

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12Q 1/26 (2006.01)

C09B 57/00 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580025476.X

[43] 公开日 2007年7月4日

[11] 公开号 CN 1993477A

[22] 申请日 2005.5.24

[21] 申请号 200580025476.X

[30] 优先权

[32] 2004.5.28 [33] GB [31] 0411993.9

[86] 国际申请 PCT/GB2005/002057 2005.5.24

[87] 国际公布 WO2005/118839 英 2005.12.15

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.29

[71] 申请人 通用电气医疗集团英国有限公司

地址 英国白金汉郡

[72] 发明人 R·M·韦斯特 R·伊斯迈尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 程 淼 梁 谋

权利要求书 7 页 说明书 26 页 附图 5 页

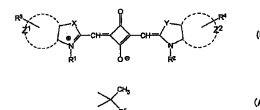
## [54] 发明名称

用于测量硝基还原酶活性的方法和试剂

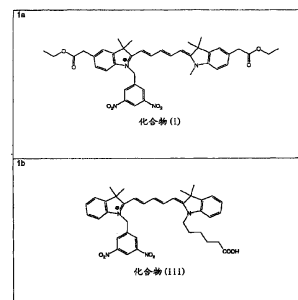
## [57] 摘要

公开了硝基-取代的 squaraine 报告染料以及用该类染料来探测细胞试验中的硝基还原酶活性和硝基还原酶基因表达的方法。所说的染料为结构式(I)的染料,其中 Z<sup>1</sup>和 Z<sup>2</sup>独立地表示苯基或萘基环系;X和Y选自氧、硫、-CH=CH-和基团, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>选自 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-P、-{(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O}<sub>p</sub>-R<sup>6</sup>和基团 W;其中 P 选自 COOR<sup>7</sup>、SO<sub>3</sub><sup>-</sup>和 OH, W 是单-或二-取代的硝基苄基, R<sup>6</sup>是甲基或乙基, R<sup>7</sup>选自 H、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基和 CH<sub>2</sub>OC(O)R<sup>8</sup>,其中 R<sup>8</sup>是甲基、或叔-丁基, n 是从 1 至 10 的整数,和 p 是从 1 至 3 的整数; R<sup>3</sup>和 R<sup>4</sup>选自氢、NO<sub>2</sub>、卤素、SO<sub>3</sub><sup>-</sup>、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷氧基和 -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-COOR<sup>7</sup>;其中 R<sup>7</sup>的定义如上文所述和 m 是 0 或 1 至 5 的整数; R<sup>5</sup>是任选地被 COOR<sub>7</sub>、SO<sub>3</sub><sup>-</sup>或 OH 取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;

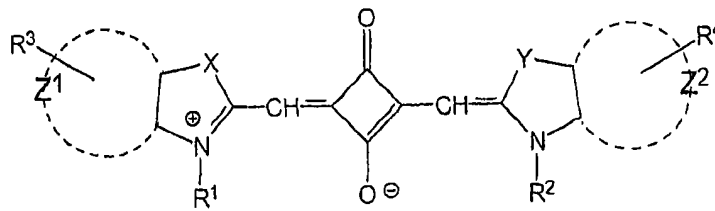
其中 R<sup>7</sup>的定义如上文所述;和基团 R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和 R<sup>4</sup>中至少一个包含至少一个 NO<sub>2</sub>基。还提供了对要测定其对硝基还原酶活性和硝基还原酶基因表达的作用的试验物质进行筛选的方法。



硝基取代的花青染料硝基还原酶底物:  
化合物 (I) 和 (II)



1. 一种探测组合物中的硝基还原酶活性的方法，其包括：
  - i) 将所说的组合物在促进硝基还原酶活性的条件下与染料分子进行混合物；和
  - ii) 测量所说染料分子光学性质的变化，其中所说的变化是硝基还原酶活性数量的度量；其特征在于所说的染料分子是包含至少一个  $\text{NO}_2$  基团的 squaraine 染料。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所说的组合物包含至少一种细胞或细胞提取物。
3. 如权利要求 1 或权利要求 2 所述的方法，其中所说的方法是在存在要测定其对硝基还原酶活性的影响的试验物质的情况下进行的。
4. 一种方法，其包括：
  - i) 将宿主细胞与染料分子进行接触，其中所说的宿主细胞已经用核酸分子进行了转染，所说的核酸分子包含与编码硝基还原酶的序列可操作地连接的表达控制序列；和
  - ii) 测量所说的染料分子光学性质的变化，其中所说的变化是硝基还原酶活性数量的度量；其特征在于所说的染料是包含至少一个  $\text{NO}_2$  基团的 squaraine 染料。
5. 如权利要求 1 至 4 中任意一项所述的方法，其中所说的光学性质的变化是所说染料分子荧光强度的增加，从而所说的增加是硝基还原酶活性数量的度量。
6. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的方法，其中所说的 squaraine 染料是式(I)的染料：



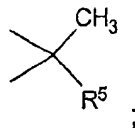
(I)

其中:

$R^3$  被连接到  $Z^1$  环结构上和  $R^4$  被连接到  $Z^2$  环结构上;

$Z^1$  和  $Z^2$  独立地表示苯基或萘基环系;

X 和 Y 相同或不同并选自氧、硫、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 和基团:



基团  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自  $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{-P}$ 、 $-\{(\text{CH}_2)_2\text{-O}\}_p\text{-R}^6$  和基团 W; 其中 P 选自  $\text{COOR}^7$ 、 $\text{SO}_3^-$  和 OH, W 是单-或二-取代的硝基苄基,  $R^6$  是甲基或乙基,  $R^7$  选自 H、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基和  $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{R}^8$ , 其中  $R^8$  是甲基、或叔-丁基, n 是从 1 至 10 的整数, 和 p 是从 1 至 3 的整数;

基团  $R^3$  和  $R^4$  独立地选自氢、 $\text{NO}_2$ 、卤素、 $\text{SO}_3^-$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷氧基和  $-(\text{CH}_2)_m\text{-COOR}^7$ ; 其中  $R^7$  的定义如上文所述和 m 是 0 或 1 至 5 的整数;

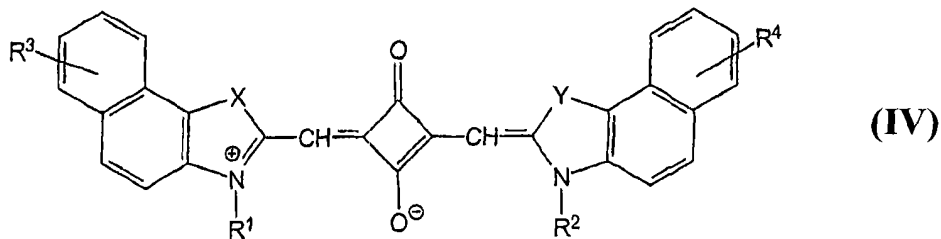
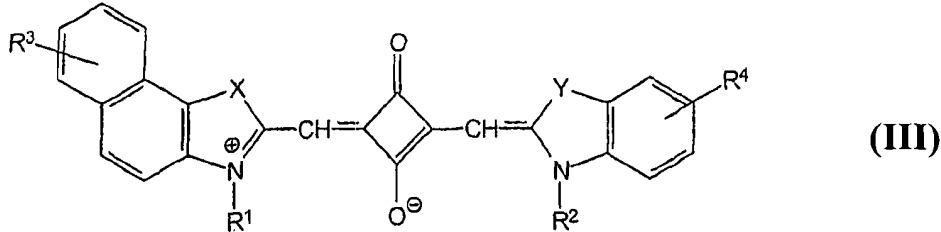
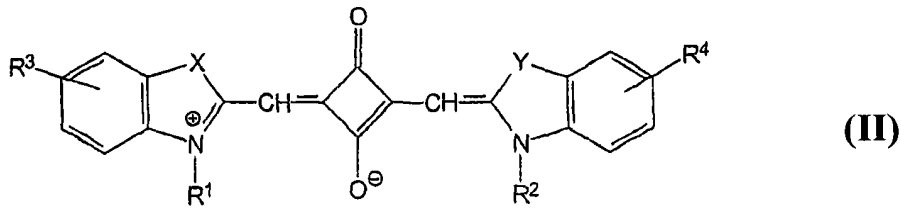
$R^5$  是任选地被  $\text{COOR}^7$ 、 $\text{SO}_3^-$  或 OH 取代的  $\text{C}_1\text{-C}_6$  烷基; 其中  $R^7$  的定义如上文所述; 和

基团  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  和  $R^4$  中至少一个包含至少一个  $\text{NO}_2$  基。

7. 如权利要求 4 至 6 中任意一项所述的方法, 其中所说的染料是细胞可渗透性的或者被赋予了细胞可渗透性。

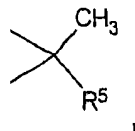
8. 如权利要求 1 至 7 中任意一项所述的方法, 其中所说 squaraine 染料的基团  $R^1$  和  $R^2$  中的一种是或者二者都是基团 W, 其中 W 的定义如上文所述。

9. 如权利要求 8 所述的方法, 其中所说的 squaraine 染料是选自下式染料的化合物:



其中：

X 和 Y 相同或不同并选自氧、硫、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 和基团：



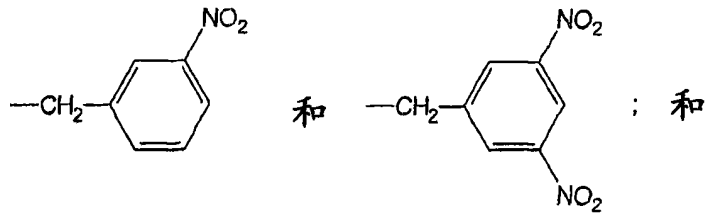
其中  $\text{R}^5$  的定义如上文所述；

$\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  中至少一个是基团 W；其中 W 的定义如上文所述；

任何其余的基团  $\text{R}^1$  或  $\text{R}^2$  选自  $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{-P}$  和  $\{(\text{CH}_2)_2\text{-O}\}_p\text{-R}^6$ ；其中 P 选自  $\text{COOR}^7$ 、 $\text{SO}_3^-$  和  $\text{OH}$ ， $\text{R}^6$  是甲基或乙基， $\text{R}^7$  选自  $\text{H}$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基和  $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{R}^8$ ，其中  $\text{R}^8$  是甲基、或叔-丁基， $n$  是从 1 至 10 的整数和  $p$  是从 1 至 3 的整数；和

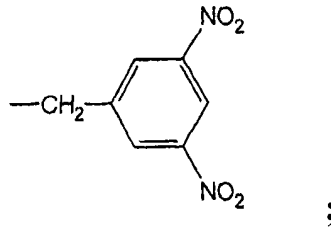
基团  $\text{R}^3$  和  $\text{R}^4$  独立地选自氢、卤素、 $\text{SO}_3^-$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷氧基和  $-(\text{CH}_2)_m\text{-COOR}^7$ ；其中  $\text{R}^7$  的定义如上文所述和  $m$  是 0 或 1 至 5 的整数。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中基团  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  中的一个选自基团 W，其中 W 选自：



其余的  $R^1$  或  $R^2$  选自甲基和乙基，或者是基团  $-(CH_2)_n-COOR^7$ ，其中  $R^7$  选自 H、 $C_1-C_4$  烷基和  $CH_2OC(O)R^8$ ，其中  $R^8$  是甲基、或叔-丁基， $n$  是从 1 至 10 的整数，优选地是 5 或 6。

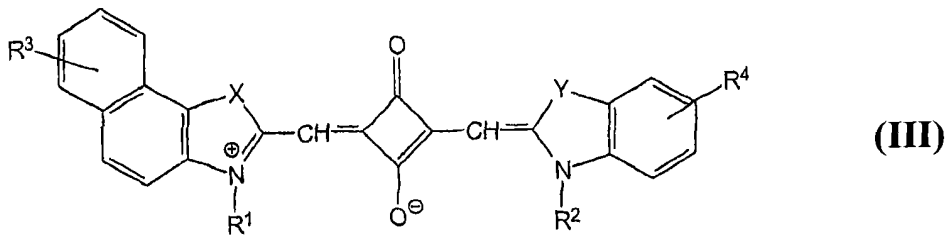
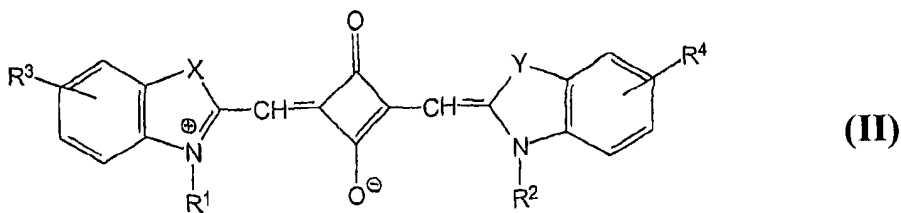
11. 如权利要求 10 所述的方法，其中 W 是基团：

