

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 9 月 29 日 (29.09.2016)



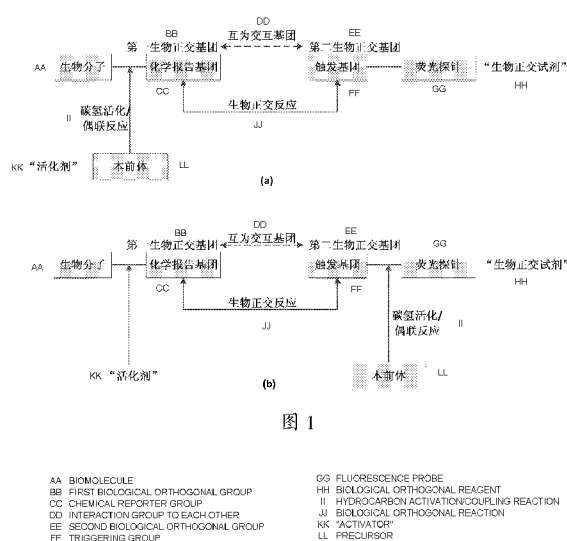
(10) 国际公布号
WO 2016/149899 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 47/48 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/074897
- (22) 国际申请日: 2015 年 3 月 23 日 (23.03.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 北京大学深圳研究生院 (PEKING UNIVERSITY SHENZHEN GRADUATE SCHOOL) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽镇丽水路深圳大学城北大校区, Guangdong 518055 (CN)。
- (72) 发明人: 洪梅 (HONG, Mei); 中国广东省深圳市南山区西丽镇丽水路深圳大学城北大校区, Guangdong 518055 (CN)。 赵劲 (ZHAO, Jing); 中国广东省深圳市南山区西丽镇丽水路深圳大学城北大校区, Guangdong 518055 (CN)。 段平 (DUAN, Ping-ping); 中国广东省深圳市南山区西丽镇丽水路深圳大学城北大校区, Guangdong 518055 (CN)。 陈颖 (CHEN, Ying); 中国广东省深圳市南山区西丽镇丽水路深圳大学城北大校区, Guangdong 518055 (CN)。 陈波 (CHEN, Bo); 中国广东省深圳市南山区西丽镇丽水路深圳大学城北大校区, Guangdong 518055 (CN)。
- (74) 代理人: 深圳中一专利商标事务所 (SHENZHEN ZHONGYI PATENT AND TRADEMARK OFFICE); 中国广东省深圳市福田区深南中路 1014 号老特区报社四楼西区 (5 号信箱), Guangdong 518028 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,

[见续页]

(54) Title: BIOLOGICAL ORTHOGONAL REAGENT, ACTIVATOR AND PRECURSOR, AND BIOLOGICAL ORTHOGONAL REAGENT KIT

(54) 发明名称: 生物正交试剂、活化剂和前体及生物正交试剂盒



(57) Abstract: Disclosed are a biological orthogonal precursor, a biological orthogonal reagent, a biological orthogonal activator, and a biological orthogonal reagent kit used for a biomarker. The biological orthogonal precursor of the present invention contains a hydroxylamine functional group that at least has multiple functions, can be used as a positioning group in a coupling reaction, and is used as a biological orthogonal group. The biological orthogonal reagent kit of the present invention comprises the biological orthogonal reagent comprising a second biological orthogonal group, of the present invention, or comprises a biological orthogonal activator capable of directly or indirectly generating a first biological orthogonal group, of the present invention.

(57) 摘要: 本发明公开了一种生物正交前体、生物正交试剂和生物正交活化剂以及用于生物标记的生物正交试剂盒。本发明生物正交前体含有至少多功能的羟胺官能基团可作为偶联反应的定位基团并作为生物正交基团。本发明生物正交试剂盒包括含有第二生物正交基团的本发明生物正交试剂或包括能直接或间接产生第一生物正交基团的本发明正交活化剂。



NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

- (84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT,

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

生物正交试剂、活化剂和前体及生物正交试剂盒

技术领域

本发明属于生物正交反应技术领域，具体的说是涉及生物正交试剂、生物正交活化剂、生物正交前体和生物正交试剂盒。

背景技术

在医学成像领域，使用小分子光学探针来可视化探测活细胞和生物体的生物事件已经成为强有力的工具。由于我们的身体和细胞的生物学事件通常不能提供足够用肉眼或仪器检测的视觉或数据信息使我们能够理解生物事件，如细胞信号传导和蛋白表达，因而采用外源性的小分子光学探针来特异性地检测体内特定分子或靶点，对于无论是基础生物学研究，还是疾病的诊断和治疗都有非常重要的意义。荧光实时成像方法无需依靠特殊或昂贵的仪器，灵敏度高，有足够的空间和时间分辨率来分析动态细胞信号传导过程，因而在化学生物学领域正得到广泛使用。大分子荧光探针，如绿色荧光蛋白基因编码的荧光蛋白（Green Fluorescent Protein）和其变种的荧光蛋白（Fluorescent Proteins）被广泛应用于标记和跟踪体内蛋白，取得巨大成功，并于2008年获得诺贝尔化学奖。然而此类基因编码探针不适合于监测非蛋白质的生物分子，包括多糖、脂质、核酸等，同时其具有较大的空间位阻，对标记位点及荧光检测的灵活性有较大的限制。相比而言，有机小分子光学探针在灵活性和空间尺寸上都有优势，适用于任何样品包括人体，而且相对便宜和容易处理，通过化学设计和调控，能够提供较高的信噪比和靶点适用性。

荧光小分子探针的成像技术能够实现对细胞甚至活体中活性小分子的实时可视化示踪，在研究信号转导、细胞生理病理功能方面具有无损、实时、灵敏度高、操作简便、背景低、信号可调控等优势。荧光小分子探针是生命体系中使用最为广泛的检测工具，已被广泛用于生命体系中气体分子如一氧化氮、一氧化碳及硫化氢等信号传导分子的分析检测，以及体内金属离子的探测。有机小分子荧光探针对生物分子如蛋白质、自由基、多肽、酶的标记和着色方向也正被逐渐重视。其中利用生物正交化学反应对体内生物大分子进行特异标记作为一种新兴的化学生物学方法，正日益得到更广泛的关注和兴趣。

生物正交反应统指一类能够在活体细胞或组织中不干扰生物自身生化反应条件下进行的化学反应。它通过活化剂在生物分子内如目标蛋白中引入特定标签（Tagging）的第一生物正交基团，又称为化学报告基团（Chemical Reporter），与含有或修饰有互补的第二生物正交基团，又称为触发基团（Trigger）的探针进行生物正交反应，从而实现对目标生物分子的特异标记。这两种正交基团被称为生物正交反应对（Bioorthogonal Pair），在生理条件下相互间发生“点击”反应，对周围分子保持惰性。然而到目前为止只有少数的几个反应可以满足生物正交的条件，已成为生物正交反应发展和技术应用的瓶颈。同时，现有生物正交反应的步骤复杂，使得生物正交反应效率低。

技术问题

本发明的目的在于克服现有技术的上述不足，提供一种生物正交前体、以及以所述生物正交前体为基础基团的生物正交试剂或生物正交活化剂，以克服现有生物正交反应发展和技术应用的瓶颈技术问题。

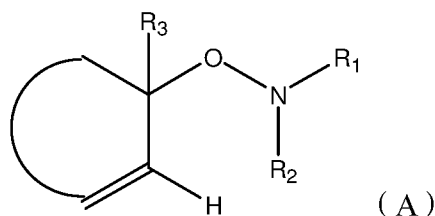
本发明的另一目的在于提供一种含有本发明生物正交试剂或生物正交前体的生物正交试剂盒，以提高现有生物正交反应效率。

发明内容

为了实现上述发明目的，本发明的技术方案如下：

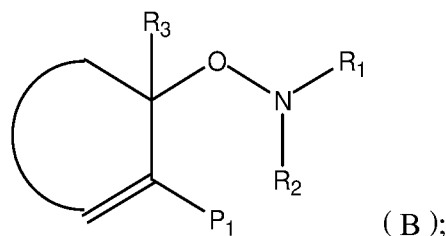
一种生物正交前体，其含有至少可作为偶联反应的定位基团和生物正交基团的多功能官能基团，其中，所述多功能官能基团为羟胺基团。

进一步地，上述本发明生物正交前体分子结构通式为下述 (A)：



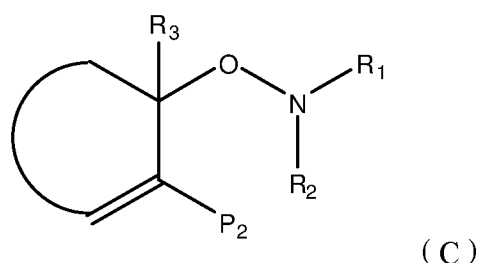
所述 A 式中， R_1 、 R_2 相同或不相同的为 H、含有直链或支链的烷基、含有直链或支链的酰基、烷氧羰基中的任一种， R_3 表示 H、烷基、烯基、芳基、杂芳基中的任一种，弧形所表示的结构为链状结构或环状结构。

以及，一种生物正交试剂，由上述本发明分子结构通式 (A) 所示的生物正交前体经脱氢偶联反应而成，其分子结构通式为下述 (B)：



所述 B 式中， P_1 为光学探针分子片段或结构基团。

以及，一种生物正交活化剂，其是上述本发明分子结构通式 (A) 或其衍生物，所示的生物正交活化剂可在生物条件下经脱氢偶联反应活化生物分子，其活化后的分子结构通式为下述 (C)：



所述 C 式中, P_2 表示为生物分子片段或构件基团。

以及, 一种用于生物标记的生物正交试剂盒, 其包括含有第二生物正交基团的生物正交试剂和能与所述生物正交试剂发生生物正交反应的且能直接或间接产生第一生物正交基团的活化剂, 所述生物正交试剂为如上述本发明生物正交试剂; 或所述活化剂为如上述本发明生物正交前体或为如上述本发明生物正交活化剂。

因此, 上述本发明生物正交前体选用羟胺基团作为功能基团, 其具有整合催化剂以活化底物作用和可生物正交性能, 因此, 本发明生物正交前体将碳-氢活化/偶联反应的定位基团与生物正交基团合二为一, 可选择在小分子光学探针上引入生物正交“触发”基团, 或者可选择在目标生物分子中引入特定生物正交“化学报告”基团。

优选地, 将上述本发明生物正交前体结构设计如上文所述的结构通式 (A), 即羟胺基团连接碳的邻位为碳-碳双键, 其能有效与生物分子中的烯基碳发生原子经济地脱氢偶联, 生成的修饰生物分子被标记上双烯结构; 或能有效与小分子光学探针中的烯基碳发生原子经济地脱氢偶联, 生成含双烯基团的生物正交试剂。

上述本发明生物正交试剂和生物正交活化剂由于含有本发明生物正交前体基团, 因此, 所述碳-氢活化/偶联反应强大的底物适用性、温和及生物兼容的反应条件可以作为修饰外源荧光探针, 或修饰本体生物分子的工具, 可轻松触发生物“点击”反应来实现生物正交标记。

有益效果

上述用于生物标记的生物正交试剂盒由于含有上文所述的本发明生物正交试剂或生物正交前体, 因此, 其能快速高效地实现生物正交标记。

附图说明

下面将结合附图及实施例对本发明作进一步说明, 附图中:

图 1 为本发明实施例生物正交前体碳-氢活化和生物正交反应耦合的路线图; 其中, 路线 a 表示本发明实施例生物正交前体碳-氢活化后提供化学报告基团和生物正交反应耦合的路线图; 路线 b 表示本发明实施例生物正交前体碳-氢活化后提供触发基团和生物正交反应耦合的路线图;

图 2 为利用本发明实施例 28 生物正交试剂盒用于 Hela 细胞表面标记的荧光强度与时间关系图。

具体实施方式

为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白, 以下结合实施例, 对本发明进行进一步详细说明。应当理解, 此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明, 并不用于限定本发明。

除非另外定义, 否则下文对于本发明实施例技术方案的阐述内容中使用的技术和科学术语具有与本发明领域的技术人员理解相同的含义。为了有利于本领域技术人员的理解, 与本发明实施例技术方案相关的定义列举如下:

生物正交反应：统指一类能够在活体细胞或组织中不干扰生物自身生化反应条件下进行的化学反应。它通过活化剂在生物分子内如目标蛋白中引入特定标签（Tagging）的第一生物正交基团，又称为化学报告基团（Chemical Reporter），与含有或修饰有互补的第二生物正交基团，又称为触发基团（Trigger）的探针进行生物正交反应，从而实现对目标生物分子的特异标记。这两种正交基团被称为生物正交反应对（Bioorthogonal Pair），在生理条件下相互间发生“点击”反应，对周围分子保持惰性。

定位基团：表示用于活化底物中的特定“惰性”碳-氢键，使其周围有足够高浓度的过渡金属催化剂来实现理想的反应动力学，并协调过渡金属与特定的碳-氢键相连从而实现在多个碳-氢键中精准区域选择性的基团。

生物正交基团：表示在生命系统和其它复杂的生物环境中可以互相进行点击化学反应（click reactions）的交互基团。所述生物正交基团具有正交性，其特征是反应组分是彼此相容并且不发生交叉反应，选择性地生物正交偶联而不干扰天然生物分子或生物过程。理想地，其相互正交的反应可以在串列式双生物分子标记中使用。本发明实施例中，所述交互生物正交基团中的第一生物正交基团安装在生物分子上作为化学报告基团，第二生物正交基团安装在探针分子上作为触发基团。

碳-氢活化：指由有机金属化合物协调的碳-氢键断裂过程，其中所述键断裂是通过碳-氢键配位到过渡金属内层电子云来完成，无需底物的预官能化步骤。在碳-氢活化反应中，定位基团（Directing Group）是非常重要的，它作为底物上的基团参与协调过渡金属与特定的碳-氢键相连，从而实现在多个碳-氢键中精准的区域选择性；同时由于它的配位作用，使得被活化的特定“惰性”碳-氢键周围有足够高浓度的过渡金属催化剂来实现理想的反应动力学。所述碳-氢键被活化的底物可以与另一个偶联底物实现交叉偶联反应。

