



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101883775 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 10

(21) 申请号 200880014862. 2

代理人 武晶晶 郑霞

(22) 申请日 2008. 03. 06

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

*G07F 5/02* (2006. 01)

60/906, 788 2007. 03. 12 US

*G01N 31/00* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 11. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2008/000449 2008. 03. 06

(87) PCT申请的公布数据

W02008/110063 EN 2008. 09. 18

(71) 申请人 弗西蒂技术有限公司

地址 中国香港

申请人 晨兴创投有限公司

(72) 发明人 杨丹 孙振宁 陈妍 刘凤琴

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

权利要求书 5 页 说明书 23 页 附图 7 页

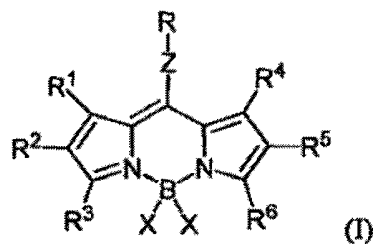
(54) 发明名称

用于检测次氯酸的试剂

(57) 摘要

本发明提供了能作为直接或间接测量、检测和 / 或筛选次氯酸或次氯酸盐的试剂的化合物或次氯酸探针。本发明还提供了能够用于直接或间接测量化学样品和生物学样品如活有机体的细胞和组织中的次氯酸或次氯酸盐的量的方法。具体而言,所述方法包括如下步骤:将本发明公开的次氯酸探针与样品接触,形成一种或多种荧光化合物,并且测量所述荧光化合物的荧光性质。本发明还提供了一种高通量筛选荧光方法,其用于检测或筛选化学和生物学样品中的次氯酸或能够直接或间接提高或降低次氯酸或次氯酸盐水平的化合物。

1. 一种式 (I) 的化合物：

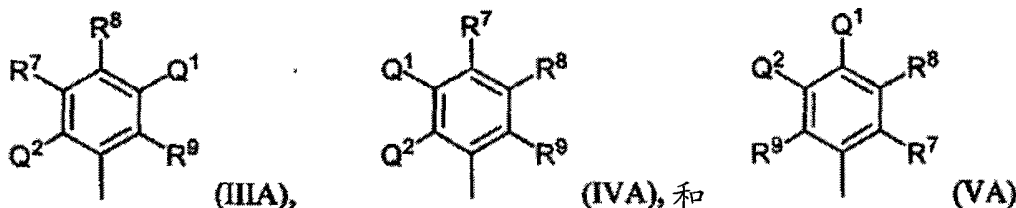


其中 X 为卤代；

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、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、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、羟基、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、磺酰基、磷酰基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-Y$  或  $-C(=O)-Q-Y$ ，其中 Y 为氢、卤代、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、氨基甲酰基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3 至 7 个环原子的杂环基；Q 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基，或者  $R^1$  和  $R^2$  或  $R^2$  和  $R^3$  或  $R^4$  和  $R^5$  或  $R^5$  和  $R^6$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环；

Z 为键或二价连接基团；

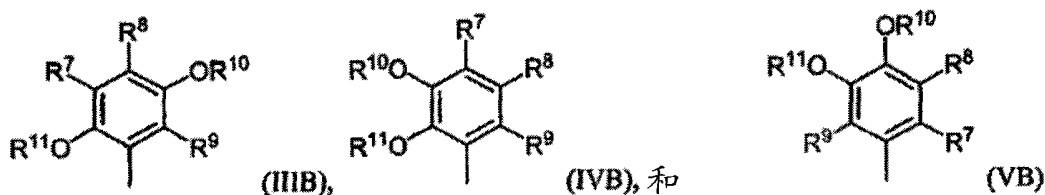
R 具有式 (IIIA)、(IVA) 和 (VA) 之一的结构：



其中  $R^7$ 、 $R^8$  和  $R^9$  各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、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、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、酰基、氨基甲酰基、酰胺基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基或杂烷基，或者式 (IIIA)、(IVA) 或 (VA) 的  $R^7$  和  $R^8$  或者式 (IVA) 的  $R^8$  和  $R^9$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环；并且

$Q^1$  和  $Q^2$  各自独立地为氨基或  $-O-Q^3$ ，其中  $Q^3$  是氢、烷基、烯基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基，条件是  $Q^1$  和  $Q^2$  不同时为氨基。

2. 权利要求 1 的化合物，其中 R 是具有式 (IIIB)、(IVB) 和 (VB) 之一结构的单价二氧化芳基：



其中  $R^7$ 、 $R^8$  和  $R^9$  各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、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、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、酰基、氨基甲酰基、酰胺基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基或杂烷基，或者式 (IIIB)-(VB) 的  $R^7$  和  $R^8$  或者式 (IVB) 的  $R^8$  和  $R^9$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环；并且

$R^{10}$  和  $R^{11}$  各自独立地为氢、烷基、烯基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基。

3. 权利要求 1-2 中任一项的化合物，其中 X 为 F。

4. 权利要求 1-2 中任一项的化合物，其中 Z 为键。

5. 权利要求 1-2 中任一项的化合物，其中 Z 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚杂烯基、亚杂炔基、亚芳基或亚杂芳基。

6. 权利要求 1-5 中任一项的化合物，其中  $R^1$  和  $R^2$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。

7. 权利要求 1-5 中任一项的化合物，其中  $R^4$  和  $R^5$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。

8. 权利要求 1-5 中任一项的化合物，其中  $R^2$  和  $R^3$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。

9. 权利要求 1-5 中任一项的化合物，其中  $R^5$  和  $R^6$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。

10. 权利要求 1-5 中任一项的化合物，其中  $R^3$  和  $R^6$  各自独立地为氢或  $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中  $R^{12}$  和  $R^{13}$  各自独立地为氢、烷基或芳基。

11. 权利要求 10 的化合物，其中式 (I) 的  $R^3$  和  $R^6$  各自为  $-(C=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中  $R^{12}$  和  $R^{13}$  各自为烷基。

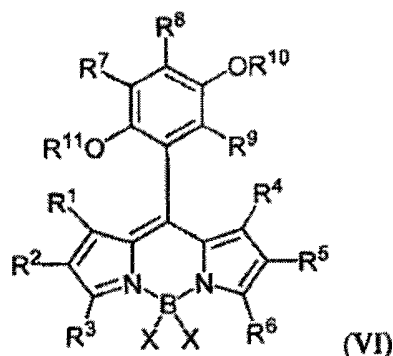
12. 权利要求 11 的化合物，其中  $R^3$  和  $R^6$  各自为  $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$ 。

13. 权利要求 1-12 中任一项的化合物，其中  $R^7$  和  $R^8$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。

14. 权利要求 2-13 中任一项的化合物，其中  $R^{10}$  和  $R^{11}$  各自独立地为氢、烷基、烯基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基。

15. 权利要求 14 的化合物，其中  $R^{10}$  为甲基，并且  $R^{11}$  为氢。

16. 权利要求 1 的化合物，其中所述化合物具有式 (VI) 结构：



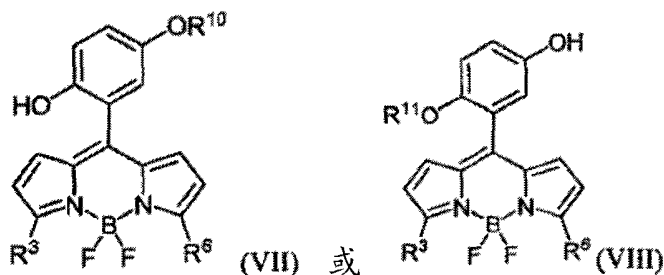
其中 X 为卤代；

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、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、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、羟基、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、磺酰基、磷酸基、磷酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-Y$  或  $-C(=O)-Q-Y$ ，其中  $Y$  为氢、卤代、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、氨基甲酰基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3 至 7 个环原子的杂环基； $Q$  为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基，或者  $R^1$  和  $R^2$  或  $R^2$  和  $R^3$  或  $R^4$  和  $R^5$  或  $R^5$  和  $R^6$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环；

$R^7$ 、 $R^8$  和  $R^9$  各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、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、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、酰基、氨基甲酰基、酰胺基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基或杂烷基，或者  $R^7$  和  $R^8$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环；并且

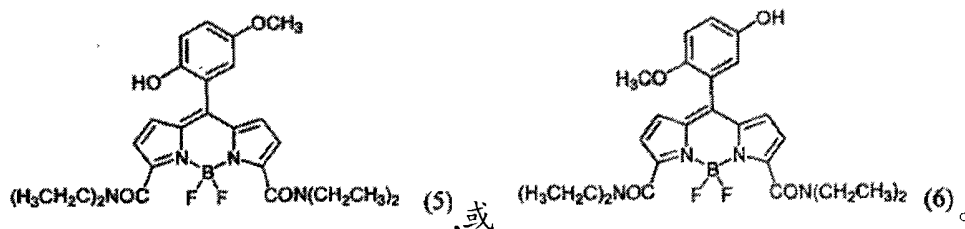
$R^{10}$  和  $R^{11}$  各自独立地为氢、烷基、烯基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基。

17. 权利要求 16 的化合物，其中所述化合物具有式 (VII) 或 (VIII) 的结构：



其中  $R^{10}$  为烷基； $R^{11}$  为烷基； $R^3$  和  $R^6$  各自独立地为氢或  $-C(=O)-Y$ ，其中  $Y$  为氢、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、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基或 3- 至 7- 元杂环。在一些实施方案中， $R^3$  和  $R^6$  各自为  $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中  $R^{12}$  和  $R^{13}$  各自为烷基。

18. 权利要求 17 的化合物，其中所述化合物是化合物 (5) 或 (6)、或其异构体：



19. 一种用于测量次氯酸的组合物，其中所述组合物包含权利要求 1-18 中任一项的化合物。

20. 权利要求 19 的组合物，其中所述组合物还包含溶剂、酸、碱、缓冲溶液或其组合。

21. 一种用于直接或间接测量样品中的次氯酸或次氯酸盐的方法，其中所述方法包括如下步骤：

a) 将权利要求 1-18 中任一项的化合物与所述样品接触，以形成荧光化合物；和

b) 测量所述荧光化合物的荧光性质。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述样品是化学样品或生物样品。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述样品是包括微生物、或来自动物的细胞或组织的生物学样品。

24. 一种用于直接或间接检测样品中的次氯酸或次氯酸盐的高通量筛选荧光方法,其中所述高通量方法包括如下步骤:

a) 将权利要求 1-18 中任一项的化合物与所述样品接触,以形成一种或多种荧光化合物;和

b) 测量所述荧光化合物的荧光性质,以确定样品中的次氯酸量。

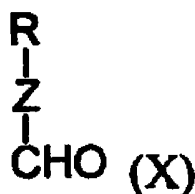
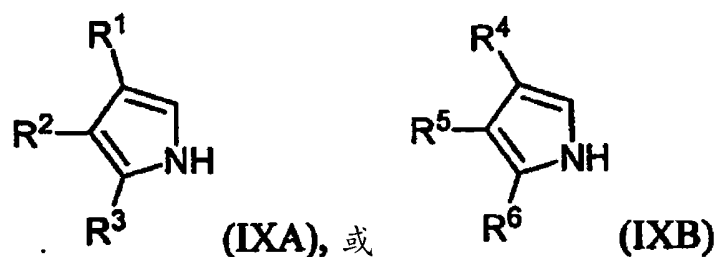
25. 一种用于筛选能够直接或间接提高或降低次氯酸或次氯酸盐水平的一种或多种靶化合物的高通量方法,其中所述高通量方法包括如下步骤:

a) 将权利要求 1-18 中任一项的化合物与靶化合物接触,以形成一种或多种荧光化合物;和

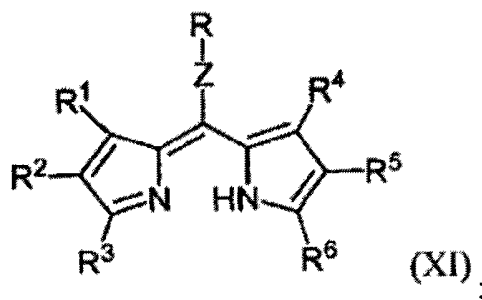
b) 测量所述荧光化合物的荧光性质,从而定性或定量地确定靶化合物。

26. 一种制备权利要求 1 的化合物的方法,所述方法包括如下步骤:

a) 在酸催化剂的存在下,使式 (IXA) 和 (IXB) 的吡咯与式 (X) 的醛反应:



b) 将苯醌添加到反应混合物中,形成式 (XI) 的二吡咯:



c) 使式 (XI) 的二吡咯与具有式  $\text{BX}_3$  的三卤化硼和三乙胺反应,其中:

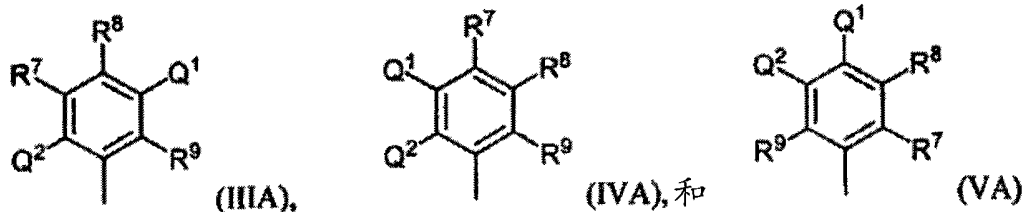
X 为卤代;

$\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$  和  $\text{R}^6$  各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、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、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、羟基、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、磺酰基、

磷酰基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-Y$  或  $-C(=O)-Q-Y$ , 其中  $Y$  为氢、卤代、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、氨基甲酰基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3 至 7 个环原子的杂环基; 并且  $Q$  为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基;

$Z$  为键或二价连接基团;

$R$  具有式 (IIIA)、(IVA) 和 (VA) 之一的结构:



其中  $R^7$ 、 $R^8$  和  $R^9$  各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、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、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、酰基、氨基甲酰基、酰胺基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基或杂烷基, 或者式 (IIIA)、(IVA) 或 (VA) 的  $R^7$  和  $R^8$  或者式 (IVA) 的  $R^8$  和  $R^9$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环; 并且

$Q^1$  和  $Q^2$  各自独立地为氨基或  $-O-Q^3$ , 其中  $Q^3$  是氢、烷基、烯基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基, 其条件是  $Q^1$  和  $Q^2$  不同时为氨基。