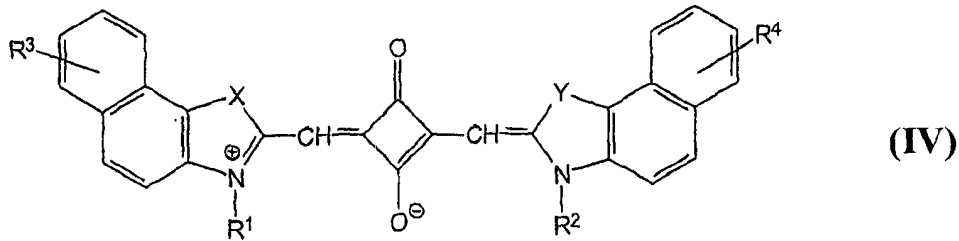


和其余  $R^1$  或  $R^2$  的定义如上文所述。

12. 如权利要求 1 至 7 中任意一项所述的方法，其中所说的 squaraine 染料的基团  $R^3$  和  $R^4$  中的一种是或者二者都是  $NO_2$ 。

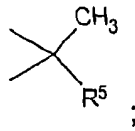
13. 如权利要求 12 所述的方法，其中所说的 squaraine 染料是下式的化合物：





其中：

X 和 Y 相同或不同并选自氧、硫、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 和基团：



其中  $\text{R}^5$  的定义如上文所述；

基团  $\text{R}^1$  或  $\text{R}^2$  独立地选自  $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{-P}$  和  $-\{(\text{CH}_2)_2\text{-O}\}_p\text{-R}^6$ ；其中 P 选自  $\text{COOR}^7$ 、 $\text{SO}_3^-$  和  $\text{OH}$ ， $\text{R}^6$  是甲基或乙基， $\text{R}^7$  选自  $\text{H}$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基和  $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{R}^8$ ，其中  $\text{R}^8$  是甲基、或叔-丁基，n 是从 1 至 10 的整数和 p 是从 1 至 3 的整数；

基团  $\text{R}^3$  和  $\text{R}^4$  中至少一个是  $\text{NO}_2$ ；和

任何其余的基团  $\text{R}^3$  或  $\text{R}^4$  选自氢、 $\text{SO}_3^-$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷氧基和  $-(\text{CH}_2)_m\text{-COOR}^7$ ；其中  $\text{R}^7$  选自  $\text{H}$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基和  $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{R}^8$ ，其中  $\text{R}^8$  是甲基、或叔-丁基，和 m 是 0 或 1 至 5 的整数。

14. 一种对要测定其对硝基还原酶基因表达的作用的试验物质进行筛选的方法，所说的方法包括：

a) 在不存在和存在所说试验物质的情况下进行如权利要求 4 至 13 中任意一项所述的方法；和

b) 在不存在和存在所说物质的情况下测定硝基还原酶基因表达的数量；

其中在不存在和存在所说物质情况下硝基还原酶基因表达数量之间的差异是所说物质对硝基还原酶基因表达的作用的指示。

15. 一种对要测定其对硝基还原酶基因表达的作用的试验物质进行筛选的方法，所说的方法包括：

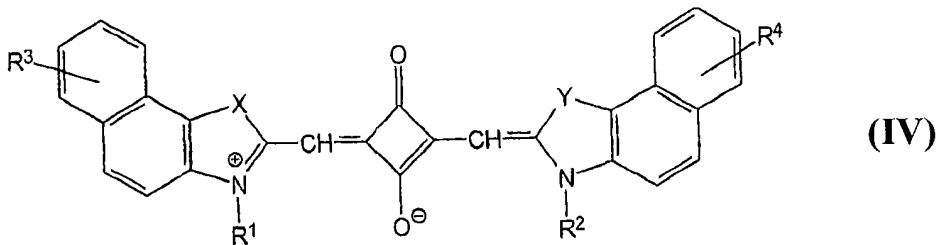
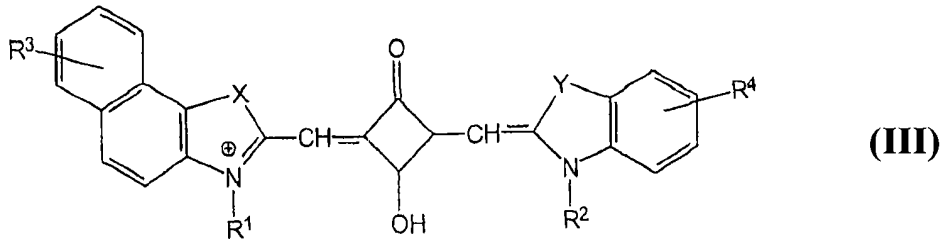
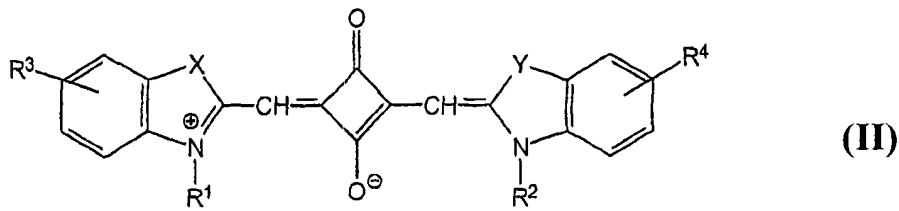
a) 在存在所说物质的情况下进行如权利要求 4 至 13 中任意一项所

述的方法；和

b)将硝基还原酶基因表达的数量与不存在该试验物质情况下硝基还原酶基因表达数量的对照值进行比较。

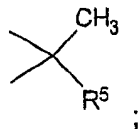
16. 如权利要求 15 所述的方法，其中将所说的对照值电子存储在数据库中或者存储为其它电子形式。

17. 一种选自下式染料的化合物：



其中：

X 和 Y 相同或不同并选自氧、硫、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 和基团：



基团  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  独立地选自  $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{-P}$ 、 $-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_p\text{-R}^6$  和基团 W；其中 P 选自  $\text{COOR}^7$ 、 $\text{SO}_3^-$  和 OH，W 是单-或二-取代的硝基苄基， $\text{R}^6$  是甲基或乙基， $\text{R}^7$  选自 H、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基和  $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{R}^8$ ，

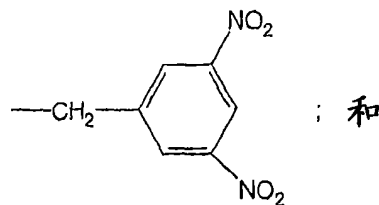
其中  $R^8$  是甲基、或叔-丁基,  $n$  是从 1 至 10 的整数, 和  $p$  是从 1 至 3 的整数;

基团  $R^3$  和  $R^4$  独立地选自氢、 $NO_2$ 、卤素、 $SO_3^-$ 、 $C_1$ - $C_4$  烷氧基和  $-(CH_2)_m-COOR^7$ ; 其中  $R^7$  选自 H、 $C_1$ - $C_4$  烷基和  $CH_2OC(O)R^8$ , 其中  $R^8$  是甲基、或叔-丁基, 和  $m$  是 0 或 1 至 5 的整数;

$R^5$  是任选地被  $COOR^7$ 、 $SO_3^-$  或 OH 取代的  $C_1$ - $C_6$  烷基; 其中  $R^7$  的定义如上文所述; 和

基团  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  和  $R^4$  中至少一个包含至少一个  $NO_2$  基。

18. 如权利要求 17 所述的化合物, 其中基团  $R^1$  和  $R^2$  中的一个



其余的  $R^1$  或  $R^2$  选自甲基、乙基和基团  $-(CH_2)_n-COOR^7$ ; 其中  $R^7$  的定义如上文所述和  $n$  是从 1 至 10 的整数。

19. 如权利要求 18 所述的化合物, 其中所说的其余的  $R^1$  或  $R^2$  选自基团  $-(CH_2)_5-COOR^7$  和  $-(CH_2)_6-COOR^7$ ; 其中  $R^7$  的定义如上文所述。

20. 如权利要求 17 所述的化合物, 其中:

基团  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自  $C_1$ - $C_4$  烷基、 $-(CH_2)_n-COOR^7$  和  $\{(CH_2)_2-O\}_p-R^6$ ; 其中  $R^6$  是甲基或乙基,  $R^7$  选自 H、 $C_1$ - $C_4$  烷基和  $CH_2OC(O)R^8$ , 其中  $R^8$  是甲基、或叔-丁基, 和  $n$  和  $p$  的定义如上文所述;

基团  $R^3$  和  $R^4$  中的至少一个是  $NO_2$ ; 和

其余的基团  $R^3$  或  $R^4$  选自氢、 $SO_3^-$ 、 $C_1$ - $C_4$  烷氧基和  $-(CH_2)_m-COOR^7$ ; 其中  $R^7$  的定义如上文所述和  $m$  是 0 或 1 至 5 的整数。

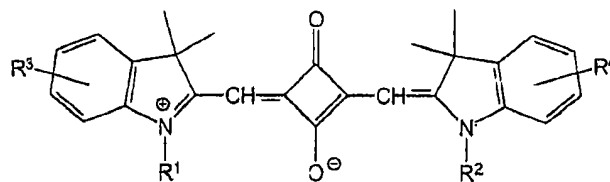
21. 如权利要求 17 至 20 中任意一项所述的化合物用作用于探测和/或测量硝基还原酶活性的底物的应用。



染料的结构，来自该 NTR 反应产物的荧光发射可以在很宽的波长范围内被产生，所说的波长范围通常为 500-900nm。更长波长下的发射可有利避免背景荧光和增加生物学系统的敏感性。

由报告基因构建体表达的野生型硝基还原酶被定位在宿主细胞的细胞质中(Spooner 等人, *Int.J.Cancer*,(2001), 93, 123-30)。为了从该试验中获得最大的信号输出，希望将所说的底物定位于相同的细胞隔室中作为报告酶，即，位于宿主细胞的细胞质中从而使得所说的底物可被硝基还原酶激活。掩盖所说底物分子上的亲水性基团或者连接到所说底物上的亲水性基团可以产生一些膜可渗透性化合物。此外，所说的掩盖基团可以被设计为可以在细胞内从所说的底物上裂解下来从而在细胞内，优选在细胞的细胞质内产生所说的底物。并未表明用于使硝基取代的花青染料相对均匀地传递到细胞的细胞质内的掩盖策略是完全成功的。用荧光显微镜进行的细胞渗透性淬灭的花青染料(Cy-Q)衍生物在细胞内的定位研究已经表明一些底物定位于内部细胞膜和细胞器中，主要位于细胞的线粒体中。亲脂性阳离子性硝基-取代的花青染料底物在线粒体中的积聚伴有探针的荧光增加，同时，这种积聚导致了 NRT 试验中的背景荧光增加。因此，需要可用作 NTR 底物的表现出更低的背景荧光、改善的荧光信号和细胞内分布的新的改良了的试剂。

Squarylium(squaraine)染料是一类总得来说为电中性的染料；其一个实例显示为化合物(ii)。



化合物 (ii)

硝基-取代的 squaraine 染料可以由 EP 645680(Bugner D.,等人)获知，其可作为近红外吸收添加剂用于电子照相成像过程。PCT 申请 WO97/40104(Hamilton, A.L.等人)公开了 squaraine 染料以及 squaraine 染料与生物学分子如肽、蛋白和核苷酸的加合物。该染料可以被供电

子和吸电子取代基，例如硝基取代；但是，其并没有公开该硝基取代的染料的荧光性质。本发明的发明人现在发现，通过将硝基还原，使得该 squaraine 染料的光学性质发生改变，优选是荧光发射发生改变，包含硝基的淬灭的 (quenched) squaraine 染料可有效作为硝基还原酶的底物。与使用常规 NTR 底物的试验相比，在测定硝基还原酶活性的试验中使用硝基-取代的 squaraine 染料大大增加了该试验的敏感性并降低了其背景荧光。

