



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101983202 A

(43) 申请公布日 2011.03.02

(21) 申请号	200980112013.5	(51) Int. Cl.	
(22) 申请日	2009.04.07	<i>C07D 493/10</i>	(2006.01)
(30) 优先权数据		<i>C07D 405/00</i>	(2006.01)
61/042,720	2008.04.05 US	<i>C07D 491/00</i>	(2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日		<i>C07D 405/14</i>	(2006.01)
2010.09.30		<i>C07D 311/82</i>	(2006.01)
(86) PCT申请的申请数据		<i>C07D 311/00</i>	(2006.01)
PCT/CN2009/000376	2009.04.07	<i>G01N 21/64</i>	(2006.01)
(87) PCT申请的公布数据		<i>G01N 21/77</i>	(2006.01)
W02009/121247 EN	2009.10.08	<i>G01N 33/533</i>	(2006.01)
(71) 申请人	港大科桥有限公司		
地址	中国香港数码港道		
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	北京安信方达知识产权代理 有限公司 11262		
代理人	武晶晶 郑霞		

权利要求书 9 页 说明书 59 页 附图 11 页

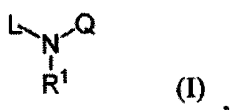
(54) 发明名称

检测活性种类的发光猝灭剂和荧光探针

(57) 摘要

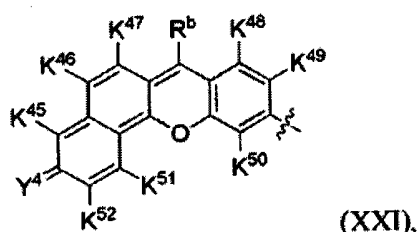
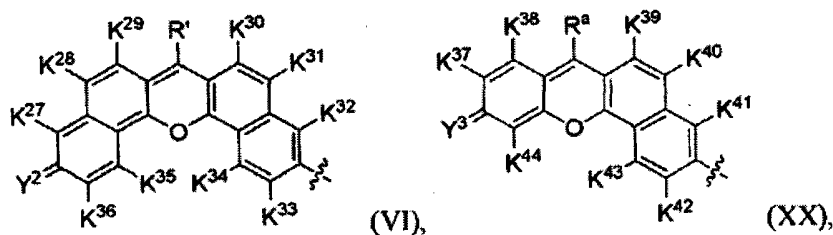
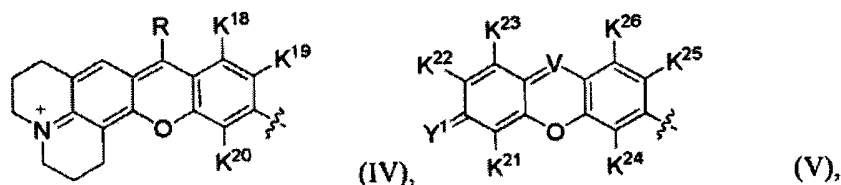
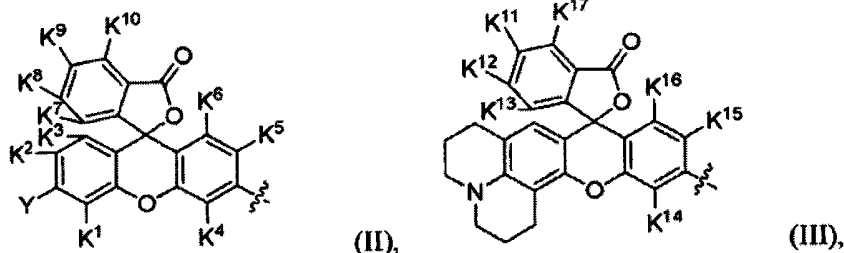
本发明提供了可用作测量、检测和 / 或筛选 ROS 或 RNS 如过氧亚硝酸盐或次氯酸盐的化合物或荧光探针。本发明还提供了可用于直接或间接测量化学样品和生物样品如活生物细胞或组织中过氧亚硝酸盐或次氯酸盐含量的方法。具体地说,所述方法包括以下步骤:使本文所述荧光探针接触样品以形成一种或多种荧光化合物,以及测量荧光化合物的荧光特性。本发明还提供了检测或筛选化学和生物样品中的过氧亚硝酸盐或有可能升高或降低过氧亚硝酸盐或次氯酸盐水平的化合物的高通量荧光筛选方法。

1. 式 (I) 的芳族胺化合物：



其中, R^1 是氢、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、环烯基或环炔基；

L 具有式 (II)-(VI)、(XX)、(XXI) 之一, 或其互变异构体：



其中, Y 是 O-A、S-A 或 NR^2R^3 ；

Y^1 、 Y^2 、 Y^3 和 Y^4 各自独立为 O、S、 NR^2 、 R^3 或 NR^2 、 R^3 ；

V 是 N 或 CR'' ；

R^2 、 R^3 、 R^2 和 R^3 各自独立是 H、烷基、卤代烷基、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、芳基烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基或酰基；

R 、 R' 、 R'' 、 R^a 和 R^b 各自独立是 H、CN、烷基、卤代烷基、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、芳基烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基氨基、烷氧基氨基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基或酰基；

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

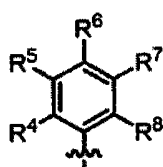
基、芳基、烷芳基、芳基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、酰基或氨基羰基；

K^1-K^{52} 各自独立是 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 $-C(=O)-Z-P^2$ ；

P^1 和 P^2 各自独立为氢、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、芳基烷基、氨基甲酸酯、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、杂烷基或有 3-7 个环原子的杂环基；和

Z 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基；和

Q 是具有式 (VIIa) 的取代或未取代的苯基：



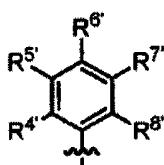
(VIIa)

其中， R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 各自独立是 H、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂环基、羟基、烷氧基、烷氧基烷基、烷氧基烷氧基、酰基、烷基羰基烷基、卤代烷基羰基烷基、氨基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、烷氧基羰基烷基、氨基羰基或 NR^9R^{10} ，或者 R^4 和 R^5 一起、 R^5 和 R^6 一起、 R^6 和 R^7 一起或者 R^7 和 R^8 一起形成与式 (VIIa) 的苯环稠合的 5- 或 6- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环；且

R^9 和 R^{10} 各自独立是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、芳酰基或聚醚；

前提是，当 L 具有式 (II)，其中 Y 是 NR^2R^3 时，则 Q 中的 R^6 是羟基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、烷氧基烷基、烷氧基烷氧基、酰基、烷基羰基烷基、卤代烷基羰基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、烷氧基羰基烷基或氨基羰基，或者 R^4 和 R^5 一起、 R^5 和 R^6 一起、 R^6 和 R^7 一起或者 R^7 和 R^8 一起形成与式 (VIIa) 的苯环稠合的 5- 或 6- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。

2. 如权利要求 1 所述的芳族胺化合物，其中，R、R'、R''、R^a 和 R^b 各自独立具有式 (VII)：



(VII)

其中， $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 各自独立是 H、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂环基、羟基、烷氧基、烷氧基烷基、烷氧基烷氧基、酰基、烷基羰基烷基、卤代烷基羰基烷基、氨基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、烷氧基羰基烷基、氨基羰基或 NR^9R^{10} ，或者 $R^{4'}$ 和 $R^{5'}$ 一起、 $R^{5'}$ 和 $R^{6'}$ 一起、 $R^{6'}$ 和 $R^{7'}$ 一起或者 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 一起形成与式 (VII) 的苯环稠合的 5- 或 6- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。

3. 如权利要求 2 所述的芳族胺化合物，其中， $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 和 $R^{7'}$ 独立是 H；且 $R^{8'}$

是 $-COOH$ 、 $-COR^{17}$ 、 $-COOR^{18}$ 或 $-CONR^{19}R^{20}$ ，其中， R^{17} 、 R^{18} 、 R^{19} 和 R^{20} 独立是 H、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂环基、羟基、烷氧基、烷氧基烷基、烷氧基烷氧基、酰基、烷基羰基烷基、卤代烷基羰基烷基、氨基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、烷氧基羰基烷基或氨基羰基，或者 N、 R^{19} 和 R^{20} 一起形成具有至少一个氮原子的 5- 或 6- 元杂环。

4. 如权利要求 3 所述的芳族胺化合物，其中， $R^{8'}$ 是 $-CONR^{19}R^{20}$ ，且 N、 R^{19} 和 R^{20} 一起形成 5- 或 6- 饱和杂环。

5. 如权利要求 4 所述的芳族胺化合物，其中，所述杂环是取代或未取代的哌啶、吗啉、吡咯烷、噁唑烷、硫代吗啉、噻唑烷或哌嗪。

6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的芳族胺化合物，其中，L 具有式 (II)、(IIa)、(IIb) 或其互变异构体。

7. 如权利要求 6 所述的芳族胺化合物，其中，Y 是 NR^2R^3 、OH 或 $CH_3C(=O)O$ 。

8. 如权利要求 6 或 7 所述的芳族胺化合物，其中， K^1 、 K^3 、 K^4 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自是 H；且 K^2 和 K^5 各自独立是 H 或卤素。

9. 如权利要求 6 或 7 所述的芳族胺化合物，其中， K^1 、 K^2 、 K^3 、 K^4 、 K^5 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自是 H。

10. 如权利要求 1-5 中任一项所述的芳族胺化合物，其中，L 具有式 (III)、(IIIa) 或其互变异构体。

11. 如权利要求 10 所述的芳族胺化合物，其中， K^{11} 、 K^{12} 、 K^{13} 、 K^{14} 、 K^{16} 和 K^{17} 各自是 H；且 K^{15} 是 H 或卤素。

12. 如权利要求 1-5 中任一项所述的芳族胺化合物，其中，L 具有式 (IV)、(IVa) 或其互变异构体。

13. 如权利要求 12 所述的芳族胺化合物，其中， K^{18} 和 K^{20} 各自是 H；且 K^{19} 是 H 或卤素。

14. 如权利要求 1-5 中任一项所述的芳族胺化合物，其中，L 具有式 (V)、(Va)、(Vb)、(Vc)、(Vd) 或其互变异构体。

15. 如权利要求 14 所述的芳族胺化合物，其中， Y^3 是 N 或 CR'' 。

16. 如权利要求 15 所述的芳族胺化合物，其中， Y^1 是 $N^+R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 或 O。

17. 如权利要求 14-16 中任一项所述的芳族胺化合物，其中， K^{21} 、 K^{22} 、 K^{23} 、 K^{24} 、 K^{25} 和 K^{26} 各自是 H。

18. 如权利要求 1-5 中任一项所述的芳族胺化合物，其中，L 具有式 (VI)、(VIa)、(VIb) 或其互变异构体。

19. 如权利要求 18 所述的芳族胺化合物，其中， Y^2 是 $N^+R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 或 O。

20. 如权利要求 18 或 19 所述的芳族胺化合物，其中， K^{27} - K^{36} 各自是 H。

21. 如权利要求 1-5 中任一项所述的芳族胺化合物，其中，L 具有式 (XX)、(XXa)、(XXb) 或其互变异构体。

22. 如权利要求 21 所述的芳族胺化合物，其中， Y^3 是 $N^+R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 或 O。

23. 如权利要求 21 或 22 所述的芳族胺化合物，其中， K^{38} - K^{44} 各自是 H；且 K^{37} 是 Cl。

24. 如权利要求 1-5 中任一项所述的芳族胺化合物，其中，L 具有式 (XXI)、(XXIa)、(XXIb) 或其互变异构体。

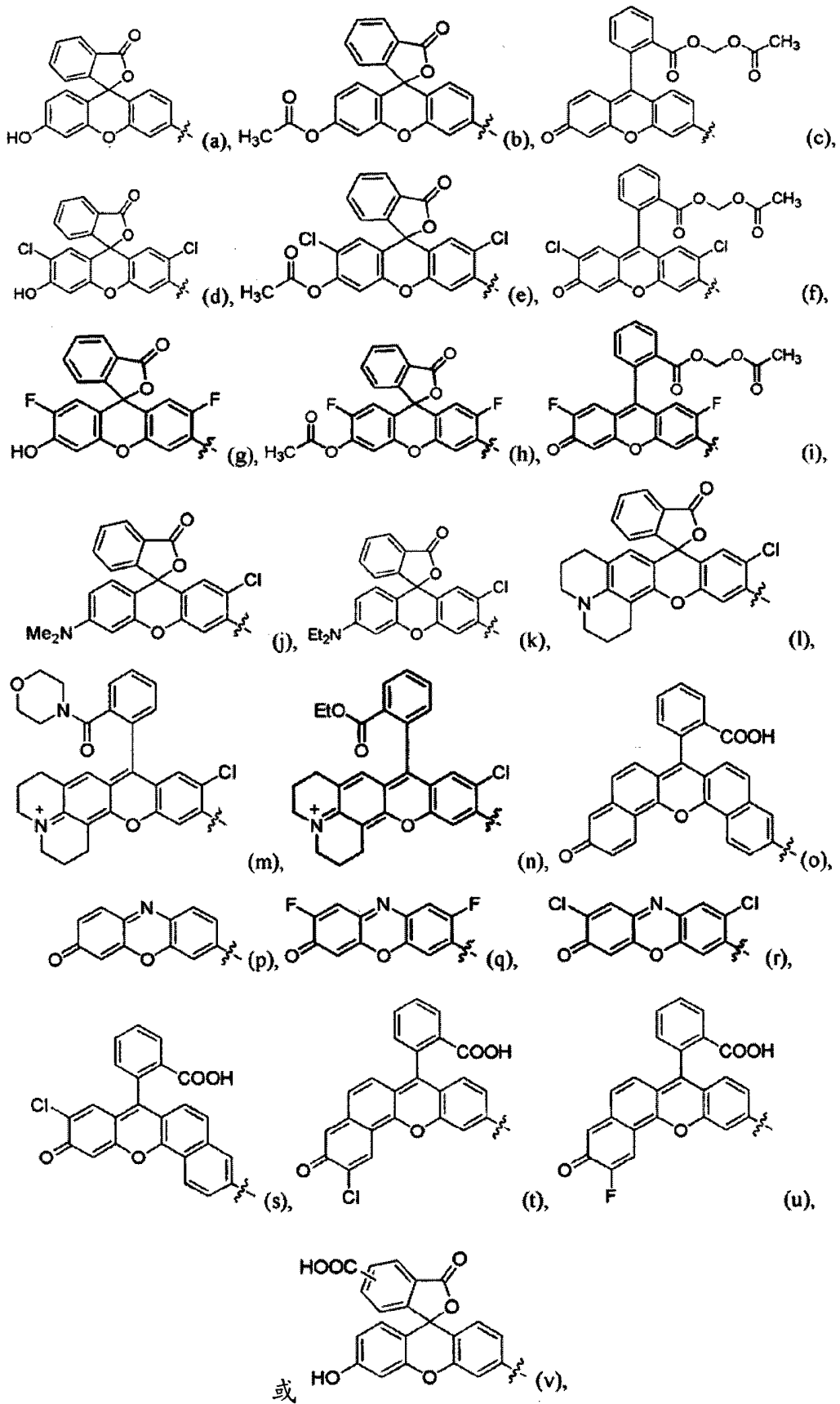
25. 如权利要求 24 所述的芳族胺化合物, 其中, Y^4 是 $N^+R^{2'}$, $R^{3'}$ 或 O 。

26. 如权利要求 1-25 中任一项所述的芳族胺化合物, 其中, $R^{6'}$ 是 $-OCH_2OCH_3$ 、 OH 、 NR^9R^{10} 、 $-CH_2CH_2C(=O)CF_3$ 或 $-CH_2CH_2C(=O)OCH_3$, 其中 R^9 和 R^{10} 各自独立是 H 或烷基; 且 R^4 、 R^5 、 R^7 和 R^8 各自是 H 。

27. 如权利要求 26 所述的芳族胺化合物, 其中, R^6 是 OH 、 NH_2 或 $-CH_2CH_2C(=O)CF_3$ 。

28. 如权利要求 1 所述的芳族胺化合物, 其中, R^1 是 H 、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、环烯基或环炔基; R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 各自独立是 H 、卤素、烷基、烷氧基或聚醚; R^6 是 OR^{11} 或 $CH_2CH_2COR^{12}$, 其中 R^{11} 是 H 、烷基、烷氧基烷基、烷酰基或聚醚; R^{12} 是选自 CF_3 、卤素取代的低级烷基或 $(C=O)-O-W$ 的吸电子基; W 是选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基或芳基烷基的基团。

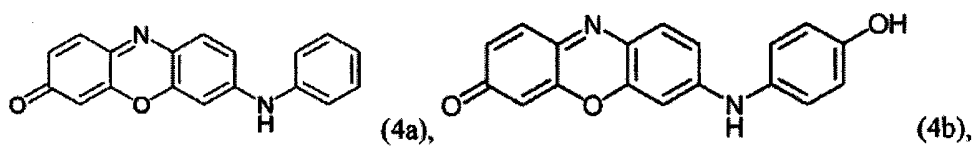
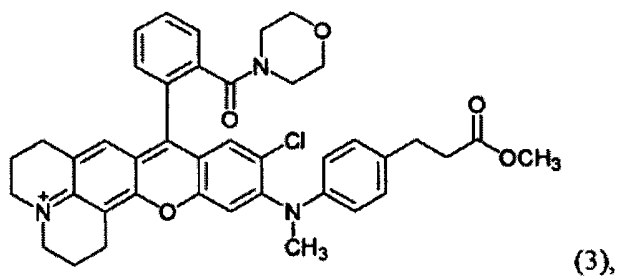
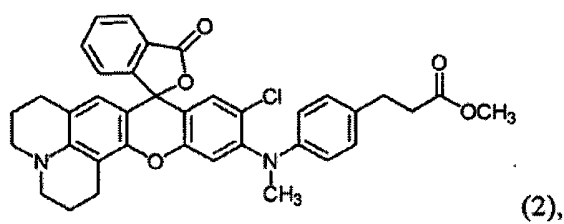
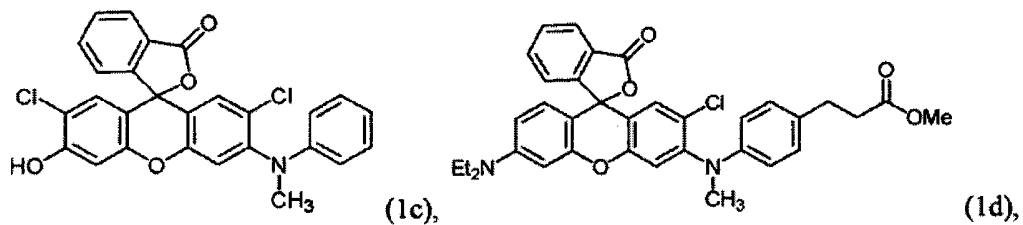
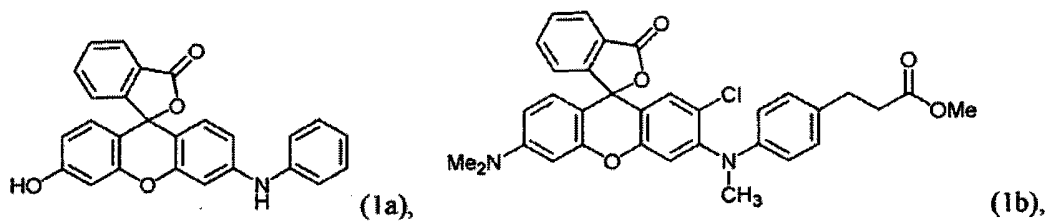
29. 如权利要求 1 所述的芳族胺化合物, 其中, L 具有式 (a)-(v) 之一, 或其互变异构体:

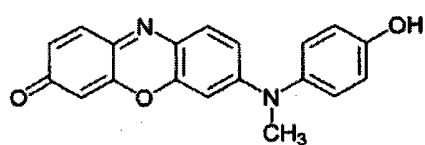


其中,式(a)-(v)各自独立是未取代的或取代的。

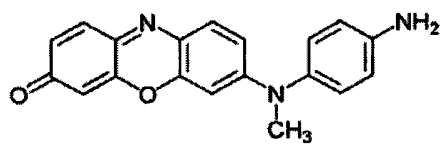
30. 如权利要求1所述的芳族胺化合物,其中,所述芳族胺化合物是化合物1a-1d、2、3、

4a-4e、5a-5d、10、12、12a、14、22 和 30 之一，或其互变异构体：

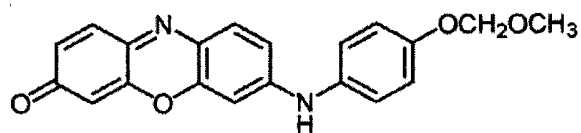




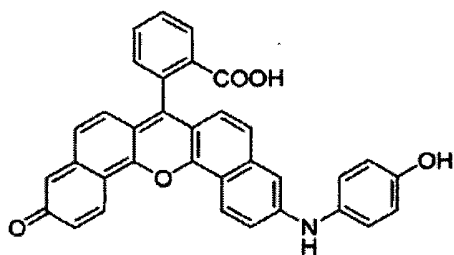
(4c),



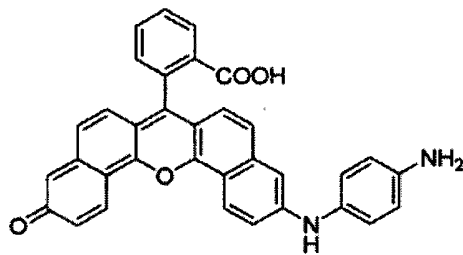
(4d),



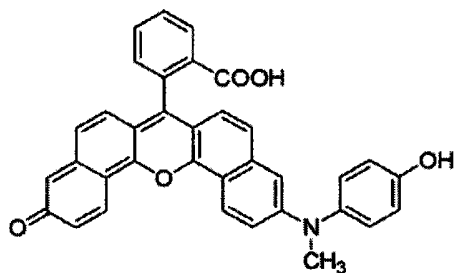
(4e),



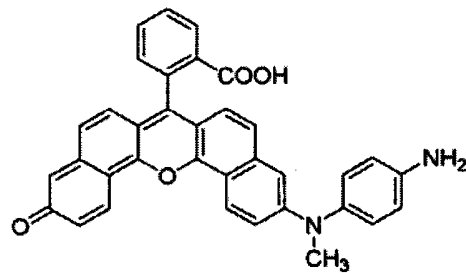
(5a),



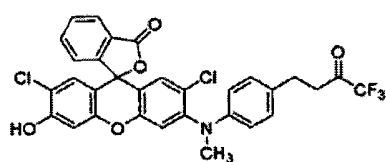
(5b),



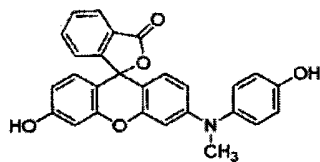
(5c),



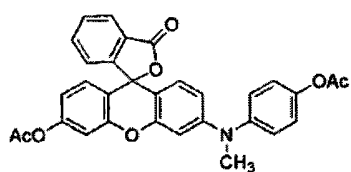
(5d),



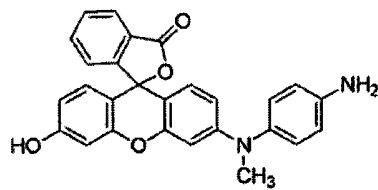
(10),



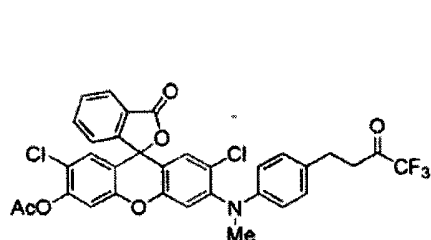
(12),



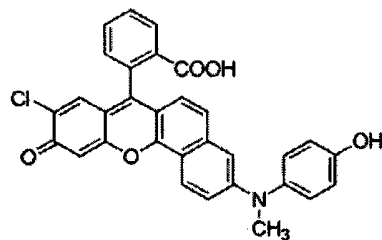
(12a),



(14),



(22),



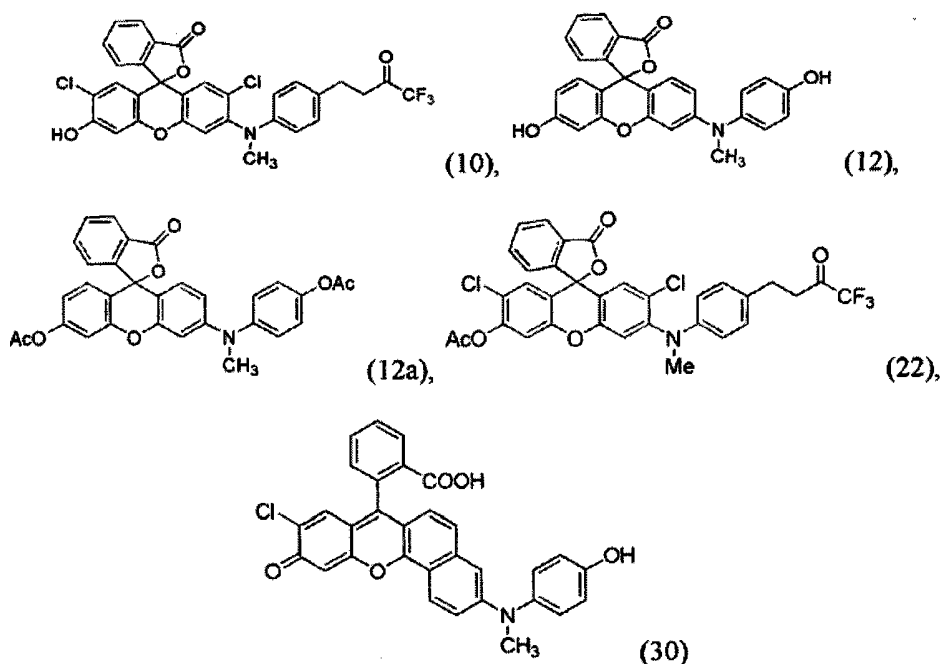
(30),

其中,化合物 1a-1d、2、3、4a-4e、5a-5d、10、12、12a、14、22 和 30 各自独立是取代的或未取代的。

31. 一种用于测量、检测或筛选过氧亚硝酸盐的荧光探针组合物,其包含如权利要求

1-30 中任一项所述芳族胺化合物。

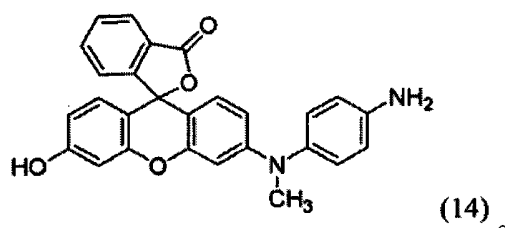
32. 如权利要求 31 所述的荧光探针组合物,其中,所述芳族胺化合物是化合物 (10)、化合物 (12)、化合物 (12a)、化合物 (22),其互变异构体或其组合:



33. 如权利要求 31 或 32 所述的荧光探针组合物,其中,所述荧光探针组合物还包含溶剂、酸、碱、缓冲液或其组合。

34. 一种用于测量、检测或筛选次氯酸盐的荧光探针组合物,其包含如权利要求 1-30 中任一项所述芳族胺化合物。

35. 如权利要求 34 所述的荧光探针组合物,其中,所述芳族胺化合物是化合物 (14),或其互变异构体:



36. 如权利要求 34 或 35 所述的荧光探针组合物,其中,所述荧光探针组合物还包含溶剂、酸、碱、缓冲液或其组合。

37. 一种测量样品中的过氧亚硝酸盐或次氯酸盐的方法,其中,所述方法包括以下步骤:

- 使权利要求 1-30 中任一项所述芳族胺化合物接触样品以形成荧光化合物;和
- 测量所述荧光化合物的荧光特性。

38. 如权利要求 37 所述的方法,其中,所述样品是化学样品或生物样品。

39. 如权利要求 38 所述的方法,其中,所述样品是包括微生物或者动物细胞或组织在

内的生物样品。

40. 一种检测样品中的过氧亚硝酸盐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以下步骤:

a) 使权利要求 1-30 中任一项所述芳族胺化合物接触样品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特性以确定样品中的过氧亚硝酸盐或次氯酸盐的量。

41. 一种筛选一种或多种能升高或降低过氧亚硝酸盐或次氯酸盐水平的目标化合物的高通量方法,其中,所述高通量方法包括以下步骤:

a) 使权利要求 1-30 中任一项所述芳族胺化合物接触目标化合物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特性以定性或定量地确定所述目标化合物。

检测活性种类的发光猝灭剂和荧光探针

[0001] 相关在先申请

[0002] 本申请要求 2008 年 4 月 5 日提交的美国临时专利申请序列号 61/042,720 的优先权。出于美国专利实践的目的,所述临时申请通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本发明提供了可用作发光猝灭剂和 / 或荧光探针以测量、检测或筛选活性氮 (RNS) 如过氧亚硝酸盐或者活性氧 (ROS) 如次氯酸盐的芳族胺化合物。本发明还提供了制造所述芳族胺化合物的方法以及使用该芳族胺化合物的方法。

背景技术

[0004] 发光通常是光的发射,其从发射体的温度不会衍生出能量。发光的原因可能是化学变化、生化变化或结晶变化,亚原子粒子的运动,或者原子或分子系统的辐射诱导的激发。发光猝灭指的是任何可降低给定发光体发光强度的过程。各种过程可导致发光猝灭,如激发态反应、能量转移、复合物形成以及碰撞猝灭。

[0005] 已经充分研究了能量转移造成的发光猝灭过程,尤其是荧光猝灭过程。当第一荧光团被激发并将其吸收能转移到第二荧光团时,能量转移导致具有第二荧光团发射波长的荧光信号。然而,当第二荧光团不发生荧光时,则吸收能不导致荧光发射,且第一荧光团就称为被“猝灭”。类似地,能量转移也可用来猝灭其他发光供体如发磷光供体和化学发光供体的发射。

[0006] 使用各种含有至少一种发光体的染料来猝灭发光如荧光是本领域已知的。应用发光猝灭来分析生物系统也被充分研究过。然而,仍旧需要具有不同吸收特性的发光猝灭剂以满足该领域的各种新要求。

[0007] 科学家通常将活性氧 (ROS) 和活性氮 (RNS) 作为具有高反应性的非常小的无机或有机分子。有各种形式的 ROS 和 RNS,包括自由基,如超氧化物自由基、羟基自由基、一氧化氮、二氧化氮和有机过氧化氢自由基,以及非自由基种类,如过氧化氢、单态氧、臭氧、亚硝酸、过氧亚硝酸盐和次氯酸盐。ROS 和 RNS 是细胞呼吸的副产物。在正常条件下,ROS 和 RNS 以非常低的水平存在,并在细胞信号传导中发挥重要作用,而在氧化应激期间,ROS 和 RNS 水平急剧升高,这可能对各种生物分子如蛋白质、脂质和 DNA 造成严重损害。已知在许多人类疾病如心血管疾病、炎症疾病、代谢疾病、癌症和中枢神经系统疾病中会过量产生 ROS 和 RNS。因此,迫切需要能够灵敏且选择性地测量、检测或筛选某些 ROS 和 RNS 的化学物质,以阐释其在体外和体内的生理作用。

[0008] 在各种形式的 ROS 和 RNS 中,过氧亚硝酸盐和次氯酸盐的氧化能力最强,同时,它们的选择性检测对于清楚地解释它们在活生物中的关键作用非常理想。过氧亚硝酸盐 (ONOO⁻) 是一种短期存在的氧化物种类,是由一氧化氮 (NO) 和超氧化物 (O₂^{•-}) 以 1 : 1 的化学剂量发生扩散控制反应 ($k = 0.4-1.9 \times 10^{10} \text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$) 在体内形成的。过氧亚硝酸盐的氧化反应性高度依赖于 pH,且过氧亚硝酸盐阴离子及其质子化形式过氧亚硝酸都直接参与生物

分子的单电子或双电子氧化反应。ONOO⁻ 的病理活性也和它与生物学上遍在的 CO₂ 的反应有关,从而以约 35% 的产率产生高反应性基团 CO₃⁻ 和 NO₂⁻。其结果是,过氧亚硝酸盐可将酪氨酸硝化并将生物分子中的蛋白质、脂质和铁硫簇氧化。与活生物中的其他氧化剂类似,过氧亚硝酸盐及其质子化形式与有益和有害效应都有关。然而,一些研究显示,过氧亚硝酸盐导致众多人类疾病,如缺血再灌注损伤、风湿性关节炎、感染性休克、多发性硬化、动脉粥样硬化、中风、炎性肠病、癌症和各种神经变性疾病中的组织损伤 (MacMillan-Crow, L. A. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 11853-11858 ; Rodenas, J. 等, Free Radical. Biol. & Med. 2000, 28, 374 ; Cuzzocrea, S. 等, Pharmacol Rev 2001, 53, 135-159 ; Szabo, C. Toxicol. Lett. 2003, 140, 105-112 ; White, C. R. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91, 1044-1048 ; Lipton, S. A. 等, Nature 1993, 364, 626-632 ; Pappolla, M. A. 等, J. Neural Transm. 2000, 107, 203-231 ; Beal, M. F., Free Radical Bio. & Med. 2002, 32, 797-803)。

[0009] 另一方面,次氯酸盐是在髓过氧化物酶 (MPO, 可由活化的吞噬细胞在炎症区域中分泌) 催化的体内化学反应中由过氧化氢和氯离子产生的。作为亲核非自由基氧化剂,次氯酸盐可用作杀微生物剂 (Thomas, E. L., Infect. Immun., 1979, 23, 522-531)。此外,由于缺乏催化解毒所需的酶,细菌细胞或正常的健康细胞都不能中和其毒性作用 (Lapenna, D 和 Cuccurullo, F., Gen. Pharmacol., 1996, 27, 1145-1147)。

[0010] 通常,次氯酸盐可与一些在杀死细菌细胞和 / 或人类疾病中扮演重要作用的蛋白质发生反应 (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 Stocker, R., Biochem. J., 1994, 302, 297-304)。当与蛋白质接触时,次氯酸盐可对蛋白质造成损害。例如,次氯酸盐可能会改变蛋白质结构,和 / 或造成蛋白质片段化和二聚化。作为强氧化剂,次氯酸盐也可以迅速氧化低密度脂蛋白 (LDL)。此外,次氯酸盐与 DNA 反应也可使 DNA 发生化学修饰和结构改变 (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)。

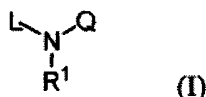
[0011] 由于 ROS 和 RNS 的上述用途和作用,需要有检测、测量和 / 或筛选 ROS 如次氯酸盐和 / 或 RNS 如过氧亚硝酸盐的方法,包括体内检测和测量。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供了可用作发光猝灭剂和 / 或荧光探针以测量、检测或筛选活性氮 (RNS) 或活性氧 (ROS), 如 ¹O₂、O₂⁻、NO、H₂O₂、•OH、⁻OCl、ONOO⁻ 和烷基过氧化氢自由基 (ROO[•]) 的芳族胺化合物。

[0014] 一方面,所述芳族胺化合物可用式 (I) 表示:

