[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02826677.3

[51] Int. Cl.
C07D 211/70 (2006.01)
C07D 241/02 (2006.01)
C07D 413/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)
C12Q 1/66 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 12 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 100439338C

[51] Int. Cl. (续)
G01N 33/53 (2006.01)
[22] 申请日 2002.11.1 [21] 申请号 02826677.3
[30] 优先权
[32] 2001.11.2 [33] US [31] 10/053,482
[86] 国际申请 PCT/US2002/034972 2002.11.1
[87] 国际公布 WO2003/040100 英 2003.5.15
[85] 进入国家阶段日期 2004.7.2
[73] 专利权人 普罗美加公司
地址 美国威斯康星州
[72] 发明人 K·伍德 E·哈金斯
M·斯库里亚 D·克劳伯特
审查员 胡 振

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘维升 徐雁漪

权利要求书 15 页 说明书 32 页 附图 3 页

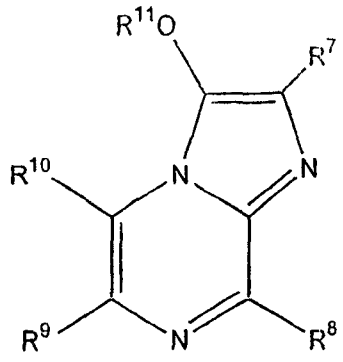
[54] 发明名称

涉及发光化合物的组合物、方法和试剂盒

[57] 摘要

一种检测荧光素酶的酶活性的方法，包括使发光蛋白质例如荧光素酶与受保护发光体接触以形成组合物；和检测由该组合物产生的光。 与相应的未修饰的水母水通道蛋白辅因子相比，受保护发光体提供了提高的稳定性和改进的信号/背景之比。

1、式（XII）的化合物：



(XII);

其中，R^7是$-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$或$-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；

R^8是$-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$或$-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$；

R^9是苯基、吲哚基、$-C_6H_4OH$、$-C_6H_4NH_2$、$-C_6H_4F$或$-C_6H_4OR^{15}$；

R^{10}是-H、$-CH_3$、或$-CH(CH_3)_2$；和

R^{11}、R^{14}和R^{15}独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基；

前提是R^{11}、R^{14}和R^{15}不都是乙酰基。

2、权利要求1的化合物，其中R^{11}、R^{14}和R^{15}各自独立地和其所连的氧原子一起是酯。

3、权利要求1的化合物，其中

R^{11}是乙酰基；和

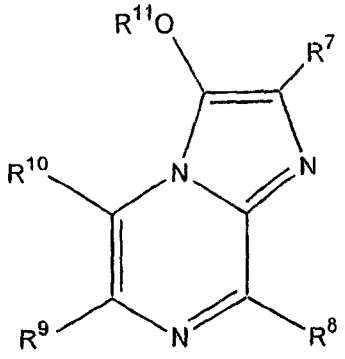
R^{14}和R^{15}独立地是丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基。

4、权利要求1的化合物，其中

R^{11}是丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基；和

R^{14}和R^{15}独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基。

5、式（XII）的化合物，



(XII);

其中 R^7 是 $-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$ 或 $-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；

R^8 是 $-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$ 或 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$；

R^9 是苯基、吲哚基、$-C_6H_4OH$、$-C_6H_4NH_2$、$-C_6H_4F$ 或 $-C_6H_4OR^{15}$；

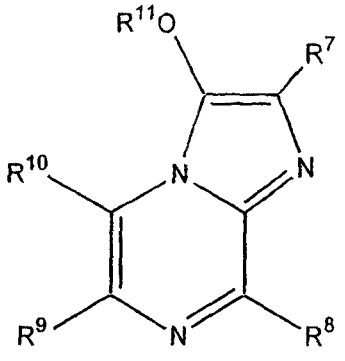
R^{10} 是 $-H$、$-CH_3$、或 $-CH(CH_3)_2$；和

R^{11}、R^{14} 和 R^{15} 独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基；和

其中在 22℃下含有 F12 培养基和 10%胎牛血清的混合物中，该化合物的浓度在 45 分钟后降低小于 50%。

6、权利要求 5 的化合物，其中 R^{11}、R^{14} 和 R^{15} 各自独立地和其所连的氧原子一起是酯。

7、式（XII）的化合物，



(XII);

其中 R^7 是 $-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$ 或 $-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；

R^8 是 $-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$ 或 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$；

R^9 是苯基、吲哚基、$-C_6H_4OH$、$-C_6H_4NH_2$、$-C_6H_4F$ 或 $-C_6H_4OR^{15}$；

R^{10} 是 $-H$、$-CH_3$、或 $-CH(CH_3)_2$；和

R^{11}、R^{14} 和 R^{15} 独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基；和

其中除去 R^{11}、R^{14}和 R^{15}中的至少一个提供了母体化合物；和

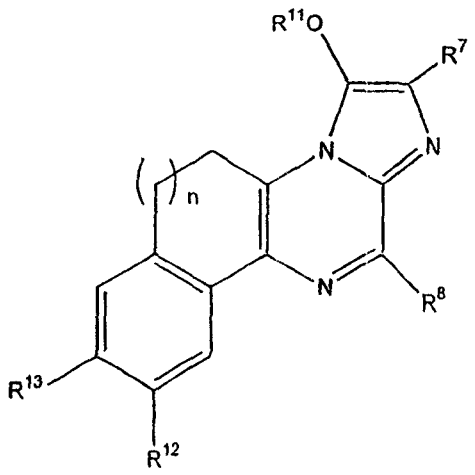
其中使得在 22℃下含有 F12 培养基和 10%胎牛血清的混合物中该化合物的浓度降低 50%所需的时间大于使得在 22℃下含有 F12 培养基和 10%胎牛血清的混合物中母体化合物的浓度降低 50%所需的时间。

8、权利要求 7 的化合物，其中除去 R^{11}、R^{14}和 R^{15}中的至少两个，提供母体化合物。

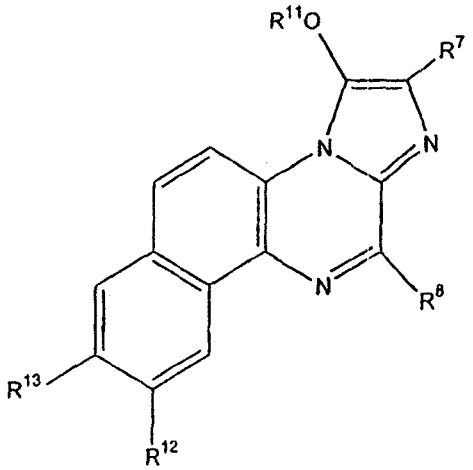
9、权利要求 7 的化合物，其中除去所有 R^{11}、R^{14}和 R^{15}，提供母体化合物。

10、权利要求 7 的化合物，其中 R^{11}、R^{14}和 R^{15}各自独立地和其所连的氧原子一起是酯。

11、式（XIII）或（XIV）的化合物：



(XIII);



(XIV);

其中，R^7是$-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$或$-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；

和

R^8是$-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$或$-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

R^{12}和R^{13}独立地是-H、-OH、烷基、杂烷基、芳基或$-OR^{16}$;

n是0、1或2;和

R^{11}、R^{14}和R^{16}独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基。

12、权利要求11的化合物，其中R^{11}、R^{14}和R^{16}各自独立地和其所连的氧原子一起是酯。

13、权利要求11的化合物，其中n是1。

14、一种组合物，含有在溶液中的权利要求1所述化合物。

15、权利要求14的组合物，其中该溶液是水溶液。

16、权利要求14的组合物，其中该溶液包含DMSO或醇。

17、一种组合物，含有在溶液中的权利要求5所述化合物。

18、权利要求17的组合物，其中该溶液是水溶液。

19、权利要求17的组合物，其中该溶液包含DMSO或醇。

20、一种组合物，含有在溶液中的权利要求7所述化合物。

21、权利要求20的组合物，其中该溶液是水溶液。

22、权利要求20的组合物，其中该溶液包含DMSO或醇。

23、一种组合物，含有在溶液中的权利要求11所述化合物。

24、权利要求23的组合物，其中该溶液是水溶液。

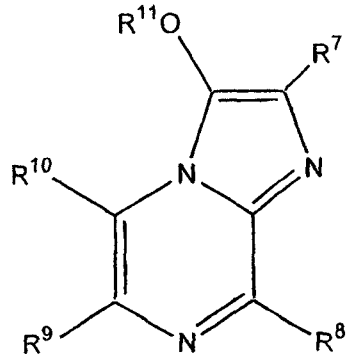
25、权利要求23的组合物，其中该溶液包含DMSO或醇。

26、一种试剂盒，包含:

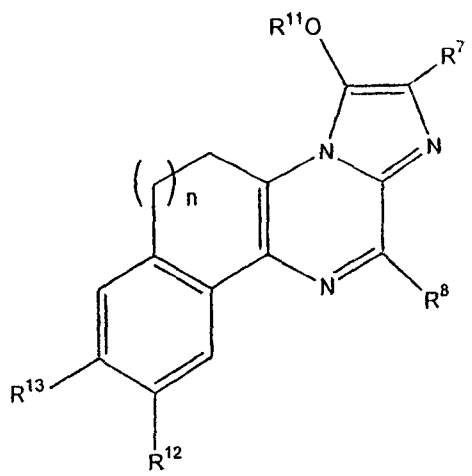
受保护的发光体;和

发光蛋白质;和

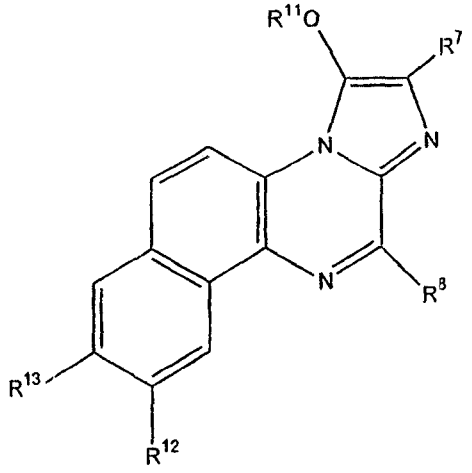
其中受保护的发光体是式（XII）、（XIII）或（XIV）的化合物:



(XII)



(XIII)



(XIV)

其中 R^7 是 $-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$ 或 $-CH_2-C_6H_4OR^{14}$;

R^8 是 $-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$ 或 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

R^9 是苯基、吲哚基、$-C_6H_4OH$、$-C_6H_4NH_2$、$-C_6H_4F$ 或 $-C_6H_4OR^{15}$;

R^{10} 是 $-H$、$-CH_3$、或 $-CH(CH_3)_2$;

R^{12} 和 R^{13} 独立地是 $-H$、$-OH$、烷基、杂烷基、芳基或 $-OR^{16}$;

n 是 0、1 或 2; 和

R^{11}、R^{14}、R^{15} 和 R^{16} 独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基;

前提是 R^{11}、R^{14} 和 R^{15} 不都是乙酰基。

27、权利要求 26 的试剂盒，进一步含有与发光体独立的脱保护酶。

28、权利要求 26 的试剂盒，其中受保护的发光体和发光蛋白质处于独立的容器中。

29、权利要求 26 的试剂盒，其中受保护的发光体和发光蛋白质处于同一容器中。

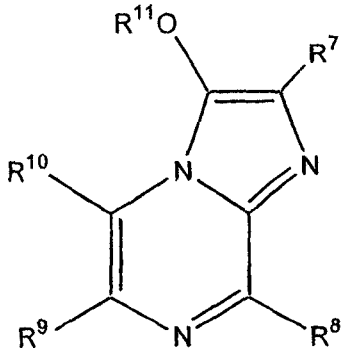
30、一种试剂盒，包含:

受保护的发光体; 和

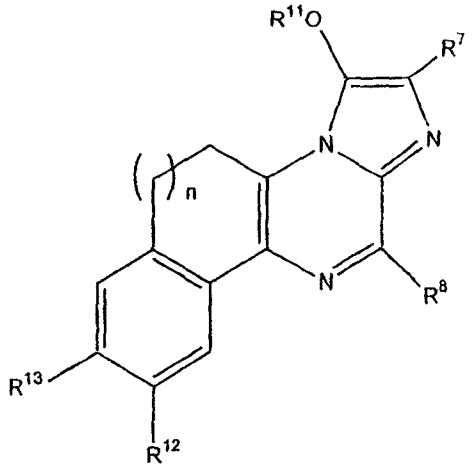
脱保护酶;

其中发光体和脱保护酶处于独立的容器中; 和

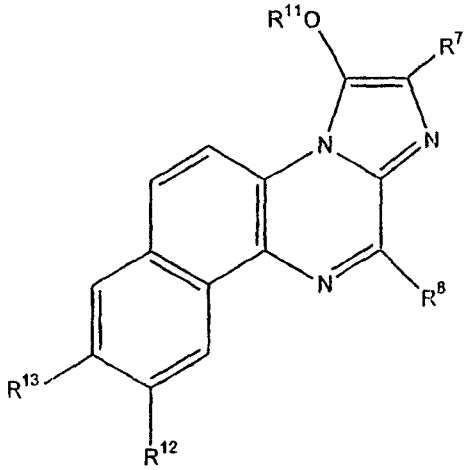
其中受保护的发光体是式（XII）、（XIII）或（XIV）的化合物:



(XII)



(XIII)



(XIV)

其中 R^7 是 $-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$ 或 $-CH_2-C_6H_4OR^{14}$;

R^8 是 $-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$ 或 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

R^9 是苯基、吲哚基、$-C_6H_4OH$、$-C_6H_4NH_2$、$-C_6H_4F$ 或 $-C_6H_4OR^{15}$;

R^{10} 是 $-H$、$-CH_3$、或 $-CH(CH_3)_2$;

R^{12} 和 R^{13} 独立地是 $-H$、$-OH$、烷基、杂烷基、芳基或 $-OR^{16}$;

n 是 0、1 或 2; 和

R^{11}、R^{14}、R^{15} 和 R^{16} 独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基;

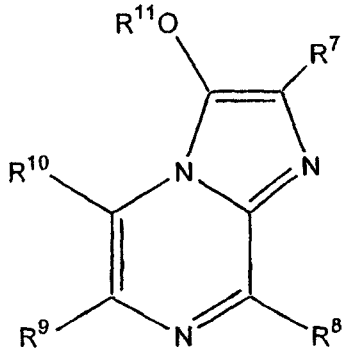
前提是 R^{11}、R^{14} 和 R^{15} 不都是乙酰基。

31、一种检测发光蛋白质的酶活性的方法，包括:

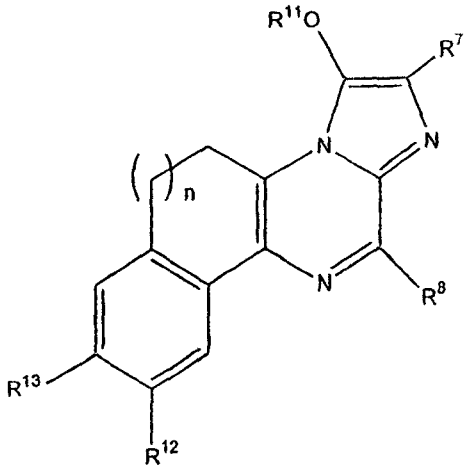
使发光蛋白质、脱保护酶和受保护发光体在溶液中接触以形成组合物; 和

检测由该组合物产生的光; 和

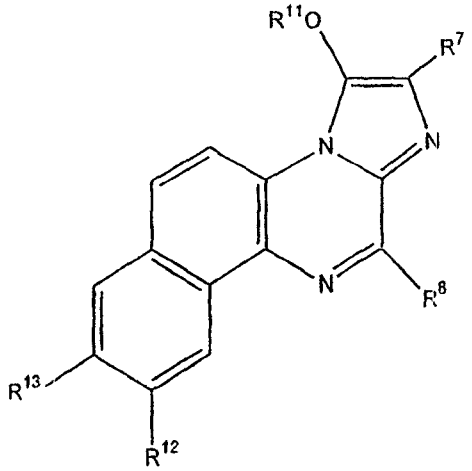
其中受保护的发光体是式（XII）、（XIII）或（XIV）的化合物:



(XII)



(XIII)



(XIV)

其中 R^7 是 $-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$ 或 $-CH_2-C_6H_4OR^{14}$;

