

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：97108564

※ 申請日期：97.3.11

※IPC 分類：G07F 5702 (2006.01)

G01N 31/00

一、發明名稱：(中文/英文)

用於檢測次氯酸之試劑

REAGENTS FOR DETECTION OF HYPOCHLOROUS ACID

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 香港商港大科橋有限公司

VERSITECH LIMITED

2. 香港商晨興創投有限公司

MORNINGSIDE VENTURES LIMITED

代表人：(中文/英文)

1. 余梓山

YU, TSZ SHAN, HAILSON

2. 唐龍興

TANG, LONG SING, RAYMOND

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 香港薄扶林道香港大學財政部

FINANCE OFFICE, THE UNIVERSITY OF HONG KONG,

POKFULAM ROAD, HONG KONG

2. 香港銅鑼灣百德新街2-20號恆隆中心22樓

22/F, HANG LUNG CENTRE, 2-20 PATERSON STREET,

CAUSEWAY BAY, HONG KONG

國 籍：(中文/英文)

1. 香港 HONG KONG
2. 香港 HONG KONG

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 楊丹
YANG, DAN
2. 孫振寧
SUN, ZHEN-NING
3. 陳燕
CHEN, YAN
4. 劉芬勤
LIU, FENGQIN

國 籍：(中文/英文)

1. 中華人民共和國 P.R.C.
2. 中華人民共和國 P.R.C.
3. 中華人民共和國 P.R.C.
4. 中華人民共和國 P.R.C.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2007年03月12日；60/906,788

2.

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明提供可用作直接或間接量測、偵測或篩檢次氯酸或次氯酸根之試劑之次氯酸探針。本發明亦提供製造該等次氯酸探針之方法及將該等次氯酸探針用作細胞檢定劑之方法。

【先前技術】

次氯酸根 (OCl^-) 及其質子化形式次氯酸 (HOCl) 自從在 1787 年被首次發現以來已為吾人所熟知且極其成功地付諸商業用途 (例如增白劑及氧化劑)。在 1825 年，報導了次氯酸鈣在下水道、廁所、停屍處、醫院病房、船隻及監獄的公共衛生方面的使用。另外，自從十九世紀末吾人發現次氯酸鈉能有效對抗致病細菌以來，次氯酸鹽已被廣泛用作通用消毒劑達 150 多年之久。

在活有機體中，次氯酸根可在活體內由過氧化氫及氯離子以酶髓過氧化物酶 (MPO) 催化之化學反應合成，髓過氧化物酶可由發炎區域中之活性吞噬細胞分泌。作為親核性非自由基氧化劑，次氯酸鹽可用作殺微生物劑 (Thomas, E. L., *Infect. Immun.*, 1979, 23, 522-531)。此外，細菌及正常健康細胞均不會中和其毒性作用，因為細菌及正常健康細胞均缺乏其催化解毒所需要之酶 (Lapenna, D. and Cuccurullo, F., *Gen. Pharmacol.*, 1996, 27, 1145-1147)。

一般而言，次氯酸根可與一些蛋白質反應，其可在殺滅細菌細胞及 / 或人類疾病中起重要作用 (Thomas, E. L.,

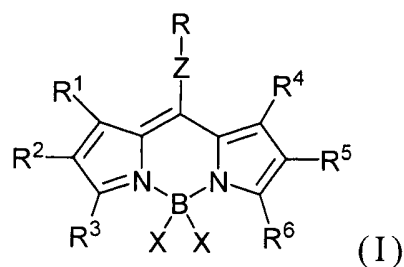
Infect. Immun., 1979, 23, 522-531 ; McKenna, S. M. 及 Davies, K. J. A., *Biochem. J.*, 1988, 254, 685-692 ; Hazell, L. J. 及 Stocker, R., *Biochem. J.*, 1993, 290, 165-172 ; Hazell, L. J., van den Berg, J. J. 及 Stocker, R., *Biochem. J.*, 1994, 302, 297-304)。當與蛋白質接觸時，次氯酸根可損害蛋白質。舉例而言，次氯酸根可改變蛋白質結構及/或使蛋白質斷裂及二聚化。作為強氧化劑，次氯酸根亦可快速氧化低密度脂蛋白質(LDL)。此外，次氯酸根與DNA之反應亦可導致DNA之化學修飾及結構改變(Hawkins, C. L. 及 Davies, M. J., *Chem. Res. Toxicol.*, 2002, 15, 83-92 ; Prutz, W. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1996, 332, 110-120 ; *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, 349, 183-191 ; *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, 371, 107-114)。

由於次氯酸根及其共軛酸(亦即次氯酸)之上述用途及作用，因而需要直接或間接偵測及量測次氯酸及次氯酸根(包括活體內偵測及量測)之方法。

【發明內容】

本發明提供可用作直接或間接量測、偵測或篩檢次氯酸或次氯酸根(亦即次氯酸之共軛鹼)之次氯酸探針之化合物。在一些實施例中，本文所揭示之次氯酸探針可選擇性地及特異性地偵測、量測或篩檢次氯酸。在其他實施例中，在其他反應性氧及/或氮物質(諸如 $^1\text{O}_2$ 、NO、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 ONOO^- 及烷基過氧化自由基(ROO^\cdot)存在下，本文所揭示之次氯酸探針可選擇性地與次氯酸反應。在某些實

施例中，以式(I)表示化合物或次氯酸探針：

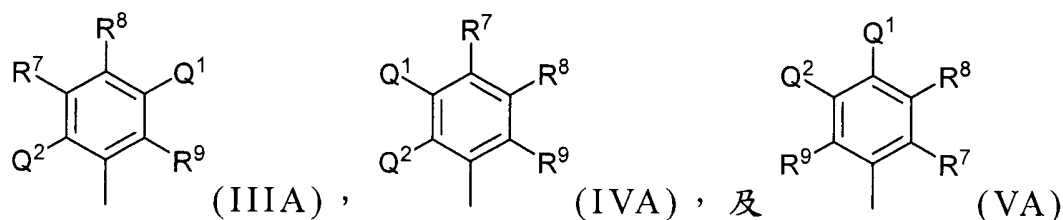


其中 X 為鹵基；

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 及 R^6 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、雜烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、磺醯基、膦醯基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-Y$ 或 $-C(=O)-Q-Y$ ，其中 Y 為氫、鹵基、烷氧基、羥基、硫基、烷基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、胺基甲酸酯、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、烷基硫基、雜烷基或具有 3 至 7 個環原子之雜環基；且 Q 為伸烷基、伸烯基、伸炔基、伸芳基、伸芳烷基或伸烷芳基，或 R^1 及 R^2 或 R^2 及 R^3 或 R^4 及 R^5 或 R^5 及 R^6 共同形成 5 員、6 員或 7 員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環；

Z 為一鍵或二價鍵聯基團；

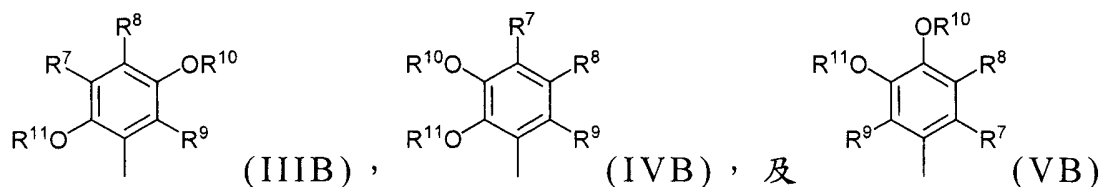
R 具有式 (IIIA)、(IVA) 及 (VA) 中之一者：



其中 R^7 、 R^8 及 R^9 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、醯基、胺基甲酸酯、醯胺基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基或雜烷基，或式 (IIIA)、(IVA) 或 (VA) 之 R^7 及 R^8 或式 (IVA) 之 R^8 及 R^9 共同形成 5 員、6 員或 7 員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環；且

Q^1 及 Q^2 各自獨立地為胺基或 $-O-Q^3$ ，其中 Q^3 為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羧基、鹵烷基或雜烷基，其限制條件為 Q^1 及 Q^2 不同時為胺基。

在一些實施例中，R 為具有式 (IIIB)、(IVB) 及 (VB) 中之一者之單價二氧化芳基：



其中 R^7 、 R^8 及 R^9 各自如上文所定義；且 R^{10} 及 R^{11} 各自獨立地為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環

炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羰基、鹵烷基或雜烷基。

在一些實施例中，X為F。在其他實施例中，Z為一鍵。在另外實施例中，Z為伸烷基、伸烯基、伸炔基、雜伸烷基、雜伸烯基、雜伸炔基、伸芳基或雜伸芳基。

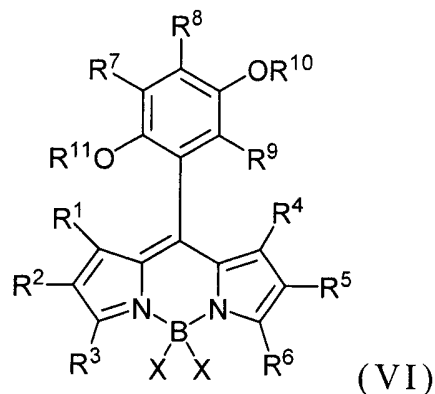
在某些實施例中， R^1 及 R^2 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。在其他實施例中， R^4 及 R^5 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。在另外實施例中， R^2 及 R^3 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。在另外實施例中， R^5 及 R^6 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。在另外實施例中， R^7 及 R^8 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。

在某些實施例中， R^3 及 R^6 各自獨立地為氫或 $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中 R^{12} 及 R^{13} 各自獨立地為氫、烷基或芳基。在另外實施例中，式(I)之 R^3 及 R^6 各自為 $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中 R^{12} 及 R^{13} 各自為烷基。在另外實施例中， R^3 及 R^6 各自為 $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$ 。

在一些實施例中，式(IIIB)-(VB)中任一者之 R^{10} 及 R^{11} 各自獨立地為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羰基、鹵烷基或雜烷基。在另外實施

例中， R^{10} 為甲基且 R^{11} 為氫。

在某些實施例中，式(VI)表示化合物或次氯酸探針：



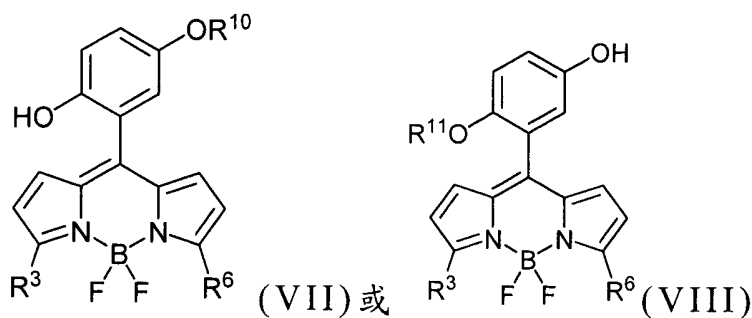
其中X為鹵基；

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 及 R^6 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、雜烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、磺醯基、膦醯基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-Y$ 或 $-C(=O)-Q-Y$ ，其中Y為氫、鹵基、烷氧基、羥基、硫基、烷基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、胺基甲酸酯、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、烷基硫基、雜烷基或具有3至7個環原子之雜環基；且Q為伸烷基、伸烯基、伸炔基、伸芳基、伸芳烷基或伸烷芳基，或 R^1 及 R^2 或 R^2 及 R^3 或 R^4 及 R^5 或 R^5 及 R^6 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環；

R^7 、 R^8 及 R^9 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、醯基、胺基甲酸酯、醯胺基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基或雜烷基，或 R^7 及 R^8 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環；且

R^{10} 及 R^{11} 各自獨立地為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羰基、鹵烷基或雜烷基。

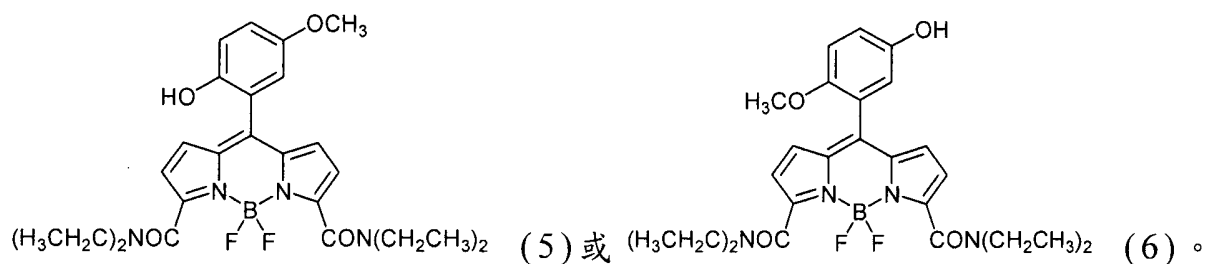
在其他實施例中，式(VII)或(VIII)表示化合物或次氯酸探針：



其中 R^{10} 為烷基； R^{11} 為烷基；且 R^3 及 R^6 各自獨立地為氫或 $-C(=O)-Y$ ，其中 Y 為氫、烷氧基、羥基、硫基、烷基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、烷基硫基或3員至7員雜環基

環。在一些實施例中， R^3 及 R^6 各自為 $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中 R^{12} 及 R^{13} 各自為烷基。

在其他實施例中，次氯酸探針為化合物(5)或(6)或其異構體：



本發明亦提供量測樣本中之次氯酸之組合物，其中該等組合物包含本文所揭示之次氯酸探針。在一些實施例中，該等組合物進一步包含溶劑、酸、鹼、緩衝溶液或其組合。

本發明亦提供量測樣本中之次氯酸之方法，其中該等方法包含下列步驟：

a)使本文所揭示之次氯酸探針與樣本接觸以形成螢光化合物；及

b)量測螢光化合物之螢光性質以測定樣本中次氯酸之量。

在一些實施例中，樣本為化學樣本或生物樣本。在其他實施例中，樣本為包含微生物或動物細胞或組織之生物樣本。

本發明亦提供偵測樣本中之次氯酸之高物料通過量篩檢螢光分析法，其中高物料通過量法包含下列步驟：

a)使本文所揭示之次氯酸探針與樣本接觸以形成一或多種螢光化合物；及

b)量測螢光化合物之螢光性質以測定樣本中次氯酸之量。

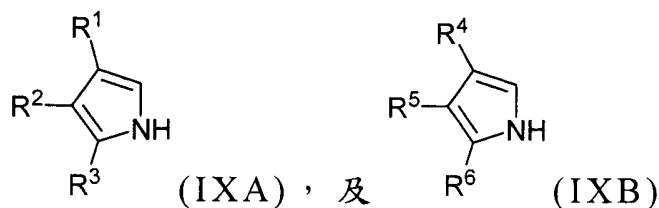
本發明亦提供篩檢一或多種可增加或減少次氯酸含量之目標化合物之高物料通過量法，其中高物料通過量法包含下列步驟：

a)使本文所揭示之次氯酸探針與目標化合物接觸以形成一或多種螢光化合物；及

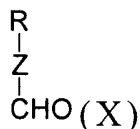
b)量測螢光化合物之螢光性質以定性或定量測定目標化合物。

本發明亦提供製備式(I)之化合物或次氯酸探針之方法，其包含下列步驟：

a)於酸觸媒存在下，使式(IXA)及(IXB)之吡咯

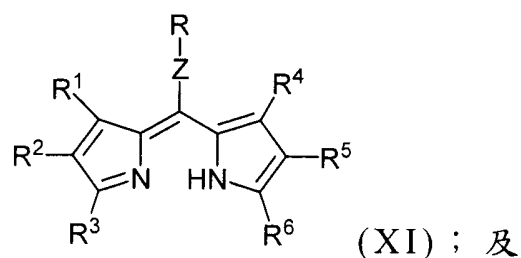


與式(X)之醛



反應；

b)將苯醌添加至反應混合物以形成式(XI)之二吡咯：



c)使式(XI)之二吡咯與醚合三鹵化硼及三乙胺反應，其中X、R、Z、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵及R⁶各自如上文所定義。

