



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101983194 A

(43) 申请公布日 2011.03.02

(21) 申请号 200980112496.9

代理人 张萍 刘健

(22) 申请日 2009.04.03

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G07D 311/96 (2006.01)

61/041923 2008.04.03 US

G01N 21/77 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.09.30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2009/000365 2009.04.03

(87) PCT申请的公布数据

WO2009/121244 EN 2009.10.08

(71) 申请人 港大科桥有限公司

地址 中国香港数码港

申请人 晨兴创投有限公司

(72) 发明人 杨丹 彭涛

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

权利要求书 7 页 说明书 26 页

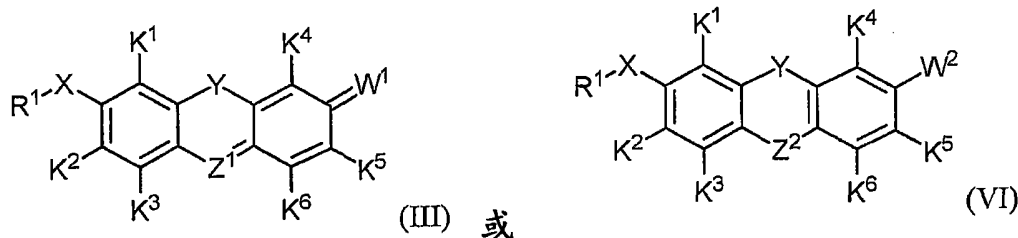
(54) 发明名称

荧光团化合物

(57) 摘要

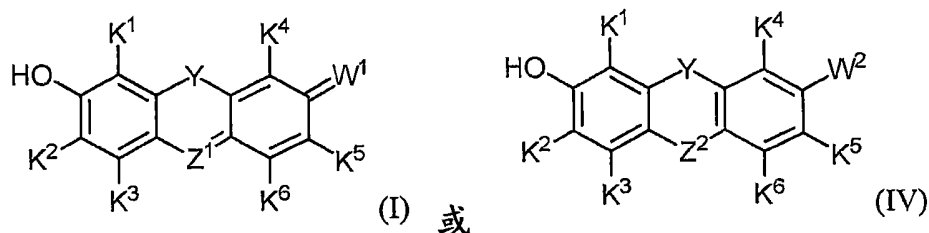
本文提供包括对甲氨基酚和若丹明化合物的可用作荧光标记和 / 或荧光探针的荧光团化合物及其制备方法。本文还提供用来示踪、测量、检测或筛选生物物质的方法,所述生物物质如或有机体中的蛋白质、DNA、酶、抗体、细胞器、细胞、组织、药物、激素、核苷酸、核酸、多糖或脂质。具体而言,所述方法包括以下步骤:使本文所公开的荧光团化合物、对甲氨基酚化合物和若丹明化合物中的任何一种与生物物质接触,以形成一种或多种荧光化合物,以及测量荧光化合物的荧光性质。本文还提供用于检测或筛选生物物质的高通量荧光筛选方法。

1. 制备式 (III) 或 (VI) 的荧光团化合物或其盐的方法：

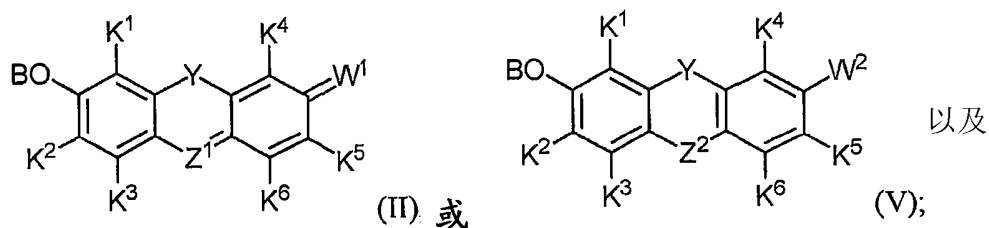


所述方法包含以下步骤：

(a) 使式 (I) 或 (IV) 的化合物：



分别与式 B-X' 的羟基活化剂反应, 分别得到中间体 (II) 或 (V)：



(b) 在钯催化剂的存在下, 使中间体 (II) 或 (V) 与式 HXR¹ 的亲核试剂偶联, 分别形成式 (III) 或 (VI) 的荧光团化合物,

其中 OB 是羟基活化基团；

W¹ 是 O 或 S；

W² 是 O-A、S-A 或 NR³R⁴；

X 是 NR²、O 或 S；

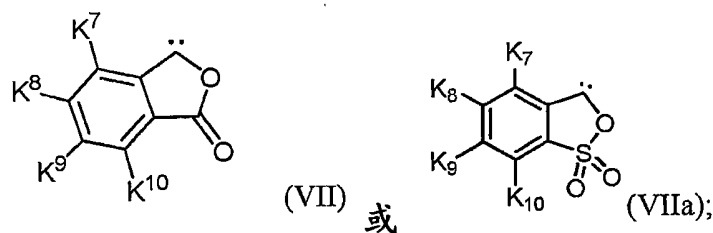
Y 是 O、S、Se、NR⁵ 或 CR⁶R⁷；

Z¹ 是 CR⁸ 或 N；

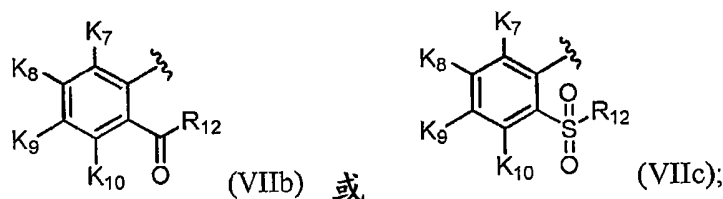
Z² 是 CR⁹R¹⁰ 或 NR¹¹；

A 是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、酰基、氨基羰基、羟基保护基或反应性官能团；

R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁹、R¹⁰ 和 R¹¹ 各自独立地为 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团；或者 CR⁹R¹⁰ 是式 (VII) 或 (VIIa) 的取代 2-羧基苯基 -C 基团：



R^8 是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团,或者具有式 (VIIb) 或 (VIIc) :

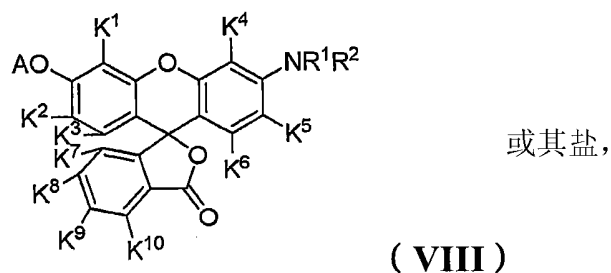


K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰基氨基、羟基、硫代、硫代烷基、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、芳氧基、芳基烷氧基、酰氧基、氰基、硝基、巯基、氨基甲酰基、三氟甲基、苯氧基、苄氧基、磺酰基、膦酰基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-P^1$ 或 $-C(=O)-Q-P^2$;

P^1 和 P^2 各自独立地为氢、卤素、烷氧基、羟基、硫代、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、氨基甲酰氧基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3-7 个环原子的杂环基 ;以及

Q 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基。

2. 权利要求 1 所述方法,其中所述荧光团化合物具有式 (VIII) :



其中 A 是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、酰基、氨基羰基、羟基保护基或反应性官能团 ;

R^1 和 R^2 各自独立地为 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团 ;

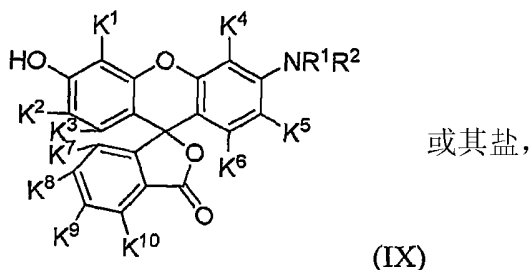
K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰基氨基、羟基、硫代、硫

代烷基、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、芳氧基、芳基烷氧基、酰氧基、氰基、硝基、巯基、氨基甲酰基、三氟甲基、苯氧基、苄氧基、磺酰基、膦酰基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-P^1$ 或 $-C(=O)-Q-P^2$;

P^1 和 P^2 各自独立地为氢、卤素、烷氧基、羟基、硫代、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、氨基甲酰氧基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3-7 个环原子的杂环基 ; 以及

Q 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基。

3. 权利要求 1 所述方法, 其中所述荧光团化合物具有式 (IX) :



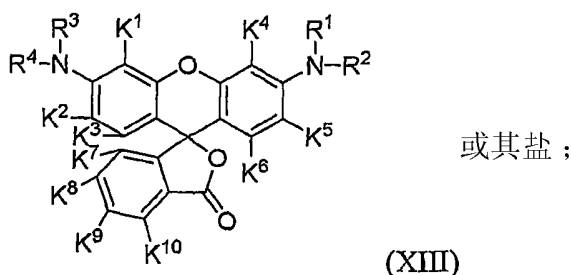
其中 R^1 和 R^2 各自独立地为 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团 ;

K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰基氨基、羟基、硫代、硫代烷基、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、芳氧基、芳基烷氧基、酰氧基、氰基、硝基、巯基、氨基甲酰基、三氟甲基、苯氧基、苄氧基、磺酰基、膦酰基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-P^1$ 或 $-C(=O)-Q-P^2$;

P^1 和 P^2 各自独立地为氢、卤素、烷氧基、羟基、硫代、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、氨基甲酰氧基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3-7 个环原子的杂环基 ; 以及

Q 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基。

4. 权利要求 1 所述方法, 其中所述荧光团化合物具有式 (XIII) :



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地为 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团 ;

K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基烷基、氨基烷基、氨

基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰基氨基、羟基、硫代、硫代烷基、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、芳氧基、芳基烷氧基、酰氧基、氰基、硝基、巯基、氨基甲酰基、三氟甲基、苯氧基、苄氧基、磺酰基、膦酰基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-P^1$ 或 $-C(=O)-Q-P^2$;

P^1 和 P^2 各自独立地为氢、卤素、烷氧基、羟基、硫代、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、氨基甲酰氧基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3-7 个环原子的杂环基;以及

Q 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基。

5. 权利要求 1 所述方法,其中 R^1 与 R^3 相同,且 R^2 与 R^4 相同。

6. 权利要求 1-5 中任一项所述方法,其中 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H。

7. 权利要求 1-5 中任一项所述方法,其中 K^1 、 K^3 、 K^4 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H;且 K^2 和 K^5 各自独立地为氯或氟。

8. 权利要求 1-7 中任一项所述方法,其中 R^1 和 R^2 是烷基。

9. 权利要求 1-7 中任一项所述方法,其中 R^1 和 R^2 各自独立地为甲基、乙基、丙基或丁基。

10. 权利要求 1-7 中任一项所述方法,其中 R^1 是氢, R^2 是烷基。

11. 权利要求 1-10 中任一项所述方法,其中所述羟基活化基团是甲磺酰氧基、对甲苯磺酰氧基、三氟甲磺酰氧基、九氟丁磺酰氧基、对硝基苯甲酰氧基或膦酰氧基。

12. 权利要求 1-10 中任一项所述方法,其中所述羟基活化剂是甲磺酰卤、三氟甲磺酰卤、甲苯磺酰卤、九氟丁磺酰卤、甲磺酸酐、三氟甲磺酸酐、甲苯磺酸酐、九氟丁磺酸酐或其组合。

13. 权利要求 1-10 中任一项所述方法,其中 B 是磺酰基、羧基或膦酰基。

14. 权利要求 13 所述方法,其中 B 是磺酰基,其选自甲磺酰基、三氟甲磺酰基、甲苯磺酰基或九氟丁磺酰基。

15. 权利要求 1-14 中任一项所述方法,其中所述亲核试剂中的 X 是 NR^2 ,其中 R^1 和 R^2 各自独立地是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团。

16. 权利要求 1-15 中任一项所述方法,其中所述钨催化剂包含至少一种钨源。

17. 权利要求 16 所述方法,其中所述钨源是乙酸钨、三(二亚苄基丙酮)二钨或其组合。

18. 权利要求 1-16 中任一项所述方法,其中所述钨催化剂包含至少一种膦配体或卡宾配体。

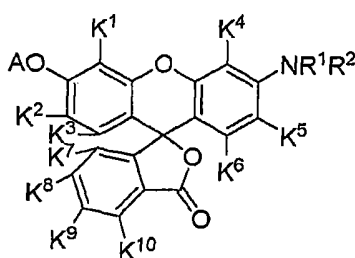
19. 权利要求 18 所述方法,其中所述膦配体是外消旋 -2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联二萘(BINAP)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁(dppf)、2-(二环己基膦基)联苯、三环己基膦、三苯基膦、三-叔丁基膦、9,9-二甲基-4,5-双(二苯基膦基)咕吨(Xantphos)、2-(二-叔丁基膦基)联苯或外消旋 -2-(二叔丁基膦基)-1,1'-联萘。

20. 权利要求 1-19 中任一项所述方法,其中所述羟基保护基是苄氧基羰基、4-硝基

苄氧基羰基、4-溴苄氧基羰基、4-甲氧基苄氧基羰基、甲氧基羰基、叔丁氧基羰基、异丙氧基羰基、二苯基甲氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基羰基、2-糠基氧基羰基、烯丙氧基羰基、乙酰基、甲酰基、氯乙酰基、三氟乙酰基、甲氧基乙酰基、苄氧基乙酰基、苯甲酰基、甲基、叔丁基、2,2,2-三氯乙基、2-(三甲基甲硅烷基)乙基、1,1-二甲基-2-丙烯基、3-甲基-3-丁烯基、烯丙基、苄基、对甲氧基苄基二苯基甲基、三苯基甲基(三苯甲基)、四氢呋喃基、甲氧基甲基、甲基硫代甲基、苄氧基甲基、2,2,2-三氯乙氧基甲基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基、甲磺酰基、对甲苯磺酰基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基或三异丙基甲硅烷基。

21. 权利要求 1-20 中任一项所述方法,其中所述反应性官能团衍生自丙烯酰胺、酰叠氮、酰卤、腈、醛、酮、烷基卤、烷基磺酸酯、酸酐、芳基卤、炔、醇、胺、羧酸、碳二亚胺、重氮烷、环氧化物、卤代乙酰胺、羟胺、肼、亚氨酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、磺酸酯或磺酰卤。

22. 式 (VIII) 的荧光团化合物或其盐:



(VIII),

其中 A 是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、酰基、氨基羰基、羟基保护基或反应性官能团;

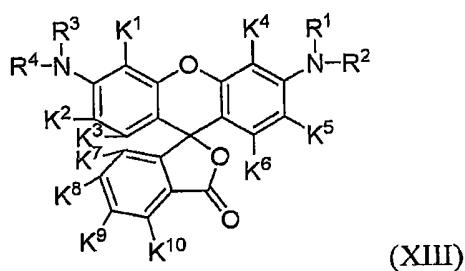
R¹ 和 R² 各自独立地为 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团;

