



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103649069 B

(45)授权公告日 2016.09.14

(21)申请号 201280021603.9

(22)申请日 2012.04.30

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103649069 A

(43)申请公布日 2014.03.19

(30)优先权数据  
61/482134 2011.05.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2013.11.01

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2012/035732 2012.04.30

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02012/151142 EN 2012.11.08

(73)专利权人 生命科技公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 A.米哈利 B.爱德华兹 Z.王

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 孔青 林森

(51)Int.Cl.  
C07D 321/00(2006.01)  
C07D 407/12(2006.01)

(56)对比文件  
US 5780649 A, 1998.07.14,  
Hashem Akhavan-Tafti et al..A Novel  
Substitution Process for the Preparation  
of Alkoxy-, Aryloxy-, and Acyloxy-  
Substituted 1,2-Dioxetanes.《J. Am. Chem.  
Soc.》.1997,第119卷(第1期),第245-246页.

审查员 刘广宇

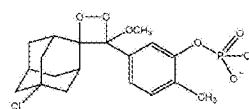
权利要求书13页 说明书81页 附图16页

### (54)发明名称

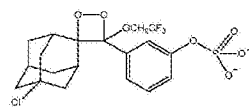
闪光和辉光1,2-二氧杂环丁烷类

### (57)摘要

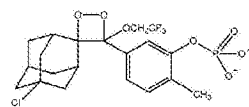
本发明公开了具有化学发光的闪光和辉光性能的化合物。也公开了使用所述化合物产生光、检测和/或定量酶、抗原和/或核酸的方法。也公开了与这些化合物有关的试剂盒。



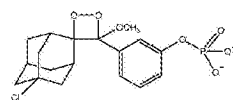
底物 A



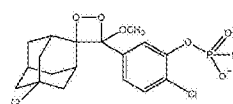
底物 B



底物 C

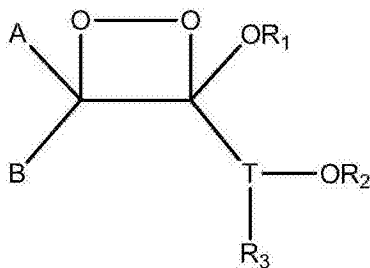


CSPD<sup>®</sup>

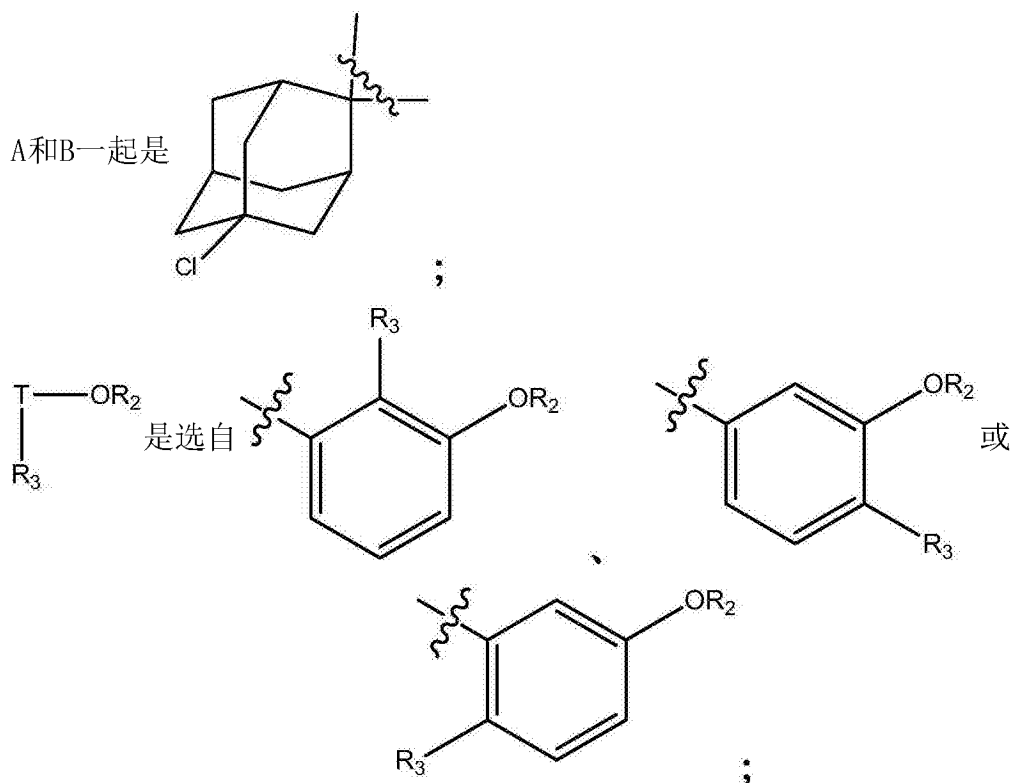


CDP-Star<sup>®</sup>

1. 一种具有下式结构的化合物

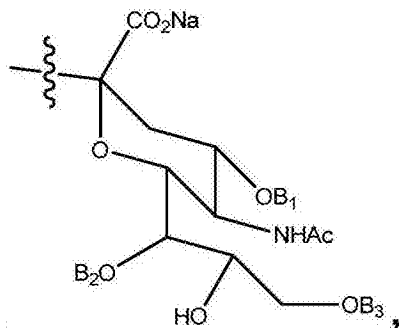


其中,



R<sub>1</sub>是1,1,1-三氟乙基;

R<sub>2</sub>是酶可切割的基团,其中OR<sub>2</sub>选自磷酸酯、乙酸酯、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酯、腺苷三磷酸、腺苷二磷酸、腺苷单磷酸、腺苷、 $\alpha$ -D-半乳糖苷、 $\beta$ -D-半乳糖苷、 $\alpha$ -D-葡萄糖苷、 $\beta$ -D-葡萄糖苷、 $\alpha$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -呋喃果糖苷、 $\beta$ -D-葡萄糖苷酸或

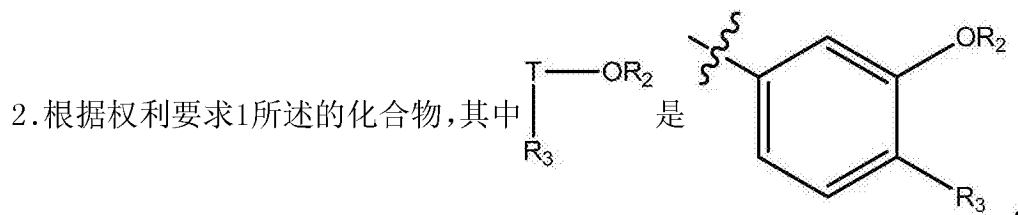


其中,B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>和B<sub>3</sub>各自独立地是H、包含1-4个碳原子的直链烷

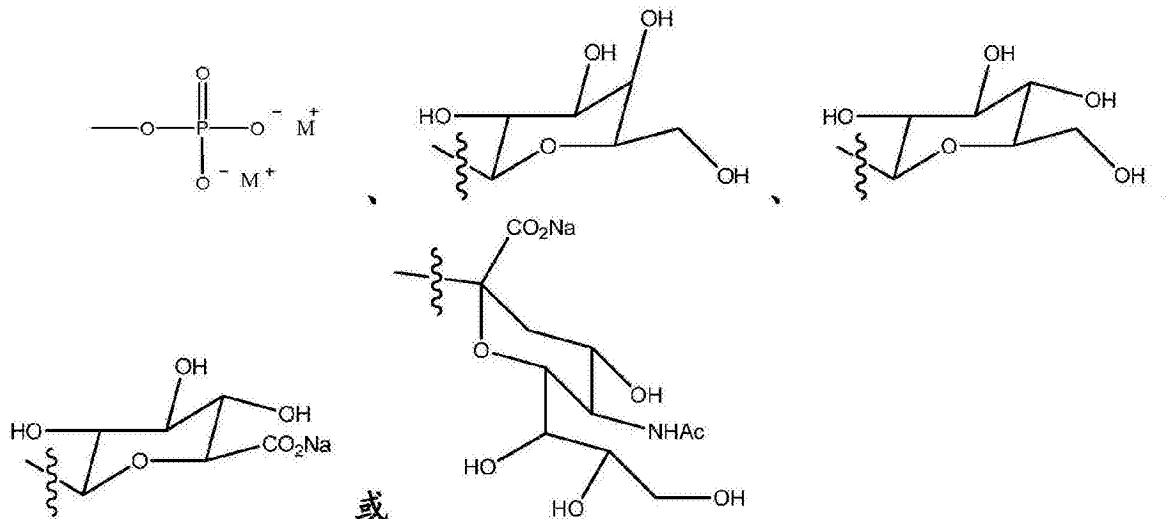
基、或包含3-6个碳原子的支链烷基,其中所述酶可切割的基团包含可被酶部分切割以在T上产生氧阴离子的键;且

R<sub>3</sub>是氢或供电子基团,所述供电子基团选自包含1-20个碳原子的直链烷基或包含1-20

个碳原子的直链烷基。



3. 根据权利要求1所述的化合物, 其中R<sub>2</sub>是



其中M<sup>+</sup>代表选自钠或钾的碱金属的阳离子、铵离子或N(C<sub>1-7</sub>烷基)<sub>4</sub><sup>+</sup>、N(苄基)<sub>4</sub><sup>+</sup>或吡啶鎓。

4. 根据权利要求1所述的化合物, 其中所述供电子基团是包含1-5个碳原子的直链烷基或包含1-5个碳原子的直链烷氧基。

5. 根据权利要求1所述的化合物, 其中所述供电子基团选自: 甲基、乙基、丙基、丁基、甲氧基、乙氧基、丙氧基和丁氧基。

6. 根据权利要求1所述的化合物, 其中所述可被酶部分切割的键的切割会导致在25℃的光的产生, 所述光的产生在小于15分钟内达到最大值。

7. 根据权利要求6所述的化合物, 其中所述光的产生在小于10分钟内达到最大值。

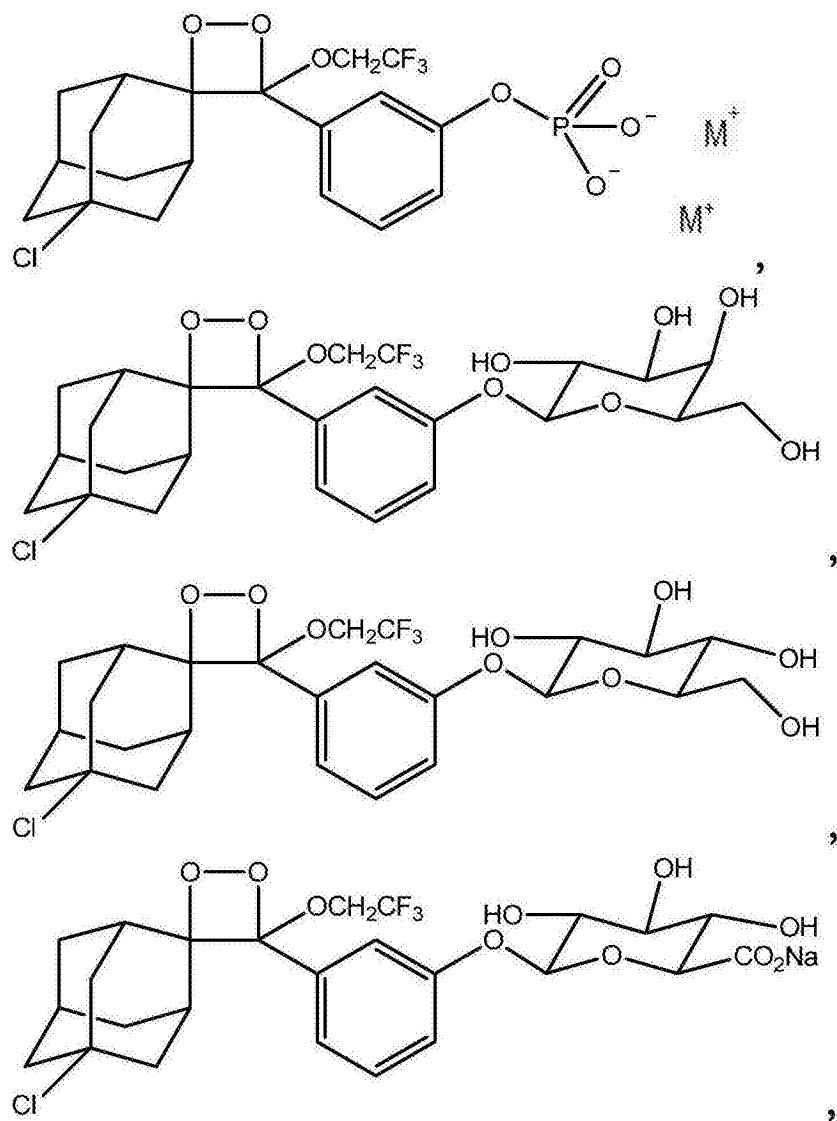
8. 根据权利要求6所述的化合物, 其中所述光的产生在小于5分钟内达到最大值。

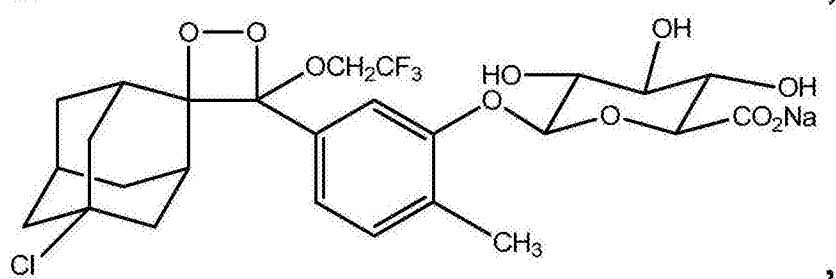
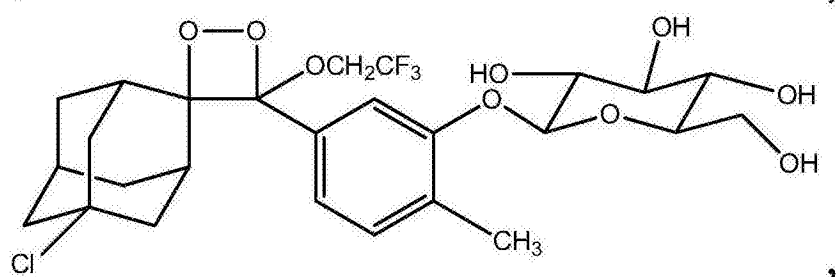
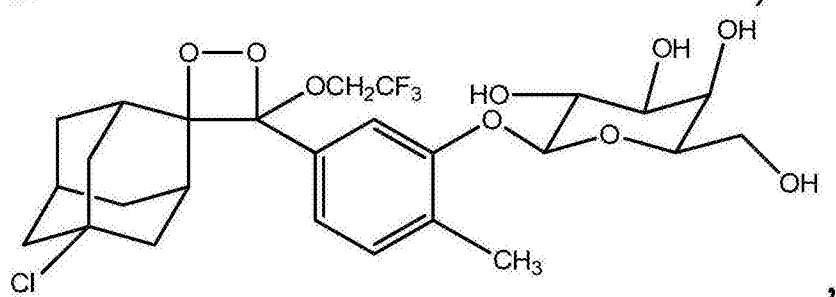
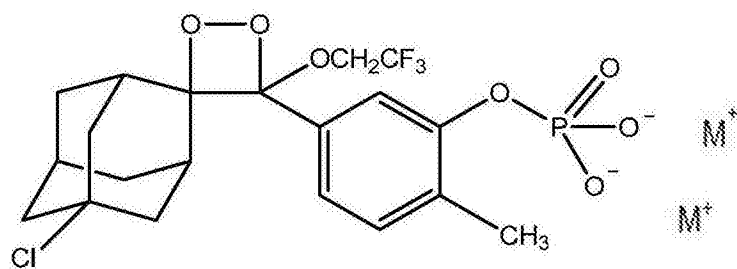
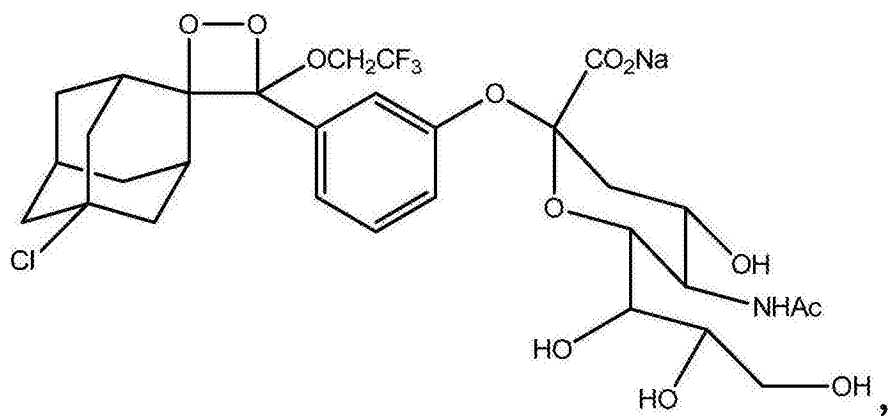
9. 根据权利要求1所述的化合物, 其中所述可被酶部分切割的键的切割会导致在37℃的光的产生, 所述光的产生在小于15分钟内达到最大值。

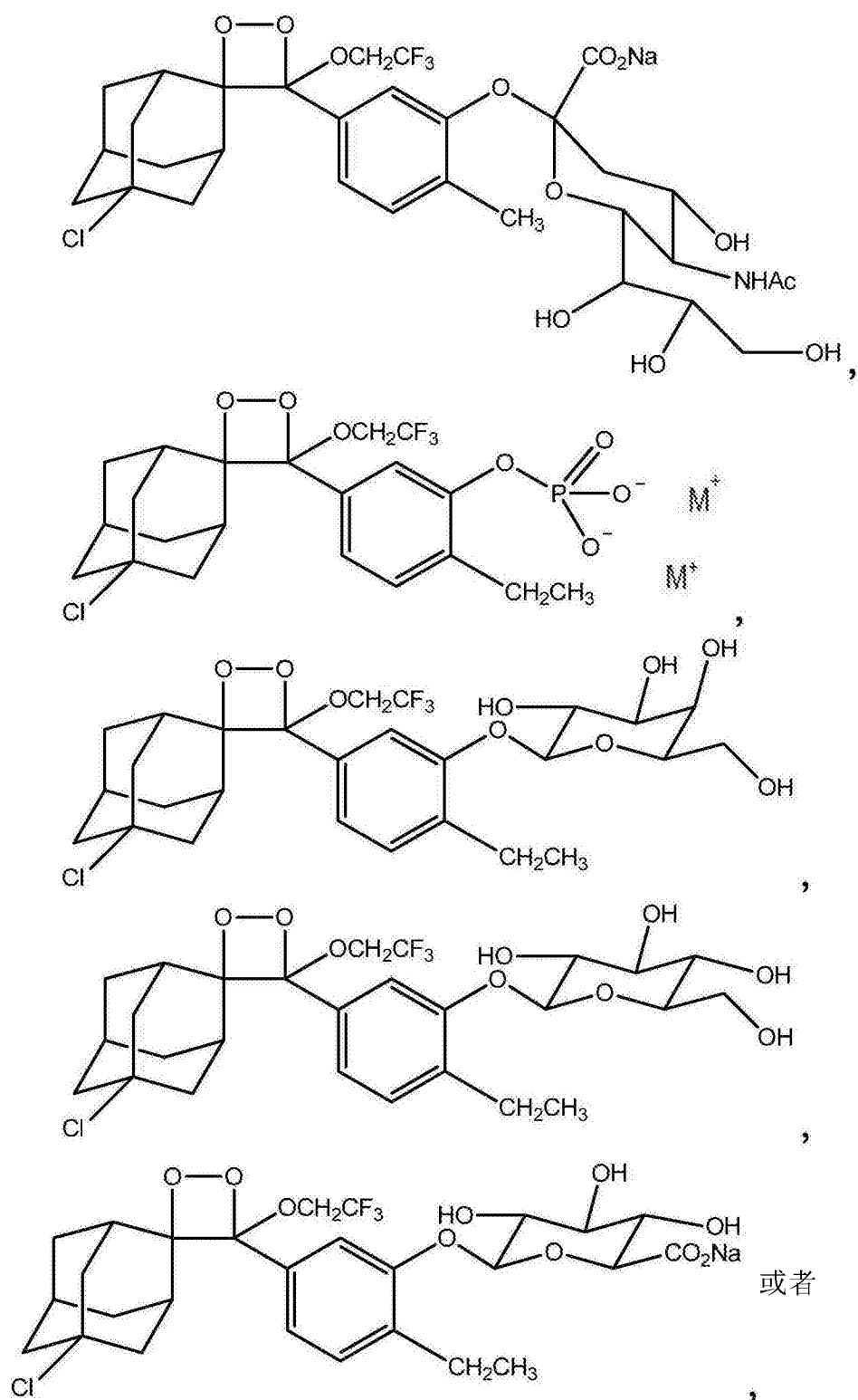
10. 根据权利要求9所述的化合物, 其中所述光的产生在小于10分钟内达到最大值。

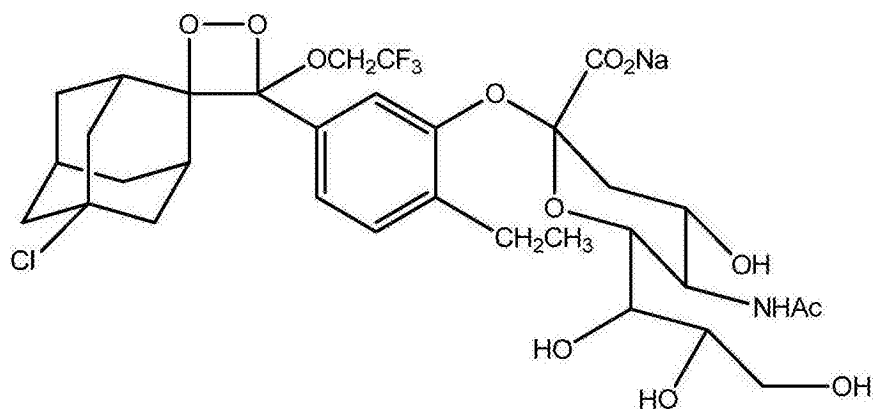
11. 根据权利要求9所述的化合物, 其中所述光的产生在小于5分钟内达到最大值。

12. 根据权利要求1所述的化合物, 所述化合物是









其中 $M^+$ 代表选自钠或钾的碱金属的阳离子、铵离子或 $N(C_{1-7}\text{烷基})_4^+$ 、 $N(\text{苄基})_4^+$ 或吡啶鎓。

13. 一种用于产生光的方法, 所述方法不包括疾病的诊断或治疗方法且所述方法包括下述步骤:

- (a) 提供根据权利要求1所述的化合物;
- (b) 提供酶复合物, 所述酶复合物包含能够切割所述化合物的酶部分;
- (c) 使所述酶复合物与所述化合物接触, 以形成反应混合物; 和,
- (d) 允许所述反应混合物产生光。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中在 $25^\circ\text{C}$ 的光的产生在小于15分钟内达到最大值。

15. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述光的产生在小于10分钟内达到最大值。

16. 根据权利要求14所述的方法, 其中所述光的产生在小于5分钟内达到最大值。

17. 根据权利要求13所述的方法, 其中在 $37^\circ\text{C}$ 的光的产生在小于15分钟内达到最大值。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述光的产生在小于10分钟内达到最大值。

19. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述光的产生在小于5分钟内达到最大值。

20. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述酶部分包含水解酶。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述水解酶是碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖醛酸糖苷酶或神经氨酸酶。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述酶部分是酶。

23. 根据权利要求22所述的方法, 所述方法另外包括下述步骤: 在加入所述化合物以后, 检测由所述反应混合物产生的光, 其中所述光的产生会指示所述酶的存在, 且产生的光的量可以与所述样品中存在的酶的量相关联, 且其中在 $25^\circ\text{C}$ 至 $37^\circ\text{C}$ 的光的产生在小于15分钟内达到最大值。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述光的产生在小于10分钟内达到最大值。

25. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述光的产生在小于5分钟内达到最大值。

26. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述酶部分是酶连接的抗体, 其包含能够结合抗原的第一抗体和酶, 所述酶能够切割所述化合物, 使得所述底物分解和产生光。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述第一抗体与所述酶共价地或非共价地连接。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述第一抗体与标记共价地连接, 且所述酶与能够非共价地结合所述标记的分子共价地连接。

29. 根据权利要求28所述的方法, 其中所述标记是生物素或生物素衍生物, 且所述分子

是抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素。

30. 根据权利要求28所述的方法, 其中所述标记是半抗原, 且所述分子是能够结合所述半抗原的抗体。

31. 根据权利要求26所述的方法, 所述方法另外包括下述步骤:

(a) 提供疑似包含抗原的样品;

(b) 提供固相, 所述固相包含能够结合所述抗原的第二抗体;

(c) 使所述样品和酶连接的抗体与所述固相接触, 以形成所述酶复合物; 和,

(d) 在加入所述化合物以后, 检测由所述反应混合物产生的光, 其中所述光的产生会指示所述抗原的存在, 且产生的光的量可以与所述样品中存在的抗原的量相关联, 且其中在25°C至37°C的光的产生在小于15分钟内达到最大值。

32. 根据权利要求31所述的方法, 其中所述光的产生在小于10分钟内达到最大值。

33. 根据权利要求31所述的方法, 其中所述光的产生在小于5分钟内达到最大值。

34. 根据权利要求31所述的方法, 所述方法另外包括下述步骤: 从所述酶复合物除去任何未结合的酶连接的抗体。

35. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述酶部分是酶连接的抗原, 其包含抗原和酶, 所述酶能够切割所述化合物, 使得它分解和产生光。

36. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述抗原与所述酶共价地或非共价地连接。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中抗原与标记共价地连接, 且所述酶与能够非共价地结合所述标记的分子共价地连接。

38. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述标记是生物素或生物素衍生物, 且所述分子是抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素。

39. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述标记是半抗原, 且所述分子是能够结合所述半抗原的抗体。

40. 根据权利要求35所述的方法, 所述方法另外包括下述步骤:

(a) 提供疑似包含抗原的样品;

(b) 提供固相, 所述固相包含能够结合所述抗原的抗体;

(c) 使所述样品和酶连接的抗原与所述固相接触, 以形成酶复合物; 和,

(d) 在加入所述化合物以后, 检测由所述反应混合物产生的光, 其中所述光的产生会指示所述抗原的存在, 且产生的光的量可以与所述样品中存在的抗原的量相关联, 且其中在25°C至37°C的光的产生在小于15分钟内达到最大值。

41. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述光的产生在小于10分钟内达到最大值。

42. 根据权利要求40所述的方法, 其中所述光的产生在小于5分钟内达到最大值。

43. 根据权利要求40所述的方法, 所述方法另外包括下述步骤: 从所述酶复合物除去任何未结合的酶连接的抗原。

44. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述酶部分是酶连接的寡核苷酸, 其包含能够与核酸杂交的寡核苷酸和酶, 所述酶能够切割所述化合物, 使得它分解和产生光。

45. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述寡核苷酸与所述酶共价地或非共价地连接。

46. 根据权利要求45所述的方法, 其中寡核苷酸与标记共价地连接, 且所述酶与能够非共价地结合所述标记的分子共价地连接。



47. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述标记是生物素或生物素衍生物, 且所述分子是抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素。

48. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述标记是半抗原, 且所述分子是能够结合所述半抗原的抗体。

49. 根据权利要求44所述的方法, 所述方法另外包括下述步骤:

(a) 提供疑似包含核酸的样品;

(b) 将所述核酸固定化至固相,

(c) 使所述固定化的核酸和所述酶连接的寡核苷酸接触, 以形成酶复合物; 和,

(d) 在加入所述化合物以后, 检测由所述反应混合物产生的光, 其中所述光的产生指示所述核酸的存在, 且产生的光的量可以与所述样品中存在的核酸的量相关联, 且其中在25℃至37℃的光的产生在小于15分钟内达到最大值。

50. 根据权利要求49所述的方法, 其中所述光的产生在小于10分钟内达到最大值。

51. 根据权利要求49所述的方法, 其中所述光的产生在小于5分钟内达到最大值。

52. 根据权利要求49所述的方法, 所述方法另外包括下述步骤: 从所述酶复合物除去任何未结合的酶连接的寡核苷酸。

53. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述反应混合物进一步包含促进剂。

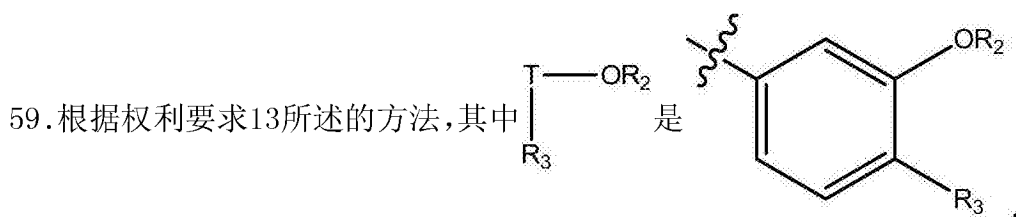
54. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述促进剂包含聚合的季铵盐、聚合的季磷盐或它们的组合。

55. 根据权利要求54所述的方法, 其中所述促进剂进一步包含受体染料。

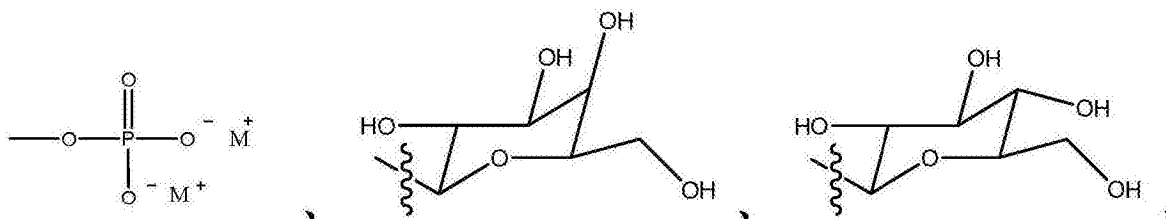
56. 根据权利要求55所述的方法, 其中所述受体染料是荧光素、罗丹明、磺酰罗丹明、ALEXA FLUOR 350、ALEXA FLUOR 405、ALEXA FLUOR 430、ALEXA FLUOR 488、ALEXA FLUOR 532、ALEXA FLUOR 546或ALEXA FLUOR 555。

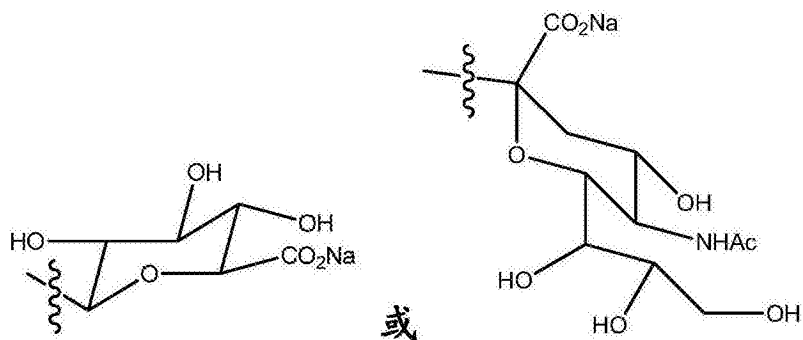
57. 根据权利要求54所述的方法, 其中所述聚合的季铵盐是聚(乙烯基苄基三甲基氯化铵)、聚[乙烯基苄基(苄基二甲基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三丁基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三戊基氯化铵)]或它们的组合。

58. 根据权利要求54所述的方法, 其中所述聚合的季磷盐是聚(乙烯基苄基三甲基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)、包含聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)和聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)的共聚物或它们的组合。



60. 根据权利要求13所述的方法, 其中  $\text{R}_2$  是



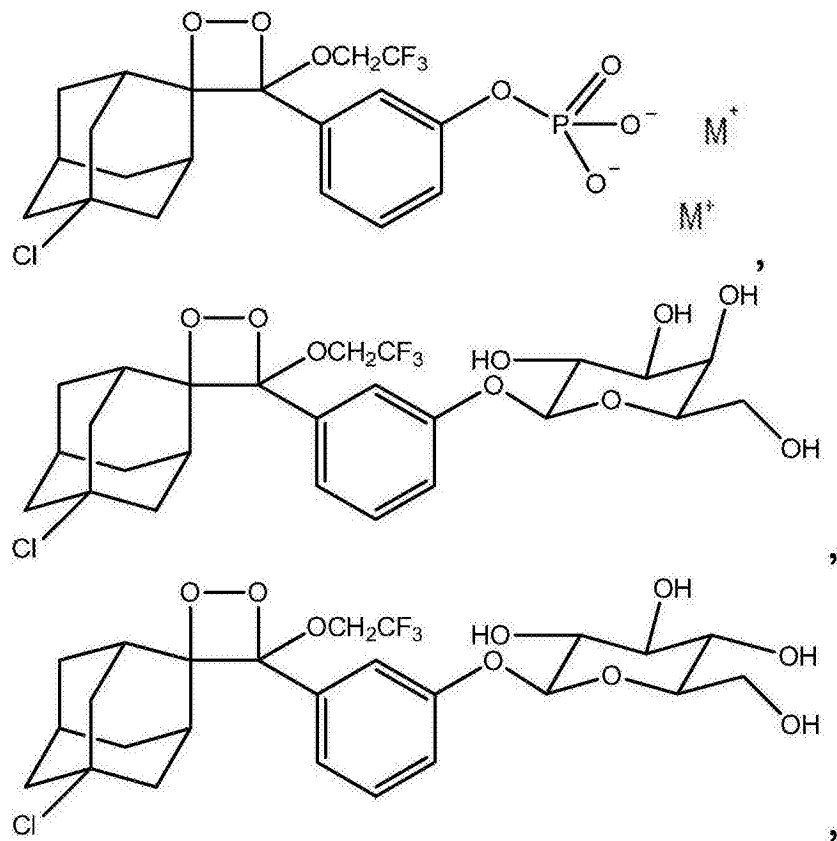


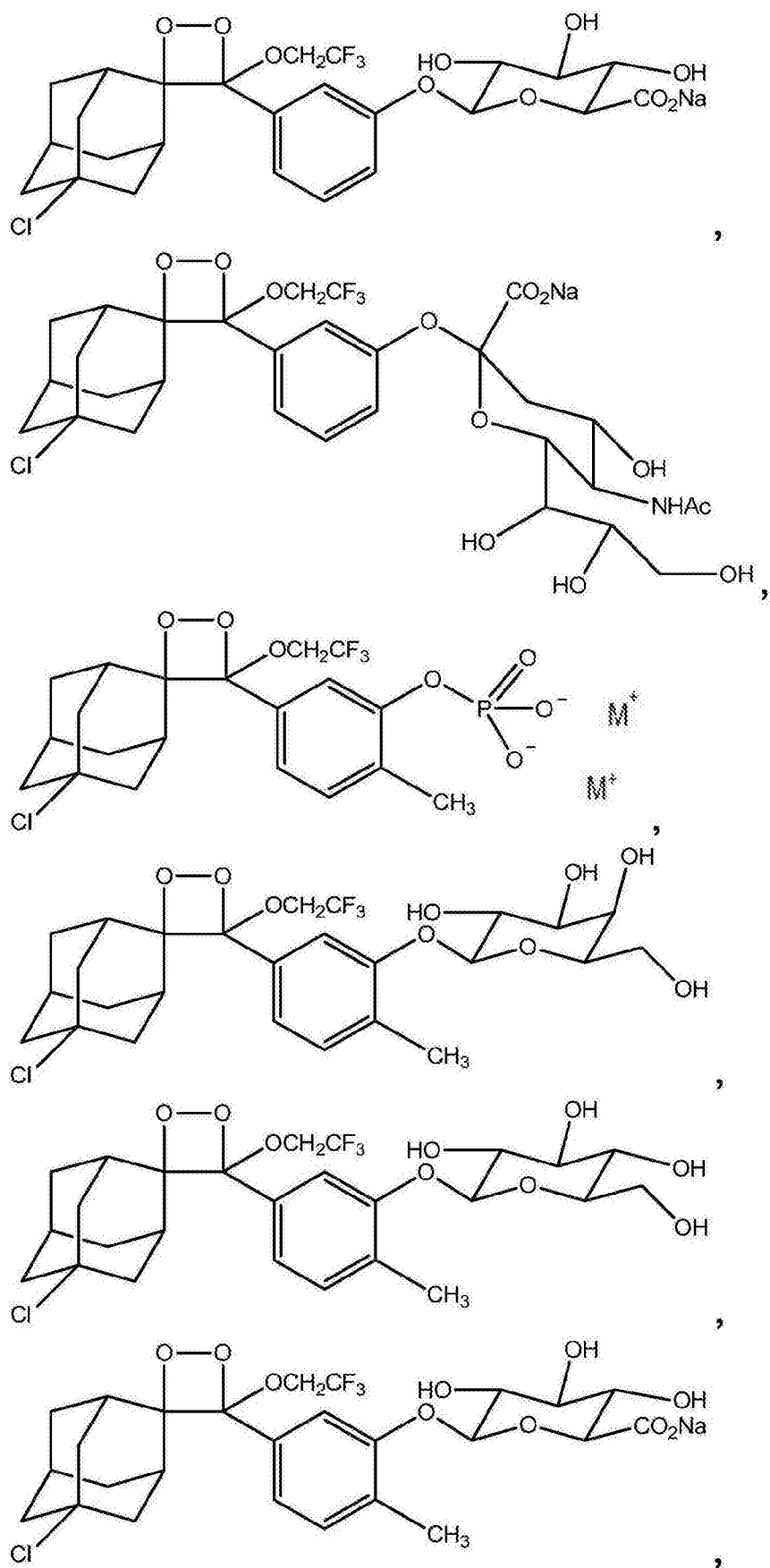
其中 $M^+$ 代表选自钠或钾的碱金属的阳离子、铵离子或 $N(C_{1-7}\text{烷基})_4^+$ 、 $N(\text{苄基})_4^+$ 或吡啶鎓。

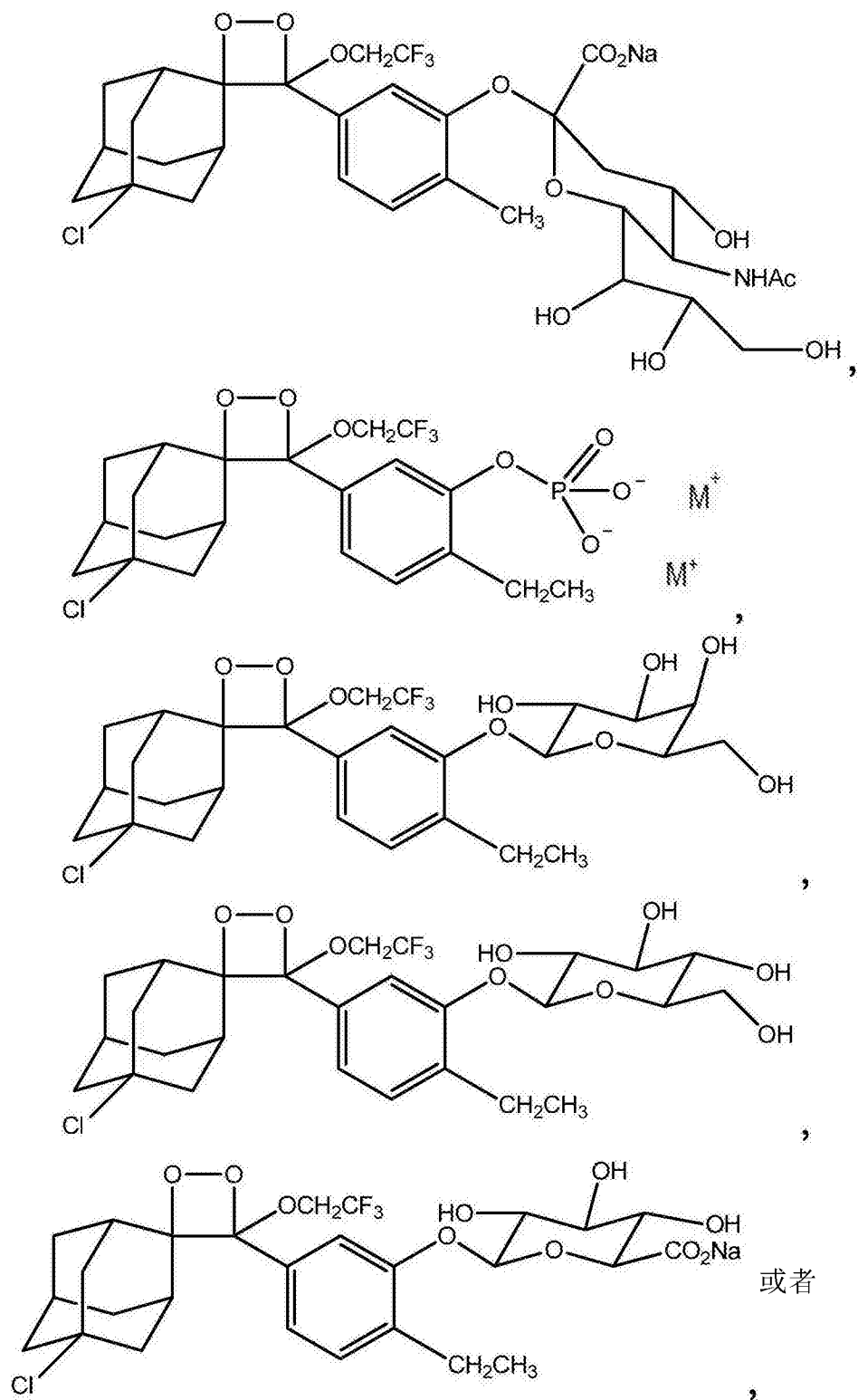
61. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述供电子基团是包含1-5个碳原子的直链烷基或包含1-5个碳原子的直链烷氧基。

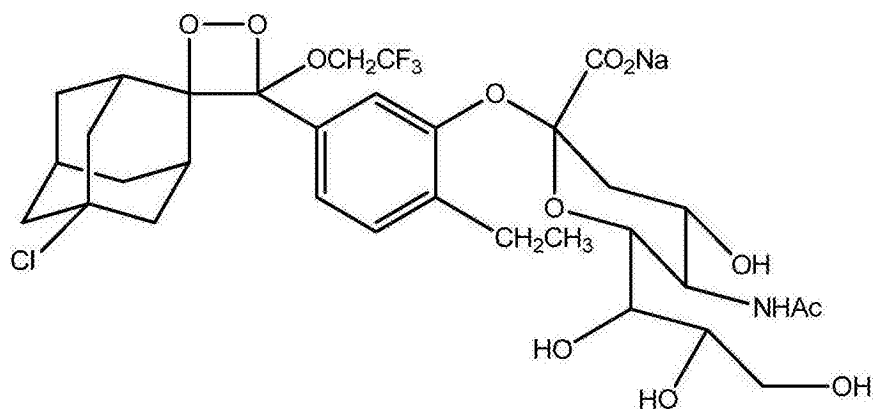
62. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述供电子基团选自: 甲基、乙基、丙基、丁基、甲氧基、乙氧基、丙氧基或丁氧基。

63. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述化合物是









其中 $M^+$ 代表选自钠或钾的碱金属的阳离子、铵离子或 $N(C_{1-7}\text{烷基})_4^+$ 、 $N(\text{苄基})_4^+$ 或吡啶鎓。

64. 一种用于确定样品中酶的存在和/或量的测定方法,所述测定方法不包括疾病的诊断或治疗方法且所述测定方法包括下述步骤:

- (a) 提供根据权利要求1所述的化合物;
- (b) 提供疑似包含所述酶的样品,所述酶能够切割所述化合物,使得它分解和产生光;
- (c) 使所述样品与所述化合物接触,以形成反应混合物;和,
- (d) 在加入所述化合物以后,检测由所述反应混合物产生的光,其中所述光的产生会指示所述酶的存在,且产生的光的量可以与所述样品中存在的酶的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于15分钟内达到最大值。

65. 一种用于确定样品中抗原的存在和/或量的测定方法,所述测定方法不包括疾病的诊断或治疗方法且所述测定方法包括下述步骤:

- (a) 提供根据权利要求1所述的化合物;
- (b) 提供疑似包含所述抗原的样品;
- (c) 提供酶连接的抗原,所述酶连接的抗原包含所述抗原和酶,所述酶能够切割所述化合物,使得它分解和产生光;
- (d) 提供固相,所述固相包含能够结合所述抗原的抗体;
- (e) 使所述样品和酶连接的抗原与所述固相接触,以形成酶复合物;
- (f) 使所述酶复合物与所述化合物接触,以形成反应混合物;和,
- (g) 在加入所述化合物以后,检测由所述反应混合物产生的光,其中所述光的产生会指示所述抗原的存在,且产生的光的量可以与所述样品中存在的抗原的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于15分钟内达到最大值。

66. 一种用于确定样品中核酸的存在和/或量的测定方法,所述测定方法不包括疾病的诊断或治疗方法且所述测定方法包括下述步骤:

- (a) 提供根据权利要求1所述的化合物;
- (b) 提供疑似包含所述核酸的样品;
- (c) 将所述核酸固定化至固相;
- (d) 提供酶连接的寡核苷酸,所述酶连接的寡核苷酸包含能够与所述核酸杂交的寡核苷酸和酶,所述酶能够切割所述化合物,使得它分解和产生光;
- (e) 使所述固定化的核酸和酶连接的寡核苷酸接触,以形成酶复合物;

(f)使所述酶复合物与所述化合物接触,以形成反应混合物;和,

(g)在加入所述化合物以后,检测由所述反应混合物产生的光,其中所述光的产生指示所述核酸的存在,且产生的光的量可以与所述样品中存在的核酸的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于15分钟内达到最大值。

67.一种用于检测样品中分析物的存在和/或量的试剂盒,所述试剂盒包括:

(a)根据权利要求1所述的化合物;和

(b)缓冲液。

## 闪光和辉光1,2-二氧杂环丁烷类

### 技术领域

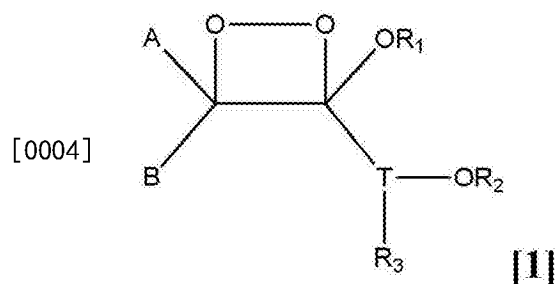
[0001] 本发明涉及用于诊断平台的检测试剂。

### 背景技术

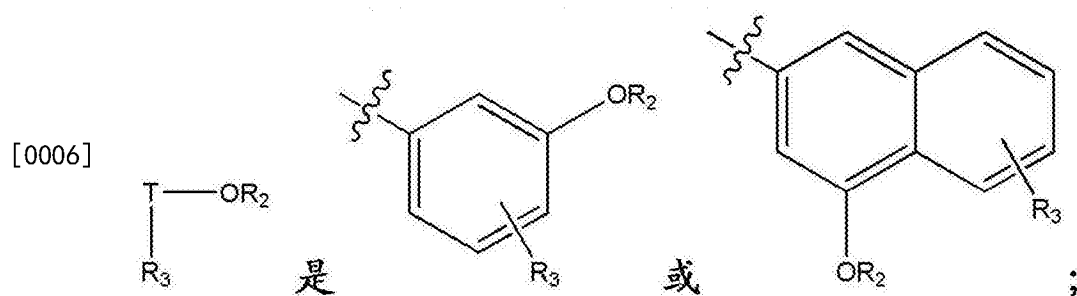
[0002] 化学发光技术被广泛地用作临床诊断平台中的检测试剂。由在加入触发溶液以后立即产生闪光化学发光信号,直接化学发光标记(诸如吖啶酯或异鲁米诺)会提供更短的检测时间。酶联化学发光底物(诸如1,2-二氧杂环丁烷类或鲁米诺)在它们加入以后具有更长的温育时间,但是也会提供超灵敏的检测和更大的底物试剂稳定性。需要会提供闪光化学发光信号和/或超灵敏检测和更大底物试剂稳定性的酶底物。

