



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102219791 A

(43) 申请公布日 2011. 10. 19

(21) 申请号 201110087655. 3

G01N 33/533 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 04. 08

G01N 33/535 (2006. 01)

(71) 申请人 天津希恩思生化科技有限公司

地址 300384 天津市西青区滨海高新技术产业
业开发区华苑科技园华天道 2 号 2039
室

(72) 发明人 何华瑞

(74) 专利代理机构 天津盛理知识产权代理有限
公司 12209

代理人 王来佳

(51) Int. Cl.

C07D 495/04 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

G01N 21/80 (2006. 01)

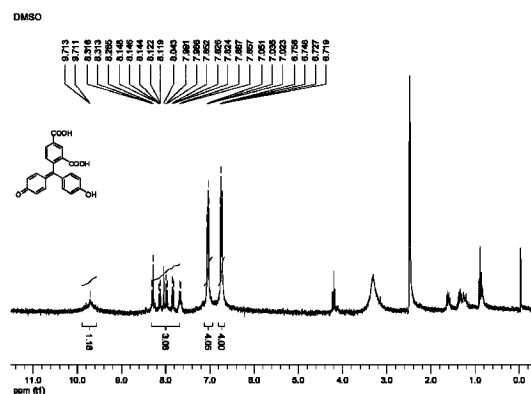
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 8 页

(54) 发明名称

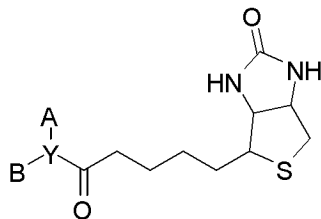
用于生物大分子标记的带色生物素及其在制备生物大分子标记试剂中的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种用于生物大分子标记的带色生物素及其制备方法,本指示剂可用于微量抗原、抗体定性、酶免疫测定、荧光免疫测定、定量检测及定位观察研究的新技术,如进行肿瘤显像诊断和靶向治疗等。本带色生物素在同大分子活性物质偶联后,偶联物在生理条件下不显色,因而不会对在正常条件下生物素与亲和素的应用有干扰。当调节 pH 到一定数值后可显紫红色,其吸光度与生物素的含量有关,因而可从其吸光度计算出每分子活性物质所含生物素的摩尔数。本带色生物素偶联物在与亲和素特异结合后也有类似功能,因此实现了在肉眼下进行示踪分析过程,大大提高了效率、灵敏度和重现性,填补了国际技术空白。

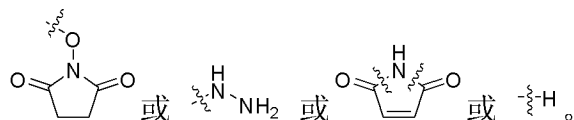


1. 一种用于生物大分子标记的带色生物素,其特征在于:结构式如下:

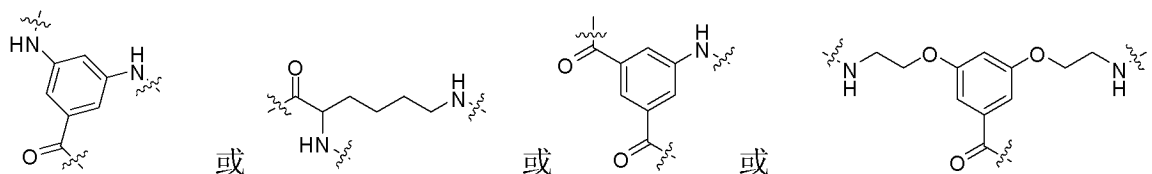


其中,Y 为具有至少三个连接功能基团的功能基,三个连接功能基团分别与 A、B 及生物素连接,B 代表三苯甲烷类指示剂,A 代表能用于大分子标记的活性功能团。

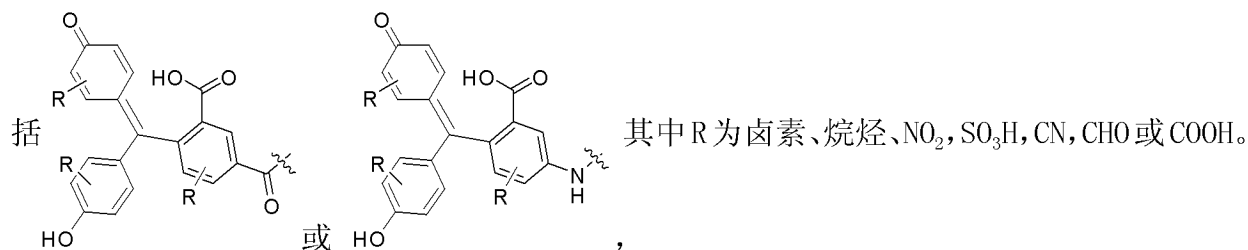
2. 根据权利要求 1 所述的用于生物大分子标记的带色生物素,其特征在于:所述 A 为



3. 根据权利要求 1 所述的用于生物大分子标记的带色生物素,其特征在于:所述 Y 为



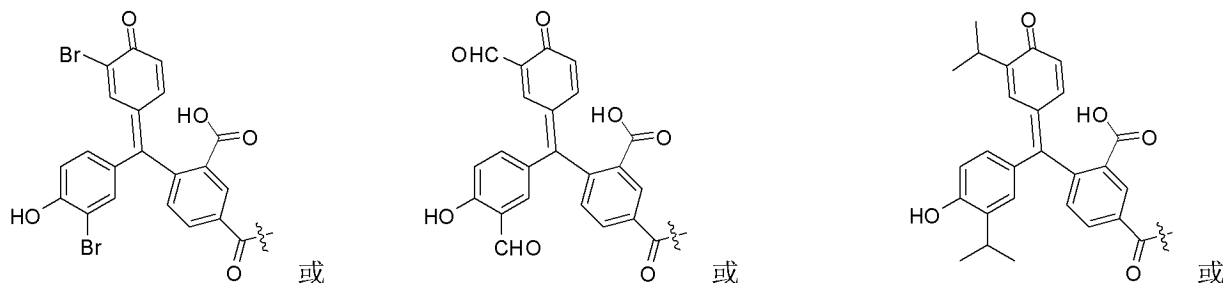
4. 根据权利要求 1 所述的用于生物大分子标记的带色生物素,其特征在于:所述 B 包

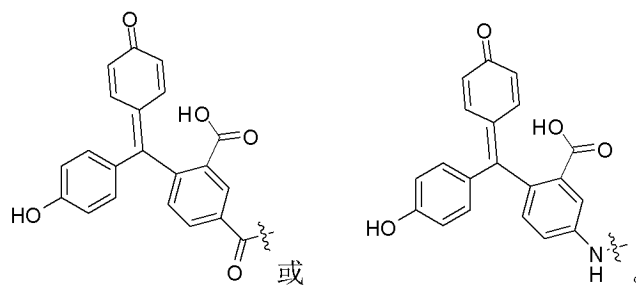


5. 根据权利要求 4 所述的用于生物大分子标记的带色生物素,其特征在于:所述 B 包括 R 为 CH₃。

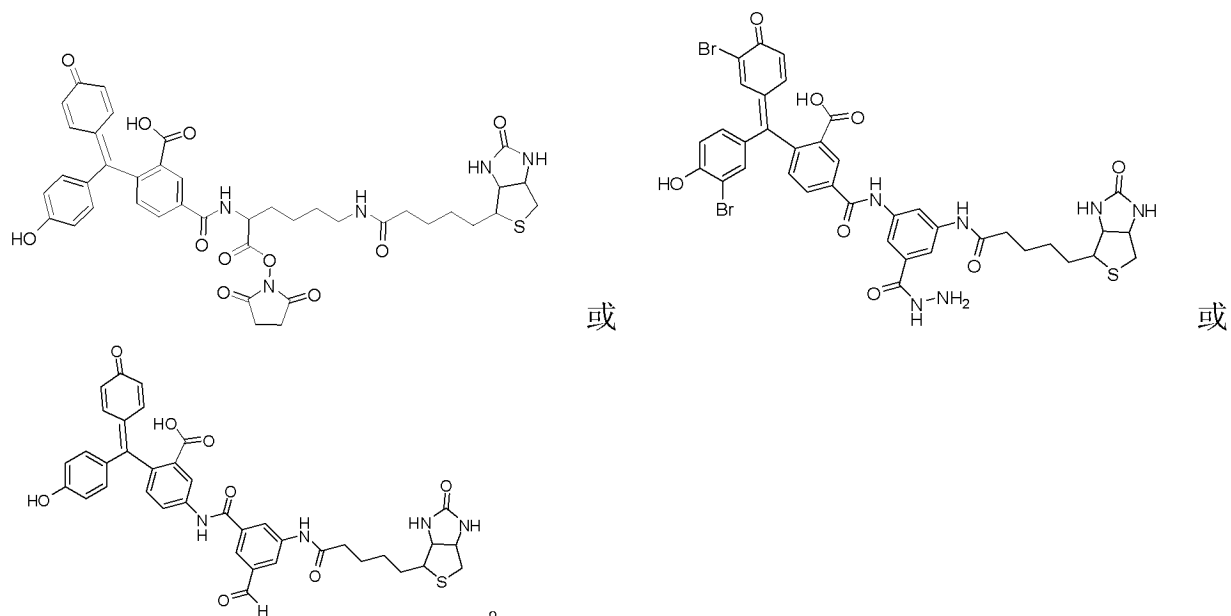
6. 根据权利要求 4 所述的用于生物大分子标记的带色生物素,其特征在于:所述 B 包括 R 为 Br 或 Cl。

