



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108892666 A

(43)申请公布日 2018.11.27

(21)申请号 201810846882.1

(22)申请日 2018.07.27

(71)申请人 中国科学院长春应用化学研究所
地址 130000 吉林省长春市朝阳区人民大街5625号

(72)发明人 潘利华 常宇 王杰 曹雪
陈华鑫 崔恩超

(74)专利代理机构 长春众邦菁华知识产权代理有限公司 22214

代理人 李外

(51)Int.Cl.

G07D 471/22(2006.01)

G09K 11/06(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

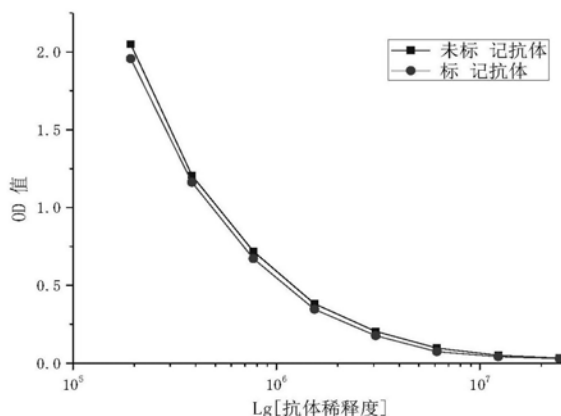
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

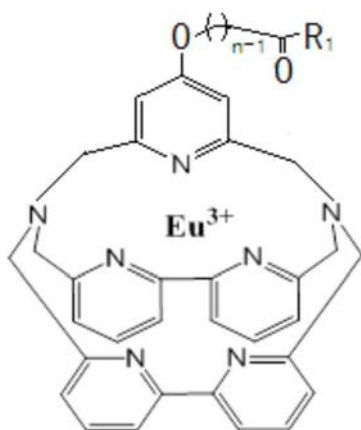
具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂及其制备方法

(57)摘要

本发明提供一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂及其制备方法,属于均相荧光免疫分析技术领域。该螯合剂的结构式如式1所示。所述的结构为吡啶-二(2,2-联吡啶)结构,在吡啶4位上引入单蛋白质连接基团,该结构有利于提高发光效率,减少标记物荧光淬灭;该螯合剂穴状结构具有热稳定性和动力学螯合稳定性。本发明还提供一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的制备方法。本发明的螯合剂激发光谱波长范围为258-356nm,最大激发波长为331nm;镧离子特征的荧光光谱峰593.616nm($^5D_0-^7F_1$, $^5D_0-^7F_2$ 能级跃迁),荧光寿命大于500 μs 。



1. 一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂, 其特征在于, 该螯合剂的结构式如式1所示:



式 1

其中, R_1 选自 OH 、 NH_2 、 $-NH-(CH_2)_{n-1}-NH_2$ 、 $-NH-C(=O)-(CH_2)_{n-1}-C(=O)-OR_2$ 、 $-NH-C_6H_4-R_3$;

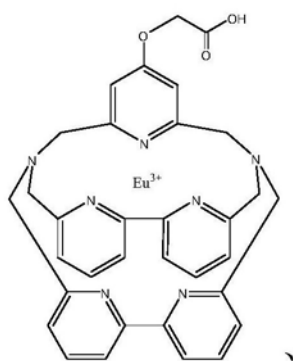
n 选自 1~10 的整数;

R_2 、 R_3 彼此独立地选自 H、取代或未取代的烷基、烷氧基、卤素、取代或未取代的氨基、硝基、取代或未取代的酰胺基、羧基、酯基、取代或未取代的吡咯烷二酮。

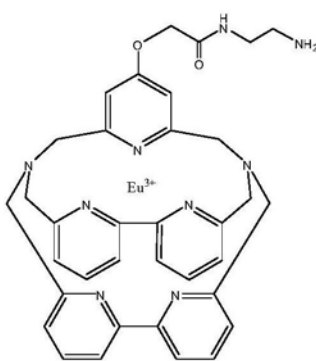
2. 根据权利要求 1 所述的一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂, 其特征在于, n 选自 1~5 的整数。

3. 根据权利要求 1 所述的一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂, 其特征在于, 所述的 R_2 、 R_3 彼此独立地选自 H、甲氧基、氨基、羧基或吡咯烷二酮。

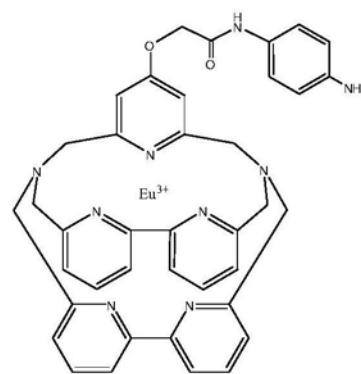
4. 根据权利要求 1-3 任何一项所述的一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂, 其特征在于, 所述的具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂, 该螯合剂的结构式如式 I 至 III 所示:



式 I



式 II



式 III

5. 根据权利要求 1 所述的一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的制备方法, 其特征在于, 该方法包括:

步骤一: 2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨甲基]-吡啶-4-氧

基}乙酸乙酯的合成

将溶剂、 Li_2CO_3 和 $\text{N,N',N,N'}\text{-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺}$ 加入到反应瓶中回流1-3h,然后滴加2-(2,6-二溴甲基吡啶-4-氧基)乙酸乙酯溶液,继续回流30-60h,冷却至室温,过滤、减压浓缩后过硅胶柱层析纯化,得到2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯;

步骤二:2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯- Eu^{3+} 的合成

将步骤一得到的2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯溶液和 EuCl_3 加入到反应瓶中,搅拌回流40-60h,冷却至室温,清洗过滤烘干得到2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯- Eu^{3+} ;