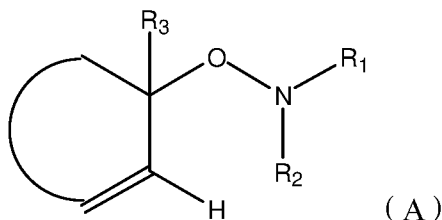
另外，在广义上，本发明实施例是基于以下认识：当碳-氢活化/偶联反应的定位基团在偶联反应后被保留并作为生物正交基团后，所述碳-氢活化/偶联反应强大的底物适用性、温和及生物兼容的反应条件可以作为修饰外源小分子光学探针，或修饰本体生物分子的工具，可轻松触发生物“点击”反应来实现生物正交标记。

基于此，本发明实施例提供了一种生物正交前体，其含有至少可作为偶联反应的定位基团和生物正交基团的多功能官能基团，其中，所述多功能官能基团为羟胺基团。这样，上述本发明实施例生物正交前体选用羟胺基团作为功能基团，其具有活化底物作用和可生物正交性能，因此，本发明实施例生物正交前体将碳-氢活化/偶联反应的定位基团与生物正交基团合二为一，可选择在小分子光学探针上引入生物正交“触发”基团，或者可选择在目标生物分子中引入特定生物正交“化学报告”基团。其中，其碳-氢活化与生物正交反应耦合的路线如图1中所示。

由图1所示的路线a和b清晰表明，上述生物正交前体作为提供生物正交基团的通用试剂。该通用试剂可以修饰生物分子提供第一生物正交化学报告基团，或者修饰探针分子提供第二生物正交触发基团，即当本发明实施例生物正交前体为活化剂时，其可被引入目标生物分子中作为第一生物正交基团，即“化学报告基团”；当本发明实施例生物正交前体为生物正交试剂前体时，其可被引入小分子光学探针中作为第二生物正交基团，即“触发基团”，能

够满足化学生物学界对于拓展生物正交试剂盒和正交方法的需求，为修饰生物分子、研究生物体系中分子网络和功能提供了新的工具。

在一实施例中，上述本发明实施例生物正交前体分子结构通式为下述 (A)：



所述 A 式中， R_1 、 R_2 相同或不相同的为 H、含有直链或支链的烷基、含有直链或支链的酰基、烷氧羰基中的任一种， R_3 表示 H、烷基、烯基、芳基、杂芳基中的任一种，弧形所表示的结构为链状结构或环状结构。因此，该式 A 所示的生物正交前体中羟胺基团连接碳的邻位为碳-碳双键时，其能有效与目标生物分子中的烯基碳发生原子经济地脱氢偶联，生成的修饰目标生物分子被标记上双烯结构，或能有效与小分子光学探针中的烯基碳发生原子经济地脱氢偶联，生成含双烯基团的生物正交试剂。

另外，基于式 A 所示的生物正交前体中 R_1 、 R_2 所表示的基团，在一实施例中，式 A 中的 R_1 、 R_2 相同的表示为 H 时，此时，上述本发明实施例生物正交试剂中羟胺基团没有被保护。

在另一实施例中，式 A 中的 R_1 、 R_2 中的至少一个不表示为 H 时，此时，上述本发明实施例生物正交前体中羟胺基团则被 R_1 和/或 R_2 保护。该羟胺基团被保护的生物正交前体是本发明实施例优选，控制反应条件可使其在上述碳-氢活化/偶联反应中被完整地保存下来作为生物正交基团。

进一步地，在一些实施例中，当式 A 所示的生物正交前体中 R_1 、 R_2 表示含有直链或支链的酰基时，所述酰基选自乙酰基、苯甲酰基、苄酰基、特戊酰基、十二酰基、三氟乙酰基中的任一种或两种；所述 R_1 、 R_2 表示烷氧羰基时，所述烷氧羰基选自叔丁氧羰基、苯氧羰基、苄氧羰基、烯丙氧羰基、乙氧羰基、三氯乙氧羰基、苄甲氧羰基中的任一种或两种。

式 A 所示的生物正交前体中 R_3 对本发明实施例生物正交前体构建的生物正交试剂的光学性能调控和溶解性能的调节、以及修饰生物分子的构象调整都有积极的影响。因此，在一些实施例中，当式 A 所示的生物正交前体中 R_3 表示烯基时，所述烯基选自乙烯基、丙烯基、异戊烯基、辛烯基、十二烯基、环戊烯基中的任一种；或

所述 R_3 表示芳基时，所述芳基选自苯环及其衍生物；或

所述 R_3 表示杂芳基时，所述杂芳基选自吡咯基、呋喃基、咪唑基、吡啶基、噻唑基、嘧啶基、噻吩基、吡唑基中的任一种。

在一些实施例中，上述分子结构通式 (A) 中弧形所示的链状结构选自含双键的链状结构。

在另一些实施例中，弧形所示的环状结构选自环丙烯、环丁烯、环戊烯、环己烯、环辛烯、四氢吡啶、二氢呋喃、二噻吩中的任一种或其衍生物。

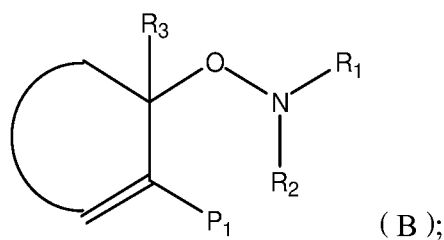
另外，如果上文所述的本发明实施例生物正交前体中的羟胺功能基团被酰肼、酯基或其

它有定位效果的基团替换,也在本发明实施例公开的范围之内。

相应地,在上文本发明实施例生物正交前体的基础上,本发明实施例还提供了一种生物正交试剂。该生物正交试剂为光学探针分子或基团与上文所述的生物正交前体经碳-氢活化/偶联反应而成,也即是说,本发明实施例生物正交试剂含有上文本发明实施例生物正交前体基团,因此,本发明实施例生物正交试剂能修饰外源小分子光学探针,即提供第二生物正交基团(触发基团),同时调控小分子光学探针的性质,如灵敏度、选择性、检测限、光学性质、以及生物相容性。

尽管小分子荧光探针被发现已经有上百年的时间了,但对小分子荧光染料的结构修饰才刚刚起步。由于生物组织在红色至近红外(Near-infrared, NIR)这一波长范围内透明,设计和合成出在红色至近红外波段内发射明亮且耐光的荧光染料尤其重要,能够用于动物和人类体内成像的需求。而本发明实施例生物正交试剂利用上文所述的本发明实施例生物正交前体对现有探针进行多共轭化修饰,并入多环和杂环体系,增加共轭链长度,从而使得本发明实施例生物正交试剂能有效满足用于动物和人类体内成像的需求。

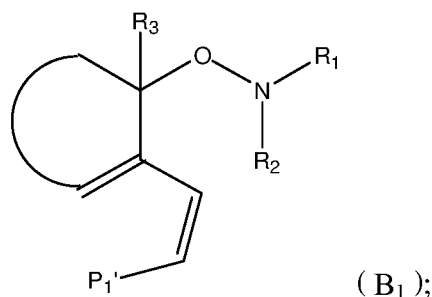
在一实施例中,本发明实施例生物正交试剂由上文所述的分子结构通式(A)所示的本发明实施例生物正交前体经脱氢偶联反应而成,其分子结构通式为下述(B):



所述B式中, P_1 为光学探针分子片段或结构基团。其中,

在进一步实施例中,所述B式中的 P_1 是通过不饱和键与上文所述的分子结构通式(A)所示的生物正交前体发生偶联反应连接至所述生物正交前体上的,其中,所述不饱和键为双键、三键、醛羰基、或酮羰基,且所述不饱和键为所述光学探针分子片段或结构基团的一部分。

因此,在进一步实施例中, P_1 是通过双键如碳-碳双键与上文所述的分子结构通式(A)所示的生物正交前体发生偶联反应连接至所述生物正交前体时,所述生物正交试剂分子结构通式为下述(B_1):

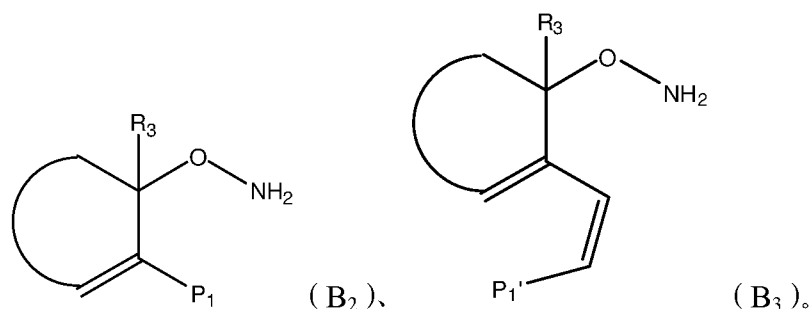


所述 B_1 式中, P_1' 为光学探针分子片段或结构基团。因此,在该 B_1 式中,羟胺基团连接碳的邻位含有双烯基团,因此,该双烯基团可以作为第二生物正交基团(触发基团)。也即是,该分子结构通式 B_1 所示的生物正交试剂除了羟胺基团作为第二生物正交基团之外,还

可以提供双烯基团作为第二生物正交基团。

另外, 所述 B、B₁ 式中, R₁、R₂ 和 R₃ 如同上文生物正交前体中所述, 为了节约篇幅, 在此不再赘述。因此,

在进一步实施例中, 当上述 B、B₁ 式所示的生物正交试剂中的 R₁、R₂ 相同的表示为 H 时, 此时, 上述本发明实施例生物正交前体中羟胺基团没有被保护。此时, 在一具体实施例中, 上述 B 式所示的生物正交试剂其分子结构通式为下述 (B₂), 上述 B₁ 式所示的生物正交试剂其分子结构通式为下述 (B₃):



对于上述各生物正交试剂分子结构中的 P₁、P₁' 所示的光学探针分子片段或结构基团可以是相同或不相同的一个或多个光学探针分子片段或结构基团, 在一些实施例中, P₁、P₁' 所述的光学探针分子片段为小分子荧光探针片段或比色探针片段。在进一步实施例中, 该 P₁、P₁' 所述的光学探针分子片段可以是芘 (pyrene) 类、硫酸奎宁 (quinine sulfate) 类、氟化硼络合二吡咯甲川 (boron-dipyrromethene, BODIPY) 类、荧光素 (fluorescein) 类、罗丹明 (rhodamine) 类中的任一种。

在另一些实施例中, P₁、P₁' 所述的结构基团可以是烯、炔、联烯、硫酮、亚磺酰、亚硝基、叠氮等中的任一种。

另外, 上述生物正交试剂可以按照如图 1 中的路线 b 进行反应制备, 将上文所述的本发明实施例生物正交前体与光学探针分子在金属催化剂的催化下进行碳-氢活化/脱氢偶联反应, 反应温度优选在 0-100°C 之间。其中, 在一实施例中, 金属催化剂可以选用钯催化剂、钌催化剂、铑催化剂、铜催化剂、镍催化剂等, 优选钯催化剂, 更优选有机配位的钯催化剂, 例如双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钯 (Pd(OAc)₂(ADHP)₂)。另外, 上述分子结构通式 B₁ 所示的生物正交试剂由于含有双烯基团, 因此, 其脱氢偶联反应发生在两个烯基碳上, 产生的小分子光学探针生物正交试剂含双烯结构, 可作为生物正交触发基团的用途, 使其在生理环境中能够激活相应化学报告基团的生物分子靶点并被识别。

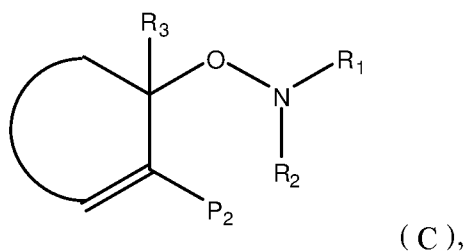
该碳-氢活化/脱氢偶联的反应溶剂优选为极性溶剂, 包含但不限于 1,2-二甲苯、氯苯、二氯甲烷、二氯乙烷、四氢呋喃、1,4-二氧六环、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺、乙腈、甲醇、叔丁醇、叔戊醇, 水或其混合溶剂, 优选为有水溶剂, 更为优选地为二甲基亚砜/水混合溶剂。

该碳-氢活化/脱氢偶联反应脱除的氢可以作为氢气被移出, 或用氧化剂捕捉, 所以氧化剂可以是有机化学家所熟知的氧化剂, 例如苯醌、碳酸银、氧气、空气、过硫酸盐、高碘试剂、过氧化物等, 优选地为空气。

另外, 当生物正交试剂分子中的羟胺功能基团被保护, 也即是如分子结构式 B、B₁ 所示的生物正交试剂分子中的 R₁、R₂ 表示不为氢时, 待脱氢偶联反应后可以进行脱保护反应, 使得羟胺功能基团得以释放。其中, 所述羟胺脱保护可以是有机化学家所熟知的方法, 例如在室温条件下采用四氢呋喃与水的混合溶剂, 在铜盐和酸的共同作用下进行。当上述生物正交试剂为 B₁ 式所述的含有双烯基团时, R₁、R₂ 可以被保护或不被保护。

相应地, 在上文本发明实施例生物正交前体的基础上, 本发明实施例同时还提供了一种生物正交活化剂。本发明实施例生物正交活化剂为上文所述的生物正交前体, 可与生物分子发生碳-氮活化/偶联反应, 也即是说, 本发明实施例生物正交活化剂含有上文本发明实施例生物正交前体基团, 因此, 本发明实施例生物正交活化剂其含有的羟胺功能基团提供第一生物正交基团, 即“化学报告基团”, 能作为标记如蛋白质等目标生物分子, 实现生物相容性地安装带有生物正交反应“把手”的方法, 从而对目标生物分子的结构、功能和相互作用进行研究, 实时检测观察其表达、运输和定位等变化过程, 以及获得关于生物组织生理代谢过程的相关信息。

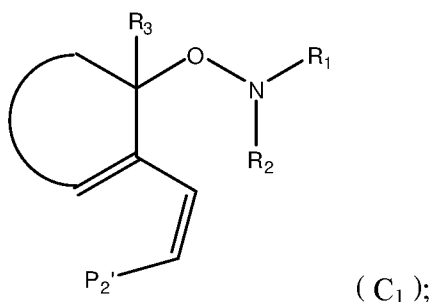
在一实施例中, 本发明实施例生物正交活化剂为上文所述的分子结构通式 (A) 所示的本发明实施例生物正交前体, 其经脱氢偶联反应修饰的生物分子结构通式为下述 (C):



