



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110944985 B

(45) 授权公告日 2022.12.13

(21) 申请号 201880047726.7	C07D 413/14 (2006.01)
(22) 申请日 2018.05.23	C09K 11/06 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 110944985 A	C07K 5/00 (2006.01)
(43) 申请公布日 2020.03.31	C07K 7/00 (2006.01)
(30) 优先权数据	A61K 38/04 (2006.01)
62/510,370 2017.05.24 US	A61K 38/05 (2006.01)
62/557,881 2017.09.13 US	
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.01.17	(56) 对比文件
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/IL2018/050557 2018.05.23	CN 1422253 A, 2003.06.04
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/216012 EN 2018.11.29	CN 106470977 A, 2017.03.01
(73) 专利权人 特拉维夫大学拉玛特有限公司 地址 以色列特拉维夫市	CN 101772577 A, 2010.07.07
(72) 发明人 D·莎芭特 M·E·罗斯-康福提	CN 1568307 A, 2005.01.19
(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事 务所(普通合伙) 11277 专利代理师 刘新宇 李茂家	US 2010278745 A1, 2010.11.04
(51) Int.Cl.	US 2009220430 A1, 2009.09.03
C07D 321/00 (2006.01)	Jean-Alexandre Richard等. Self- cleavable chemiluminescent probes suitable for protease sensing. 《Org.Biomol.Chem.》.2009,第7卷第2941-2957 页. Ori Green等.Opening a Gateway for Chemiluminescence Cell Imaging: Distinctive Methodology for Design of Bright Chemiluminescent Dioxetane Probes. 《ACS Central Science》.2017,第3卷第349-358 页.
C07D 405/12 (2006.01)	审查员 黄轲轲
C07D 405/14 (2006.01)	权利要求书7页 说明书27页 附图4页

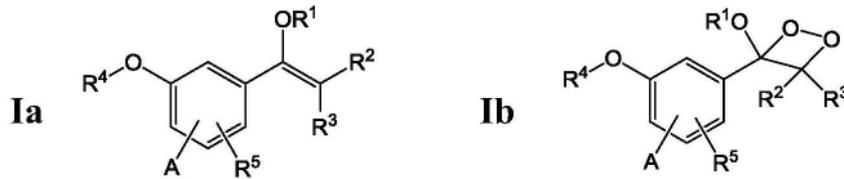
(54) 发明名称

用于蛋白酶的成像/检测的化学发光探针

(57) 摘要

本发明提供能够检测或成像、更具体地确定蛋白酶的存在或测量其水平的、基于Schaap的金刚烷叉基-二氧杂环丁烷探针的turn-ON型二氧杂环丁烷系化学发光探针,及其组合物和用途。

1. 一种式Ia或Ib的化合物:

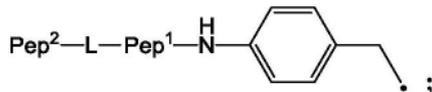


其中

R^1 选自直链或支链的 C_1 - C_{18} 烷基、或 C_3 - C_7 环烷基;

R^2 和 R^3 各自独立地选自支链的 C_3 - C_{18} 烷基或 C_3 - C_7 环烷基,或者 R^2 和 R^3 与它们所连接的碳原子一起形成稠合的、螺或桥连的环,或者稠合的、螺或桥连的多环;

R^4 为下式的基团:



R^5 为H,或者与-O- R^4 基团邻位或对位连接的卤素;

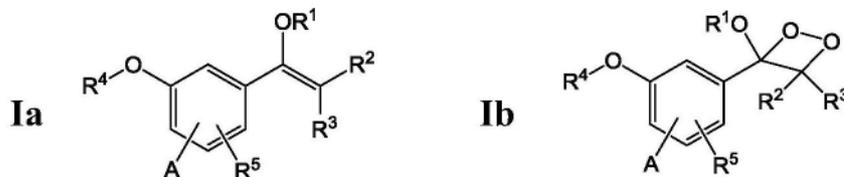
A为与上述-O- R^4 基团邻位或对位连接的式-CH=CH-E的 π^* 受体基团,其中E为-CN、-COOH、-COO(C_1 - C_{18} 烷基)、4-吡啶基、甲基吡啶鎓-4-基、3,3-二甲基-3H-吡啶基、或1,3,3-三甲基-3H-吡啶-1-鎓-2-基;

Pep^1 是由至少两个氨基酸残基组成并且经由其羧基与苯胺基团连接的蛋白酶可裂解的肽部分,其中所述肽部分被保护,或者通过其氨基与含聚乙二醇(PEG)的基团连接;

L不存在;和

Pep^2 不存在。

2. 一种式Ia或Ib的化合物:

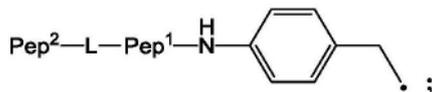


其中

R^1 选自直链或支链的 C_1 - C_{18} 烷基、或 C_3 - C_7 环烷基;

R^2 和 R^3 各自独立地选自支链的 C_3 - C_{18} 烷基或 C_3 - C_7 环烷基,或者 R^2 和 R^3 与它们所连接的碳原子一起形成稠合的、螺或桥连的环,或者稠合的、螺或桥连的多环;

R^4 为下式的基团:



R^5 为H,或者与-O- R^4 基团邻位或对位连接的卤素;

A为与上述-O- R^4 基团邻位或对位连接的式-CH=CH-E的 π^* 受体基团,其中E为-CN、-COOH、-COO(C_1 - C_{18} 烷基)、4-吡啶基、甲基吡啶鎓-4-基、3,3-二甲基-3H-吡啶基、或1,3,3-三甲基-3H-吡啶-1-鎓-2-基;

Pep^1 是由至少两个氨基酸残基组成并且经由其羧基与苯胺基团连接的蛋白酶可裂解的肽部分;

L为通过Pep¹的羧基或氨基经由酰胺键与Pep¹连接的连接基团；和
Pep²为通过其氨基或羧基经由酰胺键与L连接、或者通过其硫醇基与L连接的细胞穿透肽部分。

3. 根据权利要求1或2所述的化合物，其中R¹为直链或支链的C₁-C₈烷基。

4. 根据权利要求1或2所述的化合物，其中R²和R³与它们所连接的碳原子一起形成稠合的、螺或桥连的多环。

5. 根据权利要求4所述的化合物，其中R²和R³与它们所连接的碳原子一起形成金刚烷基。

6. 根据权利要求1或2所述的化合物，其中R⁵为与所述-O-R⁴基团邻位连接的卤素。

7. 根据权利要求1或2所述的化合物，其中A为与所述-O-R⁴基团邻位连接的-CH=CH-E，其中E为-CN、-COOH、-COO (C₁-C₈烷基)、4-吡啶基、甲基吡啶鎓-4-基、3,3-二甲基-3H-吡啶基、或1,3,3-三甲基-3H-吡啶-1-鎓-2-基。

8. 根据权利要求7所述的化合物，其中E为-CN、-COOH、或-COO (C₁-C₄烷基)。

9. 根据权利要求1或2所述的化合物，其中：

R¹为直链或支链的C₁-C₈烷基；

R²和R³与它们所连接的碳原子一起形成稠合的、螺或桥连的多环；

R⁵为与所述-O-R⁴基团邻位连接的卤素；和

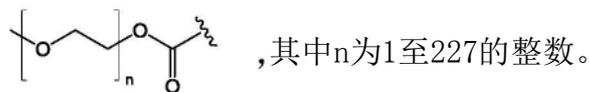
A为与所述-O-R⁴基团邻位连接的-CH=CH-E，其中E为-CN、-COOH、-COO (C₁-C₈烷基)、4-吡啶基、甲基吡啶鎓-4-基、3,3-二甲基-3H-吡啶基、或1,3,3-三甲基-3H-吡啶-1-鎓-2-基。

10. 根据权利要求9所述的化合物，其中R¹为甲基；R²和R³与它们所连接的碳原子一起形成金刚烷基；R⁵为与所述-O-R⁴基团邻位连接的卤素；和E为-CN、-COOH、或-COO (C₁-C₄烷基)。

11. 根据权利要求10所述的化合物，其中E为-CN、-COOH、-COOCH₃、或-COOC (CH₃)₃。

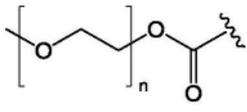
12. 根据权利要求1所述的化合物，其中Pep¹是包含以下氨基酸序列、或由其组成的肽部分：Val-Cit、Phe-Lys、Gly-Phe-Leu-Gly、Gly-Gly-Pro-Nle、Ala-Ala-Asn或His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln，其中所述氨基酸序列(i)分别经由瓜氨酸、赖氨酸、甘氨酸、正亮氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺的羧基与所述苯胺基团连接；并且(ii)在其氨基处被保护，或者经由酰胺键并且通过所述氨基与含PEG的基团连接。

13. 根据权利要求12所述的化合物，其中所述含PEG的基团为下式：



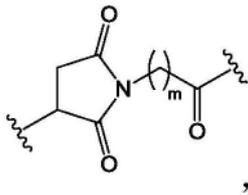
14. 根据权利要求12所述的化合物，其中Pep¹是序列Val-Cit、Phe-Lys、Gly-Phe-Leu-Gly、Gly-Gly-Pro-Nle、Ala-Ala-Asn或His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln的肽部分，所述序列分别经由瓜氨酸、赖氨酸、甘氨酸、正亮氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺的羧基与所述苯胺基团连接，并且分别在缬氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、甘氨酸、丙氨酸或组氨酸的α-氨基处用氨基保护基团保护。

15. 根据权利要求12所述的化合物，其中Pep¹是序列Val-Cit、Phe-Lys、Gly-Phe-Leu-Gly、Gly-Gly-Pro-Nle、Ala-Ala-Asn或His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln的肽部分，所述序列分别经由瓜氨酸、赖氨酸、甘氨酸、正亮氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺的羧基与所述苯胺基团连接，并且分别经由缬氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、甘氨酸、丙氨酸或组氨酸的α-氨基与下式的含PEG

的基团连接： 其中n为1至227的整数。

16. 根据权利要求2所述的化合物,其中Pep¹是包含以下氨基酸序列、或由其组成的肽部分:Val-Cit、Phe-Lys、Gly-Phe-Leu-Gly、Gly-Gly-Pro-Nle、Ala-Ala-Asn或His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln,所述氨基酸序列分别经由瓜氨酸、赖氨酸、甘氨酸、正亮氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺的羧基与所述苯胺基团连接;L是通过Pep¹的羧基或其氨基经由酰胺键与Pep¹连接的连接基团;和Pep²是通过其硫醇基与L连接的肽部分。

17. 根据权利要求16所述的化合物,其中L是下式的连接基团:



其通过Pep¹的氨基经由酰胺键与Pep¹连接,其中m为1-20的整数,和L的亚烷基链任选地被一个或多个-O-基团中断;和

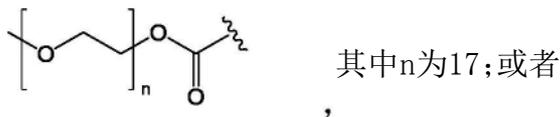
Pep²是通过半胱氨酸残基的硫醇基与L连接的序列Cys-Gly-Lys-Arg-Lys的肽部分。

18. 根据权利要求1或2所述的化合物,其中R¹为甲基;R²和R³与它们所连接的碳原子一起形成金刚烷基;R⁵为与所述-O-R⁴基团邻位连接的C1;A为与所述-O-R⁴基团邻位连接的-CH=CH-E;E为-COOCH₃或-CN;和

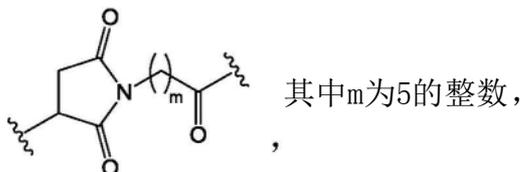
(i) Pep¹是序列Val-Cit的肽部分,所述序列经由瓜氨酸的羧基与所述苯胺基团连接,并且在缬氨酸的氨基处被羧基苄基保护;

(ii) Pep¹是序列His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln的肽部分,所述序列经由谷氨酰胺的羧基与所述苯胺基团连接,并且在组氨酸的α-氨基处被N-吗啉羰基保护;

(iii) Pep¹是序列Val-Cit的肽部分,所述序列经由瓜氨酸的羧基与所述苯胺基团连接,并且经由缬氨酸的氨基与下式的含PEG的基团连接:



(iv) Pep¹是序列Val-Cit或His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln的肽部分,所述序列分别经由瓜氨酸或谷氨酰胺的羧基与所述苯胺基团连接;L为下式的连接基团:

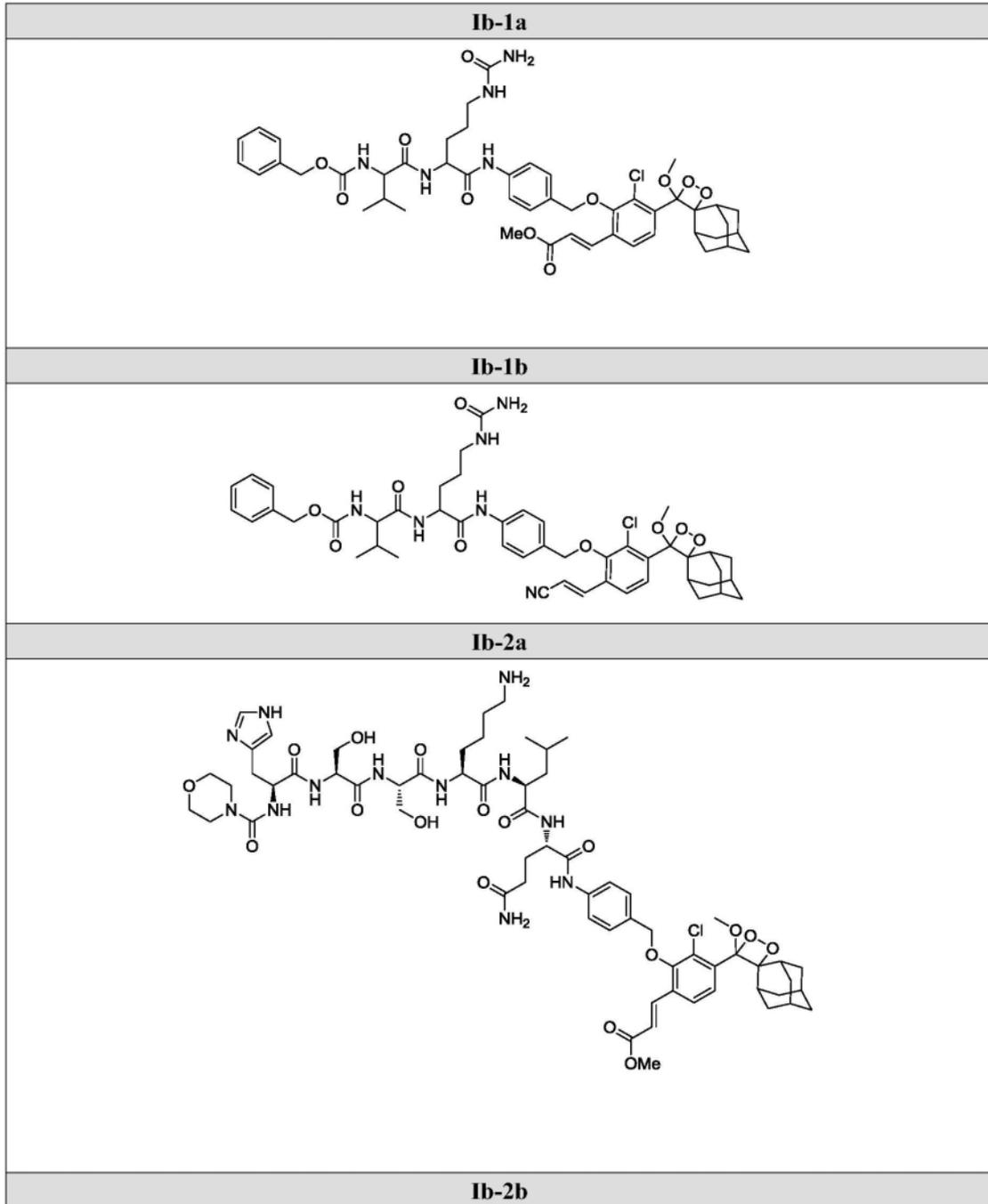


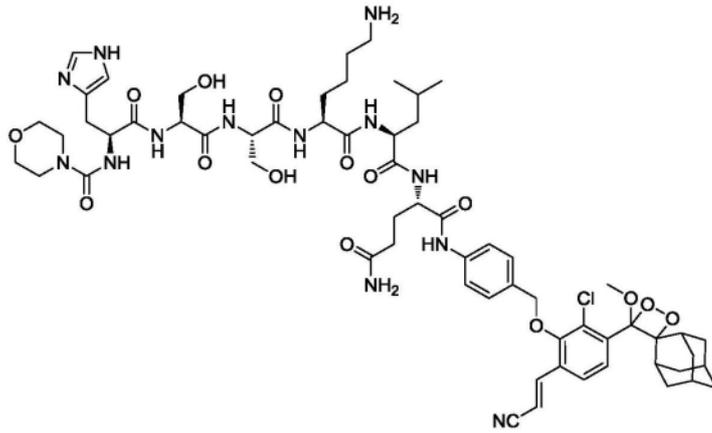
L分别通过缬氨酸或组氨酸的α-氨基经由酰胺键与Pep¹连接;和

Pep²是序列Cys-Gly-Lys-Arg-Lys的肽部分,所述序列通过半胱氨酸残基的硫醇基与所述L连接。

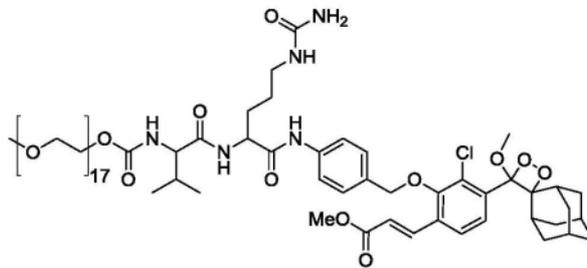
19. 根据权利要求18所述的化合物,其选自化合物Ib-1a、Ib-1b、Ib-2a、Ib-2b、Ib-3a、

