



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103597039 B

(45)授权公告日 2017.05.03

(21)申请号 201280023777.9

C09B 23/00(2006.01)

(22)申请日 2012.03.15

C09B 23/08(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C09B 23/12(2006.01)

申请公布号 CN 103597039 A

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

(43)申请公布日 2014.02.19

A61K 49/00(2006.01)

(30)优先权数据

61/452,684 2011.03.15 US

61/452,688 2011.03.15 US

61/556,335 2011.11.07 US

(56)对比文件

Siegfried Hünig et al..Phenalenium-Ionen, I 1-alkoxy-und 1.3-dialkoxy-phenalenium-Ionen und ihre Reaktionen.《Liebigs Ann.Chem.》.1970,第732卷

Alan R. Kartitzky et al..Bridged Cyanine Dyes. Part 2 [1]. 1-(N-Methyl-2-benzothiazolylinio)-3-(N-methyl-2-benzothiazolylene) and 1-(N-Methyl-4-pyridinio)-3-(N-methyl-4-pyridylene) cyclopenta-1,4-dienes with Fused Rings.《J. Heterocyclic Chem.》.1988,第25卷

Alan R. Kartitzky et al..Bridged Cyanine Dyes. Part 2 [1]. 1-(N-Methyl-2-benzothiazolylinio)-3-(N-methyl-2-benzothiazolylene) and 1-(N-Methyl-4-pyridinio)-3-(N-methyl-4-pyridylene) cyclopenta-1,4-dienes with Fused Rings.《J. Heterocyclic Chem.》.1988,第25卷

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.11.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2012/051255 2012.03.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/123916 EN 2012.09.20

(73)专利权人 雷蒙特亚特特拉维夫大学有限公司

地址 以色列特拉维夫

审查员 金英

(72)发明人 D·萨巴特 R·萨奇-法伊纳罗

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 高瑜 郑霞

(51)Int.Cl.

C07D 209/02(2006.01)

C07D 213/02(2006.01)

权利要求书7页 说明书58页 附图35页

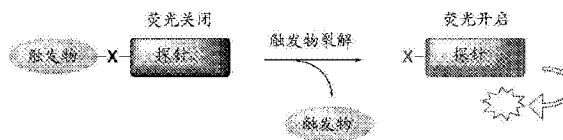
(54)发明名称

可活化的发荧光的化合物及其作为近红外探针的用途

生的荧光化合物。还公开了发荧光的化合物作为具有开启式机构的NIR探针来监测各种分析物的存在和/或水平的用途。

(57)摘要

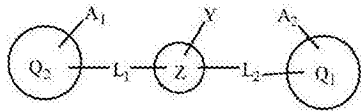
公开了设计成使得在化学事件后产生能够发射NIR光的化合物的新颖的发荧光的化合物。该化合物包含两个或更多个含受体的部分和可裂解的含供体的部分,它们是完全的π-电子共轭且是使得没有π-电子离域。还公开了在发荧光的化合物遭遇化学事件(例如,去质子化)时产



CN 103597039 B

1. 一种发荧光的化合物,所述发荧光的化合物包含至少两个含受体的部分和含供体的部分,

所述发荧光的化合物由通式I表示:

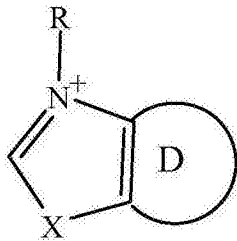


式 I

其中:

Q₁和Q₂各自独立地是含受体的部分;并且

A₁和A₂各自是所述含受体的部分中的受体基团;所述受体基团是铵离子,且所述含受体的部分独立地选自自由假吲哚的铵形式和吡啶的铵形式组成的组,所述假吲哚的铵形式由下式表示:



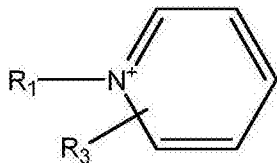
其中:

X是CR₃R₄,其中R₃和R₄各自是烷基;

R是被磺酰基取代的烷基;以及

D是苯基;且

所述吡啶的铵形式由下式表示:



其中:

R₁选自氢和烷基;以及

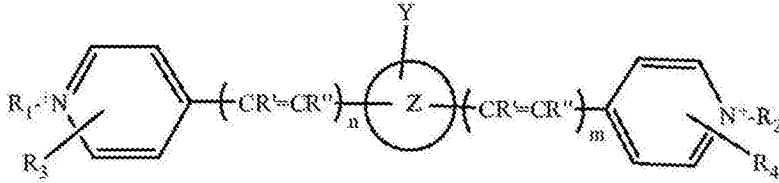
R₃选自氢、氰基和磺酰基;

Z和Y形成所述含供体的部分,其中Z是取代的或未取代的苯基,且Y是给电子基团;所述给电子基团是羟基从而使得所述含供体的部分在去质子化后产生酚盐阴离子、或者所述给电子基团包含可裂解的触发单元从而使得所述含供体的部分在所述触发单元的裂解后产生酚盐阴离子;以及

L₁和L₂各自独立地是连接部分或不存在,所述连接部分是至少一个-CR' = CR''-部分的含碳次甲基链,其中R'和R''各自独立地是氢,并且其中所述L₁和L₂、所述Q₁含受体的部分和Q₂含受体的部分以及所述Z-Y含供体的部分形成没有共振电子的共轭π-电子体系。

2. 如权利要求1所述的发荧光的化合物,其中Q₁和Q₂中的至少一个是所述吡啶的铵形式。

3. 如权利要求2所述的发荧光的化合物,具有通式IIIA:



式 IIIA

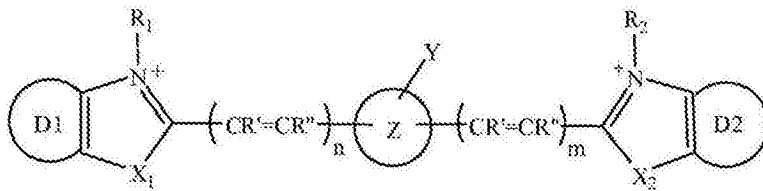
其中:

R₁和R₂各自独立地是烷基;

n和m各自独立地是从1到4的整数;并且

R₃和R₄各自独立地选自由氢、氰基和磺酰基组成的组。

4. 如权利要求1所述的发荧光的化合物,具有通式IIIB:



IIIB

其中:

D₁和D₂各自独立地是苯基;

X₁和X₂各自是CR₃R₄,其中R₃和R₄各自是烷基;

n和m各自独立地是从1到4的整数;以及

R₁和R₂各自是所述被磺酰基取代的烷基。

5. 如权利要求4所述的发荧光的化合物,其中R₃和R₄各自是甲基。

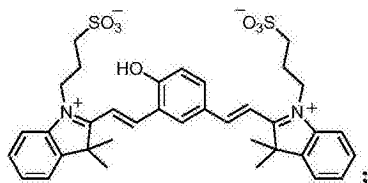
6. 如权利要求1-5中任一项所述的发荧光的化合物,其中所述L₁和L₂中的至少一个是所述连接部分,且其中所述含供体的部分被连接至所述含碳次甲基链。

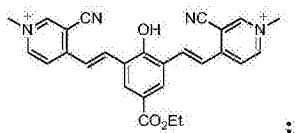
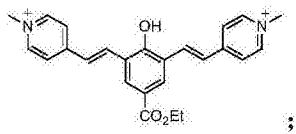
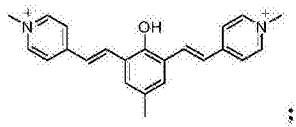
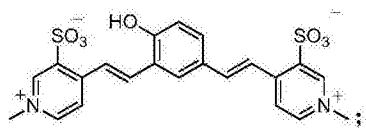
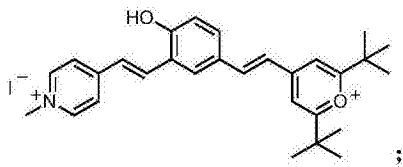
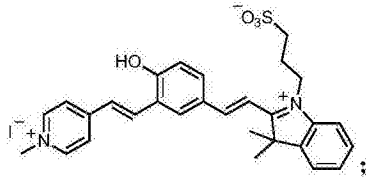
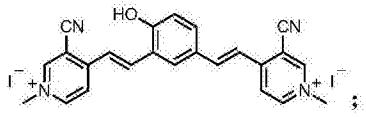
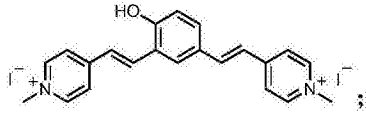
7. 如权利要求6所述的发荧光的化合物,其中所述L₁和L₂中的每一个是所述含碳次甲基链。

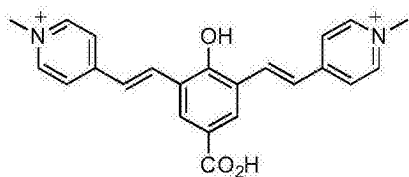
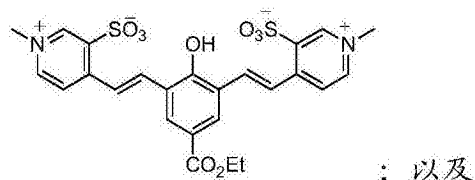
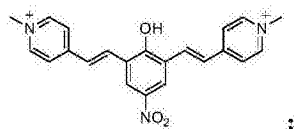
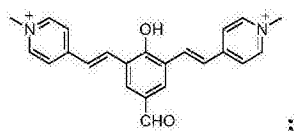
8. 如权利要求7所述的发荧光的化合物,其中L₁和L₂中的每一个是所述-CR' = CR''-。

9. 如权利要求8所述的发荧光的化合物,其中所述给电子基团是羟基。

10. 如权利要求1所述的发荧光的化合物,选自由以下成员组成的组:







11. 如权利要求1-5中任一项所述的发荧光的化合物,其中所述给电子基团是羟基。

12. 如权利要求8所述的发荧光的化合物,其中所述给电子基团包括所述可裂解的触发单元。

13. 如权利要求1所述的发荧光的化合物,其中所述可裂解的触发单元的所述裂解是在与分析物的化学反应之后。

14. 如权利要求13所述的发荧光的化合物,其中所述分析物与医学病症相关。

15. 如权利要求13所述的发荧光的化合物,其中所述分析物是过氧化氢,且所述可裂解的触发单元包括苯基硼酸。

16. 如权利要求13所述的发荧光的化合物,其中所述可裂解的触发单元的所述裂解是通过酶。

17. 如权利要求16所述的发荧光的化合物,其中所述酶在受医学病症折磨的器官或组织内过表达。

18. 如权利要求17所述的发荧光的化合物,其中所述医学病症是癌症。

19. 如权利要求18所述的发荧光的化合物,其中所述酶是组织蛋白酶。

20. 如权利要求14所述的发荧光的化合物,其中所述分析物是响应所述医学病症而在器官或组织内产生的物质。

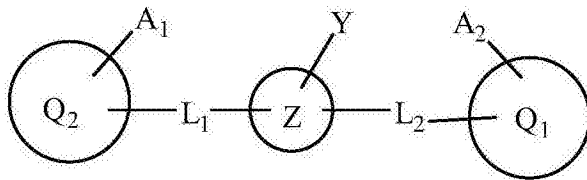
21. 如权利要求20所述的发荧光的化合物,其中所述医学病症选自由炎症、缺氧、细胞凋亡、脑缺血、骨质疏松症和自身免疫性疾病或紊乱组成的组。

22. 如权利要求1-5和12-21中任一项所述的发荧光的化合物,还包含第三含受体的部分且是使得所述第一含受体的部分、所述第二含受体的部分以及所述第三含受体的部分与所述含供体的部分形成所述共轭 π -电子体系,所述第三含受体的部分选自所述假吲哚的铵形式和所述吡啶的铵形式。

23. 如权利要求11所述的发荧光的化合物,还包含第三含受体的部分且是使得所述第一含受体的部分、所述第二含受体的部分以及所述第三含受体的部分与所述含供体的部分形成所述共轭 π -电子体系,所述第三含受体的部分选自所述假吲哚的铵形式和所述吡啶的铵形式。

24. 一种发荧光的化合物,所述发荧光的化合物包含至少两个含受体的部分和含供体的部分,

所述发荧光的化合物由通式I表示:

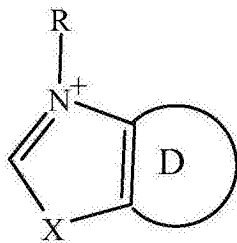


式 I

其中:

Q_1 和 Q_2 各自独立地是含受体的部分;并且

A_1 和 A_2 各自是所述含受体的部分中的受体基团;所述受体基团是铵离子,且所述含受体的部分独立地选自由假吲哚的铵形式和吡啶的铵形式组成的组,所述假吲哚的铵形式由下式表示:



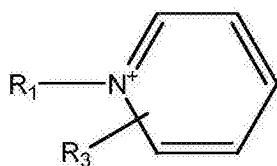
其中:

X是 CR_3R_4 ,其中 R_3 和 R_4 各自是烷基;

R是被磺酰基取代的烷基;以及

D是苯基;且

所述吡啶的铵形式由下式表示:



其中:

R₁选自氢和烷基;以及

R₃选自氢、氰基和磺酰基;

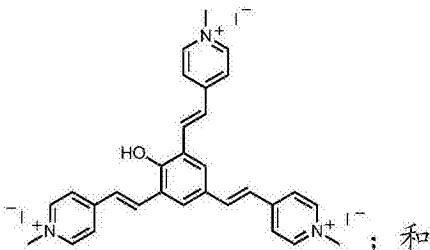
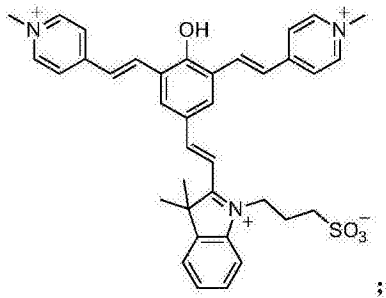
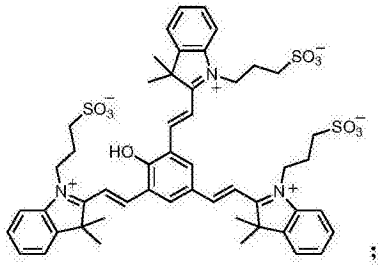
Z和Y形成所述含供体的部分;其中Z和Y形成被羟基取代的苯基从而使得在去质子化后产生酚盐阴离子、或者Z和Y形成被与过氧化氢反应的部分取代的苯基从而使得在与过氧化氢的化学反应后产生酚盐阴离子、或者Z和Y形成被组织蛋白酶B的底物取代的苯基从而使得通过组织蛋白酶B产生酚盐阴离子,其中所述与过氧化氢反应的部分包括苯基硼酸,且所述组织蛋白酶B的底物包括苯丙氨酸和赖氨酸的二肽;以及

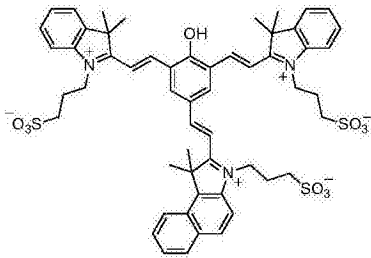
L₁和L₂各自独立地是至少一个-CR' =CR''-部分的含碳次甲基链,其中R'和R''各自独立地是氢,

并且其中所述L₁和L₂、所述Q₁含受体的部分和Q₂含受体的部分以及所述Z-Y含供体的部分形成没有共振电子的共轭π-电子体系。

25. 如权利要求24所述的发荧光的化合物,还包含第三含受体的部分且是使得所述第一含受体的部分、所述第二含受体的部分以及所述第三含受体的部分与所述含供体的部分形成所述共轭π-电子体系,所述第三含受体的部分选自所述假吲哚的铵形式和所述吡啶的铵形式。

26. 如权利要求24所述的发荧光的化合物,其中所述给电子基团是羟基,所述发荧光的化合物选自自由以下成员组成的组:





27. 权利要求1-26中任一项所述的发荧光的化合物在制备成像剂中的用途。

28. 权利要求13-21中任一项所述的发荧光的化合物在制备用于确定样品中的所述分析物的存在和/或水平的成像剂中的用途,所述确定包括将所述样品与所述发荧光的化合物接触;并收集从所述样品发射的光,其中所述光的存在和/或水平指示所述分析物的存在和/或水平。

29. 如权利要求28所述的用途,其中所述光具有在近红外范围内的波长。

30. 如权利要求28或29所述的用途,其中所述分析物与医学病症相关,且其中确定所述分析物的存在和/或水平是用于确定所述医学病症的存在或进展。

31. 如权利要求30所述的用途,其中所述分析物是在受所述医学病症折磨的器官或组织内过表达的酶。

32. 如权利要求30所述的用途,其中所述分析物响应于所述医学病症而产生。

33. 权利要求24所述的发荧光的化合物在制备用于确定样品中的过氧化氢的存在和/或水平的成像剂中的用途,其中所述Z-Y为所述被与过氧化氢反应的部分取代的苯基,所述确定包括将所述样品与所述发荧光的化合物接触;并收集从所述样品发射的光,其中所述光的存在和/或水平指示所述过氧化氢的存在和/或水平。

34. 如权利要求33所述的用途,其中所述光具有在近红外范围内的波长。

35. 权利要求24所述的发荧光的化合物在制备用于确定样品中的组织蛋白酶B的存在和/或水平的成像剂中的用途,其中所述Z-Y为所述被包括组织蛋白酶B的底物的部分取代的苯基,所述确定包括将所述样品与所述发荧光的化合物接触;并收集从所述样品发射的光,其中所述光的存在和/或水平指示所述组织蛋白酶B的存在和/或水平。

36. 如权利要求35所述的用途,其中所述光具有在近红外范围内的波长。

37. 一种药物组合物,其包含权利要求1-26中任一项所述的发荧光的化合物和药学上可接受的载体。

可活化的发荧光的化合物及其作为近红外探针的用途

[0001] 发明领域和背景

[0002] 在本发明的一些实施方案中,本发明涉及发荧光的化合物(fluorogenic compound)且更具体地,但不唯一地涉及发生化学事件后重排,从而产生近红外探针的可化学激活的发荧光的化合物以及涉及其用途。

[0003] 近几年,非放射性标记在生物化学和分子生物学中的使用已成指数增长。在用作非放射性标记的各种化合物中,产生发荧光的信号或发光信号的芳族染料是特别有用的。

[0004] 近红外光谱学(NIRS)是使用电磁波谱的近红外区(从约700nm到1400nm)的光谱学方法。NIR通常可以比中红外辐射穿透进入样品远得多,且尤其用于探测疏松材料而几乎不需要或不需样品制备。在650nm和900nm之间的近红外(NIR)范围内的光学成像非常适用于生物应用,原因是由于NIR光子在此范围内高度穿透通过有机组织和低的自发荧光背景,因而它而能够检测分子体内活性。

[0005] 适用于NIR中的荧光染料包括,例如,荧光素标记、Alexa Fluor染料、花青染料、如Cy2、Cy3、Cy5、CY7、任选取代的香豆素、R-藻红蛋白、别藻红蛋白、德克萨斯红和普林斯顿红。

[0006] 花青染料已确认为用于NIR成像,由于生物兼容性、环境稳定性、大消光系数、窄发射光谱带及其相对高的量子产率[Mujumdar ET AL. Bioconjugate Chem. 4, 105-11 (1993)],这允许它们穿透深层组织并用作用于活体无损成像的吸引人的探针。

[0007] 花青染料包含两个含氮部分(例如,假吡啶基环),一个呈受体部分的形式(例如,铵),且一个呈供体部分的形式(例如,胺),其通过一系列共轭双键连接。染料分类的根据连接两个环状结构的中心双键的数目(n)将染料归类;当n=1时,单碳花青或三次甲基碳花青;当n=2时,双碳花青或五次甲基碳花青;及当n=3时,三碳花青或七次甲基碳花青。

[0008] 花青染料已被开发用于荧光共振能量转移(FRET)测定。简单地说,FRET测定依赖于两个荧光团,供体荧光团和受体荧光团之间的相互作用。当供体分子和受体分子足够近的靠近时,供体分子的荧光被转移到受体分子上,从而减少寿命且淬灭供体物质的荧光并伴随受体物质的荧光强度增加。在肽裂解反应的情况下,荧光供体分子和荧光受体分子被连接到待裂解的肽键的任一侧上的肽底物上且以这样的发生能量转移的距离。肽裂解反应将分开供体分子和受体分子,且因此将恢复供体分子的荧光。

[0009] 已通过对花青染料通过引入具有削弱或消除分子荧光的效应的化学基团来进行某些修饰研制了在FRET测定中适合用作受体或“淬灭剂”分子的花青染料。

[0010] 例如,利用FRET的花青分子的开启式体系包含通过酶可裂解的连接基连接彼此以获得淬灭的荧光团的花青染料和淬灭剂。一旦通过特异性酶裂解连接基后,荧光团与淬灭剂分离并因此实现了荧光信号的开启。然而,这种方法需要除花青之外的另外染料(淬灭剂)。

[0011] 设计替代的开启式花青探针的尝试通常具有低量子产率、低消光系数和复杂合成的局限性[见,例如,Ho等人, Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 2599-602 (2006); 和Richard等人 Org. Lett. 10, 4175-8 (2008)],且已报道了牵涉具有 π -电子共轭变化的花青探针的仅有限

的具体实例[见,Kundu等人*Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 6134-8 (2010); 和Kundu等人*Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 299-303 (2009)]。

[0012] 已报道了耦合到靶向肽的花青分子。见,例如,Tung等人,*Bioconjug Chem.* 199910 (5):892-6,公开了包含花青肽共轭物的组织蛋白酶敏感体系,及美国专利第6,217,848号公开了用于靶向递送的包括几种花青染料与多种双同系物和四(羧酸)同系物的染料肽共轭物。

[0013] 另外的背景技术包括Samanta等人,*Chem. Commun.*, 2010, 46, 7406-7408; Dickinson等人,*J. Am. Chem. Soc.* 132, 5906-15 (2010); Dickinson等人,*Nat. Chem. Biol.* 7, 106-12 (2011); Miller等人,*Nat. Chem. Biol.* 3, 263-7 (2007); Van de Bittner等人,*Proc. Natl. Acad. Sci.* (2010)]; Avital-Shmilovici, M. & Shabat, D. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 3643-7 (2010); SeIIa, E. & Shabat, D. *Chem. Commun.*, 5701-3 (2008); SeIIa, E. & Shabat, D. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 9934-6 (2009); Wainstein等人,*Chem. Commun.* 2010; 46: 553-5; Karton-Lifshin等人,*J. Phys. Chem. A.* 2012年1月, 12; 116 (1): 85-92; Karton-Lifshin等人,*J. Am. Chem. Soc.* 2011年7月, 20; 133 (28): 10960-5; 和SeIIa等人,*J. Am. Chem. Soc.*, 132, 3945-3952。

[0014] 发明概述

[0015] 设计上述的开启式探针 (Turn-ON probe) 的以前的尝试通常具有低量子产率、低消光系数和复杂合成的局限性。

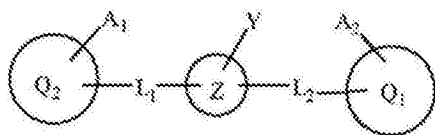
[0016] 在寻找具有花青光谱学特性的分子的开启式机构的改进方法方面,本发明人已设计并成功制备且实践了具有模块化的触发机构的基于花青的开启式NIR探针。可以根据需要,通过引入适合于期望的分析物的触发单元来调整用于基于花青的探针的这种模块化方法。根据探针中的触发单元,多种器官和组织的NIR成像可应用于或可用于多种医学应用和诊断应用。

[0017] 本文所描述的新型基于花青的NIR探针可通过简单的(例如,两步)操作来合成且具有相对高的量子产率和大的消光系数。由适当的分析物诱导的化学事件后,探针的设计允许通过 π -电子重新定位形成花青样染料。

[0018] 本文所公开的NIR探针基于 π -电子在包含含供体的部分和两个或更多个含受体的部分的体系中的重新定位,这受到化学事件的影响。含供体的部分和含受体的部分形成不具有 π -电子的离域(没有共振电子(resonating electron))的共轭 π -电子体系,使得该探针不能发射光(例如近红外光)。化学事件后,含供体的部分的重排,使得它转移电子到含受体的部分,并由此获得前者两个或更多个含受体的部分之间,且这些部分之间具有离域的共振电子的 π -电子体系。由于离域的共振电子的存在,获得了发射在期望的近红外范围(例如,650nm和900nm之间)内的光的能力,如图19中所示。

[0019] 根据本发明的一些实施方案的方面,提供了包含至少两个含受体的部分和含供体的部分的发荧光的化合物,至少两个含受体的部分和含供体的部分被这样布置使得:(i) 至少两个含受体的部分和含供体的部分形成没有共振电子的共轭 π -电子体系,使得该化合物不能发射NIR红外光;及(ii) 化学事件后,含供体的部分重排,以便转移电子到含受体的部分中的一个上并由此,含受体的部分使含供体的部分变成了至少一个另外的含受体的部分,从而使能发射近红外光。

- [0020] 根据本发明的一些实施方案,含供体的部分包含芳族部分。
- [0021] 根据本发明的一些实施方案,含供体的部分包含被给电子基团如羟基取代的芳族部分。
- [0022] 根据本发明的一些实施方案,含供体的部分是使得化学事件后,它通过经历1,4-消除而重排。
- [0023] 根据本发明的一些实施方案,由分析物产生化学事件。
- [0024] 根据本发明的一些实施方案,化学事件包括含供体的部分的裂解。
- [0025] 根据本发明的一些实施方案,含供体的部分包含触发单元,且其中化学事件包括触发单元的裂解。
- [0026] 根据本发明的一些实施方案,触发单元的裂解由存在的分析物来实现。
- [0027] 根据本发明的一些实施方案,分析物与医学病症相关。
- [0028] 根据本发明的一些实施方案,分析物是在受医学病症折磨的器官或组织内过表达的酶。
- [0029] 根据本发明的一些实施方案,医学病症是癌症。
- [0030] 根据本发明的一些实施方案,酶选自自由组织蛋白酶、半胱天冬酶、组织蛋白去乙酰化酶、基质金属蛋白酶、丝氨酸激酶或苏氨酸激酶和丝氨酸激酶组成的组。
- [0031] 根据本发明的一些实施方案,分析物是响应医学病症而在器官或组织内产生的物质。
- [0032] 根据本发明的一些实施方案,医学病症选自炎症、缺氧、细胞凋亡、脑缺血、骨质疏松症、血管生成依赖性疾病或紊乱和自身免疫性疾病或紊乱组成的组。
- [0033] 根据本发明的一些实施方案,发荧光的化合物还包含被连接到含供体的部分的治疗活性剂。
- [0034] 根据本发明的一些实施方案,治疗活性剂被连接到含供体的部分,使得化学事件后,治疗活性剂被释放。
- [0035] 根据本发明的一些实施方案,发荧光的化合物具有通式I:



[0036]

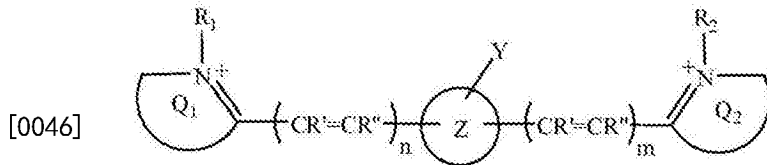
式 I

- [0037] 其中:
- [0038] Q_1 和 Q_2 各自独立地是含受体的部分;
- [0039] A_1 和 A_2 各自是含受体的部分中的受体基团;
- [0040] Z 和 Y 形成含供体的部分;
- [0041] L_1 和 L_2 各自独立地是连接部分或不存在,且每个是使得 Q_1 含受体的部分和 Q_2 含受体的部分及 Z - Y 含供体的部分形成共轭 π -电子体系。
- [0042] 根据本发明的一些实施方案,含受体的部分和含供体的部分一起形成修饰的花青结构(cyanine structure)。
- [0043] 根据本发明的一些实施方案,修饰的花青结构包含两个含受体的部分,所述两个

含受体的部分之间经由含碳次甲基的链(carbomethine-containing chain)连接,且其中含供体的部分形成含碳次甲基的链的一部分或连接到含碳次甲基的链。

[0044] 根据本发明的一些实施方案,每个含受体的部分独立地是 $=N^+RaRb$ 部分,其中Ra和Rb各自独立地是氢、烷基或环烷基,或可选择地,Ra和Rb一起形成杂脂环族(heteroalicyclic)或杂芳基。

[0045] 根据本发明的一些实施方案,发荧光的化合物具有通式II:



式 II

[0047] 其中:

[0048] Q_1 和 Q_2 各自独立地是取代的或未取代的杂环部分(含如式II中所示的正电荷的氮原子且每个形成含受体的部分);

[0049] R_1 和 R_2 各自独立地选自由氢、烷基和环烷基组成的组;

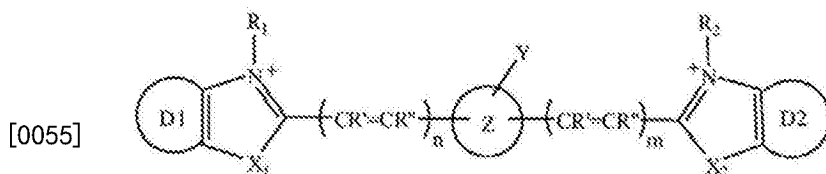
[0050] n 和 m 各自独立地是从0到4的整数;

[0051] R' 和 R'' 各自独立地是氢、烷基或环烷基,或可选择地, R' 和 R'' 一起形成芳基;及

[0052] Z 和 Y 一起形成如本文所描述的含供体的部分。

[0053] 根据本发明的一些实施方案, Q_1 和 Q_2 各自独立地是取代的或未取代的杂芳基,如,但不限于,吡啶鎓、咪唑鎓和甲基吡啶鎓(picolinium)(甲基吡啶鎓)。

[0054] 根据本发明的一些实施方案,发荧光的化合物具有通式IIIB:



式 IIIA

[0056] 其中:

[0057] D_1 和 D_2 各自独立地是芳族部分;以及

[0058] X_1 和 X_2 各自独立地选自由 CR_3R_4 、 NR_3 以及S组成的组,其中 R_3 和 R_4 各自独立地选自由氢、烷基、环烷基、芳基、杂脂环族、杂芳基、烷氧基、羟基、巯基、硫代烷氧基、芳氧基、硫代芳氧基、氨基、硝基、卤素、三卤甲基、氰基、酰胺、羧基、磺酰基、硫氧基、亚磺酰基、磺酰胺和糖组成的组。

[0059] 根据本发明的一些实施方案, D_1 和 D_2 各自是取代的或未取代的苯基。

[0060] 根据本发明的一些实施方案, X_1 和 X_2 各自独立地是 CR_3R_4 。

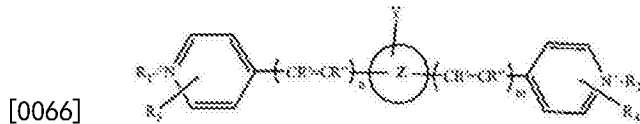
[0061] 根据本发明的一些实施方案, R_3 和 R_4 各自是烷基。

[0062] 根据本发明的一些实施方案, R_1 和 R_2 各自是氢。

[0063] 根据本发明的一些实施方案, R_1 和 R_2 各自独立地是取代的或未取代的烷基。

[0064] 根据本发明的一些实施方案, Z 和 Y 是使得化学事件包括Y的裂解。

[0065] 根据本发明的一些实施方案,发荧光的化合物具有通式IIIA:



式 IIIA

[0067] 其中:

[0068] R₁和R₂各自独立地选自由氢、烷基、环烷基和芳基、杂脂环族、杂芳基组成的组;

[0069] n和m各自独立地是从0到4的整数;

[0070] R₃和R₄各自独立地选自由氢、烷基、环烷基、芳基、杂脂环族、杂芳基、烷氧基、羟基、巯基、硫代烷氧基、芳氧基、硫代芳氧基、氨基、硝基、卤素、三卤甲基、氰基、酰胺、羧基、磺酰基、硫氧基、亚磺酰基、磺酰胺和糖组成的组。

[0071] R'和R''各自独立地是氢、烷基或环烷基,或可选择地,R'和R''一起形成芳基;及

[0072] Z和Y一起形成如本文所描述的含供体的部分。

[0073] 根据本发明的一些实施方案,发荧光的化合物还包含第三个含受体的部分且是使得第一个、第二和第三个含受体的部分以及含供体的部分形成没有共振电子的共轭π-电子体系。

[0074] 根据本发明的一些实施方案,发荧光的化合物用于确定产生化学事件的分析物的存在和/或水平。

[0075] 根据本发明的一些实施方案的一个方面,提供了具有通式IV的荧光化合物:



式 V

[0077] 其中:

[0078] Q₁和Q₂各自独立地是使得形成取代的或未取代的杂环部分;

[0079] R₁和R₂各自独立地选自由氢、烷基、环烷基和芳基、杂脂环族、杂芳基组成的组;

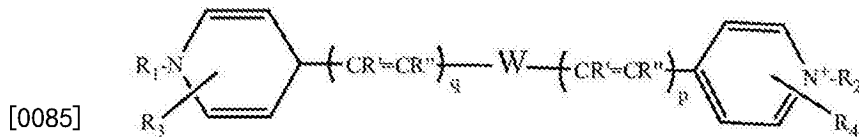
[0080] p和q各自独立地是从0到4的整数;

[0081] R'和R''各自独立地是氢、烷基或环烷基,或可选择地,R'和R''一起形成芳基;及

[0082] W是包含芳族部分的基团,其中所述芳族部分的π-电子共轭到所述-(CR'=CR'')_p-和所述-(CR'=CR'')_q-的π-电子,使得π-电子的离域在所述分子内的胺基团和胺基团之间实现。

[0083] 根据本发明的一些实施方案,Q₁和Q₂中的至少一个形成吡啶环。

[0084] 根据本发明的一些实施方案,荧光化合物具有通式IVA:



式 IVA

[0086] 其中：

[0087] R₁和R₂各自独立地选自由氢、烷基、环烷基和芳基、杂脂环族、杂芳基组成的组；

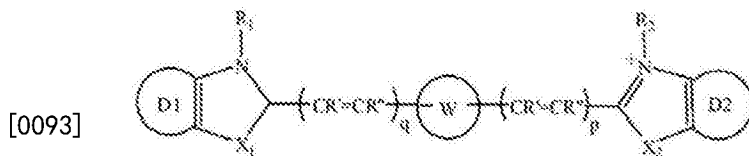
[0088] p和q各自独立地是从0到4的整数；

[0089] R₃和R₄各自独立地选自由氢、烷基、环烷基、芳基、杂脂环族、杂芳基、烷氧基、羟基、巯基、硫代烷氧基、芳氧基、硫代芳氧基、氨基、硝基、卤素、三卤甲基、氰基、酰胺、羧基、磺酰基、硫氧基、亚磺酰基、磺酰胺和糖组成的组。

[0090] R'和R''各自独立地是氢、烷基或环烷基，或可选择地，R'和R''一起形成芳基；及

[0091] W是如本文所描述的。

[0092] 在一些实施方案中，荧光化合物具有通式IVB：



式 IVB

[0094] 其中：

[0095] D₁和D₂各自独立地是芳族部分；

[0096] X₁和X₂各自独立地选自由CR'R''、NR'、O、S和SiR'R''组成的组，其中R'和R''各自独立地选自由氢、烷基、环烷基、芳基、杂脂环族、杂芳基、烷氧基、羟基、巯基、硫代烷氧基、芳氧基、硫代芳氧基、氨基、硝基、卤素、三卤甲基、氰基、酰胺、羧基、磺酰基、硫氧基、亚磺酰基、磺酰胺和糖组成的组；

[0097] R₁和R₂各自独立地选自由氢、烷基、环烷基和芳基、杂脂环族、杂芳基组成的组；

[0098] p和q各自独立地是从0到4的整数；

[0099] W是包含芳族部分的基团，其中所述芳族部分的π-电子共轭到所述-(CR'=CR''_p)-和所述-(CR'=CR''_q)-的π-电子，使得π-电子的离域在所述分子内的胺基团和胺基团之间实现。

[0100] 根据本发明的一些实施方案，如本文所描述的发荧光的化合物或如本文所描述的荧光化合物用于使样品成像的用途。

[0101] 根据本发明的一些实施例的一个方面，提供了如本文所描述的发荧光的化合物在制备成像剂中的用途。

[0102] 根据本发明的一些实施例的一个方面，提供确定样品中分析物的存在和/或水平的方法，该方法包括将样品与如本文所描述的发荧光的化合物接触，并收集从样品发射的光，其中光的存在和/或水平指示分析物的存在和/或水平。

[0103] 根据本发明的一些实施方案，光具有在近红外范围内的波长。

[0104] 根据本发明的一些实施方案的一个方面,提供了使样品成像的方法,该方法包括将样品与如本文所描述的发荧光的化合物或与如本文所描述的荧光化合物接触,并收集从样品发射的光。

[0105] 根据本发明的一些实施方案,光具有在近红外范围内的波长。

[0106] 根据本发明的一些实施例的一个方面,提供了包含如本文所描述的发荧光的化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0107] 根据本发明的一些实施方案,化学事件由分析物产生且其中该组合物被确认用于确定样品中分析物的存在和/或水平。

[0108] 根据本发明的一些实施方案,分析物与医学病症相关,且其中,确定分析物的存在和/或水平被用于确定医学病症的存在或医学病症的进展。

[0109] 根据本发明的一些实施方案,分析物是受医学病症折磨的器官或组织内过表达的酶。

[0110] 根据本发明的一些实施方案,分析物响应于医学病症而产生。

[0111] 根据本发明的一些实施方案,医学病症选自癌症、增殖性疾病或紊乱、炎性疾病或紊乱、眼部疾病、自身免疫性疾病、胃肠道疾病、血管生成依赖性紊乱和紊乱、脑缺血、糖尿病、关节炎、黄斑变性、糖尿病视网膜病、动脉粥样硬化、心力衰竭、牛皮癣、骨质疏松症和骨关节炎组成的组。

[0112] 除非另外定义,本文所用的所有技术术语和/或科学术语具有与本领域技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管类似于或等同于本文所描述的那些的方法和材料可用于实施或测试本发明的实施方案、但示例性的方法和/或材料在下面被描述。在冲突的情况下,将以包括定义的本专利说明书为主。此外,材料、方法和实施例仅是说明性的,且不意图一定是限制性的。

[0113] 附图简述

[0114] 仅通过实施例,参考附图来描述本发明的一些实施方案。现在具体参考详细的附图,强调的是,所显示的细节是通过实施例的方式且为了本发明的实施方案的说明性讨论的目的。在这点上,连同附图的描述使得如何可实践本发明的实施方案对本领域技术人员是明显的。

[0115] 附图中:

[0116] 图1A-B呈现了用于模块化开启式荧光探针的传统机构的背景技术示意图(图1A)和根据本发明的一些实施方案激活发荧光的化合物的电子重排的示意图(图1B);

[0117] 根据本发明的一些实施方案,图2A-H呈现了具有近红外荧光的示例性基于花青的开启式探针的示意图,图2A呈现了供体-两受体示例性化合物1,和其相应的共振染料化合物QCy7,与花青化合物Cy7相比,图2B呈现了类似于Cy7的供体两受体示例性化合物的另一个实例,该实例具有掩蔽的供体部分和它激活后获得的染料化合物,图2C呈现了类似于Cy5的供体两受体示例性化合物,该化合物具有掩蔽的供体部分和它激活后获得的染料化合物,图2D-G呈现了示例性供体两受体示例性化合物,该化合物具有离域的 π -电子体系的多功能配置以及图2H呈现了示例性供体三受体和其相应的共振染料化合物;

[0118] 图3A-B呈现了描绘根据本发明的一些实施方案的示例性化合物和如使用各种酚作为起始材料获得的它们相应的染料化合物的示意图(图3A)以及根据本发明的一些实施

方案的示例性受体部分的化学结构(图3B)；

[0119] 图4A-B呈现了从PBS 7.4 [100 μ M] 中的化合物1产生的QCy7的吸收和荧光光谱(图4A)和从与PBS 7.4 [100 μ M] 中的乙酸酯化合物3(蓝色)相比的化合物1(红色)产生的QCy7的NIR荧光光谱(λ_{ex} =560nm)(图4B)；

[0120] 图5A-B呈现了显示使用f luoromax-3荧光计在560nm的激发波长下获得的甲醇中的甲酚紫(图5A)和从PBS 7.4中的化合物1产生的QCy7(图5B)在指定浓度下的荧光强度与波长的图。

[0121] 图6A-B呈现了参考化合物甲酚紫(图6A)和QCy7(图6B)的荧光强度与吸光度的线性图。

[0122] 图7呈现了在560nm处测量的QCy7的吸光度随PBS 7.4中的浓度变化的线性图；

[0123] 图8A-B呈现了显示使用f luoromax-3荧光计在560nm的激发波长下获得的从化合物1产生的QCy7(图8A)和从PBS 7.4中的化合物9产生的磺基-QCy7(su lfo-QCy7)(图8B)在指定浓度下的荧光强度与波长的图。

[0124] 图9A-B呈现了QCy7(图9A)和磺基-QCy7(图9B)的荧光强度与吸光度的线性图；

[0125] 图10呈现了在590nm处测量的磺基-QCy7的吸光度随PBS 7.4中的浓度变化的线性图；

[0126] 图11呈现了PBS 7.4 [50 μ M] 中的化合物14(见表1中的条目6)的吸收(蓝色)和荧光(红色)；

[0127] 图12呈现了PBS 7.4 [50 μ M] 中的化合物18(表1中的条目10)的吸收(蓝色)和荧光(红色)；

[0128] 图13呈现了PBS 7.4 [50 μ M] 中的化合物25(表1中的条目21)的吸收(蓝色)和荧光(红色)；

[0129] 图14A-B呈现了以930nm双光子激发后,通过共聚焦显微镜获得的用化合物25(表1中的条目21)温育过夜的HeLa细胞的图像；

[0130] 图15呈现了从化合物9(绿色的圆形)、化合物14(蓝色的菱形)、化合物18(红色的正方形)、化合物25(橙色的三角形)产生的染料化合物和花青染料Cy7(空白的藏青色的正方形)的NIR荧光发射的归一化强度随在37 $^{\circ}$ C的PBS 7.4中(25 μ M)的温育时间的变化；

[0131] 图16呈现了针对化合物14(黑色的正方形)、化合物18(蓝色的三角形)和化合物25(红色的圆形)(在指定pH下的缓冲液中50 μ M)测量的紫外光-可见光吸光度随环境pH的变化；