所述 C 式中, P₂ 表示为目标生物分子片段或构件基团。

在一实施例中, 所述 C 式中的 P₂ 是通过不饱和键与上文所述的分子结构通式 (A) 所示的生物正交前体发生脱氢偶联反应连接至所述生物正交前体上的, 其中, 所述不饱和键由 C、O、S、N、或 P 构成的不饱和键, 其中所述不饱和键为所述生物分子的一部分。

因此, 在进一步实施例中, P₂ 是通过碳原子构成的双键与上文所述的分子结构通式 (A) 所示的生物正交前体发生脱氢偶联反应连接至所述生物正交活化剂上时, 得到生物正交活化剂修饰后的分子结构通式为下述 (C₁):

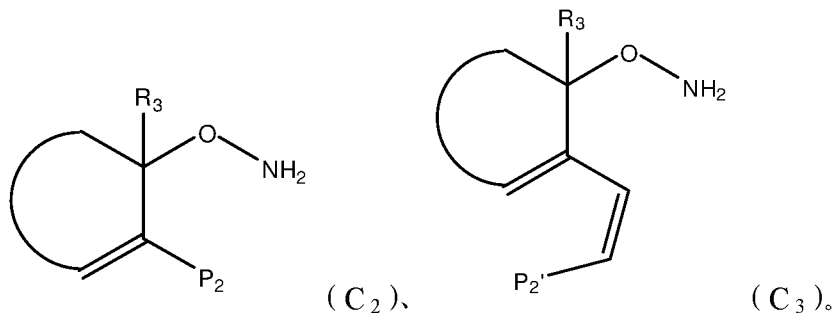


所述 C₁ 式中, P₂' 表示为生物分子片段或构件基团。因此, 在该 C₁ 式中, 羟胺基团连接碳的邻位含有双烯基团, 因此, 该双烯基团可以作为第一生物正交基团 (化学报告基团)。也即是, 该分子结构通式 (A) 所示的生物正交活化剂除了羟胺基团作为第一生物正交基团

之外, 还可以生成双烯基团作为第一生物正交基团。

另外, 所述 C、C₁ 式中, R₁、R₂ 和 R₃ 如同上文生物正交前体中所述, 为了节约篇幅, 在此不再赘述。因此,

在进一步实施例中, 当上述 C、C₁ 式所示正交活化后的生物分子中 R₁、R₂ 相同的表示为 H 时, 此时, 上述本发明实施例作为第一生物正交基团的羟胺基团没有被保护。此时, 在一具体实施例中, 上述 C 式所示的生物正交活化剂其分子结构通式为下述 (C₂), 上述 C₁ 式所示的生物正交活化剂其分子结构通式为下述 (C₃):



所述 C 式中, P₂ 表示为生物分子片段或构件基团。其中,

对于上述各生物正交活化剂分子结构中的 P₂、P₂' 可以是一个或多个生物分子片段或构件基团, 在一些实施例中, 该 P₂、P₂' 所示的生物分子片段或构件基团可以是蛋白质、核酸或多糖中的任一种片段或基团。

在一些具体实施例中, 该 P₂、P₂' 所示蛋白质片段时, 蛋白片段如金属卟啉 (metalloporphyrins) 及其构建的血红素 (heme)、色氨酸 (tryptophan); P₂、P₂' 所示核酸片段时, 核酸片段如胞嘧啶 (cytosine)、胸腺嘧啶 (thymine); P₂、P₂' 所示不饱和多糖片段时, 不饱和多糖片段如肝素双糖 (heparin disaccharides)、不包含脂肪 (unsaturated fat) 等中的任一种。另外, 从分子结构式可知, P₂' 是 P₂ 的一部分, 即 P₂' 加上碳碳双键构成 P₂; P₂ 不一定包含 P₂', 即 P₂ 与本发明活化剂相连的部分不一定是碳碳双键, 但它们表示的是同一类物质。

另外, 上述生物正交活化可以按照如图 1 中的路线 a 进行生物正交反应“把手”的安装, 将上文所述的本发明实施例生物正交前体与生物分子在金属催化的条件下进行碳-氢活化/脱氢偶联反应。该碳-氢活化/脱氢偶联的条件温和且生物兼容, 条件是加入金属催化剂, 其中, 在一实施例中, 该是金属催化剂选用钌催化剂、钨催化剂、铑催化剂、铜催化剂、镍催化剂等, 优选钌催化剂、更优选有机配位的钌催化剂, 例如双 (2-氨基-4,6-二羟基嘧啶) 合醋酸钌。同样, 该碳-氢活化/脱氢偶联反应碳-氢活化/脱氢偶联反应脱除的氢可以作为氢气被移出, 或用氧化剂捕捉, 优选是在氧化剂条件下进行, 在一实施例中, 所以氧化剂可以是有机化学家所熟知的氧化剂, 例如苯醌、碳酸银、氟化银、氧气、空气、过硫酸钠、高碘试剂、过氧化物等, 优选为空气。

该碳-氢活化/脱氢偶联的反应溶剂优选为水或混合溶剂, 包含但不限于水、乙醇/水、四氢呋喃/水、二甲基亚砜/水、乙腈/水、乙二醇/水, 优选为含水混合溶剂, 更为优选地为二甲基亚砜/水溶剂。

当上述各生物正交活化剂分子中的羟胺功能基团被保护, 也即是上述各生物正交活化剂

分子中的 R_1 、 R_2 表示不为氢时，待脱氢偶联反应后可以进行脱保护反应，使得羟胺功能基团得以释放，作为释放生物正交报告基团，使其在生理环境中能够在外源触发基团激活下实现生物分子靶点的识别。其中，所述羟胺脱保护可以是有机化学家所熟知的方法，例如在室温条件下采用四氢呋喃与水的混合溶剂，在铜盐和酸的共同作用下进行。当上述生物正交活化剂为 C_1 式所述的含有双烯基团时， R_1 、 R_2 可以被保护或不被保护。

因此，上述本发明实施例生物正交试剂和生物正交活化剂由于含有上文所述的本发明实施例生物正交前体基团兼碳-氢活化定位基团，因此，所述碳-氢活化/偶联反应强大的底物适用性、温和及生物兼容的反应条件可以作为修饰外源小分子光学探针，或修饰本体生物分子的工具，可轻松触发生物“点击”反应来实现生物正交标记。

相应地，在上文本发明实施例生物正交前体、生物正交试剂的基础上，本发明实施例还提供了用于生物标记的生物正交试剂盒。该生物正交试剂盒包括含有第二生物正交基团（触发基团）的生物正交试剂和能与所述生物正交试剂发生生物正交反应且能直接或间接产生第一生物正交基团（化学报告基团）的活化剂。其中，所述生物正交试剂选用上文所述的本发明实施例生物正交试剂，或所述活化剂选用上文所述的本发明实施例生物正交前体。

应当理解的是，当生物正交试剂选用上文所述的生物正交试剂时，选用的活化剂是能够与该生物正交试剂进行生物正交反应的，如但不仅为缩合成脒反应或狄尔斯-阿尔德环加成反应；当所述活化剂选用上文所述的生物正交前体时，选用的生物正交试剂是能够与该生物正交活化剂进行生物正交反应的，如但不仅为缩合成脒反应或狄尔斯-阿尔德环加成反应。

因此，在一实施例中，本发明实施例生物正交试剂盒（记为试剂盒 1）中的活化剂选用上文所述的生物正交前体，当该生物正交活化剂与目标生物分子或结构基团发生碳-氢活化/脱氢偶联反应后，生成如上文所述的本发明实施例的活化生物分子，如上文结构通式 C 所述，此时， P_2 即是该目标生物分子或结构基团经脱氢后形成的生物分子片段或构件基团。

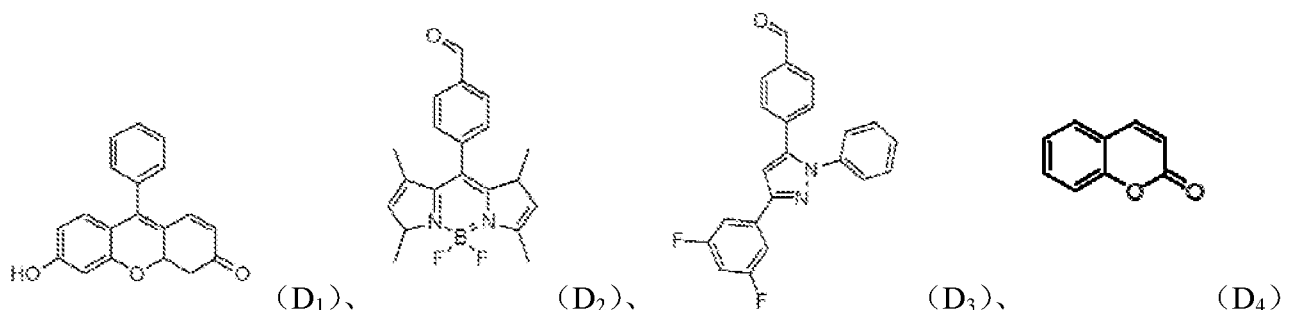
此时，该生物正交前体与目标生物分子或结构基团发生碳-氢活化/脱氢偶联反应后所形成的活化生物分子是利用所含的羟胺基团作为第一生物正交基团（化学报告基团），那么在此基础上，该试剂盒 1 中的生物正交试剂选用非生物探针分子，且该非生物探针分子提供第二生物正交基团（触发基团）为醛羰基或酮羰基，也即是试剂盒 1 中的生物正交试剂选用含羰基的小分子光学探针。

这是因为，试剂盒 1 中的活化剂提供的羟胺基团作为第一生物正交基团时，该羟胺基团（未被保护）具有强 α -效应，其能与生物正交试剂提供的醛羰基或酮羰基发生缩合生物正交反应（即缩合成脒反应）使其光学成像功能释放。其中，缩合成脒反应所用的催化剂可以是酸或苯胺。

因此，上述试剂盒 1 中作为活化剂的生物正交前体中羟胺基团在与待测生物分子或结构基团发生碳-氢活化/脱氢偶联反应过程中是被保护的，如果该生物正交前体中的羟胺基团为非保护的羟胺基团，即如上文所述的分子结构通式 A 中 R_1 、 R_2 相同为 H，那么在碳-氢活化/脱氢偶联反应之前，应该对羟胺基团进行保护处理。在生物正交前体与待测生物分子或结构基团发生碳-氢活化/脱氢偶联反应之后所生成的生物正交活化剂在与生物正交试剂进行缩

合成肟反应之前,应该将被保护的羟胺基团进行脱保护处理,使得脱保护的羟胺基团作为第一正交基团的脱保护方法如上文所述,在此不再赘述。

另外,在一些具体实施例中,与上述试剂盒1中活化剂发生碳-氢活化/脱氢偶联反应的目标生物分子为但不限于蛋白质、核酸、或多糖,优选地为含不饱和键的生物分子,如含金属卟啉(metalloporphyrins)的血红素(heme)及其共生的血红蛋白(hemoglobin)、肌红蛋白(myoglobin),不包含脂肪(unsaturated fat),肝素双糖(heparin disaccharides)等。在上述试剂盒1中所述含第二生物正交触发基团的小分子光学探针生物正交试剂可以是如下含醛羰基或酮羰基的荧光探针,如荧光素类(fluorescein)、氟硼荧类(boron-dipyrromethene, BODIPY)、苯基取代吡唑啉(phenyl pyrazoline)类、香豆素(coumarin)类母核结构及其衍生物。在具体实施例中,荧光素类如下述结构式D₁所示的荧光素,氟硼荧类如下述结构式D₂所示的氟硼荧,苯基取代吡唑啉类如下述结构式D₃所示的苯基取代吡唑啉,香豆素母核结构如下述结构式D₄所示。



基于上述试剂盒1的构成,该试剂盒1用于在生理环境中结合物质的化学工具的用途,或上文所述的本发明实施例生物正交前体与触发基团醛或酮羰基的缩合成肟反应作为用于在生理环境中结合物质的化学工具的用途。

在另一实施例中,本发明实施例生物正交试剂盒(记为试剂盒2)中的活化剂选用上文所述的本发明实施例生物正交前体,且所述生物正交前体与偶联修饰目标生物分子产生的所述第一生物正交基团为双烯基团,也即是利用上文所述的生物正交前体优选的是上文分子结构通式A所示的生物正交前体与修饰目标生物分子之间发生的碳-氢活化/偶联反应位点是生物分子的不饱和键上,优选地发生在碳-碳双键上,利用金属催化配位作用,将目标生物分子中的烯基碳与上文所述的本发明实施例生物正交前体优选的是上文分子结构通式A所示的生物正交前体中与定位基相邻的烯基碳发生原子经济地脱氢偶联,生成的修饰生物分子被标记上双烯结构,将双烯结构基团作为生物正交化学报告基团,使其在生理环境中能够在外源触发基团激活作用下实现生物分子靶点的识别。

具体地,在试剂盒2中,如上文分子结构通式A所示的生物正交前体与含有碳-碳双键的修饰目标生物分子之间发生的碳-氢活化/偶联反应位点是生物分子的碳-碳双键上,生成如上文分子结构通式C₁、C₃所示的含有双烯基团的生物正交活化剂。此时,该生物正交前体与含有不饱和键特别是碳-碳双键的目标生物分子或结构基团发生碳-氢活化/脱氢偶联反应后所产生的双烯基团至少作为第一生物正交基团(化学报告基团),那么在此基础上,该试剂盒2中的生物正交试剂选用亲双烯体,作为含第二生物正交基团的非生物探针分子。

