(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113801296 B
(45)授权公告日 2024.08.23

(21)申请号 202110960650.0
(22)申请日 2017.04.14
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113801296 A
(43)申请公布日 2021.12.17
(30)优先权数据
62/323,444 2016.04.15 US
(62)分案原申请数据
201780031306.5 2017.04.14
(73)专利权人 拜克门寇尔特公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 阿伦库马尔·伊斯瓦兰
谢尔盖·古尔尼克
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 高世豪 李婉
(51)Int.Cl.
C08G 61/02(2006.01)
C09K 11/06(2006.01)
G01N 33/58(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
(56)对比文件
CN 109415623 B,2022.07.08
审查员 井磊

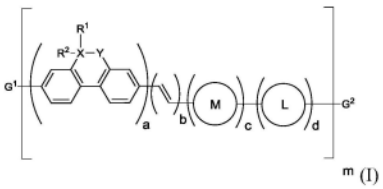
权利要求书6页 说明书37页 附图4页

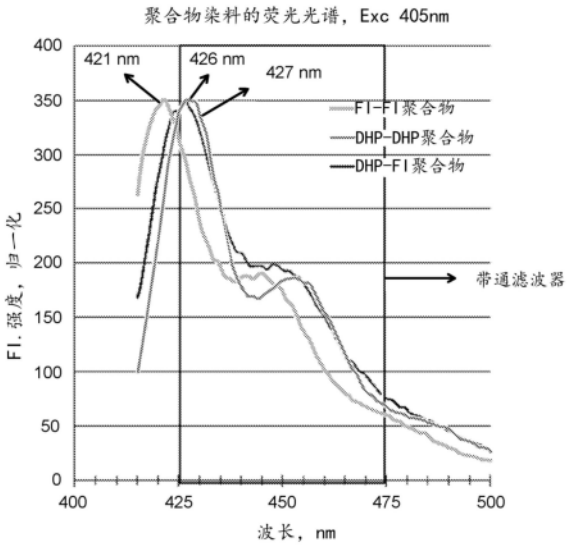
(54)发明名称

光敏大分子及其用途

(57)摘要

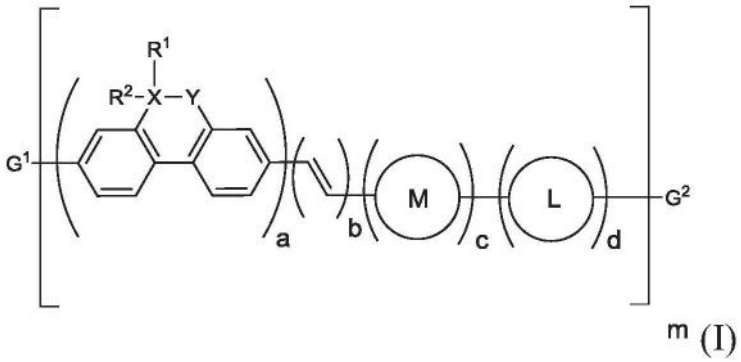
本发明涉及光敏大分子及其用途。根据本发明的一个技术方案提供具有式I的结构的水溶性荧光聚合物和用于检测样品中的分析物的方法，所述方法包括:提供怀疑含有分析物的样品;使样品与缀合至水溶性荧光聚合物的接合剂接触，其中接合剂能够与分析物或目标相关联的生物分子相互作用。





CN 113801296 B

1.一种水溶性荧光聚合物,所述水溶性荧光聚合物具有式I的结构:



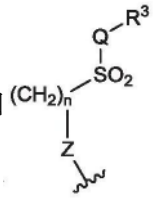
(I)

其中;

每个X为C;

每个Y为CR^1R^2;

每个R^1独立地选自亚磺酰胺基低聚醚、和



;

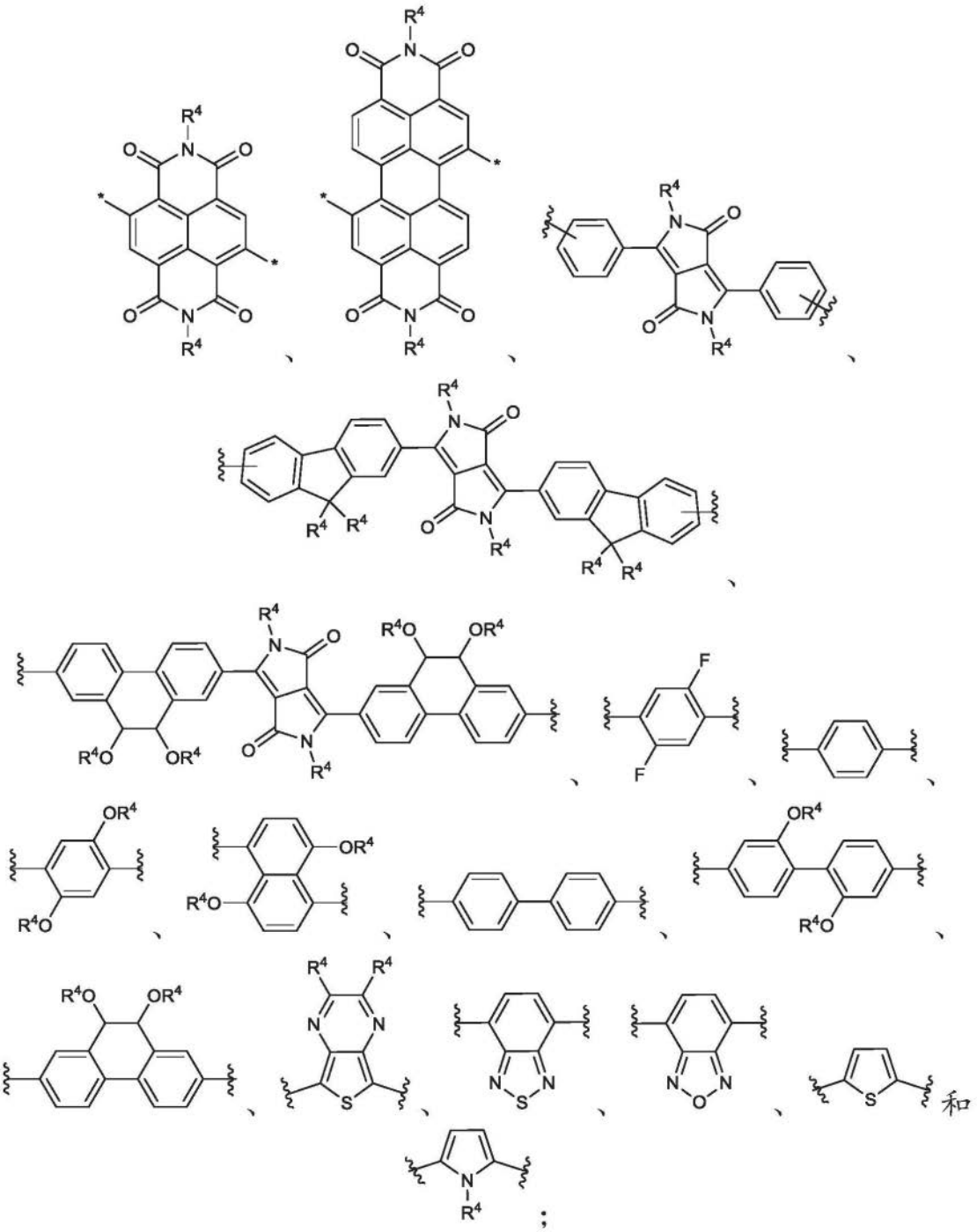
每个R^2独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、杂芳氧基、芳氧基、芳基、杂芳氨基、芳氨基、和PEG基团;

每个R^3独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、杂芳氧基、芳氧基、芳基、杂芳氨基、芳氨基、和PEG基团;

每个Z独立地选自C、O和N;

每个Q独立地选自NH、NR^4和CH_2;

每个M独立地为富电子连接基单元,所述富电子连接基单元能够改变聚合物带隙并且沿聚合物主链均匀或无规分布,并且各自独立地选自:



其中，

每个R^4为非离子侧基，所述非离子侧基能够赋予超过10mg/mL的水中溶解度，并且各自独立地选自卤素、羟基、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}杂芳氧基、C_2-C_{18}杂芳氨基、$(CH_2)_x$，$(OCH_2$-$CH_2)_y$′OCH_3、和C_2-C_{18}杂芳基基团，其中每个x’独立地为0至20的整数；每个y’独立地为0至50的整数；

每个任选的连接基L为沿所述聚合物主链均匀或无规分布并被一个或多个用选自胺、氨基甲酸酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及用于与另一种基质、受体染料、分子或接合剂缀合的其受保护基团的官能团封端的侧链取代的芳基或杂芳基基团；

G^1和G^2各自独立地选自氢、卤素、炔烃、任选地取代的芳基、任选地取代的杂芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸酯、磷酸酯、硼酸酯、硼酸、任选地取代的二氢菲、任选地取代的芴；

a、c和d定义所述结构内每个单元的mol%，其每个均匀或随机重复，并且其中a为10%至100%的mol%，c为0%至90%的mol%，并且每个d为0%至25%的mol%；

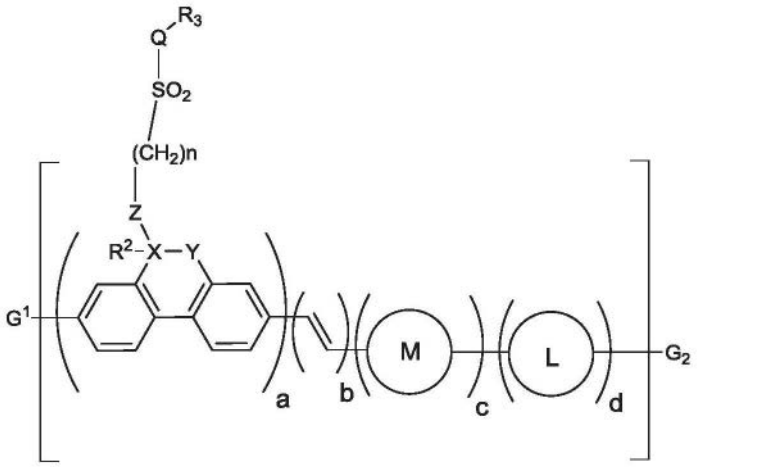
每个b独立地为0或1；

m为1至10,000的整数；并且

每个n独立地为1至20的整数。

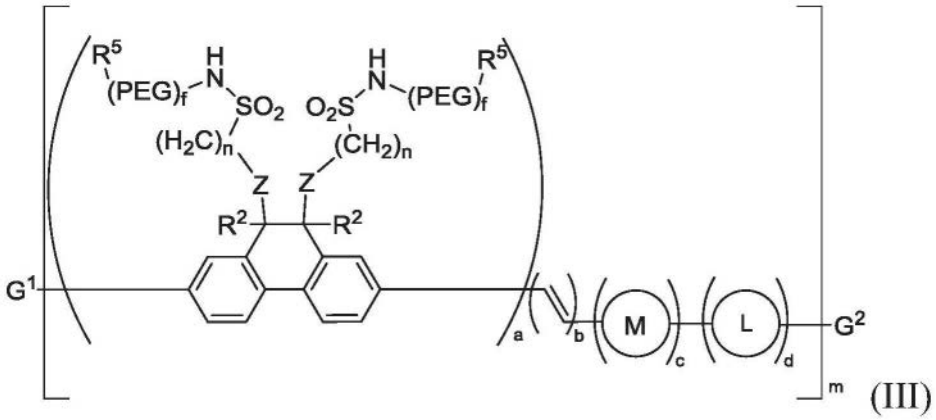
2.根据权利要求1所述的聚合物，其中G^1和G^2各自独立地选自卤素取代的芳基、硼酸取代的芳基、硼酸酯取代的芳基、被一个或多个用选自胺、氨基甲酸酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及用于与基质或接合剂缀合的其受保护基团的官能团封端的侧链取代的芳基或杂芳基。

3.根据权利要求1所述的聚合物，其中所述聚合物具有式II的结构：



(II)。

4.根据权利要求1所述的聚合物，其中所述聚合物具有式III的结构：



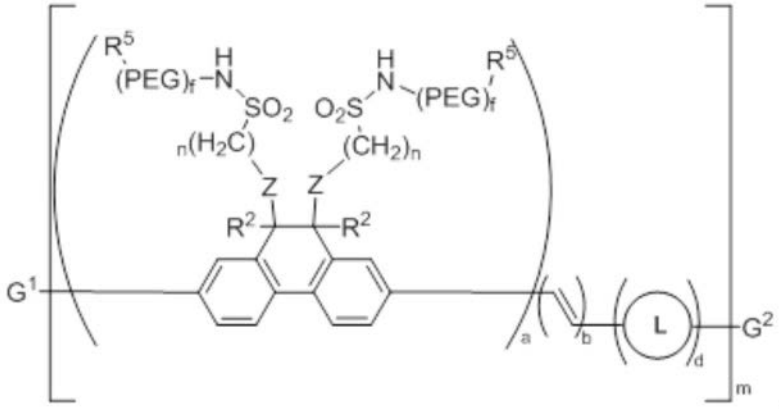
(III)

其中，

每个f独立地为0至50的整数，并且

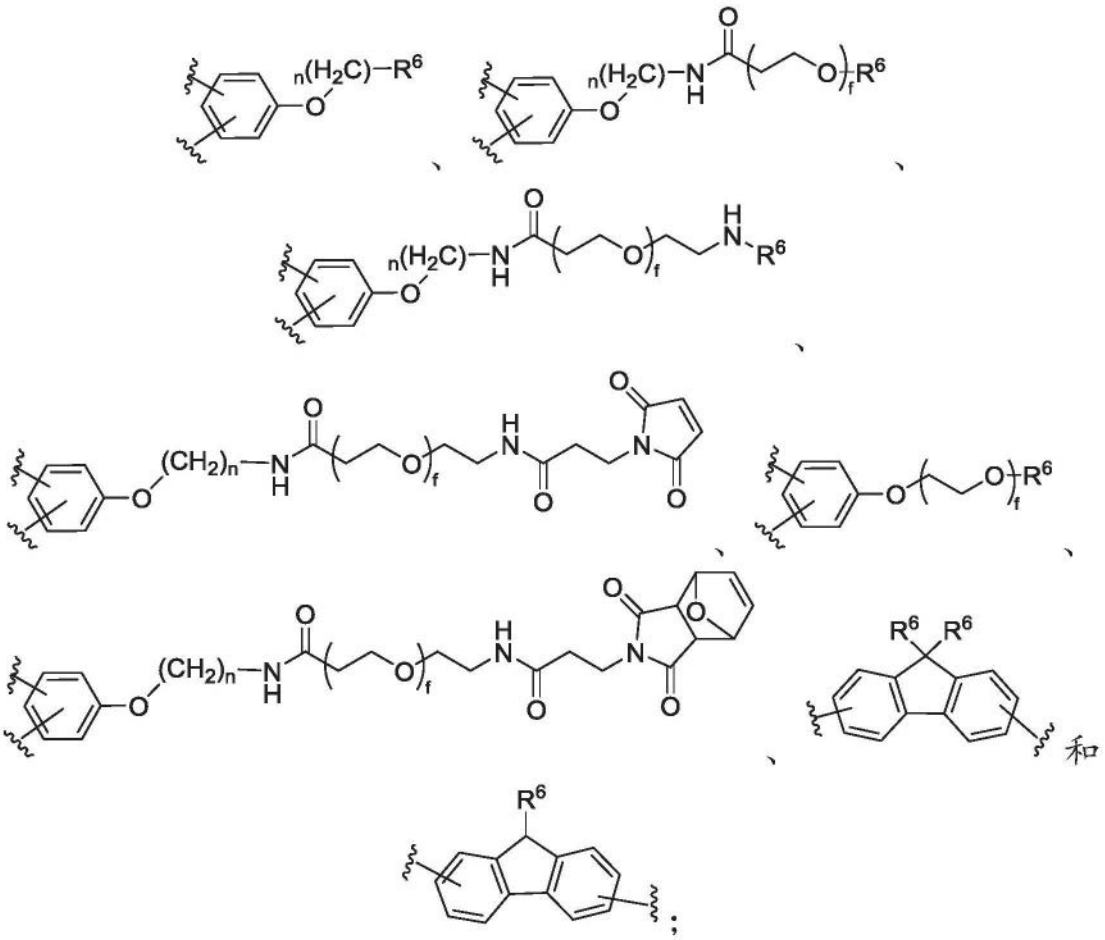
每个R^5独立地选自H、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}杂芳氧基、C_2-C_{18}杂芳氨基和C_1-C_{12}烷氧基。

5.根据权利要求4所述的聚合物,其中所述聚合物具有式IV的结构:



(IV)。

6.根据权利要求1所述的聚合物,其中L各自独立地选自:



其中,

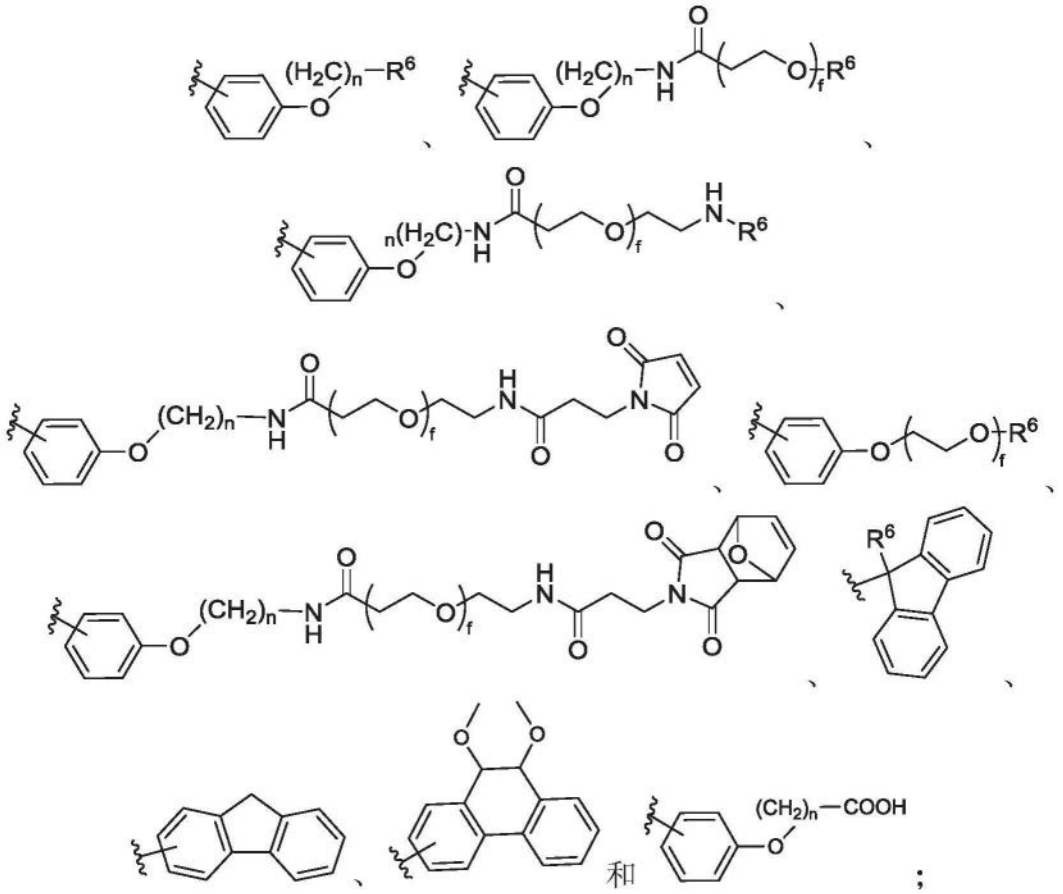
每个R^6独立地选自:H、OH、SH、NHCOO-叔丁基、$(CH_2)_nCOOH$、$(CH_2)_nCOOCH_3$、$(CH_2)_nNH_2$、$(CH_2)_nNH-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOOH$、$(CH_2)_nNHCO-(CH_2)_n-CO-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOO-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOOC(CH_3)_3$、$(CH_2)_nNHCO(C_3-C_{12})$环烷基、$(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOOH$、$(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOO(CH_2)_nCH_3$、$(CH_2)_n(OCH_2CH_2)_fOCH_3$、N-马来酰亚胺、卤素、$C_2-C_{12}$烯烃、$C_2-C_{12}$炔烃、$C_3-C_{12}$环烷基、$C_1-C_{12}$卤代烷基、$C_1-C_{12}$杂芳基、$C_1-C_{12}$杂芳氨基、和任选地被一个或多个卤素、羟基、$C_1-C_{12}$烷氧基或$(OCH_2CH_2)_fOCH_3$取代的苄基;

每个f独立地为0至50的整数;并且

每个n独立地为1至20的整数。

7.根据权利要求1所述的聚合物,其中G^1和G^2各自独立地选自任选地取代的二氢菲、任选地取代的芴、被一个或多个用官能团封端的侧链取代的芳基、和被一个或多个用官能团封端的侧链取代的杂芳基。

8.根据权利要求1所述的聚合物,其中G^1和G^2各自独立地选自:



其中,

每个R^6独立地选自:H、OH、SH、NHCOO-叔丁基、$(CH_2)_nCOOH$、$(CH_2)_nCOOCH_3$、$(CH_2)_nNH_2$、$(CH_2)_nNH-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOOH$、$(CH_2)_nNHCO-(CH_2)_n-CO-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOO-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOOC(CH_3)_3$、$(CH_2)_nNHCO(C_3-C_{12})$环烷基、$(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOOH$、$(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOO(CH_2)_nCH_3$、$(CH_2)_n(OCH_2CH_2)_fOCH_3$、N-马来酰亚胺、卤素、$C_2-C_{12}$烯烃、$C_2-C_{12}$炔烃、$C_3-C_{12}$环烷基、$C_1-C_{12}$卤代烷基、$C_1-C_{12}$杂芳基、$C_1-C_{12}$杂芳氨基、和任选地被一个或多个卤素、羟基、$C_1-C_{12}$烷氧基或$(OCH_2CH_2)_fOCH_3$取代的苄基;

每个f独立地为0至50的整数;并且

每个n独立地为1至20的整数。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的聚合物,还包含与所述聚合物连接的接合剂。

10.根据权利要求9所述的聚合物,其中所述接合剂为抗体。

11.一种用于检测样品中的分析物的方法,所述方法包括:

提供怀疑含有所述分析物的样品;