27. 权利要求 26 的方法, 其中所述反应发生在溶剂中。

28. 权利要求 26 的方法, 其中所述苯醌是 2,3- 二氯 -5,6- 二氰基 -1,4- 苯醌 (DDQ)。

29. 权利要求 26 的方法, 其中所述酸催化剂是三氟乙酸。

30. 权利要求 26 的方法, 其中所述三卤化硼是  $BF_3$ 、 $BCl_3$ 、 $BBr_3$  或其组合。

31. 权利要求 26 的方法, 其中式 (IXA) 的吡咯与式 (IXB) 的吡咯相同。

## 用于检测次氯酸的试剂

### 发明领域

[0001] 本发明提供了能够用作直接或间接测量、检测或筛选次氯酸或次氯酸盐的试剂的次氯酸探针。本发明还提供了制备所述次氯酸探针的方法和使用所述次氯酸探针作为细胞测定剂的方法。

### [0002] 发明背景

[0003] 自从 1787 年被首次发现以来,次氯酸盐 ( $\text{OCl}^-$ ) 及其质子化形式次氯酸 ( $\text{HOCl}$ ) 是公知的并且已经很成功地投入了商业使用(例如漂白剂和氧化剂)。在 1825 年,报道了次氯酸钙用于下水道、个人、停尸房、医院病房、船只和监狱的常规消毒的用途。另外,由于在十九世纪末期发现次氯酸钠能有效对抗致病菌,次氯酸盐已经被广泛用作常规消毒剂超过 150 多年。

[0004] 在活有机体内,可以在体内从被酶髓过氧化物酶 (MPO) 催化的化学反应中由过氧化氢和氯离子合成次氯酸盐,所述酶可以由炎症区域的活化噬菌细胞分泌的。作为亲核非自由基氧化剂,次氯酸盐可以被用作微生物杀灭剂 (Thomas, E. L., *Infect. Immun.*, 1979, 23, 522-531)。另外,无论细菌还是正常健康细胞都不能中和其毒性效果,因为它们缺少其催化解毒所需的酶 (Lapenna, D. 和 Cuccurullo, F., *Gen. Pharmacol.*, 1996, 27, 1145-1147)。

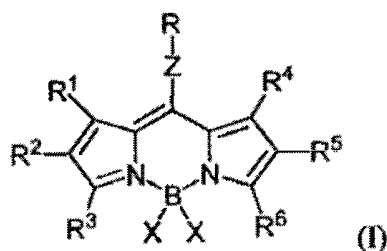
[0005] 通常,次氯酸盐可以与在杀灭细菌细胞和 / 或人类疾病中可能具有重要作用的一些蛋白质反应 (Thomas, E. L., *Infect. Immun.*, 1979, 23, 522-531; McKenna, S. M. 和 Davies, K. J. A., *Biochem. J.*, 1988, 254, 685-692; Hazell, L. J. 和 Stacker, R., *Biochem. J.*, 1993, 290, 165-172; Hazell, L. J., van den Berg, J. J. 和 Stacker, R., *Biochem. J.*, 1994, 302, 297-304)。当与蛋白质接触时,次氯酸盐可能引起蛋白质损害。例如,次氯酸盐可能改变蛋白质结构,和 / 或引起蛋白质分裂和二聚化。作为强氧化剂,次氯酸盐还可以迅速氧化低密度脂蛋白 (LDL)。另外,次氯酸盐与 DNA 的反应还会导致 DNA 的化学修饰和结构变化 (Hawkins, C. L. 和 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)。

[0006] 因为次氯酸盐及其共轭酸,即次氯酸的上述用途和作用,需要直接或间接检测和测量,包括体内检测和测量次氯酸和次氯酸盐的方法。

### [0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了能够用作直接或间接测量、检测或筛选次氯酸或次氯酸盐,即次氯酸的共轭碱的次氯酸探针的化合物。在一些实施方案中,本发明公开的次氯酸探针可以选择性和特异性地检测、测量或筛选次氯酸。在其它实施方案中,本发明公开的次氯酸探针能够在其它反应性氧类物质和 / 或氮类物质如  $^1\text{O}_2$ 、 $\text{NO}^\cdot$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $^\cdot\text{OH}$ 、 $\text{ONOO}^-$  和烷基过氧根 ( $\text{ROO}^\cdot$ ) 的存在下与次氯酸选择性反应。在某些实施方案中,所述化合物或次氯酸探针由式 (I) 表示:

[0009]



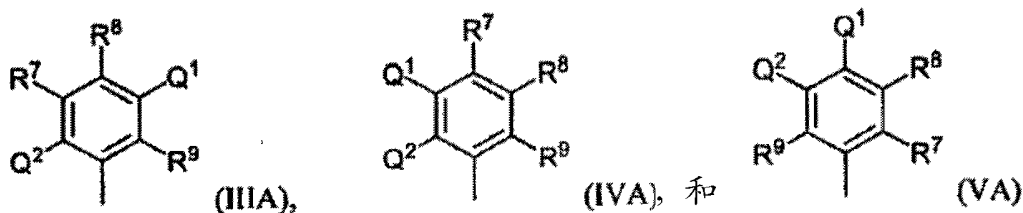
[0010] 其中 X 为卤代；

[0011]  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、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、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、羟基、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、磺酰基、磷酰基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-Y$  或  $-C(=O)-Q-Y$ ，其中 Y 为氢、卤代、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、氨基甲酰基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3 至 7 个环原子的杂环基；并且 Q 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基，或者  $R^1$  和  $R^2$  或  $R^2$  和  $R^3$  或  $R^4$  和  $R^5$  或  $R^5$  和  $R^6$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环；

[0012] Z 为键或二价连接基团；

[0013] R 具有式 (IIIA)、(IVA) 和 (VA) 之一的结构：

[0014]

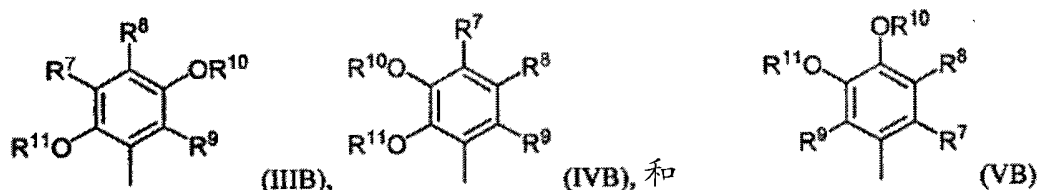


[0015] 其中  $R^7$ 、 $R^8$  和  $R^9$  各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、酰基、氨基甲酰基、酰胺基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基或杂烷基，或者式 (IIIA)、(IVA) 或 (VA) 的  $R^7$  和  $R^8$ ，或者式 (IVA) 的  $R^8$  和  $R^9$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环；并且

[0016]  $Q^1$  和  $Q^2$  各自独立地为氨基或  $-O-Q^3$ ，其中  $Q^3$  为氢、烷基、烯基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基，条件是  $Q^1$  和  $Q^2$  不同时为氨基。

[0017] 在一些实施方案中，R 是具有式 (IIIB)、(IVB) 和 (VB) 之一结构的单价二氧化芳基：

[0018]



[0019] 其中  $R^7$ 、 $R^8$  和  $R^9$  各自如上面所定义； $R^{10}$  和  $R^{11}$  各自独立地为氢、烷基、烯基、烷氧基



烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基。

[0020] 在一些实施方案中, X 为 F。在其它实施方案中, Z 为键。在另外的实施方案中, Z 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚杂烷基、亚杂烯基、亚杂炔基、亚芳基或亚杂芳基。

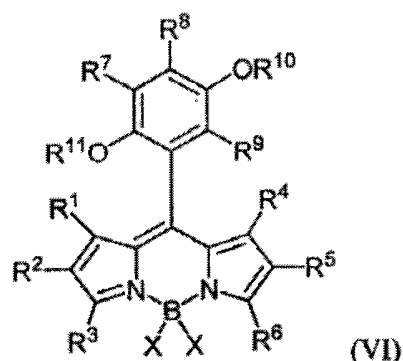
[0021] 在某些实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。在其它实施方案中,  $R^4$  和  $R^5$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。在另外的实施方案中,  $R^2$  和  $R^3$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。在其它实施方案,  $R^5$  和  $R^6$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。在其它实施方案,  $R^7$  和  $R^8$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。

[0022] 在某些实施方案中,  $R^3$  和  $R^6$  各自独立地为氢或  $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ , 其中  $R^{12}$  和  $R^{13}$  各自独立地为氢、烷基或芳基。在另外的实施方案中, 式 (I) 的  $R^3$  和  $R^6$  各自为  $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ , 其中  $R^{12}$  和  $R^{13}$  各自为烷基。在另外的实施方案中,  $R^3$  和  $R^6$  各自为  $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$ 。

[0023] 在一些实施方案中, 式 (IIIB)-(VB) 中任何一个的  $R^{10}$  和  $R^{11}$  各自独立地为氢、烷基、烯基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基。在另外的实施方案中,  $R^{10}$  为甲基,  $R^{11}$  为氢。

[0024] 在某些实施方案中, 所述化合物或次氯酸探针由式 (VI) 表示:

[0025]



[0026] 其中 X 为卤代;

[0027]  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、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、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、羟基、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、磺酰基、磷酰基、磺酸酯、磷酸酯、 $-C(=O)-Y$  或  $-C(=O)-Q-Y$ , 其中 Y 为氢、卤代、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、氨基甲酰基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或具有 3 至 7 个环原子的杂环基; Q 为亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基, 或者  $R^1$  和  $R^2$  或  $R^2$  和  $R^3$  或  $R^4$  和  $R^5$  或  $R^5$  和  $R^6$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环;

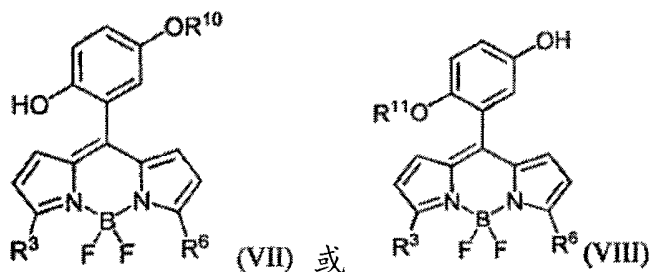
[0028]  $R^7$ 、 $R^8$  和  $R^9$  各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、酰基、氨基甲酰基、酰胺基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、

二芳基氨基或杂烷基,或者  $R^7$  和  $R^8$  一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环;并且

[0029]  $R^{10}$  和  $R^{11}$  各自独立地为氢、烷基、烯基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基。

[0030] 在其它实施方案中,所述化合物或次氯酸探针由式 (VII) 或 (VIII) 表示:

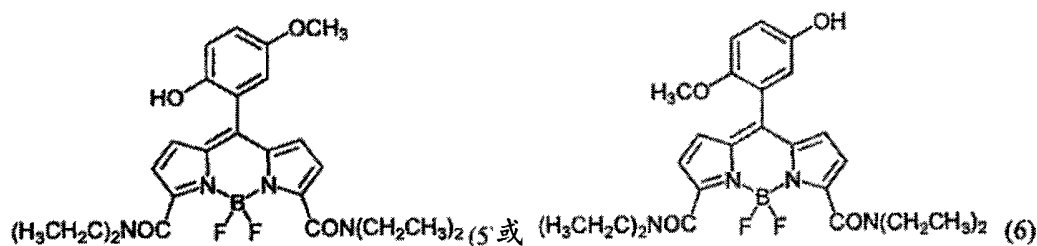
[0031]



[0032] 其中  $R^{10}$  为烷基;  $R^{11}$  为烷基;  $R^3$  和  $R^6$  各自独立地为氢或  $-C(=O)-Y$ , 其中  $Y$  为氢、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、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基或 3- 至 7- 元杂环基环。在一些实施方案中,  $R^3$  和  $R^6$  各自为  $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ , 其中  $R^{12}$  和  $R^{13}$  各自为烷基。

[0033] 在其它实施方案中,所述次氯酸探针是化合物 (5) 或 (6)、或其异构体:

[0034]



[0035] 本发明还提供了用于测量样品中的次氯酸的组合物,其中所述组合物包括本发明公开的次氯酸探针。在一些实施方案中,所述组合物还包括溶剂、酸、碱、缓冲溶液或其组合。

[0036] 本发明还提供了用于测量样品中的次氯酸的方法,其中所述方法包括如下步骤:

[0037] a) 将本发明公开的次氯酸探针与样品接触,形成荧光化合物;和

[0038] b) 测量所述荧光化合物的荧光性质,确定样品中的次氯酸量。

[0039] 在一些实施方案中,所述样品是化学样品或生物样品。在其它实施方案中,所述样品是包括微生物、或来自动物的细胞或组织的生物样品。

[0040] 本发明还提供了用于检测样品中的次氯酸的高通量筛选荧光方法,其中所述高通量方法包括如下步骤:

[0041] a) 将本发明公开的次氯酸探针与样品接触,形成一种或多种荧光化合物;和

[0042] b) 测量所述荧光化合物的荧光性质,确定样品中的次氯酸量。

[0043] 本发明还提供了用于筛选能够提高或降低次氯酸水平的一种或多种靶化合物的高通量方法,其包括如下步骤:

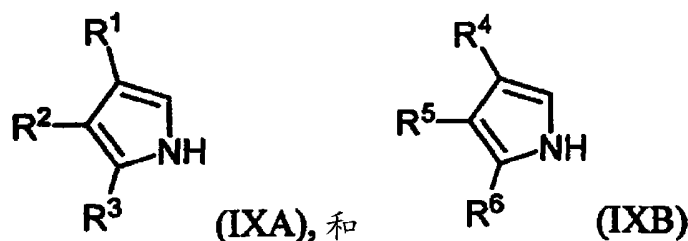
[0044] a) 将本发明公开的次氯酸探针与靶化合物接触,形成一种或多种荧光化合物;和

[0045] b) 测量所述荧光化合物的荧光性质,定性或定量地确定靶化合物。

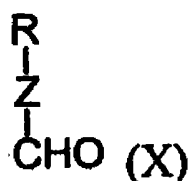
[0046] 本发明还提供了用于制备式 (I) 的化合物或次氯酸探针的方法,所述方法包括如下步骤:

[0047] a) 在酸催化剂的存在下,使式 (IXA) 和 (IXB) 的吡咯与式 (X) 的醛反应:

