



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105339436 A

(43) 申请公布日 2016.02.17

(21) 申请号 201480016214.6 *A61K 51/00*(2006.01)
(22) 申请日 2014.03.14 *C09B 23/08*(2006.01)
(30) 优先权数据 *G01N 21/47*(2006.01)
61/798,562 2013.03.15 US *G01N 33/52*(2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 *G01N 33/533*(2006.01)
2015.09.15 *G01N 33/58*(2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/029224 2014.03.14
(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/144702 EN 2014.09.18
(71) 申请人 文森医学公司
地址 美国马塞诸塞州
(72) 发明人 纳拉锡姆哈查理·纳拉亚南
(74) 专利代理机构 北京泛诚知识产权代理有限公司 11298
代理人 杨本良 文琦
(51) Int. Cl.
C09B 23/01(2006.01)

权利要求书13页 说明书55页 附图1页

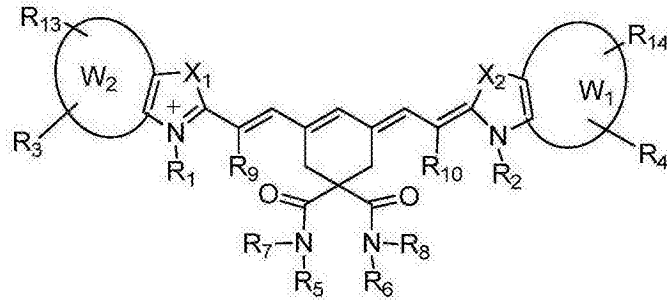
(54) 发明名称

4,4-二取代环己基桥连七甲川花菁染料及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一族包含荧光花菁染料的化合物。所述化合物是近红外吸收的七甲川花菁染料，含有作为聚甲炔发色团的一部分的4,4-二取代环己基环。所述化合物一般为亲水性，并且可以化学连接至生物分子，诸如蛋白质、核酸和治疗性小分子。所述化合物可以用于在各种医疗、生物和诊断应用中成像。

1. 一种荧光化合物, 该荧光化合物由式 I-A 或其盐表示:



(I-A)

其中:

X_1 和 X_2 各自独立地是 O、S、Se 或 $C(C_{1-4} \text{烷基})_2$;

W_1 和 W_2 是苯环、萘环或吡啶环;

R_1 和 R_2 独立地是氢或可选择地被一个或两个取代基取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基, 所述取代基独立地选自卤素、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$ 和 $-OH$ 所组成的组;

R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地是 H 或 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$;

R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是 H、 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_2N(R_{12})-$ 亚烷基 $-X_3$ 、卤素或 $-NO_2$;

X_3 在每次出现时独立地表示 H、卤素、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、N-羟基琥珀酰亚胺基酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基酯、 $-OH$ 、 $-SH$ 、马来酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、 $-NHC(O)-(CH_2)_m-$ (卤素)、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $CON(H)R_{12}$ 、炔基、 $-N_3$ 、聚乙二醇、可选择地取代的芳基或者可选择地取代的杂环;

R_9 和 R_{10} 是氢、卤素或烷基, 或者 R_1 和 R_9 或 R_2 和 R_{10} 通过相连的原子合并在一起而形成五元、六元或七元环;

R_{12} 在每次出现时独立地表示氢或烷基;

m 在每次出现时独立地表示 0、1、2、3 或 4; 以及

n 在每次出现时独立地表示 1-10。

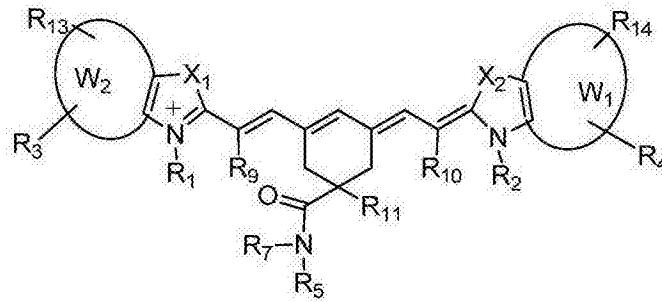
2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 R_5 和 R_6 各自独立地是 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$ 。

3. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 R_5 和 R_6 各自独立地是 $-C_2-C_8$ 亚烷基 $-X_3$ 。

4. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中 R_5 和 R_6 各自独立地是被 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^-$ 或 $-COOH$ 取代的 $-C_2-C_8$ 亚烷基。

5. 根据权利要求 1 至 4 任意一项所述的化合物, 其中 R_7 和 R_8 是氢。

6. 一种荧光化合物, 该荧光化合物由式 I-B 或其盐表示:



(I-B)

其中：

X_1 和 X_2 各自独立地是O、S、Se或C(C₁₋₄烷基)₂；

W_1 和 W_2 是苯环、萘环或吡啶环；

R_1 和 R_2 独立地是氢或可选择地被一个或两个取代基取代的-C₁-C₁₀烷基，所述取代基独立地选自自由卤素、-SO₃H、-SO₃、-COOH、-CO₂和-OH所组成的组；

R_5 和 R_7 各自独立地是氢或-C₁-C₂₂亚烷基-X₃；

R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是氢、-C₁-C₂₂亚烷基-X₃、-SO₃H、-SO₃、-SO₂N(R₁₂)-亚烷基-X₃、卤素或-NO₂；

X_3 在每次出现时独立地表示H、卤素、-CH₃、-SO₃H、-SO₃、-COOH、-CO₂、-NCS、-NCO、N-羟基琥珀酰亚胺基酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基酯、-OH、-SH、马来酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、-NHCO-(CH₂)_m-(卤素)、-CONHNH₂、-CN、-NH₂、-NO₂、-CON(H)R₁₂、炔基、-N₃、聚乙二醇、可选择地取代的芳基或者可选择地取代的杂环；

R_9 和 R_{10} 是H、卤素或烷基，或者 R_1 和 R_9 或 R_2 和 R_{10} 通过相连的原子合并在一起而形成五元、六元或七元环；

R_{11} 是-COOH、-CN、卤素、-NO₂、-C(O)-卤代烷基、卤代烷基、-COOR₁₅、-CON(H)R₁₅、或者-CO(CH₂)_nR₁₅；

R_{12} 在每次出现时独立地表示氢或烷基；

R_{15} 是H、-COOH、-SO₃H、-NH₂、-SH、烷基或者可选择地被 X_3 和/或聚乙二醇取代的芳基；

m 在每次出现时独立地表示0、1、2、3或4；以及

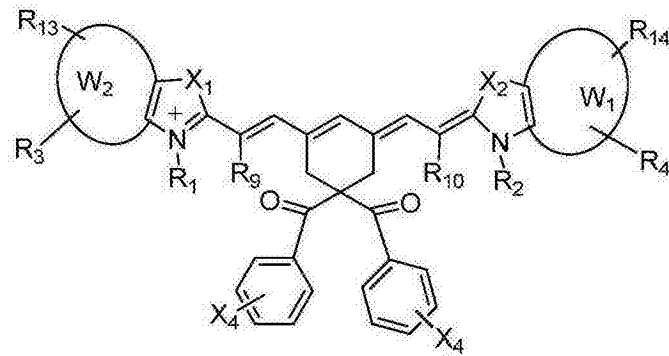
n 在每次出现时独立地表示1-10。

7. 根据权利要求6所述的化合物，其中 R_5 是-C₁-C₂₂亚烷基-X₃，并且 R_7 是氢。

8. 根据权利要求6所述的化合物，其中 R_5 是-C₂-C₈亚烷基-X₃，并且 R_7 是氢。

9. 根据权利要求6所述的化合物，其中 R_5 是由-SO₃H、-SO₃或-COOH取代的-C₂-C₈亚烷基，并且 R_7 是氢。

10. 一种荧光化合物，该荧光化合物由式I-C或其盐表示：



(I-C)

其中：

X_1 和 X_2 各自独立地是 O、S、Se 或 $C(C_{1-4}烷基)_2$ ；

R_1 和 R_2 独立地是氢或可选择地被一个或两个取代基取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基，所述取代基独立地选自自由卤素、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 和 $-OH$ 所组成的组；

R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是氢、 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基、 $-X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-SO_2N(R_{12})$ -亚烷基、 $-X_3$ 、卤素或 $-NO_2$ ；

X_3 在每次出现时独立地表示 H、卤素、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、N-羟基琥珀酰亚胺基酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基酯、 $-OH$ 、 $-SH$ 、马来酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、 $-NHCO-(CH_2)_m-(卤素)$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{12}$ 、炔基、 $-N_3$ 、聚乙二醇、可选择地取代的芳基或者可选择地取代的杂环；

X_4 在每次出现时独立地表示氢、卤素、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 或者 $-CO_2$ ；

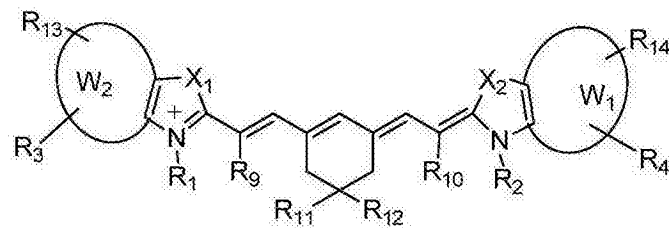
R_9 和 R_{10} 是 H、卤素或烷基，或者 R_1 和 R_9 或 R_2 和 R_{10} 通过相连的原子合并在一起而形成五元、六元或七元环；

R_{12} 在每次出现时独立地表示氢或烷基；

m 在每次出现时独立地表示 0、1、2、3 或 4；以及

n 在每次出现时独立地表示 1-10。

11. 一种荧光化合物，该荧光化合物由式 I-D 或其盐表示：



(I-D)

其中：

X_1 和 X_2 各自独立地是 O、S、Se 或 $C(C_{1-4}烷基)_2$ ；

W_1 和 W_2 是苯环、萘环或吡啶环；

R_1 和 R_2 独立地是氢或可选择地被一个或两个取代基取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基，所述取代基独立地选自自由卤素、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 和 $-OH$ 所组成的组；

R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是 H、 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基、 $-X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $SO_2N(R_{12})$ -亚烷基、 $-X_3$ 、卤素或 $-NO_2$ ；

X_3 在每次出现时独立地表示 H、卤素、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CO}_2$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{NCO}$ 、N- 羟基琥珀酰亚胺基酯、N- 羟基磺基琥珀酰亚胺基酯、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、马来酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、 $-\text{NHCO}-(\text{CH}_2)_m-(\text{卤素})$ 、 $-\text{CONHNH}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CON}(\text{H})\text{R}_{13}$ 、炔基、 $-\text{N}_3$ 、聚乙二醇、可选择地取代的芳基或者可选择地取代的杂环；

R_9 和 R_{10} 是氢、卤素或烷基，或者 R_1 和 R_9 或 R_2 和 R_{10} 通过相连的原子合并在一起而形成五元、六元或七元环；

R_{11} 和 R_{12} 各自独立地是烷基、卤代烷基、芳基、芳烷基、氰基、卤素、硝基、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{卤代烷基}$ 、 $-\text{C}(\text{O})-\text{芳基}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}_{15}$ 、 $-\text{CON}(\text{H})\text{R}_{15}$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(\text{O})\text{OR}_{15}$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{CONHR}_{15}$ 、 $-\text{CO}(\text{CH}_2)_n\text{R}_{15}$ 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ 或者 $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3$ ，

R_{13} 在每次出现时独立地表示氢或烷基；

R_{15} 在每次出现时独立地表示 H、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、烷基、聚乙二醇、或者可选择地被 X_3 和 / 或聚乙二醇取代的芳基；

m 在每次出现时独立地表示 0、1、2、3 或 4；以及

n 在每次出现时独立地表示 1-10。

12. 根据权利要求 1 至 11 任意一项所述的化合物，其中 X_1 和 X_2 是 $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ 。

13. 根据权利要求 1 至 12 任意一项所述的化合物，其中 W_1 和 W_2 是苯环。

14. 根据权利要求 1 至 12 任意一项所述的化合物，其中 W_1 和 W_2 是萘环。

15. 根据权利要求 1 至 14 任意一项所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是可选择地被 $-\text{SO}_3\text{H}$ 或 $-\text{SO}_3$ 取代的 $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ 烷基。

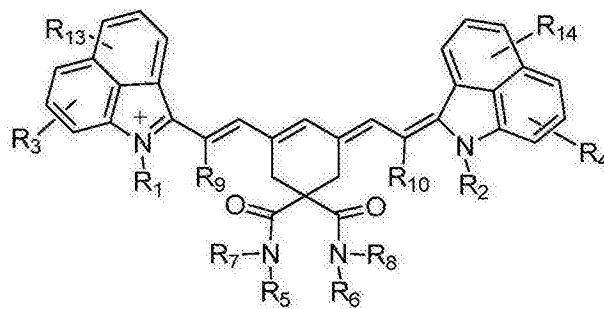
16. 根据权利要求 1 至 14 任意一项所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是 C_1-C_6 烷基。

17. 根据权利要求 1 至 16 任意一项所述的化合物，其中 R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是 H、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、或 $-\text{SO}_3$ 。

18. 根据权利要求 1 至 17 任意一项所述的化合物，其中 R_7 是氢。

19. 根据权利要求 1 至 18 任意一项所述的化合物，其中 R_9 和 R_{10} 是氢。

20. 一种荧光化合物，该荧光化合物由式 II 或其盐表示：



(II)

其中：

R_1 和 R_2 独立地是氢或可选择地被一个或两个取代基取代的 $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ 烷基，所述取代基独立地选自自由卤素、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CO}_2$ 和 $-\text{OH}$ 所组成的组；

R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地是 H 或 $-\text{C}_1-\text{C}_{22}$ 亚烷基 $-\text{X}_3$ ；

R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是 H、 $-\text{C}_1-\text{C}_{22}$ 亚烷基 $-\text{X}_3$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}_{12})-\text{亚烷基}-\text{X}_3$ 、卤素或 $-\text{NO}_2$ ；

X_3 在每次出现时独立地表示 H、卤素、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CO}_2$ 、 $-\text{NCS}$ 、 $-\text{NCO}$ 、N- 羟基琥珀酰亚胺基酯、N- 羟基磺基琥珀酰亚胺基酯、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、马来酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、 $-\text{NHCO}-(\text{CH}_2)_m-$ (卤素)、 $-\text{CONHNH}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CON}(\text{H})\text{R}_{12}$ 、炔基、 $-\text{N}_3$ 、聚乙二醇、可选择地取代的芳基或者可选择地取代的杂环；

R_9 和 R_{10} 是氢、卤素或烷基，或者 R_1 和 R_9 或 R_2 和 R_{10} 通过相连的原子合并在一起而形成五元、六元或七元环；

R_{12} 在每次出现时独立地表示氢或烷基；

m 在每次出现时独立地表示 0、1、2、3 或 4；以及

n 在每次出现时独立地表示 1-10。

21. 根据权利要求 20 所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是可选择地被 $-\text{SO}_3\text{H}$ 或 $-\text{SO}_3$ 取代的 $-\text{C}_1-\text{C}_{10}$ 烷基。

22. 根据权利要求 20 所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是可选择地被 $-\text{SO}_3\text{H}$ 或 $-\text{SO}_3$ 取代的 $-\text{C}_2-\text{C}_6$ 烷基。

23. 根据权利要求 20 所述的化合物，其中 R_1 和 R_2 独立地是 C_1-C_6 烷基。

24. 根据权利要求 20 至 23 任意一项所述的化合物，其中 R_5 和 R_6 各自独立地是 $-\text{C}_1-\text{C}_{22}$ 亚烷基 $-\text{X}_3$ 。

25. 根据权利要求 20 至 23 任意一项所述的化合物，其中 R_5 和 R_6 各自独立地是 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 亚烷基 $-\text{X}_3$ 。

26. 根据权利要求 20 至 23 任意一项所述的化合物，其中 R_5 和 R_6 各自独立地是被 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3$ 或 $-\text{COOH}$ 取代的 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 亚烷基。

27. 根据权利要求 20 至 26 任意一项所述的化合物，其中 R_7 和 R_8 是氢。

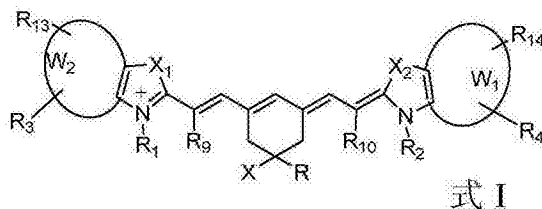
28. 根据权利要求 20 至 27 任意一项所述的化合物，其中 R_9 和 R_{10} 是氢。

29. 一种缀合化合物，该缀合化合物通过生物分子与权利要求 1 至 28 任意一项所述的化合物反应而形成。

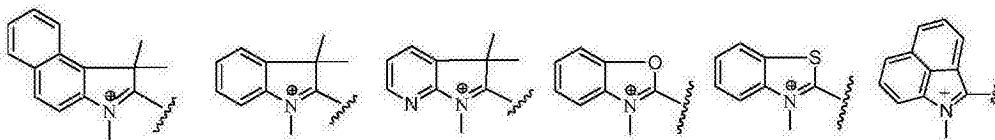
30. 一种缀合化合物，该缀合化合物是由 $-\text{L}-\text{BM}$ 定义的 1 个、2 个或 3 个基团进一步取代的权利要求 1 至 28 任意一项所述的化合物；其中 L 是键或连接物，并且 $-\text{BM}$ 是生物分子的自由基。

31. 一种药物组合物，该药物组合物包含权利要求 1 至 30 任意一项所述的化合物和药学上可接受的赋形剂。

32. 一种荧光化合物，该荧光化合物由下列结构式，式 I 表示



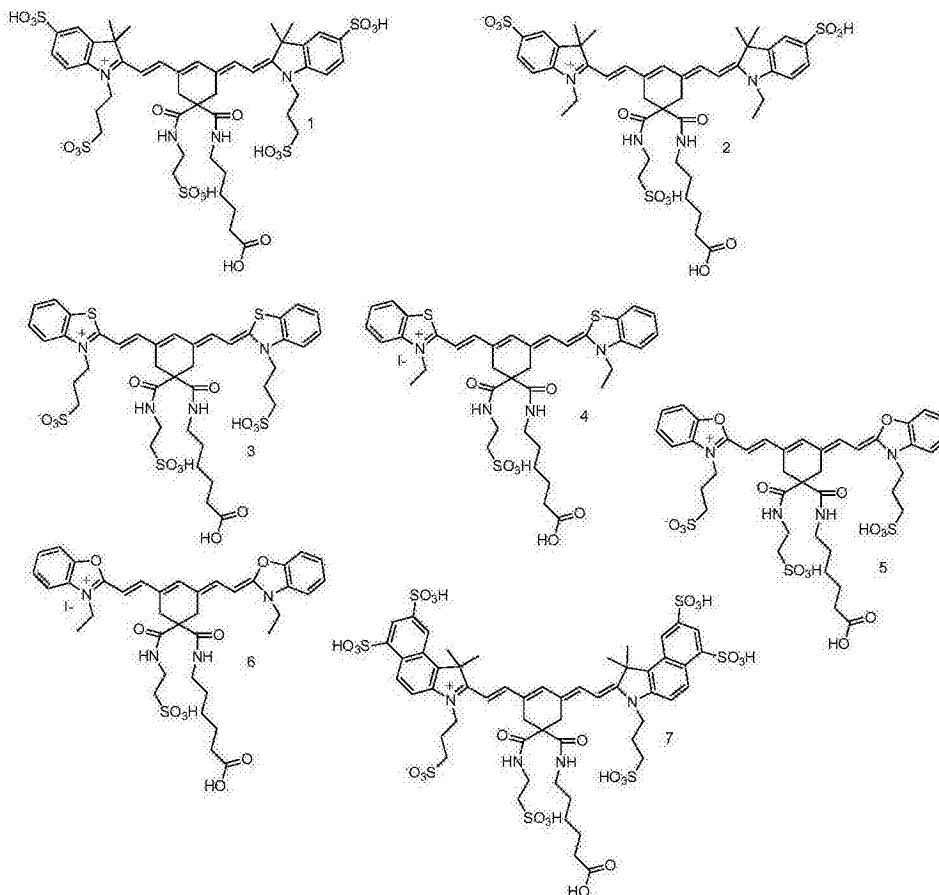
其中，当 $X = R = \text{CO}-\text{NR}_5\text{R}_7$ 时 (式 Ia)；当 $X = \text{CO}-\text{NR}_5\text{R}_7$ 并且 $R = \text{R}_{11}$ 时 (式 Ib)； $X = R = \text{CO}-\text{Ph}-\text{X}_3$ (式 Ic) 时如下所示：

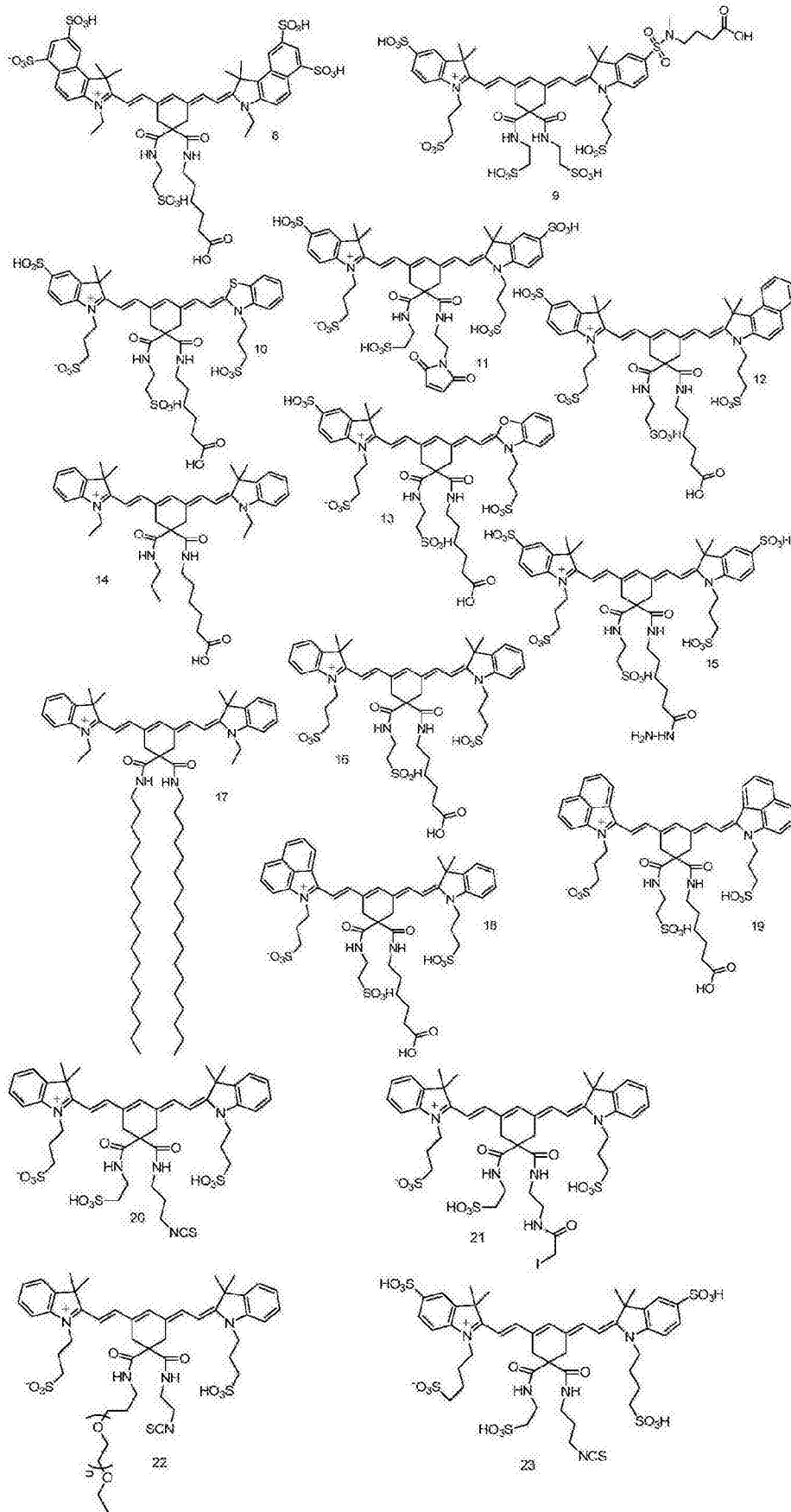


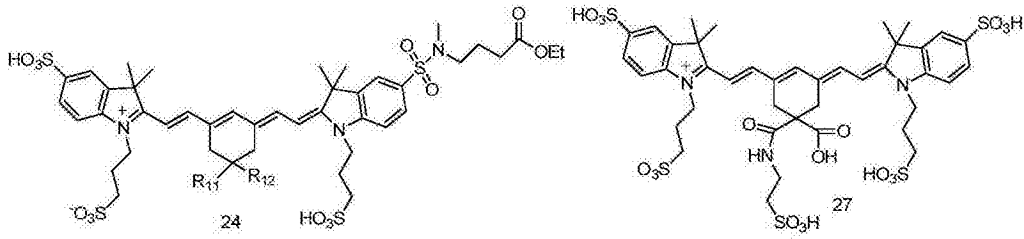
40. 根据权利要求 32 所述的化合物,其中 X_1 和 X_2 是 $C(CH_3)_2$ 。

41. 根据权利要求 32 至 40 所述的化合物,其中所述试剂在远红或近红外中具有荧光。

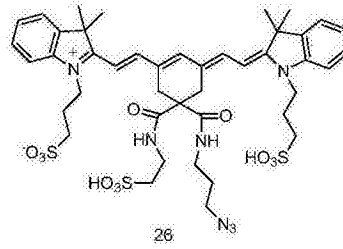
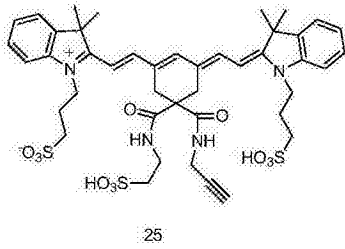
42. 一种化合物,该化合物选自下列化合物或其盐之一:



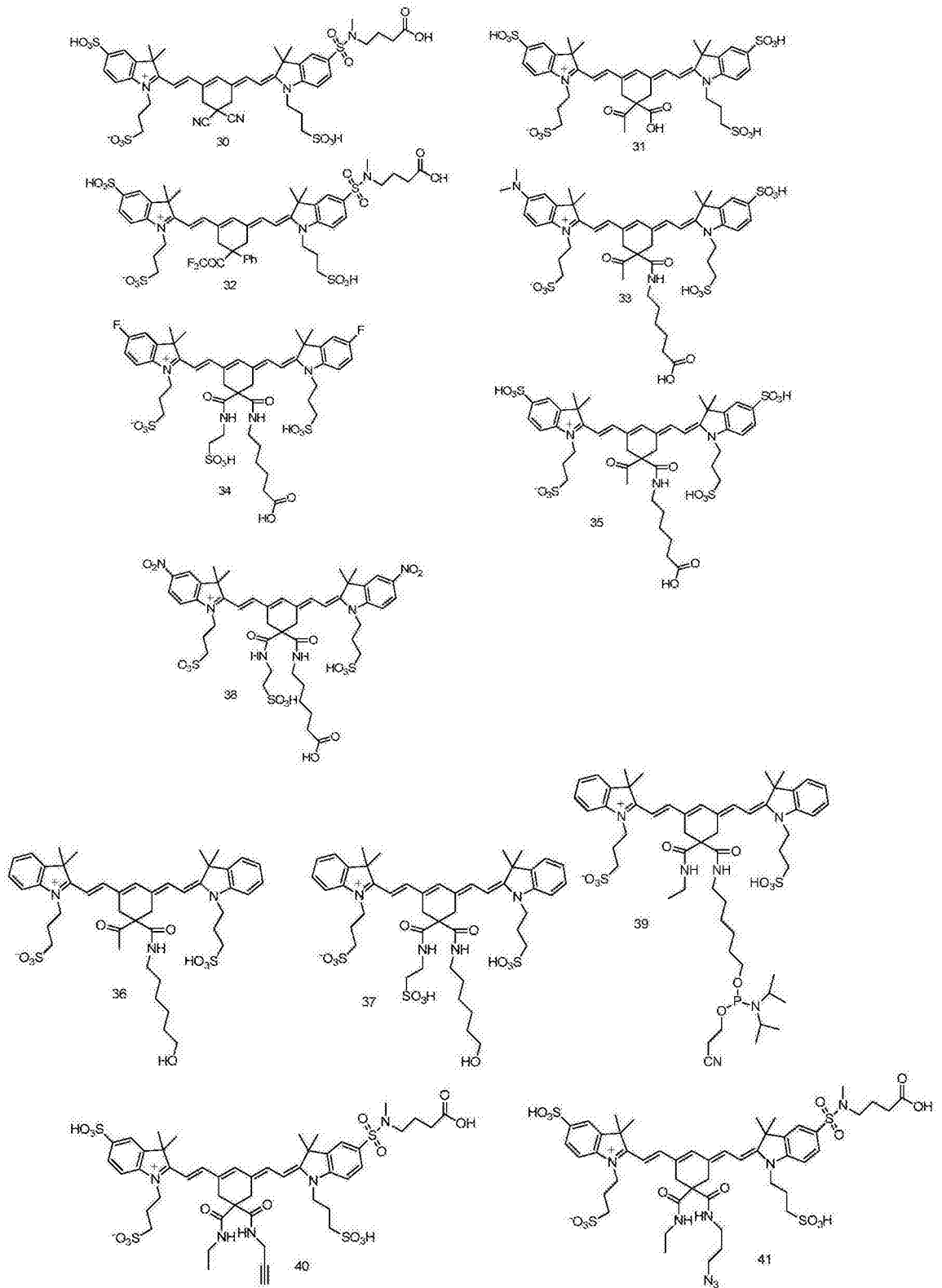


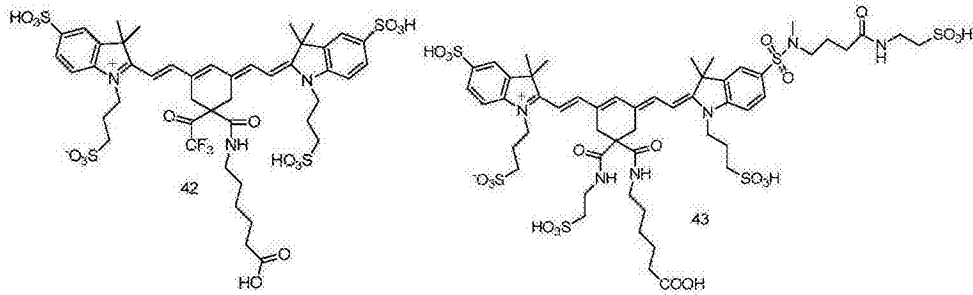


R_{11} 和 R_{12} 独立地是： COOH 、 CONHR 、 CN 、 $\text{O}=\text{C}$ -苯基、 COCH_2R ，其中 $\text{R}=\text{H}$ 或 $(\text{CH}_2)_n\text{O}$ 、 $(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$ 或 $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 或 $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ 或 $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3$ ，其中 R' =烷基或芳基



