



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I797430 B

(45) 公告日：中華民國 112 (2023) 年 04 月 01 日

(21) 申請案號：109107959 (22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 03 月 27 日

(51) Int. Cl. : C07F5/02 (2006.01) C07D311/94 (2006.01)
 C07H7/02 (2006.01) C07H17/075 (2006.01)
 G01N33/52 (2006.01) C12Q1/34 (2006.01)

(30) 優先權：2014/03/27 美國 61/971,313

(71) 申請人：中央研究院(中華民國) ACADEMIA SINICA (TW)
 臺北市南港區研究院路 2 段 128 號

(72) 發明人：翁啟惠 WONG, CHI-HUEY (TW)；方俊民 FANG, JIM-MIN (TW)；謝俊結 SHIE, JIUN-JIE (TW)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：
 WO 2014/031498A1

審查人員：吳祖漢

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：26 共 165 頁

(54) 名稱

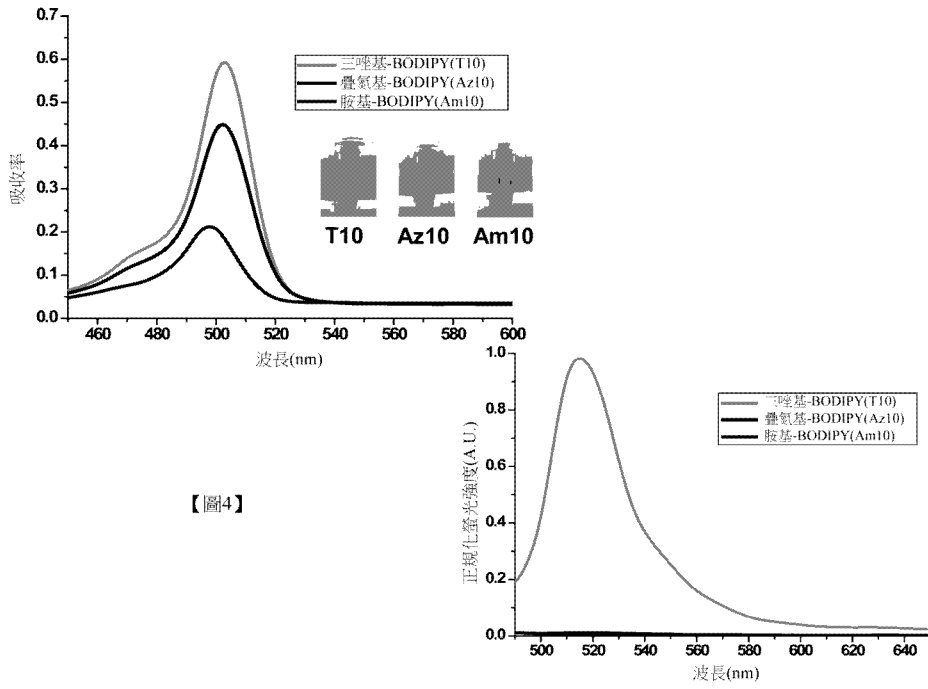
反應性標記化合物及其用途

(57) 摘要

本發明提供式(I)之疊氮基-BODIPY 化合物、式(IV)之基於環辛炔的螢光探針以及式(VI)之基於活性的探針。此等化合物經歷疊氮化物-炔環加成(AAC)以形成三唑基產物。該等所提供之化合物適用於含炔或含疊氮化物分子之偵測及成像。揭示使用本發明之化合物對生物分子進行偵測及成像之方法。

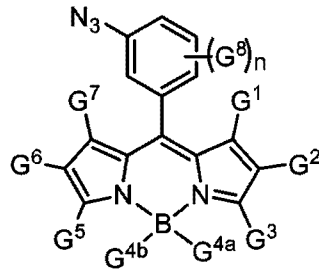
Provided are azido-BODIPY compounds of formula (I), cyclooctyne-based fluorogenic probes of formula (IV), and activity-based probes of formula (VI). These compounds undergo azide-alkyne cycloadditions (AAC) with to form triazolyl products. The provided compounds are useful for detection and imaging of alkyne-, or azide-containing molecules. Methods for detection and imaging biomolecules using compounds of the present disclosure are disclosed.

指定代表圖：



【圖4】

特徵化學式：



(I)



I797430

【發明摘要】

【中文發明名稱】

反應性標記化合物及其用途

【英文發明名稱】

REACTIVE LABELLING COMPOUNDS AND USES THEREOF

【中文】

本發明提供式(I)之疊氮基-BODIPY化合物、式(IV)之基於環辛炔的螢光探針以及式(VI)之基於活性的探針。此等化合物經歷疊氮化物-炔環加成(AAC)以形成三唑基產物。該等所提供之化合物適用於含炔或含疊氮化物分子之偵測及成像。揭示使用本發明之化合物對生物分子進行偵測及成像之方法。

【英文】

Provided are azido-BODIPY compounds of formula (I), cyclooctyne-based fluorogenic probes of formula (IV), and activity-based probes of formula (VI). These compounds undergo azide-alkyne cycloadditions (AAC) with to form triazolyl products. The provided compounds are useful for detection and imaging of alkyne-, or azide-containing molecules. Methods for detection and imaging biomolecules using compounds of the present disclosure are disclosed.

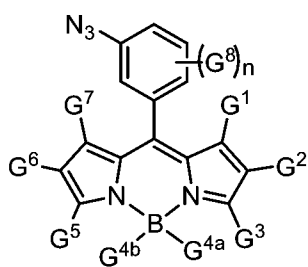
【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



(I)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

反應性標記化合物及其用途

【英文發明名稱】

REACTIVE LABELLING COMPOUNDS AND USES THEREOF

【技術領域】

本發明係關於環辛炔稠合的螢光探針、疊氮基-BODIPY化合物及螢光裂解探針之三唑形成用於含炔或含疊氮化物生物分子之診斷及成像之領域。本發明係關於在疊氮化物-炔環加成(AAC)之後之螢光增強策略。

【先前技術】

銅催化疊氮化物-炔1,3-偶極環加成(CuAAC)已在化學生物學中獲得廣泛使用，其用於諸如標記複雜混合物中之生物分子及對固定細胞及組織進行成像之應用。(Kolb等人, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004 ; Rostovtsev等人, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596 ; Wu and Fokin, *Aldrichimica Acta* **2007**, *40*, 7)。將螢光探針併入到蛋白質、DNA、RNA、脂質及聚醣中(在其天然細胞環境內)為成像及理解其活體內作用提供機會。(Best, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571)。

舉例而言，蛋白質中之聚醣在細胞表面上顯示牽涉多種生理及病理過程。通常在病理病狀，諸如炎症及癌轉移中觀測到患病細胞表面上的異常醣基化。特定言之，被認為由唾液酸轉移酶及海藻醣基轉移酶之表現位置及表現量的變化產生之改變的末端唾液酸化及海藻醣基化與惡性腫瘤相關。探究附接至蛋白質或脂質之作為癌症生物標記之聚醣的生物資訊內容的能力已變為醣組學研究之主要課程。(Hsu等人, *Proc. Nat. Acad. Sci.*

U.S.A., **2007**, *104*, 2614 ; Sawa等人, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, *103*, 12371。)

分析活系統中的醣基化模式的變化現在為可能的。(Prescher及Bertozzi, *Nat. Chem. Bio.* **2005**, *1*, 13。)將含有充當生物正交化學報導子之獨特官能基之非天然碳水化合物代謝併入到細胞生物合成機制中起始該過程。接著在細胞表面上處理及構建經修飾的聚醣。與裝備有互補生物正交官能基之可偵測螢光探針之後續反應使得能夠偵測併入的非天然聚醣。(Sletten及Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2)。

生物正交化學報導子之概念已應用於蛋白質中的醣基化之蛋白組分析及活系統中的細胞表面之化學重塑。生物正交化學反應亦已用於其他應用，諸如蛋白質標記、基於活性之蛋白質摺疊、靶蛋白識別、轉譯後修飾及細胞增殖監測。經由生物正交化學報導子策略標記活細胞上之特定官能基已在細胞生物學中變得日益強大。在過去幾年，已在生物正交化學、尤其展示活系統中的生物相容性及選擇性之彼生物正交化學方面取得巨大進展。由於此等方法的內在選擇性及可調電子學，其通常基於作為理想生物正交反應之環加成。然而，該領域特定言之自細胞及生物體應用之視角仍面臨許多挑戰。舉例而言，大部分生物正交報導子策略必然伴有使用螢光團標記的反應物搭配物之多步程序，其通常產生難以自細胞內環境或組織移除之高背景螢光雜訊。另外，此等方法需要高濃度的試劑及催化劑以獲得可偵測信號。

近期一些努力已集中於在與非螢光炔或疊氮化物之CuAAC反應之後設計非螢光或弱螢光探針，其可接合以得到高螢光三唑複合物(圖2)。(Zhou及Fahrni, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8862 ; Sivakumar等人, *Org.*

Lett. **2004**, *24*, 4603 ; Sawa等人, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, *103*, 12371 ; Xie等人, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2906 ; Li等人, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3008 ; Le Droumaguet等人, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1223 ; Qi等人, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1758 ; Chao等人, *Sci. China Chemistry* **2012**, *55*, 125 ; Herner等人, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3297。)由於在無起始物質之背景螢光雜訊的情況下形成三唑之獨特螢光特性，以高效率發生的此類型之CuAAC反應將在細胞生物學及功能蛋白組學之新興領域中具有廣泛應用。然而，此等疊氮基官能化及炔基官能化探針通常需要在UV區域中激發且發射在水溶液中具有差量子產率之藍光；此類光學特性對於生物應用不為理想的。

藉由高效CuAAC反應誘導之獨特螢光增強將在細胞生物學及功能蛋白組學之新興領域中具有廣泛應用(Le Droumaguet, C.; Wang, C.; Wang, Q. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1233-1239 ; Sawa, M.; Hsu, T.-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S. R.; Vogt, P. K.; Wong, C.-H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 12371-12376 ; Shie, J.-J.; Liu, Y.-C.; Lee, Y.-M.; Lim, C.; Fang, J.-M.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 9953-9961 ; Hsu, T.-L.; Hanson, S. R.; Kishikawa, K.; Wang, S.-K.; Sawa, M.; Wong, C.-H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2614-2619 ; Tsai, C.-S.; Liu, P.-Y.; Yen, H.-Y.; Hsu, T.-L.; Wong C.-H. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5575-5577。) 然而，銅(I)之毒性已阻礙在活系統中使用CuAAC。

為了避開與金屬催化劑相關之細胞毒性問題，已開發環應變促進的疊氮化物-炔環加成(SPAAC)作為替代策略(Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R.

Chem. Soc. Rev. **2010**, *39*, 1272-1279 ; Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, A. T. J.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805-815。)通常將環辛炔部分作為莖結構併入到諸如二氟化環辛炔(DIFO)及衍生物之SPAAC試劑中(Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047 ; Codelli, J. A.; Baskin, J. M.; Agard, N. J.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486-11493。)為了增加環應變，環辛炔部分可與其他環稠合以得到具有較高反應性之SPAAC試劑，諸如二苄基環辛炔(DIBO) (Ning, X.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253-2255 ; Poloukhtine, A. A.; Mbua, N. E.; Wolfert, M. A.; Boons, G.-J.; Popik, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15769-15777 ; Stöckmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Ireland-Zecchini, H.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 932-936 ; Friscourt, F.; Ledin, P. A.; Mbua, N. E.; Flanagan-Steet, H. R.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5381-5389)、二芳基氮雜環辛炔酮(BARAC) (Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688-3690)及雙環壬炔(BCN) (Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefeber, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422-9425)。攜帶收縮七員環之四甲基噻環庚炔(TMTH)亦在與疊氮化物之環加成反應中展現反應性(de Almeida, G.; Sletten, E. M.; Nakamura, H.; Palaniappan, K. K.; Bertozzi, C. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2443-2447 ; King, M., Baati, R.; Wagner, A. *Chem. Commun.* **2012**, *48*,

9308-9309)。兩個基於環辛炔的螢光探針CoumBARAC (Jewett, J. C.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5937-5939)及Fl-DIBO (Friscourt, F.; Fahrni, C. J.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18809-18815)已分別由Bertozzi組及Boons組描述。

4,4-二氟基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(亦稱為BODIPY)染料為用於許多生物應用之類型的普遍螢光團。BODIPY染料具有多種優點，包括大的化學及光物理穩定性、相對高的莫耳吸收係數及螢光量子產率(Φ_f)、在可見光譜區域中之激發/發射波長(比500 nm更長)及具有高峰強度之窄發射頻寬。(Loudet及Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891; Ulrich等人, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184; Boens等人, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130; Kamkaew等人, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 77。)

已開發一些疊氮基-BODIPY衍生物用於在CuAAC反應之後進行螢光標記。(Li等人, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1963。)具體言之，已展示低螢光3-疊氮基-BODIPY衍生物經歷CuAAC反應以得到具有增強的螢光之相應三唑。雖然該三唑產物提供與疊氮基-BODIPY相比300倍增加的發射，但其展現低螢光量子產率($\Phi_f < 0.03$)且未反應的疊氮基-BODIPY化合物不穩定且未能與炔基生物分子在生理條件下反應，使得其與許多生物應用不相容。(Wang等人, *Sci. China Chemistry* **2012**, *55*, 125; Chauhan等人 *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 244。)

【發明內容】

因此，需要切合細胞環境之分子探針之新穎設計用於細胞標記、偵測及/或目測生物分子在細胞中之定位。

因此，本發明係關於一種含有切合細胞環境之發射綠色BODIPY架構之新穎系列的疊氮基-BODIPY化合物。BODIPY架構用作其有吸引力之合成及螢光特徵之起始模組。例示性BODIPY易於在8-位置處經修飾。此位置處之芳基化對吸收及發射波長不具有實質性影響，因為芳基部分及BODIPY核心扭轉且共軛非偶合。

此等例示性化合物適用於在無沖洗過程之情況下標記炔官能化蛋白，且適合於藉由共焦顯微鏡目測炔標誌醣基共軛物在細胞中之定位。此外，炔基-醣修飾之細胞可溶解且藉由使用AzBOCEt標記在SDS-PAGE上進行分析，用於直接偵測在無富集之情況下的探針標記醣蛋白。

本發明亦關於能夠對炔官能化部分有反應之基於環辛炔之螢光探針。在一些態樣中，基於環辛炔之螢光探針可存在於細胞中。在一些態樣中，基於環辛炔之螢光探針可用於偵測細胞中之疊氮化物-醣共軛物。

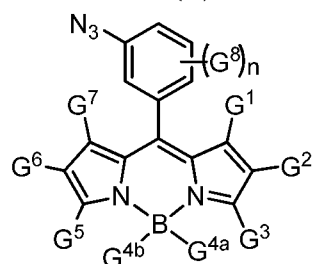
本發明亦關於藉由使樣品與式(I)之疊氮基-BODIPY化合物及/或式(IV)之基於環辛炔的螢光探針在雙成像模式下接觸進行疊氮基官能化醣共軛物及炔基官能化醣共軛物之雙成像。

本發明亦關於使用經設計以形成與酶之活性位點的共價鍵之探針來量測酶之活性，其中該等探針包含炔部分用於藉由含疊氮化物螢光探針進行進一步偵測。酶可為唾液酸酶。螢光唾液酸酶探針可基於作為基於機制之抑制劑的3-氟唾液酸氟化物。

因此，本發明係關於經歷疊氮化物-炔環加成(AAC)之式(I)之例示性新穎疊氮基-BODIPY化合物。疊氮化物-炔環加成(AAC)可為應力或催化劑(金屬或有機物)促進的。在一些實施例中，催化劑為金屬催化劑。在某些實施例中，金屬催化劑為銅(I)。

本文所描述之例示性疊氮基-BODIPY化合物可與炔化合物反應，產生具有增強的螢光之穩定三唑產物以便於偵測。所提供的例示性化合物表示在無沖洗過程之情況下細胞成像之顯著進步且適用於在SDS-PAGE之後自細胞溶解物進行炔標誌醣蛋白之直接凝膠內偵測。

本發明之一個態樣係關於一種式(I)之疊氮基-BODIPY化合物：

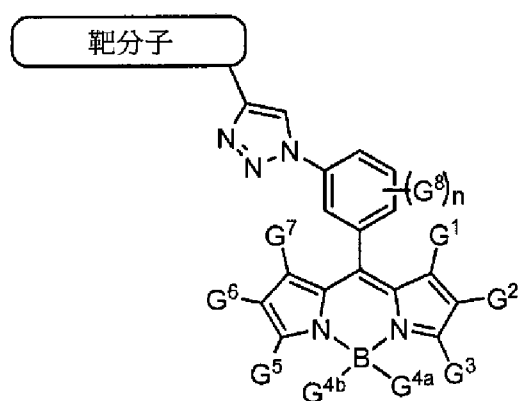


(I)

或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物或水合物，且其中G¹、G²、G³、G^{4a}、G^{4b}、G⁵、G⁶、G⁷及G⁸及n如本文所描述。

在另一態樣中，本發明提供製備疊氮基-BODIPY化合物之合成方法。本發明亦表明本文所描述之疊氮基-BODIPY化合物可與有機炔反應以形成具有增強的螢光之三唑產物。

在另一態樣中，本發明提供一種式(III)之三唑基-BODIPY化合物：



或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物或水合物，且其中G¹、G²、G³、G^{4a}、G^{4b}、G⁵、G⁶、G⁷、G⁸及n如本文所描述。靶分子包括(但不限於)生物分子，諸如DNA、RNA、蛋白質及聚醣。

疊氮化物-炔環加成(AAC)可為應力或催化劑(金屬或有機物)促進的。在一些實施例中，催化劑為金屬催化劑。在某些實施例中，金屬催化劑為銅(I)。

在又一態樣中，本發明涉及對生物分子進行偵測及/或成像之方法。

在某些實施例中，本發明提供一種對含炔分子進行成像之方法，該方法包含

(a)在允許如本文所描述之化合物接合至含炔分子之炔基的條件下用含有該分子之樣品培育該化合物以形成三唑產物；及

(b)偵測自該三唑產物釋放之螢光信號。

在某些實施例中，本發明提供一種偵測樣品中的含炔分子之方法，該方法包含：

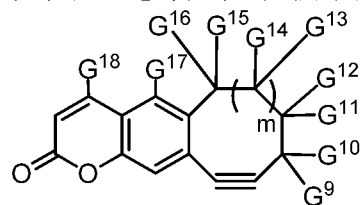
(a)使如本文所描述之化合物與疑似具有含炔分子之樣品接觸；

(b)偵測自該樣品釋放的螢光信號之位準，及

(c)確定該樣品中含炔分子之存在，

其中，相比於在分子不存在下之螢光信號位準，增強的螢光信號指示含炔分子之存在。

在另一態樣中本發明提供一種式(IV)之基於環辛炔之螢光探針：



(IV)

或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物或水合物，且其中：

G^9 、 G^{10} 、 G^{11} 、 G^{12} 、 G^{13} 、 G^{14} 、 G^{15} 、 G^{16} 、 G^{17} 及 G^{18} 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 C_{1-6} 烷基、視情況經取代之 C_{1-6} 烯基、視情

況鹵素、視情況亞硝基、視情況經取代之 C_{1-6} 炔基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之醯基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^B$ ；

R在各種情況下獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之醯基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^B$ ；

各 R^A 獨立地選自氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基；及

各 R^B 獨立地選自氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基，或兩個 R^B 與中間的氮結合在一起形成雜環；

G^9 及 G^{10} 在各種情況下為氫、氟基、氯基、溴基、碘基、亞硝基、烷基、烷氧基、芳氧基或炔基，及

其中烷基及烷氧基為非分支鏈、飽和的且具有1-4個碳原子；芳基及芳氧基之芳基可為碳環芳基或雜環芳基；碳環芳基具有總共6-20個碳原子，包括取代基之碳原子；雜環芳基具有總共5-20個碳原子，包括取代基之碳原子；烷氧羰基為羧酸之烷基酯，其中烷基如上文所定義；各烷基、芳基、烷氧基、芳氧基、苯并及烷氧羰基獨立地可不經取代或經一或多個取代基取代；烷基取代基為鹵基、羥基、胺基或芳基；芳基取代基為鹵

基、羥基、胺基、烷基、芳基、硝基或羧基；及鹵基取代基為氟基或氯基；

m為0或1；

n為0、1、2、3或4。

在某些實施例中，本發明提供一種對含疊氮化物分子進行成像之方法，該方法包含

(a)在允許式(IV)化合物接合至含疊氮化物分子之疊氮基的條件下用含有該分子之樣品培育該化合物以形成三唑產物；及

(b)偵測自該三唑產物釋放之螢光信號。

在某些實施例中，本發明提供一種偵測樣品中的含疊氮化物分子之方法，該方法包含：

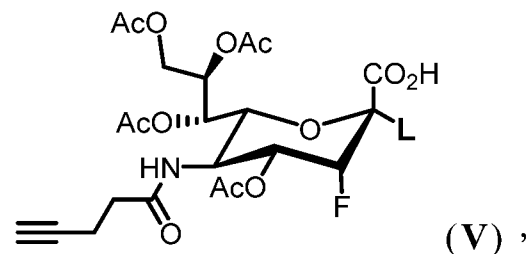
(a)使式(IV)化合物與疑似具有含疊氮化物分子之樣品接觸；

(b)偵測自該樣品釋放的螢光信號之位準，及

(c)確定該樣品中含疊氮化物分子之存在，

其中，相比於在分子不存在下之螢光信號位準，增強的螢光信號指示含疊氮化物分子之存在。

在另一態樣中，本發明係關於式(V)化合物：



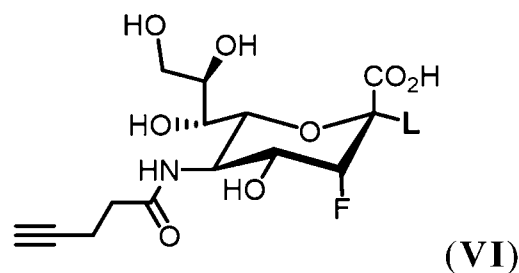
其中L選自由以下組成之群：鹵素、烷氧基、苯氧基、五氟苯氧基、4-硝基苯氧基、甲基-傘形酮基、烷酸酯、苯甲酸酯、三氟甲磺酸酯、甲磺酸酯或甲苯磺酸酯。

在某些實施例中，本發明提供一種對唾液酸酶之活性位點進行成像之方法，該方法包含：

(a)使如下所示之式(VI)之化合物與疑似包含唾液酸酶之樣品在將該化合物接合至該唾液酸酶之活性位點的條件下接觸以形成共價鍵產物，

(b)使該共價鍵產物與如本文所描述之含疊氮化物螢光探針接觸以形成螢光三唑產物，

(c)量測自該三唑產物釋放之螢光信號，



其中L選自由以下組成之群：

鹵素、烷氧基、苯氧基、五氟苯氧基、4-硝基苯氧基、甲基-傘形酮基(umbelliferyl)、烷酸酯、苯甲酸酯、三氟甲磺酸酯、甲磺酸酯或甲苯磺酸酯。

在某些實施例中，本發明提供一種偵測樣品中之唾液酸酶之活性位點之方法，其包含：

(a)使如上所述式(VI)之化合物與疑似具有唾液酸酶分子之樣品接觸，其中L為甲基-傘形酮基；

(b)量測自樣品混合物中之香豆素釋放之螢光信號之位準，及

(c)確定樣品中之唾液酸酶分子之存在，

其中，相比於在唾液酸酶分子不存在下之螢光信號位準，增強的螢光信號指示唾液酸酶分子之存在。

【圖式簡單說明】

圖1展示用於經由CuAAC反應篩檢螢光之經疊氮基取代之BODIPY衍生物**Az1-Az8**之結構。

圖2展示在微量滴定板中在UV燈激發($\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$)下**Az1-Az8**之CuAAC反應之螢光篩檢，得到相應三唑衍生物**T1-T8**。化合物**Az1**至**Az8**及**T1**至**T8**以芳基部分之電子密度之遞增次序進行分類。

圖3展示藉由與4-戊炔-1-醇之CuAAC反應獲得的胺基-BODIPY **Am10**、疊氮基-BODIPY **Az2**、**Az9-Az11**及相應三唑基-BODIPY **T2**、**T9-T11**之結構。

圖4展示三唑基-BODIPY **T10**、疊氮基-BODIPY **Az10**及胺基-BODIPY **Am10**在乙醇溶液($12 \mu\text{M}$)中在 25°C 下之吸收及正規化發射光譜。插圖：**T10**、**Az10**及**Am10**在乙醇溶液($120 \mu\text{M}$)中之影像。黃色**Az10**溶液至綠色**T10**溶液之變化是顯而易見的。

圖5展示標記有AzBOCEt (**Az10**)之炔官能化BSA。藉由螢光成像($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ ； $\lambda_{em} = 526 \text{ nm}$)分析凝膠。藉由庫馬斯藍(Coomassie blue)染色揭示總蛋白含量。

圖6展示標記有AzBOCEt (**Az10**)且藉由共焦顯微鏡成像之細胞螢光。(A)說明使用Ac₄ManNAI、Ac₄GalNAI及**Az10**之細胞標記實驗。將CL1-5細胞用 $100 \mu\text{M}$ Ac₄ManNAI、Ac₄GalNAI或對照糖(Ac₄ManNAc及Ac₄GalNAc)培育3天，且接著用 $0.1 \mu\text{M}$ **Az10**在CuAAC條件下處理1 h。(B)螢光、明視場及重疊影像。比例尺： $75 \mu\text{m}$ 。(C)表現的醣基共軛物在CL1-5細胞中之定位。用螢光探針**Az10** (綠色)、抗GRASP65 (高爾基體(Golgi)標記)隨後Cy3共軛抗兔(紅色)及赫斯特(Hoechst) (藍色，細胞核標記)標記此等醣基共軛物。比例尺： $10 \mu\text{m}$ 。

圖7展示藉由來自細胞溶解物之AzBOCEt (**Az10**)使用CuAAC進行炔標誌醣蛋白之直接凝膠內螢光偵測。藉由螢光成像($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ ； $\lambda_{em} = 526 \text{ nm}$)及庫馬斯藍染色分析凝膠以顯示總蛋白含量。

圖8展示標記有AzBOCEt (**Az10**)且藉由共焦顯微鏡成像之細胞螢光。CL1-5細胞用Ac₄GlcNAI或Ac₄GlcNAc培育3天且接著用0.1 μM **Az10**在CuAAC條件下處理1 h。(A)螢光、明視場及重疊影像。比例尺：75 μm。(B)表現的葡糖基共軛物在CL1-5肺細胞中之定位。用螢光探針**Az10**(綠色)、抗GRASP65(高爾基體標記)隨後Cy3共軛抗兔(紅色)及赫斯特(藍色，細胞核標記)標記此等葡糖基共軛物。比例尺：10 μm。

圖9展示使用細胞中之CuAAC之AzBOCEt進行運輸之聚醣之螢光成像。將CL1-5細胞用500 μM Ac₄ManNAI培育1 h且隨後用PBS緩衝液洗滌以移除過量Ac₄ManNAI。將糖處理過之細胞在培養基中分別培育1 h、7 h、14 h及21 h，且接著用0.1 μM **Az10**在CuAAC條件下標記1 h。

圖10展示基於SPAAC之螢光形成探針、比較探針及比較探針之三唑產物。

圖11展示唾液酸酶探針之結構。

圖12展示基於活性之探針之一般結構。

圖13展示唾液酸酶之機制及過渡狀態。

圖14展示唾液酸酶活性位點之x射線晶體結構。

圖15展示用於識別唾液酸酶之螢光反應。

圖16A、16B展示在螢光探針之反應期間之吸收及發射光譜及時間過程。

圖17展示逆螢光探針濃度隨**101**及模型疊氮化物分子之反應時間而變之曲線圖。

圖18展示逆螢光探針濃度隨**101**及模型含疊氮化物聚醣之反應時間而變之曲線圖。1/[**101**]對比化合物**101**與N-疊氮基乙醯甘露糖胺在CD₃OD-

D₂O溶液(5:1, v/v)中之反應時間之曲線圖如由¹H-NMR監測。

圖19展示用200 μM Ac₄ManNAz培育且用100 μM探針**101**標記之活CL1-5細胞在無洗滌及無固定條件下之延時螢光及重疊影像。

圖20展示如藉由共焦顯微鏡目測之探針標記唾液酸醣共軛物在CL1-5細胞中之定位。

圖21展示使用細胞中之SPAAC之coumOCT (**101**)進行運輸之醣共軛物之高對比度螢光成像。

圖22展示用200 μM Ac₄ManNAz培育且用100 μM探針**101**標記之活CL1-5細胞之延時螢光及重疊影像。

圖23展示使用細胞中之SPAAC之coumOCT (**101**)進行運輸之醣共軛物之螢光成像。

圖24A、24B展示細胞中標記有coumOCT (**1**)、AzBOCEt且藉由共焦顯微鏡成像之雙螢光。細胞中標記有coumOCT (**1**)、AzBOCEt且藉由共焦顯微鏡成像之雙螢光。(A)說明使用Ac₄ManNAz、Ac₄GlcNAz、**101**及AzBOCEt之細胞標記實驗。將CL1-5細胞用100 μM Ac₄ManNAz及Ac₄GlcNAz或對照糖(Ac₄ManNAc及Ac₄GlcNAc)培育3天，用100 μM探針**101**在SPAAC條件下處理0.5 h，且接著用0.1 μM AzBOCEt在CuAAC條件下培育1 h。(B) CL1-5細胞中之雙螢光成像。此等醣共軛物用探針**101**(青色)(對於含疊氨基醣共軛物)及AzBOCEt(綠色)(對於含炔醣共軛物)標記(比例尺：10 μm)。

圖25展示化合物**101**與3-巰基丙酸之CDCl₃中之¹H-NMR光譜。

圖26展示化合物**111**與3-巰基丙酸之CDCl₃中之¹H-NMR光譜。

【實施方式】

相關申請案

本發明主張2014年3月27日申請的美國臨時申請案第61/971,313號之優先權。其內容以引用的方式併入本文中。

以下更詳細地描述特定官能基及化學術語之定義。化學元素係根據CAS版本, 化學與物理學手冊(*Handbook of Chemistry and Physics*), 第75版, 內封面之元素週期表(*Periodic Table of the Elements*)來識別, 且特定官能基一般如其中所描述來定義。另外, 有機化學之一般原理以及特定官能部分及反應性描述於以下各者中: *Organic Chemistry*, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; *Smith and March March's Advanced Organic Chemistry*, 第5版, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2001; Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers, Inc., New York, 1989; 及Carruthers, *Some Modern Methods of Organic Synthesis*, 第3版, Cambridge University Press, Cambridge, 1987。

本文所描述之化合物可包含一或多個不對稱中心, 且因此可以各種立體異構形式, 例如對映異構體及/或非對映異構體存在。舉例而言, 本文所描述之化合物可呈個別對映異構體、非對映異構體或幾何異構體形式, 或可呈立體異構體之混合物的形式, 包括外消旋混合物及富集一或多種立體異構體之混合物。可使用包括對掌性高壓液相層析法(HPLC), 及形成對掌性鹽且使其結晶之方法使異構體自混合物分離; 或可藉由不對稱合成來製備較佳異構體。參見例如Jacques等人, *Enantiomers, Racemates and Resolutions* (Wiley Interscience, New York, 1981); Wilen等人, *Tetrahedron* 33:2725 (1977); Eliel, E.L. *Stereochemistry of Carbon*

Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962)；及 Wilen, S.H. *Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions* 第268頁 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972)。本發明另外涵蓋呈實質上不含其他異構體之個別異構體形式的化合物，且替代地，呈各種異構體之混合物形式。

當列出值之範圍時，意欲涵蓋該範圍內之各值及子範圍。舉例而言，「C₁₋₆烷基」意欲涵蓋C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₁₋₆、C₁₋₅、C₁₋₄、C₁₋₃、C₁₋₂、C₂₋₆、C₂₋₅、C₂₋₄、C₂₋₃、C₃₋₆、C₃₋₅、C₃₋₄、C₄₋₆、C₄₋₅及C₅₋₆烷基。

如本文所用，「烷基」係指具有1至10個碳原子之直鏈或分支鏈飽和烴基之基團(「C₁₋₁₀烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至9個碳原子(「C₁₋₉烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至8個碳原子(「C₁₋₈烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至7個碳原子(「C₁₋₇烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至6個碳原子(「C₁₋₆烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至5個碳原子(「C₁₋₅烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至4個碳原子(「C₁₋₄烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至3個碳原子(「C₁₋₃烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1至2個碳原子(「C₁₋₂烷基」)。在一些實施例中，烷基具有1個碳原子(「C₁烷基」)。在一些實施例中，烷基具有2至6個碳原子(「C₂₋₆烷基」)。C₁₋₆烷基之實例包括甲基(C₁)、乙基(C₂)、正丙基(C₃)、異丙基(C₃)、正丁基(C₄)、第三丁基(C₄)、第二丁基(C₄)、異丁基(C₄)、正戊基(C₅)、3-戊基(C₅)、戊基(C₅)、新戊基(C₅)、3-甲基-2-丁基(C₅)、第三戊基(C₅)及正己基(C₆)。烷基之額外實例包括正庚基(C₇)、正辛基(C₈)及其類似基團。除非另外說明，否則烷基在各種情況

下獨立地為未經取代(「未經取代之烷基」)或經一或多個取代基取代(「經取代之烷基」)。在某些實施例中，烷基為未經取代之 C_{1-10} 烷基(例如， $-CH_3$)。在某些實施例中，烷基為經取代之 C_{1-10} 烷基。

如本文所用，「烯基」係指具有2至10個碳原子及一或多個碳-碳雙鍵(例如，1、2、3或4個雙鍵)之直鏈或分支鏈烴基之基團。在一些實施例中，烯基具有2至9個碳原子(「 C_{2-9} 烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至8個碳原子(「 C_{2-8} 烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至7個碳原子(「 C_{2-7} 烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至6個碳原子(「 C_{2-6} 烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至5個碳原子(「 C_{2-5} 烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至4個碳原子(「 C_{2-4} 烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2至3個碳原子(「 C_{2-3} 烯基」)。在一些實施例中，烯基具有2個碳原子(「 C_2 烯基」)。一或多個碳-碳雙鍵可為內部(諸如在2-丁烯基中)或末端(諸如在1-丁烯基中)的。 C_{2-4} 烯基之實例包括乙烯基(C_2)、1-丙烯基(C_3)、2-丙烯基(C_3)、1-丁烯基(C_4)、2-丁烯基(C_4)、丁二烯基(C_4)及其類似基團。 C_{2-6} 烯基之實例包括前述 C_{2-4} 烯基以及戊烯基(C_5)、戊二烯基(C_5)、己烯基(C_6)及其類似基團。烯基之額外實例包括庚烯基(C_7)、辛烯基(C_8)、辛三烯基(C_8)及其類似基團。除非另外說明，否則烯基在各種情況下獨立地為未經取代(「未經取代之烯基」)或經一或多個取代基取代(「經取代之烯基」)。在某些實施例中，烯基為未經取代之 C_{2-10} 烯基。在某些實施例中，烯基為經取代之 C_{2-10} 烯基。

如本文所用，「炔基」係指具有2至10個碳原子及一或多個碳-碳參鍵(例如，1、2、3或4個參鍵)之直鏈或分支鏈烴基之基團(「 C_{2-10} 炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至9個碳原子(「 C_{2-9} 炔基」)。在一些實施例

中，炔基具有2至8個碳原子(「C₂₋₈炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至7個碳原子(「C₂₋₇炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至6個碳原子(「C₂₋₆炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至5個碳原子(「C₂₋₅炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至4個碳原子(「C₂₋₄炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2至3個碳原子(「C₂₋₃炔基」)。在一些實施例中，炔基具有2個碳原子(「C₂炔基」)。一或多個碳-碳參鍵可為內部(諸如在2-丁炔基中)或末端(諸如在1-丁炔基中)的。C₂₋₄炔基之實例包括(但不限於)乙炔基(C₂)、1-丙炔基(C₃)、2-丙炔基(C₃)、1-丁炔基(C₄)、2-丁炔基(C₄)及其類似基團。C₂₋₆炔基之實例包括前述C₂₋₄炔基以及戊炔基(C₅)、己炔基(C₆)及其類似基團。炔基之額外實例包括庚炔基(C₇)、辛炔基(C₈)及其類似基團。除非另外說明，否則炔基在各種情況下獨立地為未經取代(「未經取代之炔基」)或經一或多個取代基取代(「經取代之炔基」)。在某些實施例中，炔基為未經取代之C₂₋₁₀炔基。在某些實施例中，炔基為經取代之C₂₋₁₀炔基。

如本文所用，「碳環基」或「碳環」係指在非芳環系統中具有3至10個環碳原子(「C₃₋₁₀碳環基」)及0個雜原子之非芳族環烴基之基團。在一些實施例中，碳環基具有3至8個環碳原子(「C₃₋₈碳環基」)。在一些實施例中，碳環基具有3至7個環碳原子(「C₃₋₇碳環基」)。在一些實施例中，碳環基具有3至6個環碳原子(「C₃₋₆碳環基」)。在一些實施例中，碳環基具有4至6個環碳原子(「C₄₋₆碳環基」)。在一些實施例中，碳環基具有5至6個環碳原子(「C₅₋₆碳環基」)。在一些實施例中，碳環基具有5至10個環碳原子(「C₅₋₁₀碳環基」)。例示性C₃₋₆碳環基包括(但不限於)環丙基(C₃)、環丙烯基(C₃)、環丁基(C₄)、環丁烯基(C₄)、環戊基(C₅)、環戊烯基(C₅)、

環己基(C₆)、環己烯基(C₆)、環己二烯基(C₆)及其類似基團。例示性C₃₋₈碳環基包括(但不限於)前述C₃₋₆碳環基以及環庚基(C₇)、環庚烯基(C₇)、環庚二烯基(C₇)、環庚三烯基(C₇)、環辛基(C₈)、環辛烯基(C₈)、雙環[2.2.1]庚基(C₇)、雙環[2.2.2]辛基(C₈)及其類似基團。例示性C₃₋₁₀碳環基包括(但不限於)前述C₃₋₈碳環基以及環壬基(C₉)、環壬烯基(C₉)、環癸基(C₁₀)、環癸烯基(C₁₀)、八氫-1*H*-茛基(C₉)、十氫萘基(C₁₀)、螺[4.5]癸基(C₁₀)及其類似基團。如前述實例說明，在某些實施例中，碳環基為單環(「單環碳環基」)或多環(例如，含有稠合、橋聯或螺環系統，諸如雙環系統(「雙環碳環基」)或三環系統(「三環碳環基」))且可為飽和的或可含有一或多個碳-碳雙鍵或參鍵。「碳環基」亦包括其中如上文所定義之碳環基環與一或多個芳基或雜芳基稠合之環系統，其中附接點在碳環基環上，且在該等情況下，碳原子數目繼續指示碳環系統中之碳原子數目。除非另外說明，否則碳環基在各種情況下獨立地為未經取代(「未經取代之碳環基」)或經一或多個取代基取代(「經取代之碳環基」)。在某些實施例中，碳環基為未經取代之C₃₋₁₀碳環基。在某些實施例中，碳環基為經取代之C₃₋₁₀碳環基。

如本文所用，「雜環基」或「雜環」係指具有環碳原子及1至4個環雜原子之3至14員非芳環系統之基團，其中各雜原子獨立地選自氮、氧及硫(「3-14員雜環基」)。在含有一或多個氮原子之雜環基中，在價數容許時，附接點可為碳或氮原子。雜環基可為單環(「單環雜環基」)或多環(例如，稠合、橋聯或螺環系統，諸如雙環系統(「雙環雜環基」)或三環系統(「三環雜環基」))，且可為飽和的或可含有一或多個碳-碳雙鍵或參鍵。雜環基多環系統可在一個或兩個環中包括一或多個雜原子。「雜環

基」亦包括其中如上文所定義之雜環基環與一或多個碳環基稠合之環系統，其中附接點在碳環基或雜環基環上；或其中如上文所定義之雜環基與一或多個芳基或雜芳基稠合之環系統，其中附接點在雜環基環上，且在該等情況下，環成員的數目繼續指示雜環基環系統中之環成員的數目。除非另外說明，否則雜環基在各種情況下獨立地為未經取代(「未經取代之雜環基」)或經一或多個取代基取代(「經取代之雜環基」)。在某些實施例中，雜環基為未經取代之3-14員雜環基。在某些實施例中，雜環基為經取代之3-14員雜環基。

如本文所用，「芳基」係指芳環系統中提供有6-14個環碳原子及0個雜原子之單環或多環(例如，雙環或三環) $4n+2$ 芳環系統(例如在環狀陣列中共用6、10或14個 π 電子)之基團(「C₆₋₁₄芳基」)。在一些實施例中，芳基具有6個環碳原子(「C₆芳基」；例如，苯基)。在一些實施例中，芳基具有10個環碳原子(「C₁₀芳基」；例如，萘基，諸如1-萘基及2-萘基)。在一些實施例中，芳基具有14個環碳原子(「C₁₄芳基」；例如，蔥基)。「芳基」亦包括其中如上文所定義之芳基環與一或多個碳環基或雜環基稠合之環系統，其中附接基團或附接點在芳基環上，且在該等情況下，碳原子數目繼續指示芳基環系統中之碳原子數目。除非另外說明，否則芳基在各種情況下獨立地為未經取代(「未經取代之芳基」)或經一或多個取代基取代(「經取代之芳基」)。在某些實施例中，芳基為未經取代之C₆₋₁₄芳基。在某些實施例中，芳基為經取代之C₆₋₁₄芳基。

如本文所用，「雜芳基」係指芳環系統中提供有環碳原子和1-4個環雜原子(其中各雜原子獨立地選自氮、氧及硫)之5-14員單環或多環(例如，雙環、三環) $4n+2$ 芳環系統(例如，在環狀陣列中共用6、10或14個 π 電子)

之基團(「5-14員雜芳基」)。在含有一或多個氮原子之雜芳基中，在價數容許時，附接點可為碳或氮原子。雜芳基多環系統可在一個或兩個環中包括一或多個雜原子。「雜芳基」包括其中如上文所定義之雜芳基環與一或多個碳環基或雜環基稠合之環系統，其中附接點在雜芳基環上，且在該等情況下，環成員的數目繼續指示雜芳基環系統中之環成員的數目。「雜芳基」亦包括其中如上文所定義之雜芳基環與一或多個芳基稠合之環系統，其中附接點在芳基或雜芳基環上，且在該等情況下，環成員的數目指示稠合多環(芳基/雜芳基)環系統中之環成員的數目。其中一個環不含雜原子之多環雜芳基(例如，吡啶基、喹啉基、咪唑基及其類似基團)，附接點可在任一環上，亦即，在攜帶雜原子之環上(例如，2-吡啶基)或在不含雜原子之環上(例如，5-吡啶基)。

如自上文所理解，如本文所定義之烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、碳環基、雜環基、芳基及雜芳基在某些實施例中為視情況經取代的。視情況經取代係指可經取代或未經取代之基團(例如，「經取代」或「未經取代」之烷基、「經取代」或「未經取代」之烯基、「經取代」或「未經取代」之炔基、「經取代」或「未經取代」之雜烷基、「經取代」或「未經取代」之雜烯基、「經取代」或「未經取代」之雜炔基、「經取代」或「未經取代」之碳環基、「經取代」或「未經取代」之雜環基、「經取代」或「未經取代」之芳基或「經取代」或「未經取代」之雜芳基)。一般而言，術語「經取代」意謂至少一個存在於基團上之氫經容許取代基置換，例如，在取代之後導致穩定化合物之取代基，例如，不藉由諸如重排、環化、消除或其他反應自發地經歷轉化之化合物。除非另外指示，否則「經取代」之基團在基團之一或多個可取代位置處具有取代基，

且當任何既定結構中之一個以上位置經取代時，取代基在各位置處相同或不同。術語「經取代」預期包括經有機化合物之所有容許取代基、導致穩定化合物形成之本文所描述之任何取代基取代。本發明涵蓋任何及所有此類組合以便獲得穩定化合物。出於本發明的目的，雜原子(諸如氮)可具有氫取代基及/或滿足雜原子價數且導致穩定部分形成之如本文所描述之任何適合取代基。

例示性碳原子取代基包括(但不限於)鹵素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{ON}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_3^+\text{X}^-$ 、 $-\text{N}(\text{OR}^{\text{cc}})\text{R}^{\text{bb}}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SSR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{C}(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OCO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{CO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{bb}}\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OS}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{Si}(\text{R}^{\text{aa}})_3$ 、 $-\text{OSi}(\text{R}^{\text{aa}})_3$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{S})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{P}(=\text{O})(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{P}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{\text{cc}})_3$ 、 $-\text{OP}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{R}^{\text{cc}})_3$ 、 $-\text{B}(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{B}(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{BR}^{\text{aa}}(\text{OR}^{\text{cc}})$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 全鹵烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{1-10} 雜烷基、 C_{2-10} 雜烯基、 C_{2-10} 雜炔基、 C_{3-14} 碳環基、3-14員雜環基、 C_{6-14} 芳基及5-14員雜芳基，其中各

烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、碳環基、雜環基、芳基及雜芳基獨立地經0、1、2、3、4或5個 R^{dd} 基團取代；

或碳原子上的兩個成對氫經基團 $=O$ 、 $=S$ 、 $=NN(R^{bb})_2$ 、 $=NNR^{bb}C(=O)R^{aa}$ 、 $=NNR^{bb}C(=O)OR^{aa}$ 、 $=NNR^{bb}S(=O)_2R^{aa}$ 、 $=NR^{bb}$ 或 $=NOR^{cc}$ 置換；

R^{aa} 在各種情況下獨立地選自 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 全鹵烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{1-10} 雜烷基、 C_{2-10} 雜烯基、 C_{2-10} 雜炔基、 C_{3-10} 碳環基、3-14員雜環基、 C_{6-14} 芳基及5-14員雜芳基，或兩個 R^{aa} 基團連接以形成3-14員雜環基或5-14員雜芳基環，其中各烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、碳環基、雜環基、芳基及雜芳基獨立地經0、1、2、3、4或5個 R^{dd} 基團取代；

R^{bb} 在各種情況下獨立地選自氫、 $-OH$ 、 $-OR^{aa}$ 、 $-N(R^{cc})_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)R^{aa}$ 、 $-C(=O)N(R^{cc})_2$ 、 $-CO_2R^{aa}$ 、 $-SO_2R^{aa}$ 、 $-C(=NR^{cc})OR^{aa}$ 、 $-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$ 、 $-SO_2N(R^{cc})_2$ 、 $-SO_2R^{cc}$ 、 $-SO_2OR^{cc}$ 、 $-SOR^{aa}$ 、 $-C(=S)N(R^{cc})_2$ 、 $-C(=O)SR^{cc}$ 、 $-C(=S)SR^{cc}$ 、 $-P(=O)_2R^{aa}$ 、 $-P(=O)(R^{aa})_2$ 、 $-P(=O)_2N(R^{cc})_2$ 、 $-P(=O)(NR^{cc})_2$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 全鹵烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{1-10} 雜烷基、 C_{2-10} 雜烯基、 C_{2-10} 雜炔基、 C_{3-10} 碳環基、3-14員雜環基、 C_{6-14} 芳基及5-14員雜芳基，或兩個 R^{bb} 基團連接以形成3-14員雜環基或5-14員雜芳基環，其中各烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、碳環基、雜環基、芳基及雜芳基獨立地經0、1、2、3、4或5個 R^{dd} 基團取代；

R^{cc} 在各種情況下獨立地選自氫、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 全鹵烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{1-10} 雜烷基、 C_{2-10} 雜烯基、 C_{2-10} 雜炔基、 C_{3-10} 碳環基、

3-14員雜環基、C₆₋₁₄芳基及5-14員雜芳基，或兩個R^{cc}基團連接以形成3-14員雜環基或5-14員雜芳基環，其中各烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、碳環基、雜環基、芳基及雜芳基獨立地經0、1、2、3、4或5個R^{dd}基團取代；

R^{dd}在各種情況下獨立地選自鹵素、-CN、-NO₂、-N₃、-SO₂H、-SO₃H、-OH、-OR^{ee}、-ON(R^{ff})₂、-N(R^{ff})₂、-N(R^{ff})₃⁺X⁻、-N(OR^{ee})R^{ff}、-SH、-SR^{ee}、-SSR^{ee}、-C(=O)R^{ee}、-CO₂H、-CO₂R^{ee}、-OC(=O)R^{ee}、-OCO₂R^{ee}、-C(=O)N(R^{ff})₂、-OC(=O)N(R^{ff})₂、-NR^{ff}C(=O)R^{ee}、-NR^{ff}CO₂R^{ee}、-NR^{ff}C(=O)N(R^{ff})₂、-C(=NR^{ff})OR^{ee}、-OC(=NR^{ff})R^{ee}、-OC(=NR^{ff})OR^{ee}、-C(=NR^{ff})N(R^{ff})₂、-OC(=NR^{ff})N(R^{ff})₂、-NR^{ff}C(=NR^{ff})N(R^{ff})₂、-NR^{ff}SO₂R^{ee}、-SO₂N(R^{ff})₂、-SO₂R^{ee}、-SO₂OR^{ee}、-OSO₂R^{ee}、-S(=O)R^{ee}、-Si(R^{ee})₃、-OSi(R^{ee})₃、-C(=S)N(R^{ff})₂、-C(=O)SR^{ee}、-C(=S)SR^{ee}、-SC(=S)SR^{ee}、-P(=O)₂R^{ee}、-P(=O)(R^{ee})₂、-OP(=O)(R^{ee})₂、-OP(=O)(OR^{ee})₂、C₁₋₆烷基、C₁₋₆全鹵烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₆雜烷基、C₂₋₆雜烯基、C₂₋₆雜炔基、C₃₋₁₀碳環基、3-10員雜環基、C₆₋₁₀芳基、5-10員雜芳基，其中各烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、碳環基、雜環基、芳基及雜芳基獨立地經0、1、2、3、4或5個R^{eg}基團取代，或兩個成對R^{dd}取代基可連接以形成=O或=S；