R^8 是 $-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$ 或 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

R^9 是苯基、吲哚基、$-C_6H_4OH$、$-C_6H_4NH_2$、$-C_6H_4F$ 或 $-C_6H_4OR^{15}$;

R^{10} 是 $-H$、$-CH_3$、或 $-CH(CH_3)_2$;

R^{12} 和 R^{13} 独立地是 $-H$、$-OH$、烷基、杂烷基、芳基或 $-OR^{16}$;

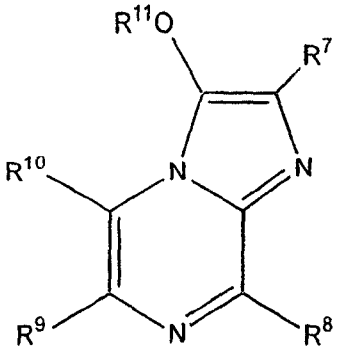
n 是 0、1 或 2; 和

R^{11}、R^{14}、R^{15} 和 R^{16} 独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基;

前提是 R^{11}、R^{14} 和 R^{15} 不都是乙酰基。

32、权利要求 31 的方法，其中发光蛋白质是 Renilla 荧光素酶。

33、权利要求 31 的方法，其中受保护发光体是式（XII）的化合物，



(XII);

其中 R^7 是 $-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$ 或 $-CH_2-C_6H_4OR^{14}$;

R^8 是 $-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$ 或 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

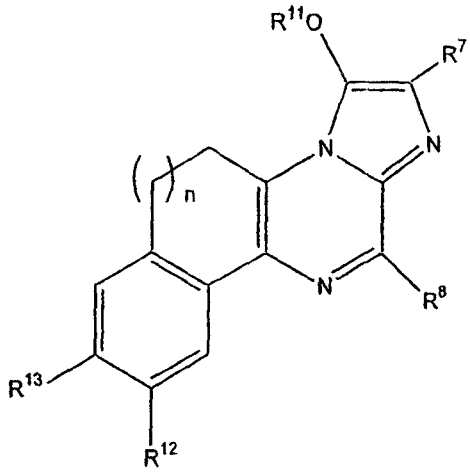
R^9 是苯基、吲哚基、$-C_6H_4OH$、$-C_6H_4NH_2$、$-C_6H_4F$ 或 $-C_6H_4OR^{15}$;

R^{10} 是 $-H$、$-CH_3$、或 $-CH(CH_3)_2$; 和

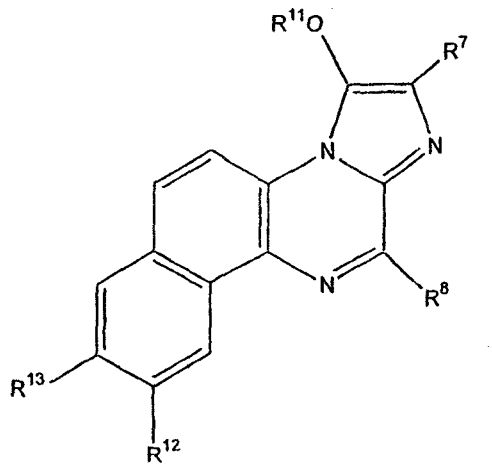
R^{11}、R^{14} 和 R^{15} 独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基。

34、权利要求 33 的方法，其中 R^{11}、R^{14} 和 R^{15} 各自独立地和其所连的氧原子一起是酯。

35、权利要求 31 的方法，其中受保护发光体是式(XIII)或(XIV)的化合物:



(XIII);



(XIV);

其中，R^7是$-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$或$-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；和

R^8是$-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$或$-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$；

R^{12}和R^{13}独立地是-H、-OH、烷基、杂烷基、芳基或$-OR^{16}$；

n是0、1或2；和

R^{11}、R^{14}和R^{16}独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基。

36、权利要求35的方法，其中R^{11}、R^{14}和R^{16}各自独立地和其所连的氧原子一起是酯。

37、权利要求35的方法，其中n是1。

38、权利要求31的方法，其中组合物包括细胞。

39、权利要求31的方法，其中组合物包括含有脱保护酶的细胞。

40、权利要求39的方法，其中检测从该组合物产生的光，指出脱保护酶在细胞中的位置。

41、权利要求31的方法，其中组合物包括细胞裂解物。

42、权利要求31的方法，其中脱保护酶是酯酶。

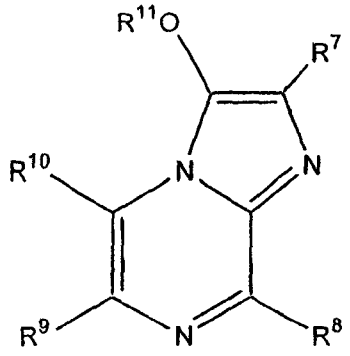
43、权利要求31的方法，其中该溶液是水溶液。

44、权利要求31的方法，其中该溶液包含DMSO。

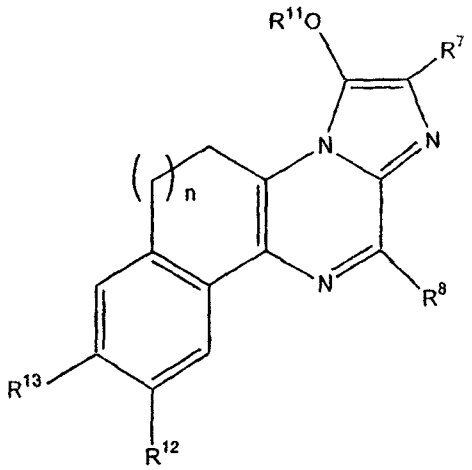
45、一种在包含荧光素酶的活细胞中产生发光的方法，包括：

使溶液中的细胞与受保护的发光体接触；

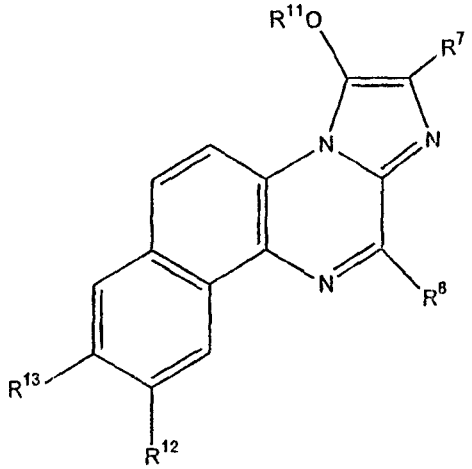
其中受保护的发光体是式（XII）、（XIII）或（XIV）的化合物：



(XII)



(XIII)



(XIV)

其中 R^7 是 $-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$ 或 $-CH_2-C_6H_4OR^{14}$;

R^8 是 $-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$ 或 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

R^9 是苯基、吲哚基、$-C_6H_4OH$、$-C_6H_4NH_2$、$-C_6H_4F$ 或 $-C_6H_4OR^{15}$;

R^{10} 是 $-H$、$-CH_3$、或 $-CH(CH_3)_2$;

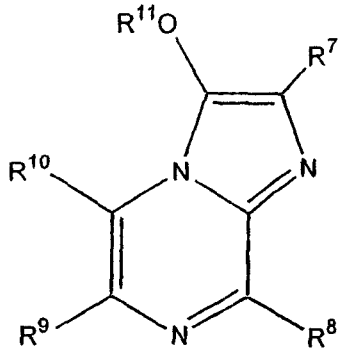
R^{12} 和 R^{13} 独立地是 $-H$、$-OH$、烷基、杂烷基、芳基或 $-OR^{16}$;

n 是 0、1 或 2; 和

R^{11}、R^{14}、R^{15} 和 R^{16} 独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基;

前提是 R^{11}、R^{14} 和 R^{15} 不都是乙酰基。

46、权利要求 45 的方法，其中受保护发光体是式（XII）的化合物，



(XII);

其中 R^7 是 $-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$ 或 $-CH_2-C_6H_4OR^{14}$;

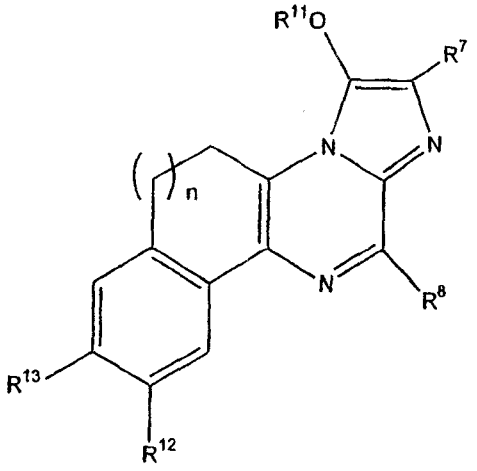
R^8 是 $-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$ 或 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

R^9 是苯基、吲哚基、$-C_6H_4OH$、$-C_6H_4NH_2$、$-C_6H_4F$ 或 $-C_6H_4OR^{15}$;

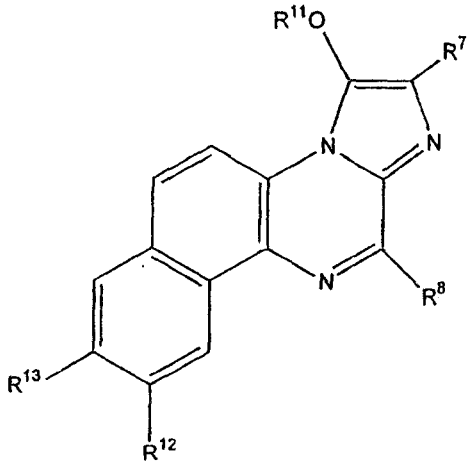
R^{10} 是 $-H$、$-CH_3$、或 $-CH(CH_3)_2$; 和

R^{11}、R^{14} 和 R^{15} 独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基。

47、权利要求 45 的方法，其中受保护发光体是式(XIII)或(XIV)的化合物:



(XIII);



(XIV);

其中，R^7是$-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$或$-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；

R^8是$-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$或$-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$；

R^{12}和R^{13}独立地是-H、-OH、烷基、杂烷基、芳基或$-OR^{16}$；

n是0、1或2；和

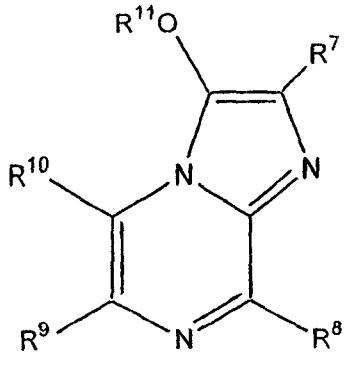
R^{11}、R^{14}和R^{16}独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基。

48、一种检测非发光性酶的酶活性的方法，包括：

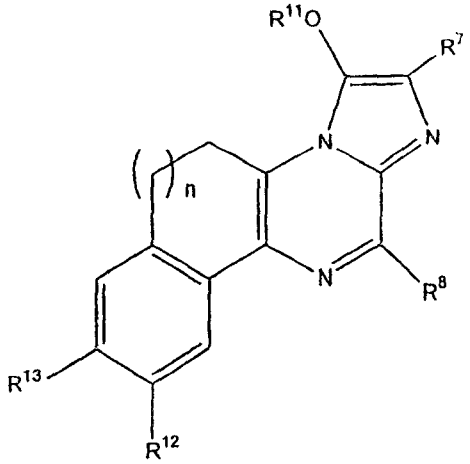
使非发光性酶与含有发光蛋白质和受保护发光体的液体混合物接触以形成组合物；和

检测由该组合物产生的光；

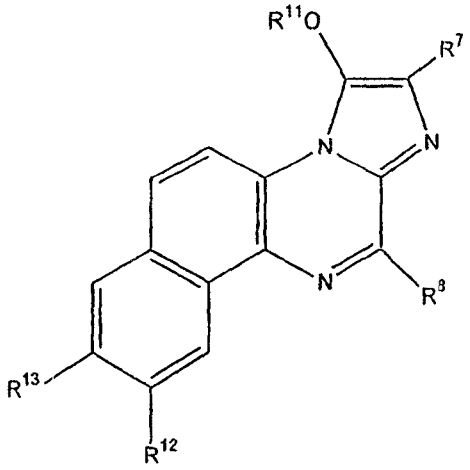
其中受保护的发光体是式（XII）、（XIII）或（XIV）的化合物：



(XII)



(XIII)



(XIV)

其中 R^7 是 $-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$ 或 $-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；

R^8 是 $-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$ 或 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$；

R^9 是苯基、吲哚基、$-C_6H_4OH$、$-C_6H_4NH_2$、$-C_6H_4F$ 或 $-C_6H_4OR^{15}$；

R^{10} 是 -H、$-CH_3$、或 $-CH(CH_3)_2$；

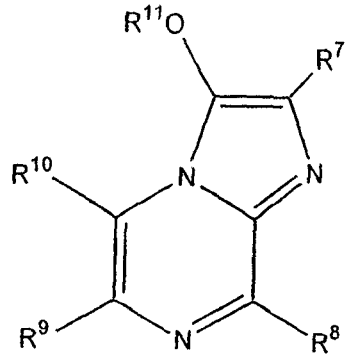
R^{12} 和 R^{13} 独立地是 -H、-OH、烷基、杂烷基、芳基或 $-OR^{16}$；

n 是 0、1 或 2；和

R^{11}、R^{14}、R^{15} 和 R^{16} 独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基

前提是 R^{11}、R^{14} 和 R^{15} 不都是乙酰基。

49、权利要求 48 的方法，其中受保护发光体是式（XII）的化合物，



(XII);

其中 R^7 是 $-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$ 或 $-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；

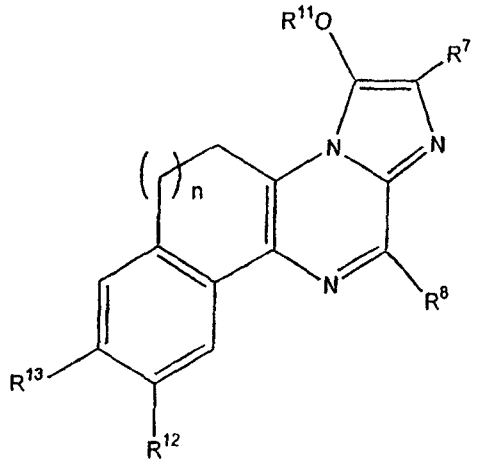
R^8 是 $-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$ 或 $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$；

R^9 是苯基、吲哚基、$-C_6H_4OH$、$-C_6H_4NH_2$、$-C_6H_4F$ 或 $-C_6H_4OR^{15}$；

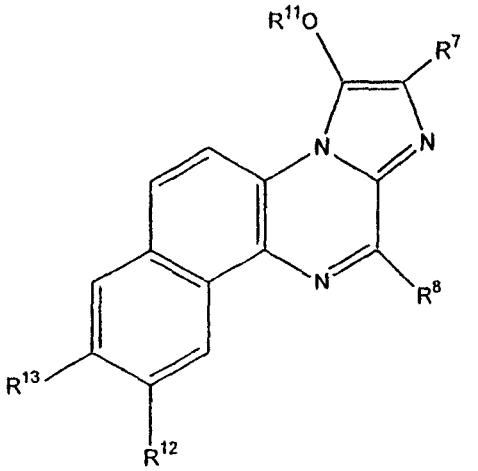
R^{10} 是 -H、$-CH_3$、或 $-CH(CH_3)_2$；和

R^{11}、R^{14}和R^{15}独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基。

50、权利要求48的方法，其中受保护发光体是式(XIII)或(XIV)的化合物：



(XIII);



(XIV);

其中，R^7是$-CH_2-C_6H_5$、萘基、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$或$-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；

R^8是$-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_{11}$、$-CH_2-C_5H_9$或$-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$；

R^{12}和R^{13}独立地是-H、-OH、烷基、杂烷基、芳基或$-OR^{16}$；

n是0、1或2；和

R^{11}、R^{14}和R^{16}独立地是乙酰基、丁酰基、乙酰氧基甲基、丙酰氧基甲基、丁酰氧基甲基或新戊酰氧基甲基并且R^{11}、R^{14}和R^{16}可通过非发光性酶除去。