### 发明内容

[0003] 在一个方面,本发明提供了具有下式结构的化合物

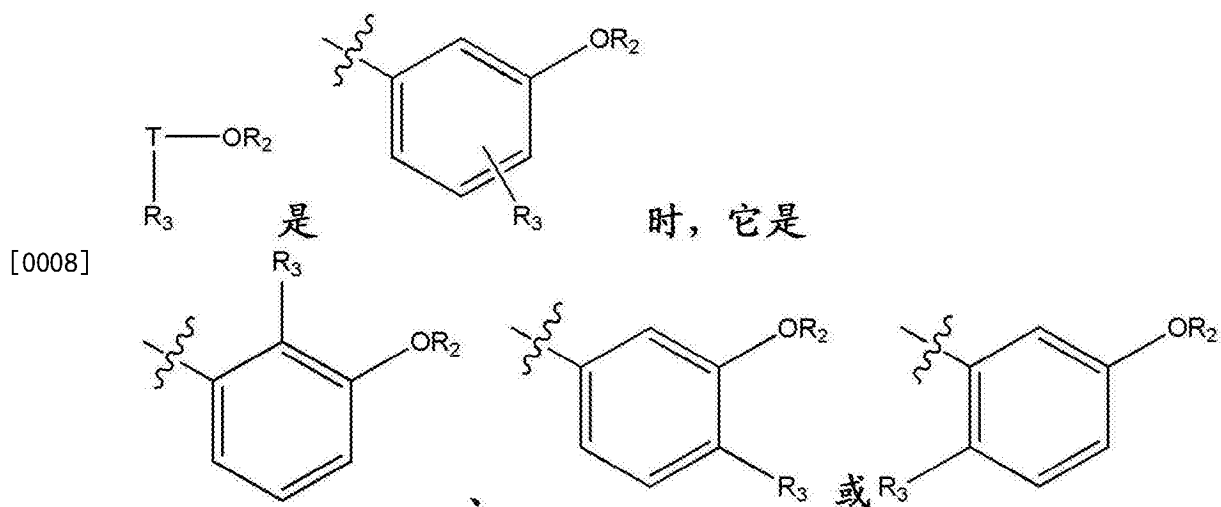


[0005] 其中,A和B独立地选自:包含1-20个碳原子的直链烷基、包含2-20个碳原子的直链烯基、包含3-20个碳原子的支链烷基、包含3-20个碳原子的支链烯基、包含3-20个碳原子的环烷基、包含3-20个碳原子的环烯基、包含3-20个碳原子的环杂烷基、包含3-20个碳原子的环杂烯基、包含4-60个碳原子的聚环烷基、包含4-60个碳原子的聚环烯基、包含4-60个碳原子的聚环杂烷基和包含4-60个碳原子的聚环杂烯基,它们中的任一个可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代,且其中A和B一起形成所述环烷基、环烯基、环杂烷基、环杂 烯基、聚环烯基、聚环杂烷基和聚环杂烯基,形成的基团可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代,或者A和B一起形成被卤素取代的聚环烷基;



[0007]  $R_1$ 是可以任选地被一个或多个卤素原子取代的包含1-20个碳原子的直链烷基或可以任选地被一个或多个卤素原子取代的包含3-20个碳原子的支链烷基; $R_2$ 是酶可切割的

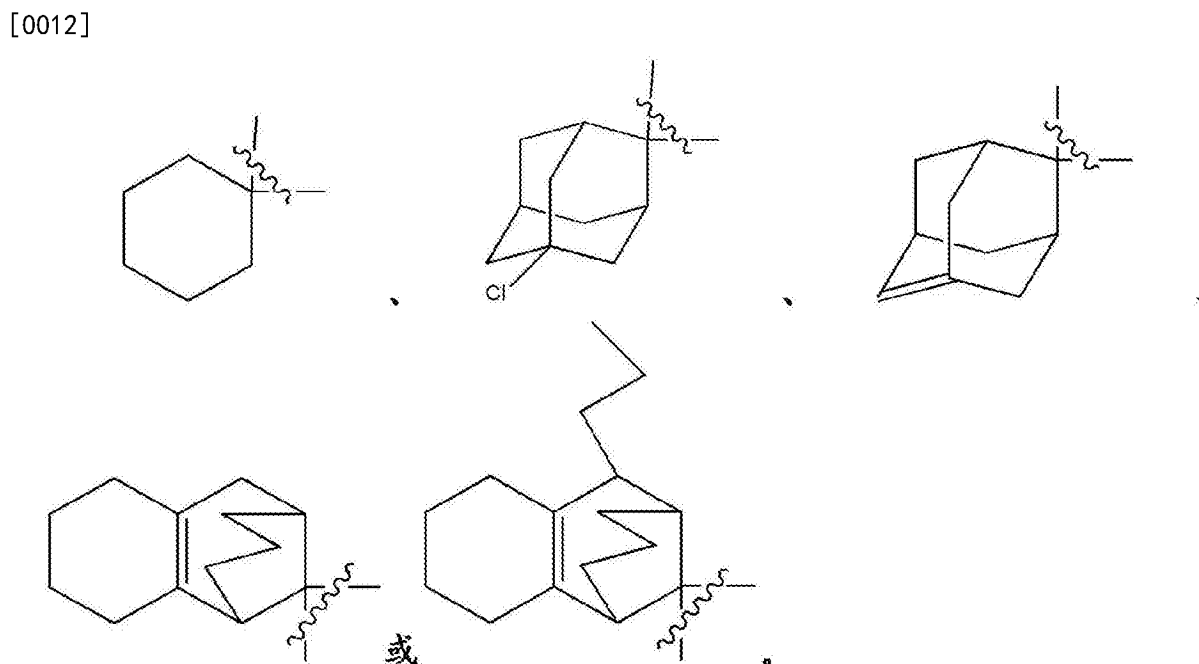
基团,其包含可被酶部分切割以在T上产生氧阴离子的键;且R<sub>3</sub>是氢或供电子基团;前提条件是,当R<sub>1</sub>未被取代时,R<sub>3</sub>是供电子基团;其中,当



[0009] 在某些实施方案中,A或B中的至少一个可以是



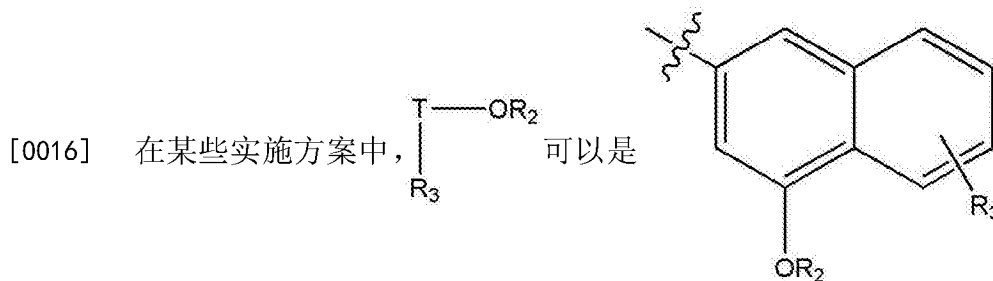
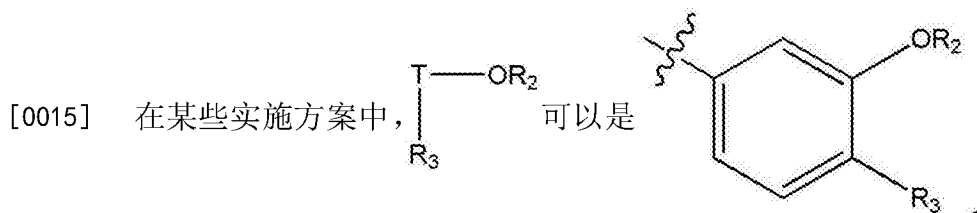
[0011] 在某些实施方案中,A和B一起可以是



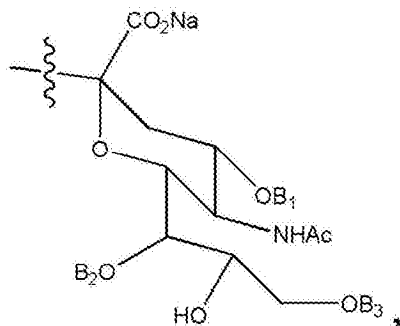
[0013] 在某些实施方案中,R<sub>1</sub>可以是包含1-5个碳原子的直链烷基,其可以任选地被一个或多个卤素原子取代。

[0014] 在某些实施方案中,R<sub>1</sub>可以是包含1-2个碳原子的直链烷基或包含1-2个碳原子的直链三氟烷基。在这些实施方案中的某些中,R<sub>1</sub>可以是甲基或1,1,1-三氟乙基。





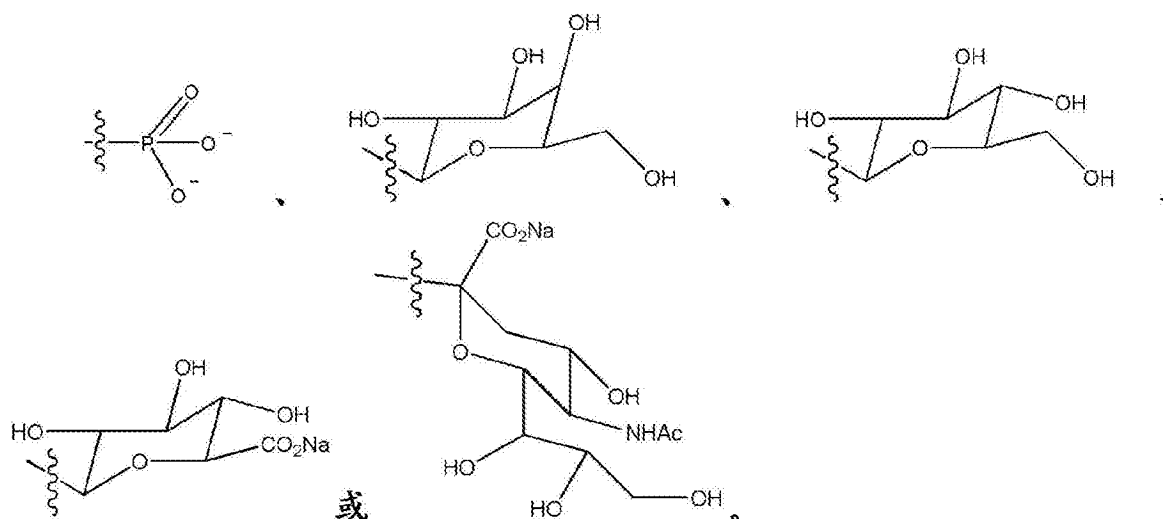
[0017] 在某些实施方案中,  $\text{OR}_2$  可以是磷酸酯、乙酸酯、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酯、腺苷三磷酸、腺苷二磷酸、腺苷单磷酸、腺苷、 $\alpha$ -D-半乳糖苷、 $\beta$ -D-半乳糖苷、 $\alpha$ -D-葡萄糖苷、 $\beta$ -D-葡萄糖苷、 $\alpha$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -呋喃果糖苷、 $\beta$ -D-葡萄糖苷酸或



其中,  $\text{B}_1$ 、 $\text{B}_2$  和  $\text{B}_3$  各自独立地是 H、包含 1-4 个碳原子的直链烷基

(支链或直链) 或包含 3-6 个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中,  $\text{R}_2$  可以是

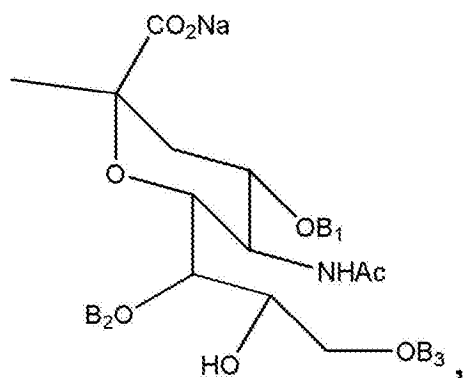
[0018]



[0019] 在某些实施方案中,  $\text{R}_2$  可以是 E-L-Nuc-Z, 其中 E 是包含亲电子原子的基团, 所述原子在 Z 基团的酶切割以后被 Nuc 基团的电子对攻击, 并通过邻助作用释放出化合物阴离子; L 是连接基团; Nuc 是亲核原子; 且 Z 是可酶促切割的基团; 其中

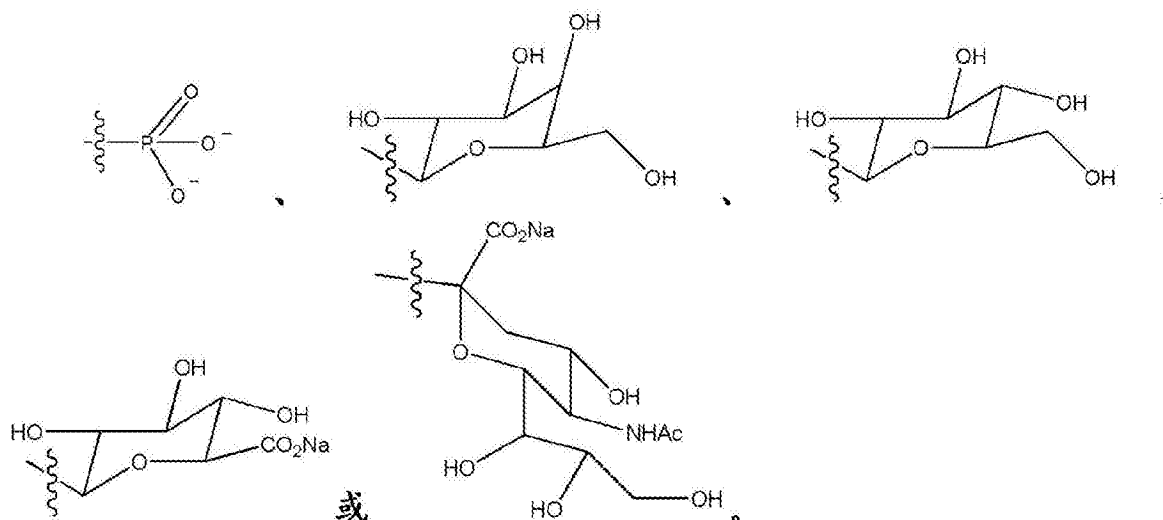
[0020] E 是羧基、羰基、被离去基团取代的亚甲基、磷酸盐、碳酸盐、黄原酸盐、亚硫酸盐、

磺酸盐、亚硫酸氢盐或二硫化物;L选自:含有1-4个碳原子的亚甲基或聚亚甲基、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n-$ 或 $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n-$ ,其中m和n是0-3,且m+n是2或3,其中R<sub>6</sub>是含有1-10个碳原子的烷基,且所述连接基团可以被下述基团取代:含有1-24个碳原子的烷基,含有2-24个碳原子的烯基,被含有1-24个碳原子的酰氧基单或二取代且含有1-24个碳原子的烷基,被含有1-24个碳原子的酰氧基单或二取代且含有2-24个碳原子的烯基,含有6-10个碳的芳基,被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有1-4个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有1-24个碳原子的烷基,或被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有1-4个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有2-24个碳原子的烯基;Nuc是氧原子或硫原子;且Z是磷酰基、乙酰基、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酰基(1-phospho-2,3-diacylglyceroyl)、腺苷三磷酰基、腺苷二磷酰基、腺苷单磷酰基、腺苷基、 $\alpha$ -D-半乳糖基、 $\beta$ -D-半乳糖基、 $\alpha$ -D-葡萄糖基、 $\beta$ -D-葡萄糖基、 $\alpha$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -呋喃果糖基、 $\beta$ -D-glucosiduransyl或



其中,B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>和B<sub>3</sub>各自独立地是H、包含1-4个碳原子的直链

烷基、或包含3-6个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中,Z可以是  
[0021]



[0022] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-20个碳原子的直链烷基、包含3-20个碳原子的支链烷基、包含1-20个碳原子的直链烷氧基或包含3-20个碳原子的支链烷氧基。

[0023] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-20个碳原子的直链 烷基或包含1-20个碳原子的直链烷氧基。

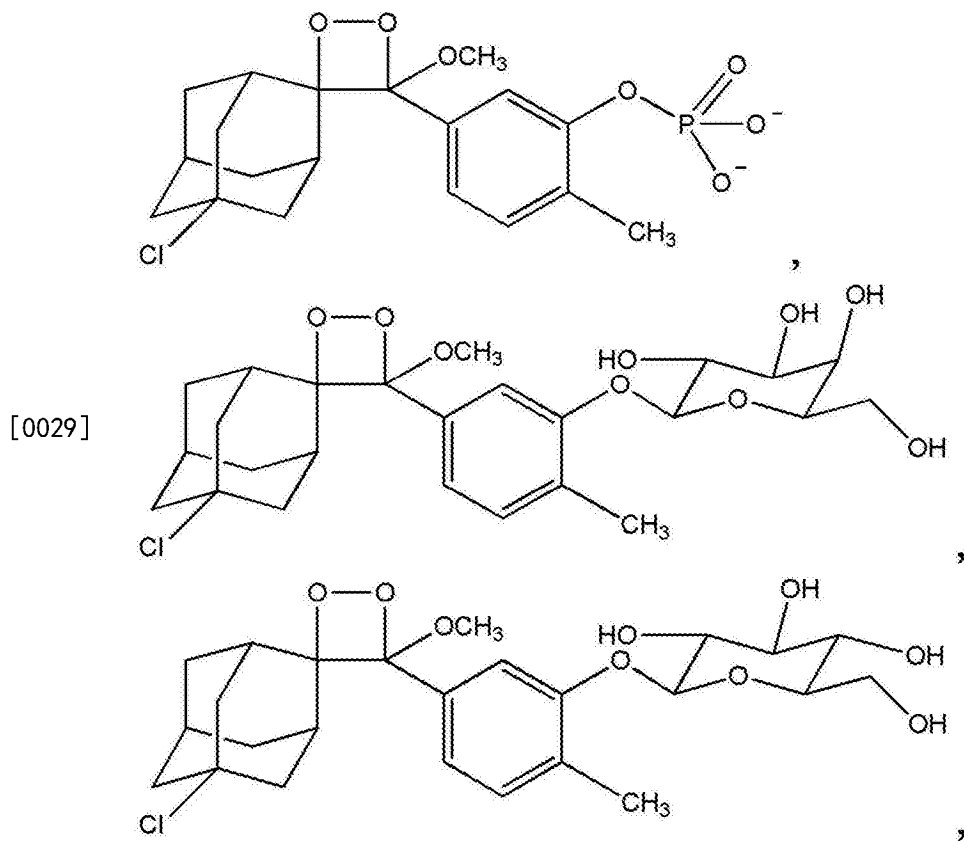
[0024] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-5个碳原子的直链烷基或包含1-5个碳原子的直链烷氧基。

[0025] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以选自:甲基、乙基、丙基、丁基、甲氧基、乙氧基、丙氧基和丁氧基。

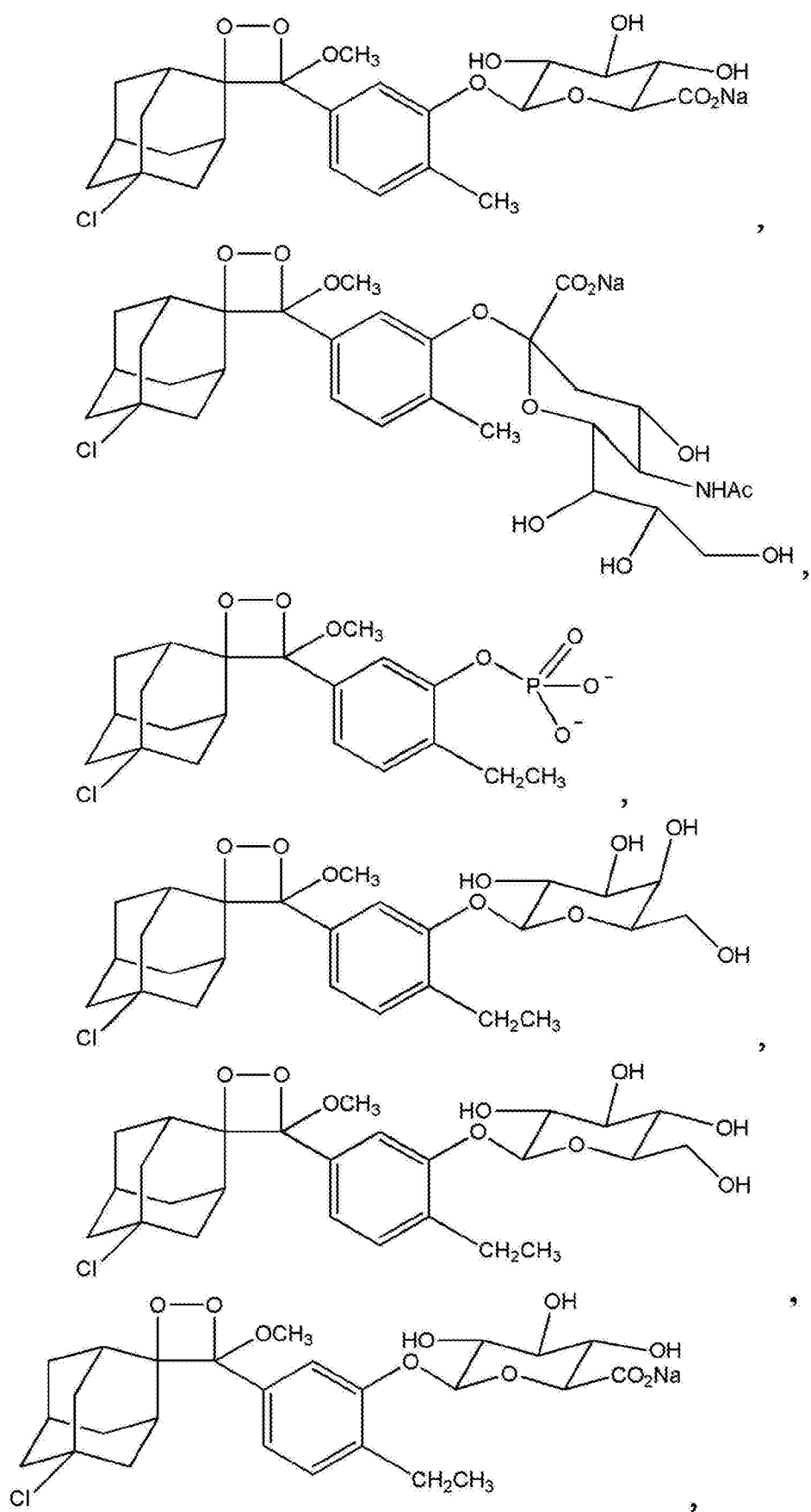
[0026] 在某些实施方案中,可被酶部分切割的键的切割会导致在25℃的光的产生,所述光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

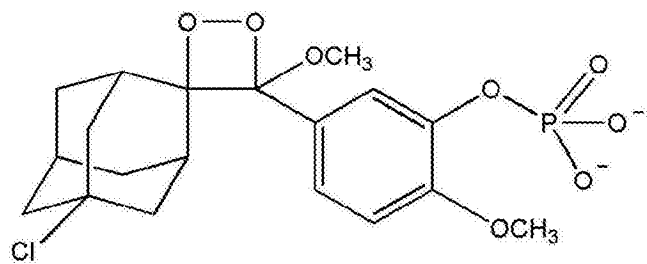
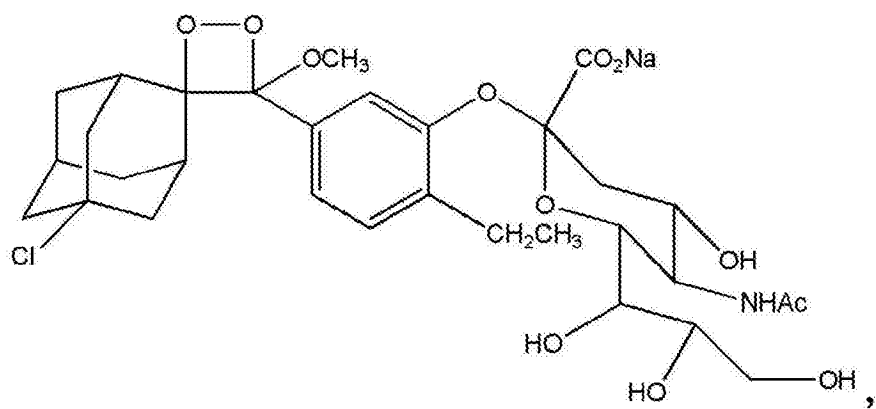
[0027] 在某些实施方案中,可被酶部分切割的键的切割会导致在37℃的光的产生,所述光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0028] 在某些实施方案中,所述化合物可以是

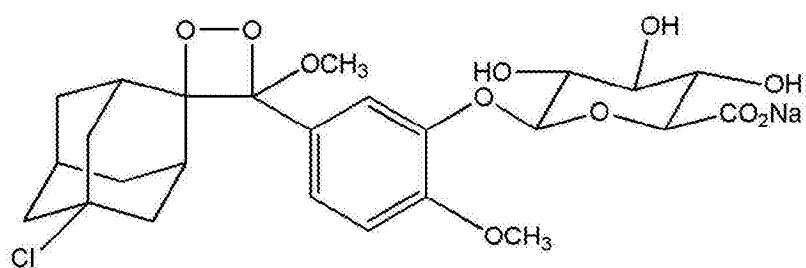
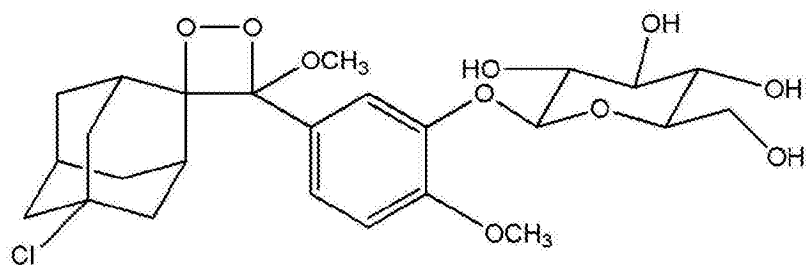
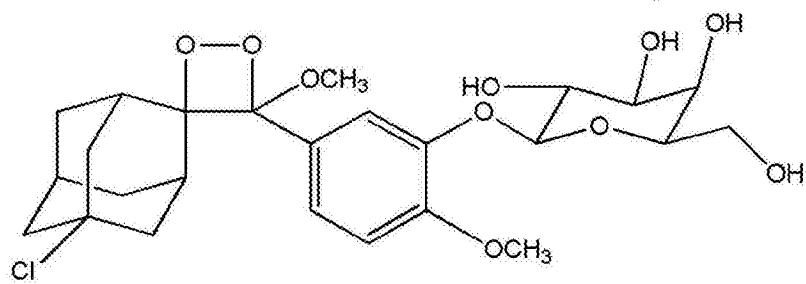


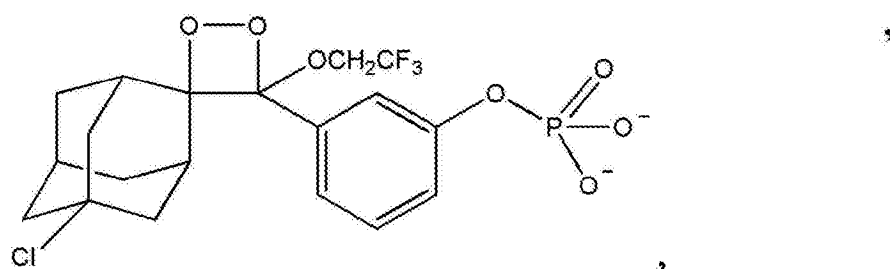
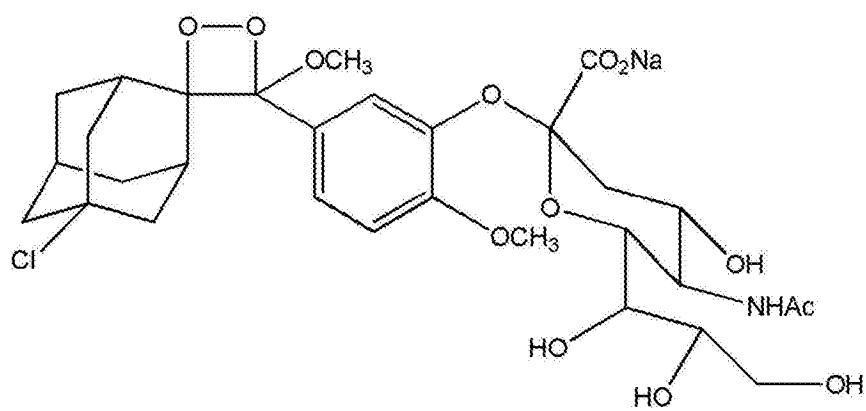
[0030]



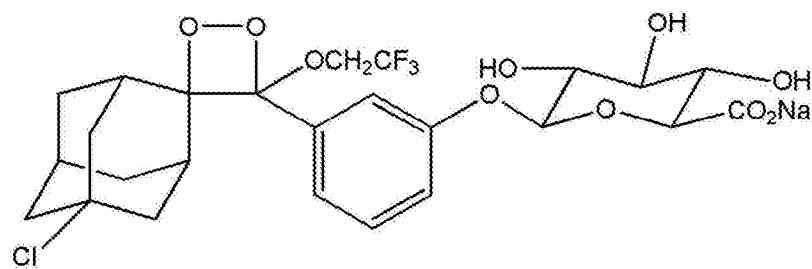
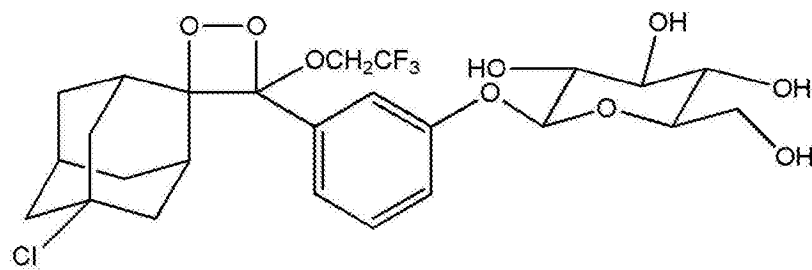
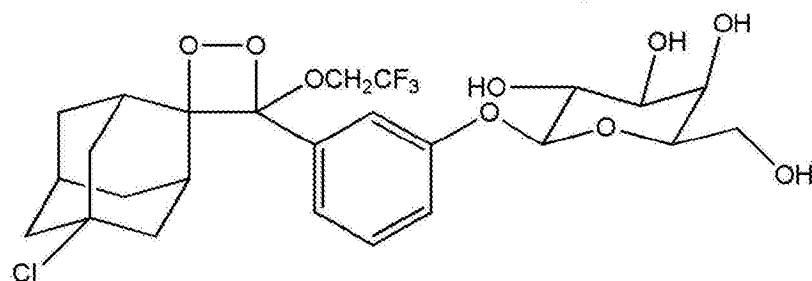


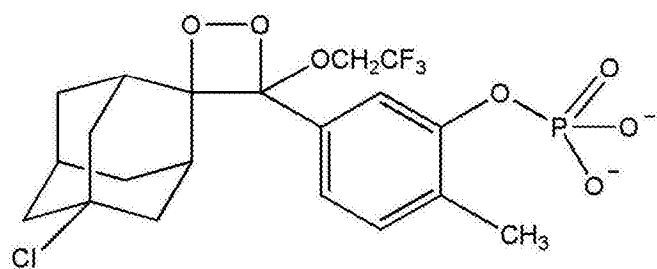
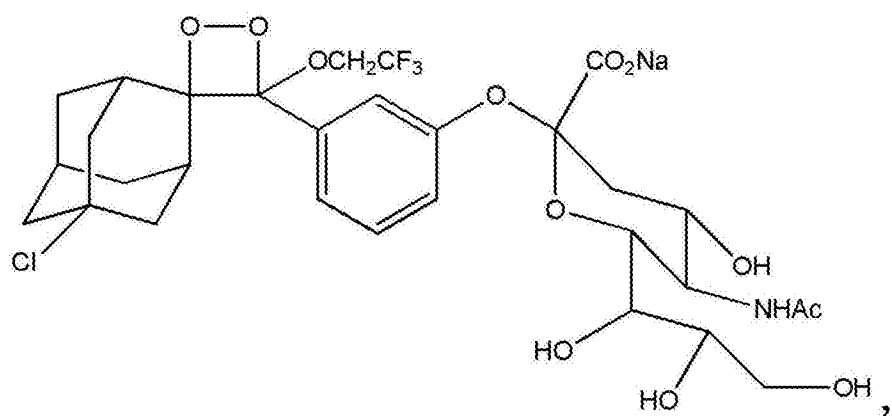
[0031]



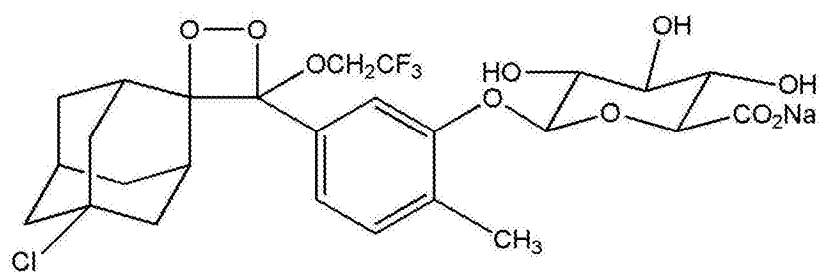
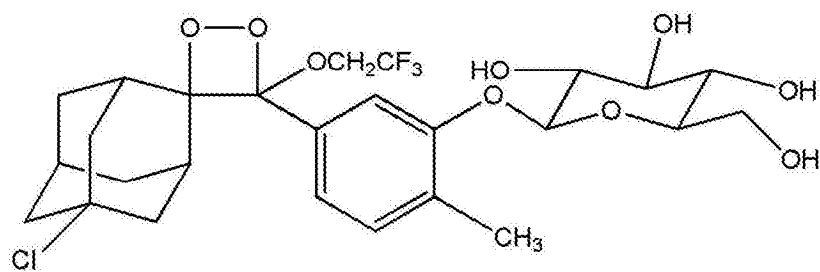
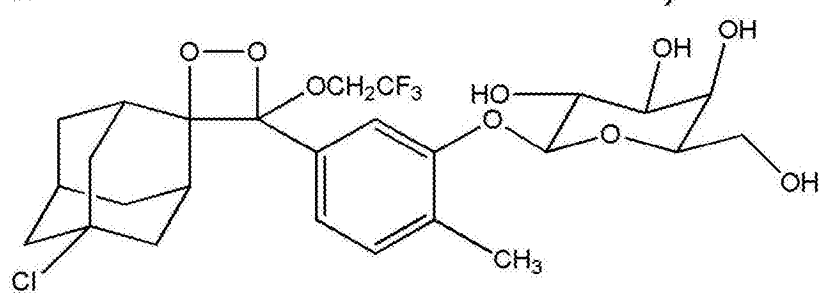


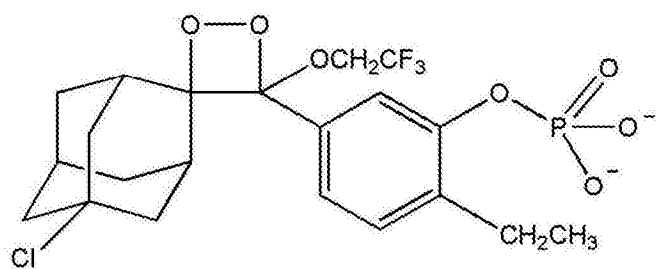
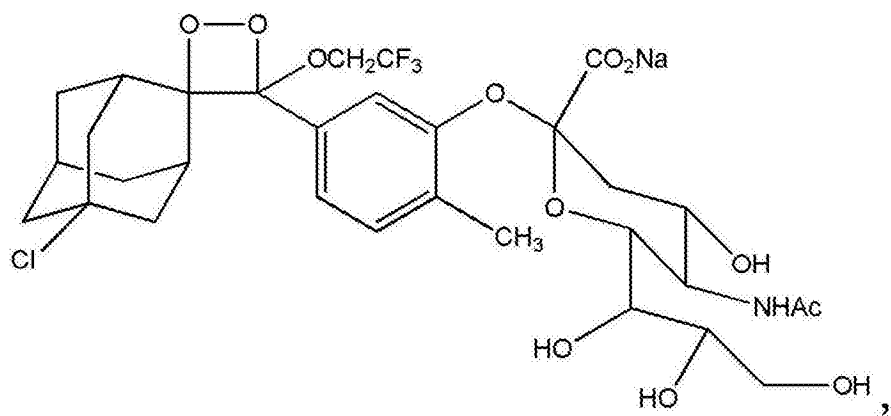
[0032]



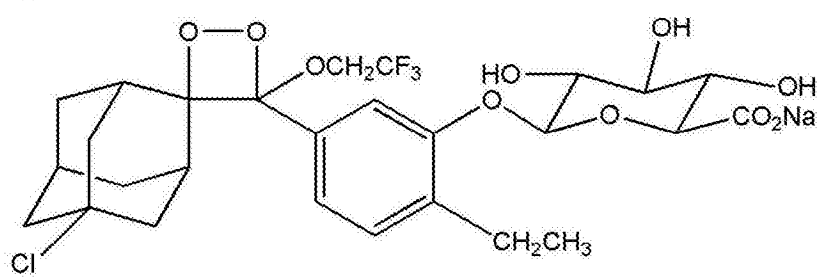
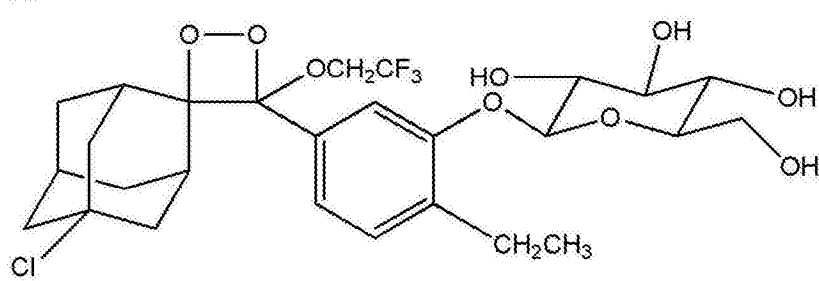
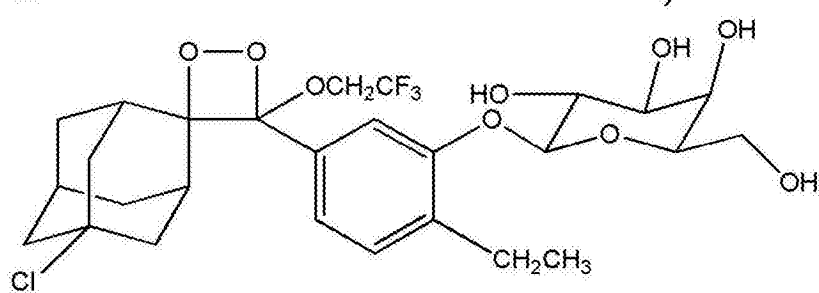


[0033]



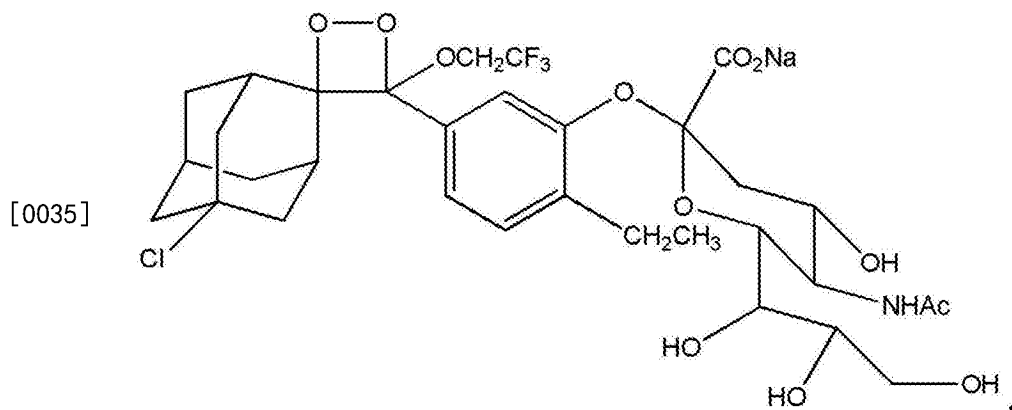


[0034]



, 或者





[0036] 在另一个方面,本发明提供了一种用于产生光的方法,所述方法包括下述步骤:提供化合物[1];提供酶复合物,其包含能够切割所述化合物的酶部分;使所述酶复合物与所述化合物接触,以形成反应混合物;和,允许所述反应混合物产生光。

[0037] 在某些实施方案中,所述在25℃的光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0038] 在某些实施方案中,所述在37℃的光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0039] 在某些实施方案中,所述酶部分可以包含水解酶。在这些实施方案中的某些中,所述水解酶可以是碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖苷酶、β-葡萄糖醛酸糖苷酶或神经氨酸酶。

[0040] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是酶。

[0041] 在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生会指示酶的存在,且产生的光的量可以与样品中存在的酶的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0042] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是酶连接的抗体,其包含能够结合抗原的第一抗体和酶,所述酶能够切割所述化合物,使得所述底物分解和产生光。

[0043] 在这些实施方案中的某些中,所述第一抗体可以与所述酶共价地或非共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述第一抗体可以与标记共价地连接,且所述酶与能够非共价地结合所述标记的分子共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述标记可以是生物素或生物素衍生物,且所述分子可以是抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素;而在其它实施方案中,所述标记可以是半抗原,且所述分子可以是能够结合所述半抗原的抗体。

[0044] 在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:提供疑似包含所述抗原的样品;提供固相,其包含能够结合所述抗原的第二抗体;使所述样品和酶连接的抗体与所述固相接触,以形成酶复合物;和,在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生会指示所述抗原的存在,且产生的光的量可以与所述样品中存在的抗原的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在

这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0045] 在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:从所述酶复合物除去任何未结合的酶连接的抗体。

[0046] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是酶连接的抗原,其包含抗原和酶,所述酶能够切割所述化合物,使得它分解和产生光。

[0047] 在这些实施方案中的某些中,所述抗原可以与所述酶共价地或非共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述抗原可以与标记共价地连接,且所述酶与能够非共价地结合所述标记的分子共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述标记可以是生物素或生物素衍生物,且所述分子是抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素;而在其它实施方案中,所述标记可以是半抗原,且所述分子是能够结合所述半抗原的抗体。

[0048] 在所述实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:提供疑似包含所述抗原的样品;提供固相,其包含能够结合所述抗原的抗体;使所述样品和酶连接的抗原与所述固相接触,以形成酶复合物;和,在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生会指示所述抗原的存在,且产生的光的量可以与所述样品中存在的抗原的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0049] 在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:从所述酶复合物除去任何未结合的酶连接的抗原。

[0050] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是酶连接的寡核苷酸,其包含能够与核酸杂交的寡核苷酸和酶,所述酶能够切割所述化合物,使得它分解和产生光。

[0051] 在这些实施方案中的某些中,所述寡核苷酸可以与所述酶共价地或非共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述寡核苷酸可以与标记共价地连接,且所述酶与能够非共价地结合所述标记的分子共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述标记可以是生物素或生物素衍生物,且所述分子是抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素;而在其它实施方案中,所述标记可以是半抗原,且所述分子是能够结合所述半抗原的抗体。

[0052] 在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:提供疑似包含所述核酸的样品;将所述核酸固定化至固相,使所述固定化的核酸和酶连接的寡核苷酸接触,以形成酶复合物;和,在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生指示所述核酸的存在,且产生的光的量可以与样品中存在的核酸的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

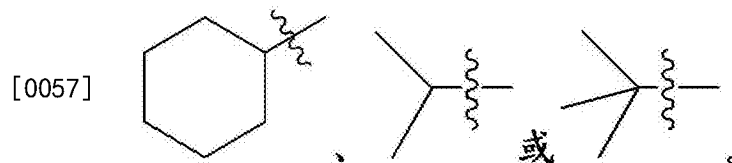
[0053] 在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:从所述酶复合物除去任何未结合的酶连接的寡核苷酸。

[0054] 在某些实施方案中,所述反应混合物可以进一步包含促进剂。在这些实施方案中的某些中,所述促进剂可以包含聚合的季铵盐,聚合的季磷盐,或它们的组合。在这些实施方案中的某些中,所述聚合的季铵盐可以是聚(乙烯基苄基三甲基氯化铵)、聚[乙烯基苄基

(苄基二甲基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三丁基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三戊基氯化铵)]或它们的组合；而在其它实施方案中，所述聚合的季磷盐可以是聚(乙烯基苄基三甲基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)、包含聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)和聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)的共聚物或它们的组合。

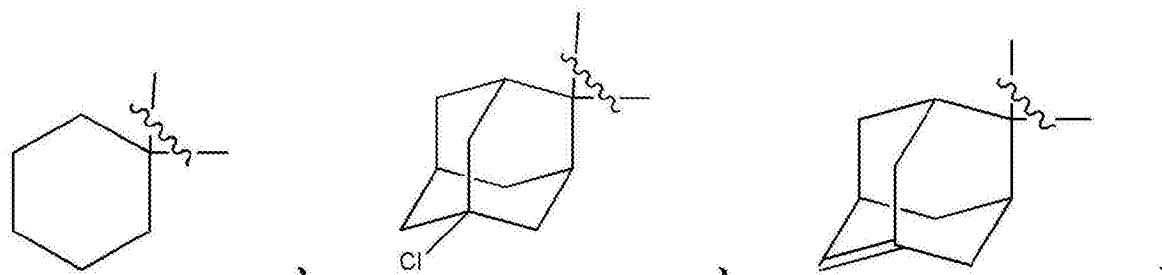
[0055] 在这些实施方案中的某些中，所述促进剂可以进一步包含受体染料。在这些实施方案中的某些中，所述受体染料可以是荧光素、罗丹明、磺酰罗丹明、ALEXA FLUOR350、ALEXA FLUOR405、ALEXA FLUOR430、ALEXA FLUOR488、ALEXA FLUOR532、ALEXA FLUOR546或ALEXA FLUOR555。

[0056] 在某些实施方案中，A或B中的至少一个可以是

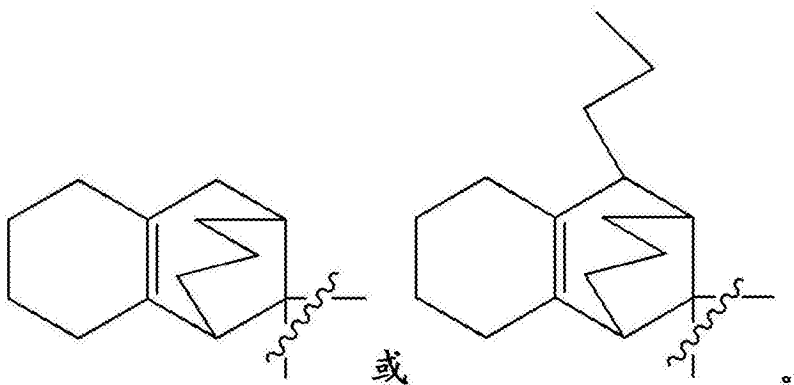


[0058] 在某些实施方案中，A和B一起可以是

[0059]

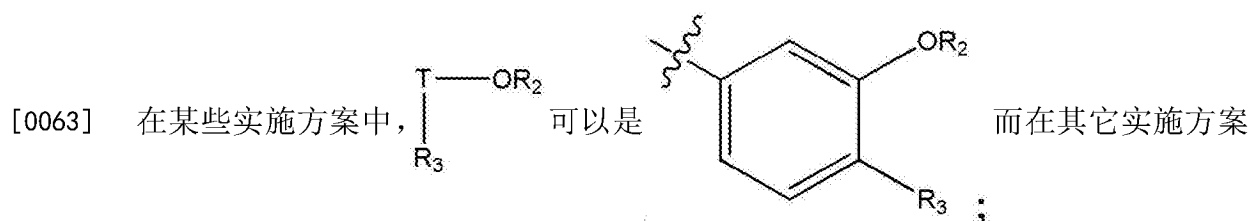


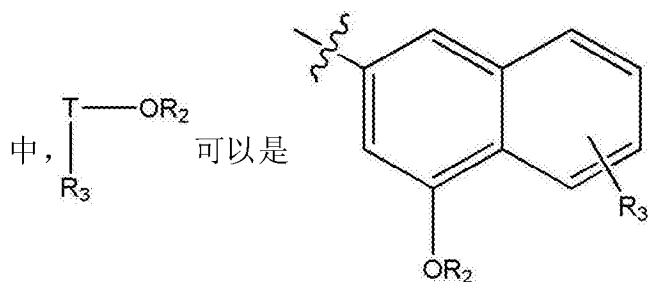
[0060]



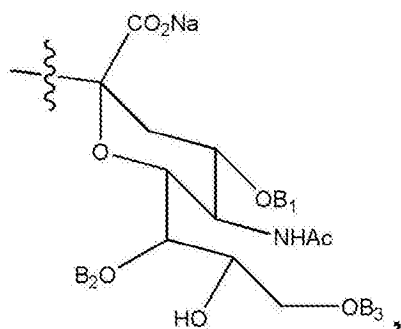
[0061] 在某些实施方案中，R<sub>1</sub>可以是包含1-5个碳原子的直链烷基，其可以任选地被一个或多个卤素原子取代。

[0062] 在某些实施方案中，R<sub>1</sub>可以是包含1-2个碳原子的直链烷基或包含1-2个碳原子的直链三氟烷基。在这些实施方案中的某些中，R<sub>1</sub>可以是甲基或1,1,1-三氟乙基。





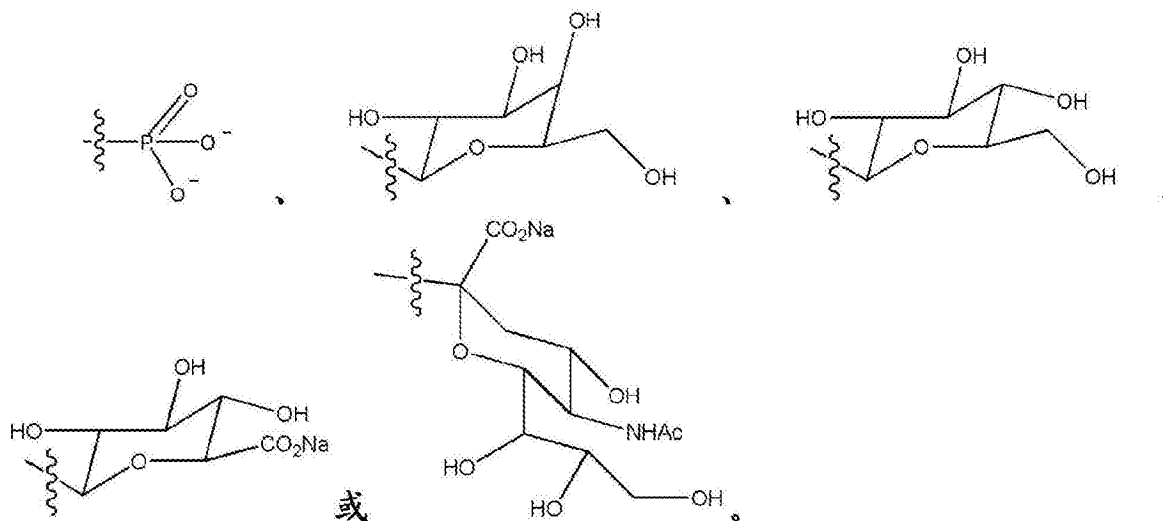
[0064] 在某些实施方案中,  $\text{OR}_2$  可以是磷酸酯、乙酸酯、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酯、腺苷三磷酸、腺苷二磷酸、腺苷单磷酸、腺苷、 $\alpha$ -D-半乳糖苷、 $\beta$ -D-半乳糖苷、 $\alpha$ -D-葡萄糖苷、 $\beta$ -D-葡萄糖苷、 $\alpha$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -呋喃果糖苷、 $\beta$ -D-葡糖苷酸或