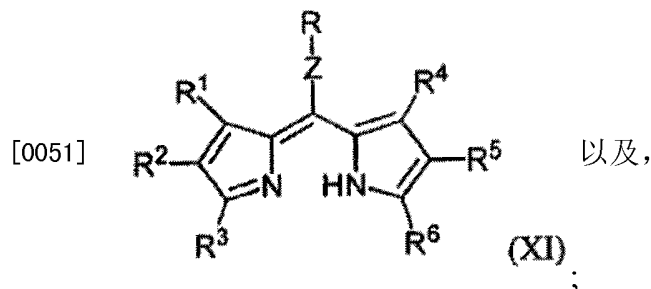
[0048]



[0049]



[0050] b) 将苯醌添加到反应混合物中,形成式 (XI) 的二吡咯:



[0052] c) 使式 (XI) 的二吡咯与三卤化硼醚合物和三乙胺反应,其中 X、R、Z、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup> 和 R<sup>6</sup> 各自如上面所定义。

[0053] 附图简述

[0054] 图 1 描述了在 25°C 下测量的 10mM 的化合物 5 的二氯甲烷溶液的 UV- 可见吸收图谱。

[0055] 图 2 描述了 10 μM 的化合物 5 在 0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) 中的溶液的荧光图谱。通过在 520nm 激发来确定荧光强度。

[0056] 图 3 描述了在 10 μM 的化合物 5 在 0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) 中的溶液与不同量 (0 ~ 5 当量) 的次氯酸反应 2 分钟后采集的该溶液的荧光图谱。所有溶液的总体积变化小于 1%。通过在 520nm 激发来确定荧光强度。

[0057] 图 4 描述了 10 μM 的化合物 5 溶液的荧光强度与次氯酸盐浓度之间的线性关系。通过在 520nm 激发,在 541nm 确定荧光强度。

[0058] 图 5 描述了 10 μM 的化合物 5 在各种反应性氧类物质 (ROS) 和反应性氮类物质 (RNS) 生成系统中的溶液的荧光图谱。所有溶液的总体积变化小于 1%。通过在 520nm 激发,在 541nm 确定荧光强度。

[0059] 图 6 描述了在不同 pH 值下,当 10 μM 的化合物 5 在 0.1M 磷酸钾缓冲液中的溶液与 10 μM 次氯酸盐反应 2 分钟后采集的该溶液的荧光图谱。所有溶液的总体积变化小于 1%。通过在 520nm 激发确定荧光强度。

[0060] 图 7 描述了 10  $\mu$  M 的化合物在  $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}$  系统中的溶液的荧光图谱。在 37 $^\circ\text{C}$  将化合物 5 添加到含有  $\text{MPO}$  (1U/100mL) 和  $\text{NaCl}$  (150mM) 的磷酸钠缓冲液 (0.1M, pH 7.4) 中。下面的线表示在缺少  $\text{H}_2\text{O}_2$  时溶液的背景荧光性质 (空白)。上面的线表示在存在最终浓度为 5  $\mu$  M 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  时溶液的荧光性质。

[0061] 图 8 描述了用浓度为 20  $\mu$  M 的化合物 5 温育的被刺激的鼠 J774.1 巨噬细胞的图像。左边的图像是对比图像, 而右边的图像是荧光图像。用不同的刺激物处理巨噬细胞, 然后用化合物 5 (20  $\mu$  M) 温育 1 小时。8A 是没有刺激物的对照图像。8B 是用磷脂多糖 (LPS) (1  $\mu$  g/mL) 和干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (50ng/mL) 处理 4 小时, 然后用 PMA (10nM) 处理 0.5 小时的细胞的图像。8C 是用 2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物 (TEMPO) (100  $\mu$  M)、LPS (1  $\mu$  g/mL) 和 IFN- $\gamma$  (50ng/mL) 处理 4 小时, 然后用 PMA (10nM) 处理 0.5 小时的细胞的图像。在用刺激物处理 20 分钟后获得荧光图像。

[0062] 图 9 描述了用浓度为 20  $\mu$  M 的化合物 5 温育的被刺激的鼠 RAW264.7 巨噬细胞的图像。左边的图像是对比图像, 而右边的图像是荧光图像。用不同的刺激物处理巨噬细胞, 然后用化合物 5 (20  $\mu$  M) 温育 1 小时。9a 是没有刺激物的对照的图像。9b 是用磷脂多糖 (LPS) (1  $\mu$  g/mL) 和干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (50ng/mL) 处理 4 小时, 然后用 PMA (10nM) 处理 0.5 小时的细胞的图像。9c 是用 2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物 (TEMPO) (100  $\mu$  M)、LPS (1  $\mu$  g/mL) 和 IFN- $\gamma$  (50ng/mL) 处理 4 小时, 然后用 PMA (10nM) 处理 0.5 小时的细胞的图像。在用刺激物处理 20 分钟后获得荧光图像。

[0063] 定义

[0064] 为了便于理解本发明公开的主题内容, 下面定义本发明使用的多个术语、缩写或其它代号。没有定义的任何术语、缩写或代号被理解为具有与本申请提交同期的技术人员所使用的通常含义。

[0065] “氨基”指伯胺、仲胺或叔胺, 它们可以是任选取代的。具体包括作为杂环组成的仲胺或叔胺氮原子。具体还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  $-\text{NR}^{14}\text{R}^{15}$ , 其中  $\text{R}^{14}$  和  $\text{R}^{15}$  各自独立地为 H、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。

[0066] “烷基”指包含碳和氢的完全饱和和无环单价基团, 并且可以是支链或直链。在一些实施方案中, 烷基包含约 1 至约 25 个碳原子。烷基的例子是甲基、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”指具有一至六个碳原子的烷基, 以甲基、乙基、正丁基、异丁基、叔丁基、异戊基、正戊基和异戊基为例。

[0067] “杂烷基”指烷基内的一个或多个碳原子被杂原子如 O、S 和 N 取代的烷基。在一些实施方案中, 杂烷基包括一个或多个 O 原子。在其它实施方案中, 杂烷基包括一个或多个 S 原子。在另外的实施方案中, 杂烷基包括一个或多个亚胺基。在某些实施方案中, 杂烷基包括两个或多个 O、S、亚胺基或其组合。

[0068] “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。在一些实施方案中, 烯基或亚烯基只包含一个双键。在其它实施方案中, 烯基或亚烯基包含两个或多个双键。在另外的实施方案中, 烯基或亚烯基可以是主链中包含二至八个碳原子的低级烯基或亚烯基。在另外的实施方案中, 烯基或亚烯基可以具有一个双键和高达 25 个碳原子, 以乙烯基、丙烯基、异丙烯基、丁烯基、

异丁烯基、己烯基等为例。

[0069] “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。在一些实施方案中,炔基或亚炔基只包含一个三键。在其它实施方案中,炔基或亚炔基包含两个或多个三键。在另外的实施方案中,炔基或亚炔基可以是主链中包含二至八个碳原子的低级炔基或亚炔基。在另外的实施方案中,炔基或亚炔基可以具有一个三键并且高达 20 个碳原子,以乙炔基、丙炔基、异丙炔基、丁炔基、异丁炔基、己炔基等为例。

[0070] “芳族”或“芳族基团”指芳基或杂芳基。

[0071] “芳基”指任选取代的碳环芳族基团。在一些实施方案中,芳基包括环部分中含有 6 至 12 个碳原子的单环或双环基团,例如苯基、联苯基、萘基、取代的苯基、取代的联苯基或取代的萘基。在其它实施方案中,芳基是苯基或取代的苯基。

[0072] “芳烷基”指用芳基取代的烷基。芳烷基的一些非限制性例子包括苄基和苯乙基。

[0073] “烷芳基”指用烷基取代的芳基。烷芳基的一些非限制性例子包括甲基苯基和甲基萘基。

[0074] “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。

[0075] “卤素”或“卤代”指氟、氯、溴和碘。

[0076] “杂原子”指除碳和氢以外的原子。

[0077] “杂环”或“杂环基”指在至少一个环中具有至少一个杂原子如 O、S、N、B 和 P 的任选取代的、完全饱和或不饱和的、单环或双环的、芳族或非芳族的基团。芳族杂环基(即杂芳基)可以在环中具有 1 或 2 个氧原子、1 或 2 个硫原子和 / 或 1 至 4 个氮原子,并且可以通过碳或杂原子与分子的剩余部分键合。杂芳基的非限制性例子包括呋喃基、噻吩基、噻唑基、吡啶基、恶唑基、吡咯基、咪唑基、喹啉基或异喹啉基等。

[0078] “烃”或“烃基”指仅由碳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。烃基还包括用其它脂族、环状或芳基烃基团取代的烷基、烯基、炔基和芳基部分,如烷芳基、烯芳基和炔芳基。在一些实施方案中,“烃”或“烃基”包括 1 至 30 个碳原子。

[0079] “亚烃基”指通过从烃中除去两个氢原子形成的二价基团,其自由化合价不参与双键中,例如亚芳基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳烷基或亚烷芳基。

[0080] 本发明用于描述化合物或化学部分的“取代的”指用第二化学部分代替该化合物或化学部分的至少一个氢原子。取代基的非限制性例子是在本发明公开的示例性化合物和实施方案中找到的一些,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;酰胺基;膦酸基;磷化氢;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,它可以是单环或者是稠合或非稠合多环(例如环丙基、环丁基、环戊基或环己基)或者是杂环烷基,它可以是单环或者是稠合或非稠合多环(例如吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基或噁嗪基);碳环或杂环、单环或者是稠合或非稠合多环芳基(例如苯基、萘基、吡咯基、咪唑基、呋喃基、苯硫基、咪唑基、恶唑基、异恶唑基、噻唑基、三唑基、四唑基、吡唑基、吡啶基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、吡嗪基、哒嗪基、嘧啶基、苯并咪唑基、苯并苯硫基或苯并呋喃基);氨基(伯氨基、仲氨基或叔氨基);o- 低级烷基;o- 芳基、芳基;芳基-低级烷基; $-CO_2CH_3$ ;  $-CONH_2$ ;  $-OCH_2CO$

$\text{NH}_2$ ;  $-\text{NH}_2$ ;  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ;  $-\text{OCHF}_2$ ;  $-\text{CF}_3$ ;  $-\text{OCF}_3$ ;  $-\text{NH}$ (烷基);  $-\text{N}$ (烷基)<sub>2</sub>;  $-\text{NH}$ (芳基);  $-\text{N}$ (烷基)(芳基);  $-\text{N}$ (芳基)<sub>2</sub>;  $-\text{CHO}$ ;  $-\text{CO}$ (烷基);  $-\text{CO}$ (芳基);  $-\text{CO}_2$ (烷基); 和  $-\text{CO}_2$ (芳基); 并且这样的部分还可以被稠环结构或桥, 如  $-\text{OCH}_2\text{O}-$  任选取代。这些取代基可以用选自这样的组的取代基进一步任选取代。除非另有说明, 本发明公开的所有化学基团都可以被取代。例如, 本发明描述的“取代的”烷基、烯基、炔基、芳基、烃基或杂环部分是用烃基部分、取代的烃基部分、杂原子或杂环取代的部分。另外, 取代基可以包括其中碳原子用杂原子如氮、氧、硅、磷、硼、硫或卤素原子取代的部分。这些取代基可以包括卤素、杂环、烷氧基、烯氧基、炔氧基、芳氧基、羟基、受保护的羟基、酮基、酰基、酰氧基、硝基、氨基、酰胺基、氰基、硫醇、醛、乙缩醛、酯和醚。

[0081] “荧光团”指引起分子产生荧光的分子部分。通常, 它是能够吸收特定波长的辐射并在不同的特定波长再发射辐射的官能团。发射辐射的强度和波长通常取决于荧光团和荧光团的化学环境。

[0082] “醌”指在同一六元环中具有两个羰基的芳族化合物。醌的一些非限制性例子包括 1,4- 苯醌、1,2- 苯醌、1,4- 萘醌、蒽醌、菲醌等。

[0083] “电子受体”指接受从另一种化合物, 通常为电子供体传递给它的至少一个电子的化合物。

[0084] “电子供体”指向另一种化合物, 通常为电子受体贡献至少一个电子的化合物。

[0085] “次氯酸探针”指能够与次氯酸反应形成荧光化合物的化合物。在一些实施方案中, 本发明公开的次氯酸探针不与反应性氧类物质和反应性氮类物质充分反应。在其它实施方案中, 本发明公开的次氯酸探针可以与反应性氧类物质和反应性氮类物质充分反应。

[0086] “反应性氧类物质”或 ROS 指包含氧的离子、自由基以及非自由基类物质。反应性氧类物质的一些非限制性例子包括  $^1\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 、 $\text{ROO}^{\cdot}$ 、 $^{\cdot}\text{OH}$ 、 $\text{OCl}^-$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。

[0087] “反应性氮类物质”或 RNS 指包含氮的离子、自由基以及非自由基类物质。反应性氮类物质的一些非限制性例子包括氧化氮 ( $\text{NO}^{\cdot}$ )、二氧化氮 ( $\text{NO}_2^{\cdot}$ )、亚硝酸盐 ( $\text{NO}_2^-$ ) 和过氧亚硝酸盐 ( $\text{ONOO}^-$ )。

[0088] “反应”、“添加”等指将一种反应物、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、反应性基团等可以单独、同时或独立添加并且可以按照任意顺序添加。它们可以在加热或不加热的情况下添加并且可以任选在惰性气氛下添加。在一些实施方案中, “反应”指反应性基团处于同一分子内的原位形成或分子内反应。

[0089] “充分反应”指反应中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%、或超过约 90 摩尔%。在一些实施方案中, “充分反应”指反应物消耗超过约 95 摩尔%。在其它实施方案中, 在一些实施方案中, “充分反应”指反应物消耗超过约 97 摩尔%。在另外的实施方案中, “充分反应”指反应物消耗超过约 99 摩尔%。

[0090] “高通量方法”指能够自动进行或者评价大量样品的方法。在一些实施方案中, 信息学系统可以用于和实施所述高通量方法。信息学系统可以提供对高通量方法所用的物理装置的软件控制, 以及组织并存储由高通量方法产生的电子数据。

[0091] 发明详述

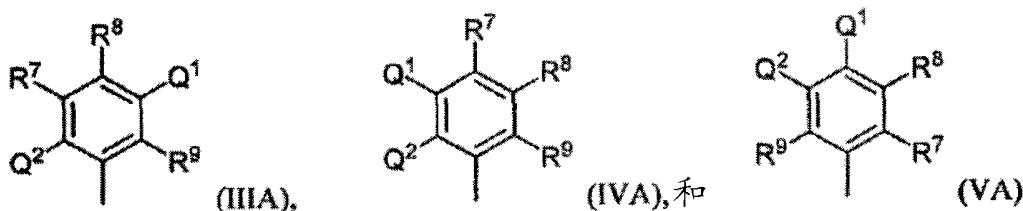
[0092] 本发明提供了能够用作特异性和 / 或选择性地检测、测量和 / 或筛选次氯酸的次