		X3	
		28	29
	A	H	29A
	B	Cl	29B
	C	Br	29C
	D	F	29D
	E	I	29E
	28F	SO_3H	29F
	28G	COO	29G
		H	
		G	

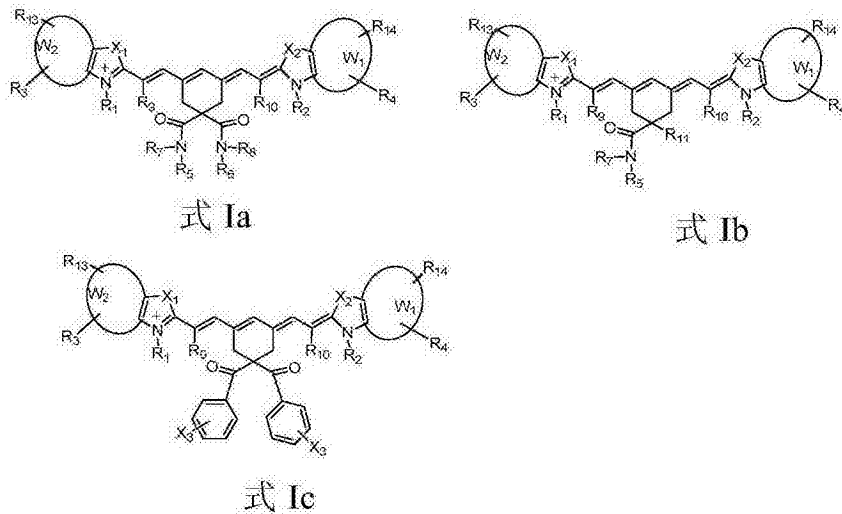




43. 一种生物相容的荧光分子, 该生物相容的荧光分子由式 III 表示
 $[BM]_n-F_m$ 式 III

其中 BM 是生物分子, F 是由式 Ia、Ib 或 Ic 表示的荧光团, 并且 $n = 1$ 至 4 ; $m = 1$ 至

100



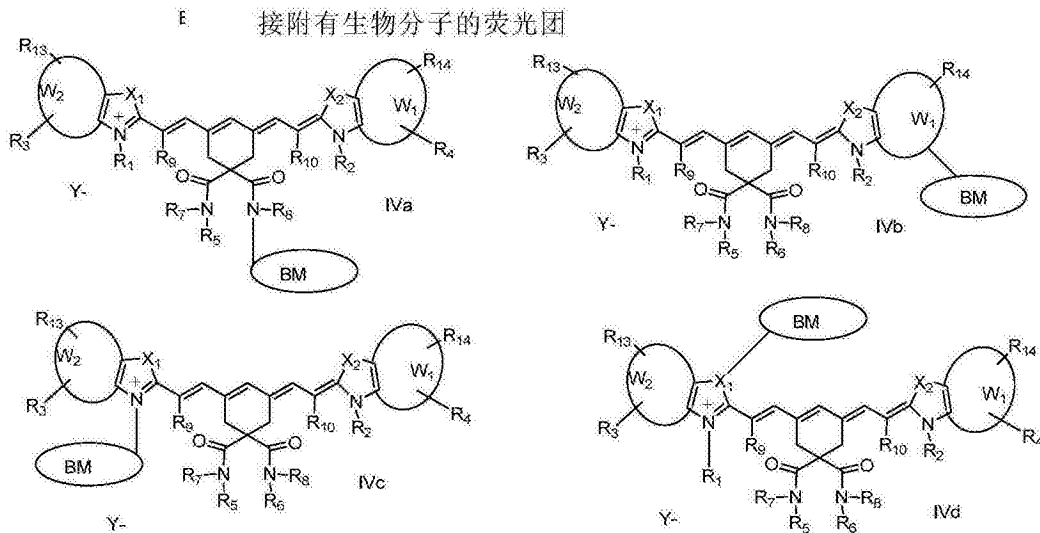
其中 X_1 和 X_2 独立地选自 O、S、Se、 $C(CH_2R_3CH_2R_4)$;
 R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 :H、 $(CH_2)_nX_3$, 其中 $n = 1-20$;
 R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地选自 :H、 $(CH_2)_nX_3$, 其中 $n = 0-20$;
 X_3 独立地选自 :H、卤素、 CH_3 、 SO_3H 、 SO_3^- 、 $COOH$ 、 NCS (异硫氰酸酯)、 NCO (异氰酸酯)、N-羟基琥珀酰亚胺基 (NHS) 酯、N-羟基磺酰琥珀酰亚胺基 (NHSS) 酯、羟基 (OH)、巯基 (SH)、马来酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、碘乙酰胺、 CN 、 NH_2 、 $CONHR$ 、炔烃、叠氮 (N_3)、 $SO_2NX_3R_7$ 、可选择地进一步被 X_3 取代的芳基 ;

R_9 和 R_{10} 是 H 或卤素或烷基基团 ;

R_1 和 R_9 或 R_2 和 R_{10} 可选择地合并在一起形成五元、六元或七元环 ;

W_1 和 W_2 是形成包括苯基或萘基或吡啶基的芳环所必需的原子 ; R_{11} 独立地选自 : $COOH$ 、 CN 、 F 、 NO_2 、 $COCF_3$ 、 CF_3 、 $COOR$ 、 $CONHR$ 、 $CO(CH_2)_nR$, 其中 R 是 H 或 $COOH$ 或 SO_3H 、或者 NH_2 或 SH 或烷基或可选择地进一步被 X_3 取代的芳基、或者聚乙二醇 (PEG) 单元 $(-CH_2-CH_2-O-)_n$ 。

44. 一种生物相容的荧光生物分子, 该生物相容的荧光生物分子由下列结构式 IVa-IVd 的任意一个表示, 其中 BM 是生物分子。

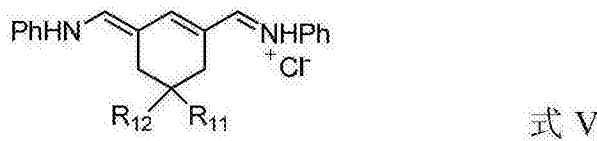


BM = 生物分子

45. 根据权利要求 44 所述的生物相容的荧光生物分子, 其中 BM 包括: 蛋白质、核酸 (DNA、RNA)、酶、抗体、细胞、脂质、脂肪酸、碳水化合物、糖、葡萄糖、肽、寡肽、氨基酸。

46. 一种药物组合物, 该药物组合物包含前项权利要求的任意一项所述的试剂和药学上可接受的赋形剂。

47. 一种化合物, 该化合物由式, 式 V 表示



其中 R₁₁ 和 R₁₂ 独立地是: COOH、CONHR、CF₃、卤素、CN、O=C- 苯基、COCH₂R, 其中 R = H 或 $\left(\text{CH}_2\right)_n\text{COOR}'$ 或 $\left(\text{CH}_2\right)_n\text{CH}_3$ 或 $\left(\text{CH}_2\right)_n\text{SO}_3\text{H}$ 或 $\left(\text{CH}_2\right)_n\text{SO}_3$, 其中 R' = 烷基或芳基; Ph 是苯基基团, 其可选择地被以下之一取代: F、Cl、Br、I、OMe、NMe₂、NO₂、CN、CF₃、烷基。

48. 根据权利要求 47 所述的化合物, 其中 R₁₁ 是 COOH, 并且 R₁₂ 是 COOH。

49. 根据权利要求 47 所述的化合物, 其中当 R₁₁ 是 COOH 时, R₁₂ 是 COOR', 并且当 R₁₂ 是 COOH 时, R₁₁ 是 COOR', 其中 R' 是烷基或芳基。

50. 一种体内成像方法, 该方法包括:

- a. 向对象给予前项权利要求的任意一项所述的试剂;
- b. 使所述试剂在所述对象体内分布; 以及
- c. 检测由蛋白质标记的试剂发射的信号。

51. 一种体内光学成像方法, 该方法包括:

- d. 向对象给予前项权利要求的任意一项所述的试剂, 其中所述试剂包含荧光染料;
- e. 使所述试剂在所述对象体内分布;
- f. 将所述对象暴露于具有可以被所述荧光染料吸收的波长的光下; 以及
- g. 检测由所述试剂发射的信号。

52. 根据权利要求 50 或 51 所述的方法, 其中由所述试剂发射的所述信号用于构建图像。

53. 根据权利要求 50 或 51 所述的方法, 其中所述图像是断层成像图像。

54. 根据权利要求 50 所述的方法,其中步骤 (a)-(c) 以预定时间间隔重复,从而允许评估在所述对象体内随时间的所述蛋白质标记的试剂的所述发射信号。

55. 根据权利要求 51 所述的方法,其中步骤 (a)-(d) 以预定时间间隔重复,从而允许评估在所述对象体内随时间的所述蛋白质标记的试剂的所述发射信号。

56. 根据权利要求 50 或 51 所述的方法,其中所述对象是动物或人。

57. 根据权利要求 50 或 51 所述的方法,其中在步骤 (a) 中,向对象给予信号性质可相互区分的两种以上成像探针,其中至少一种成像探针是蛋白质标记的试剂。

58. 根据权利要求 51 所述的方法,其中使用内窥镜、导管、断层成像系统、手持光学成像系统或者术中显微镜进行所述光照和检测步骤。

59. 根据权利要求 50 或 51 所述的方法,其中所述发射信号的存在、缺失或水平表明疾病的状态。

60. 根据权利要求 50 或 51 所述的方法,其中所述方法用于检测和 / 或监控疾病。

61. 根据权利要求 60 所述的方法,其中所述疾病选自自由骨疾病、癌症、心血管疾病、动脉粥样硬化、再狭窄、心肌缺血、心肌再灌注损伤、环境性疾病、皮肤疾病、免疫疾病、遗传疾病、传染病、炎症、代谢疾病、神经变性疾病、眼病和呼吸疾病所组成的组。

62. 根据权利要求 50 或 51 所述的方法,其中,在步骤 (a) 中,向所述对象给予用所述荧光化合物标记的细胞。

63. 根据权利要求 62 所述的方法,其中由所述试剂发射的所述信号用于监控细胞的转运和定位。

64. 一种治疗对象体内的疾病的方法,该方法包括向对象系统地或局部地给予权利要求 1 至 49 任意一项所述的试剂,其中所述试剂包含定位于疾病区域并且传递有效剂量辐射的放射性标记物。

65. 一种体外成像方法,该方法包括:

h. 将权利要求 1 至 49 任意一项所述的试剂与样品相接触;

i. 使所述试剂与生物目标结合;

j. 可选择地去除未结合的试剂;以及

k. 检测由所述试剂发射的信号,从而判定所述试剂是否已经被所述生物目标激活或者已经与所述生物目标结合。

66. 根据权利要求 65 所述的方法,其中所述样品是生物样品。

4, 4- 二取代环己基桥连七甲川花菁染料及其应用

[0001] 与相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 15 日提交的美国临时专利申请序列号 61/798, 562 的利益和优先权, 所述临时申请的内容通过引用并入本文。

发明领域

[0003] 本申请提供了新的荧光染料的组合物和方法, 该荧光染料代表包含 4, 4- 二取代环己基桥接组成部分的聚甲炔桥。新的组合物通常包含多个使染料具有高亲水性的磺酸或磺酸盐基团, 能够用于各种医疗、诊断和生物应用。

背景技术

[0004] 光学成像方法提供了优于其他成像方法的多个优点。这样的成像通常使用红和近红外 (NIR) 范围 (600–1200nm) 的光, 以最大化组织穿透并且最小化来自诸如血红蛋白和水的自然生物吸收剂的吸收。光学成像可以提供高灵敏度, 不需要将检测对象或实验室人员暴露于电离辐射, 能够允许同时使用多个可区分的探针 (可能在分子成像中非常重要), 并且提供了高的时间和空间分辨率, 其分别在功能性成像和体内显微术中非常重要。

[0005] 在荧光成像中, 将过滤的光或具有限定带宽的激光用作激发光源。激发光从身体组织中穿过, 并且在遇到报告分子 (例如, 对比剂或成像探针) 时, 光被吸收。报告分子然后发射与激发光具有可检测的不同性质的光。产生的发射光然后能够用于构建图像。大多数光学成像技术依赖于将有机和无机荧光染料用作报告分子。

[0006] 荧光染料是普遍已知的, 并且通过诸如荧光显微术、荧光免疫分析法和流式细胞术的过程用于各种生物和非生物材料的荧光标记和检测。用荧光染料标记这样的材料的典型方法是通过染料分子上的适当基团和要标记的材料上的相容基团之间成键的方式构建荧光复合体。以此方法, 诸如细胞、组织、氨基酸、蛋白质、抗体、药物、激素、核苷酸、核酸、脂质和多糖等的材料可以被化学标记并且检测或定量, 或者可以用作能够与目标物质特异性结合的荧光探针并且通过荧光检测方法检测。明亮的荧光染料以极高的灵敏度允许被连接材料的检测或定位。

[0007] 有着对于生物和生物医学研究的可检测标记物的需求。在用于体内使用的淬灭探针上应用良好的染料不都在体外应用中有效。在一些情况下, 在蛋白质或生物分子上的多于一个这些荧光团的存在导致干扰检测的显著淬灭。对于染料有着一种需求, 即染料允许体外和体内使用两者, 并且不会过度淬灭分子。高度可溶的亲水荧光染料也可以使追踪标记细胞、蛋白质和其他感兴趣的生物分子的运动和功能成为可能。在体内或体外不过度淬灭的新型染料会增加可用于生物学研究的工具。

[0008] 尽管如此, 对于能够用于各种医疗、诊断和生物应用的新染料, 有着持续的需求。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明部分地基于可以生成新的荧光染料的发现, 该荧光染料具有包含 4, 4- 二取代环己基桥接组成部分的聚甲炔桥。这些染料能够用于各种体外和体内成像应用。

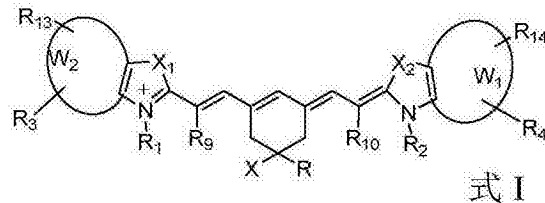
[0011] 在某些实施方式中,本发明的化合物能够由式 (II) 及其盐表示,



[0013] 其中 Z^1 和 Z^2 能够各自独立地选自取代的或未取代的亚吡啶啉或苯并亚吡啶啉环, 并且 PMB 表示包含 4, 4'-二取代环己基桥接组成部分的聚甲炔桥。在其他实施方式中, 化合物具有从约 500nm 至约 1100nm 的范围内, 优选为在从约 600nm 至约 900nm 的范围内吸收和发射波长。在某些实施方式中, 染料吸收和 / 或发射具有在从约 600nm 至约 850nm、从约 650nm 至约 900nm 或从约 650nm 至约 850nm 的范围内波长的光。

[0014] 在一个方面, 本发明提供了一族能够由式 I 通用表示的荧光团化合物。

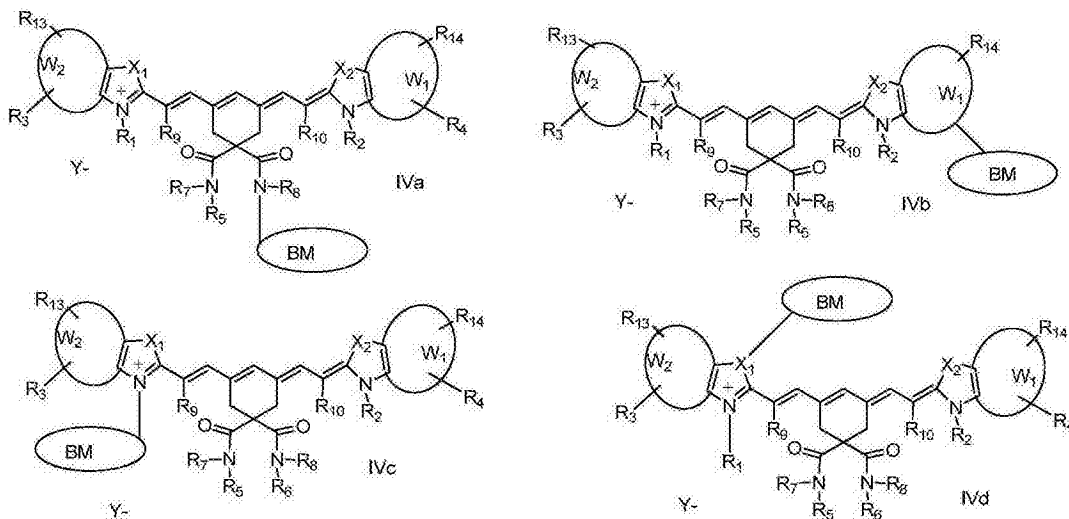
[0015]



[0016] 在某些实施方式中, 本发明是由式 III : $[BM]_n-F_m$ 表示的生物相容的荧光分子, 其中 BM 是生物分子, 并且 F 是如之前描述的荧光团。在其他实施方式中, 本发明是由下列结构式 IVa-IVd 的任意一个表示的生物相容的荧光生物分子, 其中 BM 是生物分子。

[0017] 接附有生物分子的荧光团

[0018]



[0019] 在另一个方面, 本发明提供了一种体内光学成像方法。该方法包括如下步骤: (a) 向诸如动物或人的对象给予本发明的荧光染料化合物, (b) 使该荧光染料化合物在对象体内分布或者与生物目标接触或互相作用, (c) 将对象暴露于具有可被荧光染料化合物吸收的波长的例如光的电磁辐射下, 以及 (d) 通过例如内窥镜、导管、断层成像系统、平面或反射系统、手持光学成像系统或术中系统和显微镜检测由荧光染料化合物发射的光学信号。由化合物发射的信号能够用于构建图像, 例如成像的区域或结构的断层成像图。应该理解, 荧光染料化合物可以包含化学连接至生物分子的荧光染料染料。

[0020] 前述步骤可以以预定间隔重复, 从而允许在对象体内随时间地评估荧光化合物的发射信号。在某些实施方式中, 可以向对象给予信号性质可区分的两个以上化合物, 并且它们的发射性质可以用于在对象体内成像两个以上的特征。

[0021] 本文公开的方法能够用于检测和 / 或监控疾病, 例如, 骨疾病、癌症、心血管疾病、皮肤疾病、环境性疾病、免疫疾病、传染病、炎症、遗传疾病、代谢疾病、神经变性疾病、眼病和呼吸疾病。

[0022] 在某些实施方式中, 用本文中描述的荧光染料化合物标记细胞, 并向对象给予标记的细胞。由荧光染料化合物发射的信号能够用于监控细胞的运输和定位, 或者用于评估细胞疗法的有效性。

[0023] 在另一个方面, 本发明提供了一种体外光学成像方法。该方法包括如下步骤: (a) 将例如生物细胞的样品与本发明的荧光染料化合物接触; (b) 使荧光染料化合物被生物目标激活或者与生物目标结合; (c) 可选择地去除未结合的荧光染料化合物; (d) 将样品暴露于具有可以被荧光染料化合物吸收的波长的例如光的电磁辐射下; 并且 (e) 检测由荧光染料化合物发射的信号, 从而判定荧光染料化合物是否已经被生物目标激活或者已经与生物目标结合。

附图说明

[0024] 图 1 示出本发明的牛血清蛋白 (BSA) 缀合的染料的荧光光谱和吸收光谱。图 1A 是由化合物 1b 的 BSA 缀合体发射的荧光的图。图 1B 示出 BSA 缀合的化合物 1b 的 BSA 缀合体的荧光吸收。

具体实施方式

[0025] 本发明提供了一类荧光染料化合物 (染料), 其吸收和 / 或发射具有在从约 500nm 至约 1100nm 的范围内, 更优选为在从约 600nm 至约 900nm 的范围内的波长的光。在某些实施方式中, 染料吸收和 / 或发射具有在从约 600nm 至约 850nm、从约 650nm 至约 900nm 或从约 650nm 至约 850nm 的范围内的波长的光。荧光染料化合物特别适用于各种体外和体内成像应用。

[0026] 在某些实施方式中, 本发明的荧光染料化合物能够由式 Z^1 -PMB- Z^2 及其盐表示, 其中 Z^1 和 Z^2 能够各自独立地表示相同或不同的包含杂环组成部分的多环基团, 并且 PMB 表示包含 4, 4- 二取代环己基桥接组成部分的聚甲炔桥。在下文中, 将更详细描述荧光染料化合物。然而, 在进一步描述本发明之前, 在以下部分中, 统一汇总了说明书、实施例和附带的权利要求书中采用的特定术语。

[0027] I. 定义

[0028] 应当依照本说明书的其他部分阅读此处列出的定义, 并且由本领域技术人员来理解。除非另有定义, 本文中使用的所有技术和科学术语都与本发明所属领域普通技术人员普遍理解的意义相同。

[0029] “化学连接” 意指通过原子之间的吸引力连接, 所述吸引力强得足以使结合的聚集体作为一个单位起作用。这包括但不限于化学键诸如共价键, 非共价键诸如离子键、金属键和桥键, 疏水相互作用, 氢键和范德华相互作用。这也包括交联或掩蔽 (caging)。

[0030] 术语“烷基” 是本领域公知的, 并包括饱和的脂族基团, 包括直链烷基基团、支链烷基基团、环烷基 (脂环族) 基团、烷基取代的环烷基基团和环烷基取代的烷基基团。在某些实施方式中, 直链或支链烷基在其骨架中具有约 30 个以下的碳原子 (如, 直链为 C_1 - C_{30} , 支

喃 (oxolane)、四氢硫杂茂 (thiolane)、噁唑、哌啶、哌嗪、吗啉、内酯、内酰胺诸如氮杂环丁酮和吡咯烷酮、磺内酰胺、磺内酯等。杂环的环可任选地在一个或多个位置处被如上所述的那些取代基取代,例如卤素、烷基、芳烷基、烯基、炔基、环烷基、羟基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、氨酰基、膦酸酯、亚膦酸酯、羰基、羧基、甲硅烷基、醚、烷基硫基、磺酰基、酮、醛、酯、杂环基、芳香族或杂芳族组成部分、 $-\text{CF}_3$ 或 $-\text{CN}$ 等。

[0039] 术语“多环”、“多环基团”或“多环组成部分”是本领域公知的,并且指代其中两个以上碳为两个相邻环所共有的两个以上的环(如环烷基、环烯基、环炔基、芳基和/或杂环),如所述环是“稠合环”。通过不相邻的原子结合的环术语称为“桥接”环。多环的每个环可以被如上所述的那些取代基取代,例如卤素、烷基、芳烷基、烯基、炔基、环烷基、羟基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、氨酰基、膦酸酯、亚膦酸酯、羰基、羧基、甲硅烷基、醚、烷基硫基、磺酰基、酮、醛、酯、杂环基、芳香族或杂芳族组成部分、 $-\text{CF}_3$ 或 $-\text{CN}$ 等。

[0040] 术语“硝基”是本领域公知的,并且指代 $-\text{NO}_2$;术语“卤素”是本领域公知的,并且指代 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 或 $-\text{I}$;术语“巯基”是本领域公知的,并且指代 $-\text{SH}$;术语“羟基”指代 $-\text{OH}$;以及术语“磺酰基”是本领域公知的,并且指代 $-\text{SO}_2$ 。“卤化物”指代卤素的对应阴离子,并且“类卤化物”具有如Cotton和Wilkinson所著“Advanced Inorganic Chemistry”中阐述的定义。

[0041] 术语“胺”和“氨基”是本领域公知的,并且指代未取代和取代的胺两者,如可以由下列通式表示的组成部分:

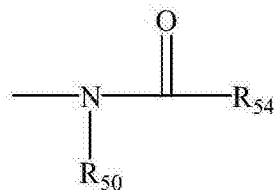
[0042]



[0043] 其中 R_{50} 、 R_{51} 、 R_{52} 和 R_{53} 各自独立地表示氢、烷基、烯基、 $-(\text{CH}_2)_m-R_{61}$,或者 R_{50} 和 R_{51} 与它们附连的N原子合在一起完成在环结构中具有4至8个原子的杂环; R_{61} 表示芳基、环烷基、环烯基、杂环或多环;并且 m 是0或1至8范围内的整数。在某些实施方式中, R_{50} 或 R_{51} 中只有一个可以是羰基,例如 R_{50} 、 R_{51} 和氮一起不形成酰亚胺。在其他实施方式中, R_{50} 和 R_{51} (以及可选择的 R_{52})各自独立地表示氢、烷基、烯基或 $-(\text{CH}_2)_m-R_{61}$ 。因此,术语“烷基胺”包括具有接附于其上的取代的或未取代的烷基的如上所述的氨基基团,即 R_{50} 和 R_{51} 的至少一个是烷基基团。

[0044] 术语“酰胺基”是本领域公知的,并且指代可以由下列通式表示的组成部分:

[0045]

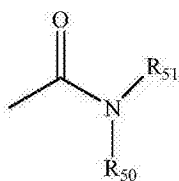


[0046] 其中 R_{50} 如以上定义,并且 R_{54} 代表氢、烷基、烯基或 $-(\text{CH}_2)_m-R_{61}$,其中 m 和 R_{61} 如以上定义。

[0047] 术语“氨酰基”是本领域公知的氨基取代的羰基,并且包括可以由下列通式表示的

组成部分：

[0048]

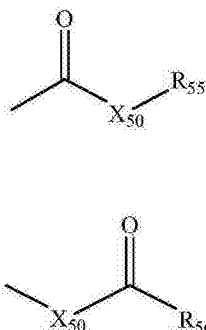


[0049] 其中 R_{50} 和 R_{51} 如以上定义。在本发明的酰胺的某些实施方式中，将不包括可能不稳定的酰亚胺。

[0050] 术语“烷基硫基”指代具有接附于其上的硫自由基的如上所述的烷基基团。在某些实施方式中，“烷基硫基”组成部分由 $-S-$ 烷基、 $-S-$ 烯基、 $-S-$ 炔基和 $-S-(CH_2)_m-R_{61}$ 中的一个表示，其中 m 和 R_{61} 如以上定义。代表性的烷基硫基基团包括甲硫基、乙硫基等。

[0051] 术语“羰基”是本领域公知的，并且包括可以由下列通式表示的组成部分：

[0052]

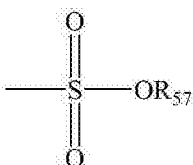


[0053] 其中 X_{50} 是键或者表示氧或硫，并且 R_{55} 和 R_{56} 表示氢、烷基、烯基、 $-(CH_2)_m-R_{61}$ 或药学上可接受的盐， R_{56} 表示氢、烷基、烯基或 $-(CH_2)_m-R_{61}$ ，其中 m 和 R_{61} 如以上定义。当 X_{50} 是氧并且 R_{55} 或 R_{56} 不是氢时，该式表示“酯”。当 X_{50} 是氧，并且 R_{55} 如以上定义时，本文中将该组成部分指称为羧基基团，并且特别地，当 R_{55} 是氢时，该式表示“羧酸”。当 X_{50} 是氧，并且 R_{56} 是氢时，该式代表“甲酸酯”。一般来说，当上式的氧原子被硫替代时，该式表示“硫代羰基”基团。当 X_{50} 是硫并且 R_{55} 或 R_{56} 不是氢时，该式表示“硫酯”。当 X_{50} 是硫并且 R_{55} 是氢时，该式表示“硫代羧酸”。当 X_{50} 是硫并且 R_{56} 是氢时，该式表示“硫代甲酸酯”。另一方面，当 X_{50} 是键，并且 R_{55} 不是氢时，上式表示“酮”基团。当 X_{50} 是键，并且 R_{55} 是氢时，上式表示“醛”基团。

[0054] 术语“烷氧基”或“烷氧”是本领域公知的，并且指代具有接附于其上的氧的如以上定义的烷基。代表性的烷氧基基团包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、叔丁氧基等。“醚”是由氧共价连接的两个烃类。因此，使烷基成为酯的烷基的取代基是或类似于烷氧基，诸如可以由 $-O-$ 烷基、 $-O-$ 烯基、 $-O-$ 炔基、 $-O-(CH_2)_m-R_{61}$ 的一个表示，其中 m 和 R_{61} 如以上所述。

[0055] 术语“磺酸盐”是本领域公知的，并且指代可以由下列通式表示的组成部分：

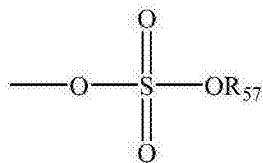
[0056]



[0057] 其中 R_{57} 是电子对、氢、烷基、环烷基或芳基。

[0058] 术语“硫酸盐”是本领域公知的,并且包括可以由下列通式表示的组成部分:

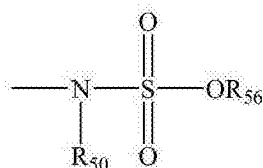
[0059]



[0060] 其中 R_{57} 如以上定义。

[0061] 术语“磺酰氨基”是本领域公知的,并且包括可以由下列通式表示的组成部分:

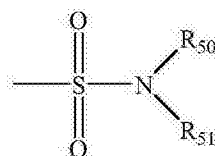
[0062]



[0063] 其中 R_{50} 和 R_{56} 如以上定义。

[0064] 术语“氮磺酰基”是本领域公知的,并且指代可以由下列通式表示的组成部分:

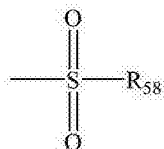
[0065]



[0066] 其中 R_{50} 和 R_{51} 如以上定义。

[0067] 术语“磺酰基”是本领域公知的,并且指代可以由下列通式表示的组成部分:

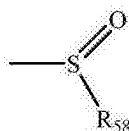
[0068]



[0069] 其中 R_{58} 是下列之一:氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基或杂芳基。

[0070] 术语“亚砷基”是本领域公知的,并且指代可以由下列通式表示的组成部分:

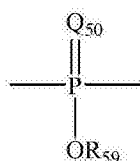
[0071]



[0072] 其中 R_{58} 如以上定义。

[0073] 术语“磷酰基”是本领域公知的,并且一般地可以由下式表示:

[0074]



[0075] 其中 Q_{50} 表示 S 或 O, 并且 R_{59} 表示氢、低级烷基或芳基。当用于取代例如烷基时, 磷酰烷基的磷酰基基团可以由下列通式表示:

[0076]



