

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480013905.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

C07D 209/56 (2006.01)

C07D 333/02 (2006.01)

C07B 61/00 (2006.01)

A61K 38/25 (2006.01)

[43] 公开日 2006年11月8日

[11] 公开号 CN 1860364A

[22] 申请日 2004.3.31

[21] 申请号 200480013905.7

[30] 优先权

[32] 2003.4.2 [33] GB [31] 0307559.5

[32] 2003.4.28 [33] US [31] 60/465,807

[86] 国际申请 PCT/GB2004/001418 2004.3.31

[87] 国际公布 WO2004/088312 英 2004.10.14

[85] 进入国家阶段日期 2005.11.21

[71] 申请人 诺丁汉大学

地址 英国诺丁汉

[72] 发明人 M·乔治 S·J·希尔

B·凯拉姆 R·J·米德尔顿

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 周承泽

权利要求书 18 页 说明书 49 页 附图 1 页

[54] 发明名称

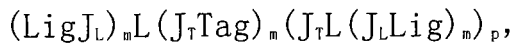
荧光标记的配体

[57] 摘要

包含许多通式 (I) 所示标记非肽配体的库： $(\text{LigJ}_L)_m \text{L}(\text{J}_T \text{Tag})_m (\text{J}_T \text{L}(\text{J}_L \text{Lig})_m)_p$ ，及其盐，它包含一个或多个相同或不同的配体部分 Lig，它们各自通过相同或不同的接头 L 以及相同或不同的连接位点或连接官能团 J_T 和 J_L 连接到一个或多个相同或不同的标记部分 Tag；其中，Lig 包含 GPCR 配体，细胞内酶或底物的抑制剂，或者药物转运蛋白的抑制剂；L 是单键或者是选自如 N、O、S、P 的杂原子、支链或直链饱和或不饱和的，并任选包含杂原子的 C_{1-600} 烷基及其组合的任意接头部分，它们可以是单体、具有 2-30 个低聚重复单元的低聚物、具有超过 30 到至多 300 个聚合重复的聚合物；Tag 是任何已知或新的标记底物；m 各独立地选自 1-3 的整数；p 是 0-3；其特征在于，连接是在包含不同 Lig、 J_L 、L、 J_T 和/或 -Tag 的化合物中的相同或不同

的连接位点上，以及在包含相同 Lig、 J_L 、L、 J_T 和/或 -Tag 的化合物中的不同连接位点上；及其制备方法；制备通式 (I) 所示库化合物或通式 (IV) 所示前体的方法；由所述库选择通式 (I) 所示化合物的方法；与其涉及药效性能的信息相关的通式 (I) 所示的化合物；通式 (I) 所示的新化合物或者通式 (IV) 所示的前体；其用途；与此有关的结合或抑制的方法；与此有关的荧光靶的用途；修饰的细胞表面 GPCR 和表达它的细胞；以及包含通式 (I) 所示化合物及其靶的试剂盒。

1. 一种库，它包括许多通式(I)所示标记的非肽配体：



及其盐，

它包含一个或多个相同或不同的配体部分 Lig，它们各自通过相同或不同的接头 L 以及相同或不同的连接位点或连接官能团 J_T 和 J_L 连接到一个或多个相同或不同的标记部分；其中，Lig 包含 GPCR 配体，细胞内酶或底物的抑制剂，或者药物转运蛋白的抑制剂；

L 是单键或者是选自如 N、O、S、P 的杂原子、支链或直链饱和或不饱和的，并任选包含杂原子的 C_{1-600} 烷基及其组合的任意接头部分，它们可以是单体、具有 2-30 个低聚重复的低聚物、具有超过 30 到至多 300 个聚合重复的聚合物；

Tag 是任何已知或新的标记底物；

m 各独立地选自 1-3 的整数；

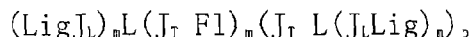
p 是 0-3；

其特征在于，连接是在包含不同 Lig、 J_L 、L、 J_T 和/或-Tag 的化合物中的相同或不同的连接位点上，以及在包含相同 Lig、 J_L 、L、 J_T 和/或-Tag 的化合物中的不同连接位点上。

