[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780036717.X

[51] Int. Cl.
C09B 23/02 (2006.01)
C09B 23/06 (2006.01)
C09B 23/08 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 9 月 2 日

[11] 公开号 CN 101522815A

[51] Int. Cl. (续)
C12Q 1/68 (2006.01)
[22] 申请日 2007.7.31
[21] 申请号 200780036717.X
[30] 优先权
[32] 2006. 7.31 [33] GB [31] 0615211.0
[86] 国际申请 PCT/GB2007/002907 2007.7.31
[87] 国际公布 WO2008/015415 英 2008.2.7
[85] 进入国家阶段日期 2009.3.31
[71] 申请人 通用电气医疗集团股份有限公司
地址 挪威奥斯陆
[72] 发明人 M·E·库珀

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 林毅斌 李连涛

权利要求书 8 页 说明书 56 页 附图 1 页

[54] 发明名称

不对称的氟取代的多次甲基染料

[57] 摘要

本发明涉及生物分子与一类改进的水溶性绿色至近红外(NIR)花青标记染料的改进的缀合物。 所述染料为不对称的氟取代的多次甲基染料，且具有高度光稳定性和降低的染料－染料猝灭以及高荧光量子产量。 所述缀合物用于体内光学成像以及荧光检测方法。 本发明还公开了包含所述缀合物的药物组合物、制备这种组合物的套装和使用所述缀合物体内成像的方法。

1. 一种式 I 的染料缀合物:

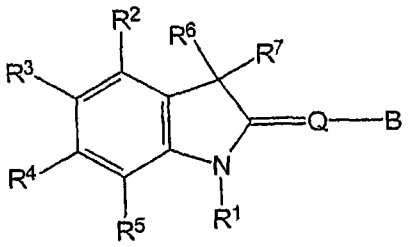
$$[BTM]-(L)_j-Cy^D$$

(I)

其中:

BTM 为生物靶向部分;

Cy^D 为式 II 的花青染料:



(II)

其中:

Q 为包含 1、2 或 3 个与 B 形成共轭体系的碳-碳双键的基团;

R^1、R^6 和 R^7 独立地选自 C_{1-4} 烷基或-$(CH_2)_k$-SO_3M^1;

R^2、R^3、R^4 和 R^5 独立地选自 H、F、-SO_3M^1 和-$(CF_2)_m$-F，其中 m 为数值为 1-4 的整数;

M^1 为 H 或 B^c，其中 B^c 为生物相容性阳离子;

j 为 0 或 1;

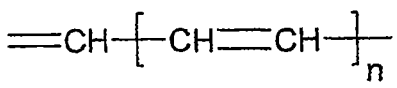
k 为数值为 1-10 的整数;

L 为式-$(A)_m$-的合成连接基，其中 A 各自独立地为-CR_2-、-CR=CR-、-C≡C-、-CR_2CO_2-、-CO_2CR_2-、-NRCO-、-CONR-、-NR(C=O)NR-、-NR(C=S)NR-、-SO_2NR-、-NRSO_2-、-CR_2OCR_2-、-CR_2SCR_2-、-CR_2NRCR_2-、C_{4-8} 亚环杂烷基、C_{4-8} 亚环烷基、C_{5-12} 亚芳基或 C_{3-12} 亚杂芳基、氨基酸、糖或单分散聚乙二醇(PEG)结构单元;

B 为选自苯并[b]吡咯鎓、喹啉鎓和吖啶鎓发色团的芳族发色团;

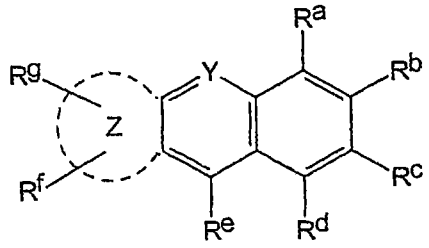
条件是R^2、R^3、R^4和R^5中至少一个为F或$-(CF_2)_m-F$。

2. 权利要求1的缀合物，其中Q为以下基团:



其中n = 1、2或3。

3. 权利要求1或权利要求2的缀合物，其中B为式IIa:



(IIa)

其中:

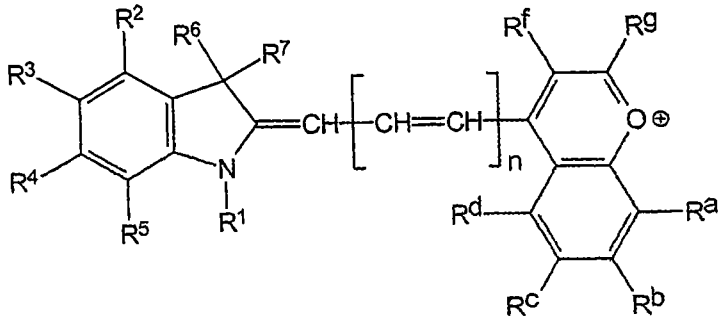
Y选自O^+和N^+-R^8，其中R^8选自H、C_{1-4}烷基和$-(CH_2)_k-SO_3M^1$;

R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f和R^g独立地选自Q、H、C_{1-4}烷基、C_{6-10}芳基、杂芳基、芳烷基、卤基、巯基、氨基、C_{1-4}烷基取代的氨基、季铵、$-SO_3M^1$、$-OR^9$和$-COOR^9$，其中R^9选自H和C_{1-4}烷基;

当Z存在时，Z表示任选稠合的苯环，使得R^f和R^g与Z环相连，或者当Z不存在时，R^f和R^g与Y环相连;

条件是R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f和R^g中一个为Q。

4. 权利要求3的缀合物，其中Y为O^+，Z不存在，且R^e为权利要求2的Q基团，所述染料具有式(III):

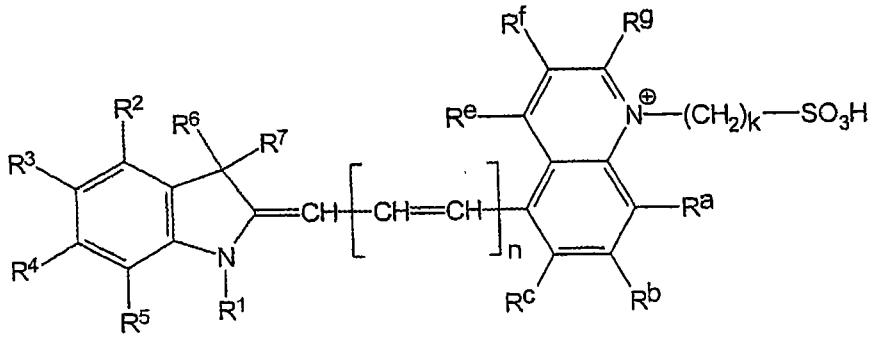


(III)

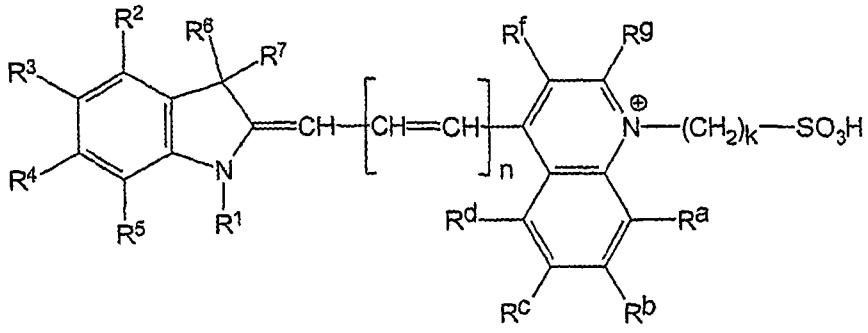
。

5. 权利要求 4 的缀合物，其中 R^b 为式-$NR^{10}R^{11}$ 的氨基，其中 R^{10} 和 R^{11} 独立地为 H 或 C_{1-4} 烷基，或者其中 R^{10} 与 R^a 组合或 R^{11} 与 R^c 组合或者二者均组合形成另外的饱和或不饱和的 6 元环。

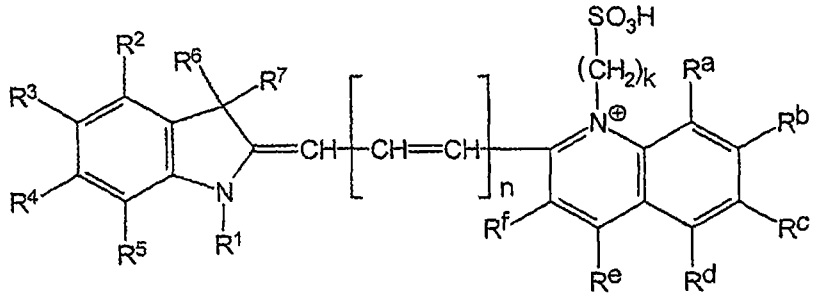
6. 权利要求 3 的缀合物，其中 Y 为 N^+-R^8，Z 不存在，且 Q 基团如权利要求 2 所定义，所述染料具有选自式(IVa)或(IVb)或(IVc)的结构:



(IVa)

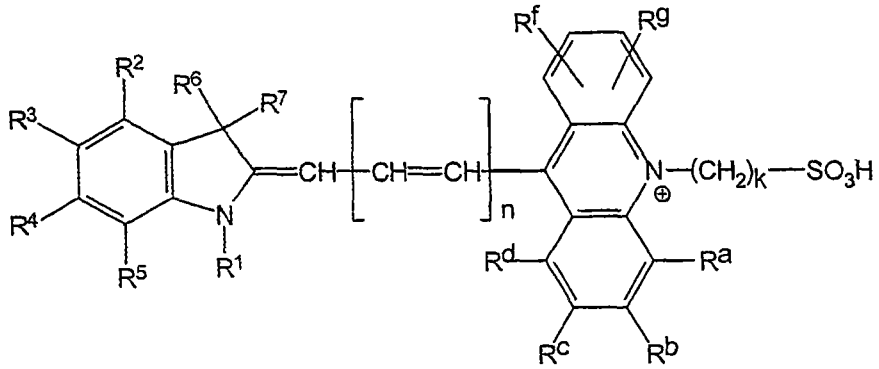


(IVb)



(IVc)

7. 权利要求 3 的缀合物，其中 Y 为 N^+-R^8，Z 存在，且 Q 基团如权利要求 2 所定义，所述染料具有式(V):



(V)

8. 权利要求 1-7 中任一项的缀合物，其中 k 为 3 或 4。

9. 权利要求 1-8 中任一项的缀合物，其中 R^2、R^3、R^4和 R^5中至少一个为 F。

10. 权利要求 1-9 中任一项的缀合物，其中 R^2、R^3、R^4和 R^5选自 H 或 F，条件是 R^2、R^3、R^4和 R^5中至少两个为 F。

11. 权利要求 10 的缀合物，其中 R^2、R^3、R^4和 R^5各自为 F。

12. 权利要求 1-9 中任一项的缀合物，其中 R^2、R^3、R^4和 R^5选自 H、F 或-$(CF_2)_m$-F，条件是 R^2、R^3、R^4和 R^5中至少一个为-$(CF_2)_m$-F。

13 权利要求 1-12 中任一项的缀合物，其中所述连接基$(L)_j$具有下式:

$$-(CHR')_p-M-(CHR')_r-$$

其中 M 选自: -CHR'-、-NR'-、-O-、-S-、-Ar-、-C(=O)NR'-和-C(=O)O-; R'为 H 或 C_{1-4}烷基，Ar 为任选被磺酸酯取代的亚苯基，p 和 r 各自为数值为 1-5 的整数。

14. 权利要求 13 的缀合物，其中:

R^1为-$(L)_j$[BTM]; 和

R^6和 R^7中一个为-$(CH_2)_k$-SO_3M^1，另一个为 C_{1-4}烷基。

15. 权利要求 13 的缀合物，其中:

R^1为-$(CH_2)_k$-SO_3M^1; 和

R^6和 R^7中一个为-$(L)_j$[BTM]，另一个为 C_{1-4}烷基。

16. 权利要求 1-15 中任一项的缀合物，其中 BTM 选自:

(i)3-100 聚体肽;

(ii)酶底物、酶拮抗剂或酶抑制剂;

(iii)受体-结合化合物;

(iv)低聚核苷酸;

(v)低聚-DNA 或低聚-RNA 片段。

17. 权利要求 16 的缀合物，其中 BTM 为 3-100 聚体肽。

18. 权利要求 17 的缀合物，所述缀合物具有式 Va 或 Vb:

$$[Cy^D]-(L)_j-[BTM]-Z^2 \qquad (Va);$$

$$Z^1-[BTM]-(L)_j-[Cy^D] \qquad (Vb);$$

其中:

Z^1与 BTM 肽的 N-端相连，且为 H 或 M^{IG};

Z^2与 BTM 肽的 C-端相连，且为 OH、OB^c或 M^{IG}，

其中 B^c 如权利要求 1 所定义，和

M^{IG} 为抑制或阻碍 BTM 肽的酶代谢的生物相容性基团的代谢抑制基团。

19. 权利要求 18 的缀合物，其中 $Z^1 = Z^2 = M^{IG}$。

20. 一种药物组合物，所述组合物包含权利要求 1-19 中任一项的缀合物以及生物相容性载体，所述组合物为适用于哺乳动物给药的形式。

21. 权利要求 20 的药物组合物，所述组合物的剂量适用于单个患者，且在合适的注射器或容器中提供。

22. 一种用于制备权利要求 20 或 21 的药物组合物的套装，所述套装包括无菌固体形式的权利要求 1-19 的缀合物，使得当使用无菌供应的生物相容性载体重构时发生溶解，以得到所需的药物组合物。

23. 权利要求 22 的套装，其中所述无菌固体形式为冻干的固体。

24. 一种可用于制备权利要求 1-19 的缀合物的官能化的染料，所述染料包括如权利要求 1-12 中任一项定义的式 II 的 Cy^D，其中所述 Cy^D 进一步包含基团 Q^a，其中 Q^a 为适用于与权利要求 1 和 16-17 中定义的 BTM 缀合的活性官能团。

25. 权利要求 24 的官能化的染料，其中 Q^a 选自：羧基、活性酯；异硫氰酸酯；马来酰亚胺；卤代乙酰胺；酰肼；二氯三嗪或亚磷酰胺。

26. 一种制备权利要求 1-19 的缀合物的方法，所述方法包括：

(i)将在权利要求 1 和 16-17 中定义的 BTM 与权利要求 24 或 25 的 Q^a-官能化的 Cy^D 混合；

(ii)在适用于 Q^a 基团与 BTM 反应的条件下，所述 Q^a-官能化的 Cy^D 与所述 BTM 温育，以得到所需的缀合物；

(iii)任选分离和/或纯化来自步骤(ii)的反应混合物的缀合物。

27. 一种哺乳动物体体内光学成像的方法，所述方法包括使用权利要求 1-19 的缀合物或权利要求 20 或 21 的药物组合物，以体内得到 BTM 的定位部位的图像。

28. 权利要求 27 的方法，其中权利要求 1-19 的缀合物或权利要求 20 或 21 的药物组合物已预先给予所述哺乳动物体。

29. 权利要求 27 或 28 的方法，所述方法包括以下步骤：

(i)使用激发光照射哺乳动物体内的目标组织表面；

(ii)使用荧光检测器检测通过 Cy^D 的激发产生的来自成像剂的荧光；

(iii)任选将通过荧光检测器检测的光滤色，以分离出荧光成分；

(iv)由步骤(ii)或(iii)的荧光形成所述目标组织表面的图像。

30. 权利要求 29 的方法，其中步骤(i)的激发光在性质上为连续波(CW)。

31. 权利要求 27 或 28 的方法，所述方法包括：

(a)将具有异质组成的所述哺乳动物体的光-散射生物组织暴露于来自光源的光，预定的时间随强度变化以激发成像剂，所述组织多次散射所述激发光；

(b)检测响应所述暴露由所述组织发射的多次散射光；

(c)通过使用处理器建立多个数值由发射量化整个组织的荧光特性，所述数值各自相应于组织内不同位置的荧光特性的水平，所述荧光特性的水平随着组织的异质组成而变；和

(d)根据步骤(c)的数值，通过绘制组织的异质组成产生组织的图像。

32. 权利要求 27-31 中任一项的方法，其中所述光学成像法包括荧光内窥镜检查法。

33. 权利要求 27-32 中任一项的方法，其中所述体内光学成像用于辅助检测、分期、诊断、监测疾病进展或监测哺乳动物体的疾病状态的治疗。

34. 一种检测、分期、诊断、监测哺乳动物体疾病进展或监测哺乳动物体的疾病状态的治疗的方法，所述方法包括权利要求 27-32 中任一项的体内光学成像法。

35. 一种测定样品中分析物的方法，所述方法包括:

(i)在适于引起所述分析物的至少一部分与所述特异性结合配偶体结合以形成复合物的条件下，将所述分析物与所述分析物的特异性结合配偶体接触，其中所述特异性结合配偶体包括权利要求 1-19 的染料缀合物;

(ii)测量标记复合物发射的荧光; 和

(iii)使发射的荧光与所述样品中的所述分析物的存在或量关联。

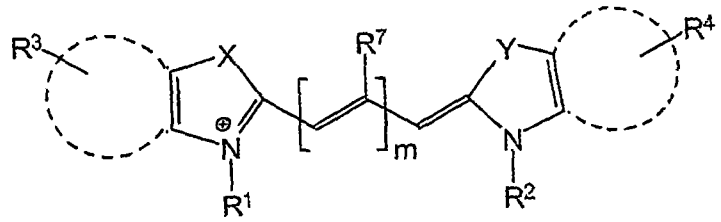
不对称的氟取代的多次甲基染料

发明领域

本发明涉及生物分子与一类改进的水溶性绿色至近红外(NIR)花青标记染料的改进的缀合物。所述染料为不对称的氟取代的多次甲基，且具有高度光稳定性和降低的染料-染料猝灭以及高荧光量子产量。所述缀合物用于体内光学成像以及荧光检测方法。本发明还公开了包含所述缀合物的药物组合物、制备这种组合物的套装和使用所述缀合物体内成像的方法。

发明背景

基于多次甲基发色团的荧光染料的特征在于可在宽的波长范围内延伸的强最大吸收。美国专利 6048982(Waggoner)公开了具有结构(1)的发光花青染料:

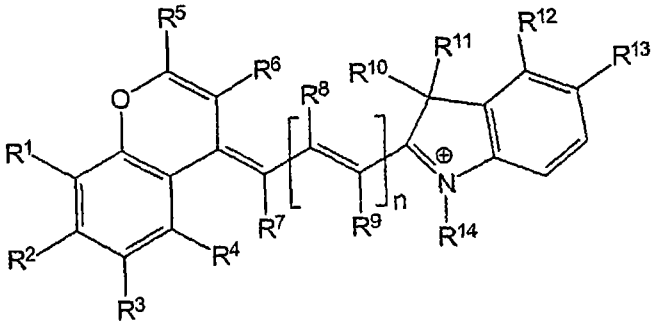


(1)

