



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107406872 B

(45) 授权公告日 2023. 03. 28

(21) 申请号 201680017762.X

(22) 申请日 2016.01.22

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107406872 A

(43) 申请公布日 2017.11.28

(30) 优先权数据  
62/106,400 2015.01.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.09.22

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/014606 2016.01.22

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02016/118910 EN 2016.07.28

(73) 专利权人 里兰斯坦福初级大学理事会  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 马修·S·博焦

马蒂金·韦尔多斯

莱斯莉·奥弗里

尼马里·P·维索娜

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理  
有限公司 11112

专利代理师 王静 张珂珂

(51) Int. Cl.  
C12Q 1/37 (2006.01)  
C07D 401/14 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 102369440 A, 2012.03.07  
CN 101743022 A, 2010.06.16  
曲恩泽等. 自制超声/荧光双功能造影剂在  
兔正常淋巴结中的显像.《中国医学科学院学  
报》. 2013, 第35卷 (第4期),

审查员 高又文

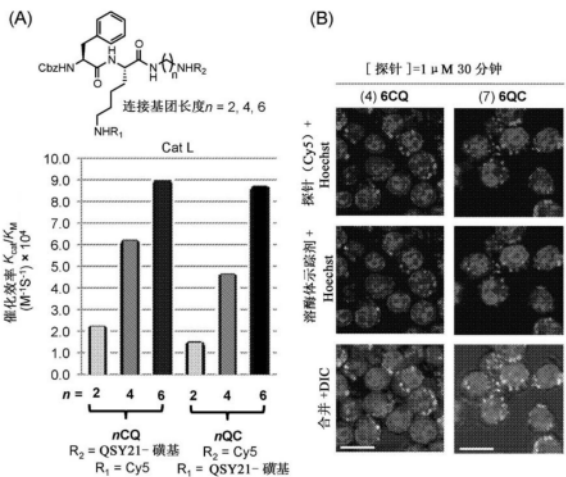
权利要求书4页 说明书30页 附图8页

(54) 发明名称

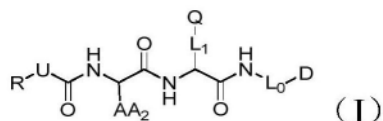
用于标记动物组织的化合物、组合物及其应  
用

(57) 摘要

本申请提供了一种用于标记动物组织的化  
合物、组合物及其应用。所述化合物包含潜在的  
阳离子溶酶体片段,其在经处理的组织内,特别  
是在肿瘤和其他病变组织内通过溶酶体蛋白酶  
切割后是可检测的。本申请还提供了包含该化  
合物的组合物、以及例如在图像引导的肿瘤切除手  
术期间动态监测体内的蛋白酶活性中使用该化  
合物的方法。



1. 一种用于标记动物组织的化合物,其具有式(I):



其中D是包括荧光标记的可检测元件,其中所述荧光标记是花菁标记;

Q是QSY淬灭剂或QC-1;

L<sub>0</sub>是C<sub>4-8</sub>烷基连接基团;

L<sub>1</sub>是C<sub>2-8</sub>烷基连接基团;

AA<sub>2</sub>是芳烷基氨基酸侧链;

U是O;

R是芳烷基。

2. 权利要求1所述的化合物,其中所述花菁标记是Cy5。

3. 权利要求1所述的化合物,其中L<sub>1</sub>是C<sub>4</sub>烷基连接基团。

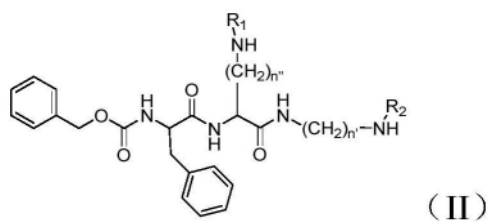
4. 权利要求1所述的化合物,其中Q是QSY淬灭剂。

5. 权利要求4所述的化合物,其中所述QSY淬灭剂是亲水性QSY淬灭剂。

6. 权利要求5所述的化合物,其中所述亲水性QSY淬灭剂是磺基-QSY淬灭剂。

7. 权利要求1所述的化合物,其中Q是QC-1。

8. 权利要求1所述的化合物,其具有式(II):



其中

n' 为4至8的整数;

n'' 为2至8的整数;

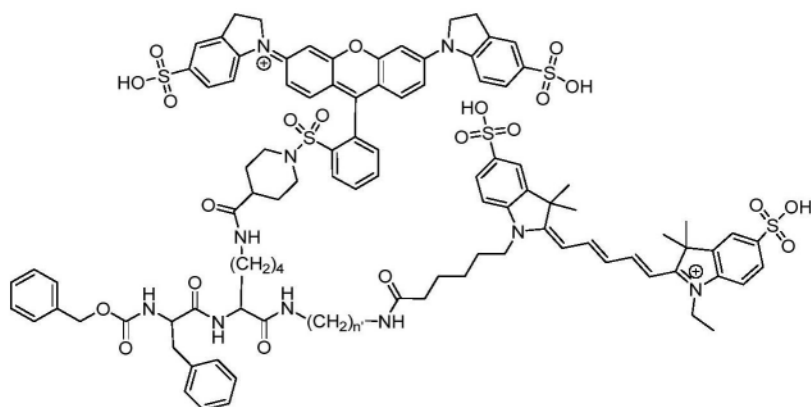
R<sub>1</sub>是QSY淬灭剂或QC-1;并且

R<sub>2</sub>是花菁标记。

9. 权利要求8所述的化合物,其中n'' 为4。

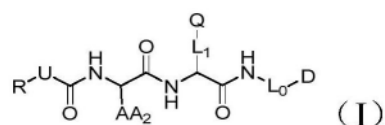
10. 权利要求9所述的化合物,其中n' 为4或6。

11. 权利要求1所述的化合物,其选自由以下化合物或该化合物药学上可接受的盐中的任一者构成的组:



其中 $n'$  为4或6。

12. 一种化合物, 其具有式 (I) :



其中D是包括荧光标记的可检测元件, 其中所述荧光标记是近红外荧光标记;

Q是QSY淬灭剂或QC-1;

$L_0$ 是 $C_{4-8}$ 烷基连接基团;

$L_1$ 是 $C_{2-8}$ 烷基连接基团;

$AA_2$ 是芳烷基氨基酸侧链;

U是O;

R是芳烷基。

13. 权利要求12所述的化合物, 其中所述近红外荧光标记是苯并吡喃或花菁标记。

14. 权利要求13所述的化合物, 其中所述苯并吡喃或花菁标记是DyLight标记。

15. 权利要求12所述的化合物, 其中 $L_1$ 是 $C_4$ 烷基连接基团。

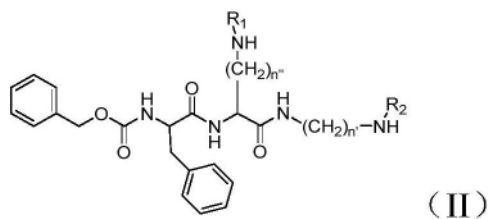
16. 权利要求12所述的化合物, 其中Q是QSY淬灭剂。

17. 权利要求16所述的化合物, 其中所述QSY淬灭剂是亲水性QSY淬灭剂。

18. 权利要求17所述的化合物, 其中所述亲水性QSY淬灭剂是磺基-QSY淬灭剂。

19. 权利要求12所述的化合物, 其中Q是QC-1。

20. 权利要求12所述的化合物, 其具有式 (II) :



其中

$n'$  为4至8的整数;

$n''$  为2至8的整数;

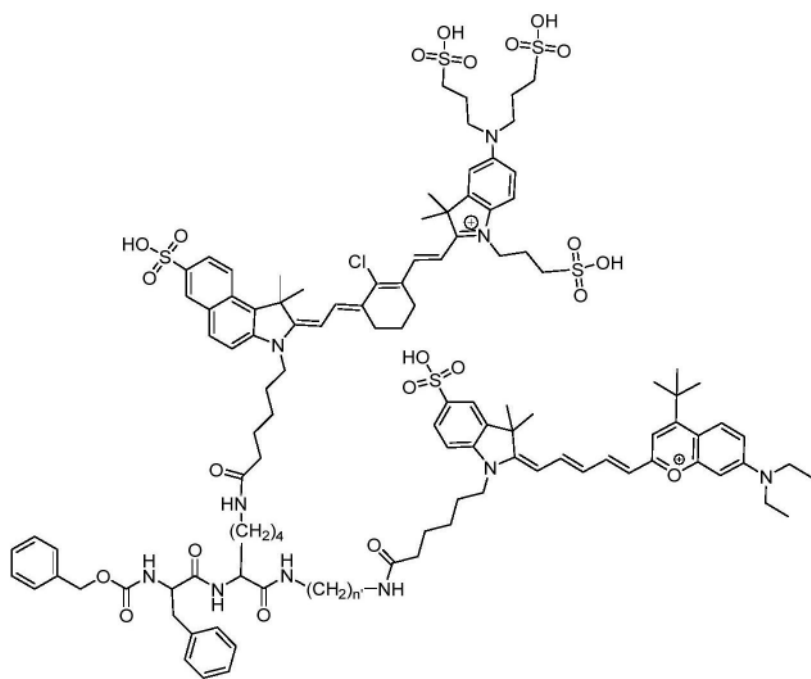
$R_1$ 是QSY淬灭剂或QC-1; 并且

$R_2$ 是苯并吡喃或花菁标记。

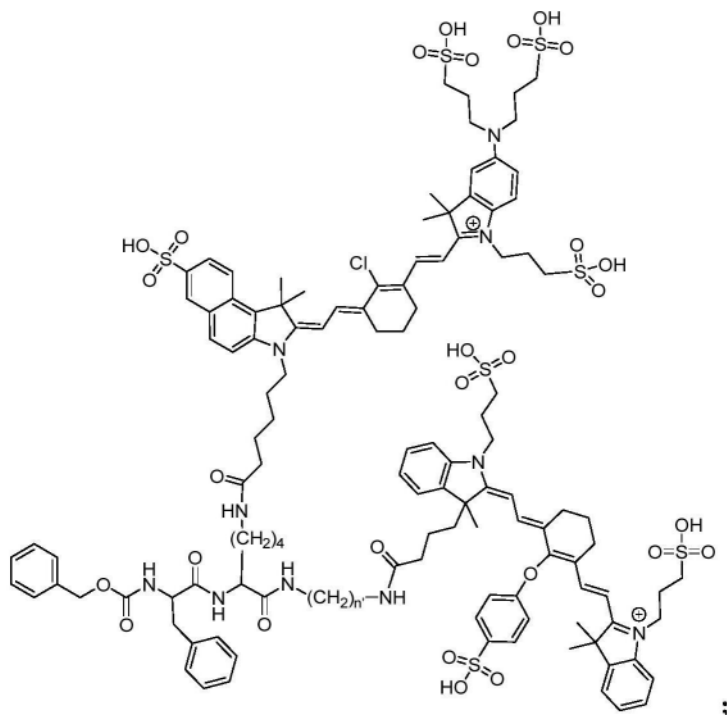
21. 权利要求20所述的化合物,其中n'为4。

22. 权利要求20所述的化合物,其中n'为4或6。

23. 权利要求1所述的化合物,其选自由以下化合物或这些化合物药学上可接受的盐中的任一者构成的组:



以及



其中n'为4或6。

24. 一种用于标记动物组织的组合物,其包含权利要求1至23中任一项所述的化合物和药学上可接受的载体。

25. 根据权利要求24所述的组合物在制备用于标记动物组织的成像剂中的应用。

26. 根据权利要求24所述的组合物在制备用于使动物中的肿瘤可视化的成像剂中的应

用，

其中通过所述动物中由所述组合物与组织蛋白酶半胱氨酸蛋白酶的反应测定所产生的可检测信号；其中所述可检测信号与所述动物中的病变组织相关联。

27. 权利要求26所述的应用，其中所述可检测信号是荧光信号。

28. 权利要求27所述的应用，其中所述荧光信号是近红外信号。

29. 权利要求26所述的应用，其中所述可检测信号在肿瘤边缘处产生。

30. 权利要求26所述的应用，其中使用图像引导手术装置测定所述可检测信号。

## 用于标记动物组织的化合物、组合物及其应用

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2015年1月22日递交的美国临时申请No.62/106,400的权益,其公开内容通过引用的方式全部并入本文。

[0003] 政府支持说明

[0004] 本发明是在政府支持的项目编号为R01 EB005011和R01HL116307 (由美国国立卫生研究院颁发)的项目下作出的。政府对本发明拥有特定的权利。

### 背景技术

[0005] 对于几乎所有类型的实体瘤,手术干预是目前最常见的治疗方法。Siegel等,(2012) CA Cancer J.Clin.62:220-41;DeSantis等,(2014) CA Cancer J.Clin.64:252-71。因此,成功的结果取决于在手术期间来自受影响的原发器官和潜在的转移部位的所有癌细胞的完全去除。Vahrmeijer等,(2013) Nat.Rev.Clin.Oncol.10:507-18。为了改善治疗结果,靶向癌症中的特异性生物标志物的造影剂可用作术中造影剂,以指导实体瘤的手术切除。Miwa等,(2014) J.Orthop.Res.32:1596-601;Fujita (2012) J.Am.Coll.Surg.215:591。在各种成像模式中,基于光学的利用荧光造影剂的技术具有巨大的潜力。Rudin和Weissleder (2003) Nat.Rev.Drug Discov.2:123-31;Bednar等,(2007) Expert Opin.Drug Discov.2:65-85。靛青绿 (ICG)、荧光素、亚甲蓝和5-氨基乙酰丙酸 (5-ALA) 都是非靶向造影剂,它们目前被认为是用于各种肿瘤的可视化的可注射增强剂。Schaafsma等,(2011) J.Surg.Oncol.104:323-32;Tanaka等,(2006) Ann.Surg.Oncol.13:1671-81。此外,几种靶向造影剂处于不同的临床开发阶段。Kovar等,(2007) Anal.Biochem.367:1-12。值得注意的是,将靶向叶酸受体 $\alpha$ 的FITC探针用于临床试验,以证明用于治疗卵巢癌的术中荧光引导手术 (FGS) 的价值。van Dam等,(2011) Nat.Med.17:1315-9。另外,已经使用各种小鼠癌症模型,对用于恶性癌细胞的光学成像的其他肿瘤靶向剂 (如Chlorotoxin-Cy5.5) 进行了验证。然而,还未充分理解这种试剂的肿瘤选择性的机制。Veiseh等,(2007) Cancer Res.67:6882-8。

[0006] 普通肿瘤靶向造影剂的另一种方法是所谓的“智能探针”的使用,该智能探针仅在与肿瘤或周围边缘相关的酶活性作用时才在肿瘤组织中产生或积累信号。智能探针设计中的一个有用的策略是制备当通过蛋白酶切割时产生信号的探针。因为蛋白酶在肿瘤生长和转移以及诸如纤维化、炎症、骨质疏松症和关节炎等多种病理学中起重要作用,所以由蛋白酶活化的造影剂可以证明对许多疾病的检测和治疗是有价值的。Turk (2006) Nat.Rev.Drug Discov.5:785-99;Drag和Salvesen (2010) Nat.Rev.Drug Discov.9:690-701。

[0007] 许多用于肿瘤成像应用的探针由于所报道的其在血管生成和肿瘤生长中的作用而靶向基质金属蛋白酶 (MMP)。这包括在切割时产生信号的小分子探针和大的聚合物基探针以及当通过MMP切割时而积聚在细胞内的掩蔽细胞穿透肽。作为MMP的替代物,半胱氨酸组织蛋白酶是肿瘤发生的各个方面的重要调节剂。Shree等,(2011) Genes Dev.25:2465-79。在许多调节内在炎症反应的细胞中这些蛋白酶也是高度表达且活化的。Mohamed和

Sloane (2006) Nat. Rev. Cancer 6:764-75。通常,由于免疫细胞的浸润增加,导致在几乎所有实体瘤中半胱氨酸组织蛋白酶活性升高。Mitchem等, (2013) Cancer Res. 73:1128-41; McIntyre和Matrisian (2003) J. Cell. Biochem. 90:1087-97; Fonovic和Bogyo (2007) Curr. Pharm. Des. 13:253-61; Gocheva等, (2010) Genes Dev. 24:241-55。因此,已经在肿瘤特异性造影剂的设计中使半胱氨酸组织蛋白酶靶向。这样的试剂包括在转化期间共价修饰组织蛋白酶的基于荧光活性的探针 (Verdoes等, (2013) J. Am. Chem. Soc. 135:14726-30; Lee和Bogyo (2010) ACS Chem. Biol. 5:233-43; Blum等, (2005) Nat. Chem. Biol. 1:203-9; Blum等, (2007) Nat. Chem. Biol. 3:668-677; Verdoes等, (2012) Chem. Biol. 19:619-28)、一系列高分子量和低分子量淬灭的底物探针 (Watzke等, (2008) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 47:406-9; Hu等, (2014) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 53:7669-73) 和荧光开启底物探针 (Kisin-Finfer等, (2014) Bioorg. Med. Chem. Lett. 24:2453-8; Chowdhury等, (2014) J. Med. Chem. 57:6092-104; Fujii等, (2014) Bioconjug. Chem. 25:1838-46)。尽管已经证明所有报道的蛋白酶触发的智能探针可用于小鼠癌症模型中的肿瘤边缘的成像 (Verdoes等, (2013) J. Am. Chem. Soc. 135:14726-30; Hu等, (2014) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 53:7669-73; Mito等, (2012) Cancer 118:5320-30), 但在肿瘤造影方面都具有局限性, 并且都没有被已经临床认可的成像仪器使用。此外, 大多数探针仅使用简单的癌症移植模型 (其中大的肿瘤在皮肤表面或附近成像) 进行验证。因此, 针对多种肿瘤类型的增强造影的靶向造影剂的优化以及可以与现有外科手术工作流程范围内的现有临床仪器一起使用将对许多外科手术起到改造作用。

[0008] 在美国专利申请公开No. 2007/0036725中公开了用于含有活性蛋白酶 (如组织蛋白酶) 的细胞成像的方法和材料。在美国专利申请公开No. 2009/0252677中公开了可用于体内放射性标记靶向酶 (包括组织蛋白酶) 的基于放射性标记活性的探针。在每种情况下, 探针采用酯连接的酰氧基甲基酮 (AOMK) 反应性基团来共价修饰蛋白酶活性位点。在PCT国际公开No. WO 2012/118715中公开了基于非肽活性的荧光探针。

[0009] PCT国际公开No. WO 2014/145257公开了淬灭ABP, 其包含醚连接的2,3,5,6-四氟取代的苯氧基甲基酮 (PMK) 离去元件。所公开的ABP的可检测组分在酶转化后保持对其靶向蛋白酶的共价连接。

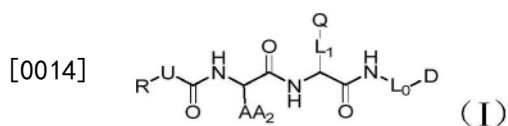
[0010] 美国专利申请公开No. 2014/0301950公开了包含暗淬灭剂、氨基酸主链、荧光团、6-氨基己酸、氨基乙氧基乙氧基乙酰基连接基团和甲氧基聚乙二醇 (mPEG) 链的成像剂。据称这些试剂被组织蛋白酶切割以产生荧光信号, 由此使患病细胞成像。该技术旨在鉴定组织的表面处或附近的病变细胞。

[0011] 尽管有这些披露, 但是在该领域中仍然需要新型的基于活性的造影剂, 其具有高细胞摄取, 靶向广谱的动物蛋白酶, 并且在各种波长下 (特别是在能够穿透病变组织的波长下) 提供更高的检测灵敏度。

