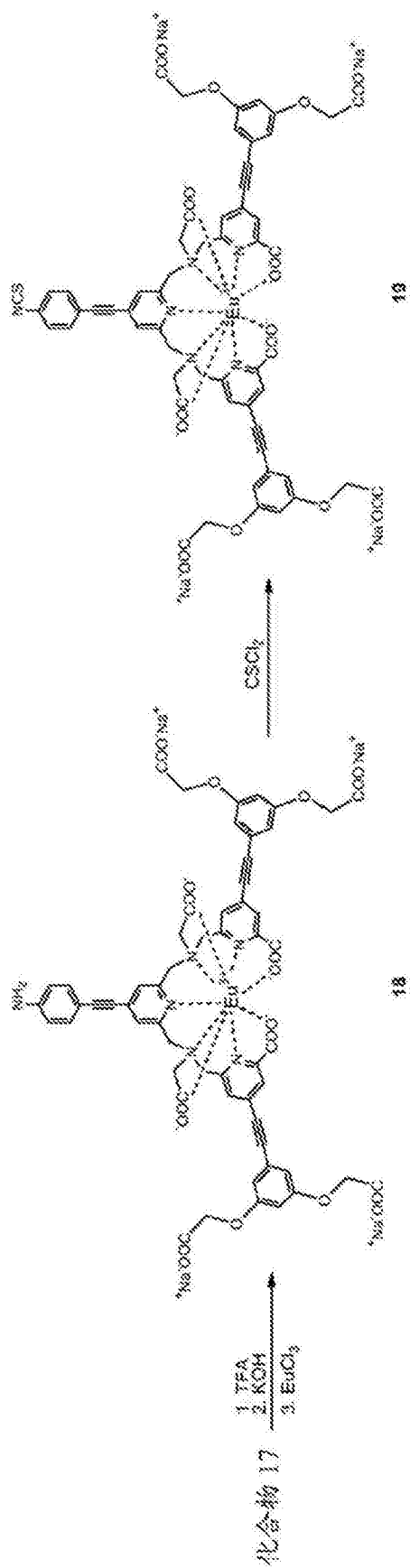
方案 4. 化合物 16 的合成

[0110]



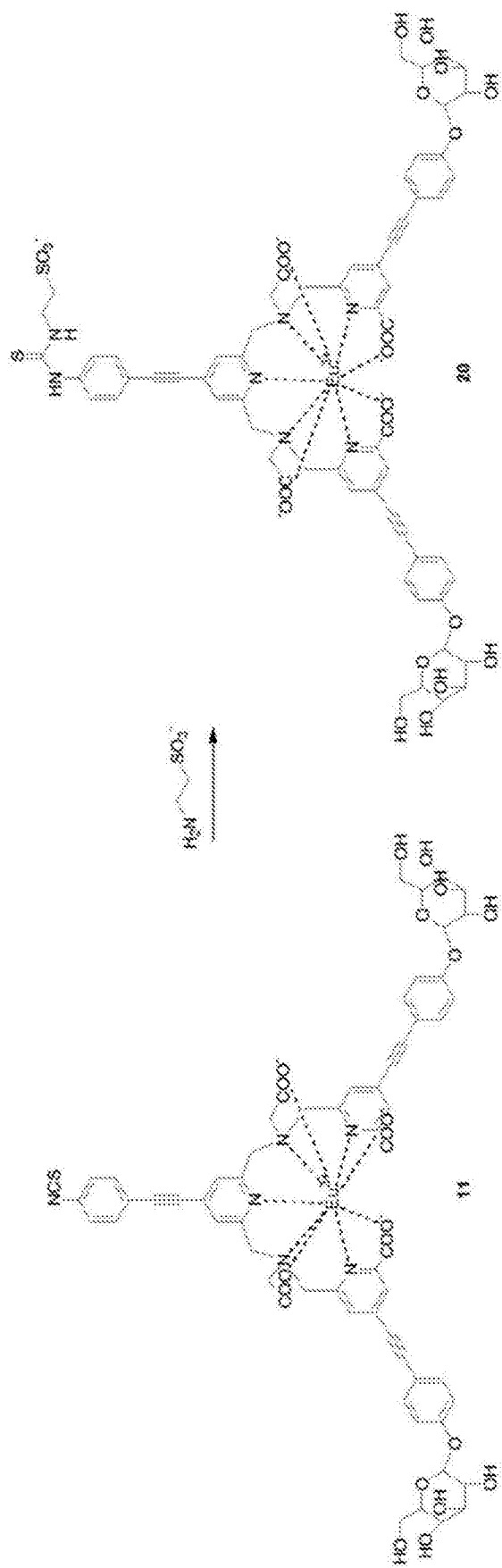
方案 5. 化合物 17 的合成

[0111]



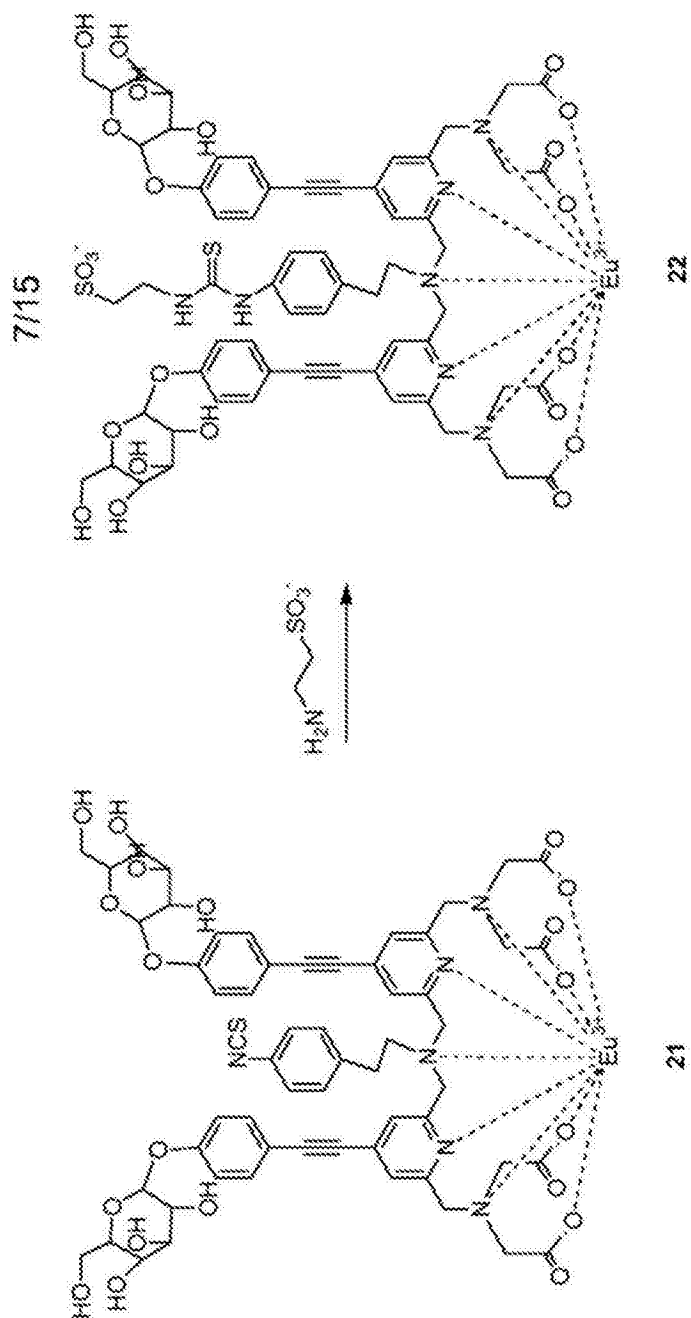
方案 6. 化合物 19 的合成

[0112]



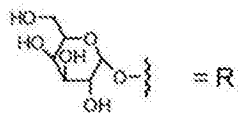
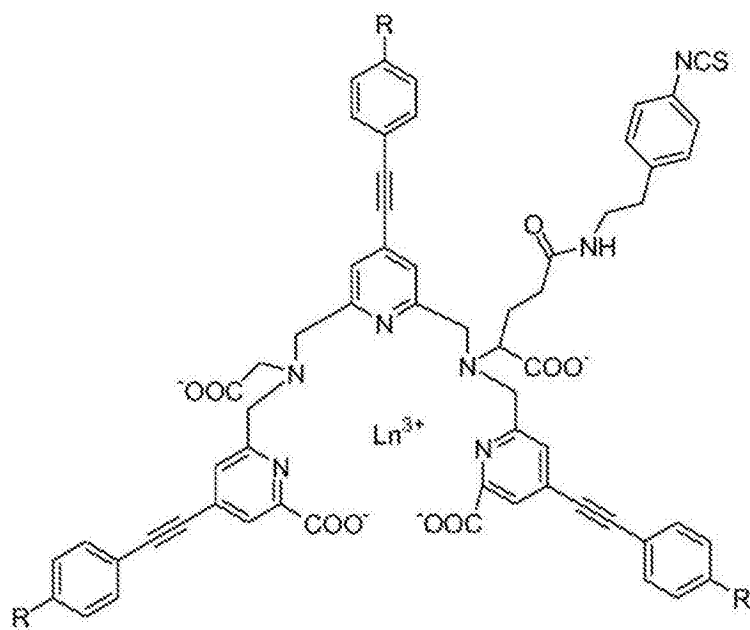
方案 7. 化合物 20 的合成

[0113]



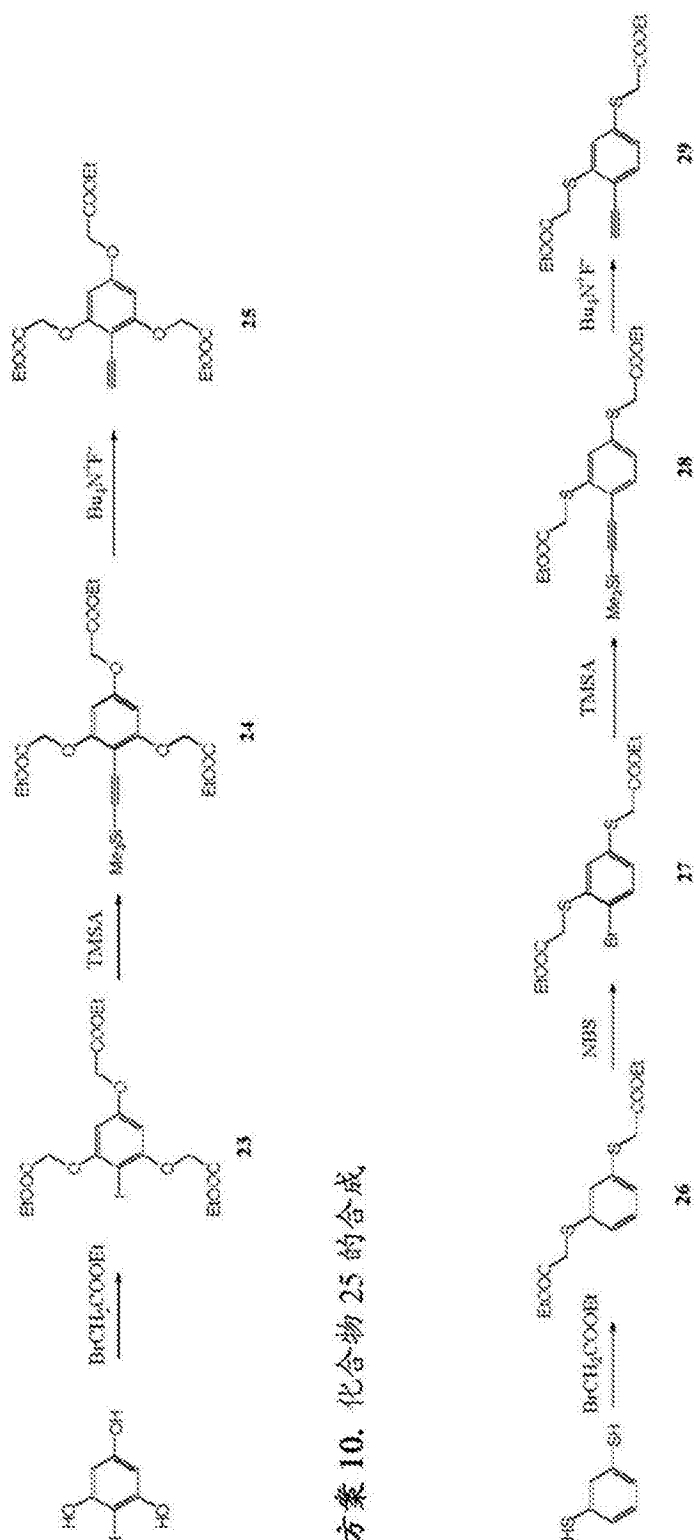
方案 8. 化合物 22 的合成

[0114]



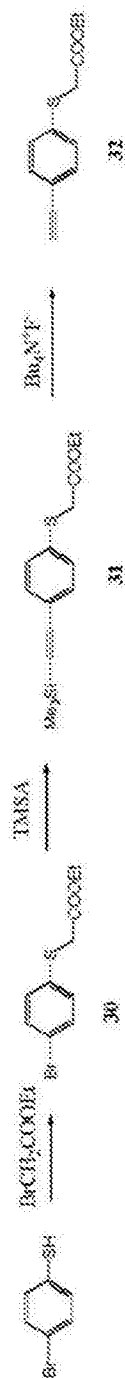
[0115] 方案9.有前景的发光镧系元素螯合物

[0116]



