

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 49/00

C09B 23/02 C09B 23/00

C09B 23/08

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00806087.8

[43]公开日 2002年5月29日

[11]公开号 CN 1351505A

[22]申请日 2000.3.28 [21]申请号 00806087.8

[30]优先权

[32]1999.4.9 [33]DE [31]19917713.9

[86]国际申请 PCT/EP00/02697 2000.3.28

[87]国际公布 WO00/61194 德 2000.10.19

[85]进入国家阶段日期 2001.10.9

[71]申请人 柏林自由大学诊断研究所有限公司

地址 德国柏林

[72]发明人 凯·利夏 安德烈亚斯·贝克尔

沃尔夫哈德·泽姆勒 贝尔特拉·维登曼

卡斯滕·黑森纽斯

鲁道夫·沃尔克默-恩格特

延斯·施奈德-默根纳

萨拉·巴尔加瓦

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 20 页 说明书 63 页 附图页数 7 页

[54]发明名称 作为光学诊断用造影剂的短链肽-染料结合物

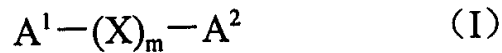
[57]摘要

本发明涉及用于肿瘤诊断的化合物,该化合物由染料与短链肽的结合物组成,而所述肽是由血管活性肠肽、促生长素抑制素或神经降压肽衍生的。本发明还涉及这些化合物作为光学诊断剂的应用以及包含这些化合物的诊断剂。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

# 权利要求书

1、通式 (I) 的肽—多亚甲基染料结合物及其生理相容盐：



其中：

X 代表具有 D 或 L 构型的  $\alpha$ —、 $\beta$ —或  $\gamma$ —氨基酸；

m 代表 5—30 的数，

其中所产生的氨基酸序列(X)<sub>m</sub> 可为直链或者通过两个半胱氨酸或高半胱氨酸之间的二硫键或者在 N—和 C—端之间的酰胺化而环化，并代表血管活性肠肽 (VIP)、促生长素抑制素或神经降压肽的氨基酸序列，或者代表 VIP、促生长素抑制素或神经降压肽的片段、部分序列、衍生物或类似物；

A<sup>1</sup> 代表氢原子、乙酰基或具有最多 10 个碳原子的烷基，该烷基可任选地被 1—3 个羧基和/或 1—6 个羟基取代，或者代表具有 2—30 个—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O—单元的聚(氧乙烯)基团，或者代表选自于多亚甲基染料的染料分子，该染料在 380—1200 nm 的范围内具有至少一个最大吸收；

A<sup>2</sup> 代表羟基、氨基或者选自于多亚甲基染料的染料分子，该染料在 380—1200 nm 的范围内具有至少一个最大吸收；

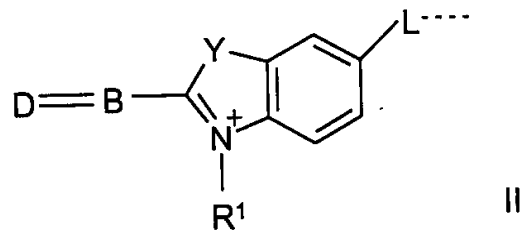
其条件是 A<sup>1</sup> 或 A<sup>2</sup> 基团中至少一个代表选自于多亚甲基染料的染料分子，而且该染料在 380—1200 nm 的范围内具有至少一个最大吸收，

其中如果 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表选自于多亚甲基染料的染料分子，而且该染料在 380—1200 nm 的范围内具有至少一个最大吸收，则 A<sup>1</sup> 连接在 N—端氨基上，而 A<sup>2</sup> 连接在氨基酸序列(X)<sub>m</sub> 中任意位置处的氨基酸赖氨

酸的氨基或者氨基酸丝氨酸的羟基上。

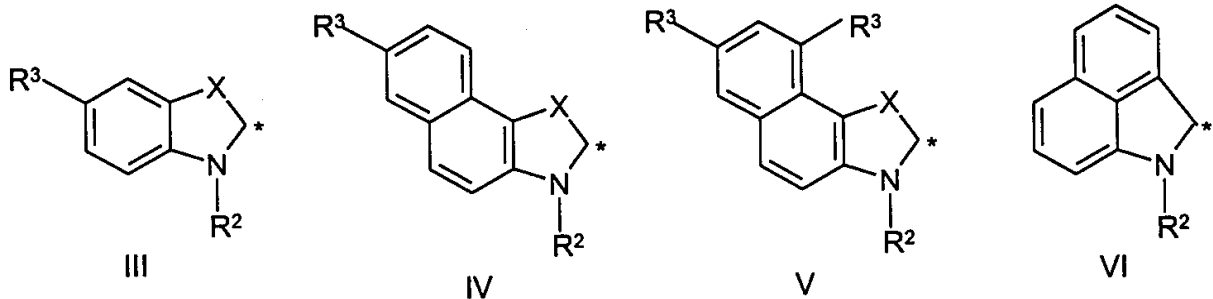
2、如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于，染料分子 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表菁、squarilium、croconium、部花菁或氧杂菁染料。

3、如权利要求 1 或 2 所述的化合物，其特征在于，染料分子 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表以下通式 II 的菁染料或 squarilium 染料：

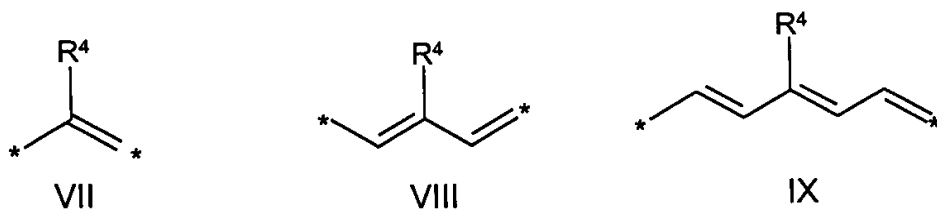


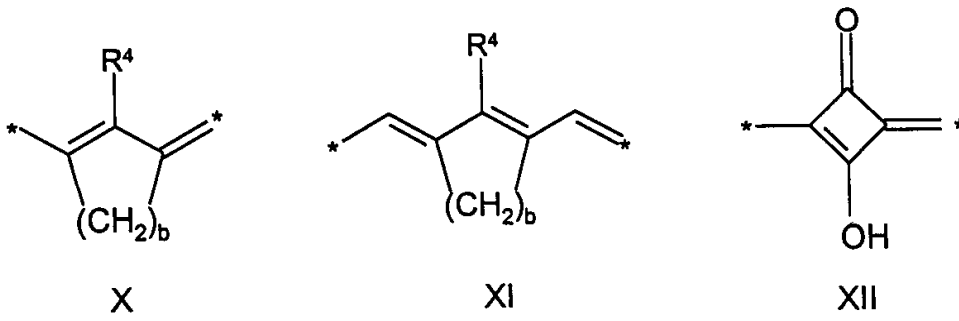
其中：

D 代表相应于以下通式 III—VI 的片段，其中用星号标记的位置表示与 B 的连接位：



B 代表相应于以下通式 VII—XII 的片段：



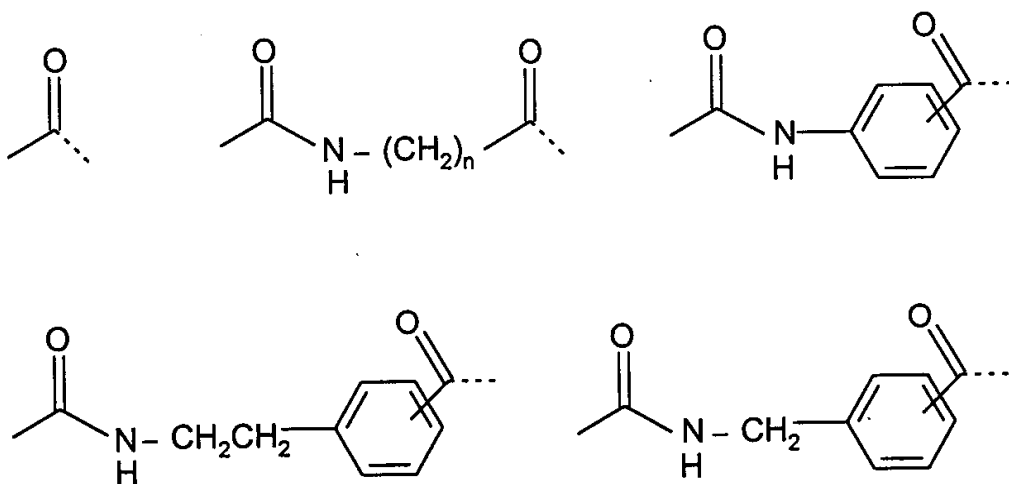


R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 代表 E<sup>1</sup>, R<sup>3</sup> 代表氟、氯、溴或碘原子或者硝基或者基团 -COOE<sup>1</sup>、  
 -CONE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>、-NHCOE<sup>1</sup>、-NHCONHE<sup>1</sup>、-NE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>、-OE<sup>1</sup>、-  
 OSO<sub>3</sub>E<sup>1</sup>、-SO<sub>3</sub>E<sup>1</sup>、-SO<sub>2</sub>NHE<sup>1</sup>、-E<sup>1</sup>, 其中  
 E<sup>1</sup> 和 E<sup>2</sup> 相互独立地代表氢原子、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 磺基烷基、饱和或不饱和、  
 直链或支链 C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> 烷基链, 其中该链或其一部分可任选地形成一个  
 或多个芳香或饱和环 C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> 单元或者二环 C<sub>10</sub> 单元, 而且 C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub>  
 烷基链中可插入 0-15 个氧原子和/或 0-3 个羰基和/或被 0-5 个  
 羟基取代,

R<sup>4</sup> 代表氢原子、氟、氯、溴、碘原子或者支链或直链 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基链,  
 b 代表 2 或 3 的数,

X 和 Y 相互独立地代表 O、S、Se、-CH=CH- 或者 C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,

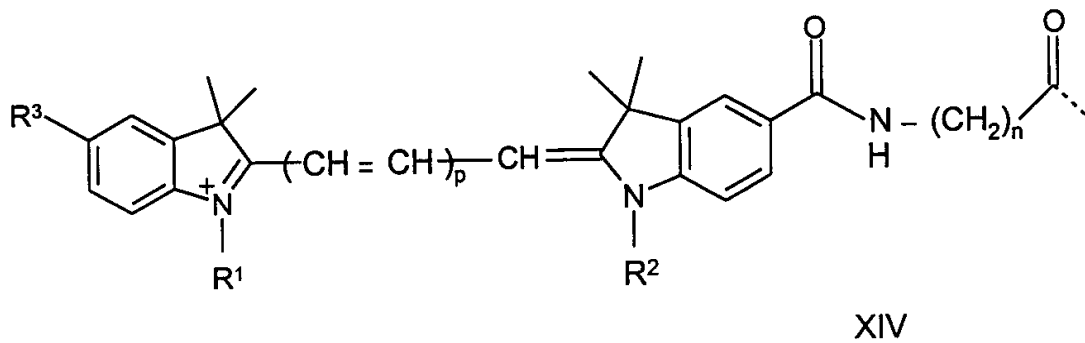
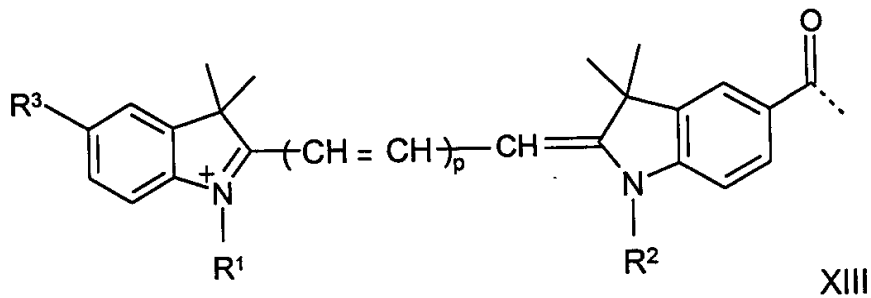
L 代表以下式的基团:



其中 n 代表 1-10 的数。

4、如权利要求 1—3 之一所述的化合物，其特征在于，染料分子 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表茚炭菁、茚二炭菁和茚三炭菁染料。

5、如权利要求 4 所述的化合物，其特征在于，染料分子 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表以下通式 XIII 或 XIV 的茚炭菁染料、茚二炭菁染料或茚三炭菁染料：



其中

p 代表 1、2 或 3，

n 代表 1、2、3、4 或 10，

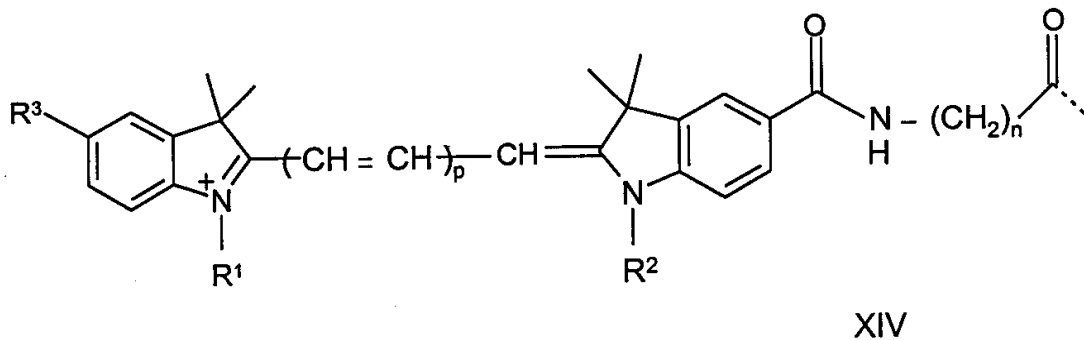
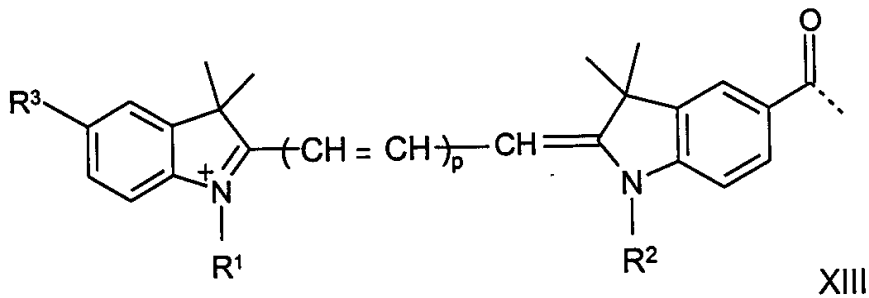
R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 相互独立地代表 4-磺基丁基、3-磺基丙基、2-磺基乙基、3-甲基-3-磺基丙基、甲基、乙基、或丙基，而

R<sup>3</sup> 代表氢、氯、溴或碘原子或者硝基或者基团 -COOE<sup>1</sup>、-CONE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>、-NHCOE<sup>1</sup>、-NHCONHE<sup>1</sup>、-NE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>、-OE<sup>1</sup>、-OSO<sub>3</sub>E<sup>1</sup>、-SO<sub>3</sub>E<sup>1</sup>、-SO<sub>2</sub>NHE<sup>1</sup>，其中

E<sup>1</sup> 和 E<sup>2</sup> 相互独立地代表氢原子、或者代表甲基、乙基或者 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 烷基，这些烷基可插入 0—2 个氧原子和/或 0—1 个羰基，和/或被 0

-5 个羟基取代，或者  $E^1$  和  $E^2$  代表具有 2-30 个  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$  单元的聚（氧乙烯）二醇基团。

6、如权利要求 4 所述的化合物，其特征在于，染料分子  $A^1$  和/或  $A^2$  代表以下通式 XIII 或 XIV 的茚炭菁染料、茚二炭菁染料或茚三炭菁染料：



其中

$p$  代表 1、2 或 3，

$n$  代表 1、2 或 4，

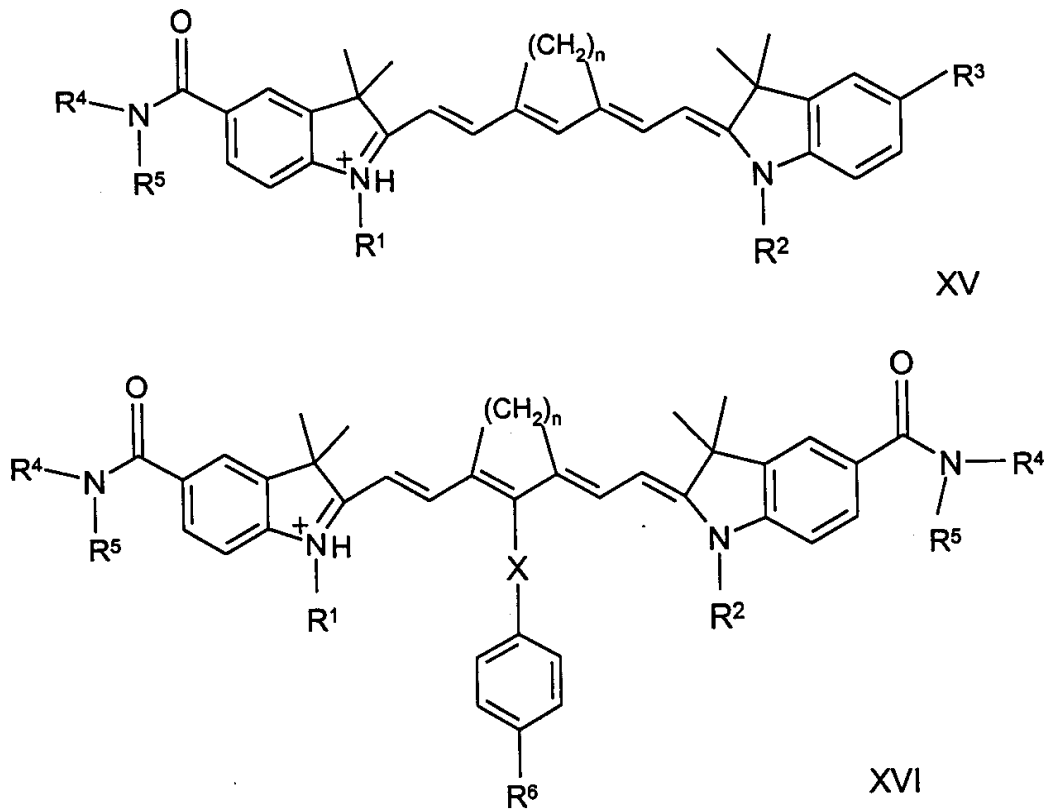
$R^1$  和  $R^2$  相互独立地代表 4-磺基丁基或 3-磺基丙基，而

$R^3$  代表氢、或者基团  $-\text{COOE}^1$  或  $-\text{CONHE}^1$ ，其中

$E^1$  相互独立地代表氢原子、或者代表甲基、乙基或者  $\text{C}_3-\text{C}_6$  烷基，这些烷基可插入 0-2 个氧原子和/或 0-1 个羰基，和/或被 0-5 个羟基取代。

7、如权利要求 4 所述的化合物，其特征在于，染料分子  $A^1$  和/或

A<sup>2</sup>代表以下通式 XV 或 XVI 的卟三炭菁染料:



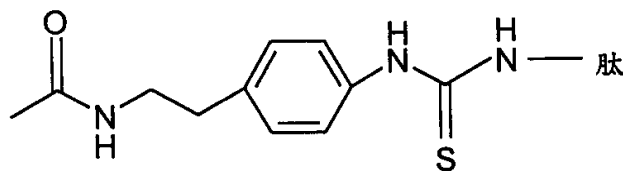
其中

n 代表 2 或 3,

R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 相互独立地代表 4-磺基丁基、3-磺基丙基或 2-磺基乙基,

R<sup>3</sup> 代表基团 -CONH-肽、-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CONH-肽、-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-CS-NH-肽或者 -CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-肽, 其中 m=1-10, 而 n=2 或 3,

或者 R<sup>3</sup> 代表以下基团:



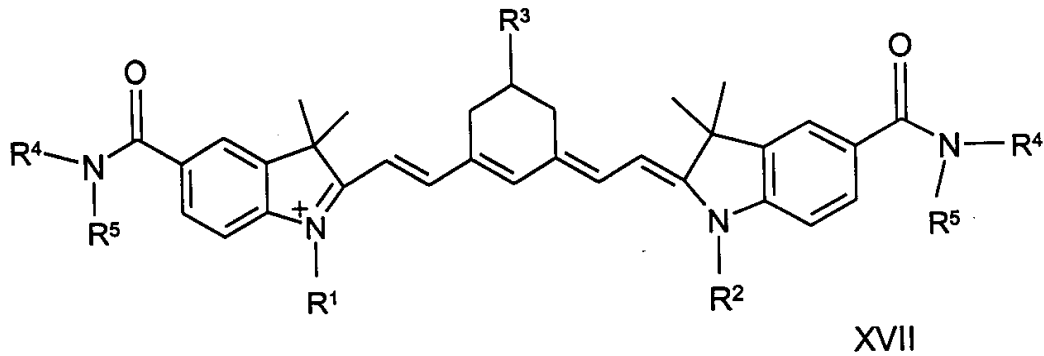
R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 相互独立地代表氢原子、甲基或羟基化烷基,

R<sup>6</sup> 代表以下基团之一:

- (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CONH-肽 其中 m=0-2,

$-(CH_2)_m-NH-CS-NH-$  肽其中  $m=0-2$ ，而 X 代表氧原子或硫原子。

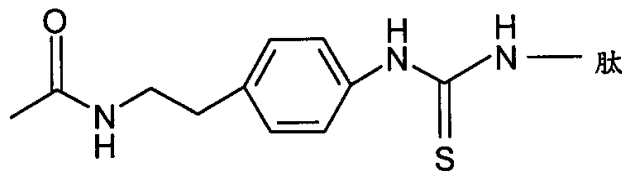
8、如权利要求 4 所述的化合物，其特征在于，染料分子  $A^1$  和/或  $A^2$  代表以下通式 XVII 的卟三炭菁染料：



其中

$R^1$  和  $R^2$  相互独立地代表 4-磺基丁基、3-磺基丙基或 2-磺基乙基，  
 $R^3$  代表基团  $-CONH-$  肽、 $-NH-CS-NH-$  肽或者  $-CONH-(CH_2)_n$   
 $-NHCO-CH_2-$  肽，其中  $n=2$  或 3，