K¹、K²、K³、K⁴、K⁵、K⁶、K⁷、K⁸、K⁹ 和 K¹⁰ 各自独立地为 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰基氨基、羟基、硫代、硫代烷基、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、芳氧基、芳基烷氧基、酰氧基、氰基、硝基、巯基、氨基甲酰基、三氟甲基、苯氧基、苄氧基、磺酰基、膦酰基、磺酸酯、磷酸酯、-C(=O)-P¹ 或 -C(=O)-Q-P²;

P¹ 和 P² 各自独立地为氢、卤素、烷氧基、羟基、硫代、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、氨基甲酰氧基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3-7 个环原子的杂环基;以及

Q 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基,条件是 R¹ 和 R² 中的至少一个包含反应性官能团。

23. 式 (XIII) 的荧光团化合物或其盐:



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 各自独立地为 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团；

K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰基氨基、羟基、硫代、硫代烷基、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、芳氧基、芳基烷氧基、酰氧基、氰基、硝基、巯基、氨基甲酰基、三氟甲基、苯氧基、苄氧基、磺酰基、膦酰基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-P^1$ 或 $-C(=O)-Q-P^2$ ；

P^1 和 P^2 各自独立地为氢、卤素、烷氧基、羟基、硫代、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、氨基甲酰氧基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3-7 个环原子的杂环基；以及

Q 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基，条件是 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 中的至少一个包含反应性官能团。

24. 权利要求 23 所述荧光团化合物，其中 R^1 与 R^3 相同，且 R^2 与 R^4 相同。

25. 权利要求 22-24 中任一项所述荧光团化合物，其中 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H。

26. 权利要求 22-25 中任一项所述荧光团化合物，其中 K^1 、 K^3 、 K^4 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H； K^2 和 K^5 各自独立地为氯或氟。

27. 权利要求 22-26 中任一项所述荧光团化合物，其中 R^1 和 R^2 各自为烷基。

28. 权利要求 22-27 中任一项所述荧光团化合物，其中 R^1 和 R^2 各自独立地为甲基、乙基、丙基或丁基。

29. 权利要求 22-28 中任一项所述荧光团化合物，其中 R^1 是氢， R^2 是烷基。

30. 权利要求 22-29 中任一项所述荧光团化合物，其中所述反应性官能团衍生自丙烯酰胺、酰叠氮、酰卤、腈、醛、酮、烷基卤、烷基磺酸酯、酸酐、芳基卤、炔、醇、胺、羧酸、碳二亚胺、重氮烷、环氧化物、卤代乙酰胺、羟胺、肼、亚氨酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、磺酸酯或磺酰卤。

31. 权利要求 22-30 中任一项所述荧光团化合物，其中所述羟基保护基是苄氧基羰基、4-硝基苄氧基羰基、4-溴苄氧基羰基、4-甲氧基苄氧基羰基、甲氧基羰基、叔丁氧基羰基、异丙氧基羰基、二苯基甲氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基羰基、2-糠基氧基羰基、烯丙氧基羰基、乙酰基、甲酰基、氯乙酰基、三氟乙酰基、甲氧基乙酰基、苄氧基乙酰基、苯甲酰基、甲基、叔丁基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基甲硅烷基乙基、1,1-二甲基-2-丙烯基、3-甲基-3-丁烯基、烯丙基、苄基、对甲氧基苄基二苯基甲基、三苯基

甲基(三苯甲基)、四氢呋喃基、甲氧基甲基、甲基硫代甲基、苄氧基甲基、2,2,2-三氯乙氧基甲基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基、甲磺酰基、对甲苯磺酰基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基或三异丙基甲硅烷基。

32. 示踪、检测、测量或筛选生物物质的方法,其中所述方法包含以下步骤:

a) 使权利要求 22-31 中任一项所述荧光团化合物与所述生物物质接触,以形成荧光化合物;以及

b) 测量所述荧光化合物的荧光性质。

33. 如权利要求 32 所述方法,其中所述生物物质包括来自动物的蛋白质、DNA、酶、抗体、细胞器、细胞、组织、药物、激素、核苷酸、核酸、多糖或脂质。

34. 权利要求 32 所述方法,其中所述动物是人。

35. 示踪或检测样品中的生物物质的高通量荧光筛选方法,其中所述高通量方法包含以下步骤:

a) 使权利要求 22-31 中任一项所述荧光团化合物与所述样品接触,以形成一种或多种荧光化合物;以及

b) 测量所述荧光化合物的荧光性质,以确定所述样品中生物物质的量。

36. 权利要求 35 所述方法,其中所述生物物质包括来自动物的蛋白质、DNA、酶、抗体、细胞器、细胞、组织、药物、激素、核苷酸、核酸、多糖或脂质。

37. 权利要求 36 所述方法,其中所述动物是人。

荧光团化合物

[0001] 相关在先申请

[0002] 本申请要求 2008 年 4 月 3 日提交的序列号为 61/041923 的美国临时专利申请的优先权。就美国专利实践而言,通过引用将该临时申请整体并入本文。

[0003] 领域

[0004] 本文提供荧光团化合物。具体地,本文提供包括对甲氨基酚和若丹明、可用作荧光标记 (fluorescent label) 和 / 或荧光探针 (fluorogenic probe) 的荧光团化合物。本文还提供制备本文所公开的荧光团化合物的新颖而通用的方法。本文还提供示踪、测量、检测或筛选生物物质 (biological species) 的方法。

[0005] 背景

[0006] 在包括化学和生物学的许多领域,荧光技术受到的关注日益增多。在某些情况中,荧光分子可用于检测食品和环境样品中是否存在分析物或化学品。在离体生化分析 (如 DNA 测序和血糖定量) 中,需要一些灵敏的荧光定量检测设备。在一些情况中,具有合适的光化学性质的荧光探针可用于示踪活细胞中的分子和生理学事件,以及用于高通量筛选。一般地,荧光技术比其他类型的光学测量更简单,并可提供更高的灵敏度和更多的分子信息。荧光测量一般是高度灵敏的,因为大多数化学和生物样品中发现的荧光背景一般处于低水平。随着荧光仪器 (如共焦和多光子荧光显微镜) 领域最近取得的进展,细胞事件的实时三维成像和生物物质的实时动力学研究已经变得可能。

[0007] 尽管有以上提及的优点,但将荧光技术用于特定应用的可行性往往可受到适当荧光分子的可利用性的限制。荧光分子一般包括荧光标记 (或荧光示踪剂) 分子和荧光探针 (或荧光传感器 (fluorogenic sensor)) 分子,二者在其荧光性质上有所不同。一般地,荧光标记分子的荧光总是处于“开启”状态。荧光标记分子可用于示踪生物物质。相反,可通过与某些分析物或化学品键合或反应来改变荧光探针分子的荧光性质。因此,荧光探针分子可用于示踪、测量、检测或筛选与荧光探针分子键合或反应的各种分析物或化学品。

[0008] 当用作荧光标记或荧光染料时,荧光标记分子需要与生物活性靶标 (如蛋白质、DNA、酶、抗体、细胞器、细胞、组织、药物、激素、核苷酸、核酸、多糖、脂质或其他生物分子) 反应,得到所述靶标的荧光衍生物。可与生物活性靶标反应的可利用荧光标记分子的数目一般是有限的。活性荧光素和若丹明衍生物是迄今为止最广泛使用的荧光标记分子,因为可通过常用光源 (如氩激光 (488nm 和 514nm 线) 和汞弧光灯 (546nm 线)) 将它们适当激发。然而,它们具有一些可能使它们无法用于一些有用应用的不利性质。例如,荧光素衍生物可相对快速地被光漂白,而且可显示依赖于 pH 的吸收性,这在等于或小于 7 的生理 pH 值下导致荧光显著减弱。另一方面,虽然相比于荧光素衍生物,若丹明衍生物对光相对稳定,且表现出发荧光对 pH 不敏感,但它们在水溶液中的量子产率低得多,而且与蛋白质缀合时进一步降低量子产率。此外,若丹明衍生物及其缀合物 (conjugates) 的低水溶性对包含若丹明衍生物的荧光标记分子的制备和使用带来困难。

[0009] 鉴于以上提及的荧光素和若丹明衍生物的不利性质,对新的荧光标记分子存在需求,所述新的荧光标记分子相对于荧光素和若丹明衍生物具有改进的性质。一些对甲氨

基酚或荧光素衍生物（如 Ioffe 等, J. Org. Chem. USSR 1965, 1, 326-336 ; Reynolds G. A. , 美国专利第 3932415 号 ; Lee 等, Cytometry 1989, 10, 151-164 ; Haugland 等, 美国专利第 5227487 号 ; Whitaker 等, Anal. Biochem. 1992, 207, 267-279 中所描述的那些）可用作另选的 (alternative) 荧光标记分子, 因为它们一般具有荧光素和若丹明的合意性质。例如, 它们具有合意的吸收性质, 其荧光对生理范围内的 pH 和溶剂极性的敏感度低, 具有高消光系数、高量子产率、高光稳定性, 在各种溶剂中具有高溶解性。

[0010] 虽然对甲氨基酚荧光染料具有合意的性质, 但文献很少报道它们作为荧光标记或荧光探针的应用, 这可能是因为对甲氨基酚化合物难以合成。一般地, 制备对甲氨基酚荧光团的关键合成步骤是在路易斯酸催化剂（如氯化锌）或脱水酸的存在下, 使取代或未取代的间苯二酚与取代或未取代的 6- 酰基 -3- 氨基苯酚缩合。或者, 可通过以下方式制备对甲氨基酚荧光团: 在路易斯酸催化剂的存在下, 使取代或未取代的氨基苯酚与取代或未取代的 4- 酰基 - 间苯二酚缩合。以上提及的一般合成方法一般具有产率低、纯化工作繁琐的缺点。因此, 需要开发更有效的合成方法, 用于制备荧光团化合物, 如对甲氨基酚荧光团。

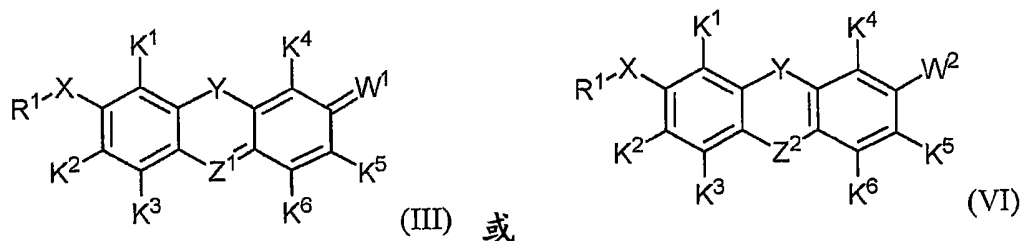
[0011] 最近, 用于不同靶标的荧光探针的开发遭遇瓶颈。这可能是因为大多数目前可利用的荧光探针是根据经验而不是理性地开发, 这可妨碍新的荧光探针的设计。尽管已经报道了一些将理论方法应用于荧光探针设计的方法, 但这些还远远不够。另一种有效的方法涉及荧光探针分子库的组合合成。对甲氨基酚荧光团适合用作荧光探针库, 因为它们具有以上所述的有利的光物理性质。因此, 还需要包括对甲氨基酚荧光团在内的荧光团化合物库, 它可通过新的有效合成方法容易地开发出来, 用于制备本文所公开的荧光团化合物。

[0012] 概述

[0013] 本文提供荧光团化合物（如对甲氨基酚和若丹明荧光团）及其制备方法, 所述荧光团化合物可用作荧光标记和 / 或荧光探针, 用于示踪、测量、检测或筛选生物物质。

[0014] 一方面, 本文提供制备式 (III) 或 (VI) 的荧光团化合物或其盐的方法:

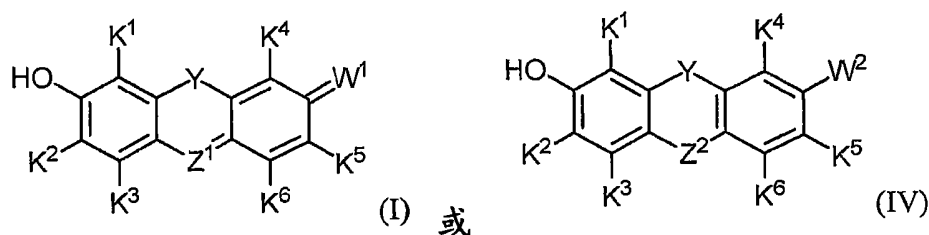
[0015]



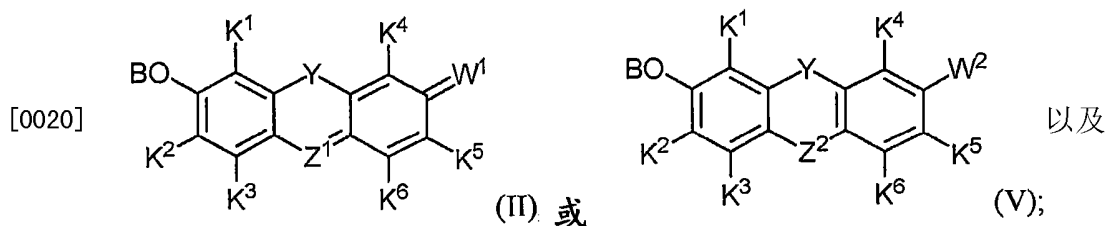
[0016] 所述方法包含以下步骤:

[0017] (a) 使式 (I) 或 (IV) 的化合物:

[0018]



[0019] 分别与式 B-X' 的羟基活化剂反应, 分别得到中间体 (II) 或 (V):



[0021] (b) 在钼催化剂的存在下,使中间体 (II) 或 (V) 与式 HXR^1 的亲核试剂偶联,分别形成式 (III) 或 (VI) 的荧光团化合物,

[0022] 其中 OB 是羟基活化基团;

[0023] W^1 是 O 或 S;

[0024] W^2 是 O-A、S-A 或 NR^3R^4 ;

[0025] X 是 NR^2 、O 或 S;

[0026] Y 是 O、S、Se、 NR^5 或 CR^6R^7 ;

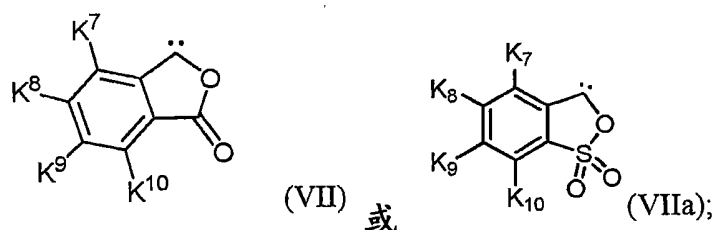
[0027] Z^1 是 CR^8 或 N;

[0028] Z^2 是 CR^9R^{10} 或 NR^{11} ;

[0029] A 是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、酰基、氨基羰基、羟基保护基或反应性官能团;