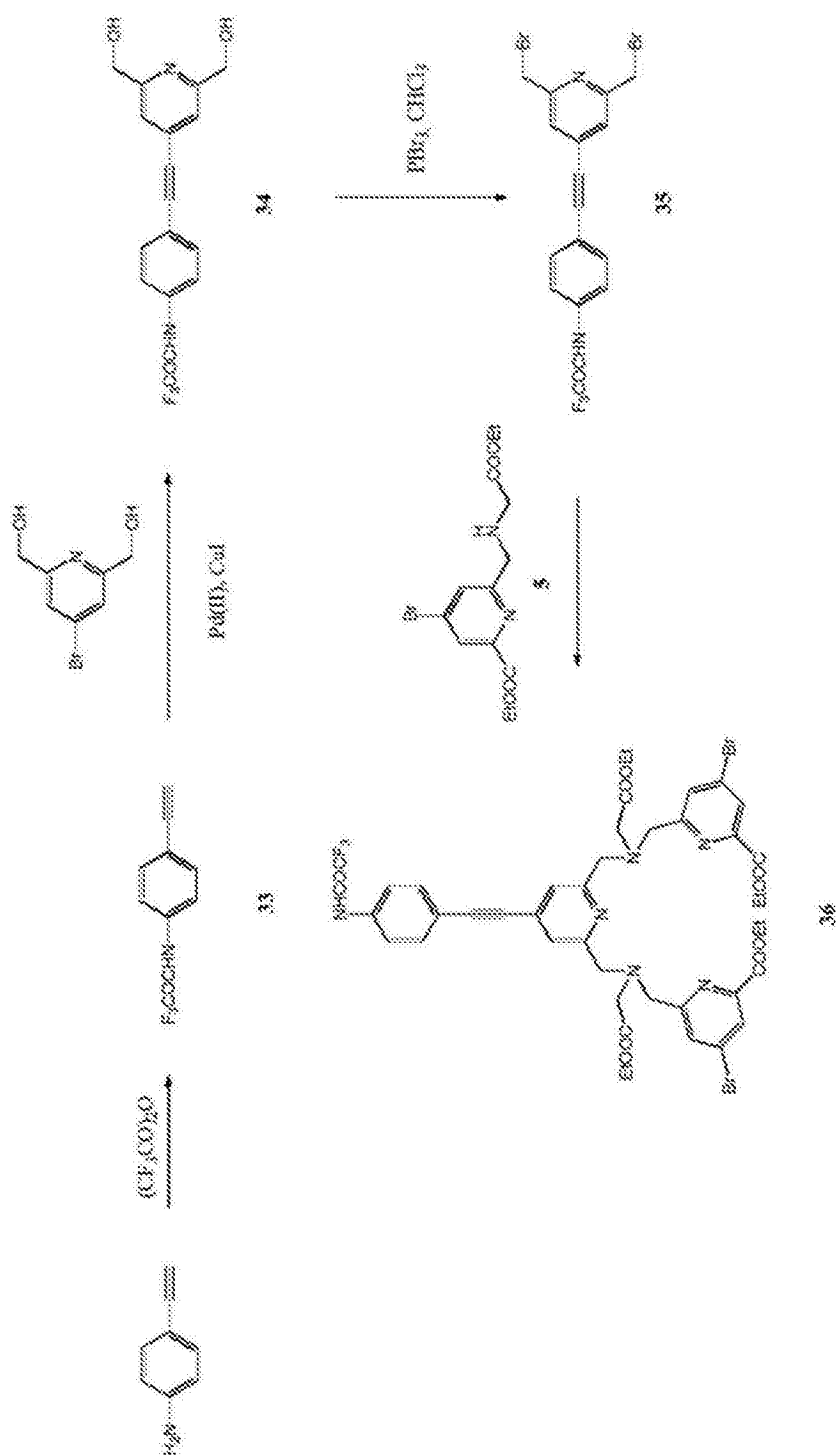
方案 10. 化合物 25 的合成

方案 11. 化合物 29 的合成



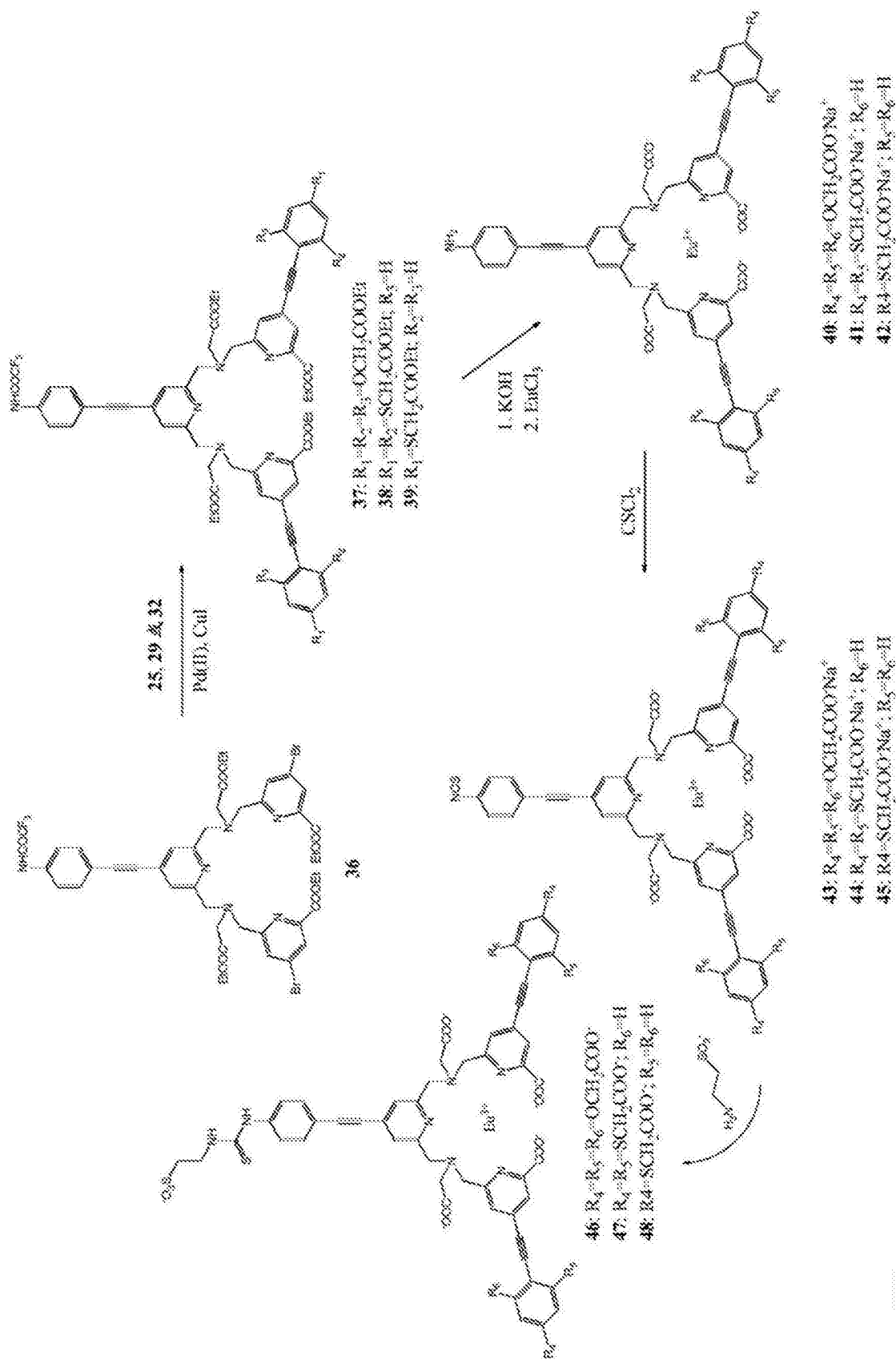
方案 12. 化合物 32 的合成

[0117]



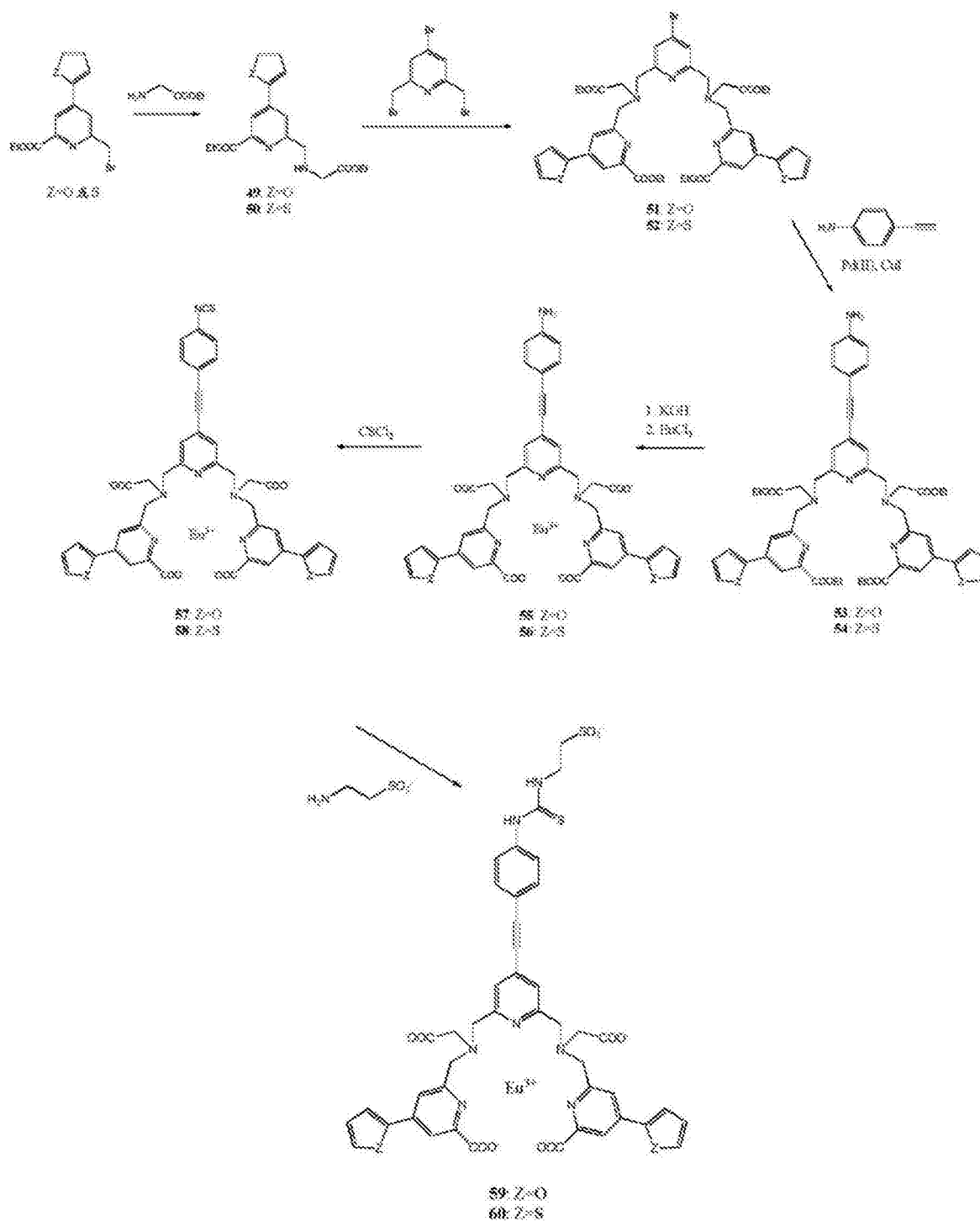
方案13. 化合物 36 的合成

[0118]



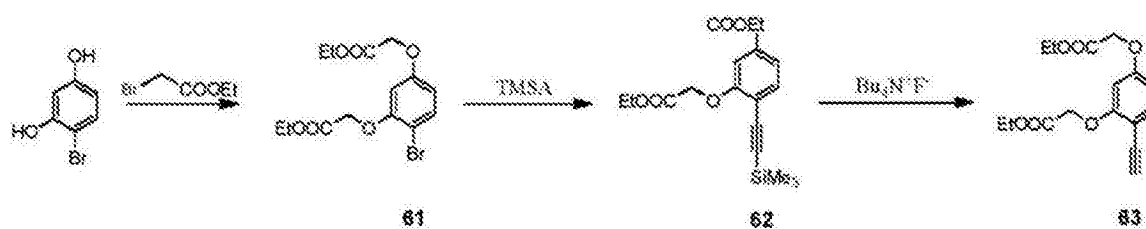
方案14. 标记试剂 43-45 及其牛磺酸衍生物 46-48 的合成

[0119]