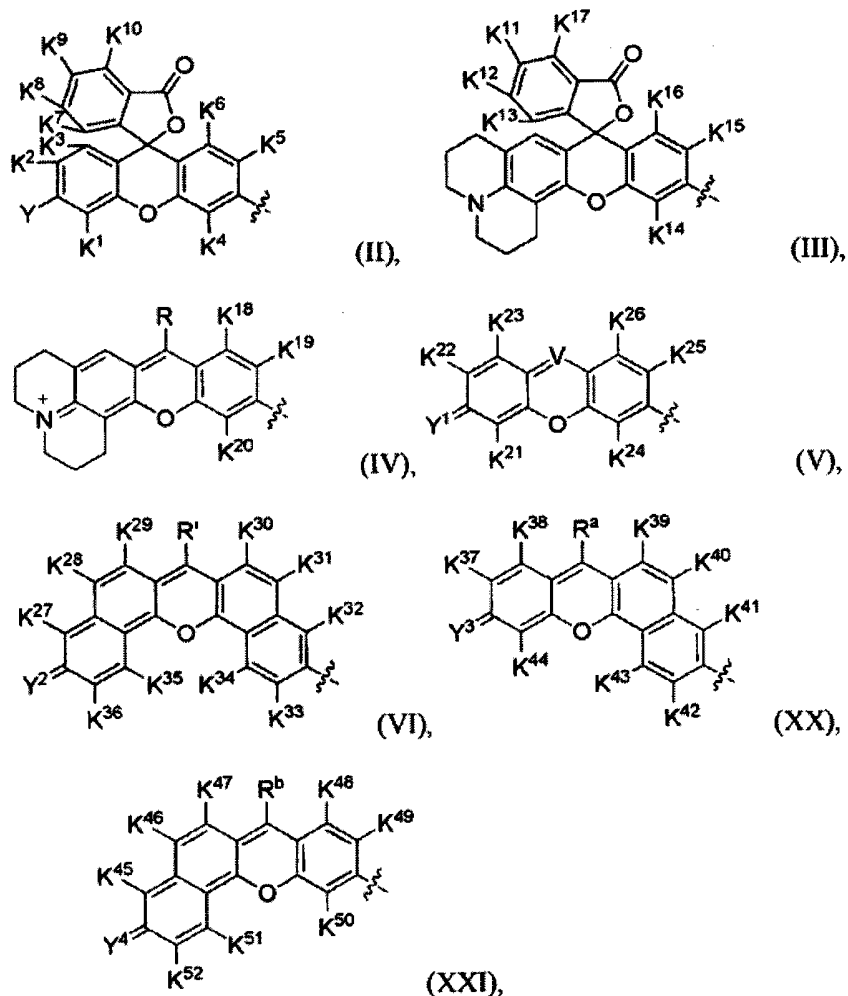
[0015]



[0016] 其中, R¹ 是氢、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、环烯基或环炔基;

[0017] L 具有式 (II)-(VI)、(XX)、(XXI) 之一,或其互变异构体:

[0018]



[0019] 其中, Y 是 O-A、S-A 或 NR^2R^3 ;

[0020] Y^1 、 Y^2 、 Y^3 和 Y^4 各自独立为 O、S、 NR^2 、 R^3 或 N^+R^2 、 R^3 ;

[0021] V 是 N 或 CR'' ;

[0022] R^2 、 R^3 、 R^2' 和 R^3' 各自独立是 H、烷基、卤代烷基、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、芳基烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基或酰基;

[0023] R、 R' 、 R'' 、 R^a 和 R^b 各自独立是 H、CN、烷基、卤代烷基、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、芳基烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基氨基、烷氧基氨基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基或酰基;

[0024] 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、芳基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、酰基或氨基羰基;

[0025] K^1 - K^{52} 各自独立是 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、磷酰基、磺酸酯、磷酸酯、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{P}^1$ 或 $-\text{C}(=\text{O})-\text{Z}-\text{P}^2$;

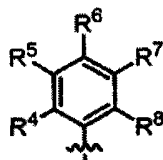
[0026] P^1 和 P^2 各自独立为氢、卤素、烷氧基、羟基、硫代、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯

基、环炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、氨基甲酸酯、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、杂烷基或有 3-7 个环原子的杂环基；和

[0027] Z 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基；和

[0028] Q 是具有式 (VIIa) 的取代或未取代的苯基：

[0029]



(VIIa)

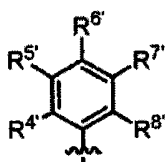
[0030] 其中, R⁴、R⁵、R⁶、R⁷ 和 R⁸ 各自独立是 H、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂环基、羟基、烷氧基、烷氧基烷基、烷氧基烷氧基、酰基、烷基羰基烷基、卤代烷基羰基烷基如三氟甲基羰基烷基、氨基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、烷氧基羰基烷基、氨基羰基或 NR⁹R¹⁰, 或者 R⁴ 和 R⁵ 一起、R⁵ 和 R⁶ 一起、R⁶ 和 R⁷ 一起或者 R⁷ 和 R⁸ 一起形成与式 (VIIa) 的苯环稠合的 5- 或 6- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环；且

[0031] R⁹ 和 R¹⁰ 各自独立是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、芳酰基或聚醚；

[0032] 前提是, 当 L 具有式 (II), 其中 Y 是 NR²R³ 时, 则 Q 中的 R⁶ 是羟基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、烷氧基烷基、烷氧基烷氧基、酰基、烷基羰基烷基、卤代烷基羰基烷基如三氟甲基羰基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、烷氧基羰基烷基、氨基羰基或 NR⁹R¹⁰, 或者 R⁴ 和 R⁵ 一起、R⁵ 和 R⁶ 一起、R⁶ 和 R⁷ 一起或者 R⁷ 和 R⁸ 一起形成与式 (VIIa) 的苯环稠合的 5- 或 6- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。

[0033] 在一些实施方式中, R、R'、R''、R^a 和 R^b 各自独立具有式 (VII)：

[0034]



(VII)

[0035] 其中, R^{4'}、R^{5'}、R^{6'}、R^{7'} 和 R^{8'} 各自独立是 H、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂环基、羟基、烷氧基、烷氧基烷基、烷氧基烷氧基、酰基、烷基羰基烷基、卤代烷基羰基烷基、氨基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、烷氧基羰基烷基、氨基羰基或 NR⁹R¹⁰, 或者 R^{4'} 和 R^{5'} 一起、R^{5'} 和 R^{6'} 一起、R^{6'} 和 R^{7'} 一起或者 R^{7'} 和 R^{8'} 一起形成与式 (VII) 的苯环稠合的 5- 或 6- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。

[0036] 在某些实施方式中, 式 (VII) 的 R^{4'}、R^{5'}、R^{6'} 和 R^{7'} 独立是 H；且 R^{8'} 是 -COOH、-COR¹⁷、-COOR¹⁸ 或 -CONR¹⁹R²⁰, 其中, R¹⁷、R¹⁸、R¹⁹ 和 R²⁰ 独立是 H、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂环基、羟基、烷氧基、烷氧基烷基、烷氧基烷氧基、酰基、烷基羰基烷基、卤代烷基羰基烷基、氨基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、烷氧基羰基烷基或氨基羰基, 或者 N、R¹⁹ 和 R²⁰ 一起形成具有至少一个氮原子的 5- 或 6- 元杂环。在其他实施方式中, R^{8'} 是 -CONR¹⁹R²⁰, 且 N、R¹⁹ 和 R²⁰ 一起形成 5- 或 6- 饱和杂环。在进一步的实施方式中, 所述杂环是取代或未取代的吡啶、吗啉、吡咯烷、噁唑烷、硫代

吗啉、噻唑烷或哌嗪。

[0037] 在一些实施方式中,式(VII)的 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 和 $R^{7'}$ 各自独立是H;且 $R^{8'}$ 是甲基、甲氧基等,以使苯环位于氧杂蒽环平面之外。

[0038] 在一些实施方式中,L具有式(II)或其互变异构体。在其他实施方式中,式(II)的Y是 NR^2R^3 。在其他实施方式中,式(II)的Y是OH、OAc或 OCH_2OCOCH_3 。在进一步的实施方式中, K^1 、 K^3 、 K^4 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自是H;且 K^2 和 K^5 各自独立是H或卤素。再在进一步的实施方式中, 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。

[0039] 在某些实施方式中,L具有式(III)或其互变异构体。在其他实施方式中, K^{11} 、 K^{12} 、 K^{13} 、 K^{14} 、 K^{16} 和 K^{17} 各自是H;且 K^{15} 是H或卤素。

[0040] 在一些实施方式中,L具有式(IV)或(IVa)。在其他实施方式中, K^{18} 和 K^{20} 各自是H;且 K^{19} 是H或卤素。

[0041] 在某些实施方式中,L具有式(V)。在其他实施方式中,V是N。在其他实施方式中,V是 CR'' 。在进一步的实施方式中, Y^1 是 $N^+R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 。再在进一步的实施方式中, Y^1 是O。再在进一步的实施方式中, K^{21} 、 K^{22} 、 K^{23} 、 K^{24} 、 K^{25} 和 K^{26} 各自是H。

[0042] 在一些实施方式中,L具有式(VI)。在其他实施方式中, Y^2 是 $N^+R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 。在进一步的实施方式中, Y^2 是O。再在进一步的实施方式中, K^{27} - K^{36} 各自是H。

[0043] 在一些实施方式中,L具有式(XX)。在其他实施方式中, Y^3 是 $N^+R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 。在进一步的实施方式中, Y^3 是O。再在进一步的实施方式中, K^{37} - K^{44} 各自是H。再在进一步的实施方式中, K^{38} - K^{44} 各自是H;且 K^{37} 是Cl或F。

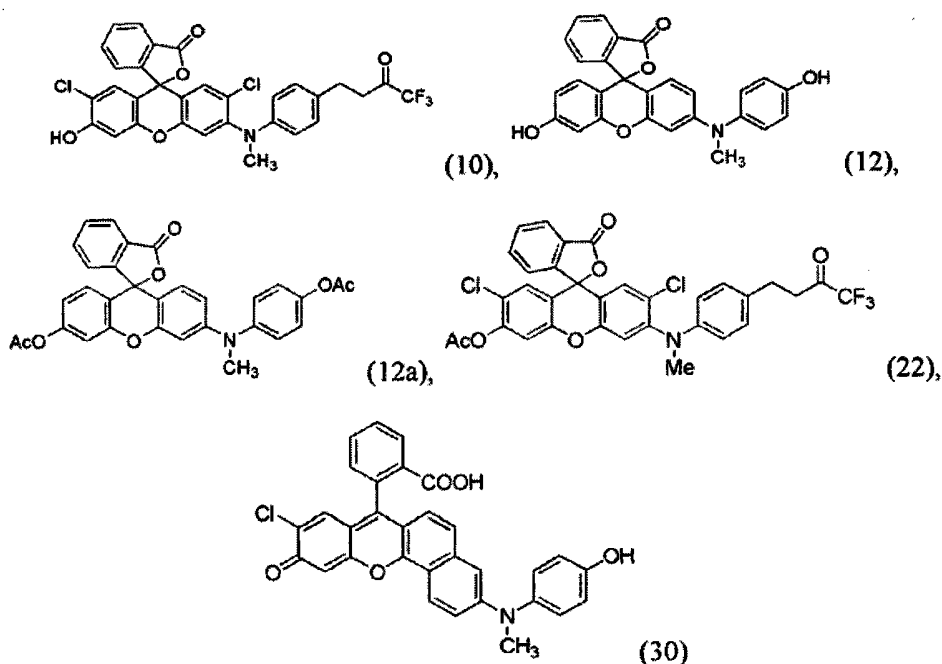
[0044] 在一些实施方式中,L具有式(XXI)。在其他实施方式中, Y^4 是 $N^+R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 。在进一步的实施方式中, Y^4 是O。再在进一步的实施方式中, K^{46} - K^{51} 各自是H,且 K^{45} 和 K^{52} 中至少有一个独立为Cl或F。

[0045] 在某些实施方式中,式(VIIa)的 R^6 是 $-OCH_2OCH_3$ 、OH、 NR^9R^{10} 、 $-CH_2CH_2C(=O)CF_3$ 或 $-CH_2CH_2C(=O)OCH_3$,其中, R^9 和 R^{10} 各自独立是H或烷基;且 R^4 、 R^5 、 R^7 和 R^8 各自是H。在其他实施方式中, R^6 是OH、 NH_2 或 $-CH_2CH_2C(=O)CF_3$ 。

[0046] 在一些实施方式中,式(I)的 R^1 是H、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、环烯基或环炔基; R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 各自独立是H、卤素、烷基、烷氧基或聚醚; R^6 是 OR^{11} 或 $CH_2CH_2COR^{12}$,其中 R^{11} 是H、烷基、烷氧基烷基、烷酰基或聚醚; R^{12} 是选自 CF_3 、卤素取代的低级烷基或 $(C=O)-O-V^2$ 的吸电子基;且 V^2 是选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基或芳基烷基的基团。

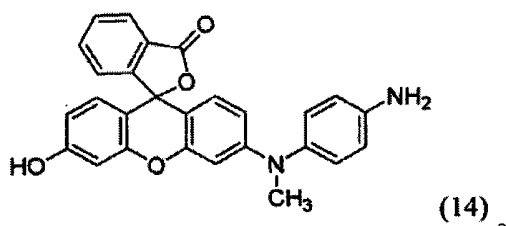
[0047] 本发明还提供了用于测量、检测或筛选过氧亚硝酸盐的包含本文所述芳族胺化合物的荧光探针组合物。在某些实施方式中,所述芳族胺化合物是化合物(10)、化合物(12)、化合物(12a)、化合物(22)或化合物(30),或其互变异构体或其组合:

[0048]



[0049] 本发明还提供了用于测量、检测或筛选次氯酸盐的包含本文所述芳族胺化合物的荧光探针组合物。在某些实施方式中,所述芳族胺化合物是化合物(14),或其互变异构体:

[0050]



[0051] 在某些实施方式中,所述荧光探针组合物还包含溶剂、酸、碱、缓冲液或其组合。

[0052] 本发明还提供了用于测量样品中的过氧亚硝酸盐或次氯酸盐的荧光探针组合物,其中所述组合物包含本文所述的芳族胺化合物。在一些实施方式中,所述荧光探针组合物还包含溶剂、酸、碱、缓冲液或其组合。

[0053] 本发明还提供了测量样品中的过氧亚硝酸盐或次氯酸盐的方法,其中,所述方法包括以下步骤:

[0054] a) 使本文所述芳族胺化合物接触样品以形成荧光化合物;和

[0055] b) 测量所述荧光化合物的荧光特性以确定样品中过氧亚硝酸盐或次氯酸盐的含量。

[0056] 在一些实施方式中,所述样品是化学样品或生物样品。在其他实施方式中,所述样品是包括微生物或者动物细胞或组织在内的生物样品。

[0057] 本发明还提供了检测样品中的过氧亚硝酸盐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以下步骤:

[0058] a) 使本文所述芳族胺化合物接触样品以形成一种或多种荧光化合物;和

[0059] b) 测量所述荧光化合物的荧光特性以确定样品中过氧亚硝酸盐或次氯酸盐的含量。

[0060] 本发明还提供了筛选一种或多种能升高或降低过氧亚硝酸盐或次氯酸盐水平的目标化合物的高通量方法,其中,所述高通量方法包括以下步骤:

[0061] a) 使本文所述芳族胺化合物接触目标化合物以形成一种或多种荧光化合物;和

[0062] b) 测量所述荧光化合物的荧光特性以定性或定量地确定所述目标化合物。

[0063] 附图简述

[0064] 图 1 描绘了荧光光谱,其显示了不同波长下 10 μ M 化合物 10 响应不同浓度 ONOO⁻ 的荧光强度。该光谱是在 0.1M 磷酸钾缓冲液, pH 7.4 中获得的,使用 0.1% DMF 作为共溶剂, $\lambda_{\text{激发}}$ 为 520nm。

[0065] 图 2 描绘了在 540nm 测得的 10 μ M 化合物 10 的荧光强度和 ONOO⁻ 浓度之间的线性相关度。

[0066] 图 3 描绘了在 25 $^{\circ}$ C、540nm 下测量 30 分钟获得的各种 ROS/RNS 生成系统中 10 μ M 化合物 10 的荧光强度。¹O₂、O₂^{•-}、NO、ROO[•] 和 H₂O₂ 的浓度为 100 μ M。[•]OH、⁻OC1、ONOO⁻ 的浓度为 10 μ M。

[0067] 图 4 描绘了荧光光谱,显示了不同波长下 1 μ M 化合物 12 响应不同浓度 ONOO⁻ 的荧光强度。该光谱是在 0.1M 磷酸钾缓冲液, pH 7.4 中获得的,使用 0.1% DMF 作为共溶剂。

[0068] 图 5 描绘了在 25 $^{\circ}$ C、530nm 下测量 30 分钟获得的各种 ROS/RNS 生成系统中 1 μ M 化合物 12 的荧光强度。¹O₂、O₂^{•-}、NO、ROO[•] 和 H₂O₂ 各自的浓度为 10 μ M。[•]OH、⁻OC1、ONOO⁻ 各自的浓度为 1 μ M。

[0069] 图 6 描绘了荧光光谱,显示了不同波长下 1 μ M 化合物 14 响应不同浓度 ⁻OC1 的荧光强度。该光谱是在 0.1M 磷酸钾缓冲液, pH 7.4 中获得的,使用 0.1% DMF 作为共溶剂。

[0070] 图 7 描绘了在 25 $^{\circ}$ C、530nm 下测量 30 分钟获得的各种 ROS/RNS 生成系统中 1 μ M 化合物 14 的荧光强度。¹O₂、O₂^{•-}、NO、ROO[•]、H₂O₂、[•]OH、⁻OC1 和 ONOO⁻ 各自的浓度为 5 μ M。

[0071] 图 8 显示了在不同刺激条件下获得的鼠 J744.1 巨噬细胞的荧光显微检测结果。巨噬细胞与 20 μ M 化合物 10 一起培育。(A) 中的巨噬细胞为对照。(B) 中的巨噬细胞用 LPS 和 IFN- γ 刺激 4 小时。(C) 中的巨噬细胞用 LPS 和 IFN- γ 刺激 4 小时,然后再用 PMA 刺激 0.5 小时。

[0072] 图 9 显示了在不同刺激条件下获得的鼠 J744.1 巨噬细胞的荧光显微检测结果。巨噬细胞与浓度为 20 μ M 的化合物 12 以及 MitoTracker Red CMXRos(购自 Invitrogen) 一起培育。(A)-(B) 中的巨噬细胞为对照。(C)-(F) 中的巨噬细胞用 LPS 刺激。

[0073] 图 10 显示了在不同刺激条件下获得的鼠 J744.1 巨噬细胞的双光子荧光显微检测结果。巨噬细胞与 20 μ M 化合物 12a 一起培育。(A) 中的巨噬细胞为对照。(B) 中的巨噬细胞用 LPS 刺激 4 小时。

[0074] 图 11 描绘了荧光光谱,显示了不同波长下 10 μ M 化合物 30 响应不同浓度过氧亚硝酸盐的荧光强度。该光谱是在 0.1M 磷酸钾缓冲液, pH 7.4 中获得的,使用 0.1% DMF 作为共溶剂,激发波长为 520nm。

[0075] 定义

[0076] 为帮助理解本发明的主旨,本文使用的大多数术语、缩写和其他速记法定义如下。任何未定义的术语、缩写或速记法理解为具有本申请提交时熟练技术人员所采用的常规含义。

[0077] “氨基”指伯、仲或叔胺,可任选被取代。具体包括作为杂环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胺或叔胺基团。氨基的一些非限制性例子包括 $-NR'R''$,其中, R' 和 R'' 各自独立是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。

[0078] “烷基”指含有碳和氢的完全饱和的无环单价基团,它可以是支链或直链的。在一些实施方式中,烷基含有约1-25个碳原子。烷基的例子有甲基、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1-6个碳原子的烷基,其例子有甲基、乙基、正丁基、异丁基、叔丁基、异戊基、正戊基和异戊基。

[0079] “杂烷基”指在烷基基团中含有一个或多个被O、S和N等杂原子取代的碳原子的烷基基团。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。在进一步的实施方式中,杂烷基包含一个或多个亚胺基(aminylene)。在某些实施方式中,杂烷基包含两个或多个O、S、亚胺基或其组合。

[0080] “烯基”或“亚烯基”分别表示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、分支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多个双键。在进一步的实施方式中,烯基或亚烯基可以是主链中含有2-8个碳原子的低级烯基或亚烯基。在进一步的实施方式中,烯基或亚烯基可以具有一个双键和最多达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,等等。

[0081] “炔基”或“亚炔基”分别表示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多个三键。在进一步的实施方式中,炔基或亚炔基可以是主链中含有2-8个碳原子的低级炔基或亚炔基。在进一步的实施方式中,炔基或亚炔基可具有一个三键和最多达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,等等。

[0082] “芳香的”或“芳香基”指芳基或杂芳基。

[0083] “芳基”指任选取代的碳环芳香基团。在一些实施方式中,芳基包括在环部分含有6-12个碳原子的单环或二环基团,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。在其他实施方式中,芳基是苯基或取代的苯基。

[0084] “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。

[0085] “烷芳基”指被烷基取代的芳基。烷芳基的一些非限制性例子甲基苯基和甲基萘基。

[0086] “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。

[0087] “卤素”指氟、氯、溴和碘。

[0088] “卤代”指氟代、氯代、溴代和碘代。

[0089] “杂原子”指碳和氢之外的原子。

[0090] “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、完全饱和的或不饱和的、单环或二环的、芳香或非芳香的基团。芳香杂环基(即,杂芳基)在环中可具有1或2个氧原子、1或2个硫原子、和/或1-4个氮原子,并且可以通过碳原子或杂原子与分子的其余部分成键。杂芳基的一些非限制性例子包括咪唑基、噻吩

基、噻唑基、吡啶基、噁唑基、吡咯基、吡啶基、喹啉基或异喹啉基,等等。

[0091] “炔”或“炔基”指仅由碳和氢构成的有机化合物或基团。炔基包括烷基、烯基、炔基和芳基。炔基还包括被其他脂肪炔基、环状炔基或芳炔基团取代的烷基、烯基、炔基和芳基,如烷芳基、烯芳基和炔芳基。在一些实施方式中,“炔”或“炔基”包含 1-30 个碳原子。

[0092] “亚炔基”指将炔的两个氢原子除去而形成的二价基团,其自由价未形成双键,例如亚芳基、亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳烷基或亚烷芳基。

[0093] “取代的”当在文中用来描述化合物或化学部分时,指该化合物或化学部分的至少一个氢原子被第二化学部分替代。取代基的非限制性例子可在本文所述的示例性化合物和实施方式中找到,并包括: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、磷(phosphonato)、膦、羧基、硫代羰基、磺酰基、氨基磺酰、酮、醛、酯、氧代、卤代烷基(例如,三氟甲基)、碳环烷基(可以是单环或者稠合或非稠合的多环(例如,环丙基、环丁基、环戊基或环己基))或杂环烷基(可以是单环或者稠合或非稠合的多环(例如,吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基或噁嗪基)、碳环或杂环的单环或者稠合或非稠合的多环芳基(例如苯基、萘基、吡咯基、吡啶基、吡嗪基、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、苯并硫苯基或苯并咪唑基)、氨基(伯、仲或叔)、O-低级烷基、O-芳基、芳基-低级烷基、 $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{OCH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{NH}(\text{烷基})$ 、 $-\text{N}(\text{烷基})_2$ 、 $-\text{NH}(\text{芳基})$ 、 $-\text{N}(\text{烷基})(\text{芳基})$ 、 $-\text{N}(\text{芳基})_2$ 、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{CO}(\text{烷基})$ 、 $-\text{CO}(\text{芳基})$ 、 $-\text{CO}_2(\text{烷基})$ 和 $\text{CO}_2(\text{芳基})$,且这些部分也可任选被稠环结构或桥例如 $-\text{OCH}_2\text{O}-$ 取代。这些取代基可任选被选自该组的取代基进一步取代。除非另有说明,上述所有化学基团都可被取代。例如,本文所述“取代的”烷基、烯基、炔基、芳基、炔基或杂环部分是被炔基部分、取代的炔基部分、杂原子或杂环取代的部分。此外,取代基可包括其中的碳原子被杂原子如氮原子、氧原子、硅原子、磷原子、硼原子、硫原子或卤原子取代的部分。这些取代基包括卤素、杂环、烷氧基、烯氧基、炔氧基、芳氧基、羟基、保护的羟基、酮、酰基、酰氧基、硝基、氨基、酰氨基、氰基、硫醇、缩酮、缩醛、酯和醚。

[0094] “发光”指光的发射,其并不从发射体的温度中衍生出能量。发光的原因可能是化学变化、生化变化或结晶变化,亚原子粒子的运动,或者原子系统的辐射诱导激发。发光包括,但不限于:磷光、荧光、化学发光、生物发光、结晶发光、电致发光如阴极射线发光、力致发光如声致发光、摩擦发光、破碎发光和压电发光、光致发光如磷光和荧光、辐射发光、和热发光。

[0095] “发光体”指显示发光的化合物中的原子或化学基团。发光体分为有机发光体和无机发光体。在一些实施方式中,本文所述发光体是有机发光体,如罗多尔、罗丹明、试卤灵或其衍生物。发光体包括,但不限于:磷光体、荧光团、化学发光体(chemolumiphore)、生物发光体(biolumiphore)、结晶发光体(crystallolumiphore)、电致发光体(electrolumiphore)如阴极射线发光体(cathodolumiphore)、力致发光体(mechanolumiphore)如声致发光体(sonolumiphore)、摩擦发光体(tribolumiphore)、破碎发光体(fractolumiphore)和压电发光体(piezolumiphore)、光致发光体(photolumiphore)、辐射发光体(radiolumiphore)和热发光体(thermolumiphore)。

[0096] “光致发光”指物质吸收光子(电磁辐射)然后将光子发射出来的过程。物质在吸

收光子后激发到较高能级,然后返回较低能级同时发射出光子。两种常见的光致发光类型包括磷光和荧光。

[0097] “发光猝灭剂”指能部分或完全消除发光体发光的化合物。

[0098] “荧光”指分子吸收光子触发另一种具有较长波长的光子发射的发光。在一些实施方式中,被吸收的光子在紫外光区,而发射光在可见光区。

[0099] “荧光团”指能够被光激发而发射荧光的一种小分子或大分子的一部分。在一些实施方式中,用波长约为 200–1000nm、或 500–800nm 的光激发荧光团能有效产生荧光。发射出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。荧光团可选自:吖啶橙、葱环、别藻蓝蛋白、BODIPY、酞菁、香豆素、Edan、曙红、赤藓红、荧胺、荧光素、FAM(羧基二乙酸荧光素)、HEX(六氯荧光素)、JOE(6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基-荧光素)、俄勒冈绿、藻蓝蛋白、藻红蛋白、罗丹明、ROX(羧基-X-罗丹明)、TAMRA(羧基四甲基罗丹明)、TET(四氯-荧光素)、德克萨斯红、四甲基罗丹明以及黄嘌呤类。其他非限制性例子可在 The Handbook: a Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies(《荧光探针和标记技术手册》,第 10 版, Molecular Probes, Eugene, Oregon, 2006) 中找到,其通过引用纳入本文。

[0100] “磷光”指涉及荧光的特定光致发光种类。与荧光不同,磷光材料不会立即重新发射其吸收的辐射。较慢的重新发射时间尺度与量子力学中的“禁止”能级跃迁有关。在某些材料中,这些跃迁的发生频率较低,在一些实施方式中吸收辐射可以在多达数小时内以较低的强度重新发射。

[0101] “化学发光”指由于化学反应而发生的发光效应。

[0102] “生物发光”指作为化学能转变为光能的化学反应的结果由活的生物体产生并发射出光。

[0103] “结晶发光”指结晶过程中产生的发光效应。

[0104] “电致发光”指材料响应电流通过或强电场而发射出光的发光效应。

[0105] “阴极射线发光”指电子枪(例如,阴极射线管)产生电子束,然后撞击磷光体等发光材料而造成所述材料发射可见光的发光效应。

[0106] “力致发光”指任何作用于固体的力学作用导致的发光效应。可通过摩擦、超声或其他方式产生。

[0107] “摩擦发光”指当刮擦、挤压或摩擦材料时通过破坏晶体中的不对称键而产生光的发光效应。

[0108] “破碎发光 (Fractoluminescence)”指晶体破碎而发光。

[0109] “压电发光”指仅导致弹性形变的压力造成的发光效应。

[0110] “辐射发光”指通过电离辐射如 β 粒子的轰击在材料中产生的发光效应。

[0111] “热发光”指一些矿物质在暴露于紫外线或其他电离辐射时储存能量,当矿物质被加热时这种能量以光的形式释放出来,从而产生发光效应。

[0112] “反应基团”或“Rg”指对胺、硫代、醇、醛或酮具有高度反应性的基团。反应基团的一些非限制性例子包括亚磷酰胺、羧酸的琥珀酰亚胺基酯、卤代乙酰胺、肼、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、全氟苯甲酰氨基、叠氨基全氟苯甲酰氨基等等。

[0113] “被偶联物 (conjugated substance)”或“Cg”指需要被偶联或通常具有与各自的

反应基团,即 Rg 发生共价反应所需的合适官能团的理想物质。被偶联物的一些非限制性例子包括抗原、类固醇、维生素、药物、半抗原、代谢物、毒素、氨基酸、肽、核苷酸、寡核苷酸、核酸、碳水化合物、脂质等的偶联物。

[0114] “活性氧”或 ROS 表示含有氧的离子、自由基以及非自由基。活性氧的一些非限制性例子包括 $^1\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{ROO}\cdot$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 OCl^- 和 H_2O_2 。

[0115] “活性氮”或 RNS 表示含有氮的离子、自由基以及非自由基。活性氮的一些非限制性例子包括一氧化氮 ($\text{NO}\cdot$)、二氧化氮 ($\text{NO}_2\cdot$)、亚硝酸盐 (NO_2^-) 和过氧亚硝酸盐 (ONOO^-)。

[0116] “荧光探针”指潜在荧光分子,其荧光在与靶物质反应之前保留在“关”状态,而在与靶物质反应之后变为“开”状态。在一些实施方式中,本文所述荧光探针不与活性氧和活性氮充分反应。在其他实施方式中,本文所述荧光探针可以与活性氧和活性氮反应。

[0117] “过氧亚硝酸盐探针”指能够与过氧亚硝酸盐反应形成荧光化合物的化合物。在一些实施方式中,本文所述过氧亚硝酸盐探针不与过氧亚硝酸盐充分反应。在其他实施方式中,本文所述过氧亚硝酸盐探针可以与过氧亚硝酸盐反应。

[0118] “次氯酸盐探针”指能够与次氯酸盐反应形成荧光化合物的化合物。在一些实施方式中,本文所述次氯酸盐探针不与次氯酸盐充分反应。在其他实施方式中,本文所述次氯酸盐探针可以与次氯酸盐反应。

[0119] “醌”指含有环己二烯二酮部分的化合物。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、菲醌等等。

[0120] “反应”、“加入”等表示使一种反应物、试剂、溶剂、催化剂、反应基团等接触另一种反应物、试剂、溶剂、催化剂、反应基团等。反应物、试剂、溶剂、催化剂、反应基团等可单独、同时或间隔加入,并且可以任何顺序加入。它们可以在加热或不加热时加入,并且可以任选地在惰性气体下加入。在一些实施方式中,“反应”指原位形成或分子内反应,此时反应基团存在于相同分子内。

[0121] “充分反应”指以摩尔百分比计,至少一种反应物的消耗量超过约 75%、超过约 80%、超过约 85%、或者超过约 90%。在一些实施方式中,“充分反应”指以摩尔百分比计,反应物的消耗量超过约 95%。在其他实施方式中,“充分反应”指以摩尔百分比计,反应物的消耗量超过约 97%。在进一步的实施方式中,“充分反应”指以摩尔百分比计,反应物的消耗量超过约 99%。

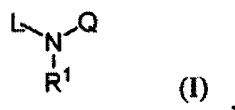
[0122] “高通量方法”指一种可自动进行或处理大量样品的方法。在一些实施方式中,在高通量方法中可使用信息系统。所述信息系统可为用于高通量方法的物理设备提供软件控制,同时组织和储存由高通量方法生成的电子数据。

[0123] 发明详述

[0124] 本发明提供了可用作发光猝灭剂和 / 或荧光探针以测量、检测或筛选活性氮 (RNS) 如过氧亚硝酸盐或活性氧 (ROS) 如次氯酸盐的芳族胺化合物。在一些实施方式中,本文所述芳族胺化合物可用作发光猝灭剂。在其他实施方式中,本文所述芳族胺化合物可用于有选择性地专门检测、测量或筛选过氧亚硝酸盐或次氯酸盐。在进一步的实施方式中,本文所述芳族胺化合物可在存在其他活性氧和 / 或活性氮如 $^1\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 NO 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 、 OCl^- 、 ONOO^- 和烷基过氧化氢自由基 ($\text{ROO}\cdot$) 时有选择性地与过氧亚硝酸盐或次氯酸盐反应。

[0125] 本文所述芳族胺化合物通常用式 (I) 表示:

[0126]



[0127] 其中, L 是发光体; Q 是发光猝灭部分; 而 R¹ 是 H、烷基、卤代烷基、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、芳基烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基氨基、烷氧基氨基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基或酰基。在一些实施方式中, R¹ 和 Q 都是发光猝灭部分。在其他实施方式中, R¹ 和 Q 是相同的。在进一步的实施方式中, R¹ 和 Q 是不同的。

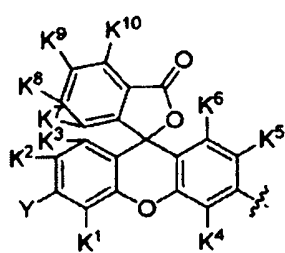
[0128] 在一些实施方式中, N、Q 和 R¹ 一起形成含有至少一个氮的 4-、5-、6-、7- 或 8- 元饱和杂环。在其他实施方式中, N、Q 和 R¹ 一起形成含有至少一个氮的 5- 或 6- 元饱和杂环。在进一步的实施方式中, N、Q 和 R¹ 一起形成 5- 或 6- 饱和杂环, 所述杂环选自取代或未取代的哌啶、吗啉、吡咯烷、噁唑烷、硫代吗啉、噻唑烷或哌嗪。

[0129] 可使用具有发光特性的任何发光体。在某些实施方式中, 发光体 L 是磷光体、荧光团、化学发光体、生物发光体、结晶发光体、电致发光体、力致发光体、光致发光体、辐射发光体或热发光体。在其他实施方式中, 发光体 L 是磷光体、荧光团或化学发光体。

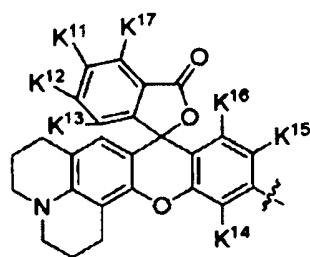
[0130] 在一些实施方式中, 发光体 L 是荧光团基团。合适的荧光团基团的一些非限制性例子包括通过从以下物质中除去一个原子或基团, 如 H、OH 或氨基, 而衍生出的单价荧光基团: 取代或未取代的荧光素、BODIPY (二吡咯基亚甲基硼 (boron dipyrromethene))、卟啉、硫代罗丹明、吖啶橙、吖啶黄、金胺 0、优黄素 (euxanthin)、萤光素、苯并蒽酮、9, 10- 双 (苯基乙炔基) 蒽、5, 12- 双 (苯基乙炔基) 萘并萘、钙黄绿素、羧基荧光素、1- 氯 -9, 10- 双 (苯基乙炔基) 蒽、香豆素类如 7- 羟基香豆素、酞菁、4', 6- 二脒基 -2- 苯基吡啶、溴化乙锭、二萘嵌苯、藻胆素、藻红蛋白、藻红素、罗多尔、罗丹明、红荧烯、均二苯乙烯、德克萨斯红、萘并荧光素、或其衍生物。合适的荧光团基团的其他非限制性例子可在《荧光探针和标记技术手册》(第 10 版, Molecular Probes, Eugene, Oregon, 2006) 中找到, 该手册通过引用纳入本文。

[0131] 在某些实施方式中, 发光体 L 是罗多尔、罗丹明、试卤灵、荧光素或其衍生物。在其他实施方式中, L 具有式 (II)-(VI)、XX、XXI 之一, 或其互变异构体:

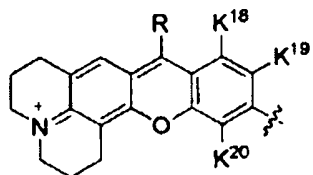
[0132]



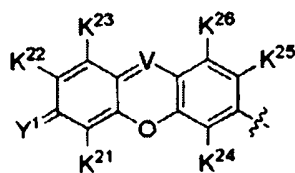
(II),



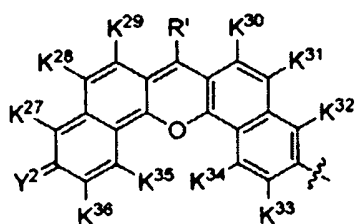
(III),



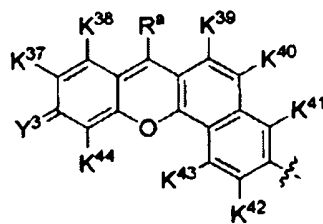
(IV),



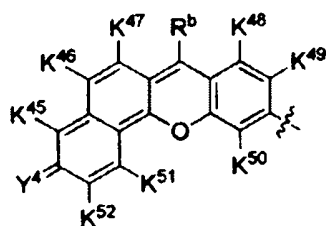
(V),



(VI),



(XX),



(XXI),

[0133] 其中, Y 是 O-A、S-A 或 NR^2R^3 ;

[0134] Y^1 、 Y^2 、 Y^3 和 Y^4 各自独立为 O、S、 NR^2 、 R^3 或 N^+R^2 、 R^3 ;

[0135] V 是 N 或 CR'' ;

[0136] R^2 、 R^3 、 R^2' 和 R^3' 各自独立是 H、烷基、卤代烷基、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、芳基烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基或酰基;

[0137] R、 R' 、 R'' 、 R^a 和 R^b 各自独立是 H、CN、烷基、卤代烷基、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、芳基烷基、烷氧基、羧基烷基、烷基氨基、烷氧基氨基、烷基酰氨基、烷氧基酰氨基、磺酰基芳基或酰基;

[0138] 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、芳基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、酰基或氨基羰基;

[0139] K^1 - K^{52} 各自独立是 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、 $-\text{CC}=\text{O}-\text{P}^1$ 或 $-\text{C}(\text{O})-\text{Z}-\text{P}^2$;

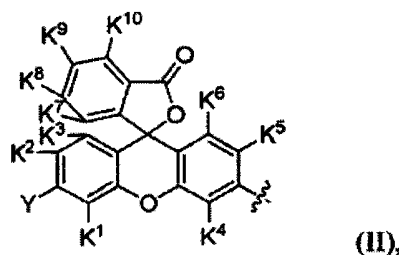
[0140] P^1 和 P^2 各自独立为氢、卤素、烷氧基、羟基、硫代、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、氨基甲酸酯、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、

烷基芳基氨基、二芳基氨基、烷硫基、杂烷基或有 3-7 个环原子的杂环基；和

[0141] Z 是亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚芳基、亚芳烷基或亚烷芳基。

[0142] 在一些实施方式中, L 具有式 (II), 或其互变异构体,

[0143]



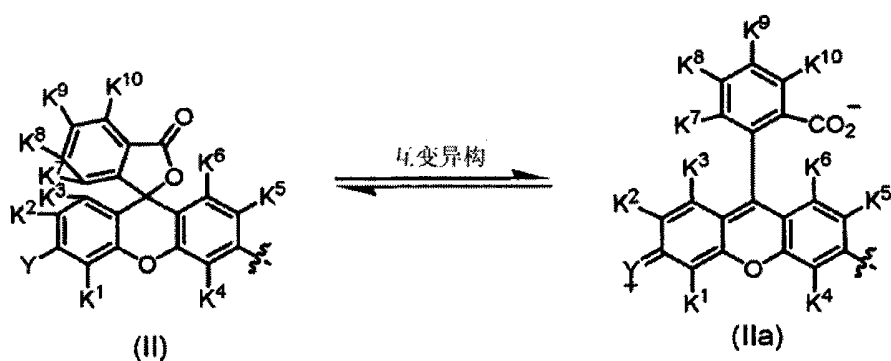
[0144] 其中, Y 和 K^1 - K^{10} 如本文所述。在一些实施方式中, Y 是 OH、 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{O}$ 或 NR^2R^3 , K^1 - K^{10} 各自独立是 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰氨基、羟基、硫代、硫代烷基、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、芳氧基、芳基烷氧基、酰氧基、氰基、硝基、巯基、氨基甲酰基、三氟甲基、苯氧基、苄氧基、磺酰基、膦酰基、磺酸酯或磷酸酯, 且 R^2 和 R^3 各自独立是 H 或烷基。

[0145] 在某些实施方式中, K^1 、 K^3 、 K^4 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自是 H, 且 K^2 和 K^5 各自独立是 H 或卤素。在其他实施方式中, K^1 - K^{10} 各自是 H。在进一步的实施方式中, Y 是 OH 或 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{O}$ 。再在进一步的实施方式中, Y 是 OH 或 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{O}$, 且 K^1 - K^{10} 各自是 H。再在进一步的实施方式中, Y 是 OH 或 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{O}$, K^1 、 K^3 、 K^4 、 K^6 、 K^7 、 K^8 、 K^9 和 K^{10} 各自是 H, 且 K^2 和 K^5 各自独立是 H 或卤素。

[0146] 在一些实施方式中, Y 是 NR^2R^3 。在其他实施方式中, R^2 与 K^2 一起或者 R^3 与 K^3 一起形成 5- 或 6- 元饱和或不饱和环的一部分, 其中, 所述环可任选被取代。在其他实施方式中, R^2 、 R^3 、 K^1 和 K^2 一起形成饱和或不饱和二环的一部分, 其中, 所述二环可任选被取代。

[0147] 在某些实施方式中, 式 (II) 的互变异构体具有式 (IIa) :

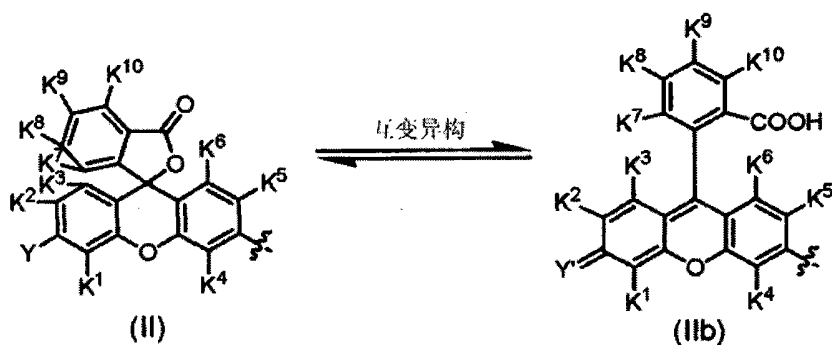
[0148]



[0149] 其中, Y 和 K^1 - K^{10} 如本文所述。在一些实施方式中, 式 (IIa) 中的 Y 是 NR^2R^3 。

[0150] 在其他实施方式中, 式 (II) 的互变异构体具有式 (IIb) :

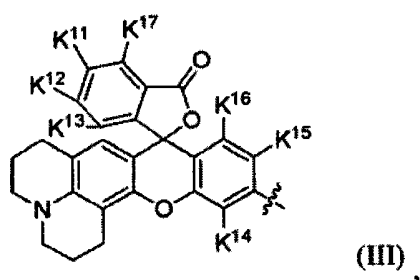
[0151]



[0152] 其中, Y 是 OH、SH 或 NHR^2 ; R^2 和 K^1 - K^{10} 如本文所述; 且 Y' 是 OH、SH 或 NHR^2 , 其是将相应的 Y 除去一个氢衍生得到的。

[0153] 在一些实施方式中, L 具有式 (III), 或其互变异构体:

[0154]



[0155] 其中, K^{11} - K^{17} 如本文所述。在一些实施方式中, K^{11} - K^{17} 各自独立是 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、磺酸酯或磷酸酯。在其他实施方式中, K^{11} 、 K^{12} 、 K^{13} 、 K^{14} 、 K^{16} 和 K^{17} 各自是 H; 且 K^{15} 是 H 或卤素。

[0156] 在某些实施方式中, 式 (III) 的互变异构体具有式 (IIIa):

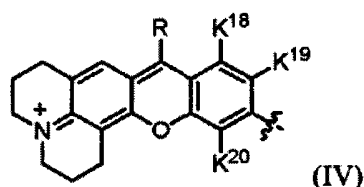
[0157]



[0158] 其中, K^{11} - K^{17} 如本文所述。

[0159] 在某些实施方式中, L 具有式 (IV), 或其互变异构体:

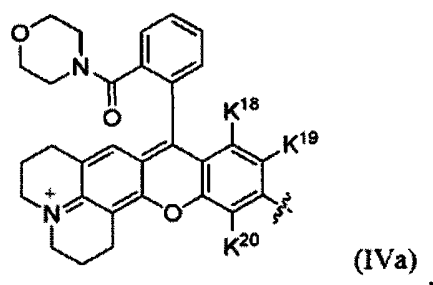
[0160]



[0161] 其中, R 和 K^{18} - K^{20} 如本文所述。在一些实施方式中, K^{18} - K^{20} 各自独立是 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、磺酸酯或磷酸酯。在其他实施方式中, K^{18} 和 K^{20} 各自是 H; 且 K^{19} 是 H 或卤素。

[0162] 在一些实施方式中, L 具有式 (IVa), 或其互变异构体:

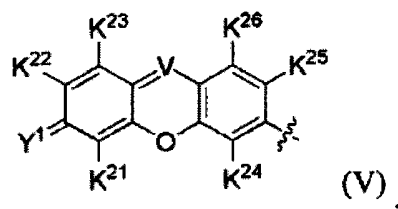
[0163]



[0164] 其中, K^{18} - K^{20} 如本文所述。在其他实施方式中, K^{18} 和 K^{20} 各自是 H; 且 K^{19} 是卤素, 如 F、Cl、Br 或 I。在进一步的实施方式中, K^{18} 和 K^{20} 各自是 H; 且 K^{19} 是 Cl。

[0165] 在一些实施方式中, L 具有式 (V), 或其互变异构体:

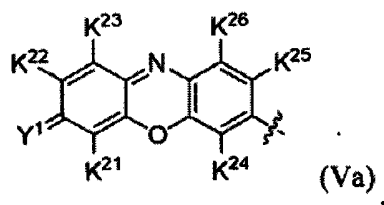
[0166]



[0167] 其中, Y^1 、V 和 K^{21} - K^{26} 如本文所述。

[0168] 在某些实施方式中, L 具有式 (V), 其中 V 是 N。在其他实施方式中, L 具有式 (Va), 或其互变异构体:

[0169]

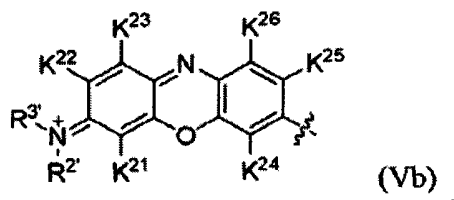


[0170] 其中, Y^1 和 K^{21} - K^{26} 如本文所述。在进一步的实施方式中, Y^1 是 $N^+R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 。在进一步的实施方式中, 式 (Va) 的 K^{21} - K^{26} 各自独立是 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基

基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰氨基、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、磺酸酯或磷酸酯。再在进一步的实施方式中, K^{21} - K^{26} 各自是 H。

[0171] 在某些实施方式中, L 具有式 (V), 其中 V 是 N; 且 Y^1 是 $N^+R^2R^3$ 。在其他实施方式中, L 具有式 (Vb), 或其互变异构体:

[0172]



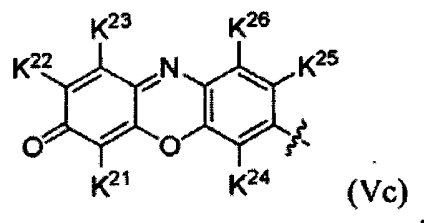
[0173] 其中, R^2 、 R^3 和 K^{21} - K^{26} 如本文所述。在进一步的实施方式中, 式 (Vb) 的 K^{21} - K^{26} 各自独立是 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰氨基、羟基、硫代、硫代烷基、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、芳氧基、芳基烷氧基、酰氧基、氰基、硝基、巯基、氨基甲酰基、三氟甲基、苯氧基、苄氧基、磺酰基、膦酰基、磺酸酯或磷酸酯。再在进一步的实施方式中, K^{21} - K^{26} 各自是 H。

[0174] 在一些实施方式中, 式 (Vb) 的 N、 R^2 和 R^3 一起形成含有至少一个氮的 5- 或 6- 元饱和杂环。再在进一步的实施方式中, 所述 5- 或 6- 元饱和杂环是取代或未取代的哌啶、吗啉、吡咯烷、噁唑烷、硫代吗啉、噻唑烷或哌嗪。再在进一步的实施方式中, R^2 和 R^3 之一是本文所述的 Q 基。再在进一步的实施方式中, R^2 和 R^3 都是 Q 基, 且 R^2 和 R^3 可以是相同或不同的。

[0175] 在某些实施方式中, R^2 与 K^{21} 一起或者 R^3 与 K^{22} 一起形成 5- 或 6- 元饱和或不饱和环的一部分, 其中, 所述环可任选被取代。在其他实施方式中, R^2 、 R^3 、 K^{21} 和 K^{22} 一起形成饱和或不饱和二环的一部分, 其中, 所述二环是取代或未取代的。

[0176] 在一些实施方式中, L 具有式 (V), 其中 V 是 N; 且 Y^1 是 O。在其他实施方式中, L 具有式 (Vc), 或其互变异构体:

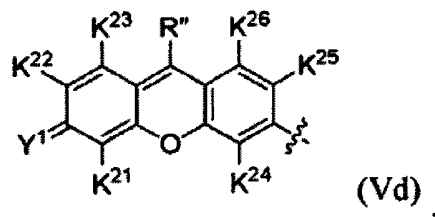
[0177]



[0178] 其中, K^{21} - K^{26} 如本文所述。在进一步的实施方式中, 式 (Vc) 的 K^{21} - K^{26} 各自独立是 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、磺酸酯或磷酸酯。再在进一步的实施方式中, K^{21} - K^{26} 各自是 H。

[0179] 在一些实施方式中, L 具有式 (V), 其中 V 是 CR”。在其他实施方式中, L 具有式 (Vd), 或其互变异构体:

[0180]

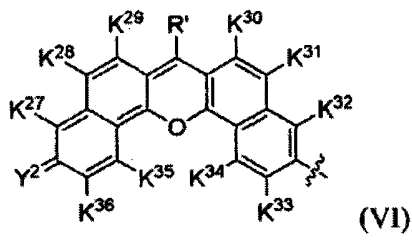


[0181] 其中, R”、Y¹ 和 K²¹-K²⁶ 如本文所述。在进一步的实施方式中, Y¹ 是 O 或 N⁺R^{2'} R^{3'}。在进一步的实施方式中, 式 (Vd) 的 K²¹-K²⁶ 各自独立是 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、二芳基氨基、酰氨基、羟基、硫代、硫代烷基、烷氧基、烷硫基、烷氧基烷基、芳氧基、芳基烷氧基、酰氧基、氰基、硝基、巯基、氨基甲酰基、三氟甲基、苯氧基、苄氧基、磺酰基、膦酰基、磺酸酯或磷酸酯。再在进一步的实施方式中, K²¹-K²⁶ 各自是 H。

[0182] 在某些实施方式中, 式 (Va)、(Vb)、(Vc) 或 (Vd) 的 K²² 和 K²³ 一起或者式 (Va)、(Vb)、(Vc) 或 (Vd) 的 K²⁵ 和 K²⁶ 一起形成 5- 或 6- 元饱和或不饱和环如苯并环 (benzo ring) 的一部分, 其中所述 5- 或 6- 元饱和或不饱和环是取代或未取代的。在进一步的实施方式中, K²² 和 K²³ 一起或者 K²⁵ 和 K²⁶ 一起形成苯并环, 其中所述苯并环是取代或未取代的。

[0183] 在一些实施方式中, L 具有式 (VI), 或其互变异构体:

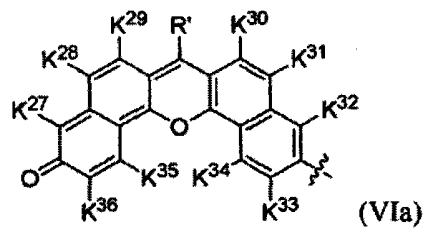
[0184]



[0185] 其中, R', Y² 和 K²⁷-K³⁶ 如本文所述。在其他实施方式中, Y² 是 O 或 N⁺R^{2'} R^{3'}。

[0186] 在某些实施方式中, L 具有式 (VI), 其中 Y² 是 O。在其他实施方式中, L 具有式 (VIa), 或其互变异构体:

[0187]

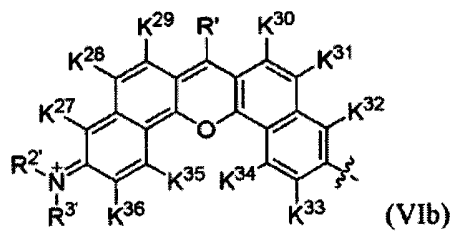


[0188] 其中, R' 和 K²⁷-K³⁶ 如本文所述。在进一步的实施方式中, 式 (VIa) 的 K²⁷-K³⁶ 各自独立是 H、卤素、烷基、卤代烷基、杂烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、烷芳基、杂环基、环烷基、环烯基、环炔基、羟烷基、氨基烷基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、二烷基氨基、烷基芳基氨基、

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、磺酸酯或磷酸酯。再在进一步的实施方式中, K^{27} - K^{36} 各自是 H。

[0189] 在某些实施方式中, L 具有式 (VI), 其中 Y^2 是 $N^+R^{2'}$ $R^{3'}$ 。在其他实施方式中, L 具有式 (VIb), 或其互变异构体:

[0190]



[0191] 其中, R' 、 $R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 和 K^{27} - K^{36} 如本文所述。在进一步的实施方式中, 式 (VIb) 的 K^{27} - K^{36} 各自独立是 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、磺酸酯或磷酸酯。再在进一步的实施方式中, K^{27} - K^{36} 各自是 H。

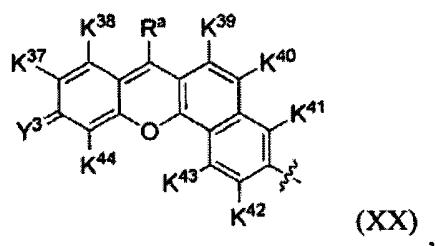
[0192] 在进一步的实施方式中, 式 (VIb) 的 N、 $R^{2'}$ 和 $R^{3'}$ 一起形成含有至少一个氮的 5- 或 6- 元饱和杂环。再在进一步的实施方式中, 5- 或 6- 元饱和杂环是取代或未取代的哌啶、吗啉、吡咯烷、噁唑烷、硫代吗啉、噻唑烷或哌嗪。再在进一步的实施方式中, $R^{2'}$ 和 $R^{3'}$ 之一是本文所述的 Q 基。再在进一步的实施方式中, $R^{2'}$ 和 $R^{3'}$ 都是 Q 基, 且 $R^{2'}$ 和 $R^{3'}$ 可以是相同或不同的。

[0193] 在一些实施方式中, $R^{2'}$ 与 K^{27} 一起或者 $R^{3'}$ 与 K^{36} 一起形成 5- 或 6- 元饱和或不饱和环的一部分, 其中, 所述环可任选被取代。在其他实施方式中, $R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 、 K^{27} 和 K^{36} 一起形成饱和或不饱和二环的一部分, 其中, 所述二环是取代或未取代的。

[0194] 在某些实施方式中, K^{28} 和 K^{29} 一起, 或者 K^{30} 和 K^{31} 一起, 或者 K^{33} 和 K^{34} 一起, 或者 K^{35} 和 K^{36} 一起形成 5- 或 6- 元饱和或不饱和环如苯并环的一部分, 其中, 该 5- 或 6- 元饱和或不饱和环是取代或未取代的。在进一步的实施方式中, K^{28} 和 K^{29} 一起, 或者 K^{30} 和 K^{31} 一起, 或者 K^{33} 和 K^{34} 一起, 或者 K^{35} 和 K^{36} 一起形成苯并环, 其中, 该苯并环是取代或未取代的。

[0195] 在一些实施方式中, L 具有式 (XX), 或其互变异构体:

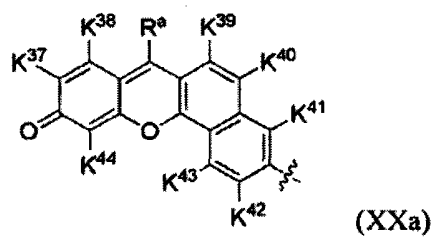
[0196]



[0197] 其中, R^a 、 Y^3 和 K^{37} - K^{44} 如本文所述。在其他实施方式中, Y^3 是 O 或 $N^+R^{2'}$ $R^{3'}$ 。

[0198] 在某些实施方式中, L 具有式 (XX), 其中 Y^3 是 O。在其他实施方式中, L 具有式 (XXa), 或其互变异构体:

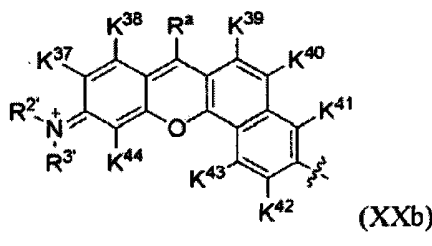
[0199]



[0200] 其中, R^a 、 K^{37} - K^{44} 如本文所述。在进一步的实施方式中, 式 (XXa) 的 K^{37} - K^{44} 各自独立是 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、磺酸酯或磷酸酯。再在进一步的实施方式中, K^{37} - K^{44} 各自是 H。再在进一步的实施方式中, K^{37} 是 Cl 或 F; 且 K^{38} - K^{44} 各自是 H。

[0201] 在某些实施方式中, L 具有式 (XX), 其中, Y^3 是 $N^+R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 。在其他实施方式中, L 具有式 (XXb), 或其互变异构体:

[0202]



[0203] 其中, R^a 、 $R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 和 K^{37} - K^{44} 如本文所述。在进一步的实施方式中, 式 (XXb) 的 K^{37} - K^{44} 各自独立是 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、磺酸酯或磷酸酯。再在进一步的实施方式中, K^{37} - K^{44} 各自是 H。

[0204] 在进一步的实施方式中, 式 (XXb) 的 N、 $R^{2'}$ 和 $R^{3'}$ 一起形成含有至少一个氮的 5- 或 6- 元饱和杂环。再在进一步的实施方式中, 5- 或 6- 元饱和杂环是取代或未取代的哌啶、吗啉、吡咯烷、噁唑烷、硫代吗啉、噻唑烷或哌嗪。再在进一步的实施方式中, $R^{2'}$ 和 $R^{3'}$ 之一是本文所述的 Q 基。再在进一步的实施方式中, $R^{2'}$ 和 $R^{3'}$ 都是 Q 基, 且 $R^{2'}$ 和 $R^{3'}$ 可以是相同或不同的。

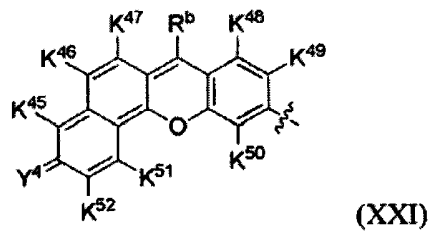
[0205] 在一些实施方式中, $R^{2'}$ 与 K^{37} 一起或者 $R^{3'}$ 与 K^{44} 一起形成 5- 或 6- 元饱和或不饱和环的一部分, 其中, 所述环可任选被取代。在其他实施方式中, $R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 、 K^{37} 和 K^{44} 一起形成饱和或不饱和二环的一部分, 其中, 所述二环是取代或未取代的。

[0206] 在某些实施方式中, K^{37} 和 K^{38} 一起, 或者 K^{39} 和 K^{40} 一起, 或者 K^{42} 和 K^{43} 一起形成 5- 或 6- 元饱和或不饱和环如苯并环的一部分, 其中, 该 5- 或 6- 元饱和或不饱和环是取代或未取代的。在进一步的实施方式中, K^{37} 和 K^{38} 一起, 或者 K^{39} 和 K^{40} 一起, 或者 K^{42} 和 K^{43} 一

起形成苯并环,其中,该苯并环是取代或未取代的。

[0207] 在一些实施方式中, L 具有式 (XXI), 或其互变异构体:

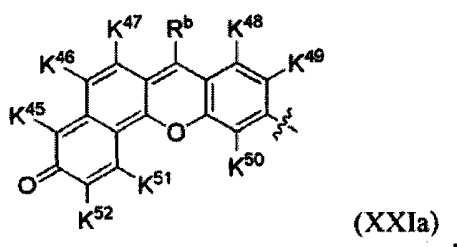
[0208]



[0209] 其中, R^b , Y^4 和 K^{45} - K^{52} 如本文所述。在其他实施方式中, Y^4 是 O 或 N^+R^2 , R^3 '。

[0210] 在某些实施方式中, L 具有式 (XXI), 其中 Y^4 是 O。在其他实施方式中, L 具有式 (XXIa), 或其互变异构体:

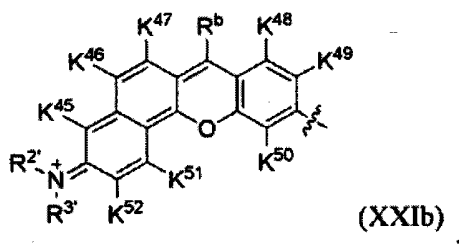
[0211]



[0212] 其中, R^b , K^{45} - K^{52} 如本文所述。在进一步的实施方式中, 式 (XXIa) 的 K^{45} - K^{52} 各自独立是 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、磺酸酯或磷酸酯。再在进一步的实施方式中, K^{46} - K^{51} 各自是 H, 且 K^{45} 和 K^{52} 中的至少一个独立为 Cl 或 F。

[0213] 在某些实施方式中, L 具有式 (XXI), 其中 Y^4 是 N^+R^2 , R^3 '。在其他实施方式中, L 具有式 (XXIb), 或其互变异构体:

[0214]



[0215] 其中, R^b , R^2 ', R^3 ' 和 K^{45} - K^{52} 如本文所述。在进一步的实施方式中, 式 (XXIb) 的 K^{45} - K^{52} 各自独立是 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、磺酸酯或磷酸酯。再在进一步的实施方式中, K^{45} - K^{52} 各自是 H。

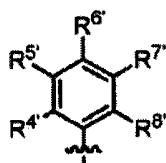
[0216] 在进一步的实施方式中,式 (XXIb) 的 N、R^{2'} 和 R^{3'} 一起形成含有至少一个氮的 5- 或 6- 元饱和杂环。再在进一步的实施方式中,该 5- 或 6- 元饱和杂环是取代或未取代的哌啶、吗啉、吡咯烷、噁唑烷、硫代吗啉、噻唑烷或哌嗪。再在进一步的实施方式中,R^{2'} 和 R^{3'} 之一是本文所述的 Q 基。再在进一步的实施方式中,R^{2'} 和 R^{3'} 都是 Q 基,且 R^{2'} 和 R^{3'} 可以是相同或不同的。

[0217] 在一些实施方式中,R^{2'} 与 K⁴⁵ 一起或 R^{3'} 与 K⁵² 一起形成 5- 或 6- 元饱和或不饱和环的一部分,其中,所述环可任选被取代。在其他实施方式中,R^{2'}、R^{3'}、K⁴⁵ 和 K⁵² 一起形成饱和或不饱和二环的一部分,其中,所述二环是取代或未取代的。

[0218] 在某些实施方式中,K⁴⁶ 和 K⁴⁷ 一起,或者 K⁴⁸ 和 K⁴⁹ 一起,或者 K⁵¹ 和 K⁵² 一起形成 5- 或 6- 元饱和或不饱和环如苯并环的一部分,其中,该 5- 或 6- 元饱和或不饱和环是取代或未取代的。在进一步的实施方式中,K⁴⁶ 和 K⁴⁷ 一起,或者 K⁴⁸ 和 K⁴⁹ 一起,或者 K⁵¹ 和 K⁵² 形成苯并环,其中,该苯并环是取代或未取代的。

[0219] 在一些实施方式中,R、R'、R''、R^a 和 R^b 各自独立为具有式 (VII) 的取代或来取代的苯基:

[0220]



(VII)

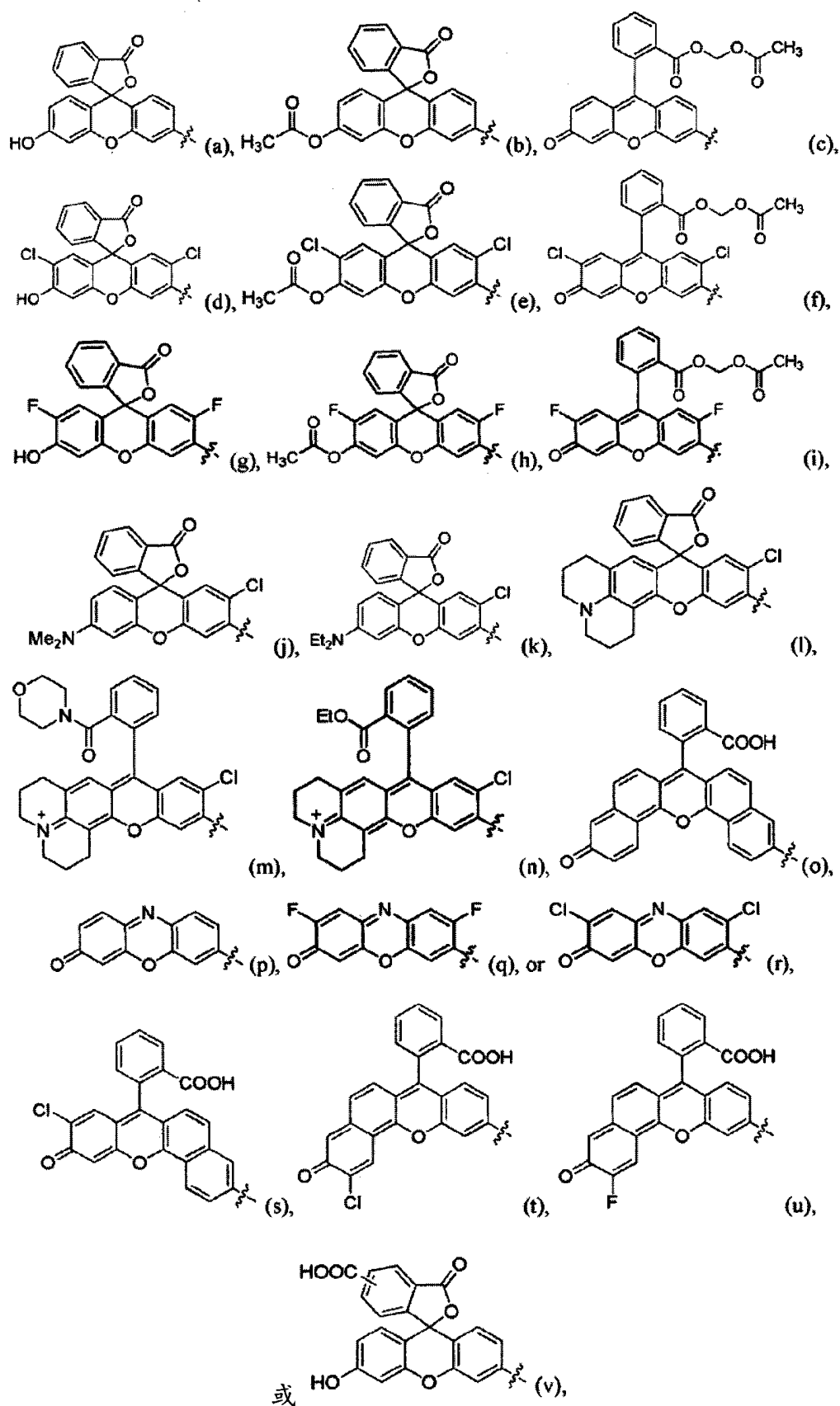
[0221] 其中,R^{4'}、R^{5'}、R^{6'}、R^{7'} 和 R^{8'} 各自独立是 H、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂环基、羟基、烷氧基、烷氧基烷基、烷氧基烷氧基、酰基、烷基羰基烷基、卤代烷基羰基烷基如三氟甲基羰基烷基、氨基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、烷氧基羰基烷基、氨基羰基或 NR⁹R¹⁰,或者 R^{4'} 和 R^{5'} 一起、R^{5'} 和 R^{6'} 一起、R^{6'} 和 R^{7'} 一起或者 R^{7'} 和 R^{8'} 一起形成与式 (VII) 的苯环稠合的 5- 或 6- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环;且

[0222] R⁹ 和 R¹⁰ 各自独立是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、芳酰基或聚醚。

[0223] 在某些实施方式中,R^{4'}、R^{5'}、R^{6'} 和 R^{7'} 独立是 H;且 R^{8'} 是 -COOH、-COR¹⁷、-COOR¹⁸ 或 -CONR¹⁹R²⁰,其中,R¹⁷、R¹⁸、R¹⁹ 和 R²⁰ 独立是 H、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂环基、羟基、烷氧基、烷氧基烷基、烷氧基烷氧基、酰基、烷基羰基烷基、卤代烷基羰基烷基、氨基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、烷氧基羰基烷基、氨基羰基、或 NR⁹R¹⁰,或 N、R¹⁹ 和 R²⁰ 一起形成具有至少一个氮原子的 5- 或 6- 元杂环。在其他实施方式中,R^{8'} 是 -CONR¹⁹R²⁰,且 N、R¹⁹ 和 R²⁰ 一起形成 5- 或 6- 饱和杂环。在进一步的实施方式中,所述杂环是取代或未取代的哌啶、吗啉、吡咯烷、噁唑烷、硫代吗啉、噻唑烷或哌嗪。再在进一步的实施方式中,R^{8'} 是 -COOH。再在进一步的实施方式中,R^{4'}、R^{5'}、R^{6'} 和 R^{7'} 各自是 H;且 R^{8'} 是 -COOH。在一些实施方式中,R^{4'}、R^{5'}、R^{6'} 和 R^{7'} 各自独立是 H;且 R^{8'} 是甲基、甲氧基或者能提供充足空间位阻的任何其他基团,以使苯环位于多环如咕吨环平面之外。

[0224] 在一些实施方式中,L 具有式 (a)-(v) 之一,或其互变异构体:

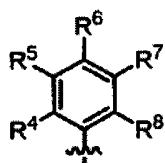
[0225]



[0226] 其中,式(a)-(v)各自独立是未取代的或取代的。

[0227] 在某些实施方式中,式(I)的Q是具有式(VIIa)的取代或未取代的苯基:

[0228]



(VIIa)

[0229] 其中, R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 独立是 H、烷基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷基芳基、芳基烷基、杂环基、羟基、烷氧基、烷氧基烷基、烷氧基烷氧基、酰基、烷基羰基烷基、卤代烷基羰基烷基如三氟甲基羰基烷基、氨基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、烷氧基羰基烷基、氨基羰基或 NR^9R^{10} , 或者 R^4 和 R^5 一起、 R^5 和 R^6 一起、 R^6 和 R^7 一起或者 R^7 和 R^8 一起形成与式(VIIa)的苯环稠合的 5- 或 6- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环;且

[0230] R^9 和 R^{10} 各自独立是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、芳酰基或聚醚。

[0231] 在某些实施方式中,式(VIIa)的 R^6 是 NR^9R^{10} 。在其他实施方式中,式(I)的 R^1 是 H、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、环烯基或环炔基;式(VIIa)的 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 各自独立是 H、卤素、烷基、烷氧基或聚醚; R^6 是 OR^{11} 或 $CH_2CH_2COR^{12}$, 其中 R^{11} 是 H、烷基、烷氧基烷基、烷酰基或聚醚; R^{12} 是选自下组的吸电子基: CF_3 、卤素取代的低级烷基(例如, CF_nH_{3-n} , 其中, n 是 1、2 或 3)、或 $(C=O)-O-V^2$, 其中, V^2 是选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基或芳基烷基的基团。