【實施方式】

定義

為便於理解本文所揭示之標的物，下面定義本文中所使用之許多術語、縮寫或其他簡寫。應理解，任一未經定義之術語、縮寫或簡寫具有與提交該申請案同時代之技術人員所使用之一般含意。

"胺基"係指可視情況經取代之第一胺、第二胺或第三胺。特定言之，包括作為雜環環之成員之第二胺或第三胺氮原子。特定言之，亦包括(例如)經醯基部分取代之第二胺基或第三胺基。胺基之一些非限制性實例包括-NR¹⁴R¹⁵，其中R¹⁴及R¹⁵各自獨立地為H、烷基、芳基、芳烷基、烷芳基、環烷基、醯基、雜烷基、雜芳基或雜環基。

"烷基"係指完全飽和的含有碳及氫之非環狀單價基團，且其可具有支鏈或為直鏈。在一些實施例中，烷基含有約1至約25個碳原子。烷基之實例為甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、第三丁基、正庚基、正己基、正辛基及

正癸基。"低碳烷基"係指具有一至六個碳原子之烷基，例如甲基、乙基、正丁基、異丁基、第三丁基、異戊基(isoamyl)、正戊基及異戊基(isopentyl)。

"雜烷基"係指烷基中一或多個碳原子經雜原子(諸如O、S及N)取代之烷基。在一些實施例中，雜烷基包含一或多個O原子。在其他實施例中，雜烷基包含一或多個S原子。在另外實施例中，雜烷基包含一或多個伸胺基(aminylene)。在某些實施例中，雜烷基包含兩個或兩個以上O、S、伸胺基或其組合。

"烯基"或"伸烯基"分別係指具有至少一個雙鍵之單價或二價烴基。烯基或伸烯基可為環狀、支鏈非環狀或直鏈非環狀基團。在一些實施例中，烯基或伸烯基僅含有一個雙鍵。在其他實施例中，烯基或伸烯基含有兩個或兩個以上雙鍵。在另外實施例中，烯基或伸烯基可為主鏈中含有兩個至八個碳原子之低碳烯基或伸烯基。在另外實施例中，烯基或伸烯基可具有一個雙鍵及至多25個碳原子，例如乙烯基、丙烯基、異丙烯基、丁烯基、異丁烯基、己烯基及其類似基團。

"炔基"或"伸炔基"分別係指具有至少一個參鍵之單價或二價烴基。在一些實施例中，炔基或伸炔基僅含有一個參鍵。在其他實施例中，炔基或伸炔基含有兩個或兩個以上參鍵。在另外實施例中，炔基或伸炔基可為主鏈中含有兩至八個碳原子之低碳炔基或伸炔基。在另外實施例中，炔基或伸炔基可具有一個參鍵及至多20個碳原子，例如乙炔

基、丙炔基、異丙炔基、丁炔基、異丁炔基、己炔基及其類似基團。

"芳族"或"芳族基"係指芳基或雜芳基。

"芳基"係指視情況經取代之碳環芳族基。在一些實施例中，芳基包括環部分中含有6至12個碳原子之單環或雙環基團，諸如苯基、聯苯基、萘基、經取代之苯基、經取代之聯苯基或經取代之萘基。在其他實施例中，芳基為苯基或經取代之苯基。

"芳烷基"係指經芳基取代之烷基。芳烷基之一些非限制性實例包括苯甲基及苯乙基。

"烷芳基"係指經烷基取代之芳基。烷芳基之一些非限制性實例包括甲基苯基及甲基萘基。

"醯基"係指式 $-C(=O)H$ 、 $-C(=O)-$ 烷基、 $-C(=O)-$ 芳基、 $-C(=O)-$ 芳烷基或 $-C(=O)-$ 烷芳基之單價基團。

"鹵素"或"鹵基"係指氟、氯、溴及碘。

"雜原子"係指不同於碳及氫之原子。

"雜環"或"雜環基"係指視情況經取代，完全飽和或不飽和，至少一個環中具有至少一個雜原子(諸如O、S、N、B及P)的單環或雙環芳族或非芳族基。芳族雜環基(亦即雜芳基)在環中可具有1或2個氧原子、1或2個硫原子及/或1至4個氮原子且可經碳或雜原子鍵結於分子之其餘部分。雜芳基之一些非限制性實例包括咪喃基、噻吩基、噻唑基、吡啶基、噁唑基、吡咯基、吲哚基、喹啉基或異喹啉基及其類似基團。

"烴"或"烴基"係指僅含有元素碳及氫之有機化合物或基團。烴基包括烷基、烯基、炔基及芳基部分。烴基亦包括經其他脂族、環狀或芳基烴基團取代之烷基、烯基、炔基及芳基部分，諸如烷芳基、烯芳基及炔芳基。在一些實施例中，"烴"或"烴基"包含1至30個碳原子。

"伸烴基"係指藉由自烴移除兩個氫原子所形成之二價基團，其自由價在雙鍵中不接合，例如伸芳基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、伸芳烷基或伸烷芳基。

本文用來描述化合物或化學部分之"經取代"係指該化合物或化學部分之至少一個氫原子經第二化學部分取代。取代基之非限制性實例為見於本文所揭示之例示性化合物及實施例中之基團，以及鹵素；烷基；雜烷基；烯基；炔基；芳基；雜芳基；羥基；烷氧基；胺基；硝基；硫醇；硫醚；亞胺；氰基；醯胺基；膦醯基；膦；羧基；硫羰基；磺醯基；磺醯胺；酮；醛；醚；側氧基；鹵烷基(例如三氟甲基)；可為單環或稠合或非稠合多環之碳環烷基(例如環丙基、環丁基、環戊基或環己基)或可為單環或稠合或非稠合多環之雜環烷基(例如吡咯啶基、哌啶基、哌嗪基、嗎啉基或噻嗪基)；碳環或雜環、單環或稠合或非稠合多環芳基(例如苯基、萘基、吡咯基、吲哚基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、噁唑基、異噁唑基、噻唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、吡啶基、喹啉基、異喹啉基、吡啶基、吡嗪基、噻嗪基、嘧啶基、苯并咪唑基、苯并噻吩基或苯并呋喃基)；胺基(第一、第二或第三)；鄰低碳烷

基；鄰芳基、芳基；芳基-低碳烷基； $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ； $-\text{CONH}_2$ ； $-\text{OCH}_2\text{CONH}_2$ ； $-\text{NH}_2$ ； $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ； $-\text{OCHF}_2$ ； $-\text{CF}_3$ ； $-\text{OCF}_3$ ； $-\text{NH}(\text{烷基})$ ； $-\text{N}(\text{烷基})_2$ ； $-\text{NH}(\text{芳基})$ ； $-\text{N}(\text{烷基})(\text{芳基})$ ； $-\text{N}(\text{芳基})_2$ ； $-\text{CHO}$ ； $-\text{CO}(\text{烷基})$ ； $-\text{CO}(\text{芳基})$ ； $-\text{CO}_2(\text{烷基})$ ；及 $-\text{CO}_2(\text{芳基})$ ；且該等部分亦可視情況經稠環結構或橋取代，例如 $-\text{OCH}_2\text{O}-$ 。該等取代基可視情況進一步經選自該等基團之取代基取代。除非另外指明，否則本文所揭示之所有化學基團可經取代。舉例而言，本文所描述之"經取代之"烷基、烯基、炔基、芳基、烴基或雜環部分為經烴基部分、經取代之烴基部分、雜原子或雜環取代之部分。另外，取代基可包括碳原子經雜原子(諸如氮、氧、矽、磷、硼、硫或鹵素原子)取代之部分。該等取代基可包括鹵素、雜環、烷氧基、烯氧基、炔氧基、芳氧基、羥基、經保護之羥基、酮基、醯基、醯氧基、硝基、胺基、醯胺基、氰基、硫醇、縮酮、縮醛、酯及醚。

"螢光團"係指引起分子發射螢光之分子的一部分。一般而言，其為可吸收特定波長之輻射及並再發射不同特定波長之輻射之官能基。所發射之輻射強度及波長一般取決於螢光團及螢光團之化學環境。

"醌"係指同一個六員環中具有兩個羰基之芳族化合物。醌之一些非限制性實例包括1,4-苯醌、1,2-苯醌、1,4-萘醌、蒽醌、菲醌及其類似物。

"電子受體"係指接受來自另一化合物(一般為電子供體)所傳遞至少一個電子之化合物。

"電子供體"係指向另一化合物(一般為電子受體)供予至少一個電子之化合物。

"次氯酸探針"係指可與次氯酸反應以形成螢光化合物之化合物。在一些實施例中,本文所揭示之次氯酸探針實質上並不與反應性氧物質及反應性氮物質反應。在其他實施例中,本文所揭示之次氯酸探針實質上可與反應性氧物質及反應性氮物質反應。

"反應性氧物質"或ROS係指含氧離子、自由基以及非自由基物質。反應性氧物質之一些非限制性實例包括 $^1\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 ROO^{\cdot} 、 $\cdot\text{OH}$ 、 OCl^- 及 H_2O_2 。

"反應性氮物質"或RNS係指含氮離子、自由基以及非自由基物質。反應性氮物質之一些非限制性實例包括氧化氮(NO^{\cdot})、二氧化氮(NO_2^{\cdot})、亞硝酸根(NO_2^-)及過氧基亞硝酸根(ONOO^{\cdot})。

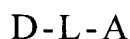
"反應"、"添加"或其類似表述指使一種反應物、試劑、溶劑、觸媒、反應性基團或其類似物與另一種反應物、試劑、溶劑、觸媒、反應性基團或其類似物接觸。可個別、同時或分別添加且可以任何次序添加反應物、試劑、溶劑、觸媒、反應性基團或其類似物。該等物質可在加熱或不加熱下添加,且可視情況於惰性蒙氣下添加。在一些實施例中,"反應"指同一分子中之反應性基團進行原位形成反應或分子內反應。

"實質上反應"係指使反應之至少一種反應物消耗掉超過約75莫耳%、超過約80莫耳%、超過約85莫耳%或超過約

90莫耳%之量。在一些實施例中，"實質上反應"係指使反應物消耗掉超過約95莫耳%。在其他實施例中，"實質上反應"係指使反應物消耗掉超過約97莫耳%。在另外實施例中，"實質上反應"係指使反應物消耗掉超過約99莫耳%。

"高物料通過量法"指一種可自主處理或評估大量樣本之方法。在一些實施例中，可使用及採行資訊系統進行高物料通過量法。資訊系統可提供高物料通過量法中所使用物理設備之軟體控制，以及組織及儲存高物料通過量法中所產生之電子資料。

本發明提供可用作特異性及/或選擇性偵測、量測及/或篩檢次氯酸之次氯酸探針之化合物。一般可以下式表示化合物或次氯酸探針：



其中D為電子供體；A為電子受體；且L為一鍵或二價鍵聯基團。

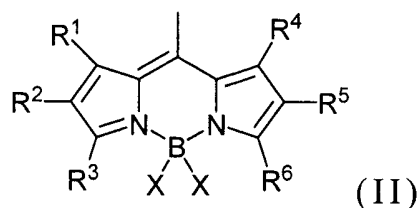
在一些實施例中，L為一鍵。在其他實施例中，L為二價鍵聯基團，諸如O、S、伸胺基(例如-NR-基團，其中R為氫、烷基、烯基、炔基、羧基、醯基、芳基或雜環基)、磺醯基、有機鍵聯基團或其組合。本文所揭示之有機鍵聯基團可為將分子之兩個片段(例如D及A基團)連接在一起之二價有機鍵聯基團。二價有機鍵聯基團之一些非限制性實例包括羰基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、伸芳基、伸芳烷基、伸烷芳基、雜伸烷基、雜伸芳基及其組合。二價有機鍵聯基團之另一非限制性實例包括 $-(\text{CH}_2)_m-$ 基團，其中m

為1與20之間(包括1及20)的整數，且一或多個亞甲基視情況經下列各者取代：O、S、N、C、B、Si、P、C=O、O=S=O、雜伸環基、伸芳基、NR_a基團、CR_b基團、CR_cR_d基團、SiR_eR_f基團、BR_g基團或P(=O)R_h基團，其中R_a、R_b、R_c、R_d、R_e、R_f、R_g及R_h各自獨立地為一鍵、氫、羥基、硫基、羧基、胺基、鹵基、醯基、烷氧基、烷基硫烷基、烯基(諸如乙烯基、烯丙基及2-苯基乙烯基)、炔基、雜環基、芳基、環基團之一部分(諸如環烷基、雜環基及苯并)或烷基(其中烷基之一或多個氫視情況經芳基、羥基、硫基、羧基、胺基或鹵基取代)。

在一些實施例中，電子供體D為螢光團基團。合適之螢光團基團之一些非限制性實例包括藉由自經取代或未經取代之下列物質移除一個氫所得之硼二吡咯亞甲基或單價基團：螢光素(fluorescein)、吡啶、磺醯基若丹明(sulforhodamines)、吡啶橙、吡啶黃、金胺O、優黃質(euxanthin)、蟲螢光素(luciferin)、苯并蔥酮、9,10-雙(苯基乙炔基)蔥、5,12-雙(苯基乙炔基)稠四苯、鈣黃綠素、羧基螢光素、1-氯-9,10-雙(苯基乙炔基)蔥、香豆素(諸如7-羥基香豆素)、花青素、4',6-二甲脒基-2-苯基吡啶、溴化乙錠、芘、藻膽素、藻紅素、藻膽紅素、若丹明(Rhodamine)、紅螢烯(rubrene)、芪、德克薩斯紅(Texas Red)、綠螢光蛋白質、黃螢光蛋白質或其衍生物。