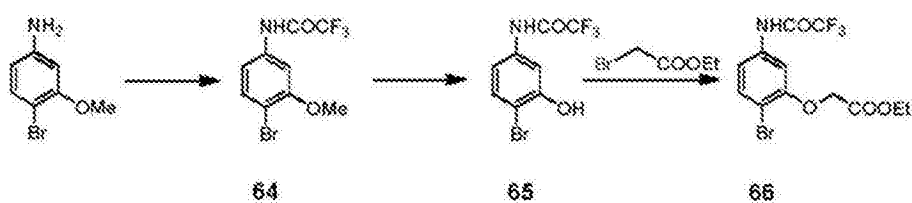


[0120] 方案15. 化合物44的合成

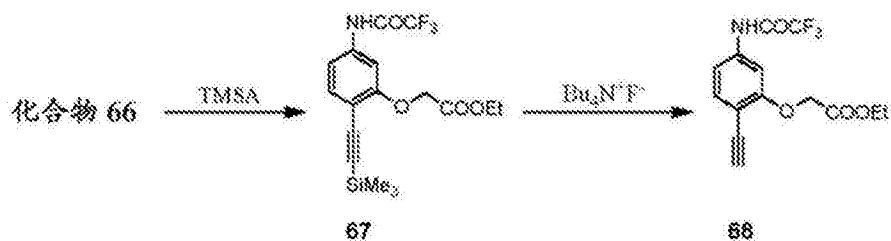
[0121]



[0122] 方案16. 化合物63的合成

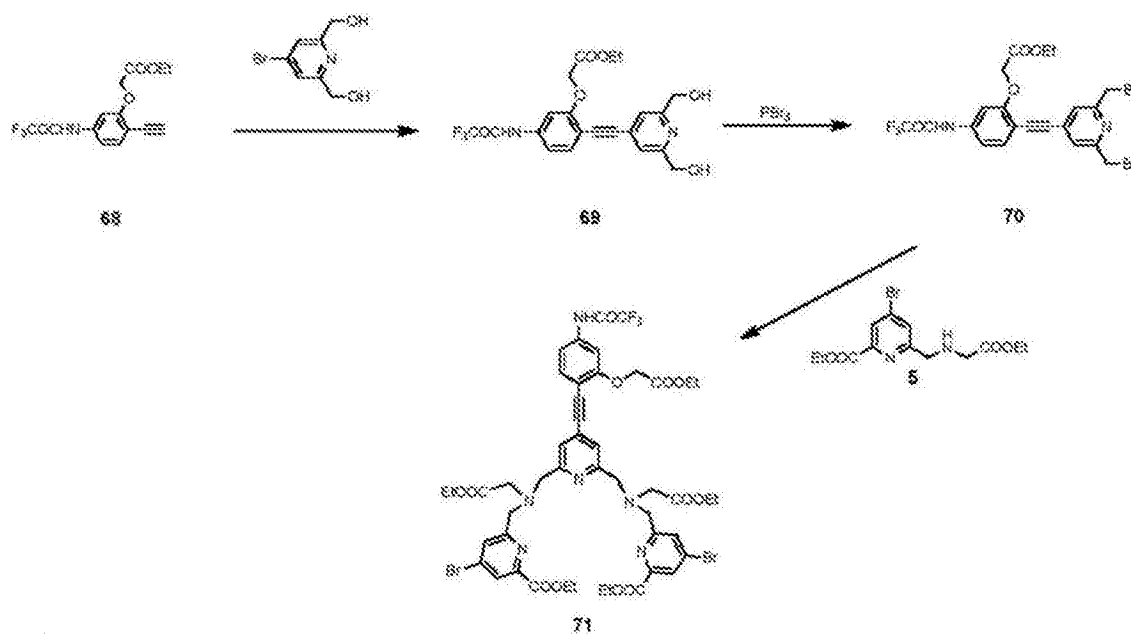


[0123]



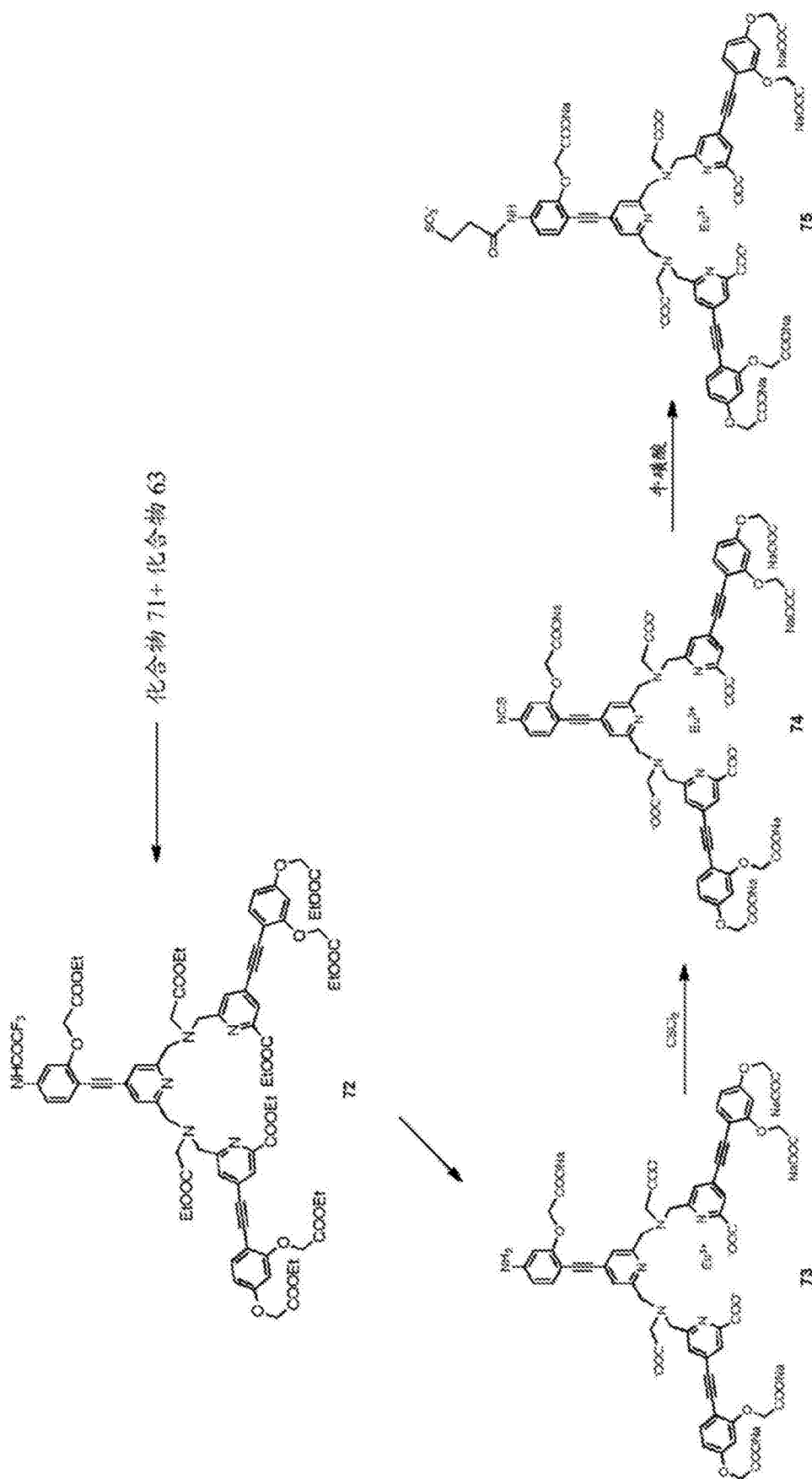
[0124] 方案17. 化合物68的合成

[0125]



[0126] 方案18. 化合物71的合成

[0127]



方案19. 标记试剂 74 及其牛磺酸衍生物 75 的合成

[0128] ^1H -NMR谱是用Bruker AVANCE DRX 500MHz记录的。使用四甲基硅烷作为内标。质谱是在Applied Biosystems QSTAR XL ESI-TOf仪器或者PerSeptive Biosystems

Voyager DE-PRO MALDI-TOF仪器上使用 α -氰基-4-肉桂酸基质记录的。UV-Vis光谱是在Pharmacia Ultrospec 3300pro上记录的。荧光效率是使用Perkin-Elmer Wallac Victor板式荧光计测定的。发光衰减时间、激发和发射谱以及荧光寿命是使用Varian Cary Eclipse荧光分光光度计测量的。进行柱色谱法,其中柱子装填有硅胶60(Merck)。

[0129] 实施例1.合成2,6-双(羟甲基)-4-碘吡啶(2)

[0130] 使4-碘-2,6-吡啶二羧酸二乙酯(1)(5.57g,17.3mmol)悬浮于乙醇(130ml)中。在15分钟期间将硼氢化钠(2.95g,78mmol)分成小份地添加到搅拌的溶液中。使混合物回流1小时30分钟,然后使其冷却至室温。将反应混合物蒸发至干,并使残留物悬浮于饱和碳酸氢钠水溶液(35ml)中。使悬浮液快速沸腾,使其冷却并蒸发至干。使残留物悬浮于DMF与二氯甲烷的混合物(1:1,65ml)中,过滤通过硅藻土垫(Celite pad),并将滤液蒸发至干。从水中结晶出产物,并将其在真空干燥器中通过硅胶进行干燥。产率3.37g(60%)。¹HNMR(CDCl₃, δ ppm):7.70(2H,s),5.46(2H,s),4.48(4H,s)。

[0131] 化合物1如在Takalo H.and Kankare J.,Acta Chemica Scandinavica B 41,1987,219-221中所描述的那样制备。

[0132] 实施例2.合成2,6-双(溴甲基)-4-碘吡啶(3)

[0133] 在0℃将三溴化磷(2.45ml,26mmol)滴加至无水DMF(19.5ml)中,得到半固体混合物。将2,6-双(羟甲基)-4-碘吡啶(2)(3.36g,12.7mmol)分成小份地添加到混合物中。固体混合物在添加期间溶解。使混合物温热至室温,并在室温搅拌4小时。将反应混合物倒入100ml碳酸氢钠水溶液(5%)中。将沉淀的产物通过过滤收集,用水洗涤,并在真空干燥器中通过硅胶进行干燥。产率4.51g(91%)。¹HNMR(CDCl₃, δ ppm):7.76(2H,s),4.45(4H,s)。

[0134] 实施例3.合成化合物2-((4-溴-6-(羧基乙基)-吡啶-2-基)亚甲基次氨基)乙酸乙酯(5)

[0135] 将4-溴-6-溴甲基-2-羧基乙基吡啶(4)(2.99g,9.3mmol)和甘氨酸乙酯盐酸盐(6.52g,46.7mmol)溶解于无水乙腈(125ml)与二-异丙基乙胺(16.5ml)的混合物中。将混合物在室温搅拌过夜。将反应混合物蒸发至干,并将产物用柱色谱法纯化,其中使用二氧化硅作为固定相,并使用二氯甲烷:甲醇(97:3)作为洗脱剂。产率2.78g(86%)。¹HNMR:(CDCl₃, δ ppm):8.14(1H,d,J=1.65Hz),7.85(1H,d,J=1.60Hz),4.47(2H,q,J=7.12Hz),4.20(2H,q,J=7.13Hz),4.05(2H,s),3.47(2H,s),2.26(1H,s),1.43(3H,t,J=7.13Hz),1.28(3H,t,J=7.13Hz)。

[0136] 化合物4如在Takalo et al.,Helv.Chim.Acta,1996,79,789-802中所描述的那样制备。

[0137] 实施例4.合成6,6'-((((4-碘吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((2-乙氧基-2-氧代乙基)氮烷二基))双(亚甲基))双(4-溴吡啶甲酸)二乙酯(6)

[0138] 将化合物3(0.94g,2.4mmol)和化合物5(1.66g,4.8mmol)溶解于无水乙腈(80ml)中。加入无水碳酸钾(1.67g,12mmol),并将混合物在55-60℃搅拌4小时。使反应混合物冷却至室温,并过滤通过硅藻土垫。将滤液蒸发至干,并将产物用柱色谱法纯化,其中使用二氧化硅作为固定相,并使用二氯甲烷:甲醇(95:5)作为洗脱剂。产率1.57g(71%)。¹HNMR:(CDCl₃, δ ppm):8.12(2H,d,J=1.60Hz),8.07(2H,d,J=1.40Hz),7.76(2H,s),4.46(4H,q,J=7.12Hz),4.18(4H,q,J=7.13),4.08(4H,s),3.92(4H,s),3.49(4H,s),1.42(6H,t,J=

7.13), 1.28(6H, t, J=7.13)。MS(ESI-TOF)C₃₃H₃₈Br₂IN₅O₈[M+H]⁺计算值:918.02, 实测:917.92。

[0139] 实施例5. 合成6,6'-((((4-((4-氨基苯基)乙炔基)吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((2-乙氧基-2-氧代乙基)氮烷二基))双(亚甲基))双(4-溴吡啶甲酸)二乙酯(7)