2. 如权利要求 1 所述的库，其特征在于，GPCR 配体选自任何能有效作为腺苷受体、 β -肾上腺素受体、蕈毒碱受体、阻胺受体、阿片受体、大麻素受体、趋化因子受体、 α -肾上腺素受体、GABA 受体、前列腺素类受体、5-HT(血清素)受体、刺激性氨基酸受体(例如，谷氨酸盐)、多巴胺受体、蛋白酶活化受体、神经激肽受体、血管紧张肽受体、催产素受体、白细胞三烯受体、核苷酸受体(嘌呤和嘧啶)、钙传感受体、甲状腺-刺激激素受体、神经降压肽受体、血管降压肽受体、嗅觉受体、核碱基受体(例如，腺苷)、溶血磷脂酸受体、鞘脂受体、酪胺受体(痕量胺类)、游离脂肪酸受体以及环核苷酸受体等的激动剂或拮抗剂的化合物；细胞内酶的抑制剂是环核苷酸磷酸二酯酶的抑制剂；药物转运蛋白的底物或抑制剂选自基于平衡的药物转运蛋白或 ATP 驱动泵如儿茶酚胺转运蛋白、核苷转运蛋白、ATP-结合盒转运蛋白、环核苷转运蛋白或其衍生物或类似物的底物或抑制剂。

3. 如权利要求 1 和 2 任一项所述的库，其特征在于，一个或多个或者各库化合

物中的一个或多个-Tag 是实体-F1, 且包含任意已知或新的荧光团, 由此, 所述库包含通式 I' 所示的一种或多种或者所有的化合物:



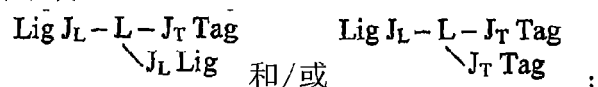
并且, 可以存在其它能在原位发挥功能的 Tag, 例如可以是任意激光活化的 Tag, 它可以激发具有局部或靶向的治疗或破坏性效果。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的库, 其特征在于, 通式 I 或 I' 所示的各化合物包含许多荧光团和/或标记物中的一个, 提供包含一个或多个不同荧光团(较好是不同化学组成、光谱特征等)的不同荧光标记的配体库; 和/或提供包括至少一个荧光标记配体的不同标记的配体库; 或者, 通式 I 或 I' 所示化合物包含许多各自连接到一个或多个不同标记物上的前体配体中的一个, 提供多配体类型的相同或不同标记配体的库; 或者, 通式 I 所示各化合物包含在相同或不同连接位点接头前体配体和至少一个 Tag 的许多接头中的一个; 或者, 通式 I 所示化合物包含相同的接头前体配体的接头部分以及在不同连接位点处的至少一个 Tag, 提供不同连接的标记配体库, 所述配体具有不同的构型或者所参与的药效和结合。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的库, 其特征在于, 所述库包含通式 II-III”中一种或多种所示的许多化合物:

II $(\text{LigJ}_L)_m \text{L} \text{J}_T \text{TagJ}_T \text{L}(\text{J}_L \text{Lig})_n$, 其中, m 如上所述, 较好是 1 或 2, 更好是 1;

III $(\text{LigJ}_L)_m \text{L}(\text{J}_T \text{Tag})_n$, 其中, m 如上所述, 较好是 1 或 2, 更好是 Lig J_L-L-J_L Tag 和/或



其中, 各 J_L 和 J_T 包含上述的 J, 它们可以相同或不同, 并且可以源自 Lig 或 L, 以及 Tag 或 L, 或它们组合中最初存在的官能团, 其特征在于, 在包含不同 Lig、J_L、L、J_T 和/或 Tag 化合物中, 连接是在相同或不同的连接位点; 在任意两种或多种化合物包含相同 Lig、J_L、L、J_T 和/或 Tag 的情况下, 所述连接是在不同的连接位点。

6. 如权利要求 1-5 任一项所述的库, 其特征在于, 所述库包括该库中包含通式 I 所示各化合物的信息, 涉及用于结合或抑制 GPCR 受体或抑制细胞内酶如环核苷酸磷酸二酯酶, 或药物转运蛋白的抑制或通过药物转运蛋白转运的药效, 包括作为激动剂、拮抗剂、底物或抑制剂的指示以及亲和性或抑制性等的测量, 这样就