其中,  $\text{B}_1$ 、 $\text{B}_2$  和  $\text{B}_3$  各自独立地是 H、包含 1-4 个碳原子的直链烷

基、或包含 3-6 个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中,  $\text{R}_2$  可以是

[0065]



[0066] 在某些实施方案中,  $\text{R}_2$  可以是 E-L-Nuc-Z, 其中 E 是包含亲电子原子的基团, 所述原子在 Z 基团的酶切割以后被 Nuc 基团的电子对攻击, 且通过邻助作用释放出化合物阴离子; L 是连接基团; Nuc 是亲核原子; 且 Z 是可酶促切割的基团; 其中

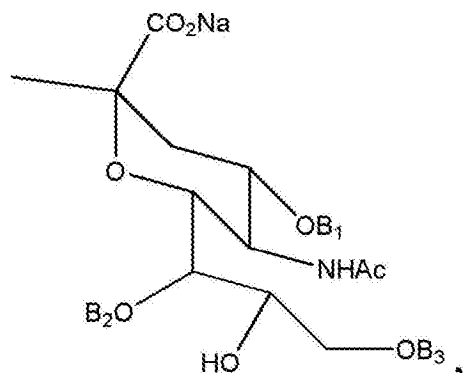
[0067] E 是羧基、羰基、被离去基团取代的亚甲基、磷酸盐、碳酸盐、黄原酸盐、亚硫酸盐、磺酸盐、亚硫酸氢盐或二硫化物;

[0068] L 选自: 含有 1-4 个碳原子的亚甲基或聚亚甲基、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-$  或  $-(\text{CH}_2)_m-\text{NR}_6-(\text{CH}_2)_n-$ , 其中 m 和 n 是 0-3, 且 m+n 是 2 或 3, 其中  $\text{R}_6$  是含有 1-10 个碳原子的烷基, 且所述连接基团可以被下述基团取代: 含有 1-24 个碳原子的烷基, 含有 2-24 个碳原子的烯基, 被含有 1-24 个碳原子的酰氧基单或二取代且含有 1-24 个碳原子的烷基, 被含有

1-24个碳原子的酰氧基单或二取代且含有2-24个碳原子的烯基,含有6-10个碳的芳基,被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有1-4个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有1-24个碳原子的烷基,或被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有1-4个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有2-24个碳原子的烯基;

[0069] Nuc是氧原子或硫原子;且

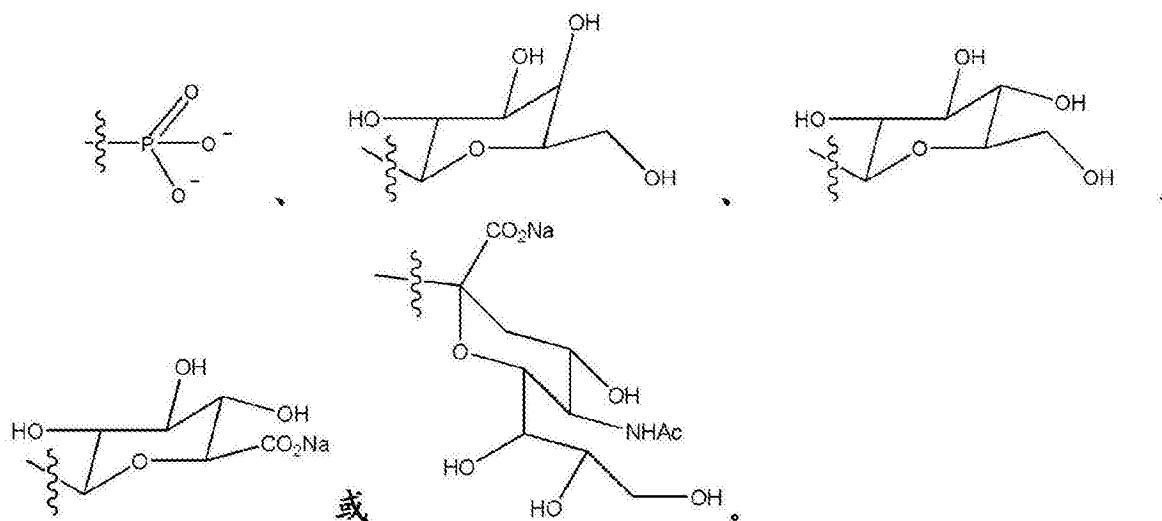
[0070] Z是磷酰基、乙酰基、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酰基、腺苷三磷酰基、腺苷二磷酰基、腺苷单磷酰基、腺苷基、 $\alpha$ -D-半乳糖基、 $\beta$ -D-半乳糖基、 $\alpha$ -D-葡萄糖基、 $\beta$ -D-葡萄糖基、 $\alpha$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -呋喃果糖基、 $\beta$ -D-glucosiduransyl或



其中, B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>和B<sub>3</sub>各自独立地是H、包含1-4个碳原子的直链

烷基、或包含3-6个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中,Z可以是

[0071]



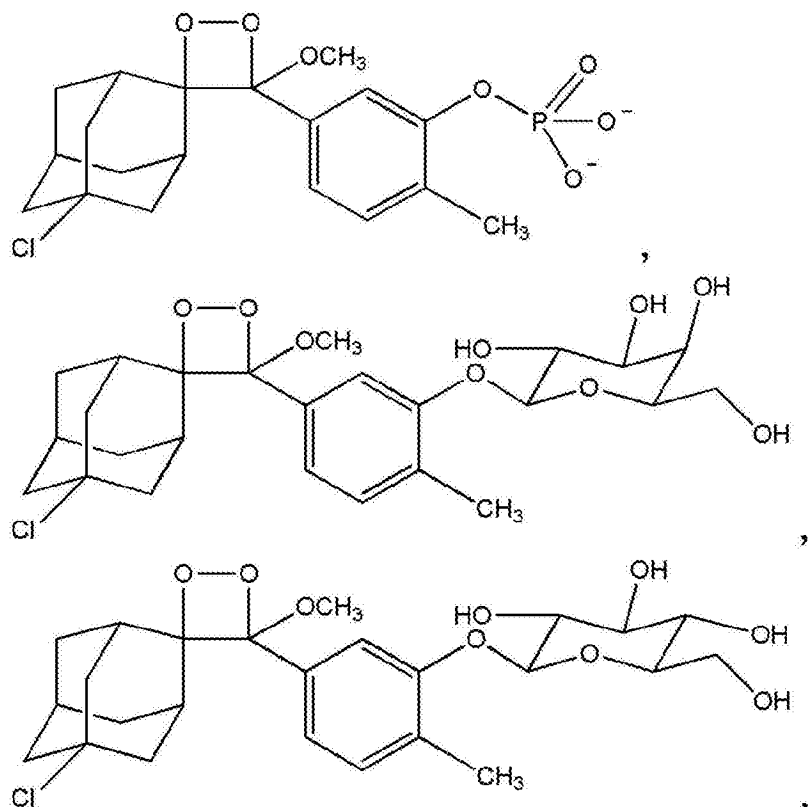
[0072] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-20个碳原子的直链烷基、包含3-20个碳原子的支链烷基、包含1-20个碳原子的直链烷氧基或包含3-20个碳原子的支链烷氧基。

[0073] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-20个碳原子的直链烷基或包含1-20个碳原子的直链烷氧基。

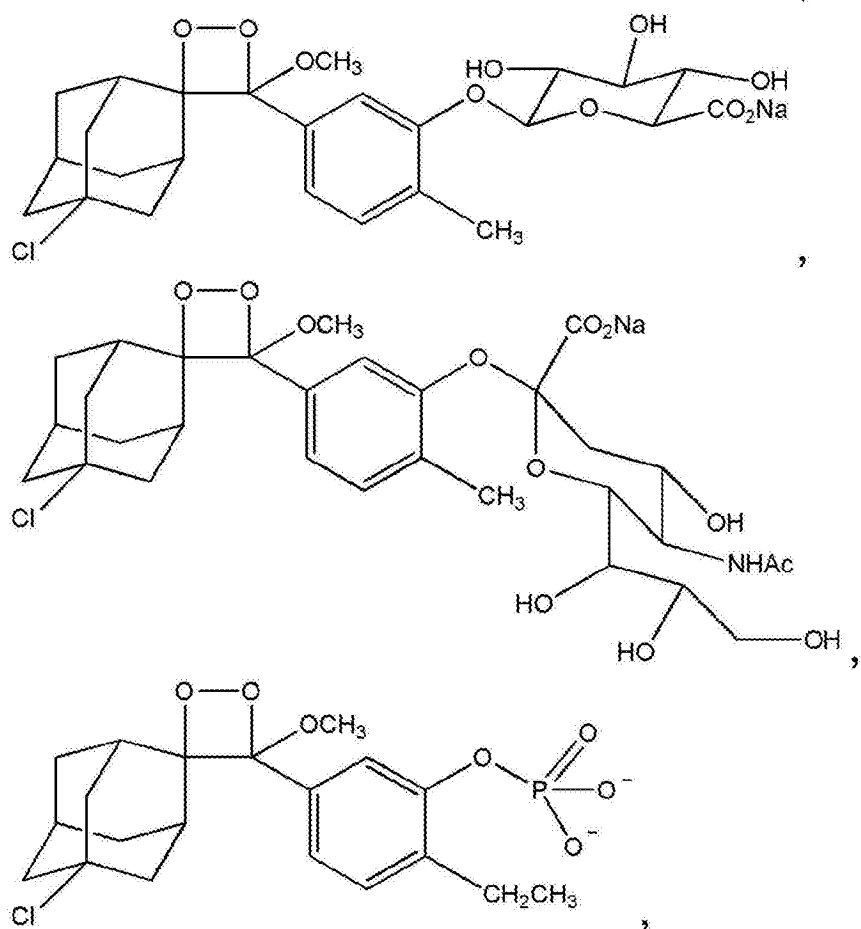
[0074] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-5个碳原子的直链烷基或包含1-5个碳原子的直链烷氧基。

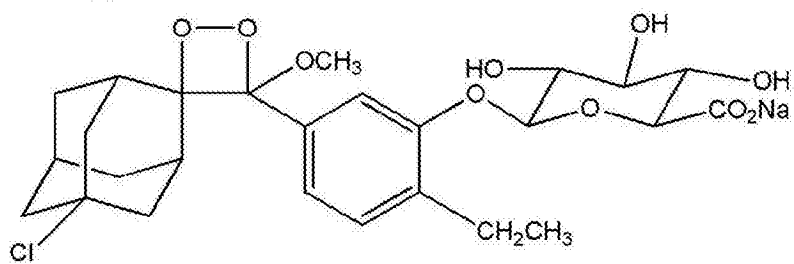
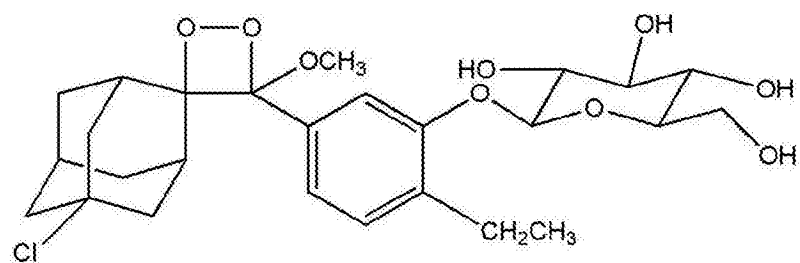
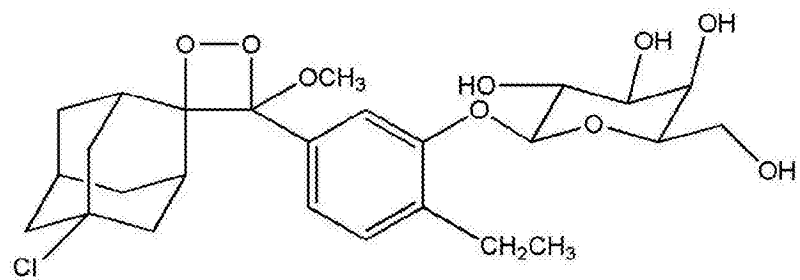
[0075] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以选自:甲基、乙基、丙基、丁基、甲氧基、乙氧基、丙氧基或丁氧基。

[0076] 在某些实施方案中,所述化合物可以是

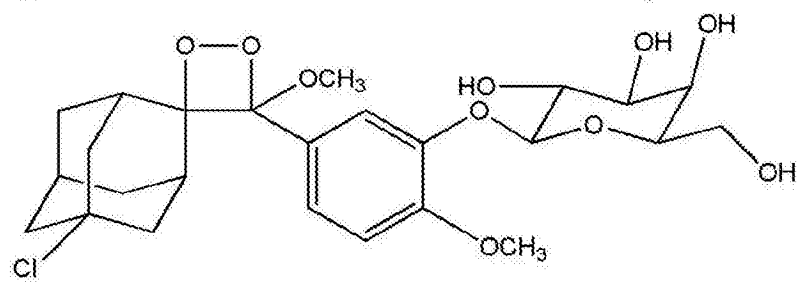
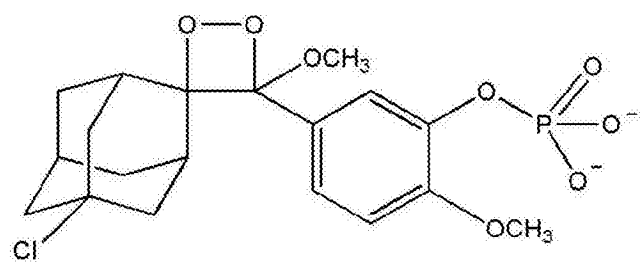
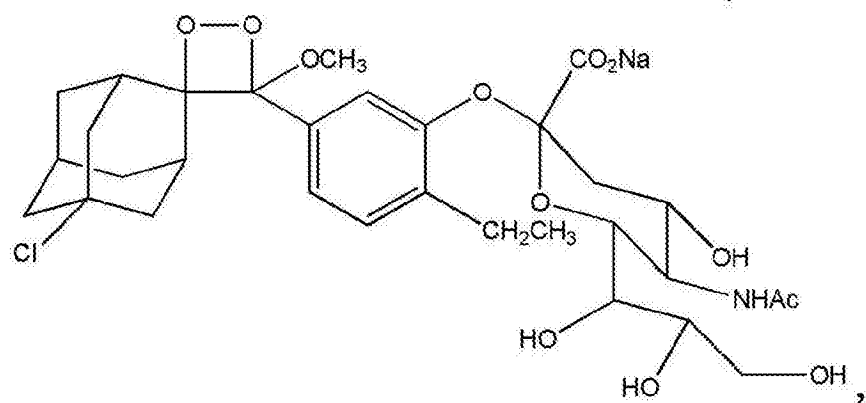


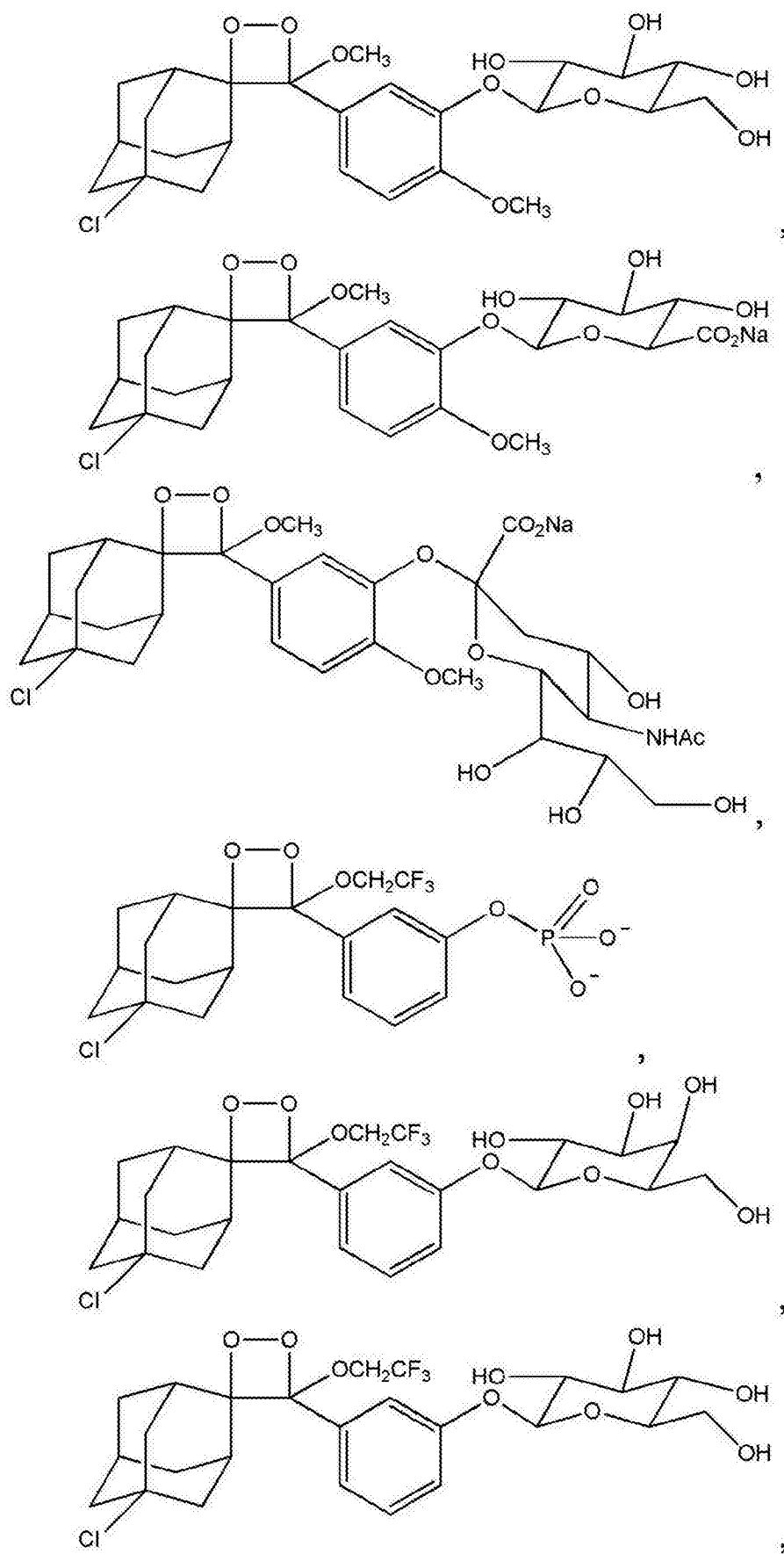
[0077]



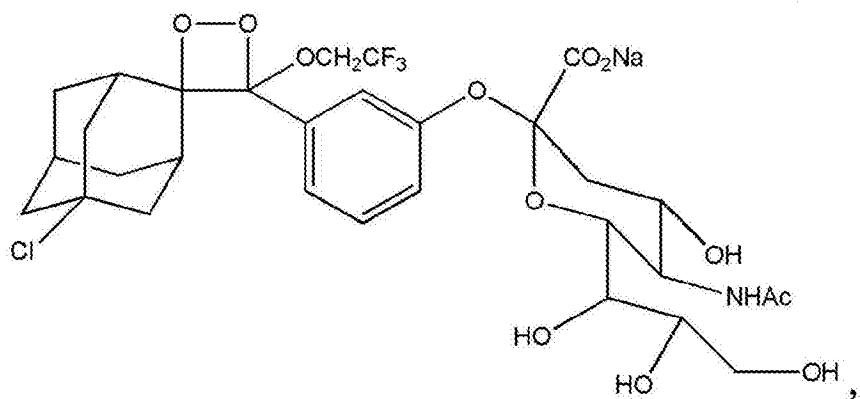
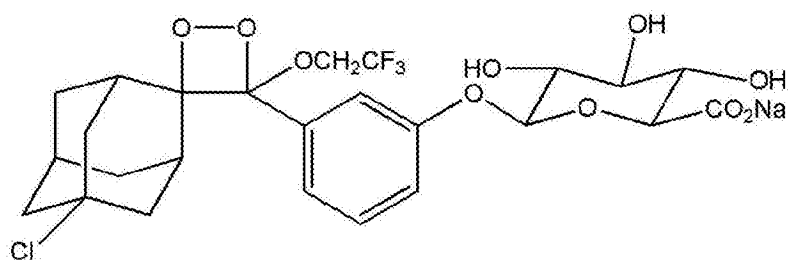


[0078]

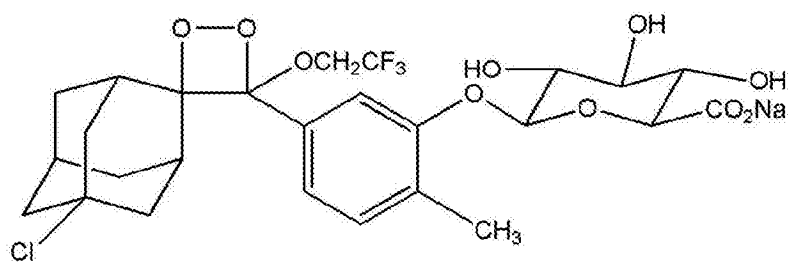
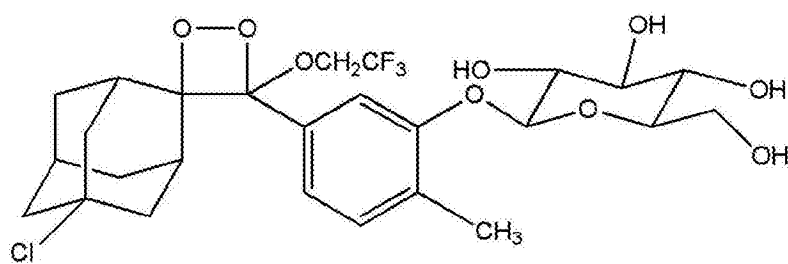
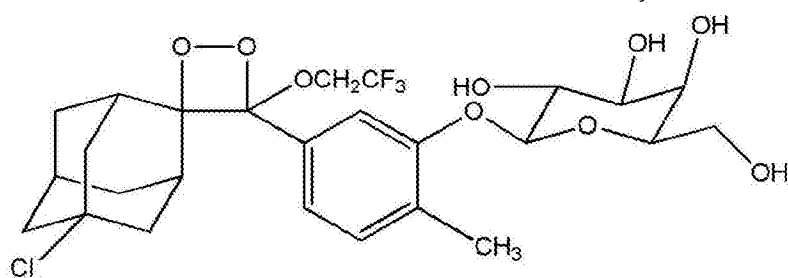
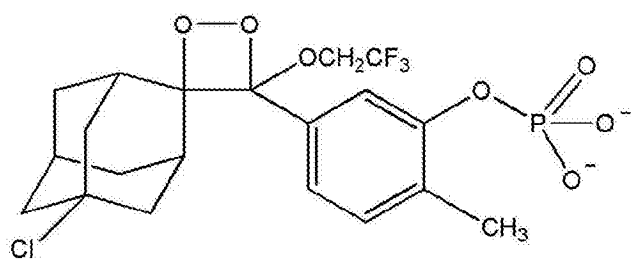


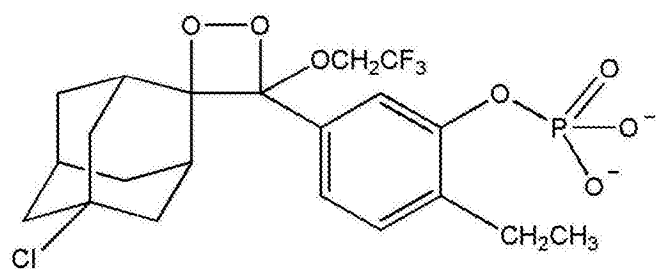
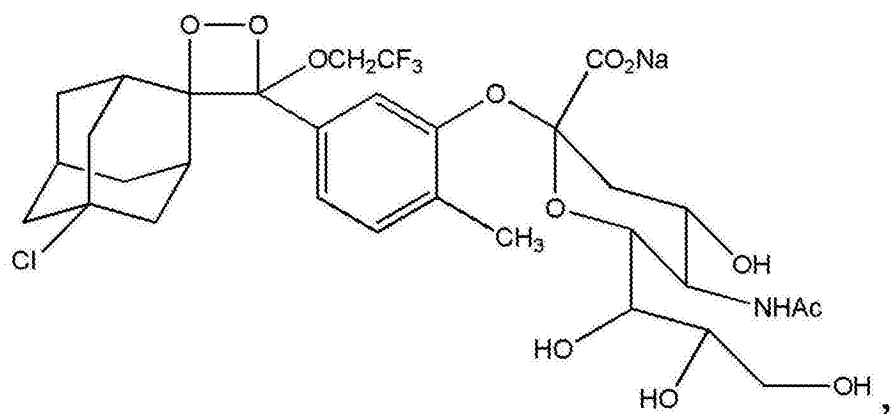




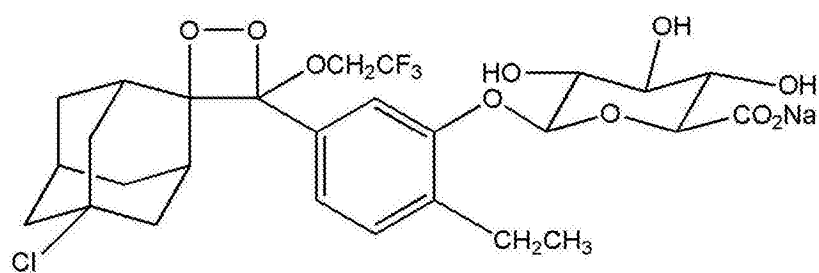
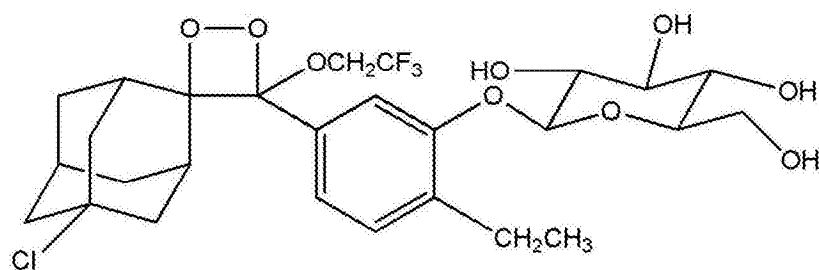
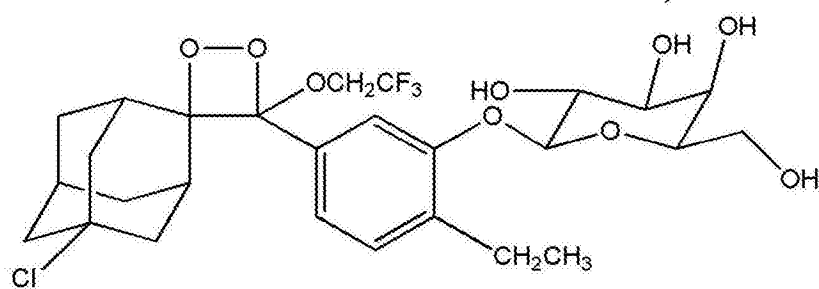


[0080]

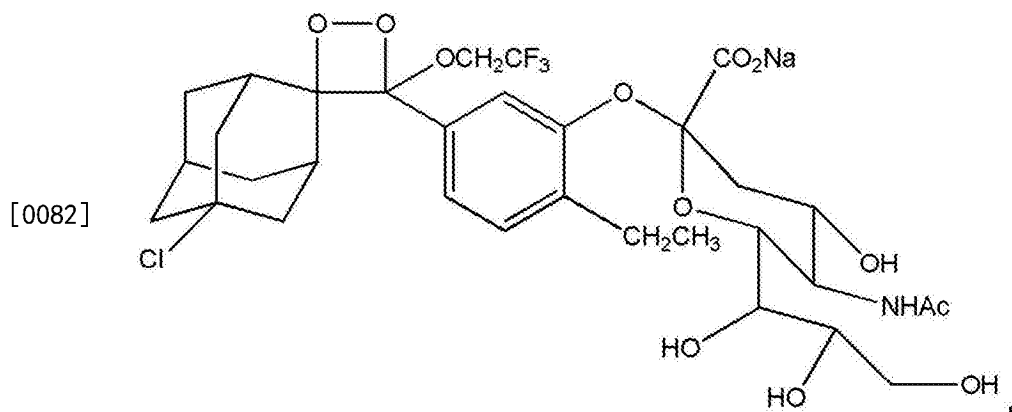




[0081]



, 或者



[0083] 在另一个方面,本发明提供了一种用于确定样品中酶的存在和/或量的测定方法,所述方法包括下述步骤:提供化合物[1];提供疑似包含所述酶的样品,所述酶能够切割所述化合物,使得它分解和产生光;使所述样品与所述化合物接触,以形成反应混合物;和,在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生会指示酶的存在,且产生的光的量可以与样品中存在的酶的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。

[0084] 在某些实施方案中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0085] 在另一个方面,本发明提供了一种用于确定样品中抗原的存在和/或量的测定方法,所述方法包括下述步骤:提供化合物[1];提供疑似包含所述抗原的样品;提供酶连接的抗原,其包含所述抗原和酶,所述酶能够切割所述化合物,使得它分解和产生光;提供固相,其包含能够结合所述抗原的抗体;使所述样品和酶连接的抗原与所述固相接触,以形成酶复合物;使所述酶复合物与所述化合物接触,以形成反应混合物;和,在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生会指示所述抗原的存在,且产生的光的量可以与所述样品中存在的抗原的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。

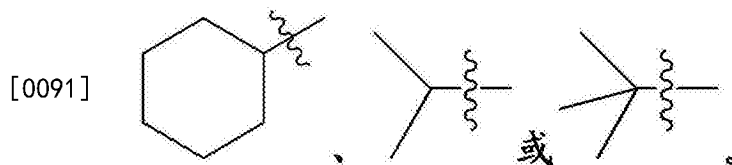
[0086] 在某些实施方案中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0087] 在另一个方面,本发明提供了一种用于确定样品中核酸的存在和/或量的测定方法,所述方法包括下述步骤:提供化合物[1];提供疑似包含所述核酸的样品;将所述核酸固定化至固相;提供酶连接的寡核苷酸,其包含能够与所述核酸杂交的寡核苷酸和酶,所述酶能够切割所述化合物,使得它分解和产生光;使所述固定化的核酸和酶连接的寡核苷酸接触,以形成酶复合物;使所述酶复合物与所述化合物接触,以形成反应混合物;和,在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生指示所述核酸的存在,且产生的光的量可以与样品中存在的核酸的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。

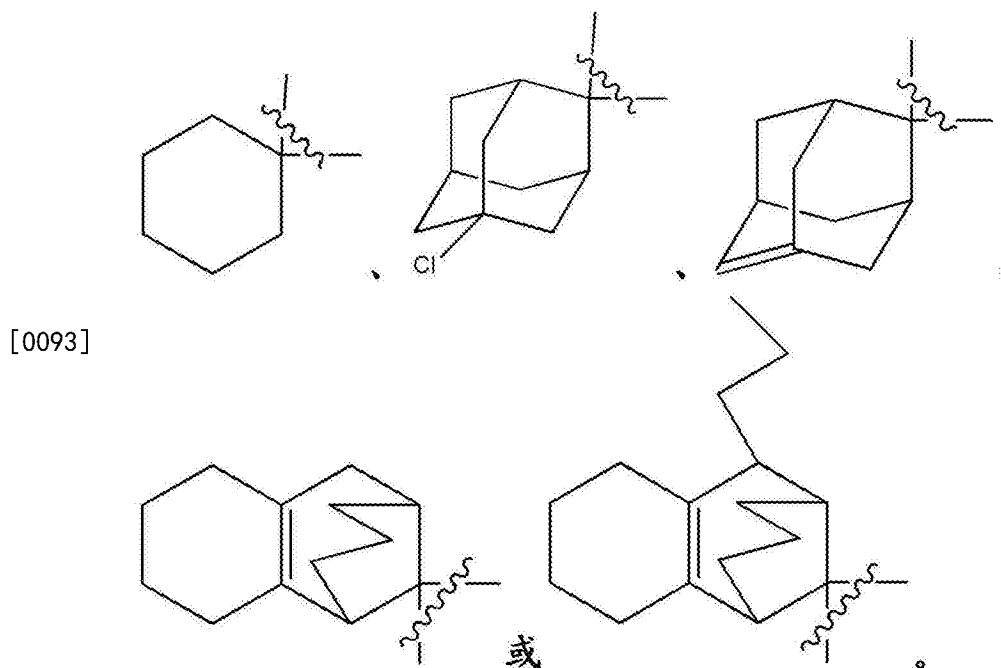
[0088] 在某些实施方案中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0089] 在另一个方面,本发明提供了一种用于检测样品中分析物的存在和/或量的试剂盒,所述试剂盒包括化合物[1];和缓冲液。

[0090] 在某些实施方案中,A或B中的至少一个可以是



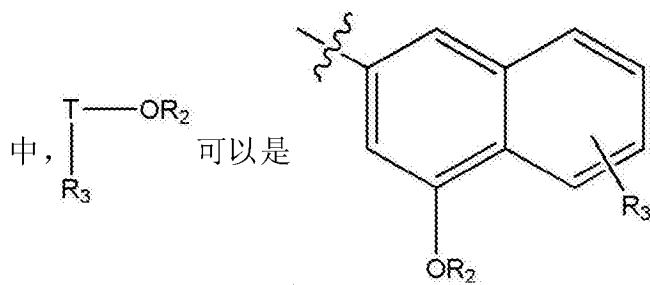
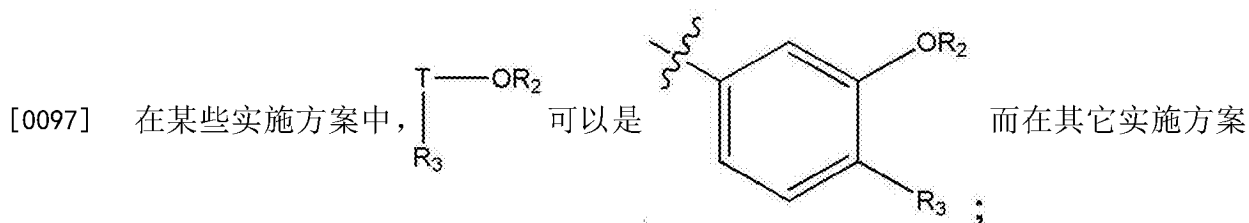
[0092] 在某些实施方案中,A和B一起可以是



[0094] 在某些实施方案中, $R_1$ 可以是包含1-5个碳原子的直链烷基,其可以任选地被一个或多个卤素原子取代。

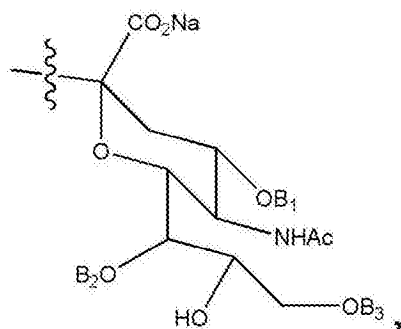
[0095] 在某些实施方案中, $R_1$ 可以是包含1-2个碳原子的直链烷基或包含1-2个碳原子的直链三氟烷基。

[0096] 在某些实施方案中, $R_1$ 可以是甲基或1,1,1-三氟乙基。



[0098] 在某些实施方案中, $\text{OR}_2$ 可以是磷酸酯、乙酸酯、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酯、腺苷三磷酸、腺苷二磷酸、腺苷单磷酸、腺苷、 $\alpha$ -D-半乳糖苷、 $\beta$ -D-半乳糖苷、 $\alpha$ -D-葡萄糖苷、 $\beta$ -D-

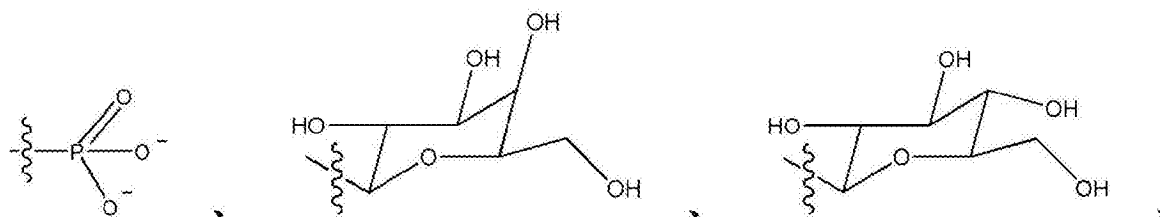
葡萄糖苷、 $\alpha$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -呋喃果糖苷、 $\beta$ -D-葡糖苷酸或



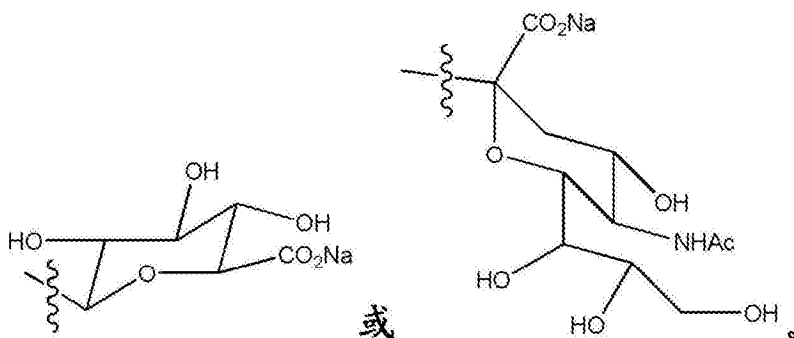
其中,  $B_1$ 、 $B_2$ 和 $B_3$ 各自独立地是H、包含1-4个碳原子的直链烷

基、或包含3-6个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中,  $R_2$ 可以是

[0099]



[0100]



[0101] 在某些实施方案中,  $R_2$ 可以是E-L-Nuc-Z, 其中E是包含亲电子原子的基团, 所述原子在Z基团的酶切割以后被Nuc基团的电子对攻击, 并通过邻助作用释放出化合物阴离子; L是连接基团; Nuc是亲核原子; 且Z是可酶促切割的基团; 其中

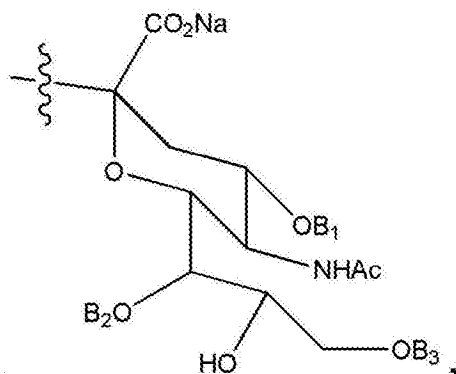
[0102] E是羧基、羰基、被离去基团取代的亚甲基、磷酸盐、碳酸盐、黄原酸盐、亚硫酸盐、磺酸盐、亚硫酸氢盐或二硫化物;

[0103] L选自: 含有1-4个碳原子的亚甲基或聚亚甲基、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n-$ 或 $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n-$ , 其中m和n是0-3, 且m+n是2或3, 其中 $R_6$ 是含有1-10个碳原子的烷基, 且所述连接基团可以被下述基团取代: 含有1-24个碳原子的烷基, 含有2-24个碳原子的烯基, 被含有1-24个碳原子的酰氧基单或二取代且含有1-24个碳原子的烷基, 被含有1-24个碳原子的酰氧基单或二取代且含有2-24个碳原子的烯基, 含有6-10个碳的芳基, 被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有1-4个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有1-24个碳原子的烷基, 或被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有1-4个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有2-24个碳原子的烯基;

[0104] Nuc是氧原子或硫原子; 且

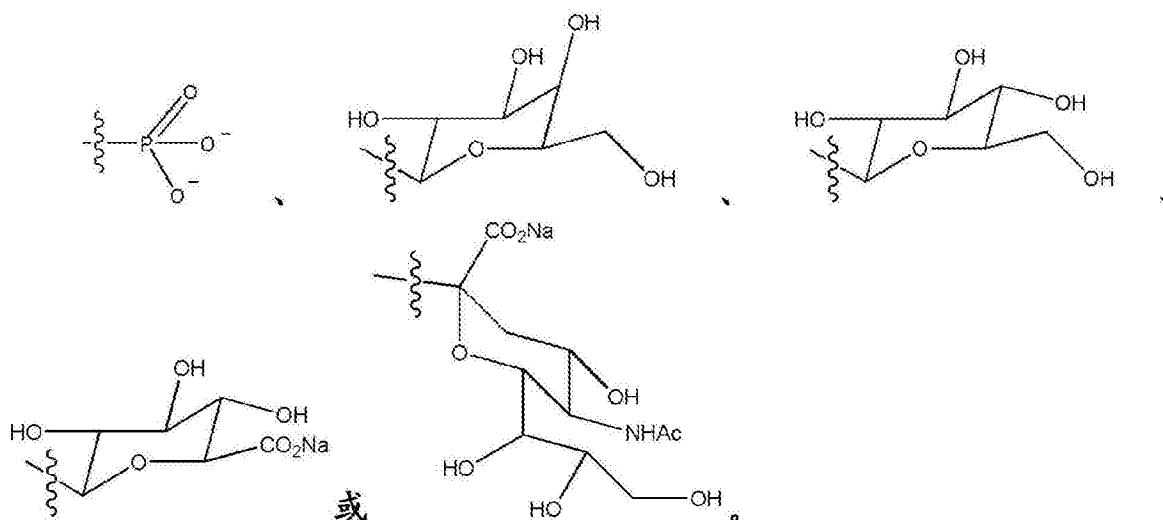
[0105] Z是磷酸基、乙酰基、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酰基、腺苷三磷酸基、腺苷二磷酸基、

腺苷单磷酸基、腺苷基、 $\alpha$ -D-半乳糖基、 $\beta$ -D-半乳糖基、 $\alpha$ -D-葡萄糖基、 $\beta$ -D-葡萄糖基、 $\alpha$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -呋喃果糖基、 $\beta$ -D-glucosiduransyl 或



其中,  $B_1$ 、 $B_2$  和  $B_3$  各自独立地是 H、包含 1-4 个碳原子的直链

烷基(支链或直链)、或包含 3-6 个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中, Z 可以是 [0106]



[0107] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含 1-20 个碳原子的直链烷基、包含 3-20 个碳原子的支链烷基、包含 1-20 个碳原子的直链烷氧基、或包含 3-20 个碳原子的支链烷氧基。

[0108] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含 1-20 个碳原子的直链烷基或包含 1-20 个碳原子的直链烷氧基。

[0109] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含 1-5 个碳原子的直链烷基或包含 1-5 个碳原子的直链烷氧基。

[0110] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以选自:甲基、乙基、丙基、丁基、甲氧基、乙氧基、丙氧基和丁氧基。

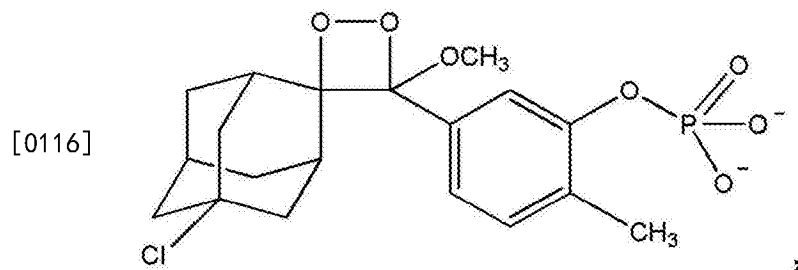
[0111] 在某些实施方案中,所述试剂盒可以进一步包含促进剂。在这些实施方案中的某些中,所述促进剂可以包含聚合的季铵盐、聚合的季磷盐或它们的组合。在这些实施方案中的某些中,所述聚合的季铵盐可以是聚(乙烯基苄基三甲基氯化铵)、聚[乙烯基苄基(苄基二甲基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三丁基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三戊基氯化铵)]或它们的组合;而在其它实施方案中,所述聚合的季磷盐可以是聚(乙烯基苄基三甲基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)、包含聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)和聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)的共聚物;或它们的组合。

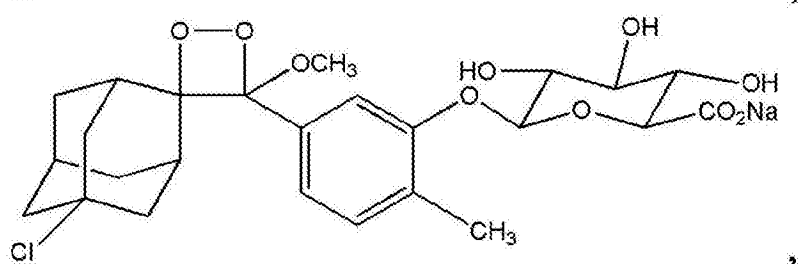
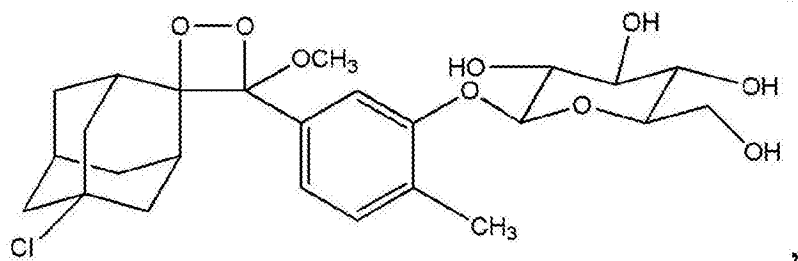
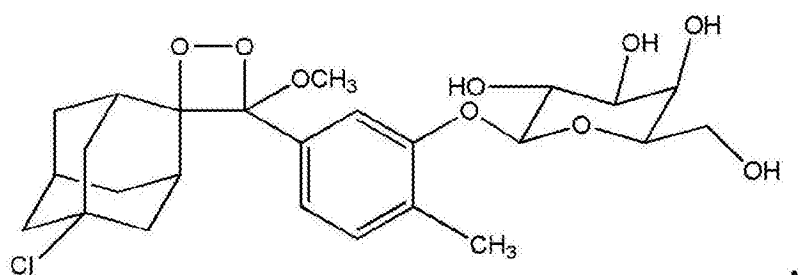
[0112] 在某些实施方案中,所述促进剂可以进一步包含受体染料。在这些实施方案中的某些中,所述受体染料可以是荧光素、罗丹明、磺酰罗丹明、ALEXA FLUOR350、ALEXA FLUOR405、ALEXA FLUOR430、ALEXA FLUOR488、ALEXA FLUOR532、ALEXA FLUOR546或ALEXA FLUOR555。

[0113] 在某些实施方案中,所述化合物的可被酶部分切割的键的切割会导致在25℃的光的产生,所述光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

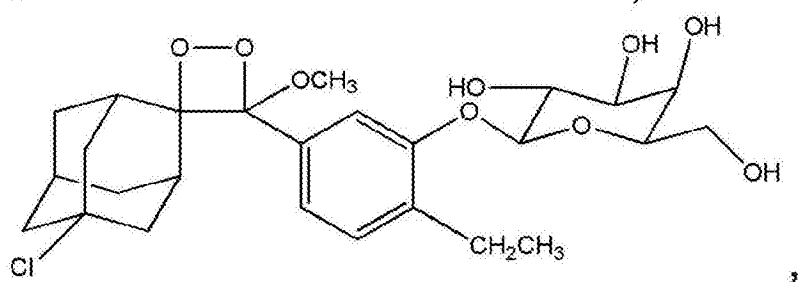
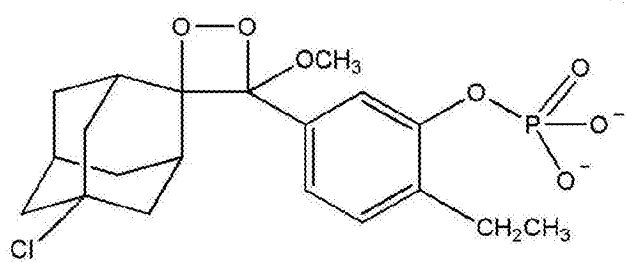
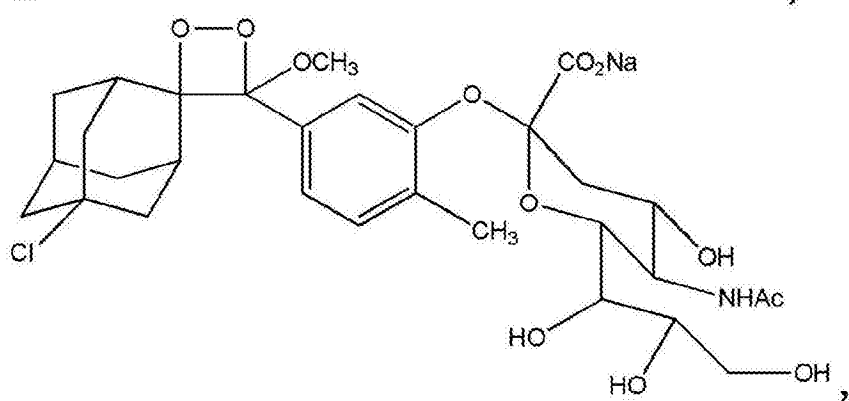
[0114] 在某些实施方案中,所述化合物的可被酶部分切割的键的切割会导致在37℃的光的产生,所述光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0115] 在某些实施方案中,所述化合物可以是