[0077] 其中 Q_{50} 和 R_{59} 各自独立地定义如上, 并且 Q_{51} 表示 O、S 或 N。当 Q_{50} 为 S 时, 磷酰基组成部分是“硫代磷酸酯”。

[0078] 术语“亚磷酰胺”是本领域公知的, 并且可以由下列通式表示:

[0079]



[0080] 其中 Q_{51} 、 R_{50} 、 R_{51} 和 R_{59} 如以上定义。

[0081] 术语“次磷酰胺”是本领域公知的, 并且可以由下列通式表示:

[0082]



[0083] 其中 Q_{51} 、 R_{50} 、 R_{51} 和 R_{59} 如以上定义, 并且 R_{60} 表示低级烷基或芳基。

[0084] 可以对烯基和炔基基团进行类似的取代, 以生成例如氨基烯基、氨基炔基、酰胺基烯基、酰胺基炔基、亚氨基烯基、亚氨基炔基、硫代烯基、硫代炔基、羰基取代的烯基或炔基。

[0085] 各个表达式的定义, 如烷基、m、n 等, 当其在任意结构中出现多于一次时, 意味着其独立于相同结构中的其他定义。

[0086] 应该理解, “取代”或“被... 取代”包括隐含的条件, 即这种取代与取代的原子和取代基的允许价态相一致, 并且取代产生了稳定的化合物, 如不自发地进行诸如通过重排、环化、消除或其他反应而变形的化合物。

[0087] 术语“取代的”也意欲包括有机化合物的所有可允许的取代基。示例性的取代基包括, 例如卤素、叠氮化物、烷基、芳烷基、烯基、炔基、环烷基、羟基、烷氧基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、氨酰基、磷酸酯、亚磷酸酯、羰基、羧基、甲硅烷基、醚、烷基硫基、磺酰基、磺酰胺基、酮、醛、酯、杂环基、芳香族或杂芳族组成部分、 $-CF_3$ 和 $-CN$ 等。在更广泛的方面, 可允许的取代基包括有机化合物的非环状的和环状的、分枝的和未分枝的、碳环的和杂环的、芳香的和非芳香的取代基。例如, 示意性的取代基包括本文中上面描述的那些。可允许的取代基对于适当的有机化合物可以是一个以上, 并且可以是相同的或不同的。为了本发明的目的, 诸如氮的杂原子可以含有氢取代基和 / 或本文中描述的满足杂原子价态的任意有机化合物可允许的取代基。本发明不意在以任何方式通过有机化合物可允许的取代基来限制。

[0088] 术语“聚甲炔桥”指代包含奇数个碳的共轭双键亚甲基链。这样的桥可以包括环状结构,作为共轭双键亚甲基链的部分。

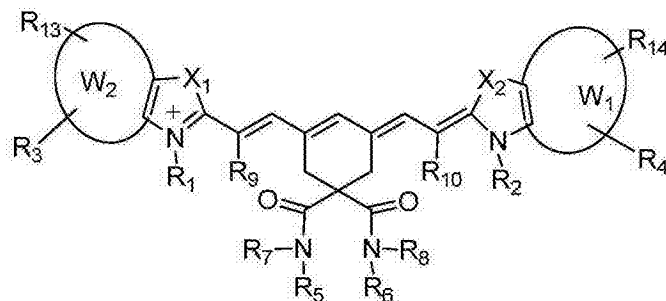
[0089] 术语“生理上可接受的载体”指代一种以上本发明的化合物在其中分散、溶解、悬浮、混合,并且在生理上可耐受的载体,即可以给予于对象的身体、身体中或身体上而没有过度不适或刺激或毒性的载体。

[0090] 在整个说明书中,当以具有、包括或包含特定组分描述组合物时,也意指该组合物基本上由所述组分构成、或者由所述组分构成。类似地,当以具有、包括或包含特定步骤描述过程时,该过程也可以基本上由所述处理步骤组成,或者由所述步骤组成。而且应该理解,只要本发明是可进行的,步骤的次序或者进行特定动作的次序不重要。另外,两个以上步骤或动作可以同时进行。

[0091] II. 本发明的荧光染料化合物

[0092] 本发明的一个方面提供了一种由式 I-A 或其盐表示的荧光化合物:

[0093]



(I-A)

[0094] 其中:

[0095] X_1 和 X_2 各自独立地是O、S、Se或 $C(C_{1-4}烷基)_2$;

[0096] W_1 和 W_2 是苯环、萘环或吡啶环;

[0097] R_1 和 R_2 独立地是氢或可选择地被一个或两个取代基取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基,所述取代基独立地选自卤素、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 和 $-OH$ 所组成的组;

[0098] R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地是H或 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$;

[0099] R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是H、 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-SO_2N(R_{12})-$ 亚烷基 $-X_3$ 、卤素或 $-NO_2$;

[0100] X_3 在每次出现时独立地表示H、卤素、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、N-羟基琥珀酰亚胺基酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基酯、 $-OH$ 、 $-SH$ 、马来酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、 $-NHCO-(CH_2)_m-(卤素)$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{12}$ 、炔基、 $-N_3$ 、聚乙二醇、可选择地取代的芳基或者可选择地取代的杂环;

[0101] R_9 和 R_{10} 是氢、卤素或烷基,或者 R_1 和 R_9 或 R_2 和 R_{10} 是通过相连的原子合并在一起而形成五元、六元或七元环;

[0102] R_{12} 在每次出现时独立地表示氢或烷基;

[0103] m 在每次出现时独立地表示0、1、2、3、或4;以及

[0104] n 在每次出现时独立地表示1-10。

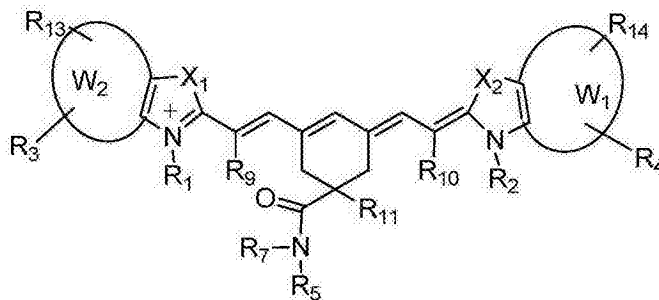
[0105] 在某些实施例中, X_1 和 X_2 是 $C(CH_3)_2$ 。在某些实施例中, W_1 和 W_2 是苯环。在某些实

施例中, W_1 和 W_2 是萘环。在某些实施例中, R_1 和 R_2 独立地是可选择地被 $-SO_3H$ 或 $-SO_3$ 取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基。在某些实施例中, R_1 和 R_2 独立地是 C_1-C_6 烷基。在某些实施例中, R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是H、 $-SO_3H$ 、或 $-SO_3$ 。在某些实施例中, R_7 是氢。在某些实施例中, R_9 和 R_{10} 是氢。

[0106] 在某些实施例中, R_5 和 R_6 各自独立地是 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$ 。在某些实施例中, R_5 和 R_6 各自独立地是 $-C_2-C_8$ 亚烷基 $-X_3$ 。在某些实施例中, R_5 和 R_6 各自独立地是被 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 或 $COOH$ 取代的 $-C_2-C_8$ 亚烷基。在某些实施例中, R_7 和 R_8 是氢。

[0107] 本发明的另一个方面提供了一种由式 I-B 或其盐表示的荧光化合物:

[0108]



[0109]

(I-B)

[0110] 其中:

[0111] X_1 和 X_2 各自独立地是O、S、Se或 $C(C_{1-4}烷基)_2$;

[0112] W_1 和 W_2 是苯环、萘环或吡啶环;

[0113] R_1 和 R_2 独立地是氢或可选择地被一个或两个取代基取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基, 所述取代基独立地选自卤素、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 和 $-OH$ 所组成的组;

[0114] R_5 和 R_7 各自独立地是氢或 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$;

[0115] R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是氢、 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-SO_2N(R_{12})$ -亚烷基 $-X_3$ 、卤素或 $-NO_2$;

[0116] X_3 在每次出现时独立地表示H、卤素、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、N-羟基琥珀酰亚胺基酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基酯、 $-OH$ 、 $-SH$ 、马来酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、 $-NHCO-(CH_2)_m-(卤素)$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{12}$ 、炔基、 $-N_3$ 、聚乙二醇、可选择地取代的芳基或者可选择地取代的杂环;

[0117] R_9 和 R_{10} 是H、卤素或烷基, 或者 R_1 和 R_9 或 R_2 和 R_{10} 通过相连的原子合并在一起而形成五元、六元或七元环;

[0118] R_{11} 是 $-COOH$ 、 $-CN$ 、卤素、 $-NO_2$ 、 $-C(O)-$ 卤代烷基、卤代烷基、 $-COOR_{15}$ 、 $-CON(H)R_{15}$ 、或者 $-CO(CH_2)_nR_{15}$;

[0119] R_{12} 在每次出现时独立地表示氢或烷基;

[0120] R_{15} 是H、 $-COOH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、烷基或者可选择地被 X_3 和/或聚乙二醇取代的芳基;

[0121] m 在每次出现时独立地表示0、1、2、3、或4; 以及

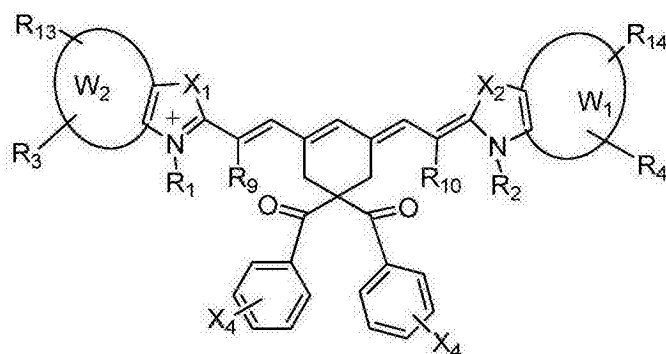
[0122] n 在每次出现时独立地表示1-10。

[0123] 在某些实施例中, X_1 和 X_2 是 $C(CH_3)_2$ 。在某些实施例中, W_1 和 W_2 是苯环。在某些实施例中, W_1 和 W_2 是萘环。在某些实施例中, R_1 和 R_2 独立地是可选择地被 $-SO_3H$ 或 $-SO_3$ 取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基。在某些实施例中, R_1 和 R_2 独立地是 C_1-C_6 烷基。在某些实施例中, R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是 H、 $-SO_3H$ 、或 $-SO_3$ 。在某些实施例中, R_7 是氢。在某些实施例中, R_9 和 R_{10} 是氢。

[0124] 在某些实施例中, R_5 是 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$, 并且 R_7 是氢。在某些实施例中, R_5 是 $-C_2-C_8$ 亚烷基 $-X_3$, 并且 R_7 是氢。在某些实施例中, R_5 是由 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 或 $-COOH$ 取代的 $-C_2-C_8$ 亚烷基, 并且 R_7 是氢。

[0125] 本发明的另一个方面提供了一种由式 I-C 或其盐表示的荧光化合物:

[0126]



(I-C)

[0127] 其中:

[0128] X_1 和 X_2 各自独立地是 O、S、Se 或 $C(C_{1-4}烷基)_2$;

[0129] R_1 和 R_2 独立地是氢或可选择地被一个或两个取代基取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基, 所述取代基独立地选自卤素、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 和 $-OH$ 所组成的组;

[0130] R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是氢、 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-SO_2N(R_{12})-$ 亚烷基 $-X_3$ 、卤素或 $-NO_2$;

[0131] X_3 在每次出现时独立地表示 H、卤素、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、N-羟基琥珀酰亚胺基酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基酯、 $-OH$ 、 $-SH$ 、马来酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、 $-NHCO-(CH_2)_m-(卤素)$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{12}$ 、炔基、 $-N_3$ 、聚乙二醇、可选择地取代的芳基或者可选择地取代的杂环;

[0132] X_4 在每次出现时独立地表示氢、卤素、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 或者 $-CO_2$;

[0133] R_9 和 R_{10} 是 H、卤素或烷基, 或者 R_1 和 R_9 或 R_2 和 R_{10} 通过相连的原子合并在一起而形成五元、六元或七元环;

[0134] R_{12} 在每次出现时独立地表示氢或烷基;

[0135] m 在每次出现时独立地表示 0、1、2、3、或 4; 以及

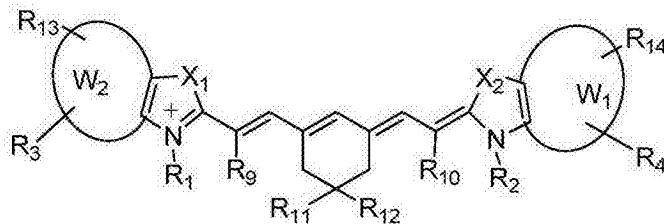
[0136] n 在每次出现时独立地表示 1-10。

[0137] 在某些实施例中, X_1 和 X_2 是 $C(CH_3)_2$ 。在某些实施例中, W_1 和 W_2 是苯环。在某些实施例中, W_1 和 W_2 是萘环。在某些实施例中, R_1 和 R_2 独立地是可选择地被 $-SO_3H$ 或 $-SO_3$ 取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基。在某些实施例中, R_1 和 R_2 独立地是 C_1-C_6 烷基。在某些实施例中, R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是 H、 $-SO_3H$ 、或 $-SO_3$ 。在某些实施例中, R_7 是氢。在某些实施例中, R_9

和 R_{10} 是氢。

[0138] 本发明的另一个方面提供了一种由式 I-D 或其盐表示的荧光化合物：

[0139]



(I-D)

[0140] 其中：

[0141] X_1 和 X_2 各自独立地是 O、S、Se 或 $C(C_{1-4} \text{烷基})_2$ ；

[0142] W_1 和 W_2 是苯环、萘环或吡啶环；

[0143] R_1 和 R_2 独立地是氢或可选择地被一个或两个取代基取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基，所述取代基独立地选自卤素、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 和 $-OH$ 所组成的组；

[0144] R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是 H、 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-SO_2N(R_{12})$ - 亚烷基 $-X_3$ 、卤素或 $-NO_2$ ；

[0145] X_3 在每次出现时独立地表示 H、卤素、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、N-羟基琥珀酰亚胺基酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基酯、 $-OH$ 、 $-SH$ 、马来酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、 $-NHC(O)-(CH_2)_m-(\text{卤素})$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{13}$ 、炔基、 $-N_3$ 、聚乙二醇、可选择地取代的芳基或者可选择地取代的杂环；

[0146] R_9 和 R_{10} 是氢、卤素或烷基，或者 R_1 和 R_9 或 R_2 和 R_{10} 通过相连的原子合并在一起而形成五元、六元或七元环；

[0147] R_{11} 和 R_{12} 各自独立地是烷基、卤代烷基、芳基、芳烷基、氰基、卤素、硝基、 $-COOH$ 、 $-C(O)-\text{卤代烷基}$ 、 $-C(O)-\text{芳基}$ 、 $-C(O)OR_{15}$ 、 $-CON(H)R_{15}$ 、 $-(CH_2)_nC(O)OR_{15}$ 、 $-(CH_2)_nCONHR_{15}$ 、 $-CO(CH_2)_nR_{15}$ 、 $-(CH_2)_nSO_3H$ 或者 $-(CH_2)_nSO_3$ ，

[0148] R_{13} 在每次出现时独立地表示氢或烷基；

[0149] R_{15} 在每次出现时独立地表示 H、 $-COOH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-NH_2$ 、 $-SH$ 、烷基、聚乙二醇、或者可选择地被 X_3 和 / 或聚乙二醇取代的芳基；

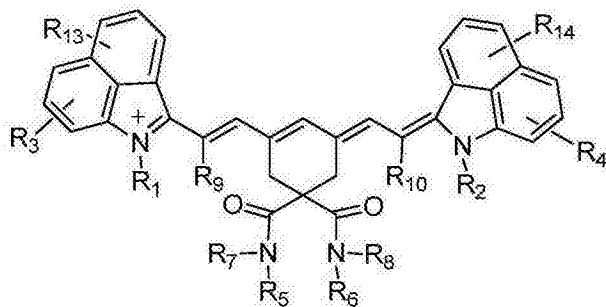
[0150] m 在每次出现时独立地表示 0、1、2、3、或 4；以及

[0151] n 在每次出现时独立地表示 1-10。

[0152] 在某些实施例中， X_1 和 X_2 是 $C(CH_3)_2$ 。在某些实施例中， W_1 和 W_2 是苯环。在某些实施例中， W_1 和 W_2 是萘环。在某些实施例中， R_1 和 R_2 独立地是可选择地被 $-SO_3H$ 或 $-SO_3$ 取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基。在某些实施例中， R_1 和 R_2 独立地是 C_1-C_6 烷基。在某些实施例中， R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是 H、 $-SO_3H$ 、或 $-SO_3$ 。在某些实施例中， R_7 是氢。在某些实施例中， R_9 和 R_{10} 是氢。

[0153] 本发明的另一个方面提供了一种由式 II 或其盐表示的荧光化合物：

[0154]



(II)

[0155] 其中：

[0156] R_1 和 R_2 独立地是氢或可选择地被一个或两个取代基取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基，所述取代基独立地选自卤素、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 和 $-OH$ 所组成的组；

[0157] R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地是H或 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$ ；

[0158] R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地是H、 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-SO_2N(R_{12})$ 、亚烷基 $-X_3$ 、卤素或 $-NO_2$ ；

[0159] X_3 在每次出现时独立地表示H、卤素、 $-CH_3$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 、 $-COOH$ 、 $-CO_2$ 、 $-NCS$ 、 $-NCO$ 、N-羟基琥珀酰亚胺基酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基酯、 $-OH$ 、 $-SH$ 、马来酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、 $-NHCO-(CH_2)_m-(\text{卤素})$ 、 $-CONHNH_2$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CON(H)R_{12}$ 、炔基、 $-N_3$ 、聚乙二醇、可选择地取代的芳基或者可选择地取代的杂环；

[0160] R_9 和 R_{10} 是氢、卤素或烷基，或者 R_1 和 R_9 或 R_2 和 R_{10} 通过相连的原子合并在一起而形成五元、六元或七元环；

[0161] R_{12} 在每次出现时独立地表示氢或烷基；

[0162] m 在每次出现时独立地表示0、1、2、3、或4；以及

[0163] n 在每次出现时独立地表示1-10。

[0164] 在某些实施例中， R_1 和 R_2 独立地是可选择地被 $-SO_3H$ 或 $-SO_3$ 取代的 $-C_1-C_{10}$ 烷基。在某些实施例中， R_1 和 R_2 独立地是可选择地被 $-SO_3H$ 或 $-SO_3$ 取代的 $-C_2-C_6$ 烷基。在某些实施例中， R_1 和 R_2 独立地是 C_1-C_6 烷基。在某些实施例中， R_5 和 R_6 各自独立地是 $-C_1-C_{22}$ 亚烷基 $-X_3$ 。在某些实施例中， R_5 和 R_6 各自独立地是 $-C_2-C_8$ 亚烷基 $-X_3$ 。在某些实施例中， R_5 和 R_6 各自独立地是被 $-SO_3H$ 、 $-SO_3$ 或 $-COOH$ 取代的 $-C_2-C_8$ 亚烷基。在某些实施例中， R_7 和 R_8 是氢。在某些实施例中， R_9 和 R_{10} 是氢。

[0165] 本发明的另一个方面提供了一种由式(II)及其盐表示的化合物。

[0166] $Z^1-(PMB)-Z^2$ (II)

[0167] Z^1 和 Z^2 各自独立地表示包含杂环组成部分的多环基团。例如， Z^1 和 Z^2 能够各自独立地选自取代的或未取代的亚吲哚啉或苯并亚吲哚啉环。PMB表示包含4,4-二取代环己基桥接组成部分的聚甲炔桥。该化合物具有在从约500nm至约1100nm的范围内，优选为在从约600nm至约900nm的范围内吸收和发射波长。在某些实施方式中，染料吸收和/或发射具有在从约600nm至约850nm、从约650nm至约900nm或从约650nm至约850nm的范围内波长的光。

[0168] Z^1 、 Z^2 和/或PMB可选择地可以包括能够形成共价键和/或与生物分子的化学键的连接物组成部分。这样的连接物组成部分可以包括能够与不同化合物上的官能团化学反

应以形成共价键的反应性基团,或者能够与不同化合物上的反应性基团化学反应以形成共价键的官能团。这样的反应性基团可以包括,例如亲电子试剂和亲核试剂,其能够通过暴露于对应的官能团来形成共价键,该对应的官能团相应地为亲核试剂和亲电子试剂。可任选地,反应性基团是光活化基团,并且仅在用适宜波长的光照射后成为化学活化的。本发明的化合物和要连接的生物分子之间的反应能够使得反应性基团的一个以上原子合并至新的连接键中,该新的连接键将本发明的化合物依附于缀合物质。

[0169] 本文中意欲包含的生物分子包括但不限于蛋白质(例如酶、激素、抗体和其抗原结合片段、以及单链抗体)、肽、氨基酸、糖蛋白、细胞受体的配体、多糖、碳水化合物、核酸(例如 DNA 和 RNA)、核苷、核苷酸、核酸适体、肽基核酸、细胞受体、酶底物、酶辅助因子、生物素、激素、神经递质、生长因子、细胞因子、淋巴因子、凝集素、选择素、脂质、脂质聚集体(例如胶束或囊泡)和毒素。能够使用其他生物分子,诸如参与靶向和递送的那些生物分子,诸如叶酸介导靶向(Leamon 和 Low, *Drug Discovery Today*, 6:44-51, 2001)、转铁蛋白、维生素、碳水化合物和靶向内化受体的配体,包括但不限于去唾液酸蛋白受体、生长激素抑制素、神经生长因子、催产素、铃蟾素、降血钙素、抗利尿激素、血管紧张素 II、心房利尿钠肽、胰岛素、胰高血糖素、催乳素、促性腺激素、各种阿片类和尿激酶型纤溶酶原激活因子。意欲包含的还有膜、跨膜和核易位信号序列,其能够衍生自包括但不限于病毒和细菌的多种来源。生物分子也可以包括有机分子、聚合物、树形分子、细胞(例如哺乳动物细胞、非哺乳动物细胞、植物细胞、昆虫细胞、胚胎细胞)、细菌、噬菌体、病毒、微生物、颗粒、微粒或纳米颗粒。生物分子也可以包括治疗药物分子,包括但不限于光疗分子或放疗分子。

[0170] 本发明的荧光染料化合物能够用于构建一种以上下列类型的成像剂或探针:分子探针、可激活探针、酶激活探针、基于量子点的成像探针、基于纳米粒子的成像探针、靶向生物分子的探针、波长转移信标、多色探针、具有与目标的高结合亲和性的探针、非特异性成像探针、基于细胞的探针、双模态试剂、光学/CT 双模态试剂(如物理或化学结合于 CT 试剂的光学试剂)、光学/MR 双模态试剂(如物理或化学结合于 MR 试剂的光学试剂)、光学/原子核双模态试剂(如物理或化学结合于放射性原子或与放射性原子在一起的光学试剂)和/或其任意组合。

[0171] 包括化学连接的生物分子的本发明的化合物与未化学连接至生物分子的化合物相比,可以具有增强的荧光。在某些实施方式中,与未连接的化合物相比,荧光增强了约 10%、约 25%或约 50%。化学连接至本发明的化合物的生物分子可以在体内和/或体外改变或增强分子的积累、生物分布、排除、靶向、结合和/或识别。

[0172] 一个以上的生物分子可以通过多价键或包含数个反应性官能团的连接物化学连接至 Z^1 、PMB 和/或 Z^2 ,以形成结构 $(Z^1-(PMB)-Z^2)-(L)_v(BM)_r$ 的生物相容的荧光分子,其中 L 是连接物或间隔物(spacer)或多价间隔物或连接物, BM 是生物分子, Z^1 、 Z^2 和 PMB 如前文定义,并且 $t = 1-6$, $v = 1-500$ 以及 $r = 1-500$ 。当 v 大于 1 时, $(L)_v$ 表示多个相同的连接物或不同连接物的组合。

[0173] 本发明的化合物的适当的连接物组成部分的实例在先前的文献中已有描述(参见,美国专利申请 2002/0064794(2002);美国专利号 6,086,737;美国专利号 6,048,982;美国专利号 6,747,159;以及美国专利号 6,448,008)。

[0174] 应该理解,多于一个本发明的荧光染料化合物能够化学连接至单一生物分子。这

样的结构的实例可以表示为： $[Z^1-(PMB)-Z^2]_u-BM$ ，其中 $u = 1-500$ ，并且 Z^1 、 Z^2 、PMB 和 BM 如以上定义。

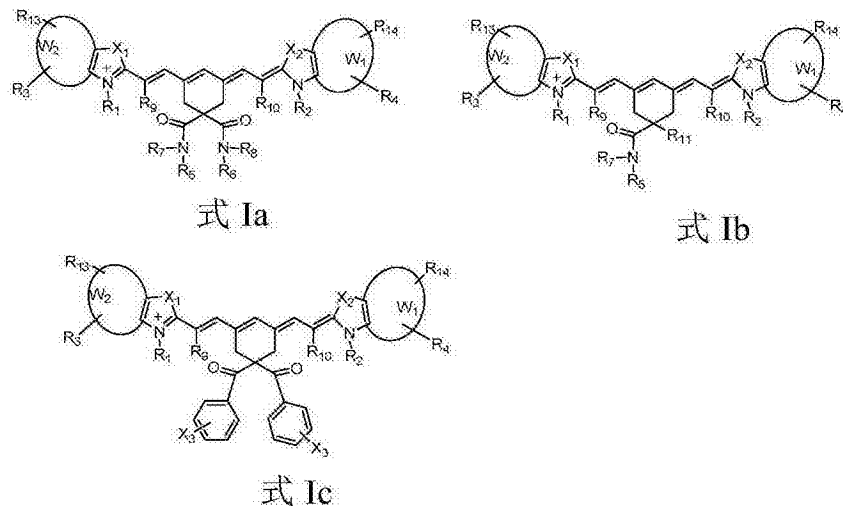
[0175] 也意欲包括公开的化合物的盐，并且包括碱和酸加成的盐两者。本发明的化合物可以具有一个以上酸性足够的质子，其能够与合适的有机或无机碱反应以形成碱加成的盐。碱加成的盐包括衍生自无机碱的盐，诸如铵或碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等，以及有机碱的盐，诸如醇盐、烷基酰胺、烷基和芳基胺等。因此，用于制备本发明的盐的碱包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、碳酸钾等。

[0176] 本发明的化合物具有碱性足够的基团，诸如能够与有机或无机酸反应以形成酸加成的盐的胺基。通常采用的将含有碱性基团的化合物形成酸加成盐的酸是无机酸，诸如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸等，以及有机酸，诸如对甲基苯磺酸、甲磺酸、草酸、对溴代苯磺酸、碳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、乙酸等。这样的盐的实例包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、磺酸盐、二甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、苯丙酸盐、苯丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、 γ -羟基丁酸盐、乙醇酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、扁桃酸盐等。

[0177] 例如，式 I 的化合物可以由式 Ia、Ib 和 Ic 及其盐表示：

[0178] 其中：

[0179]

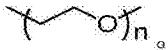


[0180] 其中 X_1 和 X_2 独立地选自 O、S、Se、 $C(CH_2R_3CH_2R_4)$ ；

[0181] R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自： H 、 $(CH_2)_nX_3$ ，其中 $n = 1-20$ ；

[0182] R_3 、 R_4 、 R_{13} 和 R_{14} 各自独立地选自： H 、 $(CH_2)_nX_3$ ，其中 $n = 0-20$ ； X_3 独立地选自： H 、卤素、 CH_3 、 SO_3H 、 SO_3 、 $COOH$ 、 NCS （异硫氰酸酯）、 NCO （异氰酸酯）、 N -羟基琥珀酰亚胺基（NHS）酯、 N -羟基磺酰琥珀酰亚胺基（NHSS）酯、羟基（OH）、巯基（SH）、马来酰亚胺、邻苯二甲酰亚胺、碘乙酰胺、 CN 、 NH_2 、 $CONHR$ 、炔烃、叠氮（ N_3 ）、 $SO_2NX_3R_7$ 、可选择地进一步被 X_3 取代的芳基；

[0183] R_9 和 R_{10} 是 H 或卤素或烷基基团； R_1 和 R_9 或 R_2 和 R_{10} 可选地合并在一起形成五元、

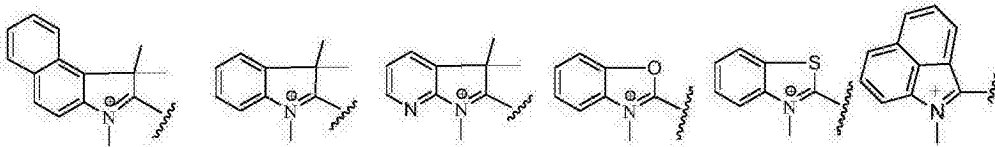
六元或七元环； W_1 和 W_2 是形成包括苯基或萘基或吡啶基的芳环所必需的原子； R_{11} 独立地选自： $COOH$ 、 CN 、 F 、 NO_2 、 $COCF_3$ 、 CF_3 、 $COOR$ 、 $CONHR$ 、 $CO(CH_2)_nR$ ，其中 R 是 H 或 $COOH$ 或 SO_3H 、或者 NH_2 或 SH 或烷基或可选择地进一步被 X_3 取代的芳基、或者聚乙二醇(PEG)单元 。

[0184] 在某些实施方式中， X_3 选自由 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、羧基、 $-COCl$ 、 $-(CO)O(CO)R_{16}$ 、 $-CONHNH_2$ 、取代的和未取代的 N -羟基琥珀酰亚胺基酯、取代的和未取代的 N -羟基磺酰琥珀酰亚胺基酯、硝基或氟代苯酚酯、叠氮、 $-NCS$ 、 $-CHO$ 、叠氮、 $-COCH_2I$ 、亚磷酰胺、邻苯二甲酰胺和马来酰亚胺所组成的组，其中 R_{16} 选自由 H 、烷基和芳基所组成的组。