7. 根据权利要求 4 所述的用于生物大分子标记的带色生物素,其特征在于:所述 B 为





8. 根据权利要求1所述的用于生物大分子标记的带色生物素,其特征在于:所述带色生物素的结构式为



9. 权利要求1至8任一所述的用于生物大分子标记的带色生物素在制备生物大分子标记试剂中的应用。

用于生物大分子标记的带色生物素及其在制备生物大分子 标记试剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物素指示剂,尤其是一种用于生物大分子标记的带色生物素及其在制备生物大分子标记试剂中的应用,本指示剂可用于微量抗原、抗体定性、酶免疫测定、荧光免疫测定、定量检测及定位观察研究的新技术,如进行肿瘤显像诊断和靶向治疗等。

背景技术

[0002] 生物素是动、植物体内广泛分布的一种小分子生长因子,生物素-亲和素系统(Biotin-Avidin System, BAS) 是迄今为止最强的非共价结合系统,在生物医学技术中得到了广泛的应用,几乎可与目前研究成功的各种标记物体系结合。该系统既可用于偶联抗体等一系列大分子活性物质,又可用于酶等多种材料的标记,具有高灵敏度、高特异性、高稳定性的特点。生物素-亲和素与标记试剂高亲和力的牢固结合及多级放大效应,使 BAS 免疫标记和有关示踪分析更加灵敏。它已成为目前广泛用于活性蛋白质提取、抗原抗体定性、酶联免疫测定、荧光免疫测定、定量检测及定位观察研究的新技术,如进行肿瘤显像诊断和靶向治疗,但由于生物素分子本身无特征吸收峰因此不利于示踪检测和观察。

[0003] 传统的对羟基苯基偶氮苯甲酸(4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid, HABA) 方法是先将 HABA 与亲和素混合, HABA 与亲和素形成一个弱结合,结合后的络合物在 500nm 处有一最大吸收峰,然后将需要定量的生物素标记物加入到 HABA 与亲和素的混合液中,生物素与 HABA 同亲和素竞争结合, HABA 被生物素所取代从而降低了 500nm 处的吸光度。因为生物素与 HABA 的竞争效应对吸光度的影响差异比较小,因此该方法灵敏度很低,测定准确度不够而且会消耗底物。HABA 法目前只适合用于浓度较大的蛋白质分子,

[0004] 现有报道的 SureLINK 生物素法突破了传统的 HABA 方法的限制,可在 354nm 波长下检测吸收度,但仍需紫外分光光度计辅助而且灵敏度相对较低。

[0005] 目前国际上尚无可通过肉眼进行示踪分析大分子标记过程的指示剂。国内使用的大多是进口同类产品,但进口产品只能在紫外下测定标记过程,而且价格昂贵。

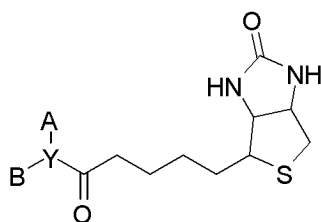
发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术的不足之处,提供一种效率高、灵敏度及重现性好的用于生物大分子标记的带色生物素及其在制备生物大分子标记试剂中的应用。

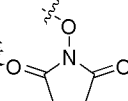
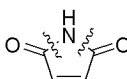
[0007] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

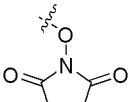
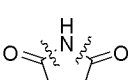
[0008] 一种用于生物大分子标记的带色生物素,结构式如下:

[0009]



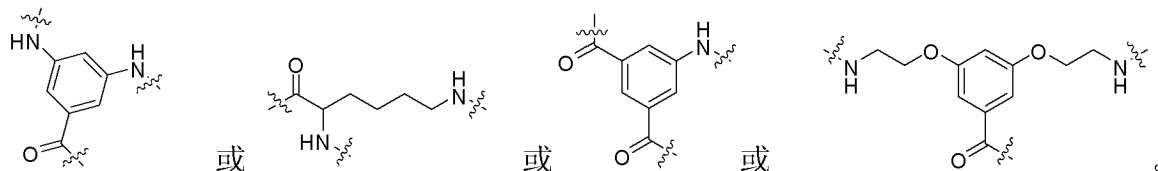
[0010] 其中, Y 具有至少三个连接功能基团的功能基, 其中三个连接功能基团分别与 A、B

及生物素连接, B 代表三苯甲烷类指示剂, A 代表  或  或  或 $\sim\text{H}$ 。

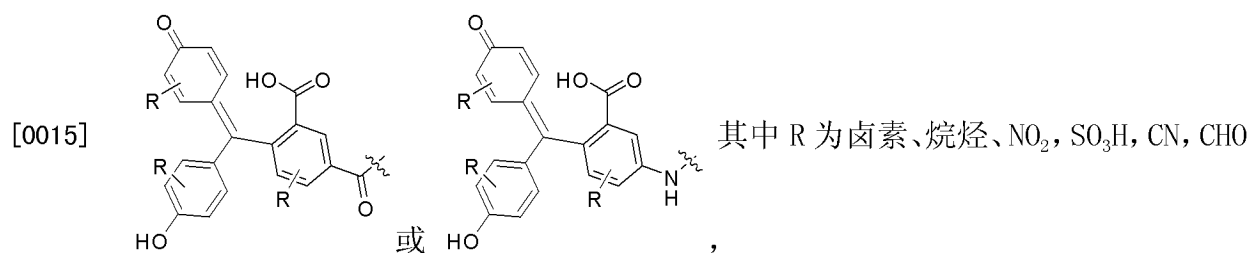
[0011] 而且, 所述 A 为  或  或  或 $\sim\text{H}$ 。

[0012] 而且, 所述 Y 为

[0013]



[0014] 而且, 所述 B 包括



或 COOH。

[0016] 而且, 所述 B 包括

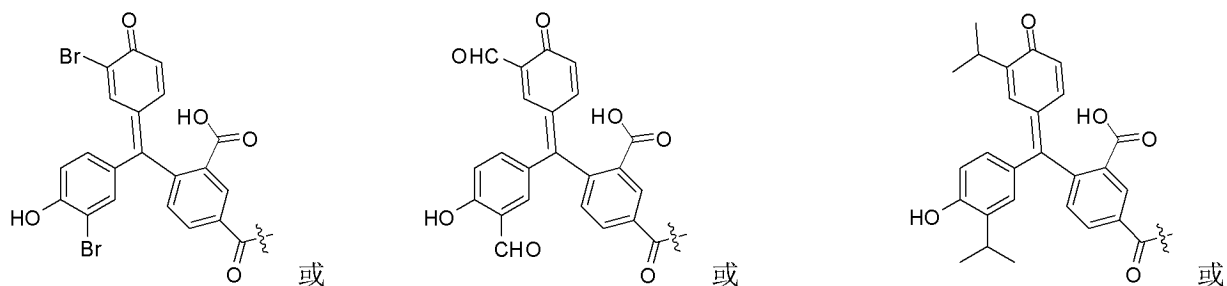
[0017] R 为 CH₃。

[0018] 而且, 所述 B 包括

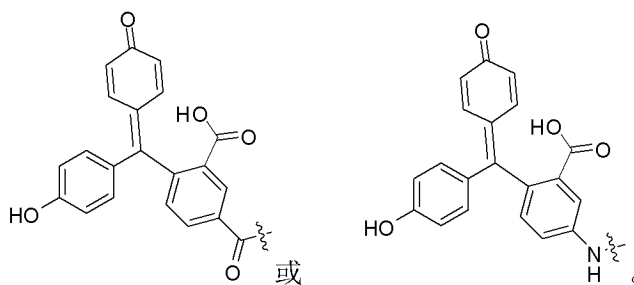
[0019] R 为 Br 或 Cl。

[0020] 而且, 所述 B 为

[0021]

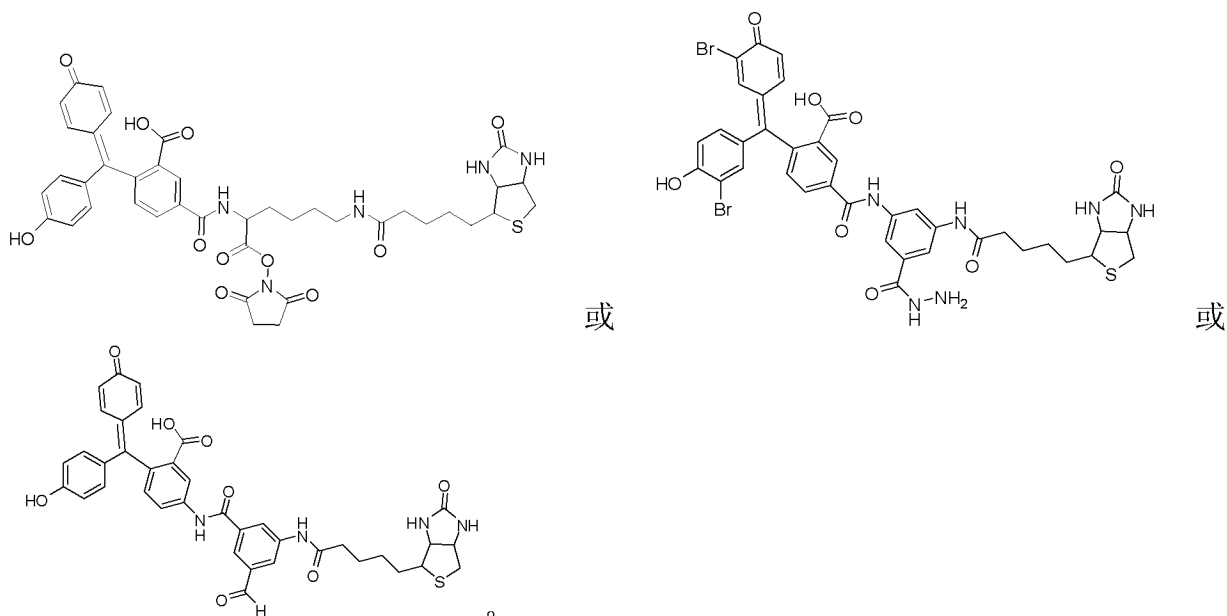


[0022]