能将结论量化。

7. 如权利要求 1-6 任一项所述的库，其特征在于，Lig 选自：

a) 黄嘌呤样结构，包括 XAC、茶碱、咖啡因、可可碱、dyphilline、恩丙茶碱 等；或稠合的二芳基结构，包括罂粟碱、二氢奎尼酮如西洛酰胺、潘生丁、长春西汀等；以及它们的类似物；

b) 腺苷样结构，包括 ADAC、NECA 以及它们的类似物；

c) 乙醇胺样结构，包括沙莫特罗、沙丁胺醇、特布他林、噻丙那林、柳胺心定、心得怡、班布特罗、非诺特罗、reprotolol、妥洛特罗、克仑特罗以及它们的类似物；

d) 氧丙醇胺样结构，包括 CGP12177、心得安、心得宁、acebutalol、倍他索洛尔、ICI 118551、阿普洛尔、塞利洛尔(塞利托尔)、美托洛尔(倍他洛克)、CGP20712A、阿替洛尔、比索洛尔、misaprolol、卡维地洛、布新洛尔、艾司洛尔、纳多洛尔、萘比洛尔、氧烯洛尔、扎莫特罗、吲哚洛尔、噻吗咯尔以及它们的类似物；

e) 黄嘌呤样结构，包括 XAC、茶碱、咖啡因、可可碱、dyphilline、恩丙茶碱、西登那菲、EHNA(赤-9-(2-羟基-3-壬基)腺嘌呤)、扎普司特等；或螺二环结构，包括 bypyridines 如氨利酮、咪唑啉类如 CI930、二氢吡嗪酮类如 indolan、咯利普兰、SB207499、等；或稠合的二芳基结构，包括罂粟碱、二氢奎尼酮如西洛酰胺、潘生丁、长春西汀等 以及它们的类似物。

8. 如权利要求 1-7 任一项所述的库，其特征在于，通式 I 或 I' 所示化合物任选包含下文所述的官能团 J，它源自通过反应接头前体或其组分的一种或多种提供接头部分的反应基团与一种或多种提供配体部分的配体前体的活性基团的合成；以及接头前体的一种或多种其它活性基团和一种或多种提供标记部分的标记前体如荧光团标记前体的活性基团的反应。

9. 如权利要求 1-8 任一项所述的库，其特征在于，L 选自饱和或不饱和单键或双键、-O-、-S-、胺、COO-、酰胺、-NN- 肼；以及饱和或不饱和、取代的 或未取代的 C₁₋₆₀₀、较好是 C₁₋₃₀₀、更好是 C₁₋₁₀₀ 支链 或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们中任一个可以包含一个或多个杂原子，选自 N、O、S、P，其中，任选的取代基选自任意的 C₁₋₂₀ 脂族、芳族或脂环族取代基，它们中任一个可包含一个或多个上述杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、肼、氧代、氰基、羰基等。

10. 如权利要求 1-9 任一项所述的库，其特征在于，J_L 和 J_T 可以包含官能团，

来自连接到荧光团和/或配体上的活性基团或位点，选自饱和或不饱和单键或双键、-O-、-S-、氨基、酰胺基、胍、羰基、氧代、烷基、链烯基、炔基、烷氧基、硫氧基等。

11. 如权利要求 1-10 任一项所述的库，其特征在于， $J_{L_m}LJ_{T_m}$ 包含单、二、三、四、五或六氨基、烷硫基、烷氧基、羧酸以及它们的组合，更好是单、二或三氨基烷硫基、氨基烷氧基、烷氧基羧酸、烷氧基胺等；较好是， $J_{L_m}LJ_{T_m}$ 选自单、二或三氨基薄荷烷、氨基乙烷、硫代乙烷、乙烷、氨基酰基，选自多肽，或选自单或聚醚衍生物，例如二胺或二硫代如单或聚乙二醇二胺或三胺或硫代。

12. 如权利要求 1-12 任一项所述的库，其特征在于，以上所述接头部分 $J_{L_m}LJ_{T_m}$ 包含单键或双键或上述单原子或基团，或包含通式 -L-I- 所示的单-、二-、三- 或四-、五-、六官能化直链或支链或环取代的或未取代的烃基，