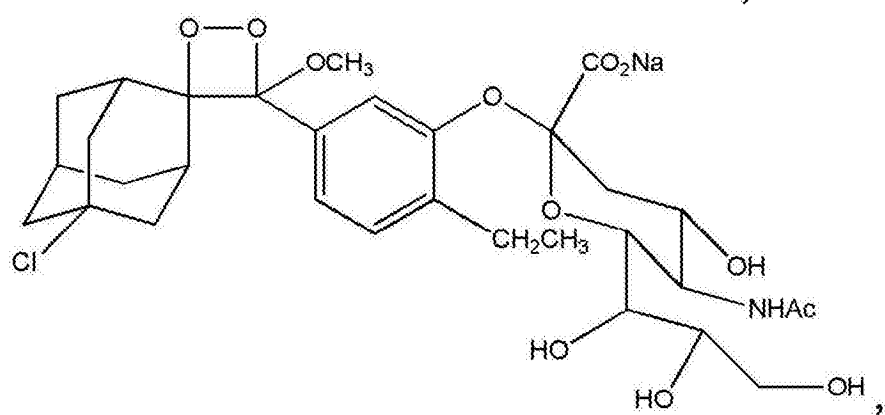
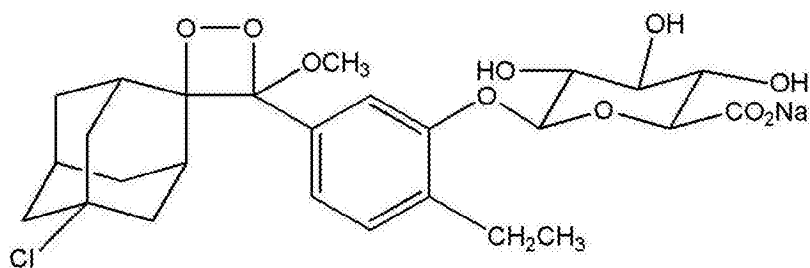
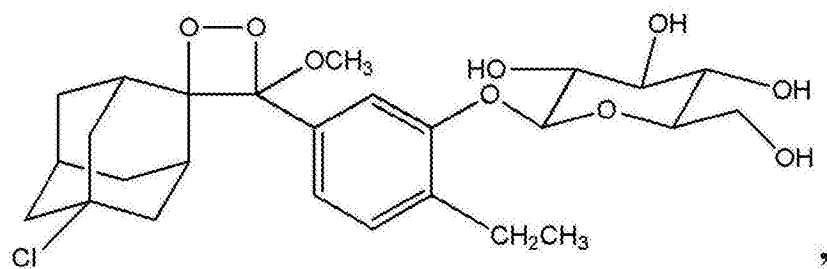




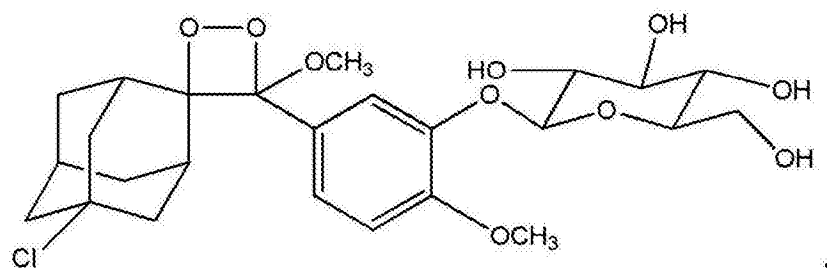
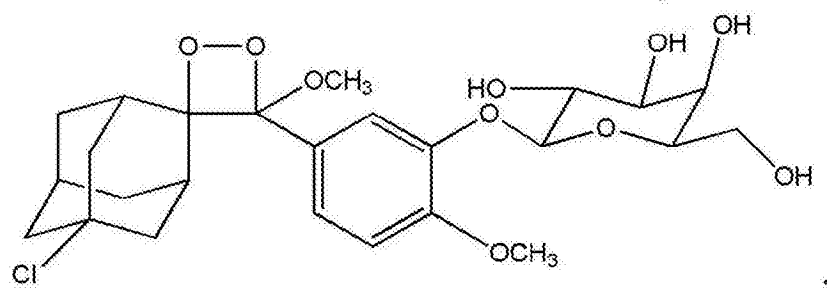
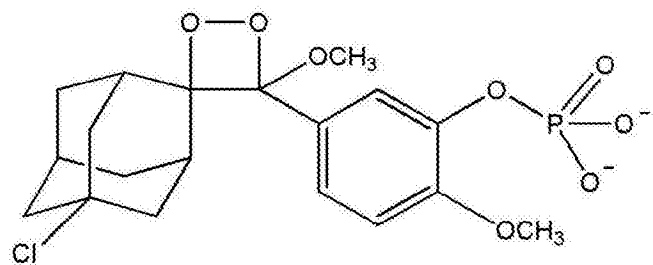
[0117]



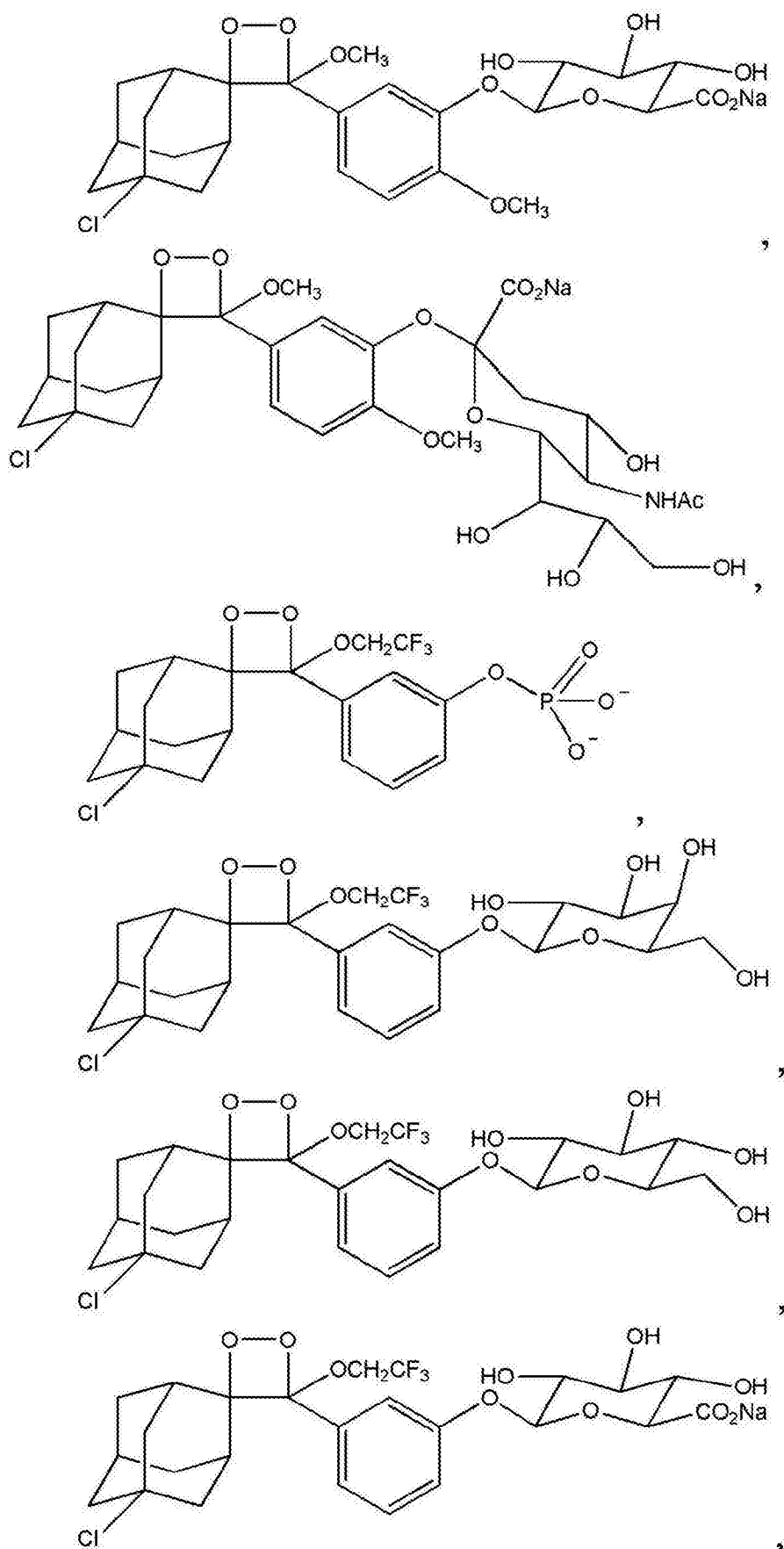


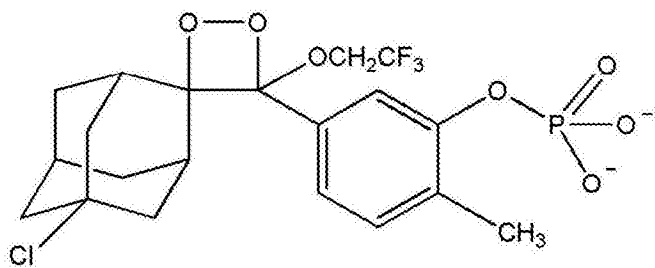
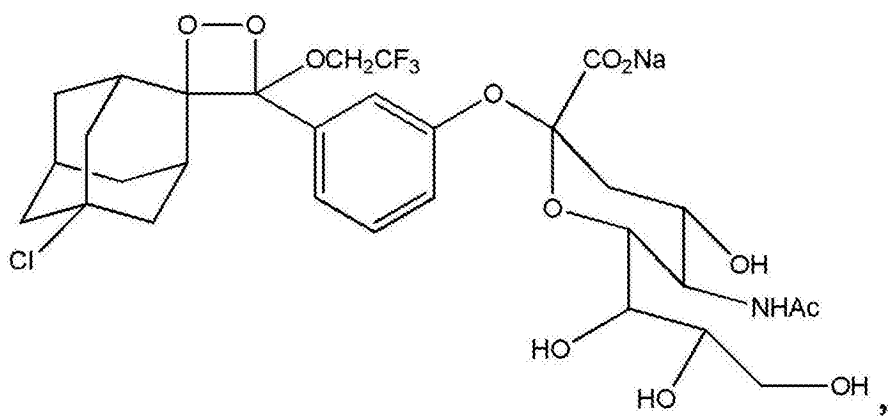


[0118]

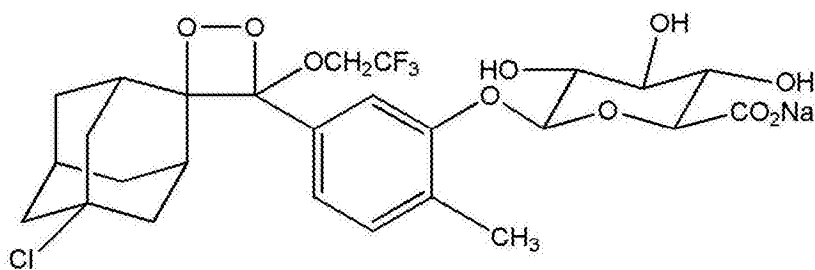
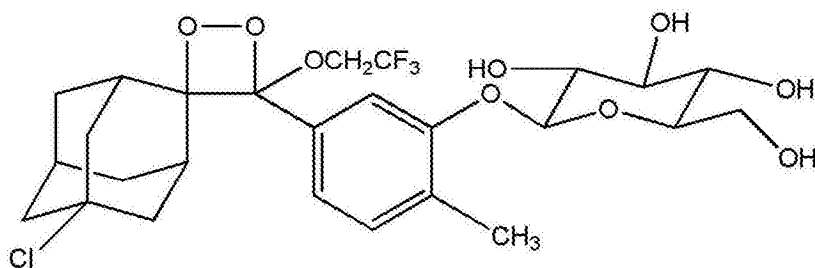
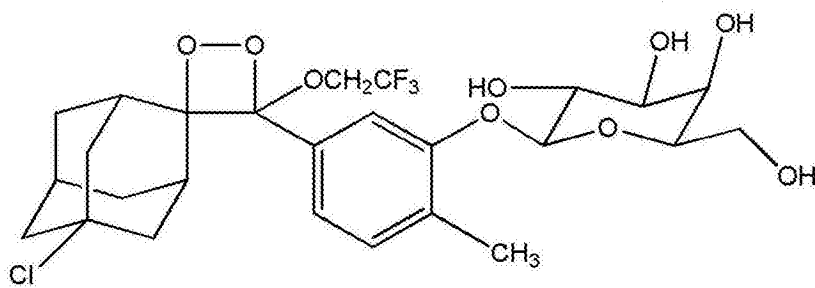


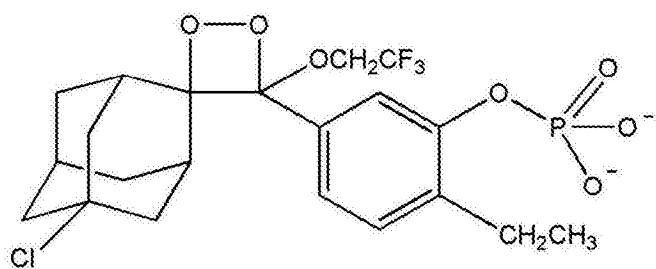
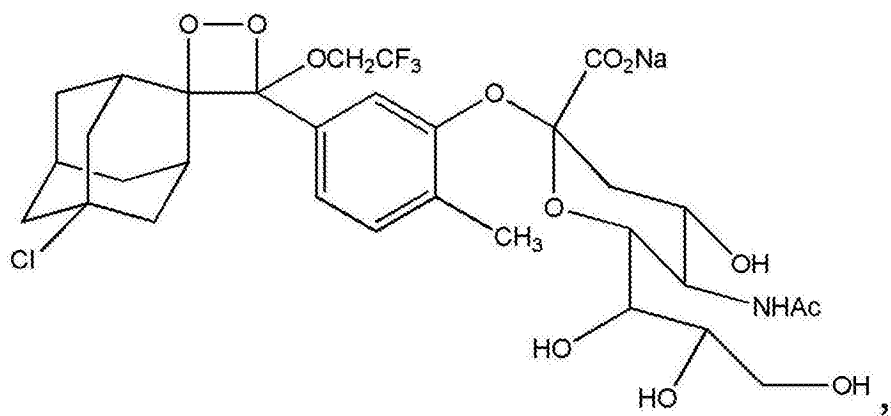
[0119]



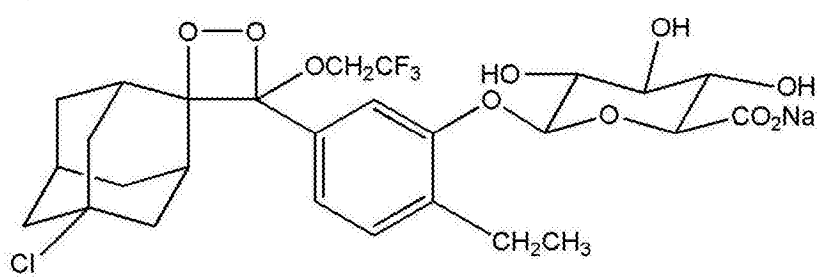
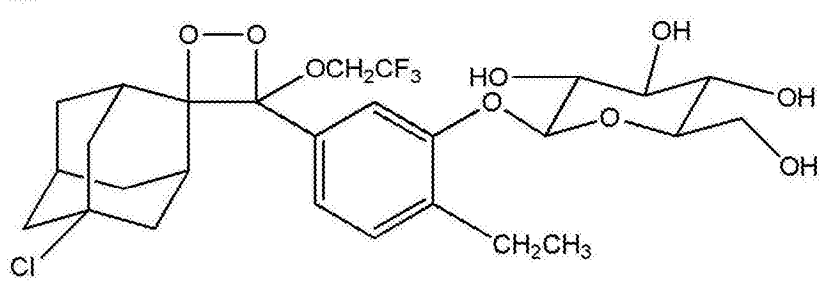
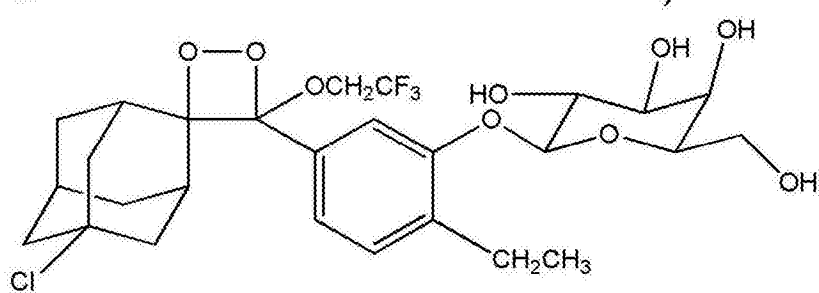


[0120]

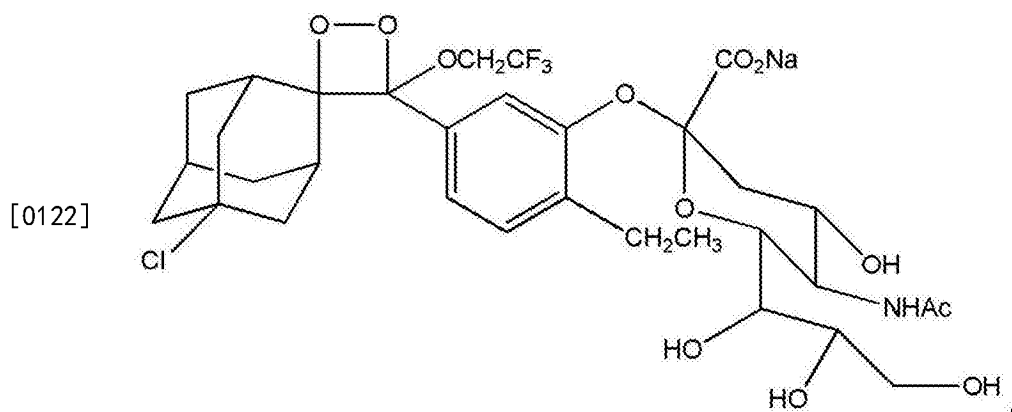




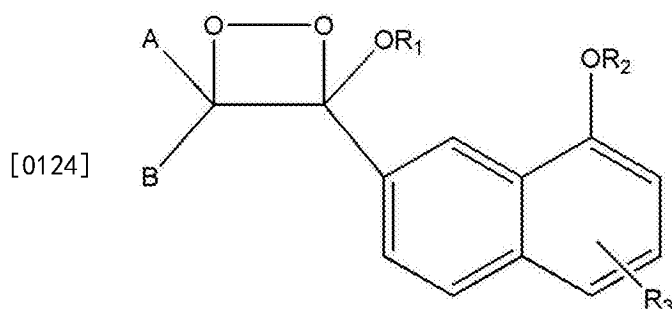
[0121]



, 或者



[0123] 在另一个方面,本发明提供了一种具有下式结构的化合物



[0125] 其中,A和B独立地选自:包含1-20个碳原子的直链烷基、包含2-20个碳原子的直链烯基、包含3-20个碳原子的支链烷基、包含3-20个碳原子的支链烯基、包含3-20个碳原子的环烷基、包含3-20个碳原子的环烯基、包含3-20个碳原子的环杂烷基、包含3-20个碳原子的环杂烯基、包含4-60个碳原子的聚环烷基、包含4-60个碳原子的聚环烯基、包含4-60个碳原子的聚环杂烷基和包含4-60个碳原子的聚环杂烯基,它们中的任一个可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代,且其中A和B一起形成所述环烷基、环烯基、聚环烷基或聚环烯基,形成的基团可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代;

[0126]  $R_1$ 是可以任选地被一个或多个卤素原子取代的包含1-20个碳原子的直链烷基或可以任选地被一个或多个卤素原子取代的包含3-20个碳原子的支链烷基;

[0127]  $R_2$ 是酶可切割的基团,其包含可被酶部分切割以产生氧阴离子的键;和

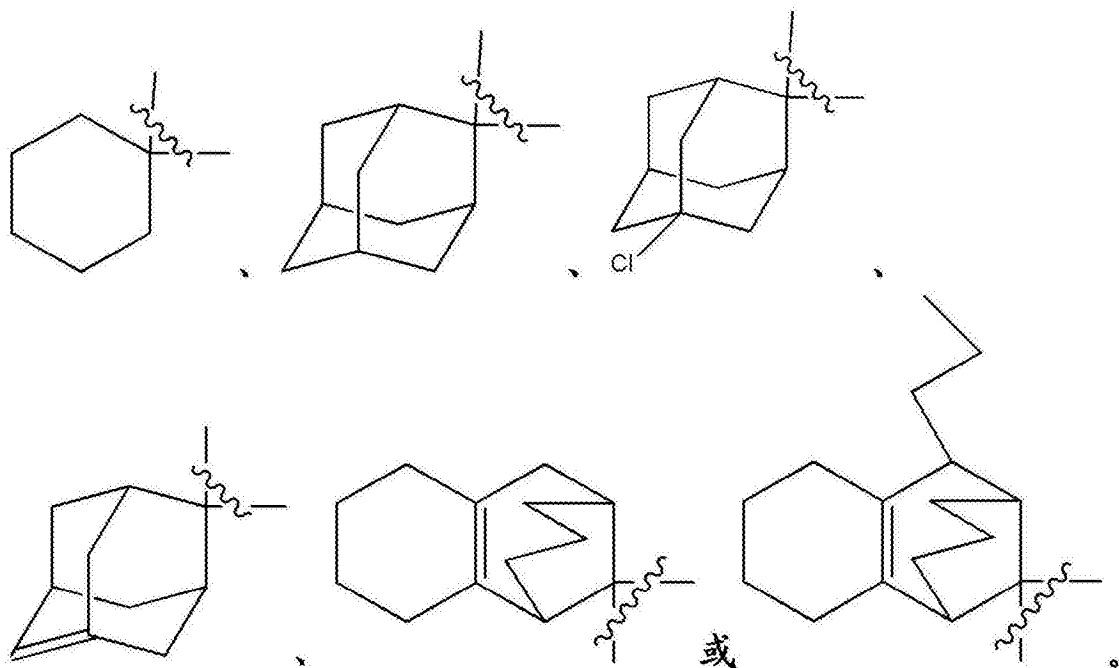
[0128]  $R_3$ 是氢或供电子基团。

[0129] 在某些实施方案中,A或B中的至少一个可以是



[0131] 在某些实施方案中,A和B一起可以是

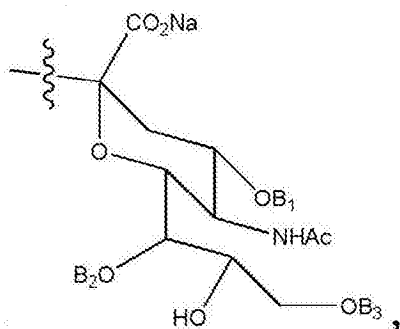
[0132]



[0133] 在某些实施方案中,  $R_1$  可以是包含1-5个碳原子的直链烷基, 其可以任选地被一个或多个卤素原子取代。

[0134] 在某些实施方案中,  $R_1$  可以是包含1-2个碳原子的直链烷基或包含1-2个碳原子的直链三氟烷基。在这些实施方案中的某些中,  $R_1$  可以是甲基或1,1,1-三氟乙基。

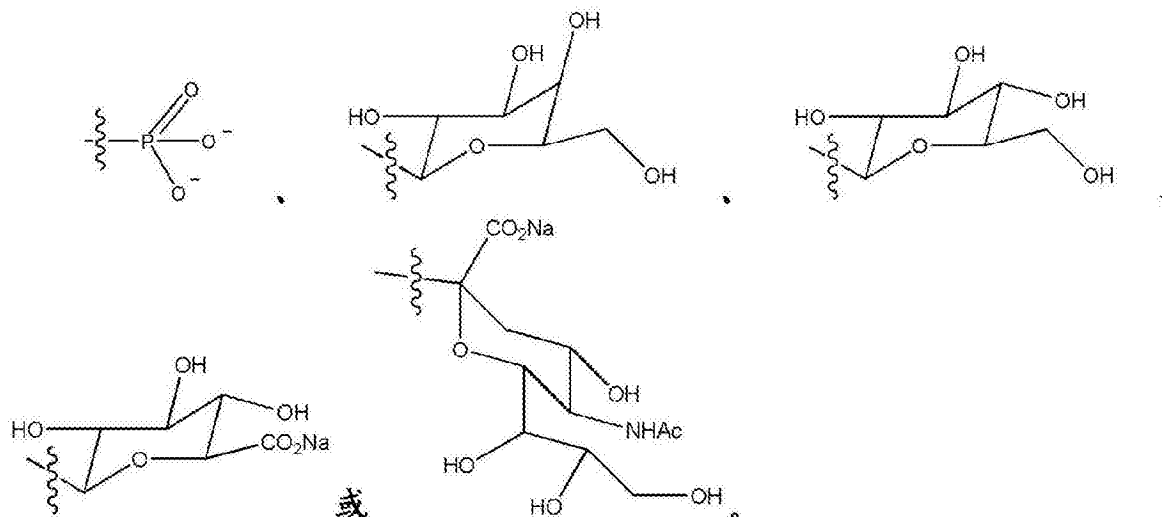
[0135] 在某些实施方案中,  $OR_2$  可以是磷酸酯、乙酸酯、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酯、腺苷三磷酸、腺苷二磷酸、腺苷单磷酸、腺苷、 $\alpha$ -D-半乳糖苷、 $\beta$ -D-半乳糖苷、 $\alpha$ -D-葡萄糖苷、 $\beta$ -D-葡萄糖苷、 $\alpha$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -呋喃果糖苷、 $\beta$ -D-葡糖苷酸或



其中,  $B_1$ 、 $B_2$  和  $B_3$  各自独立地是H、包含1-4个碳原子的直链烷

基、或包含3-6个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中,  $R_2$  可以是

[0136]



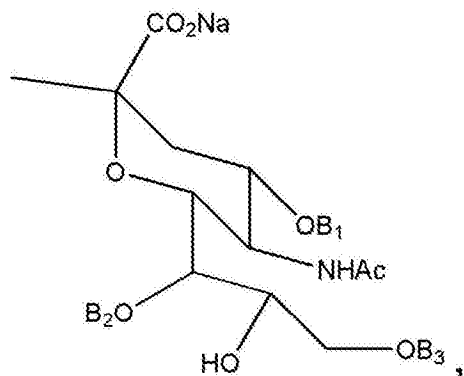
[0137] 在某些实施方案中,  $R_2$  可以是 E-L-Nuc-Z, 其中 E 是包含亲电子原子的基团, 所述原子在 Z 基团的酶切割以后被 Nuc 基团的电子对攻击, 并通过邻助作用释放出化合物阴离子; L 是连接基团; Nuc 是亲核原子; 且 Z 是可酶促切割的基团; 其中

[0138] E 是羧基、羰基、被离去基团取代的亚甲基、磷酸盐、碳酸盐、黄原酸盐、亚硫酸盐、磺酸盐、亚硫酸氢盐或二硫化物;

[0139] L 选自: 含有 1-4 个碳原子的亚甲基或聚亚甲基、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-$  或  $-(\text{CH}_2)_m-\text{NR}_6-(\text{CH}_2)_n-$ , 其中 m 和 n 是 0-3, 且 m+n 是 2 或 3, 其中  $R_6$  是含有 1-10 个碳原子的烷基, 且所述连接基团可以被下述基团取代: 含有 1-24 个碳原子的烷基, 含有 2-24 个碳原子的烯基, 被含有 1-24 个碳原子的酰氧基单或二取代且含有 1-24 个碳原子的烷基, 被含有 1-24 个碳原子的酰氧基单或二取代且含有 2-24 个碳原子的烯基, 含有 6-10 个碳的芳基, 被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有 1-4 个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有 1-24 个碳原子的烷基, 或被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有 1-4 个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有 2-24 个碳原子的烯基;

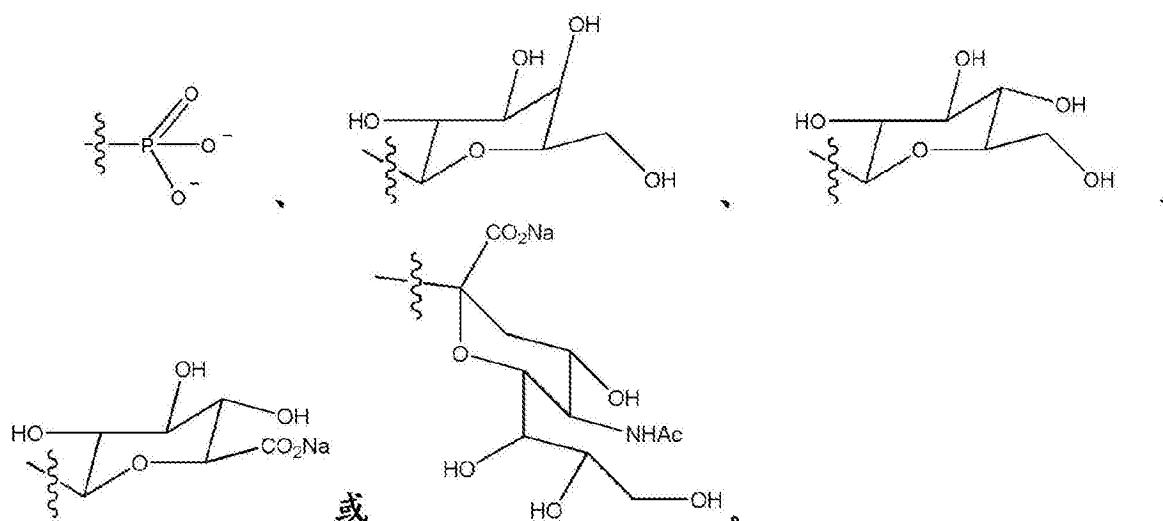
[0140] Nuc 是氧原子或硫原子; 且

[0141] Z 是磷酰基、乙酰基、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酰基、腺苷三磷酰基、腺苷二磷酰基、腺苷单磷酰基、腺苷基、 $\alpha$ -D-半乳糖基、 $\beta$ -D-半乳糖基、 $\alpha$ -D-葡萄糖基、 $\beta$ -D-葡萄糖基、 $\alpha$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -呋喃果糖基、 $\beta$ -D-glucosiduransyl 或



其中,  $B_1$ 、 $B_2$  和  $B_3$  各自独立地是 H、包含 1-4 个碳原子的直链

烷基、或包含3-6个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中,Z可以是  
[0142]



[0143] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-20个碳原子的直链烷基、包含3-20个碳原子的支链烷基、包含1-20个碳原子的直链烷氧基或包含3-20个碳原子的支链烷氧基。

[0144] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-20个碳原子的直链烷基或包含1-20个碳原子的直链烷氧基。

[0145] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-5个碳原子的直链烷基或包含1-5个碳原子的直链烷氧基。

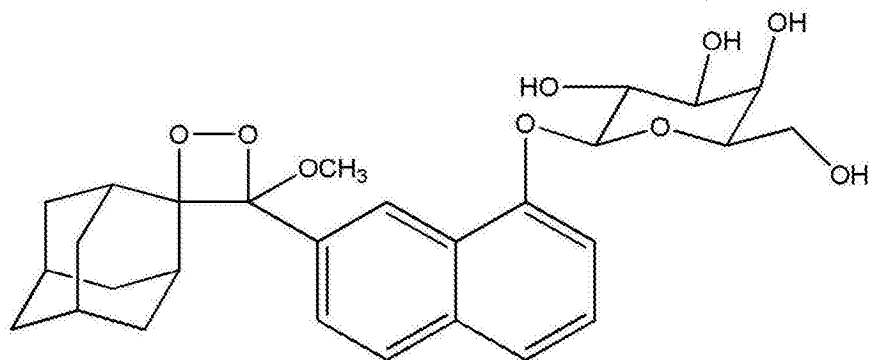
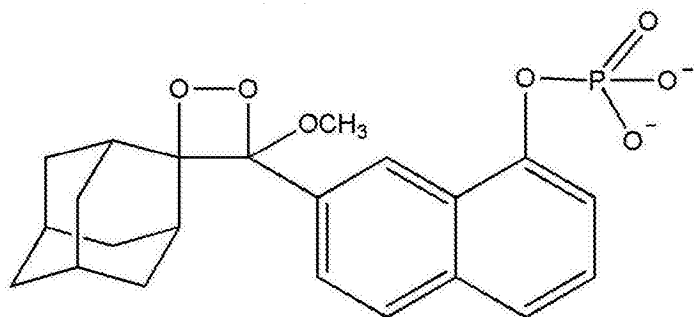
[0146] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以选自:甲基、乙基、丙基、甲氧基、乙氧基和丙氧基。

[0147] 在某些实施方案中,可被酶部分切割的键的切割会导致在25℃的光的产生,所述光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

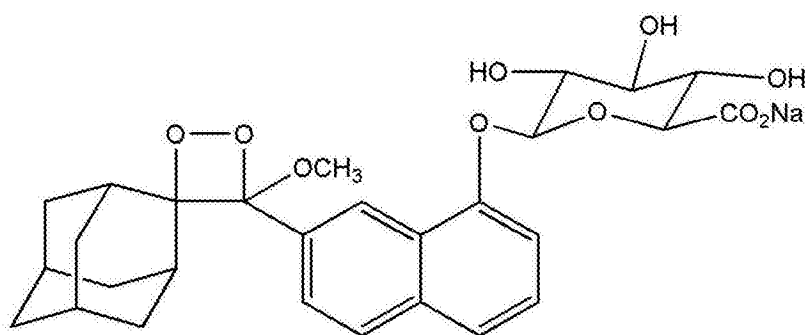
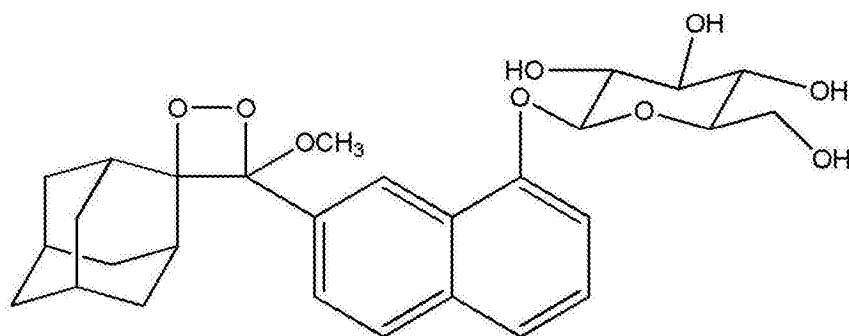
[0148] 在某些实施方案中,可被酶部分切割的键的切割会导致在37℃的光的产生,所述光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0149] 在某些实施方案中,所述化合物是

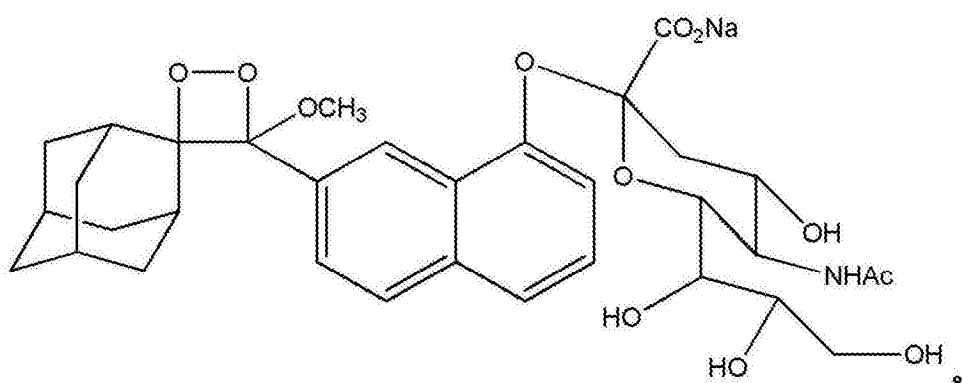




[0150]

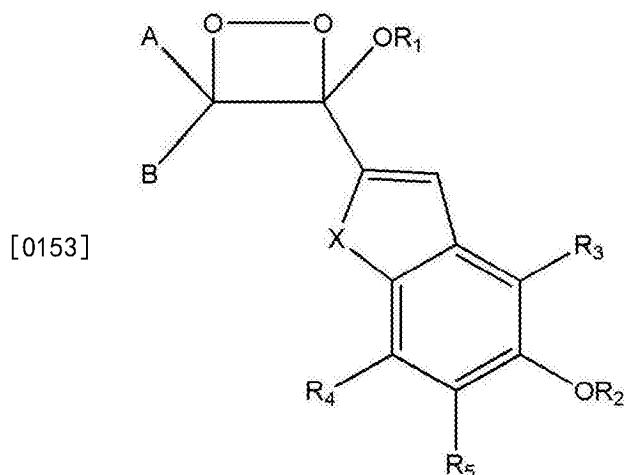


, 或者



[0151]

[0152] 在另一个方面,本发明提供了一种具有下式结构的化合物:



[0154] 其中，

[0155] A和B独立地选自：包含1-20个碳原子的直链烷基、包含2-20个碳原子的直链烯基、包含3-20个碳原子的支链烷基、包含3-20个碳原子的支链烯基、包含3-20个碳原子的环烷基、包含3-20个碳原子的环烯基、包含3-20个碳原子的环杂烷基、包含3-20个碳原子的环杂烯基、包含4-60个碳原子的聚环烷基、包含4-60个碳原子的聚环烯基、包含4-60个碳原子的聚环杂烷基和包含4-60个碳原子的聚环杂烯基，它们中的任一个可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代，且其中A和B一起形成所述环烷基、环烯基、聚环烷基或聚环烯基，形成的基团可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代；

[0156] R<sub>1</sub>是可以任选地被一个或多个卤素原子取代的包含1-20个碳原子的直链烷基或可以任选地被一个或多个卤素原子取代的包含3-20个碳原子的支链烷基；

[0157] R<sub>2</sub>是酶可切割的基团，其包含可被酶部分切割以产生氧阴离子的键；

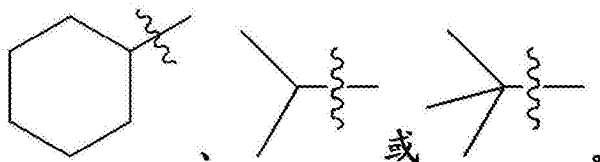
[0158] R<sub>3</sub>是氢或供电子基团；

[0159] R<sub>4</sub>和R<sub>5</sub>独立地选自：H、F、Cl、Br、I、氰基、硝基、磺酸酯、硫酸酯、三氟甲基、三氟乙基、含有1-20个碳原子的直链烷基、含有3-20个碳原子的支链烷基、含有2-20个碳原子的直链烯基、含有3-20个碳原子的支链烯基、含有3-20个碳原子的环烷基、含有3-20个碳原子的环烯基、含有3-20个碳原子的环杂烷基、含有3-20个碳原子的环杂烯基、含有4-60个碳原子的聚环烷基、含有4-60个碳原子的聚环烯基、含有4-60个碳原子的聚环杂烷基、含有4-60个碳原子的聚环杂烯基、含有1-20个碳原子的烷氧基、含有6-14个碳原子的芳基、含有6-14个碳原子的芳氧基、含有2-21个碳原子的酯、含有3-30个碳原子的三烷基铵、含有3-30个碳原子的三烷基磷、含有2-21个碳原子的烷基酰氨基、含有7-15个碳原子的芳基酰氨基、含有2-21个碳原子的烷基氨甲酰基、含有7-15个碳原子的芳基氨甲酰基、含有1-20个碳原子的烷基亚磺酰氨基、含有6-14个碳原子的芳基亚磺酰氨基、含有3-60个碳原子的三烷基甲硅烷基、含有18-42个碳原子的三芳基甲硅烷基、含有7-32个碳原子的烷基芳基甲硅烷基、含有1-20个碳原子的烷基酰氨基磺酰基、含有6-14个碳原子的芳基酰氨基磺酰基、含有1-20个碳原子的烷基磺酰基、含有6-14个碳原子的芳基磺酰基、含有2-20个碳原子的烷硫基和含有6-14个碳原子的芳硫基；和

[0160] X是硫原子、氧原子或氮原子。

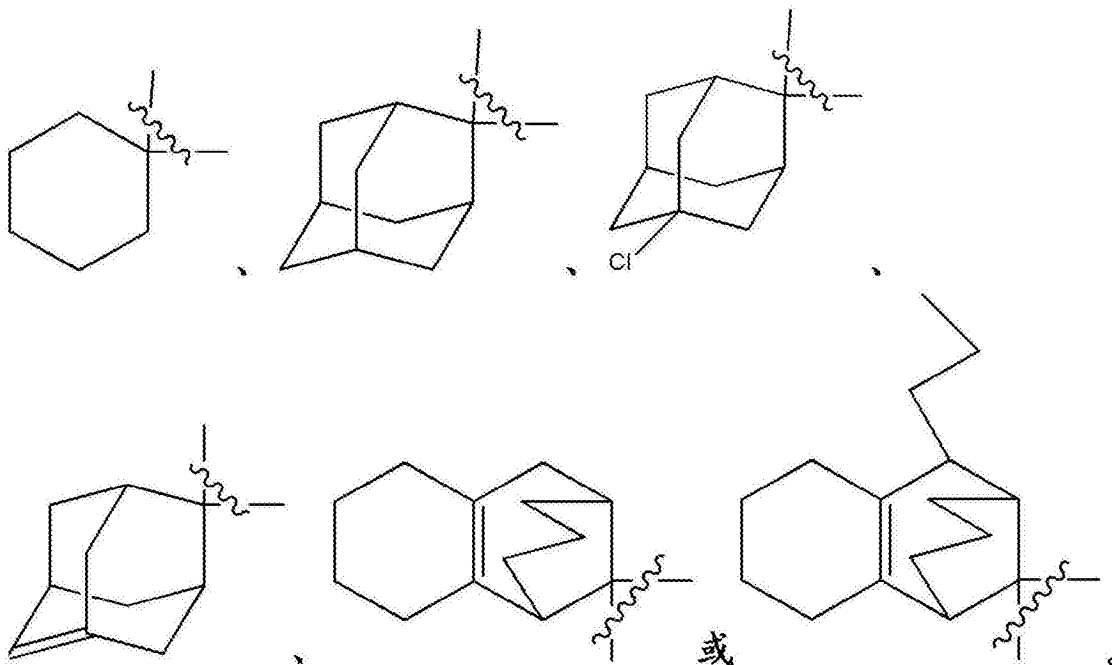
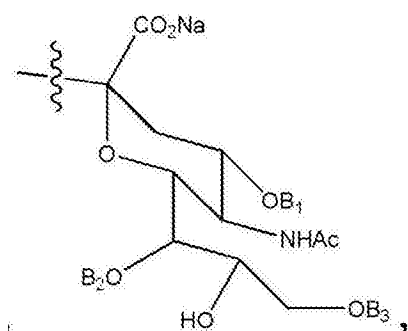
[0161] 在某些实施方案中，A或B中的至少一个可以是

[0162]

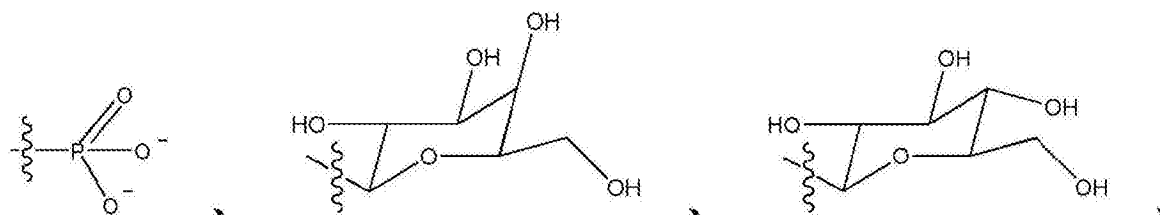


[0163] 在某些实施方案中,A和B一起可以是

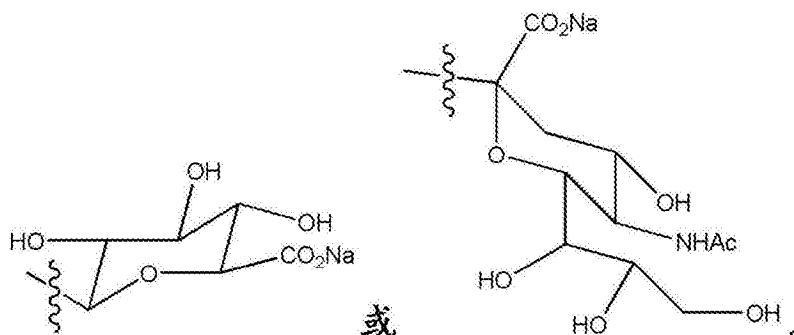
[0164]

[0165] 在某些实施方案中, $R_1$ 可以是包含1-5个碳原子的直链烷基,其可以任选地被一个或多个卤素原子取代。[0166] 在某些实施方案中, $R_1$ 可以是包含1-2个碳原子的直链烷基或包含1-2个碳原子的直链三氟烷基。在这些实施方案中的某些中, $R_1$ 可以是甲基或1,1,1-三氟乙基。[0167] 在某些实施方案中, $OR_2$ 可以是磷酸酯、乙酸酯、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酯、腺苷三磷酸、腺苷二磷酸、腺苷单磷酸、腺苷、 $\alpha$ -D-半乳糖苷、 $\beta$ -D-半乳糖苷、 $\alpha$ -D-葡萄糖苷、 $\beta$ -D-葡萄糖苷、 $\alpha$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -呋喃果糖苷、 $\beta$ -D-葡萄糖苷酸或其中, $B_1$ 、 $B_2$ 和 $B_3$ 各自独立地是H、包含1-4个碳原子的直链烷基、或包含3-6个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中, $R_2$ 可以是

[0168]



[0169]



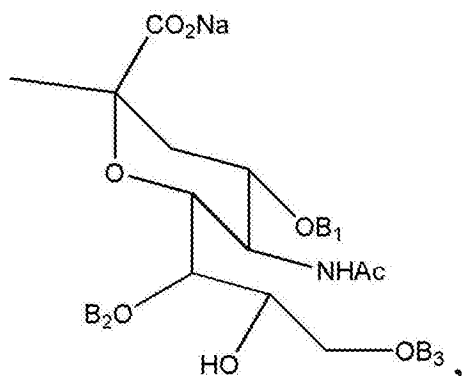
[0170] 在某些实施方案中,  $\text{R}_2$  可以是  $\text{E-L-Nuc-Z}$ , 其中  $\text{E}$  是包含亲电子原子的基团, 所述原子在  $\text{Z}$  基团的酶切割以后被  $\text{Nuc}$  基团的电子对攻击, 并通过邻助作用释放出化合物阴离子;  $\text{L}$  是连接基团;  $\text{Nuc}$  是亲核原子; 且  $\text{Z}$  是可酶促切割的基团; 其中

[0171]  $\text{E}$  是羧基、羰基、被离去基团取代的亚甲基、磷酸盐、碳酸盐、黄原酸盐、亚硫酸盐、磺酸盐、亚硫酸氢盐或二硫化物;

[0172]  $\text{L}$  选自: 含有 1-4 个碳原子的亚甲基或聚亚甲基、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CH}_2)_m-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-$  或  $-(\text{CH}_2)_m-\text{NR}_6-(\text{CH}_2)_n-$ , 其中  $m$  和  $n$  是 0-3, 且  $m+n$  是 2 或 3, 其中  $\text{R}_6$  是含有 1-10 个碳原子的烷基, 且所述连接基团可以被下述基团取代: 含有 1-24 个碳原子的烷基, 含有 2-24 个碳原子的烯基, 被含有 1-24 个碳原子的酰氧基单或二取代且含有 1-24 个碳原子的烷基, 被含有 1-24 个碳原子的酰氧基单或二取代且含有 2-24 个碳原子的烯基, 含有 6-10 个碳的芳基, 被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有 1-4 个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有 1-24 个碳原子的烷基, 或被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有 1-4 个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有 2-24 个碳原子的烯基;