[0185] 在其他实施方式中， X_1 和 X_2 是 $-C(CH_3)_2$ 。

[0186] 应该理解， W_1 和 W_2 可以相同或不同。例如， W_1 和 W_2 可以选自由下列组成的组：

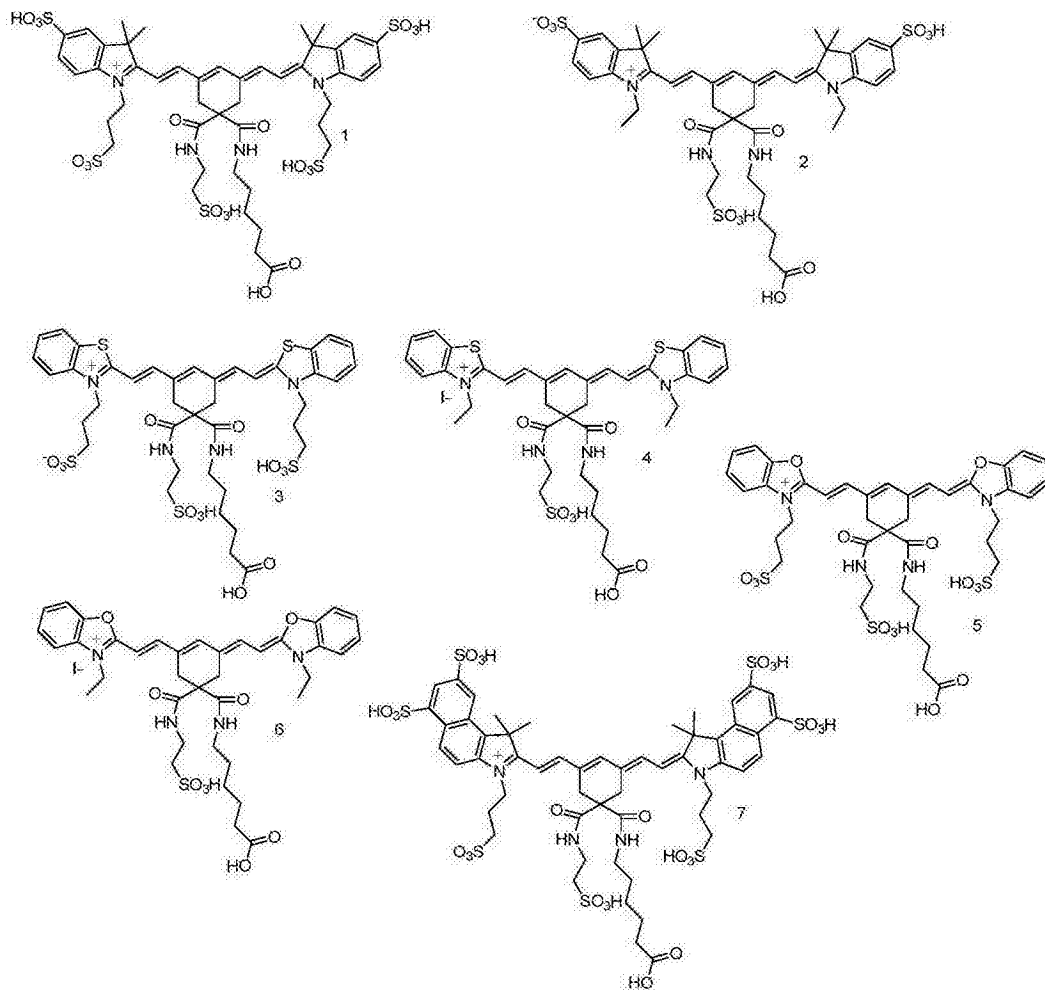
[0187]



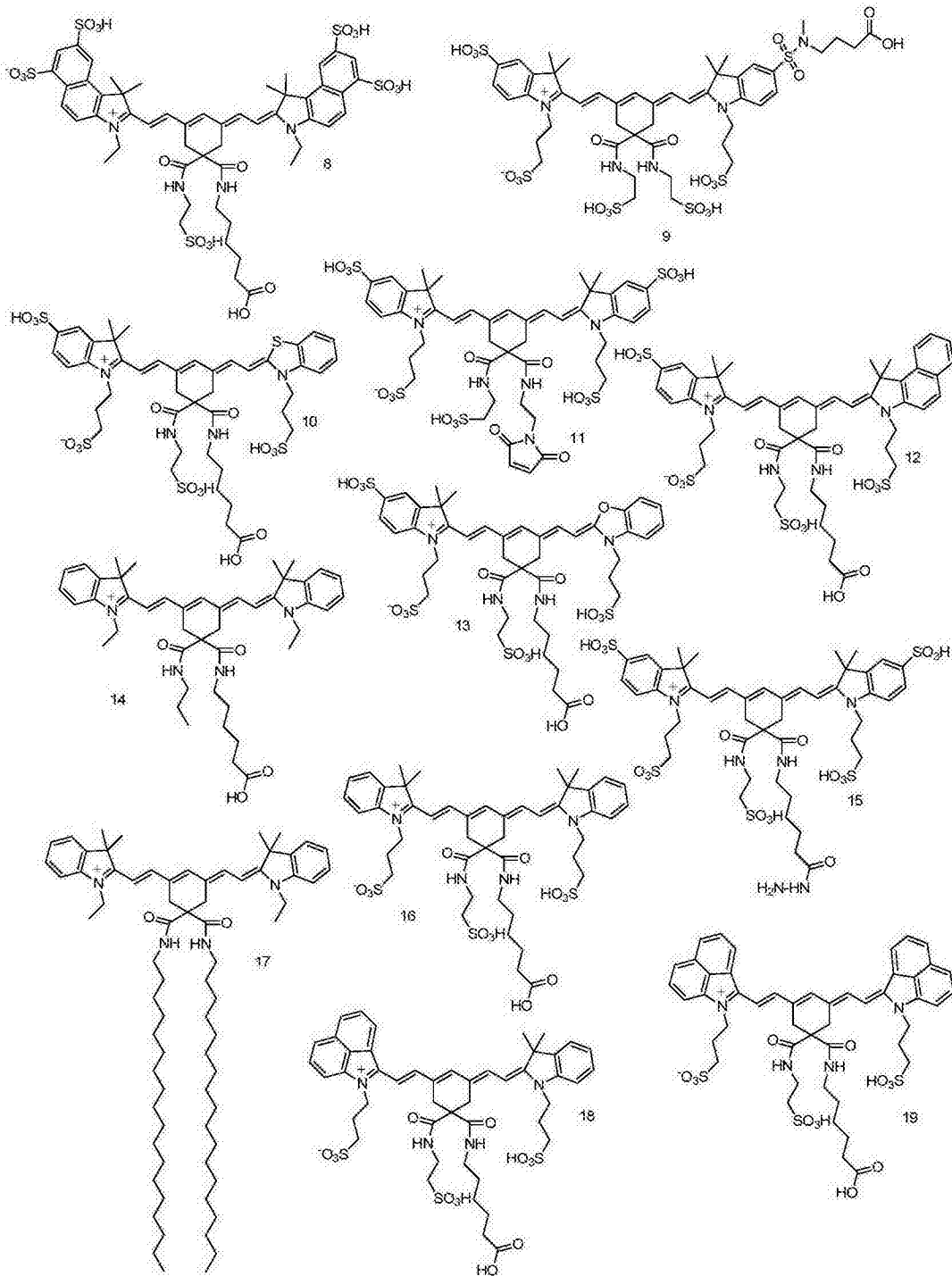
[0188] 在稠合环上并入一个以上非氢取代基，能够用于调节所得染料的吸收和发射光谱。

[0189] 在某些实施方式中，化合物是下列或其盐之一：

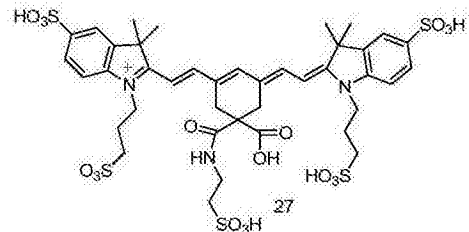
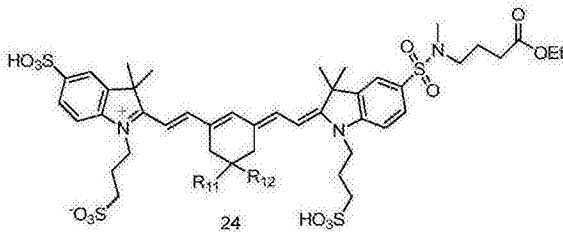
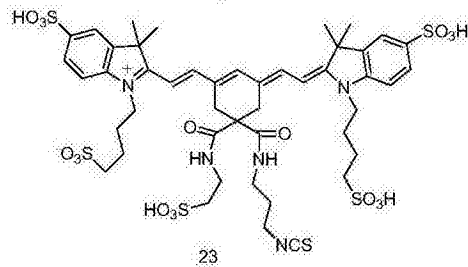
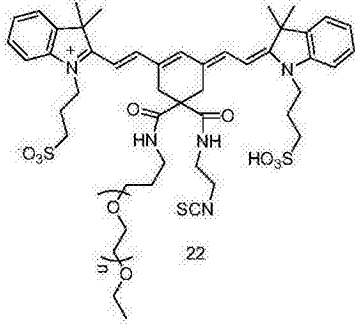
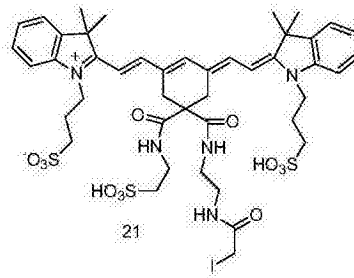
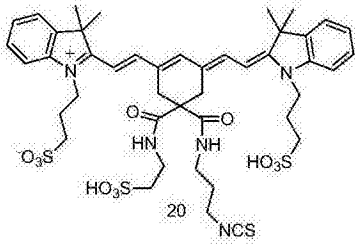
[0190]



[0191]

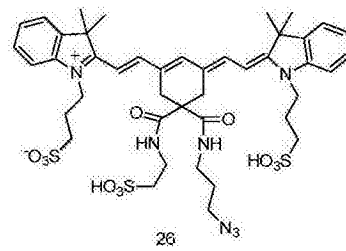
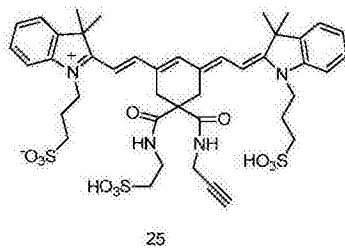


[0192]



[0193] R_{11} 和 R_{12} 独立地是:COOH、CONHR、CN、 $O=C-$ 苯基、 $COCH_2R$, 其中 $R=H$ 或 $(CH_2)_n$, $(CH_2)_nCOOR'$ 或 $(CH_2)_nCH_3$ 或 $(CH_2)_nSO_3H$ 或 $(CH_2)_nSO_3$, 其中 R' = 烷基或芳基

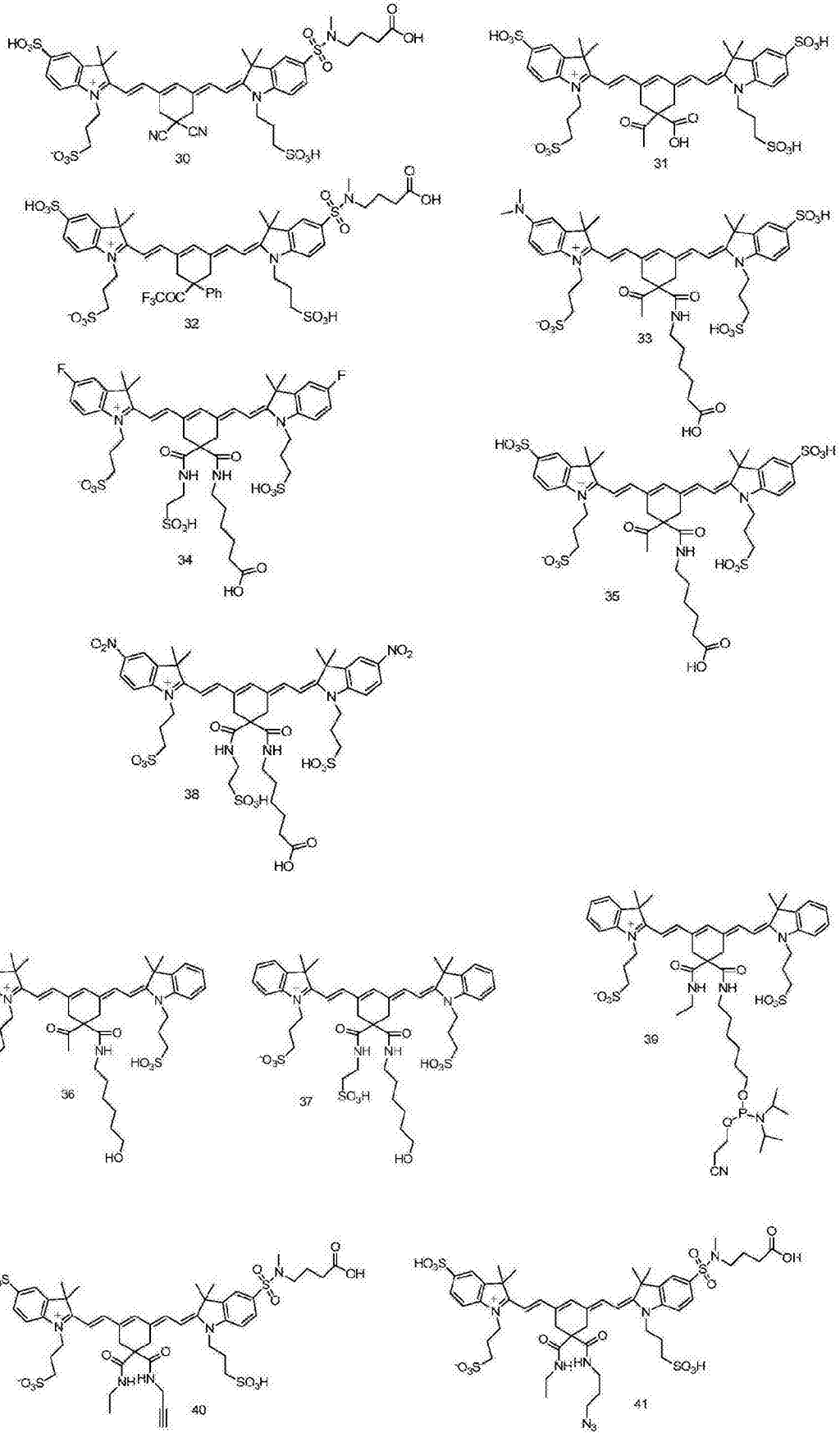
[0194]



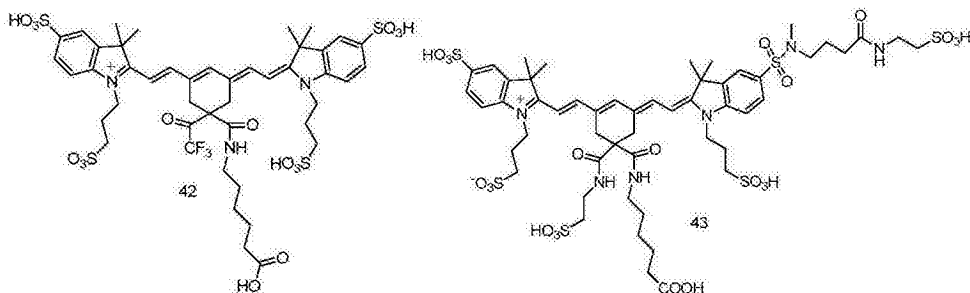
[0195]

<p>28</p>	X3 和/或 X4		<p>29</p>	
	28A	H		29A
	28B	Cl		29B
	28C	Br		29C
	28D	F		29D
	28E	I		29E
	28F	SO ₃ H		29F
	28G	COOH		29G

[0196]

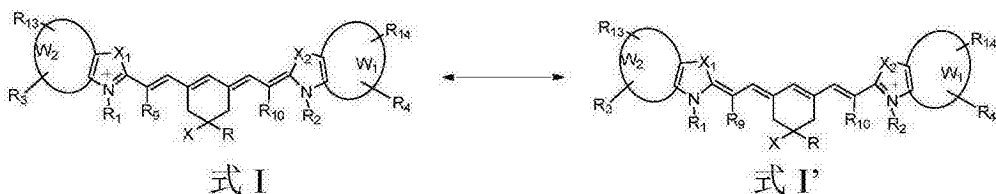


[0197]



[0198] 当本发明的化合物在本文中通过指示环和聚甲炔桥中双键位置的结构图示时,应该理解,该结构也包含任意的共振结构,例如,如下图所示:

[0199]

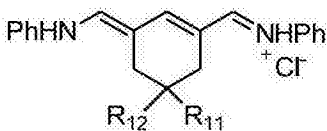


[0200] 其中,在每个上述结构中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 W_1 、 W_2 、 X_1 、 X_2 和 X_3 如本文中定义。

[0201] 通常地,本文中公开的化合物可以如下述合成。首先,制备季胺化的杂环 Z^1 。然后,该杂环碱与聚甲炔桥 (PMB) 反应,该聚甲炔桥是亲电子试剂,诸如 $\text{PhNH-PMB-CH=NPh} \cdot \text{HCl}$ 、或者 RO-PMB-CH(OR)_2 , 其中 PMB 由包括作为链的一部分的 4, 4'-二取代环己基桥接组成部分的共轭双键链 $(\text{CH}=\text{CH})_n-$ 构成,并且其中 Ph 是苯环以及 R 是甲基或乙基基团,从而获得半花菁,诸如 $Z^1\text{-PMB-CH=NPh}$ 或者 $Z^1\text{-PMB-CH=NAcPh}$ (其中 Ac 是乙酰基自由基) 或者 $Z^1\text{-(CH}=\text{CH)}_n\text{-OR}$ 。然后将这些中间体与不同的季铵化杂环 Z^2 反应。官能化的侧臂接附于第一 (Z^1) 或第二 (Z^2) 季铵化杂环。最终结果是非对称聚甲炔标记试剂, $Z^1\text{-PMB-}Z^2$ 。半花菁中间体的实例在 F. M. Hamer, "Some Unsymmetrical Pentamethincyanine Dyes and their Tetramethin Intermediates", J. Chem. Soc., 32(1949) 和 R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, Swati R. Mujumdar, C. J. Lewis, and A. S. Waggoner, "Cyanine Dye Labelling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters", Bioconjugate Chemistry, 4, 105, (1993) 中描述。

[0202] 在另一个方面,本发明提供了下列结构通式 V 的化合物

[0203]



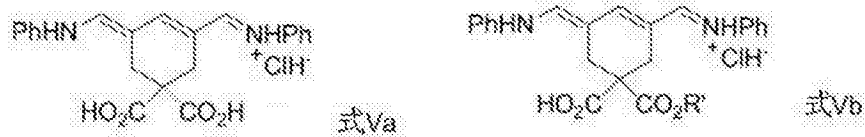
式 V

[0204] 其中 R_{11} 和 R_{12} 独立地是: COOH 、 CONHR 、 CF_3 、卤素、 CN 、 $\text{O}=\text{C}$ -苯基、 COCH_2R , 其中 $\text{R}=\text{H}$ 或 $(\text{CH}_2)_n\text{OR}$ 、 $(\text{CH}_2)_n\text{COOR}'$ 或 $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 或 $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ 或 $(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3$, 其中 R' = 烷基或芳基; Ph 是苯基基团,其可选择地被以下之一取代: F 、 Cl 、 Br 、 I 、 OMe 、 NMe_2 、 NO_2 、 CN 、 CF_3 、烷基。

[0205] 在某些其他实施方式中,意欲包含由式 45a 和 45b 表示的下列结构,其中 R' 是烷

基或芳基

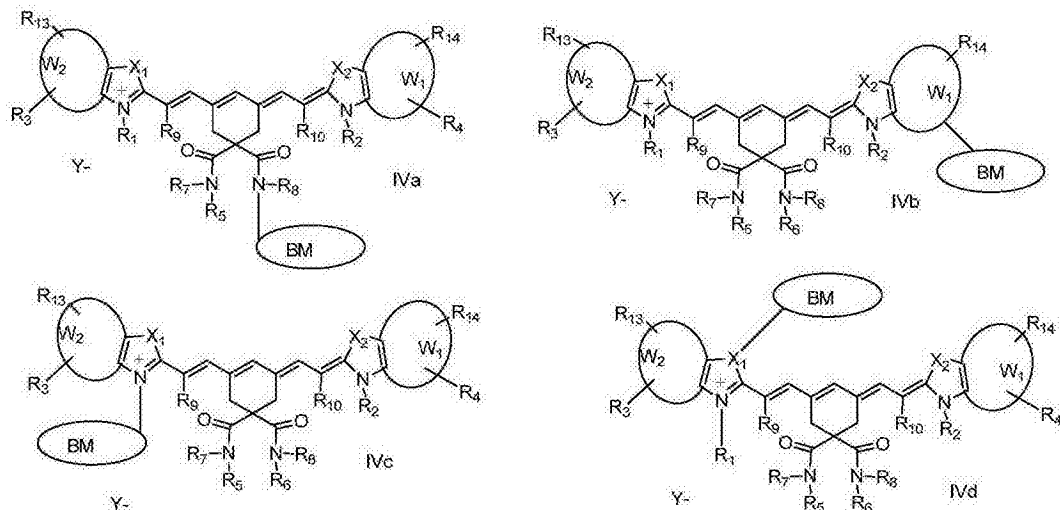
[0206]



[0207] 在某些实施方式中,本发明的化合物可以化学连接至生物学分子或生物分子(BM),如式 III-[BM]_n-F_m所示,其中 BM 是生物分子,F 是由式 1a、1b 或 1c(如上所述)表示的荧光团,并且 n = 1 至 4;m = 1 至 100。例如由于生物分子与目标之间的相互作用,例如通过受体-配体相互作用、酶-底物相互作用或抗体-抗原相互作用等,所得化合物-生物分子缀合体可以具有与目标的高结合亲和性。在其他实施方式中,通式 [Z¹-(PMB)-Z²]-BM 这样的化学连接的化合物,可以由例如以下表示:

[0208] 接附有生物分子的荧光团

[0209]



[0210] 其中,在每个上述结构中,R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、R₁₃、R₁₄、W₁、W₂、X₁、X₂和 X₃如本文中定义,Y 是平衡离子,并且 BM 是生物分子。前述结构是示例性的,并且应该理解,生物分子(BM)能够通过任意一个以上确定为 R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₀、R₁₃、R₁₄、W₁、W₂、X₁、X₂和 X₃的基团,化学连接至这样的化合物。

[0211] 本发明的另一个方面提供了一种缀合化合物,该缀合化合物通过生物分子与本文中描述的化合物反应而形成,该化合物诸如式 I-A、I-B、I-C、I-D 或 II 的化合物。

[0212] 本发明的另一个方面提供了一种缀合化合物,该缀合化合物是进一步用由 -L-BM 定义的 1 个、2 个或 3 个基团取代本文中描述的化合物(诸如式 I-A、I-B、I-C、I-D 或 II 的化合物);其中 L 是键或连接物,并且 -BM 是生物分子的自由基。

[0213] 化合物能够用生物分子或细胞如下标记。本发明的化合物(荧光染料)与一种以上各种浓度的生物分子在从约 4°C 至约 37°C 的温度下培养从约 5 分钟至 24 小时以上。在培养之后,可以使用本领域技术人员已知的方法,诸如例如色谱法或超滤法,去除游离的荧光染料或未化学连接至生物分子的荧光染料。

[0214] 在培养之后,可以离心细胞从而生成上清液从其中除去的细胞聚合体。可以在培养基或生理盐水中重新悬浮细胞,从而洗脱残留物、未结合的或游离的荧光染料。可以重复

数次。以此方式,可以通过直接缀合至内部或外部细胞分子,或者通过摄取非特异性细胞到各种细胞内结构来标记细胞,各种细胞内结构包括但不限于胞质液、胞内体、细胞核、高尔基体和其他细胞内的细胞器。

[0215] 公开的化合物和 / 或组合物可以包装成试剂盒,该试剂盒可以可选择地包括使用化合物的说明书。非限定性实施例包括,包含例如用于体内和 / 或体外应用的粉末或冻干形式的组合物以及包括重建、剂量信息和储存信息的使用说明的试剂盒。试剂盒可以可选择地包含处于可供使用的液体形式的组合物、或者需要进一步与溶液混合以给予的组合物的容器,诸如用于重建粉末形式的药水瓶、用于注射的注射器、定制 IV 递送系统、吸入器等。这样的容器可以包含单个或多个对象剂量。另外,试剂盒可以包含辅助组合物的体内或体外检测的组件,例如专用内窥镜、滤光器。

[0216] 本文中公开的化合物包括那些化学连接至生物分子、能够制剂成适宜向例如动物或人类对象的对象给予的药物组合物的化合物。因此,剂型包括化合物与适合所需的给予形式和 / 或剂量的生理上可接受的载体。生理上可接受的载体可以包括水、盐水,并且还可以包括诸如缓冲剂的试剂,以及其他试剂,诸如用于药物剂型中的相容的防腐剂。优选的载体是流体,优选为液体,更优选为水溶液;然而,固体剂型、局部剂型、吸入剂型、眼用剂型和经皮剂型的载体也意欲包含在本发明的范围内。

[0217] 另外,药物组合物可以在生理上可接受的载体中包括一种以上稳定剂。适合用于这样的组合物中的稳定剂的实例包括例如低分子量碳水化合物,例如诸如山梨醇的直线型多元醇,以及甘油。也可以使用其他低分子量碳水化合物,诸如肌醇。

[0218] 希望的是,本发明的化合物能够口服或非肠道给予。对于非肠道给予,化合物可以静脉内给予、肌肉内给予、皮肤给予、经皮给予、皮下给予、直肠给予、鼻部给予、阴道给予及眼部给予。因此,化合物可以处于如固体片剂、胶囊、丸剂、包括冻干粉的粉末、胶体悬浮剂、微球、脂质体颗粒、悬浮剂、乳化剂、溶剂、包括水凝胶的凝胶、糊剂、药膏、乳膏、硬膏、灌洗液、灌服剂、渗透递送装置、栓剂、灌肠剂、注射剂、植入物、喷剂或气雾剂。药物组合物可以根据传统药学实践来制剂(参见,例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, 2000, ed. A. R. Gerardo, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 以及 Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York)。

[0219] III. 本发明的荧光染料化合物的应用

[0220] 本发明的化合物可以用于各种体内和体外应用。这些应用在以下部分中讨论。

[0221] (a) 体内应用

[0222] 本发明提供了新颖的荧光化合物,该荧光化合物可以用于各种成像应用,例如光学成像应用。关于光学成像技术的综述,参见如 Alfano et al., Ann. NY Acad. Sci. 820:248-270, 1997; Weissleder, Nature Biotechnology 19, 316-317 (2001); Ntziachristos et al., Eur. Radiol. 13:195-208 (2003); Graves et al., Curr. Mol. Med. 4:419-430 (2004); Citrin et al., Expert Rev. Anticancer Ther. 4:857-864 (2004); Ntziachristos, Ann. Rev. Biomed. Eng. 8:1-33 (2006); Koo et al., Cell Oncol. 28:127-139 (2006); 以及 Rao et al., Curr. Opin. Biotechnol. 18:17-25 (2007)。

[0223] 本发明的实践中有用的成像系统通常包括三个基本组件:(1) 用于激发本发明的

荧光染料化合物的合适的光源, (2) 用于分离或区分从用于诱导荧光染料激发的光的发射的系统, 以及 (3) 检测系统。此检测系统可以是手持的或者整合于其他有用的成像仪器, 诸如内窥镜、导管、术中显微镜和 / 或观察镜。

[0224] 优选地, 光源提供单色 (或大体上单色) 光。光源可以是适当过滤的白光, 即源自宽带光源的带通光。例如, 源自 150 瓦卤素灯的光可以穿过适合的带通滤光器, 该带通滤光器是可从 Omega Optical (Brattleboro, VT) 商购的。取决于系统, 光源可以是激光。参见, 如 Boas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4887-4891, 1994; Ntziachristos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:2767-2772, 2000; 以及 Alexander, J. Clin. Laser Med. Surg. 9:416-418, 1991。可以在例如 Imaging Diagnostic Systems, Inc., Plantation, FL 以及各种其他来源找到用于成像的激光的信息。高通或带通滤光器可以用于从激发光分离光学发射。适合的高通或带通滤光器是从可 Omega Optical, Burlington, VT 商购的。

[0225] 一般来说, 光检测系统可以视为包括光采集 / 图像形成组件和光检测 / 图像记录组件。尽管光检测系统可以是整合了两个组件的单一集成设备, 但是单独讨论光采集 / 图像形成组件和光检测 / 图像记录组件。

[0226] 一个特别有用的光采集 / 图像形成组件是内窥镜。可以在本发明的实践中应用已经用于多组织和器官的体内光学成像的内窥镜设备和技术, 所述多组织和器官包括腹膜 (Gahlen et al., J. Photochem. Photobiol. B 52:131-135, 1999)、卵巢癌 (Major et al., Gynecol. Oncol. 66:122-132, 1997)、结肠和直肠 (Mycek et al., Gastrointest. Endosc. 48:390-394, 1998; 和 Stepp et al., Endoscopy 30:379-386, 1998)、胆管 (Izuishi et al., Hepatogastroenterology 46:804-807, 1999)、胃 (Abe et al., Endoscopy 32:281-286, 2000)、膀胱 (Kriegmair et al., Urol. Int. 63:27-31, 1999; 和 Riedl et al., J. Endourol. 13:755-759, 1999)、肺 (Hirsch et al., Clin Cancer Res 7:5-220, 2001)、脑 (Ward, J. Laser Appl. 10:224-228, 1998)、食道、以及头颈区域。

[0227] 其他类型的光采集组件是基于导管的装置, 包括光纤设备。这样的设备特别适合于血管内成像。参见, 例如 Tearney et al., Science 276:2037-2039, 1997; 和 Circulation 94:3013, 1996。

[0228] 还有其他成像技术能够与本发明的荧光染料化合物共同使用, 包括相控阵技术 (Boas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4887-4891, 1994; Chance, Ann. NY Acad. Sci. 838:29-45, 1998)、光学断层成像 (Cheng et al., Optics Express 3:118-123, 1998; 和 Siegel et al., Optics Express 4:287-298, 1999)、活体显微术 (Dellian et al., Br. J. Cancer 82:1513-1518, 2000; Monsky et al., Cancer Res. 59:4129-4135, 1999; 和 Fukumura et al., Cell 94:715-725, 1998)、共聚焦成像 (Korlach et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8461-8466, 1999; Rajadhyaksha et al., J. Invest. Dermatol. 104:946-952, 1995; 和 Gonzalez et al., J. Med. 30:337-356, 1999) 以及荧光分子断层成像 (FMT) (Ntziachristos et al., Nature Medicine 8:757-760, 2002; 美国专利号 6,615,063、PCT 申请号 WO 03/102558、和 PCT US/03/07579)。类似地, 荧光染料化合物可以用于各种成像系统, 例如 [1] **IVIS®** Imaging Systems:100 Series, 200 Series (Xenogen, Alameda, CA), [2] **SPECTRUM** and **LUMINA** (Xenogen, Alameda, CA), [3] the **SoftScan®** or the **eXplore Optix™** (GE Healthcare, United Kingdom), [4]

Maestro™ and Nuance™-2 Systems (CRi, Woburn, MA), [5] Image Station In-Vivo FX from Carestream Molecular Imaging, Rochester, NY (formerly Kodak Molecular Imaging Systems), [6] OV100, IV100 (Olympus Corporation, Japan), [7] Cellvizio Mauna Kea Technologies, France) [8] NanoSPECT/CT or HiSPECT (Bioscan, Washington, DC), [9] CTLM® or LILATM (Imaging Diagnostic Systems, Plantation, FL), [10] DYNOTTM (NIRx Medical Technologies, Glen Head, NY) 和 [11] NightOWL Imaging Systems by Berthold Technologies, Germany.