式中， J - J'' 各自是上述的连接位点或者官能团，独立地选自单键、亚甲基、炔、烯烃、NR、O、NRCO、S、CO、NCO、CHHal、P 等，其中，R 是 H 或 C_{1-8} 烷基或环烷基，或形成具有 N 的环的部分，Hal 是任意卤素，选自氯、碘、溴；并且存在于基团 A-A'' 的任意合理位置；A-A'' 各自是选自 -O-、-C(=O)-、 C_{1-12} 烷氧基、醇基、环烷基、杂环、烷基、链烯基、芳基、芳基酰胺、芳基胺、氨基、硫代烷基、杂芳基(如上所述)以及它们的组合等的基团，任选被独立地选自 C_{1-3} 烷基、 C_{1-5} 烷氧基等的基团取代；

q_L - q_L'' 各独立地选自 0 或 1，或显示为低聚的重复，且为 2-30，或显示为聚合重复，为 31 到至多 300；

R_L 是 C、N 或 S 原子或是 CR_L' 、 NR_L' 、烷基、环烷基、杂环、芳基杂芳基、胺或硫代部分，并当 p 是 1 或 2 时形成支链；其中， R_L' 是 H 或 C_{1-3} 烷基；和 p 如以上所述，为 0、1 或 2；

13. 如权利要求 12 任一项所述的库，其特征在于，各 J、J' 和 J'' 独立地是单键或双键、 NR_L 、-O 或 -S 或 -C(O) 或 -NRC(O) 或 -C(O)NR，如上所述；

A 是烷氧基，较好是 CH_2CH_2O (PEG) 及其低聚物，或是芳烷基胺、芳烷基酰胺、芳烷氧基，或是烷基，较好是 $(CH_2)_{1-12}$ ；

当 p 是 1 或 2 时， R_L 是包括或包含一个或两个支链碳原子的 C_{1-5} 烷基链；

p 是 0、1 或 2；

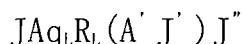
A' 和 A'' 各独立地选自 C_{1-8} 烷基、胺、苯胺、苯酰胺；和

q_L 是 0、1、2-30 或 31-300，且 q_L' 和 q_L'' 是 0 或 1。

14. 如权利要求 12-13 任一项所述的库，其特征在于， $J_m L J_m$ 是单键或具有如下通式



式中，各 J 和 J'' 是胺或 -O-，A 是 CH_2CH_2O ， q_L 是 1-30 或 31-300， R_L 是 CH_2CH_2 或具有如下通式



式中，各 J、J' 和 J'' 独立地是胺、-O 或单键， q_L 是 1、2 或 3-30 或 31-300，A 是 CH_2CH_2O 或 $HNCH_2CO$ ，或 q_L 是 1，A 是 C(O) 或 $(CH_2)_{1-8}$ ，或 q_L 是 0， R_L 是 CH 或 CH_2CH ， q_L' 是 0，或 q_L' 是 1，A' 是 CH_2 ， q_L'' 是 0。

较好是 $O(CH_2CH_2O)_{q_L}CH_2CH_2NH$ 、 $O(CH_2CH_2O)_{q_L}CH_2CH(CH_2NH)NH$ 、 $OCH(CH_2NH)NH$ 、 $-CH(CH_2NH)NH$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-(CH_2)_{1-8}-$ 、 $(-HNCH_2CO-)_{1-3}$ (= -gly₁₋₃-) 等。

15. 如权利要求 1-14 任一项所述的库，其特征在于，以上通式 I 或 I' 所示各化合物包含部分 Lig 和 L，如下所述：

其中，Lig. a_m 为以下任一形式所示的通式，包括其任意可能的连接构型或位点：

Lig. a_m^1



其中，任意或各 Ra^1 - Ra^4 、 X^1 和 X^2 可以包含连接位点或官能团 J，如以上所述；

X^1 和 X^2 各独立地选自 H、O、OR. a、NR. a、NHR. a；

X^1 和 X^2 各自较好是 O；

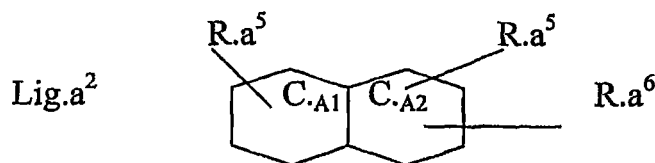
R. a、R. a^1 、R. a^2 和 R. a^3 各独立地选自 H 或 C_{1-4} 直链或支链烷基，较好是 H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基或异丁基，任选被单或多羟基或卤素取代，如 CH_2OH 、 CH_2F 或 $CH_2CHOHCH_2OH$ ；