[0023] 而且,所述带色生物素的结构式为

[0024]



[0025] 用于生物大分子标记的带色生物素在制备生物大分子标记试剂中的应用。

[0026] 本发明的优点及积极效果如下：

[0027] 1、本发明通过对生物素衍生物进行侧链修饰引入生色基团,不仅使生物大分子在被生物素标记后即有显色能力,而且使生物素在与亲和素结合后也可在特定 pH 范围内显色。本带色生物素在同大分子活性物质偶联后,偶联物在生理条件下不显色,因而不会对在正常条件下生物素与亲和素的应用有干扰。当调节 pH 到一定数值后可显紫红色,其吸光度与生物素的含量有关,因而可从其吸光度计算出每分子活性物质所含生物素的摩尔数。本带色生物素偶联物在与亲和素特异结合后也有类似功能,因此实现了在肉眼下进行示踪分析过程,大大提高了效率、灵敏度和重现性,填补了国际技术空白

[0028] 2、本发明通过多步反应完成多种末端反应基团的设计,独特的三向骨架设计将生物素、生色基团和连接生物大分子的末端基团完美结合,使本指示剂可与氨基、羧基、巯基、醛基等结合,偶联抗体等一系列大分子活性物质,增加了产品的多样性。

[0029] 3、本发明以带色生物素分子为终端产物,设计研发完成新的合成工艺路线和工艺参数,反应条件温和、安全,产品纯度可达到 99.0% 以上。

[0030] 附图说明：请将所有的核磁图粘贴上。

[0031] 图 1 为本发明具体制备方法 1 中中间体 2 的核磁谱图；

[0032] 图 2 为本发明具体制备方法 1 中中间体 3 的核磁谱图；

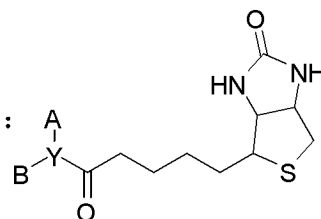
[0033] 图 3 为本发明具体制备方法 1 中中间体 7 的核磁谱图；

- [0034] 图 4 为本发明具体制备方法 1 中中间体 8 的核磁谱图；
 [0035] 图 5 为本发明具体制备方法 1 中中间体 9 的核磁谱图；
 [0036] 图 6 为本发明具体制备方法 1 中中间体 11 的核磁谱图；
 [0037] 图 7 为本发明具体制备方法 1 中中间体 13 的核磁谱图；
 [0038] 图 8 为本发明具体制备方法 1 中中间体 14 的核磁谱图；
 [0039] 图 9 为本发明生物素在中性时不显颜色的照片；
 [0040] 图 10 为本发明生物素在 pH 改变时显紫红色的照片。

具体实施方式

[0041] 下面结合实施例，对本发明进一步说明，下述实施例是说明性的，不是限定性的，不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。

[0042] 一种用于生物大分子标记的带色生物素，结构式如下：

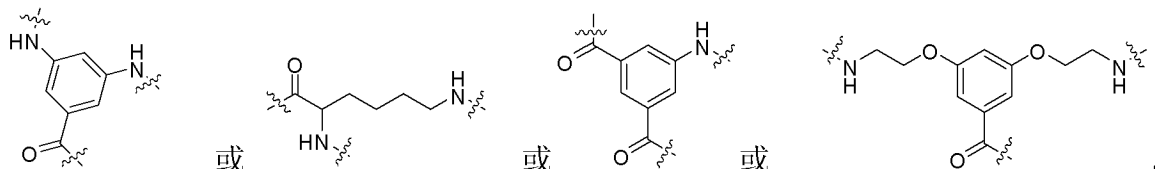


[0043] 其中，Y 具有至少三个连接功能基团的功能基，其中三个连接功能基团分别与 A、B

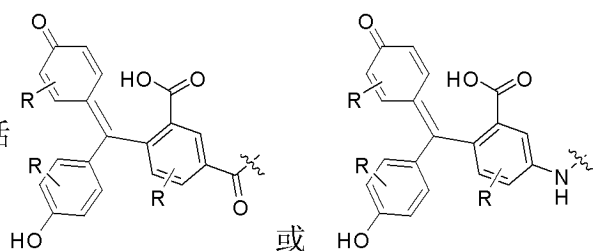
及生物素连接，B 代表三苯甲烷类指示剂，A 代表 或 或 或 $\sim\text{H}$ 。

[0044] 所述 Y 为

[0045]



[0046] 所述 B 包括



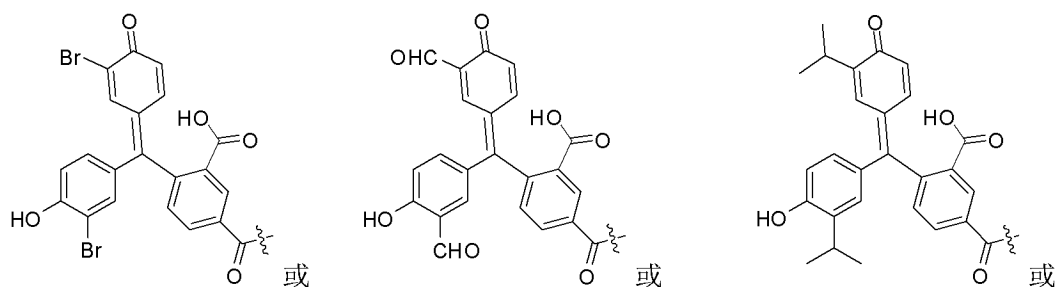
其中 R 为卤素、烷烃、 NO_2 ，

SO_3H , CN , CHO 或 COOH 。

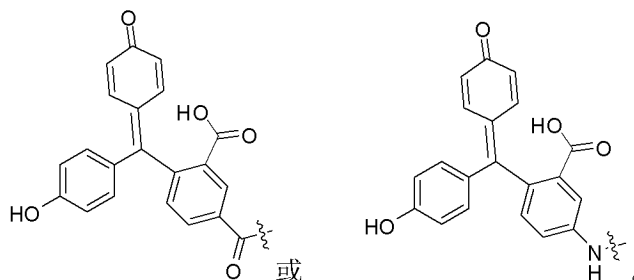
[0047] 所述 B 包括 R 为 CH_3 。

[0048] 所述 B 包括 R 为 Br 或 Cl。

[0049] 所述 B 为

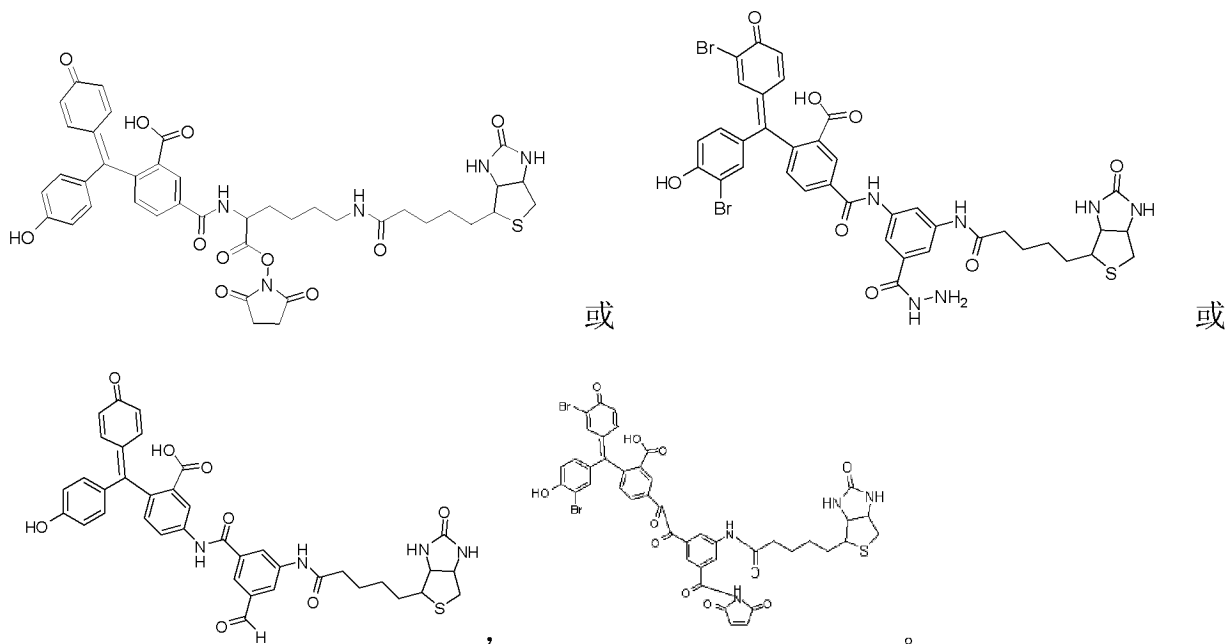


[0050]



[0051] 带色生物素的结构式为

[0052]