## 发明内容

[0012] 本发明通过提供靶向动物蛋白酶的化合物、组合物以及所述化合物和组合物的使用方法, 从而解决了上述问题和其他需求。特别地,

[0013] 本发明提供了一种用于标记动物组织的化合物, 其具有式 (I):



[0015] 其中D是包括荧光标记的可检测元件,其中所述荧光标记是花菁标记或近红外荧光标记;

[0016] Q是QSY淬灭剂或QC-1;

[0017]  $L_0$ 是 $C_{4-8}$ 烷基连接基团;

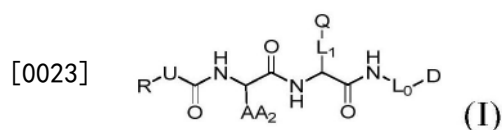
[0018]  $L_1$ 是 $C_{2-8}$ 烷基连接基团;

[0019]  $AA_2$ 是芳烷基氨基酸侧链;

[0020] U是O;

[0021] R是芳烷基。

[0022] 根据本发明的一个方面,提供了一种由结构式(I)表示的化合物:



[0024] 其中D是包括荧光标记的可检测元件;

[0025] Q是淬灭剂;

[0026]  $L_0$ 和 $L_1$ 是连接基团;

[0027]  $AA_2$ 是氨基酸侧链;

[0028] U是O、N或S;

[0029] R是烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基或保护基,并任选地由1个至3个A基团所取代;和

[0030] 各A独立地是烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷酰基、烷氨基、芳基、芳氧基、芳基氨基、芳烷基、芳烷氧基、芳烷酰基、芳烷氨基、杂芳基、杂芳氧基、杂芳基氨基、杂芳烷基、杂芳烷氧基、杂芳烷酰基、杂芳烷氨基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、环烷氧基、环烷酰基、环烷氨基、杂环基、杂环氧基、杂环基氨基、杂环基烷基、杂环基烷氧基、杂环基烷酰基、杂环基烷氨基、羟基、硫代基、氨基、烷酰基氨基、芳酰基氨基、芳烷酰基氨基、烷基羧基、碳酸酯、氨基甲酸酯、胍基、脲基、卤基、三卤代甲基、氰基、硝基、磷酰基、磺酰基、磺氨基或叠氨基。

[0031] 在式(I)的一些化合物的实施方案中,所述荧光标记是荧光素、俄勒冈绿、氟硼染料、罗丹明或花菁标记。具体而言,所述荧光标记可以是花菁标记,并且更具体而言,所述花菁标记可以是Cy5。

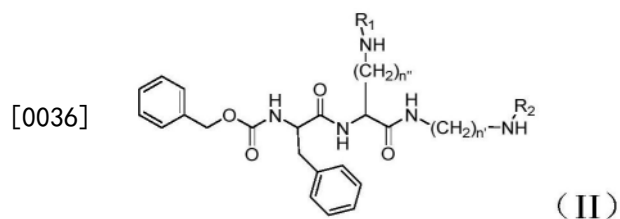
[0032] 在式(I)的一些实施方案中,所述荧光标记是近红外荧光标记。例如,所述近红外荧光标记可以是苯并吡喃(benzopyrillium)或花菁标记,并且更具体而言,所述苯并吡喃或花菁标记可以是DyLight标记。

[0033] 在一些实施方案中, $AA_2$ 是任选地由1个至3个A基团所取代的芳烷基氨基酸侧链,并且在一些实施方案中,U是O。在一些实施方案中, $L_0$ 和 $L_1$ 各自独立地为任选地被取代的烷基连接基团,其中每个碳原子任选地被杂原子替代。在具体实施方案中, $L_0$ 和 $L_1$ 各自独立地为 $C_{2-8}$ 烷基连接基团。甚至更具体而言, $L_1$ 是 $C_4$ 烷基连接基团。

[0034] 在一些实施方案中,Q是QSY淬灭剂,更具体而言是亲水性QSY淬灭剂,并且甚至更

具体而言,所述亲水性QSY淬灭剂是磺基-QSY淬灭剂。在其他具体实施方案中,Q是QC-1。

[0035] 根据一些实施方案,本发明的化合物具有结构式(II):



[0037] 其中

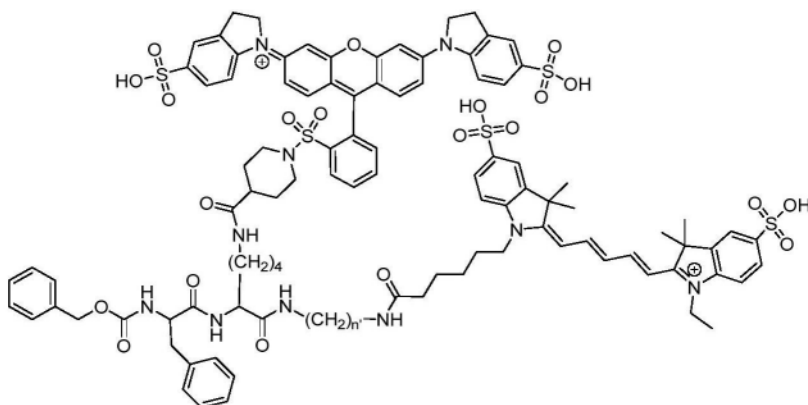
[0038]  $n'$  和  $n''$  各自独立地为2至8的整数;

[0039]  $R_1$  是QSY淬灭剂或QC-1;并且

[0040]  $R_2$  是苯并吡喃或花菁标记。

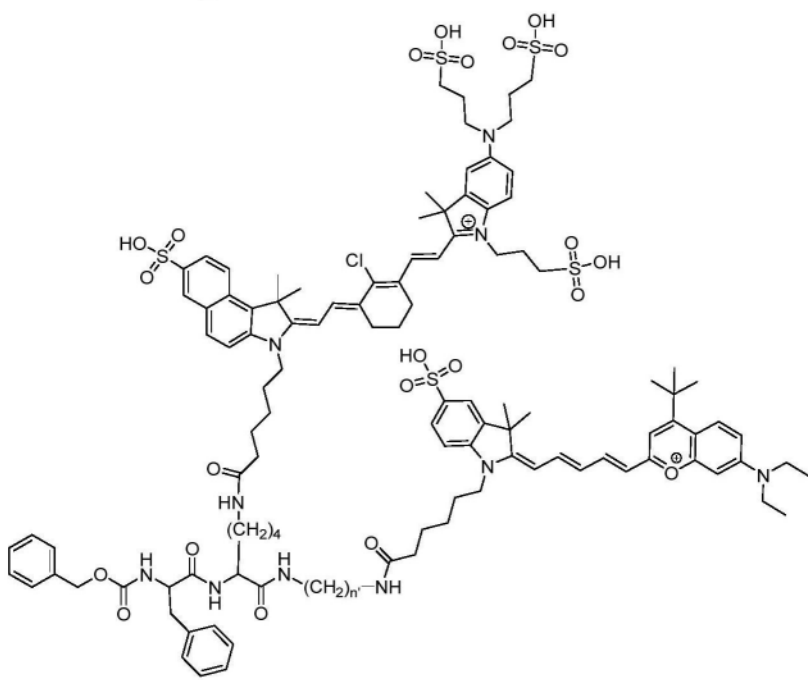
[0041] 更具体而言,  $n'$  可以为2、4或6,或者  $n''$  可以为4。甚至更具体而言,  $n'$  为2、4或6,并且  $n''$  为4。

[0042] 在一些实施方案中,所述化合物选自由以下化合物或者这些化合物药学上可接受的盐中的任一者构成的组:

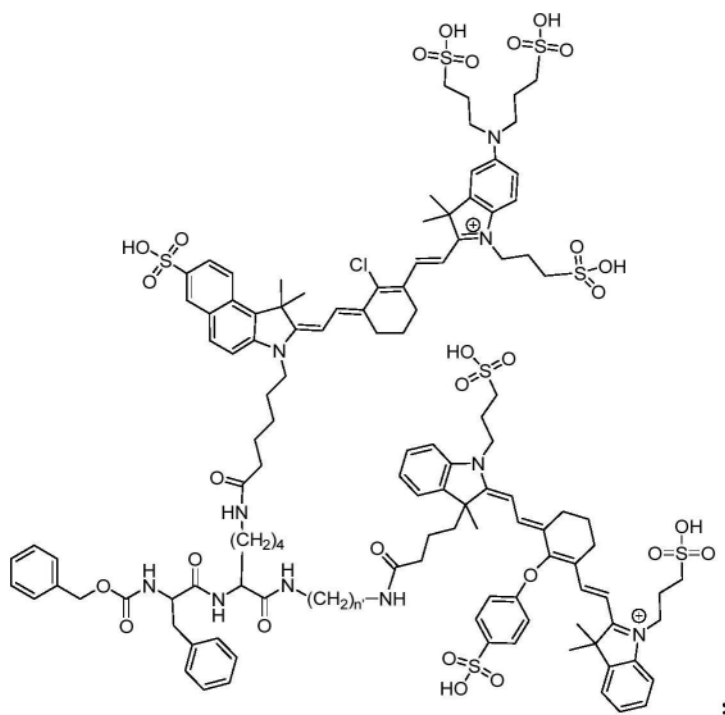


[0043]

以及

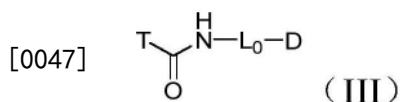


[0044]



[0045] 其中n' 为2、4或6。

[0046] 在本发明的另一方面中,提供了由结构式(III)表示的化合物:



[0048] 其中

[0049] D是可检测元件;

[0050] L<sub>0</sub>是连接基团;并且[0051] T是蛋白酶靶向元件,其任选地包含淬灭剂;条件是L<sub>0</sub>不包含乙氧基乙氧基连接基团(spacer)。

[0052] 根据具有式(III)的结构的一些化合物的实施方案,D包含荧光标记并且T包含淬灭剂。

[0053] 在具体实施方案中,所述荧光标记是荧光素、俄勒冈绿、氟硼荧染料、罗丹明或花菁标记。更具体而言,所述荧光标记可以是花菁标记,并且甚至更具体而言,所述花菁标记可以是Cy5。

[0054] 在一些实施方案中,所述荧光标记是近红外荧光标记。具体而言,所述近红外荧光标记可以是苯并吡喃或花菁标记。更具体而言,所述苯并吡喃或花菁标记可以是DyLight标记。

[0055] 在式(III)的一些实施方案中,D包含放射性物质。

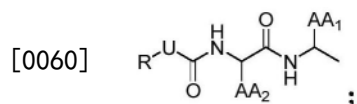
[0056] 在式(III)的一些实施方案中,L<sub>0</sub>为任选被取代的烷基连接基团,其中每个碳原子任选地被杂原子替代。具体而言,L<sub>0</sub>可以为C<sub>2-8</sub>烷基连接基团。

[0057] 在一些化合物的实施方案中,其中D包含荧光标记并且T包含淬灭剂,该淬灭剂可以是QSY淬灭剂。具体而言,所述QSY淬灭剂可以是亲水性QSY淬灭剂,并且更具体而言,所述亲水性QSY淬灭剂可以是磺基-QSY淬灭剂。在一些实施方案中,其中D包含荧光标记并且T包

含淬灭剂,该淬灭剂是QC-1。

[0058] 在式(III)的一些实施方案中,T是肽靶向元件。在具体实施方案中,T含有不超过4个氨基酸残基。在一些实施方案中,T是组织蛋白酶靶向元件,其任选地包含淬灭剂。更具体而言,T对组织蛋白酶L或组织蛋白酶V可以具有选择性。

[0059] 在式(III)的一些实施方案中,T是



[0061] AA<sub>1</sub>和AA<sub>2</sub>各自独立地是氨基酸侧链;

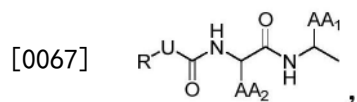
[0062] U是O、N或S;

[0063] R是烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基或保护基,并任选地由1个至3个A基团所取代;和

[0064] 各A独立地是烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷酰基、烷氨基、芳基、芳氧基、芳基氨基、芳烷基、芳烷氧基、芳烷酰基、芳烷氨基、杂芳基、杂芳氧基、杂芳基氨基、杂芳烷基、杂芳烷氧基、杂芳烷酰基、杂芳烷氨基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、环烷氧基、环烷酰基、环烷氨基、杂环基、杂环氧基、杂环基氨基、杂环基烷基、杂环基烷氧基、杂环基烷酰基、杂环基烷氨基、羟基、硫代基、氨基、烷酰基氨基、芳酰基氨基、芳烷酰基氨基、烷基羧基、碳酸酯、氨基甲酸酯、胍基、脒基、卤基、三卤代甲基、氰基、硝基、磷酰基、磺酰基、磺氨基或叠氨基。

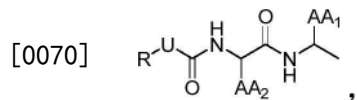
[0065] 在具体实施方案中,AA<sub>1</sub>是碱性氨基酸侧链并且AA<sub>2</sub>是芳烷基氨基酸侧链,各自任选地被1至3个A基团取代。在其他具体实施方案中,U是O。在其他具体实施方案中,D包含荧光标记并且T包含淬灭剂。更具体而言,所述荧光标记可以是荧光素、俄勒冈绿、氟硼荧染料、罗丹明或花菁标记。甚至更具体而言,所述荧光标记可以是花菁标记,例如Cy5。在一些具体实施方案中,所述荧光标记可以是诸如苯并吡喃或花菁标记之类的近红外荧光标记,例如DyLight标记。

[0066] 在式(III)的一些实施方案中,其中T是



[0068] D包含放射性物质。

[0069] 在式(III)的一些实施方案中,其中T是



[0071] 并且其中D包含荧光标记,AA<sub>1</sub>包含淬灭剂。更具体而言,AA<sub>1</sub>可以是-L<sub>1</sub>-Q,其中L<sub>1</sub>是连接基团并且Q是淬灭剂。在这些实施方案中,L<sub>1</sub>可以更具具体地为任选取代的烷基连接基团,其中每个碳原子任选地被杂原子替代。甚至更具体而言,L<sub>1</sub>可以为C<sub>2-8</sub>烷基连接基团,例如C<sub>4</sub>烷基连接基团。

[0072] 在一些上述式(III)的化合物中,AA<sub>2</sub>是任选地由1个至3个A基团所取代的芳烷基氨基酸侧链。在这些化合物的一些中,U是O。在上述一些化合物中,Q是QSY淬灭剂,例如为亲水性QSY淬灭剂,或甚至为磺基-QSY淬灭剂。

[0073] 在另一方面中,本发明提供了用于标记动物组织的组合物。这些组合物包含上述

化合物中的任一者和药学上可接受的载体。

[0074] 在又另一方面中,本发明提供了标记动物组织的方法。这些方法包括向动物施用上述组合物中的任一者的步骤。

[0075] 在又另一方面中,本发明提供了使动物中的肿瘤可视化的方法,该方法包括以下步骤:

[0076] 向所述动物施用上述组合物中的任一着;和

[0077] 从所述组合物与组织蛋白酶半胱氨酸蛋白酶的反应中测定在所述动物中产生的可检测信号;

[0078] 其中所述可检测信号与所述动物中的病变组织相关。

[0079] 在实施方案中,所述可检测信号是荧光信号。更具体而言,所述荧光信号是近红外信号。

[0080] 在其他实施方案中,所述可检测信号在肿瘤边缘产生。

[0081] 在又另一实施方案中,使用图像引导手术装置测定所述可检测信号。

## 附图说明

[0082] 图1(A)至图1(B)。组织蛋白酶选择性蛋白酶底物探针的设计。(A)具有蛋白酶可切割酰胺键的六种底物类似物的化学结构。在指定为“nCQ”(化合物2-4)的结构中,其中“n”值对应于连接基团长度( $n=2,4$ 和 $6$ ),将发色团(C)连接于赖氨酸侧链( $R_1$ ),而在指定为“nQC”(化合物5-7)的结构中,其中虽然“n”的值也对应于连接基团长度,但是将发色团连接在可切割的酰胺键( $R_2$ )的C末端侧的胺基上。(B)引入到探针设计中的潜在溶酶体效应(LLE)的示意图,该探针的引入是为了提高探针切割的经切割的荧光产物的保留。

[0083] 图2。通过多组织蛋白酶切割的底物的动力学分析。使用重组半胱氨酸组织蛋白酶的淬灭荧光nCQ和nQC底物的酶转化。各幅图中的上部迹线对应于组织蛋白酶L(Cat L)的活性。各幅图中的靠近下面的迹线对应于组织蛋白酶V(Cat V)的活性。

[0084] 图3(A)至图3(B)。体外LLE底物和非LLE底物的比较。(A)通过重组组织蛋白酶L来改变连接基团长度(space length)对淬灭荧光nCQ和nQC底物的切割效率( $K_{cat}/K_M$ )的影响。(B)用 $1\mu M$ 淬灭荧光底物(6CQ和6QC)培养的RAW 264.7细胞的代表性活细胞荧光显微镜。红色(顶部两幅图中的点状细胞溶质染色)是探针的Cy5荧光,绿色(中间两幅图中的点状细胞溶质染色)是溶酶体示踪剂(lysotracker)(溶酶体选择性染色)和蓝色(顶部两幅和中间两幅图中的核染色)是Hoechst 33342。比例尺表示 $10\mu m$ 。合并的荧光(底部两幅图)显示了Cy5染色和溶酶体示踪剂染色的重叠。

[0085] 图4(A)至图4(C)。荧光底物在4T1乳腺癌模型中的验证。(A)在注射有淬灭荧光nCQ和nQC底物( $n=2,6$ )的小鼠中,肿瘤相关半胱氨酸组织蛋白酶的非侵入性时程荧光成像在静脉注射后0.5小时、1小时、4小时、8小时和24小时下的代表性时间点图像。底部图表示在特定时间点下各个探针的最佳荧光造影。(B)在24小时内比较非溶酶体底物nCQ和溶酶体底物nQC的肿瘤标记动力学和药代动力学性质。误差条代表 $N\geq 3$ 只小鼠的平均值的标准偏差。使用无探针的对照小鼠来校正自体荧光。(C)在注射两种底物后4小时和24小时下进行离体肿瘤成像。误差条代表 $N\geq 3$ 只小鼠的平均值的标准偏差。

[0086] 图5(A)至图5(B)。LLE底物在体内组织中特异性积累的确认。(A)从在24小时终点

注射底物nCQ和nQC的小鼠中切除的肿瘤的冷冻切片上的组织学。在顶部图中示出了Cy5荧光(红色染色;仅在经2QC处理和经6QC处理的动物中观察到),在中间图中示出了巨噬细胞的CD68免疫染色(绿色染色;在所有动物中均观察到),在顶部图和中间图(蓝色染色)中示出了DAPI(核染色)。底排图示出了合并的荧光。(B) 静脉内施用后4小时和24小时,探针在各种器官中的生物分布。误差条代表:对于各个时间点, $N \geq 3$ 的平均值的标准偏差。

[0087] 图6(A)至图6(E)。经优化的NIR探针的体内特性的评价。(A) 近红外淬灭非溶酶体底物6CQNIR(8)和溶酶体类似物6QC NIR(9)的化学结构。(B) 在使用NIR探针的乳腺癌小鼠模型中,肿瘤相关的半胱氨酸组织蛋白酶的非侵入性荧光成像的时间过程。图像显示了1小时、2小时、3小时、4小时、6小时、12小时和24小时这些时间点。底部图表示在特定时间点,每个探针的最佳荧光造影。(C) 在24小时的时间段内6CQNIR和6QC NIR的肿瘤标记动力学定量。对于各个探针, $N \geq 3$ 只小鼠。误差条表示平均值的标准偏差。(D) 比较从接收两种底物的小鼠中分离的肿瘤的离体图像。分离时间为4小时和24小时时间点。(E) 注射后24小时探针在各种器官和肿瘤中的生物分布。