或者  $R^3$  代表以下基团：



$R^4$  和  $R^5$  相互独立地代表氢原子、甲基或羟基化烷基。

9、如权利要求 7 或 8 所述的化合物，其特征在于，所述羟基化烷基为 2-羟基乙基、3-羟基丙基、2, 3-二羟基丙基、1, 3-二羟基-2-丙基、2, 3, 4-三羟基丁基、1, 3, 4-三羟基-2-丁基、2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基。

10、如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于， $(X)_m$  代表天然的人

血管活性肠肽的序列，其相应于以下序列：

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN

或者由 5—30 个氨基酸组成的血管活性肠肽的片段、部分序列、衍生物或者类似物。

11、如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于， $(X)_m$  代表促生长素抑制素的氨基酸序列，其相应于以下序列：

AGCKNFFWKTFTSC  


或者由 5—20 个氨基酸组成的促生长素抑制素的片段、部分序列、衍生物或者类似物。

12、如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于， $(X)_m$  代表神经降压肽的氨基酸序列，其相应于以下序列：

焦谷氨酸—LYENKPRRPYIL

或者由 5—20 个氨基酸组成的神经降压肽的片段、部分序列、衍生物或者类似物。

13、如权利要求 10 所述的化合物，其特征在于，血管活性肠肽的片段、部分序列、衍生物或者类似物是选自于以下氨基酸序列：

RLRKQMAVKKYLSILN	RLRKQMAVKKYLSIL	RLRKQMAVKKYLSI
LRKQMAVKKYLSILN	LRKQMAVKKYLSIL	LRKQMAVKKYLSI
RKQMAVKKYLSILN	RKQMAVKKYLSIL	RKQMAVKKYLSI
KQMAVKKYLSILN	KQMAVKKYLSIL	KQMAVKKYLSI
QMAVKKYLSILN	QMAVKKYLSIL	QMAVKKYLSI
MAVKKYLSILN	MAVKKYLSIL	MAVKKYLSI
AVKKYLSILN	AVKKYLSIL	AVKKYLSI

RLRKQMAVKKYLS	RLRKQMAVKKYLN	RLRKQMAVKKYL
LRKQMAVKKYLS	LRKQMAVKKYLN	LRKQMAVKKYL
RKQMAVKKYLS	RKQMAVKKYLN	RKQMAVKKYL
KQMAVKKYLS	KQMAVKKYLN	KQMAVKKYL
QMAVKKYLS	QMAVKKYLN	QMAVKKYL
MAVKKYLS	MAVKKYLN	MAVKKYL
AVKKYLS	AVKKYLN	AVKKYL

14、如权利要求 10 所述的化合物，其特征在于，VIP 肽的类似物是选自于以下氨基酸序列：

FSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLSILN  
 ISDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLSILN  
 LSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLSILN  
 HFDVFTDNY TRLRKQMAVK KYLSILN  
 HHDVFTDNY TRLRKQMAVK KYLSILN

HIDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HLDVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HMDVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HQDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HTDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HVDVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HWDVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HYDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSEVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSFVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSHVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSIVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSLVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSMVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSWVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDVFVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDGVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDMVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDQVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDSVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDWVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDYVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAFVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAIFVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDALFVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAMFVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDATFVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAVFVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAVFVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAVFVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAVFVFTDNY TRRRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAVFVFTDNY TRWRKQMAVK KYLNSILN

HSDAVFTDNY TRLRFQMAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRLQMAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRMQMAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRRQMAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKAMAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKFMVAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKIMAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKKMAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKLMVAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKMMVAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKRMVAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKVMVAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKWMVAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKYMVAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQFAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQIAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQKAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQLAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQQAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQRAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQWAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMFVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMIVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMKVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMLVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMMVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMQVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMRVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMVVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMWVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMYVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMAAK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMAIK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMAVR KYLNSILN  
HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK RYLNSILN



交换，其中  $m$  与上述定义相同。

17、如前述任一权利要求所述的化合物，其特征在于，至少一个氨基酸( $X$ ) <sub>$m$</sub> 相互独立地用其他非天然的氨基酸或者氨基酸衍生物交换。

18、如权利要求 17 所述的化合物，其特征在于，所述非天然的氨基酸或者氨基酸衍生物选自于以下组中：萘丙氨酸、环己基丙氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、 $\alpha$ -氨基己二酸、 $\alpha$ -氨基丁酸、 $\beta$ -丙氨酸、 $\beta$ -一环己基丙氨酸、鸟氨酸、肌氨酸或  $\delta$ -羟基赖氨酸。

19、如前述任一权利要求所述的化合物，其特征在于，VIP 的类似物选自于以下式的化合物：



其中  $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$  和  $X^4$  可代表非天然的氨基酸或氨基酸衍生物。

20、如权利要求 19 所述的化合物，其特征在于，所述非天然的氨基酸或氨基酸衍生物选自于以下组中：萘丙氨酸、环己基丙氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、 $\alpha$ -氨基己二酸、 $\alpha$ -氨基丁酸、 $\beta$ -丙氨酸、 $\beta$ -一环己基丙氨酸、鸟氨酸、肌氨酸或  $\delta$ -羟基赖氨酸。

21、如前述任一权利要求所述的化合物，其特征在于，所有氨基酸( $X$ ) <sub>$m$</sub> 用它们相应的 D-氨基酸交换。

22、如前述任一权利要求所述的化合物，其特征在于，血管活性肠

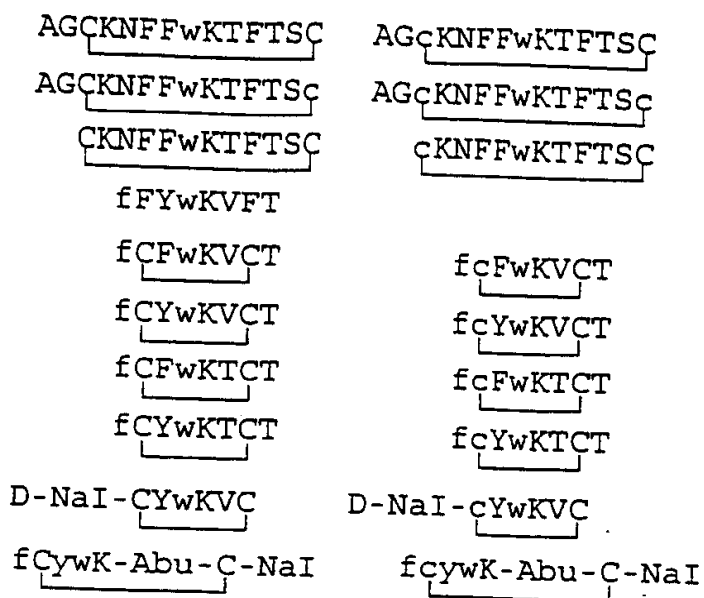
肽的片段、部分序列、衍生物或类似物选自于逆合成氨基酸序列。

23、如前述任一权利要求所述的化合物，其特征在于，血管活性肠肽序列的片段、部分序列、衍生物或类似物选自于其中 2—m 个氨基酸用相应的 D-氨基酸交换的逆合成氨基酸序列，其中 m 与上述定义相同。

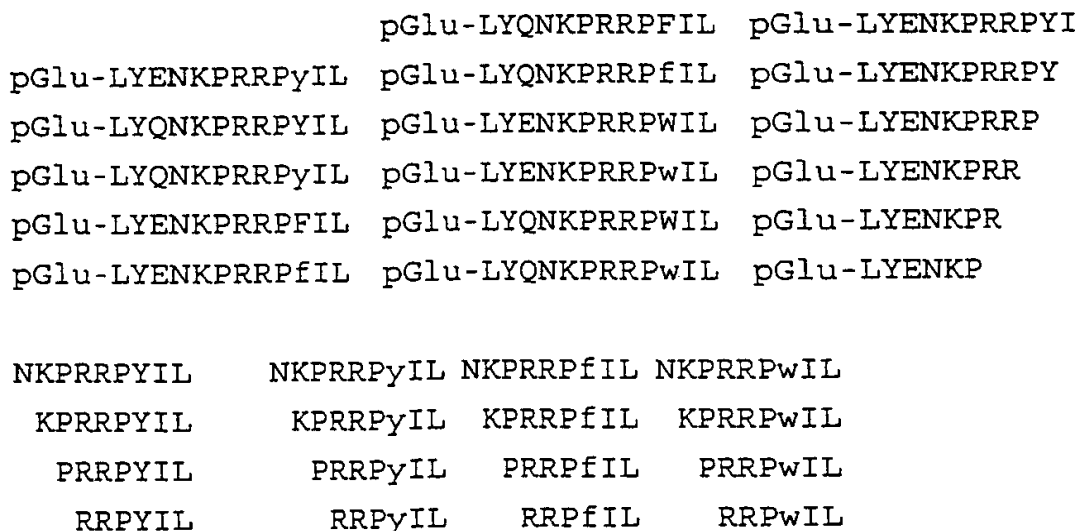
24、如权利要求 10 所述的化合物，其特征在于，血管活性肠肽的片段、部分序列、衍生物或类似物选自于以下氨基酸序列：

rlrkqmavkkylnsiln	rlrkqmavkkylnsil	rlrkqmavkkylnsi
lrkqmavkkylnsiln	lrkqmavkkylnsil	lrkqmavkkylnsi
rkqmavkkylnsiln	rkqmavkkylnsil	rkqmavkkylnsi
kqmavkkylnsiln	kqmavkkylnsil	kqmavkkylnsi
qmavkkylnsiln	qmavkkylnsil	qmavkkylnsi
mavkkylnsiln	mavkkylnsil	mavkkylnsi
avkkylnsiln	avkkylnsil	avkkylnsi
RLRKQMAvKKyLNSILN	RLRKQMAvKKyLNSIL	RLRKQMAvKKyLNSI
LRKQMAvKKyLNSILN	LRKQMAvKKyLNSIL	LRKQMAvKKyLNSI
RKQMAvKKyLNSILN	RKQMAvKKyLNSIL	RKQMAvKKyLNSI
KQMAvKKyLNSILN	KQMAvKKyLNSIL	KQMAvKKyLNSI
QMAvKKyLNSILN	QMAvKKyLNSIL	QMAvKKyLNSI
MAvKKyLNSILN	MAvKKyLNSIL	MAvKKyLNSI
AvKKyLNSILN	AvKKyLNSIL	AvKKyLNSI

25、如权利要求 11 所述的化合物，其特征在于，促生长素抑制素的片段、部分序列、衍生物或类似物选自于以下氨基酸序列：



26、如权利要求 12 所述的化合物，其特征在于，神经降压肽的片段、部分序列、衍生物或类似物选自于以下氨基酸序列：



27、如前述权利要求之一所述的化合物在以下方面的应用：使用光学检测法体内诊断肿瘤、其他患病组织区域或者腺癌，或者使用内窥镜在胃肠道、食管、支气管、膀胱或子宫颈中体内荧光诊断肿瘤、肿瘤细

胞和/或炎症组织，或者使用光学乳房 X 射线摄影术（乳房的透照或光学体层摄影）体内荧光诊断和/或吸附诊断乳腺癌。

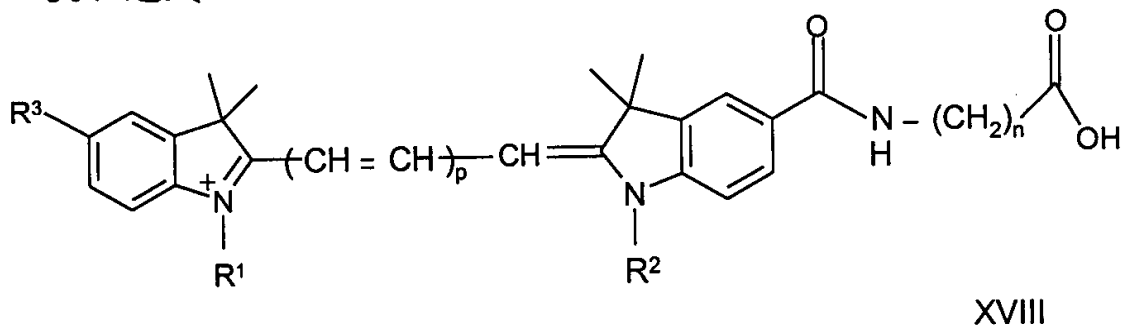
28、使用如权利要求 1 所述的化合物进行内窥镜体内荧光诊断的方法，其中通过静脉或者通过雾化在胃肠道、食管、膀胱中向患者给药所述化合物，或者通过吸入将所述化合物送入支气管中，

在雾化时，通过冲洗除去未结合的、过量部分的化合物，

而内窥镜研究是如下进行的：用选自于 380—1200 nm 光谱范围的激发光进行局部激发，然后位置依赖性地检测染料所发射的特殊荧光辐射。

29、用于体内诊断患病组织区域的光学诊断剂，其包含至少一种如权利要求 1 所述的化合物以及常规辅剂和/或载体和稀释剂。

30、通式 XVIII 的菁染料：



其中

p 代表 1、2 或 3，

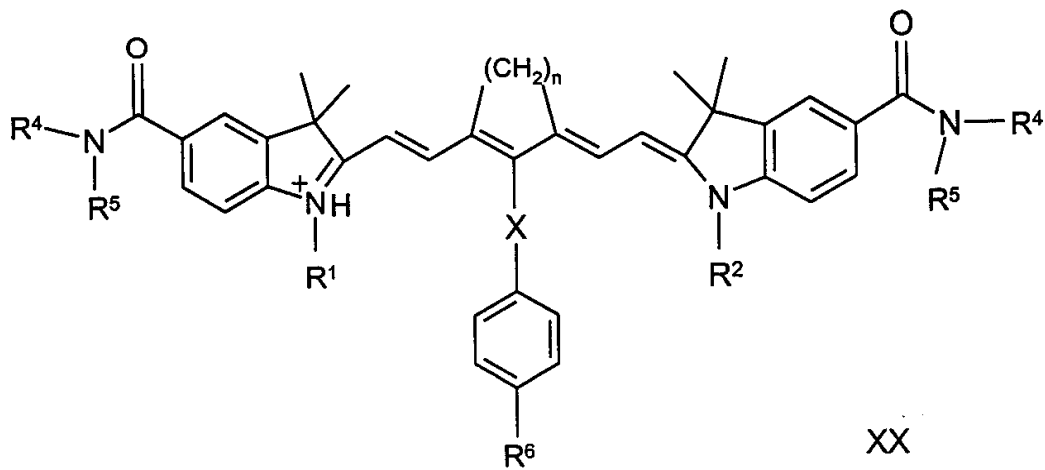
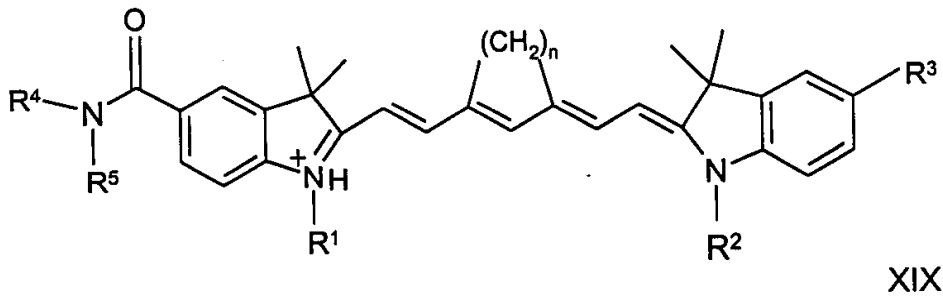
n 代表 1、2、3、4 或 10，

R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 相互独立地代表 4-磺基丁基、3-磺基丙基、2-磺基乙基、3-甲基-3-磺基丙基、甲基、乙基、或丙基，而

R<sup>3</sup> 代表氢或者基团 -COOE<sup>1</sup>、-CONE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>、-NHCOE<sup>1</sup>、-NHCONHE<sup>1</sup>、

-NE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>、-OE<sup>1</sup>、-OSO<sub>3</sub>E<sup>1</sup>、-SO<sub>3</sub>E<sup>1</sup>、-SO<sub>2</sub>NHE<sup>1</sup>，其中 E<sup>1</sup> 和 E<sup>2</sup> 相互独立地代表氢原子、或者代表甲基、乙基或者 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 烷基，这些烷基可插入 0-2 个氧原子和/或 0-1 个羰基，和/或被 0-5 个羟基取代。

31、通式 XIX 或 XX 的菁染料：



其中

n 代表 2 或 3，

R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 相互独立地代表 4-磺基丁基、3-磺基丙基或 2-磺基乙基，

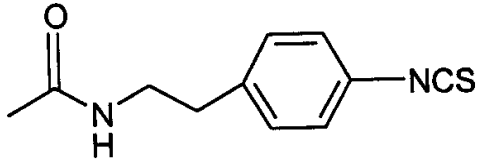
R<sup>3</sup> 代表 -COOH 基团或者以下基团中的一种：

-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-COOH，其中 n=2 或 3，

-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NCS，其中 n=2 或 3，

-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-X<sup>1</sup>，其中 n=2 或 3，而 X<sup>1</sup>=Cl、

Br、I，



$R^4$  和  $R^5$  相互独立地代表氢原子、甲基或羟基化烷基，如 2-羟基乙基、3-羟基丙基、2, 3-二羟基丙基、1, 3-二羟基-2-丙基、2, 3, 4-三羟基丁基、1, 3, 4-三羟基-2-丁基、2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基，

$R^6$  代表以下基团中的一种：

$-(CH_2)_m-COOH$ ，其中  $m=0-2$ ，

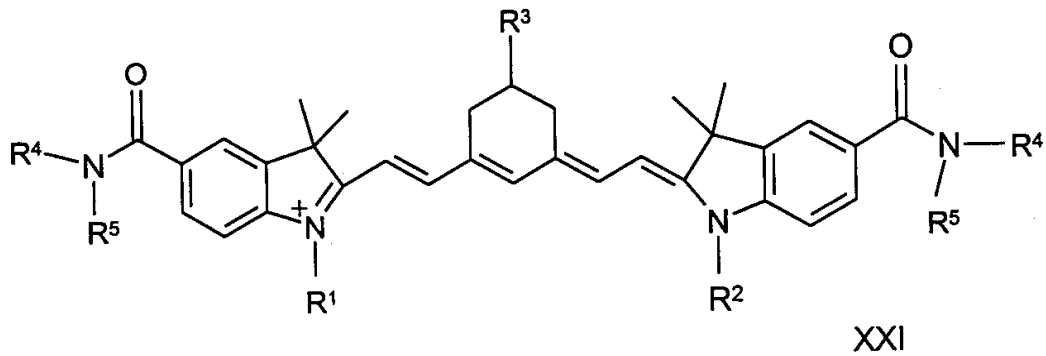
$-(CH_2)_m-NCS$ ，其中  $m=0-2$ ，

$-(CH_2)_m-CONH-$  肽，其中  $m=0-2$ ，

$-(CH_2)_m-NH-CS-NH-$  肽，其中  $m=0-2$ ，而

$X$  代表氧原子或硫原子。

32、通式 XXI 的菁染料：



其中

$R^1$  和  $R^2$  相互独立地代表 4-磺基丁基或 3-磺基丙基，

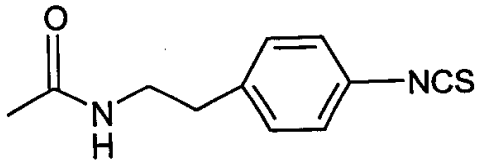
$R^3$  代表  $-COOH$  基团或者以下基团中的一种：

$-CONH-(CH_2)_n-COOH$ ，其中  $n=2$  或  $3$ ，

$-CONH-(CH_2)_n-NCS$ ，其中  $n=2$  或  $3$ ，

$-CONH-(CH_2)_n-NHCO-CH_2-X^1$ ，其中  $n=2$  或  $3$ ，而  $X^1=Cl$ 、

Br, I,



R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 相互独立地代表氢原子、甲基或羟基化烷基，如 2-羟基乙基、3-羟基丙基、2, 3-二羟基丙基、1, 3-二羟基-2-丙基、2, 3, 4-三羟基丁基、1, 3, 4-三羟基-2-丁基、2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基。

33、VIP 的类似物，其特征在于具有以下序列：

His-Trp-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 1)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Phe-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 2)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Lys-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 3)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Gln-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 4)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Arg-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 5)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Trp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-  
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 6)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Arg-Arg-Leu-Arg-  
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 7)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-  
Lys-Gln-Met-Arg-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 8).