其中 X 和 Y 独立地选自 O、S 和 CH_3-C-CH_3；m 为 1-4 的整数，且基团 R^1、R^2、R^3、R^4和 R^7中至少一个为活性基团，使用氨基、巯基或羟基亲核体活化。在上式的花青染料中，连接杂环体系的次甲基的数目限定染料的最大吸收和最大发射。因此，从 3 个至 5 个至 7 个次甲基(从 Cy™3-Cy5-Cy7)，最大吸收以每次增量为约 100nm 增加。Cy3、Cy5 和 Cy7 的相应的发射峰也间隔约 100nm。对于待用于 NIR 范围的染料，需要组装(assemble)至少 5 个连接杂环碱的 sp^2 碳原子(五

次甲基染料)，从而提供波长最大发射波长 Em 为至少 650nm 的染料。延长这类染料中多次甲基链伴随着链上化学(亲核或亲电)进攻的机会的增加，导致缀合的失去、染料光稳定性的降低和低荧光量子产量。因此，比起具有相同数目次甲基的常规多次甲基染料，预期包含增加的“杂芳香性”的荧光染料提供了优势。

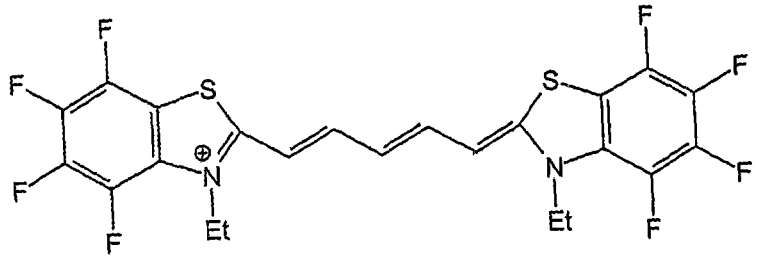
基于苯并吡咯鎓的多次甲基的激光-相容性 NIR 标记物染料见述于 US 6750346 (Czerney，P.等人)，其特别公开了结构(2)的化合物：



(2)

其中基团 R^1-R^{14} 相同或不同，且在每种情况下表示 H、Cl、Br、脂族或单核芳族基团，各自具有至多 12 个碳原子，除了碳和氢以外，还可含有至多 4 个氧原子和 0、1 或 2 个氮原子或硫原子，或硫和氮原子作为取代基团，或表示氨基官能团，其氮原子连接氢或具有至多 8 个碳原子的至少一个取代基，所述取代基选自碳、氢和至多两个磺酸基，且 n 为 0、1 或 2。R^1-R^{14} 中至少一个可包含活性基团。

近来，Waggoner 等人[Org.Lett.，6(6)，909-912(2004)]描述了在含水溶剂中具有良好光稳定性的多氟-硫杂二羰花青(thiadicarbocyanine 染料(3)。当与未氟化的类似物比较时，所述染料具有降低的聚集、提高的量子产量和更加耐光漂白：



(3)

。

对羰花青染料的吲哚鎓环 3-位的至少一个进行改性，以便引入活性基团或缀合物质见述于 WO 02/26891(Molecular Probes Inc.)。已报道 WO 02/26891 的改性染料克服了花青染料自缔合的倾向，且报道了使用改性染料标记的染料缀合物比使用结构上类似的羰花青染料标记的缀合物更具有荧光性。

Vompe 等人[Proc.USSR Acad. Sci.，272(3)，615-618 (1983)]公开了在次甲基链的一端具有二氢吲哚杂环的不对称七次甲基染料，且另一个环选自苯并噁唑、噻唑啉、吡咯啉、4-喹啉或苯并咪唑。所述环可被 CF_3 基团任选取代。该论文未记载染料与生物分子的缀合物。

本发明

以上文献中没有一个公开了生物靶向部分与包含一个或优选多个与本文所述的吲哚菁(indocyanine)发色团相连的氟取代基的不对称的多次甲基染料的缀合物。

此外，本发明的染料具有一个或多个与吲哚鎓环体系的 1-或 3-位相连的磺酸基。本发明的染料具有提高的光稳定性和降低的染料-染料相互作用。导致提高的亮度的提高的光稳定性和降低的染料-染料相互作用特别用于体内应用，例如用于内窥镜检查成像，其中光强度和相关的光漂白高，且有限的信息性荧光信号应与不利的组织自身荧光和背景信号分离。预料本发明染料的改进的化学稳定性赋予改进的对在活有机体内发生的各种生物化学过程(例如酶降解)的耐性，并预料可能降低由于染料-[生物靶向部分]缀合物的代谢引起的毒性和/

或成像无效。所述染料还用于涉及需要连续激发的荧光检测的体外测定，例如用于动力学研究或用于其中微阵载玻片可需要在数天的时间后再分析的微阵分析。

发明详述

本发明的第一方面提供了一种式 I 的染料缀合物：

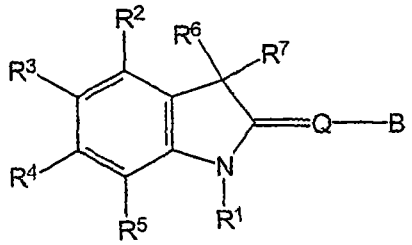
$$[BTM]-(L)_j-Cy^D$$

(I)

其中：

BTM 为生物靶向部分；

Cy^D 为式 II 的花青染料：



(II)

其中：

Q 为包含 1、2 或 3 个与 B 形成共轭体系的碳-碳双键的基团；

R^1、R^6 和 R^7 独立地选自 C_{1-4} 烷基或 $-(CH_2)_k-SO_3M^1$；

R^2、R^3、R^4 和 R^5 独立地选自 H、F、$-SO_3M^1$ 和 $-(CF_2)_m-F$，其中 m 为数值为 1-4 的整数；

M^1 为 H 或 B^c，其中 B^c 为生物相容性阳离子；

j 为 0 或 1；

k 为数值为 1-10 的整数；

L 为式 $-(A)_m-$ 的合成连接基，其中 A 各自独立地为 $-CR_2-$、$-CR=CR-$、$-C\equiv C-$、$-CR_2CO_2-$、$-CO_2CR_2-$、$-NRCO-$、$-CONR-$、$-NR(C=O)NR-$、$-NR(C=S)NR-$、$-SO_2NR-$、$-NRSO_2-$、$-CR_2OCR_2-$、$-CR_2SCR_2-$、$-CR_2NRCR_2-$、C_{4-8} 亚环杂烷基、C_{4-8} 亚环烷基、C_{5-12} 亚

芳基或 C_{3-12} 亚杂芳基、氨基酸、糖或单分散聚乙二醇(PEG)结构单元;

B 为选自苯并[b]吡咯鎓、喹啉鎓和吖啶鎓发色团的芳族发色团;

条件是 R^2、R^3、R^4 和 R^5 中至少一个为 F 或-$(CF_2)_m$-F。

“烷基”为包含 1-4 个碳原子的直链或支链烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基和叔丁基。

“芳基”为包含一个或两个包含 6-10 个碳原子的稠合芳环的芳族取代基，例如苯基或萘基，所述芳基任选且独立地被一个或多个取代基(例如卤素、C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 烷氧基)取代。

“烷氧基”为 C_{1-4} 烷氧基取代基，例如甲氧基、乙氧基、丙氧基和正丁氧基。

“杂芳基”为包含至少一个可选自 N、O 和 S 的杂原子的单环或双环 5 元至 10 元芳族环系，并任选且独立地被一个或多个取代基(例如卤素、直链或支链 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 烷氧基)取代。

“芳烷基”为被如上文所定义的芳基或杂芳基取代的 C_{1-4} 烷基。

“卤素”和卤基选自氟、氯、溴和碘。

术语“生物相容性阳离子”($B^{\oplus}$)是指与离子化的带负电荷的基团(在这种情况下的磺酸根)形成盐的带正电荷的反荷离子，其中所述带正电荷的反荷离子也是无毒的，因此适用于给予哺乳动物体，特别是人体。合适的生物相容性阳离子的实例包括：碱金属钠或钾；碱土金属钙和镁；和铵离子。优选的生物相容性阳离子为钠和钾，最优选钠。

术语“生物靶向部分”(BTM)是指给药后在哺乳动物体的特定部位体内选择性吸收或定位的化合物。这种部位可例如牵涉特定的疾病状态或指示器官或代谢过程如何作用。优选 BTM 包括：可为直链肽或环状肽或其组合的 3-100 聚体肽或肽类似物；或酶底物、酶拮抗剂或酶抑制剂；合成受体-结合化合物；低聚核苷酸，或低聚-DNA 或低聚-RNA 片段。

术语“肽”是指通过肽键(即连接一个氨基酸的氨基与另一个氨基酸的羧基的酰胺键)连接的包含两个或更多个如下定义的氨基酸的化

合物。术语“肽模拟物(peptide mimeric)”或“模拟物(mimetic)”是指模拟肽或蛋白质的生物活性但不再具有肽的化学性质的生物学上的活性化合物，也就是说，不再包含任何肽键(也就是说，氨基酸之间的酰胺键)。本文中，术语肽模拟物广义上包括在性质上不再完全为肽的分子，例如假肽(pseudo-peptide)、半肽(semi-peptide)和拟肽。术语“肽类似物”是指包含一种或多种如下所述的多种氨基酸类似物的肽。

术语“氨基酸”是指可为天然存在或纯合成来源的 L-或 D-氨基酸、氨基酸类似物(例如萘基丙氨酸)或氨基酸模拟物，且可为旋光纯的，即单一的对映异构体并因此为手性的，或多种对映异构体的混合物。本文使用氨基酸的常规的 3-字母或单字母缩写。优选本发明的氨基酸为旋光纯的。术语“氨基酸模拟物”是指为等排体的天然存在的氨基酸的合成类似物，即设计用于模拟天然化合物的空间和电子结构。这种等排体为本领域技术人员众所周知的，且包括但不局限于酯肽、retro-inverso 肽、硫代酰胺、环烷烃或 1,5-二取代的四唑[参见 M. Goodman，Biopolymers，24，137，(1985)]。

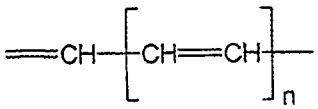
合适的酶底物、拮抗剂或抑制剂包括葡萄糖和葡萄糖类似物，例如氟脱氧葡萄糖；脂肪酸或弹性蛋白酶、血管紧张肽 II 或金属蛋白酶抑制剂。优选的非肽血管紧张肽 II 拮抗剂为氯沙坦(Losartan)。合适的合成受体-结合化合物包括雌二醇、雌激素、黄体酮、孕酮和其他类固醇激素；用于多巴胺 D-1 或 D-2 受体的配体或多巴胺转运蛋白例如托烷；和用于 5-羟色胺受体的配体。

在另一实施方案中，特别是对于体外应用，BTM 可为能与其互补特异性结合配偶体特定且非共价结合的亲和力标记，从而形成特异性结合对。特异性结合对的实例包括但不局限于：生物素/抗生物素蛋白、生物素/链霉抗生物素蛋白、与次氮基三乙酸的多聚组氨酸标记-金属离子复合物(例如 Ni^{2+}：NTA)。互补特异性结合配偶体可为用于检测靶向成分的标记复合物的一种成分。应理解的是，在本发明的上下文中，可使用互相具有特异性结合亲和力的任何两个原子或分

子。亲和力标记的优选的实例选自生物素、亚氨基生物素和脱硫生物素。

式 II 的花青染料(Cy^D)为使用绿色至近红外波长(500-1200nm，优选 600-1000nm)的光，在光学成像步骤中能直接或间接检测的荧光染料或发色团。优选 Cy^D 具有荧光性质。

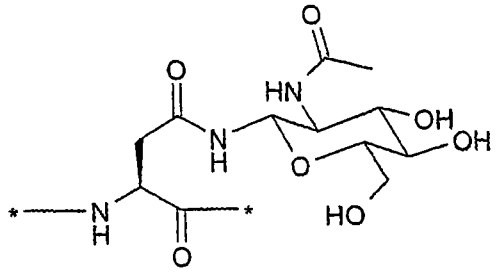
优选 Q 为以下基团:



其中 n = 1、2 或 3。优选的 NIR 染料为其中选择 n 为 2 或 3，最优选 2 的那些。

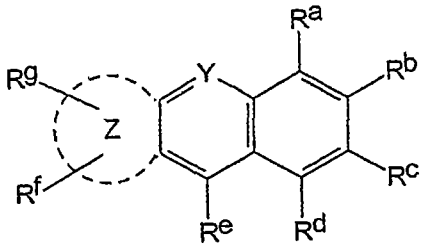
优选 j 为 1，即存在连接基(L)。预期式 I 的连接基-$(A)_m$-的作用之一为使 Cy^D 远离 BTM 的活性部位。由于 Cy^D 较大，因此远离 BTM 的活性部位是特别重要的，否则不合乎需要的空间相互作用会发生。通过挠性(例如简单的烷基链)的组合可实现这一点，使得 Cy^D 可自由远离活性部位和/或刚性基团(例如使 Cy^D 定位远离活性部位的环烷基或芳基间隔基)。连接基的性质还可用于改变体内成像剂的生物分布。因此，例如在连接基中引入醚基团有助于使血浆蛋白质结合程度最小。当-$(A)_m$-包括聚乙二醇(PEG)结构单元或 1-10 个氨基酸残基的肽链时，连接基可用于体内改变成像剂的药代动力学和血液清除率。这种“生物改性剂”连接基可加速成像剂从背景组织(例如肌肉或肝脏)和/或从血液中清除，因此由于较少的背景干扰而得到更好的诊断图像。生物改性剂连接基还可用于偏向特定的排泄路线，例如通过肾而不是通过肝脏排泄。

术语“糖”是指单-、二-或三-糖。合适的糖包括: 葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、甘露糖和乳糖。糖可任选被官能化，使得易与氨基酸偶合。因此，例如氨基酸的葡糖胺衍生物可通过肽键与其他氨基酸缀合。天冬酰胺的葡糖胺衍生物(得自 NovaBiochem 的商品)为这种情况的一个实例:



式 I 说明-$(L)_j[Cy^D]$部分可在 BTM 的任何合适的位置相连。选择-$(L)_j[Cy^D]$部分的这种合适的位置远离用于与活性部位体内结合的 BTM 的部分的位置。

适当的情况下，B 为式 IIa:



(IIa)

其中:

Y 选自 O^+和 N^+-R^8，其中 R^8选自 H、C_{1-4}烷基和-$(CH_2)_k$-SO_3M^1;

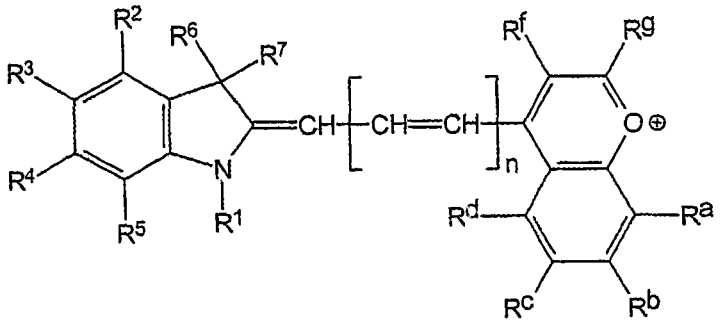
R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f和 R^g独立地选自 Q、H、C_{1-4}烷基、C_{6-10}芳基、杂芳基、芳烷基、卤基、巯基、氨基、C_{1-4}烷基取代的氨基、季铵、-SO_3M^1、-OR^9和-$COOR^9$，其中 R^9选自 H 和 C_{1-4}烷基;

当 Z 存在时，Z 表示任选稠合的苯环，使得 R^f和 R^g与 Z 环相连，或者当 Z 不存在时，R^f和 R^g与 Y 环相连;

条件是 R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f和 R^g中一个为 Q。

在式 IIa 中，R^8优选为-$(CH_2)_k$-SO_3M^1。

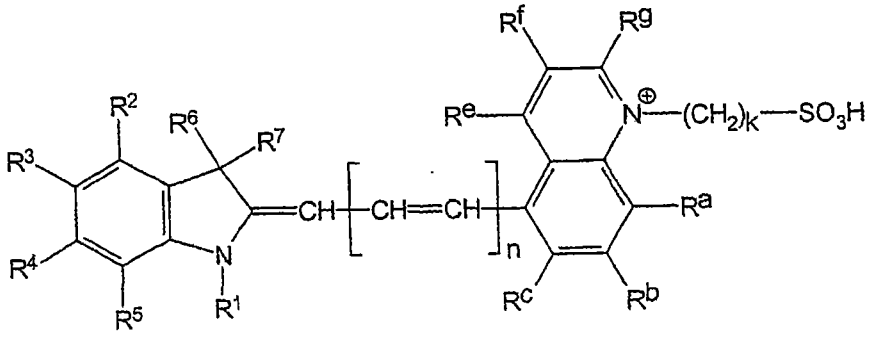
式 IIa 的一个优选的实施方案为其中 B 为苯并[b]吡咯鎓发色团，使得 Y 为 O^+，Z 不存在，且 R^e为上述优选的 Q 基团，所述染料具有式(III):



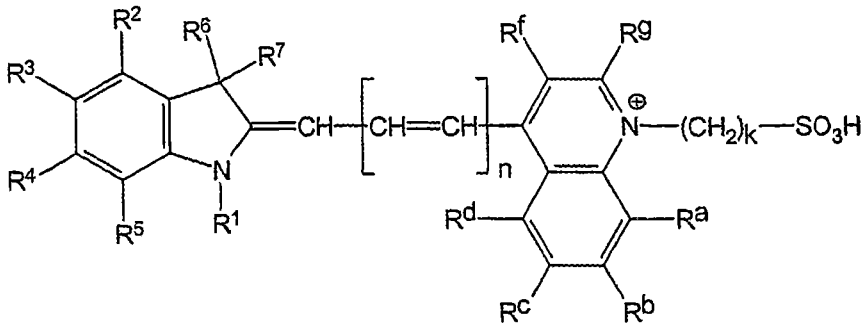
(III)

在式 III 中，R^b 优选为式-$NR^{10}R^{11}$ 的氨基，其中 R^{10} 和 R^{11} 独立地为 H 或 C_{1-4} 烷基，或者其中 R^{10} 与 R^a 组合或 R^{11} 与 R^c 组合或者二者均组合形成另外的饱和或不饱和的 6 元环。优选式 III 的 R^g 为 C_1-C_4 烷基，例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基和叔丁基。

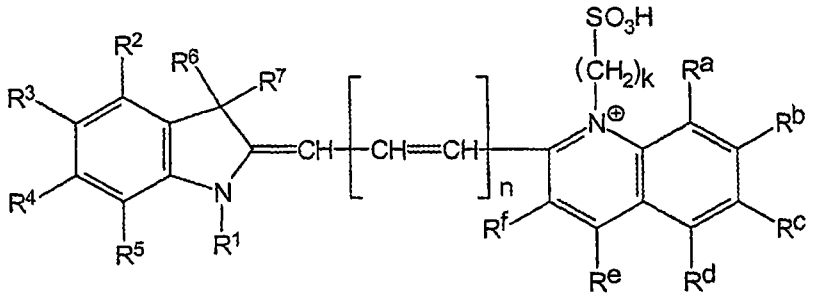
式 IIa 的第二个优选的实施方案为其中 B 为喹啉鎓发色团，使得 Y 为 N^+-R^8，Z 不存在，与优选的 Q 基团一起，所述染料具有选自式(IVa)或(IVb)或(IVc)的结构:



(IVa)