烷基环或杂芳基环。在一些实施方案中,式(II)的 $R^3$ 和 $R^6$ 各自独立地为氢或 $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ,其中 $R^{12}$ 和 $R^{13}$ 各自独立地为氢、烷基或芳基。在另外的实施方案中,式(II)的 $R^3$ 和 $R^6$ 各自为 $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ,其中 $R^{12}$ 和 $R^{13}$ 各自为烷基。在另外的实施方案中, $R^3$ 和 $R^6$ 各自为 $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$ 。

[0101] 在其它实施方案中,A是能够与次氯酸反应形成醌如1,4-苯醌、1,2-苯醌、1,4-萘醌、蒽醌、菲醌等的单价二氧化芳基。在另外的实施方案中,A具有式(IIIA)、(IVA)和(VA)之一:

[0102]

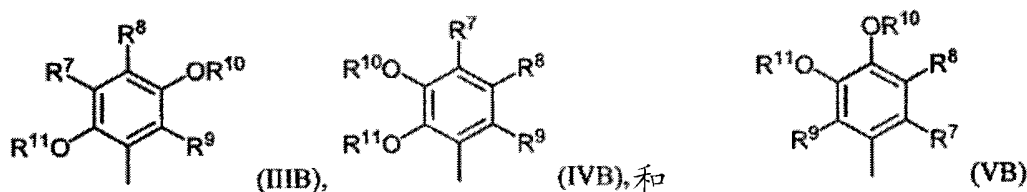


[0103] 其中 $R^7$ 、 $R^8$ 和 $R^9$ 各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、酰基、氨基甲酰基、酰胺基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基或杂烷基,或者式(IIIA)、(IVA)或(VA)的 $R^7$ 和 $R^8$ 或者式(IVA)的 $R^8$ 和 $R^9$ 一起形成5-、6-或7-元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环;并且

[0104]  $Q^1$ 和 $Q^2$ 各自为供电子基团。在一些实施方案中, $Q^1$ 和 $Q^2$ 各自独立地为氨基或 $-O-Q^3$ ,其中 $Q^3$ 是氢、烷基、烯基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基,条件是 $Q^1$ 和 $Q^2$ 不同时为氨基。在另外的实施方案中, $Q^1$ 和 $Q^2$ 各自为 $-O-Q^3$ 。在另外的实施方案中, $Q^1$ 为 $-O-Q^3$ , $Q^2$ 为氨基。在另外的实施方案中, $Q^1$ 为氨基, $Q^2$ 为 $-O-Q^3$ 。

[0105] 在某些实施方案中,R是具有式(IIIB)、(IVB)和(VB)之一的单价二氧化芳基:

[0106]



[0107] 其中 $R^7$ 、 $R^8$ 和 $R^9$ 各自如上面所定义; $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 各自独立地为氢或供电子基团。在一些实施方案中, $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 各自独立地为氢、烷基、烯基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基。

[0108] 在一些实施方案中,式(IIIA)、(IVA)、(VA)、(IIIB)、(IVB)或(VB)的 $R^7$ 和 $R^8$ 一起形成环。在其它实施方案中, $R^7$ 和 $R^8$ 一起形成5-、6-或7-元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。在另外的实施方案中, $R^7$ 和 $R^8$ 一起形成苯并环、萘并环、蒽并环、吡啶并环、哒嗪并环、嘧啶并环、吡嗪并环、三嗪并环、四嗪并环、吡唑并环、三唑并环或吡咯并环。在某些实施方案中, $R^7$ 和 $R^8$ 一起形成苯并环。

[0109] 在某些实施方案中,式(IVA)和(IVB)的 $R^8$ 和 $R^9$ 一起形成环。在一些实施方案中, $R^8$ 和 $R^9$ 一起形成5-、6-或7-元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。在

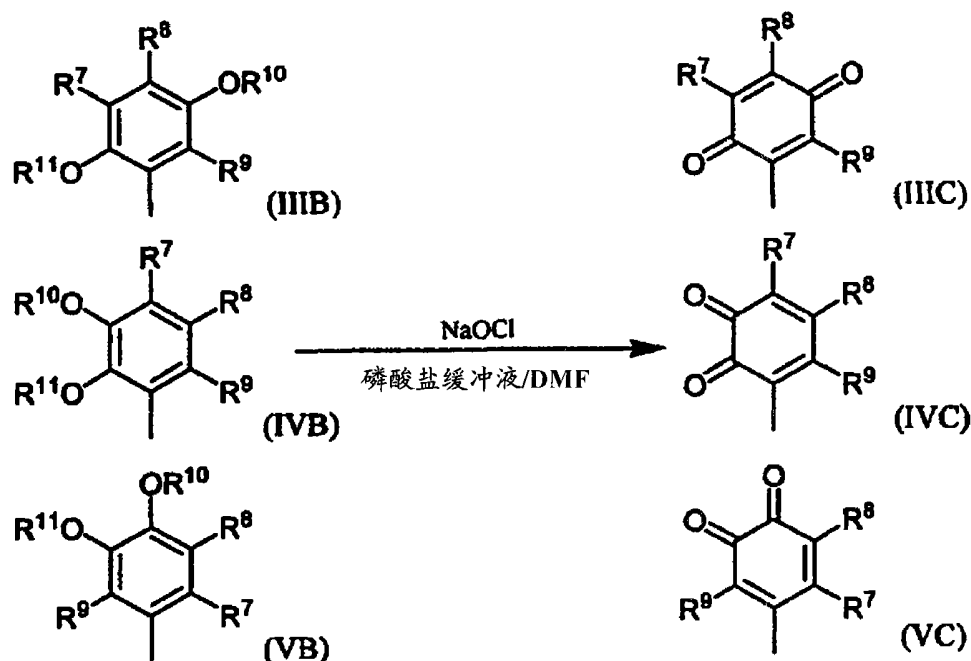


其它实施方案中,  $R^8$  和  $R^9$  一起形成苯并环、萘并环、蒽并环、吡啶并环、哒嗪并环、嘧啶并环、吡嗪并环、三嗪并环、四嗪并环、吡唑并环、三唑并环或吡咯并环。在另外的实施方案中,  $R^8$  和  $R^9$  一起形成苯并环。

[0110] 式 (IIIB)、(IVB) 或 (VB) 的单价二氧化芳基可以分别与次氯酸反应, 形成如下面方案 (A) 所示的醌 (IIIC)、(IVC) 或 (VC)。

[0111] 方案 (A)

[0112]



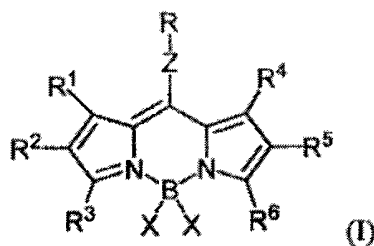
[0113] 在一些实施方案中,  $R^{10}$  是受保护或未受保护的羟基,  $R^{11}$  是烷氧基如甲氧基。在其它实施方案中,  $R^{11}$  是受保护或未受保护的羟基, 并且  $R^{10}$  是烷氧基如甲氧基。在另外的实施方案中, 在约 7.4 至约 8.2 的 pH 范围内, 方案 (A) 中式 (IIIB)、(IVB) 或 (VB) 的二氧化芳基可以在室温下分别被次氯酸氧化, 形成醌 (IIIC)、(IVC) 或 (VC)。

[0114] 在其它实施方案中, A 是 1,4- 或 1,2- 二取代的亚芳基或亚杂芳基, 其中所述取代基独立地为烷氧基或者受保护或未受保护的羟基。在另外的实施方案中, 所述亚芳基是亚苯基。

[0115] 另外, 本发明公开的化合物或次氯酸探针包括二吡咯亚甲基硼 (BODIPY) 型荧光团。在一些实施方案中, 由通式 (I)、(VI)、(VII) 和 (VIII) 表示的化合物或次氯酸探针是实质上无荧光的。在其它实施方案中, 由通式 (I)、(VI)、(VII) 和 (VIII) 表示的化合物或次氯酸探针可以在生理条件下与次氯酸有效反应, 得到强荧光信号。在另外的实施方案中, 通过测定氧化的次氯酸探针的荧光信号, 可以非常高的特异性和选择性确定次氯酸的量。

[0116] 在一些实施方案中, 本发明公开的化合物或次氯酸探针由式 (I) 表示:

[0117]

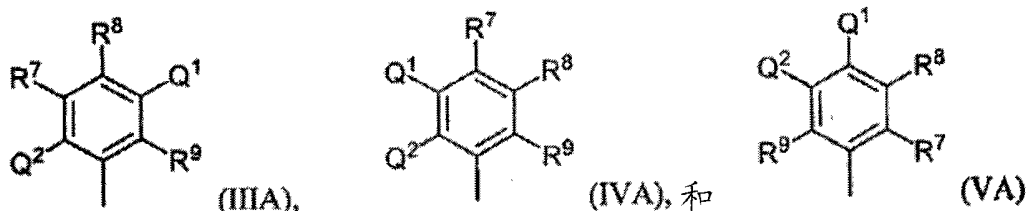


[0118] 其中 X、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup> 和 R<sup>6</sup> 各自如本发明所定义；

[0119] Z 为键或二价连接基团如亚烷基、亚杂烷基、亚芳基和亚杂芳基；

[0120] R 具有式 (IIIA)、(IVA) 和 (VA) 之一的结构：

[0121]

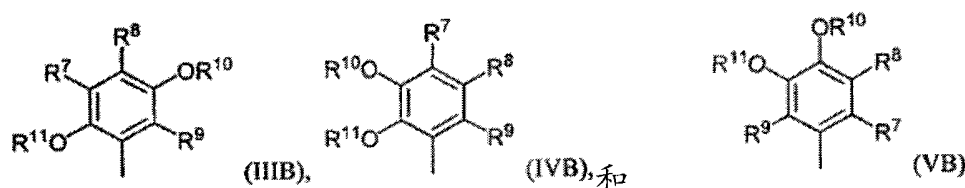


[0122] 其中 R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup> 和 R<sup>9</sup> 各自独立地为氢、卤代、烷基、卤化的烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟基、硫代、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、氰基、硝基、羧基、酰基、氨基甲酰基、酰胺基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基或杂烷基，或者式 (IIIA)、(IVA) 或 (VA) 的 R<sup>7</sup> 和 R<sup>8</sup> 或者式 (IVA) 的 R<sup>8</sup> 和 R<sup>9</sup> 一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环；并且

[0123] Q<sup>1</sup> 和 Q<sup>2</sup> 各自为供电子。在一些实施方案中，Q<sup>1</sup> 和 Q<sup>2</sup> 独立地为氨基或 -O-Q<sup>3</sup>，其中 Q<sup>3</sup> 是氢、烷基、烯基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基，条件是 Q<sup>1</sup> 和 Q<sup>2</sup> 不同时为氨基。在另外的实施方案中，Q<sup>1</sup> 和 Q<sup>2</sup> 各自为 -O-Q<sup>3</sup>。在另外的实施方案中，Q<sup>1</sup> 为 -O-Q<sup>3</sup>，Q<sup>2</sup> 为氨基。在另外的实施方案中，Q<sup>1</sup> 为氨基，Q<sup>2</sup> 为 -O-Q<sup>3</sup>。

[0124] 在某些实施方案中，R 是具有式 (IIIB)、(IVB) 和 (VB) 之一的单价二氧化芳基：

[0125]

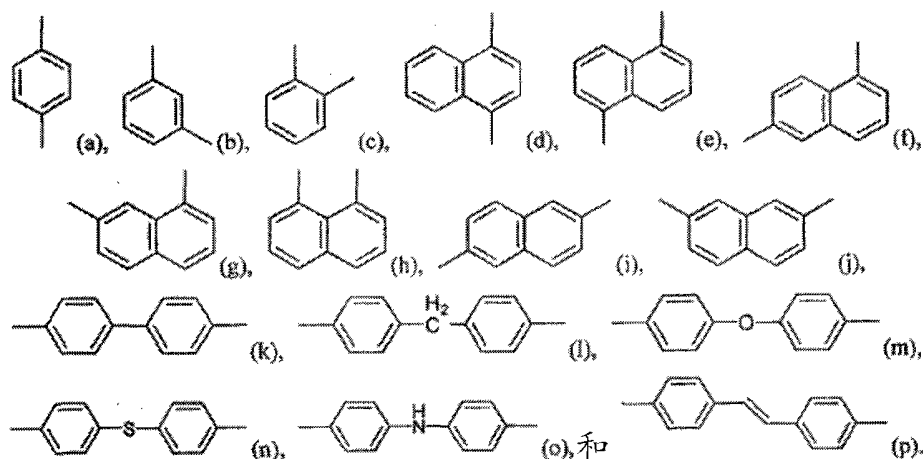


[0126] 其中 R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup> 和 R<sup>9</sup> 各自如本发明所定义；R<sup>10</sup> 和 R<sup>11</sup> 各自独立地为氢或供电子基团。

[0127] 在一些实施方案中，R<sup>10</sup> 和 R<sup>11</sup> 各自独立地为氢、烷基、烯基、烷氧基烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳烷基、烷基酰胺基、烷氧基酰胺基、烷氧基羰基、卤化的烷基或杂烷基。在其它实施方案中，R<sup>11</sup> 为氢。在另外的实施方案中，R<sup>10</sup> 为烷基如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基等。在另外的实施方案中，R<sup>11</sup> 为氢，R<sup>10</sup> 为甲基。

[0128] 在其它实施方案中，Z 为键。在其它实施方案中，Z 为亚芳基。在另外的实施方案中，Z 为具有式 (a)-(p) 之一的亚芳基：

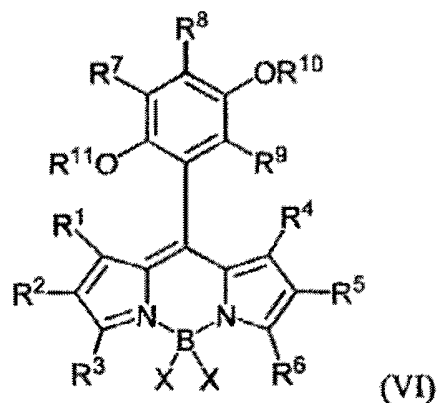
[0129]



[0130] 在另外的实施方案中,式(a)-(p)中的一个或多个被任选取代。

[0131] 在某些实施方案中,本发明公开的化合物或次氯酸探针由式(VI)表示:

[0132]



[0133] 其中 X、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>10</sup> 和 R<sup>11</sup> 各自如本发明所定义。在一些实施方案中, R<sup>11</sup> 为氢。在其它实施方案中, R<sup>10</sup> 为烷基如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基等。在另外的实施方案中, R<sup>11</sup> 为氢, R<sup>10</sup> 为甲基。在某些实施方案中,两个 X 基团是不同的。在其它实施方案中,两个 X 基团是相同的。在另外的实施方案中,两个 X 基团各自为 F。在一些实施方案中, R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 各自为氢; R<sup>3</sup> 和 R<sup>6</sup> 各自为 -C(=O)-Y, 其中 Y 为二乙氨基。

[0134] 在一些实施方案中,式(I)或(VI)的 R<sup>3</sup> 和 R<sup>6</sup> 各自独立地为氢或 -C(=O)NR<sup>12</sup>R<sup>13</sup>, 其中 R<sup>12</sup> 和 R<sup>13</sup> 各自独立地为氢、烷基或芳基。在另外的实施方案中,式(VI)的 R<sup>3</sup> 和 R<sup>6</sup> 各自为 -C(=O)NR<sup>12</sup>R<sup>13</sup>, 其中 R<sup>12</sup> 和 R<sup>13</sup> 各自为烷基。在另外的实施方案中, R<sup>3</sup> 和 R<sup>6</sup> 各自为 -C(=O)N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。

[0135] 在其它实施方案中,式(I)、(II)或(VI)的 R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 一起形成环。在其它实施方案中, R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 基团一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。在另外的实施方案中, R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 一起形成苯并环、萘并环、蒽并环、吡啶并环、哒嗪并环、嘧啶并环、吡嗪并环、三嗪并环、四嗪并环、吡唑并环、三唑并环或吡咯并环。在一些实施方案中, R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 基团一起形成苯并环。

[0136] 在另外的实施方案中,式(I)、(II)或(VI)的 R<sup>5</sup> 和 R<sup>6</sup> 一起形成环。在其它实施方案中, R<sup>5</sup> 和 R<sup>6</sup> 基团一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。在另外的实施方案中, R<sup>5</sup> 和 R<sup>6</sup> 一起形成苯并环、萘并环、蒽并环、吡啶并环、哒嗪并环、

嘧啶并环、吡嗪并环、三嗪并环、四嗪并环、吡唑并环、三唑并环或吡咯并环。在一些实施方案中， $R^5$  和  $R^6$  基团一起形成苯并环。

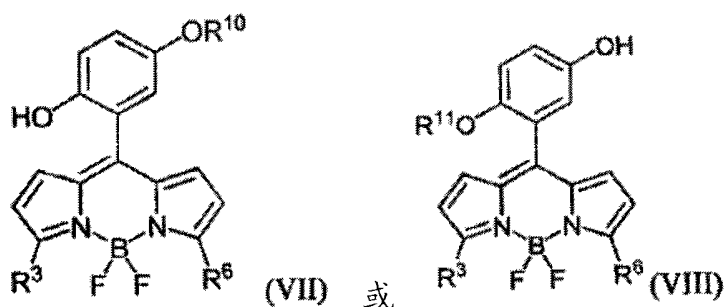
[0137] 在另外的实施方案中，式 (I)、(II) 或 (VI) 的  $R^1$  和  $R^2$  一起形成环。在其它实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  基团一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。在另外的实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  基团一起形成苯并环、萘并环、蒽并环、吡啶并环、哒嗪并环、嘧啶并环、吡嗪并环、三嗪并环、四嗪并环、吡唑并环、三唑并环或吡咯并环。在一些实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  基团一起形成苯并环。

[0138] 在另外的实施方案中，式 (I)、(II) 或 (VI) 的  $R^4$  和  $R^5$  一起形成环。在其它实施方案中， $R^4$  和  $R^5$  基团一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。在另外的实施方案中， $R^4$  和  $R^5$  基团一起形成苯并环、萘并环、蒽并环、吡啶并环、哒嗪并环、嘧啶并环、吡嗪并环、三嗪并环、四嗪并环、吡唑并环、三唑并环或吡咯并环。在一些实施方案中， $R^4$  和  $R^5$  基团一起形成苯并环。

[0139] 在另外的实施方案中，式 (VI) 的  $R^7$  和  $R^8$  一起形成环。在其它实施方案中， $R^7$  和  $R^8$  基团一起形成 5-、6- 或 7- 元环烷基环、环烯基环、芳基环、杂烷基环或杂芳基环。在另外的实施方案中， $R^7$  和  $R^8$  基团一起形成苯并环、萘并环、蒽并环、吡啶并环、哒嗪并环、嘧啶并环、吡嗪并环、三嗪并环、四嗪并环、吡唑并环、三唑并环或吡咯并环。在一些实施方案中， $R^7$  和  $R^8$  基团一起形成苯并环。

[0140] 在某些实施方案中，本发明公开的化合物或次氯酸探针由式 (VII) 或 (VIII) 表示：

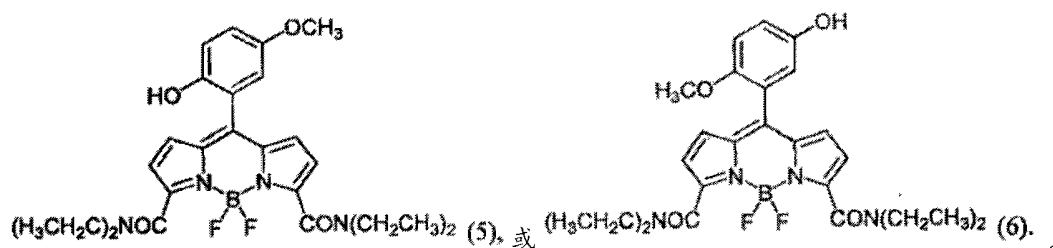
[0141]



[0142] 其中  $R^{10}$  为烷基； $R^{11}$  为烷基； $R^3$  和  $R^6$  各自独立地为氢或  $-C(=O)-Y$ ，其中 Y 为氢、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、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基或具有 3 至 7 个环原子的杂环基。在一些实施方案中， $R^3$  和  $R^6$  各自为  $-C(=O)NR^{12}R^{13}$ ，其中  $R^{12}$  和  $R^{13}$  各自为烷基。在另外的实施方案中， $R^3$  和  $R^6$  各自为  $-C(=O)N(CH_2CH_3)_2$ 。

[0143] 在一些实施方案中，本发明公开的次氯酸探针是化合物 (5) 或 (6)、或其异构体：

[0144]



[0145] 本发明还提供了用于直接或间接测量化学样品或生物学样品如微生物、或来自动物的细胞或组织中的次氯酸或次氯酸盐的试剂组合物。所述试剂组合物包括本发明公开的次氯酸探针。在一些实施方案中,所述试剂组合物还包括溶剂、酸、碱、缓冲溶液或碱、缓冲溶液的组合或其组合。

[0146] 本发明还提供了用于直接或间接测量样品中的次氯酸或次氯酸盐的方法。在一些实施方案中,所述方法包括如下步骤:(a) 将本发明公开的次氯酸探针与样品接触,形成荧光化合物;和(b) 测量所述荧光化合物的荧光性质。在一些实施方案中,使用本发明公开的方法或本领域技术人员已知的任何方法测量荧光性质。在其它实施方案中,所述样品是化学样品或生物学样品。在另外的实施方案中,所述样品是包括微生物、或来自动物的细胞或组织的生物学样品。

[0147] 本发明还提供了用于直接或间接检测样品中的次氯酸或次氯酸盐的高通量筛选荧光方法。在一些实施方案中,所述高通量筛选荧光方法包括如下步骤:(a) 将本发明公开的次氯酸探针与样品接触,形成一种或多种荧光化合物;和(b) 测量所述荧光化合物的荧光性质。在其它实施方案中,使用本发明公开的方法或本领域技术人员已知的任何方法测定荧光性质。

[0148] 本发明还提供了用于筛选能够直接或间接提高或降低次氯酸或次氯酸盐水平的一种或多种靶化合物的高通量方法。在一些实施方案中,所述高通量方法包括如下步骤:(a) 将本发明公开的次氯酸探针与靶化合物接触,形成一种或多种荧光化合物;和(b) 测量所述荧光化合物的荧光性质,以定性或定量地确定靶化合物。在其它实施方案中,使用本发明公开的方法或本领域技术人员已知的任何方法测定荧光性质。

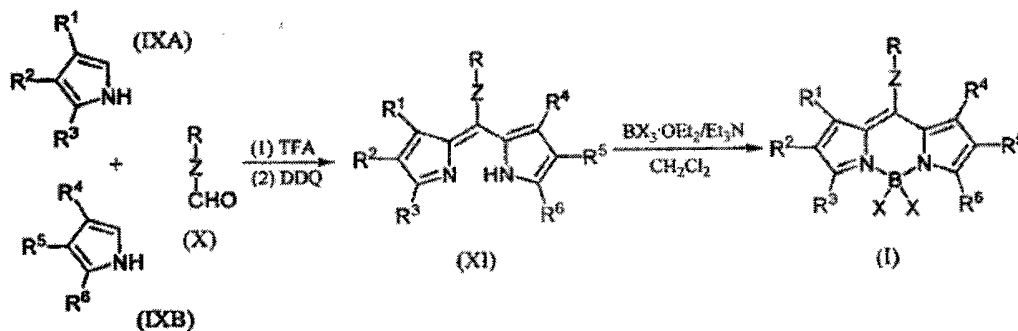
[0149] 在一些实施方案中,可以在本发明公开的高通量方法中使用实施信息学系统。在其它实施方案中,信息学系统提供对高通量方法中使用的物理装置的软件控制。在其它实施方案中,信息学系统整理由高通量方法产生的电子数据。在另外的实施方案中,信息学系统存储由高通量方法产生的电子数据。

#### [0150] 通用合成方案

[0151] 本领域技术人员可以使用已知的有机合成法以及本发明公开的各种通用或具体合成方案来制备本发明公开的化合物或次氯酸探针。例如,可以通过如下方案(B)所示的下列通用方案来合成式(I)的次氯酸探针。

[0152] 方案(B)

[0153]



[0154] 方案(B)中的R、X、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>各自如上面所定义。在酸催化剂的存在下,在适当的溶剂如二氯甲烷或1,2-二氯乙烷中,在从室温到80℃的温度下,式(IXA)和

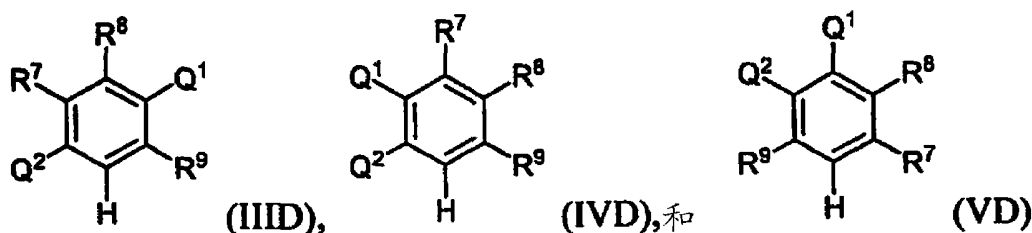
(IXB) 的吡咯可以与式 (X) 的醛反应。在充分量的式 (X) 的醛与式 (IXA) 和 (IXB) 的吡咯反应后,可以向反应混合物中添加氧化剂如苯醌,形成式 (XI) 的二吡咯。合适的苯醌的一些非限制性例子包括 2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌 (DDQ) 和 2,3,5,6-四氯-对苯醌。可以通过常规技术如洗涤、过滤、萃取、蒸发、蒸馏、重结晶、色谱法等来纯化式 (XI) 的二吡咯。

[0155] 合适的酸催化剂的一些非限制性例子包括三氟乙酸 (TFA)、4-(三氟甲基)苯甲酸、对甲苯磺酸、甲磺酸、乙酸酐、路易斯酸 (例如  $\text{Et}_2\text{AlCl}$ 、 $\text{EtAlCl}_2$ 、 $\text{BF}_3$ 、 $\text{SnCl}_4$ 、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{Ti}(\text{异丙氧基})_4$  和  $\text{TiCl}_4$ ) 及其组合。在一些实施方案中,所述酸催化剂是三氟乙酸。

[0156] 在一些实施方案中,式 (IXA) 的吡咯与式 (IXB) 的吡咯相同。在其它实施方案中,式 (IXA) 的吡咯与式 (IXB) 的吡咯不同。式 (IXA) 和式 (IXB) 的吡咯可以购自商业供应商如 Aldrich Chemical 或通过已知方法制备。吡咯的化学和制备公开于 Richard Alan Jones 等,“Chemistry of Pyrroles”, Academic Press (1977), 该文献以参考的方式并入本发明。

[0157] 式 (X) 的醛可以购自商业供应商如 Aldrich Chemical 或通过技术人员已知的方法制备。例如,可以通过将具有式  $\text{R-Z-H}$  的芳基化合物甲酰化来制备式 (X) 的醛,其中 R 和 Z 如上面所定义。在一些实施方案中,可以通过将具有式 (IIID)、(IVD) 和 (VD) 之一的芳基化合物甲酰化来制备式 (X) 的醛:

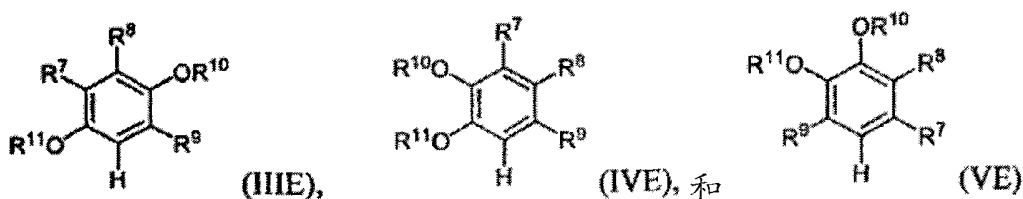
[0158]



[0159] 其中  $\text{R}^7$ 、 $\text{R}^8$ 、 $\text{R}^9$ 、 $\text{Q}^1$  和  $\text{Q}^2$  各自如本发明所定义。

[0160] 在某些实施方案中,可以通过将具有式 (IIIE)、(IVE) 和 (VE) 之一的芳基化合物甲酰化来制备式 (X) 的醛:

[0161]



[0162] 其中  $\text{R}^7$ 、 $\text{R}^8$ 、 $\text{R}^9$ 、 $\text{R}^{10}$  和  $\text{R}^{11}$  各自如本发明所定义。