# 说明书

## 作为光学诊断用造影剂的短链肽—染料结合物

本发明涉及用于肿瘤诊断的化合物，该化合物由染料与短链肽的结合物组成，而所述肽是由血管活性肠肽、促生长素抑制素或神经降压肽衍生的。本发明还涉及这些化合物作为光学诊断剂的应用以及包含这些化合物的诊断剂。

在细胞水平上，疾病诱导的变化通常表现为与正常状态相比已发生变化的受体分布或表达。这些差异可以是定量型的（如增殖细胞中的转铁蛋白的量）或者也可以是定性型的（如血管内皮生长因子 VEGF 的表达）。以前主要是在放射诊断中注意研究病理受体表达或分布的显象，这是因为检测方法所需要的灵敏度。

七螺旋（heptahelical）受体是许多药理活性成分（如  $\beta$ —阻断剂、H<sub>2</sub>—酸阻断剂、抗组胺药）的目标分子。除治疗应用外，这些受体的主要经放射标记的激动剂配体在诊断中用于所谓的受体闪烁法，以体内检测并定位肿瘤。在此情况下，受体介导的细胞摄粒作用的机理例如被促生长素抑制素受体使用，该促生长素抑制素受体在神经内分泌肿瘤中被更强烈地表达。促生长素抑制素类似物 <sup>111</sup>In-DTPA-pentetreotide（Octreoscan®）在临床上已被批准用于常规的闪烁诊断；文献：J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 37, 1079-82, 1990; J. Nucl. Med. 32, 1184-9, 1991; J. Nucl. Med. 33, 652-8, 1992; Digestion 3, 54-9, 1994; J. Clin. Invest. 93, 1321-5, 1994; Metabolism 45, 21-3, 1996。

其他药物包括使用经放射标记的结合 VIP 受体的 VIP 及 VIP 类似物。宽谱肿瘤（如腺癌）都更强烈地表达 VIP 受体。

WO 96/30055 描述了放射诊断和放射治疗剂，特殊的 VIP 受体结合

肽，其是经放射标记的，而且可用于放射诊断和放射治疗。可用 Tc-99m 标记用于闪烁法的 VIP 受体结合肽被描述是特别有利的。其他的文献：*Cancer Research* 54, 690-700, 1994; *Endocrinology* 136, 2662-80, 1994; *J. Nucl. Med.* 40, 353-361, 1999。

上述所有基于促生长素抑制素受体和 VIP 受体的诊断剂都是放射诊断药（闪烁法，用  $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  标记的肽）。

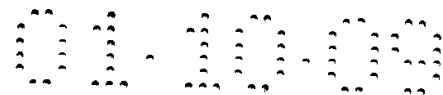
文献：EP 588754、US 5650134、US 5620675、US 5225180、WO 96/23527; *J. Steroid Biochem. Mo. Biol.* 37, 1083-87, 1990; *Lancet* 242-4, 1989; *J. Nucl. Med.* 39, 1913-17, 1998。

然而，目前尚未知晓荧光标记的与染料结合的肽，其使得体内荧光检测肿瘤成为可能（*Photochem. Photobiol.* 68, 603-632, 1998）。

本发明的目的是提供新的化合物，该化合物使得用受体特异性结合目标组织的化合物通过检测荧光辐射来灵敏诊断肿瘤成为可能。在此情况下，偶联至生物分子上的特殊染料分子将产生高度灵敏的、可检测的荧光信号。

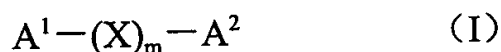
该目的是通过包含荧光染料的化合物来实现的，其中荧光染料共价键地结合在短链肽上。这些结合物对七螺旋受体、特别是促生长素抑制素受体、VIP 受体（血管活性肠肽）以及神经降压肽受体具有高的结合亲和性，而且它们任选地通过受体介导的细胞摄粒作用在细胞内被吸收。因此，根据本发明的化合物适合用于对肿瘤细胞和肿瘤组织进行技术上简单、无害的光学诊断，所述肿瘤细胞或肿瘤组织与健康的细胞相比更多地表达促生长素抑制素受体、VIP 受体或神经降压肽受体。本发明的化合物特别适合用于荧光诊断，对于中空器官中荧光内窥镜诊断是特别有利的，例如食管、结肠、子宫颈、以及支气管的各种肿瘤，如腺癌、神经内分泌肿瘤或者胰管肿瘤。

特别优选的染料具有以下特征：它们满足某些光物理和化学要求。



从光物理角度看，染料必须具有高的吸收系数和高的荧光量子产量，以便即使在最小的组织浓度时仍能提供有效的信号。最大吸收必须以可自由选择的方式重叠宽的光谱范围。因此，为检测更低的组织层（低于表面几厘米），600—900 nm 的光谱范围是必须的，而对于表面检测，400—600 nm 的吸收波长就已足够。从化学角度看，染料必须具有高的光稳定性，而且在激发过程中必须没有分解信号（光漂白）。染料在固相合成肽时必须可用作合成成分，而且因此在常规合成条件下是稳定的，使得在染料和肽之间确保简单而且有利地产生结构明确并有固体化学计量比的染料—肽结合物。多亚甲基染料，特别是菁、部花菁、氧杂菁和 squarilium 染料，可以最好地满足这些要求。

因此，本发明的主题是通式 (I) 的肽—多亚甲基染料结合物及其生理相容盐：



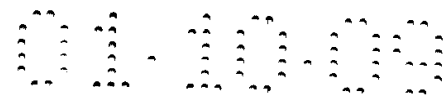
其中：

X 代表具有 D 或 L 构型的  $\alpha$ —、 $\beta$ —或  $\gamma$ —氨基酸；

m 代表 5—30 的数，

其中所产生的氨基酸序列  $(X)_m$  可为直链或者通过两个半胱氨酸或高半胱氨酸之间的二硫键或者在 N—和 C—端之间的酰胺化而环化，并代表血管活性肠肽 (VIP)、促生长素抑制素或神经降压肽的氨基酸序列，或者代表 VIP、促生长素抑制素或神经降压肽的片段、部分序列、衍生物或类似物；

$A^1$  代表氢原子、具有最多 10 个碳原子的酰基或烷基，它们可任选地被 1—3 个羧基和/或 1—6 个羟基取代，或者代表具有 2—30 个— $CH_2CH_2O$ —单元的聚（氧乙烯）基团，或者代表选自于多亚甲基染料的染料分子，该染料在 380—1200 nm 的范围内具有至少一个最大吸收；



A<sup>2</sup> 代表羟基、氨基或者选自于多亚甲基染料的染料分子，该染料在 380—1200 nm 的范围内具有至少一个最大吸收；

其条件是 A<sup>1</sup> 或 A<sup>2</sup> 基团中至少一个代表选自于多亚甲基染料的染料分子，而且该染料在 380—1200 nm 的范围内具有至少一个最大吸收，

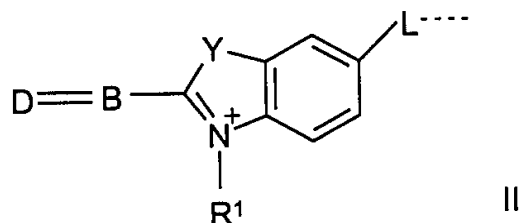
其中如果 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表选自于多亚甲基染料的染料分子，而且该染料在 380—1200 nm 的范围内具有至少一个最大吸收，则 A<sup>1</sup> 连接在 N-端氨基上，而 A<sup>2</sup> 连接在氨基酸序列(X)<sub>m</sub> 中任意位置处的氨基酸赖氨酸的氨基或者氨基酸丝氨酸的羟基上。

上述肽的片段、部分序列、衍生物或类似物代表例如缩短的氨基酸序列、单个或所有氨基酸与相应的 D-氨基酸的交换物、单个氨基酸与其他氨基酸的交换物、反向序列以及上述特征的组合。

上述肽的片段、部分序列、衍生物或类似物也可包含非天然的氨基酸，如萘丙氨酸 (naphthalanine)、环己基丙氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、α-氨基己二酸、α-氨基丁酸、β-丙氨酸、β-环己基丙氨酸、鸟氨酸、肌氨酸或 δ-羟基赖氨酸。

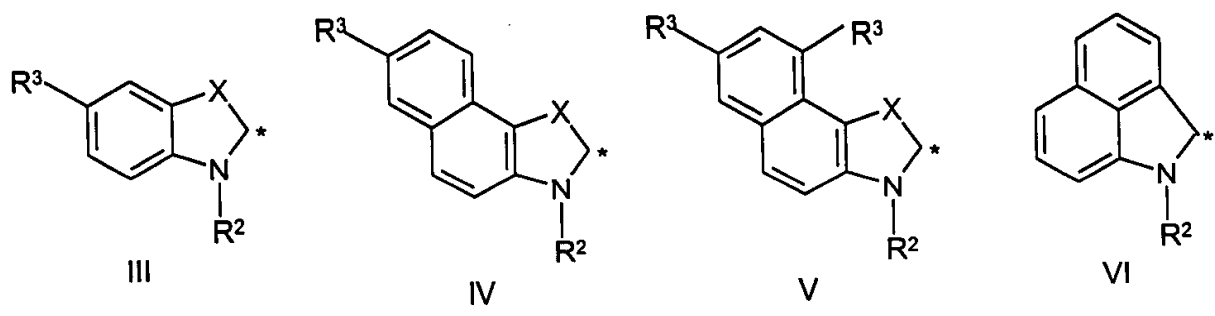
本发明特别优选的实施方案是具有以下特征的通式 I 化合物：染料分子 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表菁、squarilium、croconium、部花菁或氧杂菁染料。这些染料属于多亚甲基染料类，而且具有如上所述的优点。

其他优选的根据本发明的通式 I 化合物具有以下特征：染料分子 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表以下通式 II 的菁染料或 squarilium 染料：

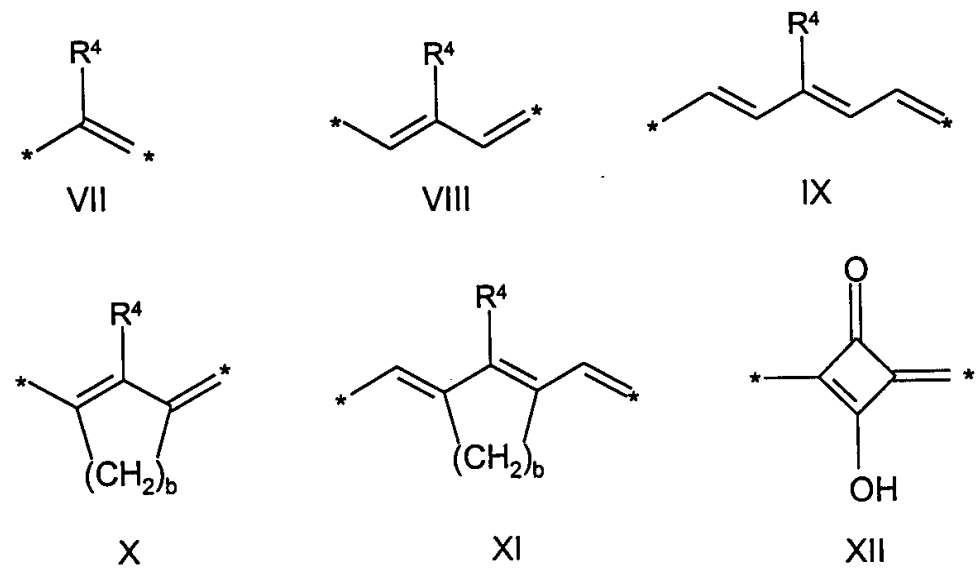


其中：

D 代表相应于以下通式 III—VI 的片段，其中用星号标记的位置表示与 B 的连接位：



B 代表相应于以下通式 VII—XII 的片段:



$R^1$  和  $R^2$  代表  $E^1$ ,  $R^3$  代表氟、氯、溴或碘原子或者硝基或者基团  $-COOE^1$ 、 $-CONE^1E^2$ 、 $-NHCOE^1$ 、 $-NHCONHE^1$ 、 $-NE^1E^2$ 、 $-OE^1$ 、 $-OSO_3E^1$ 、 $-SO_3E^1$ 、 $-SO_2NHE^1$ 、 $-E^1$ , 其中

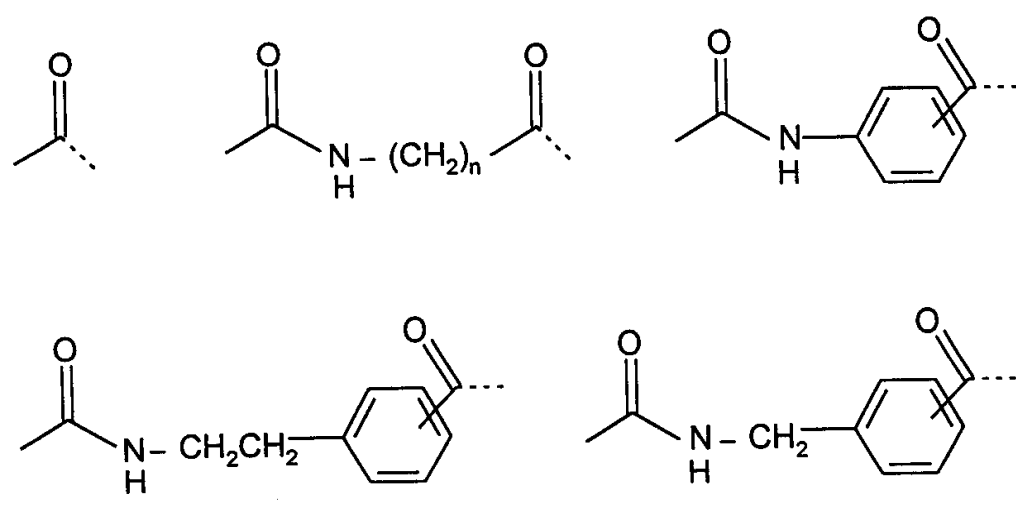
$E^1$  和  $E^2$  相互独立地代表氢原子、 $C_1-C_4$  磺基烷基、饱和或不饱和、直链或支链  $C_1-C_{50}$  烷基链, 其中该链或其一部分可任选地形成一个或多个芳香或饱和环  $C_5-C_6$  单元或者二环  $C_{10}$  单元, 而且  $C_1-C_{50}$  烷基链中可插入 0—15 个氧原子和/或 0—3 个羰基和/或被 0—5 个羟基取代,

$R^4$  代表氢原子、氟、氯、溴、碘原子或者支链或直链  $C_1-C_{10}$  烷基链,

$b$  代表 2 或 3 的数,

$X$  和  $Y$  相互独立地代表 O、S、Se、 $-CH=CH-$  或者  $C(CH_3)_2$ ,

L 代表以下式的基团:



其中 n 代表 1-10 的数。

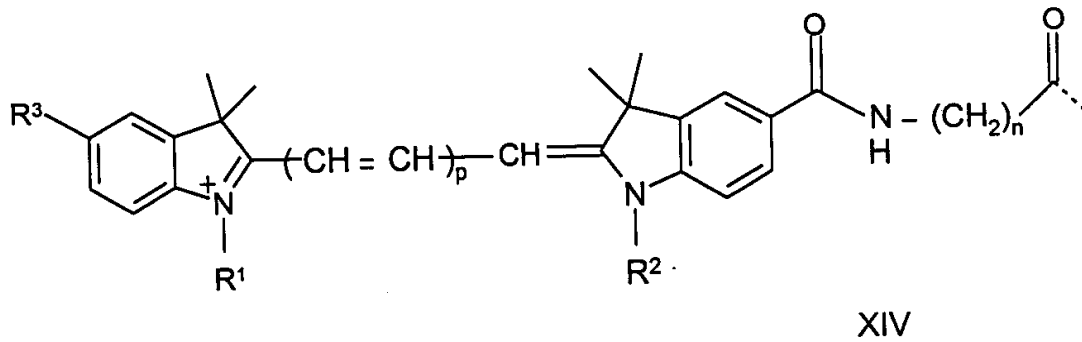
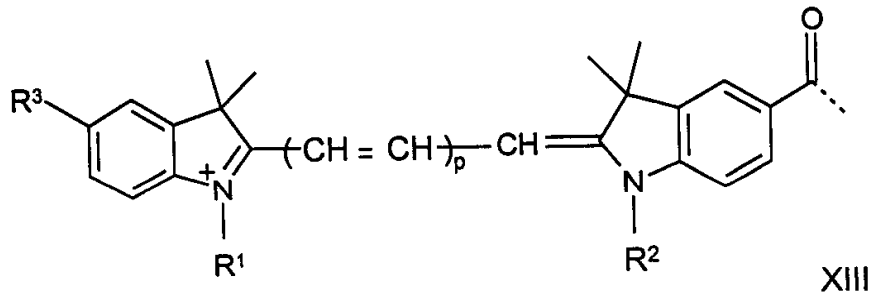
(在上述式中，分子部分中在左侧画的实线表示与染料骨架相连的键，而分子部分中在右侧画的虚线表示与肽相连的键。)

在多亚甲基染料中，菁染料，例如以吲哚结构为基础的茛炭 (indocarbo) 菁、茛二炭 (indodicarbo) 菁和茛三炭 (indotricarbo) 菁，是特别有利的。这些结构的特征在于具有高度化学和光化学稳定性。通过有利的合成法，可制得以任何所希望的方式在 400-1000 nm 之间吸收并发荧光的衍生物，其可用合适的连接基和官能团、优选羧基通过取代反应偶联在肽上，而且特别是由于磺酸基而具有高度的水溶性。与文献中已知的菁染料相反，根据本发明使用的化合物仅具有一个活性基团，这使得作为结合物的树脂合成的一部分化学计量比确定地偶联在肽上成为可能。

因此，根据本发明的通式 I 化合物的特别优选的实施方案具有以下特征：

——染料分子 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表茛炭菁染料、茛二炭菁染料或茛三炭菁染料；

——染料分子 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表以下通式 XIII 或 XIV 的茛炭菁染料、茛二炭菁染料或茛三炭菁染料：



其中

p 代表 1、2 或 3，

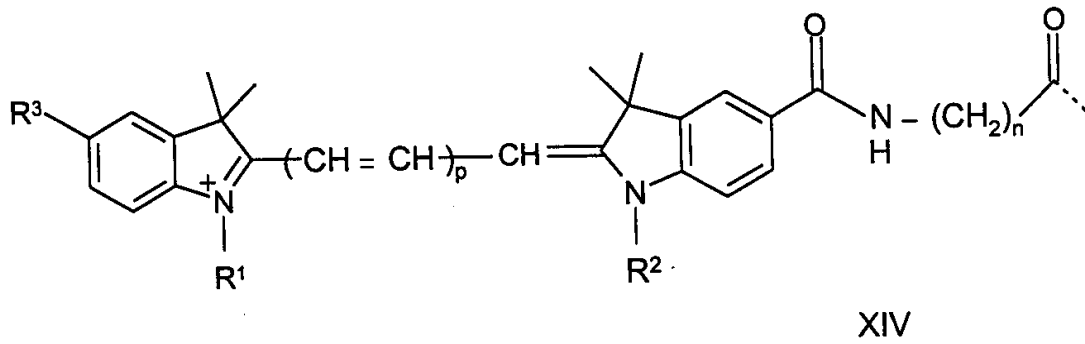
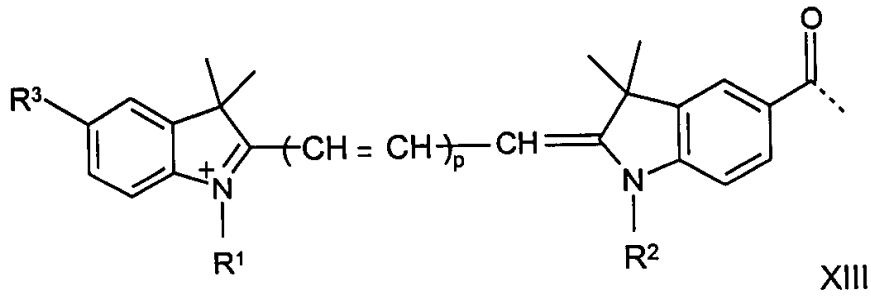
n 代表 1、2、3、4 或 10 的数，

R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 相互独立地代表 4-磺基丁基、3-磺基丙基、2-磺基乙基、3-甲基-3-磺基丙基、甲基、乙基、或丙基，而

R<sup>3</sup> 代表氢、氯、溴或碘原子或者硝基或者基团 -COOE<sup>1</sup>、-CONE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>、-NHCOE<sup>1</sup>、-NHCONHE<sup>1</sup>、-NE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>、-OE<sup>1</sup>、-OSO<sub>3</sub>E<sup>1</sup>、-SO<sub>3</sub>E<sup>1</sup>、-SO<sub>2</sub>NHE<sup>1</sup>，其中

E<sup>1</sup> 和 E<sup>2</sup> 相互独立地代表氢原子、或者代表甲基或乙基或者 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 烷基，该烷基可插入 0-2 个氧原子和/或 0-1 个羰基，和/或被 0-5 个羟基取代，或者 E<sup>1</sup> 和 E<sup>2</sup> 代表具有 2-30 个 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O- 单元的聚（氧乙烯）二醇基团；

——染料分子 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表以下通式 XIII 或 XIV 的蒽炭菁染料、蒽二炭菁染料或蒽三炭菁染料：



其中

p 代表 1、2 或 3，

n 代表 1、2 或 4，

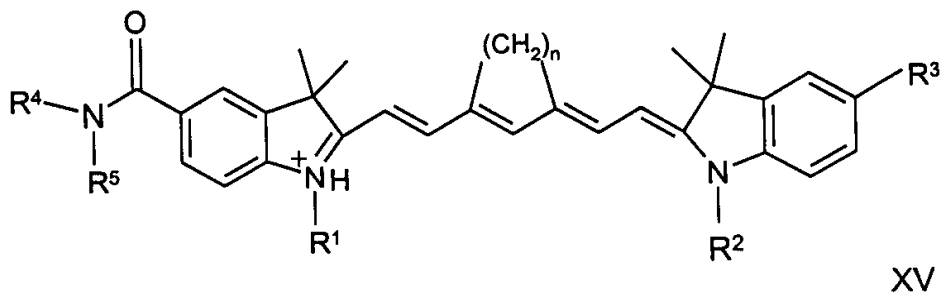
R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 相互独立地代表 4-磺基丁基或 3-磺基丙基，而

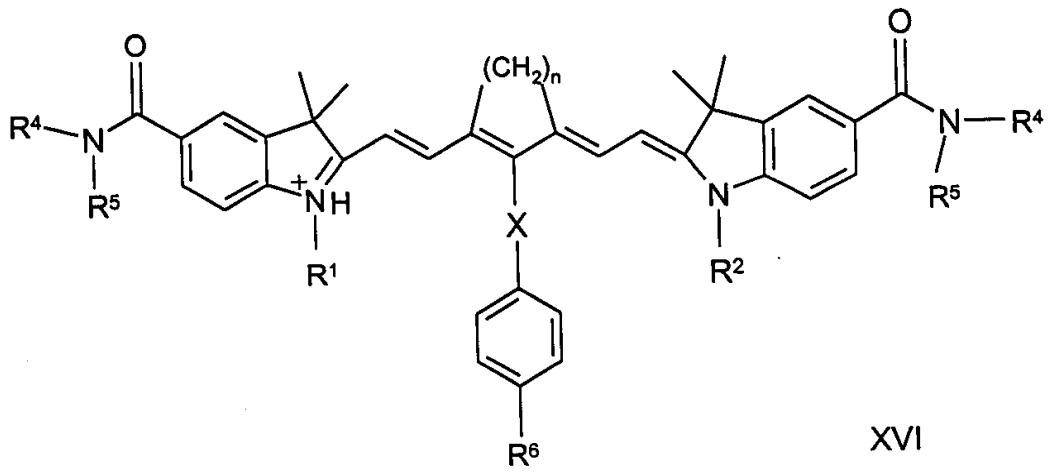
R<sup>3</sup> 代表氢、或者基团 -COOE<sup>1</sup> 或 -CONHE<sup>1</sup>，其中