使所述样品与缀合至根据权利要求1至8中任一项所限定的水溶性荧光聚合物的接合

剂接触，

其中所述接合剂能够与所述分析物或目标相关联的生物分子相互作用。

12.根据权利要求11所述的方法，其中所述接合剂为肽、糖、脂质、或核酸。

13.根据权利要求11所述的方法，其中所述接合剂为蛋白质。

14.根据权利要求11所述的方法，其中所述接合剂为亲和配体。

15.根据权利要求11所述的方法，其中所述接合剂为抗体、或抗体片段。

16.根据权利要求11所述的方法，其中所述接合剂为核酸配体。

17.根据权利要求11所述的方法，其中所述接合剂为抗体。

18.根据权利要求17所述的方法，其中所述方法被配置用于流式细胞术。

19.根据权利要求17所述的方法，其中所述接合剂与基质结合。

20.根据权利要求17所述的方法，其中所述分析物为在细胞表面上表达的蛋白质。

21.根据权利要求17所述的方法，其中所述方法被配置为免疫测定法。

22.根据权利要求17所述的方法，其中所述方法还包括提供另外的接合剂用于同时检测另外的分析物。

光敏大分子及其用途

[0001] 本申请是申请日为2017年4月14日、申请号为“201780031306.5”、发明名称为“光敏大分子及其用途”的中国专利申请的分案申请,原申请是国际申请PCT/US2017/027611的中国国家阶段申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2016年4月15日提交的美国临时申请62/323,444的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及复合物和用于检测样品中分析物的方法。

背景技术

[0005] 水溶性荧光聚合物可通过产生可实时监测的信号来用于多种生物应用中,并且提供用于检测生物目标和事件的简单而快速的方法。

[0006] 染料的亮度为消光系数(ε,在特定波长下吸收的光量的量度)和荧光量子产率(Φ,从其单重激发态以辐射形式发射的光的测量)的总体贡献。大多数报道的有机紫色染料诸如香豆素、BODIPY、花菁、方酸等为单分子,并且在405nm处在10,000$M^{-1}cm^{-1}$至70,000$M^{-1}cm^{-1}$的范围内显示出相对低的消光系数。已经表明,由于来自不同发色团的总贡献,具有多个发色团的分子表现出更高的ε值。存在关于树枝状和聚合物主链方法的各种报道,其中单个分子含有多个发色团。

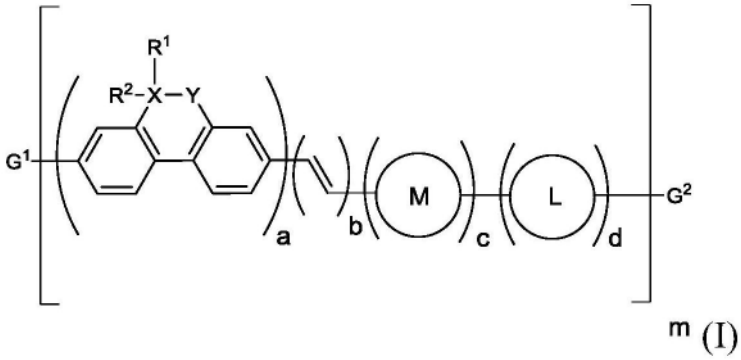
[0007] 然而,许多先前报道的聚合物染料为高度疏水的并且用于材料应用,诸如发光二极管、太阳能电池等。因此,许多聚合物染料在水性条件下不可用,因为它们的溶解性、亮度和光谱的展宽性差。只有少数报道涉及用于生物学应用的水溶性荧光聚合物,其可用405nm和355nm激光激发。因此,需要鉴定新型聚合物核以扩展水溶性聚合物染料的库,用于生物学应用,包括用于检测分析物。

[0008] 本发明解决了现有技术复合物和用于检测样品中分析物的方法的这些和其他缺点。

发明内容

[0009] 本发明一般提供新型水溶性荧光聚合物和使用包含与接合剂缀合的荧光聚合物的复合物检测样品中的分析物的方法。

[0010] 在第一实施方案中,本发明提供水溶性荧光聚合物,该水溶性荧光聚合物具有式I的结构:

[0011] 

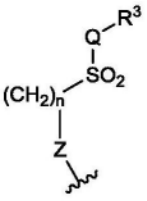
(I)

[0012] 其中;

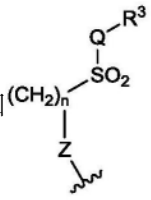
[0013] 每个X独立地选自C和Si;

[0014] 每个Y独立地选自键、CR^1R^2和SiR^1R^2;

[0015] 当Y为键时,X直接键合到两个环;

[0016] 每个R^1独立地选自聚乙二醇(PEG)、铵烷基盐、铵烷氧基盐、铵低聚醚盐、磺酸烷基盐、磺酸烷氧基盐、磺酸低聚醚盐、亚磺酰胺基低聚醚、和

;

[0017] 每个R^2独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、(杂)芳氧基、芳基、(杂)芳氨基、PEG、铵烷基盐、铵烷氧基盐、铵低聚醚盐、磺酸烷基盐、磺酸烷氧基盐、磺酸低聚醚盐、亚磺酰胺基低聚醚、和

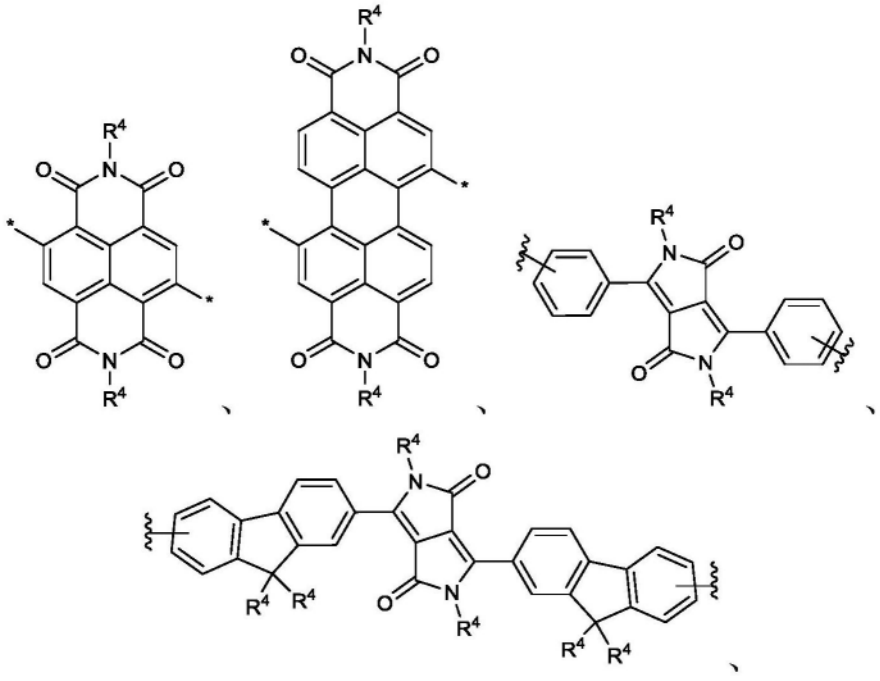
;

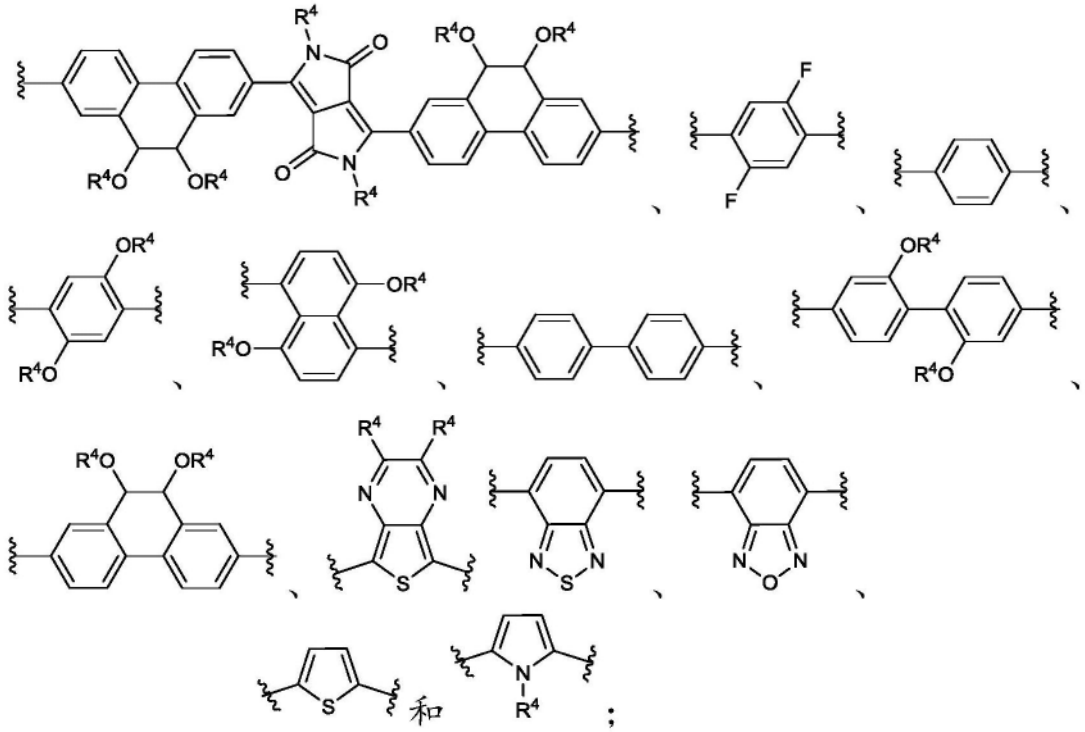
[0018] 每个R^3独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、(杂)芳氧基、芳基、(杂)芳氨基和PEG;

[0019] 每个Z独立地选自C、O和N;

[0020] 每个Q独立地选自键、NH、NR^4和CH_2;

[0021] 每个M独立地为富电子连接基单元,该富电子连接基单元能够改变聚合物带隙并且沿聚合物主链均匀或无规分布,并且各自独立地选自:

[0022] 

[0023] 

[0024] 其中，

[0025] 每个R^4为非离子侧基，该非离子侧基能够赋予超过10mg/mL的水中溶解度，并且各自独立地选自卤素、羟基、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氨基、$(CH_2)_{x'}$、$(OCH_2$-$CH_2)_{y'}OCH_3$其中每个x'独立地为0至20的整数；每个y'独立地为0至50的整数，和C_2-C_{18}(杂)芳基基团；

[0026] 每个任选的连接基L为沿聚合物主链均匀或无规分布并被一个或多个用选自胺、氨基甲酸酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及用于与另一种基质、受体染料、分子或接合剂缀合的其受保护基团的官能团封端的侧链取代的芳基或杂芳基基团；

[0027] 每个G^1和G^2各自独立地选自氢、卤素、炔烃、任选地取代的芳基、任选地取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸酯、磷酸酯、硼酸取代的芳基、硼酸酯取代的芳基、硼酸酯、硼酸、任选地取代的二氢菲(DHP)、任选地取代的茚、芳基或杂芳基,该芳基或杂芳基被一个或多个用选自胺、氨基甲酸酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及用于与基质或接合剂缀合的其受保护基团的官能团封端的侧链取代;

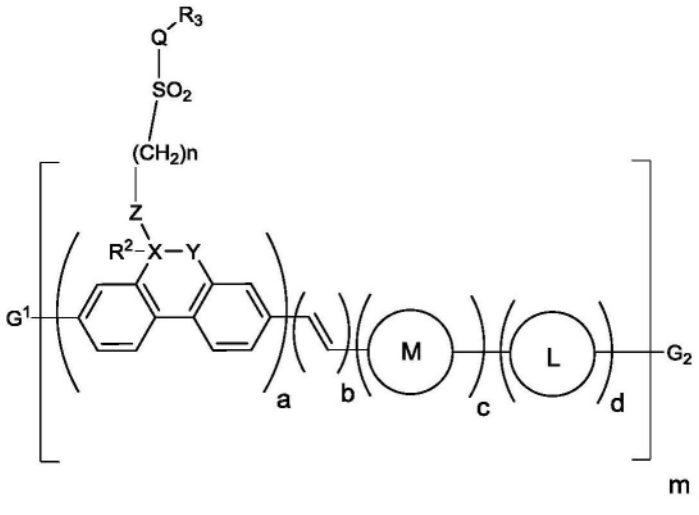
[0028] a、c和d定义结构内每个单元的mol%,其每个可以均匀或随机重复,并且其中a为10%至100%的mol%,c为0%至90%的mol%,并且每个d为0%至25%的mol%;

[0029] 每个b独立地为0或1;

[0030] m为1至约10,000的整数;并且

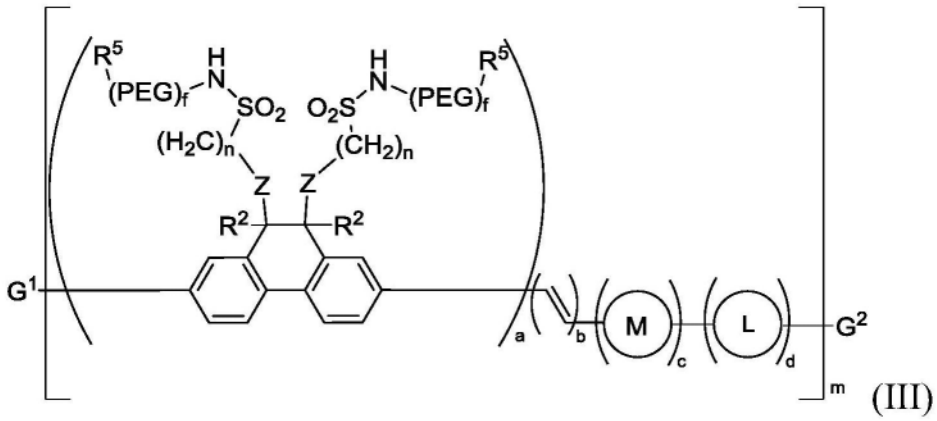
[0031] 每个n独立地为1至20的整数。

[0032] 在一些情况下,聚合物具有式II的结构:

[0033] 

(II)。

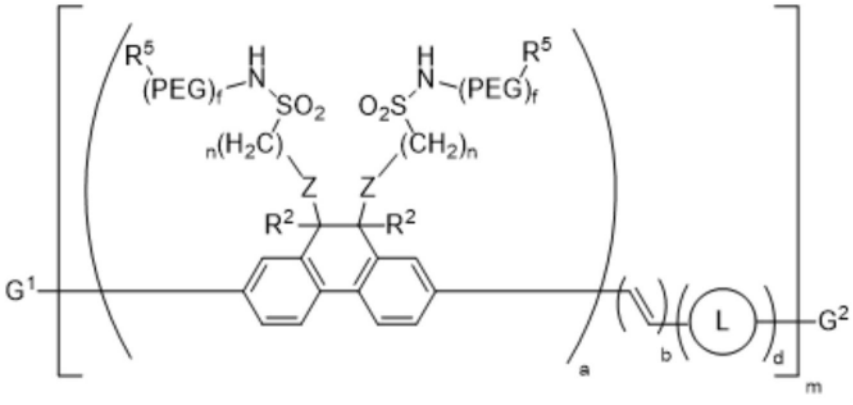
[0034] 在一些情况下,聚合物具有式III的结构:

[0035] 

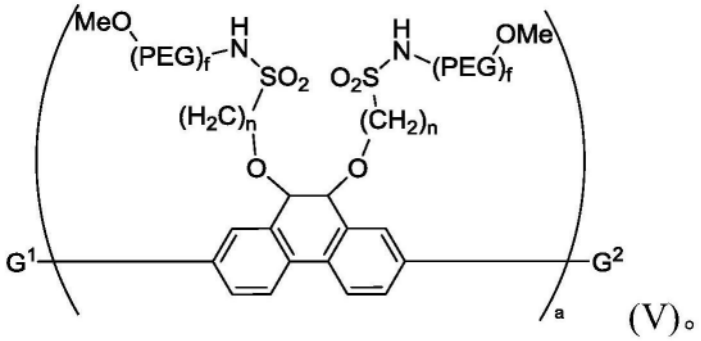
(III)

[0036] 其中,每个f独立地为0至50的整数,并且每个R^5独立地选自H、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氨基和C_1-C_{12}烷氧基。

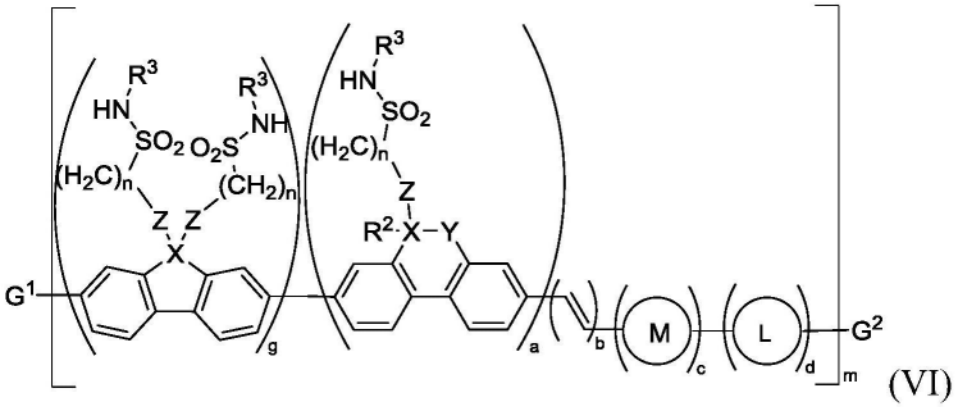
[0037] 在一些情况下,聚合物具有式IV的结构:

[0038] 
(IV)。

[0039] 在一些情况下,聚合物具有式V的结构:

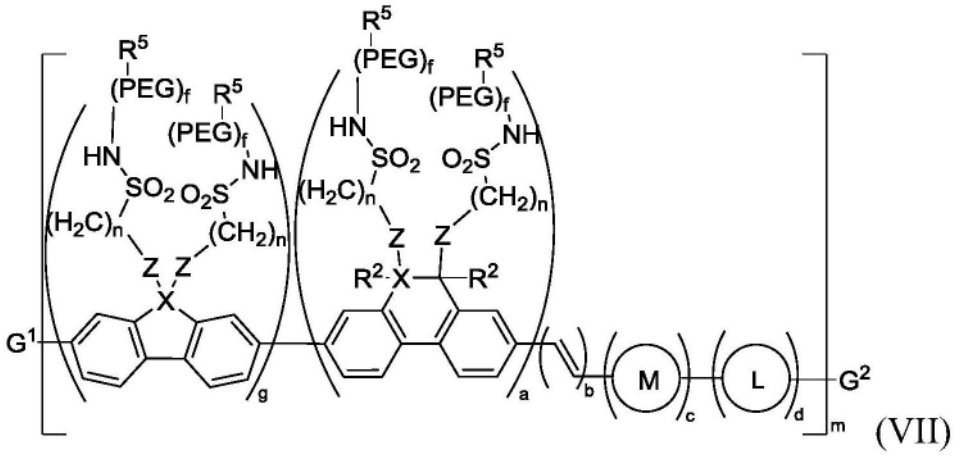
[0040] 
(V)。

[0041] 在一些情况下,聚合物为共聚物并具有式VI的结构:

[0042] 
(VI)

[0043] 其中g和a一起为10%至100%的mol%。

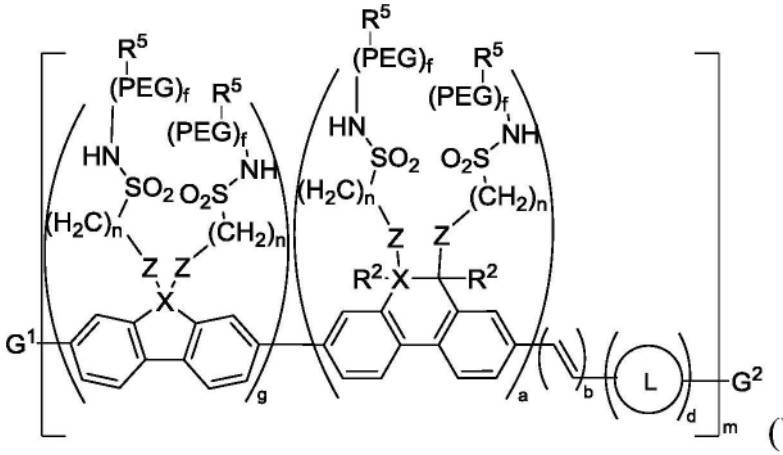
[0044] 在一些情况下,聚合物为共聚物并具有式VII的结构:

[0045] 

(VII)

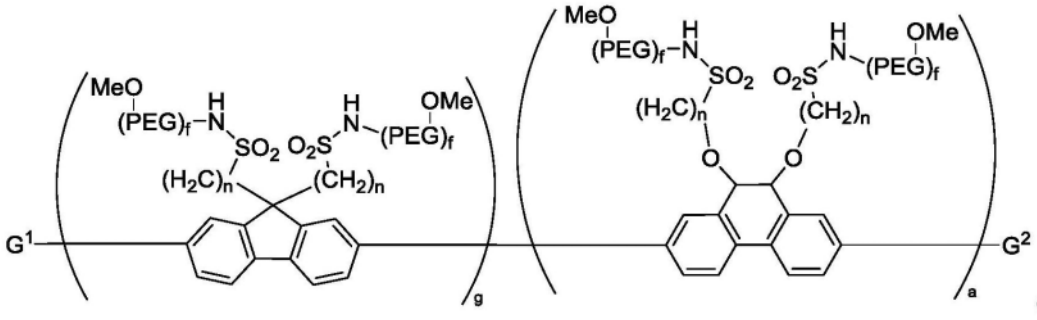
[0046] 其中,每个g和a一起为10％至100％的mol％;并且每个f独立地为0至50的整数,并且每个R^5独立地选自H、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氨基和C_1-C_{12}烷氧基。

[0047] 在一些情况下,聚合物为共聚物并具有式VIII的结构:

[0048] 