[0229] 各种光检测 / 图像记录组件, 如电荷藕合器件 (CCD) 系统或感光胶片, 可以用于这样的系统。光检测 / 图像记录的选择取决于包括使用的光收集 / 图像形成组件的类型在内的因素。然而, 应该理解, 选择合适的组件、将它们组装成光学成像系统、以及系统的操作是本领域的普通技术。

[0230] 光学成像和测量技术包括但不限于荧光成像、发光成像、内窥镜术、荧光内窥镜术、光学相干断层成像术、透射成像、时间分辨透射成像、共聚焦成像、非线性显微术、光声成像; 声光成像; 光谱术、反射光谱术、活体成像、双光子成像、干涉测量术、相干干涉测量术、扩散光学断层成像术和荧光分子断层成像术。

[0231] 希望的是, 注射的荧光染料化合物能够偶联至或合并于例如颗粒的固体支持物内。因此, 应该理解, 荧光染料化合物能够偶联至具有磁性的金属氧化物纳米颗粒, 从而产生还能发出荧光的颗粒。由此, 产生的颗粒还能够使用本领域已知的技术, 用于 MRI 成像。关于 MRI 技术的综述, 参见 Westbrook, Handbook of MRI Technique, 2nd Edition, 1999, Blackwell Science。可能的是, 例如, 通过荧光分子断层成像和通过磁共振成像获得的图像可以彼此配准或融合, 从而提供关于成像物体的附加信息。另外, 多模态成像系统 (即, 组合的光学和 MR 成像系统) 可以用于生产组合的光学 MR 图像。

[0232] 另外, 本发明的组合物和方法能够与其他成像组合物和方法组合使用。例如, 本发明的荧光染料化合物可以通过光学成像流程单独地或与其他传统成像模式诸如 X- 射线、计算机断层扫描 (CT)、MR 成像、超声、正电子发射断层扫描 (PET) 和单光子计算机断层扫描 (SPECT) 组合地对感兴趣的区域进行成像。例如, 本发明的组合物和方法可以与 CT 或 MRI 组合使用, 以通过例如与由另一种成像模式产生的图像配准的方法, 同时获得解剖学和分子信息两者。本发明的组合物和方法也可以与 X- 射线、CT、PET、超声、SPECT、MR 以及其他光学造影剂组合使用, 或者可替代地, 本发明的荧光染料化合物还可以包括成像剂诸如碘、钆原子和放射性同位素, 其可以通过使用 CT、PET、SPECT 和 MR 成像模式与光学成像的组合来检测。

[0233] 体内光学成像的示例性的方法包括如下步骤: (a) 向对象, 例如人或动物, 给予本发明的荧光化合物; (b) 给予足够的时间, 使荧光染料化合物在对象体内分布或者与生物目标接触或相互作用; (c) 将对象暴露于例如具有可以被荧光染料化合物吸收的波长的光的电磁辐射下; 并且 (d) 检测由荧光染料化合物发射的光学信号。

[0234] 应该理解, 对象可以是脊椎动物, 例如包括人的哺乳动物。动物也可以是无脊椎动物 (如秀丽隐杆线虫、果蝇或其他模式研究生物等)。生物目标可以包括但不限于细胞、细胞培养物、组织、组织切片、器官、器官切片、细胞离心样品、蛋白质、核酸、碳水化合物或脂质等。

[0235] 包括例如步骤 (a)-(d) 的前述步骤可以按预定时间间隔重复,从而允许在对象体内随时间评估荧光化合物的发射信号。可以使用平面成像系统、内窥镜、导管、断层成像系统、手持光学成像系统、护目镜或者术中显微镜来进行光照和检测步骤(相应为步骤(c)和(d))。由荧光染料化合物发射的信号能够用于构建图像,例如断层成像图。

[0236] 在这些步骤之前或当中,检测系统可以环绕对象(例如,动物或人)或在对象周围布置,以检测对象发射的光学和/或其他信号(如,MR、原子核、X-射线)。发射的光学和/或其他信号可以进行处理以构建图像,例如断层成像图或平面图像。另外,处理的信号可以单独显示为图像或者显示为融合(组合的)图像。

[0237] 另外,可以实行同时选择性地检测并成像一个以上成像剂的体内成像方法。例如,在这样的方法中,在上述步骤(a)中,向对象同时或依次给予信号性质可相互区分的两种以上成像剂,其中至少一种成像剂包含本发明的荧光染料化合物。多个试剂的使用允许了多个生物过程、功能或目标的记录。

[0238] 本发明还以向对象给予标记细胞的体内成像方法为特征。细胞可以在体外用荧光染料化合物标记。细胞可以直接源自对象或者来自其他来源(如来自其他对象、细胞培养物等)。荧光染料化合物可以与细胞混合,从而有效地标记细胞,并且在步骤(a)中向对象给予所得细胞。然后步骤(b)-(d)如以上描述地随后进行。此方法可以用于监控特定细胞类型的运输和定位,包括T细胞、肿瘤细胞、免疫细胞和干细胞,以及其他细胞类型。特别地,此方法可以用于监控基于细胞的疗法。

[0239] 应该理解,荧光染料化合物的剂型、给予模式的选择、向对象给予该染料化合物的剂量、以及荧光染料化合物的给予和暴露于光(以及如果在情况下适当的话,还有其他形式的电磁辐射)之间的时间,在本领域技术人员的水平之内。

[0240] 本发明的方法能够用于判定标记的数量,包括随时间地追踪荧光染料化合物在对象体内的定位,或者评估荧光染料化合物在对象体内随时间的代谢和/或排泄的变化或改变。方法也能够用于通过成像由疗法调节的分子事件和生物通道,跟踪用于某些疾病的疗法,包括但不限于判定有效性、优化时机、优化剂量水平(包括个体病人或试验对象)、以及疗法的组合的协同效果。

[0241] 本发明的方法和组合物也能够用于帮助内科医生或外科医生鉴定和表征诸如关节炎、癌症以及特别是结肠息肉、或者脆弱的或不稳定的斑块的疾病区域,以用于区分患病组织和正常组织,诸如检测如脑手术中使用普通操作显微镜难以检测的肿瘤边缘;用于帮助决定治疗或手术干预,例如通过判定病变是癌性的并应该去除还是非癌性的并保持不变,或者用于疾病的手术分期中,如术中淋巴结分期、前哨淋巴结定位;或者用于评估术中出血;或者用于描绘肿瘤边缘。

[0242] 本发明的方法和组合物也可以用于检测、表征和/或判定疾病尤其是早期疾病的定位、疾病的严重性或疾病相关症状、疾病分期和/或监控疾病。发射信号的存在、缺失或水平可以表明疾病的状态。本发明的方法和组合物也可以用于监控和/或指导诸如手术程序的各种治疗干预,以及监控包括基于细胞的疗法的药物疗法。本发明的方法也可以用于疾病或疾病症状的预后。

[0243] 关于前述的各种疾病或疾病症状,可以检测或监控(治疗之前、当中或之后)的疾病或疾病症状的实例包括,例如炎症(如由例如风湿性关节炎的关节炎导致的炎症)、癌症

(如结肠癌、卵巢癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、睾丸癌、皮肤癌、脑癌、胃肠道癌、胰腺癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胃癌、白血病、口腔癌、食道癌、骨癌), 心血管疾病(如血管的动脉粥样硬化和炎症性症状、局部缺血、中风、血栓、弥散性静脉内凝血), 皮肤疾病(如卡波西氏肉瘤、牛皮癣、过敏性皮炎), 眼部疾病(如黄斑变性、糖尿病性视网膜病变), 感染疾病(如细菌、病毒、真菌和寄生虫感染, 包括获得性免疫缺陷综合症、疟疾、查加斯病、血吸虫病), 免疫疾病(如自身免疫紊乱、淋巴瘤、多发性硬化、风湿性关节炎、糖尿病、红斑狼疮、重症肌无力、格雷夫斯病), 中枢神经系统疾病(如神经变性疾病, 诸如帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、朊病毒病), 遗传疾病, 代谢疾病、环境性疾病(如铅、水银和放射性中毒、皮肤癌), 骨骼相关疾病(如骨质疏松、原发性和转移性骨肿瘤、骨关节炎), 神经变性疾病, 以及手术相关并发症(诸如移植排斥、器官排斥、伤口愈合的改变、纤维变性、或者其他与手术植入物相关的并发症)。

[0244] 因此, 本发明的方法和组合物可以用于例如判定肿瘤细胞的存在和 / 或定位、炎症的存在和 / 或定位, 包括例如在动脉粥样硬化或关节炎中的活化巨噬细胞的存在、血管疾病的存在及定位, 包括在冠状动脉和外周动脉中有急性栓塞的风险的区域(即易损斑块)、扩张动脉瘤的区域、颈动脉中的不稳定斑块以及缺血区。本发明公开的方法可以用于例如鉴定和评估细胞凋亡、坏死、缺氧和血管再生。可任选地, 公开的方法也可以用于通过例如在用治疗化合物或疗法治疗之前和之后对对象进行成像, 并且比较对应的图像, 来评估治疗化合物或疗法在特定分子目标上的效果。

[0245] (b) 体外应用

[0246] 另外, 可以理解, 荧光染料化合物也可以用于各种例如结合实验的体外试验, 和体外成像实验。应该理解, 前面部分中讨论的成像技术也可以应用于体外成像实验。

[0247] 示例性的体外成像方法包括:(a) 将包含本发明的荧光染料化合物的探针与样品接触;(b) 使荧光染料化合物(i) 被生物目标激活, 和 / 或(ii) 与生物目标结合;(c) 可选择地去除未激活及未结合的荧光染料化合物;(d) 将样品暴露于具有可以被荧光染料化合物吸收的波长的例如光的电磁辐射下;并且(e) 检测由荧光染料化合物发射的信号, 从而判定探针是否已经被生物目标激活或者已经被生物目标结合。

[0248] 样品可以是包含例如原代细胞、细胞培养物或组织的液体或固体样品。生物目标可以是例如细胞、细胞的聚集体、组织或组织样品、结构(超细胞级别(例如骨或组织)或亚细胞级别(例如线粒体或细胞核)两者)、以及细胞成分, 例如蛋白质(例如酶或结构蛋白)、脂质、核酸或多糖。

[0249] 荧光染料化合物可以用于各种体外配体结合试验, 诸如当合并入磁颗粒时, 可以用于基于磁检测的试验(参见美国专利号 6, 046, 585 和 6, 275, 031、美国专利号 5, 445, 970; 美国专利号 4, 219, 335, Chemla, et. al. (2000) Proc Natl Acad. Sci USA 97, 14268-72)。它们也可以用于基于磁共振的配体结合试验, 诸如在美国专利号 5, 164, 297 和 Perez et al. Nature Biotechnol. 2002, 20(8):816-20 中描述的那些。荧光染料化合物也可以用于细胞分选和计数应用。

[0250] 荧光染料化合物也可以在基于核酸的试验中作为报告基团使用。例如, 荧光染料化合物可以偶联至例如 DNA 或 RNA 的核酸、改性核酸、PNA、分子信标、或者其他核酸结合分子(例如小干扰 RNA 或 siRNA), 从而在杂交实验中使用, 例如原位杂交试验、测序反应、扩

增反应,例如实时聚合酶链反应扩增反应。例如,对于通过核酸杂交原理在样品中检测单链的核酸(即 mRNA、cDNA 或变性的双链 DNA),本发明的荧光染料化合物化学连接至单链核酸(探针),并与可选择地固定于固相支持物上的、怀疑包含一种以上单链核酸(目标核酸)的样品相接触。探针与样品在允许探针杂交至样品中的目标核酸的条件下培养,以形成双链。可以通过冲洗去除未结合的探针,并且可以检测结合的探针,其中探针中的荧光染料化合物发射的荧光的存在或水平是样品中目标核酸的存在或含量的指标。

[0251] (c) 离体应用

[0252] 另外,可以理解,荧光染料化合物也可以用于各种例如结合实验的离体试验,和离体成像实验。应该理解,前面部分中讨论的成像技术也可以应用于离体成像实验。

[0253] 示例性的离体成像方法包括:(a) 将包含本发明的荧光染料化合物的探针与样品接触;(b) 使荧光染料化合物(i) 被生物目标激活,和/或(ii) 与生物目标结合;(c) 可选择地,去除未激活及未结合的荧光染料化合物;(d) 将样品暴露于具有可以被荧光染料化合物吸收的波长的例如光的电磁辐射下;并且(e) 检测由荧光染料化合物发射的信号,从而判定探针是否已经被生物目标激活或者已经被生物目标结合。

[0254] 样品可以是包含例如原代细胞(primary cell)、细胞培养物或组织的液体或固体样品。生物目标可以是例如细胞、细胞的聚集体、组织或组织样品、结构(超细胞级别(例如骨器官或组织)或亚细胞级别(例如线粒体或细胞核)两者)、以及细胞成分,例如蛋白质(例如酶或结构蛋白)、脂质、核酸或多糖。

[0255] 现在将通过以下实施例的方式阐述本发明,实施例仅以阐述的目的给出,并且无意限制本发明的范围。

[0256] 实施例

[0257] 以下描述可以用于制备本发明的化合物的代表性材料和方法。所有化学品和溶剂(试剂级)以其商购时的状态使用,一般没有进一步纯化。分析和制备 HPLC 方法包括:

[0258] A 色谱柱:Agilent Zorbax 80Å, Extend C18, 4.6x 250mm(5 μm)。

[0259] 流动相:乙腈,25mM 三乙铵乙酸酯。

[0260] B 色谱柱:Varian Dynamax, 100Å, C18, 4.1.4x 250mm。

[0261] 流动相:乙腈,25mM 三乙铵乙酸酯。

[0262] C 色谱柱:Phenomenex Jupiter, 300Å, C18

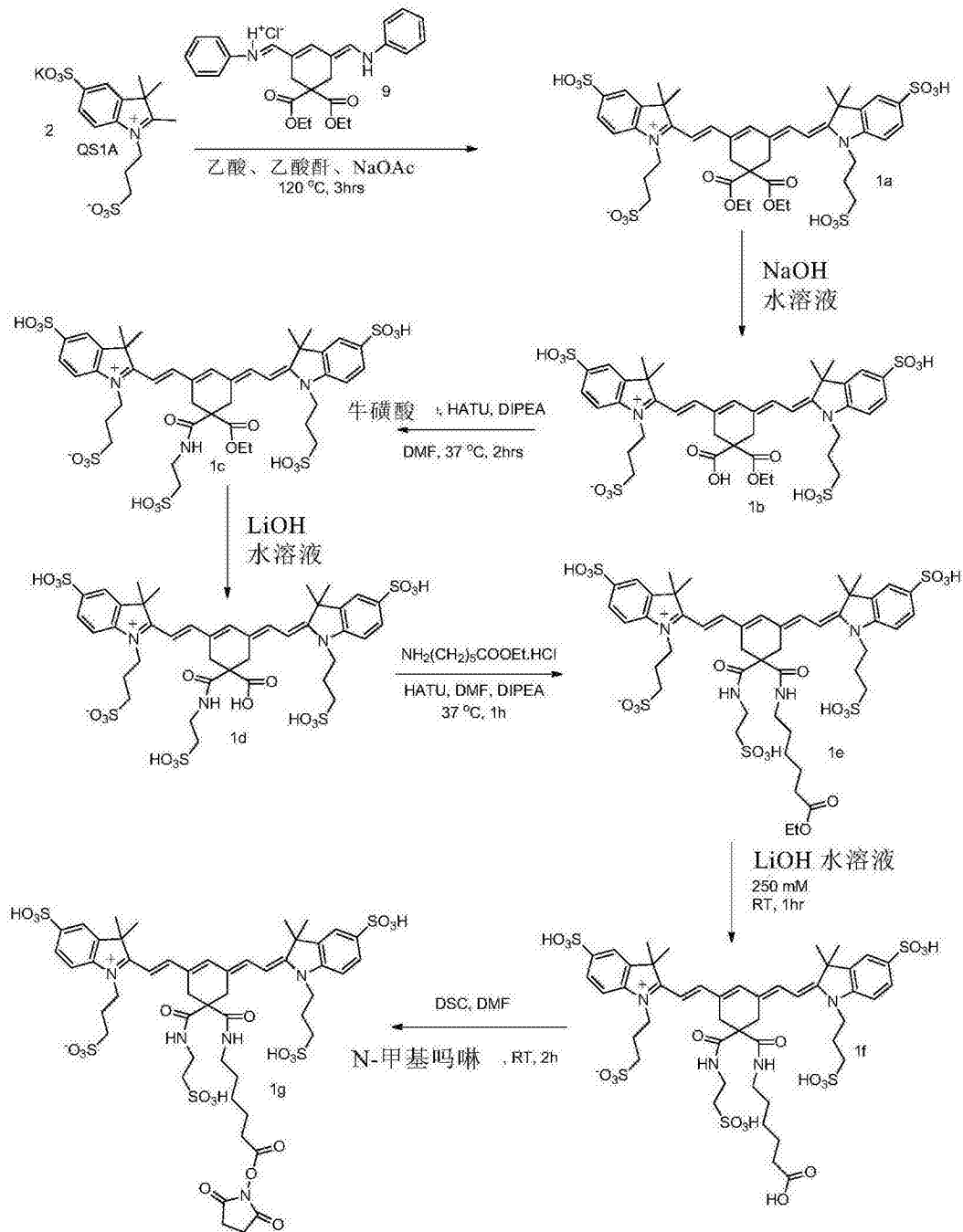
[0263] 流动相:乙腈,25mM 三乙铵乙酸酯。

[0264] 实施例 1- 化合物 1g 的合成

[0265] 作为式 1 的反应性 N- 羟基琥珀酰亚胺基酯 (NHSE) 的化合物 1g 的合成,通过以下方案 3A 中图示的多步合成步骤来完成。

[0266] 方案 3A. 对称亚吡啶亲水性染料的合成

[0267]



[0268] QS1A 的制备 :5- 磺酸基 -2, 3, 3- 三甲基亚吡啶的钾盐 (1) 从 Syntharo Fine Chemicals, Germany 获得。通过在 120 °C 油浴下的 100mL 圆底烧瓶中加热 8 小时并不断的电磁搅拌, 将在 110 °C 烘箱中干燥至少 3 小时的 10g 亚吡啶 (化合物 1) 与 1.5 当量的 1, 3- 丙烷磺内酯 (TCI America) 在 10mL 的 N- 甲基吡咯烷酮 (Aldrich) 中反应。黄色的反应混合物变为深紫色, 并且产物从溶液中沉淀出。在冷却至室温后, 向反应混合物 (RM) 中加入乙酸乙酯, 并超声 5 分钟。过滤沉淀物, 用 ~ 100mL 的 90% -10% 乙酸乙酯 (EA) - 甲醇混合物冲洗三次, 并且然后在真空下干燥 4 小时。以 90% 产率获得的季铵盐 QS1A 通过 LCMS 表征 (计算的 m/e :361 (作为自由磺酸); 测得值 :361 (M+1))。

[0269] Bisani 9 的制备 :通过依照 Deroover et. al 在美国专利 5876915 (1999 年 3 月 2 日) 中描述的流程, 以下列方案中所示的三个步骤制备化合物 9。中间产物 A 和 B 通过蒸

[0278] 1g 的制备:向 5mg 干燥的化合物 1f 中加入二琥珀酰亚胺基二碳酸酯 (10mg), 并且加入 250 μ L 干燥的 DMF, 随后加入 5 μ L N- 甲基吗啉。通过与丁胺的试反应并通过 HPLC-LCMS 分析, 发现 NHSE 酯形成在约 2 小时内完成。NHSE 通过在乙酸乙酯中沉淀分离, 并且在加速真空浓缩仪干燥 60 分钟。

[0279] 以上描述的化合物 1a 至 1g 的步骤, 用于方案 3B 至 3S 合成的化合物。

[0280] 用于制备季铵盐的通用步骤

[0281] 通过将杂环 (5mmol) 与 1, 3- 丙烷磺内酯 (7. 5mmol) 在 1, 2- 二氯苯或 N- 甲基吡咯烷酮中如方案中指示反应, 并且在 120 $^{\circ}$ C 加热并搅拌 8 小时, 制备了吡啶、苯并吡啶、苯并噁唑和苯并噻唑的 N- (丙烷 -3- 磺酸) 季铵盐 (化合物 2-5 和 10)。产物总是形成为固体并且通过过滤分离, 并用合适的有机溶剂混合物 (己烷随后用乙酸乙酯, 或者乙酸乙酯) 冲洗。产物通过 LCMS 表征。

[0282] 类似地, 通过将杂环 (5mmol) 与碘乙烷 (15mmol) 在 1, 2- 二氯苯或 N- 甲基吡咯烷酮中如方案中指示反应, 并且在压力管中在 120 $^{\circ}$ C 加热并搅拌 8 小时, 制备了化合物 1-5 和 10 的 N- 乙基季铵盐。产物总是形成为固体并且通过过滤分离, 并用合适的有机溶剂混合物冲洗。对于涉及 1, 2- 二氯苯的反应, 使用己烷随后用乙酸乙酯, 并且对于涉及 N- 甲基吡咯烷酮的反应, 仅使用乙酸乙酯。产物全部通过 LCMS 表征。

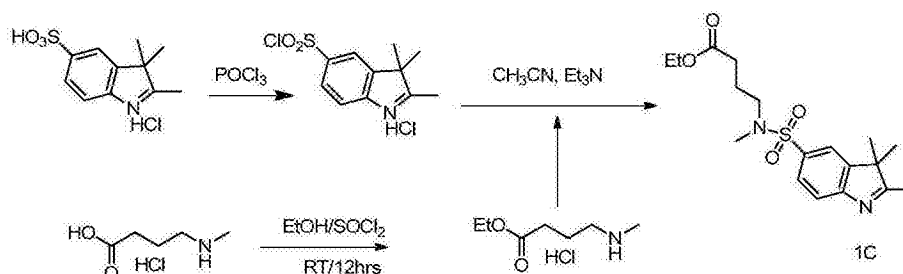
[0283] 依照上述用于化合物 1a 至 1g 的步骤, 进行合成方案 3B、3C、3D、3E、3F、3G、3H、3I 和 3J 中图示的化合物的合成。

[0284] 实施例 2- 不对称染料的合成

[0285] QS1C 的制备:

[0286] 方案 3K-1

[0287]



[0288] 将 10mmol 化合物 1 (作为酸) 与 10mL POCl₃ 加热回流 2 小时。向冷却的反应混合物中加入 25mL 正己烷, 并将有机上清液安全地弃去。将粘性固体在真空下旋转蒸发数小时, 以去除残留的三氯氧磷。磺酰氯原样用于接下来的步骤。产率: 99%。

[0289] 通过将 50mmol 4- (N- 甲基) - 胺基丁酸盐溶解于 100mL 纯乙醇, 并在室温下小心地加入亚硫酸氯 (55mmol) 并强烈搅拌, 将 4- (N- 甲基) - 胺基丁酸盐转化为乙醇酯。使反应在室温下进行超过 12 小时。将氮气通入反应烧瓶, 并且向溶液气泡地鼓入 10 分钟。通过旋转蒸发去除溶剂, 并且将所得白色固体在高真空下干燥 12 小时。

[0290] 将上面获得的 (4- (N- 甲基)) - 胺基丁酸乙基酯盐酸盐溶解于 100mL 干燥的乙腈中, 并且冷却至 5 $^{\circ}$ C。加入 10 倍过量的三乙胺, 并强烈搅拌。将磺酰氯溶于 30mL 乙腈中, 并且在 10 分钟的过程中将其缓慢加入搅拌的溶液中, 期间溶液变黄。反应在 30 分钟内完成, 并且使其变热至室温。过滤去除白色的三乙胺盐酸盐, 并且用冷的乙腈冲洗。浓缩滤液, 并

且在硅凝胶上使用 3% ACN-94% CH₂Cl₂-3% TEA 混合物来洗脱色谱分析残留物。当使用的洗脱液为 5% ACN-92% CH₂Cl₂-3% TEA 时,洗脱产物 1C。产物通过 LCMS 表征。产率 :75%。

[0291] 使用 1,2-二氯苯作为溶剂,通过按照合成季铵盐的通用步骤,将化合物 1C 转化为季铵盐 QS1C。产率 :75%

[0292] 合成不对称染料的通用步骤 :在涉及使用衍生自两个不同杂环的两个不同的季铵盐的不对称染料的方案中,依照所述用于化合物 1a 的除 bisanil(化合物 9) 之外的步骤,两个季铵盐各自以等摩尔的量使用。其余一切保持大体上相同。

[0293] 实施例 3- 化合物 1b 与 BSA 的缀合

[0294] 将 3mg BSA(44.4nmol) 溶解于 1.5mL 0.4M 的 pH 为 5.3 的 MES 缓冲液,并且加入 450nmol(45uL, 10mM) 的化合物 1b 的水溶液,随后加入 25mg EDC。将混合物在 37°C 保存过夜(18 小时)。将反应混合物用 5mL 水稀释,并用截留分子量 30kD 的 Amicon Ultra-4, PLTK Ultacel-PL 过滤膜,在 2000rpm 的离心下过滤 30 分钟。产物用 1x PBS 缓冲液冲洗几次,直至滤液无色。将浓缩产物定量,并且用下式判定染料 / 蛋白质比例 :

$$[0295] \quad A_{\text{dye}} \epsilon_p / (A_{278} - c\% A_{\text{dye}}) \epsilon_{\text{dye}}$$

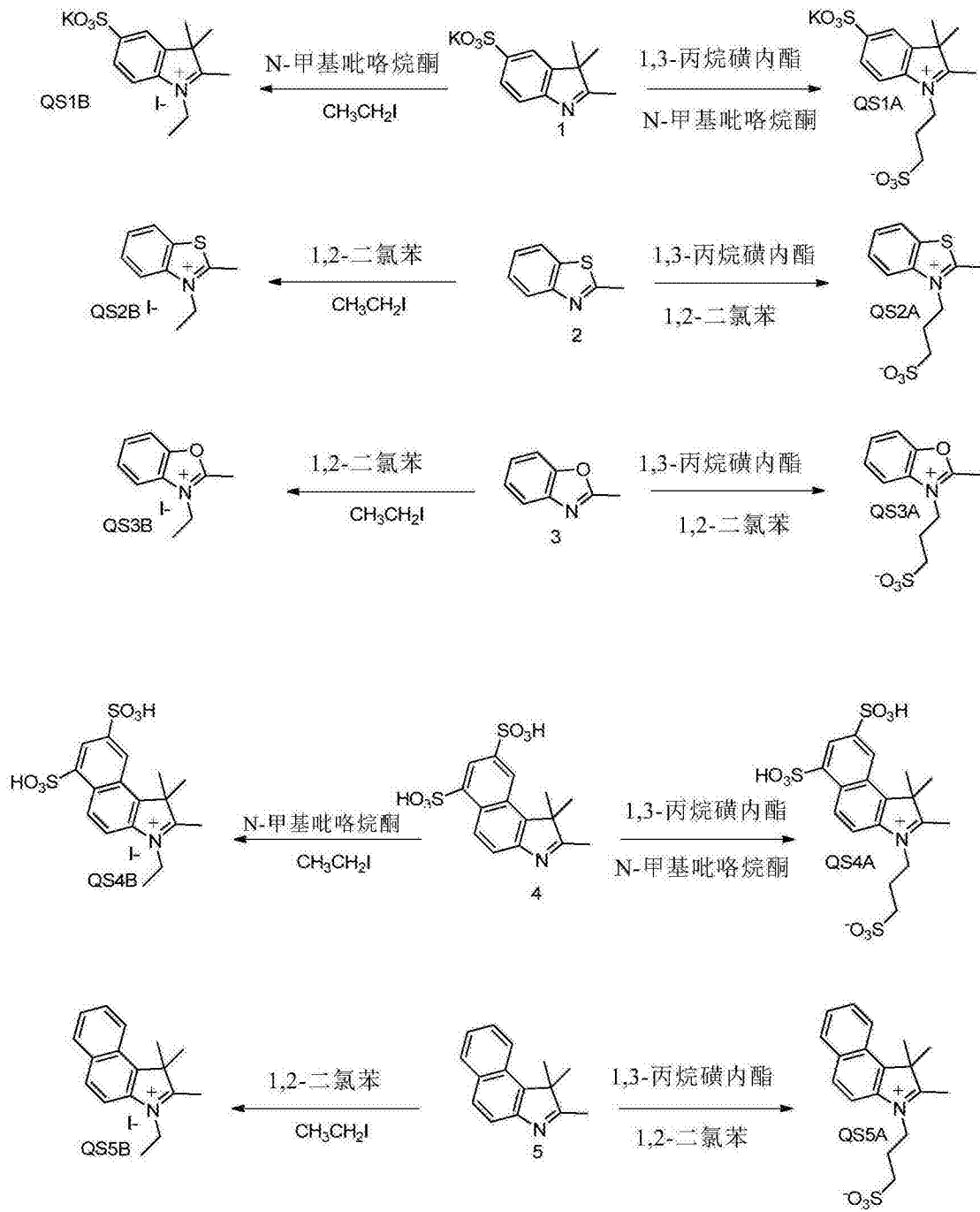
[0296] 其中, A_{dye} 是染料在 750nm 的吸收度, ϵ_p 是蛋白质 (BSA, 43824) 的消光系数, A_{278} 是蛋白质在 278nm 的吸收度, $c\% A_{\text{dye}}$ 是染料在 278nm 的吸收度相对于其在 λ_{max} 750nm(4%) 的吸收度的 % 吸收度, 并且 ϵ_{dye} 是染料的消光系数 (240,000, 1x PBS 中)。产物也由 MALDI(Tuft's University Core Facility, Boston) 表征, 并且染料的数量判定为每个 BSA8.7 个。化合物 1b 缀合于 BSA 的荧光和吸收判定的结果图示于图 1 中。