[0173]  $\text{Nuc}$  是氧原子或硫原子; 且

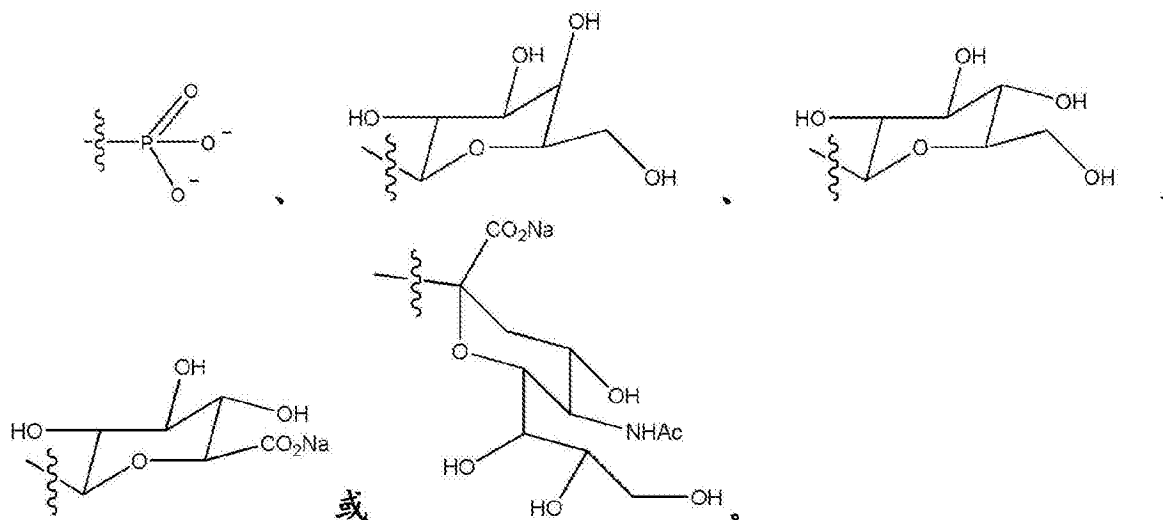
[0174]  $\text{Z}$  是磷酸基、乙酰基、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酰基、腺苷三磷酸基、腺苷二磷酸基、腺苷单磷酸基、腺苷基、 $\alpha$ -D-半乳糖基、 $\beta$ -D-半乳糖基、 $\alpha$ -D-葡萄糖基、 $\beta$ -D-葡萄糖基、 $\alpha$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -呋喃果糖基、 $\beta$ -D-glucosiduransyl 或



其中, B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>和B<sub>3</sub>各自独立地是H或包含1-4个碳原子的直

链烷基(支链或直链)、或包含3-6个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中,Z可以是

[0175]



[0176] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-20个碳原子的直链烷基、包含3-20个碳原子的支链烷基、包含1-20个碳原子的直链烷氧基、或包含3-20个碳原子的支链烷氧基。

[0177] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-20个碳原子的直链烷基或包含1-20个碳原子的直链烷氧基。

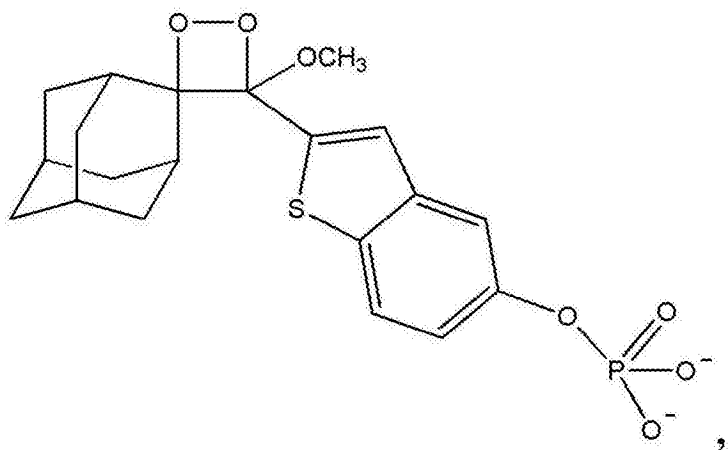
[0178] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-5个碳原子的直链烷基或包含1-5个碳原子的直链烷氧基。

[0179] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以选自:甲基、乙基、丙基、丁基、甲氧基、乙氧基、丙氧基和丁氧基。

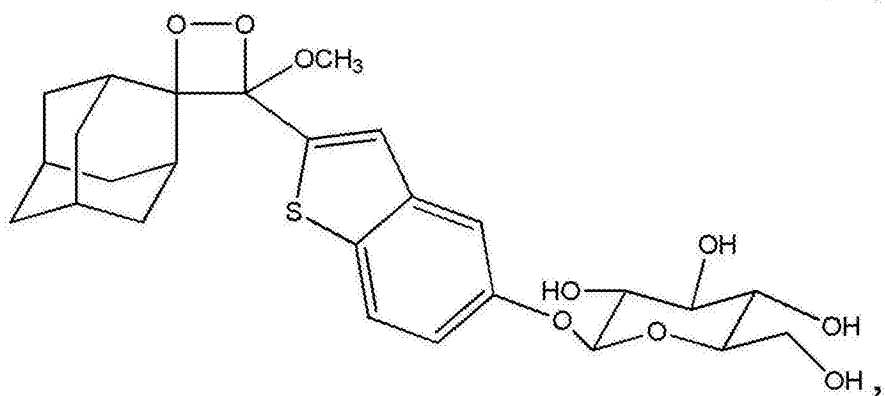
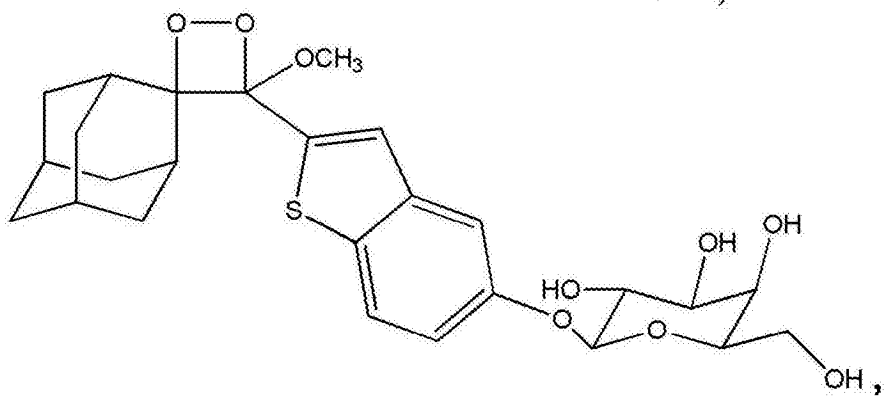
[0180] 在某些实施方案中,可被酶部分切割的键的切割会导致在25℃的光的产生,所述光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

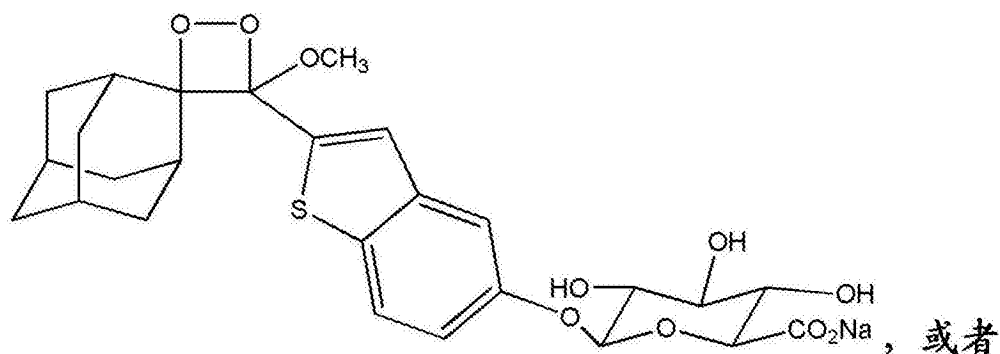
[0181] 在某些实施方案中,可被酶部分切割的键的切割会导致在37℃的光的产生,所述光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在某些实施方案中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0182] 在某些实施方案中,所述化合物可以是

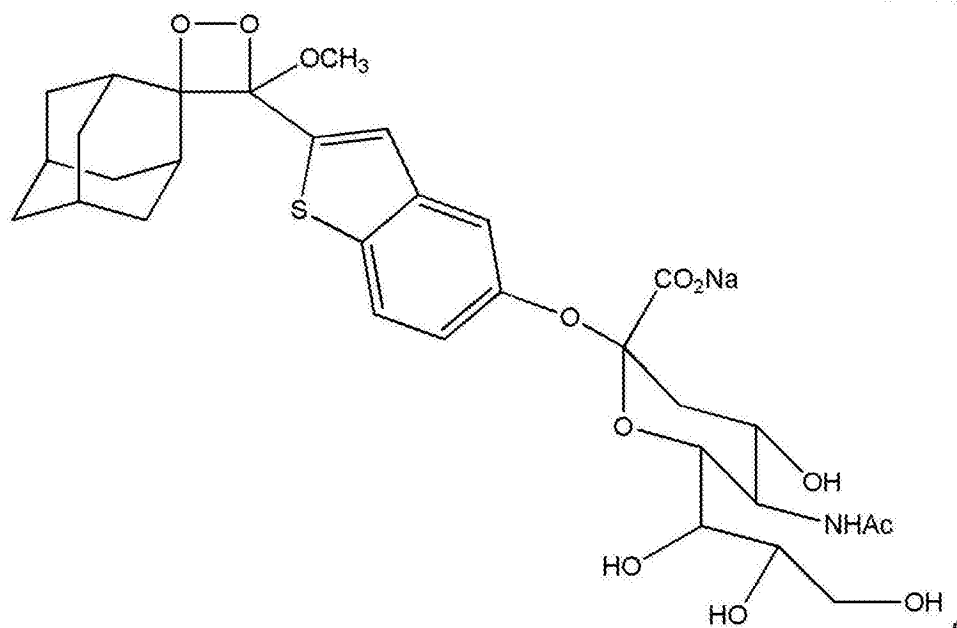


[0183]

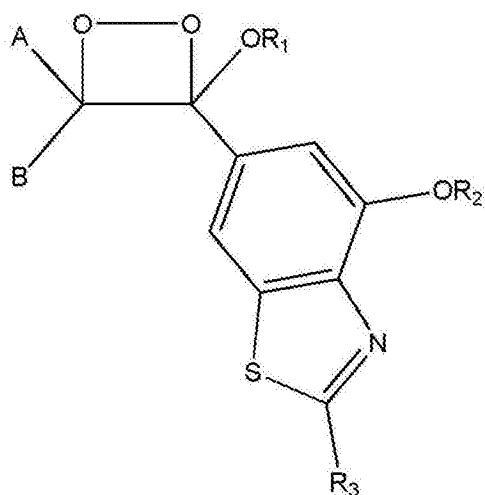




[0184]



[0185] 在另一个方面,本发明提供了一种具有下式结构的化合物:



[0186]

[0187] 其中,

[0188] A和B独立地选自:包含1-20个碳原子的直链烷基、包含2-20个碳原子的直链烯基、包含3-20个碳原子的支链烷基、包含3-20个碳原子的支链烯基、包含3-20个碳原子的环烷基、包含3-20个碳原子的环烯基、包含3-20个碳原子的环杂烷基、包含3-20个碳原子的环杂烯基、包含4-60个碳原子的聚环烷基、包含4-60个碳原子的聚环烯基、包含4-60个碳原子的聚环杂烷基和包含4-60个碳原子的聚环杂烯基,它们中的任一个可以是未被取代的或者

被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代,且其中A和B一起形成所述环烷基、环烯基、聚环烷基或聚环烯基,形成的基团可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代;

[0189]  $R_1$ 是可以任选地被一个或多个卤素原子取代的包含1-20个碳原子的直链烷基或可以任选地被一个或多个卤素原子取代的包含3-20个碳原子的支链烷基;

[0190]  $R_2$ 是酶可切割的基团,其包含可被酶部分切割以产生氧阴离子的键;和

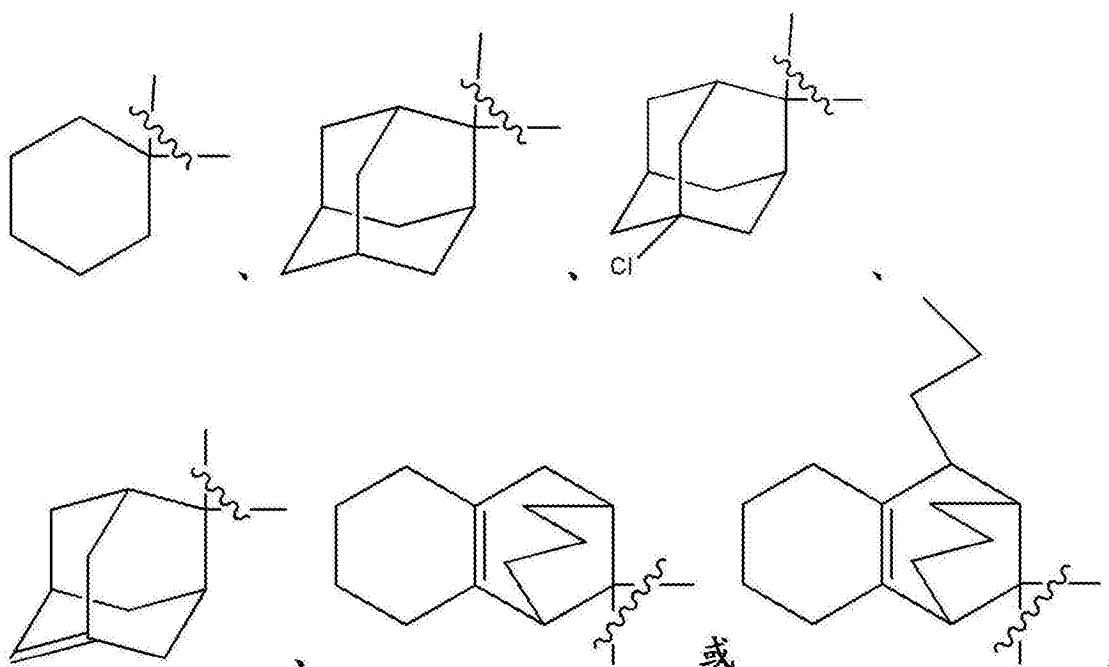
[0191]  $R_3$ 是氢或供电子基团。

[0192] 在某些实施方案中,A或B中的至少一个可以是



[0194] 在某些实施方案中,A和B一起可以是

[0195]

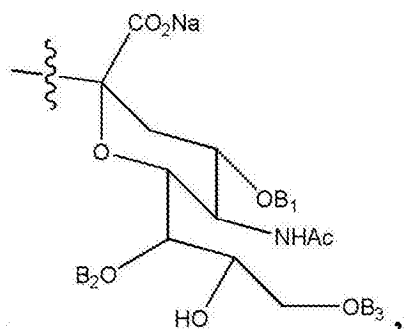


[0196] 在某些实施方案中, $R_1$ 可以是包含1-5个碳原子的直链烷基,其可以任选地被一个或多个卤素原子取代。

[0197] 在某些实施方案中, $R_1$ 可以是包含1-2个碳原子的直链烷基或包含1-2个碳原子的直链三氟烷基。在这些实施方案中的某些中, $R_1$ 可以是甲基或1,1,1-三氟乙基。

[0198] 在某些实施方案中, $OR_2$ 可以是磷酸酯、乙酸酯、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酯、腺苷三磷酸、腺苷二磷酸、腺苷单磷酸、腺苷、 $\alpha$ -D-半乳糖苷、 $\beta$ -D-半乳糖苷、 $\alpha$ -D-葡萄糖苷、 $\beta$ -D-葡萄糖苷、 $\alpha$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -D-甘露糖苷、 $\beta$ -呋喃果糖苷、 $\beta$ -D-葡糖苷酸或

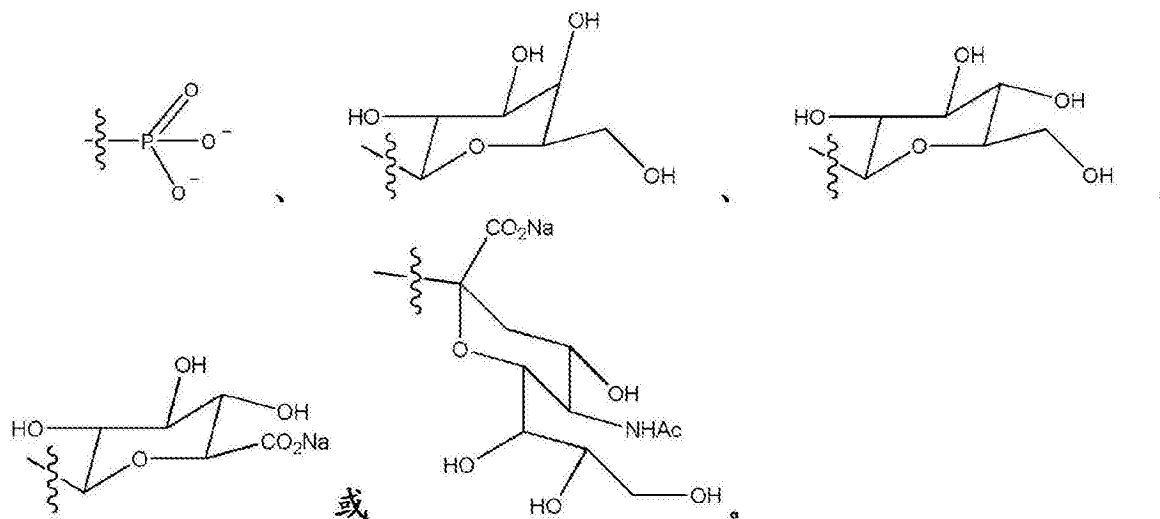




其中,  $B_1$ 、 $B_2$ 和 $B_3$ 各自独立地是H、包含1-4个碳原子的直链烷基、

基、或包含3-6个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中,  $R_2$ 可以是

[0199]



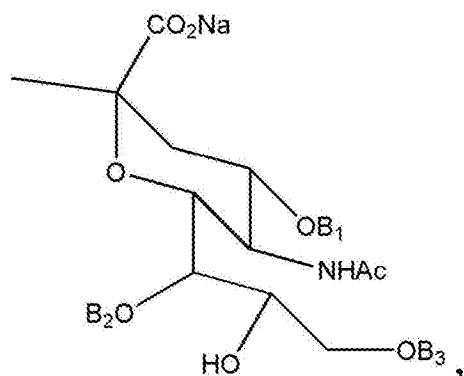
[0200] 在某些实施方案中,  $R_2$ 可以是E-L-Nuc-Z, 其中E是包含亲电子原子的基团, 所述原子在Z基团的酶切割以后被Nuc基团的电子对攻击, 并通过邻助作用释放出化合物阴离子; L是连接基团; Nuc是亲核原子; 且Z是可酶促切割的基团; 其中

[0201] E是羧基、羰基、被离去基团取代的亚甲基、磷酸盐、碳酸盐、黄原酸盐、亚硫酸盐、磺酸盐、亚硫酸氢盐或二硫化物;

[0202] L选自: 含有1-4个碳原子的亚甲基或聚亚甲基、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n$ 或 $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n$ , 其中m和n是0-3, 且m+n是2或3, 其中 $R_6$ 是含有1-10个碳原子的烷基, 且所述连接基团可以被下述基团取代: 含有1-24个碳原子的烷基, 含有2-24个碳原子的烯基, 被含有1-24个碳原子的酰氧基单或二取代且含有1-24个碳原子的烷基, 被含有1-24个碳原子的酰氧基单或二取代且含有2-24个碳原子的烯基, 含有6-10个碳的芳基, 被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有1-4个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有1-24个碳原子的烷基, 或被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有1-4个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有2-24个碳原子的烯基;

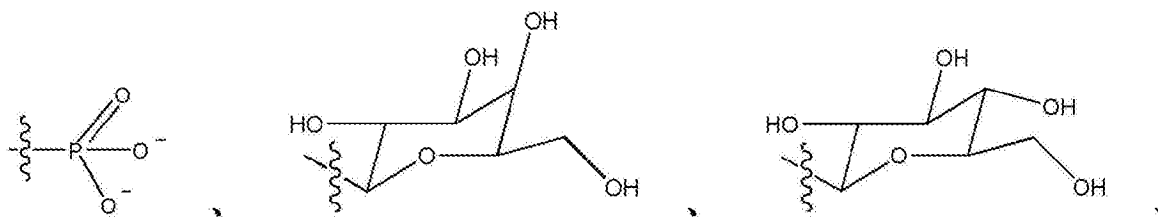
[0203] Nuc是氧原子或硫原子; 且

[0204] Z是磷酸基、乙酰基、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酰基、腺苷三磷酸基、腺苷二磷酸基、腺苷单磷酸基、腺苷基、 $\alpha$ -D-半乳糖基、 $\beta$ -D-半乳糖基、 $\alpha$ -D-葡萄糖基、 $\beta$ -D-葡萄糖基、 $\alpha$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -呋喃果糖基、 $\beta$ -D-glucosiduransyl或

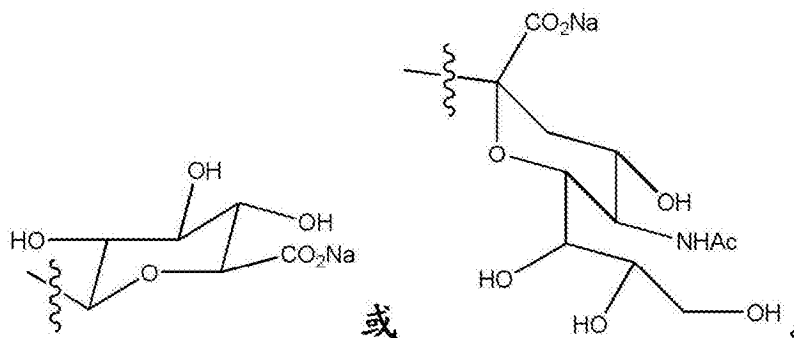


其中, B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>和B<sub>3</sub>各自独立地是H、包含1-4个碳原子的直链

烷基、或包含3-6个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中,Z可以是  
[0205]



[0206]



[0207] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-20个碳原子的直链烷基、包含3-20个碳原子的支链烷基、包含1-20个碳原子的直链烷氧基、或包含3-20个碳原子的支链烷氧基。

[0208] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以是包含1-20个碳原子的直链烷基或包含1-20个碳原子的直链烷氧基。

[0209] 在某些实施方案中,所述供电子基团是包含1-5个碳原子的直链烷基或包含1-5个碳原子的直链烷氧基。

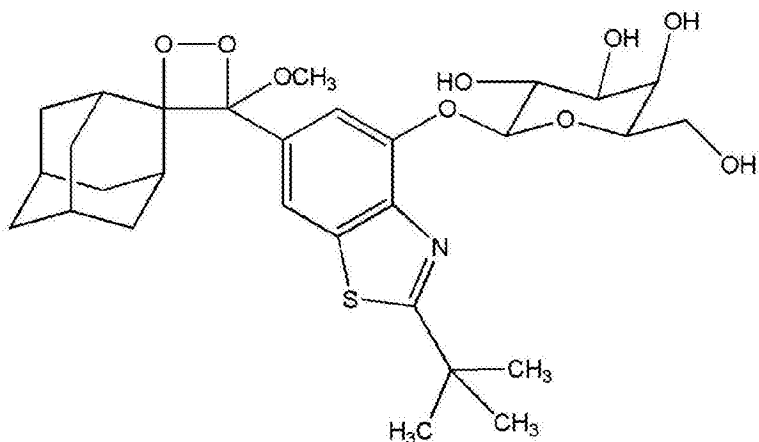
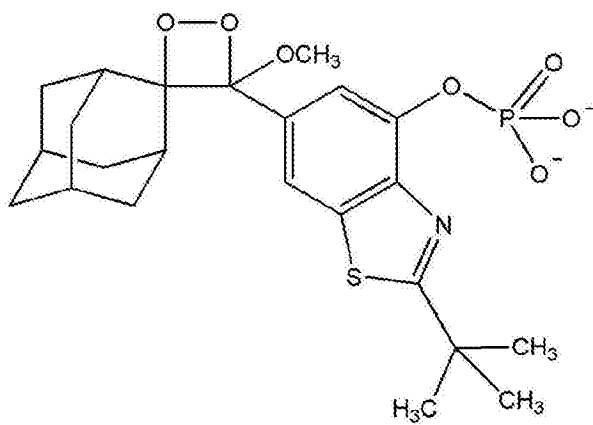
[0210] 在某些实施方案中,所述供电子基团可以选自:甲基、乙基、丙基、丁基、甲氧基、乙氧基、丙氧基和丁氧基。

[0211] 在某些实施方案中,可被酶部分切割的键的切割会导致在25℃的光的产生,所述光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

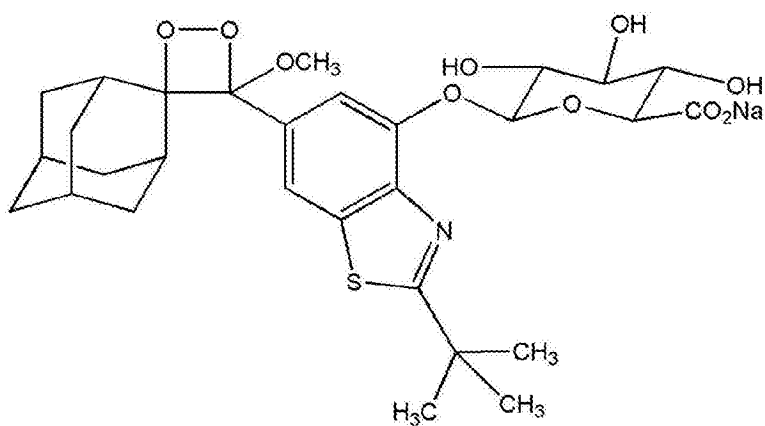
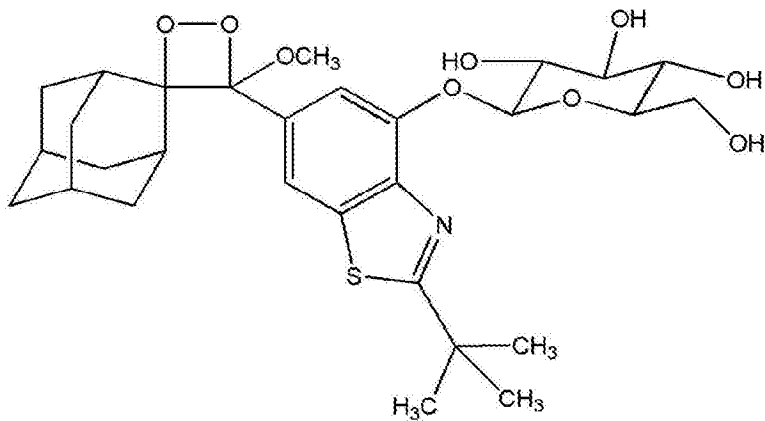
[0212] 在某些实施方案中,可被酶部分切割的键的切割会导致在37℃的光的产生,所述光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;且在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分

钟内达到最大值。

[0213] 在某些实施方案中,所述化合物可以是

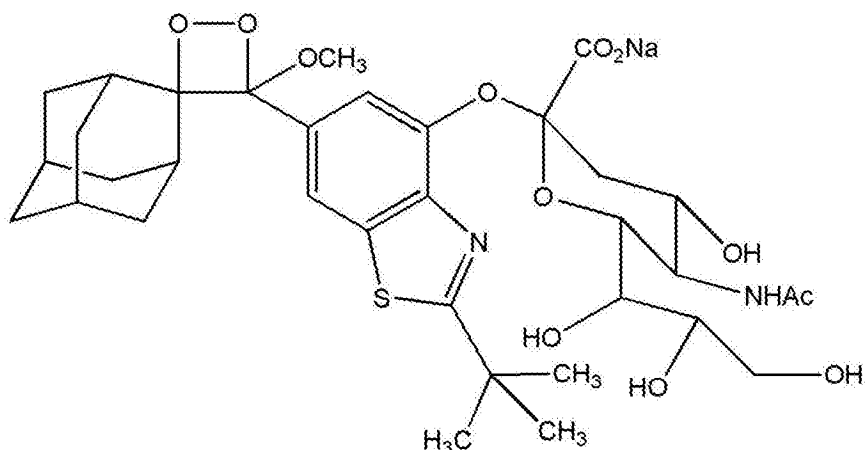


[0214]



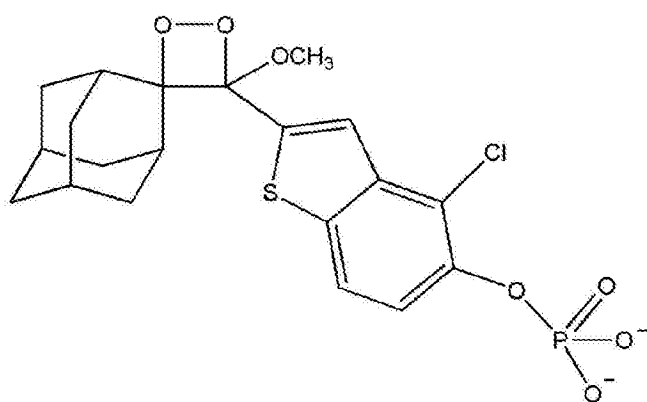
, 或者

[0215]

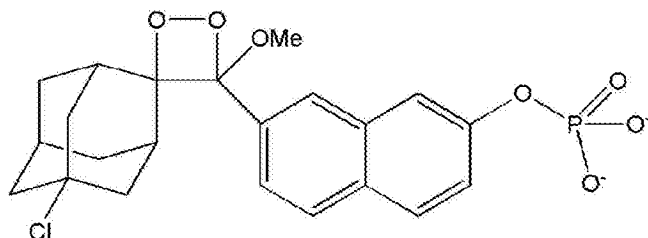


[0216] 在另一个方面,本发明提供了一种具有下式结构的化合物

[0217]

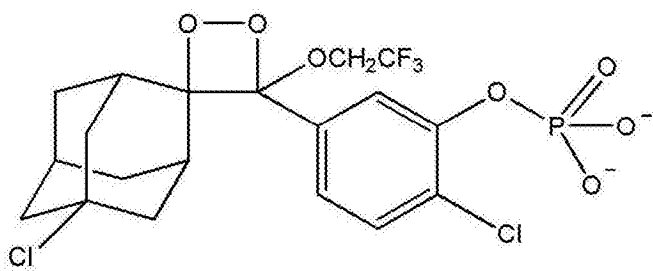


或



[0218] 在另一个方面,本发明提供了一种用于产生光的方法,所述方法包括下述步骤:提供具有下式结构的化合物

[0219]



提供酶复合物,其包含能够切割

;

所述化合物的酶部分;使所述酶复合物与所述化合物接触,以形成反应混合物;和,允许所述反应混合物产生光;前提条件是,当所述酶复合物构成固相、抗原固定至所述固相上、且所述抗原是蛋白时,那么所述固相 不是膜或微测定。

[0220] 在某些实施方案中,所述在25℃至37℃的光的产生可以在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在

其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0221] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是碱性磷酸酶。

[0222] 在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生会指示碱性磷酸酶的存在,且产生的光的量可以与所述样品中存在的碱性磷酸酶的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0223] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是碱性磷酸酶连接的抗体,其包含能够结合抗原的第一抗体。

[0224] 在这些实施方案中的某些中,所述第一抗体可以与所述碱性磷酸酶共价地或非共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述第一抗体可以与标记共价地连接,且所述碱性磷酸酶可以与能够非共价地结合所述标记的分子共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述标记可以是生物素或生物素衍生物,且所述分子可以是抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素;而在其它实施方案中,所述标记可以是半抗原,且所述分子可以是能够结合所述半抗原的抗体。

[0225] 在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:提供疑似包含所述抗原的样品;提供固相,其包含能够结合所述抗原的第二抗体;使所述样品和碱性磷酸酶连接的抗体与所述固相接触,以形成酶复合物;和,在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生会指示所述抗原的存在,且产生的光的量可以与所述样品中存在的抗原的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0226] 在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:从所述酶复合物除去任何未结合的碱性磷酸酶连接的抗体。

[0227] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是包含抗原的碱性磷酸酶连接的抗原。

[0228] 在这些实施方案中的某些中,所述抗原可以与所述碱性磷酸酶共价地或非共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述抗原可以与标记共价地连接,且所述碱性磷酸酶可以与能够非共价地结合所述标记的分子共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述标记可以是生物素或生物素衍生物,且所述分子可以是抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素;而在其它实施方案中,所述标记可以是半抗原,且所述分子可以是能够结合所述半抗原的抗体。

[0229] 在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:提供疑似包含所述抗原的样品;提供固相,其包含能够结合所述抗原的抗体;使所述样品和碱性磷酸酶连接的抗原与所述固相接触,以形成酶复合物;和,在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生会指示所述抗原的存在,且产生的光的量可以与所述样品中存在的抗原的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0230] 在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:从所述酶复合物除去任何未结合的碱性磷酸酶连接的抗原。

[0231] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是碱性磷酸酶连接的寡核苷酸,其包含能够与核酸杂交的寡核苷酸。

[0232] 在这些实施方案中的某些中,所述寡核苷酸可以与所述碱性磷酸酶共价地或非共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述寡核苷酸可以与标记共价地连接,且所述碱性磷酸酶可以与能够非共价地结合所述标记的分子共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述标记可以是生物素或生物素衍生物,且所述分子可以是抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素,而在其它实施方案中,所述标记可以是半抗原,且所述分子可以是能够结合所述半抗原的抗体。

[0233] 在这些实施方案中的某些中,可以进一步包含下述步骤:提供疑似包含核酸的样品;将所述核酸固定化至固相;使所述固定化的核酸和所述碱性磷酸酶连接的寡核苷酸接触,以形成酶复合物;和,在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生指示所述核酸的存在,且产生的光的量可以与样品中存在的核酸的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值;而在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

[0234] 在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:从所述酶复合物除去任何未结合的酶连接的寡核苷酸。

[0235] 在某些实施方案中,所述反应混合物可以进一步包含促进剂。

[0236] 在这些实施方案中的某些中,所述促进剂可以包含聚合的季铵盐、聚合的季磷盐或它们的组合。在这些实施方案中的某些中,所述聚合的季铵盐可以是聚(乙烯基苄基三甲基氯化铵)、聚[乙烯基苄基(苄基二甲基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三丁基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三戊基氯化铵)]或它们的组合;而在其它实施方案中,所述聚合的季磷盐是聚(乙烯基苄基三甲基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)、包含聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)和聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)的共聚物或它们的组合。

[0237] 在这些实施方案中的某些中,所述促进剂可以进一步包含受体染料。在这些实施方案中的某些中,所述受体染料可以是荧光素、罗丹明、磺酰罗丹明、ALEXA FLUOR350、ALEXA FLUOR405、ALEXA FLUOR430、ALEXA FLUOR488、ALEXA FLUOR532、ALEXA FLUOR546或ALEXA FLUOR555。

## 附图说明

[0238] 图1显示了4-Me-3-OBn-苯甲醛的两步合成。

[0239] 图2显示了4-Me-Phe磷酸酯的两步一锅合成。

[0240] 图3显示了4-Me-Phe烯醇醚的两步合成:Horner Emmons偶联和随后的脱苄基。

[0241] 图4显示了从4-Me-Phe烯醇醚开始,4-Me-Phe二氧杂环丁烷的两步合成。

[0242] 图5显示了本发明的闪光底物(底物A、底物B和底物C)的结构以及商购可得的CSPD<sup>®</sup>和CDP-Star<sup>®</sup>(二者得自Life Technologies, San Diego, California)的结构。

- [0243] 图6显示了在25℃进行的底物A和B、CSPD和CDP-Star的动力学评价的结果。
- [0244] 图7显示了在25℃进行的纯化的碱性磷酸酶灵敏度曲线。灵敏度被定义为,当信噪比为2时碱性磷酸酶(AP)的浓度。
- [0245] 图8显示了在25℃进行的、在IL-6免疫测定中对底物A、CSPD和CDP-Star的动力学评价。
- [0246] 图9显示了CDP-Star/Sapphire-II和底物A在不同时间点在25℃的信噪比。
- [0247] 图10显示了在37℃进行的、在IL-6免疫测定中对底物A、B和C的动力学评价。
- [0248] 图11显示了底物A、B、C和竞争对手的底物在37℃在免疫测定系统中的信号相对于信噪比动力学的对比。
- [0249] 图12显示了在IL-6免疫测定系统中的灵敏度的对比。
- [0250] 图13显示了底物A的贮存期限稳定性研究的结果。
- [0251] 图14显示了底物A、B和C、CDP-Star/Emerald-II、竞争对手的闪光底物D和竞争对手的辉光底物E、与抗生蛋白链菌素标记的Dynabeads M-280Tosylactivated(与生物素标记的碱性磷酸酶结合)的动力学评价的结果。
- [0252] 图15显示了在最适读出时间和在室温,抗生蛋白链菌素标记的 Dynabeads M-280Tosylactivated(与可变量的生物素标记的碱性磷酸酶结合)的灵敏度曲线。
- [0253] 图16显示了在最适读出时间,在室温,抗生蛋白链菌素标记的Dynabeads M-280Tosylactivated(与可变量的生物素标记的碱性磷酸酶结合)的灵敏度曲线,其中在2分钟读出信号。
- [0254] 图17显示了使用Dynabeads MyOne Carboxylic Acid和底物A/Emerald-III、底物B和CDP-Star/Emerald II,在37℃测得的发光动力学相对于信噪比。
- [0255] 图18显示了使用底物A/Emerald-III、底物B和CDP-Star/Emerald-II,在37℃在与抗-cTnI偶联的Dynabeads MyOne Carboxylic Acid珠子上进行的人心脏肌钙蛋白(cTnI)免疫测定中的性能。
- [0256] 图19显示了使用底物A,在37℃基于Dynabeads MyOne Carboxylic Acid、Dynabeads M-280、Dynabeads M-270珠子的cTnI免疫测定测得的cTnI灵敏度曲线。
- [0257] 图20显示了使用底物A、B和C、CDP-Star/Emerald-II和Vendor X的底物D,在它们各自的读出时间,基于Dynabeads M-270Epoxy珠子的cTnI免疫测定的性能。

## 具体实施方式

[0258] 在详细描述本发明之前,应当理解,本发明不限于本文公开的实施方案。此外,当以“包含”(解释为是指,“包括、但不限于”)各个步骤或组分的方式描述方法和试剂盒时,所述方法和试剂盒还可以“基本上由各个步骤和组分组成”或“由各个步骤和组分组成”,这样的术语应当解释为,限定基本上封闭成员的集合。最后,应当指出,如在本说明书中和所附权利要求书中使用的,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指明。

[0259] 定义:

[0260] 受体染料表示这样的分子:其可以接受来自其它光发射分子的能量、特别是光,并转而发射可检测的能量,也优选地是光。

[0261] 分析物表示,在分析操作中测定的物质或化学组分。本文使用的该术语包括、但不限于抗原或抗体。

[0262] 抗原表示抗体可以结合的物质。

[0263] 抗体表示这样的 $\gamma$ 球蛋白蛋白质:其存在于脊椎动物的血液或其它体液中,且被免疫系统用于识别和中和外来物。本文使用的该术语包括、但不限于:可以结合抗原的然后多克隆的、单克隆的、重组的抗体或其片段。

[0264] 促进剂表示这样的水溶性物质:其增加由1,2-二氧杂环丁烷酶底物的酶切割和它的随后分解导致的特定光能生成,其中观察到的该光生成高于在没有所述促进剂存在下观察到的生成。

[0265] 酶表示催化化学反应的蛋白质。

[0266] 半抗原表示,只有与大载体(诸如蛋白)连接时才可以引起免疫应答的小分子。

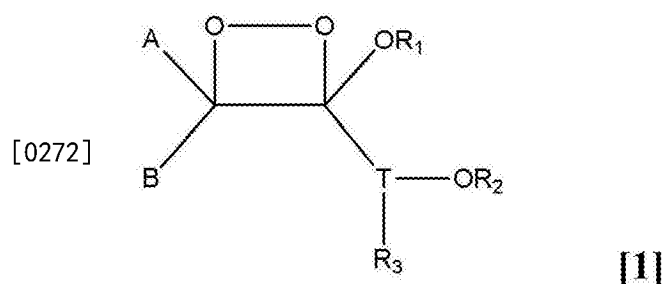
[0267] 水解酶(Hydrolytic enzyme或hydrolase)表示这样的酶:其催化化学键的水解,且在酶的EC编号分类中可以归类为EC3。

[0268] 核酸表示单链或双链DNA、RNA或其片段。

[0269] 寡核苷酸表示短核酸聚合物。本文使用的该术语包括、但不限于含有2-1000个核酸的核酸聚合物。

[0270] 本发明提供了属于1,2-二氧杂环丁烷类的化合物。本发明也提供了使用一种或多种本发明的化合物的方法。提供的方法用于产生光。所述光的产生可以用于确定样品中一种或多种分析物的存在和/或量,所述分析物包括酶、抗原或核酸。本发明也提供了用于检测样品中一种或多种分析物的存在和/或量的试剂盒。在另一个方面,本发明提供了用于产生光的试剂盒。所述试剂盒包括一种或多种本发明的化合物。这些化合物、方法和试剂盒可以用于本领域公知的测定中。

[0271] 在一个方面,本发明提供了可以是1,2-二氧杂环丁烷类的化合物。这些包括、但不限于具有结构[1]至[4]的那些,它们各自的取代基如下所述,

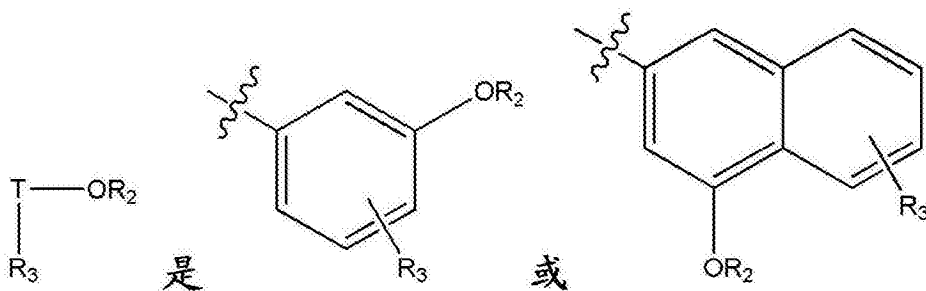


[0273] 其中,

[0274] A和B可以独立地选自:直链烷基、直链烯基、支链烷基、支链烯基、环烷基、环烯基、环杂烷基、环杂烯基、聚环烷基、聚环烯基、聚环杂烷基和聚环杂烯基,它们中的任一个可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代,且其中A和B一起形成所述环烷基、环烯基、环杂烷基、环杂烯基、聚环烯基、聚环杂烷基和聚环杂烯基,形成的基团可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代,或者A和B一起形成被卤素取代的聚环烷基;



[0275]



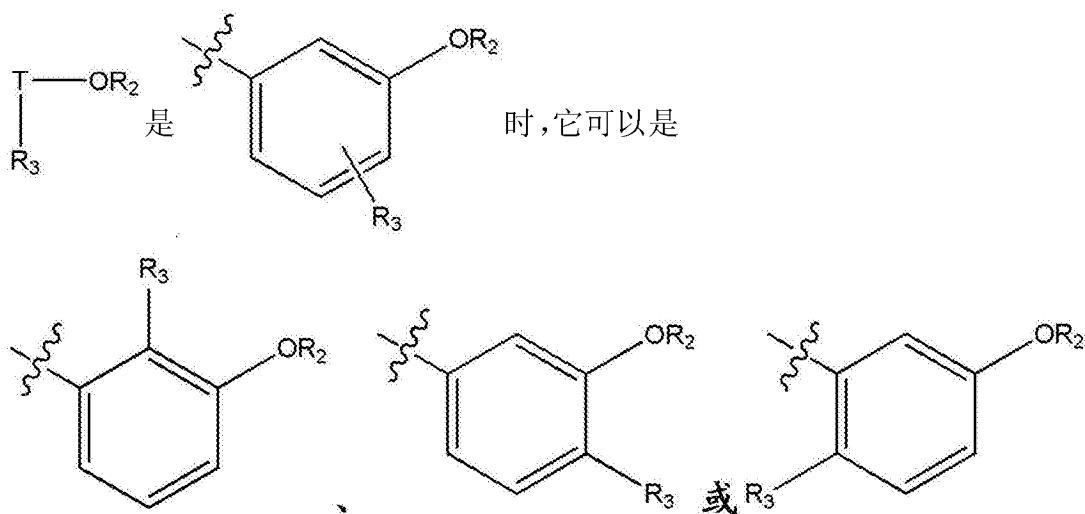
[0276]  $R_1$  可以是任意地被一个或多个卤素原子取代的包含1-20个碳原子的直链烷基或任意地被一个或多个卤素原子取代的包含3-20个碳原子的支链烷基;

[0277]  $R_2$  可以是酶可切割的基团,其包含可被酶部分切割以在T上产生氧阴离子的键;且

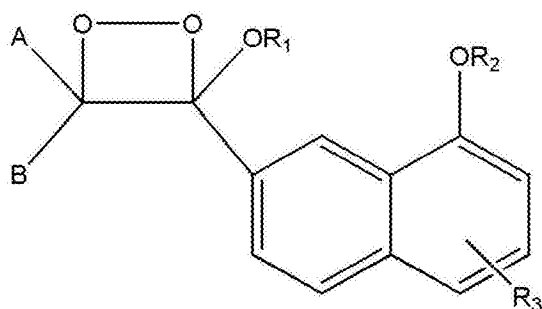
[0278]  $R_3$  可以是氢或供电子基团;前提条件是,当 $R_1$ 未被取代时, $R_3$ 是供电子基团;

[0279] 其中,当

[0280]



[0281]



[2]

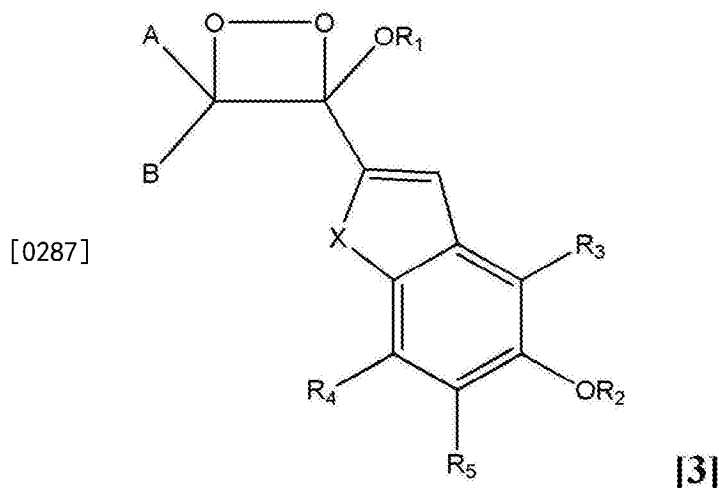
[0282] 其中,

[0283] A和B可以独立地选自:直链烷基、直链烯基、支链烷基、支链烯基、环烷基、环烯基、环杂烷基、环杂烯基、聚环烷基、聚环烯基、聚环杂烷基和聚环杂烯基,它们中的任一个可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代,且其中A和B一起形成所述环烷基、环烯基、聚环烷基或聚环烯基,形成的基团可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代;

[0284]  $R_1$  可以是任意地被一个或多个卤素原子取代的包含1-20个碳原子的直链烷基或任意地被一个或多个卤素原子取代的包含3-20个碳原子的支链烷基;

[0285]  $R_2$ 可以是酶可切割的基团,其包含可被酶部分切割以产生氧阴离子的键;和

[0286]  $R_3$ 可以是氢或供电子基团。



[0288] 其中,

[0289] A和B可以独立地选自:直链烷基、直链烯基、支链烷基、支链烯基、环烷基、环烯基、环杂烷基、环杂烯基、聚环烷基、聚环烯基、聚环杂烷基和聚环杂烯基,它们中的任一个可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代,且其中A和B一起形成所述环烷基、环烯基、聚环烷基或聚环烯基,形成的基团可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代;

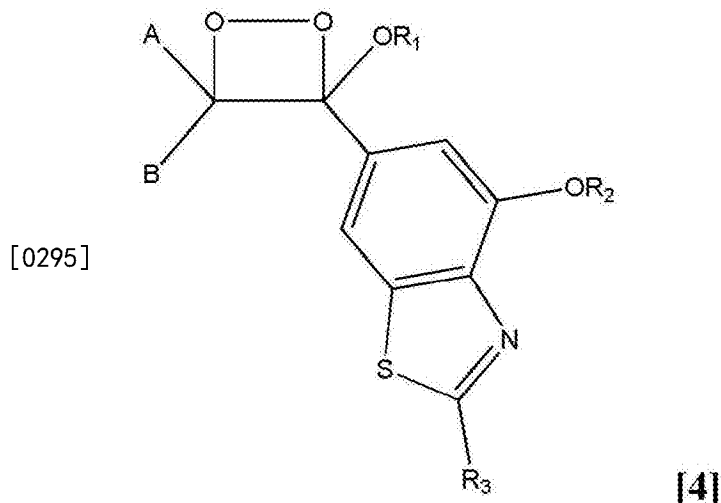
[0290]  $R_1$ 可以是任选地被一个或多个卤素原子取代的包含1-20个碳原子的直链烷基或可以任选地被一个或多个卤素原子取代的包含3-20个碳原子的支链烷基;

[0291]  $R_2$ 可以是酶可切割的基团,其包含可被酶部分切割以产生氧阴离子的键;

[0292]  $R_3$ 可以是氢或供电子基团;

[0293]  $R_4$ 和 $R_5$ 可以独立地选自:H、F、Cl、Br、I、氰基、硝基、磺酸酯、硫酸酯、三氟甲基、三氟乙基、含有1-20个碳原子的直链烷基、含有3-20个碳原子的支链烷基、含有2-20个碳原子的直链烯基、含有3-20个碳原子的支链烯基、含有3-20个碳原子的环烷基、含有3-20个碳原子的环烯基、含有3-20个碳原子的环杂烷基、含有3-20个碳原子的环杂烯基、含有4-60个碳原子的聚环烷基、含有4-60个碳原子的聚环烯基、含有4-60个碳原子的聚环杂烷基、含有4-60个碳原子的聚环杂烯基、含有1-20个碳原子的烷氧基、含有6-14个碳原子的芳基、含有6-14个碳原子的芳氧基、含有2-21个碳原子的酯、含有3-30个碳原子的三烷基铵、含有3-30个碳原子的三烷基磷、含有2-21个碳原子的烷基酰氨基、含有7-15个碳原子的芳基酰氨基、含有2-21个碳原子的烷基氨基甲酰基、含有7-15个碳原子的芳基氨基甲酰基、含有1-20个碳原子的烷基亚磺酰氨基、含有6-14个碳原子的芳基亚磺酰氨基、含有3-60个碳原子的三烷基甲硅烷基、含有18-42个碳原子的三芳基甲硅烷基、含有7-32个碳原子的烷基芳基甲硅烷基、含有1-20个碳原子的烷基酰氨基磺酰基、含有6-14个碳原子的芳基酰氨基磺酰基、含有1-20个碳原子的烷基磺酰基、含有6-14个碳原子的芳基磺酰基、含有2-20个碳原子的烷硫基和含有6-14个碳原子的芳硫基;和