R. a^4 选自杂原子 O、S 或取代的或未取代的胺或饱和或不饱和，取代的或未取代的 C_{1-20} 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们中任一个可以包含一个或多个杂原子，选自 N、O、S、P；其中任选的取代基选自任意 C_{1-12} 脂族、芳族 或脂环族取代基，任意一个可以包含一个或多个以上所述的杂原子、羟基、

硫醇、卤素、胺、肼、氧代、氰基等；

较好的是， $R.a^4$ 选自任选取代的芳基、环烷基、烷基、酮、(二)胺、(二)酰胺，更好是任选取代的烷氧基、环烷基、胺、酰胺、羧酸，或任选 o-、m- 或 p- 取代的苯基，其中所述取代基包括芳基、烷基、环烷基、杂芳基或杂烷基、胺、酰胺、羧基、羰基等，例如，所述取代基包括，或 $R.a^4$ 包含环己基、环戊基、乙氧基、 $(CH_2)_2PhPh$ 、 CH_2Ph 、 $CONH(CH_2)_nCONH$ 、 $CH_2CONH(CH_2)_2NH$ 、 $CH_2PhNHCOCH_2$ 、 $CH_2CH_2OCOCH_2$ 、琥珀酰亚氨基酯、 $NHCOCH_2$ 、 $CH_2(CH_3)NCOCH_2$ 、 $H_2N(CH_2)_2NHCOCH_2$ 、 $H_2N(CH_2)_8NHCOCH_2$ 、 $H_2NNHCOCH_2$ 、 $CH_2CONH(CH_2)_2NHCOCH_2$ 、 $HOPhCH_2N(CH_2CH_3.HOAc)(CH_2)_2NHCOCH_2$ 、杂环 $-(CH_2)_4CONH(CH_2)_2NHCOCH_2$ 、杂环 $-NHCON(杂环)COCH_2$ 等；

或 Lig. a 具有通式 Lig. a²-



式中，任意或各 Ra^5-Ra^6 ，或环 C 或杂原子可以包含连接位点或官能团 J，如以上所述； $C.A_1$ 和 $C.A_2$ 各独立地选自 C_{5-6} 芳基、杂芳基、环烷基和杂环，更好选自苯基、或包含 1 或 2 个环杂原子的芳基、或包含 1 个环杂原子和/或 1 环 $-C=C-$ 基团的杂环；

各至多 7 个 $R.a^5$ 是环碳原子或环杂原子的取代基，并且独立地选自 H、卤素、羟基、硫醇、胺、COOH、肼、氰基、饱和或不饱和，取代的或未取代的 C_{1-20} 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们中任一个可以包含一个或多个杂原子，选自 N、O、S、P，式中任选的取代基选自任意 C_{1-12} 脂族、芳族或脂环族取代基，它们任一个可以包含一个或多个以上所述的杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、肼、氧代、氰基等，如 $=O$ 、 OCH_3 、 $CH_2Ph(OCH_3)_2$ 、 $O(CH_2)_3CON(CH_3)c.hex$ 、 $N(CH_2CH_2OH)_2$ 、 $c.hex$ 、 $COOCH_2CH_3$ 、 CH_2CH_3 ；

或者，任意两个或多个 $R.a^5$ 形成一个、两个或三个环稠合的环状结构，较好包含稠合的 3 个环芳基、5-杂环、具有与稠合双环 Lig. a 结构共有的 4 个环原子的 6-杂环结构；和