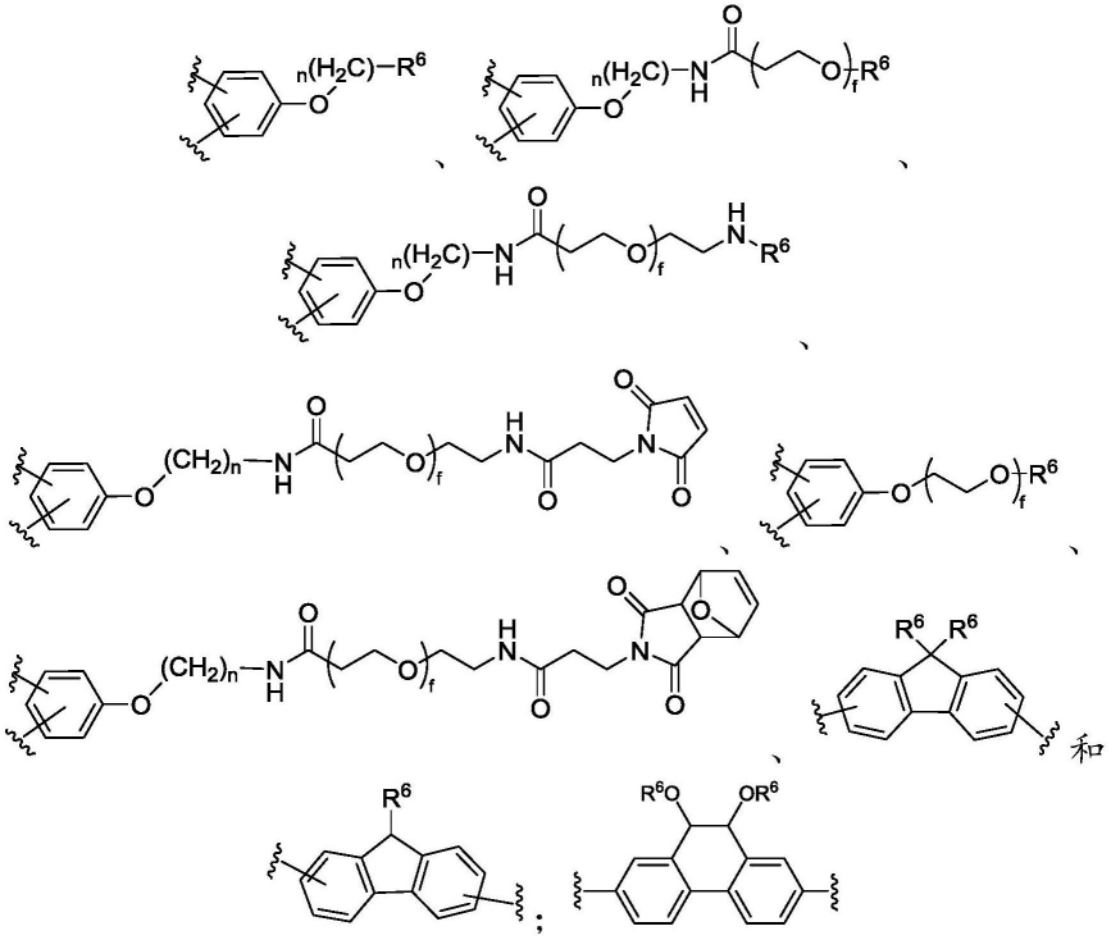
(VIII)。

[0049] 在一些情况下,聚合物为共聚物并具有式IX的结构:

[0050] 

(IX)。

[0051] 在一些实施方案中,L各自独立地选自:

[0052] 

[0053] 其中，

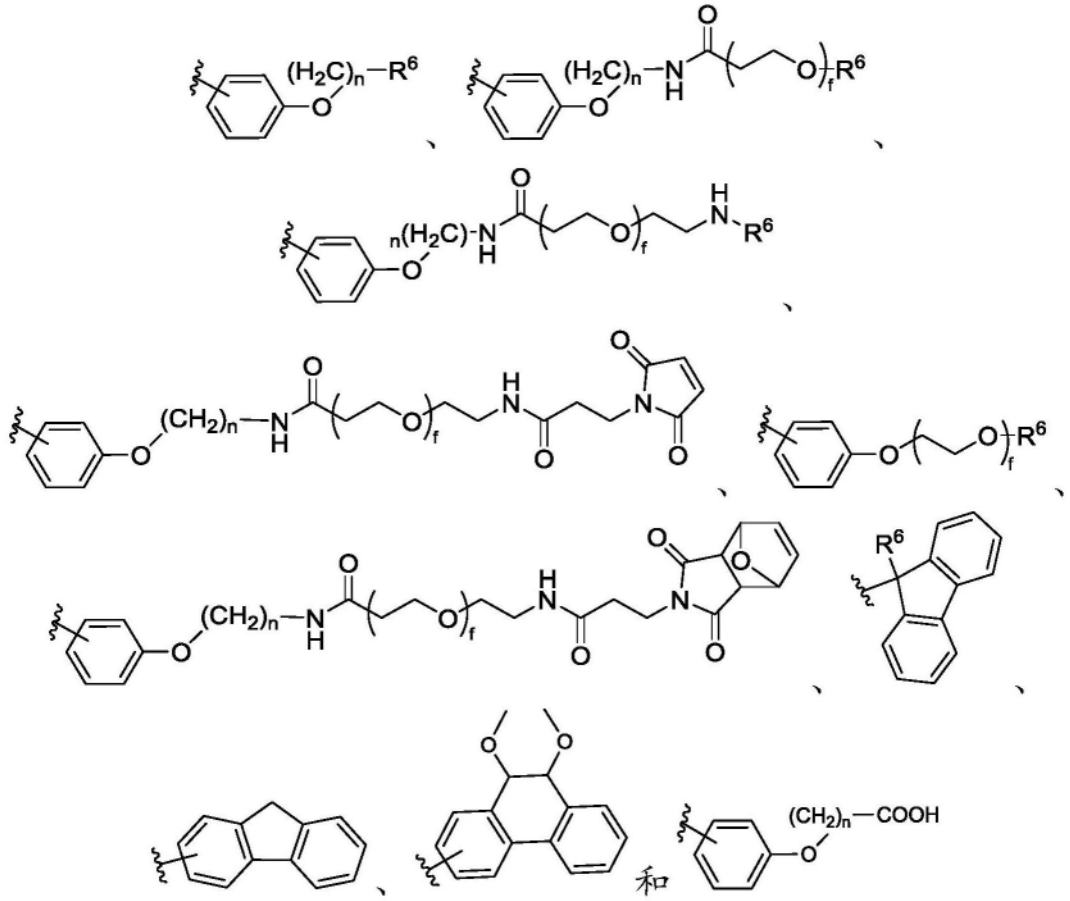
[0054] 每个R^6独立地选自：H、OH、SH、NHCOO-叔丁基、$(CH_2)_nCOOH$、$(CH_2)_nCOOCH_3$、$(CH_2)_nNH_2$、$(CH_2)_nNH-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOOH$、$(CH_2)_nNHCO-(CH_2)_n-CO-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOO-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOOC(CH_3)_3$、$(CH_2)_nNHCO(C_3-C_{12})$环烷基、$(CH_2)_nNHCO(CH_2CH_2O)_f$、$(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOOH$、$(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOO(CH_2)_nCH_3$、$(CH_2)_n(OCH_2CH_2)_fOCH_3$、N-马来酰亚胺、卤素、$C_2-C_{12}$烯烃、$C_2-C_{12}$炔烃、$C_3-C_{12}$环烷基、$C_1-C_{12}$卤代烷基、$C_1-C_{12}$(杂)芳基、$C_1-C_{12}$(杂)芳氨基、和任选地被一个或多个卤素、羟基、$C_1-C_{12}$烷氧基或$(OCH_2CH_2)_fOCH_3$取代的苄基；

[0055] 每个f独立地为0至50的整数；并且

[0056] 每个n独立地为1至20的整数。

[0057] 在一些实施方案中，G^1和G^2各自独立地选自任选地取代的二氢菲(DHP)、任选地取代的芴、被一个或多个用官能团封端的侧链取代的芳基、和被一个或多个用官能团封端的侧链取代的杂芳基。

[0058] 在一些实施方案中，G^1和G^2各自独立地选自：

[0059] 

[0060] 其中，

[0061] 每个R^6独立地选自：H、OH、SH、NHCOO-叔丁基、$(CH_2)_nCOOH$、$(CH_2)_nCOOCH_3$、$(CH_2)_nNH_2$、$(CH_2)_nNH-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOOH$、$(CH_2)_nNHCO-(CH_2)_n-CO-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOO-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOOC(CH_3)_3$、$(CH_2)_nNHCO(C_3-C_{12})$环烷基、$(CH_2)_nNHCO(CH_2CH_2O)_f$、$(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOOH$、$(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOO(CH_2)_nCH_3$、$(CH_2)_n(OCH_2CH_2)_fOCH_3$、N-马来酰亚胺、卤素、$C_2-C_{12}$烯烃、$C_2-C_{12}$炔烃、$C_3-C_{12}$环烷基、$C_1-C_{12}$卤代烷基、$C_1-C_{12}$(杂)芳基、$C_1-C_{12}$(杂)芳氨基、和任选地被一个或多个卤素、羟基、$C_1-C_{12}$烷氧基或$(OCH_2CH_2)_fOCH_3$取代的苄基；

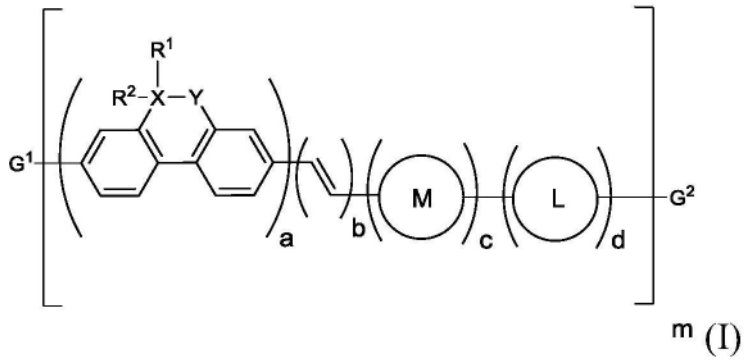
[0062] 每个f独立地为0至50的整数；并且

[0063] 每个n独立地为1至20的整数。

[0064] 在一些实施方案中，本发明提供了用于检测样品中的分析物的方法，该方法包括：

[0065] 提供怀疑含有分析物的样品；

[0066] 使样品与缀合至具有式I的结构的水溶性聚合物的接合剂接触：

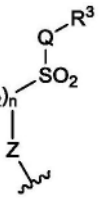
[0067] 

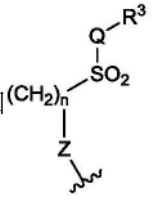
[0068] 其中;

[0069] 每个X独立地选自C和Si;

[0070] 每个Y独立地选自键、CR^1R^2和SiR^1R^2;

[0071] 当Y为键时,X直接键合到两个环;

[0072] 每个R^1独立地选自铵烷基盐、铵烷氧基盐、铵低聚醚盐、磺酸烷基盐、磺酸烷氧基盐、磺酸低聚醚盐、亚磺酰胺基低聚醚、和;

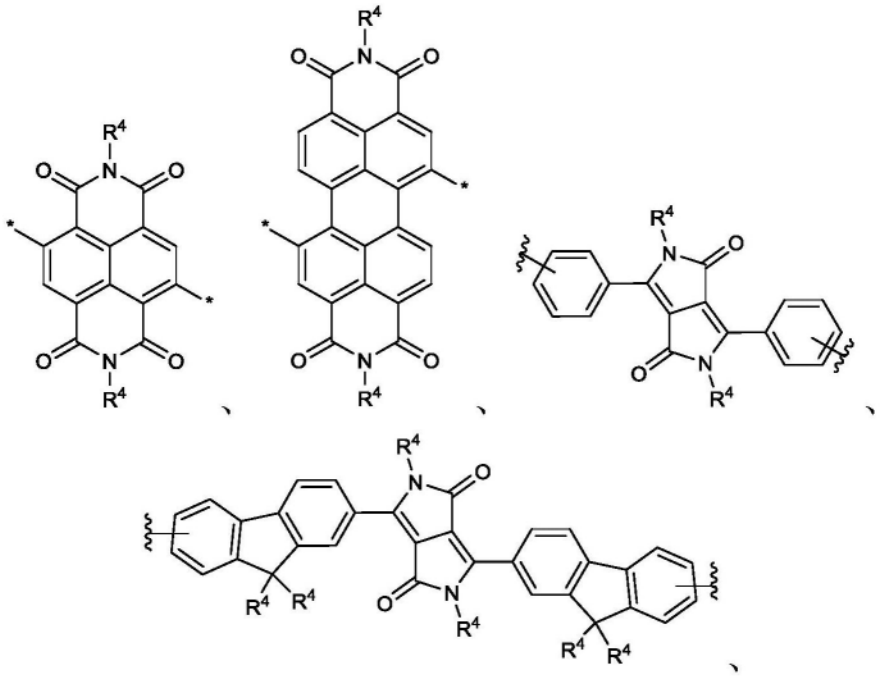
[0073] 每个R^2独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、(杂)芳氧基、芳基、(杂)芳氨基、PEG、铵烷基盐、铵烷氧基盐、铵低聚醚盐、磺酸烷基盐、磺酸烷氧基盐、磺酸低聚醚盐、亚磺酰胺基低聚醚、和;

[0074] 每个R^3独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、(杂)芳氧基、芳基、(杂)芳氨基和PEG;

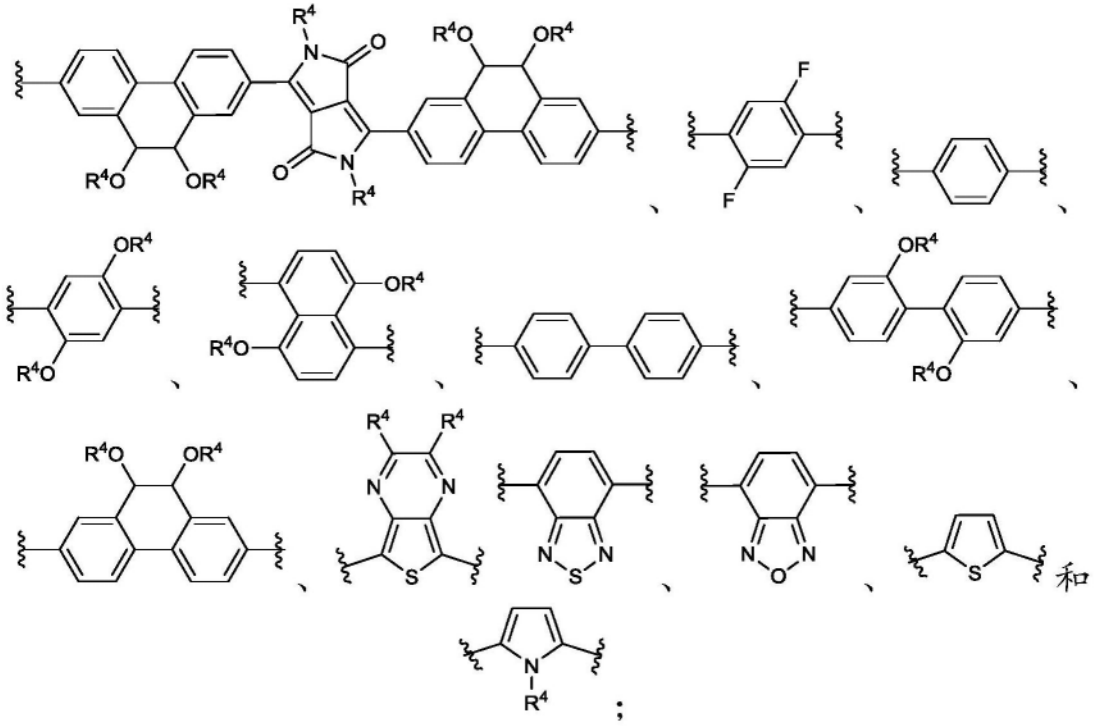
[0075] 每个Z独立地选自C、O和N;

[0076] 每个Q独立地选自键、NH、NR^4和CH_2;

[0077] 每个M独立地为富电子连接基单元,该富电子连接基单元能够改变聚合物带隙并且沿聚合物主链均匀或无规分布,并且各自独立地选自:



[0078]



[0079] 其中,

[0080] 每个R^4为非离子侧基,该非离子侧基能够赋予超过10mg/mL的水中溶解度,并且各自独立地选自卤素、羟基、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氨基、$(CH_2)_{x'}$、$(OCH_2$-$CH_2)_{y'}OCH_3$其中每个x'独立地为0至20的整数;每个y'独立地为0至50的整数,和C_2-C_{18}(杂)芳基基团;

[0081] 每个任选的连接基L为沿聚合物主链均匀或无规分布并被一个或多个用选自胺、氨基甲酸酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及用于与另一种基质、受体染料、分子或接合剂缀合的其受保护基团的官能团封端的侧链取代的芳基或杂芳基基团;

[0082] G^1和G^2各自独立地选自氢、卤素、炔烃、任选地取代的芳基、任选地取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸酯、磷酸酯、硼酸取代的芳基、硼酸酯取代的芳基、硼酸酯、硼酸、任选地取代的二氢菲(DHP)、任选地取代的芴、芳基或杂芳基,该芳基或杂芳基被一个或多个用选自胺、氨基甲酸酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及用于与基质或接合剂缀合的其受保护基团的官能团封端的侧链取代;

[0083] a、c和d定义结构内每个单元的mol%,其每个可以均匀或随机重复,并且其中a为10%至100%的mol%,c为0%至90%的mol%,并且

[0084] 每个d为0%至25%的mol%;

[0085] 每个b独立地为0或1;

[0086] m为1至约10,000的整数;并且

[0087] 每个n独立地为1至20的整数;并且

[0088] 其中接合剂能够与分析物或目标相关联的生物分子相互作用。

[0089] 在一些实施方案中,该方法还包括向样品施加可激发聚合物的光源;以及检测光是否从缀合的聚合物络合物发射。

[0090] 在一些实施方案中,接合剂为蛋白质、肽、亲和配体、抗体、抗体片段、糖、脂质、核酸或核酸配体。在一些实施方案中,接合剂为抗体。

[0091] 在一些实施方案中,该方法被配置用于流式细胞术。在一些实施方案中,接合剂与基质结合。在一些实施方案中,分析物为在细胞表面上表达的蛋白质。

[0092] 在一些实施方案中,该方法被配置为免疫测定法。在一些实施方案中,该方法还包括提供另外的接合剂用于同时检测另外的分析物。

附图说明

[0093] 图1示出了芴(FF)、二氢菲(DD)和芴-DHP(DF)聚合物的荧光发射光谱的比较。

[0094] 图2示出了FF聚合物和DD聚合物两者的吸收光谱。该图示出了在390nm和410nm处DD聚合物的吸收(黑色曲线),而FF(灰色曲线)聚合物示出了在401nm附近的最大值。在不同浓度下测量样品。

[0095] 图3示出了用新型聚合物标记的抗人CD4和Pacific Blue标记的CD4染色的裂解全血的流式细胞术分析。聚合物染料的阳性信号强度比Pacific Blue高近5倍。

[0096] 图4示出了本发明的聚合物在与抗体缀合时具有吸收、荧光、亮度、分子量、多分散性、染料与蛋白质比的某些物理和化学特征等。这些参数的优选范围示于该表中。

[0097] 图5示出了串联聚合物的激发和发射光谱。在聚合物最大值(405nm)下进行激发,并且从附接至主链上的各种受体染料观察到发射。染料1-FITC,染料2-Cy3B,染料3-Cy55。

具体实施方式

[0098] I.综述

[0099] 本发明提供了新型水溶性荧光聚合物和使用包含与接合剂缀合的荧光聚合物的复合物检测样品中的分析物的方法。与其它染料相比,本发明的水溶性缀合的聚合物显示出显著增加的亮度。

[0100] II.定义

[0101] 本文使用的缩写在化学和生物学领域内具有其常规含义。

[0102] 如本文所用,术语“铵”是指具有式NHR_3^+的阳离子,其中每个R基团独立地为氢或取代或未取代的烷基、芳基、芳烷基或烷氧基基团。优选地,每个R基团为氢。

[0103] 如本文所用,“低聚醚”应理解为是指含有具有醚官能团的结构重复单元的低聚物。如本文所用,“低聚物”应理解为是指含有一个或多个相同或不同式的可识别结构重复单元的分子。

[0104] 本文所用的术语“磺酸盐官能团”或“磺酸盐”是指游离磺酸根阴离子(-S(=O)$_2$O-)和其盐。因此,术语磺酸盐包括磺酸盐,例如钠、锂、钾和铵磺酸盐。

[0105] 本文所用的术语“亚磺酰胺基”是指式-SO_2NR-的基团,其中R为氢、烷基或芳基。

[0106] 本文所用的术语“烷基”是指具有所示碳原子数的直链或支链饱和脂族基团。例如,C_1-C_6烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、己基等。其它烷基基团包括但不限于庚基、辛基、壬基、癸基等。烷基可包括任意数量的碳,诸如1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、2-3、2-4、2-5、2-6、3-4、3-5、3-6、4-5、4-6和5-6。烷基基团通常为单价的,但可以为二价的,诸如当烷基基团将两个部分连接在一起时。

[0107] 本文所用的术语“环烷基”是指含有3至12个环原子的饱和或部分不饱和的单环、稠合双环或桥联多环环组合,或指示单环的原子数包括例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环辛基(cyclooctyl)。双环和多环环包括例如降莰烷、十氢化萘和金刚烷。例如,C_{3-8}环烷基包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环辛基和降莰烷。

[0108] 本文所用的术语“卤代烷基”是指如上定义的烷基,其中一些或所有氢原子被卤素原子取代。卤素(卤)优选代表氯或氟,但也可以为溴或碘。例如,卤代烷基包括三氟甲基、氟甲基、1,2,3,4,5-五氟-苯基等。术语“全氟”定义具有至少两个可被氟取代的氢的化合物或基团。例如,全氟苯基是指1,2,3,4,5-五氟苯基,全氟甲烷是指1,1,1-三氟甲基,并且全氟甲氧基是指1,1,1-三氟甲氧基。

[0109] 如本文所用,术语“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

[0110] 本文所用的术语“烷氧基”是指如上定义的具有连接烷基基团与附接点的氧原子的烷基基团。烷氧基基团包括例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、2-丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基等。烷氧基基团还可被本文描述的各种取代基取代。例如,烷氧基基团可被卤素取代,形成“卤代-烷氧基”基团。

[0111] 本文所用的术语“烯烃”是指具有至少一个双键的直链或支链烃。烯烃基团的示例包括但不限于乙烯基、丙烯基、异丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、丁二烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、异戊烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1,3-己二烯基、1,4-己二烯基、1,5-己二烯基、2,4-己二烯基或1,3,5-己三烯基。烯烃基团通常为单价的,但可以为二价的,诸如当烯基基团将两个部分连接在一起时。

[0112] 本文所用的术语“炔烃”是指具有至少一个三键的直链或支链烃。炔基基团的示例包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、异丁炔基、仲丁炔基、丁二炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、异戊炔基、1,3-戊二炔基、1,4-戊二炔基、1-己炔基、2-己炔基、3-己炔基、1,3-己二炔基、1,4-己二炔基、1,5-己二炔基、2,4-己二炔基或1,3,5-己三炔基。炔基基团通