[0294] X是硫原子、氧原子或氮原子。



[0296] 其中，

[0297] A和B可以独立地选自：直链烷基、直链烯基、支链烷基、支链烯基、环烷基、环烯基、环杂烷基、环杂烯基、聚环烷基、聚环烯基、聚环杂烷基和聚环杂烯基，它们中的任一个可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代，且其中A和B一起形成所述环烷基、环烯基、聚环烷基或聚环烯基，形成的基团可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代；

[0298] R<sub>1</sub>可以是任选地被一个或多个卤素原子取代的包含1-20个碳原子的直链烷基或可以任选地被一个或多个卤素原子取代的包含3-20个碳原子的支链烷基；

[0299] R<sub>2</sub>可以是酶可切割的基团，其包含可被酶部分切割以产生氧阴离子的键；和

[0300] R<sub>3</sub>可以是氢或供电子基团。

[0301] 在化合物[1]的某些实施方案中，A和B可以独立地选自：包含1-20个碳原子的直链烷基、包含2-20个碳原子的直链烯基、包含3-20个碳原子的支链烷基、包含3-20个碳原子的支链烯基、包含3-20个碳原子的环烷基、包含3-20个碳原子的环烯基、包含3-20个碳原子的环杂烷基、包含3-20个碳原子的环杂烯基、包含4-60个碳原子的聚环烷基、包含4-60个碳原子的聚环烯基、包含4-60个碳原子的聚环杂烷基和包含4-60个碳原子的聚环杂烯基，它们中的任一个可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代，且其中A和B一起形成所述环烷基、环烯基、环杂烷基、环杂烯基、聚环烯基、聚环杂烷基和聚环杂烯基，形成的基团可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代，或者A和B一起形成被卤素取代的聚环烷基。

[0302] 在化合物[2]至[4]的某些实施方案中，A和B可以独立地选自：包含1-20个碳原子的直链烷基、包含2-20个碳原子的直链烯基、包含3-20个碳原子的支链烷基、包含3-20个碳原子的支链烯基、包含3-20个碳原子的环烷基、包含3-20个碳原子的环烯基、包含3-20个碳原子的环杂烷基、包含3-20个碳原子的环杂烯基、包含4-60个碳原子的聚环烷基、包含4-60个碳原子的聚环烯基、包含4-60个碳原子的聚环杂烷基和包含4-60个碳原子的聚环杂烯基，它们中的任一个可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代，且其中A和B一起形成所述环烷基、环烯基、聚环烷基或聚环烯基，形成的基团可以是未被取代的或者被一个或多个电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代。

[0303] 电子活性基团的例子包括：F、Cl、Br、I、氰基、硝基、磺酸酯、硫酸酯、三氟甲基、三

氟乙基、含有1-20个碳原子的直链烷基、含有3-20个碳原子的支链烷基、含有2-20个碳原子的直链烯基、含有3-20个碳原子的支链烯基、含有3-20个碳原子的环烷基、含有3-20个碳原子的环烯基、含有3-20个碳原子的环杂烷基、含有3-20个碳原子的环杂烯基、含有4-60个碳原子的聚环烷基、含有4-60个碳原子的聚环烯基、含有4-60个碳原子的聚环杂烷基、含有4-60个碳原子的聚环杂烯基、含有1-20个碳原子的烷氧基、含有6-14个碳原子的芳基、含有6-14个碳原子的芳氧基、含有2-21个碳原子的酯、含有3-30个碳原子的三烷基铵、含有3-30个碳原子的三烷基磷、含有2-21个碳原子的烷基酰氨基、含有7-15个碳原子的芳基酰氨基、含有2-21个碳原子的烷基氨基甲酰基、含有7-15个碳原子的芳基氨基甲酰基、含有1-20个碳原子的烷基亚磺酰氨基、含有6-14个碳原子的芳基亚磺酰氨基、含有3-60个碳原子的三烷基甲硅烷基、含有18-42个碳原子的三芳基甲硅烷基、含有7-32个碳原子的烷基芳基甲硅烷基、含有1-20个碳原子的烷基酰氨基磺酰基、含有6-14个碳原子的芳基酰氨基磺酰基、含有1-20个碳原子的烷基磺酰基、含有6-14个碳原子的芳基磺酰基、含有2-20个碳原子的烷硫基和含有6-14个碳原子的芳硫基。

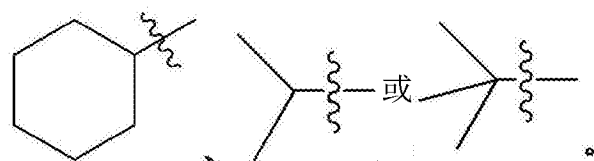
[0304] 电子活性基团包括供电子基团和吸电子基团。供电子基团的例子包括、但不限于：烷基、烷氧基、未被取代的和被取代的氨基等。吸电子基团包括、但不限于：卤素基团、氰基、硝基、羧基、酯基、羧酰胺基等。增溶基团包括、但不限于：羧基、磺酸盐、硫酸盐、三烷基铵基、三烷基磷基等。增溶基团包括、但不限于：羟基、羧基、磷酸盐、磺酸盐、硫酸盐、三烷基铵基、三烷基基磷等。

[0305] 增溶基团的例子包括：羧酸、丙二酸、羟基、硫酸盐、磺酸盐、磷酸盐和铵基团；聚(乙氧基)<sub>n</sub>基团 $[-(O-CH_2-CH_2-)_n]$ ，其中 $n=1-30$ ，以羧酸、丙二酸、羟基、硫酸盐、磺酸盐、磷酸盐和铵基团封端；聚 $[-O-(CH_2-)_n]$ ，其中 $n=1-30$ ，以羧酸、丙二酸、羟基、硫酸盐、磺酸盐、磷酸盐和铵基团封端。

[0306] 光增强基团的例子包括：阳离子的或聚阳离子的部分诸如烷基铵、烷基磷、烷基铈基团；烷基芳基铵、烷基芳基磷和烷基芳基铈基团；或芳基铵、芳基磷和芳基铈基团；和聚(烷基铵)、聚(烷基磷)、聚(烷基铈)基团；聚(烷基芳基铵)、聚(烷基芳基磷)和聚烷基芳基铈基团；或聚(芳基铵)、聚(芳基磷)和聚(芳基铈)基团。

[0307] 卤素基团包括氟、氯、溴和碘原子。

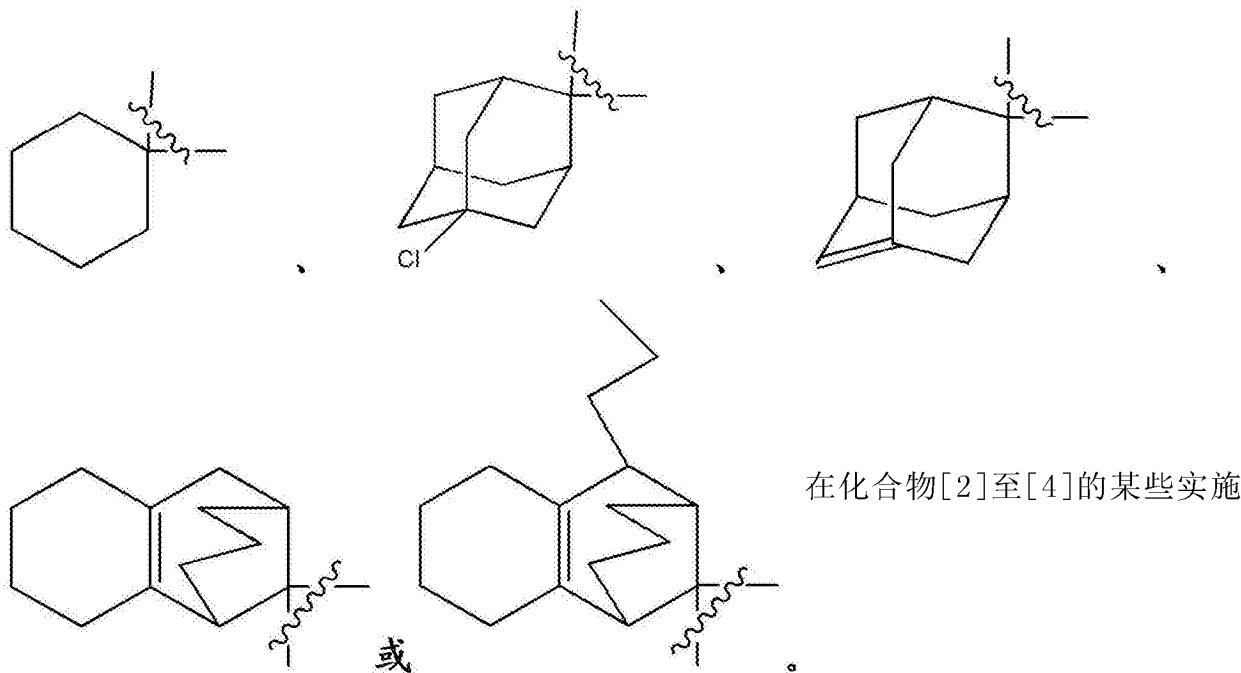
[0308] 在化合物[1]至[4]的某些实施方案中，A或B中的至少一个可以是



是

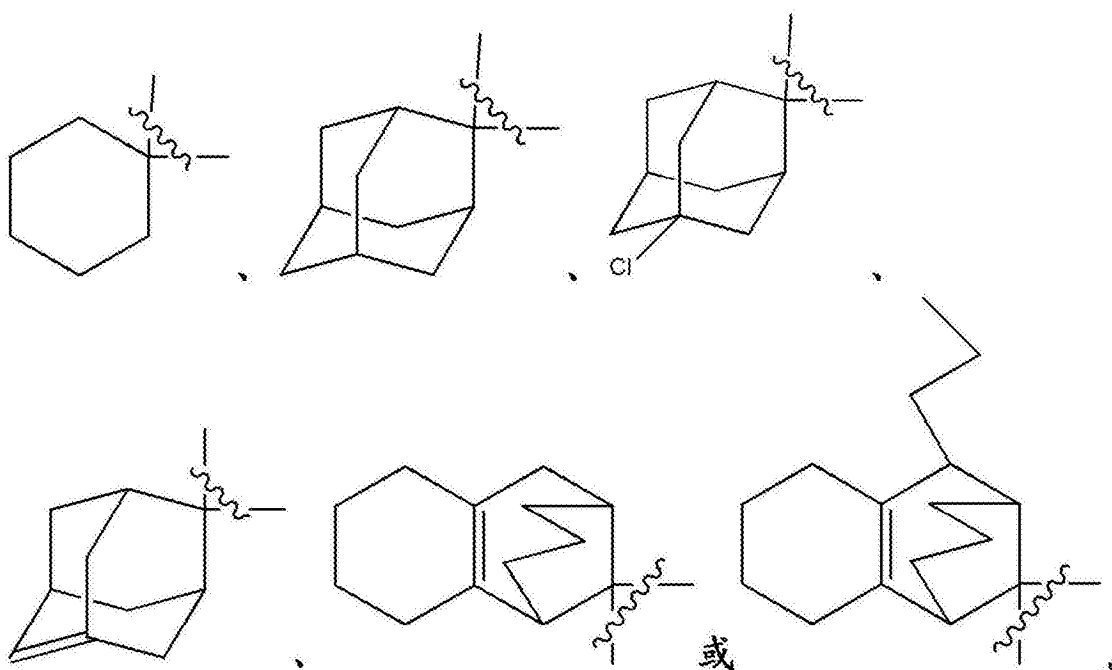
在化合物[1]的某些实施方案中，A和B一起可以

[0309]



方案中,A和B一起可以是

[0310]



[0311] 在化合物[1]至[4]的某些实施方案中, $R_1$ 可以是包含1-5个碳原子的直链烷基,其可以任选地被一个或多个卤素原子取代。在其它实施方案中, $R_1$ 可以是包含1-2个碳原子的直链烷基或包含1-2个碳原子的直链三氟烷基。在其它实施方案中, $R_1$ 可以是甲基或1,1,1-三氟乙基。

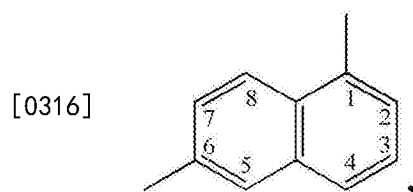
[0312] 在某些实施方案中,化合物[1]具有T,所述T可以是芳基或稠合多环化合物,所述化合物包括、但不限于能够发射光的杂芳基环。选择T,使得它不会干扰光的生成,且满足它所连接的二氧杂环丁烷环的4-碳原子的化合价。T代表许多形成光发射荧光团的荧光生色

团基团中的任一种,所述荧光生色团基团允许对应的二氧杂环丁烷分解片段以吸收能量并形成激发态,它们从所述激发态发射光学可检测的能量以恢复至它们的基态。T也被酶可切割的基团取代,所述基团含有这样的键:所述键可被酶切割,以直接地产生或通过随后调节pH而产生与二氧杂环丁烷环连接的富含电子的部分,例如,氧阴离子、硫阴离子或氮阴离子。

[0313] 在某些实施方案中,T可以是芳基,诸如苯基,其可以被电子活性基团、增溶基团或光增强基团取代。

[0314] 在某些实施方案中,T可以是含有稠合的多环的荧光团部分,其具有酶可切割的不稳定的环取代基,所述取代基含有这样的键:所述键当被酶切割时,提供富含电子的稠合多环部分,以进一步提供可分解以发射光的二氧杂环丁烷化合物。

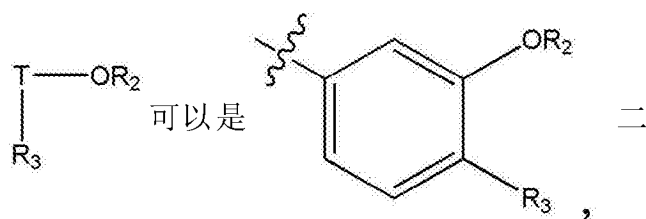
[0315] 在稠合多环化合物(其残基可以用于形成该荧光团部分)内包括,含有9至约30(包括端值)个环碳原子的稠合多环芳烃环荧光团化合物,诸如蔡:



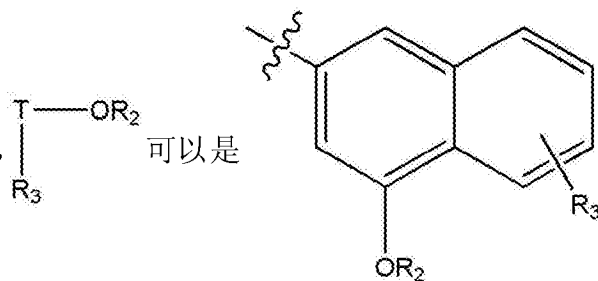
[0317] 并环戊二烯、环戊并环庚五烯、庚间三烯并庚间三烯、不对称引达省(asindacene)、对称引达省(s-indacene)、亚联苯、二萘嵌苯、茛、菲、蒽、醋菲烯、苯并茛、苯并菲、茛、蒽、萘并萘等,以及它们被一个或多个稳定取代基取代的衍生物,所述取代基诸如具有1-20(包括端值)个碳原子的支链或直链烷基,例如,甲基、正丁基或癸基,具有1-7(包括端值)个碳原子的支链或直链杂烷基,例如,甲氧基、羟乙基或羟基丙基;具有1或2个环的芳基,例如,苯基;具有1或2个环的杂芳基,例如,吡咯基或吡唑基;在环中具有3-7(包括端值)个碳原子的环烷基,例如,环己基;在环中具有3-6(包括端值)个碳原子的杂环烷基,例如,二噁烷;具有1或2个环的芳烷基,例如,苄基;具有1或2个环的烷芳基,例如,甲苯基;吸电子基团,诸如具有1-7(包括端值)个碳原子的全氟烷基,例如,三氟甲基;卤素;CO<sub>2</sub>H、Z'CO<sub>2</sub>H、SO<sub>3</sub>H、NO<sub>2</sub>、Z'NO<sub>2</sub>、CN或Z'CN,其中Z'是具有1-7(包括端值)个碳原子的支链或直链烷基,例如,甲基,或具有1或2个环的芳基,例如,苯基;供电子基团,例如,支链或直链C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷氧基,例如,甲氧基或乙氧基;具有1或2个环的芳烷氧基,例如,苯氧基;支链或直链C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷氧基,例如,甲氧基或乙氧基;具有1或2个环的芳烷氧基,例如,苯氧基;支链或直链C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>羟烷基,例如,羟甲基或羟乙基;具有1或2个环的羟基芳基,例如,羟苯基;支链或直链C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基酯基团,例如,乙酸酯;具有1或2个环的芳基酯基团,例如,苯甲酸酯;或具有1或2个环的杂芳基,例如,苯并噁唑、苯并噻唑、苯并咪唑或苯并三唑。

[0318] 此外,用T表示的荧光团部分的稠合多环部分还可以是稠合多环芳族杂环荧光团化合物的残基,所述化合物例如苯并[b]噁吩、萘并[2,3-b]噁吩、噻蒽、苯并呋喃、异苯并呋喃、色烯、咕吨、氧硫杂蒽、喹啉、异喹啉、菲啶、吩嗪、吩噻嗪、吩噻嗪、菲咯啉、嘌呤、4H-喹啉、酞嗪、萘啶、吡啶、吡嗪、色满、异色满、吡啶啉、异吡啶啉等,其未被取代或被一个或多个前述稳定取代基取代,且含有9至约30(包括端值)个环原子,其中大部分是碳原子。

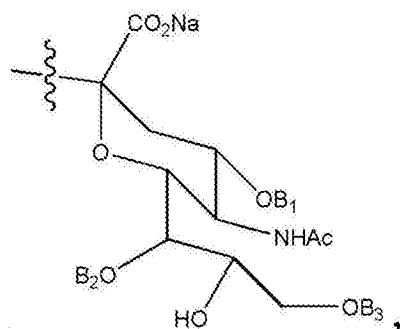
[0319] 在化合物[1]的某些实施方案中,



在其它实施方案中,



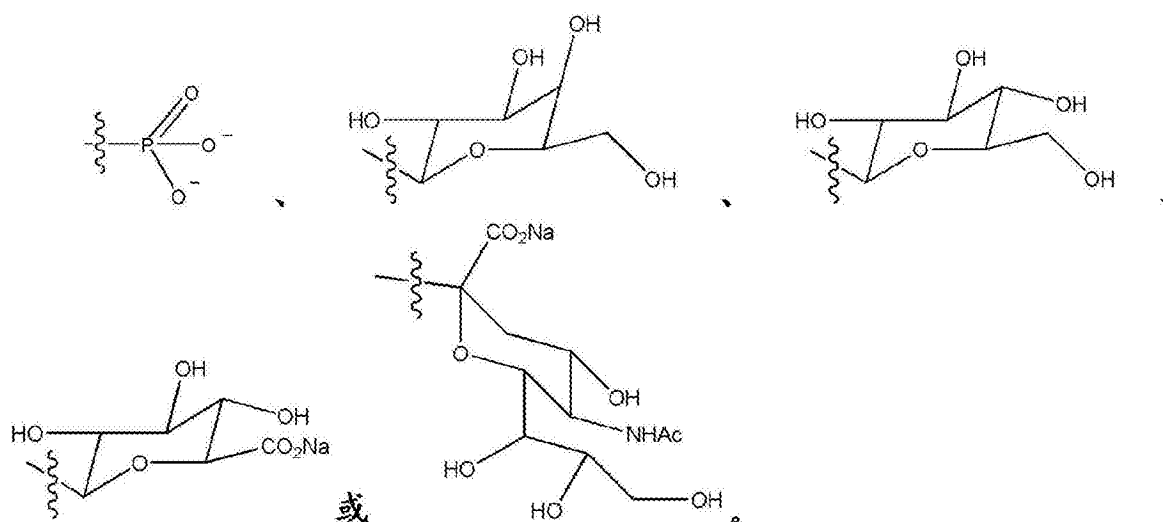
[0320] 在化合物[1]至[4]的某些实施方案中,OR<sub>2</sub>可以是磷酸酯、乙酸酯、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酯、腺苷三磷酸、腺苷二磷酸、腺苷单磷酸、腺苷、α-D-半乳糖苷、β-D-半乳糖苷、α-D-葡萄糖苷、β-D-葡萄糖苷、α-D-甘露糖苷、β-D-甘露糖苷、β-呋喃果糖苷、β-D-葡糖苷酸或



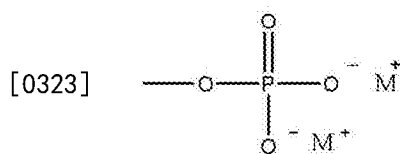
其中,B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>和B<sub>3</sub>可以各自独立地是H、包含1-4个碳原子的直链

烷基(支链或直链)或包含3-6个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中,R<sub>2</sub>可以是

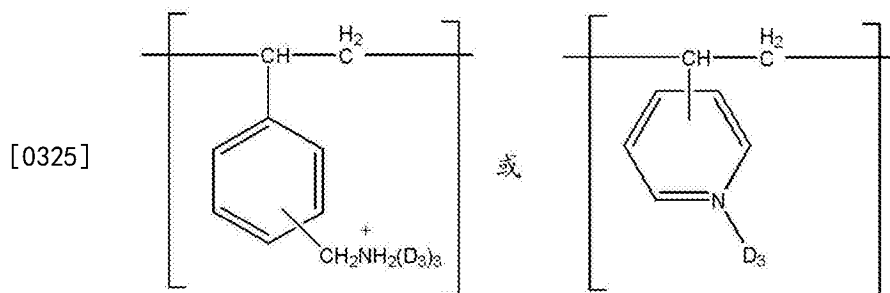
[0321]



[0322] 在化合物[1]至[4]的某些实施方案中,R<sub>2</sub>(即酶可切割的取代基)可以由下述通式代表的磷酸酯基团:



[0324] 其中 $M^+$ 代表阳离子诸如碱金属,例如,钠或钾、铵或 $C_{1-7}$ 烷基、芳烷基或芳族季铵阳离子、 $N(DR_3)_4^+$ 其中每个 $D_3$ 可以是烷基,例如,甲基或乙基、芳烷基(例如,苄基),或形成杂环系(例如,吡啶鎓,具体地,二钠盐)的一部分。这样的季铵阳离子通常还可以通过它们的季铵化基团之一与聚合主链相连。



[0326] 其中 $n$ 大于1,或可以是聚季铵盐(即,紫罗烯聚合物)的一部分。

[0327] 在化合物[1]至[4]的某些实施方案中, $R_2$ 可以是 $E-L-Nuc-Z$ ,其中 $E$ 是包含亲电子原子的基团,所述原子在 $Z$ 基团的酶切割以后被 $Nuc$ 基团的电子对攻击,并通过邻助作用释放出化合物阴离子; $L$ 是连接基团; $Nuc$ 是亲核原子;且 $Z$ 是可酶促切割的基团;其中

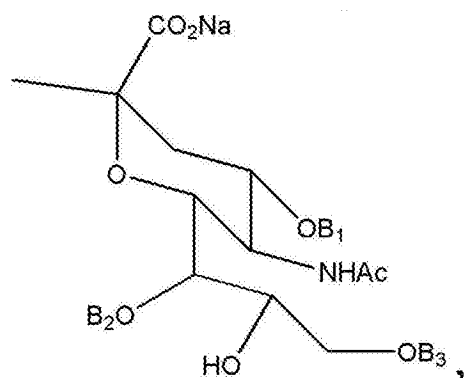
[0328]  $E$ 可以是羧基、羰基、被离去基团取代的亚甲基、磷酸盐、碳酸盐、黄原酸盐、亚硫酸盐、磺酸盐、亚硫酸氢盐或二硫化物;

[0329]  $L$ 可以选自:含有1-4个碳原子的亚甲基或聚亚甲基、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 、 $-(CH_2)_m-S-(CH_2)_n-$ 或 $-(CH_2)_m-NR_6-(CH_2)_n-$ ,其中 $m$ 和 $n$ 是0-3,且 $m+n$ 是2或3,其中 $R_6$ 是含有1-10个碳原子的烷基,且所述连接基团可以被下述基团取代:含有1-24个碳原子的烷基,含有2-24个碳原子的烯基,被含有1-24个碳原子的酰氧基单或二取代且含有1-24个碳原子的烷基,被含有1-24个碳原子的酰氧基单或二取代且含有2-24个碳原子的烯基,含有6-10个碳的芳基,被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有1-4个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有1-24个碳原子的烷基,或被苯基、羟基苯基、吡啶基、巯基、含有1-4个碳原子的烷硫基、羟基、羧基、氨基、胍基、咪唑或氨基甲酰基取代且含有2-24个碳原子的烯基;

[0330]  $Nuc$ 可以是氧原子或硫原子;且

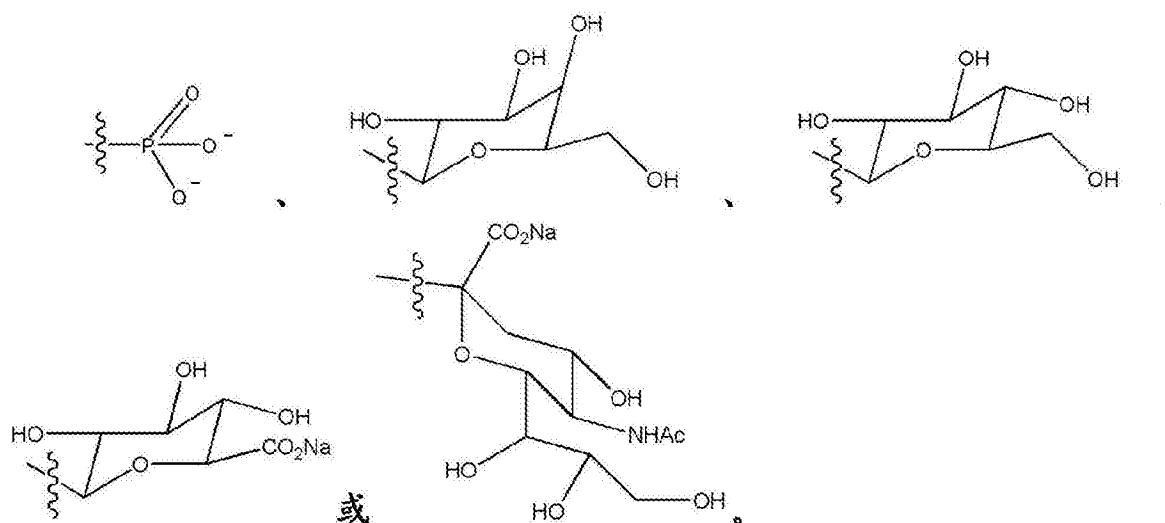
[0331]  $Z$ 可以是磷酸基、乙酰基、1-磷酸-2,3-二酰基甘油酰基、腺苷三磷酸基、腺苷二磷酸基、腺苷单磷酸基、腺苷基、 $\alpha$ -D-半乳糖基、 $\beta$ -D-半乳糖基、 $\alpha$ -D-葡萄糖基、 $\beta$ -D-葡萄糖基、 $\alpha$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -D-甘露糖基、 $\beta$ -呋喃果糖基、 $\beta$ -D-glucosiduransyl或





其中, B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>和B<sub>3</sub>各自独立地是H、包含1-4个碳原子的直链

烷基、或包含3-6个碳原子的支链烷基。在这些实施方案中的某些中,Z可以是  
[0332]



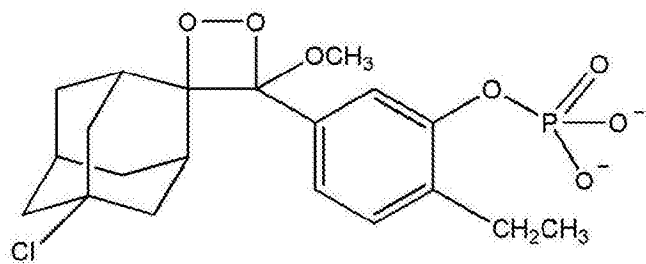
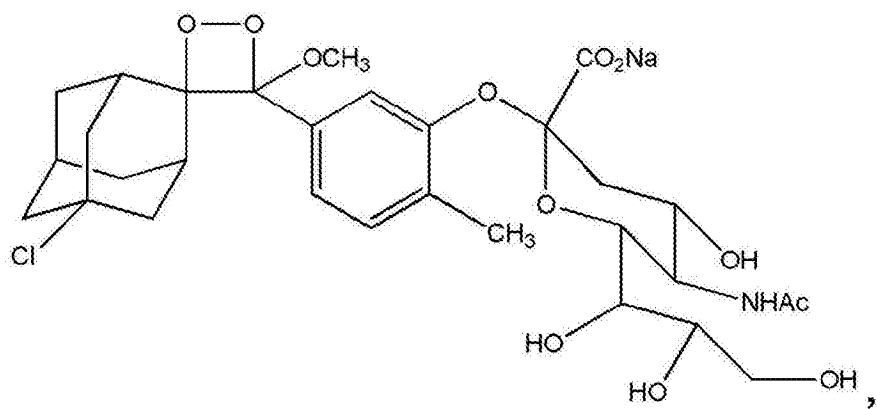
[0333] 在化合物[1]至[4]的某些实施方案中,所述供电子基团R<sub>3</sub>可以是包含1-20个碳原子的直链烷基、包含3-20个碳原子的支链烷基、包含1-20个碳原子的直链烷氧基、或包含3-20个碳原子的支链烷氧基。在其它实施方案中,R<sub>3</sub>可以是包含1-20个碳原子的直链烷基或包含1-20个碳原子的直链烷氧基。在其它实施方案中,R<sub>3</sub>可以是包含1-5个碳原子的直链烷基或包含1-5个碳原子的直链烷氧基。在其它实施方案中,R<sub>3</sub>选自:甲基、乙基、丙基、丁基、甲氧基、乙氧基、丙氧基和丁氧基。

[0334] 在化合物[1]至[4]的某些实施方案中,所述可被酶部分切割的键的切割 可以导致在25℃的光的产生,所述光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值。在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

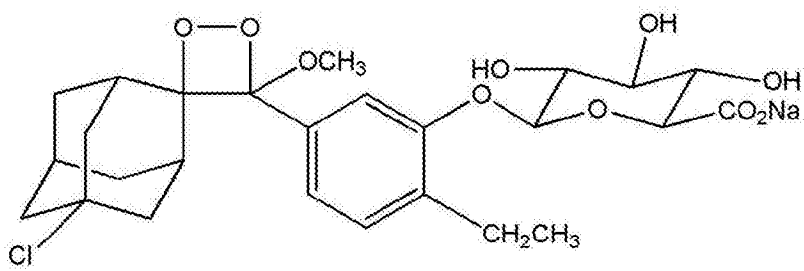
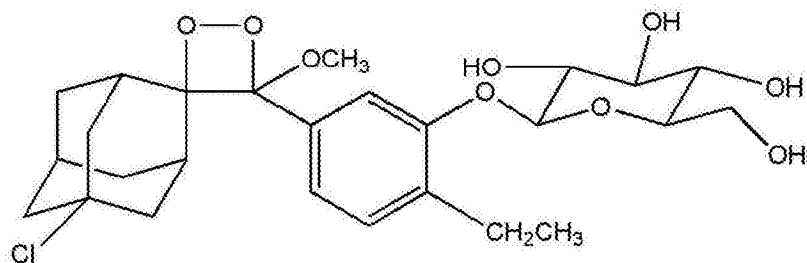
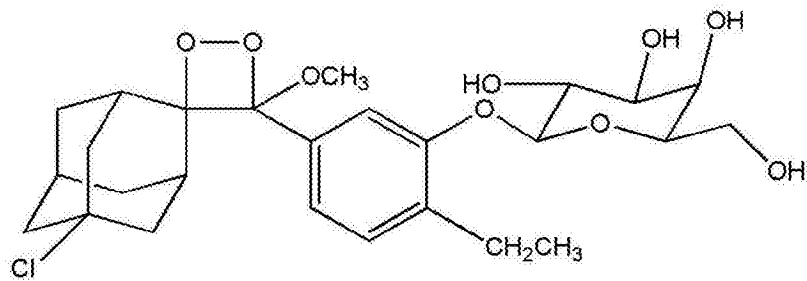
[0335] 在化合物[1]至[4]的某些实施方案中,所述可被酶部分切割的键的切割可以导致在37℃的光的产生,所述光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值。在其它实施方案中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。

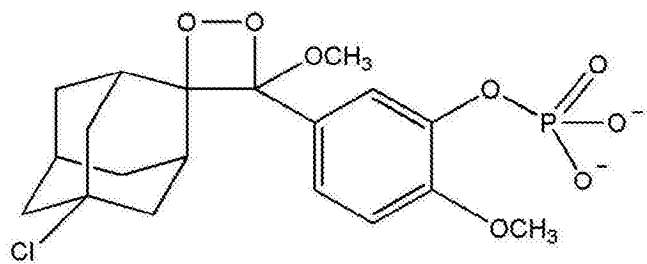
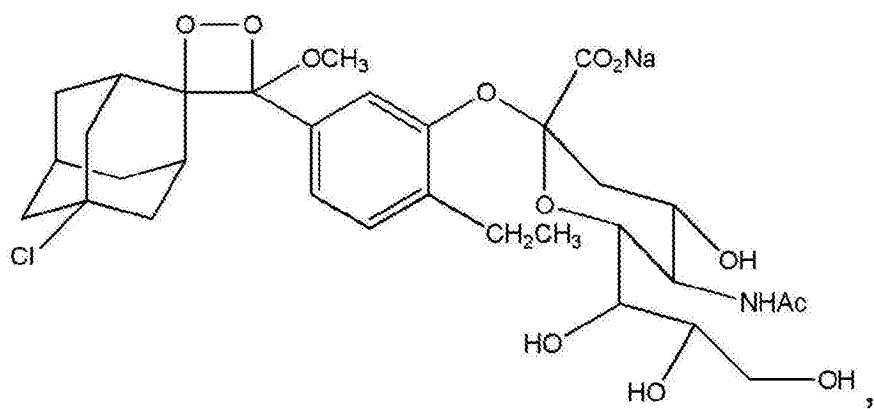
[0336] 在某些实施方案中,化合物[1]可以是:



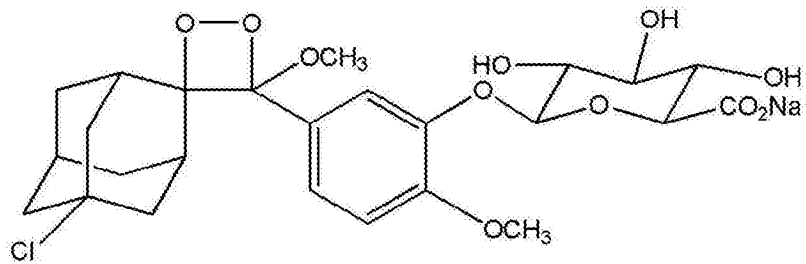
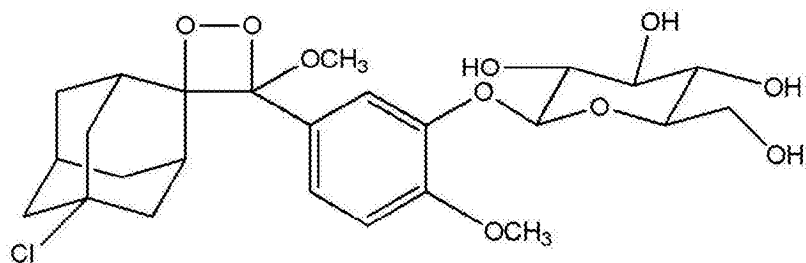
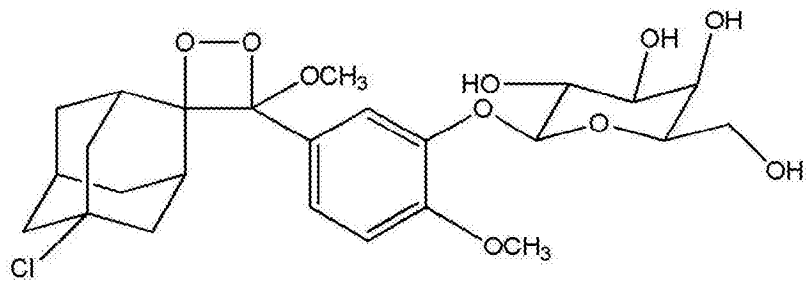


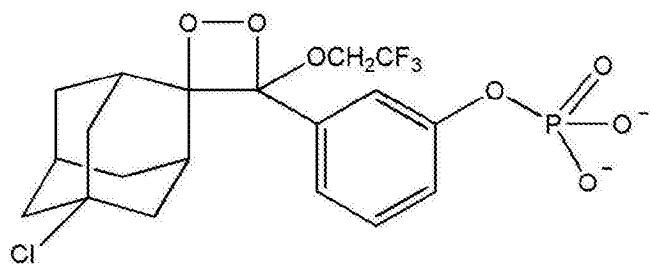
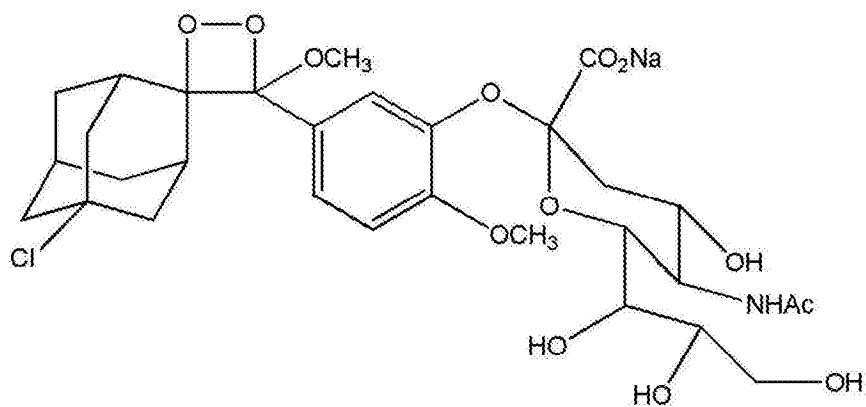
[0338]



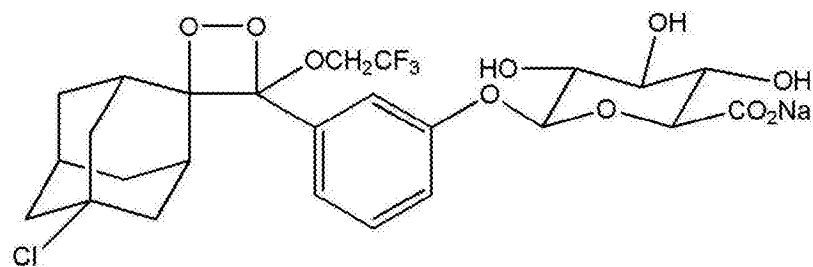
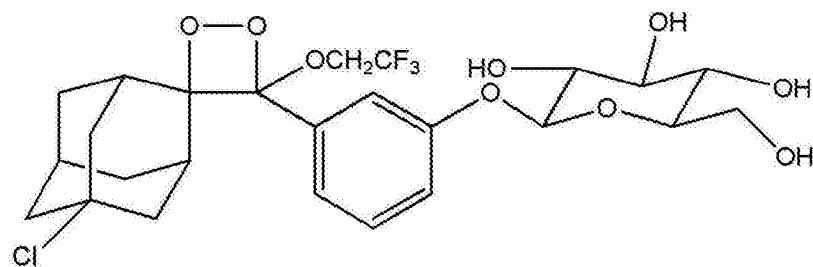
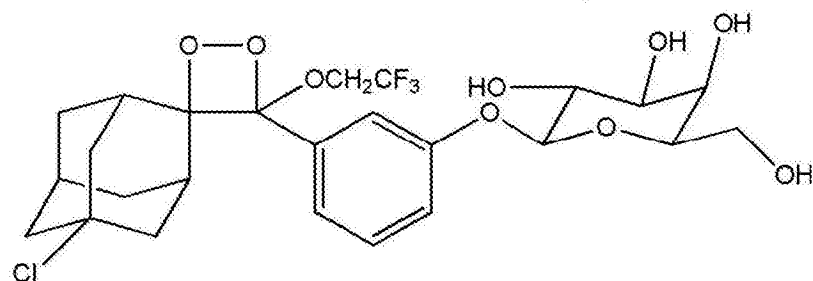


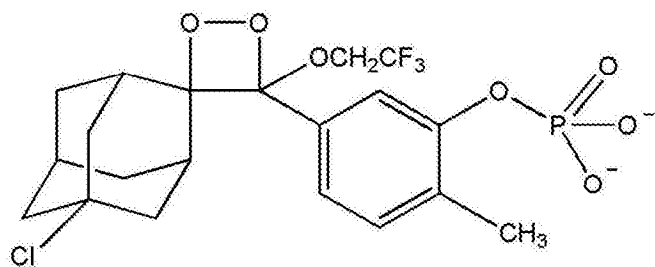
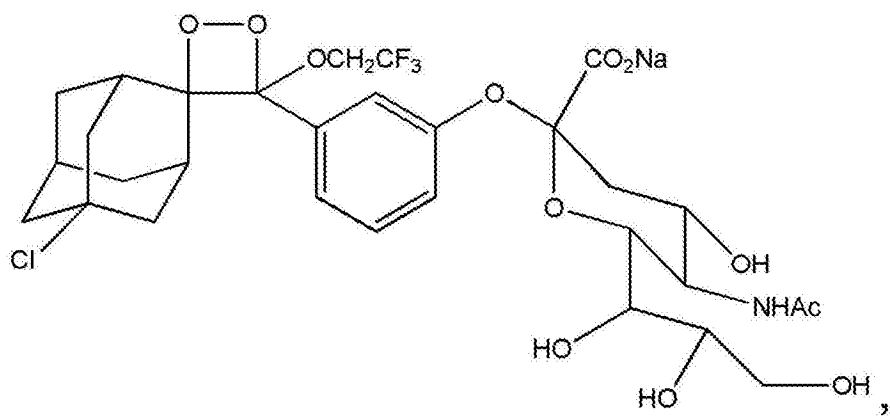
[0339]



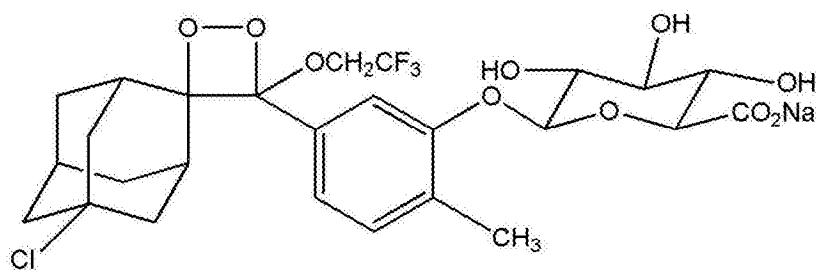
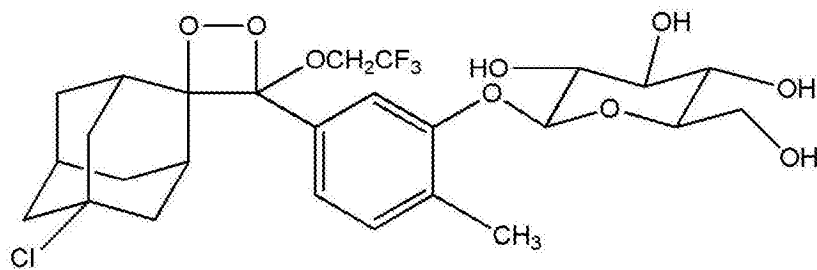
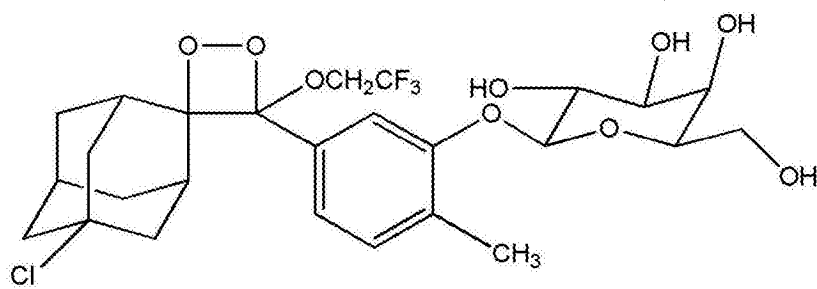


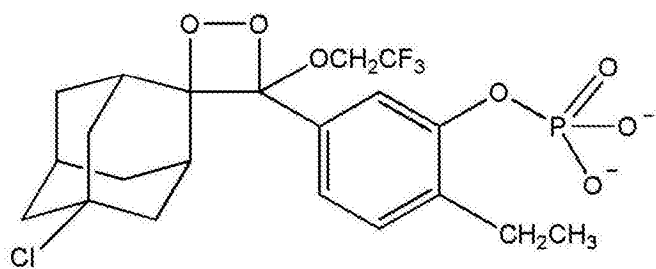
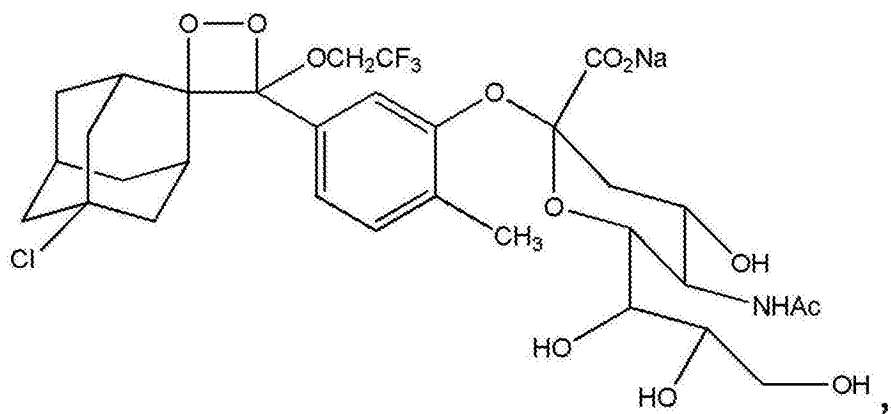
[0340]



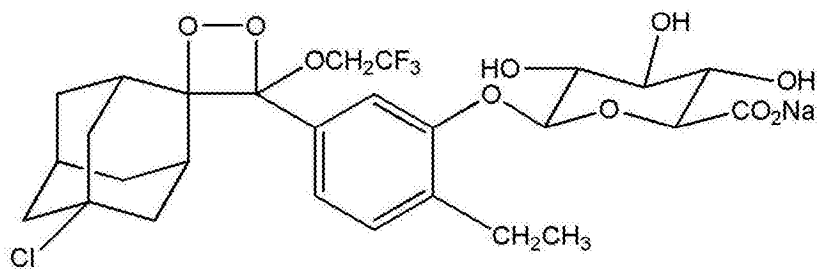
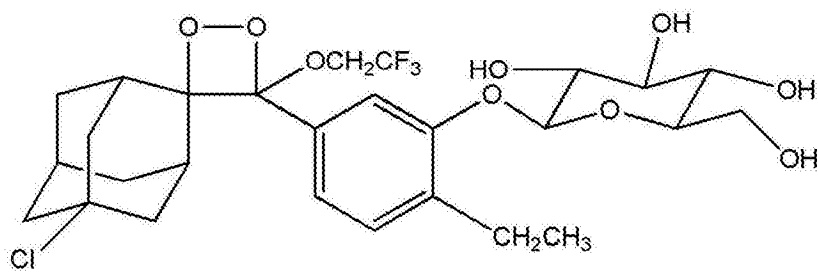
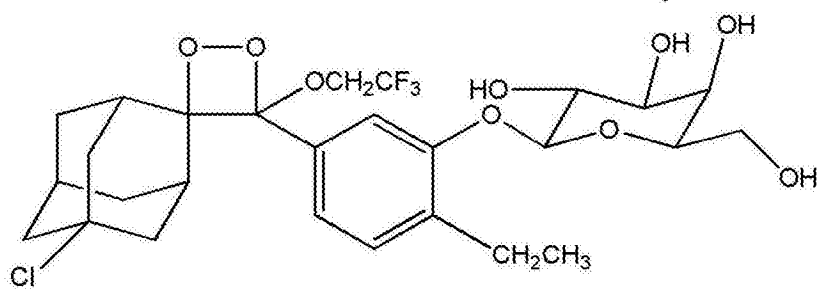


[0341]



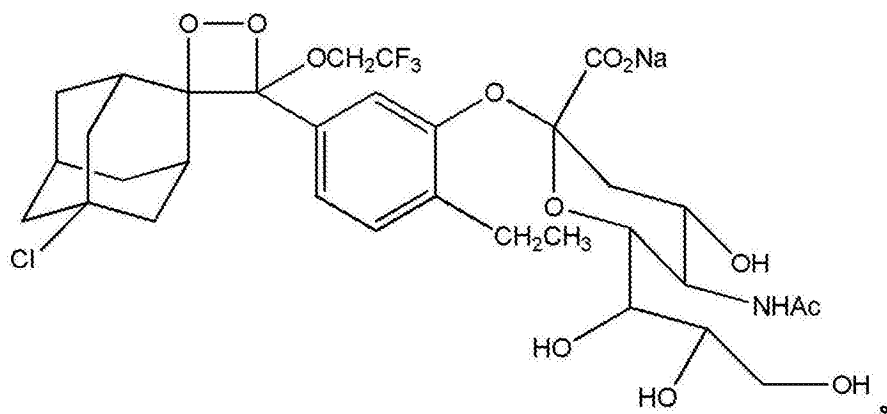


[0342]