51、权利要求26的试剂盒，进一步包含DMSO或醇或其混合物。

52、权利要求 30 的试剂盒，进一步在同一容器中包含 DMSO 或醇或其混合物作为受保护发光体。

涉及发光化合物的组合物、方法和试剂盒

背景

报道分子通常在生物、生化、免疫、细胞生物学和分子生物学领域中用于监测分子状态。例如，报道分子在分析中使用，其中报道分子的水平是由从与报道分子连接的特定启动子进行转录而引起的。报道分子分析可以用于研究生物学过程，包括基因表达、受体活性、转录因子、胞内信号传导、mRNA 处理和蛋白质折叠。通常用于这种分析的报道分子的分析包括检测放射性同位素、酶活性、荧光或发光分析法。该技术一般由 Akhavan-Tafti 等在“Bioluminescence and Chemiluminescence. Fundamentals and Applied Aspects. Proceedings of the 8th International Symposium on Bioluminescene and Chemiluminescene” Cambridge，1994 年 9 月，Campbel，Kricka，Stanley，John Wiley and Sons 1994 中讨论。

在生物分析中的发光通常涉及发光（luminogenic）蛋白质的活性。用于分析体系中的发光蛋白质包括、但不限于 Renilla 荧光素酶，Oplophorus 荧光素酶，Vargula（Cypridina）荧光素酶，Gaussia 荧光素酶和水母蛋白。在发光反应中，发光蛋白质与适宜分子（称为发光体）之间的相互作用产生作为反应产物之一的光。可以检测在该反应中产生的光量（即光子的数目）。这种检测可以用于定性地检测在样品中是否存在特定的物质。这种检测还可以用于定量地计算在反应中发光蛋白质和/或发光体的浓度。

发光反应可以用于检测非常少量的特定分析物，该物质在分析中确认和检测。例如，发光反应可以用于检测和定量蛋白酶、脂酶、磷酶、过氧化酶、糖苷酶、各种代谢物例如 ATP 或 NADH，和报道分子。发光反应还可以用于通过结合相互作用检测和定量分析物，例如通过抗体和核苷酸探针介导的那些。发光反应的另一个应用是生物发光共振能量转移（BRET），它能测定两个分子是否能互相结合或在细胞内共定位（Angers 等，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97(7):3684-9，2000）。通常，发光反应可以用于检测在样品中存在的小于约 1×10^{-16} 摩尔、通常小于 1×10^{-19} 摩尔的分析物。

当使用发光检测分析物时，优选由与分析物的存在无关的反应产生的光极少或没有。例如，在通常用于 Renilla 荧光素酶的分析条件下，即使当发光蛋白质不存在时也通常能检测到光。与发光蛋白质的催化活性无关的发光称为自动发光。这种自动发光被认为是“背景”，因为它不提供关于体系的有用信息，而是对整个发光输出有贡献。自动发光会通过降低准确检测来自分析物活性的光量的能力来限制分析方法的有用性（即“信号”）。如果噪音的幅度与实际信号的幅度相比是显著的，则这是成问题的。这种检测的不确定性可以通过信号（S）和背景（B）的幅度之比或信号/背景之比（S/B）来定量化。

自动发光可以例如是由发光体的自发氧化作用引起。而且，向分析体系加入各种组分，例如类脂（特别是在临界胶束浓度或 CMC 之上）、疏水性蛋白质（特别是具有特定三维结构的那些）以及含有疏水性微环境的细胞或其它生物物质，可大大提高自动发光。

一类显示自动发光性的发光体是水母水通道蛋白辅因子（coelenterazine）。水母水通道蛋白辅因子与许多海生的荧光素酶相互作用，由于水母水通道蛋白辅因子氧化成各自的 coelenteramide 而产生光。如果该氧化作用通过发光蛋白质来促进，则光子与基质和蛋白质之间的相互作用对应，从而产生信号。水母水通道蛋白辅因子还可以对背景作出贡献，这是因为当处于溶液中时有自发发光氧化作用，即使当不存在发光蛋白质时也是如此。除了产生背景之外，这种不稳定性还会导致发光信号的寿命短。这导致需要在短时间内检测许多样品的发光，进而在总体分析中引入了不确定性。

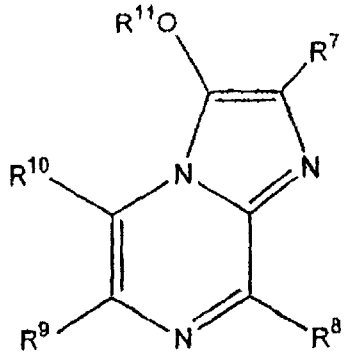
已经试图通过改进水母水通道蛋白辅因子的发光响应来研究对水母水通道蛋白辅因子的改进。受影响的水母水通道蛋白辅因子性能包括对钙离子（Ca^{2+}）的敏感性（Shimomura 等，Biochem. J. 296: 549-551, 1993; Shimomura 等, Biochem. J. 261: 913-920, 1989）；对过氧化物阴离子（O_2^-）的敏感性（Teranishi 等, Anal. Biochem. 249: 37-43, 1997）；对于单独发光蛋白质的特异性（Inouye 等，Biochem, Biophys. Res. Comm. 233: 349-53, 1997）；和细胞膜的渗透作用（Shimomura, Biochem. J. 326: 297-298, 1997）。通常，衍生物与天然水母水通道蛋白辅因子的区别在于与咪唑并哌嗪核结构连接的取代基的性质。尽管在特定分析环境中有改进，但是没有报道这些

改进的水母水通道蛋白辅因子能避免自动发光的问题。

所以，希望提供能直接或间接地用作发光体并能在常规使用条件下提供自动发光较少的组合物。这些组合物可以进一步显示相对于常规发光体而言提高的稳定性。还希望提供对不属于发光蛋白质的物质敏感的组合物。这种组合物与这些物质的相互作用能够将组合物转化成发光体。这种多功能组合物因此能提供一种通过发光方法分析非发光物质或过程的方式。

简述

在本发明的一个方面，提供式（XII）的化合物：



(XII)

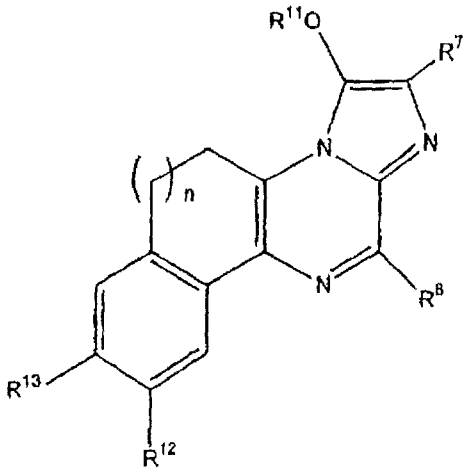
在该化合物中，R^7是H、烷基、杂烷基、芳基或$-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；R^8是H、烷基、杂烷基或芳基；R^9是H、烷基、杂烷基、芳基或$-C_6H_4OR^{15}$；R^{10}是-H、$-CH_3$、或$-CH(CH_3)_2$；和R^{11}、R^{14}和R^{15}独立地是酶可除去的基团；前提是R^{11}、R^{14}和R^{15}不都是乙酰基。

在本发明的另一个方面，提供式（XII）的化合物，其中R^7是H、烷基、杂烷基、芳基或$-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；R^8是H、烷基、杂烷基或芳基；R^9是H、烷基、杂烷基、芳基或$-C_6H_4OR^{15}$；R^{10}是-H、$-CH_3$、或$-CH(CH_3)_2$；和R^{11}、R^{14}和R^{15}独立地是酶可除去的基团。在22℃下含有F12培养基和10%胎牛血清的混合物中，该化合物的浓度在45分钟后降低小于50%。

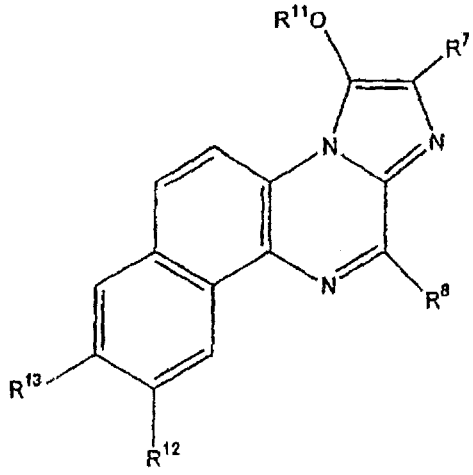
在本发明的另一个方面，提供式（XII）的化合物，其中R^7是H、烷基、杂烷基、芳基或$-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；R^8是H、烷基、杂烷基或芳基；R^9是H、烷基、杂烷基或$-C_6H_4OR^{15}$；R^{10}是-H、$-CH_3$、或$-CH(CH_3)_2$；和

R^{11}、R^{14}和R^{15}独立地是酶可除去的基团。除去至少一个酶可除去的基团提供了母体化合物（parent compound），和使在22℃下含有F12培养基和10%胎牛血清的混合物中该化合物的浓度降低50%所需的时间大于使得在22℃下在含有F12培养基和10%胎牛血清的混合物中母体化合物的浓度降低50%所需的时间。

在本发明的再一个方面，提供式（XIII）或（XIV）的化合物：



(XIII)



(XIV)

在该化合物中，R^7是H、烷基、杂烷基、芳基或$-CH_2-C_6H_4OR^{14}$；R^8是H、烷基、杂烷基或芳基；R^{12}和R^{13}独立地是-H、-OH、烷基、杂烷基、芳基或$-OR^{16}$；n是0、1或2；和R^{11}、R^{14}和R^{16}独立地是酶可除去的基团。

在本发明的另一个方面，提供在溶液中含有上述化合物之一的组合物。

在本发明的另一个方面，提供受保护的发光体，它是修饰的水母水通道蛋白辅因子，其中烯醇基团已经被转化成含有酶可除去的基团的酯或醚；所述酶可除去基团的除去提供了母体水母水通道蛋白辅因子。使得在22℃下含有F12培养基和10%胎牛血清的混合物中的修饰的水母水通道蛋白辅因子的浓度降低50%所需的时间大于使得在22℃下在含有F12培养基和10%胎牛血清的混合物中母体水母水通道蛋白辅因子的浓度降低50%所需的时间。

在本发明的另一个方面，提供包含受保护的发光体和发光蛋白质的试剂盒。

在本发明的另一个方面，提供包含受保护的发光体和脱保护的酶

（deprotecting enzyme）的试剂盒。发光体和脱保护酶处于独立的容器中。

在本发明的另一个方面，提供一种检测发光蛋白质的酶活性的方法，包括使发光蛋白质、脱保护的酶和受保护的发光体在溶液中接触以形成组合物；和检测由该组合物产生的光。

在本发明的另一个方面，提供一种在包含荧光素酶的活细胞中产生发光的方法，该方法包括使溶液中的细胞与受保护的发光体接触。

在本发明的另一个方面，提供一种检测非发光性酶的酶活性的方法，包括使非发光性酶与含有发光蛋白质和受保护的发光体的液体混合物接触以形成组合物；和检测由该组合物产生的光。

详细描述

本发明提供通过化学方式改变发光体以获得具有比未改变的基质更高的稳定性的受保护发光体的方法。还提供能用作发光蛋白质的受保护发光体的各种组合物。受保护的发光体可以至少部分被转化成发光体，使得所得的基质与发光蛋白质相互作用。受保护的发光体提供了降低的自动发光，例如在培养基中，且不会相似地降低在细胞内的发光蛋白质依赖性发光。这种效应通过提高信号/背景之比帮助增加分析灵敏度。

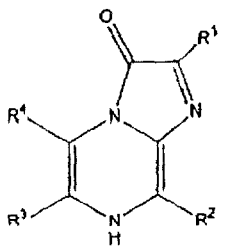
本发明的组合物用于各种分析应用中。对于使用培养的细胞的现场应用，这些组合物可以提供发光体和发光蛋白质的共定位。这些组合物可以用于检测和定量发光分析物，这些分析物可以是基质或蛋白质。这些组合物可以进一步用于检测和定量用于将受保护发光体转化成发光体的酶。现场检测还包括基因报告基因(reporter)的分析，例如多重报告基因，其中至少一个报告基因使用发光体。

对于在有机体内的体内应用，共定位可以用于提供研究细胞生长。用于非发光性酶的受保护发光体的特异性可以用于检测在特定器官、组织或细胞类型中的发光分析物，或用于检测其中的非发光性酶。对于体外应用，可以检测各种物质和随时间的进程。这些分析包括例如发光蛋白质的表达，分析物的浓度，和用于将受保护发光体转化成发光体的非发光性酶的表达。

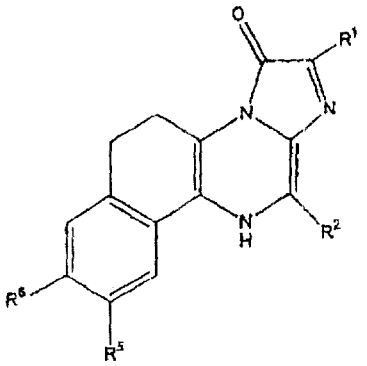
基质

用于本发明的发光体包括称为水母水通道蛋白辅因子的一类化合物。术语水母水通道蛋白辅因子定义为具有咪唑并哌嗪结构的分子，其特征在于当与给定的发光蛋白质在溶液中接触时能发光。已经知道水母水通道蛋白辅因子当与各种发光蛋白质作用时能发光，特别是海生的荧光素酶。海生的荧光素酶的例子包括 Renilla 荧光素酶，水母蛋白，Gaussia 荧光素酶，Oplophorus 荧光素酶和 Cypridina 荧光素酶。

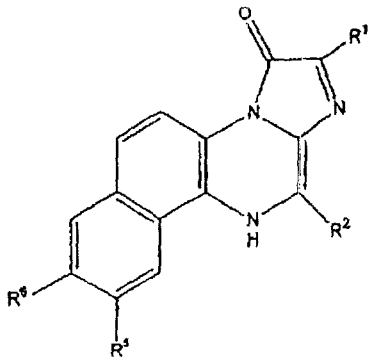
水母水通道蛋白辅因子的例子是下面的结构 I-III：



(I)



(II)

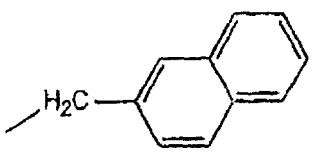


(III)

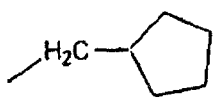
其中 R^1、R^2、R^3 和 R^4 独立地是 H、烷基、杂烷基、芳基或其组合。R^5 和 R^6 可以独立地是 H、OH、烷基、杂烷基、芳基或其组合。对于结构 II，n 可以是 0、1 或 2，优选是 1。

优选 R^1 是 $-CH_2-C_6H_5$、$-CH_2-C_6H_4OH$、$-CH_2-C_6H_4F$、$CH(CH_3)CH_2CH_3$ 或萘基（结构 IV-A）。

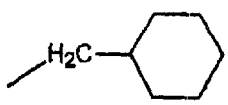
优选 R^2 是 $-CH_2-C_6H_5$、$-(CH_2)_3NHC(=N)NH_2$、$-CH_2C_6H_{11}$（结构 IV-B）或 $-CH_2C_5H_9$（结构 IV-C）。



(IV-A)

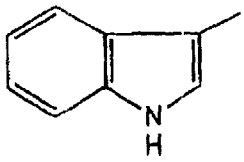


(IV-B)



(IV-C)

优选 R^3 是-C_6H_4OH、-$C_6H_4NH_2$、-C_6H_5、-C_6H_4F 或吲哚基（结构 V）。



(V)

优选 R^4 是 H、CH_3 或 $CH(CH_3)_2$。

优选 R^5 和 R^6 独立地是 H 或 OH。

在这里使用的“烷基”是含有 1-20、优选 1-15 个碳原子的烃链，可以是直链、支链的或环状的；例如-CH_3、-$CH_2(CH_2)_nCH_3$、-$(CH_2)_nCH(CH_3)_2$、-$(CH_2)_nC(CH_3)_3$（其中 n 是整数），金刚烷基，和结构 IV-B 和 IV-C。

“杂烷基”是还含有一个或多个杂原子例如 O、N、S 和卤素的烷基；例如-$(CH_2)_n$-O-$(CH_2)_mCH_3$、-$(CH_2)_n$-C(=O)-$N(CH_3)_2$、-$(CH_2)_3NHC(=N)NH_2$和-$(CH_2)_n$-C(=O)OH，其中 n 和 m 是整数。