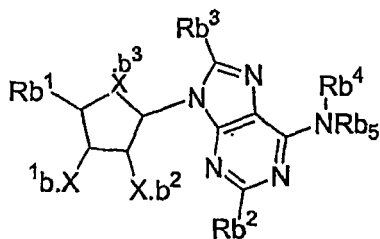
$R.a^6$ 是以上针对 $R.a^5$ 所述的部分；

L. a 如以上针对 L 或 $J_L L J_T$ 所述的，并且合适以上所述的通式 L. I 或子通式，更好选自单键、氨基酸或酰胺，如肽或多肽，例如，gly 或 gly_3 、通式 $-(CH_2)_n$

所示的烷基，其中 n 是 3-8，较好是 3、4 或 6，任选包括一个或多个杂原子或不饱和基团，如 $-O-$ 或 $-S-$ 或 $-CH=CH-$ 等；

Lig. b 适合如通式 Lig. b 所示，包括任意可能的连接构型或位点：

Lig. b



式中，任意或各 Rb^1-Rb^5 或 Xb^1-Xb^3 可以包含以上所述的连接位点或官能团 J。

环取代基 $X.b^1$ 和 $X.b^2$ 独立地选自烃如烷基或 SR_x 、 $NR_{x,2}$ 和 OR_x ，其中，(各) R_x 选自 H、 C_{1-5} 烷基、链烯基；

环杂原子 $X.b^3$ 选自 $-S-$ 、 $-O-$ 和 $-CH_2-$ ；

Rb^1 选自饱和或不饱和，取代的或未取代的 C_{1-4} 脂族、或 C_{1-3} 脂环族，任选包括一个或多个杂原子 N、O、S、P，其中所述取代基选自一个或多个环烷基、杂环、羟基、氧代、卤素、胺；较好的是， $R.b^1$ 包含被 H、烷基或直链或环状伯、仲或叔胺取代的羰基、取代的 C_{1-3} 烷基、环烷基或酰胺，更好是环丙基或 $CONHC_{1-3}$ 烷基如 $CONHEt$ 或 CH_2OH ；和

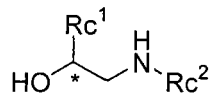
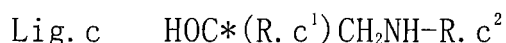
各 $R.b^2$ 和 $R.b^3$ 选自 H、卤素、羟基、硫醇、胺、 $COOH$ 、 CHO 、肼、氰基或饱和或不饱和，取代的或未取代的 C_{1-20} 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们任一个可以包含一个或多个杂原子，选自 N、O、S、P；其中任选的取代基选自任意 C_{1-12} 脂族、芳族或脂环族取代基，它们任一个可以包含一个或多个以上所述杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、肼、氧代、氰基等，较好选自 H、卤素或羟基，较好是 H 或 Cl；

Rb^4 是 H；

Rb^5 是 H 或烷基；

L. b 可以包含连接位点或官能团 J，如以上所述；并且如以上针对 L 或其子通式所述的，更好是饱和或不饱和取代的或未取代的 C_{1-12} 脂族或 C_{1-24} 芳族，如针对 L 所述的，较好包括一个或多个杂原子 O、S 或 N、环状或杂环基团，更好是通式 L. I 或子通式所示，最好是 $(CH_2)_m$ ，其中 m 是 2-12，较好是 3、4、6 或 8，或是 $(Ph-CH_2CONH)_2(CH_2)_2$ ；

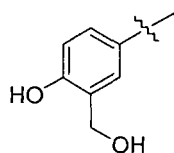
Lig. c 适合通式 Lig. c 所示的非肽，包括任意可能的连接构型或位点：



在此，任意或各 Rc^1 - Rc^2 或 OH，或链 C 或 N 可以包含连接位点或官能团 J，如以上所述；

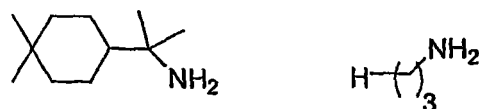
*表示旋光中心，且

其中， R. c^1 是 C_{6-14} 芳基，任选包括一个或多个杂原子，选自 H、O，任选被 OH、Hal (例如 Cl)、 NH_2 、 NHC_{1-3} 烷基、磺酰胺、氧代胺 ($-\text{CONH}_2$) 等取代，更好是单、二或三取代的苯基或喹啉，其中，所述取代基包括 OH、Cl 或 NH_2 ，更好是 m - CH_2OH 、 p -OH 苯基、 m -, p -二羟基苯酚或 m -, m -二羟基苯酚， m -, m -二 Cl、 p - NH_2 苯酚、 p -OH、 m - CONH_2 苯酚或 5-OH、8-喹啉等，如



