

(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 12 月 15 日 (15.12.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/197959 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07D 413/12 (2006.01) A61P 33/06 (2006.01)
C07D 271/12 (2006.01) G01N 33/533 (2006.01)
A61K 31/4245 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/085367
- (22) 国际申请日: 2016 年 6 月 8 日 (08.06.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510319723.2 2015 年 6 月 11 日 (11.06.2015) CN
- (71) 申请人: 华东理工大学 (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。
- (72) 发明人: 徐玉芳 (XU, Yufang); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。李洪林 (LI, Honglin); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。赵振江 (ZHAO, Zhenjiang); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。朱丽丽 (ZHU, Lili); 中国上海市徐汇区梅陇路 130

号, Shanghai 200237 (CN)。许鸣豪 (XU, Minghao); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。吴方舒 (WU, Fangshu); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。朱俊生 (ZHU, Junsheng); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。张晨 (ZHANG, Chen); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。李诗良 (LI, Shiliang); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。陈卓 (CHEN, Zhuo); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。

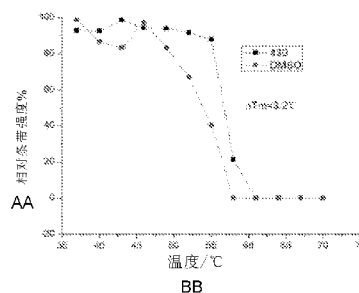
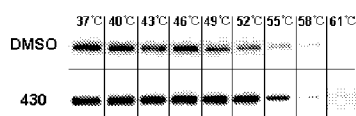
(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (CN)。

(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, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA,

[见续页]

(54) Title: COMPOUND FOR DETECTING DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE

(54) 发明名称: 检测二氢乳清酸脱氢酶的化合物



A — L — R
I

AA Relative strip strength
BB Temperature

图 1

(57) Abstract: The present invention relates to the compound of formula (I) used for detecting dihydroorotate dehydrogenase. In formula (I), A is pigment group, L is link arm, R is specific binding ligand for dihydroorotate dehydrogenase. The compound of the present invention can be used to detect and locate dihydroorotate dehydrogenase, and thus it can be used to diagnose relevant diseases mediated by dihydroorotate dehydrogenase.

(57) 摘要: 本发明涉及用于检测二氢乳清酸脱氢酶的式 I 所示化合物, 式中, A 为色素基团, L 为连接臂, R 为二氢乳清酸脱氢酶的特异性结合配体。本发明的化合物可用于检测和定位二氢乳清酸脱氢酶, 从而可用于诊断二氢乳清酸脱氢酶介导的相关疾病。



WO 2016/197959 A1



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。

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, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

检测二氢乳清酸脱氢酶的化合物

技术领域

5 本发明涉及化学合成领域；具体地说，本发明涉及用于检测二氢乳清酸脱氢酶 (DHODH)的化合物。

背景技术

疟疾 (Malaria)是由寄生性疟原虫所引起的严重危害人类健康的虫媒介传染病，至今依然是世界上最严重的寄生虫病之一。疟疾通过雌性按蚊叮咬被感染者和健康人群持续传播。能感染人类并导致疟疾的致病疟原虫有四种，分别是恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、卵形疟原虫 (*Plasmodium ovale*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)和间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)。其中，恶性疟原虫所导致的凶险型疟疾发病迅速，病症强烈且致死率极高。

生物体内的嘧啶合成与许多生命活动息息相关，嘧啶合成为 DNA 和 RNA 的生成提供原料，而 DNA 和 RNA 对于细胞的生长分裂是不可或缺的。就恶性疟原虫而言，其体内 DNA 和 RNA 复制只依赖于嘧啶源合成途径，而恶性疟原虫二氢乳清酸脱氢酶 (PfDHODH)是疟原虫嘧啶源合成途径中的关键酶 (Wu, T.; S. Nagle, A.; K. Chatterjee, A. Road Towards New Antimalarials-Overview of the Strategies and their Chemical Progress. Current Medicinal Chemistry. 2011, 18 (6), 853-871)，对 PfDHODH 进行荧光检测对疟原虫的定位示踪及疟疾的早期预警、诊断有着极其重要的科学价值和研究意义 (Malmquist, N. A.; Gujjar, R.; Rathod, P. K.; Phillips, M. A. Analysis of flavin oxidation and electron-transfer inhibition in Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase. Biochemistry. 2008, 47 (8), 2466-2475)。

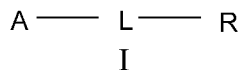
长期以来，疟原虫的生长周期、耐药机理研究尚不透彻，同时现有的疟疾快速诊断方法如镜检染色法、抗体抗原检测 (ELISA)和聚合酶链式反应 (PCR)等，这些方法缺点较多，主观偏差大、耗时长、成本高、操作复杂严重依赖仪器 (Wilson, M. L. Malaria Rapid Diagnostic Tests. Clinical Infectious Diseases, 2012, 54 (11): 1637-1641)。化学发光检测手段简便、灵敏、快捷但利用化学探针识别定位疟原虫及研究其生命史和机理目前尚未有报道。

30 因此，本领域急需能够简便、灵敏、快捷地检测或定位疟原虫，从而用于研究其生命史和机理的物质手段和方法。

发明内容

35 本发明的目的在于提供一种简便、灵敏、快捷地检测或定位疟原虫的探针化合物以及利用所述化合物研究疟原虫的生命史和机理的方法。

在第一方面，本发明提供式 I 所示化合物：



式中，

- 5 A 为色素基团；
 L 为连接臂；
 R 为二氢乳清酸脱氢酶特异性结合配体。

在优选的实施方式中，A 是发射波长介于 400 nm-800 nm 的色素基团，包括各种染料、(荧光)染料或染色剂。

- 10 在优选的实施方式中，L 包括 2-10 个碳原子的饱和或不饱和烷基链，或含氧、含硫、含氮或含羰基、酯基、酰胺基的饱和或不饱和烷基链。

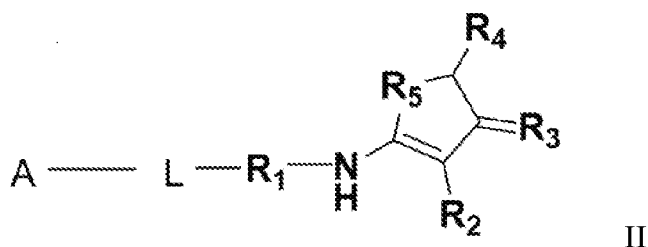
在优选的实施方式中，R 包括二氢乳清酸脱氢酶的抑制剂、拮抗剂、激活剂、抗体等。

- 15 在优选的实施方式中，L 选自任选取代的 C2-C10 烷基、任选取代的 C4-C10 含烯烷基、任选取代的 C4-C10 含炔烷基、C4-C10 含氧醚链，如 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OCH}_2\text{CH}_2)-$ 或 $-(\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}(\text{CH}_2)_n)-$ ，含酯基链，如 $-(\text{CH}_2)_m\text{COO}(\text{CH}_2)_p-$ ，含羰基链，如 $-(\text{CH}_2)_m\text{CO}(\text{CH}_2)_p-$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_q\text{O}$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_q\text{NH}$ 、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_q\text{O}$ 、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_q\text{NH}$ 、 $\text{OCO}(\text{CH}_2)_q\text{COO}$ 、 $\text{OCO}(\text{CH}_2)_q\text{O}$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_q\text{COO}$ 、 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_q\text{O}$ 、 $\text{O}(\text{CH}_2)_q\text{CONH}$ 、 $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_q\text{CONH}$ 、 $\text{S}(\text{CH}_2)_q\text{O}$ 、 $\text{S}(\text{CH}_2)_q\text{S}$ 、 $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{O}(\text{CH}_2)_m\text{OOC}(\text{CH}_2)_n$ ；n 为独立选自 0-2 的整数，m 为独立选自 1-5 的整数，p 为独立选自 1-5 的整数，q 为独立选自 1-10 的整数；
- 20

在优选的实施方式中，A 选自含合适共轭体系的发色团，如萘酰亚胺、4-氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑 (NBD)、荧光素、罗丹明、香豆素、氟硼荧光染料(BODIPY)、尼罗红、尼罗蓝、花菁、酞菁、噁菁染料、多次甲基染料、三芳次甲基染料、偶氮染料及偶氮颜料、靛蓝类染料、氮杂[18]轮烯染料、硝基及亚硝基染料、醌类羰基染料。

- 25 在优选的实施方式中，R 部分是五元环，包括含 O、S 杂原子的五元环母核结构 DHODH 抑制剂。

在具体的实施方式中，所述化合物如下式 II 所示：



式中，

- 30 R₁ 为未取代的或被选自下组的取代基取代的稠环基团：C1-C5 烷基、卤素、羧基、酯基、氨基；
 R₂ 选自：C1-C6 烷基，C1-C6 不饱和烃基，C1-C6 烷基羰基，C1-C6 氟代烷基羰基，

C1-C6 烷氧基, C1-C6 氟代烷氧基, 任选取代的苯甲酰基, 氨基羰基, C1-C6 烷氧基羰基, C1-C6 氨基羰基, 羟基, C1-C6 烷氧基、C1-C6 酯基;

R₃ 选自 O、NH 或 S;

R₄ 选自 H, C1-C6 烷基, 任选取代的 C2-C6 不饱和烃基, C1-C6 烷基羰基, 任选取代的苯甲酰基, 羧基, 氨基羰基, C1-C6 烷氧基羰基, C1-C6 氨基羰基, 羟基, C1-C6 烷氧基;