R^{ee}在各種情況下獨立地選自C₁₋₆烷基、C₁₋₆全鹵烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₆雜烷基、C₂₋₆雜烯基、C₂₋₆雜炔基、C₃₋₁₀碳環基、C₆₋₁₀芳基、3-10員雜環基及3-10員雜芳基，其中各烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、碳環基、雜環基、芳基及雜芳基獨立地經0、1、2、3、4或

5個R^{eg}基團取代；

R^{ff}在各種情況下獨立地選自氫、C₁₋₆烷基、C₁₋₆全鹵烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₆雜烷基、C₂₋₆雜烯基、C₂₋₆雜炔基、C₃₋₁₀碳環基、3-10員雜環基、C₆₋₁₀芳基及5-10員雜芳基，或兩個R^{ff}基團連接以形成3-14員雜環基或5-14員雜芳基環，其中各烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、碳環基、雜環基、芳基及雜芳基獨立地經0、1、2、3、4或5個R^{eg}基團取代；及

R^{eg}在各種情況下獨立地為鹵素、-CN、-NO₂、-N₃、-SO₂H、-SO₃H、-OH、-OC₁₋₆烷基、-ON(C₁₋₆烷基)₂、-N(C₁₋₆烷基)₂、-N(C₁₋₆烷基)₃⁺X⁻、-NH(C₁₋₆烷基)₂⁺X⁻、-NH₂(C₁₋₆烷基)⁺X⁻、-NH₃⁺X⁻、-N(OC₁₋₆烷基)(C₁₋₆烷基)、-N(OH)(C₁₋₆烷基)、-NH(OH)、-SH、-SC₁₋₆烷基、-SS(C₁₋₆烷基)、-C(=O)(C₁₋₆烷基)、-CO₂H、-CO₂(C₁₋₆烷基)、-OC(=O)(C₁₋₆烷基)、-OCO₂(C₁₋₆烷基)、-C(=O)NH₂、-C(=O)N(C₁₋₆烷基)₂、-OC(=O)NH(C₁₋₆烷基)、-NHC(=O)(C₁₋₆烷基)、-N(C₁₋₆烷基)C(=O)(C₁₋₆烷基)、-NHCO₂(C₁₋₆烷基)、-NHC(=O)N(C₁₋₆烷基)₂、-NHC(=O)NH(C₁₋₆烷基)、-NHC(=O)NH₂、-C(=NH)O(C₁₋₆烷基)、-OC(=NH)(C₁₋₆烷基)、-OC(=NH)OC₁₋₆烷基、-C(=NH)N(C₁₋₆烷基)₂、-C(=NH)NH(C₁₋₆烷基)、-C(=NH)NH₂、-OC(=NH)N(C₁₋₆烷基)₂、-OC(NH)NH(C₁₋₆烷基)、-OC(NH)NH₂、-NHC(NH)N(C₁₋₆烷基)₂、-NHC(=NH)NH₂、-NH₂SO₂(C₁₋₆烷基)、-SO₂N(C₁₋₆烷基)₂、-SO₂NH(C₁₋₆烷基)、-SO₂NH₂、-SO₂C₁₋₆烷基、-SO₂OC₁₋₆烷基、-OSO₂C₁₋₆烷基、-SOC₁₋₆烷基、-Si(C₁₋₆烷基)₃、-OSi(C₁₋₆烷基)₃、-C(=S)N(C₁₋₆烷基)₂、C(=S)NH(C₁₋₆烷基)、C(=S)NH₂、-C(=O)S(C₁₋₆烷基)、-C(=S)SC₁₋₆烷

基、 $-\text{SC}(=\text{S})\text{SC}_{1-6}$ 烷基、 $-\text{P}(=\text{O})_2(\text{C}_{1-6}$ 烷基)、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{C}_{1-6}$ 烷基) $_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{C}_{1-6}$ 烷基) $_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OC}_{1-6}$ 烷基) $_2$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 全鹵烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{1-6} 雜烷基、 C_{2-6} 雜烯基、 C_{2-6} 雜炔基、 C_{3-10} 碳環基、 C_{6-10} 芳基、3-10員雜環基、5-10員雜芳基；或兩個成對 R^{sg} 取代基可連接以形成 $=\text{O}$ 或 $=\text{S}$ ；其中 X^- 為相對離子。

如本文所用，術語「鹵基」或「鹵素」係指氟(氟基， $-\text{F}$)、氯(氯基， $-\text{Cl}$)、溴(溴基， $-\text{Br}$)或碘(碘基， $-\text{I}$)。

在某些實施例中，存在於氮原子上之取代基為氮保護基(在本文中亦稱為「胺基保護基」)。氮保護基包括(但不限於) $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{cc}})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{cc}})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{cc}})\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{SOR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}^{\text{cc}}$ 、 C_{1-10} 烷基(例如，芳烷基、雜芳烷基)、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{1-10} 雜烷基、 C_{2-10} 雜烯基、 C_{2-10} 雜炔基、 C_{3-10} 碳環基、3-14員雜環基、 C_{6-14} 芳基及5-14員雜芳基，其中各烷基、烯基、炔基、雜烷基、雜烯基、雜炔基、碳環基、雜環基、芳烷基、芳基及雜芳基獨立地經0、1、2、3、4或5個 R^{dd} 基團取代，且其中 R^{aa} 、 R^{bb} 、 R^{cc} 及 R^{dd} 如本文所定義。氮保護基包括詳細地描述於以引用的方式併入本文中之*Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene 及 P. G. M. Wuts, 第3版, John Wiley & Sons, 1999中之彼等氮保護基。

舉例而言，氮保護基，諸如醯胺基(例如， $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$)，包括(但不限於)甲醯胺、乙醯胺、氯乙醯胺、三氯乙醯胺、三氟乙醯胺、苯基乙醯胺、3-苯基丙醯胺、吡啶醯胺、3-吡啶基甲醯胺、*N*-苯甲醯基苯丙胺醯基衍生物、苯甲醯胺、對苯基苯甲醯胺、鄰硝基苯基乙醯胺、鄰硝基苯氧基

乙醯胺、乙醯乙醯胺、(*N'*-二硫苄氧基醯胺基)乙醯胺、3-(對羥苯基)丙醯胺、3-(鄰硝基苯基)丙醯胺、2-甲基-2-(鄰硝基苯氧基)丙醯胺、2-甲基-2-(鄰苯基偶氨基苯氧基)丙醯胺、4-氯丁醯胺、3-甲基-3-硝基丁醯胺、鄰硝基肉桂醯胺、*N*-乙醯基蛋胺酸衍生物、鄰硝基苯甲醯胺及鄰(苯甲醯氧基甲基)苯甲醯胺。

氮保護基，諸如胺基甲酸酯基(例如， $-C(=O)OR^{aa}$)，包括(但不限於)胺基甲酸甲酯、胺基甲酸乙酯、胺基甲酸9-苄基甲酯(Fmoc)、胺基甲酸9-(2-磺基)苄基甲酯、胺基甲酸9-(2,7-二溴)苄基甲酯、胺基甲酸2,7-二-第三丁基-[9-(10,10-二側氧基-10,10,10,10-四氫噻噸基)]甲酯(DBD-Tmoc)、胺基甲酸4-甲氧基苯甲醯甲酯(Phenoc)、胺基甲酸2,2,2-三氯乙酯(Troc)、胺基甲酸2-三甲基矽烷基乙酯(Teoc)、胺基甲酸2-苯基乙酯(hZ)、胺基甲酸1-(1-金剛烷基)-1-甲基乙酯(Adpoc)、胺基甲酸1,1-二甲基-2-鹵乙酯、胺基甲酸1,1-二甲基-2,2-二溴乙酯(DB-*t*-BOC)、胺基甲酸1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙酯(TCBOC)、胺基甲酸1-甲基-1-(4-聯苯基)乙酯(Bpoc)、胺基甲酸1-(3,5-二-第三丁基苯基)-1-甲基乙酯(*t*-Bumeoc)、胺基甲酸2-(2'-吡啶基及4'-吡啶基)乙酯(Pyoc)、胺基甲酸2-(*N,N*-二環己基甲醯胺基)乙酯、胺基甲酸第三丁酯(BOC)、胺基甲酸1-金剛烷酯(Adoc)、胺基甲酸乙烯酯(Voc)、胺基甲酸烯丙酯(Alloc)、胺基甲酸1-異丙基烯丙酯(Ipaoc)、胺基甲酸桂皮酯(Coc)、胺基甲酸4-硝基桂皮酯(Noc)、胺基甲酸8-喹啉酯、胺基甲酸*N*-羥基哌啶酯、胺基甲酸烷基二硫酯、胺基甲酸苄酯(Cbz)、胺基甲酸對甲氧基苄酯(Moz)、胺基甲酸對硝基苄酯、胺基甲酸對溴苄酯、胺基甲酸對氯苄酯、胺基甲酸2,4-二氯苄酯、胺基甲酸4-甲基亞磺醯基苄酯(Msz)、胺基甲酸9-蒎基甲酯、胺基甲酸二苯基甲酯、胺基

甲酸2-甲基硫乙酯、胺基甲酸2-甲基磺醯基乙酯、胺基甲酸2-(對甲苯磺醯基)乙酯、胺基甲酸[2-(1,3-二噻烷基)]甲酯(Dmoc)、胺基甲酸4-甲基噻吩酯(Mtpc)、胺基甲酸2,4-二甲基噻吩酯(Bmpc)、胺基甲酸2-磷鎊基乙酯(Peoc)、胺基甲酸2-三苯基磷鎊基異丙酯(Ppoc)、胺基甲酸1,1-二甲基-2-氰基乙酯、胺基甲酸間氯-對醯氧基苄酯、胺基甲酸對(二羥基硼基)苄酯、胺基甲酸5-苯并異噁唑基甲酯、胺基甲酸2-(三氟甲基)-6-色酮基甲酯(Tcroc)、胺基甲酸間硝基苄酯、胺基甲酸3,5-二甲氧基苄酯、胺基甲酸鄰硝基苄酯、胺基甲酸3,4-二甲氧基-6-硝基苄酯、胺基甲酸苯基(鄰硝基苯基)甲酯、胺基甲酸第三戊酯、硫代胺基甲酸S-苄酯、胺基甲酸對氰苄酯、胺基甲酸環丁酯、胺基甲酸環己酯、胺基甲酸環戊酯、胺基甲酸環丙基甲酯、胺基甲酸對癸氧基苄酯、胺基甲酸2,2-二甲氧醯基乙烯酯、胺基甲酸鄰(N,N-二甲基甲醯胺基)苄酯、胺基甲酸1,1-二甲基-3-(N,N-二甲基甲醯胺基)丙酯、胺基甲酸1,1-二甲基丙炔酯、胺基甲酸二(2-吡啶基)甲酯、胺基甲酸2-呋喃基甲酯、胺基甲酸2-碘乙酯、胺基甲酸異冰片酯、胺基甲酸異丁酯、胺基甲酸異菸鹼酯、胺基甲酸對(p'-甲氧苯基偶氮基)苄酯、胺基甲酸1-甲基環丁酯、胺基甲酸1-甲基環己酯、胺基甲酸1-甲基-1-環丙基甲酯、胺基甲酸1-甲基-1-(3,5-二甲氧苯基)乙酯、胺基甲酸1-甲基-1-(對苯偶氮基苯基)乙酯、胺基甲酸1-甲基-1-苯基乙酯、胺基甲酸1-甲基-1-(4-吡啶基)乙酯、胺基甲酸苯酯、胺基甲酸對(苯偶氮基)苄酯、胺基甲酸2,4,6-三-第三丁基苯酯、胺基甲酸4-(三甲基鉍)苄酯及胺基甲酸2,4,6-三甲基苄酯。

氮保護基，諸如磺醯胺基(例如， $-S(=O)_2R^{aa}$)，包括(但不限於)對甲苯磺醯胺(Ts)、苯磺醯胺、2,3,6-三甲基-4-甲氧基苯磺醯胺(Mtr)、2,4,6-

三甲氧基苯磺醯胺(Mtb)、2,6-二甲基-4-甲氧基苯磺醯胺(Pme)、2,3,5,6-四甲基-4-甲氧基苯磺醯胺(Mte)、4-甲氧基苯磺醯胺(Mbs)、2,4,6-三甲基苯磺醯胺(Mts)、2,6-二甲氧基-4-甲基苯磺醯胺(iMds)、2,2,5,7,8-五甲基色滿-6-磺醯胺(Pmc)、甲烷磺醯胺(Ms)、 β -三甲基矽烷基乙烷磺醯胺(SES)、9-蒽磺醯胺、4-(4',8'-二甲氧基萘基甲基)苯磺醯胺(DNMBS)、苄基磺醯胺、三氟甲基磺醯胺及苯甲醯甲基磺醯胺。

其他氮保護基包括(但不限於)啡噁嗪基-(10)-醯基衍生物、*N'*-對甲苯磺醯基胺醯基衍生物、*N'*-苄基胺基硫醯基衍生物、*N*-苯甲醯基苯基丙胺醯基衍生物、*N*-乙醯基蛋胺酸衍生物、4,5-二苯基-3-噁唑啉-2-酮、*N*-鄰苯二甲醯亞胺、*N*-二硫雜丁二醯亞胺(Dts)、*N*-2,3-二苯基順丁烯二醯亞胺、*N*-2,5-二甲基吡咯、*N*-1,1,4,4-四甲基二矽烷基氮雜環戊烷加合物(STABASE)、5-取代1,3-二甲基-1,3,5-三氮雜環己-2-酮、5-取代1,3-二苄基-1,3,5-三氮雜環己-2-酮、1-取代3,5-二硝基-4-吡啶酮、*N*-甲胺、*N*-烯丙胺、*N*-[2-(三甲基矽烷基)乙氧基]甲胺(SEM)、*N*-3-乙醯氧基丙胺、*N*-(1-異丙基-4-硝基-2-側氧基-3-吡咯啉-3-基)胺、四級銨鹽、*N*-苄胺、*N*-二(4-甲氧基)甲胺、*N*-5-二苯并環庚胺、*N*-三苯基甲胺(Tr)、*N*-[(4-甲氧基)二苄基甲基]胺(MMTr)、*N*-9-苯基萘基胺(PhF)、*N*-2,7-二氯-9-萘基亞甲基胺、*N*-二茂鐵基甲基胺基(Fcm)、*N*-2-吡啶甲基胺基*N'*-氧化物、*N*-1,1-二甲基硫亞甲基胺、*N*-亞苄基胺、*N*-對甲氧基亞苄基胺、*N*-二苯基亞甲基胺、*N*-[(2-吡啶基)2,4,6-三甲苯基]亞甲基胺、*N*-(*N'*,*N'*-二甲基胺基亞甲基)胺、*N*,*N'*-異亞丙基二胺、*N*-對硝基亞苄基胺、*N*-亞柳基胺、*N*-5-氯亞柳基胺、*N*-(5-氯-2-羥基)苯基亞甲基胺、*N*-亞環己基胺、*N*-(5,5-二甲基-3-側氧基-1-環己烯基)胺、*N*-硼烷衍生物、*N*-二苯基硼酸衍生物、

N-[苯基(五醯基鉻-或鎢)醯基]胺、*N*-銅螯合劑、*N*-鋅螯合劑、*N*-硝基胺、*N*-亞硝基胺、*N*-氧化胺、二苯基磷醯胺(Dpp)、二甲基硫磷醯胺(Mpt)、二苯基硫磷醯胺(Ppt)、胺基磷酸二烷酯、胺基磷酸二苄酯、胺基磷酸二苯酯、苯亞磺醯胺、鄰硝基苯亞磺醯胺(Nps)、2,4-二硝基苯亞磺醯胺、五氯苯亞磺醯胺、2-硝基-4-甲氧基苯亞磺醯胺、三苯基甲基亞磺醯胺及3-硝基吡啶亞磺醯胺(Npys)。

在某些實施例中，存在於氧原子上之取代基為氧保護基(在本文中亦稱為「羥基保護基」)。氧保護基包括(但不限於)-R^{aa}、-N(R^{bb})₂、-C(=O)SR^{aa}、-C(=O)R^{aa}、-CO₂R^{aa}、-C(=O)N(R^{bb})₂、-C(=NR^{bb})R^{aa}、-C(=NR^{bb})OR^{aa}、-C(=NR^{bb})N(R^{bb})₂、-S(=O)R^{aa}、-SO₂R^{aa}、-Si(R^{aa})₃、-P(R^{cc})₂、-P(R^{cc})₃、-P(=O)₂R^{aa}、-P(=O)(R^{aa})₂、-P(=O)(OR^{cc})₂、-P(=O)₂N(R^{bb})₂及-P(=O)(NR^{bb})₂，其中R^{aa}、R^{bb}及R^{cc}如本文所定義。氧保護基包括詳細地描述於以引用的方式併入本文中之*Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene及P. G. M. Wuts, 第3版, John Wiley & Sons, 1999中之彼等氧保護基。

例示性氧保護基包括(但不限於)甲基、甲氧基甲基(MOM)、甲硫甲基(MTM)、第三丁基硫甲基、(苯基二甲基矽烷基)甲氧基甲基(SMOM)、苄氧基甲基(BOM)、對甲氧基苄氧基甲基(PMBM)、(4-甲氧基苯氧基)甲基(對AOM)、愈創木酚甲基(GUM)、第三丁氧基甲基、4-戊烯氧基甲基(POM)、矽烷氧基甲基、2-甲氧基乙氧基甲基(MEM)、2,2,2-三氯乙氧基甲基、雙(2-氯乙氧基)甲基、2-(三甲基矽烷基)乙氧基甲基(SEMOR)、四氫吡喃基(THP)、3-溴四氫吡喃基、四氫硫吡喃基、1-甲氧基環己基、4-甲氧基四氫吡喃基(MTHP)、4-甲氧基四氫硫吡喃基、4-甲氧基四氫硫吡喃基

喃基S,S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基哌啶-4-基(CTMP)、1,4-二噁烷-2-基、四氫呋喃基、四氫噻吩基、2,3,3a,4,5,6,7,7a-八氫-7,8,8-三甲基-4,7-甲醇苯并呋喃-2-基、1-乙氧基乙基、1-(2-氯乙氧基)乙基、1-甲基-1-甲氧基乙基、1-甲基-1-苄氧基乙基、1-甲基-1-苄氧基-2-氟乙基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基矽烷基乙基、2-(苯基氧矽基)乙基、第三丁基、烯丙基、對氯苯基、對甲氧苯基、2,4-二硝基苯基、苄基(Bn)、對甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基、鄰硝基苄基、對硝基苄基、對鹵基苄基、2,6-二氯苄基、對氰苄基、對苯基苄基、2-吡啶甲基、4-吡啶甲基、3-甲基-2-吡啶甲基N-氧離子基、二苯基甲基、*p,p'*-二硝基二苯基甲基、5-二苯并環庚基、三苯基甲基、 α -萘基二苯基甲基、對甲氧苯基二苯基甲基、二(對甲氧苯基)苯基甲基、三(對甲氧苯基)甲基、4-(4'-溴苯甲醯氧基苯基)二苯基甲基、4,4',4''-參(4,5-二氯苯二甲醯亞胺基苯基)甲基、4,4',4''-參(菊芋醯基氧基苯基)甲基、4,4',4''-參(苯甲醯氧基苯基)甲基、3-(咪唑-1-基)雙(4',4''-二甲氧苯基)甲基、1,1-雙(4-甲氧苯基)-1'-苊基甲基、9-蒽基、9-(9-苯基)吡基、9-(9-苯基-10-側氧基)蒽基、1,3-苯并二硫雜環戊烷-2-基、苯并異噻唑基S,S-二氧離子基、三甲基矽烷基(TMS)、三乙基矽烷基(TEOS)、三異丙基矽烷基(TIPS)、二甲基異丙基矽烷基(IPDMS)、二乙基異丙基矽烷基(DEIPS)、二甲基第三己基矽烷基、第三丁基二甲基矽烷基(TBDMS)、第三丁基二苯基矽烷基(TBDPS)、三苯基矽烷基、三-對二甲苯基矽烷基、三苯基矽烷基、二苯基甲基矽烷基(DPMS)、第三丁基甲氧苯基矽烷基(TBMPS)、甲酸酯、苯甲醯基甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苯氧基乙酸酯、對氯苯氧基乙酸酯、3-苯

基丙酸酯、4-側氧基戊酸酯(乙醯丙酸酯)、4,4-(伸乙基二硫)戊酸酯(乙醯丙醯基二硫縮醛)、特戊酸酯、金剛酸酯、巴豆酸酯、4-甲氧基巴豆酸酯、苯甲酸酯、苯甲酸對苯酯、苯甲酸2,4,6-三甲酯(2,4,6-三甲苯酯)、碳酸甲酯、碳酸9-苄基甲酯(Fmoc)、碳酸乙酯、碳酸2,2,2-三氯乙酯(Troc)、碳酸2-(三甲基矽烷基)乙酯(TMSEC)、碳酸2-(苯磺醯基)乙酯(Psec)、碳酸2-(三苯基磷鎊基)乙酯(Peoc)、碳酸異丁酯、碳酸乙烯酯、碳酸烯丙酯、碳酸第三丁酯(BOC)、碳酸對硝基苯酯、碳酸苄酯、碳酸對甲氧基苄酯、碳酸3,4-二甲氧基苄酯、碳酸鄰硝基苄酯、碳酸對硝基苄酯、硫代碳酸S-苄酯、碳酸4-乙氧基-1-萘酯、二硫代碳酸甲酯、2-碘苯甲酸酯、4-疊氮基丁酸酯、4-硝基-4-甲基戊酸酯、鄰(二溴甲基)苯甲酸酯、2-甲醯基苯磺酸酯、2-(甲基硫甲氧基)乙基、4-(甲基硫甲氧基)丁酸酯、2-(甲基硫甲氧基甲基)苯甲酸酯、2,6-二氯-4-甲基苯氧基乙酸酯、2,6-二氯-4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯氧基乙酸酯、2,4-雙(1,1-二甲基丙基)苯氧基乙酸酯、氯二苯基乙酸酯、異丁酸酯、單丁二酸酯、(E)-2-甲基-2-丁烯酸酯、鄰(甲氧基醯基)苯甲酸酯、 α -萘甲酸酯、硝酸酯、N,N,N',N'-四甲基磷二醯胺酸烷酯、N-苯基胺基甲酸烷酯、硼酸酯、二甲基磷基亞硫醯基、2,4-二硝基亞磺酸烷酯、硫酸酯、甲烷磺酸酯(甲磺酸酯)、苯甲基磺酸酯及甲苯磺酸酯(Ts)。

在某些實施例中，存在於硫原子上之取代基為硫保護基(亦稱為「硫醇保護基」)。硫保護基包括(但不限於) $-R^{aa}$ 、 $-N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=O)SR^{aa}$ 、 $-C(=O)R^{aa}$ 、 $-CO_2R^{aa}$ 、 $-C(=O)N(R^{bb})_2$ 、 $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})OR^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})N(R^{bb})_2$ 、 $-S(=O)R^{aa}$ 、 $-SO_2R^{aa}$ 、 $-Si(R^{aa})_3$ 、 $-P(R^{cc})_2$ 、 $-P(R^{cc})_3$ 、 $-P(=O)_2R^{aa}$ 、 $-P(=O)(R^{aa})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{cc})_2$ 、 $-P(=O)_2N(R^{bb})_2$ 及 -

$P(=O)(NR^{bb})_2$ ，其中 R^{aa} 、 R^{bb} 及 R^{cc} 如本文所定義。硫保護基包括詳細地描述於以引用的方式併入本文中之*Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene及P. G. M. Wuts, 第3版, John Wiley & Sons, 1999中之彼等硫保護基。

如本文所用，當兩個實體彼此「共軛」或「接合」時，其藉由直接或間接共價或非共價相互作用連接。在某些實施例中，締合為共價的。在其他實施例中，締合為非共價的。非共價相互作用包括氫鍵結、凡得瓦爾力(van der Waals)相互作用、疏水性相互作用、磁力相互作用、靜電相互作用等。在某些實施例中，兩個實體視情況經由連接基團共價連接。

如本文所用，術語「鹽」係指任何及所有鹽，包括醫藥學上可接受之鹽，其係指在合理醫學判斷範圍內、適合用於與人類及低級動物之組織接觸而無異常毒性、刺激、過敏反應及其類似者且與合理的效益/風險比相匹配之彼等鹽(參見Berge等人在*J. Pharmaceutical Sciences* (1977) 66:1-19中詳細地描述醫藥學上可接受之鹽)。醫藥學上可接受之無毒酸式鹽之實例為胺基與諸如鹽酸、氫溴酸、磷酸、硫酸及高氯酸之無機酸或與諸如乙酸、草酸、順丁烯二酸、酒石酸、檸檬酸、丁二酸或丙二酸之有機酸形成之鹽；或藉由使用此項技術中所用的諸如離子交換之其他方法形成之鹽。其他醫藥學上可接受之鹽包括己二酸鹽、海藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天冬胺酸鹽、苯磺酸鹽、苯甲酸鹽、硫酸氫鹽、硼酸鹽、丁酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、檸檬酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡萄糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、乙烷磺酸鹽、甲酸鹽、反丁烯二酸鹽、葡庚糖酸鹽、甘油磷酸鹽、葡萄糖酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、氫碘酸鹽、2-羥基-乙烷磺酸鹽、乳糖酸鹽、乳酸鹽、月桂酸鹽、月桂基硫酸鹽、蘋果酸鹽、順丁烯二酸

鹽、丙二酸鹽、甲烷磺酸鹽、2-萘磺酸鹽、菸鹼酸鹽、硝酸鹽、油酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、雙羥萘酸鹽、果膠酸鹽、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、磷酸鹽、苦味酸鹽、特戊酸鹽、丙酸鹽、硬脂酸鹽、丁二酸鹽、硫酸鹽、酒石酸鹽、硫氰酸鹽、對甲苯磺酸鹽、十一烷酸鹽、戊酸鹽及其類似鹽。衍生自適當鹼之醫藥學上可接受之鹽包括鹼金屬、鹼土金屬、銨及 $N^+(C_{1-4}\text{烷基})_4$ 鹽。代表性鹼金屬或鹼土金屬鹽包括鈉、鋰、鉀、鈣、鎂及其類似鹽。在適當時，其他醫藥學上可接受之鹽包括使用諸如鹵離子、氫氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低碳烷基磺酸根及芳基磺酸根之相對離子形成之無毒銨、四級銨及胺陽離子。

所投與之「個體」預期包括(但不限於)人類(亦即，任何年齡組之男性或女性，例如兒科個體(例如，嬰兒、兒童、青少年)或成人個體(例如，年輕人、中年人或老年人))及/或其他非人類動物，例如哺乳動物(例如，靈長類動物(例如，食蟹獼猴、恆河猴)；商業相關的哺乳動物，諸如牛、豬、馬、羊、山羊、貓及/或狗)及鳥類(例如，商業相關的鳥類，諸如雞、鴨、鵝及/或火雞)。在某些實施例中，動物為哺乳動物。動物可為雄性或雌性且處於任何發育階段。非人類動物可為轉殖基因動物。

如本文所用，術語「病狀」、「疾病」及「病症」可互換使用。

如本文所用，「抑制(inhibition/inhibiting/inhibit)」及「抑制劑」及其類似者係指化合物減少、減緩、停止或阻止特定生物過程之活性之能力。

如本文所用，本發明術語「細胞」意謂涵蓋任何屬或種類之真核及原核細胞，其中哺乳動物細胞備受關注。「細胞」亦意謂涵蓋正常細胞及患病細胞(例如癌細胞)。在某些實施例中，本文所描述之細胞為活細胞。

如本文所用，術語「樣品」包括任何化學樣品或生物樣品。化學樣品係指任何化學混合物或化合物。生物樣品包括(但不限於)細胞培養物或其萃取物；自動物(例如哺乳動物)獲得之活檢材料或其提取物；及血液、唾液、尿液、糞便、精液、淚液或其他體液或其提取物。舉例而言，術語「生物樣品」係指自任何活生物體獲得、由其排泄或分泌之任何固體或流體樣品，活生物體包括單細胞微生物(諸如細菌及酵母)及多細胞生物體(諸如植物及動物，例如脊椎動物或哺乳動物，且特定言之健康或明顯健康的人類個體或受待診斷或研究之病狀或疾病影響之人類患者)。生物樣品可呈任何形式，包括固體材料，諸如組織、細胞、細胞集結粒、細胞提取物、細胞勻漿或細胞部份；或活檢體，或生物流體。生物流體可自任何部位(例如血液、唾液(或含有頰內細胞之口腔洗液)、淚液、血漿、血清、尿液、膽液、腦脊髓液、羊膜液、腹膜液及胸膜液，或來自其之細胞，水狀液或玻璃狀液，或任何身體分泌物)、滲出液、分泌液(例如自膿腫或感染或炎症之任何其他部位獲得的流體)或自關節(例如正常關節或受諸如類風濕性關節炎、骨關節炎、痛風性或敗血性關節炎之疾病影響之關節)獲得的流體獲得。生物樣品可自任何器官或組織(包括活檢或屍檢標本)獲得或可包含細胞(無論主要細胞或培養細胞)或經任何細胞、組織或器官調節之培養基。生物樣品亦可包括組織切片，諸如出於組織學目的採集的冷凍切片。生物樣品亦包括藉由部分或完全分餾細胞或組織勻漿而產生的包括蛋白質、脂質、碳水化合物及核酸之生物分子之混合物。雖然樣品較佳取自人類個體，但生物樣品可來自任何動物、植物、細菌、病毒、酵母等。如本文所用，術語動物係指處於任何發育階段之人類以及非人類動物，包括例如哺乳動物、鳥類、爬行動物、兩棲動物、魚、蠕蟲及單細

胞。細胞培養物及活組織樣品被視為動物中之多數。在某些例示性實施例中，非人類動物為哺乳動物(例如，嚙齒動物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、貓、綿羊、牛、靈長類動物或豬)。動物可為轉殖基因動物或人類純系。若需要，生物樣品可經受初步處理，包括初步分離技術。

術語「生理條件」意謂涵蓋與活細胞相容之彼等條件，例如，與活細胞相容之溫度、pH、鹽度等之主要水性條件。

本發明係基於新穎系列的反應性標記化合物之設計及化學合成。化合物可為含有與細胞環境切合之發射綠色BODIPY架構之疊氮基-BODIPY化合物。BODIPY架構用作其有吸引力之合成及螢光特徵之起始模組。BODIPY易於在8-位置處修飾。此位置處之芳基化對吸收及發射波長不具有實質性影響，因為芳基部分及BODIPY核心扭轉且共軛非偶合。

本文所描述的為在催化劑存在下經歷與含炔分子之疊氮化物-炔環加成(AAC)以形成展現增強的螢光之三唑基產物以便於偵測分子之疊氮基-BODIPY化合物。疊氮基-BODIPY化合物表示在無沖洗過程之情況下細胞成像之進步且適用於在SDS-PAGE之後自細胞溶解物進行炔標誌醣蛋白之直接凝膠內偵測。

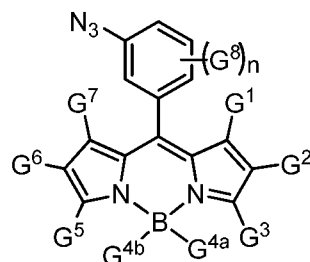
反應性標記化合物亦可為基於環辛炔之螢光探針。基於環辛炔之螢光探針可進一步包含與香豆素部分相關之環辛炔。此外，本文所描述的為在催化劑存在下經歷與含疊氮化物分子之疊氮化物-炔環加成(AAC)以形成展現增強的螢光之三唑基產物以便於偵測分子之基於環辛炔的螢光探針化合物。

本文所描述的為使用疊氮基-BODIPY及基於環辛炔之螢光探針用於對活細胞中之含疊氮基醣共軛物及含炔基醣共軛物進行成像之方法。

本文所描述的為化合物及使用該等化合物共軛至酶活性位點之方法。在一些實施例中，酶為唾液酸酶。在一些實施例中，化合物為含炔基化合物。在一些實施例中，化合物與唾液酸酶之活性位點形成共價鍵。

疊氨基-BODIPY化合物

疊氨基-BODIPY化合物為式(I)：



(I)

或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物或水合物，且其中：

G^1 、 G^2 、 G^3 、 G^5 、 G^6 、 G^7 及 G^8 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 C_{1-6} 烷基、視情況經取代之 C_{1-6} 烯基、視情況經取代之 C_{1-6} 炔基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之醯基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHOSO_2R^B$ ；

R 在各種情況下獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之醯基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHOSO_2R^B$ ；

各 R^A 獨立地選自氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳

基；及

各 R^B 獨立地選自氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基，或兩個 R^B 與中間的氮結合在一起形成雜環。

G^{4a} 及 G^{4b} 在各種情況下為氟基、烷基、烷氧基、芳氧基或炔基，及

其中烷基及烷氧基為非分支鏈、飽和的且具有1-4個碳原子；芳基及芳氧基之芳基可為碳環芳基或雜環芳基；碳環芳基具有總共6-20個碳原子，包括取代基之碳原子；雜環芳基具有總共5-20個碳原子，包括取代基之碳原子；烷氧羰基為羧酸之烷基酯，其中烷基如上文所定義；各烷基、芳基、烷氧基、芳氧基、苯并及烷氧羰基獨立地可不經取代或經一或多個取代基取代；烷基取代基為鹵基、羥基、胺基或芳基；芳基取代基為鹵基、羥基、胺基、烷基、芳基、硝基或羧基；及鹵基取代基為氟基或氯基；

n為0、1、2、3或4。

如本文一般所定義， G^1 獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^A$ 。在某些實施例中， G^1 為H。在某些實施例中， G^1 為鹵素。在某些實施例中， G^1 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^1 為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^1 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 獨立地為氫、視情況經取代之

C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中，G¹為-OH。在某些實施例中，G¹為-OR^A，其中R^A為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中，G¹為-OCH₃或-OC₂H₅。在某些實施例中，G¹為-OR^A，其中R^A為氧保護基。在某些實施例中，G¹為-N(R^B)₂，其中R^B在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個R^B與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中，G¹為NH₂。在某些實施例中，G¹為NHR^B，其中R^B為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中，G¹為NHCH₃或NHC₂H₅。在某些實施例中，G¹為NHR^B，其中R^B為氮保護基。

如本文一般所定義，G²獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、-OR^A、-CH₂OR^A、-OC(O)R^C、-SR^A、-N(R^B)₂、-N(R^A)C(O)R^C、-C(O)N(R^B)₂、-CN、-NO₂、-C(O)R^C、-C(O)OR^A、-S(O)R^C、-SO₂R^A、-SO₂N(R^B)₂、=O、=NOH、=N-OR^A、=N-NH₂、=N-NHR^A、=N-N(R^B)₂及-NHSO₂R^A。在某些實施例中，G²為H。在某些實施例中，G²為鹵素。在某些實施例中，G²為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中，G²為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中，G⁷為-OR^A，其中R^A獨立地為氫、視情況經取代之C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基

(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^2 為-OH。在某些實施例中， G^2 為-OR^A，其中R^A為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中， G^2 為-OCH₃或-OC₂H₅。在某些實施例中， G^2 為-OR^A，其中R^A為氧保護基。在某些實施例中， G^2 為-N(R^B)₂，其中R^B在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個R^B與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^2 為NH₂。在某些實施例中， G^2 為NHR^B，其中R^B為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中， G^2 為NHCH₃或NHC₂H₅。在某些實施例中， G^2 為NHR^B，其中R^B為氮保護基。

如本文一般所定義， G^3 獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、-OR^A、-CH₂OR^A、-OC(O)R^C、-SR^A、-N(R^B)₂、-N(R^A)C(O)R^C、-C(O)N(R^B)₂、-CN、-NO₂、-C(O)R^C、-C(O)OR^A、-S(O)R^C、-SO₂R^A、-SO₂N(R^B)₂、=O、=NOH、=N-OR^A、=N-NH₂、=N-NHR^A、=N-N(R^B)₂及-NHSO₂R^A。在某些實施例中， G^3 為H。在某些實施例中， G^3 為鹵素。在某些實施例中， G^3 為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中， G^3 為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^7 為-OR^A，其中R^A獨立地為氫、視情況經取代之C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^3 為-OH。在某些實施例中， G^3 為-OR^A，其中R^A為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中， G^3 為-

OCH₃或-OC₂H₅。在某些實施例中，G³為-OR^A，其中R^A為氧保護基。在某些實施例中，G³為-N(R^B)₂，其中R^B在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個R^B與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中，G³為NH₂。在某些實施例中，G³為NHR^B，其中R^B為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中，G³為NHCH₃或NHC₂H₅。在某些實施例中，G³為NHR^B，其中R^B為氮保護基。

如本文一般所定義，G⁵獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、-OR^A、-CH₂OR^A、-OC(O)R^C、-SR^A、-N(R^B)₂、-N(R^A)C(O)R^C、-C(O)N(R^B)₂、-CN、-NO₂、-C(O)R^C、-C(O)OR^A、-S(O)R^C、-SO₂R^A、-SO₂N(R^B)₂、=O、=NOH、=N-OR^A、=N-NH₂、=N-NHR^A、=N-N(R^B)₂及-NHSO₂R^A。在某些實施例中，G⁵為H。在某些實施例中，G⁵為鹵素。在某些實施例中，G⁵為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中，G⁵為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中，G⁵為-OR^A，其中R^A獨立地為氫、視情況經取代之C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中，G⁵為-OH。在某些實施例中，G⁵為-OR^A，其中R^A為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中，G⁵為-OCH₃或-OC₂H₅。在某些實施例中，G⁵為-OR^A，其中R^A為氧保護基。在某些實施例中，G⁵為-N(R^B)₂，其中R^B在各種情況下獨立地為氫、視情況

經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個 R^B 與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^5 為 NH_2 。在某些實施例中， G^5 為 NHR^B ，其中 R^B 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^5 為 $NHCH_3$ 或 NHC_2H_5 。在某些實施例中， G^5 為 NHR^B ，其中 R^B 為氮保護基。

如本文一般所定義， G^6 獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^A$ 。在某些實施例中， G^6 為 H 。在某些實施例中， G^6 為鹵素。在某些實施例中， G^6 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^6 為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^6 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^6 為 $-OH$ 。在某些實施例中， G^6 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^6 為 $-OCH_3$ 或 $-OC_2H_5$ 。在某些實施例中， G^6 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為氧保護基。在某些實施例中， G^6 為 $-N(R^B)_2$ ，其中 R^B 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個 R^B 與中間

的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^6 為 NH_2 。在某些實施例中， G^6 為 NHR^B ，其中 R^B 為視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基。在某些實施例中， G^6 為 $NHCH_3$ 或 NHC_2H_5 。在某些實施例中， G^6 為 NHR^B ，其中 R^B 為氮保護基。

如本文一般所定義， G^7 獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^A$ 。在某些實施例中， G^7 為 H 。在某些實施例中， G^7 為鹵素。在某些實施例中， G^7 為視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基。在某些實施例中， G^7 為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^7 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 獨立地為氫、視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^7 為 $-OH$ 。在某些實施例中， G^7 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基。在某些實施例中， G^7 為 $-OCH_3$ 或 $-OC_2H_5$ 。在某些實施例中， G^7 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為氧保護基。在某些實施例中， G^7 為 $-N(R^B)_2$ ，其中 R^B 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個 R^B 與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^7 為 NH_2 。在某些實施例中， G^7 為 NHR^B ，其中 R^B 為視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基。在某些實施例

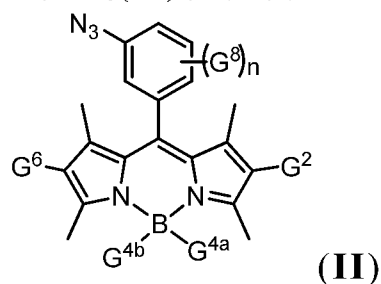
中， G^7 為 $NHCH_3$ 或 NHC_2H_5 。在某些實施例中， G^7 為 NHR^B ，其中 R^B 為氮保護基。

如本文一般所定義， G^8 獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^A$ 。在某些實施例中， G^8 為 H 。在某些實施例中， G^8 為鹵素。在某些實施例中， G^8 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^8 為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^8 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^8 為 $-OH$ 。在某些實施例中， G^8 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^8 為 $-OCH_3$ 或 $-OC_2H_5$ 。在某些實施例中， G^8 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為氧保護基。在某些實施例中， G^8 為 $-N(R^B)_2$ ，其中 R^B 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個 R^B 與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^8 為 NH_2 。在某些實施例中， G^8 為 NHR^B ，其中 R^B 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^8 為 $NHCH_3$ 或 NHC_2H_5 。在某些實施例中， G^8 為 NHR^B ，其中 R^B 為氮保護基。

在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成視情況經取代之碳環或雜環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成視情況經取代之碳環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成視情況經取代之5員碳環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成視情況經取代之6員碳環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成視情況經取代之苯基。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成未經取代之苯基。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成視情況經取代之雜環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成具有S、N或O之一個雜原子之視情況經取代之5員雜環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成具有各獨立地選自S、N及O之群的兩個雜原子之視情況經取代之5員雜環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成具有S、N或O之一個雜原子之視情況經取代之6員碳環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成具有各獨立地選自由S、N及O組成之群的兩個雜原子之視情況經取代之6員碳環。

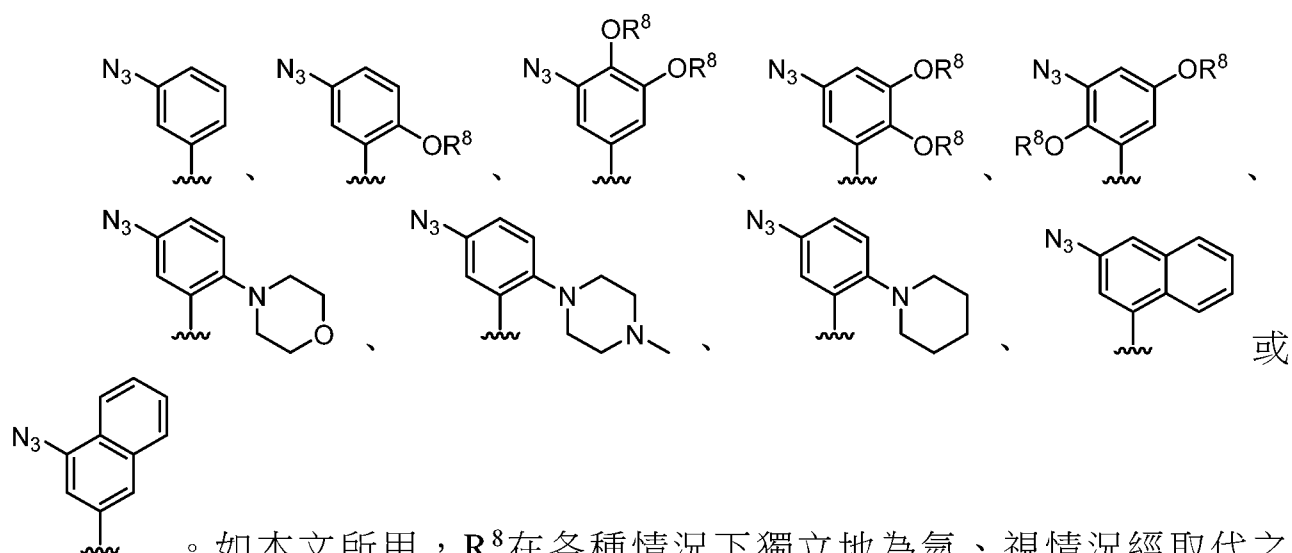
在一些實施例中， G^1 、 G^3 、 G^5 及 G^7 中之至少兩者為 C_1 - C_6 烷基。在某些實施例中， G^1 、 G^3 、 G^5 及 G^7 中之至少兩者為甲基、乙基或正丙基。在一些實施例中， G^1 、 G^3 、 G^5 及 G^7 中之每一者為 C_1 - C_6 烷基。在某些實施例中， G^1 、 G^3 、 G^5 及 G^7 中之每一者為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^1 、 G^3 、 G^5 及 G^7 中之每一者為甲基。在某些實施例中，本發明係

關於一種式(II)化合物：

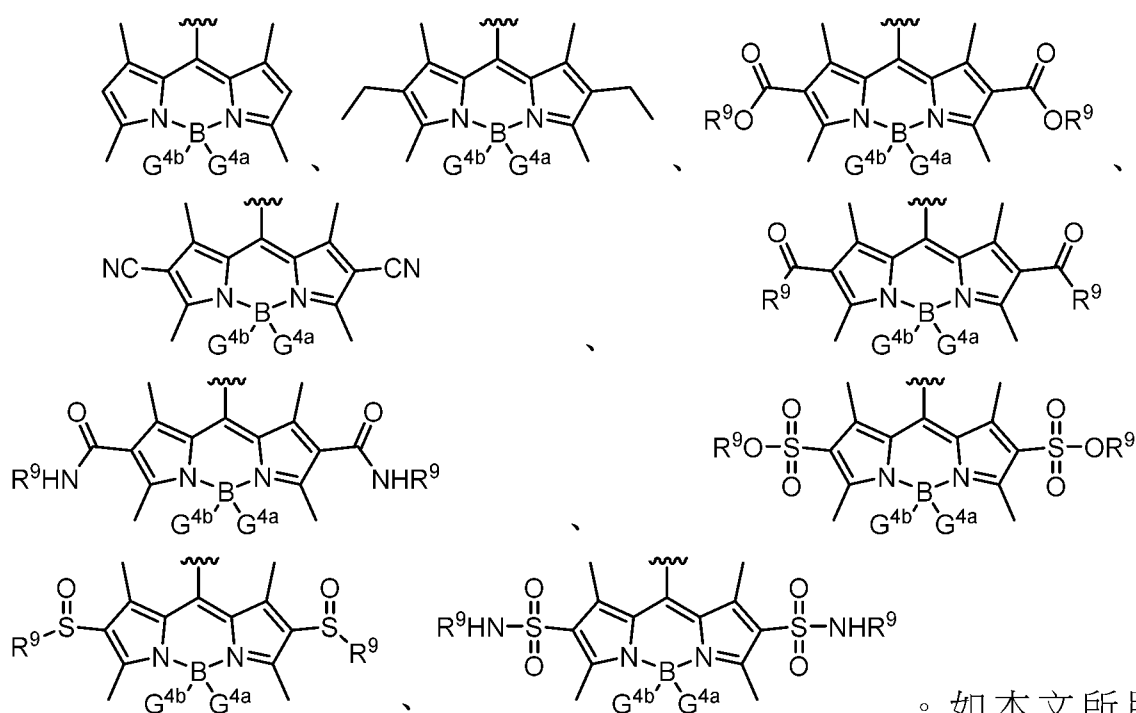


或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物或水合物，其中 G^2 、 G^{4a} 、 G^{4b} 、 G^6 、 G^8 及 n 如本文所描述。

在某些實施例中， 具有式：



在某些實施例中， 具有式：

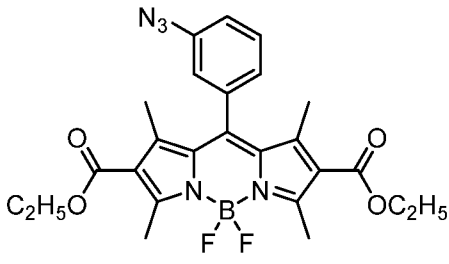
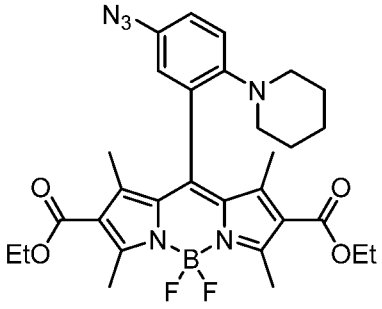
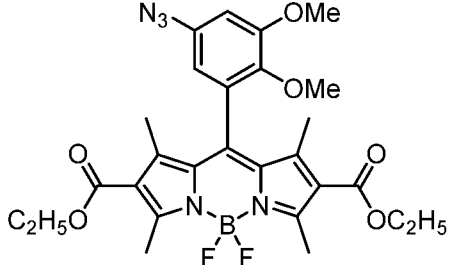
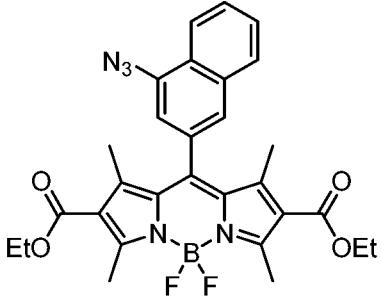
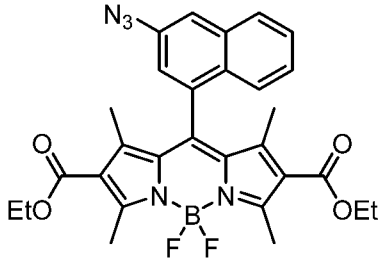
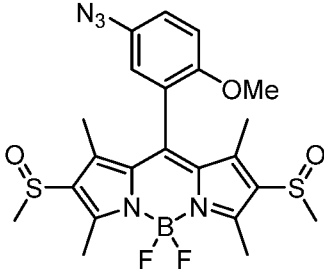
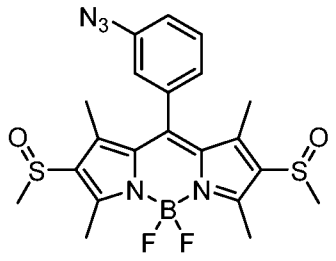
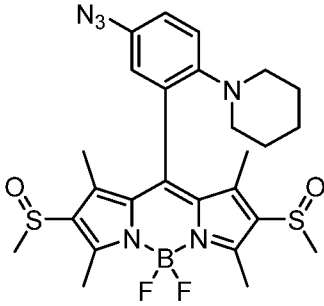
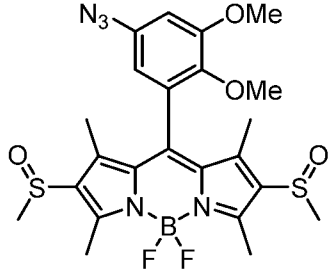
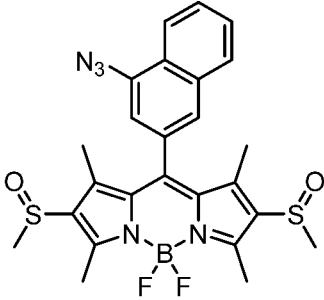