Ib-3b、Ib-4a、Ib-4b、Ib-5a、或Ib-5b，

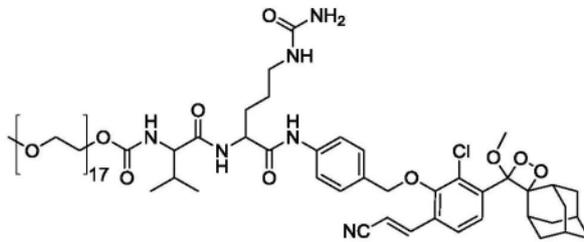




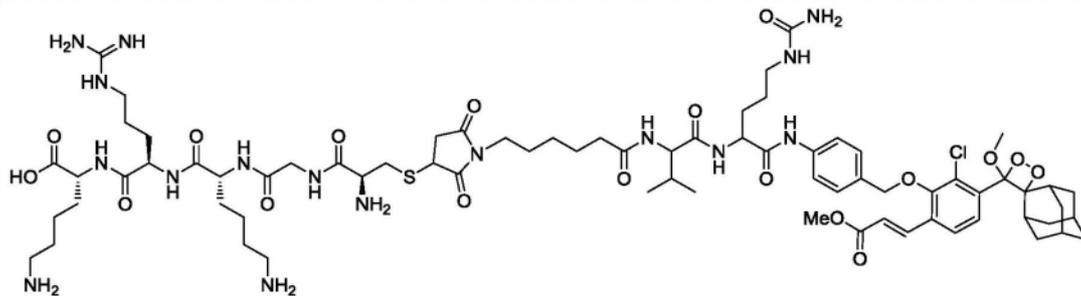
Ib-3a

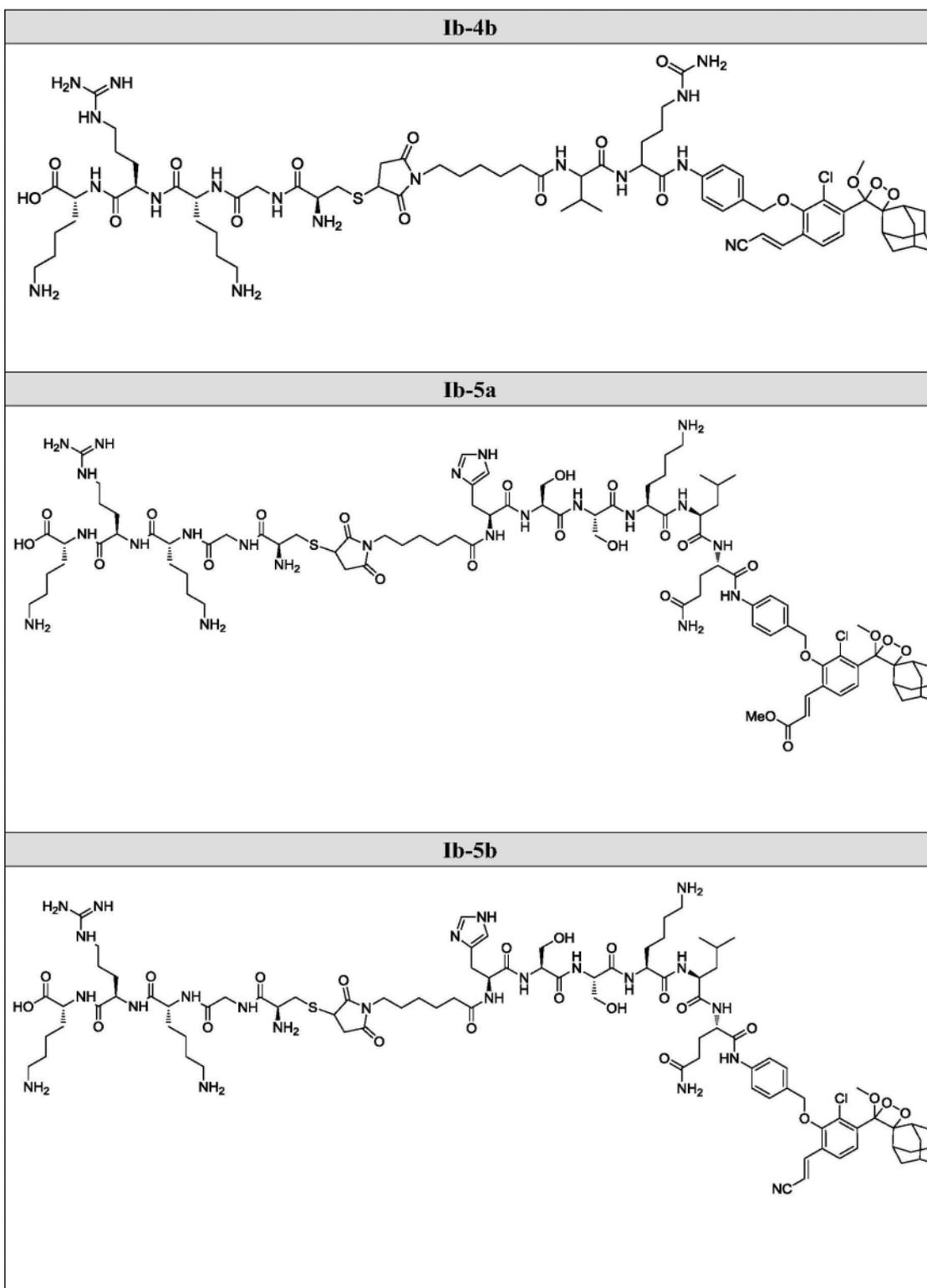


Ib-3b



Ib-4a





20. 一种组合物,其包括根据权利要求1至19中任一项所述的化合物,和载体。

21. 根据权利要求20所述的组合物,其包括根据权利要求18或19所述的化合物。

22. 根据权利要求1至19中任一项所述的化合物,或根据权利要求20或21所述的组合物在制备用于体内诊断或体内成像的探针中的用途。

23. 一种用于体外确定样品中蛋白酶的存在、或测量其水平的方法,所述方法包括:(i)使所述样品与根据权利要求1至19中任一项所述的化合物或者包括所述化合物的组合物接

触,所述化合物中Pep¹是可被所述蛋白酶裂解的基团,从而当所述蛋白酶存在于所述样品中时,通过所述蛋白酶将所述化合物水解为发射体;和(ii)检测所述发射体的化学发光发射。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述样品为生物样品。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述生物样品为体液、基于体液的溶液、或组织活检样品。

26. 根据权利要求23至25中任一项所述的方法,其中所述蛋白酶为组织蛋白酶,天冬酰胺内肽酶、前列腺特异性抗原或金属蛋白酶。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述组织蛋白酶选自组织蛋白酶A、B、C、D、E、F、G、H、K、L1、L2、O、S、W和Z。

用于蛋白酶的成像/检测的化学发光探针

技术领域

[0001] 本发明提供能够检测蛋白酶的二氧杂环丁烷系化学发光探针,及其组合物和用途。

[0002] 缩写:ACN,乙腈;DCM,二氯甲烷;DIPEA,二异丙基乙胺;DMF,N,N'-二甲基甲酰胺;EEDQ,N-乙氧基羰基-2-乙氧基-1,2-二氢喹啉;Et₂O,二乙醚;Et₃N,三乙胺;EtOAc,乙酸乙酯;HBTU,2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐;HPLC,高压液相色谱;K₂CO₃,碳酸钾;MeOH,甲醇;Na₂S₂O₃,硫代硫酸钠;Na₂SO₄,硫酸钠;NH₄Cl,氯化铵;PABA,对氨基苯甲酸;PEG,聚乙二醇;RLU,相对光单位;RP-HPLC,反相高压液相色谱;TFA,三氟乙酸;TIPS,三异丙基硅烷;TLC,薄层色谱;TMS-Cl,三甲基氯硅烷;7HC,7-羟基香豆素。

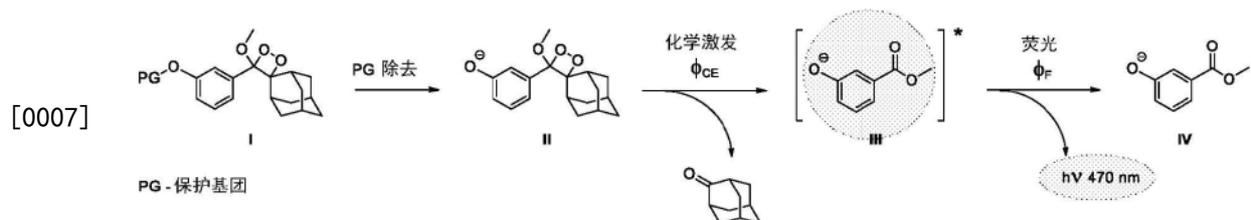
背景技术

[0003] 蛋白酶是通过肽键的水解进行蛋白质分解代谢的一类酶。蛋白酶在许多生物学过程中具有基本作用,并且与多种病理状况,包括癌症、关节炎、神经变性和心血管疾病有关。在蛋白酶参与疾病的有力证据下,蛋白酶在成像和药物开发中起着重要作用。组织蛋白酶B(溶酶体半胱氨酸蛋白酶)是非常重要的,因为它在许多不同的癌症种类中在病理状况下在细胞外和细胞周基质中过表达,所述癌症包括例如,乳腺癌、子宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、胃癌、头颈癌、肝癌、肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和甲状腺癌。因此,已经付出很多努力来开发分子和医学成像技术,通常集中在蛋白酶活性上,特别是组织蛋白酶B活性上。大多数开发围绕光学成像,针对荧光成像。

[0004] 尽管荧光成像允许灵敏的监测,但是它也具有缺点,主要是由于自发荧光导致低的信噪比。与基于荧光的分析不同,化学发光分析不需要光激发,导致增加的灵敏度和提高的信噪比。

[0005] 在已知的化学发光探针中,Schaap的金刚烷叉基(adamantylidene)-二氧杂环丁烷探针(方案1,结构I)具有最高的适用性,因为它们带有稳定的二氧杂环丁烷部分,使其适合许多化学和生物学条件。如方案1所示,Schaap的金刚烷叉基-二氧杂环丁烷系化学发光探针(结构I)设置有用于掩蔽探针的酚部分的分析物响应性保护基团。通过目标分析物除去保护基团产生不稳定的酚盐-二氧杂环丁烷物质II,其通过化学激发过程而分解以产生受激发的中间体苯甲酸酯III和金刚烷酮。受激发的中间体通过蓝光光子的发射而衰变至其基态(苯甲酸酯IV)。

[0006] 方案1:Schaap的金刚烷叉基-二氧杂环丁烷的化学发光激活途径

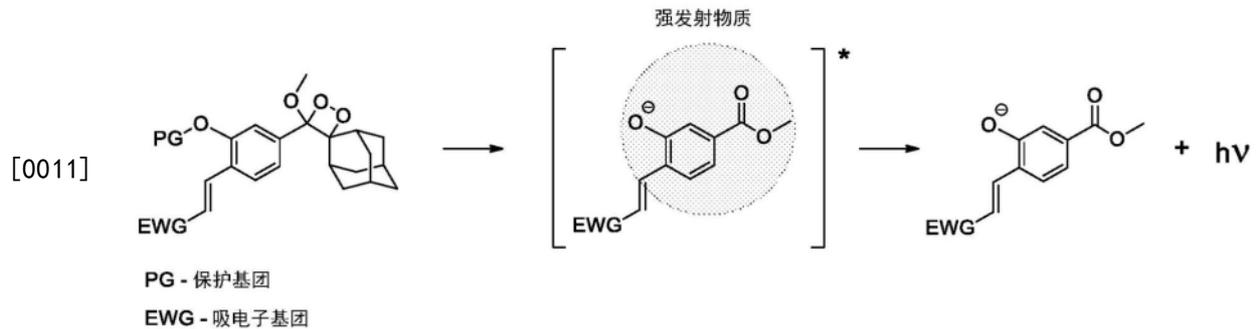


[0008] Richard等人(2007)之前开发了turn-ON型化学发光探针,其带有掩蔽二氧杂环丁

烷发光体的苯酚的蛋白酶(青霉素g-酰胺酶或半胱天冬酶-3(caspase-3))响应性底物。尽管这些探针显示显著的信噪比,但由于需要两步分析,因此它们禁止蛋白酶的活细胞成像。首先,蛋白酶在生理pH(7.4)下使保护基团裂解,然后将混合物添加至pH为12.3的缓冲液,使化学激发过程得以发生。

[0009] 国际公开号W02017/130191公开了基于Schapp的金刚烷叉基-二氧杂环丁烷探针的化学发光探针,其中通过直接作用模式放大化学发光,更特别地,其中Schapp的金刚烷叉基-二氧杂环丁烷探针在酚环的邻位被如丙烯酸酯和丙烯腈吸电子基团等 π^* 受体基团取代,以增加苯甲酸酯物质的发射性质(方案2)。如该公开中所示,所公开的化学发光探针使酶水解和化学激发过程在生理条件下同时发生,具有显著的化学发光强度。

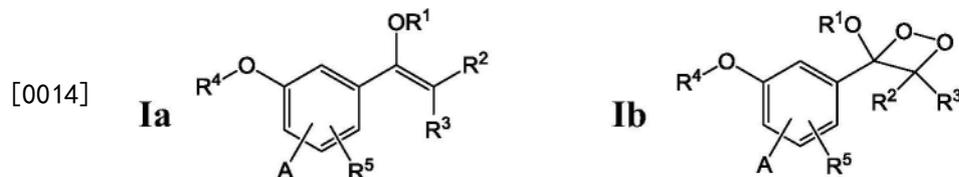
[0010] 方案2:通过使Schapp的金刚烷叉基-二氧杂环丁烷探针在酚环的邻位被 π^* 受体基团取代而获得的直接化学发光模式



发明内容

[0012] 本发明提供基于国际公开号W02017/130191中公开的内容并且以蛋白酶可裂解的底物构建的turn-ON型二氧杂环丁烷系化学发光探针,其在酶促降解后显示能够发射化学发光信号的二氧杂环丁烷发光体。所公开的探针包括改变发光体的pKa而可以适应不同卤素的二氧杂环丁烷发光体、和产生提供强的化学发光信号的给体-受体对的吸电子基团,使探针在水性条件下使用。

[0013] 更特别地,一方面,本发明提供式Ia或Ib的化合物:

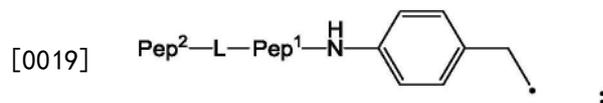


[0015] 其中

[0016] R^1 选自直链或支链的(C_1 - C_{18})烷基、或(C_3 - C_7)环烷基;

[0017] R^2 和 R^3 各自独立地选自支链的(C_3 - C_{18})烷基或(C_3 - C_7)环烷基,或者 R^2 和 R^3 与它们所连接的碳原子一起形成稠合的、螺或桥连的环,或者稠合的、螺或桥连的多环;

[0018] R^4 为下式的基团:



[0020] R^5 为H,或者与-O- R^4 基团邻位或对位连接的卤素;

[0021] A为与-O-R⁴基团邻位或对位连接的式-CH=CH-E的 π^* 受体基团,其中E为-CN、-COOH、-COO(C₁-C₁₈)烷基、4-吡啶基、甲基吡啶鎓-4-基、3,3-二甲基-3H-吡啶基、或1,3,3-三甲基-3H-吡啶-1-鎓-2-基;

[0022] Pep¹是由至少两个氨基酸残基组成并且经由其羧基与苯胺基团连接的蛋白酶可裂解的肽部分,其中所述肽部分任选地被保护,或者例如通过其氨基经由酰胺键与含PEG的基团连接;

[0023] L不存在,或者为通过Pep¹的羧基或其氨基经由酰胺键与Pep¹连接的连接基团;和

[0024] Pep²不存在,或者为通过其氨基或羧基经由酰胺键与L连接、或者通过其硫醇基与L连接的细胞穿透肽部分,

[0025] 条件是L和Pep²两者不存在或存在,并且当Pep¹被保护或者与含PEG的基团连接时,L和Pep²不存在。

[0026] 另一方面,本发明提供例如药物组合物等组合物,其包括本文公开的二氧杂环丁烷系化学发光探针,即,如上定义的式Ia/Ib的化合物,和例如药学上可接受的载体等载体。本发明的化合物和组合物可以用于例如组织蛋白酶、天冬酰胺内肽酶(legumain)、前列腺特异性抗原(PSA)和金属蛋白酶等蛋白酶在体外和体内两者的成像/检测。

[0027] 在另一方面,本发明因此涉及本文公开的二氧杂环丁烷系化学发光探针,即,如上定义的式Ia/Ib的化合物,或者包括所述化合物的药物组合物,用于体内诊断或体内成像,更具体地,用于确定体内蛋白酶的存在或测量其水平。

[0028] 还在另一方面,本发明涉及用于确定样品,例如体液、基于体液的溶液或组织活检样品等生物样品中蛋白酶的存在或者测量其水平的方法,所述方法包括(i)使所述样品与如上定义的式Ia/Ib的二氧杂环丁烷系化学发光探针(其中Pep¹是可被所述蛋白酶裂解的基团)或者包括所述化合物的组合物接触,从而当所述蛋白酶存在于所述样品中时,通过所述蛋白酶将所述化合物水解成发射体(emissive species);和(ii)检测所述发射体的化学发光发射。

附图说明

[0029] 图1A-1C示出在室温下在2.5单位/mL组织蛋白酶B的存在下在活性缓冲液(pH 7.4,10%DMSO)中探针1、2、3和4[1 μ M]的化学发光动力学曲线(1A;小图(inset)专注于探针1的动力学曲线);从各探针发出的总光(1B);和由各探针得到的最大信号(1C)。

[0030] 图2示出在具有2.5U/mL组织蛋白酶B的活性缓冲液(pH 7.4,10%DMSO)中探针4[10 μ M]的酶促降解的化学发光动力学曲线和HPLC分析。示意性地示出探针4。

[0031] 图3示出Raw 264.7、CT26肿瘤细胞和3T3正常细胞中组织蛋白酶B活性的透射光和化学发光成像。用包含探针3或探针4(5 μ M)的细胞培养基温育30分钟后获得图像,并且使用利用60倍物镜的LV200 Olympus显微镜和20分钟曝光时间拍摄图像。用探针3温育的Raw 246.7细胞的化学发光显微镜图像和透射光图像(分别为a和b);用探针4温育的Raw 246.7细胞的化学发光显微镜图像和透射光图像(分别为c和d);用探针3温育的CT26细胞的化学发光显微镜图像和透射光图像(分别为e和f);用探针4温育的CT26细胞的化学发光显微镜图像和透射光图像(分别为g和h);用探针3温育的3T3细胞的化学发光显微镜图像和透射光图像(分别为i和j);用探针4温育的3T3细胞的化学发光显微镜图像和透射光图像(分别为k

和1)。

[0032] 图4示出在对数标尺(logarithmic scale)上针对不同组织蛋白酶B浓度绘制的探针4和Z-Val-Cit-PABA-7HC的信噪比值。

[0033] 图5示出在室温下在10mg/mL PSA的存在下在Tris缓冲液(pH 7.8, 10%DMSO)中探针5[10 μ M]的化学发光动力学曲线。

具体实施方式

[0034] 一方面,本发明提供turn-ON型二氧杂环丁烷系化学发光探针,更具体地,如上定义的式Ia或Ib的化合物。

[0035] 术语“烷基”通常是指具有例如1-18个碳原子的直链或支链烃基,并且包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、2,2-二甲基丙基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、正十一烷基、正十二烷基、正十三烷基、正十四烷基、正十五烷基、和正十六烷基等。优选的是(C₁-C₈)烷基,更优选的是(C₁-C₄)烷基,最优选的是甲基、乙基和异丙基。