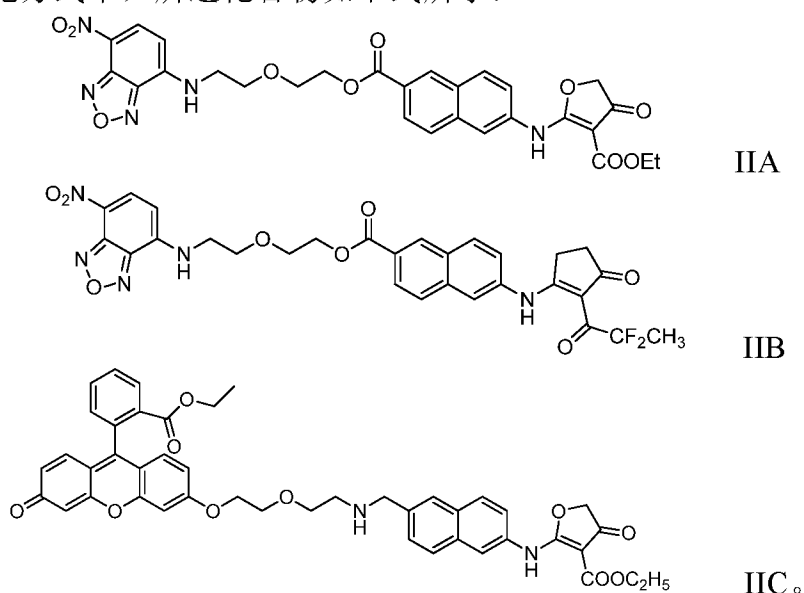
R₅ 选自 O, S, NH 和 CH₂。

在具体的实施方式中, R₁ 为含 2-3 个苯环的稠环基团, 优选地, R₁ 为萘基。

在具体的实施方式中, 所述色素选自 4-氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑 (NBD) 或荧光素。

在具体的实施方式中, L 为 (HNCH₂CH₂OCH₂CH₂OOC) 或 (OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCH₂)。

在具体的实施方式中, 所述化合物如下式所示:



在第二方面, 本发明提供一种二氢乳清酸脱氢酶介导的疾病的诊断试剂盒, 所述试剂盒装有本发明第一方面所述的化合物。

在优选的实施方式中, 所述二氢乳清酸脱氢酶介导的疾病包括恶性疟疾、间日疟、卵形疟疾、三日疟、猴型疟、克氏锥虫、血吸虫病、登革热等寄生虫传染病; 以及类风湿性关节炎、结肠炎、银屑病关节炎、红斑狼疮、肾小球疾病、黑色素瘤和同种或异种器官移植引起的宿主排斥反应。

在具体的实施方式中, 所述疾病是恶性疟疾。

在第三方面, 本发明提供本发明第一方面所述的化合物在制备二氢乳清酸脱氢酶检测或定位试剂二氢乳清酸脱氢酶介导的疾病的诊断试剂中的用途。

在优选的实施方式中, 所述二氢乳清酸脱氢酶介导的疾病包括恶性疟疾、间日疟、

卵形疟疾、三日疟、猴型疟、克氏锥虫、血吸虫病、登革热等寄生虫传染病；以及类风湿性关节炎、结肠炎、银屑病关节炎、红斑狼疮、肾小球疾病、黑色素瘤和同种或异种器官移植引起的宿主排斥反应。

在具体的实施方式中，所述疾病是恶性疟疾。

5

在第四方面，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含：

本发明第一方面所述的化合物或其药学上可接受的盐，和
药学上可接受的载体或赋形剂。

10 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

15 图 1 显示了本发明的化合物 IIA (DH03A430)与 P/DHODH 蛋白的结合情况；

图 2 显示了本发明化合物 IIA (DH03A430)与体外培养的受疟原虫感染红细胞的荧光成像图像；

图 3 显示了本发明化合物 IIA (DH03A430)与伯氏疟原虫感染小鼠的血液的检测以及荧光成像图像。

20 图 4 显示了本发明化合物与 3D7 株恶性疟原虫共聚焦实验 (体外培养) (新合成的探针，在 460 nm 激发，520 nm 发射产生的荧光；Mito Tracker:购买的线粒体染料，在 579 nm 激发，599 nm 发射产生的荧光；Merge: 探针和 Mito Tracker 染料产生的荧光的叠合；Bright field: 明场)。

25 图 5 显示了本发明化合物与伯氏疟原虫体外孵育共聚焦实验 (小鼠) (在 460 nm 激发，520 nm 发射产生的荧光；Mito Tracker:购买的线粒体染料，在 579 nm 激发，599 nm 发射产生的荧光；Merge: 探针和 Mito Tracker 染料产生的荧光的叠合；Bright field: 明场)。

具体实施方式

30 发明人经过广泛而深入的研究，出乎意料地发现了一类可用于在细胞及活体水平中特异性检测 P/DHODH 的荧光化合物，这些化合物不仅在细胞水平对恶性疟原虫有一定抑制活性，它们还能特异性识别并标记感染疟原虫的红细胞中的 DHODH。在此基础上完成了本发明。

35 术语定义

本文中涉及到的一些基团定义如下：

本文中，“烷基”指碳链长度为 1-10 个碳原子的饱和的支链或直链烷基，优选的烷基包括长 2-8 个碳原子、1-6 个、1-4 个碳原子、1-3 个碳原子不等的烷基。烷基的例子包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、庚基等。烷基可以被 1 个或多个取代基取代，例如被卤素或卤代烷基取代。例如，烷基可以是被 1-4 个氟原子取代的烷基，或者烷基可以是被氟代烷基取代的烷基。

本文中，“酯基”是指 -COOR_x 所示的基团，其中， R_x 是如上定义的烷基。

本文中，“芳基”指含有 6 到 14 个碳原子的单环、双环或三环芳族基团，包括苯基、萘基、菲基、蒽基、茚基、茚基、茚基、四氢化萘基、二氢化茚基等。芳基可任选地被 1-5 个 (例如，1、2、3、4 或 5 个)选自以下的取代基取代：卤素、C1-C4 醛基、C1-C6 的直链或支链烷基、氰基、硝基、氨基、羟基、羟甲基、卤素取代的烷基 (例如三氟甲基)、卤素取代的烷氧基 (例如三氟甲氧基)、羧基、C1-C4 的烷氧基、C1-C4 取代巯基、吗啉基、任选取代的芳基 (例如任选取代的苯基)、任选取代的芳氧基 (例如任选取代的苯氧基)和任选取代的苄氧基。例如，芳基可以被 1-3 个选自以下的基团取代：氟、氯、溴、C1-C4 烷基、三氟甲基、吗啉基、甲氧基、苯基、甲氧基取代的苯基、苯氧基、苄氧基、被卤素取代的苄氧基、乙氧基和硝基等。

本文所使用的术语“杂环基”指单一或稠合的环结构，在性质上可以是芳族或非芳族的，并且其优选含有 3-20 个成环原子，更优选含有 5-14 个环原子，其中至少 1 个并且优选最多可至 4 个是选自 O、S 和 N 的杂原子。本文中，杂环基的例子包括呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡咯烷基、咪唑基、三唑基、噻唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、吡唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、三嗪基、喹啉基、异喹啉基、喹喔啉基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、吗啉基、吡嗪基、二苯并噻吩、香豆素基和 1,2-亚甲基二氧苯基。本文中，杂环基可任选地被 1-3 个本文所述的取代基取代。

本文所使用的术语“杂原子”包括 O、S 和 N。当杂原子是 N 时，此 N 原子可以进一步由例如氢或 C1-C10 烷基的基团所取代。当杂原子是 S 时，此 S 原子可以进一步由例如 C1-C10 烷基的基团所取代。

本文所使用的术语“杂芳基”或“芳香杂环基”指如上所述具有芳族特性的那些杂环基，包括但不限于呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡啶基、噁唑基、吡嗪基、哒嗪基、嘧啶基等。

本文所使用的术语“卤素”包括氟、氯、溴和碘。

除非另有说明，本文所使用的术语“任选取代的”指其所修饰的基团可任选地被 1-5 个 (通常为 1、2 或 3 个)选自以下的取代基取代：C1-C4 烷基、羧基、卤素、C1-C4 烷氧基、氰基、硝基、氨基、羟基、醛基、C1-C6 酰基、羟甲基、卤素取代的 C1-C4 烷基 (例如三氟甲基)、卤素取代的 C1-C4 烷氧基 (例如三氟甲氧基)、巯基和 C1-C4 酰基。

本文中，酰胺基 (氨基羰基)自身或作为其它基团的一部分，指“C1-C6 烷基-CO-NH-”基团、“C3-C8 环烷基-CO-NH-”或“C3-C8 环烷基-C1-C6 烷基-CO-NH-”。示例性的

酰胺基包括但不限于甲酰胺基、乙酰胺基、丙酰胺基、丁酰胺基、环丙酰胺基、环丙甲酰胺基等。

本文中，酰基自身或作为其它基团的一部分，可含有 1-6 个碳原子，优选 1-4 个碳原子。示例性的酰基包括但不限于乙酰基、氟代乙酰基、氟代丙酰基、氟代丁酰基等。

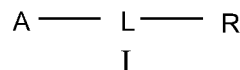
5

本发明化合物

本发明设计了一类可用于在细胞及活体水平中特异性检测 $PfDHODH$ 的荧光化合物。药理测试结果表明本发明的化合物不仅在细胞水平对恶性疟原虫有一定抑制活性，对 $PfDHODH$ 具有亲和力，同时其还其能在感染疟原虫的红细胞中特异性识别标记 $DHODH$ ，并选择性定位于线粒体中。通过伯氏疟原虫感染小鼠的血液检测证明，本发明的化合物可以准确地标记和示踪红细胞中的疟原虫，并且准确辨别不同时期疟原虫的生长形态，量化并简化疟原虫的检测过程。综上，这类新型 $DHODH$ 标记型化合物的设计和发现将会对于疟疾的早期诊断和疟原虫生命周期、致病机理研究提供详实、有力的证据，也可用于疟疾的早期诊断和预防。