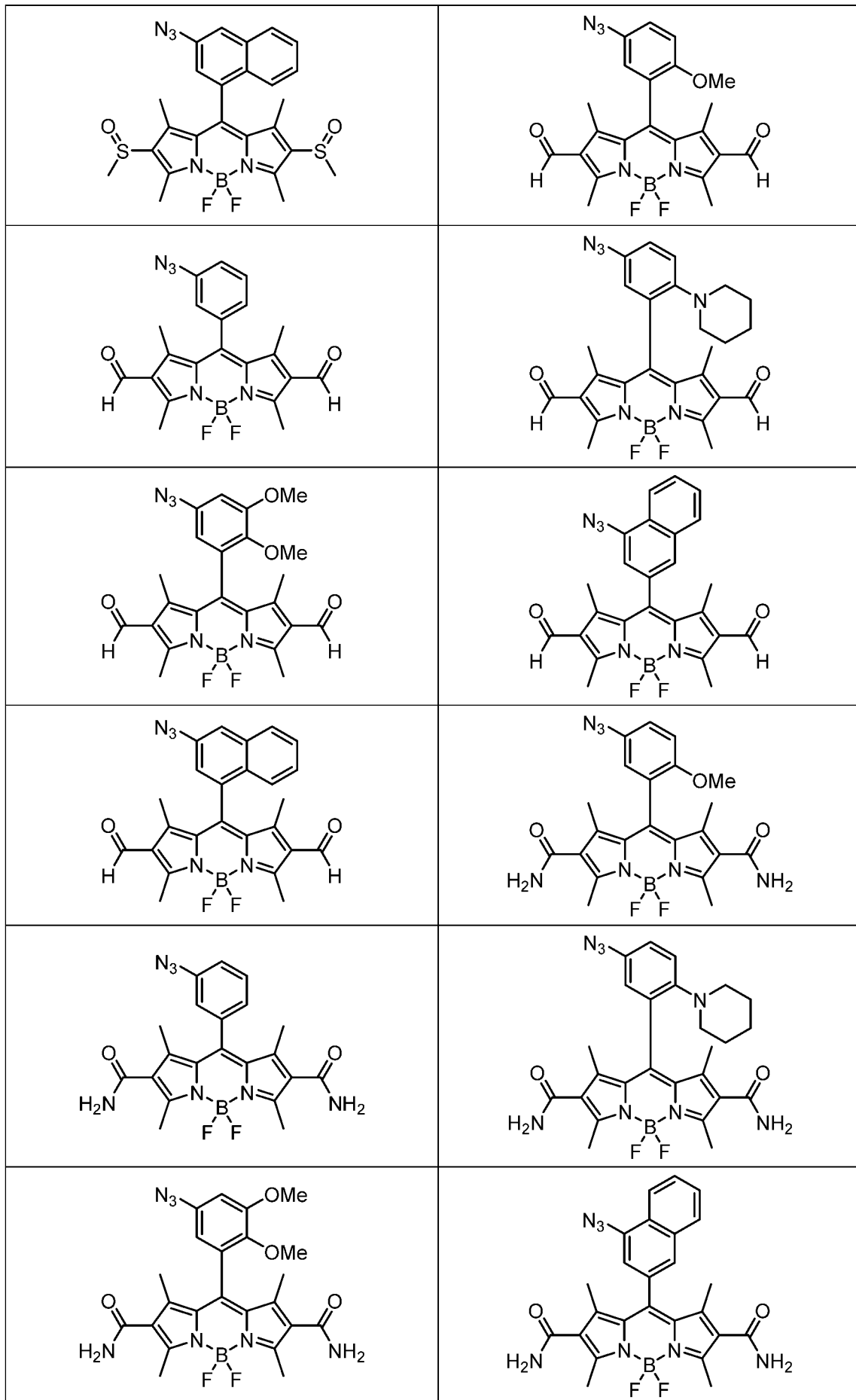
G^{4a} 及 G^{4b} 在各種情況下為氟基、烷基、烷氧基、芳氧基或炔基，

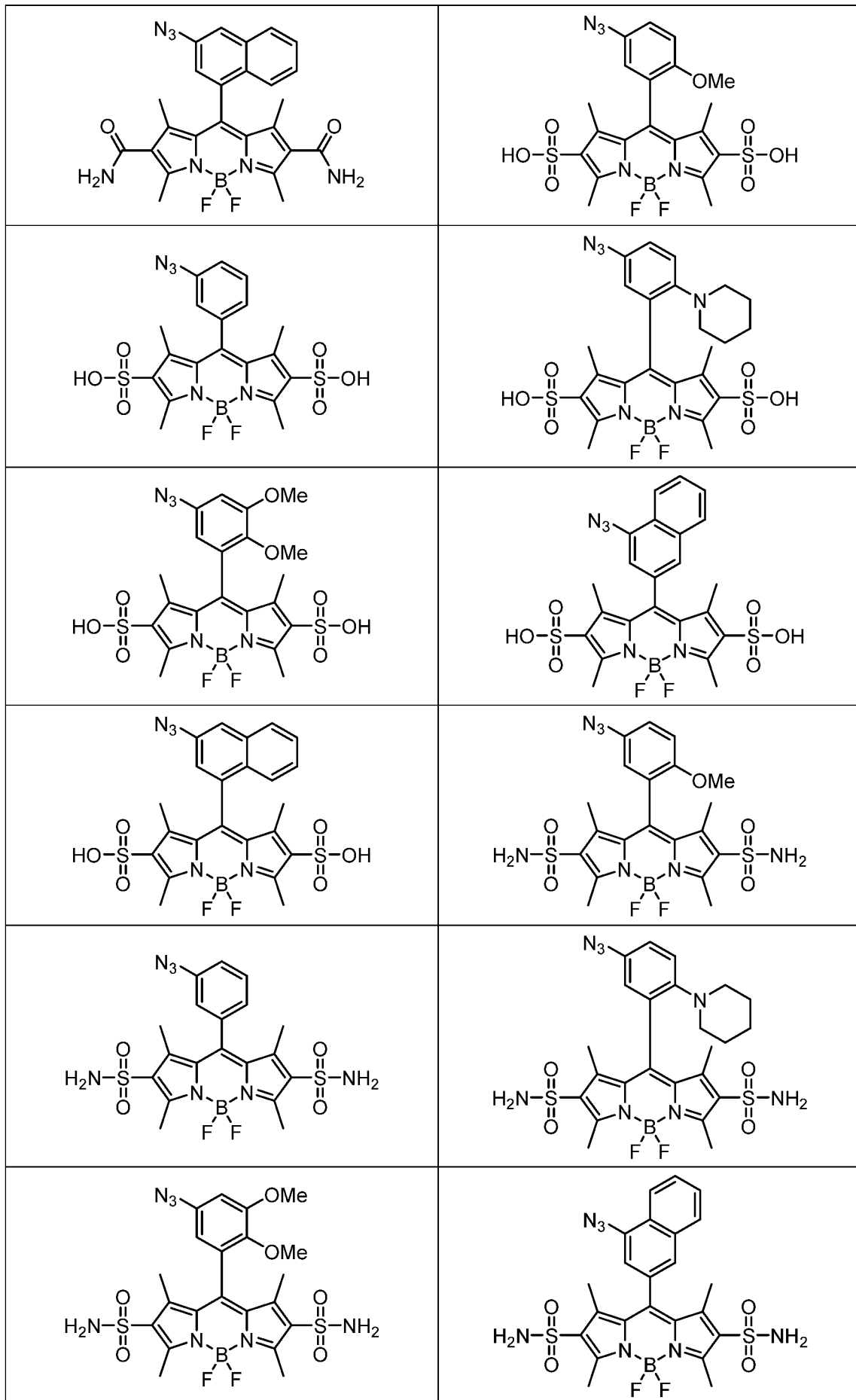
在某些實施例中，取代基可有助於化合物之光學異構及/或立體異構。亦關注化合物之鹽、溶劑合物、水合物及前藥形式。本發明涵蓋所有此類形式。因此，本文所描述之化合物包括其鹽、溶劑合物、水合物、前藥及異構體形式，包括其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、水合物、前藥及異構體。在某些實施例中，化合物可代謝成醫藥學上活性衍生物。

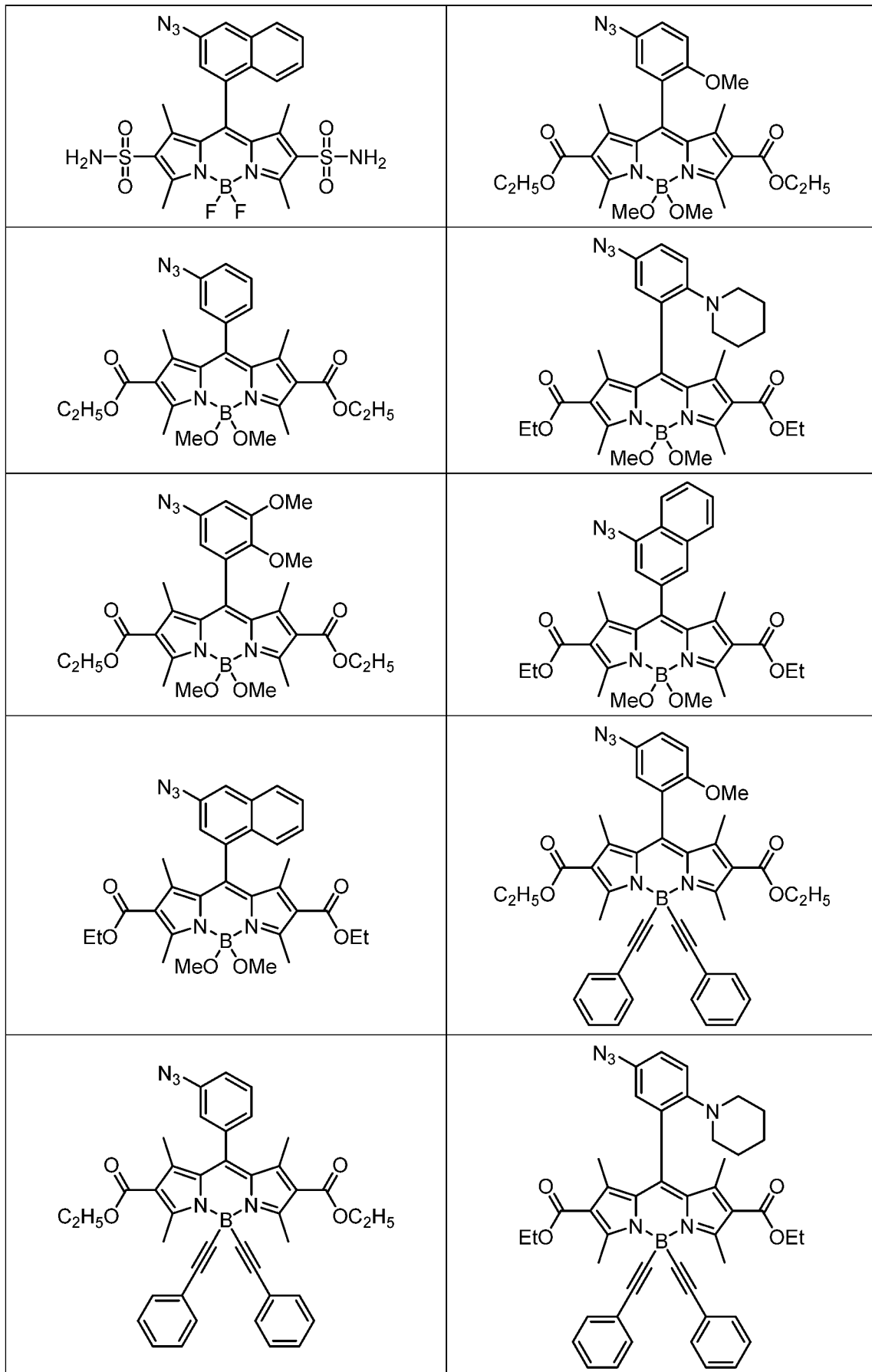
例示性式(I)及式(II)之化合物展示於表1中：

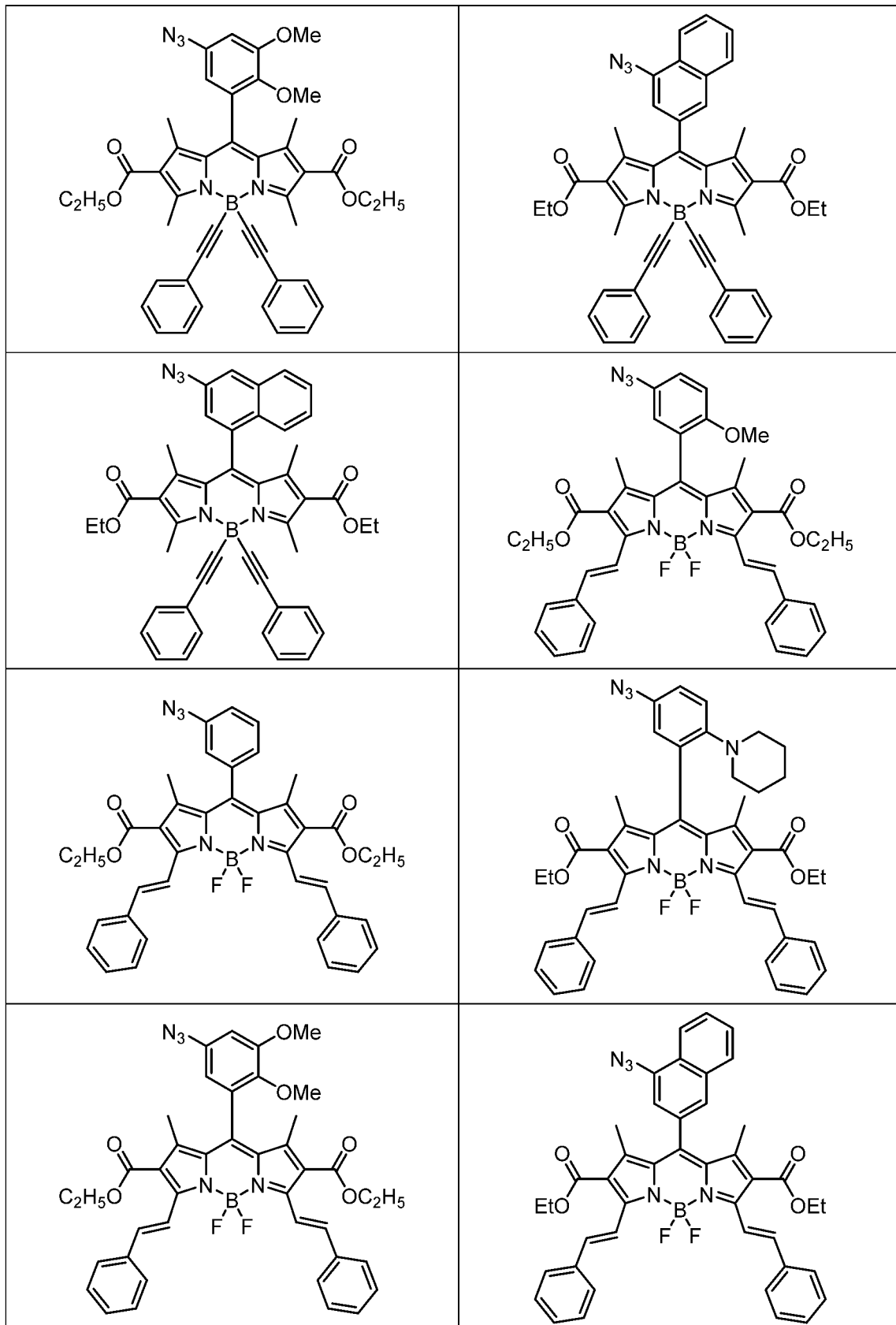
表1 例示性式(I)及式(II)之化合物。

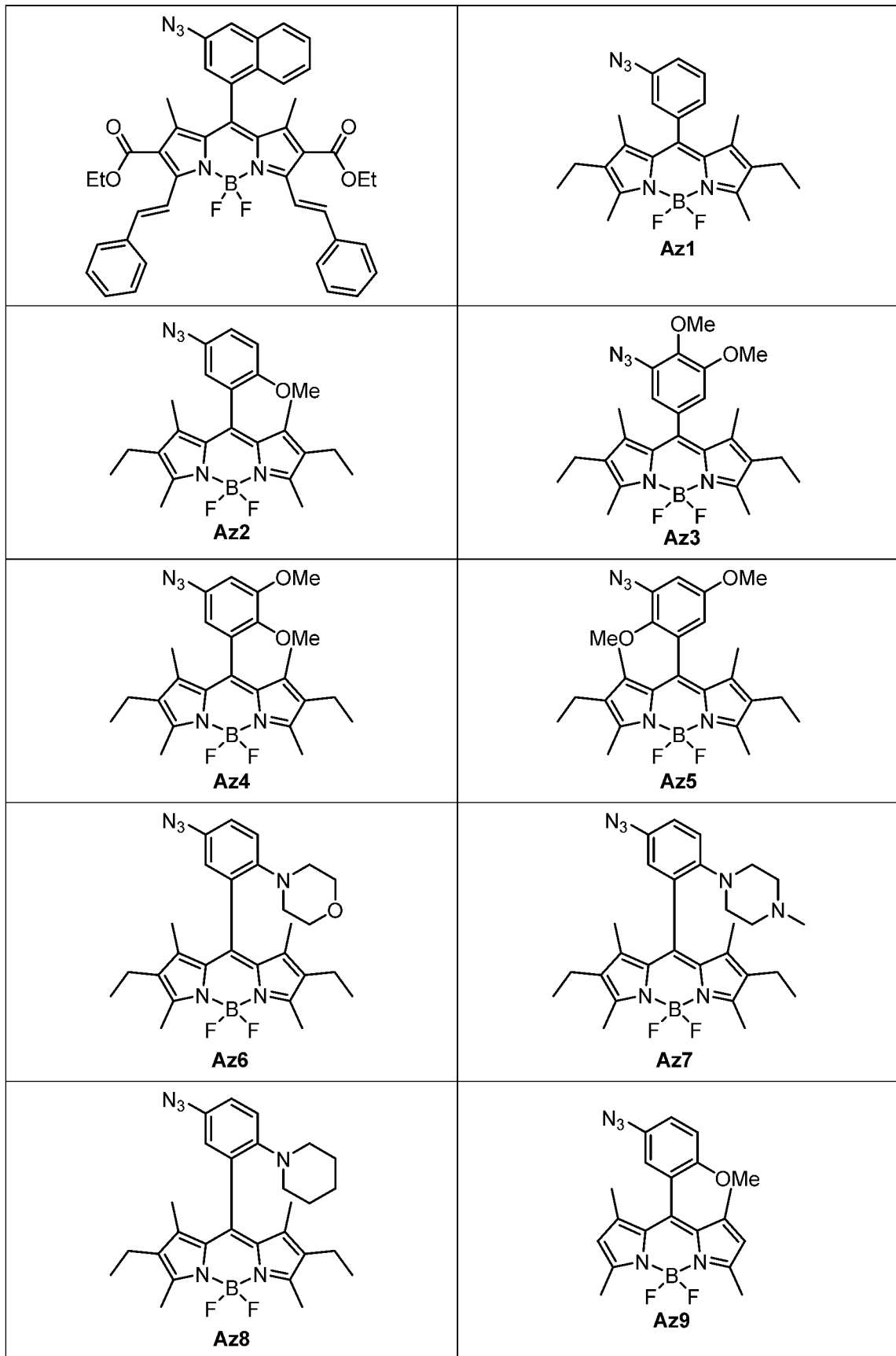
	
	
	
	
	

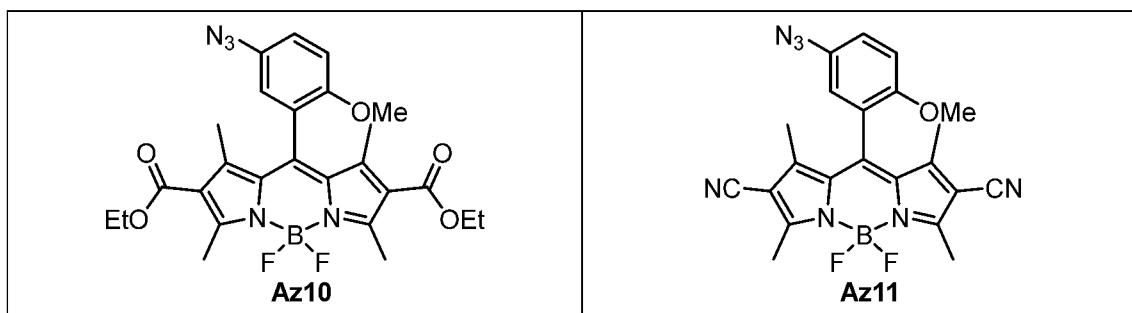








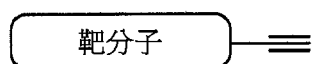




例示性疊氮基-BODIPY化合物用於偵測炔化合物，包括炔基隨附之生物分子。在與炔化合物之AAC反應之後，三唑環之形成釋放螢光淬滅，且導致螢光增強現象。化合物**T2**及**T9-T11**為經歷與疊氮化物之AAC以得到螢光三唑產物之該種類型的探針之實例。

含炔分子

本發明中所描述之含炔分子具有式：



例示性含炔靶分子包括(但不限於)胺基酸及胺基酸殘基、多肽(包括肽及蛋白質)、糖或糖殘基及其類似者，其含有至少一個炔或經修飾以含有至少一個炔。

例示性靶分子包括(但不限於)生物分子，諸如DNA、RNA、蛋白質或聚醣，且其可為天然存在的，或可以合成方式或以重組方式產生，且可經分離、實質上經純化，或存在於含炔靶分子所基於的未修飾分子之原生環境內(例如，在細胞表面上或在細胞內，包括在宿主動物，例如哺乳動物(諸如鼠科宿主(例如大鼠、小鼠)、倉鼠、犬、貓、牛、豬及其類似動物)內)。在一些實施例中，靶分子在無細胞反應中存在於活體外。在其他實施例中，靶分子存在於細胞中及/或展示在細胞表面上。在許多所關注的實施例中，靶分子在活細胞中；在活細胞表面上；在活生物體中，例如在活的多細胞生物體中。適合活細胞包括為活的多細胞生物體的一部分之

細胞；自多細胞生物體分離之細胞；永生化細胞株；及其類似細胞。

當靶分子為多肽時，多肽可由D-胺基酸、L-胺基酸或二者組成，且可進一步以天然、合成或重組方式修飾以包括其他部分。舉例而言，多肽可為脂蛋白、醣蛋白或其他此類經修飾之蛋白質。

一般而言，有用的靶分子包含至少一個炔用於與根據本發明之修飾疊氮基-BODIPY反應，但可包含2個或2個以上、3個或3個以上、5個或5個以上、10個或10個以上之炔。可存在於適合靶分子中之炔數目將根據反應之最終產物之吾人所欲應用、靶分子自身之性質及對通常熟習實施如本文所揭示之本發明的技術者而言將易為顯而易見之其他考慮因素而變化。

本發明之此實施例特別適用於活體內靶分子修飾。在此實施例中，靶受質經修飾以在需要連接至修飾疊氮基-BODIPY之點處包含炔基。舉例而言，當靶受質為多肽時，多肽經修飾以含有N端炔。當靶受質為醣蛋白時，醣蛋白之糖殘基可經修飾以含有炔。未經炔修飾但待經炔修飾之靶分子在本文中稱為「靶受質」。經修飾具有炔之靶分子在本文中稱為「炔修飾之靶分子」或「含炔靶分子」。

靶受質可在活體外產生且接著引入細胞中(例如，經由顯微注射、脂質體或脂質體介導之遞送、電穿孔等)，該等方法將根據待靶向修飾之受質之性質變化且可由通常熟習此項技術者容易且適當地選擇。最終靶受質亦可藉由採用宿主細胞之天然生物合成機制在活體內產生。舉例而言，細胞可具有用於合成所需靶分子之受質之生物相容性炔衍生物，該受質經細胞處理以提供所需最終靶受質之炔衍生物。舉例而言，當靶受質為細胞表面醣蛋白時，細胞可具有在醣蛋白內發現的糖殘基之炔衍生物，該糖殘基

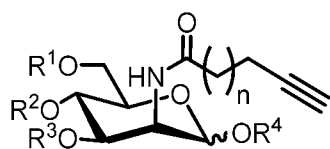
隨後經由天然生物合成過程經細胞處理以產生具有包含可獲得的炔基之至少一個修飾糖部分之修飾醣蛋白。

亦可使用方法在活體內產生靶受質。舉例而言，可將具有炔之非天然胺基酸併入在大腸桿菌(*E. coli*)中表現之重組多肽中(參見，例如Kiick等人 (2000) *Tetrahedron* 56:9487)。此類以重組方式產生之多肽可選擇性地與根據本發明之修飾疊氮基-BODIPY反應。

在一個實例中，對於所需生物聚合物靶受質，藉由使細胞(例如，使生物聚合物醣基化之真核細胞，諸如蛋白質)具有合成構建塊將炔基併入靶分子中。舉例而言，細胞可具有包含炔基之糖分子以提供炔基併入醣蛋白中。在一些實施例中，醣蛋白在細胞表面上表現。替代地，炔基可併入胺基酸中，胺基酸隨後併入由細胞合成之肽或多肽中。幾種方法可用於將非天然構建塊併入生物聚合物中；吾人不必限於將細胞表面寡醣作為靶分子。參見，例如vanHest等人 (1998) *FEBS Lett.* 428:68；及Nowak等人 (1995) *Science* 268:439。

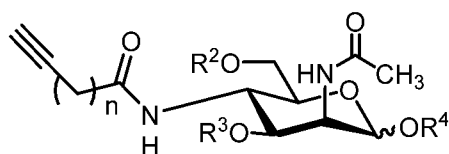
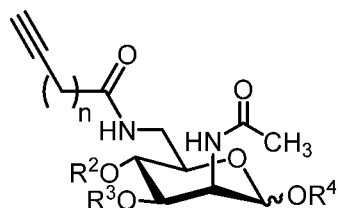
在一個實施例中，靶分子為含碳水化合物分子(例如醣蛋白；多醣；等)，且使用合成受質將炔基引入靶分子中。在一些實施例中，合成受質為用於產生醣基化分子之糖之炔衍生物。在一些實施例中，合成受質為用於例如以醣蛋白生物合成路徑產生細胞表面分子之糖之炔衍生物。舉例而言，宿主細胞可具有合成唾液酸炔基衍生物，將其併入唾液酸生物合成路徑中，最終導致合成糖殘基併入醣蛋白中。在一些實施例中，醣蛋白展示於細胞表面上。

在一個實例中，合成受質為以下通式之甘露糖胺之炔基衍生物：



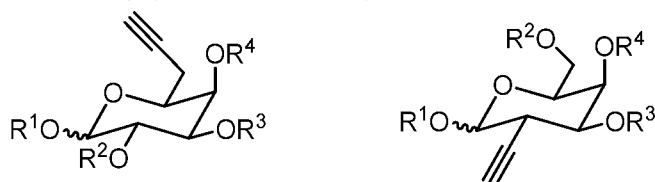
其中 n 為0至7、一般1至4、更通常1至2，且 R^1 、 R^2 、 R^3 及 R^4 獨立地為氫或乙醯基。在一些實施例中，受質為N-3-丁炔醯基甘露糖胺($n=0$)或其乙醯化衍生物，或為N-4-戊炔醯基甘露糖胺($n=1$)或其乙醯化形式。

在另一實施例中，合成受質為例如以下通式之炔基糖衍生物：



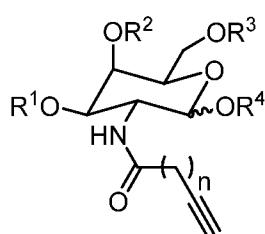
其中任一者可併入唾液酸生物合成路徑中，且其中 n 為1至6、一般1至4、更通常1至2，且 R^2 、 R^3 及 R^4 獨立地為氫或乙醯基。

在另一實施例中，合成受質為例如以下通式之炔基糖衍生物：



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 及 R^4 獨立地為氫或乙醯基，且其中將合成受質併入涉及海藻醣之生物合成路徑中。

在另一實施例中，合成受質為例如以下通式之炔基糖衍生物：



其中n為1至6、一般1至4、更通常1至2，且R¹、R²、R³及R⁴獨立地為氫或乙醯基，且將其併入涉及半乳糖之生物合成路徑中。

在一些實施例中，本發明方法用於修飾細胞之表面。因此，在一個態樣中，本發明之特徵為一種在活體外或活體內修飾細胞表面之方法。該方法一般包括使包含炔基之靶分子中之炔基與修飾疊氮基-BODIPY反應以提供在細胞表面處之化學選擇性接合。在許多實施例中，該方法包含在細胞表面上用炔基修飾靶分子；及使靶分子中之炔基與修飾疊氮基-BODIPY反應。舉例而言，如以上所描述，向活細胞提供炔基糖，將該炔基糖併入在細胞表面上展示之醣蛋白中。

本發明修飾疊氮基-BODIPY化合物及本發明修飾方法適用於各種應用，包括研究應用及診斷應用。

在一些實施例中，本發明修飾疊氮基-BODIPY化合物及本發明修飾方法適用於研究應用。所關注的應用包括研究應用，例如探究受體之功能及物理特徵；蛋白組學；代謝組學；及其類似應用。研究應用亦包括藥物發現或其他篩檢應用。

蛋白組學旨在偵測、識別及定量蛋白質以獲得生物相關資訊。代謝組學為代謝物及其他小分子(諸如脂質及碳水化合物)之偵測、識別及定量。Fiehn (2001) *Comparative and Functional Genomics* 2:155-168；及美國專利第6,873,914號。

藥物發現應用包括(但不限於)識別抑制癌細胞存活力及/或生長之試劑。因此，在一些實施例中，本發明提供識別抑制癌細胞存活力及/或生長之試劑之方法。該方法一般包括修飾細胞之組分以包含含炔之第一反應性搭配物；使細胞在測試劑存在下與包含修飾疊氮基-BODIPY之第二反

應性搭配物接觸，該接觸係在生理條件下；其中該接觸導致第一反應性搭配物之炔基與第二反應性搭配物之疊氮基-BODIPY化合物之間的反應，進而以合成方式及共價地修飾細胞組分；及確定測試劑對具有第二反應性搭配物之細胞之修飾程度的影響(若存在)。

其中癌細胞為產生比相同細胞類型之正常(非癌性)細胞更高量之碳水化合物之細胞，該方法提供識別減少癌細胞生長及/或存活力之試劑。

所關注的應用亦包括診斷應用，例如，偵測癌症；及其類似者，其中包含可偵測標記之本發明修飾環炔用於標記炔修飾靶分子，例如存在於癌細胞上之炔標誌靶分子。所關注的應用亦包括治療應用，其中使用包含共價連接藥物或其他治療劑之本發明修飾疊氮基-BODIPY化合物將藥物或其他治療劑遞送至炔修飾靶分子。

本發明之某些實施例用於活體內成像例如來確定生物體(例如個體)中之細胞之代謝或其他狀態。作為一個非限制性實例，本發明方法可應用於個體(例如哺乳動物，包括啮齒動物、兔類動物、貓科動物、犬科動物、馬科動物、牛科動物、綿羊類動物、山羊類動物、非人類靈長類動物及人類)中之癌細胞之活體內成像。

本發明疊氮化物-炔環加成之一個例示性、非限制性應用為偵測在細胞改變其表型時細胞中發生的代謝變化。作為一個實例，改變的醣基化模式為腫瘤表型之標誌，由天然存在的聚醣之不足表現及過度表現以及在胚胎發育期間通常限制表現之聚醣的呈現組成。與轉型細胞相關之常見抗原之實例為唾液酸路易斯(Lewis) a、唾液酸路易斯x、唾液酸T、唾液酸Tn及聚唾液酸(PSA)。Jørgensen等人 (1995) *Cancer Res.* 55, 1817-1819；Sell (1990) *Hum. Pathology* 21, 1003-1019；Taki等人 (1988) *J. Biochem.*

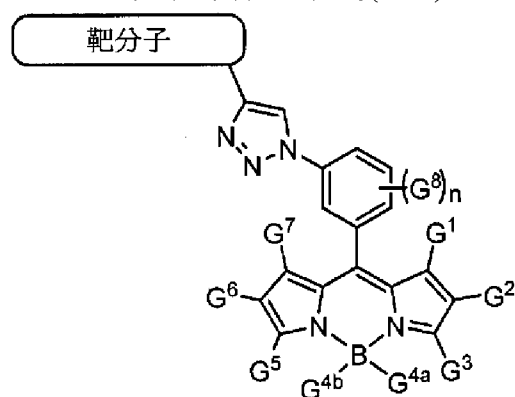
103, 998-1003 ; Gabius (1988) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27, 1267-1276 ; Feizi (1991) *Trends Biochem. Sci.* 16, 84-86 ; Taylor-Papadimitriou及Epenetos (1994) *Trends Biotech.* 12, 227-233 ; Hakomori及Zhang (1997) *Chem. Biol.* 4, 97-104 ; Dohi等人 (1994) *Cancer* 73, 1552。此等抗原共用一個重要特徵——其各自含有末端唾液酸。PSA為長度高達50個單位之唾液酸殘基之均聚物。唾液酸之較高位準與許多癌症中之轉型表型高度相關，癌症包括胃癌(Dohi等人 (1994) *Cancer* 73, 1552；及Yamashita等人 (1995) *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 441-446)、結腸癌(Yamashita等人 (1995) *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 441-446；Hanski等人 (1995) *Cancer Res.* 55, 928-933；Hanski等人 (1993) *Cancer Res.* 53, 4082-4088；Yang等人 (1994) *Glycobiology* 4, 873-884；Saitoh等人 (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 5700-5711)、胰臟癌(Sawada等人 (1994) *Int. J. Cancer* 57, 901-907)、肝癌(Sawada等人 (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 1425-1431)、肺癌(Weibel等人 (1988) *Cancer Res.* 48, 4318-4323)、前列腺癌(Jørgensen等人 (1995) *Cancer Res.* 55, 1817-1819)、腎癌(Roth等人 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2999-3000)及乳癌(Cho等人 (1994) *Cancer Res.* 54, 6302-6305)以及幾種類型之白血病(Joshi等人 (1987) *Cancer Res.* 47, 3551-3557；Altevogt等人 (1983) *Cancer Res.* 43, 5138-5144；Okada等人 (1994) *Cancer* 73, 1811-1816)。亦已在幾種不同腫瘤類型中觀測到細胞表面唾液酸之位準與轉移潛能之間的強烈相關性(Kakeji等人 (1995) *Brit. J. Cancer* 71, 191-195；Takano等人 (1994) *Glycobiology* 4, 665-674)。多個唾液酸化抗原在單個癌細胞上之集體展示可解釋以下事實：如此多的不同腫瘤類型共用高唾液酸表型而不一定表

現相同的抗原補體(前述Roth等人 (1988))。因此，基於唾液酸位準靶向細胞之診斷或治療策略對許多癌症具有廣泛適用性。

將非天然炔基糖(ManNAI、GalNAI)引入及併入活動物中提供對代謝狀態的變化之偵測。經由附接適當的抗原決定基標誌，修飾疊氮基-BODIPY化合物標記活生物體中之此等細胞，且因此偵測代謝狀態之變化。致瘤細胞之早期偵測及後續干預降低嚴重程度且增加癌症患者之存活率。

三唑基-BODIPY化合物

藉由使疊氮基-BODIPY化合物與含炔分子經由疊氮化物-炔環加成(AAC)之反應形成三唑基-BODIPY化合物。三唑基-BODIPY化合物與相應疊氮基-BODIPY化合物相比展現增強的螢光。本發明中所描述之三唑基-BODIPY化合物具有式(III)：



或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物或水合物，

其中：

G^1 、 G^2 、 G^3 、 G^5 、 G^6 、 G^7 及 G^8 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 C_{1-6} 烷基、視情況經取代之 C_{1-6} 烯基、視情況經取代之 C_{1-6} 炔基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之醯基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、-

NO_2 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 及 $-\text{NHSO}_2\text{R}^{\text{B}}$ ；

R 在各種情況下獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之醯基、 $-\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{A}})\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 及 $-\text{NHSO}_2\text{R}^{\text{B}}$ ；

各 R^{A} 獨立地選自氫、視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基；及

各 R^{B} 獨立地選自氫、視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基，或兩個 R^{B} 與中間的氮結合在一起形成雜環。

$\text{G}^{4\text{a}}$ 及 $\text{G}^{4\text{b}}$ 在各種情況下為氟基、烷基、烷氧基、芳氧基或炔基，及

其中烷基及烷氧基為非分支鏈、飽和的且具有1-4個碳原子；芳基及芳氧基之芳基可為碳環芳基或雜環芳基；碳環芳基具有總共6-20個碳原子，包括取代基之碳原子；雜環芳基具有總共5-20個碳原子，包括取代基之碳原子；烷氧羰基為羧酸之烷基酯，其中烷基如上文所定義；各烷基、芳基、烷氧基、芳氧基、苯并及烷氧羰基獨立地可不經取代或經一或多個取代基取代；烷基取代基為鹵基、羥基、胺基或芳基；芳基取代基為鹵基、羥基、胺基、烷基、芳基、硝基或羧基；及鹵基取代基為氟基或氯基；

n 為0、1、2、3或4。

如本文一般所定義， G^1 獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^A$ 。在某些實施例中， G^1 為H。在某些實施例中， G^1 為鹵素。在某些實施例中， G^1 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^1 為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^1 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^1 為 $-OH$ 。在某些實施例中， G^1 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^1 為 $-OCH_3$ 或 $-OC_2H_5$ 。在某些實施例中， G^1 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為氧保護基。在某些實施例中， G^1 為 $-N(R^B)_2$ ，其中 R^B 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個 R^B 與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^1 為 NH_2 。在某些實施例中， G^1 為 NHR^B ，其中 R^B 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^1 為 $NHCH_3$ 或 NHC_2H_5 。在某些實施例中， G^1 為 NHR^B ，其中 R^B 為氮保護基。

如本文一般所定義， G^2 獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環

基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^A$ 。在某些實施例中， G^2 為H。在某些實施例中， G^2 為鹵素。在某些實施例中， G^2 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^2 為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^7 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^2 為 $-OH$ 。在某些實施例中， G^2 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^2 為 $-OCH_3$ 或 $-OC_2H_5$ 。在某些實施例中， G^2 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為氧保護基。在某些實施例中， G^2 為 $-N(R^B)_2$ ，其中 R^B 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個 R^B 與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^2 為 NH_2 。在某些實施例中， G^2 為 NHR^B ，其中 R^B 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^2 為 $NHCH_3$ 或 NHC_2H_5 。在某些實施例中， G^2 為 NHR^B ，其中 R^B 為氮保護基。

如本文一般所定義， G^3 獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、

NO_2 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 、 $=\text{O}$ 、 $=\text{NOH}$ 、 $=\text{N}-\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $=\text{N}-\text{NH}_2$ 、 $=\text{N}-\text{NHR}^{\text{A}}$ 、 $=\text{N}-\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 及 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{R}^{\text{A}}$ 。在某些實施例中， G^3 為 H 。在某些實施例中， G^3 為鹵素。在某些實施例中， G^3 為視情況經取代之 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基。在某些實施例中， G^3 為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^7 為 $-\text{OR}^{\text{A}}$ ，其中 R^{A} 獨立地為氫、視情況經取代之 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^3 為 $-\text{OH}$ 。在某些實施例中， G^3 為 $-\text{OR}^{\text{A}}$ ，其中 R^{A} 為視情況經取代之 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基。在某些實施例中， G^3 為 $-\text{OCH}_3$ 或 $-\text{OC}_2\text{H}_5$ 。在某些實施例中， G^3 為 $-\text{OR}^{\text{A}}$ ，其中 R^{A} 為氧保護基。在某些實施例中， G^3 為 $-\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ ，其中 R^{B} 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個 R^{B} 與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^3 為 NH_2 。在某些實施例中， G^3 為 NHR^{B} ，其中 R^{B} 為視情況經取代之 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基。在某些實施例中， G^3 為 NHCH_3 或 NHC_2H_5 。在某些實施例中， G^3 為 NHR^{B} ，其中 R^{B} 為氮保護基。

如本文一般所定義， G^5 獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、 $-\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$ 、 $-\text{SR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{A}})\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 、 $=\text{O}$ 、 $=\text{NOH}$ 、 $=\text{N}-\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $=\text{N}-\text{NH}_2$ 、 $=\text{N}-\text{NHR}^{\text{A}}$ 、 $=\text{N}-\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 及 $-\text{NH}\text{SO}_2\text{R}^{\text{A}}$ 。在某

些實施例中， G^5 為H。在某些實施例中， G^5 為鹵素。在某些實施例中， G^5 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^5 為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^5 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^5 為 $-OH$ 。在某些實施例中， G^5 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^5 為 $-OCH_3$ 或 $-OC_2H_5$ 。在某些實施例中， G^5 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為氧保護基。在某些實施例中， G^5 為 $-N(R^B)_2$ ，其中 R^B 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個 R^B 與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^5 為 NH_2 。在某些實施例中， G^5 為 NHR^B ，其中 R^B 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^5 為 $NHCH_3$ 或 NHC_2H_5 。在某些實施例中， G^5 為 NHR^B ，其中 R^B 為氮保護基。

如本文一般所定義， G^6 獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^A$ 。在某些實施例中， G^6 為H。在某些實施例中， G^6 為鹵素。在某些實施例中， G^6 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^6 為甲基、乙基或正丙

基。在某些實施例中， G^6 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^6 為 $-OH$ 。在某些實施例中， G^6 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^6 為 $-OCH_3$ 或 $-OC_2H_5$ 。在某些實施例中， G^6 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為氧保護基。在某些實施例中， G^6 為 $-N(R^B)_2$ ，其中 R^B 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個 R^B 與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^6 為 NH_2 。在某些實施例中， G^6 為 NHR^B ，其中 R^B 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^6 為 $NHCH_3$ 或 NHC_2H_5 。在某些實施例中， G^6 為 NHR^B ，其中 R^B 為氮保護基。

如本文一般所定義， G^7 獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^C$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^C$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^A$ 。在某些實施例中， G^7 為 H 。在某些實施例中， G^7 為鹵素。在某些實施例中， G^7 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^7 為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^7 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之

之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^7 為-OH。在某些實施例中， G^7 為-OR^A，其中R^A為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中， G^7 為-OCH₃或-OC₂H₅。在某些實施例中， G^7 為-OR^A，其中R^A為氧保護基。在某些實施例中， G^7 為-N(R^B)₂，其中R^B在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個R^B與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^7 為NH₂。在某些實施例中， G^7 為NHR^B，其中R^B為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中， G^7 為NHCH₃或NHC₂H₅。在某些實施例中， G^7 為NHR^B，其中R^B為氮保護基。

如本文一般所定義， G^8 獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、-OR^A、-CH₂OR^A、-OC(O)R^C、-SR^A、-N(R^B)₂、-N(R^A)C(O)R^C、-C(O)N(R^B)₂、-CN、-NO₂、-C(O)R^C、-C(O)OR^A、-S(O)R^C、-SO₂R^A、-SO₂N(R^B)₂、=O、=NOH、=N-OR^A、=N-NH₂、=N-NHR^A、=N-N(R^B)₂及-NHSO₂R^A。在某些實施例中， G^8 為H。在某些實施例中， G^8 為鹵素。在某些實施例中， G^8 為視情況經取代之C₁-C₆烷基。在某些實施例中， G^8 為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^8 為-OR^A，其中R^A獨立地為氫、視情況經取代之C₁-C₆烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^8 為-OH。在某些實施例中， G^8 為-

OR^A ，其中 R^A 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^8 為 $-OCH_3$ 或 $-OC_2H_5$ 。在某些實施例中， G^8 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 為氧保護基。在某些實施例中， G^8 為 $-N(R^B)_2$ ，其中 R^B 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個 R^B 與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^8 為 NH_2 。在某些實施例中， G^8 為 NHR^B ，其中 R^B 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^8 為 $NHCH_3$ 或 NHC_2H_5 。在某些實施例中， G^8 為 NHR^B ，其中 R^B 為氮保護基。

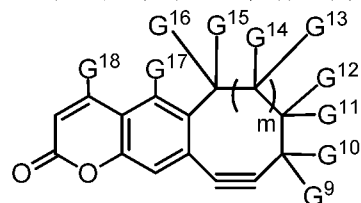
在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成視情況經取代之碳環或雜環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成視情況經取代之碳環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成視情況經取代之5員碳環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成視情況經取代之6員碳環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成視情況經取代之苯基。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成未經取代之苯基。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成視情況經取代之雜環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成具有S、N或O之一個雜原子之視情況經取代之5員雜環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個 G^8 基團與其中間的原子結合在一起以形成具有各獨立地選自S、N及O之群的兩個雜原子之視情況經取代之5員雜環。在某些實施例中，彼此相鄰

的兩個G⁸基團與其中間的原子結合在一起以形成具有S、N或O之一個雜原子之視情況經取代之6員碳環。在某些實施例中，彼此相鄰的兩個G⁸基團與其中間的原子結合在一起以形成具有各獨立地選自由S、N及O組成之群的兩個雜原子之視情況經取代之6員碳環。

本發明之一或多個實施例之功效闡述於以下描述中。本發明之其他特徵或優點將自以下幾個實施例之附圖及實施方式且亦自所附申請專利範圍為顯而易見的。

基於環辛炔之螢光探針

基於環辛炔之螢光探針為式(IV)：



(IV)

或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物或水合物，且其中：

G⁹、G¹⁰、G¹¹、G¹²、G¹³、G¹⁴、G¹⁵、G¹⁶、G¹⁷及G¹⁸在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之C₁₋₆烷基、視情況經取代之C₁₋₆烯基、視情況鹵素、視情況亞硝基、視情況經取代之C₁₋₆炔基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之醯基、-OR^A、-CH₂OR^A、-OC(O)R^A、-SR^A、-N(R^B)₂、-N(R^A)C(O)R^A、-C(O)N(R^B)₂、-CN、-NO₂、-C(O)R^A、-C(O)OR^A、-S(O)R^A、-SO₂R^A、-SO₃R^A、-SO₂N(R^B)₂及-NHSO₂R^B；

R在各種情況下獨立地選自氫、鹵素、視情況經取代之烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之醯基、-OR^A、-CH₂OR^A、-OC(O)R^A、-SR^A、-N(R^B)₂、-N(R^A)C(O)R^A、-C(O)N(R^B)₂、-CN、-NO₂、-C(O)R^A、

$-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 及 $-\text{NHSO}_2\text{R}^{\text{B}}$ ；

各 R^{A} 獨立地選自氫、視情況經取代之 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基；及

各 R^{B} 獨立地選自氫、視情況經取代之 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基，或兩個 R^{B} 與中間的氮結合在一起形成雜環；

G^9 及 G^{10} 在各種情況下為氫、氟基、氯基、溴基、碘基、亞硝基、烷基、烷氧基、芳氧基或炔基，及

其中烷基及烷氧基為非分支鏈、飽和的且具有1-4個碳原子；芳基及芳氧基之芳基可為碳環芳基或雜環芳基；碳環芳基具有總共6-20個碳原子，包括取代基之碳原子；雜環芳基具有總共5-20個碳原子，包括取代基之碳原子；烷氧羰基為羧酸之烷基酯，其中烷基如上文所定義；各烷基、芳基、烷氧基、芳氧基、苯并及烷氧羰基獨立地可不經取代或經一或多個取代基取代；烷基取代基為鹵基、羥基、胺基或芳基；芳基取代基為鹵基、羥基、胺基、烷基、芳基、硝基或羧基；及鹵基取代基為氟基或氯基；

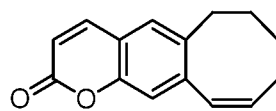
m 為1。

如本文一般所定義， G^9 獨立地選自氫、鹵素、亞硝基、視情況經取代之 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、 $-\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$ 、 $-\text{SR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{A}})\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{\text{A}}$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^{\text{C}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{B}})_2$ 、