本发明第一方面提供了一种探测组合物中的硝基还原酶活性的方法，其包括：

i) 将所说的组合物在可以促进硝基还原酶活性的条件下与染料分子进行混合；和

ii) 测量所说染料分子光学性质的变化，其中所说的变化是硝基还原酶活性数量的度量；

其特征在于所说的染料分子是包含至少一个  $\text{NO}_2$  基团的 squaraine 染料。

在一个实施方案中，要探测其中硝基还原酶活性的组合物包含至少一种细胞或细胞提取物。所说的细胞可以是离体或在体的。例如，可以将所说的细胞在标准实验室条件下进行培养，或者所说的组合物可以是活体动物细胞。

在另一个实施方案中，所说的方法是在存在要测定其对硝基还原酶活性的作用的试验物质的情况下进行的。

本发明第二方面提供了一种方法，其包括：

i) 将宿主细胞与染料分子进行接触，其中所说的宿主细胞已经用包含表达控制序列(其与编码硝基还原酶的序列可操作地相连)的核酸进行了转染；

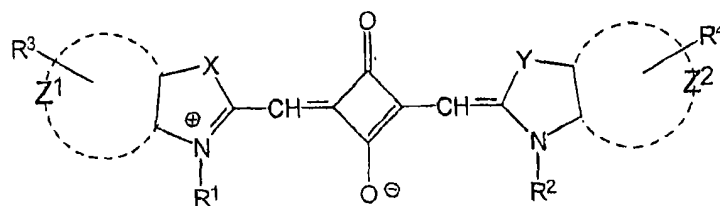
ii) 测量所说染料分子光学性质的变化，其中所说的变化是硝基还原酶活性数量的度量；

其特征在于所说的染料分子是包含至少一个  $\text{NO}_2$  基团的 squaraine 染料。

在染料分子中测量的光学性质适宜地是荧光发射强度，从而，荧光发射的增加是所说酶对所说染料作用的结果。例如，可以在第一波长(适宜地为该染料的最大激发)下对所说的组合物进行激发，在相当于

该酶反应产物的最大发射的第二波长下测量其荧光发射强度。也可以在一个波长范围内进行染料分子的激发和荧光发射的测量以将发射信号最大化和区别激发和发射信号。或者，所测量的光学性质的变化可以是该硝基还原酶作用前后该染料荧光寿命的变化。还可以用荧光寿命的变化来区别酶反应的产物和被用作底物的染料分子。作为另一种供替代的选择，所说的光学性质的变化可以是相对于产物的最大吸收而言，该染料分子最大吸收的变化。在优选的实施方案中，所说的光学性质的变化是所说染料分子荧光强度的增加，其增加是硝基还原酶活性数量的度量。

根据本发明的第一和第二方面，所说的 squaraine 染料适宜地是式 (I) 的化合物：



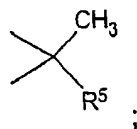
(I)

其中：

$R^3$  被连接到  $Z^1$  环结构上和  $R^4$  被连接到  $Z^2$  环结构上；

$Z^1$  和  $Z^2$  独立地表示苯基或萘基环系；

X 和 Y 相同或不同并选自氧、硫、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 和基团：



基团  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  烷基、 $-(\text{CH}_2)_n-\text{P}$ 、 $-\{(\text{CH}_2)_2-\text{O}\}_p-$ 、 $\text{R}^6$  和基团 W；其中 P 选自  $\text{COOR}^7$ 、 $\text{SO}_3^-$  和 OH，W 是单-或二-取代的硝基苄基， $\text{R}^6$  是甲基或乙基， $\text{R}^7$  选自 H、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$  烷基和  $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{R}^8$ ，其中  $\text{R}^8$  是甲基、或叔-丁基，n 是从 1 至 10 的整数，和 p 是从 1 至 3 的整数；

基团  $R^3$  和  $R^4$  独立地选自氢、 $\text{NO}_2$ 、卤素、 $\text{SO}_3^-$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷氧基和  $-(\text{CH}_2)_m\text{-COOR}^7$ ；其中  $R^7$  的定义如上文所述并且  $m$  是 0 或 1 至 5 的整数；

$R^5$  是任选地被  $\text{COOR}^7$ 、 $\text{SO}_3^-$  或  $\text{OH}$  取代的  $\text{C}_1\text{-C}_6$  烷基；其中  $R^7$  的定义如上文所述；和

基团  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  和  $R^4$  中至少一个包含至少一个  $\text{NO}_2$  基。

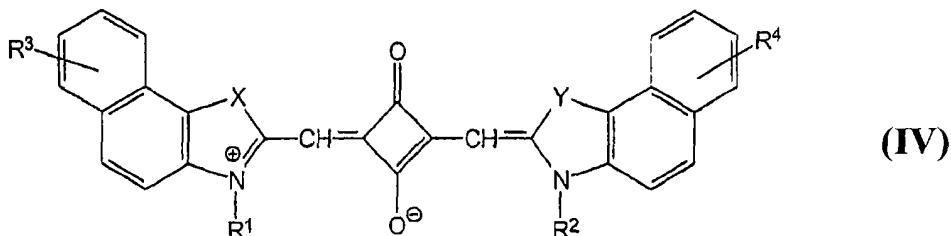
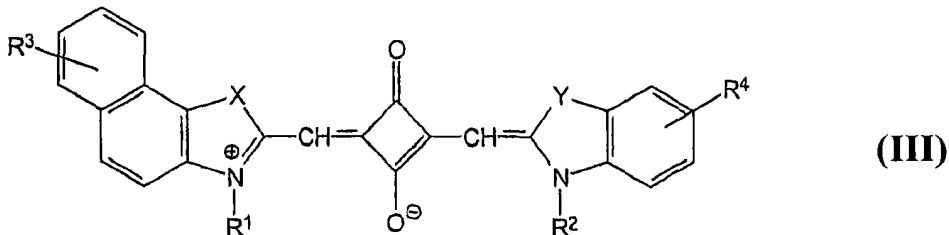
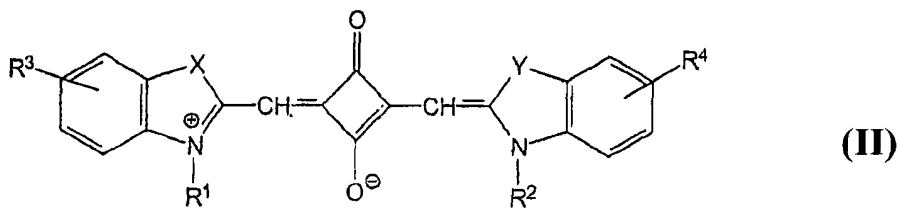
式(I)的 squaraine 染料可适宜地包含一种反荷离子(counter-ion)，所说的反荷离子可以是正电或负电以平衡该染料发色团或取代基上的形式电荷(formal charge)(或多个形式电荷)。该反荷离子的性质对本发明而言并不重要，并且可以是许多已知离子如  $\text{H}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、三氟乙酸盐( $\text{F}_3\text{C-CO}_2^-$ )、高氯酸盐( $\text{ClO}_4^-$ )、 $\text{Br}^-$ 、或  $\text{I}^-$  中的任何一种。

所说的式(I)的染料中所包含的至少一个硝基可以适宜地被直接连接到  $Z^1$  和  $Z^2$  环结构上。在这种实施方案中，该 squaraine 染料的基团  $R^3$  和  $R^4$  中的一种是或者二者都是  $\text{NO}_2$ 。在另一个实施方案中，所说 squaraine 染料的基团  $R^3$  和  $R^4$  中的一种是或者二者都是基团  $W$ ，其中  $W$  的定义如上文所述。所说的 squaraine 染料可以任选地被一个或两个连接到其芳环结构上的硝基进一步取代。

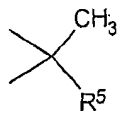
在优选的实施方案中，在本发明方法中所用的 squaraine 染料对于细胞而言是可渗透的。在这些实施方案中，基团  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  和  $R^4$  中至少一个包含细胞膜透化基团。可以通过掩盖亲水性基团从而提供更疏水的化合物来产生膜透化化合物。所说的掩盖基团可以被设计为可以在细胞内从所说底物上裂解下来从而在细胞内产生被衍生的底物。因为所说的底物比所说的膜透透衍生物更亲水，所以其被截留在细胞内。适宜的细胞膜透化基团可以选自可以容易被哺乳动物内源性细胞内的酯酶裂解的乙酰氧基甲基酯(Jansen, A. B. A.和 Russell, T. J., J. Chem. Soc., 2127-2132(1965)和 Daehne, W.等人. J. Med-. Chem. 13, 697-612(1970))以及新戊酰酯(Madhu 等人 J. Ocul. Pharmacol. Ther.,(1998), 14, 5, 第 389-399 页)，但是也可以是本领域技术人员公认的其它适宜基团。

在一个实施方案中，所说 squaraine 染料的基团  $R^1$  和  $R^2$  中的一种是或者二者都是基团  $W$ ，其中  $W$  的定义如上文所述。在本发明这一实施方案中所用染料的特定实例是这些选自式(II)、(III)和(IV)染料的染

料:



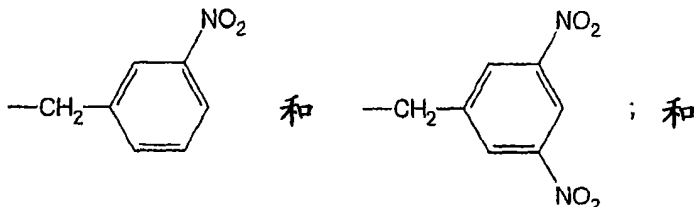
其中:

X 和 Y 相同或不同并选自氧、硫、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 和基团:其中  $\text{R}^5$  的定义如上文所述; $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  中至少一个是基团 W; 其中 W 的定义如上文所述;

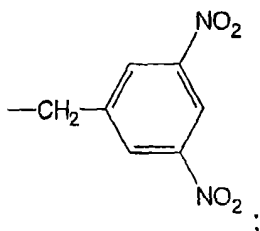
任何其余的  $\text{R}^1$  或  $\text{R}^2$  选自  $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{-P}$  和  $-((\text{CH}_2)_2\text{-O})_p\text{-R}^6$ ; 其中 P 选自  $\text{COOR}^7$ 、 $\text{SO}_3^-$  和  $\text{OH}$ ,  $\text{R}^6$  是甲基或乙基,  $\text{R}^7$  选自 H、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基和  $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{R}^8$ , 其中  $\text{R}^8$  是甲基、或叔-丁基, n 是从 1 至 10 的整数和 p 是从 1 至 3 的整数; 和

基团  $\text{R}^3$  和  $\text{R}^4$  独立地选自氢、卤素、 $\text{SO}_3^-$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷氧基和  $-(\text{CH}_2)_m\text{-COOR}^7$ ; 其中  $\text{R}^7$  的定义如上文所述和 m 是 0 或 1 至 5 的整数。

在这种实施方案中，优选地基团  $R^1$  和  $R^2$  中的一个选自基团 W，其中 W 选自：

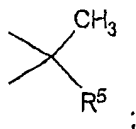


其余的  $R^1$  或  $R^2$  选自甲基或乙基、或基团  $-(CH_2)_n-COOR^7$ ，其中  $R^7$  选自 H、 $C_1-C_4$  烷基和  $CH_2OC(O)R^8$ ，其中  $R^8$  是甲基、或叔-丁基， $n$  是从 1 至 10 的整数，优选地是 5 或 6。在一个特别优选的实施方案中，W 是基团：



和其余  $R^1$  或  $R^2$  的定义如上文所述。

在另一个实施方案中，式(II)、(III)和(IV)的 squaraine 染料的基团  $R^3$  和  $R^4$  中的一种是或者二者都是  $NO_2$ 。在这种实施方案中，X 和 Y 相同或不同并选自氧、硫、 $-CH=CH-$  和基团：



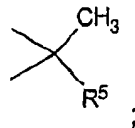
其中  $R^5$  的定义如上文所述；

基团  $R^1$  或  $R^2$  独立地选自  $C_1-C_4$  烷基、 $-(CH_2)_n-P$  和  $-((CH_2)_2-O)_p-R^6$ ；其中 P 选自  $COOR^7$ 、 $SO_3^-$  和 OH， $R^6$  是甲基或乙基， $R^7$  选自 H、 $C_1-C_4$  烷基和  $CH_2OC(O)R^8$ ，其中  $R^8$  是甲基、或叔-丁基， $n$  是从 1 至 10 的整数和  $p$  是从 1 至 3 的整数；