“杂环”是含有 2-30 个碳原子和至少一个杂原子（O、N 或 S）的烃，使得形成含有该杂原子的环。该环可以是饱和的、部分不饱和的或芳族的，可以是被取代的。该环可以是单-、双-或多环的。例子包括吖啶、苯并噻唑啉、苯并咪唑、苯并呋喃、苯并噻吩、苯并噻唑、苯并硫代苯基、咔唑、噌啉、呋喃、咪唑、1H-吲唑、吲哚、异吲哚、异喹啉、异噻唑、吗啉、噁唑（即 1,2,3-噁二唑）、吩嗪、吩噻嗪、吩噁嗪、2,3-二氮杂萘、哌嗪、蝶啶、嘌呤、吡嗪、吡唑、哒嗪、吡啶、嘧啶、吡咯、喹唑啉、喹啉、喹喔啉、噻唑、1,3,4-噻二唑、噻吩、1,3,5-三嗪、三唑（即 1,2,3-三唑）等。

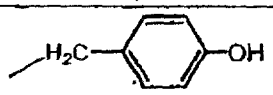
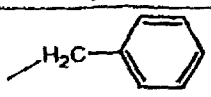
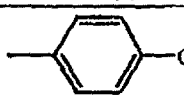
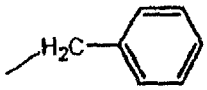
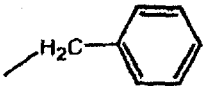
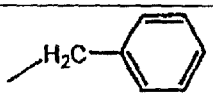
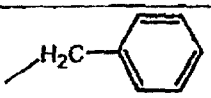
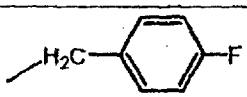
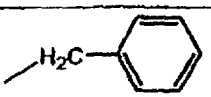
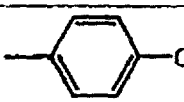
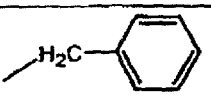
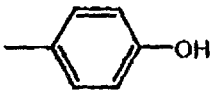
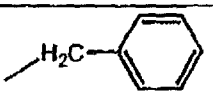
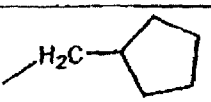
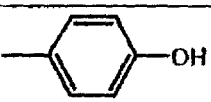
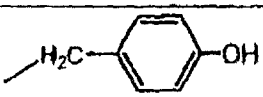
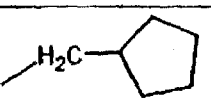
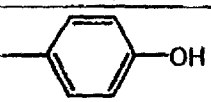
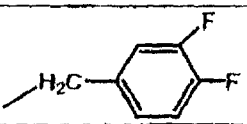
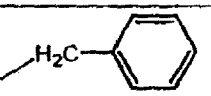
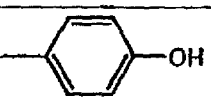
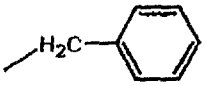
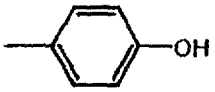
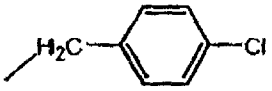
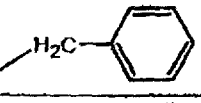
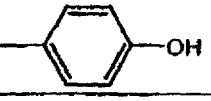
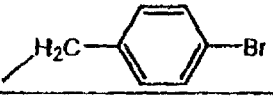
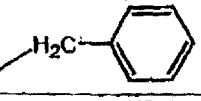
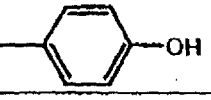
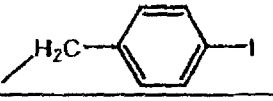
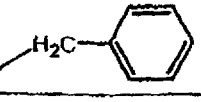
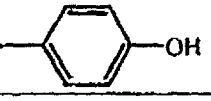
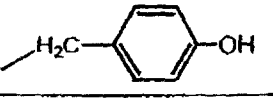
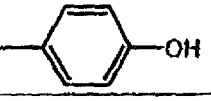
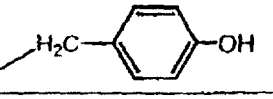
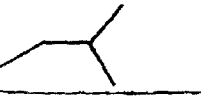
“芳基”是含有 6-30 个碳原子和至少一个芳族碳环基团的烃，任选地具有含有杂原子例如 O、N 或 S 和卤素的取代基；例如-C_6H_5（苯基）、-C_6H_4OH、-C_6H_4-C_6H_5、-C_9H_7、-$C_6H_4OCH_3$、-$C_6H_4NH_2$、-C_6H_4SH、--CH_2-C_6H_5和萘基。

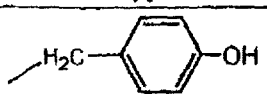
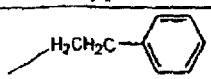
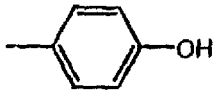
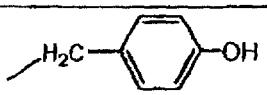
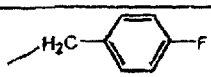
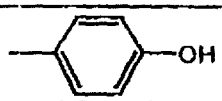
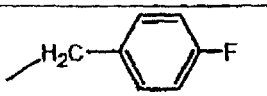
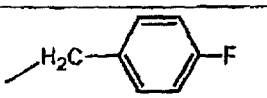
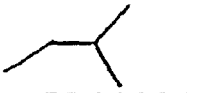
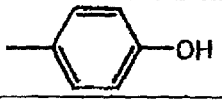
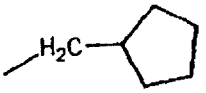
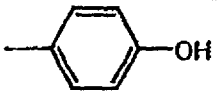
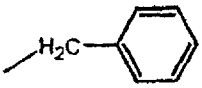
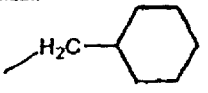
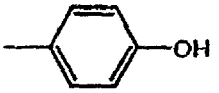
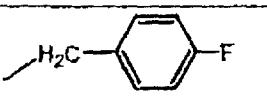
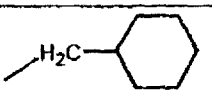
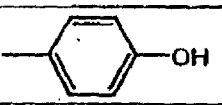
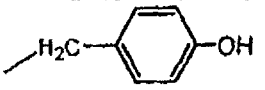
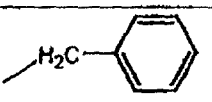
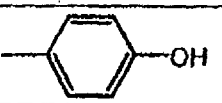
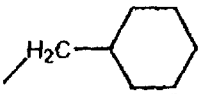
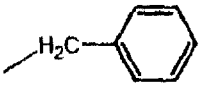
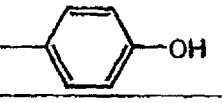
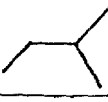
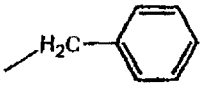
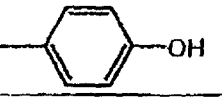
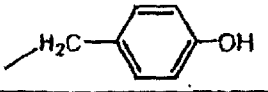
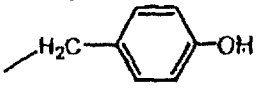
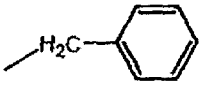
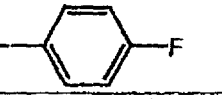
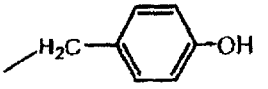
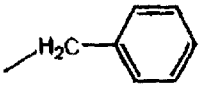
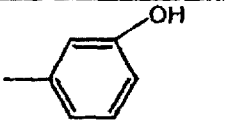
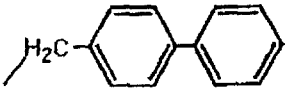
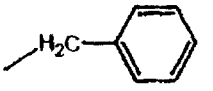
水母水通道蛋白辅因子包括天然水母水通道蛋白辅因子和修饰的水母水通道蛋白辅因子，可从 PROMEGA CORPORATION（Madison，WI）和从 MOLECULAR PROBES，INC（Eugene，OR）获得。水母水通道蛋白

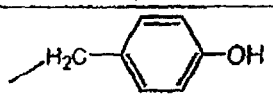
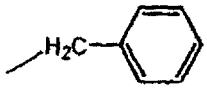
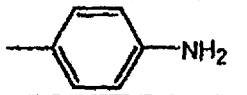
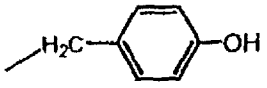
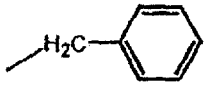
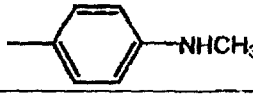
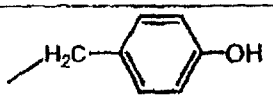
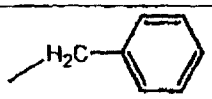
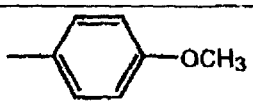
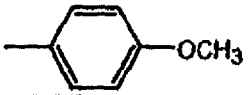
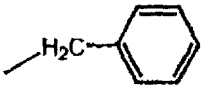
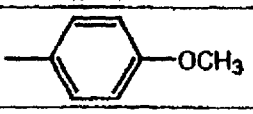
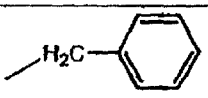
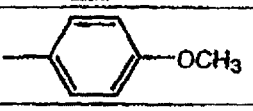
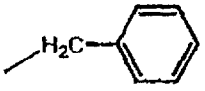
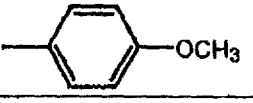
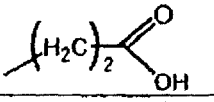
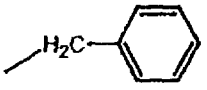
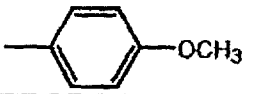
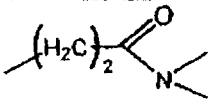
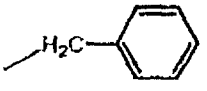
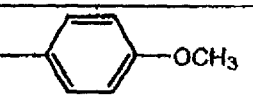
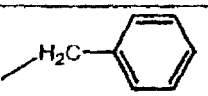
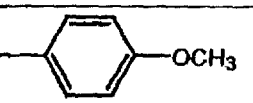
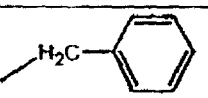
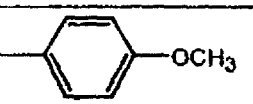
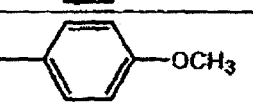
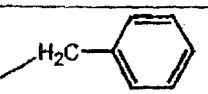
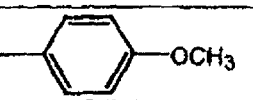
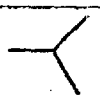
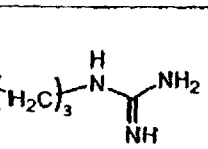
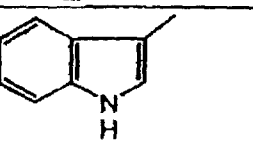
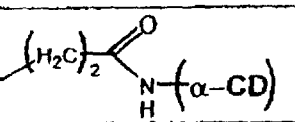
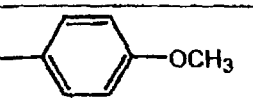
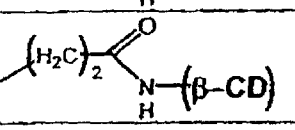
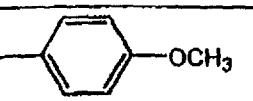
辅因子也可以合成，例如 Shimomura 等在 Biochem.J 261:913-20,1989; Inouye 等，Biochem,Biophys.Res.Comm.233:349-53,1997; 和 Teranishi 等，Anal.Biochem.249: 37-43,1997 中所述。

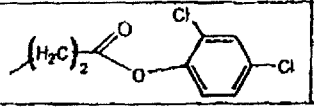
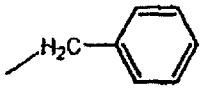
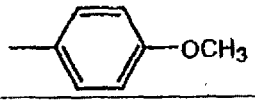
天然水母水通道蛋白辅因子和修饰的水母水通道蛋白辅因子统称为“水母水通道蛋白辅因子”，并用作发光蛋白质的发光体。这些发光体的具体例子包括基于在下表 A 中列出的结构 I 的那些，以及基于在下表 B 中列出的结构 II 和 III 的那些。具有结构 VI 的水母水通道蛋白辅因子统称为“水母水通道蛋白辅因子”，结构 VII 统称为“水母水通道蛋白辅因子-h”，结构 VIII 统称为“二脱氧基水母水通道蛋白辅因子”，分别对应于表 A 中的第 1、2 和 3 列。

表 A

R^1	R^2	R^3	R^4
			H
			H
			H
			H
			H
			H
			H
			H
$-CH_2-C_6F_5$			H
			H
			H
			H
			H
			H
			H
			H

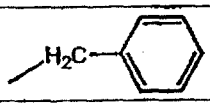
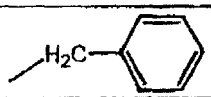
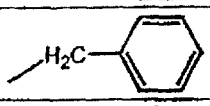
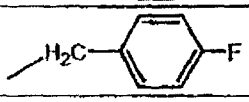
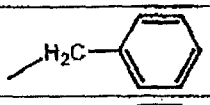
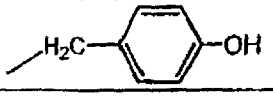
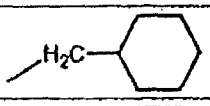
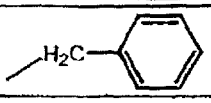
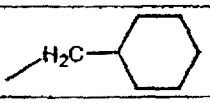
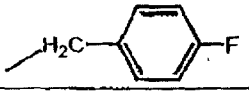
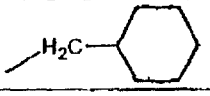
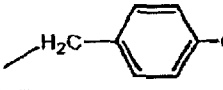
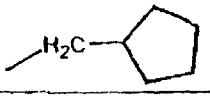
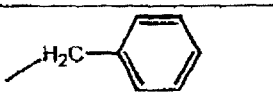
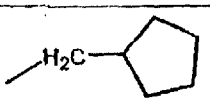
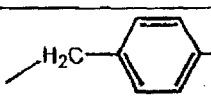
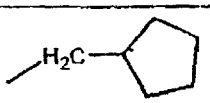
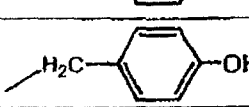
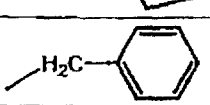
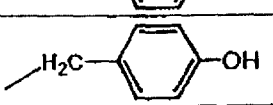
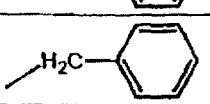
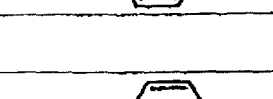
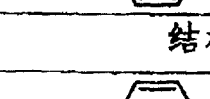
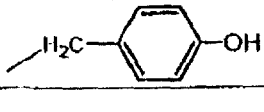
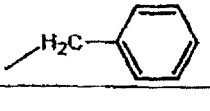
R^1	R^2	R^3	R^4
			H
			H
			H
			H
			H
			H
			H
			CH_3
			H
			H
	CH_3		H
			H
			H
			H
			H
			H

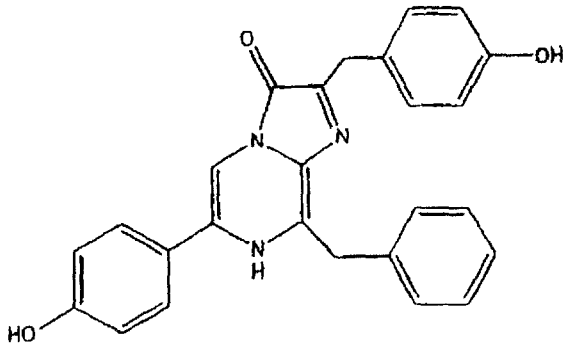
R^1	R^2	R^3	R^4
			H
			H
			H
CH_3	H		H
CH_3			CH_2CH_3
CH_3			H
CH_2-$(CH_3)_3$			H
			H
			H
CH_3			CH_3
CH_2-$(CH_3)_3$			CH_3
CH_2-$(CH_3)_3$	H		H
CH_3			
$CH(CH_3)CH_2CH_3$			H
	H		H
	H		H

