(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120132004 A
(43)申请公布日 2025.06.13

(21)申请号 202510298059.1

(22)申请日 2014.03.15

(30)优先权数据
61/794,296 2013.03.15 US

(62)分案原申请数据
201480028287.7 2014.03.15

(71)申请人 里兰斯坦福初级大学理事会
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 马修·S·博焦
马蒂金·韦尔多斯

(74)专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112
专利代理师 麦善勇 张天舒

(51)Int.Cl.
A61K 49/00(2006.01)

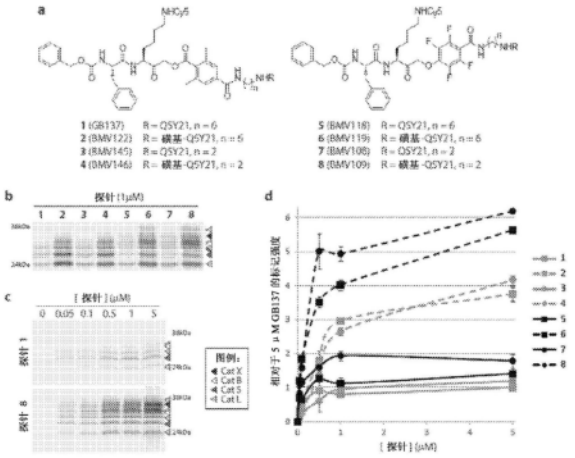
权利要求书2页 说明书30页 附图8页

(54)发明名称

基于活性的探针化合物、组合物及其使用方法

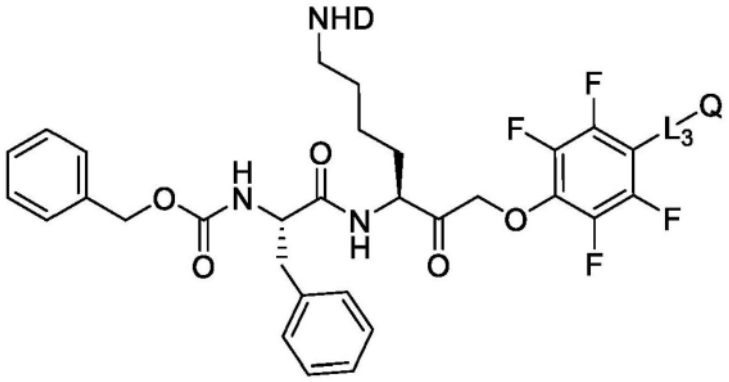
(57)摘要

本发明提供了用于标记半胱氨酸蛋白酶的基于活性的探针化合物。该化合物通过特异性靶标元件靶向蛋白酶。所述化合物还包括可检测元件,如荧光标记、放射性标记或螯合剂。在一些情况中,该化合物还包括淬灭元件,其与蛋白酶发生反应后释放。本发明还提供了包含所述化合物的组合物,以及所述化合物的使用方法,例如在动物体内标记蛋白酶以及在动物体内使肿瘤可视化。



CN 120132004 A

1.一种用于标记蛋白酶的化合物,其具有下式:

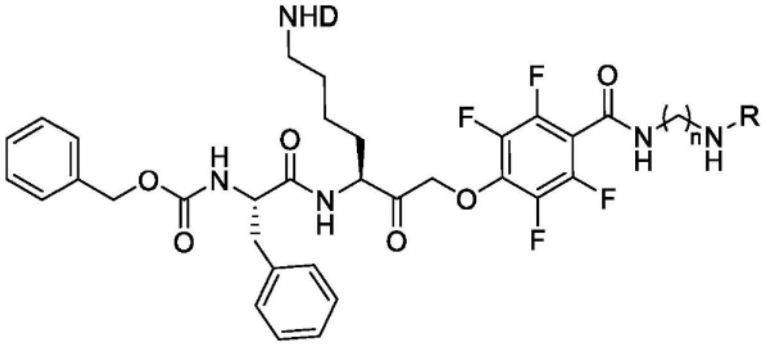


其中D是荧光标记,其中所述荧光标记是荧光素、
俄勒冈绿、氟硼荧染料、罗丹明或花菁标记;
L_3是接头;并且
Q是淬灭剂,其中所述猝灭剂是调节荧光团发射的化学实体。

2.权利要求1所述的化合物,其中所述荧光标记是花菁标记。

3.权利要求2所述的化合物,其中所述花菁标记是Cy5。

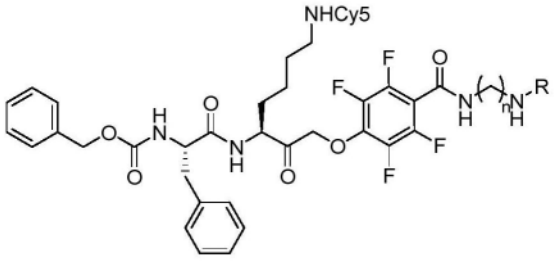
4.权利要求1所述的化合物,其具有下式:



其中R是QSY淬灭剂;
D是花菁染料;并且
n是1至16的整数。

5.权利要求4所述的化合物,其中R是QSY21或磺基-QSY21,并且D是Cy5。

6.权利要求5所述的化合物,其为选自以下化合物之一:



其中R=QSY21且n=6;
R=磺基-QSY21且n=6;
R=QSY21且n=2;和
R=磺基-QSY21且n=2。

7.权利要求1所述的化合物,其中Q是QC-1。

8.一种用于标记动物体内的蛋白酶的组合物,包含权利要求1至7中任一项所述的化合物以及药学上可接受的载体。

9.权利要求8所述的组合物,所述组合物用于使动物体内的肿瘤可视化,用途包括以下步骤:

向所述动物施用所述组合物;并且

测定在动物体内,由于所述组合物与组织蛋白酶半胱氨酸蛋白酶之间的反应所产生的可检测的信号,其中所述可检测的信号与动物体内的肿瘤有关。

10.用于权利要求9所述的组合物,其中所述可检测的信号是荧光信号。

11.用于权利要求10所述的组合物,其中所述荧光信号是在肿瘤边缘产生的。

基于活性的探针化合物、组合物及其使用方法

[0001] 本申请是申请号为2014800282877、申请日为2014年3月15日、发明名称为“基于活性的探针化合物、组合物及其使用方法”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2013年3月15日递交的美国临时申请No.61/794,296的权益,其公开内容通过引用的方式全部纳入本文。

[0004] 政府支持说明

[0005] 本发明是在政府支持的项目编号为5R01NS045684-07(由美国国立卫生研究院颁发)的项目下作出的。政府对本发明拥有特定的权利。

背景技术

[0006] 目前正在开发各种技术以用于分子成像和疾病监测的领域。特别是,光学荧光成像是一种由于其敏感性、特异性和非侵入性而开始呈现出作为临床工具潜力的方法。荧光光学探针的特异性在某些情况下可以通过生物靶标来提供。例如,如果探针的荧光只在酶反应的情况下释放时,在生物样品中通过酶靶标识别的光学探针往往产生非常特异性的信号。理想情况下,即使在荧光信号已经通过酶反应被激活的情况下,探针的荧光部分也与它的酶靶标保持相连。已经公开了将这样的基于荧光活性的探针(ABP)用于蛋白酶靶标。Blum等,(2009)PLoS One 4:e6374;doi:10.1371/journal.pone.0006374。通过ABP与酶的活性部分催化残基之间的反应而生成的永久性共价键,从而能够从简单的荧光底物中区分出ABP。虽然由于由靶标酶进行的催化反转而导致的信号放大使得荧光底物可能似乎是有利的,但是已经发现,APB由于对靶标酶的共价修饰,示出了增加的组织摄入动力学和在靶组织中延长的探针保持期。

[0007] 其中,所关注的与基于荧光的光学探针一起使用的靶标酶是蛋白酶,特别是半胱氨酸蛋白酶。该半胱氨酸蛋白酶是在健康与疾病中起到重要作用的蛋白酶家族。Reiser等,(2010)J.Clin.Invest.120:3421-31。虽然它们的功能已经主要描述为限制于胞内体途径中,然而越来越多的证据证明它们是基质降解的主要调节子,表明了它们也在细胞外发挥作用。*Brömme*&Wilson(2011)Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis.Biology of Extracellular Matrix Volume 2 23-51。此外,已经示出,半胱氨酸组织蛋白酶家族是几种类型的癌症的发展和进程的主要参与者。Mohamed&Sloane(2006)Nat.Rev.Cancer(2006)6:764-75;Palermo&Joyce(2008)Trends Pharmacol.Sci.29:22-8。此外,已在癌症观察到半胱氨酸组织蛋白酶内源抑制剂(半胱氨酸蛋白酶抑制剂)表达的改变。Cox(2009)Cystatins and cancer.Front.Biosci.14:463-74。这些观察,与胞内和胞外环境的潜在变化联合,强调了允许在天然肿瘤微环境的情况中,直接评估这些蛋白酶的活性的工具的重要性。已经合成了针对半胱氨酸组织蛋白酶家族的几种ABP。Edgington等,(2011)Curr.Opin.Chem.Biol.15:798-805。特别地,荧光淬灭

ABP(qABP)已被证明是在组织水平、细胞水平和蛋白水平上,用于癌症的非侵入性光学成像以及随后表征靶组织蛋白酶的强有力的工具。Blum等,(2007)Nat.Chem.Biol.3:668-77;Verdoes等.(2012)Chem.Biol.19:619-28。

[0008] 已经报道了基于2,3,5,6-四氟苯氧基芳基甲基酮反应性基团的基于活性的二肽肽酶I的抑制剂(Deu等,(2010)Chem Biol.17:808-819),但是这些抑制剂是非肽的,并且不包括可检测的基团。

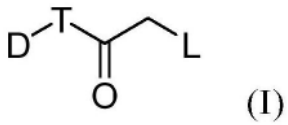
[0009] 还报道了用于含有活性蛋白酶(如组织蛋白酶)的细胞的荧光成像的淬灭的基于活性的肽抑制剂。参见,例如,美国专利申请公开No.2007/0036725。这些探针采用了酯连接的酰氧基甲基酮反应性基团来结合蛋白酶活性部位。在一些情况中,基于活性的荧光探针是非肽探针。参见,例如,PCT国际公开No.WO 2012/118715。在一些情况中,基于活性的探针用于放射性标记其靶标酶。参见,例如,PCT国际公开No.WO 2009/124265。

[0010] 然而,在该领域仍然需要新型的基于活性的半胱氨酸蛋白酶的荧光探针,其具有更高的细胞摄取率,靶向更广谱的半胱氨酸蛋白酶活性,并且提供提高的检测灵敏性。

发明内容

[0011] 本发明通过提供用于标记半胱氨酸蛋白酶的化合物、组合物以及所述化合物和组合物的使用方法,从而解决了上述问题和其它问题。

[0012] 特别地,根据本发明的一个方面,提供一种由结构式(I)表示的化合物:

[0013] 

(I)

[0014] 其中

[0015] L是醚连接的离去元件;

[0016] T 是靶标元件;

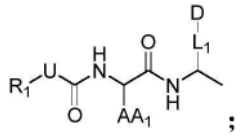
[0017] D 是可检测元件。

[0018] 在本发明的一些实施方案中,该D基团是荧光标记、放射性标记或螯合剂。

[0019] 在特定的实施方案中,D基团是荧光标记,甚至更具体的说是荧光素、俄勒冈绿(Oregon green)、氟硼荧染料、罗丹明或花菁标记。在还更特定的实施方案中,荧光标记是花菁标记,如Cy5。

[0020] 在本发明的一些实施方案中,T基团将化合物靶向半胱氨酸蛋白酶。在某些实施方案中,T基团是非肽靶标元件(例如包含三唑结构的元件),包括(例如)各种特定的包含三唑结构的元件。在某些其它实施方案中,T基团是肽靶标元件。

[0021] 在一些化合物的实施方案中,D-T-基团是

[0022] 

;

[0023] 其中L_1是接头;

[0024] AA_1是氨基酸侧链;

[0025] U是O、N或S;

[0026] R_1是烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基或保护基,并任选地由1个至3个A基团所取代;和

[0027] 各A独立地是烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷酰基、烷氨基、芳基、芳氧基、芳基氨基、芳烷基、芳烷氧基、芳烷酰基、芳烷氨基、杂芳基、杂芳氧基、杂芳基氨基、杂芳烷基、杂芳烷氧基、杂芳烷酰基、杂芳烷氨基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、环烷氧基、环烷酰基、环烷氨基、杂环基、杂环氧基、杂环基氨基、杂环基烷基、杂环基烷氧基、杂环基烷酰基、杂环基烷氨基、羟基、硫代基、氨基、烷酰基氨基、芳酰基氨基、芳烷酰基氨基、烷基羧基、碳酸酯、氨基甲酸酯、胍基、脲基、卤基、三卤代甲基、氰基、硝基、磷酰基、磺酰基、磺氨基或叠氮基。

[0028] 在特定化合物的实施方案中,L_1是任选取代的烷基接头,其中各碳原子任选地被杂原子置换。

[0029] 在其它特定化合物的实施方案中,AA_1是芳烷基氨基酸侧链并任选地被1个至3个A基团所取代。

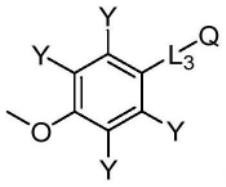
[0030] 在还一其它特定化合物的实施方案中,U是O。

[0031] 在一些实施方案中,D基团是荧光标记、放射性标记或螯合剂。

[0032] 在特定的实施方案中,D基团是荧光标记,甚至更具体的说是荧光素、俄勒冈绿,、氟硼荧染料、罗丹明或花菁标记。在还更特定的实施方案中,荧光标记是花菁标记,如Cy5。

[0033] 在一些化合物的实施方案中,L基团包含淬灭剂,在更特定的实施方案中,L是L_2-L_3-Q,其中L_2是苯氧基,L_3是接头,和Q是淬灭剂.

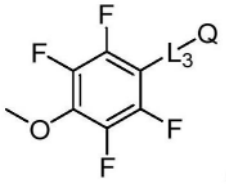
[0034] 在特定的实施方案中,L是

[0035] 

;

[0036] 其中各Y独立地是吸电子基团或氢。

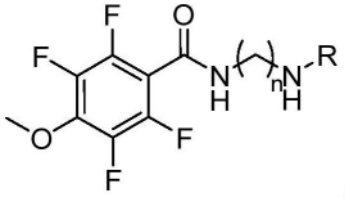
[0037] 在更特定的实施方案中,各Y独立地是卤素或氢,在还更特定的实施方案中,L是

[0038] 

并且
,

[0039] L_3是任选取代的烷基接头,其中各碳原子任选地被杂原子置换。

[0040] 在还更特定的实施方案中,L是

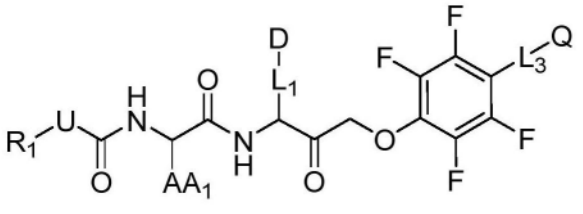
[0041] 

其中
,

[0042] R是QSY淬灭剂,且n是1至16的整数。

[0043] 在优选的实施方案中,QSY淬灭剂是亲水性QSY淬灭剂,更具体地说,亲水性QSY淬灭剂是磺基-QSY淬灭剂。

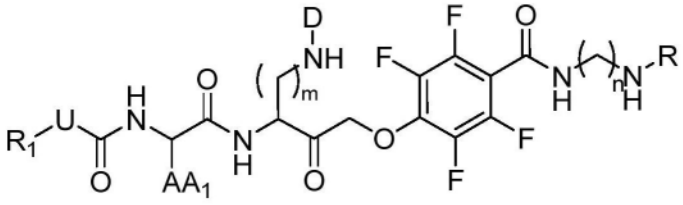
[0044] 在本发明的一些实施方案中,化合物是由结构式(II)表示的化合物:

[0045] 

(II)

[0046] 其中D是荧光标记,L_3是接头,且Q是淬灭剂。

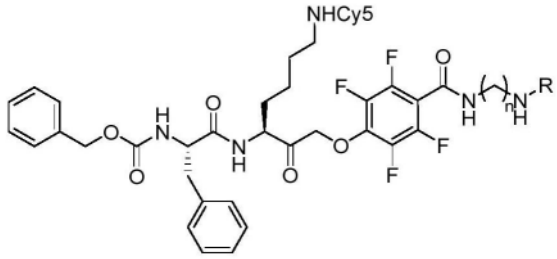
[0047] 在更特别的实施方案中,化合物是由结构式(III)表示的化合物:

[0048] 

(III)

[0049] 其中R是QSY淬灭剂,D是花菁染料,且m和n独立地是1至16整数。在一些实施方案中,R基团可以是QSY21或磺基-QSY21,且D基团可以是Cy5。

[0050] 本发明特定的化合物包括以下化合物:

[0051] 

[0052] 其中R=QSY21且n=6;

[0053] R=磺基-QSY21且n=6;

[0054] R=QSY21且n=2;和

[0055] R=磺基-QSY21且n=2。

[0056] 根据本发明的另一方面,本发明提供了包含本发明化合物和药学上可接受的载体的组合物,其用于在动物体内标记蛋白酶。

[0057] 根据本发明的还另一方面,本发明提供了一种在动物体内标记蛋白酶的方法,该方法包括以下步骤:

[0058] 向动物施用本发明的组合物。

[0059] 本发明还提供了一种使动物体内的肿瘤可视化的方法,该方法包括以下步骤:

[0060] 向动物施用本发明的组合物,并测定在动物体内,由于组合物与组织蛋白酶半胱氨酸蛋白酶之间的反应所产生的可检测的信号,其中该可检测的信号与动物体内的肿瘤有关。