[0132] 图17A-B呈现了证明在HeLa细胞内(绿色)和HeLa细胞外(红色)的磺基-QCy7(从化合物9产生)的荧光的共聚焦图像(图17A)和曲线(图17B)；

[0133] 图18A-F呈现了显示由溶酶体标记溶酶体传感器在化合物25的共定位测定中获得的图像的HeLa细胞的共聚焦成像(图18A-C)和以获得从570nm到800nm的荧光的561nm激光线激发后,使用化合物25温育过夜的HeLa细胞的共聚焦图像(图18D-F)；

[0134] 图19A-B是探针化合物4和PBS 7.4 [50 μ M] 溶液中的化合物9(产生磺基-QCy7)(图19A)和探针4以及PBS 7.4 [50 μ M] 溶液中的磺基-QCy7的照片,该照片通过NIR相机(以波长570nm激发,>690nm的截止滤波器)(图19B)来获得；

[0135] 图20A-B是显示在37 $^{\circ}$ C的PBS中的过氧化氢[50 μ M]存在下(红色)和不存在下(蓝

色),温育探针化合物4后发射的NIR荧光($\lambda_{Ex}=590\text{nm}$ 、 $\lambda_{Em}=720\text{nm}$) (图20A)和使用指定浓度的过氧化氢温育后,探针化合物4 [100 μM] 发射的NIR荧光(图20B)的曲线图;

[0136] 图21呈现了外源过氧化氢通过探针化合物4的体内成像(CRI Maestro™ image,以595nm激发,635nm的发射截止滤波器);

[0137] 图22呈现了探针化合物4的荧光对于过氧化氢浓度的依赖性(CRI Maestro™ image,以595nm激发,635nm的发射截止滤波器);

[0138] 图23A-B呈现了在LPS诱导的炎症反应期间,使用探针化合物4,小鼠腹腔中的内源过氧化氢的体内成像(图23A)(右边的小鼠-将LPS注射到小鼠的腹腔中,6小时后,接着腹腔注射探针4;中间的小鼠-将PBS注射到小鼠的腹腔中,6小时后,接着腹腔注射探针4;及左边的小鼠-阴性对照(仅PBS),和(图23B)显示来自在LPS诱导的炎症(即H₂O₂)的存在下或在LPS诱导的炎症(即H₂O₂)不存在下,使用探针化合物4注射的两只小鼠的NIR荧光发射强度的定量的条形图(对来自整个腹腔的光子总数积分并以与对照组(n=5)比较的比绘图,插入物集中在LPS诱导的炎症不存在下,注射PBS(对照)或注射探针4获得的NIR荧光发射强度;

[0139] 图24A-B呈现了描绘了在组织蛋白酶B存在下探针34酶裂解时,组织蛋白酶B激活的探针34的结构和染料QCy7的产生的示意图(图24A),和描绘了在指定pH下的组织蛋白酶B的存在和不存在下,发射的探针34的NIR荧光的对比图;

[0140] 图25是用于连接潜在的荧光团激活以监测递送系统中的药物释放心事件的设计的示意图。

[0141] 图26是基于QCy7的报告药物递送系统的示例性分解机构的示意图;以及

[0142] 图27呈现了通过形成磺基-QCy7并释放游离 taxi 来产生NIR荧光的组织蛋白酶B激活的前药。

[0143] 发明的具体实施方式

[0144] 在本发明的一些实施方案中,本发明涉及荧光化合物且更具体地,但不唯一地涉及化学事件后重排从而产生近红外探针的可化学激活的发荧光的化合物,并涉及其用途。

[0145] 在详细解释本发明的至少一个实施方案前,应理解,本发明在其应用方面不必限于在下面的描述中阐述的或通过实施例所例证的细节。本发明能够以各种方式实践或实施其它实施例。

[0146] 结合创新光学技术的高度敏感荧光探针的发展,是用于活体无损定性成像和/或无损定量成像的有前途的策略。

[0147] 如上文所指出的,为了实施允许直接且可靠地评估体内分析物的方法、具有650nm和900nm之间的发射最大值的水溶性且基于NIR荧光的探针是令人满意的。由于它们极佳的光谱学特性,花青染料被视为用于生物应用的NIR荧光探针的主要种类,然而因为不能提供具有开启式机构的有效基于花青的探针,它们的使用受到限制。

[0148] 用于将开启式机构应用到发荧光的分子中的最有效的方法学基于通过其官能团将触发部分耦合到发荧光的分子上。这样的官能团的掩蔽减少了染料的共轭 π -电子体系,并因此关闭了探针的荧光。去除触发使具有染料的 π -电子的官能团的共轭恢复,且从而开启了探针的荧光信号,如图1背景技术中所描绘的。

[0149] 然而,尽管主要关于具有紫外光-可见光荧光的染料,如香豆素来解释这样的概

念,但在花青染料中应用这种开启式机构难以执行。花青染料具有由聚次甲基桥组成的 π -电子体系,该聚次甲基桥通常是3个或更多个原子的长度,共轭到两个假吡啶型环的不饱和键上,且因此通常不具有共轭到 π -电子体系的任何官能团。此外,因为花青分子的 π -电子体系是相对长的,期望在其 π -体系中包含另外的官能团不影响荧光光谱,如是在其它常见的染料中的情况。对其它近IR探针,也期望实践这样的开启式机构的类似限制。

[0150] 实际上,已报道了包含 π -电子共轭的变化的花青探针的仅有的具体实例。

[0151] 本发明人现在设计并成功制备且实践了用于通过将开启式机构引入具有花青光谱学特性的分子中来产生开启式NIR基于花青的新种类的新方法学。设计所公开的基于花青的探针以允许在通过适当的分析物去除触发单元后,通过 π -电子重新定位来形成荧光花青分子。探针基于通过所感兴趣的分析物去除触发单元后获得的新型花青样荧光染料。 π -电子体系与众不同的变化导致产生具有强NIR荧光的花青染料。所公开的模块化的基于花青的探针与特定分析物反应后,可释放活性花青荧光染料并因此可以被模块化衍生化,并通过引入适当的触发单元来适当地调整进行各种分析物的成像。合成所公开的探针是非常简单的,根据需要,可修改以制备用于检测和使各种分析物成像的各种探针。

[0152] 根据本发明的一些实施方案还可利用如在本领域中确认的,花青染料的可控的光谱特性。已观察到这些光谱特性遵循特定的经验法则。例如,在氨基供体和铵受体之间每增加一个共轭双键将增加最大吸收和最大发射约100nm。因此,当具有 $n=1$ 的化合物具有约550nm的最大吸收时,具有 $n=2$ 和 $n=3$ 的等同化合物具有650nm和750nm的最大吸收。将芳族基团添加到分子的两侧可偏移吸收15nm到较长的波长。包含含氮的供体部分和含氮的受体部分的基团及其取代基也可促成吸收特征和发射特性。使用以偕二甲基获得的值作为参考点,在环上氧取代偕二甲基减少最大吸收和最大发射约50nm。与此相反,硫取代增加最大吸收和最大发射约25nm。在芳环上的R基团如烷基、烷基-磺酸酯基和烷基-羧酸酯基对花青染料的最大吸收和最大发射几乎没有影响(见,例如,美国专利号6,110,630)。

[0153] 如在下面的实施例部分所展示的,通过简单的两步操作已成功合成了示例性的开启式NIR基于花青的探针,并显示相对高的量子产率和大的消光系数。应用示例性的开启式探针以展示小鼠急性炎症模型中内源产生的过氧化氢的无损体内成像。

[0154] 可直接利用本文所公开的开启式NIR基于花青的探针作为用于体外应用的研究工具,体外应用如但不限于,细胞摄取、与激活荧光体系的物质(例如,酶)的存在和/或水平相关的概念的传达和证明,且重要的是,用于生物过程的体内成像和监测,生物过程例如,如疾病和紊乱的癌症和炎症的存在和/或进展。例如,本文所公开的一类新的开启式NIR基于花青的探针可用于早期检测患者的癌症和用于无损监测癌进展和治疗功效。

[0155] 图1B描述了体现本发明的一些实施方案的大体概念的示意图,其中发荧光的化合物的结构重排导致电子在由构成示例性荧光探针的部分之间转移,如下文中所详述的,使得 π -电子的重新定位产生了发荧光的化合物。

[0156] 图2A-H呈现了根据本发明的一些实施方案的开启式NIR基于花青的探针的示例性设计。化学活化后,产生酚盐阴离子的官能团被并入或被连接到花青样分子的聚次甲基链上或含碳次甲基的部分上。并入官能团产生了具有两个正电荷的分子,且因此防止两个含氮的部分(例如,假吡啶环)之间的正电荷的离域,如在典型的花青分子的情况下(例如,图2A中呈现的Cy7),使得NIR荧光是关闭的。产生酚盐阴离子后,由于例如触发单元的去质子

化或裂解,因而通过具有类似于花青的共轭模式的共振杂化使正电荷的离域成为可能。因此,探针的NIR荧光被切换到打开的位置。

[0157] 图3A-B呈现了用于根据本发明的一些实施方案产生示例性的发荧光的化合物的示例性的大体合成途径,和适用于这些途径的示例性的受体部分,展示了本文所描述的方法学的模块化并且还显示了本发明的发荧光的化合物的产生。

[0158] 图4-13呈现了根据本发明的一些实施方案的示例性的发荧光的化合物的光谱特性。

[0159] 图14-18呈现了根据本发明的一些实施方案的示例性的化合物的稳定性、酸度、细胞渗透性和荧光的数据。

[0160] 图19-23呈现了使用根据本发明的一些实施方案的示例性过氧化氢敏感探针在小鼠的急性炎症模型中获得的体外数据和体内数据。

[0161] 图24A-B呈现了根据本发明的一些实施方案的组织蛋白酶B活性探针的设计和实验。

[0162] 图25-27展示了其中开启式NIR探针应用于前药体系的示例性设计,该前药体系可用于例如,获得药物作用的实时报告模式。通过可释放的键将药物分子连接到基于花青的探针上以便产生具有关闭(OFF)NIR荧光的前药体系。去除探针的触发导致游离药物的释放和具有开启(ON)NIR荧光的活性花青分子的形成。因此,通过产生NIR荧光来报告前药活化。

[0163] 在下面的实施例部分中所展示的具有开启式机构的基于花青的探针结构的设计可被修改用于形成多功能体系,在该体系中,在化学事件后,实现 π -电子重新定位且在该体系中 π -电子重新定位产生了发射NIR光的能力。

[0164] 发荧光的化合物:

[0165] 因此,根据本发明的一些实施方案的一个方面,提供了发荧光的化合物,每个包含两个或更多个含受体的部分,例如,第一含受体的部分和第二含受体的部分,和含供体的部分,它们被布置成使得所述含受体的部分和所述含供体的部分在含受体的部分之间形成没有共振(离域的)电子的共轭 π -电子体系。然而,含供体的部分和两个或更多个含受体的部分被布置成使得化学事件后,含供体的部分重排以便将 π -电子转移到含受体的部分中的一个(如,到第一受体部分)上,且由于 π -电子的重新定位,含受体的部分中的一个变成了含供体的部分和其中新形成的含供体的部分和剩下的含受体的部分之间产生了 π -电子共振的 π -电子体系。

[0166] 由于其中含受体的部分之间的 π -电子的离域受到限制的发荧光的化合物的电子结构,该化合物至少在NIR范围内是光谱失活的(或具有弱的光谱学性质),并因此不能发射光,尤其是近红外光。然而含供体的部分和含受体的部分的布置允许通过化学事件来诱导 π -电子的重新定位。重新定位在NIR范围内产生了光谱学活性,即发射近红外光的能力。

[0167] 通过化学事件引起的 π -电子的重新定位牵涉化合物中含供体的部分的电子重排,在电子重排中电子被转移到含受体的部分中的一个上,且相对于其他含受体的部分而言,使此含受体的部分成为供体部分。因此,在剩下的含受体的部分和新形成的含供体的部分(以前是另一个含受体的部分)之间形成了具有离域的、共振电子的 π -电子体系并赋予了近红外光谱学特性。

[0168] 如在本领域通常所述的,术语“发荧光的”包括化学发生或事件、生物化学发生或

事件或物理发生或事件后,具有发荧光(即吸收光和发射光,如下文所定义的)能力的状态和情况。因此,“发荧光的化合物”描述了在化学事件、生物化学事件或物理事件发生后,变得更发荧光的(例如,多至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少为90%、至少100%(至少2倍)、任选地至少3倍、任选地至少4倍多的荧光、且任选地10倍或更高倍的荧光)非荧光化合物或弱荧光化合物。因此,如本文所用的短语“可化学激活的发荧光的化合物”描述了非荧光(即,不吸收光和不发射光)或具有微弱荧光(例如,具有比相应的具有强荧光的荧光分子的量子产率减少至少一半的量子产率)且化学事件后变得更发荧光的(如本文所定义的)化合物。

[0169] 如本文所用,“化学事件”描述了牵涉化合物的化学结构的变化的事件,包括但不限于,键裂解、键形成、质子化、去质子化、氧化、还原等等。

[0170] 化学事件可以是因为存在或不存在导致化合物的化学结构发生上述变化的试剂,可以是因为环境变化(例如,pH的变化或温度的变化或施加的电势或辐射的变化),或是因为存在或不存在催化导致化学结构变化的化学反应的生物物质(例如,酶、金属蛋白、金属离子等)。

[0171] 在一些实施方案中,化学事件是因为存在或不存在分析物,如下文中详细描述。

[0172] 因此,本文所用的短语“发荧光的化合物”描述了化学事件后,改变其荧光的化合物,并因此被视为且在本文也可互换地被称为可化学激活的发荧光的化合物、探针、可化学激活的探针或开启式探针。全文所描述的发荧光的化合物在激活后产生的发荧光的化合物的语境下还被称为产生本文所公开的各荧光(或染料)化合物的化合物。

[0173] 本文可互换地也被称为“具有开启式机构的探针”的短语“开启式探针”,描述了如本文所定义的化学事件后变得发荧光的发荧光的化合物。在发荧光的化合物中,荧光是关闭的,然而该化合物被设计成使得经受化学事件后,荧光变成开启的。

[0174] 从上文提到的原因,目前已知的NIR探针不具有有效的开启式机构。

[0175] 短语“荧光”指的是从单重态激发返回到基态后发射光的化合物。本文所公开的荧光化合物全文也被称为染料化合物或染料分子或被称为荧光团或荧光染料。

[0176] 在一些实施方案中,本文所描述的发荧光的化合物是使得化学事件后,形成能够发射光的分子(例如,荧光分子)。

[0177] 在一些实施方案中,所发射的光是近红外光(近IR或NIR),是在从约700nm到约1400nm的范围内。在一些实施方案中,所发射的光具有在适合于生物应用(例如,体内应用)的波长下的发射最大值,从650nm到900nm的范围内变动,且在一些实施方案中,从700nm到800nm。

[0178] 因此,本文所公开的发荧光的化合物,不显示荧光,且因此不发射在近红外范围处的光,例如,具有在从约650nm到约900nm的范围内的波长的光,且被设计成使得化学事件后,它能够显示荧光且因此发射在这样的近红外范围处的光。

[0179] 如本文所用,提及 π -电子体系的共轭描述了其中在横跨介于其间的 σ 键的至少两个p轨道之间存在重叠。重叠的p轨道允许横跨此处的 π -电子发生离域,使得 π -电子不“属于”单个原子或单个键,而是“分布”在一组原子上。具有离域 π -电子的共轭体系通常降低了含有其的分子的能量。参与共轭的原子数目越大, π -电子的离域越大,且能量越低。

[0180] 如本文所用,提及“共振”描述了在其中 π -电子的离域发生在具有共轭 π -电子体系

的分子中的两个原子或更多个原子之间,使得通过几个起作用的结构表示分子的情况。”共振电子”描述了在其中 π -电子离域发生使得在每个起作用的结构中,正电荷和/或负电荷存在于不同的原子上。当短语”共振电子”涉及共轭分子中的某些原子或原子的组,意味着重叠的p轨道整个存在于这些原子或原子的组之间,且意味着在至少一些起作用的结构中,这些原子的每一个或原子的组具有不同的电荷。

[0181] 因此,在本发明的实施方案的语境中,在含受体的部分之间不具有共振电子的共轭 π -电子体系被用于通过比在含受体的部分和含供体的部分之间具有共振电子的共轭 π -电子体系减少的重叠p轨道的数量描述了 π -电子的离域,符合发荧光的化合物的上述特征。

[0182] 如本文所用,短语”含受体的部分”描述了包含受体基团的部分,从而”受体基团”描述了一种具有允许将电子转移到其上的电子结构的基团。

[0183] 通常,受体基团是吸电子基团。

[0184] 如本文所用的短语”吸电子基团”通常指的是分子中的化学基团,该化学基团可吸引电子远离分子的另一部分。吸电子基团可发挥其作用的距离,即吸电子效应横跨该距离内的键的数量,可通过共轭 π -电子体系来扩展。合适的吸电子基团的非限制性实例包括,但不限于,硝基、铵离子(正电荷的氨基阳离子包括吡啶鎓离子、吡啶离子、吡啶鎓离子、甲基吡啶鎓离子)、含羧基的基团,磺酸酯基、硫酸酯基、丁腈以及三卤烷基,如本文定义了这些术语。

[0185] 含羧基的基团包括具有 $-C(=O)$ 部分的基团,包括酰卤($-C(=O)X$ 基团,其中X是卤化物)、羰基、羧酸酯基、酰胺和醛。

[0186] 受体基团可被包含在含受体的部分内,作为例如,烷基、链烯基、环烷基、芳基或杂芳基的取代基,芳基和杂芳基是优选的,由于它们参与 π -电子共轭的能力。任选地且优选地,受体基团被包含在含芳族受体的部分的主链(骨架)内,形成芳基或杂芳基。

[0187] 例如,硝基受体基团可形成氧吡啶的部分。铵受体基团可形成假吡啶的一部分,或任何其它含氮的杂芳族化合物或杂脂环族的一部分。在一个实例中,铵受体形成了假吡啶的一部分。在一个实例中,铵受体形成了吡啶如N-烷基吡啶(例如N-甲基吡啶)的一部分。羰基可以形成不饱和内酯或内酰胺的一部分。适合用于并入本文所描述的发荧光的化合物中的示例性受体基团被呈现于图3B中。

[0188] 如本文所用,术语”含供体的部分”描述了包含给电子基团的部分,从而”给电子基团”是将电子转移到分子的另一部分的化学实体。给电子基团可发挥其作用的距离,即给电子效应横跨该距离内的键的数量,可通过共轭 π -电子体系来扩展。给电子基团的非限制性实例包括,但不限于,含有氧原子、含有氮原子或含有硫原子的基团,如羟基、烷氧基、巯基、硫代烷氧基以及胺,如本文定义这些术语。

[0189] 在一些实施方案中,含供体的部分是使得化学事件后,它通过经历类似1,4-醌哌替啶(1,4-quinonemethidine-like)这样的重排而进行重排。图2中描绘了示例性的这样的重排。

[0190] ”1,4-醌哌替啶”重排牵涉酚部分的电子重排以形成在其4位上具有甲基化物($=CH-$)取代基的醌。

[0191] 相似地,“类似1,4-醌哌替啶的”重排牵涉包含非羟基的给电子基团的芳族部分的重排,如本文所定义的,在重排中电子被从给电子基团转移以在其4位上形成甲基化物基

团。

[0192] 因此,在一些实施方案中,含供体的部分包含芳族部分。在一些实施方案中,含供体的部分包含在一位置上具有给电子取代基的芳族部分,相对于该分子的其它组分,如果需要,允许类似1,4-醌哌替啶的重排发生,即,导致电子转移到含受体的部分中的一个上并产生允许电子共振的化合物的整个结构。

[0193] 在一些实施方案中,含供体的部分包含被羟基、烷氧基、巯基和/或硫代烷氧基取代的芳族部分。在一些实施方案中,含供体的部分包含被羟基取代的芳族部分。

[0194] 在一些实施方案中,如本文所描述的发荧光的化合物包含两个或更多个含受体的部分和含供体的部分,至少一个且优选全部含受体的部分包含相同或不同的如本文所描述的铵基团(例如,吡啶鎓基团,咪唑基团或如甲基吡啶鎓的吡啶鎓基团),含供体的部分包含羟基(例如,酚)取代的芳基(例如,苯基),且该含供体的部分被连接到含受体的部分,使得化学事件后,可实现1,4-消除,如本文所描述的。

[0195] 在一些实施方案中,化合物还包含将含受体的部分和含供体的部分彼此连接的一个或多个连接部分。连接部分是使得参与如定义的共轭 π -电子体系。

[0196] 在一些实施方案中,连接部分将至少一个,且优选每一个含受体的部分连接到含供体的部分上。

[0197] 一个或多个连接部分的长度和化学性质可影响探针的光谱学性能并因此被选择以便赋予该化合物如本文所定义的光谱学特性(即,化学事件后能够发射NIR光)。

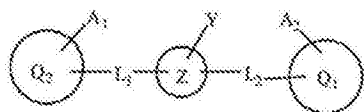
[0198] 在一些实施方案中,一个或多个连接部分包含可共同表示为 $-CR' = CR''$ -部分并形成所需的共轭 π -电子体系的一个或多个碳次甲基部分。

[0199] 如本文所描述的任一个连接部分可用于结合如本文所描述的含受体的部分和含供体的部分中的任何一个。

[0200] 在一些实施方案中,发荧光的化合物包含两个含受体的部分,使得化合物是供体-双-受体化合物。

[0201] 在一些实施方案中,发荧光的化合物包含三个含受体的部分,使得化合物是供体-三-受体化合物。

[0202] 本文所公开的可化学激活的发荧光的化合物可由下列通式I来共同表示:



[0203]

式 I

[0204] 其中:

[0205] Q_1 和 Q_2 各自独立地是如本文所定义的含受体的部分;

[0206] A_1 和 A_2 各自是含受体的部分中如本文所定义的受体基团;

[0207] Z 和 Y 形成如本文所定义的含供体的部分;及

[0208] L_1 和 L_2 各自独立地是连接部分或不存在,例如分别是使得 Q_1 和 Q_2 含受体的部分和 Z - Y 含供体的部分形成如本文所定义的共轭 π -电子体系。

[0209] 在一些实施方案中,一个或多个含受体的部分包含铵作为受体,且因此包含 $=N^+RaRb$ 部分,其中 Ra 和 Rb 各自独立地是氢、烷基、芳基或环烷基,或可选择地, Ra 和 Rb 一起形成

杂脂环族或杂芳基。

[0210] 示例性含受体的部分包括,但不限于源自苯胺、二苯胺,甲胺基,二甲胺,乙胺基,二乙胺基以及类似物的铵离子。苯基或烷基可被取代或未被取代,只要取代基不干扰如本文所描述的化合物的性能。

[0211] 在一些实施方案中,一个或多个含受体的部分是杂环部分,并可被表示如下:



[0213] 其中Q是带正电荷的含氮的杂环部分(杂脂环族或杂芳族化合物);且R是氢、烷基或环烷基。

[0214] 示例性化合物可由通式 II 来表示:



式 II

[0216] 其中:

[0217] Q₁和Q₂各自独立地是取代的或未取代的杂环部分,且是含受体的部分;

[0218] R₁和R₂各自独立地选自氢、烷基和环烷基组成的组;

[0219] n和m各自独立地是从0到4的整数;

[0220] R'和R''各自独立地是氢、烷基或环烷基,或可选择地,R'和R''一起形成芳基;及

[0221] Z和Y一起形成如本文所描述的含供体的部分。

[0222] 在一些实施方案中,Z和Y一起形成包含被给电子基团取代的芳族部分的含供体的部分,所述含供体的部分形成不具有共振电子的共轭π-电子体系且是使得化学事件后,它重排以便电子转移到Q₁和Q₂中的一个上,且由此,Q₁和Q₂中的这一个相对于Q₁和Q₂中的另一个变成了供体部分。本文这样的重排也被称为分子内电荷转移(ICT)。

[0223] 在上述的化合物中,铵基表示上文的式I中的受体基团,分别形成杂环含受体的部分Q₁和Q₂的一部分。

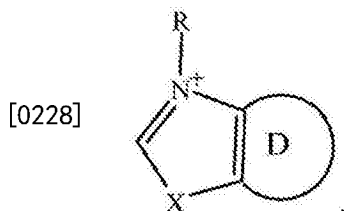
[0224] 适合包含在本文所公开的发荧光的化合物中作为含受体的部分的示例性杂环部分包括,但不限于以下成员的铵形式:咪唑啉环、咪唑环、苯并咪唑啉环、α-萘并咪唑啉环、β-萘并咪唑啉环、吡啶环、异吡啶环、假吡啶环、异假吡啶环、苯并假吡啶环、吡啶假吡啶环、噁唑啉环、噁唑环、异噁唑啉环、苯并噁唑啉环、吡啶噁唑啉环、α-萘并噁唑啉环、β-萘并噁唑啉环、硒唑啉环、硒唑环、苯并硒唑啉环、α-萘并硒唑啉环、β-萘并硒唑啉环、噻唑啉环、噻唑环、异噻唑啉环、苯并噻唑啉环、α-萘并噻唑啉环、β-萘并噻唑啉环、碲唑啉(teIIuIazoIine)环、碲唑(teIIuIazoIe)环、苯并碲唑(benzoteIIuIazoIe)环、α-萘并碲唑(α-naphthoteIIuIazoIe)环、β-萘并碲唑(β-naphthoteIIuIazoIe)环、异喹啉环、异吡咯环、咪达喹啉环、茛满二酮环、吡啶环、二氢吡啶环、噁二唑环、呋唑环、氧杂蒽环、喹唑啉环、喹啉环、噻二唑环、噻噁唑烷酮环、四唑环、三嗪环、萘啶环、哌嗪环、吡嗪环、吡啶环、吡啶啉环、吡啶烷环、吡啶酮环、吡啶环、哒嗪环、嘧啶环、吡喃环、吡咯烷环、吡咯啉环、吡咯环、吩嗪环、菲啶环、酞嗪环、呋咱环、苯并噁嗪,

吗啉环和若丹宁环。

[0225] 在一些实施方案中,含受体的部分中的一个或多个包含吡啶环,如甲基吡啶环(包括其所有异构体的甲基吡啶环),且在一些实施方案中,含受体的部分中的一个或多个包含吡啶鎓环(例如,甲基吡啶鎓环)。

[0226] 在一些实施方案中,含受体的部分中的一个或多个是类似假吡啶的环。

[0227] 短语“类似假吡啶的环”描述了具有芳族部分的环,具有被稠合到其的带正电荷的含氮的5元芳族部分,使得正电荷通过如下式中所示的环共振:



[0229] 其中D是如本文所定义的芳基,X可以是,例如取代的或未取代的碳、取代的或未取代的氮、硫、取代的或未取代的硅;及R可以是,例如,氢、或优选地,烷基、环烷基或其任意组合。

[0230] 每当代表上面式中的X的碳、氮或硫被取代时,取代基可以独立地是烷基、环烷基、烷基、环烷基、芳基、杂脂环族、杂芳基、烷氧基、羟基、巯基、硫代烷氧基、芳氧基、硫代芳氧基、氨基、硝基、卤素、三卤甲基、氰基、酰胺、羧基、磺酰基、硫氧基(sulfoxy)、亚磺酰基、磺酰胺和糖。

[0231] 在一些实施方案中,含受体的部分中的一个包含吡啶环且含受体的部分中的一个如本文所定义的假吡啶环。

[0232] 如上文所讨论的,本文所公开的发荧光的化合物被设计成化学事件后能够发射近红外光,正因为如此,在其中的含受体的部分,含供体的部分和连接部分是使得除了具有使所需的 π -电子重新定位成为可能的结构特征外,还具有经历化学事件后允许发射NIR光的结构特征。

[0233] 示例性上述的化合物是其中含受体的部分和含供体的部分以及任选的连接部分一起形成花青样结构或方酸菁样结构的那些。

[0234] 如本文所用,短语“花青样结构”描述了具有通过含碳次甲基的链(例如,聚次甲基链)接合的两个含氮的部分的分子。一个氮或两个氮可以是含氮的杂芳族化合物部分的一部分,或可选择地,是仲铵或叔铵。

[0235] 在花青样染料分子中,一个氮是带正电荷的(例如,呈铵离子的形式)且一个氮原子是中性的(例如,呈胺的形式),且因此具有孤对电子。因此,花青样染料中的正电荷经由聚次甲基链在两个氮原子之间共振。

[0236] 本文所公开的发荧光的化合物可被视为改性的花青结构,包含含受体的部分和含供体的部分中的两个或更多个含氮的部分。含氮的部分是带正电荷的部分如含铵的部分。

[0237] 和花青染料不同,在本文所公开的改性的花青结构中,含供体的部分的存在干扰了两个氮原子之间的共振(π -电子的离域),两个氮原子是带正电荷的(例如,呈铵离子的形式)。因此在含氮的部分之间不存在 π -电子的离域。

[0238] 因此,在一些实施方案中,本文所公开的发荧光的化合物具有花青样结构,被改性

以便包含两个带正电荷的含氮(例如,铵)的部分(代替具有在其之间共振的一个正电荷的两个含氮部分)和与两个含铵部分形成共轭 π -电子体系的含供体的部分,从而含供体的部分通过将 π -电子的离域限制到分子的不牵涉含氮的部分的部分中来干扰未改性的花青样分子的 π -电子体系的离域,且因此削弱或消除了存在于未改性的花青样分子中的正电荷的离域。

[0239] 上述的发荧光的化合物被设计使得化学事件后,正电荷的离域被恢复(如例如,图2A-C中所示)。

[0240] 由于其中含氮的部分之间的 π -电子不能离域的发荧光的化合物的电子结构,因此该化合物在NIR范围内是光谱学失活的(或具有微弱的光谱学性能),且因此不能发射光尤其是近红外光。然而,官能部分和含氮的部分的布置允许通过化学事件来诱导 π -电子的重新定位,重新定位产生了发射近红外光的能力。

[0241] 通过化学事件引起的 π -电子的重新定位牵涉化合物中含供体的部分的电子重排,在电子重排中,电子被转移到带正电荷的含氮的部分(含受体的部分中的一个)上,且由此,形成了具有两个含氮的部分之间的共振电子的 π -电子体系并赋予了近红外光谱学性能。

[0242] 因此,本文所描述的发荧光的化合物遵循下面的设计:其中与未改性的花青结构相比,包含含供体的部分导致通过分子的小部分(较小数量的重叠的p轨道)发生 π -电子的离域,且因此化合物不能与光相互作用以便发射NIR光。

[0243] 然而,本文所公开的发荧光的化合物还遵循下面的设计:其中化学事件后,含供体的部分的重排发生并产生了其中 π -电子被重新定位,使得含铵的部分中的一个变成了含胺的部分且因此恢复了如在花青染料中的两个含氮的部分之间共振的正电荷的结构。因此, π -电子重新定位产生了具有相似于花青染料的光谱学性能的化合物且因此能够发射NIR光。

[0244] 因此,仿已知的花青染料,通过具有因存在两个带正电荷(例如,铵)的含氮的部分(代替一个带正电荷的含氮的部分),且还因存在如本文所描述的含供体的部分而不同于花青染料的两个含氮的部分和连接其间的含碳次甲基的链来设计本文所描述的基于花青的发荧光的化合物。

[0245] 因此,在一些实施方案中,如本文所描述的发荧光的化合物是改性的花青染料,包括任何已知的花青染料,通过包含含供体的部分如花青结构内的酚来改性,如本文所描述的。

[0246] 本文所描述的发荧光的化合物可被视为包含与花青染料相同的基本化学布置,通过具有两个含氮的部分和连接其间的含碳次甲基的链,但因为含供体的部分被包含在那里,发荧光的化合物显示不同于花青染料的电子布置的电子布置,且因此通过化学事件激活前,在NIR范围内是光谱学失活的。

[0247] 具有改性的花青结构的发荧光的化合物在本文中也称为基于花青的发荧光的化合物。

[0248] 在一些实施方案中,花青样结构包含两个含铵的部分作为如本文所定义的含受体的部分,两个含铵的部分之间经由含碳次甲基的链连接。

[0249] 短语“含碳次甲基的部分”描述了包含一个或多个如本文所定义的 $-\text{CR}'=\text{CR}''$ 基团的部分。

[0250] 在一些实施方案中,含碳次甲基的部分是聚次甲基链。

[0251] 短语“聚次甲基链”描述了次甲基(例如,-CH=CH-基团)的链,每个可以独立地被取代,只要取代基不干扰所公开的化合物的如本文所定义的光学性能。

[0252] 含供体的部分形成含碳次甲基的链的一部分或被连接到含碳次甲基的链上,使得由含受体的部分形成了共轭体系,如下文进一步所详述的。

[0253] 含碳次甲基的部分和形成其一部分或被连接到其的含供体的部分一起形成了可包含2到13个碳原子,优选2到7个碳原子的链。

[0254] 在一些实施方案中,含碳次甲基的链包含2个碳原子且花青样结构具有Cy2型花青结构,因为这个术语在本领域中被广泛认可。

[0255] 在一些实施方案中,含碳次甲基的链包含3个碳原子且花青样结构具有Cy3型花青结构。

[0256] 在一些实施方案中,含碳次甲基的链包含5个碳原子且花青样结构具有Cy5型花青结构。

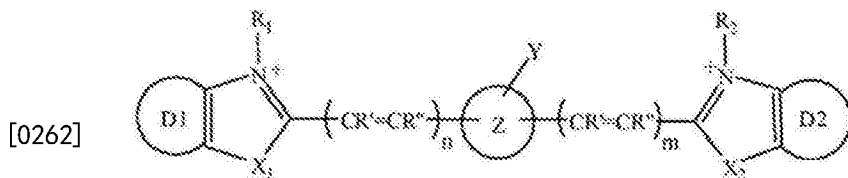
[0257] 在一些实施方案中,含碳次甲基的链包含7个碳原子且花青样结构具有Cy7型花青结构。

[0258] 在一些实施方案中,含碳次甲基的链包含5或7个碳原子。

[0259] 示例性的基于花青的发荧光的化合物包含作为每一个含受体的部分,假吡啶环(带正电荷的),如本文所定义的。

[0260] 含碳次甲基的链(例如,聚次甲基链)被连接到每个类似假吡啶的环的位置3上以便在整个分子中形成共轭 π -电子体系。

[0261] 示例性的基于花青的发荧光的化合物可通过通式IIIB来共同表示:



式 IIIB

[0263] 其中:

[0264] D_1 和 D_2 各自独立地是如本文所定义的芳基,或不存在;

[0265] X_1 和 X_2 各自独立地选自自由 CR_3R_4 、 NR_3 和S组成的组,其中 R_3 和 R_4 各自独立地选自自由氢、烷基、环烷基、芳基、杂脂环族、杂芳基、烷氧基、羟基、巯基、硫代烷氧基、芳氧基、硫代芳氧基、氨基、硝基、卤素、三卤甲基、氰基、酰胺、羧基、磺酰基、硫氧基、亚磺酰基、磺酰胺和糖;

[0266] R_1 和 R_2 各自独立地选自自由氢、烷基和环烷基组成的组;

[0267] n 和 m 各自独立地是从0到4的整数;

[0268] R' 和 R'' 各自独立地是氢、烷基或环烷基,或可选择地, R' 和 R'' 一起形成芳基;及

[0269] Z 和 Y 一起形成所述官能部分。

[0270] 在一些实施方案中, D_1 和 D_2 分别是取代的或未取代的苯基。

[0271] 在一些实施方案中, X_1 和 X_2 各自独立地是 CR_3R_4 。

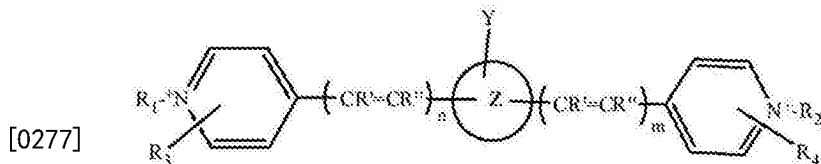
[0272] 在一些实施方案中, R_3 和 R_4 分别是烷基。

[0273] 在一些实施方案中, R_1 和 R_2 各自是氢。

[0274] 在一些实施方案中, R_1 和 R_2 各自独立地是取代的或未取代的烷基。

[0275] 应当注意到, 其中一个或多个类似假吡啶的环被如本文所描述的任一个含受体的部分, 例如本文描述的任一个含铵受体的部分(例如, 吡啶鎓部分) 替换的发荧光的化合物也被期待。

[0276] 在一些实施方案中, 发荧光的化合物具有通式 IIIA:



式 IIIA

[0278] 其中:

[0279] R_1 和 R_2 各自独立地选自由氢、烷基、环烷基和芳基、杂脂环族、杂芳基组成的组;

[0280] n 和 m 各自独立地是从0到4的整数;

[0281] R_3 和 R_4 各自独立地选自由氢、烷基、环烷基、芳基、杂脂环族、杂芳基、烷氧基、羟基、巯基、硫代烷氧基、芳氧基、硫代芳氧基、氨基、硝基、卤素、三卤甲基、氰基、酰胺、羧基、磺酰基、硫氧基、亚磺酰基、磺酰胺和糖组成的组;

[0282] R' 和 R'' 各自独立地是氢、烷基或环烷基, 或可选择地, R' 和 R'' 一起形成芳基; 及

[0283] Z 和 Y 一起形成如本文所述的含供体的部分。

[0284] 在每个碳次甲基部分中 R' 和 R'' 可以是相同的或不同的, 从而一个碳次甲基基团可包含不同于另一个含碳次甲基链的 R' 和/或 R'' 的 R' 和/或 R'' 。

[0285] 在一些实施方案中, 在每个碳次甲基部分中 R' 和 R'' 都是氢。

[0286] 任选地, 在一个或多个碳次甲基部分中, R' 和 R'' 一起形成芳基, 如例如图2中所例证的。

[0287] 在一些实施方案中, 含供体的部分形成了含碳次甲基的链的一部分, 且因此可被表示为 $-CRc=CRd-$ 部分, 其中 Rc 和 Rd 中的一个包含如本文所定义的给电子基团。

[0288] 在一些实施方案中, Rc 和 Rd 一起形成被如本文所定义的给电子基团取代的芳族环。

[0289] 在一些实施方案中, 含供体的部分被连接到含碳次甲基的链上, 同时保持共轭 π -电子体系, 如本文所描述的。

[0290] 示例性的上述的含供体的部分是 $-C(=CRcRd)-[CRcRf=CRcRd]t-$, 且 Rc 和 Rd 各自独立地是氢、烷基、芳基或环烷基或可选择地, Rc 和 Rd 一起形成杂脂环族或杂芳基; Re 和 Rf 是如关于 Rc 和 Rd 所定义的; 及 t 是从0到10、或从0到6、或从0到4、或从0到2的整数。 Rc 、 Rd 和 Rf 可以是相同的或不同的。当 t 大于0时, 含供体的部分包含聚次甲基的链。

[0291] 在一些实施方案中, 含供体的部分的芳族基团在允许含供体的基团经历类似1,4-醌哌替啶重排的位置被给电子基团取代, 如本文所描述的, 如图2中所例证的。

[0292] 在一些实施方案中, 发荧光的化合物包含超过两个(例如, 3个)的含受体的部分,

如例如图2所例证的。

[0293] 在示例性上述的实施方案中,发荧光的化合物遵循这样的设计:其中含供体的部分共轭到三个含受体的部分上,使得化学事件后,它重排以便将电子转移到含受体的部分中的一个上,使其相对于其它两个含受体的部分成为含供体的部分。

[0294] 在下面的实施例部分描述了示例性的发荧光的化合物(见,例如,表1)。

[0295] 开启式机构:

[0296] 在一些实施方案中,含供体的部分是可裂解的部分,化学事件后被裂解以便产生活性给电子基团。

[0297] 例如,在含供体的部分中的给电子基团包含氧作为活性给电子基团的情况下,含供体的部分可包含去质子化后产生活性 O^- 供体的羟基。

[0298] 因此,在一些实施方案中,给电子的部分包含羟基,并可以是,例如酚、羟基萘、任何其它羟基取代的芳基,或可选择地,可以是羟基本身,或被羟基取代的如本文所定义的碳次甲基。

[0299] 类似地,在含供体的部分中的给电子基团包含硫作为活性给电子基团的情况下,含供体的部分可包含去质子化后产生活性 S^- 供体的巯基。

[0300] 因此,在一些实施方案中,含供体的部分包含巯基,并可以是,例如,硫代苯酚、硫代萘、任何其它巯基取代的芳基,或可选择地,可以是硫基本身或被巯基取代的如本文所定义的碳次甲基。

[0301] 类似地,在含供体的部分中的给电子基团包含氮(胺)作为活性给电子基团的情况下,含供体的部分可包含胺基。

[0302] 因此,在一些实施方案中,含供体的部分包含胺基,并可以是,例如,苯胺、氨基萘、任何其它氨基取代的芳基,或可选择地,可以是胺基本身,或被胺取代的如本文所定义的碳次甲基。

[0303] 在一些实施方案中,含供体的部分包含如本文所描述的羟基、巯基和/或胺基,被裂解以通过去质子化产生活性物质。在一些实施方案中,一旦发荧光的化合物是在水溶液中或在具有高于化合物的 pK_a 值的 pH 的任何其它溶液中,去质子化发生。

[0304] 在一些实施方案中,这些给电子部分作为潜在的基团存在于含供体的部分中,在裂解事件后产生。

[0305] 在上述的实施方案中,含供体的部分包含化学事件后,被裂解以产生如本文所定义的(活性)给电子基团的可裂解的触发单元。

[0306] 上文所描述的通式I-III中, Y 表示给电子基团或化学事件后产生给电子基团的可裂解的触发单元。 Z 可以是不存在的,或可以是芳基、碳次甲基或聚次甲基链,如上文所描述的。

[0307] 可裂解的触发单元可以是化学反应后被分析物裂解的化学上可移动的触发物(trigger),如下文进一步详细描述的和在下面的实施例部分所例证的。

[0308] 可选择地或另外地,可裂解的触发单元可以是生物反应后使用适当的生物触发物裂解的可生物降解的触发物。

[0309] 根据本发明的实施方案的示例性生物触发物是酶,然而触发单元是相应的酶底物,或是可被所选择的酶裂解的任何其它单元。另外的示例性生物触发物是响应生物过程

内源产生或外源产生的试剂。

[0310] 包含可被特定分析物裂解的触发单元的发荧光的化合物是化学试剂或生物分子如酶,可被用于通过NIR成像检测分析物,如下文进一步详细描述。

[0311] 发荧光的化合物:

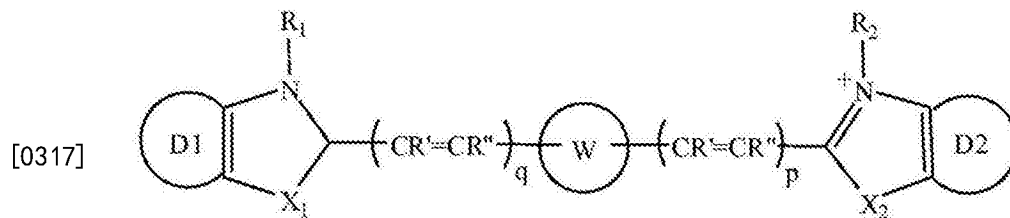
[0312] 本文所描述的每一种发荧光的化合物,化学事件后产生能够发射NIR光的荧光化合物。

[0313] 产生的荧光化合物的特征在于有利的光谱学性能,如高量子产率、高延伸系数。

[0314] 因此,根据本发明的一些实施方案,荧光化合物源自本文所描述的发荧光的化合物,并包含如本文所定义的含受体的部分和对应于含受体的部分的含供体的部分(例如,相对应于含铵受体的部分的含胺的部分)及源自针对发荧光的化合物所描述的且呈上文所描述的含供体的部分的重排形式的含供体的部分。

[0315] 在一些实施方案中,荧光化合物包括含铵受体的部分和含胺供体的部分及连接在这些部分之间的一个或多个含碳次甲基的部分(例如,聚次甲基链),全部均具有共轭 π -电子体系,其中铵的正电荷被离域且因此其中存在共振电子。荧光化合物还包含化学事件后发生电子转移时获得的,上文所描述的含供体的部分的重排形式。该重排形式可以是,例如,被给电子部分(例如,酚)取代的芳族部分的1,4-醌哌替啶重排后形成的物质,是聚次甲基链的一部分或被连接到聚次甲基链(如例如图2中所描述的)。

[0316] 示例性的荧光化合物可由下列通式IV来表示:



式 IV

[0318] 其中:

[0319] D_1 和 D_2 各自独立地是如本文关于发荧光的化合物所定义的芳族部分;

[0320] X_1 和 X_2 各自独立地选自由 $CR'R''$ 、 NR' 、 O 、 S 和 $SiR'R''$ 组成的组,其中 R' 和 R'' 各自独立地选自由氢、烷基、环烷基、芳基、杂脂环族、杂芳基、烷氧基、羟基、巯基、硫代烷氧基、芳氧基、硫代芳氧基、氨基、硝基、卤素、三卤甲基、氰基、酰胺、羧基、磺酰基、硫氧基、亚磺酰基、磺酰胺和糖组成的组;

[0321] R_1 和 R_2 各自独立地选自由氢、烷基、环烷基和芳基、杂脂环族、杂芳基组成的组;

[0322] p 和 q 各自独立地是从0到4的整数;及

[0323] W 是包含芳族部分的基团,其中所述芳族部分的 π -电子共轭到 $-(CR'=CR'')_p$ -和 $-(CR'=CR'')_q$ -基团的 π -电子,使得 π -电子的离域在所述分子内的铵基团和胺基团之间实现。

[0324] W 表示源自如上文所解释的在荧光化合物的语境下本文所描述的含供体的部分的基团。

[0325] D_1 、 D_2 、 X_1 、 X_2 、 R_1 、 R_2 、 R' 和 R'' 是在发荧光的化合物的语境中如上文所描述的。

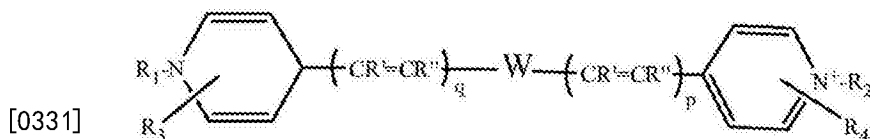
[0326] 在图2中描述了示例性化合物和在下面的实施例部分中描述了另外的化合物。

[0327] 应当指出,在其中本文所描述的荧光化合物中包含的含铵的假吡啶基被上文所描述的含受体的部分中的任何一个所替换的荧光化合物也被期待。示例性的这样的荧光化合物包括,例如,在其中一个或两个假吡啶基被吡啶或吡啶鎓(例如甲基吡啶或甲基吡啶鎓)所取代的化合物。

[0328] 此外,或可选择地,在其中本文所描述的荧光化合物中包含的含胺的假吡啶基被上文所描述的杂环部分中的任何一个所替换的荧光化合物也被期待,如在权利要求中所呈现的。

[0329] 示例性上述的荧光化合物包括,例如在其中一个或两个假吡啶基被吡啶或吡啶鎓(例如,甲基吡啶或甲基吡啶鎓)所取代的化合物,如下式IVA和式IVB所描述的。

[0330] 在一些实施方案中,荧光化合物具有通式IVA:



式 IVA

[0332] 其中:

[0333] R₁和R₂各自独立地选自由氢、烷基、环烷基和芳基、杂脂环族、杂芳基组成的组;

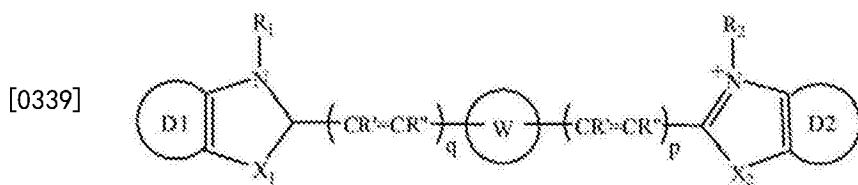
[0334] p和q各自独立地是从0到4的整数;

[0335] R₃和R₄各自独立地选自由氢、烷基、环烷基、芳基、杂脂环族、杂芳基、烷氧基、羟基、巯基、硫代烷氧基、芳氧基、硫代芳氧基、氨基、硝基、卤素、三卤甲基、氰基、酰胺、羧基、磺酰基、硫氧基、亚磺酰基、磺酰胺和糖组成的组。

[0336] R'和R''各自独立地是氢、烷基或环烷基,或可选择地,R'和R''一起形成芳基;及

[0337] W是如本文所定义的。

[0338] 在一些实施方案中,发荧光的化合物具有通式IVB:



式 IVB

[0341] 其中:

[0342] D₁和D₂各自独立地是芳族部分;

[0343] X₁和X₂各自独立地选自由CR'R''、NR'、O、S和SiR'R''组成的组,其中R'和R''各自独立地选自由氢、烷基、环烷基、芳基、杂脂环族、杂芳基、烷氧基、羟基、巯基、硫代烷氧基、芳氧基、硫代芳氧基、氨基、硝基、卤素、三卤甲基、氰基、酰胺、羧基、磺酰基、硫氧基、亚磺酰基、磺酰胺和糖组成的组;

[0344] R₁和R₂各自独立地选自由氢、烷基、环烷基和芳基、杂脂环族、杂芳基组成的组;

[0345] p和q各自独立地是从0到4的整数;

[0346] R'和R"各自独立地是氢、烷基或环烷基,或可选择地,R'和R"一起形成芳基;及

[0347] W是如本文所定义的。

[0348] 下面实施例部分中描述了示例性的荧光化合物,例如在呈现产生具有有利的光学性能的荧光化合物的酚化合物的表1中。

[0349] 结合了开启式NIR探针的前药:

[0350] 在一些实施方案中,本文所描述的发荧光的化合物还包含被连接到含供体的部分上的治疗活性剂(例如药物),使得化学事件后,治疗活性剂被释放。

[0351] 在一些实施方案中,含供体的部分包含可裂解的触发单元和含供体的部分,可裂解的触发单元和治疗活性剂是使得触发单元(化学事件)裂解后,治疗活性剂被释放。

[0352] 这可通过利用触发单元和治疗活性剂被连接到其上的自切除间隔物(self-immolative spacer)来实现,使得化学事件(触发单元裂解)后自切除间隔物从而释放治疗活性剂并产生可按照本文关于含供体的部分所描述的进行重排的含供体的物质以便产生发射NIR光的化合物。

[0353] 自切除间隔物是本领域已知的,且所有被期待在这些实施方案中。

[0354] 示例性的自切除间隔物是使得触发单元裂解后,能够经历一系列的自切除反应。

[0355] 自切除反应通常牵涉电子级联自消除并因此自切除体系通常包含通过例如,直链或环状的1,4-消除、1,6-消除等而自消除的电子级联单元。

[0356] 在一些实施方案中,自切除受体是五元芳族环或六元芳族环,如例如WO 2004/019993中所描述的,通过引用将其并入犹如在本文中完全阐述。

[0357] 实例包含可经历1,4-醌哌替啶重排的间隔物,使得裂解事件后,治疗活性剂被释放且形成可进一步经历1,4-醌哌替啶重排的物质。

[0358] 在图15中描述了示例性这样的发荧光的化合物。

[0359] 当上述的发荧光的化合物经历特定激活,药物被释放且通过形成荧光化合物产生荧光。因此,通过所选择的化学事件激活提供了关于药物释放的时间和地点的数据。

[0360] 上述的发荧光的化合物是非常有用的药物递送系统,原因是(i)通过选择适当的触发单元,实现了选择性靶向递送;及(ii)使用无损荧光检测技术,获得关于释放过程的实时信息。

[0361] 可有效并入本文所描述的发荧光的化合物中的治疗活性剂的代表性实例包括但不限于,抗增殖剂、抗炎剂、抗生素、抗病毒剂、抗高血压剂和/或化学增敏剂。

[0362] 用于本发明的一些实施方案的语境中的抗炎剂的非限制性实例包括水杨酸甲酯、阿司匹林、布洛芬和萘普生及其衍生物。

[0363] 用于本发明的一些实施方案的语境中的抗病毒剂的非限制性实例包括泛昔洛韦,伐昔洛韦,阿昔洛韦及其衍生物。

[0364] 抗生素的非限制性实例包括青霉素V、阿洛西林、四环素及其衍生物。

[0365] 在一些实施方案中,治疗活性剂是抗增殖剂,如化学治疗剂。

[0366] 可有效并入在本文所描述的发荧光的化合物中的化学治疗剂的非限制性实例包括含氨基的化学治疗剂如柔红霉素、多柔比星、N-(5,5-二乙酰氧戊基)多柔比星、葱环类药物、丝裂霉素C、丝裂霉素A、9-氨基喜树碱、aminopertin、放线菌素、N⁸-乙酰亚精胺、1-(2-氯乙基)-1,2-二甲烷磺酰肼、博来霉素、他利霉素及其衍生物;含羟基的化学治疗剂、如依

托泊昔、喜树碱、依立替康、托泊替康、9-氨基喜树碱、紫杉醇、多西紫赛、esperamycin、1,8-二羟基-双环[7.3.1]十三碳-4-烯-2,6-二炔-13-酮、anguidine、吗啉基-多柔比星、长春新碱和长春碱及其衍生物、含巯基的化学治疗剂和含羧基的化学治疗剂。

[0367] 可有利并入本文所描述的发荧光化的合物中的其它治疗活性剂包括,例如,抗组胺剂、麻醉剂、止痛剂、抗真菌剂、维生素以及抗感染剂。

[0368] 根据这些实施方案,发荧光的化合物被设计成使得化学事件是由与可通过化学治疗剂治疗的医学病症相关的生物化合物引起的。

[0369] 应用:

[0370] 本文所描述的发荧光的化合物和荧光化合物中的任何一种可被用于牵涉用于成像样品的NIR成像的方法中。

[0371] 上述的方法牵涉化合物与样品接触,并收集从样品发射的光。

[0372] 样品可以是简单的水溶液。样品可以是生物样品,如细胞培养物、微生物、体液样品(例如,血液或尿液),或身体组织样品或身体器官样品。样品还可以是身体部位。

[0373] 如本文所用,术语“身体部位”包括任何器官、组织、膜、腔、血管、道、生物表面或肌肉。

[0374] 示例性的身体部位,和尤其衍生的组织或器官,包括,但不限于,皮、真皮层、头皮、眼睛、耳朵、嘴、咽喉、胃、小肠组织、大肠组织、肾脏、胰腺、肝、消化系统、呼吸道、骨髓组织、粘膜、鼻膜、血液系统、血管、肌肉、肺腔、动脉、静脉、毛细血管、心脏、心室、男性生殖器或女性生殖器和任何内脏器官或腔。

[0375] 在一些实施方案中,收集的光被处理以产生信号或图像。

[0376] 任何NIR成像技术和仪器(例如,滤光片、检测器、数字处理器以及类似物)可被用于收集发射的光。通常,样品优选地在其中化合物具有吸光度最大值的波长下先被照射。可通过传统光谱测定来确定这样的波长。在一些实施方案中,使用近红外相机实现收集光,近红外相机将收集的光处理成为图像。

[0377] 通常发荧光的化合物优于本文所公开的荧光化合物,因为开启式机构与之相关。

[0378] 发荧光的化合物可被用于确定产生化学事件的分析物的存在和/或水平的方法中。

[0379] 当化合物接触探求的分析物时,如本文所描述的化学事件导致能够发射NIR光的荧光化合物的产生。

[0380] 因此,发射的NIR光的存在和/或水平指示产生化学事件的分析物的存在和/或水平。

[0381] 发射的NIR光的存在和/或水平的确定可通过收集发射的NIR光来实现,如上文所描述的。

[0382] 在一些实施方案中,分析物是与发荧光的化合物反应以便产生荧光化合物的化学试剂,如本文所描述的。

[0383] 在一些实施方案中,分析物被认为指示生物过程。在这些实施方案中,触发单元是可被生物分析物裂解的可生物降解的触发单元。

[0384] 在一些实施方案中,与医学病症有关并确定分析物的存在和/或水平的分析物被用于确定该医学病症的存在或进展。

[0385] 在一些实施方案中,分析物是在受医学病症折磨的器官或组织内过表达的酶。

[0386] 在一些实施方案中,分析物是响应医学病症而在器官或组织内产生的物质。

[0387] 在一些实施方案中,与指示医学病症的存在试剂反应后,可生物降解的触发单元被裂解,使得发射的NIR光的存在和/或水平是医学病症的存在和/或水平的指示。

[0388] 示例性上述的试剂是过氧化氢,是炎症过程的指示,如在下面的实施例部分中进一步详细讨论的。在这样的示例性实施方案中,具有氢氧化物-过氧化物敏感性触发单元的发荧光的化合物可有效地被利用(例如在下面的实施例部分中所例证的)。被过氧化氢裂解的示例性可裂解的触发单元是硼酸或酯。

[0389] 另外的示例性试剂是NO,它是缺氧的指示[Kiang, J., Tsen, KT, *Biology of hypoxia*. The Chinese Journal of Physiology 2006.49 (5): 第223-233页]。因此,包含可被NO裂解的可裂解的触发单元的发荧光的化合物可被用于监测缺氧并因此任何血管生成依赖性疾病和紊乱。

[0390] 另外的示例性试剂是铁(II),它是疟疾的指示[Mahajan et al. *ChemMedChem*, 2011.6: 第415-419页]。被Fe(II)裂解的示例性可裂解的触发单元是三噁茂烷环。因此包含被Fe(II)裂解的裂解单元的发荧光的化合物可被用于监测缺氧且因此任何血管生成依赖性疾病和紊乱。

[0391] 另外的示例性试剂是硫醇,它是癌肿瘤的指示。因此包含被硫醇裂解的裂解单元的发荧光的化合物可被用于监测癌肿瘤。

[0392] 另外的示例性试剂是氟化物。包含被氟化物裂解的裂解单元的发荧光的化合物可被用于检测样品如饮用水中的氟化物。

[0393] 在一些实施方案中,pH改变后,即,在酸或碱的存在下,或在酸性环境中或在碱性的环境中,可生物降解的触发单元被裂解,它是医学病症在某些器官和组织中存在的指示。使得发射的NIR光是医学病症在某些器官和组织中存在和/或水平的指示。示例性这样的医学病症包括,但不限于,在其中已知pH值低于正常生理pH的癌、炎症和血管生成依赖性疾病或紊乱。具有在酸性环境中可裂解的触发单元的发荧光的化合物还可被用于成像胃。

[0394] 在酸性环境中可裂解的示例性触发单元(酸不稳定的触发单元)包括,但不限于,包括N-顺式乌头酰基、脘、羧酸脘键、缩醛、亚胺和三苯甲基键、缩醛键的触发单元。

[0395] 在一些实施方案中,分析物是已知其由于生物过程(例如,疾病或紊乱)而过表达的酶。在这样的示例性实施方案中,具有可被酶(例如,是酶底物)裂解的触发单元的发荧光的化合物可被有效利用。

[0396] 牵涉一种或多种酶的过表达的示例性疾病和紊乱包括,但不限于,各种癌肿瘤(例如乳腺癌、肺癌、结直肠癌、胃癌、子宫颈癌)、肿瘤侵袭和转移、肝癌转移、血液癌(白血病,淋巴瘤等)、血管生成依赖性疾病和紊乱(包括,例如,黄斑变性、疟疾和Leishmaniasis)、转移性骨病、骨质疏松症、骨性关节炎、自身免疫性疾病、如多发性硬化、类风湿性关节炎、牛皮癣、眼病、如黄斑变性、糖尿病、糖尿病视网膜病变、动脉粥样硬化、心肌梗塞后心力衰竭、慢性阻塞性肺疾患、脑缺血、伴有溃疡的胃肠道疾病,其他炎性疾病和紊乱和缺氧。

[0397] 在一些实施方案中,酶在肿瘤(如癌肿瘤)中被过表达。示例性这样的酶的实例包括,但不限于,组织蛋白酶(半胱氨酸蛋白酶)诸如组织蛋白酶B、组织蛋白酶K、组织蛋白酶D、组织蛋白酶H、组织蛋白酶L、和组织蛋白酶S、天冬酰胺内肽酶(Iegumain)、基质金属蛋白

酶如MMP-2和MMP-9、以及MMP1、MMP3、MMP7、MMP13和MMP14、KLK6 (编码胰蛋白酶样丝氨酸肽酶的激肽释放酶相关的肽酶-6)、PIM丝氨酸/苏氨酸激酶如PIM 1、PIM 2和PIM 3、组织蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 如HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC6和kdac8。

[0398] 在一些实施方案中,由于炎症酶被过表达。在一些实施方案中,由于自身免疫性疾病酶被过表达。

[0399] 具有组织蛋白酶可裂解的位点的合适的触发单元包括氨基酸序列,如,但不限于,-[Asn-Glu-Val-Ala]-和-[Lys-Lys]-。

[0400] 具有组织蛋白酶-B可裂解的位点的合适的触发单元包括氨基酸序列如,但不限于,-[Gly-Phe-Lys]-、-[Cit-Val]-、-[Arg]-、-[Arg-Arg]-、-[Val-Arg]-、-[Phe-Lys]-、-[Phe-Arg]-、[Gly-Phe-Leu-Gly]-、-[Gly-Phe-Ala-Leu]-以及-[Ala-Leu-Ala-Leu]-、-[Gly-Leu-Gly]-、-[Gly-Phe-Gly]-、-[Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-Lys]-、-[(Glu)₆-(Asp)₈]-及其组合。

[0401] 在一些实施方案中,所述触发单元包括氨基酸序列-[Gly-Phe-Lys]-、-[Gly-Leu-Gly]-、-[Gly-Phe-Gly]-、-[Gly-Leu-Phe-Gly]-、-[Gly-Phe-Leu-Gly]-、-[Phe-Lys]-和-[Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-Lys]-。在一些实施方案中,触发单元由这些氨基酸序列或其组合组成。

[0402] 组织蛋白酶B在癌肿瘤中被过表达,并因此具有带组织蛋白酶-B可裂解的位点的触发单元的发荧光的化合物可被用于监测癌肿瘤的存在和/或进展。

[0403] 具有组织蛋白酶-D可裂解的位点的合适的触发单元包括氨基酸序列如,但不限于,-[Gly-Pro-Ile-Cys (Et)-Phe-Phe-Arg-Leu]-。

[0404] 组织蛋白酶D在癌转移中被过表达,并因此具有带组织蛋白酶-D可裂解的位点的触发单元的发荧光的化合物可被用于监测癌转移的存在和/或进展。

[0405] 具有组织蛋白酶-K可裂解的位点的合适的触发单元包括氨基酸序列如,但不限于,-[Gly-Gly-Pro-Nle]-。

[0406] 组织蛋白酶K在乳腺癌;转移性骨病;骨质疏松症、牛皮癣、多发性硬化、类风湿性关节炎和骨性关节炎中被过表达,并因此具有带组织蛋白酶-K可裂解的位点的触发单元的发荧光的化合物可被用于监测这些疾病和紊乱的存在和/或进展。

[0407] 具有组织蛋白酶-L可裂解的位点的合适的触发单元包括氨基酸序列如,但不限于,-[Phe-Arg]-。

[0408] 组织蛋白酶L在癌肿瘤中被过表达,并因此具有带组织蛋白酶-L可裂解的位点的触发单元的发荧光的化合物可被用于监测癌肿瘤的存在和/或进展。

[0409] 组织蛋白酶H在肝癌转移中被过表达,并因此具有带组织蛋白酶-H可裂解的位点的触发单元的发荧光的化合物可被用于监测肝癌转移的存在和/或进展。

[0410] 组织蛋白酶S在骨质疏松症、牛皮癣、多发性硬化、类风湿性关节炎和骨性关节炎中被过表达,并因此具有带组织蛋白酶-S可裂解的位点的触发单元的发荧光的化合物可被用于监测这些疾病和紊乱的存在和/或进展。

[0411] 具有天冬酰胺内肽酶可裂解的位点的合适的触发单元氨基酸序列包括,如,但不限于,-[Ala-Ala-Asn]-、-[Asn-Glu-Val-Ala]-和-[(Glu)₆-(Asp)₈]-、及其任意组合。基质金属蛋白酶 (MMP),特别是MMP-2和MMP-9,已被确定为恶性肿瘤进展(例如,结直肠癌,肺癌)

以及在炎症,MI后的心力衰竭、COPD、眼病和伴有溃疡的胃肠道疾病中的重要蛋白酶,并因此具有带基质金属蛋白酶可裂解的位点的触发单元的发荧光的化合物,可被用于监测这些疾病和紊乱的存在和/或进展。

[0412] 具有基质金属蛋白酶可裂解的位点的合适的触发单元包括氨基酸序列如,但不限于,-[Cys-Gly-Leu-Asp-Asp]-,-[Gly-Pro-Leu-Gly-Val]-,-[Gly-Pro-Leu-Gly-Ala-Gly]-,-[Cys-Asp-Gly-Arg]-,-[Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Gly-Cys]-和-[Pro-Leu-Gly-Met-Thr-Ser]-及其任意组合。在一些实施方案中,触发单元仅具有上述氨基酸序列中的一部分。在一些实施方案中,触发单元由上述序列中的3个氨基酸组成。

[0413] 具有MMP-2和MMP-9可裂解的位点的合适的触发单元包括氨基酸序列,如,但不限于,-[Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln]-,-[Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln]-,-[Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln]-,-[Pro-Leu-Gly-Val-Arg]-,[Pro-Leu-Gly-Leu-Tyr-Leu]-,-[Pro-Leu-Gly-Leu-Tyr-Ala-Leu]-,-[Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln]-,-[Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Gln]-,-[Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Gly-Lys]-,-[His-Pro-Val-Gly-Leu-Leu-Ala-Arg]-,-[Gly-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Gly-Gly]-,-[Ala-Ala-Ala-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala]-及其组合。在一些实施方案中,触发单元仅具有上述氨基酸序列中的一部分。在一些实施方案中,触发单元由上述序列中的3个氨基酸组成。

[0414] MMP2和MMP9在关节炎,肿瘤侵袭和转移,血管生成和脑缺血中被过表达,并因此具有带MMP2和MMP9可裂解的位点的触发单元的发荧光的化合物可被用于监测这些疾病和紊乱的存在和/或进展。

[0415] 具有MMP-7可裂解的位点的合适的触发单元包括氨基酸序列,如,但不限于,-[Gly-Val-Pro-Leu-Ser-Leu-Thr-Met-Gly-Cys]-和-[Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-Ser]-及其组合。在一些实施方案中,触发单元仅具有上述氨基酸序列中的一部分。在一些实施方案中,触发单元由上述序列中的3个氨基酸组成。

[0416] 具有MMP-13可裂解的位点的合适的触发单元包括氨基酸序列,如,但不限于,-[Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Leu-Gly-Lys]-。在一些实施方案中,触发单元仅具有上述氨基酸序列中的部分。在一些实施方案中,触发单元由上述序列中的3个氨基酸组成。

[0417] 具有KLK6可裂解的位点的合适的触发单元包括氨基酸序列,如,但不限于,-[Gly-Ala-Arg-Arg-Arg-Gly]-,-[Trp-Ala-Arg-Arg-Ser]-,-[Trp-Ala-Arg-Lys-Arg]-,-[Leu-Arg-Lys-Arg-Trp]-,-[Ala-Lys-Arg-Arg-Gly]-和-[Trp-Lys-Lys-Lys-Arg]。在一些实施方案中,触发单元仅具有上述氨基酸序列中的一部分。在一些实施方案中,触发单元由上述序列中的3个氨基酸组成。

[0418] KLK6L在结肠癌和胃癌中被过表达,并因此,具有带KLK6L可裂解的位点的触发单元的发荧光的化合物可被用于监测这样的癌的存在和/或进展。

[0419] PIM(PIM1、PIM2和PIM3)是在恶性血液病和实体瘤中过表达的丝氨酸/苏氨酸激酶,并因此具有带PIM可裂解的位点的触发单元的发荧光的化合物可被用于监测这样的恶性肿瘤的存在和/或进展。

[0420] 具有PIM可裂解位点的合适的触发单元包括氨基酸序列,如,但不限于,-[(Arg/Lys)₃-AA1-[Ser/Thr-AA₂]-,AA₁和AA₂独立地是除基本的或大的疏水残基外的任何氨基酸

残基。示例性氨基酸序列包括：-[Ala-Arg-Lys-Arg-Arg-Arg-His-Pro-Ser-Gly-Pro-Pro-Thr-Ala]-。具有HDAC可裂解的位点的合适的触发单元包括乙酰化赖氨酸。

[0421] HDAC在癌肿瘤中被过表达。已知HDAC1与前列腺癌肿瘤、胃癌肿瘤、结肠癌肿瘤和乳腺癌肿瘤相关；已知HDAC2与结直肠癌肿瘤、宫颈癌肿瘤和胃癌肿瘤相关；已知HDAC3与结肠癌肿瘤相关；及已知HDAC6与乳腺癌肿瘤相关。具有带一个或多个HDAC的可裂解的位点的触发单元的发荧光的化合物可被用于监测上面指出的癌肿瘤的存在和/或进展。

[0422] 半胱天冬酶(例如,半胱天冬酶3、半胱天冬酶7和半胱天冬酶9)是可被用于监测与细胞凋亡及缺氧相关的生物过程的蛋白酶,并因此具有带半胱天冬酶可裂解的位点的触发单元的发荧光的化合物可被用于监测这样的过程的存在和/或进展。

[0423] 具有半胱天冬酶可裂解的位点的合适的触发单元包括氨基酸序列,如,但不仅限于,-[Asn-Glu-Val-Ala]-,-[(Glu)₆-(Asp)₈]-,-[Asp-Glu-Val-Asp]-和[Asp-Glu-Val-Asp-Ala-Pro-Lys]-。

[0424] 只要发荧光的化合物还包含化学事件后可被释放的治疗活性剂,那么活性剂可被选为适用于治疗分析物是其指示的医学病症。

[0425] 因此,例如,如果可生物降解的触发单元可被在癌肿瘤中过表达的酶裂解,那么治疗活性剂可以是化学治疗剂,且发荧光的化合物还可被用于监测化学治疗剂的治疗效果,如上文所详述的。

[0426] 如果可生物降解的触发单元可被是指示细胞凋亡的酶裂解,,那么治疗活性剂可以是化学治疗剂,且发荧光的化合物还可被用于监测化学治疗剂的治疗效果,如上文所详述的。

[0427] 如果可生物降解的触发单元可被与炎症相关的试剂裂解,那么治疗活性剂可以是抗炎剂,且发荧光的化合物还可被用于监测抗炎剂的治疗效果,如上文中所详述的。

[0428] 鉴于前面的描述,可裂解的触发单元和治疗活性剂以及相关应用的另外的组合将被本领域技术人员容易地确认。

[0429] 在一些实施方案中,本文所描述的发荧光的化合物形成了聚合物结构的一部分。

[0430] 在本文所描述的方法和用途的任何一种中,如本文所描述的发荧光的(或荧光)化合物可本身被使用或作为还包含载体的药物组合物中的一部分被使用。

[0431] 如本文所用的“药物组合物”指的是制备如本文所描述的一种或多种发荧光的(或荧光)化合物、或生理上可接受的盐或其前药,其他它化学成分,包括但不限于,生理上合适的载体、赋形剂、润滑剂、缓冲剂以及类似物。药物组合物的目的是有助于给受治疗者施用化合物。术语“活性成分”指的是负责生物效应,本文负责诊断的化合物。

[0432] 可被互换使用的术语“生理上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”指的是不引起对生物体的显著刺激且不消除施用的化合物的生物活性和性能的载体或稀释剂。

[0433] 本文术语“赋形剂”指的是被添加到药物组合物中以进一步有助于施用如本文所描述的发荧光的(或荧光)化合物的惰性物质。赋形剂的实例,没有限制,包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0434] 因此,可使用一种或多种药学上可接受的载体以常规的方式来配制按照本发明使用的药物组合物,药学上可接受的载体包含有助于将化合物加工成药学上可使用的药剂的赋形剂和助剂。适当的制剂取决于所选择的给药途径。剂量可根据采用的剂型和使用的给

药途径变化。可由个体医生根据病人的状况来选择正确的制剂、给药途径和剂量(见,例如Fingl等人,1975,in“*The Pharmacological Basis of Therapeutics*”,第1章第1页)。

[0435] 可配制药物组合物用于以或一种或多种途径给药,取决于是否局部治疗或全身治疗或给药具有选择性。可通过吸入口服给药、或可例如通过静脉滴注或腹腔内注射、皮下注射、肌内注射或静脉注射进行肠胃外给药,或可进行局部给药(包括眼的、阴道的、直肠的、鼻内的)。

[0436] 用于口服给药的组合物包括粉末或颗粒、在水或非水介质中的悬浮液或溶液、囊剂、丸剂、囊片、胶囊剂或片剂。增稠剂、稀释剂、调味剂、分散剂、乳化剂或粘合剂可以是令人满意的。

[0437] 用于肠胃外给药的制剂可以包括,但不限于,还可含有缓冲剂、稀释剂和其它合适添加剂的无菌溶液。缓释组合物可被设想用于治疗。

[0438] 根据本发明的一些实施方案,如上文所描述的组合物被包装进包装材料中并根据包装材料中或包装材料上的印刷来识别用于监测医学病症。医学病症是使得与诱导本文描述的化学事件(例如,酶)的分析物相关。

[0439] 根据一些实施方案,组合物被包装进包装材料中并根据包装材料中或包装材料上的印刷来识别用于监测医学病症。这样的组合物包含还包含如本文所描述的治疗活性剂的发荧光的化合物,且还可被识别用于监测药物释放和药物的治疗效果。

[0440] 如整个本文所用,术语“烷基”指的是包括直链基团和支链基团的饱和脂族烃。优选地,烷基具有1到20个碳原子。只要本文确定了数值范围;例如,“1-20”,这意味着基团,在这种情况下,烷基,可含有1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等等,直至及包括20个碳原子。更优选地,烷基是具有1到10个碳原子的中等大小的烷基。最优选地,除非另外指明,否则,烷基是具有1到4个碳原子的低级烷基。烷基可以是未取代的或取代的,只要取代基不干扰化合物的性能和/或预期的用途。当被取代时,取代基可以是,例如,环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂脂环族、卤素、羟基、烷氧基、芳氧基、巯基、硫代烷氧基、硫代芳氧基、亚磺酰基、磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、磷酰基、氧磷基、氧代、羰基、硫代羰基、脲、硫脲、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、C-羧基、O-羧基、磺酰氨基以及氨基,如本文定义了这些术语。

[0441] “环烷基”基团指的是全碳的单环或稠环(即,共享相邻的一对碳原子的环)基团,其中多个环中的一个不具有完全的共轭 π -电子体系。环烷基的实例,没有限制,是环丙烷、环丁烷、环戊烷、环戊烯、环己烷、环己二烯、环庚烷、环庚三烯和金刚烷。环烷基可以是未取代的或取代的,只要取代基不干扰化合物的性能和/或预期的用途。当被取代时,取代基可以是,例如,烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂脂环族、卤素、羟基、烷氧基、芳氧基、巯基、硫代烷氧基、硫代芳氧基、亚磺酰基、磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、磷酰基、氧磷基、氧代、羰基、硫代羰基、脲、硫脲、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、C-羧基、O-羧基、磺酰氨基以及氨基,如本文定义了这些术语。

[0442] “烯基”基团指的是由至少两个碳原子和至少一个碳-碳双键组成的烃基。

[0443] “炔基”基团指的是由至少两个碳原子和至少一个碳-碳三键组成的烷基。

[0444] “芳基”基团指的是全碳的单环或稠环的多环(即,共享相邻的一对碳原子的环)基团,具有完全的共轭 π -电子体系。芳基的实例,没有限制,是苯基、萘基和蒽基。芳基可以是

未取代的或取代的,只要取代基不干扰化合物的性能和/或预期的用途。当被取代时,取代基团可以是,例如,烷基、烯基、炔基、烷氧基、芳基、杂芳基、杂脂环族、卤素、羟基、烷氧基、芳氧基、巯基、硫代烷氧基、硫代芳氧基、亚磺酰基、磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、膦酰基、氧膦基、氧代、羰基、硫代羰基、脲、硫脲、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、C-羧基、O-羧基、磺酰氨基以及氨基,如本文定义了这些术语。

[0445] “杂芳基”指的是单环或稠环(即,共享相邻的一对原子的环)基团,在环中具有一个或多个原子,如,例如,氮、氧和硫,且此外,具有完全的共轭 π -电子体系。杂芳基的实例,没有限制,包括吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、恶唑、噻唑、吡唑、吡啶、嘧啶、吡啶、假吡啶、喹啉、异喹啉和嘌呤。杂芳基可以是未取代的或取代的,只要取代基不干扰化合物的性能和/或预期的用途。当被取代时,取代基可以是,例如,烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基、杂脂环族、卤素、羟基、烷氧基、芳氧基、巯基、硫代烷氧基、硫代芳氧基、亚磺酰基、磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、膦酰基、氧膦基、氧代、羰基、硫代羰基、脲、硫脲、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、C-羧基、O-羧基、磺酰氨基以及氨基,如本文定义了这些术语。

[0446] “杂脂环族”基团指的是指的是单环或稠环基团,在环中具有一个或多个原子,如,氮、氧和硫。环还可具有一个或多个双键。然而环不具有完全的共轭 π -电子体系。杂脂环族可以是未取代的或取代的,只要取代基不干扰化合物的性能和/或预期的用途。当被取代时,取代基可以是,例如,烷基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基、杂脂环族、卤素、羟基、烷氧基、芳氧基、巯基、硫代烷氧基、硫代芳氧基、亚磺酰基、磺酰基、氰基、硝基、叠氮基、膦酰基、氧膦基、氧代、羰基、硫代羰基、脲、硫脲、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、C-羧基、O-羧基、磺酰氨基以及氨基,如本文定义了这些术语。

[0447] “羟基”基团指的是-OH基团。

[0448] “叠氮基”基团指的是-N=N⁺=N⁻基团。

[0449] “烷氧基”基团指的是如本文所定义的-O-烷基和-O-环烷基两者。

[0450] “芳氧基”基团指的是如本文所定义的-O-芳基和-O-杂芳基两者。

[0451] “硫代羟基”基团或“巯基”基团指的是-SH-基团。

[0452] “硫代烷氧基”基团指的是如本文所定义的-S-烷基和S-环烷基。

[0453] “硫代芳氧基”基团指的是如本文所定义的-S-芳基和-S-杂芳基两者。

[0454] “羰基”基团指的是-C(=O)-R'基团,其中R'是如上文所定义的。

[0455] “硫代羰基”基团指的是-C(=S)-R'基团,其中R'是如本文所定义的。

[0456] “C-羧基”基团指的是-C(=O)-O-R'基团,其中R'是如本文所定义的。

[0457] “O-羧基”基团指的是R' C(=O)-O-基团,其中R'是如本文所定义的。

[0458] “氧代”基团指的是=O基团。

[0459] “羧酸酯基”或“羧基”包括如本文所定义的C-羧基和O-羧基。

[0460] “羧酸”基团指的是在其中R'是氢的C-羧基。

[0461] “硫代羧基”基团或“硫代羧酸酯基”基团指的是-C(=S)-O-R'基团和-O-C(=S)R'基团两者。

- [0462] “酯”指的是C-羧基,其中R' 不是氢。
- [0463] 酯键指的是 $-O-C(=O)-$ 键。
- [0464] “卤素”基团指的是氟、氯、溴或碘。
- [0465] “亚磺酰基”基团指的是 $-S(=O)-R'$ 基团,其中R' 是如上文所定义的。
- [0466] “磺酰基”基团指的是 $-S(=O)_2-O-R'$ 基团,其中R' 是如上文所定义的。
- [0467] “磺酸酯”基团指的是 $-S(=O)_2-O-R'$ 基团,其中R' 是如上文所定义的。
- [0468] “硫酸酯”基团指的是 $-O-S(=O)_2-O-R'$ 基团,其中R' 是如上文所定义的。
- [0469] “磺酰胺”基团或“磺酰氨基”基团包括如本文所定义的S-磺酰氨基和N-磺酰氨基。
- [0470] “S-磺酰氨基”基团指的是 $-S(=O)_2-NR'R''$ 基团,R' 和R''中的每一个如本文所定义的。
- [0471] “N-磺酰氨基”基团指的是 $R'S(=O)_2-NR''$ 基团,其中R' 和R''中的每一个如本文所定义的。
- [0472] “O-氨基甲酰基”基团指的是 $-OC(=O)-NR'R''$ 基团,其中R' 和R''中的每一个如本文所定义的。
- [0473] “N-氨基甲酰基”基团指的是 $R'OC(=O)-NR''$ 基团,其中R' 和R''中的每一个如本文所定义的。
- [0474] “氨基甲酰基”基团或“氨基甲酸酯”基团包括O-氨基甲酰基和N-氨基甲酰基。
- [0475] 氨基甲酸酯键描述了 $-O-C(=O)-NR'-$ 键,其中R' 是如本文所描述的。
- [0476] “O-硫代氨基甲酰基”基团指的是 $-OC(=S)-NR'R''$ 基团,其中R' 和R''中的每一个如本文所定义的。
- [0477] “N-硫代氨基甲酰基”基团指的是 $R'OC(=S)NR''$ 基团,其中R' 和R''中的每一个如本文所定义的。
- [0478] “硫代氨基甲酰基”基团或“硫代氨基甲酸酯”基团包括O-氨基甲酰基和N-氨基甲酰基。
- [0479] 硫代氨基甲酸酯键描述了 $-O-C(=S)-NR'-$ 键,其中R' 是如上文所定义的。
- [0480] “C-酰氨基”指的是 $-C(=O)-NR'R''$ 基团,其中R' 和R''中的每一个如本文所定义的。
- [0481] “N-酰氨基”指的是 $R'C(=O)-NR''$ 基团,其中R' 和R''中的每一个如本文所定义的。
- [0482] “酰胺”基团包括C-酰氨基和N-酰氨基两者。
- [0483] 酰胺键描述了 $-NR'-C(=O)-$ 键,其中R' 是如上文所定义的。
- [0484] “脲”基团指的是 $-N(R')-C(=O)-NR''R'''$ 基团,其中R' 和R''中的每一个如本文所定义的,且R''' 是如本文所定义的R' 和R''所定义的。
- [0485] “硝基”基团指的是 $-NO_2$ 基团。
- [0486] “氰基”基团指的是 $-C\equiv N$ 基团。
- [0487] 术语“膦酰基”或“膦酸酯”描述了 $-P(=O)(OR')(OR'')$ 基团,R' 和R''是如本文所定义的。
- [0488] 术语“磷酸酯”描述了 $-O-P(=O)(OR')(OR'')$ 基团,R' 和R''中的每一个如本文所定义的。
- [0489] “磷酸”是在其中R的每一个是氢的磷酸盐基团。
- [0490] 术语“氧磷基”描述了 $-PR'R''$ 基团,R' 和R''中的每一个如本文所定义的。

- [0491] 术语“硫脲”描述了-N(R')-C(=S)-NR”基团,R'和R”中的每一个如本文所定义的。
- [0492] 如本文所用的术语“约”指的是±10%。
- [0493] 术语“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“包括(includes)”、“包括(including)”、“具有(having)及其共轭物意思是“包括但不限于”。
- [0494] 术语“由…组成”意思是“包括并限于”。
- [0495] 术语“基本上由…组成”意思是,组合物、方法或结构可包括另外的成分、步骤和/或部分,但只有另外的成分、步骤和/或部份不实质地改变要求保护的组合物、方法或结构的基本特征和新颖的特征。
- [0496] 本文使用的单词“示例性的”意思是“用作实例、例子或说明”。被描述为“示例性的”的任何实施方案不必被解释为比其它实施方案优选或有优势和/或不必排除并入来自其它实施方案的特征。
- [0497] 本文使用的单词“任选地”意思是“在一些实施方案中被提供且在其它实施方案中不被提供”。本发明的任何特定实施方案可包括多个“任选的”特征,除非这样的功能冲突。
- [0498] 如本文所用,单数形式“一(a)”,“一(an)”和“该(the)”包括复数指代,除非上下文清楚地另外规定。例如,术语“化合物”或“至少一种化合物”可包括多种化合物,包括其混合物。
- [0499] 整个本申请中,可以范围格式呈现本发明的各种实施方案。应理解,呈范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁,不应被解释为在本发明的范围上的固定限制。因此,范围的描述应被认为已具体公开了所有可能的子范围,以及该范围内的各个数值。例如,范围如1到6的描述,应被认为已具体公开了子范围,如从1到3、从1到4、从1到5、从2到4、从2到6、从3到6等,以及在该范围内的各个数,例如,1、2、3、4、5和6。这适用无论范围的广度。
- [0500] 无论何时本文指定了数值范围,这意味着包括在所指定范围内的任何引用的数字(分数或整数)。短语在第一个指定数和第二个指定数“之间的范围内变化”及在第一个指定数“到”第二个指定数的“范围内变化”在本文可互换使用,且意味着包括第一个指定数和第二个指定数以及那之间的所有分数和整数。
- [0501] 如本文所用的术语“方法”指的是用于完成给定任务的方式、手段、技术和操作,包括,但不限于,那些方式、手段、技术和程序,或已知的或由化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的从业者容易地从已知的方式、手段、技术和操作发展而来的那些方式、手段、技术和操作。
- [0502] 如本文所用,术语“治疗”包括消除、基本上抑制、减缓或逆转病症的进展,基本上改善病症的临床症状或美学症状或基本上防止病症的临床症状或美学症状的出现。
- [0503] 应理解,为了清晰而在单独的实施方案的上下文中描述的本发明的某些特征还可在单独的实施方案中以组合提供。相反地,还可单独地或以任何合适的子组合或作为适合于本发明的任何其它描述的实施方案中提供,为了简洁在单个实施方案的上下文中描述的本发明的各种特征。各种实施方案的上下文中所描述的某些特征不被认为是那些实施方案的必要特征,除非实施方案没有这些元素是不起作用的。
- [0504] 如上文所描述的和如下面权利要求部分所要求保护的本发明的各种实施方案和方面在下面实施例中找到了实验支持。