[0297] 方案

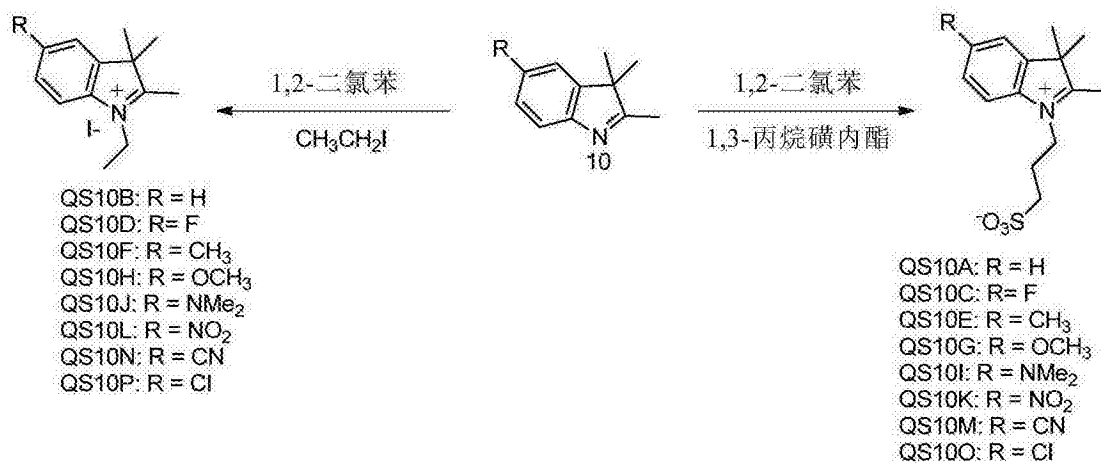
[0298] 关于季铵盐的合成的方案 1、关于作为希夫碱的 4,4-二取代环己基二醛的合成的方案 2 和 2A、以及关于各式的染料的合成的 3B 至 3T 在以下各页中示出。

[0299] 方案 1. 季铵盐的制备

[0300]

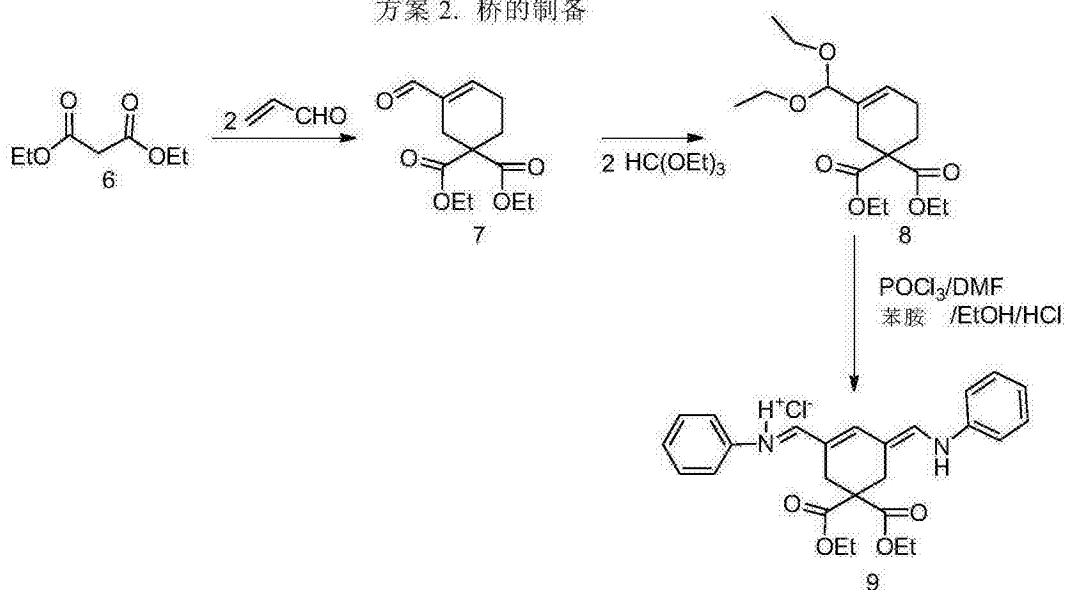


[0301]



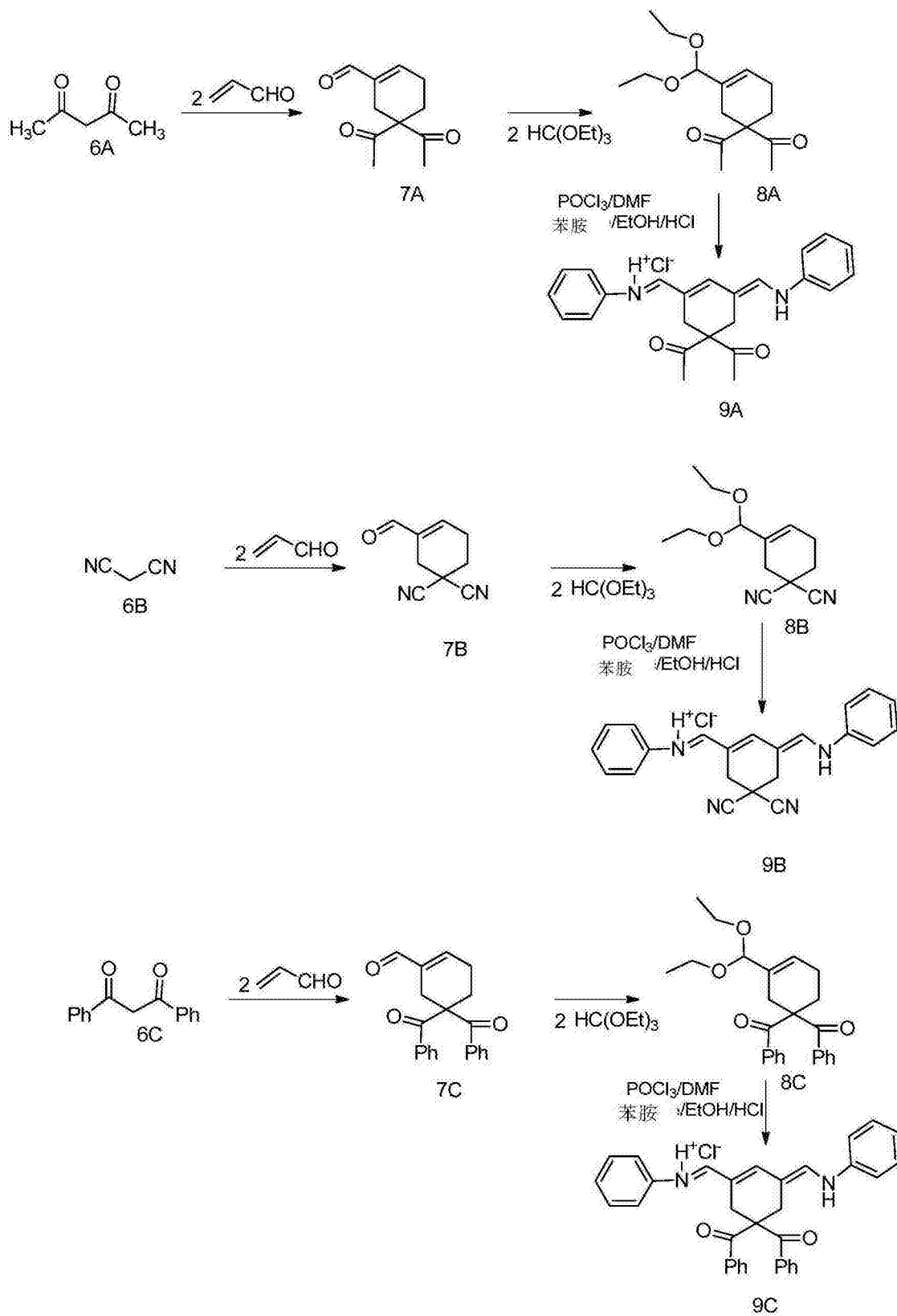
[0302]

方案 2. 桥的制备

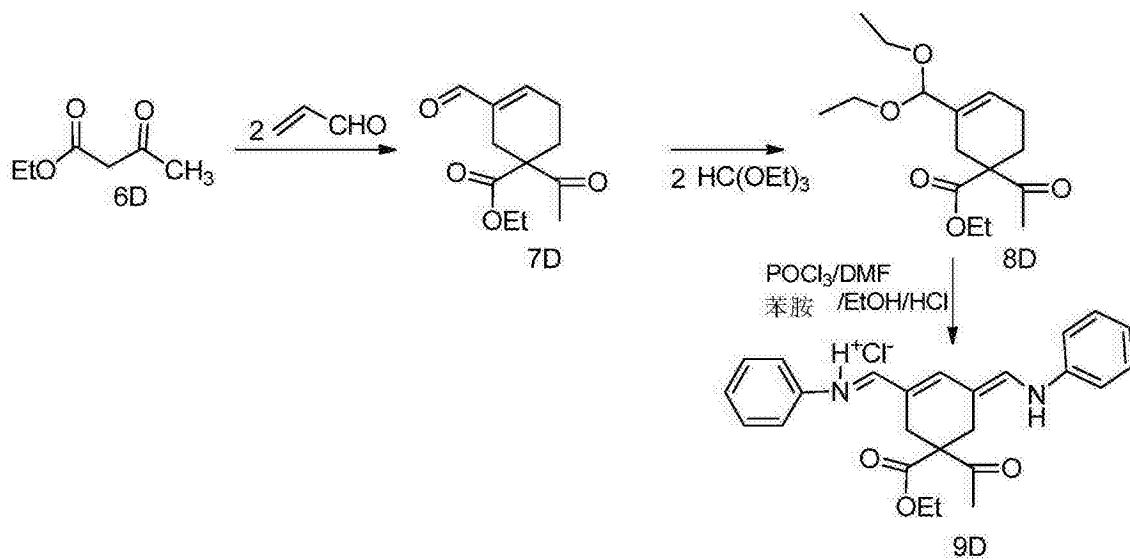


[0303] 方案 2A. 桥的制备

[0304]

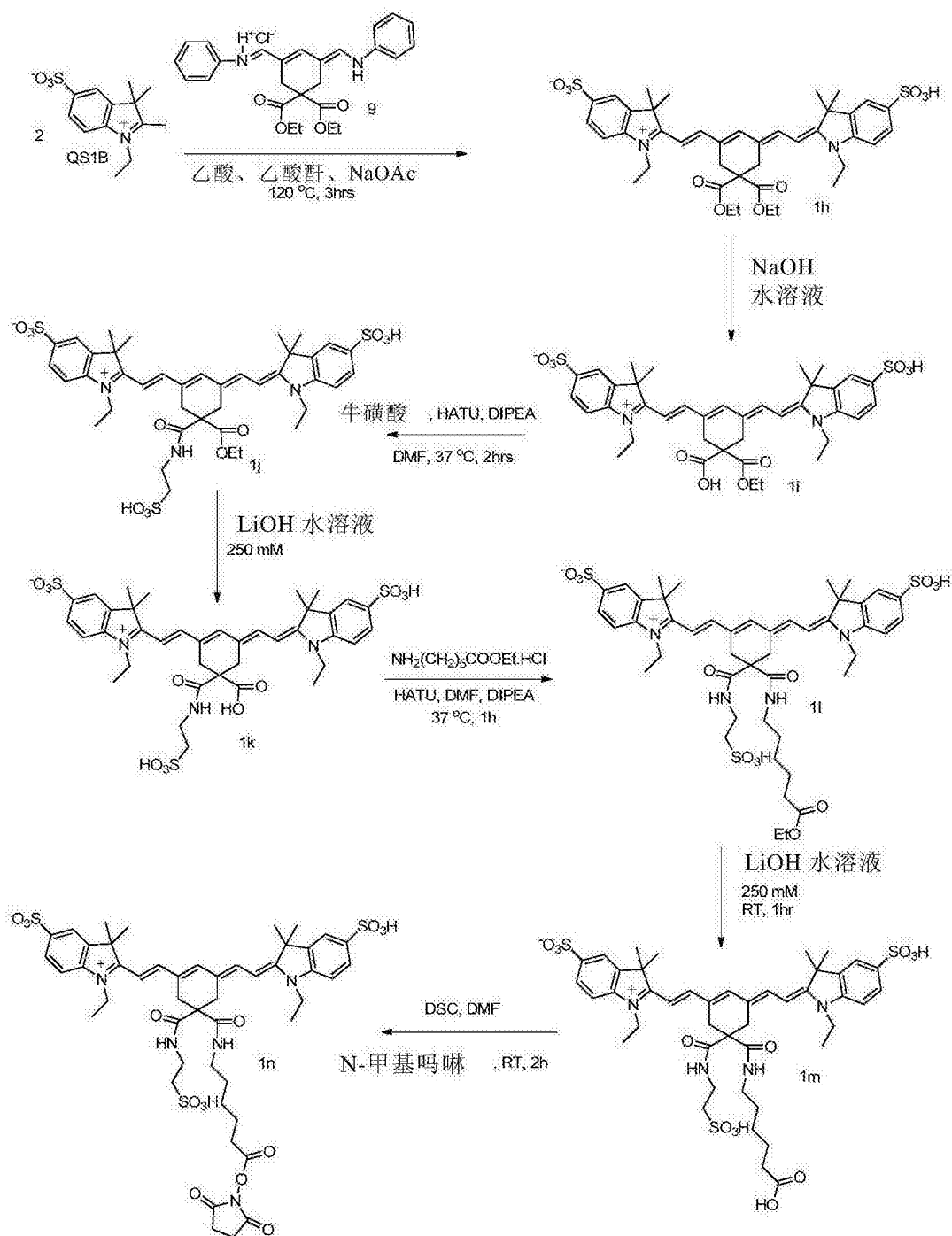


[0305]



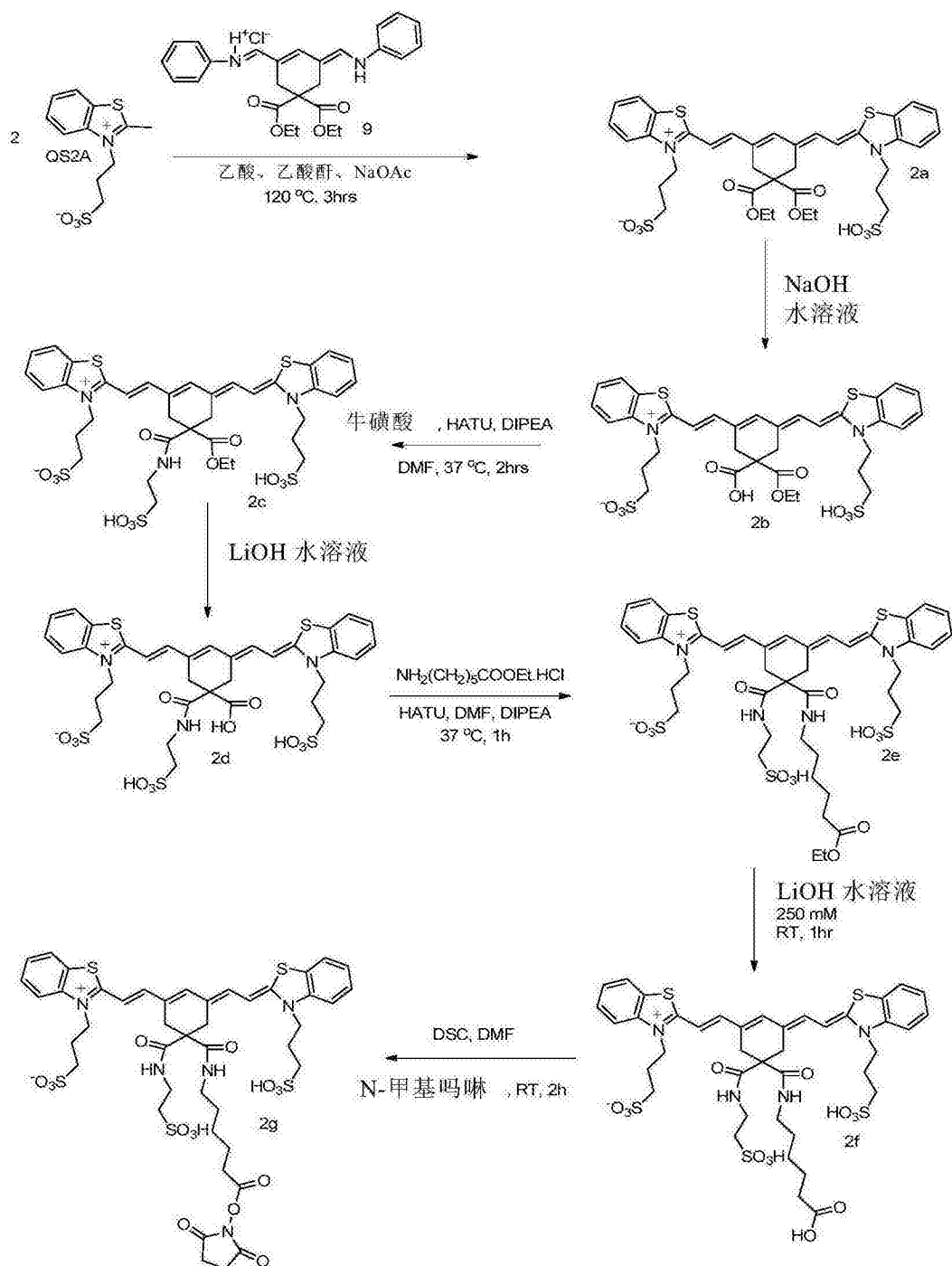
[0306] 方案 3B. 对称亚吲哚啉染料的合成

[0307]



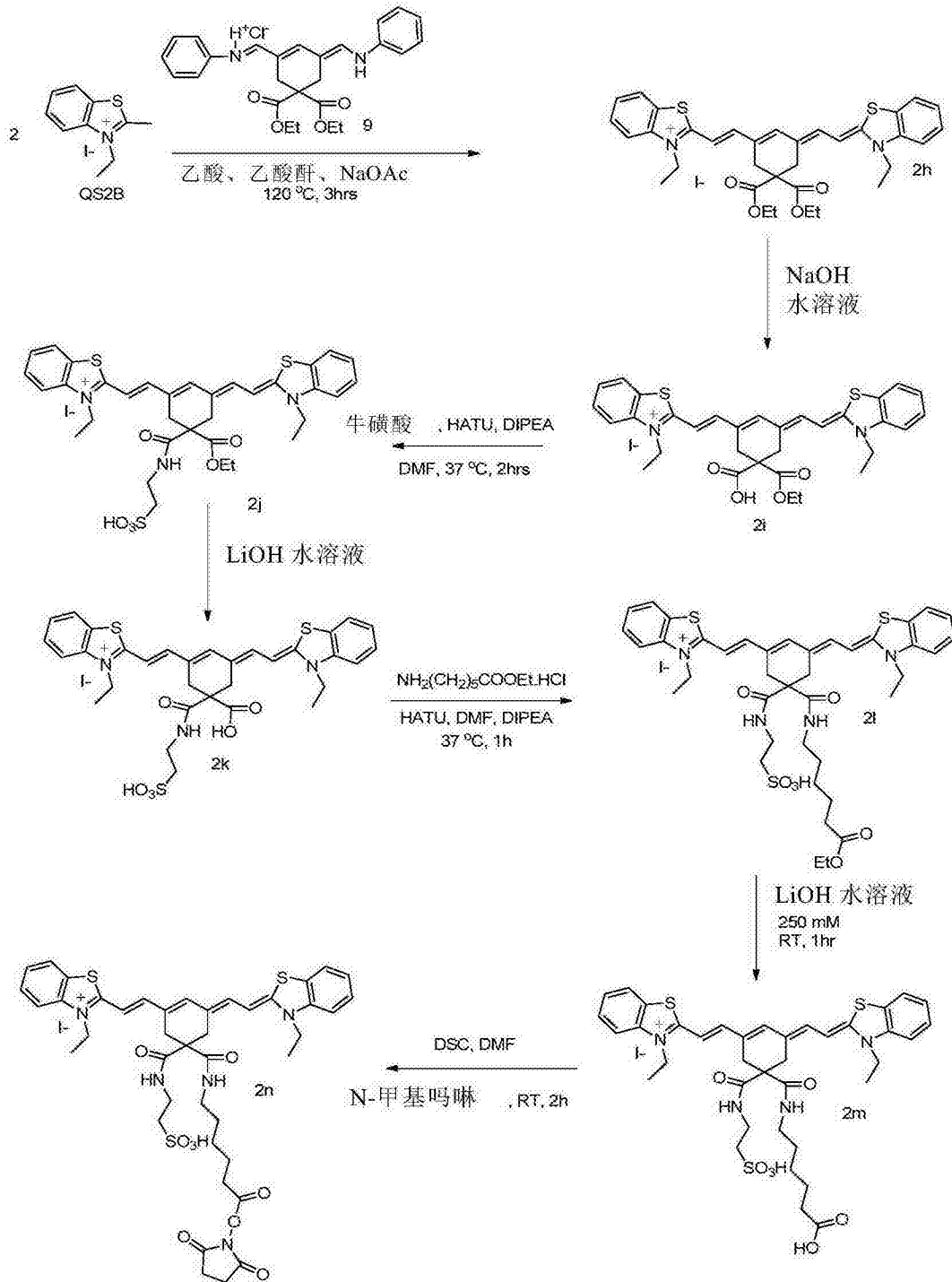
[0308] 方案 3C. 对称苯并噻唑染料的合成

[0309]



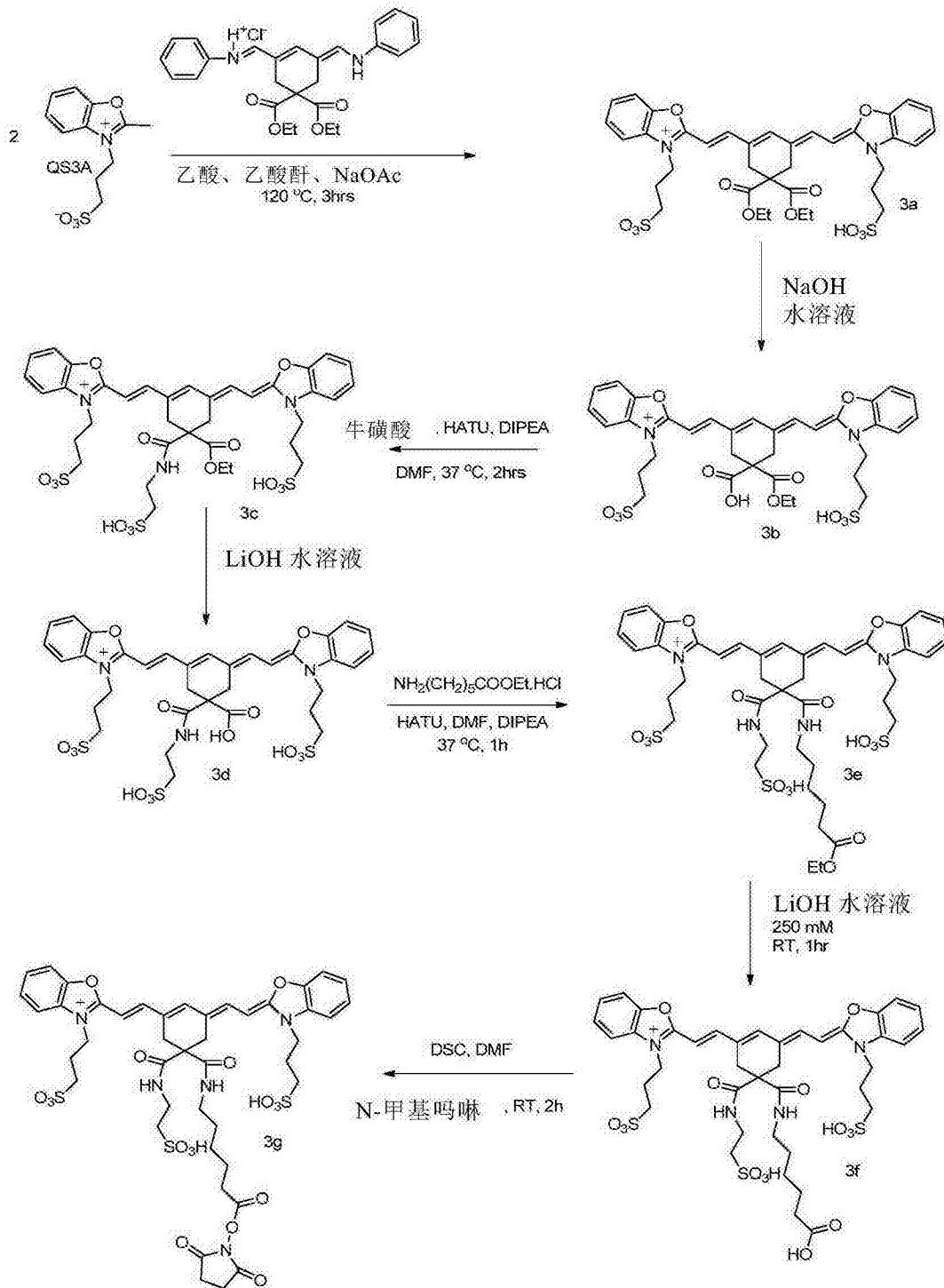
[0310] 方案 3D. 对称苯并噻唑染料的合成

[0311]



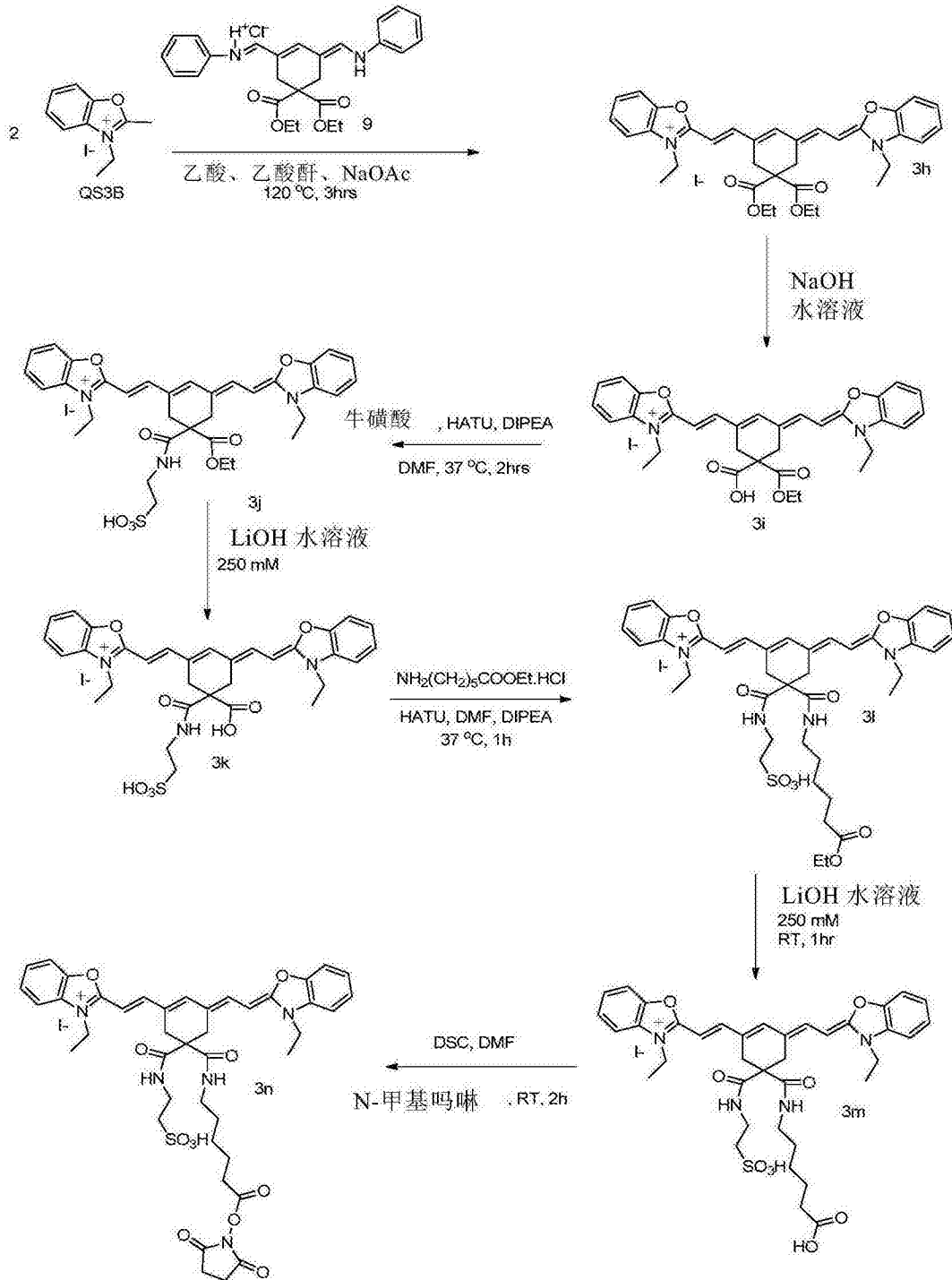
[0312] 方案 3E. 对称苯并噻唑染料的合成

[0313]