[0036] 术语“亚烷基”是指从烷基除去氢原子后衍生的直链或支链二价烃基。亚烷基的实例包括但不限于亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、2-甲基亚丙基、亚戊基、2-甲基亚丁基、亚己基、2-甲基亚戊基、3-甲基亚戊基、2,3-二甲基亚丁基、亚庚基、亚辛基、亚正十三烷基、亚正十四烷基、亚正十五烷基、亚正十六烷基、亚正十七烷基、亚正十八烷基、亚正十九烷基、亚二十烷基、亚二十一烷基、亚二十二烷基、亚二十三烷基、亚二十四烷基和亚二十五烷基等。术语“亚烷基链”是指从式C_nH_{2n+2}的直链烃中除去两个氢原子后衍生的式-(CH₂)_n-的基团。

[0037] 术语“环烷基”是指具有例如3-7个碳原子的单环或双环饱和和烃基,例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基等,其可以被例如,一种或多种烷基取代。

[0038] 如本文所用的术语“卤素”是指卤素,并且包括氟、氯、溴和碘,但是优选氟或氯。

[0039] 如本文所用的术语“氨基酸”是指包括胺和羧酸官能团两者的有机化合物,其可以是天然或者非天然的氨基酸。蛋白质中天然存在的二十二种氨基酸为天冬氨酸(Asp)、酪氨酸(Tyr)、亮氨酸(Leu)、色氨酸(Trp)、精氨酸(Arg)、缬氨酸(Val)、谷氨酸(Glu)、甲硫氨酸(Met)、苯丙氨酸(Phe)、丝氨酸(Ser)、丙氨酸(Ala)、谷氨酰胺(Gln)、甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)、苏氨酸(Thr)、天冬酰胺(Asn)、赖氨酸(Lys)、组氨酸(His)、异亮氨酸(Ile)、半胱氨酸(Cys)、硒代半胱氨酸(Sec)和吡咯赖氨酸(Py1)。其它氨基酸的非限制性实例包括瓜氨酸(Cit)、二氨基丙酸(Dap)、二氨基丁酸(Dab)、鸟氨酸(Orn)、氨基己二酸、 β -丙氨酸、1-萘基丙氨酸、3-(1-萘基)丙氨酸、3-(2-萘基)丙氨酸、 γ -氨基丁酸(GABA)、3-(氨基甲基)苯甲酸、对乙炔基苯丙氨酸、对-丙炔氧基-苯丙氨酸、间-乙炔基-苯丙氨酸、对-溴苯丙氨酸、对-碘苯丙氨酸、对-叠氮基苯丙氨酸、对-乙酰基苯丙氨酸、正亮氨酸(N1e)、叠氮亮氨酸、6-乙炔基色氨酸、5-乙炔基-色氨酸、3-(6-氯吡啶基)丙氨酸、3-(6-溴吡啶基)丙氨酸、3-(5-溴吡啶基)丙氨酸、叠氮高丙氨酸、对氯苯丙氨酸、 α -氨基辛酸、0-甲基-L-酪氨酸、N-乙酰半乳糖胺- α -苏氨酸和N-乙酰半乳糖胺- α -丝氨酸。

[0040] 如本文所用的术语“氨基酸残基”是指从其氨基,例如其 α -氨基或侧链氨基(如果存在)除去氢原子后的氨基酸的残基,和从其羧基,例如其 α -羧基或侧链羧基(如果存在)除

去-OH基后的氨基酸的残基。

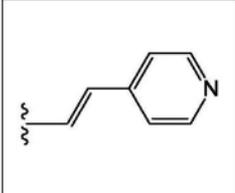
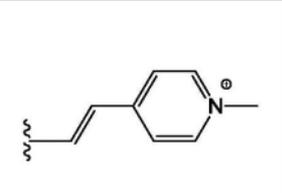
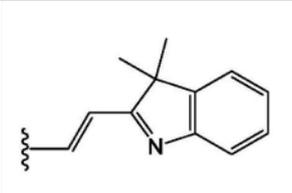
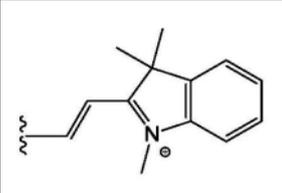
[0041] 术语“肽”是指氨基酸单体(残基)的短链,例如由2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个以上的氨基酸残基组成的链,所述氨基酸残基通过肽键,即当一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基反应时形成的共价键而连接。如本文所用的术语“肽部分”是指如本文所定义的肽在从其羧基,即末端或侧链羧基除去氢原子后的部分,和/或从其氨基,即末端或侧链氨基除去氢原子后的部分。

[0042] 如本文所用的术语“肽键”或“酰胺键”是指当一个分子的羧基与另一个分子的氨基反应,导致水分子的释放时,在两个分子例如两个氨基酸之间形成的共价键-C(O)NH-。

[0043] 如本文所用的术语“氨基保护基团”是指本领域已知的任意氨基保护基团。本领域技术人员可以容易地确定哪些保护基团可以用于氨基的保护,并且标准方法是本领域已知的并且在文献中有所描述。例如,在Green和Wuts的“Protective Groups in Organic Synthesis”, John Wiley and Sons, 1991年第7章中描述了合适的保护基团。优选的氨基保护基团包括苄氧羰基(carbobenzyloxy)(羧基苄基,Cbz)、N-吗啉羰基、对甲氧基苄基羰基、叔丁氧基羰基(Boc)、9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)、乙酰基、苄基、氨基甲酸酯基、对甲氧基苄基(PMB)、3,4-二甲氧基苄基(DMPM)、对甲氧基苄基(PMP)和甲苯磺酰基。

[0044] 如本文所用的术语“ π^* 受体基团”是指包含能够接受电子的 π^* 受体系统的基团,更具体地,是指式-CH=CH-E的基团,其中E为-CN、-COOH、-COO(C₁-C₁₈)烷基,优选为-COO(C₁-C₈)烷基,更优选为-COO(C₁-C₄)烷基、4-吡啶基、甲基吡啶鎓-4-基、3,3-二甲基-3H-吡啶基、或1,3,3-三甲基-3H-吡啶-1-鎓-2-基(也参见表1)。

[0045] 表1:式-CH=CH-E的某些 π^* 受体基团A(名称是指基团E)

	4-吡啶基	甲基吡啶鎓-4-基	3,3-二甲基-3H-吡啶基	1,3,3-三甲基-3H-吡啶-1-鎓-2-基
[0046]				

[0047] 在某些实施方案中,本发明提供式Ia或Ib的化合物,其中R¹为直链或支链的(C₁-C₈)烷基,优选为(C₁-C₄)烷基,更优选为甲基、乙基或异丙基。

[0048] 在某些实施方案中,本发明提供式Ia或Ib的化合物,其中R²和R³各自独立地为支链的(C₃-C₁₈)烷基或(C₃-C₇)环烷基。在其它实施方案中,R²和R³与它们所连接的碳原子一起形成稠合的、螺或桥连的多环。在特定的此类实施方案中,R²和R³与它们所连接的碳原子一起形成金刚烷基。

[0049] 在某些实施方案中,本发明提供式Ia或Ib的化合物,其中R⁵为与-O-R⁴基团邻位连接的卤素,例如Cl或F。

[0050] 在某些实施方案中,本发明提供式Ia或Ib的化合物,其中A为与-O-R⁴基团邻位连接的-CH=CH-E,其中E为-CN、-COOH、-COO(C₁-C₈)烷基,例如-COOCH₃、-COOC₂H₅、-COOC₃H₇、-COOCH(CH₃)₂、或-COOC(CH₃)₃等-COO(C₁-C₄)烷基、4-吡啶基,甲基吡啶鎓-4-基,3,3-二甲基-3H-吡啶基,或者1,3,3-三甲基-3H-吡啶-1-鎓-2-基。在特定的此类实施方案中,E为-CN、-COOH、-COOCH₃、-COOC₂H₅、-COOC₃H₇、-COOCH(CH₃)₂、或-COOC(CH₃)₃。

[0051] 在某些实施方案中,本发明提供式Ia或Ib的化合物,其中 R^1 为直链或支链的(C_1-C_8)烷基,优选为(C_1-C_4)烷基,更优选为甲基、乙基或异丙基; R^2 和 R^3 与它们所连接的碳原子一起形成稠合的、螺或桥连的多环; R^5 为与-O- R^4 基团邻位连接的卤素;和A为与-O- R^4 基团邻位连接的-CH=CH-E,其中E为-CN、-COOH、-COO(C_1-C_8)烷基、4-吡啶基、甲基吡啶鎓-4-基、3,3-二甲基-3H-咪唑基、或1,3,3-三甲基-3H-咪唑-1-鎓-2-基。特定的此类实施方案为如下:其中 R^1 为甲基; R^2 和 R^3 与它们所连接的碳原子一起形成金刚烷基; R^5 为与-O- R^4 基团邻位连接的卤素;和E为-CN, -COOH, 或者例如-COOCH₃、-COOC₂H₅、-COOC₃H₇、-COOCH(CH₃)₂、或-COOC(CH₃)₃等-COO(C_1-C_4)烷基。更特定的此类实施方案为如下:其中E为-CN、-COOH、-COOCH₃、或-COOC(CH₃)₃,即A分别是与-O- R^4 基团邻位连接的丙烯腈、丙烯酸、丙烯酸甲酯或丙烯酸叔丁酯取代基。

[0052] 如上所述,本发明的化学发光探针具有蛋白酶(也称为“肽酶”或“蛋白酶(proteinase)”)可裂解的肽部分(在本文中表示为Pep¹,其是基团 R^4 的一部分),即可被蛋白酶,即能通过肽键的水解进行蛋白水解(蛋白质分解代谢)的酶裂解的、任选地被修饰的氨基酸序列的部分,其中通过特定的目标蛋白酶除去所述可裂解的基团产生不稳定的酚盐-二氧杂环丁烷物质(species),其通过化学激发过程分解以产生受激发的中间体,然后通过发光衰变至其基态。

[0053] 本说明书通篇所指的蛋白酶可以是任意蛋白酶,例如丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、或金属蛋白酶(即其催化机理涉及金属(通常是锌)的蛋白酶)。

[0054] 在某些实施方案中,本文所指的蛋白酶是组织蛋白酶,例如组织蛋白酶A或G(丝氨酸蛋白酶);组织蛋白酶B、C、F、H、K、L1、L2、O、S、W或Z(半胱氨酸蛋白酶);和组织蛋白酶D或E(天冬氨酸蛋白酶)。

[0055] 在某些特定的此类实施方案中,式Ia/Ib的化学发光探针旨在检测组织蛋白酶B的存在,更特别地检测其过表达,所述组织蛋白酶B是参与细胞内蛋白水解的溶酶体半胱氨酸蛋白酶,其在癌前病变和各种病理状况、以及癌症中,例如在溶酶体中的肿瘤内皮细胞和许多其它肿瘤细胞中过表达(Miller等人,2009)。组织蛋白酶B可裂解的肽包括但不限于,包含氨基酸序列Val-Cit、Phe-Lys或Gly-Phe-Leu-Gly,或者由其组成的肽(此类肽将分别经由瓜氨酸、赖氨酸或甘氨酸的羧基与 R^4 的苯胺基团连接)。

[0056] 在其它特定的此类实施方案中,式Ia/Ib的化学发光探针旨在检测组织蛋白酶K的存在,更特别地检测其过表达,所述组织蛋白酶K是参与骨骼重塑和吸收的溶酶体半胱氨酸蛋白酶,主要在破骨细胞中表达,和在骨肿瘤中在细胞外过表达(Segal等人,2009)。组织蛋白酶K可裂解的肽包括但不限于,包含氨基酸序列Gly-Gly-Pro-Nle的肽(此类肽将经由正亮氨酸的羧基与 R^4 的苯胺基团连接)。

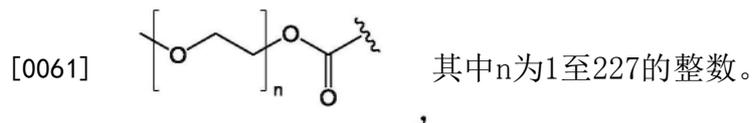
[0057] 在某些实施方案中,本文所指的蛋白酶是天冬酰胺内肽酶,其为在肿瘤细胞中过表达的溶酶体酶(Stern等人,2009),并且式Ia/Ib的化学发光探针旨在检测所述蛋白酶的存在,更特别地检测其过表达。天冬酰胺内肽酶可裂解的肽包括但不限于,包含氨基酸序列Ala-Ala-Asn的肽(此类肽将经由天冬酰胺的羧基与 R^4 的苯胺基团连接)。

[0058] 在某些实施方案中,本文所指的蛋白酶是PSA(也称为激肽释放酶-3),其为由前列腺的上皮细胞分泌的激肽释放酶相关蛋白酶家族的成员,并用作前列腺癌或其它前列腺病

症的标志物,并且式Ia/Ib的化学发光探针旨在检测所述蛋白酶的存在,更特别地检测其过表达。PSA可裂解的肽包括但不限于,包含氨基酸序列His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln的肽(此类肽将经由谷氨酰胺的羧基与R⁴的苯胺基团连接)。

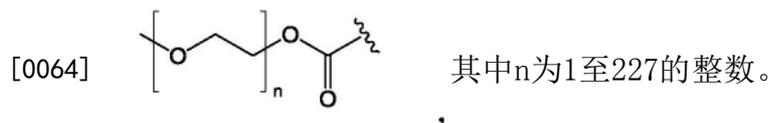
[0059] 在某些实施方案中,本文所指的蛋白酶是基质金属蛋白酶(MMP),即共同地能够水解细胞外基质的所有蛋白质的锌依赖性内肽酶家族成员,因此在例如组织形态发生和修复等生理过程中起重要作用。MMP通过促进基底膜和基质的肿瘤细胞侵袭、血管渗透和转移,也是癌症进展的重要贡献者。例如,许多研究表明,MMP9对于转移前微环境(pre-metastatic niche)的形成至关重要,并且通过调节血管内皮生长因子的生物利用度在肿瘤血管生成中具有独特的作用。在临床上,MMP9的升高的水平与宽范围的癌症类型的肿瘤侵袭性、分期和不良预后相关。关于MMP2的数据也已经发布。

[0060] 在某些实施方案中,本发明提供如以上实施方案中任一项所定义的式Ia或Ib的化合物,其中Pep¹是包含以下氨基酸序列、或由其组成的蛋白酶可裂解的肽部分:Val-Cit、Phe-Lys、Gly-Phe-Leu-Gly、Gly-Gly-Pro-Nle、Ala-Ala-Asn或His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln,其中所述氨基酸序列分别经由瓜氨酸、赖氨酸、甘氨酸、正亮氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺的羧基与R⁴的苯胺基团连接;并且任选地在其氨基处被保护,或者经由酰胺键并且通过所述氨基与含PEG的基团,例如下式的含PEG的基团连接:

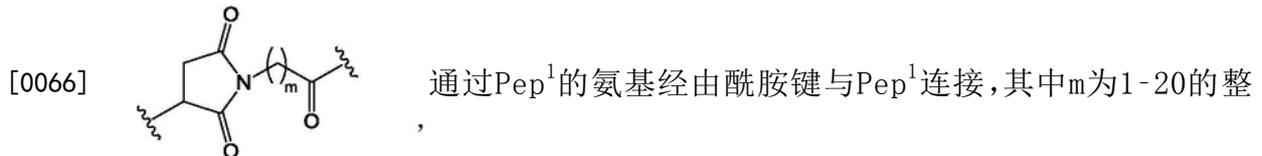


[0062] 在某些特定的此类实施方案中,Pep¹是序列Val-Cit、Phe-Lys、Gly-Phe-Leu-Gly、Gly-Gly-Pro-Nle、Ala-Ala-Asn或His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln的蛋白酶可裂解的肽部分,所述序列分别经由瓜氨酸、赖氨酸、甘氨酸、正亮氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺的羧基与苯胺基团连接,并且分别在缬氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、甘氨酸、丙氨酸或组氨酸的α-氨基处用例如羧基苄基或N-吗啉羰基等氨基保护基团保护。

[0063] 在其它特定的此类实施方案中,Pep¹是序列Val-Cit、Phe-Lys、Gly-Phe-Leu-Gly、Gly-Gly-Pro-Nle、Ala-Ala-Asn或His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln的蛋白酶可裂解的肽部分,所述序列分别经由瓜氨酸、赖氨酸、甘氨酸、正亮氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺的羧基与苯胺基团连接,并且分别经由缬氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸、甘氨酸、丙氨酸或组氨酸的α-氨基与下式的含PEG的基团连接:

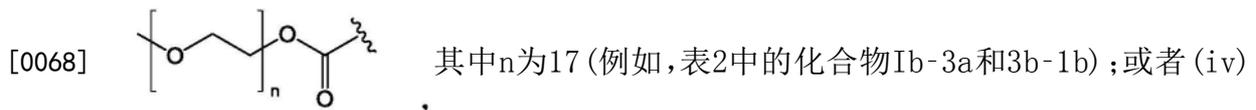


[0065] 在某些实施方案中,本发明提供如以上实施方案中任一项所定义的式Ia或Ib的化合物,其中Pep¹是包含以下氨基酸序列、或由其组成的蛋白酶可裂解的肽部分:Val-Cit、Phe-Lys、Gly-Phe-Leu-Gly、Gly-Gly-Pro-Nle、Ala-Ala-Asn或His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln,所述氨基酸序列分别经由瓜氨酸、赖氨酸、甘氨酸、正亮氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺的羧基与苯胺基团连接;L是通过Pep¹的羧基或其氨基经由酰胺键与Pep¹连接的连接基团;和Pep²是通过其硫醇基与L连接的细胞穿透和增溶的肽部分。在特定的此类实施方案中,L是下式的连接基团:

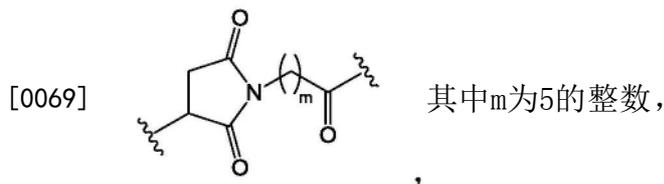


数,和L的亚烷基链任选地被一个或多个-O-基团中断;并且Pep²是细胞穿透和增溶的肽部分,例如通过半胱氨酸残基的硫醇基与L连接的序列Cys-Gly-Lys-Arg-Lys的肽部分。

[0067] 在具体的实施方案中,本文公开的化合物为式Ia或Ib的化合物,其中R¹为甲基;R²和R³与它们所连接的碳原子一起形成金刚烷基;R⁵为与-O-R⁴基团邻位连接的C1;A为与-O-R⁴基团邻位连接的-CH=CH-E;E为-COOCH₃或-CN;并且(i)Pep¹是序列Val-Cit的肽部分,所述序列经由瓜氨酸的羧基与苯胺基团连接,并且在缬氨酸的氨基处被羧基苄基保护(例如,表2中的化合物Ib-1a和Ib-1b);(ii)Pep¹是序列His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln的肽部分,所述序列经由谷氨酰胺的羧基与苯胺基团连接,并且在组氨酸的α-氨基处被N-吗啉羰基保护(例如,表2中的化合物Ib-2a和Ib-2b);(iii)Pep¹是序列Val-Cit的肽部分,所述序列经由瓜氨酸的羧基与苯胺基团连接,并且经由缬氨酸的氨基与下式的含PEG的基团连接:

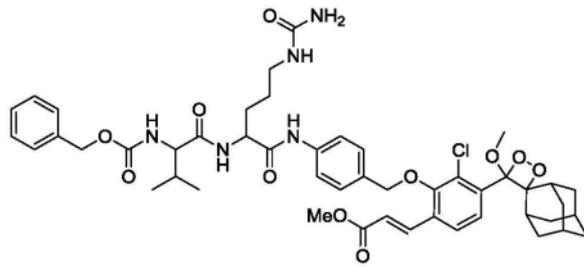
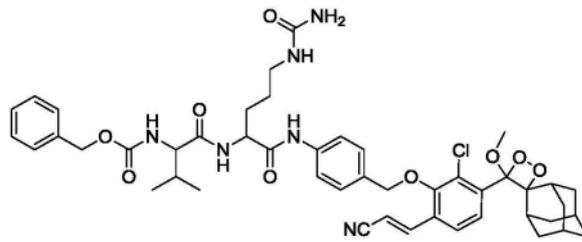


Pep¹是序列Val-Cit或His-Ser-Ser-Lys-Leu-Gln的肽部分,所述序列分别经由瓜氨酸或谷氨酰胺的羧基与苯胺基团连接;L为下式的连接基团:

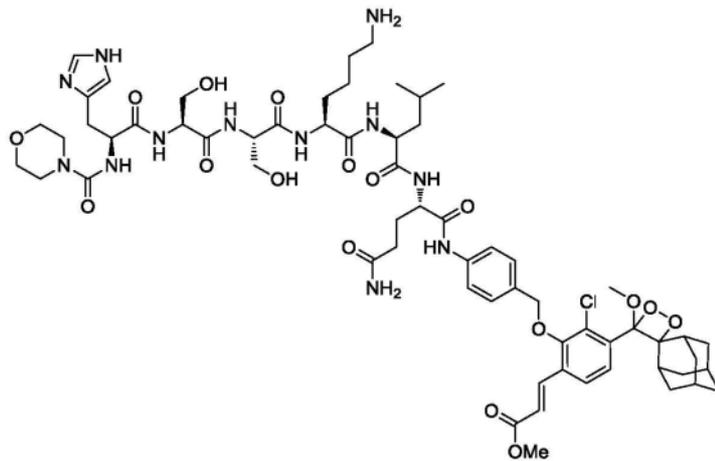


[0070] 分别通过缬氨酸或组氨酸的α-氨基经由酰胺键与Pep¹连接;和Pep²是序列Cys-Gly-Lys-Arg-Lys的肽部分,通过半胱氨酸残基的硫醇基与L连接(例如,表2中的化合物Ib-4a、Ib-4b、Ib-5a和Ib-5b)。

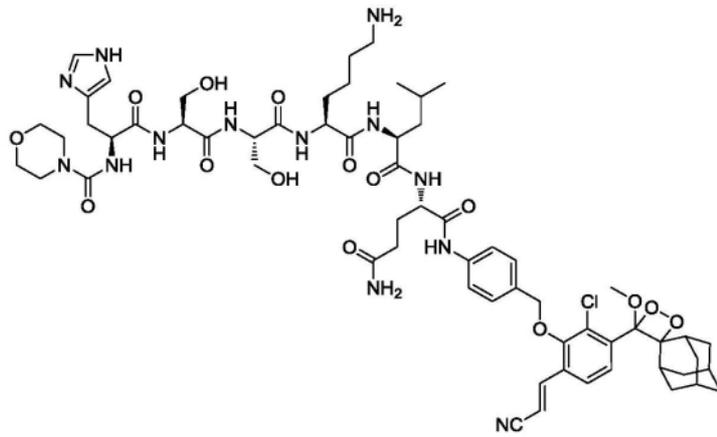
[0071] 表2:本文公开的式Ia/Ib的具体化合物

Ib-1a**Ib-1b**

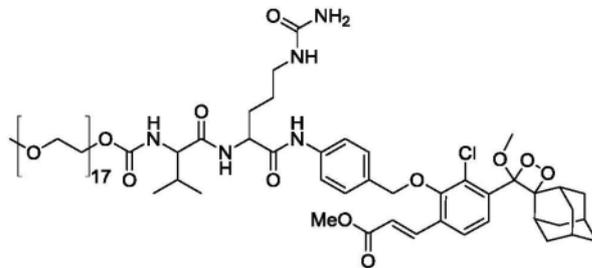
[0072]

Ib-2a

Ib-2b

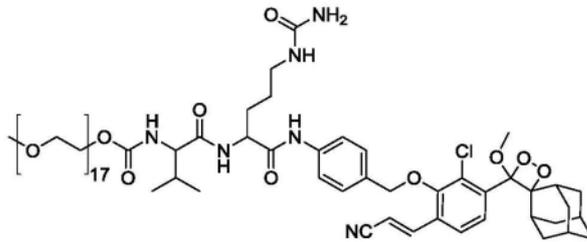


Ib-3a

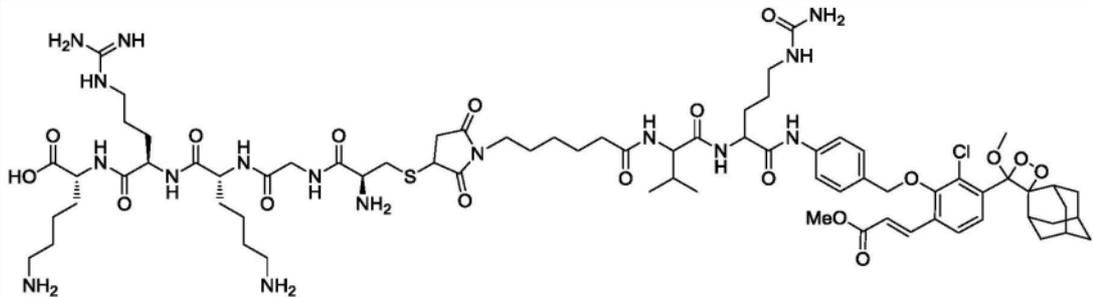


[0073]

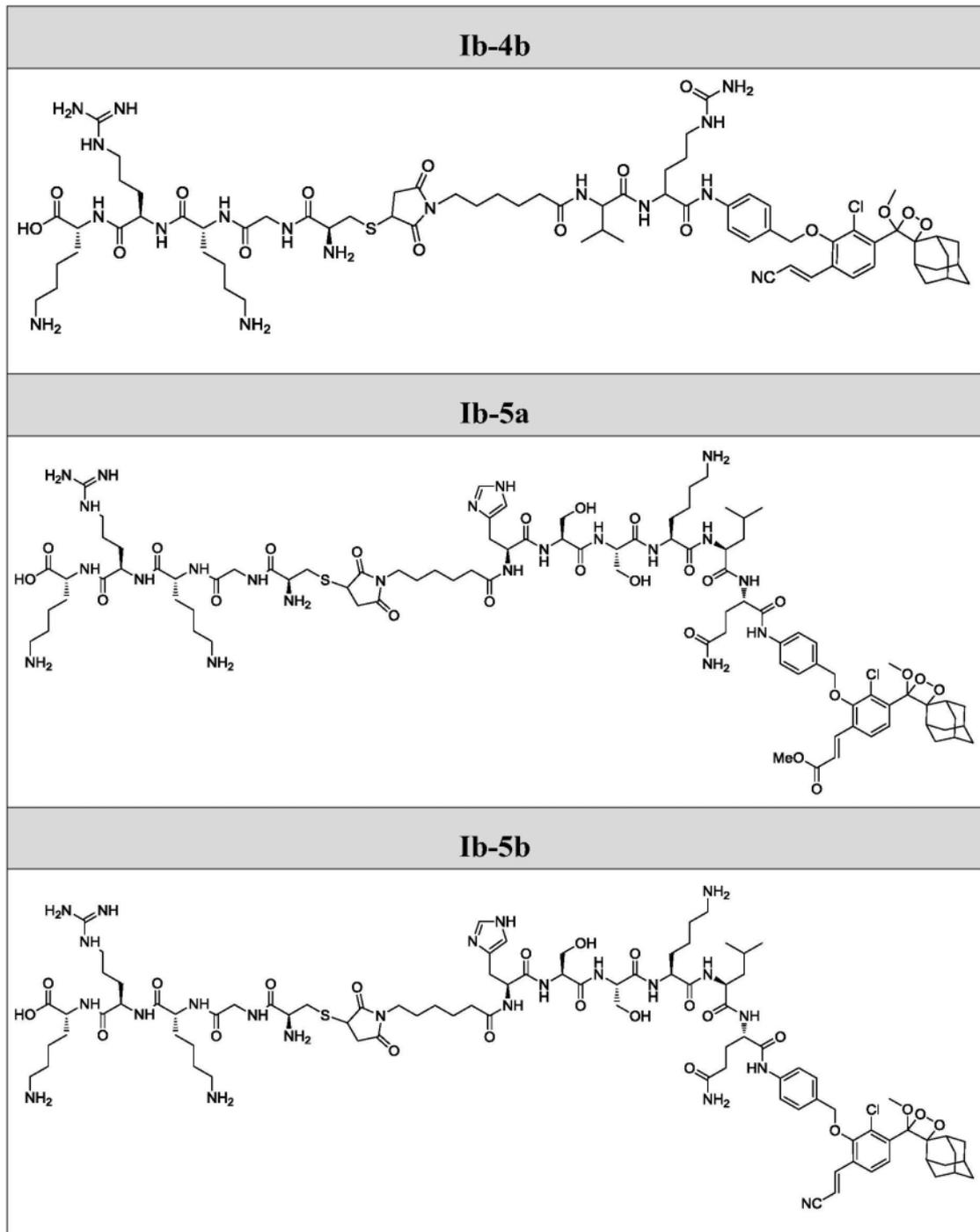
Ib-3b



Ib-4a



[0074]



[0075] 另一方面,本发明提供组合物,其包括本文所公开的二氧杂环丁烷系化学发光探针,即如以上实施方案中任一项所定义的式Ia/Ib的化合物,和载体。特别的此类组合物是包括所述化学发光探针和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0076] 在具体的实施方案中,本发明的组合物包括选自表2中所列的那些式Ia/Ib的化学发光探针。

[0077] 式Ia/Ib的化学发光探针可以用于诊断和/或体内成像,更具体地,用于确定蛋白酶的存在、或测量其水平,所述蛋白酶例如丝氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、谷氨酸蛋白酶或金属蛋白酶。此类蛋白酶的实例包括但不限于,例如组织蛋白酶A、B、C、D、E、F、G、H、K、L1、L2、O、S、W和Z等组织蛋白酶,天冬酰胺内肽酶和PSA。

[0078] 在另一方面,本发明因此涉及(i)如以上实施方案中任一项所定义的式Ia/Ib的二氧杂环丁烷系化学发光探针;或者(ii)包括所述化学发光探针的药物组合物,用于体内诊断或体内成像,即用于确定体内如上所定义的蛋白酶的存在、或测量其水平。

[0079] 换言之,本发明涉及用于确定有需要的个体中如上所定义的蛋白酶的存在、或测量其水平的方法,所述方法包括:(i)向所述个体给予上述实施方案中任一项所定义的式Ia/Ib的化合物或包括所述化合物的组合物,从而当所述蛋白酶存在于所述个体中时,通过所述蛋白酶将所述化合物水解为发射体;和(ii)检测所述发射体的化学发光发射。根据本发明,化学发光探针可以全身或局部给予,例如给予至所述个体的特定器官,以确定在所述个体的整个身体中或在所述特定器官中所述蛋白酶的存在、或测量其水平。

[0080] 在另一方面,本发明涉及确定样品中即体外蛋白酶的存在、或测量其水平的方法,所述方法包括:(i)使所述样品与以上实施方案中任一项所定义的式Ia/Ib的化合物(其中 Pep^1 是可被所述蛋白酶裂解的基团)或者包括所述化合物的组合物接触,从而当所述蛋白酶存在于所述样品中时,通过所述蛋白酶将所述化合物水解为发射体;和(ii)检测所述发射体的化学发光发射。

[0081] 根据该方法分析的样品可以是任意样品,例如生物样品。如本文所用,术语“生物样品”是指组织活检样品;体液,例如羊水、房水、玻璃体液、胆汁、血清、母乳、脑脊液、耳垢(耳垢)、内淋巴、外淋巴、女性阴道射液、胃液、黏液、腹膜液、唾液、皮脂(皮肤油)、精液、汗液、泪液、阴道分泌物、呕吐物和尿液;或者基于体液的溶液,即其中溶解有体液的水溶液。

[0082] 根据本发明的药物组合物可以通过常规技术来制备,例如,如在Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,1995中所述。例如,可以通过均匀且紧密地将活性剂,即本文公开的二氧杂环丁烷系化学发光探针,与液体载体、细分的固体载体、或者两者结合,然后,如果需要,将产物成形为期望的配方产品来制备组合物。组合物可以是液体、固体或半固体形式,并且可以进一步包括药学上可接受的填料、载体、稀释剂或佐剂,以及其它惰性成分和赋形剂。在一个实施方案中,将本发明的药物组合物配制为纳米颗粒。

[0083] 根据本发明的药物组合物可以配制为用于任何适合的给药途径,例如,用于例如静脉内、动脉内、鞘内、胸膜内、气管内、腹膜内、肌内或皮下给药等肠胃外给药,局部给药,口服或者肠内给药,或者用于吸入。在特定的实施方案中,将此类组合物配制为用于静脉内或腹膜内给药,或者用于皮下给药。

[0084] 本发明的药物组合物可以是无菌可注射水性或油性悬浮液的形式,其可以根据已知技术使用适合的分散剂、湿润剂或悬浮剂来配制。无菌可注射制剂还可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液。可以采用的可接受的载体和溶剂包括例如水、林格氏溶液(Ringer's solution)和等渗氯化钠溶液。

[0085] 本发明探针的化学发光可以利用本领域已知的任何技术或程序来检测。

[0086] 光学分子成像是在肿瘤边缘检测中提供高度的灵敏度和特异性的有前途的技术。此外,现有的临床应用证明,光学分子成像是用于指导外科医生进行精确手术的强大的术中工具,从而实现根治性切除和提高存活率。在荧光指导下临床批准的用于微创外科手术的仪器的实例是da Vinci Surgical System(Haber等人,2010)。该仪器特征在于具有在患者体内呈现清晰和放大的视野的3D HD视觉系统,并且允许外科医生通过少许小开口进行复杂和常规的操作,类似于传统的腹腔镜检查。此外,以下系统已被应用于乳腺癌、肝转移

和旁路移植手术的外科手术: The Hamamatsu's Photodynamic Eye (PDETM)、ArtemisTM和 Novadaq SPYTM (Novadaq Technologies Inc., Toronto, Canada) (Chi等人, 2014)。在临床试验中评价几种现有的术中NIR荧光分子成像系统: 包括Fluobeam[®]、FLARETM和GXMI Navigator。它们在操作便利性、改善图像评估和增加检测深度方面发挥了重要作用 (Chi等人, 2014)。

[0087] 近年来, 在IR范围内在用于光学荧光成像的相机和激光器的开发方面取得了很大进展 (Mieog等人, 2011; Troyan等人, 2009)。同时, 存在如ICG和亚甲基蓝等低MW有机染料的大量临床使用, 以用于确定心输出量、肝功能和肝血流量, 以及用于眼科血管造影。在2015年, 荧光成像系统Xiralite[®]获得FDA批准用于手部微循环的可视化 (用于炎症和灌注相关疾病)。

[0088] 现在将通过以下非限制性实施例说明本发明。

[0089] 实施例

[0090] 实验

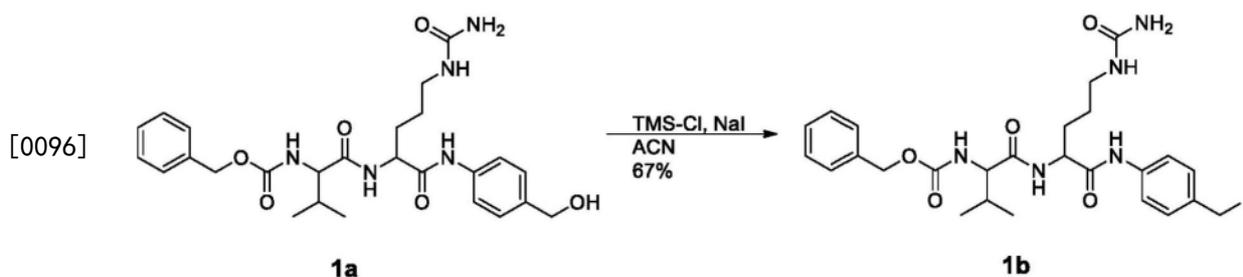
[0091] 一般方法

[0092] 所有要求无水条件的反应均在氩气氛下进行。除非另有说明, 否则所有反应均在室温下进行。化学品和溶剂为分析试剂 (A. R.) 级或者通过标准技术纯化。TLC: 硅胶板Merck 60F₂₅₄: 化合物通过用UV光照射而可视化。柱色谱 (FC): 硅胶Merck 60 (粒径0.040-0.063mm), 括号中给出洗脱液。RP-HPLC: C18 5u, 250×4.6mm, 括号中给出洗脱液。制备型 RP-HPLC: C18 5u, 250×21mm, 括号中给出洗脱液。使用在400MHz下操作的Bruker Avance测量¹H-NMR光谱。使用在100MHz下操作的Bruker Avance测量¹³C-NMR光谱。相对于残余溶剂, 在δ标度上以ppm报告化学位移 (CDCl₃: 对于¹H-NMR为δ=7.26和对于¹³C-NMR为77.16, DMSO-d₆: 对于¹H-NMR为δ=2.50和对于¹³C-NMR为39.52)。在Waters Xevo TQD上测量质谱。在Molecular Devices Spectramax i3x上记录化学发光。包括盐和溶剂的所有试剂, 均购自Sigma-Aldrich。用于光化学反应的光照射: LED PAR38灯 (19W, 3000K)。

[0093] 探针1的合成

[0094] 化合物1b. 如方案3中所示, 将化合物1a (Dubowchik等人, 2002) (300mg, 0.58mmol, 1eq) 溶解于7mL的ACN中并且冷却至0℃。添加碘化钠 (264mg, 1.76mmol, 3eq), 然后快速添加TMS-Cl (222μl, 1.76mmol, 3eq)。使反应升温至室温, 并且通过TLC (MeOH: DCM 10:90) 监测。完成后, 将反应混合物用EtOAc稀释, 并且用饱和Na₂S₂O₃洗涤, 随后用盐水洗涤。将有机层分离, 经Na₂SO₄干燥, 过滤, 并且将溶剂在减压下蒸发, 以得到作为灰白色固体的化合物1b (245mg, 67%收率)。使化合物反应而无需进一步纯化。MS (ES⁺): m/z C₂₆H₃₄IN₅O₅的计算值: 623.16; 实测值: 624.4 [M+H]⁺。