E<sup>1</sup> 和 E<sup>2</sup> 相互独立地代表氢原子、或者代表甲基或乙基或者 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 烷基，该烷基可插入 0-2 个氧原子和/或 0-1 个羰基，和/或被 0-5 个羟基取代；

——染料分子 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表以下通式 XV 或 XVI 的茚三碳菁染料：

料：





XVI

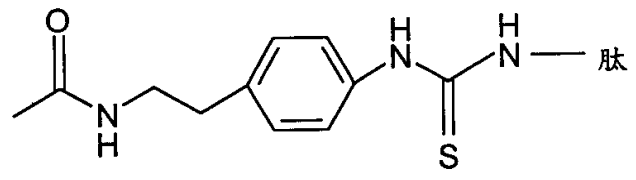
其中

n 代表 2 或 3,

R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 相互独立地代表 4-磺基丁基、3-磺基丙基或 2-磺基乙基,

R<sup>3</sup> 代表基团 -CONH-肽、-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CONH-肽、-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-CS-NH-肽或者 -CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-肽, 其中 m=1-10, 而 n=2 或 3,

或者 R<sup>3</sup> 代表以下基团:

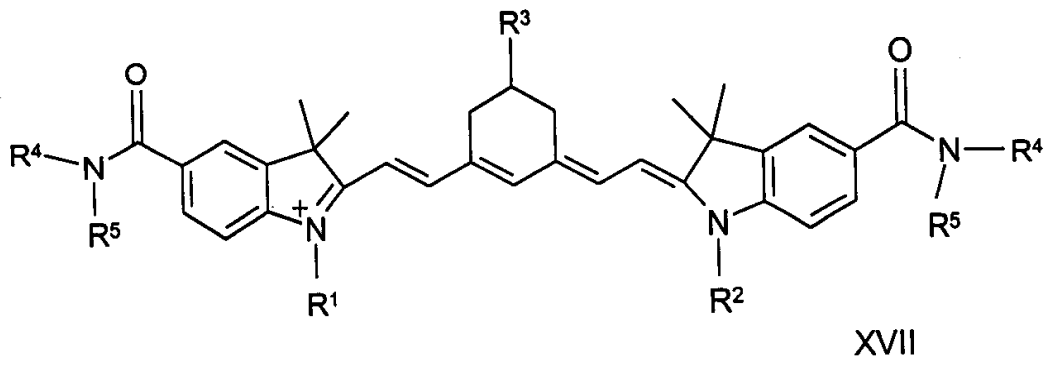


R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 相互独立地代表氢原子、甲基或羟基化烷基, 如 2-羟基乙基、3-羟基丙基、2, 3-二羟基丙基、1, 3-二羟基-2-丙基、2, 3, 4-三羟基丁基、1, 3, 4-三羟基-2-丁基、2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基,

R<sup>6</sup> 代表以下基团之一: -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CONH-肽其中 m=0-2, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-NH-CS-NH-肽其中 m=0-2, 而

X 代表氧原子或硫原子;

--染料分子 A<sup>1</sup> 和/或 A<sup>2</sup> 代表以下通式 XVII 的蒽三碳菁染料:

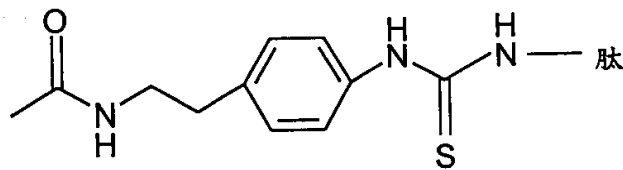


其中

R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 相互独立地代表 4-磺基丁基或 3-磺基丙基，

R<sup>3</sup> 代表基团 -CONH-肽、-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CONH-肽、-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NH-CS-NH-肽或者 -CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-NHCO-CH<sub>2</sub>-肽，其中 m=1-10，而 n=2 或 3，

或者 R<sup>3</sup> 代表以下基团：



R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 相互独立地代表氢原子、甲基或羟基化烷基，如 2-羟基乙基、3-羟基丙基、2, 3-二羟基丙基、1, 3-二羟基-2-丙基、2, 3, 4-三羟基丁基、1, 3, 4-三羟基-2-丁基、2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基。

使用经染料标记的抗体检测肿瘤在文献中是已知的 (J. Cell. Pharmacol. 3, 141-145, 1992; Cancer Immunol. Immunother. 41, 257-63, 1995; Cancer Research 54, 2643-9, 1994; Biotechnol. Prog. 13, 649-658, 1997)。

相反地，根据本发明的化合物包含对抗体具有优势的低分子量肽和肽衍生物作为生物分子，所述肽或肽衍生物例如对目标结构具有高结合性，其诊断潜力不会由于不利的药代动力学而受到限制 (长的血液半衰

期，过敏性副作用（免疫原性）。

因此，对肽序列的生物及药理学要求是当在目标组织中快速增加时具有足够的血浆稳定性，并同时从身体的其他部分、优选通过肾排泄途径消除。

现在足以令人惊奇地发现，包含至少 5 个 VIA 序列之 C-端侧氨基酸而且在其上偶联用于荧光诊断的染料的肽序列，与天然 VIP 相比，能够在肿瘤细胞中显影。另外还发现，掺入至少一个 D-氨基酸或者用至少一个 D-氨基酸交换，可显著增加血浆稳定性。例如在结合 VIP 的染料-肽结合物中，所有 L-氨基酸被 D-氨基酸完全交换，则显示结合性质及细胞显影没有变化。

其他特别优选的根据本发明的通式 I 化合物具有以下特征：

--(X)<sub>m</sub> 代表天然的人血管活性肠肽的序列，其相应于以下序列：

HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN

或者由 5-30 个氨基酸组成的血管活性肠肽的片段、部分序列、衍生物或者类似物；

--(X)<sub>m</sub> 代表促生长素抑制素的氨基酸序列，其相应于以下序列：

AGCKNFFWKTFTSC

或者由 5-20 个氨基酸组成的促生长素抑制素的片段、部分序列、衍生物或者类似物；

--(X)<sub>m</sub>代表神经降压肽的氨基酸序列，其相应于以下序列：

焦谷氨酸—LYENKPRRPYIL

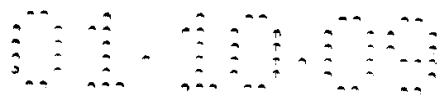
或者由 5—20 个氨基酸组成的神经降压肽的片段、部分序列、衍生物或者类似物；

--作为血管活性肠肽（VIP）的片段、部分序列、衍生物或者类似物，选择以下氨基酸序列：

RLRKQMAVKKYLNSILN	RLRKQMAVKKYLNSIL	RLRKQMAVKKYLNSI
LRKQMAVKKYLNSILN	LRKQMAVKKYLNSIL	LRKQMAVKKYLNSI
RKQMAVKKYLNSILN	RKQMAVKKYLNSIL	RKQMAVKKYLNSI
KQMAVKKYLNSILN	KQMAVKKYLNSIL	KQMAVKKYLNSI
QMAVKKYLNSILN	QMAVKKYLNSIL	QMAVKKYLNSI
MAVKKYLNSILN	MAVKKYLNSIL	MAVKKYLNSI
AVKKYLNSILN	AVKKYLNSIL	AVKKYLNSI
RLRKQMAVKKYLNS	RLRKQMAVKKYLN	RLRKQMAVKKYL
LRKQMAVKKYLNS	LRKQMAVKKYLN	LRKQMAVKKYL
RKQMAVKKYLNS	RKQMAVKKYLN	RKQMAVKKYL
KQMAVKKYLNS	KQMAVKKYLN	KQMAVKKYL
QMAVKKYLNS	QMAVKKYLN	QMAVKKYL
MAVKKYLNS	MAVKKYLN	MAVKKYL
AVKKYLNS	AVKKYLN	AVKKYL,

--作为 VIP 序列的类似物，选择以下氨基酸序列：

FSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN



ISDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
LSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HFDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HHDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HIDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HLDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HMDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HQDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HTDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HVDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HWDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HYDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSAVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSEAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSFAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSHAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSIAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSLAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSMVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSWVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDVAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDGVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDMVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDQVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDSVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDWVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDYVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAFFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAIFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDALFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAMFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDATFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAWFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAYFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAVKTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN  
HSDAVFVDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN



HSDAVFTDNY TRLRKQMAIK KYLNSILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMALK KYLNSILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVR KYLNSILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK RYLNSILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK WYLNSILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KFLNSILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KWLNSILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLASILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLFSILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLISILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLMSILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLSSILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLVSILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLWSILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNNILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNRILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNWILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNYILN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSSLN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSWLN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSYLN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSIFN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSIIN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSIWN  
 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILW

——作为 VIP 的类似物，选择根据以下式的化合物：

HSDAVFTX<sup>1</sup>X<sup>2</sup>Y X<sup>3</sup>RLRKQMAVK KYLNSILN，其中 X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup> 和 X<sup>3</sup> 可代表任何氨基酸，

——2-m 个氨基酸可相互独立地用它们相应的 D-氨基酸或者其他 L-或 D-氨基酸交换，其中 m 与上述定义相同，

—至少一个氨基酸(X)<sub>m</sub> 相互独立地用其他非天然的氨基酸或者氨基酸衍生物交换，

—至少一个氨基酸(X)<sub>m</sub> 相互独立地用其他非天然的氨基酸或者氨基酸衍生物交换，例如萘丙氨酸、环己基丙氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、α-氨基己二酸、α-氨基丁酸、β-丙氨酸、β-环己基丙氨酸、鸟氨酸、肌氨酸或δ-羟基赖氨酸，

—作为 VIP 的类似物，选择以下式的化合物：

X<sup>1</sup>SDAVX<sup>2</sup>TDNX<sup>3</sup> TRLRKQMAVK KX<sup>4</sup>LNSILN，其中 X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup> 和 X<sup>4</sup> 可代表非天然的氨基酸或氨基酸衍生物，例如萘丙氨酸、环己基丙氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、α-氨基己二酸、α-氨基丁酸、β-丙氨酸、β-环己基丙氨酸、鸟氨酸、肌氨酸或δ-羟基赖氨酸，

—所有氨基酸(X)<sub>m</sub> 用它们相应的 D-氨基酸交换，

—选择逆合成氨基酸序列作为血管活性肠肽的片段、部分序列、衍生物或类似物，

—选择其中 2-m 个氨基酸用相应的 D-氨基酸交换的逆合成氨基酸序列作为血管活性肠肽序列的片段、部分序列、衍生物或类似物，其中 m 与上述定义相同，

—选择以下氨基酸序列作为血管活性肠肽的片段、部分序列、衍生物或类似物：

rlrkqmavkkylnsil	rlrkqmavkkylnsil	rlrkqmavkkylnsi
lrkqmavkkylnsiln	lrkqmavkkylnsil	lrkqmavkkylnsi
rkqmavkkylnsiln	rkqmavkkylnsil	rkqmavkkylnsi
kqmavkkylnsiln	kqmavkkylnsil	kqmavkkylnsi
qmavkkylnsiln	qmavkkylnsil	qmavkkylnsi
mavkkylnsiln	mavkkylnsil	mavkkylnsi
avkkylnsiln	avkkylnsil	avkkylnsi

RLRKQMAvKKyLNSILN	RLRKQMAvKKyLNSIL	RLRKQMAvKKyLNSI
LRKQMAvKKyLNSILN	LRKQMAvKKyLNSIL	LRKQMAvKKyLNSI
RKQMAvKKyLNSILN	RKQMAvKKyLNSIL	RKQMAvKKyLNSI
KQMAvKKyLNSILN	KQMAvKKyLNSIL	KQMAvKKyLNSI
QMAvKKyLNSILN	QMAvKKyLNSIL	QMAvKKyLNSI
MAvKKyLNSILN	MAvKKyLNSIL	MAvKKyLNSI
AvKKyLNSILN	AvKKyLNSIL	AvKKyLNSI

——选择以下氨基酸序列作为促生长素抑制素的片段、部分序列、衍生物或类似物:

AGCKNFFwKTFTSC	AGcKNFFwKTFTSC
AGCKNFFwKTFTSc	AGcKNFFwKTFTSc
CKNFFwKTFTSC	cKNFFwKTFTSC
fFYwKVFT	
fCFwKVCT	fcFwKVCT
fCYwKVCT	fcYwKVCT
fCFwKTCT	fcFwKTCT
fCYwKTCT	fcYwKTCT
D-NaI-CYwKVC	D-NaI-cYwKVC
fCywK-Abu-C-NaI	fcywK-Abu-C-NaI

——选择以下氨基酸序列作为神经降压肽的片段、部分序列、衍生物或类似物：

	pGlu-LYQNKPRRPFIL	pGlu-LYENKPRRPYI	
pGlu-LYENKPRRPyIL	pGlu-LYQNKPRRPfIL	pGlu-LYENKPRRPY	
pGlu-LYQNKPRRPYIL	pGlu-LYENKPRRPWIL	pGlu-LYENKPRRP	
pGlu-LYQNKPRRPyIL	pGlu-LYENKPRRPwIL	pGlu-LYENKPRR	
pGlu-LYENKPRRPFIL	pGlu-LYQNKPRRPWIL	pGlu-LYENKPR	
pGlu-LYENKPRRPfIL	pGlu-LYQNKPRRPwIL	pGlu-LYENKP	
NKPRRPYIL	NKPRRPyIL	NKPRRPfIL	NKPRRPwIL
KPRRPYIL	KPRRPyIL	KPRRPfIL	KPRRPwIL
PRRPYIL	PRRPyIL	PRRPfIL	PRRPwIL
RRPYIL	RRPyIL	RRPfIL	RRPwIL

通式 I 的术语包括氨基酸序列的常规语言。N-端总是在左侧，而 C-端总是在右侧（根据  $H-(X)_m-OH$  未被取代，或者为酰胺时， $H-(X)_m-NH_2$ ）。所用氨基酸的单个字母缩写参见 M. Bodanszky, Peptide Chemistry - A Practical Textbook, 第 2 版, Springer-Verlag Heidelberg 1993, 第 3 页。大写字母表示具有 L-构型的氨基酸（天然氨基酸），小写字母代表 D-氨基酸，二硫键（环肽）用相应字母之间的连线表示（C=半胱氨酸或高半胱氨酸）。逆合成的序列是表示，在合成中，与给定的天然序列相比氨基酸的序列被颠倒，也就是说，合成由原始 N-端氨基酸开始，并产生直至原始 C-端氨基酸的序列。

VIP 的类似物使用取代分析来测定（见实施例 43）。特别优选的 VIP 类似物是以下化合物：



His-Trp-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-  
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 1)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Phe-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-  
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 2)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Lys-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-  
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 3)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Gln-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-  
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 4)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Arg-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-  
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 5)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Trp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-  
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 6)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Arg-Arg-Leu-Arg-  
Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 7)

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-  
Lys-Gln-Met-Arg-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn  
(SEQ ID NO: 8).

与放射标记的物质相比，根据本发明的物质具有各种优点。荧光染料可随时按需要激发以发射荧光。不存在连续的信号，其使用具有相应半衰期的分解作用作为基础。因此，可随时根据需要选择诊断时间，并可经常根据需要重复，而且不会受到同位素半衰期的限制。患者不暴露



于任何离子辐射中，而且所使用的光辐射在所用剂量下是无害的。光学检测技术使得检测达到几个光子的高灵敏度，而且因此在灵敏度方面可与放射诊断相媲美。

已有人描述了使用染料生物分子结合物通过近红外辐射（NIR 辐射）进行诊断的方法（WO 96/17628）。已证明本发明特别有利的是用自动固相合成法能够以有利的产率和高纯度制备肽结合物。足以令人惊奇地发现，可使用各种携带羧基的茚菁化合物作为氨基酸类似物，而且赖氨酸的 N-端基团和氨基都可偶联在固相（树脂）上。在断裂树脂并进行色谱纯制后，所得的染料-肽结合物具有大于 95% 的纯度。新的偶联方法能够使卤代酰基染料偶联在氨基酸半胱氨酸或高半胱氨酸上，它们可替换天然 VIP 序列的任何氨基酸。

在使用用于激发荧光的光时，基础问题是光的有限穿透深度，其在 VIS 时低于几毫米，但是在 NIR 时可为数厘米。对于穿透深度，在表面组织疾病以及软组织时，检测法没有任何问题。因此，本发明的主题是乳房 X 射线照相法，其中使用根据本发明的化合物通过检测荧光或者未吸收的辐射诊断患病组织。本发明更具体的主题是根据本发明的化合物在内窥镜检查法中的应用，所述内窥镜检查法例如是结肠镜、支气管镜、食管内窥镜，其中诊断接近表面的组织中的变化。在内窥镜诊断中通常使用白光进行直接肉眼观察。根据本发明的化合物通过产生组织特异性的信号，特别是在诊断早熟但不可肉眼检测的组织变化（如结肠发育异常）时，对诊断方法具有决定性的改善。

现已发现，在患有化学诱导的发育异常及结肠癌的大鼠的肠道中雾化根据本发明的偶联染料的化合物后，随后冲洗并实施内窥镜荧光诊断（激发 740 nm，在 760 nm 以上检测），使得可以检测结肠中荧光增加的组织区域。

因此，本发明的主题还在于使用根据本发明的化合物进行内窥镜荧

光诊断的方法，特别是用于诊断胃肠道。在此情况下，优选静脉、或者通过雾化局部地向组织输送一种或多种物质，并照射相应光谱范围的光以电子激发所用的染料。记录反射的荧光辐射或者由染料发射出的荧光辐射。优选的方法是，在大的表面范围照射组织，并通过 CCD 照相机成像局部解析荧光辐射，或者用光导纤维对待成像的组织区域进行光栅扫描，然后用计算机处理所得的信号并处理成合成图象。在此情况下，光谱和/或相选择性以及以静态和/或时间分辨方式检测并评估荧光。所得的荧光图象可与白光图象同时产生，而且在一个图中相互叠加产生用于数据评估。

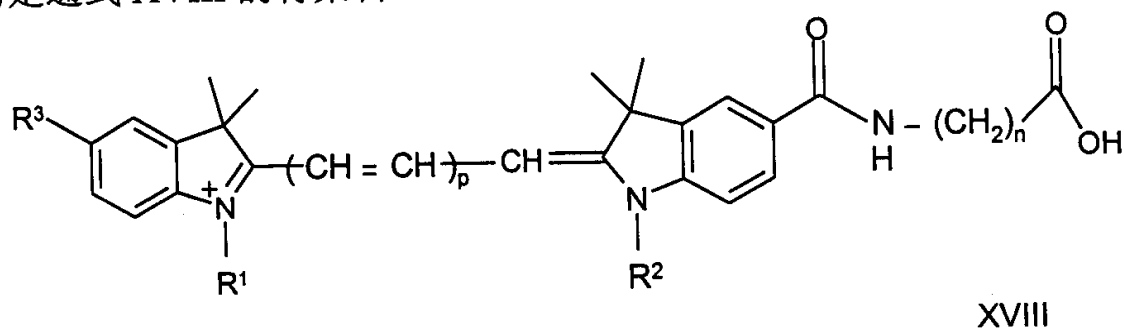
根据本发明的化合物的合成可类似于文献中已知的方法进行。在聚合物树脂中以固相合成法制备肽。具体细节对于本领域技术人员是已知的。文献：Peptide Chemistry – A Practical Textbook (M. Bodanszky), 第 2 版, Springer-Verlag Heidelberg 1993; Anti-Cancer Drug Design 12, 145-167, 1997; J. Am. Chem. Soc. 117, 11821-2, 1995。

染料是单独制备的，然后作为肽的固相合成的一部分，将染料偶联在肽上，接着从树脂上断裂并纯制，由此得到根据本发明的化合物。优选的是那些包含羧基的染料，其在用常规试剂活化后偶联在肽的氨基上，特别是赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基或者 N-端肽氨基。另外，含有卤烷基或卤酰基的染料优选偶联在肽的硫醇基上，特别是氨基酸半胱氨酸或高半胱氨酸。

合成多亚甲基染料的文献：Bioconjugate Chem. 4, 105-111, 1993; Bioconjugate Chem. 7, 356-62, 1996; Bioconjugate Chem. 8, 751-56, 1997; Cytometry 10, 11-19, 1989 和 11, 418-30, 1990; J. Heterocycl. Chem. 33, 1871-6, 1996; J. Org. Chem. 60, 2391-5, 1995; Dyes and Pigments 17, 19-27, 1991; Dyes and Pigments 21, 227-34, 1993; J. Fluoresc. 3, 153-55, 1993; Anal. Biochem. 217, 197-204, 1994; US 4981977; US 5688966; US 5808044;

WO 97/42976; WO 97/42978; WO 98/22146; WO 98/26077; EP 0800831。

仅包含一个羧基的染料特别适合于在固相中偶联在肽上，特别有利的是通式 XVIII 的菁染料：



其中

p 代表 1、2 或 3，

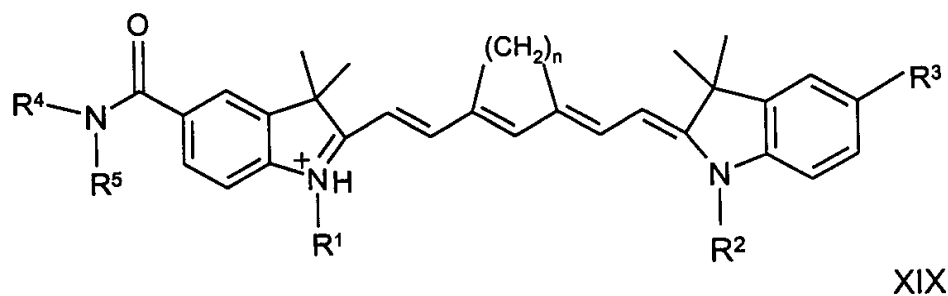
n 代表 1、2、3、4 或 10，

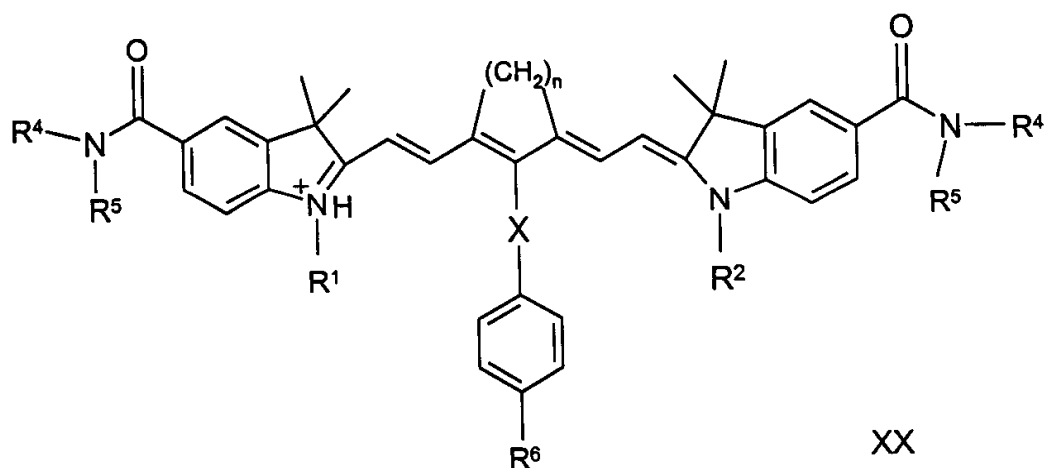
R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 相互独立地代表 4-磺基丁基、3-磺基丙基、2-磺基乙基、3-甲基-3-磺基丙基、甲基、乙基、或丙基，而