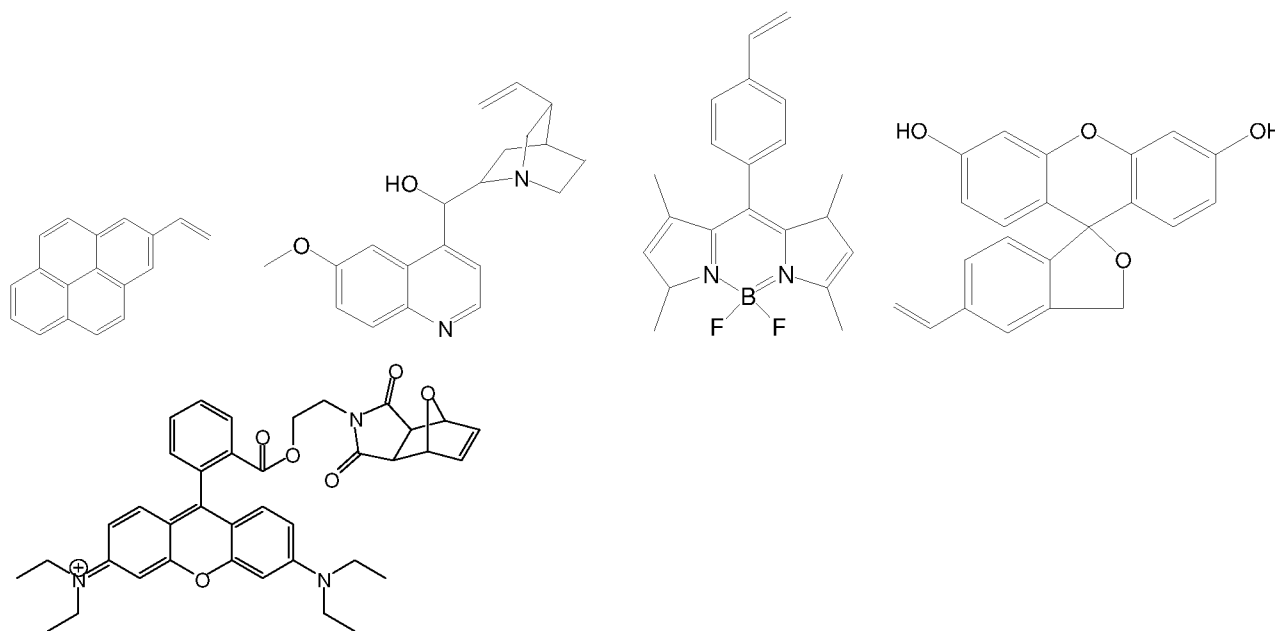
这是因为，试剂盒2中的产生双烯基团的活化剂提供的化学报告双烯基团与生物正交试剂中作为触发基团的亲二烯体基团之间诱导发生狄尔斯-阿尔德环加成反应（Diels-Alder Cycloaddition, DAc）。所述狄尔斯-阿尔德环加成反应作为生物正交工具来活化生物正交试剂，在生理环境中开启或关闭荧光，导致在生物靶点的荧光成像功能的释放。

该DAc反应发生在富电子的1,3-二烯和缺电子亲二烯体之间，通过 $[4\pi+2\pi]$ 环加成生成六元碳环。狄尔斯-阿尔德环加成反应反应选择性高，与生物大分子兼容性好，可被用于多肽序列、小分子、脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic Acid, DNA）、蛋白质的修饰和缀合，并且水的存在对反应有明显的加速作用，反应速度相对于纯有机相可以加速几个数量级。由于亲二烯体不存在于任何生物分子中，DAc反应作为生物正交反应无需保护基就可以达到理想的化学选择性。

但是现有利用DAc反应作为生物正交反应技术只能通过与含双烯的活化剂反应安装第一生物正交的化学报告基团，这导致了现有活化剂选择受限、不易得、分子大、链长较长，而且安装的化学报告基团双烯与生物分子的靶点间隔远，降低了生物正交反应标记生物分子的靶向性、选择性和可信度，并且显著改变了生物分子的尺寸。而上述试剂盒2克服了双烯中的两个碳-碳双键都必须从活化剂中得来的技术缺陷，利用目标生物分子中大量存在的不饱和键，直接脱氢偶联本发明实施例生物正交前体，优选如上文分子结构通式A生物正交前体作为活化剂，在线产生至少两个共轭双键，所述共轭双键零距离地修饰在生物分子靶点上，生成如上文分子结构通式C₁、C₃所示的含有双烯基团的修饰生物分子，大大提高了DAc反应作为生物正交技术标记生物分子的靶向性、选择性和可信度，避免显著改变目标生物分子的大小。

因此，上述试剂盒2中作为活化剂的生物正交前体中羟胺基团可以是被保护或非保护的羟胺基团。那么其在与待测生物分子或结构基团发生碳-氢活化/脱氢偶联反应过程中也可以是被保护或非保护的，同样在生物正交前体与待测生物分子或结构基团发生碳-氢活化/脱氢偶联反应之后所生成的生物正交活化剂在与生物正交试剂进行DAc反应之前，所含的羟胺基也可以是被保护或非保护的。

另外，在一些具体实施例中，上述试剂盒2中亲双烯体的生物正交试剂所含第二生物正交触发基团为亲双烯基团如烯、炔、联烯、硫酮、亚磺酰、亚硝基、叠氮等。具体的，该生物正交试剂选用如下结构式所示的但不仅仅限于乙烯芘（vinyl pyrene）、奎尼丁（quinidine）、乙烯苄基氟化硼络合二吡咯甲川（vinylbenzyl BODIPY）、螺[异苯并呋喃-1(3H),9'-[9H]咕吨]-3,1,5-乙烯基-3',6'-二羟基（vinyl fluorescein）、含马来酰亚胺的罗丹明B（maleimide-containing rhodamine B）等母核及其衍生物。



当然，本领域的技术人员应清楚地知道试剂盒2中亲双烯体的上述生物正交试剂所述结构的拓展将远远超过本示例所给出的母核结构及其衍生物。

基于上述试剂盒2的构成，该试剂盒2含亲双烯基团的小分子光学探针生物正交试剂和含有双烯基团的活化剂修饰的生物分子之间的狄尔斯-阿尔德环加成反应作为生物正交反应，反应条件是在水相室温下进行，优选地所述反应不添加任何金属催化剂。

在再一实施例中，本发明实施例生物正交试剂盒（记为试剂盒3）中的生物正交试剂选用上文所述的本发明实施例生物正交试剂，优选的如分子结构通式B、B₂所示生物正交试剂，在此生物正交试剂的前提下，该试剂盒3中的所述活化剂为能直接或间接产生所述第一生物正交基团为醛羰基或酮羰基的活化剂。因此，该试剂盒3中的生物正交试剂是利用所含的羟胺基团作为第二生物正交基团（触发基团），那么在此基础上，该试剂盒3中的活化剂利用所诱导的醛羰基或酮羰基提供第一生物正交基团（化学报告基团）。因此，基于试剂盒3中的生物正交试剂与活化剂的设定，生物正交试剂与活化剂之间的反应原理与上文所述的试剂盒1的反应原理类似，也是利用羟胺基团（未被保护）具有强 α -效应，其能与活化剂提供的醛羰基或酮羰基发生缩合生物正交反应（即缩合成肟反应）使其荧光成像功能的释放。具体的缩合成肟反应如同上文所述，在此不赘述。

那么同样，上述试剂盒3中，如果生物正交试剂中的羟胺基团被保护，则其与活化剂进行缩合成肟反应之前，应该将被保护的羟胺基团进行脱保护处理，使得脱保护的羟胺基团作为第一生物正交基团，脱保护方法如上文所述，在此不再赘述。如果生物正交试剂中的羟胺基团没有被保护，如上述分子结构通式B₂所示生物正交试剂，则其与活化生物分子或片段直接可进行缩合成肟反应。

在一些具体实施例中，试剂盒3的含有醛羰基或酮羰基的活化剂可以选用活化二甲亚砜（activated DMSO）、高碘试剂（hypervalent iodine compounds）、柯林斯试剂（collins reagent）、四甲基哌啶氮氧化物（TEMPO）、四正丙基过钨酸铵/N-甲基吗啉-N-氧化物（TPAP/NMO）中的任一种。

在又一实施例中，本发明实施例生物正交试剂盒（记为试剂盒4）中的生物正交试剂选用上文所述的如分子结构通式 B₁、B₃ 所示的本发明实施例生物正交试剂。在此生物正交试剂的前提下，该试剂盒4中的所述活化剂含有或诱导产生亲双烯体。因此，该试剂盒4中，生物正交试剂含有双烯基团，那么该生物正交试剂至少是利用所含的双烯基团作为第二生物正交基团（触发基团），那么在此基础上，该试剂盒4中的活化剂所含的亲双烯基团作为第一生物正交基团（化学报告基团）。因此，基于试剂盒4中的生物正交试剂与活化剂的设定，生物正交试剂与活化剂之间的反应原理与上文所述的试剂盒2的反应原理类似，也是利用作为化学报告基团的双烯基团与活化剂中作为触发基团的亲二烯体基团之间发生狄尔斯-阿尔德环合加成反应。所述狄尔斯-阿尔德环加成反应作为生物正交工具来活化生物正交试剂，在生理环境中开启或关闭荧光，导致在生物靶点的荧光成像功能的释放。具体 DAc 如同上文所述，在此不赘述。

那么同样，上述试剂盒4中生物正交试剂所含的羟胺基团可以是被保护或非保护的羟胺基团。活化剂在与生物正交试剂进行 DAc 反应之前，所含的羟胺基也可以是被保护或非保护的。

在一些具体实施例中，试剂盒4中作为活化剂的亲双烯体可以选用马来酰亚胺（maleimide）衍生物、马来酸酐（maleic anhydride）衍生物、丙烯酸酯（acrylate）衍生物、苯醌（benzoquinone）衍生物、偶氮二甲酯（dimethyl azodicarboxylate）衍生物、二氧三唑（dioxotriazole）衍生物等中的任一种。

因此，上述本发明实施例用于生物标记的生物正交试剂盒由于含有上文所述的本发明生物正交试剂或生物正交前体，能快速高效地实现生物正交标记。

现结合实施例对本发明进行进一步详细说明。以下实施例仅仅用以进一步说明本发明的生物正交前体、生物正交试剂、生物正交活化剂、用于生物标记的生物正交试剂盒等方面，并不用于限定本发明。

实施例1

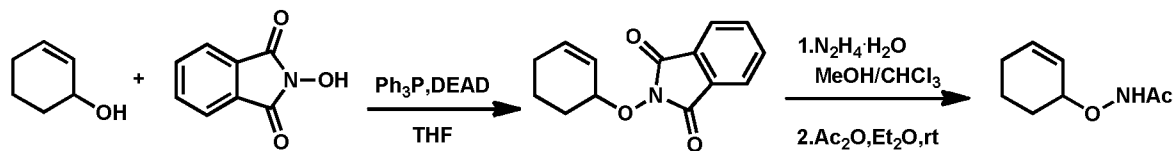
一种生物正交前体试剂 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺的制备：

将 N-羟基邻苯二甲酰亚胺(1.1 eq)，三苯基膦(1.5 eq)溶于干燥的四氢呋喃中，然后向其中加入 2-环己烯-1-醇(1 eq)。将反应体系冷却至 0℃，然后逐滴加入偶氮二甲酸二乙酯(1.5 eq)。反应混合物恢复至室温，过夜搅拌后，将溶液浓缩，过柱得到 2-(环己基-2-烯-1-氧基)异吲哚啉酮-1,3-二酮。

将 2-(环己基-2-烯-1-基氧基)异吲哚啉酮-1,3-二酮(1.0 eq)溶解在含有 10% 甲醇的氯仿(0.1 M)中，然后向其中加入单水合肼(3.0 eq)，混合物室温搅拌过夜，然后过滤，滤液浓缩，过柱；

将过柱获得的产物(1.0 eq)溶解在乙醚(0.2 M)中，冰浴条件下缓慢加入醋酸酐(2.0 eq)，然后恢复至室温，搅拌 3 小时。将混合物浓缩，过柱得到相应的 N-(环己-2-烯-1-基氧基)乙酰胺产物。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺制备的化学反应式如下：



将制备的产物 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.58 (s, 1H), 5.98 (d, $J=17.8$, 1H), 5.80 (s, 1H), 4.31 (d, $J=81.4$, 1H), 2.18 – 1.96 (m, 3H), 1.84 (m, 4H), 1.79 – 1.48 (m, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.33, 133.57, 125.02, 78.58, 26.89, 25.19, 19.74, 18.63。进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到分子量其结果为 178.0838, 与计算 $[\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{Na}]^+$ 的分子量 178.0844 相符, 该结果进一步证实了产物 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺分子结构正如上述分子结构。

实施例 2

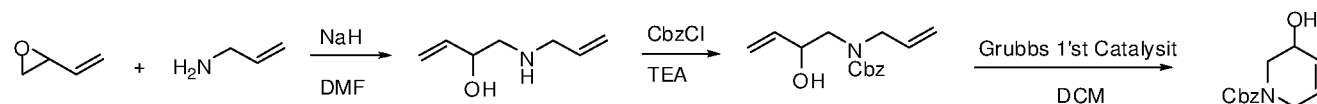
一种生物正交前体试剂苄基-5-(乙酰氨基)-5,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸的制备:

在封管中加入环氧丁烯 (1 eq), 烯丙胺 (2 eq) 和 0.4 mL 水, 然后加热到 100°C , 反应 6 h。待反应结束后, 直接旋干, 得到粗产物 1-(烯丙基氨基)丁基-3-烯-2-醇, 直接用于下一步反应。

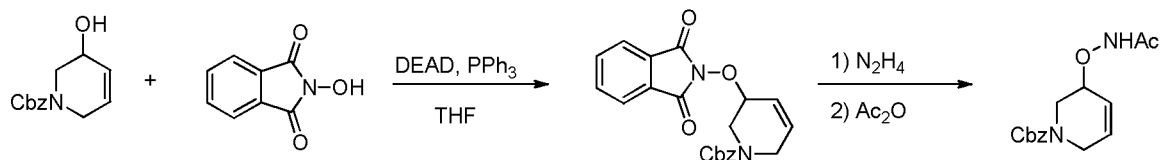
将上述产物溶解在二氯甲烷中, 然后加入三乙胺 (1.2eq), 冷却至 0°C , 缓慢滴加氯甲酸苄酯 (1 eq), 恢复至室温, 混合物在室温下进行反应。待原料转化完全, 向体系中加入一点甲醇, 然后旋干, 过柱, 得到苄基烯丙基(2-羟基丁基-3-烯-1-基)氨基甲酸酯。