[0140] 将化合物6(412mg, 0.45mmol)溶解于无水二氯甲烷(6ml)中。加入三乙胺(2ml)、碘化亚铜(I)(3.2mg, 0.017mmol)、双(三苯基膦)二氯化钯(II)(9.5mg, 0.014mmol)和4-乙炔基苯胺(52.5mg, 0.45mmol)。将反应混合物用氩气进行脱气, 并将混合物在室温搅拌3小时。将反应混合物蒸发至干, 并将产物用柱色谱法纯化, 其中使用二氧化硅作为固定相, 并使用二氯甲烷:甲醇(90:10)作为洗脱剂。产率193mg(47%)。¹HNMR:(CDCl₃, δppm):8.11(2H, d, J=1.35Hz), 7.83(2H, s), 7.32(2H, d, J=8.15Hz), 7.18(2H, s), 6.67(2H, d, J=8.45Hz), 4.38(4H, s), 4.30(4H, q, J=6.74Hz), 4.01(4H, q, J=7.10Hz), 3.97(4H, s), 3.39(4H, s), 1.32(6H, t, J=6.90Hz), 1.17(6H, t, J=6.93Hz)。MS(ESI-TOF)C₄₁H₄₄Br₂N₆O₈[M+H]⁺计算值:907.17, 实测:907.05。

[0141] 实施例6. 合成6,6'-((((4-((4-氨基苯基)乙炔基)吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((2-乙氧基-2-氧代乙基)氮烷二基))双(亚甲基))双((4-(4-(2,3,4,6-四-O-乙酰基-α-半乳糖吡喃氧基(galactopyranoxy))苯基)乙炔基)吡啶甲酸)二乙酯(9)

[0142] 将化合物7(190mg, 0.21mmol)和化合物8(240mg, 0.54mmol)溶解于无水四氢呋喃(3ml)中。加入三乙胺(3ml)、碘化亚铜(I)(2.3mg, 0.012mmol)、双(三苯基膦)二氯化钯(II)(4.3mg, 0.006mmol)(63.8mg, 0.54mmol)。将反应混合物用氩气进行脱气, 并将混合物在55-60℃搅拌过夜。将反应混合物蒸发至干, 并将产物用柱色谱法纯化, 其中使用二氧化硅作为固定相, 并使用二氯甲烷:甲醇(90:10)作为洗脱剂。产率155mg(44%)。MS(ESI-TOF)C₈₅H₉₀N₆O₂₈[M+H]⁺计算值:1643.59, 实测:1643.51。

[0143] 实施例7. 合成6,6'-((((4-((4-氨基苯基)乙炔基)吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((羧酸根甲基(carboxylatomethyl))氮烷二基))双(亚甲基))双((4-(4-α-半乳糖吡喃氧基)苯基)乙炔基)吡啶甲酸铈(10)

[0144] 将化合物9(152mg, 0.092mmol)溶解于在乙醇(7.7ml)中的0.5M KOH中, 并加入水(3.6ml)。将混合物在室温搅拌2小时。将混合物蒸发至干, 将残留物溶解于水(2.5ml)中, 并通过加入盐酸(6M)将pH调节至6.5。向反应混合物中加入溶解于水(920μl)中的氯化铈(34mg, 0.092mmol)。将反应混合物在室温搅拌2小时, 并通过向混合物中加入碳酸氢钠或盐酸使pH保持在6.3-6.5。产物从反应混合物沉淀出来, 并通过离心分离。将产物在真空干燥器中通过硅胶干燥过夜。产率115mg。MS(ESI-TOF)C₆₁H₅₄EuN₆O₂₀-[M+2H]⁺计算值:1345.28, 实测:1345.25。UV/VIS:λ_{max,abs}(H₂O)=331nm。

[0145] 实施例8. 合成6,6'-((((4-((4-异硫氰基苯基)乙炔基)吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((羧酸根甲基)氮烷二基))双(亚甲基))双((4-(4-α-半乳糖吡喃氧基)苯基)乙炔基)吡啶甲酸铈(11)

[0146] 将化合物10(108mg, 0.08mmol)的水溶液加入硫光气(42μl, 0.55mmol)、NaHCO₃(52mg, 0.61mmol)和氯仿(1.65ml)的混合物中。在室温搅拌1小时之后, 将水相用氯仿(3×1ml)洗涤。然后用1M乙酸将pH调节至6.8-7.2, 并将产物用丙酮(33ml)沉淀。通过离心收集产物, 将沉淀用丙酮(3×30ml)洗涤并在真空干燥器中通过硅胶干燥过夜。MS(ESI-TOF)

$C_{62}H_{52}EuN_6O_{20}S^- [M^-]$ 计算值: 1385.22, 实测 1385.98。UV/VIS: $\lambda_{\max, \text{abs}}(H_2O) = 328\text{nm}$, $\epsilon = 86000\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

[0147] 实施例9. 合成1-溴-3,5-二羟基苯(13)

[0148] 将1-溴-3,5-二甲氧基苯(12)(1.00g, 4.60mmol)溶解于无水二氯甲烷(40ml)中, 并在冰浴中冷却。加入三溴化硼(1.33ml, 13.82mmol), 并将混合物搅拌2小时。使混合物温热至室温并搅拌过夜。滴加甲醇(1.4ml)以终止反应, 并将混合物倒入水(50ml)中且在室温搅拌2小时。将反应混合物用 NaHCO_3 中和, 并将混合物用乙酸乙酯(30ml)萃取两次。将合并的有机层通过 Na_2SO_4 进行干燥, 并蒸发至干。将产物通过柱色谱法纯化, 其中使用硅胶作为固定相, 并使用甲醇: 二氯甲烷(5:95)作为洗脱剂。产物为白色固体。产率: 0.71g(81%)。 $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6, \delta\text{ppm})$: 9.68(2H, s), 6.38(2H, d, $J=2\text{Hz}$), 6.19(1H, dd, $J=2\text{Hz}$)。

[0149] 实施例10. 合成2,2'-(5-溴-1,3-亚苯基)双(氧基)二乙酸二叔丁酯(14)

[0150] 将化合物13(0.49g, 2.59mmol)溶解于DMF(10ml, 无水)中。加入无水 K_2CO_3 (2.15g, 15.56mmol)和溴乙酸叔丁酯(1.15ml, 7.78mmol), 并将混合物在氩气气氛下于50℃搅拌过夜。加入水(17ml), 并将混合物用乙酸乙酯($3 \times 40\text{ml}$)萃取。将合并的有机萃取液通过 NaHCO_3 进行干燥, 并蒸发至干。将粗制产物通过柱色谱法纯化, 其中使用硅胶作为固定相, 并使用二氯甲烷作为洗脱剂。产物为白色固体。产率: 0.95g(87%) $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \delta\text{ppm})$: 6.67(2H, d, $J=2\text{Hz}$), 6.42(1H, dd, $J=2\text{Hz}$), 1.49(18H, s)。

[0151] 实施例11. 合成2,2'-(5-((三甲基甲硅烷基)乙炔基)-1,3-亚苯基)双(氧基)二乙酸二叔丁酯(15)

[0152] 将化合物14(2.00g, 4.79mmol)溶解于DMF(4ml, 无水)中, 并将溶液置于微波反应瓶中。加入二乙胺(12ml, 无水)、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (168mg, 0.24mmol)、 CuI (46mg, 0.24mmol)和 PPh_3 (251mg, 0.96mmol), 将该瓶在氩气气氛中密封。通过隔片(septum)加入三甲基甲硅烷基乙炔(996 μl , 7.19mmol), 并使用微波加热将混合物在120℃搅拌30分钟。将反应混合物蒸发至干, 溶解于二氯甲烷中, 并通过柱色谱法纯化, 其中使用硅胶作为固定相, 并使用乙酸乙酯: 石油醚(10:90)作为洗脱剂。产率: 1.36g(65%) $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \delta\text{ppm})$: 6.61(2H, d, $J=2.35\text{Hz}$), 6.49(1H, dd, $J=2.3\text{Hz}$), 4.46(4H, s), 1.49(18H, s), 0.23(9H, m)。

[0153] 实施例12. 合成2,2'-(5-乙炔基-1,3-亚苯基)双(氧基)二乙酸二叔丁酯(16)

[0154] 将化合物15(1.29g, 2.98mmol)溶解于二氯甲烷(40ml, 无水)中。加入氟化四丁基铵(0.934g, 3.57mmol), 并将混合物在氩气气氛中在室温搅拌45分钟。将混合物用10%柠檬酸溶液(20ml)洗涤, 并用水洗涤4次($4 \times 40\text{ml}$)。将有机相通过 Na_2SO_4 进行干燥, 并蒸发至干。将粗制产物通过柱色谱法纯化, 其中使用硅胶作为固定相, 并使用乙酸乙酯: 石油醚(10:90)作为洗脱剂。产物为带黄色的固体。产率: 895mg(83%) $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, \delta\text{ppm})$: 6.64(2H, d, $J=2.3\text{Hz}$), 6.51(1H, dd, $J=2.33\text{Hz}$), 4.47(4H, s), 3.02(1H, s), 1.49(18H, s)。

[0155] 实施例13. 合成2,2',2'',2'''-((((6,6'-((((4-((4-氨基苯基)乙炔基)吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((2-乙氧基-2-氧代乙基)氮烷二基))双(亚甲基))双(2-(乙氧基羰基)吡啶-6,4-二基))双(乙炔-2,1-二基))双(苯-5,3,1-三基))四(氧基))四乙酸四叔丁酯(17)

[0156] 将化合物16(0.167g, 0.459mmol)和化合物7(0.167g, 0.184mmol)溶解于无水四氢呋喃(4ml)与三乙胺(2.5ml)的混合物中。加入双(三苯基膦)氯化钯(II)(3.8mg,

0.0054mmol)和碘化亚铜(I)(2.3mg,0.012mmol),并将混合物在氩气气氛下在55-60℃搅拌过夜。将反应混合物蒸发至干,并通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用甲醇:二氯甲烷(10:90)作为洗脱剂。产率:71mg(27%)MS(ESI-TOF) $C_{81}H_{94}N_6O_{20}[M+H]^+$ 计算值:1471.66,实测:1471.68。

[0157] 实施例14.合成6,6'-((((4-((4-氨基苯基)乙炔基)吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((羧酸根甲基)氮烷二基))双(亚甲基))双(4-((3,5-双(羧基甲氧基)苯基)乙炔基)吡啶甲酸铈(III))(18)

[0158] 将化合物17(68mg,0.048mmol)溶解于三氟乙酸(1ml,13.5mmol)中,并将混合物在室温搅拌1.5小时。将反应混合物在无加热的情况下蒸发至干。向残留物中加入乙醚(2.5ml),并将混合物搅拌15分钟。产物从混合物中沉淀出来,通过离心分离。将沉淀物用乙醚洗涤两次,然后在真空干燥器中通过硅胶进行干燥。将干燥的沉淀物(64mg,0.051mmol)溶解于水(1.8ml)和在乙醇(4ml)中的0.5M氢氧化钾溶液的混合物中。将混合物在室温搅拌2小时。将反应混合物蒸发至干,并将残留物溶解于水(1.7ml)中。通过加入盐酸(6M)将pH调节至6.5。向反应混合物中滴加溶解于水(485 μ l)中的氯化铈(20mg,0.055mmol)。将反应混合物在室温搅拌2小时,并通过向混合物中加入碳酸氢钠将pH保持在6.3-6.5。通过加入氢氧化钠调节pH至8.5-9.0,将过量的铈从混合物中沉淀,并将沉淀物通过离心除去。将产物用丙酮(25ml)沉淀,并通过离心分离。将沉淀物用丙酮(3 $\times$ 10ml)洗涤,并在真空干燥器中通过硅胶干燥过夜。产率:180mg。MS(ESI-TOF) $C_{57}H_{42}EuN_6O_{20}^-[M+2H]^+$ (对于无钠离子的游离酸)计算值:1285.18,实测:1285.24。

[0159] 实施例15.合成6,6'-((((4-((4-异硫氰基苯基)乙炔基)吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((羧酸根甲基)氮烷二基))双(亚甲基))双(4-((3,5-双(羧基甲氧基)苯基)乙炔基)吡啶甲酸)铈(III))(19)

[0160] 将化合物18(175mg,0.143mmol)的水溶液滴加至氯仿(2.85ml)、硫光气(74 μ l,0.97mmol)和碳酸氢钠(91mg,1.09mmol)的混合物中。将反应混合物在室温搅拌45分钟。将两相分离,并将水相用氯仿(3 $\times$ 6ml)洗涤。用1M乙酸将pH调节至7,并将产物用丙酮(57ml)沉淀且通过离心分离。将沉淀物用丙酮(3 $\times$ 15ml)洗涤,并在真空干燥器中通过硅胶干燥过夜。产率:216mg。MS(ESI-TOF) $C_{58}H_{40}EuN_6O_{20}S^-[M-H]^{2-}$ (对于无钠离子的游离酸)计算值:662.56,实测:662.47。

[0161] 实施例16.根据本发明的Eu-螯合物和常规的9-齿 α -半乳糖Eu螯合物的发光之间的比较

[0162] 通过将起始原料溶解于碳酸氢钠水溶液(2ml,50mM,pH9.8)和DMF(200 μ l)的混合物中,将化合物11(5.3mg)和常规的9-齿 α -半乳糖Eu螯合物(21)(5.5mg)偶联至牛磺酸(对于每个反应5mg)。将混合物在室温温育过夜。将产物(20和22)通过使用反相HPLC(RP-18柱)纯化。溶剂是A:三乙基铵乙酸盐缓冲液(20mM,pH7)和B:在三乙基铵乙酸盐中的50%乙腈缓冲液(20mM,pH7)中的溶液。梯度起始于5%的溶剂B,且溶剂B的量在25分钟内线性升至100%。在16.7分钟(20)和15.1分钟(22)的时间点处从柱子洗脱出产物。收集包含产物的级分,将其汇集并蒸发至干。