R<sup>3</sup> 代表氢或者基团 -COOE<sup>1</sup>、-CONE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>、-NHCOE<sup>1</sup>、-NHCONHE<sup>1</sup>、-NE<sup>1</sup>E<sup>2</sup>、-OE<sup>1</sup>、-OSO<sub>3</sub>E<sup>1</sup>、-SO<sub>3</sub>E<sup>1</sup>、-SO<sub>2</sub>NHE<sup>1</sup>，其中

E<sup>1</sup> 和 E<sup>2</sup> 相互独立地代表氢原子、或者代表甲基或乙基或者 C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 烷基，该烷基可插入 0-2 个氧原子和/或 0-1 个羰基，和/或被 0-5 个羟基取代；

或者通式 XIX 或 XX 的菁染料：





其中

$n$  代表 2 或 3,

$R^1$  和  $R^2$  相互独立地代表 4-磺基丁基、3-磺基丙基或 2-磺基乙基,

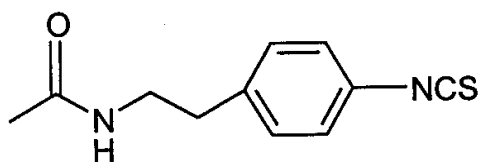
$R^3$  代表  $-\text{COOH}$  基团或者以下基团中的一种:

$-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ , 其中  $n=2$  或 3,

$-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NCS}$ , 其中  $n=2$  或 3,

$-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{NHCO}-\text{CH}_2-\text{X}^1$ , 其中  $n=2$  或 3, 而  $\text{X}^1=\text{Cl}$ 、

$\text{Br}$ 、 $\text{I}$ ,



$R^4$  和  $R^5$  相互独立地代表氢原子、甲基或羟基化烷基, 如 2-羟基乙基、3-羟基丙基、2, 3-二羟基丙基、1, 3-二羟基-2-丙基、2, 3, 4-三羟基丁基、1, 3, 4-三羟基-2-丁基、2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基,

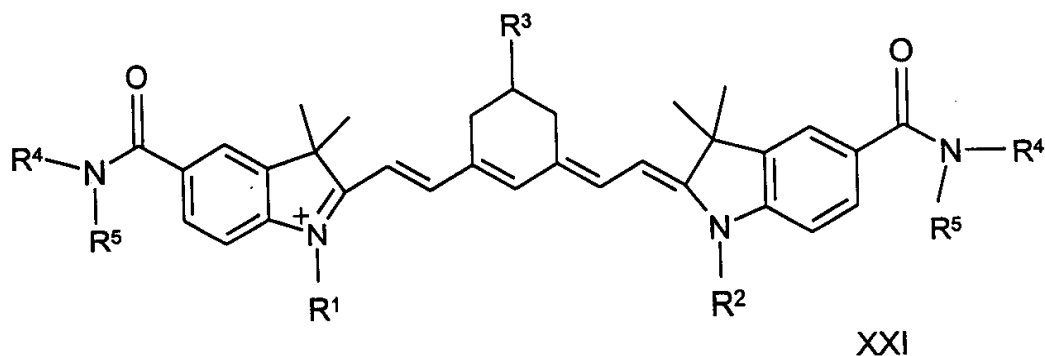
$R^6$  代表以下基团中的一种:

$-(\text{CH}_2)_m-\text{COOH}$ , 其中  $m=0-2$ ,

$-(\text{CH}_2)_m-\text{NCS}$ , 其中  $m=0-2$ , 而

$\text{X}$  代表氧原子或硫原子;

或者通式 XXI 的菁染料:



其中

$R^1$  和  $R^2$  相互独立地代表 4-磺基丁基、3-磺基丙基或 2-磺基乙基,

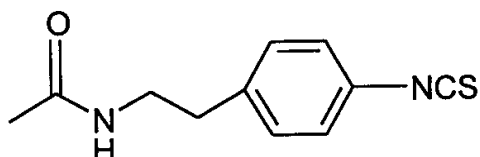
$R^3$  代表  $-COOH$  基团或者以下基团中的一种:

$-CONH-(CH_2)_n-COOH$ , 其中  $n=2$  或  $3$ ,

$-CONH-(CH_2)_n-NCS$ , 其中  $n=2$  或  $3$ ,

$-CONH-(CH_2)_n-NHCO-CH_2-X^1$ , 其中  $n=2$  或  $3$ , 而  $X^1=Cl、$

$Br、I、$



$R^4$  和  $R^5$  相互独立地代表氢原子、甲基或羟基化烷基, 如 2-羟基乙基、3-羟基丙基、2, 3-二羟基丙基、1, 3-二羟基-2-丙基、2, 3, 4-三羟基丁基、1, 3, 4-三羟基-2-丁基、2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基。

仅一个可活化基团如羧基或者已经活化的基团如异硫氰酸酯、卤烷基或卤酰基的优点在于, 可进行化学上均匀的偶联。卤酰基具有特别的优点, 即、能够化学均匀地偶联在半胱氨酸或高半胱氨酸的巯基上。该偶联可在溶液中实施在已脱除保护基且未键合的肽上。通过活化基团,

在偶联于肽上时有可能不发生副反应。为增加水溶解度，染料中的肽-染料结合物具有更多的羟基数量。通过在染料的吡啶系统中定位连接基，另外在吡啶系统的氮原子上还可通过包含磺酸基的基团产生足够的亲水性。其结果是，可用肽进行结构均匀的偶联反应（见实施例 4-38 和 44-49）。

本发明的另一个主题是用于体内诊断患病组织区域的光诊断剂，其特征在于包含至少一个通式 I 的化合物以及常规辅剂和/或载体及稀释剂。

以下实施例用于解释本发明。

### 实施例 1-3: 合成用于固相合成偶联于肽的氨基（N-端或 $\epsilon$ -赖氨酸）上的茚菁（indocyanine）染料 1-3

该合成总地是由 1-(4-磺基丁基)-2,3,3-三甲基-3H-假吡啶和 1-(4-磺基丁基)-2,3,3-三甲基-5-羧基-3H-假吡啶起始（Cytometry 10, 11-19, 1989; Talanta 39, 505-510, 1992）。

#### 实施例 1: 合成 1,1'-二(4-磺基丁基)茚菁-5-羧酸钠盐 (1)

将 0.8 g (4.0 mmol) 的 N,N-二苯基甲脒引入至 15 ml 乙酸酐中，并在室温下分批地与 1.4 g (4.2 mmol) 的 1-(4-磺基丁基)-2,3,3-三甲基-5-羧基-3H-假吡啶混合，在 120°C 下搅拌 30 分钟，然后用水浴冷却至室温。接着添加 1.2 g (4.1 mmol) 的 1-(4-磺基丁基)-2,3,3-三甲基-3H-假吡啶、1.2 g (14.6 mmol) 的无水乙酸钠、15 ml 的乙酸酐和 6 ml 的乙酸。反应混合物加热 1 小时至 120°C，然后冷却暗红色的溶液，并与 100 ml 的乙醚混合。抽滤出沉淀固体。在 RP 硅胶 EUROPREP 60-30 C18, 60A, 20-45 m 上进行色谱纯制（洗脱剂：水/MeOH, 0-70%MeOH 的梯度）。在旋转蒸发器中从包含



该合成是如下进行的：用  $\beta$ -丙氨酸-叔丁基酯使染料 1-3 酰胺化，然后断裂叔丁基酯基。

0.5 mmol 的染料 1-3 和 0.1 g (1.0 mmol) 的三乙胺在 20 ml 二甲基甲酰胺中的溶液在 0°C 下与 0.5 mmol 的 TBTU 于 10 ml 二甲基甲酰胺中的溶液混合，然后在 0°C 下搅拌 15 分钟。接着滴加 0.11 g (0.6 mmol) 的  $\beta$ -丙氨酸-叔丁基酯盐酸盐和 0.6 mmol 的三乙胺在 5 ml 二甲基甲酰胺中的溶液，并在室温下搅拌反应混合物 2 小时。添加 100 ml 的乙醚，然后抽滤沉淀的固体，溶解在 20 ml 的二氯甲烷中，与 10 ml 的三氟乙酸混合，并在室温下搅拌 24 小时。真空蒸发浓缩混合物，然后如实施例 1 对残留物进行色谱纯化和冻干，产量：0.21 g (58%) 的 4，0.29 g (76%) 的 5，0.28 g (72%) 的 6。

**实施例 7-9：**由 1-3 合成用于固相合成偶联于肽的氨基（N-端或  $\zeta$ -赖氨酸）上的茚菁染料 7-9

制备方法类似于实施例 4-6，其中使用 0.1 g (0.6 mmol) 的甘氨酸-叔丁基酯盐酸盐，产量：0.25 g (68%) 的 4，0.30 g (80%) 的 5，0.32 g (83%) 的 6。

**实施例 10-12：**由 1-3 合成用于通过偶联在半胱氨酸的巯基上而固相合成偶联于肽上的茚菁染料 10-12

该合成是如下进行的：用 3-氨基丙醇使染料 1-3 酰胺化，然后将醇基转化为溴化物。

在 0°C 下使 0.5 mmol 染料 1-3 和 0.1 g (1.0 mmol) 三乙胺在 20 ml 二甲基甲酰胺中的溶液与 0.5 mmol 的 TBTU 在 10 ml 二甲基甲酰胺中的溶液混合，然后在 0°C 下搅拌 15 分钟。接着滴加 850 mg (1.2 mmol) 3-氨基丙醇和 1.2 mmol 三乙胺在 5 ml 二甲基甲酰胺中的溶液，并在室

温下搅拌反应混合物 6 小时。添加 100 ml 的乙醚，然后如实施例 1 所述过滤出沉淀固体，进行色谱纯制并冻干。

在 4°C 下于 4 ml 二甲基甲酰胺和 4 ml 二氯甲烷的混合物中搅拌 0.3 mmol 中间产物与 55 mg (0.5 mmol) 的 N-溴代琥珀酰亚胺和 130 mg (0.5 mmol) 三苯基磷混合，由此进行形成溴化物 10-12 的反应。添加 3 ml 的乙醚，沉淀出产物，过滤，并用作肽偶联反应中的粗产物。

### 实施例 14-16 和 18-27: 树脂合成 VIP-受体结合肽与染料 1-9 和 13 的肽结合物

#### a) 固相肽合成

根据 Fmoc 策略并类似于标准 Fmoc 机器方案 (Pept. Res., 36 (1990) 225)，在 50  $\mu$  mol 的 TentaGel-Sram 树脂 (Rapp Polymers, Tuebingen) 中合成肽，其中使用偶联剂 PyBOP (苯并三唑-1-基氧基-三吡咯烷基六氟磷酸磷) 和 N-甲基吗啉。使用以下侧链保护基：对于 Cys、His、Asn 和 Gln 用三苯甲基；对于 Asp、Glu、Ser 和 Thr 用叔丁基；对于 Lys 和 Trp 用叔丁氧基羰基；而对于 Arg 用五甲基苯并二氢吡喃磺酰基。

用正交保护基方法实现偶联于赖氨酸的  $\epsilon$ -氨基上 (实施例 24)。作为赖氨酸组分，使用 Fmoc-赖氨酸 (Dde-OH)，而肽如上所述进行合成。在使 N-端酰化后，用 3% 胍水合物选择性地断裂 Dde-保护基。

#### b) 染料偶联

染料连接在 N-端部分中或者仍为固相键合的肽中的赖氨酸上。在此方面，在 600  $\mu$  l 二甲基甲酰胺中溶解 75  $\mu$  mol 的各染料 1-9 和 13 (1.5 eq)，然后与 83  $\mu$  mol 的 TBTU (2-(1H-苯并三唑-1-基)-1, 1, 3, 3-四甲基四氟硼酸尿) 及 150  $\mu$  mol 的 N, N-二异丙基乙基胺混合。2 分钟后，将该反应混合物添加在携带各种肽的树脂中，并反应过

夜。用二甲基甲酰胺洗涤树脂 5 次，并用二氯甲烷洗涤 3 次，然后在空气中干燥。

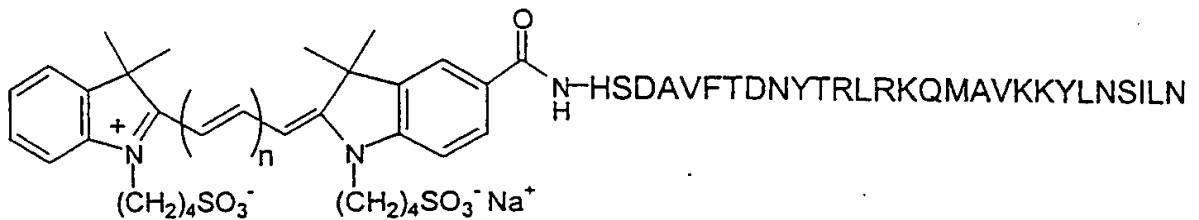
c) 保护基断裂以及脱掉染料-肽结合物

将 1.5 ml 由 750 mg 苯酚、250 μl 乙烷二硫醇、500 μl 硫代苯甲醚和 500 μl 水在 10 ml 三氟乙酸中组成的混合物分别添加在携带肽-结合物的树脂中，并反应 4 小时。染料-肽结合物用冷的叔丁基甲基醚沉淀，用冷的乙醚洗涤 6 次，溶解在 5% 乙酸中，然后冻干。在 Vydac-C18 柱中用 RP-HPLC 进行结合物的纯度分析及纯制（梯度：水+0.05% TFA/乙腈，5%—60% 乙腈，20 分钟，检测 214 和 750 nm）。

所合成的染料-肽结合物的结构如下所示。

与 VIP-受体结合肽 I 的染料结合物

实施例 14-16: 染料 1-3 与 VIP (1-28) 的结合物

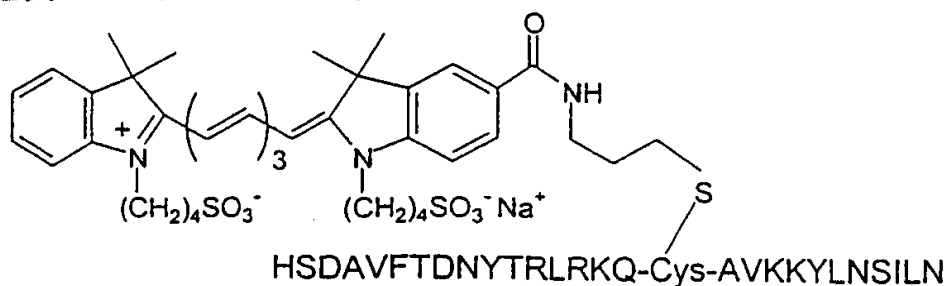


n=1: 茛炭菁-VIP (1-28) 结合物 14

n=2: 茛二炭菁-VIP (1-28) 结合物 15

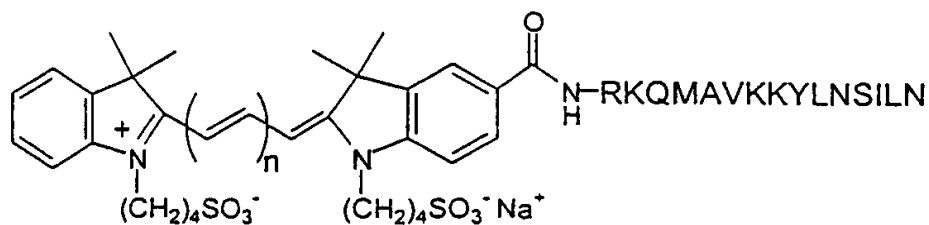
n=3: 茛三炭菁-VIP (1-28) 结合物 16

实施例 17: 染料 12 与 Cys<sup>17</sup>-VIP (1-28) 的结合物



茛三炭菁-Cys<sup>17</sup>-VIP (1-28) 结合物 17

实施例 18-20: 染料 1-3 与 VIP (14-28) 的结合物

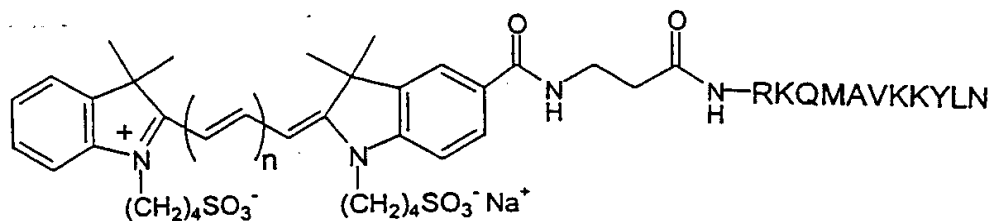


n=1: 茛炭菁-VIP (14-28) 结合物 18

n=2: 茛二炭菁-VIP (14-28) 结合物 19

n=3: 茛三炭菁-VIP (14-28) 结合物 20

实施例 21-23: 染料 4-6 与 VIP (14-24) 的结合物



n=1: 茛炭菁-β-丙氨酸-VIP (14-24) 结合物 21

n=2: 茛二炭菁-β-丙氨酸-VIP (14-24) 结合物 22

n=3: 茛三炭菁-β-丙氨酸-VIP (14-24) 结合物 23

实施例 17: 树脂合成由 VIP-受体结合肽与染料 10-22 组成的肽结合物

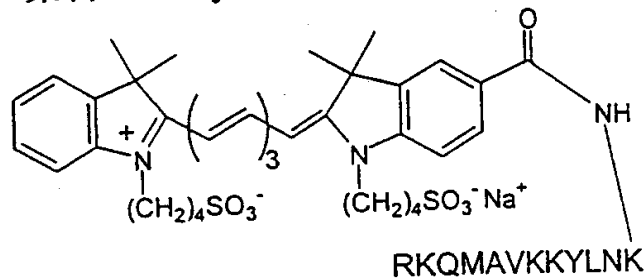
为通过硫醚键将携带溴化物的染料 10-22 化学选择性地连接在肽上, 必须在肽中插入具有正交保护基的半胱氨酸或者高半胱氨酸。如实

施例 14-16/18-27 所述进行固相肽合成, 并使用成分 Fmoc-cys(Mmt)-OH。在二氯甲烷中用 1%TFA/5%三异丙基硅烷可断裂单甲氧基三苯甲基 (Mmt), 同时得到其他侧链保护基。在此方面, 用 1 ml 上述溶液分别与树脂温育 10 分钟, 共三次。用二氯甲烷 (3×)、DMF (5×) 和乙醇 (3×) 洗涤树脂后, 树脂与 20%碳酸铯溶液 (1 ml) 温育 2 分钟, 用水 (2×)、乙醇 (2×) 和 DMF (2×) 洗涤。将 75 μmol 的各染料 10-22 (1.5 eq) 溶解在 600 μl 二甲基甲酰胺中, 然后添加在各树脂中, 并重复该步骤 30 分钟。树脂用二甲基甲酰胺 (5×) 和二氯甲烷 (2×) 洗涤 5 次。在空气中干燥树脂后, 如上所述断裂保护基并脱掉载体。

其他合成的染料-肽结合物的结构都如下所示。

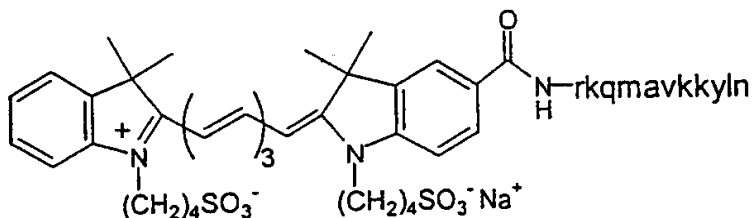
与 VIP-受体结合肽 II 的染料结合物

**实施例 24: 染料 6 与 Lys<sup>25</sup>-VIP (14-25) 的结合物**



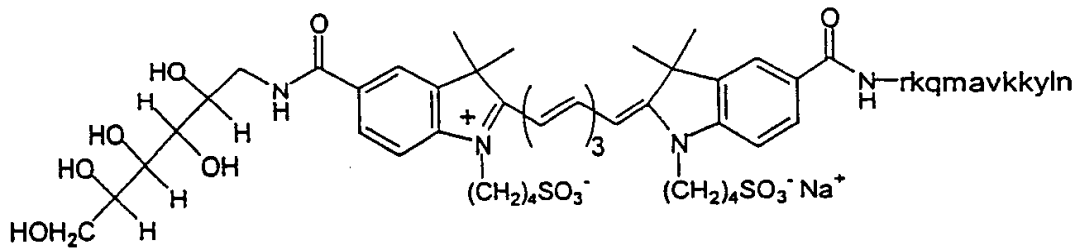
(ε-氨基-茚三炭菁)-Lys<sup>25</sup>-VIP (14-25) 结合物 24