常为单价的,但可以为二价的,诸如当炔基基团将两个部分连接在一起时。

[0113] 本文所用的术语“芳基”是指含有6至16个环碳原子的单环或稠合双环、三环或更大的芳环组合。例如,芳基可以为苯基、苄基或萘基,优选苯基。“亚芳基”是指衍生自芳基基团的二价基团。芳基基团可以为被一个、两个或三个选自烷基、烷氧基、芳基、羟基、卤素、氰基、氨基、氨基-烷基、三氟甲基、亚烷基二氧基和氧基-C_2-C_3-亚烷基的基团单取代、二取代或三取代;所有这些都任选地进一步被取代,例如如上所定义;或1-或2-萘基;或1-或2-菲基。亚烷基二氧基为与苯基的两个相邻碳原子附接的二价取代基,例如,亚甲二氧基或亚乙二氧基。氧基-C_2-C_3-亚烷基也为与苯基的两个相邻碳原子附接的二价取代基,例如氧乙烯或氧丙烯。氧基-C_2-C_3-亚烷基-苯基的示例为2,3-二氢苯并呋喃-5-基。

[0114] 优选芳基为萘基、苯基或被烷氧基、苯基、卤素、烷基或三氟甲基单取代或二取代的苯基,尤其是苯基或被烷氧基、卤素或三氟甲基单取代或二取代的苯基,特别是苯基。

[0115] 本文所用的术语“芳氧基”是指O-芳基基团,其中芳基如上所定义。芳氧基基团可以为未取代的或被一个或两个合适的取代基取代。术语“苯氧基”是指芳氧基基团,其中芳基部分为苯环。本文所用的术语“杂芳氧基”是指-O-杂芳基基团,其中杂芳基如下所定义。术语“(杂)芳氧基”用于表示该部分为芳氧基或杂芳氧基基团。

[0116] 本文所用的术语“聚乙二醇”或“PEG”是指基于乙二醇单体单元的生物相容性水溶性线性聚合物家族。

[0117] 如本文所用的术语“杂芳基”是指含有5至16个环原子的单环或稠合双环或三环芳环组合,其中1至4个环原子为N、O或S的杂原子。例如,杂芳基包括吡啶基、吲哚基、吲唑基、喹喔啉基、喹啉基、异喹啉基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、呋喃基、吡咯基、噻唑基、苯并噻唑基、噁唑基、异噁唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、咪唑基、噻吩基或任何其它被取代的基团,尤其是被例如烷基、硝基或卤素的单取代或二取代。吡啶基代表2-、3-或4-吡啶基,有利地为2-或3-吡啶基。噻吩基代表2-或3-噻吩基。喹啉基优选代表2-、3-或4-喹啉基。异喹啉基优选代表1-、3-或4-异喹啉基。苯并吡喃基、苯并噻喃基分别优选代表3-苯并吡喃基或3-苯并噻喃基。噻唑基优选代表2-或4-噻唑基,并且最优选4-噻唑基。三唑基优选为1-、2-或5-(1,2,4-三唑基)。四唑基优选为5-四唑基。

[0118] 优选地,杂芳基为吡啶基、吲哚基、喹啉基、吡咯基、噻唑基、异噁唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、咪唑基、噻吩基、呋喃基、苯并噻唑基、苯并呋喃基、异喹啉基、苯并噻吩基、噁唑基、吲唑基、或任何取代的基团,尤其是单取代的或二取代的。

[0119] 类似地,芳基和杂芳基基团的取代基为变化的,并且选自:-卤素、-OR’、-OC(O)R’、-NR’R”、-SR’、-R’、-CN、-NO_2、-CO_2R’、-CONR’R”、-C(O)R’、-OC(O)NR’R”、-NR”C(O)R’、-NR”C(O)$_2$R’、-NR’-C(O)NR”R”’、-NH-C(NH_2)=NH、-NR’C(NH_2)=NH、-NH-C(NH_2)=NR’、-S(O)R’、-S(O)$_2$R’、-S(O)$_2$NR’R”、-N_3、-CH(Ph)$_2$、全氟(C_1-C_4)烷氧基和全氟(C_1-C_4)烷基,数量范围从零到芳环系统上的开放化合价总数;并且其中R’、R”和R”’独立地选自氢、(C_1-C_8)烷基和杂烷基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C_1-C_4)烷基和(未取代的芳基)氧基-(C_1-C_4)烷基。

[0120] 芳基或杂芳基环的相邻原子上的两个取代基可任选地被式-T-C(O)-(CH_2)$_q$-U-的取代基替代,其中T和U独立地为-NH-、-O-、-CH_2-或单键,并且q为0至2的整数。另选地,芳基或杂芳基环的相邻原子上的两个取代基可任选地被式-A-(CH_2)$_r$-B-的取代基替代,其中A和

B独立地为-CH_2-、-O-、-NH-、-S-、-S(O)-、-S(O)$_2$-、-S(O)$_2$NR'-或单键,并且r为1至3的整数。如此形成的新环的单键之一可任选地用双键替代。另选地,芳基或杂芳基环的相邻原子上的两个取代基可任选地被式-$(CH_2)_s$-X-$(CH_2)_t$-的取代基替代,其中s和t独立地为0至3的整数,并且X为-O-、-NR'-、-S-、-S(O)-、-S(O)$_2$-或-S(O)$_2$NR'-。-NR'-和-S(O)$_2$NR'-中的取代基R'选自氢或未取代的(C_1-C_6)烷基。

[0121] 本文所用的术语"(杂)芳氨基"是指被芳基基团取代的胺基基团(例如-NH-芳基)。芳氨基也可以为被胺基基团取代的芳基基团(例如,芳基-NH_2)。芳氨基可以为取代的或未取代的。

[0122] 本文所用的术语"胺"是指具有一个或多个氨基基团的如上所定义的烷基基团。氨基基团可以为伯氨基、仲氨基或叔氨基。烷基胺还可被羟基基团取代。可用于本发明的胺包括但不限于乙胺、丙胺、异丙胺、乙二胺和乙醇胺。氨基基团可将烷基胺连接到与化合物的其余部分的附接点、在烷基基团的ω位置、或者将烷基基团的至少两个碳原子连接在一起。本领域技术人员将理解,其它烷基胺可用于本发明。

[0123] 本文所用的术语"氨基甲酸酯"是指具有结构-NR"CO_2R'的官能团,其中R'和R"独立地选自氢、(C_1-C_8)烷基和杂烷基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)-(C_1-C_4)烷基,和(未取代的芳基)氧基-(C_1-C_4)烷基。氨基甲酸酯的示例包括t-Boc、Fmoc、苄氧基-羰基、alloc、氨基甲酸甲酯、氨基甲酸乙酯、9-(2-磺基)芴基甲基氨基甲酸酯、9-(2,7-二溴)芴基甲基氨基甲酸酯、Tbfmoc、Climoc、Bimoc、DBD-Tmoc、Bsmoc、Troc、Teoc、2-苯基乙基氨基甲酸酯、Adpoc、2-氯乙基氨基甲酸酯、1,1-二甲基-2-卤代乙基氨基甲酸酯、DB-t-BOC、TCBOC、Bpoc、t-Bumeoc、Pyoc、Bnpeoc、_V-(2-新戊酰氨基)-1,1-二甲基乙基氨基甲酸酯、NpSSPeoc。

[0124] 本文所用的术语"羧酸酯"是指羧酸的缀合碱,其通常可由式RCOO表示。例如,术语"羧酸镁"是指羧酸的镁盐。

[0125] 本文所用的术语"活化酯"是指肽化学中用于促进羧基基团与氨基酸衍生物的游离氨基基团的容易缩合的羧基活化基团。这些羧基活化基团的描述可在肽化学的一般教科书中找到;例如K.D.Kopple的"Peptides and Amino Acids",W.A.Benjamin公司New York,1966年第50至51页中以及E.Schroder和K.Lubke的"The Peptides",第1卷,Academic出版社,New York,1965年,第77至128页中。

[0126] 术语"肼"和"酰肼"是指含有单键氮的化合物,其中一个为伯胺官能团。

[0127] 如本文所用的术语"醛"是指具有-CHO基团的化合物。

[0128] 如本文所用的术语"硫醇"是指含有由硫-氢键组成的官能团的化合物。硫醇官能团的一般化学结构为R-SH,其中R代表烷基、烯烃、芳基或其它含碳原子基团。

[0129] 本文所用的术语"甲硅烷基"是指Si(R^z)$_3$,其中每个R^z独立地为烷基芳基或其它含碳原子基团。

[0130] 本文所用的术语"重氮盐"是指一组具有R-$N_2^+X^-$结构的有机化合物,其中R可以为任何有机残基(例如烷基或芳基),并且X为无机或有机阴离子(例如,卤素)。

[0131] 术语"三氟甲磺酸酯(tritiate)"也称为三氟甲磺酸酯(trifluoromethanesulfonate),为具有式CF_3SO_3的基团。

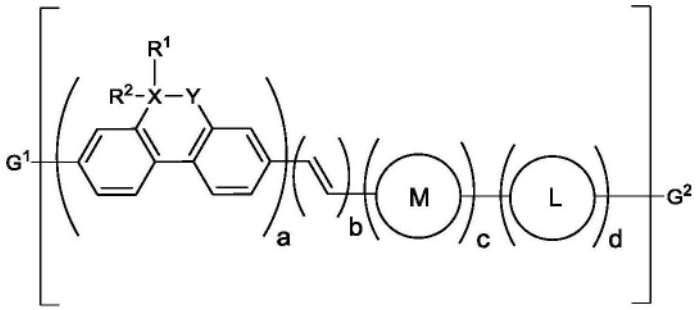
[0132] 如本文所用的术语"硼酸"是指结构-B(OH)$_2$。本领域技术人员认识到硼酸可在淬

灭剂合成的各个阶段作为硼酸酯存在。硼酸意在包括这种酯。本文所用的术语“硼酸酯”或“硼酸酯”是指含有-B(Z[1])(Z[2])部分的化合物,其中Z[1]和Z[2]一起形成在每种情况下与硼附接的原子为氧原子的部分。在一些实施方案中,硼酸酯部分为5-元环。在一些其它实施方案中,硼酸酯部分为6-元环。在一些其它实施方案中,硼酸酯部分为5-元环和6-元环的混合物。

[0133] III.组合物

[0134] 聚合物

[0135] 本发明的化合物包含具有式I-XIII的结构的水溶性荧光聚合物。在一些实施方案中,本发明的聚合物利用二氢菲(DHP)、芴、以及如式I中所示的DHP和芴单体的组合:

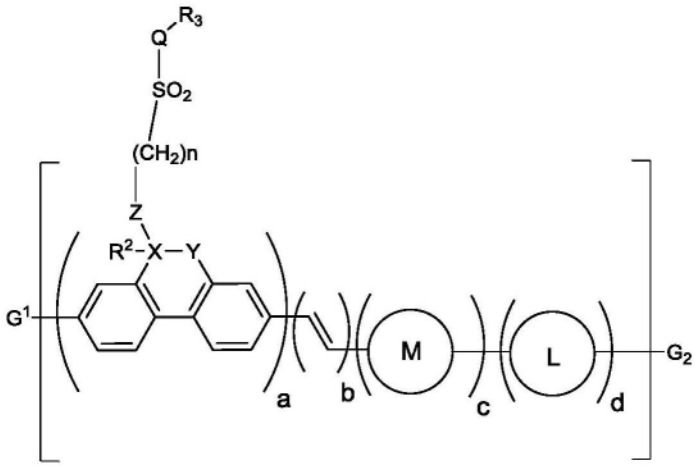
[0136] 

(I)。

[0137] 本发明的聚合物复合物可含有能够改变聚合物带隙并沿聚合物主链均匀或无规分布的单元。这些单元在式I中表示为M。本发明的聚合物复合物还可含有式I中表示为L的连接基。每个任选的连接基L为沿聚合物主链均匀或无规分布并被一个或多个用选自胺、氨基甲酸酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及用于与基质或接合剂缀合的其受保护基团的官能团封端的侧链取代的芳基或杂芳基基团。

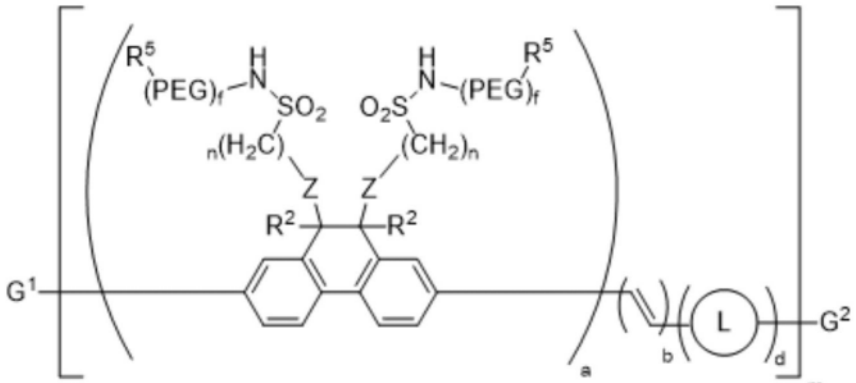
[0138] 本发明的聚合物复合物还含有式I表示为每个G[1]和G[2]的封端单元,它们各自独立地选自氢、卤素、炔烃、任选地取代的芳基、任选地取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸酯、磷酸酯、硼酸取代的芳基、硼酸酯取代的芳基、硼酸酯、硼酸、任选地取代的二氢菲(DHP)、任选地取代的芴、芳基或杂芳基,该芳基或杂芳基被一个或多个用选自胺、氨基甲酸酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及用于与基质或接合剂缀合的其受保护基团的官能团封端的侧链取代。

[0139] 在一些情况下,聚合物具有式II的结构:

[0140] 

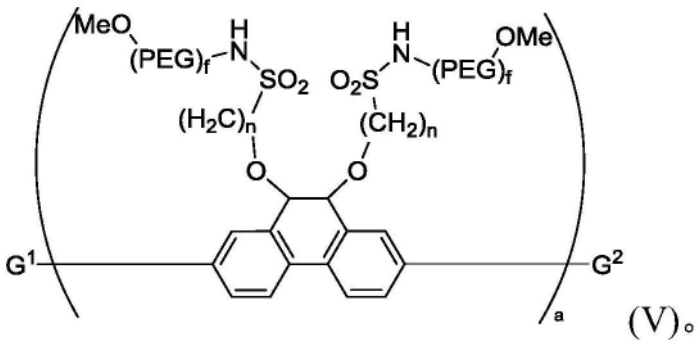
(II)。

[0141] 在一些情况下,聚合物具有式IV的结构:

[0142] 

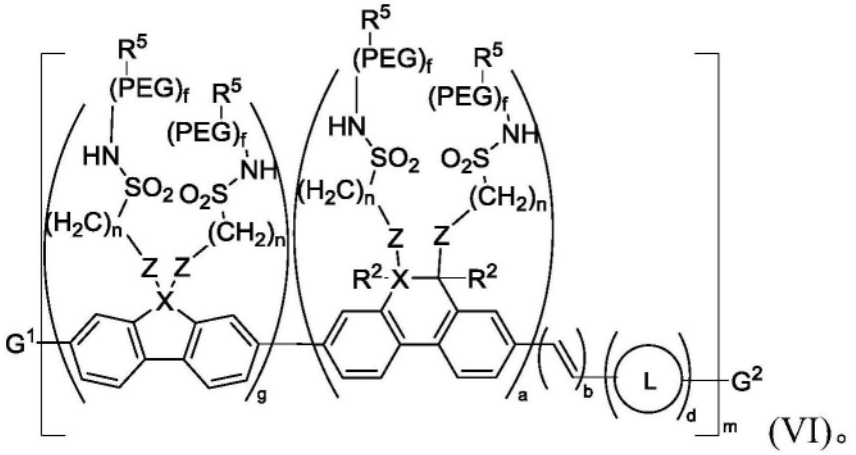
(IV)。

[0143] 在一些情况下,聚合物具有式V的结构:

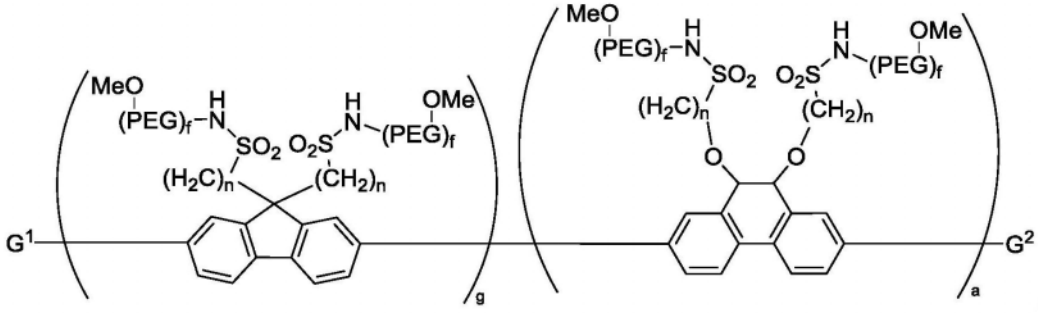
[0144] 

(V)。

[0145] 在一些情况下,聚合物为共聚物并具有式VI的结构:

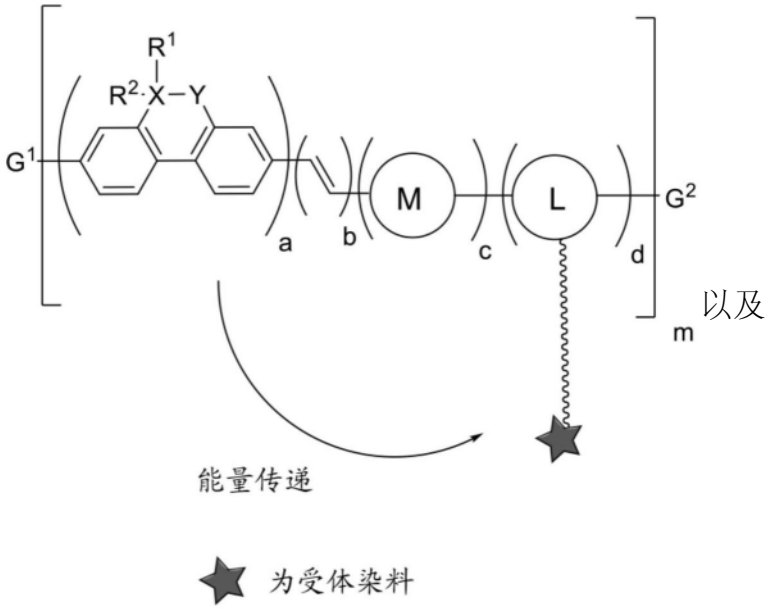
[0146] 
(VI)。

[0147] 在一些情况下,聚合物为共聚物并具有式VII的结构:

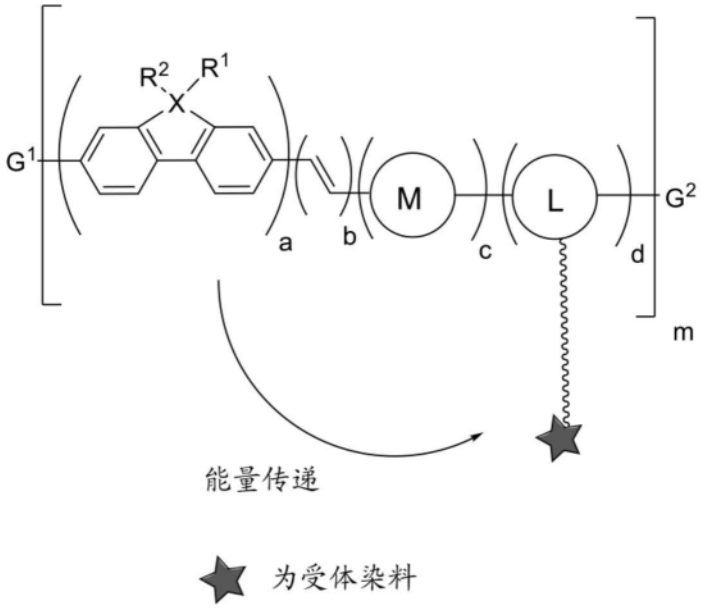
[0148] 
(VII)

。

[0149] 在一些实施方案中,聚合物具有附接至主链的受体染料,其将允许激发聚合物主链并且通过能量传递监测附接于主链的受体染料的发射。可用于本发明的受体染料包括FITC、CY3B、Cy55、Alexa 488、Texas red、Cy5、Cy7、Alexa 750和800CW。例如,具有本发明的受体染料的聚合物包括:

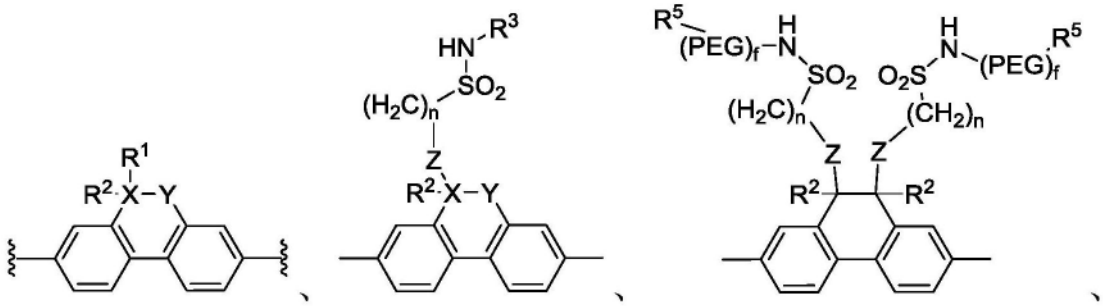
[0150] 

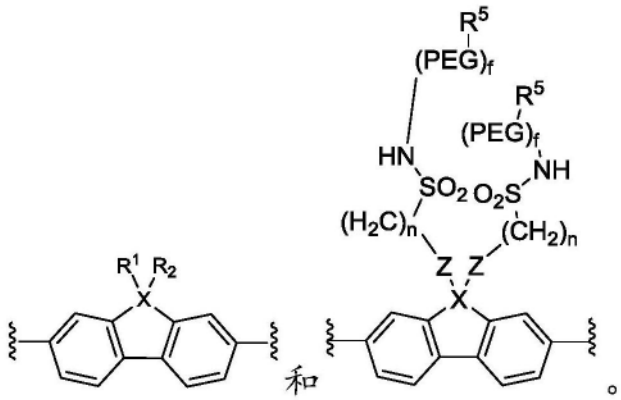
以及

[0151] 

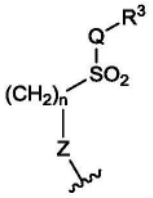
[0152] 单体

[0153] 本发明的单体包括二氢菲(DHP)和基于芴的单体。例如,本发明的单体包括:

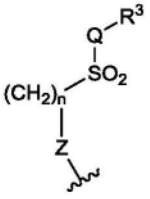


[0154] 

[0155] 其中单体的两个末端独立地或两者都为卤原子、硼酸酯或硼酸、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸酯、乙酰氧基、磺酸酯或磷酸酯,它们可进行Pd或镍盐催化的聚合反应。R^1独立地为能够赋予水/缓冲液中溶解性的侧基,并且每个R^1独立地选自铵烷基盐、铵烷氧基盐、铵低聚醚盐、磺酸烷基盐、磺酸烷氧基盐、磺酸低聚醚盐、亚磺酰胺基低聚醚、和