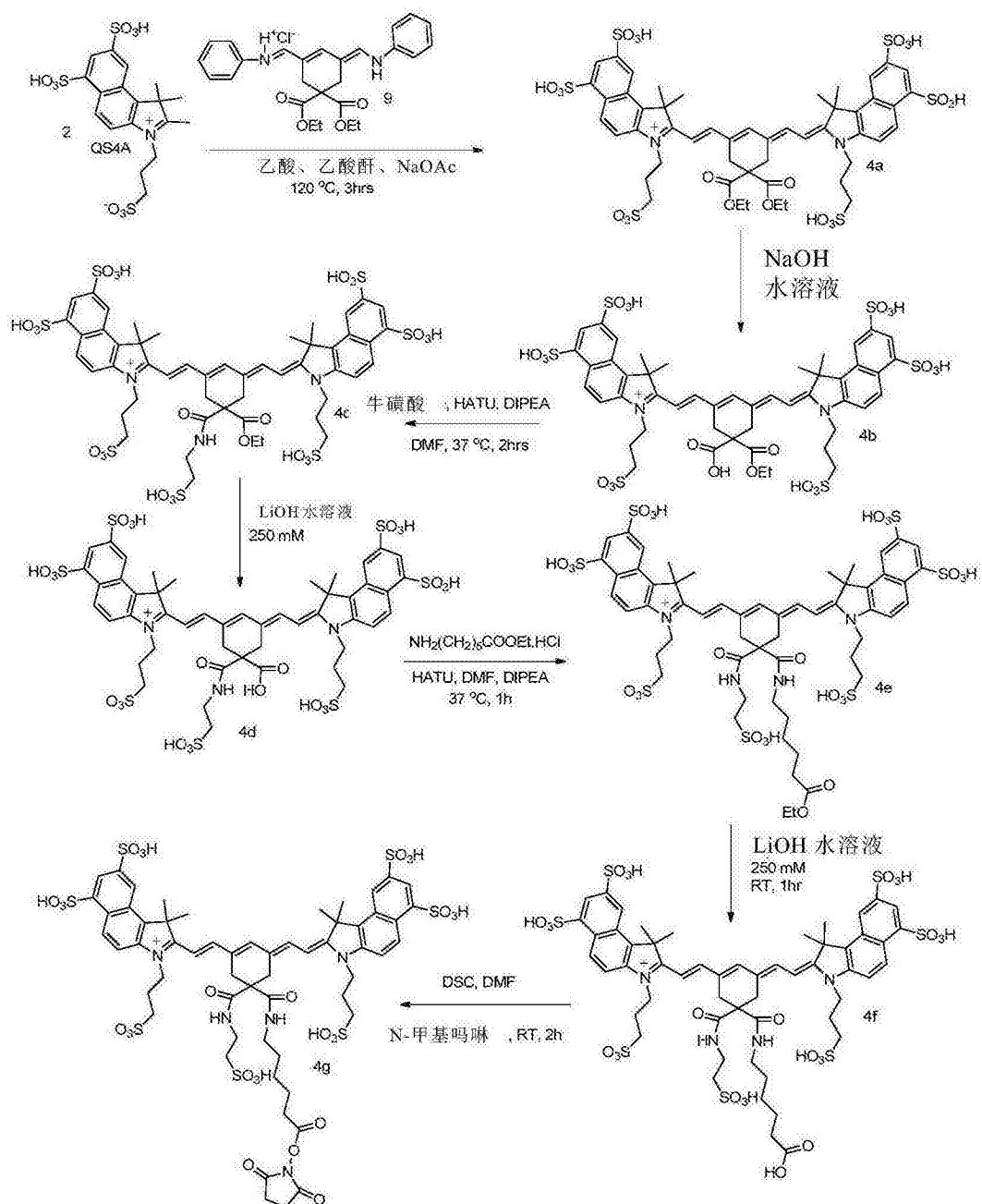
[0314] 方案 3F. 对称苯并噻唑染料的合成

[0315]



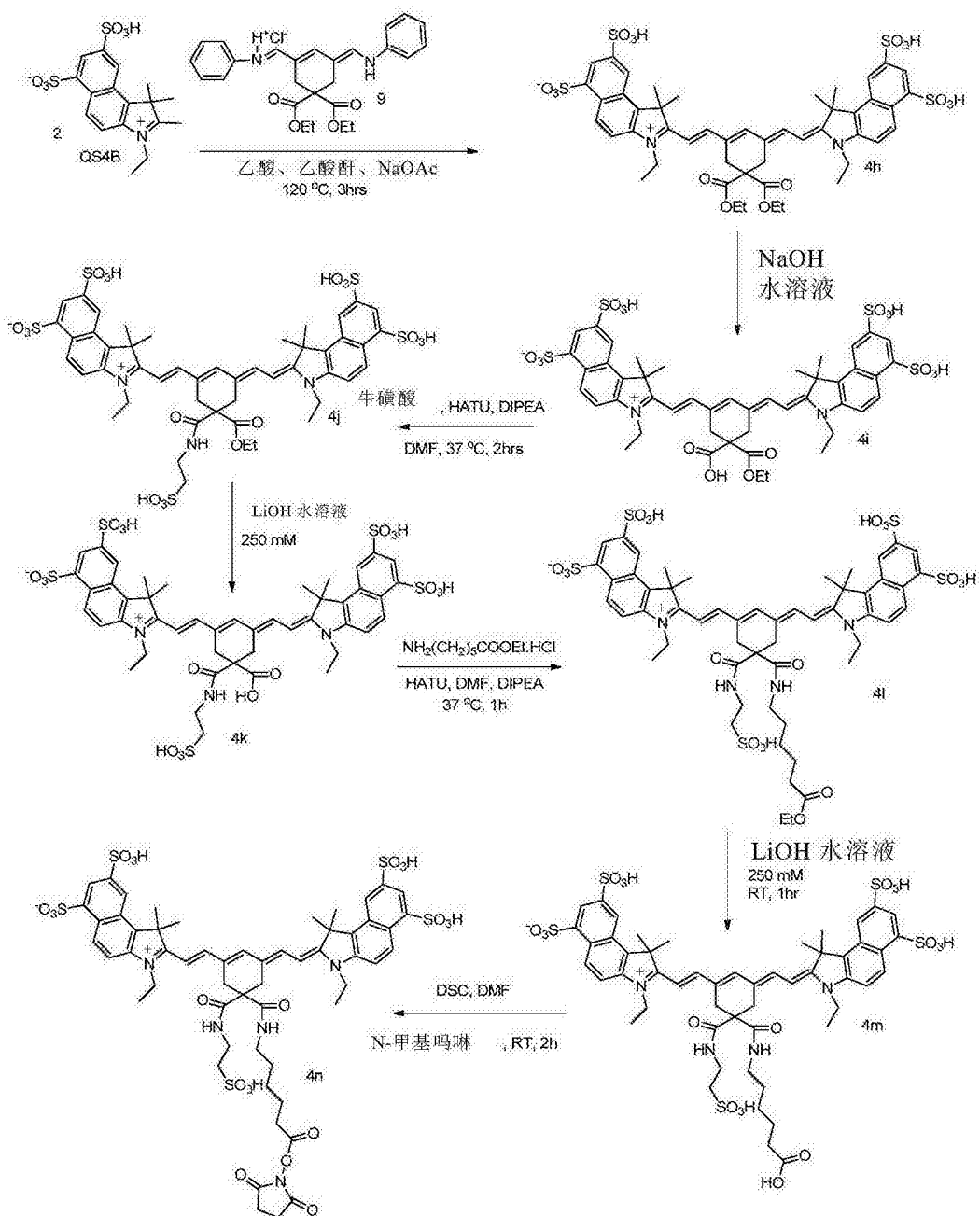
[0316] 方案 3G. 对称苯并亚吡咯染料的合成

[0317]



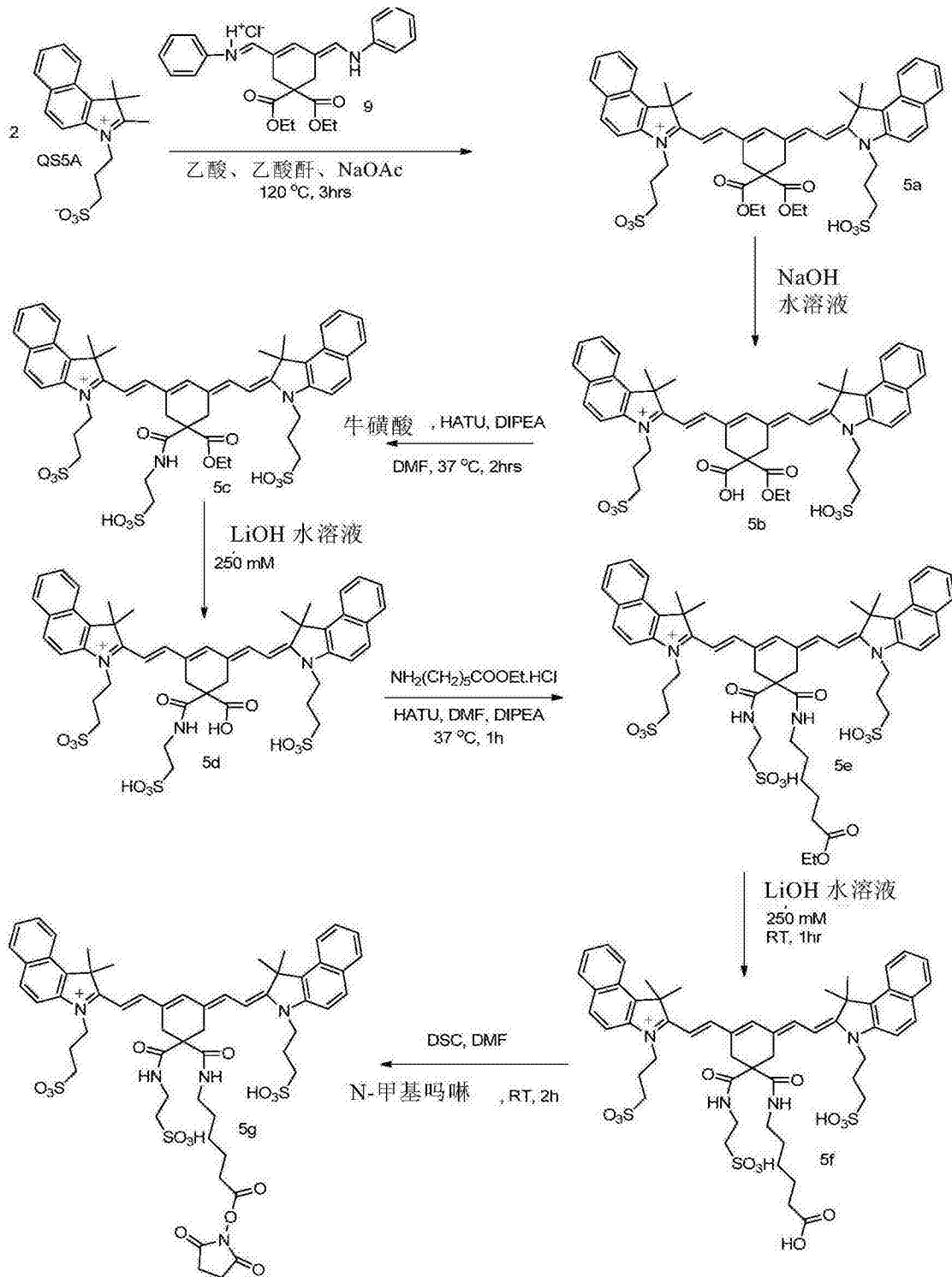
[0318] 方案 3H. 对称苯并咪唑染料的合成

[0319]



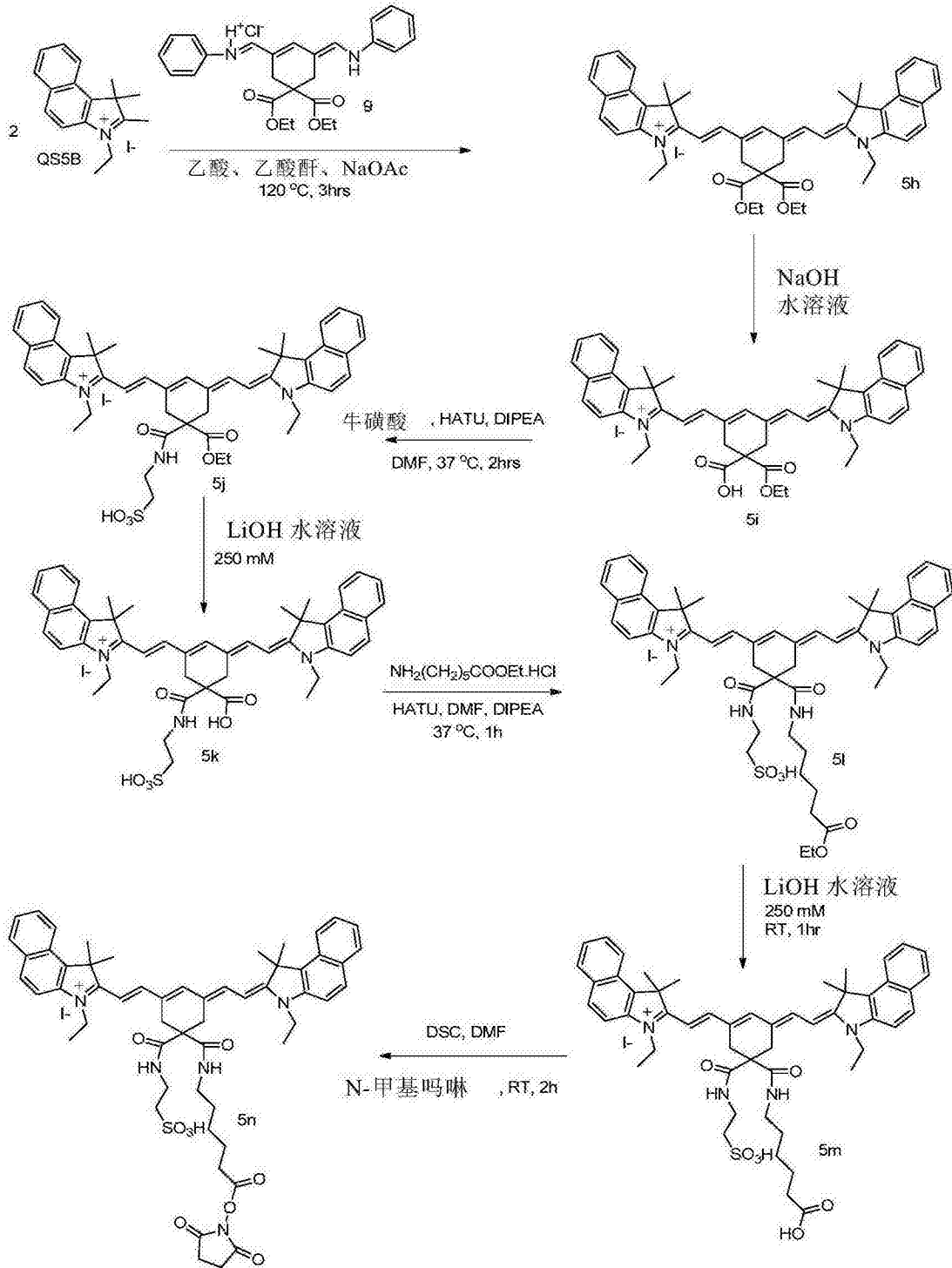
[0320] 方案 3I. 对称苯并咪唑染料的合成

[0321]



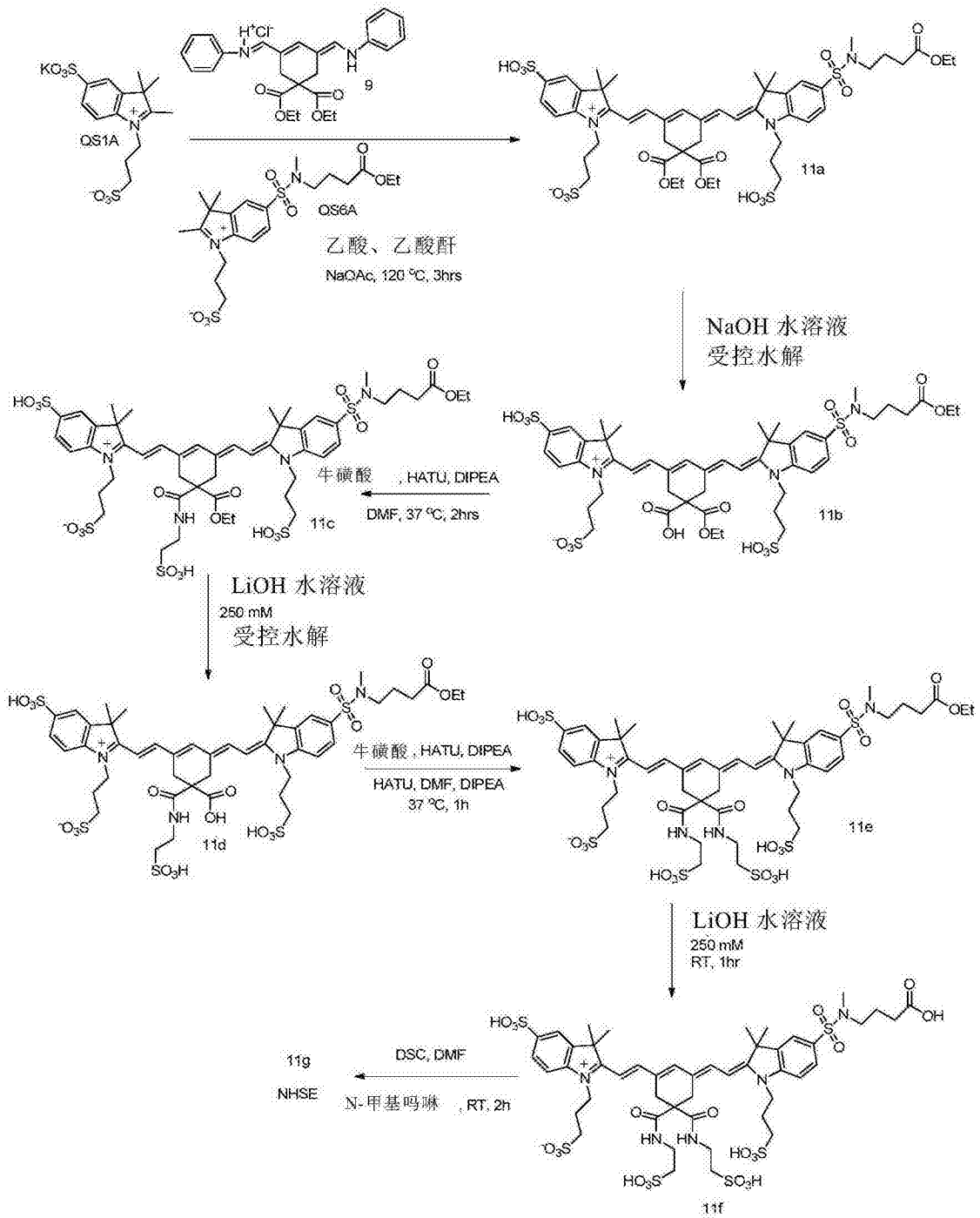
[0322] 方案 3J. 对称苯并咪唑染料的合成

[0323]



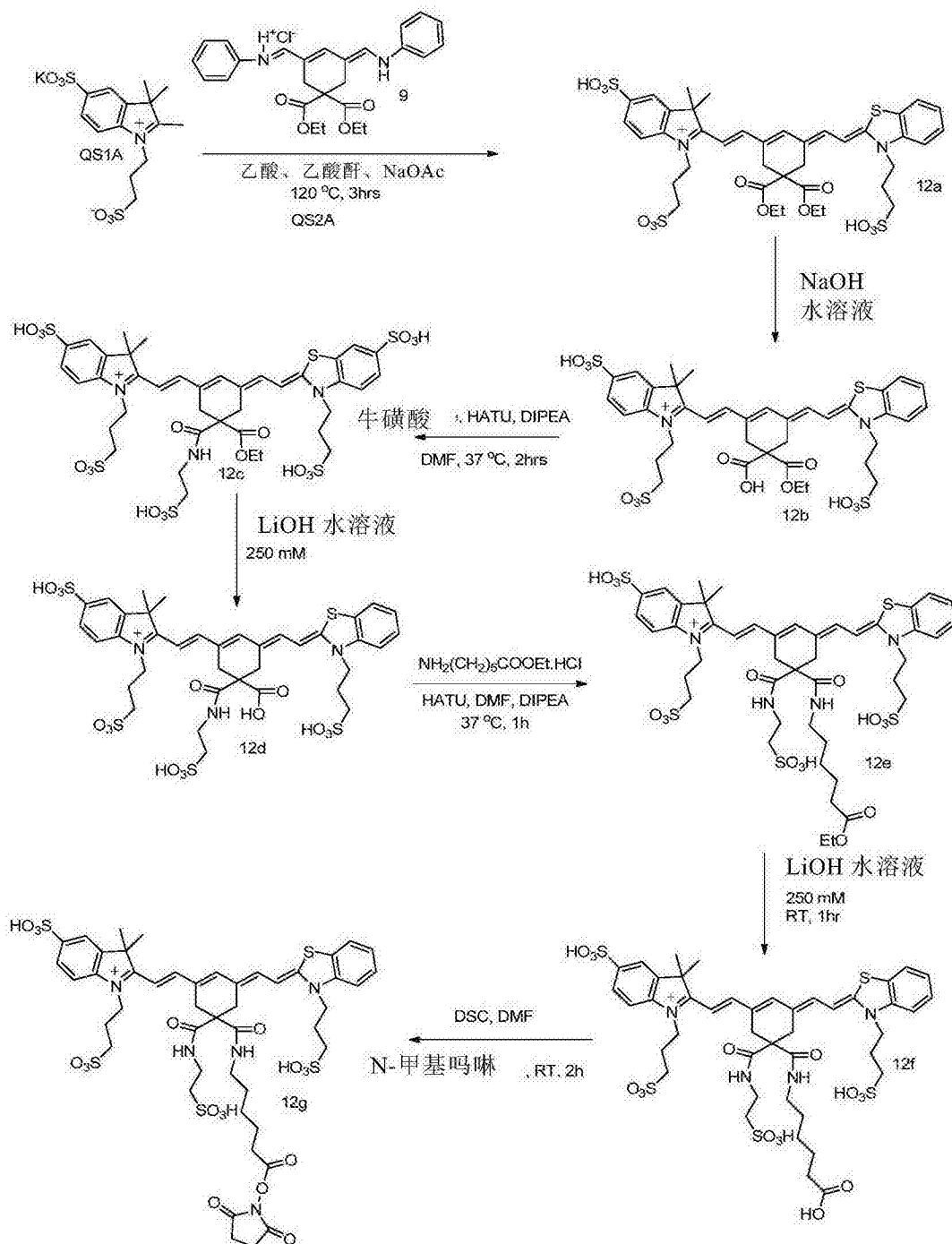
[0324] 方案 3K. 不称亚吡啶染料的合成

[0325]



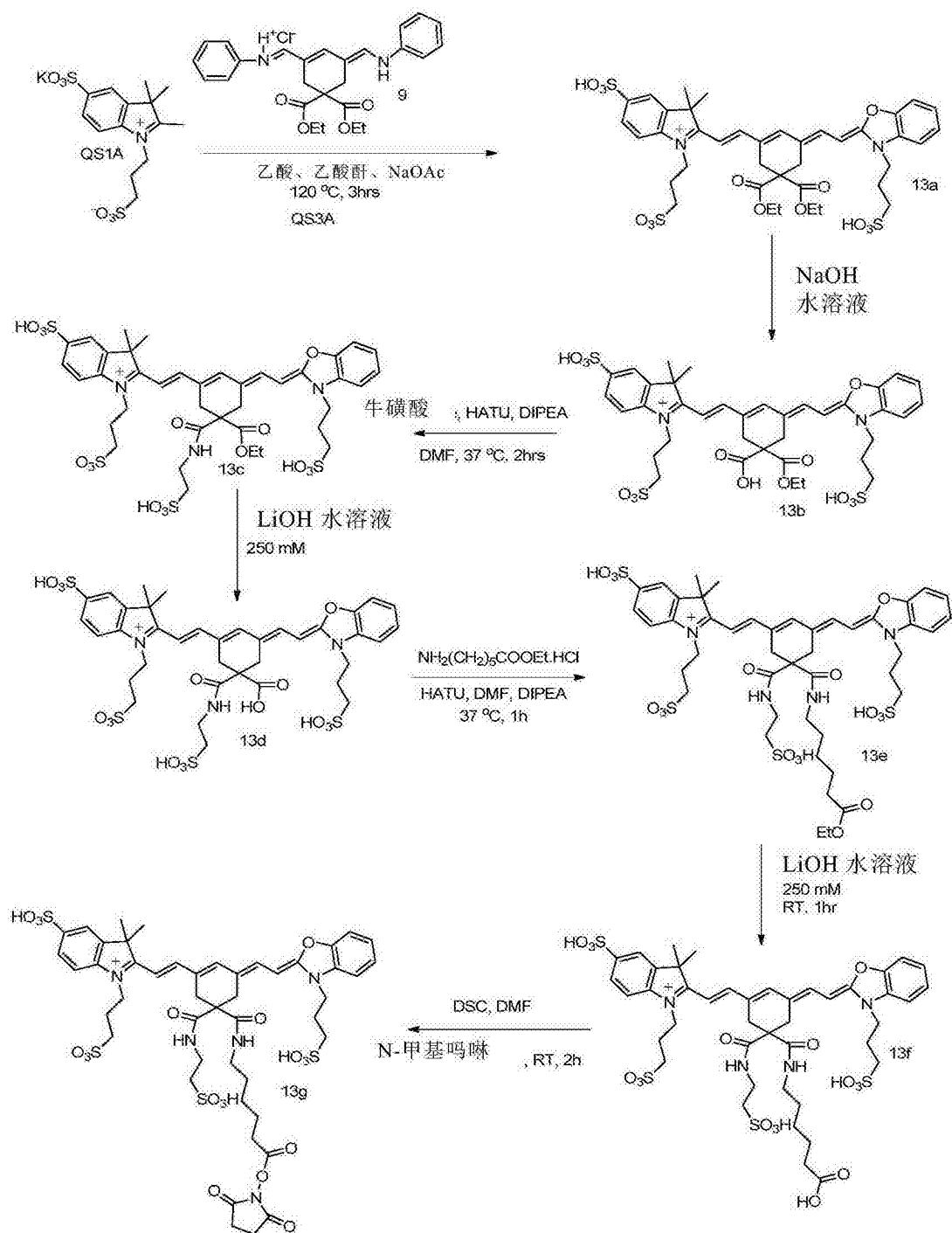
[0326] 方案 3L. 不对称亚吡啶 - 苯并噻唑染料的合成

[0327]



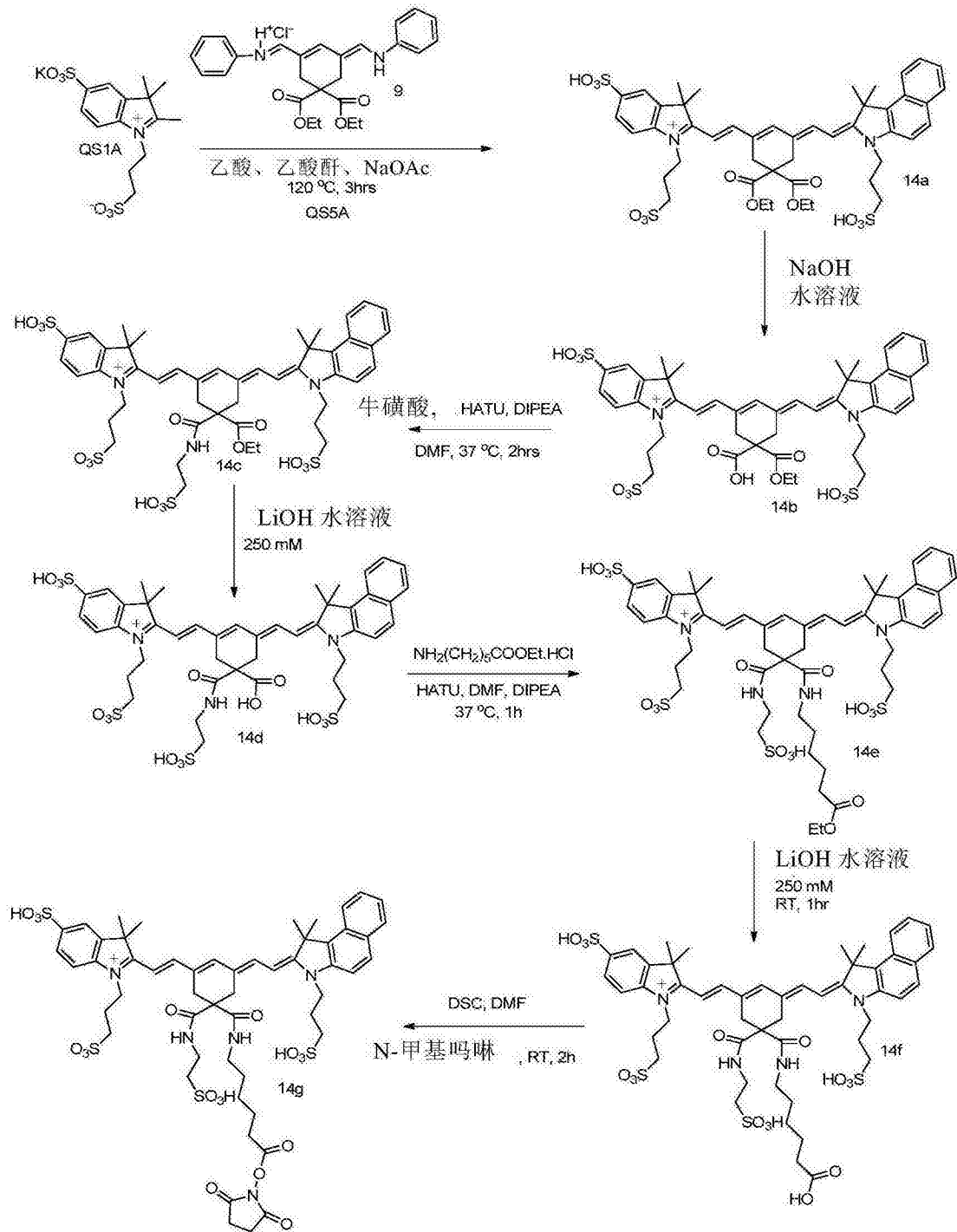
[0328] 方案 3M. 不对称亚吡啶啉-苯并噻唑染料的合成

[0329]