实施例

[0505] 现在参考下面的实施例,这些实施例连同上面的描述以非限制性的方式说明了本发明的一些实施方案。

[0506] 材料与实验方法

[0507] 化学合成:

[0508] 要求无水条件的所有反应在氩气下进行。除非另外说明,所有反应在室温下进行。

[0509] 化学品和溶剂或是A.R.级或通过标准技术来纯化。

[0510] 薄层色谱法(TLC):硅胶板Merck 60F₂₅₄:化合物通过使用UV光照射被可视化。

[0511] 快速色谱法(FC):硅胶Merck 60(粒度0.040mm-0.063mm),在括号中给出的洗脱剂。

[0512] 使用如提到的以400MHz运行的Bruker Avance来测定¹H-NMR光谱。使用如提到的以400MHz运行的Bruker Avance来测定¹³C-NMR光谱。

[0513] 所有通用试剂,包括盐和溶剂,购自Sigma-Aldrich。

[0514] 缩写:AcOH-醋酸、DMF-二甲基甲酰胺、ACN-乙腈、DCM-二氯甲烷、Et₂O-二乙醚、EtOAc-乙酸乙酯、Hex-正己烷、MeOH-甲醇、EtOH-乙醇、Ac₂O乙酸酐、CHCl₃-氯仿、DMSO-二甲亚砜、TFA-三氟乙酸、HMTA六亚甲基四胺。

[0515] 体内实验方法:

[0516] 探针4在小鼠内激活的活体无损成像:为了在BaIb/c小鼠内诱导急性炎症,将1mI (0.1mg/mI)的LPS(来自大肠杆菌055:B5的脂多糖,Sigma)注射到BaIb/c小鼠的腹腔内,如以前所描述的[Lee,D.等人,Nat.Mater.6,765-769(2007)]。6小时后,进行另外i.p.注射400μI的1mM测试探针化合物或PBS(作为对照)。对第二对照组的小鼠使用1mI PBS i.p.注射,接着另外i.p.注射400μI PBS。15分钟后,使用克他命(100mg/kg)和甲苯噻嗪(12mg/kg)麻醉小鼠,使用脱毛乳膏(Veet®)处理,并将其放置在CRI Maestro™无损荧光成像体系中。使用激发(595nm)和发射(635nm长通)滤光片设置,以10nm步长通过600-800nm光谱范围来获得多光谱图像立方体。通过光谱分析和线性分解算法来消除小鼠自发荧光和不需要的背景信号。将未混合特定信号的激活的探针荧光量化为光子/曝光时间(秒)的总信号。数据被表示为平均值±标准差。

[0517] 实施例1

[0518] 具有开启式机构的花青样探针:一般方法学

[0519] 如上文所表明的,在花青染料中应用基于拉-推共轭π-电子体系的变化开启式机构比用于其它常见的荧光染料,如香豆素和荧光素更困难。因为花青分子在两个氮原子之间内具有不可通过触发物来掩蔽的聚次甲基π-电子体系。

[0520] 为了在花青分子中产生上述的开启式机构,新方法学已被设计。

[0521] 设计方法基于在其中可被掩蔽的官能团共轭到花青分子上的新型花青样分子。示范性共轭花青样分子,Cy7样分子,被以化合物QCy7呈现在图2A中。

[0522] Cy7是已知广泛用于NIR成像的七甲川花青染料。Cy7的共轭π-电子体系具有在两个氮原子之间离域的正电荷。与Cy7不同,在酚化合物1中,氮原子具有两个正电荷(每一个上一个),且因此共轭模式是显著不同的。如图2A中所示,酚化合物1的去质子化导致酚盐化

合物1a的产生。酚盐的负电荷可朝向氮原子中的一个被离域以形成醌1b或1c,且从而消除了一个正电荷。现在获得的醌衍生物QCy7(物质1a、1b和1c的共振混合物)具有类似于Cy7的共轭模式的共轭模式,且因此发射NIR荧光。

[0523] 各种保护基团可共轭到酚化合物1上,以便允许通过其去除后将获得游离的荧光团(QCy7)的特定的触发部分来掩蔽QCy7的NIR荧光。

[0524] 在分子中可通过例如,由Cy5或Cy9替换Cy7、通过并入酚以外的芳族部分、通过由一个或多个其它受体部分替换(花青分子的)假吡啶部分、和/或通过并入超过两个的受体部分,基于上述方法来制备多种结构上和功能上相关的花青样分子。

[0525] 根据本发明的一些实施方案的示例性基于花青的NIR探针和它们的开启式机构被呈现于图2B-2H中。

[0526] 用于获得根据本发明的一些实施方案的示例性NIR探针,从受体部分耦合到其上的各种酚化合物开始的示例性合成途径被呈现于图3A中。通常,将双醛酚化合物或三醛酚化合物(或具有合适官能度的任何其它双醛芳族化合物或三醛芳族化合物)与两当量或更多当量的受体部分缩合。

[0527] 如图3A所表明的,缩合酚-二醛化合物2和两当量的大体的受体分子提供了包含在与两个受体共轭中作为潜在供体发挥作用的酚部分的化合物。酚的去质子化导致酚盐活性供体的形成,现在可给共轭受体中的任一个提供一对 π 电子,从而产生QCy7型染料化合物或其类似物(例如,具有不同受体/供体部分或是QCy5或其它)。

[0528] 染料分子中的供体部分可被其它酚衍生物替换。例如,酚化合物2a可与两当量的受体分子缩合以提供QCy9型染料化合物,而酚2b可与3当量的受体分子缩合以产生QCy7/9型染料化合物。在每种染料化合物中的受体分子可以是相同的或不同的。

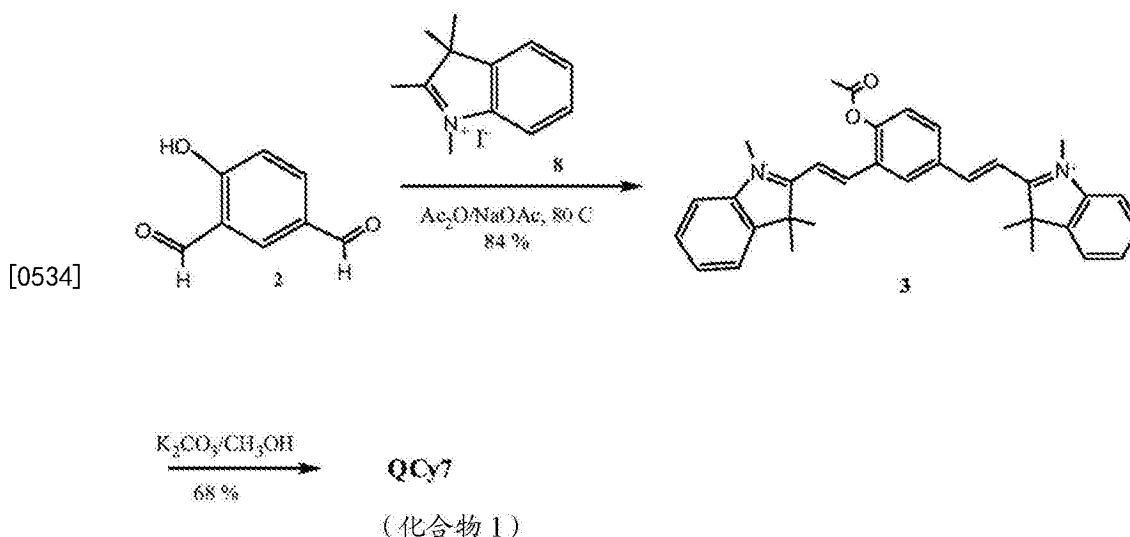
[0529] 根据本发明的一些实施方案的示例性受体部分被呈现于图3B中。这些受体中的每一个可作为如图3A中所呈现的QCy7型和QCy9型染料化合物中的一个或两个受体存在以及作为如图3A中所呈现的QCy7/9型的染料化合物的受体中的一个、两个或所有存在。

[0530] 遵循本文所描述的一般方法学,合成了一系列化合物,形成了具有供体-双-受体或供体-三-受体的作用机制的新染料分子库。获得的合成的染料分子的结构和光谱学数据被呈现在下文的表1-3中。

[0531] 合成QCy7:

[0532] 通过如下面方案1中呈现的简单的两步操作来合成QCy7(见图2)。简单地说,市售的二醛化合物2与两当量的吡啶碘化物(化合物8)缩合,产生酯化合物3。使用甲醇中的碳酸钾去除化合物3的乙酸盐基团以得到QCy7。

[0533] 方案1



[0535] 化合物3的制备:将市售的化合物2 (50mg, 0.33mmol)、NaOAc (83.9mg, 1.02mmol) 和市售的1,2,3,3-四甲基-3H-吡啶碘化物 (210.6mg, 0.70mmol) 的混合物溶解在2mL Ac_2O 中。反应混合物在氩气下在80℃搅拌30分钟,并通过RP-HPLC (在水中梯度10%–90%ACN, 20分钟) 监测。完成后,减压蒸发溶剂,并将粗产物溶解在DCM中,过滤并浓缩以得到红色固体的化合物3 (210mg)。

[0536] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3 +一滴MeOD) : δ =9.63 (1H, s), 8.67 (1H, d, $J=16.4\text{Hz}$), 8.52 (1H, d, $J=8.6\text{Hz}$), 8.27 (2H, m), 8.05 (1H, d, $J=16.4\text{Hz}$), 7.62–7.70 (8H, m), 7.52 (1H, d, $J=8.6\text{Hz}$), 4.54 (3H, s), 4.48 (3H, s), 2.49 (3H, s), 1.98 (6H, s), 1.88 (6H, s)。

[0537] ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3 +一滴MeOD) : δ =183.89, 183.32, 186.77, 154.20, 152.68, 145.82, 144.41, 143.96, 142.03, 136.88, 133.39, 133.23, 131.40, 131.05, 130.56, 130.25, 127.94, 127.94, 124.73, 123.48, 117.40, 115.93, 115.58, 115.53, 53.85, 53.52, 38.40, 37.92, 30.31, 27.38, 27.12, 27.12, 21.93, 0.57。

[0538] MS (ESI) : m/z 对于 $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_2^{2+}$ 的计算值:252.2;实测:252.2 $[\text{M}]^+$ 。

[0539] QCy7的制备:将化合物3 (150mg, 0.20mmol) 溶解在6mL MeOH中。将 K_2CO_3 (27mg, 0.20mmol) 添加到悬浮液中,且反应混合物在室温下搅拌60分钟,并通过RP-HPLC (水中梯度10%–90%ACN, 20分钟) 监测。完成后,通过减压蒸发浓缩反应混合物。使用6mL H_2O 、1mL AcOH稀释粗产物,并通过制备型RP-HPLC (水中梯度10%–90%ACN, 20分钟) 来纯化,以得到橙色固体的QCy7 (80mg, 68%)。

[0540] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) : δ =8.91 (1H, s), 8.65 (1H, d, $J=16.2\text{Hz}$), 8.28 (1H, d, $J=15.9\text{Hz}$), 8.00 (1H, d, $J=16.2\text{Hz}$), 7.82 (1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.50–7.59 (9H, m), 7.40 (1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 4.16 (3H, s), 4.14 (3H, s), 1.79 (6H, s), 1.76 (6H, s)。

[0541] ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3) : δ =183.85, 182.82, 168.52, 156.07, 151.79, 143.87, 143.63, 142.16, 142.07, 138.87, 135.42, 130.45, 130.14, 126.28, 123.63, 123.39, 123.30, 120.30, 114.83, 114.57, 112.77, 109.94, 53.14, 52.93, 34.90, 34.73, 27.57, 27.40, 0.70。

[0542] MS (ESI) : m/z 对于 $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}^+$ 的计算值:461.3;实测:461.3 $[\text{M}]^+$ 。

[0543] 应当注意,获得的QCy7染料在通过HPLC纯化期间被转换成化合物1 (其相应的酚), 假设由于洗脱剂中存在酸)。

[0544] 尽管如此,应当指出,整个本文中,如本文所描述的任何染料化合物被表示为它们的酚互变异构体,但在具有高于酚形式的pKa的pH的水溶液中容易被质子化。因此如本文所公开的酚形式和相应的醌形式应被视为可互换的。

[0545] 化合物9的合成(也被表示NK-118;产生染料化合物磺基-QCy7):

[0546] 通过使用吡啶-3-丙基-硫酸酯(化合物7)代替吡啶碘化物相似地按照关于QCy7(见,上面的方案1以及下面的方案6和方案7)的描述来合成化合物9。

[0547] 将化合物2(20mg,0.13mmol)、NaOAc(33.9mg,0.41mmol)和化合物7(见下面的方案7;79mg,0.27mmol)的混合物溶解在1ml Ac₂O中。反应混合物在氩气下在80℃搅拌30分钟,并通过RP-HPLC监测(水中梯度10%-90%ACN,20分钟)。完成后,通过减压蒸发来浓缩反应混合物。将乙酸酯衍生物溶解在4ml甲醇中。将K₂CO₃(催化量)添加到悬浮液中并将反应混合物在室温下搅拌60分钟,并通过RP-HPLC监测(水中梯度10%-90%ACN,20分钟)。完成后,使用4ml H₂O、800μL AcOH来稀释反应混合物,并通过制备型RP-HPLC(水中梯度10%-90%ACN,20分钟)纯化,得到红色固体的磺基-QCy7(44mg,收率51%)。

[0548] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ=9.20(1H,s),8.52-8.59(3H,m),8.17(1H,d,J=16.3Hz),8.07(1H,d,J=7.30Hz),8.01(1H,d,J=7.30Hz),7.90(1H,d,J=7.2Hz),7.86(1H,d,J=7.2Hz),7.61-7.68(4H,m),7.21(4H,m,J=8.7Hz),4.97(2H,t,J=7.6Hz),4.92(2H,t,J=7.6Hz),2.75(2H,t,J=6.0Hz),2.71(2H,t,J=6.0Hz),2.23-2.28(4H,m),1.86(6H,s),1.83(6H,s)。

[0549] ¹³C NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ=183.07,182.91,164.26,154.78,147.93,145.07,144.95,142.12,142.05,137.97,135.54,130.36,130.39,130.27,128.28,124.25,124.19,123.41,116.41,116.07,114.54,112.23,53.28,53.21,48.29,48.28,46.83,46.47,27.45,27.20,25.77。

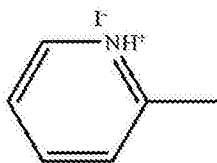
[0550] MS(ESI):m/z对于C₃₆H₃₉N₂O₇S₂的计算值:675.8;实测:675.4[M]⁻。

[0551] 使用类似的合成方法已制备了具有各种受体部分、供体部分及其组合的花青样化合物库。下面描述一些示例性合成。

[0552] 用于制备包含甲基吡啶鎓受体部分的花青样化合物的一般操作:

[0553] 将二醛(例如,0.067mmol)、吡啶(1-2mmol当量)和甲基吡啶鎓化合物(1-2mmol当量)的混合物溶在EtOH中。在氩气下在80℃搅拌反应混合物30分钟,同时通过RP-HPLC(使用水中10%-90%ACN的梯度洗脱剂,20分钟)监测反应过程。一旦反应完成后,通过减压蒸发来浓缩反应混合物。使用1:1:0.1的H₂O:ACN:AcOH来稀释粗产物,并通过制备型RP-HPLC(使用水中10%-90%ACN的梯度洗脱剂,20分钟)纯化以得到期望的产物。

[0554] 所用的最基本的甲基吡啶鎓化合物是甲基吡啶鎓碘化物:



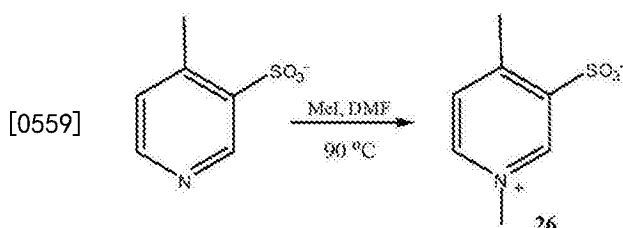
[0555]

甲基吡啶鎓碘化物

[0556] 合成化合物26:

[0557] 按照下面方案2中的描述来制备示例性的甲基吡啶鎓衍生物,化合物26。

[0558] 方案2



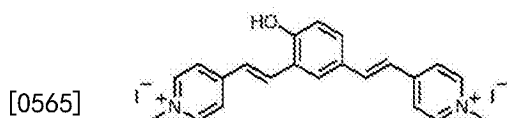
[0560] 将4-甲基吡啶-3-磺酸酯(0.51mmol)溶解在2ml DMF中。将碘代甲烷(5.1mmol)添加到悬浮液中,并在90℃搅拌反应混合物过夜,之后添加EtOAc,然后产物沉淀。过滤获得的固体以得到棕色固体的化合物26(90%收率)。

[0561] ^1H NMR (400MHz, MeOD): δ = 9.09 (1H, s)、8.77 (1H, d, J = 6.1Hz)、7.97 (1H, d, J = 6.1Hz)、4.40 (3H, s)、2.99 (3H, s)。

[0562] ^{13}C NMR (400MHz, MeOD): δ = 158.41、145.86、144.78、143.55、130.63、47.73、20.39。

[0563] MS (ESI): m/z 对于 $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$ 的计算值:187.03;实测:210.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

[0564] 合成化合物10(表1中的条目2):



化合物 10

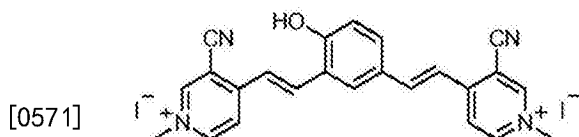
[0566] 根据上文所描述的一般方法,将市售的4-羟基间苯二甲醛(0.067mmol)、哌啶(0.133mmol)以及甲基吡啶鎓碘化物(0.133mmol)的混合物反应以得到黄色固体的化合物10(收率70%)。

[0567] ^1H NMR (400MHz, MeOD): δ = 8.71–8.65 (4H, m)、8.17–8.11 (5H, m)、7.91 (1H, d, J = 16.2Hz)、7.90 (1H, d, J = 16.4Hz)、7.72–7.62 (2H, m)、7.37 (1H, d, J = 16.2Hz)、7.00 (1H, d, J = 8.4Hz)、4.32 (3H, s)、4.29 (3H, s)。

[0568] ^{13}C NMR (400MHz, MeOD): δ = 155.06、154.86、145.38、145.22、141.76、137.12、132.25、130.10、128.88、127.98、124.25、124.08、123.93、123.43、121.06、118.98、117.28。

[0569] MS (ESI): m/z 对于 $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}^+$ 的计算值:329.16;实测:329.2 $[\text{M}]^+$ 。

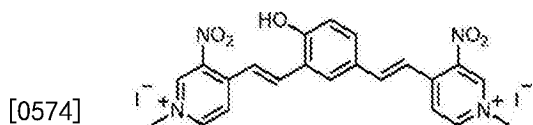
[0570] 合成化合物11(表1中的条目3):



化合物 11

[0572] 根据本文所描述的一般方法,将市售的4-羟基间苯二甲醛(0.066mmol)、哌啶(0.133mmol)和3-氰基-1,4-二甲基吡啶鎓碘化物(0.133mmol)的混合物反应以得到绿色固体的化合物11(40%收率)。通过NMR来证实结构。

[0573] 合成化合物12(表1中的条目4)：



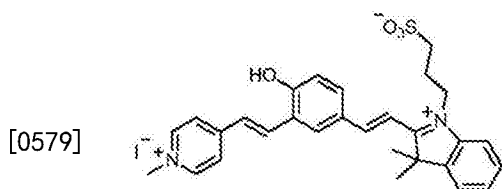
化合物 12

[0575] 根据本文所描述的一般方法,将市售的4-羟基间苯二甲醛(0.066mmol)、哌啶(0.133mmol)和1,4-二甲基-3-硝基吡啶鎓碘化物(0.133mmol)的混合物反应以得到棕色固体的化合物11(收率40%)。通过NMR证实结构。

[0576] 合成化合物13(表1中的条目5)：

[0577] 如上所述根据的一般方法,将市售的4-羟基间苯二甲醛(0.066mmol)、哌啶(0.133mmol)和4-甲基-1-N-甲基喹啉鎓碘化物(0.133mmol)进行反应,得到棕色固体的化合物13(收率90%)。通过NMR验证结构。

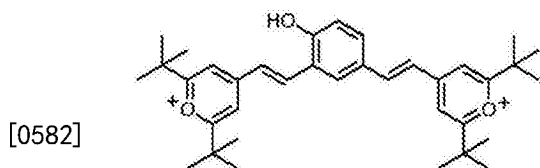
[0578] 合成化合物14(表1中的条目6)：



化合物 14

[0580] 根据上文描述的一般方法,将市售的4-羟基间苯二甲醛(0.20mmol)、哌啶(0.21mmol)和甲基吡啶鎓碘化物(0.21mmol)进行反应。将反应混合物通过减压蒸发浓缩,粗产物无需纯化(0.20mmol)与EtOH(1.5mL)中的哌啶(0.21mmol)和化合物7(0.21mmol)进一步反应。将反应混合物在80℃的Ar气氛下搅拌60分钟,同时通过RP-HPLC(用在水中10-90%ACN的梯度洗脱剂,20分钟)监测。一旦反应完成后,将反应混合物通过减压蒸发浓缩。将粗产物用1:1:0.1的H₂O:ACN:AcOH稀释,并通过制备型RP-HPLC(用在水中10-90%ACN的梯度洗脱剂,20分钟)纯化,得到红色固体的化合物14(收率80%)。通过NMR验证结构。

[0581] 合成化合物15(表1中的条目7)：

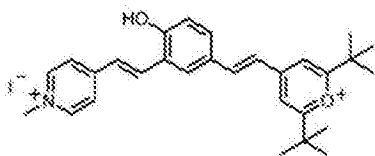


化合物 15

[0583] 根据上文描述的一般方法,将市售的4-羟基间苯二甲醛(0.066mmol)和2,6-二叔丁基-4-甲基吡啶三氟甲磺酸酯(0.133mmol)进行反应,得到棕红色固体的化合物15(收率80%)。通过NMR验证结构。

[0584] 合成化合物16(表1中的条目8)：

[0585]

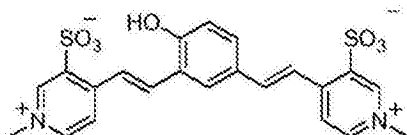


化合物 16

[0586] 根据如上所述的一般方法,将市售的4-羟基间苯二甲醛(0.066mmol)、2,6-二叔丁基-4-甲基吡啶三氟甲磺酸酯(0.066mmol)以及甲基吡啶鎓碘化物(0.066mmol)的混合物进行反应,得到化合物16。通过NMR验证结构。

[0587] 合成化合物17(表1中的条目9):

[0588]



化合物 17

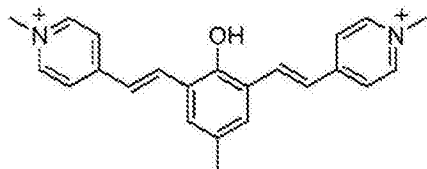
[0589] 根据一般程序如上所述,将市售的4-羟基间苯二甲醛(0.066mmol)、哌啶(0.133mmol)和化合物26(0.133mmol)进行反应,得到黄色固体的化合物17(收率75%)。

[0590] ^1H NMR (400MHz, DMSO): δ = 8.71-8.65 (4H, m), 8.17-8.11 (5H, m), 7.91 (1H, d, J = 16.2Hz), 7.90 (1H, d, J = 16.4Hz), 7.72-7.62 (2H, m), 7.37 (1H, d, J = 16.2Hz), 7.00 (1H, d, J = 8.4Hz), 4.32 (3H, s), 4.29 (3H, s).

[0591] ^{13}C NMR (400MHz, MeOD): δ = 155.06, 154.86, 145.38, 145.22, 141.76, 137.12, 132.25, 130.10, 128.88, 127.98, 124.25, 124.08, 123.93, 123.43, 121.06, 118.98, 117.28.

[0592] 合成化合物18(表1中的条目10):

[0593]



化合物 18

[0594] 根据如上所述的一般程序,将化合物2c(0.06mmol;参见图3A)、哌啶(0.12mmol)和甲基吡啶鎓碘化物(0.12mmol)的混合物进行反应得到橙色固体的化合物18(收率87%)。

[0595] ^1H NMR (400MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOD}$): δ = 8.61-8.72 (4H, m), 8.19 (2H, d, J = 15.3Hz), 8.18-8.22 (4H, m), 7.47 (2H, s), 7.15 (2H, d, J = 15.3Hz), 4.29 (6H, s), 2.65 (3H, s).

[0596] ^{13}C NMR (400MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{MeOD}$): δ = 154.93, 144.99, 137.96, 131.25, 130.69, 129.34, 124.74, 124.65, 121.41, 45.06, 23.12

[0597] MS (ESI): m/z 对于 $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}^+$ 的计算值: 343.18; 实测: 343.2 [M] $^+$.

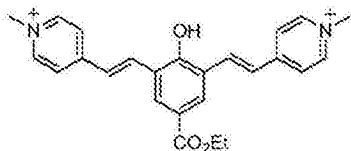
[0598] 化合物2d(苯基二醛)的合成:

[0599] 将市售的乙基-4-羟基苯甲酸酯(6mmol)和HMTA(24.8mmol)溶解在TFA(7mL)中。用迪安-斯达克体系将反应混合物回流过夜,其后冷却至室温。加入40mL水,将反应物加热到80°C下持续2小时。冷却至室温后,产物沉淀为黄色固体(定量收率)。

[0600] ^1H NMR (400MHz的, $\text{CDCl}_3+\text{MeOD}$) : $\delta=10.22$ (2H, s) , 8.59 (2H, s) , 4.34 (2H, q, $J=7.1\text{Hz}$) , 1.37 (3H, t, $J=7.1\text{Hz}$) 。

[0601] ^{13}C NMR (400MHz, $\text{CDCl}_3+\text{MeOD}$) : $\delta=192.56$, 165.17 , 139.53 , 136.54 , 135.71 , 123.59 , 62.42 , 14.94 。

[0602] MS (ESI) : m/z 对于 $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$ 的计算值:222.05;实测:221.1 $[\text{M}]^-$ 。合成化合物19(表1中的条目11) :



[0603]

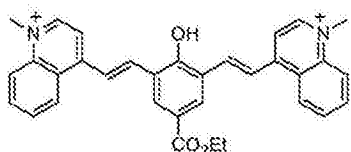
化合物 19

[0604] 根据本文所描述的一般方法,将二醛化合物2d (0.06mmol)、吡啶 (0.12mmol) 和甲基吡啶鎓碘化物 (0.12mmol) 的混合物进行反应,得到黄色固体的化合物19(收率90%)。

[0605] ^1H NMR (400MHz, MeOD) : $\delta=8.74$ (4H, d, $J=6.6\text{Hz}$) , 8.39 (2H, s) , 8.22 (2H, d, $J=16.3\text{Hz}$) , 8.18 (4H, d, $J=6.6\text{Hz}$) , 7.48 (2H, d, $J=16.3\text{Hz}$) , 4.40 (2H, q, $J=7.1\text{Hz}$) , 4.33 (6H, s) , 1.42 (3H, t, $J=7.1\text{Hz}$) 。

[0606] ^{13}C NMR (400MHz, MeOD) : $\delta=166.40$, 159.51 , 154.38 , 145.55 , 135.79 , 131.19 , 125.21 , 124.63 , 123.60 , 61.76 , 47.17 , 14.01 。MS (ESI) : m/z 对于 $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3^+$ 的计算值:401.19;实测:401.2 $[\text{M}]^+$ 。

[0607] 合成化合物20(表1中的条目12) :



[0608]

化合物 20

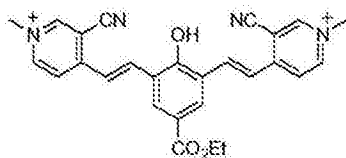
[0609] 根据本文所描述的一般方法,将二醛化合物2d (0.06mmol)、吡啶 (0.12mmol) 和4-甲基-N-甲基喹啉鎓碘化物 (0.12mmol) 的混合物进行反应,得到棕色固体的化合物20(收率60%)。

[0610] ^1H NMR (400MHz, $\text{CDCl}_3+\text{MeOD}$) : $\delta=9.25$ (2H, d, $J=6.3\text{Hz}$) , 8.62 (2H, d, $J=8.4\text{Hz}$) , 8.44 (2H, d, $J=6.3\text{Hz}$) , 8.32 (2H, s) , 8.29 (2H, d, $J=15.9\text{Hz}$) , 8.19 (2H, d, $J=8.4\text{Hz}$) , 8.13 (2H, t, $J=6.9\text{Hz}$) , 8.09 (2H, d, $J=15.9\text{Hz}$) , 7.95 (2H, t, $J=6.9\text{Hz}$) , 4.58 (6H, s) , 4.43 (2H, q, $J=7.1\text{Hz}$) 。

[0611] ^{13}C NMR (400MHz, MeOD) : $\delta=165.96$, 159.48 , 153.90 , 147.89 , 139.18 , 137.00 , 135.32 , 131.31 , 129.62 , 127.03 , 126.12 , 124.96 , 122.83 , 121.53 , 118.74 , 116.64 , 61.28 , 44.32 , 13.43 。

[0612] MS (ESI) : m/z 对于 $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_3^+$ 的计算值:501.22;实测:501.2 $[\text{M}]^+$ 。

[0613] 合成化合物21(表1中的条目13) :



[0614]

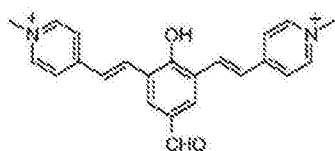
化合物 21

[0615] 根据本文所描述的一般方法,将二醛化合物2d (0.06mmol)、哌啶 (0.12mmol) 以及 N-甲基-3-氰基-4-甲基吡啶鎓碘化物 (0.12mmol) 的混合物进行反应,得到绿色蓝色固体的化合物21 (收率50%)。

[0616] ^1H NMR (400MHz, MeOD) : δ = 9.35 (2H, s) , 8.84 (2H, d, J = 6.7Hz) , 8.53 (2H, d, J = 6.7Hz) , 8.43 (2H, d, J = 15.9Hz) , 8.40 (2H, s) , 7.86 (2H, d, J = 15.9Hz) , 4.42 (2H, q, J = 7.1Hz) , 4.33 (6H, s) , 1.41 (3H, t, J = 7.1Hz) .

[0617] ^{13}C NMR (400MHz, MeOD) : δ = 162.43, 162.08, 150.60, 147.12, 146.67, 142.67, 134.09, 122.75, 121.79, 118.95, 118.00, 117.58, 116.04, 61.76, 47.90, 14.01. MS (ESI) : m/z 对于 $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_3^+$ 的计算值: 451.18; 实测: 451.2 [M] $^+$ 。

[0618] 合成化合物22的 (表1中的条目14) :

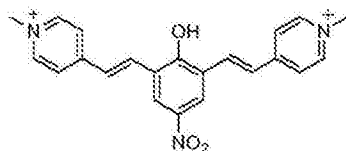


[0619]

化合物 22

[0620] 根据本文所描述的一般程序,将三醛化合物2b (0.06mmol)、哌啶 (0.12mmol) 和甲基吡啶鎓碘化物 (0.12mmol) 的混合物在室温下进行反应,得到红棕色固体的化合物22 (90%收率)。通过NMR确认结构。

[0621] 合成化合物23 (表1中的条目15) :



[0622]

化合物 23

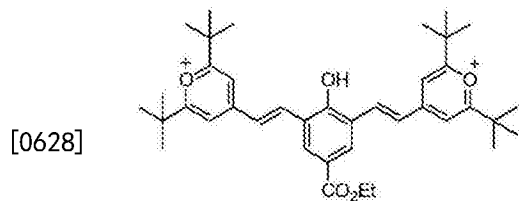
[0623] 将 (2-羟基-5-硝基-1,3-亚苯基) 二甲醇 (0.50mmol) 和 MnO_2 (3.5mmol) 溶解在 2ml 的 EtOAc 中,将反应物回流 24 小时,同时用 TLC 监测 (使用 30:70 EtOAc/己烷作为洗脱剂)。一旦完成,将反应混合物通过减压蒸发浓缩。将粗产物在硅胶上通过柱色谱法纯化 (用 30:70 EtOAc/己烷作为洗脱剂) 纯化,得到黄色固体的 2-羟基-5-硝基间苯二甲醛 (40%收率)。

[0624] 根据本文所描述的一般方法,将 2-羟基-5-硝基间苯二甲醛 (0.06mmol)、哌啶 (0.12mmol) 和甲基吡啶鎓碘化物 (0.12mmol) 进行反应,得到橙色固体的化合物 23 (收率 35%)。

[0625] ^1H NMR (400MHz, DMSO) : δ = 8.84 (4H, d, J = 6.7Hz) , 8.56 (2H, s) , 8.25 (2H, d, J = 6.7Hz) , 8.04 (4H, d, J = 16.5Hz) , 7.71 (2H, d, J = 16.5Hz) , 4.20 (6H, s) .

[0626] ^{13}C NMR (400MHz, DMSO) : $\delta = 164.03, 153.62, 146.37, 135.42, 127.99, 126.74, 126.04, 124.97, 123.68, 48.14$.

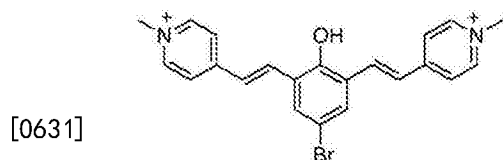
[0627] 合成化合物24(表1中的条目16) :



化合物 24

[0629] 根据如上所述的一般方法,将二醛化合物2d (0.06mmol)、哌啶 (0.12mmol) 以及2,6-二叔丁基-4-甲基吡喃三氟甲磺酸酯 (0.133mmol) 的混合物进行反应,得到化合物24。通过NMR验证结构。

[0630] 合成化合物27(表1中的条目17) :



化合物 27

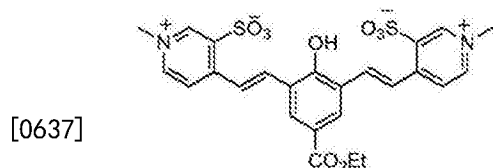
[0632] 根据本文所描述的一般方法,将4-羟基间苯二甲醛 (0.06mmol, 化合物2f)、哌啶 (0.12mmol) 和甲基吡啶鎓碘化物 (0.12mmol) 进行反应,得到橙色固体的化合物27 (收率83%)。

[0633] ^1H NMR (400MHz, MeOD) : $\delta = 8.74$ (4H, d, $J = 6.8\text{Hz}$) , $8.15\text{--}8.19$ (6H, m) , 7.96 (2H, s) , 7.47 (2H, d, $J = 16.2\text{Hz}$) , 4.33 (6H, s) .

[0634] ^{13}C NMR (400MHz, MeOD) : $\delta = 154.33, 145.58, 141.73, 135.15, 132.24, 127.53, 125.29, 124.61, 113.74, 47.16$.

[0635] MS (ESI) : m/z 对于 $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{OBr}^+$ 的计算值:407.08;实测:407.1 $[\text{M}]^+$ 。

[0636] 合成化合物28(表1中的条目18) :



化合物 28

[0638] 根据本文所描述的一般方法,将二醛化合物2d (0.06mmol)、哌啶 (0.12mmol) 以及化合物26 (0.12mmol) 的混合物进行反应,得到黄色固体的化合物28 (收率78%)。

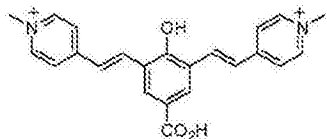
[0639] ^1H NMR (400MHz, DMSO) : $\delta = 9.15$ (2H, s) , 8.89 (2H, d, $J = 6.6\text{Hz}$) , 8.54 (2H, d, $J = 6.6\text{Hz}$) , 8.41 (2H, d, $J = 16.2\text{Hz}$) , 8.27 (2H, s) , 8.19 (2H, d, $J = 16.2\text{Hz}$) , 4.42 (2H, q, $J = 7.1\text{Hz}$) , 4.36 (6H, s) , 1.41 (3H, t, $J = 7.1\text{Hz}$) .

[0640] ^{13}C NMR (400MHz, DMSO) : $\delta = 151.32, 145.60, 144.68, 143.92, 136.38, 132.25,$

126.34, 125.92, 125.47, 123.92, 122.14, 62.22, 48.16, 15.43.

[0641] MS (ESI) :m/z $C_{25}H_{24}N_2O_9S_2$ 的计算值:560.09;实测:561.1 [M+H]⁺.

[0642] 合成化合物29:



[0643]

化合物 29

[0644] 将市售的4-羟基苯甲酸 (7.2mmol) 和HMTA (29.8mmol) 溶解在TFA (7.6ml) 中。用迪安-斯达克体系将反应物回流3天,其后冷却至室温。加入44毫升水,并将得到的混合物加热至80℃下持续4小时。冷却至室温,得到黄色固体的3,5-二甲酰基-4-羟基苯甲酸(化合物2g) (定量收率)。

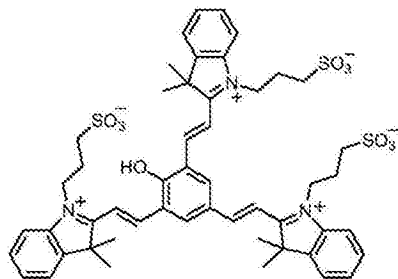
[0645] ¹H NMR (400MHZ, DMSO) :δ=10.25 (2H) , 8.50 (2H, S) . ¹³C NMR (400MHZ, DMSO) :δ=193.11, 166.70, 157.61, 138.75, 124.75, 123.78。

[0646] 根据本文所描述的一般方法,将二醛3,5-二甲酰基-4-羟基苯甲酸 (0.06mmol) 、哌啶 (0.12mmol) 以及甲基吡啶鎓碘化物 (0.12mmol) 的混合物在室温下反应,得到绿色固体的化合物29 (40%收率)。

[0647] ¹H NMR (400MHz的, MeOD) :δ=8.74 (4H, D, J=6.8HZ) , 8.45 (2H,) , 8.25 (2H, D, J=16.2HZ) , 8.19 (4H, D, J=6.8HZ) , 7.52 (2H, D, J=16.2HZ) , 4.33 (6H,) 。

[0648] ¹³C NMR (400MHZ, MeOD) :δ=167.43, 158.89, 153.81, 144.89, 135.24, 130.91, 124.59, 124.45, 123.93, 123.29, 46.48。

[0649] 合成化合物30 (表1中的条目20) :



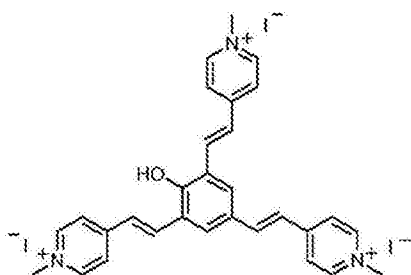
[0650]

化合物 30

[0651] 根据本文所描述的一般方法,将三醛化合物2b (0.056mmol) 、哌啶 (0.168mmol) 和化合物7 (0.168mmol) 的混合物进行反应,得到化合物30。通过NMR验证结构。

[0652] 化合物31的合成 (表1中的条目22) :

[0653]

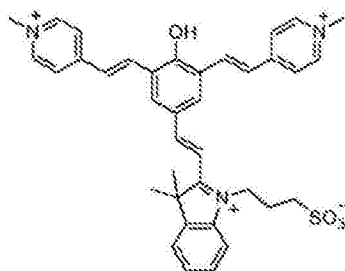
**化合物 31**

[0654] 根据本文所描述的一般方法,将三醛化合物2b(0.056mmol)、哌啶(0.168mmol)以及甲基吡啶鎓碘化物(0.168mmol)的混合物进行反应得到红色固体的化合物31(50%收率)。

[0655] ^1H NMR(400MHz, MeOD): δ =8.75(4H, d, J =6.6Hz), 8.72(2H, d, J =6.6Hz), 8.27(2H, d, J =16.2Hz), 8.18-8.23(6H, m), 8.15(2H, d, J =6.7Hz), 7.95(1H, d, J =16.3Hz), 7.58(2H, d, J =16.2Hz), 7.52(1H, d, J =16.3Hz), 4.34(6H, s), 4.32(3H, s)。

[0656] ^{13}C NMR(400MHz, MeOD): δ =154.49, 154.47, 145.60, 145.44, 140.95, 135.94, 130.08, 128.93, 126.00, 125.14, 124.55, 124.18, 122.54, 47.17, 17.06。

[0657] 合成化合物25(表1的条目21):



[0658]

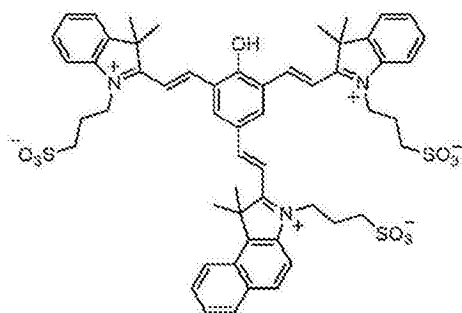
化合物 25

[0659] 根据本文所描述的一般方法,将三醛化合物2b(0.06mmol)、哌啶(0.12mmol)和甲基吡啶鎓碘化物(0.12mmol)的混合物进行反应。一旦完成,将反应混合物减压蒸发浓缩,得到化合物22,如本文所述。该粗产物无需纯化(0.20mmol),按照如上所述的一般方法进一步与哌啶(0.21mmol)和化合物7(0.21mmol)反应,得到蓝色固体的化合物25(50%收率)。

[0660] ^1H NMR(400MHz, MeOD): δ =8.69(4H, d, J =6.5Hz), 8.65(2H, m), 8.43(1H, d, J =15.8Hz), 8.26-8.22(6H, m), 7.94(1H, d, J =15.8Hz), 7.88(2H, d, J =16.3Hz), 7.81(1H, d, J =7.7Hz), 7.73(1H, d, J =6.4Hz), 7.563-7.57(2H, m), 4.86(2H, m), 4.31(6H, s), 3.12(2H, m), 2.43(2H, m)。

[0661] ^{13}C NMR(400MHz, MeOD): δ =180.91, 154.43, 154.21, 144.67, 143.37, 140.96, 135.33, 133.17, 129.18, 128.66, 126.51, 125.33, 124.11, 123.84, 22.65, 113.69, 108.70, 51.77, 46.32, 44.55, 25.72, 23.84, 23.29。

[0662] 合成化合物32(表1中的条目23):



[0663]

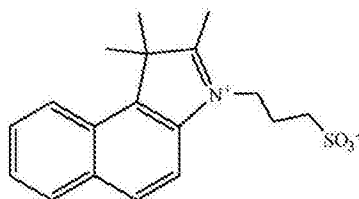
化合物 32

[0664] 根据本文所描述的一般方法,将粗化合物22 (0.06mmol,获得按照上面关于化合物25所描述的)、哌啶 (0.07mmol) 和吡啶化合物33 (0.07mmol) 的混合物反应,得到蓝色固体的化合物32 (40%收率)。

[0665] ^1H NMR (400MHz, MeOD) : δ = 8.75–8.73 (6H, m) , 8.57 (1H, d, J = 16.2Hz) , 8.41 (1H, d, J = 8.6Hz) , 8.31–8.23 (7H, m) , 8.15 (1H, d, J = 8.2Hz) , 8.11 (2H, d, J = 16.2Hz) , 8.04 (1H, d, J = 8.9Hz) , 7.90 (2H, d, J = 16.2Hz) , 7.81 (1H, t, J = 7.3Hz) , 7.71 (1H, t, J = 7.3Hz) , 4.87 (2H, t, J = 9.9Hz) , 4.34 (6H, s) , 3.17 (2H, m) , 2.53 (2H, m) .