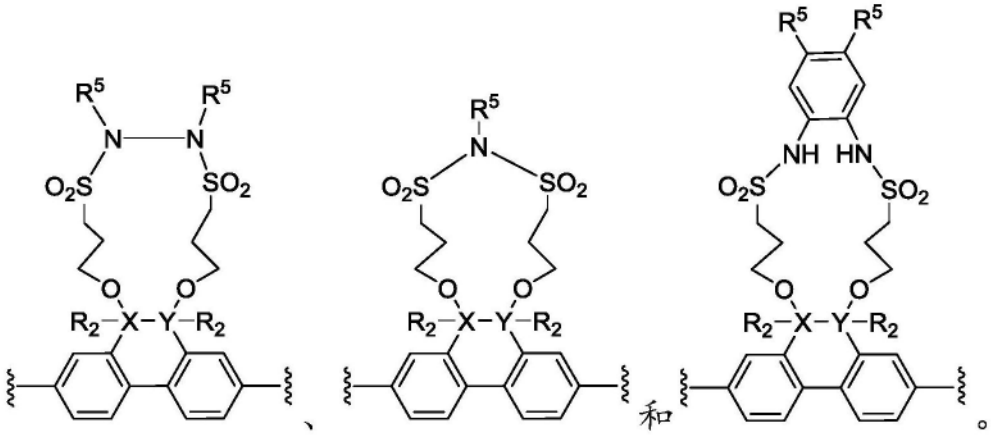


每个R^2独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、(杂)芳氧基、芳基、(杂)芳氨基、PEG、铵烷基盐、铵烷氧基盐、铵低聚醚盐、磺酸烷基盐、磺酸烷氧基盐、磺酸低聚醚盐、亚磺酰胺基低聚醚、和



每个R^3独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、(杂)芳氧基、芳基、(杂)芳氨基和PEG;每个Z独立地选自C、O和N;每个Q独立地选自键、NH、NR^4和CH_2;并且每个R^5独立地选自H、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氨基和C_1-C_{12}烷氧基。

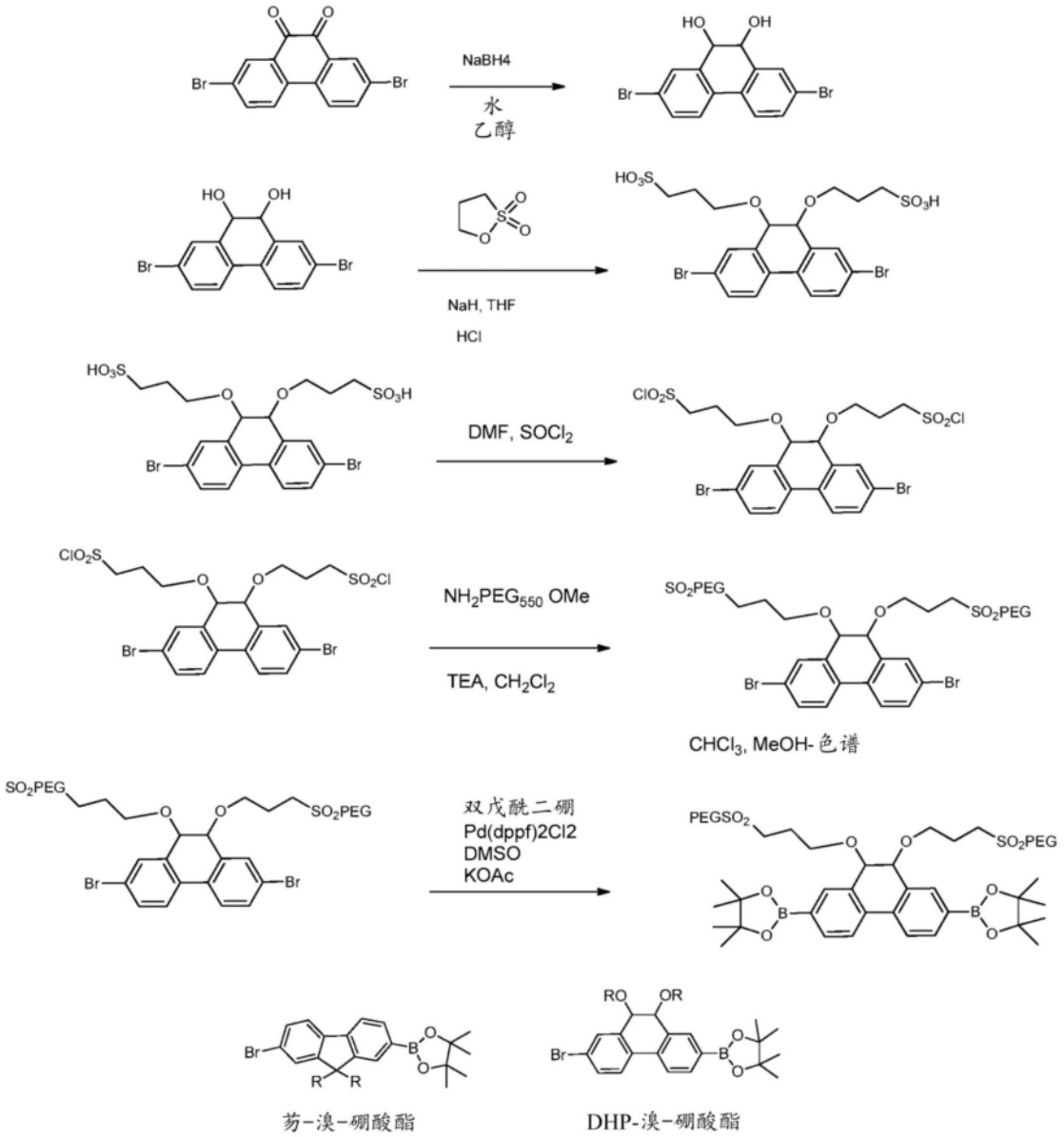
[0156] 在一些实施方案中,本发明的单体还包括桥联单体。例如,本发明的桥联单体包括:

[0157] 

[0158] 合成

[0159] 本发明的DHP单体可如下制备。

[0160]



[0161] 例如,2,7-二溴-反式-9,10-二氢菲-9,10-二醇(DHP-OH)可如下制备。在锥形烧瓶(2000L)中,将约26g $NaBH_4$加入搅拌的水-乙醇混合物(120mL+780mL)中。向该溶液中,分批但快速(在5分钟内)加入约24g 2,7-二溴菲,9,10-二酮。允许反应混合物搅拌一天。在反应结束时,溶液的颜色从橙红色变为浅黄色至白色。停止反应并用稀HCl酸中和反应混合物。中和后,过滤白色沉淀并用过量的水洗涤。如此获得的白色沉淀用非常冷(<-15℃)的乙醇(100mL)和甲醇(100mL)洗涤。

[0162] DHP-OSO_3H可如下制备。在2颈圆底烧瓶中,将DHP-OH(3.6g)和18C6(500mg)溶解在120mL THF中。将溶液用氮气吹扫(20分钟)并加入NaH(2g),同时继续进行氮气吹扫。溶液的颜色在10至15分钟内从无色变为淡粉色、深粉色、棕色和深绿色。在另一个RB中,将12克1,3丙磺酸内酯溶解在20mLTHF中并用氮气吹扫。通过加料漏斗在20至30分钟时间段内将该磺酸内酯溶液加入到DHP-OH溶液中。将反应物在室温下搅拌4至5小时。蒸发溶剂,并将沉淀物溶解在水中。加入丙酮以获得二钠盐形式的DPS白色沉淀。过滤沉淀物并再溶解于水(最少量)中,用HCl中和,再次在丙酮中沉淀。重复沉淀(2至3次),然后离心,得到DPS,为白色固

体。

[0163] DHP-OSO_2Cl可如下制备。将5g DHP-OSO_3H置于圆底烧瓶中并与25mL DMF混合。向其中逐滴加入约10mL $SOCl_2$并允许混合物搅拌过夜。第二天早上,将反应混合物倒入200mL水中,并且过滤沉淀物并干燥。

[0164] DHP-磺酰胺PEG可如下制备。将DHP-OSO_2Cl与2.2当量的PEG胺在二氯甲烷/TEA混合物中混合。在超声处理反应3小时后,将粗制产物在二氯甲烷中萃取,然后进行柱色谱(硅胶,MeOH-$CHCl_3$)。

[0165] DHP-磺酰胺PEG的二硼酸酯可如下制备。在氮气下将二溴化合物与DMSO混合,并向其中加入3当量的双戊酰二硼(bispinacolatodiboron)。使试剂与12当量的乙酸钾和4当量的Pd(dppf)Cl_2催化剂在80度下反应5小时。冷却反应混合物并用CHCl3/水萃取。浓缩有机层并通过柱色谱(硅胶,MeOH-$CHCl_3$)纯化。

[0166] 类似地,本发明的芴单体可如下制备。例如,FL-OSO_3H可如下制备。在2颈圆底烧瓶中,将5g芴与70g DMSO混合。将溶液用氮气吹扫(20分钟)并加入50%NaOH(12当量),同时继续进行氮气吹扫。溶液的颜色从无色变为深棕色。称量丙磺酸内酯(3eq)并溶解在DMSO中。将其在5分钟时间段内滴加到芴反应混合物。将反应物在室温下搅拌4至5小时。蒸发溶剂,并将沉淀物溶解在水中。加入丙酮以获得二钠盐形式的DPS白色沉淀。过滤沉淀物并再溶解于水(最少量)中,用HCl中和,并再次在丙酮中沉淀。重复沉淀(2至3次),然后离心,得到FL-OSO_3H,为白色固体。

[0167] FL-OSO_2Cl可如下制备。将5g FL-OSO_3H置于圆底烧瓶中并与25mL DMF混合。向其中逐滴加入约10mL $SOCl_2$并允许混合物搅拌过夜。第二天早上,将反应混合物倒入200mL水中,并且过滤沉淀物并干燥。

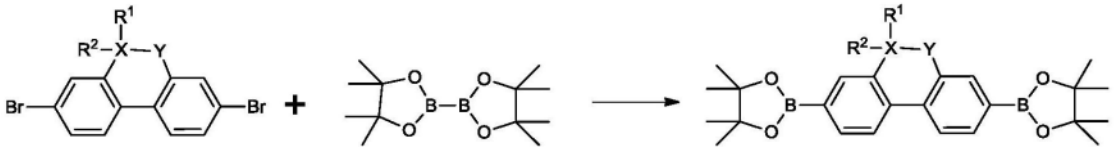
[0168] FL-磺酰胺PEG可如下制备。将FL-OSO_2Cl与2.2当量的PEG胺在二氯甲烷/TEA混合物中混合。在超声处理反应3小时后,将粗制产物在二氯甲烷中萃取,然后进行柱色谱(硅胶,MeOH-$CHCl_3$)。

[0169] FL-磺酰胺PEG的二硼酸酯可如下制备。在氮气下将二溴化合物与DMSO混合,并向其中加入3当量的双戊酰二硼。使试剂与12当量的乙酸钾和4当量的Pd(dppf)Cl_2催化剂在80度下反应5小时。冷却反应混合物并用$CHCl_3$/水萃取。浓缩有机层并通过柱色谱(硅胶,MeOH-$CHCl_3$)纯化。

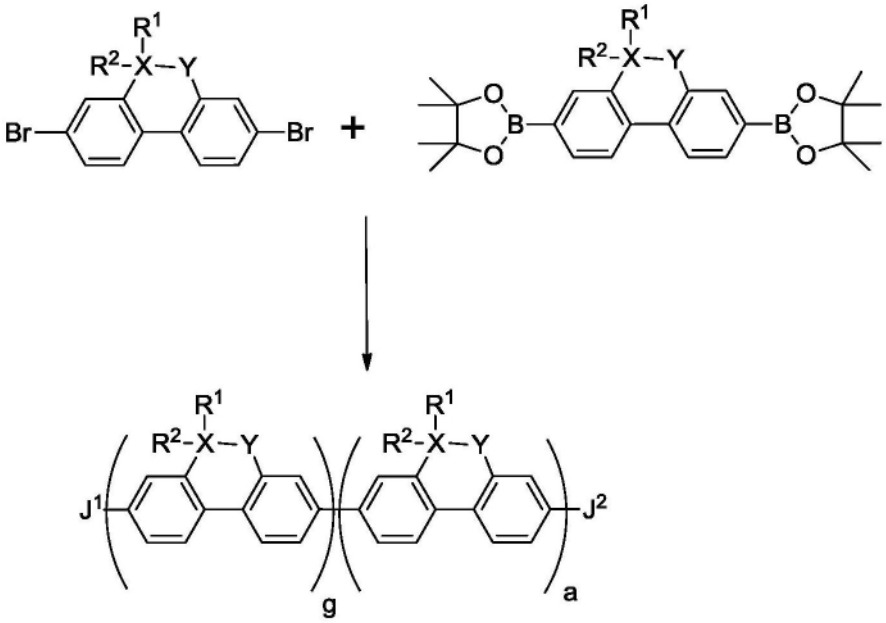
[0170] 聚合

[0171] 上述实施方案中描述的化合物可使用本领域已知的方法制备。在一些实施方案中,荧光聚合物可由二氢菲(DHP)单体与富电子连接基单元组合制成。在一些实施方案中,光亮聚合物染料可由芴单体与富电子连接基单元组合制成。在一些实施方案中,光亮聚合物染料可由DHP和芴单体与富电子连接基单元组合的组合制成。

[0172] 通常,上述聚合单体单元可使用本领域技术人员已知的聚合技术或使用本领域已知的方法结合本文所述的方法完成。例如,由二卤化物单体合成二硼酸酯衍生物可通过与双(戊酰)二硼的Suzuki偶联来完成:

[0173] 

[0174] 类似地,聚合也可通过Suzuki偶联实现:

[0175] 

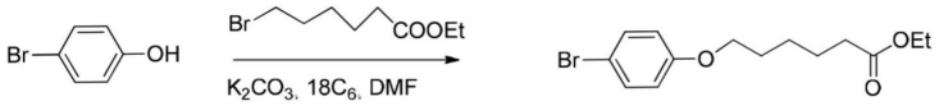
[0176] 其中J^1和J^2独立地为H、Br、$B(OH)_2$或硼酸酯。

[0177] 例如,聚合可如下进行。在圆底烧瓶中,将溴和硼单体两者加入(DMF-水)混合物中并用氮气吹扫10分钟。在氮气下,将约20当量的CsF和10%的Pd(OAc)2混合并在80摄氏度下加热。使用UV-Vis光谱和SEC色谱监测聚合。然后向反应混合物,加入含有适当官能团的封端剂(选自G1),并且3小时后加入第二封端剂(选自G2)。反应后,蒸发掉粗制反应混合物并通过凝胶过滤柱以除去小有机分子和低MW低聚物。

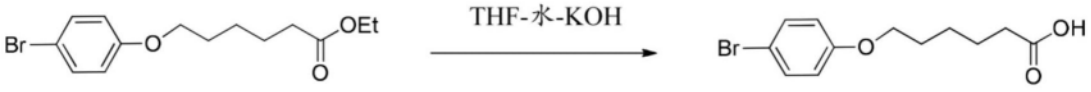
[0178] 封端单元

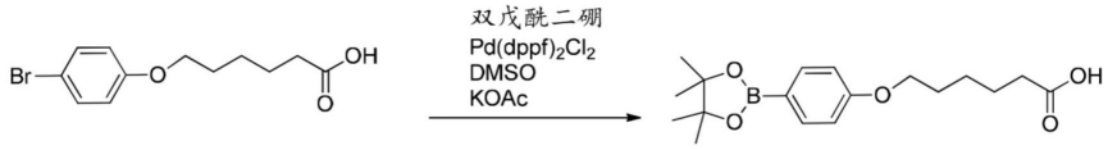
[0179] 连接基和封端单元可通过如前所述的类似机制与本发明的聚合物主链缀合。例如,封端单元的溴代和硼酸酯可用于附加聚合物的一端或两端。利用封端单元的溴代和硼酸酯两者将附加聚合物的两端。仅利用一种形式(封端单元的溴代或硼酸酯)将仅附加以其各自的互补物封端的那些末端,并且对称聚合可用于统计学上仅修饰聚合物的一个末端。对于不对称聚合物,该方法用于化学确保聚合物仅在单链末端修饰。封端单元也可通过首先使溴封端单元与具有Y端的聚合物反应并随后使聚合物与硼酸酯封端单元反应而不对称地附着。

[0180] 例如,本发明的封端剂可如下制备。



[0181]





[0182] 接合剂

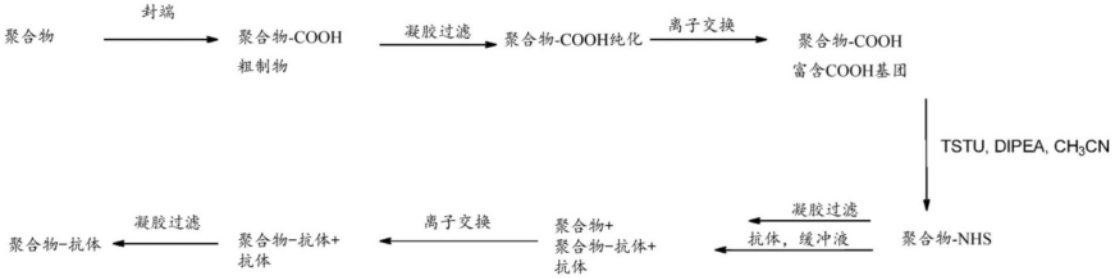
[0183] 本发明的“接合剂”可以为能够具体结合到目标分析物的任何分子或分子复合物。本发明的接合剂包括例如蛋白质、小有机分子、碳水化合物(包括多糖)、寡核苷酸、多核苷酸、脂质、亲和配体、抗体、抗体片段、核酸配体等。在一些实施方案中,接合剂为抗体或其片段。在本发明的上下文中的具体结合是指结合反应,其在异质群体存在下决定目标分析物的存在。因此,在指定的测定条件下,特定的接合剂优先结合特定蛋白质或特定蛋白质的同种型,并且不会以显著量结合样品中存在的其它蛋白质或其它同种型。

[0184] 当接合剂为抗体时,它们可以为单克隆或多克隆抗体。如本文所用的术语抗体是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白(Ig)分子的免疫活性部分。此类抗体包括但不限于多克隆、单克隆、单特异性多克隆抗体、抗体模拟物、嵌合、单链、Fab、Fab’和F(ab’)$_2$片段、Fv和Fab表达文库。

[0185] 复合物

[0186] 通常,本发明的荧光聚合物可使用本领域技术人员已知的技术或使用本领域已知的方法结合本文所述的方法与接合剂缀合。

[0187]



[0188] 例如,聚合物NHS酯的制备可如下进行。在干净的小瓶中取5mg聚合物,并且溶解在1mL无水CH_3CN中。向其中加入15mg TSTU并再搅拌2分钟。向其中加入100uL DIPEA并继续搅拌过夜,用石蜡膜盖密封。然后蒸发掉反应混合物中的有机溶剂,通过快速涡旋将粗制NHS溶解在约750uL的1xBBS缓冲液(pH 8.8)中,并将其传递至Zeba柱40K MWCO。将样品以2200RPM旋转沉淀2分钟并立即使用该聚合物NHS。

[0189] 聚合物NHS与CD4的缀合可如下进行。取1XBBS(~800uL)中的聚合物NHS,将其旋转沉淀,加入到0.6mg CD4并与100μL0.5M硼酸盐缓冲液(pH 9.0)混合。快速涡旋30秒,并允许在犁刀混合中混合3-4小时。

[0190] 通过Histrap HP柱纯化缀合物可如下进行。方法1:粗制反应后,使用Histrap HP柱纯化缀合物。使用1XPBS缓冲液加载样品并收集未结合级分。这可使用20CV的缓冲液来完成。然后改变缓冲液以洗涤具有缀合物和游离抗体两者的结合级分。这可使用1XPBS与0.25M咪唑运行10CV来完成。

[0191] 方法2:Hitrap SP Sepharose FF柱。平衡柱并使用pH 3.5的20mM柠檬酸盐缓冲液加载样品并收集未结合级分。这可使用20CV的缓冲液来完成。然后改变缓冲液以洗提具有缀合物和游离抗体两者的结合级分。这可使用pH 8.5的20mM Tris缓冲液运行20CV来完成。

[0192] 方法3:将粗制缀合物加载在配备有300K MWCO膜的切向流过滤系统中。使用1XPBS洗涤缀合物,直到滤液在405nm处显示没有吸收。然后将化合物浓缩。

[0193] 通过SEC柱纯化缀合物可如下进行。使用1XPBS将含有游离抗体的粗制缀合物加载到尺寸排阻柱中。在检查吸收光谱后汇集管并浓缩在具有30KDa MWCO离心浓缩器的Amicon Ultra-15中。

[0194] IV.检测分析物的方法

[0195] 概述

[0196] 本发明提供了一种用于检测样品中的分析物的方法,该方法包括:提供怀疑含有分析物的样品;提供缀合的聚合物复合物,该缀合的聚合物复合物包含与水溶性缀合的聚合物缀合的接合剂。接合剂能够与分析物相互作用。将光源施加到样品,该光源可激发聚合物并检测从缀合的聚合物复合物发出的光。在典型的测定中,本发明的荧光聚合物可用波长在约395nm和约415nm之间的光激发。发射的光通常在约415nm和约475nm之间。另选地,激发光可具有在约340nm和约370nm之间的波长,并且发射的光在约390nm和约420nm之间。

[0197] 样品

[0198] 本发明方法中的样品可以为,例如,血液、骨髓、脾细胞、淋巴细胞、骨髓抽吸物(或从骨髓获得的任何细胞)、尿液(灌洗液)、血清、唾液、脑脊髓液、尿液、羊水、间质液、粪便、粘液或组织(例如,肿瘤样品、解聚的组织、解聚的实体瘤)。在某些实施方案中,样品为血液样品。在一些实施方案中,血液样品为全血。可使用标准临床程序从受试者获得全血。在一些实施方案中,样品为一种或多种全血细胞的子集(例如,红细胞、白细胞、淋巴细胞(例如,T细胞、B细胞或NK细胞)、吞噬细胞、单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、血小板或具有一种或多种可检测标记物的任何细胞)。在一些实施方案中,样品可来自细胞培养物。

[0199] 受试者可以为人(例如患有疾病的患者)、商业上重要的哺乳动物,包括例如猴、牛或马。样品也可从家庭宠物包括例如狗或猫获得。在一些实施方案中,受试者为用作疾病动物模型或用于药物筛选的实验动物,例如小鼠、大鼠、兔或豚鼠。

[0200] 分析物

[0201] 如本文所用的“分析物”是指物质,例如分子,其丰度/浓度通过一些分析程序确定。例如,在本发明中,分析物可以为蛋白质、肽、核酸、脂质、碳水化合物或小分子。