**实施例 25: 染料 3 与 D-VIP (14-24) 的结合物**



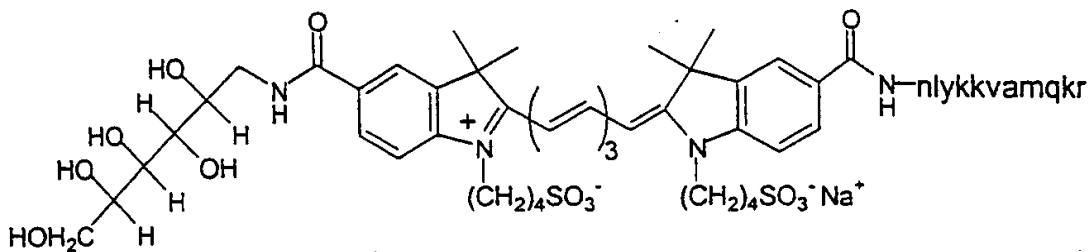
茚三炭菁-D-VIP (14-24) 结合物 25

实施例 26: 染料 13 与 D-VIP (14-24) 的结合物



葡三炭菁-5-羧酸葡糖酰胺-D-VIP (14-24) 结合物 26

实施例 27: 染料 13 与逆-D-VIP (14-24) 的结合物



葡三炭菁-5-羧酸葡糖酰胺-逆-D-VIP (14-24) 结合物 27

实施例 28-32: 树脂合成由促生长素抑制素-受体结合肽与染料 1-9 及 13 组成的肽结合物

总的指示

在 500 mg 的 TCP-Thr (But)-fmoc-树脂 (Pepchem Tuebingen Company) 上进行合成, 该树脂的浓度为 0.49 mmol/g。使用以下临时保护基“逐步”合成肽: 对于 Thr 和 Ser 用叔丁基, 对于 Cys 和 Asp 用三苯甲基, 对于 Trp 和 Lys 用 Boc。作为缩合试剂, 可使用 HBTU。

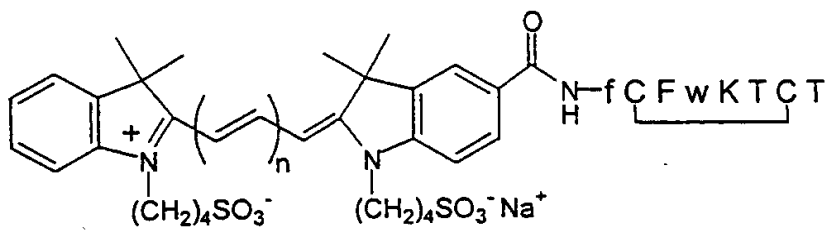
断裂 N-端 Fmoc 保护基后, 在特殊的合成步骤中缩合染料 1-9、13。为此目的, 将 255 mg 的树脂悬浮于约 2 ml 的 DMF 中, 并与 0.5 mmol 的染料、0.5 mmol 的 HBTU 和 0.17 ml 的 DIEA 混合。在室温下搅拌 18 小时, 抽滤树脂, 用二氯甲烷洗涤, 然后干燥。用 95% 三氟乙酸以及三异丙基硅烷, 并随后由 10% 乙酸中冻干, 由此从树脂上断裂染料一

肽结合物。粗产物用活性炭环化，并进行色谱纯制（50×300 mm VYDAC RP-18，梯度：水/乙腈）。

所合成的染料-肽结合物的结构如下所示。

染料与促生长素抑制素-受体结合肽的结合物

**实施例 28-30 染料 1-3 与 pentetreotide 的结合物**

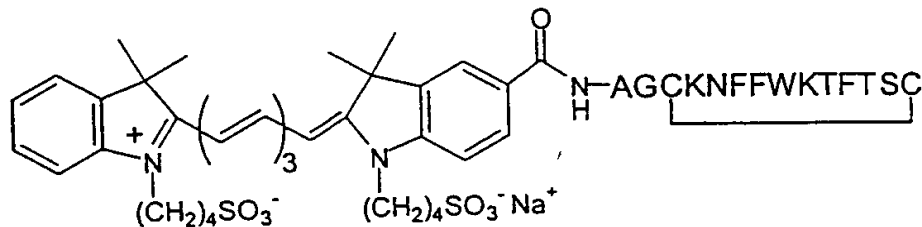


n=1: 茛炭菁-pentetreotide 28

n=2: 茛二炭菁-pentetreotide 29

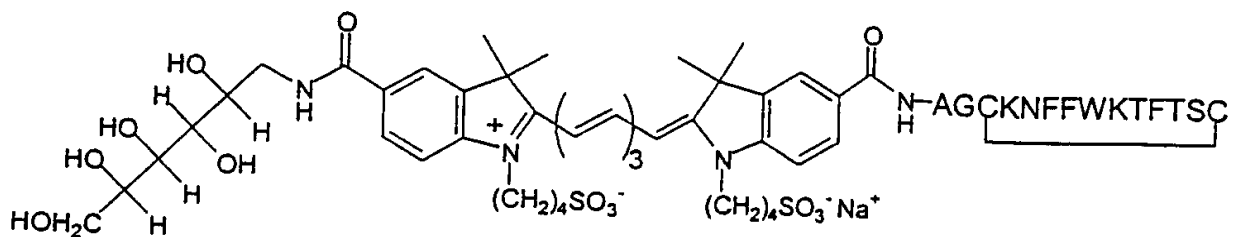
n=3: 茛三炭菁-pentetreotide 30

**实施例 31: 染料 3 与促生长素抑制素-14 的结合物**



茛三炭菁-促生长素抑制素-14 结合物 31

**实施例 32: 染料 13 与促生长素抑制素-14 的结合物**



茛三炭菁-5-羧酸-葡糖酰胺-促生长素抑制素-14 结合物 32

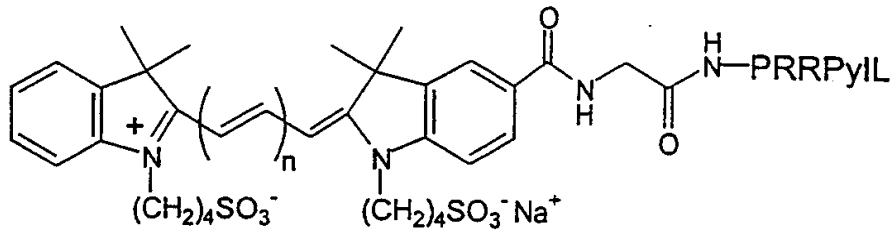
实施例 33-38: 合成由神经降压肽与染料 3 组成的肽结合物

类似于实施例 14-27 中描述的总方案进行所述物质的合成。

所合成的染料-肽结合物的结构如下所示。

染料与神经降压肽-受体结合肽的结合物

实施例 33-35: 染料 7-9 与 D-Tyr<sup>11</sup>-神经降压肽 (7-13) 的结合物

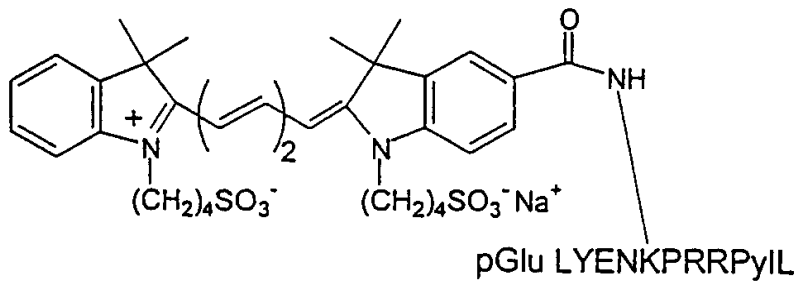


n=1: 茛炭菁-D-Tyr<sup>11</sup>-神经降压肽 (7-13) 结合物 33

n=2: 茛二炭菁-D-Tyr<sup>11</sup>-神经降压肽 (7-13) 结合物 34

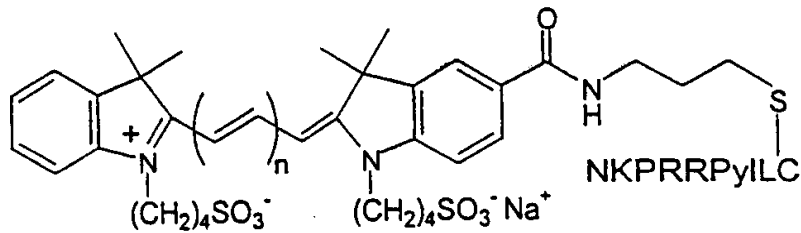
n=3: 茛三炭菁-D-Tyr<sup>11</sup>-神经降压肽 (7-13) 结合物 35

实施例 36: 染料 2 与 D-Tyr<sup>11</sup>-神经降压肽的结合物



(ε-氨基-Lys<sup>6</sup>-茛二炭菁)-D-Tyr<sup>11</sup>-神经降压肽结合物 36

实施例 37-38: 染料 10-11 与 D-Tyr<sup>11</sup>-神经降压肽 (5-13) -Cys 的结合物



$n=1$ : 茛炭菁-D-Tyr<sup>11</sup>-神经降压肽(5-13)-Cys 结合物 37

$n=2$ : 茛二炭菁-D-Tyr<sup>11</sup>-神经降压肽(5-13)-Cys 结合物 38

### 实施例 39: 所合成的染料-肽结合物的吸收及荧光性质

在 PBS 和牛血浆 (Perkin Elmer Lambda 2) 中测定最大吸收和消光系数。在 PBS 中通过在短链侧激发得到荧光发射光谱 (距最大吸收为约 40 nm)。

吸收及荧光数据总结于图 4 中。在图 5 中, 以实施例的方式给出了典型的吸收及荧光发射光谱。

### 实施例 40: 使用荧光显微镜测定细胞成像

在人肿瘤细胞中于体外研究根据本发明的化合物的结合及成像, 并表达血管活性肠肽和/或促生长素抑制素和/或神经降压肽的受体。为此目的, 在 1.5 ml 包含测试物质的培养基中培养  $5 \times 10^5$  个细胞肿瘤。使用不同浓度的物质 (10 nM-10  $\mu$ M), 而且培养时间也是变化的 (1 分钟-24 小时)。培养后, 使细胞沉降, 并制备显微镜制剂。在 Zeiss Axiovert 135-荧光显微镜上进行评估, 该荧光显微镜装备有 Cy7- (激发器 HQ 710/70 nm, 发射器 810/90 nm, 分光器 750 nm LP)、Cy5- (激发器 575-625 nm, 发射器 660-710 nm BP, 分光器 645 nm) 和 Cy3-滤光器 (激发器 546/12 nm, 发射器 590 nm LP, 分光器 580 nm)。所有制剂中, 用 CCD-照相机 (Visitron RTE/CCD-576) 记录白光和荧光图象并进行数字储存。

如下描述所选择的结果：

与  $10\ \mu\text{M}$  茛三炭菁-VIP (1-28) 结合物 16 培养 30 分钟后建立 HT29 细胞的显微镜白光和荧光图象 (Cy7-滤光器)。在荧光图象中，检测到在所有细胞上分散非常均匀的荧光。另外，信号增加的区域是可见的，这有可能是与血管腔有关。荧光图象中的细胞在它们的空间扩展方面与白光图象是相关联的。

用以下化合物，通过类似的方法得到白光和荧光图象 (Cy7-滤光器)：

茛三炭菁-VIP (14-28) 结合物 20,  $10\ \mu\text{M}$ , HT29 细胞。荧光均匀地分散在细胞上，与白光图象良好关联。

茛三炭菁-逆-D-VIP (24-14) 结合物 25,  $10\ \mu\text{M}$ , HT29 细胞。荧光均匀地分散在细胞上，与白光图象良好关联。

茛三炭菁-pentetreotide 结合物 30,  $10\ \mu\text{M}$ , RIN38-VIP1 细胞。在细胞的膜区域中荧光具有血管图形，与白光图象良好关联。

另外，用以下化合物通过类似的方法得到荧光图象 (一氨基-茛三炭菁) -Lys<sup>25</sup>-VIP (14-25) 结合物 24,  $10\ \mu\text{M}$ , RIN38-VIP1 细胞, Cy7-滤光器。荧光图象是均匀的、细胞内近核荧光。

茛二炭菁-VIP (1-28) 结合物 15,  $10\ \mu\text{M}$ , RIN38-VIP1 细胞, Cy5-滤光器。荧光图象显示细胞内荧光区域，在细胞的膜区域中具有血管图形。

茛炭菁-VIP (1-28) 结合物 14,  $10\ \mu\text{M}$ , RIN38-VIP1 细胞, Cy3-滤光器。荧光图象显示细胞内荧光区域，在细胞的膜区域中具有血管图形。

#### 实施例 41：使用体内荧光成像在携带肿瘤的小鼠中研究肿瘤浓度

在携带肿瘤的裸鼠中注射后体内研究根据本发明的化合物的成像性

质。为此目的，静脉注射  $0.1-2 \mu\text{mol/kg}$  的测试物质，然后在  $0-48$  小时的时间段中观察肿瘤区域中的浓度。用波长为  $640 \text{ nm}$ （茛三炭菁）或  $740 \text{ nm}$ （茛三炭菁）的近红外光照射动物，由此激发物质的荧光，所述近红外光是由 Nd:YAG 激光产生的。用增强型 CCD 照相机在大于  $700 \text{ nm}$  但小于  $800 \text{ nm}$  的波长范围内检测荧光辐射，并数字储存荧光图象。

如下描述结果：

在携带肿瘤的裸鼠（右后肋中的 HT29 肿瘤）中，在给药  $0.1 \mu\text{mol/kg}$  的茛三炭精-VIP（14-28）结合物 20 之前以及之后 1 小时记录整个身体的荧光图象。给药前的荧光强度是可以忽略的（低自体荧光）。给药 1 小时后，在荧光发射中，相对于对侧肋在肿瘤中产生强度增加约 2 倍的信号，而此等发射则均匀地分散在身体的其余部分中。

在携带肿瘤的裸鼠（右后肋中的 RIN38-SSTR2 肿瘤）中，在给药  $0.1 \mu\text{mol/kg}$  的茛三炭精-pentetreotide 结合物 30 之前以及之后 1 小时记录整个身体的荧光图象。给药前的荧光强度是可以忽略的（低自体荧光）。给药 1 小时后，在荧光发射中，相对于对侧肋在肿瘤中产生强度增加约 3 倍的信号，而此等发射则均匀地分散在身体的其余部分中。

在携带肿瘤的裸鼠（右后肋中的 HT29 肿瘤）中，在给药  $0.1 \mu\text{mol/kg}$  的（ $\epsilon$ -氨基-茛三炭精）-Lys<sup>25</sup>-VIP（14-25）结合物 24 之前以及之后 1 小时记录整个受体的荧光图象。给药前的荧光强度是可以忽略的（低自体荧光）。给药 1 小时后，在荧光发射中，相对于对侧肋在肿瘤中产生强度增加约 1.5 倍的信号。另外，在肾脏中检测到增强的荧光信号。

在携带肿瘤的裸鼠（右后肋中的 HT29 肿瘤）中，在给药  $0.2 \mu\text{mol/kg}$  的茛二炭精-VIP（1-28）结合物 15 之前以及之后 5 分钟记录整个受体的荧光图象。给药前的荧光强度是可以忽略的（低自体荧光）。给药

1 小时后，在荧光发射中，相对于对侧肋在肿瘤中产生强度增加约 1.4 倍的信号。另外，在肾脏中检测到增强的荧光信号。

#### 实施例 42：染料-肽结合物在牛血浆中的稳定性研究

使用 HPLC 研究根据本发明的化合物随时间在血浆中的化学稳定性。为此目的，用移液管量取 1 mM 的肽 PBS 溶液在牛血浆（Graeber Company，冷冻，用于肝素分析）中，同时得到 30  $\mu$  M 的浓度，然后在 37°C 温育该溶液。

在各种时间（0.5、1、2、4、6、24 小时）处，1 ml 血浆溶液用 1 ml 甲醇混合，由此对样品进行处理，然后离心沉淀的蛋白。

使用 HPLC 分析上清液，其中在 750 nm 处测定相对于 0°C 下温育 1 分钟后的含量（对照）的含量。

HPLC：Beckmann，二极管阵列检测器 TIDAS（J & M Company），350—1000 nm；

柱：Chromasil 5  $\mu$ ，250 mm  $\times$  4.5 mm；

流动溶剂：A：90% 水（+0.5% TFA）/ 10% 甲醇

B：10% 水（+0.5% TFA）/ 90% 甲醇

梯度：10% B — 100% B，20 分钟内

实施例总结于图 6 中。

#### 实施例 43：使用斑点合成进行 VIP 的取代分析

##### 1、在纤维素上合成肽

在纤维素上合成肽（斑点合成）首次由 R. Frank 和 R. Doering 于 1988 年公开，其细节描述在 R. Frank<sup>1</sup>（1992）中。在此，使用 AG Schneider-Mergener 确立的方法<sup>2</sup>。

纤维素膜进行化学改性，以对随后的肽合成形成合适的锚定功能。

在此情况下，在氨基官能化的纤维素膜（CAPE 膜）<sup>3</sup> 中插入巯基<sup>4</sup>。溴丙基酯形式的第一个氨基酸可偶联在该巯基上。接着，根据 Fmoc 策略可顺序地构建肽的所有氨基酸。最后，在肽的 N-端位置上连接茚二碳菁染料，并脱除所有的侧链保护基。

为能够研究用于受体结合的肽，肽必须从纤维素上脱掉。在此方面，所研制的方法是首先从纤维素上断裂具有真正 C-端的肽。

### 1a、纤维素膜的改性

- 20×30 mm 纤维素膜（Whatman 50）与甲醇/1.2%全氯乙酸温育 2 分钟，然后冻干。

- 在二恶烷/1.2%全氯乙酸中与 10%表溴醇温育 3 小时后，与甲醇反应 30 分钟，并用甲醇洗涤 2 次。

- 用二甲基甲酰胺（DMF）洗涤 3 次，然后与 50%的 1, 3-二氨基丙烷（v/v）在 DMF 中温育过夜。接着，如下进行洗涤：3×DMF，2×乙醇，2×蒸馏水，2×乙醇，15 分钟 5 M 甲醇钠，3×甲醇，4×蒸馏水，3×乙醇，1×乙醚。

### 1b、斑点的限定

- 对于斑点限定，在 15 分钟的反应时间处，在纤维素膜的某些点上用自动斑点机器人（auto-spot robot）222 XL（Abimed, Laugenfeld）双滴定 1.3 μl 的 0.6 M Fmoc-β-丙氨酸-Opfp 溶液。

- 膜用 2%乙酸酐溶液酰化 2 分钟，用 20%乙酸酐/10%二异丙基乙基胺酰化 30 分钟。

- 在断裂 Fmoc 保护基时，膜用 3×DMF 洗涤，与 20%哌啶溶液温育 10 分钟共 2 次，然后用 5×DMF 和 1×乙醇洗涤。用溴酚蓝可使游离氨基为可见的。用乙醇重复洗涤后，干燥膜。

### 1c、Mmt-巯基丙酸与溴丙基酯的偶联

- 0.6 M 的巯基丙酸在 15 分钟的反应时间处双滴定于限定的斑点中。然后用 3×DMF 和 3×二氯甲烷 (DCM) 洗涤。

- 与 10%二氯乙酸/0.5%三氟乙酸温育 2 分钟, 然后与 10%二氯乙酸/0.5%三氟乙酸/5%三异丁基硅烷温育 5 分钟共 3 次, 由此断裂 Mmt 保护基。进行以下洗涤步骤: 1×DCM, 2×乙醇, 1×蒸馏水, 用 10%碳酸铯 1—2 分钟, 1×蒸馏水, 2×乙醇, 1×乙醚。

- 在 0.6 M 的浓度和 15 分钟的反应时间, 偶联相应的 Fmoc-溴丙基-氨基酸酯。如 1b 所述断裂 Fmoc 保护基。

### 1d、氨基酸的偶联

- 在 N-甲基吡咯烷酮中重复移入 0.6 M 的氨基酸溶液, 并随后断裂 Fmoc 保护基, 由此构建肽。

### 1e、茚二炭菁染料的偶联

- 0.3 M 的茚二炭菁染料溶液用 0.3 M 的 TBTU 和 0.6 M 的二异丙基乙基胺活化, 然后在 15 分钟的反应时间处分 4 次移液至斑点。

### 1f、侧链保护基的断裂

- 随后如下处理膜以断裂侧链保护基: 90%三氟乙酸/3%三异丙基硅烷/2%蒸馏水/1%苯酚共 30 分钟, 然后 50%三氟乙酸/3%三异丙基硅烷/2%蒸馏水/1%苯酚共 2.5 小时。然后用 4×二氯甲烷、3×DMF、1×乙醇洗涤。

## 2、从纤维素膜上断裂肽

- 冲压掉斑点，用甲醇洗涤。为进行断裂，与 7 mM 的甲醇钠甲醇溶液温育 30 分钟。添加 37% 乙酸，可校正 pH。然后在快速真空中干燥肽。

- 干燥后，将肽放入蒸馏水中，然后使用反相 HPLC 和 MALDI-TOF 进行分析。

## 3、细胞分析及连续流动细胞计量

- 通过染料用光度计测定 VIP 衍生物的浓度。在细胞分析中，所用肽的最终浓度为 150 nM。在此情况下， $1 \times 10^5$  个 RIN38 (VAPC1) 细胞与 VIP 衍生物在 37°C 下于结合缓冲液 (50 mM 的 tris/HCl, pH7.5, 5 nM 的氯化镁, 1 mM 的氯化钙, 100 mM 的氯化钠, 4% BSA) 中温育 1 小时。

- 细胞用 2×PBS 洗涤，移入 FACS 管中，然后在 377 g 下离心 5 分钟。细胞沉淀物重新悬浮在 300  $\mu$ l 的 Cellfix 中，然后在 FACS-Calibur (Becton Dickinson) 用 FL4-透镜系统测定。

## 4、评估

- 将在连续流动的细胞计量中测定的天然人 VIP 肽的荧光强度设定为 100%。28 个天然 VIP 肽的标准偏差为 11%。其他 VIP 衍生物对此调节为 100%。

图 7 显示了 RIN38 VPAC1 细胞在有 150 nM 染料标记的肽存在时于 37°C 下温育 1 小时后的相对荧光强度。百分数的数据为相对于相应系列的天然肽。

斑点合成中的文献：

- 1、Frank, R. (1992) Spot Synthesis: An Easy Technique for the

Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support. *Tetrahedron* 48, 9217-9232.

2、Kramer, A.; Schneider-Mergener, J. (1998) Synthesis and Screening of Peptide Libraries on Continuous Cellulose Membrane Support. *Methods in Molecular Biology* 87, 25-39.

3、Volkmer-Engert, R.; Hoffman, B.; Schneider-Mergener, J. (1997) *Tetrahedron Lett.* 38, 1029-1032.