15

在具体的实施方式中，本发明提供式 I 所示化合物：



式中，

20 A 为色素基团，优选发射波长介于 400 nm-800 nm 的色素基团，包括各种染料、(荧光)染料或染色剂；

L 为连接臂，包括 2-10 个碳原子的饱和或不饱和烷基链，或含氧、含硫、含氮或含羰基、酯基、酰胺基的饱和或不饱和烷基链；

25 R 为二氢乳清酸脱氢酶特异性结合配体，包括二氢乳清酸脱氢酶的抑制剂、拮抗剂、激活剂、抗体等。

鉴于本发明的教导，本领域技术人员可以采用任何合适的色素基团、连接臂和二氢乳清酸脱氢酶特异性结合配体。

在优选的实施方式中，L 选自任选取代的 C2-C10 烷基、任选取代的 C4-C10 含烯烷基、任选取代的 C4-C10 含炔烷基、C4-C10 含氧醚链，如 $-(CH_2CH_2(OCH_2CH_2)_nOCH_2CH_2)-$ 或 $-(OCH_2CH_2OCH_2CH_2NHCH_2)-$ ，含酯基链，如 $-(CH_2)_mCOO(CH_2)_p-$ ，含羰基链，如 $-(CH_2)_mCO(CH_2)_p-$ 、 $O(CH_2)_qO$ 、 $O(CH_2)_qNH$ 、 $NH(CH_2)_qO$ 、 $NH(CH_2)_qNH$ 、 $OCO(CH_2)_qCOO$ 、 $OCO(CH_2)_qO$ 、 $O(CH_2)_qCOO$ 、 $NHCO(CH_2)_qO$ 、 $O(CH_2)_qCONH$ 、 $NHCO(CH_2)_qCONH$ 、 $S(CH_2)_qO$ 、 $S(CH_2)_qS$ 、 $NH(CH_2)_mO(CH_2)_mOOC(CH_2)_n$ ；n 为独立选自 0-2 的整数、m 为独立选自 1-5 的整数、p 为独立选自 1-5 的整数、q 为独立选自 1-10 的整数；

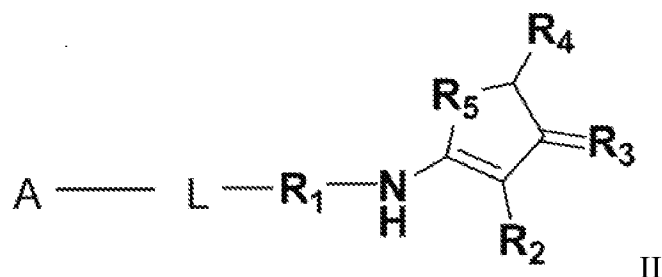
35

A 选自含合适共轭体系的发色团，如萘酰亚胺、4-氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑

(NBD)、荧光素、罗丹明、香豆素、氟硼荧光染料(BODIPY)、尼罗红、尼罗蓝、花菁、酞菁、噁菁染料、多次甲基染料、三芳次甲基染料、偶氮染料及偶氮颜料、靛蓝类染料、氮杂[18]轮烯染料、硝基及亚硝基染料、醌类羰基染料。在具体的实施方式中，A 选自 4-氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑 (NBD)或荧光素。

5 R 部分是五元环，包括含 O、S 杂原子的五元环母核结构 DHODH 抑制剂。

在进一步的具体实施方式中，本发明的化合物如下式 II 所示：



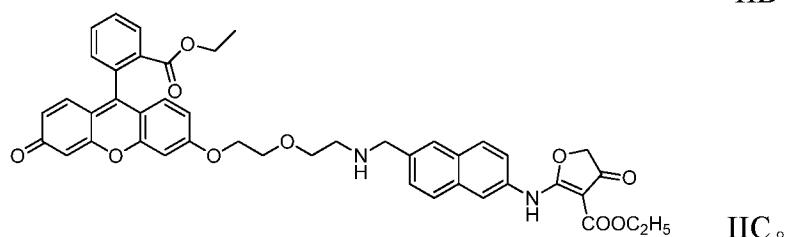
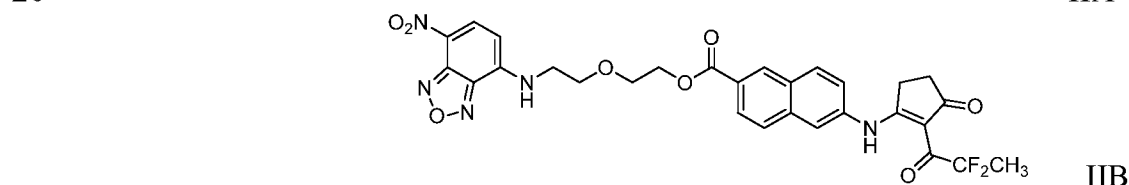
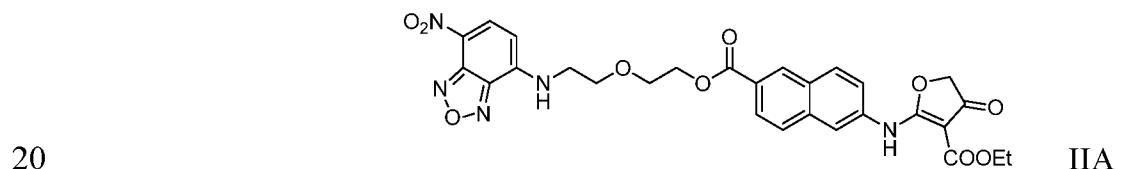
式中，

10 R₁ 为未取代的或被选自下组的取代基取代的稠环基团：C1-C5 烷基、卤素、羧基、酯基、氨基，R₁ 优选为含 2-3 个苯环的稠环基团，更优选为萘基；R₂ 选自：C1-C6 烷基，C1-C6 不饱和烃基，C1-C6 烷基羰基，C1-C6 氟代烷基羰基，C1-C6 烷氧基，C1-C6 氟代烷氧基，任选取代的苯甲酰基，氨基羰基，C1-C6 烷氧基羰基，C1-C6 氨基羰基，羟基，C1-C6 烷氧基、C1-C6 酯基；R₃ 选自 O、NH 或 S；R₄ 选自 H，C1-C6 烷基，任选取代的 C2-C6 不饱和烃基，C1-C6 烷基羰基，任选取代的苯甲酰基，羧基，氨基羰基，C1-C6 烷氧基羰基，C1-C6 氨基羰基，羟基，C1-C6 烷氧基；R₅ 选自 O，S，NH 和 CH₂。

15

本领域技术人员可以采用各种结构的连接臂，例如(HNCH₂CH₂OCH₂CH₂OOC) 或 (OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCH₂)所示的连接臂。

在具体的实施方式中，本发明提供以下化合物：



本发明的优点:

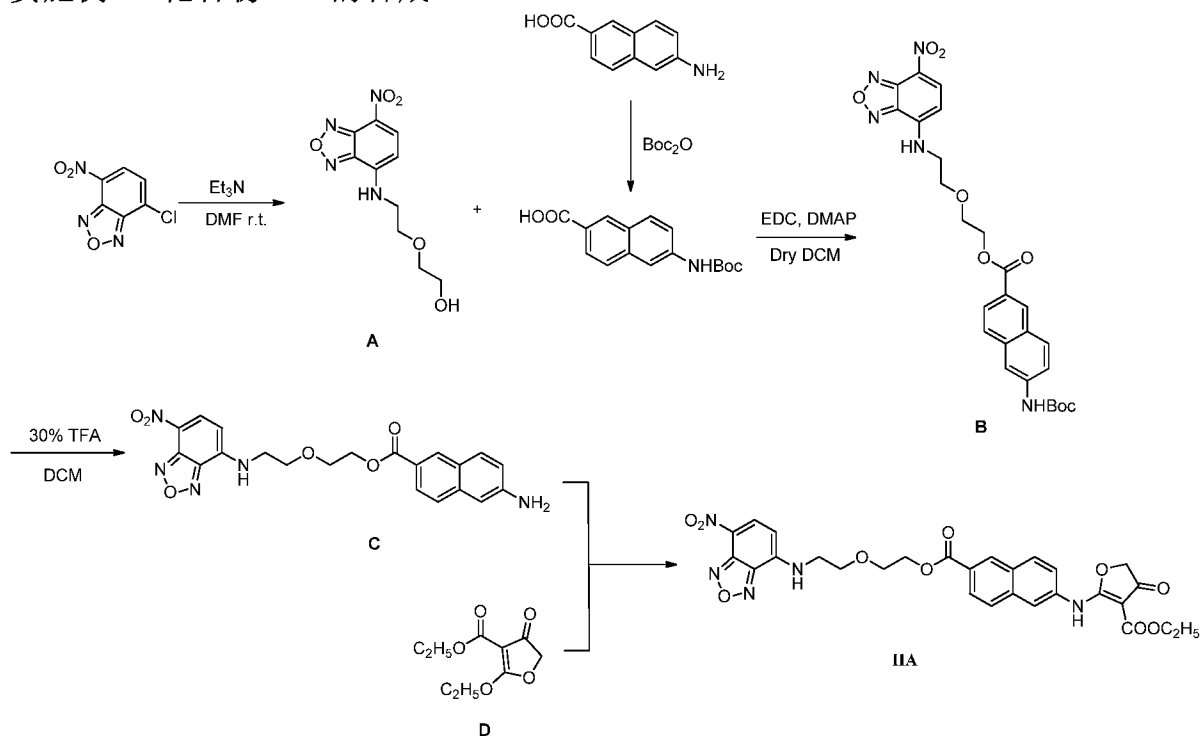
1. 本发明化合物的吸收和发射波长涵盖所有波长范围, 且基本没有背景荧光干扰, 可用作检测 DHODH 的荧光探针;
2. 本发明化合物既可特异性结合二氢乳清酸脱氢酶, 又能产生荧光信号。

5

以下结合具体实施案例对本发明的技术方案进一步描述, 但以下实施案例不构成对本发明的限制, 所有依据本发明的原理和技术手段采用的各种施用方法, 均属于本发明范围。在下列合成实施例中, 除非另有说明, 否则所用试剂均是从市场上直接购买所得, 所用溶剂使用前均经无水处理, 所述的常温是指 25℃。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明, 否则百分比和份数按重量计算。

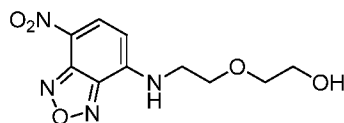
10

实施例 1. 化合物 IIA 的合成



15

中间体 A 的合成



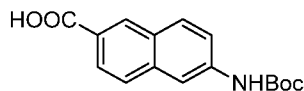
氩气保护下, 将 996 mg, 5 mmol 的 4-氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑(NBD-Cl)加入到 2.5 mL 的无水 DMF 中, 缓慢滴加 630 mg, 6 mmol 的 2-氨基乙醇的 2.5 mL 无水 DMF 溶液和 0.9 mL 的三乙胺, 常温搅拌过夜, 减压蒸除 DMF, 二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗涤, 有机层浓缩, 柱层析(石油醚: 乙酸乙酯 = 1: 2, v/v)得红色固体, 收率 35%。

20

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.46 (s, 1H), 8.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.47 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.61 (s, 1H), 3.72-3.66 (m, 4H), 3.49 (brs, 4H).

HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 267.0729, found 267.0506.

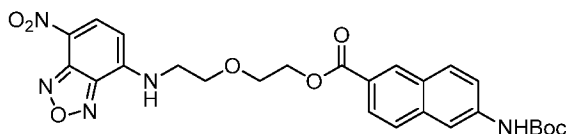
中间体 6-氨基甲酸叔丁酯-2-萘甲酸的合成



将 20 mmol 的 6-氨基-2-萘甲酸溶于 20 mL 叔丁醇和 20 mL 水的混合溶液中, 依次加入 24 mmol 的二碳酸二叔丁酯和 24 mmol 的氢氧化钠, 常温反应过夜。用 5% 盐酸溶液调节至 pH 2-3, 加入大量二氯甲烷萃取, 有机层干燥, 浓缩, 柱层析(石油醚: 乙酸乙酯 = 1: 1, v/v)得米色固体, 收率 75%。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.90 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.47 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 9.2$ Hz, 1H), 1.52 (s, 9H).

中间体 B 的合成



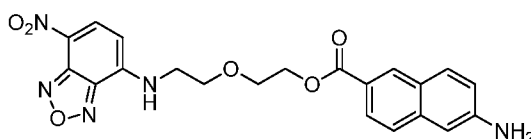
冰浴下将 5 mmol 的 6-氨基甲酸叔丁酯-2-萘甲酸溶于 20 mL 无水二氯甲烷中, 滴加 7.5 mmol 的二甲氨基吡啶(DMAP)和 6 mmol 中间体 A 的 20 mL 的无水二氯甲烷混合溶液, 搅拌半小时后再加入 10 mmol 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC), 2 小时后撤去冰浴, 常温反应过夜。加入大量二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗涤, 有机层干燥, 浓缩, 柱层析(石油醚: 乙酸乙酯 = 1: 2, v/v)得黄色固体, 收率 50%。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.77 (s, 1H), 9.43 (brs, 1H), 8.37 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.74 (s, 2H), 7.57 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.44-4.42 (m, 2H), 3.84-3.81 (m, 4H), 3.68 (brs, 2H), 1.53 (s, 9H).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 165.7, 152.7, 148.8, 139.7, 135.9, 130.0, 129.8, 127.8, 127.2, 124.9, 120.1, 112.7, 106.6, 79.6, 68.3, 63.7, 55.9, 28.1, 18.5.

HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 560.1757, found 560.1757.

中间体 C 的合成



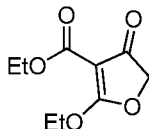
将 0.5 mmol 的中间体 B 溶于 4 mL 二氯甲烷中, 冰浴下滴加 1.5 mL 三氟乙酸, 常温反应过夜。用 10% 碳酸氢钠溶液调节至 pH 7-8, 加入大量二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗涤, 有机层干燥, 浓缩, 柱层析(二氯甲烷: 甲醇 = 50: 1, v/v)得橙红色固体, 收率 72%。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 9.49 (s, 1H), 8.41 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.66 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.98 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.86 (s, 2H), 4.40-4.38 (m, 2H), 3.82-3.80 (m, 4H), 3.68 (brs, 2H).

5 ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 166.5, 149.9, 145.8, 144.8, 144.4, 138.0, 130.9, 130.8, 125.3, 125.1, 121.6, 119.5, 105.5, 99.9, 68.9, 63.8, 56.5, 43.8, 19.0.

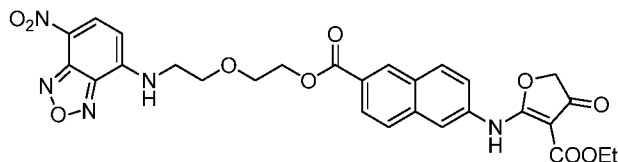
HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 436.1257, found 436.1263.

中间体 D 的合成



10 在 50 mL 烧瓶中加入 3 mmol 的钠氢(60%)约 240 mg 和 1.8 mL 的无水 THF, 冰浴下滴加 1.8 mL 含有 6 mmol 的丙二酸二乙酯的无水 THF 溶液, 10 分钟后滴加 3 mL 含有 3 mmol 的氯乙酰氯溶液, 维持冰浴一小时, 40-45 摄氏度反应 1-2 小时, 乙酸乙酯萃取, 食盐水洗涤 2 次, 有机层浓缩, 干燥, 柱层析(100%EA), 柱层析得白色粉末, GC-MS 验证无误。

15 化合物 IIA 的合成



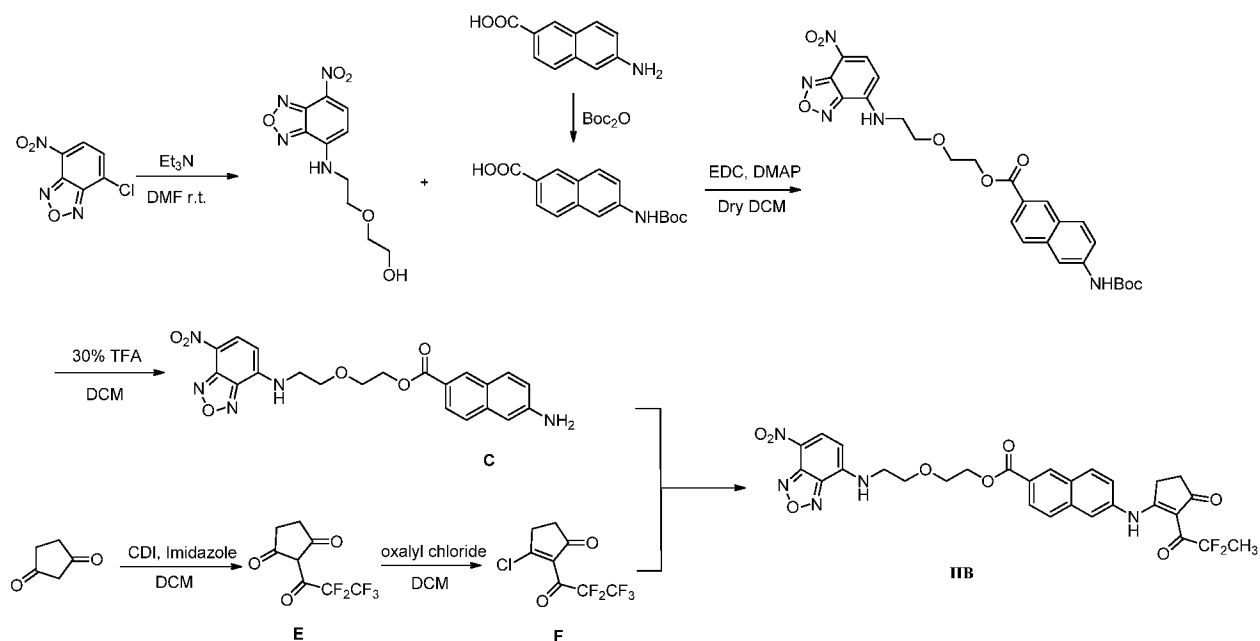
将 0.22 mmol 的中间体 D 溶于 5 mL 无水 THF 中, 加入 0.2 mmol 的中间体 C, 40 °C 下反应 96 小时。加入大量二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗涤, 有机层干燥, 浓缩, 柱层析分离纯化(二氯甲烷: 甲醇 = 60: 1, v/v)得橙黄色固体。

20 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 10.50 (s, 1H), 9.41 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.91-7.80 (m, 3H), 7.58 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 5.30 (s, 2H), 4.48-4.45 (m, 2H), 4.29 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.86-3.82 (m, 4H), 3.67 (brs, 2H), 1.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

25 ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 188.7, 177.3, 165.5, 163.9, 135.1, 130.3, 130.1, 128.0, 125.4, 123.0, 119.5, 99.4, 87.4, 75.4, 68.3, 68.2, 65.5, 63.9, 59.6, 56.0, 43.3, 18.4, 14.4, 14.3.

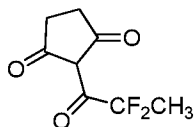
HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_{10}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 590.1523, found 590.1526.

实施例 2. 化合物 IIB 的合成



中间体 A-C 的合成如前所述

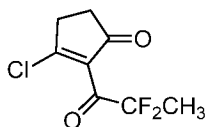
中间体 E 的合成



5

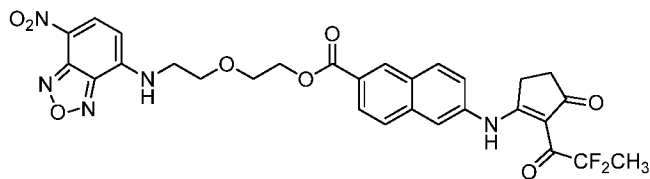
常温下将溶有 4 mmol 的 2,2-二氟丙酸中的 5 mL 无水二氯甲烷溶液滴加到溶有 324 mg 的 N,N-二羧基咪唑(2 mmol)的 5 mL 无水二氯甲烷溶液, 搅拌 30 min 后滴加溶有 68 mg 咪唑(1 mmol)和 98 mg 的 1,3-环戊二酮(1 mmol), 加毕, 反应 6 小时。5%盐酸溶液, 饱和食盐水依次洗涤, 有机层浓缩, 干燥, 浓缩得粗品, 黄色固体, GC-MS 验证无误。

10 中间体 F 的合成



常温下将 0.7 mL 草酰氯加入到 0.3 mmol 的中间体 E 中，常温反应 4 小时，常压蒸除余下的草酰氯，二氯甲烷萃取，饱和食盐水洗涤，有机层浓缩，干燥，快速柱层析(二氯甲烷：甲醇 = 100：1，v/v)得黄色油状液体，收率 55%，-35 °C 冰箱保存。

15 化合物 IIB 的合成



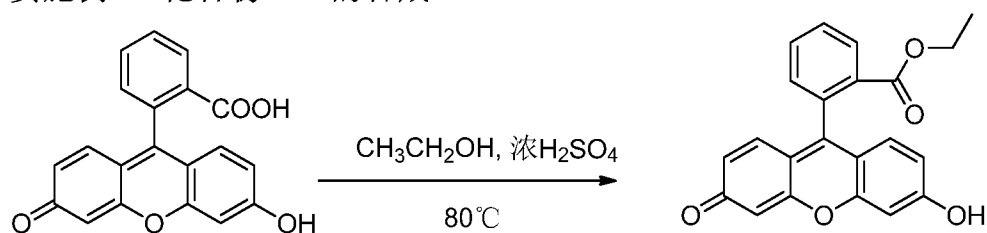
将 0.2 mmol 的中间体 C 溶于 5 mL 无水 THF 中，加入 0.2 mmol 的中间体 F，40 °C 下反应 96 小时。加入大量二氯甲烷萃取，饱和食盐水洗涤，有机层干燥，浓缩，柱层析分离纯化(二氯甲烷：甲醇 = 60：1，v/v)得橙黄色固体。

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.45 (s, 1H), 8.29 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.86 (q, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.48-4.46 (m, 2H), 4.39 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H), 3.86-3.81 (m, 4H), 3.67 (brs, 2H), 2.42-2.39 (m, 2H), 1.95 (t, $J = 18.8$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 197.2, 165.4, 137.5, 134.9, 130.5, 130.4, 130.0, 128.1, 127.1, 125.4, 124.3, 122.3, 117.9, 107.7, 68.2, 63.8, 55.9, 54.8, 47.7, 47.5, 47.3, 33.6, 25.9, 19.9, 18.5.