[0202] 目标分析物可以为例如核酸(DNA、RNA、mRNA、tRNA或rRNA)、肽、多肽、蛋白质、脂

质、离子、单糖、寡糖、多糖、脂蛋白、糖蛋白、糖脂或其片段。在一些实施方案中，目标分析物为蛋白质并且可以为例如结构微丝、微管和中间丝蛋白、细胞器官特异性标记、蛋白酶体、跨膜蛋白、表面受体、核孔蛋白、蛋白质/肽移位酶、蛋白质折叠伴侣蛋白、信号转导支架、离子通道等。蛋白质可以为可激活的蛋白质或在患病或异常细胞中差异表达或激活的蛋白质，包括但不限于转录因子、DNA和/或RNA结合和修饰蛋白，核输入和输出受体，细胞凋亡或存活调节因子等。

[0203] 测定

[0204] 利用接合剂和荧光标记来定量结合分子的测定系统为众所周知的。此类系统的示例包括流式细胞术、扫描细胞仪、成像细胞仪、荧光显微镜和共聚焦荧光显微镜。

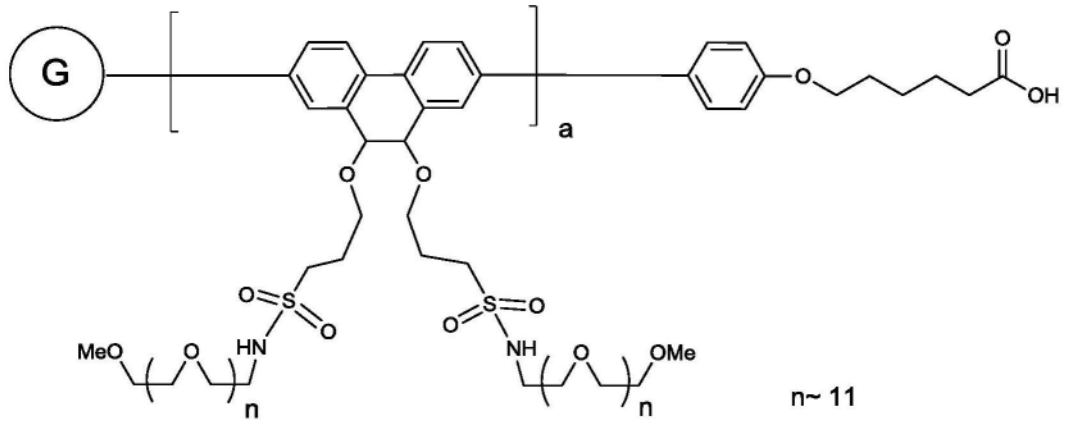
[0205] 在一些实施方案中，流式细胞术用于检测荧光。适用于该用途的许多装置为可用的并且为本领域技术人员已知的。示例包括BCI Navios、Gallios、Aquios和CytoFLEX流式细胞术。

[0206] 在其它实施方案中，该测定为免疫测定法。可用于本发明的免疫测定法的示例包括但不限于荧光发光测定(FLA)等。该测定也可在蛋白质阵列上进行。

[0207] 当接合剂为抗体时，也可使用抗体或多抗体夹心测定。夹心测定是指使用连续识别事件来构建各种接合剂层和报告元件以表示特定分析物的存在。夹心测定的示例公开于美国专利No.4,486,530和其中提到的参考文献中。

[0208] V.实施例

[0209] 实施例1:DHP聚合物复合物的制备

[0210] 

[0211] 方法1:在圆底烧瓶中，将二溴DHP和二硼酸DHP单体(1:1)两者加入(DMF-水)混合物中并用氮气吹扫10分钟。在氮气下，将约20当量的CsF和10％的Pd(OAc)2混合并在80摄氏度下加热。使用UV-Vis光谱和SEC色谱监测聚合。然后向反应混合物，加入含有适当官能团的封端剂(选自G1)，并且3小时后加入第二封端剂(选自G2)。反应后，蒸发掉粗制反应混合物并通过凝胶过滤柱以除去小有机分子和低MW低聚物。然后粗制聚合物通过配备有100K MWCO膜的切向流过滤系统。使用20％乙醇洗涤，直到滤液的吸收减少。

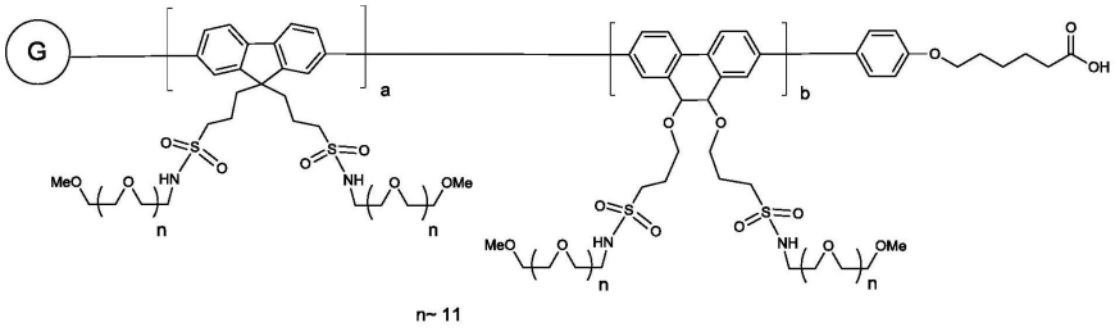
[0212] 方法2:另选地，可通过自聚合DHP分子的溴硼酸酯来进行聚合。在圆底烧瓶中，将DHP溴代硼酸酯加入(DMF-水)混合物中并用氮气吹扫10分钟。在氮气下，将约10当量的CsF和5％的Pd(OAc)2混合并在80摄氏度下加热。使用UV-Vis光谱和SEC色谱监测聚合。然后向反应混合物，加入含有适当官能团的封端剂(选自G1)，并且3小时后加入第二封端剂(选自G2)。反应后，蒸发掉粗制反应混合物并通过凝胶过滤柱以除去小有机分子和低MW低聚物。

然后粗制聚合物通过配备有100K MWCO膜的切向流过滤系统。使用20％乙醇洗涤,直到滤液的吸收减少。

[0213] 方法3:在圆底烧瓶中加入二溴二氢菲和二硼酸二氢蒽(diboronic dihydrophanenthrene)单体(1:1)两者并溶解在含有10当量K_2CO_3和3％Pd(PPh3)4的THF-水(4:1)混合物中。将反应混合物置于Schlenk管线上并用三次冷冻-泵-解冻循环脱气,并且然后在氮气下在剧烈搅拌下加热至80摄氏度持续18小时。然后向反应混合物,在过量氮气压力下通过套管加入含有适当官能团的封端剂(选自G1),并且3小时后加入第二种封端剂(选自G2)。反应后,蒸发掉粗制反应混合物并通过凝胶过滤柱以除去小有机分子和低MW低聚物。然后粗制聚合物通过配备有100K MWCO膜的切向流过滤系统。使用20％乙醇洗涤,直到滤液的吸收减少。

[0214] 方法4:另选地,可通过自聚合二氢菲分子的溴硼酸酯来进行聚合。在圆底烧瓶中加入二氢菲溴硼酸酯并溶解在含有10当量K_2CO_3和3％Pd(PPh3)4的THF-水(4:1)混合物中。将反应混合物置于Schlenk管线上并用三次冷冻-泵-解冻循环脱气,并且然后在氮气下在剧烈搅拌下加热至80摄氏度持续18小时。然后向反应混合物,在过量氮气压力下通过套管加入含有适当官能团的封端剂(选自G1),并且3小时后加入第二种封端剂(选自G2)。反应后,蒸发掉粗制反应混合物并通过凝胶过滤柱以除去小有机分子和低MW低聚物。然后粗制聚合物通过配备有100K MWCO膜的切向流过滤系统。使用20％乙醇洗涤,直到滤液的吸收减少。

[0215] 实施例2:芴-DHP共聚物复合物的制备

[0216] 

n~11

[0217] 方法1:在圆底烧瓶中,将二溴DHP和二硼酸芴单体(1:1)两者加入(DMF-水)混合物中并用氮气吹扫10分钟。在氮气下,将约20当量的CsF和10％的Pd(OAc)2混合并在80摄氏度下加热。使用UV-Vis光谱和SEC色谱监测聚合。然后向反应混合物,加入含有适当官能团的封端剂(选自G1),并且3小时后加入第二封端剂(选自G2)。反应后,蒸发掉粗制反应混合物并通过凝胶过滤柱以除去小有机分子和低MW低聚物。然后粗制聚合物通过配备有100K MWCO膜的切向流过滤系统。使用20％乙醇洗涤,直到滤液的吸收减少。

[0218] 方法2:在圆底烧瓶中,将二溴芴和二硼酸DHP单体(1:1)两者加入(DMF-水)混合物中并用氮气吹扫10分钟。在氮气下,将约20当量的CsF和10％的Pd(OAc)2混合并在80摄氏度下加热。使用UV-Vis光谱和SEC色谱监测聚合。然后向反应混合物,加入含有适当官能团的封端剂(选自G1),并且3小时后加入第二封端剂(选自G2)。反应后,蒸发掉粗制反应混合物并通过凝胶过滤柱以除去小有机分子和低MW低聚物。然后粗制聚合物通过配备有100K MWCO膜的切向流过滤系统。使用20％乙醇洗涤,直到滤液的吸收减少。

[0219] 方法3:在圆底烧瓶中加入二溴二氢菲和二硼酸芴单体(1:1)两者并溶解在含有10

当量K_2CO_3和3％Pd(PPh$_3$)$_4$的THF-水(4:1)混合物中。将反应混合物置于Schlenk管线上并用三次冷冻-泵-解冻循环脱气,并且然后在氮气下在剧烈搅拌下加热至80摄氏度持续18小时。然后向反应混合物,在过量氮气压力下通过套管加入含有适当官能团的封端剂(选自G1),并且3小时后加入第二种封端剂(选自G2)。反应后,蒸发掉粗制反应混合物并通过凝胶过滤柱以除去小有机分子和低MW低聚物。然后粗制聚合物通过配备有100K MWCO膜的切向流过滤系统。使用20％乙醇洗涤,直到滤液的吸收减少。

[0220] 方法4:在圆底烧瓶中加入二溴芴和二硼酸二氢菲单体(1:1)并溶解在含有10当量K_2CO_3和3％Pd(PPh3)4的THF-水(4:1)混合物中。将反应混合物置于Schlenk管线上并用三次冷冻-泵-解冻循环脱气,并且然后在氮气下在剧烈搅拌下加热至80℃持续18小时。然后向反应混合物,在过量氮气压力下通过套管加入含有适当官能团的封端剂(选自G1),并且3小时后加入第二种封端剂(选自G2)。反应后,蒸发掉粗制反应混合物并通过凝胶过滤柱以除去小有机分子和低MW低聚物。然后粗制聚合物通过配备有100K MWCO膜的切向流过滤系统。使用20％乙醇洗涤,直到滤液的吸收减少。

[0221] 实施例3荧光发射光谱的比较

[0222] 进行芴(F1-F1)、二氢菲(DHP-DHP)和芴-DHP(DHP-F1)聚合物的荧光发射光谱的比较。含有DHP的聚合物的荧光最大值显示出426nm至428nm的显著差异,而基于芴的聚合物显示出421nm的最大值(图1)。

[0223] 实施例4吸收光谱的比较

[0224] 测量芴(F1-F1)聚合物和二氢菲(DHP-DHP)聚合物两者的吸收光谱。该图显示了在390nm和410nm处DHP-DHP聚合物的吸收(黑色曲线),而F1-F1(灰色曲线)聚合物显示在400nm附近的最大值。在不同浓度下测量样品(图2)。

[0225] 实施例5CD4信噪比

[0226] 进行用新的聚合物标记的抗人CD4和Pacific Blue标记的CD4染色的裂解全血的流式细胞术分析。聚合物染料的阳性信号强度比Pacific Blue高近5倍(图3)。

[0227] 实施例6

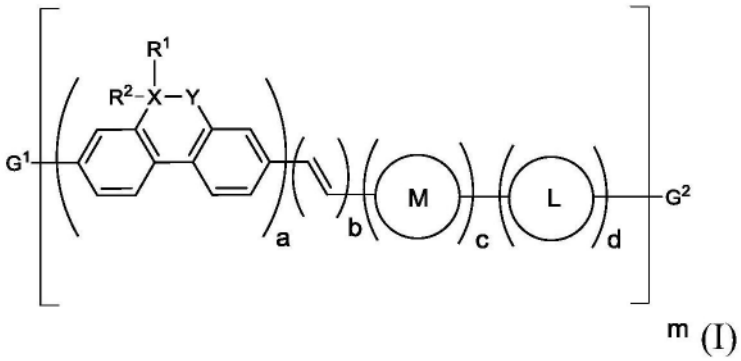
[0228] 发现本发明的聚合物在与抗体缀合时具有吸收、荧光、亮度、分子量、多分散性、染料与蛋白质比的某些物理和化学特征等。这些参数的优选范围显示在图4的表中。

[0229] 测量串联聚合物的激发和发射光谱。在聚合物最大值(405nm)下进行激发,并从附接至主链上的各种受体染料观察到的发射(图5)。

[0230] 应当理解,本文描述的实施例和实施方案仅用于说明目的,并且本领域技术人员可提出对其进行各种修改或改变,并且包括在本申请的精神和范围内以及所附权利要求的范围内。出于所有目的,本文引用的所有出版物、专利和专利申请均通过引用整体并入本文。

[0231] 本发明还包括例如以下实施方案:

[0232] 实施方案1:一种水溶性荧光聚合物,所述水溶性荧光聚合物具有式I的结构:

[0233] 

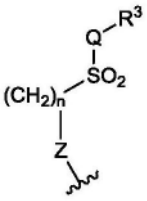
(I)

[0234] 其中;

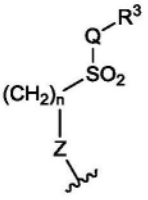
[0235] 每个X独立地选自C和Si;

[0236] 每个Y独立地选自键、CR^1R^2和SiR^1R^2;

[0237] 当Y为键时,X直接键合到两个环;

[0238] 每个R^1独立地选自聚乙二醇(PEG)、铵烷基盐、铵烷氧基盐、铵低聚醚盐、磺酸烷基盐、磺酸烷氧基盐、磺酸低聚醚盐、亚磺酰胺基低聚醚、和

;

[0239] 每个R^2独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、(杂)芳氧基、芳基、(杂)芳氨基、PEG基团、铵烷基盐、铵烷氧基盐、铵低聚醚盐、磺酸烷基盐、磺酸烷氧基盐、磺酸低聚醚盐、亚磺酰胺基低聚醚、和

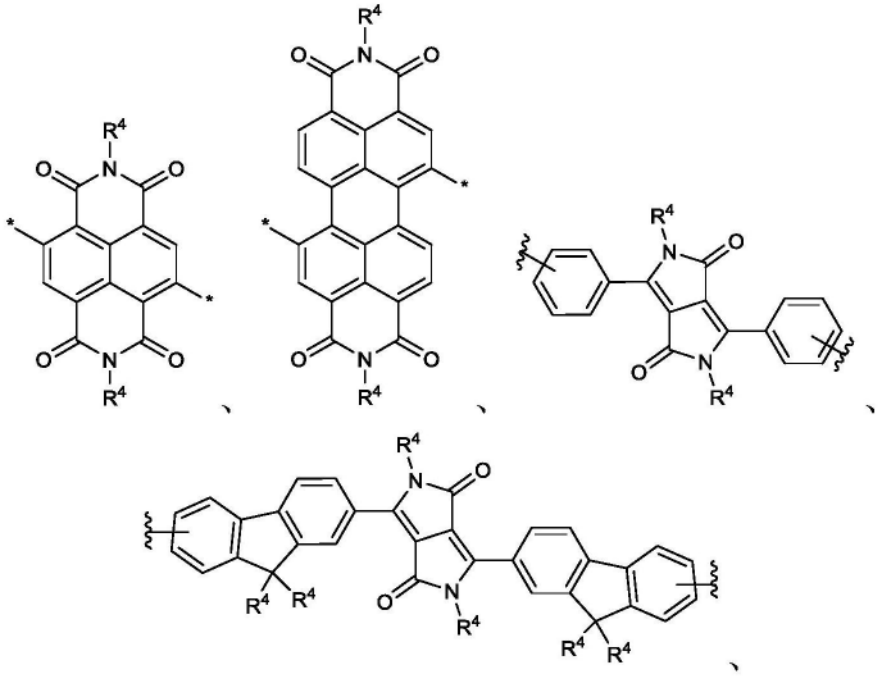
;

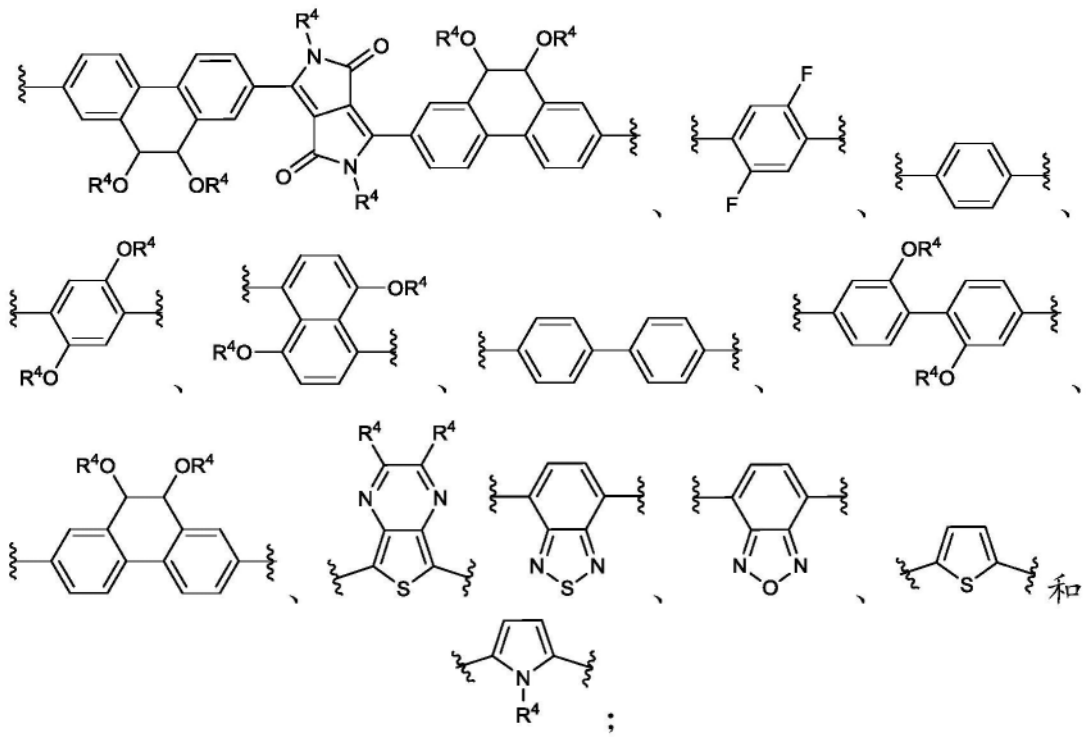
[0240] 每个R^3独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、(杂)芳氧基、芳基、(杂)芳氨基和PEG基团;

[0241] 每个Z独立地选自C、O和N;

[0242] 每个Q独立地选自键、NH、NR^4和CH_2;

[0243] 每个M独立地为富电子连接基单元,所述富电子连接基单元能够改变聚合物带隙并且沿聚合物主链均匀或无规分布,并且各自独立地选自:

[0244] 

[0245] 

[0246] 其中,

[0247] 每个R^4为非离子侧基,所述非离子侧基能够赋予超过10mg/mL的水中溶解度,并且各自独立地选自卤素、羟基、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氨基、$(CH_2)_x$、$(OCH_2$-$CH_2)_y$、OCH_3、和C_2-C_{18}(杂)芳基基团,其中每个x'独立地为0至20的整数;每个y'独立地为0至50的整数;

[0248] 每个任选的连接基L为沿所述聚合物主链均匀或无规分布并被一个或多个用选自胺、氨基甲酸酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及用于与另一种基质、受体染料、分子或接合剂缀合的其受保护基团的官能团封端的侧链取代的芳基或杂芳基基团;

[0249] G^1和G^2各自独立地选自氢、卤素、炔烃、任选地取代的芳基、任选地取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸酯、磷酸酯、硼酸取代的芳基、硼酸酯取代的芳基、硼酸酯、硼酸、任选地取代的二氢菲(DHP)、任选地取代的芴、芳基或杂芳基,所述芳基或杂芳基被一个或多个用选自胺、氨基甲酸酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及用于与基质或接合剂缀合的其受保护基团的官能团封端的侧链取代;

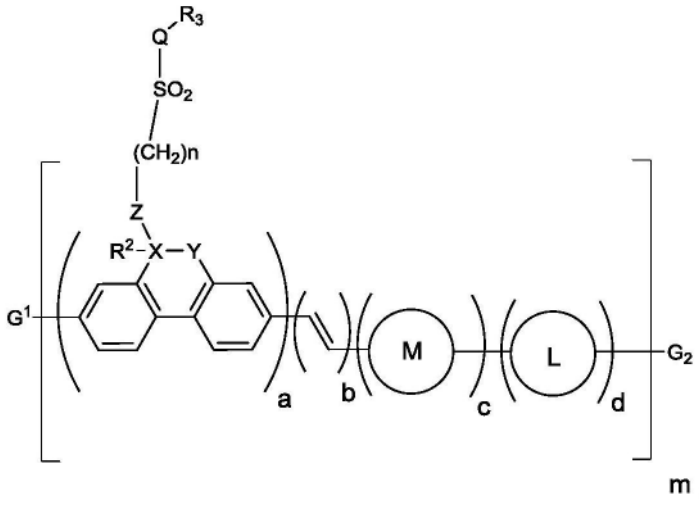
[0250] a、c和d定义所述结构内每个单元的mol%,其每个可以均匀或随机重复,并且其中a为10%至100%的mol%,c为0%至90%的mol%,并且每个d为0%至25%的mol%;

[0251] 每个b独立地为0或1;