[0088] 图7(A)至图7(D)。采用临床达芬奇手术器械与经设计的组织蛋白酶探针的结合,结肠直肠癌、乳腺癌和肺腺癌的术中荧光图像引导检测和切除。(A) 配备有近红外摄像机的达芬奇手术机器人系统的图示。(B) 在静脉内施用LLE蛋白酶靶向造影剂6QC NIR(9) 6小时后,在结肠直肠癌结肠癌中的息肉APC<sup>min+</sup>小鼠模型的检测。图像是从显微结肠的实时术中成像的截图中获得的。这些图显示了在被切除的肿瘤的光(左)、荧光(中)和H&E染色(右)照亮的相同小鼠的结肠中检测到的息肉的代表性图像。(C) 使用临床仪器和造影剂6QC NIR来检测以及荧光图像引导手术去除小鼠乳腺肿瘤(4T1)。图像比较了肿瘤和瘤床的光照射(左)、荧光(中心)以及通过H&E染色(右)对肿瘤恶性的确认。(D) 探针在小鼠肺癌的检测和切除中的应用以及癌症与组织学的相关性。

[0089] 图8(A)至图8(C)。用于使组织蛋白酶成像的PET底物探针的设计和验证。(A) 底物探针L0263的结构。(B) 在第7天,在成像的2小时和24小时,用盐水或博来霉素处理的小鼠的非侵入性PET/CT扫描。在指定的时间点,冠状(左)、横轴(右上)和矢状(右下)图像显示了经生理盐水或博来霉素处理的组中的代表性小鼠。(C) 在不同处理组中,在第7天所有小鼠肺部的PET/CT强度的定量。误差条表示平均值 $\pm$  SEM,第7天(盐水 $n=4$ ;博来霉素 $n=4$ 。 $*p < 0.05$ ,通过t检验)。

## 具体实施方式

[0090] 本说明书尤其公开了用于非侵入式成像应用的淬灭荧光底物探针的设计和优化。特别地,提供了含有淬灭剂和荧光团对或放射性同位素标记的修饰肽。该化合物在蛋白酶切割时释放片段,其含有报告物(未淬灭荧光团或放射性同位素)和可质子化的胺,从而导致释放片段的溶酶体保留增加。

[0091] 对于在涉及炎症的任何病症中的造影成像,本发明的化合物是有用的。该化合物在各种实体瘤(乳腺癌、结肠癌、肺癌等)的图像引导手术中特别有用,但也可用于诊断和监测粥样硬化、纤维化、感染性疾病(例如结核感染)、以及在炎症反应中分泌组织蛋白酶或其他蛋白酶的地方的任何病症。

[0092] 已知靶向半胱氨酸蛋白酶的基于活性的探针(ABP)的先前实例包括一系列基于淬

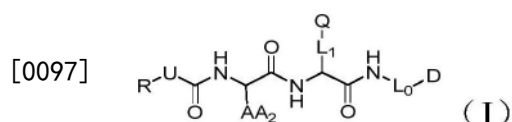
灭的近红外荧光活性的探针(qNIRF-ABP),其共价靶向半胱氨酸蛋白酶的木瓜蛋白酶家族(Blum等,(2007) Nat.Chem.Bio.3:668-677)和一系列具有醚键离去基团的有效半胱氨酸蛋白酶选择性ABP化合物(Verdoes等,(2013) J.Am.Chem.Soc.135:14726-30;PCT国际公开No.W02014/145257)。先前的ABP导致在酶转化期间由反应性探针共价修饰蛋白酶活性位点。荧光标记保持共价连接到蛋白酶的状态,并且其潜在荧光通过在酶转化期间释放含有淬灭剂的探针部分而未被掩蔽。

[0093] 目前的探针是发明人现有的ABP(Verdoes等,(2013) J.Am.Chem.Soc.135:14726-30;PCT国际公开No.W02014/145257)的新的变体,其中已经用可通过蛋白酶切割的天然酰胺键取代PMK弹头(图1(A))。已经新的底物中改变了底物和裂解基团之间的烷基连接基团的长度,并且已经评估了在不同位置中放置报告荧光团和淬灭剂对底物的影响。不期望受理论的约束,据信,溶酶体(pH为4至5)中切割的底物片段的游离氨基的质子化降低了阳离子中间体跨越溶酶体膜的扩散速率(Soulet等,(2004) J.Biol.Chem.279:49355-66),从而增强溶酶体中的裂解片段的保留,并且由此增加信号强度并延长用于在切割的片段上含有荧光团的底物的肿瘤中的持续时间。也参见Kazmi等,(2013) 41:897-905。

[0094] 体外酶动力学分析表明,通过各种半胱氨酸组织蛋白酶(特别是通过组织蛋白酶L)来有效地切割(未淬灭)设计的底物。对底物的转化数和亲和力与用于半胱氨酸组织蛋白酶的市售底物相当。在使用乳腺癌的同源原位小鼠模型的非侵入性成像研究中,发现设计的底物探针具有理想的药理学性质,例如快速标记动力学,肿瘤中和肿瘤周围区域中的显著积累,然后从器官中快速清除。这些结果证实,通过在探针设计中引入潜伏性阳离子向性,可以增加信号强度和总体对比度。

#### [0095] 化合物

[0096] 因此,在一个方面中,本公开提供了在动物组织中的蛋白酶活性(特别是组织蛋白酶活性)的检测和成像中用作成像剂的新的化合物。在一些实施方案中,该化合物具有式(I):



[0098] 其中D是包括荧光标记的可检测元件;

[0099] Q是淬灭剂;

[0100] L<sub>0</sub>和L<sub>1</sub>是连接基团;

[0101] AA<sub>2</sub>是氨基酸侧链;

[0102] U是O、N或S;

[0103] R是烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基或保护基,并任选地由1个至3个A基团所取代;和

[0104] 各A独立地是烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷酰基、烷氨基、芳基、芳氧基、芳基氨基、芳烷基、芳烷氧基、芳烷酰基、芳烷氨基、杂芳基、杂芳氧基、杂芳基氨基、杂芳烷基、杂芳烷氧基、杂芳烷酰基、杂芳烷氨基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、环烷氧基、环烷酰基、环烷氨基、杂环基、杂环氧基、杂环基氨基、杂环基烷基、杂环基烷氧基、杂环基烷酰基、杂环基烷氨基、羟基、硫代基、氨基、烷酰基氨基、芳酰基氨基、芳烷酰基氨基、烷基羧基、碳酸酯、氨基甲

酸酯、胍基、脒基、卤基、三卤代甲基、氰基、硝基、磷酰基、磺酰基、磺氨基或叠氨基。

[0105] 如本文所用,术语“烷基”是指饱和脂族基团的自由基,该饱和脂族基团包括直链烷基、支链烷基、环烷基(脂环族)、烷基取代的环烷基和环烷基取代的烷基。在一些实施方案中,直链或支链烷基在其主链上具有30个以下的碳原子(例如,对于直链为 $C_1$ - $C_{30}$ ,对于支链为 $C_3$ - $C_{30}$ ),更具体地为20个以下。同样地,一些环烷基在其环结构中具有3至10个碳原子,并且更具体而言,在环结构中具有5、6或7个碳原子。

[0106] 此外,如在整个说明书、实施例和权利要求书中所使用的术语“烷基”(或“低级烷基”)旨在包括“未取代的烷基”和“取代的烷基”,取代的烷基是指烷基部分具有取代了烃骨架上的一个或多个碳上的氢的取代基。这样的取代基可(例如)包括卤基、羟基、羰基(例如酮基、羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫代羰基(如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸盐、氨基、酰氨基、脒基、亚胺、氰基、硝基、叠氨基、硫代基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺氨基、磺酰基、杂环基、芳烷基、芳香族或杂芳香族部分。本领域技术人员将会理解的是在烃链上取代的部分如果需要的话,本身是可被取代的。例如,取代的烷基的取代基可以包括取代和未取代形式的氨基、叠氨基、亚氨基、酰氨基、磷酰基(包括膦酸酯和次膦酸酯)和磺酰基(包括硫酸酯、磺氨基、氨磺酰基和磺酸酯),以及醚、烷硫基、羰基(包括酮、醛、羧酸和酯)、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等。示例性的取代的烷基如下所述。环烷基可以进一步被烷基、烯基、烷氧基、烷硫基、氨基烷基、羰基-取代的烷基、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 等取代。

[0107] 在一些特定的实施方案中,如本文所使用的术语“烷氧基”是指其中连接有氧的低级烷基。示例性的烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、正丁氧基等。

[0108] 如本文所使用的术语“烯基”是指含有至少一个双键的脂族基团,并旨在包括“未取代的烯基”和“取代的烯基”,后者是指烯基部分具有取代了烯基的一个或多个碳上的氢的取代基。这样的取代基,可能会发生在那些包括或不包括在一个或多个双键中的一个或多个碳上。此外,除非稳定性受到抑制,否则这样的取代基包括所有那些预期用于如以上所讨论的烷基的那些取代基。例如,烯基被一个或多个烷基、环烷基、杂环基、芳基、或杂芳基的取代是能够预期的。

[0109] 当与化学基团(如酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基、或烷氧基)联合使用时,术语“ $C_{x-y}$ ”旨在包括链中包含x至y个碳原子的基团。例如,术语“ $C_{x-y}$ ”是指取代的或未取代的饱和烃基,包括在链中含有x至y个碳原子的直链烷基和支链烷基,包括卤代烷基,如三氟甲基和2,2,2-三氟乙基等。“ $C_0$ -烷基”表示在末端的基团是氢或者如果在内部则是键。术语“ $C_{2-y}$ -烯基”和“ $C_{2-y}$ -炔基”是指取代的或未取代的不饱和脂肪族基团类似物,其在长度和可能的取代度方面与上述烷基类似,但分别包含至少一个双键或三键。

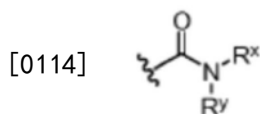
[0110] 如本文所使用的术语“烷氨基”是指被至少一个烷基所取代的氨基。

[0111] 如本文所使用的术语“烷硫基”是指被烷基取代的硫代基,并且可以通过通式烷基-S-表示。

[0112] 如本文所使用的术语“炔基”是指含有至少一个三键的脂族基团,并旨在包括“未取代的炔基”和“取代的炔基”,后者指的是炔基部分具有取代了炔基的一个或多个碳上的氢的取代基。这样的取代基,可能会发生在那些包括或不包括在一个或多个三键中的一个或多个碳上此外,除非稳定性受到抑制,否则这样的取代基包括所有那些预期用于如以上

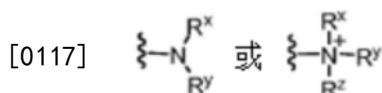
所讨论的烷基的那些取代基。例如,炔基被一个或多个烷基、环烷基、杂环基、芳基、或杂芳基的取代是能够预期的。

[0113] 如本文所使用的术语“酰胺”是指以下基团:



[0115] 其中 $R^x$ 和 $R^y$ 各独立地表示氢或烃基或 $R^x$ 和 $R^y$ 与它们连接N原子一起形成具有4至8个原子的环结构的杂环。

[0116] 术语“胺”和“氨基”是本领域公知的,是指未取代的和取代的胺及其盐,例如由下式表示的基团:



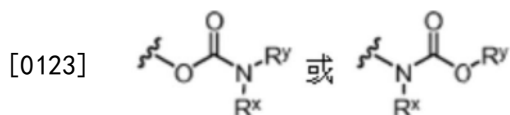
[0118] 其中 $R^x$ 、 $R^y$ 和 $R^z$ 各独立地表示氢或烃基或 $R^x$ 和 $R^y$ 与它们连接N原子一起形成具有4至8个原子的环结构的杂环。

[0119] 如本文所使用的术语“氨基烷基”是指被氨基取代的烷基。

[0120] 如本文所使用的术语“芳烷基”是指被芳基取代的烷基。

[0121] 如本文所使用的术语“芳基”包括取代的或未取代的单环芳族基团,其中环的各原子为碳。在某些实施方案中,所述环是5元至7元环,并且在更具体的实施方案是6元环。术语“芳基”还包括具有两个或更多个环的多环体系,其中两个或更多个碳共用于两个相邻环,其中所述相邻环中的至少一个是芳族的,例如,其他的环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。芳基包括苯、萘、菲、苯酚、苯胺等。

[0122] 术语“氨基甲酸酯基”是本领域公知的,并且是指以下基团:



[0124] 其中 $R^x$ 和 $R^y$ 独立地表示氢或烃基或 $R^x$ 和 $R^y$ 与它们连接原子一起形成具有4至8个原子的环结构的杂环。

[0125] 如本文所使用的术语“环烷基”是指非芳族的饱和或不饱和环,其中环的各原子为碳。在某些实施方案中,环烷基的环包含3至10个原子,在更具体的实施方案中是5至7个原子。

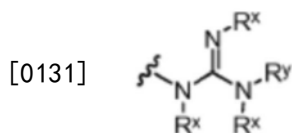
[0126] 术语“碳酸酯基”是本领域公知的,并且是指基团 $-OCO_2-R^x$ ,其中 $R^x$ 表示烃基。

[0127] 如本文所使用的术语“羧基”是指由式 $-CO_2H$ 表示的基团。

[0128] 如本文所使用的术语“酯”是指基团 $-C(O)OR^x$ ,其中 $R^x$ 表示烃基。

[0129] 如本文所使用的术语“醚”是指通过氧连接到另一个烃基的烃基。因此,烃基的醚取代基可以是烃基-0-。醚可以是对称的或不对称的。醚的实例包括,但不限于,杂环-0-杂环和芳基-0-杂环。醚包括“烷氧基烷基”基团,其可以由通式烷基-0-烷基表示。

[0130] 术语“胍基”是本领域公知的,并且可以由以下通式表示:



[0132] 其中 $R^x$ 和 $R^y$ 独立地表示氢或烃基。

[0133] 本文所使用的术语“卤代”和“卤素”是指卤素并包括氟、氯、溴和碘。

[0134] 本文所使用的术语“杂芳烷基 (heteralkyl)”和“杂芳烷基 (heteroaralkyl)”是指具有杂芳基取代的烷基。

[0135] 术语“杂芳基 (heteroaryl)”和“杂芳基 (hetaryl)”包括取代的或未取代的芳族单环结构,在某些具体实施方案中为5元至7元环,更具体的为5元至6元环,其环结构至少包括一个杂原子,在一些实施方案中,1至4个杂原子,并且在更具体的实施方案中,一个或两个杂原子。术语“杂芳基 (heteroaryl)”和“杂芳基 (hetaryl)”还包括具有两个或更多个环的多环体系,其中两个或更多个碳共用于两个相邻环,其中所述环中的至少一个是杂芳香族,例如,其他的环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、和/或杂环基。杂芳基 (例如) 包括吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、恶唑、噻唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶等。

[0136] 如本文所使用的术语“杂原子”指除碳或氢以外的任何元素的原子。典型的杂原子是氮、氧和硫。

[0137] 术语“杂环基”、“杂环”和“杂环的”是指取代或未取代的非芳香族环结构,在某些具体的实施方案中为3至10元环,更具体的为3至7元环,其环结构至少包括一个杂原子,在一些实施方案中为1至4个杂原子,并且在更具体的实施方案中为一个或两个杂原子。术语“杂环基”和“杂环的”还包括具有两个或更多个环的多环体系,其中两个或更多个碳是两个相邻环,其中所述环中的至少一个是杂环基,例如多环体系,其他的环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、和/或杂环。杂环基 (例如) 包括哌啶、哌嗪、吡咯烷、吗啉、内酯和内酰胺等。

[0138] 如本文所使用的术语“杂环基烷基”指被杂环基团取代的烷基。

[0139] 如本文所使用的术语“烃基”是指是通过碳原子键合的不具有 $=O$ 或 $=S$ 取代基的基团,并且通常具有至少一个碳-氢键和基本上为碳的骨架,但可任选地包括杂原子。因此,出于此目的,像甲基、乙氧基乙基、2-吡啶基和三氟甲基都被认为是烃基,但取代基如乙酰基 (这在连接碳上具有 $=O$ 取代基) 和乙氧基 (其通过氧而不是碳连接) 则不被看作是烃基。所述烃基包括,但不限于,芳基、杂芳基、碳环、杂环、烷基、烯基、炔基、以及它们的组合。

[0140] 如本文所使用的术语“羟基烷基”是指被羟基取代的烷基。

[0141] 当术语“低级”与化学基团 (如酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基或烷氧基) 共同使用时是指这样的基团,其中在取代基中包括十个以下的非氢原子。并且在某些实施方案中为六个以下。“低级烷基”,例如,是指包含十个以下碳原子的烷基,并在具体的实施方案中,为六个以下的碳原子。在某些实施方案中,本文所限定的酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基取代基分别是低级酰基、低级酰氧基、低级烷基、低级烯基、低级炔基和低级烷氧基,无论它们是单独出现还是与其他取代基组合出现,如在羟烷基和芳烷基所限定的那样 (在这种情况下,例如,当计算烷基取代基中的碳原子时不计算在芳基中的原子)。

[0142] 术语“多环基 (polycyclyl)”、“多环 (polycycle)”和“多环的”是指两个或更多个环 (例如,环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、和/或杂环基),其中两个或更多个原子共

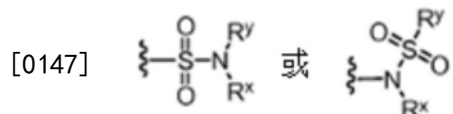
用于两个相邻的环,例如,所述环是“稠合环”。多环的各环可以是取代或未取代的。在某些实施方案中,多环的各环为含有3至10个原子的环,更具体地为5至7个原子的环。

[0143] 术语“取代的”是指在骨架上的一个或多个碳原子上具有取代了氢的取代基的基团。应该理解的是,“取代”或“取代的”包括隐含的条件,其是这样的取代根据取代的原子和取代基的允许的化合价,并且该取代产生稳定的化合物,例如,化合物在其使用条件下不自发进行转化(例如通过重排、环化、消除等转化)。如本文所使用的“取代的”意指包括有机化合物的所有允许的取代基。广义上说,允许的取代基包括有机化合物的无环和有环、支链和无支链、碳环和杂环、芳香族和非芳香族的取代基。对于适当的有机化合物而言,允许的取代基可以是一个或更多个以及相同或不同的。出于本发明的目的,杂原子(如氮)可具有氢取代基和/或本文所描述的满足杂原子的化合价的有机化合物任何可允许的取代基。取代基可以包括本文所描述的任何取代基,例如,卤素、羟基、羰基(例如酮、羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫代羰基(如硫酯、硫代乙酸酯、或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸酯、氨基、酰氨基、脒基、亚胺基、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺氨基、磺酰基、杂环基、芳烷基芳香族或杂芳香族部分。本领域技术人员应当理解的是如果合适的话,烃链上取代的部分可被本身取代。

[0144] 除非特别说明,在此提及的化学部分“未取代的”应理解为包含取代的变体。例如,提及“芳基”基团或部分隐含包含取代和未取代的变体。

[0145] 术语“硫酸酯”是本领域公知的并且是指基团 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 或其药学上可接受的盐。

[0146] 术语“磺酰胺”是本领域公知的,并且指的是由下列通式表示的基团:



[0148] 其中 $\text{R}^x$ 和 $\text{R}^y$ 独立地表示氢或烷基。

[0149] 术语“亚砷”是本领域公知的并且是指基团 $-\text{S}(\text{O})-\text{R}^x$ ,其中 $\text{R}^x$ 表示烷基。

[0150] 术语“磺基”或“磺酸酯基”是本领域公知的并且是指基团 $-\text{SO}_3\text{H}$ 或其药学上可接受的盐。

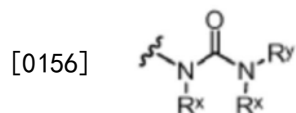
[0151] 术语“砷”是本领域公知的并且是指基团 $-\text{S}(\text{O})_2-\text{R}^x$ ,其中 $\text{R}^x$ 表示烷基。

[0152] 如本文所使用的术语“硫代烷基”是指被巯基取代的烷基。

[0153] 如本文所使用的术语“硫酯”是指基团 $-\text{C}(\text{O})\text{SR}^x$ 或 $-\text{SC}(\text{O})\text{R}^x$ ,其中 $\text{R}^x$ 表示烷基。

[0154] 如本文所使用的术语“硫醚”等价于醚,其中氧被硫取代。

[0155] 术语“脲基”是本领域公知的并且可有以下通式表示:



[0157] 其中 $\text{R}^x$ 和 $\text{R}^y$ 独立地表示氢或烷基。

[0158] 本发明的化合物通常是使用标准的合成化学技术合成的,例如,使用在下面的实施例部分所描述的方法合成。其他有用的合成技术(例如)描述在March's Advanced Organic Chemistry:Reactions,Mechanisms,and Structure,7th Ed.,(Wiley,2013); Carey和Sundberg,Advanced Organic Chemistry 4<sup>th</sup> Ed.,Vols.A and B(Plenum 2000,

2001); Fiesers' Reagents for Organic Synthesis, Volumes 1-27 (Wiley, 2013); Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, Volumes 1-5 and Supplementals (Elsevier Science Publishers, 1989); Organic Reactions, Volumes 1-81 (Wiley, 2013); 以及 Larock's Comprehensive Organic Transformations (VCH Publishers Inc., 1989) (它们的全部内容通过引用纳入本文)。这些化合物使用的原料是通常可从商业来源获得的或可容易地使用本领域技术人员公知的方法制备。例如, 参见 Fiesers' Reagents for Organic Synthesis, Volumes 1-27 (Wiley, 2013) 或 Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4, Aufl. ed. Springer-Verlag, Berlin, 包括增刊。

[0159] 当提及本发明化合物的组分时, 可以使用术语“衍生自...的残基”来描述由第一组分上的第一反应官能团和第二组分上的第二反应官能团反应而形成的残基。在示例性实施方案中, 在第一组分上的胺基团可以与第二组分上的活化的羧基反应, 从而形成包括一个或多个酰胺部分的残基。本发明涵盖了第一和第二反应官能团的其他排列。例如, 本领域技术人员能够理解的, 通过公知的“点击”反应, 叠氮化物-取代的第一组分与炔取代的第二组分之间的由酮催还或非酮催化的反应产生包含三唑的残基。参见 Kolb 等, (2001) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 40:2004; Evans (2007) Aus. J. Chem. 60:384。在 PCT 国际公开 No. WO 2012/118715 中提供了利用“点击”反应产生非肽荧光成像探针的示范性方法。用于产生或修饰本发明化合物 (特别是本发明化合物的蛋白酶靶向元件) 的对这些方法的适应性修改落入本领域的技术范围内。

[0160] 本领域的技术人员将理解, 保护基可逆地连接到分子的所需位置, 以控制其他试剂在该位置的反应。在本发明化合物的合成中有用的保护基团是本领域所公知的。例如参见 P.G.M. Wuts 和 T.W. Greene 的 Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 4<sup>th</sup> edition (Wiley-Interscience, 2006); 和 P. Kocienski 的 Protecting Groups (Thieme, 2005)。

[0161] 本发明化合物的  $L_0$  和  $L_1$  基团是连接基团, 其分别将可检测元件 D 和淬灭剂 Q 与本发明化合物连接。如本领域技术人员所理解的, 各连接基团可以独立地是任何合适的化学连接基团。 $L_0$  和  $L_1$  基团优选为烷基连接基团, 其中该烷基连接基团任选地被取代, 此外, 连接基团中的碳任选地以获得的结构化学稳定的程度被杂原子置换。这样的取代和置换应该理解为包括在连接基团内插入基团, 如醚、硫醚、二硫化物、酯、酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯等等。优选的连接基团长度在 5 至 40 个键长的范围内, 并且其可以是支链、直链或包含环。在一些情况下, 连接基团可以包括双键。根据包含连接基团的化合物的特殊需要, 它们可以根据需要而具有疏水性或亲水性。

[0162] 在具体实施方案中,  $L_0$  和  $L_1$  各自独立地为任选被取代的烷基连接基团, 其中每个碳原子任选被杂原子替代。在更具体的实施方案中,  $L_0$  和  $L_1$  各自独立地为  $C_{2-8}$  烷基连接基团。在甚至更具体的实施方案中,  $L_1$  是  $C_4$  烷基连接基团。

[0163] 还应该理解的是, 在  $L_0$  基团和可检测元件 D 之间, 以及在  $L_1$  基团和淬灭剂 Q 之间的连接可以是任何合适的化学连接, 正如本领域技术人员可以理解的那样。例如, 在一些情况下, 本发明化合物可能可以方便地通过在可检测元件或淬灭剂前体中包括与特定化学基团 (例如氨基, 硫醇基等) 反应的部分来制备。反应性可检测元件或淬灭剂能够通过带有反应性基团的化合物上的氨基、硫醇基等的反应而在这样的位置容易地连接到化合物上。由此

能够理解的是,即使未明确示出连接结构的细节,化学连接的这些类型也在本公开化合物的范围内。

[0164] 根据一些实施方案,可以修饰式(I)的化合物中的 $L_1$ 基团以延长本发明化合物的体内半衰期。因此,在这些实施方案中, $L_1$ 基团可以包含聚乙二醇部分、棕榈酸酯或其他长链脂肪酸部分、白蛋白结合蛋白等,以稳定经改性的化合物。

[0165] 如本领域技术人员可以理解的是,本发明化合物的 $AA_1$ 基团和 $AA_2$ 基团可以独立地是任何天然或非天然氨基酸侧链,或可以是基团“- $L_1$ -Q”。在一些实施方案中, $AA_1$ 基团是碱性氨基酸侧链并且 $AA_2$ 基团是芳烷基氨基酸侧链, $AA_1$ 基团和 $AA_2$ 基团各自可任选地被1个至3个A基团取代。在具体实施方案中, $AA_1$ 基团为赖氨酸侧链,并且 $AA_2$ 基团为苯丙氨酸侧链。在一些实施方案中, $AA_1$ 基团是- $L_1$ -Q,并且 $AA_2$ 基团是芳烷基氨基酸侧链。在其他实施方案中, $AA_1$ 基团是碱性氨基酸侧链,并且 $AA_2$ 基团是- $L_1$ -Q。在其他实施方案中, $AA_1$ 基团和 $AA_2$ 基团独立地是来自酸性氨基酸残基的侧链,例如来自天冬氨酸或谷氨酸残基的侧链、或来自烷基氨基酸残基(例如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸或其他这样的氨基酸残基)的侧链。来自其他氨基酸残基(例如赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺等)的侧链也适用于本发明化合物中的 $AA_1$ 基团或 $AA_2$ 基团。

[0166] 在 $AA_1$ 基团或 $AA_2$ 基团为“- $L_1$ -Q”基团的化合物的实施方案中, $L_1$ 连接基团组分可以由氨基酸侧链提供。例如,赖氨酸残基方便地提供用于与适当活化的淬灭剂反应的氨基-烷基。

[0167] 在一些化合物的实施方案中,U基团为0。

[0168] 在一些化合物的实施方案中,R基团是任选被1个至3个A基团取代的烷基。更具体而言,R基团可以是被芳基取代的烷基,该芳基本身任选地被取代。甚至更具体而言,R基团可以是任选被取代的芳烷基,例如苄基。

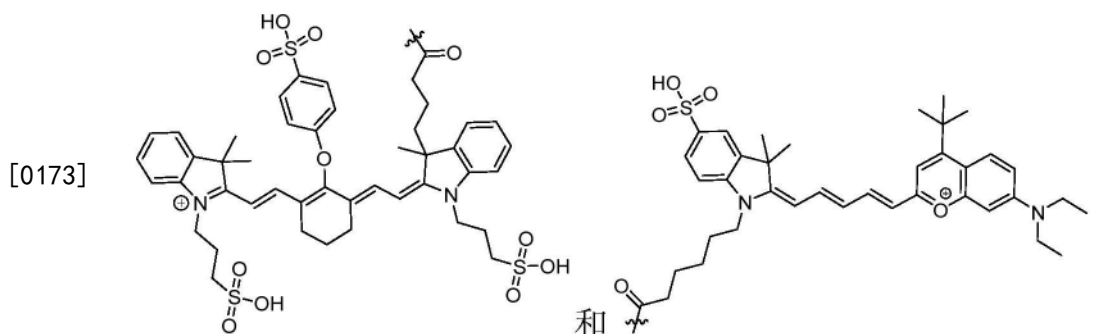
[0169] 本发明化合物的可检测元件D是能够通过任意合适方式(包括而不限于光学、电化学或化学检测方法)检测的任意化学基团。在具体实施方案中,可检测元件是荧光标记、发光物质、磷光物质、放射性物质(包括正电子发射物质)、纳米颗粒、SERS纳米颗粒、量子点或其他荧光晶体纳米颗粒、衍射颗粒、拉曼颗粒、金属颗粒(包括螯合金属)、磁性颗粒、微球、RFID标签、微条码颗粒或这些标记的组合。在更具体的实施方案中,可检测元件是荧光标记、包括螯合金属的放射性标记等。在PCT国际公开No.2009/124265中描述了适于在这些化合物中使用的放射性标记和螯合金属的实例,其全部内容通过引用并入本文。

[0170] 在本发明化合物优选的实施方案中,可检测元件是荧光标记。如本领域的普通技术人员已知的,当由于吸收入射电磁辐射而引起刺激时,荧光标记发射电磁辐射,优选可见光或近红外光。市售有各种各样的荧光标记,包括具有用于将标记与反应基团偶联的反应性部分的标记,所述反应性基团例如为氨基、硫醇基等。例如,参见The Molecular *Probes*<sup>®</sup> Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies。其他有用的荧光试剂(包括各种近红外(NIR)荧光标记)可从Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products,Rockford,IL获得。

[0171] 通常在700-900nm的范围内吸收的近红外荧光团特别适合用于组织成像,因为与较短波长的光(例如可见光)相比,这些波长的光能够更深地穿透到组织中。可用于本发明的化合物中的示例性近红外荧光标记是从LI-COR Biosciences,Lincoln,NE获得的IRDye

红外染料。这些染料的非限制性实例为IRDye 800CW、IRDye 680RD、IRDye 680LT、IRDye 750、IRDye 700DX、IRDye 800RS和IRDye 650。

[0172] 特别适用于体内成像应用的红外染料的其他实例是可从位于美国伊利诺伊州Rockford市的Thermo Scientific Pierce Protein Biology Products获得的DyLight系列的苯并吡喃(benzopyrillium)和苯并菁蓝(benzocyanine)化合物。这些染料的非限制性实例为DyLight 675-B1、DyLight 675-B2、DyLight 675-B3、DyLight 675-B4、DyLight 679-C5、DyLight 690-B1、DyLight 690-B2、DyLight 700-B1、DyLight 700-B2、DyLight 730-B1、DyLight 730-B2、DyLight 730-B3、DyLight 730-B4、DyLight 747-B1、DyLight 747-B2、DyLight 747-B3、DyLight 747-B4、DyLight 775-B2、DyLight 775-B3、DyLight 775-B4、DyLight 780-B1、DyLight 780-B2、DyLight 780-B3、DyLight 800和DyLight 830-B2。优选的近红外荧光团是DyLight 780B和DyLight 800,其具有以下结构:



[0174] 应当理解,上述染料中的任一者的药学上可接受的盐也被认为适用于这些应用。

[0175] 用于可见光波长的荧光标记的实例是广泛用于免疫荧光标记的荧光素。荧光素是在495纳米处具有最大吸收度的咕吨染料。相关的荧光团是俄勒冈绿,其是荧光素的氟化衍生物。

[0176] 适用于本发明化合物中的其他示例性的荧光标记是氟硼荧染料、罗丹明和花菁染料。特别地,氟硼荧染料由4,4-二氟-4-硼杂3a,4a-二氮杂-s-苯并二茚(氟化硼络合二吡咯甲川)表示,被称为BODIPY<sup>®</sup>染料。这些染料的各种衍生物是已知的,并且被认为适合用作本发明化合物中的可检测元件。例如,参见Chen等,(2000) J. Org. Chem. 65: 2900-2906。

[0177] 罗丹明染料是一类基于罗丹明环结构的染料。罗丹明尤其包括,四甲基罗丹明(TMR)和羧基四甲基罗丹明(TAMRA),TMR是非常普遍的用于制备蛋白质缀合物(特别是抗体和抗生物素蛋白缀合物)的荧光团,而TAMRA是通常用于寡核苷酸标记和自动核酸测序的染料。罗丹明作为基于荧光素的荧光基团的天然补给物存在,它提供更长的波长发射最大值和由此为多色标记或染色提供了机会。

[0178] 称为Alexa Fluor染料的磺化罗丹明系列荧光团也包含在罗丹明染料的组中。由Molecular Probes公司引入的Alexa Fluor染料例证了现代荧光技术中的巨大进步。对于更强烈的荧光发射,这些磺化罗丹明衍生物显示出比光谱类似探针更高的量子产率,并且具有几个附加的改进特性,包括增强的光稳定性、与共同激光线匹配的吸收光谱、pH值不敏感和高度水溶性。

[0179] 花菁染料对应于相关的染料Cy2、Cy3、Cy5、Cy7和它们的衍生物家族,它们基于部分饱和的吡啶氮杂环核,具有通过不同碳数的聚烯烃桥相连的两个芳香族单元。这些探针

展示出类似于许多传统的染料(例如荧光素和四甲基罗丹明)的荧光激发和发射图谱,但是它们具有增强的水溶性、光稳定性和更高的量子产率。大多数的花菁染料比它们的传统对应物更具有环境稳定性,使它们的荧光发射强度对于pH和有机封装介质(mounting medium)较不敏感。以类似于Alexa Fluors的方式,将Cy系列合成染料的激发波长特意性地调谐为被普通激光和电弧放电光源所用,并且可以利用传统的过滤器的组合来检测荧光发射。作为反应性染料或荧光团的花菁染料是容易得到的。花菁染料通常具有比的Alexa Fluor家族的成员更广泛的吸收光谱,使它们在一定程度上在共焦显微镜的激光激发源的选择中更为通用。

[0180] 在具体实施方案中,本发明化合物的可检测元件是花菁染料Cy5。

[0181] 在一些实施方案中,在本发明化合物的可检测元件中使用的荧光标记可以是pH依赖性荧光团。如本领域技术人员所理解的,这样的荧光标记物显示出取决于标记环境的pH的荧光光谱,并因此可用于报告反应后的标记的环境信息,例如被反应化合物标记的蛋白酶的位置或类型的信息。在本发明化合物的可检测元件中有用的各种标记的pH依赖性荧光团是已知的,例如,参见The Molecular *Probes*<sup>®</sup> Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies,它的全部内容通过引入纳入本文。

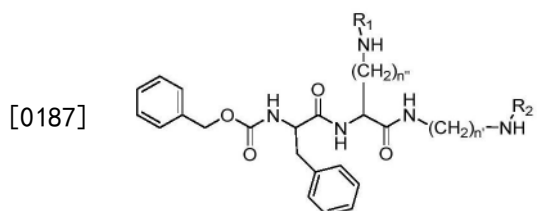
[0182] 在一些实施方案中,有益的是,本发明化合物的可检测元件内包括多个可检测基团(例如,荧光标记、放射性标记、螯合金属等)。如本领域技术人员能够理解的,这种多个标记可使用常规偶联化学法得以实现。

[0183] 本说明书的化合物通常还包含淬灭剂基团Q。术语“淬灭剂”是指调节荧光团的发光的化学实体。在一些情况下,淬灭剂本身可以是在特征波长发射荧光的荧光分子,该特征波长不同于荧光淬灭的标记。因此,当适当地与其他染料偶联时,荧光团可以充当淬灭剂,反之亦然。在这些情况下,来自受体分子(受体具有与供体标记不同的波长)荧光的增加可以分别报告标记化合物与它的环境(例如,溶酶体的内部或其他细胞隔室)的相互作用。在一些情况下,淬灭剂本身不发荧光(即,淬灭剂是“暗受体”)。这样淬灭剂(例如)包括dabcyl、甲基红、QSY二芳基罗丹明染料等。特别地,dabcyl(4-二甲基氨基-苯偶氮基)苯甲酸)是一种常见的广泛应用于许多测定法(如用于DNA检测的“分子信标”)的暗淬灭剂(美国专利No.5989823)。被称为“黑洞淬灭剂”的BHQ系列重氮染料具有广范围的吸收,其与许多与许多荧光团的发光重叠良好(参见PCT国际公开No.W001/86001)。来自Molecular Probes公司的QSY是在许多生物分析中已被广泛地用作淬灭剂的暗淬灭剂染料的另一实例(美国专利No.6399392)。

[0184] 特别地,QSY7是非荧光二芳基罗丹明衍生物(美国专利申请公开No.2005/0014160)。QSY21是在可见光谱内具有强吸收的非荧光二芳基罗丹明发色团,并且是有效的荧光淬灭剂。磺基-QSY21是QSY21的磺酸酯型(参见图1(A))。在美国专利申请公开No.2004/0241679中进一步说明了荧光团/淬灭剂对。

[0185] IRDye QC-1(可购自Li-Cor)是非荧光染料的另一实例,其适合用作本发明化合物的淬灭剂(参见图6(A))。它有效地淬灭由广范围(包括从可见光预期到近红外区域的波长范围)的荧光团产生的荧光。

[0186] 在另一方面中,本说明书提供具有式(II)的化合物:



(II)