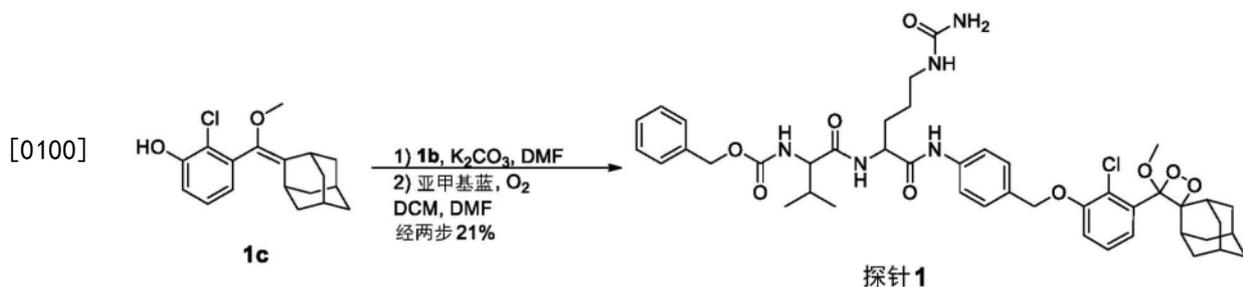
[0095] 方案3: 化合物1b的合成



[0097] 探针1.如方案4中所示,将化合物1b (69mg, 0.115mmol, 1eq) 和化合物1c (Green等人, 2017) (37mg, 0.127mmol, 1.1eq) 溶解于0.5mL DMF中, 并且添加 K_2CO_3 (35mg, 0.253mmol, 2.2eq)。通过TLC (MeOH:DCM 10:90) 来监测反应。完成后, 将反应混合物用EtOAc稀释, 并且用饱和 NH_4Cl 洗涤。将有机层分离, 用盐水洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并且将溶剂在减压下蒸发。粗产物反应而无需进一步纯化。MS (ES⁺): m/z $C_{44}H_{54}ClN_5O_7$ 的计算值: 799.37; 实测值: 800.5 [M+H]⁺。

[0098] 将粗产物溶解于5mL DCM和几滴DMF (以提高溶解度) 中。添加几毫克的亚甲基蓝, 并且在用黄光照射的同时, 使氧气通过溶液鼓泡。通过RP-HPLC (在水中50-100% ACN, 20min) 监测反应。完成后, 将反应混合物通过在减压下蒸发而浓缩, 并且将粗产物通过制备型RP-HPLC (在水中50-100% ACN, 20min) 来纯化, 以得到作为白色固体的探针1 (20mg, 21% 收率)。MS (ES⁺): m/z $C_{44}H_{54}ClN_5O_9$ 的计算值: 831.36; 实测值: 854.5 [M+Na]⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 10.07 (s, 1H), 8.10 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.60 (d, J=8.5Hz, 2H), 7.54 (d, J=7.7Hz, 1H), 7.44 (t, J=8.0Hz, 1H), 7.41-7.25 (m, 7H), 5.97 (s, 1H), 5.74 (s, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.16 (q, J=12.0Hz, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.40 (dd, J=13.4, 7.9Hz, 1H), 3.95-3.86 (m, 1H), 3.07 (s, 3H), 3.05-2.97 (m, 1H), 2.92 (dd, J=13.0, 6.1Hz, 1H), 2.85 (s, 1H), 2.24 (d, J=12.8Hz, 1H), 2.03-1.86 (m, 2H), 1.75-1.49 (m, 9H), 1.37 (dd, J=37.8, 8.8Hz, 3H), 1.28-1.12 (m, 4H), 0.86 (d, J=6.8Hz, 3H), 0.82 (d, J=6.7Hz, 3H)。¹³C NMR (101MHz, DMSO) δ 171.77, 171.17, 159.42, 156.68, 155.07, 139.27, 137.62, 132.84, 131.60, 128.87, 128.29, 128.17, 125.05, 120.70, 119.55, 116.55, 112.02, 95.77, 70.85, 65.92, 60.59, 53.58, 49.75, 36.46, 33.76, 33.48, 32.25, 31.62, 31.31, 30.90, 30.00, 27.31, 26.05, 25.72, 19.74, 18.68。

[0099] 方案4: 化学发光探针1的合成

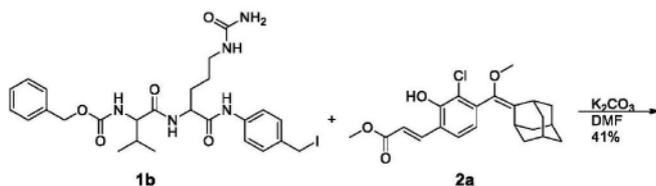


[0101] 探针2的合成

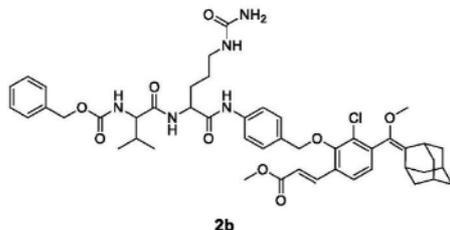
[0102] 化合物2b.如方案5中所示,将化合物1b (50mg, 0.08mmol, 1eq) 和化合物2a (Green等人, 2017) (34mg, 0.09mmol, 1.1eq) 溶解于0.5mL DMF中, 并且添加 K_2CO_3 (24mg, 0.18mmol, 2.2eq)。通过TLC (MeOH:DCM 10:90) 来监测反应。完成后, 将反应混合物用EtOAc稀释, 并且用饱和 NH_4Cl 洗涤。将有机层分离, 用盐水洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并且将溶剂在减压下蒸发。将粗产物通过硅胶上的柱色谱 (MeOH:DCM 10:90) 来纯化, 以得到作为淡黄色固体的化

合物2b(29mg,41%收率)。MS(ES⁺):m/z C₄₈H₅₈ClN₅O₉的计算值:883.39;实测值:884.8[M+H]⁺。¹H NMR(400MHz,CDC1₃) δ7.83(d,J=16.2Hz,1H),7.53(d,J=8.2Hz,2H),7.35(t,J=8.5Hz,3H),7.30-7.18(m,5H),7.00(d,J=8.0Hz,1H),6.36(d,J=16.2Hz,1H),5.02(q,J=12.3Hz,3H),4.87(d,J=3.1Hz,2H),4.49(dd,J=8.8,4.9Hz,1H),3.96(d,J=6.2Hz,1H),3.71(s,3H),3.25(s,3H),3.22-2.98(m,4H),2.06-1.94(m,3H),1.92-1.80(m,6H),1.80-1.70(m,5H),1.70-1.56(m,5H),1.46(s,3H),0.88(d,J=6.7Hz,3H),0.84(d,J=6.8Hz,3H)。¹³C NMR(101MHz,CDC1₃) δ172.55,170.37,167.50,157.00,153.69,139.29,139.04,138.32,138.26,138.20,138.12,136.17,132.78,131.83,129.61,128.51,128.18,127.88,125.15,119.91,119.74,75.82,67.07,60.48,57.26,53.16,51.84,39.13,38.59,36.99,32.94,31.00,29.72,29.29,28.31,25.99,19.17,17.79。

[0103] 方案5:化合物2b的合成

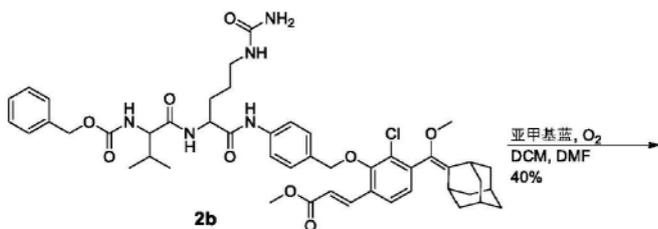


[0104]

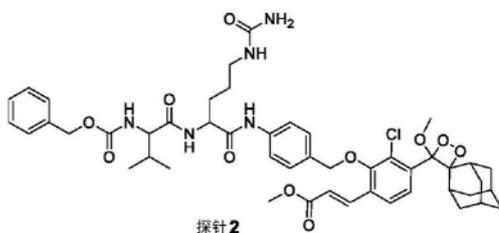


[0105] 探针2.如方案6中所示,将化合物2b(20mg,0.02mmol)溶解于5mL DCM和几滴DMF(以提高溶解度)中。添加几毫克的亚甲基蓝,并且在用黄光照射的同时,使氧气通过溶液鼓泡。通过RP-HPLC(在水中50-100%ACN,20min)监测反应。完成后,将反应混合物通过在减压下蒸发而浓缩,并且将粗产物通过制备型RP-HPLC(在水中50-100%ACN,20min)来纯化,以得到作为白色固体的探针2(8mg,40%收率)。MS(ES⁻):m/z C₄₈H₅₈ClN₅O₁₁的计算值:915.38;实测值:950.6[M+Cl]⁻。¹H NMR(400MHz,DMSO) δ10.09(s,1H),8.11(d,J=7.6Hz,1H),7.94(d,J=8.4Hz,1H),7.77(d,J=8.4Hz,1H),7.71(d,J=16.2Hz,1H),7.60(d,J=8.5Hz,2H),7.37-7.27(m,6H),6.67(d,J=16.2Hz,1H),5.98(s,1H),5.42(s,1H),5.02(s,2H),4.92-4.85(m,2H),4.41(dd,J=13.4,8.0Hz,1H),3.96-3.85(m,1H),3.71(s,3H),3.10(s,3H),2.98(d,J=23.1Hz,2H),2.87(s,1H),2.22(d,J=12.4Hz,1H),1.96(dd,J=13.5,6.7Hz,1H),1.89(s,1H),1.77-1.48(m,11H),1.49-1.11(m,7H),0.86(d,J=6.8Hz,3H),0.82(d,J=6.7Hz,3H)。¹³C NMR(101MHz,DMSO) δ171.79,171.22,166.73,159.43,156.69,154.23,139.86,137.90,137.62,134.85,131.79,130.73,130.20,128.87,128.30,128.19,127.39,126.56,121.77,119.39,111.72,95.95,76.26,65.93,60.59,53.60,52.24,49.95,39.83,39.62,39.41,36.39,33.81,33.59,32.36,32.18,31.61,31.38,30.91,30.00,27.31,26.03,25.69,19.73,18.68。

[0106] 方案6:化学发光探针2的合成



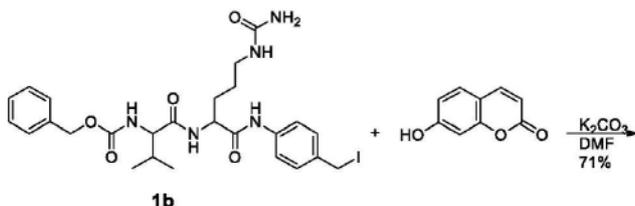
[0107]



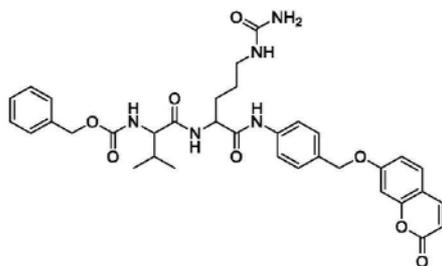
[0108] Z-Val-Cit-PABA-7HC的合成

[0109] 如方案7中所示,将化合物1b (40mg, 0.064mmol, 1eq) 和7-羟基香豆素 (12mg, 0.07mmol, 1.1eq) 溶解于0.5mL DMF中,并且添加 K_2CO_3 (20mg, 0.141mmol, 2.2eq)。通过TLC (MeOH:DCM 10:90) 来监测反应。完成后,将反应混合物用EtOAc稀释,并且用饱和 NH_4Cl 洗涤。将有机层分离,用盐水洗涤,经 Na_2SO_4 干燥,过滤,并且将溶剂在减压下蒸发。将粗产物通过硅胶上的柱色谱 (MeOH:DCM 10:90) 来纯化,以得到作为淡黄色固体的Z-Val-Cit-PABA-7HC (29mg, 71%收率)。MS (ES⁺): m/z $C_{35}H_{39}N_5O_8$ 的计算值:657.28;实测值:680.52[M+Na]⁺。

[0110] 方案7:Z-Val-Cit-PABA-7HC的合成



[0111]

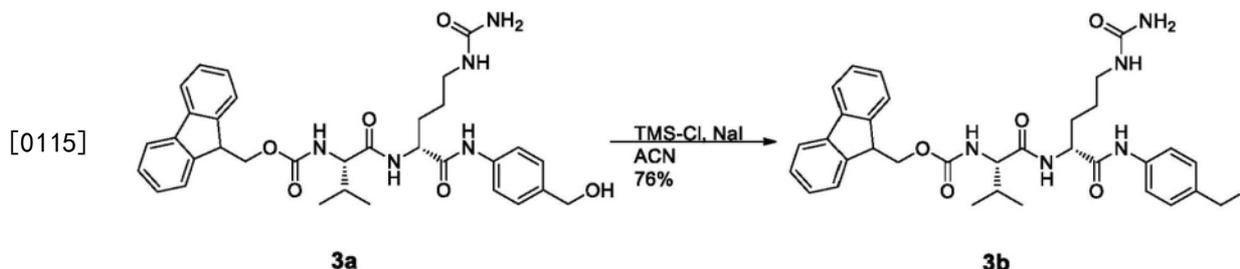


[0112] 探针3的合成

[0113] 化合物3b.如方案8中所示,将化合物3a (Dubowchik等人,2002) (100mg, 0.2mmol, 1eq) 溶解于7mL的ACN中并且冷却至0℃。添加碘化钠 (90mg, 0.6mmol, 3eq), 然后快速添加TMS-Cl (78μl, 0.6mmol, 3eq)。使反应升温至室温,并且通过TLC (MeOH:DCM 10:90) 监测。完成后,将反应混合物用EtOAc稀释,并且用饱和 $Na_2S_2O_3$ 洗涤,随后用盐水洗涤。将有机层分离,经 Na_2SO_4 干燥,过滤,并且将溶剂在减压下蒸发,以得到作为淡黄色固体的化合物3b (108mg, 76%收率)。MS (ES⁺): m/z $C_{33}H_{38}IN_5O_5$ 的计算值:711.19;实测值:712.5[M+H]⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ10.10 (d, J=7.4Hz, 1H), 8.13 (d, J=7.1Hz, 1H), 7.87 (d, J=7.4Hz, 2H), 7.73 (t, J=7.4Hz, 2H), 7.59 (d, J=8.2Hz, 1H), 7.52 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.46-7.25 (m, 4H), 7.21 (s, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.60 (s, 1H), 4.41 (s, 2H), 4.34-4.15 (m, 4H), 3.94-3.89 (m,

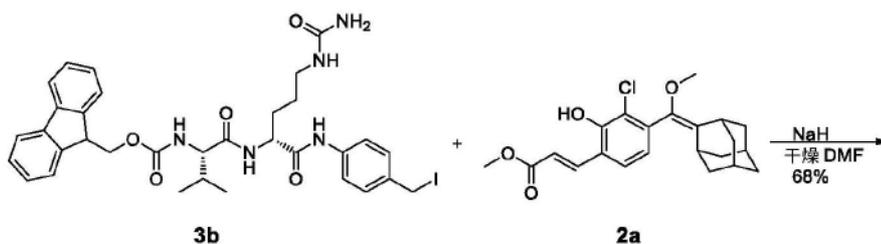
2H), 3.00 (s, 1H), 2.94 (s, 1H), 1.97 (d, J=6.4Hz, 1H), 1.67 (s, 1H), 1.59 (s, 1H), 1.50-1.26 (m, 2H), 1.21 (s, 1H), 0.86 (d, J=6.8Hz, 3H), 0.84 (d, J=6.7Hz, 3H). ¹³C NMR (101MHz, DMSO) δ171.84, 171.23, 159.46, 156.65, 144.43, 144.30, 141.23, 139.50, 132.96, 130.06, 128.18, 127.61, 125.90, 120.64, 120.11, 119.64, 118.09, 66.20, 63.11, 60.57, 57.25, 53.64, 47.21, 46.71, 39.83, 39.63, 39.42, 30.97, 29.93, 29.53, 27.29, 19.75, 18.82。

[0114] 方案8: 化合物3b的合成

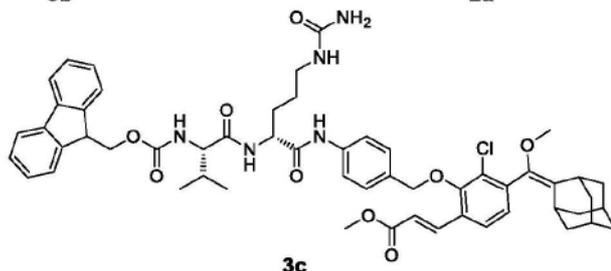


[0116] 化合物3c. 如方案9中所示, 在氩气氛下, 将化合物2a (120mg, 0.31mmol, 1.2eq) 溶解于干燥DMF中, 并且冷却至0°C。添加碘化钠 (11.2mg, 0.28, 1.1eq), 并且使反应升温至室温。搅拌15分钟后, 添加化合物3b (184mg, 0.26mmol, 1eq), 并且通过TLC (MeOH:DCM 10:90) 监测反应。完成后, 在减压下除去溶剂。将所得油状物用2mL EtOAc析出, 然后用Et₂O (7mL) 研磨10分钟。然后将混合物经由真空过滤来过滤并且将固体干燥以提供作为灰白色固体的化合物3c (236mg, 68%)。MS (ES⁺): m/z C₅₅H₆₂ClN₅O₉的计算值: 971.42; 实测值: 972.7[M+H]⁺。 ¹H NMR (400MHz, DMSO) δ10.10 (s, 1H), 8.13 (d, J=7.4Hz, 1H), 7.87 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.77 (dd, J=8.3, 4.4Hz, 2H), 7.72 (d, J=7.8Hz, 2H), 7.60 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.41 (dd, J=17.4, 8.5Hz, 3H), 7.31 (t, J=7.9Hz, 4H), 7.09 (d, J=8.0Hz, 1H), 6.64 (d, J=16.2Hz, 1H), 5.98-5.95 (m, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.92 (dd, J=15.0Hz, 2H), 4.41 (s, 1H), 4.31-4.18 (m, 3H), 3.96-3.86 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.36 (dd, J=14.0, 7.0Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.17 (s, 1H), 3.07-2.97 (m, 1H), 2.97-2.86 (m, 1H), 2.03-1.82 (m, 6H), 1.80-1.50 (m, 9H), 1.50-1.27 (m, 2H), 1.07 (t, J=7.0Hz, 1H), 0.87 (d, J=6.7Hz, 3H), 0.84 (d, J=6.7Hz, 3H)。 ¹³C NMR (101MHz, DMSO) δ171.82, 171.21, 166.95, 159.41, 156.64, 153.54, 144.44, 144.31, 141.23, 139.86, 138.41, 137.90, 130.92, 130.75, 130.10, 129.87, 129.26, 128.17, 127.60, 126.39, 125.91, 120.63, 119.33, 76.03, 66.21, 65.46, 60.57, 57.06, 53.63, 52.16, 47.21, 38.95, 38.63, 36.98, 32.93, 30.99, 30.00, 29.55, 28.09, 27.34, 19.75, 18.80, 15.70。