[0061] 在特定的方法实施方案中,可检测的信号是荧光信号。在其它特定的方法实施方案中,荧光信号是在肿瘤边缘产生的。

附图说明

[0062] 图1.a)在这项工作中合成的qABP GB137(1)和探针2至8的结构。b)在活RAW细胞中1μM的探针1至8的标记图谱。c)在活RAW细胞中探针1和8的浓度依赖性标记。d)在活RAW细胞中探针1-8相对于5μM GB137(1)的总组织蛋白酶标记强度。

[0063] 图2.a)在pH 5.5下,探针8对RAW细胞裂解物的浓度依赖性标记。b)在活RAW细胞中,0.5μM探针8的标记时间进程。c)在活RAW细胞中,利用JPM-OEt(50μM)进行预处理对探针1和8的标记抑制和血清稳定性。d)暴露于1μM探针8的RAW细胞的活细胞荧光显微图(上排图)或与溶酶体示踪剂(lysotracker)共定位的显微图(第二排图,比例尺:10μm)。

[0064] 图3.a)注射有探针8和1(右图)的荷瘤小鼠的非侵入性光学成像的时间-过程图。底下的图表示各时间点的最佳荧光对比。b)用探针1或8(n=3;数据代表平均值±标准误差)处理的小鼠时间依赖性的肿瘤特异性荧光(肿瘤-背景)。c)在进行SDS-PAGE之后通过凝胶内荧光扫描而可视化的离体肿瘤荧光(上图)和体内荧光标记的蛋白质(下图)。d)在非侵入性光学成像(在a中示出)、离体肿瘤成像以及凝胶内荧光标记(在c中示出)的结束点的荧光强度。示出了相对于探针1的强度(n=3;数据代表平均值±标准误差)。e)探针8处理(左图)的肿瘤组织切片荧光的显微图,其中进行了CD68免疫染色(中图)和核染色(DAPI-右图,比例尺:50μm)。f)探针8(红色)处理的肿瘤组织切片的CLSM的三维重构,其中进行了CD68免疫染色(绿色)和核染色(DAPI-蓝色)。

[0065] 图4.a)BMV109标记的半胱氨酸组织蛋白酶的免疫沉淀。b、c)在活的RAW细胞中,探针1-8的浓度依赖性标记。b)和c)中的图分别是在相同的凝胶上进行电泳的。

[0066] 图5.a)注射探针1、2、6或8达到8小时后的荷瘤小鼠的非侵入性光学成像图。底下的图表示各时间点的最佳荧光对比。b)用探针1、2、6或8(n=3;数据代表平均值±标准误差)处理的小鼠的时间依赖性的肿瘤特异性荧光(肿瘤-背景)。c)在进行SDS-PAGE之后通过凝胶内荧光扫描而可视化的离体肿瘤荧光(上图)和体内荧光标记的蛋白质(下图)。d)在非侵入性光学成像(在a中示出)、离体肿瘤成像以及凝胶内荧光标记(在c中示出)的结束点的荧光强度。示出了相对于探针1的强度(n=3;数据代表平均值±标准误差)。e)探针8处理(第一、第三和第四列)的肿瘤组织切片的荧光显微图,其中进行了CD68免疫染色(第二、第三和第四列)以及核染色(DAPI,第三和第四列,比例尺:50μm)。示出了无探针对照(中间行的图)和进行免疫染色的异型对照(下图)。f)探针8(Cy5)和CD68(FITC)的共定位图。

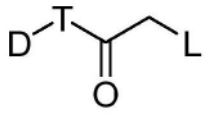
具体实施方式

[0067] 半胱氨酸组织蛋白酶是在正常细胞生理学中,以及在许多人类疾病的病理学中发挥重要作用的蛋白酶家族。因此,已开发出了许多底物和基于活性的探针(ABP)类别来研究这些酶的功能。本文提供一类基于淬灭荧光活性的探针,在一些实施方案中,其包含苯氧基甲基酮(PMK)亲电体。与先前的的报道ABP相比,这些试剂显示出对于半胱氨酸组织蛋白酶增强的光谱反应性,从而导致体外和体内的标记性能大幅度地提高。本文中,进一步地证明了探针在小鼠体内以空前的信号强度和对比度显示肿瘤。这些新的试剂能够在人类疾病的多种模型中以机体水平、组织水平、细胞水平和蛋白质水平研究半胱氨酸组织蛋白酶。

[0068] 化合物

[0069] 因此,在一些方面,本发明提供了一种用于标记蛋白酶,特别是组织蛋白酶的新型

化合物。本发明的化合物可以是式(I)的化合物：

[0070]  (I)

[0071] 其中

[0072] L是醚连接的离去元件；

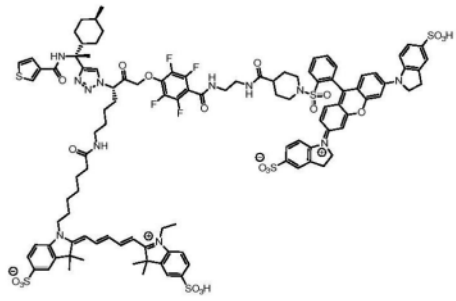
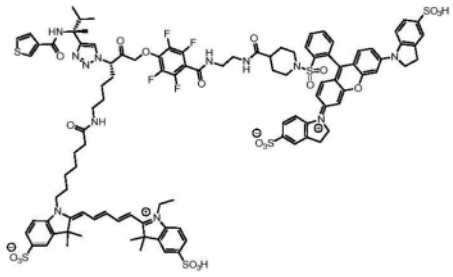
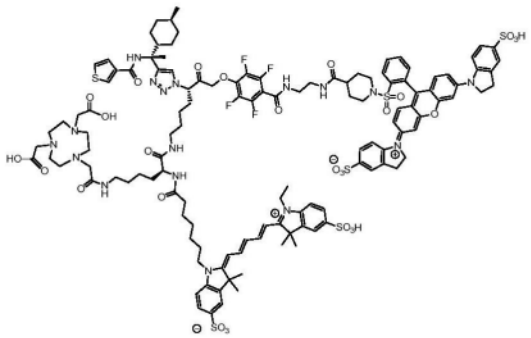
[0073] T是靶标元件；和

[0074] D是可检测元件。

[0075] 本发明化合物的靶标元件T可以是肽或非肽结构，优选使化合物靶向半胱氨酸蛋白酶。

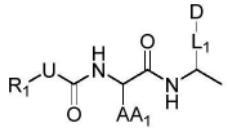
[0076] 以这些目的而纳入本发明化合物中使用的非肽结构元件的非限制性实例的是PCT国际公开No.WO2012/118715中所描述的那些，它的全部内容通过引用纳入本文。在优选的实施方案中，非肽靶标元件包括三唑结构。

[0077] 具有非肽靶标元件的本发明化合物的特定例子为：

[0078] 、和

[0079] 用于将化合物靶向半胱氨酸蛋白酶(特别是半胱氨酸组织蛋白酶)的可用于纳入本发明化合物的肽结构元件的非限制性例子是PCT国际公开No.WO2009/124265中所描述的那些，它的全部内容通过引用纳入本文。

[0080] 在本发明化合物的一些实施方案中，D-T-是

[0081] 

[0082] 其中L_1是接头；

[0083] AA_1是氨基酸侧链；

[0084] U是O、N或S；

[0085] R_1是烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基、环烯基、环烷基烷

基、杂环基、杂环基烷基或保护基,并任选地由1个至3个A基团所取代;和

[0086] 各A独立地是烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷酰基、烷氨基、芳基、芳氧基、芳基氨基、芳烷基、芳烷氧基、芳烷酰基、芳烷氨基、杂芳基、杂芳氧基、杂芳基氨基、杂芳烷基、杂芳烷氧基、杂芳烷酰基、杂芳烷氨基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、环烷氧基、环烷酰基、环烷氨基、杂环基、杂环氧基、杂环基氨基、杂环基烷基、杂环基烷氧基、杂环基烷酰基、杂环基烷氨基、羟基、硫代基、氨基、烷酰基氨基、芳酰基氨基、芳烷酰基氨基、烷基羧基、碳酸酯、氨基甲酸酯、胍基、脲基、卤基、三卤代甲基、氰基、硝基、磷酰基、磺酰基、磺氨基或叠氮基。

[0087] 如本文所使用的术语“烷基”是指饱和脂肪族基团,其包括直链烷基、支链烷基、环烷基(脂环族)、烷基取代的环烷基和环烷基取代的烷基。在一些实施方案中,直链或支链烷基在其骨架中具有30个以下的碳原子(例如,直链C_1-C_{30},支链C_3-C_{30}),更具体地20个以下。同样地,一些环烷基在其环结构中具有3至10个碳原子,更具体地环结构中具有5、6或7个碳。

[0088] 此外,如在整个说明书、实施例和权利要求书中所使用的术语“烷基”(或“低级烷基”)旨在包括“未取代的烷基”和“取代的烷基”,取代的烷基是指烷基部分具有取代了烃骨架上的一个或多个碳上的氢的取代基。这样的取代基可(例如)包括卤基、羟基、羰基(例如酮基、羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫代羰基(如硫酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸盐、氨基、酰氨、脒、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、硫代基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺氨基、磺酰基、杂环基、芳烷基、芳香族或杂芳香族部分。本领域技术人员将会理解的是在烃链上取代的部分如果需要的话,本身是可被取代的。例如,取代的烷基的取代基可以包括取代和未取代形式的氨基、叠氮基、亚氨基、酰氨基、磷酰基(包括膦酸酯和次膦酸酯)和磺酰基(包括硫酸酯、磺氨基、氨磺酰基和磺酸酯),以及醚、烷硫基、羰基(包括酮、醛、羧酸和酯)、-CF_3,-CN等。示例性的取代的烷基如下所述。环烷基可以进一步被烷基、烯基、烷氧基、烷硫基、氨基烷基、羰基-取代的烷基、-CF_3,-CN等取代。

[0089] 在一些特定的实施方案中,如本文所使用的术语“烷氧基”是指其中连接有氧的低级烷基。示例性的烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、正丁氧基等。

[0090] 如本文所使用的术语“烯基”是指含有至少一个双键的脂族基团,并旨在包括“未取代的烯基”和“取代的烯基”,后者是指烯基部分具有取代了烯基的一个或多个碳上的氢的取代基。这样的取代基,可能会发生在那些包括或不包括在一个或多个双键中的一个或多个碳上。此外,除非稳定性受到抑制,否则这样的取代基包括所有那些预期用于如以上所讨论的烷基的那些取代基。例如,烯基被一个或多个烷基、环烷基、杂环基、芳基、或杂芳基的取代是能够预期的。

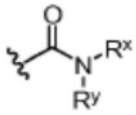
[0091] 当与化学基团(如酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基、或烷氧基)联合使用时,术语“C_{x-y}”旨在包括链中包含x至y个碳原子的的基团。例如,术语“C_{x-y}”是指取代的或未取代的饱和烃基,包括在链中含有x至y个碳原子的直链烷基和支链烷基,包括卤代烷基,如三氟甲基和2,2,2-三氟乙基等。“C_0-烷基”表示在末端的基团是氢或者如果在内部则是键。术语“C_{2-y}-烯基”和“C_{2-y}-炔基”是指取代的或未取代的不饱和脂肪族基团类似物,其在长度和可能的取代度方面与上述烷基类似,但分别包含至少一个双键或三键。

[0092] 如本文所使用的术语“烷氨基“是指被至少一个烷基所取代的氨基。

[0093] 如本文所使用的术语“烷硫基”是指被烷基取代的硫代基，并且可以通过通式烷基-S-表示。

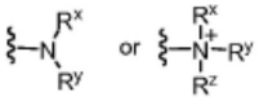
[0094] 如本文所使用的术语“炔基”是指含有至少一个三键的脂族基团，并旨在包括“未取代的炔基”和“取代的炔基”，后者指的是炔基部分具有取代了炔基的一个或多个碳上的氢的取代基。这样的取代基，可能会发生在那些包括或不包括在一个或多个三键中的一个或多个碳上此外，除非稳定性受到抑制，否则这样的取代基包括所有那些预期用于如以上所讨论的烷基的那些取代基。例如，炔基被一个或多个烷基、环烷基、杂环基、芳基、或杂芳基的取代是能够预期的。

[0095] 如本文所使用的术语“酰胺”是指以下基团：

[0096] 

[0097] 其中R^x和R^y各独立地表示氢或烃基或R^x和R^y与它们连接N原子一起形成具有4至8个原子的环结构的杂环。

[0098] 术语“胺”和“氨基”是本领域公知的，是指未取代的和取代的胺及其盐，例如由下式表示的基团：

[0099] 

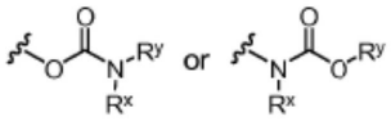
[0100] 其中R^x、R^y和R^z各独立地表示氢或烃基或R^x和R^y与它们连接N原子一起形成具有4至8个原子的环结构的杂环。

[0101] 如本文所使用的术语“氨基烷基”是指被氨基取代的烷基。

[0102] 如本文所使用的术语“芳烷基”是指被芳基取代的烷基。

[0103] 如本文所使用的术语“芳基”包括取代的或未取代的单环芳族基团，其中环的各原子为碳。在某些实施方案中，所述环是5元至7元环，并且在更具体的实施方案是6元环。术语“芳基”还包括具有两个或更多个环的多环体系，其中两个或更多个碳共用于两个相邻环，其中所述相邻环中的至少一个是芳族的，例如，其它的环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、和/或杂环基。芳基包括苯、萘、菲、苯酚、苯胺等。

[0104] 术语“氨基甲酸酯基”″是本领域公知的，并且是指以下基团：

[0105] 

[0106] 其中R^x和R^y独立地表示氢或烃基或R^x和R^y与它们连接原子一起形成具有4至8个原子的环结构的杂环。

[0107] 如本文所使用的术语“环烷基”是指非芳族的饱和或不饱和环，其中环的各原子为碳。在某些实施方案中，环烷基的环包含3至10个原子，在更具体的实施方案中是5至7个原子。

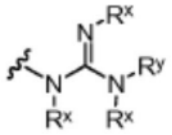
[0108] 术语“碳酸酯基”是本领域公知的，并且是指基团$-OCO_2-R^x$，其中R^x表示烃基。

[0109] 如本文所使用的术语“羧基”是指由式$-CO_2H$表示的基团。

[0110] 如本文所使用的术语“酯”是指基团$-C(O)OR^x$，其中R^x表示烃基。

[0111] 如本文所使用的术语“醚”是指通过氧连接到另一个烃基的烃基。因此,烃基的醚取代基可以是烃基-O-。醚可以是对称的或不对称的。醚的例子包括,但不限于,杂环-O-杂环和芳基-O-杂环。醚包括“烷氧基烷基”基团,其可以由通式烷基-O-烷基表示。

[0112] 术语“胍基”是本领域公知的,并且可以由以下通式表示:

[0113] 

[0114] 其中R^x和R^y独立地表示氢或烃基。

[0115] 本文所使用的术语“卤代”和“卤素”是指卤素并包括氟、氯、溴和碘。

[0116] 本文所使用的术语“杂芳烷基(hetaralkyl)”和“杂芳烷基(heteroaralkyl)”是指具有杂芳基取代的烷基。

[0117] 术语“杂芳基(heteroaryl)”和“杂芳基(hetaryl)”包括取代的或未取代的芳族单环结构,在某些具体实施方案中为5元至7元环,更具体的为5元至6元环,其环结构至少包括一个杂原子,在一些实施方案中,1至4个杂原子,并且在更具体的实施方案中,一个或两个杂原子。术语“杂芳基(heteroaryl)”和“杂芳基(hetaryl)”还包括具有两个或更多个环的多环体系,其中两个或更多个碳共用于两个相邻环,其中所述环中的至少一个是杂芳香族,例如,其他的环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、和/或杂环基。杂芳基(例如)包括吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、恶唑、噻唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶等。

[0118] 如本文所使用的术语“杂原子”指除碳或氢以外的任何元素的原子。典型的杂原子是氮、氧和硫。

[0119] 术语“杂环基”、“杂环”和“杂环的”是指取代或未取代的非芳香族环结构,在某些具体的实施方案中为3至10元环,更具体的为3至7元环,其环结构至少包括一个杂原子,在一些实施方案中为1至4个杂原子,并且在更具体的实施方案中为一个或两个杂原子。术语“杂环基”和“杂环的”还包括具有两个或更多个环的多环体系,其中两个或更多个碳是两个相邻环,其中所述环中的至少一个是杂环基,例如多环体系,其他的环可以是环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、和/或杂环。杂环基(例如)包括哌啶、哌嗪、吡咯烷、吗啉、内酯和内酰胺等。

[0120] 如本文所使用的术语“杂环基烷基”指被杂环基团取代的烷基。

[0121] 如本文所使用的术语“烃基”是指是通过碳原子键合的不具有=O或=S取代基的基团,并且通常具有至少一个碳-氢键和基本上为碳的骨架,但可任选地包括杂原子。因此,出于此目的,像甲基、乙氧基乙基、2-吡啶基和三氟甲基都被认为是烃基,但取代基如乙酰基(这在连接碳上具有=O取代基)和乙氧基(其通过氧而不是碳连接)则不被看作是烃基。所述烃基包括,但不限于,芳基、杂芳基、碳环、杂环、烷基、烯基、炔基、以及它们的组合。

[0122] 如本文所使用的术语“羟基烷基”是指被羟基取代的烷基。

[0123] 当术语“低级”与化学基团(如酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基或烷氧基)共同使用时是指这样的基团,其中在取代基中包括十个以下的非氢原子。并且在某些实施方案中为六个以下。“低级烷基”,例如,是指包含十个以下碳原子的烷基,并在具体的实施方案中,为六个以下的碳原子。在某些实施方案中,本文所限定的酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基取代基分别是低级酰基、低级酰氧基、低级烷基、低级烯基、低级炔基和低级烷氧基,无论它们是