[0666] ^{13}C NMR (400MHz, MeOD) : δ = 183.30, 154.50, 153.75, 145.50, 139.34, 138.90, 134.95, 132.71, 132.12, 130.70, 128.92, 128.06, 127.81, 126.55, 125.77, 124.76, 123.42, 112.72, 111.02, 54.59, 47.12, 45.86, 26.04, 24.96, 23.55.

[0667] MS (ESI) : m/z 对于 $\text{C}_{41}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}^+$ 的计算值: 670.27; 实测: 670.3 $[\text{M}]^+$ 。



[0668]

化合物 33

[0669] 实施例2

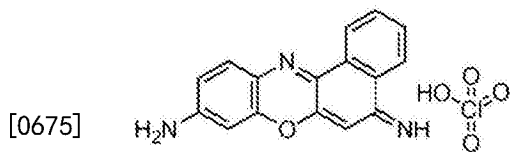
[0670] 染料化合物的光谱性质

[0671] QCy7的光谱特性的表征:

[0672] 获得橙色结晶粉末的化合物1 (其去质子化产生染料化合物QCy7)。图4A和图4B中呈现了化合物1的紫外光-可见光光谱 (图4A), 与乙酸酯化合物3的相比 (图4B)。由化合物1产生的染料QCy7的紫外光-可见光光谱显示在460nm和570nm处具有最大值的两个吸收峰 (图4A)。正如预期的那样, 荧光光谱确实显示了在715nm波长处在近红外区域内的发射峰值。所得到的约150nm的激发波长和发射波长之间大的斯托克斯位移是荧光探针的期望特征, 这有助于增加信噪比。据预测, 酚化合物1的乙酸酯衍生物在NIR区域内并未显示任何荧光发射 (图4B, 蓝色曲线)。由于乙酸酯化合物3是化合物1的掩蔽衍生物, 其在水溶液中仅去质子化后并不产生QCy7, 所以乙酸酯化合物3可以用来以特定的触发物对探针的荧光活性建模 (model)。

[0673] QCy7的量子产率的计算:

[0674] 甲酚紫高氯酸盐(如下文提出的)被选为用于测定QCy7量子产率的参考化合物。该化合物呈现相似的光谱特性,例如约560nm处的吸光度和600-740nm区域处的荧光。



甲酚紫高氯酸盐

[0676] 图5呈现了所获得的在所示浓度下关于标准样品(甲酚紫;图5A)和测试样品(QCy7;图5B)的荧光强度对波长的数据。在1cm小池中使用Fluoromax-3荧光计进行测量;在560nm的激发波长下。甲酚紫溶解在甲醇中且化合物1在PBS 7.4中(刚产生QCy7)。

[0677] 图6呈现了(甲酚紫;图6A)和QCy7(图6B)的线性图。

[0678] 通过下面的公式转换为绝对量子产率:

$$[0679] \quad \Phi_X = \Phi_{ST} (\text{Grad}_X / \text{Grad}_{ST}) (\eta^2_X / \eta^2_{ST})$$

[0680] 其中下标ST和X分别表示标准和测试, Φ 是荧光量子产率, Grad是从积分的荧光强度对吸光度的曲线图得到的梯度(参见图6)以及 η 是溶剂的折射率。

[0681] $\Phi_{\text{甲酚紫}} = 0.55$ [Stefan等人(1992) J. Phys. Chem. 86, 1738-1742]。

$$[0682] \quad \Phi_{\text{QCy7}} = 0.55 \left(\frac{20668866}{170479123} \right) \left(\frac{1.333^2}{1.314^2} \right) = 0.069$$

[0683] 消光系数的计算:

[0684] 图7呈现了在所示的在PBS 7.4中的浓度下,在QCy7的最大波长下(560nm),在1厘米小池中测量的QCy7的线性图。

$$[0685] \quad \epsilon_{\text{QCy7}} = 26848 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$$

[0686] 磺基-QCy7的光谱特性的表征:

[0687] 磺基-QCy7呈现了720nm的波长下,具有近红外荧光最大值的类似QCy7的光谱行为,如图8所示。

[0688] 选择QCy7作为用于确定磺基-QCy7的量子产率的参考化合物。

[0689] 图8给出了关于标准样品(QCy7;图8A)和试验样品(磺基-QCy7,由化合物9产生,图8B)在指定浓度下的荧光强度与波长的关系所得到的数据。使用Fluoromax-3荧光计,在560nm的激发波长下,对96孔板读数器进行了测量。这两个样品溶解在PBS 7.4中。

[0690] 图9给出QCy7(图9A)和磺基-QCy7(图9B)的线性图。

[0691] 如上所述计算绝对量子产率,发现为:

$$[0692] \quad \Phi_{\text{Sulfo-QCy7}} = 0.069 \left(\frac{397654}{176082} \right) = 0.16$$

[0693] 消光系数的计算:

[0694] 图10给出了在所示的在PBS 7.4中的浓度下,在最大磺基-QCy7的波长(590纳米),如在1厘米小池中测量的磺基-QCy7的线性图。

$$[0695] \quad \epsilon_{\text{Sulfo-QCy7}} = 52235 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$$

[0696] 磺基-QCy7的量子产率(16%)和消光系数(52000mol⁻¹cm⁻¹)具有足够用于体内测

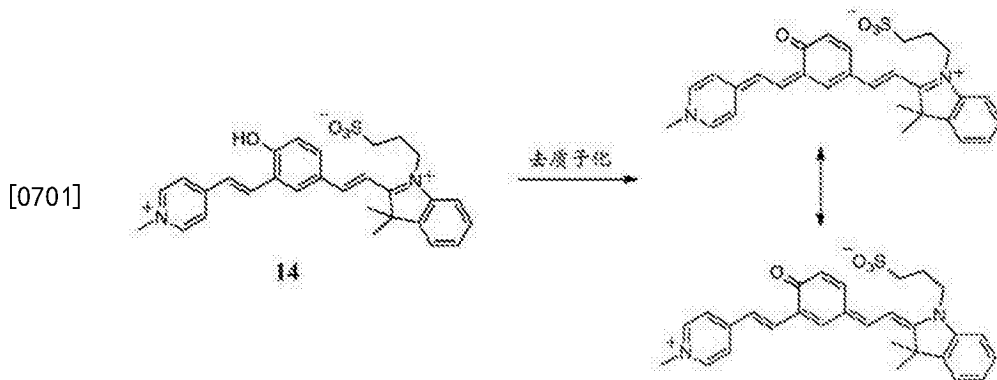
量的高的值。

[0697] 图11显示了化合物14(表1,条目6)的吸收(蓝色)和荧光(红色),。

[0698] 化合物14是由酚的潜在供体和两个不同的受体;甲基吡啶鎓部分和吡啶部分(参见方案3)。酚染料的去质子化导致形成新的供体-受体对荧光染料。正如在图11中所示,在紫外光-可见光光谱显示550nm处具有最大值的主要的吸收峰且荧光光谱示出在波长为680nm下在近红外区域内的发射峰。

[0699] 化合物14的量子产率计算为17%。

[0700] 方案3

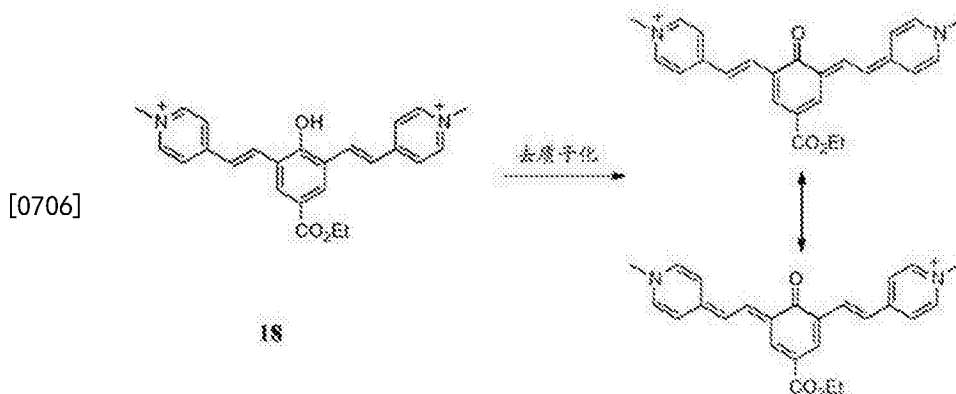


[0702] 图12呈现了化合物17(表1,条目10)的吸收(蓝色)和荧光(红色)。

[0703] 化合物18是由酚的潜在供体和基于甲基吡啶鎓部分上的两个相同的受体组成(参见方案4)。酚形式的去质子化形成新的供体-受体对荧光染料。紫外光-可见光光谱显示在330nm和490nm处具有最大值的两个吸收峰且荧光光谱显示在670nm波长下在近红外区域内的发射峰。

[0704] 化合物18的量子产率计算为5%。

[0705] 方案4

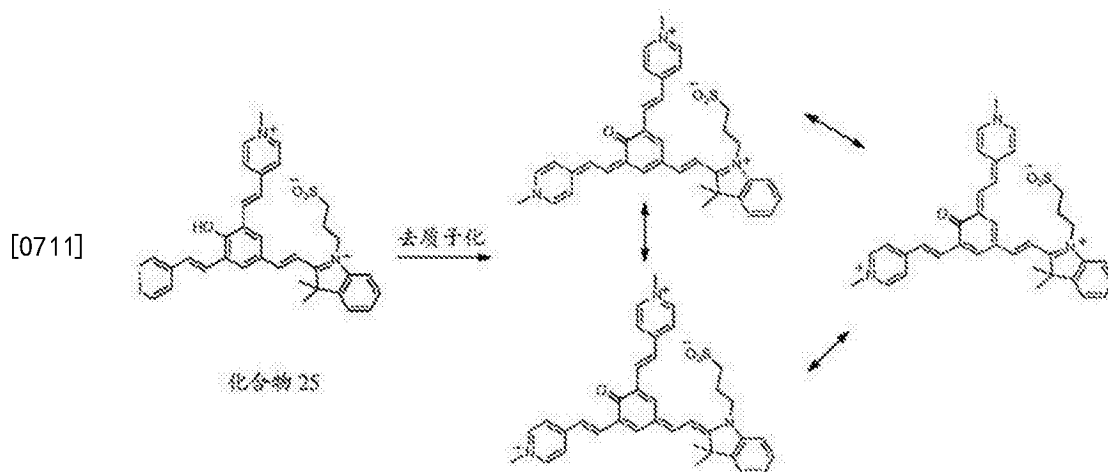


[0707] 图13呈现了化合物25(表1,条目21)的吸收(蓝色)和荧光(红色)的。

[0708] 化合物25是由酚的潜在供体和3个受体:两个甲基吡啶鎓部分和一个吡啶部分(参见方案5)。酚化合物的去质子化导致形成三个共振供体-双受体结构的新的荧光染料。紫外光-可见光光谱显示在330nm和550nm处具有最大值的两个吸收峰且荧光光谱显示在680nm波长下在近红外区域内的发射峰。

[0709] 化合物25的量子产率计算为16%。

[0710] 方案5



[0712] 将化合物30(表1, 条目16) 也表现出其量子产率为16%。

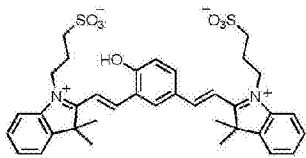
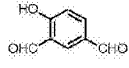
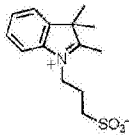
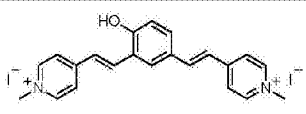
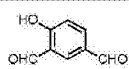
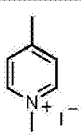
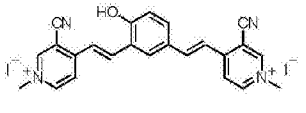
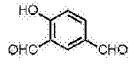
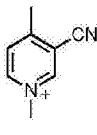
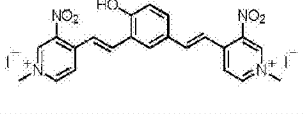
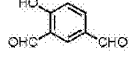
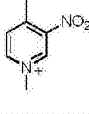
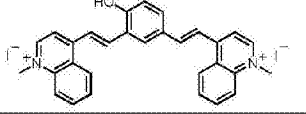
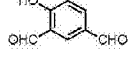
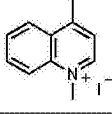
[0713] 化合物17、27和29(表1, 分别是条目9、17和19) 展出了量子产率分别为2.6%、2.9%和2%。化合物22和(分别是表1中的条目14和23) 分别呈现7%和6%的量子产率。

[0714] 获得根据本发明的实施例的示例性染料分子的化学2D结构和光谱数据列于表1。

[0715] 表1中的条目1-9表示由酚化合物2制备的染料化合物9-17所获得的结构和数据；条目10-19表示由酚化合物2a或其取代的衍生物酚化合物2c、2d、2e、2f和2g制备的染料化合物18-24和27-29所获得的结构和数据；条目20-24表示由酚化合物2b制备的染料化合物25和30-32所获得的结构和数据。

[0716] 表1

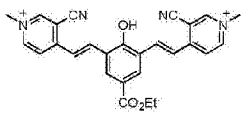
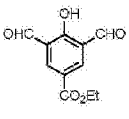
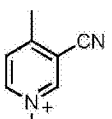
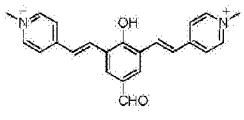
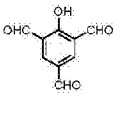
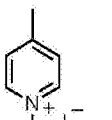
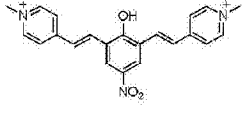
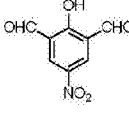
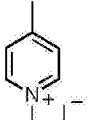
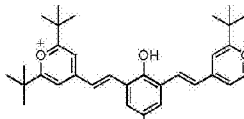
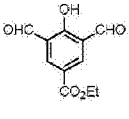
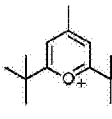
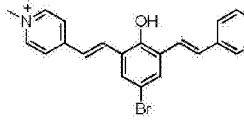
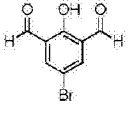
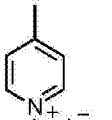
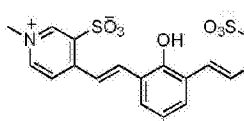
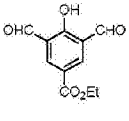
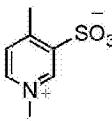
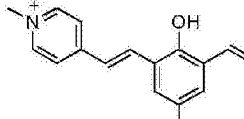
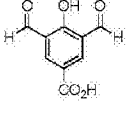
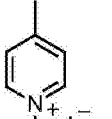
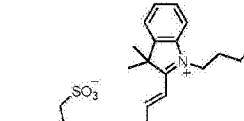
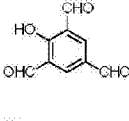
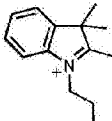
[0717]

项目	化合物编号	染料结构	供体	受体	λ_{max}	λ_{max}
1	9				460nm 590nm	710nm
2	10				350nm 420nm 500nm	720nm
3	11				350nm 500nm 570nm	730nm
4	12				350nm	无荧光
5	13				550nm	无荧光

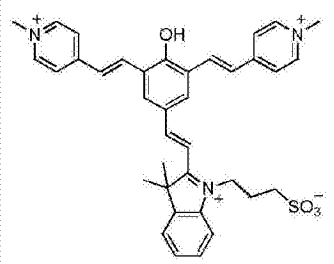
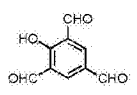
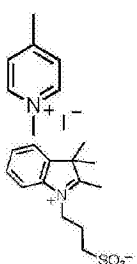
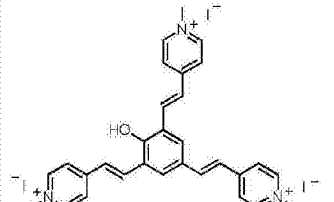
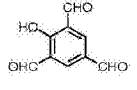
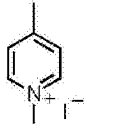
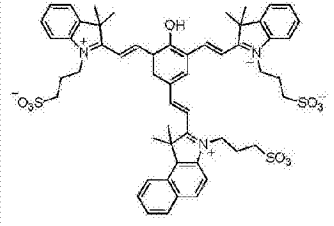
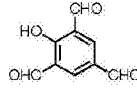
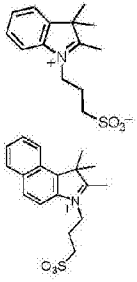
[0718]

6	14				450nm 550nm	650nm
7	15				520nm 580nm 620nm	无荧光
8	16				580nm	730nm
9	17				350nm 475nm 540nm	730nm
10	18				350nm 540nm	720nm
11	19				320nm 490nm	660nm
12	20				390nm 550nm	无荧光

[0719]

13	21		 2d		360nm 550nm	730nm
14	22		 2b		330nm 470nm	650nm
15	23		 2e		390nm 430nm	600nm
16	24		 2d		475nm 650nm	无荧光
17	27		 2f		340nm 530nm	720nm
18	28		 2d		300nm 350nm 530nm	720nm
19	29		 2g		350nm 510nm	700nm
20	30		 2b		460nm 590nm	710nm

[0720]

21	25		 2b		550nm	650nm
22	31		 2b		350nm 420nm 500nm	720nm
23	32		 2b		350nm 550nm	660nm

[0721] 大部分的染料化合物所获得的约150–200nm的激发和发射波长之间的斯托克斯位移显著大于已知的花青,如Cy5和Cy7 (10–20nm) 所观察到的。斯托克斯位移的增加是荧光探针的期望特征,这有助于增加信-噪比。

[0722] 在350–550nm波长吸收的荧光染料可以用双光子激光在近红外区域内被激发。此选项允许应用发色团的近红外范围内不吸收的近红外激发的优势。为了证明如本文所述的染料化合物库的效力以用近红外激光经历双光子激发,评价了化合物25。

[0723] 用HeLa细胞及PBS 7.4温育化合物25。在图14A和14B可以看出,化合物25表现出在800–1000纳米之间的波长的双光子激发光谱,从而表明它可以被用来提供共聚焦细胞图像。

[0724] 因此,本文中所示,这里所描述的方法,可以制备发荧光的化合物的库,和由此产生的荧光化合物提供了选择具有所需特性的染料化合物的巨大的灵活性。

[0725] 实施例2

[0726] 花青类化合物在水溶液中的表征

[0727] 水稳定性:

[0728] 对本文提供的花青样染料化合物的水稳定性进行了测试且比较了花青分子Cy7的水稳定性。

[0729] 在37°C下,在PBS 7.4 [25μM] 中温育所有测试的化合物且在72小时内监测它们的近红外荧光发射。图15给出了由化合物9 (绿色的圆形;磺基-QCy7)、化合物14 (蓝色的菱形)、化合物18 (红色的正方形)、化合物25 (橙色的三角形) 以及化合物1 (空白的藏青色的正方形;QCy7) 产生的染料的近红外荧光发射的归一化强度随温育时间的变化。所给出的三种染料比Cy7 (化合物14, 18和25) 增强了水稳定性,而化合物9表现出相似的稳定性。化合物14

和18被认为是高度稳定的,并没有表现出在整个温育期间近红外荧光的任何损失。

[0730] pKa值测量:

[0731] 如在图2A中示出的,从酚盐供体的分子内电荷转移(ICT)到两个受体部分之一形成新的具有近红外荧光的荧光染料。重要的是,染料的质子化形式(如酚结构)在近红外区域内不发射荧光。因此,这些化合物可以在酚的pKa值的区域内被用于确定水溶液中的pH的近红外荧光探针。存在于染料分子中的受体部分的类型影响每个酚的pKa值。

[0732] 通过监测根据本发明的一些实施方案的示例性化合物,化合物14、18和25的紫外光-可见光吸光度随环境pH的变化,测试了这些化合物的pKa值。将浓度为50 μ M的测试化合物溶解在所指示的pH的各自的缓冲液中,并测定其吸光度。

[0733] 图16给出所获得的数据且表明酚类化合物14、18和25分别表征为2.9、4.3和5.4的pKa值。

[0734] 相对低的pKa值表明这些化合物将在生理条件下经历ICT(分子内电荷转移)的作用方式,以便发射近红外荧光,原因是将发生生理pH下的去质子化和将生成荧光化合物。

[0735] 实施例3

[0736] 细胞通透性

[0737] 荧光探针通常用于多种生物功能的成像。是细胞可通透的发荧光的化合物可以有效地产生体外荧光图像。因此,测试了本文所描述的化合物的细胞通透性。

[0738] 在PBS 7.4中,由化合物9温育HeLa细胞过夜且通过共聚焦显微镜成像该细胞。

[0739] 图17A呈现细胞的共聚焦图像。图17B给出了在细胞内(绿色)和细胞外由化合物9(NK-118)产生的磺基-QCy7的荧光强度对波长,表明在细胞内较高的荧光。

[0740] 用溶酶体标记溶酶体传感器进行了化合物25的共定位测定。用561纳米激光线和从570纳米到800纳米获取的荧光激发样品。

[0741] 图18A-C显示了由化合物25温育HeLa细胞的共聚焦图像。溶酶体泡中的染料的积累表示通过胞吞作用机制进行细胞渗透。正如所料,染料即使在溶酶体的酸性条件下(pH约为5)也发射近红外荧光。

[0742] 为了进一步证明荧光团的近红外体外成像的能力,用化合物25温育细胞过夜,洗涤并用激光共聚焦显微镜成像。获得的图像示于图18D-F中并显示由染料发射的近红外荧光,说明其在细胞培养基中过夜后的化学稳定性。

[0743] 实施例4

[0744] 具有过氧化氢敏感的触发部分的基于花青的探针

[0745] 示例性的诊断探针根据上述的近红外荧光团被设计和制备。

[0746] 众所周知炎症事件导致氧化应激和过度产生过氧化氢,这样可以破坏活体组织。因此,开发可以成像体内的过氧化氢的光学探针是分子成像领域的重大挑战。在科学文献中有大量的报告描述这种成像探针的开发和评估 [Dickinson等人J. Am. Chem. Soc. 132, 5906-15 (2010); Dickinson等人Nat. chem. Biol. 7, 106-12 (2011); Miller等人Nat. chem. Biol. 3, 263-7 (2007); Van de Bittner等人Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2010)], 其中大部分是基于硼酸/酯作为特异性掩蔽基团,它们在与过氧化氢反应时可以去除“[Avital-Shmilovici, M. & Shabat, D. Biorg. Med. Chem. 18, 3643-7 (2010); Sella等人J. Am. Chem. Soc. 132, 3945-52 (2010); Sella, E. & Shabat, D. Chem. Commun., 5701-3 (2008);

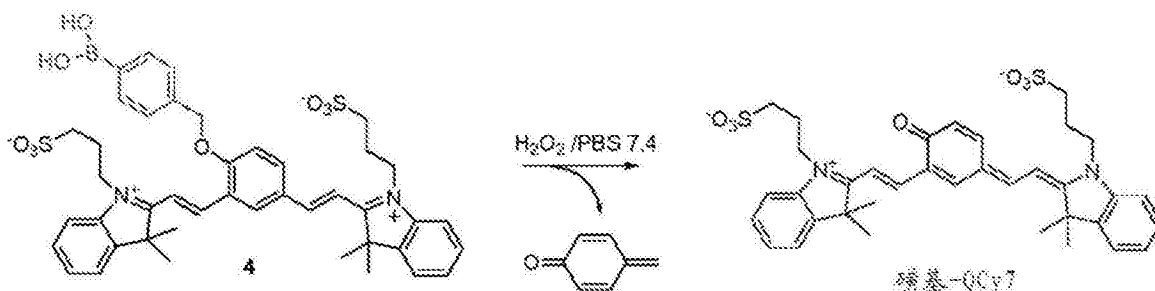
以及Sella, E. & Shabat, D. J. Am. Chem. Soc. 131, 9934-6 (2009)]。

[0747] 具有苯基硼酸触发单元的基于QCy7的体系的制备:

[0748] 因此,已经设计了具有通过自切除链附接于QCy7衍生物的苯基硼酸触发单元的分子探针。方案6中示出了分子探针化合物4,其具有通过醚链附接于QCy7的磺化衍生物的苯基硼酸。磺化的烷基链的目的是增强水溶解性和防止相对疏水的QCy7分子的聚集。探针化合物4被设计成在生理条件下由过氧化氢温育导致苯基硼酸的氧化,然后通过水解和对酞甲基化物的1,6-消除释放出活性的荧光团磺基-QCy7,所方案6所描述的。

[0749] 方案6

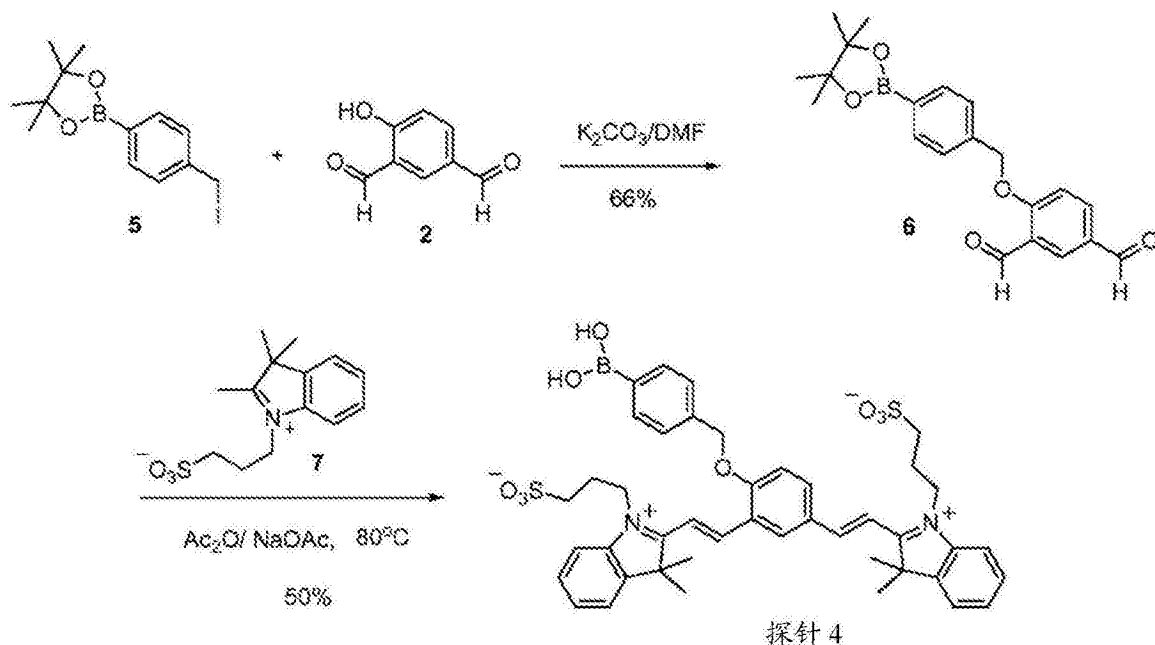
[0750]



[0751] 探针化合物4按照方案7中所描述的合成。简要地说,二醛化合物2被先前合成的苯基硼化物5烷基化[参见Sella, E. & Shabat, D. Chem. Commun., 5701-3 (2008)],以生成醚化合物6。用吡啶-丙烷-硫酸酯(化合物7)冷凝化合物6的醛基,得到探针化合物4。

[0752] 方案7

[0753]



[0754] 化合物6的合成:将化合物2 (50mg, 0.33mmol) 溶解在1ml干DMF中,并冷却至0°C。加入K₂CO₃ (101mg, 0.73mmol) 并在0°C下搅拌溶液10分钟,然后加入化合物5 (229mg, 0.66mmol)。将反应混合物在室温下搅拌12小时并用TLC (EtOAc/Hex 30:70) 监测。完成后,将反应混合物用Et₂O稀释,并用NH₄Cl饱和溶液洗涤。分离有机层,用盐水洗涤,经硫酸镁干燥,然后减压蒸发。将粗产物用柱色谱法在硅胶上 (EtOAc/Hex30:70) 纯化,得到白色固体的

化合物6 (80mg, 66%)。

[0755] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): $\delta = 10.55$ (1H, s), 9.93 (1H, s), 8.35 (1H, s), 8.07 (1H, d, 8.7Hz), 7.86 (2H, d, 7.7Hz), 7.44 (2H, d, 7.7Hz), 7.17 (1H, d, 8.7Hz), 5.32 (2H, s), 1.35 (12H, s)。

[0756] ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3): $\delta = 190.81, 189.19, 165.62, 138.68, 136.31, 136.05, 132.59, 130.59, 127.21, 125.90, 114.40, 84.72, 71.74, 25.59$ 。

[0757] MS (ESI): m/z $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{BO}_5$ 的计算值: 366.2; 实测: 389.2 $[\text{M}+\text{NA}]^+$ 。

[0758] 探针化合物4的合成: 将化合物6 (23mg, 0.06mmol)、NaOAc (11.3mg, 0.13mmol) 以及化合物7 [Mason等人 (2005) *J. Org. Chem.* 70, 2939-49] (39mg, 0.13mmol) 溶解在1毫升 Ac_2O 中。将反应混合物在80℃的氩气气氛下搅拌30分钟, 并通过RP-HPLC监测 (梯度10%-90水中的乙腈, 20分钟)。完成后, 将反应混合物通过减压蒸发浓缩。将粗产物用1.5mL H_2O 、1.5mL ACN、300 μL AcOH稀释, 通过制备型RP-HPLC (梯度10%-90水中的ACN, 20分钟) 纯化, 得到橙色固体的探针化合物4 (23mg, 68%)。

[0759] ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 9.25$ (1H, s), $8.54-8.65$ (3H, m), 8.18 (1H, d, $J = 16.5\text{Hz}$), $8.00-8.10$ (4H, m), $7.85-7.89$ (4H, s), $7.60-7.66$ (4H, s), $7.53-7.56$ (3H, s), 5.50 (2H, s), 4.94 (4H, t, $J = 6.8\text{Hz}$), 2.70 (4H, m), 2.24 (4H, m), 1.85 (6H, s), 1.74 (6H, s)。

[0760] ^{13}C NMR (200MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 182.41, 182.18, 162.02, 153.57, 153.35, 146.74, 144.44, 144.16, 141.25, 138.16, 137.77, 134.79, 133.37, 130.06, 129.66, 129.43, 128.74, 126.97, 124.35, 123.43, 123.39, 115.78, 115.50, 115.24, 114.91, 114.80, 112.76, 112.53, 71.37, 52.70, 52.47, 47.56, 46.20, 45.85, 26.50, 26.68, 25.10$ 。

[0761] MS (ESI): m/z 对于 $\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{BN}_2\text{O}_9\text{S}_2$ 的计算值: 810.3; 实测: 809.4 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。

[0762] 磺基-QCy7和探针4的光谱特性的表征:

[0763] 图19A (右小瓶) 显示了PBS7.4中得到的化合物9 (产生磺基-QCy7) 的溶液的典型的宝石蓝。由于150纳米的蓝色斯托克斯位移所预期到的, 掩蔽形式的磺基-QCy7, 探针4具有黄色的水溶液 (图19A, 左瓶)。当置于近红外成像相机下时, 探针4的溶液是澄清透明的, 而化合物9 (产生磺基-QCy7) 的溶液中表现出明确观察到的近红外荧光 (参见图19B)。

[0764] 近红外荧光检测:

[0765] 为了评价由探针化合物4在生理条件下与过氧化氢反应得到的近红外荧光, 在不同浓度的过氧化氢存在下, 探针在37℃的PBS7.4中温育, 并用分光光度计 (M2分子设备) 测量所发射的近红外荧光。在图20A中呈现的结果表明探针化合物4在30分钟内全都转化成磺基-QCy7 (红色曲线)。在没有过氧化氢时未观察到近红外荧光 (蓝色曲线)。

[0766] 接着, 评估了探针化合物4对过氧化氢检测的灵敏度。图20B显示了探针可以直接检测低于1 μM 的过氧化氢的浓度。

[0767] 实施例5

[0768] 利用具有苯基硼酸触发单元的基于花青的探针体系在体内的研究

[0769] 由于体内过度产生过氧化氢与许多炎症疾病的发展有关, 因而在小鼠模型中研究了上述开启式NIR探针使内源性产生的过氧化氢成像的能力, 如上所述。

[0770] 最初, 作为简单的对照实验, 探针4与过氧化氢的预混合溶液注入腹腔, 且在CR1 Maestro™无损荧光成像体系中对小鼠成像。

[0771] 所获得的图像呈现在图21中,并清楚地表明外源激活的探针化合物4可以产生近红外荧光的体内图像。仅用探针或用缓冲液处理的小鼠没有表现出任何可检测到的近红外荧光。

[0772] 接着,测试了探针化合物4是否可以用来区分体内的过氧化氢的各种浓度,以测试体系的灵敏度。因此,两种不同浓度的过氧化氢与探针化合物4预混合;立即肌内注射到腿中,然后由CR1 Maestro™无损荧光成像体系成像。

[0773] 所获得的图像呈现在图22中,且显示了探针化合物4的近红外发射荧光的强度的确依赖于过氧化氢的初始浓度。

[0774] 测试了用于视觉化内源性产生的过氧化氢的探针化合物4的用途。为此,使用可以简单地由脂多糖(LPS)诱导的先前描述的小鼠急性炎症模型[Lee等人*Nat. Mater.* 6,765-9 (2007)]。对小鼠腹腔注射(i.p.) LPS(1ml的0.1mg/ml),接着6小时后额外i.p.注射探针化合物4(400 μ l的1mM),并随后由CR1 Maestro™无损荧光成像体系成像。

[0775] 所得到的图像和相关数据分别呈现在图23A和23B中,并显示了用LPS处理的小鼠和用LPS和探针化合物4处理的小鼠比未经LPS处理的用探针4或PBS注射的小鼠产生了明显大的近红外荧光信号强度。在仅用探针化合物4处理的小鼠内观察到的轻微的近红外荧光归因于活体动物中产生的过氧化氢的基础水平。在小鼠内由过氧化氢成像探针观察到的近红外荧光强度的信噪比比对照组高约10倍。对于体内的过氧化氢成像探针,此前还从未观察到如此高的比的开启式探针。这样的比足够获得强烈反差的图像。

[0776] 先前已成功实施了使用硼酸酯触发基团掩蔽各种荧光团来检测和成像过氧化氢。已经显示出在几个其他活性氧物质中,基于硼酸酯的探针对过氧化氢是高度选择性的[参见Dickinson等人*J. Am. Chem. Soc.* 132,5906-15 (2010)]。本发明所给出的数据证实了以前的报道并证明了在使用过氧化氢作为示例性的分析物时,所设计的探针对体内生物过程成像的能力。

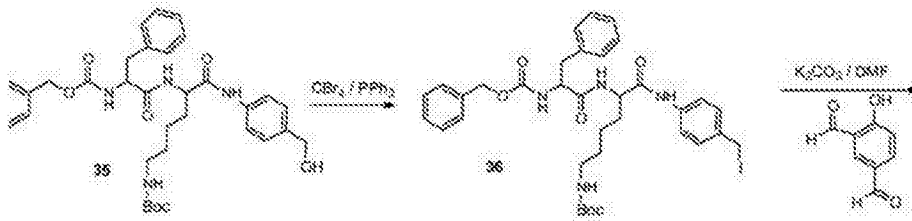
[0777] 实施例6

[0778] 基于组织蛋白酶B活化的花青的探针

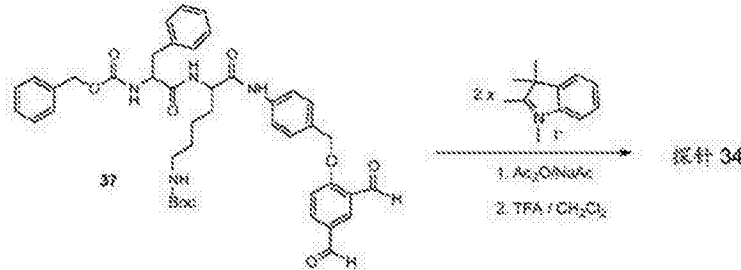
[0779] 基于图2中提出的设计,制备了由组织蛋白酶B活化的开启式探针。示例性的这样的探针由通过短的自切除的连接基连接到化合物1的二肽Z-Phe-Lys构建,如图24A中所描绘的。二肽是组织蛋白酶B的已知底物且其裂解和1,6-消除对-氨基苄醇(PABA)连接基后,QCy7被释放。根据先前所描述的作用方式,在附着到二肽时,探针化合物34的近红外荧光在关闭位置,且因此暴露于组织蛋白酶B时在开启位置。

[0780] 探针34的合成阐释在方案8中。Z-Phe-Lys-PABA 35与四溴甲烷和三苯基膦反应生成碘化物36。二醛化合物2被碘化物36烷基化得到二醛37,然后将其与2当量的吡啶碘化物缩合,得到探针化合物34。

[0781] 方案8



[0782]



[0783] 组织蛋白酶B温育后,研究探针化合物34的荧光行为。数据呈现于图24B中。

[0784] 利用探针评价组织蛋白酶B的体外活性,按如下方式执行:

[0785] 两个癌细胞种群在细胞培养测定中经历用探针化合物7的治疗。第一细胞种群在治疗前在完全培养基(补充了10%胎牛血清的RPMI)中生长且第二细胞种群在治疗前的24小时期间在饥饿培养基(补充了2%胎牛血清的RPMI)中生长。在这些应力条件下,已知细胞增强蛋白水解酶的表达。因此,细胞饥饿用来模仿癌组织中观察到的组织蛋白酶B的表达升高。然后,这两种细胞种群在存在和不存在PBS 7.4中不同浓度的探针化合物7时在37°C下温育,然后用分光光度计测量发射的近红外荧光。

[0786] 组织蛋白酶B活化的探针的设计可应用于成像/检测与癌症相关的像基质金属蛋白酶和天冬酰胺内肽酶的其他酶。原则上,具有蛋白水解或水解活性的任何酶仅通过用适当的酶的特异性底物替换触发部分就可以由本文公开的近红外探针方法确定。

[0787] 实施例7

[0788] 含有基于花青的探针部分的前药

[0789] 为了更好地评价药物递送系统的治疗效果,期望获得有关在活细胞和体内递送系统的药物释放的时间和位置的数据。

[0790] 最近报道了用于组装药物递送系统的具有潜在荧光的基于香豆素的部分(参见Wainstein等人,Chem. Commun, 2010, 46: 553-5)。当体系经历特定的激活,该药物被释放,并通过形成香豆素衍生物荧光产生。通过耦合潜荧光活化药物前药递送系统的药物释放事件,实时信息发布过程采用无损荧光检测技术,如图15所示。当体系经历特定的活化,药物释放,并通过形成花青衍生物产生荧光。因此,前药活化通过发射荧光报告了其对癌细胞的细胞毒性活性。

[0791] 由于抗肿瘤细胞生长抑制活性和发射的荧光之间的直接关系曾观察到[Wainstein等人,2010年,同上],药物释放的量的计算方法是量化所发射的荧光。这允许预测药物递送系统的治疗效果和潜在的副作用,并进一步作为药物释放和前药活化的记录系统。

[0792] 除了具有可以携带和释放药物分子的适当的官能团的触发部分外,从而QCy7的合适的衍生物被合成并在图26中呈现为化合物41,以及NIR前药体系的作用方式。前药41基于QCy7作为连接触发单元(记为“触发”)和药物分子之间的连接基被构建。激活触发单元导致

形成酚盐42a,这能够经历1,4-消除以释放药物分子。将得到的反应邻醌甲基化物42b迅速与水分子反应生成酚盐42c。得到的醌类衍生物具有与Cy7相似的共轭模式且从而发射近红外荧光。此设计允许由特定的触发部分掩蔽QCy7的近红外荧光,在其去除时,药物单元被释放且得到近红外荧光。