$=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^A$ 。在某些實施例中， G^9 為H。在某些實施例中， G^9 為鹵素。在某些實施例中， G^9 為視情況經取代之 C_1-C_6 烷基。在某些實施例中， G^9 為甲基、乙基或正丙基。在某些實施例中， G^9 為 $-OR^A$ ，其中 R^A 獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)。在某些實施例中， G^9 為氟基。

如本文一般所定義， G^{10} 獨立地選自氫、鹵素、亞硝基、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之雜芳基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^C$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^C$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 、 $=O$ 、 $=NOH$ 、 $=N-OR^A$ 、 $=N-NH_2$ 、 $=N-NHR^A$ 、 $=N-N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^A$ ，其中 R^A 獨立地為氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基、視情況經取代之芳基或氧保護基(當附接至氧時)或硫保護基(當附接至硫時)，其中 R^B 在各種情況下獨立地選自氫、視情況經取代之 C_1-C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基或氮保護基，或兩個 R^B 與中間的氮結合在一起形成雜環。在某些實施例中， G^{10} 為氟基。

在某些實施例中，本發明係關於一種**101**化合物：



101。

本文描述一種藉由稠合環辛炔與香豆素螢光團所設計之新穎螢光形成探針**101**，用於在無洗滌及無固定以及無催化劑條件下進行活細胞中之含疊氮基醣共軛物之即時成像。此探針為細胞可滲透有低細胞毒性且在三唑形成之後產生螢光，因此實現醣蛋白定位之細胞內成像及運輸有良好的螢光信號。此外，**101**與本文所描述之疊氮基-BODIPY探針之組合允許在雙標記實驗中之活細胞中形成三唑之後分別偵測兩種不同的代謝併入之含疊氮基及含炔醣共軛物。

已展示低螢光7-炔基香豆素**102**經歷CuAAC反應，由於三唑環之供電子特性得到具有增強的螢光之三唑**103**。^{6c}因此，環辛炔併入香豆素部分**101**可能降低螢光，但**101**與疊氮化物之SPAAC反應可產生高螢光三唑產物用於敏感偵測。在本發明中，吾人報導基於SPAAC之螢光形成探針**101**(圖10)，即coumOCT，其可以用於在無洗滌及無固定的條件下進行活細胞中之疊氮基標誌聚醣之時間過程成像。

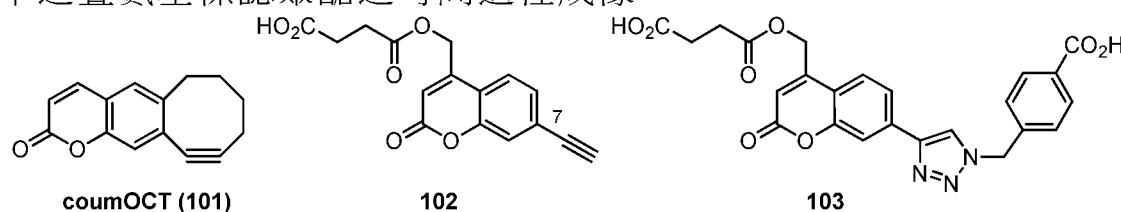


圖10.設計在三唑形成之後展示高螢光之基於SPAAC之螢光形成探針**101**，用於活細胞中之含疊氮基醣共軛物之成像。為了比較，7-炔基香豆素**102**為經歷與疊氮化物之CuAAC反應以形成高螢光三唑**103**之弱螢光探針。

基於活性之酶探針

本發明描述一系列由作為基於機制之抑制劑之3-氟唾液酸氟化物製

備且藉由併入炔基用於報導子接合的基於活性之唾液酸酶探針DFSA (501)及CoumFSA (601)。DFSA (501)為所有測試唾液酸酶之活性位點失活劑。在此報導中，吾人已描述基於活性之唾液酸酶探針CoumFSA (601)與DFSA (501)之化學合成。

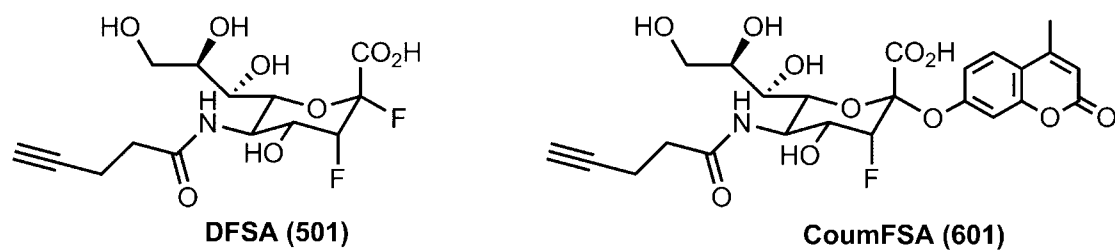
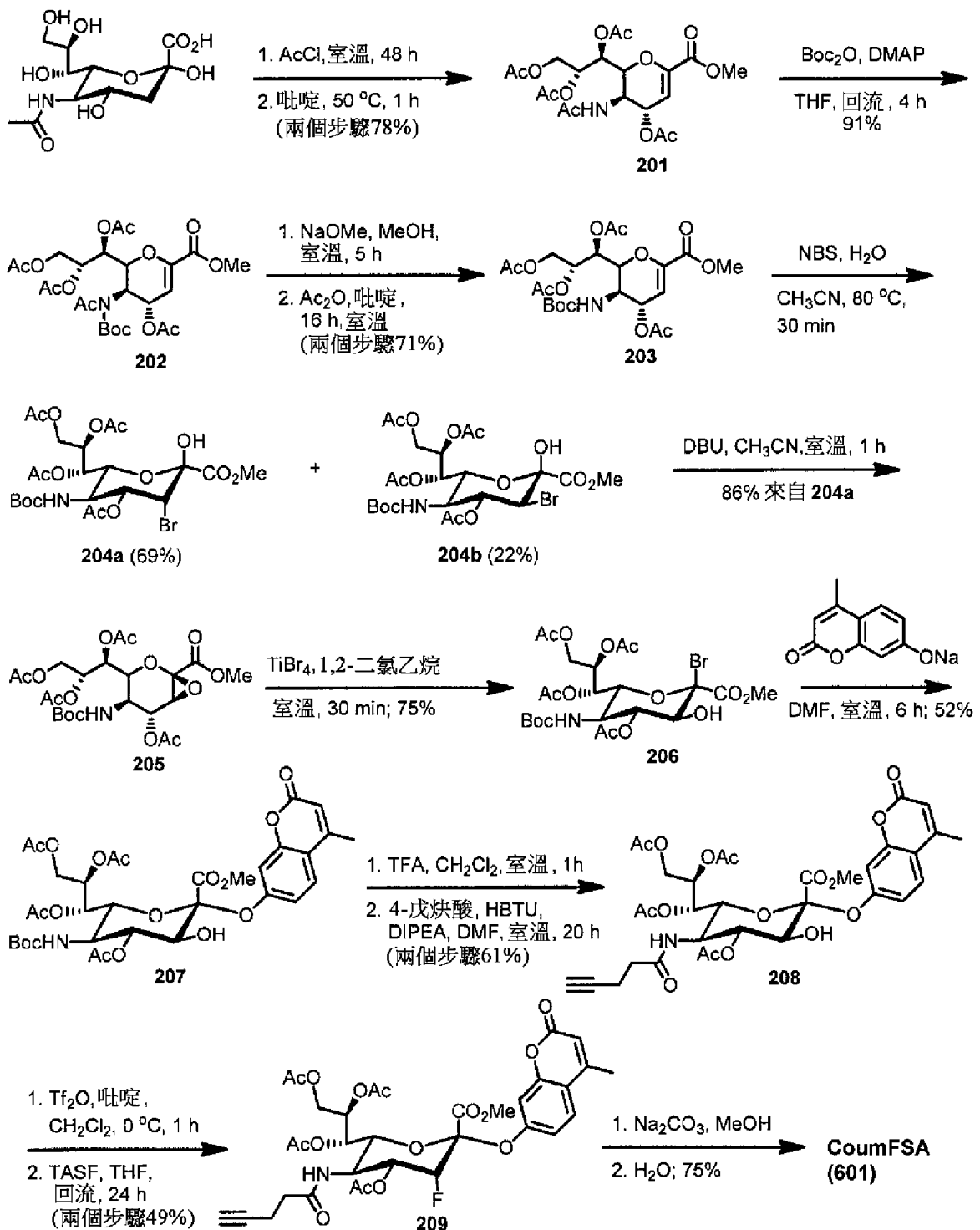
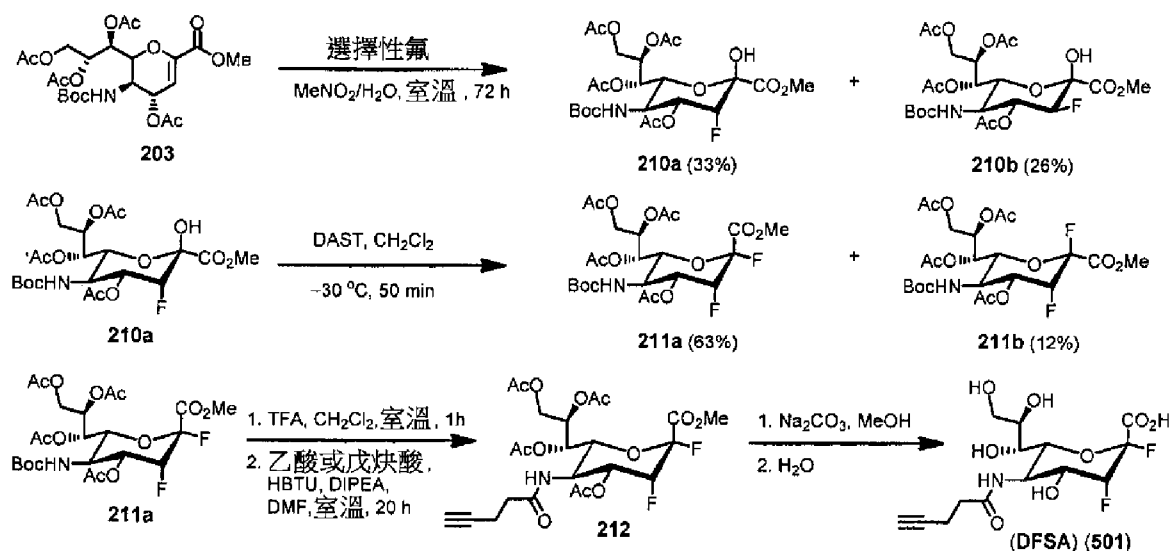


圖11.唾液酸酶探針DFSA 501及CoumFSA 601之結構。

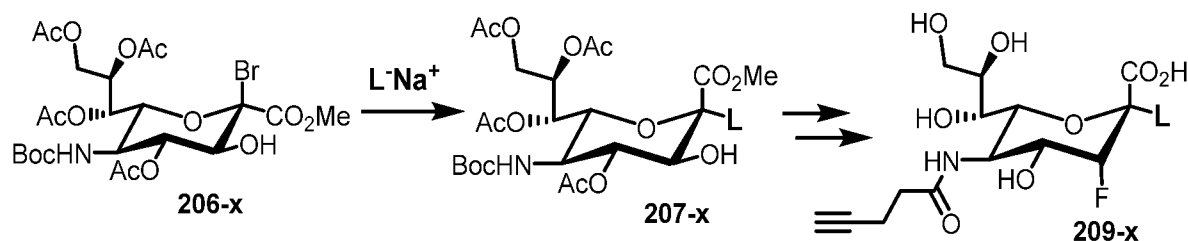


流程500.CoumFSA之化學合成。



流程600.DFSA (501)之化學合成。

在一些實施例中，一系列基於活性之酶探針可藉由改變添加至化合物**206**之離去基**L**來合成。如流程700中所示，任何選擇的弱酸之鹽(鈉鹽如所示，但可使用任何陽離子相對離子)可用作可接受的離去基。舉例而言，**L**可為烷氧基、苯氧基、五氟苯氧基、4-硝基苯氧基、香豆素、烷酸鹽、苯甲酸鹽、三氟甲磺酸鹽、甲磺酸鹽或甲苯磺酸鹽。



流程700.藉由選擇離去基鹽 L^-Na^+ 進行化合物**209**之變體的變體之化學合成。

圖12描繪基於活性之酶探針(ABP)之一般結構。ABP含有反應性基團、間隔基或結合基團及報導子標誌。反應性基團基於酶靶之催化機制進行設計，且其可含有可與酶活性位點中之親核殘基反應以形成共價加合物之親電子試劑。各種報導子標誌可用於酶可視化及富集，包括螢光團及生物素，以及「可點擊的」柄狀物，諸如疊氮化物及乙炔。

本發明描述基於活性之酶探針，具體言之唾液酸酶之設計。3-氟唾液酸氟化物根據動力學模型以時間依賴的方式使野生型反式-唾液酸酶失活。因為強拉電子基團，氟可使積極改變的側氧基-碳離子不穩定，如過渡狀態(圖801)，進而減緩共價中間物之形成及水解。

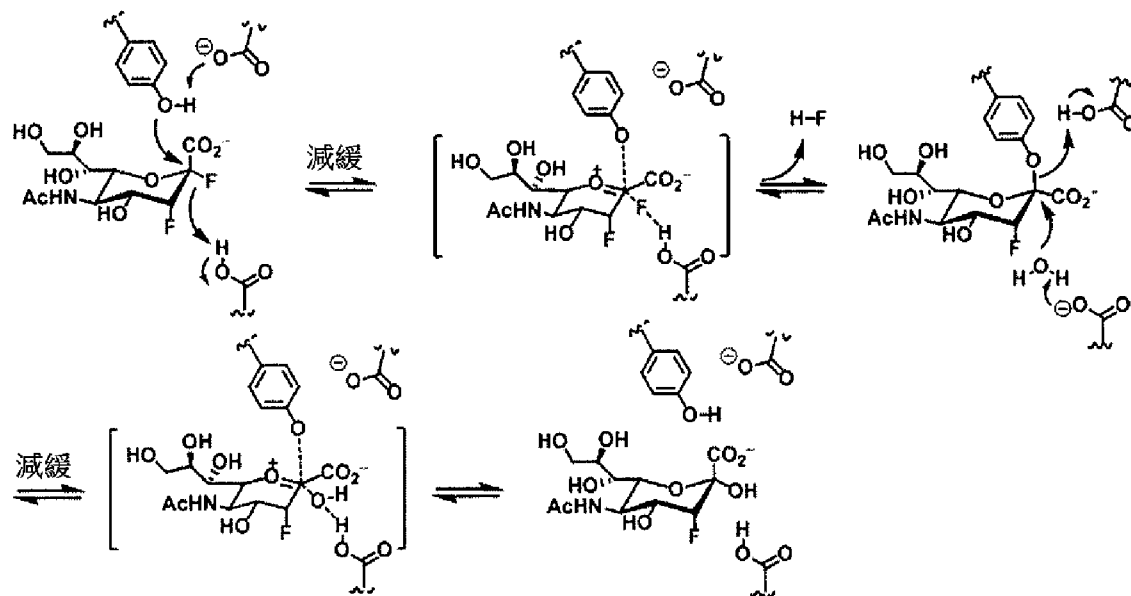


圖13.作用於受質的唾液酸酶之機制及過渡狀態。

本發明人已認識到唾液酸酶之晶體結構支撐神經胺酸苷酶與3-氟唾液酸氟化物之共價複合物，其可經進一步修飾以將新穎化學官能基併入活性位點。如圖802中所示，神經胺酸苷酶(唾液酸酶)活性位點處之Tyr406在3-氟唾液酸氟化物受質上對C-2進行親核攻擊(*Nat. Commun.* **2013**, 4, 1491)。因此，用離去基修飾C-2將在Tyr406與3-氟唾液酸氟化物受質之間產生共價鍵。進一步修飾3-氟唾液酸氟化物受質以包括烷基官能基使得共價結合受質能夠藉由含疊氮化物螢光探針(諸如本文所描述之彼等化合物)偵測。

圖14.具有3-氟唾液酸氟化物受質之神經胺酸苷酶(唾液酸酶)活性位點之晶體結構。

在一些實施例中，本文所描述之基於活性之探針(ABP)可用於偵測及

識別唾液酸酶。如圖26所描繪，ABP可與唾液酸酶之活性位點反應，形成共價鍵。細胞可視情況溶解。ABP可進一步與含疊氮化物報導子分子(例如，本文所描述之含疊氮化物螢光探針)反應以形成三唑複合物。可接著偵測(例如藉由質譜分析、螢光、發光、吸收光譜法)三唑複合物。

圖15.用於識別唾液酸酶之螢光反應。

實例

實例1：疊氨基-BODIPY化合物之合成

材料

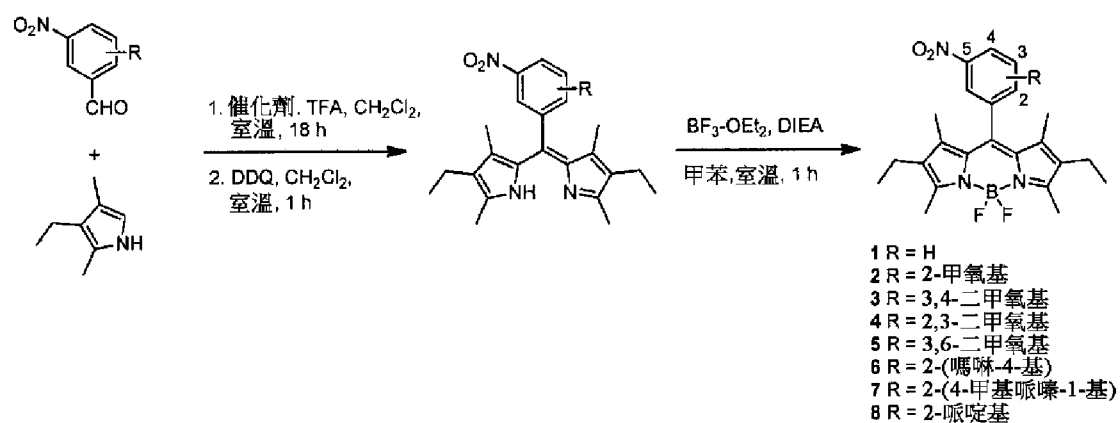
除非另外指示，否則所有試劑均為市售的且未經進一步純化即使用。除非另外指示，否則所有溶劑均為無水級的。除非另外說明，否則所有非水性反應均在氬氣微正壓下在烘乾的玻璃器皿中進行。反應經磁力攪拌且藉由矽膠上之薄層層析監測。在粒度為40-63 μm 之矽膠上進行管柱層析。報導光譜純化合物之產率。

儀器

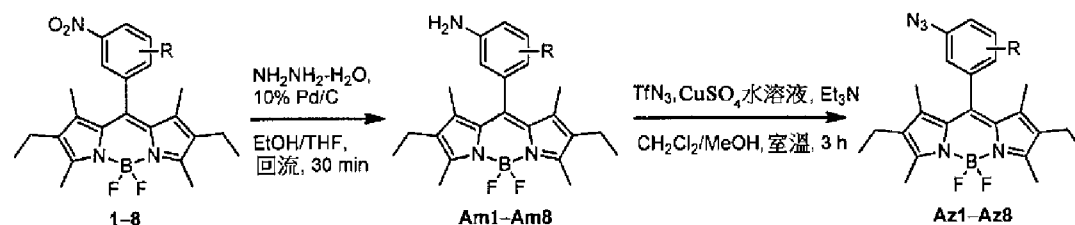
在Electrothermal MEL-TEMP[®] 1101D熔點裝置上記錄熔點且不經校正。在Bruker AVANCE 600光譜儀(600 MHz)上記錄NMR光譜。以相對於四甲基矽烷(TMS)之 δ 值給出化學位移；以Hz給出偶合常數 J 。¹H-NMR光譜之內標準為CDCl₃ ($\delta_{\text{H}} = 7.24$)，¹³C-NMR光譜之內標準為CDCl₃ ($\delta_{\text{C}} = 77.0$)。分裂模式報導為s (單重峰)、d (雙重峰)、t (三重峰)、q (四重峰)、m (多重峰)、br (寬峰)及dd (雙二重峰)。在Bruker Daltonics光譜儀上記錄高解析度ESI質譜。在Perkin Elmer Lambda 35紫外可見光(UV-Visible)分光光度計上記錄吸收光譜。在AMINCO-Bowman系列2發光光譜儀上記錄螢光光譜。所有相片均收集在Leica TCS-SP5共焦雷射掃描顯微鏡上。

本文揭示一種用於合成疊氮基-BODIPY化合物 **Az1**、**Az2**、**Az3**、**Az4**、**Az5**、**Az6**、**Az7**及**Az8**之方便途徑。該製備使用關鍵硝基中間物 **1**、**2**、**3**、**4**、**5**、**6**、**7**及**8**，其被有效地轉化成相應疊氮基-BODIPY化合物。疊氮基-BODIPY化合物 **Az1**、**Az2**、**Az3**、**Az4**、**Az5**、**Az6**、**Az7**及**Az8**之結構展示於圖1中。合成途徑中之試劑及步驟如下。

步驟1.進行2,4-二甲基-3-乙基吡咯與經取代之硝基苯甲醛之酸催化縮合，隨後在溫和條件下用DDQ氧化，得到二吡咯亞甲基中間物，其經 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 處理以產生相應硝基-BODIPY **1-8**。



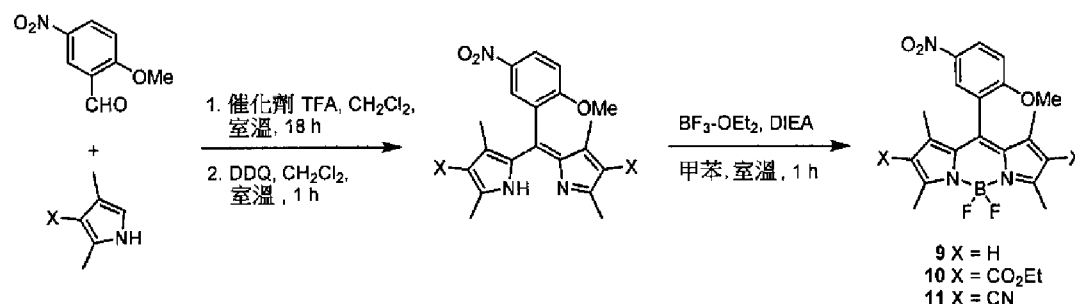
步驟2.根據先前報導之方法，藉由在10% Pd/C存在下用肼還原硝基-BODIPY獲得呈合理產率之胺基-BODIPY **Am1-Am8**。在溫和條件下用三氟甲磺醯基疊氮化物(TfN_3)處理時，將胺基-BODIPY轉化成靶疊氮基-BODIPY **Az1-Az8**。(Li, L.; Han, J.; Nguyen, B.; Burgess, K. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1963-1970。)



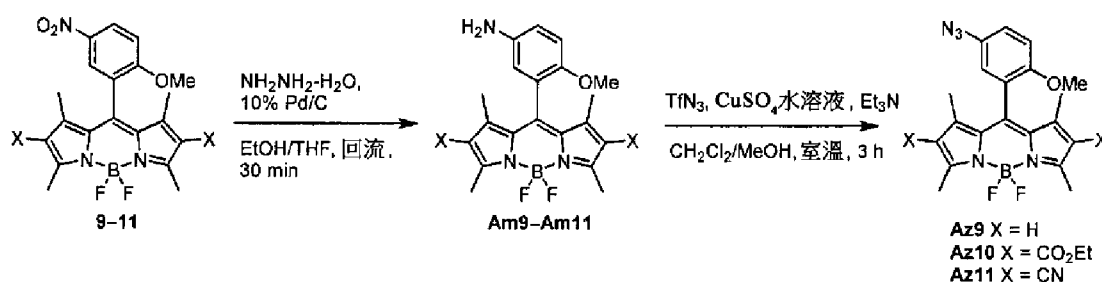
本文揭示一種用於合成疊氮基-BODIPY化合物 **Az9**、**Az10**及**Az11**之方便途徑。該製備使用關鍵硝基中間物 **9**、**10**及**11**，其被有效地轉化成相

應疊氨基-BODIPY化合物。疊氨基-BODIPY化合物Az9、Az10及Az11之結構展示於圖3中。合成途徑中之試劑及步驟為如下。

步驟1.進行2,4-二甲基-3-取代之吡咯與2-甲氧基-5-硝基苯甲醛之酸催化縮合，隨後在溫和條件下用DDQ進行氧化，得到二吡咯亞甲基中間物，其經BF₃•OEt₂處理以產生相應硝基-BODIPY 9-11。



步驟2.根據先前報導之方法，藉由在10% Pd/C存在下用肼還原硝基-BODIPY獲得呈合理產率之胺基-BODIPY Am9-Am11。在溫和條件下用三氟甲磺醯基疊氮化物(TfN₃)處理時，將胺基-BODIPY轉化成靶疊氨基-BODIPY Az9-Az11。(Li, L.; Han, J.; Nguyen, B.; Burgess, K. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1963-1970。)

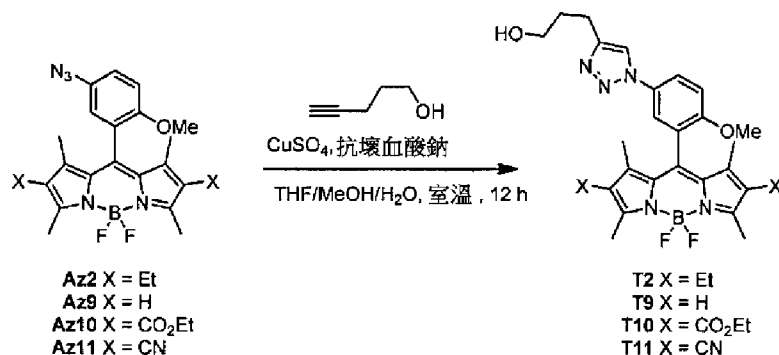


實例2：三唑基-BODIPY化合物之合成

本文揭示一種用於合成三唑基-BODIPY化合物T2、T9、T10及T11之方便途徑。三唑基-BODIPY化合物T2、T9、T10及T11之結構展示於圖3中。合成途徑中之試劑及步驟為如下。

藉由疊氨基-BODIPY化合物Az2、Az9、Az10及Az11與4-戊炔-1-醇在含有CuSO₄、抗壞血酸鈉及由三炔丙基胺與疊氮乙酸乙酯製備的tris-三

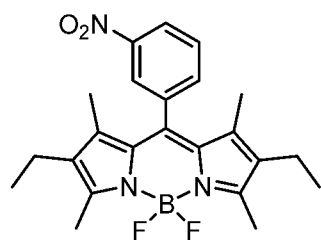
唑配位體之CuAAC條件下之1,3-偶極環加成獲得呈合理產率之三唑基-BODIPY化合物**T2**、**T9**、**T10**及**T11**。(Zhou, Z.; Fahrni, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8862-8863。)



硝基-BODIPY之一般合成程序及產物特徵化。

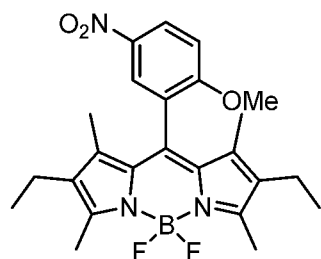
將經取代之硝基苯甲醛(3 mmol)及3-取代之2,4-二甲基吡咯(6 mmol)在Ar氛圍下溶解於無水CH₂Cl₂ (400 mL)中。添加TFA (1滴)，且將所得溶液在室溫下攪拌隔夜。在如由TLC分析所示在12-18 h內完全消耗反應物之後，一次性添加2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌(DDQ, 3 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌1 h，且接著用鹽水(400 mL)洗滌。有機溶離份經MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。在短氧化鋁管柱(CH₂Cl₂)上純化粗化合物，得到二吡咯亞甲基之棕色固體。將粗二吡咯亞甲基產物及*N,N*-二異丙基乙胺(DIEA) (40 mmol)溶解於無水甲苯(150 mL)中且在室溫下攪拌10 min。緩慢地添加BF₃·OEt₂ (55 mmol)，且繼續攪拌1 h。用水(3 × 50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌反應混合物，經MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。藉由在矽膠上藉由用CH₂Cl₂/己烷或EtOAc/己烷溶離進行管柱層析來純化粗產物，得到相應硝基-BODIPY產物**1-11**。

2,6-二乙基-4,4-二氟基-8-(3-硝基苯基)-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(1)。



以三個步驟自2,4-二甲基-3-乙基吡咯及3-硝基苯甲醛製備呈15%產率之化合物**1**。C₂₃H₂₆BF₂N₃O₂, 暗紅色固體, 熔點246-248°C; TLC (EtOAc/己烷, 1:4) $R_f = 0.38$; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.36-8.34 (1 H, m), 8.20 (1 H, t, $J = 1.7$ Hz), 7.70-7.64 (2 H, m), 2.52 (6 H, s), 2.28 (4 H, q, $J = 7.6$ Hz), 1.23 (6 H, s), 0.96 (6 H, t, $J = 7.6$ Hz); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 155.0, 148.6, 137.6, 136.3, 134.8, 133.5, 130.4, 130.2, 123.89, 123.85, 17.0, 14.5, 12.6, 12.1; C₂₃H₂₇BF₂N₃O₂之HRMS計算值: 426.2164, 實驗值: m/z 426.2167 [M + H]⁺。

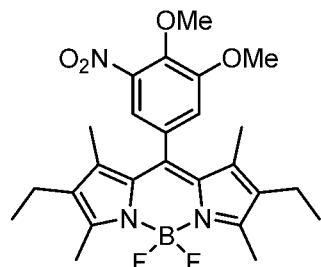
2,6-二乙基-4,4-二氟基-8-(2-甲氧基-5-硝基苯基)-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(2)。



以三個步驟自2,4-二甲基-3-乙基吡咯及2-甲氧基-5-硝基苯甲醛製備呈51%產率之化合物**2**。C₂₄H₂₈BF₂N₃O₃, 暗紅色固體, 熔點210-212°C; TLC (EtOAc/己烷, 1:4) $R_f = 0.33$; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.42 (1 H, dd, $J = 9.1, 2.5$ Hz), 8.15 (1 H, d, $J = 2.5$ Hz), 7.11 (1 H, d, $J = 9.1$ Hz), 3.93 (3 H, s), 2.56 (6 H, s), 2.32 (4 H, q, $J = 7.6$ Hz), 1.36 (6 H, s), 1.02 (6 H, t, $J = 7.6$ Hz); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 162.0, 154.4, 141.8, 137.1, 133.5, 133.0, 130.4, 126.8, 126.1, 125.6, 110.9, 56.6, 17.0, 14.6, 12.6,

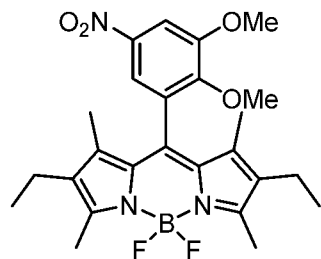
11.5; $C_{24}H_{29}BF_2N_3O_3$ 之HRMS計算值: 456.2270, 實驗值: m/z 456.2267 [$M + H$]⁺。

2,6-二乙基-4,4-二氟基-8-(3,4-二甲氧基-5-硝基苯基)-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(3)。



以三個步驟自2,4-二甲基-3-乙基吡咯及3,4-二甲氧基-5-硝基苯甲醛製備呈45%產率之化合物**3**。 $C_{25}H_{30}BF_2N_3O_4$, 暗紅色固體, 熔點190-192°C; TLC (EtOAc/己烷, 1:3) $R_f = 0.5$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.28 (1 H, s), 7.02 (1 H, s), 4.04 (3 H, s), 3.89 (3 H, s), 2.51 (6 H, s), 2.30 (4 H, q, $J = 7.5$ Hz), 1.38 (6 H, s), 0.98 (6 H, t, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 154.9, 145.3, 143.2, 137.7, 136.4, 133.4, 131.4, 130.4, 116.16, 116.12, 62.5, 56.8, 17.0, 14.5, 12.6, 12.0; $C_{25}H_{31}BF_2N_3O_4$ 之HRMS計算值: 486.2376, 實驗值: m/z 486.2377 [$M + H$]⁺。

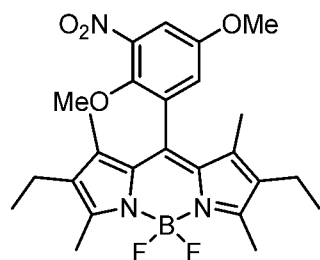
2,6-二乙基-4,4-二氟基-8-(2,3-二甲氧基-5-硝基苯基)-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(4)。



以三個步驟自2,4-二甲基-3-乙基吡咯及2,3-二甲氧基-5-硝基苯甲醛製備呈41%產率之化合物**4**。 $C_{25}H_{30}BF_2N_3O_4$, 暗紅色固體, 熔點185-187°C; TLC (EtOAc/己烷, 1:4) $R_f = 0.35$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.88 (1

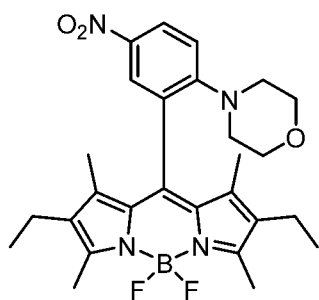
H, d, $J = 2.3$ Hz), 7.76 (1 H, d, $J = 2.3$ Hz), 4.00 (3 H, s), 3.83 (3 H, s), 2.51 (6 H, s), 2.29 (4 H, q, $J = 7.6$ Hz), 1.38 (6 H, s), 0.97 (6 H, t, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 154.5, 152.8, 151.8, 143.8, 137.1, 133.4, 133.2, 130.3, 129.5, 117.8, 108.1, 60.8, 56.4, 17.0, 14.6, 12.6, 11.6; $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_4$ 之HRMS計算值: 486.2376, 實驗值: m/z 486.2378 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

2,6-二乙基-4,4-二氟基-8-(2,5-二甲氧基-3-硝基苯基)-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(5)。



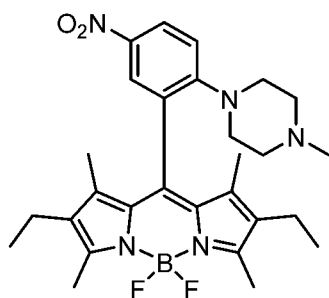
以三個步驟自2,4-二甲基-3-乙基吡咯及2,5-二甲氧基-3-硝基苯甲醛製備呈36%產率之化合物**5**。 $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_4$, 暗紅色固體, 熔點181-183°C; TLC (CH_2Cl_2 /己烷, 3:7) $R_f = 0.5$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.41 (1 H, d, $J = 3.1$ Hz), 6.98 (1 H, d, $J = 3.1$ Hz), 3.83 (3 H, s), 3.71 (3 H, s), 2.52 (6 H, s), 2.30 (4 H, q, $J = 7.6$ Hz), 1.44 (6 H, s), 0.98 (6 H, t, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 155.6, 154.8, 145.0, 144.3, 137.3, 133.4, 133.2, 132.9, 130.3, 120.7, 110.4, 62.2, 56.2, 17.1, 14.6, 12.6, 11.7; $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_4$ 之HRMS計算值: 486.2376, 實驗值: m/z 486.2378 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

2,6-二乙基-4,4-二氟基-8-(2-嗎啶基-5-硝基苯基)-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(6)。



以三個步驟自2,4-二甲基-3-乙基吡咯及2-嗎啉基-5-硝基苯甲醛製備呈38%產率之化合物**6**。C₂₇H₃₃BF₂N₄O₃, 暗紅色固體, 熔點179-181°C; TLC (EtOAc/己烷, 3:7) *R_f* = 0.25; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (1 H, dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz), 8.02 (1 H, d, *J* = 2.6 Hz), 6.96 (1 H, d, *J* = 9.1 Hz), 3.84 (4 H, t, *J* = 4.3 Hz), 3.24 (4 H, t, *J* = 4.3 Hz), 2.52 (6 H, s), 2.31 (4 H, q, *J* = 7.6 Hz), 1.42 (6 H, s), 0.99 (6 H, t, *J* = 7.6 Hz); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 155.1, 154.9, 141.1, 137.1, 136.0, 133.5, 129.8, 127.4, 126.2, 126.1, 117.4, 66.6, 50.4, 17.1, 14.6, 12.6, 12.1; C₂₇H₃₄BF₂N₄O₃之HRMS 計算值: 511.2692, 實驗值: *m/z* 511.2695 [M + H]⁺。

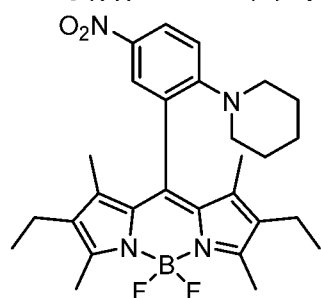
2,6-二乙基-4,4-二氟基-8-[2-(4-甲基哌嗪基)-5-硝基苯基]-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(7)。



以三個步驟自2,4-二甲基-3-乙基吡咯及2-(4-甲基哌嗪基)-5-硝基苯甲醛製備呈48%產率之化合物**7**。C₂₈H₃₆BF₂N₅O₂, 暗紅色固體, 熔點175-177°C; TLC (EtOAc/己烷, 3:7) *R_f* = 0.25; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (1 H, dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz), 8.00 (1 H, d, *J* = 2.8 Hz), 6.93 (1 H, d, *J* = 9.2 Hz), 3.29 (4 H, t, *J* = 4.7 Hz), 2.52 (6 H, s), 2.32 (4 H, q, *J* = 7.6

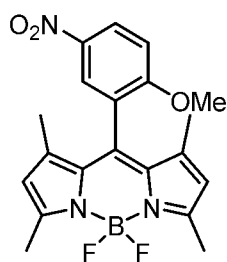
Hz), 2.19 (4 H, t, $J = 4.7$ Hz), 2.15 (3 H, s), 1.42 (6 H, s), 0.99 (6 H, t, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 155.1, 154.6, 140.6, 137.2, 136.4, 133.4, 129.9, 127.4, 126.1, 125.5, 117.5, 54.7, 49.8, 45.9, 17.1, 14.7, 12.6, 12.1; $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_2$ 之HRMS計算值: 524.3008, 實驗值: m/z 524.3010 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

2,6-二乙基-4,4-二氟基-8-(2-哌啶基-5-硝基苯基)-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(8).



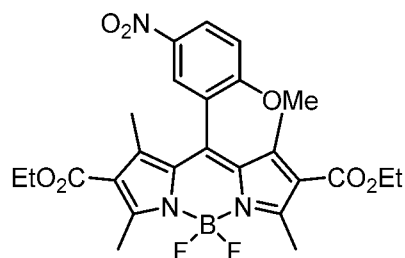
以三個步驟自2,4-二甲基-3-乙基吡咯及2-哌啶基-5-硝基苯甲醛製備呈40%產率之化合物**8**。 $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_2$, 暗紅色固體, 熔點201-203 $^{\circ}\text{C}$; TLC (EtOAc/己烷, 1:9) $R_f = 0.38$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.19 (1 H, dd, $J = 9.2, 2.8$ Hz), 7.97 (1 H, d, $J = 2.8$ Hz), 6.91 (1 H, d, $J = 9.2$ Hz), 3.23 (4 H, t, $J = 5.3$ Hz), 2.52 (6 H, s), 2.30 (4 H, q, $J = 7.6$ Hz), 1.48-1.44 (2 H, m), 1.43 (6 H, s), 1.37-1.34 (4 H, m), 0.98 (6 H, t, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 156.0, 154.3, 139.9, 137.2, 137.0, 133.2, 130.0, 127.5, 126.1, 125.1, 117.3, 51.3, 25.8, 23.9, 17.1, 14.6, 12.6, 12.1; $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_2$ 之HRMS計算值: 509.2899, 實驗值: m/z 509.2901 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

4,4-二氟基-8-(2-甲氧基-5-硝基苯基)-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(9).



以三個步驟自2,4-二甲基吡咯及2-甲氧基-5-硝基苯甲醛製備呈39%產率之化合物**9**。C₂₀H₂₀BF₂N₃O₃，暗紅色固體，熔點178-180°C；TLC (EtOAc/己烷, 1:4) *R_f* = 0.31；¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.42 (1 H, dd, *J* = 9.1, 2.7 Hz), 8.17 (1 H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.12 (1 H, d, *J* = 9.1 Hz), 6.02 (2 H, s), 3.93 (3 H, s), 2.59 (6 H, s), 1.46 (6 H, s)；¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 161.7, 156.1, 141.9, 135.0, 131.1, 126.9, 126.0, 124.8, 121.5, 118.9, 111.0, 56.7, 14.6, 14.2；C₂₀H₂₁BF₂N₃O₃之HRMS計算值：400.1644，實驗值：*m/z* 400.1640 [M + H]⁺。

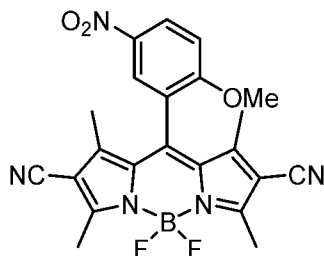
2,6-二乙氧羰基-4,4-二氟基-8-(2-甲氧基-5-硝基苯基)-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3 α ,4 α -二氮雜-s-二環戊二烯并苯(10)。



以三個步驟自2,4-二甲基-4-乙氧羰基吡咯及2-甲氧基-5-硝基苯甲醛製備呈60%產率之化合物**10**。C₂₆H₂₈BF₂N₃O₇，橙紅色固體，熔點181-183°C；TLC (CH₂Cl₂/己烷, 7:3) *R_f* = 0.18；¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.43 (1 H, dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz), 8.09 (1 H, d, *J* = 2.8 Hz), 7.11 (1 H, d, *J* = 9.2 Hz), 4.26 (4 H, q, *J* = 7.1 Hz), 3.89 (3 H, s), 2.82 (6 H, s), 1.71 (6 H, s), 1.31 (6 H, t, *J* = 7.1 Hz)；¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 164.0, 161.4, 160.0, 146.4, 142.2, 139.2, 131.1, 127.6, 125.5, 124.3, 122.7, 111.3, 60.3,

56.8, 15.1, 14.2, 13.2; C₂₆H₂₉BF₂N₃O₇之HRMS計算值: 544.2067, 實驗值: m/z 544.2061 [M + H]⁺。

2,6-二氰基-4,4-二氟基-8-(2-甲氧基-5-硝基苯基)-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(11).



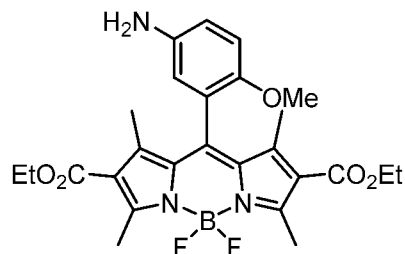
以三個步驟自3-氰基-2,4-二甲基吡咯^{S7}及2-甲氧基-5-硝基苯甲醛製備呈13%產率之化合物**11**。C₂₂H₁₈BF₂N₅O₃, 紅色固體, 熔點278-280°C; TLC (CH₂Cl₂/己烷, 7:3) R_f = 0.18; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.49 (1 H, dd, J = 9.1, 2.6 Hz), 8.10 (1 H, d, J = 2.6 Hz), 7.19 (1 H, d, J = 9.1 Hz), 3.93 (3 H, s), 2.72 (6 H, s), 1.63 (6 H, s); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 160.9, 160.2, 148.2, 142.2, 140.6, 131.2, 128.3, 125.1, 122.2, 113.2, 111.8, 106.8, 57.1, 13.9, 13.7; C₂₂H₁₉BF₂N₅O₃之HRMS計算值: 450.1549, 實驗值: m/z 450.1546 [M + H]⁺。

疊氮基-BODIPY (Az1-Az11) 之一般合成程序及產物特徵化.

將硝基-BODIPY **1-11** (0.5 mmol)於EtOH (20 mL)與THF (20 mL)之混合溶劑中之溶液用Ar吹掃10 min。添加單水合肼(0.3 mL)及10% Pd/C (60 mg, 0.1當量)。將反應混合物加熱至回流歷時30 min, 且接著藉由真空過濾移除Pd/C。在蒸發溶劑之後, 藉由在矽膠上之管柱層析純化殘餘物, 得到胺基-BODIPY之紅色固體。將胺基-BODIPY **Am1-Am11**之粗產物在50 mL圓底燒瓶中溶解於CH₂Cl₂ (20 mL)中。將三乙胺(Et₃N, 1.5 mmol)及CuSO₄ (25 μmol於0.1 mL水中)溶液添加至燒瓶。接著添加新製

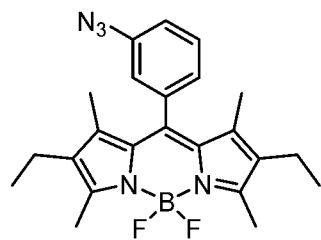
備的三氟甲磺醯基疊氮化物(TfN₃)溶液 (1.5 mmol於3 mL CH₂Cl₂中)，且藉由添加甲醇(0.5 mL)使混合物達到均勻性。在室溫下攪拌3 h之後，將混合物傾入NaHCO₃飽和水溶液(10 mL)中且用CH₂Cl₂ (3 × 10 mL)萃取。合併之有機萃取物經MgSO₄乾燥，過濾且濃縮。藉由在矽膠上藉由用CH₂Cl₂/己烷、EtOAc/己烷或MeOH/CH₂Cl₂溶離進行管柱層析來純化殘餘物，得到相應疊氮基-BODIPY產物Az1-Az11。

8-(5-胺基-2-甲氧苯基)-2,6-二乙氧羰基-4,4-二氟基-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(Am10).



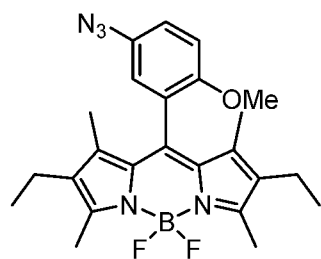
自化合物**10**製備呈83%產率之化合物**Am10**。C₂₆H₃₀BF₂N₃O₅，暗紅色固體，熔點188-190°C；TLC (EtOAc/己烷, 3:7) R_f = 0.23；¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.82-6.77 (2 H, m), 6.45 (1 H, d, J = 2.5 Hz), 4.25 (4 H, q, J = 7.1 Hz), 3.66 (3 H, s), 3.52 (2 H, br s), 2.79 (6 H, s), 1.82 (6 H, s), 1.30 (6 H, t, J = 7.1 Hz)；¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 164.4, 158.9, 148.8, 147.3, 143.4, 141.4, 131.5, 123.7, 122.0, 117.4, 115.6, 112.8, 60.1, 56.0, 14.9, 14.3, 12.9；C₂₆H₃₁BF₂N₃O₅之HRMS計算值: 514.2325, 實驗值: m/z 514.2327 [M + H]⁺。

8-(3-疊氮苯基)-2,6-二乙基-4,4-二氟基-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(Az1).



以兩個步驟自化合物**1**製備呈47%產率之化合物**Az1**。C₂₃H₂₆BF₂N₅, 暗紅色固體, 熔點151-153°C (分解); TLC (EtOAc/己烷, 1:9) *R_f* = 0.38; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.01 (1 H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.85 (1 H, s), 7.75 (1 H, t, *J* = 7.7 Hz), 7.65 (1 H, d, *J* = 7.1 Hz), 2.52 (6 H, s), 2.27 (4 H, q, *J* = 7.4 Hz), 1.22 (6 H, s), 0.95 (6 H, t, *J* = 7.4 Hz); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.0, 154.7, 137.7, 137.4, 137.1, 135.3, 133.3, 130.5, 130.2, 121.2, 121.0, 17.0, 14.5, 12.6, 12.1; C₂₃H₂₇BF₂N₅之HRMS計算值: 422.2328, 實驗值: *m/z* 422.2330 [M + H]⁺。

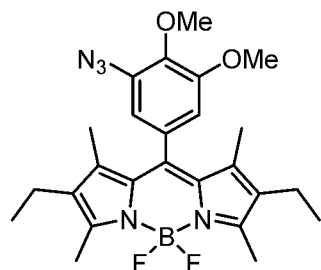
8-(5-疊氮基-2-甲氧苯基)-2,6-二乙基-4,4-二氟基-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(Az2).



以兩個步驟自化合物**2**製備呈59%產率之化合物**Az2**。C₂₄H₂₈BF₂N₅O, 暗紅色固體, 熔點163-165°C (分解); TLC (EtOAc/己烷, 1:4) *R_f* = 0.52; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.08 (1 H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.95 (1 H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.84 (1 H, s), 3.74 (3 H, s), 2.50 (6 H, s), 2.28 (4 H, q, *J* = 7.4 Hz), 1.36 (6 H, s), 0.97 (6 H, t, *J* = 7.4 Hz); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 154.1, 153.7, 137.6, 135.5, 133.4, 132.6, 130.6, 126.2, 120.5, 112.4, 56.0, 17.1, 14.6, 12.5, 11.2; C₂₄H₂₉BF₂N₅O之HRMS

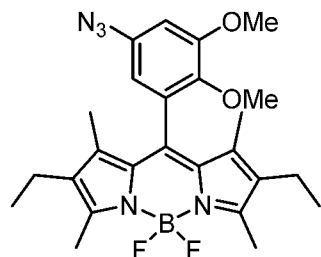
計算值: 452.2433, 實驗值: m/z 452.2429 $[M + H]^+$ 。

8-(3-疊氮基-4,5-二甲氧苯基)-2,6-二乙基-4,4-二氟基-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(Az3).