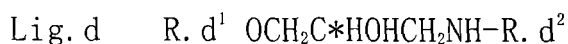
R. c^2 选自饱和或不饱和，取代的或未取代的 C_{1-20} ，较好是 C_{1-12} 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们中任一个可以包含一个或多个杂原子选自 N、O、S、P；其中，任选的取代基选自任意任选取代的 C_{1-12} 脂族、芳族或脂环族取代基，它们任一个可以包含一个或多个以上所述杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、胍、氧代、氰基等以及它们的组合；

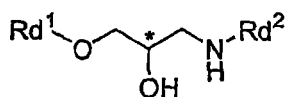
较好的是， R. c^2 选自 C_{1-6} 支链或直链脂族、任选被 OH 取代的 C_{6-10} 芳代脂肪族 (araliphatic)，以及任选包括杂原子，选自 N、O，较好是包括醚 O、如选自 $-(\text{CH}_2)_6\text{OCH}((\text{CH}_2)_3\text{Ph})$ 、 $\text{CHCH}_3(\text{CH}_2)_2\text{Ph}$ 、 $\text{CHCH}_3\text{CH}_2\text{PhOH}$ 、 $\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$ ，或选自如下所示结构：



L. c 可以作为 R. c^2 存在，或可以包含以上所述连接位点或官能团 J，并且如针对 L 所述的，较好是具有以上所述通式 L. I 或其子通式，更好选自 C_{1-12} 烷基、酰胺等；

Lig. d 适合通式 Lig. d 所示的非肽，包括任意可能的连接构型或位点：



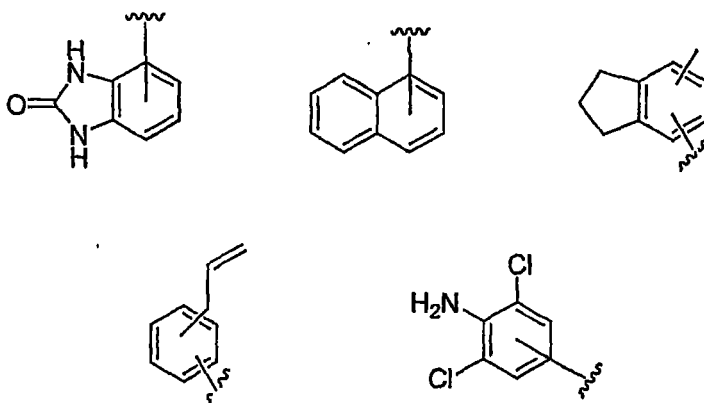


式中，任意或各 Rd^1 - Rd^2 或 OH，链 C 或 N 可以包含连接位点或官能团 J，如上所述；

*表示旋光中心；

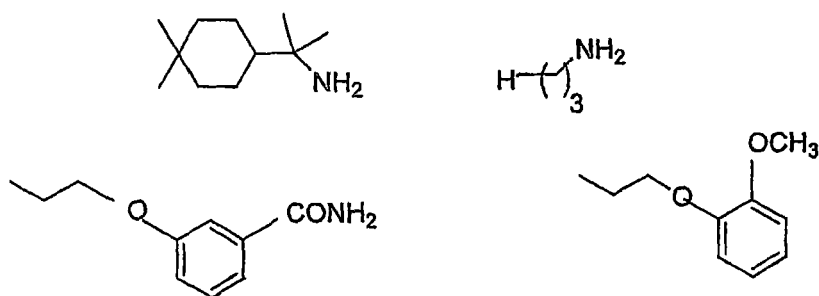
其中， Rd^1 是饱和或不饱和、取代的或未取代的 C_{1-20} 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们中任一个可以包含一个或多个杂原子，选自 N、O、S、P；式中，任选的取代基选自任意 C_{1-12} 脂族、芳族或脂环族取代基，它们任一个可以包含一个或多个以上所述的杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、肼、氧代、氰基等；