[0793] 作为一个例子,涉及了紫杉醇的前药(前药43)被组织蛋白酶B活化,以释放荧光染料和紫杉醇药物,如图27中所描绘的。

[0794] Taxol®(紫杉醇)是作为化疗药物的合适的候选者,可掺入如上的前药41中,因为它有一个可用的羟基官能团,易于连接。此外,紫杉醇不溶于水且其与前药41的亲水性骨架的组装有助于将其溶解在水介质中。基于图26提出的设计,制备前药43。前药由通过短的自我切除的连接基连接到紫杉醇和磺基-QCy7的二肽Z-Phe-Lys构成。组织蛋白酶B活化前药导致释放游离紫杉醇并通过形成磺基-QCy7的而产生近红外荧光(图27)。

[0795] 由化合物35合成前药43(参见,上述方案8),这是与羟甲基化的二醛化合物2反应(参见图3A)得到相应的醚。后者是反应的紫杉醇的4-硝基苯基碳酸酯,且所得到的偶联化合物随后与磺酰基吡啶碘化物(化合物7)缩合,得到前药43。

[0796] 接着研究了经组织蛋白酶B温育后,前药43的荧光行为。然后按照上文实施例6中所描述的进行了利用前药43时组织蛋白酶B活性的体外评价。从处理过的细胞发射的近红外荧光被实时监测。前药43所获得的细胞毒性被评估,并与所发射的荧光有关。所观察到的信号然后被校准以实时报告前药活化。

[0797] 虽然本发明已结合其具体实施方案得到描述,但显然许多替换、修改和变化对于本领域技术人员将是明显的。因此,意在包括落入在所附的权利要求书的精神和范围之内所有这些替换,修改和变化。

[0798] 在本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请通过引用被完全并入到本说明书中,至就好像每个单独的出版物、专利或专利申请被具体地和单独通过引用并入本文相同的程度。此外,在本申请中,对任何参考文献的引用或确认不应被解释为承认这样的参考文献可利用为本发明的现有技术。就使用的节标题来说,它们不应该被解释为一定是限制性的。

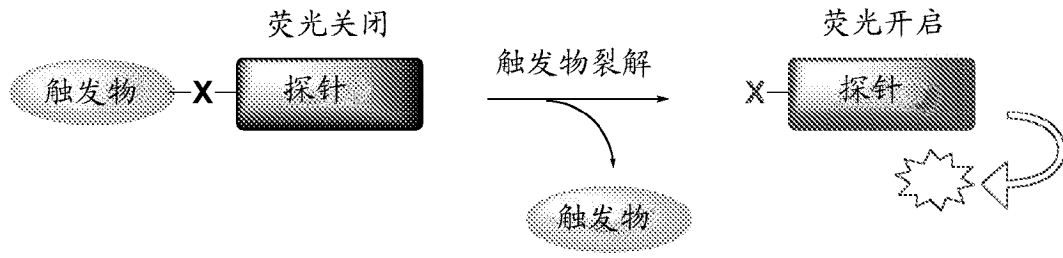


图1A

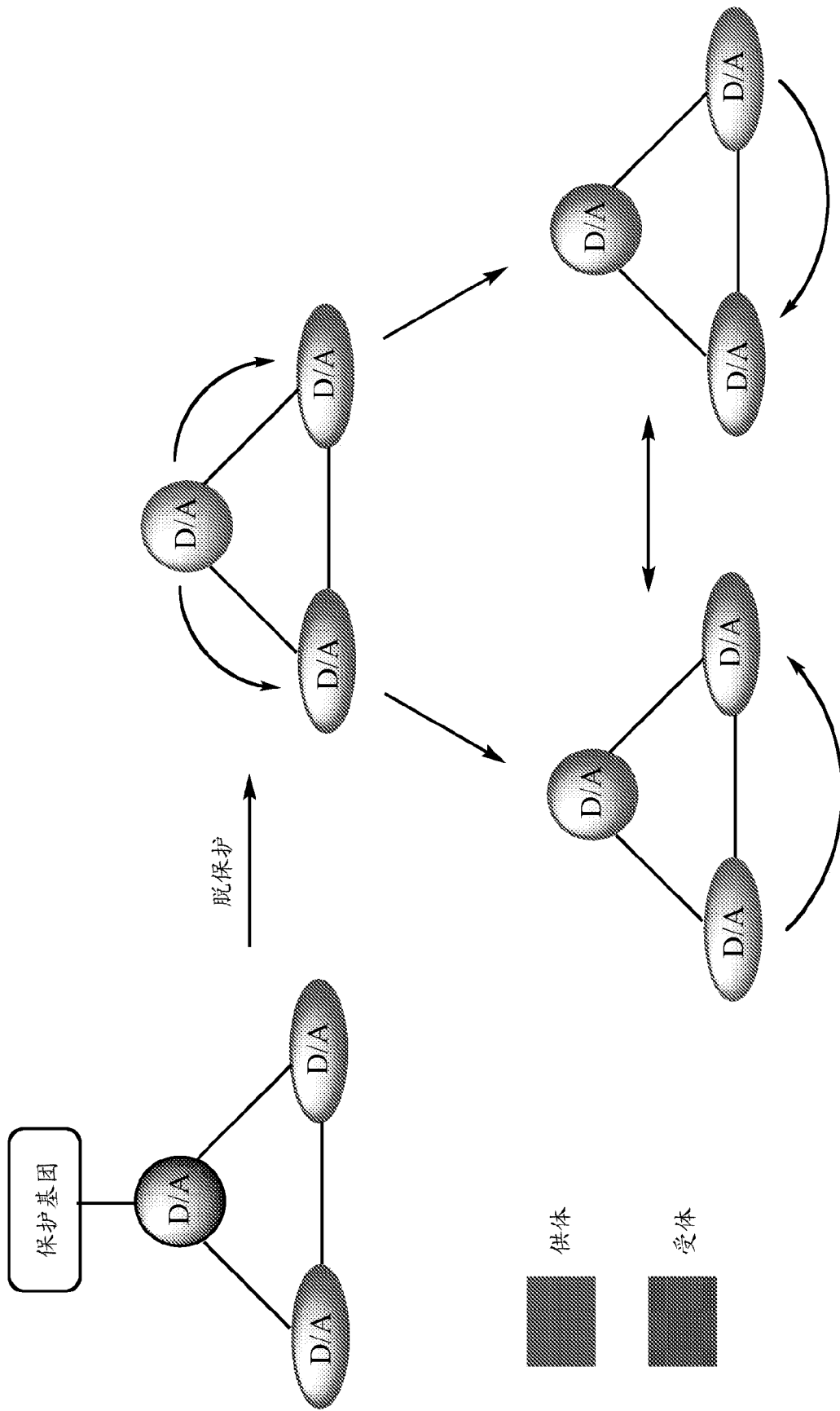


图1B

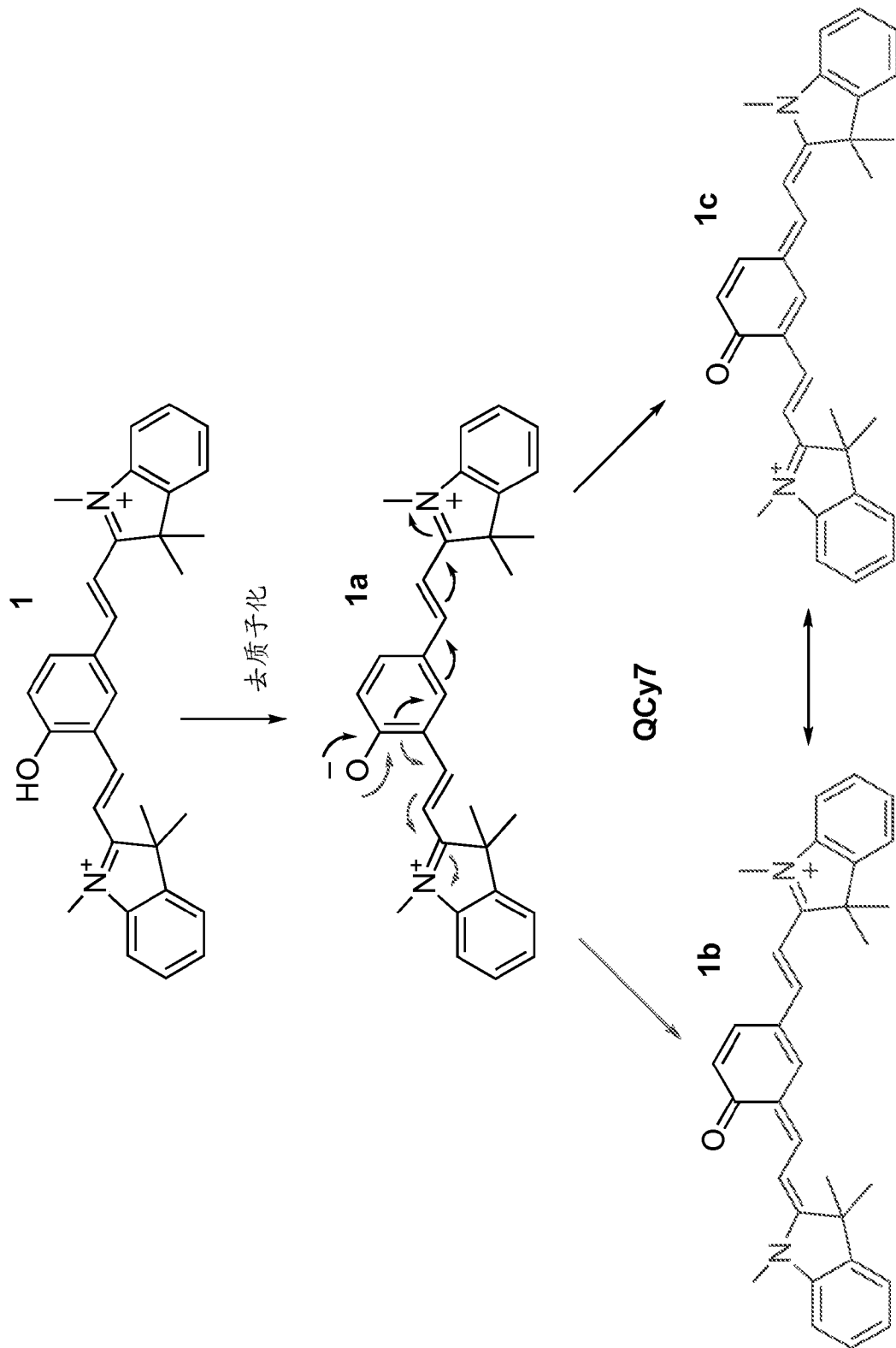
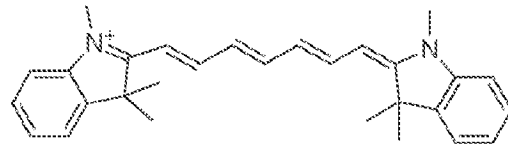
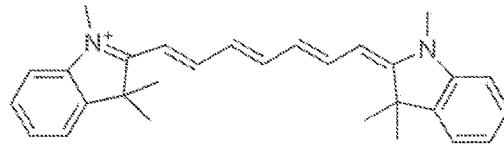


图2A



Cy7

图2A(续)



Cy7

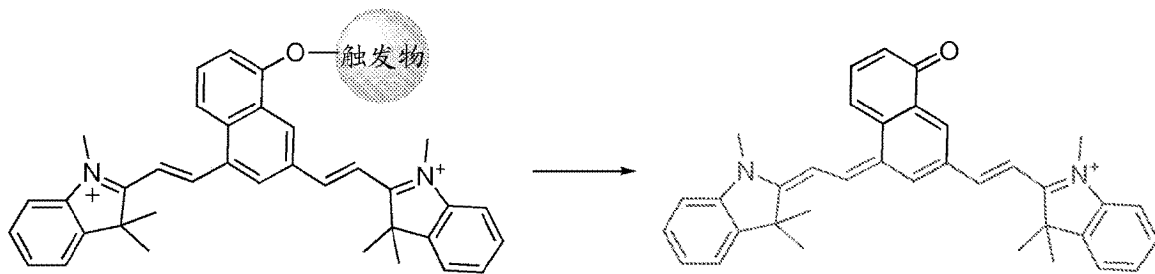
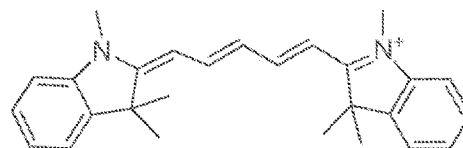


图2B



Cy5

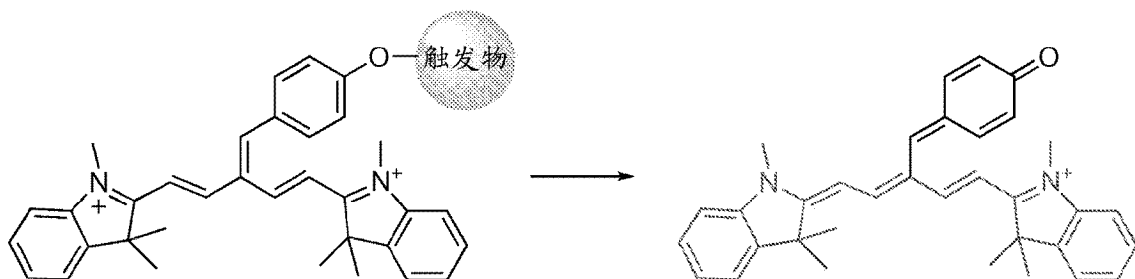


图2C

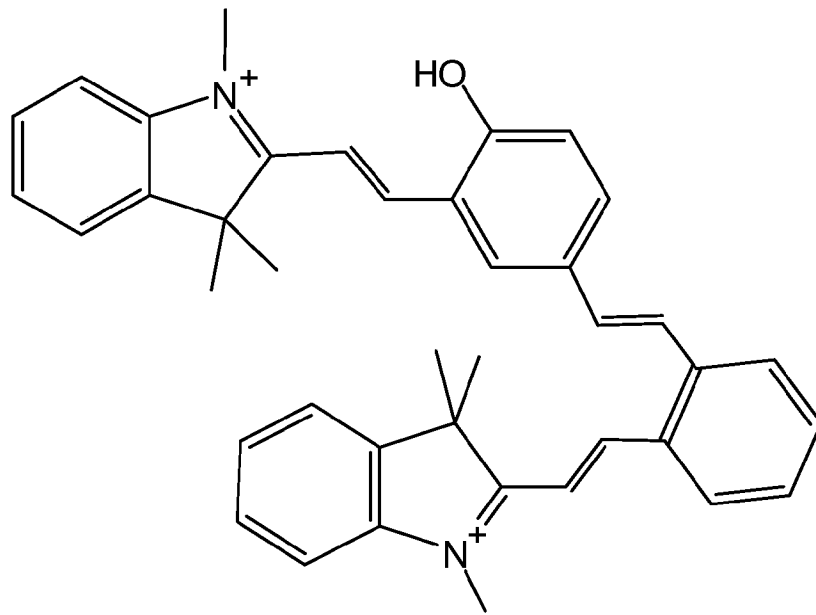


图2D

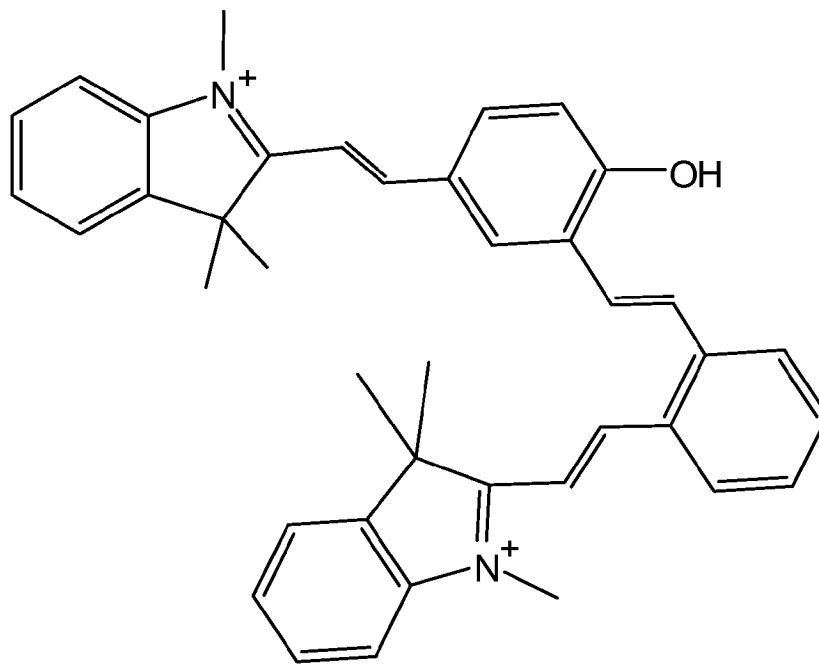


图2E

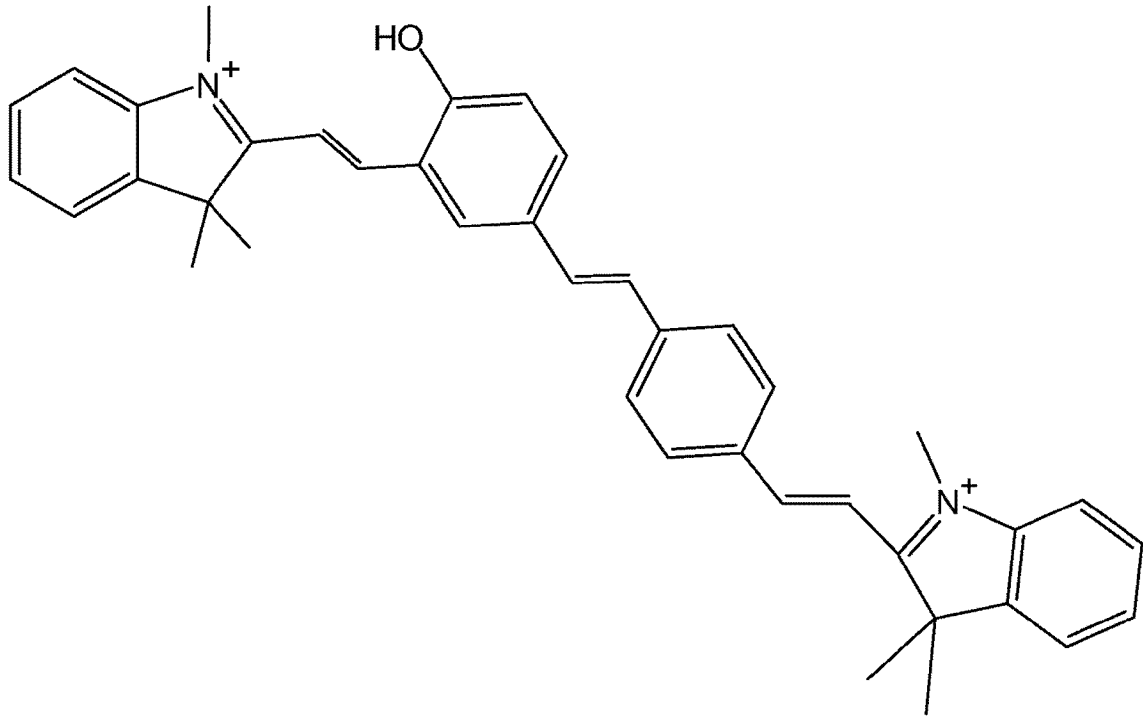


图2F

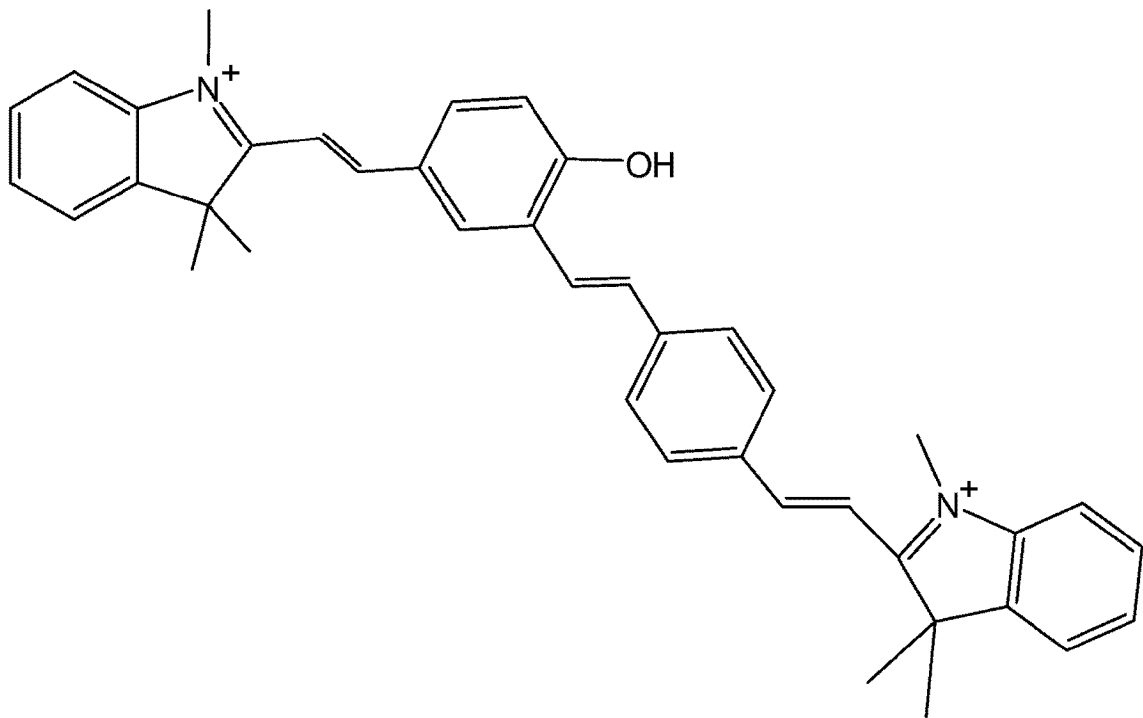


图2G

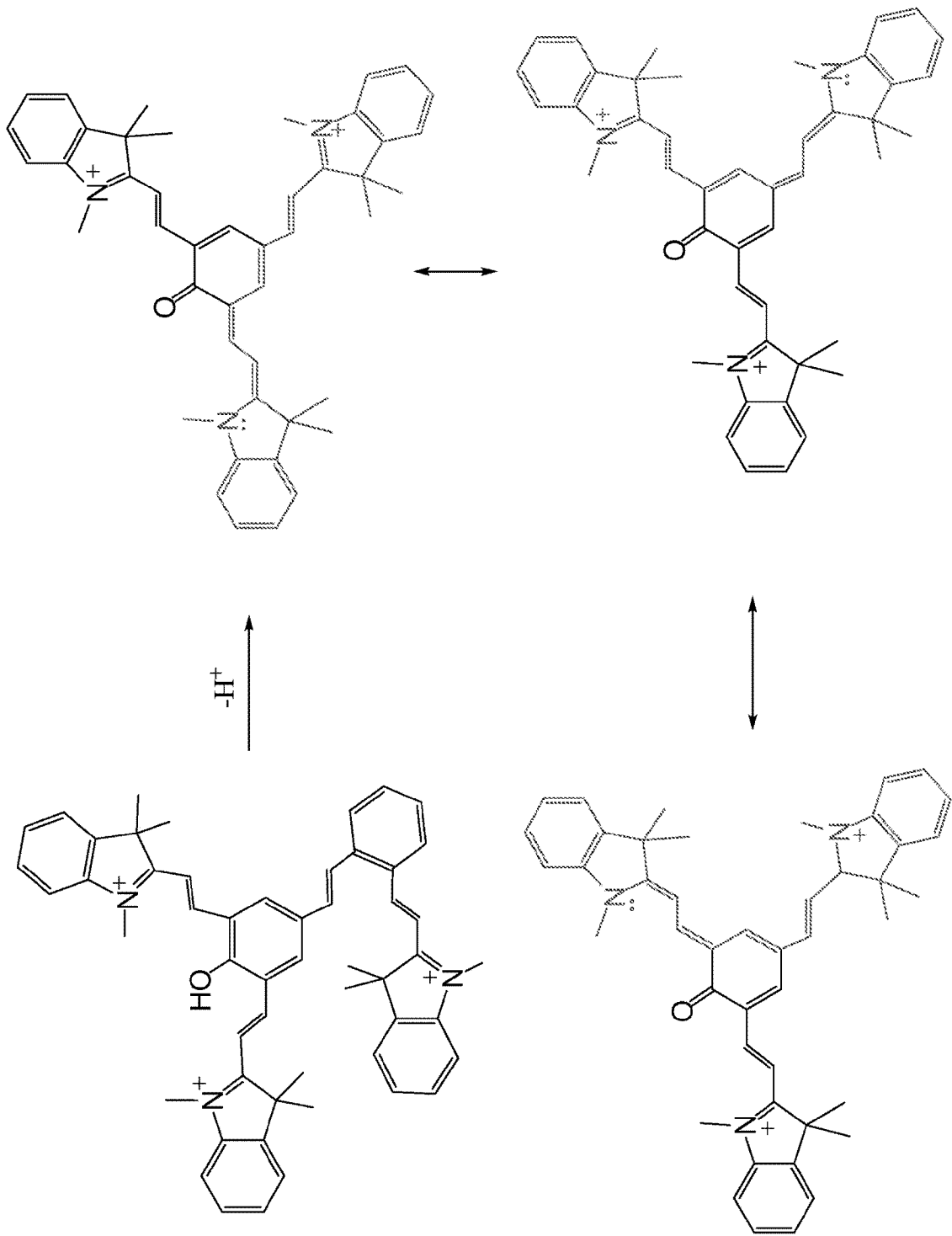


图2H

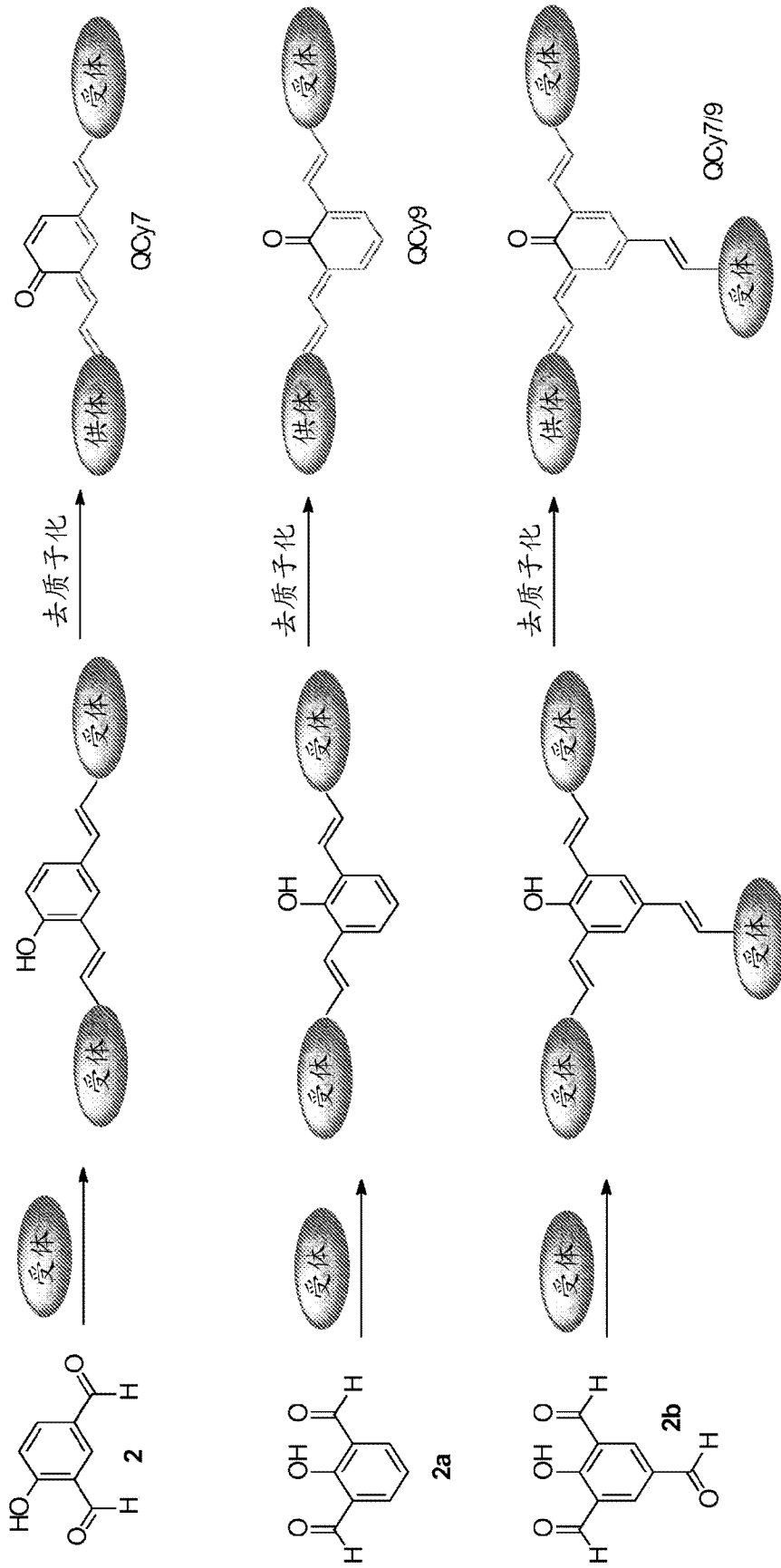
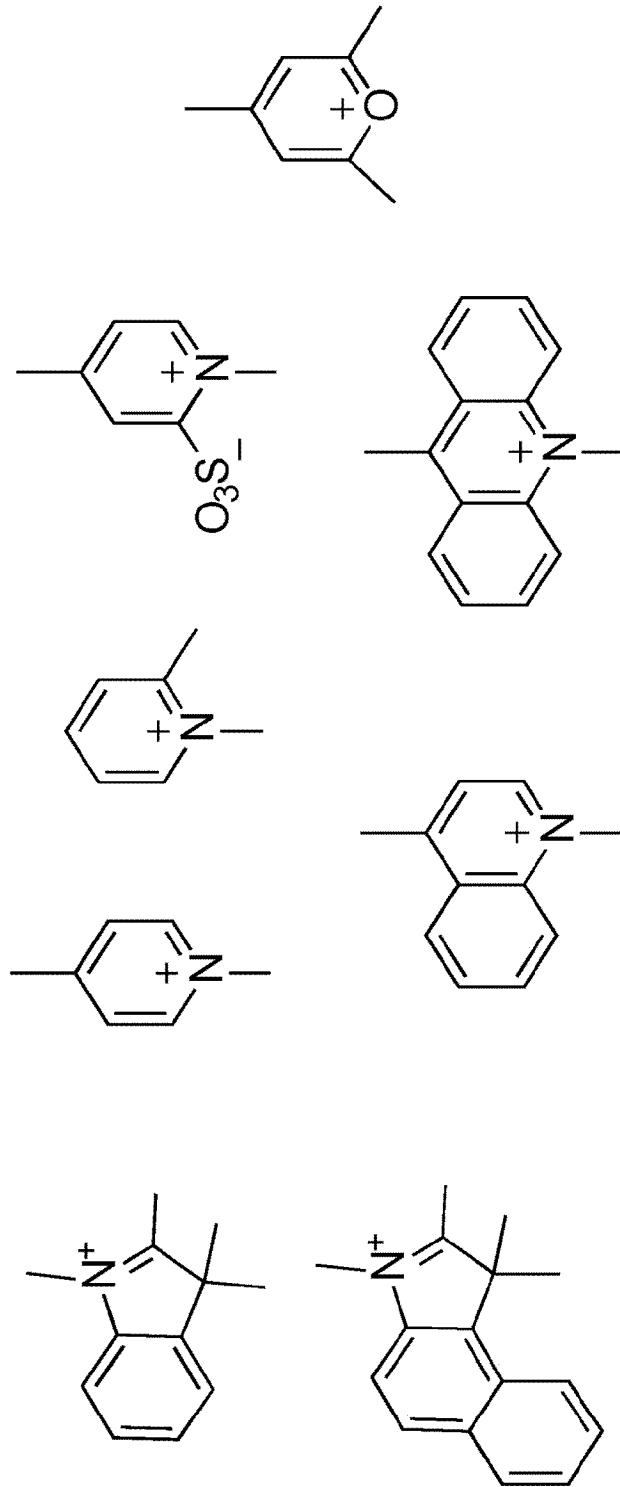