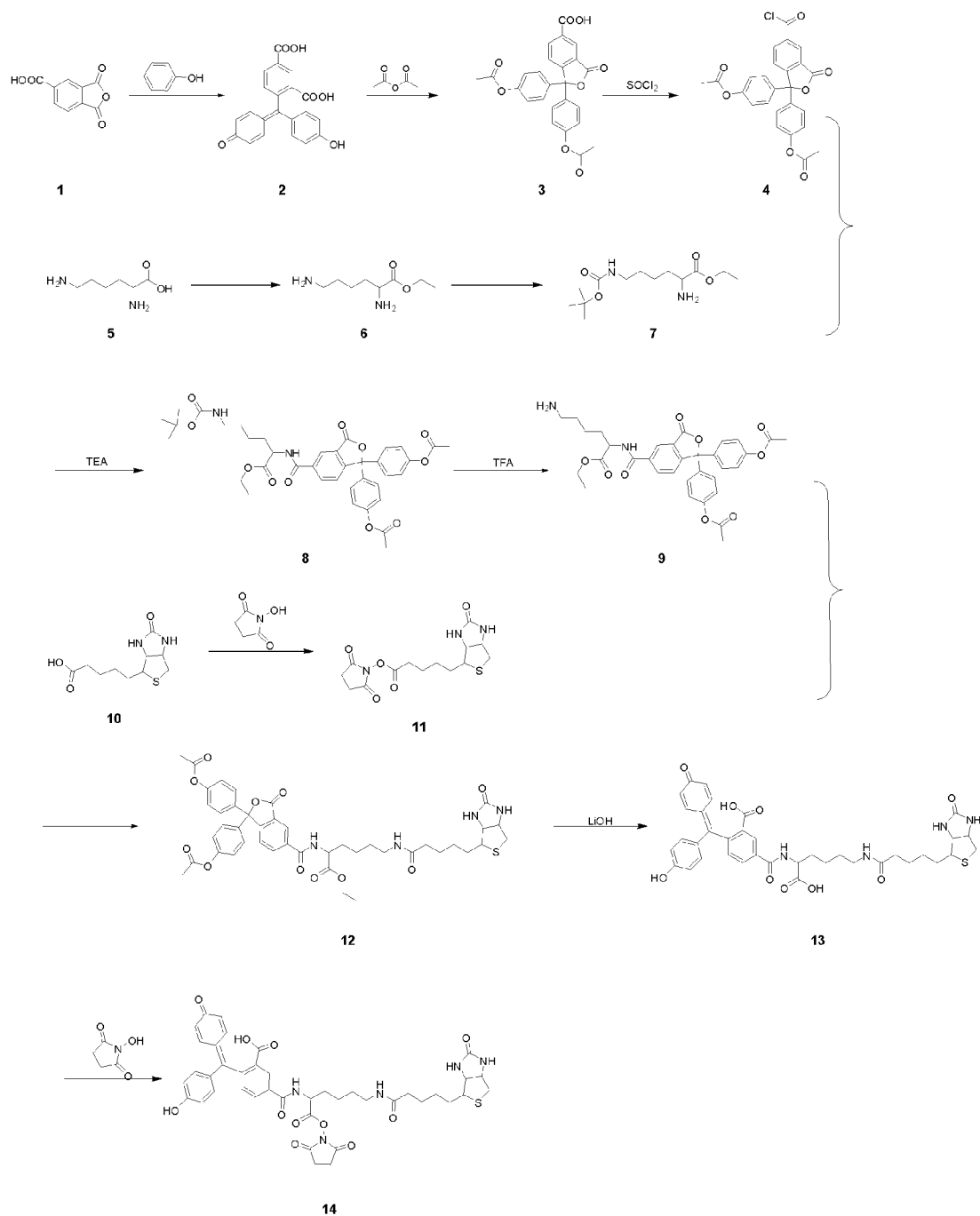
[0053] 还包括如 Y、A、B 代表的分子式的各种组合,就不一一列举。

[0054] 用于生物大分子标记的带色生物素在制备生物大分子标记试剂中的应用。

[0055] 本发明通过多步反应完成多种末端反应基团的设计,独特的三向骨架设计将生物素、生色基团和连接生物大分子的末端基团完美结合,使本指示剂可与氨基、羧基、巯基、组氨酸残基等结合,能够偶联抗体等一系列大分子活性物质。

[0056] 一种用于生物大分子标记的带色生物素的制备方法,本方法以一种具体结构为例,其余结构的带色生物素的合成方法同本方法,具体步骤如下:

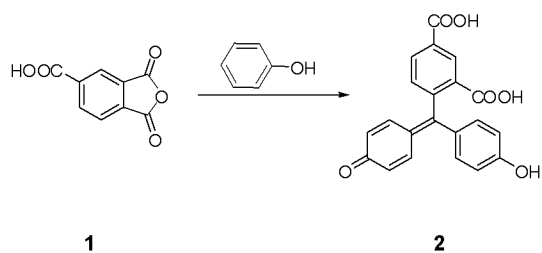
[0057]



[0058] 每个步骤的反应的具体步骤如下：

[0059] 中间体 2 的合成

[0060]



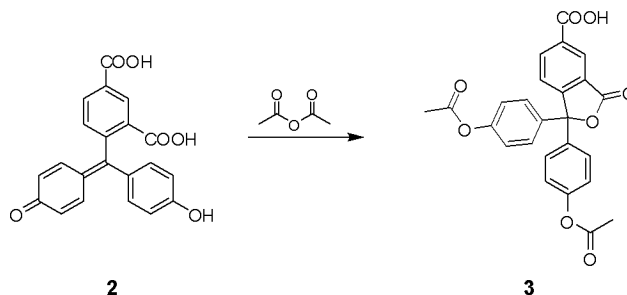
[0061] 称量 1 (70g, 0.36mol) 和苯酚 (68.6g, 0.73mol) 放入 500mL 三口瓶中, 加热至

80℃,待苯酚全部熔化,然后升温至 120℃,反应 18h。加入 500mL 二氯甲烷,用饱和碳酸氢钠溶液洗涤多次,合并水相,用 1mol/L 的盐酸调 pH 至 2,很多粘稠状固体析出,过滤,烘干,用氯仿进行重结晶,得到浅棕色固体 25g,产率 18.94%,其核磁图如下:

[0062] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300MHz) $\delta = 9.711$ (s, 1H), $\delta = 7.656$ –8.316 (m, 3H), $\delta = 7.023$ –7.051 (m, 4H), $\delta = 6.719$ –6.756 (m, 4H)

[0063] 中间体 3 的合成

[0064]

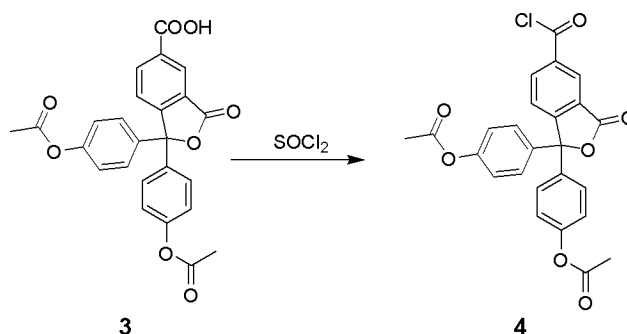


[0065] 称量中间体 2 (20g, 0.055mol) 于 1000mL 的三口瓶中,量取 400mL 的乙酸酐加入三口瓶中,加热至 80℃,反应 10h,旋干乙酸酐,进行柱层析分离提纯,最后得到 10g 中间体 3,产率 40.58%,其核磁图如下:

[0066] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) $\delta = 7.726$ –8.219 (m, 3H), $\delta = 7.327$ –7.438 (m, 4H), $\delta = 7.158$ –7.216 (m, 4H), $\delta = 2.248$ (s, 6H)

[0067] 中间体 4 的合成

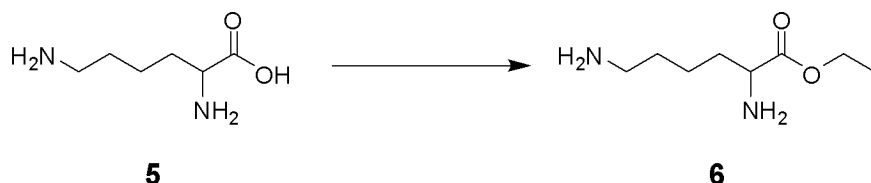
[0068]



[0069] 称量中间体 3 (10g, 0.0224mol) 溶于 40mL 氯化亚砷中,加热至回流,反应 20h, TLC 跟踪反应至完全,停止反应,将氯化亚砷旋干,不纯化,直接投入下一步反应,称量粗品 10g。

[0070] 中间体 6 的合成

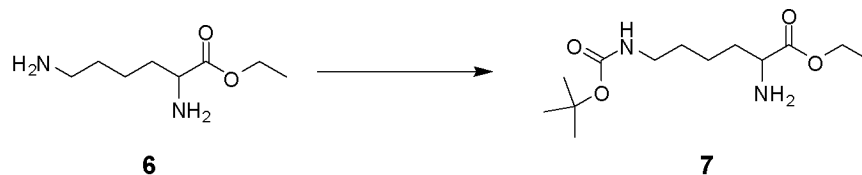
[0071]



[0072] 称量赖氨酸盐酸盐 (50g, 0.228mol) 放入 2000mL 的三口瓶中,加入 1200mL 乙醇, 10mL 浓盐酸,加热至回流,反应 20h,停止反应,将乙醇和浓盐酸旋干,得到 5 和 6 的盐酸盐的混合物 60g。

[0073] 中间体 7 的合成

[0074]