在某些實施例中，式D-L-A可表示本文所揭示之螢光化合物，其中A為電子受體；L為一鍵或鍵聯基團；且D為具

有式(II)之硼二吡咯亞甲基：

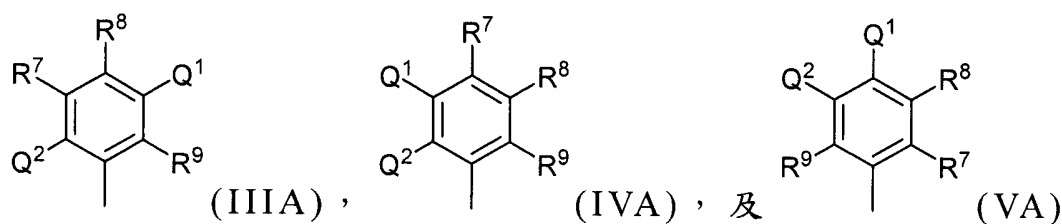


其中X為鹵基；且

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 及 R^6 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、雜烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、磺醯基、膦醯基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-Y$ 或 $-C(=O)-Q-Y$ ，其中Y為氫、鹵基、烷氧基、羥基、硫基、烷基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、胺基甲酸酯、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、烷基硫基、雜烷基或具有3至7個環原子之雜環基；且Q為伸烷基、伸烯基、伸炔基、伸芳基、伸芳烷基或伸烷芳基，或 R^1 及 R^2 或 R^2 及 R^3 或 R^4 及 R^5 或 R^5 及 R^6 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。在一些實施例中，式(II)之 R^3 及 R^6 各自獨立地為氫或 $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中 R^{12} 及 R^{13} 各自獨立地為氫、烷基或芳基。在另外實施例中，式(II)之 R^3 及 R^6 各自為 $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中 R^{12} 及 R^{13} 各自為烷基。在另外實施

例中， R^3 及 R^6 各自為 $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$ 。

在其他實施例中，A為單價二氧化芳基，其可與次氯酸反應以形成醌，諸如1,4-苯醌、1,2-苯醌、1,4-萘醌、蔥醌、菲醌及其類似物。在另外實施例中，A具有式(IIIA)、(IVA)及(VA)中之一者：

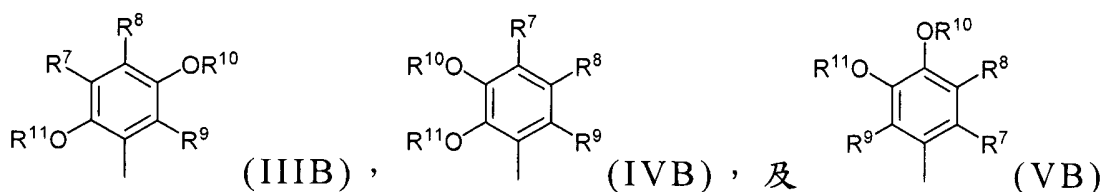


其中 R^7 、 R^8 及 R^9 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、醯基、胺基甲酸酯、醯胺基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基或雜烷基，或式(IIIA)、(IVA)或(VA)之 R^7 及 R^8 或式(IVA)之 R^8 及 R^9 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環；且

Q^1 及 Q^2 各自為推電子基。在一些實施例中， Q^1 及 Q^2 各自獨立地為胺基或 $-O-Q^3$ ，其中 Q^3 為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羰基、鹵烷基或雜烷基，其限制條件為 Q^1 及 Q^2 不同時為胺基。在另外實施例中， Q^1 及 Q^2 各自為 $-O-Q^3$ 。在另外實施例中， Q^1 為 $-O-Q^3$ 且 Q^2 為胺基。在另外實施例中， Q^1 為胺基且 Q^2

為 $-O-Q^3$ 。

在某些實施例中，R 為具有式 (IIIB)、(IVB) 及 (VB) 中之一者之單價二氧化芳基：



其中 R^7 、 R^8 及 R^9 各自如本文所定義；且 R^{10} 及 R^{11} 各自獨立地為氫或推電子基。在一些實施例中， R^{10} 及 R^{11} 各自獨立地為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羰基、鹵烷基或雜烷基。

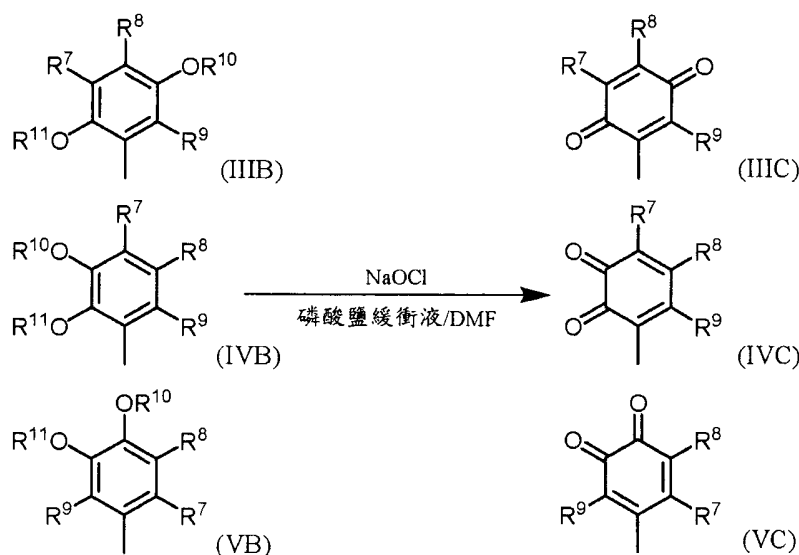
在一些實施例中，式 (IIIA)、(IVA)、(VA)、(IIIB)、(IVB) 或 (VB) 之 R^7 及 R^8 共同形成環。在其他實施例中， R^7 及 R^8 共同形成 5 員、6 員或 7 員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。在另外實施例中， R^7 及 R^8 共同形成苯并環、萘環、蔥環、吡啶并環、喹啉并環、嘧啶并環、吡嗪并環、三嗪并環、四嗪并環、吡唑并環、三唑并環或吡咯并環。在某些實施例中， R^7 及 R^8 共同形成苯并環。

在某些實施例中，式 (IVA) 或 (IVB) 之 R^8 及 R^9 共同形成環。在一些實施例中， R^8 及 R^9 共同形成 5 員、6 員或 7 員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。在其他實施例中， R^8 及 R^9 共同形成苯并環、萘環、蔥環、吡啶

并環、噁嗪并環、嘓啖并環、吡嗪并環、三嗪并環、四嗪并環、吡唑并環、三唑并環或吡咯并環。在另外實施例中， R^8 及 R^9 共同形成苯并環。

式(IIIB)、(IVB)或(VB)之單價二氧化芳基可與次氯酸反應以分別形成醌(IIIC)、(IVC)或(VC)，如下文流程(A)所示。

流程(A)



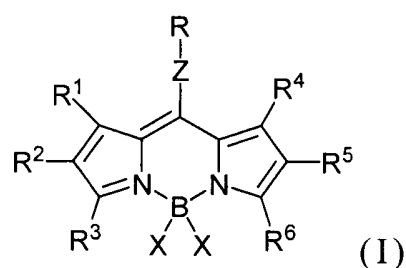
在一些實施例中， R^{10} 為經保護或未經保護之羥基且 R^{11} 為烷氧基(諸如甲氧基)。在其他實施例中， R^{11} 為經保護或未經保護之羥基且 R^{10} 為烷氧基(諸如甲氧基)。在另外實施例中，流程(A)中之式(IIIB)、(IVB)或(VB)之二氧化芳基可於室溫下在約7.4至約8.2之pH值範圍中經次氯酸氧化而分別形成醌(IIIC)、(IVC)或(VC)。

在其他實施例中，A為經1,4-雙取代或1,2-雙取代之伸芳基或雜伸芳基，其中取代基獨立地為烷氧基或經保護或未

經保護之羥基。在另外實施例中，伸芳基為伸苯基。

另外，本文所揭示之化合物或次氯酸探針包含硼二吡咯亞甲基(BODIPY)類型之螢光團。在一些實施例中，通式(I)、(VI)、(VII)及(VIII)所表示之化合物或次氯酸探針實質上不發螢光。在其他實施例中，通式(I)、(VI)、(VII)及(VIII)所表示之化合物或次氯酸探針可在生理條件下與次氯酸有效地反應而產生強螢光信號。在另外實施例中，可藉由量測經氧化之次氯酸探針之螢光信號來以極高特異性及選擇性測定次氯酸之量。

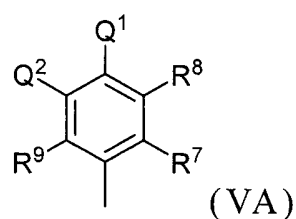
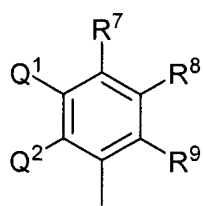
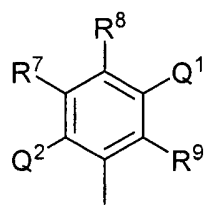
在一些實施例中，式(I)表示本文所揭示之化合物或次氯酸探針：



其中X、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵及R⁶係如本文所定義；

Z為一鍵或二價鍵聯基團(諸如伸烷基、雜伸烷基、伸芳基及雜伸芳基)；

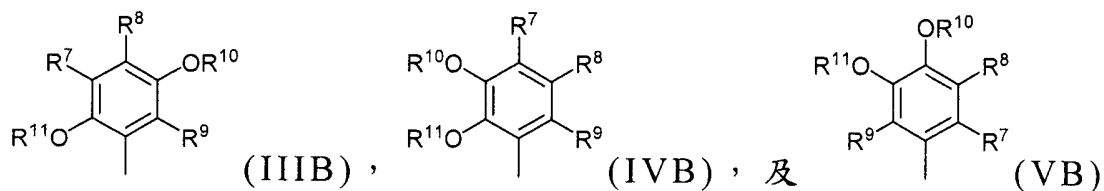
R具有式(IIIA)、(IVA)及(VA)中之一者：



其中 R^7 、 R^8 及 R^9 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、醯基、胺基甲酸酯、醯胺基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基或雜烷基，或式(IIIA)、(IVA)或(VA)之 R^7 及 R^8 或式(IVA)之 R^8 及 R^9 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環；且

Q^1 及 Q^2 各自為推電子基。在一些實施例中， Q^1 及 Q^2 各自獨立地為胺基或 $-O-Q^3$ ，其中 Q^3 為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羰基、鹵烷基或雜烷基，其限制條件為 Q^1 及 Q^2 不同時為胺基。在另外實施例中， Q^1 及 Q^2 各自為 $-O-Q^3$ 。在另外實施例中， Q^1 為 $-O-Q^3$ 且 Q^2 為胺基。在另外實施例中， Q^1 為胺基且 Q^2 為 $-O-Q^3$ 。

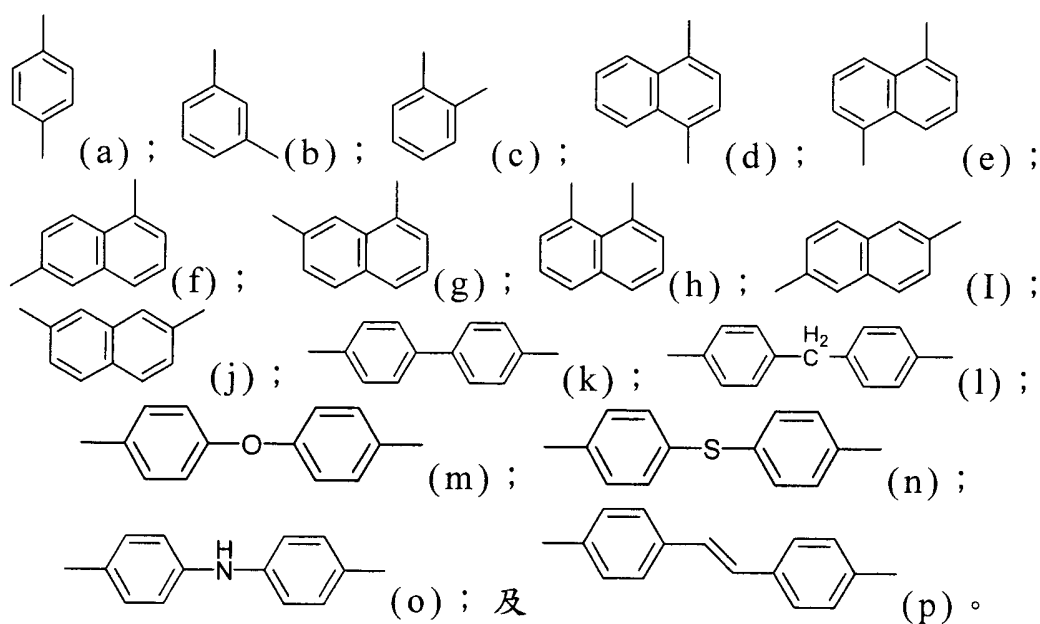
在某些實施例中，R為具有式(IIIB)、(IVB)及(VB)中之一者之單價二氧化芳基：



其中 R^7 、 R^8 及 R^9 各自如本文所定義；且 R^{10} 及 R^{11} 各自獨立地為氫或推電子基。

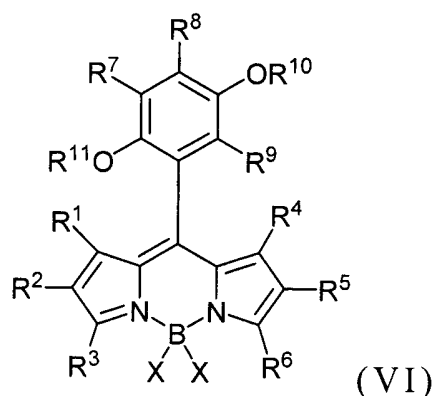
在一些實施例中， R^{10} 及 R^{11} 各自獨立地為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羰基、鹵烷基或雜烷基。在其他實施例中， R^{11} 為氫。在另外實施例中， R^{10} 為烷基，諸如甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基、第三丁基及其類似基團。在另外實施例中， R^{11} 為氫且 R^{10} 為甲基。

在其他實施例中，Z為一鍵。在其他實施例中，Z為伸芳基。在另外實施例中，Z為具有式(a)-(p)中之一者之伸芳基：



在另外實施例中，式(a)-(p)中之一或多者視情況經取代。

在某些實施例中，式(VI)表示本文所揭示之化合物或次氯酸探針：



其中X、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰及R¹¹各自如本文所定義。在一些實施例中，R¹¹為氫。在其他實施例中，R¹⁰為烷基，諸如甲基、乙基、丙基、異丙基、丁基、異丁基、第三丁基及其類似基團。在另外實施例中，R¹¹為氫；且R¹⁰為甲基。在某些實施例中，兩個X基團不相同。在其他實施例中，兩個X基團相同。在另外實施例中，兩個X基團各自為F。在一些實施例中，R¹、R²、R⁴及R⁵各自為氫；且R³及R⁶各自為-C(=O)-Y，其中Y為二乙基胺基。

在一些實施例中，式(I)或(VI)之R³及R⁶各自獨立地為氫或-C(=O)NR¹²R¹³，其中R¹²及R¹³各自獨立地為氫、烷基或芳基。在另外實施例中，式(VI)之R³及R⁶各自為-C(=O)NR¹²R¹³，其中R¹²及R¹³各自為烷基。在另外實施例中，R³及R⁶各自為-C(=O)N(CH₂CH₃)₂。

在其他實施例中，式(I)、(II)或(VI)之R²及R³共同形成環。在其他實施例中，R²及R³基團共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。在另外實施例中，R²及R³基團共同形成苯并環、萘環、蔥