单独出现还是与其它取代基组合出现,如在羟烷基和芳烷基所限定的那样(在这种情况下,例如,当计算烷基取代基中的碳原子时不计算在芳基中的原子)。

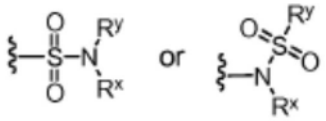
[0124] 术语“多环基(polycyclyl)”,“多环(polycycle)”和“多环的”是指两个或更多个环(例如,环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、和/或杂环基),其中两个或更多个原子共用于两个相邻的环,例如,环是“稠合环”。多环的各环可以是取代或未取代的。在某些实施方案中,多环的各环为含有3至10个原子的环,更具体地为5至7个原子的环。

[0125] 术语“取代的”是指在骨架上的一个或多个碳原子上具有取代了氢的取代基的基团。应该理解的是,“取代”或“取代的”包括隐含的条件,其是这样的取代根据取代的原子和取代基的允许的化合价,并且该取代产生稳定的化合物,例如,化合物在其使用条件下不自发进行转化(例如通过重排、环化、消除等转化)。如本文所使用的“取代的”意指包括有机化合物的所有允许的取代基。广义上说,允许的取代基包括有机化合物的无环和有环、支链和无支链、碳环和杂环、芳香族和非芳香族的取代基。对于适当的有机化合物而言,允许的取代基可以是一个或更多个以及相同或不同的。出于本发明的目的,杂原子(如氮)可具有氢取代基和/或本文所描述的满足杂原子的化合价的有机化合物任何可允许的取代基。取代基可以包括本文所描述的任何取代基,例如,卤素、羟基、羰基(例如酮、羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫代羰基(如硫酯、硫代乙酸酯、或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸酯、氨基、酰氨基、脒基、亚胺基、胍基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺氨基、磺酰基、杂环基、芳烷基芳香族或杂芳香族部分。本领域技术人员应当理解的是如果合适的话,烃链上取代的部分可被本身取代。

[0126] 除非特别说明,在此提及的化学部分“未取代的”应理解为包含取代的变体。例如,提及“芳基”基团或部分隐含包含取代和未取代的变体。

[0127] 术语“硫酸酯”是本领域公知的并且是指基团-OSO_3H或其药学上可接受的盐。

[0128] 术语“磺酰胺”是本领域公知的,并且指的是由下列通式表示的基团:

[0129] 

[0130] 其中R^x和R^y独立地表示氢或烃基。

[0131] 术语“亚砜”是本领域公知的并且是指基团-S(0)-R^x,其中R^x表示烃基。

[0132] 术语“磺基”或“磺酸酯基”是本领域公知的并且是指基团-SO_3H或其药学上可接受的盐。

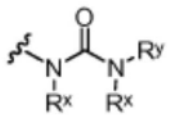
[0133] 术语“砜”是本领域公知的并且是指基团-$S(0)_2$-R^x,其中R^x表示烃基。

[0134] 如本文所使用的术语“硫代烷基”是指被巯基取代的烷基。

[0135] 如本文所使用的术语“硫酯”是指基团-C(0)SR^x或-SC(0)R^x,其中R^x表示烃基。

[0136] 如本文所使用的术语“硫醚”等价于醚,其中氧被硫取代。

[0137] 术语“脲基”是本领域公知的并且可有以下通式表示:

[0138] 

[0139] 其中R^x和R^y独立地表示氢或或烃基。

[0140] 本发明的化合物通常是使用标准的合成化学技术合成的,例如,使用在下面的实施例部分所描述的方法合成。其它有用的合成技术(例如)描述在March's Advanced Organic Chemistry:Reactions,Mechanisms,and Structure,7th Ed.,(Wiley,2013);Carey和Sundberg,Advanced Organic Chemistry 4th Ed.,Vols.A and B(Plenum 2000,2001);Fiesers'Reagents for Organic Synthesis,Volumes 1-27(Wiley,2013);Rodd's Chemistry of Carbon Compounds,Volumes 1-5and Supplementals(Elsevier Science Publishers,1989);Organic Reactions,Volumes 1-81(Wiley,2013);以及Larock's Comprehensive Organic Transformations(VCH Publishers Inc.,1989)(它们的全部内容通过引用纳入本文)。这些化合物使用的原料是通常可从商业来源获得的或可容易地使用本领域技术人员公知的方法制备。例如,参见Fiesers'Reagents for Organic Synthesis,Volumes 1-27(Wiley,2013)或Beilsteins Handbuch der organischen Chemie,4,Aufl.ed.Springer-Verlag,Berlin,包括增刊。

[0141] 当提及本发明化合物的组分时,可以使用术语"衍生自...的残基"来描述由第一组分上的第一反应官能团和第二组分上的第二反应官能团反应而形成的残基。在示例性实施方案中,在第一组分上的胺基团可以与第二组分上的活化的羧基反应,从而形成包括一个或多个酰胺部分的残基。本发明涵盖了第一和第二反应官能团的其它排列。例如,本领域技术人员能够理解的,通过公知的"点击"反应,叠氮化物-取代的第一组分与炔取代的第二组分之间的由酮催还或非酮催化的反应产生包含三唑的残基。参见Kolb等,(2001)Angew.Chem.Int.Ed.Engl.40:2004;Evans(2007)Aus.J.Chem.60:384。在PCT国际公开No.WO 2012/118715中提供了利用"点击"反应产生非肽荧光成像探针的示范性方法。这些方法产生或修饰本发明化合物的适应性落入本领域的技术范围内。

[0142] 本领域的技术人员将理解,保护基可逆地连接到分子的所需位置,以控制其他试剂在该位置的反应。在本发明的实践中有用的保护基团是本领域所公知的。例如参见P.G.M.Wuts和T.W.编辑的Greene Greene's Protective Groups in Organic Synthesis,4th edition(Wiley-Interscience,2006);和P.Kocienski的Protecting Groups(Thieme,2005)。

[0143] 本发明化合物的L_1基团是接头基团,其使可检测元件D与靶标元件相连。如本领域技术人员所理解的,该基团可以是任何合适的接头。L_1基团优选为烷基接头基团,其中该烷基接头任选地被取代,此外,接头中的碳任选地以获得的结构化学稳定的程度被杂原子置换。这样的取代和置换应该理解为包括在接头内插入基团,如醚、硫醚、二硫化物、酯、酰胺、碳酸酯、氨基甲酸酯等等。优选的接头长度在5至40个键长的范围内,并且其可以是支链、直链或包含环。在一些情况下,接头可以包括双键。根据特殊需要,它们可以是根据需要的疏水的或亲水的。

[0144] 还应该理解的是,在L_1基团和可检测元件D之间的连接可以是任何合适的化学连接,正如本领域技术人员可以理解的那样。例如,在一些情况下,本发明化合物可能可以方便地通过在可检测元件的前体中包括与特定化学基团(例如氨基,硫醇基等)反应的部分来制备。可检测元件能够通过靶标元件上的该进团的反应而在这样的位置容易地连接到靶标元件上。由此能够理解的是即使未明确示出连接结构的细节,连接的这些类型也在本公开化合物的范围内。

[0145] 如本领域技术人员可以理解的是本发明化合物的AA_1基团可以是任何天然或非天然氨基酸侧链。在优选的实施方案中,AA_1基是任选地被1至3个A基团取代的芳烷基氨基酸侧链。在甚至更优选的实施方案中,AA_1基是苯丙氨酸侧链。

[0146] 在优选的化合物中,U基团是O。

[0147] 在特定的实施方案中,本发明的化合物的可检测元件是荧光标记、放射性标记、螯合剂等。在PCT国际公开No.2009/124265中描述了适于在这些化合物中使用的放射性标记和螯合剂的例子。

[0148] 在本发明化合物优选的实施方案中,可检测元件是荧光标记。如本领域的普通技术人员已知的,当由于吸收入射电磁辐射而引起刺激时,荧光标记发射电磁辐射,优选可见光。市售有各种各样的荧光标记,包括具有用于将标记与反应基团偶联的反应的部分标记,所述反应基团例如为氨基、硫醇基等。例如,参见,The Molecular *Probes*®Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies。

[0149] 荧光标记的实例是广泛用于免疫荧光标记的荧光素。荧光素是在495纳米处具有最大吸收度的咕吨染料。相关的荧光团是俄勒冈绿,荧光素的氟化衍生物。

[0150] 在一些实施方案中,在本发明化合物的可检测元件中使用的荧光标记可以是pH依赖性荧光团。如本领域技术人员所理解的,例如,如使用在如下所示的标记为“LES12”和“LES13”的化合物中的这样的荧光标记物,显示出取决于标记环境的pH的荧光光谱,并因此可用于报告反应后的标记的环境信息,例如被反应化合物标记的蛋白酶的位置或类型的信息。在本发明化合物的可检测元件中有用的各种标记的pH依赖性荧光团是已知的,例如,参见The Molecular *Probes*®Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies,它的全部内容通过引入纳入本文。

[0151] 适用于本发明化合物中的其它示例性的荧光标记是氟硼荧染料、罗丹明和花菁染料。特别是,氟硼荧染料由4,4-二氟-4-硼杂3a,4a-二氮杂-s-苯并二茚(氟化硼络合二吡咯甲川))表示,被称为BODIPY®染料。这些染料的各种衍生物是已知的,并且被认为适合用作本发明化合物中的可检测元件。例如,参见Chen等,(2000)J.Org.Chem.65:2900-2906。

[0152] 在本发明化合物中采用的另一类有用的荧光标记是可从Li-Cor(www.licor.com)获得的IRDye红外染料。这些染料的非限制性例子为IRDye 800CW、IRDye 680RD、IRDye 680LT、IRDye 750、IRDye700DX、IRDye 800RS和IRDye 650。

[0153] 罗丹明染料是一类基于罗丹明环结构的染料。罗丹明尤其包括,四甲基罗丹明(TMR)和羧基四甲基罗丹明(TAMRA),TMR是非常普遍的用于制备蛋白质缀合物(特别是抗体和抗生物素蛋白缀合物)的荧光团,而TAMRA是通常用于寡核苷酸标记和自动核酸测序的染料。罗丹明作为基于荧光素的荧光基团的天然补给物存在,它提供更长的波长发射最大值和由此为多色标记或染色提供了机会。

[0154] 称为Alexa Fluor染料的磺化罗丹明系列荧光团也包含在罗丹明染料的组中。由Molecular Probes公司引入的Alexa Fluor染料例证了现代荧光技术中的巨大进步。对于更强烈的荧光发射,这些磺化罗丹明衍生物显示出比光谱类似探针更高的量子产率,并且具有几个附加的改进特性,包括增强的光稳定性、与共同激光线匹配的吸收光谱、pH值不敏感和高度水溶性。

[0155] 花菁染料对应于相关的染料Cy2、Cy3、Cy5、Cy7和它们的衍生物家族,它们基于部

分饱和的吲哚氮杂环核,具有通过不同碳数的聚烯烃桥相连的两个芳香族单元。这些探针展示出类似于许多传统的染料(例如荧光素和四甲基罗丹明)的荧光激发和发射图谱,但是它们具有增强的水溶性、光稳定性和更高的量子产率。大多数的花菁染料比它们的传统对应物更具有环境稳定性,使它们的荧光发射强度对于pH和有机封装介质(mounting medium))较不敏感。以类似于Alexa Fluors的方式,将Cy系列合成染料的激发波长特意性地调谐为被普通激光和电弧放电光源所用,并且可以利用传统的过滤器的组合来检测荧光发射。作为反应性染料或荧光团的花菁染料是容易得到的。花菁染料通常具有比的Alexa Fluor家族的成员更广泛的吸收光谱,使它们在一定程度上在共焦显微镜的激光激发源的选择中更为通用。

[0156] 在优选的实施方案中,本发明化合物的可检测元件是花菁染料Cy5。

[0157] 在一些实施方案中,在本发明化合物的可检测元件内,有益的是可以包括多个荧光标记、放射性标记、螯合剂等。例如,以下标记为“LES12”和“LES13”的示范性化合物在单独的检测元件内包括两个不同的荧光标记。如本领域技术人员能够理解的,这种多个标记可使用常规偶联化学法得以实现。例如,“LES12”和“LES13”化合物中的荧光标记使用“点击”化学偶联。通过“点击”化学合成在可检测元件内包含多个标记的化合物的有用中间体化合物的例子如下所示(“WL938”)。此化合物包含叠氮基团,因此在“点击”反应中,与合适的含炔试剂可以容易地反应。正如本领域普通技术人员可以理解的那样,如果需要的话,炔和叠氮基团的位置也可以是颠倒的。

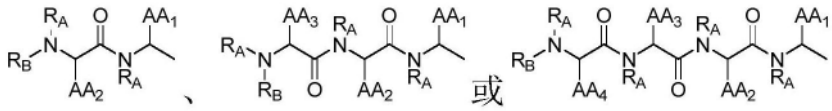
[0158] 在一些实施方案中,本发明的化合物为式(I)的化合物,其中T是肽靶标元件,并且该化合物在以下编号的声明中进一步描述:

[0159] 1.式(I)的化合物,其中D-T-是短的可检测的肽基;并且

[0160] L是醚连接的离去元件。

[0161] 2.声明1的化合物,其中可检测的肽基包含1至4个氨基酸残基。

[0162] 3.声明2的化合物,其中D-T是:

[0163] 

其中;

[0164] 各AA_1、AA_2、AA_3和AA_4独立地是氨基酸侧链或-L_1-D;

[0165] 各R_A独立地是氢或R_1;

[0166] R_B是氢、R_1、-C(O)R_1、-C(O)OR_1、-C(O)SR_1或-C(O)N(R_1)(R_A);

[0167] R_1是烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基、保护基或-L_1-D,并任选地由1个至3个A基团所取代;

[0168] 各A独立地是烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷酰基、烷氨基、芳基、芳氧基、芳基氨基、芳烷基、芳烷氧基、芳烷酰基、芳烷氨基、杂芳基、杂芳氧基、杂芳基氨基、杂芳烷基、杂芳烷氧基、杂芳烷酰基、杂芳烷氨基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、环烷氧基、环烷酰基、环烷氨基、杂环基、杂环氧基、杂环基氨基、杂环基烷基、杂环基烷氧基、杂环基烷酰基、杂环基烷氨基、羟基、硫代基、氨基、烷酰基氨基、芳酰基氨基、芳烷酰基氨基、烷基羧基、碳酸酯、氨基甲酸酯、胍基、脲基、卤基、三卤代甲基、氰基、硝基、磷酰基、磺酰基、磺氨基或叠氮基;和

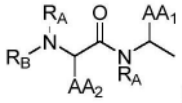
[0169] L_1是接头。

[0170] 4.声明3的化合物,其中

[0171] 各R_A是氢;并且

[0172] R_B是-C(O)OR_1。

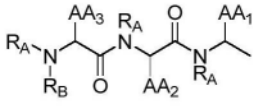
[0173] 5.声明3的化合物,其中D-T-是

[0174] ;

[0175] 各AA_1和AA_2独立地是氨基酸侧链或-L_1-D;并且

[0176] 各R_A是氢。

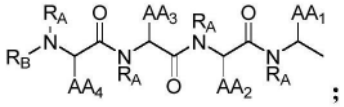
[0177] 6.声明3的化合物,其中D-T-是

[0178] ;

[0179] 各AA_1、AA_2和AA_3独立地是氨基酸侧链或-L_1-D;并且

[0180] 各R_A是氢。

[0181] 7.声明3的化合物,其中D-T-是

[0182] ;

[0183] 各AA_1、AA_2、AA_3和AA_4独立地是氨基酸侧链或-L_1-D;并且

[0184] 各R_A是氢。

[0185] 8.声明3的化合物,其中L_1是任选取代的烷基接头,其中各碳原子任选地被杂原子置换。

[0186] 9.声明3的化合物,其中R_B是-C(O)OR_1。

[0187] 10.声明3的化合物,其中D是荧光标记、放射性标记或螯合剂。

[0188] 11.声明10化合物,其中D是荧光标记。

[0189] 12.声明11化合物,其中荧光标记是荧光素、俄勒冈绿、氟硼荧染料、罗丹明或花菁标记。

[0190] 13.声明12化合物,其中荧光标记是花菁标记。

[0191] 14.声明13化合物,其中花菁标记是Cy5。

[0192] 如本领域技术人员可以理解的是本发明化合物的AA_1、AA_2、AA_3和AA_4基团可以独立的是任何天然或非天然氨基酸侧链或者是基团“-L_1-D”。在优选的实施方案中,该基团是任选地被1至3个A基团取代的芳烷基氨基酸侧链。在甚至更优选的实施方案中,该基团是来自苯丙氨酸的侧链。在其它优选的实施方案中,该基团是来自酸性氨基酸残基的侧链,如来自天冬氨酸或谷氨酸残基,或来自烷基氨基酸残基(如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)或来自其它这样的氨基酸残基的任意组合的的侧链。来自其它氨基酸残基(如赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺等)的侧链也优选包含在本发明的化合物内。

[0193] 在AA_1、AA_2、AA_3或AA_4基团是“-L_1-D”基团的化合物的实施方案中,在L_1接头元件可以由氨基酸侧链提供。例如,赖氨酸残基方便地提供了用于与适当活化的可检测元件反应的氨基烷基。

[0194] “短的”可检测的肽基团在本文中定义为具有至多10个氨基酸残基的可检测的肽基团。

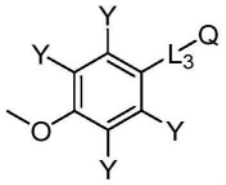
[0195] 本发明化合物的醚连接的离去元件L影响化合物与它们的目标酶的活性部位的反应性,并且还可以影响靶向特定酶的特异性。这些化合物中的离去元件的醚键与其它基于活性的探针(如酰氧基甲基酮(AOMK))中的酯键形成对比。相比酯连接或其它类型的探针,醚连接的离去元件,例如,酚醚连接离去元件,可以具有改善的体内稳定性。