以兩個步驟自化合物 **3** 製備呈 51% 產率之化合物 **Az3**。
 $C_{25}H_{30}BF_2N_5O_2$, 橙紅色固體, 熔點 $156-158^\circ C$ (分解); TLC (EtOAc/己烷, 1:4) $R_f = 0.41$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.09 (1 H, d, $J = 1.4$ Hz), 5.85 (1 H, d, $J = 1.4$ Hz), 4.64 (3 H, s), 3.95 (3 H, s), 2.49 (6 H, s), 2.26 (4 H, q, $J = 7.5$ Hz), 1.26 (6 H, s), 0.94 (6 H, t, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 160.4, 155.2, 154.56, 154.53, 137.6, 137.3, 133.1, 130.4, 128.4, 118.2, 100.6, 65.6, 56.9, 17.0, 14.5, 12.5, 12.0; $C_{25}H_{31}BF_2N_5O_2$ 之HRMS計算值: 482.2539, 實驗值: m/z 482.2542 $[M + H]^+$ 。

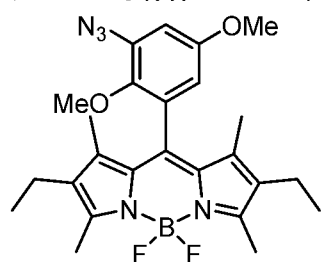
8-(5-疊氮基-2,3-二甲氧苯基)-2,6-二乙基-4,4-二氟基-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(Az4).



以兩個步驟自化合物 **4** 製備呈 54% 產率之化合物 **Az4**。
 $C_{25}H_{30}BF_2N_5O_2$, 暗紅色固體, 熔點 $158-160^\circ C$ (分解); TLC (EtOAc/己烷, 1:4) $R_f = 0.48$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 8.18 (1 H, s), 6.82 (1 H, s),

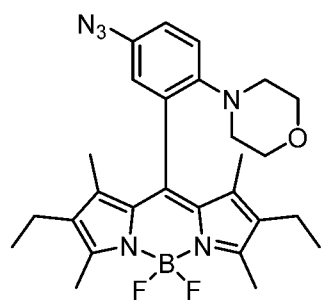
3.94 (3 H, s), 3.88 (3 H, s), 2.54 (6 H, s), 2.29 (4 H, q, $J = 7.6$ Hz), 1.43 (6 H, s), 0.97 (6 H, t, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 163.1, 154.4, 153.1, 152.9, 137.3, 134.1, 133.2, 130.6, 129.3, 125.1, 97.6, 60.8, 56.1, 17.1, 14.6, 12.6, 11.7; $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_2$ 之HRMS計算值: 482.2539, 實驗值: m/z 482.2541 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

8-(3-疊氮基-2,5-二甲氧苯基)-2,6-二乙基-4,4-二氟基-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(Az5).



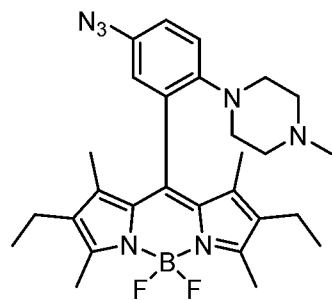
以兩個步驟自化合物 **5** 製備呈 54% 產率之化合物 **Az5**。
 $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_2$, 暗紅色固體, 熔點150-152°C (分解); TLC (CH_2Cl_2 /己烷, 1:4) $R_f = 0.45$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.16 (1 H, d, $J = 3.2$ Hz), 5.81 (1 H, d, $J = 3.2$ Hz), 4.42 (3 H, s), 3.72 (3 H, s), 2.55 (6 H, s), 2.32 (4 H, q, $J = 7.6$ Hz), 1.52 (6 H, s), 0.99 (6 H, t, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 160.0, 156.7, 154.7, 154.4, 137.3, 134.1, 133.1, 133.0, 130.6, 126.0, 90.7, 66.1, 55.8, 17.1, 14.6, 12.6, 11.8; $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_2$ 之HRMS計算值: 482.2539, 實驗值: m/z 482.2543 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

8-(5-疊氮基-2-嗎啉基苯基)-2,6-二乙基-4,4-二氟基-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(Az6).



以兩個步驟自化合物 **6** 製備呈 62% 產率之化合物 **Az6**。
 $C_{27}H_{33}BF_2N_6O$, 暗紅色油狀物; TLC (EtOAc/己烷, 1:4) $R_f = 0.4$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.06 (1 H, dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz), 7.01 (1 H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.81 (1 H, d, $J = 2.7$ Hz), 3.48 (4 H, t, $J = 4.4$ Hz), 2.94 (4 H, t, $J = 4.4$ Hz), 2.51 (6 H, s), 2.30 (4 H, q, $J = 7.6$ Hz), 1.39 (6 H, s), 0.97 (6 H, t, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 153.8, 147.3, 137.4, 134.9, 132.9, 131.0, 130.2, 121.1, 120.6, 120.5, 67.1, 51.6, 17.1, 14.6, 12.6, 11.7; $C_{27}H_{34}BF_2N_6O$ 之HRMS計算值: 507.2855, 實驗值: m/z 507.2858 [M + H]⁺。

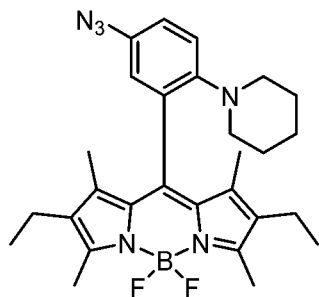
8-[5-疊氨基-2-(4-甲基哌嗪基)苯基]-2,6-二乙基-4,4-二氟基-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(Az7).



以兩個步驟自化合物 **7** 製備呈 72% 產率之化合物 **Az7**。 $C_{28}H_{36}BF_2N_7$, 暗紅色泡沫; TLC (MeOH/ CH_2Cl_2 , 1:19) $R_f = 0.33$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.06-7.01 (2 H, m), 6.80 (1 H, s), 2.99 (4 H, br s), 2.51 (6 H, s), 2.32-2.26 (8 H, m), 2.18 (3 H, s), 1.38 (6 H, s), 0.97 (6 H, t, $J = 7.4$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 153.8, 146.8, 137.4, 135.3, 133.0, 131.2,

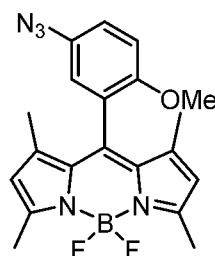
130.2, 121.4, 121.0, 120.5, 54.7, 50.1, 45.0, 17.1, 14.7, 12.6, 11.7;
 $C_{28}H_{37}BF_2N_7$ 之HRMS計算值: 520.3172, 實驗值: m/z 520.3177 $[M + H]^+$ 。

8-(5-疊氮基-2-哌啶基苯基)-2,6-二乙基-4,4-二氟基-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(Az8).



以兩個步驟自化合物**8**製備呈69%產率之化合物**Az8**。 $C_{28}H_{35}BF_2N_6$, 暗紅色油狀物; TLC (EtOAc/己烷, 1:4) $R_f = 0.67$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.07 (1 H, dd, $J = 8.7, 2.6$ Hz), 7.03 (1 H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.82 (1 H, d, $J = 2.6$ Hz), 2.94 (4 H, t, $J = 5.2$ Hz), 2.56 (6 H, s), 2.34 (4 H, q, $J = 7.6$ Hz), 1.44 (6 H, s), 1.43-1.38 (6 H, m), 1.02 (6 H, t, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 153.3, 148.9, 138.2, 137.5, 133.8, 132.6, 130.7, 130.4, 121.0, 120.8, 120.3, 52.6, 26.2, 24.1, 17.1, 14.6, 12.5, 11.7; $C_{28}H_{36}BF_2N_6$ 之HRMS計算值: 505.3063, 實驗值: m/z 505.3066 $[M + H]^+$ 。

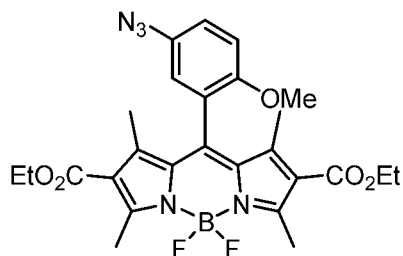
8-(5-疊氮基-2-甲氧基苯基)-4,4-二氟基-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(Az9).



以兩個步驟自化合物**9**製備呈71%產率之化合物**Az9**。 $C_{20}H_{20}BF_2N_5O$, 暗紅色固體, 熔點152-154°C (分解); TLC (EtOAc/己烷,

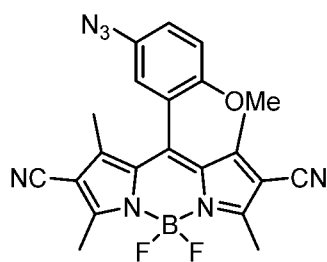
1:4) $R_f = 0.51$; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.08 (1 H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.96 (1 H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.84 (1 H, s), 5.95 (2 H, s), 3.74 (3 H, s), 2.53 (6 H, s), 1.46 (6 H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 155.4, 153.8, 142.3, 137.1, 133.5, 131.2, 125.3, 121.1, 120.7, 120.3, 112.5, 56.0, 14.6, 13.9; $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}$ 之HRMS計算值: 396.1807, 實驗值: m/z 396.1805 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

8-(5-疊氮基-2-甲氧苯基)-2,6-二乙氧羰基-4,4-二氟基-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(Az10).



自化合物 **Am10** 製備呈 58% 產率之化合物 **Az10**。 $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_5$, 紅色固體, 熔點 $86-88^\circ\text{C}$; TLC (EtOAc/己烷, 3:7) $R_f = 0.41$; $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.14 (1 H, dd, $J = 8.8, 2.8$ Hz), 6.99 (1 H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.79 (1 H, d, $J = 2.8$ Hz), 4.26 (4 H, q, $J = 7.1$ Hz), 3.75 (3 H, s), 2.80 (6 H, s), 1.76 (6 H, s), 1.31 (6 H, t, $J = 7.1$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 164.3, 159.4, 153.5, 146.9, 141.4, 134.2, 131.3, 124.7, 122.3, 121.4, 119.8, 112.7, 60.2, 56.1, 15.0, 14.3, 13.0; $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_5$ 之HRMS計算值: 540.2230, 實驗值: m/z 540.2227 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

8-(5-疊氮基-2-甲氧苯基)-2,6-二氟基-4,4-二氟基-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(Az11).

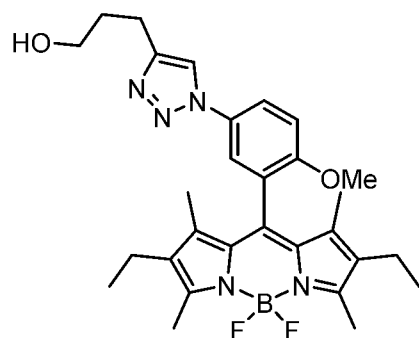


以兩個步驟自化合物 **11** 製備呈 61% 產率之化合物 **Az11**。
 $C_{22}H_{18}BF_2N_7O$, 紅色固體, 熔點 141-143°C (分解); TLC (CH_2Cl_2 /己烷, 7:3) $R_f = 0.31$; 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.21 (1 H, dd, $J = 8.9, 2.3$ Hz), 7.06 (1 H, d, $J = 8.9$ Hz), 6.77 (1 H, d, $J = 2.3$ Hz), 3.77 (3 H, s), 2.70 (6 H, s), 1.67 (6 H, s); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 158.6, 151.9, 147.7, 141.8, 133.6, 130.4, 121.6, 121.2, 118.2, 112.5, 112.1, 105.4, 55.3, 12.9, 12.4; $C_{22}H_{19}BF_2N_7O$ 之HRMS計算值: 446.1712, 實驗值: m/z 446.1714 [$M + H$] $^+$ 。

疊氮基-BODIPY與4-戊炔-1-醇之銅(I)催化之疊氮化物-炔環加成反應之程序。

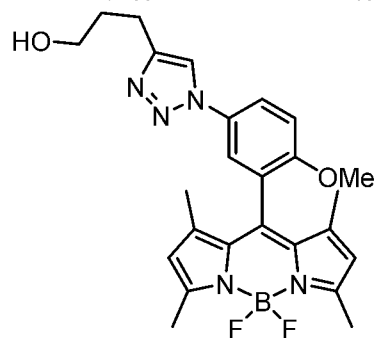
將疊氮基-BODIPY (**Az2**或**Az9-Az11**, 0.1 mmol)及4-戊炔-1-醇(0.1 mmol)溶解於THF (5 mL)中。添加新製備的1 M抗壞血酸鈉溶液(0.2 mmol於0.2 mL水中), 隨後添加銅(II)五水合物(0.005 mmol於0.1 mL水中)。藉由添加甲醇(0.5 mL)使混合物達到均勻性, 且接著在室溫下攪拌12 h。TLC監測展示反應物在12 h內完全消耗。在蒸發溶劑之後, 藉由在矽膠上藉由用EtOAc/己烷溶離進行管柱層析來純化殘餘物, 得到相應三唑產物 **T2**及**T9-T11**。

2,6-二乙基-4,4-二氟基-8-{3-[4-(3-羥丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基]-2-甲氧苯基}-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(T2**)。**



自化合物 **Az2** 製備呈 71% 產率之化合物 **T2**。C₂₉H₃₆BF₂N₅O₂, 紅色固體, 熔點 180-182°C; TLC (EtOAc/己烷, 1:1) *R_f* = 0.15; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (1 H, dd, *J* = 8.9, 2.7 Hz), 7.66 (1 H, s), 7.46 (1 H, d, *J* = 2.7 Hz), 7.10 (1 H, *J* = 8.9 Hz), 3.83 (3 H, s), 3.73 (2 H, t, *J* = 6.1 Hz), 2.88 (2 H, t, *J* = 7.3 Hz), 2.51 (6 H, s), 2.28 (4 H, q, *J* = 7.5 Hz), 1.98-1.96 (2 H, m), 1.38 (6 H, s), 0.97 (6 H, t, *J* = 7.5 Hz); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 156.8, 154.0, 148.3, 137.5, 134.7, 132.8, 131.3, 130.5, 125.9, 122.6, 121.9, 119.1, 112.0, 61.8, 56.1, 31.8, 22.0, 17.0, 14.6, 12.5, 11.4; C₂₉H₃₇BF₂N₅O₂之HRMS計算值: 536.3008, 實驗值: *m/z* 536.3005 [M + H]⁺。

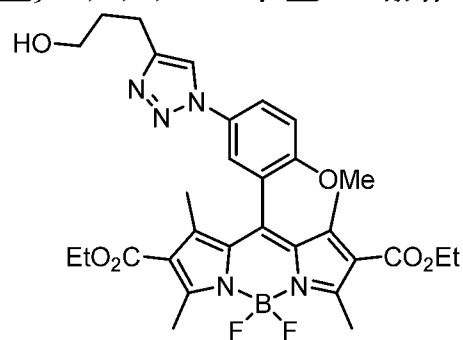
4,4-二氟基-8- $\{3-[4-(3-羥丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基]-2-甲氧苯基\}$ -1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(T9).



自化合物 **Az9** 製備呈 79% 產率之化合物 **T9**。C₂₅H₂₈BF₂N₅O₂, 紅色固體, 熔點 165-167°C; TLC (EtOAc/己烷, 7:3) *R_f* = 0.23; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (1 H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.66 (1 H, s), 7.49 (1 H, s), 7.11 (1 H,

d, $J = 8.8$ Hz), 5.97 (2 H, s), 3.83 (3 H, s), 3.73 (2 H, q, $J = 5.3$ Hz), 2.88 (2 H, t, $J = 7.3$ Hz), 2.54 (6 H, s), 1.99-1.95 (2 H, m), 1.47 (6 H, s); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 156.5, 155.7, 148.4, 142.2, 136.3, 131.3, 131.2, 125.0, 122.7, 121.7, 121.2, 119.0, 112.1, 61.7, 56.1, 31.8, 22.0, 14.6, 14.1; $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_2$ 之HRMS計算值: 480.2382, 實驗值: m/z 480.2379 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

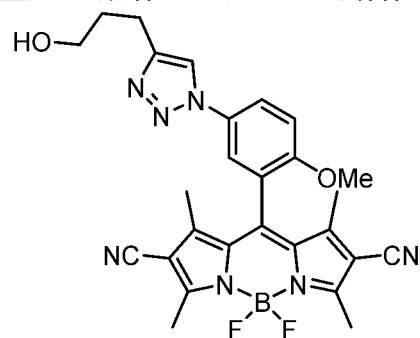
2,6-二乙氧羰基-4,4-二氟基-8- $\{3-[4-(3-羥丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基]-2-甲氧羰基\}-1,3,5,7-四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(T10)$ 。



自化合物**Az10**製備呈90%產率之化合物**T10**。 $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_6$, 紅色固體, 熔點 $157-159^\circ\text{C}$; TLC (EtOAc/己烷, 4:1) $R_f = 0.32$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (1 H, dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz), 7.67 (1 H, s), 7.49 (1 H, d, $J = 2.6$ Hz), 7.14 (1 H, d, $J = 8.9$ Hz), 4.26 (4 H, q, $J = 7.1$ Hz), 3.84 (3 H, s), 3.73 (2 H, q, $J = 5.8$ Hz), 2.88 (2 H, t, $J = 7.3$ Hz), 2.81 (6 H, s), 1.99-1.94 (2 H, m), 1.79 (6 H, s), 1.31 (6 H, t, $J = 7.1$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 164.2, 159.6, 156.3, 148.5, 146.7, 140.6, 131.7, 131.3, 124.5, 123.3, 122.5, 121.4, 119.0, 112.3, 61.6, 60.3, 56.3, 31.8, 21.9, 15.0, 14.2, 13.1; $\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{BF}_2\text{N}_5\text{O}_6$ 之HRMS計算值: 624.2805, 實驗值: m/z 624.2801 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

2,6-二氟基-4,4-二氟基-8- $\{3-[4-(3-羥丙基)-1H-1,2,3-三唑-1-基]-1,3,5,7-$

四甲基-4-硼雜-3a,4a-二氮雜-s-二環戊二烯并苯(T11).



自化合物 **Az11** 製備呈 78% 產率之化合物 **T11**。C₂₇H₂₆BF₂N₇O₂, 紅色固體, 熔點 175-177°C (分解); TLC (EtOAc) *R_f* = 0.42; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (1 H, dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz), 7.71 (1 H, s), 7.58 (1 H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.20 (1 H, d, *J* = 9.0 Hz), 3.86 (3 H, s), 3.73 (2 H, t, *J* = 6.1 Hz), 2.89 (2 H, t, *J* = 7.3 Hz), 2.71 (6 H, s), 1.99-1.95 (2 H, m), 1.69 (6 H, s); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 159.9, 155.7, 148.7, 148.6, 142.0, 131.9, 131.4, 123.7, 122.5, 121.0, 118.9, 113.4, 112.6, 106.5, 61.7, 56.5, 31.8, 22.0, 13.9, 13.6; C₂₇H₂₇BF₂N₇O₂ 之 HRMS 計算值: 530.2287, 實驗值: *m/z* 530.2289 [M + H]⁺。

實例 3：生物分子偵測及成像

光譜量測

在 25 ± 0.1°C 下使用路徑長度為 1-cm 之光析槽在乙醇中進行胺基-BODIPY **Am10**、疊氮基-BODIPY **Az2** 及 **Az9-Az11** 以及相應三唑基-BODIPY **T2** 及 **T9-T11** 之所有光譜量測。所有溶液在量測之前在氬氣下脫氣幾分鐘。對於各實驗，激發及發射之狹縫寬度為 2.0 nm。在 0.07 至 0.7 之吸收率範圍內 (*l* = 10 cm) 量測吸收光譜。在螢光計及 UV-Vis 儀器上進行螢光量子產率量測。藉由比較校正發射光譜下之面積獲得相對量子效率。所報導的量子產率根據以下方程式計算為 4 個點之平均值：

$$\Phi_{\text{樣品}} = \Phi_{\text{標準}} (A_{\text{標準}} / A_{\text{樣品}}) (F_{\text{樣品}} / F_{\text{標準}}) (n_{\text{樣品}} / n_{\text{標準}})^2$$

其中「 Φ 」為量子產率，「 A 」為在激發頻率處之吸收率，「 F 」為發射曲線下之積分面積，且「 n 」為所用溶劑之折射率。0.1 M NaOH水溶液中之螢光素($\Phi_f = 0.85$)及乙醇中之若丹明(Rhodamine) 6G ($\Phi_f = 0.95$)為螢光標準。(Parker, C. A.; Rees, W. T. *Analyst* **1960**, *85*, 587-600 ; Kubin, R. F.; Fletcher, A. N. *J. Luminescence* **1982**, *27*, 455-462。)

微量滴定盤中之CuAAC反應之螢光篩檢之程序

96孔黑色底部微量滴定盤用於實驗，且使用Molecular Devices Spectramax M5光譜儀進行螢光量測。在上方列中，各孔含有於EtOH/水(1:1)中之200 μ L疊氮基-BODIPY (**Az1-Az8**) (15 μ M)。在下方列中，各孔中之總體積為200 μ L，含有疊氮基-BODIPY (**Az1-Az8**) (15 μ M)、4-戊炔-1-醇(75 μ M)、CuSO₄ (150 μ M)、抗壞血酸鈉(300 μ M)及tris-三唑配位體(150 μ M)於EtOH/水(1:1)中之溶液。如藉由TLC或MS分析監測，盤在室溫下培育6 h，且接著當場進行螢光量測($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$)。可在365 nm下用UV燈照射之後辨別螢光或非螢光三唑化合物之形成(圖2)。

標記有AzBOCEt (**Az10**)之蛋白質

對於蛋白質標記實驗，將60 μ g/mL炔基官能化BSA及90:10 pH 7.4 PBS/DMSO中之未修飾BSA用100 μ M tris-三唑配位體、1 mM CuSO₄、2 mM新製備的抗壞血酸鈉及0至100 μ M **Az10**在室溫下在暗處培育1 h。將各混合物(30 μ L)與含有5% β -巰基乙醇之10 μ L (4 \times) SDS負載染料混合，且將40 μ L各混合物逐漸載到4%至12% Bis-Tris凝膠上。使凝膠在100 V下運行2.5 h。凝膠使用Typhoon 9400可變模式影像器(Amersham BioScience)成像($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 526 \text{ nm}$)且用庫馬斯藍染色(圖5)。

細胞中之螢光標記之顯微鏡分析

將CL1-5細胞接種於腔室載片上(1×10^4 個細胞/1 mL/孔)，且在培養基(補充有10% FBS、100 U/mL青黴素、100 μ g/mL鏈黴素、1 mM L-麩醯胺酸及1 mM丙酮酸鈉之RPMI-1640)中用100 μ M各別炔基糖或對照物培育3天。炔基糖包括全乙醯化炔基-*N*-乙醯甘露糖胺(Ac₄ManNAI)、全乙醯化炔基-*N*-乙醯半乳糖胺(Ac₄GalNAI)及全乙醯化炔基-*N*-乙醯葡萄糖胺(Ac₄GlcNAI)。對照糖包括全乙醯化-*N*-乙醯甘露糖胺(Ac₄ManNAc)、全乙醯化-*N*-乙醯半乳糖胺(Ac₄GalNAc)及全乙醯化-*N*-乙醯葡萄糖胺(Ac₄GlcNAc)。

為了偵測AzBOCEt (Az10)對糖類似物處理過之細胞之標記，將糖處理過之細胞用PBS洗滌，在室溫下用3%多聚甲醛在PBS中固定20 min，在室溫下用0.2% Triton X-100在PBS中透化20 min，且在室溫下用3%牛血清白蛋白在PBS中阻斷30 min。為了觀測細胞中之螢光標記炔標誌糖基共軛物，用具有50%乙醇之PBS緩衝液中之0.1 μ M AzBOCEt (Az10)、100 μ M tris-三唑配位體、1 mM CuSO₄及2 mM抗壞血酸鈉將細胞在室溫下培育1h。藉由使用共焦雷射掃描顯微鏡在496-nm激發下獲取細胞之螢光影像。為了識別炔基-聚糖之位置，進一步用抗GRASP65隨後Cy3共軛抗兔(對於高爾基體)及赫斯特(對於細胞核)染色探針標記細胞(圖6)。

細胞提取物中之炔標誌唾液酸糖蛋白之偵測及識別

將自經100 μ M Ac₄ManNAc或Ac₄ManNAI處理3天之CL1-5細胞收穫之細胞提取物(20 μ g)用指定濃度之Az10、100 μ M tris-三唑配位體、^{S3} 1 mM CuSO₄及2 mM抗壞血酸鈉在室溫下培育1 h，進行CuAAC反應。進一步藉由SDS-PAGE分離反應提取物且用Typhoon 9400可變模式影像器

(Amersham BioScience)偵測螢光信號($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 526 \text{ nm}$)。用庫馬斯藍染色之蛋白質條帶表示內參考物(圖7)。

將含有標記有螢光信號之蛋白質之指定12個條帶切除且切成小片。用50 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ 1:1 (v/v)使凝膠片脫色，且接著用25 mM NH_4HCO_3 中之10 mM二硫蘇糖醇(DTT)在56°C下再水合45 min。移除過量DTT且在室溫下在暗處添加25 mM NH_4HCO_3 中之55 mM碘乙醯胺(IAA)歷時30 min用以烷基化。移除過量IAA且將凝膠用50 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{CH}_3\text{CN}$ 1:1 (v/v)洗滌兩次，且在使用真空離心乾燥之後經 CH_3CN 乾燥。將新製備的胰蛋白酶溶液(5 ng/ μL 於25 mM NH_4HCO_3 中，40 μL)添加至各凝膠片，且將凝膠片升溫至37°C後維持18 h。用含有50% CH_3CN (50 μL)之1%三氟乙酸(TFA)水溶液將消化的肽在音波處理10 min下提取兩次。使用真空離心將合併之提取物及洗滌液濃縮3 h以移除揮發物。如表2中所示分析消化肽且用混合線性離子阱四極傅里葉(fourier)-轉移(LTQ-FT)質譜儀識別。

表2.藉由質譜分析識別細胞提取物中之唾液酸醣蛋白。藉由寄存編號對蛋白質列表且列出彼等蛋白質發現的肽編號(肽編號(# of Pep.))。

條帶	編號	基因名稱	蛋白質名稱	寄存編號	肽編號
1	1-1	IGF2R	陽離子獨立甘露糖-6-磷酸受體	IPI00289819	13
4	4-1	COLGALT1	原膠原半乳糖基轉移酶1	IPI00168262	16
	4-2	PRKCSH	葡糖苷酶2次單元 β	IPI00026154 IPI00792916	19
	4-3	FKBP10	肽基-脯胺醯基順反異構酶 FKBP10	IPI00303300	22
	4-4	SLC1A1	中性胺基酸轉運蛋白B(0)	IPI00019472 IPI00922487 IPI00922776	6
	4-5	RPN1	核糖體結合糖蛋白-1	IPI00025874	1
5	5-1	P4HA1	脯胺醯基4-羥化酶次單元 α -1	IPI00009923 IPI00218682 IPI00916535	14
	5-2	OIT3	癌蛋白誘導之轉錄3蛋白	IPI00328215 IPI00855752	4

第 102 頁(發明說明書)

6	6-1	NCLN	Nicalin	IPI00470649 IPI00607732	4
7	7-1	ERO1L	ERO1樣蛋白 α	IPI00386755	4
8	8-1	NCEH1	中性膽固醇酯水解酶1	IPI00002230 IPI00790972 IPI00924788	4
	8-2	SERPINH1	絲胺酸蛋白酶抑制蛋白H1	IPI00032140	3
	8-3	SIGLEC7	唾液酸結合之Ig樣凝集素7	IPI00004288 IPI00220858 IPI00220860 IPI00220862	2
9	9-1	ERLIN1	Erlin-1	IPI00007940	18
	9-2	DNAJB11	DnaJ同源子族B成員11	IPI00074870	9
	9-3	AHSG	α -2-HS-糖蛋白	IPI00953689	6
	9-4	RCN1	網鈣結合蛋白-1	IPI00015842	1
	9-5	IMPAD1	肌醇單磷酸酶3	IPI00787853	2
	9-6	IKBIP	核因子 κ -B激酶之抑制劑的相互作用蛋白	IPI00043598 IPI00401792 IPI00797136 IPI00896464	4
10	10-1	CTSL	組織蛋白酶L1	IPI00012887	7
	10-2	TOR1B	耐扭蛋白-1B	IPI00023137	1
11	11-1	SUMF2	硫酸酯酶修飾因子2	IPI00334513 IPI00334514 IPI00334516 IPI00783919 IPI00939930	5
	11-2	CNPY3	蛋白冠層同源物3	IPI00398366 IPI00551062	4
	11-3	PPT1	軟脂醯基蛋白硫酯酶1	IPI00002412	2
	11-4	SSR1	轉位子相關蛋白次單元 α	IPI00301021 IPI00449669	2
12	12-1	PSMA1	蛋白酶體次單元 α 1型	IPI00016832 IPI00472442	30
	12-2	CTXZ	組織蛋白酶Z	IPI00002745	3

細胞中之雙螢光標記之顯微鏡分析

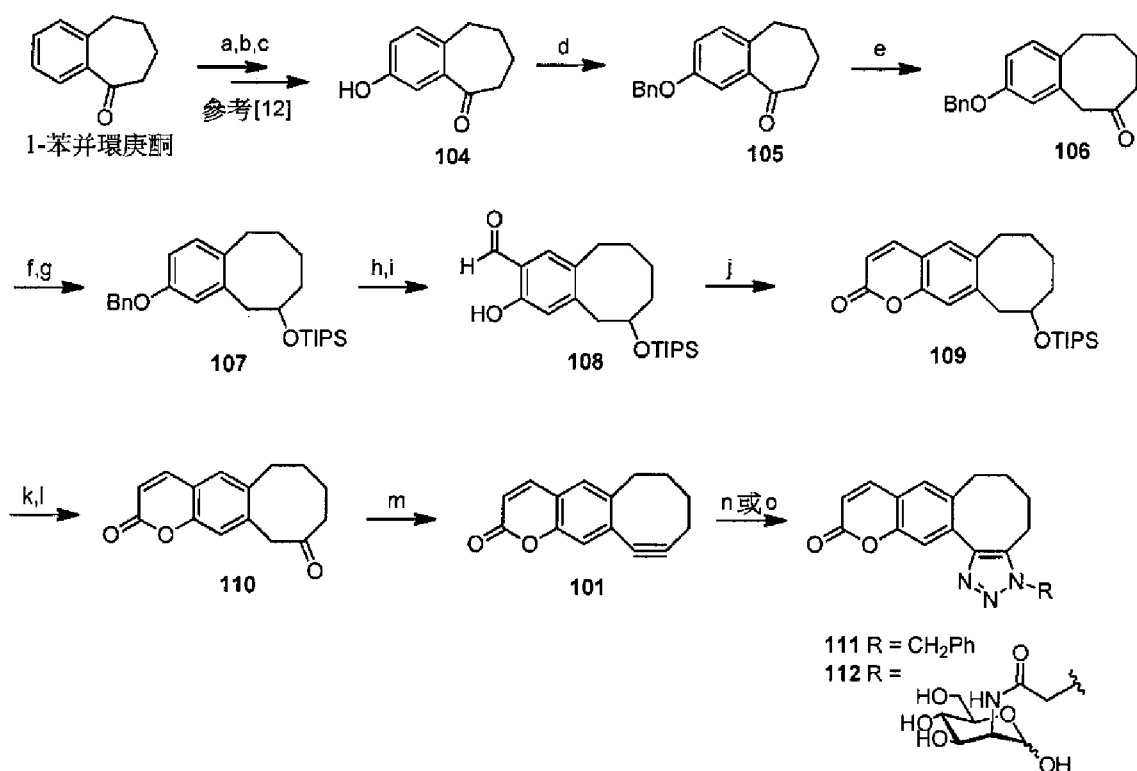
將CL1-5細胞接種於腔室載片上(2.5×10^4 個細胞/0.5 mL/孔)，且在培養基(補充有10% FBS、100 U/mL青黴素、100 μ g/mL鏈黴素、1 mM L-麩醯胺酸及1 mM丙酮酸鈉之RPMI-1640)中用100 μ M炔基糖(全乙醯化炔基-N-乙醯甘露糖胺，Ac₄ManNA1)或疊氮基糖(全乙醯化疊氮基-N-乙醯葡萄糖胺，Ac₄GlcNAz)或兩者培育3天或無糖作為陰性對照。將細胞用PBS洗

滌三次且接著在37°C下用100 μ M coumOCT在具有10% DMSO之PBS中培育30 min。在用具有10% DMSO之PBS洗滌三次之後，隨後在室溫下用3%多聚甲醛在PBS中固定20 min，在室溫下將細胞用0.1 μ M AzBOCEt (Az10)、100 μ M配位體、1 mM CuSO₄及2 mM抗壞血酸鈉在具有50%乙醇之PBS中培育1 h且使用共焦顯微鏡(TCS-SP5-MP-SMD, Leica)完成細胞之螢光影像(圖9)。

實例4：環辛炔官能化螢光探針101之合成：

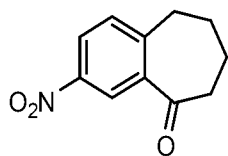
流程100展示使用1-苯并環庚酮作為起始材料進行化合物**101**之合成。根據先前所報導之程序，¹² 1-苯并環庚酮在8-位置處經受區域選擇性硝化。接著還原硝基，隨後在酸性條件下進行重氮化及羥基化，得到醇**104**。在以苄基醚形式保護羥基之後，藉由在BF₃·OEt₂存在下用TMS-重氮甲烷處理使環酮**105**經歷擴環，得到呈73%產率之環辛酮產物**106**。用NaBH₄還原羰基，隨後矽烷化，得到呈96%產率之矽烷基醚**107**。藉由氫化移除**107**中之苄基，且用過量多聚甲醛在Et₃N及MgCl₂存在下處理酚中間物以形成柳醛**108**。藉由用新製備的亞烯酮基三苯基磷烷處理**108**來建構**109**之香豆素架構。在去矽烷化及氧化之後，獲得呈78%產率之酮**110**。將化合物**110**中之羰基轉化成烯醇三氟甲磺酸酯，隨後用強鹼NaHMDS處理以呈現消除反應，得到coumOCT探針**101**。

流程100.基於SPAAC之螢光形成探針**101**及相應三唑**111**及**112**之合成。



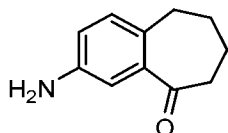
試劑及條件：(a)濃H₂SO₄、KNO₃，0℃，1.5 h，72%；(b) Sn、濃鹽酸、C₂H₅OH，回流，50 min，82%；(c) 10%H₂SO₄水溶液、NaNO₂，0℃至室溫，72 h，76%；(d) BnBr、K₂CO₃、DMF，室溫，24 h，98%；(e) TMSCHN₂、BF₃·OEt₂、CH₂Cl₂，0℃，12 h，73%；(f) NaBH₄、CH₃OH，0℃，1 h；(g) TIPSOTf、2,6-二甲基吡啶、CH₂Cl₂，室溫，1 h，兩個步驟96%；(h) H₂、Pd/C、CH₃OH、EtOAc，1 h；(i)多聚甲醛、MgCl₂、Et₃N、CH₃CN，回流，12 h，兩個步驟87%；(j) Ph₃P=C=C=O、甲苯，90℃，1.5 h，83%；(k) TBAF、THF，0℃至室溫，1 h；(l) (COCl)₂、DMSO、Et₃N、CH₂Cl₂，-78℃至室溫，1 h，兩個步驟78%；(m) NaHMDS、Tf₂NPh，-78℃至室溫，2 h，44%；(n) BnN₃ (1.5當量)、CH₃CN，室溫，2 h，95%；(o) *N*-疊氮基乙醯甘露糖胺(1.5當量)、MeOH、H₂O，室溫，2 h，92%。

3-硝基-6,7,8,9-四氫苯并環庚烯-5-酮(A).



將1-苯并環庚酮(4.0 g, 25 mmol)於濃H₂SO₄ (28 mL)中之溶液在0°C下冷卻，且歷經30 min時段逐滴添加KNO₃ (2.8 g, 27.7 mmol)於濃H₂SO₄ (7.5 mL)中之溶液。將混合物在0°C下攪拌額外1 h，且接著傾入碎冰中。過濾沈澱物，用水洗滌且風乾，產生黃色固體。藉由矽膠上管柱層析(EtOAc/己烷，1:4)純化粗產物，得到純硝基產物A (3.69 g, 72%)。C₁₁H₁₁NO₃，白色針狀物，熔點90-92°C (文獻^{S2}熔點89-90°C)；TLC (EtOAc/己烷，1:4) *R_f* = 0.31；¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.53 (1 H, d, *J* = 2.5 Hz), 8.22 (1 H, dd, *J* = 8.3, 2.5 Hz), 7.37 (1 H, d, *J* = 8.3 Hz), 3.01 (2 H, t, *J* = 6.4 Hz), 2.77 (2 H, t, *J* = 6.1 Hz), 1.94-1.90 (2 H, m), 1.85-1.81 (2 H, m)；¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 203.4, 148.0, 147.0, 139.8, 131.0, 126.2, 123.9, 40.4, 32.4, 24.7, 20.5；C₁₁H₁₂NO₃之HRMS計算值: 206.0812, 實驗值: *m/z* 206.0814 [M + H]⁺。

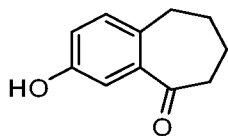
3-氨基-6,7,8,9-四氫苯并環庚烯-5-酮(B).



將硝基化合物A (2.05 g, 10 mmol)及Sn (8.31 g, 70 mmol)於濃鹽酸(45 mL)及乙醇(25 mL)中之混合物在回流下加熱50 min。將混合物冷卻到室溫，且用30% NaOH水溶液鹼化。經由矽藻土墊過濾混合物，且用乙醇洗滌。用EtOAc (5 × 50 mL)萃取濾液。合併之有機萃取物用鹽水(100 mL)洗滌，經MgSO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮，得到分析純氨基產物B (1.44 g, 82%)。C₁₁H₁₃NO，淡黃色固體，熔點102-104°C (文獻^{S2}熔點103-105°C)；TLC (EtOAc/己烷，3:7) *R_f* = 0.29；¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ

7.02 (1 H, d, $J = 2.6$ Hz), 6.96 (1 H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.72 (1 H, dd, $J = 8.0, 2.6$ Hz), 3.65 (2 H, br s, NH), 2.79 (2 H, t, $J = 5.5$ Hz), 2.67 (2 H, t, $J = 6.6$ Hz), 1.81-1.74 (4 H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 206.2, 144.9, 139.3, 131.6, 130.7, 118.8, 114.5, 40.8, 31.5, 25.4, 20.9; $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}$ 之HRMS計算值: 176.1070, 實驗值: m/z 176.1069 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

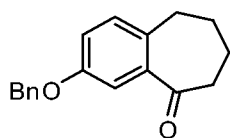
3-羥基-6,7,8,9-四氫苯并環庚烯-5-酮(104).



向胺基化合物**B** (1.45 g, 8.3 mmol)於 H_2SO_4 (40 mL於10%水溶液中)中之冷(0°C)溶液中小心地添加水(3 mL)中之 NaNO_2 水溶液(687 mg, 9.96 mmol)。將反應混合物在0°C下攪拌30 min, 且接著添加胺磺酸以破壞過量亞硝酸。過濾懸浮液且將濾液傾入10% H_2SO_4 水溶液(100 mL)及甲苯(50 mL)中。將混合物在室溫下攪拌3天。接著分離各層且用EtoAc (5 × 30 mL)萃取水層。用鹽水(100 mL)洗滌合併之有機萃取物, 經 MgSO_4 乾燥, 過濾且在減壓下濃縮。藉由矽膠上管柱層析(EtOAc/己烷, 1:4)純化粗產物, 得到分析純醇產物**104** (1.11 g, 76%)。 $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2$, 黃色固體, 熔點98-100°C (文獻^{S3}熔點96-99°C); TLC (EtOAc/己烷, 3:7) $R_f = 0.37$; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.33 (1 H, d, $J = 2.8$ Hz), 7.07 (1 H, d, $J = 8.2$ Hz), 6.94 (1 H, dd, $J = 8.2, 2.8$ Hz), 6.27 (1 H, s, OH), 2.84 (2 H, t, $J = 5.7$ Hz), 2.72 (2 H, t, $J = 6.4$ Hz), 1.86-1.76 (4 H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 206.7, 154.7, 139.2, 133.9, 131.3, 119.8, 114.9, 40.8, 31.6, 25.3, 20.8; $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_2$ 之HRMS計算值: 177.0910, 實驗值: m/z 177.0911 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

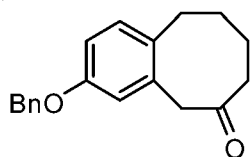
3-苄氧基-6,7,8,9-四氫苯并環庚烯-5-酮(105).

第 107 頁(發明說明書)



用苄基溴(1 mL, 8.4 mmol)及碳酸鉀(2.1 g, 15.2 mmol)處理醇化合物**104** (1.25 g, 7.1 mmol)於無水DMF (10 mL)中之溶液。將懸浮液在室溫下劇烈攪拌24 h。將混合物傾入水(20 mL)中且用Et₂O (4 × 30 mL)萃取，用水(3 × 20 mL)及鹽水(100 mL)洗滌合併之有機萃取物，經MgSO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。藉由矽膠上管柱層析(EtOAc/己烷, 1:9)純化粗產物，得到純苄氧基產物**105** (1.85 g, 98%)。C₁₈H₁₈O₂, 淺黃色油狀物; TLC (EtOAc/己烷, 1:9) *R_f* = 0.37; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.41 (2 H, d, *J* = 7.2 Hz), 7.37-7.35 (3 H, m), 7.31 (1 H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.10 (1 H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.02 (1 H, dd, *J* = 8.3, 2.9 Hz), 5.06 (2 H, s), 2.86 (2 H, t, *J* = 5.8 Hz), 2.71 (2 H, t, *J* = 6.2 Hz), 1.84-1.78 (4 H, m); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 205.6, 157.4, 139.5, 136.7, 134.2, 131.0, 128.5 (2 ×), 127.9, 127.5 (2 ×), 119.7, 113.2, 70.1, 40.7, 31.6, 25.3, 20.8; C₁₈H₁₉O₂之HRMS計算值: 267.1380, 實驗值: *m/z* 267.1383 [M + H]⁺。

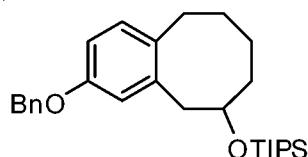
3-苄氧基-7,8,9,10-四氫-5H-苯并環辛烯-6-酮(106).



歷經1 h時段在0°C下將(三甲基矽烷基)重氮甲烷(5 mL, 約2 M己烷溶液, 10 mmol)於CH₂Cl₂ (10 mL)中之攪拌溶液逐滴添加至化合物**105** (1.6 g, 6 mmol)及BF₃·OEt₂ (820 μL, 10 mmol)於CH₂Cl₂ (20 mL)中之攪拌溶液中。將混合物在0°C下攪拌12 h, 且接著傾入碎冰中。用CH₂Cl₂ (3 × 20 mL)萃取水層。用鹽水(50 mL)洗滌合併之有機萃取物, 經MgSO₄乾燥且濃縮, 得到橙色油狀物, 其藉由矽膠上管柱層析(EtOAc/己烷, 1:19)純

化，得到純環辛酮產物**106** (1.23 g, 73%)。C₁₉H₂₀O₂，無色油狀物；TLC (EtOAc/己烷, 1:9) $R_f = 0.29$ ；¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.40 (2 H, d, $J = 7.4$ Hz), 7.37-7.34 (2 H, m), 7.31-7.29 (1 H, m), 7.09 (1 H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.84 (1 H, dd, $J = 8.4, 2.7$ Hz), 6.75 (1 H, d, $J = 2.7$ Hz), 5.01 (2 H, s), 3.72 (2 H, s), 2.74 (2 H, t, $J = 5.8$ Hz), 2.31 (2 H, t, $J = 5.3$ Hz), 1.81-1.77 (2 H, m), 1.72-1.68 (2 H, m)；¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 211.8, 157.4, 136.9, 134.7, 133.4, 131.2, 128.5 (2 ×), 127.9, 127.5 (2 ×), 116.0, 114.4, 70.0, 48.8, 41.0, 32.3, 31.5, 24.7；C₁₉H₂₁O₂之HRMS計算值：281.1536，實驗值： m/z 281.1539 [M + H]⁺。

3- 苄氧基-6-三異丙基甲矽烷氧基-5,6,7,8,9,10-六氫苯并環辛烯(107).

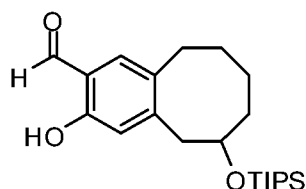


用NaBH₄ (970 mg, 25.7 mmol)處理化合物**106** (4.8 g, 17.1 mmol)於甲醇(40 mL)中之冷(0°C)溶液。將混合物在0°C下攪拌1 h，且接著在減壓下濃縮。將殘餘物溶解於CH₂Cl₂ (80 mL)中，且用1 M鹽酸水溶液(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌。有機層經MgSO₄乾燥，過濾且濃縮，提供呈無色泡沫狀之粗醇產物(4.8 g)，其不經進一步純化即用於下一步驟。

將以上製備之醇(4.8 g, 17.0 mmol)及2,6-二甲基吡啶(8 mL, 68.7 mmol)溶解於無水CH₂Cl₂ (50 mL)中，且冷卻至0°C。歷經3 min時段將三氟甲烷磺酸三異丙基矽烷酯(9.2 mL, 34.2 mmol)逐滴添加至混合物中。將混合物在室溫下攪拌1 h，且接著用CH₂Cl₂ (100 mL)稀釋。用NaHCO₃ (50 mL)飽和水溶液、1 M鹽酸水溶液(50 mL)及鹽水(50 mL)洗滌溶液。有機層經MgSO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。藉由矽膠上管柱層析

(EtOAc/己烷, 1:9)純化殘餘物, 得到純矽烷基醚產物**107** (7.2 g, 兩個步驟96%)。C₂₈H₄₂O₂Si, 無色漿狀物; TLC (EtOAc/己烷, 1:9) $R_f = 0.51$; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.41 (2 H, d, $J = 7.4$ Hz), 7.37-7.34 (2 H, m), 7.31-7.28 (1 H, m), 6.99 (1 H, dd, $J = 6.6, 2.5$ Hz), 6.75-6.74 (2 H, m), 5.01 (2 H, s), 3.96-3.93 (1 H, m), 2.91-2.83 (2 H, m), 2.77-2.72 (1 H, m), 2.65-2.61 (1 H, m), 1.76-1.72 (1 H, m), 1.71-1.64 (1 H, m), 1.50-1.41 (3 H, m), 1.18-1.15 (1 H, m), 1.07-1.05 (21 H, m); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 156.8, 138.5, 137.3, 134.1, 130.1, 128.5 (2 \times), 127.8, 127.5 (2 \times), 116.7, 112.5, 73.8, 70.0, 40.9, 34.5, 32.3, 32.0, 20.8, 18.2 (6 \times), 12.4 (3 \times); C₂₈H₄₃O₂Si之HRMS計算值: 439.3032, 實驗值: m/z 439.3022 [M + H]⁺。

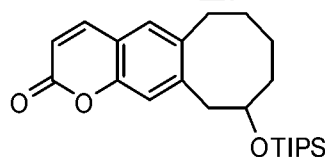
3-羥基-6-三異丙基甲矽烷氧基-5,6,7,8,9,10-六氫苯并環辛烯-2-甲醛 (108).