步骤三:螯合剂的合成

将步骤二得到的2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯- Eu^{3+} 在碱性条件下水解,或者加入胺类化合物反应,得到具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂。

6. 根据权利要求5所述的一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的制备方法,其特征在于,所述步骤一中的溶剂为乙腈或四氢呋喃。

7. 根据权利要求5所述的一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的制备方法,其特征在于,所述步骤一中 $\text{N,N',N,N'}\text{-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺}$ 与2-(2,6-二溴甲基吡啶-4-氧基)乙酸乙酯的摩尔比为1:(1~2)。

8. 根据权利要求5所述的一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的制备方法,其特征在于,所述步骤二中的2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯与 EuCl_3 摩尔比为1:(2~10)。

9. 根据权利要求5所述的一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的制备方法,其特征在于,所述的步骤三的碱性水解时间为3~6h。

10. 根据权利要求5所述的一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的制备方法,其特征在于,所述的步骤三的加入胺类化合物,反应温度为-20~0℃,反应时间为3~8h。

具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于均相荧光免疫分析技术领域,具体涉及一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 均相时间分辨免疫分析技术-ELISA的替代技术,无需洗涤、两步操作,具有无可比拟的优势,操作非常简单:空板直接加样,加完即可检测;体系非常稳定:7天之内可随时检测,信号基本不变;数据客观真实:可有效去除背景荧光,假阳性率、假阴性率低。

[0003] 均相时间分辨荧光免疫分析技术结合了荧光共振能量转移(FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer)和时间分辨荧光(TRF, Time Resolved Fluorescence))两种技术。该技术是利用了具有穴状结构的Eu元素的螯合标记物和XL665作为一个供体(Donor),是基于Eu穴状化合物的供体与受体(第二荧光标记物)之间的荧光共振能量转移(FRET)。在荧光共振能量转移中,受体的发射的荧光寿命与供体的发射荧光的寿命相同。因为含Eu供体的荧光衰减时间较长,会诱导XL665受体长时间地发射荧光,这样通过时间分辨就可以区分那些短寿命的自身散射的荧光,这样从短寿命荧光背景中就很容易区分出FRET信号。

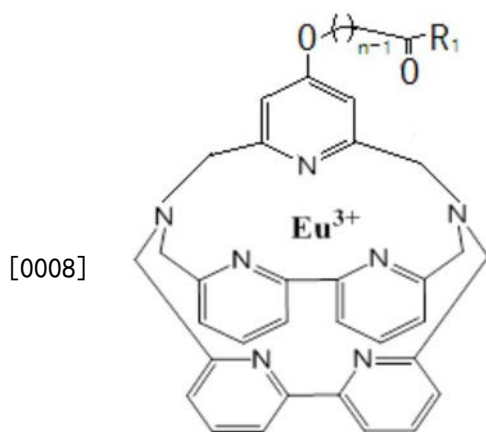
[0004] 均相时间分辨荧光免疫分析技术是基于TR-FRET技术,它使用了镧系离子标记化合物,具有长的荧光寿命,大的Stroke's shift;同时,镧系离子穴状物(Cryptate)与其它螯合物结构(Chelate)相比,显著增加了稳定性。

[0005] 将一个稀土阳离子纳入到立体笼中的穴状结构,可收集光然后将能量转移到核心的镧系离子,大环的性质形成异常稳固的复合体。穴能耐受一些特殊的实验条件如大量存在的阳离子(Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 等)、螯合物(EDTA)、溶剂或者温度。从均相时间分辨荧光免疫分析技术能应用到临床诊断就能看出它也适用于浓度高的血清(50%)。在读板前或者孵育时加入氟离子能增强实验对大量化合物的抗干扰性。穴没有光漂白性,多次读数后信号没有损失,因此能按照需要的次数去读,进行动力学检测。

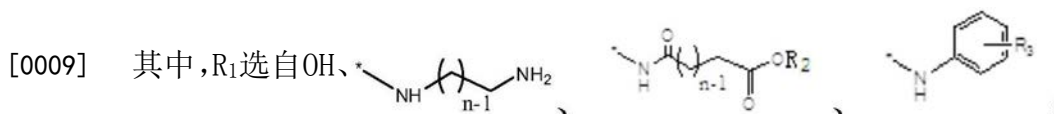
发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂及其制备方法,该螯合剂穴状结构具有热稳定性和动力学螯合稳定性,荧光寿命长。

[0007] 本发明首先提供一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂,该螯合剂的结构式如式1所示:



式 1

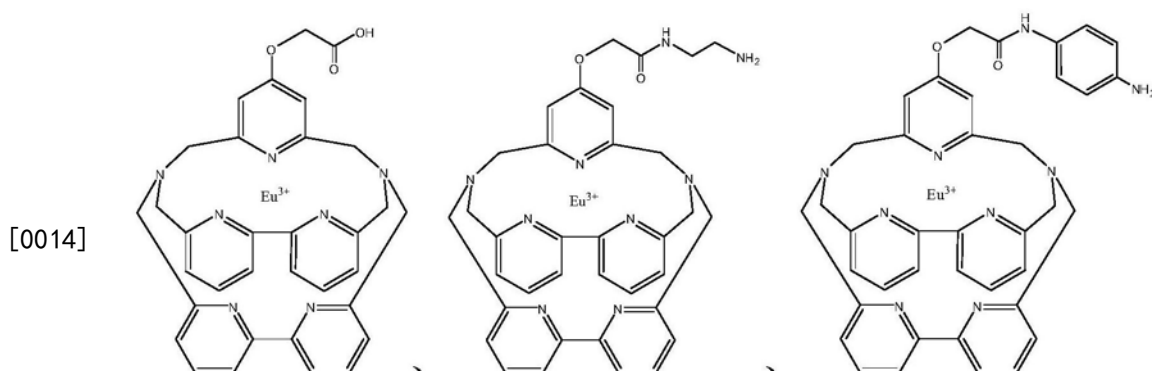


[0010] n 选自 1~10 的整数;