環、吡啶并環、噻嗪并環、嘧啶并環、吡嗪并環、三嗪并環、四嗪并環、吡唑并環、三唑并環或吡咯并環。在一些實施例中， R^2 及 R^3 基團共同形成苯并環。

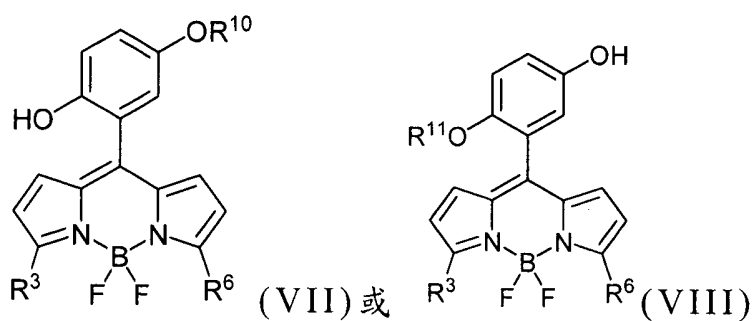
在另外實施例中，式(I)、(II)或(VI)之 R^5 及 R^6 共同形成環。在其他實施例中， R^5 及 R^6 基團共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。在另外實施例中， R^5 及 R^6 基團共同形成苯并環、萘環、蔥環、吡啶并環、噻嗪并環、嘧啶并環、吡嗪并環、三嗪并環、四嗪并環、吡唑并環、三唑并環或吡咯并環。在一些實施例中， R^5 及 R^6 基團共同形成苯并環。

在另外實施例中，式(I)、(II)或(VI)之 R^1 及 R^2 共同形成環。在其他實施例中， R^1 及 R^2 基團共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。在另外實施例中， R^1 及 R^2 基團共同形成苯并環、萘環、蔥環、吡啶并環、噻嗪并環、嘧啶并環、吡嗪并環、三嗪并環、四嗪并環、吡唑并環、三唑并環或吡咯并環。在一些實施例中， R^1 及 R^2 基團共同形成苯并環。

在另外實施例中，式(I)、(II)或(VI)之 R^4 及 R^5 共同形成環。在其他實施例中， R^4 及 R^5 基團共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。在另外實施例中， R^4 及 R^5 基團共同形成苯并環、萘環、蔥環、吡啶并環、噻嗪并環、嘧啶并環、吡嗪并環、三嗪并環、四嗪并環、吡唑并環、三唑并環或吡咯并環。在一些實施例中， R^4 及 R^5 基團共同形成苯并環。

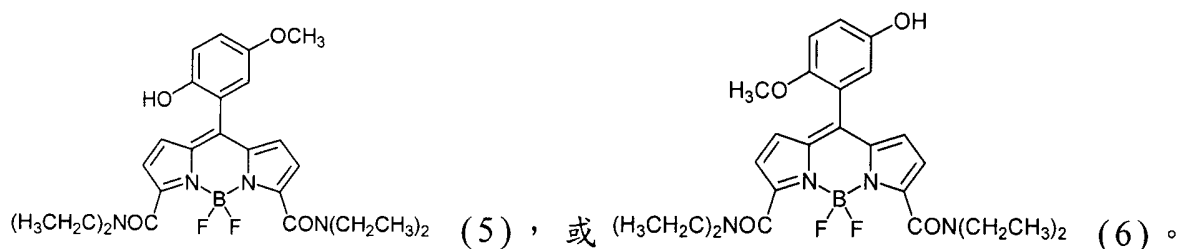
在另外實施例中，式(VI)之 R^7 及 R^8 共同形成環。在其他實施例中， R^7 及 R^8 基團共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。在另外實施例中， R^7 及 R^8 基團共同形成苯并環、萘環、蔥環、吡啶并環、噁嗪并環、嘧啶并環、吡嗪并環、三嗪并環、四嗪并環、吡唑并環、三唑并環或吡咯并環。在一些實施例中， R^7 及 R^8 基團共同形成苯并環。

在某些實施例中，式(VII)或(VIII)表示本文所揭示之化合物或次氯酸探針：



其中 R^{10} 為烷基； R^{11} 為烷基；且 R^3 及 R^6 各自獨立地為氫或 $-C(=O)-Y$ ，其中 Y 為氫、烷氧基、羥基、硫基、烷基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、烷基硫基或3員至7員雜環基環。在一些實施例中， R^3 及 R^6 各自為 $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中 R^{12} 及 R^{13} 各自為烷基。在另外實施例中， R^3 及 R^6 各自為 $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$ 。

在一些實施例中，本文所揭示之次氯酸探針為化合物(5)或(6)或其異構體：



本發明亦提供直接或間接量測化學或生物樣本(諸如微生物或動物細胞或組織)中之次氯酸或次氯酸根之試劑組合物。該試劑組合物包含本文所揭示之次氯酸探針。在一些實施例中，試劑組合物進一步包含溶劑、酸、鹼、緩衝溶液或其組合。

本發明亦提供直接或間接量測樣本中之次氯酸或次氯酸根之方法。在一些實施例中，該等方法包含下列步驟：(a)使本文所揭示之次氯酸探針與樣本接觸以形成螢光化合物；及(b)量測螢光化合物之螢光性質。在一些實施例中，以本文所揭示之方法或熟習此項技術者已知之任何方法量測螢光性質。在其他實施例中，樣本為化學樣本或生物樣本。在另外實施例中，樣本為包含微生物或動物細胞或組織之生物樣本。

本發明亦提供直接或間接偵測樣本中次氯酸或次氯酸根之高物料通過量篩檢螢光分析法。在一些實施例中，高物料通過量篩檢螢光分析法包含下列步驟：(a)使本文所揭示之次氯酸探針與樣本接觸以形成一或多種螢光化合物；及(b)量測螢光化合物之螢光性質。在其他實施例中，以本文所揭示之方法或熟習此項技術者已知之任何方法量測螢光性質。

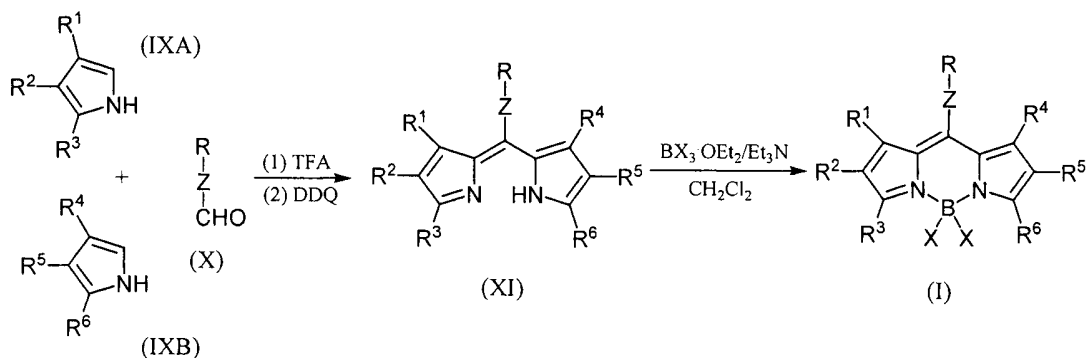
本發明亦提供篩檢一或多種可直接或間接增加或減少次氯酸或次氯酸根含量之目標化合物之高物料通過量法。在一些實施例中，高物料通過量法包含下列步驟：(a)使本文所揭示之次氯酸探針與目標化合物接觸以形成一或多種螢光化合物；及(b)量測螢光化合物之螢光性質以定性或定量測定目標化合物。在其他實施例中，以本文所揭示之方法或熟習此項技術者已知之任何方法量測螢光性質。

在一些實施例中，資訊系統可於本文所揭示之高物料通過量法中加以使用及實施。在其他實施例中，資訊系統提供高物料通過量法中所使用之物理裝置之軟體控制。在其他實施例中，資訊系統組織高物料通過量法所產生之電子資料。在另外實施例中，資訊系統儲存高物料通過量法所產生之電子資料。

一般合成程序

本文所揭示之化合物或次氯酸探針可由熟習此項技術者以已知有機合成法以及本文所揭示之多種一般或特定合成程序製得。舉例而言，可藉由下文流程(B)中所示之以下一般程序合成式(I)之次氯酸探針。

流程(B)



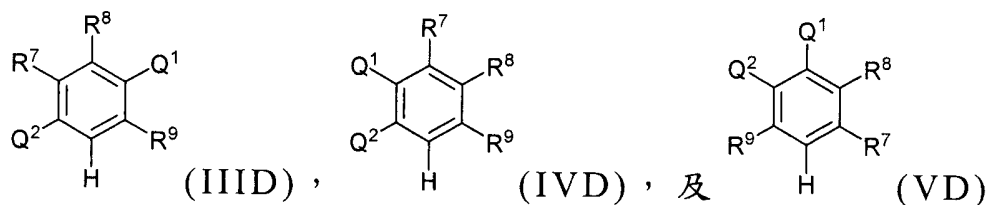
流程(B)中之R、X、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵及R⁶係如上文所定義。在適當溶劑(諸如二氯甲烷或1,2-二氯乙烷)中,於酸觸媒存在下,在處於室溫至80°C之範圍內之溫度下,式(IXA)及(IXB)之吡咯可與式(X)之醛反應。在大量的式(X)之醛與式(IXA)及(IXB)之吡咯反應之後,可將氧化劑(諸如苯醌)添加至反應混合物中以形成式(XI)之二吡咯。合適之苯醌之一些非限制性實例包括2,3-二氯-5,6-二氯基-1,4-苯醌(DDQ)及2,3,5,6-四氯-對苯醌。可藉由習知技術(諸如洗滌、過濾、萃取、蒸發、蒸餾、再結晶、層析法及其類似技術)純化式(XI)之二吡咯。

合適之酸觸媒之一些非限制性實例包括三氟乙酸(TFA)、4-(三氟甲基)苯甲酸、對甲苯磺酸、甲烷磺酸、乙酸酐、路易斯酸(例如Et₂AlCl、EtAlCl₂、BF₃、SnCl₄、AlCl₃、鈦酸四異丙酯及TiCl₄)及其組合。在一些實施例中,酸觸媒為三氟乙酸。

在一些實施例中,式(IXA)之吡咯與式(IXB)之吡咯相同。在其他實施例中,式(IXA)之吡咯與式(IXB)之吡咯不相同。式(IXA)及(IXB)之吡咯可購自供應商(諸如Aldrich Chemical)或藉由已知方法製備。Richard Alan Jones等人的"*Chemistry of Pyrroles*,"Academic Press (1977)(其以引用的方式併入本文中)中揭示吡咯之化學及製備。

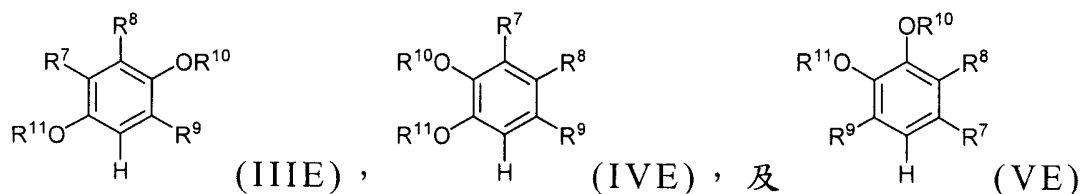
式(X)之醛可購自供應商(諸如Aldrich Chemical)或藉由技術人員已知之方法製備。舉例而言,可藉由甲醯化具有式R-Z-H(其中R及Z係如上文所定義)之芳基化合物來製備

式(X)之醛。在一些實施例中，可藉由甲醯化具有式(IIID)、(IVD)及(VD)中之一者之芳基化合物來製備式(X)之醛：



其中 R^7 、 R^8 、 R^9 、 Q^1 及 Q^2 各自如本文所定義。

在某些實施例中，可藉由甲醯化具有式(IIIE)、(IVE)及(VE)中之一者之芳基化合物來製備式(X)之醛：



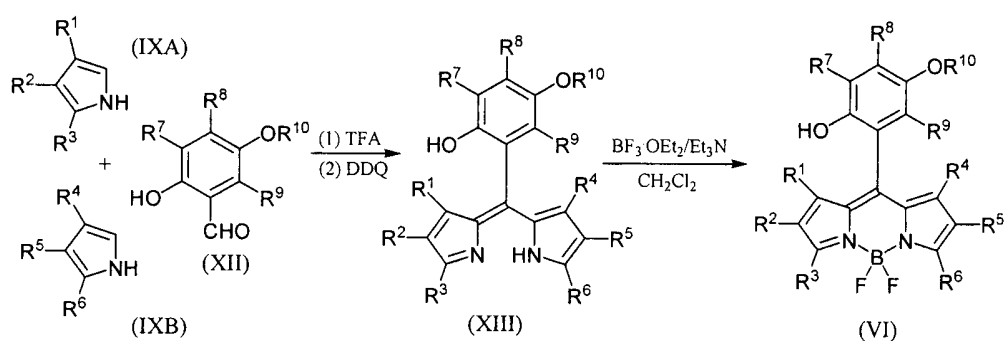
其中 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 及 R^{11} 各自如本文所定義。

當R為酚系基團或包含酚系基團時，可單獨以聚甲醛進行甲醯化。或者，當Z為伸芳基時，可以二甲基甲醯胺與磷醯氯之混合物經維斯邁爾-哈克反應(Vilsmeier-Haack reaction)進行甲醯化。類似地，當Z為一鍵且R為二氧化芳基時，可藉由甲醯化具有式R-H之二氧化芳基化合物製備式(X)之醛。或者，賴默爾-蒂曼反應(Reimer-Tiemann reaction)、達夫反應(Duff reaction)、加特曼-科赫反應(Gattermann-Koch reaction)及加特曼反應可用於以適當的起始物質製備式(X)之醛。

其次，可在合適溶劑(諸如二氯甲烷)中以醚合三鹵化硼及三乙胺處理式(XI)之二吡咯以形成式(I)之次氯酸探針。在一些實施例中，三鹵化硼為 BF_3 、 BCl_3 、 BBr_3 或其組合。可藉由習知技術(諸如洗滌、過濾、萃取、蒸發、蒸餾、再結晶、層析法及其類似技術)純化式(I)之次氯酸探針。

類似地，可藉由下文流程(C)中所示之以下一般程序合成式(VI)之化合物或次氯酸探針。

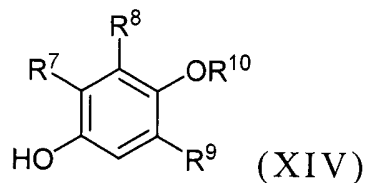
流程(C)



流程(C)中之 R 、 X 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 及 R^{10} 各自如本文所定義。如上文流程(B)中所揭示，在適當溶劑(諸如二氯甲烷或1,2-二氯乙烷)中，於酸觸媒存在下，在處於室溫至 80°C 之範圍內之溫度下，式(IXA)及(IXB)之吡咯可與式(XII)之醛反應。在一些實施例中，式(IXA)之吡咯與式(IXB)之吡咯相同。在其他實施例中，式(IXA)之吡咯與式(IXB)之吡咯不同。