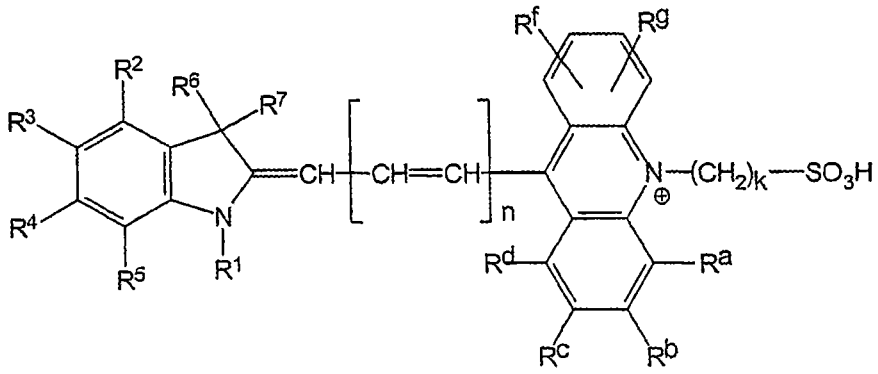


(IVb)



(IVc)

式 IIa 的第三个优选的实施方案为其中 B 为吖啶鎓发色团，使得 Y 为 N^{+}-R^{8}，Z 存在，与如上定义的优选的 Q 基团一起，所述染料具有式(V):



(V)

优选的特征

本发明的化合物包括至少一个、优选两个或更多个在染料发色团上直接或间接取代的氟原子。在一个实施方案中，式(II)、(III)、(IVa)、

(IVb)、(IVc)和(V)的化合物可在吲哚鎓环系中被氟原子取代。因此，对于 R^2、R^3、R^4和 R^5基团，优选至少一个、更优选至少两个、最优选至少三个选择为 F。任何其余的基团 R^2、R^3、R^4和 R^5优选为 H。在一个特别优选的实施方案中，R^2、R^3、R^4和 R^5各自为 F。发现本发明染料的氟取代基改进染料光稳定性。

在另一实施方案中，式(II)、(III)、(IVa)、(IVb)、(IVc)和(V)的化合物可在吲哚鎓环系中，在 R^2、R^3、R^4和 R^5位置的一个、优选不多于两个位置上包括式-$(CF_2)_mF$ 的 C_{1-4}全氟烷基取代基，其中 m 为数值为 1-4 的整数。优选其余的基团 R^2、R^3、R^4和 R^5选自 H 或 F。优选所述全氟烷基取代基为三氟甲基，即 m 为 1。

本发明的 Cy^D 染料可被 2-4 个或更多个磺酸基、优选 2-3 个磺酸基直接或间接取代。这些磺酸基选自式 II 的-SO_3M^1 和-$(CH_2)_kSO_3M^1$ 取代基。使用被氟取代且具有三个或更多个用于标记 BTM 的磺酸基的染料产生这样的标记产物，其中与不具有这种取代的染料相比，降低染料-染料聚集并改进光稳定性。使用本发明的优选染料这样标记的 BTM 的荧光发射强度随着共价相连的染料的数目的增加而提高。此外，使用磺酸基取代吲哚鎓3-位除了增加染料分子的整体电荷以外，还增加空间体积，从而降低染料-染料聚集。在式(II)、(III)、(IVa)、(IVb)、(IVc)和(V)中，优选的基团-$(CH_2)_k$-SO_3M^1 为其中 k 为 3 或 4 的那些，也就是-$(CH_2)_3SO_3M^1$ 和-$(CH_2)_4SO_3M^1$。

在式 I 中，[BTM]-$(L)_j$-部分共价连接在 Cy^D 的任何合适的位置(包括 B、Q 或 R^1-R^7 基团)。[BTM]-$(L)_n$-部分代替现有的取代基(例如 R^1-R^7 基团)或与现有的取代基共价相连。优选 [BTM]-$(L)_j$-部分在式(II)、(III)、(IVa)、(IVb)、(IVc)和(V)的 Cy^D 的 R^1、R^6、R^7、R^8、R^a、R^b、R^c、R^d、R^e、R^f和 R^g 的一个或多个位置相连。更优选[BTM]-$(L)_j$-部分在 Cy^D 的 R^1、R^6或 R^7的一个或多个位置相连。在一个最优选的实施方案中，R^1为-$(L)_j$[BTM]；且 R^6和 R^7中一个为-$(CH_2)_k$-SO_3M^1，另一个为 C_{1-4}烷基。在第二个最优选的实施方案中，R^1为-$(CH_2)_k$-SO_3M^1；

且 R^6 和 R^7 中一个为-$(L)_j$[BTM]，另一个为 C_{1-4} 烷基。

BTM 可为合成或天然来源，但优选为合成来源。术语“合成”具有其常规含义，即人造的而不是从天然来源(例如哺乳动物体)中分离的。这种化合物的优点在于其制造和杂质特性可完全控制。因此，天然来源的单克隆抗体及其片段排除在本文使用的术语 “合成” 的范围之外。

优选 BTM 选自：3-100 聚体肽、酶底物、酶拮抗剂或酶抑制剂。BTM 最优选为 3-100 聚体肽或肽类似物。当 BTM 为肽时，优选为 4-30 聚体肽，最优选为 5-28 聚体肽。

当 BTM 为肽时，优选的这种肽包括:

-促生长素抑制素、抑生长肽及类似物，

-与 ST 受体结合的肽，其中 ST 是指由大肠杆菌(*E. coli*)和其他微生物产生的热稳定的毒素;

-层粘连蛋白片段，例如 YIGSR、PDSGR、IKVAV、LRE 和 KCQAGTFALRGDPQG，

-用于靶向白细胞累积部位的 N-甲酰基肽，

-血小板因子 4(PF4)及其片段，

-包含 RGD(Arg-Gly-Asp)的肽，可例如靶向血管发生[R.Pasqualini 等人，Nat Biotechnol. 1997 年 6 月；15(6): 542-6]; [E. Ruoslahti，Kidney Int. 1997 年 5 月； 51(5): 1413-7]。

-α_2-抗纤溶酶、纤连蛋白或 β-酪蛋白、血纤维蛋白原或血小板反应蛋白的肽片段。可在以下参考文献中发现α_2-抗纤溶酶、纤连蛋白、β-酪蛋白、血纤维蛋白原和血小板反应蛋白的氨基酸序列：α_2-抗纤溶酶前体[M.Tone 等人，J.Biochem，102，1033，(1987)]；β-酪蛋白[L.Hansson 等人，Gene，139，193，(1994)]；纤连蛋白 [A.Gutman 等人，FEBS Lett.，207，145，(1996)]；血小板反应蛋白-1 前体[V.Dixit 等人，Proc. Natl. Acad. Sci.，USA，83，5449，(1986)]；R.F.Doolittle，Ann. Rev. Biochem.，53，195，(1984);

-为血管紧张素的底物或抑制剂的肽，例如:

血管紧张肽 II Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe (E. C. Jorgensen 等人，J. Med. Chem.，1979，第 22 卷，9，1038-1044)

[Sar，Ile] 血管紧张肽 II: Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ile (R.K. Turker 等人，Science，1972，177，1203)

-血管紧张肽 I: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu;

当 BTM 为肽时，肽的一个或两个(优选两个)末端与代谢抑制基团(M^{IG})缀合。因此具有采用这种方式保护的两个肽末端对于体内成像应用是重要的，原因是不然的话随着 BTM 肽的选择性结合亲和力的下降，预计会发生快速代谢。术语"代谢抑制基团"(M^{IG})是指在氨基末端或羧基末端的抑制或阻碍 BTM 肽的酶(特别是肽酶)代谢的生物相容性基团。这种基团本领域技术人员众所周知，且对于肽的氨基末端，适当地选自: N-酰基化的基团-NH(C=O)R^G，其中酰基-(C=O)R^G 的 R^G 选自: C_{1-6} 烷基、C_{3-10} 芳基或为聚乙二醇(PEG)结构单元。合适的 PEG 基团见以下对连接基(L)的描述。优选的这种 PEG 基团为式 Bio1 或 Bio2(见下)的生物改性剂。优选的这种氨基末端 M^{IG} 基团为乙酰基、苄氧基羰基或三氟乙酰基，最优选乙酰基。

对于肽羧基末端的合适的代谢抑制基团包括: 甲酰胺、叔丁基酯、苄基酯、环己基酯、氨基醇或聚乙二醇(PEG)结构单元。对于 BTM 肽的羧基末端氨基酸残基的合适的 M^{IG} 基团为其中氨基酸残基的末端氨基被 C_{1-4} 烷基(优选甲基)N-烷基化。优选的这种 M^{IG} 基团为甲酰胺或 PEG，最优选的这种基团为甲酰胺。

当肽的一个或两个末端被 M^{IG} 基团保护时，-$(L)_j[Cy^D]$部分可任选与 M^{IG} 基团相连。优选至少一个肽末端不具有 M^{IG} 基团，因此在该位置连接-$(L)_j[Cy^D]$部分，分别得到式 Va 或 Vb 的化合物:

$$[Cy^D]\text{-}(L)_j\text{-}[BTM]\text{-}Z^2 \qquad (Va);$$

$$Z^1\text{-}[BTM]\text{-}(L)_j\text{-}[Cy^D] \qquad (Vb);$$

其中:

Z^1与 BTM 肽的 N-端相连，且为 H 或 M^{IG};

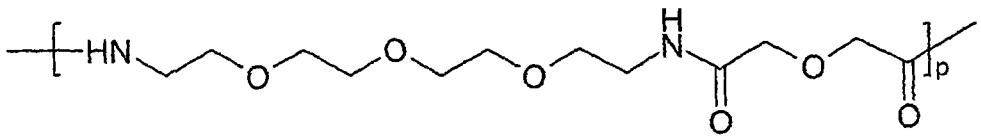
Z^2与 BTM 肽的 C-端相连，且为 OH、OB^c或 M^{IG},

其中 B^c为生物相容性阳离子(如上定义)。

在式 Va 和 Vb 中，优选 Z^1和 Z^2均独立地为 M^{IG}。对于 Z^1和 Z^2的优选的这种 M^{IG}基团为以上对肽端所述的那些。虽然通过采用这种方式连接-$(L)_j[Cy^D]$部分也可实现在各肽端抑制 BTM 肽的代谢，但是-$(L)_j[Cy^D]$本身在本发明的 M^{IG}的定义之外。

BTM 肽可任选包括具有适用于易缀合 Cy^D的侧链并形成连接基(L)的$(A)_m$残基的一部分的至少一个另外的氨基酸残基。合适的这种氨基酸残基包括用于与胺-官能化的 Cy^D染料缀合的 Asp 或 Glu 残基，或用于与羧基-或活性酯-官能化的 Cy^D染料缀合的 Lys 残基。用于缀合 Cy^D的另外的氨基酸残基适宜地远离 BTM 肽的结合区，并优选位于 C-或 N-端。优选用于缀合的氨基酸残基为 Lys 残基。

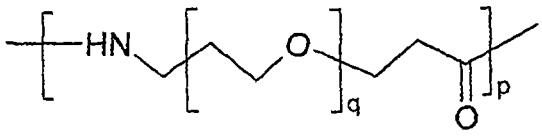
当存在合成连接基(L)时，优选包括促进与[BTM]和 Cy^D缀合的末端官能团。合适的这种基团(Q^a)如下所述。当 L 包括 1-10 个氨基酸残基的肽链时，优选氨基酸残基选自甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸或丝氨酸。对于体内应用，在一个实施方案中，当 L 包括 PEG 部分时，优选包括衍生自式 Bio1 或 Bio2 的单分散 PEG-样(PEG-like)结构的低聚的单元:



(Bio1)

式 Bio1 的 17-氨基-5-氧代-6-氮杂-3,9,12,15-四氧杂十七烷酸

其中 p 为 1-10 的整数。或者，可使用基于式 Bio2 的丙酸衍生物的 PEG-样结构:



(Bio2)

其中 p 如式 Bio1 所定义，且 q 为 3-15 的整数。

在式 Bio2 中，p 优选为 1 或 2，且 q 优选为 5-12。

在体内应用的第二个实施方案中，当连接基不包括 PEG 或肽链时，优选的 L 基团具有连接原子的主链，连接原子组成 2-10 个原子、最优选 2-5 个原子、特别优选 2 个或 3 个原子的-$(A)_m$-部分。2 个原子的最小连接基主链的优势在于 Cy^D 充分分隔，使得任何不合乎需要的相互作用程度最小。

对于体外应用，优选连接基 L 选自：

$$-(CHR')_p-M-(CHR')_r-$$

其中 M 选自：-CHR'-、-NR'-、-O-、-S-、-Ar-、-C(O)-NR'-和-C(O)-O-；R'为 H 或 C_{1-4} 烷基，Ar 为任选被磺酸酯取代的亚苯基，p 和 r 为数值为 1-5 的整数。特别优选的连接基为其中 M 选自-CH_2-和-CONH-的那些。

不是市售可得的 BTM 肽可通过在 P. Lloyd-Williams，F. Albericio 和 E. Girald; Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (合成肽和蛋白质的化学方法)，CRC Press，1997 中所述的固相肽合成来合成。

在第二方面，本发明提供了一种适用于哺乳动物给药形式的药物组合物，所述组合物包含第一方面的缀合物以及生物相容性载体。

“生物相容性载体”为流体，特别是液体，其中可将缀合物悬浮或溶解，使得组合物在生理学上可耐受，即可给予哺乳动物体而无毒性或过度不适。生物相容性载体适宜地为可注射的载体液体，例如用于注射的无菌不含致热源的水；水溶液，例如盐水(可有利地平衡，使得用于注射的终产物为等渗的)；一种或多种张力调节物质的水溶液

(例如血浆阳离子与生物相容性反荷离子的盐)、糖(例如葡萄糖或蔗糖)、糖醇(例如山梨糖醇或甘露糖醇)、二醇(例如甘油)、或者其他非离子多元醇材料(例如聚乙二醇、丙二醇等)。优选生物相容性载体为用于注射的不含致热源的水或等渗盐水。

缀合物和生物相容性载体各自在合适的小瓶或容器中提供,包括能保持整体无菌和/或放射活性安全性的密封容器,加上任选的惰性顶部空间气体(例如氮气或氩气),而允许通过注射器或套管加入和抽出溶液。优选的这种容器为隔膜密封的小瓶,其中使用顶密封(通常由铝制成)将气密密封物钳口。该密封物(closure)适用于使用皮下注射针单次或多次刺破(例如钳口隔膜密封),而保持无菌完整性。这种容器的另外的优势在于,如果需要(例如改变顶部空间气体或使溶液脱气),密封物可承受真空,且承受压力变化(例如压力下降)而不会允许外部大气(例如氧或水蒸汽)的进入。

优选的多剂量容器包括包含多个患者剂量的单个散装(bulk)小瓶(例如 10-30cm^3体积),其中在制剂的有效期中,在不同的时间间隔,单个患者剂量可抽出至临床级注射器中,以适应临床情况。设计预填充的注射器以盛有单人剂量或者"单位剂量",并因此优选为适用于临床应用的一次性或其他注射器。优选本发明的药物组合物的剂量适用于单个患者并在如上所述的合适的注射器或容器中提供。

所述药物组合物可任选包含另外的赋形剂,例如抗微生物防腐剂、pH-调节剂、填料、稳定剂或同渗质量摩尔浓度调节剂。术语"抗微生物防腐剂"是指抑制可能有害的微生物(例如细菌、酵母或霉菌)生长的试剂。根据使用的剂量,抗微生物防腐剂还可具有某些杀菌性质。本发明的抗微生物防腐剂的主要作用是抑制在药物组合物中的任何这些微生物的生长。但是,抗微生物防腐剂还可任选用于在给药前抑制在用于制备所述组合物的套装的一种或多种成分中可能有害的微生物的生长。合适的抗微生物防腐剂包括:对羟基苯甲酸酯,即对羟基苯甲酸甲酯、乙酯、丙酯或丁酯或其混合物;苄基醇;苯酚;甲

酚；西曲溴铵和乙基汞硫代水杨酸钠。优选的抗微生物防腐剂为对羟基苯甲酸酯。

术语“pH-调节剂”是指可用于确保组合物的 pH 在人或哺乳动物给药可接受的限度内(pH 为约 4.0-10.5)的化合物或多种化合物的混合物。合适的这种 pH-调节剂包括药学上可接受的缓冲液，例如曲辛、磷酸盐或 TRIS [即三(羟甲基)氨基甲烷]，以及药学上可接受的碱，例如碳酸钠、碳酸氢钠或其混合物。当使用套装形式的组合物时，pH 调节剂可任选在单独的小瓶或容器中提供，使得套装的使用者可作为多步法的一部分来调节 pH。

术语“填料”是指在生产和冻干过程中可促进材料处理的药学上可接受的填充剂。合适的填料包括无机盐例如氯化钠，和水溶性糖或糖醇，例如蔗糖、麦芽糖、甘露糖醇或海藻糖。

第二方面的药物组合物可在无菌制造(即净室)条件下制备，以得到所需的无菌无致热源产品。优选关键的成分，特别是相关的反应物加上与缀合物接触的设备的那些零件(例如小瓶)为无菌的。各种成分和反应物可通过本领域已知的方法杀菌，所述方法包括：无菌过滤、例如使用 γ-照射终端杀菌、高压灭菌、干热或化学处理(例如使用环氧乙烷)。优选事先对某些成分进行杀菌，因此需要进行最小次数的处理。但是，作为预先提醒，优选包括至少一个无菌过滤步骤作为制备药物组合物的最后步骤。

优选第二方面的药物组合物由如以下第三方面所述的套装制备。

在第三方面，本发明提供了一种用于制备第二方面的药物组合物的套装，所述套装包括无菌固体形式的第一方面的缀合物，使得当使用如第二方面所述的无菌供应生物相容性载体重构时，发生溶解，以得到所需的药物组合物。

在那种情况下，缀合物加上如上所述的其他任选的赋形剂可以冻干的粉末形式在合适的小瓶或容器中提供。随后将冻干物设计为使用所需的生物相容性载体重构为易对哺乳动物给药的无菌、不致热形式

的药物组合物。

缀合物的优选的无菌固体形式为冻干的固体。优选所述无菌固体形式在如以上针对药物组合物所述的药物级容器中提供。当将套装冻干时，所述制剂可任选包括选自糖(优选甘露糖醇、麦芽糖或曲辛)的防冻剂。

在第四方面，本发明提供了一种可用于制备第一方面的缀合物的官能化的染料。所述官能化的染料包括式 II 的 Cy^D，其中所述 Cy^D 进一步包括基团 Q^a，其中 Q^a 为适用于与 BTM 缀合的活性官能团。

将 Q^a 基团设计成与 BTM 的互补官能团反应，因此，在 Cy^D 和 BTM 之间形成共价键。BTM 的互补官能团可为 BTM 的固有部分或可使用本领域已知的方法通过双官能的化合物衍生 BTM 而引入。优选使用未衍生的 BTM，因此 Q^a 基团优选为活性基团。

表 1 说明活性基团及其互补配对物的实例:

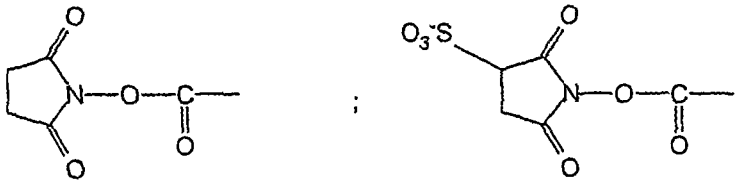
表 1: 活性取代基及与其反应的互补基团

活性基团	互补基团
活性酯，例如琥珀酰亚氨基酯、磺基-琥珀酰亚氨基酯或五氟苯基	伯氨基、仲氨基
酸酐、酰卤	伯氨基、仲氨基、羟基
异硫氰酸酯	氨基
乙烯基砜	氨基
二氯三嗪	氨基
卤代乙酰胺、马来酰亚胺	硫醇、咪唑、羟基、胺、硫代磷酸酯(thiophosphate)
碳二亚胺	羧酸
肼、酰肼	羰基，包括醛和酮
亚磷酰胺	羟基

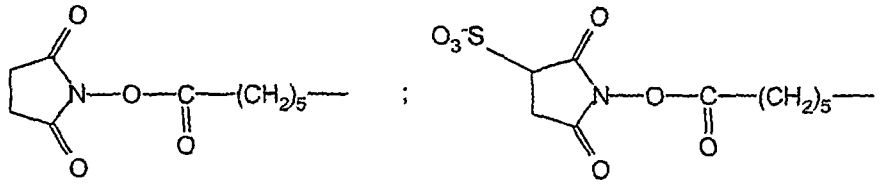
术语“活化的酯”或“活性酯”是指经设计为更好离去基团的羧酸的酯衍生物，并因此更易与亲核体(例如胺)反应。合适的活性酯的实例为：N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、五氟苯酚、五氟苯硫酚、对硝基苯酚和羟基苯并三唑。优选的活性酯为 N-羟基琥珀酰亚胺或五氟苯酚酯。

存在于BTM(例如蛋白质、肽、核酸、糖(nucleic acids carbohydrates)等)中的官能团的实例包括：羟基、氨基、巯基、羰基(包括醛和酮)和硫代磷酸酯。合适的Q^a基团可选自：羧基；活性酯；异硫氰酸酯；马来酰亚胺；卤代乙酰胺；酰肼；乙烯基砜、二氯三嗪和亚磷酰胺。优选Q^a为：羧酸的活性酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺或卤代乙酰胺。

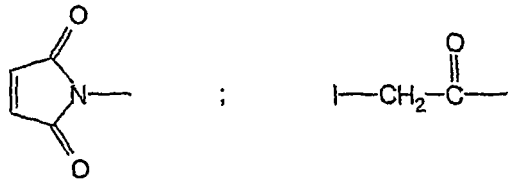
当互补基团为胺或羟基时，Q^a优选为活性酯，特别优选的这种酯包括：



Cy^D上的优选的这种取代基为烷基羧酸的活性酯，优选5-羧基戊基。优选的这种酯包括：



当互补基团为硫醇时，优选Q^a选自：

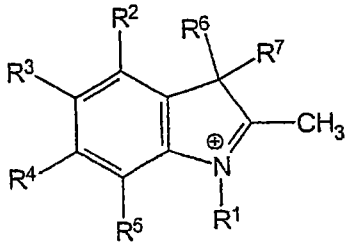


花青染料与生物分子缀合的通用方法见述于 Licha 等人[Topics Curr. Chem.，222，1-29 (2002)；Adv.Drug Deliv.Rev.，57，1087-1108 (2005)]。用于本发明的肽、蛋白质或低聚核苷酸BTM可在末端位置标记或在一个或多个内部位置标记。使用荧光染料标记试剂的蛋白质标记的综述和实例参见“Non-Radioactive Labelling，a Practical Introduction(非放射性标记，实践引言)”，德国，A.J. Academic Press，1997；“Bioconjugation-Protein Coupling Techniques for the Biomedical

Sciences(生物医学科学的生物缀合-蛋白质偶合技术)”，Aslam，M. 和 Dent，A.，Macmillan Reference Ltd，(1998)。各种方案可用于在合成肽中得到部位特异性标记，例如参见 Hermanson，G.T.，“Bioconjugate Techniques(生物缀合技术)”，Academic Press (1996)。

本发明的 Cy^D 染料可通过以下方法制备，所述方法包括将以下物质进行反应：

(a)具有式(A)的第一种化合物：

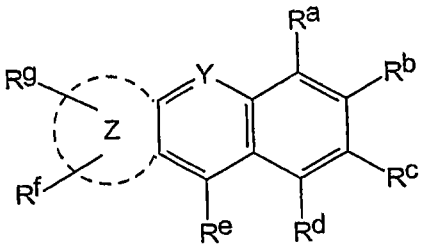


(A)

其中：

基团 R^1-R^7 如第一方面(如上所述)所定义；和

(b)具有式(IIa)的第二种化合物：



(IIa)

其中：

基团 R^a-R^g、Y 和 Z 如第一方面(如上所述)所定义；和

(c)适用于在所述第一和第二种化合物之间形成共价连接键 Q 的第三种化合物(C)。

根据该方法，中间体化合物(A)、(IIa)和(C)可在两步法中反应。在该方法中，首先通过下述方法形成中间体化合物，在乙酸酐的存在下，通过式(A)的吲哚鎓化合物与适用于形成连接键的化合物(C)(例如

适当取代的N,N'-二苯基甲脒或丙二醛双苯胺)反应以形成2-苯胺基乙烯基或4-苯胺基-1,3-丁二烯基季盐。所述中间体季盐可与具有适当活性甲基的芳族杂环(例如苯并[b]吡咯鎓(pyrilium)、喹啉鎓或吖啶鎓部分)反应。适当情况下，于环境温度下，在乙酸酐和乙酸钾的存在下进行该反应。

用于形成连接杂环系的多次甲基连接键的备选的中间体为已知的，且例如描述于 Hamer，F.M.，“The Cyanine Dyes and Related Compounds(花青染料及相关化合物)”，Interscience (1964)。可将本发明的 Cy^D 染料任选修饰以包括带电荷或极性基团，加入这些基团可提高化合物在极性或非极性溶剂中的溶解度。关于这样修饰的实例，羧酸基团可转化为酯和酰胺基团，可使用烷基卤化物(例如甲基碘)或丁烷磺内酯或ω-卤代烷基羧酸进行喹哪啶、4-甲基喹啉和吖啶的 N-烷基化。

Cy^{TM} 为 GE Healthcare UK Limited 的商标。

在第五方面，本发明提供了一种制备第一方面的缀合物的方法，所述方法包括:

(i)将如第一方面中定义的 BTM 与第四方面的 Q^a-官能化的 Cy^D 混合;

(ii)在适用于 Q^a 基团与 BTM 反应的条件下，将所述 Q^a-官能化的 Cy^D 与所述 BTM 温育，以得到所需的缀合物;

(iii)从步骤(ii)的反应混合物中任选分离和/或纯化所述缀合物。

BTM 的优选的方面如第一方面(如上所述)所述。

共价标记蛋白通常在含水缓冲介质(适宜地为 pH 为 9.0 的碳酸氢盐)中进行，通常于环境温度下进行 1 小时。该反应通常在暗处进行。通过尺寸排阻色谱法，例如使用 Sephadex™ 作为固定相且使用 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液作为洗脱液，可将标记蛋白与任何未反应的染料分离。对于多标记 BTM，应因此调节染料的量或浓度与 BTM 的比率。

除了以上标记法以外，本发明还涉及两步标记法，其中，在第一

步中，第四方面的 Q^a-官能化的 Cy^D 结合并从而标记主要成分，例如抗体、蛋白质、DNA 探针等。在标记法的第二步中，荧光标记的主要成分随后用作检测次要成分(例如抗体特异的抗原)的探针。

优选制备缀合物的方法包括:

(i)BTM 的胺官能团与式 Y^1-$(L)_j$-$[Cy^D]$的化合物反应；或

(ii)BTM 的羧酸或活性酯官能团与式 Y^2-$(L)_j$-$[Cy^D]$的化合物反应;

(iii)BTM 的硫醇基团与式 Y^3-$(L)_j$-$[Cy^D]$的化合物反应;

其中 BTM、M^{IG}、L、j 和 Cy^D 如上定义，和

Y^1 为羧酸、活性酯、异硫氰酸酯或硫氰酸酯基团;

Y^2 为胺基团;

Y^3 为马来酰亚胺基团。

Y^2 优选为伯或仲胺基团，最优选伯胺基团。在步骤(iii)中，优选 BTM 的硫醇基团来自半胱氨酸残基。

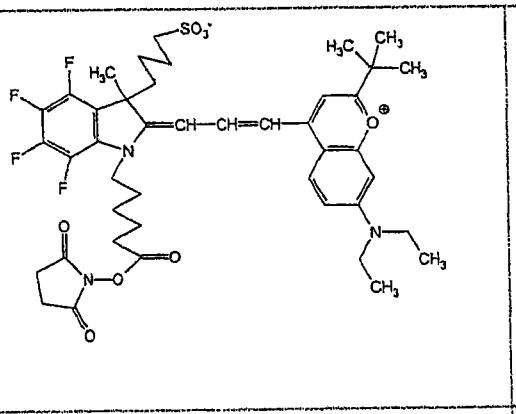
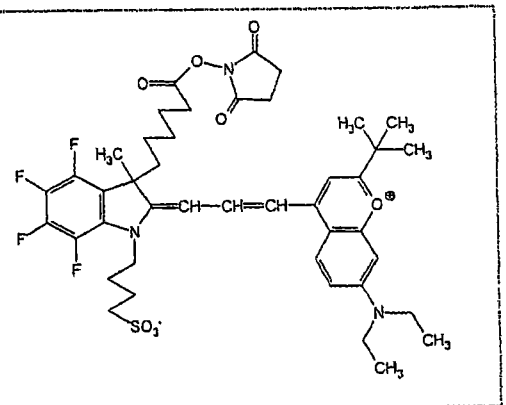
在步骤(i)-(iii)中，BTM 可任选具有可与使用合适的保护基团保护的 Cy^D 衍生物反应的其他官能团，因此化学反应仅在所需的部位选择性地发生。术语“保护基团”是指抑制或阻碍不合乎需要的化学反应的基团，但是设计其具有足够活性，使得可在不改变分子的其余部分的足够温和的条件下从所考虑的官能团离去。脱保护后，制得所需的产品。胺保护基团为本领域技术人员众所周知的，且适当地选自: Boc(其中 Boc 为叔丁氧基羰基)、Fmoc(其中 Fmoc 为芴基甲氧基羰基)、三氟乙酰基、烯丙氧基羰基、Dde[即 1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己基)乙基]或 Npys(即 3-硝基-2-吡啶亚磺酰基)。合适的硫醇保护基团为 Trt(三苯甲基)、Acm(乙酰氨基甲基)、t-Bu(叔丁基)、叔丁硫基、甲氧基苄基、甲基苄基或 Npys(3-硝基-2-吡啶亚磺酰基)。其他保护基团的使用见述于‘Protective Groups in Organic Synthesis (有机合成中的保护基团)’，Theodora W. Greene 和 Peter G. M. Wuts，(John Wiley & Sons，1991)。优选的胺保护基团为 Boc 和 Fmoc，最优选 Boc。优选

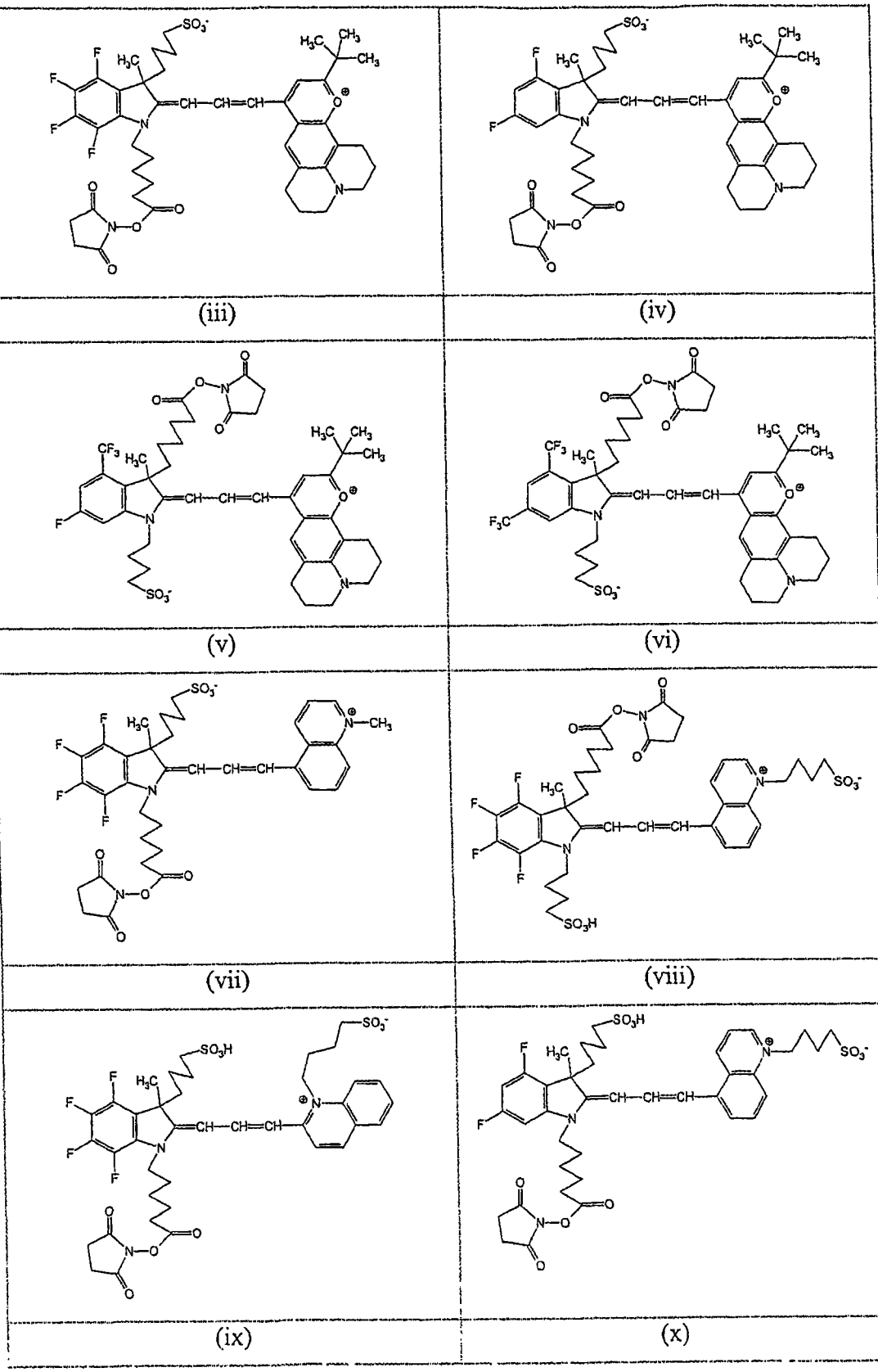
的硫醇保护基团为 Trt 和 Acm。

染料与氨基酸和肽的缀合方法描述于 Licha(见上)以及 Flanagan 等人[Bioconj.Chem.，8，751-756 (1997)]; Lin 等人，[ibid，13，605-610 (2002)]和 Zaheer [Mol.Imaging，1(4)，354-364 (2002)]。连接基(L)与 BTM 的缀合方法使用仅与染料的缀合方法类似的化学方法(参见以上)，且为本领域已知的。

本发明的 Cy^D 染料的以下更具体的实例示于表 2、3 和 4:

表 2: 三次甲基染料

	
(i)	(ii)



(iii)

(iv)

(v)

(vi)

(vii)

(viii)

(ix)

(x)

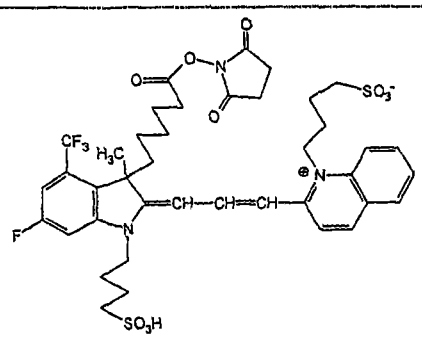
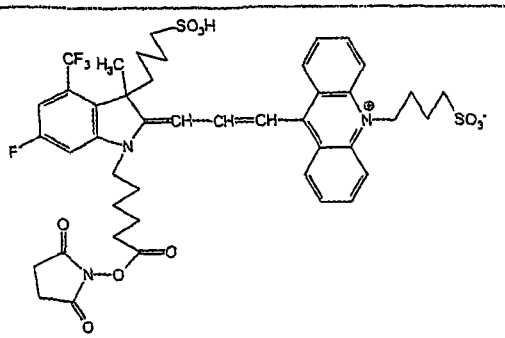
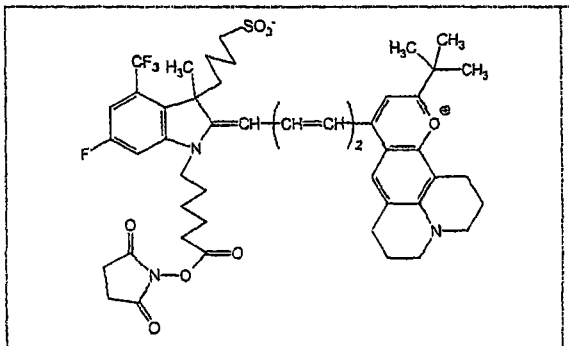
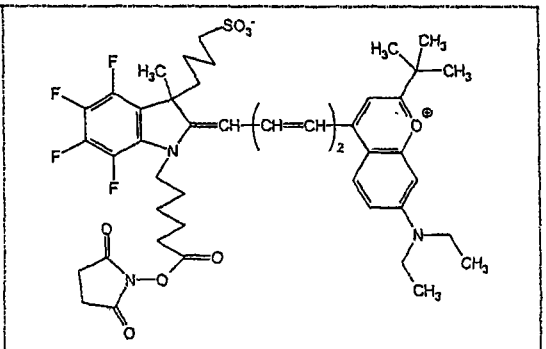
	
(xi)	(xii)

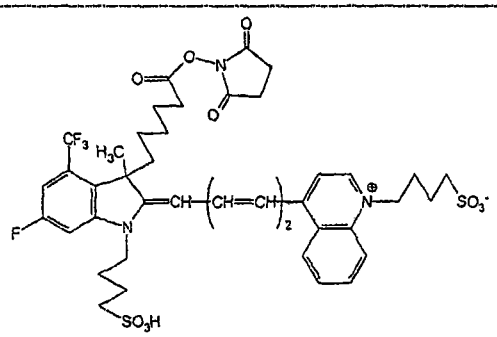
表 3：五次甲基染料



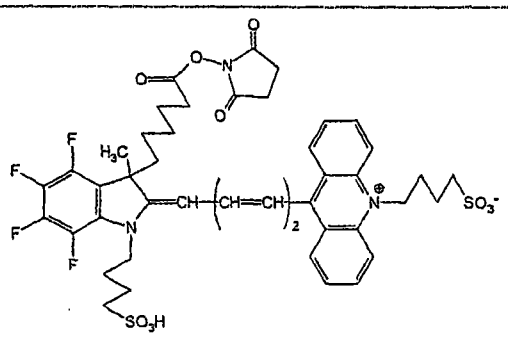
(xiii)