图3A



受体

图3B

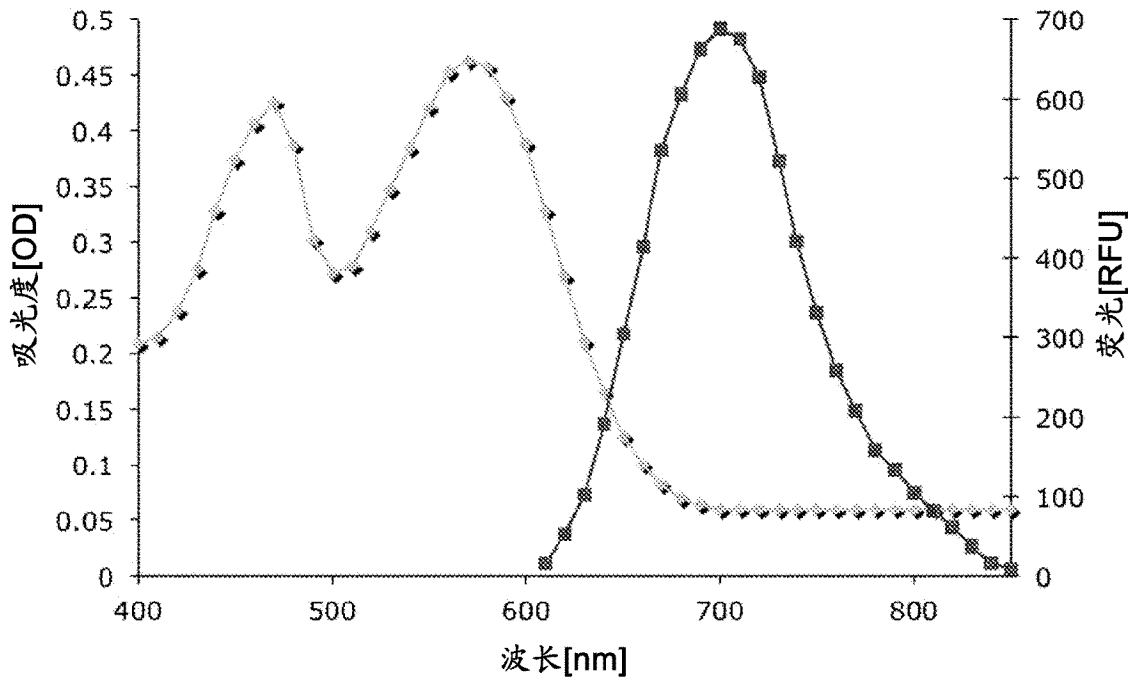


图4A

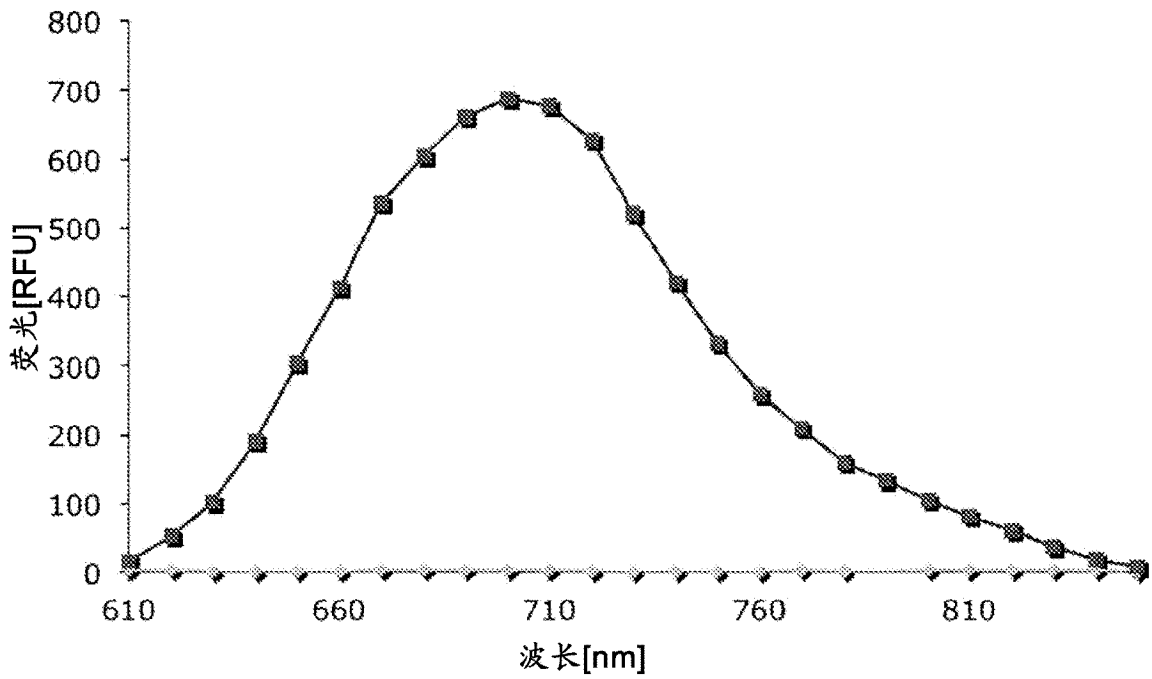


图4B

甲酚紫高氯酸盐

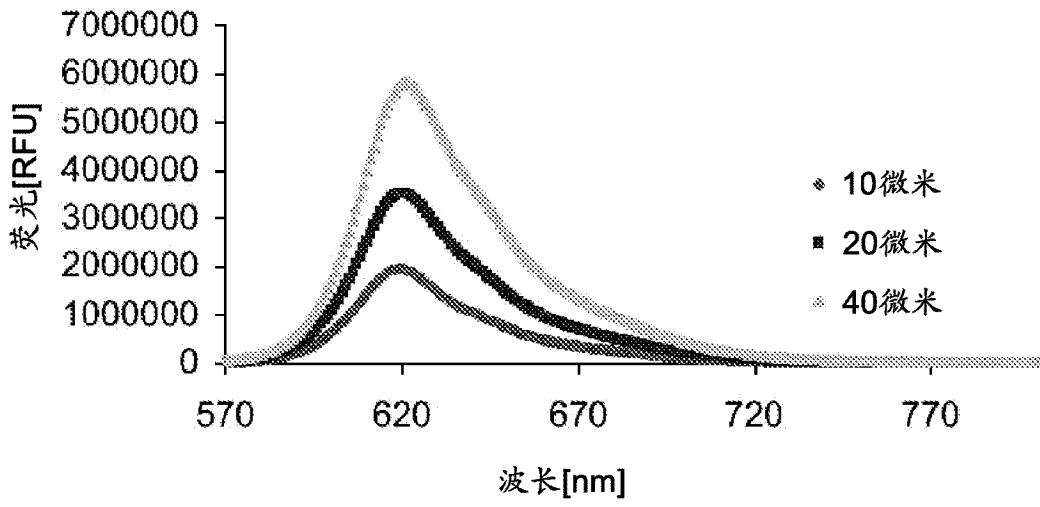


图5A

QCy 7

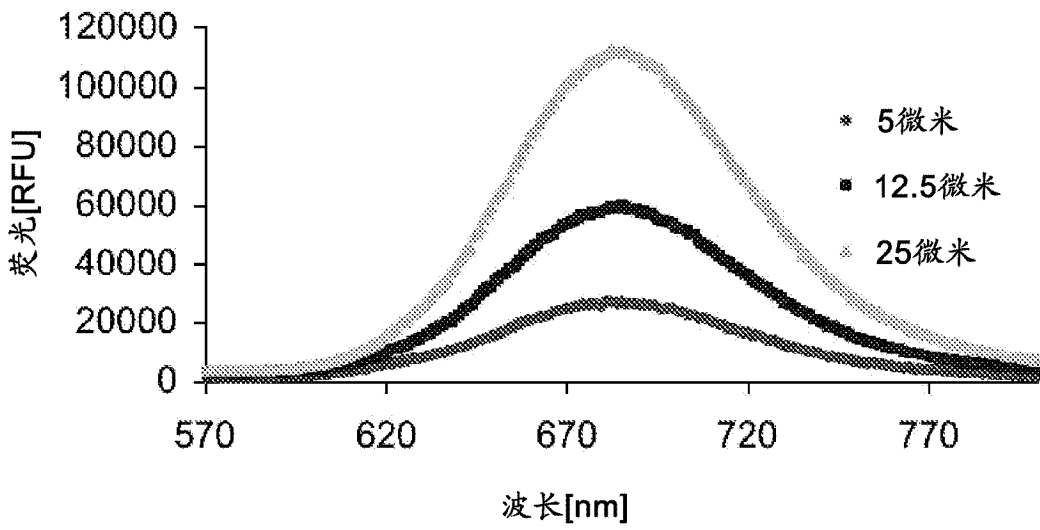


图5B

甲酚紫高氯酸盐

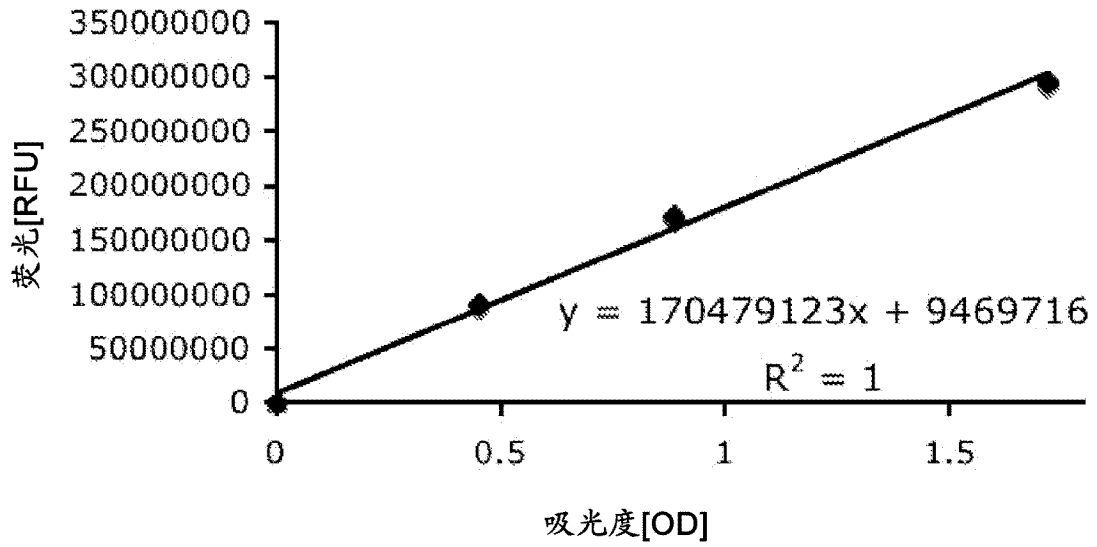


图6A

QCy7

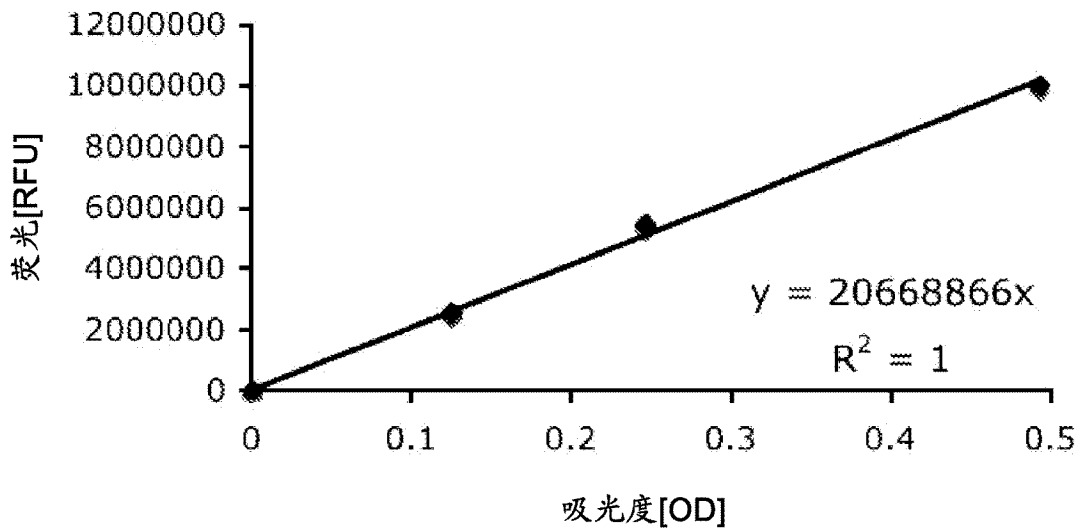


图6B

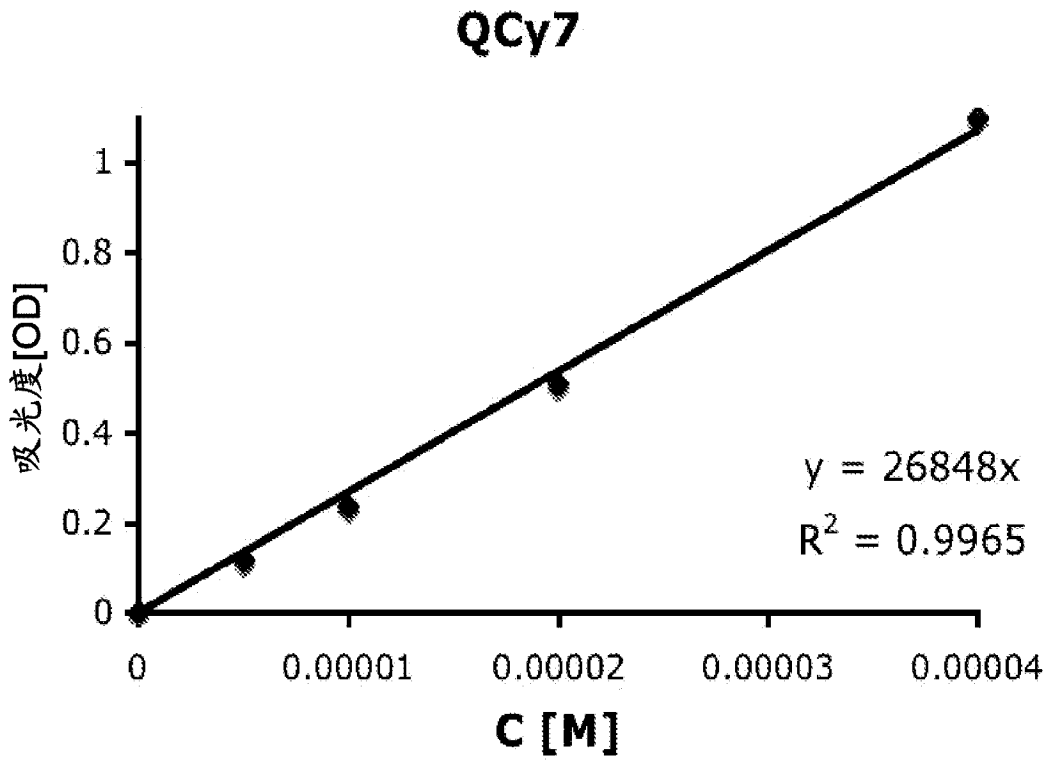


图7

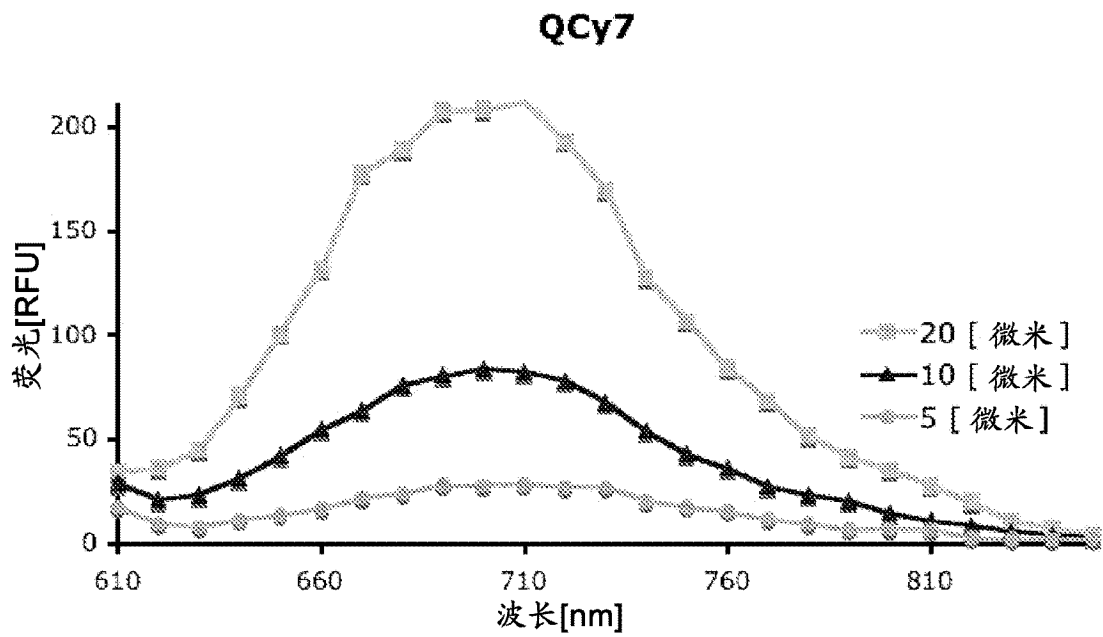


图8A

磺基-QCy7

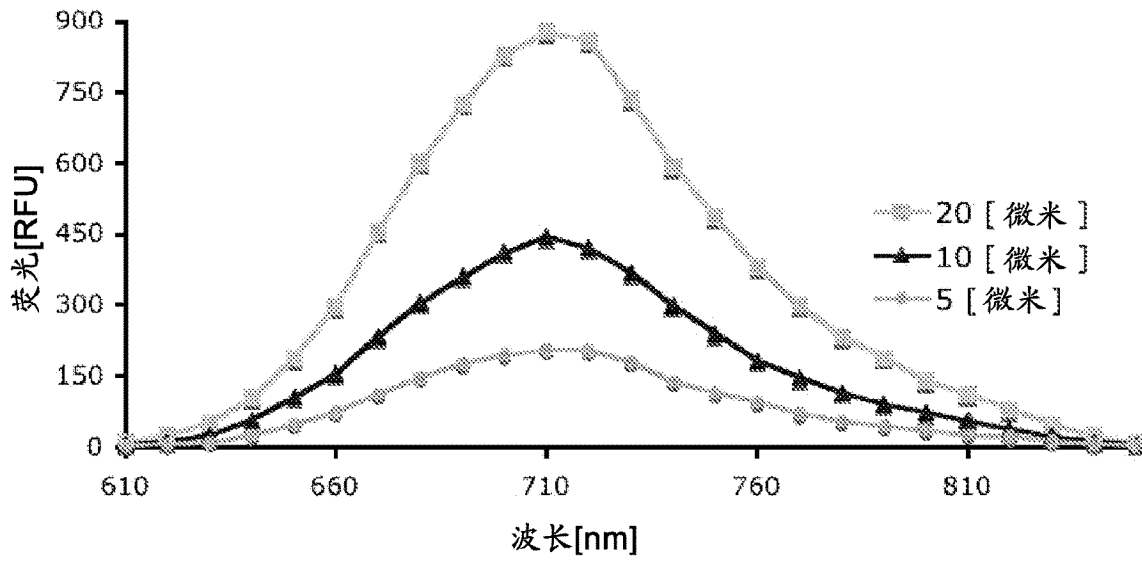


图8B

QCy7

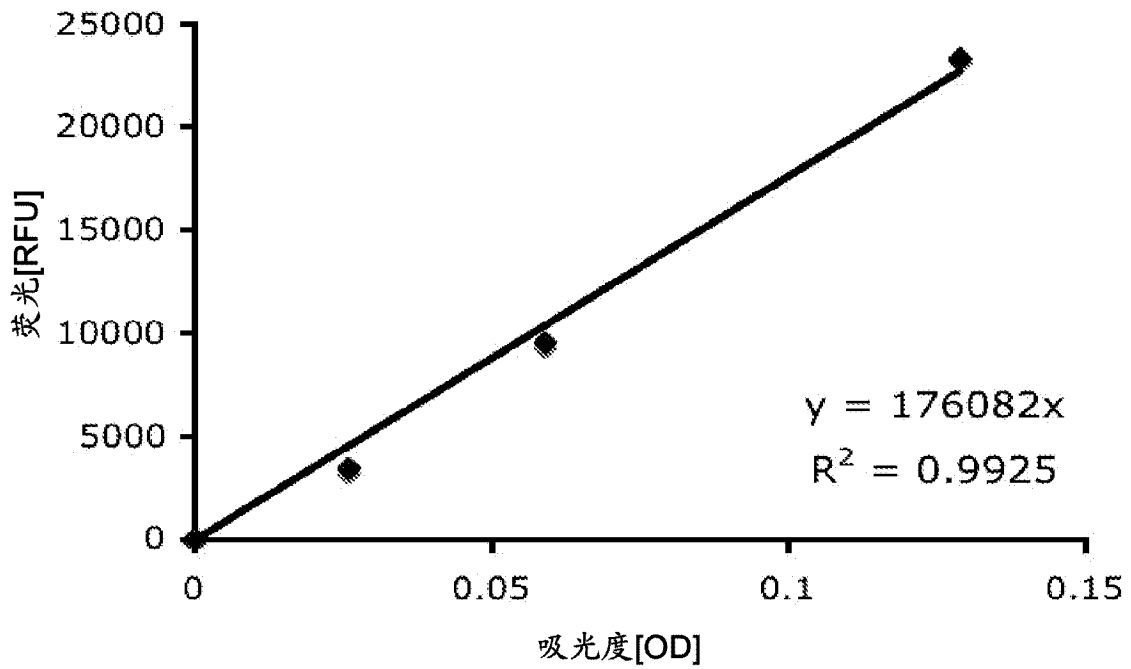


图9A

磺基-QCy7

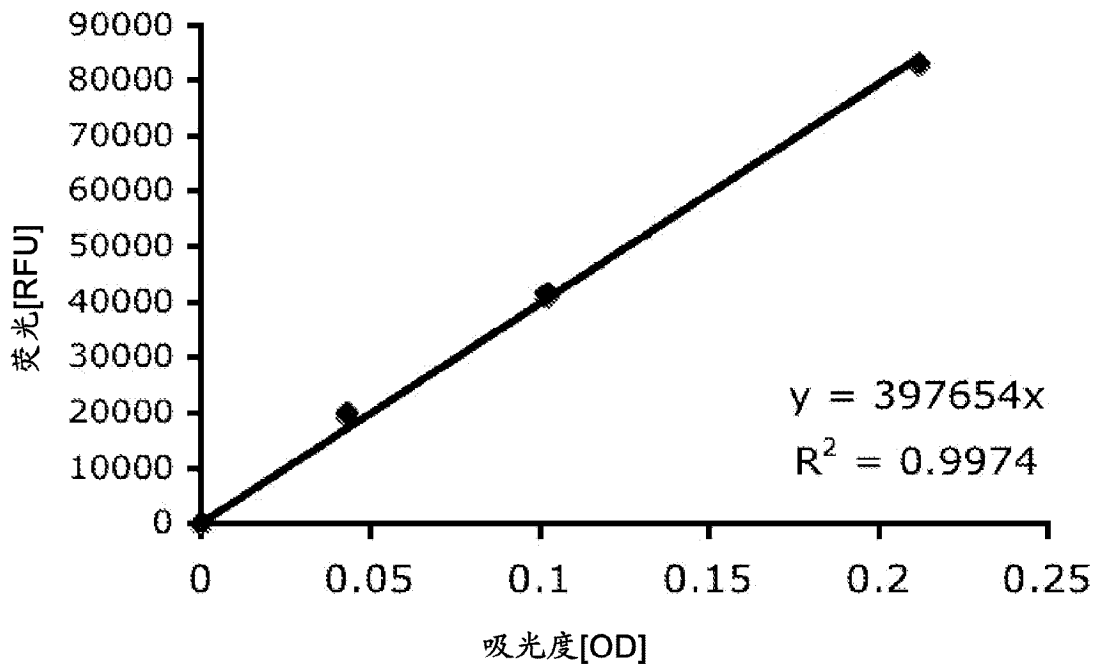


图9B

磺基-QCy7

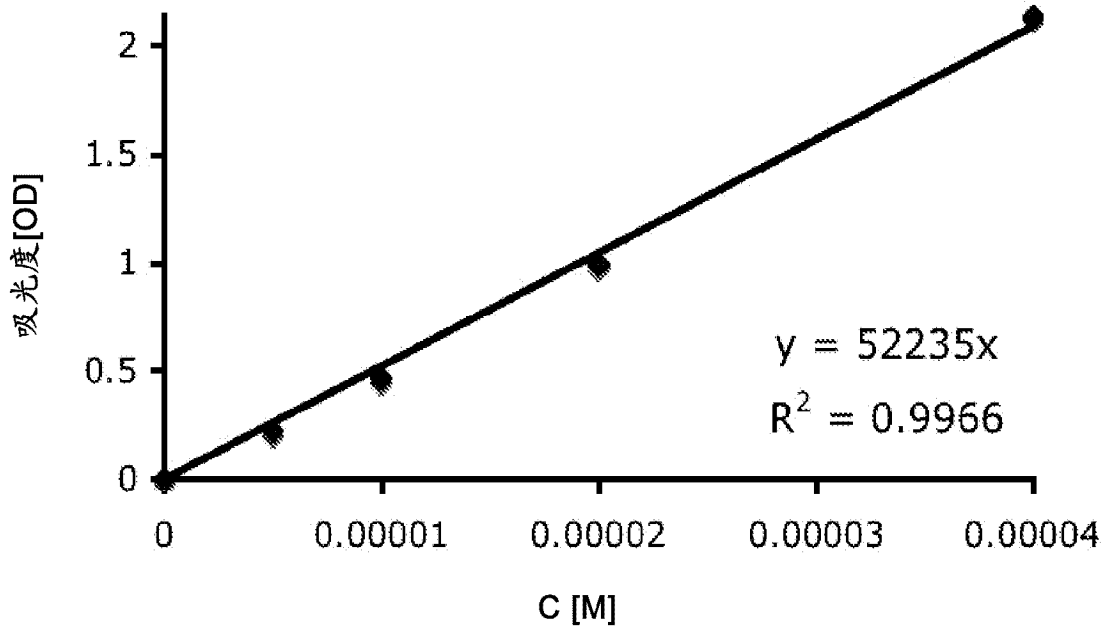


图10

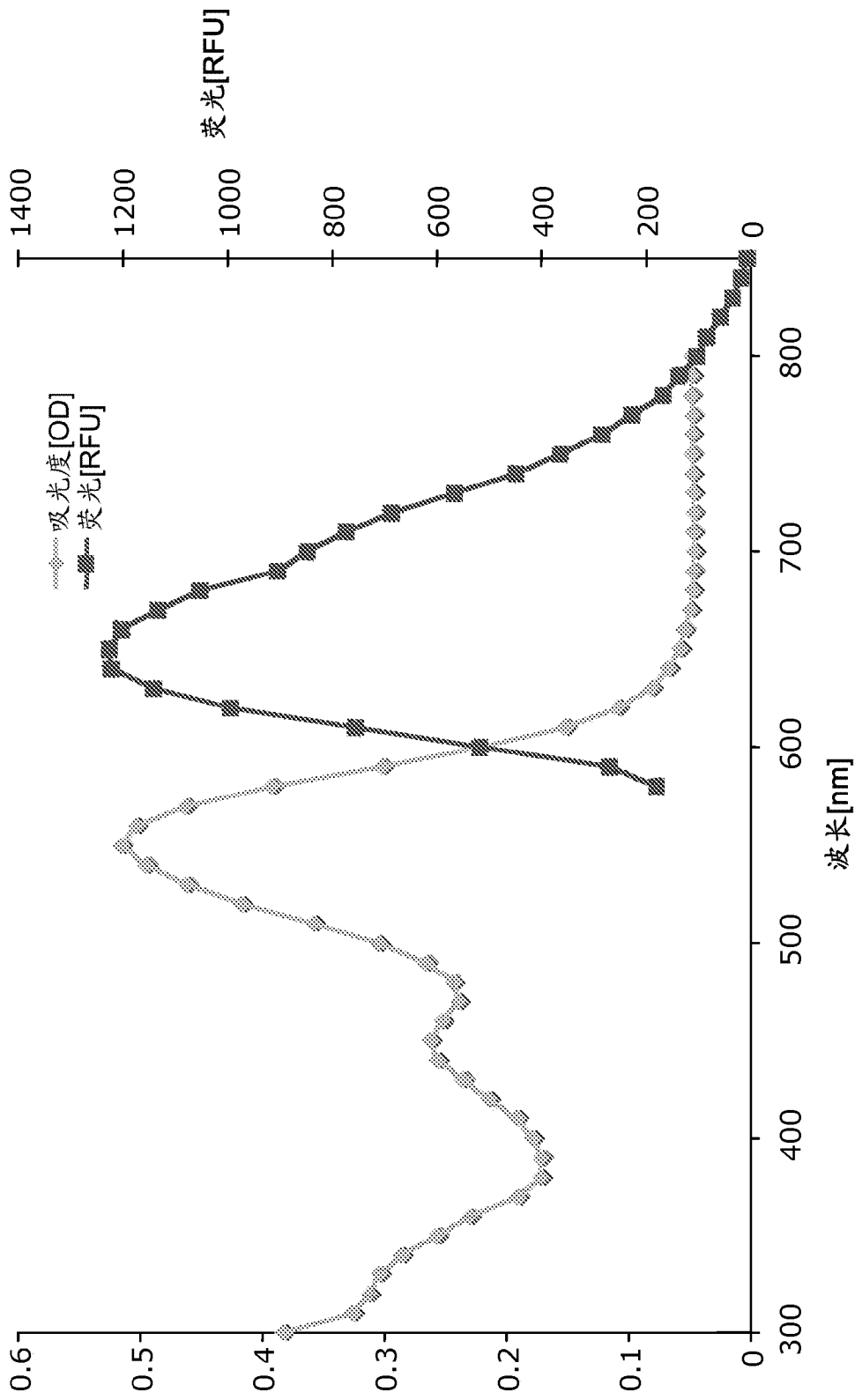


图11

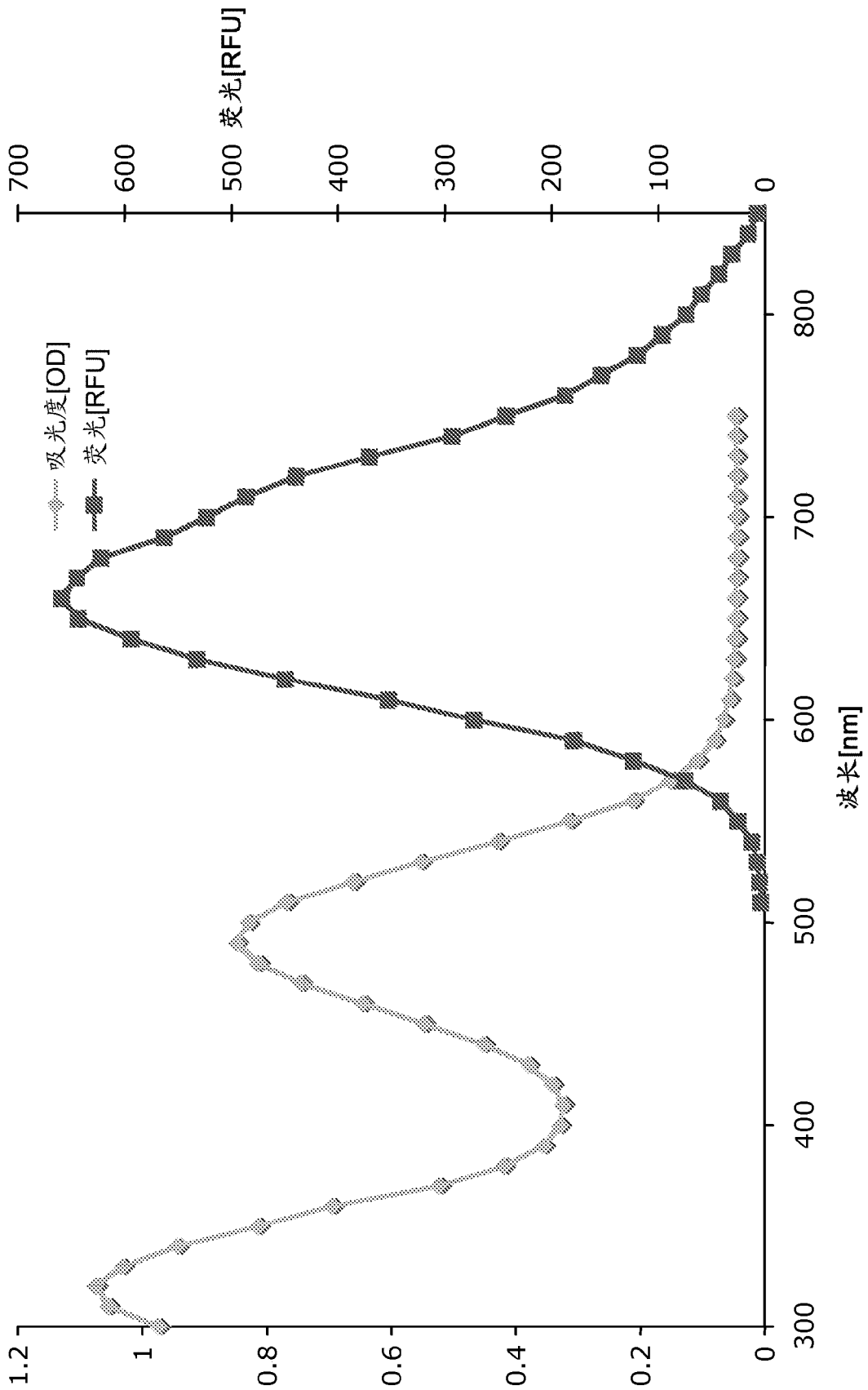


图12

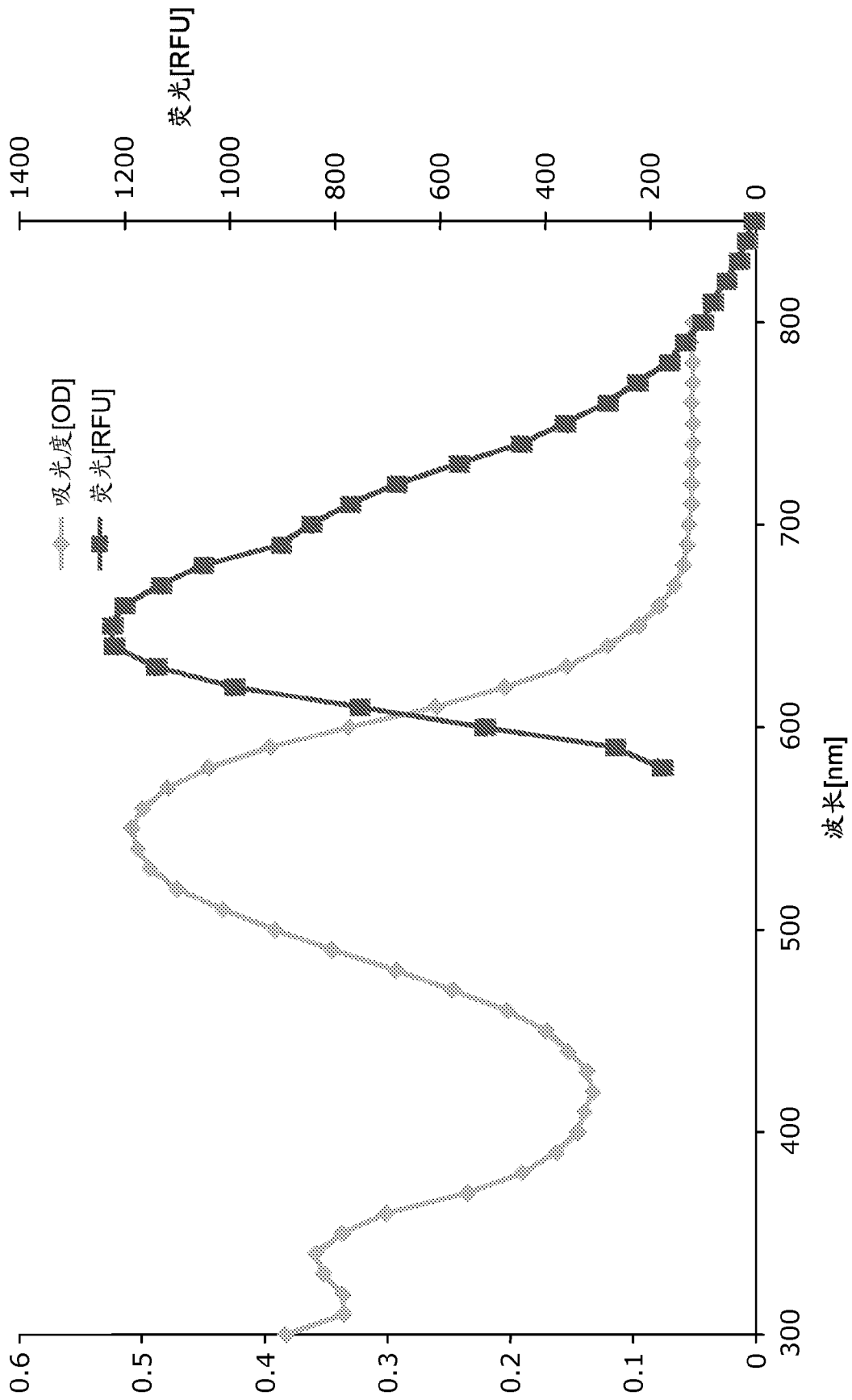


图13

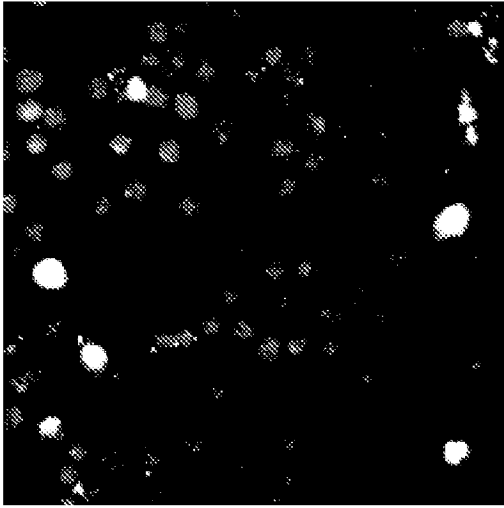


图14A

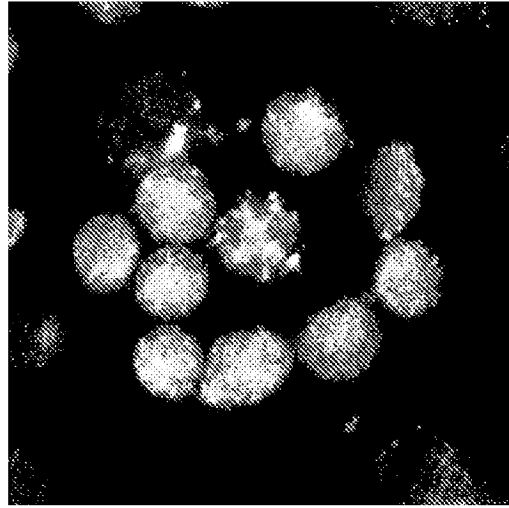


图14B

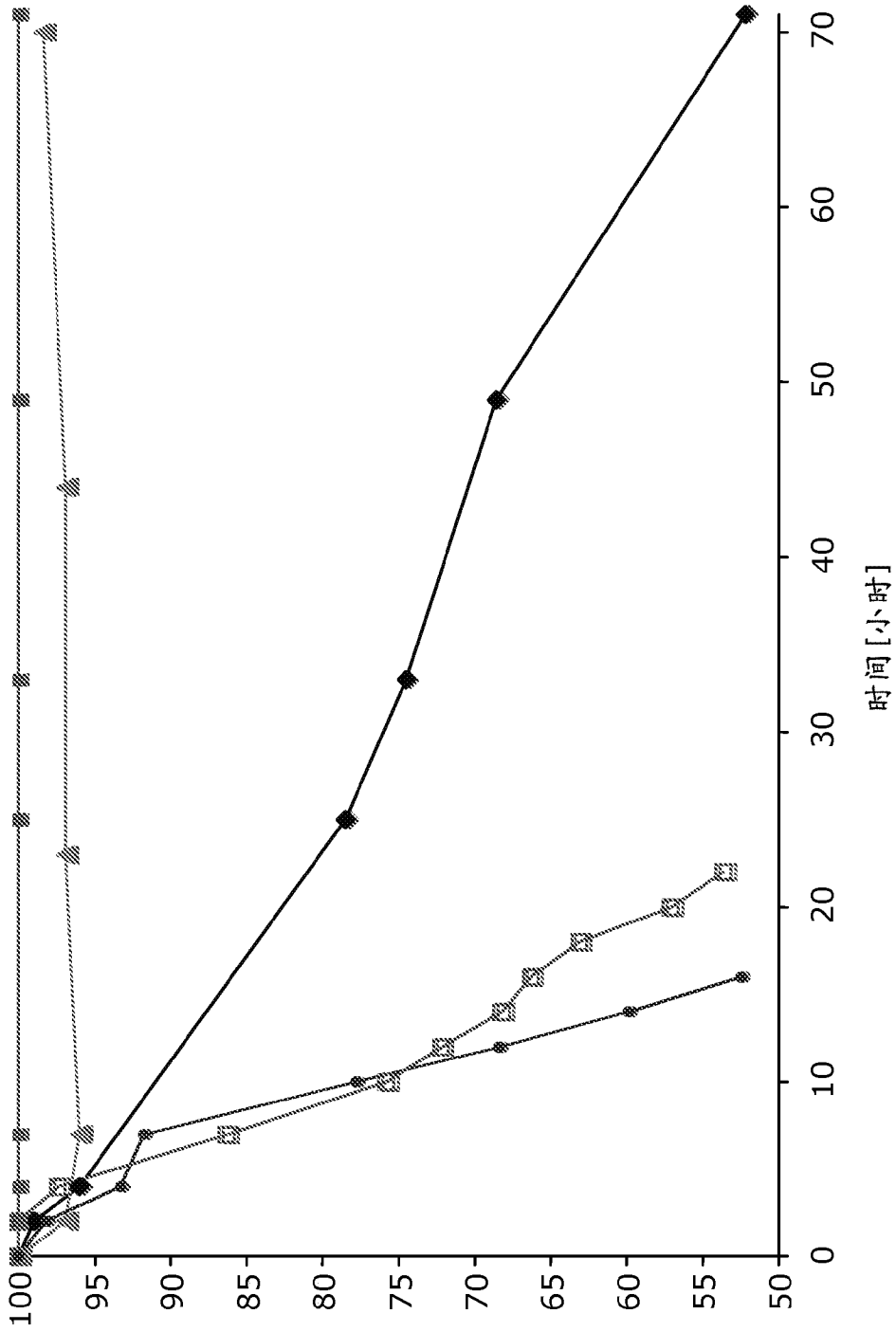


图15

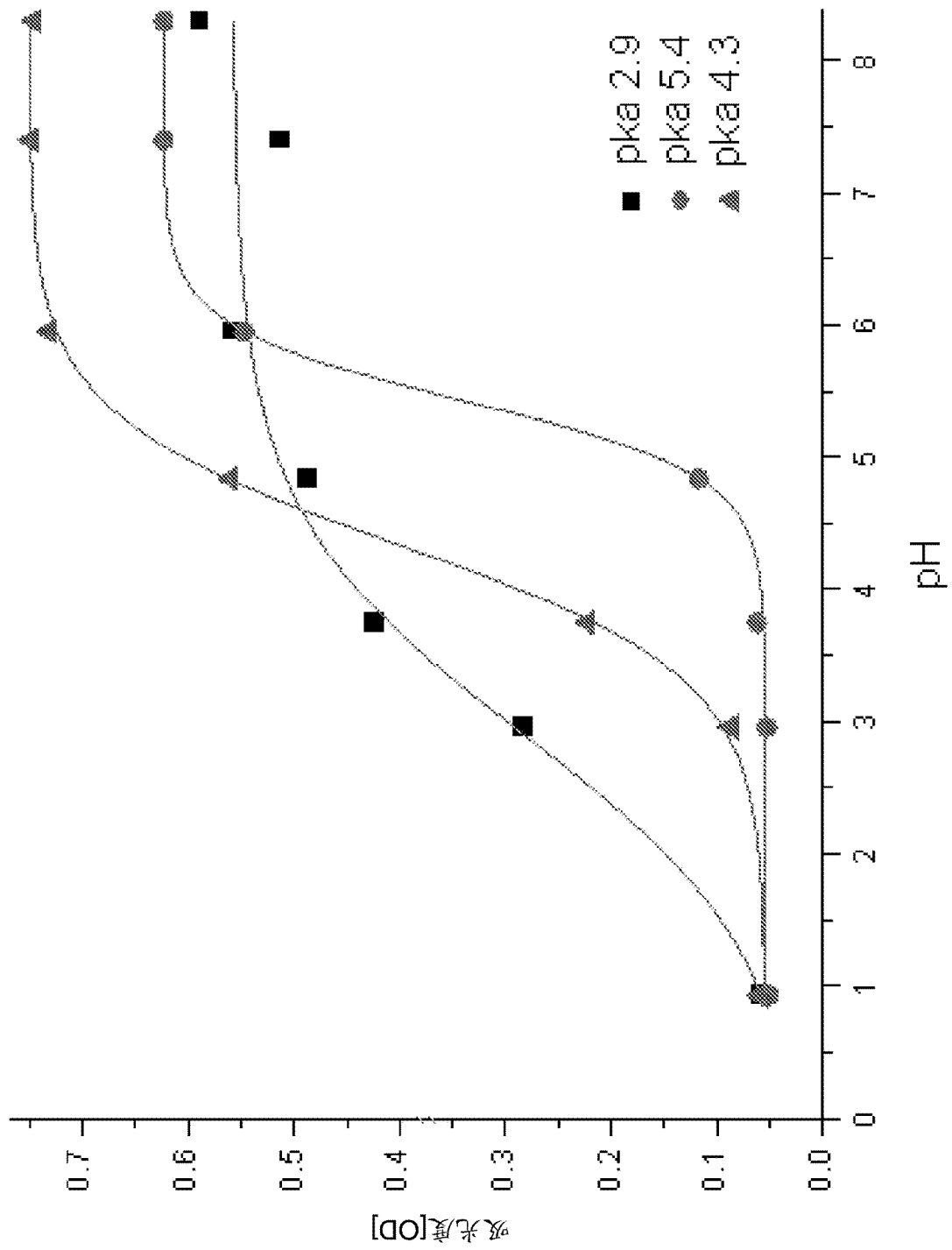


图16

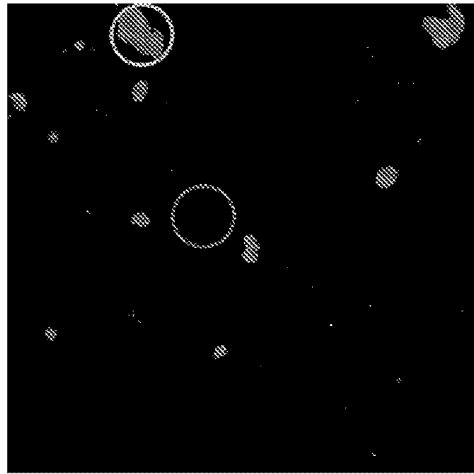


图17A

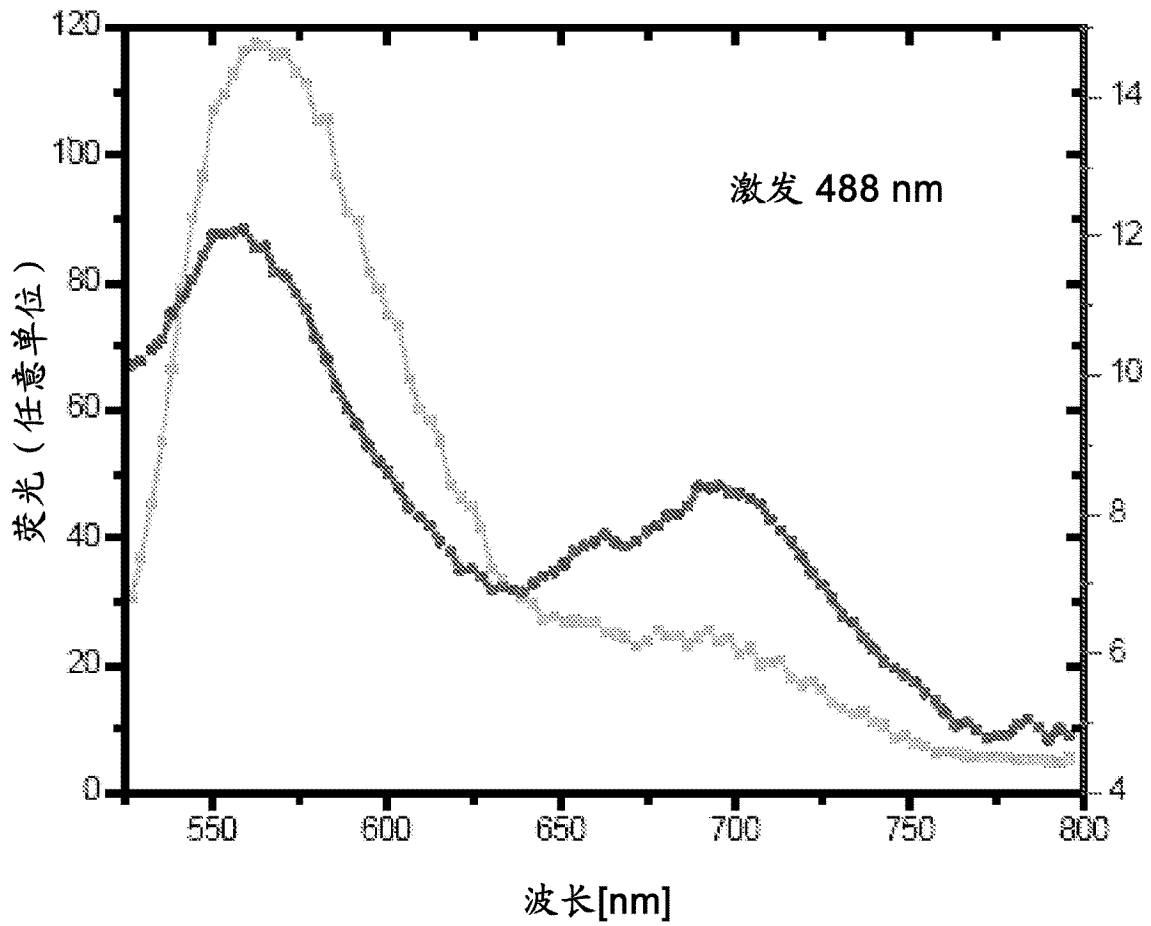


图17B

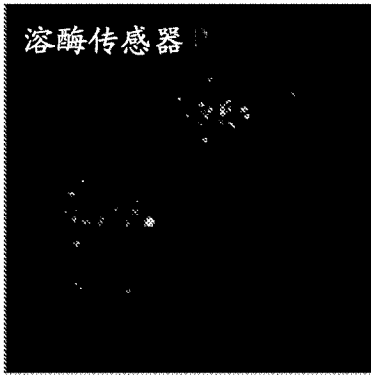


图18A

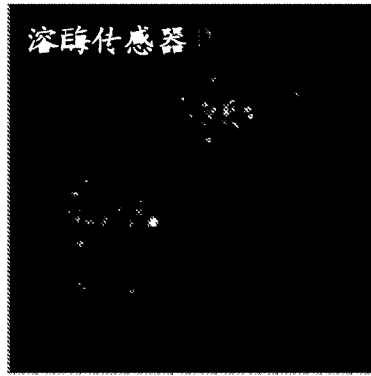


图18B



图18C

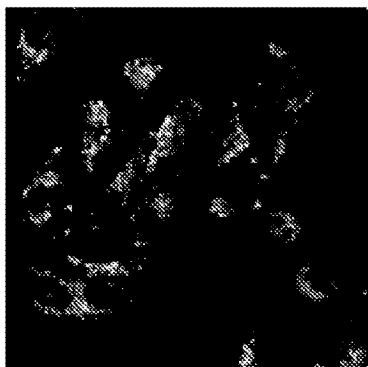


图18D

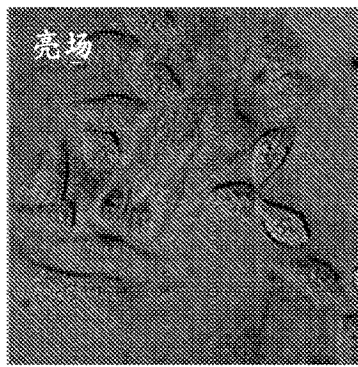


图18E

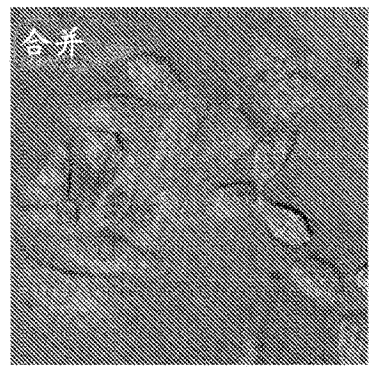


图18F

探针4

磺基-QCy7

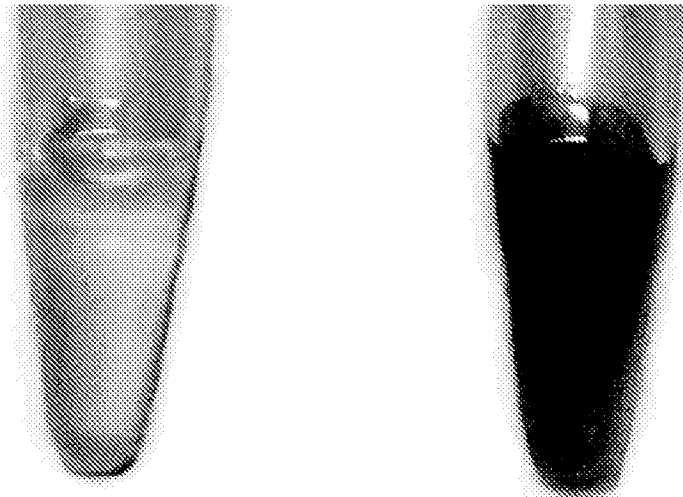


图19A



图19B

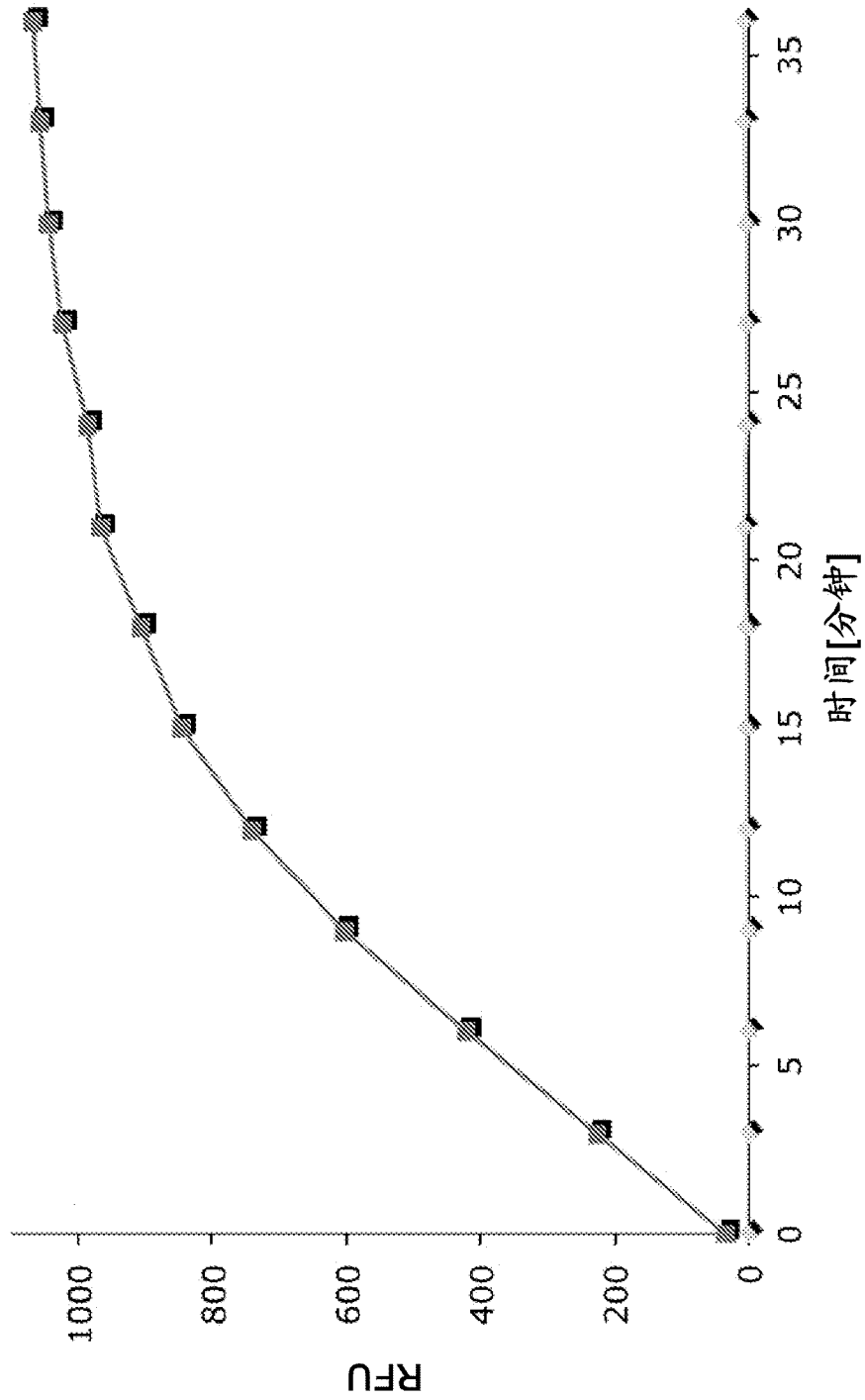


图20A

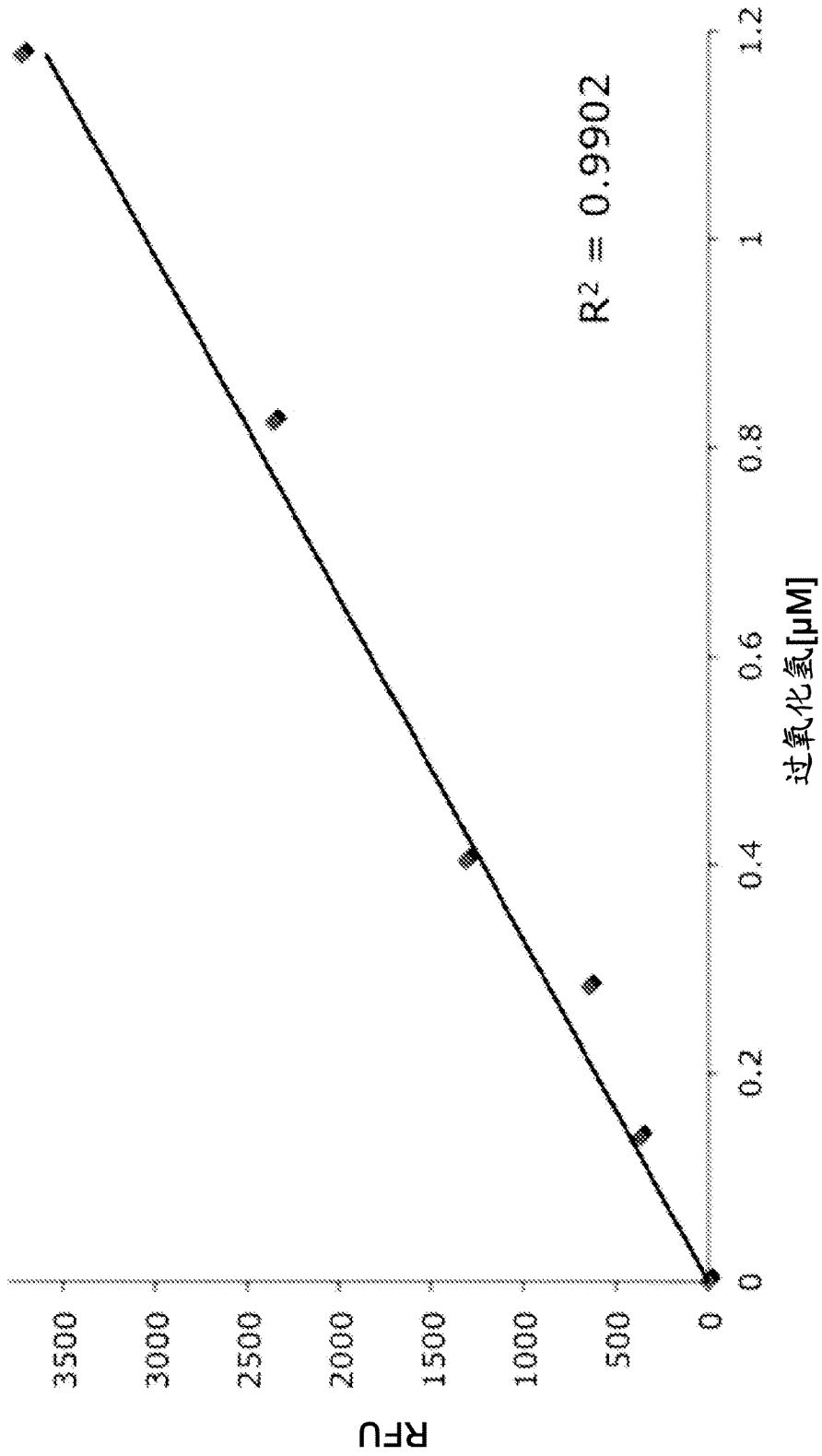
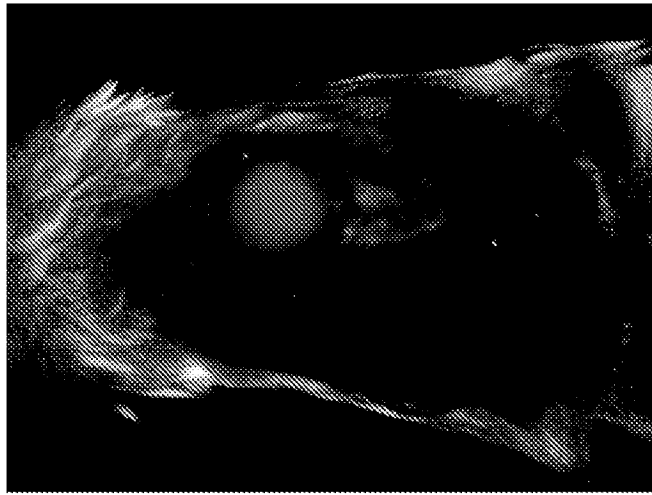