[0163] 常规的9-齿 α -半乳糖Eu螯合物(21)是根据von Lode P.et al.,Anal.Chem.,2003,75,3193-3201制备的。

[0164] 将经纯化的产物溶解于水中并分析其UV光谱,使用DELTA[®]相对于Eu标准物分析其Eu含量,并使用Victor[™]板式荧光计分析其在水中的发光信号。在发光测量中,基于Eu含量将化合物20和22的浓度调整为等摩尔的。结果总结于表1中。

[0165] 表1

[0166]

	化合物 22 (参比化合物)	化合物 20
基于 Eu 含量的摩尔吸光系数(ϵ)	56,000	86,000
相对发光信号(浓度约 1 nM)	195,000	633,000

[0167] 这些结果显示,与参比化合物相比,化合物20提供意想不到地高的发光产额(高超过300%)。与抗体偶联的 α -gal-9-D Eu(化合物21)的早期公开的发光产额($\epsilon \Phi$)为4,787(von Lode P.et al.,Anal.Chem.,2003,75,3193-3201)。假定化合物22具有相同的发光产额,则化合物20的发光产额可估算为 $\epsilon \Phi = 633,000/195,000 \times 4,787 = \text{约} 15,500$ 。这是对于用于标记生物分子的还具有反应性基团的螯合物所观察到的最高的发光产额之一。

[0168] 实施例17.用化合物19标记抗体

[0169] 通过使用90倍过量的化合物19如von Lode P.et al.,Anal.Chem.,2003,75,3193-3201中所描述的那样进行TnI抗体的标记。反应在室温过夜进行。将被标记的抗体与过量的化合物19在Superdex 200HR 10/30凝胶过滤柱(GE healthcare)上通过使用Tris-盐水-叠氮化物(Tris 50mM,NaCl 0.9%,pH7.75)缓冲液作为洗脱剂进行分离。将包含抗体的级分汇集,并使用Victor[™]板式荧光计相对于Eu标准物测量铕浓度。获得1.6Eu/IgG的标记程度。

[0170] 实施例18.肌钙蛋白I免疫测定

[0171] 将用化合物19标记的TnI抗体在用于心肌肌钙蛋白I的夹心免疫测定中进行测试。作为参比化合物,使用以化合物21标记的TnI抗体(标记程度11Eu/IgG)。将10 μ l的经稀释的示踪抗体(5ng/ μ l)和20 μ l的TnI标准溶液用吸液管吸移到经预涂覆的测定孔(well)中(96孔板形式的单个孔,孔涂覆有链霉亲和素以及TnI的生物素化俘获抗体,Innotrac Diagnostics)。将反应混合物在36 $^{\circ}$ C在振荡下温育20分钟。在用Victor[™]板式荧光计测量之前,将所述孔洗涤6次并干燥。结果总结于表2中。A和B标准物两者都是以12个同样的样品测量的(重复测量12次,measured in 12replicates),且其它标准物C-F是以6个同样的样品测量的(重复测量6次)。

[0172] 表2

[0173]

	cTnI 标准物 (ng/ml)	A	B	C	D	E	F
		0	0.022	0.08	0.75	5.34	41.6
用化合物 19 标记的 IgG	cps-空白	197	310	1030	9098	64347	459222
参比化合物	cps-空白	195	258	775	6624	47913	369540
用化合物 19 标记的 IgG	cv%	7.8	6.4	4.1	3.2	1.9	3.2
参比化合物	cv%	9.5	8.7	3.8	3.1	5.3	7.1

[0174] 结果显示,当与参比化合物(21)相比时,化合物19使用1/10量的螯合物/1gG提供相同的信号水平。换言之,根据本发明的化合物提供比现有技术的参比化合物多一个数量级的发光信号/螯合物。

[0175] 评论

[0176] 本申请的螯合物是九齿的(对于镧系元素是最佳的)并具有三个单独的发色团,其应比目前使用的具有两个单独的发色团的九齿螯合物高50%的发光。与其它已知的具有两个或三个发色团的螯合物(例如基于NOTA和DOTA的结构)相比,本发明的螯合物在发射离子的紧邻处具有较少的CH₂基团。因此,离子发光通过C-H键振动能量簇的非辐射猝灭是不太显著的,且因此发光应更加增强。此外,作为无环的九齿螯合物,配体在络合镧系元素离子时不具有任何空间位阻。在该情况中,发射镧系元素离子与吡啶氮之间的距离对于1)从给体吡啶氮到镧系元素离子的有效的能量转移和对于2)高的络合物稳定性是最佳的,并因此提供增强的发光。与其它含有三个发色团的基于DOTA的螯合物相比,螯合物合成更容易进行。所述三个发色团彼此之间可以完全不同,这意味着更多可能的变化和更多的调整可能性,例如在不同溶剂中的溶解性、多种激发波长和能量转移等。便宜且小的LED可用于激发被标记的生物分子。因此,可使用更小且更便宜的商业生物测定系统用仪器。与其它发射线相比,本发明的螯合物的配位场突出了在约615nm处的发射线强度,且因此所观察到的发光应与其它相比得到改善。预计提高的发色团对称性提高发光产额。

[0177] 意想不到的的是,所观察到的发光比目前使用的螯合物高约300%。设想是约50-70%的改善。这意味着,与目前的灵敏度相比将我们的测定灵敏度改善约三倍应是可能的。

[0178] 实施例19.合成2,2',2''-((4-碘-1,3,5-亚苯基)三(氧基))三乙酸三乙酯(23)

[0179] 将4-碘-1,3,5-三羟基苯(3.41g,13.5mmol;Acta Chem.Scand.1991,45,539)、无水K₂CO₃(6.17g,44.7mmol)、溴乙酸乙酯(4.96ml,44.7mmol)和无水MeCN(100ml)的混合物在55℃搅拌过夜。将混合物过滤,将固体物质用MeCN洗涤并将滤液蒸发至干。将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用MeOH:CH₂Cl₂(首先0:100,然后20:80)作为洗脱剂。产率:0.64g(9%)。¹H NMR(CDCl₃,δppm):6.10(2H,s),4.65(4H,s),4.55(4H,s),4.27(2H,q,J=7.15Hz),4.26(4H,q,J=7.15Hz),1.31(3H,t,J=7.15Hz),1.30(6H,t,J=7.15Hz)。MS(ESI-TOF)C₁₈H₂₃IO₉[M+H]⁺计算值:511.05,实测:510.93。

[0180] 实施例20.合成2,2',2''-((4-(三甲基甲硅烷基)乙炔基-1,3,5-亚苯基)三(氧基))三乙酸三乙酯(24)

[0181] 该化合物24由化合物23使用与实施例11中所述的合成类似的方法合成。通过使用

微波加热将混合物首先在100℃搅拌30分钟,然后在120℃搅拌20分钟。将混合物用Et₂O(50ml)萃取,用H₂O(2×20ml)洗涤,用Na₂SO₄干燥,并将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用乙酸乙酯:石油醚(首先20:80,然后30:70)作为洗脱剂。产率:70%。¹H NMR(CDCl₃, δppm):6.10(2H, s), 4.67(4H, s), 4.55(2H, s), 4.27(2H, g, J=7.15Hz), 4.26(4H, q, J=7.15Hz), 1.30(6H, t, J=7.15Hz), 1.29(3H, t, J=7.15Hz), 0.26(9H, s)。MS(ESI-TOF)C₂₃H₃₂O₉Si[M+H]⁺计算值:481.19, 实测:481.99。

[0182] 实施例21. 合成2,2',2''-((4-乙炔基-1,3,5-亚苯基)三(氧基))三乙酸三乙酯(25)

[0183] 该化合物25由化合物24使用与实施例12中所述的合成类似的方法合成。在用10%柠檬酸和H₂O洗涤之后,产物(100%)在未进一步纯化的情况下用于下一步骤。¹H NMR(CDCl₃, δppm):6.06(2H, s), 4.69(4H, s), 4.55(2H, s), 4.27(2H, q, J=7.15Hz), 4.26(4H, q, J=7.15Hz), 3.50(1H, s), 1.30(3H, t, J=7.15Hz), 1.29(6H, t, J=7.15Hz)。MS(ESI-TOF)计算值:C₂₀H₂₄O₉[M+H]⁺:409.15, 实测:409.20。

[0184] 实施例22. 合成2,2'-(1,3-亚苯基双(硫烷二基))二乙酸二乙酯(26)

[0185] 将苯-1,3-二硫醇(0.76g, 4mmol)、无水K₂CO₃(2.21g, 16mmol)、溴乙酸乙酯(0.93ml, 8.4mmol)和无水MeCN(20ml)的混合物在55℃且在氩气下搅拌过夜。将混合物过滤,将固体物质用MeCN洗涤且将滤液蒸发至干。将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用CH₂Cl₂作为洗脱剂。产率:0.96g(76%)。¹H NMR(CDCl₃, δppm):7.45-7.43(1H, m), 7.25-7.20(3H, m), 4.18(4H, q, J=7.15Hz), 3.64(4H, s), 1.23(6H, t, J=7.15Hz)。MS(ESI-TOF)C₁₄H₁₈O₄S₂[M+H]⁺计算值:315.07, 实测:315.98。

[0186] 实施例23. 合成2,2'-(4-溴-1,3-亚苯基双(硫烷二基))二乙酸二乙酯(27)

[0187] 将化合物26(0.64g, 2.04mmol)和N-溴琥珀酰亚胺(0.47g, 2.66mmol)在CH₂Cl₂(10ml)中的混合物在室温搅拌4天。在蒸发至干之后,将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用石油醚:CH₂Cl₂(20:80)作为洗脱剂。产率:0.50g(63%)。¹H NMR(CDCl₃, δppm):7.45(1H, d, J=8.32Hz), 7.42(1H, d, J=2.18Hz), 7.09(1H, dd, J=8.32和2.18Hz), 4.20(2H, q, J=7.15Hz), 4.18(2H, q, J=7.15Hz), 3.70(2H, s), 3.63(2H, s), 1.27(3H, t, J=7.15Hz), 1.24(3H, t, J=7.15Hz)。MS(ESI-TOF)C₁₄H₁₇BrO₄S₂[M+H]⁺计算值:394.98和391.99, 实测:394.95和391.82。

[0188] 实施例24. 合成2,2'-(4-(三甲基甲硅烷基)乙炔基-1,3-亚苯基双(硫烷二基))二乙酸二乙酯(28)

[0189] 该化合物28由化合物27使用与实施例11中所述的合成类似的方法合成。通过使用微波加热,将混合物在100℃搅拌30分钟。在蒸发至干之后,将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用乙酸乙酯:石油醚(首先10:90,然后20:80)作为洗脱剂。产率:82%。¹H NMR(CDCl₃, δppm):7.36(1H, d, J=1.75Hz), 7.34(1H, d, J=8.08Hz), 7.12(1H, dd, J=8.08和1.75Hz), 4.19(2H, q, J=7.13Hz), 4.18(2H, q, J=7.13Hz), 3.73(2H, s), 3.67(2H, s), 1.26(3H, t, J=7.13Hz), 1.24(3H, t, J=7.13Hz), 0.27(9H, s)。MS(ESI-TOF)C₁₉H₂₆O₄S₂Si[M+H]⁺计算值:411.11, 实测:412.02。

[0190] 实施例25. 合成2,2'-(4-乙炔基-1,3-亚苯基双(硫烷二基))二乙酸二乙酯(29)

[0191] 该化合物29由化合物28使用与实施例12中所述的合成类似的方法合成。在用10%

柠檬酸和H₂O洗涤之后,将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用乙酸乙酯:石油醚(首先10:90,然后15:85,最后20:80)作为洗脱剂。产率:41%。¹H NMR(CDCl₃, δ ppm):7.40(1H, d, J=1.88Hz), 7.39(1H, d, J=8.08Hz), 7.15(1H, dd, J=8.08和1.88Hz), 4.19(2H, q, J=7.15Hz), 4.18(2H, q, J=7.15Hz); 3.73(2H, s), 3.68(2H, s), 3.47(1H, s), 1.25(6H, t, J=7.15Hz)。MS(ESI-TOF)C₁₆H₁₈O₄S₂[M+H]⁺计算值:339.07, 实测:339.83。

[0192] 实施例26. 合成2-((4-溴苯基)硫代)乙酸乙酯30

[0193] 将4-溴苯硫酚(0.95g, 5mmol)、无水K₂CO₃(1.38g, 10mmol)、溴乙酸乙酯(0.72ml, 6.5mmol)和无水MeCN(20ml)的混合物在室温下且在氩气下搅拌三天。将混合物过滤,将固体物质用MeCN洗涤并将滤液蒸发至干。将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用乙酸乙酯:石油醚作为洗脱剂(首先2:98,然后7:93)。产率:1.22g(88%)。¹H NMR(CDCl₃, δ ppm):7.42(2H, d, J=8.58Hz), 7.28(2H, d, J=8.58Hz), 4.17(2H, q, J=7.15Hz), 3.61(2H, s), 1.23(3H, t, J=7.15Hz)。MS(ESI-TOF)C₁₀H₁₁BrO₂S[M+H]⁺计算值:276.97和274.98, 实测:276.66和274.63。