在氫氣氛圍下用Pd/C (100 mg)處理化合物**107** (7.1 g, 16.2 mmol)於甲醇(50 mL)及EtOAc (20 mL)中之溶液。在攪拌1 h之後, 經由矽藻土過濾混合物, 且用EtOAc沖洗。在減壓下濃縮濾液, 得到淡棕色漿狀物(5.6 g), 將其溶解於無水乙腈(150 mL)中且用無水MgCl₂ (4.64 g, 48.6 mmol)、三乙胺(13.5 mL, 97.2 mmol)及多聚甲醛(4.86 g, 162 mmol)處理。將懸浮液在回流下加熱12 h。將混合物冷卻至室溫, 且用1 M鹽酸水溶液(200 mL)使深黃色懸浮液酸化。用EtOAc (5 \times 150 mL)萃取溶液。用鹽水(200 mL)洗滌合併之有機萃取物, 經MgSO₄乾燥, 過濾且在減壓下

濃縮。藉由矽膠上管柱層析(EtOAc/己烷, 1:19)純化粗產物, 得到純柳醛產物**108** (5.3 g, 兩個步驟87%)。C₂₂H₃₆O₃Si, 淺黃色漿狀物; TLC (EtOAc/己烷, 1:9) $R_f = 0.71$; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 10.77 (1 H, s), 9.79 (1 H, s), 7.24 (1 H, s), 6.76 (1 H, s), 4.03-3.99 (1 H, m), 2.94-2.88 (2 H, m), 2.81-2.76 (1 H, m), 2.71-2.67 (1 H, m), 1.80-1.75 (1 H, m), 1.72-1.66 (1 H, m), 1.52-1.46 (2 H, m), 1.43-1.38 (1 H, m), 1.24-1.16 (1 H, m), 1.07-1.05 (21 H, m); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 195.9, 159.5, 148.2, 133.8, 133.7, 119.5, 118.8, 73.2, 41.0, 34.4, 32.2, 32.1, 20.6, 18.1 (6 ×), 12.4 (3 ×); C₂₂H₃₇O₃Si之HRMS計算值: 377.2506, 實驗值: m/z 377.2511 [M + H]⁺。

6,7,8,9,10,11-六氫-10-三異丙基甲矽烷氧基-環辛[g]吡啶-2(2H)-酮(109)

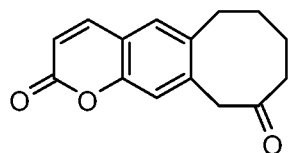


亞烯酮基三苯基磷烷之製備：在0°C下向乙氧羰基亞甲基三苯基磷烷 (10 g, 30 mmol)於無水甲苯(200 mL)中之攪拌溶液中逐滴添加六甲基二矽烷胺化鈉(17.5 mL, 2 M THF溶液, 35 mmol)溶液。一旦完成添加, 將混合物在60°C下加熱24 h。接著使反應物冷卻至室溫且過濾出。在減壓下濃縮濾液, 且接著傾入乙醚(200 mL)中。過濾沈澱物, 用乙醚洗滌且風乾, 得到呈淺黃色固體狀之亞烯酮基三苯基磷烷(5.8 g, 64%)。

在室溫下向柳醛**108** (4.3 g, 11.42 mmol)於無水甲苯(100 mL)中之攪拌溶液中添加新製備之亞烯酮基三苯基磷烷(5.2 g, 17.2 mmol)。將混合物在90°C下加熱1.5 h, 且接著在減壓下濃縮。藉由矽膠上管柱層析(EtOAc/己烷, 1:9)純化殘餘物, 得到純香豆素產物**109** (3.8 g, 83%)。

$C_{24}H_{36}O_3Si$, 無色固體, 熔點 $103-105^{\circ}C$; TLC (EtOAc/己烷, 1:9) $R_f = 0.25$;
 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.61 (1 H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.18 (1 H, s), 7.10 (1 H, s), 6.33 (1 H, d, $J = 9.5$ Hz), 4.02 (1 H, dd, $J = 11.9, 5.5$ Hz), 3.00-2.94 (2 H, m), 2.86-2.81 (1 H, m), 2.76-2.72 (1 H, m), 1.80-1.73 (1 H, m), 1.69-1.64 (1 H, m), 1.60-1.55 (1 H, m), 1.47-1.43 (2 H, m), 1.20-1.13 (1 H, m), 1.11-1.03 (21 H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 161.3, 152.3, 143.3, 142.4, 138.4, 127.8, 118.1, 117.3, 115.7, 73.3, 40.8, 34.5, 32.4, 32.0, 20.6, 18.1 (6 \times), 12.4 (3 \times); $C_{24}H_{37}O_3Si$ 之HRMS計算值: 401.2506, 實驗值: m/z 401.2511 $[M + H]^+$ 。

6,7,8,9-四氫-11H-10-側氧基-環辛[g]吡烯-2(2H)-酮(110)

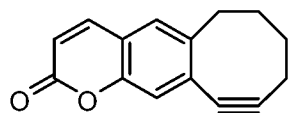


用四丁基氟化銨(10 mL, 1 M THF溶液, 10 mmol)處理化合物**109** (3.0 g, 7.5 mmol)於THF (20 mL)中之冷($0^{\circ}C$)溶液。在室溫下攪拌1 h之後, 在減壓下濃縮混合物。經由矽膠短墊(EtOAc/己烷, 1:4)過濾殘餘油狀物且濃縮濾液, 得到無色固體(1.67 g)。

在 $-78^{\circ}C$ 下在氮氣氛圍下將DMSO (1.5 mL, 21.2 mmol)於無水 CH_2Cl_2 (10 mL)中之溶液逐滴添加至乙二醯氯(0.89 mL, 10.3 mmol)於無水 CH_2Cl_2 (10 mL)中之攪拌溶液中。將混合物在 $-78^{\circ}C$ 下攪拌30 min, 且逐滴添加以上製備之無水 CH_2Cl_2 (10 mL)中之醇(1.67 g)。將混合物在 $-78^{\circ}C$ 下攪拌額外30 min, 且添加三乙胺(7.1 mL, 50.4 mmol)。使混合物升溫至 $0^{\circ}C$ 後維持30 min, 且接著傾入(40 mL)水中。用 CH_2Cl_2 (5 \times 50 mL)萃取水層。用水(100 mL)及鹽水(100 mL)洗滌合併之有機萃取物, 經

MgSO₄乾燥，過濾且在減壓下濃縮。藉由矽膠上管柱層析(EtOAc/己烷, 1:4)純化粗產物，得到所要產物**110** (1.45 g, 兩個步驟78%)。C₁₅H₁₄O₃, 無色固體，熔點127-129°C; TLC (EtOAc/己烷, 3:7) $R_f = 0.32$; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.63 (1 H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.29 (1 H, s), 7.09 (1 H, s), 6.34 (1 H, d, $J = 9.5$ Hz), 3.82 (2 H, s), 2.84 (2 H, t, $J = 5.7$ Hz), 2.31 (2 H, t, $J = 5.6$ Hz), 1.86-1.84 (2 H, m), 1.73-1.71 (2 H, m); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 209.9, 160.7, 152.6, 142.8, 138.2, 137.7, 129.0, 118.4, 117.7, 116.6, 48.8, 41.1, 32.3, 31.4, 24.5; C₁₅H₁₅O₃之HRMS計算值: 243.1016, 實驗值: m/z 243.1016 [M + H]⁺。

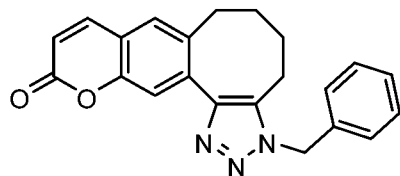
6,7,8,9-四氫-10,11-二脫氫-環辛[g]吡烯-2(2H)-酮(101)



歷經5 min時段經由注射器向化合物**110** (245 mg, 1 mmol)及*N*-苯基雙(三氟甲基磺醯亞胺) (393 mg, 1.1 mmol)於無水THF (10 mL)中之冷(-78°C)溶液中添加六甲基二矽烷胺化鈉溶液(0.55 mL, 2 M THF溶液, 1.1 mmol)。將混合物在-78°C下攪拌1 h, 且添加另一批六甲基二矽烷胺化鈉 (0.55 mL, 2 M THF溶液, 1.1 mmol)。使混合物升溫至0°C, 攪拌額外1 h, 且接著用甲醇(1 mL)淬滅。在減壓下濃縮混合物, 得到黃色漿狀物, 其藉由矽膠上管柱層析(EtOAc/己烷, 1:9)純化, 得到靶產物**101** (72 mg, 44%)。C₁₅H₁₂O₂, 淡黃色固體, 熔點98-100°C; TLC (EtOAc/己烷, 3:7) $R_f = 0.42$; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (1 H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.23 (1 H, s), 7.06 (1 H, s), 6.35 (1 H, d, $J = 9.5$ Hz), 2.81 (2 H, br s), 2.61 (2 H, t, $J = 56.7$ Hz), 2.13 (2 H, br s), 1.74 (2 H, br s); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 161.1, 152.6, 147.4, 143.3, 128.6, 127.1, 117.5, 117.4,

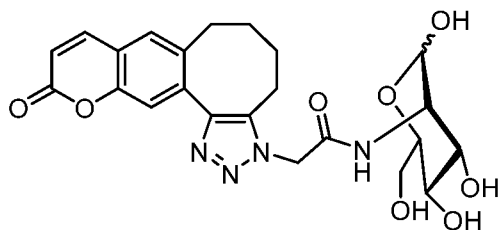
116.1, 113.9, 92.5, 38.3, 33.5, 25.5, 20.5; C₁₅H₁₃O₂之HRMS計算值: 225.0910, 實驗值: m/z 225.0910 [M + H]⁺。

10-苄基-6,7,8,9-四氫-環辛三唑并[5,4-g]吡啶-2(2H)-酮(111)



用苄基疊氮化物(44 μ L, 0.33 mmol)處理化合物**101** (50 mg, 0.22 mmol)於CH₃CN (5 mL)中之溶液。在室溫下攪拌2 h之後, 在減壓下濃縮混合物。藉由矽膠上管柱層析(EtOAc/己烷, 3:7)純化殘餘物, 得到所要三唑產物**111** (75 mg, 95%)。C₂₂H₁₉N₃O₂, 無色固體, 熔點60-62°C; TLC (EtOAc/己烷, 1:1) R_f = 0.35; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (1 H, s), 7.65 (1 H, d, J = 9.4 Hz), 7.37-7.32 (3 H, m), 7.24 (1 H, s), 7.20-7.19 (2 H, m), 6.39 (1 H, d, J = 9.4 Hz), 5.50 (2 H, s), 2.69-2.67 (2 H, m), 2.65-2.63 (2 H, m), 1.79-1.75 (2 H, m), 1.67-1.64 (2 H, m); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 161.0, 152.4, 143.1, 136.1, 135.3, 135.0, 134.4, 129.0 (2 \times), 128.7, 128.4, 128.1, 127.1 (2 \times), 126.9, 116.7, 116.4, 51.9, 30.8, 30.6, 23.9, 20.0; C₂₂H₂₀N₃O₂之HRMS計算值: 358.1550, 實驗值: m/z 358.1548 [M + H]⁺。

***N*-[2-(11-側氧基-4,6,7,11-四氫吡啶并[7',6':3,4]環辛[1,2-*d*][1,2,3]三唑-3(5*H*)-基)]乙醯胺基-2-脫氧- α,β -D-呷喃甘露糖(112)**



用*N*-疊氮基乙醯甘露糖胺(142 mg, 0.33 mmol)處理化合物**101** (50

mg, 0.22 mmol)於MeOH (5 mL)及水(1 mL)中之溶液。在室溫下攪拌2 h 之後，在減壓下濃縮混合物。藉由矽膠上管柱層析(MeOH/CH₂Cl₂, 1:9) 純化殘餘物，得到所要三唑產物**112** (98 mg, 92%)。C₂₃H₂₆N₄O₈，無色固體，熔點170-172°C (分解); TLC (MeOH/CH₂Cl₂, 1:8) $R_f = 0.25$; ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.04 (1 H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.59 (1 H, s), 7.52 (1 H, s), 6.48 (1 H, d, $J = 9.5$ Hz), 5.15 (1 H, d, $J = 2.9$ Hz), 5.11 (1 H, d, $J = 6.9$ Hz), 4.98-4.85 (1 H, m), 4.89-4.81 (2 H, m), 4.44-4.38 (1 H, m), 3.61-3.59 (3 H, m), 3.53-3.45 (2 H, m), 3.42-3.37 (1 H, m), 3.16-3.14 (2 H, m), 2.86-2.82 (2 H, m), 2.72-2.70 (2 H, m), 1.78 (2 H, br s), 1.61 (2 H, br t, $J = 5.5$ Hz); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.2, 160.1, 151.9, 143.8, 140.6, 137.0, 135.9, 134.7, 128.8, 118.6, 116.1, 115.2, 92.5, 90.4, 72.9, 72.1, 71.0, 70.5, 68.2, 67.5, 61.5, 61.0, 54.7, 54.2, 50.0, 49.9, 30.6, 29.9, 22.8, 19.6; C₂₃H₂₇N₄O₈之HRMS計算值: 487.1829, 實驗值: m/z 487.1827 [M + H]⁺。

實例5：模型受質上使用的環辛炔稠合螢光探針之量測反應範圍及動力學

為了評估化合物**101**作為基於SPAAC之螢光標記之試劑的可行性，首先研究使用苄基疊氮化物作為模型受質之其反應範圍及動力學。**101**與苄基疊氮化物在乙腈中之SPAAC反應在室溫下在2 h內完成，得到呈95%產率之三唑**111** (流程100)。藉由對¹H-NMR光譜中之多個化學位移進行積分確定**101**與苄基疊氮化物(1:1)在CD₃CN中之反應性，在25°C下產生二階速率常數0.012 M⁻¹s⁻¹。吾人亦觀測**101**與*N*-疊氮基乙醯甘露糖胺(ManNAz)之間的環加成反應，類似地進行，在25°C下在CD₃OD-D₂O溶液(5:1, v/v)中產生二階速率常數為0.010 M⁻¹s⁻¹之三唑**112** (圖17及圖18)。

表3展示在模擬生理條件(含有10% DMSO之PBS緩衝液，pH 7.4)下所記錄之**101**、**111**及**112**之吸收及螢光資料。三唑**111**及**112**之形成伴隨螢光強度之顯著增加，其中對於香豆素發射，其中大的斯托克位移(Stokes shift)在標準範圍內(圖16a)。在330 nm處激發後，探針**101**產生中心位於405 nm處之具有低量子產率($\Phi_f = 0.011$)之弱發射頻帶，然而三唑**111**及**112**均在435 nm處展現強螢光，其中量子產率分別為0.23及0.21。

為了探測在對於生物分子標記而言將為更典型之條件下之SPAAC反應，吾人研究**101**與ManNAz反應之螢光響應及時間過程。實驗指示大於90%的ManNAz在40分鐘內被消耗，且螢光強度在小於1 h內達到平穩階段(圖16b)。

表3.探針**101**及三唑**111**、**112**之光譜特性

	吸收 ($\lambda_{\text{最大}}$, nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ^[a]	發射 ($\lambda_{\text{最大}}$, nm)	斯托克位移 (cm^{-1})	Φ_f ^[b]
101	336	7800	405	5070	0.011
111	328	12200	435	7500	0.23
112	330	10800	435	7320	0.21

^a消光係數：在340 nm處針對**101**量測，且在330 nm處針對**111**及**112**量測。

^b螢光量子產率：使用硫酸奎寧($\Phi_f = 0.54 \pm 0.03$)作為標準。

圖16描述(a) **101** (黑色)、**111** (藍色)及**112** (紅色)之吸收及螢光發射光譜($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm) (45 μM ，含有10% DMSO之PBS緩衝液，pH 7.4)。(b)在435 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm)處用於**101** (30 μM)與N-疊氮基乙醯甘露糖胺 (30 μM)在含有10% DMSO之PBS緩衝液中之接合反應之正規化螢光強度之時間過程。

部分A：將化合物**101**及苄基疊氮化物預溶解於 CD_3CN 中，且接著以20 mM等莫耳濃度混合。歷經1 h時段藉由 $^1\text{H-NMR}$ 分析監測該反應。基於

初始化合物**101**之濃度，藉由對¹H-NMR光譜中之多個化學位移進行積分來確定各組分之濃度。藉由繪製 $1/[101]$ (M^{-1})對比時間(秒)之曲線圖，使用線性回歸分析測定以 $M^{-1}s^{-1}$ 為單位之二階速率常數。此程序重複3次，其中濃縮為20 mM，在25°C下得到速率常數 $0.012 M^{-1}s^{-1}$ (圖17)。

圖17描述如藉由¹H-NMR監測的化合物**101**與苄基疊氮化物在 CD_3CN 中之反應之 $1/[101]$ 對比時間之曲線圖。

部分B：將化合物**101**及*N*-疊氮基乙醯甘露糖胺預溶解於 CD_3OD/D_2O (5:1, v/v)中，且接著以20 mM等莫耳濃度混合。歷經1 h時段藉由¹H-NMR分析監測該反應。基於初始化合物**101**之濃度，藉由對¹H-NMR光譜中之多個化學位移進行積分來確定各組分之濃度。藉由繪製 $1/[101]$ (M^{-1})對比時間(秒)之曲線圖，使用線性回歸分析測定以 $M^{-1}s^{-1}$ 為單位之二階速率常數。此程序重複3次，其中濃縮為20 mM，在25°C下得到速率常數 $0.010 M^{-1}s^{-1}$ (圖18)。

圖18描述如藉由¹H-NMR監測的化合物**101**與*N*-疊氮基乙醯甘露糖胺在 CD_3OD-D_2O 溶液(5:1, v/v)中之反應之 $1/[101]$ 對比時間之曲線圖。

實例6：使用環辛炔稠合螢光探針**101**進行染色樣品之活細胞成像：

評估**101**在活細胞成像中之效能。出於此目的，將高度唾液酸化肺癌細胞CL1-5在全乙醯化*N*-疊氮基乙醯甘露糖胺($Ac_4ManNAz$)存在下培養3天以代謝產生疊氮基-唾液酸表現之細胞。作為陰性對照，CL1-5細胞在全乙醯化*N*-乙醯甘露糖胺($Ac_4ManNAc$)存在下生長。藉由在無洗滌及無固定的條件下以30-min間隔使細胞暴露來進行時間過程實驗(圖19、圖22)。 $Ac_4ManNAz$ 處理過之細胞展示螢光強度之時間依賴性增加(上方列：青色，下方列：藍色)且接著培育1.5 h達到飽和。相比之下，對照細

胞展現幾乎無螢光染色，支持背景標記為可忽略的。此外，藉由共焦顯微鏡目測到含疊氮基醣共軛物在活細胞中之定位。隨後，用抗GRASP65隨後FITC共軛抗兔(對於高爾基體)及碘化丙錠(PI，核標記)染色由探針**101**標記之細胞。來源於香豆素探針之藍色螢光信號在不添加Ac₄ManNAc之情況下明顯展示於Ac₄ManNAz處理過之細胞中(圖20)。使用coumOCT探針(藍色螢光)在細胞溶質中目測到標記的唾液酸化醣共軛物，且與高爾基體(綠色染色)顯著重疊，但不在細胞核(紅色染色)中。

圖19描述在無洗滌及無固定的條件下用200 μM Ac₄ManNAz培育且用100 μM探針**101**標記之活CL1-5細胞之延時螢光及重疊影像：細胞之螢光影像(上方列)及細胞之明視場重疊影像(下方列)。對照物：用Ac₄ManNAc培育之細胞。(比例尺：10 μm)

圖20描述如藉由共焦顯微鏡目測之探針標記唾液酸化醣共軛物在CL1-5細胞中之定位。用200 μM Ac₄ManNAz或Ac₄ManNAc培育之細胞經100 μM **101** (藍色)標記且經抗GRASP65隨後FITC共軛抗兔(對於高爾基體，綠色)及碘化丙錠(對於細胞核，紅色)染色。(比例尺：10 μm)

出人意料地，在延時實驗中不僅在細胞表面上且亦在細胞內觀測到藍色螢光。因此，吾人檢查coumOCT **101**是否可為可用於活細胞中之直接細胞內標記之細胞可滲透探針。朝向此目標，將CL1-5細胞用Ac₄ManNAz培育1 h且隨後移除過量Ac₄ManNAz。吾人接著進行成像來監測唾液酸化醣共軛物之運輸。如圖21中所示，唾液酸化醣共軛物容易藉由使用coumOCT成像且在初始階段與高爾基體(紅色)顯著重疊。然而，在5 h之後在細胞表面上偵測到藍色螢光信號之出現。螢光強度隨時間增加，且在8 h下達到飽和(圖21及圖23)。吾人之結果指示coumOCT不僅為

細胞可滲透探針且亦特異於活細胞中之內源性含疊氨基醣共軛物之直接標記。

圖21描述使用細胞中之SPAAC之coumOCT (1)運輸的醣共軛物之螢光成像。將CL1-5細胞用500 μM Ac_4ManNAz 培育1 h且隨後用PBS緩衝液洗滌以移除過量 Ac_4ManNAz 。將糖處理過之細胞在培養基中分別培育3 h、5 h及8 h，且接著在SPAAC條件下用100 μM 探針101標記0.5 h。將高爾基體用抗GRASP65隨後Cy3共軛抗兔標記。(比例尺：5 μm)

藉由螢光光譜法進行時間過程量測。

將探針101 (0.075 μmol)及*N*-疊氨基乙醯甘露糖胺(0.075 μmol)於含10% DMSO之PBS緩衝液(2.5 mL)混合物中之溶液在37°C下培育。以5分鐘間隔監測在330 nm處激發後在435 nm處之螢光發射強度。對於各點，歷經5秒時段量測螢光強度且對總共3個點取平均值。在對照實驗中，除了將*N*-乙醯甘露糖胺(0.075 μmol)添加至溶液中以外，使用相同條件。

活細胞中之螢光標記之延時顯微鏡分析。

為了觀測細胞中之螢光標記疊氨基-醣共軛物，將CL1-5細胞接種於腔室載片(2.5×10^4 個細胞/0.5 mL/孔)上且在培養基(補充有10% FBS、100 U/mL青黴素、100 $\mu\text{g/mL}$ 鏈黴素、1 mM L-麩醯胺酸及1 mM丙酮酸鈉之RPMI-1640)中用200 μM 對照糖(全乙醯化*N*-乙醯甘露糖胺， Ac_4ManNAc)或疊氨基糖(全乙醯化*N*-疊氨基乙醯甘露糖胺， Ac_4ManNAz)培育3天。

對於活細胞之延時成像，使用裝備有培育箱以將細胞保持於培養條件下之共焦顯微鏡(TCS-SP5-MP-SMD，Leica)進行實驗。將預洗滌細胞用100 μM 探針101在具有10% DMSO之PBS中培育且歷經1.5 h進行來自先前實驗之活細胞之螢光成像。在450 nm發射處且以5-min為間隔獲取影

像。

為了比較疊氨基-醣共軛物之定位，將探針標記細胞用PBS洗滌，在室溫下用3%多聚甲醛在PBS中固定20 min，在室溫下用0.2% Triton X-100在PBS中透化20 min，且在室溫下用3%牛血清白蛋白在PBS中阻斷30 min。將細胞用抗GRASP65隨後FITC共軛抗兔(對於高爾基體)及碘化丙錠(PI) (對於細胞核)染色。

圖22描述在無洗滌及無固定的條件下用200 μM Ac₄ManNAz培育且用100 μM 探針**101**標記之活CL1-5細胞之延時螢光及重疊影像：細胞之螢光影像(上方列)及細胞之明視場重疊影像(下方列)。對照物：用Ac₄ManNAc培育之細胞。(比例尺：25 μm)

藉由活細胞中之螢光標記進行運輸之唾液酸共軛物的顯微鏡分析。

為了觀測依賴於不同時間之細胞中螢光標記唾液酸共軛物，將CL1-5細胞接種於腔室載片(2.5×10^4 個細胞/0.5 mL/孔)上且在培養基(補充有10% FBS、100 U/mL青黴素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鏈黴素、1 mM L-麩醯胺酸及1 mM丙酮酸鈉之RPMI-1640)中用500 μM 疊氨基糖(全乙醯化N-疊氨基乙醯甘露糖胺，Ac₄ManNAz)培育1 h。將細胞用PBS洗滌三次且接著在培養基中培育。在3 h、5 h及8 h之後，在37°C下將細胞用100 μM coumOCT (**101**)在具有10% DMSO之PBS中培育30 min。對於活細胞之螢光成像，使用裝備有培育箱以將細胞保持於培養條件下之共焦顯微鏡(TCS-SP5-MP-SMD，Leica)進行實驗。

為了比較唾液酸共軛物之定位，將探針標記細胞用PBS洗滌，在室溫下用3%多聚甲醛在PBS中固定20 min，在室溫下用0.2% Triton X-100在PBS中透化20 min，且在室溫下用3%牛血清白蛋白在PBS中阻斷30

min。將細胞進一步用抗GRASP65隨後Cy3共軛抗兔(對於高爾基體)染色。

圖23描述使用細胞中之SPAAC之coumOCT (101)進行運輸之醣共軛物的螢光成像。將CL1-5細胞用500 μ M Ac₄ManNAz培育1 h且隨後用PBS緩衝液洗滌以移除過量Ac₄ManNAz。將糖處理過之細胞在培養基中分別培育3 h、5 h及8 h，且接著在SPAAC條件下用100 μ M探針101標記0.5 h。將高爾基體用抗GRASP65隨後Cy3共軛抗兔標記。(比例尺：10 μ m)

實驗7：雙標記實驗

使用SPAAC與CuAAC之組合對兩種不同代謝併入醣共軛物之併發的螢光標記進行雙標記實驗。全乙醯化*N*-乙醯甘露糖胺(Ac₄ManNAc)及全乙醯化*N*-乙醯葡萄糖胺(Ac₄GlcNAc)用作對照糖。將ManNAc代謝轉化成唾液酸，其經發現為細胞中之醣蛋白及醣脂之末端單醣，然而GlcNAz為富含在內質網及高爾基體中產生的*N*-連接聚醣及*O*-連接聚醣之內部單醣。將CL1-5細胞在含炔糖(Ac₄ManNAI)及含疊氮基糖(Ac₄GlcNAz)存在下培育三天。將細胞藉由SPAAC用coumOCT (對於疊氮基糖)、隨後藉由CuAAC用AzBOCEt^{6j} (對於炔基糖)染色，且藉由共焦顯微鏡進行研究(圖24)。

疊氮基糖及炔基糖處理過之細胞均在兩個螢光通道中展示獨特圖案(圖24a、圖24b、圖24c)，然而，任一糖之遺漏導致相應通道中無標記(圖24d、圖24e、圖24f及圖24g、圖24h、圖24i)。有趣的是，成像實驗顯示ManNAI及GlcNAz標記物質在相同定位處、可能在高爾基體中顯著展現。另外，在細胞表面上且部分地在關於AzBOCEt標記之細胞溶質中清楚地觀測到所表現之炔基標記唾液酸化醣共軛物，然而，僅在使用

coumOCT探針之細胞溶質中展示GlcNAz標記聚醣。雖然通常藉由末端醣基化將唾液酸附接至*N*-連接聚醣及*O*-連接聚醣，但將非天然GlcNAz併入醣蛋白中可能影響醣基轉移酶用於進一步醣基化之特異性及效率。因此，可將不成熟的異常醣蛋白輸送至細胞溶質用於降解。此等發現驗證coumOCT及AzBOCEt可用作螢光形成探針，用於藉由SPAAC及CuAAC三唑形成化學反應同時偵測單個細胞內之疊氨基標記及炔標記代謝併入之醣共軛物。

圖24A、24B展示細胞中標記有coumOCT (1)、AzBOCEt且藉由共焦顯微鏡成像之雙螢光。(A)說明使用Ac₄ManNAI、Ac₄GlcNAz、101及AzBOCEt之細胞標記實驗。將CL1-5細胞用100 μM Ac₄ManNAI及Ac₄GlcNAz或對照糖(Ac₄ManNAc及Ac₄GlcNAc)培育3天，用100 μM探針101在SPAAC條件下處理0.5 h，且接著用0.1 μM AzBOCEt在CuAAC條件下培育1 h。(B) CL1-5細胞中之雙螢光成像。此等醣共軛物用探針101(青色)(對於含疊氨基醣共軛物)及AzBOCEt(綠色)(對於含炔醣共軛物)標記。(比例尺：10 μm)

細胞中之雙螢光標記之顯微鏡分析

將CL1-5細胞接種於腔室載片上(2.5×10⁴個細胞/0.5 mL/孔)，且在培養基(補充有10% FBS、100 U/mL青黴素、100 μg/mL鏈黴素、1 mM L-麩醯胺酸及1 mM丙酮酸鈉之RPMI-1640)中用100 μM炔基糖(全乙醯化炔基-*N*-乙醯甘露糖胺，Ac₄ManNAI)或疊氨基糖(全乙醯化*N*-疊氨基乙醯葡萄糖胺，Ac₄GlcNAz)或兩者培育3天或無糖作為陰性對照。將細胞用PBS洗滌三次且接著在37°C下用100 μM coumOCT (101)在具有10% DMSO之PBS中培育30 min。在用具有10% DMSO之PBS洗滌三次之後，隨後在室

溫下用3%多聚甲醛在PBS中固定20 min，在室溫下將細胞用0.1 μM AzBOCEt、100 μM 配位體、1 mM CuSO_4 及2 mM抗壞血酸鈉在具有50%乙醇之PBS中培育1 h且使用共焦顯微鏡(TCS-SP5-MP-SMD, Leica)完成細胞之螢光影像。

實驗8：化合物(101)及化合物(111)在3-巰基丙酸存在下之穩定性

環辛炔之潛在難以解決的副反應為蛋白質或內源性硫醇與相應乙烯硫醚之加成。為了測試**101**及相應三唑**111**之潛在非特定染色是否可能由於蛋白質或內源性硫醇之SH基團與三鍵或雙鍵之加成而發生，藉由用3-巰基丙酸在 CDCl_3 中培育**101**及**111**進行實驗(圖25及圖26)。NMR光譜分析表明**101**及**111**對用3-巰基丙酸進行硫醇-炔或硫醇-烯加成失活。此等結果展示應用**101**作為螢光形成探針允許出人意料地偵測活細胞中之代謝併入的醣共軛物，而無需藉由硫醇-炔加成進行非特定染色，且所形成之三唑將不經歷硫醇-烯加成以淬滅螢光。

在室溫(25 $^{\circ}\text{C}$)下用3-巰基丙酸溶液(32 mM於 CDCl_3 中)培育化合物**101**及化合物**111**之溶液(25 mM於 CDCl_3 中)。歷經24 h藉由 $^1\text{H-NMR}$ 分析監測該反應。 $^1\text{H-NMR}$ 分析表明化合物**101**及化合物**111**在硫醇存在下具有高穩定性，因為藉由 $^1\text{H-NMR}$ 分析，3-巰基丙酸對化合物**101**及化合物**111**無取代效應(圖25及圖26)。

圖25展示單獨的化合物**101**及3-巰基丙酸於 CDCl_3 中之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜，且在25 $^{\circ}\text{C}$ 下將化合物**101**之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜用3-巰基丙酸處理0 h、2 h及24 h。

圖26展示單獨的化合物**111**及3-巰基丙酸於 CDCl_3 中之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜，且在25 $^{\circ}\text{C}$ 下將化合物**111**之 $^1\text{H-NMR}$ 光譜用3-巰基丙酸處理24 h。

本發明描述一種新穎的基於SPAAC之螢光形成探針 coumOCT (101)，其用於在無洗滌及無固定的條件下進行活細胞中之即時成像。分別以 $0.012 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 速率常數在 CD_3CN 中及以 $0.010 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 速率常數在 $\text{CD}_3\text{OD-D}_2\text{O}$ 溶液(5:1, v/v)中進行101與苄基疊氮化物及*N*-疊氨基乙醯甘露糖胺之SPAAC反應。三唑產物111及112與未反應之101相比展示量子產率增加20倍($\Phi_f = 0.23$ 及 $\Phi_f = 0.21$)。此外，本發明確定101為用於使活細胞中之含疊氨基醣共軛物成像之螢光接通探針。SPAAC反應為自發的且不需要沖洗步驟。此外，探針101為無毒且細胞可滲透的而無背景標記問題，允許在CuAAC下同時標記兩種不同糖與AzBOCet之組合。本發明代表細胞成像之顯著進步，且應潛在地適用於活體內生物化學事件之即時偵測。

實例9：CoumFSA (601)之合成.

用乙醯氯處理唾液酸(Neu5Ac)，根據 ^1H NMR分析得到呈大於90%產率之氯化物中間物。將粗產物溶解於吡啶中且加熱至 50°C ，隨後濃縮且研磨以移除吡啶鹽酸鹽，自唾液酸得到具有78%總產率之烯糖201。藉由用 Boc_2O 處理化合物201以產生*N*-乙醯基-*N*-Boc保護之產物202，其在Zemplén條件下去乙醯隨後乙醯化提供*N*-Boc保護之化合物203自化合物201合成 Neu5Boc2en 203。203與*N*-溴丁二醯亞胺(NBS)及水在MeCN中在 80°C 下之溴氫基化得到溴醇204a及204b (91%；204a/204b = 3.1:1)。用1,8-二氮雜雙環[5.4.0]十一-7-烯(DBU)處理204a，得到環氧化物205 (86%)。自205製備在C-3處具有羥基之醣基溴化物206。藉由甲基傘形酮鈉在無水DMF中獲得呈52%產率之 α -醣苷207。在用三氟乙酸(TFA)在水中移除207之Boc基團之後，將所得胺鹽在鹼DIPEA及偶合劑HBTU存在下用4-戊炔

酸在DMF中處理，得到炔基產物**208**。藉由將**208**轉化成三氟甲磺酸酯，使其與二氟三甲基矽酸參(二甲胺基)鎢(TASF)在回流THF中反應完成氟化合物**209**。在逆相管柱上純化之後，在鹼性條件下使**209**去保護，產生呈75%產率之CoumFSA (**601**)。

實例10：DFSA (**501**)之合成.

化合物**203**與選擇性氟試劑(Selectfluor)在MeNO₂水溶液中在室溫下之氟經基化得到氟醇**210a**及**210b** (59%；210a/210b = 1.3:1)。用三氟化二乙胺基硫(DAST)處理**210a**，得到二氟化合物**211a**及**211b** (75%；**211a/211b** = 5.3:1)。在用三氟乙酸(TFA)在水中移除**211a**之Boc基團之後，將所得胺鹽在鹼DIPEA及偶合劑HBTU存在下用4-戊炔酸在DMF中處理，得到炔基產物**212**。在逆相管柱上純化之後，在鹼性條件下使**212**去保護，產生呈55%產率之DFSA (**501**)。

在申請專利範圍中，除非相反地指示或另外從上下文顯而易見，否則諸如「一(a/an)」及「該」之冠詞可意謂一個或大於一個。除非相反地指示或另外從上下文顯而易見，否則若一個、大於一個或所有群組成員存在於、用於給定產物或方法中或另外與給定產物或方法相關，則在群組的一或多個成員之間包括「或」之申請專利範圍或描述被視為滿足。本發明包括恰好一個群組成員存在於、用於給定產物或方法中或另外與給定產物或方法相關之實施例。本發明包括大於一個或所有群組成員存在於、用於給定產物或方法中或另外與給定產物或方法相關之實施例。

此外，本發明涵蓋所有變化、組合及排列，其中將來自所列的申請專利範圍中之一或多項之一或多個限制、要素、條款及描述性術語引入另一申請專利範圍中。舉例而言，依附於另一申請專利範圍之任何申請專利

範圍可經修改以包括在依附於同一基本申請專利範圍之任何其他申請專利範圍中可見的一或多個限制。其中，要素如所列呈現，例如呈馬庫什 (Markush) 組格式，亦揭示要素之各子組，且可自該組移除任何要素。應理解，一般而言，當本發明或本發明之態樣稱為包含特定要素及/或特徵時，本發明之某些實施例或本發明之態樣由此類要素及/或特徵組成或基本上由其組成。出於簡單的目的，彼等實施例尚未具體地以詞語闡述在本文中。亦應注意，術語「包含」及「含有」意欲為開放的且容許包括額外要素或步驟。當給出範圍時，包括端點。此外，除非另外指示或另外從上下文及一般技術者的理解顯而易見，否則表示為範圍之值可在本發明之不同實施例中採用所述範圍內之任何特定值或子範圍，除非上下文另外明確規定，否則達到該範圍下限之單位的十分之一。

本申請案提及各種頒予的專利、公開的專利申請案、期刊文章及其他出版物，以上所有者均以引用的方式併入本文中。若任何併入之參考文獻與本說明書之間存在衝突，則應以本說明書為準。另外，本發明之屬於先前技術之任何特定實施例可明確地自申請專利範圍中之任何一或多項排除。因為此類實施例被認為是一般技術者所已知的，其可經排除，即使未在本文中明確地闡述該排除。本發明之任何特定實施例可出於任何原因自任何申請專利範圍排除，無論是否與先前技術之存在相關。

熟習此項技術者最多使用常規實驗將認識到或能夠確定本文所描述之特定實施例之許多等效物。本文所描述之本發明實施例之範圍並不意欲限於以上描述，但實際上如所附申請專利範圍中所闡述。一般技術者將瞭解，可在不脫離如以下申請專利範圍所定義之本發明之精神或範圍的情況下對本說明書進行各種改變及修改。

參考文獻

Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. "A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes." *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.

Zhou, Z.; Fahrni, C. J. A "Fluorogenic probe for the copper(I)-catalyzed azide-alkyne ligation reaction: Modulation of the fluorescence emission via $3(n,\pi^*)-1(\pi,\pi^*)$ Inversion." *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8862-8863.

Sivakumar, K.; Xie, F.; Cash, B. M.; Long, S.; Barnhill, H. N.; Wang, Q. "A fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes." *Org. Lett.* **2004**, *24*, 4603-4606.

Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. "Chemistry in living systems." *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.

Sawa, M.; Hsu, T.-L.; Itoh, T.; Sugiyama, M.; Hanson, S. R.; Vogt, P. K.; Wong, C.-H. "Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans in vivo." *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, *103*, 12371-12376.

Hsu, T.-L.; Hanson, S. R.; Kishikawa, K.; Wang, S.-K.; Sawa, M.; Wong, C.-H. "Alkynyl sugar analogs for the labeling and visualization of glycoconjugates in cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2614-2619.

Loudet, A.; Burgess, K. "BODIPY dyes and their derivatives:

syntheses and spectroscopic properties.” *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.

Wu, P.; Fokin, V. V. “Catalytic azide-alkyne cycloaddition: reactivity and Applications.” *Aldrichim. Acta* **2007**, *40*, 7-17.

Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A. “The chemistry of fluorescent bodipy dyes:

Versatility unsurpassed.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184-1201.

Li, L.; Han, J.; Nguyen, B.; Burgess, K. “Syntheses and spectral properties of functionalized, water-soluble BODIPY derivatives.” *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1963-1970.

Xie, F.; Sivakumar, K.; Zeng, Q. B.; Bruckman, M. A.; Hodges, B.; Wang, Q. “A fluorogenic 'click' reaction of azidoanthracene derivatives.” *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2906-2914.

Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R.” In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish.” *Science* **2008**, *320*, 664-667.

Best, M. D. “Click chemistry and bioorthogonal reactions: unprecedented selectivity in the labeling of biological molecules.” *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571-6584.

Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. “Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of Functionality.” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.

Li, J.; Hu, M.; Yao, S. Q. “Rapid synthesis, screening, and identification of xanthone and xanthene-based fluorophores using click chemistry.” *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3008-3011.

Le Droumaguet, C.; Wang, C.; Wang, Q. “Fluorogenic click reaction.” *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1233-1239.

Qi, J.; Han, M.-S.; Chang, Y.-C.; Tung, C.-H. “Developing visible fluorogenic 'click-on' dyes for cellular imaging.” *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1758-1762.

Chao, W.; Fang, X.; Nisaraporn, S.; Jian, S.; Qian, W. “Tuning the optical properties of BODIPY dye through Cu(I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction.” *Sci. China Chemistry* **2012**, *55*, 125-130.

Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W. “Fluorescent indicators based on BODIPY.” *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130-1172.

Shieh, P.; Hangauer, M. J.; Bertozzi, C. R. “Fluorogenic azidofluoresceins for biological imaging.” *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17428-17431.

Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Burgess, K. “BODIPY dyes in photodynamic therapy.” *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 77-88.

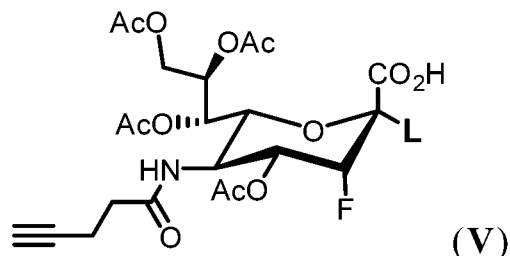
Herner, A.; Nikić, I.; Kállay, M.; Lemke, E. A.; Kele, P. “A new family of bioorthogonally applicable fluorogenic labels.” *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3297-3306.

Chauhan, D. P.; Saha, T.; Lahiri, M.; Talukdar, P. “BODIPY based 'click on' fluorogenic dyes: application in live cell imaging.” *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 244-247.

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

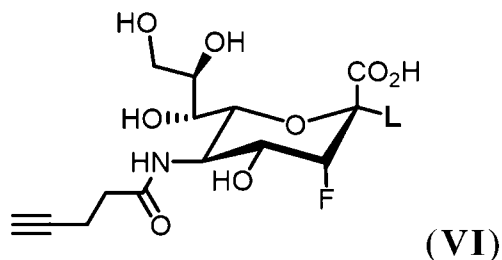
一種式(V)化合物，



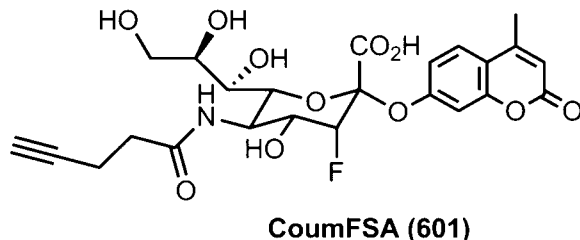
其中L為甲基-傘形酮基(umbelliferyl)。

【請求項2】

一種式(VI)化合物，



其中L為甲基-傘形酮基(umbelliferyl)，該化合物為化合物**601**：



【請求項3】

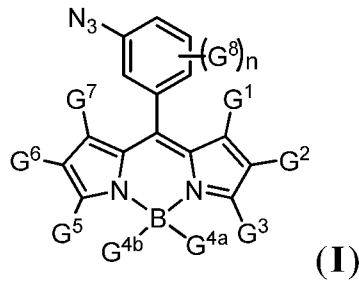
一種偵測樣品中之唾液酸酶之活性位點之方法，其包含

(a)使如請求項2之式(VI)化合物與疑似包含該唾液酸酶之樣品在將該化合物接合至該唾液酸酶之該活性位點的條件下接觸以形成共價鍵產物，

(b)使該共價鍵產物與含疊氮化物螢光探針接觸以形成螢光三唑產物，

(c)量測自該三唑產物釋放之螢光信號，

其中該含疊氮化物具式(I)結構：



或其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物或水合物，

其中：

G^1 、 G^2 、 G^3 、 G^5 、 G^6 、 G^7 及 G^8 在各種情況下獨立地為氫、視情況經取代之 C_{1-6} 烷基、視情況經取代之 C_{1-6} 烯基、視情況經取代之 C_{1-6} 炔基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之醯基、 $-OR^A$ 、 $-CH_2OR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-N(R^B)_2$ 、 $-N(R^A)C(O)R^A$ 、 $-C(O)N(R^B)_2$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-C(O)R^A$ 、 $-C(O)OR^A$ 、 $-S(O)R^A$ 、 $-SO_2R^A$ 、 $-SO_3R^A$ 、 $-SO_2N(R^B)_2$ 及 $-NHSO_2R^B$ ；

各 R^A 獨立地選自氫、視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基；及

各 R^B 獨立地選自氫、視情況經取代之 C_1 - C_6 烷基、視情況經取代之烯基、視情況經取代之炔基、視情況經取代之雜環基及視情況經取代之芳基，或兩個 R^B 與中間的氮結合在一起形成雜環；

G^{4a} 及 G^{4b} 在各種情況下為氟基、烷基、烷氧基、芳氧基或炔基，及

其中烷基及烷氧基為非分支鏈、飽和的且具有1至4個碳原子；芳基及芳氧基之芳基可為碳環芳基或雜環芳基；碳環芳基具有總共6至20個碳原子，包括取代基之碳原子；雜環芳基具有總共5至

20個碳原子，包括取代基之碳原子；烷氧羰基為羧酸之烷基酯，其中烷基如上文所定義；各烷基、芳基、烷氧基、芳氧基、苯并及烷氧羰基獨立地可不經取代或經一或多個取代基取代；烷基取代基為鹵基、羥基、胺基或芳基；芳基取代基為鹵基、羥基、胺基、烷基、芳基、硝基或羧基；及鹵基取代基為氟基或氯基；

n為0、1、2、3或4。

【請求項4】

一種偵測樣品中之唾液酸酶之活性位點之方法，其包含：

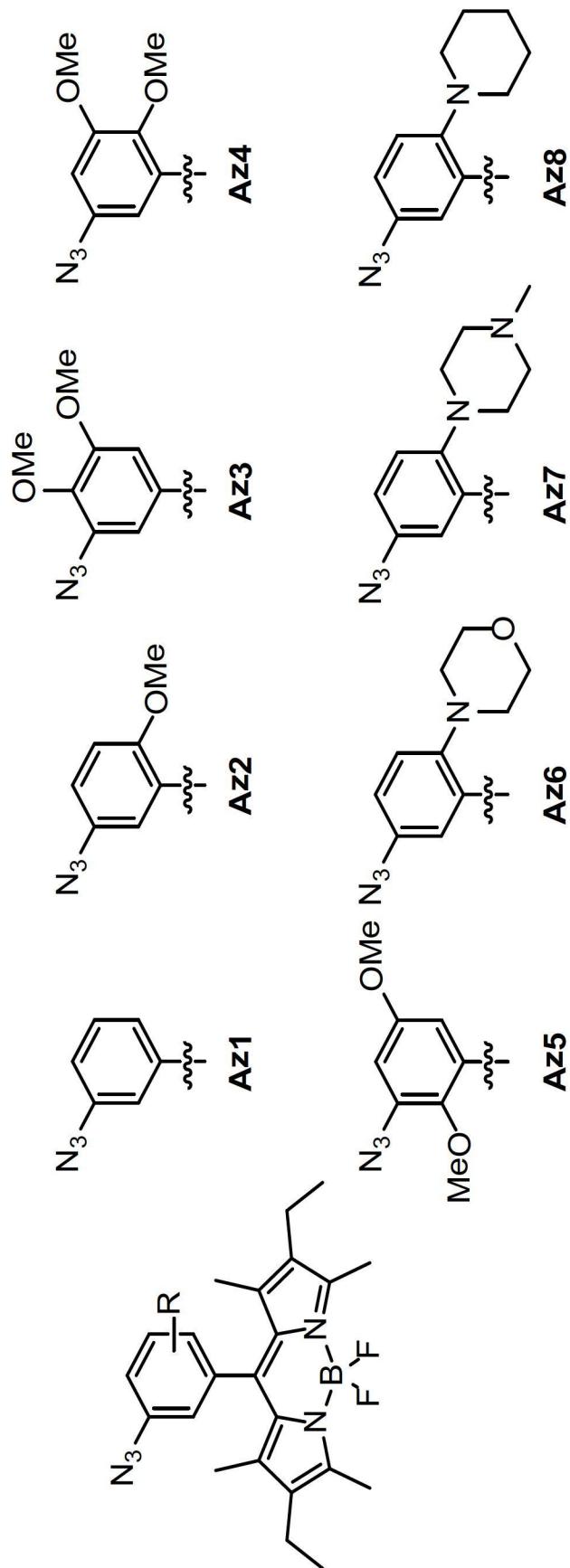
(a)使如請求項2之化合物601與疑似具有唾液酸酶分子之樣品接觸；

(b)量測自該樣品混合物中之香豆素(coumarin)釋放之螢光信號之位準，及

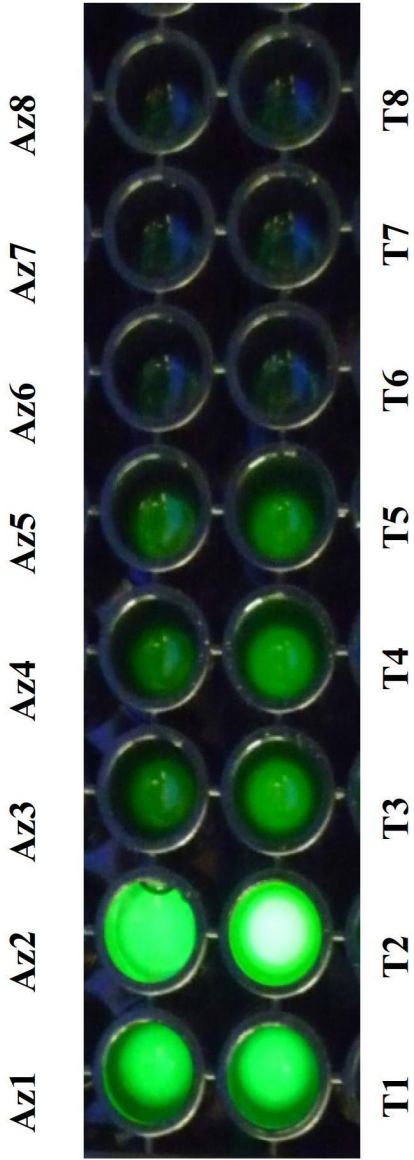
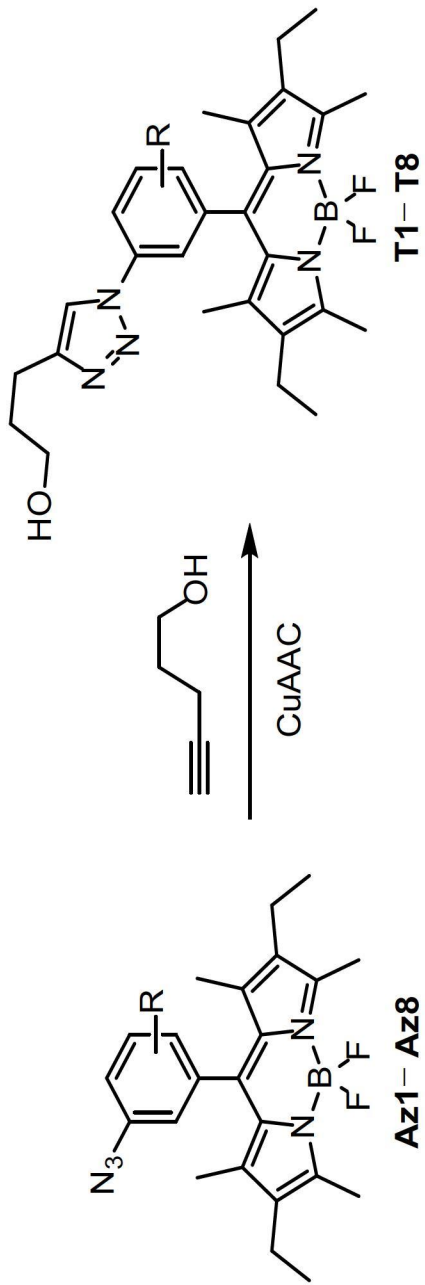
(c)確定該樣本中之該唾液酸酶分子之存在，