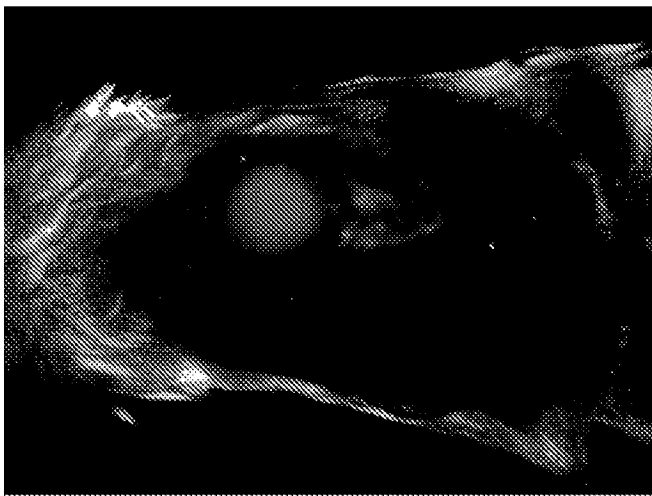


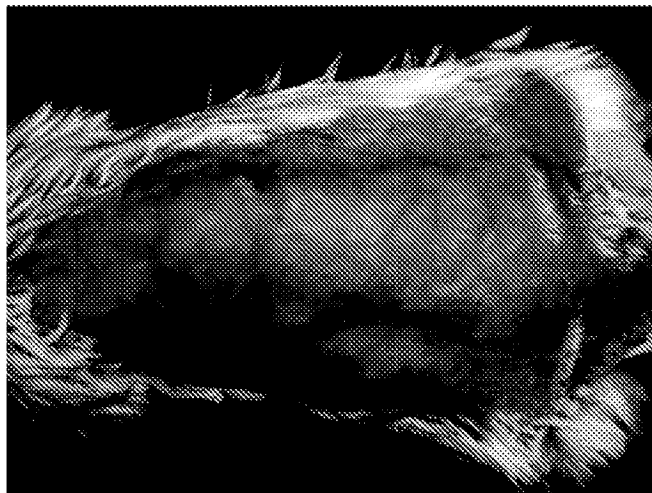
图20B



探针4 (1 mM) +
H₂O₂ (1 μm)



探针4 (1 mM)



对照
(介质)

图21

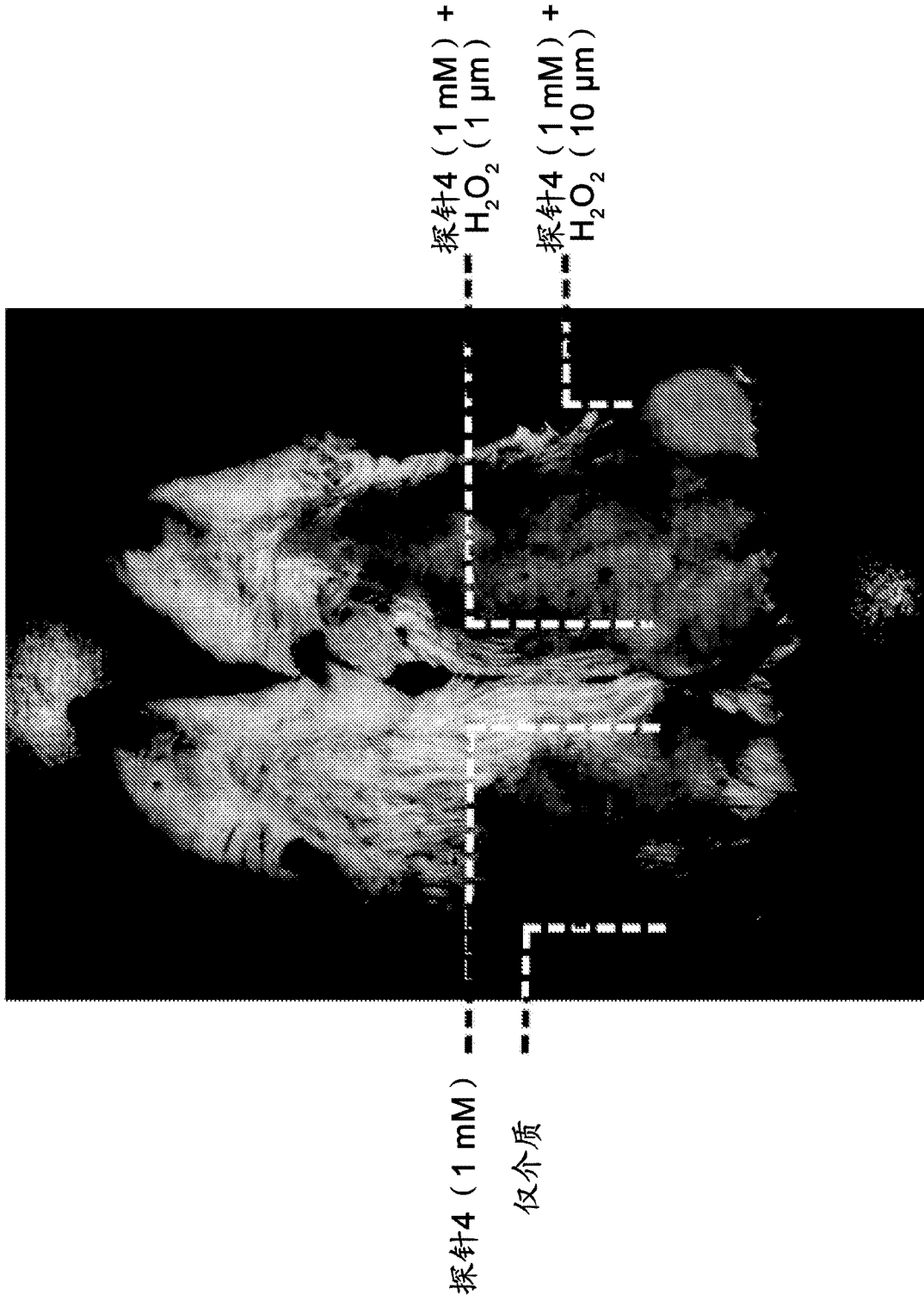


图22

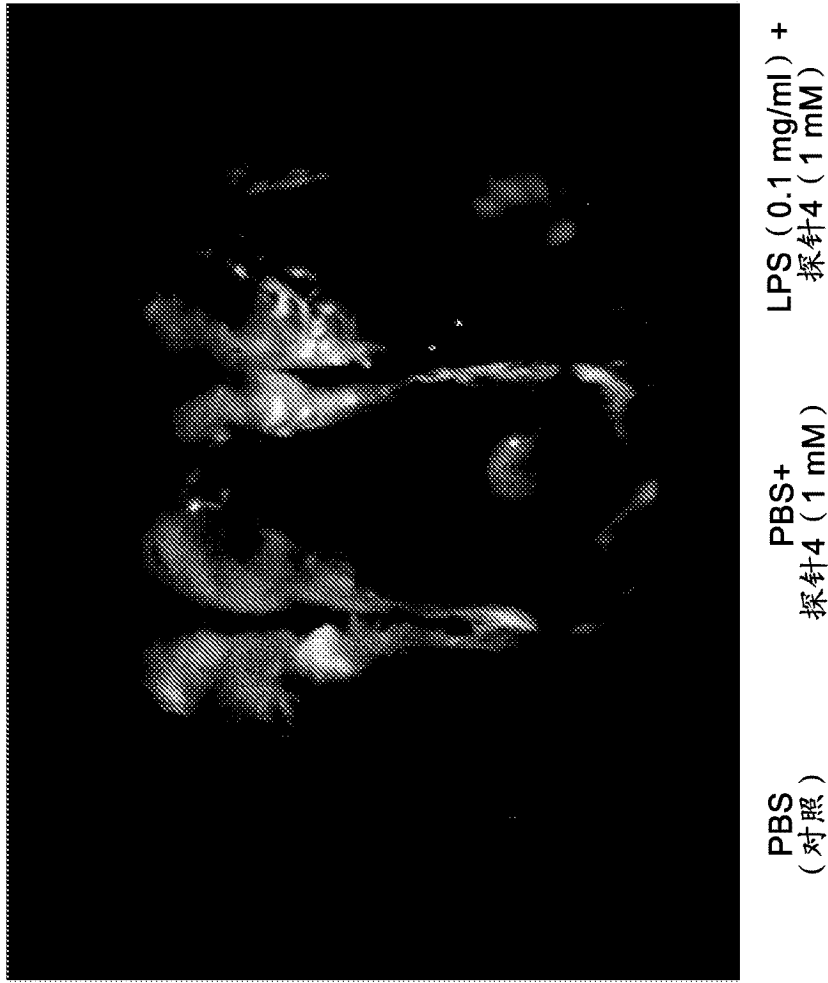


图23A

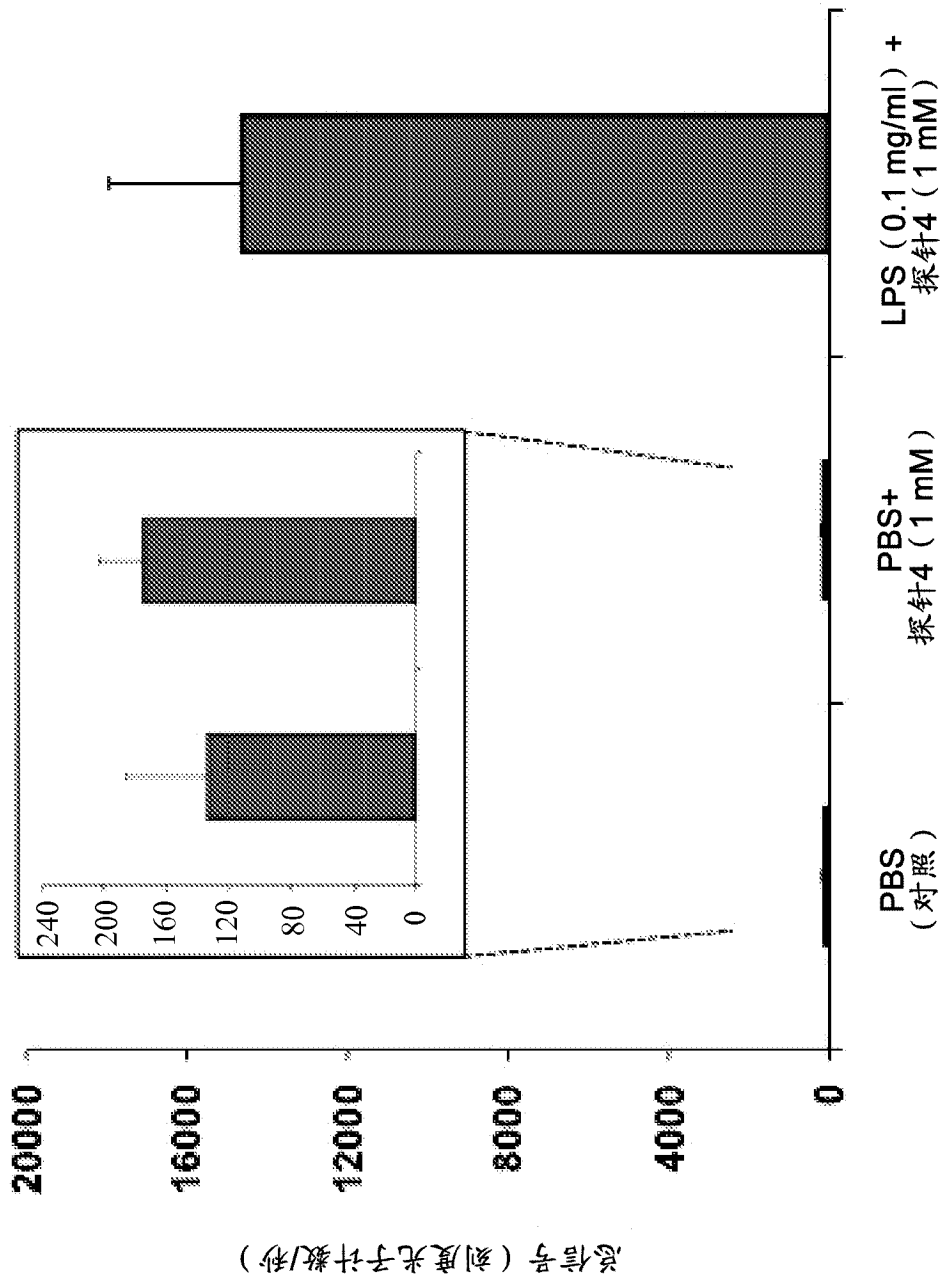


图23B

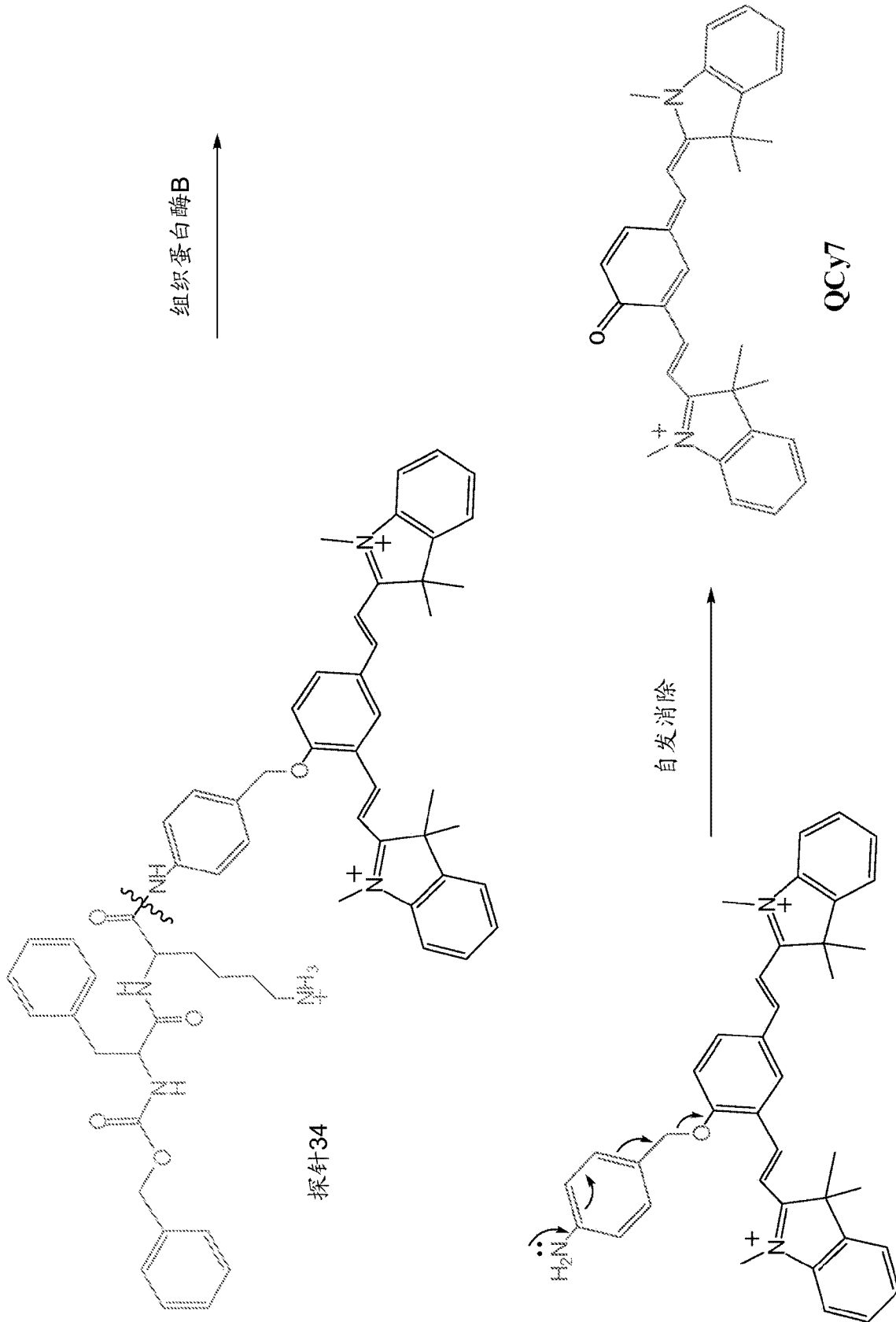
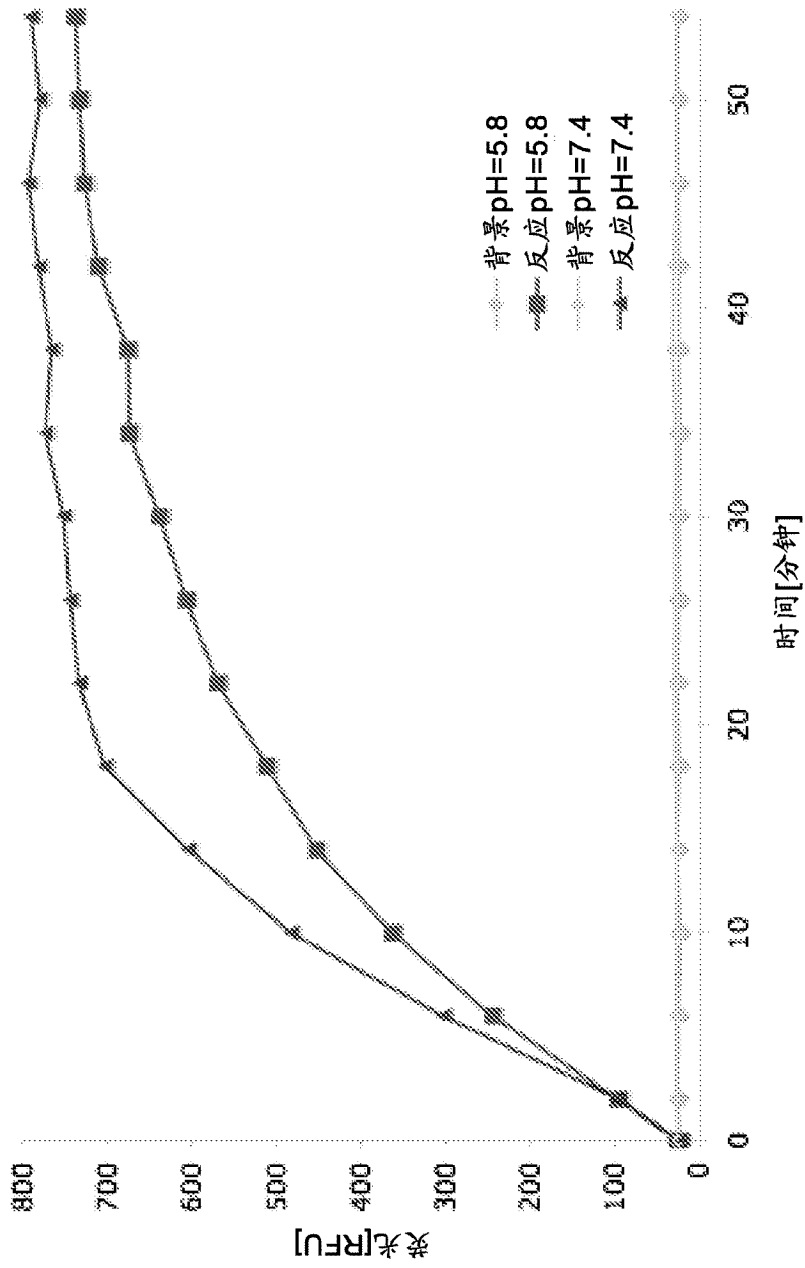


图24A



$\lambda_{ex}=570\text{ nm}, \lambda_{em}=715\text{ nm}$

图24B

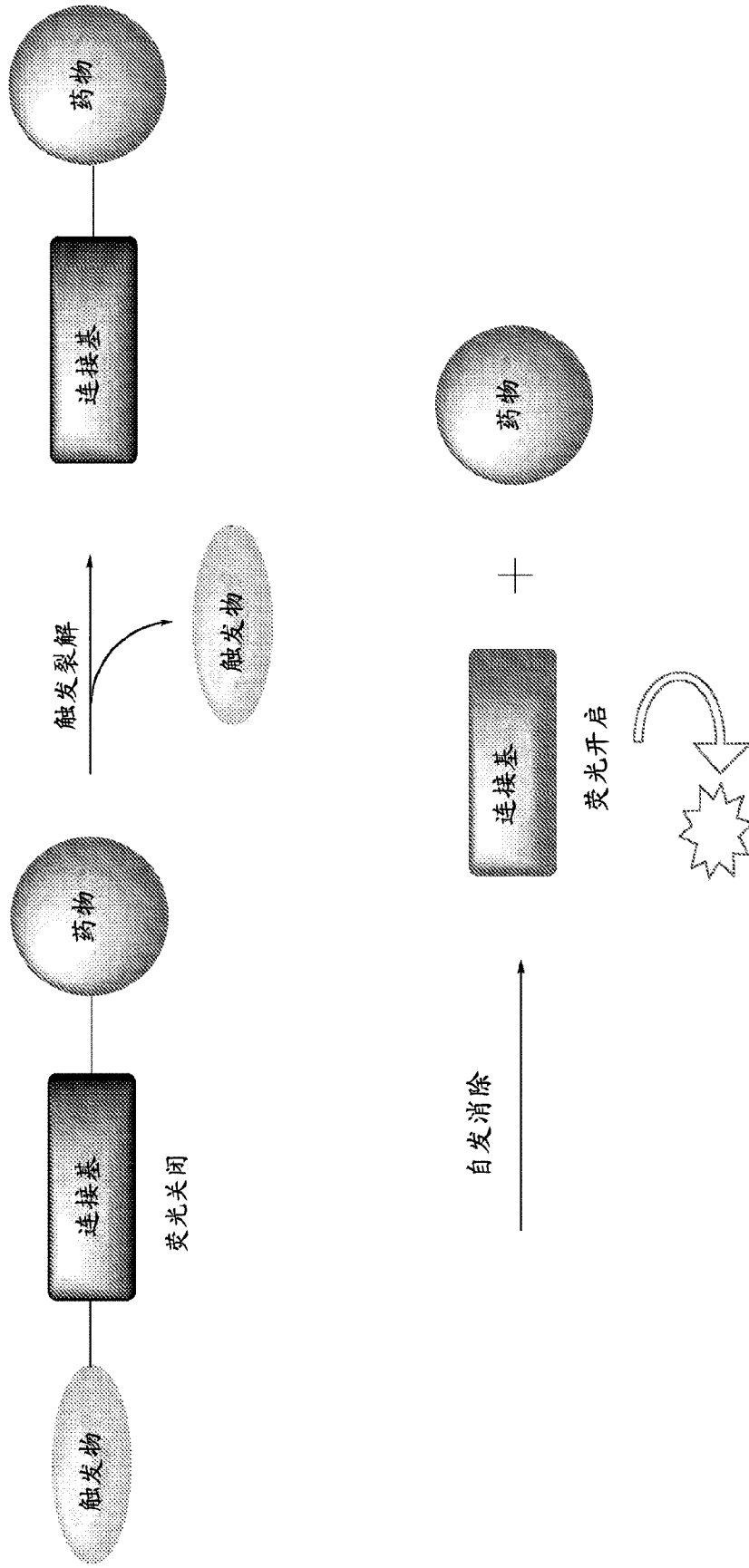


图25

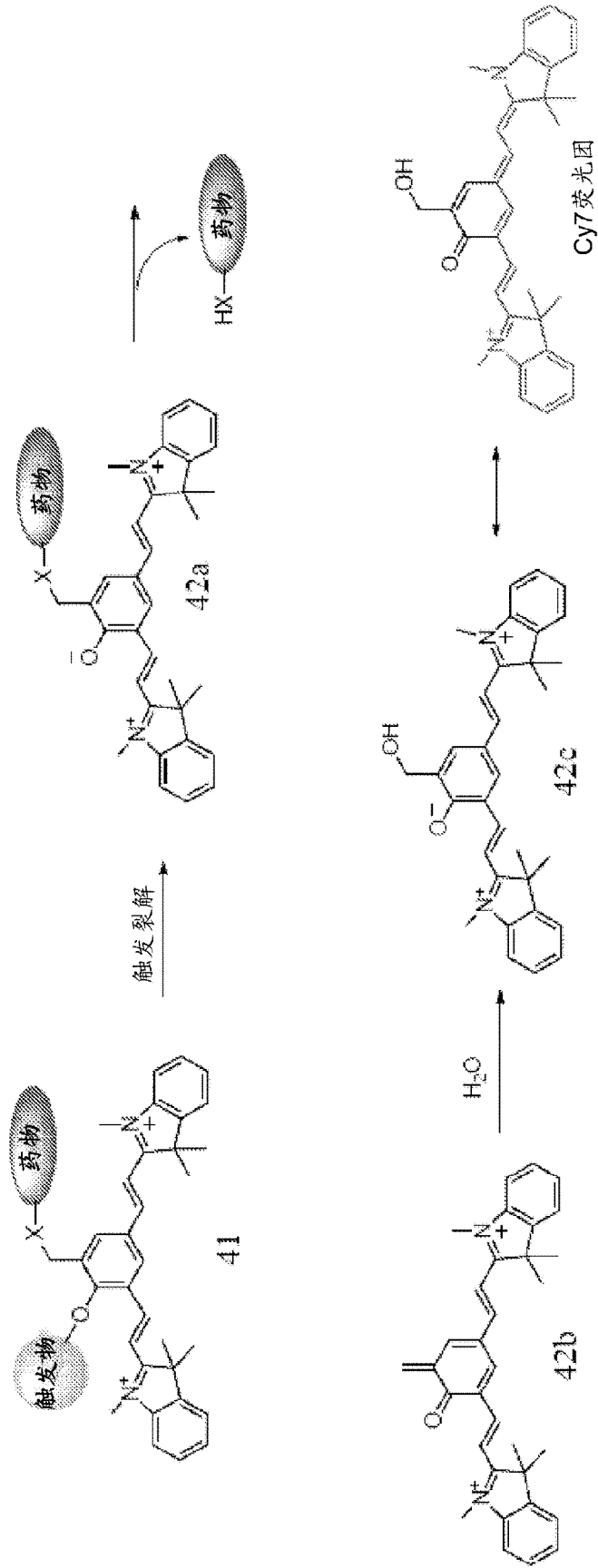


图26

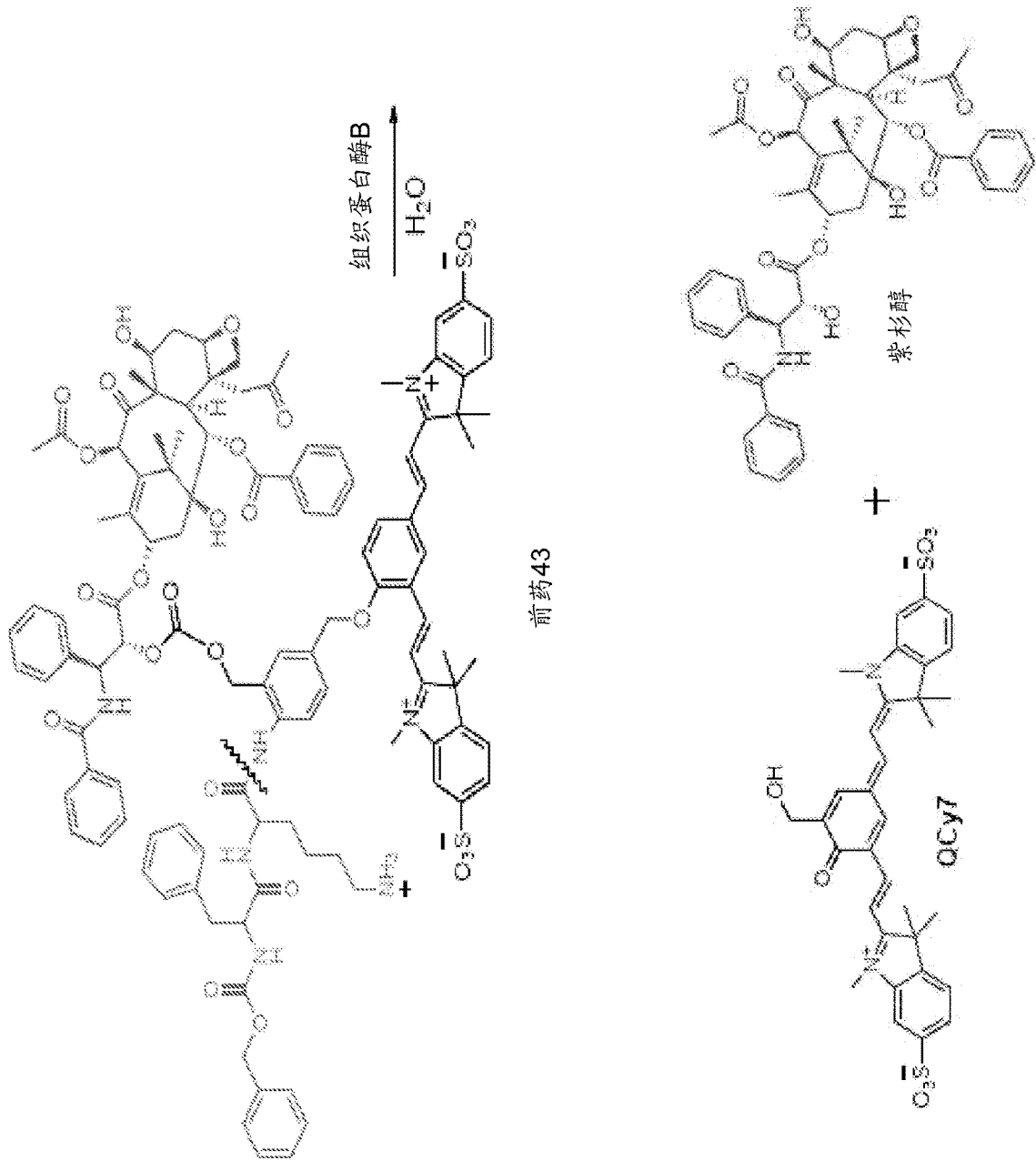


图27

专利名称(译)	可活化的发荧光的化合物及其作为近红外探针的用途		
公开(公告)号	CN103597039B	公开(公告)日	2017-05-03
申请号	CN201280023777.9	申请日	2012-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	特拉维夫大学拉莫特有限公司		
申请(专利权)人(译)	雷蒙特亚特特拉维夫大学有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	雷蒙特亚特特拉维夫大学有限公司		
[标]发明人	D萨巴特 R萨奇 法伊纳罗		
发明人	D·萨巴特 R·萨奇-法伊纳罗		
IPC分类号	C07D209/02 C07D213/02 C09B23/00 C09B23/08 C09B23/12 G01N33/533 G01N33/58 A61K49/00		
CPC分类号	C07D401/14 A61K47/558 A61K49/0021 A61K49/0032 A61K49/0052 A61K49/0056 C07D209/08 C07D209/12 C07D213/30 C07D213/71 C07D213/76 C07D213/85 C09B23/0066 C09B23/086 C09B23/12 G01N33/52 G01N33/582		
代理人(译)	高瑜 郑霞		
审查员(译)	金英		
优先权	61/452684 2011-03-15 US 61/452688 2011-03-15 US 61/556335 2011-11-07 US		
其他公开文献	CN103597039A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了设计成使得在化学事件后产生能够发射NIR光的化合物的新颖的发荧光的化合物。该化合物包含两个或更多个含受体的部分和可裂解的含供体的部分，它们是完全的 π -电子共轭且是使得没有 π -电子离域。还公开了在发荧光的化合物遭遇化学事件(例如，去质子化)时产生的荧光化合物。还公开了发荧光的化合物作为具有开启式机构的NIR探针来监测各种分析物的存在和/或水平的用途。