[0194] 实施例27. 合成2-((4-((三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯基)硫代)乙酸乙酯31

[0195] 该化合物31由化合物30使用与实施例11中所述的合成类似的方法合成。通过使用微波加热将混合物在120℃搅拌40分钟。在蒸发至干之后,将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用乙酸乙酯:石油醚(10:90)作为洗脱剂。产率:88%。¹H NMR(CDCl₃, δ ppm):7.38(2H, d, J=8.38Hz), 7.30(2H, d, J=8.38Hz), 4.17(2H, q, J=7.15Hz), 3.64(2H, s), 1.23(3H, t, J=7.15Hz), 0.24(9H, s)。MS(ESI-TOF)C₁₅H₂₀O₂SSi[M+H]⁺计算值:294.11, 实测:294.11。

[0196] 实施例28. 合成2-((4-乙炔基苯基)硫代)乙酸乙酯32

[0197] 该化合物32由化合物31使用与实施例12中所述的合成类似的方法合成。在用10%柠檬酸和H₂O洗涤之后,将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用乙酸乙酯:石油醚(首先5:95,然后10:90)作为洗脱剂。产率:68%。¹H NMR(CDCl₃, δ ppm):7.41(2H, d, J=8.45Hz), 7.32(2H, d, J=8.45Hz), 4.18(2H, q, J=7.15Hz), 3.65(2H, s), 3.09(1H, s), 1.23(3H, t, J=7.15Hz)。MS(ESI-TOF)C₁₂H₁₂O₂S[M+H]⁺计算值:221.07, 实测:221.15。

[0198] 实施例29. 合成N-(4-乙炔基苯基)-2,2,2-三氟乙酰胺(33)

[0199] 将4-乙炔基苯胺(1.38g, 11.8mmol)分成小份加入到冰冷的(CF₃CO)₂O(6.6ml)中。在冰浴中搅拌10分钟之后,将混合物在室温搅拌2.5小时。将混合物倒入冰-H₂O(100ml)中,将产物过滤并用水洗涤。产物(2.29g, 91%)在未进一步纯化的情况下用于下一步骤。¹H NMR(CDCl₃): δ(ppm) 8.08(1H, s), 7.55(2H, d, J=8.80Hz), 7.51(2H, d, J=8.80Hz), 3.1(1H, s)。MS(ESI-TOF)C₁₀H₆F₃NO[M+H]⁺计算值:214.02, 实测213.07。

[0200] 实施例30. 合成N-(4-((2,6-双(羟甲基)吡啶-4-基)乙炔基)苯基)-2,2,2-三氟乙酰胺(34)

[0201] 将化合物33(0.55g, 2.58mmol)和6-溴-2,6-二羟甲基吡啶(0.47g, 2.15mmol; Acta Chem. Scand. 1988, Ser B, 42, 614)在无三乙胺(5ml)和四氢呋喃(10ml)中的混合物用氩气脱气。在加入双(三苯基膦)-氯化钯(II)(30mg, 43μmol)和CuI(16mg, 86μmol)之后,将混合物在55℃搅拌19小时。在蒸发至干之后,将残留物用CH₂Cl₂(40ml)和H₂O(20ml)的冷的混

合物处理,过滤,并将产物(0.56g,75%)用冷的H₂O(10ml)和CH₂Cl₂(10ml)洗涤。产率:0.56g(75%)。¹H NMR(D₆-DMSO, δ ppm):11.4(1H,bs),7.79(2H,d,J=8.80Hz),7.68(2H,d,J=8.80Hz),7.42(2H,s),5.49(2H,bs),4.56(4H,s)。MS(ESI-TOF)C₁₇H₁₃F₃N₂O₃[M+H]⁺计算值:351.10,实测351.96。

[0202] 实施例31.合成N-(4-((2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)乙炔基)苯基)-2,2,2-三氟乙酰胺(35)

[0203] 将PBr₃(225 μ l)加入化合物34(0.56g,1.6mmol)在CHCl₃(65ml)中的悬浮液中。在60℃下搅拌20小时之后,将混合物用5%NaHCO₃(35ml)中和。将水相用CHCl₃(40ml)萃取,并将合并的有机相用Na₂SO₄进行干燥,过滤并蒸发至干。产物(1.09g,93%)在未进一步纯化的情况下用于下一步骤。¹H NMR(CDCl₃, δ ppm):7.93(1H,s),7.63(2H,d,J=8.68Hz),7.59(2H,J=8.68Hz),7.47(2H,s),4.53(4H,s)。MS(ESI-TOF)C₁₇H₁₁Br₂F₃N₂O[M+H]⁺计算值:474.93、476.93、498.92,实测475.38、477.44、479.45。

[0204] 实施例32.合成6,6'-((((4-((4-三氟乙酰胺基苯基)乙炔基)吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((2-乙氧基-2-氧代乙基)氮烷二基))双(亚甲基))双(4-溴吡啶甲酸)二乙酯(36)

[0205] 该化合物36由化合物34和5使用与实施例4中所述的合成类似的方法合成。在70℃的反应时间是27小时。将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用三乙胺:乙酸乙酯:石油醚(1:69:30)作为洗脱剂。产率:66%。¹H NMR(CDCl₃, δ ppm):8.53(1H,s),8.14(2H,d,J=1.80Hz),8.11(2H,d,J=1.80Hz),7.68(2H,d,J=8.73Hz),7.60(2H,d,J=8.73Hz),7.34(2H,s),4.44(4H,q,J=7.08Hz),4.18(4H,q,J=7.15Hz);4.10(4H,s),3.98(4H,s),3.50(4H,s),1.40(6H,t,J=7.08Hz),1.28(6H,t,J=7.15Hz)。MS(ESI-TOF)计算值:C₄₃H₄₃Br₂F₃N₆O₉[M+H]⁺计算值:1003.15、1005.15、1007.15,实测1003.71、1005.48、1007.58。

[0206] 实施例33.合成化合物37

[0207] 将化合物36(120g,0.148mmol)和25(145mg,0.355mmol)在无水三乙胺(1ml)和四氢呋喃(2ml)中的混合物用氩气脱气。在加入双(三苯基膦)氯化钯(II)(10mg,14 μ mol)和CuI(6mg,28 μ mol)之后,将混合物在55℃搅拌22小时。在蒸发至干之后,将残留物溶解于CH₂Cl₂(40ml)中,用H₂O(3 $\times$ 10ml)洗涤,并用Na₂SO₄进行干燥。将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用三乙胺:乙酸乙酯:石油醚(1:69:30)作为洗脱剂。产率:115mg(47%)。¹H NMR(CDCl₃, δ ppm):9.12(1H,s),8.09(2H,d,J=1.25Hz),8.06(2H,d,J=1.25Hz),7.57(2H,s),7.34(2H,d,J=8.80Hz),7.30(2H,d,J=8.80Hz),5.97(4H,s),4.63(8H,s),4.60(4H,s),4.45(4H,q,J=7.12Hz),4.30(4H,q,J=7.12Hz),4.21(8H,q,J=7.12Hz),4.17(4H,q,J=7.12),4.10(4H,s),4.02(4H,s),3.52(4H,s),1.42(6H,t,J=7.12Hz),1.33(6H,t,J=7.12Hz),1.29(6H,J=7.12Hz),1.25(12H,t,J=7.12Hz)。MS(ESI-TOF)C₈₃H₈₉F₃N₆O₂₇[M+H]⁺计算值:1659.58,实测1659.81。

[0208] 实施例34.合成化合物38

[0209] 该化合物38由化合物36和29使用与实施例33中所述的合成类似的方法合成。将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用三乙胺:乙酸乙酯:石油醚(1:69:30)作为洗脱剂。产率:85%。¹H NMR(CDCl₃, δ ppm):9.22(1H,s),8.07(2H,d,J=1.15Hz),

8.02(2H,d,J=1.15Hz),7.55(2H,s),7.41(2H,d,J=8.75Hz),7.38(2H,d,J=8.10Hz),7.31(2H,d,J=8.75Hz),7.30(2H,d,J=1.67Hz),7.01(2H,dd,J=8.10和1.67Hz),4.46(4H,q,J=7.15Hz),4.22(4H,q,J=7.15Hz),4.19(4H,q,J=7.15Hz),4.17(4H,q,J=7.15Hz),4.10(4H,s),3.89(4H,s),3.74(4H,s),3.70(4H,s),3.50(4H,s),1.42(6H,t,J=7.15Hz),1.28(12H,t,J=7.15Hz),1.24(6H,t,J=7.15Hz)。MS(ESI-TOF) $C_{75}H_{77}F_3N_6O_{17}S_4[M+H]^+$ 计算值:1519.42,实测1519.56。

[0210] 实施例35.合成化合物39

[0211] 该化合物39由化合物36和32使用与实施例33中所述的合成类似的方法合成。将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用三乙胺:乙酸乙酯:石油醚(1:69:30)作为洗脱剂。产率:81%。 1H NMR($CDCl_3$, δ ppm):9.29(1H,s),8.03(2H,d,J=1.28Hz),8.01(2H,d,J=1.28Hz),7.57(2H,s),7.44(4H,d,J=8.48Hz),7.42(2H,d,J=8.70Hz),7.32(2H,d,J=8.70Hz),7.25(4H,d,J=8.48Hz),4.46(4H,q,J=7.15Hz),4.21(4H,q,J=7.15Hz),4.18(4H,q,J=7.15Hz),4.08(4H,s),3.95(4H,s),3.73(4H,s),3.49(4H,s),1.42(6H,t,J=7.15Hz),1.28(6H,t,J=7.15Hz),1.27(6H,t,J=7.15Hz)。

[0212] 实施例36.合成铈(III)螯合物40

[0213] 将化合物37(105mg,63 μ mol)和0.5M KOH在乙醇(9ml)中的混合物在室温搅拌30分钟,并加入水(2ml)。在室温下搅拌3小时之后,蒸发掉EtOH,将残留物在室温搅拌30分钟,并用6M HCl将pH调节至约6.5。在10分钟内加入在H₂O(0.17ml)中的氯化铈(III)(23mg,63 μ mol),并用固体NaHCO₃将pH保持在5-7。在室温下搅拌过夜之后,用1M NaOH使pH升至8.5,将沉淀物离心除去,并将上清液用苯酚萃取(用0.75g萃取一次,然后用0.5g萃取三次)。将合并的苯酚相用H₂O(1ml)和Et₂O(20ml)处理,将水相用Et₂O洗涤(2 $\times$ 20ml)并用丙酮研磨(triturate)。将沉淀物离心并用丙酮洗涤。产物在未进一步纯化的情况下用于下一步骤。HPLC运行的条件:参见实施例16。 R_f (HPLC)=14.5分钟。UV/VIS=359nm。

[0214] 实施例37.合成铈(III)螯合物41

[0215] 该化合物41由化合物38使用与实施例36中所述的合成类似的方法合成。 R_f (HPLC)=17.3分钟。UV/VIS=318、325和350(sh)nm。

[0216] 实施例38.合成铈(III)螯合物42

[0217] 该化合物42由化合物39使用与实施例36中所述的合成类似的方法合成。 R_f (HPLC)=21.5分钟。UV/VIS=349nm。

[0218] 实施例39.合成铈(III)标记螯合物43

[0219] 该化合物43由螯合物40使用与实施例15中所述的合成类似的方法合成。HPLC运行的条件:参见实施例16。 R_f (HPLC)=20.9分钟。UV/VIS=325(sh)、340和362(sh)nm。

[0220] 实施例40.合成铈(III)标记螯合物44

[0221] 该化合物44由螯合物41使用与实施例15中所述的合成类似的方法合成。HPLC运行的条件:参见实施例16。 R_f (HPLC)=23.3分钟。UV/VIS=305(sh)、318和335(sh)nm。

[0222] 实施例41.合成铈(III)标记螯合物45

[0223] 该化合物45由螯合物42使用与实施例15中所述的合成类似的方法合成。HPLC运行的条件:参见实施例16。 R_f (HPLC)=27.9分钟。UV/VIS=339nm。

[0224] 实施例42.合成铈(III)螯合物46

[0225] 该化合物46由螯合物43使用与实施例16中所述的合成类似的方法合成。 R_f (HPLC)=14.3分钟。UV/VIS=349nm。

[0226] 实施例43.合成铈(III)螯合物47

[0227] 该化合物47由螯合物44使用与实施例16中所述的合成类似的方法合成。 R_f (HPLC)=17.2分钟。UV/VIS=317和324(sh)nm。

[0228] 实施例44.合成铈(III)螯合物48

[0229] 该化合物48由螯合物45使用与实施例16中所述的合成类似的方法合成。 R_f (HPLC)=20.5分钟。UV/VIS=336nm。

[0230] 实施例45.合成2-((4-(呋喃-2-基)-6-(羧基乙基)-吡啶-2-基)亚甲基次氨基)-乙酸乙酯49

[0231] 该化合物49使用与实施例3中所述的合成类似的方法由4-(呋喃-2-基)-6-溴甲基-2-羧基乙基吡啶(W02005/021538)合成。将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用甲醇:CH₂Cl₂(5:95)作为洗脱剂。¹H NMR(CDCl₃, δ ppm): 8.21(1H, d, J=1.43Hz), 7.83(1H, d, J=1.43Hz), 7.58(1H, d, J=1.63Hz), 6.99(1H, d, J=3.20Hz), 6.55(1H, dd, J=1.63和3.20Hz), 4.49(2H, q, J=7.12Hz), 4.21(2H, q, J=7.15Hz), 4.08(2H, s), 3.50(2H, s), 2.37(1H, s), 1.45(3H, t, J=7.12Hz), 1.28(3H, t, J=7.15Hz)。MS(ESI-TOF) C₁₇H₂₀N₄O₅[M+H]⁺计算值:333.15, 实测334.09。