R^1	R^2	R^3	R^4
			H

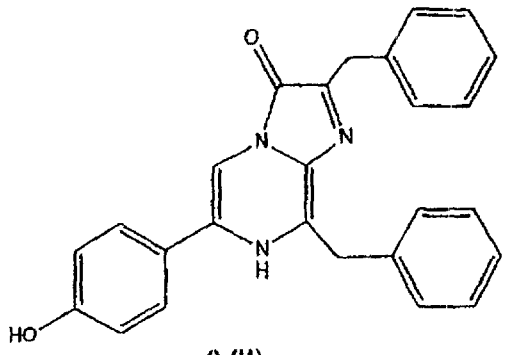
*CD=环糊精

表 B

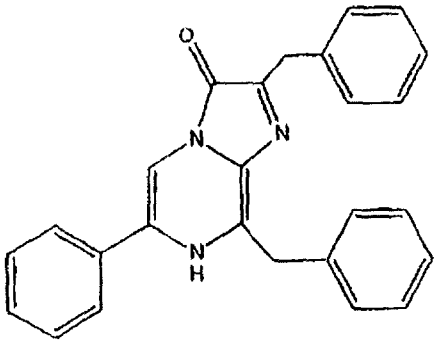
R^1	R^2	R^5	R^6	N
结构 II				
		OH	H	1
		OH	H	1
		OH	H	1
		OH	H	1
		OH	H	1
		OH	H	1
		OH	H	1
		OH	H	1
		OH	H	1
		OH	H	1
		H	OH	1
		OH	H	2
结构 III				
		OH	H	—



(VI)

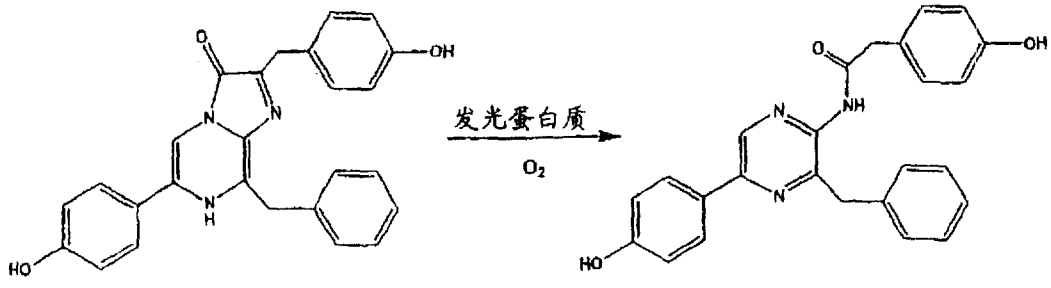


(VII)



VIII

水母水通道蛋白辅因子可以用作各种发光蛋白质的发光体。影响这一相互作用的因素包括发光蛋白质的性质和周围环境的特性。例如,发光蛋白质例如 Renilla 或 Oplophorus 荧光素酶或水母蛋白与水母水通道蛋白辅因子在氧气和至少痕量辅因子 Ca^{2+} 的存在下的相互作用将产生光。水母水通道蛋白辅因子在该过程中被氧化成其相应的 Coelenteramide，如下所示。



(VI)

来自这些相互作用的光可以检测，和在一些体系中与蛋白质的量、水母水通道蛋白辅因子和/或涉及的辅因子相关。发光检测通常是

通过将从具有给定表面积的样品发出的光的强度积分来进行。用于检测发光的仪器包括发光计、电荷耦合设备（CCD）和光电倍增管。

受保护的发光体

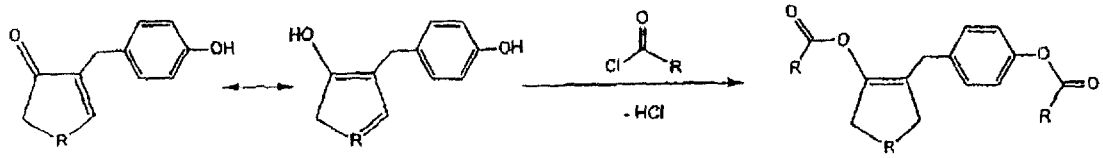
受保护的发光体能提高发光分析的应用性。“受保护的发光体”定义为已经被修饰使得它不再与发光蛋白质相互作用而发光的水母水通道蛋白辅因子。如果修饰方式是向水母水通道蛋白辅因子中引入酶可除去的基团，则受保护的发光体与适宜的酶发生相互作用，产生能发光的活性水母水通道蛋白辅因子。能将受保护的水母水通道蛋白辅因子转化成发光体的酶优选是非发光性酶。所有上述水母水通道蛋白辅因子可以被转化成受保护的发光体。术语“基团”是指化合物的任何部分。

一般而言，这种衍生作用涉及官能团例如苯酚（$-C_6H_4OH$）、羰基（>C=O）和苯胺（$-C_6H_4NH_2$）基团转化成对其环境不太活泼的基团。因为官能团的正常反应性被酶可除去基团的存在所抑制，所以酶可除去的基团可以称为保护基团。可能的保护基团包括酯，它能通过与酯酶的相互作用而除去。可能的保护基团还包括磷酰基，它能通过与磷酸酶（包括磷酸二酯酶和碱性磷酸酶）的相互作用而除去。可能的保护基团还包括葡糖基，它能通过与糖苷酶、α-D-半乳糖苷、β-D-半乳糖苷、α-D-葡糖苷、β-D-葡糖苷、α-D-甘露糖苷、β-D-甘露糖苷、β-D-呋喃果糖苷和β-D-葡糖苷酸的相互作用而除去。本领域技术人员将能认识到其它可用于本发明的酶可除去基团。酶与酶可除去基团之间的相互作用例如描述在美国专利 5831102 以及 Tsien, R.Y. Nature, 290: 527-28, 1981; Redden, P.R. 等, Int J Pharm, 180: 151-60, 1999; 和 Annaert, P 等, Pharmaceut Res, 14: 492-96, 1997 中。

酶可除去的基团可以设计成使得它们只能通过与特定酶的作用而除去。例如，特定的脂肪酸可以用作酶可除去的基团，和仅仅特定的酯酶将这些受保护的发光体转化成发光体。可以使用具有高位阻的保护基团，例如叔丁基。这种保护基团可以用于屏蔽能对体积大的位阻酯起作用的新型酯酶。氨基酸也可以用作保护基团。受保护的发光体可以进一步通过用与保护基团连接的氮原子取代烯醇氧原子来进一步

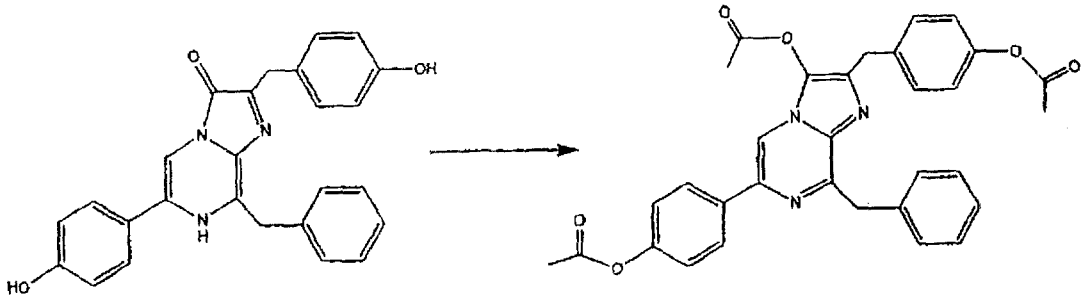
修饰。这种保护基团然后可以用蛋白酶除去，随后将受保护的发光体水解成烯醇/羰基，从而提供发光体。

这些酶可除去的基团优选是醇官能团的衍生物。在水母水通道蛋白辅因子中的羰基官能团的情况下，衍生作用可以涉及将羰基转化成烯醇基团（-C=C-OH）。水母水通道蛋白辅因子的羰基和烯醇形式可以是在溶液中的动态平衡，使得总是有一定比例的处于烯醇形式的基质。烯醇的羟基（-OH）可以衍生。经由用酰化剂形成酯的衍生作用在下面示意性地说明。具有结构 VI 的水母水通道蛋白辅因子含有两个酚基和一个羰基，任何这些基团的组合可以受保护。



用醚保护基团进行的衍生反应可以例如通过用烷基化剂例如乙酰氧基甲基溴处理水母水通道蛋白辅因子来进行。用酯保护基团进行的衍生可以例如通过用酰化剂例如乙酰酸酐或乙酰氯处理水母水通道蛋白辅因子来进行。这些衍生作用是在碱性条件下进行，即 pH 为 7-14。在这些条件下，酚羟基以及咪唑啉酮氧（imidazolone oxygen）都可以反应形成相应的酯或醚。认为咪唑酮氧当处于烯醇形式时发生反应。保护/脱保护方法以及各种保护基团的例子描述在“Protective Groups in Organic Synthesis” 中，Greene，Wuts 编辑，John Wiley and Sons，纽约，1991。

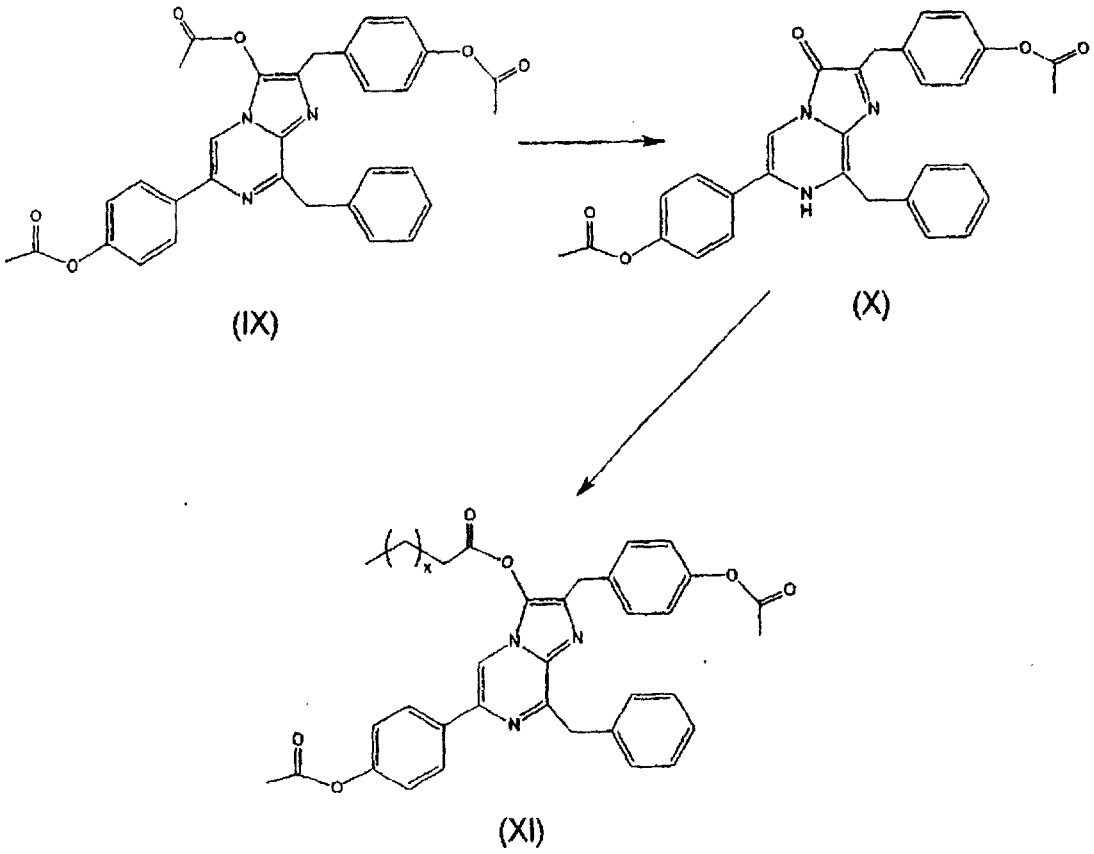
衍生方法的一个例子是从水母水通道蛋白辅因子 VI 合成受保护的发光体 IX。受保护的发光体 IX 也称为三乙酰基-水母水通道蛋白辅因子，这是因为存在三个乙酰基保护基团。



(VI) (IX)

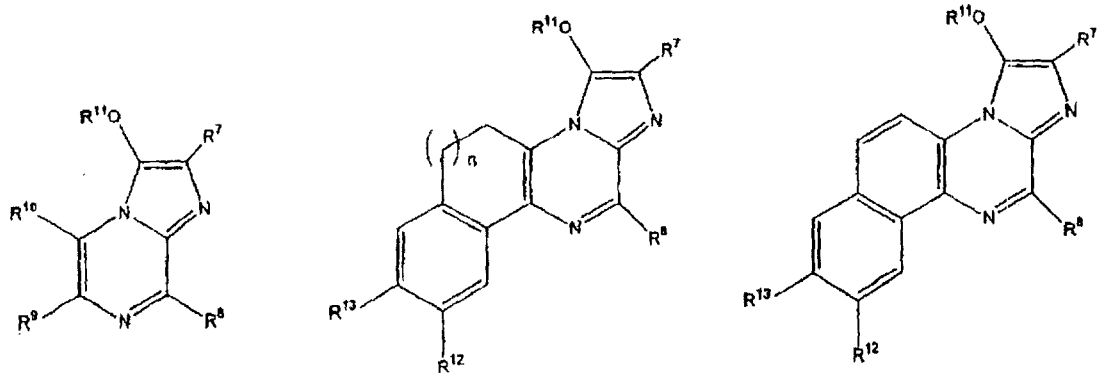
已经报道了具有结构IX的化合物用作中间体以试图形成天然水母水通道蛋白辅因子VI的结构（Inoue等，Tetrahedron Letters 31: 2685-2688（1977））。预期受保护的发光体IX将具有比其它受保护发光体稍低的稳定性，这是考虑到由乙酰基衍生的烯醇基团的易反应性。

对于给定的保护基团，衍生的烯醇比类似衍生的酚更易反应。这种烯醇衍生物的增加的反应能力允许烯醇衍生物进行选择性水解以再次提供咪唑啉酮的羰基。这类化合物称为部分受保护的物质，因为一部分官能团受保护，而另一部分则不受保护。这些部分受保护的物质可以用于生物学分析，或它们可以进一步与不同的酰化剂或烷基化剂反应形成不对称的化合物，即具有多于一种保护基团的化合物。适宜保护基团的选择取决于所考虑的细胞类型和所需的水解速率。选择性水解可以例如如Inoue等，Tetrahedron Letters 31: 2685-2688（1977）中所述进行。这表示在下面的反应路线中，其中将三乙酰基-水母水通道蛋白辅因子（IX）选择性水解成二乙酰基-水母水通道蛋白辅因子（X）和随后形成不对称的受保护发光体（XI）。



(IX) (X) (XI)

结构 XII-XIV 显示了在羰基上具有保护基的受保护发光体。



(XII) (XIII) (XIV)

R^7、R^8、R^9和R^{10}可以独立地是 H、烷基、杂烷基、芳基或其组合。R^{12}和 R^{13}可以独立地是$-OR^{16}$、H、OH、烷基、杂烷基、芳基或其组合。对于结构 XIII，n 可以是 0、1 或 2，优选是 1。

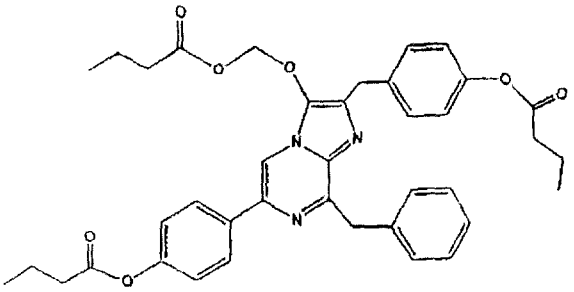
优选，R^7是如对于 R^1所述的含义或是$-CH_2-C_6H_4\ OR^{14}$。