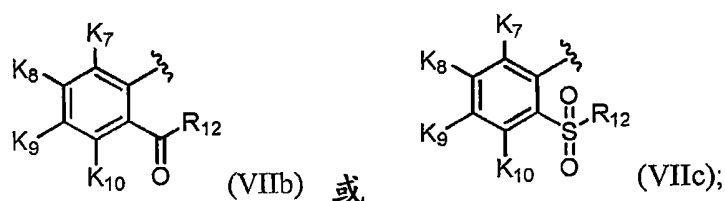
[0030] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^9 、 R^{10} 和 R^{11} 各自独立地为 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团;或者 CR^9R^{10} 是式 (VII) 或 (VIIa) 的取代 2-羧基苯基 -C 基团:

[0031]



[0032] R^8 是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团,或者具有式 (VIIb) 或 (VIIc):

[0033]



[0034] K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰基氨基、羟基、硫代、硫

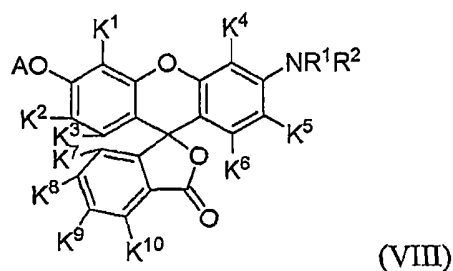
代烷基、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、芳氧基、芳基烷氧基、酰氧基、氰基、硝基、巯基、氨基甲酰基、三氟甲基、苯氧基、苄氧基、磺酰基、膦酰基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-P^1$ 或 $-C(=O)-Q-P^2$;

[0035] P^1 和 P^2 各自独立地为氢、卤素、烷氧基、羟基、硫代、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、氨基甲酰氧基 (carbamate)、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3-7 个环原子的杂环基; 以及

[0036] Q 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基。

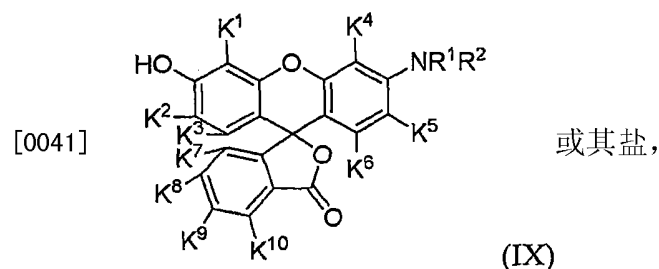
[0037] 在一些实施方式中, 荧光团化合物是式 (VIII) 的对甲氨基酚荧光团或其盐:

[0038]



[0039] 其中 A、 R^1 、 R^2 、 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 如本文所公开。

[0040] 在其他实施方式中, 对甲氨基酚荧光团具有式 (IX):

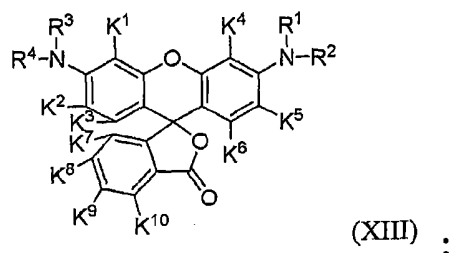


[0041] 或其盐,

[0042] 其中 R^1 、 R^2 、 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 如本文所公开。

[0043] 在其他实施方式中, 荧光团化合物是式 (XIII) 的若丹明荧光团或其盐:

[0044]



[0045] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 如本文所公开。在其他实施方式中, R^1 和 R^3 相同, 且 R^2 和 R^4 相同。

[0046] 在一些实施方式中, 羟基活化基团是甲磺酰氧基 (methanesulfonate)、对甲苯磺酰氧基 (p-toluenesulfonate)、三氟甲磺酰氧基 (trifluoromethanesulfonate)、九氟丁磺酰氧基 (nonafluorobutanesulfonate)、对硝基苯甲酰氧基 (p-nitrobenzoate) 或膦酰氧基 (phosphonate)。在其他实施方式中, 羟基活化剂是甲磺酰卤、三氟甲磺酰卤、甲苯磺酰卤、九氟丁磺酰卤 (nonfluorobutyl halide)、甲磺酸酐、三氟甲磺酸酐、甲苯磺酸酐、九氟丁磺酸

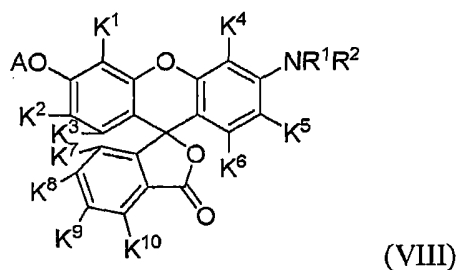
酐 (nonflyl anhydride) 或其组合。在另外实施方式中, B 是磺酰基、羧基或膦酰基。在另外实施方式中, B 是磺酰基, 其选自甲磺酰基、三氟甲磺酰基、甲苯磺酰基或九氟丁磺酰基 (nonflyl)。

[0047] 在某些实施方式中, 亲核试剂中的 X 是 NR^2 , 其中 R^1 和 R^2 各自独立地是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团。

[0048] 在一些实施方式中, 钯催化剂包含至少一种钯源。在其他实施方式中, 所述钯源是乙酸钯、三(二亚苺基丙酮)二钯或其组合。在另外实施方式中, 所述钯催化剂包含至少一种膦配体或卡宾配体。在另外实施方式中, 所述膦配体是外消旋 (rac)-2,2'-双(二苺基膦基)-1,1'-联二萘 (BINAP)、1,1'-双(二苺基膦基)二茂铁 (dppf)、2-(二环己基膦基)联苺、三环己基膦、三苺基膦、三-叔丁基膦、9,9-二甲基-4,5-双(二苺基膦基)咕吨 (Xantphos)、2-(二-叔丁基膦基)联苺或外消旋-2-(二叔丁基膦基)-1,1'-联萘。

[0049] 另一方面, 本文明提供式 (VIII) 的对甲氨基酚化合物或其盐:

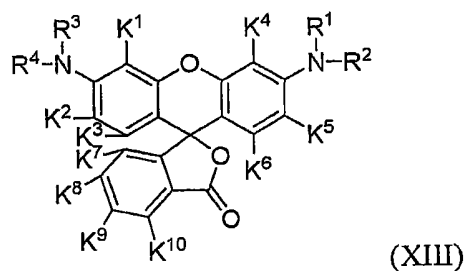
[0050]



[0051] 其中 A、 R^1 、 R^2 、 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 如本文所公开, 条件是 R^1 和 R^2 中的至少一个包含反应性官能团。

[0052] 另一方面, 本文提供式 (XIII) 的若丹明化合物或其盐:

[0053]



[0054] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 如本文所公开, 条件是 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 中的至少一个包含反应性官能团。在其他实施方式中, R^1 和 R^3 相同, 且 R^2 和 R^4 相同。

[0055] 在一些实施方式中, K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H。在其他实施方式中, R^1 和 R^2 各自是烷基。在另外实施方式中, K^1 、 K^3 、 K^4 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H; 且 K^2 和 K^5 各自独立地为氯或氟。在另外实施方式中, R^1 和 R^2 各自是甲基、乙基、丙基或丁基。在另外实施方式中, R^1 是 H, R^2 是烷基。

[0056] 在某些实施方式中, 羟基保护基是苺氧基羰基、4-硝基苺氧基羰基、4-溴苺氧基羰基、4-甲氧基苺氧基羰基、甲氧基羰基、叔丁氧基羰基、异丙氧基羰基、二苺基甲氧基羰基

基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基羰基、2-糠基氧基羰基、烯丙氧基羰基、乙酰基、甲酰基、氯乙酰基、三氟乙酰基、甲氧基乙酰基、苄氧基乙酰基、苯甲酰基、甲基、叔丁基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基甲硅烷基乙基、1,1-二甲基-2-丙烯基、3-甲基-3-丁烯基、烯丙基、苄基、对甲氧基苄基二苯基甲基、三苯基甲基(三苯甲基(trityl))、四氢呋喃基、甲氧基甲基、甲基硫代甲基(methylthiomethyl)、苄氧基甲基、2,2,2-三氯乙氧基甲基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基、甲磺酰基、对甲苯磺酰基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基或三异丙基甲硅烷基。

[0057] 在一些实施方式中,通过去除氢或单价原子或基团(如OH或卤素),从以下化合物衍生反应性官能团:丙烯酰胺、酰叠氮、酰卤、腈、醛、酮、烷基卤、烷基磺酸酯(alkyl sulfonate)、酸酐、芳基卤、炔、醇、胺、羧酸、碳二亚胺、重氮烷、环氧化物、卤代乙酰胺、羟胺、肼、亚氨酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、磺酸酯或磺酰基。

[0058] 另一方面,本文提供示踪、检测、测量或筛选生物物质的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0059] a) 使本文公开的对甲氨基酚化合物与生物物质接触,以形成荧光化合物;以及

[0060] b) 测量该荧光化合物的荧光性质。

[0061] 另一方面,本文提供用于示踪或检测样品中的生物物质的高通量荧光筛选方法(high-throughput screening fluorescent methods),其中该高通量方法包括以下步骤:

[0062] a) 使本文公开的对甲氨基酚与样品接触,以形成一种或多种荧光化合物;以及

[0063] b) 测量所述荧光化合物的荧光性质,以确定样品中生物物质的量。

[0064] 在一些实施方式中,生物物质包括来自动物的蛋白质、DNA、酶、抗体、细胞器、细胞、组织、药物、激素、核苷酸、核酸、多糖或脂质。在另外实施方式中,所述动物是人。

[0065] 定义

[0066] 为了促进理解本文所公开的主题,以下定义本文所用的许多术语、缩写或其他简写形式(shorthand)。未加定义的任何术语、缩写或简写形式应理解为具有在本申请递交同期本领域技术人员所使用的普通含义。

[0067] “氨基”指可任选被取代的伯胺、仲胺或叔胺。具体包括作为杂环的成员的仲胺或叔胺氮原子。还具体包括例如被酰基部分取代的仲氨基或叔氨基。氨基的一些非限制性例子包括 $-NR_6R_7$,其中 R_6 和 R_7 各自独立地为氢、烷基、芳基、芳烷基、烷芳基、环烷基、酰基、杂烷基、杂芳基或杂环基。

[0068] “烷基”指含碳和氢的完全饱和的无环单价基团,其可以是支链的或直链的。在一些实施方式中,烷基含有约1至约25个碳原子。烷基的例子为甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、正庚基、正己基、正辛基和正癸基。“低级烷基”指具有1-6个碳原子的烷基,例如甲基、乙基、正丁基、异丁基、叔丁基、异戊基、正戊基和异戊基。

[0069] “杂烷基”指烷基中的一个或多个碳原子被杂原子(如O、S和N)取代的烷基。在一些实施方式中,杂烷基包含一个或多个O原子。在其他实施方式中,杂烷基包含一个或多个S原子。在另外实施方式中,杂烷基包含一个或多个亚氨基(aminylene)。在某些实施方式中,杂烷基包含两个或更多个O、S、亚氨基或其组合。

[0070] “烯基”或“亚烯基”分别指具有至少一个双键的单价或二价烃基。烯基或亚烯基可以是环状的、支链无环的或直链无环的。在一些实施方式中,烯基或亚烯基仅含有一个双

键。在其他实施方式中,烯基或亚烯基含有两个或更多个双键。在另外实施方式中,烯基或亚烯基可以是主链中含有两个至八个碳原子的低级烯基或低级亚烯基。在另外实施方式中,烯基或亚烯基可具有一个双键和至多 25 个碳原子,例如乙烯基、丙烯基、异丙烯基、丁烯基、异丁烯基、己烯基等。

[0071] “炔基”或“亚炔基”分别指具有至少一个三键的单价或二价烃基。在一些实施方式中,炔基或亚炔基仅含有一个三键。在其他实施方式中,炔基或亚炔基含有两个或更多个三键。在另外实施方式中,炔基或亚炔基可以是主链中含有两个至八个碳原子的低级炔基或低级亚炔基。在另外实施方式中,炔基或亚炔基可具有一个三键和至多 20 个碳原子,例如乙炔基、丙炔基、异丙炔基、丁炔基、异丁炔基、己炔基等。

[0072] “芳族基 (aromatic)”或“芳族基团 (aromatic group)”指芳基或杂芳基。

[0073] “芳基”指任选取代的碳环芳族基团。在一些实施方式中,芳基包括环部分中含有 6-12 个碳原子的单环或双环基团,如苯基、联苯基、萘基、取代苯基、取代联苯基或取代萘基。在其他实施方式中,芳基是苯基或取代苯基。

[0074] “芳烷基”指被芳基取代的烷基。芳烷基的一些非限制性例子包括苄基和苯乙基。

[0075] “烷芳基”指被烷基取代的芳基。烷芳基的一些非限制性例子包括甲基苯基和甲基萘基。

[0076] “酰基”指式 $-C(=O)H$ 、 $-C(=O)-$ 烷基、 $-C(=O)-$ 芳基、 $-C(=O)-$ 芳烷基或 $-C(=O)-$ 烷芳基的单价基团。

[0077] “卤素”或“卤代”指氟、氯、溴和碘。

[0078] “杂原子”指不同于碳和氢的原子。

[0079] “杂环”或“杂环基”指任选取代的、完全饱和或不饱和的、单环或双环芳族基团或非芳族基团,其在至少一个环中具有至少一个杂原子,如 O、S、N、B 和 P。芳族杂环基(即,杂芳基)可在环中具有 1 个或 2 个氧原子、1 个或 2 个硫原子和 / 或 1 至 4 个氮原子,且可通过碳原子或杂原子与分子的其余部分键合。杂芳基的一些非限制性例子包括咪唑基、噁吩基、噁唑基、吡啶基、噁唑基、吡咯基、吡啶基、喹啉基或异喹啉基等。

[0080] “烃”或“烃基”指全部由碳元素和氢元素组成的有机化合物或基团。烃基包括烷基、烯基、炔基和芳基部分。烃基还包括被其他脂族、环状或芳族烃基(如烷芳基、烯芳基和炔芳基)取代的烷基、烯基、炔基和芳基部分。在一些实施方式中,“烃”或“烃基”包含 1 至 30 个碳原子。

[0081] “亚烃基”指通过从烃去除两个氢原子而形成的二价基团,其自由价不在双键上,例如亚芳基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳烷基 (aralkylene) 或亚烷芳基 (alkarylene)。

[0082] 本文用来描述化合物或化学部分的“取代”指该化合物或化学部分的至少一个氢原子被另一个化学部分置换。取代基的非限制性例子是本文所公开的示例性化合物和实施方式中出现的那些取代基,以及卤素;烷基;杂烷基;烯基;炔基;芳基、杂芳基、羟基;烷氧基;氨基;硝基;硫醇;硫醚;亚胺;氰基;酰氨基;膦酸基 (phosphonato);膦;羧基;硫代羰基;磺酰基;磺酰胺;酮;醛;酯;氧代;卤代烷基(例如三氟甲基);碳环烷基,其可以是单环或稠合多环或非稠合多环(例如环丙基、环丁基、环戊基或环己基)或杂环烷基,杂环烷基可以是单环或稠合多环或非稠合多环(例如吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基或噻嗪基);碳环或杂环的、单环或稠合多环或非稠合多环芳基(例如苯基、萘基、吡咯基、吡啶