其中，相比於在該唾液酸酶分子不存在下之該螢光信號位準，增強的螢光信號指示該唾液酸酶分子之存在。

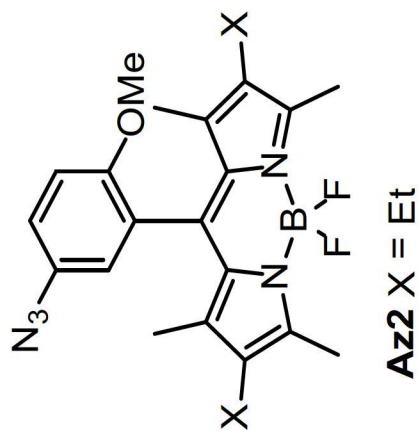
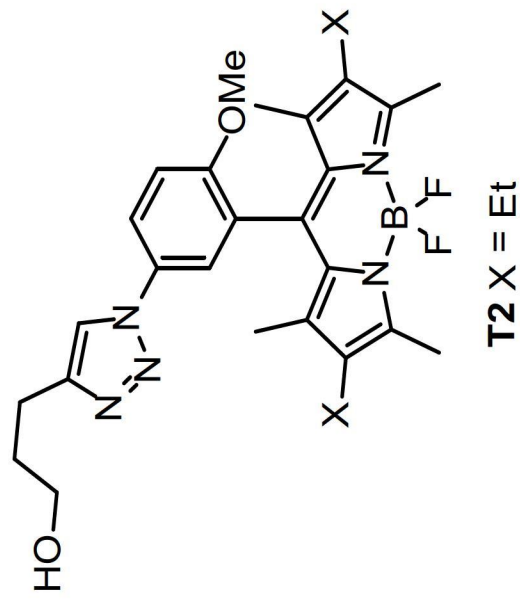
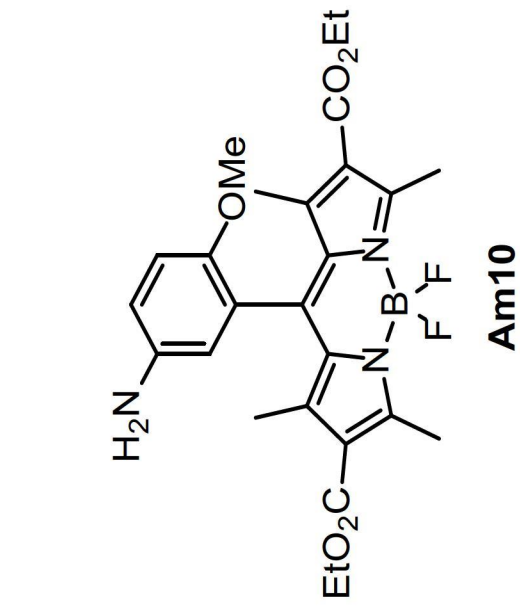
【發明圖式】



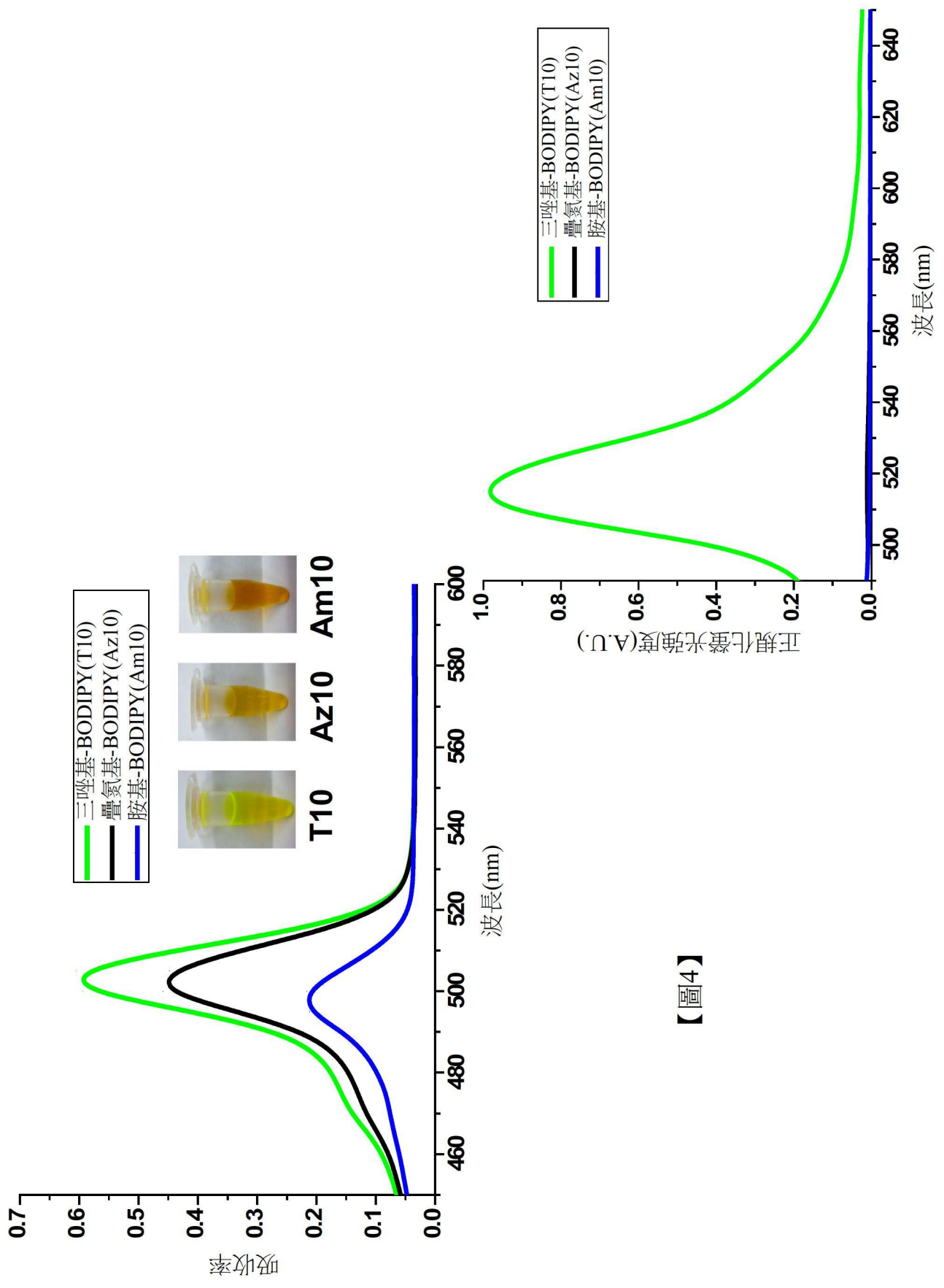
【圖1】



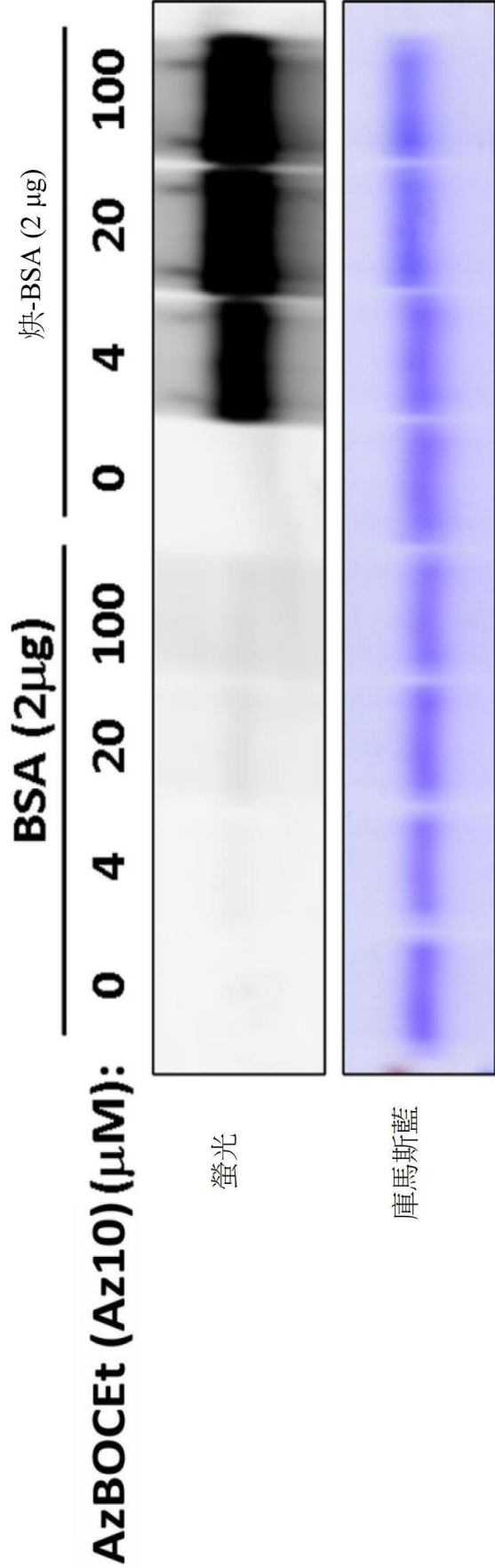
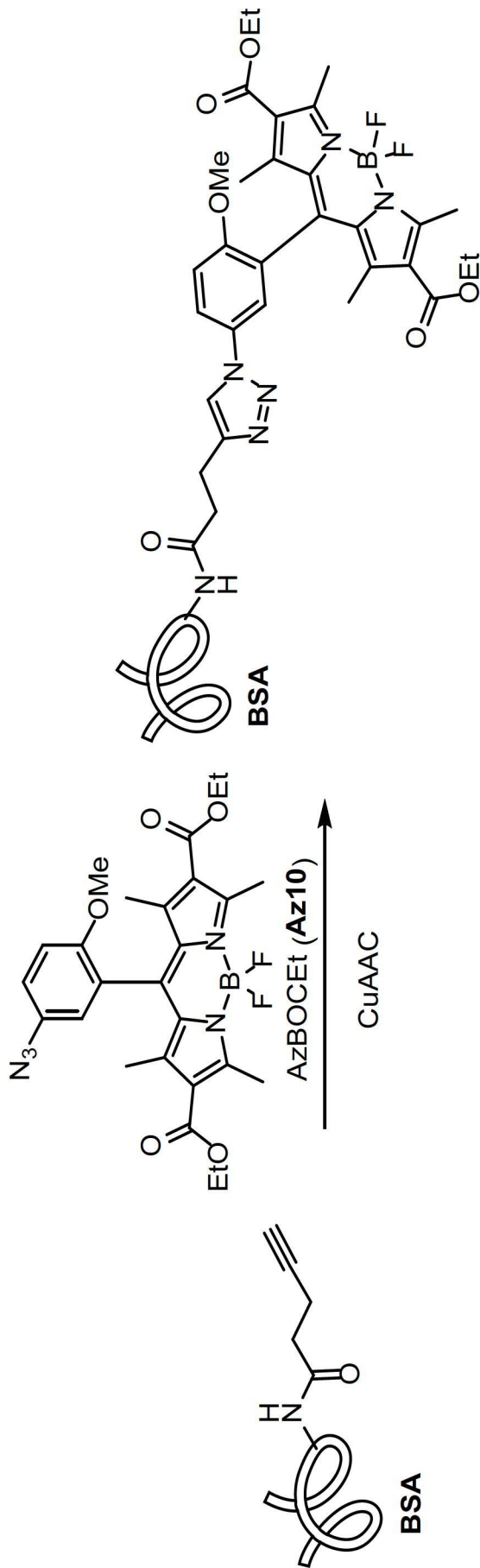
【圖2】



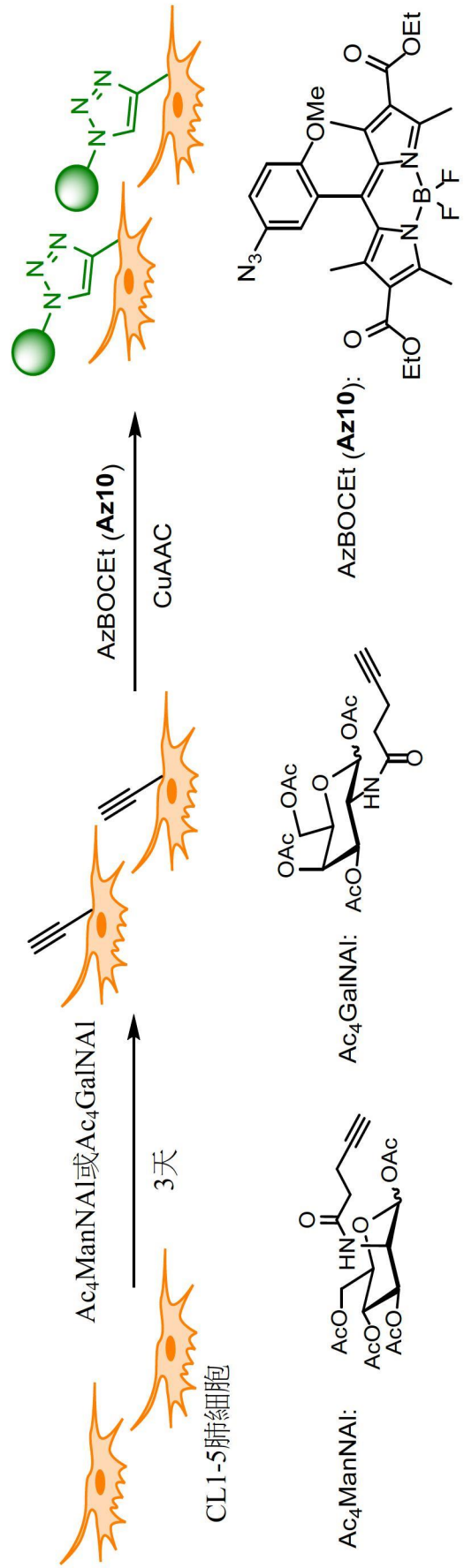
【圖3】



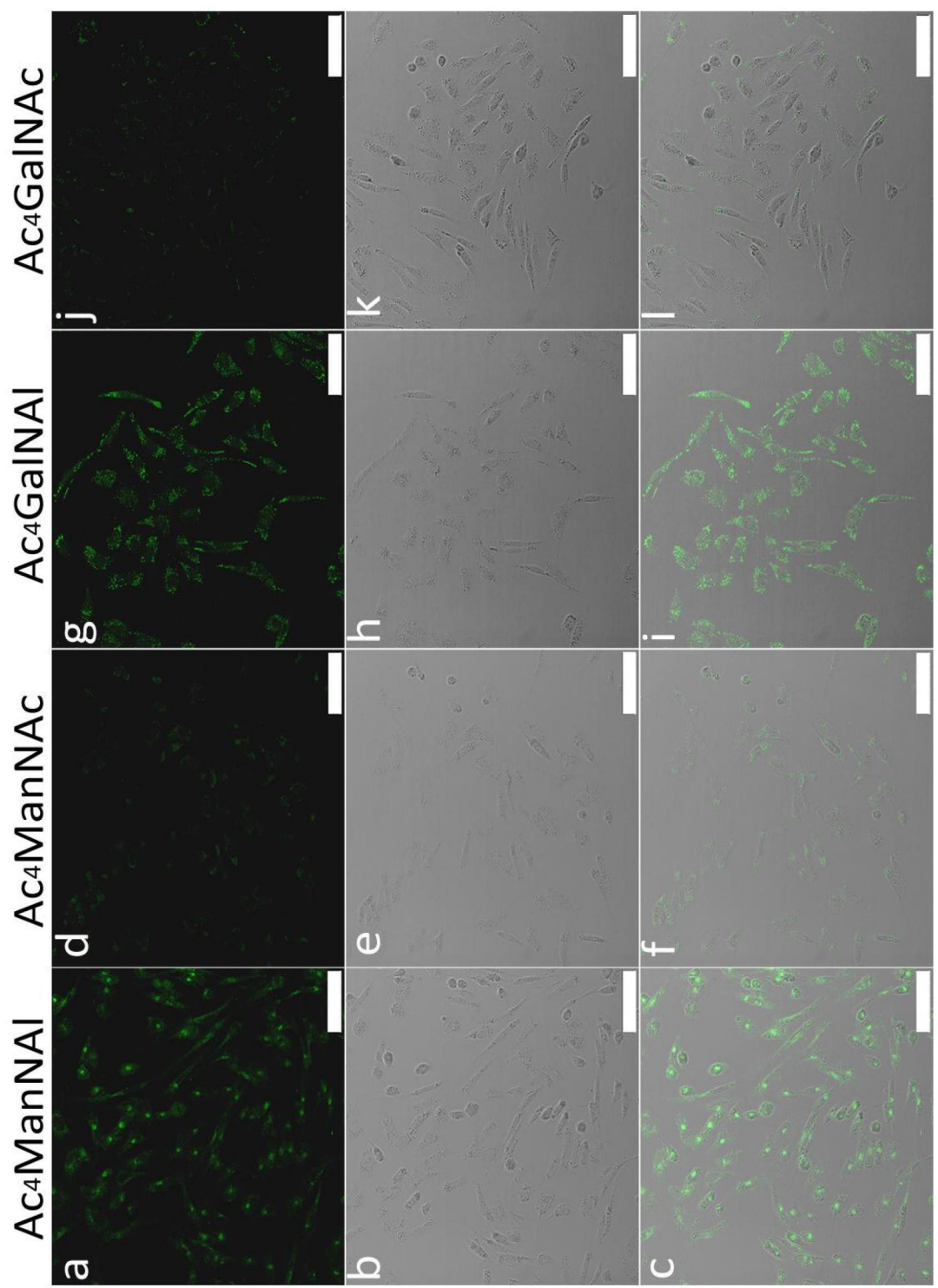
【圖4】



【圖5】



【圖6A】

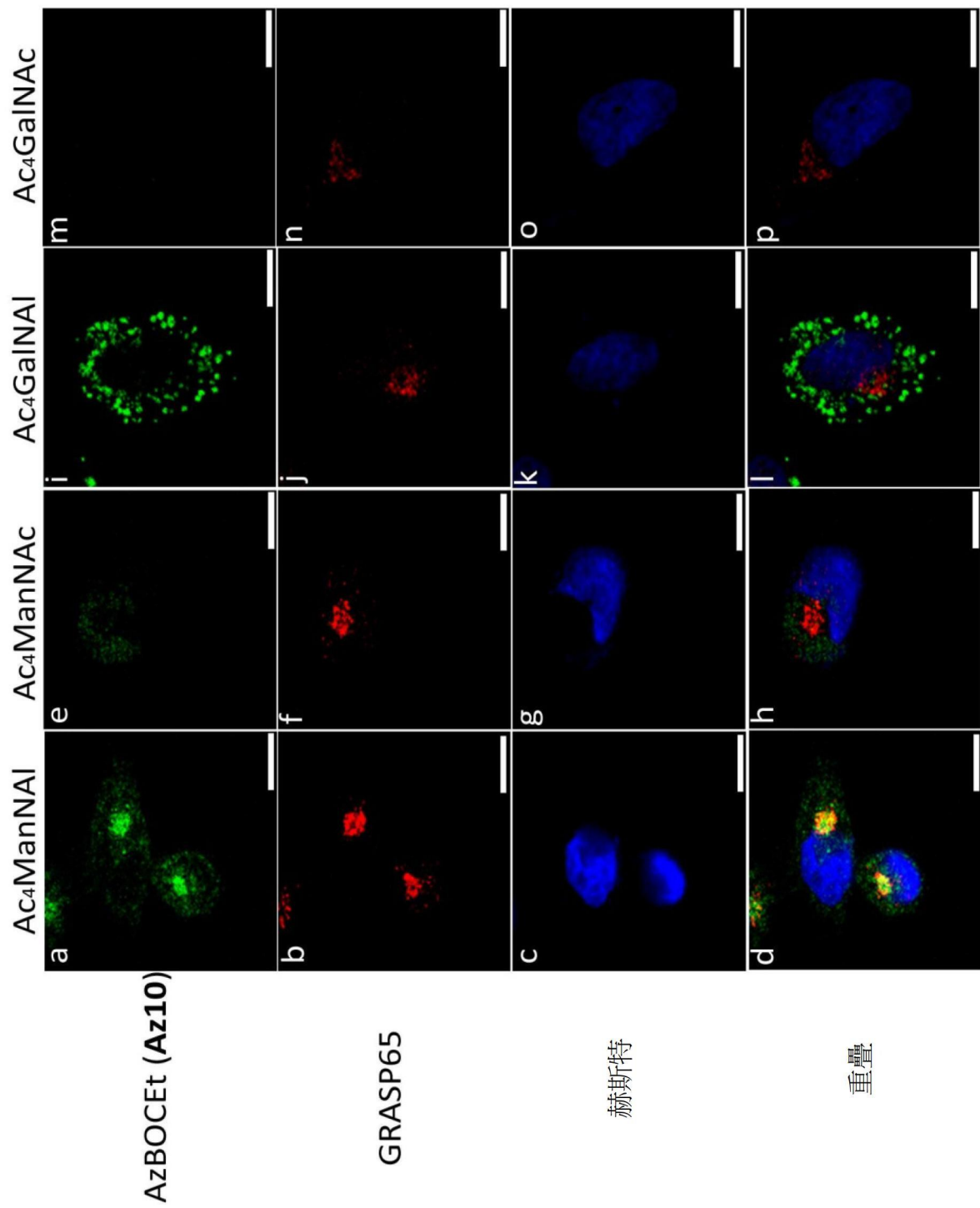


【圖6B】

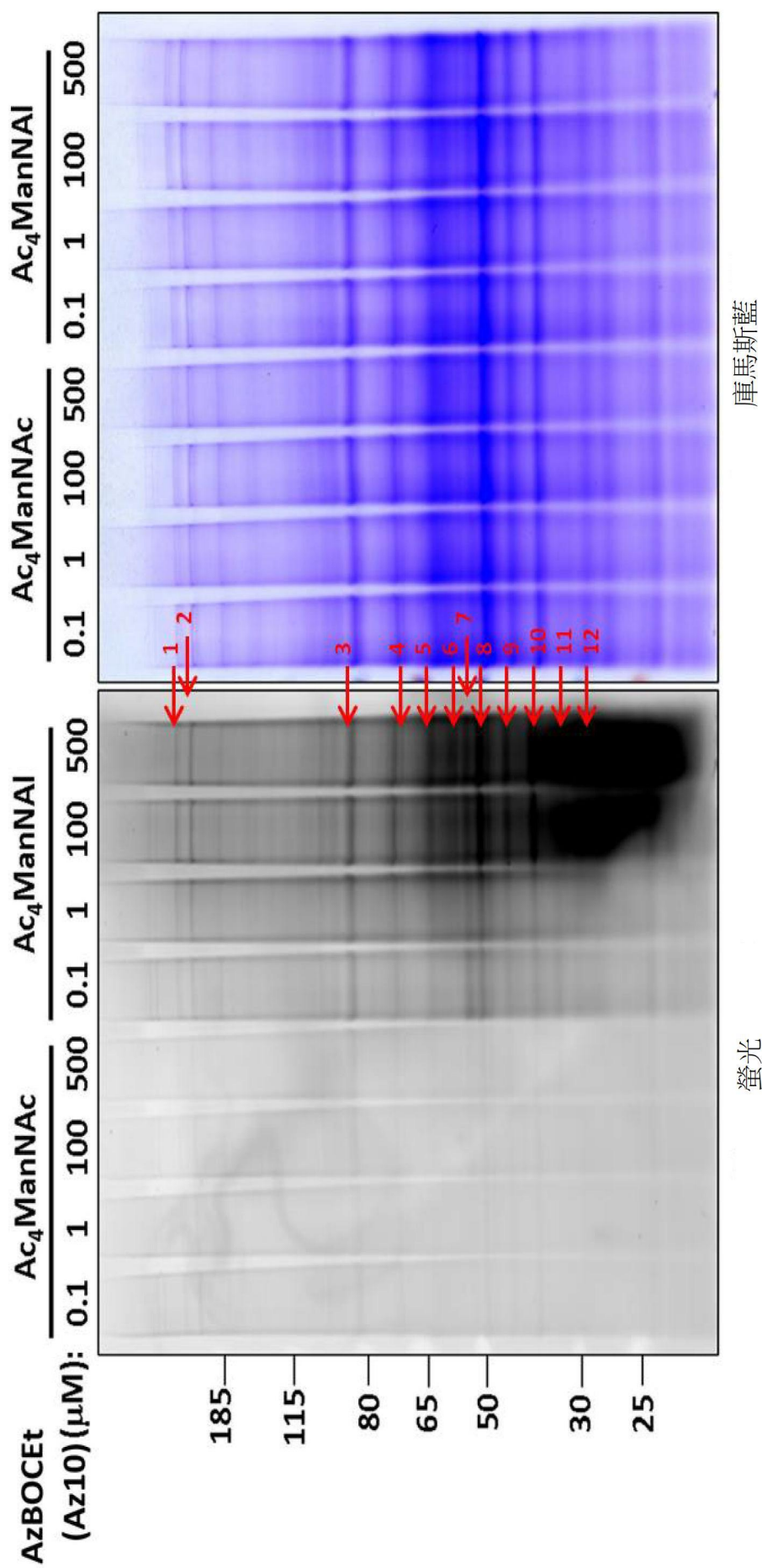
AzBOCEt (Az10)

明視場

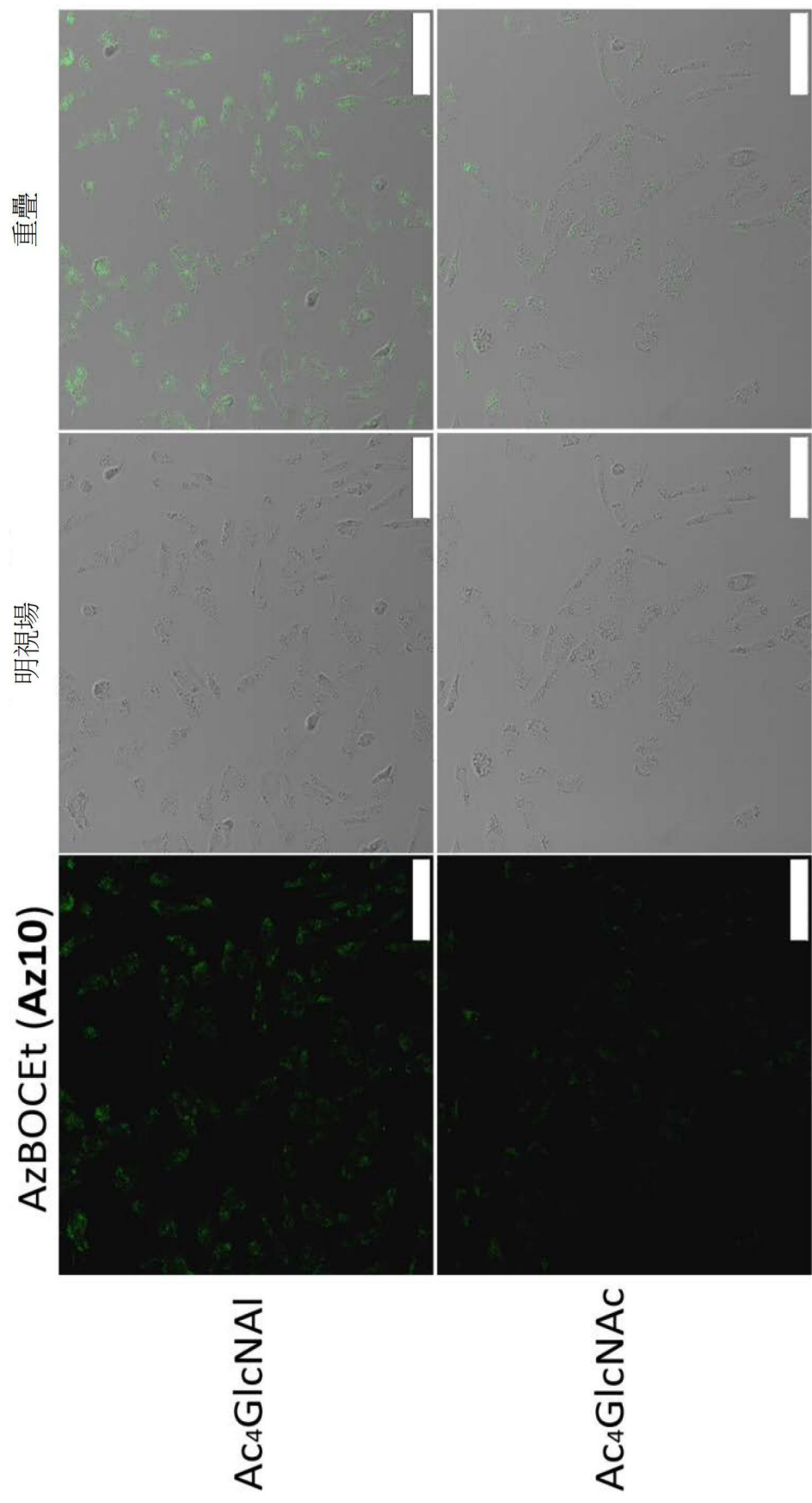
重疊



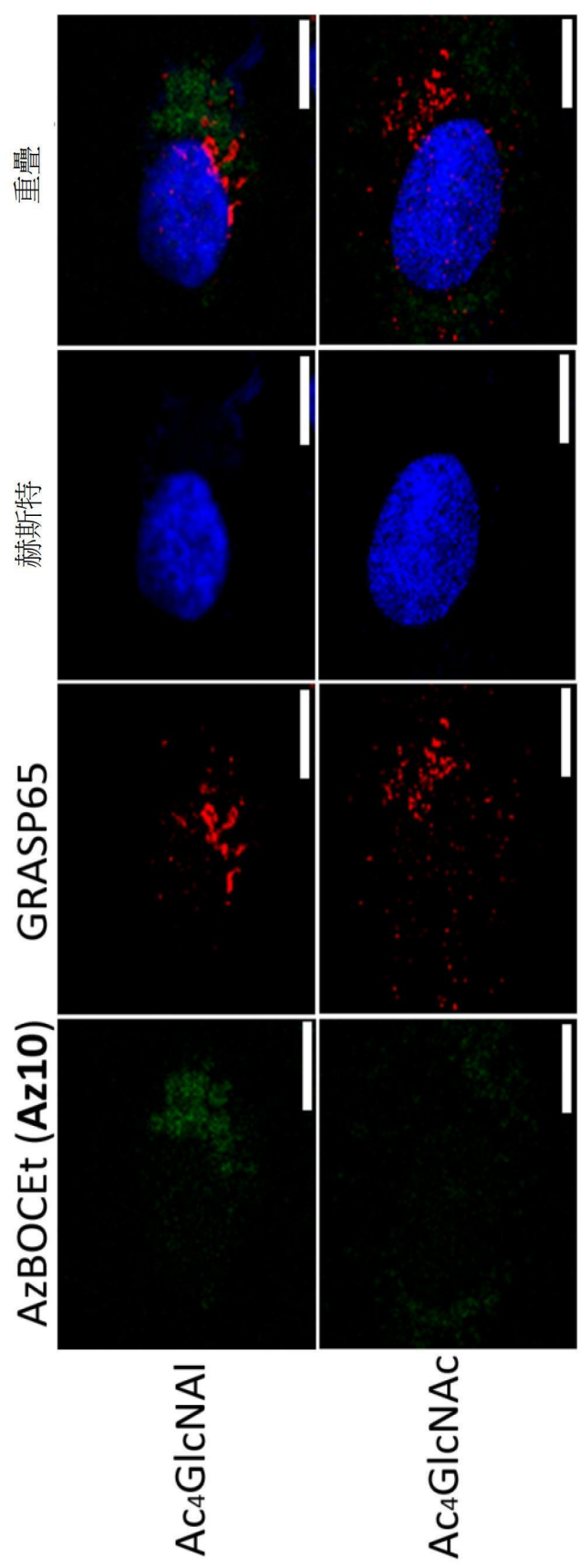
【圖6C】



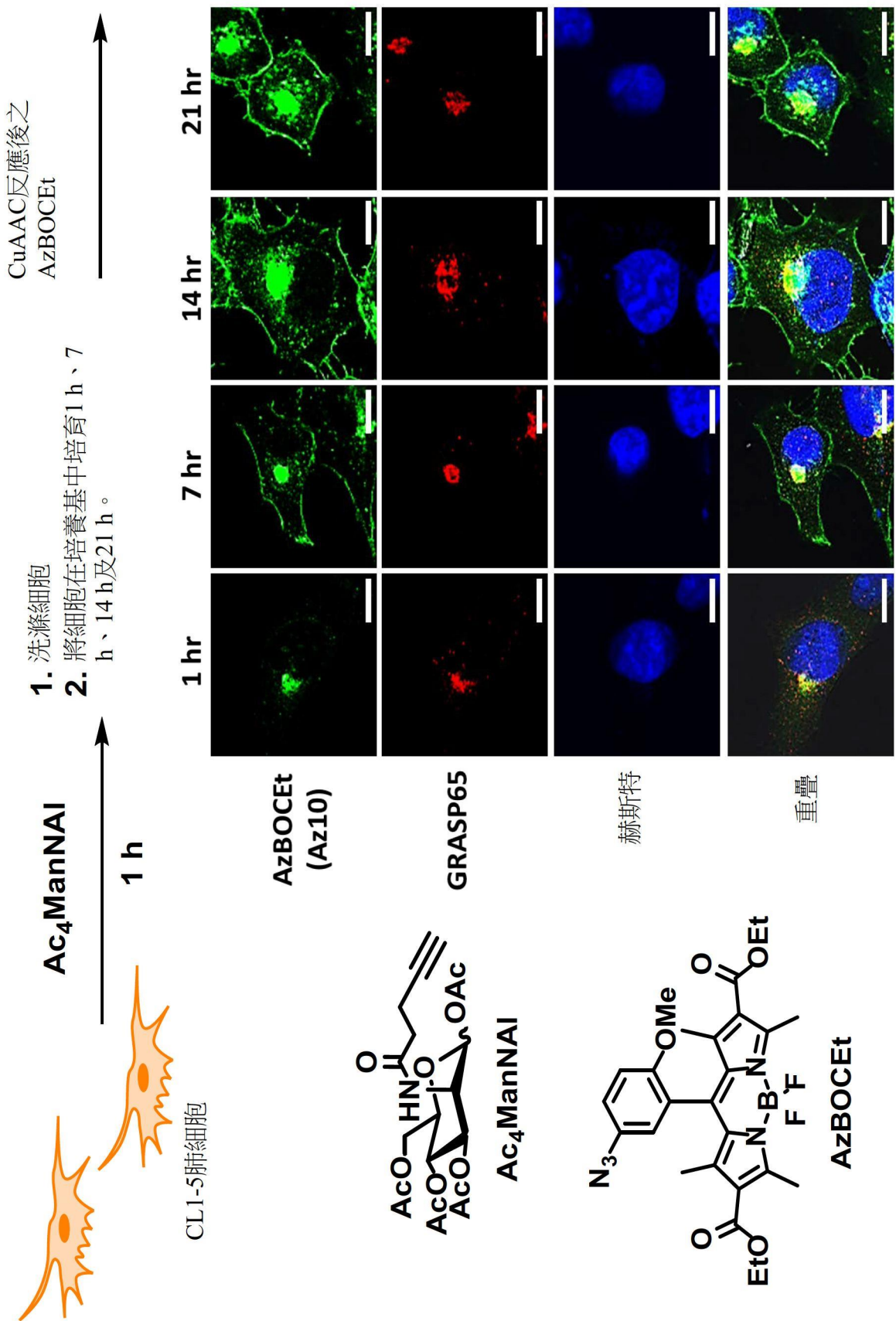
【圖7】



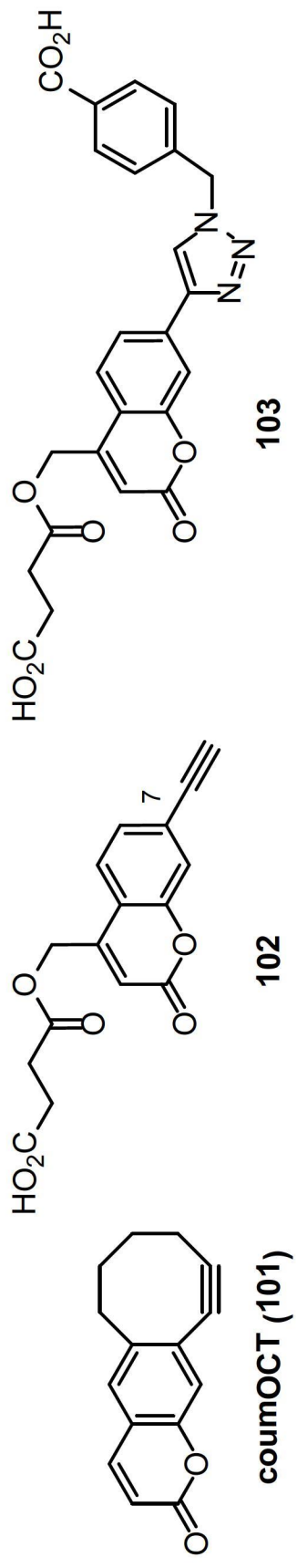
【圖8A】



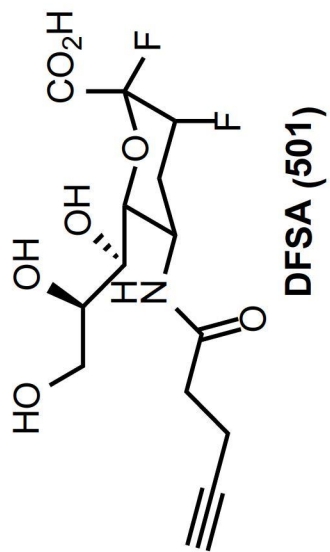
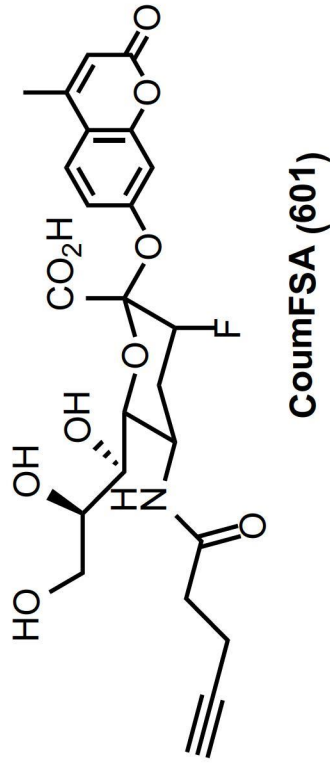
【圖8B】