在室温下将上述产物溶解在二氯甲烷中, 然后加入催化量的格拉布催化剂, 保持反应体系浓度为 0.01 M, 反应约 10 h, 得到产物苄基-5-羟基-5,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸。

苄基-5-羟基-5,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸制备的化学反应式如下:



由苄基-5-羟基-5,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸到苄基-5-(乙酰氨基)-5,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸的反应过程与实施例 1 类似, 在此不再赘述, 其反应化学式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.39 (s, 1H), 7.29 (d, $J=28.5$ Hz, 5H), 5.97 (d, $J=24.0$ Hz, 2H), 5.20 (dd, $J=40.2$, 12.8 Hz, 1H), 5.08 (d, $J=12.3$ Hz, 1H), 4.53 – 3.94 (m, 3H), 3.74 (d, $J=18.9$ Hz, 1H), 3.24 (dd, $J=96.4$, 13.3 Hz, 1H), 2.18 – 1.53 (m, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.12, 156.31, 136.32, 131.01, 128.59(2C), 128.21(2C), 127.86, 123.19, 74.47, 67.60, 44.02, 43.03, 19.74。进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到分子量其结果为 313.1158, 与计算 $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}]^+$ 的分子量 313.1165 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构正如上述分子结构。

实施例 3

一种生物正交前体试剂 N-(环庚基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺的制备:

将 N-羟基邻苯二甲酰亚胺(1.1 eq), 三苯基膦(1.5 eq)溶于干燥的四氢呋喃中, 然后向其中加入环庚-2-烯醇(1 eq)。其余步骤与实施例 1 相同。

将制备的产物进行核磁共振谱图 NMR 分析, 其结果为: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.54 (dd, $J = 45.7, 45.2$ Hz, 1H), 6.19 – 5.56 (m, 2H), 4.86 – 4.23 (m, 1H), 2.25 – 1.85 (m, 7H), 1.73 – 1.49 (m, 4H); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 168.64, 133.27, 130.94, 84.78, 30.99, 27.98, 26.37, 26.26, 18.05。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析, 得到分子量其结果为 192.0999, 与计算 $[\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{Na}]^+$ 的分子量 192.0995 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为 N-(环庚基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺。

实施例 4

一种生物正交前体试剂 N-(环戊基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺的制备:

将 N-羟基邻苯二甲酰亚胺(1.1 eq), 三苯基膦(1.5 eq)溶于干燥的四氢呋喃中, 然后向其中加入环戊-2-烯醇(1 eq)。其余步骤与实施例 1 相同。

将制备的产物进行核磁共振谱图 NMR 分析, 其结果为: ^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 6.18 – 6.14 (m, 1H), 5.88 – 5.85 (m, 1H), 5.01 – 4.97 (m, 1H), 3.31 (dt, $J = 3.2, 1.6$ Hz, 1H), 2.54 – 2.44 (m, 1H), 2.34 – 2.26 (m, 1H), 2.11 (dddd, $J = 14.2, 8.8, 7.6, 5.2$ Hz, 1H), 1.95 (ddt, $J = 15.5, 13.8, 5.2$ Hz, 1H), 1.86 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 168.87, 138.14, 128.38, 90.79, 30.60, 27.78, 18.00。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析, 得到分子量其结果为 164.0687, 与计算 $[\text{C}_7\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Na}]^+$ 的分子量 164.0682 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为 N-(环戊基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺。

实施例 5

一种生物正交前体试剂与三氟甲基苯乙烯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在 15 ml 的封管中加入实施例 1 中所示的生物正交前体 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入 3-三氟甲基苯乙烯 (51.6 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后再室温下搅拌约 6 小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率 86%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与 3-三氟甲基苯乙烯的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.73 (s, 2H), 7.53 – 7.41 (m, 3H), 6.83 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 6.37 – 6.15 (m, 1H), 4.72 (s, 1H), 2.29 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 2.22 – 2.10 (m, 1H), 1.92 (s, 3H), 1.88 – 1.76 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.56 – 1.42 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 168.86, 139.33, 136.63, 133.31, 131.39, 130.52, 129.11, 128.88, 126.18, 125.76, 122.88, 122.51, 76.00, 25.94, 25.22, 18.27, 16.24。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析, 得到分子量其结果为 348.1182, 与计算 $[\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}_2\text{F}_3\text{Na}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分

子量 348.1187 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为(E)-N-2-(3-三氟甲基苯乙烯基环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺。

实施例 6

一种生物正交前体试剂与氟苯乙烯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在 15 ml 的封管中加入实施例 1 中所示的生物正交前体 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钡钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入 3-氟苯乙烯 (36.6 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约 6 小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率 74%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与 3-氟苯乙烯的脱氢偶联反应方程式如下:



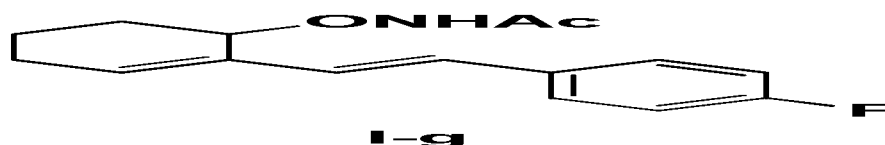
将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.40 – 7.25 (m, 3H), 7.20 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 6.90 (dt, J = 8.7, 3.5 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 6.19 (m, 1H), 4.71 (s, 1H), 2.37 – 2.12 (m, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.89 – 1.77 (m, 1H), 1.62 (m, 1H), 1.49 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 168.86, 163.23, 140.89, 136.06, 133.36, 130.82, 129.71, 126.15, 121.97, 113.04, 111.97, 76.10, 25.91, 25.28, 18.26, 16.27。进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到分子量其结果为 298.1215, 与计算 $[\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{NO}_2\text{FNa}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 298.1219 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为(E)-N-2-(3-氟苯乙烯基环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺。

实施例 7

一种生物正交前体试剂与氯苯乙烯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在 15 ml 的封管中加入实施例 1 中所示的生物正交前体 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钡钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入 4-氯苯乙烯 (41.6 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约 6 小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率 85%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与 4-氯苯乙烯的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.44 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.29 (m, 3H), 6.73 (d, J = 16.3 Hz, 1H), 6.21 – 6.07 (m, 1H), 4.70 (s, 1H), 2.39 – 2.12 (m, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.88 – 1.74 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.49 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 168.80, 136.99, 135.69, 133.41, 132.00, 130.21, 128.19, 127.32, 125.95, 76.08, 25.91, 25.26, 18.30, 16.28。进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到分子量其结果为 314.0917,

与计算 $[C_{16}H_{18}NO_2ClNa, M+Na]^+$ 的分子量 314.0924 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为(E)-N-2-(4-氯苯乙烯基环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺。

实施例 8

一种生物正交前体试剂与甲氧基苯乙烯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在15 ml的封管中加入实施例1中所示的生物正交前体N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺(15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入4-甲氧基苯乙烯(40.3 mg, 0.3 mmol)和二甲基亚砜/水(1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约6小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率66%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与4-甲氧基苯乙烯的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物 I-1 进行核磁共振谱图(NMR)分析, 其结果为: ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.40 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.60 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 6.19 – 6.03 (m, 1H), 4.70 (s, 1H), 3.77 (s, 3H), 2.34 – 2.25 (m, 1H), 2.23 (m, 1H), 2.20 – 2.13 (m, 1H), 1.91 (s, 3H), 1.86 (m, 1H), 1.64 – 1.56 (m, 1H), 1.48 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 168.78, 159.04, 133.74, 133.59, 130.88, 127.40, 127.11, 126.75, 113.59, 76.27, 54.31, 25.83, 25.38, 24.79, 18.29, 16.39。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析, 得到分子量其结果为 310.1413, 与计算 $[C_{17}H_{21}NO_3Na, M+Na]^+$ 的分子量 310.1419 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为(E)-N-2-(4-甲氧基苯乙烯基环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺。

实施例 9

一种生物正交前体试剂与叔丁基苯乙烯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在15 ml的封管中加入实施例1中所示的生物正交前体N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺(15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入4-叔丁基苯乙烯(48.1 mg, 0.3 mmol)和二甲基亚砜/水(1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约6小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率77%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与4-叔丁基苯乙烯的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图(NMR)分析, 其结果为: ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.41 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.25 (dd, $J = 16.4, 4.5$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 6.20 – 6.08 (m, 1H), 4.72 (s, 1H), 2.37 – 2.12 (m, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.90 – 1.79 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.56 – 1.42 (m, 1H), 1.31 (s, 9H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 168.79, 149.72, 135.30, 134.44, 133.56, 128.66, 126.96, 125.70, 124.96, 76.17, 33.94, 30.36, 25.84, 25.34, 18.26,

16.34。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析, 得到分子量其结果为 336.1933, 与计算 $[C_{20}H_{27}NO_2Na, M+Na]^+$ 的分子量 336.1939 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为 (E)-N-2-(4-叔丁基苯乙烯基环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺。

实施例 10

一种生物正交前体试剂与五氟苯乙烯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在 15 ml 的封管中加入实施例 1 中所示的生物正交前体 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入五氟苯乙烯 (58.2 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后室温下搅拌约 6 小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率 87%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与五氟苯乙烯的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.90 (s, 1H), 7.35 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 16.6$ Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 4.62 (s, 1H), 2.40 – 2.06 (m, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.71 – 1.61 (m, 1H), 1.55 (m, 1H), 1.37 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167.01, 146.12, 142.86, 139.96, 139.29, 136.01, 133.91, 113.58, 112.07, 74.22, 26.44, 25.13, 20.00, 16.54。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析, 得到分子量其结果为 370.0837, 与计算 $[C_{16}H_{14}NO_2F_5Na, M+Na]^+$ 的分子量 370.0842 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为 (E)-N-2-(五氟苯乙烯基环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺。

实施例 11

一种生物正交前体试剂与乙烯基萘的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在 15 ml 的封管中加入实施例 1 中所示的生物正交前体 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入 2-乙烯基萘 (58.2 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后室温下搅拌约 6 小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率 88%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与 2-乙烯基萘的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.85 (s, 1H), 7.82 – 7.74 (m, 3H), 7.70 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 7.46 – 7.34 (m, 2H), 6.87 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 6.17 (m, 1H), 4.77 (s, 1H), 2.29 (m, 1H), 2.26 (m, 1H), 2.23 – 2.11 (m, 1H), 1.93 (s, 3H), 1.90 – 1.80 (m, 1H), 1.70 – 1.57 (m, 1H), 1.56 – 1.43 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 168.87, 135.69, 135.21, 133.92, 133.62, 132.91, 129.87, 127.64,

127.48, 127.35, 127.22, 125.89, 125.77, 125.17, 123.09, 76.20, 25.92, 25.33, 18.31, 16.34。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析,得到分子量其结果为 330.1467,与计算 $[C_{20}H_{21}NO_2Na, M+Na]^+$ 的分子量 330.1470 相符,该结果进一步证实了产物分子结构为(E)-N-2-(2-萘乙烯基环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺。

实施例 12

一种生物正交前体试剂与乙烯基噻吩的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在15 ml的封管中加入实施例1中所示的生物正交前体N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺(15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入2-乙烯基噻吩(33.1 mg, 0.3 mmol)和二甲基亚砜/水(1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约6小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率89%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与2-乙烯基噻吩的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图(NMR)分析,其结果为: ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.50 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.04 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.96 (dd, $J = 5.1, 3.6$ Hz, 1H), 6.52 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H), 6.23 – 6.01 (m, 1H), 4.68 (s, 1H), 2.50 – 2.11 (m, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.88 – 1.74 (m, 1H), 1.70 – 1.56 (m, 1H), 1.56 – 1.40 (m, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 168.81, 143.57, 134.84, 133.21, 129.14, 127.06, 125.31, 123.20, 120.97, 76.00, 25.88, 25.26, 18.26, 16.29。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析,得到分子量其结果为 286.0874,与计算 $[C_{14}H_{17}NO_2SNa, M+Na]^+$ 的分子量 286.0878 相符,该结果进一步证实了产物分子结构为(E)-N-2-(2-噻吩乙烯基环己-2-烯-1-基氧基)乙酰胺。

实施例 13

一种生物正交前体试剂与甲基乙烯基噻唑的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在15 ml的封管中加入实施例1中所示的生物正交前体N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺(15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入4-甲基-5-乙烯基噻唑(37.6 mg, 0.3 mmol)和二甲基亚砜/水(1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约6小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率81%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与4-甲基-5-乙烯基噻唑的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图(NMR)分析,其结果为: ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.68 (s, 1H), 7.63 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.13 (m, 1H), 4.76 (s, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.20 (m, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.81 (m, 1H), 1.68 – 1.56 (m, 1H), 1.56 – 1.41 (m, 1H);

^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 168.62, 149.97, 149.34, 136.17, 133.41, 132.89, 132.13, 117.33, 75.49, 25.95, 25.08, 18.27, 16.18, 13.75。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析, 得到分子量其结果为 301.0962, 与计算 $[\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{SNa}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 301.0987 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为(E)-N-(2-(2-(4-甲基噻唑-5-基)乙烯基)环己-2-烯-1-基氧基)乙酰胺。

实施例 14

一种生物正交前体试剂与乙基乙烯基酮的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在15 ml的封管中加入实施例1中所示的生物正交前体N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入乙基乙烯基酮 (21.0 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约6小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率65%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与乙基乙烯基酮的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.19 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.70 – 6.32 (m, 1H), 4.62 (s, 1H), 2.66 (qd, $J = 7.3, 1.1$ Hz, 2H), 2.35 (dt, $J = 20.3, 4.5$ Hz, 1H), 2.26 (dd, $J = 23.0, 11.6$ Hz, 2H), 1.90 (s, 3H), 1.89 – 1.78 (m, 1H), 1.72 – 1.57 (m, 1H), 1.50 (tt, $J = 14.2, 3.2$ Hz, 1H), 1.10 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 203.12, 168.85, 144.54, 143.45, 132.74, 124.63, 75.46, 48.25, 48.04, 47.83, 47.61, 47.40, 47.19, 46.97, 34.02, 26.43, 24.99, 18.22, 15.93, 7.25。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析, 得到分子量其结果为 260.1260, 与计算 $[\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{Na}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 260.1263 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为(E)-N-((2-(3-羰基-1-烯-1-基戊基)环己基-2-烯-1-基)氧基)乙酰胺。