$R^3$  和  $R^4$  中的至少一个是  $NO_2$ ； 和

任何其余的  $R^3$  或  $R^4$  选自氢、 $SO_3^-$ 、 $C_1-C_4$  烷氧基和  $-(CH_2)_m-COOR^7$ ；其中  $R^7$  选自 H、 $C_1-C_4$  烷基和  $CH_2OC(O)R^8$ ，其中  $R^8$  是甲基、或叔-丁基，和  $m$  是 0 或 1 至 5 的整数。

在优选的实施方案中，X 和 Y 选自氧、硫和



其中  $R^5$  是甲基。

优选的  $C_1-C_4$  烷基选自甲基和乙基。特别优选的  $-(CH_2)_n-COOR^7$  基选自  $-(CH_2)_5-COOR^7$ 、和  $-(CH_2)_6-COOR^7$ ；其中  $R^7$  的定义如上文所述。

卤素原子选自氟、氯、溴和碘。

本发明第三方面提供了一种对试验物质进行筛选的方法，对该试验物质对硝基还原酶基因表达的作用进行了测试。所说的方法包括的步骤有：a) 在不存在和存在所说试验物质的情况下进行本发明第二方面所说的方法；和 b) 在不存在和存在所说物质的情况下测定硝基还原酶基因表达的数量；其中在不存在和存在所说物质情况下硝基还原酶基因表达之间的差异是所说物质对硝基还原酶基因表达作用的指示。

在另一方面，所说的用于对试验物质进行筛选的方法可以通过 a) 在存在所说物质的情况下进行本发明第二方面的方法；和 b) 将硝基还原酶基因表达的数量与不存在所说试验物质情况下硝基还原酶基因表达数量的对照值进行比较来进行。可以将该对照值以电子格式存储在数据库中或者以其它电子格式进行存储。

用许多酶基因作为哺乳动物细胞中的报告基因的方法是众所周知的(其综述可参见 Naylor L.H.(1999) *Biochemical Pharmacology* 58, 749-757)。对所说的报告基因进行选择以使得可以在存在其它细胞蛋白的情况下测量所说基因的产物并在所选择的对宿主细胞中基因表达改变有响应的调节序列的控制下将其引入到细胞内。典型的调节序列包括那些对激素、第二信使和其它细胞控制和信号因子有响应的序列。例如，已知与七种膜受体结合的激动剂可以调节一些启动子原件，包括 cAMP 响应原件、NFAT、SRE 和 AP1；MAP 激酶的活化产生了导

致 Fos 和 Jun 转录的 SRE 调节；DNA 损害激活了 DNA 修复酶和肿瘤抑制基因 p53 的转录。通过选择适宜的调节序列，可以用所说的报告基因来对所加入的物质对涉及所选择的正在进行研究的调节序列的细胞过程的影响进行分析。

对于作为报告基因的应用而言，所说的硝基还原酶基因可以用众所周知的方法进行分离，例如可以通过用聚合酶链反应由 cDNA 库进行扩增(分子克隆，实验室手册(Molecular Cloning, A Laboratory Manual),第 2 版, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989, 第 14.5-14.20 页)。在分离出来之后，可以与进行研究的基因调节序列一起并在其控制下将该硝基还原酶基因插入到适用于与哺乳动物启动子一起使用的载体中(分子克隆，实验室手册，第 2 版, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989, 第 16.56-16.57 页)。然后，可以通过用众所周知的技术进行转染而将该包含硝基还原酶报告基因和相关联的调节序列的载体引入到宿主细胞中，例如可以用 DEAE-葡聚糖或磷酸钙来进行转染(分子克隆，实验室手册，第 2 版, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989, 第 16.30-16.46 页)。其它适宜的技术对于本领域技术人员而言也是众所周知的。已经表明，当以这种方式进行表达时，硝基还原酶可以被保留在细胞中(见 Bridgewater 等人 Eur. J. Cancer,(1995), 31A, 2362-70)。

本发明的方法可以与可在标准组织培养塑料器皿中进行培养的任何粘附细胞类型一起使用，所说的细胞类型包括就种属(例如人、啮齿类动物、猿)、组织来源(例如脑、肝、肺、心、肾、皮肤、肌肉)和细胞类型(例如上皮、内皮)而言衍生自任何公认来源的细胞类型。已经确定了一些可用于对不同细胞类型进行培养的方案。(见例如, Freshney, R.I., 动物细胞的培养：基础技术手册(Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique), 第 2 版, Alan R.Liss Inc. 1987)。将所选择的宿主细胞系接种到无菌的组织培养物处理的培养皿中并将其在 37°C 下，在 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿气氛中在适宜的培养基中进行培养，所说的适宜培养基通常为包含 10% 胎牛血清 + 2mM L-谷酰胺的 Dulbecco's Modified Eagles 培养基。可以用众所周知的方法将该质粒载体转染到哺乳动物细胞中，例如可以用阳离子脂质、磷酸钙、和电穿孔来进行转染。推荐在试验前将各细胞系的转染效率进行优化以确保可以获得

可再现的数据。通常在转染后 24-72 小时对硝基还原酶的短暂表达进行分析。将所制备的硝基还原酶基因报告 DNA/转染试剂复合体滴加到各皿中。将所说皿的内含物仔细混合并将其培养最少 4 小时。将其在 37 °C 下在 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿气氛下培养一整夜是适当的。在培养后，取出各皿的培养基并将细胞单层用无菌的磷酸盐缓冲盐水(PBS)进行洗涤。可以直接在该转染皿中对被转染了的细胞进行分析，或者可以将细胞从各皿中分离出来，汇集，将其制成转染细胞的混悬液。通常在转染后 24-72 小时对硝基还原酶的短暂表达进行分析。

在本发明典型的以腺病毒为基础的 NTR 基因报告试验中，在病毒转导前 24 小时，将所选择的宿主细胞继代培养并将其在 37°C 下在 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿气氛下培养一整夜。用胰蛋白酶对这些细胞进行分离并将得自各烧瓶的细胞汇集，将其制成细胞的混悬液。将位于混悬液中的细胞与病毒在预定的感染复数(MOI)下合并于体积足以覆盖适宜的组织培养物处理的烧瓶底部的完全培养基中并将其在 37°C 下在 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿气氛中培养一整夜。将细胞分离(胰蛋白酶)，制备转导细胞的混悬液。

可以适宜地用所说的包含硝基还原酶的载体来制备用于基因报告试验的瞬时细胞和稳定细胞。对于稳定细胞系的制备而言，必需选择适宜的试剂如抗生素 G418。根据这种方法，应当以低密度(适宜地为 100-500)将这些细胞接种到适宜的皿中，并向培养基中加入所选择的试剂。所选择试剂的最佳浓度将根据细胞类型和所需的生长速率来进行变化，并且 0.1 mg/ml 至 1 mg/ml 的加入浓度是适宜的。

为了对试验物质对硝基还原酶活性的作用进行分析，将细胞分配到微孔板的孔中，所说的微孔板适宜地为具有 24、96、384 或更高的孔密度，例如 1536 个孔的微量滴定板。在将其在 37°C 下培养一整夜后，除去培养基并将试验物质加入到不含血清的培养基中。用仅包含不含血清的培养基的孔作为对照。在培养后，向其中加入硝基还原酶底物并用适宜的荧光计或成像系统来测量随着时间的流逝荧光信号的增加。

为了对试验物质通过进行研究的调节序列激活细胞响应的能力进行分析，将已经用所说的硝基还原酶报告基因进行了转染的细胞与试验物质一起进行培养，然后向其中加入细胞渗透性 squaraine 染料底

物,如包含至少一个 NO<sub>2</sub>基团的 squaraine 染料。在经过将所说的染料底物转化为荧光发射增加的形式所需的适宜时间后,用适宜的荧光计或成像系统在对于所选择的 squaraine 染料而言适宜的波长下测量随着时间的流逝得自所说细胞的荧光发射。

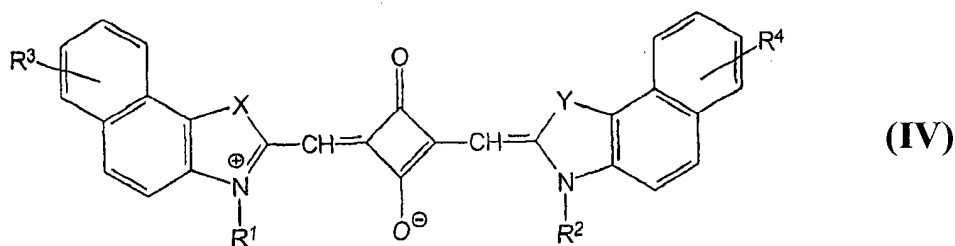
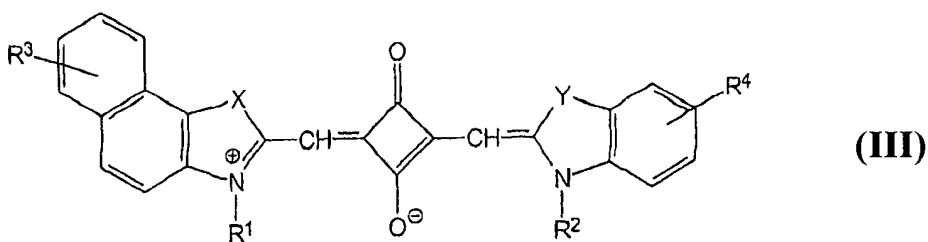
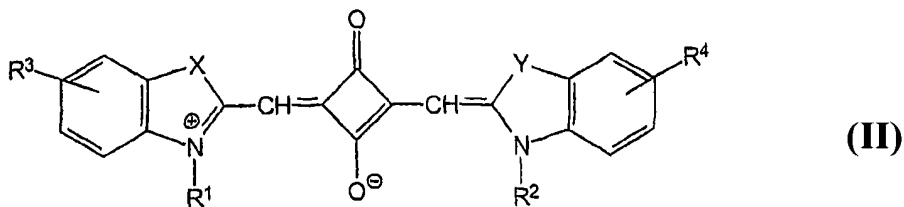
这些基因报告试验通常是在“终止”条件下进行的,例如将细胞溶解以探测报告基因。因此,使所说的反应进行预定的时间,然后用终止试剂结束该反应,所说的终止试剂通常为表面活性剂。终止试剂的一个实例是 Triton X-100,可以用其来破坏细胞膜和释放酶活性。此外,可以用标准试剂如甲醛将细胞“固定”,并且将该硝基还原酶反应的产物截留在细胞内。其使得可以将试验板储存适宜的时间直至进行读数。

在要对试验进行格式化以对试验物质对硝基还原酶活性的活性进行测定时,该试验可以在连续测量底物荧光的情况下来进行。在这种形式中,所说底物的荧光发射强度不断发生变化。可以获得该反应的时间-过程,从而使得可以进行实时动力学研究。可以将所发射荧光的测量结果与得自未与试验物质进行接触的对照细胞的荧光测量结果进行比较,并且如果有的话,由试验细胞荧光与对照细胞荧光的比例来测定试验物质对由所说调节序列调节的基因表达的作用。

可以用装有光电倍增管作为检测器的仪器,例如“Ultra”荧光计(Tecan)或电荷耦合器件(CCD)图像仪(如扫描图像仪或面积图像仪)对微量滴定板的所有孔成像来测量荧光强度的变化。LEADseeker™系统的特色在于CCD照相机使得可以在单次经过时对高密度微量滴定板进行荧光成像。其成像是定量的并且很快,并且适用于成像应用的仪器现在同时可以对整个多孔板进行成像。或者,可以在“活细胞”格式下用 INCell™ 1000 分析器或 INCell™ 3000 分析器来对细胞进行成像。在这种形式中,应当向所说的细胞中加入适宜的细胞标记物,如具有与被还原底物的荧光发射不同并且可以与之区分开的荧光发射波长的细胞质、核或膜荧光标记。适宜地在 500 nm 至 900 nm,优选 550-780 nm,最优选 630-700 nm 的波长下来探测底物所发射的荧光。例如,对于化合物(1)(实施例 1)而言,可以在 630 nm 下激发,在 645 nm 下对荧光发射进行监测。或者,可以将所说的染料体内给药于适当地工程化的转基因动物模型。然后,可以用适宜的光学系统,例如 eXplore