[0117] 方案9: 化合物3c的合成

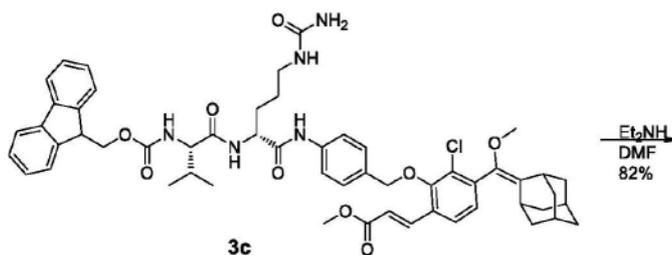


[0118]

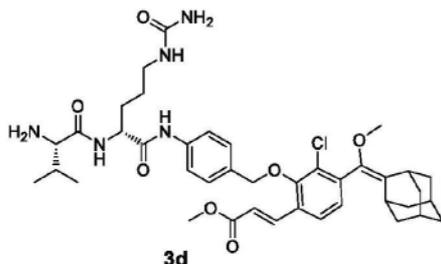


[0119] 化合物3d.如方案10中所示,将化合物3c (220mg, 0.23mmol, 1eq) 溶解于DMF (6mL) 中,并且添加二乙胺 (2mL)。通过RP-HPLC (在水中50-100%ACN, 20min) 监测反应。完成后,在减压下除去溶剂。将所得油状物用1.5mL EtOAc析出,然后用Et₂O (20mL) 研磨10分钟。然后将混合物经由真空过滤来过滤并且将固体干燥以提供作为灰白色固体的化合物3d (140mg, 82%)。MS (ES⁺): m/z C₄₀H₅₂ClN₅O₇的计算值: 749.36; 实测值: 750.6 [M+H]⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 10.18 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.81-7.71 (m, J=11.2Hz, 2H), 7.60 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.33 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.10 (d, J=8.1Hz, 1H), 6.63 (d, J=16.1Hz, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.42 (s, 2H), 4.93 (dd, J=30.5, 9.9Hz, 2H), 4.47 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.20 (s, 3H), 3.17 (s, 1H), 3.13 (d, J=4.7Hz, 1H), 3.05-2.97 (m, 1H), 2.97-2.88 (m, 1H), 1.94-1.85 (m, J=24.5Hz, 6H), 1.78-1.55 (m, 9H), 1.46-1.32 (m, 3H), 1.22 (s, 2H), 0.88 (d, J=6.7Hz, 3H), 0.80 (d, J=6.7Hz, 3H)。¹³C NMR (101MHz, DMSO) δ 173.82, 171.24, 166.96, 159.43, 153.55, 139.87, 139.72, 138.42, 137.91, 131.01, 130.77, 130.11, 129.88, 129.26, 128.19, 126.40, 120.58, 119.41, 76.02, 59.72, 57.06, 53.17, 52.16, 40.04, 39.83, 39.62, 39.41, 38.96, 38.63, 36.98, 32.92, 31.62, 30.46, 29.55, 28.08, 27.26, 22.60, 19.85, 17.61, 14.50。

[0120] 方案10: 化合物3d的合成

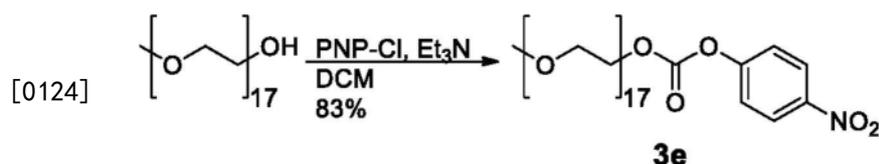


[0121]

[0122] 化合物3e.如方案11中所示,在氩气氛下,将mPEG₇₈₀ (100mg, 0.128mmol, 1eq) 溶解

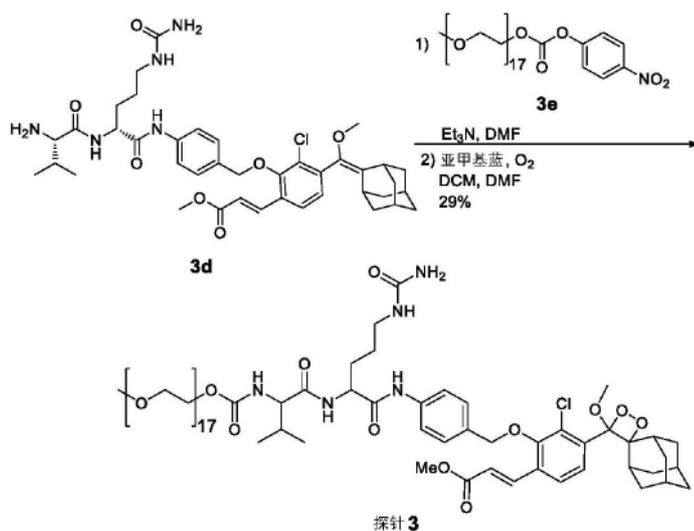
于干燥DCM中,并且冷却至0℃。添加Et₃N (36μl, 0.256mmol, 2eq) 和对硝基苯基氯甲酸酯 (PNP-Cl, 52mg, 0.256mmol, 2eq), 并且使反应升温至室温。通过TLC (MeOH:DCM 10:90) 监测反应。完成后,将反应混合物用DCM稀释,并且用饱和NH₄Cl洗涤。将有机层分离,经Na₂SO₄干燥,过滤,并且将溶剂在减压下蒸发。将粗产物通过硅胶上的柱色谱 (MeOH:DCM 20:80) 来纯化,以得到作为白色-淡黄色固体的化合物3e (101mg, 83%收率)。MS (ES⁺): m/z C₄₂H₇₅NO₂₂的计算值:946.04;实测值:946.8。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ8.2 (d, 2H, J=8Hz), 7.32 (d, 2H, J=8Hz), 4.41-4.33 (m, 2H), 3.77-3.72 (m, 2H), 3.64-3.60 (m, 6H), 3.56-3.58 (m, 56H), 3.46-3.48 (m, 2H), 3.30 (s, 3H)。¹³C NMR (101MHz, CDCl₃) δ155.54, 152.49, 145.38, 125.32, 121.86, 71.92, 70.69, 70.55, 68.62, 68.33, 59.02。

[0123] 方案11:化合物3e的合成



[0125] 探针3.如方案12中所示,将化合物3d (10mg, 0.013mmol, 1eq) 和化合物3e (19mg, 0.02mmol, 1.5eq) 溶解于DMF中,并且添加几滴Et₃N。将反应加热至50℃过夜。通过RP-HPLC (在水中30-100%ACN, 20min) 监测反应。完成后,将反应混合物通过在减压下蒸发而浓缩,并且将粗产物不经进一步纯化而用于下一步骤。MS (ES⁺): m/z C₇₆H₁₂₂ClN₅O₂₆的计算值:1557.25;实测值:790.4 [(M+Na)/2]⁺。

[0126] 方案12:化学发光探针3的合成



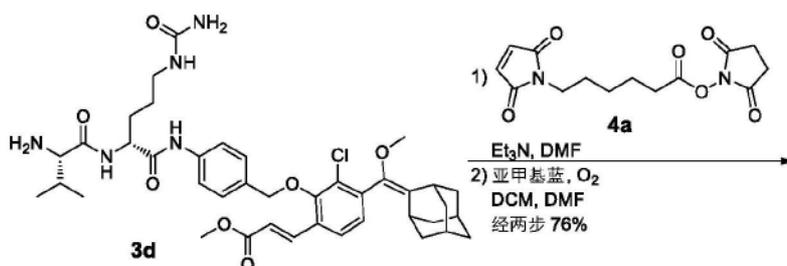
[0128] 将粗产物 (12mg, 0.008mmol) 溶解于5mL DCM中。添加几毫克的亚甲基蓝,并且在用黄光照射的同时,使氧气通过溶液鼓泡。通过RP-HPLC (在水中30-100%ACN, 20min) 监测反应。完成后,将反应混合物通过在减压下蒸发而浓缩,并且将粗产物通过制备型RP-HPLC (在水中30-100%ACN, 20min) 来纯化,以得到作为白色固体的探针3 (6mg, 29%收率,经两步)。MS (ES⁺): m/z C₇₆H₁₂₂ClN₅O₂₈的计算值:1587.80;实测值:1589.0 [M+H]⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ10.06 (s, 1H), 8.05 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.94 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.77 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.74-7.68 (m, 1H), 7.60 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.32 (d, J=8.3Hz, 2H), 7.23 (d, J=8.7Hz, 1H), 6.67 (d, J=16.1Hz, 2H), 5.95 (t, J=5.5Hz, 1H), 5.39 (s, 2H), 4.88 (t, J=11.6Hz, 2H),

4.41 (d, J=5.1Hz, 2H), 4.05 (s, 2H), 3.88 (d, J=11.7Hz, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.70 (s, 1H), 3.56 (d, J=4.5Hz, 6H), 3.49 (s, 56H), 3.41 (dd, J=5.8, 3.5Hz, 2H), 3.22 (s, 3H), 3.11 (s, 3H), 3.07-2.90 (m, 2H), 2.87 (s, 1H), 2.28-2.11 (m, 2H), 2.01-1.83 (m, 3H), 1.64 (dd, J=48.9, 13.1Hz, 9H), 1.39 (dd, J=52.0, 12.3Hz, 5H), 1.22 (s, 2H), 0.86 (d, J=6.7Hz, 3H), 0.82 (d, J=6.7Hz, 3H). ^{13}C NMR (101MHz, DMSO) δ 171.80, 171.24, 169.86, 169.80, 168.91, 166.76, 164.34, 159.45, 156.78, 154.29, 152.20, 139.94, 137.90, 134.91, 133.96, 133.65, 131.83, 131.41, 130.85, 130.20, 129.00, 127.38, 126.60, 123.76, 121.77, 119.46, 116.80, 111.80, 111.77, 96.06, 76.18, 71.86, 70.36, 70.16, 69.39, 64.06, 60.53, 58.62, 53.54, 53.29, 52.27, 49.94, 40.74, 40.54, 40.33, 40.12, 39.91, 39.70, 39.49, 36.46, 36.40, 33.88, 33.78, 33.65, 32.42, 32.23, 31.77, 31.44, 30.94, 30.07, 29.57, 29.21, 27.34, 26.08, 25.79, 22.66, 19.77, 18.70。

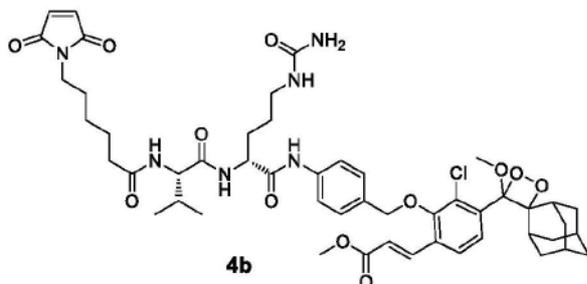
[0129] 探针4的合成

[0130] 化合物4b. 如方案13中所示, 将化合物3d (10mg, 0.013mmol, 1eq) 和化合物4a (Ikeda等人, 2012) 溶解于DMF (0.5mL) 中, 并且添加几滴 Et_3N 。通过RP-HPLC (在水中30-100%ACN, 20min) 监测反应。完成后, 将反应混合物在减压下浓缩。粗产物不经纯化而进一步反应。将粗产物和几毫克亚甲基蓝溶解于5mL DCM和几滴DMF (以提高溶解度) 中。在用黄光照射的同时, 使氧气通过溶液鼓泡。通过RP-HPLC (在水中30-100%ACN, 20min) 监测反应。完成后, 将反应混合物通过在减压下蒸发而浓缩。将粗产物通过制备型RP-HPLC (在水中30-100%ACN, 20min) 来纯化, 以得到作为白色固体的化合物4b (11mg, 76%收率)。MS (ES⁺): m/z $\text{C}_{50}\text{H}_{63}\text{ClN}_6\text{O}_{12}$ 的计算值: 974.42; 实测值: 975.8 [M+H]⁺。 ^1H NMR (400MHz, DMSO) δ 10.02 (s, 1H), 8.09 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.94 (d, J=8.4Hz, 1H), 7.78 (t, J=9.4Hz, 2H), 7.70 (d, J=16.2Hz, 1H), 7.60 (d, J=8.5Hz, 2H), 7.32 (d, J=7.2Hz, 2H), 6.98 (s, 2H), 6.67 (d, J=16.2Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.95-4.80 (m, 2H), 4.37 (d, J=5.4Hz, 1H), 4.26-4.10 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.35 (t, J=7.0Hz, 3H), 3.10 (s, 3H), 3.06-2.97 (m, 1H), 2.97-2.89 (m, 1H), 2.87 (s, 1H), 2.29-2.02 (m, 3H), 1.99-1.85 (m, 2H), 1.79-1.52 (m, 9H), 1.47 (dd, J=14.3, 7.9Hz, 6H), 1.32 (d, J=11.3Hz, 2H), 1.18 (dd, J=17.9, 10.0Hz, 3H), 0.84 (d, J=6.7Hz, 3H), 0.80 (d, J=6.7Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (101MHz, DMSO) δ 172.80, 171.61, 171.22, 166.74, 159.43, 154.25, 139.89, 137.90, 134.99, 130.19, 127.40, 121.79, 119.37, 111.72, 95.96, 76.27, 58.07, 53.63, 52.24, 49.96, 39.83, 39.62, 39.42, 37.54, 36.39, 35.45, 33.58, 32.18, 31.38, 30.93, 29.82, 28.30, 27.36, 26.31, 26.02, 25.69, 25.44, 19.78, 18.72。

[0131] 方案13: 化合物4b的合成



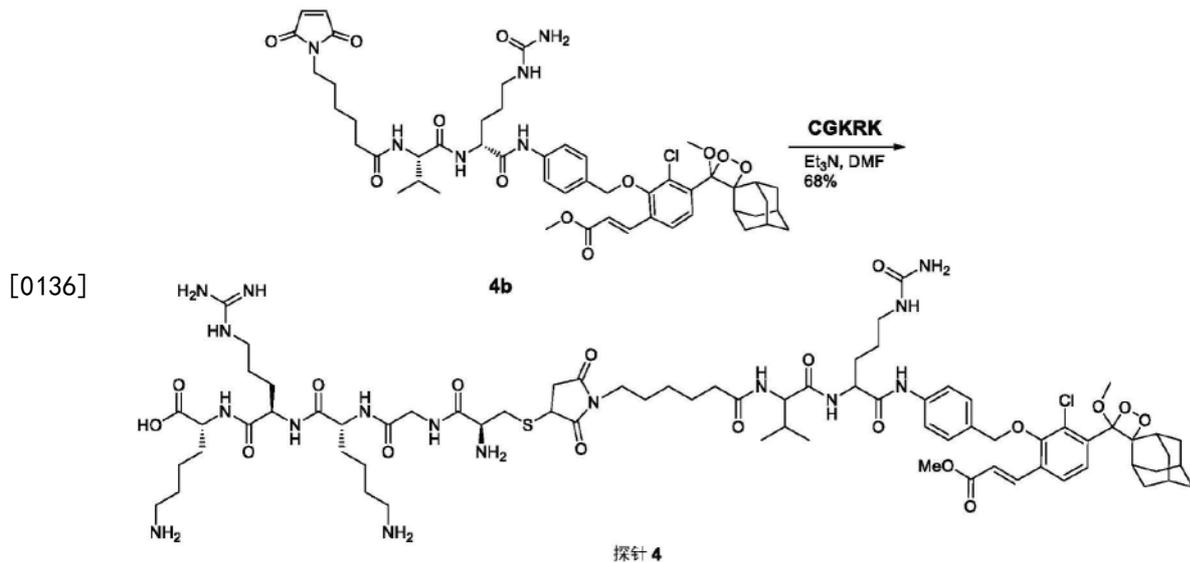
[0132]



[0133] CGKRK. 通过Fmoc-固相肽合成来合成肽CGKRK (Cys-Gly-Lys-Arg-Lys)。将Fmoc-Lys (Boc) -Wang树脂在DMF中涡旋30分钟。用20%哌啶进行Fmoc脱保护(15分钟),然后在DIPEA (6eq) 和DMF的混合物中将下一个氨基酸(4eq) 与HBTU (4eq) 偶联(30分钟)。重复这两个步骤,直至完成序列。最后,完成半胱氨酸的Fmoc脱保护,并且使用TFA/TIPS/ H_2O (90/5/5) 溶液使CGKRK序列从树脂裂解。将肽析出并且用冷的乙醚溶液洗涤并且冻干。得到作为白色析出物的产物。MS (ES⁺): m/z $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{N}_{10}\text{O}_6\text{S}$ 的计算值:590.33;实测值:591.3[M+H]⁺。

[0134] 探针4. 如方案14中所示,将化合物4b (7mg, 0.007mmol, 1eq) 和CGKRK肽 (7.5mg, 0.008mmol, 1.1eq) 溶解于DMF中,并且添加几滴 Et_3N 。通过RP-HPLC (在水中30-100%ACN, 20min) 监测反应。完成后,将反应混合物通过在减压下蒸发而浓缩。将粗产物通过制备型RP-HPLC (在水中30-100%ACN, 20min) 来纯化,以得到作为白色固体的探针4 (8mg, 68%收率)。MS (ES⁺): m/z $\text{C}_{73}\text{H}_{109}\text{ClN}_{16}\text{O}_{18}\text{S}$ 的计算值:1566.26;实测值:784.1[(M+H)/2]⁺。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 10.06 (s, 1H), 8.88-8.74 (m, 1H), 8.36 (s, 2H), 8.23-8.06 (m, 4H), 7.93 (t, J=12.1Hz, 1H), 7.85-7.74 (m, 9H), 7.71 (d, J=16.2Hz, 1H), 7.60 (t, J=7.5Hz, 2H), 7.33 (d, J=8.4Hz, 3H), 6.70-6.65 (m, 1H), 6.05 (s, 1H), 4.93-4.83 (m, 2H), 4.46-4.02 (m, 13H), 3.85 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.33 (dd, J=14.4, 7.3Hz, 2H), 3.24-2.90 (m, 8H), 2.87 (s, 1H), 2.71 (dd, J=13.8, 9.6Hz, 4H), 2.52 (d, J=3.0Hz, 1H), 2.28-2.04 (m, 2H), 2.01-1.86 (m, 1H), 1.76-1.40 (m, 28H), 1.37-1.26 (m, 6H), 1.23-1.11 (m, 3H), 0.85 (d, J=6.7Hz, 3H), 0.81 (d, J=6.8Hz, 3H)。¹³C NMR (101MHz, DMSO) δ 177.35, 175.41, 173.84, 172.76, 171.95, 171.85, 171.23, 168.35, 167.82, 166.74, 159.53, 159.12, 158.80, 157.34, 154.24, 139.88, 137.89, 134.85, 131.77, 130.72, 130.19, 128.87, 127.39, 126.57, 121.77, 119.37, 118.78, 115.83, 111.71, 95.95, 76.26, 57.99, 53.63, 52.67, 52.55, 52.24, 49.95, 42.52, 40.02, 39.81, 39.61, 39.40, 39.21, 39.09, 38.71, 36.39, 35.45, 33.81, 33.59, 32.19, 31.60, 31.38, 30.99, 30.88, 29.84, 27.35, 27.11, 26.36, 26.02, 25.69, 25.45, 22.85, 22.76, 19.78, 18.70。