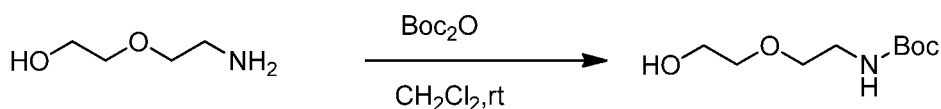
HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_8\text{F}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 608.1590, found 608.1593.

实施例 3. 化合物 IIC 的合成



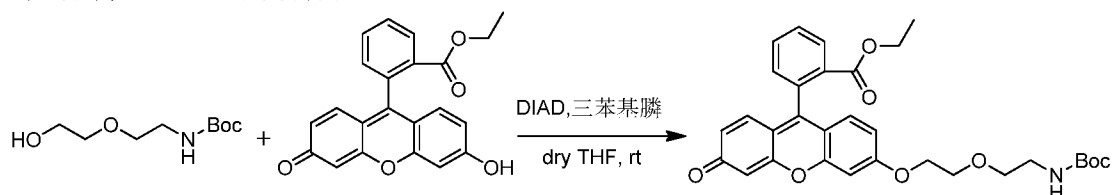
称取荧光素 (1.66 g, 5mmol) 置于 50mL 的圆底烧瓶中加入 20mL 的无水乙醇, 再加入 3ml 浓硫酸后于 80℃ 下加热搅拌 5h. TLC 跟踪至原料反应完全, 旋干, 用 DCM 和饱和碳酸氢钠溶液萃取, 取有机相旋干, 干燥, (DCM/MeOH=50:3 v/v) 柱层析分离, 得橙红色固体 1.58 g, 产率为 87.78%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.26 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.748- 7.659 (m, 2H), 7.44 (s, 1H), 7.31 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.89 (s, 2H), 6.82 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.99 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 0.91 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

连接臂 ZC-Z-1 的合成



称取二甘醇胺(1.26g, 12mmol)置于 25mL 的圆底烧瓶中, 在冰浴下搅拌, 滴加 Boc_2O 的二氯甲烷溶液, 滴毕常温下搅拌 10h, 点板有新点产生原料基本反应完, 1c-ms 为目标产物, 将反应液用 CH_2Cl_2 /水萃取 5 遍, 取有机相, 干燥, 旋干, 不进一步纯化。得无色油状液体 912.8mg, 产率为 37.1%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.12 (s, 1H), 3.74 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 3.59-3.54 (m, 4H), 3.34 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 2.68 (s, 1H), 1.45 (s, 9H).

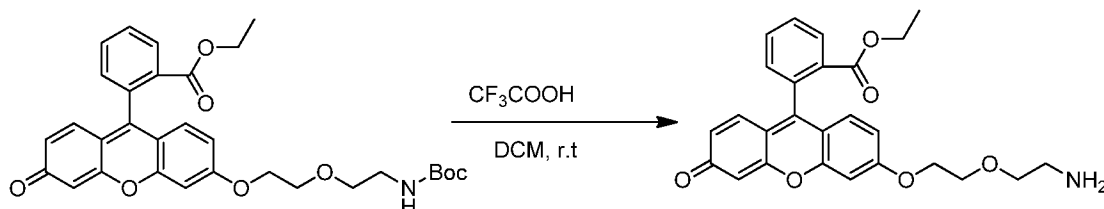
化合物 ZC-B-3 的合成



称取化合物 ZC-B-2 (360mg, 1mmol), DIAD (0.606mL, 3mL), 三苯基膦 (790mg, 3mmol) 溶于无水 THF 中置于 25mL 的圆底烧瓶中, 在氩气保护和避光下搅拌 1h, 再缓

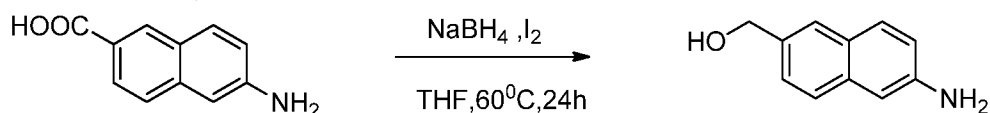
慢滴加化合物 ZC-Z-1 (400.5mg, 2mmol) 的 THF 溶液, 滴毕, 继续搅拌 10h, 点板原料反应了大半, 直接旋干, 柱层析 (EA:PE=1:1 v/v) 得黄色固体 420.5mg, 产率为 76.8%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.76-7.67 (m, 2H), 7.31 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 6.930-6.873 (m, 2H), 6.79 (d, *J*₁ = 8.8 Hz, *J*₂ = 2.2 Hz, 1H), 6.56 (dd, *J*₁ = 9.7 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.23 (t, *J* = 4.4 Hz, 2H), 4.06-3.99 (m, 2H), 3.87 (t, *J* = 4.2 Hz, 2H), 3.63 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.36 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 1.44 (s, 9H), 0.96 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

化合物 ZC-B-4 的合成



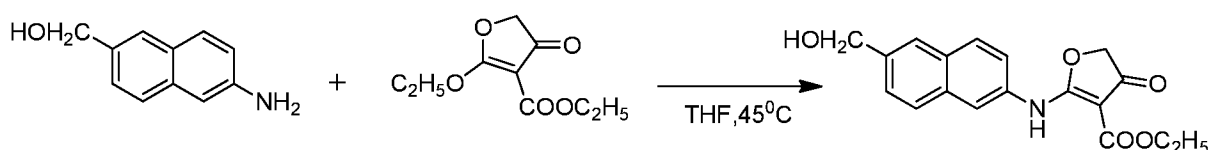
将化合物 ZC-A-3 (100mg, 0.15mmol) 溶于三氟乙酸的二氯甲烷溶液中 (三氟乙酸: 二氯甲烷=3:7 v/v), 室温下搅拌反应 5h, 旋干溶剂, 饱和碳酸氢钠和二氯甲烷萃取, 取有机相干燥, 旋干得到黄色固体 67mg, 不做进一步纯化用于下一步反应。LC-MS (ESI) calcd for C₂₆H₂₅NO₆[M+H]⁺: 448.17, found 448.21.

化合物 ZC-Y-2 的合成



称硼氢化钠 (112 mg, 3 mmol) 于三口圆底烧瓶中加入 10 ml THF, 在冰浴下恒压滴加溶于 5 ml THF 的化合物 ZC-Z-1 (187 mg, 1 mmol) 溶液, 滴加完毕后至气泡不再产生后, 缓慢滴加溶于 5 ml THF 的碘 (304 mg, 1.2 mmol) 溶液, 滴加完毕后, 搅拌 30 分钟, 升温至 60°C, 反应 24 小时, TLC 跟踪至原料转化完全。在冰水浴中冷却, 滴加甲醇到溶液澄清, 旋去溶剂, 剩余物中加入 10 ml 的 20% 的 KOH 溶液, 在 50°C 下搅拌 2 小时, 用乙酸乙酯萃取, 取有机层, 无水硫酸钠干燥, 旋干, 产物经硅胶柱层析 (PE/EA=7/1, v/v) 分离, 得 158mg 白色固体, 产率为 91.3%。¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.61 – 7.59 (m, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz, 1H), 7.01-6.99 (m, 2H), 4.66 (s, 2H), 3.31 (s, 1H).

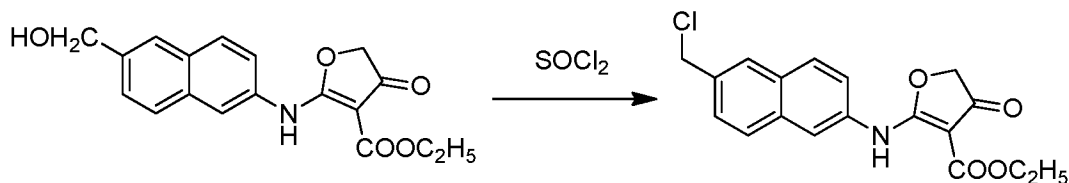
化合物 ZC-Y-3 的合成



称取化合物 ZC-Y-2 (207.6 mg, 1.2mmol) 和化合物 ZC-Z-2 (200 mg, 1 mmol) 置于 25 ml 的圆底烧瓶中加入 10 ml 的无水 THF, 在氩气保护下于 45°C 下搅拌 12 h, TLC 跟踪至原料反应完, 直接旋干柱层析 (DCM:MeOH=50:1 v/v), 得 178.5g 灰白色固体产率为 54.9%。

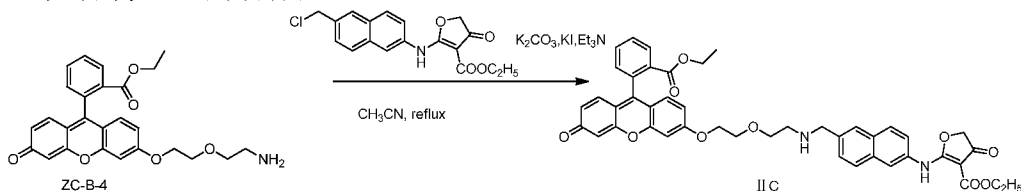
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.34 (s, 1H), 7.84-7.78 (m, 4H), 7.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.38 (dd, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.60 (s, 2H), 4.41 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.44 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.26 (s, 1H).