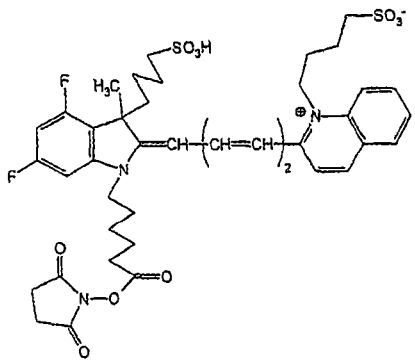
(xiv)



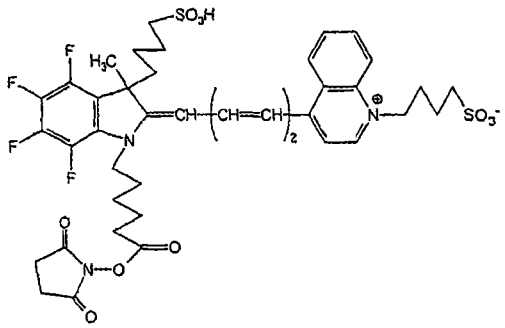
(xv)



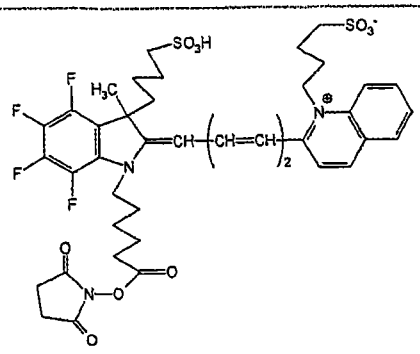
(xvi)



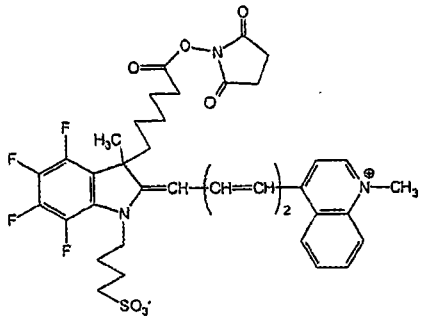
(xvii)



(xviii)

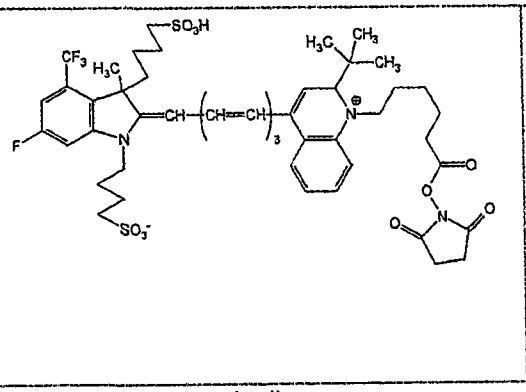
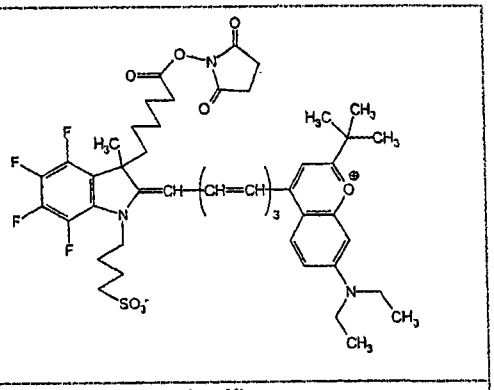


(xix)



(xx)

表 3：七次甲基染料

	
(xxi)	(xxii)

在第六方面，本发明提供了一种哺乳动物体体内光学成像的方法，所述方法包括使用第一方面的缀合物或第二方面的药物组合物，以体内得到 BTM 定位部位的图像。

术语“光学成像”是指基于绿色至近红外区(波长 500-1200nm)光的相互作用，形成图像以用于检测、分期或诊断疾病、跟踪疾病发展或跟踪疾病治疗的任何方法。光学成像还包括来自直接目视而无需使用任何装置并涉及使用各种装置的所有的方法，所述装置例如各种观察器，导管和光学成像设备，例如用于 X 射线断层扫描的计算机辅助硬件。物理治疗设备和测量技术包括但不局限于：发光成像；内窥镜检查法；荧光内窥镜检查法；光学相干 X 射线断层术；透射成像；时间分辨透射成像；共焦成像；非线性显微镜法；光声成像；声学-光学成像；光谱学；反射光谱学；干涉分析法；相干干涉分析法；扩散光学 X 射线断层术和荧光介导的扩散光学 X 射线断层术(连续波，时域和频域体系)，以及测量光散射、吸收、极化、发光、荧光寿命、量子产量和猝灭。这些技术的其他细节提供于：(Tuan Vo-Dinh (编者)：“Biomedical Photonics Handbook(生物医学光子学手册)” (2003)，CRC Press LCC；Mycek & Pogue (编者)：“Handbook of Biomedical Fluorescence(生物医学荧光手册)” (2003)，Marcel Dekker，Inc.；Splinter & Hopper：“An Introduction to Biomedical Optics(生物医学光学元件入门)” (2007)，CRC Press LCC。

优选绿色至近红外区光的波长为 600-1000nm。光学成像法优选为荧光内窥镜检查法。第六方面的哺乳动物体优选为人体。缀合物的优选的实施方案如第一方面(见上)所述。具体而言，优选所用 Cy^D 染料为荧光、耐光、Stokes 偏移大于 20nm、具有高量子产量且还为水溶性的。

在第六方面的方法中，优选预先将缀合物或药物组合物给予所述哺乳动物体。“预先给予”是指涉及临床医师的步骤(其中将药物给予患者例如通过静脉内注射)已在成像前实施。该实施方案包括使用第一个实施方案的缀合物用于制造其中包含 BTM 的哺乳动物体的疾病状态的体内诊断成像的诊断药物。

第六方面的优选的光学成像法为荧光反射成像(FRI)。在 FRI 中，将本发明的药物给予待诊断的受试者，随后使用激发光(通常为连续波(CW)激发)照射受试者的组织表面。光激发染料分子。使用荧光检测器检测通过激发光产生的来自 Cy^D 的荧光。优选将返回光滤色，以分离出荧光成分(全部的或部分)。由荧光形成图像。通常进行最小程度的加工(不使用处理器来计算光学参数，例如寿命、量子产量等)，且将图像与荧光强度绘图。将成像剂设计成浓集在疾病区域，产生较高的荧光强度。因此，疾病区域在荧光强度图像中产生正对比度。优选使用 CCD 像机或芯片得到图像，使得可实时成像。

根据使用的具体 Cy^D 染料来改变激发波长。用于产生激发光的装置可为常规激发光源，例如：激光器(例如离子激光器、染料激光器或半导体激光器)；卤素光源或氙光源。各种滤光片可任选用于得到最优化激发波长。

优选的 FRI 方法包括以下步骤：

(i)使用激发光照射哺乳动物体内的目标组织表面；

(ii)使用荧光检测器检测通过 Cy^D 的激发产生的来自成像剂的荧光；

(iii)任选将通过荧光检测器检测的光滤色，以分离出荧光成分；

(iv)由步骤(ii)或(iii)的荧光形成所述目标组织表面的图像。

在步骤(i)中，激发光在性质上优选为连续波(CW)。在步骤(iii)中，优选将已检测的光滤色。特别优选的 FRI 方法为荧光内窥镜检查法。

第六方面的备选的成像法使用 FDPM(频域光子迁移)。该方法比连续波(CW)方法在重点在于更深度检测组织内的 IM 时更具优势[Sevick-Muraca 等人，Curr.Opin.Chem.Biol.，6，642-650 (2002)]。对于这种频域/时域成像，如果 Cy^D 具有可根据待成像病灶的组织深度以及使用的设备类型而调整的荧光性质，则是有利的。

FDPM 方法如下所示：

(a)将具有异质组成的所述哺乳动物体的光-散射生物组织暴露于来自光源的光，预定的时间随强度变化以激发成像剂，所述组织多次散射所述激发光；

(b)检测响应所述暴露由所述组织发射的多次散射光；

(c)通过使用处理器建立多个数值由发射量化整个组织的荧光特性，所述数值各自相应于组织内不同位置的荧光特性的水平，所述荧光特性的水平随着组织的异质组成而变；和

(d)根据步骤(c)的数值，通过绘制组织的异质组成产生组织的图像。

优选步骤(c)的荧光特性相应于成像剂的吸收(uptake)，并优选进一步包括绘制相应于在给予药物之前组织的吸附和散射系数的各种量。优选步骤(c)的荧光特性相应于荧光寿命、荧光量子效率、荧光产额和成像剂吸收中的至少一个。优选荧光特性独立于发射强度且独立于成像剂浓度。

优选步骤(c)的量化包括：(i)建立数值的估计值，(ii)确定计算的发射与估计值的关系，(iii)比较计算的发射与所述检测的发射以确定误差，(iv)提供荧光特性的修正估计值(modified estimate)与误差的关系。优选量化包括由模型化组织的多次光散射行为的数学关系确定该值。优选该方法的第一备选方法进一步包括通过检测所述荧光特性的

变化来体内监测组织的代谢性质。

优选第六方面的光学成像用于帮助促进管理哺乳动物体的疾病状态。术语“管理”是指用于：检测、分期(staging)、诊断、监测疾病进展或监测治疗。疾病状态适宜地为其中包括BTM的成像剂的那些。优选疾病状态位于身体表面附近或在体腔内或通过外科步骤暴露。

合适的光学成像法的其他细节综述于 Sevick-Muraca 等人的[Curr.Opin.Chem.Biol.，6，642-650 (2002)]。

在第七方面，本发明提供了一种检测、分期、诊断、监测疾病进展或监测哺乳动物体的疾病状态的治疗的方法，所述方法包括第六方面的体内光学成像法。

在另一方面，本发明提供了一种测定样品中分析物的方法，所述方法包括:

(i)在适于引起所述分析物的至少一部分与所述特异性结合配偶体结合以形成复合物的条件下，将所述分析物与所述分析物的特异性结合配偶体接触，其中所述特异性结合配偶体包括第一方面的染料缀合物;

(ii)测量标记复合物发射的荧光；和

(iii)使发射的荧光与所述样品中的所述分析物的存在或量关联。

在一个实施方案中，测定方法为用于测量样品中分析物的直接测定。任选已知的或公认的抑制剂化合物可包括在测定混合物中，在这种情况下，测量可与已知的或公认的抑制剂的生物活性相关。在第二种或备选的实施方案中，测定可为竞争性测定，其中包含分析物的样品与荧光缀合物竞争能特异性结合分析物和缀合物二者的结合配偶体上有限数目的结合部位。提高样品中分析物的量(或浓度)会降低与特异性结合配偶体结合的式II的荧光缀合物的量。测量荧光信号，并由标准曲线内推可得到分析物的浓度。

在另一实施方案中，结合测定可使用两步形式，其中将可任选与不溶性载体偶合的第一种成分与第二种成分结合，以形成特异性结合

复合物，该特异性结合复合物继而与第三种成分结合。在这种形式中，第三种成分能与第二种成分或特异性结合复合物特定结合。第二种或第三种成分可为本发明的缀合物。其实例包括“夹心”测定，其中将特异性结合对的一种成分(例如第一种抗体)涂布在表面(例如多孔板的孔)上。抗原与第一种抗体结合后，将荧光标记的第二种抗体加至测定混合物中，使得与抗原-第一种抗体复合物结合。测量荧光信号，且由标准曲线内推可得到抗原的浓度。

分析物-特异性结合配偶体对的实例包括但不局限于抗体/抗原、凝集素/糖蛋白、生物素/链霉抗生物素蛋白、激素/受体、酶/底物或辅因子、DNA/DNA、DNA/RNA 和 DNA/结合蛋白。应理解的是，可使用互相具有特异性结合亲和力的任何分子，使得本发明的荧光染料可用于标记特异性结合对的一种成分，这样继而可进一步用于检测与其他成分的结合。

本发明的化合物还可用于其中多种荧光染料与多种不同的主要成分(例如抗体)共价相连的检测方法，各主要成分对于不同的次要成分(例如抗原)是特异的，以便确定在次要成分的混合物中多种次要成分的每一种。根据该应用方法，每种主要成分使用荧光染料单独标记，与用于标记其他主要成分的染料分子相比，该荧光染料具有不同的光吸收和发射波长特性。随后将已标记的主要成分加至包含次要成分(例如抗原)的制剂中，使主要成分与其所选择的相应的次要成分相连。

可例如通过洗涤将任何未反应的探针材料从制剂中除去，以防止干扰分析。随后将制剂经受包括具体荧光化合物的吸收波长的激发波长范围。接着使用具有滤色片或单色仪来选择激发波长射线和选择荧光波长的荧光显微镜或其他荧光检测体系(例如流式细胞仪或荧光分光光度计)来确定相应于使用的荧光化合物的发射波长的强度，荧光强度说明与具体已标记的主要成分结合的次要成分的量。进行多参数荧光研究的已知技术例如包括多参数流式细胞仪法。在某些情况下，可使用单一波长的激发来激发来自混合物中的两种或更多种材料的

荧光，其中通过检测在其各自的发射波长下的各自的荧光强度可测量在不同波长下的各荧光和各标记物质的量。如果需要，还可使用光吸收方法。

本发明的检测方法可适用于其中可产生荧光主要成分的任何体系。例如，适当活性的荧光化合物可与 DNA 或 RNA 片段缀合，且随后所得到的缀合物可引起与 DNA 或 RNA 的互补靶向链结合。随后可使用适当的荧光检测设备来检测已结合的荧光缀合物的存在。

参考以下实施例和附图来进一步说明本发明，其中：

实施例 1-7 提供了本发明的式 A 的各种氟化染料前体的合成，其可与如上所述的成分(IIa)和(C)反应，以得到本发明的染料。实施例 8 和 9 提供了适用于与实施例 1-7 的前体偶合的式(IIa)的苯并[b]吡咯鎓化合物。实施例 10 提供了一种 N-烷基化杂环 N 原子以引入 4-磺基丁基取代基的方法。实施例 11-23 提供了本发明的式 III、IVb 和 IVc 的染料。实施例 11-18 提供了本发明的五次甲基染料的合成。实施例 19-21 提供了本发明的三次甲基染料的合成。实施例 22-23 说明本发明的七次甲基染料的合成。实施例 24 和 25 提供了被 NHS 酯(Q^a基团)取代的本发明的染料。实施例 26 提供了一种光稳定性研究，说明当与未氟化的染料类似物比较时，氟化染料通常更加耐光漂白。经相同时间的未曝光对照样品的吸光度未下降。实施例 27 提供了本发明染料的 RGD 肽缀合物的合成。

附图 1 和 2 表明本发明染料的改进的光稳定性。

缩写

DMF：二甲基甲酰胺

HATU：六氟磷酸 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N′,N′-四甲基脲鎓

HPLC：高效液相色谱法

NHS：N-羟基-琥珀酰亚胺

NMM: N-甲基吗啉

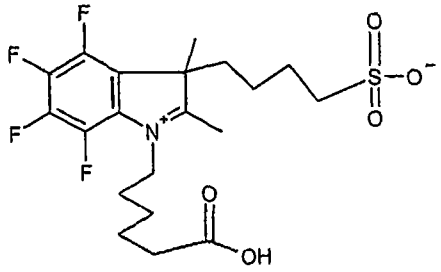
NMP: 1-甲基-2-吡咯烷

LC-MS: 液相色谱－质谱法

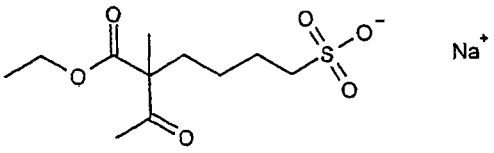
TFA: 三氟乙酸

TLC: 薄层色谱法。

实施例 1: 4-[1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐

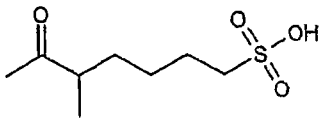


1.1 5-(乙氧基羰基)-5-甲基-6-氧代庚烷-1-磺酸钠



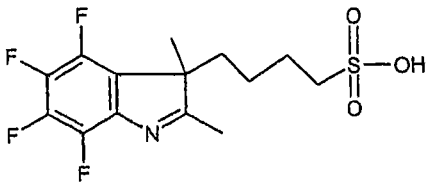
将氢化钠(60wt%，12g ≡ 0.3mol NaH)在无水 DMF(100ml)中淤浆化。搅拌下将所得到的悬浮液冷却至 0℃。向其中逐滴加入 2-甲基乙酰乙酸乙酯(50g，0.346mol)的 DMF(25ml)溶液，以保持温度<10℃，且控制起泡旦加入完成且氢气放出停止时，将混合物在温水浴中温热，直至得到澄清的浅黄色溶液。将其再次冷却至 0℃。经 15 分钟加入 1,4-丁烷磺内酯(45g，0.33mol)的 DMF(25ml)溶液，保持温度<10℃。一旦加入完成，将混合物于 50℃下加热 16 小时。随后将溶剂在真空下蒸发至干；残余物在水和乙醚之间分配。水层保留；有机层用新鲜的水萃取，随后丢弃。合并的含水萃取物用新鲜的乙醚洗涤，随后在真空下蒸发，得到蜡质固体状的标题产物。δH (270 MHz; D_2O) 4.23 (2H，q)，2.9 (2H，app t)，2.26 (3H，s)，2.0-1.6 (6H，m)，1.36 (3H，s)和 1.26 (3H，t)。

1.2 5-甲基-6-氧代庚烷-1-磺酸



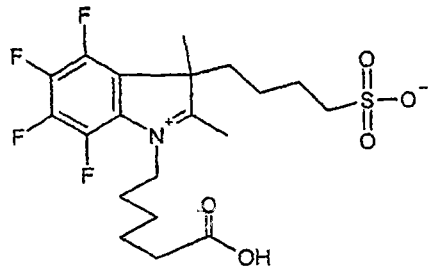
将 5-(乙氧基羰基)-5-甲基-6-氧代庚烷-1-磺酸钠(得自 1.1)于 90℃下在浓盐酸(200ml)中加热，直至 TLC 说明完全反应(约 3 小时)。随后将溶剂在真空下蒸发；残余物通过快速色谱法纯化(二氧化硅，乙醇/二氯甲烷混合物)，得到 49.6g 标题化合物。δH (270 MHz; D_2O) 2.9 (2H，app t)，2.68 (1H，m)，2.2 (3H，s)，1.8-1.3 (6H，m)和 1.18 (3H，d)。

1.3 2,3-二甲基-3-(4-磺酸基丁基)-4,5,6,7-四氟-3*H*-吲哚



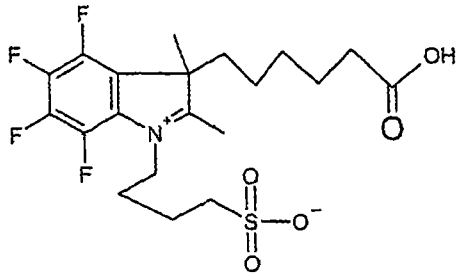
将 2,3,4,5-四氟苯胺(1.75g，0.01M)溶解于浓 HCl(280ml)中。烧瓶保持在-10℃，逐滴加入 $NaNO_2$(1 当量)的水(10ml)溶液，随后加入氯化锡(II)(3.4g)的浓 HCl(40ml)溶液。使反应物返回至环境温度，并搅拌 1 小时。真空除去溶剂，得到黄色固体状的粗品 2,3,4,5-四氟苯基肼盐酸盐(7g)。将其再溶解于乙酸(50ml)中，随后加入 5-甲基-6-氧代庚烷-1-磺酸(6g)。将溶液于 140℃下加热 2 小时，得到含有细微橙色沉淀物的橙色溶液。将溶剂蒸发，得到褐色胶，由其通过反相 HPLC(0.1% TFA，水/乙腈梯度洗脱)分离标题产物。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 354。