式(XII)之醛可購自供應商(諸如Aldrich Chemical)或藉由技術人員已知之方法製備。舉例而言，可藉由甲醯化具有

式(XIV)之芳基化合物來製備式(XII)之醛：



其中 R^7 、 R^8 、 R^9 及 R^{10} 各自如本文所定義。可單獨以聚甲醛進行式(XIV)之芳基化合物之甲醯化。或者，可以二甲基甲醯胺與磷醯氯之混合物經維斯邁爾-哈克反應進行甲醯化。

在式(XIV)之醛完全反應之後，可將氧化劑(諸如苯醌)添加至反應混合物中，以形成式(XIII)之二吡咯。可藉由習知技術(諸如洗滌、過濾、萃取、蒸發、蒸餾、再結晶、層析法及其類似技術)純化式(XIII)之二吡咯。

其次，如上文流程(B)中所揭示，可在合適溶劑(諸如二氯甲烷)中，以醚合三鹵化硼及三乙胺處理式(XIII)之二吡咯，以形成式(VI)之次氯酸探針。可藉由習知技術(諸如洗滌、過濾、萃取、蒸發、蒸餾、再結晶、層析法及其類似技術)純化式(VI)之次氯酸探針。

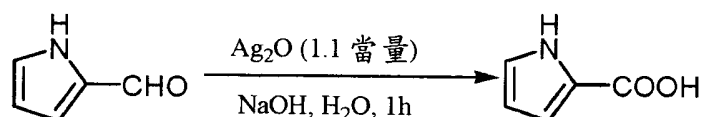
可藉由保護基團來保護流程B及C中諸式之一些官能基。在一些實施例中，可藉由使用不同的保護基團使流程B及C達最適當程度。保護基團之化學可見於諸如Greene, T. W.及Wuts, P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第3版, John Wiley & Sons, Inc., 1999(其以引用的方式併入本文中)之文獻中。

實例

以下實例 1-4 係為製造及使用通式 (I)、(VI)、(VII) 及 (VIII) 所表示之一些次氯酸探針之方法的詳述。該詳細揭示內容在形成本揭示案之一部分之上述一般合成程序的範疇內，且用於例示形成本揭示案之一部分之上述一般合成程序。提出該等實例僅係用於說明之目的而非旨在限制本揭示案之範疇。

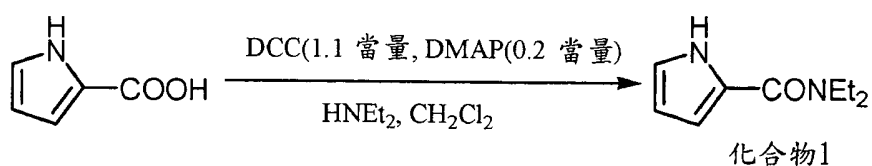
實例 1-化合物 5 之合成流程

合成吡咯-2-甲酸



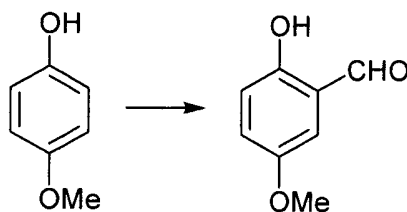
將吡咯-2-甲醛 (10.0 g, 105 mmol) 溶於 50 mL 甲醇中且然後由 500 mL 蒸餾水稀釋。將新近製備之氧化銀 (48.3 g, 210 mmol) 及氫氧化鈉 (8.5 g, 212 mmol) 添加至吡咯-2-甲醛溶液中。將反應混合物於室溫下攪拌 1 小時之後，將沈澱物濾出且以熱水洗滌。將組合之濾液及洗滌液以乙醚 (500 mL) 萃取且然後於 0°C 下用 37% 鹽酸酸化。用乙醚 (200 mL × 4) 萃取溶液。將組合之有機萃取物經硫酸鎂乾燥。在減壓下蒸發溶劑以生成 9.9 g 吡咯-2-甲酸 (85% 產率)。

合成化合物 1



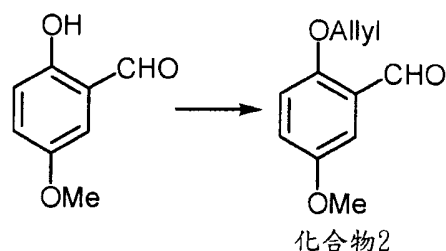
將吡咯-2-甲酸(10.0 g, 90 mmol)溶於250 mL二氯甲烷中。隨後於0°C下在氫蒙氣下添加*N,N'*-二環己基碳化二醯亞胺(DCC)(20.4 g, 99 mmol)、4-二甲基-胺基吡啶(DMAP)(2.2 g, 18 mmol)及二乙胺(10.2 mL, 99 mmol)。將反應混合物於0°C下攪拌30分鐘然後於室溫下攪拌8小時。在用二氯甲烷稀釋溶液及將固體濾出之後，將濾液以稀鹽酸洗滌，隨後以飽和碳酸氫鈉溶液洗滌。經Na₂SO₄乾燥有機層且然後在減壓下蒸發溶劑。藉由管柱層析法將正己烷中之35% EtOAc用作稀釋劑純化殘餘物以得到10.5 g呈白色固體狀之化合物1(70%產率)。

合成2-羥基-5-甲氧基苯甲醛



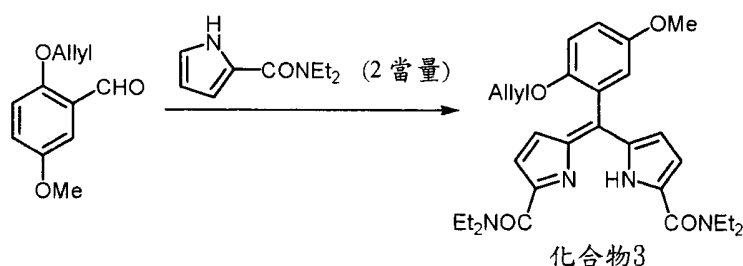
將乾燥聚甲醛(5 g, 167 mmol)添加至化合物對甲氧基酚(3 g, 24.2 mmol)、無水二氯化鎂(3.48 g, 37.0 mmol)及無水三乙胺(12.8 mL, 92.1 mmol)在100 mL乙腈中之混合物中。將反應混合物回流8小時且冷卻至室溫。然後將反應混合物傾倒於5% HCl(300 mL)中且以乙醚(200 mL)萃取三次。將組合之有機層經無水Na₂SO₄乾燥，過濾及蒸發。藉由急驟管柱層析法(正己烷中之20% EtOAc)純化殘餘物以生成3.35 g 2-羥基-5-甲氧基苯甲醛(91%產率)。

合成化合物2



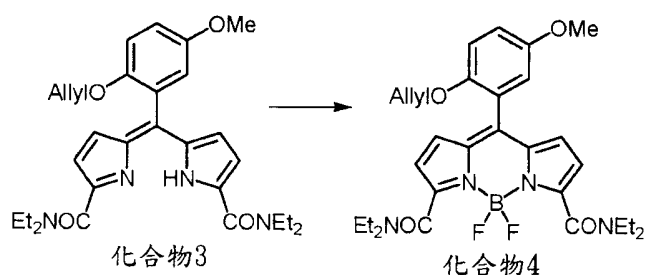
將烯丙基溴 (3.2 mL, 32.7 mmol) 及 K_2CO_3 (12 g, 86.2 mmol) 添加至 2-羥基-5-甲氧基苯甲醛 (3.3 g, 21.7 mmol) 在 60 mL THF 中之溶液。將反應混合物回流 10 小時。然後將混合物用 20 mL 水洗滌兩次。將組合之有機萃取物經 Na_2SO_4 乾燥，過濾及蒸發。藉由管柱層析法 (正己烷中之 20% EtOAc) 純化粗化合物以生成 3.33 g 呈無色油狀之化合物 2 (80% 產率)。化合物 2 之物理性質特徵如下： 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 10.48 (s, 1H), 7.30 (d, $J=3.3$ Hz, 1H), 7.11 (dd, $J=9.0, 3.3$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 6.08-6.02 (m, 1H), 5.42 (dd, $J=17.2, 1.4$ Hz, 1H), 5.31 (dd, $J=10.6, 1.2$ Hz, 1H), 4.60-4.59 (m, 2H), 3.79 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 189.2, 155.5, 153.6, 132.5, 125.2, 123.2, 117.8, 114.7, 110.1, 69.7, 55.6; IR (CH_2Cl_2) 2996, 1704, 1638 cm^{-1} ; LRMS (EI) m/z (%) 192 (M^+ ; 63), 151 (100); HRMS (EI): $C_{11}H_{12}O_3$ 之計算值: 192.0786, 實驗值: 192.0781。

合成化合物 3



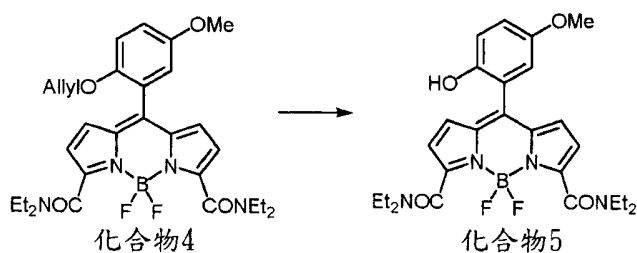
在氫蒙氣下將化合物 1(4.2 g, 25.4 mmol)及化合物 2(2.44 g, 12.7 mmol)溶於 20 mL 無水 1,2-二氯乙烷中。添加一滴三氟乙酸(TFA)，且於回流下加熱溶液。在 TLC 監測(二氧化矽；CH₂Cl₂)顯示化合物 2 已被完全消耗掉之後，添加 DDQ(2,3-二氯-5,6-二氟基-1,4-苯醌)(2.89 g, 12.7 mmol)在 40 mL CH₂Cl₂中之溶液，且持續攪拌 20 分鐘。將反應混合物用水洗滌，經 MgSO₄ 乾燥，過濾及蒸發。藉由管柱層析法(正己烷中之 40% EtOAc, 20% CH₂Cl₂)純化粗化合物以生成呈紅褐色油狀之化合物 3(1.51 g, 62% 產率)。化合物 3 之物理性質特徵如下：¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 12.2 (br, 1H), 6.93 (d, J=2.6 Hz, 2H), 6.84 (d, J=2.4 Hz, 1H), 6.64 (d, J=4.3 Hz, 2H), 6.52 (d, J=4.3 Hz, 2H), 5.79-5.72 (m, 1H), 5.14-5.06 (m, 2H), 4.42-4.40 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.62 (br, 8H), 1.23 (m, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 163.0, 153.0, 150.5, 149.0, 142.0, 139.0, 133.2, 128.2, 127.1, 119.4, 117.3, 116.9, 115.2, 114.6, 70.2, 55.7, 43.0 (br), 14.0 (br); IR (CH₂Cl₂) 2944, 1658, 1635 cm⁻¹; LRMS (EI) m/z (%) 504 (M⁺; 19), 447 (100); HRMS (EI): C₂₉H₃₆N₄O₄ 之計算值: 504.2737, 實驗值: 504.2726。

合成化合物 4



在氫蒙氣下將化合物 **3** (2.2 g, 4.38 mmol) 及三乙胺 (12.3 mL, 87.5 mmol) 溶於 137 mL 無水二氯甲烷中，且將該溶液於室溫下攪拌 10 分鐘。添加 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (12.3 mL, 96.3 mmol) 且持續攪拌 4 小時。用水及 2 N NaOH 洗滌反應混合物。用 CH_2Cl_2 萃取水溶液。將組合之有機萃取物經 Na_2SO_4 乾燥，過濾及蒸發。藉由管柱層析法 (正己烷中之 40% EtOAc, 20% CH_2Cl_2) 純化粗化合物以生成呈固體狀之化合物 **4** (1.47 g, 61% 產率)。化合物 **3** 之物理性質特徵如下：
 m.p. 72.0-73.9°C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.01-6.99 (m, 2H), 6.87 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J=4.2$ Hz, 2H), 6.44 (d, $J=4.2$ Hz, 2H), 5.84-5.76 (m, 1H), 5.16 (dd, $J=17.1, 1.5$ Hz, 1H), 5.11 (dd, $J=10.3, 1.4$ Hz, 1H), 4.45 (dd, $J=3.4, 1.5$ Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.57 (q, $J=7.1$ Hz, 4H), 3.29 (q, $J=7.1$ Hz, 4H), 1.26 (t, $J=7.1$ Hz, 6H), 1.09 (t, $J=7.1$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 162.6, 153.0, 151.2, 149.8, 144.6, 135.1, 132.5, 131.2, 123.2, 117.0, 116.6, 116.4, 114.4, 69.6, 55.6, 42.8, 38.5, 13.8, 11.9; ^{19}F NMR (376.5 MHz, CDCl_3): δ -144.1 (m, $J=30.1$ Hz), -145.5 (m, $J=30.1$ Hz); IR (CH_2Cl_2) 2980, 1734, 1640 cm^{-1} ; LRMS (EI) m/z (%) 552 (M^+ ; 16), 495 (100); HRMS (EI) : $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_4$ 之計算值 : 552.2719, 實驗值 : 552.2715。

合成化合物 5



由氫氣使化合物4(400 mg, 0.725 mmol)在50 mL乙醇中之溶液鼓泡30 min以移除任何溶解氧。然後在強氫流下緩慢添加Pd(PPh₃)₄(83.7 mg, 0.0725 mmol)。將反應混合物回流6小時。濾出固體且經MgSO₄乾燥濾液。在減壓下蒸發溶劑。藉由管柱層析法(CHCl₃中之5% MeOH)純化殘餘物以生成呈固體狀之化合物5(258 mg, 70%產率)。化合物5之物理性質特徵如下：m.p. 89.6-91.2°C；¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.40 (br, 1H), 7.0 (d, J=8.9 Hz, 1H), 6.90-6.85 (m, 3H), 6.72 (d, J=3.1 Hz, 1H), 6.37 (d, J=4.2 Hz, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.54 (br, 4H), 3.24 (q, J=7.3 Hz, 4H), 1.26 (t, J=7.1 Hz, 6H), 1.06 (t, J=7.1 Hz, 6H)；¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 163, 151.9, 150.3, 148.7, 146.0, 135.2, 131.9, 120.3, 117.9, 117.4, 116.6, 116.3, 55.7, 43.1, 38.7, 13.9, 12.0；¹⁹F NMR (376.5 MHz, CDCl₃): -143.4 (m, J=30.1 Hz), -145.3 (m, J=30.1 Hz)；IR (CH₂Cl₂) 3234, 1654, 1573 cm⁻¹；LRMS (EI) m/z (%) 512 (M⁺; 18), 277 (100)；HRMS (EI)：C₂₆H₃₁BF₂N₄O₄之計算值：512.2406，實驗值：512.2405。

實例2-以化合物5偵測次氯酸

化合物5之UV可見吸收光譜

將實例1中獲得之化合物5溶於二氯甲烷中以形成10 mM溶液。量測10 mM化合物5溶液之吸收光譜且將其顯示於圖1中。圖1中之資料顯示化合物5在約520 nm處具有吸收最大值。