实施例 15

一种生物正交前体试剂与烯丙醛的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在15 ml的封管中加入实施例1中所示的生物正交前体N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入烯丙醛 (16.8 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约6小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到, 收率67%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与烯丙醛的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 6.87 (dd, $J = 15.7, 7.9$ Hz, 1H), 6.74 – 6.56

(m, 1H), 4.63 (s, 1H), 2.57 – 2.33 (m, 1H), 2.34 – 2.20 (m, 2H), 1.97 – 1.87 (m, 3H), 1.86 (s, 1H), 1.69 – 1.59 (m, 1H), 1.53 (ddd, $J = 14.0, 8.8, 3.3$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 195.51, 168.86, 154.91, 146.03, 132.99, 127.81, 75.31, 26.53, 24.95, 18.14, 15.84。进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到分子量其结果为 232.0945, 与计算 $[\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{Na}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 232.0950 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为 (E)-N-((2-(3-羧基-1-烯-1-基丙基)环己基-2-烯-1-基)氧基)乙酰胺。

实施例 16

一种生物正交前体试剂与辛烯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在 15 ml 的封管中加入实施例 1 中所示的生物正交前体 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐 (2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入 1-辛烯 (33.7 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后再 50°C 下搅拌约 48 小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率 30%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与 1-辛烯的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 6.18 – 6.04 (m, 1H), 5.41 (s, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.58 (s, 1H), 2.36 – 2.10 (m, 5H), 1.89 (s, 1H), 1.90 – 1.81 (m, 3H), 1.57 (s, 1H), 1.43 (dd, $J = 16.1, 5.3$ Hz, 3H), 1.32 (d, $J = 7.8$ Hz, 6H), 0.90 (dd, $J = 8.8, 4.7$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 168.60, 147.10, 134.32, 130.46, 110.29, 76.90, 33.75, 31.51, 28.85, 28.36, 25.57, 25.54, 22.31, 18.16, 16.02, 13.01。进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到分子量其结果为 288.1944, 与计算 $[\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_2\text{Na}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 288.1939 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为 (E)-N-(2-(1-烯-1-基辛基)环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺。

实施例 17

一种生物正交前体试剂与烯丙基甲酯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在 15 ml 的封管中加入实施例 1 中所示的生物正交前体 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐 (2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入烯丙基甲酯 (25.8 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约 6 小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率 89%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与烯丙基甲酯的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.24 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.49 – 6.44 (m, 1H), 4.61 (s, 1H), 3.73 (s,

3H), 2.39 – 2.29 (m, 1H), 2.26 – 2.24 (m, 1H), 2.21 – 2.20 (m, 1H), 1.89 (s, 3H), 1.85 – 1.74 (m, 1H), 1.67 – 1.56 (m, 1H), 1.54 – 1.44 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 168.79, 168.62, 145.85, 143.85, 132.44, 116.59, 75.31, 50.55, 26.29, 24.97, 18.24, 15.93。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析, 得到分子量其结果为 262.1051, 与计算 $[\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{Na}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 262.1055 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为(E)-甲基 3-(6-(乙酰胺-基氧基)环己基-1-烯-1-基)丙烯酸酯。

实施例 18

另一例生物正交前体试剂与烯丙基甲酯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在15 ml的封管中加入实施例2中所示的生物正交前体苄基-5-(乙酰胺基)-5,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸 (29.0 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钡钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入烯丙基甲酯(25.8 mg, 0.3 mmol)和二甲基亚砜/水(1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约6小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率80%。

苄基-5-(乙酰胺基)-5,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸与烯丙基甲酯的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图(NMR)分析, 其结果为: ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.35 (d, $J = 8.1$ Hz, 5H), 7.28 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J = 21.0$ Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 4.73 (s, 1H), 4.53 (dd, $J = 14.5, 10.0$ Hz, 2H), 3.98 – 3.76 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.99 (d, $J = 14.6$ Hz, 1H), 1.83 (d, $J = 41.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 169.32, 168.17, 156.16, 143.51, 137.53, 136.52, 130.92, 128.23, 127.85, 127.56, 118.72, 73.95, 67.26, 50.68, 43.80, 41.95, 18.27。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析, 得到分子量其结果为 397.1368, 与计算 $[\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 397.1376 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为(E)-苄基 5-(乙酰胺-基氧基)-4-(3-甲氧基-3-氧-1-烯-1-基)-5,6-二氢吡啶-1(2H)-羧酸酯。

实施例 19

另一例生物正交前体试剂与烯丙基甲酯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在15 ml的封管中加入实施例4中所示的生物正交前体N-(环戊基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (16.9 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钡钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入烯丙基甲酯(25.8 mg, 0.3 mmol)和二甲基亚砜/水(1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约6小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率85%。

N-(环戊基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与烯丙基甲酯的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.43 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.65 – 6.26 (m, 2H), 5.35 – 5.05 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 2.75 – 2.56 (m, 1H), 2.44 (m, 1H), 2.21 – 2.13 (m, 2H), 1.87 (s, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 169.08, 168.20, 146.08, 138.67, 138.57, 119.35, 88.16, 50.62, 30.86, 28.86, 18.17。进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到分子量其结果为 248.0895, 与计算 $[\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{Na}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 248.0899 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为(E)-甲基 3-(5-(乙酰胺-基氧基)环庚基-1-烯-1-基)丙烯酸酯。

实施例 20

一种生物正交前体试剂与烯丙基乙酯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在15 ml的封管中加入实施例1中所示的生物正交前体N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入烯丙基乙酯 (55.9 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后室温下搅拌约6小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率84%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与烯丙基乙酯的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.24 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.64 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.57 – 6.28 (m, 1H), 4.61 (s, 1H), 4.19 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.44 – 2.28 (m, 1H), 2.28 – 2.23 (m, 1H), 2.22 – 2.16 (m, 1H), 1.89 (s, 3H), 1.85 – 1.76 (m, 1H), 1.70 – 1.56 (m, 1H), 1.55 – 1.43 (m, 1H), 1.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 168.81, 168.19, 145.66, 143.70, 132.45, 116.93, 75.31, 59.93, 26.27, 24.98, 18.19, 15.94, 13.25。进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到分子量其结果为 276.1207, 与计算 $[\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{Na}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 276.1212 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为(E)-乙基 3-(6-(乙酰胺-基氧基)环己基-1-烯-1-基)丙烯酸酯。

实施例 21

一种生物正交前体试剂与烯丙基叔丁酯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在15 ml的封管中加入实施例1中所示的生物正交前体N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (15.5 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钨钠盐(2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入烯丙基叔丁酯 (38.5 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后室温下搅拌约6小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率85%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与烯丙基叔丁酯的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.14 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.48 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.43 (m, 1H), 4.59 (s, 1H), 2.34 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 2.21 (m, 1H), 1.89 (s, 3H), 1.83 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.45 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, MeOD) δ 168.83, 167.64, 144.75, 143.11, 132.40, 118.55, 79.90, 75.42, 27.09, 26.23, 25.05, 18.18, 15.98。进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到分子量其结果为 304.1521, 与计算 $[\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_4\text{Na}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 304.1525 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为 (E)-叔丁基 3-(6-(乙酰胺-基氧基)环己基-1-烯-1-基)丙烯酸酯。

实施例 22

另一例生物正交前体试剂与烯丙基叔丁酯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在 15 ml 的封管中加入实施例 3 中所示的生物正交前体 N-(环庚基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (16.9 mg, 0.1 mmol), 双 (2-氨基-4,6-二羟基嘧啶) 合醋酸钨钠盐 (2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入烯丙基叔丁酯 (38.5 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约 6 小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率 62%。

N-(环庚基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与烯丙基叔丁酯的脱氢偶联反应方程式如下:



将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (500 MHz, MeOD) δ 7.19 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.66 – 6.44 (m, 1H), 5.95 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 4.90 (m, 1H), 2.70 – 2.51 (m, 1H), 2.37 – 2.21 (m, 2H), 2.11 – 2.02 (m, 1H), 1.89 – 1.79 (m, 4H), 1.78 – 1.68 (m, 1H), 1.63 – 1.55 (m, 1H), 1.48 (m, 10H); ^{13}C NMR (126 MHz, MeOD) δ 168.66, 167.27, 147.63, 147.02, 138.18, 116.74, 79.98, 78.99, 28.37, 27.97, 26.99, 26.08, 23.93, 18.04。进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到分子量其结果为 318.1681, 与计算 $[\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}_4\text{Na}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 318.1676 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为 (E)-叔丁基 3-(7-(乙酰胺-基氧基)环庚基-1-烯-1-基)丙烯酸酯。

实施例 23

一种生物正交前体试剂与烯丙基苄酯的脱氢偶联反应制备生物正交试剂片段:

在 15 ml 的封管中加入实施例 1 中所示的生物正交前体 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (15.5 mg, 0.1 mmol), 双 (2-氨基-4,6-二羟基嘧啶) 合醋酸钨钠盐 (2.8 mg, 0.005 mmol)。向封管中加入烯丙基苄酯 (48.7 mg, 0.3 mmol) 和二甲基亚砜/水 (1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后在室温下搅拌约 6 小时。反应结束后过滤, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物, 收率 93%。

N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺与烯丙基苄酯的脱氢偶联反应方程式如下:



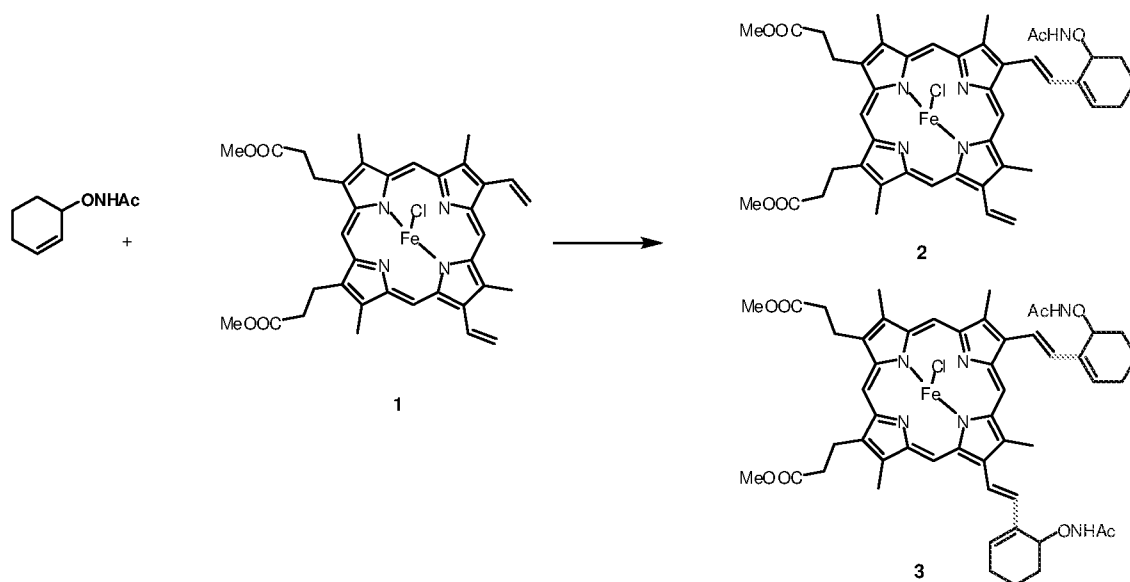
将制备的产物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7.46 – 7.28 (m, 5H), 7.27 (d, J = 12.7 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.45 (m, 1H), 5.18 (s, 2H), 4.61 (s, 1H), 2.29 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 2.19 (m, 1H), 1.86 (s, 3H), 1.84 – 1.74 (m, 1H), 1.66 – 1.53 (m, 1H), 1.54 – 1.39 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 168.84, 167.88, 146.17, 144.08, 136.43, 132.43, 128.13, 127.82, 127.73, 116.61, 75.29, 65.70, 26.29, 24.97, 18.19, 15.91。进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到分子量其结果为 338.1362, 与计算 $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{Na}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 338.136 相符, 该结果进一步证实了产物分子结构为 (E)-苄基 3-(6-(乙酰胺-基氧基)环己基-1-烯-1-基)丙烯酸酯。

实施例 24

一种生物正交活化剂与生物分子的脱氢偶联反应用以对生物分子安装化学报告基团:

向封管中加入实施例1中所示的生物正交活化剂 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (3.7 mg, 0.024 mmol), 氯化血红素的二甲基酯化合物 (20.4 mg, 0.03 mmol), 双 (2-氨基-4,6-二羟基嘧啶) 合醋酸钡钠盐 (0.9 mg, 5 mol%) 和二甲基亚砜/水 (0.5 ml, 20% DMSO), 滴加完后再室温下搅拌约 8 小时。反应结束后, 用二氯甲烷进行稀释, 转移到圆底烧瓶中, 然后向其中加入 0.3 g 硅胶, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到产物 **2** (9.2 mg) 和 **3** (2.2 mg), 总收率 55%, 产物 **2** 和产物 **3** 的摩尔比为 5: 1。

生物正交活化剂 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺对铁卟啉 IX 的脱氢偶联选择性修饰反应方程式如下:



进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到 **2** 的分子量其结果为 797.2905, 与计算 $[\text{C}_{44}\text{H}_{47}\text{FeN}_5\text{O}_6, \text{M}-\text{Cl}]^+$ 的分子量 797.2876 相符, 得到 **3** 的分子量其结果为 950.3702, 与计算 $[\text{C}_{44}\text{H}_{47}\text{FeN}_5\text{O}_6, \text{M}-\text{Cl}]^+$ 的分子量 950.3666 相符, 该结果进一步证实了活化剂对生物分子修饰后的产物分子结构, 并且证实了反应可以选择性地进行生物分子的单靶点活化。

实施例 25

一种生物正交活化剂与生物分子的脱氢偶联反应用以对生物分子安装化学报告基团:

向封管中加入实施例1中所示的生物正交活化剂 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺 (11.6

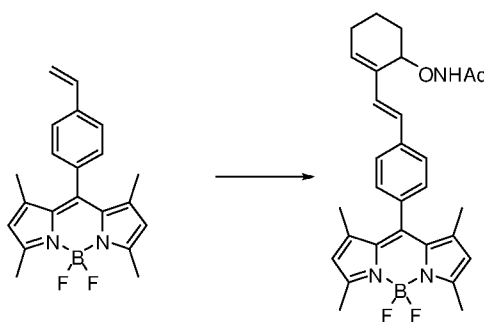
mg, 0.075 mmol), 氯化血红素的二甲基酯化合物 **1** (20.4 mg, 0.03 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钡钠盐(0.9 mg, 5 mol%)和二甲基亚砜/水(0.5 ml, 20% DMSO), 滴加完后室温下搅拌约14小时。其余步骤与实施例24相同。得到产物 **2** (3 mg) 和 **3** (10.6 mg), 总收率48%, 产物 **2** 和产物 **3** 的摩尔比为1: 3, 该结果进一步证实了活化剂对生物分子修饰后的产物分子结构, 并且证实了反应可以选择性地进行生物分子的多靶点活化。

实施例 26

一种生物正交前体试剂与氟硼茚类荧光分子的脱氢偶联反应用以对荧光分子安装触发基团制备生物正交试剂:

向封管中加入实施例 1 中所示的生物正交前体 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺(18.6 mg, 0.12 mmol)和烯基化的氟化硼络合二吡咯甲川类底物(35 mg, 0.1 mmol), 双(2-氨基-4,6-二羟基嘧啶)合醋酸钡钠盐(2.8 mg, 5 mol%)和二甲基亚砜/水(1.0 ml, 20% DMSO), 滴加完后室温下搅拌约 14 小时。反应结束后, 用二氯甲烷进行稀释, 转移到圆底烧瓶中, 然后向其中加入 0.3 g 硅胶, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到修饰后的氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子(35mg), 收率 70%。

生物正交试剂前体 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺对氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子的脱氢偶联选择性修饰反应方程式如下:



将制备的产物化合物进行核磁共振谱图(NMR)分析, 其结果为: ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ 8.04 (s, 1H), 7.64 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.85 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.04 (s, 2H), 4.85 (s, 1H), 2.53 (s, 6H), 2.40 – 2.16 (m, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.88 – 1.67 (m, 3H), 1.48 (s, 6H)。进行高分辨质谱 HRMS (ESI)分析, 得到分子量其结果为 526.2449, 与计算 $[\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}, \text{M}+\text{Na}]^+$ 的分子量 526.2453 相符, 该结果进一步证实了氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子已被修饰, 修饰位点为氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子的烯基上, 产生双烯, 并且生物正交试剂前体中的乙酰胺被保存且被保护, 其产生的双烯基团可作为第一生物正交的化学报告基团。

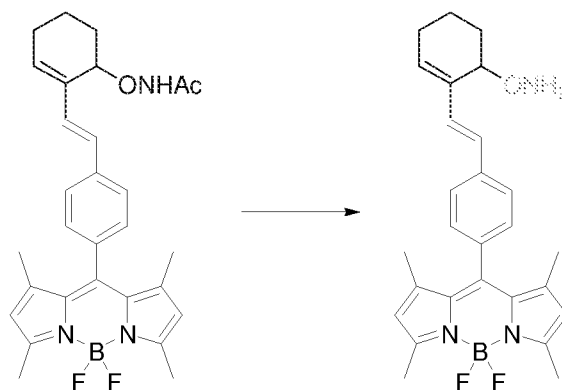
实施例 27

生物正交试剂前体 N-(环己基-2-烯-1-基氧基)乙酰胺修饰的氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子脱保护制备含氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子的生物正交试剂:

将实施例26中得到的生物正交试剂修饰的氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子(25 mg, 0.05 mmol)溶于THF/ H_2O (0.2 mL/0.2 mL), 然后向其中加入 CuCl_2 (6.6 mg, 0.05 mmol) 和 HCl (5 M, 20 μL)。室温下搅拌约36小时。加入饱和的碳酸氢钠进行中和, 用二氯甲烷萃取三

次, 收集有机层, 然后用 MgSO_4 进行干燥。最后加入0.3 g硅胶, 浓缩得到粗品。将粗品经柱层析纯化得到含脱保护羟胺结构的氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子 (9.2 mg), 收率40%。

修饰后氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子中生物正交片段中羟胺基团的脱保护反应方程式如下:



将制备的产物化合物进行核磁共振谱图 (NMR) 分析, 其结果为: ^1H NMR (500 MHz, CD_2Cl_2) δ 7.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.26 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.85 – 6.75 (m, 2H), 6.16 – 6.14 (m, 1H), 6.04 (s, 2H), 4.48 (s, 1H), 2.53 (s, 6H), 2.40 – 2.11 (m, 3H), 1.68 (m, 3H), 1.48 (s, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, CD_2Cl_2) δ 155.23, 143.31, 142.01, 138.76, 135.65, 134.51, 133.27, 131.59, 131.39, 128.25, 126.80, 125.10, 120.99, 26.40, 25.98, 16.97, 14.21。进行高分辨质谱 HRMS (ESI) 分析, 得到分子量其结果为 462.2492, 与计算 $[\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2, \text{M}+\text{H}]^+$ 的分子量 462.2528 相符, 该结果进一步证实了修饰氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子的羟胺基团已被脱保护, 其产生的非保护羟胺基团可作为第一生物正交的化学报告基团。

实施例 28

含实施例 27 所述修饰氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子的生物正交试剂和活化细胞的活化剂组成的生物正交试剂盒及其使用方法。

试剂盒组成: 生物正交试剂, 此处为实施例 27 所述修饰氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子或其衍生物; 活化剂, 此处为用于生物分子标签化的高碘酸盐或其类似物。

试剂盒使用方法: 活化剂活化生物分子表面形成化学报告基团, 活化后的生物分子再与生物正交试剂进行生物正交的缩合反应。

以 HeLa 细胞为例说明生物正交试剂盒的使用方法:

细胞表面唾液酸的高碘酸盐氧化: HeLa 贴壁细胞先在培养皿中培养 48 小时, 再用磷酸缓冲盐溶液 (pH 7.4) 洗涤三次, 然后让其在冰浴条件下保存在含有 1 mM 高碘酸钠的磷酸缓冲盐溶液 (pH 7.4) 中半小时, 以室温下作为其对照试验。该氧化反应被 1 mM 的甘油淬灭, 然后再用磷酸缓冲盐溶液 (pH 7.4) 洗涤三次。

苯胺催化的缩合反应生成脒: HeLa 细胞浸没在含有 5% 胎牛血清、100 μM 实施例 36 所述修饰氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子、和 10 mM 苯胺的磷酸缓冲盐溶液 (pH 6.7) 中, 将其置于黑暗和冰浴条件下, 通过摇床轻轻地搅动, 然后用细胞胰蛋白酶化, 离心, 再用磷酸缓冲盐溶液 (pH 7.4) 洗涤三次。将细胞置于含有 HaltTM 蛋白酶抑制剂 (Thermo) 的 RIPA 裂解液中, 保证浓度为 1×10^7 cells/mL。然后将该裂解物通过 10% 聚丙烯酰胺凝胶

电泳以检测相应的蛋白。通过 Typhoon FLA 9500 直接检测原位荧光。

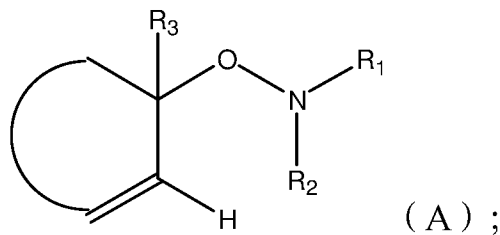
如图 2 所示, 经过 10 mM 高碘酸钠处理之后, HeLa 细胞在 100 μ M 实施例 29 所述修饰氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子和 10 mM 苯胺存在下孵育 30 到 90 分钟。30 分钟后, 荧光强度有明显的加强, 60 分钟后与不经过 NaIO_4 处理相比, 荧光强度有非常明显的改变。这些数据表明实施例 27 所述修饰氟化硼络合二吡咯甲川类荧光分子可以作为生物正交试剂通过苯胺催化下缩合反应用于标记含有醛的细胞表面。

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已, 并不用以限制本发明, 凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种生物正交前体，其含有至少可作为偶联反应的定位基团和生物正交基团的多功能官能基团，其中，所述多功能官能基团为羟胺基团。

2. 根据权利要求 1 所述的生物正交前体，其特征在于：其分子结构通式为下述 (A)：



所述 A 式中， R_1 、 R_2 相同或不相同的为 H、含有直链或支链的烷基、含有直链或支链的酰基、烷氧羰基中的任一种， R_3 表示 H、烷基、烯基、芳基、杂芳基中的任一种，弧形所表示的结构为链状结构或环状结构。

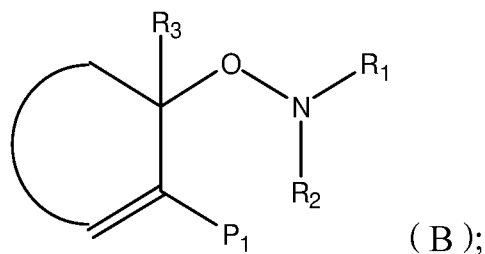
3. 根据权利要求 2 所述的生物正交前体，其特征在于：所述 R_1 、 R_2 表示含有直链或支链的酰基时，所述酰基选自乙酰基、苯甲酰基、苄酰基、特戊酰基、十二酰基、三氟乙酰基中的任一种或两种；或所述 R_1 、 R_2 表示烷氧羰基时，所述烷氧羰基选自叔丁氧羰基、苄氧羰基、烯丙氧羰基、乙氧羰基、三氟乙氧羰基、芴甲氧羰基中的任一种或两种；和/或

所述 R_3 表示烯基时，所述烯基选自乙烯基、丙烯基、异戊烯基、辛烯基、十二烯基、环戊烯基中的任一种；或

所述 R_3 表示芳基时，所述芳基选自苯环或其衍生物；或

所述 R_3 表示杂芳基时，所述杂芳基选自吡咯基、呋喃基、咪唑基、吡啶基、噻唑基、嘧啶基、噻吩基、吡唑基中的任一种。

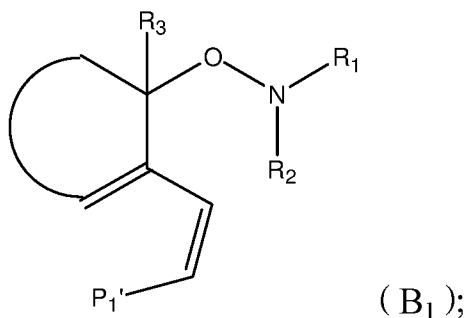
4. 一种生物正交试剂，由权利要求 2 或 3 所述的分子结构通式 (A) 所示的生物正交前体经脱氢偶联反应而成，其分子结构通式为下述 (B)：



所述 B 式中, P_1 为光学探针分子片段或结构基团。

5. 根据权利要求 4 所述的生物正交试剂, 其特征在于: 所述 P_1 是通过不饱和键与权利要求 2 或 3 所述的分子结构通式 (A) 所示的生物正交前体发生脱氢偶联反应连接至所述生物正交前体上, 其中, 所述不饱和键为双键、三键、醛羰基或酮羰基, 且所述不饱和键为所述光学探针分子片段或结构基团的一部分。

6. 根据权利要求 5 所述的生物正交试剂, 其特征在于: 所述不饱和键为碳-碳双键, 所述生物正交试剂分子结构通式为下述 (B_1):

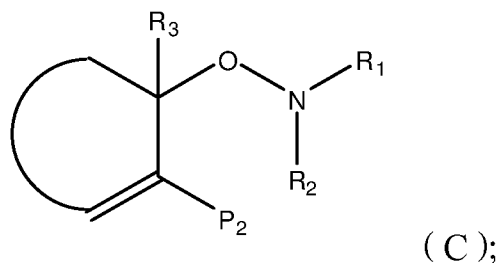


所述 B_1 式中, P_1' 为光学探针分子片段或结构基团。

7. 根据权利要求 4-6 任一所述的生物正交试剂, 其特征在于: 所述分子结构通式中的所述 R_1 、 R_2 均为 H。

8. 根据权利要求 4-6 任一所述的生物正交试剂, 其特征在于: 所述光学探针分子片段为荧光探针片段或比色探针片段。

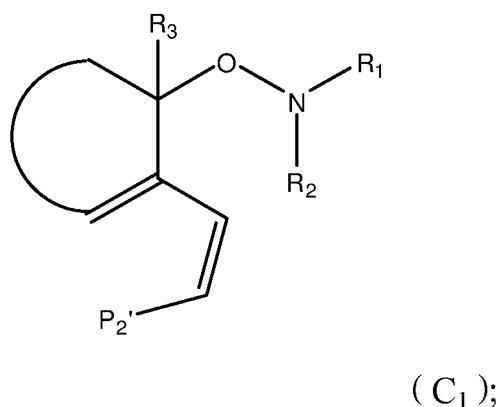
9. 一种生物正交活化剂, 为权利要求 2 或 3 所述的分子结构通式为 (A) 所示的生物正交前体, 所述生物正交活化剂与生物分子经脱氢偶联反应生成活化生物分子, 其分子结构通式为下述 (C):



所述 C 式中, P_2 表示为目标生物分子片段或构件基团。

10. 根据权利要求 9 所述的生物正交活化剂, 其特征在于: 所述 P_2 是通过不饱和键与权利要求 2 或 3 所述的分子结构通式为 (A) 所示的生物正交前体发生脱氢偶联反应活化生物分子, 其中, 所述不饱和键由 C、O、S、N 或 P 构成的不饱和键, 其中, 所述不饱和键为所述目标生物分子片段或构件基团的一部分。

11. 根据权利要求 10 所述的生物正交活化剂, 其特征在于: 所连接的不饱和键由碳-碳构成的双键, 所述活化的生物分子结构通式为下述 (C_1):