1.4 4-[1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐

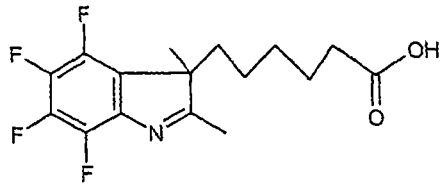


在氮气气氛下，将四-氟化吲哚(得自 1.3) (150mg，4.2×10^{-4}mol，1 当量)于 140℃下与 6-溴己酸(15g，0.073mol，260 当量)一起加热 24 小时。最终的反应混合物与乙醚研磨，并真空干燥，得到褐色物质。通过 LC-MS 证实主要的成分为标题化合物。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 470。

实施例 2：4-[3-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-1-基]丁烷-1-磺酸盐



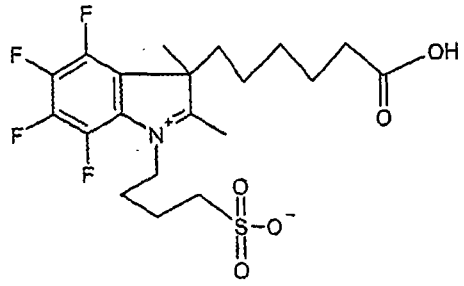
2.1 6-(4,5,6,7-四氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚-3-基)己酸



向 2,3,4,5-四氟苯基肼盐酸盐(2g)中加入 7-甲基-8-氧代壬酸(3g)和乙酸(50ml)，将混合物加热至 140℃下保持 5 小时。冷却后，在旋转蒸发仪上除去挥发性成分，将残余物溶解于水(10ml)中，过滤，并通过制备 HPLC 分两次(shots)纯化，得到标题化合物。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 332

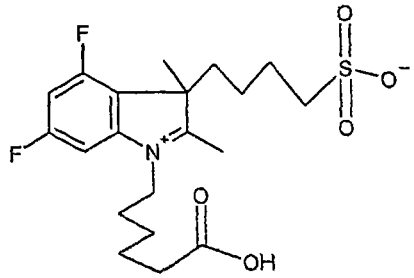
2.2 4-[3-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-1-基]

丁烷-1-磺酸盐

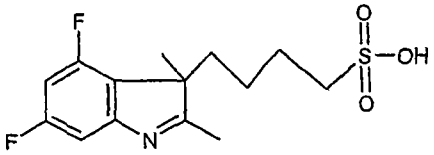


向 6-(4,5,6,7-四氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚-3-基)己酸(600mg)中加入丁烷磺内酯(4ml)，将混合物加热至 140℃下过夜。冷却后，将混合物用水(4ml)稀释，过滤，并通过制备 HPLC 纯化，得到标题化合物 800mg。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 468。

实施例 3：4-[1-(5-羧基戊基)-4,6-二氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐

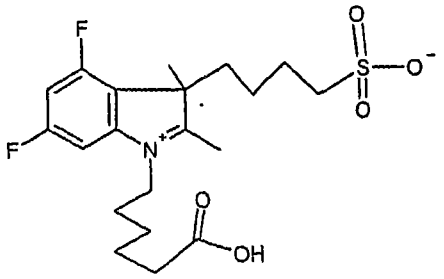


3.1 4,6-二氟-2,3-二甲基-3-(4-磺酸基丁基)-3*H*-吲哚



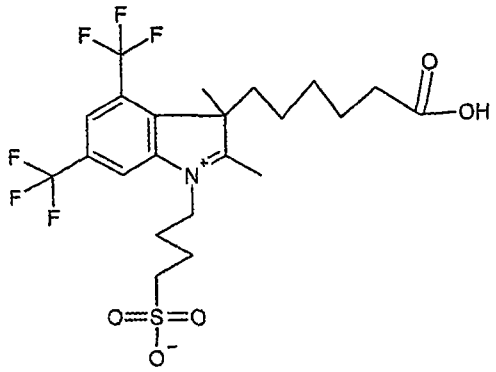
向 3,5-二氟苯基肼盐酸盐(1g)的乙酸(20ml)溶液中加入 5-甲基-6-氧代庚烷-1-磺酸(1.6g)，并将溶液加热回流过夜。在旋转蒸发仪上除去挥发物，得到粗产物 50mg，其通过制备 HPLC 纯化。将相关的流分合并，在旋转蒸发仪上浓缩，并冷冻-干燥，得到标题产物(19mg)。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 317。

3.2 4-[1-(5-羧基戊基)-4,6-二氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐

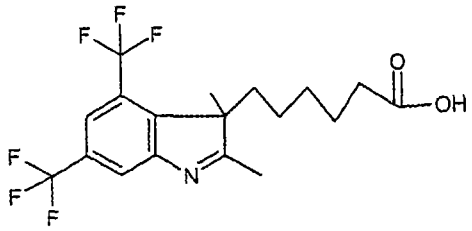


向 4,6-二氟-2,3-二甲基-3-(4-磺酸基丁基)-3*H*-吲哚(0.8g 未纯化的物质)中加入 6-溴己酸(1.6g)，并将溶液加热至 140℃下保持 2 天。冷却后，产物用乙腈稀释，并通过制备 HPLC 纯化。将相关的流分合并，在旋转蒸发仪上浓缩，并冷冻干燥，得到所需的产物(110mg)。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 432。

实施例 4: 4-[3-(5-羧基戊基)-2,3-二甲基-4,6-双(三氟甲基)-3*H*-吲哚鎓-1-基]丁烷-1-磺酸盐



4.1 4,6-双(三氟甲基)-2,3-二甲基-3-(5-羧基戊基)-3*H*-吲哚

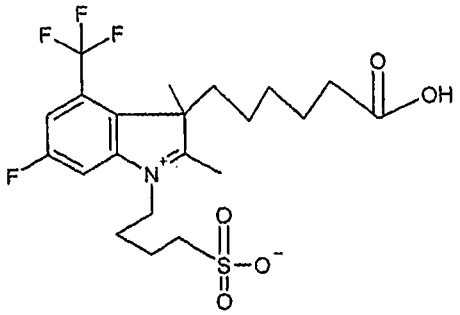


向 3,5-双(三氟甲基)苯基肼盐酸盐(1g)的乙酸(20ml)溶液中加入 7-甲基-8-氧代壬酸(0.66g)，并将溶液加热回流 5 小时。在旋转蒸发仪上除去挥发物，得到粗产物，其中 1ml 通过制备 HPLC 纯化。将相关的流分合并，在旋转蒸发仪上浓缩，并冷冻干燥，得到所需的产物

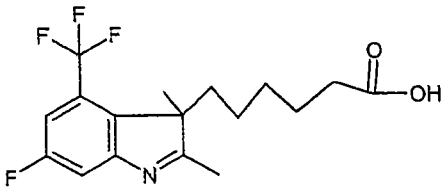
(17mg)。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 395。

4.2 向 4,6-双(三氟甲基)-2,3-二甲基-3-(5-羧基戊基)-3*H*-吲哚(300mg 未纯化的物质)中加入丁烷磺内酯(3ml)，并将溶液加热至 140℃下保持 1 天。冷却后，产物在水中萃取，并通过制备 HPLC 纯化。将相关的流分合并，在旋转蒸发仪上浓缩，并冷冻干燥，得到所需的产物(19mg)。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 532。

实施例 5: 4-[3-(5-羧基戊基)-6-氟-2,3-二甲基-4-(三氟甲基)-3*H*-吲哚鎓-1-基]丁烷-1-磺酸盐

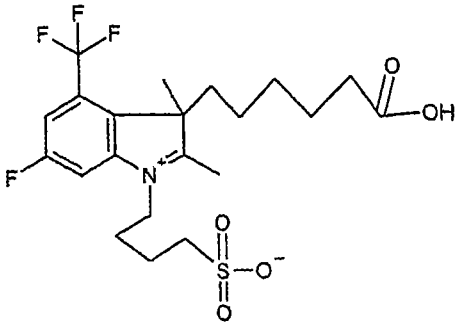


5.1 6-(4-三氟甲基-6-氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚-3-基)己酸



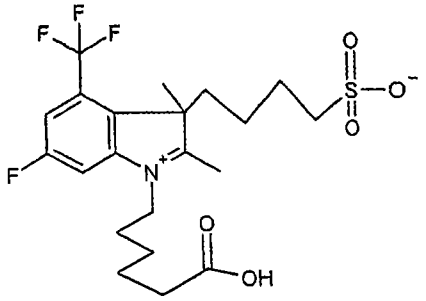
向3-三氟甲基-5-氟苯基肼(2g)中加入7-甲基-8-氧代壬酸(3g)和乙酸(50ml)，并将混合物加热至 140℃下保持 5 小时。冷却后，在旋转蒸发仪上除去挥发性成分，将残余物溶解于水(10ml)中，过滤，并通过制备 HPLC 纯化，得到所需的产物(600mg)。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 346。

5.2 4-[3-(5-羧基戊基)-6-氟-2,3-二甲基-4-(三氟甲基)-3*H*-吲哚鎓-1-基]丁烷-1-磺酸盐

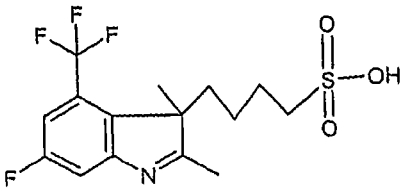


向 6-(4-三氟甲基-6-氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚-3-基)己酸(600mg)中加入 1,4-丁烷磺内酯(4ml)，并将混合物加热至 140℃下过夜。冷却后，将混合物用水(4ml)稀释，过滤，并通过制备 HPLC 纯化，得到所需的产物(800mg)。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 483。

实施例 6: 4-[1-(5-羧基戊基)-6-氟-2,3-二甲基-4-(三氟甲基)-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐



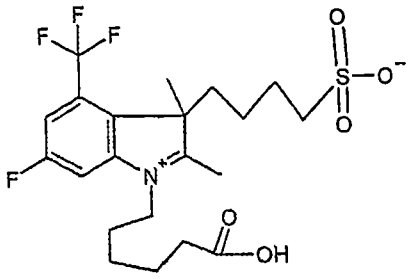
6.1 4-三氟甲基-6-氟-2,3-二甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚



向 3-三氟甲基-5-氟苯基肼(2g)中加入 5-甲基-6-氧代庚烷-1-磺酸(3g)和乙酸(60ml)，并将混合物加热至 140℃下保持 5 小时。该时间后，在旋转蒸发仪上除去挥发性物质，将残余物溶解于水(10ml)中，过滤，并通过制备 HPLC 纯化，得到所需的产物(790mg)。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 368。

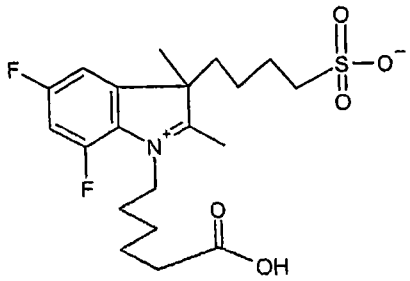
6.2 4-[1-(5-羧基戊基)-6-氟-2,3-二甲基-4-(三氟甲基)-3*H*-吲哚

鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐

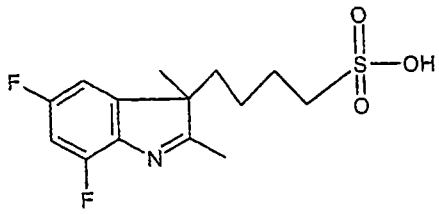


向 4-三氟甲基-6-氟-2,3-二甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚(790mg)中加入丁烷磺内酯(10ml)，并将混合物于 140℃下加热过夜。混合物用水(4ml)稀释，过滤，并通过制备 HPLC 纯化，得到所需的产物(1g)。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 505。

实施例 7: 4-[1-(5-羧基戊基)-5,7-二氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐

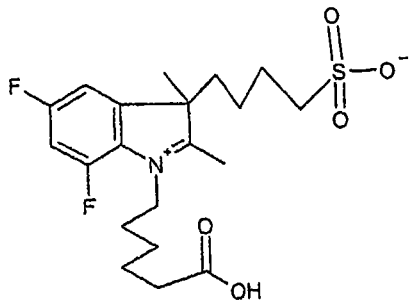


7.1 5,7-二氟-2,3-二甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚



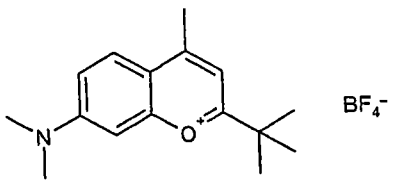
向 2,4-二氟苯基肼盐酸盐(2g)的乙酸(60ml)溶液中加入 5-甲基-6-氧代庚烷-1-磺酸(4.5g)，并将溶液加热回流 2 小时。在旋转蒸发仪上除去挥发物，得到粗产物，其通过快速色谱法纯化(RP-18 二氧化硅，水/乙腈混合物作为洗脱液)。将相关的流分(通过 LC-MS 确定)合并，在旋转蒸发仪上浓缩，并冷冻-干燥，得到所需的产物(6g)。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 317。

7.2 4-[1-(5-羧基戊基)-5,7-二氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐



向 5,7-二氟-2,3-二甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚(1.0g)中加入 6-溴己酸(5g)，并将溶液加热至 140℃下保持 2 天。冷却后，产物与乙醚研磨，得到淤浆。过滤收集固体，用乙醚洗涤，并真空干燥，得到粗产物。其通过制备 HPLC 进一步纯化，得到标题产物(300mg)。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 432。

实施例 8: 四氟硼酸 2-叔丁基-7-二甲基氨基-4-甲基苯并吡喃鎓



8.1 2-叔丁基-7-(二甲基氨基)-4*H*-苯并吡喃-4-酮

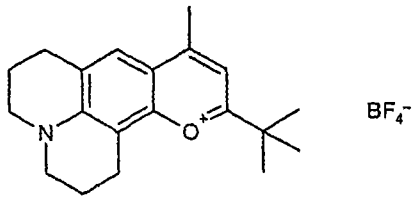
此类化合物的制备见述于 WO 92/09661(Telfer 等人)的实施例 1。根据该方法，在氮气气氛下，将 3-二甲基氨基苯酚(4.4g，0.032mol)和 4,4-二甲基-3-氧代戊酸甲酯(8.8g，0.056mol)于 180℃下(Woods 金属浴)搅拌 40 小时。将反应混合物冷却，溶解于二氯甲烷/己烷中，并通过硅胶快速色谱法，使用乙酸乙酯/己烷混合物纯化。产量 5.41g。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 246。UV/VIS(MeOH): 347、294、263 和 215nm。

8.2 四氟硼酸 2-叔丁基-7-二甲基氨基-4-甲基苯并吡喃鎓

该化合物的制备见述于 WO 92/09661(Telfer 等人)的实施例 3。在

氮气气氛下，于 0℃下，将甲基溴化镁(4.5ml 3M 的乙醚溶液，13.5.5mmol)逐滴加至 2-叔丁基-7-(二甲基氨基)-4*H*-苯并吡喃-4-酮(2.45g，10mmol)的无水四氢呋喃(24ml)溶液中。将反应混合物于 25℃下搅拌 17 小时，随后倒入冰水中。加入四氟硼酸(48wt%水溶液，5ml)，将混合物短时搅拌，随后用二氯甲烷(100ml + 2×25ml)萃取。将有机萃取物合并，干燥($MgSO_4$)，过滤，并在真空下蒸发至低体积。加入乙酸乙酯(100ml)，并继续蒸发，得到黄色固体状的产物。在更多的乙酸乙酯中淤浆化，过滤收集，并真空干燥。产量 2.97g。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 244。UV/VIS(MeOH): 468、287 和 219nm。

实施例 9：四氟硼酸 11-叔丁基-9-甲基-2,3,6,7-四氢-1*H*,5*H*-吡喃并[2,3-f]吡啶并[3,2,1-ij]喹啉-12-基鎓

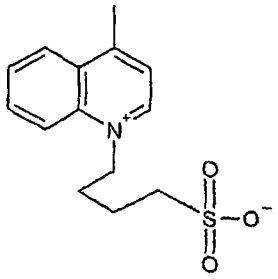


采用类似于在实施例 8 中给出的方式制备该化合物，不同之处在于 3-二甲基氨基苯酚原料用 8-羟基久洛尼定代替。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 296。UV/VIS(MeOH): 486、359、299、275 和 228nm。

实施例 10：使用丁烷磺内酯 N-烷基化喹哪啶、4-甲基喹啉和吖啶的通用方法

使用丁烷磺内酯 N-烷基化喹哪啶、4-甲基喹啉和 9-甲基-吖啶以形成 N-(4-磺酸基丁基)-衍生物可采用类似于美国专利 6579718(Yue 等人)所述的方法进行。通常将含氮杂芳族化合物和丁烷磺内酯(过量)的混合物于至多 140℃下加热至多 24 小时，同时搅拌。冷却至室温后，混合物与乙酸乙酯或乙醚研磨，得到 N-烷基化的产物，其直接用于染料合成。以下实施例描述典型的合成。

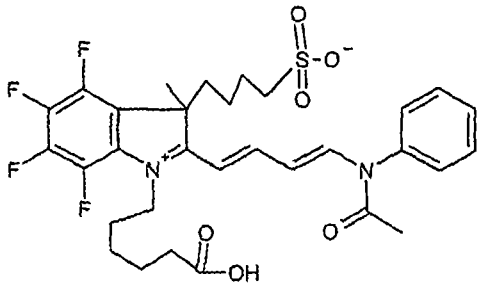
4-(4-甲基喹啉鎓-1-基)丁烷-1-磺酸盐



将 4-甲基喹啉(2.86g)和 1,4-丁烷磺内酯(5ml)的混合物混合，并于 65℃下加热 17 小时，在此期间分离白色固体。让混合物冷却至环境温度后，将混合物用乙醚稀释，并过滤收集固体，用新鲜的乙醚洗涤，并真空干燥，得到标题化合物 3.14g。MS(MALDI-TOF)，MH^+ = 280。

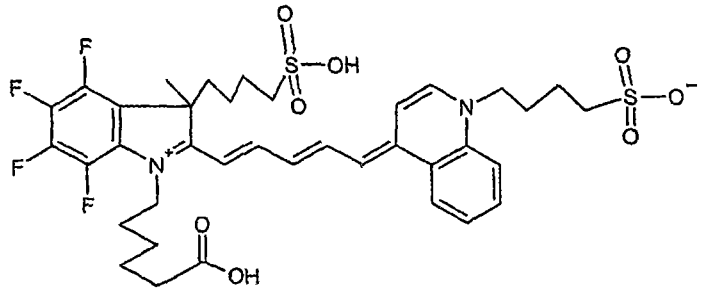
实施例 11: 4-[(4*E*)-4-{(2*E*,4*E*)-5-[1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚鎓-2-基]戊-2,4-二烯亚基}喹啉-1(4*H*)-基]丁烷-1-磺酸盐