[0252] m为1至约10,000的整数;并且

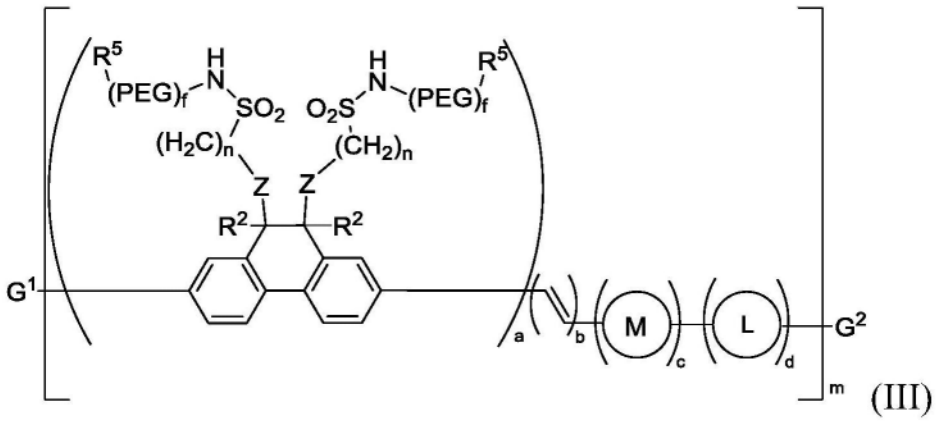
[0253] 每个n独立地为1至20的整数。

[0254] 实施方案2:根据实施方案1所述的聚合物,其中所述聚合物具有式II的结构:

[0255] 

(II)。

[0256] 实施方案3:根据实施方案1所述的聚合物,其中所述聚合物具有式III的结构:

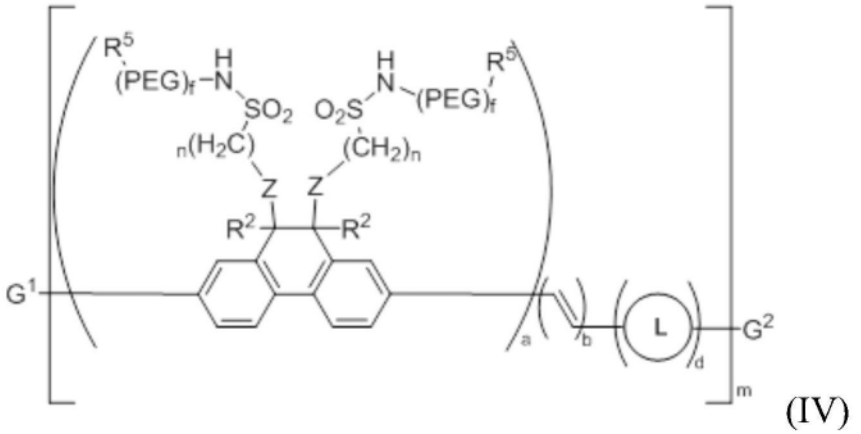
[0257] 

(III)

[0258] 其中,

[0259] 每个f独立地为0至50的整数,并且每个R^5独立地选自H、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氨基和C_1-C_{12}烷氧基。

[0260] 实施方案4.根据实施方案1所述的聚合物,其中所述聚合物具有式IV的结构:

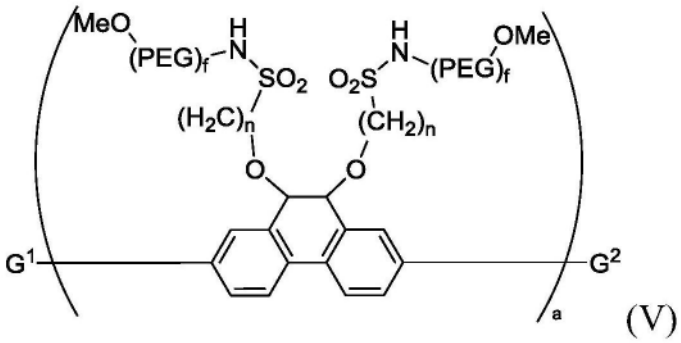
[0261] 

(IV)

[0262] 其中,

[0263] 每个f独立地为0至50的整数,并且每个R^5独立地选自H、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氨基和C_1-C_{12}烷氧基。

[0264] 实施方案5.根据实施方案1所述的聚合物,其中所述聚合物具有式V的结构:

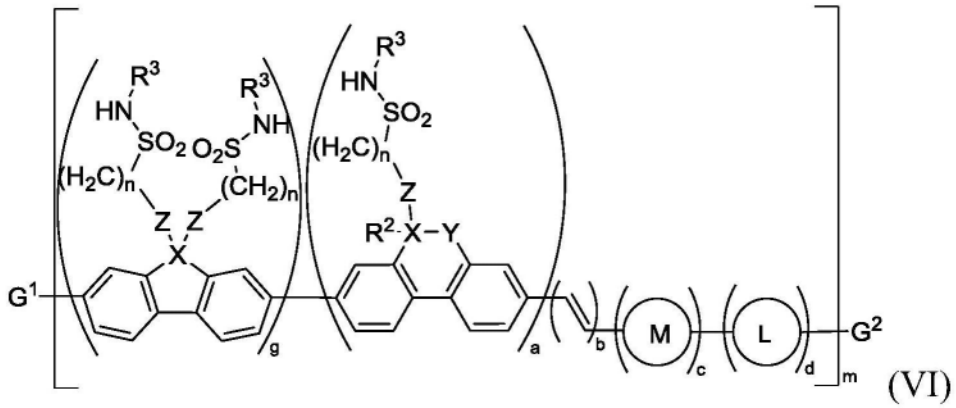
[0265] 

(V)

[0266] 其中,

[0267] 每个f独立地为0至50的整数。

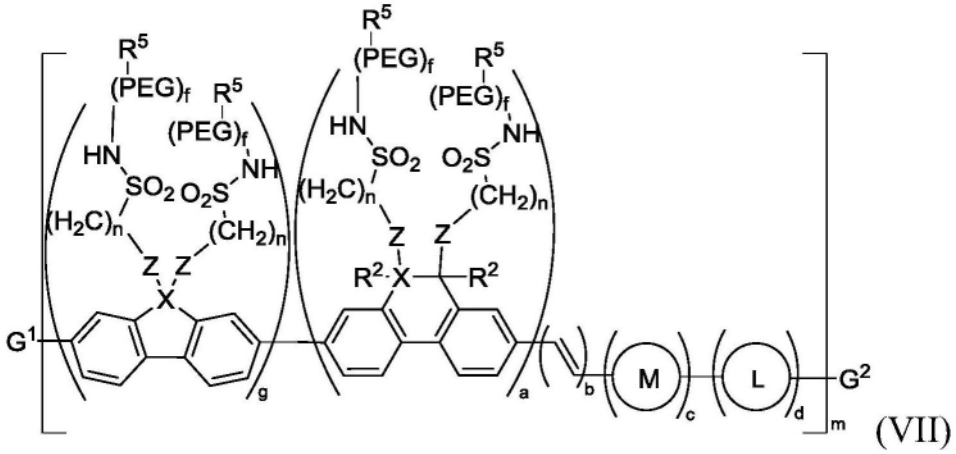
[0268] 实施方案6.根据实施方案1所述的聚合物,其中所述聚合物为共聚物并具有式VI的结构:

[0269] 

(VI)

[0270] 其中g和a一起为10%至100%的mol%。

[0271] 实施方案7.根据实施方案1所述的聚合物,其中所述聚合物为共聚物并具有式VII的结构:

[0272] 

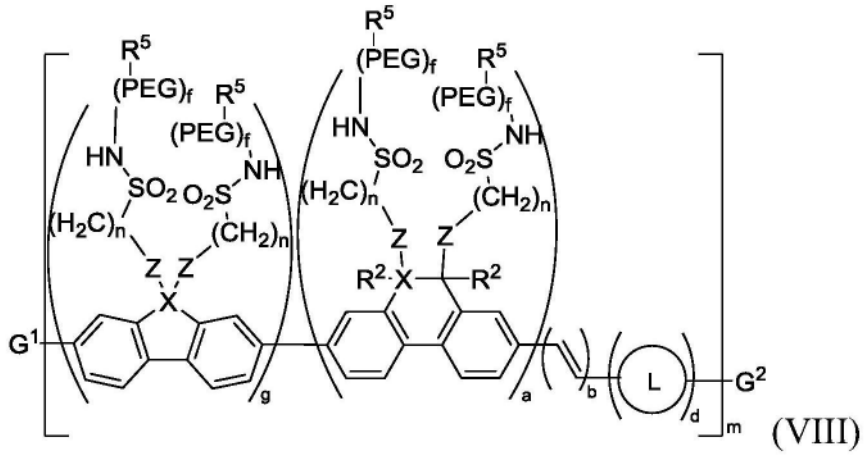
(VII)

[0273] 其中,

[0274] 每个g和a一起为10%至100%的mol%;并且

[0275] 每个f独立地为0至50的整数,并且每个R^5独立地选自H、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氨基和C_1-C_{12}烷氧基。

[0276] 实施方案8.根据实施方案1所述的聚合物,其中所述聚合物为共聚物并具有式VIII的结构:

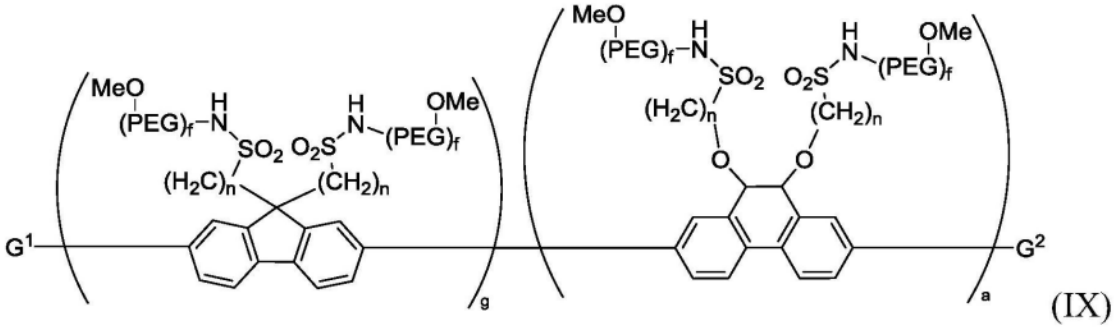
[0277] 

(VIII)

[0278] 其中,

[0279] 每个f独立地为0至50的整数,并且每个R^5独立地选自H、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氨基和C_1-C_{12}烷氧基。

[0280] 实施方案9.根据实施方案1所述的聚合物,其中所述聚合物为共聚物并具有式IX的结构:

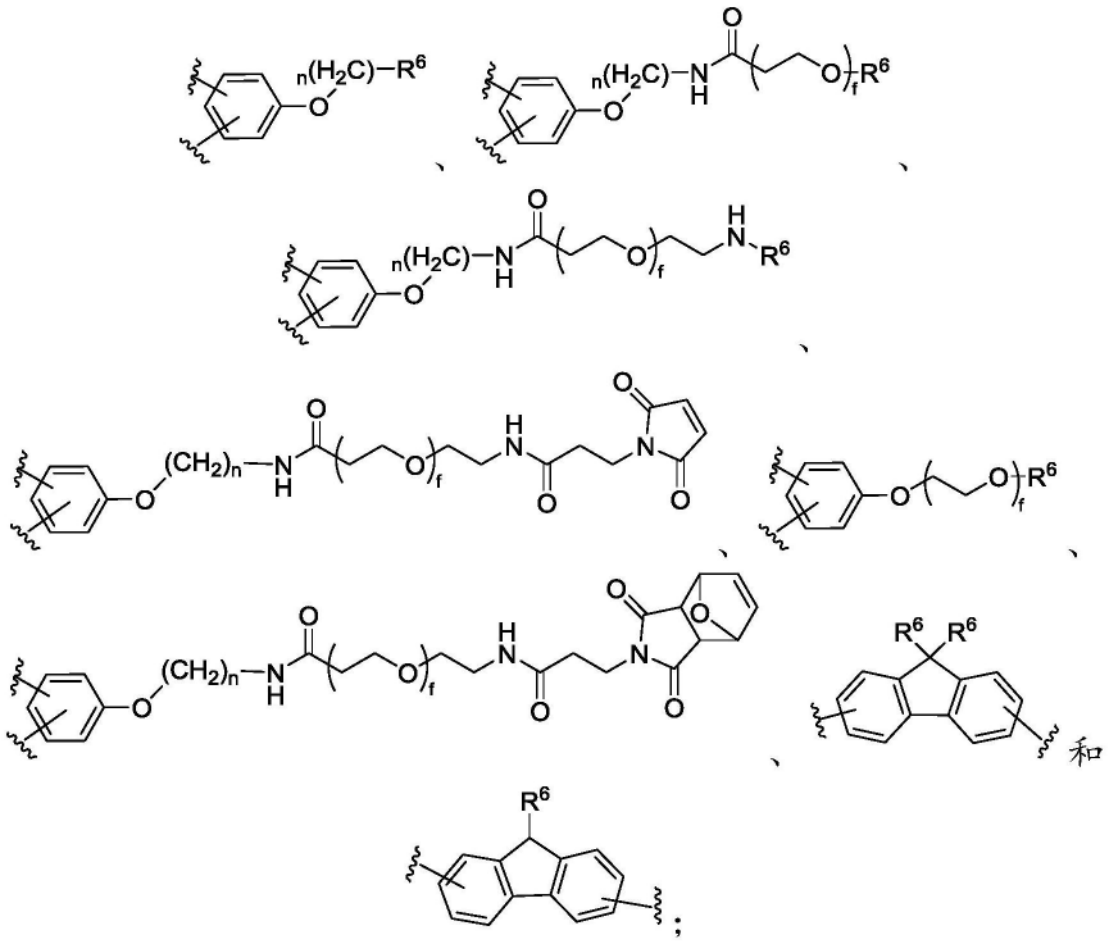
[0281] 

(IX)

[0282] 其中，

[0283] 每个f独立地为0至50的整数。

[0284] 实施方案10.根据实施方案1所述的聚合物，其中L各自独立地选自：

[0285] 

[0286] 其中，

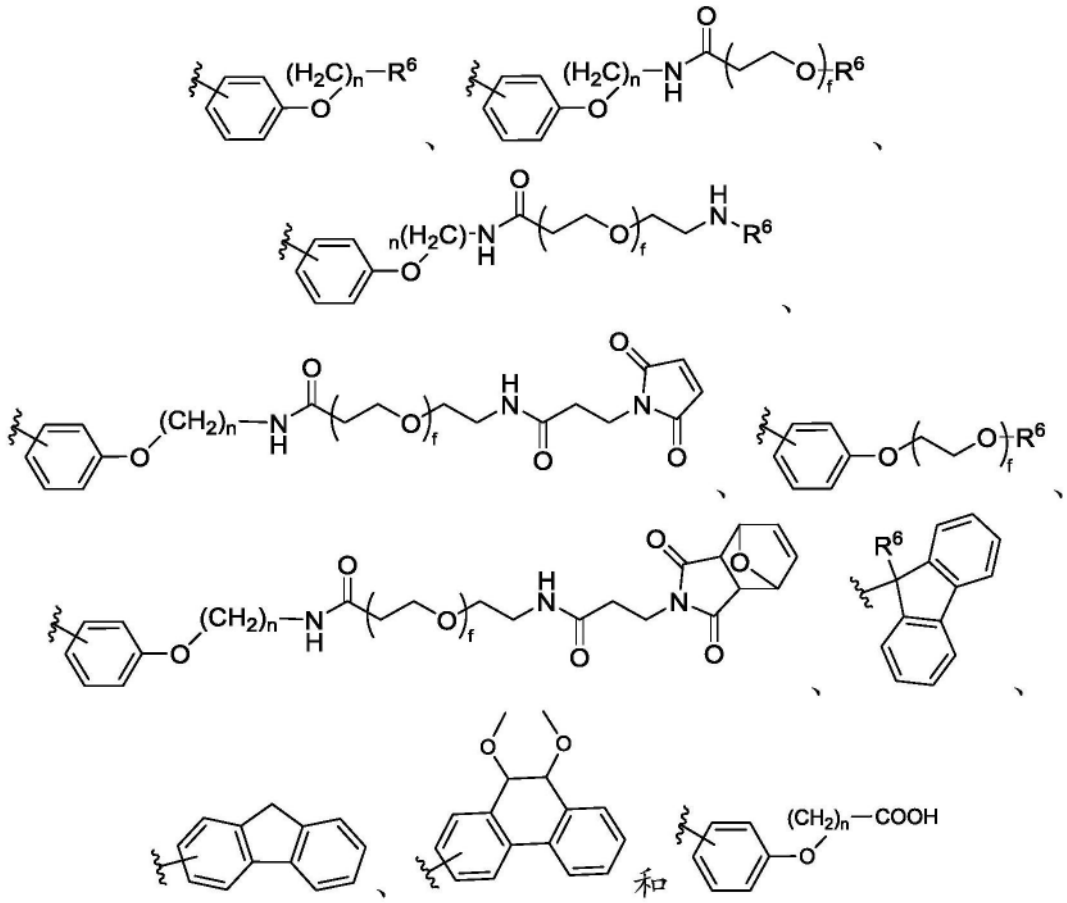
[0287] 每个R^6独立地选自：H、OH、SH、NHCOO-叔丁基、$(CH_2)_nCOOH$、$(CH_2)_nCOOCH_3$、$(CH_2)_nNH_2$、$(CH_2)_nNH-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOOH$、$(CH_2)_nNHCO-(CH_2)_n-CO-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOO-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOOC(CH_3)_3$、$(CH_2)_nNHCO(C_3-C_{12})$环烷基、$(CH_2)_nNHCO(CH_2CH_2O)_f$、$(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOOH$、$(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOO(CH_2)_nCH_3$、$(CH_2)_n(OCH_2CH_2)_fOCH_3$、N-马来酰亚胺、卤素、$C_2-C_{12}$烯烃、$C_2-C_{12}$炔烃、$C_3-C_{12}$环烷基、$C_1-C_{12}$卤代烷基、$C_1-C_{12}$(杂)芳基、$C_1-C_{12}$(杂)芳氨基、和任选地被一个或多个卤素、羟基、$C_1-C_{12}$烷氧基或$(OCH_2CH_2)_fOCH_3$取代的苄基；

[0288] 每个f独立地为0至50的整数；并且

[0289] 每个n独立地为1至20的整数。

[0290] 实施方案11.根据实施方案1所述的聚合物,其中G^1和G^2各自独立地选自任选地取代的二氢菲(DHP)、任选地取代的芴、被一个或多个用官能团封端的侧链取代的芳基、和被一个或多个用官能团封端的侧链取代的杂芳基。

[0291] 实施方案12.根据实施方案1所述的聚合物,其中G^1和G^2各自独立地选自:

[0292] 

[0293] 其中,

[0294] 每个R^6独立地选自:H、OH、SH、NHCOO-叔丁基、$(CH_2)_nCOOH$、$(CH_2)_nCOOCH_3$、$(CH_2)_nNH_2$、$(CH_2)_nNH-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOOH$、$(CH_2)_nNHCO-(CH_2)_n-CO-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOO-(CH_2)_n-CH_3$、$(CH_2)_nNHCOOC(CH_3)_3$、$(CH_2)_nNHCO(C_3-C_{12})$环烷基、$(CH_2)_nNHCO(CH_2CH_2O)_f$、$(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOOH$、$(CH_2)_nNHCO(CH_2)_nCOO(CH_2)_nCH_3$、$(CH_2)_n(OCH_2CH_2)_fOCH_3$、N-马来酰亚胺、卤素、$C_2-C_{12}$烯烃、$C_2-C_{12}$炔烃、$C_3-C_{12}$环烷基、$C_1-C_{12}$卤代烷基、$C_1-C_{12}$(杂)芳基、$C_1-C_{12}$(杂)芳氨基、和任选地被一个或多个卤素、羟基、$C_1-C_{12}$烷氧基或$(OCH_2CH_2)_fOCH_3$取代的苄基;

[0295] 每个f独立地为0至50的整数;并且

[0296] 每个n独立地为1至20的整数。

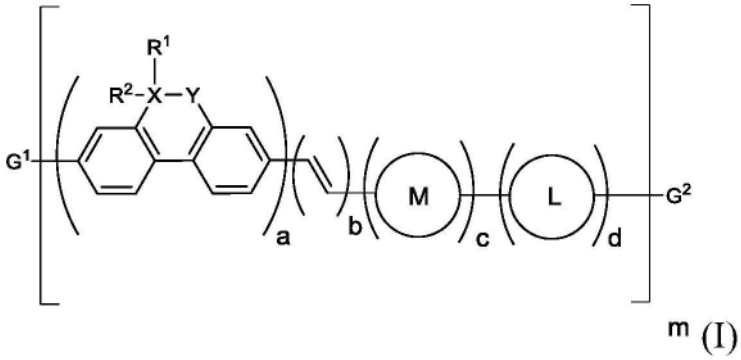
[0297] 实施方案13.根据实施方案1所述的聚合物,还包含与所述聚合物连接的接合剂。

[0298] 实施方案14.根据实施方案13所述的聚合物,其中所述接合剂为抗体。

[0299] 实施方案15.一种用于检测样品中的分析物的方法,所述方法包括:

[0300] 提供怀疑含有所述分析物的样品;

[0301] 使所述样品与缀合至具有式I的结构的水溶性聚合物的接合剂接触:

[0302] 

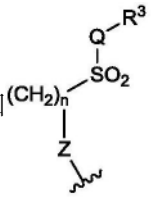
(I)

[0303] 其中;

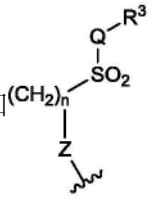
[0304] 每个X独立地选自C和Si;

[0305] 每个Y独立地选自键、CR^1R^2和SiR^1R^2;

[0306] 当Y为键时,X直接键合到两个环;

[0307] 每个R^1独立地选自PEG、铵烷基盐、铵烷氧基盐、铵低聚醚盐、磺酸烷基盐、磺酸烷氧基盐、磺酸低聚醚盐、亚磺酰胺基低聚醚、和

;

[0308] 每个R^2独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、(杂)芳氧基、芳基、(杂)芳氨基、PEG基团、铵烷基盐、铵烷氧基盐、铵低聚醚盐、磺酸烷基盐、磺酸烷氧基盐、磺酸低聚醚盐、亚磺酰胺基低聚醚、和

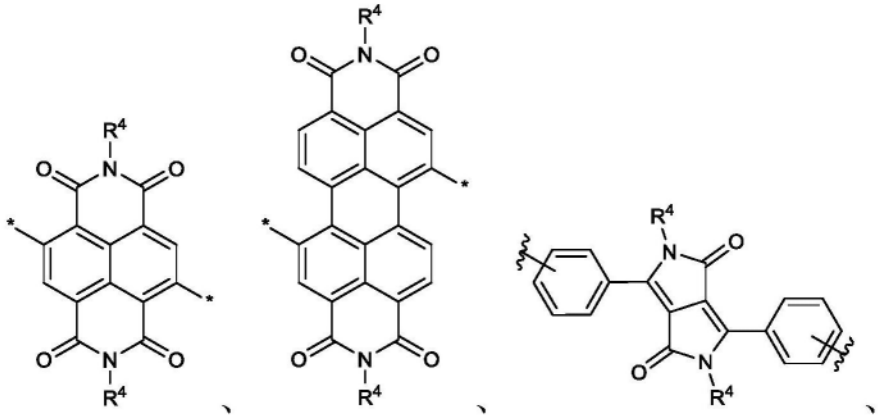
;