[0011] R_2 、 R_3 彼此独立地选自 H、取代或未取代的烷基、烷氧基、卤素、取代或未取代的氨基、硝基、取代或未取代的酰胺基、羧基、酯基、取代或未取代的吡咯烷二酮。

[0012] 优选的是, 所述的 R_2 、 R_3 彼此独立地选自 H、甲氧基、氨基、羧基或吡咯烷二酮。

[0013] 优选的是, 所述的具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂, 该螯合剂的结构式如式 I 至 III 所示:



式 I

式 II

式 III

[0015] 本发明还提供具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的制备方法, 该方法包括:

[0016] 步骤一: 2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨甲基]-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯的合成

[0017] 将溶剂、 Li_2CO_3 和 $\text{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺}$ 加入到反应瓶中回流 1-3h, 然后滴加 2-(2,6-二溴甲基吡啶-4-氧基)乙酸乙酯溶液, 继续回流 30-60h, 冷却至室温, 过滤、减压浓缩后过硅胶柱层析纯化, 得到 2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨甲基]-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯;

[0018] 步骤二: 2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨甲基]-吡啶

-4-氧基}乙酸乙酯-Eu³⁺的合成

[0019] 将步骤一得到的2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯溶液和EuCl₃加入到反应瓶中,搅拌回流40-60h,冷却至室温,清洗过滤烘干得到2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯-Eu³⁺;

[0020] 步骤三:螯合剂的合成

[0021] 将步骤二得到的2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯-Eu³⁺在碱性条件下水解,或者加入胺类化合物反应,得到具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂。

[0022] 优选的是,所述步骤一中的溶剂为乙腈或四氢呋喃。

[0023] 优选的是,所述步骤一中N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺与2-(2,6-二溴甲基吡啶-4-氧基)乙酸乙酯的摩尔比为1:(1~2)。

[0024] 优选的是,所述步骤二中的2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯与EuCl₃摩尔比为1:(2~10)。

[0025] 优选的是,所述的步骤三的碱性水解时间为3~6h。

[0026] 优选的是,所述的步骤三的加入胺类化合物,反应温度为-20~0℃,反应时间为3~8h。

[0027] 本发明的有益效果

[0028] 本发明提供一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂,该螯合剂的结构如式1所示,所述的吡啶-联吡啶结构有利于更紧密的将稀土离子包裹在穴状体内、水分子不易进入,该结构有利于减少反应体系对荧光的淬灭,从而提高检测系统的灵敏度;在吡啶4位上引入单蛋白质连接基团,有利于提高发光效率及螯合剂内部能量向Eu³⁺离子的转移;该螯合剂穴状结构具有热稳定性和动力学螯合稳定性;实验结果表明:本发明的螯合剂激发光谱波长范围为258-356nm,最大激发波长为331nm;镧离子特征的荧光光谱峰593、616nm (⁵D₀-⁷F₁, ⁵D₀-⁷F₂能级跃迁),斯托克斯位移约为285nm,荧光寿命大于500μs。

[0029] 本发明提供一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的制备方法,该制备方法简单、原料易得,将得到的螯合剂进行活化,与甲胎蛋白(AFP)单克隆抗体进行偶联,结果表明:甲胎蛋白单克隆抗体的标记回收率为90%,标记率为9.8,标记前后免疫活性无明显差异。该发明为时间分辨荧光免疫分析螯合剂提供了新品种,具有广阔的应用前景。

附图说明

[0030] 图1为本发明实施例1制备得到的中间体A3的核磁共振氢谱图;

[0031] 图2为本发明实施例1制备得到的中间体A3的质谱图;

[0032] 图3为本发明实施例1制备得到的具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂A5的质谱图;

[0033] 图4为本发明实施例1制备得到的具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的荧光激发光谱图和发射光谱图;

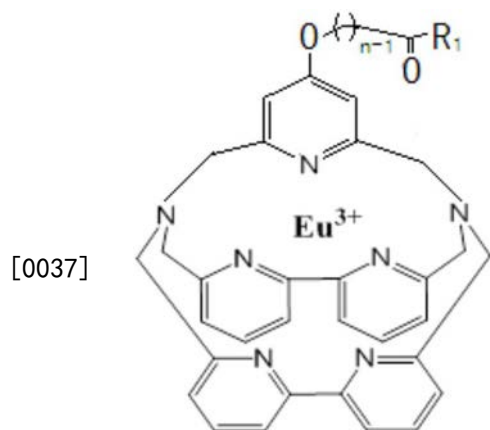
[0034] 图5为本发明实施例1制备得到的具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯

合剂的水溶液的荧光寿命图。

[0035] 图6为本发明实施例7稀土荧光标记物制备过程中标记抗体与未标记抗体 免疫活性的比较图。

具体实施方式

[0036] 本发明首先提供一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂,该 螯合剂的结构式如式1所示:



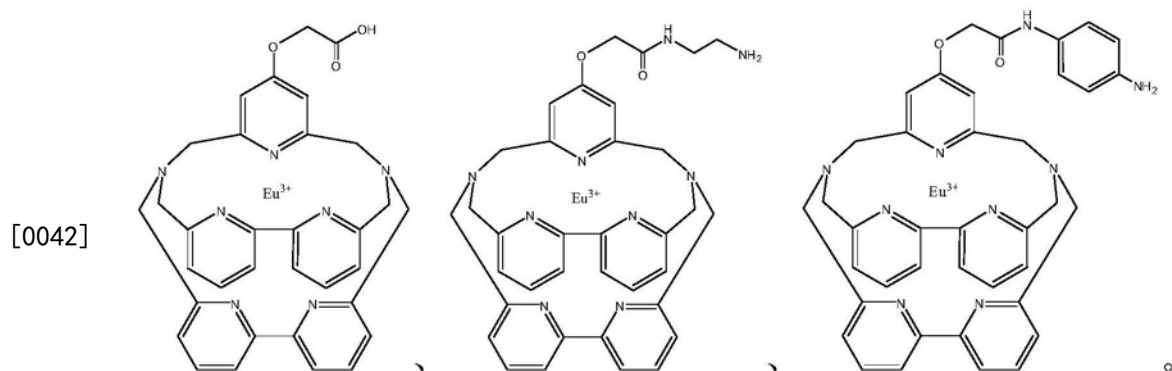
式 1

[0038] 其中, R_1 选自 OH 、 NH_2 、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_{n-1}\text{NH}_2$ 、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_{n-1}\text{C(=O)OR}_2$ 、 $\text{NH}(\text{C}_6\text{H}_4)_{R_3}$;

[0039] n 选自 1~10 的整数, 优选为 2~5 的整数;

[0040] R_2 、 R_3 彼此独立地选自 H、取代或未取代的烷基、烷氧基、卤素、取代或未取代的氨基、硝基、取代或未取代的酰胺基、羧基、酯基、取代或未取代的吡咯烷二酮, 优选选自 H、甲氧基、氨基、羧基或吡咯烷二酮。

[0041] 按照本发明, 所述的具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂, 该 螯合剂的结构式如式 I 至 III 所示:



式 I

式 II

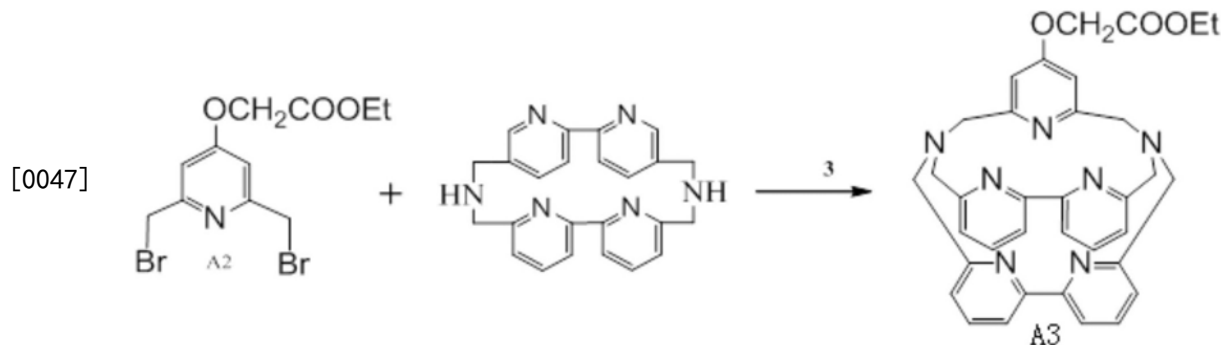
式 III

[0043] 本发明还提供具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的制备方法, 该方法包括:

[0044] 步骤一: 2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯的合成

[0045] 将溶剂、 Li_2CO_3 和 $\text{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺}$ 加入到反应瓶中回流1-3h,然后滴加2-(2,6-二溴甲基吡啶-4-氧基)乙酸乙酯溶液,继续回流30-60h,冷却至室温,过滤、减压浓缩后过硅胶柱层析纯化,得到 2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯;

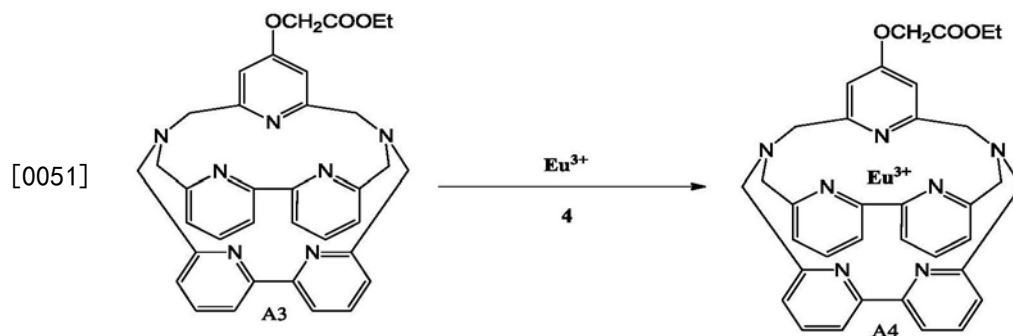
[0046] 所述溶剂优选为乙腈或四氢呋喃, $\text{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺}$ 与2-(2,6-二溴甲基吡啶-4-氧基)乙酸乙酯摩尔比为优选1:(1-2),更优选为1:(1-1.5);所述的滴加时间优选为2-3h;具体反应如下:



[0048] 步骤二: 2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯- Eu^{3+} 的合成

[0049] 将步骤一得到的2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯溶液和 EuCl_3 加入到反应瓶中,搅拌回流40-60h,冷却至室温,经乙醚清洗、过滤干燥得到淡黄色粉末无需纯化,烘干得到 2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯- Eu^{3+} ;

[0050] 按照本发明,所述的2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯溶液是将2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯溶于溶剂中得到的,所述的溶剂优选为甲醇,所述步骤二中的2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯与 EuCl_3 摩尔比为1:(2~10),更优选为1:(2.5~9);具体反应如下:



[0052] 步骤三: 螯合剂的合成

[0053] 将步骤二得到的2-{2,6-[N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨基甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯- Eu^{3+} 在碱性条件下水解,或者加入胺类化合物反应,得到具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂。

[0054] 按照本发明,所述的碱性条件下水解优选为:将2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯-Eu³⁺溶于CH₃OH中,搅拌的状态下加入LiOH水溶液进行水解,所述的水解时间优选为3-6h,所述的 2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯-Eu³⁺的质量(mg):CH₃OH的体积(mL):LiOH水溶液的体积(mL)为25:5:0.2;