11.1 4-[2-{(1*E*,3*E*)-4-[乙酰基(苯基)氨基]丁-1,3-二烯基}-1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐



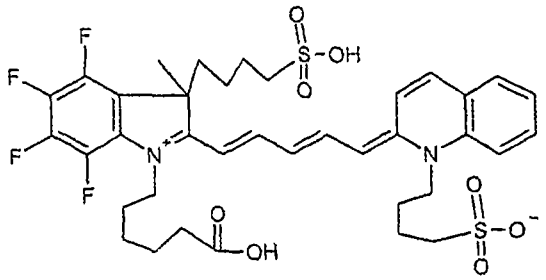
将 4-[1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐(实施例 1，1.5g)与丙二醛双(苯基亚胺).HCl(1.0g)在乙酸酐(33ml)和乙酸(17ml)中混合，并于 120℃下加热 17 小时。所得到的深黄色溶液随后直接用于制备五次甲基染料实施例。

11.2 4-[(4*E*)-4-{(2*E*,4*E*)-5-[1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚鎓-2-基]戊-2,4-二烯亚基}喹啉-1(4*H*)-基]丁烷-1-磺酸盐



向盛有 4-(4-甲基喹啉鎓-1-基)丁烷-1-磺酸盐(实施例 10，150mg)和乙酸钾(1.0g)的烧瓶中加入等份得自实施例 11.1 的溶液(5.0ml)。将所得到的混合物于环境温度下搅拌 24 小时，随后加至 100ml 搅动的乙酸乙酯中。过滤收集沉淀的固体，用乙酸乙酯和乙醚洗涤，并空气干燥。随后粗品固体通过制备 HPLC 纯化，得到标题染料。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 783。精确质量：$C_{37}H_{43}N_2F_4O_8S_2^+$计算值 783.2397，实测值 M^+ @ 783.2408 (1.4ppm)。UV/VIS(MeOH)：607nm。荧光(MeOH)：激发 λmax = 608nm；发射 λmax = 724nm。

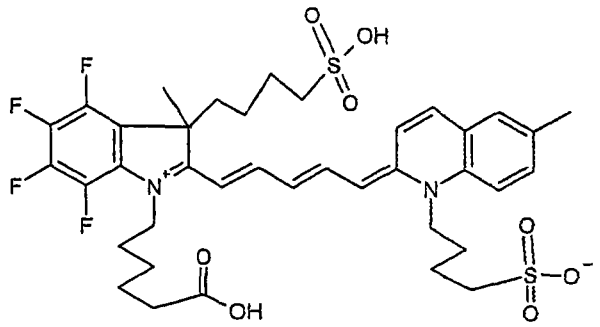
实施例 12：4-[(2*E*)-2-{(2*E*,4*E*)-5-[1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚鎓-2-基]戊-2,4-二烯亚基}喹啉-1(2*H*)-基]丁烷-1-磺酸盐(化合物 2)



化合物 2

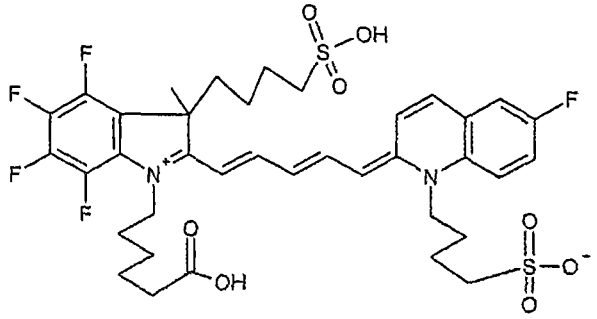
采用实施例 11.2 的方法制备，不同之处在于使用 4-(2-甲基喹啉鎓-1-基)丁烷-1-磺酸盐(150mg)。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 783。精确质量：$C_{37}H_{43}N_2F_4O_8S_2^+$计算值 783.2397，实测值 M^+ @ 783.2419 (2.8ppm)。UV/VIS(MeOH)：598nm。荧光(MeOH)：激发 λmax = 600nm；发射 λmax = 680nm。

实施例 13：4-[(2*E*)-2-{(2*E*,4*E*)-5-[1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚鎓-2-基]戊-2,4-二烯亚基}-6-甲基喹啉-1(2*H*)-基]丁烷-1-磺酸盐



采用实施例 11.2 的方法制备，不同之处在于使用 4-(2,6-二甲基喹啉鎓-1-基)丁烷-1-磺酸盐(150mg)。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 797。精确质量：$C_{38}H_{45}N_2F_4O_8S_2^+$计算值 797.2553，实测值 M^+ @ 797.2588 (4.3ppm)。UV/VIS(MeOH)：586nm。荧光(MeOH)：激发 λmax = 598nm；发射 λmax = 678nm。

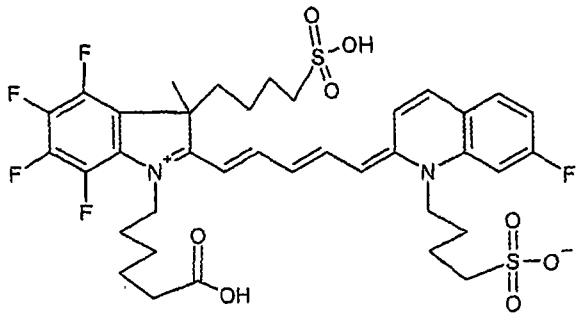
实施例 14：4-[(2*E*)-2-{(2*E*,4*E*)-5-[1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚鎓-2-基]戊-2,4-二烯亚基}-6-氟喹啉-1(2*H*)-基]丁烷-1-磺酸盐



采用实施例 11.2 的方法制备，不同之处在于使用 4-(2-甲基-6-氟喹啉鎓-1-基)丁烷-1-磺酸盐(60mg)、乙酸钾(400mg)和得自实施例 11.1 的溶液 (2.0ml)。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 801。精确质量：$C_{37}H_{42}N_2F_5O_8S_2^+$计算值 801.2303，实测值 M^+ @ 801.2321 (2.3ppm)。

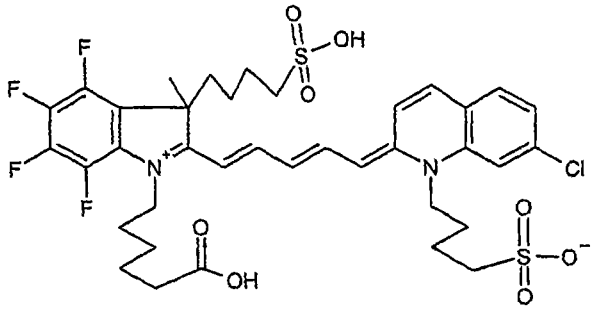
UV/VIS(MeOH): 607nm。荧光(MeOH): 激发 λmax = 616nm; 发射 λmax = 683nm。

实施例 15: 4-[(2*E*)-2-{(2*E*,4*E*)-5-[1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚鎓-2-基]戊-2,4-二烯亚基}-7-氟喹啉-1(2*H*)-基]丁烷-1-磺酸盐



采用实施例 11.2 的方法制备，不同之处在于使用 4-(2-甲基-7-氟喹啉鎓-1-基)丁烷-1-磺酸盐(60mg)、乙酸钾(400mg)和得自实施例 11.1 的溶液(2.0ml)。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 801。精确质量：$C_{37}H_{42}N_2F_5O_8S_2^+$计算值 801.2303，实测值 M^+ @ 801.2318 (1.9ppm)。UV/VIS(MeOH): 614nm。荧光(MeOH): 激发 λmax = 616nm; 发射 λmax = 685nm。

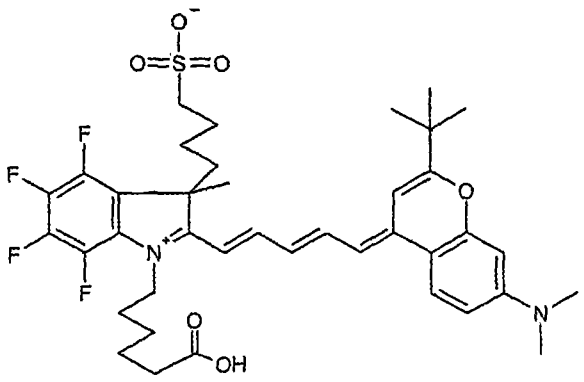
实施例 16: 4-[(2*E*)-2-{(2*E*,4*E*)-5-[1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚鎓-2-基]戊-2,4-二烯亚基}-7-氯喹啉-1(2*H*)-基]丁烷-1-磺酸盐



采用实施例 11.2 的方法制备，不同之处在于使用 4-(2-甲基-7-氯喹啉鎓-1-基)丁烷-1-磺酸盐(60mg)、乙酸钾(400mg)和得自实施例 11.1

的溶液(2.0ml)。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 817/819。精确质量：$C_{37}H_{42}N_2ClF_4N_2O_8S_2^+$($^{35}Cl$)计算值 817.2007，实测值 M^+ @ 817.2039 (3.9ppm)。UV/VIS(MeOH)：627nm。

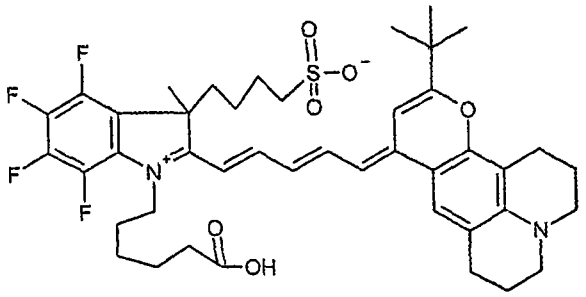
实施例 17：4-[2-{(1*E*,3*E*,5*E*)-5-[2-叔丁基-7-(二甲基氨基)-4*H*-苯并吡喃-4-亚基]戊-1,3-二烯基}-1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐(化合物 1)



化合物 1

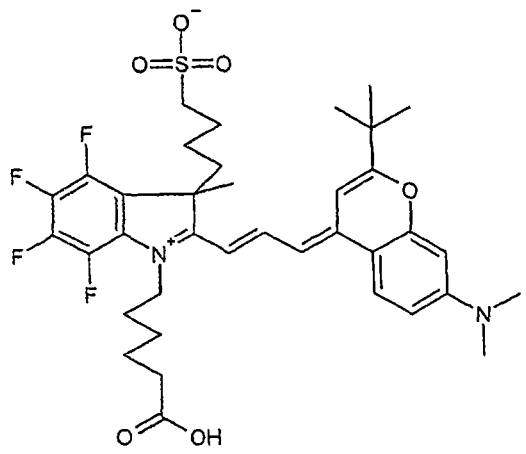
采用实施例 11.2 的方法制备，不同之处在于使用四氟硼酸 2-叔丁基-7-二甲基氨基-4-甲基苯并吡喃鎓(实施例 8.2，165mg)。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 747。精确质量：$C_{39}H_{47}N_2F_4O_6S^+$计算值 747.3091，实测值 M^+ @ 747.3055 (4.8ppm)。UV/VIS(MeOH)：702nm。荧光(MeOH)：激发 λmax = 701nm；发射 λmax = 736nm。

实施例 18：4-[2-[(1*E*,3*E*,5*E*)-5-(11-叔丁基-2,3,6,7-四氢-1*H*,5*H*,9*H*-吡喃并[2,3-f]吡啶并[3,2,1-ij]喹啉-9-亚基)戊-1,3-二烯基]-1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐



采用实施例 11.2 的方法制备，不同之处在于使用四氟硼酸 11-叔丁基-9-甲基-2,3,6,7-四氢-1*H*,5*H*-吡喃并[2,3-f]吡啶并[3,2,1-ij]喹啉-12-鎓(实施例 9，190mg)。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 799。精确质量：$C_{43}H_{51}N_2F_4O_6S^+$计算值 799.3404，实测值 M^+ @ 799.3412 (1.0ppm)。UV/VIS(MeOH): 699nm。荧光(MeOH): 激发 λmax = 698nm; 发射 λmax = 748nm。

实施例 19: 4-[2-{(1*E*,3*E*)-3-[2-叔丁基-7-(二甲基氨基)-4*H*-苯并吡喃-4-亚基]丙-1-烯基}-1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐(化合物 3)

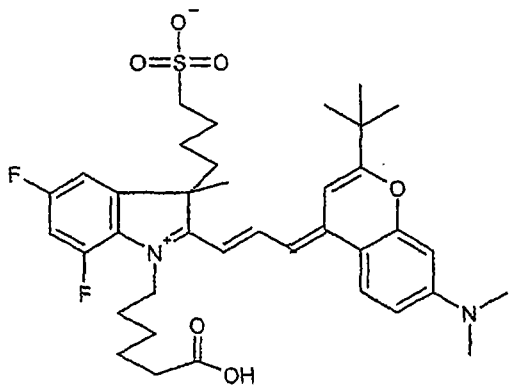


化合物 3

将 4-[1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐(实施例 1，60mg)、四氟硼酸 2-叔丁基-7-二甲基氨基-4-甲基苯并吡喃鎓(实施例 8，80mg)、原甲酸三乙酯(0.5ml)和吡啶(1.0ml)的混合物混合，并于 120℃下加热 3 小时。随后将溶剂在真空下蒸发，

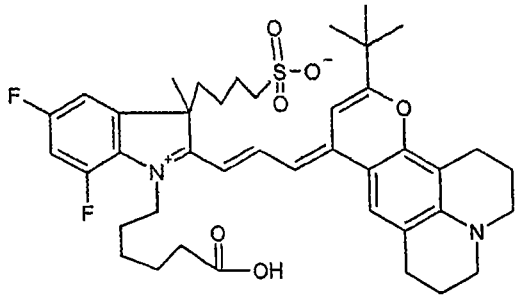
将残余物进行制备 HPLC，收集蓝色染料级分。通过进一步制备 TLC (二氧化硅。甲醇，15：乙酸乙酯，85)，制得分析纯的样品。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 721。精确质量：$C_{37}H_{45}N_2F_4O_6S^+$计算值 721.2934，实测值 M^+ @ 721.2946 (1.6ppm)。UV/VIS(MeOH)：617nm。荧光(MeOH)：激发 λmax = 616nm；发射 λmax = 641nm。

实施例 20：4-[2-{(1*E*,3*E*)-3-[2-叔丁基-7-(二甲基氨基)-4*H*-苯并吡喃-4-亚基]丙-1-烯基}-1-(5-羧基戊基)-5,7-二氟-3-甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐



将 4-[1-(5-羧基戊基)-5,7-二氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐(实施例 7，100mg)、四氟硼酸 2-叔丁基-7-二甲基氨基-4-甲基苯并吡喃鎓(实施例 8，100mg)、原甲酸三乙酯(0.5ml)和吡啶(1.0ml)的混合物混合，并于 120℃下加热 3 小时。随后将溶剂在真空下蒸发，将残余物进行制备 RP-HPLC，收集蓝色染料级分。通过进一步制备 TLC (二氧化硅。甲醇，15：乙酸乙酯，85)，制得分析纯的样品。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 685。精确质量：$C_{37}H_{47}N_2F_2O_6S^+$计算值 685.3123，实测值 M^+ @ 685.3109 (2.0 ppm)。UV/VIS(MeOH)：626nm。荧光(MeOH)：激发 λmax = 627nm；发射 λmax = 647nm。

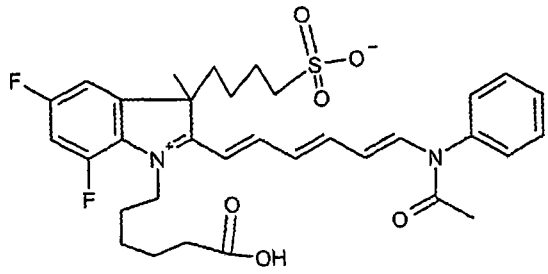
实施例 21：4-[2-[(1*E*,3*E*)-3-(11-叔丁基-2,3,6,7-四氢-1*H*,5*H*,9*H*-吡喃并[2,3-f]吡啶并[3,2,1-ij]喹啉-9-亚基)丙-1-烯基]-1-(5-羧基戊基)-5,7-二氟-3-甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐



将 4-[1-(5-羧基戊基)-5,7-二氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐(实施例 7，100mg)、四氟硼酸 11-叔丁基-9-甲基-2,3,6,7-四氢-1*H*,5*H*-吡喃并[2,3-f]吡啶并[3,2,1-ij]喹啉-12-鎓(实施例 9，120mg)、原甲酸三乙酯(1.0ml)和吡啶(2.0ml)的混合物混合，并于 120℃下加热 3 小时。随后将溶剂在真空下蒸发，将残余物进行制备 HPLC，收集蓝色染料级分。通过进一步制备 TLC (二氧化硅。甲醇，15: 乙酸乙酯，85)，制得分析纯的样品。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 737。精确质量: $C_{41}H_{51}N_2F_2O_6S^+$计算值 737.3436，实测值 M^+ @ 737.3433 (0.4ppm)。UV/VIS(MeOH): 639nm。荧光(MeOH): 激发 λmax = 639nm; 发射 λmax = 663nm。

实施例 22: 4-[(2*E*)-2-{(2*E*,4*E*,6E)-7-[1-(5-羧基戊基)-5,7-二氟-3-甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚鎓-2-基]庚-2,4,6-三烯亚基}-6-甲基喹啉-1(2*H*)-基]丁烷-1-磺酸盐

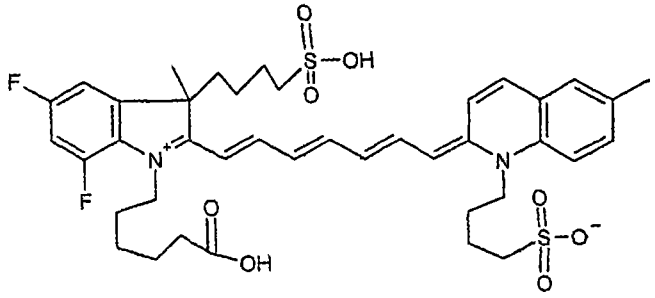
22.1 4-[2-{(1*E*,3*E*,5*E*)-6-[乙酰基(苯基)氨基]己-1,3,5-三烯基}-1-(5-羧基戊基)-5,7-二氟-3-甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐



将 4-[1-(5-羧基戊基)-5,7-二氟-2,3-二甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐(实施例 7，0.3g)和戊烯二醛双(苯基亚胺).HCl (200mg)在乙

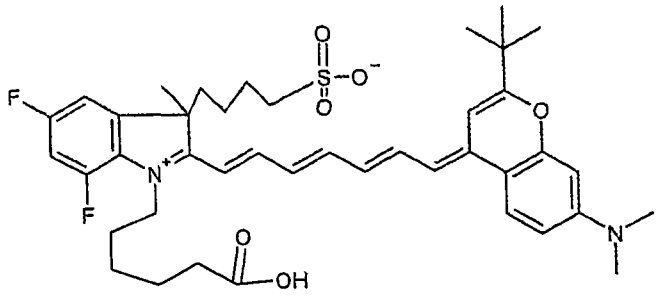
酸酐(6.7ml)和乙酸(3.4ml)中混合，并于 120℃下加热 17 小时。所得到的深红色溶液随后直接用于制备七次甲基染料实施例。