[0196] 在一些实施方案中,本发明化合物的醚连接的离去元件包括淬灭剂。术语“淬灭剂”是指调节荧光团的发光的化学实体。在一些情况下,淬灭剂本身可以是在特征波长发射荧光的荧光分子,该特征波长不同于荧光淬灭的标记。因此,当适当地与其他染料偶联时,荧光团可以充当淬灭剂,反之亦然。在这些情况下,来自受体分子(受体具有与供体标记不同的波长)荧光的增加可以分别报告标记化合物与它的环境(例如,靶标酶的活性部位)的相互作用。在一些情况下,淬灭剂本身不发荧光(即,淬灭剂是“暗受体”)。这样淬灭剂(例如)包括dabcyl、甲基红、QSY二芳基罗丹明染料等。特别地,dabcyl(4-二甲基氨基-苯偶氮基)苯甲酸)是一种常见的广泛应用于许多测定法(如用于DNA检测的“分子信标”)的暗淬灭剂(美国专利No.5989823)。被称为“黑洞淬灭剂”的BHQ系列重氮染料具有广范围的吸收,其与许多与许多荧光团的发光重叠良好(PCT国际公开No.WO01/86001)。来自Molecular Probes公司的QSY是在许多生物分析中已被广泛地用作淬灭剂的暗淬灭剂染料的另一例子(美国专利No.6399392)。

[0197] 特别地,QSY7是非荧光二芳基罗丹明衍生物(美国专利申请公开No.2005/0014160)。QSY21是在可见光谱内具有强吸收的非荧光二芳基罗丹明发色团,并且是有效的荧光淬灭剂。在美国专利申请公开No.2004/0241679中进一步说明了荧光团/淬灭剂对。

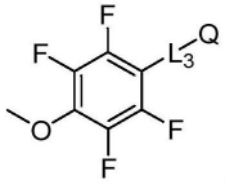
[0198] IRDye QC-1(可购自LI-COR)是非荧光染料的另一实例,其适合用作本发明化合物的淬灭剂。它有效地淬灭由广范围(包括从可见光预期到近红外区域的波长范围)的荧光团产生的荧光。

[0199] 在本发明化合物的一些实施方案中,离去基团元件L是L_2-L_3-Q,其中L_2是苯氧基,L_3是接头,并且Q是淬灭剂。离去基团元件(例如)可以是:

[0200] 

,

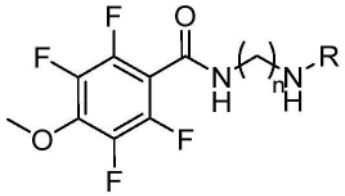
[0201] 其中各Y独立地是吸电子基团或氢。在这样的化合物中,各Y可以独立地是卤素或氢。在特定的化合物,中,L基团例如是:

[0202] 

。

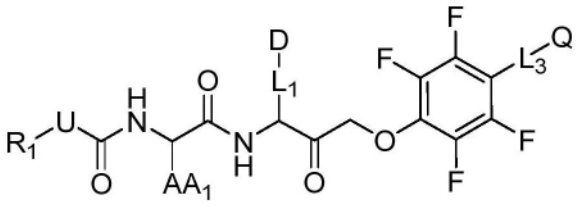
[0203] 如本领域的普通技术人员的人员所理解的,上述离去元件的L_3接头基团可以是任何合适的接头。特别地,L_3接头基团例如)可以是如上所述的L_1基团。

[0204] 在特定的化合物,中,L基团例如是:

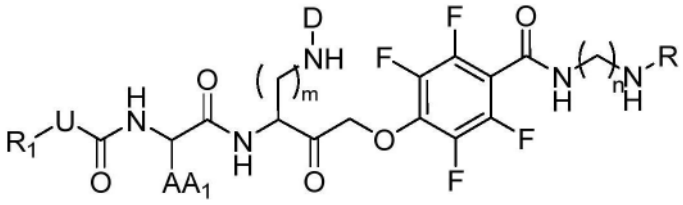
[0205] 

[0206] 其中R是QSY淬灭剂,且n是1至8的整数。在特定的实施方案中,QSY淬灭剂是亲水性淬灭剂,,如,例如,磺基-QSY淬灭剂。

[0207] 在一些具体的实施方案中,本公开的化合物具有式(II)的结构:

[0208] 
(II)。

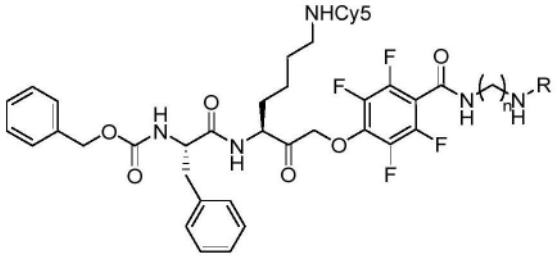
[0209] 在一些更具体的实施方案中,本公开的化合物具有式(III)的结构:

[0210] 
(III)。

[0211] 在这些实施方案中,m和n独立地是整数1至16。

[0212] 在一些实施方案中,R是QSY21或磺基-QSY21,D为Cy5。

[0213] 本发明特定的非限制性化合物的实施方案包括:

[0214] 

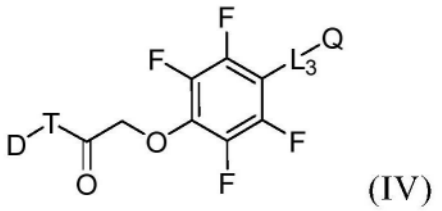
[0215] 其中R=QSY21且n=6;

[0216] R=磺基-QSY21且n=6;

[0217] R=QSY21且n=2;和

[0218] R=磺基-QSY21且n=2。

[0219] 在一些实施方案中,本发明的化合物是具有式(IV)的结构的化合物:

[0220] 
(IV)

[0221] 其中T是肽靶标元件,该化合物在以下编号的声明中进一步描述:

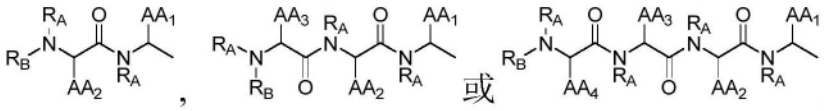
[0222] 1.式(IV)的化合物,其中D-T-是短的可检测的肽基;

[0223] L_3是接头;并且

[0224] Q是淬灭剂。

[0225] 2.声明1的化合物,其中可检测的肽基包含1至4个氨基酸残基。

[0226] 3.声明2的化合物,其中D-T是:

[0227] ,其中

[0228] 各AA_1、AA_2、AA_3和AA_4独立地是氨基酸侧链或-L_1-D;

[0229] 各R_A独立地是氢或R_1;

[0230] R_B是氢、R_1、-C(O)R_1、-C(O)OR_1、-C(O)SR_1或-C(O)N(R_1)(R_A);

[0231] R_1是烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳烷基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、杂环基、杂环基烷基、保护基或-L_1-D,并任选地由1个至3个A基团所取代;

[0232] 各A独立地是烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷酰基、烷氨基、芳基、芳氧基、芳基氨基、芳烷基、芳烷氧基、芳烷酰基、芳烷氨基、杂芳基、杂芳氧基、杂芳基氨基、杂芳烷基、杂芳烷氧基、杂芳烷酰基、杂芳烷氨基、环烷基、环烯基、环烷基烷基、环烷氧基、环烷酰基、环烷氨基、杂环基、杂环氧基、杂环基氨基、杂环基烷基、杂环基烷氧基、杂环基烷酰基、杂环基烷氨基、羟基、硫代基、氨基、烷酰基氨基、芳酰基氨基、芳烷酰基氨基、烷基羧基、碳酸酯、氨基甲酸酯、胍基、脲基、卤基、三卤代甲基、氰基、硝基、磷酰基、磺酰基、磺氨基或叠氮基;和

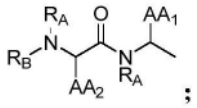
[0233] L_1是接头。

[0234] 4.声明3的化合物,其中

[0235] 各R_A是氢;并且

[0236] R_B是-C(O)OR_1。

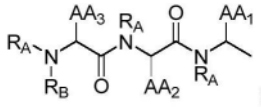
[0237] 5.声明3的化合物,其中D-T-是

[0238] ;

[0239] 各AA_1和AA_2独立地是氨基酸侧链或-L_1-D;并且

[0240] 各R_A是氢。

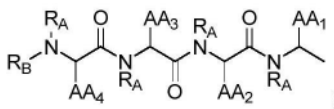
[0241] 6.声明3的化合物,其中D-T-是

[0242] ;

[0243] 各AA_1、AA_2和AA_3独立地是氨基酸侧链或-L_1-D;并且

[0244] 各R_A是氢。

[0245] 7.声明3的化合物,其中D-T-是

[0246] ;

[0247] 各AA_1、AA_2、AA_3和AA_4独立地是氨基酸侧链或-L_1-D;并且

[0248] 各R_A是氢。

[0249] 8.声明3的化合物,其中L_1是任选取代的烷基接头,其中各碳原子任选地被杂原子置换。

[0250] 9.声明3的化合物,其中R_B是-C(O)OR_1。

[0251] 10.声明3的化合物,其中D是荧光标记、放射性标记或螯合剂。

[0252] 11.声明10化合物,其中D是荧光标记。

[0253] 12.声明11化合物,其中荧光标记是荧光素、俄勒冈绿、氟硼荧染料、罗丹明或花菁标记。

[0254] 13.声明12化合物,其中荧光标记是花菁标记。

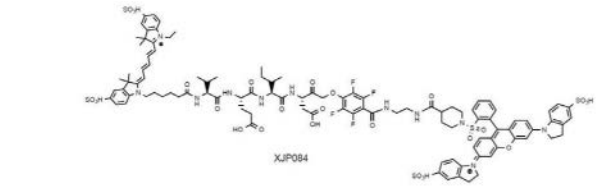
[0255] 14.声明13化合物,其中花菁标记是Cy5。

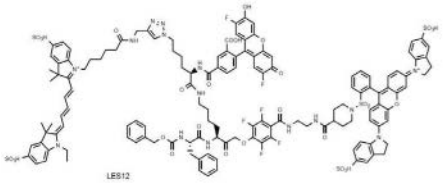
[0256] 如本领域技术人员可以理解的是本发明化合物的AA_1、AA_2、AA_3和AA_4基团可以独立的是任何天然或非天然氨基酸侧链或者是基团"-L_1-D"。在优选的实施方案中,该基团是任选地被1至3个A基团取代的芳烷基氨基酸侧链。在甚至更优选的实施方案中,该基团是来自苯丙氨酸的侧链。在其它优选的实施方案中,该基团是来自酸性氨基酸残基的侧链,如来自天冬氨酸或谷氨酸残基,或来自烷基氨基酸残基的侧链,如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、或其它这样的氨基酸残基的任意组合。来自其它氨基酸残基(如赖氨酸、精氨酸、酪氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺等)的侧链也优选包含在本发明的化合物内。

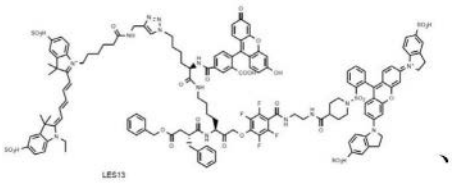
[0257] 在AA_1、AA_2、AA_3或AA_4基团是"L_1-D"基团的化合物实施方案中,在L_1接头元件可以由氨基酸侧链提供。例如,赖氨酸残基方便地提供了用于与适当活化的可检测元件反应的氨基烷基。

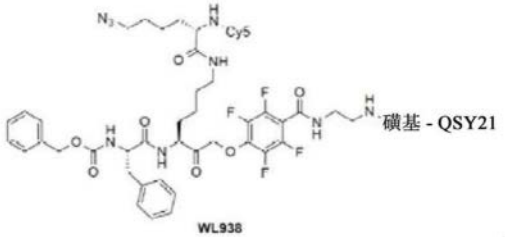
[0258] "短的"可检测的肽基团在本文中定义为具有至多10个氨基酸残基的可检测的肽基团。

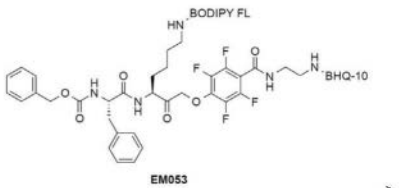
[0259] 本发明的其它具体的非限制性化合物的实施方案包括:

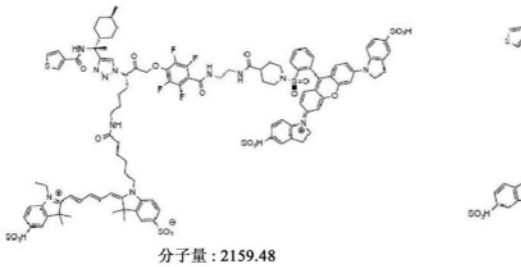
[0260] 

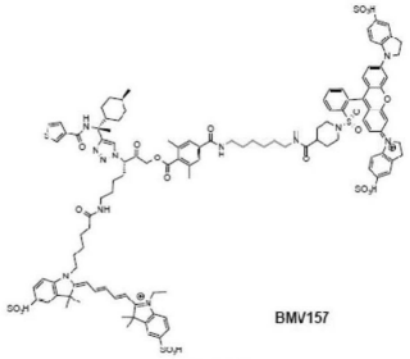


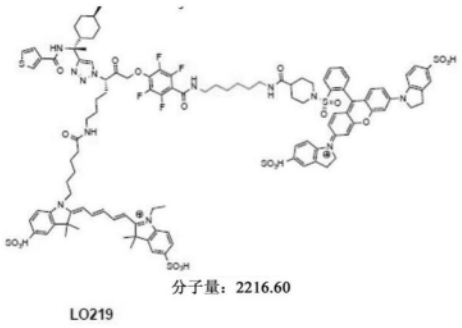






[0261] 

、

和

。

[0262] 药物组合物

[0263] 在另一个方面，本发明提供了包含本发明化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。这类组合物（例如）用于动物体的组织内成像并还用于评估动物体内的酶（例如蛋白酶）活性。特别地，对于标记组织蛋白酶的本发明的化合物，药物组合物可以用作癌细胞的非侵入性光学成像工具。

[0264] 药学上可接受的载体是本领域已知的，并且（例如）包括水溶液例如水或生理缓冲盐水或其他溶剂或赋形剂（如乙二醇、甘油、油（如橄榄油）或可注射的有机酯）。在具体实施方案中，当这种药物组合物施用于人类时，该水溶液是无热原的，或基本上无热原的。可以选择赋形剂（例如）从而实现药剂的缓释或选择性地靶向一种或多种细胞、组织或器官。药物组合物可以是单位剂量形式（如片剂、胶囊、胶囊微粒（sprinkle capsule）、颗粒剂、粉剂、糖浆、栓剂、或注射剂等）。组合物也可存在于透皮递送系统（例如，皮肤贴剂）。

[0265] 药学上可接受的载体可包含生理上可接受的药剂，其（例如）用于稳定或增加本发明的化合物的吸收。这种生理上可接受的药剂（例如）包括碳水化合物，如葡萄糖、蔗糖或葡聚糖；抗氧化剂，如抗坏血酸或谷胱甘肽；螯合剂；低分子量蛋白或其它稳定剂或赋形剂。药学上可接受的载体的选择（包括生理上可接受的药剂）取决于（例如）组合物的给药途径。药物组合物还可以包括脂质体或其他聚合物基质，其中（例如）本发明的化合物药物组合物已经容纳于它们之中。例如由磷脂或其它脂质构成的脂质体是无毒的、生理上可接受和可代谢的载体，其能够相对简单的制造和施用。

[0266] 在本文中短语“药学上可接受的”用来指这样的化合物、材料、组合物和/或剂型，在合理的医学判断范围内，它们适合用于与人类和动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

[0267] 如本文所使用的短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或赋形剂，如液体或固体填充剂、稀释剂、赋料、溶剂或包封材料，涉及将来自体内的一个器官

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

[0268] 包含本发明化合物的药物组合物可通过多种给药途径中的任意一种施用给受试者,所述途径(例如)包括口服(例如,作为在水性或非水性溶液或悬浮液中的浸润剂、片剂、丸剂、粉剂、颗粒剂、施用到舌头上的糊剂);舌下含服;经肛门、经直肠或经阴道(例如作为阴道栓剂、乳膏或泡沫);经肠胃外(包括肌内、静脉内、皮下或鞘内,例如,通过无菌溶液或悬浮液形式);经鼻;腹腔内;皮下;透皮(例如,如施用到皮肤的贴剂);或局部给药(例如作为乳膏、软膏或喷雾剂施用到皮肤上)。所述化合物也可以被配制为用于吸入。在某些实施方案中,本发明的化合物可以简单地溶解或悬浮在无菌水中。合适的给药途径及适合施用组合物的给药途径的细节(例如)可在以下文献中找到:美国专利No.6,110,973;5,763,493;5,731,000;5,541,231;5,427,798;5,358,970;和4,172,896,以及这些专利文献中所引用的文献。

[0269] 标记和可视化的方法

[0270] 在另一个方面,本发明提供了使动物体内的肿瘤可视化的方法,该方法包括向动物施用本发明组合物的步骤。

[0271] 在另一个方面,本发明提供了使动物体内的肿瘤可视化的方法,该方法包括向动物施用本发明组合物,并测定在动物体内,由于组合物与半胱氨酸组织蛋白酶之间的反应所产生的可检测的信号,其中该可检测的信号与动物体内的肿瘤有关。

[0272] 在所述方法的一些实施方案中,可检测的信号是荧光信号。在一些实施方案中,荧光信号是在肿瘤边缘产生的。

[0273] 将肽类成像剂施用给动物是本领域普通技术人员所熟知的。在优选的实施方案中,所述药剂是通过注射来施用的,但是其它合适的施用方式也被认为是在本发明的范围之内。

[0274] 本发明的方法针对使动物体内蛋白酶(特别是半胱氨酸蛋白酶)的标记和可视化。合适的动物包括表达半胱氨酸蛋白酶,特别是在肿瘤细胞中表达半胱氨酸蛋白酶的动物。在优选的实施方案中,该动物是哺乳动物。在高度优选的实施方案中,该动物是人。在其它优选的实施方案中,该动物是家畜或宠物。