[0055] 按照本发明,所述的胺类化合物反应,优选是将2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯-Eu³⁺溶于甲醇中,然后加入胺类化合物进行反应,所述的反应温度优选为-20~0℃,更优选为-15~-10℃,反应时间优选为3~8h,更优选为4~6.5h;将反应产物进行离心、干燥,用HPLC-MS分离纯化。所述的2-{2,6-{N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二氨甲基}-吡啶-4-氧基}乙酸乙酯-Eu³⁺和二胺类化合物的摩尔比优选为1:(1~5),更优选为1:(1~2);所述的胺类化合物优选为乙二胺或对苯二胺。

[0056] 将上述制备得到的螯合剂溶解后用水稀释配成为1.00×10⁻⁵mol/L的溶液,测定其吸收光谱范围和发射荧光光谱、荧光寿命。本发明的螯合剂在紫外光源激发下,发出593nm(⁵D₀-⁷F₁),616nm(⁵D₀-⁷F₂)钕离子特征峰。

[0057] 将上述制备得到的螯合剂用于稀土荧光标记物制备,优选为:

[0058] 将0.1ml 25mg/ml EDC溶液和0.1ml 7.5mg/ml NHS溶液混匀,加入到0.238 ml的0.5mg/ml钕螯合剂溶液中,室温反应24h;加入0.726ml PH7.4 10mM PBS,调节反应的PH为7,加入400μg甲胎蛋白单抗(AFP),间隔混匀数次,4℃反应24h;将该溶液在PH7.4 10mM PBS中进行透析24h,透析后得到稀土荧光标记物Eu³⁺-AFP。

[0059] 结合具体实施例对本发明做进一步详细的说明,实施例中涉及到的原料均为商购。

[0060] 实施例1螯合剂式I的制备

[0061] 将乙腈(118mL)、N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺(0.279mmol)、Li₂CO₃(2.793mmol)加入到500mL反应瓶中,搅拌升温至82℃,回流1h,滴加2-(2,6-二溴甲基吡啶-4-氧基)乙酸乙酯(0.280mmol)的乙腈溶液(108mL),2h滴完,反应48h,冷却至室温,除去反应液中固体,蒸干溶剂,粗产物以柱层析纯化(淋洗剂CH₂Cl₂:CH₃OH=80:20),旋蒸得到A3,产率47.7%;

[0062] 将A3(0.08mmol)甲醇溶液(10mL)加入到50mL三口烧瓶中,再将EuCl₃(0.20mmol)加入到三口瓶,搅拌升温至65℃,回流40h结束反应,冷却反应液至室温,分批加入5mL乙醚,过滤,真空烘干得到淡黄色粉末A4;

[0063] 将A4(25mg,3.32×10⁻⁵mol)溶于5mL CH₃OH中,将溶液加入反应瓶中,搅拌的状态下加入LiOH水溶液0.20mL,此条件下水解3.0h,制备得到A5即螯合剂I。

[0064] 实施例1得到的螯合剂I质谱(C₃₃H₂₉EuN₇O₃):794.09(M+2Cl)⁺;

[0065] 元素分析(C₃₃H₂₉EuN₇O₃, %):C 54.83, H 4.08, N 13.54。

[0066] 图1为本发明实施例1制备得到的中间体A3的核磁共振氢谱图;图2为本发明实施例1制备得到的中间体A3的质谱图;图1和2说明,本发明成功制备得到的中间体A3。

[0067] 图3为本发明实施例1制备得到的具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂A5的质谱图;图3说明,本发明成功制备得到的螯合剂I。

[0068] 实施例2螯合剂式I的制备

[0069] 将乙腈(118mL)、N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺(0.279mmol)、Li₂CO₃(2.793mmol)加入到500mL反应瓶中,搅拌升温至82℃,回流1h,滴加2-(2,6-二溴甲基吡啶-4-氧基)乙酸乙酯的乙腈溶液(0.349mmol, 108mL),2h滴完,反应48h,冷却至室温,除去反应液中固体,蒸干溶剂,粗产物以柱层析纯化(淋洗剂CH₂Cl₂:CH₃OH=80:20)。旋蒸得到A3,产率47.9%。

[0070] 将A3(0.02mmol)甲醇溶液(10mL)加入到50mL三口烧瓶中,再将EuCl₃(0.12mmol)加入到三口瓶,搅拌升温至65℃,回流50h结束反应,冷却反应液至室温,分批加入5mL乙醚,过滤,真空烘干得到淡黄色粉末A4。

[0071] 将A4(25mg, 3.32×10^{-5} mol)溶于5mL CH₃OH中,将溶液加入反应瓶中,搅拌的状态下加入LiOH水溶液0.20mL,此条件下水解3.5h,制备得到螯合剂 I。

[0072] 实施例3螯合剂式I的制备

[0073] 将乙腈(118mL)、N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺(0.279mmol)、Li₂CO₃(2.793mmol)加入到500mL反应瓶中,搅拌升温至82℃,回流2h,滴加2-(2,6-二溴甲基吡啶-4-氧基)乙酸乙酯(0.418mmol)的乙腈溶液(108mL),2h滴完,反应48h,冷却至室温,除去反应液中固体,蒸干溶剂,粗产物以柱层析纯化(淋洗剂CH₂Cl₂:CH₃OH=80:20)。旋蒸得到A3,产率50.8%。

[0074] 将A3(0.02mmol)甲醇溶液(10mL)加入到50mL三口烧瓶中,再将EuCl₃(0.18mmol)加入到三口瓶,搅拌升温至65℃,回流60h结束反应,冷却反应液至室温,分批加入5mL乙醚,过滤,真空烘干得到淡黄色粉末A4。