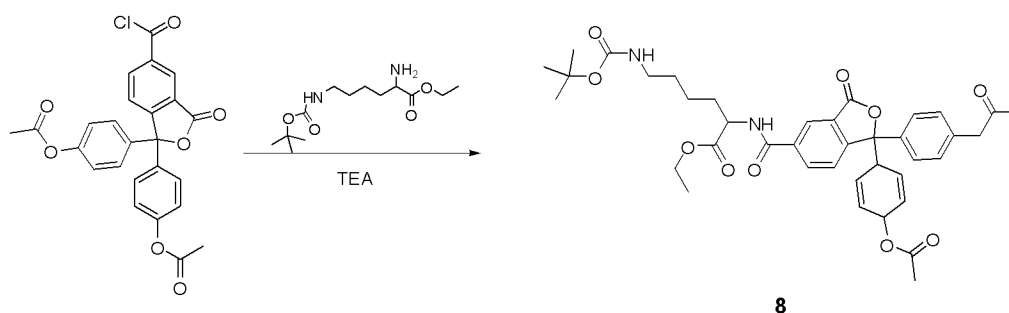


[0075] 称量中间体 6 的混合物 (40g, 0.16mol) 加入到 1000mL 的三口瓶中, 慢慢加入 500mL 的饱和碳酸氢钠溶液将其全部溶解。然后称量二碳酸二叔丁酯 (34.9g, 0.16mol) 溶于 100mL 甲醇中, 然后将其以较慢的速度滴入三口瓶中, 5h 后反应完全, 停止反应, 用二氯甲烷多次萃取水相, 合并二氯甲烷层, 用无水硫酸钠干燥, 旋干溶剂后柱层析分离提纯, 得到 12g 中间体 7, 产率 19.05%, 其核磁图如下:

[0076] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) $\delta = 4.095-4.200$ (m, 3H), $\delta = 2.670-2.716$ (m, 2H), $\delta = 1.444-1.743$ (m, 5H), $\delta = 1.379$ (s, 10H), $\delta = 1.194-1.217$ (t, 3H)。

[0077] 中间体 8 的合成

[0078]

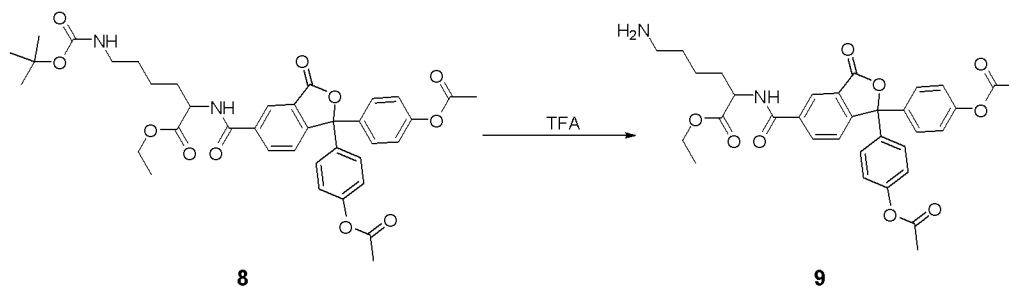


[0079] 称量中间体 7 (2.95g, 10.76mmol) 和三乙胺 (2.2g, 21.52mmol) 加入 250mL 的三口瓶中, 加入 20mL 的二氯甲烷将其全部溶解。然后称量中间体 4 (5g, 10.76mmol), 将其溶于 100mL 的二氯甲烷中, 慢慢滴入三口瓶中, 常温反应, TLC 跟踪反应至完全。然后将二氯甲烷旋干, 柱层析分离, 得到 3g 中间体 8, 产率 39.59%, 其核磁图如下:

[0080] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) $\delta = 7.933-8.255$ (m, 3H), $\delta = 7.295-7.348$ (m, 4H), $\delta = 7.040-7.077$ (m, 4H), $\delta = 4.129-4.294$ (m, 3H), $\delta = 3.404-3.485$ (t, 2H), $\delta = 2.284$ (s, 6H), $\delta = 1.758-1.896$ (m, 1H), $\delta = 1.592-1.722$ (m, 3H), $\delta = 1.380$ (s, 9H), $\delta = 1.303-1.316$ (m, 2H), $\delta = 1.221-1.284$ (m, 5H)。

[0081] 中间体 9 的合成

[0082]



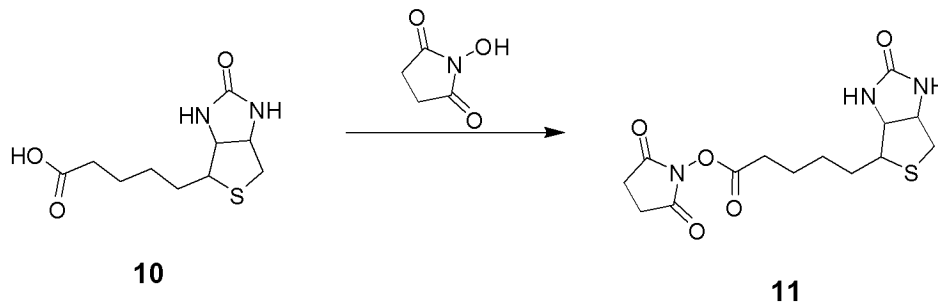
[0083] 称量中间体 8 (2g, 2.84mmol) 溶于 10mL 二氯甲烷中, 然后加入三氟乙酸 10mL, 常温反应 2h, TLC 监测反应已完毕, 将二氯甲烷和三氟乙酸旋干, 加入饱和碳酸氢钠溶液, 调 pH 至 8~9, 析出很多固体, 用二氯甲烷溶解, 无水硫酸钠干燥, 旋干溶剂得 1.5g 中间体 9, 产

率 87.42%，其核磁图如下：

[0084] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) $\delta = 7.577-7.897$ (m, 3H), $\delta = 7.259-7.323$ (m, 4H), $\delta = 7.016-7.092$ (m, 4H), $\delta = 4.189-4.271$ (m, 2H), $\delta = 4.003-4.052$ (m, 1H), $\delta = 3.404-3.454$ (m, 2H), $\delta = 2.285$ (s, 6H), $\delta = 1.879-2.075$ (m, 2H), $\delta = 1.595-1.643$ (m, 2H), $\delta = 1.394-1.516$ (m, 2H), $\delta = 1.222-1.269$ (t, 3H)。

[0085] 中间体 11 的合成

[0086]

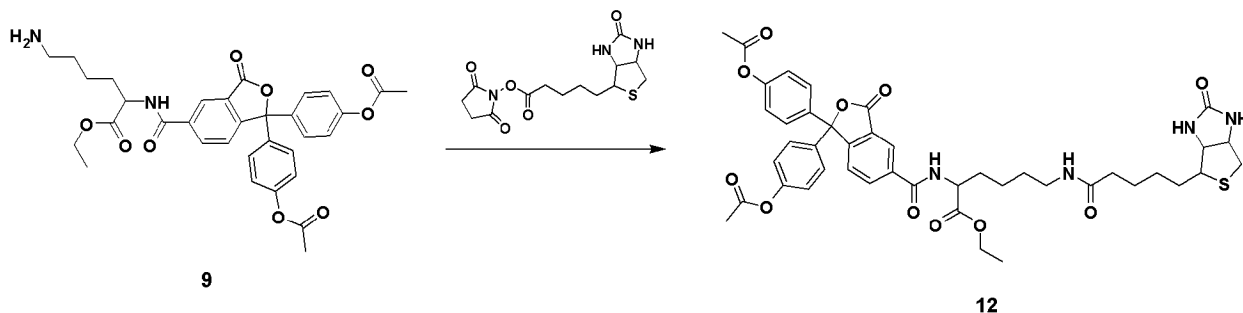


[0087] 称量生物素 10 (12.2g, 0.05mol), NHS (6.5g, 0.056mol), EDCI (10.7g, 0.056mol) 一起加入到 200mL 的 DMF 溶液中, 室温搅拌过夜。然后将反应液旋蒸, 蒸去大部分 DMF, 冷却, 向该溶液中加入水, 出现大量白色固体, 静置, 过滤, 得到白色固体 12g, 产率 70.39%, 其核磁图如下：

[0088] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO , 300MHz) $\delta = 6.400$ (s, 1H), $\delta = 6.341$ (s, 1H), $\delta = 4.269-4.311$ (m, 1H), $\delta = 4.110-4.151$ (m, 1H), $\delta = 3.084-3.098$ (m, 1H), $\delta = 2.791$ (s, 4H), $\delta = 2.628-2.677$ (t, 2H), $\delta = 1.422-1.655$ (m, 8H)。

[0089] 中间体 12 的合成

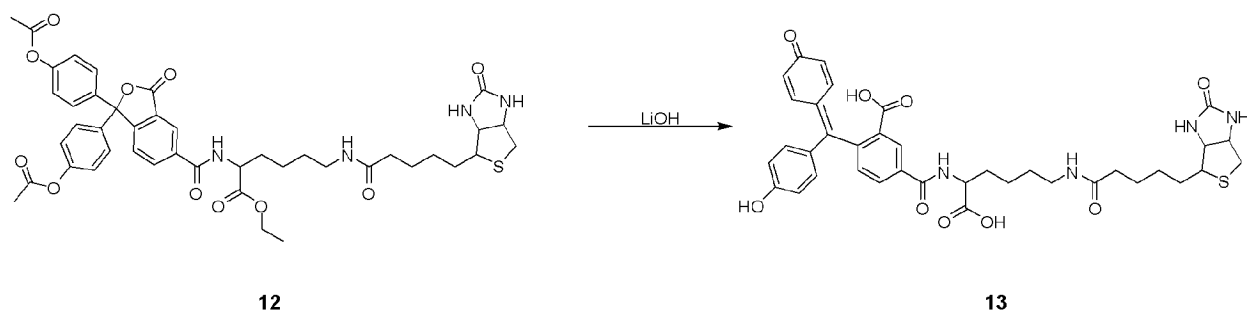
[0090]



[0091] 称量中间体 9 (1.5g, 2.4mmol) 和中间体 11 (0.8g, 2.4mmol) 放入 100mL 的三口瓶中, 加入 20mL 的 DMF 中将其全部溶解, 常温反应 20h, 旋干 DMF, 柱层析分离提纯, 但提纯时中间体 11 不能除干净, 得 1g 中间体 11 和 12 的混合物, 产率为 48.83%。

[0092] 中间体 13 的合成

[0093]