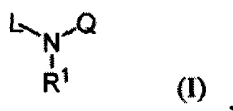
[0232] 在一些实施方式中, Q 中的 R^6 是 $-OCH_2OCH_3$ 、 OH 、 NR^9R^{10} 、 $-CH_2CH_2C(=O)CF_3$ 或 $-CH_2CH_2C(=O)OCH_3$, 其中 R^9 和 R^{10} 各自独立是 H 或烷基;且 R^4 、 R^5 、 R^7 和 R^8 各自是 H。在其他实施方式中, R^6 是 OH 、 NH_2 或 $-CH_2CH_2C(=O)CF_3$ 。

[0233] 在某些实施方式中, R^1 是 H、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、环烯基或环炔基; R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 各自独立是 H、卤素、烷基、烷氧基或聚醚; R^6 是 OR^{11} 或 $CH_2CH_2COR^{12}$, 其中 R^{11} 是 H、烷基、烷氧基烷基、烷酰基或聚醚; R^{12} 是选自 CF_3 、卤素取代的低级烷基或 $(C=O)-O-V^2$ 的吸电子基, 其中, V^2 是选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基或芳基烷基的基团。

[0234] 在一些实施方式中, 当 L 具有式(II), 其中 Y 是 NR^2R^3 时, 则 Q 中的 R^6 是羟基、烯基、炔基、杂烷基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、烷氧基烷基、烷氧基烷氧基、酰基、烷基羰基烷基、卤代烷基羰基烷基如三氟甲基羰基烷基、羧基烷基、烷氧基羰基、烷氧基羰基烷基或氨基羰基, 或者 R^4 和 R^5 一起、 R^5 和 R^6 一起、 R^6 和 R^7 一起或者 R^7 和 R^8 一起形成与式(VIIa)的苯环稠合的 5- 或 6- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。

[0235] 在一些实施方式中, 芳族胺化合物具有式(I):

[0236]

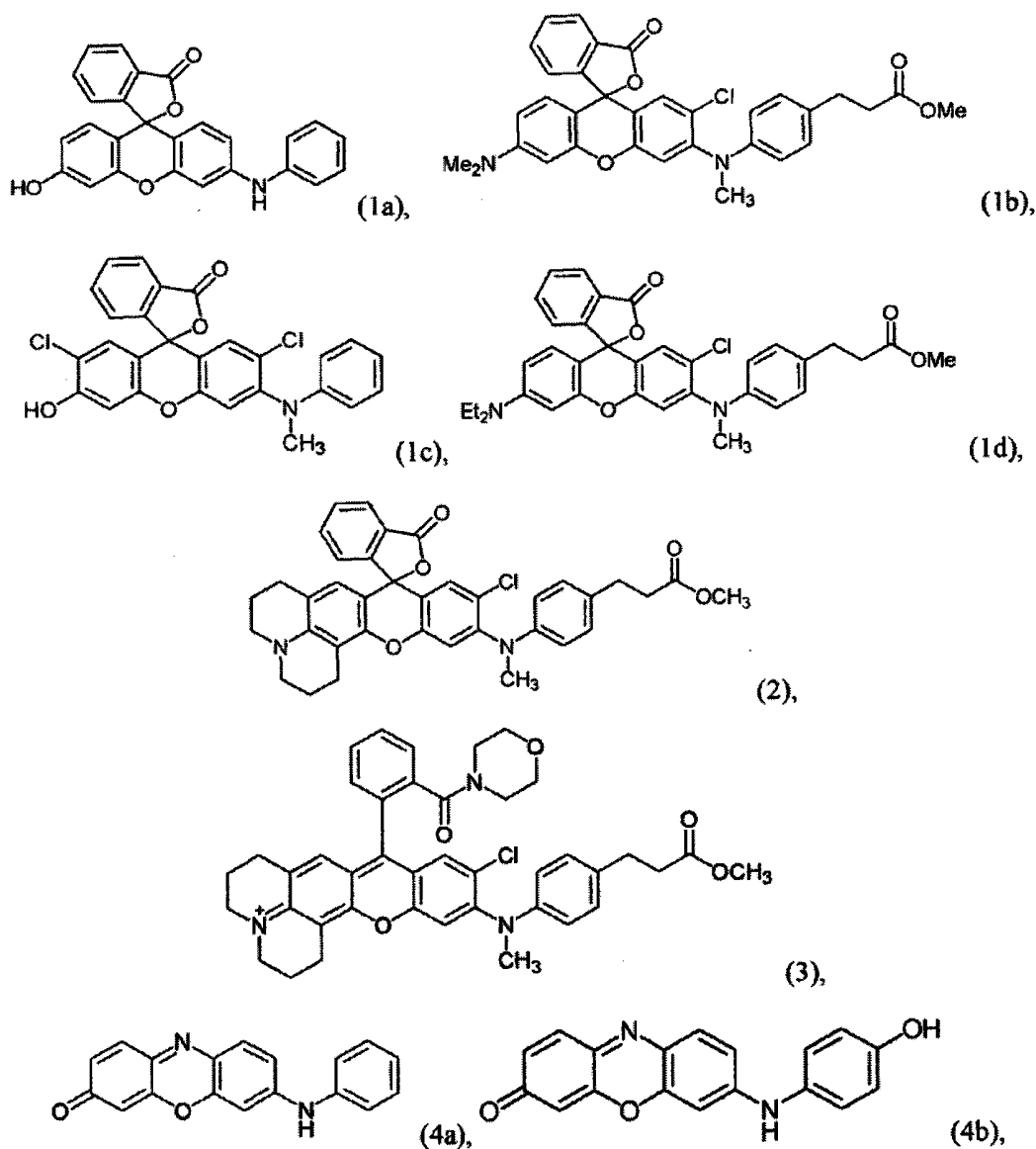


[0237] 其中, L 具有本文所述的式(II)-(VI)、(XX)、(XXI)、(Va)-(Vd)、(VIa)-(VIb)、(XXa)-(XXb)、(XXIa)-(XXIb) 和 (a)-(v) 之一; Q 具有本文所述的式(VIIa); R^1 如本文所述。

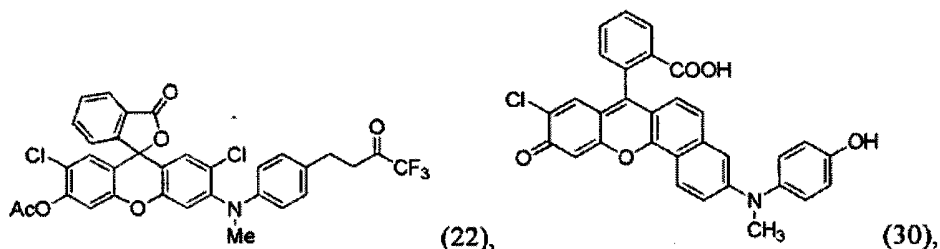
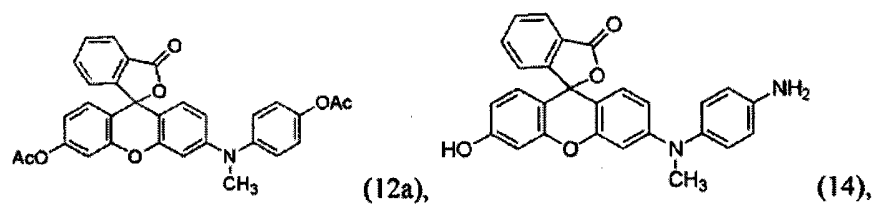
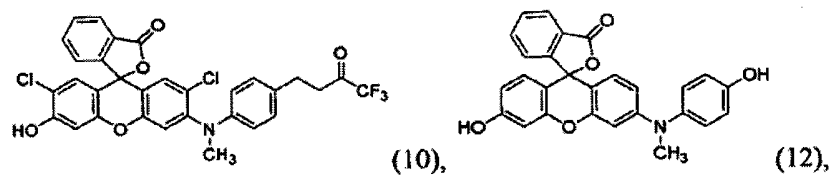
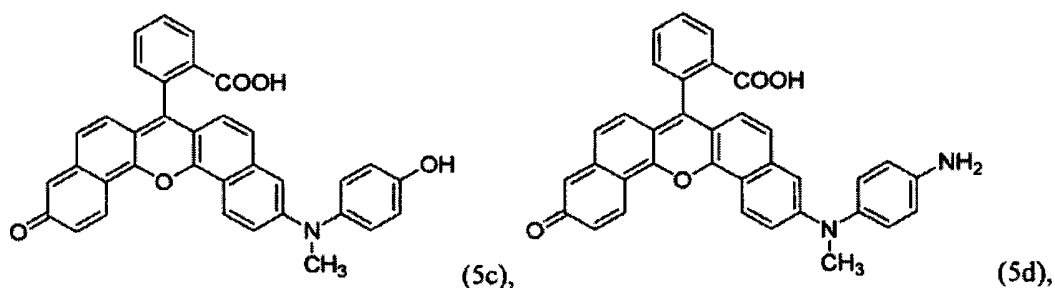
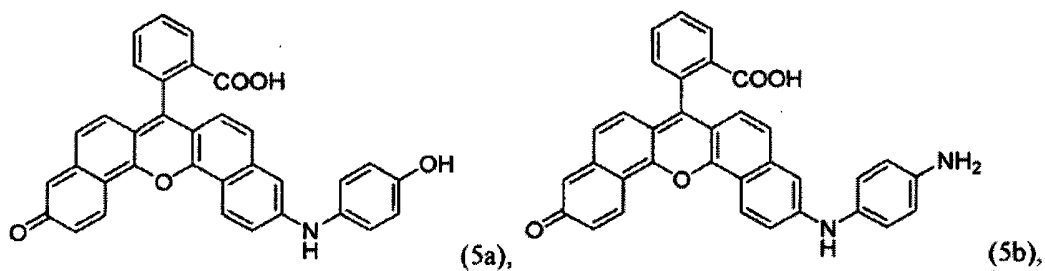
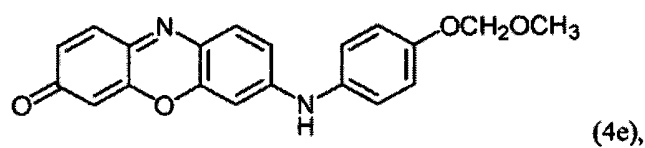
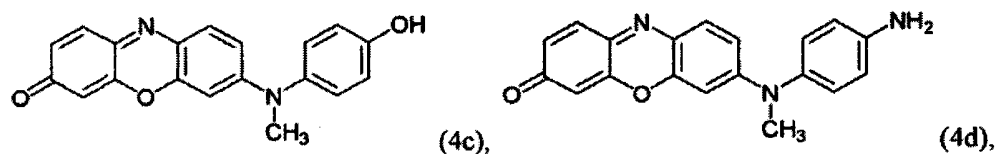
[0238] 当任何一种芳族胺化合物,如式 (IVa)、式 (Vb)、式 (VIIIb)、式 (IXb) 或化合物 3, 带有正电荷时,可用本领域技术人员已知的任何合适的抗衡离子平衡该正电荷。合适的抗衡离子的一些非限制性例子包括:卤离子如氟离子、氯离子、溴离子和碘离子,羧酸根离子如甲酸根离子和乙酸根离子,碳酸氢根离子,硝酸根离子,亚硝酸根离子等等。在一些实施方式中,抗衡离子包括氯化物。在一些实施方式中,抗衡离子是乙酸根离子。

[0239] 在某些实施方式中,本文所述芳族胺化合物包括化合物 1a-1d、2、3、4a-4e 和 5a-5d,或其互变异构体:

[0240]



[0241]



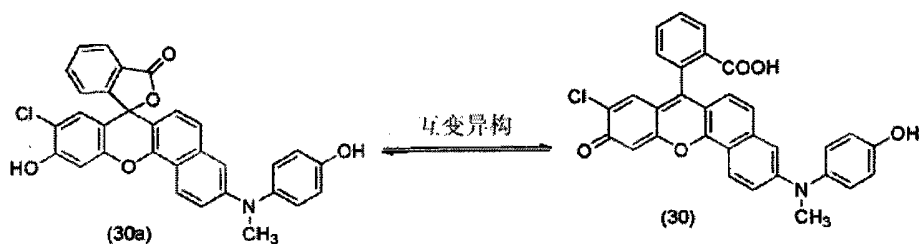
[0242] 其中, 化合物 1a-1d、2、3、4a-4e、5a-5d、10、12、12a、14、22 和 30 各自独立是取代的或未取代的。

[0243] 在某些实施方式中, 芳族胺化合物是化合物 (10)。在其他实施方式中, 芳族胺化合物是化合物 (12)。在进一步的实施方式中, 芳族胺化合物是化合物 (12a)。再在进一步的实施方式中, 芳族胺化合物是化合物 (14)。再在进一步的实施方式中, 芳族胺化合物是化合

物 (22)。在其他实施方式中,芳族胺化合物是化合物 (30)。

[0244] 在一些实施方式中,芳族胺化合物是化合物 (30)。在其他实施方式中,化合物 (30) 的互变异构体具有如下所示的式 (30a)。

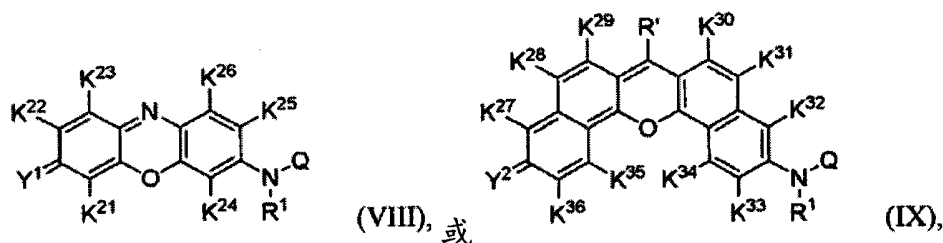
[0245]



[0246] 芳族胺化合物作为发光猝灭剂

[0247] 在某些实施方式中,具有式 (I) 的芳族胺化合物可用作发光猝灭剂或发光猝灭化合物。在某些实施方式中,发光猝灭化合物具有式 (VIII) 或 (IX) :

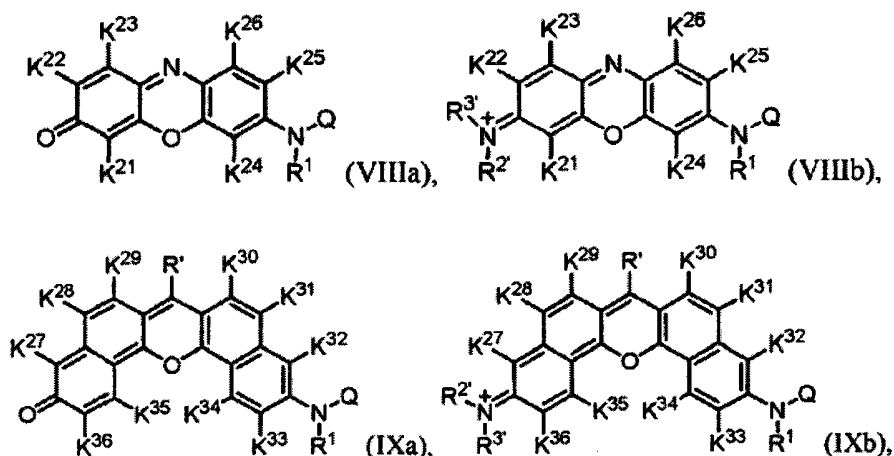
[0248]



[0249] 其中, Y^1 、 Y^2 、 Q 、 R' 、 R^1 和 K^{21} - K^{36} 如本文所述。

[0250] 在某些实施方式中, Y^1 或 Y^2 各自独立为 O 。在其他实施方式中, Y^1 或 Y^2 各自独立为 N^+R^2 、 R^3 。在进一步的实施方式中, Y^1 或 Y^2 各自独立为 NR^2 、 R^3 。再在进一步的实施方式中,发光猝灭化合物具有式 (VIIIa)、(VIIIb)、(IXa) 或 (IXb) :

[0251]



[0252] 其中, Q 、 R' 、 R^1 和 K^{21} - K^{36} 如本文所述。

[0253] 在某些实施方式中,式 (VIIIb) 或 (IXb) 的 N 、 R^2 和 R^3 一起形成含有至少一个氮的 4-、5-、6-、7- 或 8- 元饱和杂环。在其他实施方式中,式 (VIIIb) 或 (IXb) 的 N 、 R^2 和 R^3 一起形成 5- 或 6- 元饱和杂环。在进一步的实施方式中,式 (VIIIb) 或 (IXb) 的 N 、 R^2 和 R^3 一起形成 5- 或 6- 元饱和杂环,所述杂环选自取代或未取代的哌啶、吗啉、吡咯烷、噁唑烷、硫代吗啉、噻唑烷或哌嗪。再在进一步的实施方式中,式 (VIIIb) 或 (IXb) 的 R^2 和

$R^{3'}$ 之一是本文所述的 Q。再在进一步的实施方式中, $R^{2'}$ 和 $R^{3'}$ 都是 Q, 且 $R^{2'}$ 和 $R^{3'}$ 可以是相同或不同的。

[0254] 在一些实施方式中, 式 (VIII)、(VIII)、(VIIIa)、(VIIIb)、(IXa) 或 (IXb) 的 N、Q 和 R^1 一起形成含有至少一个氮的 5- 或 6- 元饱和杂环。在其他实施方式中, 5- 或 6- 元饱和杂环是取代或未取代的哌啶、吗啉、吡咯烷、噁唑烷、硫代吗啉、噻唑烷或哌嗪。在进一步的实施方式中, R^1 是本文所述的 Q 基。再在进一步的实施方式中, R^1 和 Q 基可以是相同或不同的。

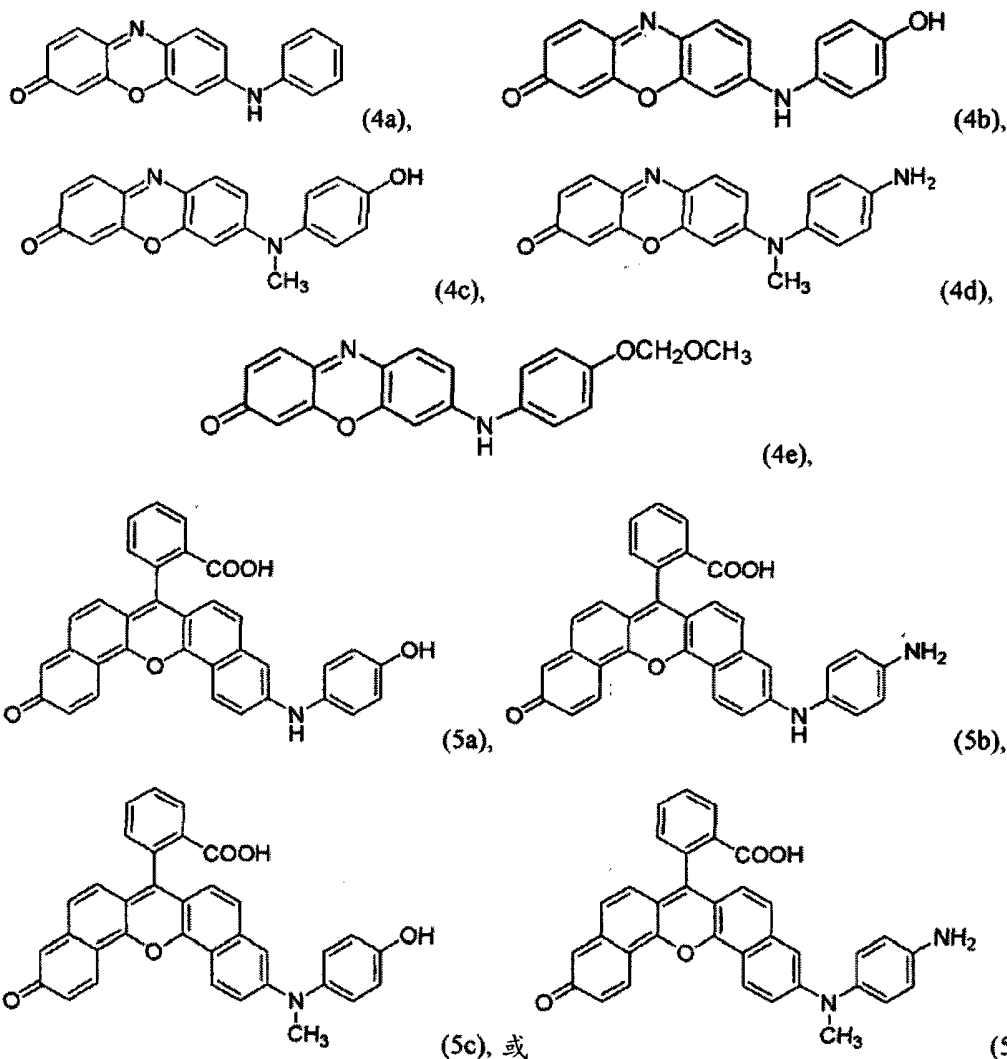
[0255] 在某些实施方式中, 式 (VIIIb) 的 $R^{2'}$ 与 K^{21} 一起或者 $R^{3'}$ 和 K^{22} 一起形成 5- 或 6- 元饱和或不饱和环的一部分, 其中, 所述环可任选被取代。在其他实施方式中, $R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 、 K^{21} 和 K^{22} 一起形成形成饱和或不饱和二环的一部分, 其中, 所述二环是取代或未取代的。

[0256] 在一些实施方式中, 式 (IXb) 的 $R^{2'}$ 与 K^{27} 一起或者 $R^{3'}$ 和 K^{36} 一起形成 5- 或 6- 元饱和或不饱和环的一部分, 其中, 所述环可任选被取代。在其他实施方式中, $R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 、 K^{27} 和 K^{36} 一起形成形成饱和或不饱和二环的一部分, 其中, 所述二环是取代或未取代的。

[0257] 在某些实施方式中, K^{22} 和 K^{23} 一起或者 K^{25} 和 K^{26} 一起形成 5- 或 6- 元饱和或不饱和环, 如苯并环的一部分, 其中, 该 5- 或 6- 元饱和或不饱和环是取代或未取代的。在进一步的实施方式中, K^{22} 和 K^{23} 一起或者 K^{25} 和 K^{26} 一起形成苯并环, 其中, 该苯并环是取代或未取代的。

[0258] 在一些实施方式中, 发光猝灭化合物包括化合物 4a-4e 和 5a-5d:

[0259]



[0260] 其中, 化合物 4a-4e 和 5a-5d 各自独立是取代的或未取代的。

[0261] 在一些实施方式中, 式 (I) 的芳族胺化合物的 L、R¹ 和 Q 基中的至少一个被反应基团 (Rg) 或偶联基团 (Cg) 取代, 其中, Rg 或 Cg 任选通过连接基 -X- 与本文所述芳族胺化合物连接。在其他实施方式中, 本文所述芳族胺化合物的 L、R¹ 和 Q 基中的至少一个被 -X-Rg 或 -X-Cg 基取代。在其他实施方式中, 式 (I) 的芳族胺化合物的 L 基被 -X-Rg 或 -X-Cg 基取代。

[0262] 在一些实施方式中, X 是, 或者包含, 键或连接基, 如 O、S、亚胺基 (例如, NR 基, 其中 R 是 H、烷基、烯基、炔基、羧基、酰基、芳香基或杂环基)、磺酰基、有机连接基, 或其组合。本文所述有机连接基可以是化学式的任何两个片段, 如 L、R¹、Q、Rg 或 Cg 连接在一起的二价有机连接基。二价有机连接基的一些非限制性例子包括羰基、亚烷基、亚芳基、二价杂环基, 以及它们的组合。二价有机连接基的另一个非限制性例子包括 -(CH₂)_m- 基团, 其中 m 是 1-50 的整数 (包括端点), 且所述一个或多个亚甲基可任选被以下基团取代: O、S、N、C、B、Si、P、C=O、O=S=O、杂环基、芳香基、NR_a、CR_b、CR_cR_d、SiR_eR_f、BR_g 或 P(=O)R_h, 其中 R_a、R_b、R_c、R_d、R_e、R_f、R_g 和 R_h 各自独立为: 键, H, 羟基, 硫醇基, 羧基, 氨基, 卤素, 酰基, 烷氧基, 烷基硫烷基, 烯基如乙烯基、烯丙基和 2-苯基乙烯基, 炔基, 杂环基, 芳香基, 环状基团如环烷基、杂环基和苯并基的一部分, 或烷基, 所述烷基中的一个或多个氢任选被芳香基、羟基、硫

醇基、羧基、氨基或卤素替代。亚胺基的非限制性例子包括 NR 基团,其中 R 是 H、烷基、烯基、炔基、酰基、芳香基和杂环基。

[0263] 在某些实施方式中,有机连接基可以是 3 价或更高价的,因此可将化学式的任意三个或更多片段,如 L、R¹、Q、R_g 或 C_g 连接在一起。3 价有机连接基的非限制性例子包括用 CR_b 基团替代 -(CH₂)_m- 中的亚甲基而得到的三价有机连接基。4 价有机连接基的另一个非限制性例子是用碳原子替代 -(CH₂)_m- 中的亚甲基而得到的四价有机连接基。3 价有机连接基的另一个非限制性例子包括用 N、P 或 B 替代 -(CH₂)_m- 中的亚甲基而得到的三价有机连接基。4 价有机连接基的另一个非限制性例子是用两个 CR_b 基团替代 -(CH₂)_m- 中的两个亚甲基而得到的四价有机连接基。基于本发明的内容,本领域技术人员可用至少一个 3 价或更高价的原子或基团替代 -(CH₂)_m- 中的至少一个亚甲基而形成 2 价以上的有机连接基,所述原子或基团如 N、P、B、C、Si、CR_b 基团、2 价以上的芳香基以及 2 价以上的杂环基。

[0264] 在感兴趣的其他实施方式中,有机连接基可包含至少一个不饱和键,如 -CR_b = N- 键、双键或三键。具有双键的有机连接基的非限制性例子是用两个 CR_b 基团替代 -(CH₂)_m- 中的两个相邻亚甲基而形成的不饱和有机连接基。双键位于两个相邻 CR_b 基团之间。具有三键的有机连接基的另一个非限制性例子是分别用两个碳原子替代 -(CH₂)_m- 中的两个相邻亚甲基而形成的不饱和有机连接基。三键位于两个相邻的碳原子之间。具有 -CR_b = N- 键的有机连接基的非限制性例子是用一个 CR_b 基团和一个 N 原子替代 -(CH₂)_m- 中的两个相邻亚甲基而形成的不饱和有机连接基。基于本发明的内容,本领域技术人员可以用选自下组的原子或基团分别单独替代 -(CH₂)_m- 中的至少一对相邻亚甲基而形成具有至少一个不饱和键的有机连接基:N、P、B、C、Si、CR_b 基团、2 价以上的芳香基以及 2 价以上的杂环基。

[0265] 在某些实施方式中,R'¹、R'²、R'³、R¹-R¹² 和 K²¹-K³⁶ 中的一个或多个被 -C_v-R_g 或 -C_v-C_g 基团独立取代。在其他实施方式中,Q、R'¹、R'²、R'³ 和 R¹¹-R¹² 中的一个或多个被 -C_v-R_g 或 -C_v-C_g 基团独立取代。

[0266] 具有反应基团 (R_g) 的发光猝灭化合物可包括许多含有或经修饰而含有至少一个对 R_g 基团具有适当反应性从而导致反应基团 (R_g) 发生化学连接 (表示为 -C_v-R_g) 的官能团的有机或无机物质。在一些实施方式中,反应基团 (R_g) 和官能团分别为亲电体和亲核体,从而可反应生成共价键。反应基团 (R_g) 和官能团在被偶联物 (C_g) 上发生偶联反应导致反应基团 (R_g) 中的一个或多个原子掺入连接物 C_v,C_v 将具有反应基团 (R_g) 的化合物连接于偶联物 (C_g)。反应基团 (R_g) 和代表性官能团的一些非限制性例子列于表 1。所述列表不表示化学反应性,因为通过选择合适的溶剂、共溶剂、化学计量比、温度、压力、反应时间、pH、催化剂等等,其他官能团也能与本文所述反应位点发生反应,而本文所述官能团也可能与其他反应位点发生反应。合适的反应基团 (R_g) 的一些非限制性例子包括:丙烯酰胺、酰基叠氮、酰卤、腈、醛、酮、烷基卤、烷基磺酸盐、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、亚胺酯、异硫氰酸酯、马来酰亚胺、磺酸酯或磺酰卤。

[0267] 表 1

[0268]

反应基团(亲电体)	官能团(亲核体)	得到的键
活性酯(琥珀酰亚胺基酯)	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
烷基磺酸盐	硫醇	硫醚
烷基磺酸盐	羧酸	酯
烷基磺酸盐	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	三唑
醇	酸衍生物	酯
胺	羧酸	酰胺
胺	卤化物	芳基胺
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-酰基脲或酸酐
	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
	亚胺酯	胺/苯胺	脒
[0269]	异硫氰酸酯	胺/苯胺	硫脲
	异硫氰酸酯	醇/酚	异氨基甲酸酯
	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

[0270] 本文所述发光猝灭化合物中的反应基团可用于制备带有适合将两者共价连接的官能团的任何被偶联物。合适的偶联物的一些非限制性例子包括抗原、类固醇、维生素、药物、半抗原、代谢物、毒素、氨基酸、肽、核苷酸、寡核苷酸、核酸、碳水化合物、脂质等的偶联物。选择用来将本文所述发光猝灭化合物连接到被偶联物的反应基团时通常要考虑被偶联物上的官能团以及所需共价键的类型或长度。所述物质上通常存在的官能团的类型包括，但不限于：胺、硫醇、醇、酚、醛、酮、磷酸酯、咪唑、肼、羟胺或这些基团的组合。

[0271] 在一些实施方式中，被偶联物又偶联于一个或多个相同或不同的发光体。在其他实施方式中，能量从发光体转移到猝灭化合物，导致发光的显著猝灭。

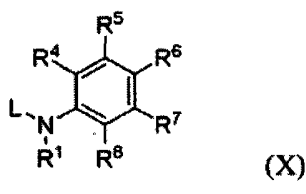
[0272] 已经详细记录了发光猝灭化合物的应用，但仅仅是作为被偶联物的热量标记，或用于荧光共振能量转移 (FRET) 技术。这种应用的一些非限制性例子描述于美国专利 6399392；以及《荧光探针和标记技术手册》(第 10 版, 分子探针公司, 2006), 其通过引用纳入本文。

[0273] 芳族胺化合物作为活性氧 / 活性氮的荧光探针

[0274] 在某些实施方式中，具有式 (I) 的芳族胺化合物可用作荧光探针化合物或荧光探针组合物。所述荧光探针化合物可用作活性氧 (ROS) 或活性氮 (RNS)，如 $^1\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 NO 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 、 OCl^- 、 ONOO^- 和烷基过氧化氢自由基 ($\text{ROO}\cdot$) 的荧光探针。在一些实施方式中，式 (I) 的 Q 是取代的苯基，它可被某些 ROS 或 RNS 氧化切开从而从相应的具有强发光或荧光特性的 L-NHR^1 发光体释放。

[0275] 在一些实施方式中，荧光探针化合物具有式 (X)：

[0276]



[0277] 其中, L、R¹ 和 R⁴-R⁸ 如本文所述。在一些实施方式中, L 是荧光团。在其他实施方式中, L 具有本文所述的式 (II)-(VI)、(XX)、(XXI)、(Va)-(Vd)、(VIa)-(VIb)、(XXa)-(XXb)、(XXIa)-(XXIb) 和 (a)-(v) 之一。

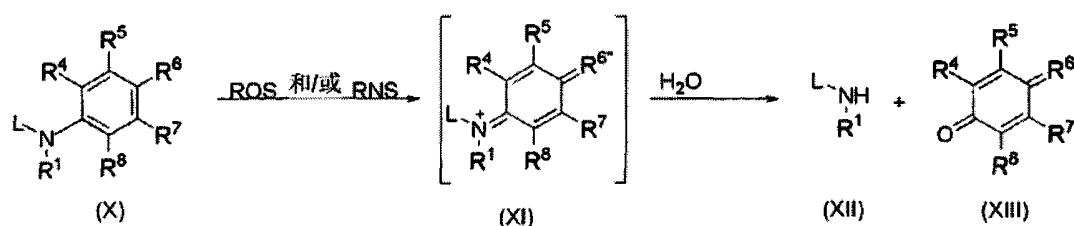
[0278] 在某些实施方式中, R¹ 和 R⁴ 一起或者 R¹ 和 R⁸ 一起形成与式 (X) 的苯环稠合的 5- 或 6- 或 7- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环的一部分。

[0279] 在一些实施方式中, R⁴-R⁸ 各自是 H。在一些实施方式中, R⁴、R⁵、R⁷ 和 R⁸ 各自是 H; 且 R⁶ 是 H、羟基、甲氧基、三氟甲基羰基乙基、甲氧基羰基烷基或甲氧基甲氧基。

[0280] 通常, 本文所述式 (X) 的荧光探针可与活性氧和 / 或活性氮反应形成四取代的铵 (XI), 铵 (XI) 水解形成 L- 衍生的荧光团 (XII) 和醌型副产品 (XIII)。这种常规反应示于下面的方案 1, 其中 L、R¹ 和 R⁴-R⁸ 如本文所述, R^{6''} 是将 R⁶ 中的氢或单价基团如烷基除去而从 R⁶ 衍生出的。

[0281] 方案 1

[0282]



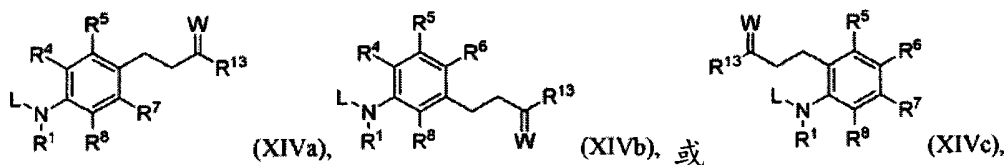
[0283] 在一些实施方式中, 本文所述式 (X) 的荧光探针以远高于其他物质的产率仅与一种或两种或三种类型的活性氧或活性氮反应形成式 (X) 的荧光团。在某些实施方式中, 式 (X) 的荧光探针以高于任何其他 ROS 和 RNS 的产率与过氧亚硝酸盐、次氯酸盐或羟基自由基反应。在其他实施方式中, 式 (X) 的荧光探针以高于任何其他 ROS 和 RNS 的产率与过氧亚硝酸盐反应。在进一步的实施方式中, 式 (X) 的荧光探针以高于任何其他 ROS 和 RNS 的产率与次氯酸盐反应。再在进一步的实施方式中, 式 (X) 的荧光探针以高于任何其他 ROS 和 RNS 的产率与羟基自由基反应。

[0284] 在某些实施方式中, 式 (X) 的荧光探针以高于任何其他 ROS 或 RNS 约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25%、约 30%、约 35%、约 40%、约 45%、约 50%、约 55%、约 60%、约 65%、约 70%、约 75%、约 80%、约 85%、约 90% 或约 95% 的产率与过氧亚硝酸盐、次氯酸盐或羟基自由基反应。

[0285] 本发明提供的荧光探针可用来特异性地检测过氧亚硝酸盐。在一些实施方式中, 式 (X) 的 R⁴、R⁵、R⁶、R⁷ 和 R⁸ 中至少一个是 -CH₂CH₂C(=W)R¹³, 其中, R¹³ 是选自下组的吸电子基: CF₃、卤素取代的低级烷基 (例如, CF_nH_{3-n}, 其中 n 是 1、2 或 3)、-O-V¹, 或 (C=O)-O-V², 其中, V¹ 和 V² 是选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基或芳基烷基的基团。