化合物5之發射光譜

將實例1中獲得之化合物5於DMF中溶解至10 mM之濃度，且然後由0.1 M磷酸鉀緩衝液(pH 7.4)將溶液稀釋至10 μ M。使用Hitachi F2500螢光質譜儀量測10 μ M化合物5溶液之螢光光譜，且光電倍增管電壓為700 V。對於激發及發射，隙縫寬度為2.5 nm。於520 nm之激發波長下進行量測。圖2中顯示結果，其顯示化合物5自身不發射螢光。

以化合物5偵測次氯酸

將實例1中獲得之化合物5於DMF中溶解至10 mM之濃度，且然後由0.1 M磷酸鉀緩衝液(pH 7.4)將溶液稀釋至10 μ M。商業漂白劑為NaOCl之來源。藉由用硫代硫酸鈉溶液滴定來測定NaOCl之濃度，該硫代硫酸鈉溶液已藉由用KIO₃滴定標準化。然後添加NaOCl以提供0、3、4、5、6及8 μ M之最終濃度。在與上述相同之條件下2分鐘之後量測溶液之螢光光譜。圖3中顯示螢光光譜。如圖3中明確顯示，在添加次氯酸根之後化合物5之螢光強度顯著增加。另外，圖4顯示541 nm下之螢光強度隨著次氯酸根濃度的增加而線性增加。

實例3-化合物5對不同反應性氧物質及反應性氮物質之特異性比較

比較化合物5對不同反應性氧物質(ROS)及反應性氮物質(RNS)(包括OCl⁻、H₂O₂、¹O₂、NO、O₂^{•-}、[•]OH、ONOO⁻及烷基過氧化自由基(ROO[•]))之活性。將不同反應性氧物質及反應性氮物質獨立添加至5 mL相應化合物5溶液(0.1 M

磷酸鉀緩衝液中之10 μM 溶液)。量測處理前後螢光強度之變化。圖5中顯示結果。如下製備圖5中之樣本(a)-(h)：

- a. 於25 $^{\circ}\text{C}$ 下添加 H_2O_2 (最終100 μM)且然後攪拌1小時。
- b. 於25 $^{\circ}\text{C}$ 下添加3-(1,4-二氫-1,4-環二氧基-1-茶基)丙酸(最終100 μM)且然後攪拌1小時。
- c. 於25 $^{\circ}\text{C}$ 下添加2,2'-偶氮雙(2-甲脒基丙烷)二鹽酸鹽(最終100 μM)且然後攪拌1小時。
- d. 於25 $^{\circ}\text{C}$ 下添加SNP(二水合硝基鐵氰化鈉(III))(最終100 μM)且然後攪拌1小時。
- e. 由黃嘌呤及黃嘌呤氧化酶生成 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。首先添加黃嘌呤氧化酶。在黃嘌呤氧化酶溶解之後，於25 $^{\circ}\text{C}$ 下添加黃嘌呤(最終100 μM)且將混合物攪拌1小時。
- f. 於10當量 H_2O_2 (100 μM)存在下添加氯化亞鐵(最終10 μM)。
- g. 於25 $^{\circ}\text{C}$ 下添加 ONOO^- (最終10 μM)。
- h. 於25 $^{\circ}\text{C}$ 下添加 NaOCl (最終10 μM)。

圖5顯示僅在與次氯酸根反應後產生之螢光增強。該等結果證實，在非生物系統中，化合物5對ROS及RNS中之次氯酸根具有極高反應性。另外，在化合物5之酚衍生物與生物系統中存在之其他反應性氧物質或反應性氮物質之間不進行類似反應。

實例4-用不同pH值之化合物5偵測次氯酸

將實例1中獲得之化合物5於DMF中溶解至10 mM之濃度，且然後由具有不同pH值(約4.0至約12.0)之0.1 M磷酸

鉀緩衝液將溶液稀釋至10 μM 。商業漂白劑為NaOCl之來源。藉由以硫代硫酸鈉溶液滴定來測定NaOCl之濃度，該硫代硫酸鈉溶液已藉由以KIO₃滴定標準化。然後添加NaOCl以提供10 μM 之最終濃度。在於上述相同之條件下2分鐘之後量測溶液之螢光光譜。圖6中顯示螢光光譜。如圖6中明確顯示，化合物5之螢光強度在約5至約7.5之pH值範圍中顯著高於在其他pH值時。鑒於次氯酸之pK_a為7.6，很可能化合物5一般偵測次氯酸而非次氯酸根。

實例5-用化合物5偵測MPO/H₂O₂/Cl⁻系統中之次氯酸

活有機體中之次氯酸主要由過氧化氫及氯離子以經酶MPO催化之反應合成(Hidalgo, E.; Bartolome, R.; Dominguez, C., *Chem. Biol. Interact.* 2002, 139, 265-282)，吾人將化合物5施用於MPO/H₂O₂/Cl⁻系統(圖7)。添加化合物5後螢光強度顯著增加，而對照實驗(不存在H₂O₂)中幾乎偵測不到螢光。因為化合物5不回應於H₂O₂，所以所觀測到之螢光增加可能歸因於次氯酸之形成；亦即，本文所揭示之次氯酸探針可偵測酶系統中次氯酸之生成。

實例6-細胞檢定

使用鼠科動物J774.1巨噬細胞(ATCC, USA)來研究化合物5偵測活細胞中之次氯酸之潛力。首先，以脂多糖(LPS)(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及干擾素- γ (IFN- γ)(50 ng/mL)刺激鼠科動物J774.1細胞4小時。在用化合物5(20 μM)培育1小時之後，將細胞用PBS緩衝液洗滌三次，且進一步以PMA刺激

0.5小時。如圖8A中所示，在用刺激劑處理之前細胞中未觀測到明顯螢光。值得注意的是，在用LPS/IFN- γ 處理隨後用PMA處理之後觀測到螢光細胞(圖8B)。圖8C顯示在以2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基(TEMPO)處理之後螢光淬滅。由於自身為自由基，因此TEMPO可清除超氧化自由基(Muijsers, R. B. R.; van den Worm, E.; Folkerts, G.; Beukelman, C. J.; Koster, A. S.; Postma, D. S.; Nijkamp, F. P., *Br. J. Pharmacol.*, 2000, 130, 932-936.)，該自由基為次氯酸之前驅體。該等結果表明經刺激劑處理後巨噬細胞的確生成 OCl^- ，且藉由使用化合物5可觀察到次氯酸之形成。

實例7-細胞檢定2

鼠科動物巨噬細胞株RAW264.7經刺激後生成MPO(Adachi, Y.; Kindzelskii, A. L.; Petty, A. R.; Huang, J. B.; Maeda, N.; Yotsumoto, S.; Aratani, Y.; Ohno, N.; Petty, H. R., *J. Immunol.* 2006, 176, 5033-5040)。另外，巨噬細胞暴露於諸如LPS/IFN- γ (干擾素- γ)及佛波醇十四烷酸乙酸酯(PMA)之刺激物亦可促使生成其他ROS及RNS。在該實驗中，將RAW264.7用作測試化合物5是否可用於偵測MPO/H₂O₂/Cl⁻系統在刺激下所生成之 OCl^- 之模型。在以刺激劑處理之前吾人在細胞中未觀測到明顯的螢光(圖9a)。值得注意的是，在以LPS/IFN- γ 處理隨後以PMA處理之後螢光細胞出現(圖9b)。圖9c指示在以2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基(TEMPO)(一種可清除超氧化自由基之自由基)處理之

後螢光淬滅。該等結果證實巨噬細胞經刺激後可生成 OCI^- 且使用化合物5可觀察到該過程。

如上文所證實，本文所揭示之實施例提供多種可用作偵測、量測及/或篩檢次氯酸之次氯酸探針之化合物。雖然本揭示案已對有限數目的實施例作了描述，但一實施例之特定特徵不應歸於本發明之其他實施例。任何單個實施例均不能代表本揭示案之所有態樣。在一些實施例中，組合物或方法可包括本文未提及之許多化合物或步驟。在其他實施例中，組合物或方法不包括或實質上不包括本文未列舉之任何化合物或步驟。存在所述實施例之變更及修改。例如，本文所揭示之試劑組合物不需要僅包含本文所揭示之次氯酸探針。其可包含一般適於次氯酸探針之任何類型之化合物。應注意，製造及使用本文所揭示之次氯酸探針之方法係參照許多步驟來加以描述。該等步驟可以任何序列付諸實踐。可省略一或多個步驟或將其組合但仍達成實質上相同之結果。隨附之申請專利範圍旨在涵蓋處於本揭示案範疇內的所有該等變更及修改。

本說明書中所提及之所有公開案及專利申請案係以引用的方式全部併入本文中，該引用的程度就如同已特定地及個別地將各個公開案或專利申請案以引用的方式併入一般。應理解已藉由圖解及實例詳述本揭示案以使其他熟習此項技術者熟悉本發明、其原則及其實際應用。另外，本文中所提出之特定實施例並非意欲為詳盡的或限制本揭示案，且根據前述實例及詳述，多種替代、修改及變更對於

熟習此項技術者而言係顯而易見的。相應地，本揭示案旨在包含處於以下申請專利範圍之精神及範疇內的所有替代、修改及變更。雖然上文一些實例及描述包括一些關於化合物、組合物及方法可發揮功能之方式之結論，但本發明者並非意欲受該等結論及功能束縛，而僅作為根據當前理解所作出的可能解釋提出該等結論及功能。

【圖式簡單說明】

圖1描述於25°C下量測的化合物5在二氯甲烷中之10 mM溶液之UV可見吸收光譜。

圖2描述化合物5在0.1 M磷酸鉀緩衝液(pH 7.4)中之10 μM溶液之螢光光譜。以在520 nm下之激發測定螢光強度。

圖3描述化合物5在0.1 M磷酸鉀緩衝液(pH 7.4)中之10 μM溶液在與0至5當量範圍內之不同量的次氯酸鹽反應後2分鐘獲取之螢光光譜。所有溶液之總體積改變少於1%。以在520 nm下之激發測定螢光強度。

圖4描述10 μM化合物5溶液之螢光強度與次氯酸根濃度之間的線性關係。以在520 nm下之激發測定541 nm下之螢光強度。

圖5描述多種反應性氧物質(ROS)及反應性氮物質(RNS)生成系統中化合物5之10 μM溶液之螢光強度。所有溶液之總體積改變少於1%。以在520 nm下之激發測定541 nm下之螢光強度。

圖6描述化合物5在0.1 M磷酸鉀緩衝液中之10 μM溶液與

與不同 pH 值之 10 μM 次氯酸鹽反應後 2 分鐘獲取之螢光光譜。所有溶液之總體積改變少於 1%。以在 520 nm 下之激發測定螢光強度。

圖 7 描述 $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$ 系統中化合物 5 之 10 μM 溶液之螢光光譜。於 37°C 下將化合物 5 添加至含有 MPO (1 U/100 mL) 及 NaCl (150 mM) 之磷酸鈉緩衝液 (0.1 M, pH 7.4) 中。下線表示不存在 H_2O_2 之溶液 (空白) 之背景螢光性質。上線表示於最終濃度為 5 μM 之 H_2O_2 存在下溶液之螢光性質。

圖 8 描述用 20 μM 濃度之化合物 5 培育之經刺激鼠科動物 J774.1 巨噬細胞之影像。左側影像為相差影像，而右側影像為螢光影像。將該等巨噬細胞用不同刺激劑處理且然後用化合物 5 (20 μM) 培育 1 小時。8A 為無刺激劑之對照組之影像。8B 為用脂多糖 (LPS) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及干擾素- γ (IFN- γ) (50 ng/mL) 處理 4 小時然後用 PMA (10 nM) 處理 0.5 小時之細胞之影像。8C 為用 2,2,6,6-四甲基哌啶基氧基 (TEMPO) (100 μM)、LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及 IFN- γ (50 ng/mL) 處理 4 小時然後用 PMA (10 nM) 處理 0.5 小時之細胞之影像。在以刺激劑處理 20 分鐘之後獲得螢光影像。

圖 9 描述用 20 μM 濃度之化合物 5 培育之經刺激鼠科動物 RAW264.7 巨噬細胞之影像。左側影像為相差影像，而右側影像為螢光影像。將巨噬細胞用不同刺激劑處理且然後用化合物 5 (20 μM) 培育 1 小時。9a 為無刺激劑之對照組之影像。9b 為用脂多糖 (LPS) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及干擾素- γ (IFN- γ) (50 ng/mL) 處理 4 小時然後用 PMA (10 nM) 處理 0.5 小時之細胞之

影像。9c 為用 2,2,6,6-四甲基哌啶基氧基 (TEMPO)(100 μM)、LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及 IFN- γ (50 ng/mL)處理 4 小時然後用 PMA(10 nM)處理 0.5 小時之細胞之影像。在以刺激劑處理 20 分鐘之後獲得螢光影像。

五、中文發明摘要：

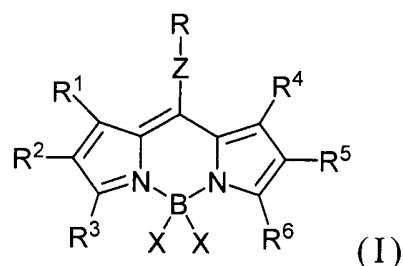
本發明提供一種化合物或次氯酸探針，其可用作直接或間接量測、偵測及/或篩檢次氯酸或次氯酸根之試劑。本發明亦提供可直接或間接量測化學樣本及諸如活有機體中細胞及組織之生物樣本中次氯酸或次氯酸根的量之方法。特定言之，該等方法包括使本文所揭示之次氯酸探針與該等樣本接觸形成一或多種螢光化合物，及量測該等螢光化合物之螢光性質之步驟。本發明亦提供偵測或篩檢化學及生物樣本中之次氯酸或可直接或間接增加或減少次氯酸或次氯酸根含量之化合物的高物料通過量篩檢螢光分析法。

六、英文發明摘要：

Provided herein are compounds or hypochlorous acid probes which can be used as reagents for measuring, detecting and/or screening, directly or indirectly, hypochlorous acid or hypochlorite. Provided also herein are methods that can be used to measure, directly or indirectly, the amount of hypochlorous acid or hypochlorite in chemical samples and biological samples such as cells and tissues in living organisms. Specifically, the methods include the steps of contacting the hypochlorous acid probes disclosed herein with the samples to form one or more fluorescent compounds, and measuring fluorescence properties of the fluorescent compounds. Provided also herein are high-throughput screening fluorescent methods for detecting or screening hypochlorous acid or compounds that can increase or decrease, directly or indirectly, the level of hypochlorous acid or hypochlorite in chemical and biological samples.