基、咪唑基、噻吩基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、吡啶基、喹啉基、异喹啉基、吡啶基、吡嗪基、哒嗪基、嘧啶基、苯并咪唑基、苯并噻吩基或苯并咪唑基)；氨基(伯、仲或叔)；o-低级烷基；o-芳基、芳基；芳基-低级烷基； $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ； $-\text{CONH}_2$ ； $-\text{OCH}_2\text{CO NH}_2$ ； $-\text{NH}_2$ ； $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ； $-\text{OCHF}_2$ ； $-\text{CF}_3$ ； $-\text{OCF}_3$ ； $-\text{NH}(\text{烷基})$ ； $-\text{N}(\text{烷基})_2$ ； $-\text{NH}(\text{芳基})$ ； $-\text{N}(\text{烷基})(\text{芳基})$ ； $-\text{N}(\text{芳基})_2$ ； $-\text{CHO}$ ； $-\text{CO}(\text{烷基})$ ； $-\text{CO}(\text{芳基})$ ； $-\text{CO}_2(\text{烷基})$ ；以及 $-\text{CO}_2(\text{芳基})$ ；此类部分还可任选被稠环结构或桥(bridge)(例如 $-\text{OCH}_2\text{O}-$)取代。这些取代基可任选被选自这样的基团的取代基进一步取代。除非另有指明，本文所公开的所有化学基团都可被取代。例如，本文所述的“取代”烷基、烯基、炔基、芳基、烃基或杂环部分是被烃基部分、取代烃基部分、杂原子或杂环取代的部分。此外，取代基可包括其中碳原子被杂原子取代的部分，所述杂原子例如氮、氧、硅、磷、硼、硫或卤素原子。这些取代基可包括卤素、杂环、烷氧基、烯氧基、炔氧基、芳氧基、羟基、保护羟基、酮基、酰基、酰氧基、硝基、氨基、酰氨基、氰基、硫醇、缩酮、缩醛、酯和醚。

[0083] “荧光团”指分子中导致分子发荧光的部分。一般地，它是可吸收特定波长的辐射，并在另一特定波长处再发射辐射的官能团。所发射的辐射的强度和波长一般取决于荧光团和荧光团的化学环境两者。

[0084] “荧光标记”指荧光分子，其荧光始终保持在“开启”状态，也就是说，无论是在与靶标反应之前还是之后，它始终发射荧光。

[0085] “荧光探针”指潜在的荧光分子，其荧光在与靶标反应之前处于“关闭”状态，与靶标反应之后可切换到“开启”状态。

[0086] “羟基活化基团”指不稳定的化学部分，本领域已知其在活化反应过程中(如在取代反应中)活化羟基。例如，可通过用氢取代B基团而将羟基活化基团 $-\text{OB}$ 活化，形成 $-\text{OH}$ 。在一些实施方式中，B是甲磺酰基(甲磺酰基(mesyl))、对甲苯磺酰基(甲苯磺酰基(tosyl))、三氟甲磺酰基(三氟甲磺酰基(triflyl))、九氟丁磺酰基(九氟丁磺酰基(nonflyl))或3-硝基苯磺酰基。羟基活化基团的一些非限制性例子包括甲磺酰氧基(甲磺酸酯基(mesylate))、对甲苯磺酰氧基(甲苯磺酸酯基(tosylate))、三氟甲磺酰氧基(三氟甲磺酸酯基(triflate))、九氟丁磺酰氧基($-\text{OSO}_2-\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_2\text{CF}_3$ ，九氟丁磺酸酯基(nonflate))、对硝基苯甲磺酰氧基、膦酰氧基等。

[0087] “羟基保护基”指不稳定的化学部分，本领域已知其在合成过程中，反应保护羟基不发生(against)不利反应。当不需要它的保护时，可选择性地去除羟基保护基。一些合适的羟基保护基描述于P. G. M. Wuts和T. H. Greene, “Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis”, 第4版, Wiley-Interscience, New York (2006), 通过引用将其并入本文。羟基保护基的一些非限制性例子包括苄氧基羰基、4-硝基苄氧基羰基、4-溴苄氧基羰基、4-甲氧基苄氧基羰基、甲氧基羰基、叔丁氧基羰基、异丙氧基羰基、二苯基甲氧基羰基、2,2,2-三氯乙氧基羰基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基羰基、2-糠基氧基羰基、烯丙氧基羰基、乙酰基、甲酰基、氯乙酰基、三氟乙酰基、甲氧基乙酰基、苄氧基乙酰基、苯甲酰基、甲基、叔丁基、2,2,2-三氯乙基、2-三甲基甲硅烷基乙基、1,1-二甲基-2-丙烯基、3-甲基-3-丁烯基、烯丙基、苄基、对甲氧基苄基二苯基甲基、三苯基甲基(三苯甲基)、四氢咪唑基、甲氧基甲基、甲基硫代甲基、苄氧基甲基、2,2,2-三氯乙氧基甲基、2-(三甲基甲硅烷基)乙氧基甲基、甲磺酰基、对甲苯磺酰基、三甲基甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基等。

在一些实施方案中,羟基保护基是乙酰基、苯甲酰基或三甲基甲硅烷基。

[0088] “反应”“加入 (adding)”等指使一种反应物、试剂、溶剂、催化剂、反应性基团等与另一种反应物、试剂、溶剂、催化剂、反应性基团等接触。反应物、试剂、溶剂、催化剂、反应性基团等可单独 (individually)、同时或分开加入,可以任意顺序加入。它们可在存在或不存在热的条件下加入,并可任选在惰性气氛下加入。在一些实施方式中,“反应”指原位形成或其中反应性基团位于相同分子内的分子内反应。

[0089] “高通量方法”指可自动处理或评价大量样品的方法。在一些实施方式中,可利用信息学系统,按高通量方法执行。信息学系统可对高通量方法中使用的物理设备进行软件控制,并组织及存储高通量方法产生的电子数据。

[0090] “基本上反应”指反应的至少一种反应物的消耗量超过约 75 摩尔%,超过约 80 摩尔%,超过约 85 摩尔%,或者超过约 90 摩尔%。在一些实施方式中,“基本上反应”指反应物的消耗量超过约 95 摩尔%。在其他实施方式中,“基本上反应”指反应物的消耗量超过约 97 摩尔%。在另外实施方式中,“基本上反应”指反应物的消耗量超过约 99 摩尔%。

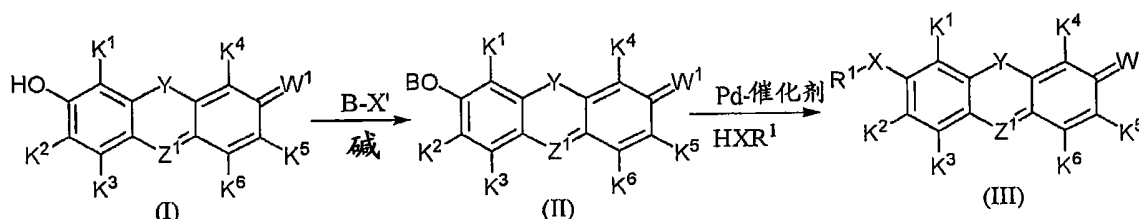
[0091] 详细说明

[0092] 本文提供荧光团化合物或对甲氨基酚荧光团,其可用作荧光标记和 / 或荧光探针,用于示踪、测量、检测或筛选生物物质。在一些实施方式中,荧光团化合物或对甲氨基酚荧光团具有以下方案 1 和 2 中所示式 (III) 或 (VI)。

[0093] 可通过本领域技术人员已知的任何合成方法来制备式 (III) 和 (VI) 的荧光团化合物。在一些实施方式中,分别按照以下方案 1 和 2 制备式 (III) 和 (VI) 的荧光团。

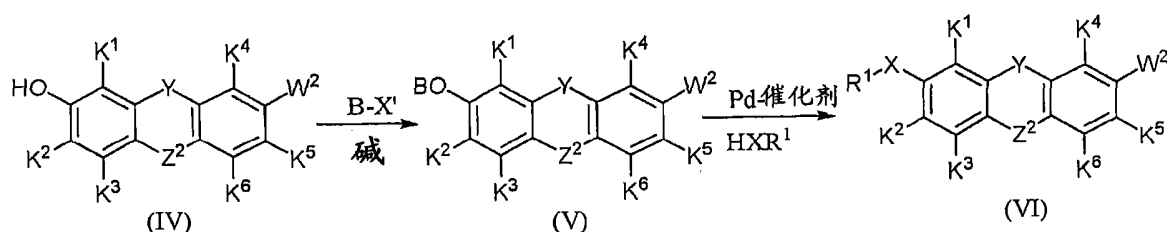
[0094] 方案 1

[0095]



[0096] 方案 2

[0097]



[0098] 其中 OB 是羟基活化基团;

[0099] K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 和 K^6 各自独立地为取代基;

[0100] W^1 是 O 或 S;

[0101] W^2 是 O-A、S-A 或 NR^3R^4 ;

[0102] X 是 NR^2 、O 或 S;

[0103] Y 是 O、S、Se、 NR^5 或 CR^6R^7 ;

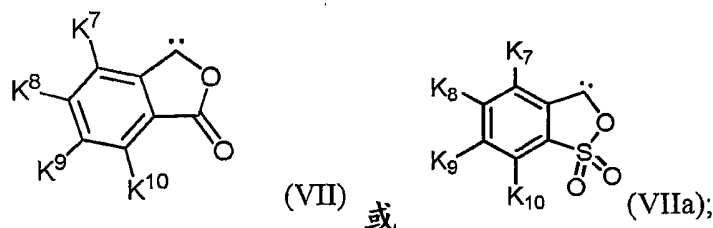
[0104] Z^1 是 CR^8 或 N；

[0105] Z^2 是 CR^9R^{10} 或 NR^{11} ；

[0106] A 是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、酰基、氨基羰基或羟基保护基；

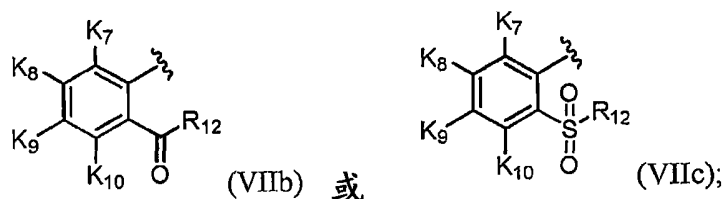
[0107] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^9 、 R^{10} 和 R^{11} 各自独立地为 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团；或者 CR^9R^{10} 是式 (VII) 或 (VIIa) 的取代 2-羧基苯基 -C 基团：

[0108]



[0109] R^8 是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基、酰基或反应性官能团，或者具有式 (VIIb) 或 (VIIc)：

[0110]



[0111] 其中 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自独立地为 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰基氨基、羟基、硫代、硫代烷基、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、芳氧基、芳基烷氧基、酰氧基、氰基、硝基、巯基、氨基甲酰基、三氟甲基、苯氧基、苄氧基、磺酰基、膦酰基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-P^1$ 或 $-C(=O)-Q-P^2$ ，其中 P^1 和 P^2 各自独立地为氢、卤素、烷氧基、羟基、硫代、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、氨基甲酰氧基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3-7 个环原子的杂环基；以及 Q 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基。

[0112] 在一些实施方式中， K^7 与 K^8 一起或 K^8 与 K^9 一起或 K^9 与 K^{10} 一起形成 5 元、6 元或 7 元环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂烷基或杂芳基环的一部分。在其他实施方式中， K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 中的至少一个是吸电子基团，如卤素和三氟甲基。在另外实施方式中， K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 中的至少一个是 F 或 Cl。在一些实施方式中， Z^2 具有式 (VII)。

[0113] 方案 1 和方案 2 各自涉及两步：优选三氟甲磺酯活化酚，然后与胺交叉偶联。可通过在碱的存在下，使酚与三氟甲磺酰基供体试剂反应获得优选的三氟甲磺酸酯，所述供体试剂如三氟甲磺酸酐、三氟甲磺酰氯或 N-苯基-双(三氟甲磺酰亚胺(trifluoromethanesulfonimide))。为随后的氨基化反应选择催化剂体系的典型程

序和技术可见于：例如，Hartwig, J.F. 在 Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis (Negishi, E. 编, John Wiley & Sons, Inc., 2002) 中的综述 Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Halides and Related Reactions；或者 Diederich 和 Stang 编的书 Metal-catalyzed Cross-coupling Reactions (Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1997)，通过引用将所有这些文献并入本文。甲苯磺酸酯和九氟丁磺酸酯 (nonflate) 的氨基化反应也可在以下文献中找到：Hamann 等, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 7369-7370；Huang 等, J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 6653-6655；Gao 等, J. Org. Chem. 2008, 73, 1624-1627；Anderson 等, J. Org. Chem. 2003, 68, 9563-9573；以及 Zhang 等, J. Fluor. Chem. 2006, 127, 588-591，通过引用将所有这些文献并入本文。

[0114] B-X' 是羟基活化剂，它与 -OH 反应，形成 -OB 基团和 HX'。在一些实施方式中，B-X' 是甲磺酰卤、三氟甲磺酰卤、甲苯磺酰卤、九氟丁磺酰卤、甲磺酸酐、三氟甲磺酸酐、甲苯磺酸酐、九氟丁磺酸酐或其组合。-OB 基团可以是任何羟基活化基团，所述羟基活化基团在钯催化剂的存在下与式 HXR¹ 的亲核试剂发生交叉偶联反应，形成 -XR¹ 基团和 HOB。在一些实施方式中，X，是卤素，B 是磺酰基、羧基或膦酰基。在其他实施方式中，B 是甲磺酰基、三氟甲磺酰基、甲苯磺酰基或九氟丁磺酰基。在其他实施方式中，X 是 N 或 O。在另外实施方式中，Y 是 O、S 或 NR⁵。在另外实施方式中，Y 是 O。

[0115] K¹、K²、K³、K⁴、K⁵ 和 K⁶ 各自可以是不影响式 (III) 或 (VI) 的荧光性质的任何取代基。在一些实施方式中，K¹、K²、K³、K⁴、K⁵ 和 K⁶ 各自独立地为氢、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰基氨基、羟基、硫代、硫代烷基、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、芳氧基、芳基烷氧基、酰氧基、氰基、硝基、巯基、氨基甲酰基、三氟甲基、苯氧基、苄氧基、磺酰基、膦酰基、磺酸酯、磷酸酯、-C(=O)-P¹ 或 -C(=O)-Q-P²，其中 P¹ 和 P² 各自独立地为氢、卤素、烷氧基、羟基、硫代、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、氨基甲酰氧基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3-7 个环原子的杂环基；Q 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基。在一些实施方式中，K² 与 K³ 一起或 K⁵ 与 K⁶ 一起形成 5 元、6 元或 7 元环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂烷基或杂芳基环的一部分。在其他实施方式中，K¹、K²、K³、K⁴、K⁵ 和 K⁶ 中的至少一个是吸电子基团，如卤素和三氟甲基。在另外实施方式中，K¹、K²、K³、K⁴、K⁵ 和 K⁶ 中的至少一个是 F 或 Cl。