优选，R^8是如对于 R^2所述的含义，和 R^{10}是如对于 R^4所述的含义。

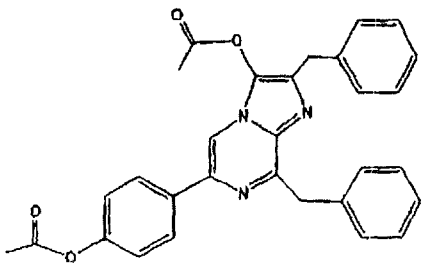
优选，R^9是如对于R^3所述的含义或是$-C_6H_4OR^{15}$。

R^{11}、R^{14}、R^{15}和R^{16}一起表示为R^p，是保护基团，可以独立地是各种保护基团的任何一种。优选，这些物质与其相应的氧原子一起是醚、酯或其组合。例如，保护基团可以是乙酰基（R^p=-C(=O)-CH_3）、丁酰基（R^p=-C(=O)-C_3H_7）、乙酰氧基甲基（R^p= $-CH_2-O-C(=O)-CH_3$）、丙酰氧基甲基（R^p= $-CH_2-O-C(=O)-C_2H_5$）、丁酰氧基甲基（R^p= $-CH_2-O-C(=O)-C_3H_7$）、新戊酰氧基甲基（R^p= $-CH_2-O-C(=O)-C(CH_3)_3$）或叔丁酰基（R^p= $-C(=O)-C(CH_3)_3$）。

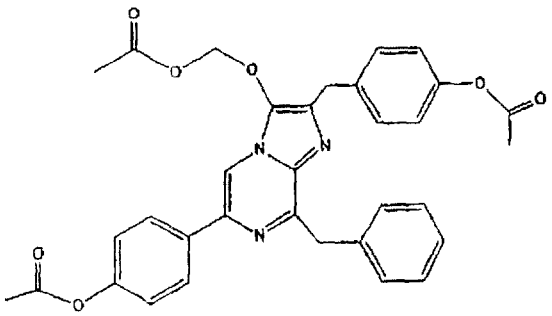
受保护发光体的具体例子包括三乙酰基-水母水通道蛋白辅因子（IX）、三丁酰基-水母水通道蛋白辅因子（XV）、二乙酰基-水母水通道蛋白辅因子-h（XVI）、乙酰氧基甲基二乙酰基-水母水通道蛋白辅因子（XVII）、乙酰氧基甲基乙酰基-水母水通道蛋白辅因子-h（XVIII）、新戊酰氧基甲基-水母水通道蛋白辅因子-h（XIX）和乙酰氧基甲基-二脱氧基水母水通道蛋白辅因子（XX）。



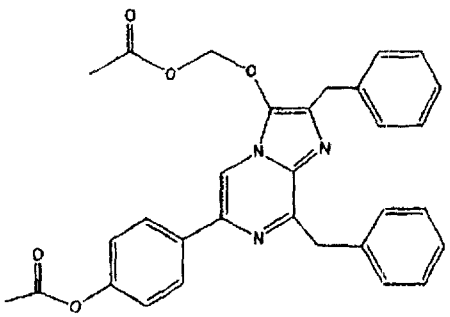
(XV)



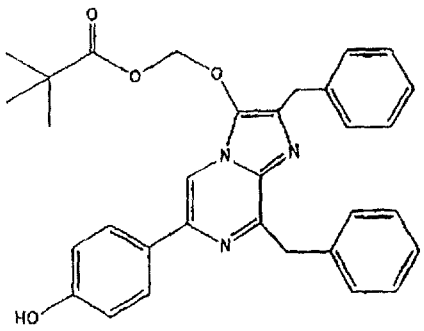
(XVI)



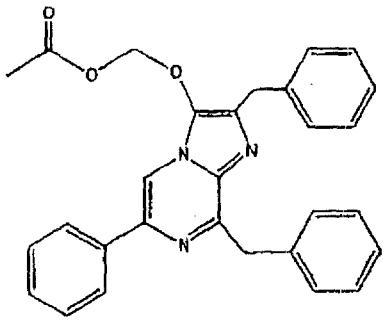
(XVII)



(XVIII)



(XIX)



(XX)

当受保护的发光体与适宜的脱保护酶相互作用时，保护基团被除去，恢复了初始官能团。对于酯和醚保护基团，脱保护酶可以例如是任何水解酶，包括酯酶。对于水母水通道蛋白辅因子，在其脱保护形式中具有羰基官能团（即羰基）使得与发光蛋白质发生发光相互作用，发光蛋白质包括 Renilla 荧光素酶，Oplophorus 荧光素酶，Cypridina 荧光素酶和水母蛋白。受保护的发光体可以仅仅需要在羰基位置被脱保护而转化成发光体。但是，保护基团在酚羟基上的存在可能仍然阻碍或防止发光相互作用。

受保护发光体的性能

受保护的发光体显示在正常使用条件下比其相应发光体更高的稳定性。水母水通道蛋白辅因子通常在溶剂化时、特别是在具有中性 pH 以上的水溶液（例如细胞培养基）中是不稳定的，这种不稳定性导致自动发光。自动发光为体系中的检测背景作出贡献，降低了检测的灵敏度。而且，这种不稳定性会引起信号的持续时间较短。这种持续时间通过信号的半衰期来定量，半衰期定义为信号衰减到其初始幅度一半时所需的时间。

对于受保护发光体和发光体而言，“稳定性”定义为特定化合物在特定环境中的半衰期。半衰期为化合物浓度减低到其初始浓度一半时所需的时间。特定化合物的存在和/或浓度可以通过各种本领域技术人员公知的技术来检测。这些技术包括例如核磁共振谱（NMR）和高效液相色谱（HPLC）。优选，稳定性通过首先将受保护发光体或发光体与含水混合物混合以得到初始浓度来检测。所述含水混合物优选是在 22℃下含有 10%胎牛血清的 F12 培养基。然后按照特定时间间隔从该

混合物中取出小份样品，通过HPLC检测化合物的浓度。测量浓度降低到初始浓度的50%所需的时间是半衰期。较长的半衰期对应于更稳定的化合物。

本发明的受保护发光体比其相应的发光体更稳定。在对比稳定性的过程中，发光体称为受保护发光体的“母体化合物”，这是因为所有酶可除去的基团已经被除去。受保护发光体的其它“母体化合物”是部分脱保护的衍生物。也就是说，母体化合物包括其中至少一个酶可除去基团已被除去的受保护发光体。例如，化合物VI和X都是化合物IX的母体化合物。

受保护发光体的显著稳定性提供了对发光分析的各种改进。例如，受保护的发光体在与发光蛋白质接触时不会发光，而是必须先与适宜的脱保护酶发生相互作用。因此，受保护的发光体可以在发光蛋白质的附近被转化成发光体。不如受保护发光体稳定的发光体免受去稳定化的影响（即自动发光），这是因为该发光体不是处于其活性形式，直到与脱保护酶发生相互作用为止。如果将脱保护酶限定到细胞或有机体中的特定区域，则可以仅仅在该区域中检测发光。

受保护的发光体在发光分析中的应用可以提供许多其它优点，包括提高分析的信号/背景之比和改进发光信号的稳定性。

分析：体外

在本发明的具体实施方案中，受保护的发光体可以用作分析试剂。使用荧光素酶的分析是本领域公知的。这些分析特别用于分析生物机制，例如基因表达和调节。通常，细胞与编码荧光素酶的核酸转染，然后分解生产蛋白质提取物。荧光素酶在蛋白质提取物中的存在通过添加试剂（包括基质）来检测。

在优选实施方案中，受保护的发光体在包括Renilla荧光素酶的分析中使用。Renilla荧光素酶可以是在分析中使用的唯一发光蛋白质（Srikantha等，J.Bacteriol. 178(1):121-9, 1996; Liu and Escher, Gene 237(1): 153-9, 1999）可以与一种或多种其它发光蛋白质一起存在（Skarpidi等，Blood 96(1):321-6, 2000; Parsons等，Anal.Biochem. 281(2): 187-92, 2000; Stables等，J. Recept. Signal Transduct.Res.19(1-4):395-410,1999; Grentzmann等，

RNA 4(4):479-86,1998），或可以是融合蛋白质与另一种发光蛋白质的一部分（Liu 等，Luminescence 15(1):45-9,2000）。

在一些实施方案中，受保护的发光体用于这样的分析中，其中脱保护酶在添加分析试剂之前就存在于样品中。这种分析可以用于检测脱保护酶在样品中的存在的方法中。例如，Renilla 荧光素酶和受保护发光体可以加入样品中。如果脱保护酶存在于样品中，则受保护发光体将被活化，并可以达到荧光素酶而产生光。如果脱保护酶不存在，则受保护的发光体保持不能达到荧光素酶，从而不能产生光。这些分析还可用于检测脱保护酶在样品中的相对浓度。

在另一个实施方案中，脱保护酶包含在分析试剂中。例如，在包含甲虫和 Renilla 荧光素酶的双重荧光素酶分析中，ATP、荧光素和受保护的发光体可以先加入样品中。甲虫荧光素酶将利用 ATP 和荧光素，并检测产生的光。随后加入脱保护酶。脱保护酶通过从烯醇/羰基基团除去至少一个保护基而活化了水母水通道蛋白辅因子。因此，基质具有能参与水母水通道蛋白辅因子-Renilla 荧光素酶的发光相互作用的羰基，并检测产生的光。

在另一个实施方案中，使用甲虫和 Renilla 荧光素酶，这些分析用于检测或定量样品中的细胞。因为甲虫荧光素酶取决于 ATP 的活性，所以它用于检测样品中的 ATP。这种依赖性已经被利用来用甲虫荧光素酶产生 ATP 分析、细胞检测分析和细胞活性分析。使用具有受保护的发光体的单一双重荧光素酶分析，可以检测在 ATP 和脱保护酶在样品中的存在。

分析：现场

本发明的化合物特别用于分析细胞的现场方法。使用荧光素酶进行细胞现场分析的方法是本领域公知的，参见美国专利 5998204。本发明的受保护发光体需要除去保护基团而成为荧光素酶的基质。但是，一旦除去了保护基团，这些化合物可以立即用作荧光素酶的基质。因此，可以通过现场成像测定脱保护酶在细胞中的位置。这可以通过使表达荧光素酶例如 Renilla 荧光素酶的细胞与受保护发光体接触来进行。无论能使受保护发光体脱保护的酶位于细胞中的何处位置，都将发光。这种发光可以通过成像系统检测到。受保护发光体也用于分

析报道基因表达。用于将受保护发光体转化成发光体所要求的脱保护酶的生产受到许多因素的影响。因为脱保护酶的存在和量可以通过使用受保护发光体来检测，所以可以研究这种酶的表达。

使用生物发光共振能转移（BRET），可以检测两个分子是否能互相结合或者共定位在细胞中(Angers 等,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 97(7):3684-9, 2000）。BRET 涉及使用两个生物发光分子或者一个生物发光分子和一个荧光分子。选择这些分子，使得给体的发射波长处于受体的激发范围中。此外，两个分子的激发和发射范围应该最小程度地重叠。当分子彼此接近时，给体的激发导致能量转移到受体而不是发射光。然后，受体发射出光形式的转移能量。因此，当分子彼此接近时，从给体检测的光弱，而从受体检测的光强。当分子不是彼此接近时，从给体检测的光强，而从受体检测的光弱（PCT 出版物 WO99/66324）。

通过将给体与第一种蛋白质结合并将受体与第二种蛋白质结合，两种蛋白质之间的相互作用可以通过 BRET 检测来测定。（Angers 等，2000）。在优选的实施方案中，给体是 Renilla 荧光素酶，受体是绿色荧光蛋白质。当受保护的发光体在这些分析中使用时，分析的准确性大大提高，这是因为由发光体的去稳定化所产生的光减少。

生化过程的分析不限于体外或现场环境，而是可以扩展到体内研究。受保护的发光体在体内发光分析中的应用对本领域技术人员而言是显然的。

试剂盒

本发明的一个重要方面包括包含本发明的受保护发光体的试剂盒。试剂盒可以用于基本上任何其中使用发光体的分析，包括在这里详细描述的优选方法。在优选的实施方案中，用于特定分析的基本试剂由试剂盒提供。这些试剂可以包括硫脲或硫脲衍生物、一种或多种缓冲水溶液和酶。试剂还可以包括 DMSO 和/或醇以帮助溶解受保护发光体。各试剂可以具有其自身的容器，或几种试剂可以预先混合并一起包装在容器中。在特定的实施方案中，试剂盒包含编码荧光素酶的基因。在另一个实施方案中，提供荧光素酶蛋白质本身。

化合物

本发明还提供式 XII、XIII 和 XIV 的新型化合物。对于化合物 XII，R^7是$-CH_2-C_6H_4OC(=O)CH_3$和R^9是$-C_6H_4OC(=O)CH_3$，R^{10}是 H，R^8是$-CH_2-C_6H_5$，则R^{11}不是$-C(=O)CH_3$。优选，本发明提供式 XII、XIII 和 XIV 的新型化合物，其进一步具有在 22℃下含有 F12 培养基和 10%胎牛血清的混合物中的半衰期为至少 45 分钟。优选，式 XII、XIII 和 XIV 的受保护发光体比其母体化合物更稳定，这通过化合物在含水环境中的半衰期来测定。具体而言，本发明提供式 XV、XVI、XVII、XVIII、XIX 和 XX 的新型化合物。

实施例

所有溶剂和试剂从 FISHER SCIENTIFIC 获得，但下述情况除外。Mathew 缓冲剂按照以下方式形成，从 SIGMA CHEMICALS 获得：pH 为 7.4 的 100mM 磷酸钾缓冲液；500mM 氯化钠；1mM 的乙二胺四乙酸（EDTA）；和 0.1%w: v 明胶型 A（75-100Bloom）。Ham 的 F12 培养基和胎牛血清是从 LIFE TECHNOLOGIES 获得，兔酯酶是从 SIGMA CHEMICALS 获得，Renilla 荧光素酶是从 CHEMICON CORP. 获得。

实施例 1

在此实施例中，具有三个乙酰基保护基团的受保护发光体是从具有结构 VI 的水母水通道蛋白辅因子合成。向化合物 VI（STOP AND GLO® SUBSTRATE，PROMEGA CORPORATION）（500mg；1.2mM）在无水吡啶（20ml）中的溶液中加入乙酸酐（1.1ml；12mM），使反应保持在惰性气氛和室温下。1 小时之后，向反应中加入 30ml 二氯甲烷，然后加入 80ml 水。该混合物搅拌 5 分钟，然后分离各层。有机层蒸发至干，然后如下用柱色谱法提纯。常规相硅胶（20g）溶解在二氯甲烷中，然后装入适宜尺寸的玻璃柱中。提取的反应混合物溶解在最小量的二氯甲烷中，并加入柱顶部。采用逐步梯度，开始是在二氯甲烷中的 1%乙酸乙酯（EtOAc），增加极性直至所需的化合物洗脱出来（二氯甲烷中的 10% EtOAc）。收集所有 HPLC 提纯的级分（>95%），蒸发至干，获得 410mg 的纯化合物 IX。

实施例 2

在此实施例中，具有三个丁酰基保护基团的受保护发光体是从具有结构 VI 的水母水通道蛋白辅因子合成。向化合物 VI（300mg；0.7mM）在无水吡啶（30ml）中的溶液中加入丁酸酐（1.12g；7mM），使反应保持在惰性气氛和室温下。1 小时之后，将反应混合物置于真空中以便除去溶剂，直至形成浆液。向浆液中加入 30ml 二氯甲烷，然后加入 80ml 水。该混合物搅拌 5 分钟，然后分离各层。有机层蒸发至干，然后如下用柱色谱法提纯。常规相硅胶（20g）溶解在二氯甲烷中的 2%EtOAc 中，然后装入适宜尺寸的玻璃柱中。提取的反应混合物溶解在最小量的二氯甲烷中，并加入柱顶部。流动相是恒溶剂成分的，所有所需的化合物用在二氯甲烷中的 2% EtOAc 洗脱出来。收集所有 HPLC 提纯的级分（>95%），蒸发至干，获得 225mg 的纯化合物 XV。