[0075] 将A4(25mg, 3.32×10^{-5} mol)溶于5mL CH₃OH中,将溶液加入反应瓶中,搅拌的状态下加入LiOH水溶液0.20mL,此条件下水解4.5h,制备得到螯合剂 I。

[0076] 实施例4螯合剂式II的制备

[0077] 将乙腈(118mL)、N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺(0.279mmol)、Li₂CO₃(2.793mmol)加入到500mL反应瓶中,搅拌升温至82℃,回流1h,滴加2-(2,6-二溴甲基吡啶-4-氧基)乙酸乙酯(0.418mmol)的乙腈溶液(108mL),2.5h滴完,反应36h,冷却至室温,除去反应液中固体,蒸干溶剂,粗产物以柱层析纯化(淋洗剂CH₂Cl₂:CH₃OH=80:20)。旋蒸得到A3,产率46.0%。

[0078] 将A3(0.08mmol)甲醇溶液(10mL)加入到50mL三口烧瓶中,再将EuCl₃(0.20mmol)加入到三口瓶,搅拌升温至65℃,回流40h结束反应,冷却反应液至室温,分批加入5mL乙醚,过滤,真空烘干得到淡黄色粉末A4。

[0079] 将0.05mmol的A4溶于甲醇,-10℃下缓慢加入0.05mmol乙二胺,持续搅拌4h,反应完成后,离心,真空干燥,用HPLC-MS分离纯化,得到螯合剂II。

[0080] 实施例4得到的螯合剂II质谱(C₃₅H₃₅EuN₉O₂):836.15(M+2Cl⁻)⁺;

[0081] 元素分析(C₃₅H₃₅EuN₉O₂, %):C 54.84, H 4.63, N 16.50。

[0082] 实施例5螯合剂式III的制备

[0083] 将乙腈(118mL)、N,N',N,N'-[二(2,2'-联吡啶-6,6'-二甲基)]二胺(0.279mmol)、Li₂CO₃(2.793mmol)加入到500mL反应瓶中,搅拌升温至82℃,回流2h,滴加2-(2,6-二溴甲基吡啶-4-氧基)乙酸乙酯的乙腈溶液(0.418mmol; 108mL),2h滴完,反应60h,冷却

至室温,除去反应液中固体,蒸干溶剂,粗产物以柱层析纯化(淋洗剂 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}=80:20$)。旋蒸得到A3,产率49.3%。

[0084] 将A3 (0.08mmol) 甲醇溶液 (10mL) 加入到50mL三口烧瓶中,再将 EuCl_3 (0.24mmol) 加入到三口瓶,搅拌升温至65℃,回流40h结束反应,冷却反应液至室温,分批加入5mL乙醚,过滤,真空烘干得到淡黄色粉末A4。

[0085] 将0.05mmol的A4溶于甲醇,-15℃下缓慢加入0.10mmol对苯二胺,持续搅拌6.5h,反应完成后,离心,真空干燥,用HPLC-MS分离纯化,得到螯合物 III。

[0086] 实施例5得到的螯合剂III质谱($\text{C}_{39}\text{H}_{35}\text{EuN}_9\text{O}_2$):884.15 ($\text{M}+2\text{Cl}^-$)⁺;

[0087] 元素分析($\text{C}_{39}\text{H}_{35}\text{EuN}_9\text{O}_2$, %):C 57.61, H 4.33, N 15.46。

[0088] 实施例6

[0089] 取实施例1制备得到的螯合剂I,溶解后用二次蒸馏水稀释配成为 1.00×10^{-5} mol/L的溶液,所测荧光光谱的激发峰范围为258nm-356nm,最大激发波长为331nm,其荧光光谱中出现了三个特征峰, $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$ (581nm)、 $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ (594nm)、 $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ (616nm),最强的发射峰为616nm。

[0090] 图4为本发明实施例1制备得到的具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的荧光激发光谱图(a图)和发射光谱图(b图);由图4可知,A5荧光光谱的激发峰范围为258nm-356nm,最大激发波长为331nm,其荧光光谱的三个特征峰,581nm($^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$)、594nm($^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$)、616nm($^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$),最强的发射峰为616nm。

[0091] 图5为本发明实施例1制备得到的螯合剂水溶液的荧光寿命图,螯合剂水溶液的荧光寿命为512μs。

[0092] 实施例7稀土荧光标记物制备

[0093] 将0.1ml (25mg/ml) EDC溶液和0.1ml (7.5mg/ml) NHS溶液混匀,加入到实施例1制备得到的0.238ml (0.5mg/ml) 螯合剂溶液中,搅拌室温反应24h;加入0.726ml PH7.4 (10mM) PBS,加入400μg甲胎蛋白单克隆抗体(AFP),4℃反应24h后在PH 7.4 (10mM) PBS中进行透析24h,透析后得到 Eu^{3+} -AFP稀土荧光标记物。标记过程和条件研究所获得的结果:甲胎蛋白单克隆抗体的标记回收率为90%,标记率为9.8,标记前后免疫活性无明显差异。具体数据如表1和表2所示。

[0094] 1、对标记物进行稀释,用337.1光激发,测定620nm处荧光强度如表1。

[0095] 表1标记抗体的荧光强度

[0096]				
	稀释度	浓度	荧光强度 (620nm)	
	稀释液 1	10	56μg/ml	1008063
	稀释液 2	100	5.6μg/ml	100767
	稀释液 3	1000	0.56μg/ml	10091

[0097] 2、测定标记前后甲胎蛋白抗体的浓度如表2所示:

[0098] 表2标记前后抗体的量

	标记前	标记后
[0099]	抗体质量 400μg	361μg
	抗体体积 160μl	1338μl
	抗体浓度 2.5mg/ml	0.27mg/ml

[0100] 图6为实施例7稀土荧光标记物制备过程中标记抗体与未标记抗体免疫活性的比较图,图6说明:抗体标记前后的免疫活性无明显差异。

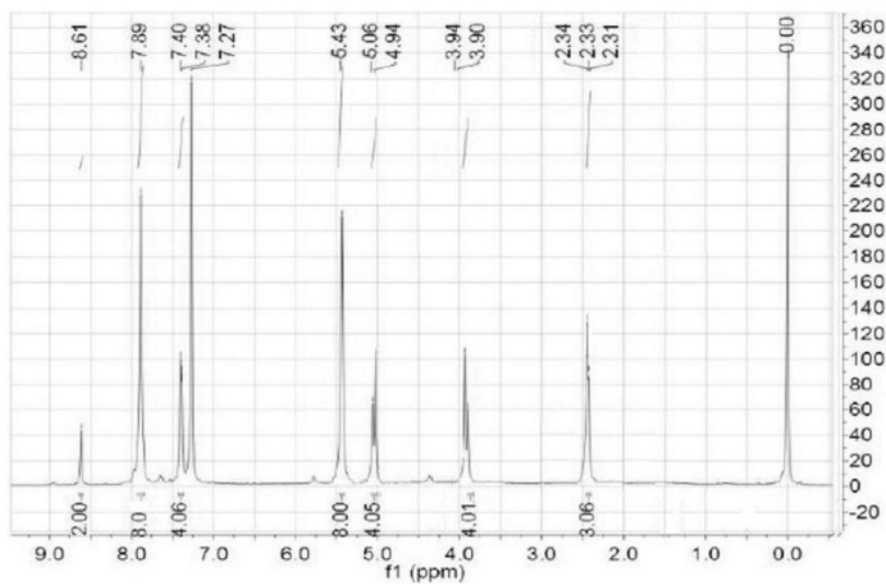


图1

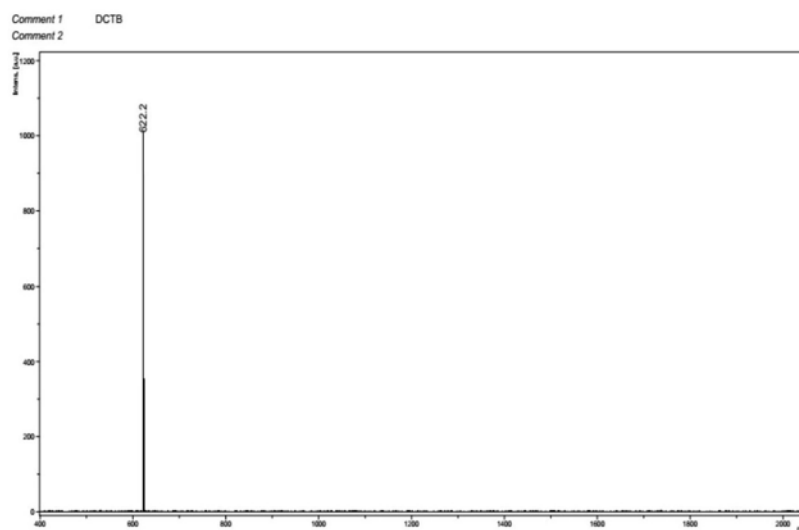


图2

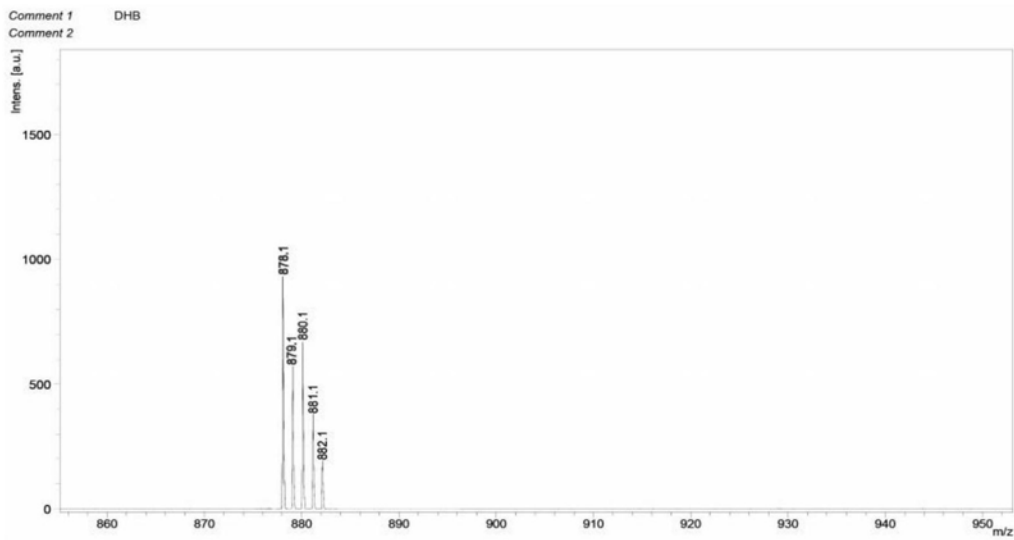


图3

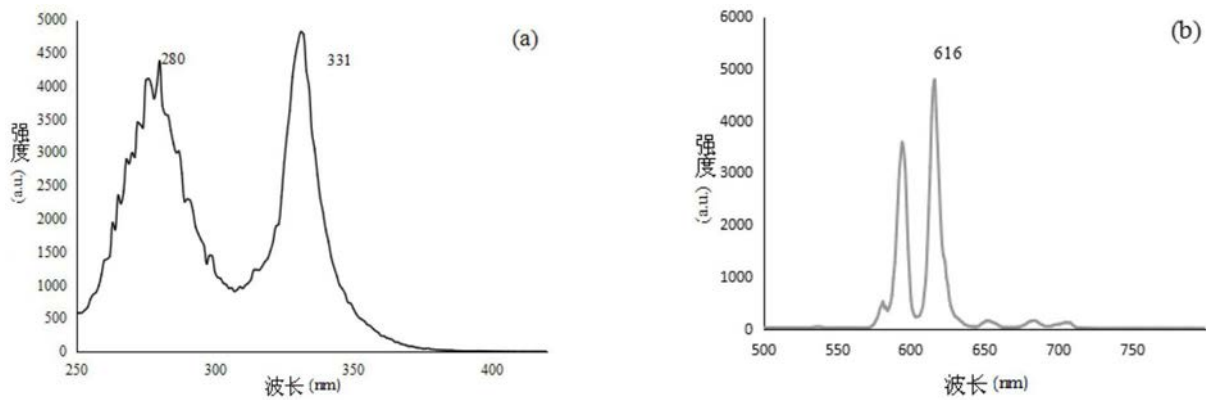


图4

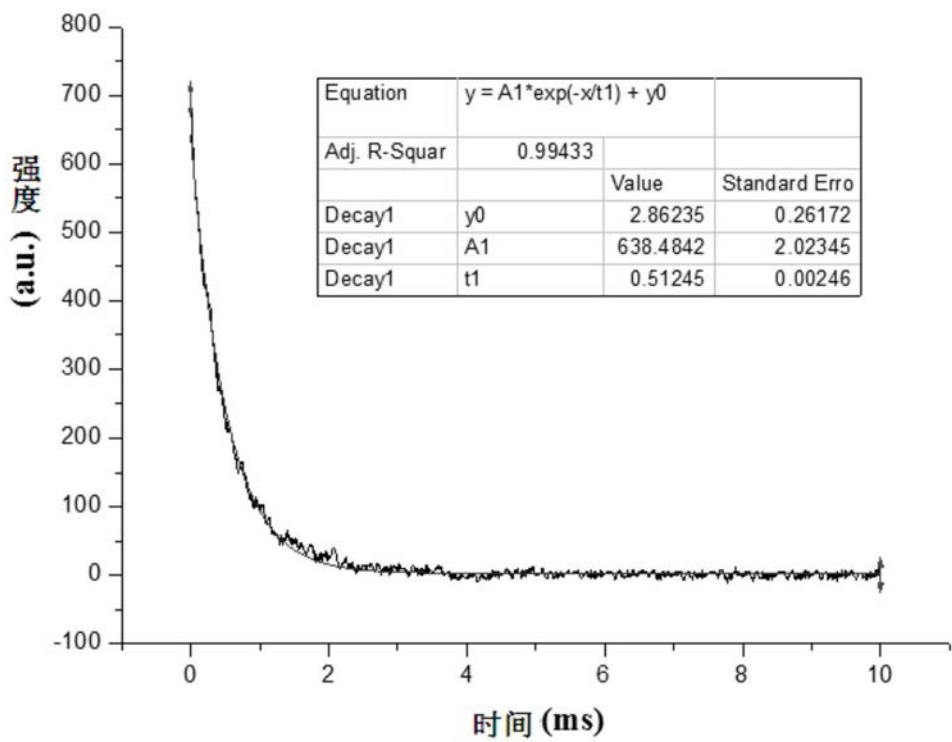


图5

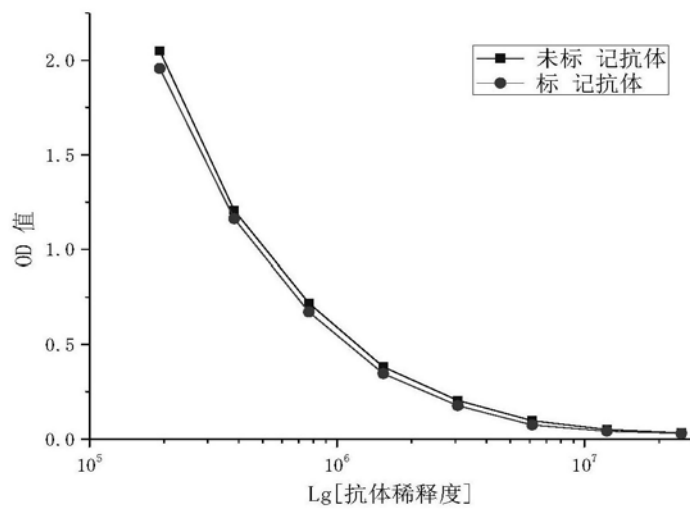


图6

专利名称(译)	具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂及其制备方法		
公开(公告)号	CN108892666A	公开(公告)日	2018-11-27
申请号	CN201810846882.1	申请日	2018-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院长春应用化学研究所		
[标]发明人	潘利华 常宇 王杰 曹雪 陈华鑫 崔恩超		
发明人	潘利华 常宇 王杰 曹雪 陈华鑫 崔恩超		
IPC分类号	C07D471/22 C09K11/06 G01N33/53		
CPC分类号	C07D471/22 C09K11/06 C09K2211/1029 C09K2211/1074 G01N33/53		
代理人(译)	李外		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂及其制备方法,属于均相荧光免疫分析技术领域。该螯合剂的结构式如式1所示。所述的结构为吡啶-二(2,2-联吡啶)结构,在吡啶4位上引入单蛋白质连接基团,该结构有利于提高发光效率,减少标记物荧光淬灭;该螯合剂穴状结构具有热稳定性和动力学螯合稳定性。本发明还提供一种具有吡啶-联吡啶穴状结构的荧光免疫分析螯合剂的制备方法。本发明的螯合剂激发光谱波长范围为258-356nm,最大激发波长为331nm;镧离子特征的荧光光谱峰593、616nm(5D0-7F1,5D0-7F2能级跃迁),荧光寿命大于500μs。