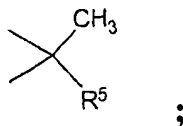
Optix™ 成像来测定硝基还原酶的活性和定位。

另一方面，本发明提供了选自下式染料的确基-取代的 squaraine 染料：



其中：

X 和 Y 相同或不同并选自氧、硫、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 和基团：



基团  $\text{R}^1$  和  $\text{R}^2$  独立地选自  $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{-P}$ 、 $-[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_p\text{-R}^6$  和基团 W；其中 P 选自  $\text{COOR}^7$ 、 $\text{SO}_3^-$  和 OH，W 是单-或二-取代的硝基苄基， $\text{R}^6$  是甲基或乙基， $\text{R}^7$  选自 H、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基和  $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{R}^8$ ，其中  $\text{R}^8$  是甲基、或叔-丁基，n 是从 1 至 10 的整数，和 p 是从 1 至 3 的整数；

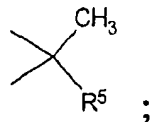
基团  $\text{R}^3$  和  $\text{R}^4$  独立地选自氢、 $\text{NO}_2$ 、卤素、 $\text{SO}_3^-$ 、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷氧基和  $-(\text{CH}_2)_m\text{-COOR}^7$ ；其中  $\text{R}^7$  选自 H、 $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基和  $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{R}^8$ ，其中

$R^8$  是甲基、或叔-丁基，和  $m$  是 0 或 1 至 5 的整数；

$R^5$  是任选地被  $COOR^7$ 、 $SO_3^-$  或  $OH$  取代的  $C_1-C_6$  烷基；其中  $R^7$  的定义如上文所述；和

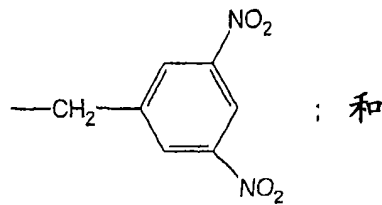
基团  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  和  $R^4$  中至少一个包含至少一个  $NO_2$  基。

$X$  和  $Y$  优选地选自氧、硫和



其中  $R^5$  是甲基。

在一个实施方案中，基团  $R^1$  和  $R^2$  中的一个



其余的  $R^1$  或  $R^2$  选自甲基、乙基和基团  $-(CH_2)_n-COOR^7$ ；其中  $R^7$  的定义如上文所述和  $n$  是从 1 至 10 的整数，优选地是 5 或 6。

在另一个实施方案中，基团  $R^1$  和  $R^2$  独立地选自  $C_1-C_4$  烷基、 $-(CH_2)_n-COOR^7$  和  $-((CH_2)_2-O)_p-R^6$ ；其中  $R^6$  是甲基或乙基， $R^7$  选自  $H$ 、 $C_1-C_4$  烷基和  $CH_2OC(O)R^8$ ，其中  $R^8$  是甲基、或叔-丁基，和  $n$  和  $p$  的定义如上文所述；

基团  $R^3$  和  $R^4$  中至少一个是  $NO_2$ ；和

其余的基团  $R^3$  或  $R^4$  选自氢、 $SO_3^-$ 、 $C_1-C_4$  烷氧基和  $-(CH_2)_m-COOR^7$ ；其中  $R^7$  的定义如上文所述和  $m$  是 0 或 1 至 5 的整数。

所说的 squaraine 染料可用作探测和/或测量硝基还原酶活性并且特别是用于测量细胞试验中硝基还原酶基因表达数量的底物。

本发明第一方面染料的实例如下：

i) 2-(1-甲基-3,3-二甲基-2-亚二氢吲哚基甲基)-4-(1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-2-亚二氢吲哚基甲基)环丁烯二基鎓(cyclobutenediylum)-1,3-二酸盐(-diolate) (2-(1-methyl-3,3-dimethyl-2-indolinyliidene-methyl)-4-(1-(3,5-dinitrobenzyl)-3,3-dimethyl-2-

indolinyliidenemethyl)cyclobutenediylum-1,3-diolate)(化合物 1);

ii) 2-(1-(5-羧基戊基)-3,3-二甲基-2-亚二氢吲哚基甲基)-4-(1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-2-亚二氢吲哚基甲基)环丁烯二基𨾏-1,3-二酸盐(化合物 2);

iii) 2-(1-(5-羧基戊基)-3,3-二甲基-2-亚苯并二氢吲哚基甲基)-4-(1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-2-亚二氢吲哚基甲基)环丁烯二基𨾏-1,3-二酸盐 (2-(1-(5-carboxypentyl)-3,3-dimethyl-2-benzindolinyliidenemethyl)-4-(1-(3,5-dinitrobenzyl)-3,3-dimethyl-2-indolinyliidenemethyl)cyclobutenediylum-1,3-diolate)(化合物 3);

iv) 2-(3-乙基-6-硝基-2-亚苯并噻唑啉基甲基)-4-(1-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-3,3-二甲基-2-亚二氢吲哚基甲基)环丁烯二基𨾏-1,3-二酸盐 (2-(3-ethyl-6-nitro-2-benzothiazolinyliidenemethyl)-4-(1-(2-(2-methoxyethoxy)ethyl)-3,3-dimethyl-2-indolinyliidenemethyl)cyclobutenediylum-1,3-diolate)(化合物 4);

v) 2-(1-乙基-3,3-二甲基-5-甲氧基-2-亚二氢吲哚基甲基)-4-(1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-5-甲氧基-2-亚二氢吲哚基甲基)环丁烯二基𨾏-1,3-二酸盐(化合物 5);

vi) 2-(1-(5-羧基戊基)-3,3-二甲基-5-甲氧基-2-亚二氢吲哚基甲基)-4-(1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-5-甲氧基-2-亚二氢吲哚基甲基)环丁烯二基𨾏-1,3-二酸盐(化合物 6);

vii) 3-(5-羧基戊基)-1-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-3-甲基-1,3-二氢-2H-吲哚-2-亚基甲基-4-((1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-3H-吲哚𨾏(indolium)-2-基)亚甲基)-3-氧代环丁-1-烯-1-酸盐(化合物 7); 和

viii) 2-((3,3-二甲基-5-磺基-1-(4-磺基丁基)-1,3-二氢-2H-吲哚-2-亚基)甲基)-4-((1-甲基-6-硝基喹啉𨾏-2-基)亚甲基)-3-氧代环丁-1-烯-1-酸盐 (2-((3,3-dimethyl-5-sulfo-1-(4-sulfobutyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-ylidene)methyl)-4-((1-methyl-6-nitroquinolinium-2-yl)methylene)-3-oxocyclobut-1-en-1-olate)(化合物(8))

参考下面的附图和实施例对本发明进行进一步说明, 其中:

图 1 表示如实施例 11 中所示的, 与在硝基还原酶基因报告试验中作为底物的本发明硝基-取代的 squaraine 染料(化合物(1))相比的两种

硝基-取代的花青型染料——化合物(i)和(iii)的分子结构;

图 2 说明了两种硝基-取代的花青染料——化合物(i)和(iii)与 NTR 基因报告试验中硝基-取代的 squaraine(化合物(1))进行的比较;

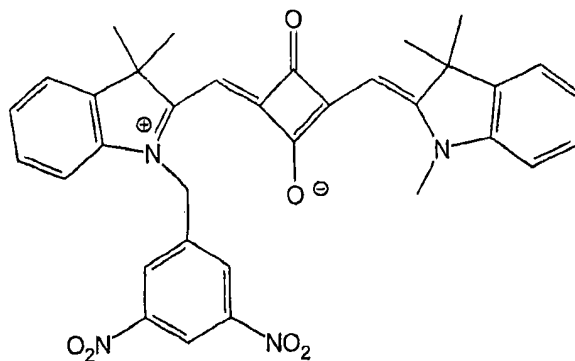
图 3 是在硝基还原酶基因报告试验中作为底物的硝基-取代的 squaraine 染料(化合物(1)和 2)的比较研究;

图 4 表示了化合物(2)在 HeLa 细胞中的分布; 和

图 5 表示了对在活细胞 NTR 试验中作为硝基还原酶底物的化合物 (2)、(3)和(4)进行的评估。

### 实施例

1.2-(1-甲基-3,3-二甲基-2-亚二氢吲哚基甲基)-4-(1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-2-亚二氢吲哚基甲基)环丁烯二基鎓-1,3-二酸盐(化合物(1))的制备



化合物 (1)

#### 1.1 1-(3,5-二硝基苄基)-2,3,3-三甲基-3H-吲哚鎓碘化物的制备

向 2,3,3-三甲基假吲哚(1.64g)中加入 3,5-二硝基苄基碘化物(3.71g)和二氯苯(15ml)。在将其加热至 90℃加热 6 小时后,使该混合物冷却并通过过滤除去所产生的沉淀。将该固体用二氯苯(2x10ml)和乙醚(2x50ml)进行洗涤。将该物质在真空烘箱中进行干燥,得到黄色固体形式的产物(2.69g)。

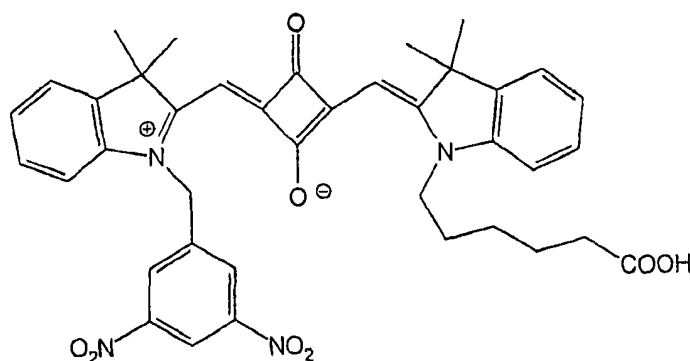
MALDI-TOF( $C_{18}H_{18}N_3O_4$  需要  $M^+$  340) 339, 340。

## 1.2 化合物(1)的制备

向 1-(3,5-二硝基苄基)-2,3,3-三甲基-3H-吲哚鎓碘化物(100mg)中加入 3-羟基-4-(1,3,3-三甲基-1,3-二氢吲哚-2-亚基甲基)环丁-3-烯-1,2-二酮(54mg)、吡啶(2.25ml)、醋酸(2.25ml)和醋酸酐(0.5ml)。将该混合物加热回流 6 小时,然后用旋转蒸发除去溶剂。将残余物在水和二氯甲烷之间进行分配,将有机相相继用稀碳酸氢钠水溶液和 1M HCl 进行洗涤。除去溶剂并用二氧化硅闪柱色谱对其进行纯化(MeOH/DCM)。将所得的物质用反相 HPLC 进一步进行纯化(CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O / TFA)。

MALDI-TOF(C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> 需要 M<sup>+</sup> 590) 591。

2.2-(1-(5-羧基戊基)-3,3-二甲基-2-亚二氢吲哚基甲基)-4-(1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-2-亚二氢吲哚基甲基)环丁烯二基鎓-1,3-二酸盐  
(化合物(2))的制备

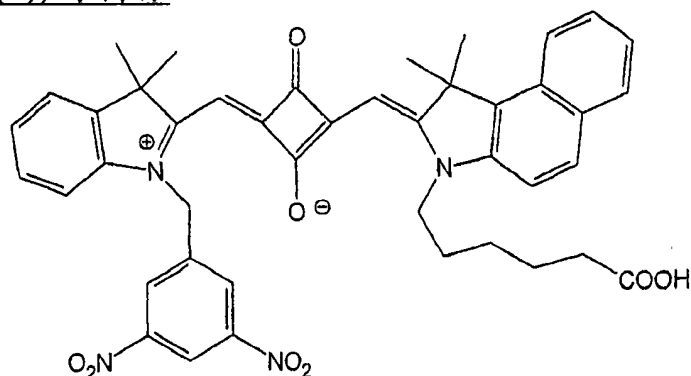


化合物(2)

向 1-(3,5-二硝基苄基)-2,3,3-三甲基-3H-吲哚鎓碘化物(467mg)中加入 3,4-二羟基-3-环丁烯-1,2-二酮(110mg)、1-(5-羧基戊基)-2,3,3-三甲基-3H-吲哚鎓碘化物(354mg)、吡啶(4.5ml)、醋酸(4.5ml)和醋酸酐(1ml)。将该混合物加热回流 3 小时,然后用旋转蒸发除去溶剂。将这种粗品用二氧化硅闪柱色谱进行处理(用 MeOH / DCM 进行洗脱)。将包含产物的级分合并并除去溶剂。将所得的物质用反相 HPLC 进一步进行纯化(CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O / TFA)。