[0286] 在某些实施方式中, 本文所述荧光探针具有式 (XIVa)、(XIVb) 或 (XIVc):

[0287]

[0288] 其中, L、R¹、R⁴、R⁵、R⁷、R⁸ 如本文所定义;

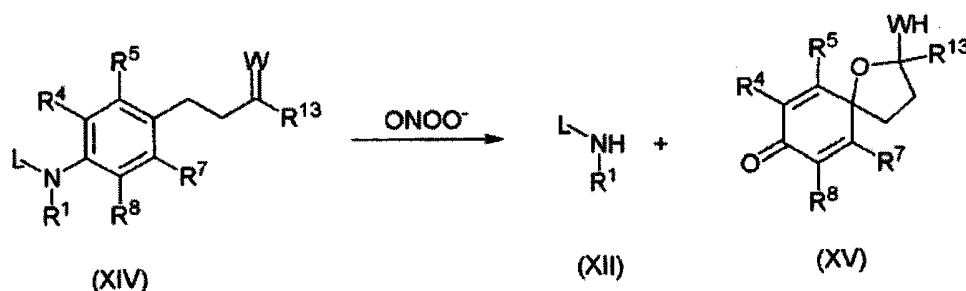
[0289] W 是 O 或 S; 和

[0290] R¹³ 是选自下组的吸电子基: CF₃、卤素取代的低级烷基(例如, CF_nH_{3-n}, 其中 n 是 1、2 或 3)、-O-V¹, 或 (C=O)-O-V², 其中, V¹ 和 V² 是选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基或芳基烷基的基团。[0291] 在一些实施方式中, W 是 O。在其他实施方式中, R¹³ 是 CF₃。在进一步的实施方式中, R¹ 是甲基。在进一步的实施方式中, W 是 O; R¹³ 是 CF₃; R⁴、R⁵、R⁷ 和 R⁸ 各自是 H; R¹ 是甲基。

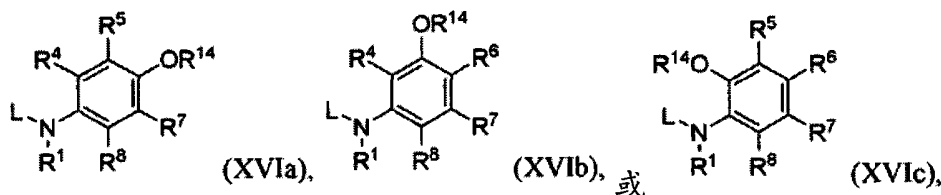
[0292] 在某些实施方式中, 式 (XIV) 的荧光探针与过氧亚硝酸盐特异性反应形成二环氧乙烷(dioxirane) 中间体, 该中间体随后将式 (XIV) 的苯环氧化从而造成 C-N 键断裂并因此释放 L 衍生物 (XII), 如下面的方案 2 所示。L 衍生物 (XII) 在激发时可发出强荧光信号。

[0293] 方案 2

[0294]

[0295] 本文所述荧光探针可用来以高敏感性检测过氧亚硝酸盐。在一些实施方式中, 式 (X) 的荧光探针中 R⁴、R⁵、R⁶、R⁷ 和 R⁸ 中的至少一个是 OR¹⁴, 其中 R¹⁴ 是 H、烷基、烷氧基烷基、烷酰基或聚醚。在其他实施方式中, 本发明提供的荧光探针具有式 (XVIa)、(XVIb) 或 (XVIc):

[0296]

[0297] 其中, L、R¹、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷ 和 R⁸ 如本文所述; 和[0298] R¹⁴ 是 H、烷基、烷氧基烷基、烷酰基或聚醚。[0299] 在一些实施方式中, R⁵ 和 R¹⁴ 一起或者 R⁷ 和 R¹⁴ 一起形成与式 (XVIa) 的苯环稠合的 5- 或 6- 或 7- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。在其他实施方式中, R⁴ 和 R¹⁴ 一起或者 R⁶ 和 R¹⁴ 一起形成与式 (XVIb) 的苯环稠合的 5- 或 6- 或 7- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。在进一步的实施方式中, R⁵ 和 R¹⁴ 一起形成与式 (XVIc) 的苯环稠合的 5- 或 6- 或

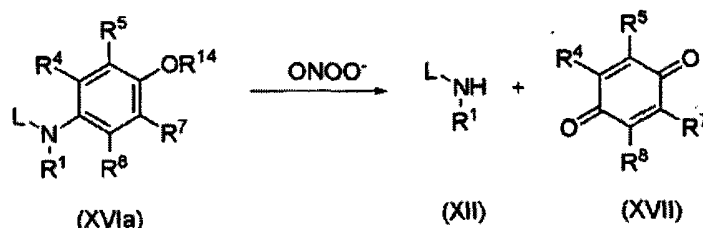
7-元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。

[0300] 在某些实施方式中,式 (XVIa) 的 R^4 、 R^5 、 R^7 、 R^8 和 R^{14} 各自是 H;且 R^1 是甲基。在其他实施方式中,式 (XVIb) 的 R^4 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^{14} 各自是 H;且 R^1 是甲基。在进一步的实施方式中,式 (XVIc) 的 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 和 R^{14} 各自是 H;且 R^1 是甲基。

[0301] 在一些实施方式中,式 (XVIa) 的荧光探针与过氧亚硝酸盐特异性地充分反应形成二环氧乙烷中间体,该中间体随后将式 (XVIa) 的苯环氧化从而造成 C-N 键断裂并因此释放 L 衍生物 (XII),如下面的方案 3 所示。L 衍生物 (XII) 在激发时可发出强荧光信号。

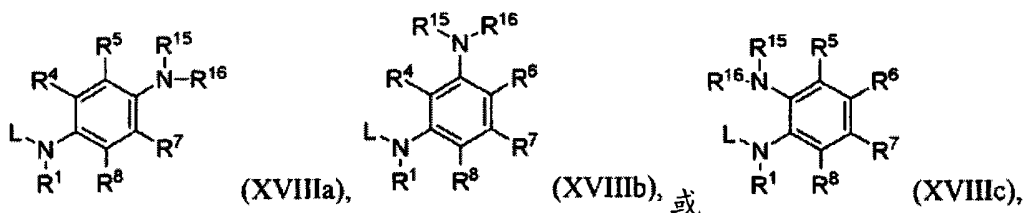
[0302] 方案 3

[0303]



[0304] 本文所述荧光探针可用来以高敏感性检测次氯酸盐。在一些实施方式中,式 (X) 的荧光探针中 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 中至少一个是 $NR^{15}R^{16}$,其中 R^{15} 和 R^{16} 各自是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、芳酰基或聚醚。在其他实施方式中,本发明提供的荧光探针具有式 (XVIIIa)、(XVIIIb) 或 (XVIIIc) :

[0305]



[0306] 其中, L、 R^1 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 如本文所述;且

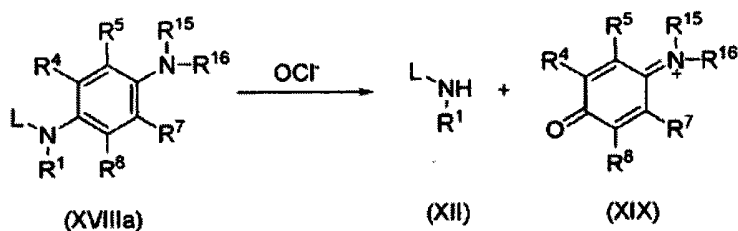
[0307] R^{15} 和 R^{16} 各自独立是 H、烷基、烯基、炔基、烷氧基烷基、烷酰基、烯酰基、炔酰基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、烷芳基、芳基烷基、芳酰基或聚醚。

[0308] 在一些实施方式中, R^5 和 R^{15} 一起或者 R^7 和 R^{16} 一起形成与式 (XVIIIa) 的苯环稠合的 5- 或 6- 或 7- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。在其他实施方式中, R^4 和 R^{15} 一起或者 R^6 和 R^{16} 一起形成与式 (XVIIIb) 的苯环稠合的 5- 或 6- 或 7- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。在进一步的实施方式中, R^5 和 R^{15} 一起形成与式 (XVIIIc) 的苯环稠合的 5- 或 6- 或 7- 元环烷基、杂环基、芳基或杂芳基环。

[0309] 在一些实施方式中,式 (XVIIIa) 的荧光探针与次氯酸盐特异性地充分反应造成 C-N 键断裂并因此释放 L 衍生物 (XII),如下面的方案 4 所示。L 衍生物 (XII) 在激发时可发出强荧光信号。

[0310] 方案 4

[0311]



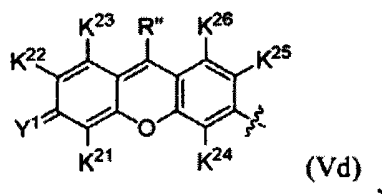
[0312] 在某些实施方式中,式 (XVIIIa) 的 R^4 、 R^5 、 R^7 和 R^8 各自是 H; R^1 是甲基,且 R^{15} 和 R^{16} 各自独立是 H 或甲基。在某些实施方式中,式 (XVIIIb) 的 R^4 、 R^6 、 R^7 和 R^8 各自是 H; R^1 是甲基;且 R^{15} 和 R^{16} 各自独立是 H 或甲基。在某些实施方式中,式 (XVIIIc) 的 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 各自是 H; R^1 是甲基;且 R^{15} 和 R^{16} 各自独立是 H 或甲基。

[0313] 本文所述活性氧和 / 或活性氮的荧光探针包括罗多尔、罗丹明、试卤灵以及萘并荧光素荧光团。在一些实施方式中,本文所述化合物或过氧亚硝酸盐探针或次氯酸盐探针基本没有荧光。在其他实施方式中,本文所述化合物或过氧亚硝酸盐探针或次氯酸盐探针可以在生理条件下与过氧亚硝酸盐或次氯酸盐有效反应产生强荧光信号。在进一步的实施方式中,过氧亚硝酸盐或次氯酸盐的量可以通过测量氧化探针的荧光信号高特异性和高选择性地检测。

[0314] 在一些实施方式中,式 (I) 的荧光探针中的 L 可以是熟练技术人员已知的任何荧光团。在其他实施方式中, L 衍生自罗多尔、罗丹明、试卤灵、萘并荧光素、半萘并荧光素或其衍生物。

[0315] 在一些实施方式中, L 衍生自罗多尔、罗丹明或其衍生物,其中, L 具有式 (Vd) :

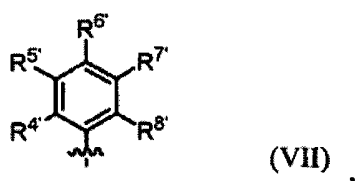
[0316]



[0317] 其中, Y^1 和 K^{21} - K^{26} 如本文所述。

[0318] 在一些实施方式中,式 (Vd) 的 R'' 是具有式 (VII) 的取代或未取代的苯基 :

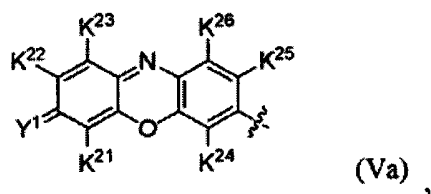
[0319]



[0320] 其中, $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 如本文所述。在某些实施方式中,式 (VII) 的 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 中的一个或多个是卤代烷基。在其他实施方式中,式 (VII) 的 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 中的一个或多个是氯甲基,它可与细胞中的硫醚基反应从而将荧光探针保持在细胞内并避免泄漏。在其他实施方式中,式 (VII) 的 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 中的至少一个与细胞器定位部分如三苯基膦 (triphenylphosphonium) 相连。在进一步的实施方式中,式 (VII) 的 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 和 $R^{7'}$ 各自是 H; $R^{8'}$ 是 $-\text{COOH}$ 、甲基或甲氧基。

[0321] 在某些实施方式中, L 衍生自试卤灵或其衍生物,并具有式 (Va) :

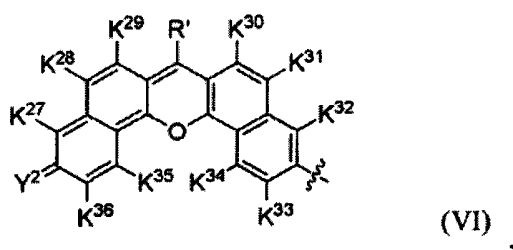
[0322]



[0323] 其中, Y^1 和 K^{21} - K^{26} 如本文所述。在一些实施方式中, Y^1 是 0。在其他实施方式中, Y 是 N^+R^2, R^3 。在进一步的实施方式中, 式 (Va) 的 K^{21} - K^{26} 各自独立是 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、磺酸酯或磷酸酯。在其他实施方式中, K^{21} - K^{26} 各自是 H。在其他实施方式中, K^{22} 和 K^{25} 各自独立为氯或氟。

[0324] 在一些实施方式中, L 衍生自萘并荧光素或其衍生物, 并具有式 (VI) :

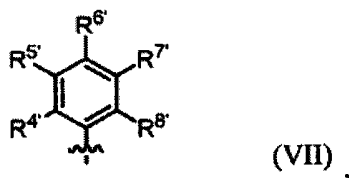
[0325]



[0326] 其中, Y 和 K^{27} - K^{36} 如本文所述。在其他实施方式中, Y 是 N^+R^2, R^3 , 其中, R^2 和 R^3 如本文所述。在进一步的实施方式中, Y^2 是 0。

[0327] 在一些实施方式中, R' 是式 (VII) 的取代或未取代的苯基 :

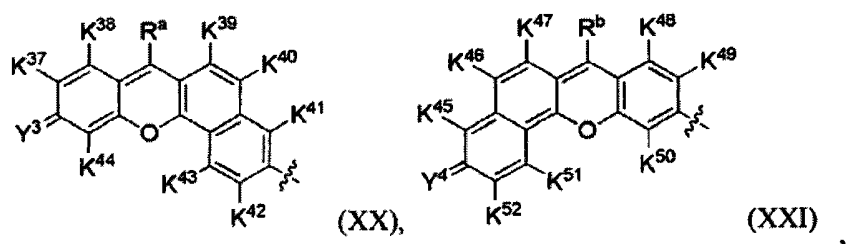
[0328]



[0329] 其中, R^4, R^5, R^6, R^7 和 R^8 如本文所述。在一些实施方式中, 式 (VII) 的 R^4 或 R^8 是 $-COOH$ 。在进一步的实施方式中, 式 (VII) 的 R^4, R^5, R^6 和 R^7 各自是 H; 且 R^8 是 $-COOH$ 、甲基或甲氧基。

[0330] 在一些实施方式中, L 衍生自半萘并荧光素或其衍生物, 并具有式 (XX) 或 (XXI) :

[0331]

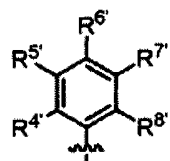


[0332] 其中, Y^3, Y^4 和 K^{37} - K^{52} 如本文所述。在其他实施方式中, Y^3 和 Y^4 各自独立为 N^+R^2, R^3 , 其中, R^2 和 R^3 如本文所述。在进一步的实施方式中, Y^3 和 Y^4 各自是 0。在一些实施方式

中, K^{37} 是氯或氟。在一些实施方式中, K^{45} 和 K^{52} 中至少一个是氯或氟。

[0333] 在一些实施方式中, R^a 或 R^b 是具有式 (VII) 的取代或未取代的苯基:

[0334]

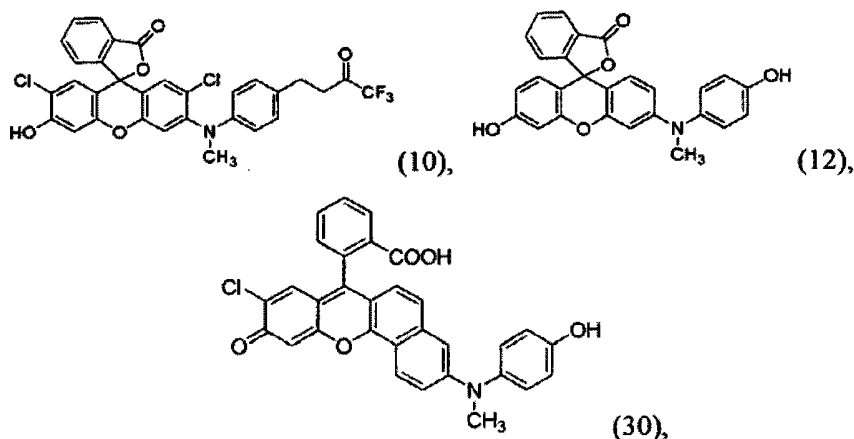


(VII)

[0335] 其中, $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 、 $R^{7'}$ 和 $R^{8'}$ 如本文所述。在一些实施方式中, 式 (VII) 的 $R^{4'}$ 或 $R^{8'}$ 是 $-COOH$ 。在进一步的实施方式中, 式 (VII) 的 $R^{4'}$ 、 $R^{5'}$ 、 $R^{6'}$ 和 $R^{7'}$ 各自是 H; 而 $R^{8'}$ 是 $-COOH$ 、甲基或甲氧基。

[0336] 在某些实施方式中, 荧光探针组合物可用于测量、检测或筛选过氧亚硝酸盐, 其中, 荧光探针组合物包含本文所述芳族胺化合物。在某些实施方式中, 芳族胺化合物是化合物 (10)、化合物 (12) 或化合物 (30):

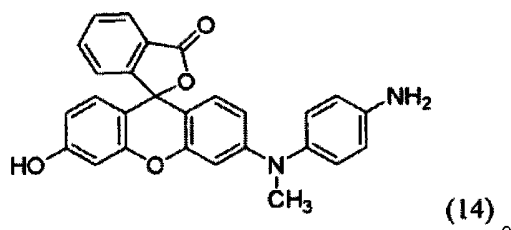
[0337]



[0338] 或其互变异构体, 或其组合。

[0339] 在一些实施方式中, 荧光探针组合物可用于测量、检测或筛选次氯酸盐, 其中, 荧光探针组合物包含本文所述芳族胺化合物。在某些实施方式中, 芳族胺化合物是化合物 (14) 或其互变异构体:

[0340]



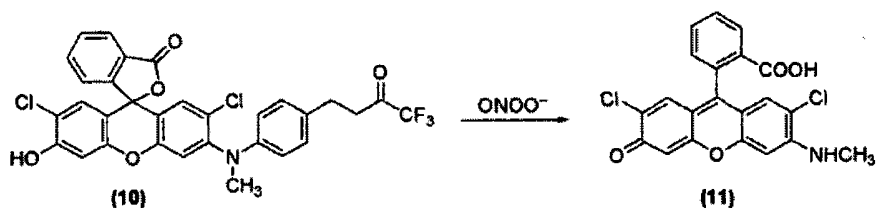
(14)

[0341] 在某些实施方式中, 本文所述荧光探针组合物还包含溶剂、酸、碱、缓冲液或其组合。

[0342] 在一些实施方式中, 芳族胺化合物是化合物 (10), 其与 $ONOO^-$ 反应形成具有强荧光特性的化合物 (11), 如下面的方案 5 所示。显示化合物 10 在不同波长下响应不同浓度 $ONOO^-$ 时的荧光强度的荧光光谱示于图 1-2。化合物 10 响应不同 ROS 和 RNS 的荧光强度示于图 3。

[0343] 方案 5

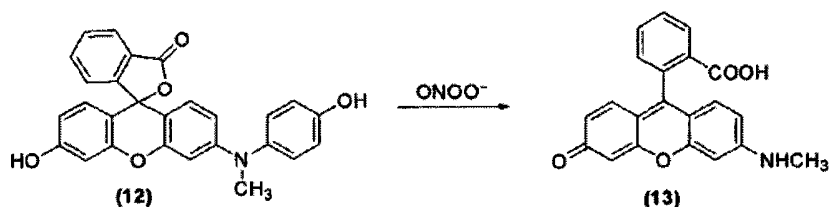
[0344]



[0345] 在其他实施方式中,芳族胺化合物是化合物(12),其与 ONOO^- 反应形成具有强荧光特性的化合物(13),如下面的方案6所示。显示化合物12在不同波长下响应不同浓度 ONOO^- 时的荧光强度的荧光光谱示于图4。化合物12响应不同 ROS 和 RNS 的荧光强度示于图5。

[0346] 方案 6

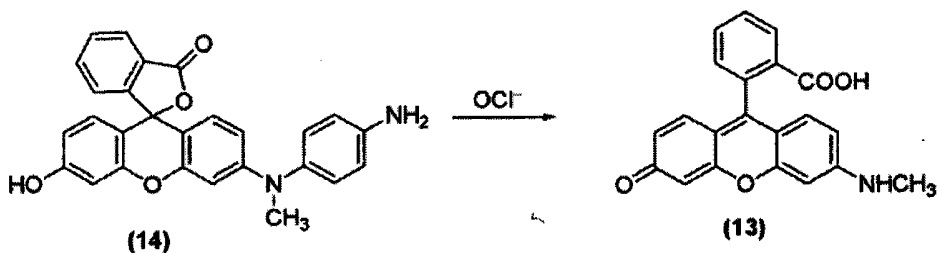
[0347]



[0348] 在进一步的实施方式中,芳族胺化合物是化合物(14),其与 OCl^- 反应形成具有强荧光特性的化合物(13),如下面的方案7所示。显示化合物14在不同波长下响应不同浓度 OCl^- 时的荧光强度的荧光光谱示于图6。化合物14响应不同 ROS 和 RNS 的荧光强度示于图7。

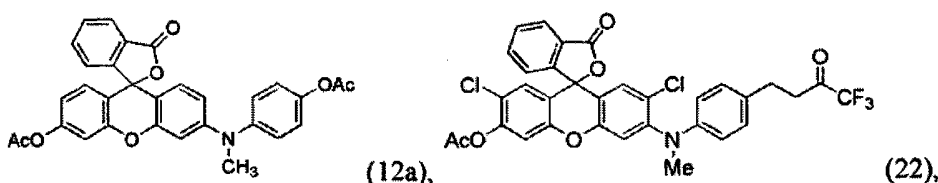
[0349] 方案 7

[0350]



[0351] 在一些实施方式中,用于测量、检测或筛选过氧亚硝酸盐的荧光探针组合物包含化合物(22)、化合物(12a)或其组合。化合物(22)和化合物(12a)各自分别为化合物(10)和化合物(12)的酯衍生物。在某些实施方式中,化合物(22)和化合物(12a)提供了理想的细胞膜通透性。

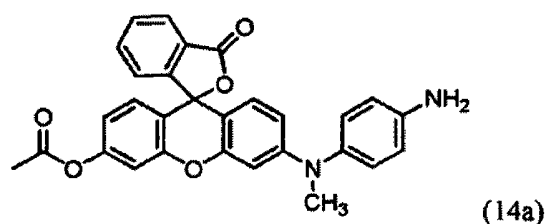
[0352]



[0353] 在一些实施方式中,用于测量、检测或筛选次氯酸/次氯酸盐的荧光探针组合物包含化合物(14a),其为化合物(14)的酯衍生物。化合物(14a)提供了理想的细胞膜通透

性。

[0354]



[0355] 在某些实施方式中,本文所述荧光探针组合物包含本文所述荧光探针化合物的乙酸酯或乙氧基甲基 (AM) 酯衍生物。这些荧光探针化合物的中性形式有利于细胞膜通透性。

[0356] 在某些实施方式中,本文所述荧光探针组合物还包括溶剂、酸、碱、缓冲液或其组合。

[0357] 本发明还提供了用于直接或间接测量化学或生物样品,如微生物或者动物的细胞或组织中的过氧亚硝酸盐或次氯酸盐的试剂组合物。所述试剂组合物包含本文所述荧光探针。在一些实施方式中,试剂组合物还包含溶剂、酸、碱、缓冲液或其组合。

[0358] 本发明还提供了测量样品中的过氧亚硝酸盐或次氯酸盐的方法。在一些实施方式中,该方法包括以下步骤:(a) 使本文所述荧光探针接触样品以形成荧光化合物;和 (b) 测量所述荧光化合物的荧光特性。在一些实施方式中,荧光特性是采用本文所述方法或本领域技术人员已知的任何方法测量的。在其他实施方式中,所述样品是化学样品或生物样品。在进一步的实施方式中,所述样品是包括微生物或者动物细胞或组织在内的生物样品。

[0359] 本发明还提供了检测样品中的过氧亚硝酸盐或次氯酸盐的高通量筛选荧光方法。在一些实施方式中,所述高通量筛选荧光包括以下步骤:(a) 使本文所述荧光探针接触样品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特性。在其他实施方式中,荧光特性是采用本文所述方法或本领域技术人员已知的任何方法测量的。

[0360] 本发明还提供了筛选一种或多种能升高或降低过氧亚硝酸盐或次氯酸盐水平的目标化合物的高通量方法。在一些实施方式中,所述高通量该方法包括以下步骤:(a) 使本文所述荧光探针接触目标化合物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特性以定性或定量地确定所述目标化合物。在其他实施方式中,荧光特性是采用本文所述方法或本领域技术人员已知的任何方法测量的。

[0361] 在一些实施方式中,在本文所述高通量方法中可使用信息系统。在其他实施方式中,信息系统为用于高通量方法的物理装置提供软件控制。在其他实施方式中,信息系统组织高通量方法生成的电子数据。在进一步的实施方式中,信息系统储存高通量方法生成的电子数据。

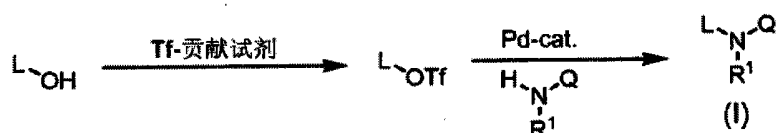
[0362] 通用合成过程

[0363] 本文所述芳族胺化合物或荧光探针可由本领域技术人员通过已知的有机合成方法以及本文所述的各种通用或具体合成过程来合成。

[0364] 通常,合成芳族胺化合物的关键步骤包括羟基活化步骤,一般采用三氟甲磺酸酯,以及随后的胺化步骤,如下面的方案 8 所示。

[0365] 方案 8

[0366]



[0367] 其中, L、R¹ 和 Q 如本文所述; Tf 是三氟甲磺酰基 (triflyl), Pd-cat 是形成 C-N 键的钯-配体催化体系。首先, 使发光体 (L-OH) 与三氟甲磺酰基-贡献试剂如三氟甲磺酸酐反应形成三氟甲磺酸酯基团从而将 OH 基团激活。然后在存在催化剂如 Pd 催化剂时使三氟甲磺酸酯基团与式 HNR¹Q 的胺交叉偶联形成式 (I) 的芳族胺化合物。

[0368] 合适的合成方法的一些非限制性例子可在 2008 年 4 月 3 日提交的美国专利申请号 61/041923 中找到, 该专利通过引用纳入本文。

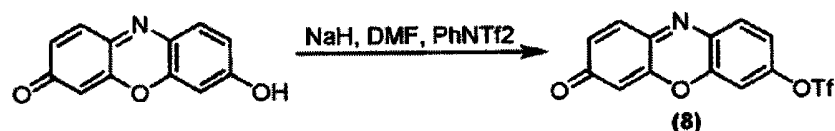
实施例

[0369] 下面的实施例 1-13 和图 1-11 详细描述了本发明所述目的化合物的制造和使用方法。详细描述落入构成本说明书一部分的本文所述合成方案或合成过程的范围, 并作为示例。这些实施例、图和方案仅是列举, 并不构成对本发明范围的限制。

[0370] 实施例 1- 化合物 1-4 的合成方案

[0371] 合成化合物 8

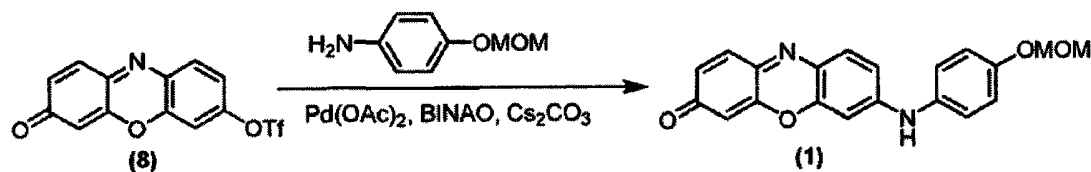
[0372]



[0373] 0°C 下向试卤灵 (2.13g, 10mmol) 的 50mL 无水二甲基甲酰胺溶液中加入氢化钠 (437mg, 11mmol, 60% 矿物油分散体)。在 0°C 搅拌半小时后在溶液中加入 N- 苯基双-三氟甲烷磺酰胺 (4.3g, 12mmol)。所得混合物室温搅拌过夜, 然后用水猝灭。之后在混合物中加入 1N 盐酸以将溶液酸化至 pH 2。然后加入乙酸乙酯。将有机层分离并用盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥并真空蒸发。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 8。

[0374] 合成化合物 1

[0375]



[0376] 在烘干的 Schlenk 管中加入乙酸钯 (II) (2mg, 1% mmol), 2,2'-双(二苯基膦)-1,1'-二萘基 (BINAP) (9mg, 1.5% mmol) 和碳酸铯 (Cs₂CO₃) (91mg, 0.28mmol), 并用氩气吹扫 5 分钟。加入化合物 8 (69mg, 0.2mmol) 和 4-(甲氧基甲氧基)苯胺 (37mg, 0.24mmol) 的甲苯 (2mL) 溶液, 所得混合物先在氩气下室温搅拌 30 分钟, 然后在 100°C 搅拌 20 小时。将反应混合物冷却至室温, 用二氯甲烷稀释并通过硅藻土垫过滤。滤饼用 10mL 二氯甲烷洗涤三次。然后浓缩滤液并将残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 1。

[0377] 合成化合物 2

[0378]



[0379] 0℃下将三氟乙酸(1mL)逐滴加入到化合物1(35mg,0.1mmol)的无水二氯甲烷(1mL)溶液中。所得溶液室温搅拌直到薄层层析显示所有原料都被消耗。混合物然后真空浓缩并与甲苯共沸三次。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物2。

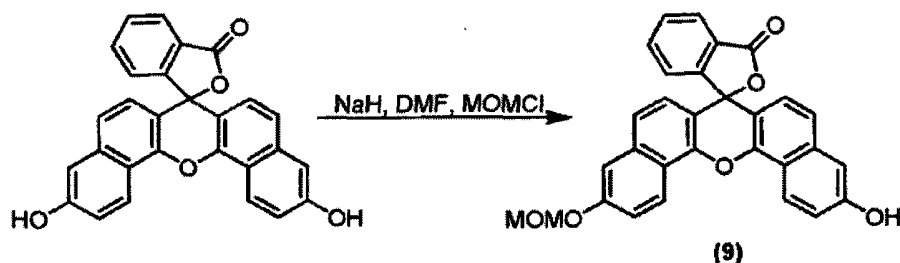
[0380] 合成化合物3和4

[0381] 化合物3和4可通过与化合物1和2类似的方案合成,包括三氟甲磺酸化反应和随后的胺化反应。

[0382] 实施例2-化合物5-7的合成方案

[0383] 合成化合物9

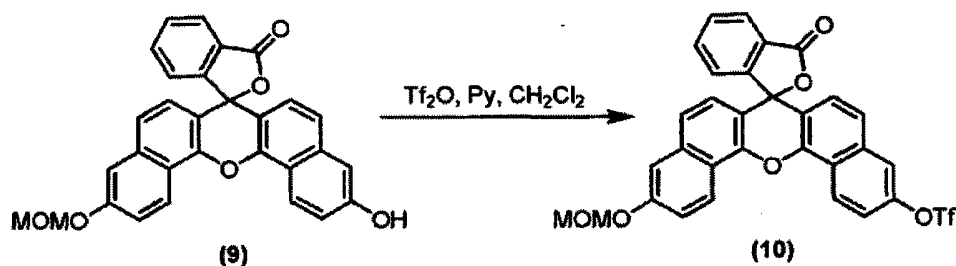
[0384]



[0385] 0℃向萘并荧光素(4.3g,10mmol)的50mL无水二甲基甲酰胺溶液中加入氢化钠(437mg,11mmol,60%矿物油分散体)。在0℃搅拌半小时,然后向溶液中加入甲氧基甲基氯(MOMCl)(0.76mL,10mmol)。所得混合物室温搅拌过夜,然后用水猝灭。之后在混合物中加入1N盐酸以将溶液酸化至pH 2。然后加入乙酸乙酯。将有机层分离并用盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,真空蒸发。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物9。

[0386] 合成化合物10

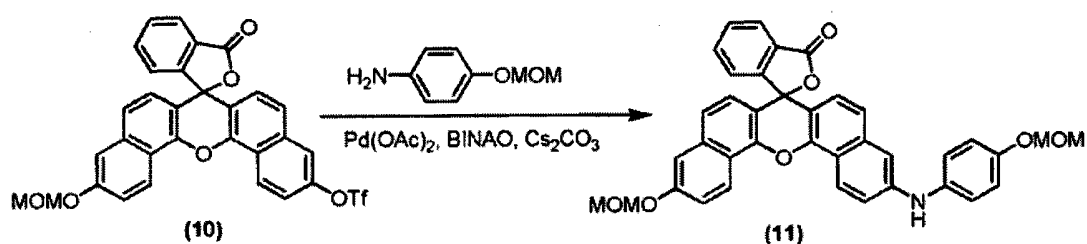
[0387]



[0388] 0℃氩气气氛下向化合物9(476mg,1mmol)和吡啶(0.32mL,4mmol)的无水二氯甲烷溶液中逐滴加入三氟甲烷磺酸酐(0.34mL,2mmol)。所得溶液室温搅拌2小时,然后用水猝灭。向混合物中加入二氯甲烷,并将有机层分离,用1N盐酸以及随后用水和盐水洗涤。有机层然后用无水硫酸钠干燥并浓缩。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物10。

[0389] 合成化合物11

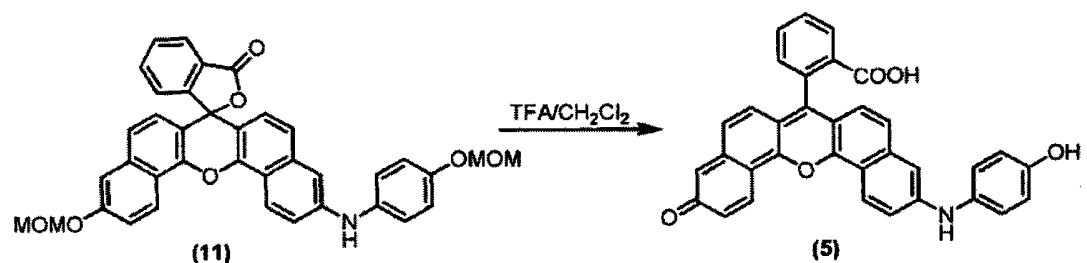
[0390]



[0391] 在烘干的 Schlenk 管中加入乙酸钯 (II) (2mg, 1% mmol), 2,2'-双(二苯基膦)-1,1'-二萘基 (BINAP) (9mg, 1.5% mmol) 和碳酸铯 (Cs_2CO_3) (91mg, 0.28mmol), 并用氩气吹扫 5 分钟。加入化合物 10 (122mg, 0.2mmol) 和 4-(甲氧基甲氧基)苯胺 (37mg, 0.24mmol) 的甲苯 (2mL) 溶液, 所得混合物先在氩气下室温搅拌 30 分钟, 然后在 100°C 搅拌 20 小时。将反应混合物冷却至室温, 用二氯甲烷稀释并通过硅藻土垫过滤。滤饼用 10mL 二氯甲烷洗涤三次。然后浓缩滤液, 残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 11。

[0392] 合成化合物 5

[0393]