[0275] 在一些实施方案中,本发明的方法包括测定在动物体内产生的可检测信号的步骤。测定可检测信号的方法包括但不限于,成像方法,例如荧光成像法。在一些实施例中,例如,荧光成像系统(例如)是Xenogen IVIS100系统,但是可以使用任何合适的系统。

[0276] 对于本领域技术人员来说,显而易见的是在不脱离本发明或其任意实施方案的范

围下,可以对本文所描述的方法和应用做出其它合适的修改与调整。虽然现在已经详细描述了本发明,但是通过参照以下实施例将更加清楚地理解本发明,在此包括以下实施例仅用于举例说明,并非意在限制本发明。

[0277] 实施例

[0278] 包含新型苯氧基甲基酮(PMK)亲电体的淬灭荧光半胱氨酸组织蛋白酶成像探针的合成与表征

[0279] 这项工作的目的在于开发一种与现有的用于癌症的非侵入性光学成像的qABP相比,体内性能总体提高的qABP。因此,决定优化探针的三个主要的元件:淬灭剂、接头和亲电"弹头"。迄今报告的半胱氨酸组织蛋白酶qABP的最大的缺点之一是水溶性较差。因此将磺酸酯基团引入到QSY21淬灭剂(Xing等,(2005)J.Am.Chem.Soc.127:4158-9),以提高水溶性,由此提高探针的生物分布。还改变了连接亲电体和淬灭剂的间隔子的长度,以降低qABP的亲脂性。最后,探索了新的亲电体,以增加可能的组织蛋白酶靶标的范围。由于在多种癌症中,半胱氨酸蛋白酶家族的一些成员的表达上调(Mohamed&Sloane(2006)Nat.Rev.Cancer(2006)6:764-75),因此如果探测靶向广谱的半胱氨酸蛋白酶活性,则将可以预期到更明亮的荧光信号。为了获得更广泛反应性(pan-reactive)的探针,降低了亲电体的尺寸,并提高了反应性。先前已表明相比于2,6-二甲基苯甲酸衍生的酰氧基甲基酮(AOMK)而言,2,3,5,6-四氟取代的苯氧基甲基酮(PMK)亲电体对于半胱氨酸二肽基氨基肽酶具有更高的反应性。Deu等,(2010)Chem Biol.17:808-819。PMK的小尺寸也能提高广泛反应性,因为一些半胱氨酸组织蛋白酶的结合槽在空间上受到限制。Blum等,(2005)Nat.Chem.Biol.1:203-9;Blum等,(2007)Nat.Chem.Biol.3:668-77;Paulick&Bogyo(2011)ACS Chem.Biol.6:563-72。此外,相比于AOMK亲电体(包含能够被酯酶降解的酯键),预期苯酚醚在体内更稳定。

[0280] 作为这项研究的起点,合成了qABP GB137的7种类似物(2-8)(图1a)。Blum等,(2007)Nat.Chem.Biol.3:668-77。这些化合物代表两种亲电体、两种淬灭剂和两种接头长度的所有组合。使用基于如与以下方案1相关的描述中所述的基于溶液化学方案的优选方案合成所有探针。最初,通过标记完整的RAW 264.7细胞(小鼠单核细胞白血病巨噬细胞系)测试探针的特异性和效力(图1b)。观察探针性质中的几种趋势。与包含更疏水的QSY21的探针(1、3、5和7)相比,所有磺基-QSY21官能化的qABP(2、4、6和8)都表现出更强的整体组织蛋白酶标记性能。有趣的是,由己基接头变为乙基接头而发生的间隔子长度的变化没有显著影响标记行为。也许最引人注目的发现是,具有PMK亲电体的qABP与它们的AOMK对应物相比,表现出了更广泛的半胱氨酸蛋白酶标记图谱。探针5至8示出了强大的组织蛋白酶X标记,并且磺基QSY21官能化的探针6和8能够标记更高分子量的组织蛋白酶L前体。利用免疫沉淀确定荧光标记的组织蛋白酶的属性(图4a)。在活细胞RAW中进行滴定标记试验后,观察其它感兴趣的趋势(图1c、d。图4b、c)。最疏水的qABP(1和5)在0.5μM达到减小的标记强度最大值,这表明它们降低的水溶性导致探针在较高浓度沉淀。更短的间隔子长度似乎是有益的,因为与包含己基的探针相比,携带乙基间隔子的探针具有更明亮的标记。当与具有PMK的AOMK比较时,观察到选择性存在明显的差异。AOMK qABP优先标记组织蛋白酶S和L,并且仅在较高浓度下标记组织蛋白酶B。出乎意料的是,AOMK qABP 2-4标签组织蛋白酶X,尽管先前的研究已经表明一些其它相关的AOMK不能标记该靶标(Paulick&Bogyo(2011)ACS化学

生物学6:563-72)。即使在较低的探针浓度水平,PMK qABP也用同等的强度标记所有的靶标半胱氨酸组织蛋白酶。总之,这些试验表明,增加的亲水性提高了标记强度并且该新型PMK qABP具有更广、更全的半胱氨酸组织蛋白酶标记图谱。

[0281] 由于PMK qABP 8在整体标记强度和光谱的组织蛋白酶反应性方面是最优化的,因此决定进一步进行这种探针的体内研究。为了进一步确定靶标的选择性,在pH 5.5下,以浓度逐步提高的qABP 8标记RAW细胞裂解物。这些结果表明,该探针对于组织蛋白酶B和X是最有效的,因为在浓度低至为5nM观察到标记。然而,所有的组织蛋白酶(B、S、L、X)的标记被500nM的探针饱和(图2a)。当在500nm的设定浓度下将探针用于活RAW细胞中进行实时标记时,观察到组织蛋白酶X迅速饱和,然后是更缓慢的标记组织蛋白酶S、L和B,其中组织蛋白酶B标记信号逐步增强,甚至是在120分钟也是如此(图2b)。这些数据表明,所述探针可能最快地进入组织蛋白酶X池(pool),这可能是由于它定位在细胞内或细胞表面上。它也表明,组织蛋白酶B和X可能是细胞中探针以不同的程度地进入的其他位置。为了测试新的PMK探针的稳定性,检测了血清暴露对RAW细胞中标记的影响(图1c)。虽然初始的AOMK探针1的4个小时血清预暴露导致了近70%的靶标标记损失,但是对于PMK qABP 8超过80%的标记得到保留。用半胱氨酸组织蛋白酶抑制剂JPM-OET预处理的细胞也阻断了超过90%的标记。鉴于PMK探针的稳定性和改进的标记特性,接着进行活细胞的荧光显微学研究。这些结果证实,探针产生明亮且特异性的标记信号,而且大部分探针标记的组织蛋白酶驻留在溶酶体中(图2d)。

[0282] 鉴于新的PMK亲电体阳性活细胞标记特性,在乳腺癌的原位小鼠模型测试了表现最好的PMK qABP 2、6和8。Tao等,(2008)BMC Cancer 8:228。另外,将这些PMK探针与初始的AOMK探针1进行比较(图3和图5)。4T1细胞移植到Balb/c小鼠的编号为2和7的乳腺脂肪垫中,并监测肿瘤生长。当肿瘤形成时,所述小鼠经尾静脉注射等摩尔量的qABP(20nmol),并随着时间的推移,以非侵入性成像Cy5荧光(图3a、b)。这些结果再一次证实qABP 8证明是优越的。对于探针8来说,能够明确地在肿瘤区域内,以高的整体对比度观察到强大的肿瘤特异性荧光活化。该信号继续随时间推移而增加直到时间进程结束为止。

[0283] 最终探针8实现了比探针1高20倍的增强的肿瘤特异性荧光信号。探针6也观察到了良好的肿瘤特异性对比度,并且探针2在较小程度上也观察到了肿瘤特异性对比度,然而两者都超过了探针1的10倍(图5a、b)。完成时间进程后,将肿瘤切除并测定离体肿瘤荧光,随后进行均化,并通过SDS-PAGE分析荧光标记的蛋白(图3c和图5c)。离体荧光以及总的半胱氨酸组织蛋白酶标记的定量示出了与非侵入性光学成像研究中类似的趋势(图3d和5d)。为了确定探针荧光的细胞来源,用巨噬细胞标记物CD68染色来自探针标记的小鼠的肿瘤组织切片的免疫荧光染色(图3e和图5e)。Cy5的荧光定位于CD68阳性细胞,但是,并非所有的CD68阳性细胞都是探针8阳性的,表明肿瘤相关巨噬细胞不同的活化状态。利用激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)进行的更详细的分析证实,对于探针8呈阳性的所有细胞都是CD68阳性的,但探针标记的组织蛋白酶和CD68信号没有共定位到相同的囊泡中(图3f和图5f)。总之,这些数据证实,增加淬灭剂的亲水性,缩短间隔子并引入更具反应性且空间受限较少的亲核性阻断体(trap)致使qABP具有广泛的半胱氨酸组织蛋白酶反应性和整体改善的体内特性。

[0284] 虽然对于某些半胱氨酸蛋白酶的家族成员已经描述了非常不同的功能(Conus&

Simon(2010)Swiss Med.Wkly.140:w13042),但是其他作用是多余的,并且一种组织蛋白酶的活性的改变可以影响其它组织蛋白酶的活性。例如,组织蛋白酶B的损失由组织蛋白的X的活性增加来补偿(Sevenich等,(2010)Proc.Natl Acad.Sci.USA 107:2497-502)并且组织蛋白酶B上调导致组织蛋白酶L的下调(Gopinathan等,(2012)Gut 61:877-84)。因此广谱探针是非常有价值的,因为其有利于在一个试验中读出多种半胱氨酸组织蛋白酶,并能够使得单独的组织蛋白酶的活性彼此进行比较。这种广泛反应性ABP的有效性已经被广泛丝氨酸水解酶氟代磷酸酯探针(Liu等,(1999)Proc.Natl Acad.Sci.USA 96:14694-9)和广泛反应性蛋白酶探针MV151(Verdoes等,(2006)Chem.Biol.13:1217-26)所证实。此外,由于PMK的qABP对于组织蛋白酶X具有高反应性,因此这些骨架可用来制备对仍然知之甚少的半胱氨酸组织蛋白酶具有选择性的qABP(Paulick&Bogyo(2011)ACS Chem.Biol.6:563-72)。

[0285] 总之,已经合成了一类新型的基于淬灭的荧光活性的探针,与先前报道的基于AOMK探针相比,该探针承载有具有更高反应性和更宽选择性的PMK亲电体。通过引入磺化淬灭剂并且缩短连接亲电体和淬灭剂之间的间隔子,进一步增加了qABP的亲水性,从而导致更高的水溶性并改善的体内性质,导致在癌症非侵入性光学成像中呈现增强的对比度。

[0286] 方法

[0287] 概括

[0288] 所有的树脂和试剂均购自商业供应商,使用时未经进一步纯化。使用的所有溶剂均为HPLC级。所有水敏感反应均在氩气的正压下,在无水溶剂中进行。利用API 150EX单四极质谱仪(Applied Biosystems),通过LC-MS分析反应。使用C18柱,利用ÅKTA探测器100(Amersham Pharmacia Biotech)进行反相HPLC。在装配有脉冲场梯度附件的Varian 400MHz(400/100)、Varian 500MHz(500/125)或Varian Inova 600MHz(600/150MHz)上记录NMR谱。以ppm(δ)相对于作为内标的四甲基硅烷示出化学位移。偶合常数以Hz示出。使用Typhoon 9400平板式激光扫描器(GE Healthcare)扫描荧光凝胶。利用Image J软件定量凝胶内标记强度。使用Microsoft Excel进行统计分析,用s.d.除以n的平方根计算s.e.m.。在装备有10×、40×和63×物镜的Zeiss共焦LSM 710和Zeiss Axiovert反相显微镜(Carl Zeiss)中获取荧光显微镜图像。Slidebook软件用于控制显微镜和照相机并且用于数据分析(Intelligent Imaging Innovations公司)。

[0289] qABP合成

[0290] 在以下所示的方案1中描述用于合成以下化合物的合成方案。

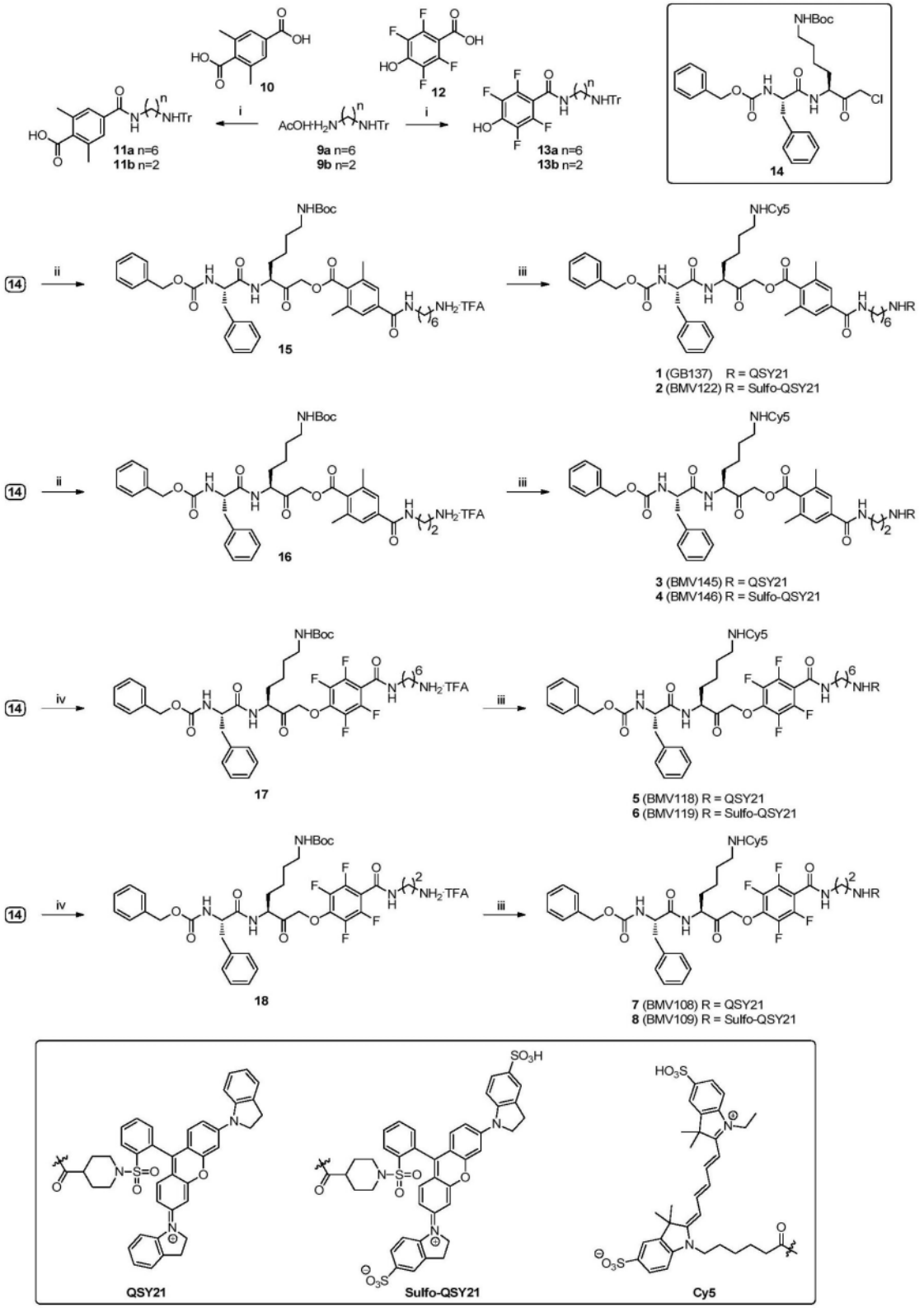
[0291] 2,6-二甲基-4-((6-(三苯甲基氨基)己基)氨基甲酰基)苯甲酸(11a)。将单-三苯甲基1,6-己二胺乙酸盐(9a)(117.2mg,0.28mmol)溶于DCM中,并用$NaHCO_3$饱和水溶液洗涤,经Na_2SO_4干燥并真空浓缩。将胺溶解在DMF和HOBt一水合物(43mg,0.28mmol,1当量)中,并加入EDC(54mg,0.28mmol,1当量)和2,6-二甲基对苯甲酸(10)(54.4mg,0.28mmol,1当量),将该反应混合物搅拌过夜,之后在真空中浓缩。通过快速柱色谱(DCM→5%MeOH的DCM溶液)纯化粗产物,随后溶解在DCM中并用水洗涤,经$MgSO_4$干燥,得到70mg产物(0.13mmol,分离产率:47%)。

[0292] 2,6-二甲基-4-((2-(三苯基氨基)乙基)氨基甲酰)苯甲酸(11b)。将单-三苯甲基乙二胺乙酸盐(9b)(97.9mg,0.27mmol)溶于DCM中,并用$NaHCO_3$饱和水溶液洗涤,经Na_2SO_4干燥并真空浓缩。将胺溶解在DMF和HOBt一水合物(43mg,0.28mmol,1.04当量)中,并加入EDC

(61mg,0.32mmol,1.2当量)和2,6-二甲基对苯甲酸(10)(52mg,0.27mmol,1当量),将该反应混合物搅拌过夜,之后在真空中浓缩。通过快速柱色谱(DCM→5%MeOH的DCM溶液)纯化粗产物,随后溶解在DCM中并用水洗涤,经$MgSO_4$干燥,得到28mg产物(0.06mmol,分离产率:22%)。

[0293] 2,3,5,6-四氟-4-羟基-N-(6-(三苯甲基氨基)己基)苯酰胺(13a)。将单-三苯甲基1,6-己二胺乙酸盐(9a)(117.2mg,0.28mmol)溶于DCM中,并用$NaHCO_3$饱和水溶液洗涤,经Na_2SO_4干燥并真空浓缩。将胺溶解在DMF和HOBt一水合物(43mg,0.28mmol,1当量)中,并加入EDC(54mg,0.28mmol,1当量)和2,3,5,6-四氟-4-羟基苯甲酸(12)(59mg,0.28mmol,1当量),将该反应混合物搅拌过夜,之后在真空中浓缩。通过快速柱色谱(15%->已烷中的30%乙酸乙酯)纯化粗产物,得到90mg产物(0.16mmol,分离产率:58%)。