所述 C_1 式中, P_2' 表示为生物分子片段或构件基团。

12. 根据权利要求 9-11 任一所述的生物正交试剂, 其特征在于: 所述分子结构通式中的所述 R_1 、 R_2 均为 H。

13. 根据权利要求 9-11 任一所述的生物正交活化剂, 其特征在于: 所述生物分子片段或构件基团为蛋白质、核酸、多糖片段中的任一种。

14. 一种用于生物标记的生物正交试剂盒, 其包括含有第二生物正交基团的生物正交试剂和能与所述生物正交试剂发生生物正交反应且能直接或间接产

生第一生物正交基团的活化剂，其特征在于：所述生物正交试剂为如权利要求 4-8 任一所述的生物正交试剂；或所述活化剂为如权利要求 1-3 任一所述的生物正交前体或如权利要求 9-13 任一所述的生物正交活化剂。

15. 根据权利要求 14 所述的用于生物标记的生物正交试剂盒，其特征在于：所述生物正交试剂为如权利要求 5-6 任一所述的含有双烯基团的生物正交试剂，所述活化剂为亲双烯体。

16. 根据权利要求 14 所述的用于生物标记的生物正交试剂盒，其特征在于：所述生物正交试剂为如权利要求 7 所述的生物正交试剂，所述活化剂为能直接或间接产生所述第一生物正交基团为醛羰基或酮羰基的活化剂。

17. 根据权利要求 14 所述的用于生物标记的生物正交试剂盒，其特征在于：所述活化剂为如权利要求 1-3 所述的生物正交前体或如权利要求 9-13 任一所述的生物正交活化剂，其产生的第一生物正交基团为羟胺基团；所述生物正交试剂为非生物探针分子，所述非生物探针分子含有的所述第二生物正交基团为醛羰基或酮羰基。

18. 根据权利要求 14 所述的用于生物标记的生物正交试剂盒，其特征在于：所述生物正交活化剂为如权利要求 1-3 所述的生物正交前体或如权利要求 9-13 任一所述的生物正交活化剂，所述生物正交前体或所述生物正交活化剂与偶联修饰目标生物分子产生的所述第一生物正交基团为双烯基团；所述生物正交试剂为亲双烯体。

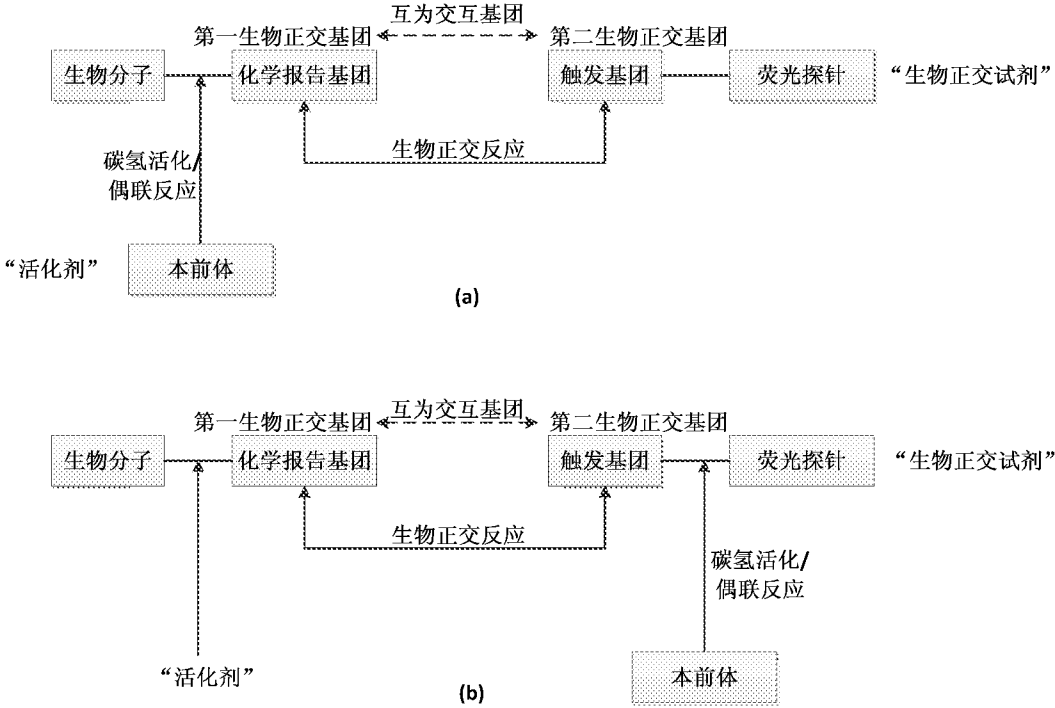
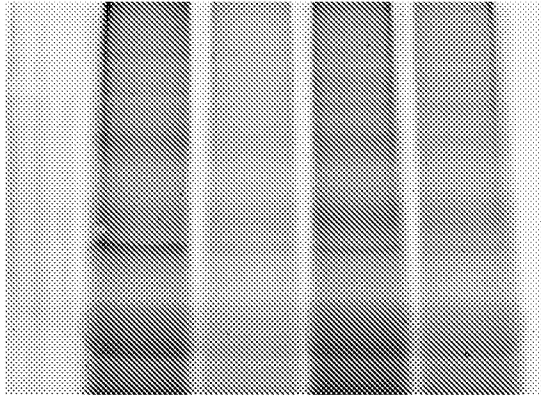


图 1

1 mM 活化剂	+	-	+	+
100 μ M 生物正交试剂	+	+	+	+
反应时间 (分钟)	90	90	60	30

凝胶内的荧光



考马斯亮蓝染色

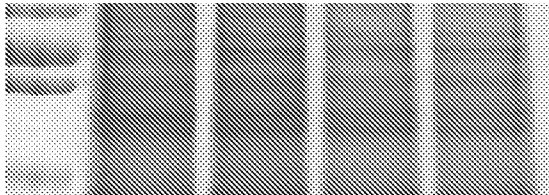


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/074897

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/48 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNABS, WPI, EPODOC, CA, ELSEVIER, EMBASE, ISI Web of Knowledge, STN and Key Words: hydroxylamine, hydrazine, acetamide, bioorthogonal, dydroxylamine, aminooxy, hydrazone, oxime, labling, tag, acetic acid amide, acetamide, structural formula

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104262283 A (PEKING UNIVERSITY SHENZHEN GRADUATE SCHOOL), 07 January 2015 (07.01.2015), paragraphs [0184] and [0202]	1-5, 9, 10
Y	CN 104262283 A (PEKING UNIVERSITY SHENZHEN GRADUATE SCHOOL), 07 January 2015 (07.01.2015), paragraphs [0184] and [0202]	14-17
X	FENG, Tian et al., "A General Approach to Site-Specific Antibody Drug Conjugates", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICAN, vol. 111, no. 5, 04 February 2014 (04.02.2014) ISSN: 1091-6490, see page 1766, left column, paragraph 1	1
Y	FENG, Tian et al., "A General Approach to Site-Specific Antibody Drug Conjugates", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICAN, vol. 111, no. 5, 04 February 2014 (04.02.2014) ISSN: 1091-6490, see page 1766, left column, paragraph 1	14-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
22 December 2015 (22.12.2015)

Date of mailing of the international search report
30 December 2015 (30.12.2015)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
XIAO, Jing
Telephone No.: (86-10) **62411141**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/074897**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HOWARD, C.H. et al., "Ketone Isosteres of 2-N-Acetamidoglycans as Substrates for Metabolic Cell Surface Engineering", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 123, no. 6, 20 January 2001 (20.01.2001) ISSN: 0002-7863, page 1242, left column, paragraph 1	1
A	WO 03063797 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO. et al.), 07 August 2003 (07.08.2003), claims 1	5-8, 9-11
A	WANG, Yue et al., "Rapid Site-Specific Protein Labeling Based on Diels-Alder Bioorthogonal Reactions", ACTA CHIMICA SINICA, vol. 70, 31 December 2012 (31.12.2012) ISSN: 0567-7351, pages 2208-2212	1-18
A	ANOUK, D. et al., "Nucleophilic Catalysis of Hydrazone Formation and Transimination: Implications for Dynamic Covalent Chemistry", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 128, 18 November 2006 (18.11.2006) ISSN: 0002-7863, pages 15602-15603	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/074897

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104262283 A	07 January 2015	None	
WO 03063797 A2	07 August 2003	AR 038466 A1	19 January 2005
		RU 2343143 C2	10 January 2009
		KR 20040096542 A	16 November 2004
		EP 1507504 A1	23 February 2005
		US 7202253 B2	10 April 2007
		US 2005234106 A1	20 October 2005
		NO 329356 B1	04 October 2010
		NO 20043645 A	31 August 2004
		PL 375359 A1	28 November 2005
		MXPA 04007365 A	31 March 2005
		CN 1732146 A	08 February 2006
		AU 2003210817 B2	16 July 2009
		WO 03063797 A8	16 December 2004
		JP 4598397 B2	15 December 2010
		JP 2010180208 A	19 August 2010
		BR 0307329 A	11 April 2006
		TW 200307539 A	16 December 2003
		US 2004072880 A1	15 April 2004
		HRP 20040667 A2	31 August 2005
		GEP 20063923 B	11 September 2006
		AU 2009222566 A1	22 October 2009
		IS 7370 A	23 July 2004
		JP 5148646 B2	20 February 2013
		CN 101704810 A	12 May 2010
		BRPI 0307329 A	11 April 2006
		ZA 200405905 A	31 May 2006
		CO 5601004 A2	31 January 2006
		JP 2006508016 A	09 March 2006
		NZ 534098 A	27 April 2007
		EP 2253328 A1	24 November 2010
		CA 2474451 A1	07 August 2003
		AU 2003210817 B9	29 October 2009
		EP 1507504 A4	05 July 2006
		CN 100558697 C	11 November 2009
		RU 2004126608 A	10 May 2005
		YU 66204 A	17 August 2006
		UA 87434 C2	27 July 2009
		US 2007142333 A1	21 June 2007

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/074897

A. 主题的分类

A61K 47/48(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI, CNABS, WPI, EPODOC, CA, ELSEVIER, EMBASE, ISI Web of Knowledge, STN和关键词: 生物正交, 羟胺, 肼, 肟, 乙酰胺, 标记, 标签, bioorthogonal, hydroxylamine, aminoxy, hydrazone, oxime. labling, tag, acetic acid amide, acetamide, 结构式

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 104262283 A (北京大学深圳研究生院) 2015年 1月 7日 (2015 - 01 - 07) 第[0184], [0202]段	1-5, 9, 10
Y	CN 104262283 A (北京大学深圳研究生院) 2015年 1月 7日 (2015 - 01 - 07) 第[0184], [0202]段	14-17
X	Feng Tian等. "A general approach to site-specific antibody drug conjugates" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American, 第111卷, 第5期, 2014年 2月 4日 (2014 - 02 - 04), ISSN: 1091-6490, 参见第1766页左栏第1段	1
Y	Feng Tian等. "A general approach to site-specific antibody drug conjugates" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American, 第111卷, 第5期, 2014年 2月 4日 (2014 - 02 - 04), ISSN: 1091-6490, 参见第1766页左栏第1段	14-17

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2015年 12月 22日

国际检索报告邮寄日期

2015年 12月 30日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10) 62019451

授权官员

肖晶

电话号码 (86-10) 62411141

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	Howard C. H 等. "Ketone Isosteres of 2-N-Acetamidosugars as Substrates for Metabolic Cell Surface Engineering" Journal of the American Chemical Society, 第123卷, 第6期, 2001年 1月 20日 (2001 - 01 - 20), ISSN: 0002-7863, 第1242页左栏第1段	1
A	WO 03063797 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO等) 2003年 8月 7日 (2003 - 08 - 07) 权利要求1	5-8, 9-11
A	王玥等. "基于Diels-Alder 生物正交反应的蛋白质快速位点特异性标记方法" 化学学报, 第70卷, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), ISSN: 0567-7351, 第2208-2212页	1-18
A	Anouk Dirksen等. "Nucleophilic Catalysis of Hydrazone Formation and Transimination: Implications for Dynamic Covalent Chemistry" Journal of the American Chemical Society, 第128卷, 2006年 11月 18日 (2006 - 11 - 18), ISSN: 0002-7863, 第15602-15603页	1-18

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/074897

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104262283	A	2015年 1月 7日	无			
WO	03063797	A2	2003年 8月 7日	AR	038466	A1	2005年 1月 19日
				RU	2343143	C2	2009年 1月 10日
				KR	20040096542	A	2004年 11月 16日
				EP	1507504	A1	2005年 2月 23日
				US	7202253	B2	2007年 4月 10日
				US	2005234106	A1	2005年 10月 20日
				NO	329356	B1	2010年 10月 4日
				NO	20043645	A	2004年 8月 31日
				PL	375359	A1	2005年 11月 28日
				MX	PA04007365	A	2005年 3月 31日
				CN	1732146	A	2006年 2月 8日
				AU	2003210817	B2	2009年 7月 16日
				WO	03063797	A8	2004年 12月 16日
				JP	4598397	B2	2010年 12月 15日
				JP	2010180208	A	2010年 8月 19日
				BR	0307329	A	2006年 4月 11日
				TW	200307539	A	2003年 12月 16日
				US	2004072880	A1	2004年 4月 15日
				HR	P20040667	A2	2005年 8月 31日
				GE	P20063923	B	2006年 9月 11日
				AU	2009222566	A1	2009年 10月 22日
				IS	7370	A	2004年 7月 23日
				JP	5148646	B2	2013年 2月 20日
				CN	101704810	A	2010年 5月 12日
				BR	PI0307329	A	2006年 4月 11日
				ZA	200405905	A	2006年 5月 31日
				CO	5601004	A2	2006年 1月 31日
				JP	2006508016	A	2006年 3月 9日
				NZ	534098	A	2007年 4月 27日
				EP	2253328	A1	2010年 11月 24日
				CA	2474451	A1	2003年 8月 7日
				AU	2003210817	B9	2009年 10月 29日
				EP	1507504	A4	2006年 7月 5日
				CN	100558697	C	2009年 11月 11日
				RU	2004126608	A	2005年 5月 10日
				YU	66204	A	2006年 8月 17日
				UA	87434	C2	2009年 7月 27日
				US	2007142333	A1	2007年 6月 21日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)