[0163] 当 R 为酚基或包括酚基时,可以只用低聚甲醛进行甲酰化。可选择地,当 Z 为亚芳基时,可以通过 Vilsmeier-Haack 反应,用二甲基甲酰胺与氯化磷的混合物进行甲酰化。同样,当 Z 为键并且 R 为二氧化的芳基时,可以通过将具有式  $\text{R-H}$  的二氧化芳基化合物甲酰化来制备式 (X) 的醛。可选择地,可以使用赖默-梯曼反应、达夫反应、伽特曼-柯区反应和伽特曼反应,用适当的原料来制备式 (X) 的醛。

[0164] 接下来,可以在合适的溶剂如二氯甲烷中,用三卤化硼醚合物和三乙胺处理式 (XI) 的二吡咯,形成式 (I) 的次氯酸探针。在一些实施方案中,所述三卤化硼是  $\text{BF}_3$ 、 $\text{BCl}_3$ 、 $\text{BBr}_3$  或其组合。可以通过常规技术如洗涤、过滤、萃取、蒸发、蒸馏、重结晶、色谱法等纯化式

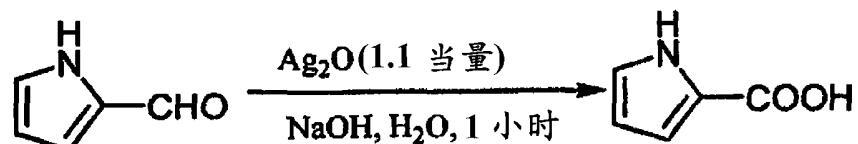


[0175] 下面实施例 1-4 详细描述了制备和使用由通式 (I)、(VI)、(VII) 和 (VIII) 表示的一些次氯酸探针的方法。所述详细内容落入构成本发明部分的上述通用合成方案的范围内并用于例示上述通用合成方案。列出这些实施例仅仅是为了说明,并非用于限制本发明的范围。

[0176] 实施例 1- 化合物 5 的合成方案

[0177] 吡咯-2-羧酸的合成

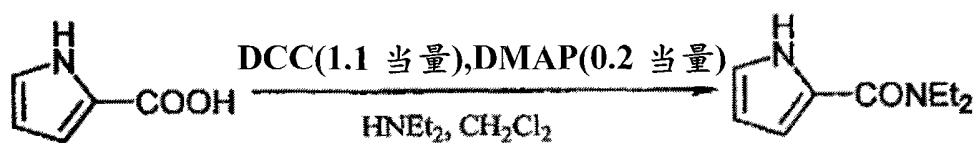
[0178]



[0179] 将吡咯-2-醛 (10.0g, 105mmol) 溶于 50mL 甲醇中,然后用 500mL 蒸馏水稀释。向吡咯-2-醛溶液中添加新鲜的氧化银 (48.3g, 210mmol) 和氢氧化钠 (8.5g, 212mmol)。在室温下将混合物搅拌 1 小时后,滤除沉淀物并用热水洗涤。将合并的滤液和洗液用二乙醚 (500mL) 萃取,然后在 0°C 用 37% 次氯酸酸化。用二乙醚 (200mL×4) 萃取溶液。用硫酸镁干燥合并的有机萃取物。在减压下蒸发溶剂,获得 9.9g 吡咯-2-羧酸 (产率 85%)。

[0180] 化合物 1 的合成

[0181]

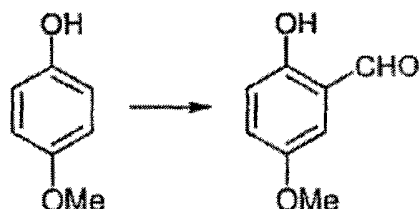


[0182] 化合物 1

[0183] 将吡咯-2-羧酸 (10.0g, 90mmol) 溶于 250mL 二氯甲烷中。随后在 0°C, 在氩气氛下,随后添加 N, N' - 二环己基碳二亚胺 (DCC) (20.4g, 99mmol)、4- 二甲基 - 氨基吡啶 (DMAP) (2.2g, 18mmol) 和二乙胺 (10.2mL, 99mmol)。将反应混合物在 0°C 搅拌 30 分钟,然后在室温下搅拌 8 小时。在用二氯甲烷稀释所述溶液并滤除固体后,用稀次氯酸、然后用饱和碳酸氢钠溶液洗涤滤液。用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥有机层,然后在减压下蒸发溶剂。通过柱色谱法纯化残渣,使用 35% EtOAc 的正己烷溶液作为洗脱液,获得呈白色固体的 10.5g 化合物 1 (产率 70%)。

[0184] 2-羟基-5-甲氧基苯甲醛的合成

[0185]



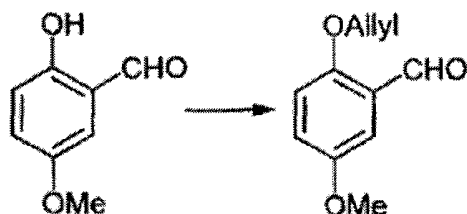
[0186] 向 100mL 的化合物对甲氧基苯酚 (3g, 24.2mmol)、无水氯化镁 (3.48g, 37.0mmol) 和干三乙胺 (12.8mL, 92.1mmol) 在乙腈中的混合物中添加干低聚甲醛 (5g, 167mmol)。将反应混合物回流 8 小时并冷却到室温。然后将反应混合物倒入 5% HCl (300mL) 中并用二乙醚 (200mL) 萃取三次。将合并的有机层用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥,过滤,并蒸发。通过



闪蒸柱色谱法 (20% EtOAc 的正己烷溶液) 纯化残渣, 获得 3.35g 2-羟基-5-甲氧基苯甲醛 (产率 91%)。

[0187] 化合物 2 的合成

[0188]

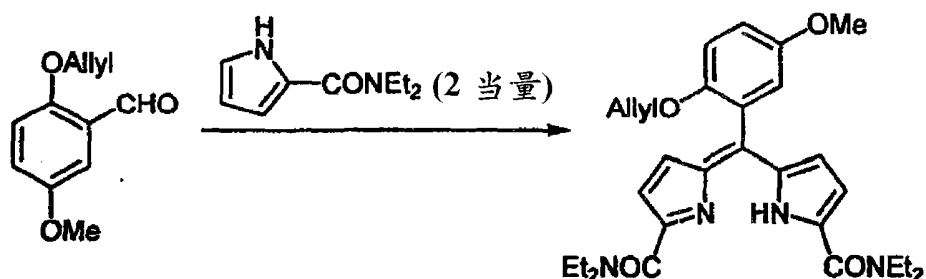


[0189] 化合物 2

[0190] 向 60mL 的 2-羟基-5-甲氧基苯甲醛 (3.3g, 21.7mmol) 在 THF 中的溶液中添加烯丙基溴 (3.2mL, 32.7mmol) 和  $K_2CO_3$  (12g, 86.2mmol)。将反应混合物回流 10 小时。然后用 20mL 水将混合物洗涤两次。将合并的有机萃取物用  $Na_2SO_4$  干燥, 过滤, 并蒸发。通过柱色谱法 (20% EtOAc 的正己烷溶液) 纯化粗化合物, 获得 3.33g 呈无色油状的化合物 2 (产率 80%)。化合物 2 的特征由下列物理性质表征:  $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  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 (100MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  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):  $C_{11}H_{12}O_3$  的计算值: 192.0786, 实测值: 192.0781。

[0191] 化合物 3 的合成

[0192]



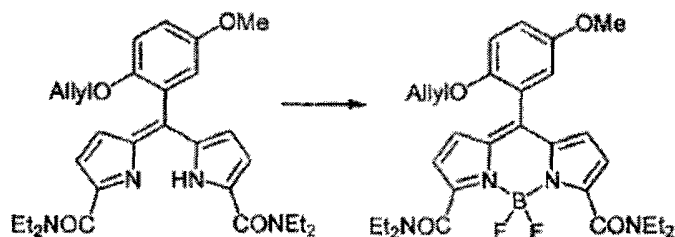
[0193] 化合物 3

[0194] 在氩气氛下, 将化合物 1 (4.2g, 25.4mmol) 和化合物 2 (2.44g, 12.7mmol) 溶于 20mL 无水 1,2-二氯甲烷中。添加一滴三氟乙酸 (TFA), 并将所述溶液在回流下加热。在 TLC 监测 (二氧化硅;  $CH_2Cl_2$ ) 显示化合物 2 完全消耗以后, 添加 40mL DDQ (2,3-二氯-5,6-二氰基-1,4-苯醌) (2.89g, 12.7mmol) 的  $CH_2Cl_2$  溶液, 并继续搅拌 20 分钟。将反应混合物用水稀释, 用  $MgSO_4$  干燥, 过滤, 并蒸发。通过柱色谱法 (40% EtOAc、20%  $CH_2Cl_2$  的正己烷溶液) 纯化粗化合物, 获得呈棕红色油状的化合物 3 (1.51g, 产率 62%)。化合物 3 的特征由下列物理性质表征:  $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  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);  $^{13}C$  NMR (100MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  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(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 2944, 1658, 1635cm<sup>-1</sup>; LRMS(EI)m/z(%) 504(M<sup>+</sup>;19), 447(100); HRMS(EI): C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 的计算值: 504.2737, 实测值: 504.2726。

[0195] 化合物 4 的合成

[0196]

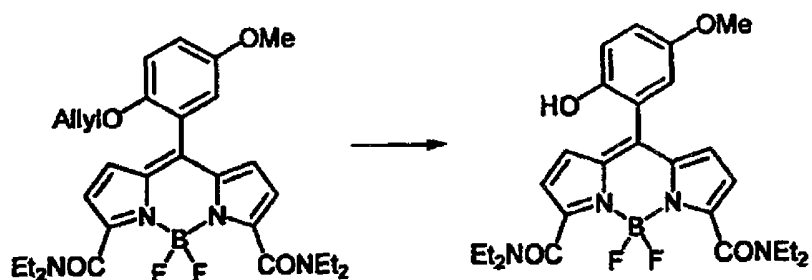


[0197] 化合物 3 化合物 4

[0198] 在氩气氛下, 将化合物 3(2.2g, 4.38mmol) 和三乙胺(12.3mL, 87.5mmol) 溶于 137mL 无水二氯甲烷中, 并将所述溶液在室温下搅拌 10 分钟。添加 BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>(12.3mL, 96.3mmol), 并继续搅拌 4 小时。用水和 2N NaOH 洗涤反应混合物。用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 萃取水溶液。将合并的有机萃取物用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤, 并蒸发。通过柱色谱法(40% EtOAc、20% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 的正己烷溶液) 纯化粗化合物, 获得呈固体的化合物 4(1.47g, 产率 61%)。化合物 4 的特征由下列物理性质表征: m. p. 72.0-73.9°C; <sup>1</sup>H NMR(300MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.01-6.99(m, 2H), 6.87(d, J = 2.5Hz, 1H), 6.84(d, J = 4.2Hz, 2H), 6.44(d, J = 4.2Hz, 2H), 5.84-5.76(m, 1H), 5.16(dd, J = 17.1, 1.5Hz, 1H), 5.11(dd, J = 10.3, 1.4Hz, 1H), 4.45(dd, J = 3.4, 1.5Hz, 2H), 3.79(s, 3H), 3.57(q, J = 7.1Hz, 4H), 3.29(q, J = 7.1Hz, 4H), 1.26(t, J = 7.1Hz, 6H), 1.09(t, J = 7.1Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR(75MHz, CDCl<sub>3</sub>): 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; <sup>19</sup>F NMR(376.5MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -144.1(m, J = 30.1Hz), -145.5(m, J = 30.1Hz); IR(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 2980, 1734, 1640cm<sup>-1</sup>; LRMS(EI)m/z(%) 552(M<sup>+</sup>;16), 495(100); HRMS(EI): C<sub>29</sub>H<sub>35</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 的计算值: 552.2719, 实测值: 552.2715。

[0199] 化合物 5 的合成

[0200]



[0201] 化合物 4 化合物 5

[0202] 向 50mL 的化合物 4(400mg, 0.725mmol) 的乙醇溶液中鼓泡氩气 30 分钟, 以除去任何溶解的氧。然后, 在强氩流下缓慢添加 Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(83.7mg, 0.0725mmol)。将反应混合物回流 6 小时。滤除固体并用 MgSO<sub>4</sub> 干燥滤液。在减压下蒸发溶剂。通过柱色谱法(5% MeOH 的 CHCl<sub>3</sub> 溶液) 纯化残渣, 获得呈固体的化合物 5(258mg, 产率 70%)。化合物 5 的特征以下列物理性质表征: m. p. 89.6-91.2°C; <sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.40(br, 1H),

7.0(d,  $J = 8.9\text{Hz}$ , 1H), 6.90–6.85(m, 3H), 6.72(d,  $J = 3.1\text{Hz}$ , 1H), 6.37(d,  $J = 4.2\text{Hz}$ , 2H), 3.71(s, 3H), 3.54(br, 4H), 3.24(q,  $J = 7.3\text{Hz}$ , 4H), 1.26(t,  $J = 7.1\text{Hz}$ , 6H), 1.06(t,  $J = 7.1\text{Hz}$ , 6H);  $^{13}\text{C}$  NMR(100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  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;  $^{19}\text{F}$ NMR(376.5MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): -143.4(m,  $J = 30.1\text{Hz}$ ), -145.3(m,  $J = 30.1\text{Hz}$ ); IR( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) 3234, 1654, 1573 $\text{cm}^{-1}$ ; LRMS(EI)m/z(%) 512( $\text{M}^+$ ; 18), 277(100); HRMS(EI):  $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{IBF}_2\text{N}_4\text{O}_4$  的计算值: 512.2406, 实测值: 512.2405。

[0203] 实施例 2- 用化合物 5 检测次氯酸

[0204] 化合物 5 的 UV- 可见吸收图谱

[0205] 将实施例 1 获得的化合物 5 溶于二氯甲烷中, 以形成 10mM 溶液。测定 10mM 的化合物 5 溶液的吸收图谱并将其示于图 1。图 1 的数据显示化合物 5 在约 520nm 具有最大吸收。

[0206] 化合物 5 的发射图谱

[0207] 将实施例 1 获得的化合物 5 溶于 DMF 以获得 10mM 的浓度, 然后用 0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) 将所述溶液稀释到 10  $\mu\text{M}$ 。使用 Hitachi F2500 荧光分光计测定 10  $\mu\text{M}$  的化合物 5 溶液的荧光图谱, 光电倍增管电压为 700V。激发和发射两者的狭缝宽度均为 2.5nm。在 520nm 的激发波长下进行测定。结果示于图 2 中, 其显示化合物本身是无荧光的。