实施例 3

在此实施例中，合成具有结构 VII 的水母水通道蛋白辅因子。合成过程是 Inoue 等报道的改进方法（Inoue 和 Kakoi，Heterocycles48（8），1669（1998））。向 2-氨基-3-苄基-5(4-羟基苯基)吡嗪（2g，7.2mM）在二甲苯（80ml）中的溶液中一次加入所有的苯基丙酮酸（8.3g；50.5mM），将反应混合物加热回流（130-140℃）1 小时，然后冷却到室温。将混合物减压蒸发成黑色固体泡沫体。将泡沫体在 300g 的 N.P.硅胶用二氯甲烷中的甲醇逐步梯度进行色谱分离。所需的产物用二氯甲烷中的 5%甲醇洗脱，获得 2g 化合物 VII，通过 HPLC 提纯到 80%纯度。重复进行色谱分离，获得 900mg 的化合物 VII（“水母水通道蛋白辅因子-h”，HPLC 提纯>95%），是棕色固体。

实施例 4

在此实施例中，具有两个乙酰基保护基团的受保护发光体是从具有结构 VII 的水母水通道蛋白辅因子合成。向化合物 VII（300mg；0.74mM）在无水吡啶（15ml）中的溶液中加入乙酸酐（1ml；11mM），使反应保持在惰性气氛和室温下。1 小时之后，将反应混合物蒸发成粘性浆液，然后如下用柱色谱法提纯该粘性浆液。常规相硅胶（40g）溶解在 EtOAc 和庚烷的 1:3 混合物烷中，然后装入适宜尺寸的玻璃柱中。

将浆液溶解在最小量的二氯甲烷中，并加入柱顶部。流动相是恒溶剂成分的，所有所需的化合物用 1: 3 的 EtOAc/庚烷洗脱。收集所有 HPLC 提纯的级分（>95%），蒸发至干，获得 170mg 的纯化合物 XVI。

实施例 5

在此实施例中，具有一个乙酰基保护基团（在酚基上）的受保护发光体是从实施例 4 的受保护发光体（XVI）合成。将化合物 XVI 在吡啶和二氯甲烷的 1: 1 混合物中的 1%溶液冷却到 0℃。向该溶液中，滴加入预先冷却的 1%甲醇氨溶液。氨溶液的体积等于用于溶解 XVI 的吡啶/二氯甲烷混合物的体积。在反应几分钟后，用 HPLC 检测样品，确定脱保护的完成程度。通过 HPLC 测得形成新的峰，它比原料的极性更强（即在 C18 硅胶上更容易洗脱），但比化合物 VI 的亲油性更强（即在 C18 硅胶上更晚洗脱出来）。一旦通过 HPLC 检测不到化合物 XVI，将反应混合物蒸发至干，然后如下用柱色谱法提纯。常规相硅胶按照硅胶: 化合物=75: 1 的比例溶解在 EtOAc 和庚烷的 1: 2 混合物中，流动相是呈步进梯度的，通过增加 EtOAc 的浓度来提高溶剂体系的极性，直至洗脱出所有所需的化合物。收集所有 HPLC 提纯的级分（>95%），浓缩获得纯化合物 XXI。化合物 XXI 具有结构 I，其中 R^1=$-CH_2-C_6H_5$; R^2=$-CH_2-C_6H_5$; R^3=$-C_6H_4-O-C(=O)-CH_3$; 和 R^4=H。

化合物 XXI 因此具有脱保护的烯醇/羰基，其可以被保护以提供不对称的受保护发光体。例如，与乙酸溴甲酯的反应将获得受保护的发光体 XVIII。

实施例 6

在此实施例中，具有两个乙酰基保护基团（在酚基上）和一个乙酰氧基甲基保护基团的受保护发光体是从实施例 1 中合成的受保护发光体（IX）合成。向化合物 IX 在无水吡啶中的 1%溶液中加入 NaH（5.0 当量），使该溶液在惰性气氛和室温下搅拌。10 分钟之后，将乙酸溴甲酯（5.0 当量）滴加入该混合物中，将该反应混合物于室温再搅拌 30 分钟。向反应中加入二氯甲烷，其体积是吡啶体积的两倍，然后加入水，其体积等于吡啶的体积。将该混合物再搅拌 5 分钟，然后分离各层。有机层蒸发至干。该物质可以使用常规相硅胶用 EtOAc/庚烷作

为流动相进行柱色谱法提纯，获得化合物 XVII。

实施例 7

在此实施例中，具有结构 XIX 的受保护发光体是从具有结构 VII 的水母水通道蛋白辅因子使用 Aungst 等（Pharmaceutical Research，12(5),763(1995)）的改进方法合成。向 KI（0.122g; 0.74mM）、碳酸钾（0.031g; 0.44mM）和新戊酸氯甲酯（1.1g，7.3mM）在无水 DMF（3ml）中的混合物中加入化合物 VII（0.3g，0.73mM），将该反应于室温在惰性气氛下搅拌过夜。通过 HPLC 分析，显示化合物 VII 完全被消耗，出现了与化合物 XIX 相关的极性较弱的峰。DMF 在减压下蒸发。将固体溶解在二氯甲烷中，在 50gN.P 硅胶上进行色谱提纯，获得 255mg 的化合物 XIX（98%，用 HPLC 提纯）。

实施例 8

在此实施例中，具有结构 VIII 的水母水通道蛋白辅因子（“二脱氧基水母水通道蛋白辅因子”）是从 2-氨基-3-苄基-5-苯基吡嗪和 2-乙酰氧基-3-苯基丙烯醛合成。化合物 2-氨基-3-苄基-5-苯基吡嗪是根据前面描述的方法制备（Kishi，Y 等，Tet. Lett，2747（1972）；Cormier，M 等，Biochemistry， 18(11),2204(1979)；Hirano，T 等，Tetrahedron 53(38) 12903-12916（1997））。化合物 2-乙酰氧基-3-苯基丙烯醛是如下合成。向苯基丙酮酸（25g，152mM）在无水吡啶（250ml）中的溶液中加入乙酸酐（170ml）。将溶液在惰性气氛下搅拌过夜，通过薄层色谱（TLC）使用在二氯甲烷中的 10%甲醇进行监控。吡啶在减压下蒸发，所得的浆液溶解在二氯甲烷（700ml）中，并用 200ml 份的 0.1N 盐酸水溶液洗涤 3 次。有机相用硫酸钠干燥，并过滤，滤液在减压下浓缩，得到粘性琥珀色浆液。该浆液在 N.P 硅胶上用二氯甲烷进行色谱提纯，获得 24g 的 2-乙酰氧基-3-苯基丙烯酸。将该乙酸烯醇酯中间体溶解在 150mlTHF 中，并冷却到 0℃。然后在搅拌下滴加入草酰氯（51ml，580 mM），并将该溶液于 0℃再搅拌 20 分钟。滴加入二甲基甲酰胺（DMF）（7.5ml），然后将该溶液于 0℃搅拌 4 小时，在减压下浓缩，用甲苯共蒸发两次，得到酰氯。将该酰氯中间体（14.5g，87mM）溶解在 200ml 的二氯甲烷/THF 的 1：1 混合物

中。将该溶液冷却到-70℃，滴加入 $LiAl(OtBu)_3H$（152ml，152mM），同时保持反应温度低于-70℃。$LiAl(OtBu)_3H$ 的添加完成之后，于-70℃继续搅拌 2 小时。除去冷却浴，加入盐酸水溶液（2N，100ml），将反应加热到室温。该混合物萃取入 500ml 醚中，组合的有机相用硫酸钠干燥，并过滤。滤液进行减压浓缩，得到粘性油，用 N.P.硅胶（250g）和在己烷中的乙酸乙酯梯度通过柱色谱提纯。所需的化合物在庚烷中的 10%乙酸乙酯中洗脱出来，得到 13.5g 的 2-乙酰氧基-3-苯基丙烯醛，是琥珀色的油（80%产率，在 ^1H NMR 中的醛单峰位于 9ppm，ms.=189）。

二脱氧基水母水通道蛋白辅因子是从 2-氨基-3-苄基-5-苯基吡嗪和 2-乙酰氧基-3-苯基丙烯醛根据 Kishi 等描述的方法制备（Tet.Lett.，1972），其中有以下改进。向 2-氨基-3-苄基-5-苯基吡嗪（2g，8.1mM）在乙醇（125ml）中的溶液中一次加入 2-乙酰氧基-3-苯基丙烯醛（3g，16.2mM）。通过向该溶液中通入氮气将该溶液脱氧 30 分钟。加入浓盐酸水溶液（4ml），反应加热回流 18 小时。在冷却到室温之后，过滤收集浅灰色沉淀物，用 40ml 乙醇洗涤，真空干燥，获得 1.28g 的化合物 VIII，即二脱氧基水母水通道蛋白辅因子（80%产率）。

化合物 VIII 因此具有脱保护的烯醇/羰基，其受到保护以提供受保护的发光体。例如，与乙酸溴甲酯的反应将获得受保护的发光体 XX。

体外分析

实施例 9-各种受保护发光体的稳定性

水母水通道蛋白辅因子或受保护发光体的样品以约 3mM 的浓度溶解在甲醇中。这些储备溶液稀释到在 F12 培养基；F12 培养基+10%胎牛血清；或 F12 培养基+0.01%Tween 20 中至 1μM。在不同时间提取样品，用 HPLC 检测保留在样品中的化合物的量（水母水通道蛋白辅因子或受保护发光体）。在各溶液中的化合物的半衰期通过用吸收率的 log 值对时间作图获得的线性函数进行回归分析来确定。然后计算化合物浓度降低到初始浓度的 50%所需的时间。

表 C

	半衰期（分钟）						
	VI	XVII	VII	XVIII	XIX	VIII	XX
F12 培养基+FBS	17	92	35	55	1155	40	92
F12 +0.01%Tween 20	55	866					
F12 +FBS（37℃）			25		866		

现场分析

在这些实施例中，发光体和受保护发光体的性能在各种培养的细胞中现场检测。细胞暂时地或稳定地与编码 Renilla 荧光素酶的质粒子转染。在与水母水通道蛋白辅因子（VI 或 VII）接触的细胞或受保护的发光体（IX、XV 或 XVI）之间比较发光。通过检测随着时间的发光和比较其中不存在细胞情况下的发光。证明了和与未修饰的水母水通道蛋白辅因子接触的细胞相比，细胞与受保护发光体的接触导致通常较少的发光，具有较长的半衰期和较高的信号/背景之比。

中国田鼠的卵巢（CHO）细胞保持在 Ham 的含有 10%胎牛血清（FBS）的 F-12 培养基中。HeLa 和 293 细胞保持在含有 10%胎小牛血清（FCS）的 DMEM 培养基中。所有细胞系在 5%CO_2 存在下于 37℃生长。细胞暂时性地与 15μg 的 pUC19 或 pRL-控制质粒（PROMEGA CORPORATION，E6271）在 7.5×10^5 细胞/10cm 板的浓度下用 Tfx-20（PROMEGA CORPORATION，E2391）或 TransFast™转染剂（PROMEGA CORPORATION，E2431）进行转染。第二天，收集转染物，分到白色 DYNEX96 孔型发光计板的 48 个孔中。

CHO 细胞也独立地用 pHRL-控制和 pPGKNeo（用于克隆选择的质粒表达 Neomycin 基因）使用 TransFast™试剂进行稳定性转染。在 500μg/ml Neomycin（PROMEGA CORP.）的克隆选择之后，使用在完全 F12 培养基中的水母水通道蛋白辅因子选择用于 Renilla 荧光素酶活性的稳定克隆。

如此制备的细胞然后进行各种分析。用于这些分析的反应缓冲剂使用 DMEM 或 F12 培养基用 FBS 或 FCS（10 体积%）制备。然后加入水母水通道蛋白辅因子 VI、水母水通道蛋白辅因子 VII 或受保护发光体 IX、XV 或 XVI 之一达到 60μM 的浓度。这些缓冲剂然后用于在下列分

析中进行发光检测。用 ORION 发光计检测发光。

实施例 10-活细胞分析，随着信号/背景之比增加

在转染之后的 24 或 48 小时之后，从细胞中吸出培养基。细胞用 100μl/孔的 1X 磷酸盐缓冲的盐水洗涤。通过 half-logs 将含有 VI 或 IX 的反应缓冲剂滴入完全的培养基中，并将这些溶液加入空孔中和含有已转染的细胞的孔中。在替换培养基之后 5 分钟检测发光。立即在初始检测之后，加入 TERGITOL NP-9（SIGMA CHEMICALS）到最终浓度为 1%。样品混合约 15 秒，以 1 秒/孔将发光积分。在将 Tergitol NP-9 加入含有水母水通道蛋白辅因子 VI 或 VII 的样品中之后，从细胞样品检测的发光增加。在将 Tergitol NP-9 加入含有水母水通道蛋白辅因子 IX、XV 或 XVI 或 XIX 的样品中之后，从细胞样品检测的发光几乎降低到自动发光的水平。

对于仅含有培养基和血清的样品测得的发光作为自动发光。发光与自动发光之比作为信号/背景之比（S/B）。被 pHRL CMV，E6271 转染的 CHO 细胞的结果列在表 D 中。

表 D

		化合物/参比化合物的比率		
化合物	参比化合物	自动发光	发光	S/N
IX	VI	0.2	1.5	9.1
XV	VI	0.2	0.7	3.9
XVI	VI	0.4	1.1	3.4
XVI	VII	0.9	1.4	1.7
XIX	VII	0.2	0.32	17

实施例 11- 自动发光的对比

CHO 细胞在用合成 Renilla 荧光素酶基因在 CMV 启动子（PROMEGA，目录）控制下稳定地转染之后，在 5%CO_2 的存在下在 37℃下在含有 10%FBS 的 F12 培养基中生长。将细胞种在 96 孔板的 3 行（A-C 行）中，并静置过夜生长。将水母水通道蛋白辅因子 VI 或乙酰氧基甲基二乙酰基水母水通道蛋白辅因子 XVII 在 F12 培养基+10%FBS

中稀释到 60μM。含有水母水通道蛋白辅因子 XVII 的 F12 用于代替 A 行中的培养基，并加入 E 行的空孔中（检测自动发光）。含有水母水通道蛋白辅因子的 F12 用于代替 C 行中的培养基，并加入 G 行的空孔中。B 行用于确保在水母水通道蛋白辅因子或乙酰氧基甲基二乙酰基水母水通道蛋白辅因子不存在下不产生发光。在 3 小时内，每 10 分钟检测在该板上的孔中的发光，并绘制各化合物的发光（发光蛋白质依赖性发光）和自动发光（非发光蛋白质依赖性发光，从不含细胞的孔检测）随时间变化的曲线。发光随时间变化的情况在图 1 中显示。信号/背景之比表示在图 2 中。

实施例 12-半衰期短的基因报告分子

该实施例显示了阻隔两部分蛋白质合成通路的作用。嘌呤霉素和环己酰亚胺都能抑制蛋白质合成，但它们以不同的方式在通路中的不同点进行。在体外，酶的强度将降低超过 100 倍，在 22℃下的半衰期为 3-5 分钟。

CHO 细胞在用合成人化 Renilla 荧光素酶基因在 CMV 启动子（Promega，目录）控制下稳定地转染，并在 5%CO_2的存在下在 37℃下在含有 10%胎牛血清的 F12 培养基中在 96 孔板中生长。将一系列 12-16 个板仅仅种在 A 行，并静置以过夜生长。除去该培养基，并用含有 600μM 的 POM 水母水通道蛋白辅因子-h（XIX）的 F12 培养基+10%FBS 代替。检测在一个板上的细胞的发光，将所有板放回培育器中。每 1 小时检测在一个板上的细胞的发光，进行 1、2 和 3 小时的后培养基替换。也在大约 3.5 小时的后培养基替代下检测发光。将嘌呤霉素和环己酰亚胺加入每个板上的一半孔中，将这些板放回培育器中。此时作为时刻 0。在时刻 0，检测在一个板上的细胞的发光。以 5 分钟的间隔，将这些板放回培育器中，取出新板，并检测发光。这种循环每 5 分钟重复进行，直至变化速度降低。此时，除去单板，并检测其发光。然后将该板立即放回培育器中。这种循环每 15 分钟重复进行。在所有这些板中检测的发光平均为“未处理的细胞”（不暴露于蛋白质抑制剂的那些）和“经过处理的细胞”（暴露于环己酰亚胺或嘌呤霉素的那些）。数据显示在图 3 中，其中显示每次归一化到未处理的细胞的平均发光（同时检测）的发光。对于未处理的细胞的绝对发光保持从时