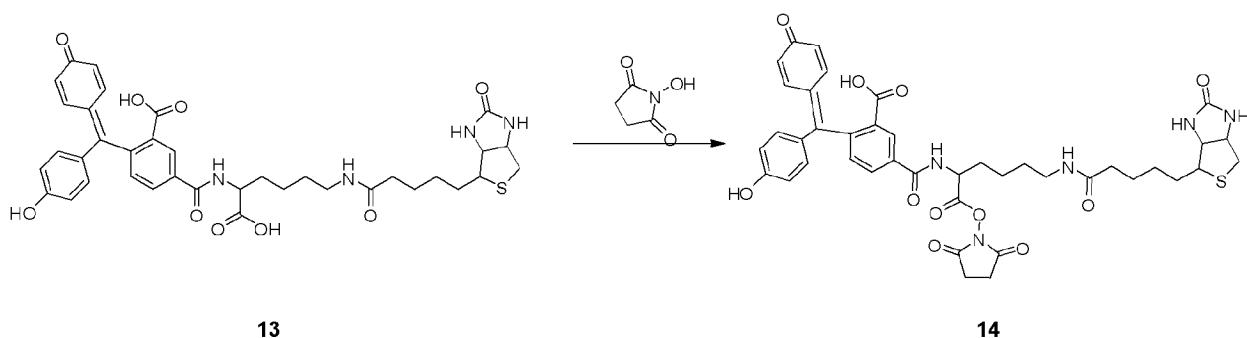


[0094] 称量中间体 12 (1g, 1.2mmol) 溶于 10mL 的四氢呋喃中, 加入 10mL 的 10% g/ml 的氢氧化锂水溶液, 常温搅拌 18h, 旋干溶剂, 再加少量的水溶解, 用稀盐酸调 pH 至 4, 析出很多白色固体, 过滤, 烘干, 得 700mg 中间体 13, 产率 80.92%, 其核磁图如下:

[0095] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 300MHz) $\delta = 7.797-8.263$ (m, 3H), $\delta = 7.024-7.060$ (m, 4H), $\delta = 6.726-6.768$ (m, 4H), $\delta = 6.463$ (s, 1H), $\delta = 6.398$ (s, 1H), $\delta = 4.247-4.289$ (m, 1H), $\delta = 4.067-4.108$ (m, 1H), $\delta = 3.202-3.259$ (m, 3H), $\delta = 3.024-3.054$ (m, 1H), $\delta = 2.751-2.809$ (m, 1H), $\delta = 2.051-2.098$ (t, 2H), $\delta = 1.235-1.712$ (m, 14H)。

[0096] 目标化合物 14 的合成

[0097]



[0098] 称量中间体 13 (0.5g, 0.7mmol) N-羟基琥珀酰亚胺 (0.08g, 0.7mmol) 和 EDC 盐酸盐 (0.14g, 0.7mmol) 溶于 5mL 的 DMF 中, 常温搅拌 20h, 旋干溶剂, 用厚硅胶板分离, 最终的目标产物 286mg, 产率 50.39%, 其核磁图如下:

[0099] $^1\text{H-NMR}$ (DM SO, 300MHz) $\delta = 8.274-8.299$ (2, 1H), $\delta = 8.114-8.133$ (2, 1H), $\delta = 7.935-8.7.962$ (2, 1H), $\delta = 7.022-7.067$ (m, 4H), $\delta = 6.751-6.789$ (m, 4H), $\delta = 6.443-6.418$ (d, 2H), $\delta = 4.074-4.297$ (m, 3H), $\delta = 3.557-3.571$ (d, 2H), $\delta = 3.216-3.257$ (m, 2H), $\delta = 3.135$ (s, 4H), $\delta = 3.026-3.062$ (m, 2H), $\delta = 2.076-2.123$ (t, 2H), $\delta = 1.184-1.668$ (m, 12H)。

[0100] 显色实验:

[0101] 溶剂: DMSO 10ml, 产物 14: 10mg, 调 pH 溶液: 10% 碳酸钾水溶液;

[0102] 图 9 为中性为 10mg 产品溶于 10ml DMSO 中;

[0103] 图 10 为碱性为用 10% 碳酸钾溶液调中性溶液的 pH = 9, 变为紫红色。

[0104] 本发明通过对生物素衍生物进行侧链修饰引入生色基团, 不仅使生物大分子在被生物素标记后即有显色能力, 而且使生物素在与亲和素结合后也可在特定 pH 范围内显色。本带色生物素在同大分子活性物质偶联后, 偶联物在生理条件下不显色, 因而不会对在正常条件下生物素与亲和素的应用有干扰。当调节 pH 到一定数值后可显紫红色, 其吸光度与

生物素的含量有关,因而可从其吸光度计算出每分子活性物质所含生物素的摩尔数。本带色生物素偶联物在与亲和素特异结合后也有类似功能,因此实现了在肉眼下进行示踪分析过程,大大提高了效率、灵敏度和重现性,填补了国际技术空白。