[0208] 用化合物 5 检测次氯酸

[0209] 将实施例 1 获得的化合物 5 溶于 DMF 得到 10mM 的浓度, 然后用 0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) 将所述溶液稀释到 10  $\mu\text{M}$ 。NaOCl 来源于商业漂白剂。NaOCl 的浓度通过用硫代硫酸钠溶液滴定来确定, 通过用  $\text{KIO}_3$  滴定来标定硫代硫酸钠溶液。然后添加 NaOCl, 提供 0、3、4、5、6 和 8  $\mu\text{M}$  的最终浓度。在 2 分钟后, 在与上述相同的条件下测定所述溶液的荧光图谱。荧光图谱示于图 3。图 3 清楚地显示, 在添加次氯酸后, 化合物 5 的荧光强度明显上升。另外, 图 4 显示 541nm 处的荧光强度随着次氯酸浓度上升而线性增加。

[0210] 实施例 3- 比较化合物 5 对不同的反应性氧类物质和反应性氮类物质的特异性

[0211] 比较化合物 5 对不同的反应性氧类物质 (ROS) 和反应性氮类物质 (RNS), 包括  $\text{OCl}^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $^1\text{O}_2$ 、NO、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{ONOO}^-$  和烷基过氧根 ( $\text{ROO}^-$ ) 的反应性。将不同的反应性氧类物质和反应性氮类物质单独地添加到 5mL 化合物 5 的相应溶液 (10  $\mu\text{M}$  的 0.1M 磷酸钾缓冲液) 中。测量处理前后荧光强度的变化。结果示于图 5。如下制备图 5 中的样品 (a)–(h):

[0212] a. 添加  $\text{H}_2\text{O}_2$  (终浓度为 100  $\mu\text{M}$ ), 然后在 25 $^\circ\text{C}$  搅拌 1 小时。

[0213] b. 添加 (3-(1,4-二氢-1,4-环二氧-1-萘基)丙酸) (终浓度为 100  $\mu\text{M}$ ), 然后在 25 $^\circ\text{C}$  搅拌 1 小时。

[0214] c. 添加 2,2'-偶氮双(2-脒基丙烷)二盐酸化物 (终浓度为 100  $\mu\text{M}$ ), 然后在 25 $^\circ\text{C}$  搅拌 1 小时。

[0215] d. 添加 SNP (硝基铁氰化钠 (III) 二水合物) (终浓度为 100  $\mu\text{M}$ ), 然后在 25 $^\circ\text{C}$  搅拌 1 小时。

[0216] e. 通过黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶产生  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。首先添加黄嘌呤氧化酶。在黄嘌呤氧化酶溶解后, 添加黄嘌呤 (终浓度为 100  $\mu\text{M}$ ), 并将混合物在 25 $^\circ\text{C}$  搅拌 1 小时。

[0217] f. 在 10 当量  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) 的存在下添加氯化亚铁 (终浓度为 10  $\mu\text{M}$ )。

[0218] g. 在 25°C 添加  $\text{ONOO}^-$  (终浓度为 10  $\mu\text{M}$ )。

[0219] h. 在 25°C 添加  $\text{NaOCl}$  (终浓度为 10  $\mu\text{M}$ )。

[0220] 图 5 显示了在仅与次氯酸盐反应后的荧光增加。这些结果证实,在非生命系统中,在 ROS 和 RNS 中,化合物 5 对次氯酸盐具有更高的反应性。另外,化合物 5 的酚衍生物与生物学系统中存在的其它反应性氧类物质或反应性氮类物质之间没有发生类似的反应。

[0221] 实施例 4- 在不同的 pH 值下用化合物 5 检测次氯酸

[0222] 将实施例 1 获得的化合物 5 溶于 DMF 得到 10mM 的浓度,然后用各种 pH 值 (约 4.0 至约 12.0) 的 0.1M 磷酸钾缓冲液将所述溶液稀释到 10  $\mu\text{M}$ 。 $\text{NaOCl}$  来源商业漂白剂。通过用硫代硫酸钠溶液滴定来确定  $\text{NaOCl}$  的浓度,并通过用  $\text{KIO}_3$  滴定来标定硫代硫酸钠溶液。然后添加  $\text{NaOCl}$ ,以产生 10  $\mu\text{M}$  的最终浓度。在 2 分钟后,在与上述相同的条件下测定所述溶液的荧光图谱。荧光图谱示于图 6。图 6 清楚地显示,与其它 pH 值相比,化合物 5 的荧光强度在约 5 至约 7.5 的 pH 范围内明显更高。考虑到次氯酸的  $\text{pK}_a$  为 7.6,可能化合物 5 通常检测次氯酸而不是次氯酸盐。

[0223] 实施例 5- 在  $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$  系统中用化合物 5 检测次氯酸

[0224] 活有机体内的次氯酸主要在受酶 MPO 催化的反应中由过氧化氢和氯离子合成 (Hidalgo, E.; Bartolome, R.; Dominguez, C, Chem. Biol. Interact. 2002, 139, 265-282),我们将化合物 5 用于  $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$  系统 (图 7)。在添加化合物 5 后,荧光强度剧烈上升,而在对照实验 (缺少  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 中几乎没有检测到荧光。因为化合物 5 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  没有响应,所以观察到的荧光增加可以归因于形成了次氯酸;即本发明公开的次氯酸探针可以检测酶系统中的次氯酸生成。

[0225] 实施例 6- 细胞测定

[0226] 使用鼠 J774.1 巨噬细胞 (ATCC, USA) 研究化合物 5 检测活细胞中的次氯酸的效能。首先,用磷脂多糖 (LPS) (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (50ng/mL) 将鼠 J774.1 细胞刺激 4 小时。在用化合物 5 (20  $\mu\text{M}$ ) 温育 1 小时后,用 PBS 缓冲液将细胞洗涤三次,再用 PMA 刺激 0.5 小时。如图 8A 所示,在用刺激物处理前,没有在细胞中观察到明显的荧光。值得注意的是,在用 LPS/IFN- $\gamma$ 、然后用 PMA 处理后,观察到了荧光细胞 (图 8B)。图 8C 显示,在用 2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧化物 (TEMPO) 处理后,荧光熄灭了。作为自由基本身,TEMPO 能够清除超氧自由基 (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.),所述超氧自由基是次氯酸的前体。这些结果提示,在用刺激物处理后,巨噬细胞事实上产生了  $\text{OCl}^-$ ,并且可以使用化合物 5 使次氯酸的形成可视化。

[0227] 实施例 7- 细胞测定 2

[0228] 鼠巨噬细胞系 RAW264.7 在受刺激后产生 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)。此外,将巨噬细胞暴露于刺激物如 LPS/IFN- $\gamma$  (干扰素- $\gamma$ ) 和豆蔻酸佛波醇乙酸酯 (PMA) 也将激活其它 ROS 和 NOS 的生成。在本实验中,使用 RAW264.7 作为模型,检查化合物 5 是否能够被用于检测  $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$  系统在受刺激后产生的  $\text{OCl}^-$ 。在用刺激物处理前,我们没有在细胞中观察到明显的荧光 (图 9a)。值得注意的是,在用 LPS/IFN- $\gamma$ 、然后用 PMA 处理后,出现了荧光细胞 (图 9b)。图 9c 表明,在用 2,2,

6,6-四甲基哌啶-1-氧化物 (TEMPO), 一种能够清除超氧自由基的自由基处理后, 荧光熄灭了。这些结果证实, 巨噬细胞在受刺激后能够产生  $\text{OCl}^-$  并且可以使用化合物 5 使这个过程可视化。

[0229] 如上面所证实的, 本发明公开的实施方案提供了能够用作检测、测量和 / 或筛选次氯酸的次氯酸探针的各种化合物。尽管已经参考有限数目的实施方案描述了本发明, 但一个实施方案的具体特征不应归属于本发明的其它实施方案。没有一个实施方案代表本发明的所有方面。在一些实施方案中, 所述组合物或方法可以包括本发明没有提到的众多化合物或步骤。在其它实施方案中, 所述组合物或方法不包括, 或者基本上不包括本发明没有列举的任何化合物或步骤。存在来自所述实施方案的变体和修改。例如, 本发明公开的试剂组合物无需只包括本发明所述的次氯酸探针。它可以包括通常适合次氯酸探针的任何类型的化合物。要注意, 参考许多步骤描述了制备和使用本发明公开的次氯酸探针的方法。这些步骤可以按任意顺序进行。可以省略或组合一个或多个步骤但仍获得本质上相同的结果。所附的权利要求书旨在覆盖落入本发明范围内的所有这样的变体和修改。

[0230] 本说明书中提到的所有出版物和专利申请均作为参考并入本发明, 其程度如同具体和单独地指出每个单独的出版物或专利申请被作为参考并入本发明。要理解为了向本领域的其他技术人员说明本发明、其原理及其实际应用, 通过说明和举例方式详细描述了本发明。另外, 本发明上面提供的具体实施方案并非意在是穷尽的或者限制本发明, 根据前面的实施例和详细描述, 许多替换、修改和变体对于本领域技术人员都将是显而易见的。因此, 本发明旨在包括落入权利要求书的主旨和范围内的所有这样的替换、修改和变体。尽管上面的一些实施例和描述包括关于化合物、组合物和方法可能作用的方式的一些结论, 但本发明人并不希望受那些结论和功能的限制, 而是根据当前的理解只将它们作为可能的解释列出。