化合物 ZC-Y-4 的合成



取化合物 ZC-Y-3 (327 mg, 1 mmol) 置于 25 ml 圆底烧瓶中, 加入 5 ml 无水二氯甲烷, 在氩气保护冰浴下滴加 1 ml 二氯亚砷, 在冰浴下搅拌 5 min 后溶液有无色变墨绿, TLC 跟踪至原料反应完, 旋干, 用二氯甲烷和饱和碳酸氢钠溶液萃取, 取有机相干燥, 旋干, 柱层析 (DCM:MeOH=100:1 v/v), 得 235.6 mg 灰色固体, 产率为 68.4%。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.49 (s, 1H), 7.88 – 7.80 (m, 4H), 7.55 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.47 (dd, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H), 4.75 (s, 4H), 4.41 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.42 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

化合物 IIC 的合成



称取化合物 ZC-B-4 (894 mg, 2 mmol), 化合物 ZC-Y-4 (345 mg, 1 mmol), 碳酸钾 (690 mg, 5 mmol), 碘化钾 (166 mg, 1 mmol) 置于 50 ml 的圆底烧瓶中加入 20 ml 无水乙腈, 再加入三乙胺 (101 mg, 1 mmol) 在氩气保护下回流搅拌反应, TLC 跟踪至原料反应完。旋干, 用二氯甲烷和水萃取, 取有机相干燥, 旋干柱层析 (DCM:MeOH=50:1 v/v), 得 112.7 mg 黄色固体产率为 14.9%。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.32 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.90 – 7.73 (m, 6H), 7.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.92 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 5.37 (s, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.47 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.30 (s, 2H), 4.08 (d, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.95 (s, 2H), 3.83 (s, 2H), 3.01 (s, 2H), 1.48 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.32 (s, 1H), 1.03 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 188.4, 185.7, 177.7, 165.65, 165.31, 163.20, 158.87, 154.10, 150.23, 137.04, 134.19, 132.79, 132.53, 132.26, 131.23, 130.74, 130.37, 130.31, 129.89, 129.67, 129.35, 128.97, 128.01, 127.97, 126.76, 120.59, 118.48, 117.73, 115.08, 113.65, 105.74, 100.99, 87.89, 75.60, 70.40, 69.17, 68.15, 61.35, 60.70, 53.55, 48.45, 29.69, 14.55, 13.61. HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{10}[\text{M}+\text{H}]^+ = 757.2761$, found 757.2759.

实施例 4. 本发明化合物对细胞株的抑制活性

本发明提供的化合物对两种恶性疟原虫细胞株(3D7和Dd2)的体外活性的抑制效果:

氯喹购于 Sigma 公司, SYBR Green I 购于 Life technologies 公司, 氯喹敏感的 3D7 细胞株和氯喹抗性的 Dd2 细胞株用于体外测试抗疟活性, 通过 Trager and Jensen 的培养方法(Human malaria parasites in continuous culture. Science. 1976, 193 (4254): 673-675)在含有 0.5%Albumax II 非人血清的介质中培养。以 SYBR Green I 为探针, 通过荧光滴定方法测定抗疟原虫细胞株活性。首先, 不同时期的寄生虫一式三份, 在 2%的血红细胞和在 100 μ L 的 1%的寄生虫血症与一系列的药物存在或不存在条件下培养, 稀释时每个化合物浓度 0.15625 变化到 20 μ M。0.2% DMSO 作为反向对照, 不同浓度的氯喹作为正向对照。培养皿在 37 $^{\circ}$ C 下培养 3 天, 然后取出上清液, 并加入 100 μ L of SYBR Green I 的细胞缓冲液(8.26 g/L NH_4Cl , 1 g/L KHCO_3 , 0.037 g/L EDTA 和 5 $\times$ SYBR Green I)。培养皿在暗室中常温继续培养 1 小时, 通过 Synergy MX, Biotek 荧光检测器在 485/520 nm 下读数, 重复 2 次本实验。数据分析是根据 Michael 等报道的方法进行改进获得。简述如下, 阴性对照处理组获得的荧光数据减去未感染红细胞组所产生的背景荧光数据, 代表本次实验中正常培养的恶性疟原虫中的 DNA 最大量, 记为阴性对照孔的荧光数据, 各测试组及阳性对照组的荧光数据均如此校正。不同浓度下抑制率的计算由下式所得: 抑制率(%)= (1-(测试孔中平均荧光计数/阴性对照孔中平均荧光计数)) $\times$ 100%。通过软件 Origin 8.0 中的 Growth/Sigmoidal 程序拟合曲线并计算获得半数抑制率(IC₅₀ values), 通过 Microsoft Excel 计算平均值和标准差。

实施例 4 的结果如下表:

化合物	IC ₅₀ (μ M)	
	<i>Pf</i> 3D7	<i>Pf</i> Dd2
IIA	9.029 $\pm$ 1.067	9.690 $\pm$ 0.292
IIB	5.489 $\pm$ 0.623	6.581 $\pm$ 0.125
氯喹	0.011 $\pm$ 0.001	0.012 $\pm$ 0.004

实施例 5. 本发明化合物与靶蛋白的结合

将含有 *Pf*DHODH 基因的片段克隆到 PET-19b 载体中, 得到重组质粒, 转入大肠杆菌 BL21 中进行表达, 分别经过固定金属离子亲和色谱和凝胶过滤色谱纯化后, 得到较纯的蛋白, 将纯化好的 *Pf*DHODH 蛋白稀释到终浓度为 2 mg/mL, 分装成两管, 每管 500 μ L, 一管加 25 μ L 母液为 50 mM 的本发明化合物(IIA), 另一管加 25 μ L DMSO 作为对照, 冰上孵育 30 min, 用 PCR 管分装蛋白, 将加化合物和 DMSO 的蛋白分别分装 12 管, 每管 30 μ L, 用 PCR 仪在不同温度下(37 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C, 43 $^{\circ}$ C, 46 $^{\circ}$ C, 49 $^{\circ}$ C, 52 $^{\circ}$ C, 55 $^{\circ}$ C, 58 $^{\circ}$ C, 61 $^{\circ}$ C, 64 $^{\circ}$ C, 67 $^{\circ}$ C, 70 $^{\circ}$ C)分别加热 3min, 化合物和对照进行相同的处理, 加热完后, 4 $^{\circ}$ C 高速离心半小时, 分别取上清 2 μ L, 用 Buffer 稀释到 100 μ L, 制备蛋白样品进行 western blot, 最后用化学发光成像系统进行显影, 得到结果如图 1 所示。

由图 1 所知, 与只加 DMSO 的对照相比, 加入本发明化合物后, 对 *p**f*DHODH 蛋白

起一定的稳定作用。加 DMSO 的对照组, $T_m=53.77^{\circ}\text{C}$, 而加入本发明化合物的实验组, $T_m=56.94^{\circ}\text{C}$, 使 T_m 值增大了 3.2°C , 即, 本发明化合物对 PfDHODH 蛋白有结合, 并且在一定程度上能够对其起稳定作用。

5 鉴于 PfDHODH 蛋白蛋白质结构复杂, 构象处于不停变化中, 不同构象下的能垒不同, 稳定性亦不同; 本实施例证明, 加入本发明物(IIA)后, 其与蛋白质结合, 与之间未结合时相比, 蛋白质更稳定, 因此说明本发明化合物与靶蛋白的结合效果较好。

实施例 6. 本发明化合物与体外培养的受疟原虫感染红细胞的荧光成像

10 用 DMSO 溶解本发明化合物(IIA、IIC)至 50 mM。在 37°C 培养箱中培养一定量恶性疟原虫(湖州师范学院周洪昌老师惠赠), 平均分两皿, 标记为 A 和 B; 将 A、B 培养皿中的恶性疟原虫用 5%山梨醇间隔一天同步, 培养两天; 向 A 和 B 培养皿中加入本发明化合物至终浓度为 $10\mu\text{g/mL}$, 37°C 培养箱中培养 3.5 小时, 之后向 A、B 培养皿中加入荧光染料 MitoTracker® Red CMXROS (购自 Life Technologies)至终浓度为 500 nM, 放在 37°C 培养箱中培养 30 min; 将两个培养皿中感染恶性疟原虫的红细胞转移到 15 mL 离心管中, 在 1800 rpm, 3 min 条件下离心, 去掉上清, 用 PBS 洗三遍; 分别制作血涂片, 用共聚焦显微镜定位。MitoTracker® Red CMXROS: 激发波长为 579 nm, 发射波长为 599 nm; IIA: 激发波长为 480 nm, 发射波长为 530 nm。结果如图 2 所示。

15 由图 2 所见, 在严重感染的红细胞中, 血红蛋白变性, 降解成黑色沉淀物, 即疟色素, 这是肉眼区分正常红细胞和受感染红细胞的粗略方法。A-F 为不同视野内 IIA 在细胞内的定位效果, 在明显含有疟色素的红细胞中, 细胞呈现绿色荧光, 同时 Tracer 进行叠合发现, IIA 仅作用于细胞线粒体中, 明亮如小星。而在未感染疟原虫的红细胞中, 没有出现荧光信号, 说明本发明化合物具有良好的细胞水平靶向性。

实施例 7. 本发明化合物对伯氏疟原虫感染小鼠的血液的检测及荧光成像

25 昆明种小鼠(雄性, $20\pm 2\text{g}$, 购自上海杰思捷实验动物有限公司), 接种伯氏疟原虫(第二军医大学潘卫庆老师惠赠)200 μL ; 在光学显微镜下观察小鼠感染情况, 当感染率达到 20%时, 采用眼球取血的方法取血。加入本发明化合物(IIA)至终浓度为 $10\mu\text{g/mL}$, 荧光染料 MitoTracker® Red CMXROS 至终浓度为 500 nM; 在 37°C 条件下孵育 15 min; 在 1800 rpm, 3 min 条件下离心, 去掉上清, 用 PBS 洗三遍; 制作血涂片, 用共聚焦显微镜定位。