4、Licha, K.; Bhargava, S.; Rheinlaender, C.; Becker, A.; Schneider-Mergener, J.; Volkmer-Engert, R. (印刷中) Highly Parallel Nano-Synthesis of Cleavable Peptide-Dye Conjugates on Cellulose Membrane. *Tetrahedron Lett.*

#### 实施例 44

a) 5-N-(2, 3-二羟基丙基) 氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基 (3H) 假吡啶

将 0.9 g (2.6 mmol) 的 5-羧基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基 (3H) 假吡啶 (*Anal. Biochem.* 217, 197, 1994) 引入至 30 ml 无水 N, N-二甲基甲酰胺和 3 ml 吡啶中, 然后与 1.35 g (5.3 mmol) 的二琥珀酰亚胺基碳酸酯混合。3 小时后, 添加 0.965 g (10.6 mmol) 的 2, 3-二羟基丙基胺。在室温下搅拌过夜, 将反应物蒸发至干, 然后残留物用乙醚进行吸附性沉淀。抽滤出固体, 并在 RP 材料上进行色谱纯制。

产量: 0.82 g (理论值的 76%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 55.32 H 6.84 N 6.79 S 7.77 O 23.27

实测: C 55.39 H 6.95 N 6.57 S 7.58

b) 4-[2-[4-氯-7-[5-N-(二羟基丙基)氨基羰基-3,3-二甲基-1-(4-磺酸基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3,5-(丙烷-1,3-二基)-1,3,5-庚三烯-1-基]-5-N-(二羟基丙基)氨基羰基-3,3-二甲基(3H)-indolio]-丁烷磺酸钠

在氩气中使 360 mg (1 mmol) 的 N-[5-苯胺基-3-氯-2,4-(丙烷-1,3-二基)-2,4-戊二烯-1-亚基]氯化苯铵、825 mg (2 mmol) 5-N-(2,3-二羟基丙基)氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2,3,3-三甲基(3H)假吲哚(实施例 44a) 和 330 mg (4 mmol) 无水乙酸钠在 30 ml 乙醇中的溶液回流 2 小时。蒸馏出乙醇, 残留物进行色谱纯制。

产量: 0.58 g (理论值的 59%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

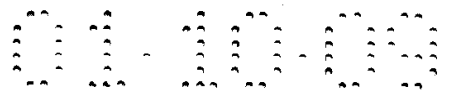
计算: C 56.17 H 6.15 Cl 3.60 N 6.79 S 7.77 O 23.27 Na 2.34

实测: C 55.99 H 6.30 Cl 3.41 N 6.87 S 7.64 Na 2.17

c) 4-[2-[4-(4-(2-羧基乙基)苯基氧基)-7-[5-N-(二羟基丙基)氨基羰基-3,3-二甲基-1-(4-磺酸基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3,5-(丙烷-1,3-二基)-1,3,5-庚三烯-1-基]-5-N-(二羟基丙基)氨基羰基-3,3-二甲基(3H)-indolio]-丁烷磺酸钠, N-羟基琥珀酰亚胺酯

在保护气体中将 225 mg (1.4 mmol) 的 3-(4-羟基苯基)丙酸溶解在 10 ml 的无水 N,N-二甲基甲酰胺中, 然后与 65 mg (2.7 mmol) 的氢化钠 (60%, 在油中) 混合。30 分钟后, 添加 138 mg (0.14 mmol) 的 4-[2-[4-氯-7-[5-N-(二羟基丙基)氨基羰基-3,3-二甲基-1-(4-磺酸基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3,5-(丙烷-1,3-





—氯—7—[5—N—(二羟基丙基)氨基羰基—3, 3—二甲基—1—(4—磺酸基丁基)二氢亚吲哚—2—基]—3, 5—(丙烷—1, 3—二基)—1, 3, 5—庚三烯—1—基]—5—N—(二羟基丙基)氨基羰基—3, 3—二甲基(3H)—indolio]—丁烷磺酸钠(实施例 44b)中。在室温下搅拌过夜, 然后用干冰淬灭。在旋转蒸发器中蒸发至干, 残留物用制备性 HPLC 纯制。

产量: 85 mg (理论值的 54%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 58.65 H 6.09 N 6.22 S 8.54 O 18.47 Na 2.04

实测: C 58.53 H 6.17 N 6.11 S 8.63 Na 1.83

类似于实施例 14—16 以及 18—27a (固相肽合成) 的合成方法, 在固相中合成 VIP 类似物 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN。染料 4—[2—[4—(4—(2—异硫氰酸基乙基)苯基氧基)—7—[5—N—(二羟基丙基)氨基羰基—3, 3—二甲基—1—(4—磺酸基丁基)二氢亚吲哚—2—基]—3, 5—(丙烷—1, 3—二基)—1, 3, 5—庚三烯—1—基]—5—N—(二羟基丙基)氨基羰基—3, 3—二甲基(3H)—indolio]—丁烷磺酸钠偶联在肽的 N—端位置上, 然后根据实施例 14—16 和 18—27c (保护基断裂以及脱掉染料—肽结合物) 分离并纯制该结合物。

类似地, 可由以下成分合成其他对称的亲水性染料:

具有羟基烷基取代基的亲水性假吲哚衍生物 (根据实施例 44a 制备):

a) 5—N—(2, 3—二羟基丙基)—N—甲基氨基羰基—1—(4—磺酸基丁基)—2, 3, 3—三甲基(3H)假吲哚

b) 5—N—(羟基乙基)—氨基羰基—1—(4—磺酸基丁基)—2, 3, 3—三甲基(3H)假吲哚

c) 5-N-(2, 3-二羟基丙基)-N-(羟基乙基)氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

d) 5-N, N-二(羟基乙基)-氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

e) 5-N-(2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基)-氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

f) 5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-N-甲基氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

#### 实施例 45

a) 5-N-(2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基)氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

将 0.6 g (1.8 mmol) 的 5-羧基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚 (Anal. Biochem. 217, 197, 1994) 引入至 20 ml 无水 N, N-二甲基甲酰胺和 2 ml 吡啶中, 然后与 0.95 g (3.6 mmol) 的二琥珀酰亚胺基碳酸酯混合。2 小时后, 添加 1.4 ml (10 mmol) 的三乙胺和 322 mg (1.8 mmol) 的葡糖胺。在室温下搅拌过夜, 将反应物蒸发至干, 然后残留物用乙醚进行吸附性沉淀。抽滤出固体, 并在 RP 材料上进行色谱纯制。

产量: 0.67 g (理论值的 74%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 52.58 H 6.82 N 5.57 S 6.38 O 28.65

实测: C 52.47 H 6.91 N 5.39 S 6.44

b) 4-[2-[4-氯-7-[5-N-(2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基)氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5

—(丙烷—1, 3—二基)—1, 3, 5—庚三烯—1—基]—3, 3—二甲基—5—[N—(2, 3, 4, 5, 6—五羟基己基)氨基羰基](3H)—indolio]—丁烷磺酸钠

在氩气中使 180 mg (0.5 mmol) 的 N—[5—苯胺基—3—氯—2, 4—(丙烷—1, 3—二基)—2, 4—戊二烯—1—亚基]氯化苯铵、503 mg (1 mmol) 5—N—(2, 3, 4, 5, 6—五羟基己基)氨基羰基—1—(4—磺基丁基)—2, 3, 3—三甲基(3H)假吲哚(实施例 45a)和 165 mg (2 mmol) 无水乙酸钠在 30 ml 乙醇中的溶液回流 2 小时。蒸馏出乙醇, 残留物进行色谱纯制。

产量: 0.31 g (理论值的 53%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 54.05 H 6.33 Cl 3.01 N 4.76 S 5.44 O 24.45 Na 1.95

实测: C 53.89 H 6.20 Cl 2.87 N 4.83 S 5.29 Na 1.72

c) 4—[2—[4—(4—异硫氰酸基硫代苯基氧基)—7—[5—N—(2, 3, 4, 5, 6—五羟基己基)氨基羰基—3, 3—二甲基—1—(4—磺酸基丁基)二氢亚吲哚—2—基]—3, 5—(丙烷—1, 3—二基)—1, 3, 5—庚三烯—1—基]—3, 3—二甲基—5—[N—(2, 3, 4, 5, 6—五羟基己基)氨基羰基](3H)—indolio]—丁烷磺酸钠

于氩气下将 54 mg (0.4 mmol) 的 4—氨基苯硫酚溶解在 10 ml 的无水 N, N—二甲基甲酰胺中, 然后在室温下与 165 mg (0.14 mmol) 的 4—[2—[4—氯—7—[5—N—(2, 3, 4, 5, 6—五羟基己基)氨基羰基—3, 3—二甲基—1—(4—磺酸基丁基)二氢亚吲哚—2—基]—3, 5—(丙烷—1, 3—二基)—1, 3, 5—庚三烯—1—基]—3, 3—二甲基—5—[N—(2, 3, 4, 5, 6—五羟基己基)氨基羰基](3H)—indolio]—丁烷磺酸钠(实施例 45b)中。10 分钟后, 反应混合物用干冰淬灭,

并添加 210 mg (1 mmol) 的硫代羰基二咪唑。45 分钟后, 用乙醚沉淀染料, 并通过离心分离固体。纯制时, 在 RP 材料上进行色谱分离。

产量: 78 mg (理论值的 43%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 55.07 H 6.01 N 5.35 S 9.80 O 22.01 Na 1.76

实测: C 54.89 H 6.20 N 5.24 S 9.58 Na 1.54

类似于实施例 14-16 以及 18-27a (固相肽合成) 的合成方法, 在固相中合成 VIP 类似物 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN。染料 4-[2-[4-(4-异硫氰酸基硫代苯基氧基)-7-[5-N-(2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基)氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-(丙烷-1, 3-二基)-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-3, 3-二甲基-5-[N-(2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基)氨基羰基](3H)-indolio]-丁烷磺酸钠偶联在肽的 N-端位置上, 然后根据实施例 14-16 和 18-27c (保护基断裂以及脱掉染料-肽结合物) 分离并纯制该结合物。

类似地, 可由以下成分合成其他对称的亲水性染料:

具有羟基烷基取代基的亲水性假吲哚衍生物 (根据实施例 44a 制备):

a) 5-N-(2, 3-二羟基丙基)-N-甲基氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基 (3H) 假吲哚

b) 5-N-(羟基乙基)-氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基 (3H) 假吲哚

c) 5-N-(2, 3-二羟基丙基)-N-(羟基乙基)氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基 (3H) 假吲哚

d) 5-N, N-二(羟基乙基)-氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-

2, 3, 3-三甲基 (3H) 假吲哚

e) 5-N-(2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基)-氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基 (3H) 假吲哚

f) 5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-N-甲基氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基 (3H) 假吲哚

#### 实施例 46

7-[5-N-(2, 3-二羟基丙基)氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-3, 3-二甲基-5-羧基 (3H)-indolio]-丁烷磺酸钠

在 120°C 下使 2.35 g (5.71 mmol) 的 5-N-(2, 3-二羟基丙基)氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基 (3H) 假吲哚 (实施例 44a) 和 1.57 g (5.5 mmol) 的戊烯二醛二苯胺盐酸盐在 25 ml 乙酸酐中的溶液搅拌 30 分钟。接着添加 2.4 g (7.1 mmol) 的 5-羧基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基 (3H) 假吲哚、1.71 g 的乙酸钠、22 ml 的乙酸酐和 8.6 ml 的乙酸。反应混合物在 120°C 下搅拌 1 小时，然后冷却至室温，并用乙醚沉淀产物。粗产物在 RP 材料上进行色谱分离。

产量: 1.9g (理论值的 40%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 54.47 H 6.03 N 5.03 S 7.67 O 21.05 Na 2.75

实测: C 54.26 H 6.12 N 5.00 S 7.49 Na 2.48

类似于实施例 14-16 以及 18-27a (固相肽合成) 的合成方法，在固相中合成 VIP 类似物 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN。染料 7-[5-N-(2, 3-二羟基丙基)氨基羰基-3, 3-二甲基-1-



(4-磺基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-3, 3-二甲基-5-羧基(3H)-indolio]-丁烷磺酸钠根据实施例 14-16 以及 18-27b (染料偶联) 偶联在肽的 N-端位置上, 然后根据实施例 14-16 和 18-27c (保护基断裂以及脱掉染料-肽结合物) 分离并纯制该结合物。

类似地, 可由以下成分合成其他非对称的亲水性染料:

具有羟基烷基取代基的亲水性假吲哚衍生物 (根据实施例 44a 制备):

a) 5-N-(2, 3-二羟基丙基)-N-甲基氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

b) 5-N-(羟基乙基)-氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

c) 5-N-(2, 3-二羟基丙基)-N-(羟基乙基)氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

d) 5-N, N-二(羟基乙基)-氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

e) 5-N-(2, 3, 4, 5, 6-五羟基己基)-氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

f) 5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-N-甲基氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

具有羧基的假吲哚衍生物:

a) 5-羧基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

b) 5-羧甲基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚



- c) 5-羧基-1-(3-磺基丙基)-2,3,3-三甲基(3H)假吡啶
- d) 5-羧甲基-1-(3-磺基丙基)-2,3,3-三甲基(3H)假吡啶
- e) 5-羧基-1-(2-磺基乙基)-2,3,3-三甲基(3H)假吡啶
- f) 5-羧甲基-1-(2-磺基乙基)-2,3,3-三甲基(3H)假吡啶

用于与上述假吡啶反应形成单、二或三羰菁的双苯胺衍生物:

- a) 戊烯二醛二苯胺盐酸盐
- b) 丙二醛-二苯基亚胺盐酸盐
- c) N,N-二苯基甲脒
- d) N-[5-苯胺基-2,4-(丙烷-1,3-二基)-2,4-戊二烯-1-亚基]氯化苯铵
- e) N-[5-苯胺基-2,4-(乙烷-1,2-二基)-2,4-戊二烯-1-亚基]氯化苯铵
- f) N-[5-苯胺基-3-氯-2,4-(丙烷-1,3-二基)-2,4-戊二烯-1-亚基]氯化苯铵
- g) N-[5-苯胺基-3-氯-2,4-(乙烷-1,2-二基)-2,4-戊二烯-1-亚基]氯化苯铵

#### 实施例 47

7-[5-N-(1,3,4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基-3,3-二甲基-1-(4-磺基丁基)二氢亚吡啶-2-基]-3,5-(2-羧基丙烷-1,3-二基)-1,3,5-庚三烯-1-基]-3,3-二甲基-5-N-(1,

3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基 (3H)-indolio]-丁烷磺酸钠,  
N-羟基琥珀酰亚胺酯

a) 4-[2-[4-氯-7-[5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-[2-(甲氧基羰基)丙烷-1, 3-二基]-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-3, 3-二甲基-5-[N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基 (3H)-indolio]-丁烷磺酸钠

于 0°C 下将 5.5 ml (10 mmol) 磷酰氯和 6 ml 的 N, N-二甲基甲酰胺添加在 0.8 g (5 mmol) 4-(甲氧基羰基)-环己酮于 5 ml 二氯甲烷中的溶液内。然后回流 1 小时。蒸馏出二氯甲烷, 在不超过 5°C 的温度下添加 4 ml 苯胺于 10 ml 甲醇中的溶液。将反应混合物倾倒在冰上, 添加 5 ml 的浓盐酸, 然后在 0°C 下使中间产物结晶 5 小时。抽滤出晶体, 而且未进一步纯制即用于下一步的反应中。为此目的, 将晶体溶解在无水乙醇中, 然后添加 4.4 g (10 mmol) 的 5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-N-甲基氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基 (3H) 假吲哚 (见实施例 45) 和 0.8 g 的无水乙酸钠。回流 1 小时, 过滤固体, 并蒸发滤液至干。残留物进行色谱纯制。

产量: 3.25 g (理论值的 58%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 54.90 H 6.14 Cl 3.18 N 5.02 S 5.75 O 22.94 Na 2.06

实测: C 54.76 H 6.03 Cl 2.99 N 4.91 S 5.60 Na 1.83

b) 7-[5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-(2-羧基丙烷-1, 3-二基)-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-3, 3-二甲基-5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基 (3H)-indolio]-丁烷磺酸钠

于氮气、室温下使 10 mg (0.4 mmol) 氢化钠和 80 mg (1.3 mmol) 乙硫醇在 10 ml 无水 N, N 二甲基甲酰胺中的混合物搅拌 30 分钟。然后与 112 mg (0.1 mmol) 的 4-[2-[4-氯-7-[5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺酸基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-[2-(甲氧基羰基)丙烷-1, 3-二基]-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-3, 3-二甲基-5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基(3H)-indolio]-丁烷磺酸钠(实施例 47a) 在 3 ml 的 N, N-二甲基甲酰胺中混合。反应混合物加热至 100°C 共 2 小时, 然后冷却至室温, 并用二氧化碳淬灭。在旋转蒸发器中蒸发至干, 残留物用热乙醇萃取。蒸发萃取液, 粗产物进行色谱纯制。

产量: 75 mg (理论值的 67%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 56.27 H 6.33 N 5.25 S 6.01 O 23.99 Na 2.15

实测: C 56.13 H 6.46 N 5.12 S 5.87 Na 1.88

c) 7-[5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺酸基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-(2-羧基丙烷-1, 3-二基)-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-3, 3-二甲基-5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基(3H)-indolio]-丁烷磺酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯, 钠盐

为制备活性酯, 将 14 mg (0.12 mmol) 的 N-羟基琥珀酰亚胺和 64 mg (0.06 mmol) 的羧酸溶解在 2 ml 的 N, N-二甲基甲酰胺中。15 分钟后, 添加 25 mg (0.12 mmol) 的二环己基碳化二亚胺, 并在室温下搅拌过夜。使用制备性 HPLC 纯制活性酯。

产量: 60 mg (理论值的 86%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 55.71 H 6.06 N 6.02 S 5.51 O 24.73 Na 1.97  
 实测: C 55.59 H 6.21 N 5.93 S 5.37 Na 1.75

类似于实施例 14-16 以及 18-27a (固相肽合成) 的合成方法, 在固相中合成 VIP 类似物 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN。染料 7-[5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺酸基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-(2-羧基丙烷-1, 3-二基)-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-3, 3-二甲基-5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基(3H)-indolio]-丁烷磺酸钠根据实施例 14-16 以及 18-27b (染料偶联) 偶联在肽的 N-一端位置上, 然后根据实施例 14-16 和 18-27c (保护基断裂以及脱掉染料-肽结合物) 分离并纯制该结合物。

### 实施例 48

7-[5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺酸基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-(2-羧基丙烷-1, 3-二基)-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-3, 3-二甲基-5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基(3H)-indolio]-丁烷磺酸钠  
 a) 5-N-(11-氨基十一烷基)氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚

将 340 mg (1 mmol) 的 5-羧基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚 (Anal. Biochem. 217, 197, 1994) 引入至 5 ml 无水 N,N-二甲基甲酰胺和 1 ml 吡啶中, 然后与 0.5 g (2 mmol) 的碳酸二琥珀酰亚胺基酯混合。3 小时后, 添加 0.805 g (4 mmol) 的 11-氨基十一烷酸。在室温下搅拌过夜, 蒸发反应物至干, 残留物用乙醚进行吸附沉淀。抽滤固体, 并在 RP 材料上进行色谱纯制。

产量: 0.37 g (理论值的 71%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 62.04 H 8.10 N 5.36 S 6.13 O 18.37

实测: C 61.88 H 8.23 N 5.17 S 6.02

b) 7-[5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-(2-羧基丙烷-1, 3-二基)-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-3, 3-二甲基-5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基(3H)-indolio]-丁烷磺酸钠

0.35 g (0.67 mmol) 5-N-(11-氨基十一烷基)氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚(实施例 48a)和 0.18 g (0.645 mmol) 戊烯二醛二缩苯胺在 3 ml 乙酸酐中的溶液在 110°C 下搅拌 20 分钟。添加 344 mg (0.83 mmol) 的 5-N-(2, 3-二羟基丙基)-氨基羰基-1-(4-磺基丁基)-2, 3, 3-三甲基(3H)假吲哚(44a)、0.2 g 的乙酸钠、3 ml 的乙酸酐和 1 ml 的乙酸。反应混合物在 110°C 下搅拌 2 小时, 冷却至室温, 然后用乙醚沉淀产物。粗产物在 RP 材料上进行色谱纯制。

产量: 0.41 g (理论值的 60%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 60.10 H 7.02 N 5.50 S 6.29 O 18.84 Na 2.26

实测: C 59.96 H 7.14 N 5.33 S 6.15 Na 2.11

类似于实施例 14-16 以及 18-27a (固相肽合成) 的合成方法, 在固相中合成 VIP 类似物 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN。染料 7-[5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-(2-羧

基丙烷-1, 3-二基)-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-3, 3-二甲基-5-N-(1, 3, 4-三羟基丁-2-基)-氨基羰基(3H)-indolio]-丁烷磺酸钠根据实施例 14-16 以及 18-27b (染料偶联) 偶联在肽的 N-一端位置上, 然后根据实施例 14-16 和 18-27c (保护基断裂以及脱掉染料-肽结合物) 分离并纯制该结合物。

根据实施例 44a 和 b 可制备根据本发明的其他染料, 其中可使用以下氨基酸替代实施例 48a 中的 11-氨基十一烷酸, 实施例 46 中提到的假吲哚衍生物具有以下羟基烷基取代基 a)-f):

- i. 甘氨酸
- ii. 丙氨酸
- iii.  $\beta$ -丙氨酸
- iv. 4-氨基丁酸
- v. 6-氨基己酸
- vi.  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{COOH}$  (TH 53, 20, 6977)
- vii.  $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{COOH}$  (JOC 63, 5, 1728, 1998)
- viii.  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CO}-\text{CH}_2\text{COOH}$  (Lett. Pept. Sci. 6, 135, 1999)
- ix.  $\text{HCl}^* \text{H}_2\text{N}-\text{PEG}-\text{COOH}$  (MW 4300 g/mol; Schearwater Polymers Inc., USA)