3.2-(1-(5-羧基戊基)-3,3-二甲基-2-亚苯并二氢吲哚基甲基)-4-(1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-2-亚二氢吲哚基甲基)环丁烯二基鎓-1,3-

### 二酸盐(化合物(3))的制备



化合物(3)

#### 3.1 3-(5-羧基戊基)-1,1,2-三甲基-1H-苯并[e]吡咯鎓碘化物的制备

向 1,1,2-三甲基-1H-苯并[e]吡咯(16.2g)中加入 6-溴己酸(31.2g)和二氯苯(50ml)。将该混合物在 110℃ 下加热 136 小时,冷却至环境温度,在冰上冷却,过滤。将滤饼用二氯苯(50ml)、乙醚(50ml)洗涤并将起在 40℃ 下在低真空下进行干燥,得到淡棕色固体形式的化合物(25.38g)。

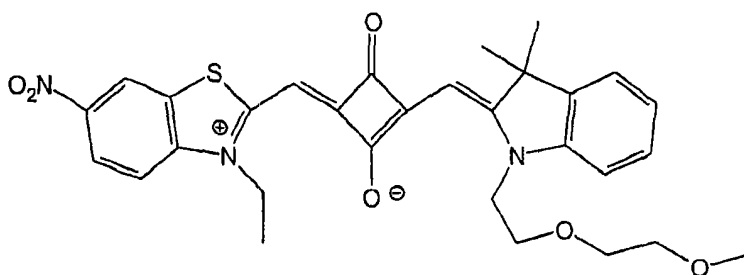
LCMS( $C_{21}H_{26}NO_2$  需要  $M^+$  324) 324。

#### 3.2 化合物(3)的制备

向 1-(3,5-二硝基苄基)-2,3,3-三甲基-3H-吡咯鎓碘化物(132mg)中加入 3-(5-羧基戊基)-1,1,2-三甲基-1H-苯并[e]吡咯鎓碘化物(114mg)、3,4-二羟基-3-环丁烯-1,2-二酮(32mg)、吡啶(4.5ml)、醋酸(4.5ml)和醋酸酐(1ml)。将该混合物加热至 90℃ 加热 4 小时,然后用旋转蒸发除去溶剂。用二氧化硅闪柱色谱进行纯化(EA/MeOH),合并相关级分并将其浓缩。将所得的物质用反相 HPLC 进一步进行纯化( $CH_3CN / H_2O / TFA$ ),得到 1.7mg。

MALDI-TOF( $C_{43}H_{40}N_4O_8$  需要  $M^+$  740) 741。

#### 4.2-(3-乙基-6-硝基-2-亚苯并噻唑啉基甲基)-4-(1-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-3,3-二甲基-2-亚二氢吡咯基甲基)环丁烯二基鎓-1,3-二酸盐(化合物(4))的制备



化合物(4)

#### 4.1 1-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-2,3,3-三甲基-3H-吡啶鎓溴化物的制备

向 2,3,3-三甲基假吡啶(1.59g)中加入 1-溴-2-(2-甲氧基乙氧基)乙烷(2.75g)和二氯苯(5ml)。将该混合物加热至 70℃ 加热一整夜。除去挥发性物质并用 HPLC 对该物质进行纯化。

MALDI-TOF( $C_{16}H_{24}NO_2$  需要  $M^+$  262) 263。

#### 4.2 2-甲基-6-硝基苯并噻唑的制备

将位于浓硫酸(80ml)中的 2-甲基苯并噻唑(22g)冷却至 -5℃。向其加入位于浓硝酸(20ml)中的浓硫酸(12ml)混合物，将其唯独维持在低于 5℃ 的温度上(约 1.5 小时)。其后，使该混合物加温至室温并将该溶液倾倒在冰上，产生一种黄色沉淀。通过过滤除去固体并将其用乙醇重结晶。在过滤后，将该固体用乙醇洗涤并在真空烘箱中对其进行干燥，得到 18g 所需的产物。

LCMS( $C_8H_6N_2O_2S$  需要  $M^+$  194) 195。

#### 4.3 3-乙基-2-甲基-6-硝基苯并噻唑鎓碘化物的制备

向 2-甲基-6-硝基苯并噻唑(0.36g)中加入碘乙烷(1.5ml)和二氯苯(20ml)。将该混合物加热至 120℃ 加热 2 天，然后使之冷却至室温。向其中加入乙酸乙酯并通过过滤取出所得的沉淀。将其在真空烘箱中干燥，得到所需的物质(80mg)。

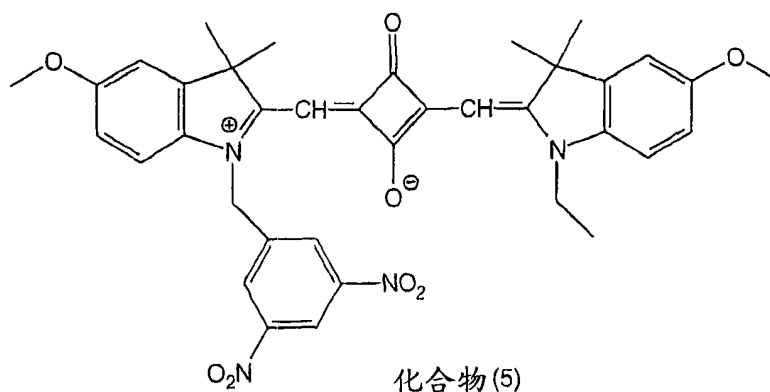
#### 4.4 化合物(4)的制备

向 3-乙基-2-甲基-6-硝基苯并噻唑鎓碘化物(400mg)中加入 3,4-二羧

基-3-环丁烯-1,2-二酮(128mg)、1-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-2,3,3-三甲基-3H-吡啶鎓溴化物(420mg)、吡啶(20ml)、醋酸(18ml)和醋酸酐(8ml)。将该混合物加热至 120℃ 加热 4 小时, 然后使之冷却至室温。通过旋转蒸发除去挥发性物质, 将残余物溶解于 DCM 中, 用二氧化硅闪柱色谱进行纯化(DCM / EA / MeOH)。将该物质用制备 TLC 进一步进行纯化, 得到 23mg。

LCMS(C<sub>30</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S 需要 M<sup>+</sup> 561) 560。

5.2-(1-乙基-3,3-二甲基-5-甲氧基-2-亚二氢吡啶基甲基)-4-(1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-5-甲氧基-2-亚二氢吡啶基甲基)环丁烯二基鎓-1,3-二酸盐(化合物(5))的制备



5.1 5-甲氧基-2,3,3-三甲基-3H-吡啶的制备

向盐酸 4-甲氧基苄基胍(4.84g)中加入 3-甲基-2-丁酮(6.4ml)和醋酸(45ml)。将该混合物加热至 100℃ 加热 2.5 小时, 其后, 通过旋转蒸发除去溶剂。用闪柱色谱进行处理, 得到所说的产物(4.66g)。

$\delta$ H(270MHz; CDCl<sub>3</sub>) 1.3(6H, s), 2.2(3H, s), 3.8(3H, s), 6.8(2H, m), 7.4(1H, m)。

5.2 1-乙基-5-甲氧基-2,3,3-三甲基-3H-吡啶鎓碘化物的制备

向 5-甲氧基-2,3,3-三甲基-3H-吡啶(1.9g)中加入碘代乙烷(5ml)和 1,2-二氯苯(10ml)。将该混合物加热至 80℃ 加热 4 小时, 其后, 使该混合物冷却并通过过滤取出沉淀, 将其相继用二氯苯和乙醚进行洗涤。将其在烘箱中干燥, 得到所说的产物(3g)。

$\delta$ H(270MHz; CDCl<sub>3</sub>) 1.6(3H, t), 1.6(6H, s), 3.1(3H, s), 3.9(3H, s), 4.7(2H, q), 7.1(2H, m), 7.7(1H, m).

### 5.3 1-(3,5-二硝基苄基)-5-甲氧基-2,3,3-三甲基-3H-吡啶鎓碘化物的制备

向 5-甲氧基-2,3,3-三甲基-3H-吡啶(1.90g)中加入 3,5-二硝基苄基碘化物(4.62g)和 1,2-二氯苯(10ml)。将该混合物加热至 75℃加热 3 小时,在此期间,分离出一种橙色的固体。然后,将该混合物在冰浴上进行冷却并通过过滤收集固体级分;将其相继用二氯苯和乙醚进行洗涤,并将其真空干燥,得到所说的产物(2.62g)。

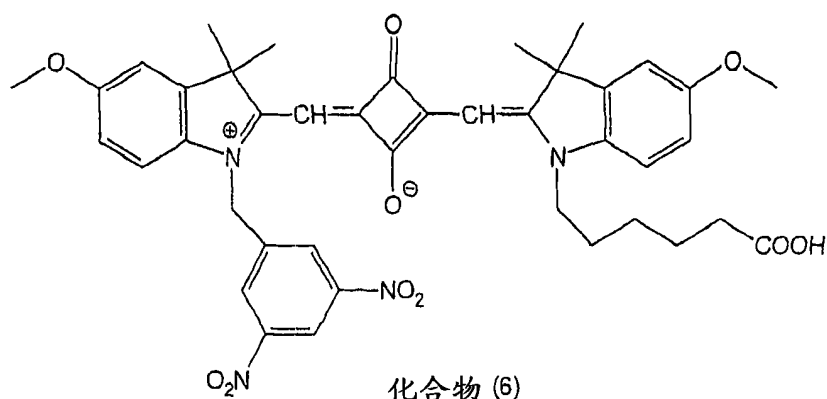
$\delta$ H(270MHz; DMSO-d<sub>6</sub>) 1.6(6H, s), 2.9(~3H, s), 3.85(3H, s), 6.1(2H, s), 7.1(1H, dd), 7.55(1H, d), 7.8(1H, d), 8.65(2H, s) and 8.8(1H, s)。

### 5.4 化合物(5)的制备

向 1-(3,5-二硝基苄基)-5-甲氧基-2,3,3-三甲基-3H-吡啶鎓碘化物(250mg)中加入 3,4-二羟基-3-环丁烯-1,2-二酮(55mg)、1-乙基-5-甲氧基-2,3,3-三甲基-3H-吡啶鎓碘化物(175mg)、吡啶(2.25ml)、醋酸(2.25ml)和醋酸酐(0.5ml)。将该混合物加热回流 5 小时,然后用旋转蒸发除去溶剂。将该粗品在 DCM 和 1M HCl 之间进行分配。将有机层进一步用水进行洗涤。用二氧化硅闪柱色谱进行处理(DCM/MeOH),将相关级分合并并对其进行浓缩。将所得的物质用反相 HPLC 进一步进行纯化(CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O / TFA)。

MALDI-TOF(C<sub>37</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> requires M+ 664) 665。

### 6.2-(1-(5-羧基戊基)-3,3-二甲基-5-甲氧基-2-亚二氢吡啶基甲基)-4-(1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-5-甲氧基-2-亚二氢吡啶基甲基)环丁烯二基鎓-1,3-二酸盐(化合物(6))的制备



### 6.1 1-(5-羧基戊基)-5-甲氧基-2,3,3-三甲基-3H-吡啶鎓溴化物的制备

向 5-甲氧基-2,3,3-三甲基-3H-吡啶(1.9g)中加入 6-溴己酸(3g)和 1,2-二氯苯(10ml)。将该混合物加热至 100℃ 加热 3 小时,然后使之冷却至室温。向其中加入乙醚并通过过滤取出沉淀出来的物质。将其在真空烘箱中进行干燥,得到所说的产物(3.12g)。

$\delta$ H(270MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) 1.4(2H, m), 1.5(6H, s), 1.6(2H, m), 1.8(2H, m), 2.2(2H, m), 2.8(3H, s), 3.8(3H, s), 4.4(2H, m), 7.1(1H, m), 7.5(1H, m), 7.9(1H, m)。