[0116] 可用来促进方案 1 和方案 2 所述交叉偶联反应的任何催化剂都可用于本发明。在一些实施方式中，用于本文所公开的交叉偶联反应的催化剂包括大体积 (bulky) 膦配体和钯。此类催化反应、膦配体和反应条件可参见例如 Hartwig, J.F. 在 Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis (Negishi, E. 编, John Wiley & Sons, Inc., 2002) 中的综述 Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Halides and Related Reactions，通过引用将其并入本文。应认识到，不将本文所述的钯和膦配体系统限制为此类反应的唯一可用的系统，一些其他的催化系统也是可能的。

[0117] 在一些实施方式中，用于本文所公开的交叉偶联反应的催化剂包含配体和钯源。合适的钯源的一些非限制性例子包括乙酸钯、三(二亚苄基丙酮)二钯、氯化钯及其组合。

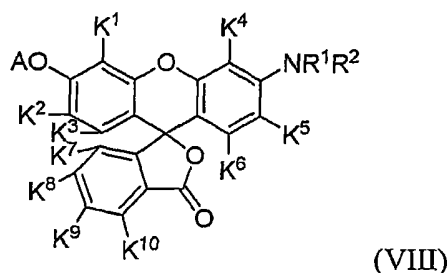
[0118] 在某些实施方式中，配体是膦配体或卡宾配体。合适的膦配体的一些非限制性例

子包括外消旋-2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联二萘(BINAP)、1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁(dppf)、2-(二环己基膦基)联苯、三环己基膦、三苯基膦、三-叔丁基膦、9,9-二甲基-4,5-双(二苯基膦基)咕吨(Xantphos)、2-(二-叔丁基膦基)联苯或外消旋-2-(二叔丁基膦基)-1,1'-联萘及其组合。

[0119] 在一些实施方式中,配体是卡宾配体。合适的钯-卡宾络合物的一些非限制性例子包括 Navarro 等, J. Org. Chem. 2004, 69, 3173-3180 中所公开的(N-杂环卡宾)Pd(烯丙基)Cl 络合物,通过引用将该文献并入本文。

[0120] 在一些实施方式中,本文所公开的式(VI)的荧光团是式(VIII)的对甲氨基酚荧光团:

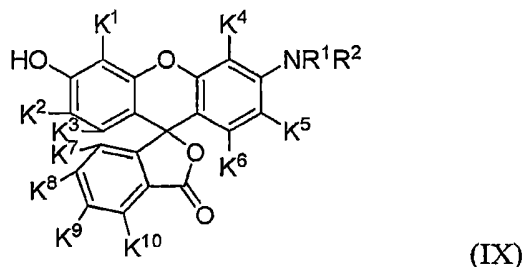
[0121]



[0122] 其中式(VI)中的X是NR²;W²是O-A;Z²具有式(VII),R¹、R²、K¹、K²、K³、K⁴、K⁵、K⁶、K⁷、K⁸、K⁹、K¹⁰和A如本文所公开。

[0123] 在一些实施方式中,本文所公开的式(VIII)的对甲氨基酚荧光团中的基团A是H。在其他实施方式中,本文所公开的式(VI)的荧光团是式(IX)的对甲氨基酚荧光团:

[0124]

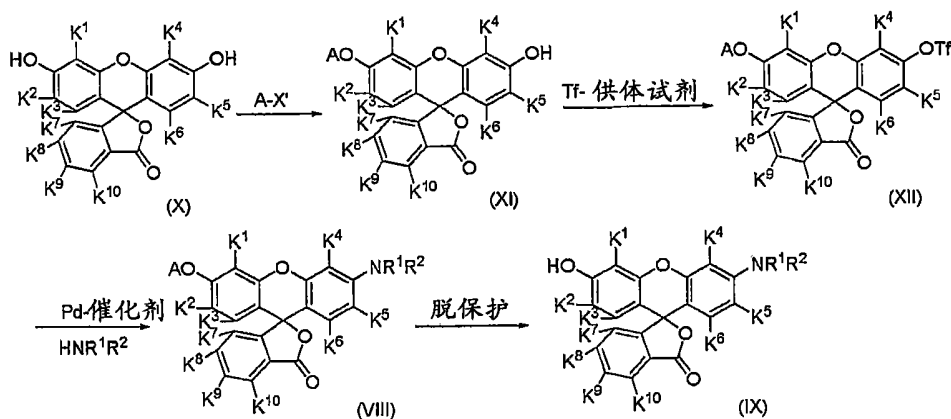


[0125] 其中式(VI)中的X是NR²;W²是O-A,其中A是H;Z²具有式(VII),R¹、R²、K¹、K²、K³、K⁴、K⁵、K⁶、K⁷、K⁸、K⁹和K¹⁰如本文所公开。

[0126] 可通过本领域技术人员已知的任何合成方法来制备式(VIII)和(IX)的对甲氨基酚荧光团。在一些实施方式中,可按照以下所示的方案3来制备式(VIII)和(IX)的对甲氨基酚荧光团。

[0127] 方案3

[0128]



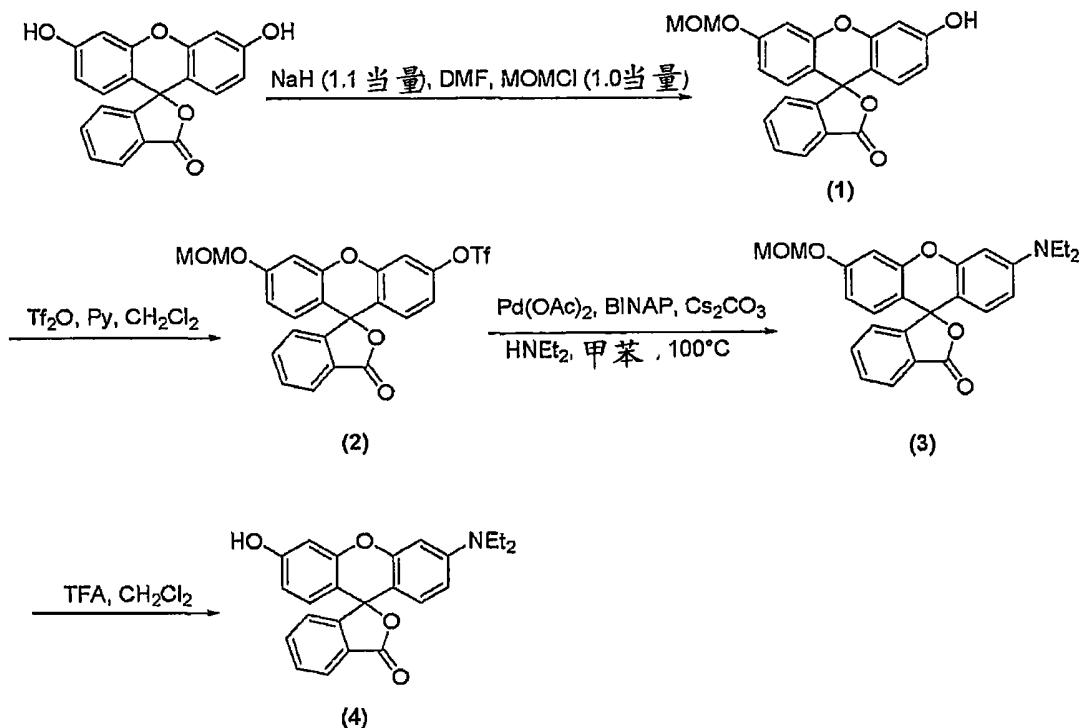
[0129] 其中 X' 是卤素, 如 Cl、Br 或 I; Tf 是三氟甲磺酰基; R^1 、 R^2 、 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 、 K^{10} 和 A 如本文所公开。

[0130] 一般可按照以上方案 3 所示的程序来合成式 (VIII) 的对甲氨基酚荧光团。首先, 通过与保护试剂 (如式 $A-X'$ 的卤化物) 反应, 形成 O-A 基团, 将荧光素 (X) 的酚 OH 基团之一进行单保护。接着, 可通过与三氟甲磺酸反应形成荧光素 (XII) 中的三氟甲磺酸酯基, 将受单保护的荧光素 (XI) 中的酚 OH 基团活化。随后在催化剂 (如 Pd 催化剂) 的存在下, 荧光素 (XII) 的三氟甲磺酸酯基与式 HNR^1R^2 的胺发生交叉偶联反应, 形成受单保护的的对甲氨基酚荧光团 (VIII)。接着, 任选在脱保护条件下去除保护基, 形成对甲氨基酚荧光团 (IX)。

[0131] 在一些实施方式中, 可按照以下方案 4 来制备化合物 3 (式 (VIII) 的受单保护的的对甲氨基酚荧光团) 和化合物 4 (式 (IX) 的对甲氨基酚荧光团)。

[0132] 方案 4

[0133]



[0134] 在一些实施方式中, 可通过两步程序来制备受单保护的荧光素 (XI)。首先, 可使荧光素 (X) 与过量的式 $A-X'$ (A 和 X' 如本文所公开) 的卤化物反应, 得到二烷基化产物, 一处烷基化发生在羟基位置, 另一处烷基化发生在羧酸位置形成酯。接着, 在碱性条件下

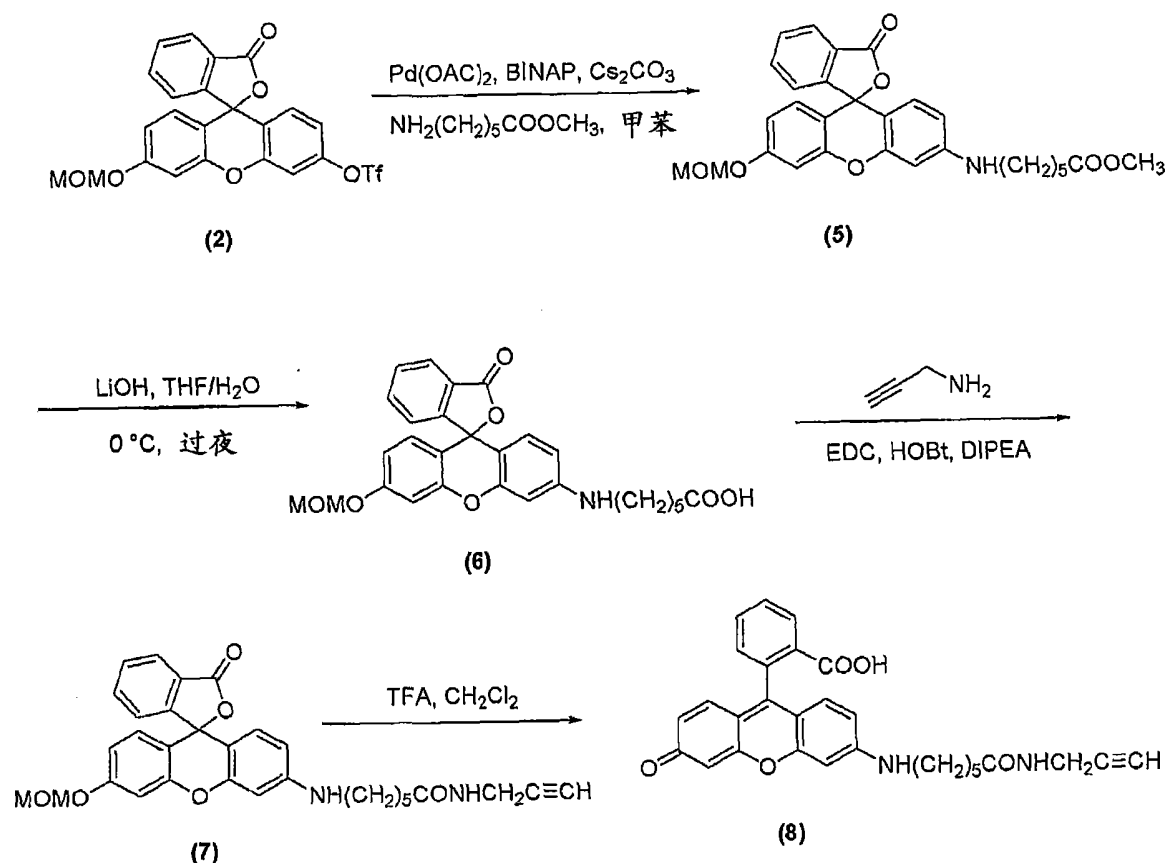
水解酯,得到受单保护的荧光素(XI)。在其他实施方式中,可通过以下方式在一步中制备具有甲氧基甲基(MOM)羟基保护基的受单保护的荧光素(XI):在氢化钠(NaH)的存在下,使荧光素(X)与甲氧基甲基氯(MOMCl)反应。荧光素与MOMCl的比率为约1:1.25至约1.25:1,约1:1.1至约1.1:1,或约1:1。荧光素与NaH的比率为约1:1.25至约1.25:1,约1:1.1至约1.1:1,或约1:1。

[0135] 在某些实施方式中,A可以是酚羟基保护基,如甲基、甲氧基甲基、苄氧基甲基、甲氧基乙氧基甲基、乙氧基乙基、烯丙基、炔丙基、异丙基、环己基、叔丁基、苄基、2,6-二甲基苄基、4-甲氧基苄基、邻硝基苄基、9-蒎基甲基、4-(二甲氨基)羰基苄基、4-吡啶甲基、甲硅烷基、酰基、磺酰基等。可在合适的脱保护条件下去除上述保护基,得到式(IX)的对甲氨基酚荧光团。羟基保护基和保护/脱保护反应条件公开于例如P. G. M. Wuts和T. H. Greene, "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis",第4版,Wiley-Interscience, New York(2006),通过引用将其并入本文。

[0136] 在某些实施方式中,可按照以下方案5来制备化合物5、6和7(式(VIII)的受单保护的甲氨基酚荧光团)以及化合物8(式(III)的甲氨基酚荧光团)。

[0137] 方案5

[0138]



[0139] 在一些实施方式中,A是甲氧基甲基(MOM),可在二氯甲烷中用三氟乙酸(TFA)简单地将它去除。在其他实施方式中,A可以是烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、酰基、氨基羰基等。

[0140] 在一些实施方式中,用于羟基的活化基团B可以是三氟甲磺酰基(triflic)(三氟

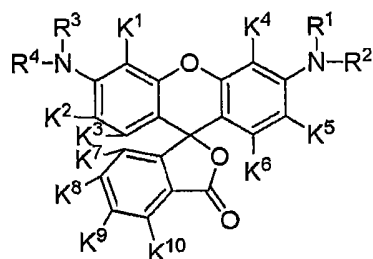
甲磺酰基)、甲苯磺酰基或九氟丁磺酰基。在其他实施方式中, B 是三氟甲磺酰基。

[0141] 在某些实施方式中,用于交叉偶联反应的催化剂可以是钯和大体积膦配体系统。交叉偶联反应、钯催化剂、合适的配体和交叉偶联反应条件公开于例如 Hartwig, J.F. 在 Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis (Negishi, E. 编, John Wiley & Sons, Inc., 2002) 中的综述 Palladium-Catalyzed Amination of Aryl Halides and Related Reactions。应认识到,用于交叉偶联反应的合适催化剂和配体系统不限于本文所公开的钯和膦配体系统。也可采用本领域技术人员已知的其他催化剂和配体系统。