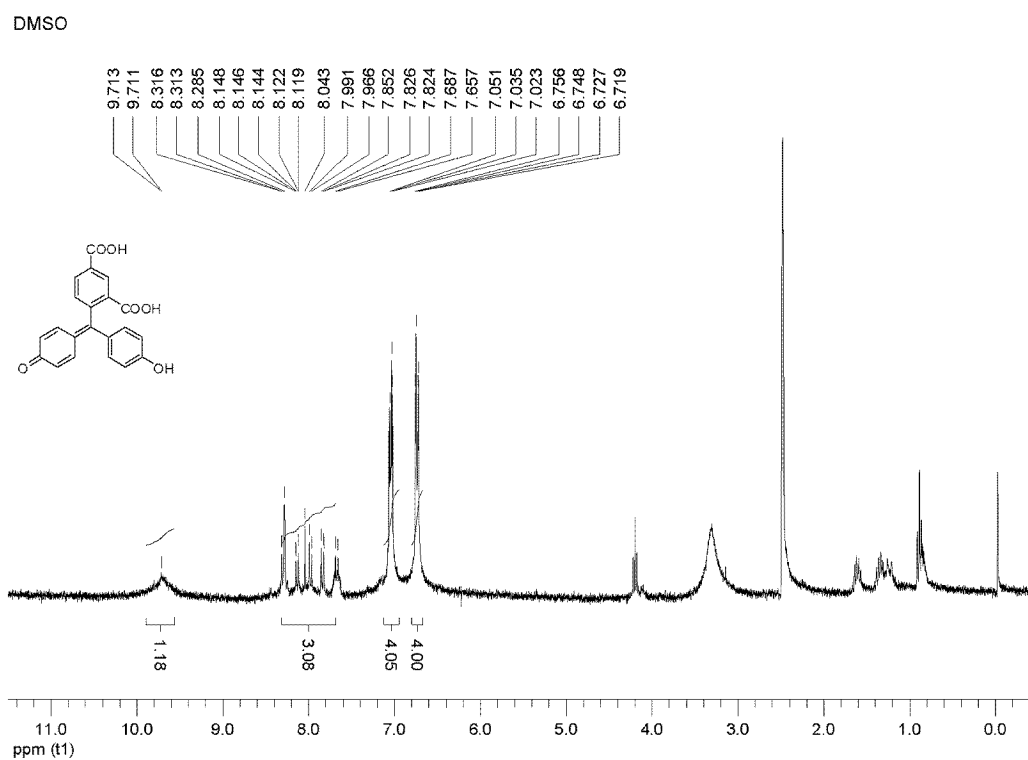


图 1

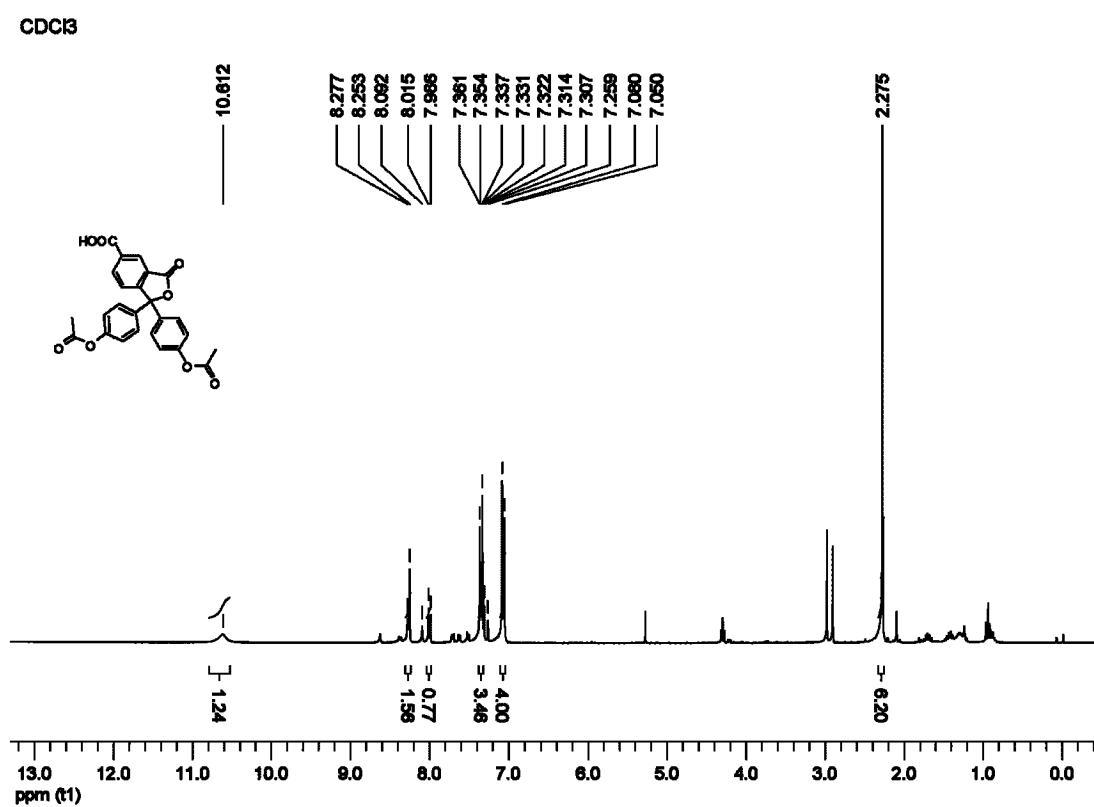


图 2

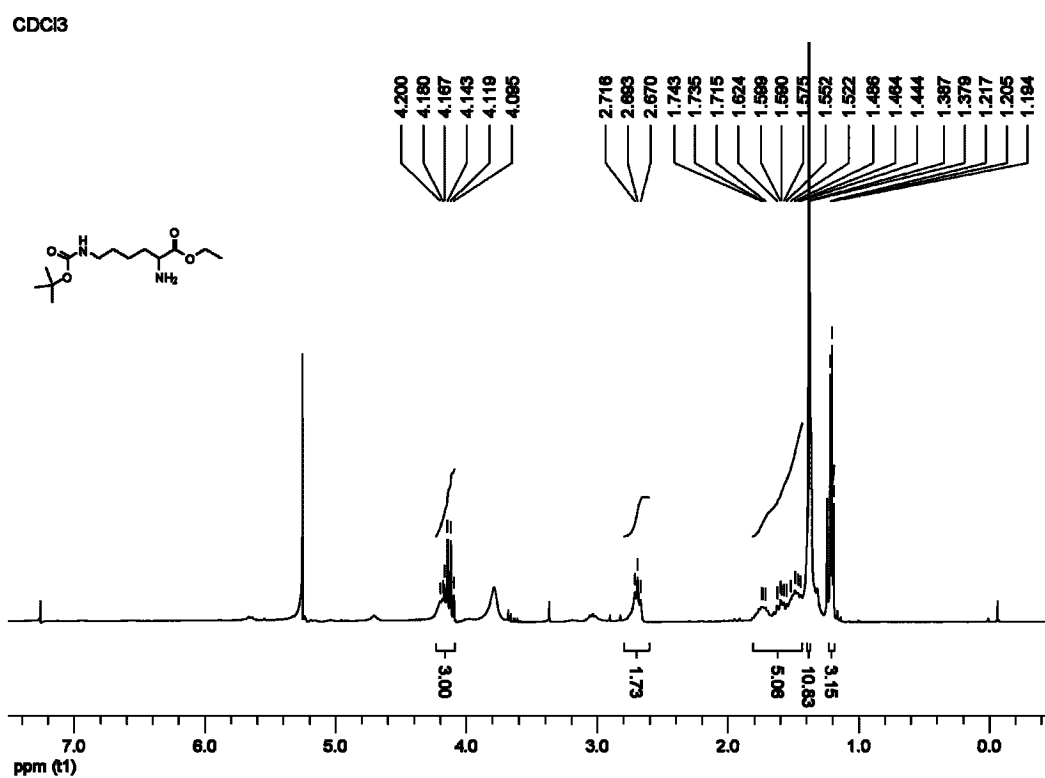
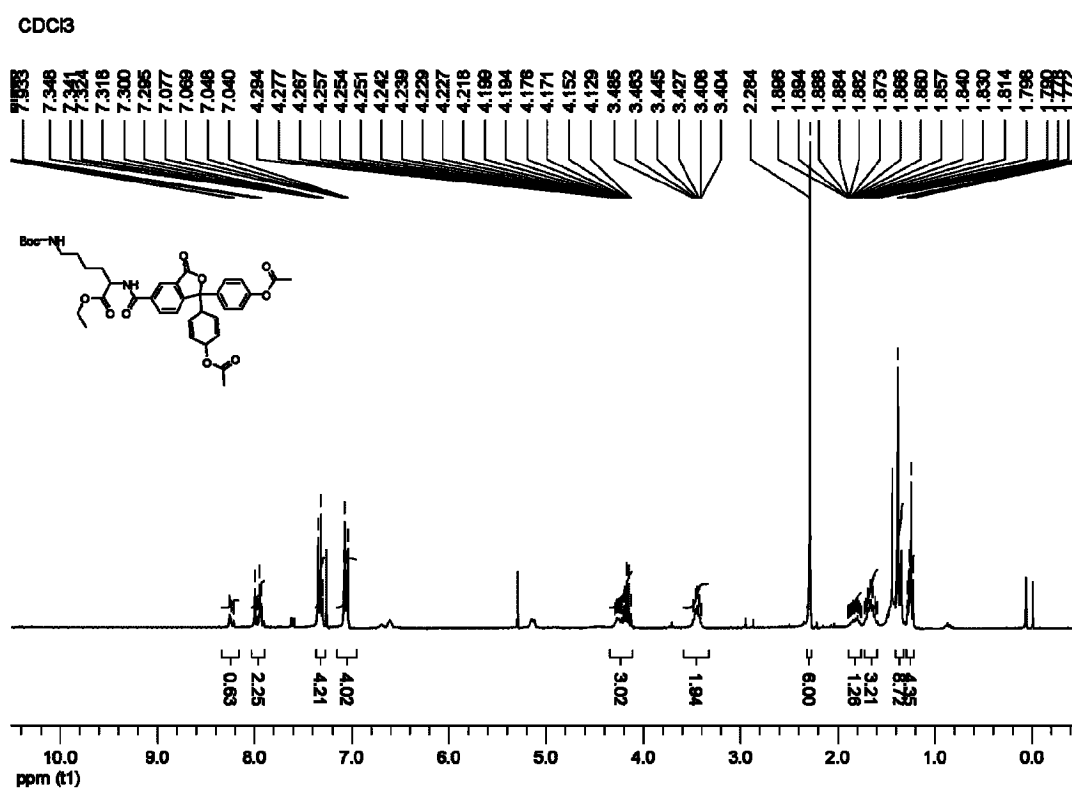