[0394] 0°C 下向化合物 11 (61mg, 0.1mmol) 的无水二氯甲烷 (1mL) 溶液中逐滴加入三氟乙酸 (1mL)。所得溶液室温搅拌直到薄层层析显示所有原料都被消耗。混合物然后真空浓缩并与甲苯共沸三次。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 5。

[0395] 合成化合物 6 和 7

[0396] 化合物 6 和 7 可按照与化合物 5 类似的方案合成, 包括三氟甲磺酸化反应和随后的胺化反应。

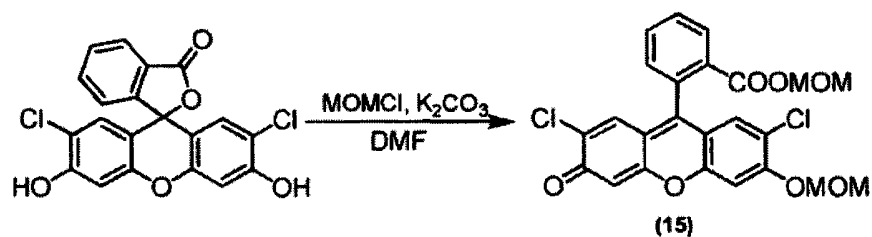
[0397] 实施例 3- 评价猝灭化合物的荧光

[0398] 将实施例 1 和 2 获得的化合物 1-7 各自溶于 DMF 至浓度为 10mM, 然后溶液用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释至 10 μM 。用日立 (Hitachi) F2500 荧光计将测量 10 μM 化合物溶液的荧光光谱, 将光电倍增管设置成 700V。激发和发射缝宽均为 2.5nm。在 600nm 激发波长下进行测量。结果表明, 化合物 1-7 的绝对荧光强度都小于 10。因此, 化合物 1-7 实际上都没有荧光。

[0399] 实施例 4- 化合物 10 的合成方案

[0400] 合成化合物 15

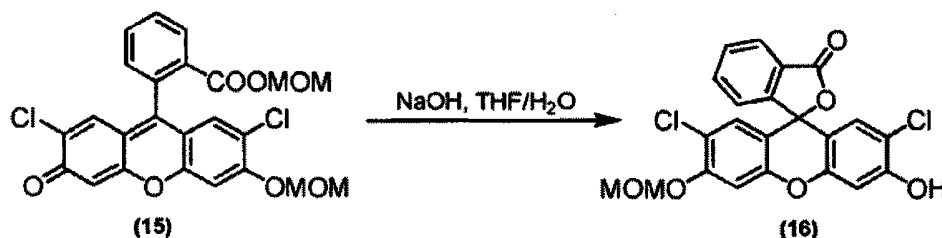
[0401]



[0402] 向 2,7-二氯荧光素 (1.0g, 2.5mmol) 和碳酸钾 (860mg, 6.2mmol) 的二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中加入氯甲基甲基醚 (0.57mL, 7.5mmol)。室温搅拌 3 小时后, 反应混合物用乙酸乙酯稀释, 然后用 1N 盐酸溶液、水和盐水洗涤。有机层用无水硫酸钠干燥并浓缩以得到化合物 15, 其为红色固体。

[0403] 合成化合物 16

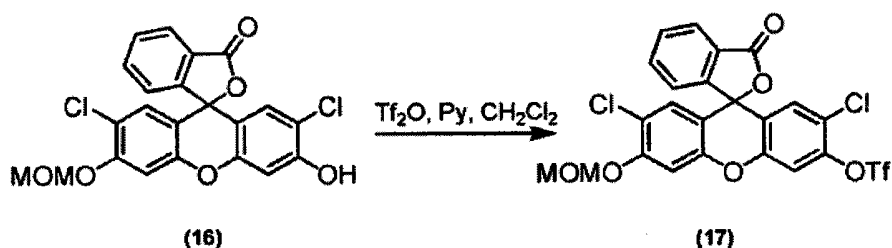
[0404]



[0405] 将化合物 15 的红色固体溶于含氢氧化钠 (3g, 7.5mmol) 的四氢呋喃 (30mL) 和水 (10mL) 的混合物。将溶液加热回流 1 小时。冷却至室温后, 反应溶液用 1N 盐酸中和至 pH 2, 然后用乙酸乙酯萃取。有机层用盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥并真空蒸发。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 16 (830mg, 75% 产率)。实施例 16 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 8.07 (d, $J = 6.7\text{Hz}$, 1H), 7.75–7.67 (m, 2H), 7.17 (d, $J = 7.0\text{Hz}$, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.73 (d, $J = 9.6\text{Hz}$, 2H), 6.44 (br, 1H), 5.33–5.28 (m, 2H), 3.53 (s, 3H); ^{13}C NMR (75.5MHz, CDCl_3) δ 169.2, 154.3, 153.4, 152.1, 151.0, 150.5, 135.6 (CH), 130.4 (CH), 128.7 (CH), 128.0 (CH), 126.2, 125.5 (CH), 123.9 (CH), 119.1, 116.3, 112.6, 112.0, 104.2 (CH), 104.1 (CH), 95.0 (CH_2), 82.5, 56.6 (CH_3); LRMS (EI) m/z (%) 444 (M^+ ; 5), 355 (100); $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{O}_6$ 的 HRMS (EI): 计算分子量为 444.0167, 实测分子量为 444.0170。

[0406] 合成化合物 17

[0407]

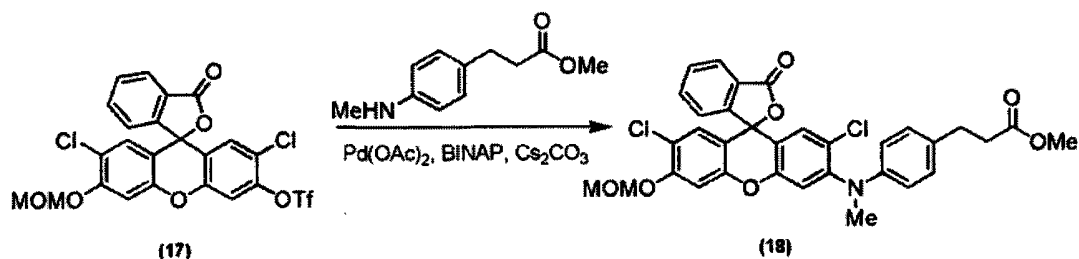


[0408] 0°C 氩气下向化合物 16 (830mg, 1.87mmol) 和吡啶 (0.6mL, 7.5mmol) 的无水二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 溶液中逐滴加入三氟甲烷磺酸酐 (0.63mL, 3.74mmol)。所得溶液室温搅拌 2 小时, 然后用水猝灭。将二氯甲烷加入混合物, 将有机层分离, 用 1N 盐酸以及随后用水和盐水洗涤。有机层然后用无水硫酸钠干燥并浓缩。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 17, 其为白色固体 (1.06g, 98% 产率)。化合物 17 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.09 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 1H), 7.79–7.70 (m, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.21–7.17 (m, 2H), 6.95 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 6.44 (br, 1H), 5.34–5.29 (m, 2H), 3.53 (s, 3H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 168.4, 154.6, 151.6, 150.0, 149.8, 146.1, 135.8 (CH), 130.7 (CH), 130.0 (CH), 128.6 (CH), 125.7 (CH), 123.7 (CH), 122.0, 120.4, 120.1, 119.9, 118.5 (q, $J_{\text{C-F}} = 319.0\text{Hz}$), 112.2 (CH), 112.0, 104.1 (CH), 95.1 (CH_2), 80.3, 56.5 (CH_3); ^{19}F NMR (377MHz,

CDCl_3) δ -73.1; LRMS (ET) m/z (%) 577 (M^+ ; 20), 400 (100); $\text{C}_{23}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{O}_8\text{S}$ 的 HRMS (EI): 计算分子量为 575.9660, 实测分子量为 575.9660。

[0409] 合成化合物 18

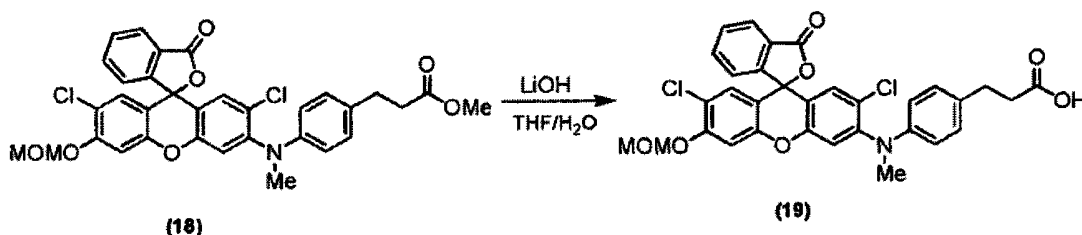
[0410]



[0411] 在烘干的 Schlenk 管中加入乙酸铯 (II) (6mg, 2.5% mmol), 2,2'-双(二苯基膦)-1,1'-二萘基 (BINAP) (24mg, 3.75% mmol) 和碳酸铯 (Cs_2CO_3) (228mg, 0.7mmol), 并用氩气吹扫 5 分钟。加入化合物 17 (289mg, 0.5mmol) 和 3-(4-(甲基氨基)苯基)丙酸甲酯 (1.16mg, 0.6mmol) 的甲苯 (5mL) 溶液。所得混合物先在氩气下室温搅拌 30 分钟, 然后在 100°C 搅拌 20 小时。将反应混合物冷却至室温, 用二氯甲烷稀释并通过硅藻土垫过滤。滤饼用 10mL 二氯甲烷洗涤三次。然后浓缩滤液, 残余物通过硅胶柱层析纯化以得到实施例 18 (264mg, 85% 产率)。化合物 18 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.08 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.77-7.67 (m, 2H), 7.23 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.06 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.67 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 5.30 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.26 (s, 3H), 2.88 (t, $J = 7.8\text{Hz}$, 2H), 2.59 (t, $J = 7.8\text{Hz}$, 2H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 173.4, 168.7, 154.4, 151.9, 150.5, 150.4, 148.1, 146.6, 135.5, 131.7, 130.4, 129.6, 128.9, 128.7, 127.1, 126.2, 125.5, 123.9, 119.1, 116.6, 116.2, 116.1, 112.5, 104.1, 95.0, 81.4, 56.5, 51.5, 39.8, 35.9, 30.0; LRMS (EI) m/z (%) 619 (M^+ , 9), 540 (42), 136 (100); $\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{NO}_7$ 的 HRMS (EI): 计算分子量为 619.1165, 实测分子量为 619.1188。

[0412] 合成化合物 19

[0413]

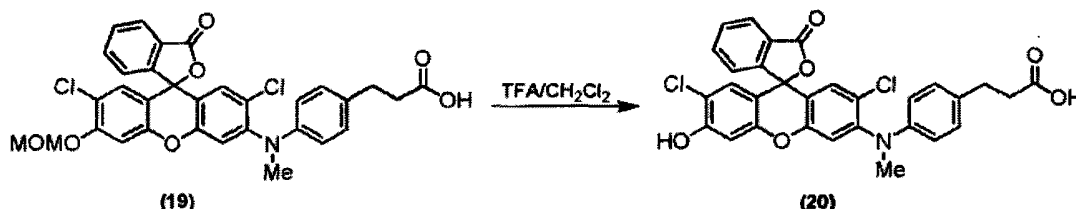


[0414] 0°C 下向化合物 18 (264mg, 0.43mmol) 的四氢呋喃 (6mL) 和水 (2mL) 溶液中加入氢氧化锂 (95mg, 2.2mmol)。反应混合物在 0°C 搅拌直到所有原料被消耗。之后用 1N 盐酸将混合物酸化。用氯化钠将溶液饱和并用 15mL 乙酸乙酯萃取三次。合并的有机层用无水硫酸钠干燥并浓缩。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 19 (237mg, 92% 产率)。实施例 19 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.08 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.77-7.68 (m, 2H), 7.23 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.07 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.67 (d, $J = 8.4\text{Hz}$, 2H), 5.29 (m, 2H), 3.51 (s, 3H), 3.26 (s, 3H), 2.88 (t, $J =$

7.5Hz, 2H), 2.64 (t, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 178.8, 168.8, 154.4, 151.9, 150.5, 150.4, 148.1, 146.6, 135.5, 131.3, 130.4, 129.6, 128.9, 128.7, 127.2, 126.2, 125.5, 123.9, 119.1, 116.6, 116.3, 116.0, 112.5, 104.1, 95.0, 81.5, 56.5, 39.8, 35.7, 29.7; LRMS (FAB) m/z (%) 607 ($\text{M}+\text{H}^+$, 8), 570 (35), 219 (100); $\text{C}_{32}\text{H}_{25}\text{ClNO}_7$ (M^+-Cl) 的 HRMS (EI): 计算分子量为 570.1320, 实测分子量为 570.1307。

[0415] 合成化合物 20

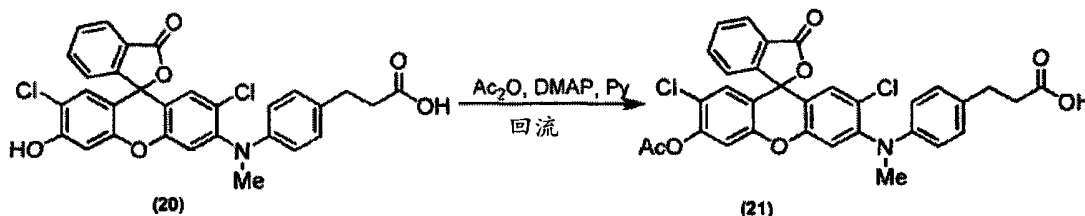
[0416]



[0417] 0°C 下向化合物 19 (237mg, 0.39mmol) 的无水二氯甲烷 (3mL) 溶液中逐滴加入三氟乙酸 (3mL)。所得溶液室温搅拌直到薄层层析显示所有原料都被消耗。混合物然后真空浓缩并与甲苯共沸三次以得到实施例 20 (250mg, 100%产率), 该物质无需任何进一步纯化直接用于下面的步骤。化合物 20 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.05 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.83-7.72 (m, 2H), 7.26 (d, $J = 7.6\text{Hz}$, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.05 (d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 6.84 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.65 (d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 3.24 (s, 3H), 2.81 (t, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 2.53 (t, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H)。

[0418] 合成化合物 21

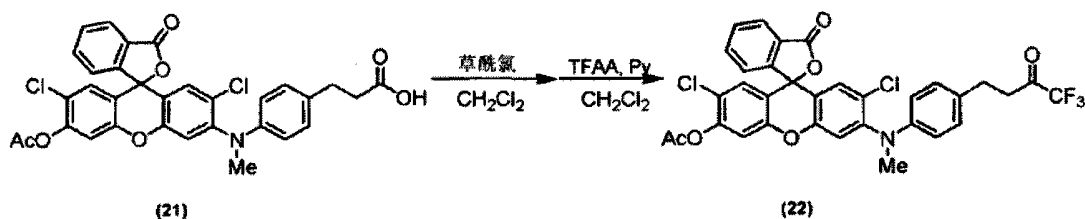
[0419]



[0420] 向化合物 20 (250mg, 0.39mmol) 的吡啶 (8mL) 溶液中加入乙酸酐 (3mL) 和 4-二甲基氨基吡啶 (DMAP) (10mg, 0.08mmol)。所得混合物加热回流 2 小时。然后反应混合物用水猝灭并用乙酸乙酯稀释。有机溶液用饱和碳酸氢钠 (NaHCO_3) 和盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥并浓缩。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 21 (172mg, 73%产率)。化合物 21 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 8.07 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.74-7.68 (m, 2H), 7.26 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.08 (d, $J = 8.3\text{Hz}$, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.68 (d, $J = 8.3\text{Hz}$, 2H), 3.26 (s, 3H), 2.89 (t, $J = 7.8\text{Hz}$, 2H), 2.64 (t, $J = 7.8\text{Hz}$, 2H), 2.37 (s, 3H); ^{13}C NMR (75.5MHz, CDCl_3) δ 178.0, 168.6, 168.0, 151.7, 150.2, 150.0, 148.4, 148.3, 146.6, 135.7 (CH), 131.5, 130.6 (CH), 129.6 (CH), 129.0 (CH), 128.9 (CH), 127.5, 126.0, 125.7 (CH), 124.0 (CH), 122.4, 117.8, 116.4, 116.3 (CH), 116.2 (CH), 112.7 (CH), 80.9, 39.9 (CH_3), 35.6 (CH_2), 29.8 (CH_2), 20.6 (CH_3); LRMS (EI) m/z (%) 569/568 (M^+-Cl , 10), 482 (40), 219 (100); $\text{C}_{32}\text{H}_{23}\text{ClNO}_7$ (M^+-Cl) 的 HRMS (EI): 计算分子量为 568.1163, 实测分子量为 568.1160。

[0421] 合成化合物 22

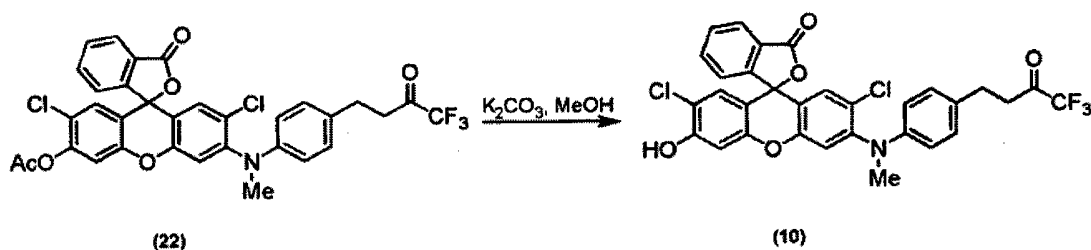
[0422]



[0423] 向化合物 21(172mg, 0.28mmol) 的无水二氯甲烷 (4mL) 溶液中加入草酰氯 (0.12mL, 1.4mmol) 并在室温搅拌 2 小时。然后减压蒸发掉溶剂和过量草酰氯。将所得酸性氯化物重溶于无水二氯甲烷 (10mL)。在 -40°C 氩气气氛下向上述溶液中连续加入三氟乙酸酐 (0.24mL, 1.7mmol) 和吡啶 (0.17mL, 2.2mmol)。使所得混合物缓慢升至 -20°C 并在该温度下搅拌 4 小时。之后通过缓慢加水 (5mL) 猝灭反应。混合物然后用二氯甲烷稀释, 用盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥并浓缩。所得残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 22(116mg, 63% 产率)。化合物 22 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 8.09(d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.79-7.69(m, 2H), 7.26(d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.19(s, 1H), 7.12(s, 1H), 7.05(d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 6.87(s, 1H), 6.85(s, 1H), 6.67(d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 3.27(s, 3H), 3.01(t, $J = 7.3\text{Hz}$, $0.85 \times 2\text{H}$, $-\text{COCF}_3$), 2.92(t, $J = 7.3\text{Hz}$, $0.85 \times 2\text{H}$, $-\text{COCF}_3$), 2.82(t, $J = 7.3\text{Hz}$, $0.15 \times 2\text{H}$, $-\text{C}(\text{OH})_2\text{CF}_3$), 2.37(s, 3H), 2.13(t, $J = 7.3\text{Hz}$, $0.15 \times 2\text{H}$, $-\text{C}(\text{OH})_2\text{CF}_3$); ^{13}C NMR(75.5MHz, CDCl_3) δ 190.5(q, $J = 35.2\text{Hz}$), 168.5, 167.9, 151.7, 150.3, 150.0, 148.4, 148.2, 146.9, 135.7, 130.6, 130.4, 129.7, 129.0, 128.9, 127.6, 126.0, 125.7, 124.0, 122.4, 1.17.8, 116.6, 1.16.5, 116.1, 115.8(q, $J_{\text{C-F}} = 297.7$), 112.7, 80.8, 39.8, 38.3, 27.5, 20.6; LRMS(EI) m/z (%) 656(M^+ , 17), 534(100); $\text{C}_{33}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{F}_3\text{NO}_6$ 的 HRMS(EI): 计算分子量为 655.0776, 实测分子量为 655.0783。

[0424] 合成化合物 10

[0425]



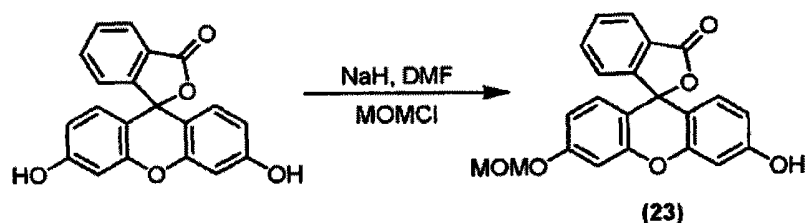
[0426] 向化合物 22(66mg, 0.1mmol) 的甲醇 (3mL) 溶液中加入碳酸钾 (41mg, 0.3mmol) 的水 (1mL) 溶液。室温搅拌 3 小时后将所得混合物用乙酸乙酯稀释, 用稀盐酸和盐水洗涤。有机溶液然后用无水硫酸钠干燥并浓缩。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 10(60mg, 98% 产率)。化合物 10 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 8.08(d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.79-7.69(m, 2H), 7.25(d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.18(s, 1H), 7.05(d, $J = 8.3\text{Hz}$, 2H), 6.92(s, 1H), 6.82(s, 1H), 6.74(s, 1H), 6.68(d, $J = 8.3\text{Hz}$, 2H), 3.26(s, 3H), 3.01(t, $J = 7.0\text{Hz}$, 2H), 2.91(t, $J = 7.5\text{Hz}$, 2H); ^{13}C NMR(100MHz, CDCl_3) δ 190.9(q, $J = 35.0\text{Hz}$), 169.0, 153.5, 151.9, 151.0, 150.5, 148.0, 146.9, 135.7, 130.5, 130.3, 129.7, 128.9, 128.0, 127.2, 126.2, 125.6, 123.9, 116.7, 116.5, 116.1, 116.3, 115.5(q, $J_{\text{C-F}} = 290.3$), 112.0, 104.2, 81.7, 39.8, 38.3, 27.4; LRMS(EI) m/z (%) 614(M^+ , 16), 535(100);

$C_{31}H_{20}Cl_2F_3NO_5$ 的 HRMS(EI) : 计算分子量为 613.0671, 实测分子量为 613.0682。

[0427] 实施例 5- 化合物 12 和 12a 的合成方案

[0428] 合成化合物 23

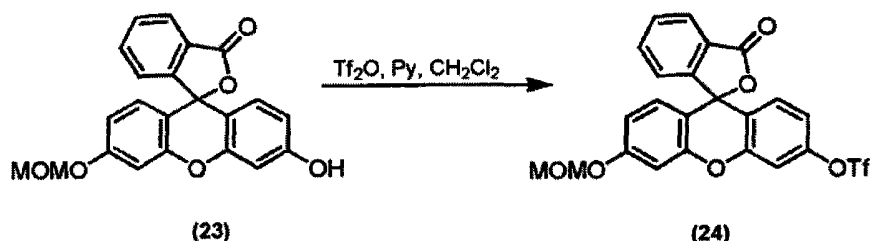
[0429]



[0430] 0°C 下向荧光素 (3.3g, 10mmol) 的 50mL 无水二甲基甲酰胺溶液中加入氢化钠 (437mg, 11mmol, 60% 矿物油分散体)。在 0°C 搅拌半小时后再向溶液中加入甲氧基甲基氯 (MOMCl) (0.76mL, 10mmol)。所得混合物室温搅拌过夜, 然后用水猝灭。之后在混合物中加入 1N 盐酸以将溶液酸化至 pH 2。然后加入乙酸乙酯。将有机层分离并用盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥并真空蒸发。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 23 (3.2g, 85% 产率)。化合物 23 通过以下光谱数据表征: ^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); $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{O}_6$ 的 HRMS (EI) : 计算分子量为 376.0947, 实测分子量为 376.0949。

[0431] 合成化合物 24

[0432]

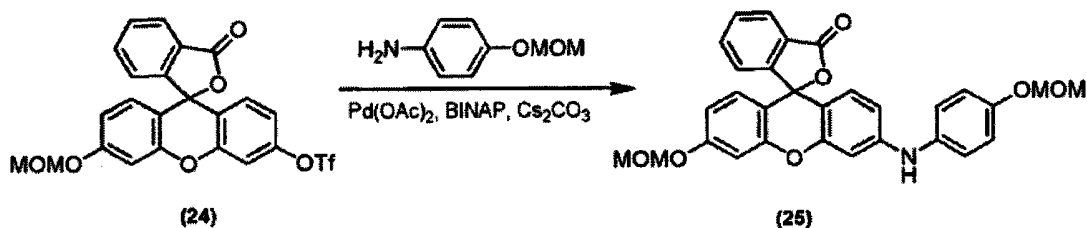


[0433] 0°C 在氩气下向化合物 23 (3.2g, 8.5mmol) 和吡啶 (2.74mL, 34mmol) 的无水二氯甲烷溶液中逐滴加入三氟甲烷磺酸酐 (2.86mL, 17mmol)。所得溶液室温搅拌 2 小时, 然后用水猝灭。在混合物中加入二氯甲烷, 将有机层分离, 用 1N 盐酸以及随后用水和盐水洗涤。有机层然后用无水硫酸钠干燥并浓缩。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 24 (4.2g, 98% 产率)。化合物 24 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.04 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.72–7.65 (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); $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{O}_8\text{S}$ 的 HRMS (EI) : 计算分子

量为 508.0440, 实测分子量为 508.0438。

[0434] 合成化合物 25

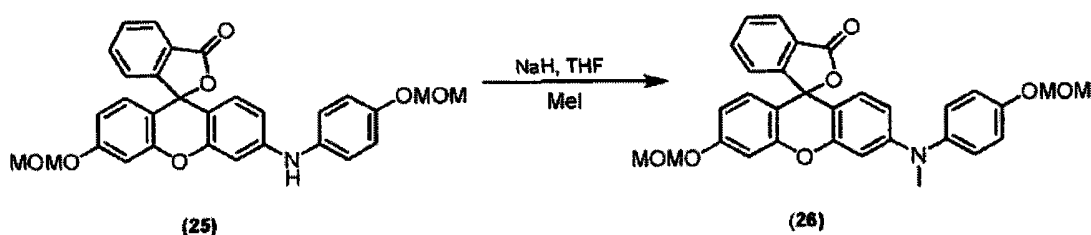
[0435]



[0436] 在烘干的 Schlenk 管中加入乙酸钯 (II) (2mg, 1% mmol), 2,2'-双(二苯基膦)-1,1'-二萘基 (BINAP) (9mg, 1.5% mmol) 和碳酸铯 (Cs_2CO_3) (91mg, 0.28mmol), 并用氩气吹扫 5 分钟。加入化合物 24 (102mg, 0.2mmol) 和 4-(甲氧基甲氧基)苯胺 (37mg, 0.24mmol) 的甲苯 (2mL) 溶液, 所得混合物先在氩气下室温搅拌 30 分钟, 然后在 100℃ 搅拌 20 小时。将反应混合物冷却至室温, 用二氯甲烷稀释并通过硅藻土垫过滤。滤饼用 10mL 二氯甲烷洗涤三次。然后浓缩滤液, 残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 25 (84mg, 82% 产率)。化合物 25 通过以下光谱数据表征: $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 7.99 (d, $J = 7.4\text{Hz}$, 1H), 7.66-7.58 (m, 2H), 7.16 (d, $J = 7.4\text{Hz}$, 1H), 7.08 (d, $J = 8.9\text{Hz}$, 2H), 6.99 (d, $J = 8.9\text{Hz}$, 2H), 6.91 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.67 (s, 2H), 6.57-6.48 (m, 2H), 5.94 (s, br, 1H), 5.16 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 3.48 (s, 3H), 3.45 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (75.5MHz, CDCl_3) δ 169.6, 158.8, 153.5, 153.1, 152.6, 152.5, 147.6, 135.3, 134.9, 129.6, 129.1, 129.0, 127.0, 124.9, 124.0, 123.2, 117.4, 112.7, 112.6, 111.9, 109.0, 103.6, 100.8, 94.9, 94.3, 83.8, 56.1, 56.0; LRMS (EI) m/z (%) 511 (M^+ , 47), 467 (100); $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{NO}_7$ 的 HRMS (EI): 计算分子量为 511.1631, 实测分子量为 511.1632。

[0437] 合成化合物 25

[0438]

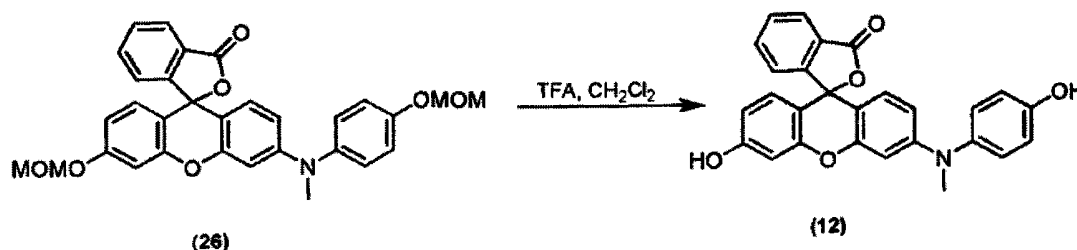


[0439] 0℃ 下向化合物 25 (84mg, 0.16mmol) 的四氢呋喃 (4mL) 溶液中加入氢化钠 (10mg, 0.24mmol, 60% 矿物油分散体)。将悬浮液搅拌半小时, 然后加入甲基碘 (20 μL , 0.32mmol)。混合物室温搅拌过夜, 然后用水猝灭。混合物用乙酸乙酯稀释, 用 1N 盐酸和盐水洗涤。用无水硫酸钠干燥, 之后将有机溶液真空浓缩, 残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 26 (64mg, 76% 产率)。化合物 26 通过以下光谱数据表征: $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 7.98 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 1H), 7.66-7.58 (m, 2H), 7.15 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 1H), 7.14-7.08 (m, 2H), 7.04 (d, $J = 9.0\text{Hz}$, 2H), 6.92 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.52 (d, $J = 9.0\text{Hz}$, 2H), 6.36-6.34 (m, 2H), 5.16 (s, 4H), 3.48 (s, 3H), 3.45 (s, 3H), 3.25 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (75.5MHz, CDCl_3) δ 169.5, 158.7, 155.0, 153.1, 152.6, 152.4, 151.5, 141.7, 134.8, 129.5, 129.1, 128.4, 127.7, 127.1, 124.8, 124.0, 117.5, 112.8, 112.6, 110.9, 107.5, 103.6, 100.5, 94.6, 94.3, 83.8,

56.1, 56.0, 40.4; LRMS(EI) m/z (%) 526 (M^+ , 8), 482 (100); $C_{31}H_{27}NO_7$ 的 HRMS(EI): 计算分子量为 525.1788, 实测分子量为 525.1792。

[0440] 合成化合物 12

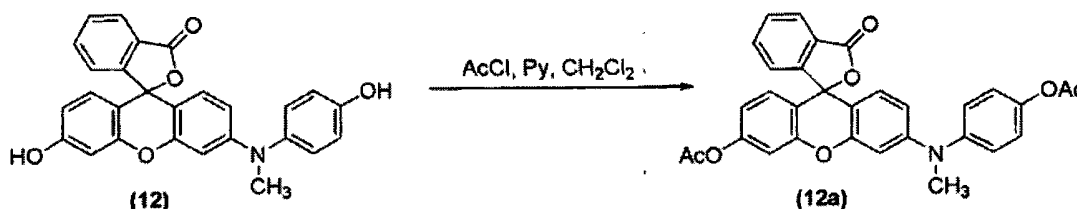
[0441]



[0442] 0°C下向化合物 26 (64mg, 0.12mmol) 的无水二氯甲烷 (CH₂Cl₂) (2mL) 溶液中逐滴加入三氟乙酸 (2mL)。所得溶液室温搅拌直到薄层层析显示所有原料都被消耗。混合物然后真空浓缩并与甲苯共沸三次。将残余物溶于乙酸乙酯, 用饱和碳酸氢钠 (NaHCO₃) 以及随后用水和盐水洗涤。将有机溶液真空浓缩, 然后残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 12 (47mg, 90% 产率)。化合物 12 通过以下光谱数据表征: ¹H NMR (500MHz, CD₃OD) δ 8.26 (d, J = 7.7Hz, 1H), 7.83–7.75 (m, 2H), 7.35 (d, J = 7.7Hz, 1H), 7.13 (d, J = 8.7Hz, 2H), 7.09 (d, J = 9.0Hz, 1H), 7.04–7.02 (m, 2H), 6.92–6.88 (m, 4H), 6.80 (d, J = 9.4Hz, 1H), 3.52 (s, 3H); ¹³C NMR (125.8MHz, CD₃OD) δ 169.1, 168.2, 159.3, 159.1, 158.7, 158.0, 139.2, 138.1, 134.6, 132.3, 132.1, 131.7, 131.6, 131.3, 130.1, 130.0, 128.9, 118.1, 118.0, 117.4, 115.9, 115.4, 103.6, 99.1, 42.3; LRMS(EI) m/z (%) 437 (M^+ ; 6), 393 (100); $C_{27}H_{19}NO_5$ 的 HRMS(EI): 计算分子量为 437.1263, 实测分子量为 437.1266。

[0443] 合成化合物 12a

[0444]

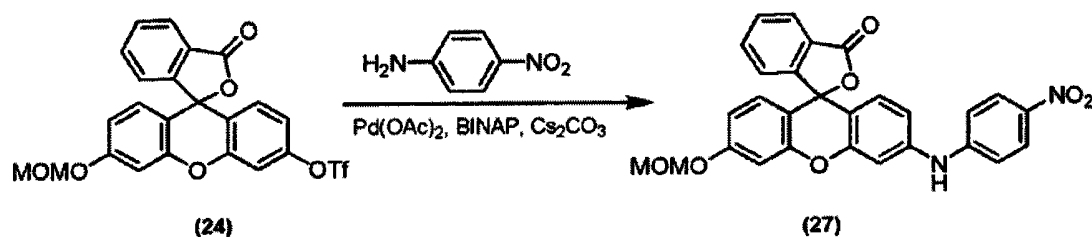


[0445] 向化合物 12 (108mg, 0.25mmol) 的无水二氯甲烷 (CH₂Cl₂) (4mL) 溶液中连续加入吡啶 (0.4mL) 和乙酰氯 (0.8mL)。所得溶液室温搅拌直到薄层层析显示所有原料被消耗。反应然后用饱和 NH₄Cl 溶液猝灭并用乙酸乙酯萃取。将有机溶液真空浓缩, 然后残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 12a (110mg, 85% 产率)。化合物 12a 通过以下光谱数据表征: ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.00 (d, J = 7.2Hz, 1H), 7.66–7.60 (m, 2H), 7.19–7.17 (m, 3H), 7.08 (d, J = 9.0Hz, 2H), 7.02 (d, J = 1.8Hz, 1H), 7.78–7.76 (m, 2H), 6.66 (d, J = 1.8Hz, 1H), 6.56 (d, J = 9.0Hz, 1H), 6.48 (dd, J = 9.0, 1.8Hz, 1H), 3.31 (s, 3H), 2.30 (s, 6H); ¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) δ 169.5, 169.3, 168.9, 152.9, 152.2, 152.1, 151.8, 151.0, 147.5, 145.2, 135.0, 129.7, 129.0, 128.5, 126.8, 126.3, 125.0, 124.1, 122.8, 117.2, 116.9, 112.4, 110.2, 108.4, 102.1, 83.0, 40.4, 21.1; LRMS(EI) m/z (%) 521 (M^+ , 26), 477 (100); $C_{31}H_{23}NO_7$ 的 HRMS(EI): 计算分子量为 521.1475, 实测分子量为 521.1471。