[0142] 由于通过本文所公开的通用合成程序可以制备许多不同的对甲氨基酚荧光团和衍生物,因此可使用高通量筛选方法来评价它们的荧光性质。可在孔中容纳本文所公开的多种不同对甲氨基酚荧光团的荧光读板仪中加载已知量的分析物,该分析物的相对荧光强度提供用于包含和不含分析物的对甲氨基酚荧光团的荧光性质的快速筛选方法。

[0143] 在一些实施方式中,本文所公开的式 (IV) 的荧光团化合物具有式 (XIII) :

[0144]



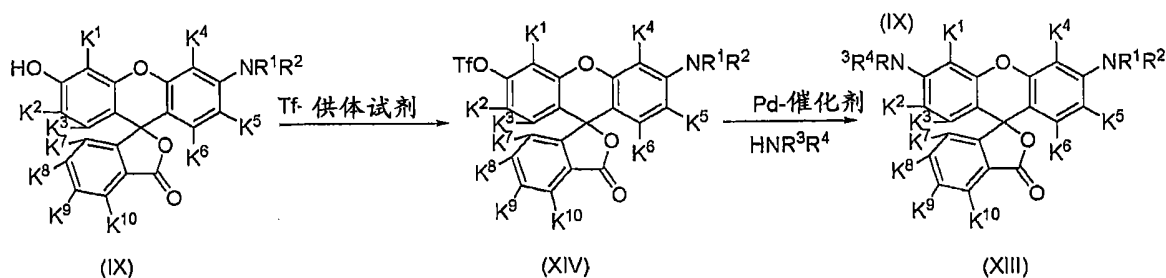
(XIII)

[0145] 其中式 (VI) 中的 X 是 NR^2 ; W^2 是 NR^3R^4 ; Z^2 具有式 (VII), 且 $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{K}^1, \text{K}^2, \text{K}^3, \text{K}^4, \text{K}^5, \text{K}^6, \text{K}^7, \text{K}^8, \text{K}^9$ 和 K^{10} 如本文所公开。

[0146] 在某些实施方式中,可按照以下所示方案 6 来制备式 (XIII) 的荧光团化合物。

[0147] 方案 6

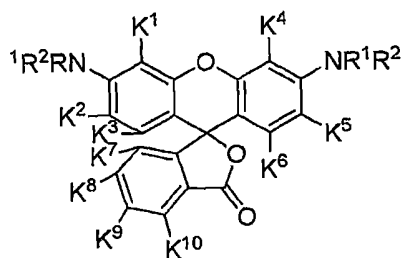
[0148]



[0149] 其中 Tf 是三氟甲磺酰基, $\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4, \text{K}^1, \text{K}^2, \text{K}^3, \text{K}^4, \text{K}^5, \text{K}^6, \text{K}^7, \text{K}^8, \text{K}^9$ 和 K^{10} 如本文所公开。

[0150] 在一些实施方式中,本文所公开的式 (IV) 的荧光团化合物具有式 (XV) :

[0151]



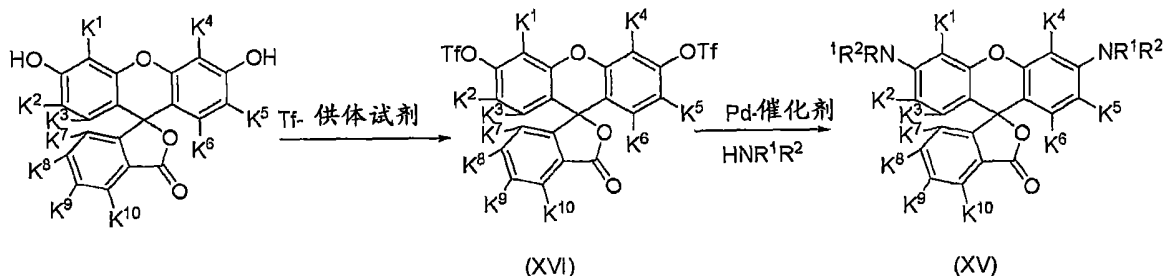
(XV)

[0152] 其中式 (VI) 中的 X 是 NR^2 ; W^2 是 NR^3R^4 , 其中 R^1 与 R^3 相同, R^2 与 R^4 相同; Z^2 具有式 (VII), R^1 、 R^2 、 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 如本文所公开。

[0153] 在一些实施方式中, 可按照以下所示方案 7 来制备式 (XV) 的荧光团化合物。

[0154] 方案 7

[0155]

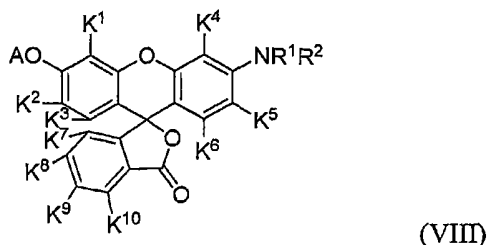


[0156] 其中 Tf 是三氟甲磺酰基, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 如本文所公开。

[0157] 本文所公开的荧光团化合物的示例性应用

[0158] 本文所公开的荧光团化合物可用作生物物质的荧光标记和 / 或某些分析物的荧光探针。在一些实施方式中, 式 (III)、(VI)、(VIII)、(IX)、(XIII) 和 (XIV) 的荧光团化合物中的一种或多种可用作荧光标记和 / 或荧光探针。在其他实施方式中, 诸如化合物 (3)、(4)、(5)、(6)、(7) 和 (8) 的对甲氨基酚荧光团中的一种或多种可用作荧光标记和 / 或荧光探针。在另外实施方式中, 式 (VIII) 的对甲氨基酚荧光团用作荧光标记和 / 或荧光探针。在另外实施方式中, 所述荧光标记或荧光探针是式 (VIII) 的对甲氨基酚荧光团:

[0159]



[0160] 其中式 (VI) 中的 X 是 NR^2 ; W^2 是 O-A ; Z^2 具有式 (VII), R^1 、 R^2 、 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 、 K^{10} 和 A 如本文所公开。

[0161] 1. 荧光标记

[0162] 在某些实施方式中, 式 (VIII) 的对甲氨基酚荧光团具有化学反应性, 可用作生物相关物质的示踪剂。在此情况下, A、 R^1 和 R^2 各自独立地为氢、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基或酰基。

[0163] 如本文所公开的, 可按照以上方案 4 和 5 所述的一般程序来制备式 (VIII) 的对甲氨基酚荧光团。如下表 1 所示, 按照以上方案 4 和 5 所述的一般程序制备了式 (VIII) 的对甲氨基酚化合物库, 其中 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自为 H。表 1 中还示出了每种对甲氨基酚荧光团的 A、 R^1 和 R^2 基团。一般地, 表 1 中的数据表明, 一些对甲氨基酚化合物具有强荧光性。

[0164] 表 1

[0165]

化合物			Abs Max ^a	ϵ_{\max}^a	Em Max ^a	QY ^{a,b}	纯度 ^c
A	R ₁	R ₂	(nm)	(cm ⁻¹ M ⁻¹)	(nm)		(%)
H	H	H	493	约 70000	516	0.98	93
H	CH ₂ CH ₂ CH ₂	CH ₂ CH ₂	523	62500	555	0.03	100
H	Me	Me	518	64000	544	0.20	100
H	Et	Et	522	47000	549	0.08	98
H	n-Bu	n-Bu	525	63000	553	0.12	99
H	H	n-Pr	507	61000	531	0.94	98
H	H	n-Bu	508	60000	533	0.90	95
H	H	Bn	503	71000	529	0.95	100
H	H	Ph	513	55000	N.D. ^d	N.D. ^d	100
H	H	COPh	462/490	-	525	0.16	100
H	H	COCHCH ₂	462/490	-	524	0.19	100
Me	H	H	477	-	516	0.85	100
MOM	H	n-Pr	494	-	532	0.35	-
MOM	H	COPh	293	-	N.D. ^d	N.D. ^d	-

[0166] 注：^a 样品在 50mM 水性磷酸盐缓冲液中，pH 为约 8.0。[0167] ^b 使用若丹明 6G(QY = 0.76, 水中) 作参照。[0168] ^c 用 HPLC 测定。[0169] ^d 未检测到荧光。

[0170] 在一些实施方式中，A、R¹ 和 R² 中的至少一个是化学反应性官能团，其可与靶分子中的相应反应性位点偶联或反应或键合。对甲氨基酚荧光团的化学反应性官能化合物和靶分子的反应性位点的一些非限制性例子列于表 2 中。该表格不意味着包括化学反应性，因为在适当选择溶剂、助溶剂、化学计量比、温度、压力、反应时间、pH、催化剂等情况下，也可使其他官能团与本文所公开的反应性位点反应，也可使本文所公开的官能团与其他反应性位点反应。合适的反应性官能团的一些非限制性例子包括衍生自以下化合物的基团：丙烯酰胺、酰叠氮、酰卤、腈、醛、酮、烷基卤、烷基磺酸酯、酸酐、芳基卤、炔、醇、胺、羧酸、碳二亚胺、重氮烷、环氧化物、卤代乙酰胺、羟胺、肼、亚氨酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、磺酸酯或磺酰卤。在一些实施方式中，通过从以下化合物去除氢或单价原子或基团（如 OH 或卤素）来衍生反应性官能团：丙烯酰胺、酰叠氮、酰卤、腈、醛、酮、烷基卤、烷基磺酸酯、酸酐、芳基卤、炔、醇、胺、羧酸、碳二亚胺、重氮烷、环氧化物、卤代乙酰胺、羟胺、肼、亚氨酸酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、磺酸酯或磺酰卤。

[0171] 表 2 用于荧光标记的一些反应性官能团

[0172]

反应性官能团	反应性位点	所得连接 (Linkage)
活化酯 (琥珀酰亚胺酯)	胺 / 苯胺	酰胺
丙烯酰胺	硫醇	硫醚
酰叠氮	胺 / 苯胺	酰胺

酰卤	胺 / 苯胺	酰胺
酰卤	醇 / 酚	酯
酰基腈	醇 / 酚	酯
酰基腈	胺 / 苯胺	酰胺
醛	胺 / 苯胺	亚胺
醛或酮	肼	脎
醛或酮	羟胺	肟
烷基卤	胺 / 苯胺	烷基胺
烷基卤	羧酸	酯
烷基卤	硫醇	硫醚
烷基卤	醇 / 酚	醚
烷基磺酸酯	硫醇	硫醚
烷基磺酸酯	羧酸	酯
磺酸烷基酯	醇 / 酚	醚
酸酐	醇 / 酚	酯
酸酐	胺 / 苯胺	酰胺
芳基卤	硫醇	苯硫酚
芳基卤	胺	芳基胺
炔	叠氮化物	三唑
醇	酸衍生物	酯
胺	羧酸	酰胺
胺	卤化物	烷基胺
胺	醛 / 酮	亚胺

羧酸	胺 / 苯胺	酰胺
羧酸	醇	酯
羧酸	肼	酰肼
碳二亚胺	羧酸	N- 酰脲或酸酐
重氮烷	羧酸	酯
环氧化物	硫醇	硫酯
卤代乙酰胺	硫醇	硫醚
羟胺	醛 / 酮	肟
肼	醛 / 酮	脎
亚氨酸酯	胺 / 苯胺	脘
异硫氰酸酯	胺 / 苯胺	硫脲
异硫氰酸酯	醇 / 酚	异尿烷
马来酰亚胺	硫醇	硫醚
马来酰亚胺	胺	胺
磺酸酯	胺 / 苯胺	烷基胺
磺酸酯	硫醇	硫酯
磺酸酯	羧酸	酯
磺酸酯	醇	醚
磺酰卤	胺 / 苯胺	磺酰胺
磺酰卤	酚 / 醇	磺酸酯

[0173]

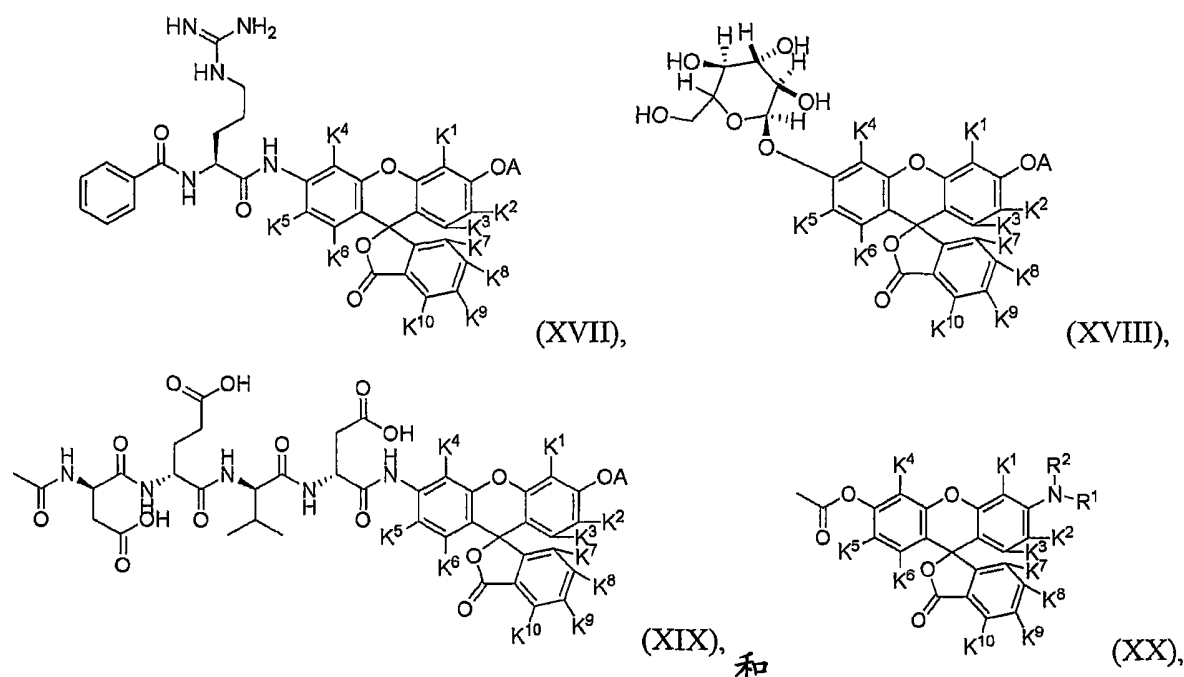
[0174] 在一些实施方式中,式(VIII)的对甲氨基酚化合物的A和R¹各自是氢;R²是本文所公开的化学反应性官能团。在另外实施方式中,K¹、K²、K³、K⁴、K⁵、K⁶、K⁷、K⁸、K⁹和K¹⁰各自为H。此类对甲氨基酚化合物可显示非常强的荧光性,量子产率为约0.9。因此,它们可适合用作荧光标记。