[0294] 2,3,5,6-四氟-4-羟基-N-(2-(三苯甲基氨基)乙基)苯甲酰胺(13b)。将单-三苯甲基乙二胺乙酸盐(9b)(100mg,0.28mmol)溶于DCM中,并用$NaHCO_3$饱和水溶液洗涤,经Na_2SO_4干燥并真空浓缩。将胺溶解在DMF和HOBt一水合物(43mg,0.28mmol,1当量)中,并加入EDC(54mg,0.28mmol,1当量)和2,3,5,6-四氟-4-羟基苯甲酸(12)(59mg,0.28mmol,1当量),将该反应混合物搅拌过夜,之后在真空中浓缩。通过快速柱色谱(20%->35%已烷中的乙酸乙酯)纯化粗产物,得到90mg产物(0.18mmol,分离产率:65%)。^1H NMR(400MHz,DMSO)δ=8.77(t,J=6.0,1H),7.39(d,J=7.8,6H),7.27(t,J=7.7,6H),7.17(t,J=7.2,3H),3.40-3.35(m,2H),2.86-2.77(m,1H),2.14-2.04(m,2H)。



[0295]

[0296] (Sulso-QSY21:磺基-QSY21)

[0297] 方案1.试剂和条件:i.EDC、HOBt、DMF。ii.a)KF、DMF。b)1％ TFA、DCM。iii.a)QSY21-NHS或磺基-QSY21-NHS、DiPEA、DMSO;b)TFA/DCM＝1/1;c)Cy5-NHS、DiPEA、DMSO。iv.a)KF、DMF,80℃。b)1％ TFA、DCM。

[0298] 中间体15。通过超声处理5分钟将氟化钾(3mg,52μmol,3当量)悬浮于DMF中,之后

加入羧酸11a(10mg,19μmol,1.1当量)。将反应混合物搅拌10分钟,之后加入氯甲基酮14(9.7mg,17.3μmol,1当量)。2小时后,在真空中浓缩反应混合物,将粗产物溶解在1%TFA的DCM溶液中,并搅拌30分钟,之后通过加入三异丙基硅烷淬灭,直到溶液变为无色的。与甲苯(3x)共蒸发后,通过HPLC(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,15:85至55:45经过20分钟;5mL/min)纯化标题化合物,接着冻干,得到白色粉末15(3.12mg,3.46μmol,经过两步的产率为20%)。

[0299] 中间体16。通过超声处理5分钟将氟化钾(3mg,52μmol,3当量)悬浮于DMF中,之后加入羧酸11b(9.5mg,20μmol,1.1当量)。将反应混合物搅拌10分钟,之后加入氯甲基酮14(10mg,17.9μmol,1当量)。1.5小时后,在真空中浓缩反应混合物,将粗产物溶解在1%TFA的DCM溶液中,并搅拌30分钟,之后通过加入三异丙基硅烷淬灭,直到溶液变为无色的。与甲苯(3x)共蒸发后,通过HPLC(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,15:85至55:45经过20分钟;5mL/min)纯化中间体16,接着冻干,从而得到白色粉末(3.99mg,4.57μmol,经过两步的产率为26%)。^{1}H NMR(500MHz,CD_3OD)δ7.80(s,1H),7.42(s,1H),7.35-7.18(m,10H),5.06(s,2H),4.85-4.78(m,2H),4.42(dd,J=13.1,6.2Hz,1H),4.37(dd,J=10.1,4.0Hz,1H),3.64(t,J=5.7Hz,2H),3.18(t,J=4.8Hz,2H),3.12(dd,J=13.7,7.0Hz,1H),3.01(t,J=7.3Hz,2H),2.94(dd,J=13.6,8.9Hz,1H),2.41(s,3H),2.34(s,3H),1.92-1.82(m,1H),1.67-1.57(m,1H),1.49-1.26(m,4H),1.42(s,9H)。

[0300] 中间体17。通过超声处理5分钟将氟化钾(6.3mg,108μmol,3当量)悬浮于DMF中,之后加入苯酚13a(21.5mg,39μmol,1.1当量)。将反应混合物搅拌10分钟,之后加入氯甲基酮14(20mg,36μmol,1当量)。在80℃下搅拌反应混合物5小时,之后真空浓缩。将粗产物溶解在1%TFA的DCM溶液中,并搅拌30分钟,之后通过加入三异丙基硅烷淬灭,直到溶液变为无色的。与甲苯(3x)共蒸发后,通过HPLC(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,25:75至70:30经过20分钟;5mL/min)纯化,接着冻干,从而得到白色粉末(16.6mg,17.5μmol,经过两步的产率为49%)。^{1}H NMR(500MHz,CD_3OD)δ7.29(m,10H),5.07(s,2H),4.86(m,2H),4.44(m,2H),3.41(t,J=6.8,2H),3.10(dd,J=13.5,7.0,1H),3.02(t,J=6.8,2H),2.97-2.91(m,3H),1.93-1.81(m,1H),1.73-1.62(m,4H),1.62-1.53(m,1H),1.51-1.46(m,4H),1.43(s,9H),1.45-1.25(m,4H)。

[0301] 中间体18。通过超声处理5分钟将氟化钾(6.3mg,108μmol,3当量)悬浮于DMF中,之后加入苯酚13b(19.4mg,39μmol,1.1当量)。将反应混合物搅拌10分钟,之后加入氯甲基酮14(20mg,36μmol,1当量)。在80℃下搅拌反应混合物3小时,之后真空浓缩。将粗产物溶解在1%TFA的DCM溶液中,并搅拌30分钟,之后通过加入三异丙基硅烷淬灭,直到溶液变为无色的。与甲苯(3x)共蒸发后,通过HPLC(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,20:80至60:40经过20分钟;5mL/min)纯化,接着冻干,从而得到白色粉末的标题化合物((15.4mg,17.3μmol,经过两步的产率为48%)。^{1}H NMR(400MHz,CD_3OD)δ=7.36-7.12(m,10H),5.05(s,2H),4.86-4.81(m,2H),4.42-4.37(m,2H),3.64(t,J=6.5,2H),3.14(t,J=6.5,2H),3.08(dd,J=13.9,7.2,1H),2.99(t,J=6.5,2H),2.91(dd,J=13.9,8.4,1H),1.90-1.78(m,1H),1.62-1.48(m,1H),1.41(s,9H),1.46-1.20(m,4H)。

[0302] 探针1(GB137)。中间体15(1.5mg,1.7μmol)溶解在DMSO(50μl),并加入QSY21-NHS(1.39mg,1.7μmol,1当量)和DiPEA(1.5μl,8.5μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC(制备型反

相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,40:60至80:20经过20分钟;5mL/min)纯化QSY21酰胺,然后冻干。为了去除Boc保护基,将得到的深蓝色粉末溶解在TFA/DCM(1/1)并且反应30分钟,之后与甲苯(3x)共蒸发,从而得到2.42mg相应的TFA盐(1.6μmol,经过两步的产率为95%)。将胺溶解于DMSO(50μl)中,并加入Cy5-NHS(1.3mg,1.76μmol,1.1当量)和DiPEA(1.4μl,8μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC纯化(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,40:60至75:25经过20分钟;5mL/min)后,接着冻干,从而得到深蓝色粉末状的探针1(2.0mg,0.99μmol,62%)。

[0303] 探针2(BMV122)。中间体15(1.5mg,1.7μmol)溶解在DMSO(50μl),并加入磺基-QSY21-NHS(1.66mg,1.7μmol,1当量)和DiPEA(1.5μl,8.5μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,30:70至70:30经过20分钟;5mL/min)磺基-QSY21酰胺,然后冻干。为了去除Boc保护基,将得到的深蓝色粉末溶解在TFA/DCM(1/1),并且反应30分钟,之后与甲苯(3x)共蒸发,从而得到2.29mg相应的TFA盐(1.39μmol,经过两步的产率为81%)。将胺溶解于DMSO(50μl)中,并加入Cy5-NHS(1.1mg,1.5μmol,1.1当量)和DiPEA(1.2μl,7μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC纯化(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O0.1% TFA,15:85至50:50经过20分钟;5mL/min)后,接着冻干,从而得到深蓝色粉末状的探针2(1.83mg,0.84μmol,61%)。

[0304] 探针3(BMV145)。中间体16(1.5mg,1.7μmol)溶解在DMSO(50μl),并加入QSY21-NHS(1.39mg,1.7μmol,1当量)和DiPEA(1.5μl,8.5μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,40:60至80:20经过20分钟;5mL/min)QSY21酰胺,然后冻干。为了去除Boc保护基,将得到的深蓝色粉末溶解在TFA/DCM(1/1)并且反应30分钟,之后与甲苯(3x)共蒸发,从而得到0.86mg相应的TFA盐(0.6μmol,经过两步的分离产率为35%)。将胺溶解于DMSO(50μl)中,并加入Cy5-NHS(0.5mg,0.66μmol,1.1当量)和DiPEA(0.57μl,3.3μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC纯化(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1%TFA,40:60至75:25经过20分钟;5mL/min)后,接着冻干,从而得到深蓝色粉末状的探针3(0.67mg,0.34μmol,57%)。

[0305] 探针4(BMV146)。中间体16(1.0mg,1.2μmol)溶解在DMSO(50μl),并加入磺基-QSY21-NHS(1.25mg,1.2μmol,1当量)和DiPEA(1.05μl,6μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,20:80至80:20经过20分钟;5mL/min)磺基-QSY21酰胺,然后冻干。为了去除Boc保护基,将得到的深蓝色粉末溶解在TFA/DCM(1/1),并且反应30分钟,之后与甲苯(3x)共蒸发,从而得到1.06mg相应的TFA盐(0.66μmol,经过两步的产率为55%)。将胺溶解于DMSO(50μl)中,并加入Cy5-NHS(0.55mg,0.73μmol,1.1当量)和DiPEA(0.64μl,3.65μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC纯化(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O0.1% TFA,15:85至50:50经过20分钟;5mL/min)后,接着冻干,从而得到深蓝色粉末状的探针4(0.63mg,0.3μmol,45%)。

[0306] 探针5(BMV118)。中间体17(1.2mg,1.3μmol)溶解在DMSO(50μl),并加入QSY21-NHS(1.0mg,1.3μmol,1当量)和DiPEA(1.13μl,6.5μmol,5当量)。2小时后,通过HPLC(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,40:60至80:20经过20分钟;5mL/min)纯化QSY21酰胺,然后冻干。为了去除Boc保护基,将得到的深蓝色粉末溶解在TFA/DCM(1/1),并且反应30分钟,之后与甲苯(3x)共蒸发,从而得到2.0mg相应的TFA盐(1.3μmol,经过两步后定量)。将胺溶解

于DMSO(50μl)中,并加入Cy5-NHS(1.0mg,1.3μmol,1当量)和DiPEA(1.1μl,6.5μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC纯化(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,40:60至85:15经过20分钟;5mL/min)后,接着冻干,从而得到深蓝色粉末状的探针5(1.91mg,0.94μmol,72%)。

[0307] 探针6(BMV119)。中间体17(1.2mg,1.3μmol)溶解在DMSO(50μl),并加入磺基-QSY21-NHS(1.35mg,1.3μmol,1当量)和DiPEA(1.13μl,6.5μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,30:70至90:10经过20分钟;5mL/min)磺基-QSY21酰胺,然后冻干。为了去除Boc保护基,将得到的深蓝色粉末溶解在TFA/DCM(1/1),并且反应30分钟,之后与甲苯(3x)共蒸发,从而得到1.98mg相应的TFA盐(0.9μmol,经过两步的产率为70%)。将胺溶解于DMSO(50μl)中,并加入Cy5-NHS(0.7mg,0.9μmol,1.1当量)和DiPEA(0.8μl,4.5μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC纯化(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O0.1% TFA,15:85至50:50经过20分钟;5mL/min)后,接着冻干,从而得到深蓝色粉末状的探针6(1.63mg,0.74μmol,82%)。

[0308] 探针7(BMV108)。中间体18(1.2mg,1.3μmol)溶解在DMSO(50μl),并加入QSY21-NHS(1.2mg,1.4μmol,1.1当量)和DiPEA(1.13μl,6.5μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,30:70至70:30经过20分钟;5mL/min)纯化QSY21酰胺,然后冻干,从而得到深蓝色粉末(1.43mg,0.99μmol,76%)。为了去除Boc保护基,将得到的深蓝色粉末溶解在TFA/DCM(1/1),并且反应30分钟,之后与甲苯(3x)共蒸发。将TFA盐溶解于DMSO(50μl)中,并加入Cy5-NHS(0.83mg,1.1μmol,1.1当量)和DiPEA(0.88μl,5μmol,5当量)。1小时后,通过HPLC纯化(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,30:70至70:30经过20分钟;5mL/min)后,接着冻干,从而得到深蓝色粉末状的探针7(0.95mg,0.48μmol,49%)。

[0309] 探针8(BMV109)。中间体18(5.8mg,6.5μmol)溶解在DMSO(100μl),并加入磺基-QSY21-NHS(9.75mg,10.39μmol,1.6当量)和DiPEA(8.4μl,50.5μmol,7.8当量),搅拌混合物过夜。通过HPLC(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,25:75至55:45经过20分钟;5mL/min)纯化磺基-QSY21酰胺,然后冻干,从而得到深蓝色粉末。随后在TFA/DCM(1/1)中反应30分钟去除Boc保护基,之后与甲苯(3x)共蒸发。残留物溶解于DMSO(250μl)中,并加入Cy5-NHS(10.5mg,13.9μmol,2.1当量)和DiPEA(12μl,72μmol,11当量)。4小时后,通过HPLC纯化(制备型反相C_{18}柱,CH_3CN/H_2O 0.1% TFA,25:75至45:55经过20分钟;5mL/min)后,接着冻干从而得到深蓝色粉末状的探针8(7.74mg,4.61μmol,经三步的产率为:49%)。^1H NMR(600MHz,CD_3CN)δ8.12-8.08(m,1H),8.01-7.93(m,2H),7.89-7.85(m,2H),7.75(dd,J=12.0,1.5Hz,2H),7.72(dd,J=8.4,1.7Hz,1H),7.69(dd,J=8.3,1.2Hz,1H),7.66(s,2H),7.62-7.57(m,2H),7.51(dd,J=8.4,5.1Hz,2H),7.46(d,J=9.4Hz,2H),7.41-7.35(m,3H),7.24(s,1H),7.22(s,1H),7.21-7.14(m,6H),7.13-7.09(m,6H),7.05(dd,J=8.8,4.6Hz,1H),6.39(t,J=12.8Hz,1H),6.11(t,J=12.6Hz,1H),4.87(q,J=12.7Hz,2H),4.83(dd,J=39.7,14.1Hz,2H),4.23-4.12(m,4H),3.93(q,J=7.2Hz,2H),3.86(t,J=7.4Hz,2H),3.34(dd,J=6.7,4.1Hz,2H),3.28-3.15(m,9H),3.04-2.92(m,3H),2.80-2.74(m,1H),2.45(t,J=11.9Hz,2H),2.15-2.09(m,1H),2.09-2.03(m,2H),1.74-1.58(m,7H),1.57(s,6H),1.55(s,6H),1.49(dd,J=15.1,7.4Hz,4H),1.35-1.22(m,7H),1.20(t,J=7.3Hz,3H),1.16-1.12(m,4H)。

[0310] 活细胞和细胞裂解物的细胞培养和标记

[0311] 在DMEM(GIBCO)培养基中培养RAW细胞,该培养基补充有10％胎牛血清(FBS;GIBCO)、100单位/mL的青霉素和100μg/mL的链霉素(GIBCO)。在RPMI(GIBCO)培养基中培养4T1细胞(ATCC),该培养基补充有10％胎牛血清(GIBCO FBS)、100单位/mL的青霉素和100μg/mL的链霉素(GIBCO)。所有细胞在37℃下,在5％CO_2加湿的培养箱中培养。除非另有说明,否则为完整细胞标记,将细胞在培养基中暴露于探针(在DMSO中,500x),并在37℃下孵育2小时。其中指定细胞与抑制剂JPM-OET(在DMSO中,500x)预先培养1小时或者在加入细胞4小时之前,暴露于小鼠血清(1μl探针的DMSO储备液加到9μl血清中)。标记后,将细胞用PBS洗涤并再悬浮于低渗裂解缓冲液(50mM PIPES(pH为7.4)、10mM的氯化钾、5mM的氯化镁、2mM的EDTA、4mM的DTT和1％NP-40),并置于冰上15分钟,在4℃离心30分钟,之后收集上清液,并且使用BCA试剂盒(Pierce)测定蛋白质浓度。将40μg总蛋白加入到4×SDS样品缓冲液并在100℃下加热3分钟使之变性,通过SDS-PAGE(15％)解析,并且用Typhoon成像仪(GE Healthcare)扫描凝胶使标记的蛋白酶可视化。利用Image J软件定量标记强度。为了进行细胞裂解物中的组织蛋白酶标记,收集细胞,用PBS洗涤并再悬浮于柠檬酸缓冲液(50mM的柠檬酸盐缓冲液(pH 5.5)、5mM的DDT、0.5％的CHAPS、0.1％的Triton X)。置于冰上15分钟并在4℃下离心30分钟后,收集上清液,并且使用BCA试剂盒(Pierce)测定蛋白质浓度。在37℃下,将40μg总蛋白暴露于所指定的探针(DMSO中200x)1小时。加入4×SDS样品缓冲液,在100℃下将蛋白质变性3分钟,如上所述进行分析。为了进行活细胞显微镜,将RAW细胞以1•10^5细胞的密度接种在35mm玻璃底皿的无酚红的完全培养基(体外系统)中,并培养过夜。将细胞或者暴露于DMSO或者1μM的探针(DMSO中500x)2小时。对于最后的1小时,将绿色溶酶体示踪剂(终浓度200nM,DMSO中1000x)加入到细胞中。其中指定细胞与抑制剂JPM-OET(在DMSO中500x)预先培养1小时。利用Zeiss Axiovert200μM的共聚焦显微镜在Cy5的和FITC两个通道以40倍将细胞成像。