图 3



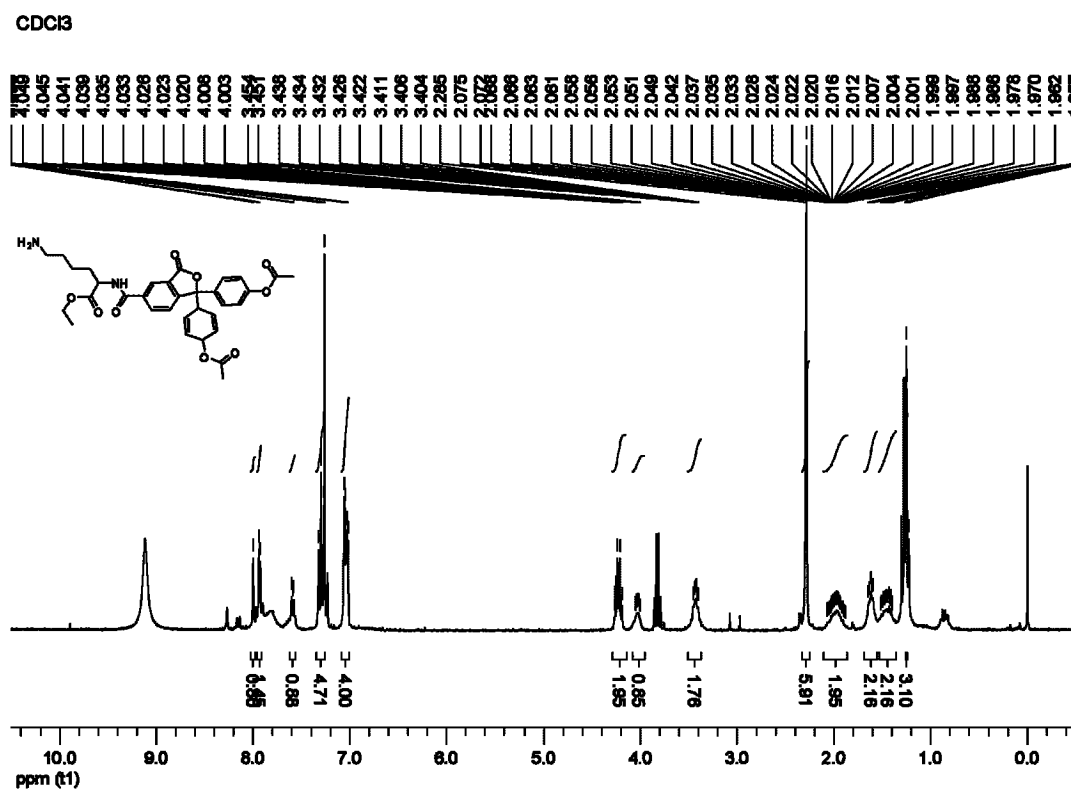


图 5

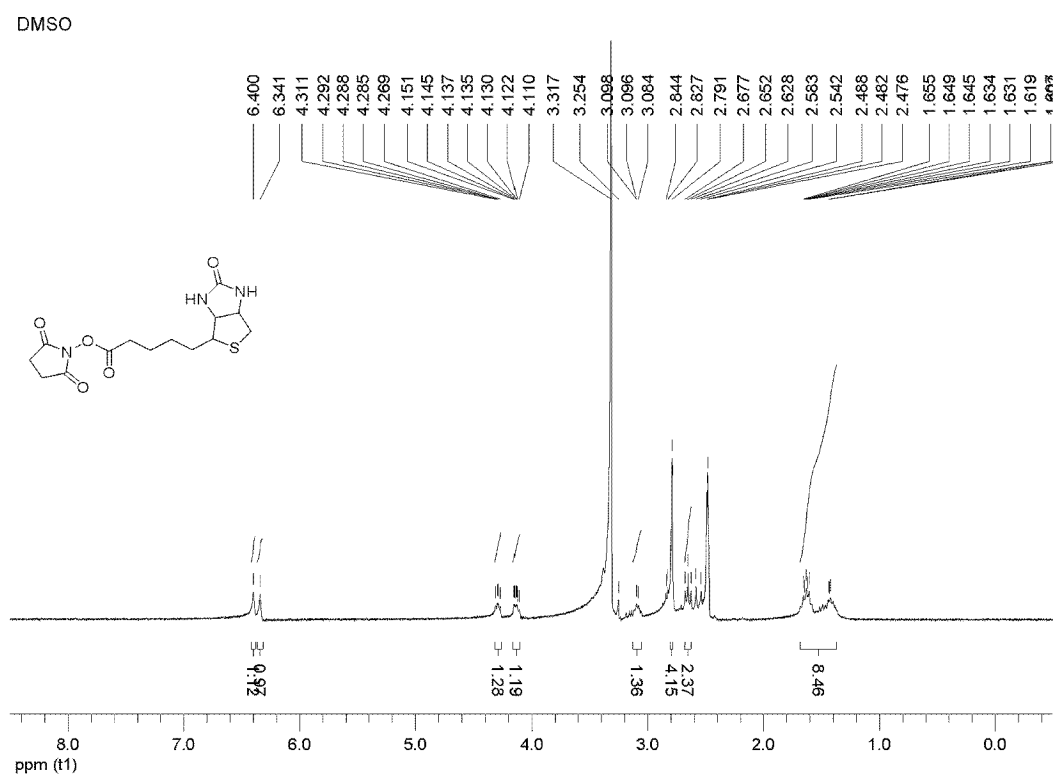


图 6

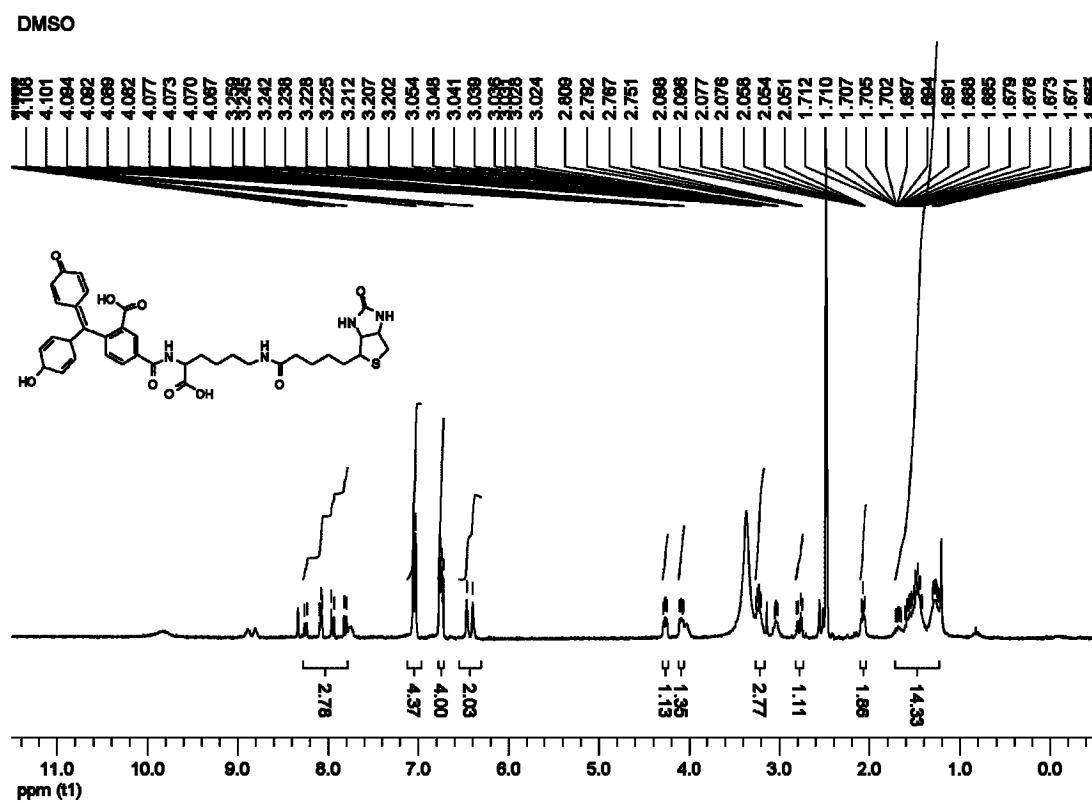


图 7

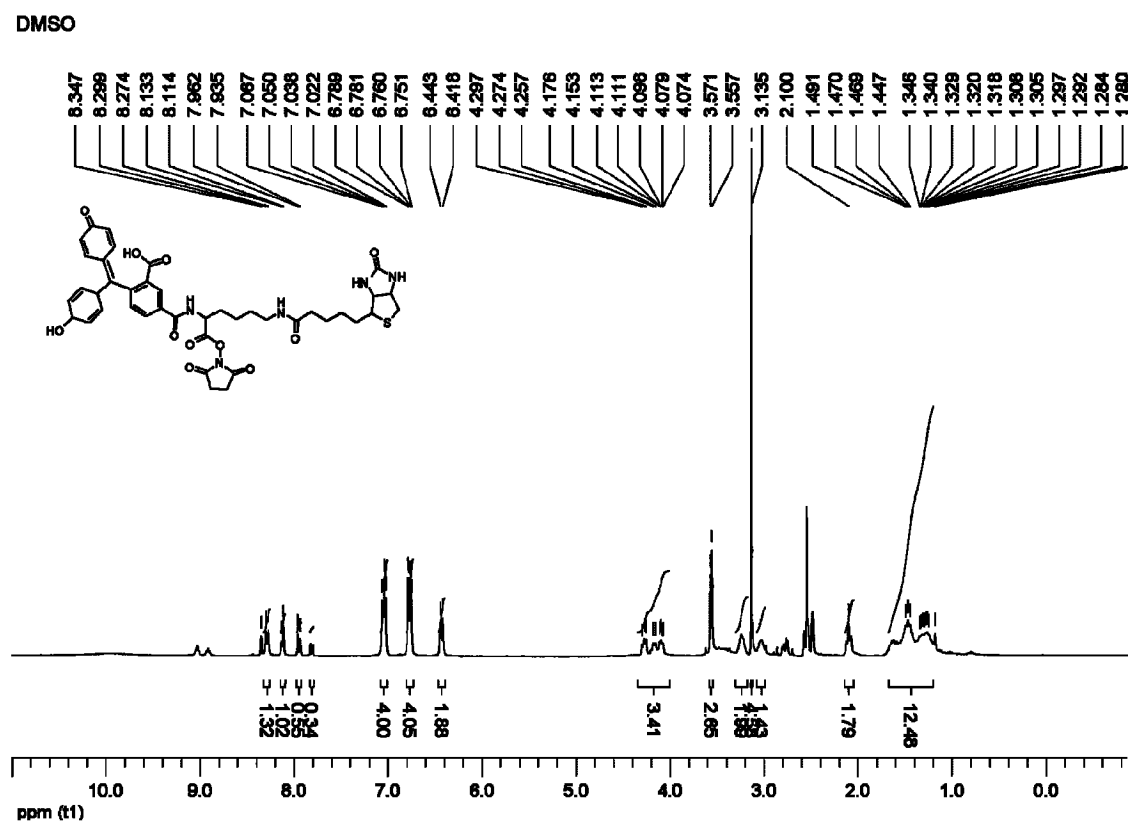


图 8



图 9

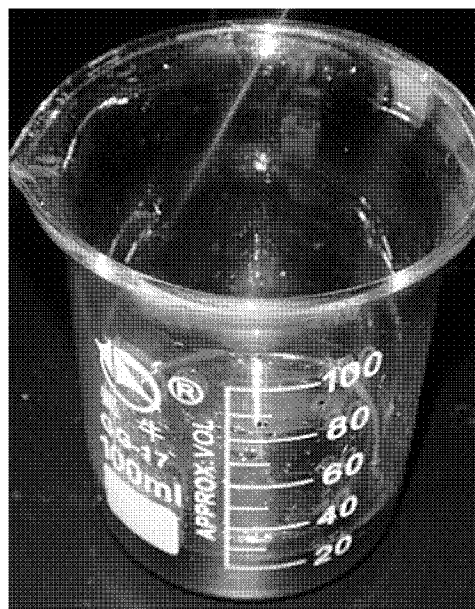


图 10

专利名称(译)	用于生物大分子标记的带色生物素及其在制备生物大分子标记试剂中的应用		
公开(公告)号	CN102219791A	公开(公告)日	2011-10-19
申请号	CN201110087655.3	申请日	2011-04-08
[标]申请(专利权)人(译)	天津希恩思生化科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津希恩思生化科技有限公司		
[标]发明人	何华瑞		
发明人	何华瑞		
IPC分类号	C07D495/04 G01N21/31 G01N21/80 G01N33/533 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于生物大分子标记的带色生物素及其制备方法，本指示剂可用于微量抗原、抗体定性、酶免疫测定、荧光免疫测定、定量检测及定位观察研究的新技术，如进行肿瘤显像诊断和靶向治疗等。本带色生物素在同大分子活性物质偶联后，偶联物在生理条件下不显色，因而不会对在正常条件下生物素与亲和素的应用有干扰。当调节pH到一定数值后可显紫红色，其吸光度与生物素的含量有关，因而可从其吸光度计算出每分子活性物质所含生物素的摩尔数。本带色生物素偶联物在与亲和素特异结合后也有类似功能，因此实现了在肉眼下进行示踪分析过程，大大提高了效率、灵敏度和重现性，填补了国际技术空白。