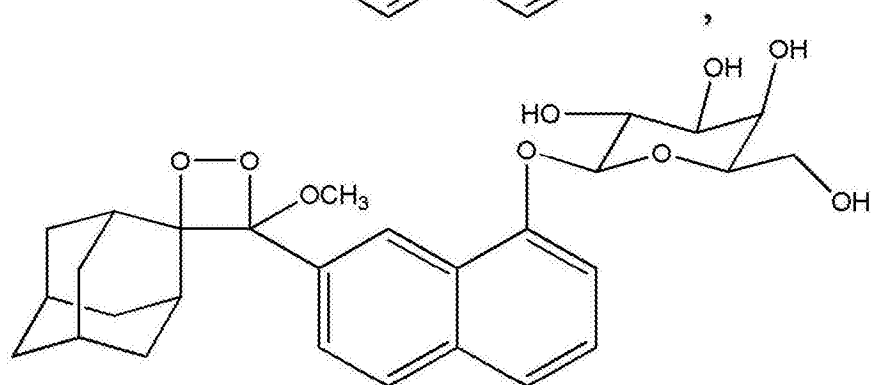
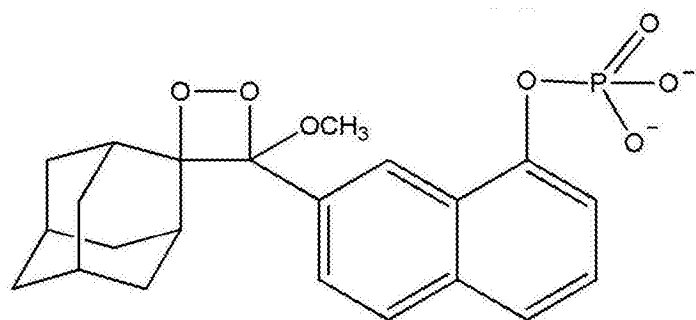
, 或者

[0343]

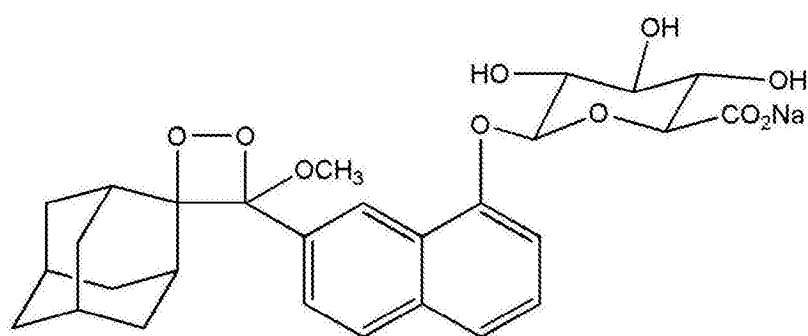
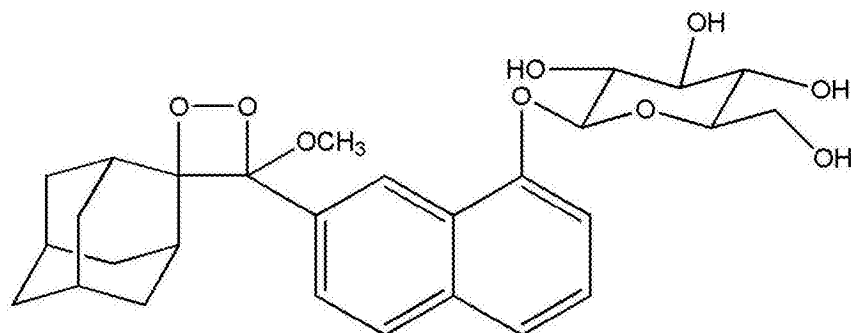


[0344] 在某些实施方案中,化合物[2]可以是:



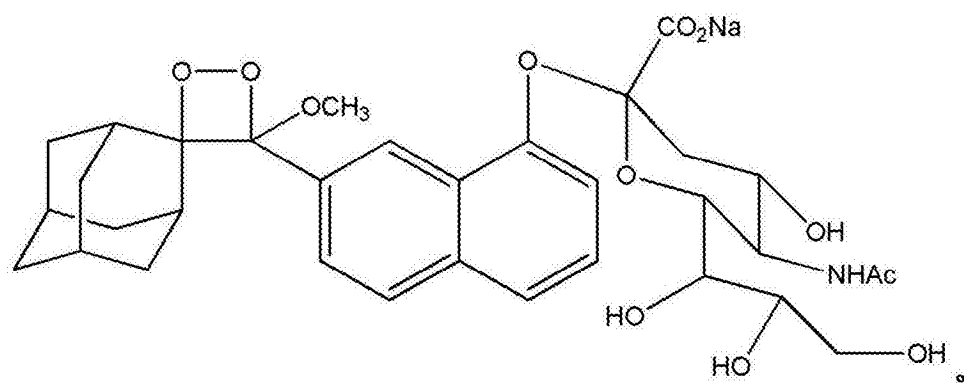


[0345]

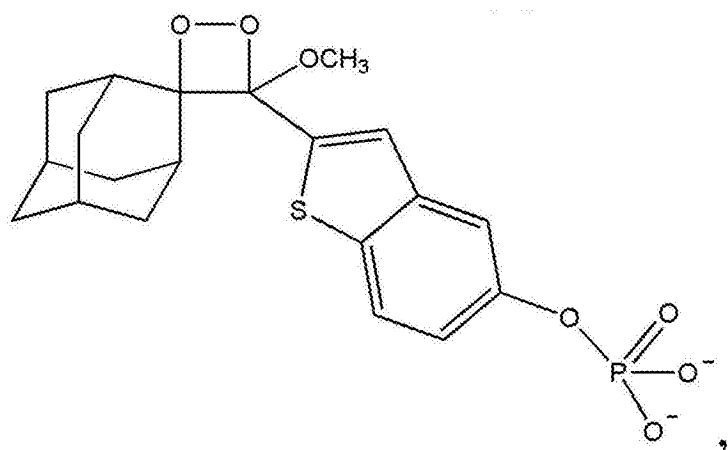


, 或者

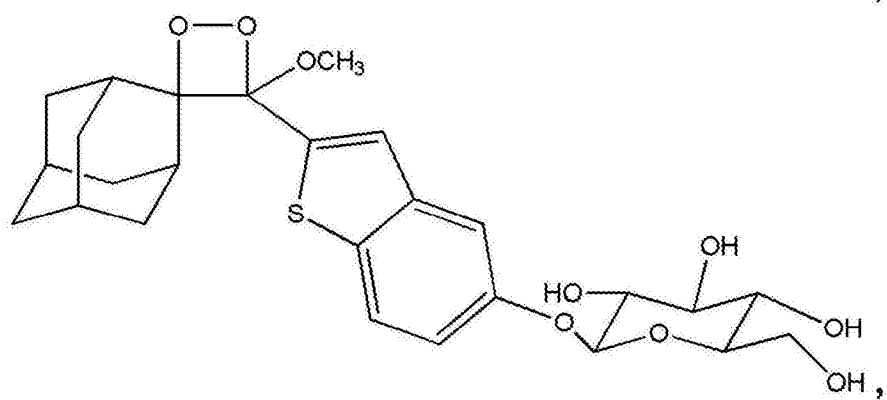
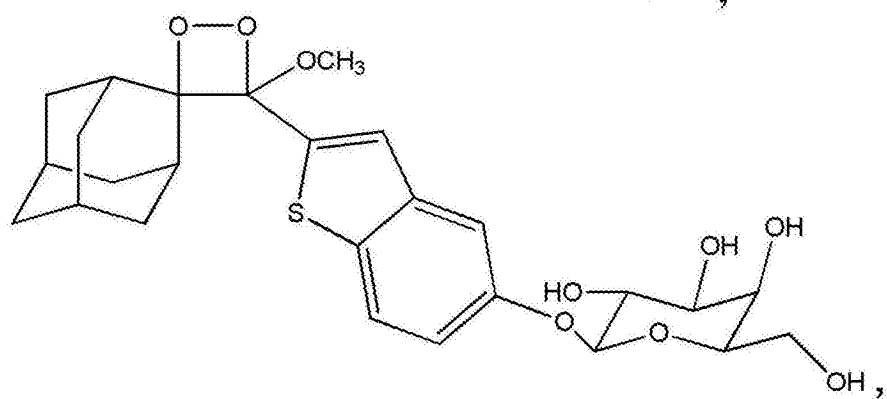
[0346]

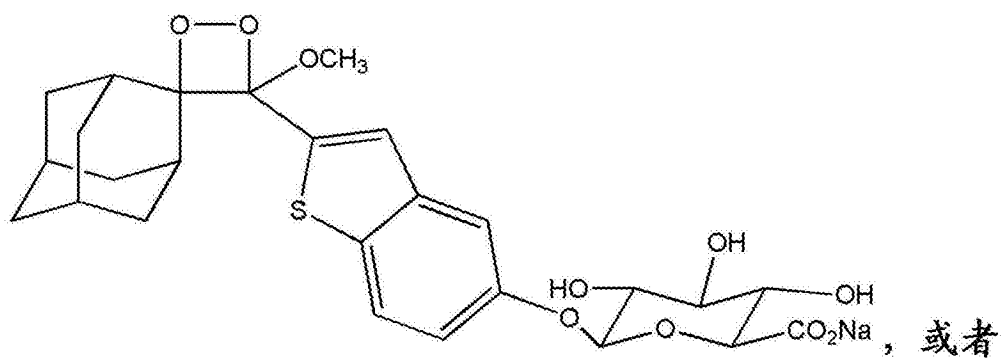


[0347] 在某些实施方案中,化合物[3]可以是:

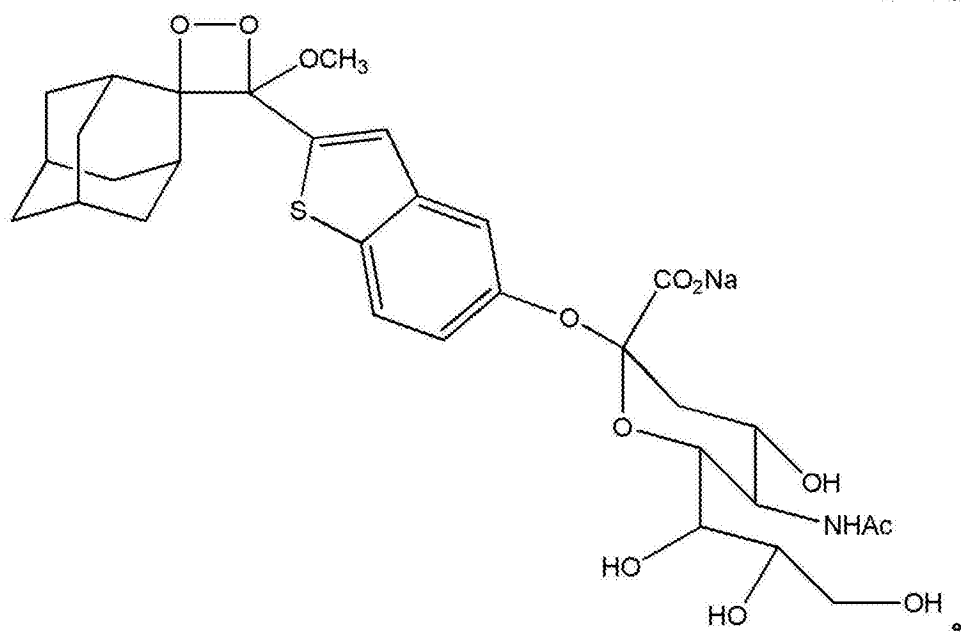


[0348]



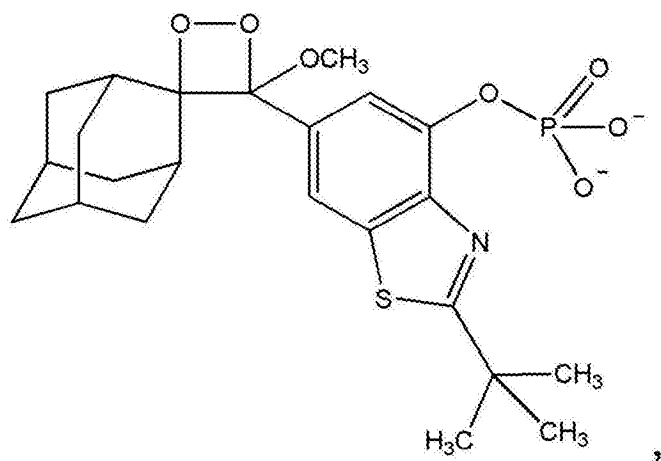


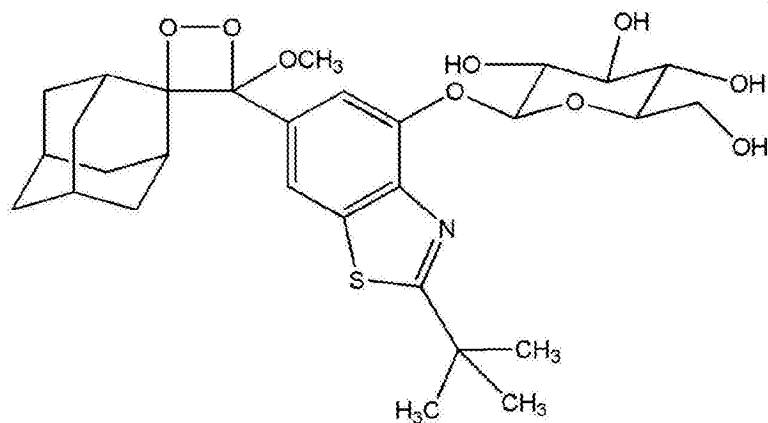
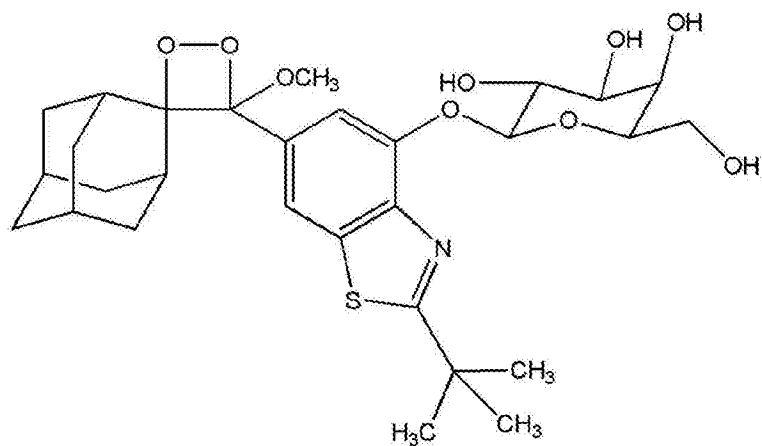
[0349]



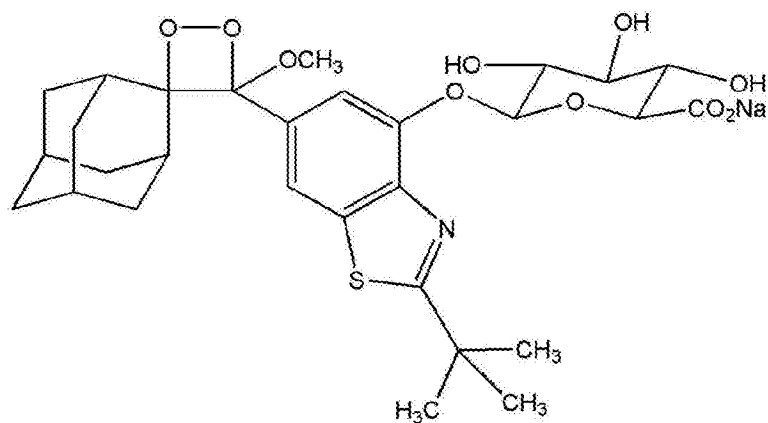
[0350] 在某些实施方案中化合物[4]可以是：

[0351]

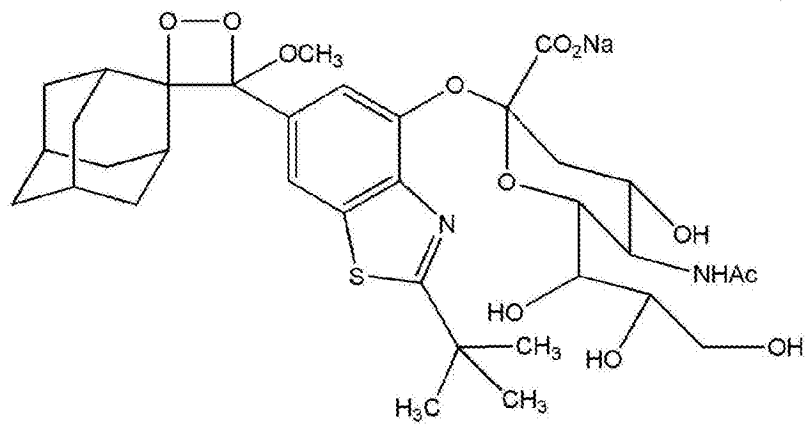




[0352]

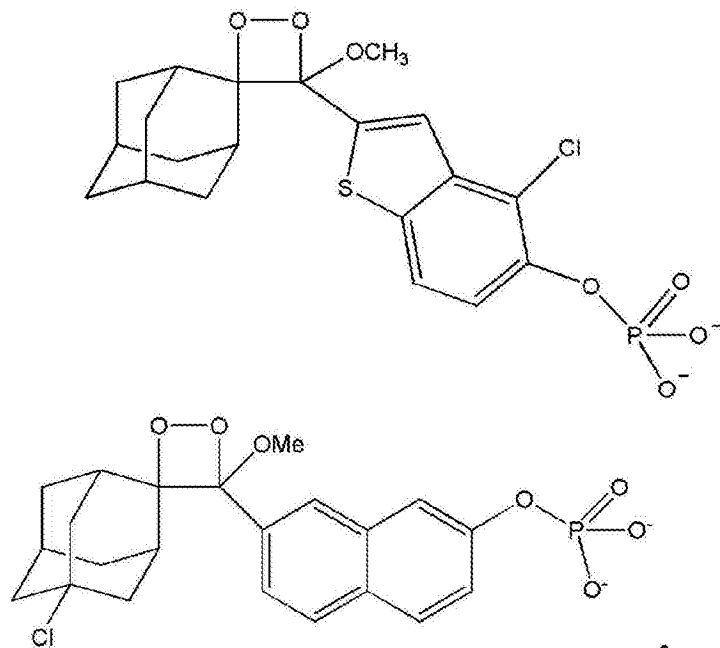


, 或者



[0353] 在某些实施方案中,本发明的化合物还可以包括、但不限于:

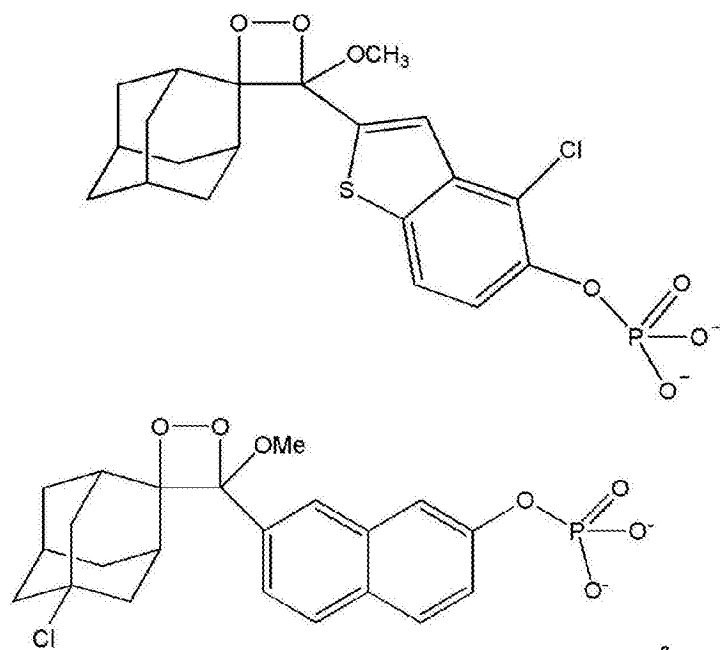
[0354]



或

[0355] 在另一个方面,本发明提供了一种化合物,它是

[0356]



或

[0357] 上文中公开的本发明的任意化合物可以用于在下面或在上述发明内容中公开的方法和试剂盒中。

[0358] 在另一个方面,本发明提供了方法。所述方法可以包括下述步骤:提供如上定义的本发明的化合物;提供酶复合物,其包含能够切割所述化合物的酶部分;使所述酶复合物与所述化合物接触,以形成反应混合物;和,允许所述反应混合物产生光。

[0359] 在这些方法的一个步骤中,提供了本发明的化合物。这样的化合物可以具有式[1]、[2]、[3]或[4],且可以包括在上面或在发明内容中公开的其任意实施方案。

[0360] 在这些方法的另一个步骤中,提供了疑似包含酶、抗原、抗体、核酸或分析物的样

品。可以测定疑似包含酶、抗原、核酸或分析物的样品。所述样品可以具有生物的或非生物的起源。在样品具有生物起源的情况下,它可以是血液、血清、血浆、尿、粪便、唾液、粘液、精液、组织、组织提取物、细胞培养基、细胞、细胞提取物等。

[0361] 在这些方法的另一个步骤中,提供了酶复合物,其可以包含能够切割如上定义的本发明化合物的酶部分。所述酶部分可以是酶、酶连接的抗体、酶连接的抗原或酶连接的寡核苷酸。所述酶部分可以包含能够切割本发明的化合物的酶。在某些实施方案中,所述酶可以是水解酶。水解酶包括这样的酶:其切割酯键且被归类为EC3.1,或切割糖键且被归类为EC3.2,其包括、但不限于碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖醛酸糖苷酶或神经氨酸酶。

[0362] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是酶。在这些实施方案中,样品中的酶构成酶复合物。使所述酶复合物与本发明的化合物接触以形成反应混合物,并使所述反应混合物产生光。

[0363] 在某些实施方案中,可以检测光的发射,并且这样的发射将指示酶的存在,并且发射的光的量可以与样品中存在的酶的量相关联。

[0364] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是酶连接的抗体。所述酶连接的抗体包含能够结合抗原的第一抗体和酶,所述酶能够切割本发明的化合物,使得所述底物分解并产生光。在这些实施方案中,所述酶连接的抗体、抗原和第二抗体(其能够结合所述抗原且固定化在固相上)构成酶复合物。使所述酶复合物与本发明的化合物接触,以形成反应混合物,并使所述反应混合物产生光。

[0365] 在某些实施方案中,可以使疑似包含抗原的样品与酶连接的抗体(其包含第一抗体和酶)和固相(其包含第二抗体)接触,其中两种抗体都能够结合抗原以提供酶复合物,所述酶复合物能够切割本发明的化合物,使得所述底物分解并产生光。所述样品、酶连接的抗体和固相可以以任意次序组合。

[0366] 在某些实施方案中,所述方法可以另外包括下述步骤:通过洗涤所述酶复合物,从所述酶复合物除去任何未结合的酶连接的抗体。这可以通过加入和除去与所述酶复合物的组分相容的缓冲液来实现。这样的缓冲液是诊断领域众所周知的。可以进行固相的其它洗涤步骤。

[0367] 所述第一抗体、第二抗体或二者可以是多克隆的、单克隆的或重组的抗体。

[0368] 所述固相可以是珠子、试管、多孔板、微阵列、凝胶、膜、微粒、纳米晶体、量子点等。用于制备这些固相的材料是诊断领域已知的。

[0369] 通过诊断领域已知的技术,通过第二抗体与固相的非共价或共价连接,可以将所述第二抗体固定化在所述固相上。

[0370] 所述第一抗体可以与所述酶共价地或非共价地连接。当非共价地连接时,第一抗体可以与标记共价地连接,且所述酶可以与能够非共价地结合所述标记的分子共价地连接。

[0371] 在某些实施方案中,所述标记可以是生物素或生物素衍生物,且所述分子可以是抗生物素蛋白或抗生物素链菌素。生物素衍生物是具有取代的生物素分子。其中缺失生物素结构的一部分的生物素分子,也被视作物素衍生物。生物素衍生物包括被取代的天然存在的生物素以及合成的生物素。

[0372] 在某些实施方案中,所述标记可以是半抗原,且所述分子可以是能够结合所述半抗原的抗体。地高辛配基作为半抗原的用途,和抗-地高辛配基作为分子的用途,是诊断领域已知的。

[0373] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是酶连接的抗原。所述酶连接的抗原包含抗原和酶,所述酶能够切割本发明的化合物。在这些实施方案中,所述酶复合物包含与固相结合的酶连接的抗原,所述固相包含能够结合所述抗原的抗体。使所述酶复合物与如上定义的本发明的化合物接触,以形成反应混合物,并使所述反应混合物产生光。

[0374] 在某些实施方案中,可以使疑似包含抗原的样品与酶连接的抗原和固相(其包含能够结合所述抗原的抗体)接触。所述样品、酶连接的抗原和固相可以以任意次序组合。

[0375] 在某些实施方案中,所述方法可以另外包括下述步骤:通过洗涤所述酶复合物,从所述酶复合物除去任何未结合的酶连接的抗原。这可以通过加入和除去与所述酶复合物的组分相容的缓冲液来实现。这样的缓冲液是诊断领域众所周知的。可以进行固相的其它洗涤步骤。

[0376] 所述抗体可以是多克隆的、单克隆的或重组的抗体。

[0377] 所述固相可以是珠子、试管、多孔板、微阵列、凝胶、膜、微粒、纳米晶体、量子点等。用于制备这些固相的材料是诊断领域已知的。

[0378] 通过抗体与固相的非共价或共价连接,可以将所述抗体固定化在所述固相上。

[0379] 所述抗原可以与所述酶共价地或非共价地连接。当非共价地连接时,所述抗原可以与标记共价地连接,且所述酶可以与特定分子共价地连接,所述特定分子能够非共价地结合所述标记。

[0380] 在某些实施方案中,所述标记可以是如上所述的生物素或生物素衍生物,且所述分子可以是抗生物素蛋白或抗生物素链菌素。

[0381] 在某些实施方案中,所述标记可以是半抗原,且所述分子可以是能够结合所述半抗原的抗体。地高辛配基作为半抗原的用途,和抗-地高辛配基作为分子的用途,是诊断领域已知的。

[0382] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是酶连接的寡核苷酸。所述酶连接的寡核苷酸包含:能够与某种核酸杂交的寡核苷酸,和能够切割本发明的化合物的酶。在这些实施方案中,所述酶复合物包含酶连接的寡核苷酸,所述寡核苷酸与包含核酸的固相杂交。使所述酶复合物与本发明的化合物接触,以形成反应混合物,并使所述反应混合物产生光。

[0383] 在某些实施方案中,所述方法可以另外包括下述步骤:提供疑似包含核酸的样品;将所述核酸固定化在固相上;使所述固定化的核酸和所述酶连接的寡核苷酸接触,以形成酶复合物;和,在加入本发明的化合物的水溶液以后,检测从所述反应混合物发射出的光,其中光的发射指示所述核酸的存在,并且发射的光的量可以与样品中存在的核酸的量相关联。

[0384] 在某些实施方案中,所述方法可以另外包括下述步骤:通过洗涤所述酶复合物,从所述酶复合物除去任何未结合的酶连接的寡核苷酸。这可以通过加入和除去与所述酶复合物的组分相容的缓冲液来实现。这样的缓冲液是诊断领域众所周知的。可以进行所述固相的其它洗涤。

[0385] 所述固相可以是珠子、试管、多孔板、微阵列、凝胶、膜、微粒、纳米晶体、量子点等。

用于制备这些固相的材料是诊断领域已知的。

[0386] 所述寡核苷酸可以与酶共价地或非共价地连接。当非共价地连接时,所述寡核苷酸可以与标记共价地连接,且所述酶可以可以与特定分子共价地连接,所述特定分子能够非共价地结合所述标记。

[0387] 在某些实施方案中,所述标记可以是如上所述的生物素或生物素衍生物,且所述分子可以是抗生物素蛋白或抗生物素链菌素。

[0388] 在某些实施方案中,所述标记可以是半抗原,且所述分子可以是能够结合所述半抗原的抗体。地高辛配基作为半抗原的用途,和抗-地高辛配基作为分子的用途,是诊断领域已知的。

[0389] 在该方法的另一个步骤中,使所述样品(单独地或作为包含酶部分的复合物)与如上定义的本发明的化合物接触,以形成反应混合物。

[0390] 在某些实施方案中,可以将样品加入本发明的化合物中,而在其它实施方案中,可以将包含本发明的化合物的水溶液加入所述样品中。

[0391] 在某些实施方案中,所述反应混合物可以进一步包含促进剂。所述促进剂可以包含CTAB(鲸蜡基三甲溴化铵)和其它胶束形成物质。所述促进剂可以是,天然物质诸如牛血清白蛋白,或类似类型的生物的或基于蛋白的分子或化合物,无脂肪的牛血清白蛋白,或改善由增强物质实现的检测的化学发光发射的增强的任何增强添加剂。所述促进剂可以是聚合物。代表性的聚合物和它们作为促进剂的作用阐述在美国专利号5,145,772和5,547,836,它们通过引用并入本文。这些聚合物可以单独使用,或与表面活性剂添加剂一起使用,以进一步提高增强值,如也通过引用并入本文中的在美国专利号5,994,073中所公开的。所述促进剂可以包含聚合的季铵盐、聚合的季磷盐或它们的组合。所述聚合的季铵盐可以是聚(乙烯基苄基三甲基氯化铵)、聚[乙烯基苄基(苄基二甲基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三丁基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三戊基氯化铵)]或它们的组合。所述聚合的季磷盐可以是聚(乙烯基苄基三甲基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)、包含聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)和聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)的共聚物或它们的组合。

[0392] 在某些实施方案中,所述促进剂可以进一步包含受体染料。在这些实施方案中,所述受体染料可以是荧光染料。在这些实施方案中的某些中,所述荧光染料可以是荧光素、罗丹明、磺酰罗丹明、ALEXA FLUOR350、ALEXA FLUOR405、ALEXA FLUOR430、ALEXA FLUOR488、ALEXA FLUOR532、ALEXA FLUOR546或ALEXA FLUOR555。在这些实施方案中的某些中,所述荧光染料可以是荧光素。

[0393] 在这些方法的另一个步骤中,使所述反应混合物产生光。

[0394] 在某些实施方案中,可以用眼观察所述光,或可以使用X-射线胶片或能够检测和测量产生的光的仪器测量所述光。能够检测和测量产生的光的仪器包括,但不限于、光度计、带有胶片的照相机或电荷耦合的照相机。

[0395] 在某些实施方案中,在加入本发明的化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生会指示所述抗原的存在,且产生的光的量可以与所述样品中存在的抗原的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生在小于约10分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,

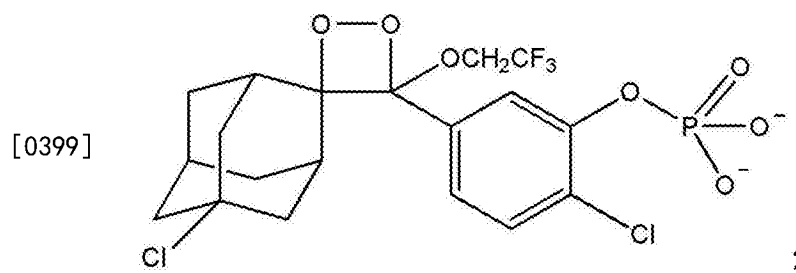


所述光的产生在小于约5分钟内达到最大值。

[0396] 在另一个方面,本发明提供了用于检测样品中分析物的存在或量的试剂盒,所述试剂盒包括如上面和本文中公开的不同实施方案所定义的本发明的化合物和缓冲液。

[0397] 在某些实施方案中,所述试剂盒可以进一步包含如上所述的促进剂。在某些实施方案中,所述试剂盒可以进一步包含如上所述的受体染料。

[0398] 在另一个方面,本发明提供了一种产生光的方法,所述方法包括下述步骤:提供具有下式结构的化合物:



[0400] 提供酶复合物,其包含能够切割所述化合物的酶部分;使所述酶复合物与所述化合物接触,以形成反应混合物;和,允许所述反应混合物产生光;前提条件是,当所述酶复合物构成固相、抗原固定至所述固相上、且所述抗原是蛋白时,那么所述固相不是膜或微测定。

[0401] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是碱性磷酸酶。

[0402] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是能够结合抗原的碱性磷酸酶连接的抗体。

[0403] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是碱性磷酸酶连接的抗原。

[0404] 在某些实施方案中,所述酶部分可以是碱性磷酸酶连接的寡核苷酸。

[0405] 在某些实施方案中,所述碱性磷酸酶可以与抗体、抗原或寡核苷酸非共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述抗体、抗原或寡核苷酸可以与标记共价地连接,且所述碱性磷酸酶与能够非共价地结合所述标记的分子共价地连接。在这些实施方案中的某些中,所述标记可以是生物素或生物素衍生物,且所述分子是抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素,而在这些实施方案中的其它中,标记可以是半抗原,且所述分子是能够结合所述半抗原的抗体。

[0406] 在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括下述步骤:提供疑似包含所述抗原的样品;提供固相,其包含能够结合所述抗原的第二抗体;使所述样品和碱性磷酸酶连接的抗体与所述固相接触,以形成酶复合物;和,在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生会指示所述抗原的存在,且产生的光的量可以与所述样品中存在的抗原的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:从所述酶复合物除去任何未结合的碱性磷酸酶连接的抗体。

[0407] 在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括下述步骤:提供疑似包含所述抗原的样品;提供固相,其包含能够结合所述抗原的抗体;使所述样品和碱性磷酸酶连接的抗原与所述固相接触,以形成酶复合物;和,在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的

光,其中所述光的产生会指示所述抗原的存在,且产生的光的量可以与所述样品中存在的抗原的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:从所述酶复合物除去任何未结合的碱性磷酸酶连接的抗原。

[0408] 在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括下述步骤:提供疑似包含核酸的样品;将所述核酸固定化至固相,使所述固定化的核酸和所述碱性磷酸酶连接的寡核苷酸接触,以形成酶复合物;和,在加入所述化合物以后,检测由反应混合物产生的光,其中所述光的产生指示所述核酸的存在,且产生的光的量可以与样品中存在的核酸的量相关联,且其中在25℃至37℃的光的产生在小于约15分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约10分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述光的产生可以在小于约5分钟内达到最大值。在这些实施方案中的某些中,所述方法可以进一步包括下述步骤:从所述酶复合物除去任何未结合的酶连接的寡核苷酸。

[0409] 在某些实施方案中,所述固相可以是珠子、试管、多孔板、微阵列、凝胶、膜、微粒、纳米晶体、量子点等。用于制备这些固相的材料是诊断领域已知的。

[0410] 在某些实施方案中,所述反应混合物可以进一步包含促进剂。所述促进剂可以包含CTAB(鲸蜡基三甲基氯化铵)和其它胶束形成物质。所述促进剂可以是,天然物质诸如牛血清白蛋白,或类似类型的生物的或基于蛋白的分子或化合物,无脂肪的牛血清白蛋白,或改善由增强物质实现的检测的化学发光发射的增强的任何增强添加剂。所述促进剂可以是聚合物。代表性的聚合物和它们作为促进剂的作用阐述在美国专利号5,145,772和5,547,836,它们通过引用并入本文。这些聚合物可以单独使用,或与表面活性剂添加剂一起使用,以进一步提高增强值,如也通过引用并入本文中的在美国专利号5,994,073中所公开的。所述促进剂可以包含聚合的季铵盐、聚合的季磷盐或它们的组合。所述聚合的季铵盐可以是聚(乙烯基苄基三甲基氯化铵)、聚[乙烯基苄基(苄基二甲基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三丁基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三戊基氯化铵)]或它们的组合。所述聚合的季磷盐可以是聚(乙烯基苄基三甲基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)、包含聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)和聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)的共聚物或它们的组合。在这些实施方案中的某些中,所述促进剂可以包含聚合的季铵盐、聚合的季磷盐或它们的组合。在这些实施方案中的某些中,所述聚合的季铵盐可以是聚(乙烯基苄基三甲基氯化铵)、聚[乙烯基苄基(苄基二甲基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三丁基氯化铵)]、聚[乙烯基(苄基三戊基氯化铵)]或它们的组合。在这些实施方案中的某些中,所述聚合的季磷盐可以是聚(乙烯基苄基三甲基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)、聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)、包含聚(乙烯基苄基三丁基氯化磷)和聚(乙烯基苄基三辛基氯化磷)的共聚物或它们的组合。

[0411] 在某些实施方案中,所述促进剂可以进一步包含受体染料。在这些实施方案中的某些中,所述受体染料可以是荧光素、罗丹明、磺酰罗丹明、ALEXA FLUOR350、ALEXA FLUOR405、ALEXA FLUOR430、ALEXA FLUOR488、ALEXA FLUOR532、ALEXA FLUOR546或ALEXA FLUOR555。

[0412] 下述实施例意图解释而不是限制本发明。

[0413] 仪器.

[0414] 使用96/384-孔HydroSpeedplate洗涤机(TecanGroup Ltd.,瑞士)、Orion-II96/384-孔微量培养板光度计(Titertek Instrument Berthold Technologies,Huntsville,AL)来测量化学发光。

[0415] 珠子和微量培养板.

[0416] 得到:**Dynabeads®**(Life Tech Dynal AS,挪威),平底、高结合、固体 白色的Corning96-孔聚苯乙烯微量培养板(Corning,3922),和圆底、固体白色的Corning96-孔微量培养板(Corning,3355)。

[0417] 化学发光底物和促进剂.

[0418] **CSPD®**和**CDP-Star®**得自Life Technologies,San Diego,California。

[0419] AP-5化学发光底物(用于碱性磷酸酶)得自Lumigen,Inc.,Southfield,Michigan。其在本文中被称作竞争对手的底物D或竞争对手的AP底物D、竞争对手的闪光底物D或Vendor X的底物D。

[0420] LumiGLO Reserve™化学发光底物(用于HRP)得自KPL,Inc.(Gaithersburg,Maryland)。其在本文中被称作竞争对手的HRP底物或竞争对手的辉光底物E。

[0421] Sapphire-II™发光促进剂(Sapphire-II)、Sapphire-III™发光促进剂(Sapphire-III)、Emerald™-II发光促进剂(Emerald-II)和Emerald™-III发光促进剂(Emerald-III)得自Applied Biosystems Inc.,Foster City,California。

[0422] 纯化的碱性磷酸酶测定.

[0423] 将100μL底物制剂加入碱性磷酸酶(BBI BioZyme,ALPI12G)的10μL系列稀释物中,并在底物加入以后2分钟,动力学地读出白色微孔滴定板。

[0424] 在抗生蛋白链菌素包被的M-280Tosylactivated **Dynabeads®**中偶联的生物素化的碱性磷酸酶.

[0425] 将10μL经洗涤的珠子与40μL生物素化的碱性磷酸酶(BioLabs,N7022S)的10倍系列稀释物一起在25℃温育40min。用电子回旋加速器磁体(Life Tech Ambion的磁体,目录号:AM10050)分离珠子2-3min,并用含有1%BSA的1x PBS洗涤3次。

[0426] 加入100μL底物制剂,并在底物加入后2分钟,动力学地读出平板。

[0427] 使用微量培养板作为用于捕获抗体的固体支持物的夹心ELISA.

[0428] 将针对人IL-6的单克隆抗体(R&D Systems,MAB206)固定化至96-孔微量培养板上,以结合标准人重组IL-6(R&D Systems,206-IL)。加入生物素化的抗-人IL-6(R&D Systems,BAF206),其与结合在平板上的人重组IL-6结合,然后加入抗生蛋白链菌素碱性磷酸酶(Jackson ImmunoResearch,16-050-084)。独立于化学检测,免疫测定操作是相同的。将底物制剂加入经洗涤的孔中,并在底物加入以后37秒,动力学地读出平板。

[0429] 使用 **Dynabeads®**作为用于捕获抗体的固体支持物的肌钙蛋白夹心ELISA.

[0430] 使用LYNX快速碱性磷酸酶抗体缀合试剂盒(AbDSerotec,LNK012AP),将50μL在血清(Sigma,S7023)中的人心脏肌钙蛋白I(HyTest Ltd.,8T53)与50μL小鼠α-人心脏肌钙

蛋白I( $\alpha$ -cTnI)、SDIX(克隆TPC6)抗体缀合的碱性磷酸酶一起在25℃温育10分钟。

[0431] 将100 $\mu$ L与 $\alpha$ -人心脏肌钙蛋白I( $\alpha$ -cTnI)单克隆抗体(HyTest Ltd., 4T21, Mab560)偶联的 **Dynabeads**<sup>®</sup>与上述样品一起在摇动下在37℃温育30分钟。用电子回旋加速器磁体(Life Tech Ambion's磁体目录号:AM10050)分离珠子2-3分钟,并用TBS-Tween洗涤缓冲液洗涤3次。

[0432] 加入100 $\mu$ L底物制剂,并在底物加入后2分钟,动力学地读出平板。

[0433] 实施例1

[0434] 底物A的合成

[0435] 通过在图1至图4中描绘的反应路线图,制备底物A。

[0436] 如图1所示,制备4-Me-3-OBn-苯甲醛。17.56g起始原料产生了13.6g终产物。如图2所示,从4-Me-3-OBn-苯甲醛开始,制备4-Me-Phe磷酸酯。13.6g起始原料产生了17.7g终产物。通过图3所示的反应路线图,从4-Me-Phe磷酸酯开始制备底物A的烯醇醚前体。5.6g起始原料产生了2.1g终产物。如图4所示,从底物A的烯醇醚前体开始制备底物A。1.5g起始原料产生了1.37g终产物。

[0437] 通过上述的反应路线图,经过技术人员已知的修改,可以制备本发明的化合物。

[0438] 实施例2

[0439] 在微孔滴定板中在25℃进行的二氧杂环丁烷底物的动力学研究

[0440] 使用在25℃运行的“纯化的碱性磷酸酶测定”方案,评价了CSDP、CDP-Star、底物A和底物B的发光动力学。

[0441] 图6显示了观察到的发光时程的结果。结果表明,底物A和B在5-10分钟内达到最大发光,而CDP-Star在30-60分钟后达到最大发光。试验的所有底物在达到最大发光以后数小时表现出信号稳定性。

[0442] 图7显示了使用变化浓度的碱性磷酸酶和CDP-Star、底物A、底物B和AP-5运行的灵敏度曲线,其中在指定的时间读出总发光。灵敏度被定义为,当信噪比等于2时碱性磷酸酶的最低浓度。发现CDP-Star、底物A和底物B的灵敏度是AP-5的灵敏度的10倍。

[0443] 实施例3

[0444] 在微孔滴定板中在25℃进行的IL-6免疫测定中对底物A、CSPD和CDP-Star的动力学评价

[0445] 在“使用微量培养板作为用于捕获抗体的固体支持物的夹心ELISA”方案中在25℃,评价了底物A、CSDP和CDP-Star的发光动力学。

[0446] 图8显示了当与CSPD+Sapphire-II、CSPD+Sapphire-III、和CDP-Star+Sapphire-II对比时,底物A的发光时程。底物A的最大发光是在约5分钟,与此相比,CSPD和CDP-Star是在30-60分钟。

[0447] 图9显示了CDP-Star+Sapphire-II和底物A在25℃的信噪比。CDP-Star最大性能需要等待加入该底物后15分钟。对于底物A,早期辉光信号会提供在观察的测定时程内的稳定信噪比,使得它对于微量培养板ELISA而言是理想的。

[0448] 实施例4

[0449] 在微孔滴定板中在37℃进行的IL-6免疫测定中对底物A、B、C和CDP-Star的动力学评价

[0450] 在“使用微量培养板作为用于捕获抗体的固体支持物的夹心ELISA”方案中在37℃,评价了底物A、B、C和CDP-Star的发光动力学。

[0451] 图10显示了24pg/mL IL-6在免疫测定中的动力学,所述免疫测定代表有关的低分析物浓度。CDP-Star+Emerald-II达到最大发光的时间是15-30分钟,而底物A、B和C达到最大发光的时间分别是3分钟、2分钟和立即。

[0452] 图11显示了与竞争对手的底物D相比,底物A、B和C的信号(发光)和信噪比的动力学。针对底物A、B和C观察到的恒定信噪比会实现检测时间的弹性,这会实现使用与大多数仪器形式相容的这些底物的免疫测定。

[0453] 实施例5

[0454] 在微孔滴定板上在37℃进行的免疫测定系统中对底物A、B和C的灵敏度对比

[0455] 在“使用微量培养板作为用于捕获抗体的固体支持物的夹心ELISA”方案中在37℃,评价了使用底物A、底物B、底物C、CDP-Star+Emerald-II、竞争对手的AP底物D和竞争对手的HRP底物的灵敏度。

[0456] 图12表明,底物A、B和C提供的灵敏度是用竞争对手的AP底物D和竞争对手的HRP底物观察到的灵敏度的5-8倍。灵敏度被定义为在2的信噪比时检测到的hIL-6的最低量。

[0457] 实施例6

[0458] 底物A的贮存期限稳定性

[0459] 使用“纯化的碱性磷酸酶测定”方案,评价了在-20℃、4℃和37℃储存的底物A样品的最大发光。在历时80天的时程中,在同一天测定在这些温度储存的样品。

[0460] 图13显示了该研究的结果。基于37℃加速曲线的外推,估测底物A的实时(4℃)稳定性为14个月。

[0461] 实施例7

[0462] 在Dynabeads M-280珠子上在室温对底物A、B和C的动力学评价

[0463] 使用抗生蛋白链菌素标记的Dynabeads M-280Tosylactivated珠子(结合有生物素标记的碱性磷酸酶),评价了底物A、底物B、底物C、CDP-Star+Emerald-II、竞争对手的闪光底物D和竞争对手的Flow底物E的发光和信噪比的动力学。使20μg抗生蛋白链菌素标记的Dynabeads与0.04ng生物素标记的碱性磷酸酶结合。在室温进行评价。

[0464] 图14显示了该评价的结果。底物B因为具有达到最大发光的快速曲线而突出,并在观察时程内保持恒定信噪比。底物A比底物B更缓慢地达到最大发光,而底物C非常快速地达到最大发光。

[0465] 实施例8

[0466] 底物A、B和C在Dynabeads M-280珠子上在室温的灵敏度曲线

[0467] 使用“在抗生蛋白链菌素包被的M-280Tosylactivated **Dynabeads**<sup>®</sup>中偶联的生物素化的碱性磷酸酶”方案,使用抗生蛋白链菌素标记的Dynabeads M-280Tosylactivated珠子(结合有生物素标记的碱性磷酸酶),评价了底物A、底物B、底物C、CDP-Star+Emerald-II、竞争对手的闪光底物D和竞争对手的辉光底物E的灵敏度。使20μg抗生蛋白链菌素标记的Dynabeads与可变量的生物素标记的碱性磷酸酶结合。在各种底物的最适读出时间和在室温,进行评价。

[0468] 图15显示了该评价的结果。底物A提供了高信号和信噪比。底物B提供了最高信号和高信噪比。底物C灵敏度类似于竞争对手的闪光底物D。底物B的表现类似于或优于评价的二氧杂环丁烷类。

[0469] 如上评价了底物A、底物B、底物C、CDP-Star+Emerald-II、竞争对手的闪光底物D和竞争对手的辉光底物E的灵敏度,其中在2分钟时读出信号。

[0470] 图16显示了该评价的结果。在它们的最佳最适读出时间时,底物B的表现优于或类似于其它底物。

[0471] 实施例9

[0472] 底物A、底物B和CDP-Star在Dynabeads MyOne Carboxylic Acid珠子上在37℃的发光动力学和信噪比

[0473] 使用“肌钙蛋白夹心ELISA,使用**Dynabeads**<sup>®</sup>作为用于捕获抗体的固体支持物”方案,使用Dynabeads MyOne Carboxylic Acid珠子,评价了底物A+Emerald-III、底物B和CDP-Star+Emerald-II的发光和信噪比的动力学。使用16pg/mL cTnI和在37℃,执行该方案。

[0474] 图17显示了该评价的结果。信噪比随时间变化,取决于底物制剂。底物B信噪比在前10分钟内是恒定的。

[0475] 实施例10

[0476] 在最适读出时间和在37℃的免疫测定性能

[0477] 使用“使用**Dynabeads**<sup>®</sup>作为用于捕获抗体的固体支持物的肌钙蛋白夹心ELISA”方案,在37℃,评价了底物A+Emerald-III、底物B和CDP-Star+Emerald-II的性能。

[0478] 图18显示了该评价的结果。底物B提供了最高信号,且由高背景,其在信噪比方面的表现类似于试验的其它底物制剂。

[0479] 实施例11

[0480] 使用底物A在免疫测定中评价珠子和发光促进剂

[0481] 使Dynabeads M-280Tosylactivated、Dynabeads MyOne Carboxylic Acid和Dynabeads M-270Epoxy与 $\alpha$ -人心脏肌钙蛋白I( $\alpha$ -cTnI)单克隆抗体(HyTest Ltd., 4T21, Mab560)偶联。