[0188] 其中n' 和n" 各自独立地为2至8的整数；

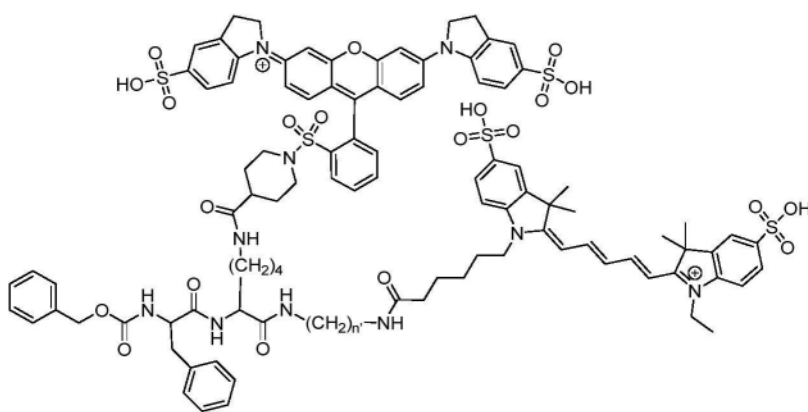
[0189] R<sub>1</sub>是QSY淬灭剂或QC-1；并且

[0190] R<sub>2</sub>是苯并吡喃或花菁标记。

[0191] 在这些化合物的一些实施方案中，n" 为4。

[0192] 在这些化合物的一些实施方案中，n' 为2、4或6。

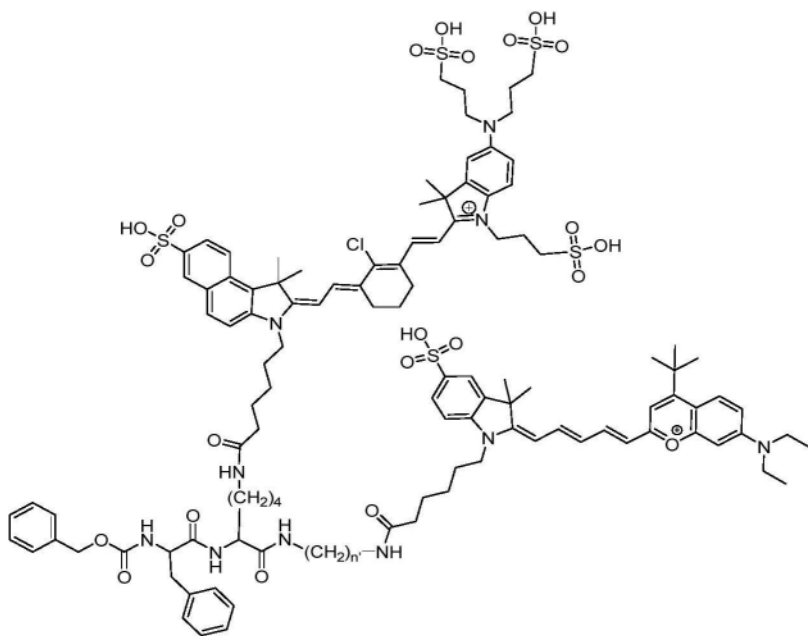
[0193] 在具体实施方案中，该化合物选自由以下化合物中或这些化合物的药学上可接受的盐中的任一者构成的组：



;

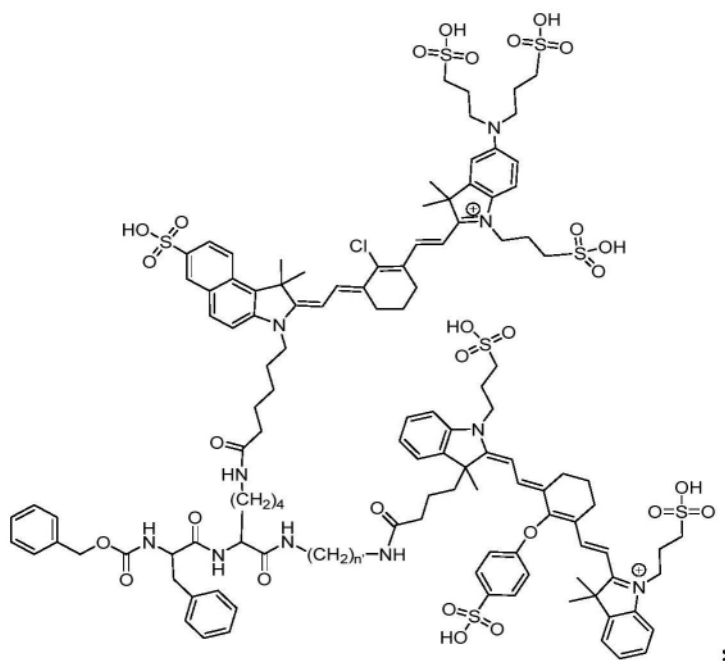
[0194]

以及



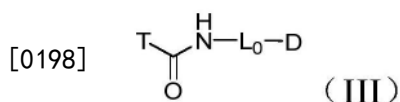
;

[0195]



[0196] 其中n' 为2、4或6。

[0197] 根据另一方面,本公开的化合物实施方案具有式(III)的结构:



[0199] 其中

[0200] D是可检测元件;

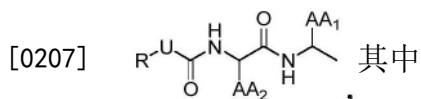
[0201] L<sub>0</sub>是连接基团;并且[0202] T是蛋白酶靶向元件,其任选地包含淬灭剂;条件是L<sub>0</sub>不包含乙氧基乙氧基连接基团。

[0203] 式(III)的化合物中的蛋白酶靶向元件T是任何合适的化学结构,该化学结构能够被蛋白酶识别并被蛋白酶催化水解以释放溶酶体片段D-L<sub>0</sub>-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>。在蛋白酶酶学领域中,包括但不限于肽类和非肽类蛋白酶靶向元件的这种结构的实例是众所周知的。在具体实施方案中,蛋白酶靶向元件是含有不超过四个氨基酸残基或不超过三个氨基酸残基的肽结构。在更具体的实施方案中,蛋白酶靶向元件是含有不超过两个氨基酸残基的肽结构。例如,如上所示,式(I)的化合物包括含有两个氨基酸残基的蛋白酶靶向元件。在具体实施方案中,蛋白酶靶向元件是对组织蛋白酶(特别是组织蛋白酶L或组织蛋白酶V)切割有选择性的结构。

[0204] 根据一些实施方案,可以修饰式(III)的化合物中的T基团以延长本发明化合物的体内半衰期。在这些实施方案中,因此,T基团可以包含聚乙二醇部分、棕榈酸酯或其他长链脂肪酸部分、白蛋白结合蛋白等,以稳定经改性的化合物。

[0205] 在式(III)的一些实施方案中,L<sub>0</sub>不包含聚乙二醇基团。

[0206] 在式(III)的一些实施方案中,蛋白酶靶向元件是



[0208] AA<sub>1</sub>和AA<sub>2</sub>各自独立地是氨基酸侧链；

[0209] U是O、N或S；

[0210] R如上述式(I)的化合物所定义。

[0211] 在具体实施方案中,AA<sub>1</sub>是碱性氨基酸侧链并且AA<sub>2</sub>是芳烷基氨基酸侧链,其各自任选被1个至3个A基团取代。在其他具体实施方案中,U为O。在其他具体实施方案中,R基团为芳烷基,例如苄基。

[0212] 在上述蛋白酶靶向元件的一些实施方案中,AA<sub>1</sub>包含淬灭剂。在这些实施方案中,AA<sub>1</sub>可以具有结构-L<sub>1</sub>-Q,其中L<sub>1</sub>是如上定义的连接基团,并且Q是淬灭剂。

[0213] 在这些实施方案中的一些实施方案中,可以修饰L<sub>1</sub>基团以延长本发明化合物的体内半衰期。在这些实施方案中,因此,L<sub>1</sub>基团可以包含聚乙二醇部分、棕榈酸酯或其他长链脂肪酸部分、白蛋白结合蛋白等,以稳定改性化合物。

[0214] 式(III)化合物中的可检测元件D是上述可检测的基团中的任一者。在具体实施方案中,可检测元件包括荧光标记或放射性物质(包括正电子发射物质)。在更具体的实施方案中,可检测元件包含荧光标记,并且胰天蛋白酶靶向元件T包含淬灭剂。

[0215] 在某些实施方案中,荧光标记是荧光素、俄勒冈绿、硼-二氮杂茛、罗丹明或花菁标记。具体而言,荧光标记可以是花菁标记,例如Cy5。在某些其他实施方案中,荧光标记是近红外荧光标记,例如苯并吡喃或花菁标记。在具体的实施方案中,苯并吡喃或花菁标记是DyLight标记,例如DyLight 780B染料或DyLight 800。

[0216] 在式(III)的化合物的一些实施方案中,可检测元件包含放射性物质。

[0217] 式(III)的化合物中的L<sub>0</sub>连接基团可以是上述连接基团中的任一者。

[0218] 药物组合物

[0219] 在另一个方面,本发明提供了包含本发明化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。这类组合物(例如)用于动物体的组织内成像并还用于评估动物体内的酶(例如蛋白酶)活性。特别地,对于作为蛋白酶底物、特别是组织蛋白酶底物的本发明的化合物,所述药物组合物可以用作癌细胞的非侵入性光学成像的试剂。

[0220] 药学上可接受的载体是本领域已知的,并且(例如)包括水溶液例如水或生理缓冲盐水或其他溶剂或赋形剂(如乙二醇、甘油、油(如橄榄油)或可注射的有机酯)。在具体实施方案中,当这种药物组合物施用于人类时,该水溶液是无热原的,或基本上无热原的。可以选择赋形剂(例如)从而实现药剂的缓释或选择性地靶向一种或多种细胞、组织或器官。药物组合物可以是单位剂量形式(如片剂、胶囊、胶囊微粒(sprinkle capsule)、颗粒剂、粉剂、糖浆、栓剂、或注射剂等)。组合物也可存在于透皮递送系统(例如,皮肤贴剂)。

[0221] 药学上可接受的载体可包含生理上可接受的药剂,其(例如)用于稳定或增加本发明的化合物的吸收。这种生理上可接受的药剂(例如)包括碳水化合物,如葡萄糖、蔗糖或葡聚糖;抗氧化剂,如抗坏血酸或谷胱甘肽;螯合剂;低分子量蛋白或其他稳定剂或赋形剂。药学上可接受的载体的选择(包括生理上可接受的药剂)取决于(例如)组合物的施用途径。药物组合物还可以包括脂质体或其他聚合物基质,其中(例如)本发明的化合物药物组合物已经容纳于它们之中。例如由磷脂或其他脂质构成的脂质体是无毒的、生理上可接受和可代谢的载体,其能够相对简单的制造和施用。

[0222] 在本文中短语“药学上可接受的”用来指这样的化合物、材料、组合物和/或剂型,

在合理的医学判断范围内,它们适合用于与人类和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的利益/风险比相称。

[0223] 如本文所使用的短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或赋形剂,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋料、溶剂或封装材料,涉及将来自体内的一个器官或部分的目标化合物运送或运输到体内的另一个器官或部分。各载体必须是在与制剂的其他成分相容的意义上“可接受的”并对患者无害。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:(1)糖类,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4)粉末状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋料,如可可脂和栓剂蜡;(9)油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇,例如丙二醇;(11)多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲溶液;和(21)在药物制剂采用的其他无毒性相容物质。参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,20th ed.(Alfonso R.Gennaro编),2000。

[0224] 包含本发明化合物的药物组合物可通过多种施用途径中的任意一种施用给受试者,所述途径(例如)包括口服(例如,作为在水性或非水性溶液或悬浮液中的浸润剂、片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、施用到舌头上的糊剂);舌下含服;经肛门、经直肠或经阴道(例如作为阴道栓剂、乳膏或泡沫);经肠胃外(包括肌内、静脉内、皮下或鞘内,例如,通过无菌溶液或悬浮液形式);经鼻;腹腔内;皮下;透皮(例如,如施用到皮肤的贴剂);或局部施用(例如作为乳膏、软膏或喷雾剂施用到皮肤上)。所述化合物也可以被配制为用于吸入。在某些实施方案中,本发明的化合物可以简单地溶解或悬浮在无菌水中。合适的施用途径及适合施用组合物的施用途径的细节(例如)可在以下文献中找到:美国专利No.6,110,973;5,763,493;5,731,000;5,541,231;5,427,798;5,358,970;和4,172,896,以及这些专利文献中所引用的文献。

#### [0225] 标记组织和使肿瘤可视化的方法

[0226] 在另一个方面中,本公开提供了标记动物体内的组织的方法,该方法包括向动物施用本发明组合物的步骤。

[0227] 在另一个方面中,本公开提供了使动物体内的肿瘤可视化的方法,该方法包括向动物施用本发明组合物,并测定在动物体内,由于组合物与蛋白酶(特别是半胱氨酸蛋白酶)之间的反应所产生的可检测的信号,其中该可检测的信号与动物体内的肿瘤有关。

[0228] 在所述方法实施方案中的一些实施方案中,可检测的信号是荧光信号。在一些实施方案中,荧光信号是在肿瘤边缘产生的。

[0229] 将肽类成像剂施用给动物是本领域普通技术人员所熟知的。在优选的实施方案中,所述药剂是通过注射来施用的,但是其他合适的施用方式也被认为是在本发明的范围之内。

[0230] 本发明的方法针对使动物体内蛋白酶(特别是半胱氨酸蛋白酶)的标记和可视化。合适的动物包括表达半胱氨酸蛋白酶,特别是在肿瘤细胞中表达半胱氨酸蛋白酶的动物。在优选的实施方案中,该动物是哺乳动物。在高度优选的实施方案中,该动物是人。在其他优选的实施方案中,该动物是家畜或宠物。

[0231] 在一些实施方案中,本发明的方法包括测定在动物体内产生的可检测信号的步骤。测定可检测信号的方法包括但不限于,成像方法,例如荧光成像法。在一些实施例中,荧光成像系统(例如)是Xenogen IVIS 100系统、IVIS Spectrum系统(PerkinElmer,Waltham, MA)或任何其他合适的非侵入性体内荧光成像系统。在一些实施方案中,使用达芬奇手术系统(Intuitive Surgical, Inc., Sunnyvale, CA)测定可检测的荧光信号。如下面进一步详细描述,可以使用这样的系统来在用瞬时成像剂治疗的患者组织中结合术中荧光引导外科技术实施即时标记和可视化方法。

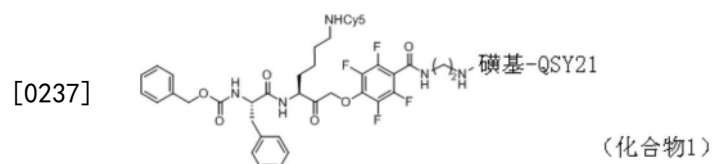
[0232] 在另一方面中,本说明书提供用于标记动物组织的化合物。上面详细描述了这些化合物。将这些化合物与药学上可接受的载体组合施用于动物以标记组织。这些化合物也用于使动物体内的肿瘤可视化。如上所述,将化合物与药学上可接受的载体组合施用于动物,并测定在动物中由化合物与蛋白酶(特别是半胱氨酸蛋白酶)的反应产生的可检测信号,以便使肿瘤可视化。

[0233] 对于本领域技术人员来说,显而易见的是在不脱离本发明或其任意实施方案的范围下,可以对本文所描述的方法和应用做出其他合适的修改与调整。虽然现在已经详细描述了本发明,但是通过参照以下实施例将更加清楚地理解本发明,在此包括以下实施例仅用于举例说明,并非意在限制本发明。

#### [0234] 实施例

#### [0235] 淬灭荧光底物的设计与合成

[0236] 使用最近报道的一系列有效和选择性ABP(以下示例为化合物1)的化学结构作为设计本文报道的淬灭的荧光底物探针的起点。参见Verdoes等,(2013) J. Am. Chem. Soc. 135: 14726-30和PCT国际公开No. W02014/145257。



[0238] 作为设计方法的一部分,据确定:与原始共价探针相比,底物在不抑制靶蛋白酶的情况下产生信号的能力以及改善的水溶性将获得这样的底物类似物,该底物类似物在体内更快地激活并产生更明亮的信号。使用可切割的酰胺键来代替不可逆的硫醇反应性四氟苯氧基甲基酮(PMK)亲电体(图1(A))。为了选择用于使组织蛋白酶活性成像的最佳底物,通过引入两个结构修饰来设计淬灭的荧光底物探针的6元文库。首先,改变底物和淬灭剂之间的烷基连接基团的长度,以便测量连接基团长度对探针被组织蛋白酶切割/去淬灭效果的影响。从 $[(CH_2)_n]$ 的范围内选择三种不同的连接基团长度,在 $[(CH_2)_n]$ 中, $n=2,4$ 和 $6$ ,代表底物2CQ(化合物2)、4CQ(化合物3)和6CQ(化合物4)。其次,将Cy5荧光团的位置从赖氨酸侧链的胺基转换为与P1酰胺键相邻的末端胺,以分别生成底物2QC(化合物5)、4QC(化合物6)和6QC(化合物7)(图1(A))。字母C和Q分别对应于荧光团(Cy5)组分和淬灭剂(QSY21-磺基)组分。不期望受理论的约束,据信在溶酶体中的nQC探针的酶切之后,由于溶酶体中的酸性pH环境,切割产物的Cy5部分上的游离末端胺被质子化。因此,由于阳离子物质通过膜的扩散缓慢,导致所得到的阳离子Cy5被保留在溶酶体室中。由于这种潜在溶酶体效应(LLE),阳离子荧光团在溶酶体室中的增强的保留进而在非侵入性成像期间放大并维持肿瘤位点中荧

光信号的持续时间(图1(B))。

[0239] 如下面的方案1所示,通过固相化学法和溶液相化学法的组合实现了所有6种底物探针的合成。使用Fmoc固相化学法将正烷基二胺、Boc-N-赖氨酸和Z-苯丙氨酸组装在2-氯三苯甲基氯树脂上。使用1%三氟乙酸(TFA)的二氯甲烷溶液从树脂中选择性切割底物,生成各自具有不同长度的烷基连接基团的底物的核心结构。通过反相制备HPLC纯化后,将产物分成两部分。在DMSO中将磺基-QSY21-NHS或Cy5-NHS与分开的一半的游离末端胺偶联,随后在50%TFA(溶解于DCM中)中将赖氨酸上的Boc-保护基团除去。通过将Cy5-NHS(对于nQC底物)或磺基-QSY21-NHS(对于nQC底物)偶联到赖氨酸侧链上,从而获得最终的淬灭底物。通过HPLC纯化后,测试探针在体外对各种重组半胱氨酸组织蛋白酶的活性。

[0240] 淬灭荧光底物的体外分析

[0241] 通过在各种重组半胱氨酸蛋白酶(特别是组织蛋白酶L、S、K、B和V)的存在下监测各个内部淬灭的探针的转化曲线,从而确定全部6种底物的活性和选择性。在37℃下,在50mM的柠檬酸盐缓冲液(pH=5.5,5mM DTT,0.1%曲拉通X(triton X),0.5%CHAPS)中将相同浓度(5nM)的各种酶与不同的探针一起孵育。使用共价半胱氨酸蛋白酶抑制剂ZFK-PMK和市售底物Z-VVR-AMC(对于组织蛋白酶S、L、B和V)、或Z-KR-AMC(对于组织蛋白酶K),通过活性位点滴定(Boucher等,(2014)Methods Mol.Biol.1133:3-39)确认所使用的各种组织蛋白酶的精确浓度。测定各探针的Cy5荧光增加率(其是表示组织蛋白酶的探针切割的指标)。

[0242] 全部淬灭的底物(nQC和nCQ,n=2、4、6)都被组织蛋白酶L、V、S和K切割,然而,组织蛋白酶B在所用条件下没有观察到荧光增加(图2)。在所测试的组织蛋白酶中,Cat L与所有探针产生最高的荧光增加,表明文库对半胱氨酸组织蛋白酶L的选择性很强(图2,各图中的顶部迹线)。有趣的是,底物的切割不受荧光团和淬灭剂对的取向的影响,因为nCQ探针和nQC探针都通过各种组织蛋白酶而被切割至相同的程度(图2,左图与右图相比)。相比之下,酶的催化/切割效率( $K_{cat}/K_m$ )与邻近底物的p1位置的烷基连接基团的长度之间似乎存在很强的相关性。例如,对于Cat L,在2CQ和6CQ之间观察到催化效率增加4倍,而在2QC底物和6QC底物之间观察到催化效率增加6倍(表1)。对于Cat V,这一观察结果是一致的,其中在连接基团长度n分别等于2和6时,观察到效率增加了8倍和4倍(表2)。催化效率的这些差异完全是由于转化数( $k_{cat}$ )的差异导致的,因为对于Cat L,所有底物的 $K_m$ 保持显著相同(表1)。底物在体外中的较高的酶转化是尤其值得注意的,因为在非侵入性成像期间较高的转化数可能表明细胞中的这种探针的激活更快。