22.2 4-[(2*E*)-2-{(2*E*,4*E*,6*E*)-7-[1-(5-羧基戊基)-5,7-二氟-3-甲基-3-(4-磺基丁基)-3*H*-吲哚鎓-2-基]庚-2,4,6-三烯亚基}-6-甲基喹啉-1(2*H*)-基]丁烷-1-磺酸盐



向 2ml 得自 21.1 的七次甲基半-染料溶液(half-dye solution)中加入 4-(2,6-二甲基喹啉鎓-1-基)丁烷-1-磺酸盐(60mg)和乙酸钾(400mg)。将所得到的混合物于环境温度下搅拌过夜，随后在过量的乙酸乙酯中沉淀。过滤收集粗品固体染料，再溶解于水/乙腈中，并通过制备 RP-HPLC 纯化，得到标题染料。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 787。UV/VIS(MeOH): 661nm。荧光(MeOH): 发射 λmax = 800nm。

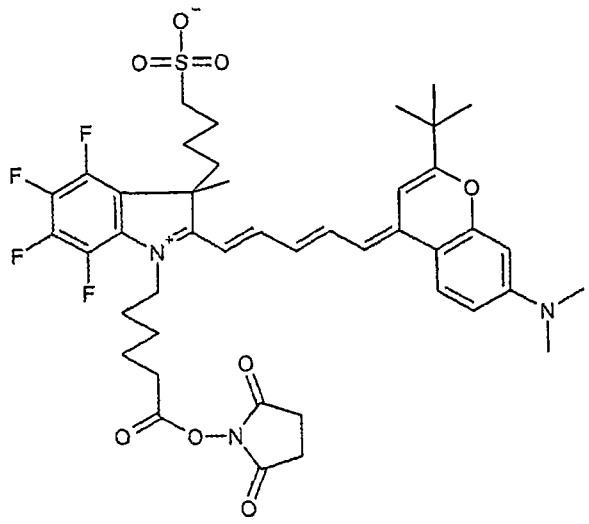
实施例 23: 4-[2-{(1*E*,3*E*,5*E*,7*E*)-7-[2-叔丁基-7-(二甲基氨基)-4*H*-苯并吡喃-4-亚基]庚-1,3,5-三烯基}-1-(5-羧基戊基)-5,7-二氟-3-甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐



向 2ml 得自 21.1 的七次甲基半-染料溶液中加入四氟硼酸 2-叔丁基-7-二甲基氨基-4-甲基苯并吡喃鎓(实施例 8，65mg)和乙酸钾(400mg)。将所得到的混合物于环境温度下搅拌过夜，随后在过量的

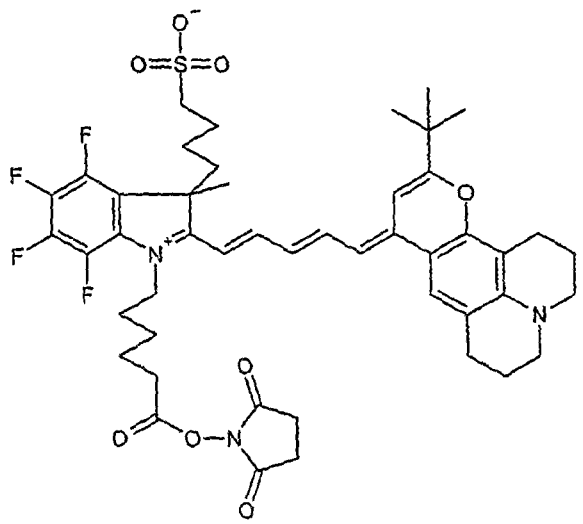
乙酸乙酯中沉淀。过滤收集粗品固体染料，再溶解于水/乙腈中，并通过制备 RP-HPLC 纯化，得到标题染料。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 737。UV/VIS(MeOH): 829nm。

实施例 24: 4-(2-{(1*E*,3*E*,5*E*)-5-[2-叔丁基-7-(二甲基氨基)-4*H*-苯并吡喃-4-亚基]戊-1,3-二烯基}-1-{6-[(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)氧基]-6-氧代己基}-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基)丁烷-1-磺酸盐



使用声波振荡将化合物 1(实施例 17，20mg)溶解于 DMF(1ml)和 DMSO(1ml)中。向所得到的溶液中加入四氟硼酸 O-(N-琥珀酰亚氨基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓(10mg)和 N,N-二异丙基乙基胺(5μl)；随后将反应物于环境温度下搅拌 1 小时。通过 TLC(二氧化硅。甲醇，20:二氯甲烷，80。Rf SM 游离酸 ≈0.3，Rf SM NHS 酯≈0.5)证实反应完全。随后将混合物通过过滤器滴至冷却的乙酸乙酯(20ml)和乙醚(20ml)的混合物中，得到沉淀物。离心过滤收集，用新鲜的乙酸乙酯洗涤，并真空干燥，得到 25mg 产物。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 896。

实施例 25: 4-(2-[(1*E*,3*E*,5*E*)-5-(11-叔丁基-2,3,6,7-四氢-1*H*,5*H*,9*H*-吡喃并[2,3-f]吡啶并[3,2,1-ij]喹啉-9-亚基)戊-1,3-二烯基]-1-{6-[(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)氧基]-6-氧代己基}-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基)丁烷-1-磺酸盐



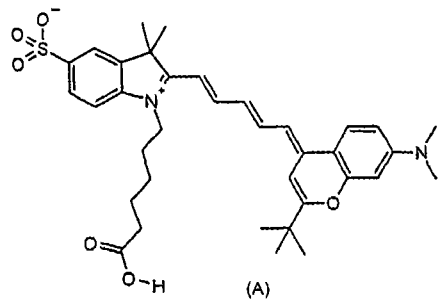
使用声波振荡将羧基染料 4-[2-[(1*E*,3*E*,5*E*)-5-(11-叔丁基-2,3,6,7-四氢-1*H*,5*H*,9*H*-吡喃并[2,3-f]吡啶并[3,2,1-ij]喹啉-9-亚基)戊-1,3-二烯基]-1-(5-羧基戊基)-4,5,6,7-四氟-3-甲基-3*H*-吲哚鎓-3-基]丁烷-1-磺酸盐(实施例 18，16mg)溶解于 DMF(1ml)中。向所得到的溶液中加入四氟硼酸 O-(N-琥珀酰亚氨基)-N,N,N′,N′-四甲基脲鎓(10mg)和 N,N-二异丙基乙基胺(5μl)；随后将反应物于环境温度下搅拌 1 小时。通过 TLC(二氧化硅。甲醇，20: 二氯甲烷，80。Rf SM 游离酸≈ 0.25，Rf SM NHS 酯≈ 0.5)证实反应完全。随后将混合物通过过滤器滴至冷却的乙酸乙酯(20ml)和乙醚(20ml)的混合物中，得到沉淀物。离心过滤收集，用新鲜的乙酸乙酯洗涤，并真空干燥，得到 18mg 产物。MS(MALDI-TOF)，M^+ = 844。

实施例 26：本发明染料的光稳定性

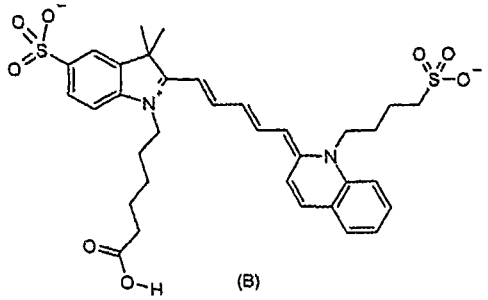
如下详述进行光稳定性研究。将各测定染料溶解于 1:1 的甲醇:水混合物或水中，得到吸光度读数为 0.7-1.2Au。随后将每种溶液分在另两个小瓶中。在实验过程中一个小瓶的染料溶液保持在暗的环境中作为对照样品("暗处对照物")。另一个暴露于强光源(Wallac 灯箱；1295-013)。样品保持在光源上方 22cm，连续曝光。在 6 天的试验期间，在有规律的间隔下测定每种样品的 UV/可见光光谱。相同的比色

皿和分光光度计用于每个测量点。对于保持在暗处的对照样品，在实验的开始和结束时测量 UV/可见光吸收光谱。试验一式双份。

与相应的未氟化的类似物 Cy5 吡喃鎓(pyrylium)比较物 1(实施例 17 的 Cy5F 吡喃鎓(pyrylium)染料)的光稳定性:

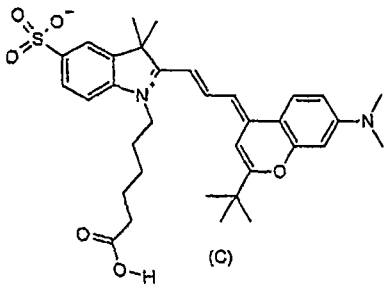


与未氟化的类似物 Cy5 喹啉鎓(化合物 B)比较，研究化合物 2(实施例 12 的 Cy5F 喹啉鎓染料)的光稳定性。



将每个实验得到的数据归一化，并绘图示于图 1 和 2。

在其他实施例中，测量荧光信号的光稳定性。与未氟化的类似物 Cy3 吡喃鎓(化合物 C)比较，研究化合物 3(实施例 19 的氟化的 Cy3F 吡喃鎓)的光稳定性。



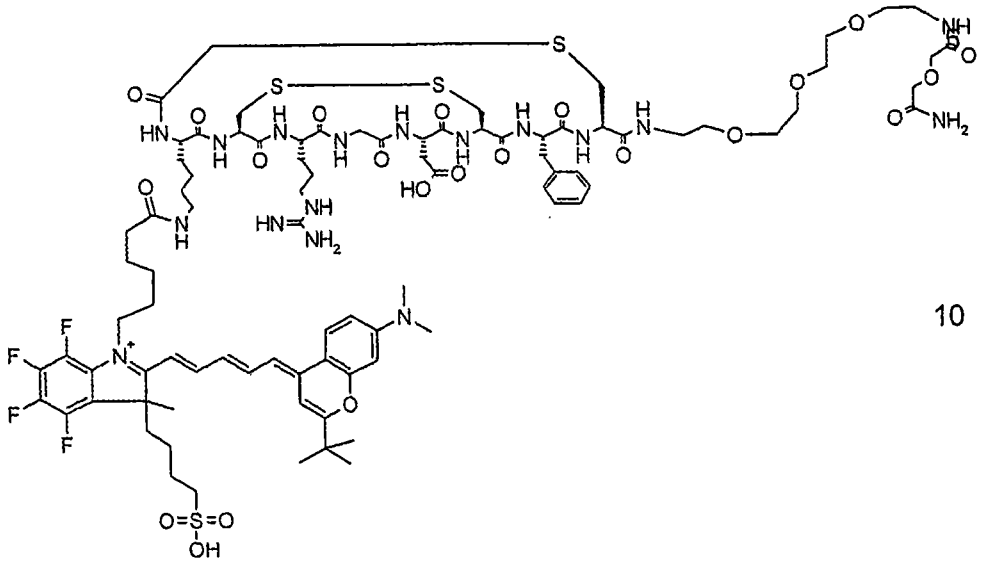
将染料溶解于 1:1 的甲醇:水混合物中，在染料 λmax 处得到吸光度读数为 1Au，随后稀释 20 倍用于荧光测量。使用 Karl Storz Xenon

175 光源，在 100%强度下将样品曝光 30 分钟。在曝光的同时将比色皿置于水浴中，以避免加热。在 Cary Eclipse(Varian)荧光分光光度计上用 1cm 比色皿进行荧光测量，ex/em 狭缝(slit) 5nm。

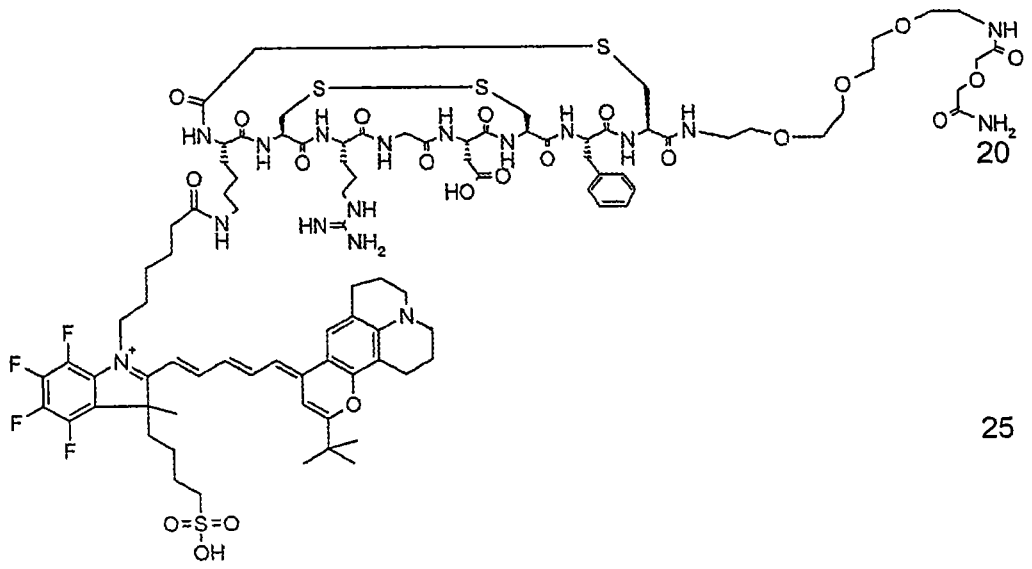
化合物 3 表现出为暗处对照物的 0.94 的改进的光稳定性，而未氟化的类似物(化合物 C)的最大荧光强度为该对照物的 0.79。

实施例 27: 染料-RGD 肽缀合物(缀合物 1 和缀合物 2)的合成

缀合物 1



缀合物 2



使用标准固相肽合成方法组装所示肽。将氯乙酰基化的肽从固体载体解离，并在溶液中环化，首先形成硫醚桥，随后形成二硫化物桥。

将化合物 1(实施例 17；0.0018mmol)溶解于 NMP(0.5ml)和 NMM(1μL)中，随后加入 HATU(0.84mg，0.0022mmol)。将溶液在暗处搅拌5分钟，随后加至RGD肽胺(2.3mg，0.0018mmol)的NMP(0.5ml)溶液中。将反应混合物于室温下搅拌 5 小时，随后加热至 50℃下保持 2 小时。

采用类似的方式，使用实施例 18 的染料制备缀合物 2。

通过 LCMS(ESI+，Phenomenex Gemini 50×4.6mm，5 微米，110Å，A = 水/0.1%甲酸，B = MeCN/0.1%甲酸，经 10 分钟梯度从 5 至 95)检测染料肽缀合物。缀合物 1 的保留时间 = 5.73，m/z = 994 $[MH]^{2+}$，缀合物 2 的保留时间 = 6.10，m/z = 1020 $[MH]^{2+}$。

对于缀合物 1，随后将反应混合物用 5%的 MeCN/水(5ml)稀释，并使用制备 HPLC 纯化产物。

纯化和表征

通过制备 HPLC 纯化(梯度：经 40 分钟 B 由 5%至 60% ，其中 A = H_2O/0.1% HCOOH，且 B = MeCN/0.1% HCOOH，流动速率：10ml/分钟，柱：Phenomenex Luna 5μ C18 (2) 150 × 21.20 mm，检测：UV 650nm，产物保留时间：32.60 分钟)纯的染料-肽缀合物。

通过分析 LCMS(ESI+，Phenomenex Gemini 50×4.6mm，5 微米，110Å，A = 水/0.1%甲酸，B = MeCN/0.1%甲酸，经 10 分钟梯度从 5 至 95)来分析纯产物。缀合物 1 的保留时间 = 5.73，m/z = 994 $[MH]^{2+}$。

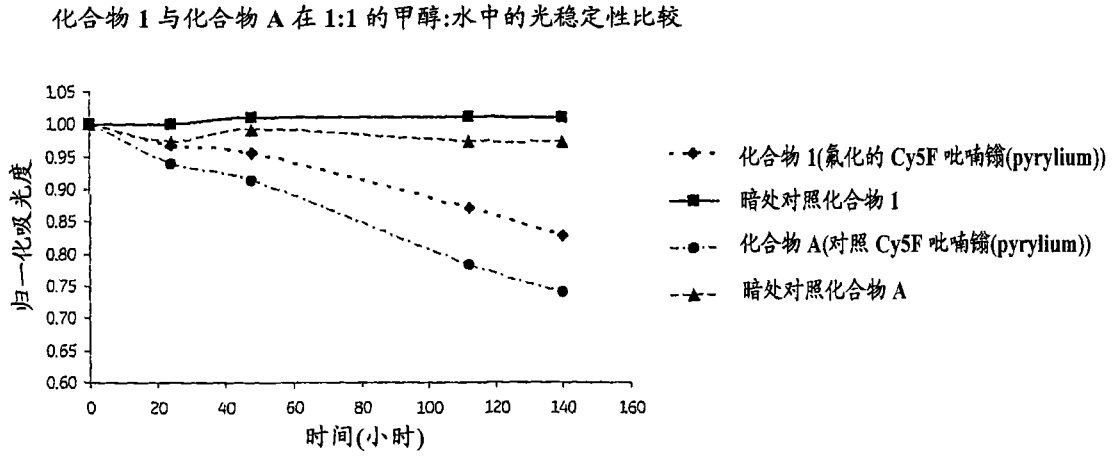


图 1: 化合物 1 与化合物 A 的光稳定性比较

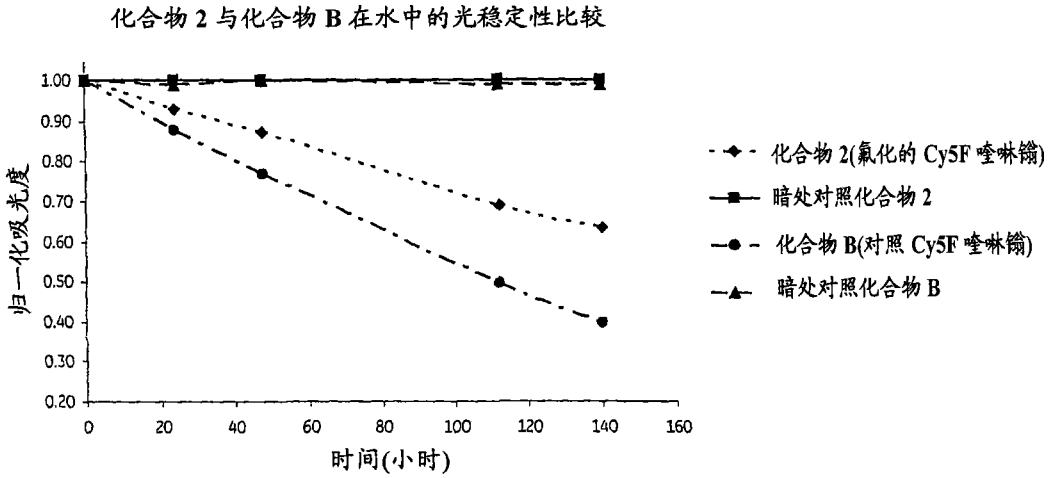


图 2: 化合物 2 与化合物 B 的光稳定性比较