[0232] 实施例46.合成2-((4-(噻吩-2-基)-6-(羧基乙基)-吡啶-2-基)亚甲基次氨基)乙酸乙酯50

[0233] 该化合物50采用与实施例3中所述的合成类似的方法由4-(噻吩-2-基)-6-溴甲基-2-羧基乙基吡啶(W02005/021538)合成。将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用甲醇:CH₂Cl₂(5:95)作为洗脱剂。¹H NMR(CDCl₃, δ ppm): 8.19(1H, d, J=1.70Hz), 7.79(1H, d, J=1.70Hz), 7.61(1H, dd, J=1.05和3.70Hz), 7.45(1H, dd, J=1.05和5.05Hz), 7.15(1H, dd, J=3.70和5.05Hz), 4.50(2H, q, J=7.12Hz), 4.20(2H, q, J=7.15Hz), 4.09(2H, s), 3.51(2H, s), 2.45(1H, s), 1.45(3H, t, J=7.12Hz), 1.28(3H, t, J=7.15Hz)。MS(ESI-TOF) C₁₇H₂₀N₂O₄S[M+H]⁺计算值:349.11, 实测349.99。

[0234] 实施例47.合成6,6'-((((4-溴吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((2-乙氧基-2-氧代乙基)氮烷二基))双(亚甲基))双(4-(呋喃-2-基)吡啶甲酸)二乙酯51

[0235] 将化合物49(0.16g, 0.48mmol)、2,6-二溴甲基-4-溴吡啶(83mg, 0.24mmol; Acta Chem. Scand. 1988, Ser. B, 42, 614)、无水K₂CO₃(0.13g, 0.96mmol)和无水MeCN(8ml)的混合物在55℃搅拌4.5小时。将反应混合物过滤,将固体物质用MeCN洗涤并将滤液蒸发至干。将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用三乙胺:乙酸乙酯:石油醚(1:69:30)作为洗脱剂。产率:0.19g(95%)¹H NMR(CDCl₃, δ ppm): 8.18(2H, d, J=1.38Hz), 8.05(2H, J=1.38Hz), 7.70(2H, s), 7.58(2H, d, J=1.68Hz), 6.98(2H, d, J=3.42Hz), 6.54(2H, dd, J=1.68和3.42Hz), 4.48(4H, q, J=7.11Hz), 4.17(4H, J=7.12Hz), 4.10(4H, s), 3.96(4H, s), 3.50(4H, s), 1.44(6H, t, J=7.11Hz), 1.27(6H, t, J=7.12Hz)。MS(ESI-TOF) C₄₁H₄₄BrN₅O₁₀[M+H]⁺计算值:846.24和848.24, 实测846.79和848.80。

[0236] 实施例48.合成6,6'-((((4-溴吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((2-乙氧基-2-氧代乙基)氮烷二基))双(亚甲基))双(4-(噻吩-2-基)吡啶甲酸)二乙酯52

[0237] 该化合物52由化合物50使用与实施例47中所述的合成类似的方法合成。将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用乙醇:CH₂Cl₂(梯度从2:98至15:85)作为洗脱剂。产率:50%。¹H NMR(CDCl₃, δppm):8.15(2H, s), 8.02(2H, s), 7.71(2H, s), 7.70(2H, d, J=3.1Hz), 7.42(2H, J=4.8Hz), 7.14(2H, dd, J=3.1和4.8Hz), 4.49(4H, q, J=7.18Hz), 4.18(4H, q, J=7.07Hz), 3.96(4H, s), 3.96(4H, s), 3.50(4H, s), 1.43(6H, t, J=7.18Hz), 1.27(6H, t, J=7.07Hz)。MS(ESI-TOF)C₄₁H₄₄BrN₅O₁₀S₂[M+H]⁺计算值:878.19和880.19,实测878.77和880.74。

[0238] 实施例49.合成6,6'-((((4-((4-氨基苯基)乙炔基)吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((2-乙氧基-2-氧代乙基)氮烷二基))双(亚甲基))双(4-(呋喃-2-基)吡啶甲酸)二乙酯53

[0239] 将化合物51(0.18g, 0.21mmol)和4-乙炔基苯胺(30mg, 0.26mmol)在无水三乙胺(1ml)和四氢呋喃(2ml)中的混合物用氩气脱气。在加入双(三苯基膦)氯化钯(II)(10mg, 14 μmol)和CuI(6mg, 28 μmol)之后,将混合物在55℃搅拌20小时。在蒸发至干之后,将产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用三乙胺:乙酸乙酯:石油醚(首先1:69:30,然后1:79:20)作为洗脱剂。产率:0.14g(74%)。¹H NMR(CDCl₃, δppm):8.18(2H, d, J=1.20Hz), 8.12(2H, d, J=1.20Hz), 7.74(2H, s), 7.52(2H, d, J=1.5Hz), 7.32(2H, d, J=8.48Hz), 6.99(2H, d, J=3.32Hz), 6.65(2H, d, J=8.48Hz), 6.45(2H, dd, J=1.5和3.32Hz), 4.47(4H, q, J=7.12Hz), 4.17(4H, q, J=7.12Hz), 4.11(4H, s), 3.98(4H, s), 3.52(4H, s), 1.43(6H, t, J=7.12Hz), 1.26(6H, t, J=7.12Hz)。MS(ESI-TOF)C₄₉H₅₀N₆O₁₀[M+H]⁺计算值:883.34,实测883.90。

[0240] 实施例50.合成6,6'-((((4-((4-氨基苯基)乙炔基)吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((2-乙氧基-2-氧代乙基)氮烷二基))双(亚甲基))双(4-(噻吩-2-基)吡啶甲酸)二乙酯54

[0241] 该化合物54由化合物52使用与实施例49中所述的合成类似的方法合成。产率:50%。¹H NMR(CDCl₃, δppm):8.14(2H, s), 8.11(2H, s), 7.61(2H, d, J=3.40Hz), 7.58(2H, s), 7.30-7.33(4H, m), 7.03-7.07(2H, m), 8.35(2H, d, J=8.35Hz), 4.47(4H, q, J=7.09Hz), 4.18(4H, q, J=7.10Hz), 4.13(4H, s), 3.98(4H, s), 3.52(4H, s), 1.41(6H, t, J=7.09Hz), 1.26(6H, t, J=7.10Hz)。MS(ESI-TOF)C₄₉H₅₀N₆O₈S₂[M+H]⁺计算值:915.32,实测915.05。

[0242] 实施例51.合成铕(III)螯合物55

[0243] 将化合物53(0.13g, 0.143mmol)和0.5M KOH在乙醇(9ml)中的混合物在室温搅拌30分钟,并加入水(1ml)。在室温下搅拌3小时之后,蒸发掉EtOH。在加入H₂O(3ml)之后,将混合物在室温下搅拌3小时,并用6M HCl将pH调节至约6.5。在10分钟内加入在H₂O(0.39ml)中的氯化铕(III)(52mg, 0.143mmol),并用固体NaHCO₃将pH保持在5-7。在室温下搅拌过夜之后,用1M NaOH将pH升高至8.5。将溶液用四氢呋喃研磨,将沉淀物离心并用四氢呋喃洗涤。产物在未进一步纯化的情况下用于下一步骤。HPLC运行的条件:参见实施例16。R_f(HPLC)=24.9分钟。UV/VIS=323和355(sh)nm。MS(ESI-TOF)C₄₁H₃₀EuN₆NaO₁₀[M+2H]⁺计算值:944.13,实测:945.73。

[0244] 实施例52.合成铕(III)螯合物56

[0245] 该化合物56由化合物54使用与实施例51中所述的合成类似的方法合成。HPLC运行

的条件:参见实施例16。 R_f (HPLC)=26.3分钟。UV/VIS=325和356(sh)nm。MS(ESI-TOF) $C_{41}H_{30}EuN_6NaO_8S_2[M+2H]^+$ 计算值:976.09,实测976.88。

[0246] 实施例53.合成铈(III)标记螯合物57

[0247] 该化合物57由螯合物55使用与实施例15中所述的合成类似的方法合成。HPLC运行的条件:参见实施例16。 R_f (HPLC)=33.4。UV/VIS=325nm。MS(ESI-TOF) $C_{42}H_{28}EuN_6NaO_{10}S[M+H]^+$ 计算值:985.08,实测984.77。

[0248] 实施例54.合成铈(III)标记螯合物58

[0249] 该化合物58由螯合物56使用与实施例15中所述的合成类似的方法合成。HPLC运行的条件:参见实施例16。 R_f (HPLC)=34.7。UV/VIS=325nm。MS(ESI-TOF) $C_{42}H_{28}EuN_6NaO_8S_3[M+H]^+$ 计算值:1017.04,实测1017.21。

[0250] 实施例55.合成铈(III)螯合物59

[0251] 该化合物59由螯合物57使用与实施例16中所述的合成类似的方法合成。HPLC运行的条件:参见实施例16。 R_f (HPLC)=23.2。UV/VIS=321nm。

[0252] 实施例56.合成铈(III)螯合物60

[0253] 该化合物60由螯合物58使用与实施例16中所述的合成类似的方法合成。HPLC运行的条件:参见实施例16。 R_f (HPLC)=24.9。UV/VIS=322nm。

[0254] 实施例57.合成2,2'-((4-溴-1,3-亚苯基)双(氧基))二乙酸二乙酯(61)

[0255] 将4-溴间苯二酚(1.00g, 5.29mmol)溶解于DMF(20ml, 无水)中。加入无水 K_2CO_3 (4.39g, 31.74mmol)和溴乙酸乙酯(2.30ml, 15.87mmol)。将混合物在40℃下且在氩气气氛下搅拌过夜。加入水(30ml),并将混合物用乙酸乙酯(1×20ml, 2×10ml)萃取。将合并的有机萃取液用水(2×10ml)洗涤,通过 Na_2SO_4 进行干燥,并浓缩。将粗制产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用二氯甲烷作为洗脱剂。产物为白色固体。产率:1.70g(89%) 1H NMR($CDCl_3$, δ ppm):7.43(1H, d, $J=8.7$ Hz), 6.48(1H, d, $J=2.7$ Hz), 6.40(1H, dd, $J=8.7$ Hz, $J=2.7$ Hz), 4.66(2H, s), 4.57(2H, s), 4.27(4H, m), 1.30(6H, m)。

[0256] 实施例58.合成2,2'-((4-((三甲基甲硅烷基)乙炔基)-1,3-亚苯基)双(氧基))二乙酸二乙酯(62)

[0257] 将化合物61(1.56g, 4.33mmol)溶解于DMF(3ml, 无水)中,并将溶液置于微波反应瓶中。加入二乙胺(9ml, 无水)、 $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ (152.0mg, 0.217mmol)、 CuI (41.2mg, 0.217mmol)和 PPh_3 (113.6mg, 0.433mmol),并将该瓶在氩气气氛中密封。通过隔片加入三甲基甲硅烷基乙炔(925 μ l, 6.50mmol),并使用微波加热将混合物在100℃搅拌30分钟。使用二氯甲烷作为洗脱剂将反应混合物过滤通过硅胶,并将滤液蒸发至干。将粗制产物溶解于二氯甲烷中并通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用乙酸乙酯:石油醚(10:90)作为洗脱剂。产率:0.99g(61%) 1H NMR($CDCl_3$, δ ppm):7.36(1H, dd, $J=1.35$ Hz, $J=7.55$ Hz), 6.43(2H, m), 4.67(2H, s), 4.58(2H, s), 4.27(4H, m), 1.30(6H, m), 0.25(9H, s)。

[0258] 实施例59.合成2,2'-((4-乙炔基-1,3-亚苯基)双(氧基))二乙酸二乙酯(63)

[0259] 将化合物62(398.9mg, 1.054mmol)溶解于二氯甲烷(10ml, 无水)中。加入氟化四丁基铵(330.7mg, 1.265mmol),并将混合物在氩气气氛中在室温搅拌1小时30分钟。将混合物用10%柠檬酸溶液(5ml)和水(4×10ml)洗涤。将有机相通过 Na_2SO_4 进行干燥,并蒸发至干。将粗制产物通过柱色谱法纯化,其中使用硅胶作为固定相,并使用乙酸乙酯:石油醚(15:

85)作为洗脱剂。产率259.2mg(80%)。¹H NMR(CDCl₃, δppm):7.40(1H, d, J=8.35Hz), 6.45(1H, d, J=2.4Hz), 6.43(1H, dd, J=5.25Hz, J=2.4Hz), 4.70(2H, s), 4.59(2H, s), 4.27(4H, m), 3.24(1H, s), 1.29(6H, m)。