[0243] 表1:具有重组组织蛋白酶L的淬灭底物的酶动力学参数。数据表示三个重复实验的平均值±平均值的标准误差。

探针	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
(2) 2CQ	$6.4 \pm 0.8$	0.141	22,094
(3) 4CQ	$4.6 \pm 0.7$	0.283	61,744
[0244] (4) 6CQ	$5.4 \pm 0.5$	0.487	89,551
(5) 2QC	$6.5 \pm 1.5$	0.095	14,687
(6) 4QC	$8.6 \pm 1.3$	0.396	46,008
(7) 6QC	$5.3 \pm 0.8$	0.458	86,763

[0245] 表2:具有重组组织蛋白酶V的淬灭底物的酶动力学参数。数据表示三个重复实验的平均值±平均值的标准误差。

	探针	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )
	(2)2CQ	$5.0 \pm 0.4$	0.014	2,702
	(3)4CQ	$3.4 \pm 0.3$	0.073	21,423
[0246]	(4)6CQ	$6.8 \pm 0.4$	0.164	23,483
	(5)2QC	$0.9 \pm 0.1$	0.008	7,951
	(6)4QC	$4.8 \pm 0.2$	0.188	39,470
	(7) 6QC	$4.4 \pm 0.2$	0.150	34,104

[0247] 许多形式的癌症的一个特征是组织蛋白酶丰富的免疫细胞(例如巨噬细胞)对肿瘤周围的区域的浸润增加。Shree等, (2011) Genes Dev. 25:2465-79; Bell-McGuinn等, (2007) Cancer Res. 67:7378-85。因此,在使用淬灭底物作为半胱氨酸组织蛋白酶活性的非侵入性成像的可能的试剂之前,最初测量了巨噬细胞来源的细胞系RAW264.7中的蛋白酶的活化。将细胞与探针一起孵育,然后通过荧光显微术成像。在37℃下在CO<sub>2</sub>气氛中,在具有10%FBS的DMEM中将1μM的各淬灭底物nCQ和nQC与RAW264.7细胞一起孵育30分钟。用PBS洗涤细胞,并用溶酶体选择标记Lysotracker Red和Hoechst 33342核染色进行染色,用PBS洗涤3次,然后在用于活细胞成像的PBS中悬浮。对于与细胞一起孵育的各淬灭底物,观察到强的Cy5荧光探针,证明这些探针在该巨噬细胞来源的细胞系中被半胱氨酸蛋白酶活化。如探针与Lysotracker Red的强共同定位所示,活细胞中的标记对于酸性囊泡是非常有选择性的。非共价底物的标记形态与用共价标记(化合物1)处理的细胞的标记形态相似,表明进入细胞的相似模式。

[0248] 具有可逆底物的肿瘤的非侵入性光学成像

[0249] 已经证明了底物在体外和基于细胞的测定中的活性,接着在乳腺癌的同源原位小鼠(syngeneic, orthotopic mouse)模型中评估底物。在该模型中,将4T1细胞接种到小鼠的左侧1号和10号乳腺脂肪垫中以产生肿瘤。为了确定LLE的影响,将溶酶体探针2QC(化合物5)和6QC(化合物7)的成像信号直接与非溶酶体类似物2CQ(化合物2)和6CQ(化合物4)的成像信号进行比较。将底物经静脉施用于患瘤小鼠中,并在施用后的不同时间点对小鼠进行成像。在施用后不到30分钟内,在肿瘤内和肿瘤周围观察到来自淬灭底物探针的转化中的Cy5荧光的快速积累,并在1小时内观察到来自周围正常组织的足够的造影分界肿瘤(图4(A))。荧光信号的强度在施用后4小时达到最大值,随后信号强度降低(图4(B))。与非溶酶体底物2CQ和6CQ相比,注射有LLE底物2QC和6QC的小鼠的肿瘤中的总体绝对荧光强度更高且更亮。此外,在施用LLE底物的小鼠的肿瘤中,信号的强度在24小时内保持恒定,而来自非LLE底物的信号在24小时后几乎完全清除(图4(A)和4(B))。通过从在4小时后和24小时后已被安乐死的小鼠中切除的肿瘤的离体成像观察到类似的趋势(图4(C))。这些数据表明了低分子量可逆结合的造影剂的设计中的潜在溶酶体效应的价值。

[0250] 为了确定哪个细胞群负责激活体内的淬灭底物探针,使用巨噬细胞选择性标记物CD68对分离自注射有各底物的小鼠的肿瘤冷冻切片上进行免疫荧光染色。底物的Cy5信号仅共定位于CD68阳性细胞(巨噬细胞),而在4T1肿瘤细胞中没有观察到信号(图5(A))。此

外,仅在来自接受nQC底物的小鼠的组织中观察到Cy5荧光,而在用nCQ底物处理的小鼠的组织中未观察到Cy5荧光(图5(A))。这些结果进一步验证了LLE作为增强肿瘤中探针保留的策略的效用。

[0251] 探针在使用达芬奇手术系统的FGS中的应用

[0252] 达芬奇手术系统是由Intuitive Surgical Inc.制造的机器人手术系统,其目前在世界各地的诊所用于腹腔镜手术。使用该系统的手术过程目前在白光照射下进行,然而,其不能提供足够的造影来限定肿瘤与周围正常组织的边缘。因此,与现有达芬奇系统兼容的肿瘤靶向造影剂的发展具有重要价值,并且应当会在荧光指导手术(FGS)中获得显著改善的治疗效果。

[0253] 因此,已经在FGS的临床相关模型系统中测试了上述优化的底物探针。为了达到这些结果,因此已经合成了可逆探针6CQNIR(化合物8)和该底物的溶酶体类似物6QCNIR(化合物9)。在这些化合物中,在策略上用类似分子量的近红外(NIR)DyLight 780-B1荧光团取代Cy5发色团。基于体外组织蛋白酶的最佳转化数来选择具有 $n=6$ 的连接基团的化合物。也用IRDye QC-1来代替QSY21-磺基淬灭剂,该IRDye QC-1是暗NIR淬灭剂(图6(A))。除了在达芬奇机器人的相机系统上可检测到外,NIR染料的发射波长(吸收/发射最大值为783/799nm)落在具有低总体背景的窗口内,因此在成像期间将增强组织穿透并改善信号与背景比。Richards-Kortum和Sevick-Muraca(1996)Annu.Rev.Phys.Chem.47:555-606。首先使用IVIS光谱成像系统将NIR探针作为上述4T1乳腺癌模型中的造影剂进行分析。在全身施用造影剂之后,每小时对小鼠进行非侵入性成像4小时,然后在注射底物后6、8、12和24小时进行非侵入性成像。在植入的乳腺肿瘤中观察到探针信号的快速积累。具体而言,早在注射两个探针后1小时就观察到将肿瘤边界与健康的周围组织划分的显著对比(图6(B))。在用两种类型的探针注射的小鼠中,肿瘤中荧光信号的强度迅速增加,并且其最终在4小时至6小时之间达到峰值。这个时间点可能意味着在全身施用这类非共价淬灭荧光探针后用于使肿瘤成像的最佳窗口。与初始探针类似,近红外类似物通过用与非LLE底物相关的LLE底物6QCNIR注射小鼠的肿瘤中的更慢的清除率和更亮的信号而显示溶酶体捕获效应作为证据(图6(C))。在1小时至4小时之间,两个底物显示出相似的初始强度,这表明组织蛋白酶对两种底物的活化率相等。

[0254] 在使用小动物成像系统获得了积极结果的情况下,接下来进行使用达芬奇手术系统的图像引导切除研究。可以使用该机器人手术系统(图7(A))进行微创腹腔镜外科手术。该系统还配备有NIR照相机,其中除了白光成像系统之外,可以使用该NIR照相机来使带有NIR信号的造影剂可视化。因此,可以在多种癌症模型中进行肿瘤切除研究。选择结肠癌模型(APC小鼠;图7(B))、以及乳腺癌(4T1移植模型;图7(C))和转移性肺癌模型(图7(D))的外科切除术。对于每次手术,使用达芬奇机器人进行阳性探针信号的切除。也从动物中取出组织以进行组织学分析,从而确认底物阳性组织中癌细胞的存在。

[0255] 总的来说,这些数据证实,NIR荧光底物探针能够突出所有三种癌症模型中的肿瘤。此外,现有的达芬奇机器人系统可用于识别癌症病变并将其移除以进一步分析。

[0256] 图8(A)-图8(C)示出了在离去基团中含有螯合剂的组织蛋白酶探针的结构,以及使用PET底物探针对动物中的组织蛋白酶活性进行成像。

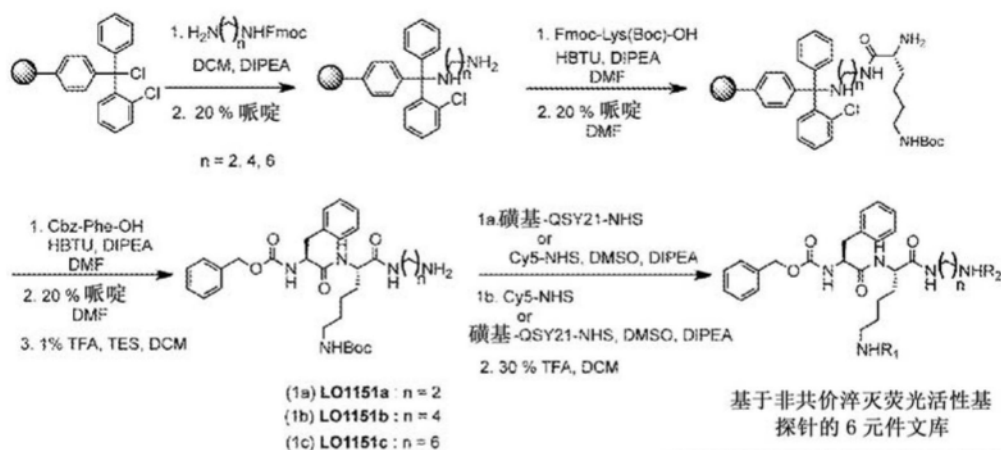
[0257] 方法

## [0258] 概括

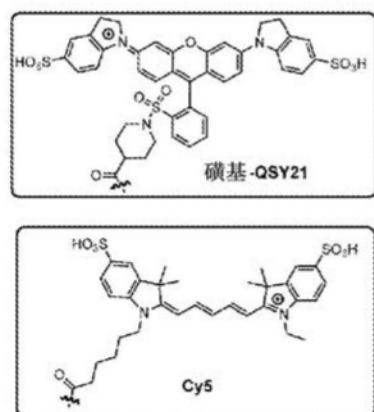
[0259] 所有的树脂和试剂均购自商业供应商,使用时未经进一步纯化。从去离子水进料中将用于反应和水处理的水玻璃蒸馏。所有非水提取物均使用试剂级溶剂。所有水敏感反应均在氩气的正压下,在无水溶剂中进行。利用API 150EX单四极质谱仪(Applied Biosystems),通过LC-MS分析反应。使用C18柱,通过配有ÅKTA探测器100(Amersham Pharmacia Biotech)的反相HPLC来纯化合成的化合物。用二次蒸馏水的梯度和含有1%三氟乙酸的乙腈作为溶剂来洗脱化合物。在装配有脉冲场梯度附件的Varian 400MHz (400/100)、Varian 500MHz (500/125)上记录NMR谱。在Bruker Avance 400 (400MHz)或Bruker Avance 500 (500MHz)仪器上,在25℃下记录<sup>1</sup>H NMR光谱,并使用MestReNova NMR处理软件进行处理。化学位移( $\delta$ )以偏移四甲基硅烷的百万分比(ppm)来表示,并参考NMR溶剂中的残留气信号(CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ =7.25)。数据表示如下:化学位移、多重性(s=单峰、d=双峰、t=三重峰、m=多重峰和q=四重峰)、单位为赫兹(Hz)的偶合常数(J)和积分。在补充有10%FBS和1%青霉素-链霉素(pen-strep)的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM (GIBCO Cat#11995))中培养细胞。

## [0260] 化合物合成

[0261] 方案1总结了这些研究中使用的荧光底物的初始系列的合成。



## [0262]



非溶酶体探针: LOnCQ	
(2) LO2CQ:	R <sub>1</sub> = Cy5, R <sub>2</sub> = QSY21-磺基 n = 2
(3) LO4CQ:	R <sub>1</sub> = Cy5, R <sub>2</sub> = QSY21-磺基 n = 4
(4) LO6CQ:	R <sub>1</sub> = Cy5, R <sub>2</sub> = QSY21-磺基 n = 6
潜在的溶酶体效应探针: LOnQC	
(5) LO2QC:	R <sub>1</sub> = QSY21-磺基 R <sub>2</sub> = Cy5, n = 2
(6) LO4QC:	R <sub>1</sub> = QSY21-磺基 R <sub>2</sub> = Cy5, n = 4
(7) LO6QC:	R <sub>1</sub> = QSY21-磺基 R <sub>2</sub> = Cy5, n = 6

[0263] 方案1. 基于非共价淬灭荧光活性的底物的6元文库的合成。

[0264] 中间体1a、1b和1c。

[0265] 称量0.5g 2-氯三苯甲基氯树脂(0.84mmol/g负载)到三个单独的固相反应容器中。将该反应容器从a至c标记。加入二氯甲烷(DCM)以使树脂悬浮,然后使用实验室振荡器

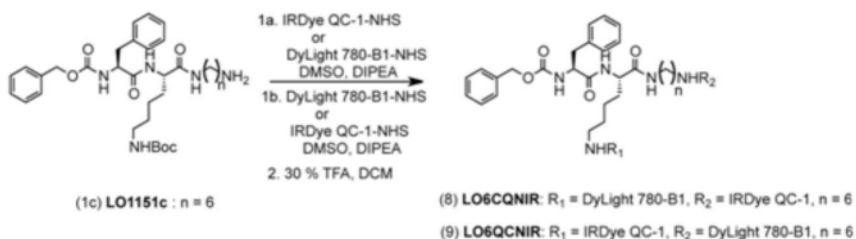
将反应搅拌15分钟。在用DCM洗涤2次后,将溶解于3mL DCM中的单-Fmoc-1,3-乙二胺(0.35g,1.26mmol)、单-Fmoc-1,4-丁二胺(0.39g,1.26mmol)和单-Fmoc-1,6-己二胺(0.43g,1.26mmol)分别加入到容器a、b和c中的树脂中。然后向各个容器中加入二异丙基乙胺(DIPEA,3当量),并在室温下将反应物搅拌30分钟。然后用DCM洗涤树脂,然后在甲醇中悬浮10分钟,以使未反应的三苯甲基氯失活。通过将树脂在20%哌啶的DMF溶液中悬浮1小时,然后分别用DCM和DMF洗涤3次来实现Fmoc脱保护。接下来,使用溶解于3mL DMF中的HBTU(0.48g,1.26mmol)和DIPEA(0.17g,1.26mmol),从而将第一氨基酸Fmoc-Lys(Boc)-OH(0.58g,1.26mmol)与树脂偶联,并使该混合物旋转混合2小时。洗涤循环后,在DMF中使用5mL 20%哌啶使Fmoc脱保护完成1小时,然后再进行洗涤循环。类似地,将剩余的氨基酸Cbz-Phe-OH与树脂上的肽偶联。然后用1%三氟乳酸的DCM溶液处理该树脂,以从树脂中选择性地切割肽(具有所得的Boc-保护的赖氨酸)。通过与甲苯共蒸发而从各个切割产物中除去溶剂,分别得到中间底物1a、1b和1c(方案1)。然后通过反相制备型HPLC来进一步纯化各个产物,以得到纯度大于95%的最终肽。

[0266] 底物2CQ、4CQ和6CQ(化合物2、3和4)

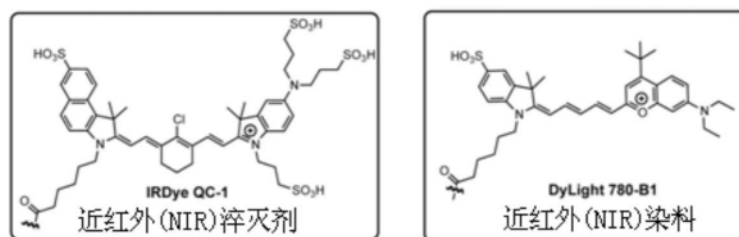
[0267] 在单独的1mL艾本德(eppendorf)管中,将中间体1a(2.0mg,  $\mu\text{mol}$ )、1b(2.0mg,  $\mu\text{mol}$ )和1c(2.0mg,  $\mu\text{mol}$ )溶解在100 $\mu\text{L}$ 的DMSO中。加入DIPEA(3 $\mu\text{L}$ ,  $\mu\text{mol}$ ),然后加入QSY21-磺基-NHS(1.2mmol)。在室温下将反应物搅拌1小时,然后通过HPLC纯化产物。通过旋转蒸发除去溶剂,然后通过用溶解于DCM的30% TFA溶液处理30分钟来除去赖氨酸上的Boc-保护基。除去溶剂后,将产物冻干,然后与DMSO中的Cy5-NHS和3当量的DIPEA反应(方案1)。通过反相HPLC将各个最终产物纯化,以分别产生非溶酶体淬灭的荧光底物nCQ,其中n=2、4和6。

[0268] 底物2QC、4QC和6QC(化合物5、6和7)

[0269] 在单独的1mL艾本德管中,将中间体1a(2.0mg,  $\mu\text{mol}$ )、1b(2.0mg,  $\mu\text{mol}$ )和1c(2.0mg,  $\mu\text{mol}$ )溶解在100 $\mu\text{L}$ 的DMSO中。加入DIPEA(3 $\mu\text{L}$ ,  $\mu\text{mol}$ ),然后加入Cy5-NHS(1.2mmol)。在室温下将反应物搅拌1小时,然后通过HPLC纯化产物。通过旋转蒸发除去溶剂,然后通过用溶解于DCM的30% TFA处理30分钟来除去赖氨酸上的Boc-保护基。除去溶剂后,将产物冻干,然后与DMSO中的QSY21-磺基-NHS和3当量的DIPEA反应(方案1)。通过反相HPLC将各个最终产物纯化,以分别得到潜在溶酶体效应淬灭的荧光底物nCQ,其中n=2、4和6。



[0270]



[0271] 方案2. 与达芬奇手术机器人兼容的基于近红外非共价淬灭荧光活性的探针的合

成

[0272] 放射性标记

[0273] 简言之,在37℃下,通过将在90μL乙酸钠缓冲液(0.1M,pH 5.5)中的10μL L0263(10mM)(图8(A))与在100μL乙酸钠缓冲液(0.1M,pH 5.5)中的4mCi的<sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub>孵育1小时来制备<sup>64</sup>Cu-L0263。冷却至室温后,通过RP-HPLC分析反应混合物。然后通过RP-HPLC纯化<sup>64</sup>Cu-L0263,其中以95%溶剂A(含0.1%TFA的去离子水)和5%溶剂B(含0.1%TFA的乙腈)开始作为流动相3分钟,然后以5%溶剂A和95%溶剂B作为流动相持续23分钟。然后收集含有<sup>64</sup>Cu-L0263(保留时间18.9分钟)的洗脱级分并使用旋转蒸发器干燥。放射性标记产率为90%(由HPLC计算)。通过放射性HPLC测定放射化学纯度(定义为主要产物峰与其他峰的比)>95%,探针的比活性确定为3-4Ci/mmol。然后在0.9%盐水中将<sup>64</sup>Cu-L0263重构,并通过0.22μmMillipore过滤器而进入用于动物PET/CT成像的无菌小瓶中。