十、申請專利範圍：

1. 一種式(I)化合物：

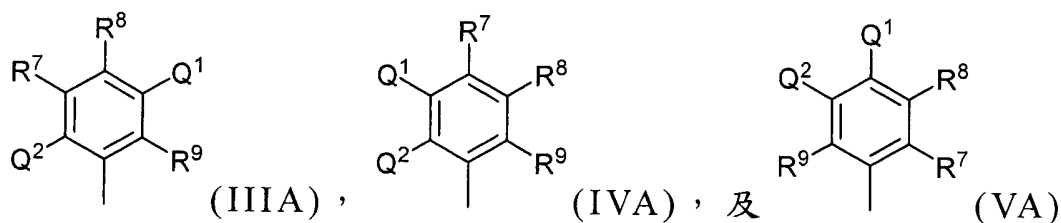


其中 X 為鹵基；

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 及 R^6 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、雜烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、磺醯基、膦醯基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-Y$ 或 $-C(=O)-Q-Y$ ，其中 Y 為氫、鹵基、烷氧基、羥基、硫基、烷基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、胺基甲酸酯、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、烷基硫基、雜烷基，或具有 3 至 7 個環原子之雜環基；且 Q 為伸烷基、伸烯基、伸炔基、伸芳基、伸芳烷基或伸烷芳基，或 R^1 及 R^2 或 R^2 及 R^3 或 R^4 及 R^5 或 R^5 及 R^6 共同形成 5 員、6 員或 7 員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環；

Z 為一鍵結或二價鍵聯基團；

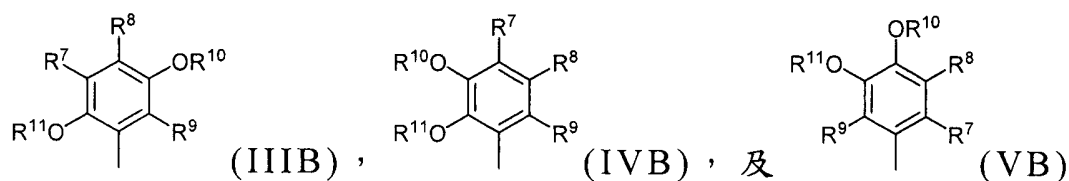
R 具有式 (IIIA)、(IVA) 及 (VA) 中之一者：



其中 R^7 、 R^8 及 R^9 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、醯基、胺基甲酸酯、醯胺基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基或雜烷基，或式 (IIIA)、(IVA) 或 (VA) 之 R^7 及 R^8 或式 (IVA) 之 R^8 及 R^9 共同形成 5 員、6 員或 7 員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環；且

Q^1 及 Q^2 各自獨立地為胺基或 $-O-Q^3$ ，其中 Q^3 為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羧基、鹵烷基或雜烷基，其限制條件為 Q^1 及 Q^2 不同時為胺基。

2. 如請求項 1 之化合物，其中 R 為具有式 (IIIB)、(IVB) 及 (VB) 中之一者之單價二氧化芳基：



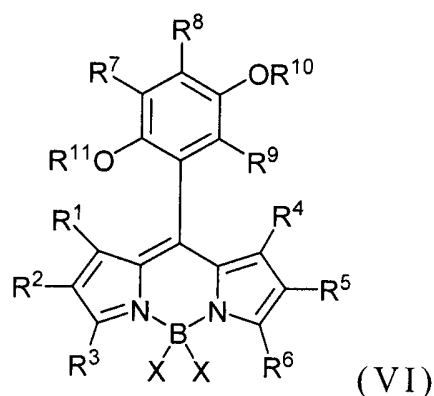
其中 R^7 、 R^8 及 R^9 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷

基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、醯基、胺基甲酸酯、醯胺基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基或雜烷基，或式(IIIB)-(VB)之 R^7 及 R^8 或式(IVB)之 R^8 及 R^9 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環；及

R^{10} 及 R^{11} 各自獨立地為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羰基、鹵烷基或雜烷基。

3. 如請求項1-2中任一項之化合物，其中X為F。
4. 如請求項1-2中任一項之化合物，其中Z為一鍵。
5. 如請求項1-2中任一項之化合物，其中Z為伸烷基、伸烯基、伸炔基、雜伸烷基、雜伸烯基、雜伸炔基、伸芳基、或雜伸芳基。
6. 如請求項1-5中任一項之化合物，其中 R^1 及 R^2 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。
7. 如請求項1-5中任一項之化合物，其中 R^4 及 R^5 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。
8. 如請求項1-5中任一項之化合物，其中 R^2 及 R^3 共同形成5

- 員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。
9. 如請求項1-5中任一項之化合物，其中 R^5 及 R^6 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。
10. 如請求項1-5中任一項之化合物，其中 R^3 及 R^6 各自獨立地為氫或 $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中 R^{12} 及 R^{13} 各自獨立地為氫、烷基或芳基。
11. 如請求項10之化合物，其中式(I)之 R^3 及 R^6 各自為 $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中 R^{12} 及 R^{13} 各自為烷基。
12. 如請求項11之化合物，其中 R^3 及 R^6 各自為 $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$ 。
13. 如請求項1-12中任一項之化合物，其中 R^7 及 R^8 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環。
14. 如請求項2-13中任一項之化合物，其中 R^{10} 及 R^{11} 各自獨立地為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羰基、鹵烷基或雜烷基。
15. 如請求項14之化合物，其中 R^{10} 為甲基且 R^{11} 為氫。
16. 如請求項1之化合物，其中該化合物具有式(VI)：



其中 X 為鹵基；

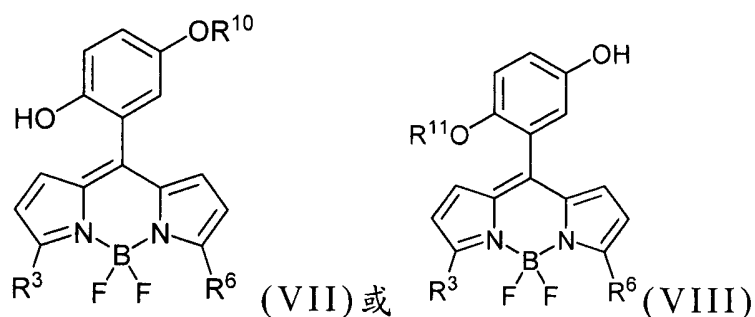
R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 及 R^6 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、雜烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、磺醯基、膦醯基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-Y$ 或 $-C(=O)-Q-Y$ ，其中 Y 為氫、鹵基、烷氧基、羥基、硫基、烷基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、胺基甲酸酯、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、烷基硫基、雜烷基或具有 3 至 7 個環原子之雜環基；且 Q 為伸烷基、伸烯基、伸炔基、伸芳基、伸芳烷基或伸烷芳基，或 R^1 及 R^2 或 R^2 及 R^3 或 R^4 及 R^5 或 R^5 及 R^6 共同形成 5 員、6 員或 7 員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環；

R^7 、 R^8 及 R^9 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷

基、環烯基、環炔基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、醯基、胺基甲酸酯、醯胺基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基或雜烷基，或 R^7 及 R^8 共同形成5員、6員或7員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環；且

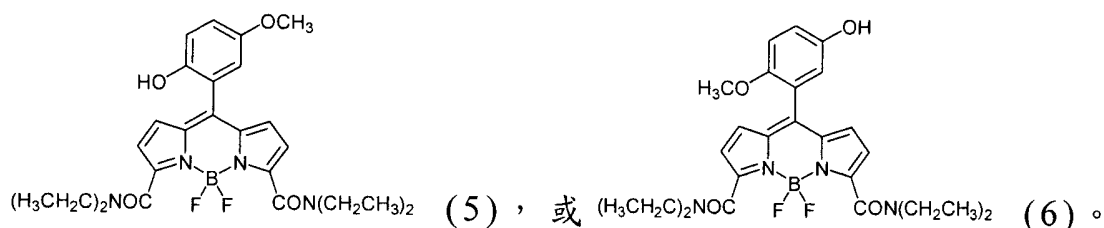
R^{10} 及 R^{11} 各自獨立地為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羰基、鹵烷基或雜烷基。

17. 如請求項16之化合物，其中該化合物具有式(VII)或(VIII)：



其中 R^{10} 為烷基； R^{11} 為烷基；且 R^3 及 R^6 各自獨立地為氫或 $-C(=O)-Y$ ，其中 Y 為氫、烷氧基、羥基、硫基、烷基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、烷基硫基或3員至7員雜環基環。在一些實施例中， R^3 及 R^6 各自為 $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中 R^{12} 及 R^{13} 各自為烷基。

18. 如請求項 17 之化合物，其中該化合物為化合物 (5) 或 (6) 或其異構體：



19. 一種用於量測次氯酸之組合物，其中該組合物包含如請求項 1-18 中任一項之化合物。
20. 如請求項 19 之組合物，其中該組合物進一步包含溶劑、酸、鹼、緩衝溶液或其組合。
21. 一種直接或間接量測樣本中之次氯酸或次氯酸根之方法，其中該方法包含下列步驟：
- a) 使如請求項 1-18 中任一項之化合物與該樣本接觸，以形成螢光化合物；及
 - b) 量測該螢光化合物之螢光性質。
22. 如請求項 21 之方法，其中該樣本為化學樣本或生物樣本。
23. 如請求項 22 之方法，其中該樣本為包含微生物或動物細胞或組織之生物樣本。
24. 一種直接或間接偵測樣本中之次氯酸或次氯酸根之高物料通過量篩檢螢光分析法，其中該高物料通過量法包含下列步驟：
- a) 使如請求項 1-18 中任一項之化合物與該等樣本接觸，以形成一或多種螢光化合物；及

b) 量測該等螢光化合物之螢光性質，以測定該等樣本中之次氯酸的量。

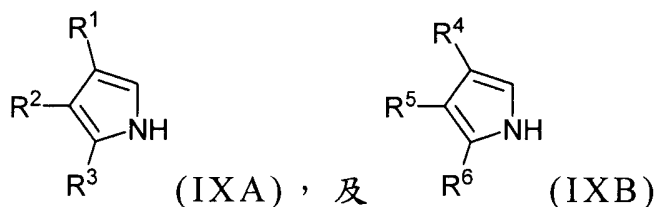
25. 一種篩檢一或多種直接或間接增加或減少次氯酸或次氯酸根含量之目標化合物的高物料通過量法，其中該高物料通過量法包含下列步驟：

a) 使如請求項 1-18 中任一項之化合物與該等目標化合物接觸，以形成一或多種螢光化合物；及

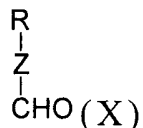
b) 量測該等螢光化合物之螢光性質，以定性或定量該等目標化合物。

26. 一種製備如請求項 1 之化合物之方法，其包含下列步驟：

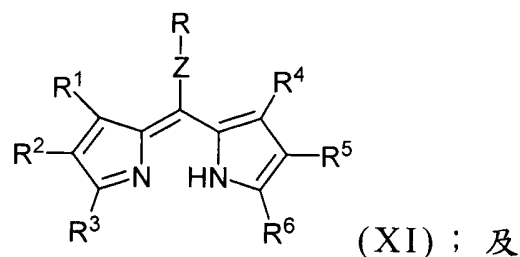
a) 於酸觸媒存在下，使式 (IXA) 及 (IXB) 之吡咯：



與式 (X) 之醛反應：



b) 將苯醌添加至該反應混合物，以形成式 (XI) 之二吡咯：



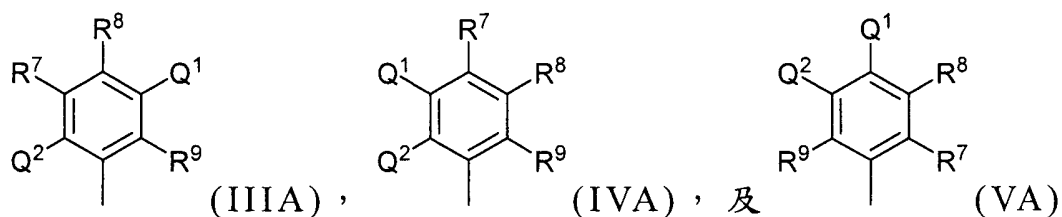
c)使式(XI)之二吡咯與具有式 BX_3 之三鹵化硼及三乙胺反應，其中

X為鹵基；

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 及 R^6 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、雜烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、磺醯基、膦醯基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-Y$ 或 $-C(=O)-Q-Y$ ，其中Y為氫、鹵基、烷氧基、羥基、硫基、烷基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、胺基甲酸酯、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基、烷基硫基、雜烷基，或具有3至7個環原子之雜環基；且Q為伸烷基、伸烯基、伸炔基、伸芳基、伸芳烷基或伸烷芳基；

Z為一鍵結或二價鍵聯基團；

R具有式(IIIA)、(IVA)及(VA)中之一者：



其中 R^7 、 R^8 及 R^9 各自獨立地為氫、鹵基、烷基、鹵烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、雜環基、環烷基、環烯基、環炔基、羥基、硫基、烷氧基、烷基硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、醯基、胺基甲酸酯、醯胺基、胺基、烷基胺基、芳基胺基、二烷基胺基、烷基芳基胺基、二芳基胺基或雜烷基，或式 (IIIA)、(IVA) 或 (VA) 之 R^7 及 R^8 或式 (IVA) 之 R^8 及 R^9 共同形成 5 員、6 員或 7 員環烷基環、環烯基環、芳基環、雜烷基環或雜芳基環；且

Q^1 及 Q^2 各自獨立地為胺基或 $-O-Q^3$ ，其中 Q^3 為氫、烷基、烯基、烷氧基烷基、環烷基、環烯基、環炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、烷基醯胺基、烷氧基醯胺基、烷氧基羰基、鹵烷基或雜烷基，其限制條件為 Q^1 及 Q^2 不同時為胺基。

27. 如請求項 26 之方法，其中該反應在溶劑中發生。
28. 如請求項 26 之方法，其中該苯醌為 2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌 (DDQ)。
29. 如請求項 26 之方法，其中該酸觸媒為三氟乙酸。
30. 如請求項 26 之方法，其中該三鹵化硼為 BF_3 、 BCl_3 、 BBr_3 或其組合。
31. 如請求項 26 之方法，其中式 (IXA) 之吡咯與式 (IXB) 之吡咯相同。