#### 实施例 49

4-[2-[4-(4-(N-(4-氮杂-6-溴-5-氧代己基)氨基羰基-乙基)苯基氧基)-7-[5-N-(二羟基丙基)-氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺酸基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-(丙烷-1, 3-二基)-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-5-N-(二羟基丙基)氨基羰基-3, 3-二甲基(3H)-indolio]-丁烷磺酸钠

a) [3-[N-(叔丁氧基羰基)氨基]丙基]-N'-(溴乙酰基)-酰胺

将 2.5 g (14.4 mmol) 的[3-[N-(叔丁氧基羰基)氨基]丙基]胺溶解在 15 ml 的二恶烷中, 然后在 0°C 下添加 4.4 ml 的三乙胺, 并与 3.2 g (16 mmol) 的溴乙酰基溴混合。在室温下搅拌过夜, 然后再添加 320 mg 的溴乙酰基溴。在室温下 2 小时后, 抽滤出沉淀物, 蒸发浓缩溶液, 残留物在乙酸乙酯中处理。用水洗涤, 然后在硫酸钠上干燥有机相。

产量: 3.2 g (理论值的 75%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 40.69 H 6.49 Br 27.07 N 9.49 O 16.26

实测: C 40.50 H 6.37 Br 26.89 N 9.58

b)[3-[N-(溴乙酰基)氨基]丙基]胺盐酸盐

在室温下于乙酸乙酯中使 3.1 g (10.5 mmol) 的[3-[N-(叔丁氧基羰基)氨基]丙基]-N'-(溴乙酰基)-酰胺 (实施例 49a) 与 50 mmol 的 1 M 盐酸搅拌 5 小时。抽滤出产物, 然后用乙酸乙酯重新洗涤固体。

产量: 2.3 g (理论值的 95%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 25.94 H 5.22 Cl 15.31 Br 34.51 N 12.10 O 18.84

实测: C 25.76 H 5.41 Cl 15.55 Br 34.34 N 11.97

c) 4-[2-[4-(4-(N-(4-氮杂-6-溴-5-氧代己基)氨基羰基-乙基)苯基氧基)-7-[5-N-(二羟基丙基)-氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺酸基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-(丙烷-1, 3-二基)-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-5-N-(二羟基丙基)氨基羰基-3, 3-二甲基 (3H)-indolio]-丁烷磺酸钠

将 121 mg (0.1 mmol) 的 4-[2-[4-(4-(2-羧基乙基)苯基

氧基) -7-[5-N-(二羟基丙基)氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺酸基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-(丙烷-1, 3-二基)-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-5-N-(二羟基丙基)氨基羰基-3, 3-二甲基(3H)-indolio]-丁烷磺酸钠, N-羟基琥珀酰亚胺酯(实施例 44c) 溶解在 0.5 ml 的 N, N-二甲基甲酰胺中, 然后与 0.06 ml 的三乙胺和 70 mg (0.3 mmol) 的[3-[N-(溴乙酰基)氨基]丙基]胺盐酸盐(实施例 49b) 混合。

在 60°C 下搅拌 4 小时, 然后冷却至室温, 并用乙醚沉淀产物。抽滤固体, 并用乙醚洗涤。

产量: 0.11 mg (理论值的 80%)

分析 (相对于无溶剂的物质):

计算: C 56.17 H 6.18 Br 6.13 N 6.44 S 4.92 Na 1.76 O 18.40

实测: C 55.96 H 6.26 Br 6.01 N 6.27 S 4.81 Na 1.53

类似于实施例 14-16 以及 18-27a (固相肽合成) 的合成方法, 在固相中合成 VIP 类似物 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN。染料 4-[2-[4-(4-(N-(4-氮杂-6-溴-5-氧代己基)氨基羰基-乙基)苯基氧基)-7-[5-N-(二羟基丙基)-氨基羰基-3, 3-二甲基-1-(4-磺酸基丁基)二氢亚吲哚-2-基]-3, 5-(丙烷-1, 3-二基)-1, 3, 5-庚三烯-1-基]-5-N-(二羟基丙基)氨基羰基-3, 3-二甲基(3H)-indolio]-丁烷磺酸钠根据实施例 17 偶联在肽的 N-端位置上, 然后根据实施例 14-16 和 18-27c (保护基断裂以及脱掉染料-肽结合物) 分离并纯制该结合物。

# 序 列 表

## (1) 一般信息

### (i) 申请人

- (A) 名称: 柏林自由大学诊断研究所有限公司
- (B) 街道: Spandauer Damm 130
- (C) 城市: 柏林
- (E) 国家: 德国
- (F) 邮政编码 (ZIP): D-14050
- (G) 电话: (030)-30390412
- (H) 传真: (030)-30390499

(ii) 发明名称: 作为光学诊断用造影剂的短链肽-染料结合物

(iii) 序列数量: 8

(iv) 计算机可读形式:

- (A) 介质类型: 软盘
- (B) 计算机: IBM PC compatible
- (C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS
- (D) 软件: PatentIn Release#1.0, Version #1.25 (EPO)

(v) 目前申请数据

申请号:

(vi) 在先申请数据:

- (A) 申请号:
- (B) 申请日:

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 28 个氨基酸
  - (B) 类型: 肽
  - (C) 链性: 单链
  - (D) 拓扑学:
- (ii) 分子类型: 肽
  - (iii) 假说: 否
  - (vi) 原始来源: 合成
  - (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

His-Trp-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(3) SEQ ID NO: 2 的信息:

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度: 28 个氨基酸
  - (B) 类型: 肽
  - (C) 链性: 单链
  - (D) 拓扑学:
- (ii) 分子类型: 肽
- (iii) 假说: 否
- (vi) 原始来源: 合成
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Phe-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(4) SEQ ID NO: 3 的信息:

- (i) 序列特征:

(A) 长度: 28 个氨基酸

(B) 类型: 肽

(C) 链性: 单链

(D) 拓扑学:

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 否

(vi) 原始来源: 合成

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Lys-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-  
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(5) SEQ ID NO: 4 的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 28 个氨基酸

(B) 类型: 肽

(C) 链性: 单链

(D) 拓扑学:

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 假说: 否

(vi) 原始来源: 合成

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Gln-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-  
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(6) SEQ ID NO: 5 的信息:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 28 个氨基酸
- (B) 类型: 肽
- (C) 链性: 单链
- (D) 拓扑学:
- (ii) 分子类型: 肽
- (iii) 假说: 否
- (vi) 原始来源: 合成
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Arg-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-  
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(7) SEQ ID NO: 6 的信息:

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度: 28 个氨基酸
  - (B) 类型: 肽
  - (C) 链性: 单链
  - (D) 拓扑学:
- (ii) 分子类型: 肽
- (iii) 假说: 否
- (vi) 原始来源: 合成
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Trp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-  
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(8) SEQ ID NO: 7 的信息:

- (i) 序列特征:

- (A) 长度: 28 个氨基酸
  - (B) 类型: 肽
  - (C) 链性: 单链
  - (D) 拓扑学:
- (ii) 分子类型: 肽
  - (iii) 假说: 否
  - (vi) 原始来源: 合成
  - (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Arg-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-  
Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(9) SEQ ID NO: 8 的信息:

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度: 28 个氨基酸
  - (B) 类型: 肽
  - (C) 链性: 单链
  - (D) 拓扑学:
- (ii) 分子类型: 肽
- (iii) 假说: 否
- (vi) 原始来源: 合成
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 8:

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-  
Met-Arg-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

# 说明书附图

图 1

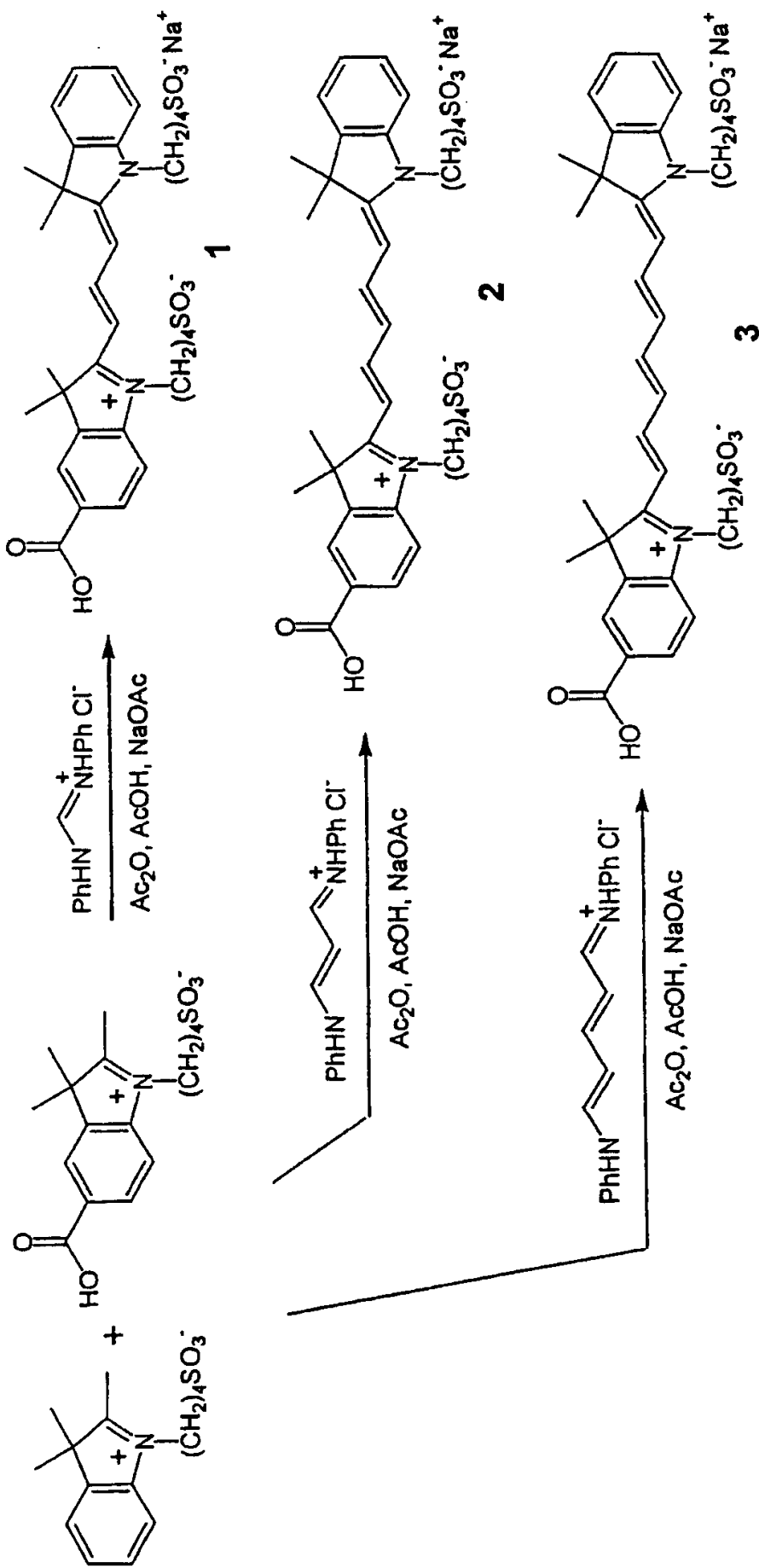
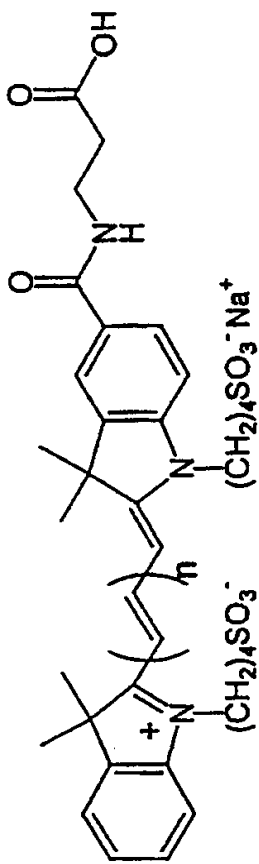


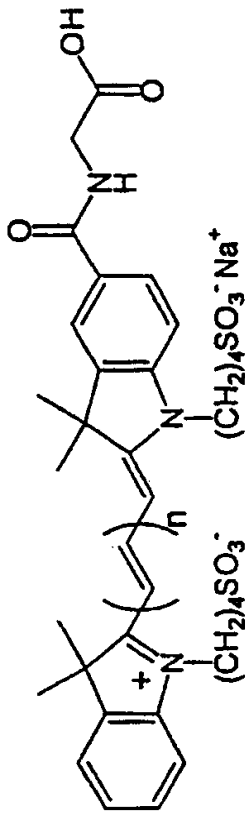
图2

1-3  
 1) TBTU, β-丙氨酸-叔丁基酯  
 2) 三氟乙酸



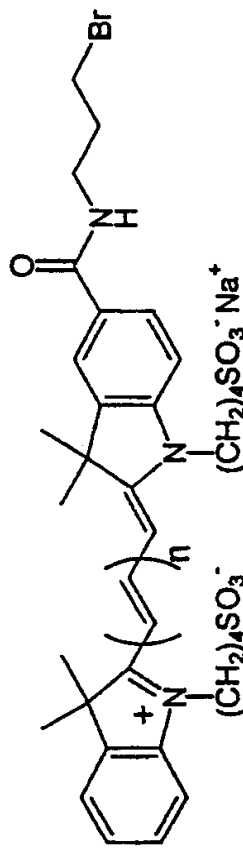
4-6

7-9  
 1) TBTU, 甘氨酸-叔丁基酯  
 2) 三氟乙酸



7-9

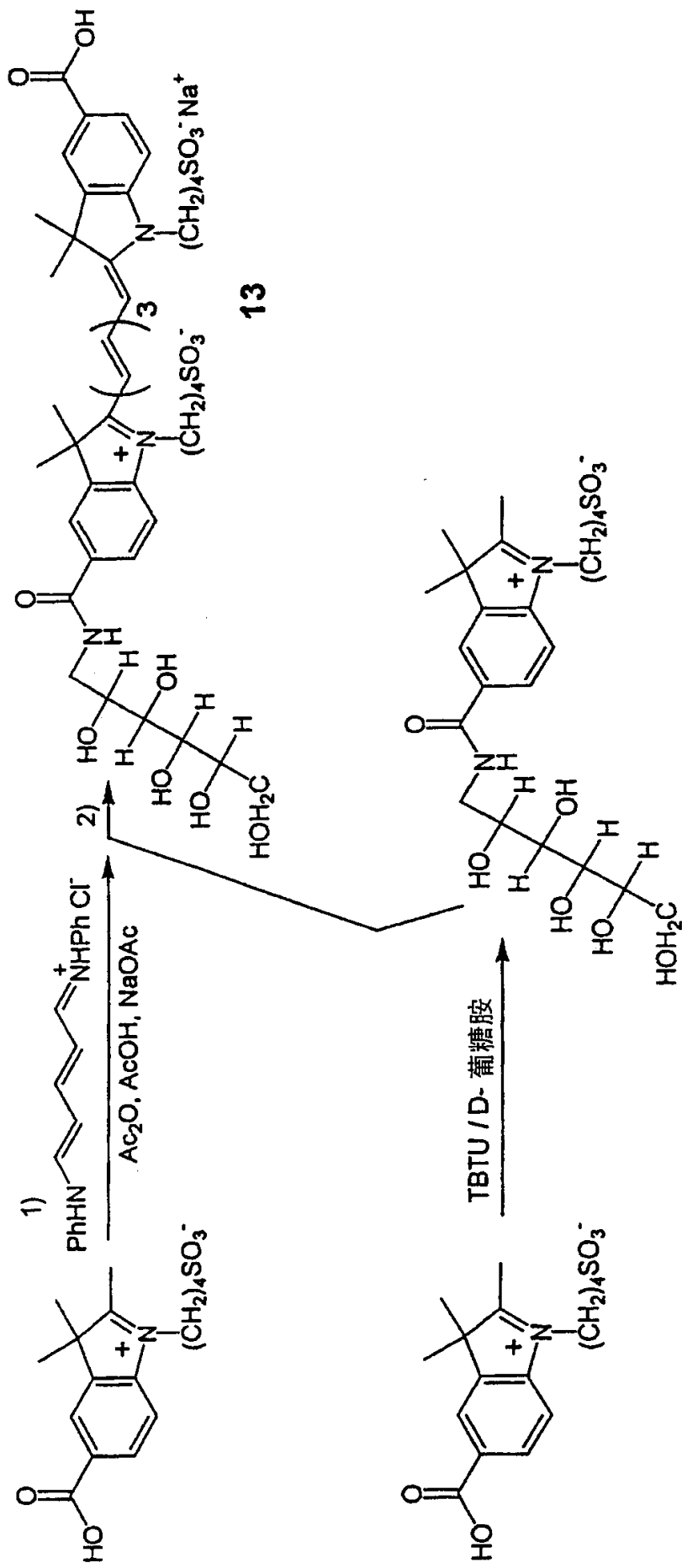
10-12  
 TBTU, 3-溴-1-丙基胺



10-12

n = 1: 1, 4, 7, 10  
 n = 2: 2, 5, 8, 11  
 n = 3: 3, 6, 9, 12

图3



## 图4

## 染料-肽结合物14-38的光物理性质

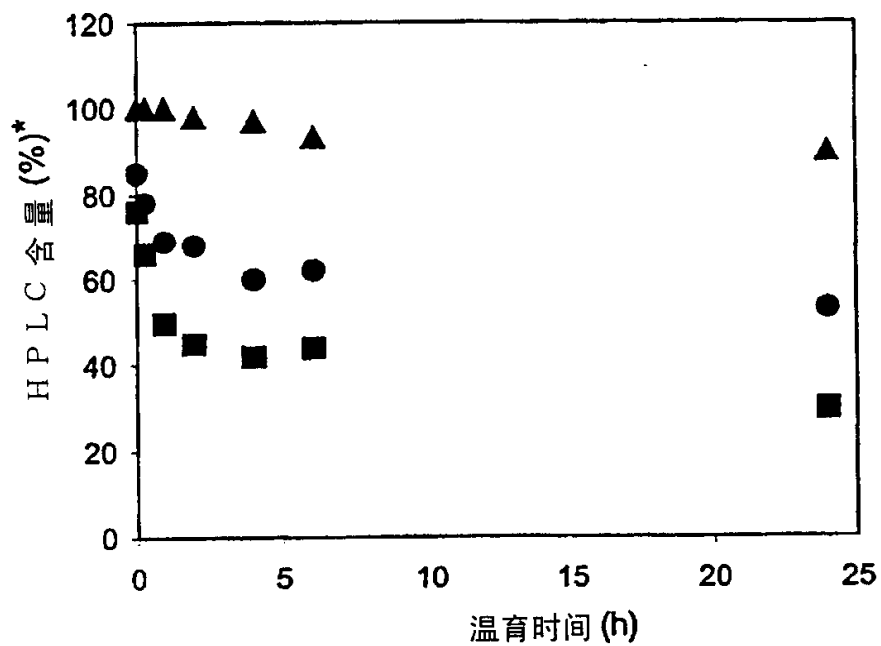
溶剂: PBS (磷酸盐缓冲盐水, pH7.4)

化合物 #	最大吸收 $\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm)	最大荧光 $\lambda_{\text{em, max}}$ (nm)	消光系数 $\epsilon$ ( $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )
14	556	582	98 000
15	649	675	105 000
16	746	781	125 000
17	749	783	115 000
18	556	580	108 000
19	649	677	110 000
20	746	781	135 000
21	552	580	n. b.
22	648	676	111 000
23	746	781	n. b.
24	746	783	n. b.
25	747	784	121 000
26	748	784	156 000
27	748	784	159 000
28	552	579	102 000
29	648	676	111 000
30	746	781	128 000
31	746	781	n. b.
32	748	782	169 000
33	552	579	101 000
34	648	677	121 000
35	746	780	130 000
36	747	781	109 000
37	554	578	99 000
38	648	676	121 000



图6

染料与VIP受体结合肽的结合物在牛血浆中的稳定性



▲ 茈三炭菁 -D-VIP(14-24)-结合物 (实施例25)

● 茈三炭菁 -VIP(14-28)-结合物 (实施例20)

■ 茈三炭菁 -VIP(1-28)-结合物 (实施例16)

\* 在 750 nm, 相对于对照值 (1分钟0°C)

图7

	1A	2C	3D	4E	5F	6G	7H	8I	9K	10L	11M	12N	13P	14Q	15R	16S	17T	18V	19W	20Y	
1H	143	143	143	143	103		100	126		156					85			113	125	6	
2S	91	93	167		167		96	184		95	131			235		100	152	121	235	121	
3D	111	132	100	110	110		103	105		101	96							89	149	86	
4A	100	97	135	120				95			111			110		130			79	172	140
5V		81			100	84		107		113	105				82		114	100	144	95	
6F	21	7	18	16	100	12	26	78	105	78		4	4	20	28	20	17	9			
7T		86	23	29								89	36				100	111	94		
8D	134	178	100	104	231	153	199	223	240	225	208	190		250	407	177	219	220	251	184	
9N	84	174			151	125	104	114	102	115	145	100		117	153	114	102	89	135	117	
10Y	39	81	15	17	88	18	26	40	67	90		28	20	27	39	35	26			132	100
11T	116	240	33	26	178	106	87	211	216	169	111	146		128	246	108	100	112	122	137	
12R		91	19	25		25	22	31	85			38	15		100	38	79			80	
13L	80	113	13	17	86	21		84	79	105	80	35	14		92				123	87	
14R	30	113	9	25		26	28		87	89		24	15	13	100	24	26			39	
15K		192	17	33	108	37		87	100	104	92		15		138				81	90	
16Q	100	154	19	31	94	39	18	108	106	115	108		21	100	150			84	120	174	107
17M	78	129	31	30	106	45		118	91	111	100	90	18	141	118		56		126	87	
18A	100	137	21	32	133	42		92	159	115	122	82	25	104	172	78			99	137	95
19V	110	149	17	15	80	26	22	105	28	104		19	18	26	9	23	29	100	91		
20K		132	12	29	83	31	32		100	78		27	12	24	121	35	27			88	
21K		104	29	16		22	16		100					11	94		36			117	
22Y	19	83	8	10	97	15	21	19	24		35	14	14	18	42	17	18			115	100
23L	17	13	10	13	42	14	17		22	100	29	15	18	20	26	13	14	31		23	
24N	111	160	35	31	95	26		125		79	136	100	23	85	80	95			141	191	
25S		134	40	37	85			80	89		83	92	24		116	100		39	145	108	
26I	25	46	9	12		13	21	100		119		15	9	24		112	20	85	115	122	
27L			23	18	124		24	109	36	100		34	19	31					93	80	
28N		104	25		88	81	5				82	100	17						108	32	