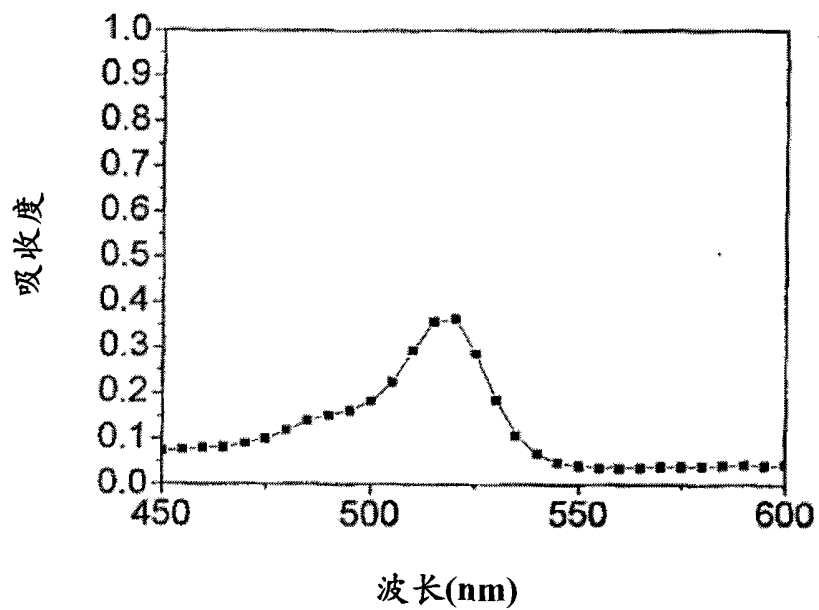


图 1

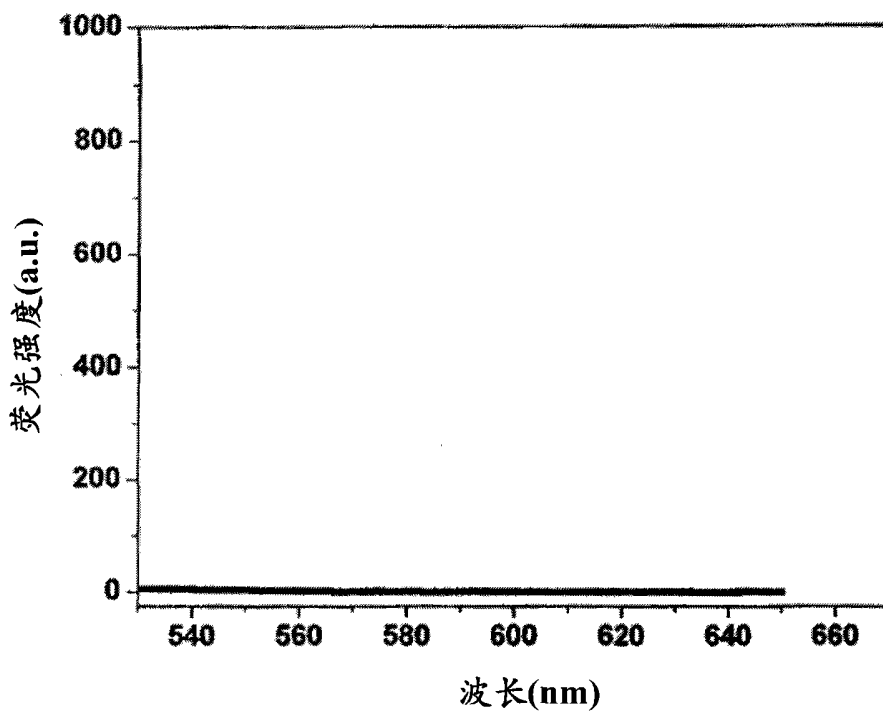


图 2

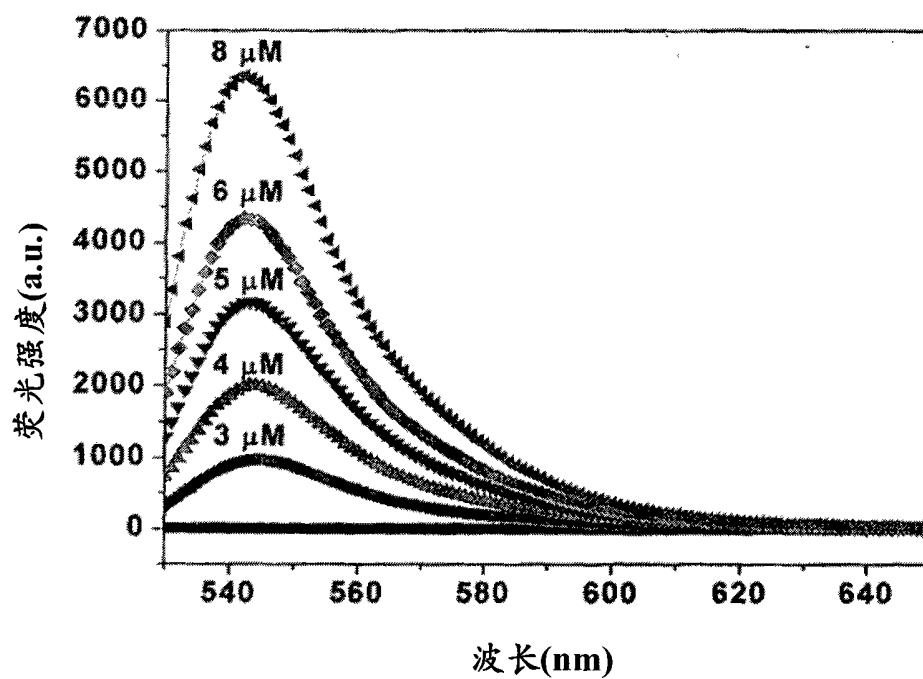


图 3

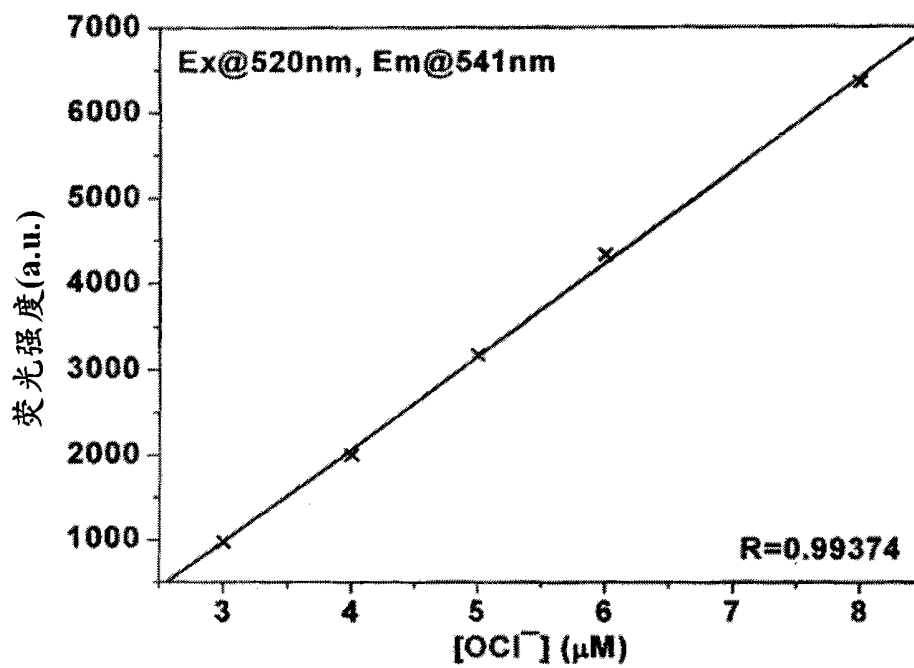


图 4

FIG. 5

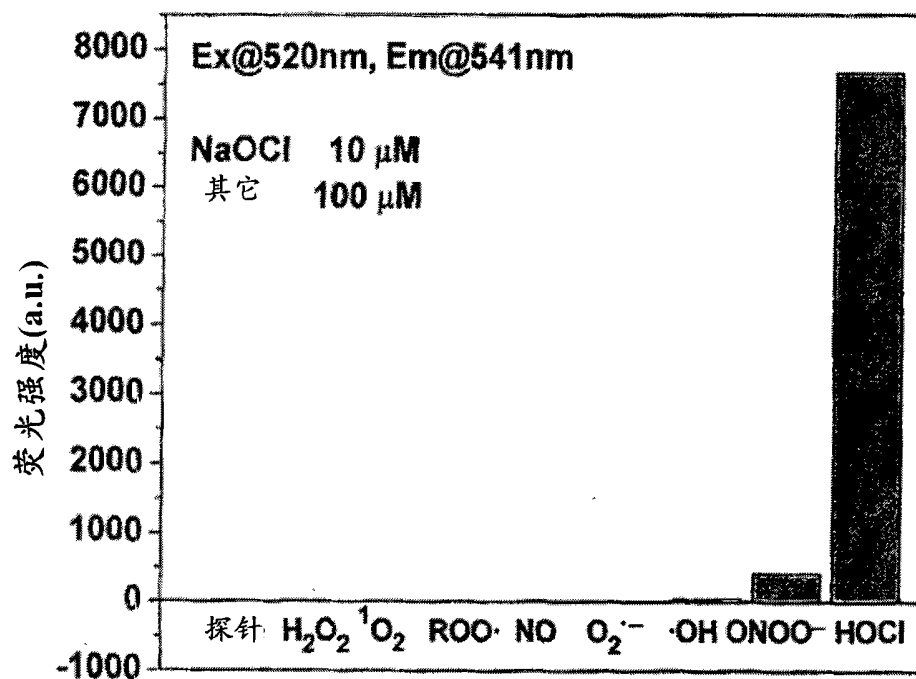


图 5



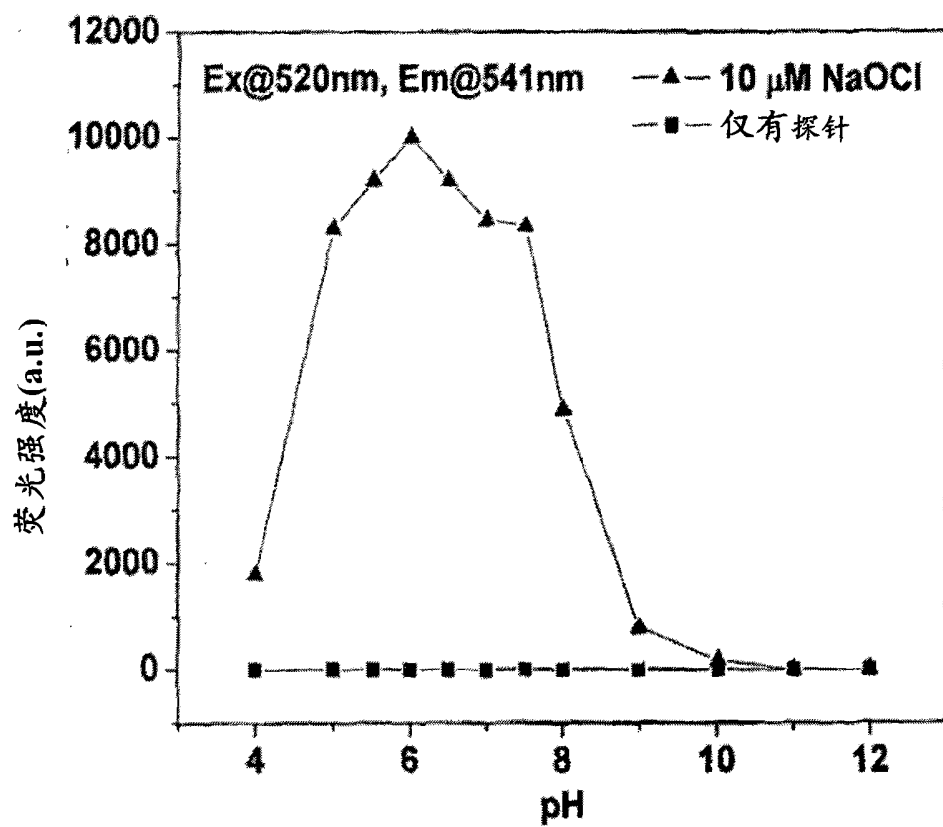


图 6

FIG. 7

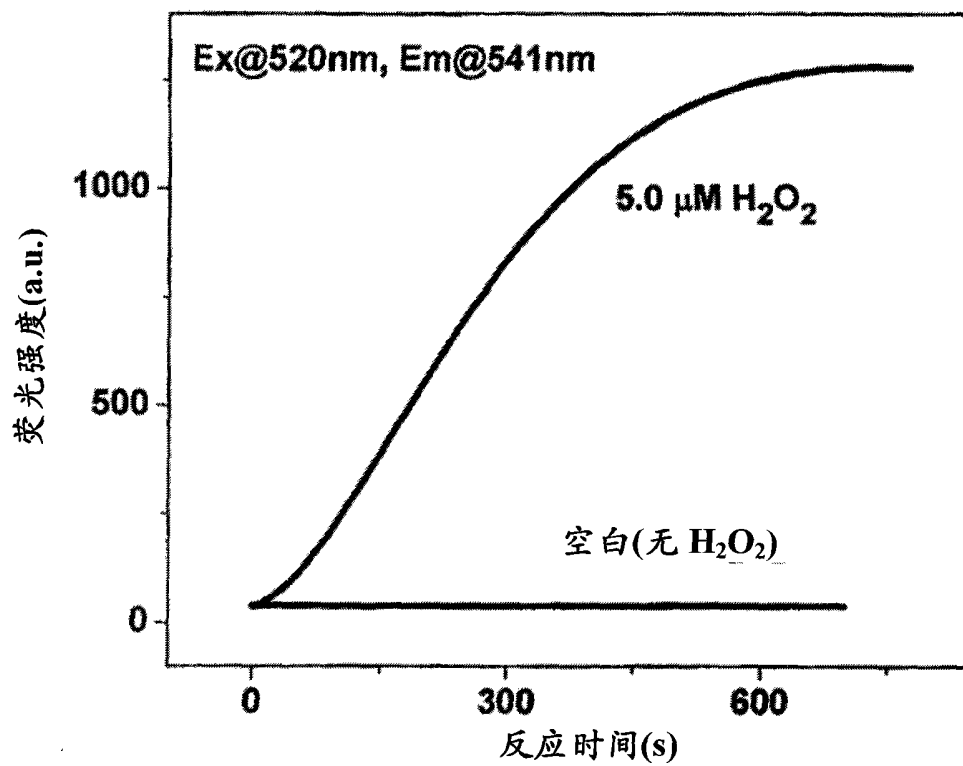


图 7

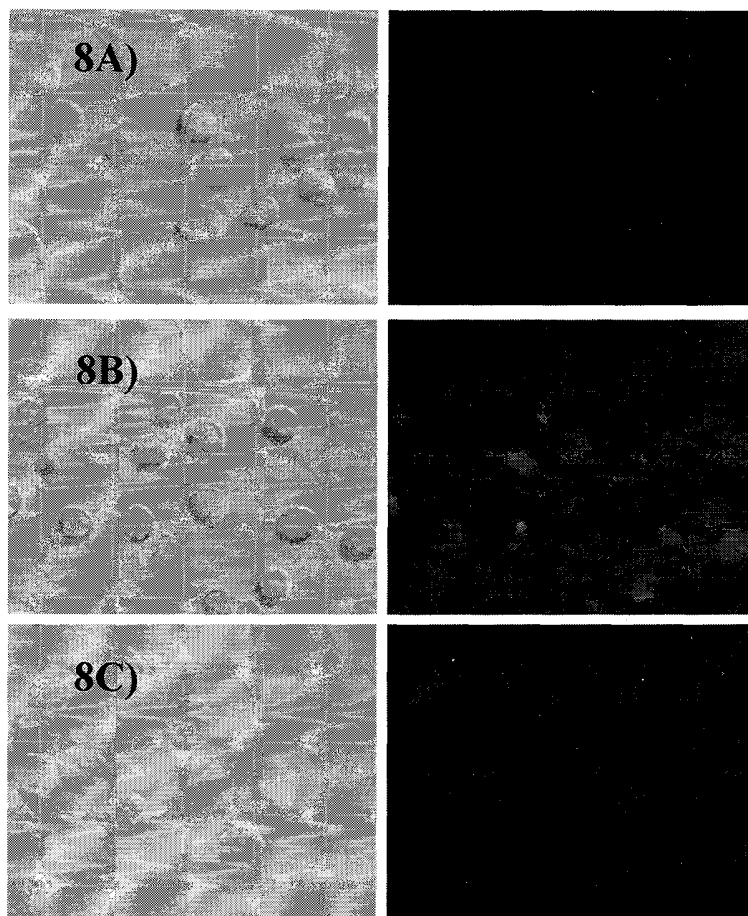


图 8

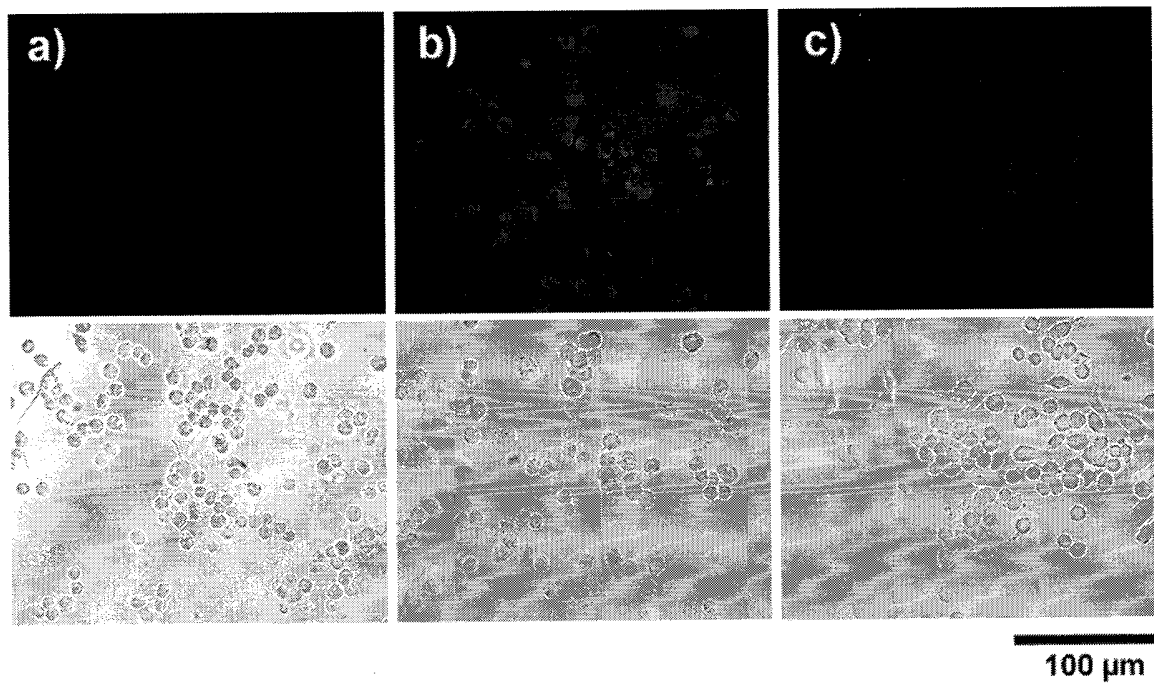


图 9