刻 0 保持不变，直至分析结束。

实施例 13-用于从水母水通道蛋白辅因子衍生物与水母水通道蛋白辅因子母体化合物的发光的定位的分析。

A. POM-h（XIX）与水母水通道蛋白辅因子-h（VII）

将 CHO hRL25 细胞（它表达荧光素酶）（4.5ml 的（7.5×10^{5}个细胞）/（板/5×10^{9}个细胞/ml）再悬浮在 5.5ml 的培养基中，并加入 96 孔板中。第二天，吸出细胞，用 100μl 的 PBS 洗涤，然后再次吸出。然后将不含基质（背景）的 100μl 的培养基（F12）加入不含细胞的孔中。然后用 ORION 发光计（BERTHHOLD）以 1 秒/孔读取这些孔的数据（表 E; Bkg）。

类似地，将含有 100μM 的 POM-h 或水母水通道蛋白辅因子-h 的 100μl 部分的培养基放入含有细胞的孔中或仅置于孔中。然后立即(水母水通道蛋白辅因子）和在 10 分钟后添加（POM-h）之后用 ORION 发光计（BERTHHOLD）以 1 秒/孔读取这些孔的数据（表 E; Subs）。

然后，向每个孔中加入 0.5μl 的提纯的 Renilla 荧光素酶（3.96×10^{-5}M/反应（Chemicon）。然后以 1 秒/孔读取所有孔的数据（表 E; RL）。

表 E

	Bkg	Subs (RLU)	RL (RLU)
hRL25+水母水通道蛋白辅因子-h (VII)	18	39342	331381
hRL25+POM-h (XIX)	23	19584	35349
培养基+ 水母水通道蛋白辅因子-h (VII)	19	763	278467
培养基+ POM-h (XIX)	16	21	3641

使用表达荧光素酶的 CHO hRL25 细胞获得的上述数据证明了 POM-h 在从外部向培养基中添加荧光素酶之前和之后都被转化成发光体（19584 对 35349），表明该基质迅速在细胞内定位。相比之下，在相似的条件下，与后添加外源荧光素酶相比，在添加外源荧光素酶之前水母水通道蛋白辅因子-h 具有较低的发光（39342 对 331381），表明该基质可以在细胞内部以及外部使用，不需要含有酯酶的复合物。

这些数据进一步证明在仅仅培养基（含极少的酯酶）中，POM-h具有与含hRL25细胞的培养基相比更低的发光（3641对35349），表明该水母水通道蛋白辅因子衍生物必须先在其被荧光素酶转化成发光体之前被酯酶转化。相比之下，水母水通道蛋白辅因子-h显示与仅仅用培养基和用含hRL25细胞的培养基相当的结果（278467对331381），表明在与外源荧光素酶反应之前没有必要有细胞介导的转化。

B. 三乙酰基水母水通道蛋白辅因子（IX）
与水母水通道蛋白辅因子（VI）

将未转染的CHO（并不自然产生荧光素酶）和CHO hRL25细胞（它表达荧光素酶）（4.5ml的（7.5×10^{5}个细胞）/（板/5×10^{9}个细胞/ml）再悬浮在5.5ml的培养基中，并加入96孔板中。第二天，吸出细胞，用100μl的PBS洗涤，然后再次吸出。然后将不含基质（背景）的100μl培养基（F12）加入不含细胞的孔中。然后用ORION发光计（BERTHHOLD）以1秒/孔读取这些孔的数据（表F; Bkg）。

类似地，将含有100μM的水母水通道蛋白辅因子或三乙酰基水母水通道蛋白辅因子的100μl部分的培养基放入含有细胞的孔中或仅置于孔中。然后立即（水母水通道蛋白辅因子）和在4分钟后添加之后用（三乙酰基水母水通道蛋白辅因子）ORION发光计（BERTHHOLD）以1秒/孔读取这些孔的数据（表F; Subs）。

然后，向每个孔中加入0.5μl的提纯的Renilla荧光素酶（3.96×10^{-5}M/反应（Chemicon）。然后以1秒/孔读取所有孔的数据（表F; RL）。

表F

	Bkg	Subs（RLU）	RL（RLU）
hRL2+三乙酰基水母水通道蛋白辅因子（IX）	23	224353	229111
hRL2+水母水通道蛋白辅因子（VI）	23	139842	110008374
CHO+三乙酰基水母水通道蛋白辅因子（IX）	23	864	8910
CHO+ 水母水通道蛋白辅因子（VI）	23	6253	11930147

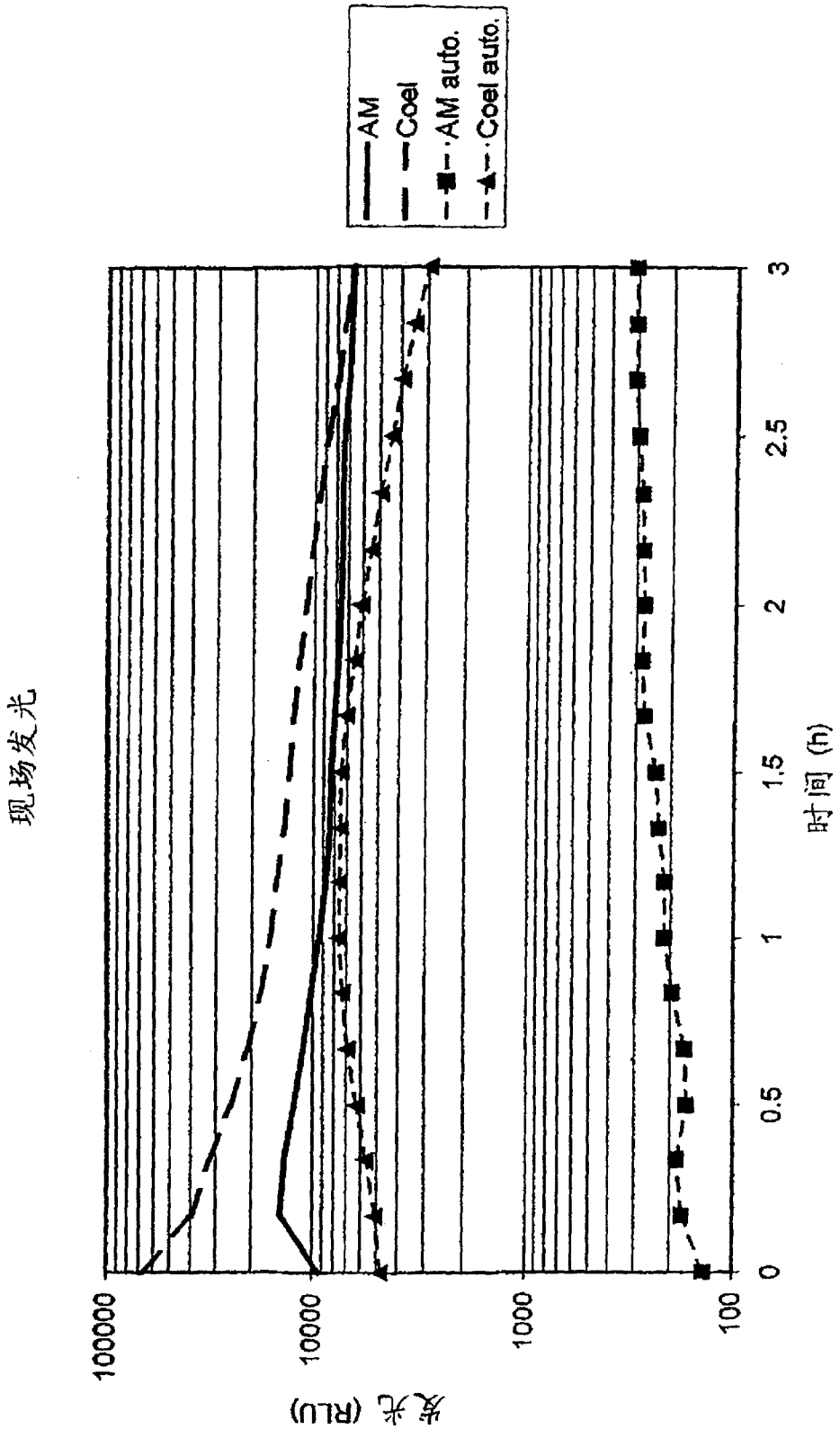

AM
Coel
AM auto.
Coel auto.
现场发光
发光 (RLU)
100000
10000
1000
100
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
时间 (h)

图 1

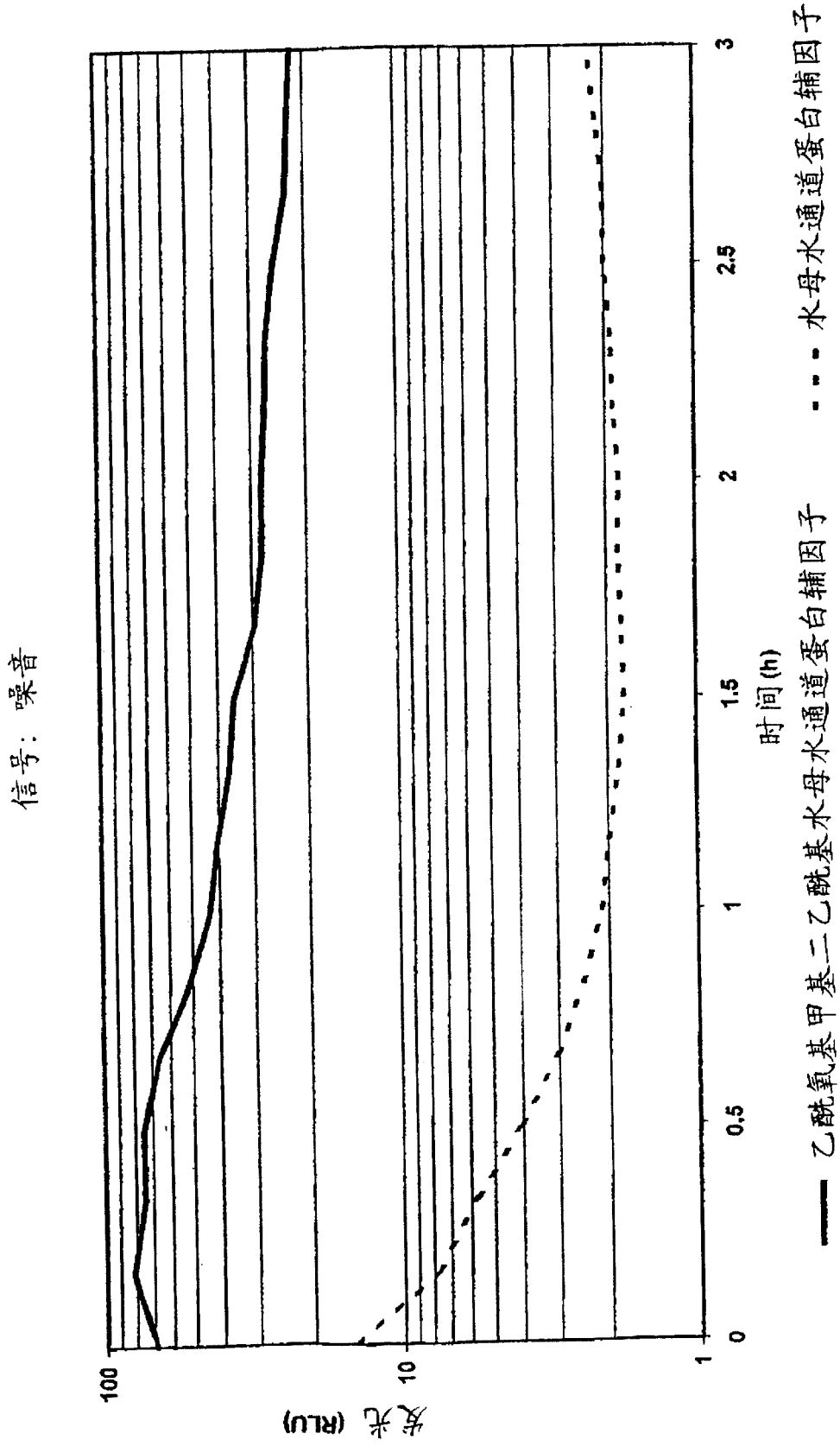

信号：噪音
发光 (RLU)
100
10
1
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
时间(h)
乙酰氧基甲基二乙酰基水母水通道蛋白辅因子
水母水通道蛋白辅因子

图 2

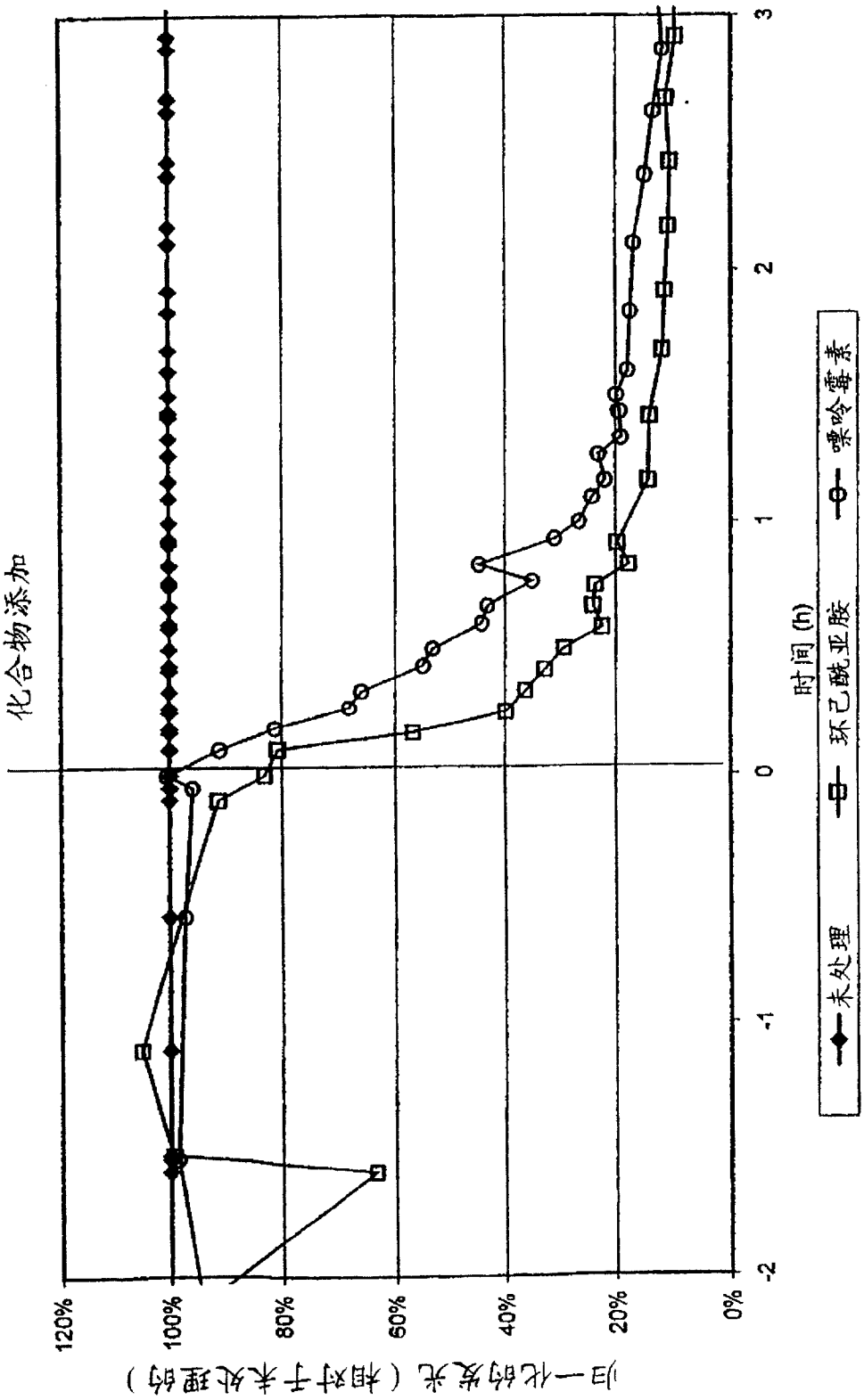

归一化的发光（相对于未处理的）
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
-2
-1
0
1
2
3
时间(h)
化合物添加
未处理
环己酰亚胺
嘌呤霉素

图 3