[0312] 动物模型

[0313] 根据现行的美国国立卫生研究院和斯坦福大学机构动物护理和使用委员会指南进行所有的动物护理和试验。在异氟烷麻醉下,将雌性BALB/c小鼠(6-8周,Jackson试验室)在编号为2和7的脂肪垫注射PBS中的1•10^5 4T1细胞(ATCC)并监测肿瘤生长。成像前24小时,使用“奈尔洗剂”(Nair Lotion)去除目的区域的毛发。在第10天,经尾静脉施用100μL体积(20％DMSO的PBS溶液)的指定的探针(20nmol;0.8nmol g^{-1})。注射后,利用IVIS100系统(Xenogen),在指定的时间点对小鼠进行无创成像。利用Living Image软件(PerkinElmer)分析图像。在最后的时间点后,用异氟烷麻醉小鼠,并通过颈椎脱臼法处死小鼠。为了进行离体荧光测量和评估体内探针标记图谱,去除肿瘤,利用FMT 2500(PerkinElmer)成像,并在在柠檬酸盐缓冲液(50mM的柠檬酸盐缓冲液(pH 5.5)、5mM的DDT、0.5％的CHAPS、0.1％的Triton X)中对组织进行超声处理(冰上1分钟)。在4℃离心30分钟后,收集上清液,并且使用BCA试剂盒(Pierce)测定蛋白质浓度。在100℃下,将40μg总蛋白在SDS样品缓冲液中变性3分钟,并如上所述进行分析。对了进行免疫荧光,在4℃下,将切除的肿瘤在4％PFA的PBS溶液中培养6小时,随后在30％蔗糖溶液中过夜培养并在OCT培养基中冷冻组织。将6μm的切片固定在丙酮中,用PNB封闭缓冲液封闭,并与大鼠抗小鼠CD68(1:1000;Serotec公司)共同培养过夜。室温下,培养与AlexaFluor-488(1:500;Invitrogen)缀合的羊抗大鼠1小时。然后将切片用DAPI(2μg/mL;Invitrogen)染色五分钟,随后封装在ProLong Gold封装培养基

(Invitrogen)中。随后利用Zeiss Axiovert 200M显微镜使组织可视化。

[0314] 本文中提到的所有专利、专利出版物和其它公开的文献的全文通过引用的方式纳入本文,如同各参考文献已经独立并具体地引入本文中。

[0315] 尽管已经提供了具体的实施例,但是上述说明也只是说明性的而非限制性的。前述实施方式的任何一个或多个特征可以与本发明的任何其它实施方案的一个或多个特征以任意的方式组合。此外,在阅读本说明书后,对于本领域技术人员来说,本发明的许多变化将变得显而易见。因此,本发明的范围应当通过参考所附权利要求以及其等价物的全部范围来确定。

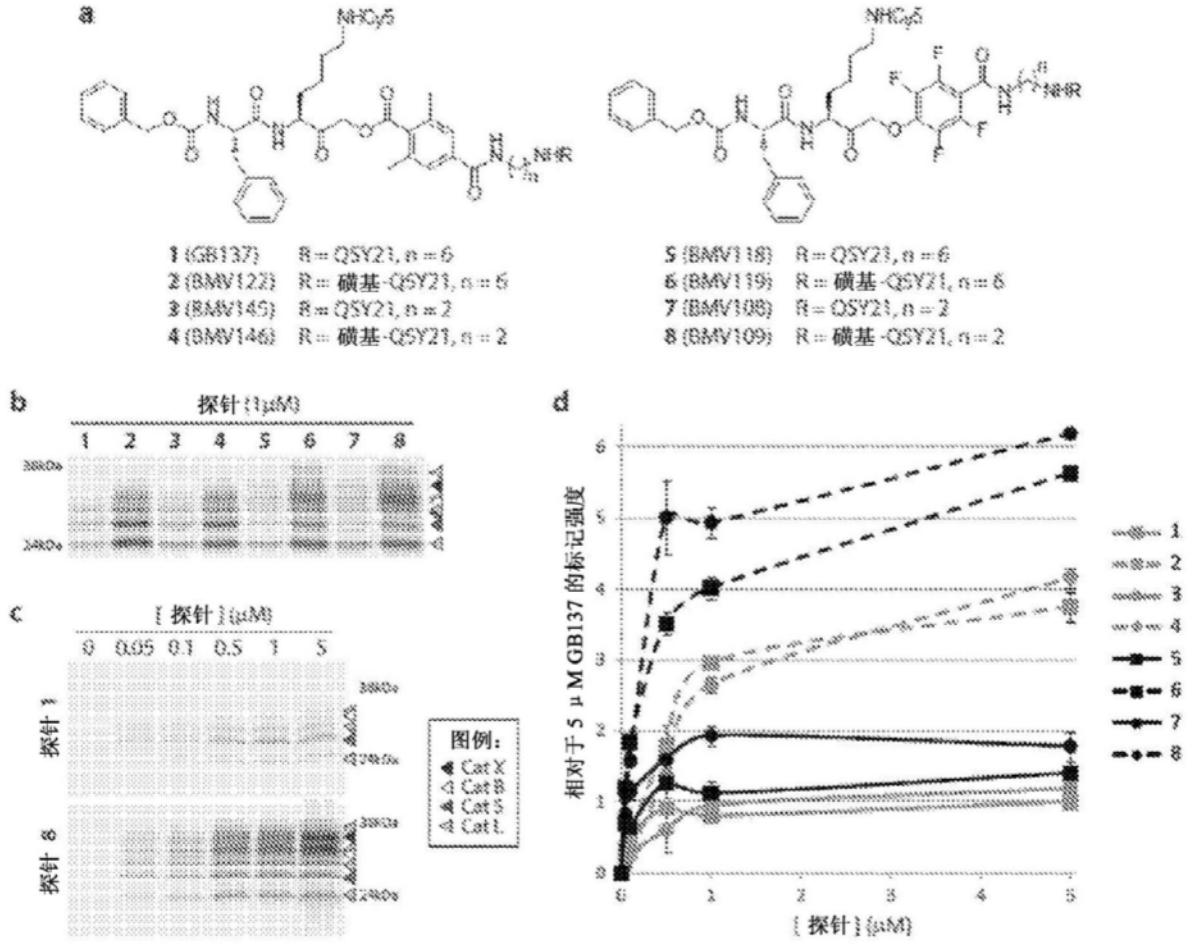

a
1 (GB137) R = QSY21, n = 6
2 (BMV122) R = 磺基-QSY21, n = 6
3 (BMV145) R = QSY21, n = 2
4 (BMV146) R = 磺基-QSY21, n = 2
5 (BMV118) R = QSY21, n = 6
6 (BMV119) R = 磺基-QSY21, n = 6
7 (BMV108) R = QSY21, n = 2
8 (BMV109) R = 磺基-QSY21, n = 2
b
探针 (1μM)
1 2 3 4 5 6 7 8
c
[探针] (μM)
0 0.05 0.1 0.5 1 5
探针 1
探针 8
图例:
Cat X
Cat B
Cat S
Cat L
d
相对于 5 μM GB137 的标记强度
[探针] (μM)
1
2
3
4
5
6
7
8

图1

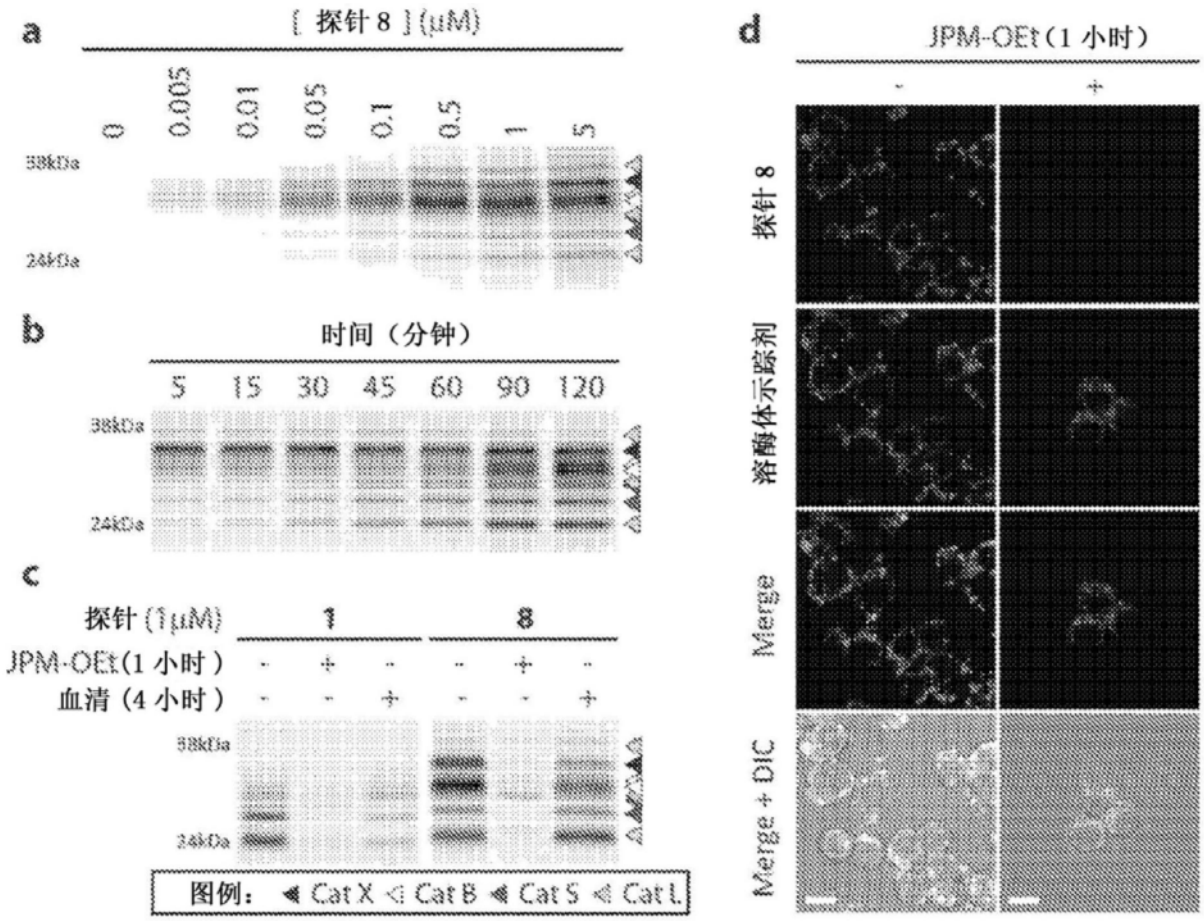

a
[探针 8] (μM)
0
0.005
0.01
0.05
0.1
0.5
1
5
38kDa
24kDa
b
时间（分钟）
5
15
30
45
60
90
120
38kDa
24kDa
c
探针 (1μM)
1
8
JPM-OEt(1 小时)
血清 (4 小时)
38kDa
24kDa
图例： Cat X Cat B Cat S Cat L
d
JPM-OEt(1 小时)
探针 8
溶酶体示踪剂
Merge
Merge + DIC

图2

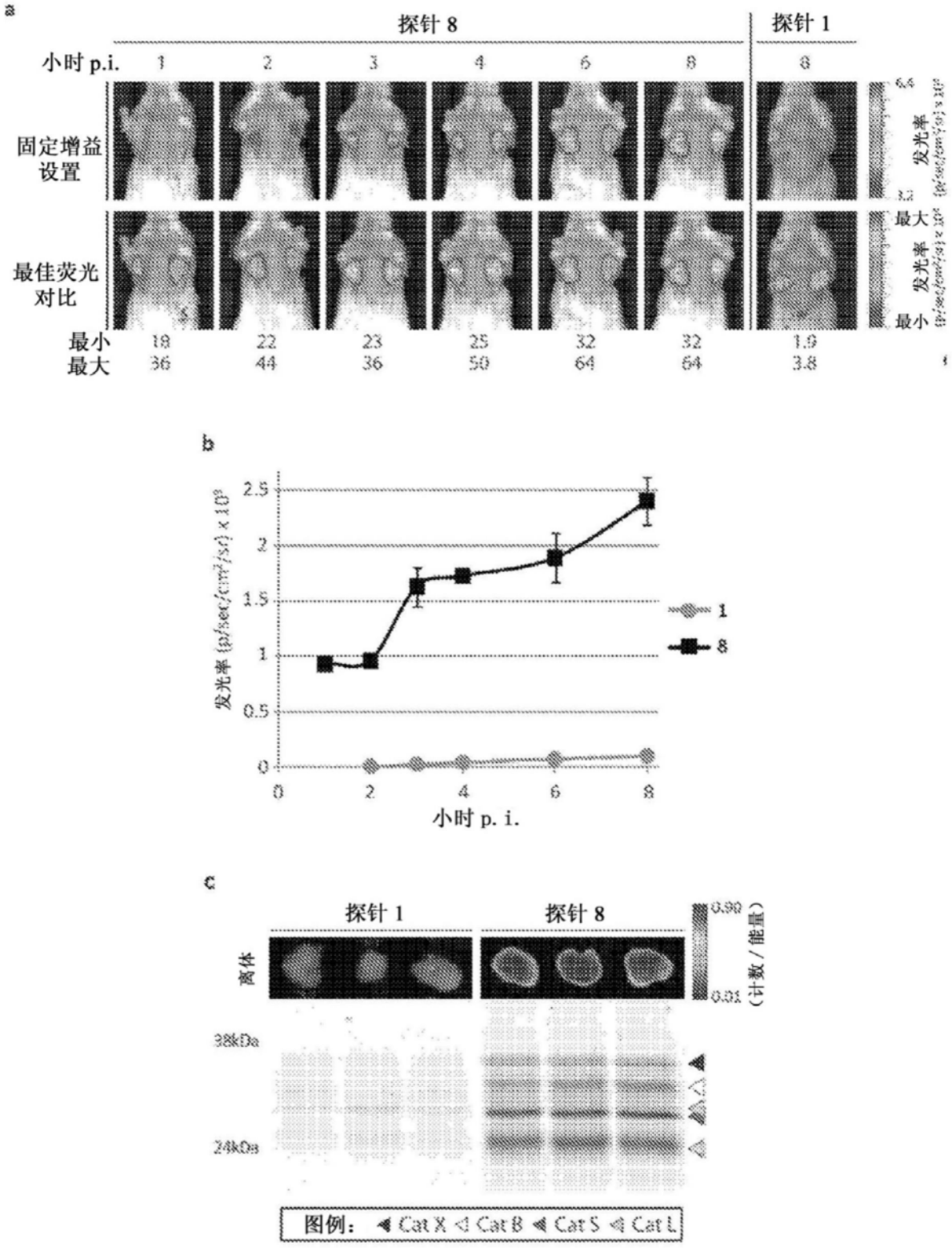

a
探针 8
探针 1
小时 p.i.
1
2
3
4
6
8
8
固定增益设置
最佳荧光对比
发光率
最大
最小
最小 18 22 23 25 32 32 1.9
最大 36 44 36 50 64 64 3.8
b
发光率 (p/sec/cm²/sr) x 10³
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
2
4
6
8
小时 p. i.
1
8
c
探针 1
探针 8
离体
0.90
0.01
(计数 / 能量)
38kDa
24kDa
图例： ◀ Cat X ◁ Cat B ◀ Cat S ◁ Cat L

图3

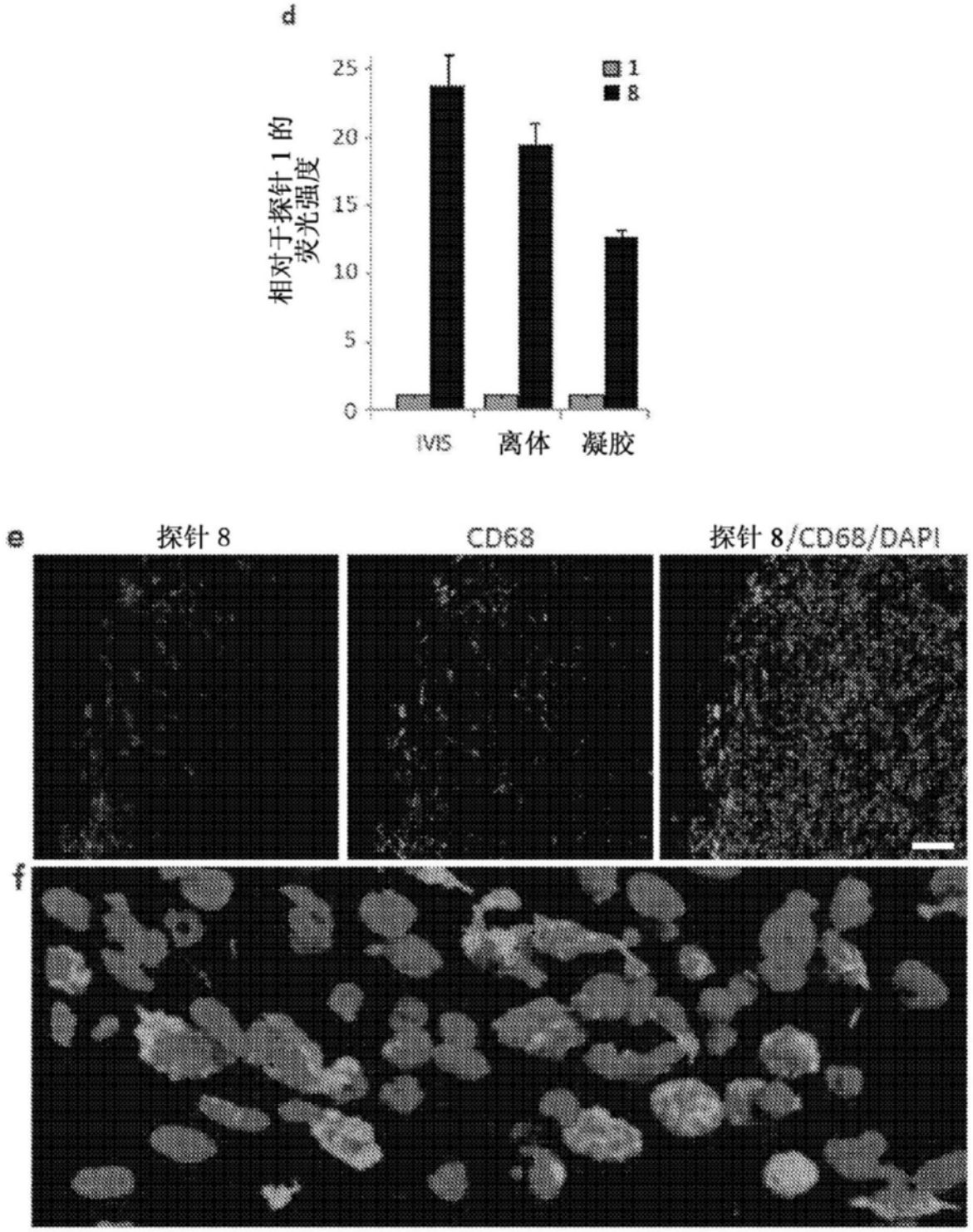

d
相对于探针 1 的
荧光强度
25
20
15
10
5
0
1
8
IVIS
离体
凝胶
e
探针 8
CD68
探针 8/CD68/DAPI
f

图3 (续)