[0260] 实施例60.合成N-(4-溴-3-甲氧基苯基)-2,2,2-三氟乙酰胺(64)

[0261] 将4-溴-3-甲氧基苯胺(2.00g, 9.90mmol)溶解于THF(15ml)中。将该溶液加入冰冷的三氟乙酸酐(15ml, 107.8mmol)中,并将混合物在冰浴上搅拌20分钟。将混合物倒入冰水中,并继续搅拌10分钟。将混合物用二氯甲烷(2×20ml)萃取。将合并的有机层用5%NaHCO₃(5×40ml)和水(30ml)洗涤。将经洗涤的有机层用Na₂SO₄进行干燥,过滤,并蒸发至干。产物(3.08, >99%)在未进一步纯化的情况下使用。

[0262] 实施例61.合成N-(4-溴-3-羟基苯基)-2,2,2-三氟乙酰胺(65)

[0263] 化合物65由化合物64(3.08g, 10mmol)使用与实施例9中的合成类似的方法合成。产率0.51g(17%)。¹H NMR(DMSO, δppm):11.24(1H, s), 10.51(1H, s), 7.48(2H, m), 7.05(1H, dd, J=2.5和8.7Hz)。

[0264] 实施例62.合成2-(2-溴-5-(2,2,2-三氟乙酰胺基)苯氧基)乙酸乙酯(66)

[0265] 化合物66由化合物65(0.51g, 1.78mmol)使用与实施例10中的合成类似的方法合成。使用CH₃CN作为溶剂。在40℃的反应时间是18小时。产率0.47g(71%)。¹H NMR(CDCl₃, δppm):7.96(1H, s), 7.52(1H, d, J=8.5Hz), 7.38(1H, d, J=2.3Hz), 6.91(1H, dd, J=2.35和8.55Hz), 4.72(2H, s), 4.28(2H, q, J=7.15Hz), 1.32(3H, t, J=7.15Hz)。

[0266] 实施例63.合成2-(5-(2,2,2-三氟乙酰胺基)-2-((三甲基甲硅烷基)乙炔基)苯氧基)乙酸乙酯(67)

[0267] 化合物67由化合物66(0.46g, 1.24mmol)使用与实施例11中的合成类似的方法合成。在100℃下在微波中的反应时间是30分钟。产率0.37g(77%)。¹H NMR(CDCl₃, δppm):7.92(1H, s), 7.43(1H, d, J=8.3Hz), 7.34(1H, d, J=1.9Hz), 6.98(1H, dd, J=1.9和8.3Hz), 4.72(2H, s), 4.29(2H, q, J=7.15Hz), 1.31(3H, t, J=7.15Hz), 0.26(9H, s)。

[0268] 实施例64.合成2-(2-乙炔基-5-(2,2,2-三氟乙酰胺基)苯氧基)乙酸乙酯(68)

[0269] 化合物68由化合物67(0.37g, 0.96mmol)使用与实施例12中的合成类似的方法合成。产率0.30g(99%)。

[0270] 实施例65.合成2-(2-((2,6-双(羟甲基)吡啶-4-基)乙炔基)-5-(2,2,2-三氟乙酰胺基)苯氧基)乙酸乙酯(69)

[0271] 化合物69由化合物68(0.37g, 0.96mmol)使用与实施例30中的合成类似的方法合成。产率0.19g(44%)。

[0272] 实施例66.合成2-(2-((2,6-双(溴甲基)吡啶-4-基)乙炔基)-5-(2,2,2-三氟乙酰胺基)苯氧基)乙酸乙酯(70)

[0273] 化合物70由化合物69(0.19g, 0.42mmol)使用与实施例31中的合成类似的方法合成。产率0.22g(90%)。¹H NMR(CDCl₃, δppm):7.94(1H, s), 7.51(1H, d, J=8.3Hz), 7.49(2H, s), 7.44(1H, d, J=1.85Hz), 7.02(1H, dd, J=1.9和8.3Hz), 4.78(2H, s), 4.53(4H, s), 4.31(2H, q, J=7.15Hz), 1.33(3H, t, J=7.15Hz)。

[0274] 实施例67.合成6,6'-((((4-((2-(2-乙氧基-2-氧代乙氧基)-4-(2,2,2-三氟乙酰胺基)苯基)乙炔基)吡啶-2,6-二基)双(亚甲基))双((2-乙氧基-2-氧代乙基)氮烷二基))

双(亚甲基))双(4-溴吡啶甲酸)二乙酯(71)

[0275] 化合物71由化合物70(0.19g, 0.42mmol)和化合物5(0.25g, 0.73mmol)使用与实施例4中的合成类似的方法合成。在55℃的反应时间是20小时。产率0.23g(57%)。MS(MALDI) $C_{47}H_{49}Br_2F_3N_6O_{12}[M+H]^+$ 计算值: 1107.18, 实测1107.62。

[0276] 实施例68. 合成化合物72

[0277] 化合物72由化合物71(0.11g, 0.10mmol)和化合物63(75mg, 0.25mmol)使用与实施例33中的合成类似的方法合成。产率140mg(87%)。

[0278] 实施例69. 合成铈(III)螯合物73

[0279] 化合物73由化合物72(0.14g, 0.09mmol)使用与实施例36中的合成类似的方法合成。产物在未进一步纯化的情况下用于下一步骤。HPLC运行的条件: 参见实施例16。R_f(HPLC)=14.5分钟。UV/VIS=350nm。

[0280] 实施例70. 合成铈(III)标记螯合物74

[0281] 化合物74由化合物73(0.1g, 0.07mmol)使用与实施例15中所述的合成类似的方法合成。HPLC运行的条件: 参见实施例16。R_f(HPLC)=18.7分钟。UV/VIS=340nm。

[0282] 实施例71. 合成铈(III)螯合物75

[0283] 化合物75由化合物74使用与实施例16中所述的合成类似的方法合成。HPLC运行的条件: 参见实施例16。R_f(HPLC)=14.5分钟。UV/VIS=351nm。

[0284] 实施例72. 与牛磺酸缀合的新型螯合物(螯合物19、46、47、48、59和75)的光物理性质

[0285] 将所制备的异硫氰酸酯活化的螯合物(19、43、44、45、57和75)如以上在实施例16中所描述的那样与牛磺酸缀合。产物用半制备型反相HPLC(RP-18柱)纯化。在使产物级分蒸发之后, 将残留物溶解于50mM TRIS缓冲液中。

[0286] 所测量的新型螯合物(19、46、48和59)在50mM TRIS缓冲液(pH 7.75)中的光物理性质: 激发波长(λ_{exc})、发光衰减时间(τ)、摩尔吸光系数(ϵ)、估算的发光产额($\epsilon\Phi$) 在表3中。

[0287] 表3

[0288]	化合物	$\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$	估算的 $\epsilon\Phi$	τ/ms	λ_{exc}/nm
	19	83000	14100	0.93	323
[0289]	46	64000	16400	0.70	343
	48	69000	13800	0.77	340
	59	139000	12600	0.94	320
	75	82000	16400	0.79	347

[0290] 螯合物46、48和75的激发最大值示于图1中, 螯合物19、47、59和60的激发最大值示于图2中, 以显示宽的激发区域, 这提供了如下可能性: 使用基于便宜的LED的激发可能性。

[0291] 实施例73. 用螯合物19、43、45和74标记抗体

[0292] 如实施例17中所描述的那样制备TnI标记的抗体。

[0293] 表4中给出了所测量的用螯合物19、43、45和74标记的cTnI在50mMTRIS缓冲液(pH 7.75)中的光物理性质:激发波长(λ_{exc})、发光衰减时间(τ)、摩尔吸光系数(ϵ)、发光产额($\epsilon \Phi$)。

[0294] 干燥测量(19(干燥)、43(干燥)、45(干燥)和74(干燥))表示基于在如实施例18中所描述的那样进行干燥免疫测定之后的信号测量结果的估算的发光产额。

[0295] 表4

[0296]

化合物	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	估算的 $\epsilon \Phi$	τ/ms	$\lambda_{\text{exc}}/\text{nm}$
19	70000	9100	0.90	323
19(干燥)		10200		
43	78000	11400	0.69	344
43(干燥)		20700		
45	88000	6800	0.66	343
45(干燥)		9000		
74	110000	11600	0.71	350
74(干燥)		13700		

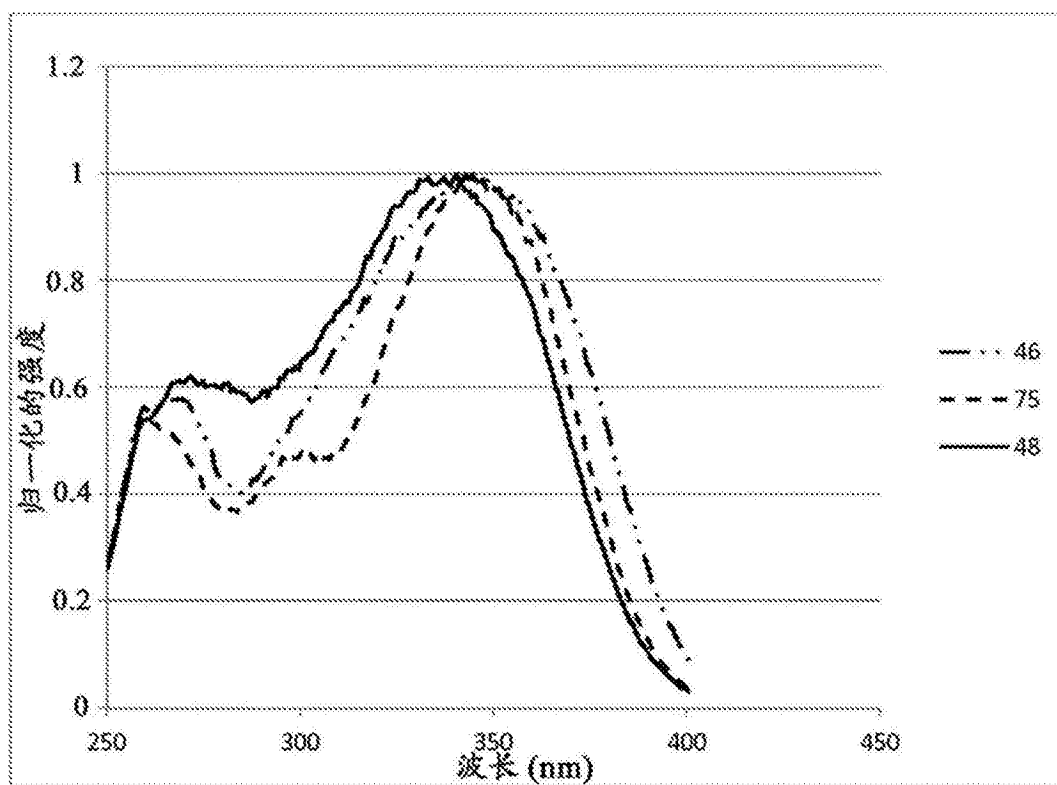


图1

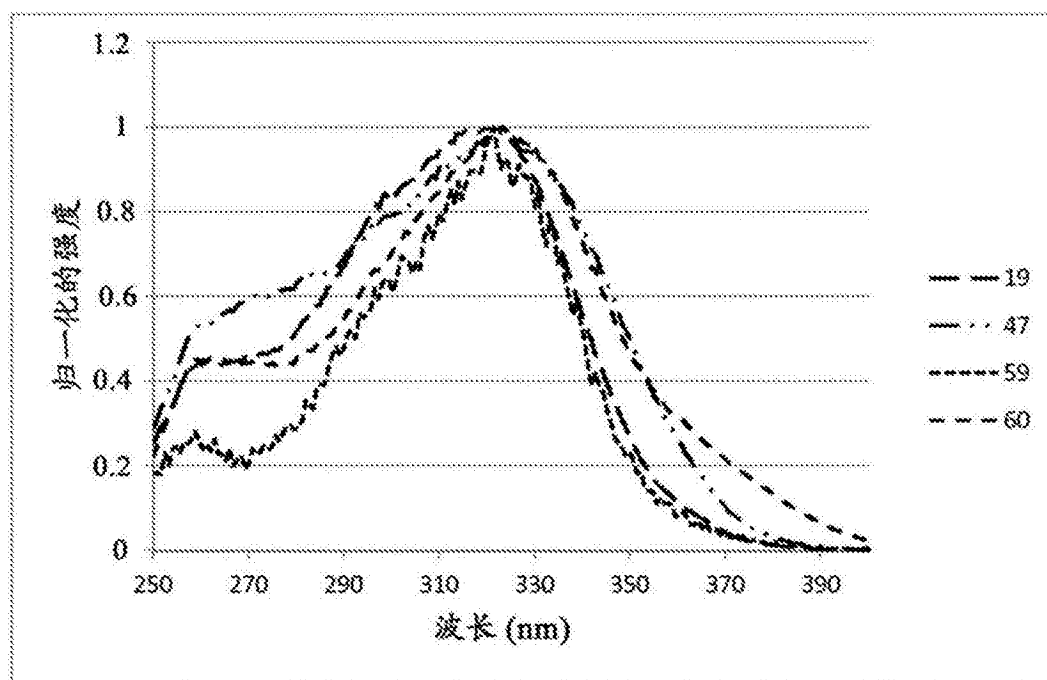


图2