[0274] PET体内成像

[0275] 向小鼠静脉注射100μCi的<sup>64</sup>Cu-L0263,并通过使用Inveon小动物PET/CT(西门子)在2小时和24小时后进行成像(图8(B))。简言之,获取像素尺寸为约0.1mm的CT解剖图像扫描。CT成像后,用静态扫描5分钟进行全身PET成像。使用基于CT衰减的有序子集期望最大化3维算法重建PET图像,并使用Inveon Research Workplace(IRW)软件(西门子)进行分析。PET体素大小为0.796×0.861×0.861mm,总共128×128×159体素。然后进行PET/CT定量测定,计算组织放射性,并表示为每克组织的衰减校正百分比注射剂量(%ID/g)。进行审判的调查人员并不知道哪些组正在成像。

[0276] 合成化合物的NMR光谱

[0277] 2CQ(2)

[0278] LCMS:C<sub>99</sub>H<sub>108</sub>N<sub>10</sub>O<sub>21</sub>S<sub>5</sub><sup>2+</sup>的理论值:966.81;实测值:966.8,HRMS:C<sub>99</sub>H<sub>108</sub>N<sub>10</sub>O<sub>21</sub>S<sub>5</sub><sup>2+</sup>的理论值:966.8159;实测值:966.8121。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO):δ8.40-8.29(m,2H),8.18(d,J=8.4Hz,1H),8.04-7.92(m,2H),7.84(s,1H),7.81(s,2H),7.73(dd,J=10.7,5.6Hz,2H),7.70-7.57(m,9H),7.57-7.47(m,5H),7.34-7.15(m,14H),6.54(t,J=10.2Hz,7H),6.29(dd,J=13.6,7.9Hz,2H),4.92(s,2H),4.35(dd,J=9.5,7.2Hz,4H),4.30-4.22(m,1H),4.10(tdd,J=12.7,7.4,5.6Hz,4H),3.28-3.20(m,9H),3.09-2.90(m,8H),2.70(d,J=2.1Hz,1H),2.69-2.64(m,1H),2.34-2.32(m,1H),2.02(t,J=6.6Hz,2H),1.67(s,13H),1.62-1.47(m,6H),1.35-1.21(m,10H)。

[0279] 4CQ(3)

[0280] LCMS:C<sub>101</sub>H<sub>112</sub>N<sub>10</sub>O<sub>21</sub>S<sub>5</sub><sup>2+</sup>的理论值:980.8;实测值:980.6,HRMS:C<sub>101</sub>H<sub>112</sub>N<sub>10</sub>O<sub>21</sub>S<sub>5</sub><sup>2+</sup>的理论值:980.8315;实测值:980.8264。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO):δ8.33(t,J=13.0Hz,2H),8.18(dd,J=7.7,1.1Hz,1H),8.03-7.91(m,3H),7.79(s,3H),7.75-7.55(m,12H),7.55-7.49(m,4H),7.47(d,J=8.1Hz,1H),7.35-7.11(m,15H),6.54(t,J=12.5Hz,2H),6.27(dd,J=14.0,8.0Hz,2H),4.90(s,2H),4.41-4.29(m,4H),4.29-4.18(m,1H),4.19-3.95(m,6H),3.29-3.12(m,9H),3.04-2.80(m,8H),2.67(ddd,J=8.8,6.3,5.4Hz,2H),2.31(dt,J=3.5,1.9Hz,1H),2.00(t,J=7.0Hz,2H),1.65(s,14H),1.50(dd,J=11.2,6.4Hz,6H),1.36-1.17(m,16H)。

[0281] 6CQ(4)

[0282] LCMS:  $C_{103}H_{116}N_{10}O_{21}S_5^{2+}$  的理论值: 994.8; 实测值: 994.8, HRMS:  $C_{103}H_{116}N_{10}O_{21}S_5^{2+}$  的理论值: 994.8472; 实测值: 994.8444。 $^1H$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  8.34 (t,  $J=12.9$ Hz, 2H), 8.19 (d,  $J=9.0$ Hz, 1H), 8.04-7.91 (m, 3H), 7.79 (s, 2H), 7.71 (t,  $J=5.5$ Hz, 1H), 7.63 (ddd,  $J=20.6, 10.2, 5.4$ Hz, 10H), 7.50 (dd,  $J=17.0, 7.9$ Hz, 5H), 7.21 (ddt,  $J=23.7, 21.2, 7.0$ Hz, 14H), 6.54 (t,  $J=12.3$ Hz, 4H), 6.27 (dd,  $J=13.7, 7.8$ Hz, 2H), 4.90 (s, 2H), 4.34 (t,  $J=9.9$ Hz, 4H), 4.25 (dd,  $J=10.2, 6.0$ Hz, 1H), 4.19-3.97 (m, 5H), 3.23 (dt,  $J=17.2, 8.7$ Hz, 9H), 3.04-2.84 (m, 7H), 2.71 (d,  $J=12.6$ Hz, 1H), 2.67-2.63 (m, 1H), 2.31 (dt,  $J=3.7, 1.9$ Hz, 1H), 2.00 (t,  $J=7.1$ Hz, 3H), 1.65 (s, 13H), 1.50 (t,  $J=11.5$ Hz, 6H), 1.36-1.05 (m, 20H)。

[0283] 2QC (5)

[0284] LCMS:  $C_{99}H_{108}N_{10}O_{21}S_5^{2+}$  的理论值: 966.81; 实测值: 966.8, HRMS:  $C_{99}H_{108}N_{10}O_{21}S_5^{2+}$  的理论值: 966.8159; 实测值: 966.8122。 $^1H$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  8.33 (t,  $J=12.4$ Hz, 2H), 8.18 (d,  $J=8.0$ Hz, 1H), 8.07-7.91 (m, 3H), 7.90-7.84 (m, 1H), 7.79 (s, 3H), 7.70-7.57 (m, 10H), 7.50 (dd,  $J=18.9, 10.0$ Hz, 4H), 7.23 (ddt,  $J=24.4, 16.0, 8.0$ Hz, 14H), 6.60-6.50 (m, 2H), 6.27 (dd,  $J=13.4, 10.2$ Hz, 2H), 4.89 (s, 2H), 4.43-4.29 (m, 4H), 4.25 (td,  $J=11.1, 6.0$ Hz, 1H), 4.17-4.00 (m, 5H), 3.28-3.17 (m, 8H), 3.09-2.94 (m, 6H), 2.87 (dt,  $J=12.4, 6.4$ Hz, 2H), 2.75-2.63 (m, 2H), 2.34-2.28 (m, 1H), 2.05-1.98 (m, 3H), 1.73 (s, 1H), 1.65 (s, 13H), 1.52 (s, 6H), 1.34-1.07 (m, 13H)。

[0285] 4QC (6)

[0286] LCMS:  $C_{101}H_{112}N_{10}O_{21}S_5^{2+}$  的理论值: 980.8; 实测值: 980.8, HRMS:  $C_{101}H_{112}N_{10}O_{21}S_5^{2+}$  的理论值: 980.8315; 实测值: 980.8267。 $^1H$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  8.33 (t,  $J=13.5$ Hz, 2H), 8.18 (d,  $J=7.0$ Hz, 1H), 8.03-7.90 (m, 3H), 7.79 (s, 3H), 7.72 (t,  $J=5.4$ Hz, 1H), 7.68-7.56 (m, 10H), 7.52 (d,  $J=8.4$ Hz, 4H), 7.47 (d,  $J=8.7$ Hz, 1H), 7.23 (dq,  $J=24.2, 8.1$ Hz, 14H), 6.55 (t,  $J=12.3$ Hz, 3H), 6.27 (dd,  $J=13.8, 7.1$ Hz, 2H), 4.89 (s, 2H), 4.34 (t,  $J=9.5$ Hz, 4H), 4.22 (dd,  $J=16.2, 7.4$ Hz, 1H), 4.16-4.00 (m, 5H), 3.28-3.15 (m, 8H), 3.07-2.90 (m, 6H), 2.86 (dd,  $J=11.4, 5.5$ Hz, 2H), 2.74-2.63 (m, 2H), 2.43 (d,  $J=11.5$ Hz, 2H), 2.31 (dd,  $J=3.5, 1.8$ Hz, 1H), 1.99 (t,  $J=7.2$ Hz, 2H), 1.65 (s, 14H), 1.57-1.43 (m, 6H), 1.36-1.17 (m, 15H)。

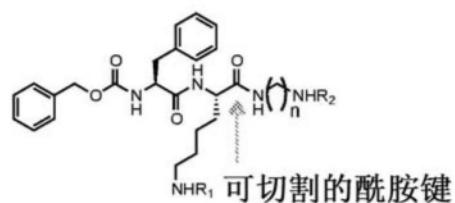
[0287] 6QC (7)

[0288] LCMS:  $C_{103}H_{116}N_{10}O_{21}S_5^{2+}$  的理论值: 994.8; 实测值: 994.8, HRMS:  $C_{103}H_{116}N_{10}O_{21}S_5^{2+}$  的理论值: 994.8472; 实测值: 994.8429。 $^1H$  NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  8.34 (t,  $J=13.1$ Hz, 2H), 8.21-8.12 (m, 1H), 7.96 (dt,  $J=15.3, 8.5$ Hz, 3H), 7.79 (s, 3H), 7.73-7.55 (m, 11H), 7.50 (dd,  $J=19.7, 8.5$ Hz, 5H), 7.23 (dq,  $J=16.3, 7.7$ Hz, 14H), 6.53 (s, 8H), 6.27 (dd,  $J=13.8, 5.6$ Hz, 2H), 4.89 (s, 2H), 4.28 (ddd,  $J=19.8, 16.3, 7.2$ Hz, 5H), 4.08 (ddd,  $J=16.0, 11.8, 6.5$ Hz, 5H), 3.27-3.13 (m, 7H), 3.04-2.90 (m, 5H), 2.86 (dd,  $J=12.5, 5.9$ Hz, 2H), 2.74-2.63 (m, 2H), 2.31 (dt,  $J=3.5, 1.7$ Hz, 1H), 2.00 (t,  $J=7.0$ Hz, 2H), 1.66 (s, 12H), 1.58-1.44 (m, 5H), 1.38-1.13 (m, 20H)。

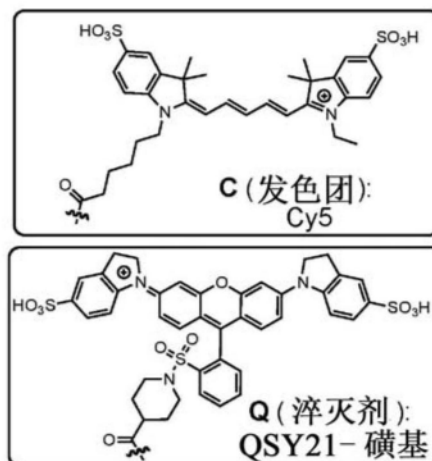
[0289] 本文中提到的所有专利、专利出版物和其他公开的文献的全文通过引用的方式纳入本文, 如同各参考文献已经独立并具体地引入本文中。

[0290] 尽管已经提供了具体的实施例,但是上述说明也只是说明性的而非限制性的。前述实施方式的任何一个或多个特征可以与本发明的任何其他实施方案的一个或多个特征以任意的方式组合。此外,在阅读本说明书后,对于本领域技术人员来说,本发明的许多变化将变得显而易见。因此,本发明的范围应当通过参考所附权利要求以及其等价物的全部范围来确定。

(A)

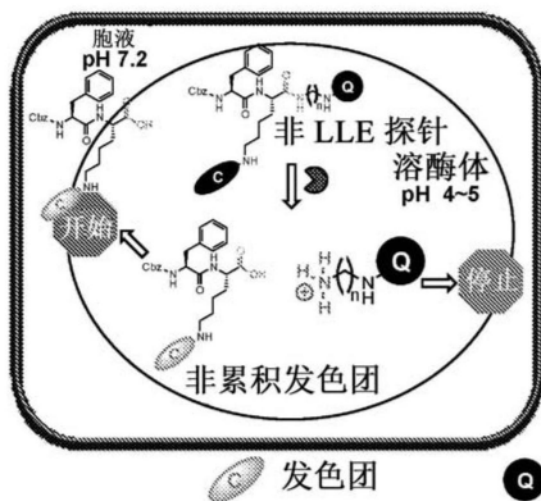


底物 / 非共价类似物探针

(2) **2CQ**:  $R_1 = \text{Cy5}$ ,  $R_2 = \text{QSY21-磺基}$   $n = 2$ (3) **4CQ**:  $R_1 = \text{Cy5}$ ,  $R_2 = \text{QSY21-磺基}$   $n = 4$ (4) **6CQ**:  $R_1 = \text{Cy5}$ ,  $R_2 = \text{QSY21-磺基}$   $n = 6$ (5) **2QC**:  $R_1 = \text{QSY21-磺基}$   $R_2 = \text{Cy5}$ ,  $n = 2$ (6) **4QC**:  $R_1 = \text{QSY21-磺基}$   $R_2 = \text{Cy5}$ ,  $n = 4$ (7) **6QC**:  $R_1 = \text{QSY21-磺基}$   $R_2 = \text{Cy5}$ ,  $n = 6$ 

(B)

非溶酶体效应



潜在溶酶体效应 (LLE)