[0175] 2. 酶的荧光底物 (fluorogenic substrate)

[0176] 式 (VIII) 的对甲氨基酚化合物还可用作检测酶活性的荧光探针。在此情况中, 本文所公开的对甲氨基酚荧光探针是酶底物类似物, 在酶反应之后, 可将它们精确地调至发光状态。

[0177] 在某些实施方式中, 式 (VIII) 的对甲氨基酚荧光探针可用来检测某些氨基肽酶的活性。在一些实施方式中, R^1 和 R^2 各自独立地为氢和相应肽的 C 末端残基; A 是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、杂环基、氨基烷基、芳基、烷芳基、芳烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、酰基、氨基羰基或羟基保护基。在其他实施方式中, 氨基肽酶的对甲氨基酚荧光探针或底物是如下所示胰岛素底物 (VII)、b- 葡糖苷酶底物 (VIII)、胱冬酶 (caspase) 底物 (IX) 和酯酶底物 (X) :

[0178]



[0179] 其中, A、 R^1 、 R^2 、 K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 如本文所公开的。在一些实施方式中, K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自是 H。

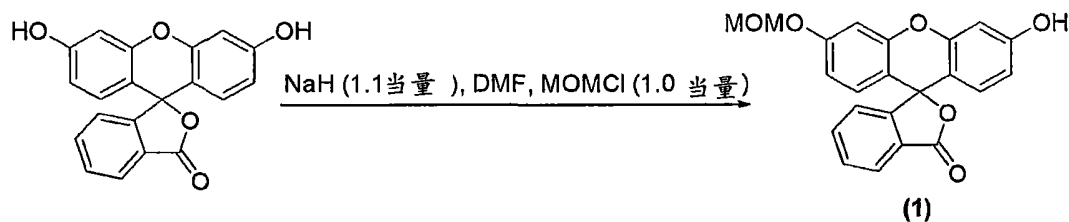
[0180] 还应认识到, 本文所述示例性应用仅仅显示本文所公开的对甲氨基酚荧光团的应用潜力, 并未穷举本文所公开的对甲氨基酚荧光团 (如表 1 中示出的对甲氨基酚库) 的所有可能的应用。其他潜在应用也视为落在本公开内容的范围之内。

实施例

[0181] 以下实施例 1-9 详细描述了制备和使用本文所公开的荧光探针 (如式 (III)、(VI)、(VIII)、(IX)、(XIII) 和 (XIV) 所表示的那些荧光探针) 的方法。该详细的公开内容落在本文所公开的合成程序的范围内, 并用于举例说明本文所公开的合成程序, 如方案 1-7。提供这些实施例仅用于阐述目的, 并非有意限制本公开内容的范围。还应理解, 对于本领域技术人员显而易见的某些变化和修改都包括在本公开内容的范围和目的之内。

[0182] 制备实施例 1

[0183]



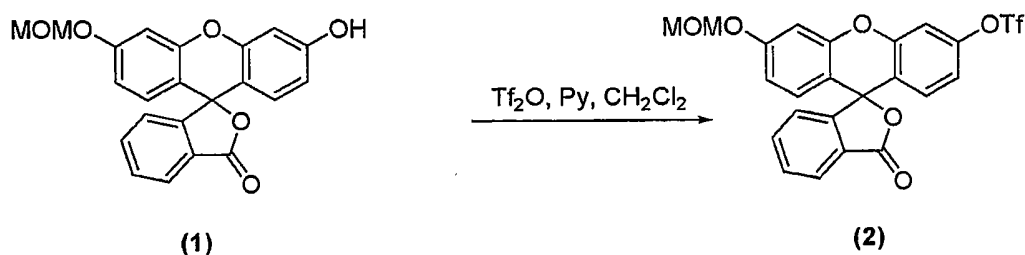
[0184] 在0℃下,向荧光素(3.3g,10mmol)的无水二甲基甲酰胺(DMF)(50mL)溶液中加入氢化钠(NaH)(437mg,11mmol,矿物油中的60%分散体)。在0℃下搅拌半小时后,向该溶液中加入一定量的甲氧基甲基氯(MOMCl)(0.76mL,10mmol)。将所得混合物在室温下搅拌过夜,然后用水猝灭。此后,向混合物中加入1N盐酸(HCl),将溶液酸化至pH为2。然后加入乙酸乙酯。分离有机层,用盐水洗涤,经无水硫酸钠干燥,并真空蒸发。通过硅胶柱色谱纯化残余物,得到实施例1(3.2g,产率85%)。用以下光谱数据表征实施例1:

[0185] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 8.01(d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.66-7.59(m, 2H), 7.14(d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 6.92(d, $J = 1.7\text{Hz}$, 1H), 6.73(d, $J = 1.9\text{Hz}$, 1H), 6.68-6.67(m, 2H), 6.55-6.54(m, 2H), 5.18(s, 2H), 3.46(s, 3H); ^{13}C NMR(100MHz, CDCl_3) δ 170.6, 158.7, 158.6, 152.8, 152.4, 152.3, 135.3(CH), 129.8(CH), 129.0(CH), 128.9(CH), 126.5, 125.0(CH), 124.0(CH), 112.9(CH), 112.6(CH), 112.0, 110.2, 103.5(CH), 103.1(CH), 94.1(CH_2), 85.2, 56.1(CH_3); LRMS(EI) m/z (%) 376(M^+ ;7), 332(100);

[0186] $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{O}_6$ 的 HRMS(EI): 计算分子量为 376.0947, 实测分子量为 376.0949。

[0187] 制备实施例 2

[0188]



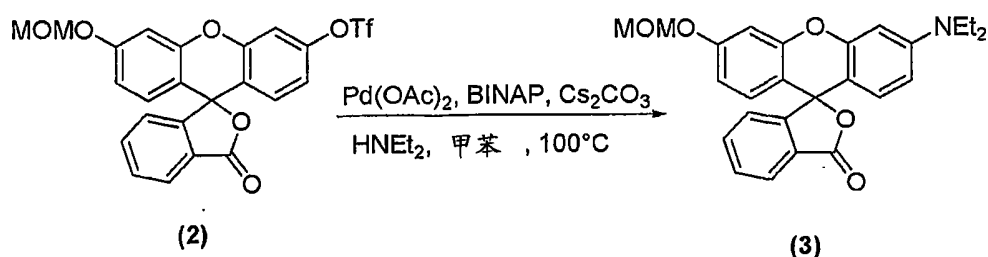
[0189] 在氩(Ar)气下,于0℃,向实施例1(3.2g,8.5mmol)和吡啶(2.74mL,34mmol)在无水二氯甲烷(CH_2Cl_2)中的溶液中滴加三氟甲磺酸酐(2.86mL,17mmol)。将所得溶液在室温下搅拌2小时,然后用水猝灭。向该混合物中加入二氯甲烷(CH_2Cl_2)。分离有机层,用1N盐酸(HCl)洗涤,然后用水和盐水洗涤。然后用无水硫酸钠干燥有机层,并浓缩。通过硅胶柱色谱纯化残余物,得到实施例2(4.2g,产率98%)。用以下光谱数据表征实施例2:

[0190] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 8.04(d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.72-7.65(m, 2H), 7.27(d, $J = 2.3\text{Hz}$, 1H), 7.18(d, $J = 7.4\text{Hz}$, 1H), 7.01-6.93(m, 3H), 6.77-6.73(m, 2H), 5.19(s, 2H), 3.46(s, 3H); ^{13}C NMR(100MHz, CDCl_3) δ 168.7, 159.0, 152.3, 151.9, 151.5, 149.8, 135.3(CH), 130.1(CH), 129.9(CH), 128.8(CH), 126.0, 125.1(CH), 123.7(CH), 123.0, 120.1, 119.7, 116.9, 116.5(CH), 113.6(CH), 111.6, 110.3(CH), 103.5(CH), 94.1(CH_2), 81.3, 55.9(CH_3); ^{19}F NMR(377MHz, CDCl_3) δ -72.7; LRMS(EI) m/z (%) 508(M^+ ;23), 331(100);

[0191] $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{O}_8\text{S}$ 的 HRMS(EI): 计算分子量为 508.0440, 实测分子量为 508.0438。

[0192] 制备实施例 3

[0193]



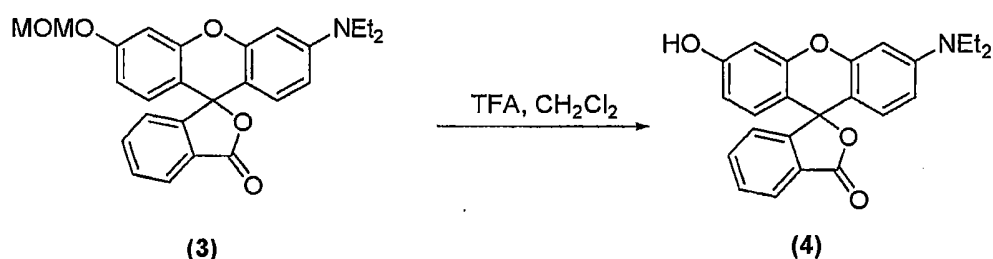
[0194] 在烘箱干燥的 Schlenk 管中装有乙酸钯 (II) (1mg, 0.5% mmol)、2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联二萘 (BINAP) (5mg, 0.75% mmol) 和碳酸铯 (Cs_2CO_3) (49mg, 1.5mmol), 用氩 (Ar) 气冲洗 5 分钟。加入实施例 2 (51mg, 0.1mmol) 和 N,N-二乙胺 (Et_2NH) (0.1mL, 1mmol) 在甲苯 (2mL) 中的溶液。将所得混合物首先在氩 (Ar) 气下于室温搅拌 30 分钟, 然后在 100°C 下搅拌 20 小时。使反应混合物冷却至室温, 用二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 稀释, 通过硅藻土垫过滤。用 5mL 二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 将滤饼洗涤 3 次。然后浓缩滤液, 通过硅胶柱色谱纯化残余物, 得到实施例 3 (26mg, 产率 60%)。用以下光谱数据表征实施例 3:

[0195] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.00 (d, $J = 7.4\text{Hz}$, 1H), 7.65-7.59 (m, 2H), 7.18 (d, $J = 7.4\text{Hz}$, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.67 (s, 2H), 6.56 (d, $J = 8.9\text{Hz}$, 1H), 6.44 (d, $J = 2.5\text{Hz}$, 1H), 6.35 (dd, $J = 8.9, 2.5\text{Hz}$, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.35 (q, $J = 7.1\text{Hz}$, 4H), 1.17 (t, $J = 7.0\text{Hz}$, 6H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 169.6, 158.6, 153.1, 152.9, 152.7, 149.5, 134.7 (CH), 129.4 (CH), 129.1 (CH), 128.8 (CH), 127.2, 124.8 (CH), 124.0 (CH), 112.4 (CH), 108.3 (CH), 105.1, 103.5 (CH), 97.6 (CH), 94.3 (CH_2), 84.2, 56.1 (CH_3), 44.4 (CH_2), 12.5 (CH_3); LRMS (EI) m/z (%) 431 (M^+ ; 21), 387 (100);

[0196] $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_5$ 的 HRMS (EI): 计算分子量为 431.1733, 实测分子量为 431.1739。

[0197] 制备实施例 4

[0198]



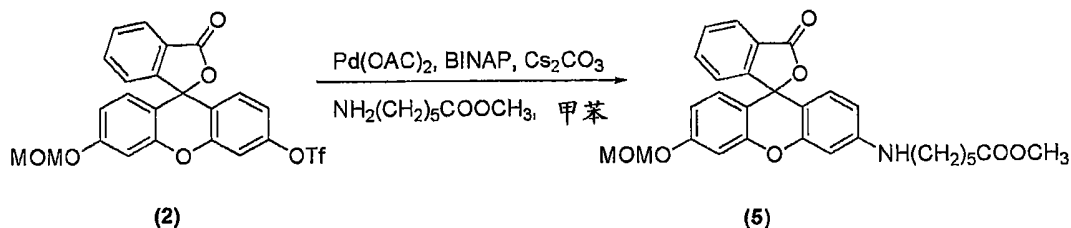
[0199] 在 0°C 下, 向实施例 3 (26mg, 0.06mmol) 的无水二氯甲烷 (CH_2Cl_2) (1mL) 溶液中滴加三氟乙酸 (1mL)。将所得溶液在室温下搅拌, 直至薄层色谱 (TLC) 显示所有原料均被消耗。然后将混合物真空浓缩并与甲苯共沸三次, 得到实施例 4 (30mg)。分析高效液相色谱 (HPLC) 显示, 实施例 4 的纯度足以测量光物理性质。用以下光谱数据表征实施例 4:

[0200] ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.36 (d, $J = 7.7\text{Hz}$, 1H), 7.85-7.78 (m, 2H), 7.40 (d, $J = 7.7\text{Hz}$, 1H), 7.24-7.10 (m, 4H), 7.04 (d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 6.95 (dd, $J = 8.5, 2.2\text{Hz}$, 1H), 3.69 (q, $J = 7.1\text{Hz}$, 4H), 1.30 (t, $J = 7.0\text{Hz}$, 6H); ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD) δ 167.4, 166.6, 161.8, 159.0, 157.4, 156.9, 133.6, 132.6, 132.0, 131.2, 131.1, 130.8, 130.3, 130.0, 117.0, 116.5, 115.6, 115.2, 102.0, 96.0, 46.1, 11.5; LRMS (EI) m/z (%) 387 (M^+ ; 35), 342 (100);

[0201] $C_{24}H_{21}NO_4$ 的 HRMS (EI) : 计算分子量为 387. 1471, 实测分子量为 387. 1472。

[0202] 制备实施例 5

[0203]



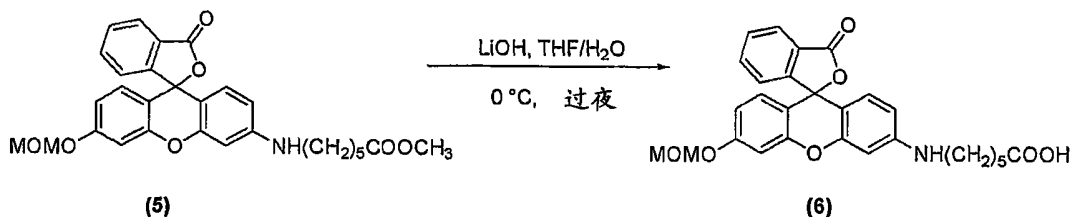
[0204] 在烘箱干燥的 Schlenk 管中装有乙酸钯 (II) (Pd(OAc)_2) (5. 6mg, 0. 025mmol)、2, 2'-双(二苯基膦基)-1, 1'-联二萘 (BINAP) (23mg, 0. 0375mmol)、碳酸铯 (Cs_2CO_3) (407mg, 1. 25mmol) 和盐酸 6-氨基己酸甲酯 (109mg, 0. 6mmol), 并用氩 (Ar) 气冲洗 5 分钟。然后加入实施例 2 (254mg, 0. 5mmol) 的甲苯 (5mL) 溶液。将所得混合物首先在氩 (Ar) 气下于室温搅拌 30 分钟, 然后在 100℃ 下搅拌 20 小时。使反应混合物冷却至室温, 用二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 稀释, 通过硅藻土垫过滤。用 15mL 二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 将滤饼洗涤 3 次。然后浓缩滤液, 用硅胶柱色谱纯化残余物, 得到实施例 5 (226mg, 产率 90%)。用以下光谱数据表征实施例 5:

[0205] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8. 00 (d, $J = 7. 5\text{Hz}$, 1H), 7. 64-7. 58 (m, 2H), 7. 16 (d, $J = 7. 5\text{Hz}$, 1H), 6. 93 (d, $J = 1. 5\text{Hz}$, 1H), 6. 68-6. 67 (m, 2H), 6. 51 (d, $J = 8. 6\text{Hz}$, 1H), 6. 38 (d, $J = 2. 3\text{Hz}$, 1H), 6. 26 (dd, $J = 8. 6\text{Hz}$, 1H), 5. 18 (s, 2H), 3. 67 (s, 3H), 3. 47 (s, 3H), 3. 12 (t, $J = 7. 0\text{Hz}$, 2H), 2. 37 (t, $J = 7. 5\text{Hz}$, 2H), 1. 69-1. 61 (m, 4H), 1. 47-1. 42 (m, 2H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 179. 2, 169. 7, 158. 6, 153. 1, 152. 8, 152. 5, 150. 4, 134. 8 (CH), 129. 4 (CH), 129. 0 (CH), 128. 8 (CH), 127. 1, 124. 8 (CH), 124. 0 (CH), 112. 7, 112. 5 (CH), 110. 3 (CH), 106. 8, 103. 5 (CH), 97. 9 (CH), 94. 3 (CH_2), 84. 5, 56. 1 (CH_3), 51. 5 (CH_3), 43. 3 (CH_2), 33. 8 (CH_2), 28. 8 (CH_2), 26. 4 (CH_2), 24. 3 (CH_2); LRMS (EI) m/z 503 (M^+ ; 3), 460 (30), 129 (100);

[0206] $C_{29}H_{29}NO_7$ 的 HRMS (EI) : 计算分子量为 503. 1944, 实测分子量为 503. 1945。

[0207] 制备实施例 6

[0208]



[0209] 在 0℃ 下, 向实施例 5 (226mg, 0. 45mmol) 在四氢呋喃 (THF) (6mL) 和水 (2mL) 中的溶液中加入一水合氢氧化锂 ($\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$) (95mg, 2. 25mmol)。在 0℃ 下搅拌反应混合物, 直至所有原料均被消耗。此后, 用 1N 盐酸 (HCl) 酸化混合物。用氯化钠 (NaCl) 使溶液饱和, 用 15mL 乙酸乙酯萃取三次。合并的有机层经无水硫酸钠干燥, 浓缩。通过硅胶柱色谱纯化残余物, 得到实施例 6 (187mg, 产率 85%)。实施例 6 用以下光谱数据表征:

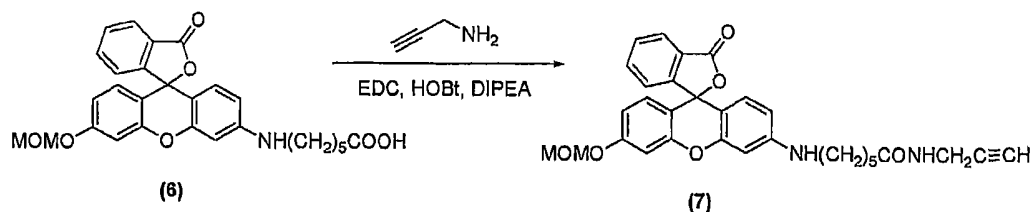
[0210] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8. 00 (d, $J = 7. 5\text{Hz}$, 1H), 7. 64-7. 58 (m, 2H), 7. 16 (d, $J = 7. 5\text{Hz}$, 1H), 6. 93 (d, $J = 1. 5\text{Hz}$, 1H), 6. 68-6. 67 (m, 2H), 6. 51 (d, $J = 8. 6\text{Hz}$, 1H), 6. 38 (d, $J = 2. 3\text{Hz}$, 1H), 6. 26 (dd, $J = 8. 6\text{Hz}$, 1H), 5. 18 (s, 2H), 3. 47 (s, 3H), 3. 12 (t, $J = 7. 0\text{Hz}$,

2H), 2.37 (t, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H), 1.69–1.61 (m, 4H), 1.47–1.42 (m, 2H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 179.2, 169.7, 158.6, 153.1, 152.8, 152.5, 150.4, 134.8 (CH), 129.4 (CH), 129.0 (CH), 128.8 (CH), 127.1, 124.8 (CH), 124.0 (CH), 112.7, 112.5 (CH), 110.3 (CH), 106.8, 103.5 (CH), 97.9 (CH), 94.3 (CH_2), 84.5, 56.1 (CH_3), 43.3 (CH_2), 33.8 (CH_2), 28.8 (CH_2), 26.4 (CH_2), 24.3 (CH_2); LRMS (EI) m/z 445 (22), 129 (100); LRMS (FAB) m/z 489 (M^+);

[0211] $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{NO}_5$ ($\text{M}^+ - \text{HCO}_2$) 的 HRMS (EI): 计算分子量为 444.1811, 实测分子量为 444.1816。

[0212] 制备实施例 7

[0213]



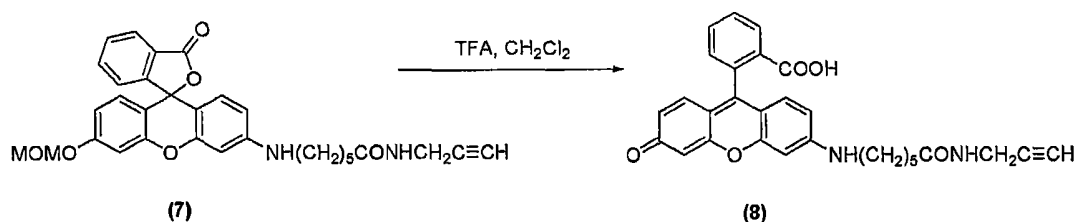
[0214] 向实施例 6 (187mg, 0.38mmol) 的二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 溶液中加入炔丙胺 (53 μL , 0.76mmol)、1-羟基苯并三唑 (HOBt) (57mg, 0.42mmol)、盐酸 N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺 (EDC \cdot HCl) (81mg, 0.42mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (73 μL , 0.42mmol)。将反应混合物搅拌过夜, 然后用二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 稀释。有机层用饱和碳酸氢钠 (NaHCO_3) 溶液洗涤, 然后用 0.1N 盐酸 (HCl) 和盐水洗涤。萃取物经无水硫酸钠干燥, 浓缩, 通过硅胶柱色谱纯化残余物, 得到实施例 7 (174mg, 产率 87%)。实施例 7 用以下光谱数据表征:

[0215] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.00 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.65–7.59 (m, 2H), 7.17 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 6.94 (d, $J = 1.5\text{Hz}$, 1H), 6.68–6.67 (m, 2H), 6.50 (d, $J = 8.6\text{Hz}$, 1H), 6.37 (s, 1H), 6.26 (dd, $J = 8.6\text{Hz}$, 1H), 5.95 (br, 1H), 5.19 (s, 2H), 4.03–4.02 (m, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.10 (t, $J = 6.8\text{Hz}$, 2H), 2.21–2.17 (m, 3H), 1.70–1.57 (m, 4H), 1.43–1.36 (m, 2H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 172.5, 169.7, 158.6, 153.1, 152.8, 152.5, 150.4, 134.8 (CH), 129.5 (CH), 129.0 (CH), 128.7 (CH), 127.0, 124.8 (CH), 124.0 (CH), 112.7, 112.5 (CH), 110.2 (CH), 106.6, 103.5 (CH), 97.9 (CH), 94.3 (CH_2), 84.5, 71.4 (CH), 56.1 (CH_3), 43.2 (CH_2), 36.0 (CH_2), 29.0 (CH_2), 28.7 (CH_2), 26.5 (CH_2), 25.0 (CH_2); LRMS (EI) m/z 427 ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_2$; 6), 181 (42), 129 (100); LRMS (FAB) m/z 526 (M^+);

[0216] $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ ($\text{M}^+ - \text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_2$) 的 HRMS (EI): 计算分子量为 427.1784, 实测分子量为 427.1785。

[0217] 制备实施例 8

[0218]



[0219] 在 0°C 下, 向实施例 7 (53mg, 0.1mmol) 的无水二氯甲烷 (CH_2Cl_2) (1mL) 溶液中滴加三氟乙酸 (1mL)。将所得溶液在室温下搅拌, 直至薄层色谱 (TLC) 显示所有原料均被消耗。

真空浓缩混合物,然后用二氯甲烷(CH_2Cl_2)稀释。有机层用饱和碳酸氢钠(NaHCO_3)溶液洗涤,并浓缩。然后通过硅胶柱色谱纯化残余物,得到实施例 8(43mg,产率 89%)。

[0220] 实施例 8 用以下光谱数据表征:

[0221] ^1H NMR(400MHz, CD_3OD) δ 8.26(dd, $J = 7.6, 1.0\text{Hz}$, 1H), 7.77-7.71(m, 2H), 7.33(dd, $J = 7.5, 1.0\text{Hz}$, 1H), 7.13-7.05(m, 3H), 6.90-6.87(m, 3H), 3.84(d, $J = 2.5\text{Hz}$, 2H), 3.38(t, $J = 7.0\text{Hz}$, 2H), 2.46(t, $J = 2.5\text{Hz}$, 1H), 2.14(t, $J = 7.3\text{Hz}$, 2H), 1.68-1.57(m, 4H), 1.40-1.38(m, 2H); ^{13}C NMR(75.5MHz, CD_3OD) δ 174.1, 167.2, 166.6, 161.6, 159.9, 156.8, 133.8, 132.6, 131.5, 131.2, 131.1, 130.8, 130.3, 129.9, 123.0, 118.8, 116.9, 116.0, 115.1, 101.9, 94.5, 79.2, 70.7, 43.2, 35.0, 28.0, 27.8, 26.0, 24.9; LRMS(FAB) m/z 483($[\text{M}+\text{H}]^+$);

[0222] $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5(\text{M}^+)$ 的 HRMS(FAB):计算分子量为 482.1842,实测分子量为 482.1830。

[0223] 实施例 9

[0224] 在一些实施方式中,本文所公开的式(III)、(VI)、(VIII)、(IX)、(XIII)和/或(XIV)的对甲氨基酚荧光团中的两种或多更种可用于形成对甲氨基酚荧光团库。在其他实施方式中,库中的每种对甲氨基酚荧光团具有式(VI)。式(VI)的对甲氨基酚荧光团的一些非限制性例子在上表 1 中示出。在某些实施方式中,表 1 中示出的所有或部分对甲氨基酚荧光团形成对甲氨基酚荧光团库。

[0225] 表 1 中的对甲氨基酚荧光团的光物理性质按照本文所公开程序测定,并概括于表 1 中。通过以下方式制备储液:将约 5-10mg 表 1 中的对甲氨基酚荧光团准确称重,并溶解在乙腈(CH_3CN)中。通过用 pH 为 8.0 的 50mM 磷酸钾缓冲液进一步稀释储液来制备吸收溶液。在个人计算机上运行的制造商提供的软件包的其控制下,在 CARY 50 Bio UV-可见光分光光度计(可得自 Varian Incorporation, Palo Alto, CA)上记录吸收光谱。在光程为 1cm、容积为 3.5mL 的石英比色杯中,在 25 $^\circ\text{C}$ 下常规获得光谱。在个人计算机上运行的制造商提供的软件包的控制下,在日立 F-2500 分光荧光计(可得自日本日立公司)上记录荧光光谱。激发光谱和荧光光谱的狭缝宽度均为 2.5nm,光电倍增管电压为 700eV。利用制造商提供的光电倍增管曲线对所有光谱进行发射强度校正。荧光团的量子产率可通过比较样品和参比溶液(如若丹明 6G 的水溶液(量子效率为 0.76))的校正发射光谱的积分面积进行估计。调节参比样的浓度,使之与测试样的吸光度相匹配。

[0226] 表 1 中对甲氨基酚荧光团的纯度按照本文所公开的程序进行测定,并概括于表 1 中。通过用高效液相色谱(HPLC)分析 10 μL 含有含于甲醇(MeOH)中的样品的溶液的等分试样来测定表 1 中的每种对甲氨基酚荧光团的纯度。用 Agilent 1100 HPLC 系统(可得自 Agilent Technologies, Palo Alto, CA)进行高效液相色谱(HPLC)分析。检测器设定在 254nm。用含 0.1%三氟乙酸(TFA)的水和 2% -98%乙腈的梯度在 15 分钟内将样品从 AlltimaTM 反相柱(4.6 \times 250mm, C-18, 5 μm)中洗脱出来,流速为 1mL/min。检测样品在 254nm 处的吸光度,通过此吸光度的积分计算纯度。

[0227] 表 1 中的数据表明,取决于式(III)中的 A、 R^1 和 R^2 基团,对甲氨基酚荧光团水溶液的最大吸收大约从 490nm 变化到 560nm,它们的消光系数一般不小于 47000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 。大多数对甲氨基酚荧光团在磷酸盐缓冲液中显示中等量子产率至高量子产率。

[0228] 如上文所说明的,本文所公开的实施方式提供各种对甲氨基酚化合物,它们可用

于示踪、检测、测量和 / 或筛选生物物质。尽管已参考有限量的实施方式对本公开内容进行了描述, 但一个实施方式的具体特征不应归因于 (be attributed to) 本文所公开的其他实施方式。单个实施方式不代表本公开内容的所有方面。在一些实施方式中, 所述方法可包括众多本文未提及的化合物或步骤。在其他实施方式中, 所述方法不包括或基本上不含本文未列举的步骤。所述实施方式存在变化和修改。应指出, 制备和使用本文所公开的对甲氨基酚化合物的方法是参考若干步骤描述的, 这些步骤可以任何顺序实施。可以省略或者合并一个或多个步骤, 但基本上仍能获得相同的结果。所附权利要求书意在覆盖所有此类变化和修改, 它们落在本发明的范围内。

[0229] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请都通过引用并入本文, 如同于具体单独地指出的每件单独的出版物或专利申请都通过引用并入本文。应理解, 本公开内容已通过说明和实例得到详细描述, 以便本发明所属领域的其他技术人员熟悉本发明、其原理及其实际应用。此外, 本文提供的具体实施方式无意对本发明进行穷举或限制, 根据前述的实施例和详细描述, 许多替代、修改和变化对于本领域技术人员是显而易见的。因此, 本公开内容意在涵盖落在所附权利要求书的精神和范围之内所有此类替代、修改和变化。尽管以上的一些实施例和描述包含有关化合物、组合物和方法的作用方式的一些结论, 但本发明人无意受那些结论和作用的束缚, 只是根据当前的理解, 将它们写出来作为可能的解释。