[0135] 方案14:化学发光探针4的合成



[0137] 光谱数据

[0138] 活性缓冲液包含：磷酸盐缓冲液0.1M, 55mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM谷胱甘肽。所有光谱测量均一式三份进行。将用于检测限计算的空白测量重复十次。检测限 (LOD) 计算如下：

[0139] $LOD = \text{平均}_{\text{空白}} + 3 \times SD$

[0140] 其中SD-标准偏差。

[0141] 化学发光显微镜成像

[0142] 使用安装有EMCCD相机 (Hamamatsu C9100-13) 的Olympus LV200倒置显微镜获得化学发光图像。将RAW 264.7Abelson鼠白血病病毒诱导的肿瘤细胞、CT26CL25结肠癌细胞和NIH 3T3小鼠成纤维细胞 (对照) 细胞在35mm玻璃底培替氏培养皿上于37℃生长24小时。将细胞培养基改变为含有5μM探针MR 3-128或MR 3-131的Molecular Probes®活细胞成像溶液。将细胞在37℃下温育另外的20分钟。为了化学发光的可视化,以20分钟的曝光时间记录图像。

[0143] 将图像导入ImageJ软件。为了图像可视化,应用滚动球滤镜 (filter) (具有20像素半径), 并且调整图像的亮度和对比度。

[0144] 研究1. 探针2-4在组织蛋白酶B的检测方面有效

[0145] 在该研究中,如实验中所述,合成本文中标识为探针1、2、3和4的四种探针。探针1基于常规的Schaap金刚烷叉基-二氧杂环丁烷,具有组织蛋白酶B不稳定的保护基团,而探针2用延长的π-体系和吸电子基团的添加来构建。该给体-受体对设计在生理条件下增加发光体的发射,使其可以用作具有酶促活化和活细胞成像的一步分析的良好发光体。为了改善在水中的溶解度和探针进入细胞的几率,我们还合成了探针3和4。在探针3中,N-羧基苄基 (Cbz) 附加物被中等长度的PEG代替。由于PEG是水溶性的,改善所连接分子的药代动力学特性,并且是FDA批准的,因此PEG被大量用于生物学上适用的体系的构建。

[0146] 在探针4中,添加连接基团并且连接至CGKRK (Cys-Gly-Lys-Arg-Lys) 肽。CGKRK肽包含多个碱性残基。高含量的碱性残基是内化肽中共同的特征,使CGKRK成为有效的细胞穿透和增溶肽。该五肽首先在转基因小鼠表皮癌的筛选中识别。当小分子与CGKRK肽偶联时,它将缀合物内化至大多数靶肿瘤细胞中,但不会在正常组织中摄取。这是因为识别CGKRK的

p32受体在激活的内皮细胞和肿瘤细胞的表面上过表达。由于CGKRK被多种类型的癌症所识别,这些癌症主要与组织蛋白酶B过表达的癌症有关,因此我们希望在用探针4时看到活的癌细胞中细胞摄取量的增加。

[0147] 接下来,在添加或不添加组织蛋白酶B的情况下,测量作为时间的函数的探针的化学发光。化学发光信号的动力学曲线及其相对总光子发射分别示于图1A和1B中。在添加组织蛋白酶B之后,探针显示特征性的化学发光动力学曲线,其中初始信号上升至最大,然后缓慢下降直至终止。从探针1至探针2、3和4,化学发光信号明显增加。探针1由于其缺少所添加的给体-受体对而如预期地产生极弱的发射(图1A,小图)。自此,看到增加的化学发光信号的模式,这与附加物的变化和探针在水性介质中改善的溶解度相关。评价探针用于即将进行的细胞成像,要求我们还评估由各探针产生的最大信号,因为它将以更高的灵敏度和分辨率达到最高水平(图1C)。不同探针的最大信号与探针4的最大信号相比都变得逊色,这使探针4成为进一步研究的首选。在缺乏组织蛋白酶B的情况下,没有从探针观察到发光。

[0148] 为了确认探针的酶促降解和化学发光信号之间的关系,使用HPLC来追踪探针4的酶促降解。HPLC分析揭示探针4的快速酶解和苯胺连接基团的超快速1,6-消除。HPLC和化学发光数据的比较显示化学发光最大信号与酶促裂解的终止之间的强的相关性。此外,化学发光衰变与化学激发过程之间的关系是显而易见的(通过从未掩蔽的酚盐向苯甲酸酯的动力学降解看出)。此外,这证明苯甲酸酯向其基态衰变的效率和迅速性(伴随着发光)。

[0149] 在利用细胞外组织蛋白酶B经由化学发光动力学初步筛选后,选择探针3和4进行细胞成像评价。选择这些探针是因为它们在用组织蛋白酶B温育后显示最高的发光。使用适合于定位和定量化学发光信号的显微镜(LV200)进行成像。将Raw 264.7、CT26肿瘤细胞和3T3正常细胞与探针3或探针4温育,并且使用LV200成像。如图3所示,用探针4温育导致Raw 246.7和CT26癌细胞两者经由化学发光信号成像,而对于3T3细胞未观察到化学发光信号。这与以下事实相关:发现Raw 246.7和CT26细胞过表达组织蛋白酶B,而作为正常组织细胞的小鼠成纤维细胞3T3细胞产生明显较低的组织蛋白酶B水平。因此,可以得出结论,探针4能够区分癌细胞与正常组织。另一方面,对于各类型的细胞,用探针3温育未显示化学发光信号。这可能是由于与探针4相比,探针3的较低的溶解度(可以从体外实验得出结论),或者缺少可以增加探针4封装在细胞内的能力的肿瘤归巢肽(tumor homing peptide)。

[0150] 测量探针4检测组织蛋白酶B的灵敏度,并且将其与基于7-羟基香豆素的经典荧光探针(Z-Val-Cit-PABA-7HC)的灵敏度进行比较。为了直接查看两种检测方法之间的比较,使用对数标尺将使用不同组织蛋白酶B浓度的信噪比相对于酶浓度作图(图4)。显著地,探针4显示检测限(LOD)值为76.29 μ U/mL,而Z-Val-Cit-PABA-7HC检测组织蛋白酶B的LOD值为1.25U/mL。这种优越的灵敏度(大于16,000倍)清楚地证明化学发光模式相对于荧光在诊断分析中的优势。

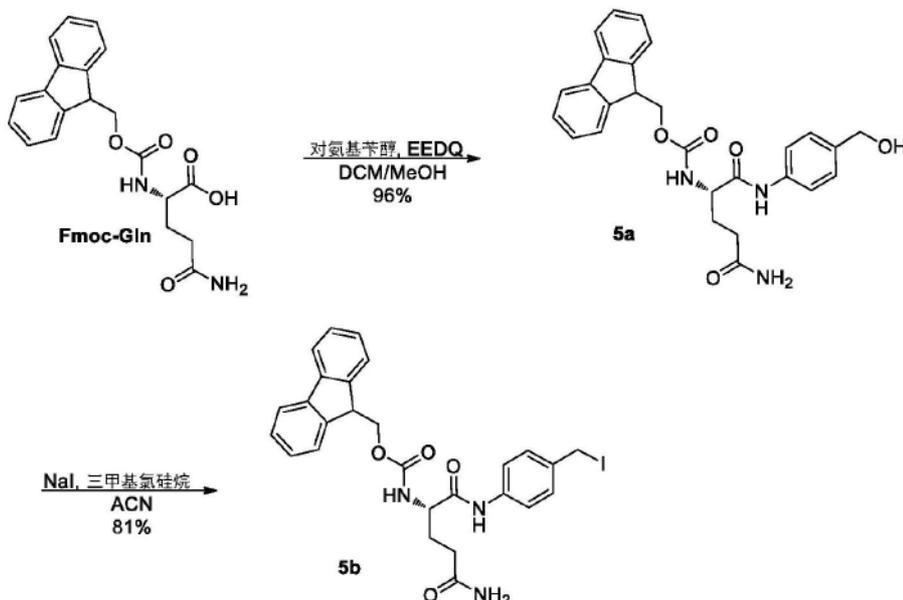
[0151] 研究2. 探针5用于前列腺特异性抗原的检测

[0152] 探针5(PSA探针)的合成

[0153] 化合物5a. 如方案15中所示,将Fmoc-谷氨酰胺(Fmoc-Gln)(380mg,1.03mmol,1eq)和对氨基苄醇(133mg,1.08mmol,1.05eq)溶解于THF(7mL)中,并且添加EEDQ(266.3mg,1.08,1.05eq)。16小时后,将混合物在30 $^{\circ}$ C蒸发至干燥,并且将残余物用乙醚(15mL)研磨。将所得灰白色固体产物通过过滤收集,用乙醚洗涤,并且真空干燥(467mg,96%)。

[0154] 化合物5b.如方案15中所示,将化合物5a (250mg,0.525mmol,1eq) 溶解于7mL的ACN中并且冷却至0℃。添加碘化钠(237.5mg,1.585mmol,3eq),然后快速添加TMS-Cl(200μl,1.585mmol,3eq)。使反应升温至室温,并且通过TLC (MeOH:DCM 10:90) 监测。完成后,将反应混合物用EtOAc稀释,并且用饱和Na₂S₂O₃洗涤,随后用盐水洗涤。将有机层分离,经Na₂SO₄干燥,过滤,并且将溶剂在减压下蒸发,以得到作为灰白色固体的化合物1b (248mg,81%收率)。

[0155] 方案15:化合物5b的合成



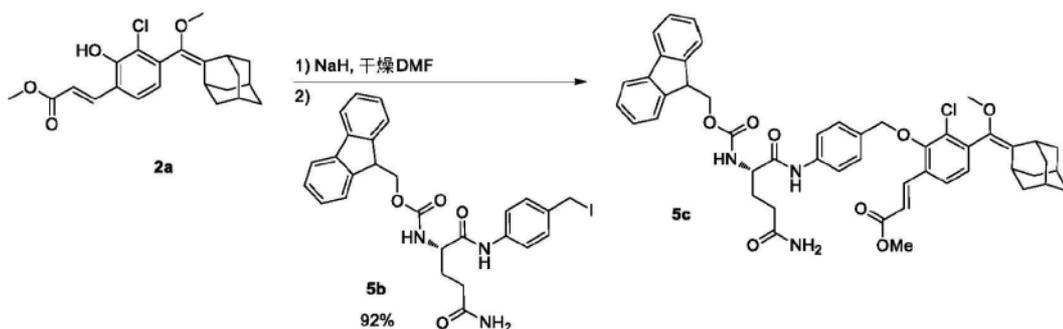
[0156]

[0157] 化合物5c.如方案16中所示,在氩气氛下,将化合物2a (100mg,0.25mmol,1.2eq) 溶解于干燥DMF中,并且冷却至0℃。添加碘化钠(9.23mg,0.23,1.1eq),并且使反应升温至室温。搅拌15分钟后,添加化合物5b (123mg,0.21mmol,1eq),并且通过TLC (EtOAc) 监测反应。完成后,在减压下除去溶剂。将所得油状物用1.5mL EtOAc析出,然后用Et₂O (5mL) 研磨10分钟。然后将混合物经由真空过滤来过滤并且将固体干燥以提供作为灰白色固体的化合物5c (163mg,92%)。MS (ES⁻):m/z C₄₉H₅₀ClN₃O₈的计算值:843.33;实测值:878.64[M+Cl]⁻。

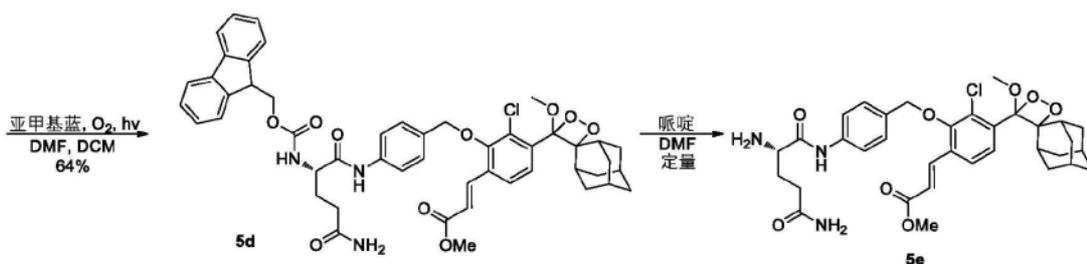
[0158] 化合物5d.如方案16中所示,将化合物5a (110mg,0.13mmol) 溶解于5mL DCM中。添加几毫克的亚甲基蓝,并且在用黄光照射的同时,使氧气通过溶液鼓泡。通过RP-HPLC (在水中70-100%ACN,20min) 监测反应。完成后,将反应混合物通过在减压下蒸发而浓缩,并且将粗产物通过制备型RP-HPLC (在水中70-100%ACN,20min) 来纯化,以得到作为白色固体的化合物5d (72mg,64%收率)。

[0159] 化合物5e.如方案16中所示,将化合物5d (30mg,0.034mmol) 溶解于DMF (8mL) 中并且添加哌啶(2mL)。通过RP-HPLC (在水中50-100%ACN,20min) 监测反应。完成后,在减压下除去溶剂。将所得油状物用1.5mL EtOAc析出,然后用Et₂O (20mL) 研磨10分钟。然后将混合物经由真空过滤来过滤并且将固体干燥以提供作为灰白色固体的化合物5e (22mg,定量)。

[0160] 方案16:化合物5e的合成



[0161]



[0162] Mu-HSSKL. 通过Fmoc-固相肽合成来合成肽Mu-HSSKL (吗啉代-His-Ser-Ser-Lys-Leu)。将Fmoc-Leu-Wang树脂在DMF中涡旋30分钟。用20%哌啶进行Fmoc脱保护(15分钟),然后在DIPEA (6eq) 和DMF的混合物中将下一个氨基酸(4eq) 与HBTU (4eq) 偶联(30分钟)。重复这两个步骤,直至完成序列。最后,完成His的Fmoc脱保护,并且将HSSKL序列与4-吗啉羰基氯偶联。之后,使用TFA/TIPS/H₂O (90/5/5) 溶液使肽从树脂裂解。将肽析出并且用冷的乙醚溶液洗涤并且冻干。得到作为白色析出物的产物。MS (ES⁻): m/z C₂₉H₄₉N₉O₁₀的计算值: 683.36; 实测值: 682.6 [M-H]⁻。

[0163] 化合物5f. 如方案17中所示,将Mu-HSSKL (175mg, 0.25mmol, 1eq) 溶解于DMF (3mL) 中并且添加Fmoc-OSu (129mg, 0.38mmol, 1.5eq) 和DIPEA (134μl, 0.66mmol, 3eq)。通过RP-HPLC (在水中10-90%ACN, 20min) 监测反应。完成后,将反应混合物通过在减压下蒸发而浓缩,并且将粗产物通过制备型RP-HPLC (在水中10-90%ACN, 40min) 来纯化,以得到作为白色固体的化合物5f (162mg, 70% 收率)。MS (ES⁺): m/z C₄₄H₅₉N₉O₁₂的计算值: 905.43; 实测值: 906.7 [M+H]⁺。

[0164] 化合物5g. 如方案17中所示,将化合物5f (10mg, 0.0114mmol, 1eq) 溶解于DMF (3mL) 中,并且添加HBTU (4.8mg, 0.0125mmol, 1.1eq) 和DIPEA (4μl, 0.028mmol, 2eq)。15分钟后,添加化合物5e (1.83mg, 0.028mmol, 2eq)。通过RP-HPLC (在水中10-90%ACN, 20min) 监测反应。完成后,将反应混合物通过在减压下蒸发而浓缩,并且将粗产物通过制备型RP-HPLC (在水中10-90%ACN, 20min) 来纯化,以得到作为白色固体的化合物5g (18mg, 82% 收率)。MS (ES⁺): m/z C₇₈H₉₇C₁N₁₂O₁₉的计算值: 1540.67; 实测值: 1541.8 [M+H]⁺。

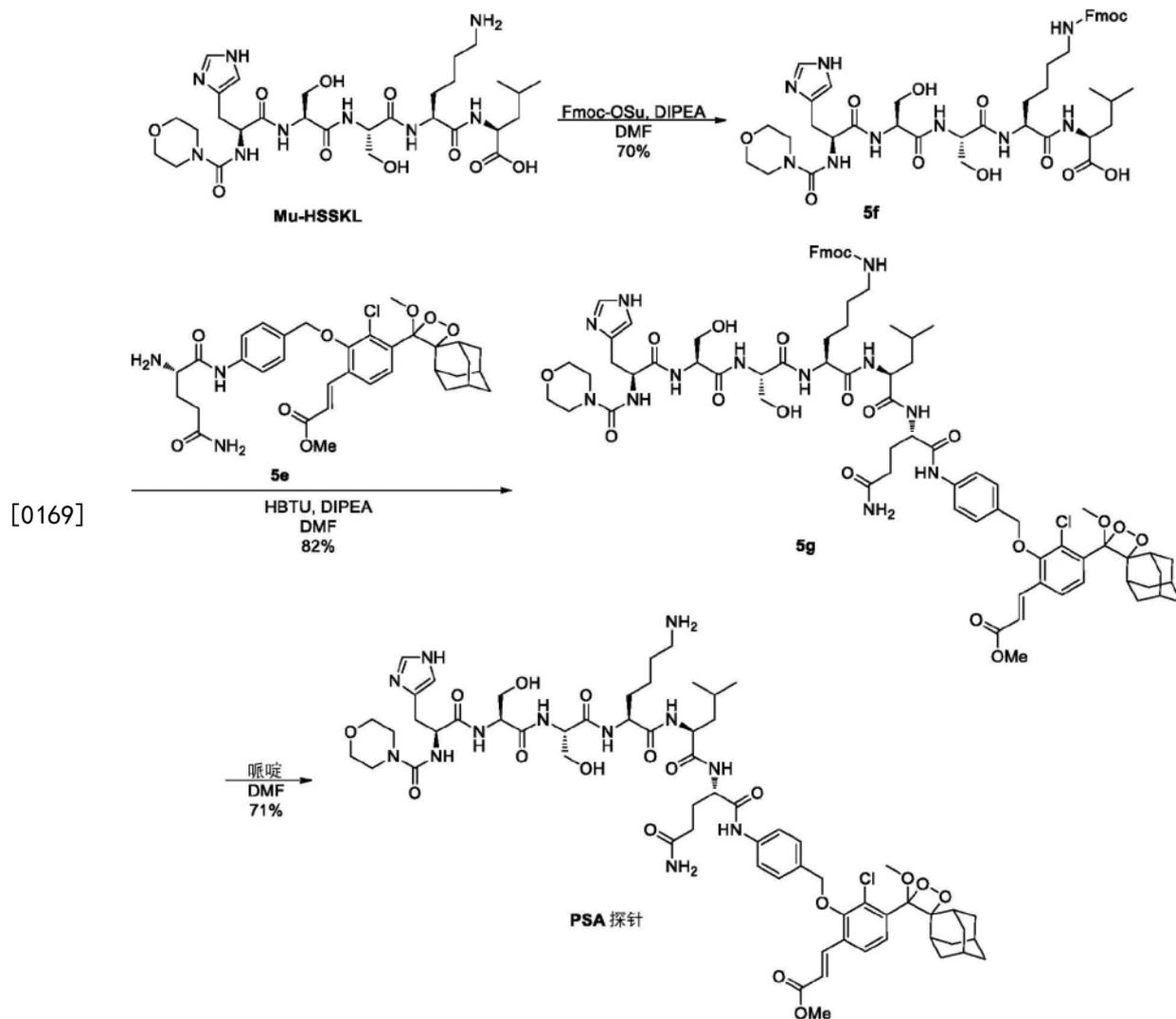
[0165] 探针5. 如方案17中所示,将化合物5g (9mg, 0.0057mmol) 溶解于在DMF中的20%哌啶(1mL)。通过RP-HPLC (在水中10-90%ACN, 20min) 监测反应。完成后,在减压下除去溶剂。将所得油状物析出并且用冷的乙醚溶液洗涤并且冻干。得到作为灰白色析出物的产物(7mg, 定量)。MS (ES⁺): m/z C₆₃H₈₇C₁N₁₂O₁₇的计算值: 1318.60; 实测值: 1319.8 [M+H]⁺。