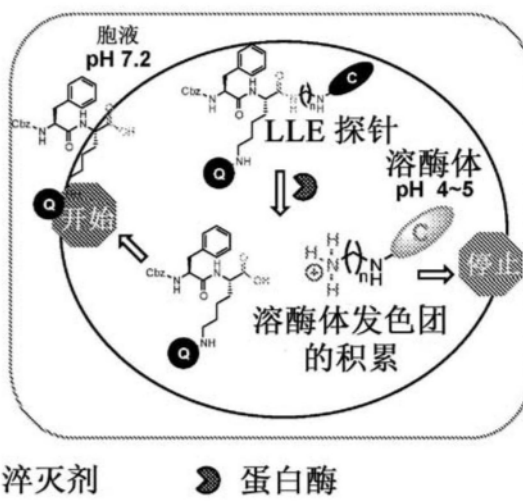


图1

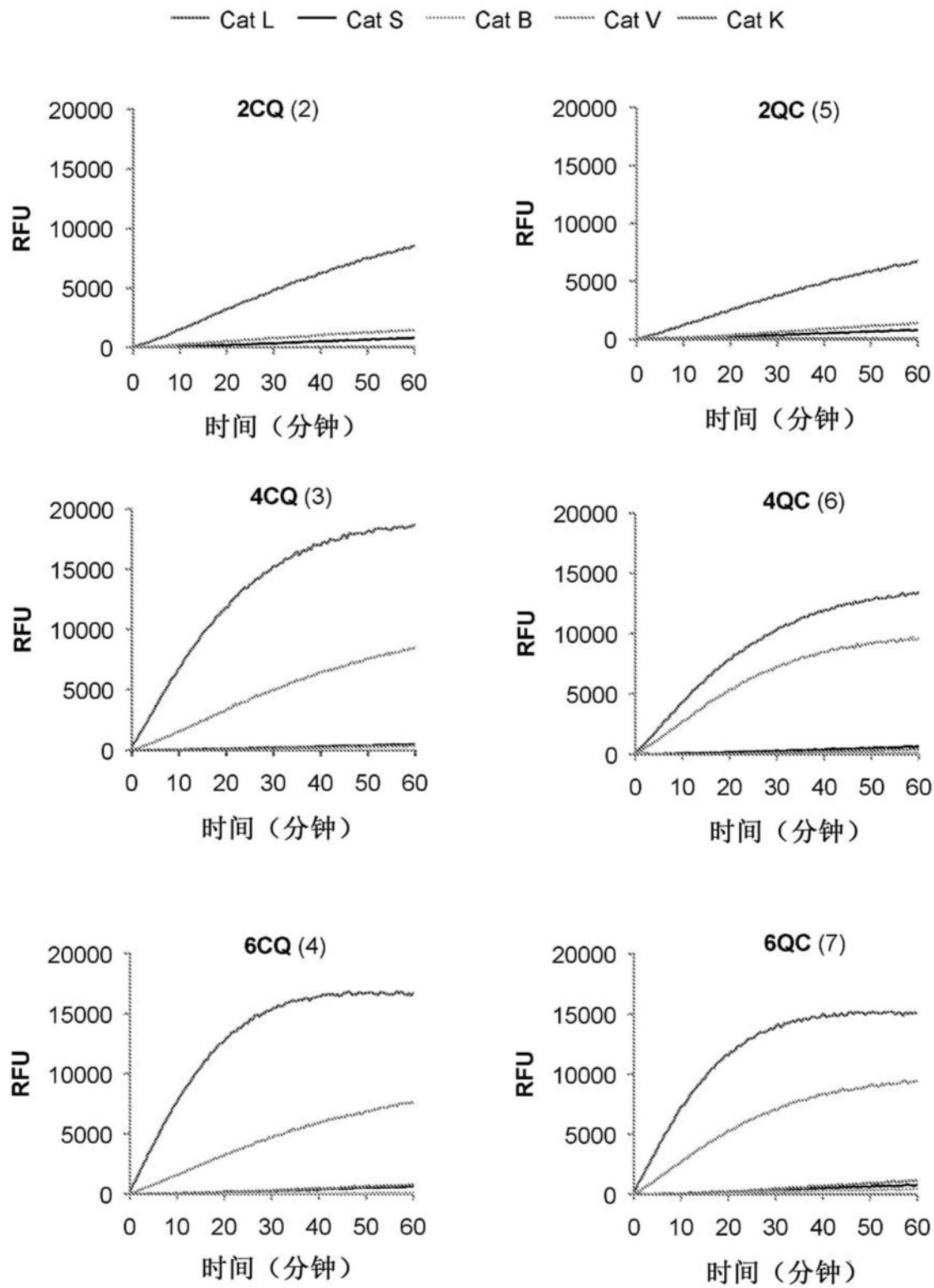


图2

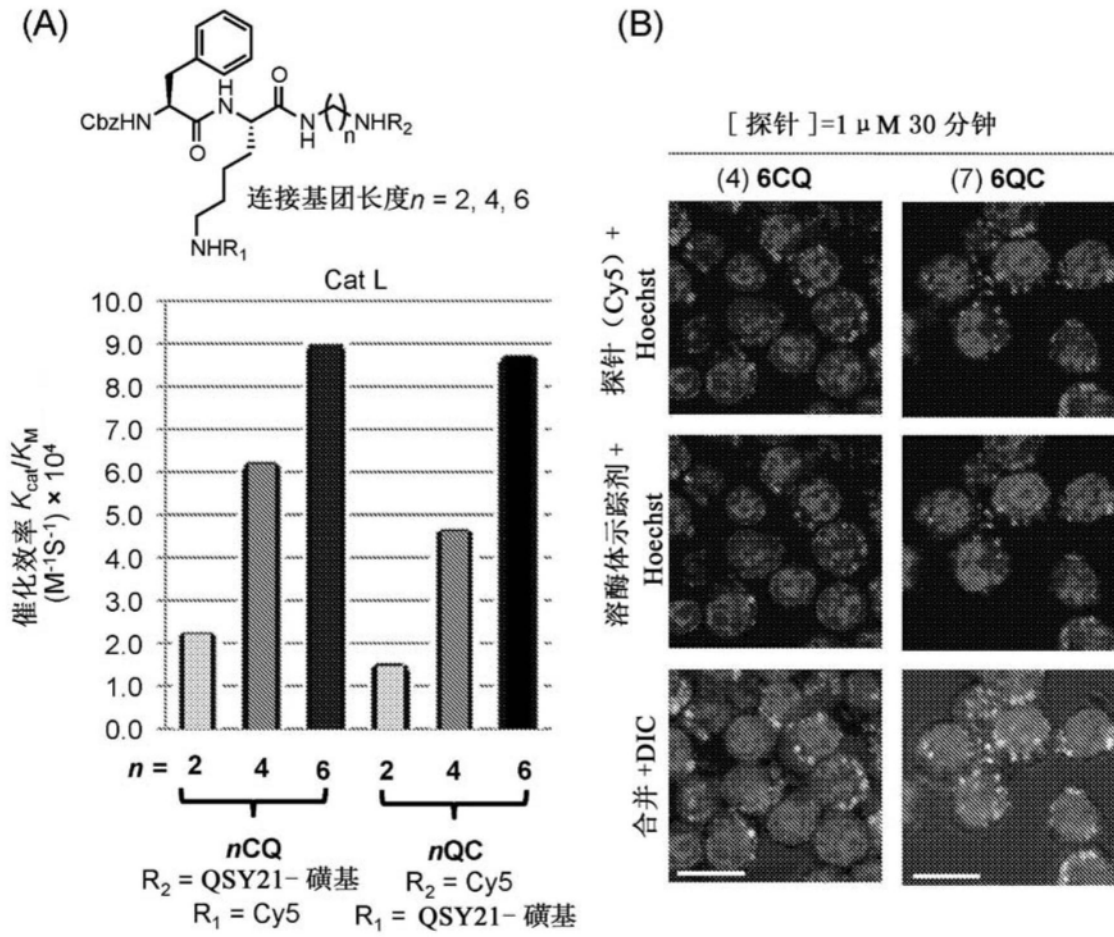


图3

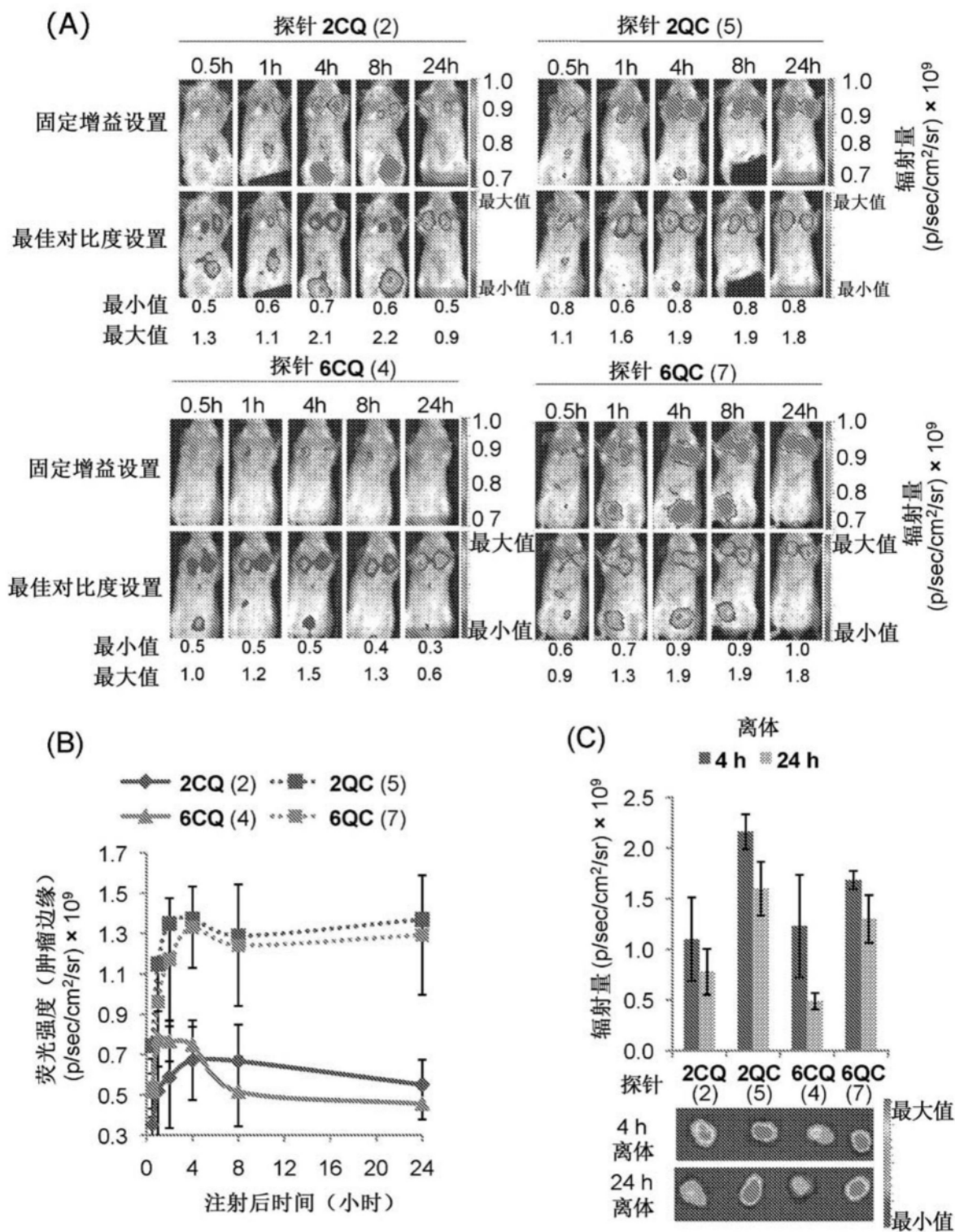


图4

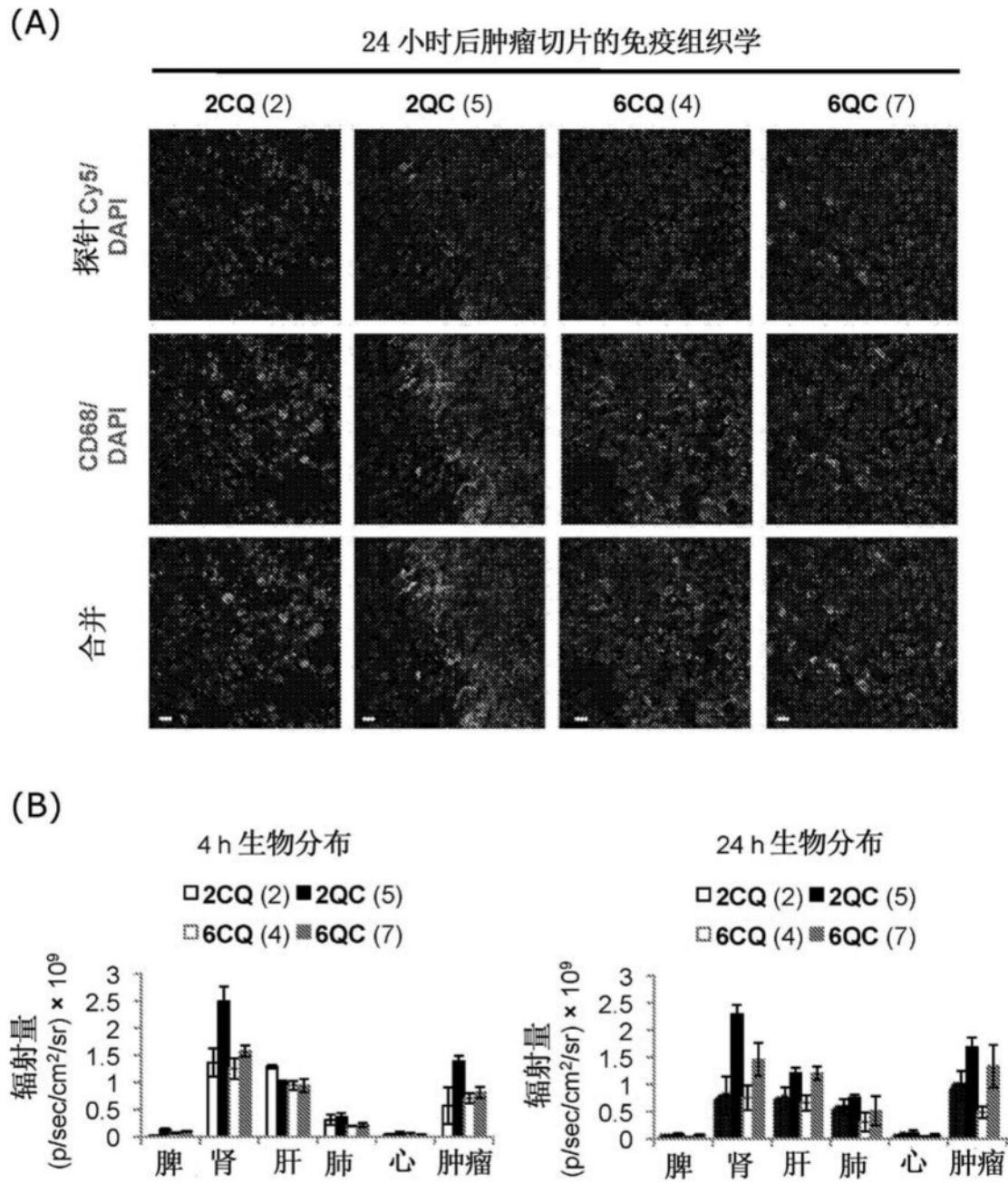


图5

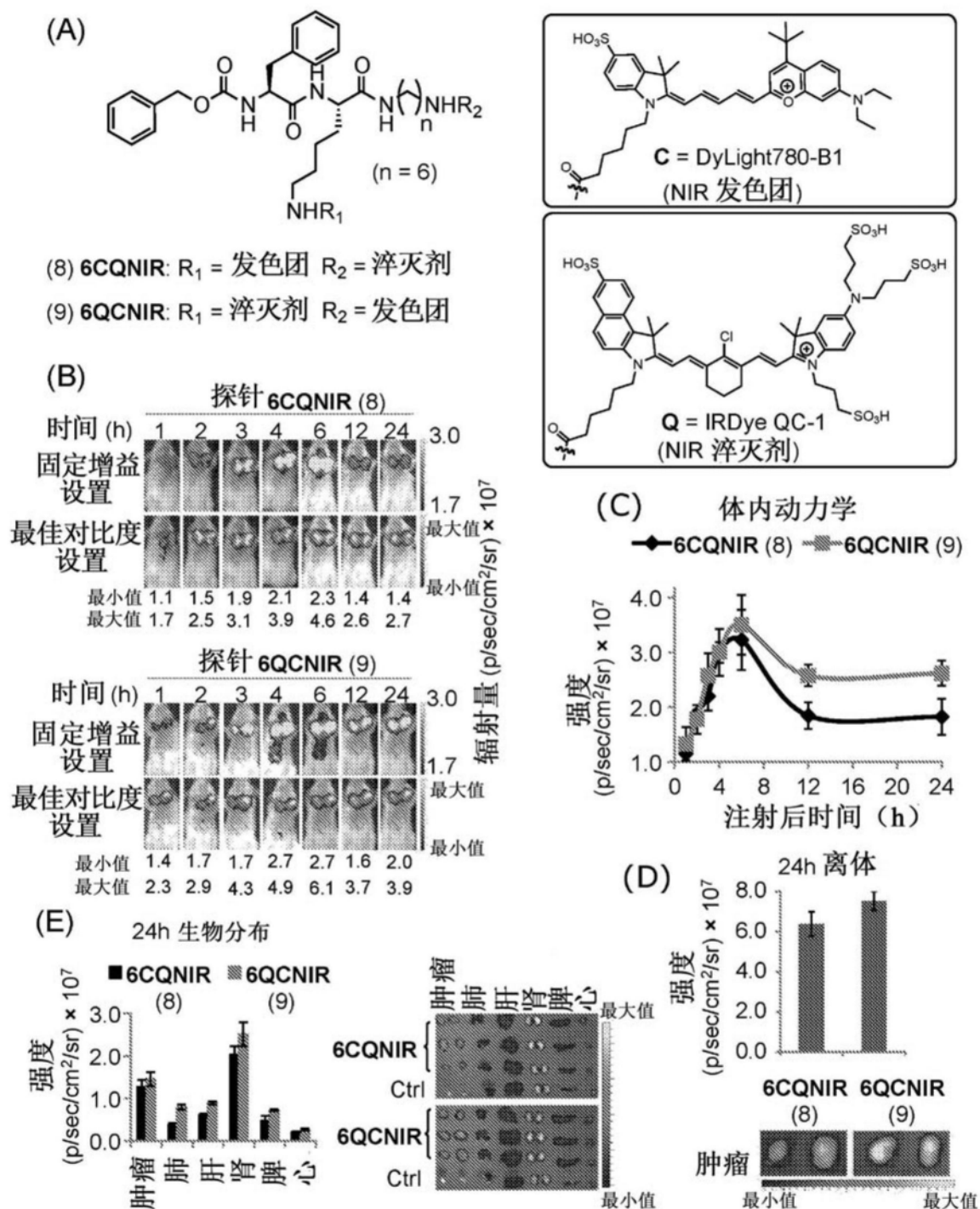


图6

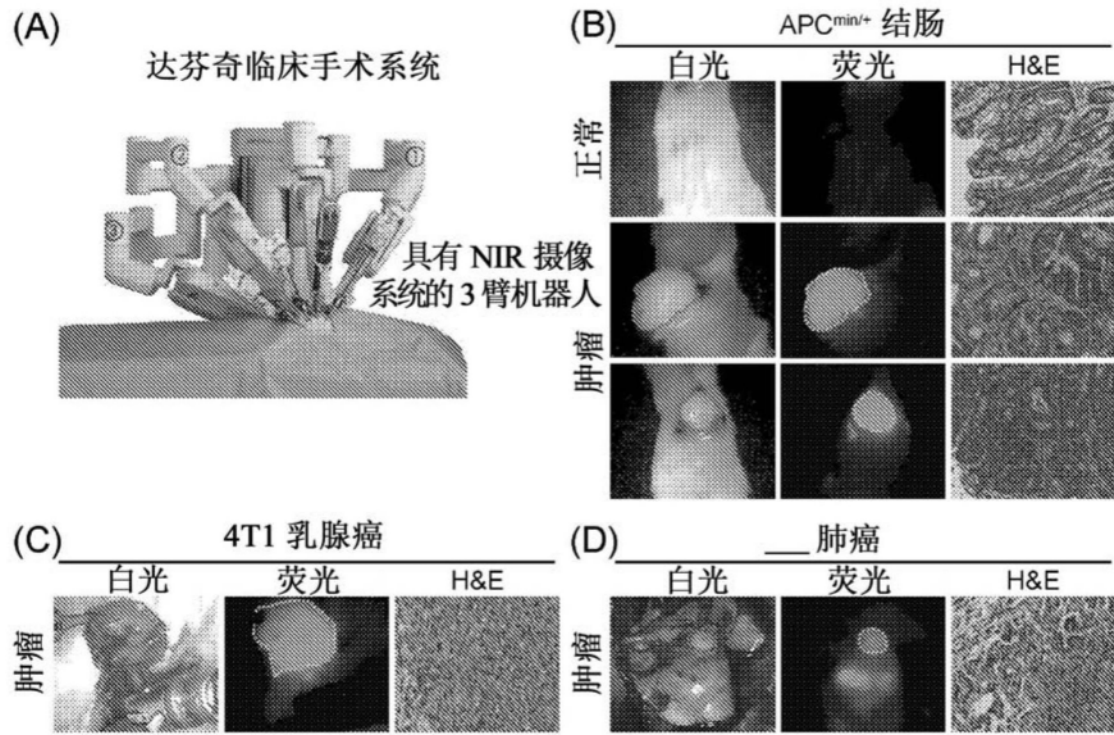


图7

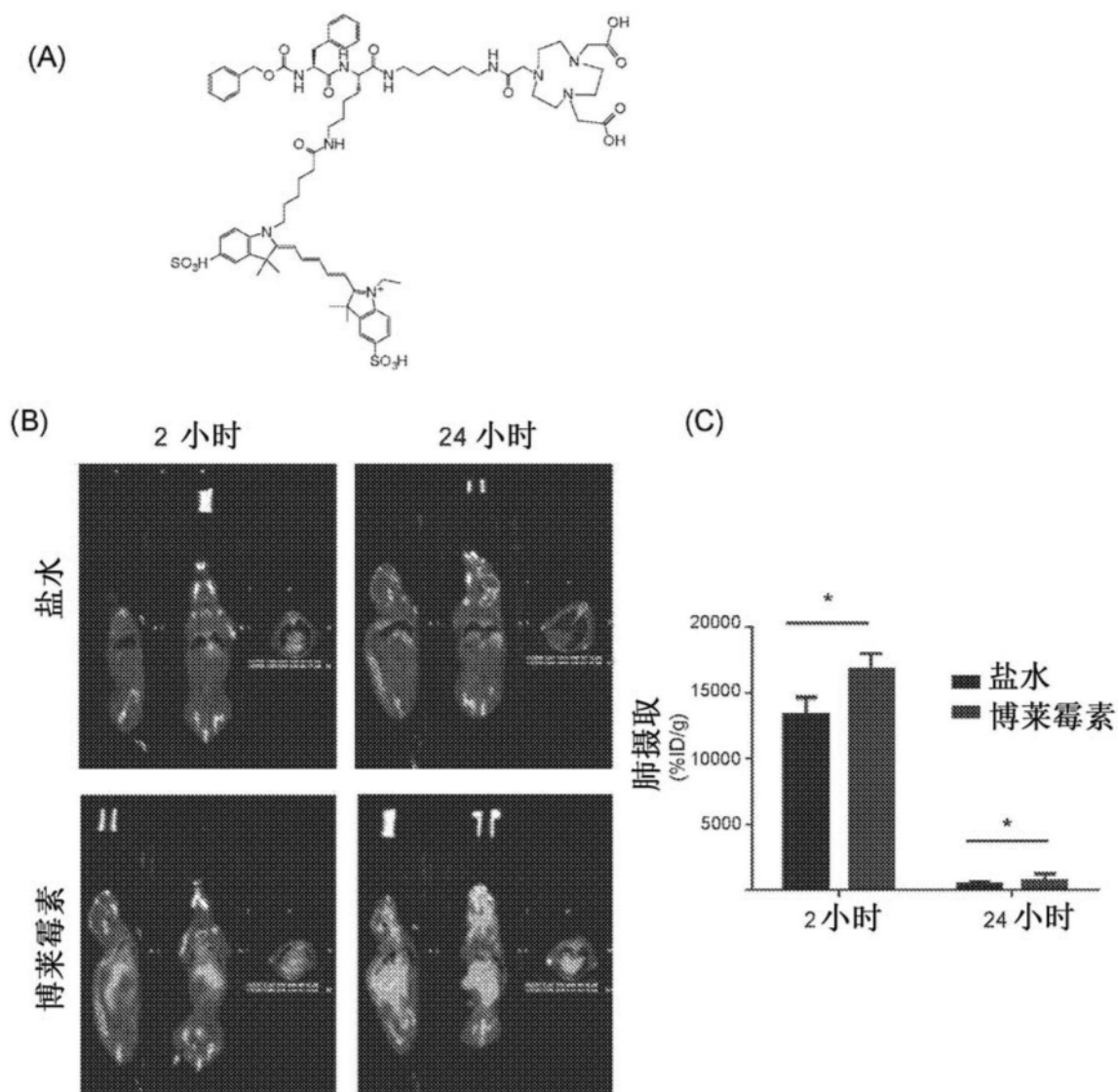


图8