[0446] 实施例 6- 化合物 14 的合成方案

[0447] 合成化合物 27

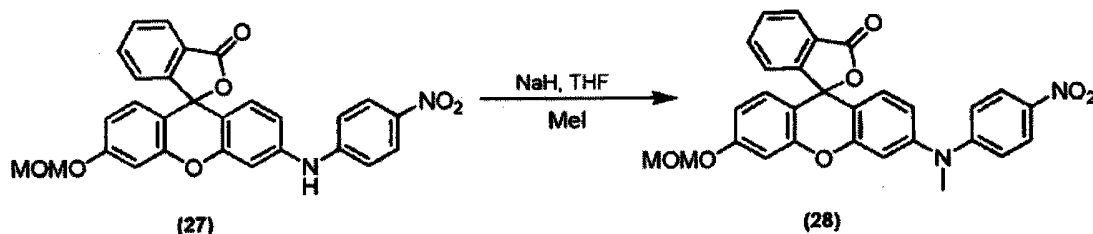
[0448]



[0449] 在烘干的 Schlenk 管中加入乙酸钯 (II) (2mg, 1% mmol), 2,2'-双(二苯基膦)-1,1'-二萘基 (BINAP) (9mg, 1.5% mmol) 和碳酸铯 (Cs_2CO_3) (91mg, 0.28mmol), 并用氩气吹扫 5 分钟。加入化合物 24 (102mg, 0.2mmol) 和 4-硝基苯胺 (33mg, 0.24mmol) 的甲苯 (2mL) 溶液, 所得混合物先在氩气下室温搅拌 30 分钟, 然后在 100°C 搅拌 20 小时。将反应混合物冷却至室温, 用二氯甲烷稀释并通过硅藻土垫过滤。滤饼用 10mL 二氯甲烷洗涤三次。然后浓缩滤液, 残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 27 (79mg, 80% 产率)。化合物 27 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 8.06-8.01 (m, 3H), 7.72-7.63 (m, 2H), 7.19 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 1H), 7.06-7.03 (m, 3H), 6.93 (s, 1H), 6.80-6.64 (m, 4H), 5.18 (s, 2H), 3.46 (s, 3H); ^{13}C NMR (75.5MHz, CDCl_3) δ 169.8, 159.0, 152.8, 152.2, 148.8, 142.6, 140.3, 135.4, 130.0, 129.1, 129.0, 126.5, 126.0, 125.1, 124.0, 115.9, 115.1, 113.2, 112.0, 106.9, 103.7, 94.3, 83.4, 56.2; LRMS (FAB) m/z (%) 496 (M^+ ; 20), 154 (100); $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$ ($\text{M}^+ - \text{CO}_2$) 的 HRMS (EI): 计算分子量为 452.1372, 实测分子量为 452.1366。

[0450] 合成化合物 28

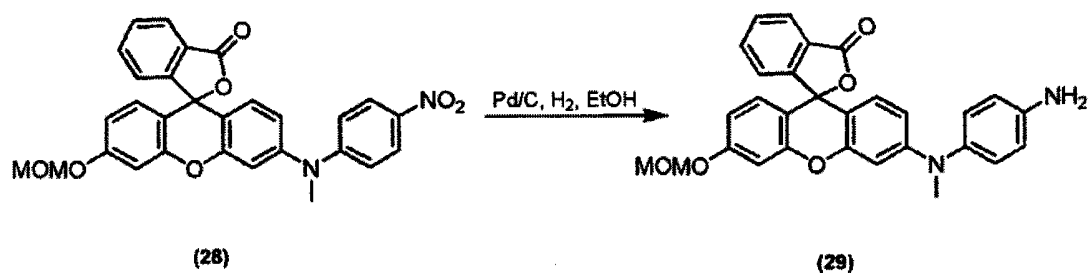
[0451]



[0452] 0°C 下向化合物 27 (79mg, 0.16mmol) 的四氢呋喃 (4mL) 溶液中加入氢化钠 (10mg, 0.24mmol, 60% 矿物油分散体)。将悬浮液搅拌半小时然后加入甲基碘 (20 μL , 0.32mmol)。混合物室温搅拌过夜然后用水猝灭。混合物用乙酸乙酯稀释, 用 1N 盐酸和盐水洗涤。用无水硫酸钠干燥后将有机溶液真空浓缩, 残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 28 (67mg, 83% 产率)。化合物 28 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 8.10-8.04 (m, 3H), 7.80-7.63 (m, 2H), 7.24 (d, $J = 7.4\text{Hz}$, 1H), 7.14 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.98 (d, $J = 2.0\text{Hz}$, 1H), 6.90-6.82 (m, 4H), 6.76-6.73 (m, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.48 (s, 3H), 3.44 (s, 3H); ^{13}C NMR (75.5MHz, CDCl_3) δ 159.0, 153.0, 152.7, 152.4, 152.1, 148.5, 139.4, 135.2, 130.0, 129.6, 129.1, 126.6, 125.7, 125.2, 124.0, 120.8, 116.5, 114.5, 1.13.3 (2C), 112.1, 103.7, 94.4, 85.3, 56.2, 40.4; LRMS (FAB) m/z (%) 510 (M^+ ; 20), 109 (100); $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$ ($\text{M}^+ - \text{CO}_2$) 的 HRMS (EI): 计算分子量为 466.1522, 实测分子量为 466.1529。

[0453] 合成化合物 29

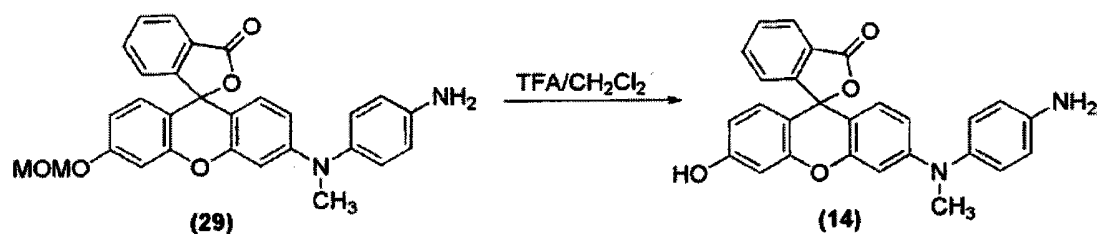
[0454]



[0455] 向化合物 28 (67mg, 0.13mmol) 的乙醇 (10mL) 溶液中缓慢加入钯 (10%, 载于活性碳粉末, 7mg)。将混合物室温氢化 2 小时。混合物然后通过硅藻土垫过滤, 并将滤液真空浓缩。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 29 (48mg, 77% 产率)。化合物 29 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.99 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 7.64–7.57 (m, 2H), 7.17 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 6.98 (d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 6.91 (s, 1H), 6.710–6.67 (m, 4H), 6.51–6.48 (m, 2H), 6.35–6.32 (m, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.68 (br, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.24 (s, 3H); ^{13}C NMR (75.5MHz, CDCl_3) δ 169.6, 158.7, 153.2, 152.7, 152.4, 151.8, 144.5, 138.7, 134.7, 129.4, 129.1, 128.3, 128.0, 127.2, 124.8, 124.0, 116.2, 112.8, 112.5, 110.5, 106.8, 103.6, 99.8, 94.4, 84.0, 56.1, 40.4; LRMS (EI) m/z (%) 481 (M^+ , 24), 437 (100); $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$ 的 HRMS (EI): 计算分子量为 480.1685, 实测分子量为 480.1688。

[0456] 合成化合物 14

[0457]

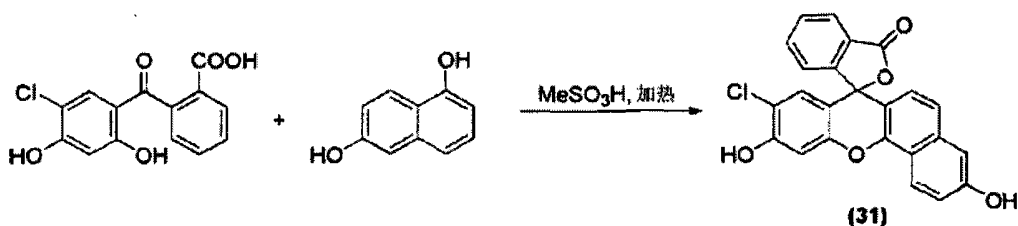


[0458] 0°C 下向化合物 29 (48mg, 0.10mmol) 的无水二氯甲烷 (2mL) 溶液中逐滴加入三氟乙酸 (2mL)。所得溶液室温搅拌直到薄层层析显示所有原料都被消耗。混合物然后真空浓缩并与甲苯共沸三次。将残余物溶于乙酸乙酯并用饱和碳酸氢钠 (NaHCO_3) 以及随后用水和盐水洗涤。将有机溶液真空浓缩, 然后残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 14 (40mg, 91% 产率)。化合物 14 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.02 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 1H), 7.70–7.64 (m, 2H), 7.16 (d, $J = 7.2\text{Hz}$, 1H), 6.92 (d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 6.76 (d, $J = 8.6\text{Hz}$, 2H), 6.69 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 1H), 6.64 (d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H), 6.59–6.52 (m, 3H), 6.42 (dd, $J = 8.8, 2.2\text{Hz}$, 1H), 3.26 (s, 3H); ^{13}C NMR (100MHz, CD_3OD) δ 164.6, 154.5, 153.7, 153.6, 153.5, 147.5, 146.2, 137.3, 133.7, 129.5, 129.4, 128.5, 127.6, 127.3, 125.9, 125.4, 116.1, 114.6, 114.1, 111.4, 108.5, 102.3, 98.6, 76.0, 39.7; LRMS (ESI) m/z (%) 437 ($\text{M}+\text{H}^+$, 100); $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4$ 的 HRMS (EI): 计算分子量为 436.1423, 实测分子量为 436.1424。

[0459] 实施例 7- 化合物 30 的合成方案

[0460] 合成化合物 31

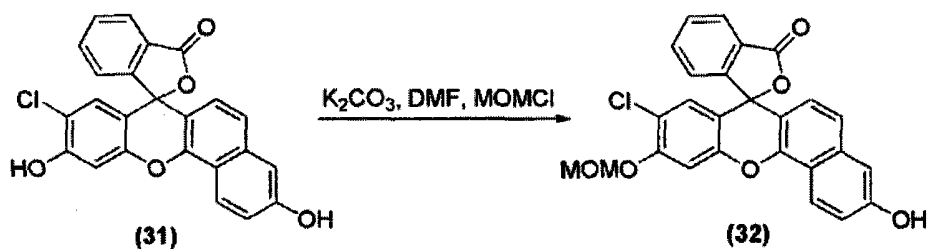
[0461]



[0462] 将 2'-羧基-5-氯-2,4-二羟基二苯甲酮和 1,6-二羟基萘在甲磺酸中混合并密封在厚壁玻璃试管中。之后将所得混合物在 90℃ 搅拌 24 小时,将反应物倒入冰冷的水中,将沉淀滤出,用水洗涤并真空干燥。粗产物 31 无需进一步纯化即用于下面的步骤。

[0463] 合成化合物 32

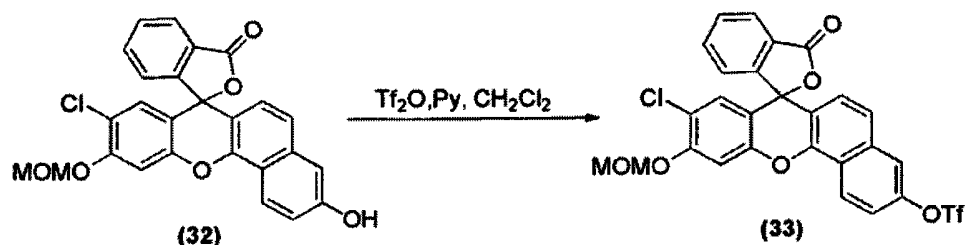
[0464]



[0465] 向化合物 31 (1.23g, 2.95mmol) 和碳酸钾 (407mg, 2.95mmol) 的二甲基甲酰胺 (DMF) 溶液中加入氯甲基甲基醚 (0.22mL, 2.95mmol)。室温搅拌 3 小时后反应混合物用乙酸乙酯稀释,然后用 1N 盐酸溶液、水和盐水洗涤。有机层用无水硫酸钠干燥并浓缩。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 32 (680mg, 50% 产率)。

[0466] 合成化合物 33

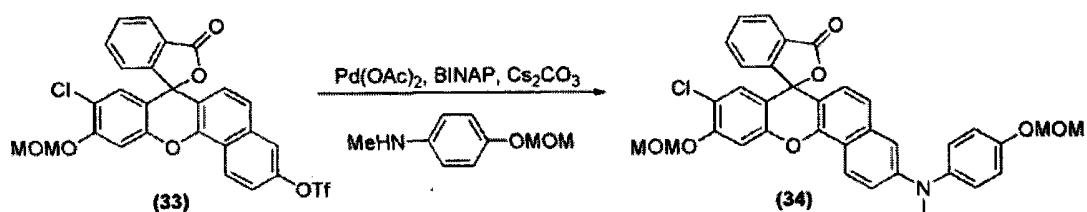
[0467]



[0468] 0℃ 氩气下向化合物 32 (340mg, 0.75mmol) 和吡啶 (0.36mL, 4.48mmol) 的无水二氯甲烷 (CH₂Cl₂) 溶液中逐滴加入三氟甲烷磺酸酐 (0.38mL, 2.24mmol)。所得溶液室温搅拌 2 小时,然后用水猝灭。在混合物中加入二氯甲烷,将有机层分离,用 1N 盐酸以及随后用水和盐水洗涤。有机层然后用无水硫酸钠干燥并浓缩。残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 33,其为白色固体 (436mg, 98% 产率)。

[0469] 合成化合物 34

[0470]

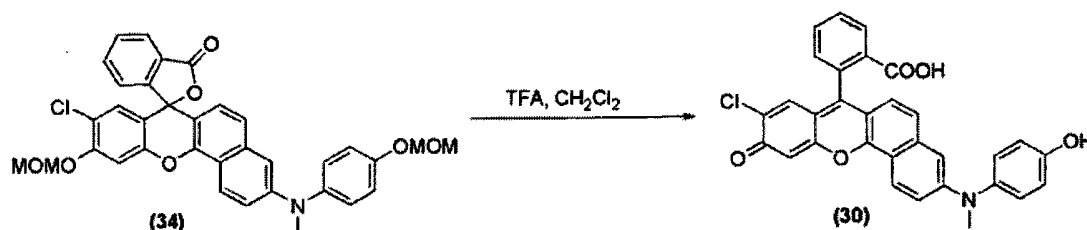


[0471] 在烘干的 Schlenk 管中加入乙酸钯 (II) (5mg, 0.02mmol), 2,2'-双(二苯基

膦)-1,1'-二萘基 (BINAP) (19mg, 0.03mmol) 和碳酸铯 (Cs_2CCh) (79mg, 0.24mmol), 并用氩气吹扫5分钟。加入化合物 33 (120mg, 0.2mmol) 和 4-(甲氧基甲氧基)-N-甲基苯胺 (36mg, 0.21mmol) 的甲苯 (3mL) 溶液。所得混合物先在氩气下室温搅拌 30 分钟, 然后在 100℃ 搅拌 20 小时。将反应混合物冷却至室温, 用二氯甲烷稀释并通过硅藻土垫过滤。滤饼用 10mL 二氯甲烷洗涤三次。然后浓缩滤液, 残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 34 (104mg, 85% 产率)。

[0472] 合成化合物 30

[0473]



[0474] 0℃向化合物 34 (104mg, 0.17mmol) 的无水二氯甲烷 (2mL) 溶液中逐滴加入三氟乙酸 (2mL)。所得溶液室温搅拌直到薄层层析显示所有原料被消耗。混合物然后真空浓缩并与甲苯共沸三次。将残余物溶于乙酸乙酯并用饱和碳酸氢钠 (NaHCO_3) 以及随后用水和盐水洗涤。将有机溶液真空浓缩, 然后残余物通过硅胶柱层析纯化以得到化合物 30 (72mg, 82% 产率)。化合物 30 通过以下光谱数据表征: ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 8.21 (d, $J = 9.3\text{Hz}$, 1H), 8.09 (dd, $J = 6.8, 1.1\text{Hz}$, 1H), 7.71–7.63 (m, 2H), 7.23 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 1H), 7.16 (dd, $J = 6.8, 1.1\text{Hz}$, 1H), 7.08–7.04 (m, 3H), 6.99 (s, 1H), 6.91–6.86 (m, 3H), 6.80 (s, 1H), 6.61 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.18 (br, 2H); ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 169.7, 154.5, 152.0, 149.5, 147.5, 140.3, 136.5, 135.0, 129.9, 128.4, 127.2, 126.9, 125.7, 124.6, 123.8, 122.6, 122.5, 118.1, 116.4, 116.2, 111.9, 108.2, 107.3, 104.1, 40.6; LRMS (EI) m/z (%) 521 (M^+ ; 16), 476 (100); $\text{C}_{31}\text{H}_{20}\text{ClNO}_5$ 的 HRMS (EI): 计算分子量为 521.1030, 实测分子量为 521.1033。

[0475] 实施例 8- 用化合物 10 特异性检测过氧亚硝酸盐

[0476] 化合物 10 的 UV- 可见吸收光谱

[0477] 将实施例 4 所得化合物 10 溶于含有 0.1% DMF (作为共溶剂), pH 7.4 的 0.1M 磷酸盐缓冲液中以形成 10 μM 溶液。测量 10 μM 化合物 10 溶液的吸收光谱, 结果显示化合物 10 的最大吸收在约 520nm。

[0478] 化合物 10 的发射光谱

[0479] 将实施例 4 所得化合物 10 溶于 DMF 至浓度为 10mM, 然后用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 将溶液稀释至 10 μM 。用日立 (Hitachi) F2500 荧光计将测量 10 μM 化合物 10 溶液的荧光光谱, 将光电倍增管设置成 700V。激发和发射缝宽均为 2.5nm。在 520nm 激发波长下进行测量。图 1 所示结果表明, 化合物 10 本身没有荧光。

[0480] 用化合物 10 检测过氧亚硝酸盐

[0481] 将实施例 4 所得化合物 10 溶于 DMF 至浓度为 10mM, 然后用 0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) 将溶液稀释至 10 μM 。通过 Keith 和 Powell 的方法 (Keith, W. G. 和 Powell, R. E.; Kinetics of decomposition of peroxyntrous acid, J. Chem. Soc. A, 1969, 1, 90) 制备过

氧亚硝酸盐的 0.1MNaOH 溶液,用 302nm 时消光系数为 $1670\text{cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}$ 估算其在所用原液中的浓度 (Hughes 和 Nicklin, The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid, J. Chem. Soc. A, 1968, 2, 450-452)。将过氧亚硝酸盐原液加入化合物 10 的溶液中以提供各种终浓度,如 0、2、6、10、20、30、50、100 和 200 μM 。5 分钟后在上述相同条件下测量溶液的荧光光谱。荧光光谱示于图 1。由图 1 清楚可见,加入过氧亚硝酸盐后化合物 10 的荧光强度显著增强。此外,图 2 显示,541nm 的荧光强度随过氧亚硝酸盐浓度的增加线性增加。

[0482] 比较化合物 10 对不同 ROS 和 RNS 的特异性

[0483] 比较了化合物 10 对不同活性氧 (ROS) 和活性氮 (RNS),包括 OCF^- 、 H_2O_2 、 $^1\text{O}_2$ 、 NO 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 ONOO^- 和烷基过氧化氢自由基 ($\text{ROO}\cdot$) 的反应性。将不同活性氧和活性氮单独加入到 5mL 化合物 10 的溶液 (10 μM ,用 0.1M 磷酸钾缓冲液配制)中。测量处理前后荧光强度的变化。结果示于图 3。活性氧和活性氮的制备如下:

[0484] a. 加入 H_2O_2 (终浓度 100 μM),然后 25 $^\circ\text{C}$ 搅拌 1 小时。

[0485] b. 加入 (3-(1,4-二氢-1,4-环二氧-1-萘基)丙酸) (终浓度 100 μM),然后 25 $^\circ\text{C}$ 搅拌 1 小时。

[0486] c. 加入 2,2'-偶氮双(2-脘基丙烷)二盐酸 (终浓度 100 μM),然后 25 $^\circ\text{C}$ 搅拌 1 小时。

[0487] d. 加入 SNP (亚硝基铁氰化钠 (III) 二水合物) (终浓度 100 μM),然后 25 $^\circ\text{C}$ 搅拌 1 小时。

[0488] e. 由黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶生成 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。首先加入黄嘌呤氧化酶。在黄嘌呤氧化酶溶解后加入黄嘌呤 (终浓度 100 μM),并将混合物 25 $^\circ\text{C}$ 搅拌 1 小时。

[0489] f. 在存在 10 当量 H_2O_2 (100 μM) 时加入氯化亚铁 (终浓度 10 μM)。

[0490] g. 在 25 $^\circ\text{C}$ 加入 ONOO^- (终浓度 10 μM)。

[0491] h. 在 25 $^\circ\text{C}$ 加入 NaOCl (终浓度 10 μM)。 NaOCl 来自市售商品。

[0492] 图 3 显示,过氧亚硝酸盐导致化合物 10 的荧光增强显著强于任何其他 ROS 和 RNS。这些结果证明,在无生命系统中化合物 10 对过氧亚硝酸盐的反应性远高于其他 ROS 和 RNS。此外,在化合物 10 的三氟甲基衍生物与生物系统中存在的任何其他活性氧或活性氮之间不发生类似反应。

[0493] 实施例 9- 化合物 22 在细胞试验中的应用

[0494] 用鼠 J744.1 巨噬细胞 (ATCC, USA) 来研究化合物 22 (化合物 10 的乙酸酯形式) 检测活细胞中过氧亚硝酸盐的能力。在 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 , 含 10% 热灭活胎牛血清 (Gibco) 并添加有 100U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 Dulbecco 改进 Eagle 培养基 (DMEM) (Gibco) 中培养 J744.1 巨噬细胞。按照制造商的说明通过刮片传代培养并接种到 6 孔平板上。每 2-3 天更换一次生长培养基。等细胞生长至汇合再开始实验。将鼠 J744.1 巨噬细胞与化合物 22 (20 μM) 一起培育 1 小时,然后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。在没有刺激物时只观察到非常微弱的荧光 (图 8A)。用 LPS (脂多糖, 1 $\mu\text{g/ml}$) 和 IFN- γ (干扰素- γ , 50ng/ml) 处理 4 小时后诱导出荧光 (图 8B), 在额外加入 PMA (12-十四酸佛波酯-13-乙酸盐, 10nM) 半小时后观察到强荧光 (图 8C)。因此,我们认为化合物 22 适合检测刺激的鼠 J744.1 巨噬细胞中产生的过氧亚硝酸盐。

[0495] 实施例 10- 用化合物 12 高敏感性检测过氧亚硝酸盐

[0496] 化合物 12 的 UV- 可见吸收光谱

[0497] 将实施例 5 所得化合物 12 溶于含有 0.1% DMF (作为共溶剂), pH 7.4 的 0.1M 磷酸盐缓冲液中以形成 $1 \mu\text{M}$ 溶液。测量 $1 \mu\text{M}$ 化合物 12 溶液的吸收光谱, 结果显示化合物 12 的最大吸收在约 515nm。

[0498] 化合物 12 的发射光谱

[0499] 将实施例 5 所得化合物 12 溶于 DMF 至浓度为 1mM, 然后用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 将溶液稀释至 $1 \mu\text{M}$ 。用日立 (Hitachi) F2500 荧光计将测量 $1 \mu\text{M}$ 化合物 12 溶液的荧光光谱, 将光电倍增管设置成 700V。激发和发射缝宽均为 2.5nm。在 515nm 激发波长下进行测量。图 4 所示结果表明, 化合物 12 本身没有荧光。

[0500] 用化合物 12 检测过氧亚硝酸盐

[0501] 将实施例 5 所得化合物 12 溶于 DMF 至浓度为 1mM, 然后用 0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) 将溶液稀释至 $1 \mu\text{M}$ 。通过 Keith 和 Powell 的方法 (Keith, W.G. 和 Powell, R.E.; Kinetics of decomposition of peroxyxynitrous acid, J. Chem. Soc. A, 1969, 1, 90) 制备过氧亚硝酸盐的 0.1M NaOH 溶液, 用 302nm 时消光系数为 $1670\text{cm}^{-1}(\text{mol/L})^{-1}$ 估算其在所用原液中的浓度 (Hughes 和 Nicklin, The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid, J. Chem. Soc. A, 1968, 2, 450-452)。将过氧亚硝酸盐原液加入化合物 12 的溶于中以提供各种终浓度, 如 0、1、2、3、4、5、6 和 $7 \mu\text{M}$ 。5 分钟后在上述相同条件下测量溶液的荧光光谱。荧光光谱示于图 4。由图 4 清楚可见, 加入过氧亚硝酸盐后化合物 12 的荧光强度显著增强。此外, 535nm 的荧光强度随过氧亚硝酸盐浓度的增加线性增加 (数据未显示)。

[0502] 比较化合物 12 对不同 ROS 和 RNS 的特异性

[0503] 比较了化合物 12 对不同活性氧 (ROS) 和活性氮 (RNS) 的反应性, 其中包括 OCl^- 、 H_2O_2 、 $^1\text{O}_2$ 、 NO 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 ONOO^- 和烷基过氧化氢自由基 ($\text{ROO}\cdot$)。将不同活性氧和活性氮单独加入到 5mL 化合物 12 的溶液 ($1 \mu\text{M}$, 用 0.1M 磷酸钾缓冲液配制)。测量处理前后荧光强度的变化。结果示于图 5。活性氧和活性氮的制备如下:

[0504] i. 加入 H_2O_2 (终浓度 $100 \mu\text{M}$), 然后 25°C 搅拌 1 小时。

[0505] j. 加入 (3-(1,4-二氢-1,4-环二氧-1-萘基)丙酸) (终浓度 $100 \mu\text{M}$), 然后 25°C 搅拌 1 小时。

[0506] k. 加入 2,2'-偶氮双(2-脒基丙烷)二盐酸 (终浓度 $100 \mu\text{M}$), 然后 25°C 搅拌 1 小时。

[0507] l. 加入 SNP (亚硝基铁氰化钠 (III) 二水合物) (终浓度 $100 \mu\text{M}$), 然后 25°C 搅拌 1 小时。

[0508] m. 由黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶生成 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 。首先加入黄嘌呤氧化酶。在黄嘌呤氧化酶溶解后加入黄嘌呤 (终浓度 $100 \mu\text{M}$), 并将混合物 25°C 搅拌 1 小时。

[0509] n. 在存在 10 当量 H_2O_2 ($100 \mu\text{M}$) 时加入氯化亚铁 (终浓度 $10 \mu\text{M}$)。

[0510] o. 在 25°C 加入 ONOO^- (终浓度 $10 \mu\text{M}$)。

[0511] p. 在 25°C 加入 NaOCl (终浓度 $10 \mu\text{M}$)。NaOCl 来自市售商品。

[0512] 图 5 显示, 过氧亚硝酸盐导致化合物 12 的荧光增强显著强于任何其他 ROS 和 RNS。

这些结果证明,在无生命系统中化合物 12 对过氧亚硝酸盐的反应性远高于其他 ROS 和 RNS。此外,在化合物 12 的三氟甲基衍生物与生物系统中存在的任何其他活性氧或活性氮之间不发生类似反应。

[0513] 实施例 11- 用化合物高敏感性检测次氯酸盐

[0514] 化合物 14 的 UV- 可见吸收光谱

[0515] 将实施例 6 所得化合物 14 溶于含有 0.1% DMF (作为共溶剂), pH 7.4 的 0.1M 磷酸盐缓冲液以形成 1 μ M 溶液。测量 1 μ M 化合物 14 溶液的吸收光谱,结果显示化合物 14 的最大吸收在约 515nm。

[0516] 化合物 14 的发射光谱

[0517] 将实施例 6 所得化合物 14 溶于 DMF 至浓度为 1mM,然后用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 将溶液稀释至 1 μ M。用日立 (Hitachi) F2500 荧光计将测量 1 μ M 化合物 14 溶液的荧光光谱,将光电倍增管设置成 700V。激发和发射缝宽均为 2.5nm。在 515nm 激发波长下进行测量。图 6 所示结果表明,化合物 14 本身没有荧光。

[0518] 用化合物 14 检测过氧亚硝酸盐

[0519] 将实施例 6 所得化合物 14 溶于 DMF 至浓度为 1mM,然后用 0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) 将溶液稀释至 1 μ M。NaOCl 来自市售商品。用已经用 KIO_3 滴定标准化的硫代硫酸钠溶液滴定确定 NaOCl 的浓度。然后加入 NaOCl 以提供各种终浓度,如 0、2、3、4、5、6、7 和 8 μ M。5 分钟后在上述相同条件下测量溶液的荧光光谱。荧光光谱示于图 6。由图 6 清楚可见,加入次氯酸盐后化合物 14 的荧光强度显著增强。此外,535nm 的荧光强度随次氯酸盐浓度的增加线性增加。

[0520] 比较化合物 14 对不同 ROS 和 RNS 的特异性

[0521] 比较了化合物 14 对不同活性氧 (ROS) 和活性氮 (RNS) 的反应性,其中包括 OCl^- 、 H_2O_2 、 1O_2 、 NO 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 $ONOO^-$ 和烷基过氧化氢自由基 ($ROO\cdot$)。将不同活性氧和活性氮单独加入到 5mL 化合物 14 的溶液 (1 μ M,用 0.1M 磷酸钾缓冲液配制)。测量处理前后荧光强度的变化。结果示于图 7。活性氧和活性氮的制备如下:

[0522] a. 加入 H_2O_2 (终浓度 100 μ M),然后 25 $^\circ$ C 搅拌 1 小时。

[0523] b. 加入 (3-(1,4-二氢-1,4-环二氧-1-萘基)丙酸) (终浓度 100 μ M),然后 25 $^\circ$ C 搅拌 1 小时。

[0524] c. 加入 2,2'-偶氮双(2-脘基丙烷)二盐酸 (终浓度 100 μ M),然后 25 $^\circ$ C 搅拌 1 小时。

[0525] d. 加入 SNP (亚硝基铁氰化钠 (III) 二水合物) (终浓度 100 μ M),然后 25 $^\circ$ C 搅拌 1 小时。

[0526] e. 由黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶生成 $O_2^{\cdot-}$ 。首先加入黄嘌呤氧化酶。在黄嘌呤氧化酶溶解后加入黄嘌呤 (终浓度 100 μ M),并将混合物 25 $^\circ$ C 搅拌 1 小时。

[0527] f. 在存在 10 当量 H_2O_2 (100 μ M) 时加入氯化亚铁 (终浓度 10 μ M)。

[0528] g. 在 25 $^\circ$ C 加入 $ONOO^-$ (终浓度 10 μ M)。过氧亚硝酸盐按照实施例 4 的描述制备。

[0529] h. 在 25 $^\circ$ C 加入 NaOCl (终浓度 10 μ M)。

[0530] 图 7 显示,次氯酸盐导致化合物 14 的荧光增强显著强于任何其他 ROS 和 RNS。这些结果证明,在无生命系统中化合物 14 对次氯酸盐的反应性远高于其他 ROS 和 RNS。此外,

在化合物 14 的苯胺衍生物与生物系统中存在的任何其他活性氧或活性氮之间不发生类似反应。

[0531] 实施例 12- 化合物 12 和 12a 在细胞试验中的应用

[0532] 用鼠 J744.1 巨噬细胞 (ATCC, USA) 来研究化合物 12 和 12a 检测活细胞中过氧亚硝酸盐的能力。在 37°C, 5% CO₂, 含 10% 热灭活胎牛血清 (Gibco) 并添加有 100U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 Dulbecco 改进 Eagle 培养基 (DMEM) (Gibco) 中培养 J744.1 巨噬细胞。按照制造商的说明通过刮片传代培养并接种到 6 孔平板上。每 2-3 天更换一次生长培养基。等细胞生长至汇合再开始实验。将鼠 J744.1 巨噬细胞与化合物 12 或 12a (20 μM) 一起培育 1 小时, 然后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。在没有刺激物时只观察到非常微弱的荧光 (图 9B 和图 10A)。用 LPS (脂多糖, 1 μg/ml) 处理 4 小时后诱导出荧光 (图 9D 和图 10B)。还发现化合物 12 产生的绿色与线粒体染料 Mito Tracker Red CMXRos 的红色共定位 (图 9F)。结果表明化合物 12 可选择性定位于线粒体。

[0533] 实施例 13- 用化合物 30 检测过氧亚硝酸盐

[0534] 化合物 30 的 UV- 可见吸收光谱

[0535] 将实施例 7 所得化合物 30 溶于含有 0.1% DMF (作为共溶剂), pH 7.4 的 0.1M 磷酸盐缓冲液以形成 10 μM 溶液。测量 10 μM 化合物 30 溶液的吸收光谱, 结果显示化合物 30 的最大吸收在约 540nm。

[0536] 化合物 30 的发射光谱

[0537] 将实施例 7 所得化合物 30 溶于 DMF 至浓度为 10mM, 然后用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 将溶液稀释至 10 μM。用日立 (Hitachi) F7000 荧光计将测量 10 μM 化合物 30 溶液的荧光光谱, 将光电倍增管设置成 900V。激发和发射缝宽均为 2.5nm。在 520nm 激发波长下进行测量。图 11 所示结果表明, 化合物 30 本身没有荧光。

[0538] 用化合物 30 检测过氧亚硝酸盐

[0539] 将实施例 7 所得化合物 30 溶于 DMF 至浓度为 10mM, 然后用 0.1M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.4) 将溶液稀释至 10 μM。通过 Keith 和 Powell 的方法 (Keith, W. G. 和 Powell, R. E. ; Kinetics of decomposition of peroxyxynitrous acid, J. Chem. Soc. A, 1969, 1, 90) 制备过氧亚硝酸盐的 0.1M NaOH 溶液, 用 302nm 时消光系数为 1670cm⁻¹(mol/L)⁻¹ 估算其在所用原液中的浓度 (Hughes 和 Nicklin, The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid, J. Chem. Soc. A, 1968, 2, 450-452)。将过氧亚硝酸盐原液加入化合物 30 的溶液中以提供各种终浓度。5 分钟后在上述相同条件下测量溶液的荧光光谱。荧光光谱示于图 11。由图 11 清楚可见, 加入过氧亚硝酸盐后化合物 30 的荧光强度显著增强。

[0540] 如上所述, 本文所述实施方式提供了各种可用作检测、测量和 / 或筛选过氧亚硝酸盐的荧光探针的化合物。尽管已经根据有限数量的实施方式描述了本发明, 但某一实施方式的具体特征不属于其他实施方式。没有一个单一的实施方式可代表本发明的所有方面。在一些实施方式中, 所述组合物或方法可包括许多文中未提及的化合物或步骤。在其他实施方式中, 所述组合物或方法不包括, 或者基本上不含, 任何文中未列出的化合物或步骤。可对所述实施方式进行变化和修饰。例如, 本文所述试剂组合物不必仅包含本文所述荧光探针。它可包含通常适合荧光探针的任何类型的化合物。注意, 描述本文所述荧光探

针的制造和使用方法时参照了许多步骤。这些步骤可采取任何顺序进行。一个或多个步骤可省略或者组合,但仍能获得相同结果。待批权利要求试图覆盖本说明书范围内的所有这些变化或修饰。

[0541] 通过引用将本说明书中提到的所有发表物和专利申请纳入本文,就好像将各篇单独的发表物或专利申请特别和单独地通过引用纳入本文那样。应理解,为使本领域技术人员熟悉本发明、本发明的原则以及本发明的实践应用,已经通过列举和实施例详细描述了本说明书。此外,文中列出的具体实施方式不是穷举性的或是要限制其内容,很明显,本领域技术人员可从上述实施例和详细描述中受益而进行许多的替代、改良和变化。因此,本说明书旨在涵盖所有落入所附权利要求的精神和范围内的这种改变、修改以及变型。尽管上述实施例和描述中有一些包括了有关化合物、组合物和方法的若干功能性结论,但发明人不是要局限于那些结论和功能,而只是将它们作为在目前理解基础上的一种可能解释。