[0482] 使用“使用**Dynabeads**<sup>®</sup>作为用于捕获抗体的固体支持物的肌钙蛋白夹心ELISA”方案在37℃评价了底物A+Sapphire-III和底物+Emerald-III的测定性能。

[0483] 图19显示了该评价的结果。Dynabeads M-270Epoxy珠子提供了最高测定性能。对于所有试验的珠子类型,Emerald-III发光促进剂提供了较高的信号和稍微较好的灵敏度。S-III表示Sapphire-III,而E-III表示Emerald-III。

[0484] 实施例12

[0485] 肌钙蛋白夹心珠子免疫测定

[0486] 使Dynabeads M-270Epoxy与 $\alpha$ -人心脏肌钙蛋白I( $\alpha$ -cTnI)单克隆抗体(HyTest Ltd., 4T21, Mab560)偶联。使用“使用**Dynabeads**<sup>®</sup>作为用于捕获抗体的固体支持物的肌钙蛋白夹心ELISA”方案在37℃评价了底物A、底物B、底物C、CDP-Star+Emerald-II和Vendor

X的底物D在免疫测定中的性能。

[0487] 图20显示了评价的结果。在2的信噪比,底物A、B或C提供了在人血清中低至0.1ng/孔的人心脏肌钙蛋白I(cTnI)的下限检测,且动态范围为约3log。Vendor X的底物D提供了0.6ng/孔的cTnI的下限检测,且动态范围为约3log。

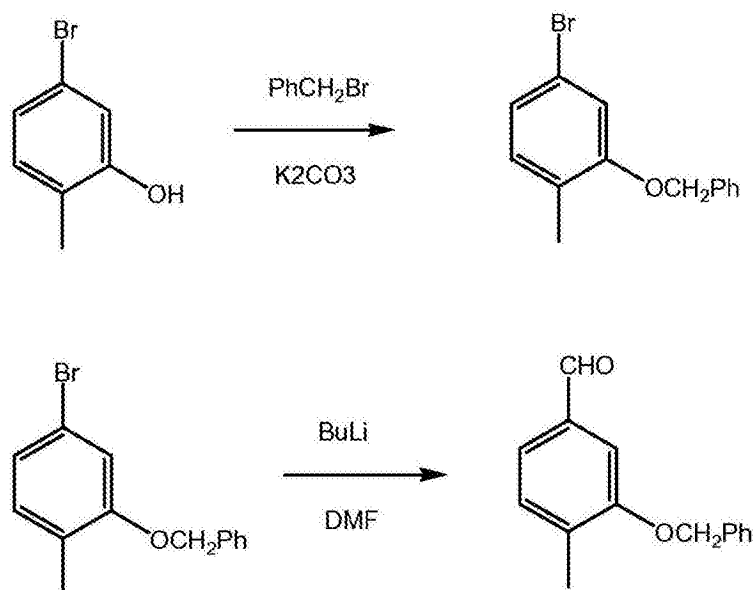


图1

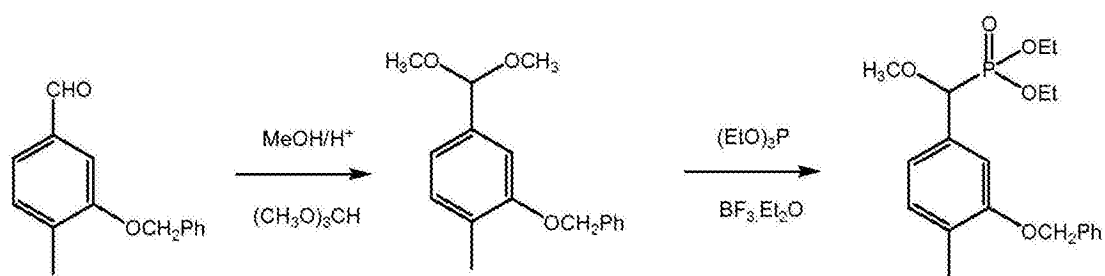


图2

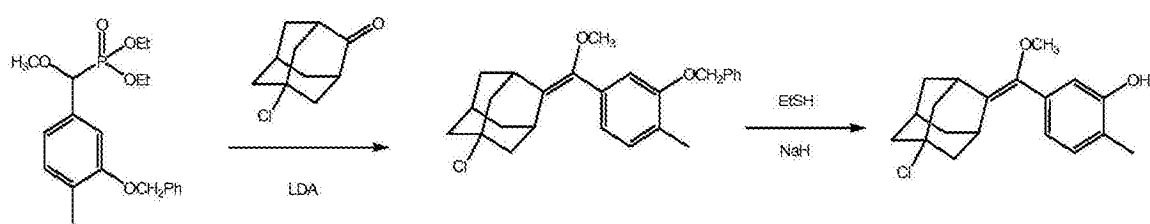


图3

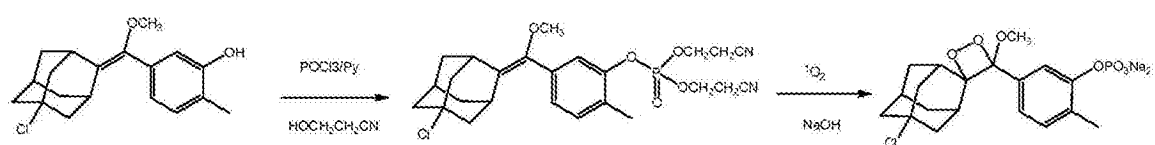
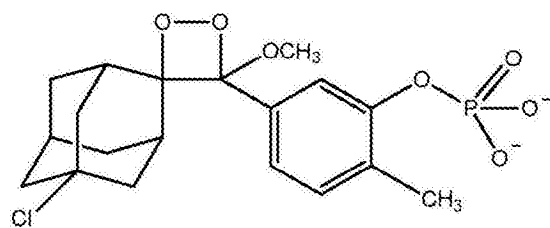
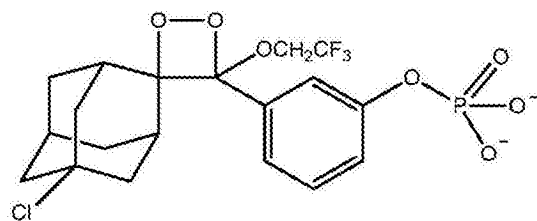


图4

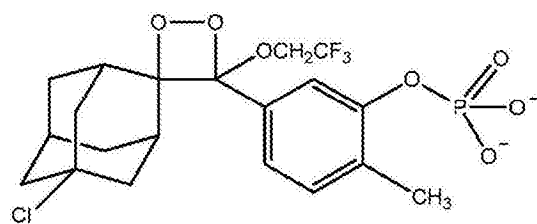




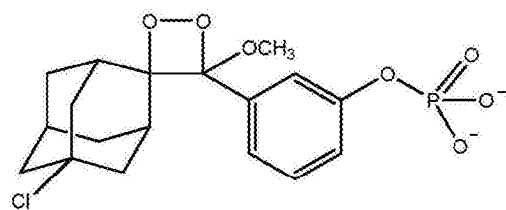
底物 A



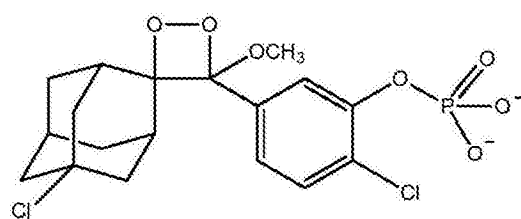
底物 B



底物 C

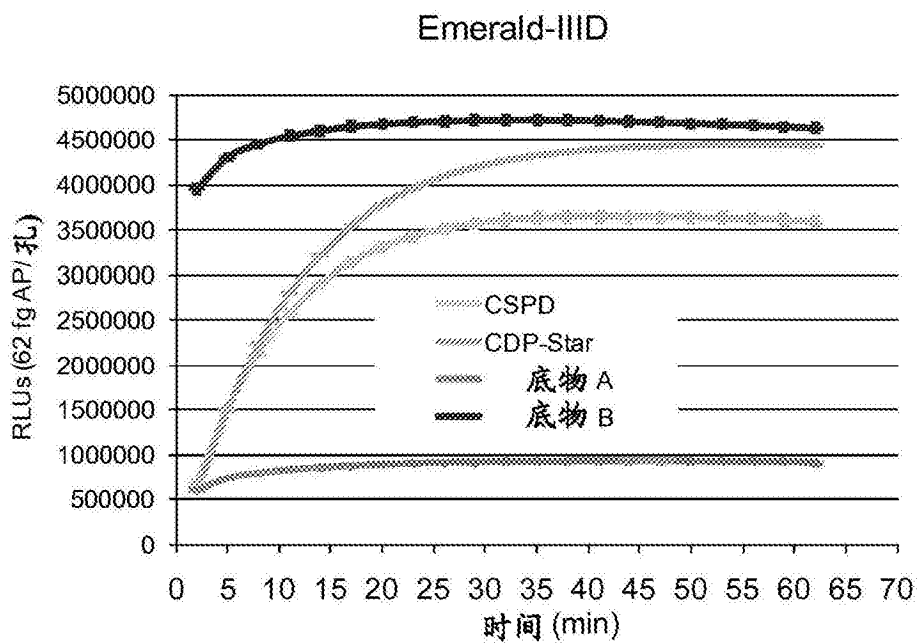


CSPD®



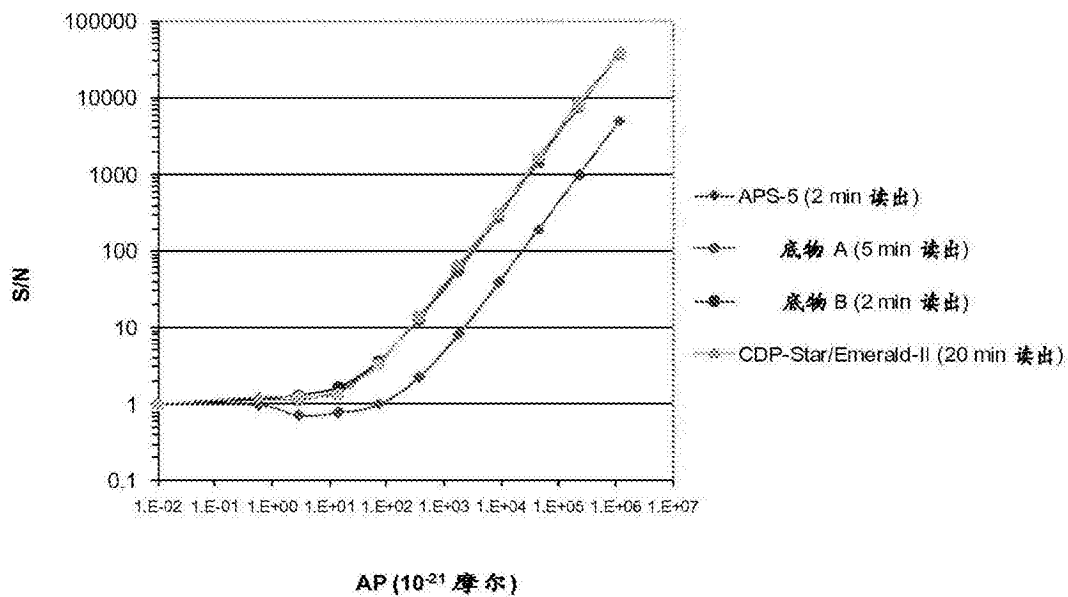
CDP-Star®

图5



| 在 25℃ 达到最大发光 (峰)<br>所需的时间 |           |
|---------------------------|-----------|
| CDP-Star/Emerald-II       | 30-60 min |
| 底物 A                      | 5-10 min  |
| 底物 B                      | 5-10 min  |
| 在 25℃ 达到最大发光以后<br>的信号稳定性  |           |
| 所有底物                      | 小时        |

图6



| CL 检测           | Lumigen's APS-5 (底物 D) | 底物 A     | 底物 B     | CDP-Star/Emerald-II |
|-----------------|------------------------|----------|----------|---------------------|
| 在 S/N=2 时 AP 的量 | 0.36 渺摩尔               | 0.03 渺摩尔 | 0.03 渺摩尔 | 0.03 渺摩尔            |

图7

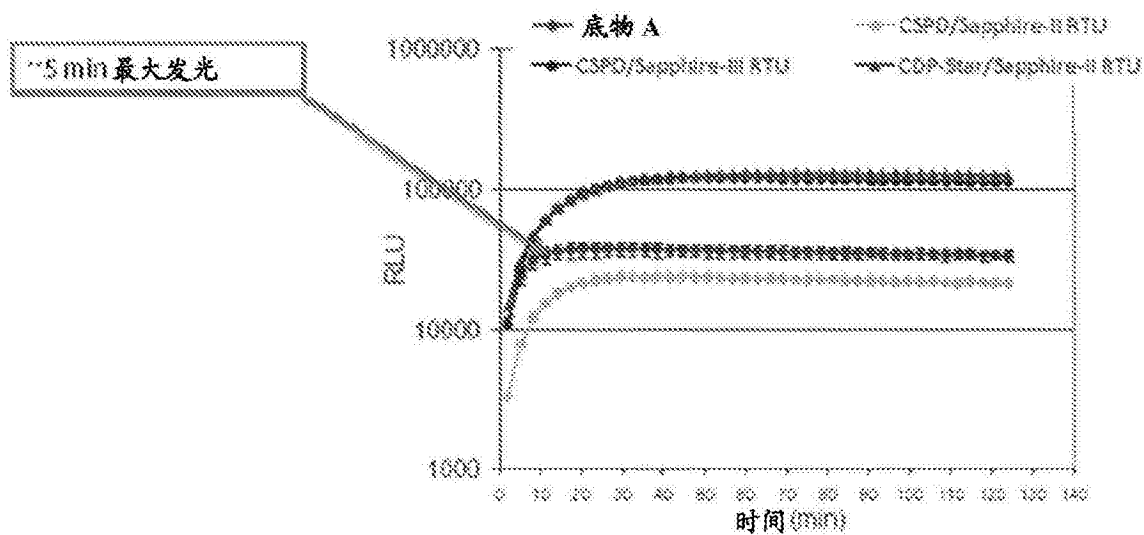
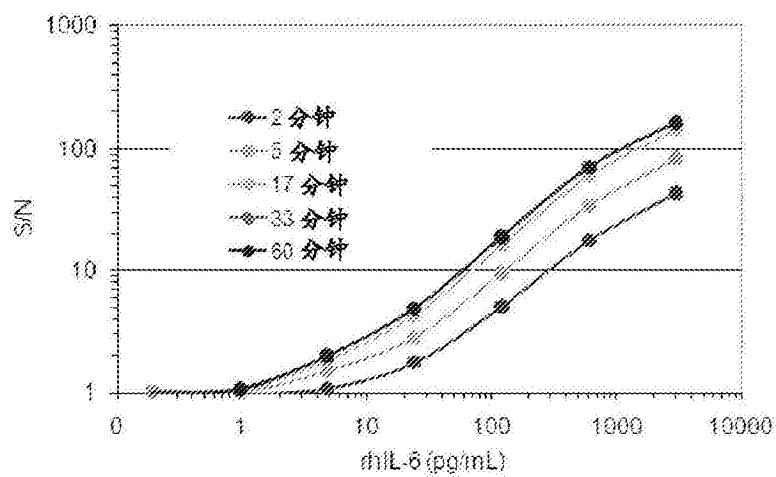


图8

## CDP-Star/Sapphire-II



## 底物 A

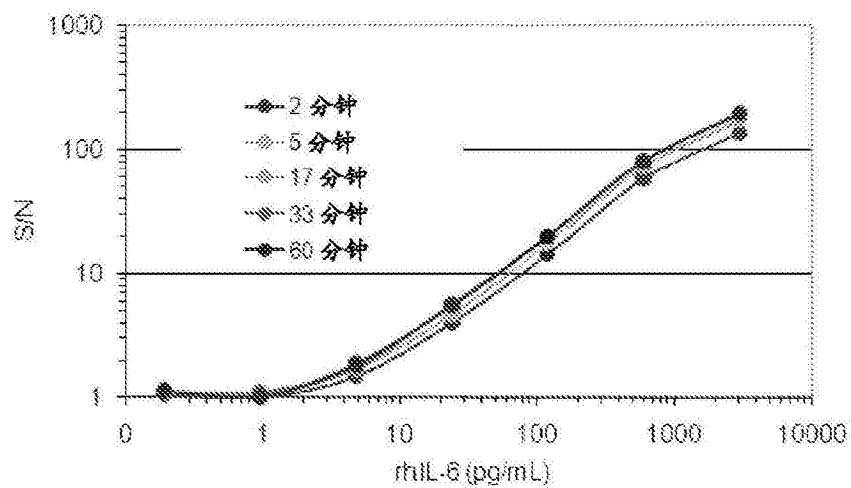
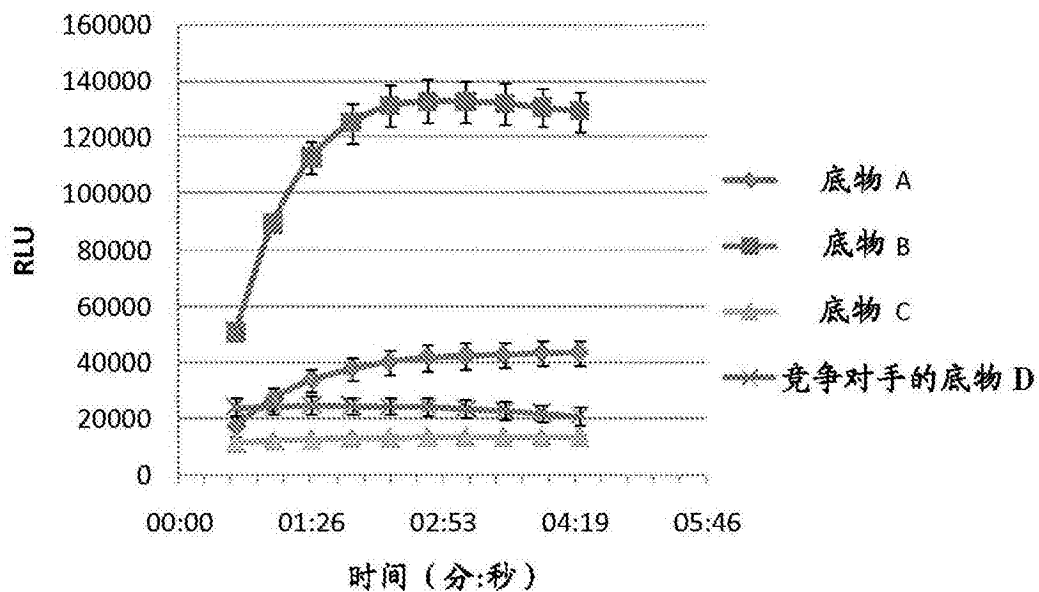


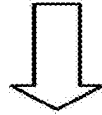
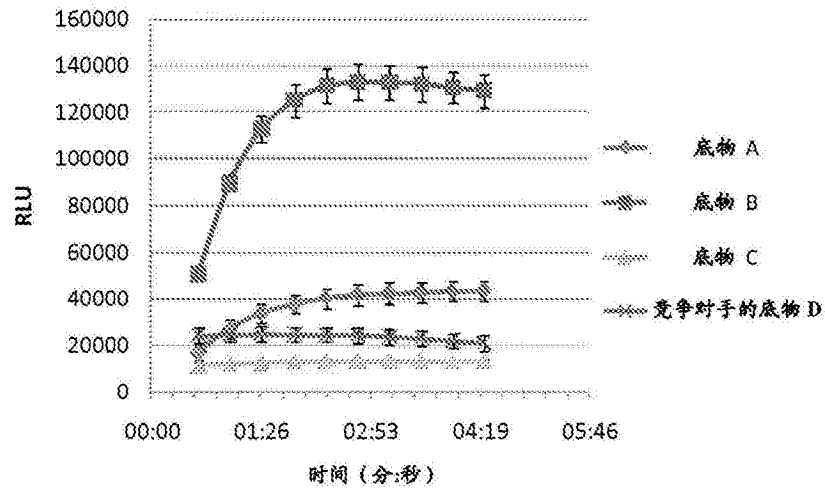
图9



| 在 37℃ 达到最大发光 (峰)<br>所需的时间 |           |
|---------------------------|-----------|
| CDP-Star/Emerald-II       | 15-30 min |
| 底物 A                      | 3 min     |
| 底物 B                      | 2 min     |
| 底物 C                      | 立即        |

图10

## 信号动力学



## 信噪比动力学

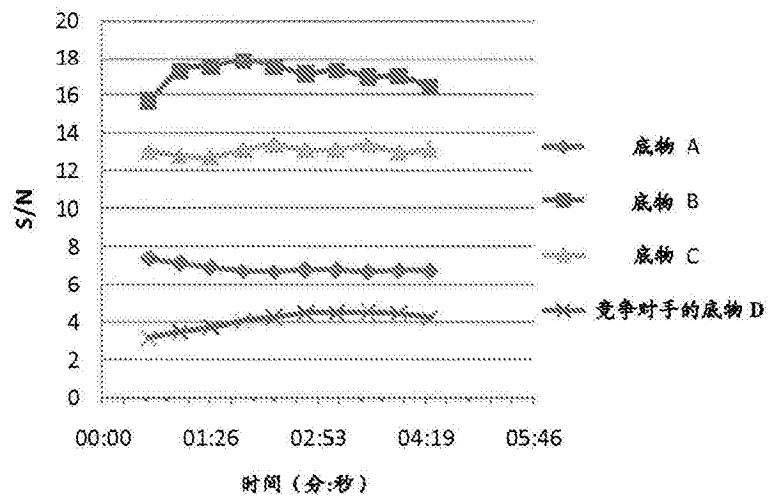
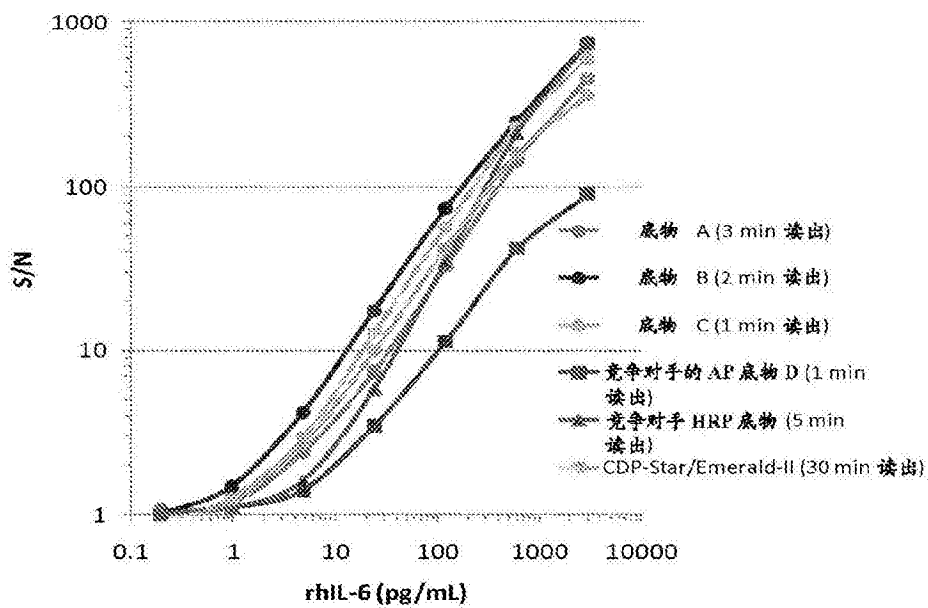
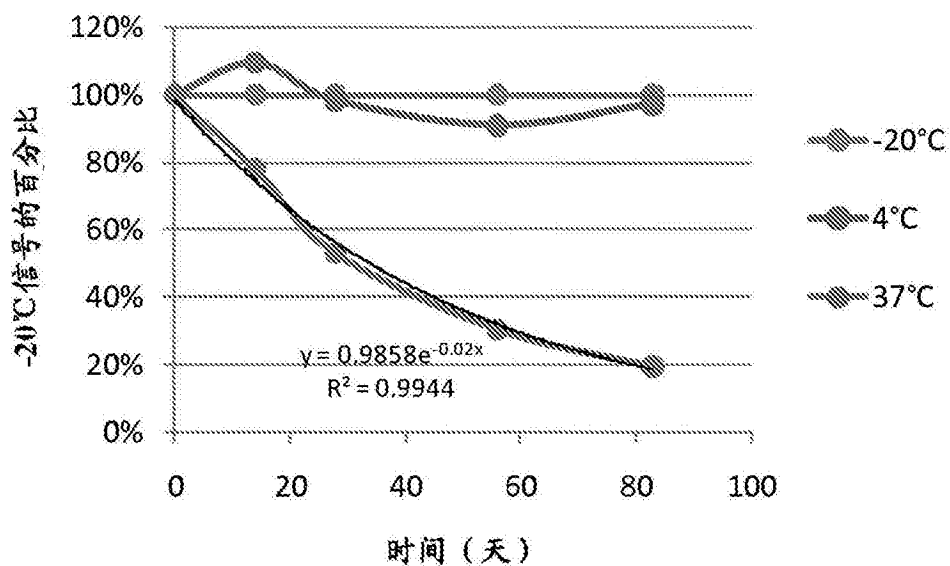


图11



| 等级                | 1         | 2         | 4                   | 3         | 5           | 6           |
|-------------------|-----------|-----------|---------------------|-----------|-------------|-------------|
| 检测系统              | 底物 B      | 底物 A      | CDP-Star/Emerald-II | 底物 C      | 竞争对手 HRP 底物 | 竞争对手的 AP 底物 |
| 在 S/N=2 时的 [IL-6] | 1.6 pg/mL | 2.6 pg/mL | 3 pg/mL             | 3.5 pg/mL | 8 pg/mL     | 12 pg/mL    |

图12



标准:

1. 该图中的数据已经相对于每个时间点的-20°C信号强度标准化。
2. 将稳定性定义为, 信号强度衰减至-20°C对照的 80%所需的时间。

图13



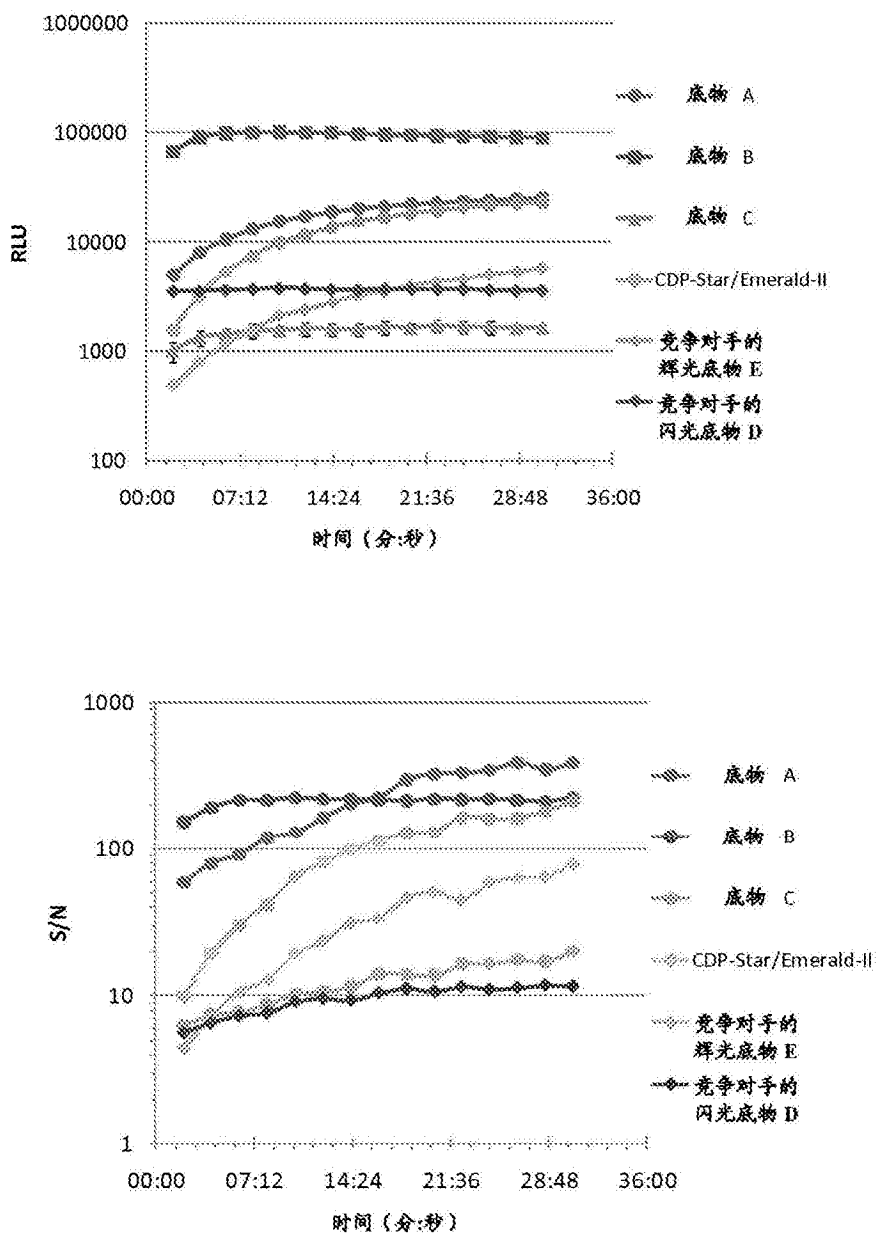


图14

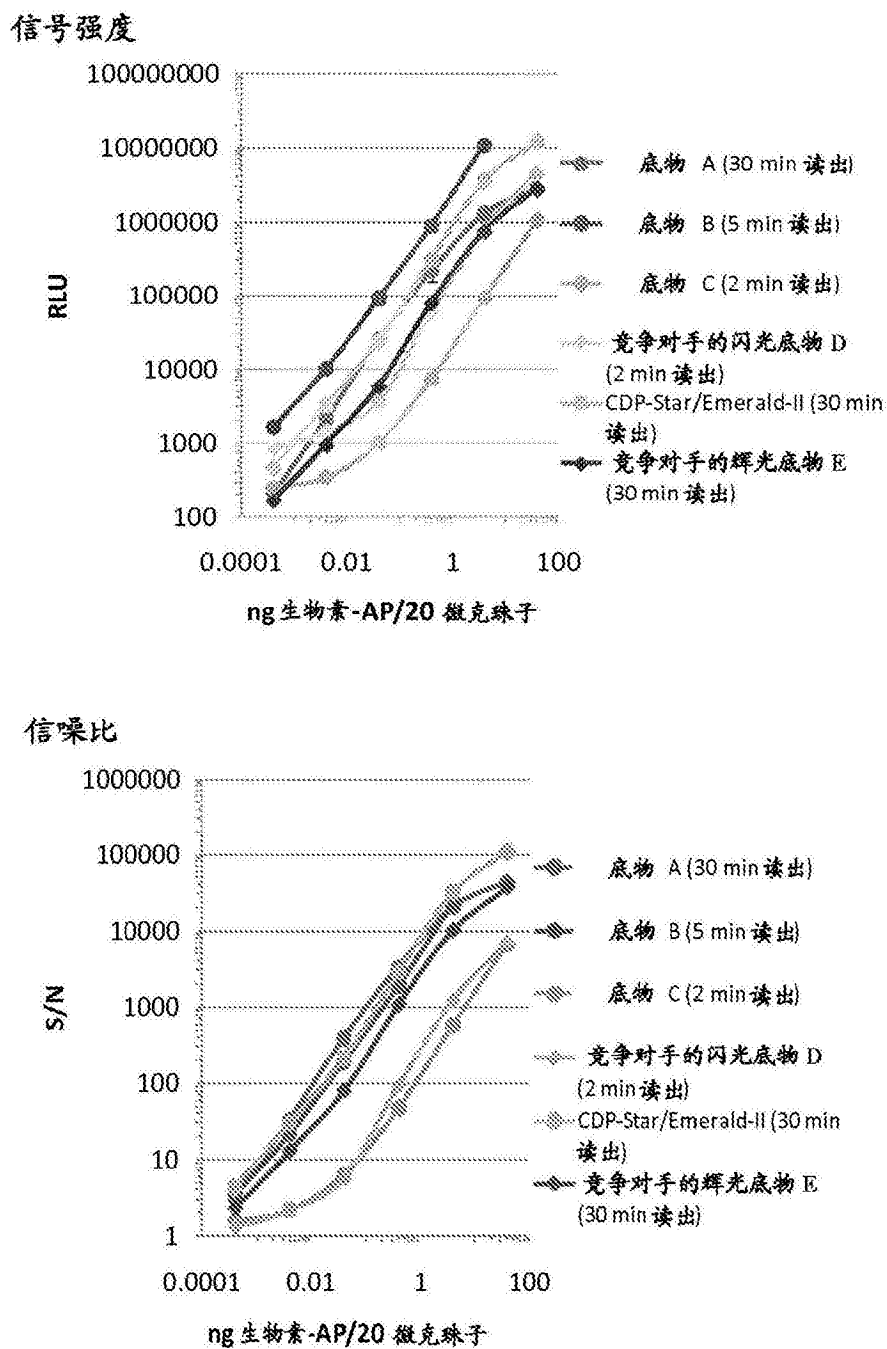


图15

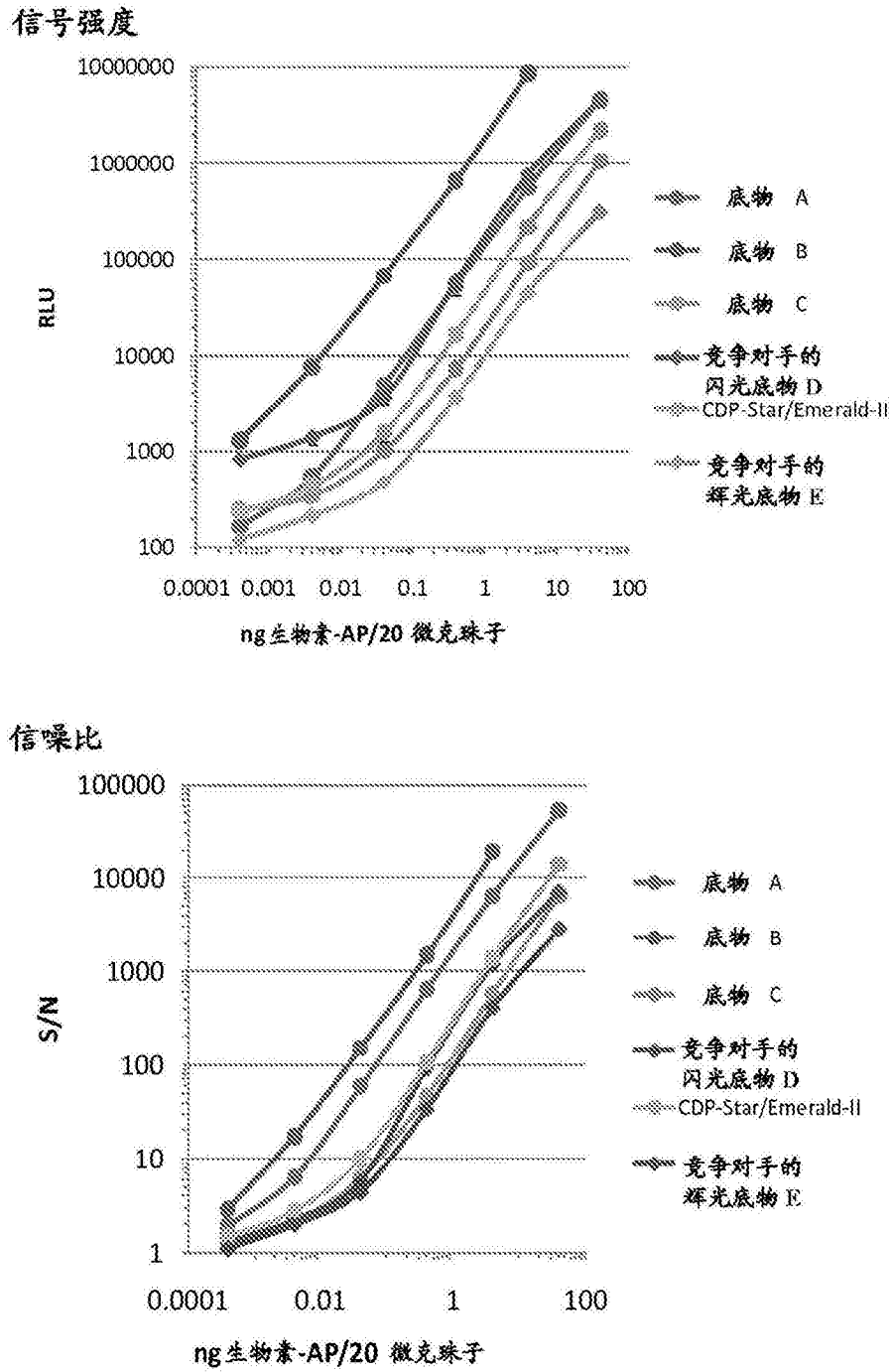


图16

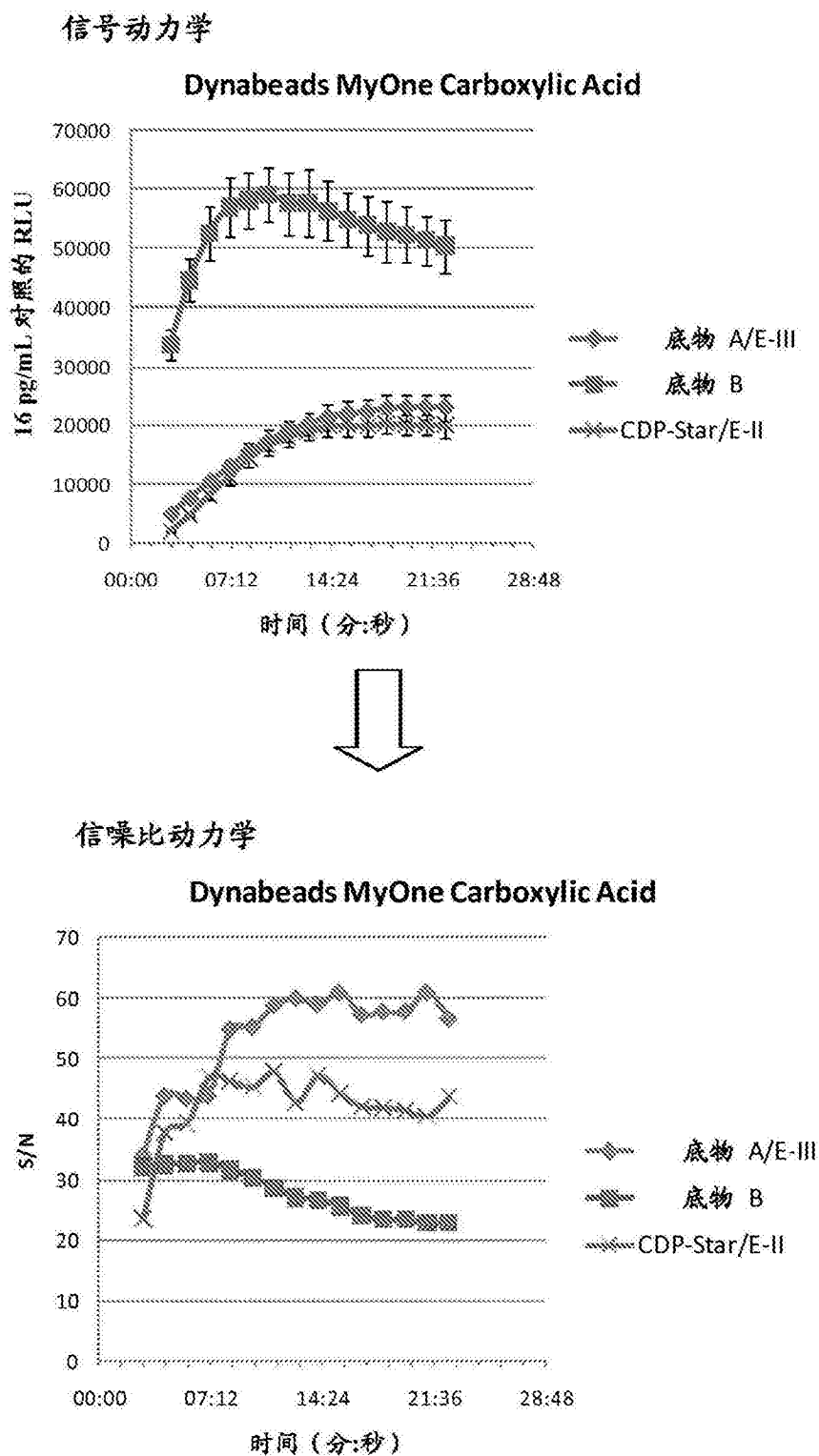
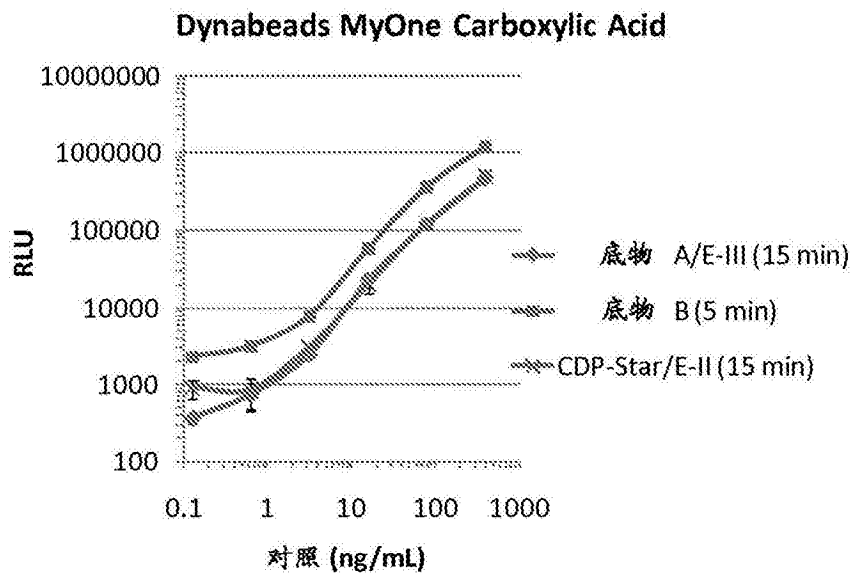


图17

信号强度



信噪比

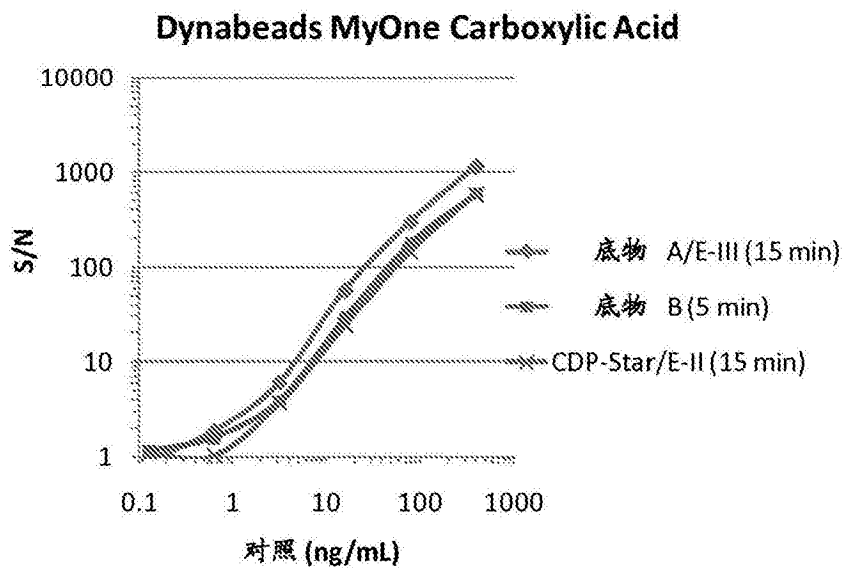


图18

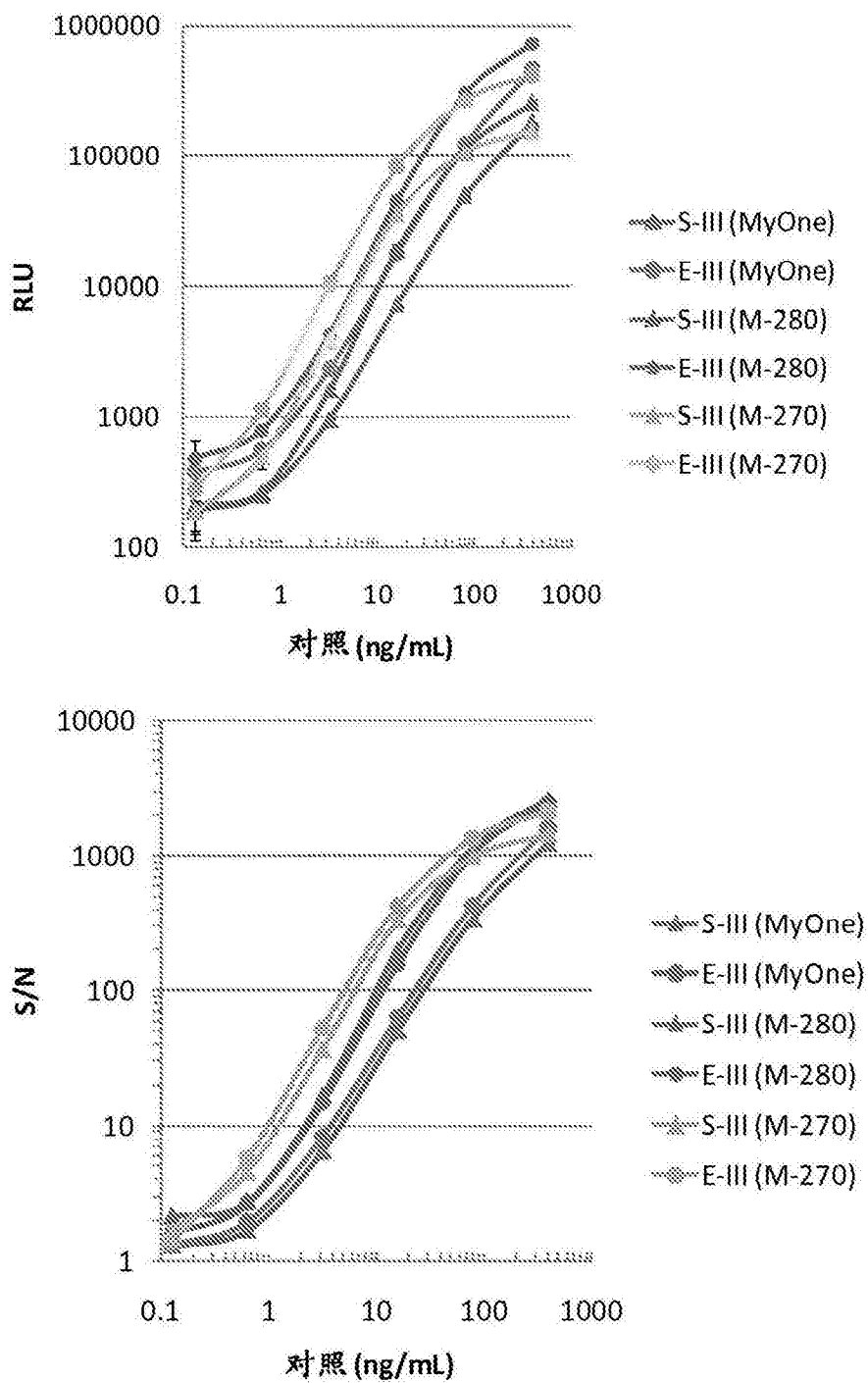


图19

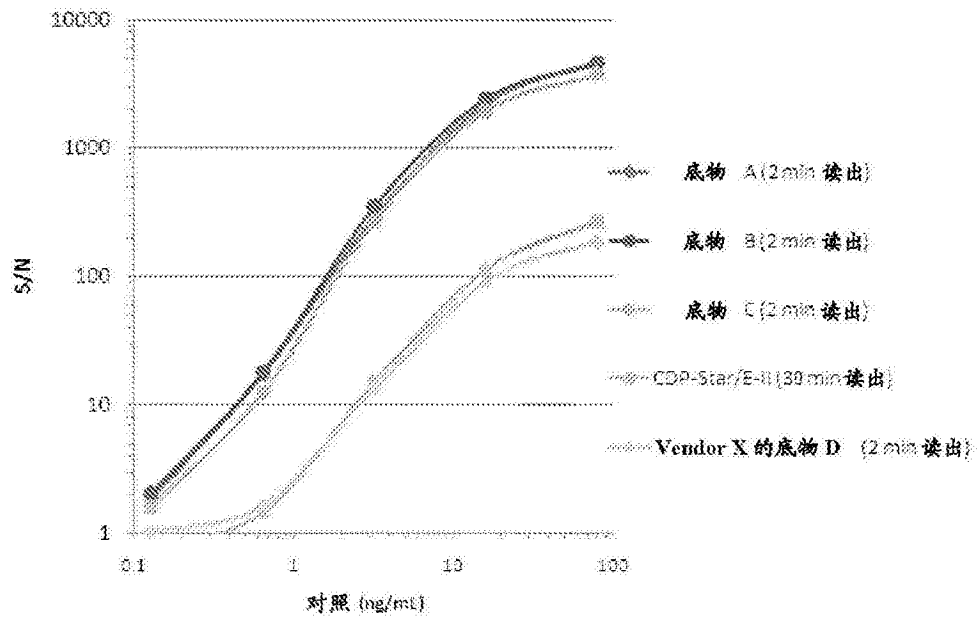


图20