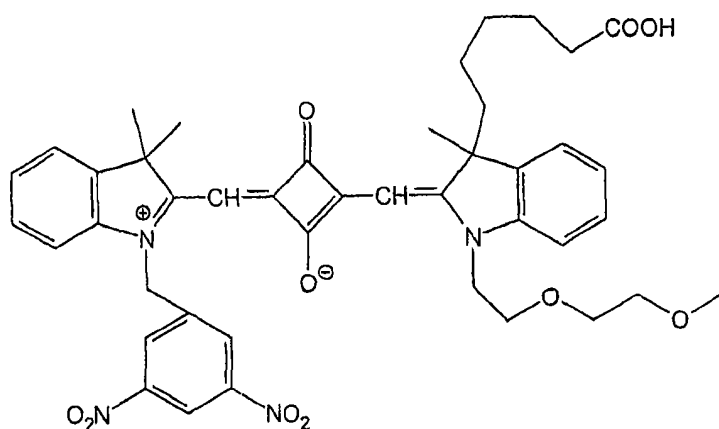
### 6.2 化合物(6)的制备

向 1-(3,5-二硝基苄基)-5-甲氧基-2,3,3-三甲基-3H-吡啶鎓碘化物(500mg)(见 5.3)中加入 3,4-二羟基-3-环丁烯-1,2-二酮(114mg)、1-(5-羧基戊基)-5-甲氧基-2,3,3-三甲基-3H-吡啶鎓溴化物(385mg)、吡啶(4.5ml)、醋酸(4.5ml)和醋酸酐(1ml)。将该混合物加热至 110℃ 加热 4.5 小时,然后用旋转蒸发除去溶剂。将这种粗品在 DCM 和 1M HCl 之间进行分配。将有机层用水进一步进行洗涤。用二氧化硅闪柱色谱进行处理(DCM/MeOH),将相关级分合并并对其进行浓缩。将所得的物质用反相 HPLC 进一步进行纯化( $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O} / \text{TFA}$ )。

MALDI-TOF( $\text{C}_{41}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{10}$  需要  $\text{M}^+$  750) 751。

7.3-(5-羧基戊基)-1-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-3-甲基-1,3-二氢-2H-吡啶-2-亚基甲基-4-((1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-3H-吡啶鎓-2-基)亚

## 甲基)-3-氧代环丁-1-烯-1-酸盐(化合物(7))的制备



化合物 (7)

### 7.1 3-(5-羧基戊基)-1-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-2,3-二甲基-3H-吡啶鎓溴化物的制备

向 6-(2,3-二甲基-3H-吡啶-3-基)己酸(100mg)中加入 1-溴-2-(2-甲氧基乙氧基)乙烷(1ml)并将该混合物加热至 90℃加热一整夜。在冷却时,向其中加入乙醚(10ml)并通过过滤取出所说的物质。

LCMS(C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>4</sub> 需要 M<sup>+</sup> 362) 363。

### 7.2 化合物(7)的制备

向 3-(5-羧基戊基)-1-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-2,3-二甲基-3H-吡啶鎓溴化物中加入方形酸(44mg)、1-(3,5-二硝基苄基)-2,3,3-三甲基-3H-吡啶鎓碘化物(177mg)、吡啶(4.5ml)、醋酸(4.5ml)和醋酸酐(1ml)。将该混合物加热至 80℃加热一整夜。在冷却后,用制备 HPLC 进行处理,得到所需的物质。

LCMS(C<sub>43</sub>H<sub>46</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> 需要 M<sup>+</sup> 778) 779。

### 8. 化合物(7)的乙酰氧基甲酯衍生物

向 3-(5-羧基戊基)-1-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-3-甲基-1,3-二氢-2H-吡啶-2-亚基甲基-4-((1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-3H-吡啶鎓-2-基)亚甲基)-3-氧代环丁-1-烯-1-酸盐(14mg)中加入乙腈(3ml)、Hunigs 碱(32μl)

和溴乙酸甲酯(9ul)。在将其在室温下搅拌 2 小时后, 用 HPLC 进行处理, 得到所需的物质(8mg)。

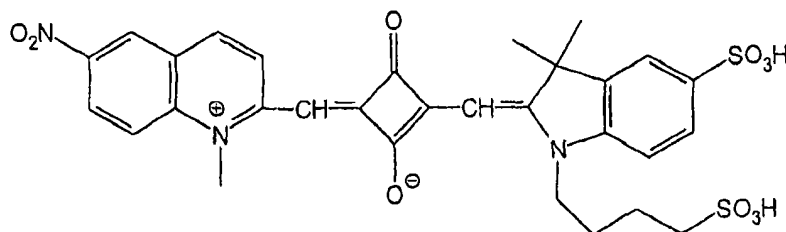
LCMS(C<sub>46</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub> 需要 M<sup>+</sup> 850) 851。

### 9. 化合物(7)的乙酯衍生物的制备

向乙醇(10ml)中加入乙酰氯(1ml), 然后向其中加入 3-(5-羧基戊基)-1-(2-(2-甲氧基乙氧基)乙基)-3-甲基-1,3-二氢-2H-吡啶-2-亚基甲基-4-((1-(3,5-二硝基苄基)-3,3-二甲基-3H-吡啶-2-基)亚甲基)-3-氧代环丁-1-烯-1-酸盐(2mg)。将该混合物在室温下搅拌 5 小时, 其后在真空下除去挥发性物质。

LCMS(C<sub>45</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> 需要 M<sup>+</sup> 806) 807。

10. 2-((3,3-二甲基-5-磺基-1-(4-磺基丁基)-1,3-二氢-2H-吡啶-2-亚基)甲基)-4-((1-甲基-6-硝基喹啉-2-基)亚甲基)-3-氧代环丁-1-烯-1-酸盐(化合物(8))的制备



化合物(8)

### 10.1 1,2-二甲基-6-硝基喹啉碘化物的制备

将 2-甲基-6-硝基喹啉(0.5g, 2.66mmol)和碘代甲烷(1ml, 16mmol)一起在乙腈(10ml)中加热回流 48 小时。将该混合物冷却至室温, 一种灰色的物质从该溶液中结晶出来, 将其滤出。表明其是起始材料。将滤液用乙酸乙酯(200ml)进行稀释, 得到一种黄色/绿色沉淀。将产物滤出, 用乙酸乙酯进行洗涤, 然后将其在真空下进行干燥。得到黄色/绿色固体形式的产物(147mg, 16.8%)。

LCMS(C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 需要 M<sup>+</sup> 203) 单一组分 M<sup>+</sup>203。

### 10.2 2,3,3-三甲基-5-磺基-1-(4-磺基丁基)-3H-吡啶，钾盐的制备

将 2,3,3-三甲基假吡啶-5-磺酸钾(6g, 21.6mmol)和 1,4-丁磺酸内酯(55ml)一起在氮气下在 90℃下加热 24 小时。在冷却后，将该反应混合物用乙酸乙酯进行稀释，将所得的固体滤出，用乙酸乙酯洗涤并将其真空干燥。分离出淡粉色固体形式的产物(10.3g)。用  $^1\text{H NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$  对该产物进行定性。

### 10.3 化合物(8)的制备

将 1,2-二甲基-6-硝基-喹啉碘化物(100mg, 0.30mmol)、3,4-二羟基-3-环丁烯-1,2-二酮(34.5mg, 0.30mmol)和 2,3,3-三甲基-5-磺基-1-(4-磺基丁基)-3H-吡啶，钾盐(124mg, 0.30mmol) 一起在吡啶(3ml)、醋酸(3ml)和醋酸酐(2ml)的混合物中在 120℃下加热 1 小时。看到该反应混合物变成深绿/蓝色。在冷却后，将该反应混合物倾倒入乙酸乙酯中以使产物沉淀。将产物滤出并用 RP HPLC 对该混合物进行纯化，用水/乙腈/0.1%TFA 混合物进行洗脱。得到深蓝色固体形式的产物(14mg)。

LCMS( $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}_2$  需要  $\text{M}^+$  656)  $\text{ES}^-$  给出了  $(\text{M}-\text{H})2^-$  再造 (reconstruction)给出了 654 下的  $\text{M}^-$ 。

## 11. 硝基-取代的 Squaraine 染料(化合物(1))与硝基-取代的花青染料(化合物(i)和(iii))在硝基还原酶基因报告试验中作为底物的比较研究

将包含 NTR 基因上游的 NF- $\kappa$ B 响应元件的报告基因构建体构建到 pDC511(Admax<sup>TM</sup>)中。将该报告基因与 Ad5 基因组 DNA 一起包装到辅助细胞，HEK293 中并拯救出不能复制的腺病毒。

在病毒转导前将 HeLa 细胞继代培养 24 小时并将其在 37℃下在 5%  $\text{CO}_2$  的潮湿气氛中在包含 10% 胎牛血清 + 2mM L-谷酰胺的 Dulbecco's Modified Eagles 培养基中培养一整夜。在该整夜培养后，用胰蛋白酶将这些细胞从各烧瓶中分离出来，汇集，制成细胞混悬液并测定细胞浓度。将该 HeLa 细胞混悬液以预定的感染复数(MOI)与病毒在足以覆盖组织培养烧瓶底部的最小体积的完全培养基中进行混合，在  $\text{T75cm}^2$  Costar 烧瓶中对于  $10^6$  个细胞而言通常为 15ml。将该细胞/病毒混悬液送回到恒温箱中并将其在 37℃下在 5%  $\text{CO}_2$  的潮湿气氛下放置一整夜。在第二天，从各烧瓶中取出该培养基并将细胞单层用 5-

10ml PBS 进行冲洗。用胰蛋白酶对这些细胞进行分离并将其汇集，制得转导细胞的混悬液；测定该细胞混悬液的浓度并将其调节至  $5.0 \times 10^4$  个细胞/ml。将 200 $\mu$ l 这种细胞混悬液分配到 96 孔微量滴定板的各孔中； $\approx 10^4$  个细胞/孔。将所有的板都在 37 $^{\circ}$ C 下在 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿气氛中培养一整夜。将培养了一整夜的培养基用 200 $\mu$ l PBS 代替。从各孔中取出该 PBS 并代之以位于不含血清的 Dulbecco's Modified Eagles 培养基 (100ng/ml, 90 $\mu$ l) 中的 TNF $\alpha$  激动剂或者向复制孔(replicate wells)中加入对照(90 $\mu$ l 不含血清的培养基)。将这些板放回到 37 $^{\circ}$ C 的恒温箱中在 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿气氛中放置 2 小时。同时，独立地向复制孔中分配 10 $\mu$ l 10 $\mu$ M 化合物(i)和(iii)(硝基-花青染料)以及化合物(1)(硝基-squaraine 染料)的溶液并将这些板放回到 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 的潮湿气氛中。用 Tecan "Ultra" 荧光计对随着时间的流逝的荧光信号进行监测。在相同的条件下测量所有的底物以避免仪器假象。

图 2 对包含硝基的 squaraine 染料(化合物(1)与包含硝基的花青染料(化合物(i) 和(iii))的性能进行了比较。化合物(1)的信号与背景的比例为 3:1，与化合物(i)的 1.3:1 相比，清楚地表明其在具有相似的荧光信号增加的情况下降低了背景荧光。

## 12. 硝基-取代的 Squaraine 染料(化合物(1)和(2))在硝基还原酶基因报告试验中作为底物的比较研究

用与实施例 11 所述方法相同的方法，将 HeLa 细胞用腺病毒 NF- $\kappa$ B 报告系统转导。在适宜的时间，将化合物(1)和(2)各自独立地加入到复制孔中。在 Tecan Ultra 荧光计上监测随着时间的流逝的荧光信号，其数据如图 3 中所示。

当与化合物(1)进行比较时，在存在激动剂——TNF- $\alpha$ 的情况下，化合物(2)清楚地表现出试验信号显著增加。化合物(2)还能探测包含所说报告基因的对照样品细胞中的基础转录活性。这种基础活性是包含 NF- $\kappa$ B 报告基因但是不含激动剂的细胞和 mock 转导细胞间信号的差异。化合物(1)不够敏感，不能探测这种低水平的活性。认为试验敏感性的改善是进行了改良的化合物在细胞中的可获得性(availability)的直接后果。因此，认为化合物(2)可以在细胞质中被获得，所说的细胞质也是表达的报告蛋白的同一隔室。在 NTR 表达后，对试验板的显微

成像产生了具有强烈红色细胞质染色的细胞。

得自图 2 和 3 的数据说明了硝基-取代的 squaraine 染料(化合物(2))性质的改善是向该染料中引入两个 squarylium 部分和加上了己酸基的结果。在化合物(iii), 硝基-取代的花青染料中存在的己酸基不足以改变化合物(i)的细胞定位, 也不足以改变其在 NTR 试验中的性能。