[0309] 每个R^3独立地选自H、烷基、烯烃、炔烃、环烷基、卤代烷基、烷氧基、(杂)芳氧基、芳基、(杂)芳氨基和PEG基团;

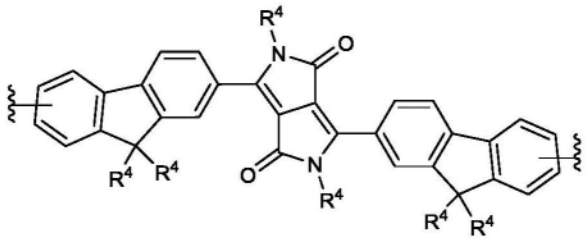
[0310] 每个Z独立地选自C、O和N;

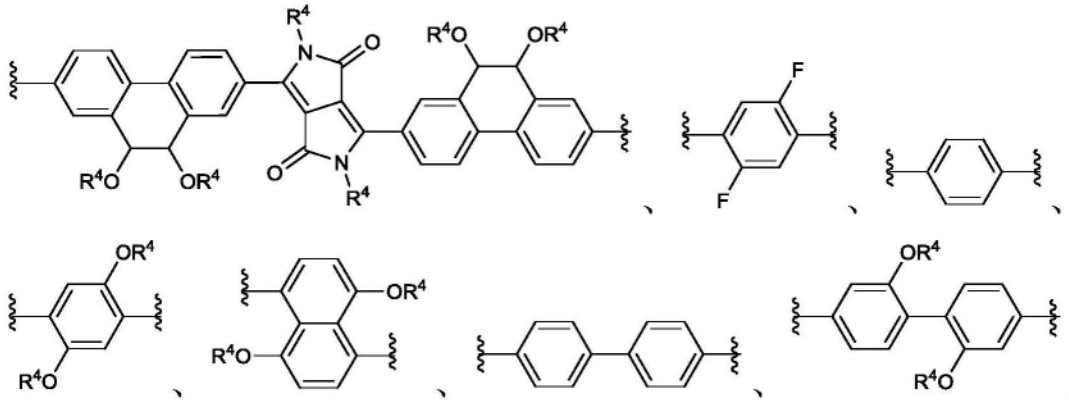
[0311] 每个Q独立地选自键、NH、NR^4和CH_2;

[0312] 每个M独立地为富电子连接基单元,所述富电子连接基单元能够改变聚合物带隙并且沿聚合物主链均匀或无规分布,并且各自独立地选自:

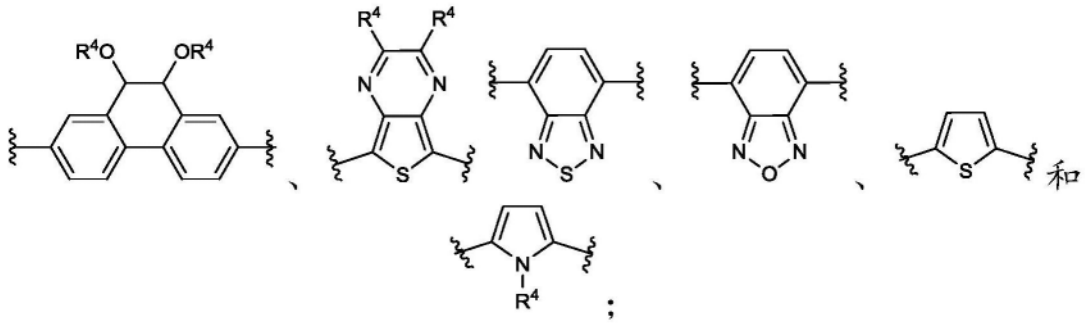


[0313]





[0314]



[0315] 其中,

[0316] 每个R^4为非离子侧基,所述非离子侧基能够赋予超过10mg/mL的水中溶解度,并且各自独立地选自卤素、羟基、C_1-C_{12}烷基、C_2-C_{12}烯烃、C_2-C_{12}炔烃、C_3-C_{12}环烷基、C_1-C_{12}卤代烷基、C_1-C_{12}烷氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氧基、C_2-C_{18}(杂)芳氨基、$(CH_2)_{x'}$、$(OCH_2$-$CH_2)_{y'}OCH_3$其中每个x'独立地为0至20的整数;每个y'独立地为0至50的整数,和C_2-C_{18}(杂)芳基基团;

[0317] 每个任选的连接基L为沿所述聚合物主链均匀或无规分布并被一个或多个用选自胺、氨基甲酸酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及用于与另一种基质、受体染料、分子或接合剂缀合的其受保护基团的官能团封端的侧链取代的芳基或杂芳基基团;

[0318] G^1和G^2各自独立地选自氢、卤素、炔烃、任选地取代的芳基、任选地取代的杂芳基、卤素取代的芳基、甲硅烷基、重氮盐、三氟甲磺酸酯、乙酰氧基、叠氮化物、磺酸酯、磷酸酯、硼酸取代的芳基、硼酸酯取代的芳基、硼酸酯、硼酸、任选地取代的二氢菲(DHP)、任选地取代的芴、芳基或杂芳基,所述芳基或杂芳基被一个或多个用选自胺、氨基甲酸酯、羧酸、羧酸酯、马来酰亚胺、活化酯、N-羟基琥珀酰亚胺基、肼、酰肼、腙、叠氮化物、炔烃、醛、硫醇及用于与基质或接合剂缀合的其受保护基团的官能团封端的侧链取代;

[0319] a、c和d定义所述结构内每个单元的mol%,其每个可以均匀或随机重复,并且其中a为10%至100%的mol%,c为0%至90%的mol%,并且每个d为0%至25%的mol%;

[0320] 每个b独立地为0或1;

[0321] m为1至约10,000的整数;并且

[0322] 每个n独立地为1至20的整数;并且

[0323] 其中所述接合剂能够与所述分析物或目标相关联的生物分子相互作用。

[0324] 实施方案16.根据实施方案15所述的方法,其中所述接合剂为蛋白质、肽、亲和配体、抗体、抗体片段、糖、脂质、核酸或核酸配体。

[0325] 实施方案17.根据实施方案15所述的方法,其中所述接合剂为抗体。

[0326] 实施方案18.根据实施方案17所述的方法,其中所述方法被配置用于流式细胞术。

[0327] 实施方案19.根据实施方案17所述的方法,其中所述接合剂与基质结合。

[0328] 实施方案20.根据实施方案17所述的方法,其中所述分析物为在细胞表面上表达的蛋白质。

[0329] 实施方案21.根据实施方案17所述的方法,其中所述方法被配置为免疫测定法。

[0330] 实施方案22.根据实施方案17所述的测定方法,其中所述方法还包括提供另外的接合剂用于同时检测另外的分析物。

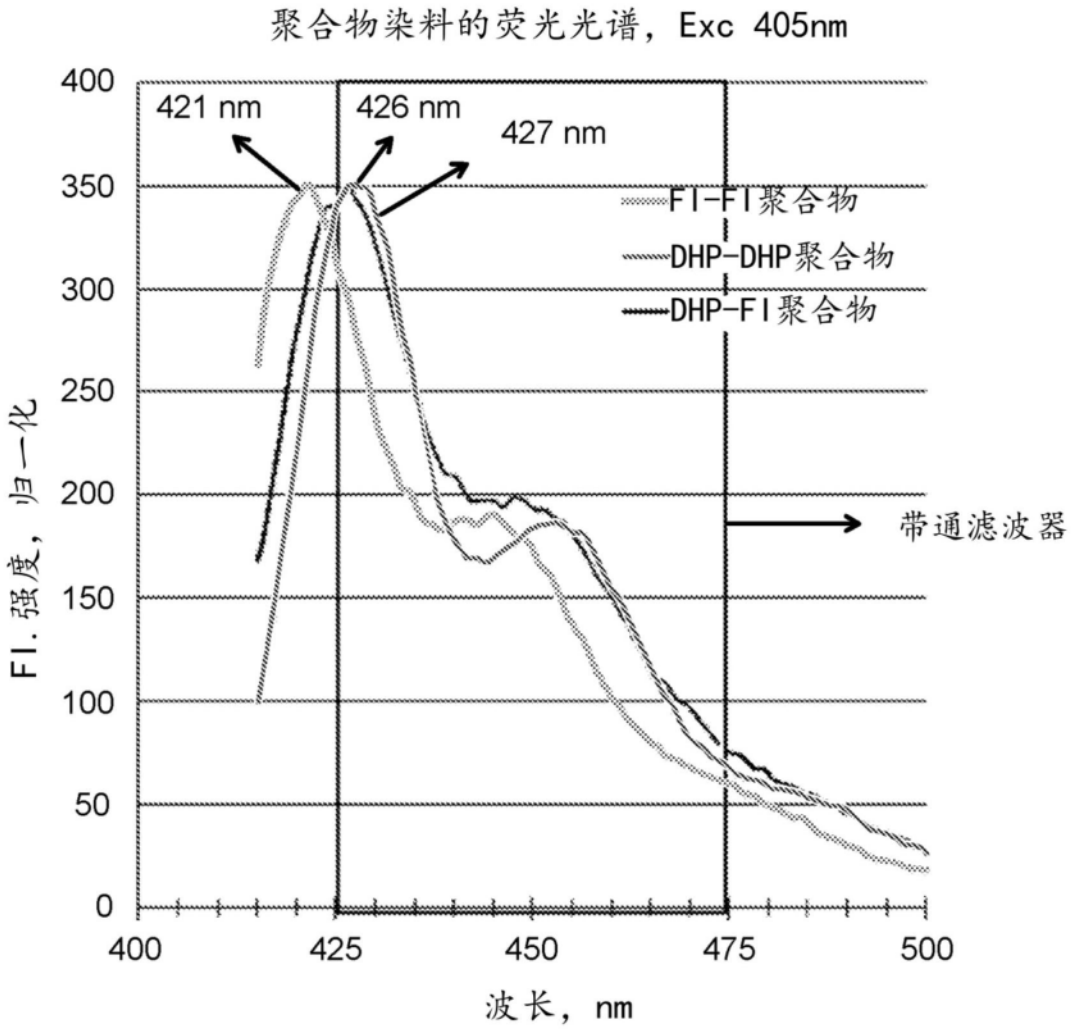

聚合物染料的荧光光谱，Exc 405nm
421 nm
426 nm
427 nm
FI-FI聚合物
DHP-DHP聚合物
DHP-FI聚合物
带通滤波器
FI.强度，归一化
波长，nm
400
350
300
250
200
150
100
50
0
400
425
450
475
500

图1

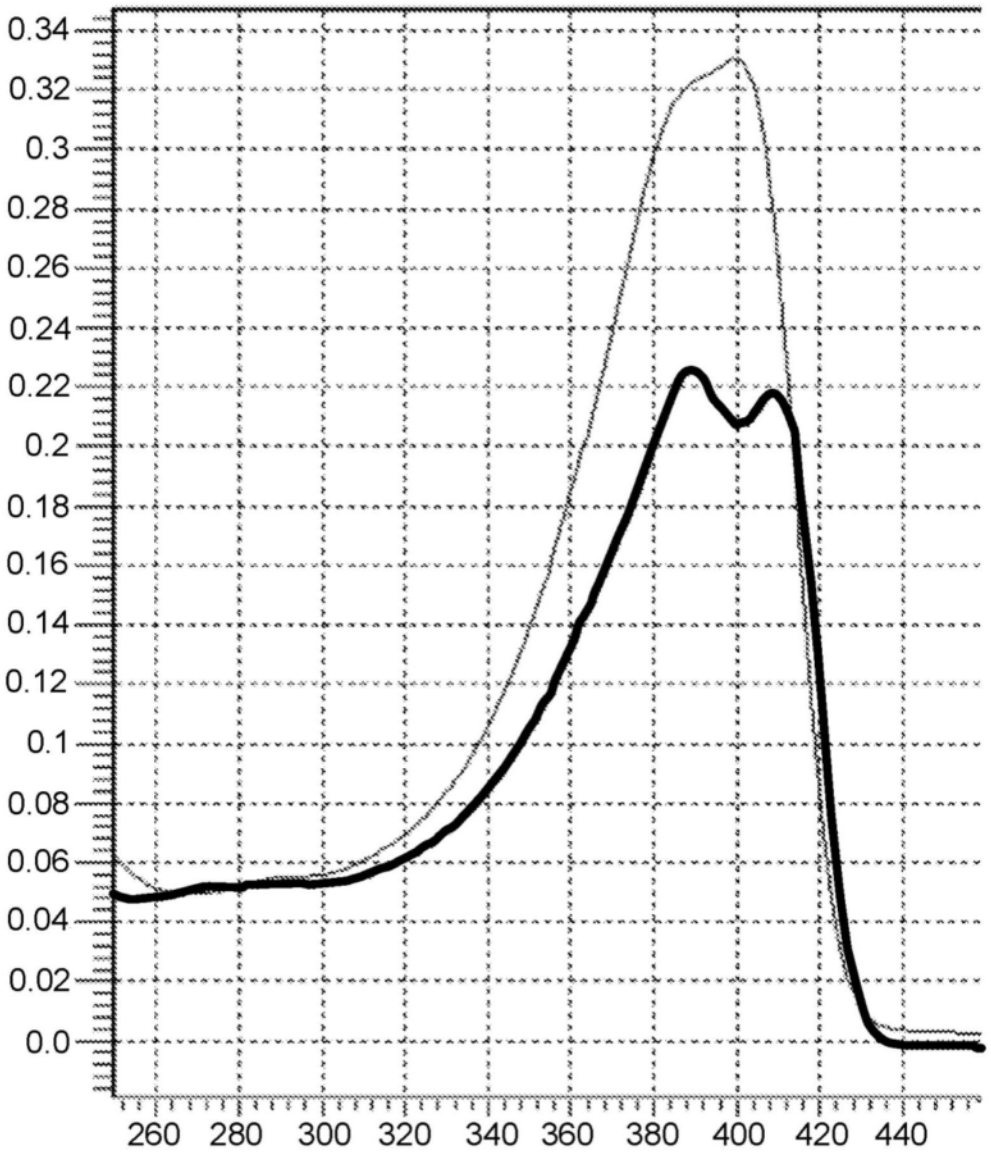

0.34
0.32
0.3
0.28
0.26
0.24
0.22
0.2
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0.0
260
280
300
320
340
360
380
400
420
440

图2

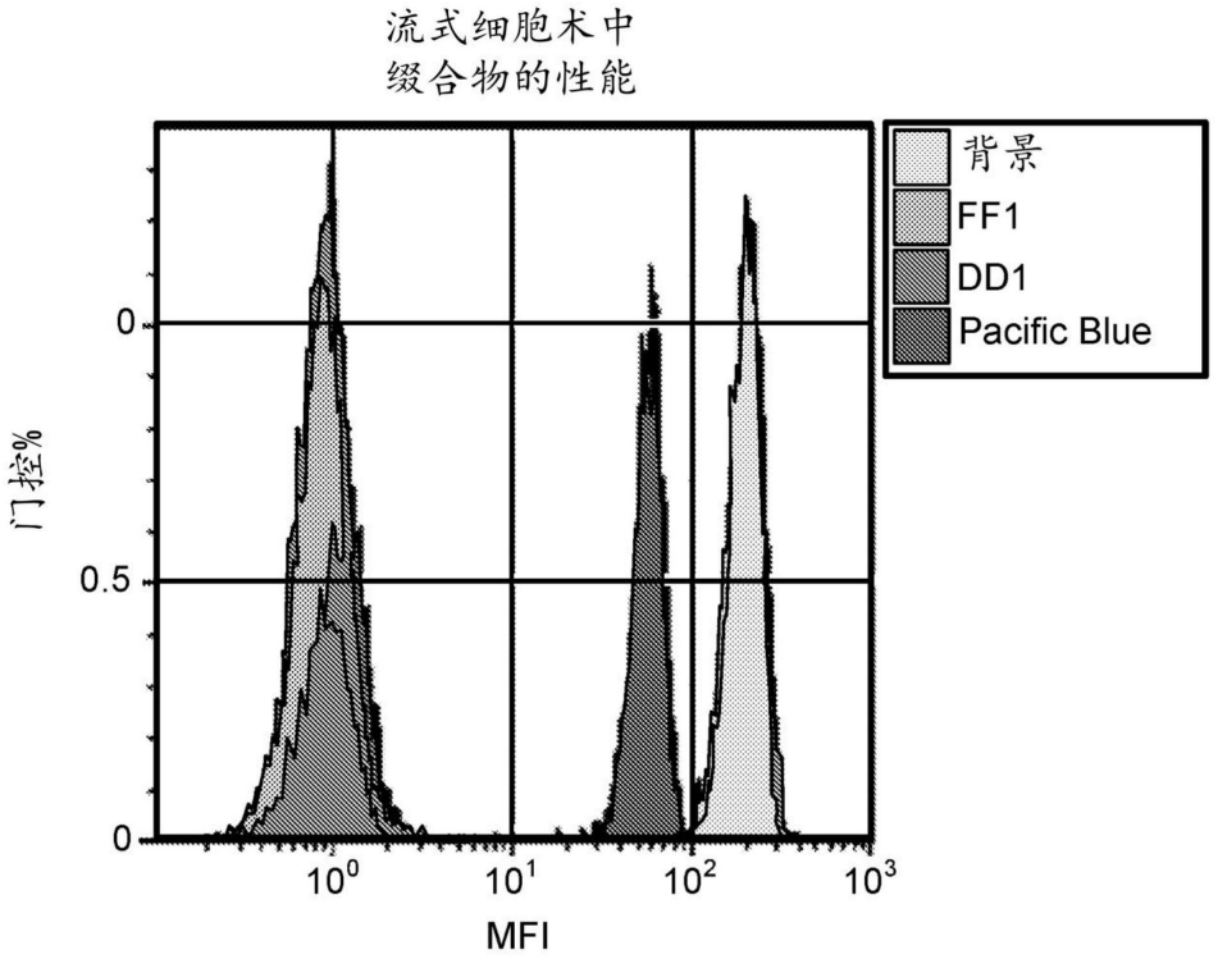


图3

Abs/Em Max	MW (M_n)	PD	ε	ϕ	亮度	F/P
λ_{max}395-415nm λ_{em} 420-430nm	20K-70K	在1.5至2.5之间	300K至2500K	0.4至0.75	150K至1900K	1至12
λ_{max}340-370nm λ_{em} 390-420nm	20K-70K	在1.5至2.5之间	300K至2500K	0.1至0.75	30K至1900K	1至12

图4

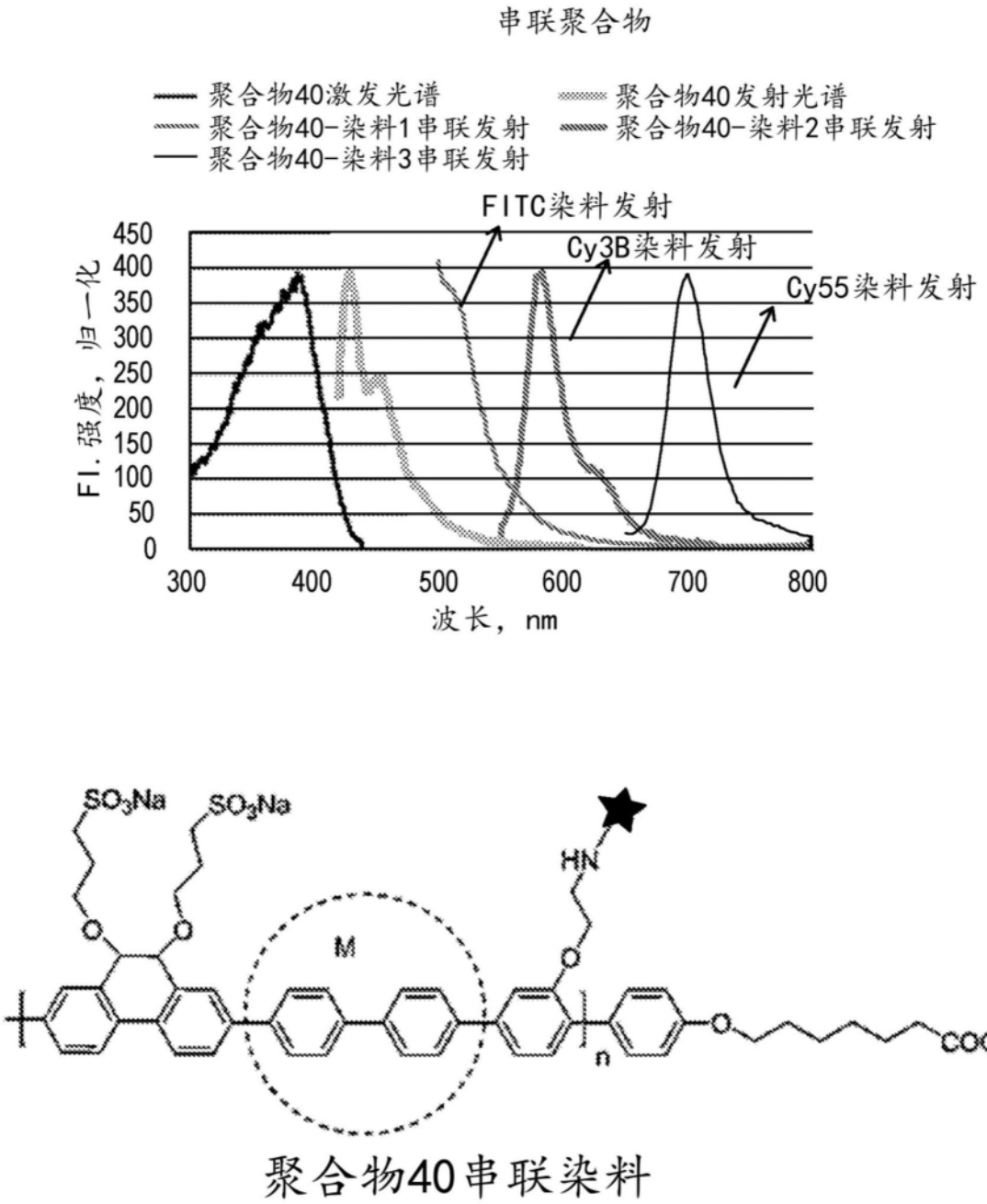

串联聚合物
聚合物40激发光谱
聚合物40发射光谱
聚合物40-染料1串联发射
聚合物40-染料2串联发射
聚合物40-染料3串联发射
FITC染料发射
Cy3B染料发射
Cy55染料发射
FI.强度，归一化
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
300
400
500
600
700
800
波长，nm
SO3Na
SO3Na
HN
O
M
n
COOH
聚合物40串联染料

图5