[0166] 在该研究中,合成不同的化学发光探针,在本文中标识为探针5,其具有PSA可裂解的肽(HSSKLQ, 组氨酸-丝氨酸-丝氨酸-赖氨酸-亮氨酸-谷氨酰胺)作为保护基团,并且具有稳定的并认为增加溶解度的4-吗啉羰基封端。该探针基于常规的Schaap金刚烷叉基-二氧

杂环丁烷,其中增加延长的 π 体系和吸电子基团。该给体-受体对设计在生理条件下增加发光体的发射,使其用作具有酶促活化和活细胞成像的一步分析的良好发光体。

[0167] 图5显示在室温下在10mg/mL PSA的存在下,探针5[10 μ M]在Tris缓冲液(pH 7.8, 10%DMSO)中的化学发光动力学曲线。

[0168] 方案17:探针5的合成



[0170] 参考文献

[0171] Chi, C.; Du, Y.; Ye, J.; Kou, D.; Qiu, J.; Wang, J.; Tian, J.; Chen, X. *Theranostics* 2014, 4 (11), 1072-1084

[0172] Dubowchik, G. M.; Firestone, R. A.; Padilla, L.; Willner, D.; Hofstead, S. J.; Mosure, K.; Knipe, J. O.; Lasch, S. J.; Trail, P. A. *Bioconjug. Chem.* 2002, 13, 855-869

[0173] Green, O.; Eilon, T.; Hananya, N.; Gutkin, S.; Bauer, C.; Shabat, D. *ACS Cent. Sci.* 2017, 3, 349-358

[0174] Haber, G. P.; White, M. A.; Autorino, R.; Escobar, P. F.; Kroh, M. D.; Chalikonda, S.; Khanna, R.; Forest, S.; Yang, B.; Altunrende, F.; Stein, R. J.; Kaouk, J. H. *Urology* 2010, 76, 1279-1282

[0175] Ikeda, M.; Ochi, R.; Kurita, Y.; Pochan, D. J.; Hamachi, I. *Chem. - A Eur. J.* 2012,

18,13091-13096

[0176] Mieog, J.S.; Troyan, S.L.; Hutteman, M.; Donohoe, K.J.; van der Vorst, J.R.; Stockdale, A.; Liefers, G.J.; Choi, H.S.; Gibbs-Strauss, S.L.; Putter, H.; Gioux, S.; Kuppen, P.J.; Ashitate, Y.; Lowik, C.W.; Smit, V.T.; Oketokoun, R.; Ngo, L.H.; van de Velde, C.J.; Frangioni, J.V.; Vahrmeijer, A.L. *Annals of surgical oncology* 2011, 18, 2483-2491

[0177] Miller, K.; Erez, R.; Segal, E.; Shabat, D.; Satchi-Fainaro, R. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009, 48 (16), 2949-2954

[0178] Richard, J.A.; Jean, L.; Romieu, A.; Massonneau, M.; Noack-Fraissignes, P.; Renard, P.Y. *Org Lett.*, 2007, 9 (23), 4853-4855

[0179] Segal, E.; Pan, H.; Ofek, P.; Udagawa, T.; Kopeckova, P.; Kopecek, J.; Satchi-Fainaro, R. *PLoS One* 2009, 4 (4), e5233

[0180] Troyan, S.L.; Kianzad, V.; Gibbs-Strauss, S.L.; Gioux, S.; Matsui, A.; Oketokoun, R.; Ngo, L.; Khamene, A.; Azar, F.; Frangioni, J.V. *Annals of surgical oncology* 2009, 16, 2943-2952

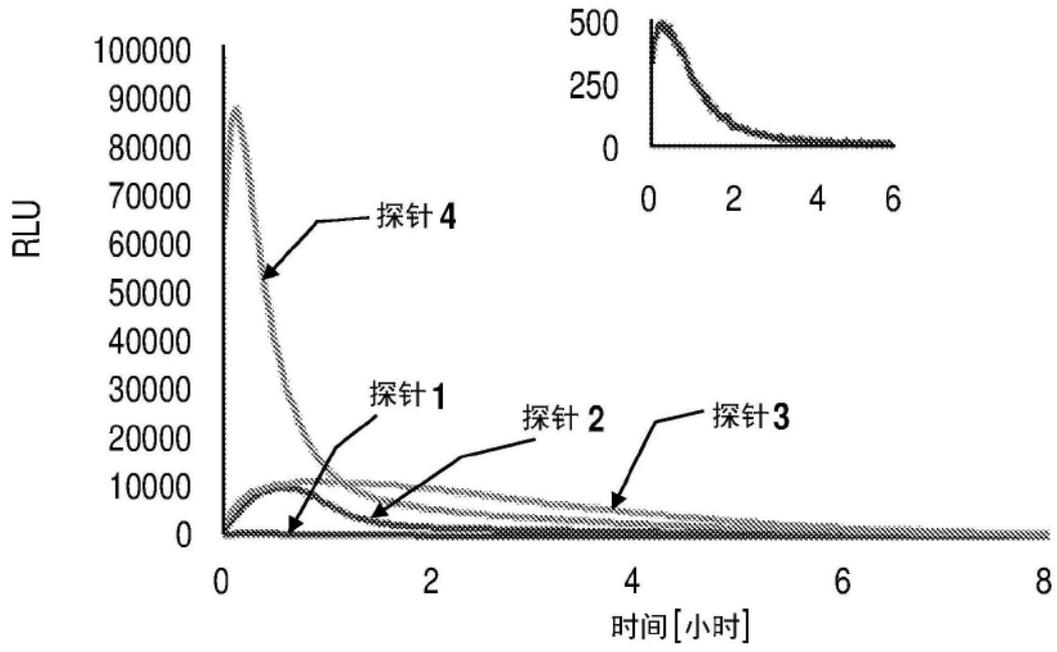


图1A

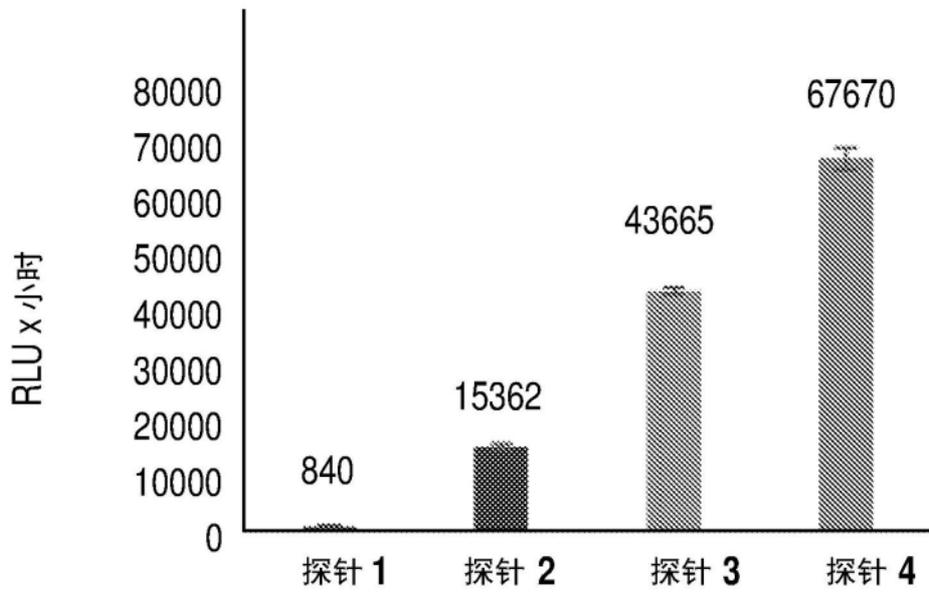


图1B

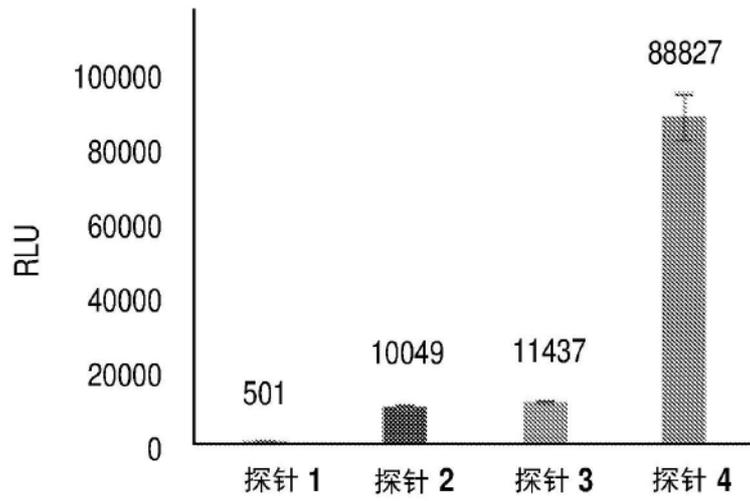


图1C

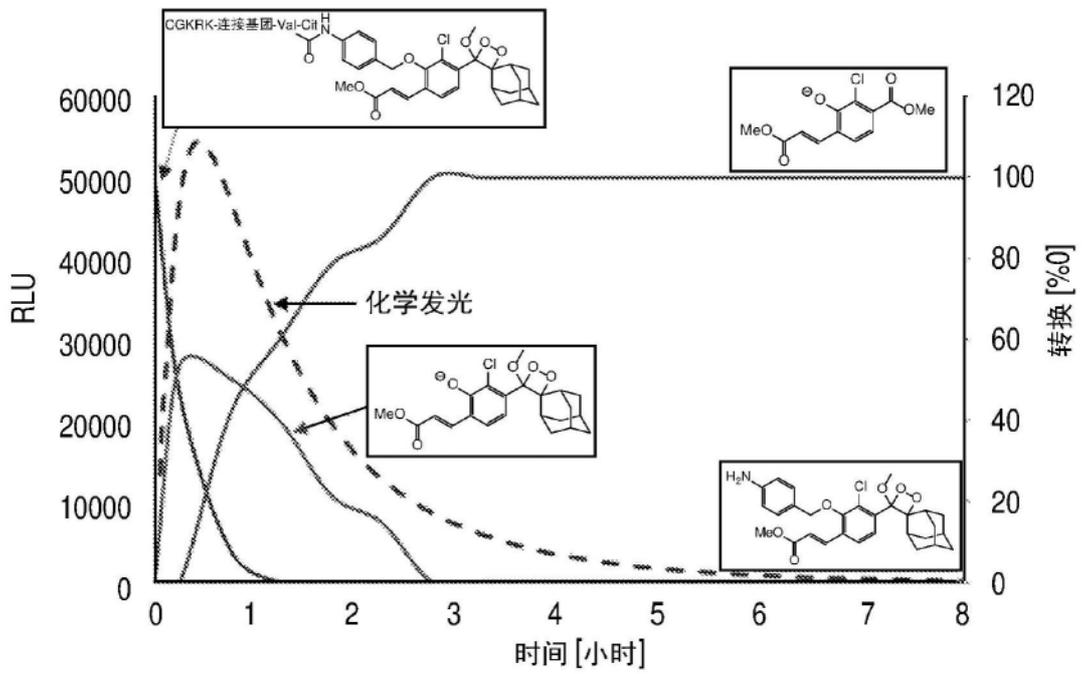


图2

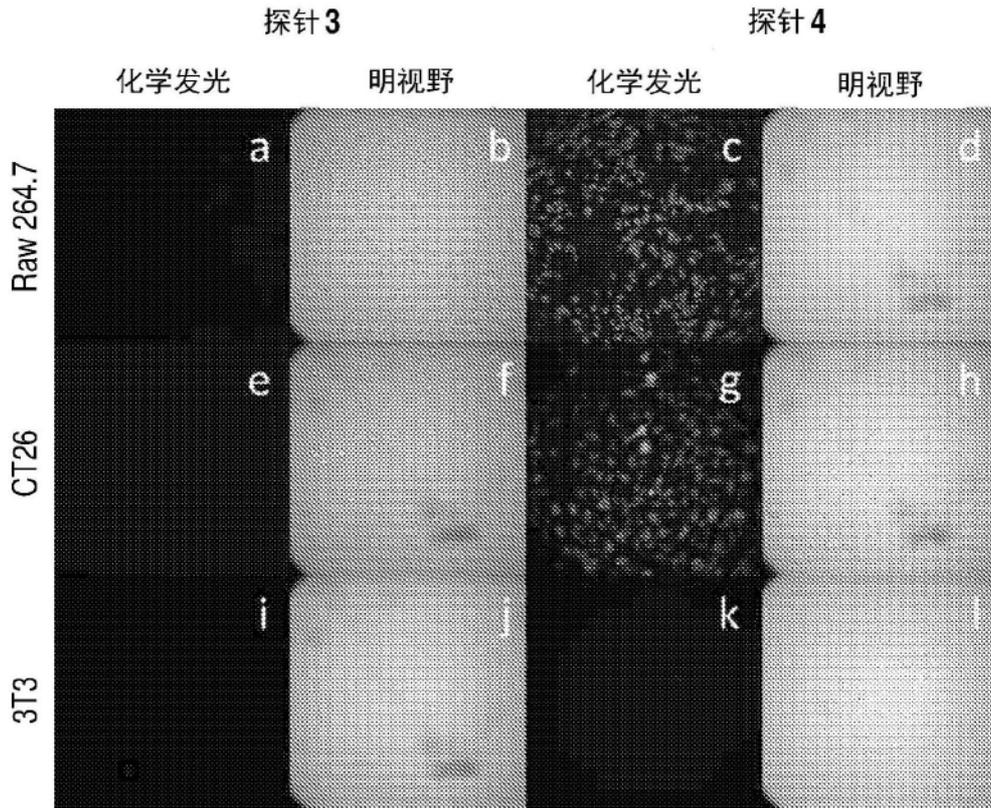


图3

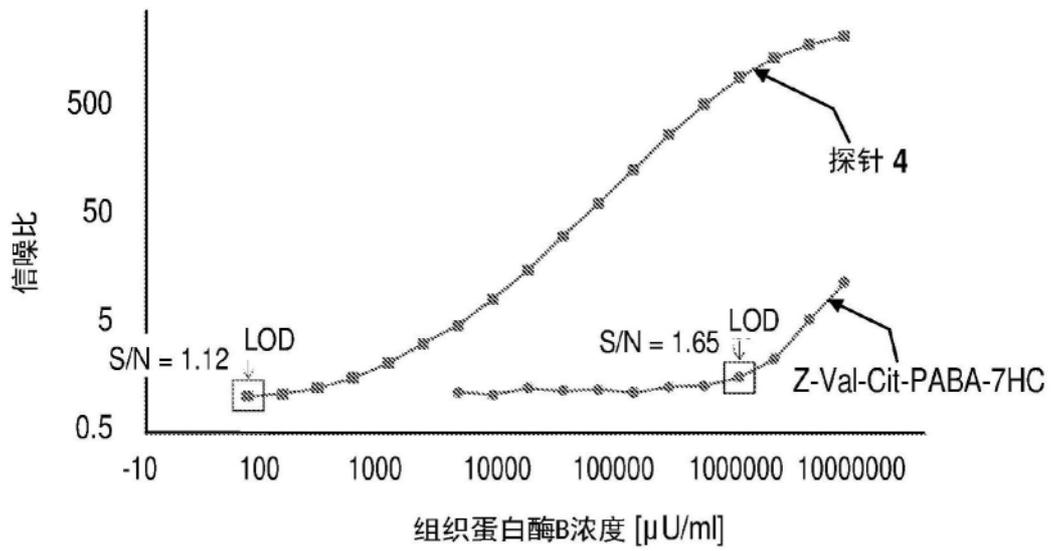


图4

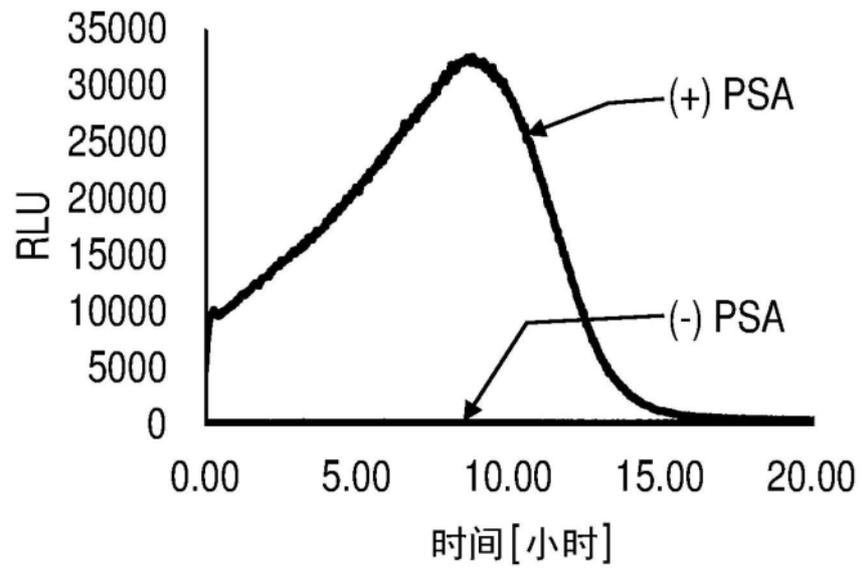


图5