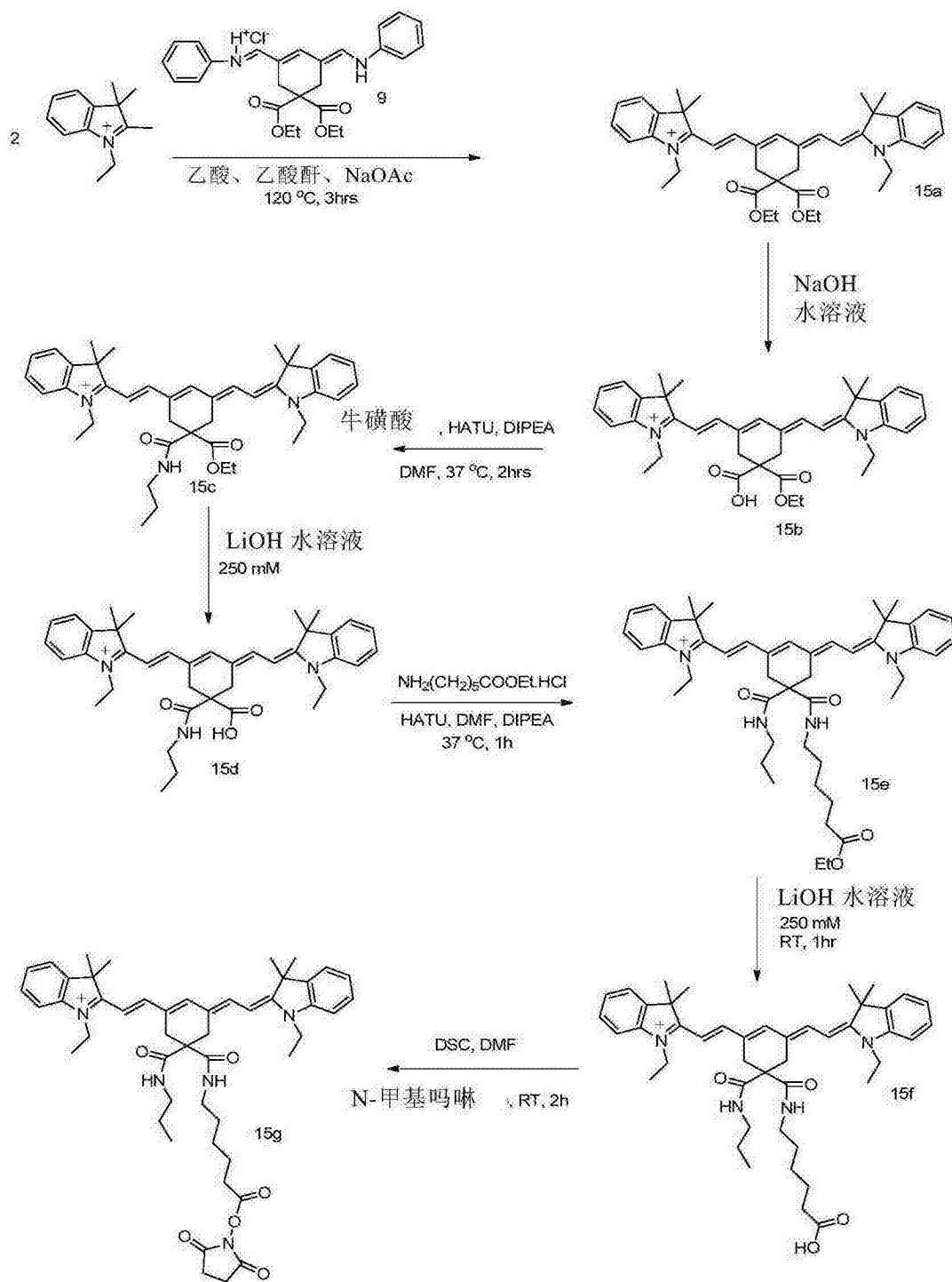
[0330] 方案 3N. 不对称亚吡啶啉-苯并亚吡啶啉染料的合成

[0331]



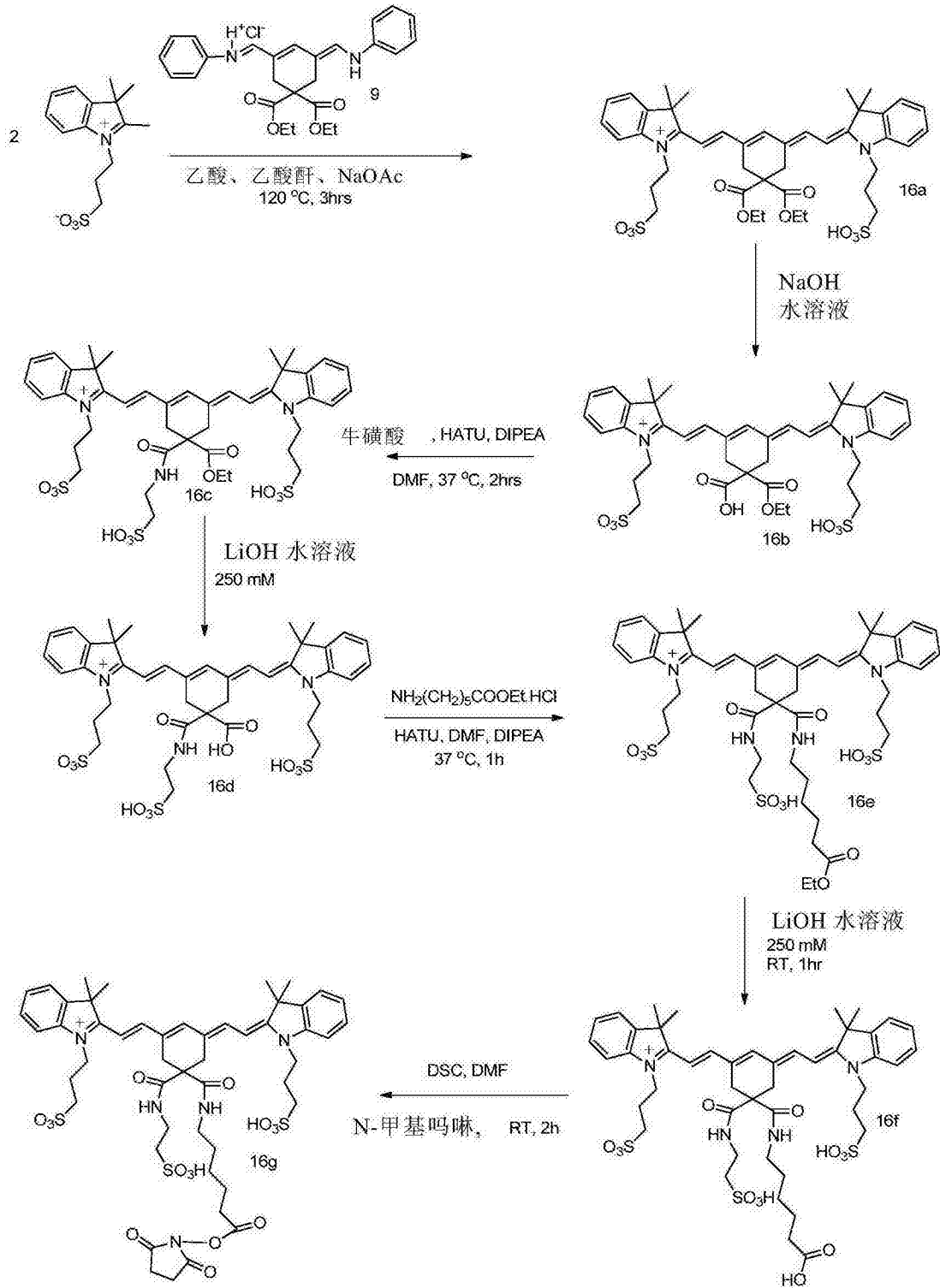
[0332] 方案 3P. 对称亚吲哚啉亲水性染料的合成

[0333]



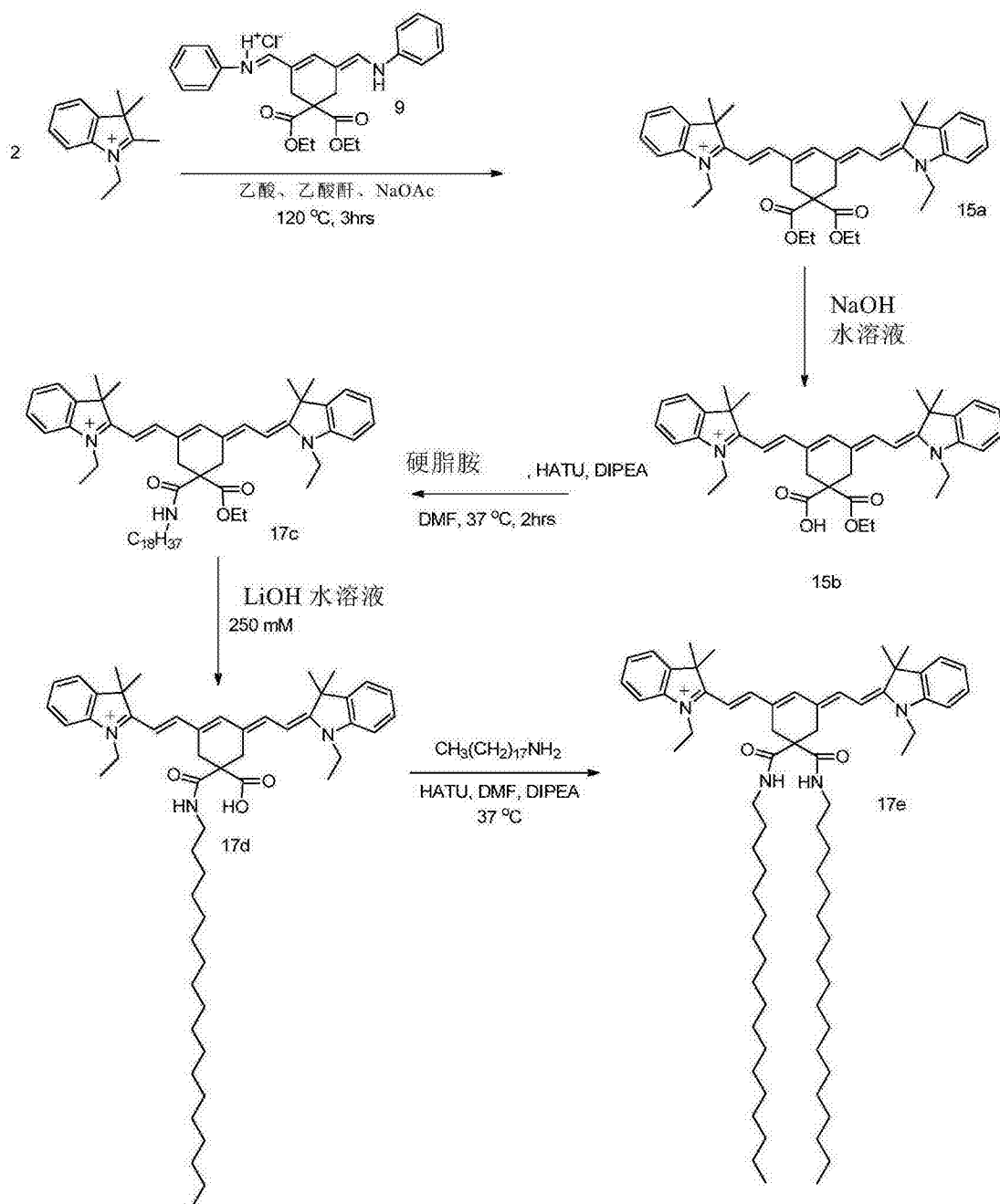
[0334] 方案 3Q. 对称亚吲哚染料合成

[0335]



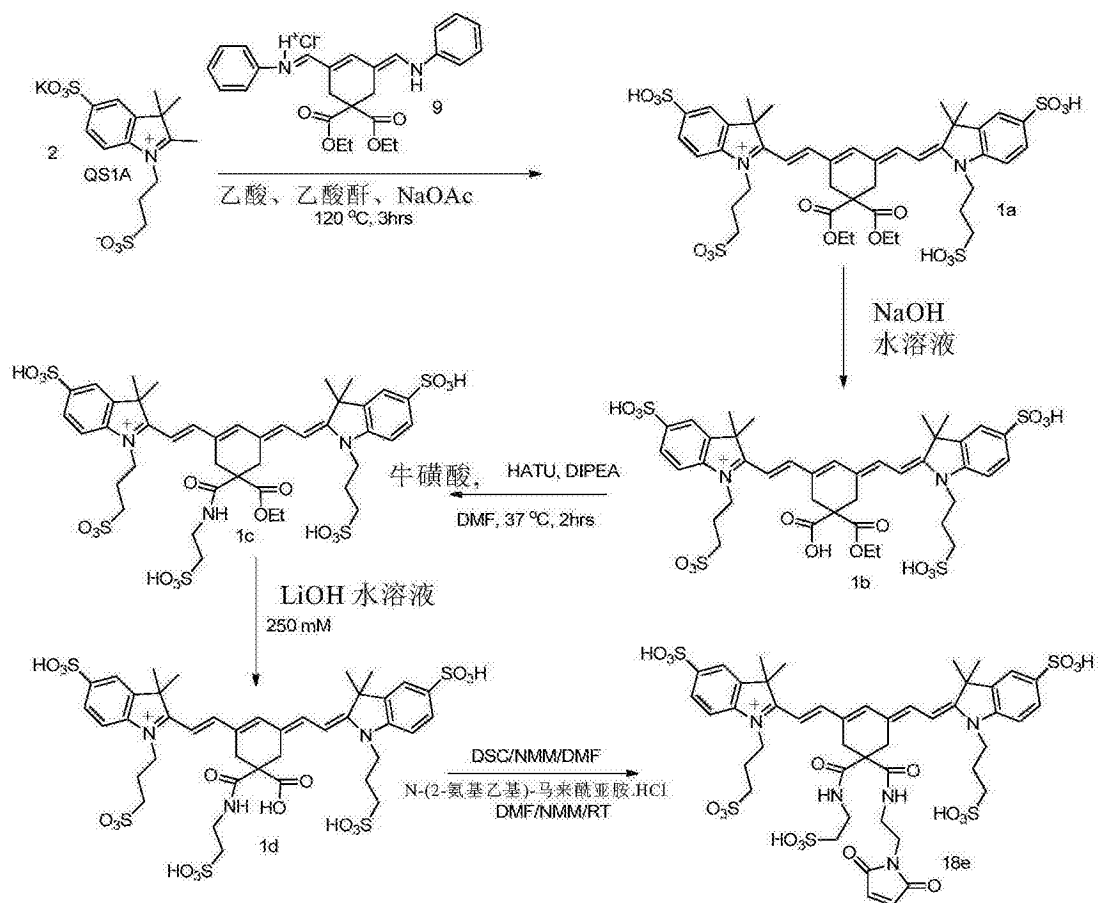
[0336] 方案 3R. 具有两条长链尾部的对称亚吡啶亲水性染料的合成

[0337]



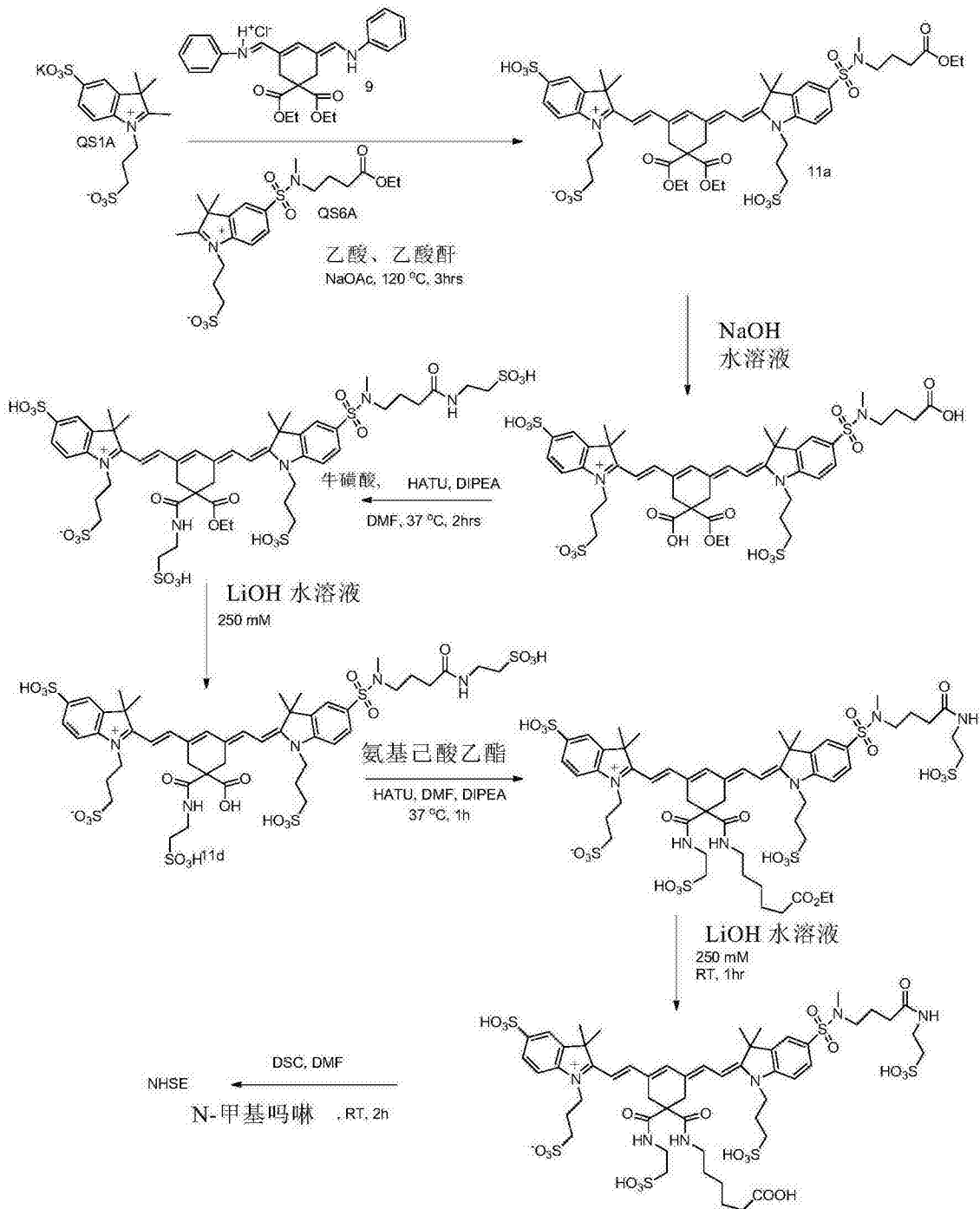
[0338] 方案 3S. 对称亚吡啶亲水性马来酰亚胺染料的合成

[0339]



[0340] 方案 3T. 不对称亚吲哚染料合成

[0341]

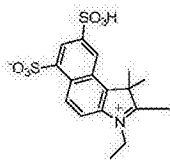


[0342] 实施例 4- 化合物 4m 的合成 (方案 3H)

[0343] A. 化合物 QS4B 的制备

[0344] 将 2,3,3-三甲基苯并吡咯-5,7-二磺酸盐 (化合物 4, 3.1g, 7mmol) 溶解于 25mL 干燥的 DMF 中, 获得透明的橙色溶液。加入 3mL 碘乙烷 (5.85g, 37.5mmol, Aldrich), 并且在封闭试管中将溶液加热至 130 °C 16 小时。将变为深紫色的反应混合物冷却, 并且倒入 150mL 乙醚中。将混合物离心, 并且将溶剂倾析出。在试管中, 使用三组 25mL 份量的 2-丙醇将固体产物进一步冲洗, 随后用 25mL 醚冲洗, 并且在真空中干燥。获得 2.6g 深紫色固体 (85%), 并且通过 MALDI-TOF-MS 确认。C₁₇H₁₉N₆S₂⁺ 的 m/e 计算为 397.1 [M]⁺, 测得为 397.6。

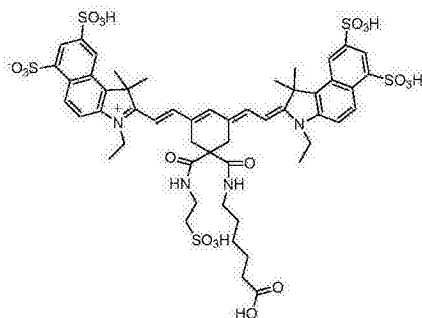
[0345]



[0346] B. 化合物 4m 的制备

[0347] 按照与所述的化合物 1f 的合成相同的步骤,使用化合物 QS4B 和 9 经过 4h-4l 合成化合物 4m。总产率为约 15%。最大 Abs.:775nm(水),780nm(MeOH);最大 Em.:795nm(水),8053nm(MeOH)。

[0348]



[0349] 实施例 5- 细胞标记

[0350] 将小鼠脾细胞制备成单细胞悬液,并且通过去除 B 细胞和巨噬细胞的色谱柱 (R&D kit,小鼠 T 细胞富集色谱柱,MTCC500) 富集脾细胞制备物中的 T 细胞亚群。然后将 T 细胞离心,从而生成 10^7 个细胞的细胞聚合体。从细胞聚合体中去除上清液,并且加入 $100 \mu\text{L}$ 浓度为 10mg/mL 的 1g(化合物 1f 的 N-羟基琥珀酰亚胺酯)的溶液。在室温下培养细胞 5 分钟,随后进行 2 轮离心和生理缓冲液中的再悬浮,以洗脱未结合的化合物 1f。通过荧光显微术评估细胞。

[0351] 实施例 6- 细胞标记和体内成像

[0352] 离心小鼠 4T1 乳腺癌细胞,以生成 10^7 个细胞的细胞聚合体。从细胞聚合体中去除上清液,并且加入 $100 \mu\text{L}$ 浓度为 10mg/mL 的化合物 1f 的 N-羟基琥珀酰亚胺酯的溶液。在室温下培养细胞 5 分钟,随后进行 2 轮离心和生理缓冲液中的再悬浮,以洗脱未结合的化合物 1f。通过荧光显微术评估细胞。

[0353] 将细胞以每小鼠 5×10^5 个细胞的量,向小鼠静脉注射,并且在注射后即刻和注射 24 小时后通过荧光分子断层成像术成像活体小鼠。由于 4T1 细胞主要转移至肺,所以能够定量肺荧光。

[0354] 实施例 7- 使用化合物 1f- 多肽缀合体的 FMT 成像

[0355] 在基本条件下,将化合物 1f 的 N-羟基琥珀酰亚胺酯的溶液化学连接至含有 Arg-Gly-Asp 的肽,从而生成用于体内光学成像的生物相容的荧光分子。

[0356] 从 ATCC(Manassas, VA) 获得肿瘤细胞株 HT-29(人结肠癌/HTB-38)。在包含 5% CO_2 的 37°C 的潮湿环境下,HT-29 细胞在辅以 10% FBS 的 McCoy's 中生长。指数生长的细胞用胰蛋白酶处理,并且在汉克氏平衡盐溶液中以 3×10^7 细胞/mL 的浓度重新悬浮。6-8 周大的雌性 NU/NU 小鼠(Charles River Laboratory, Wilmington, MA) 在双边第一乳腺脂肪垫皮下注射 3×10^6 HT-29 细胞。一周后,当肿瘤大约 30mm^3 大时,向小鼠静脉注射荧光分子 ($150 \mu\text{L}$

1x PBS), 并且在 24 小时后在荧光反射系统 (FRI, Kodak 2000MM) 和 PerkinElmer, Inc. (Waltham, MA) 的荧光断层成像系统 (FMT2500) 上成像。

[0357] 实施例 8- 使用化合物 1f 的骨生长的体内成像

[0358] 在基本条件下, 将化合物 1f 的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯的溶液化学连接至含有二磷酸盐的生物分子, 从而生成用于体内光学成像的生物相容的荧光分子。

[0359] 向五天大的 BALB/c x CF-1F₁ 小鼠皮下注射荧光分子 (15 μ L 1x PBS), 并且在 24 小时后使用荧光反射成像 (FRI) 系统 (Kodak 2000MM) 成像。成像了骨生长的区域。

[0360] 实施例 9- 纳米微粒标记

[0361] 将化合物 1f 的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯的溶液化学连接至设置于氧化铁纳米颗粒的聚合物表面上的胺基基团, 从而生成用于体内荧光成像的生物相容的荧光平台。随后将聚乙二醇偶联至这些纳米颗粒, 从而生成适合于荧光成像和活体显微术的生物相容的成像剂。

[0362] 通过引用并入

[0363] 本文中引用的所有出版物、专利和专利申请, 以其全部内容通过引用明确地并入本文, 并且为任何目的, 其引入程度与如同将每份出版物、专利或专利申请单独引入的程度相同。

[0364] 等同

[0365] 本发明可以体现为其他特定形式而不背离其精神和本质特征。因此, 上述实施例在所有方面视为说明性的, 而不是对本文描述的发明的限制。因此, 本发明的范围由随附的权利要求书而不是由前面的描述指明, 并且意图将进入权利要求书的意义和等同范围之内所有变化涵盖在其中。

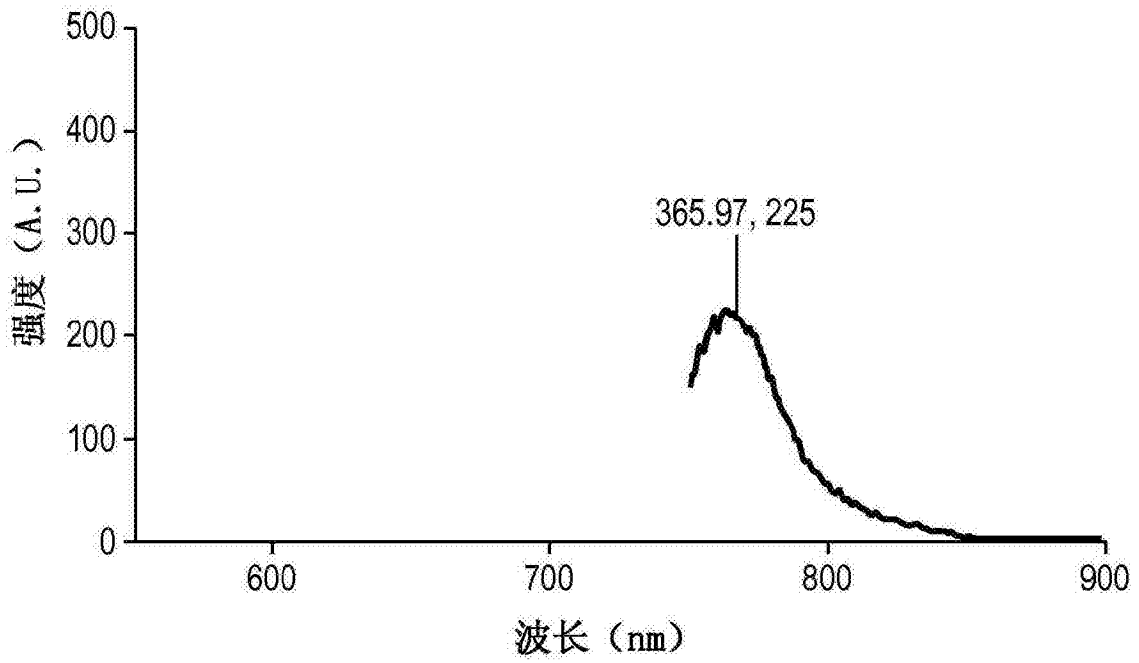


图 1A

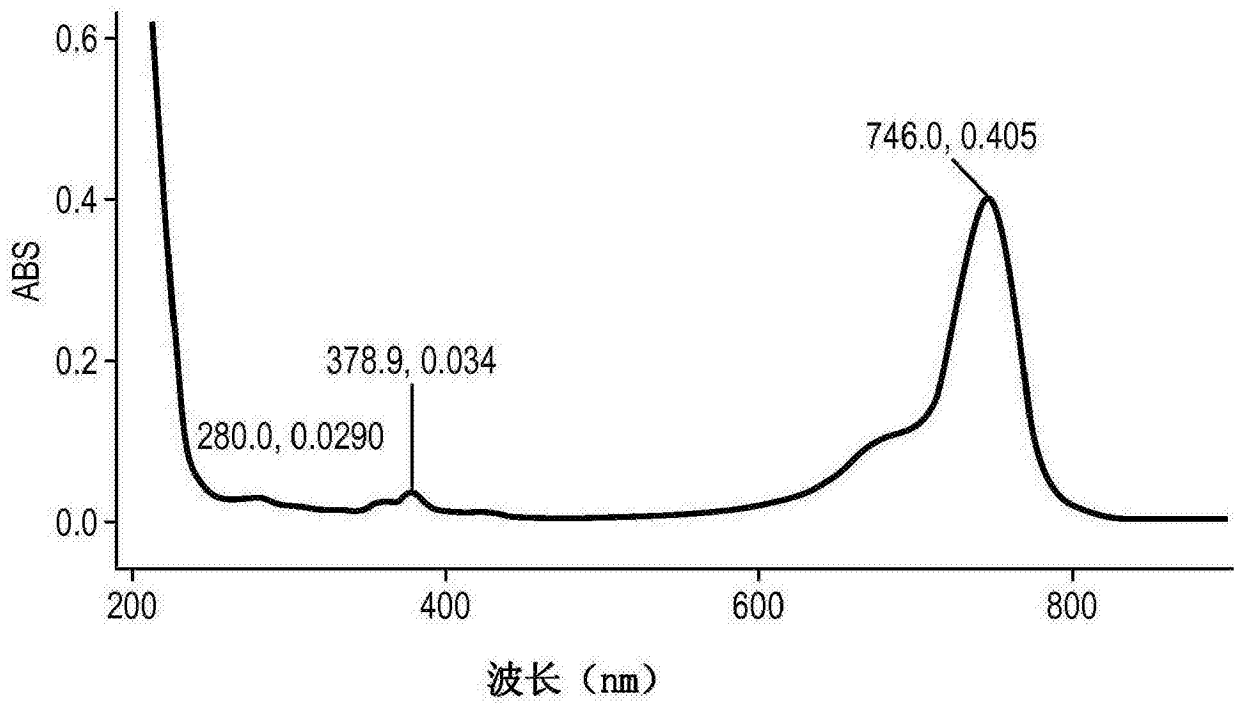
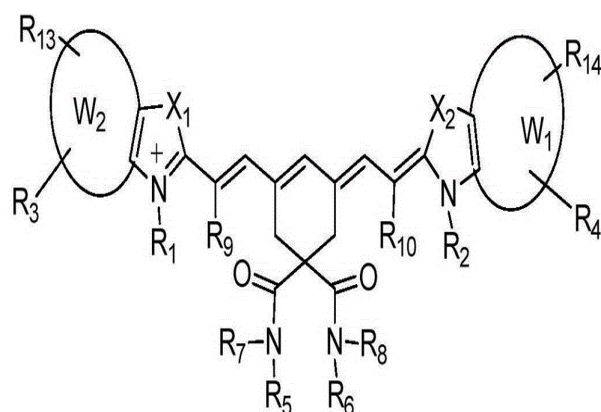


图 1B

专利名称(译)	4, 4-二取代环己基桥连七甲川花菁染料及其应用		
公开(公告)号	CN105339436A	公开(公告)日	2016-02-17
申请号	CN201480016214.6	申请日	2014-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	文森医学公司		
申请(专利权)人(译)	文森医学公司		
当前申请(专利权)人(译)	文森医学公司		
[标]发明人	纳拉锡姆哈查理纳拉亚南		
发明人	纳拉锡姆哈查理·纳拉亚南		
IPC分类号	C09B23/01 A61K51/00 C09B23/08 G01N21/47 G01N33/52 G01N33/533 G01N33/58		
CPC分类号	A61K49/0032 A61K49/0056 A61P3/00 A61P11/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P19/08 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07D403/08 C07D403/14 C07D413/14 C07D417/14 C09B23/0066 C09B23/086 G01N33/582 A61K49/0052 A61K51/0446 C07B2200/05 G01N33/56966		
代理人(译)	文琦		
优先权	61/798562 2013-03-15 US		
其他公开文献	CN105339436B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一族包含荧光花菁染料的化合物。所述化合物是近红外吸收的七甲川花菁染料，含有作为聚甲炔发色团的一部分的4,4-二取代环己基环。所述化合物一般为亲水性，并且可以化学连接至生物分子，诸如蛋白质、核酸和治疗性小分子。所述化合物可以用于在各种医疗、生物和诊断应用中成像。



(I-A)