### 13. 化合物(2)在 HeLa 细胞中的定位

将 HeLa 细胞以每个皿 120,000 个细胞的密度进行涂布并将其在 37 °C 下在包含 10% 胎牛血清 + 2Mm L-谷酰胺的 Dulbecco's Modified Eagles 培养基中培养一整夜。除去该培养了一整夜的培养基并代之以 2ml 包含 1 $\mu$ M 化合物(2)的不含血清的培养基。将这些培养皿放回到恒温箱中放置 2 小时, 然后在 Zeiss Confocal 显微镜上对其进行成像。

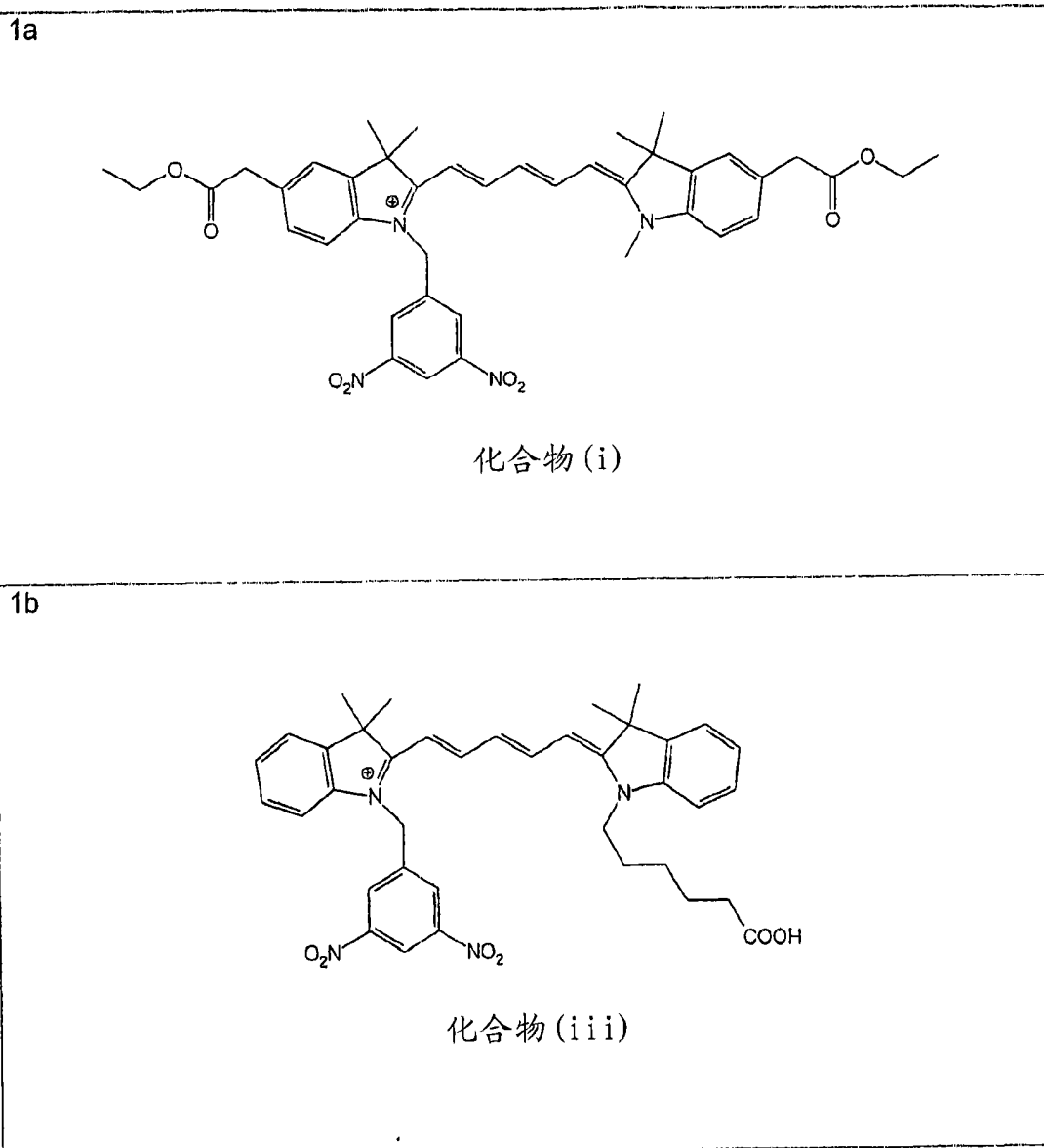
图 4 表示了化合物(2)在 HeLa 细胞中的吸收和分布。没有迹象表明化合物(2)被隔离到细胞器中。有细胞结构背景标记的迹象, 但其并不会损害该试验的性能。

### 14. 对在活细胞 NTR 试验中作为硝基还原酶底物的化合物(2)、(3)和(4)进行的评估

在活细胞 NTR 试验, 图 5 中表示了用硝基-取代的染料(化合物(2)、(3)和(4))作为硝基还原酶底物的用途的另外的实例。图 5 中所示的化合物(3)的数据表明通过延长该染料的共轭系统可以获得可以在更高的波长下进行发射的 squaraine 染料底物。如细胞的固定所表明的那样, 存在的己酸基团增加了该探针在细胞中的保留性。在固定后, 化合物(2)和(3)在信号方面几乎没有降低, 而在固定后, 化合物(4)的信号几乎损失了 50%。

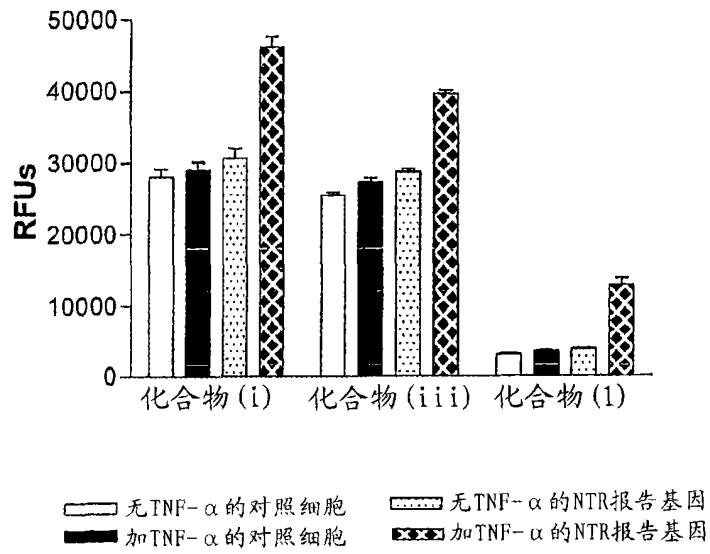
### 15. 在 NTR 对底物作用后最大吸收移位的实例

将位于 DMSO 中的化合物(8)(1mMol)(4 $\mu$ l)用 PBS 缓冲液进行稀释 (0.01M)(1.76ml)。测量该溶液的 UV/Vis 光谱。该底物在 682nm 下具有最大吸收, AU= 0.22。向该溶液中加入 NADH(0.01M, PBS 中)(200 $\mu$ l)和 NTR 酶(446ng/ml, 37 $\mu$ l), 将该混合物在室温下静置 30 分钟。其后, 重新测量其吸收光谱。观察到在 621 nm 下具有新的最大吸收, AU=0.17。

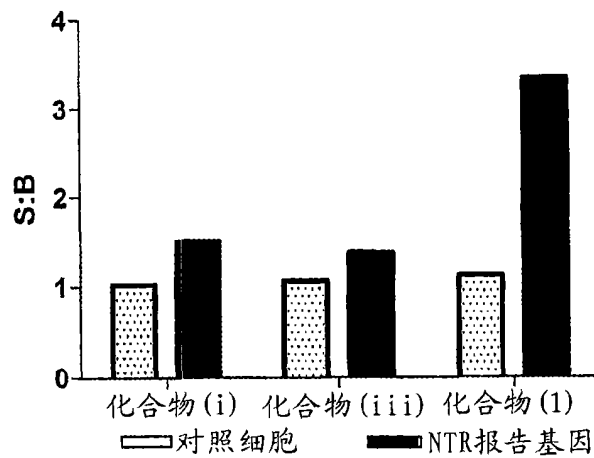


两种硝基-取代的花青型染料,化合物(i)和(iii)与硝基-取代的squaraine染料(化合物(1))的比较

2a. 荧光发射

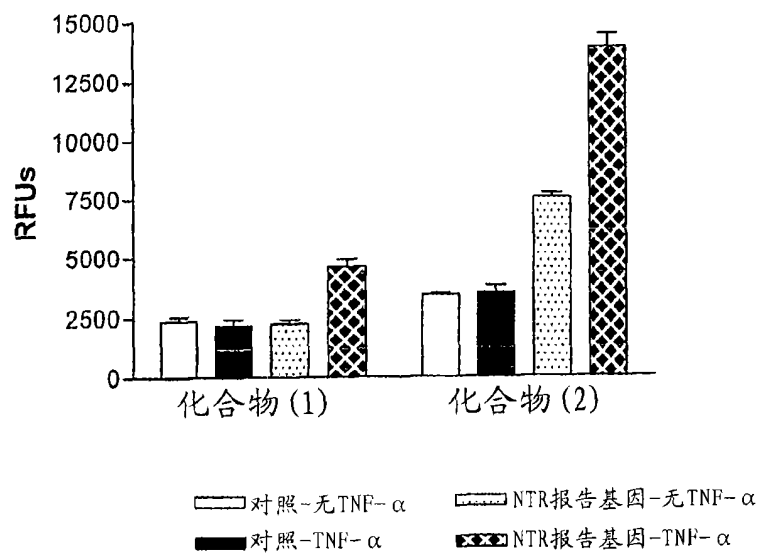


2b. 信号:背景

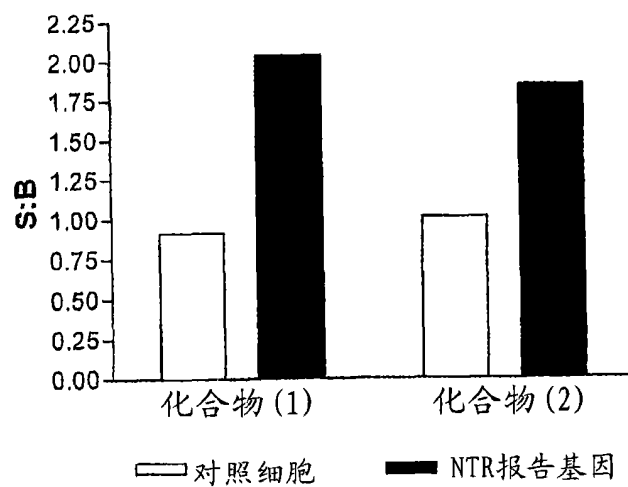


在硝基还原酶基因报告试验中作为底物的硝基-取代的squaraine染料(化合物(1)和2)的比较研究

3a. 荧光发射



3b. 信号:背景



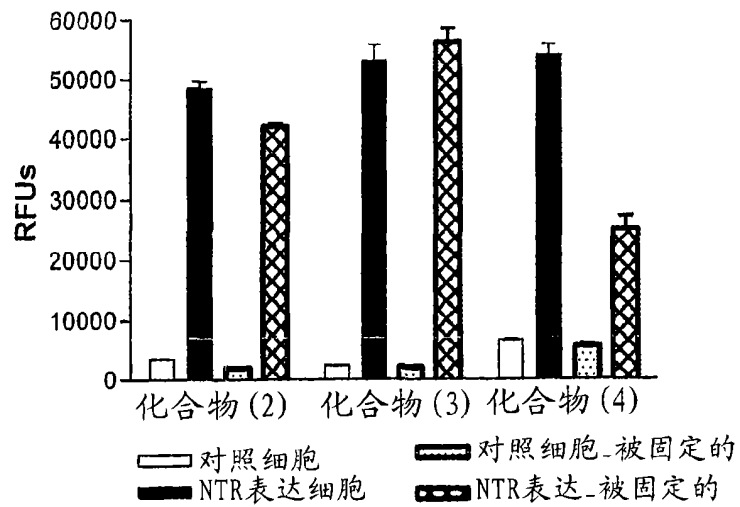
化合物(2)在HeLa细胞中的分布



图 4

对在活细胞NTR试验中作为硝基还原酶底物的  
化合物(2)、(3)和(4)进行的评估

5a. 荧光发射



5b. 信号:背景