30 由图 3 所示, A-D 不同视野下可见不同生长周期的疟原虫。如图 3A 所示, 明场下红细胞内小圈即处于环状体阶段的疟原虫; 如图 3B 或 3C 所示, 明场下红细胞内带有黑色素大圈即晚期的大滋养体, 其中小点即小滋养体。不同生长周期的疟原虫虽然形态、体积不一, 但 IIA 都可对其进行选择性标记, 且荧光强度与疟原虫形态、体积成一定的正相关。大滋养体中荧光亮而大, 而小滋养体中荧光如小星。不仅如此, 正常红细胞完全不显荧光, 特异性强、背景信噪极低。

由图 4 和图 5 所示, IIC 也可对伯氏疟原虫和恶性疟原虫感染的细胞进行选择标记。

对比例

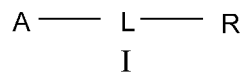
5 本发明人进一步合成了包含其它连接臂的多种化合物, 当利用这些化合物重复以上实施例 5-7 时, 发现这些化合物或无法结合 *Pf*DHODH, 或无法与体外培养的受疟原虫感染红细胞进行荧光成像, 或无法与疟原虫感染的小鼠血液进行荧光成像。

10 发明人认为, 由于本发明将色素基团经连接臂与二氢乳清酸脱氢酶特异性配体结合起来, 最终获得的化合物是否能够兼具与二氢乳清酸脱氢酶特异性结合以及产生荧光信号的功能是无法合理预知的; 换言之, 本发明化合物中色素基团、连接臂与二氢乳清酸脱氢酶特异性结合配体之间可能会互相影响, 从而不利地影响最终所得化合物与二氢乳清酸脱氢酶的结合特异性或者色素基团产生荧光的能力。

15 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 式 I 所示化合物:



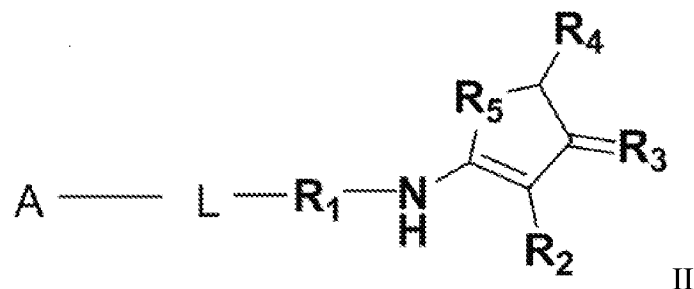
式中,

A 为色素基团;

L 为连接臂;

R 为二氢乳清酸脱氢酶特异性结合配体。

2. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 所述化合物如下式 II 所示:



式中,

R₁ 为未取代的或被选自下组的取代基取代的稠环基团: C1-C5 烷基、卤素、羧基、酯基、氨基;

R₂ 选自: C1-C6 烷基, C1-C6 不饱和烃基, C1-C6 烷基羰基, C1-C6 氟代烷基羰基, C1-C6 烷氧基, C1-C6 氟代烷氧基, 任选取代的苯甲酰基, 氨基羰基, C1-C6 烷氧基羰基, C1-C6 氨基羰基, 羟基, C1-C6 烷氧基、C1-C6 酯基;

R₃ 选自 O、NH 或 S;

R₄ 选自 H, C1-C6 烷基, 任选取代的 C2-C6 不饱和烃基, C1-C6 烷基羰基, 任选取代的苯甲酰基, 羧基, 氨基羰基, C1-C6 烷氧基羰基, C1-C6 氨基羰基, 羟基, C1-C6 烷氧基;

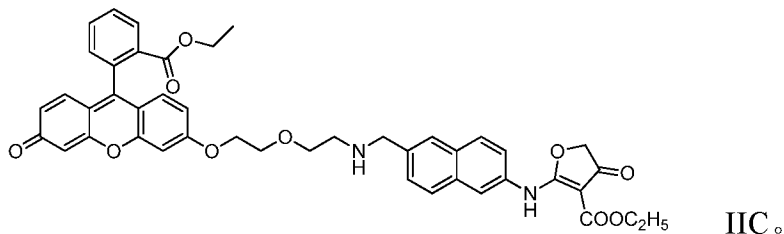
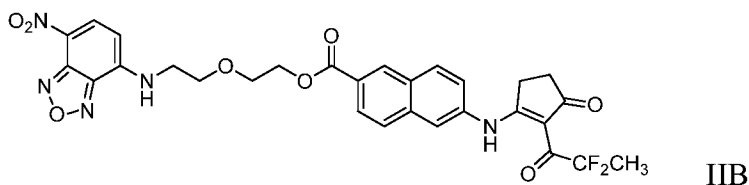
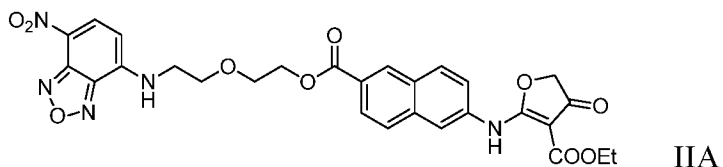
R₅ 选自 O, S, NH 和 CH₂。

3. 如权利要求 2 所述的化合物, 其特征在于, R₁ 为含 2-3 个苯环的稠环基团, 优选地, R₁ 为萘基。

4. 如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 所述色素选自 4-氯-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑 (NBD) 或荧光素。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的化合物, 其特征在于, L 为 (HNCH₂CH₂OCH₂CH₂OOC) 或 (OCH₂CH₂OCH₂CH₂NHCH₂)。

6. 如权利要求 5 所述的化合物, 其特征在于, 所述化合物如下式所示:



7. 一种二氢乳清酸脱氢酶介导的疾病的诊断试剂盒，所述试剂盒装有权利要求 1-6 中任一项所述的化合物。
8. 如权利要求 7 所述的诊断试剂盒，其特征在于，所述疾病是恶性疟疾。
9. 权利要求 1-6 中任一项所述的化合物在制备二氢乳清酸脱氢酶检测或定位试剂二氢乳清酸脱氢酶介导的疾病的诊断试剂中的用途。
10. 如权利要求 9 所述的用途，其特征在于，所述疾病是恶性疟疾。
11. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包含：
权利要求 1-6 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐，和
药学上可接受的载体或赋形剂。

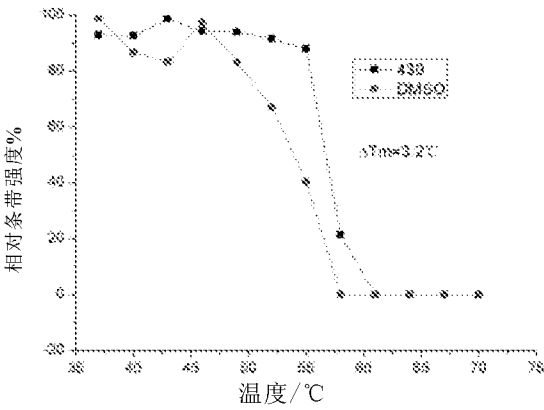
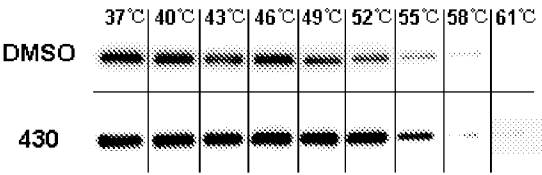