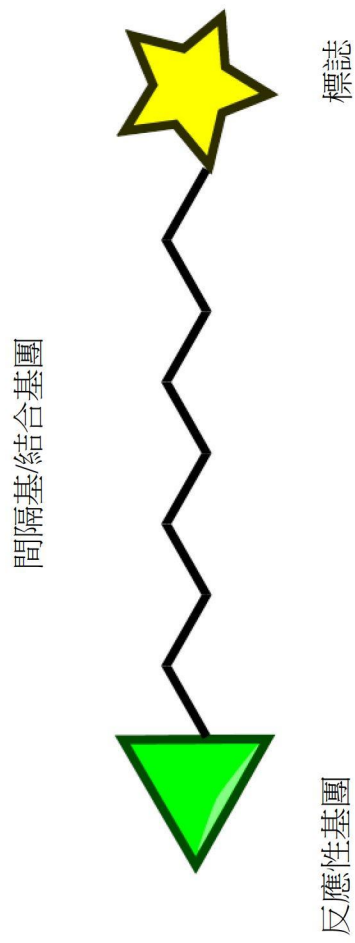
【圖9】



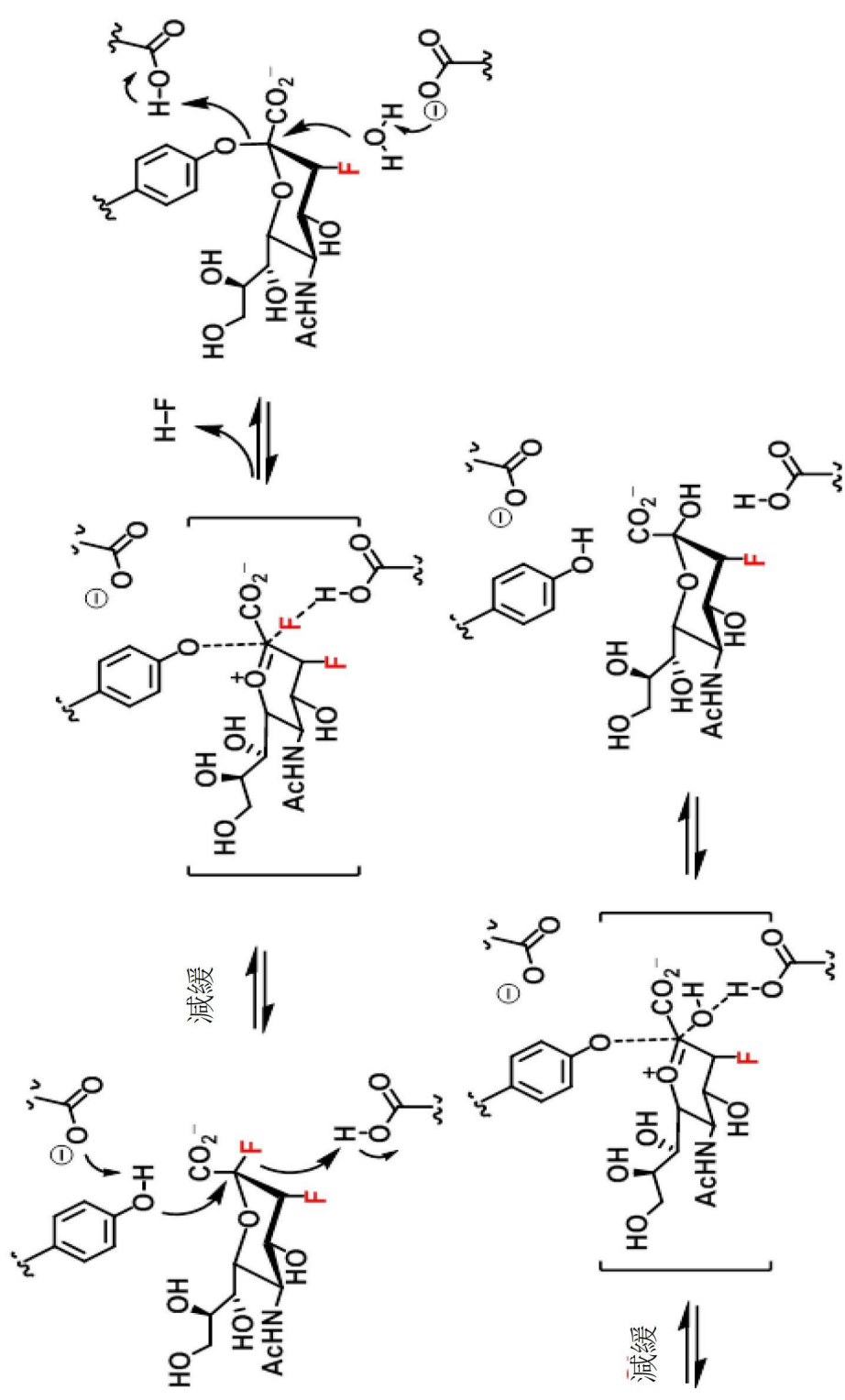
【圖10】



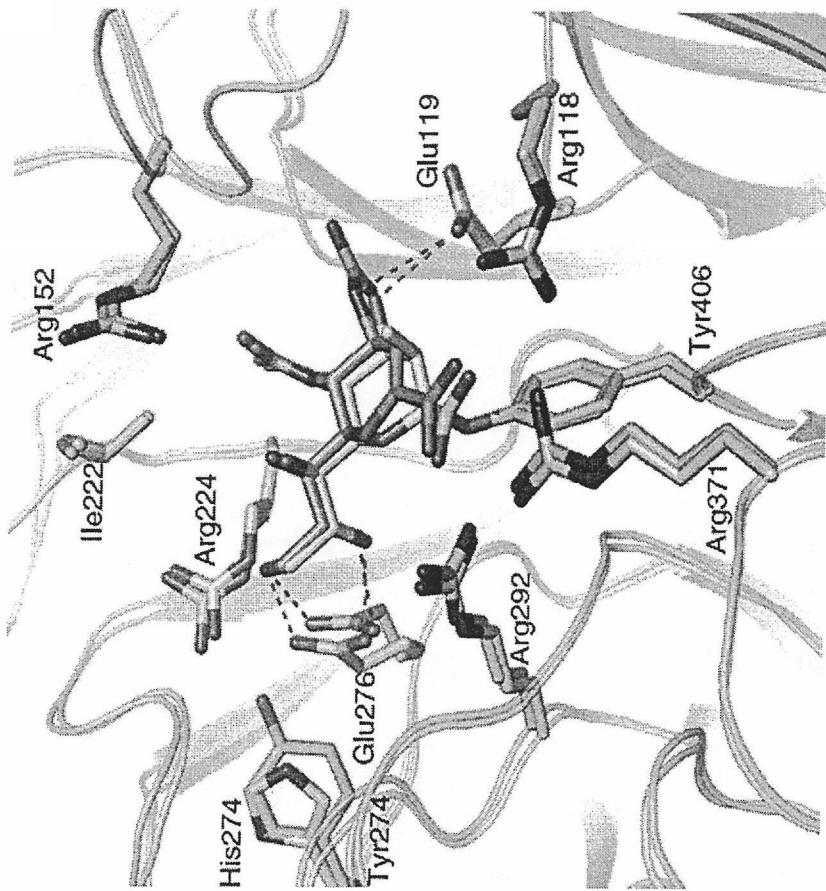
【圖11】



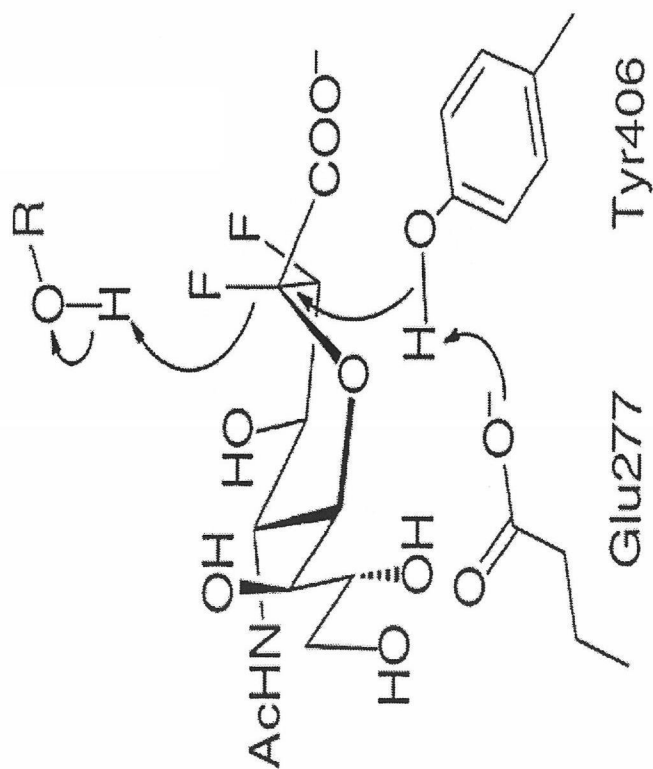
【圖12】



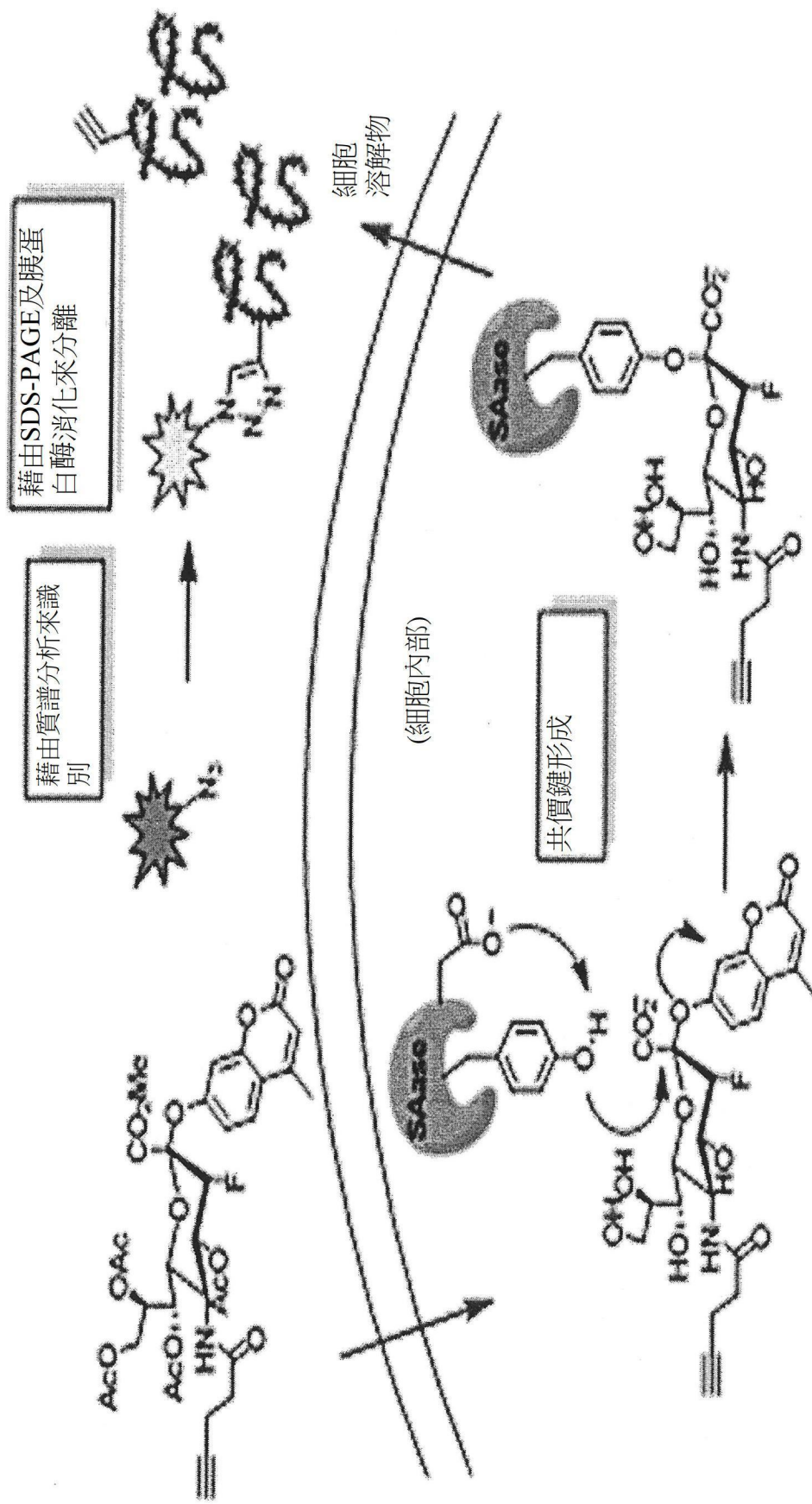
【圖13】



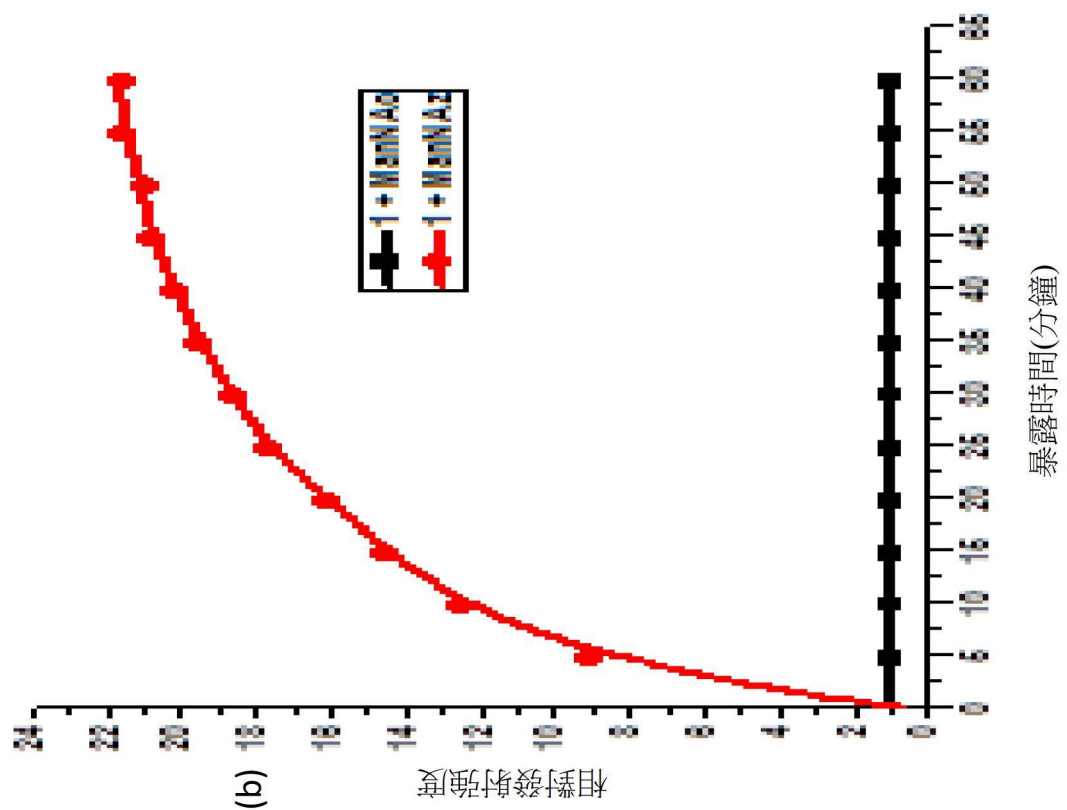
【圖14B】



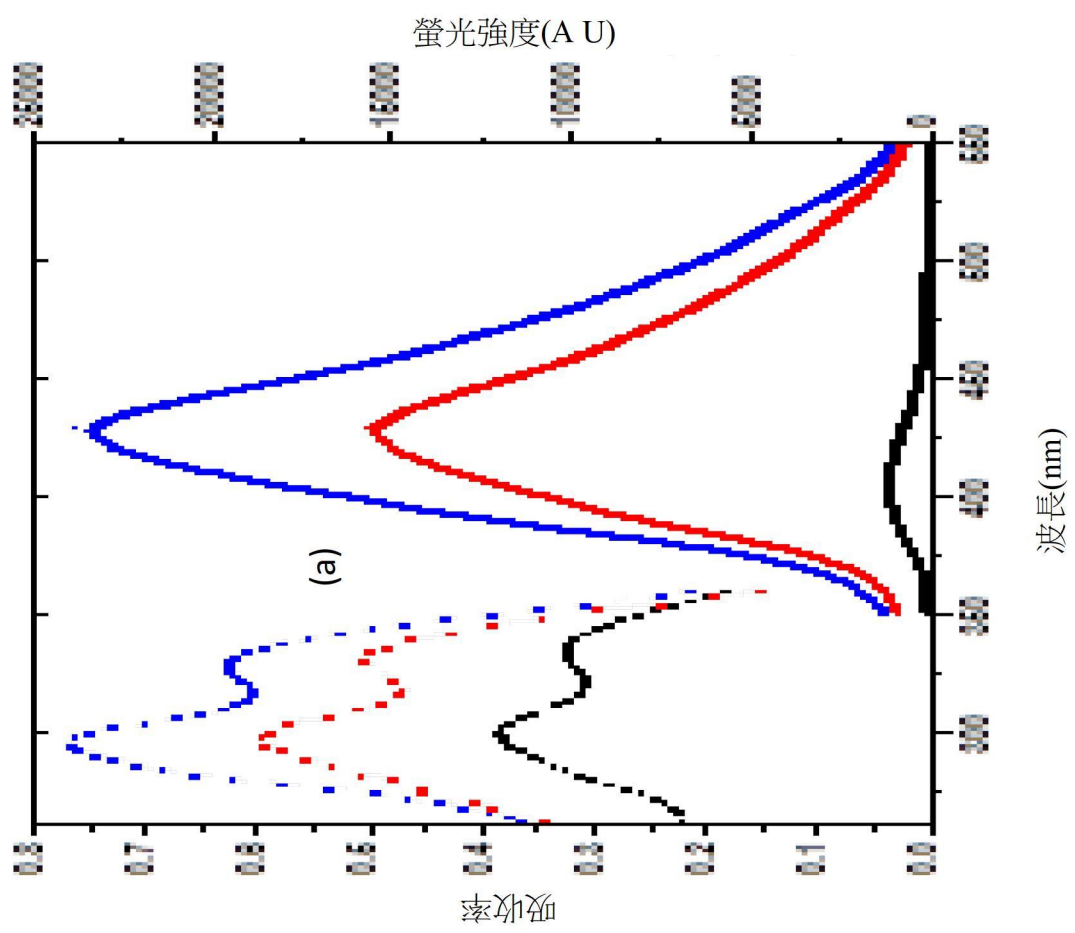
【圖14A】



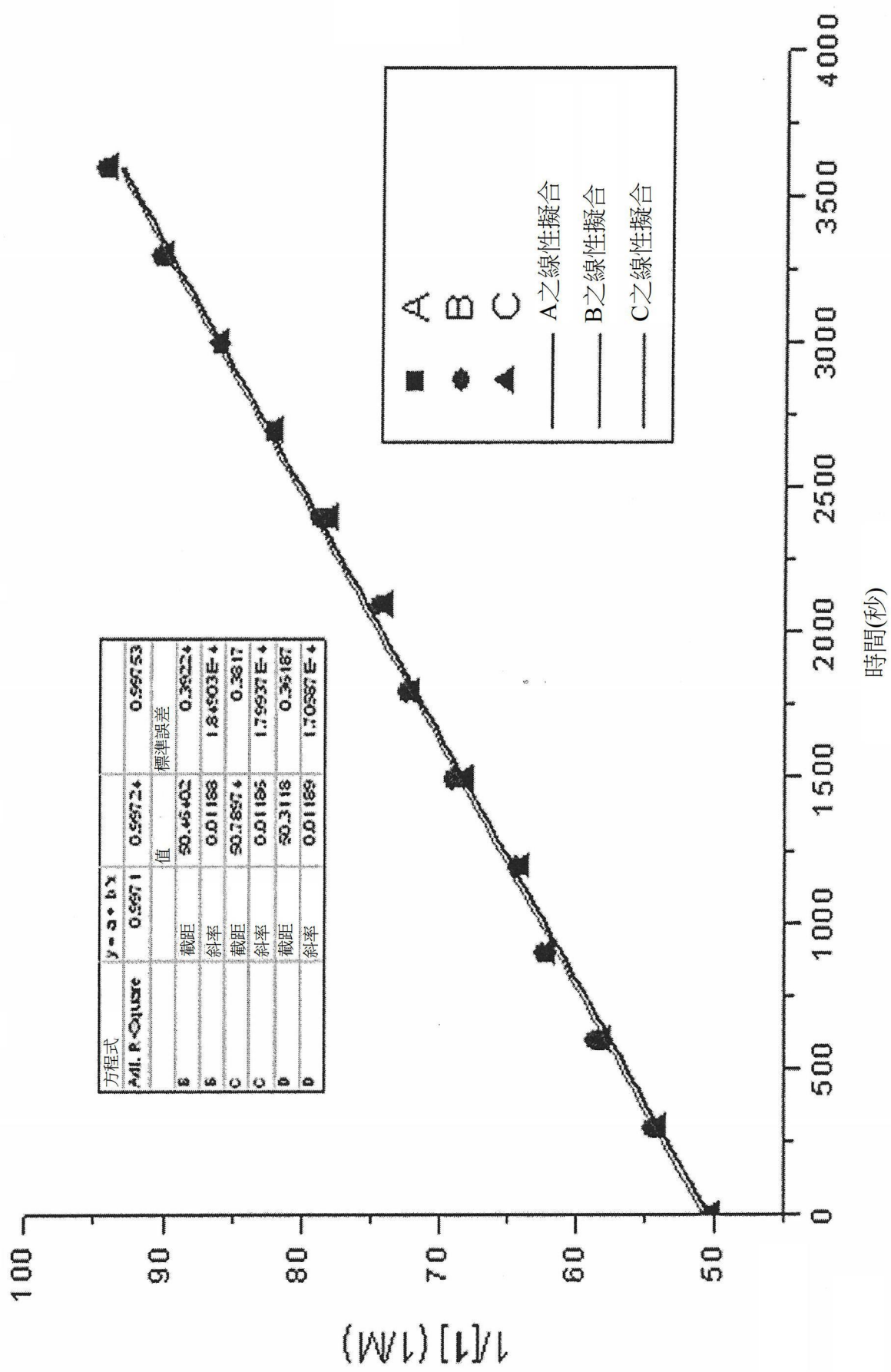
【圖15】



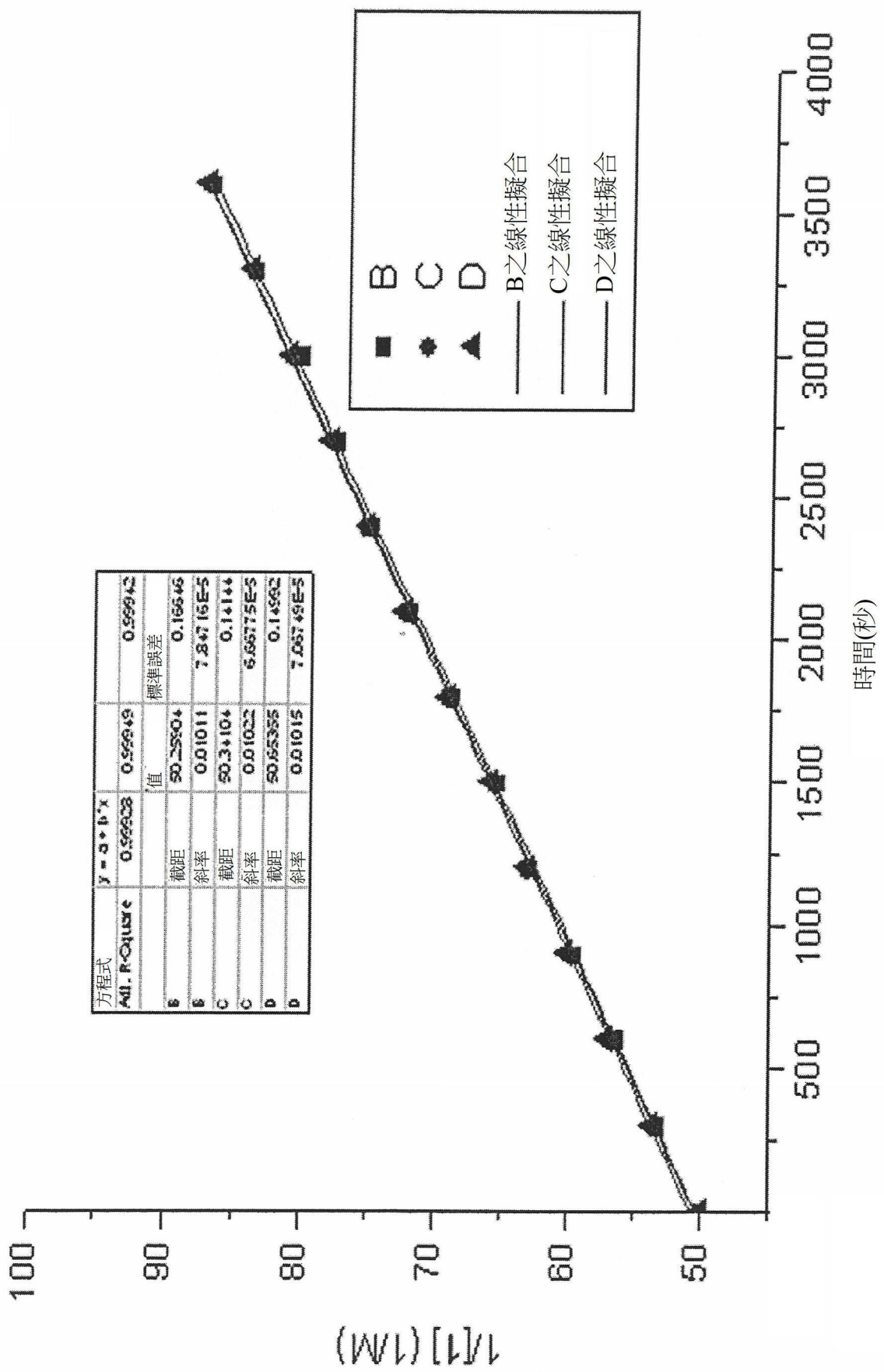
【圖16B】



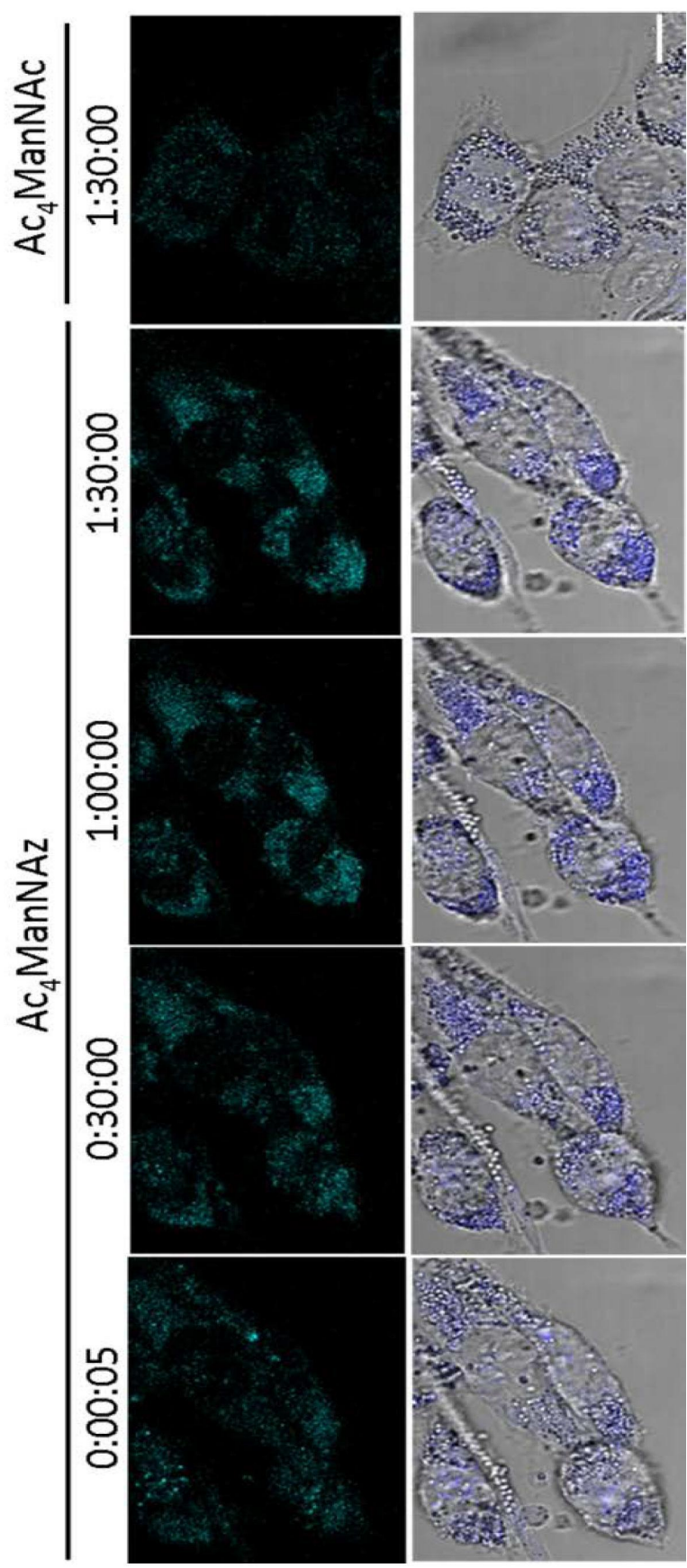
【圖16A】



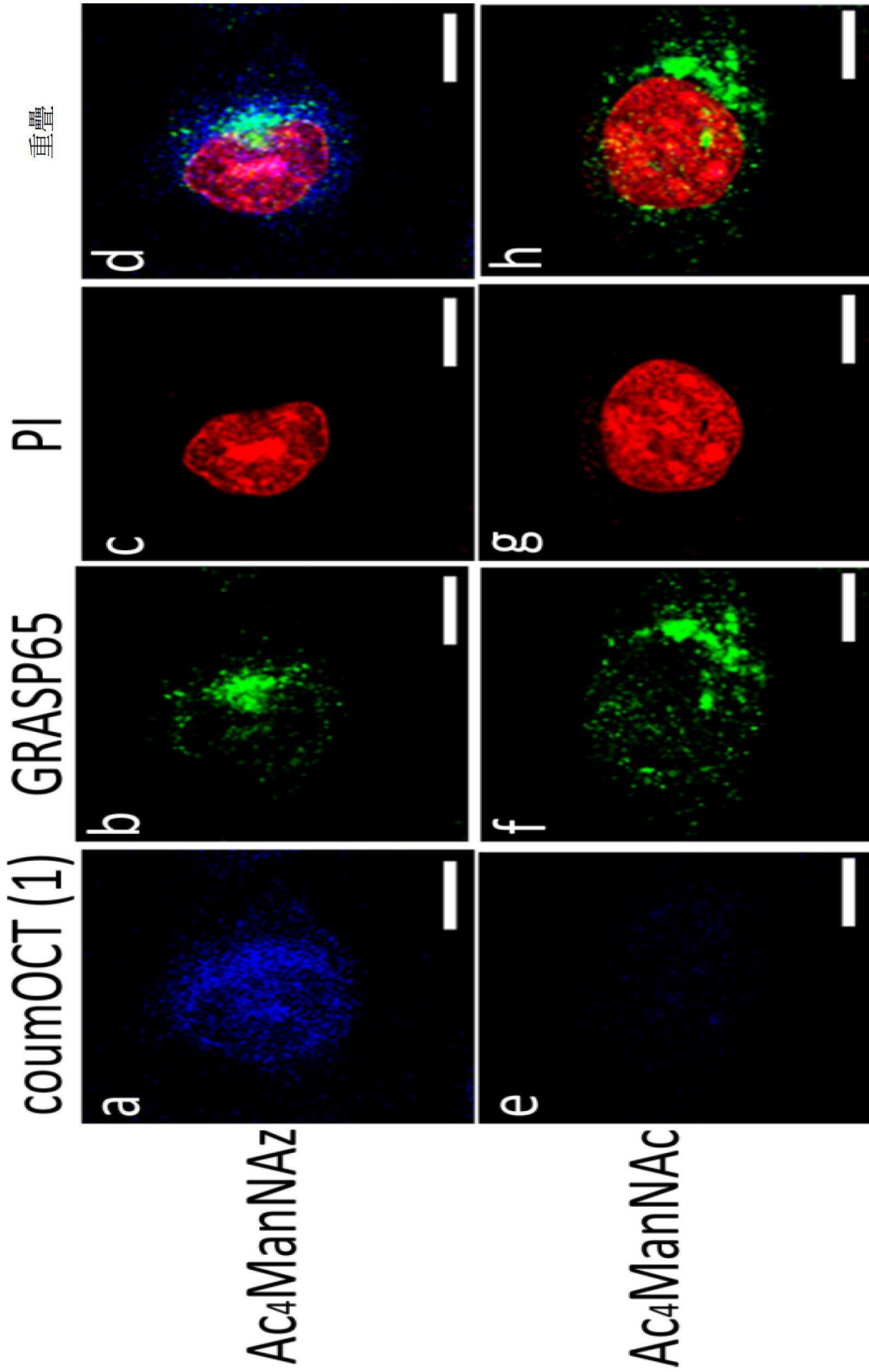
【圖17】



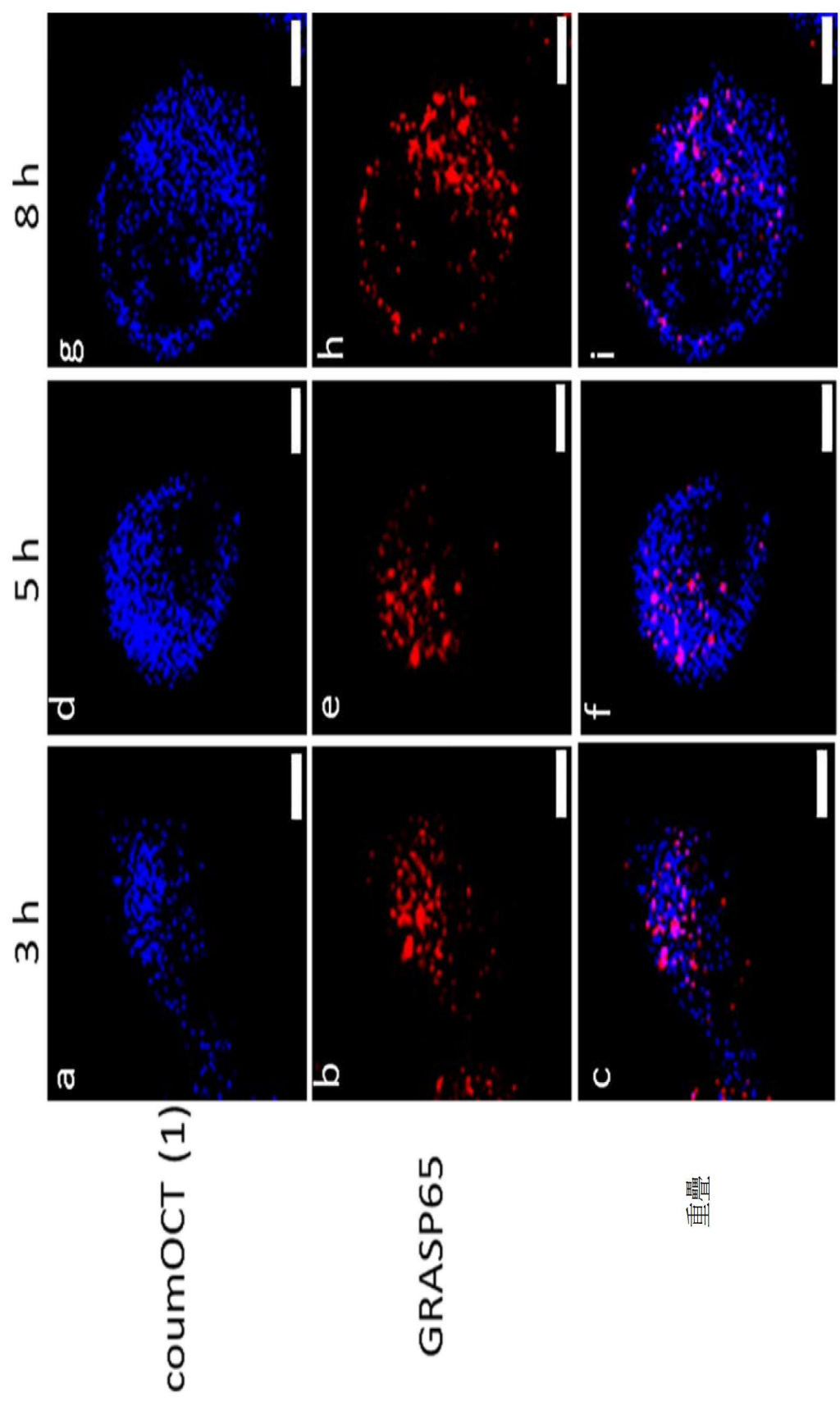
【圖18】



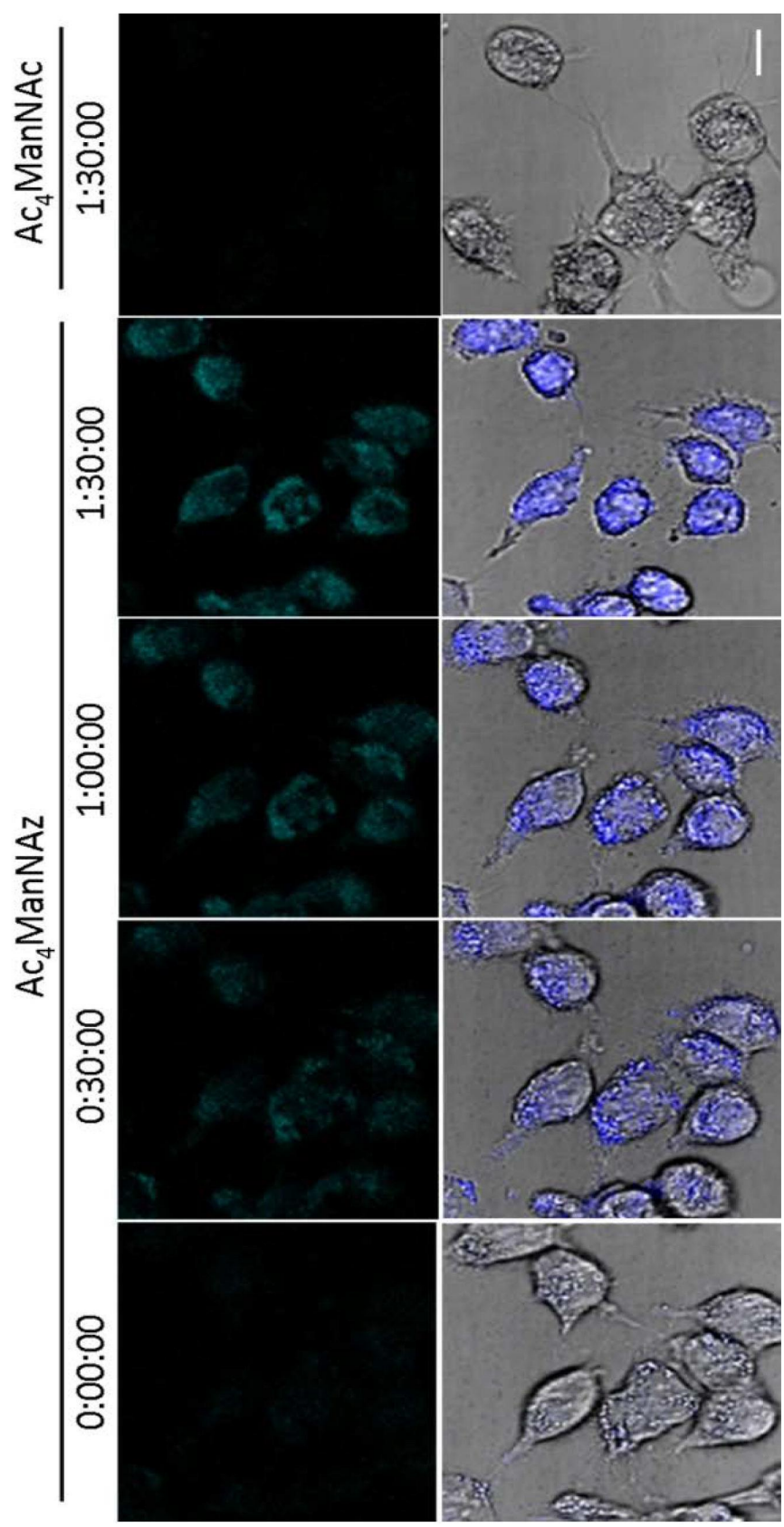
【圖19】



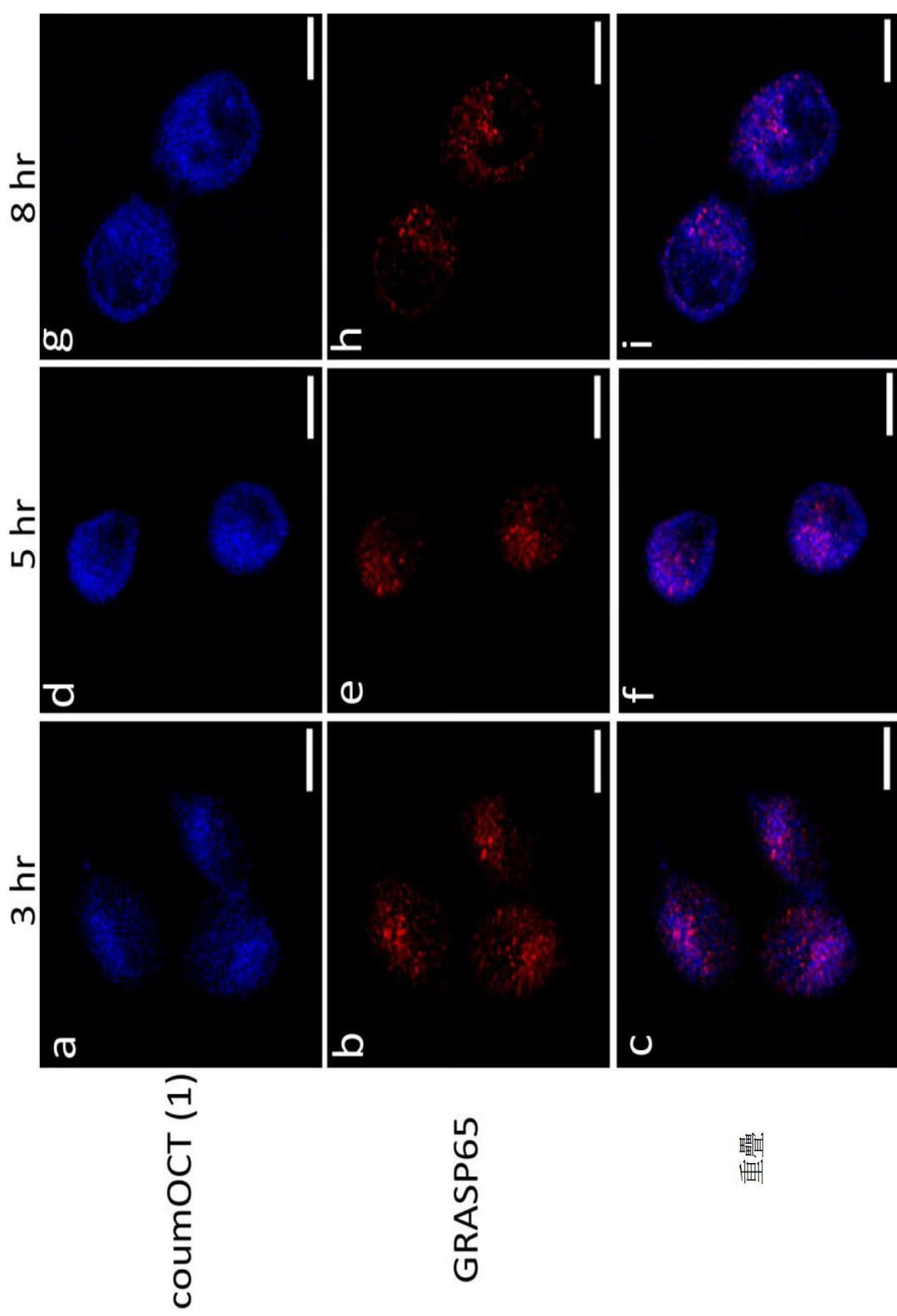
【圖20】



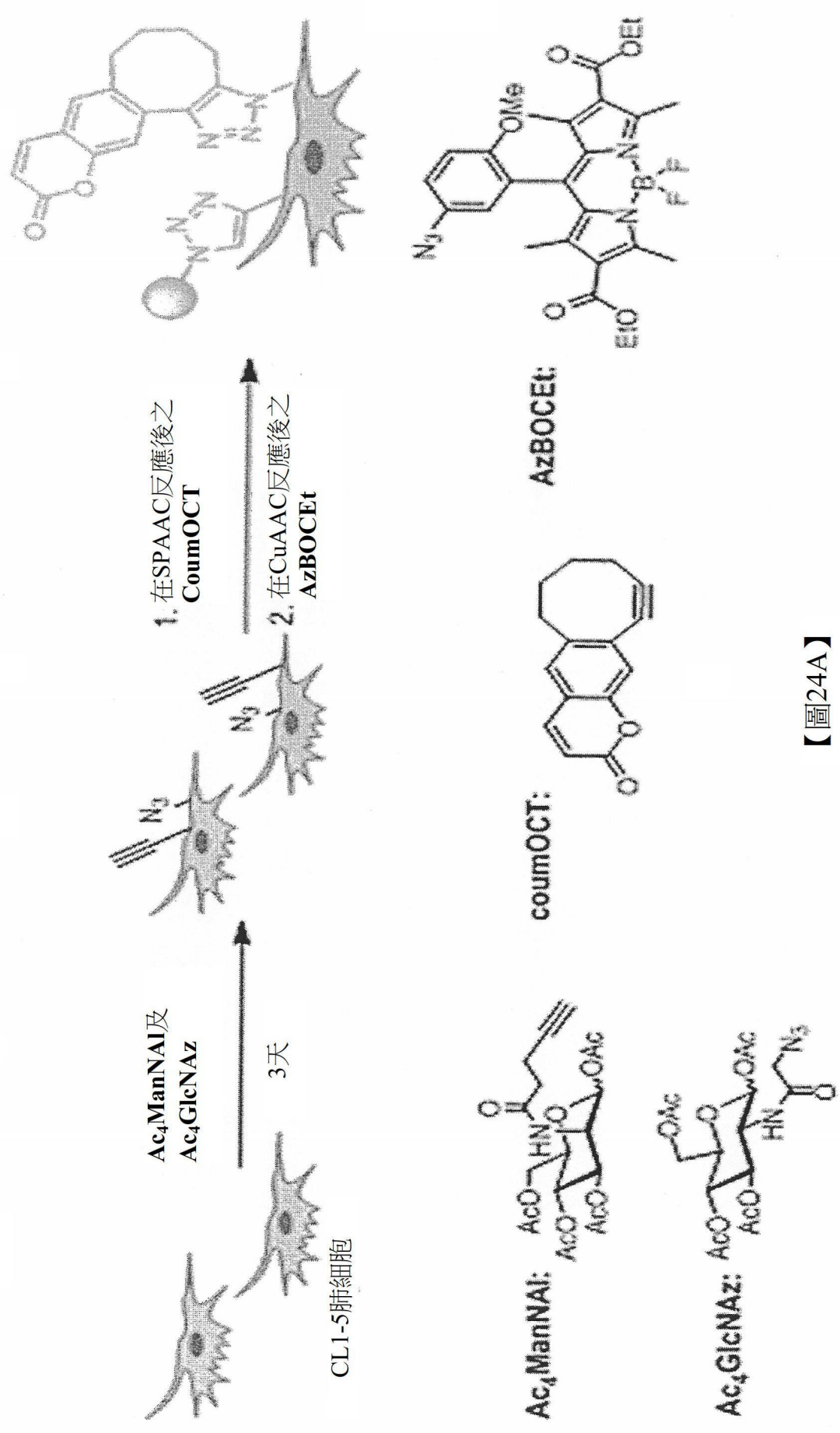
【圖21】



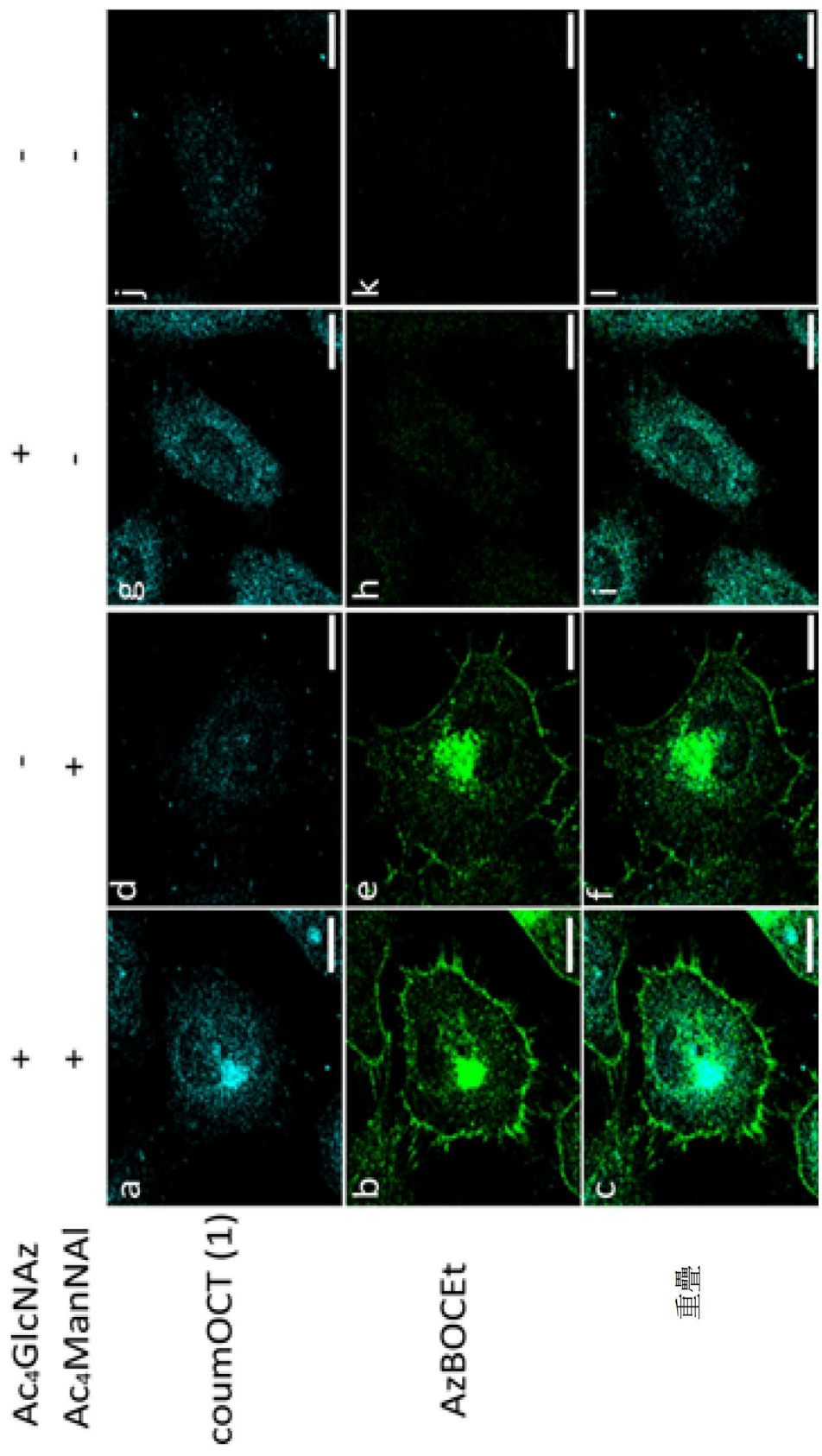
【圖22】



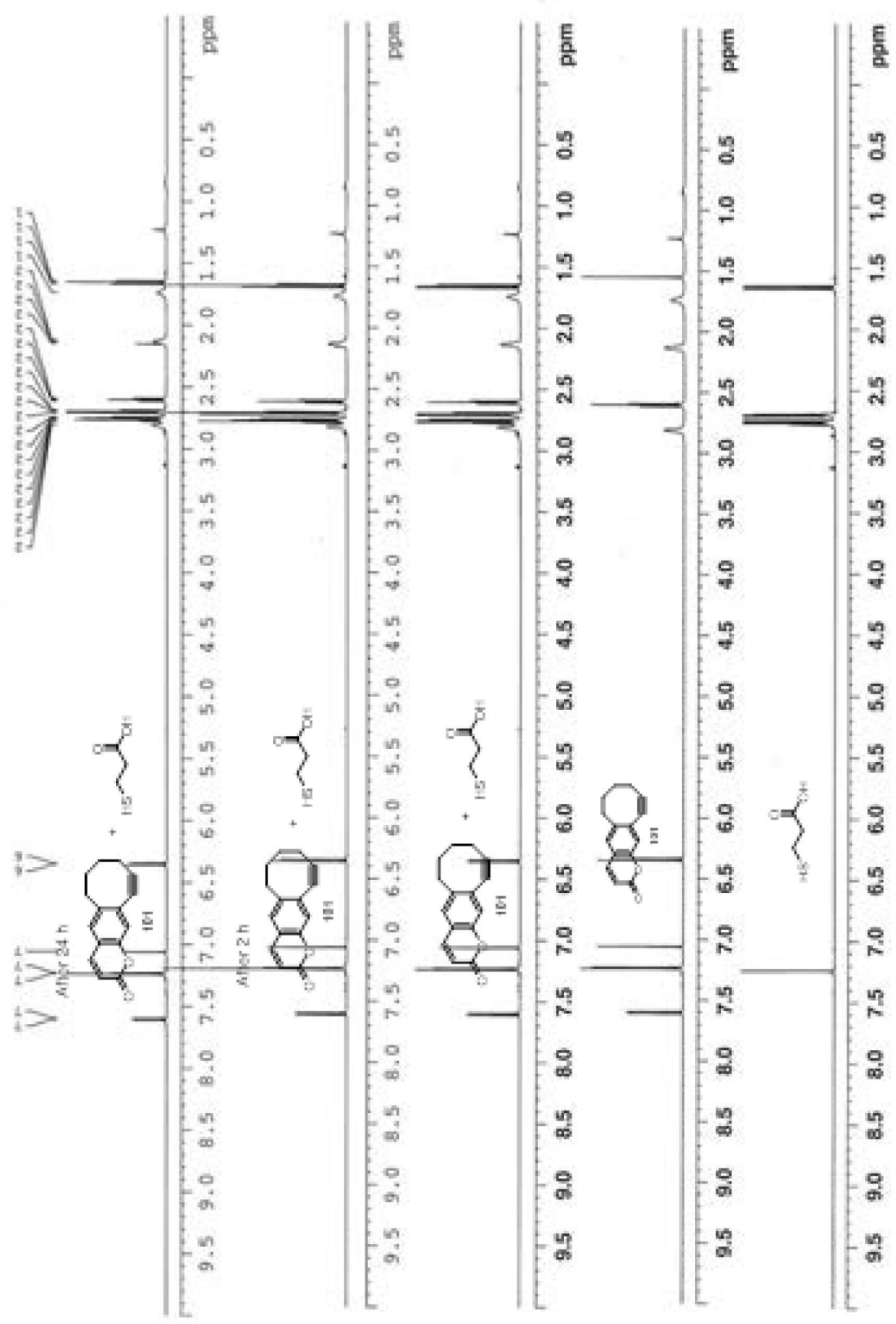
【圖23】



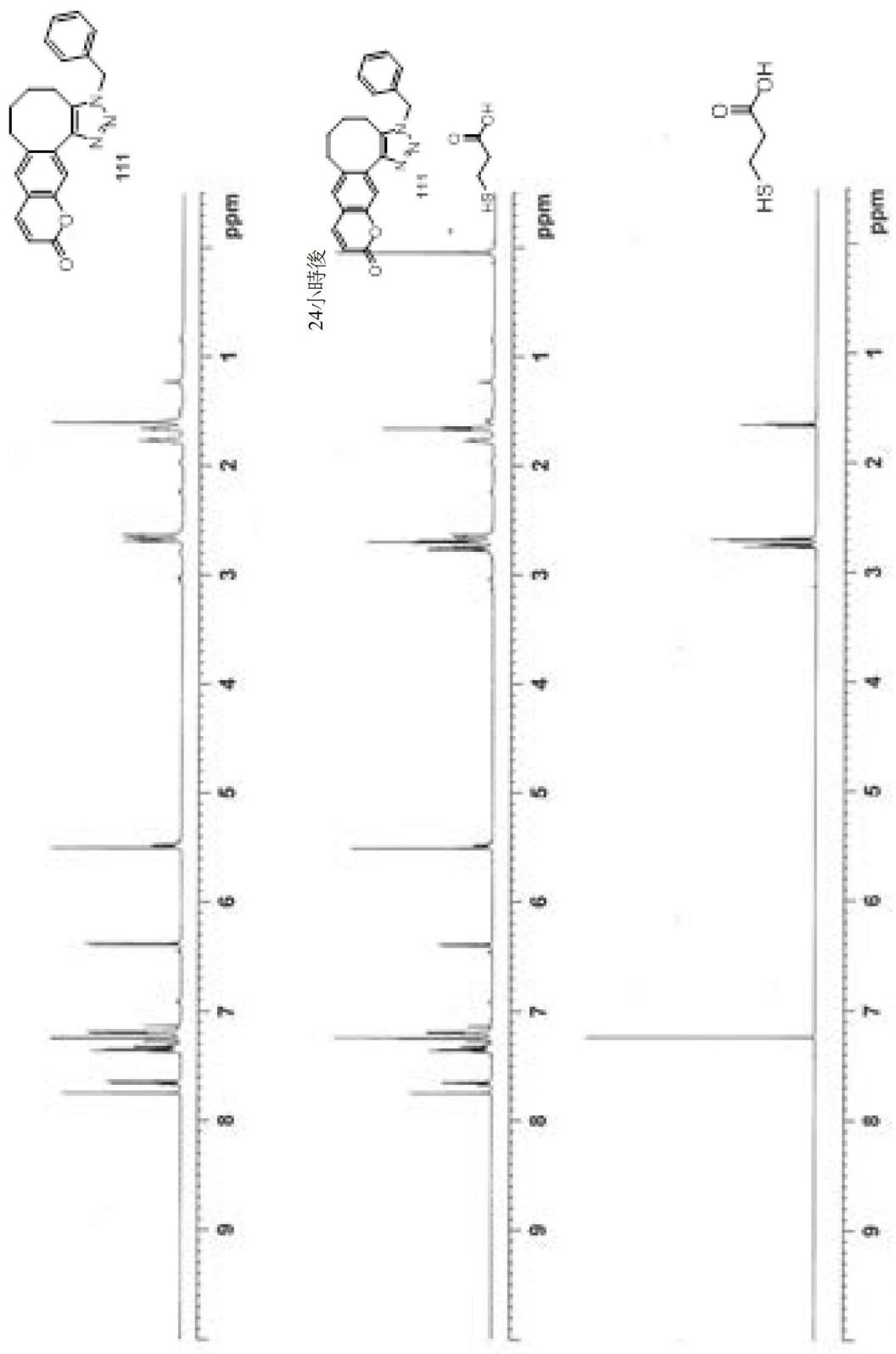
【圖24A】



【圖24B】



【圖25】



【圖26】