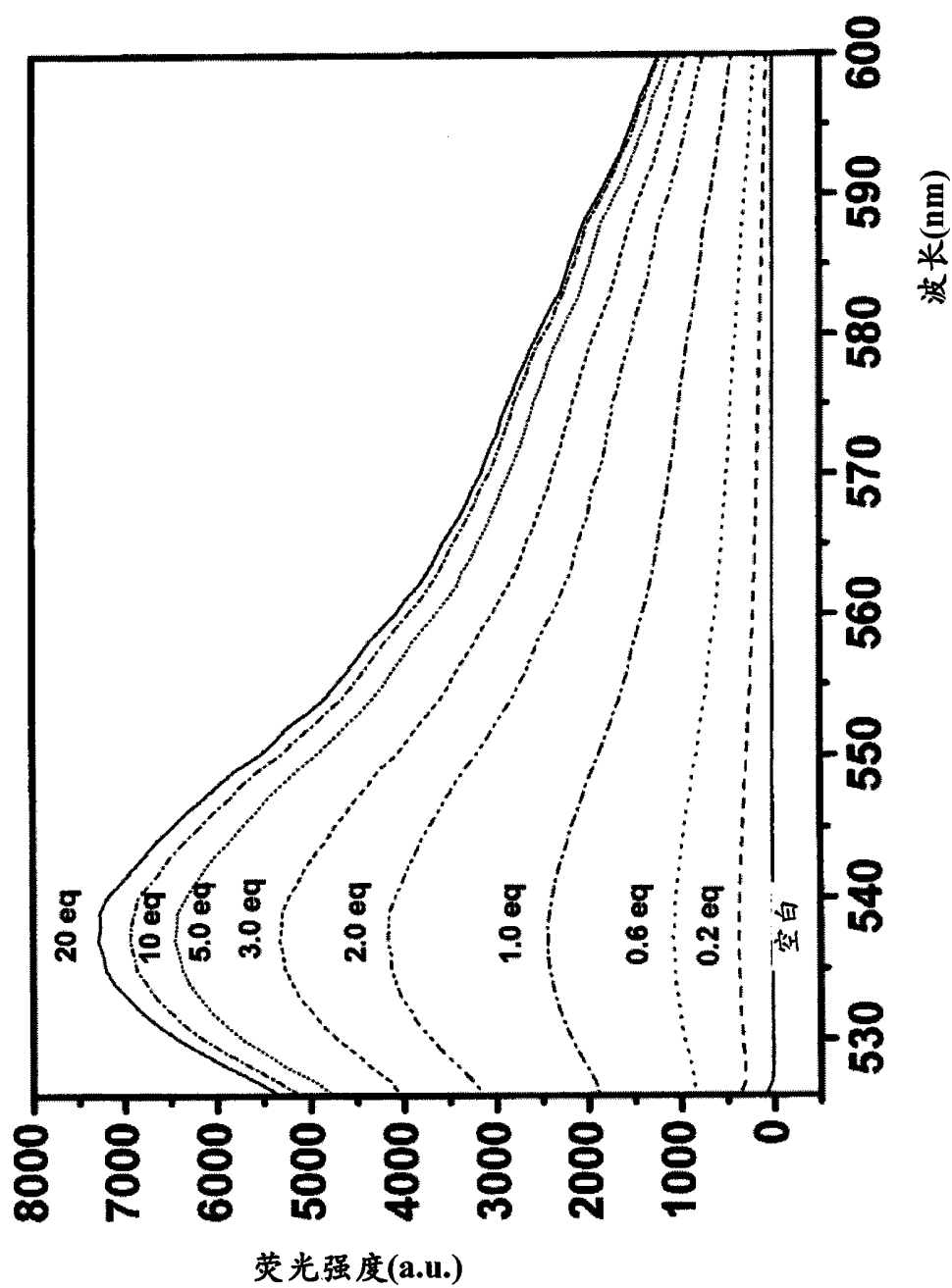


图 1

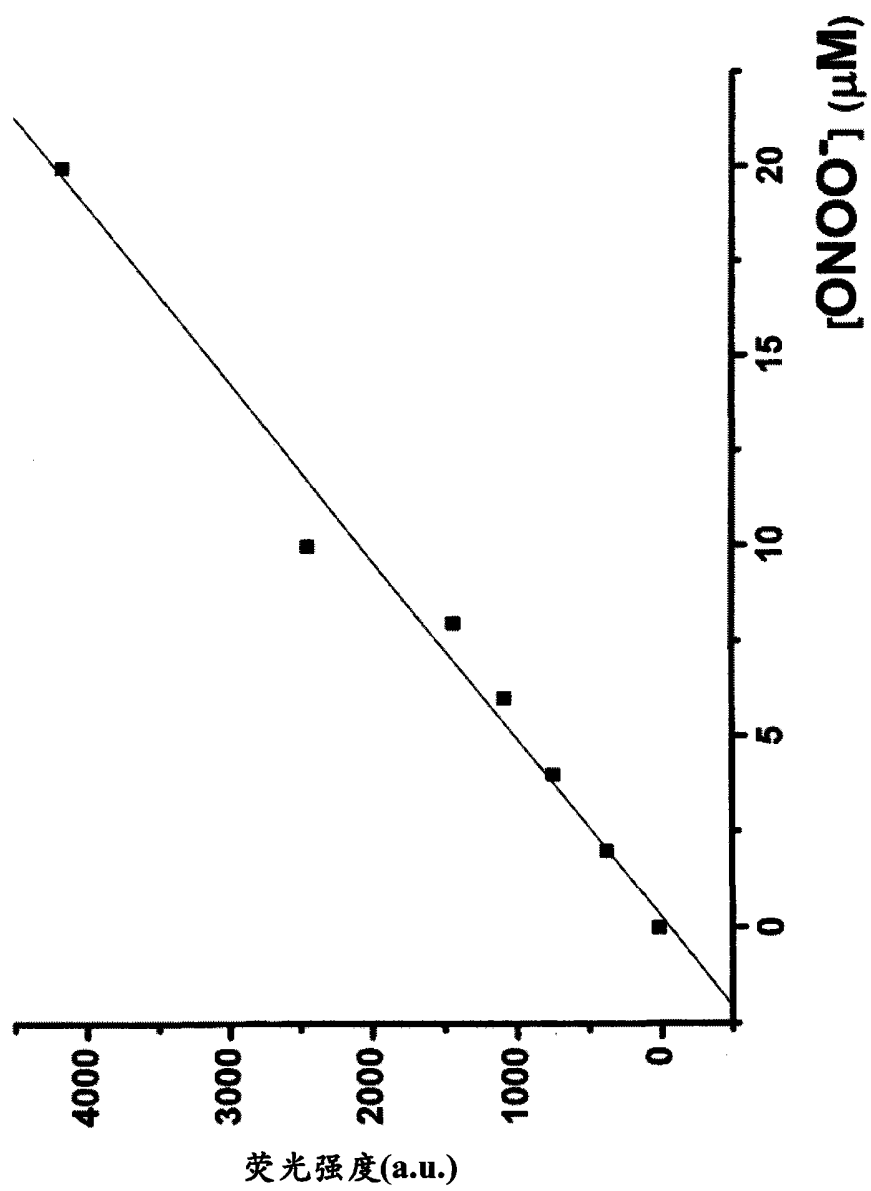


图 2

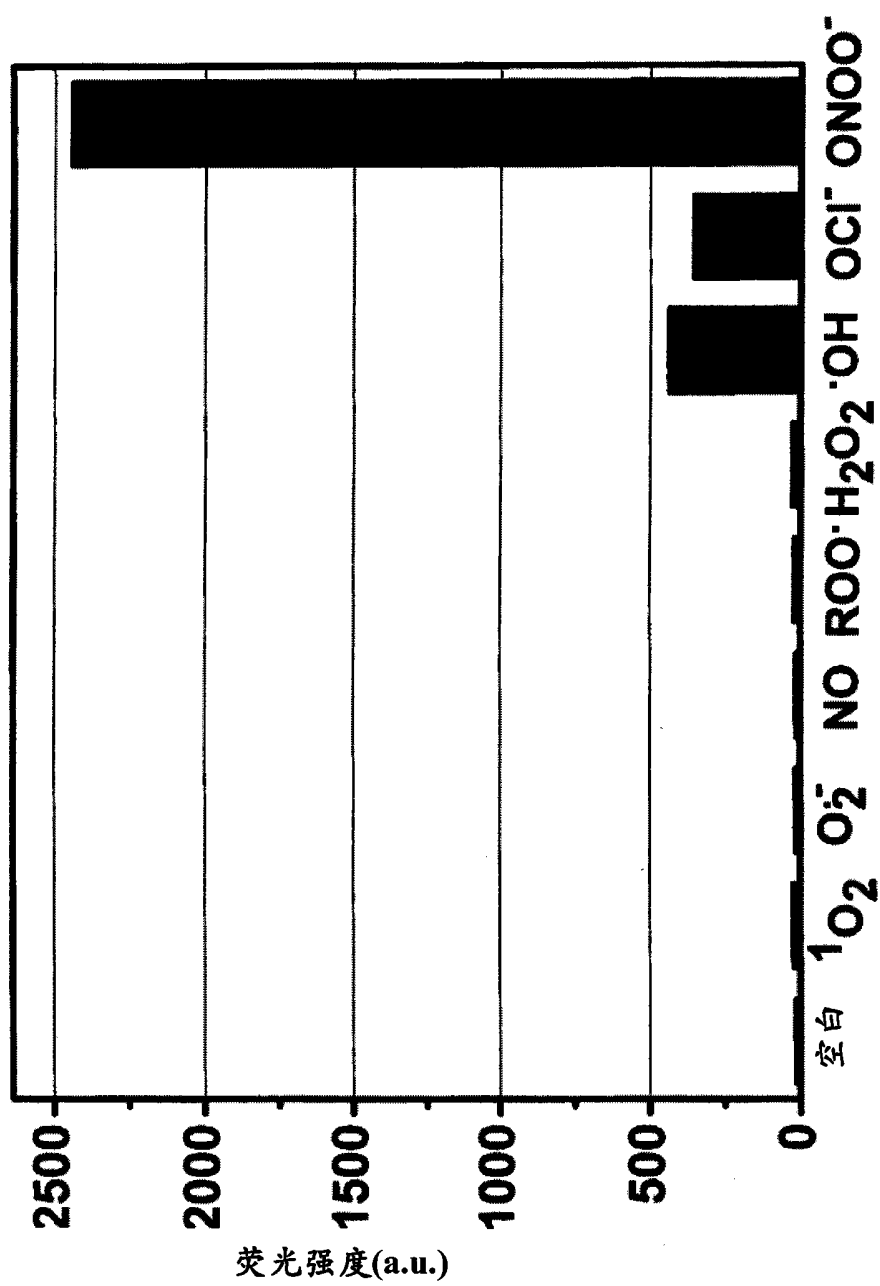


图 3

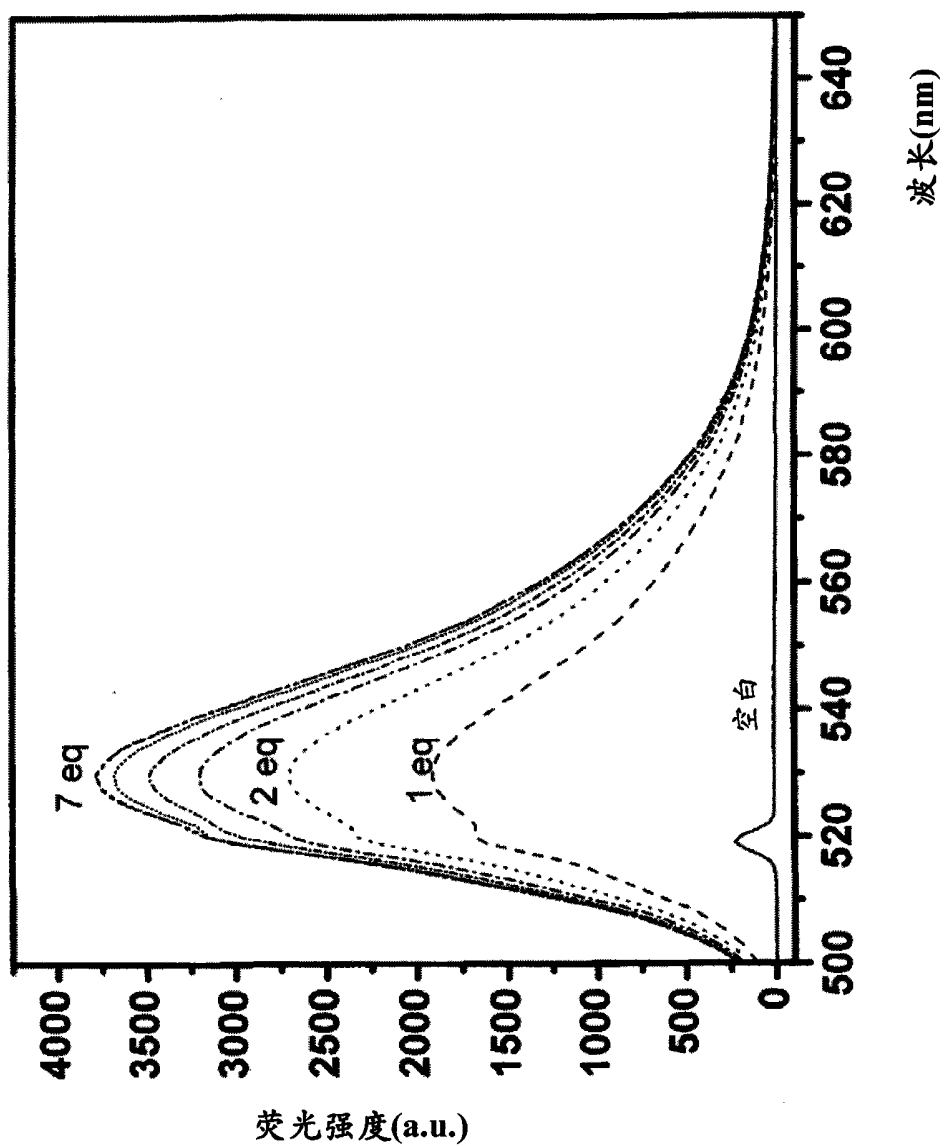


图 4

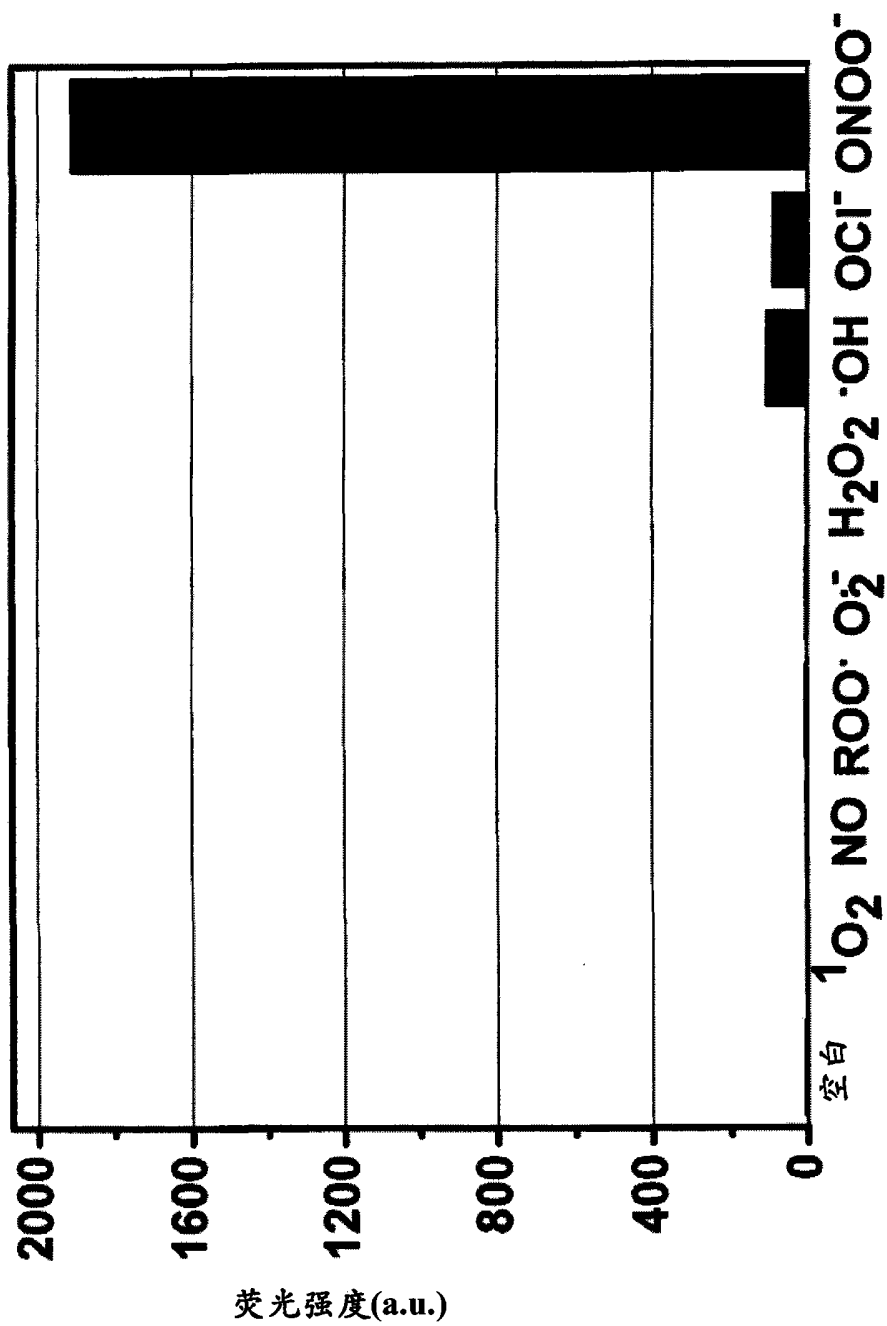


图 5

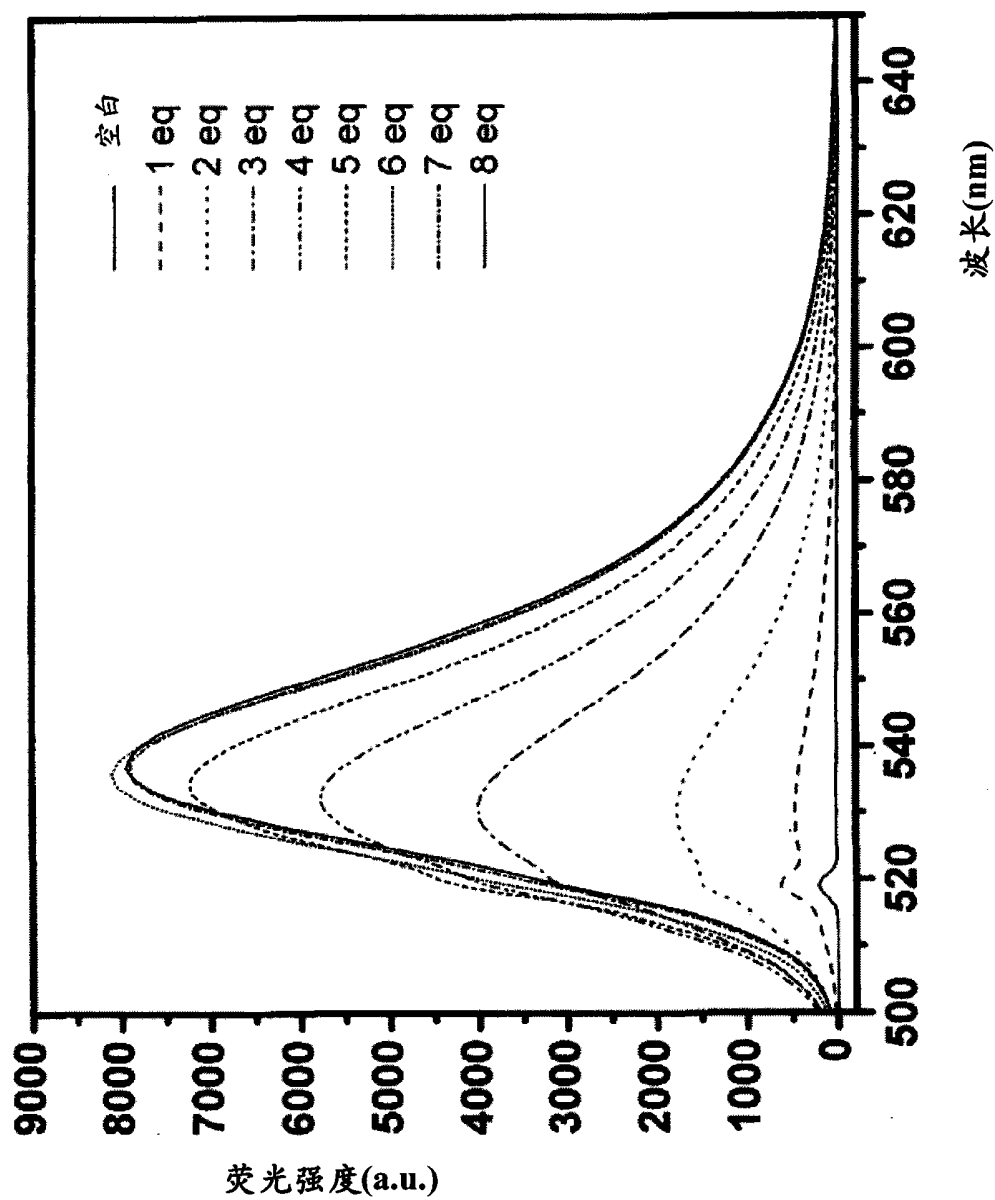


图 6

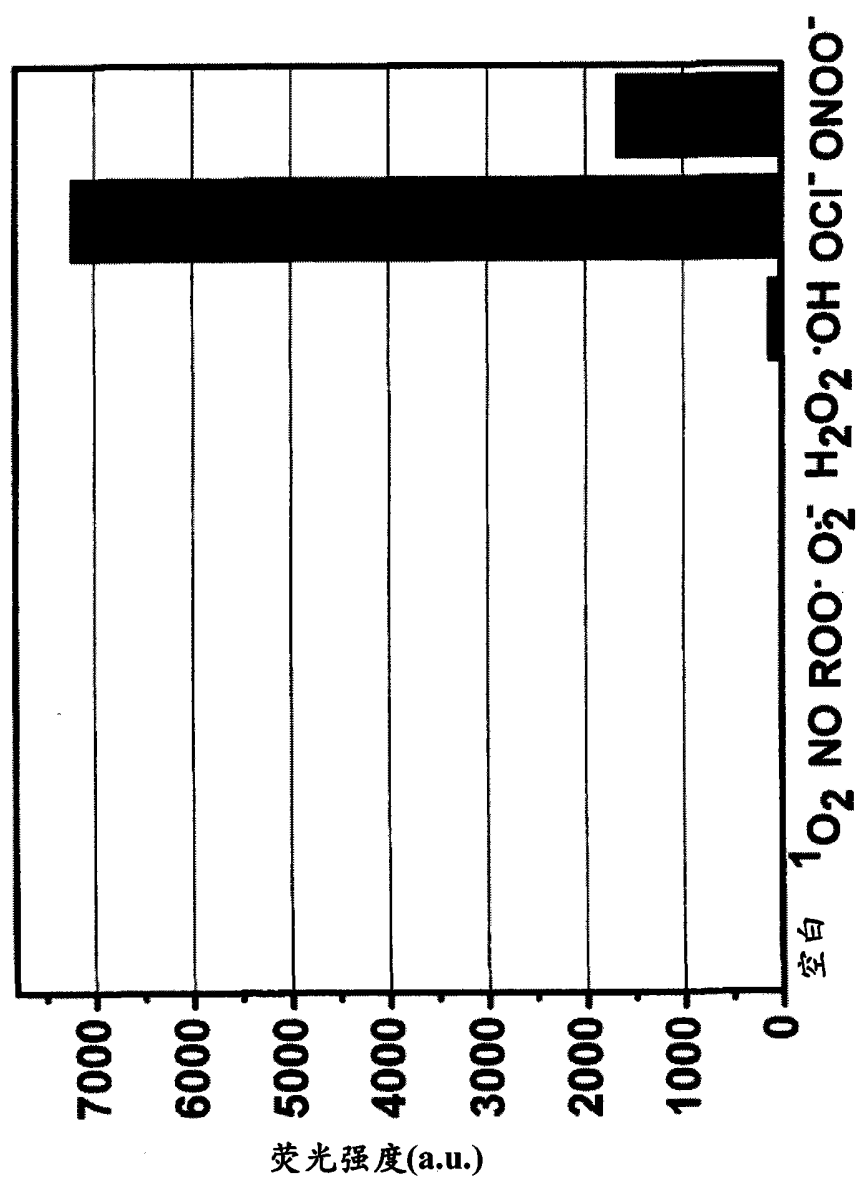


图 7

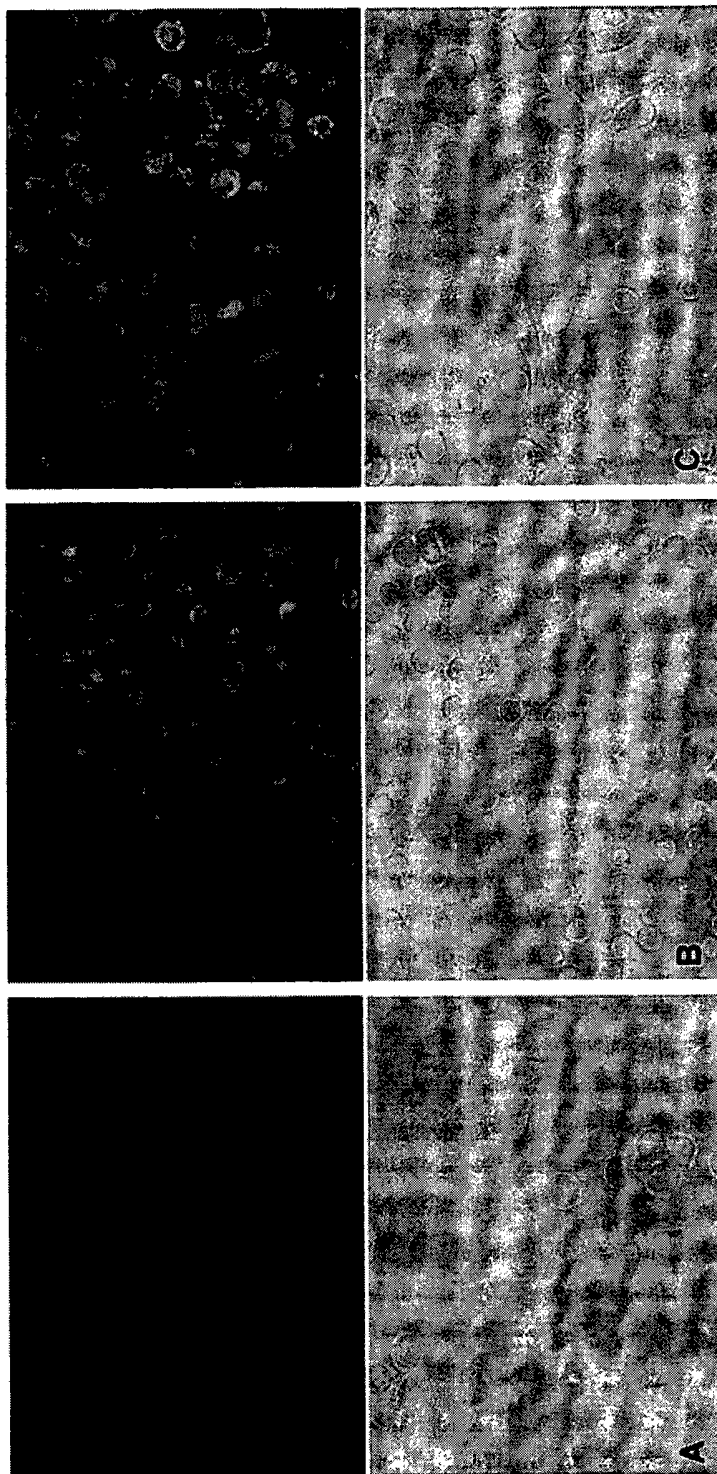


图 8

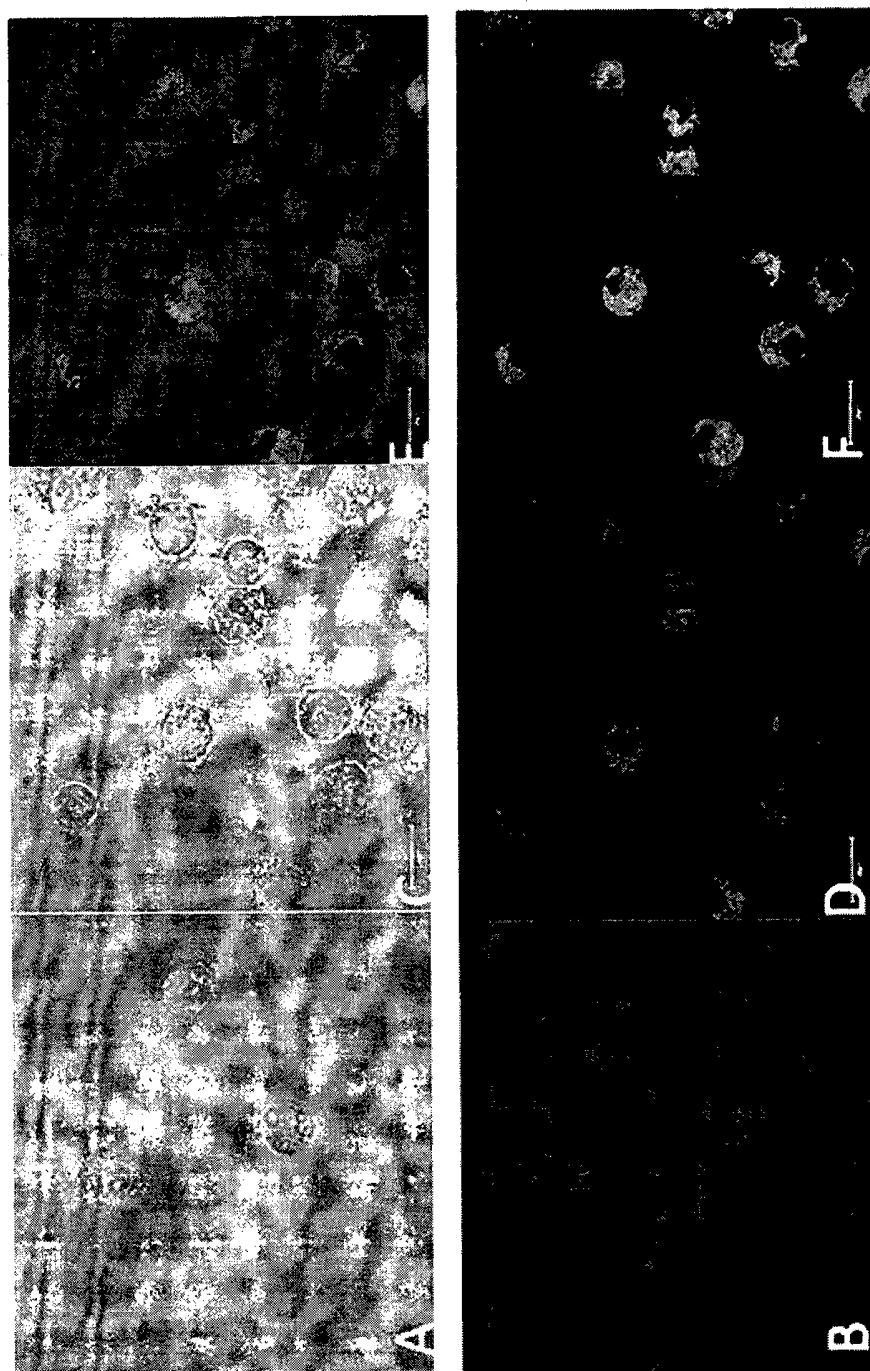


图 9



图 10

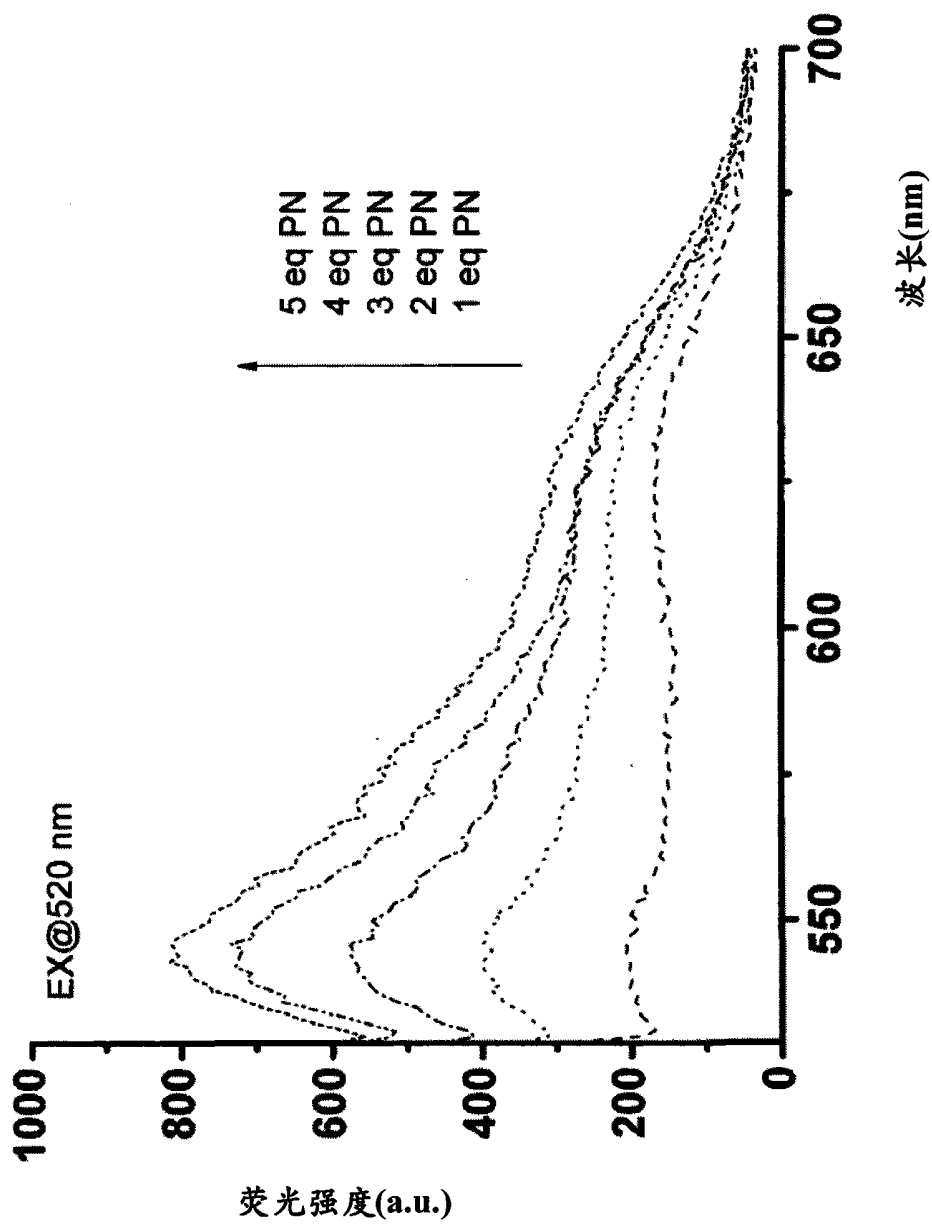


图 11