图 1

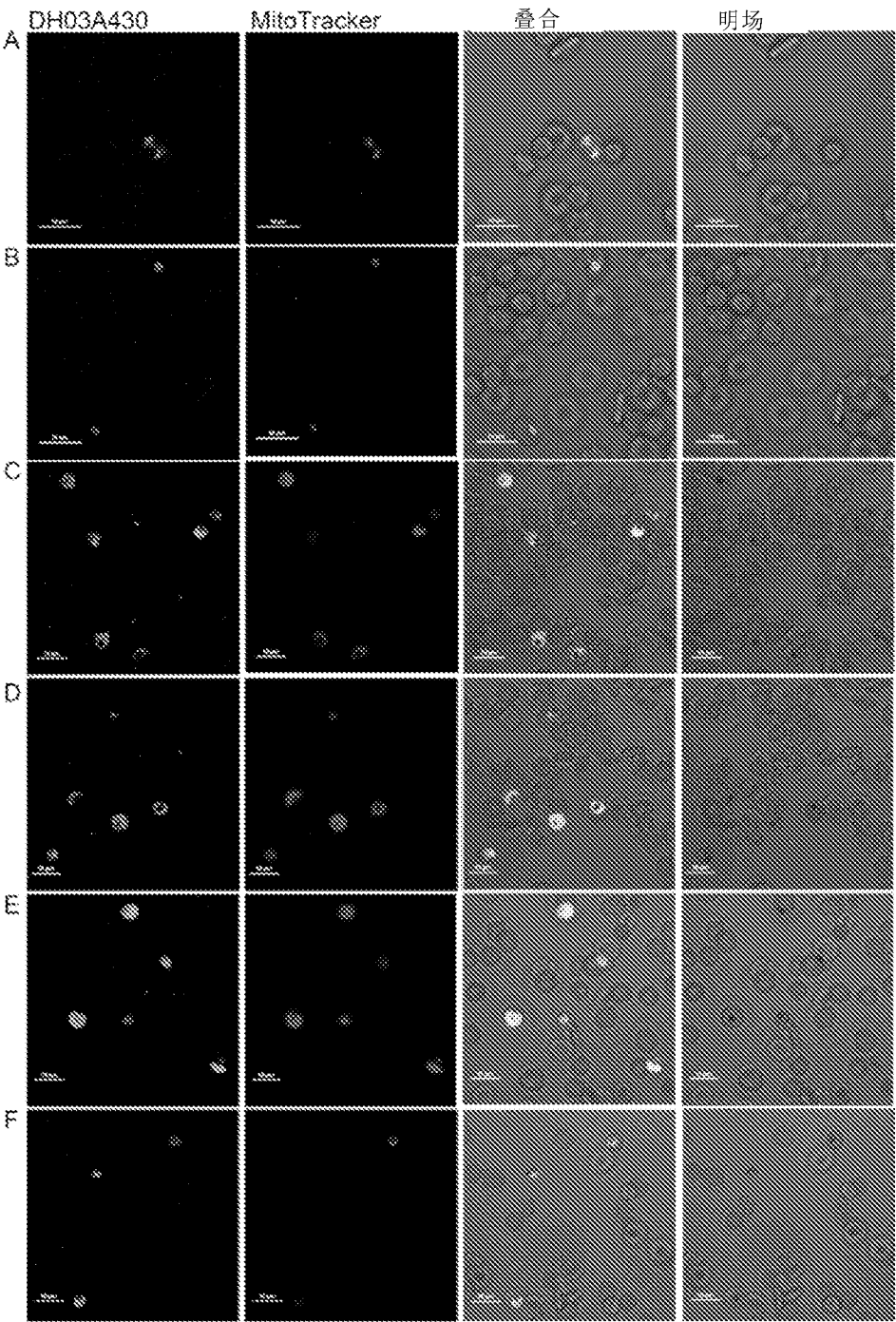


图 2

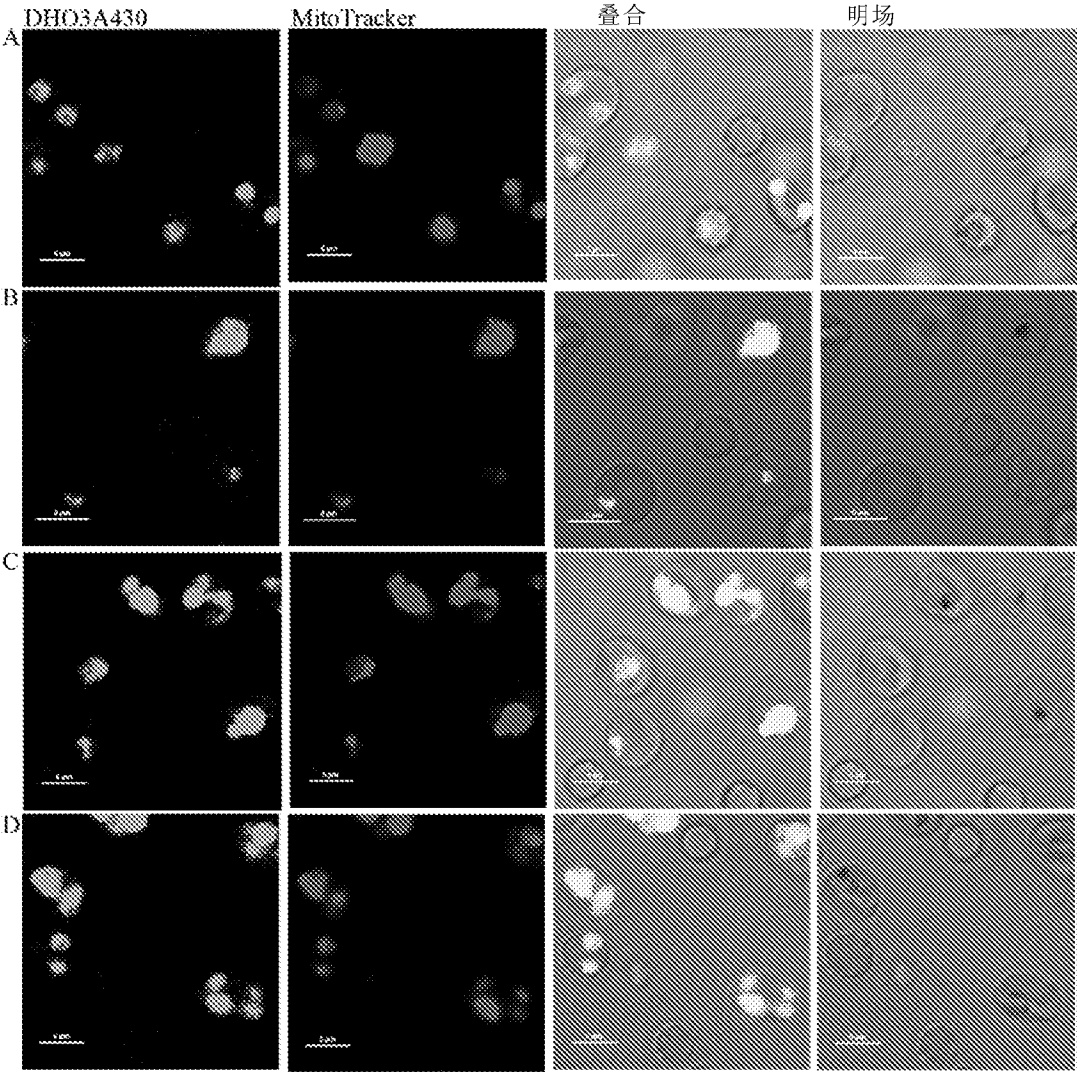


图 3

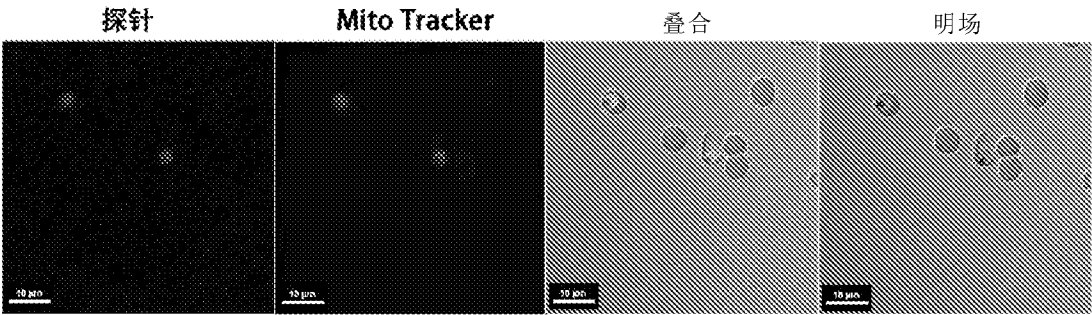


图 4

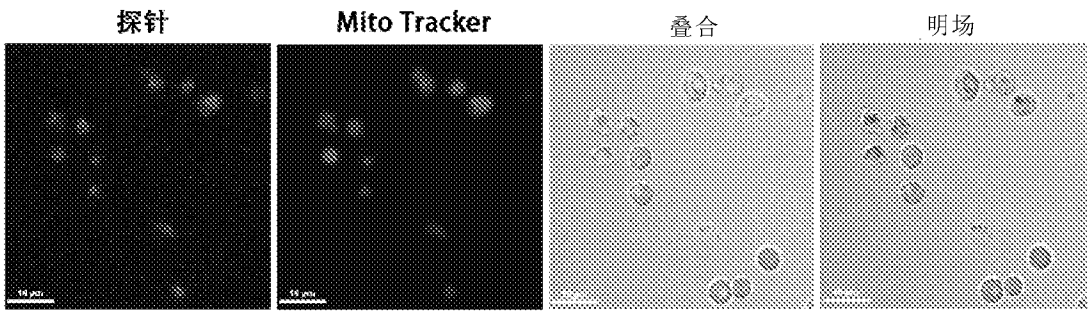


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/085367

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 413/12 (2006.01) i; C07D 271/12 (2006.01) i; A61K 31/4245 (2006.01) i; A61P 33/06 (2006.01) i; G01N 33/533 (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)

C07D 413/-; C07D 271/-; A61K 31/-; A61P 33/-; G01N 33/-

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, DWPI, SIPOABS, STN (Registry, CAplus): DHODH, Dihydroorotate Dehydrogenase, pigment, dye+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103127095 A (UNIV EAST CHINA SCI & TECHNOLOGY) 05 June 2013 (05.06.2013) claims 1-10	1-11
A	WO 2015031824 A1 (ICAHN SCHOOL MED MOUNT SINAI) 05 March 2015 (05.03.2015) the whole document	1-11

☐ 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 28 August 2016	Date of mailing of the international search report 09 September 2016
Name and mailing address of the ISA 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 DI, Yanxin Telephone No. (86-10) 62086311

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/085367

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103127095 A	05 June 2013	CN103842350A	04 June 2014
		CH 707498 B1	31 May 2016
		DE 112012004878 T8	23 October 2014
		WO 2013075596 A1	30 May 2013
		DE 112012004878 T5	14 August 2014
		CN 103842350 B	25 November 2015
WO 2015031824 A1	05 March 2015	US 2016200666 A1	14 July 2016
		WO 2015031824 A9	16 June 2016
		EP 3038612 A1	06 July 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/085367

A. 主题的分类

C07D 413/12(2006.01)i; C07D 271/12(2006.01)i; A61K 31/4245(2006.01)i; A61P 33/06(2006.01)i; G01N 33/533(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)

C07D 413/-, C07D 271/-, A61K 31/-, A61P 33/-, G01N 33/-

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, DWPI, SIPOABS, STN(Registry, CAplus): 二氢乳清酸脱氢酶, 色素, 染料, DHODH, Dihydroorotate Dehydrogenase, pigment, dye+

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
A	CN 103127095 A (华东理工大学) 2013年 6月 5日 (2013 - 06 - 05) 权利要求1-10	1-11
A	WO 2015031824 A1 (ICAHN SCHOOL MED MOUNT SINAI) 2015年 3月 5日 (2015 - 03 - 05) 全文	1-11

☐ 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

2016年 8月 28日

国际检索报告邮寄日期

2016年 9月 9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

狄延鑫

电话号码 (86-10) 62086311

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/085367

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	103127095	A	2013年 6月 5日	CN	103842350	A	2014年 6月 4日
				CH	707498	B1	2016年 5月 31日
				DE	112012004878	T8	2014年 10月 23日
				WO	2013075596	A1	2013年 5月 30日
				DE	112012004878	T5	2014年 8月 14日
				CN	103842350	B	2015年 11月 25日
WO	2015031824	A1	2015年 3月 5日	US	2016200666	A1	2016年 7月 14日
				WO	2015031824	A9	2016年 6月 16日
				EP	3038612	A1	2016年 7月 6日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)