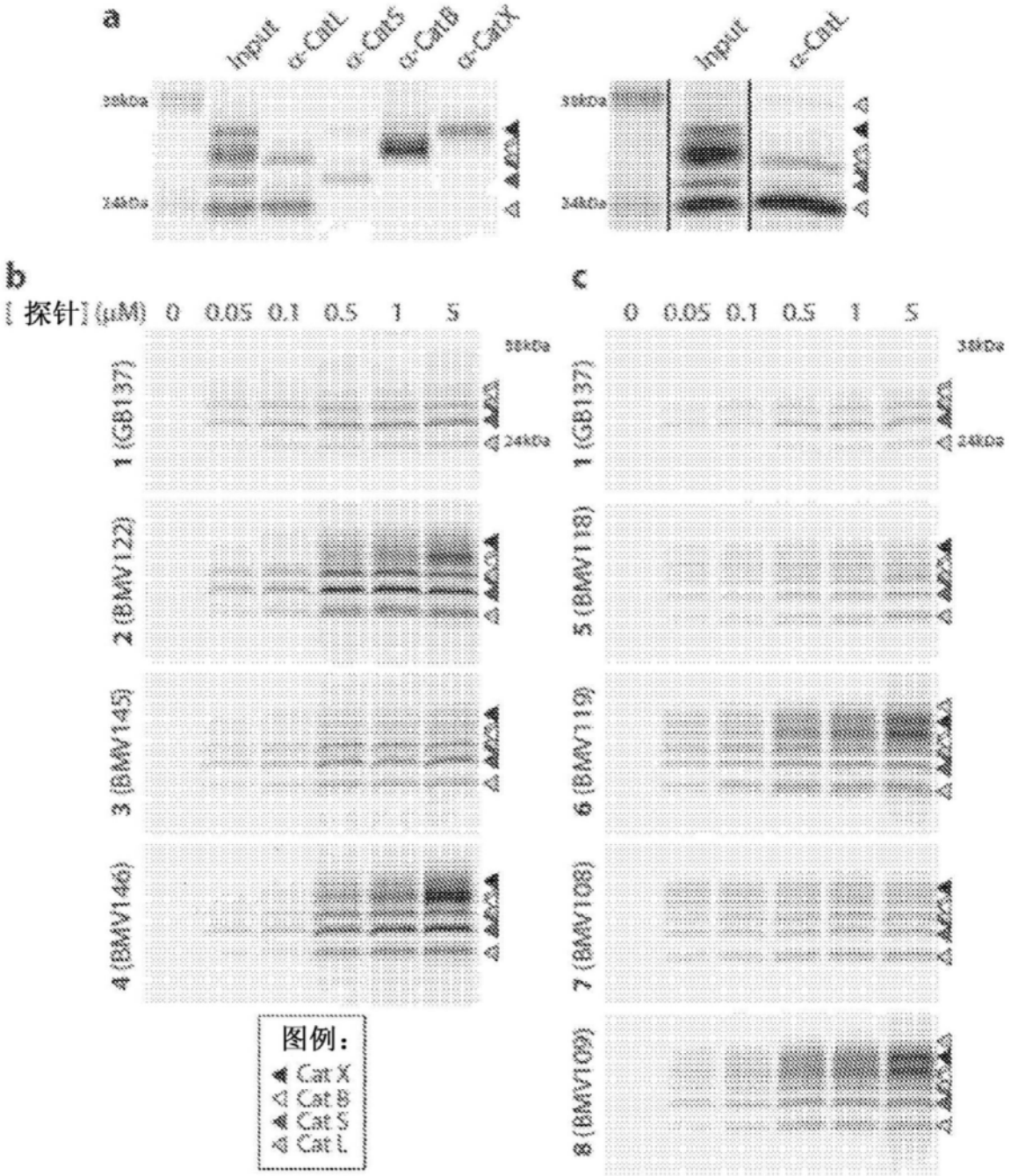

a
Input
α-CatL
α-CatS
α-CatB
α-CatX
38kDa
24kDa
b
[探针](μM) 0 0.05 0.1 0.5 1 5
1 (GB137)
2 (BMV122)
3 (BMV145)
4 (BMV146)
c
5 (BMV118)
6 (BMV119)
7 (BMV108)
8 (BMV109)
图例:
Cat X
Cat B
Cat S
Cat L

图4

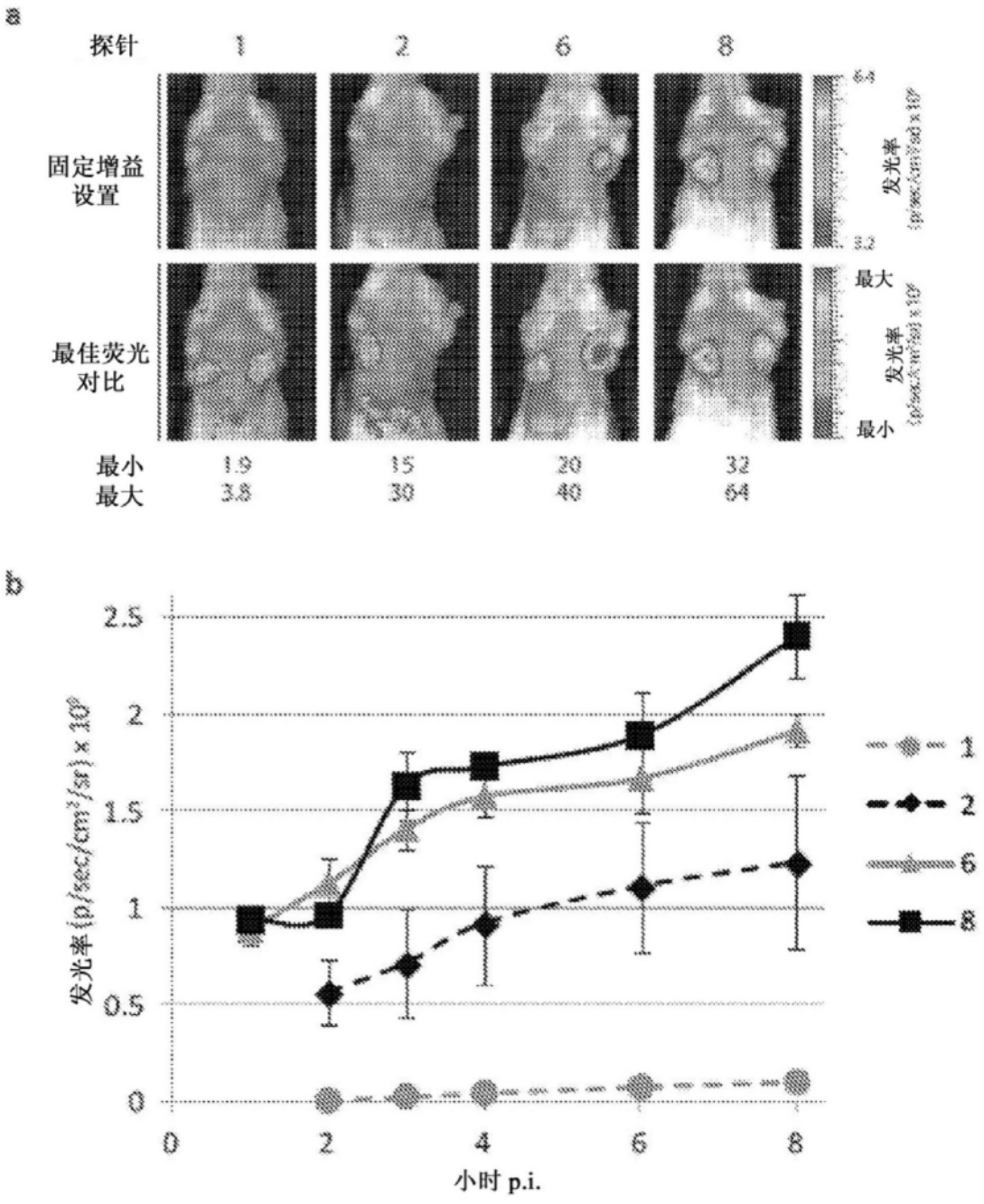

a
探针
1
2
6
8
固定增益
设置
最佳荧光
对比
最小
最大
发光率
最小
最大
1.9
3.8
15
30
20
40
32
64
b
发光率 {p/sec/cm²/sr} x 10⁶
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
2
4
6
8
小时 p.i.
1
2
6
8

图5

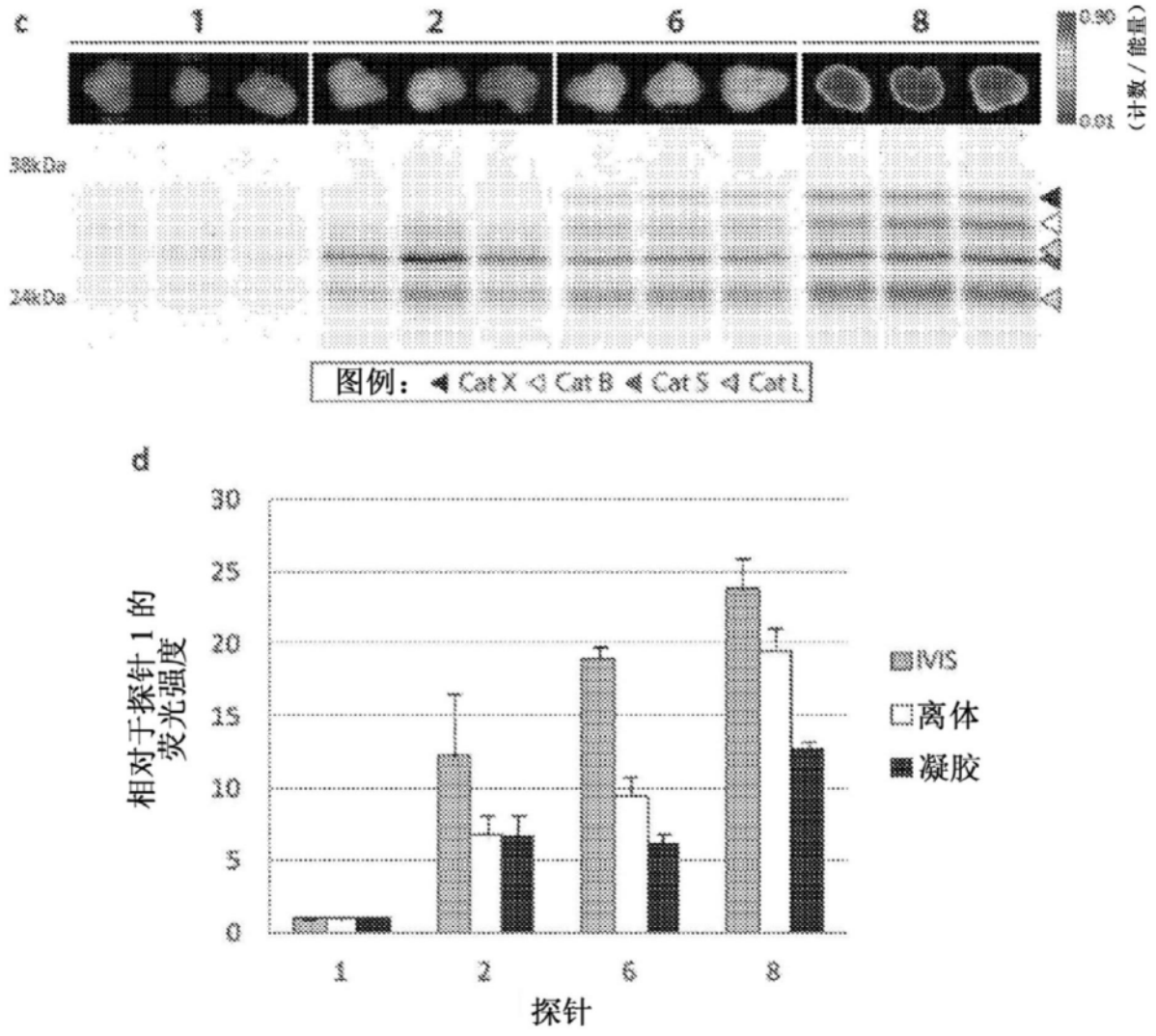

c
1
2
6
8
0.30
0.01
(计数 / 能量)
38kDa
24kDa
图例：◀ Cat X ◁ Cat B ◀ Cat S ◁ Cat L
d.
相对于探针 1 的荧光强度
30
25
20
15
10
5
0
1
2
6
8
探针
IVIS
离体
凝胶

图5(续)

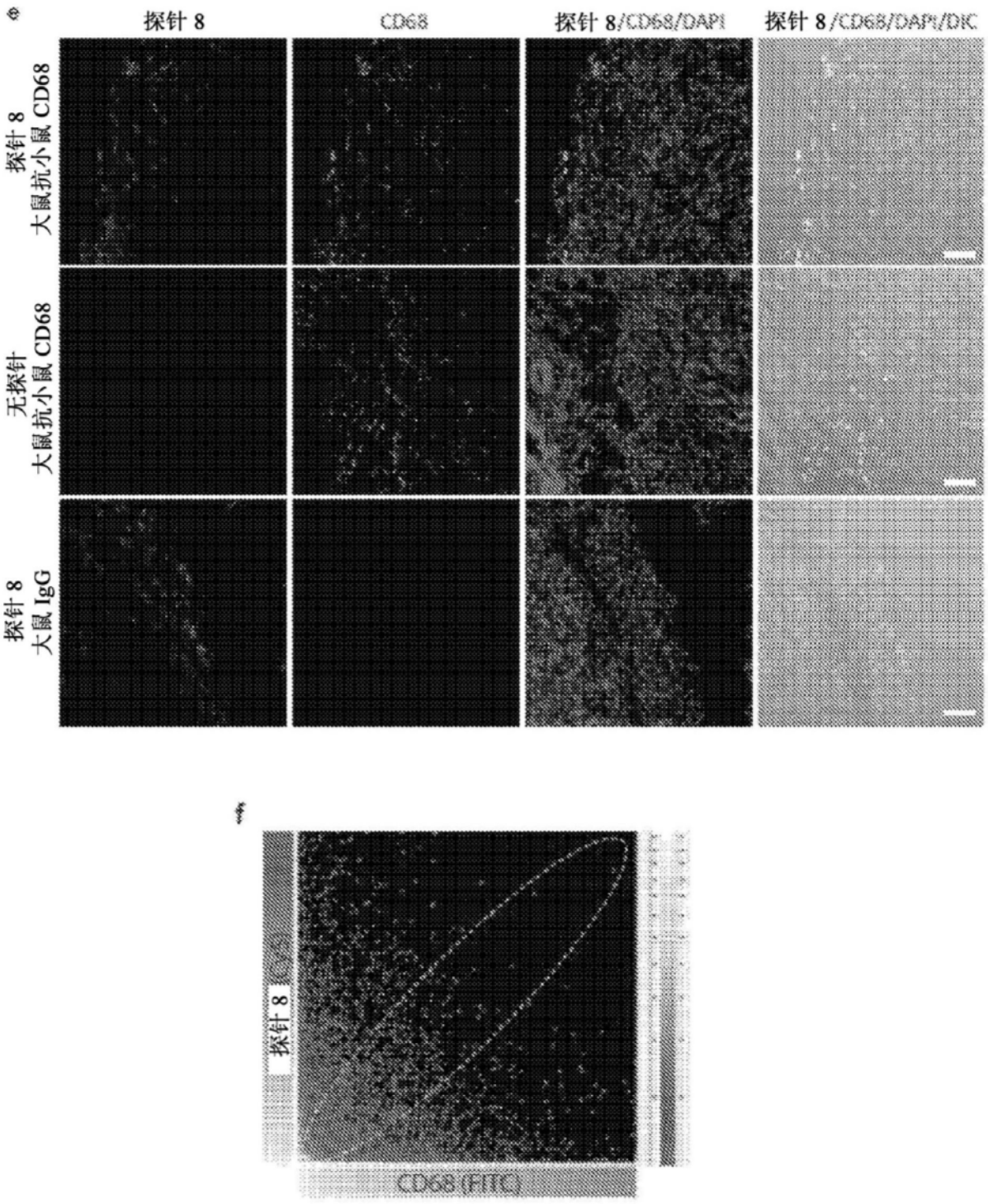

e
探针 8
CD68
探针 8/CD68/DAPI
探针 8/CD68/DAPI/DIC
探针 8
大鼠抗小鼠 CD68
无探针
大鼠抗小鼠 CD68
探针 8
大鼠 IgG
f
探针 8 (Cy3)
CD68 (FITC)

图5 (续)