十一、圖式：

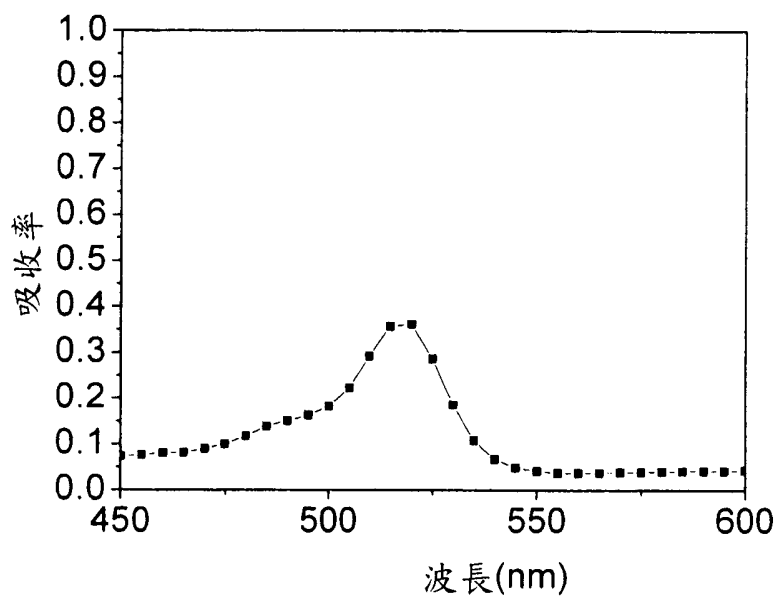


圖 1

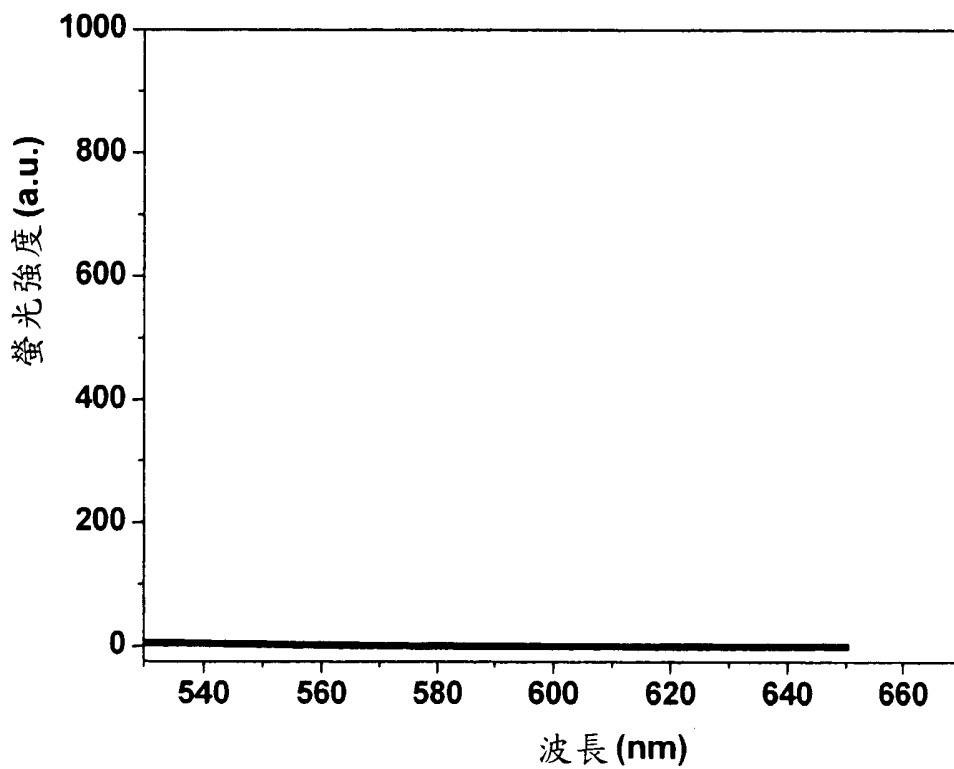


圖 2

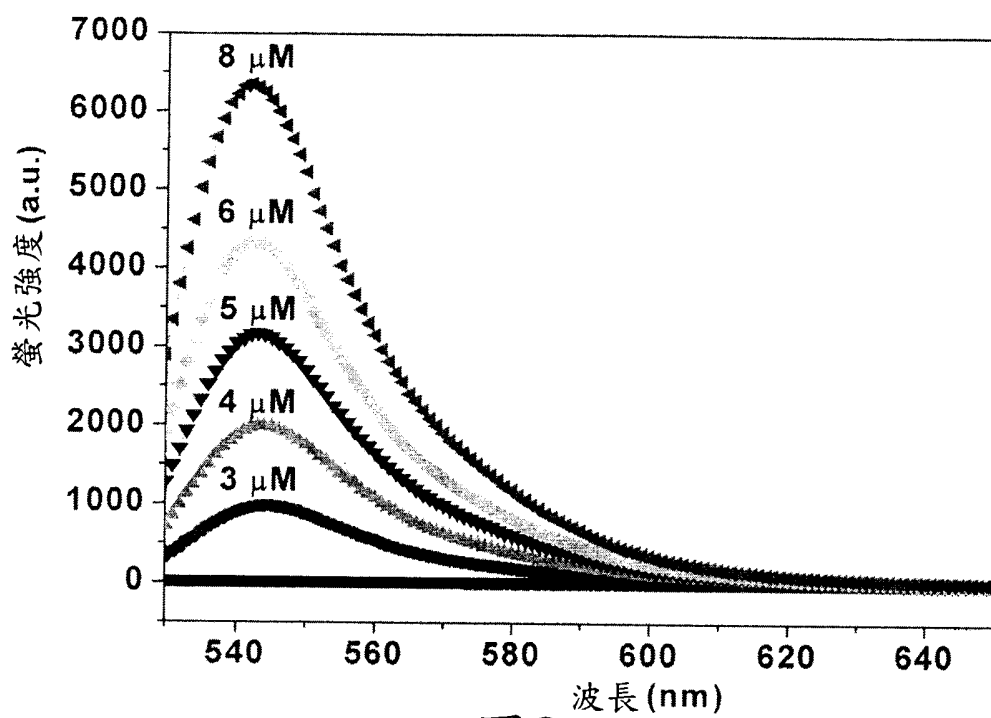


圖3

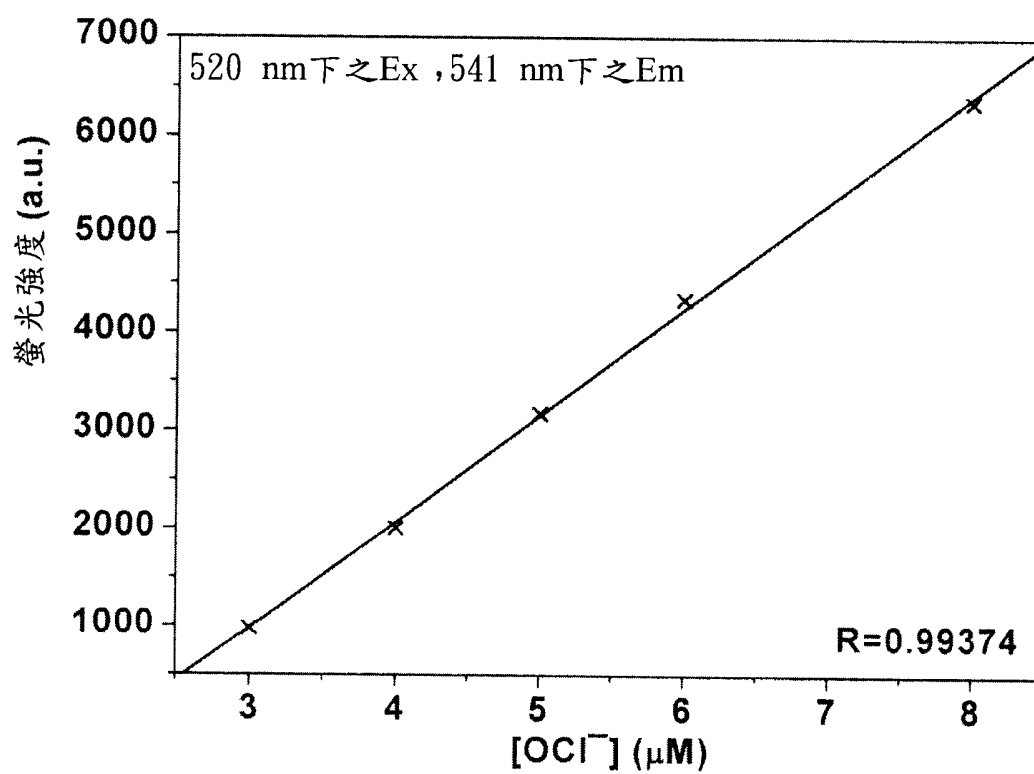


圖4

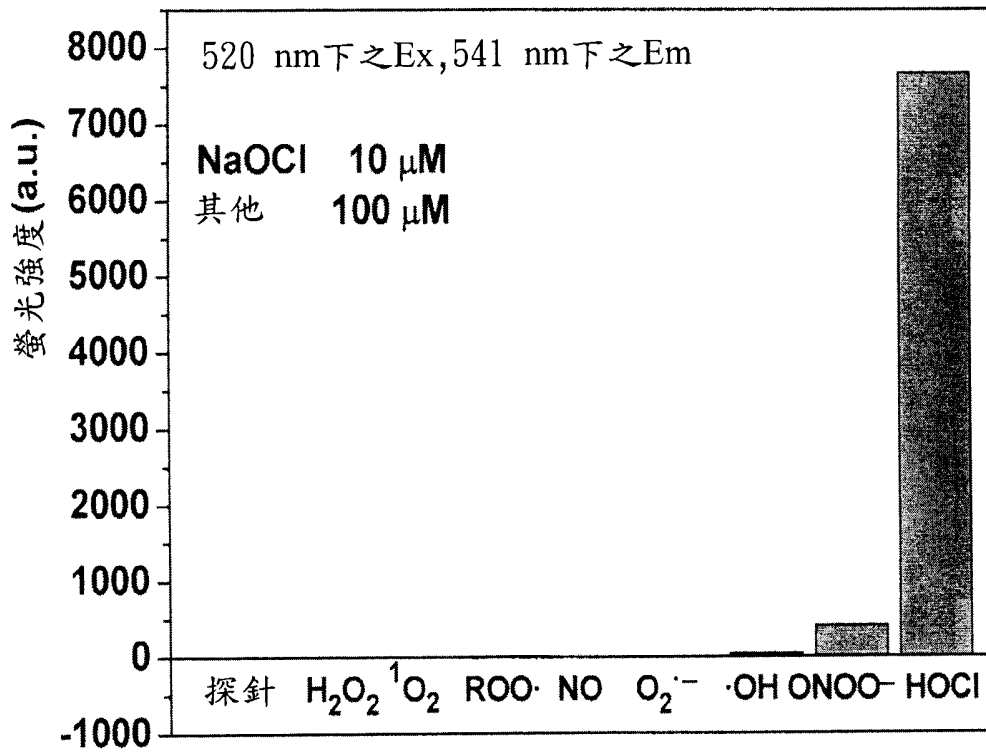


圖5

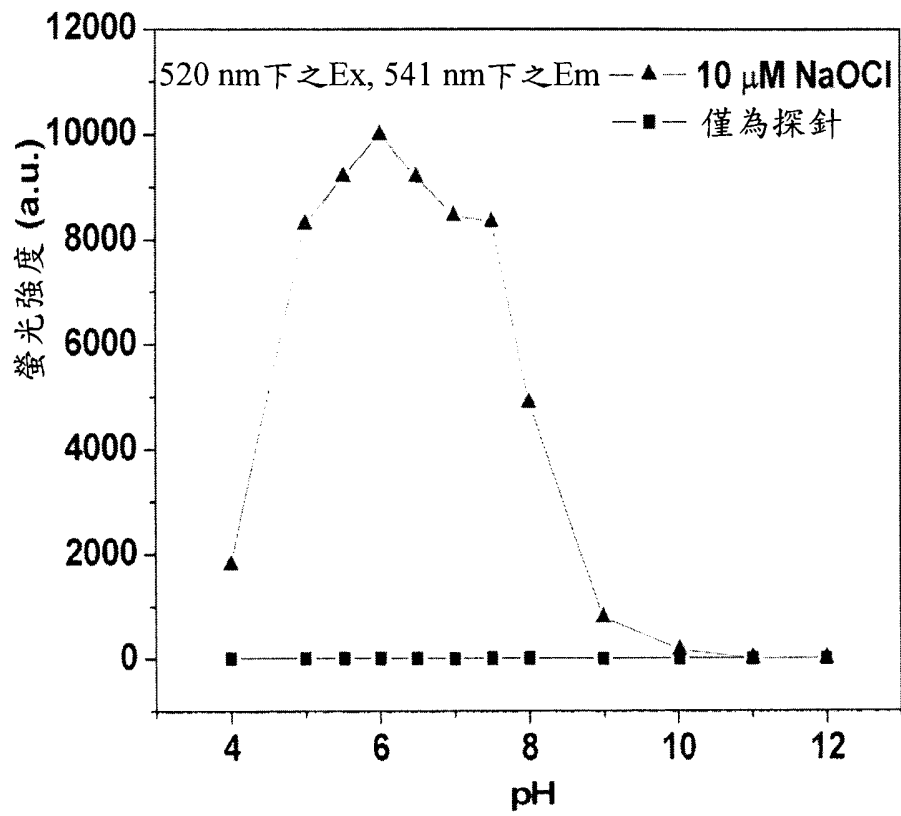


圖6

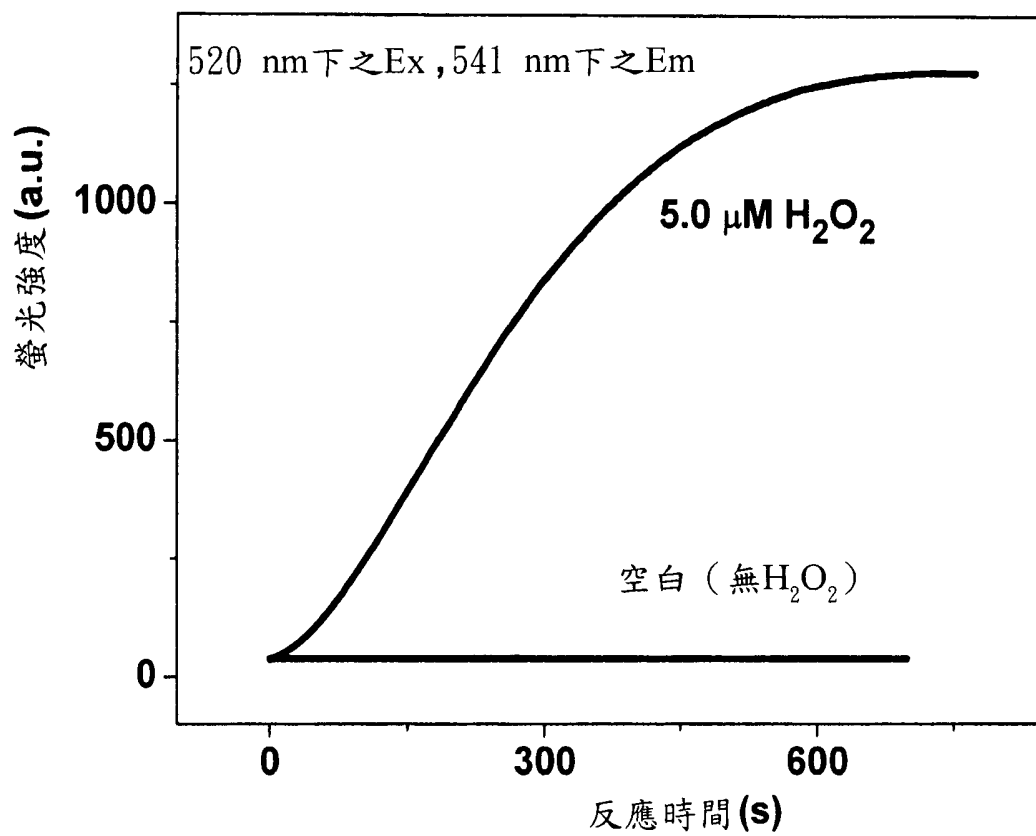


圖 7

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