较好的是， Rd^1 是取代的或未取代的 C_{1-24} 芳烷基或杂芳烷基，包括单环和稠合的环系统，具有(杂)芳基或环烷基环，其中任选的取代基包括 C_{1-6} 烷基、烷氧基、醚、羰基、链烯基、胺、酰胺，各自任选羰基、酰胺、卤素或 OH 取代，或卤素如氯或 OH， Rd^1 较好是未取代的或取代的烷基、链烯基、卤素、胺、酰胺、羰基、酮、醚取代的苯基或萘基，如以下所述，最好是单-、二-、三- 或四取代的单环或多环稠合的芳基或环芳基或杂环芳基如苯基、咪唑或以下所示的结构，或螺环体系，最好是单-、二-、三- 或四烷氧基烷基、烷氧基烷氧基烷基或 CF_3 取代的苯基或未取代的或单取代的萘或 5,6 环体系，最好是如下所示的结构：



Rd^2 是取代的或未取代的胺、饱和或不饱和，取代的或未取代的 C_{1-12} 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们任一个可以包含一个或多个杂原子，选自 N、O、S、P；其中，任选的取代基选自任意的 C_{1-12} 脂族、芳族或脂环族取代基，它们中任一个可以包含一个或多个以上所述的杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、肼、氧代、氰基等，更好是胺、 C_{1-6} 支链或直链烷基，任选包括醚 O，且

任选被 C₆₋₁₀ 芳基取代, 例如, i. pr、i. bu、或以下通式所示:



L. d 可以作为 R. c² 存在, 或可以包含以上所述的连接位点或官能团 J, 并且如针对 L 及其子通式所述的, 适合以上通式 L. I 及其子通式所示, 更好是单键或如针对 L. a 所述的;

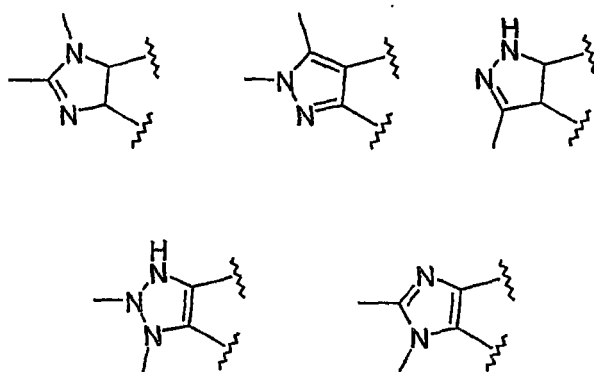
Lig. e 包括细胞渗透部分, 或和细胞渗透 L 或 F1 部分相关, 并且适合如以下所列形式的通式所示, 包括任意可能的连接构型或位点:

Lig. e¹

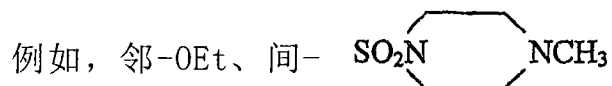


其中, 任意或各自 Re¹-Re⁴、X 和环 C 或 N 可以包含以上所述的连接位点或官能团 J;

h 选自



各自任选被 R. e³-R. e⁴ 取代, 其中, R. e¹-R. e⁴ 如以上所述的 R. a¹-R. a⁴ 所述, R. e³ 是 C₅₋₉ 直链或支链烷基、任选单或多羟基或卤素取代的, 或是任选被烷氧基、磺酰基等取代的芳基:



各 X 独立地选自 H、O、-OR. e²、N、HN、NR. e⁵、HR. e⁶ 以及任选被醚取代的芳

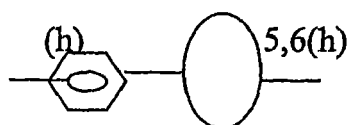
基；或 X 是任选被烷基或烷氧基取代的芳基，如 Ph-邻-OCH₂CH₂CH₃；

当 R. e⁵ 如对于以上 R. e¹ 的所述，或形成具有相邻环上 N 原子的稠环；较好是 1 或 2 稠合的 5 元环；

R. e⁶ 如对于以上 R. e¹ 的所述，或选自任选取代的苯基，其中任选的取代基包括醚如 o-乙氧基或 o-丙氧基、烷基、OH 等、磺酰基、羰基等，它们被杂环、或环 C₅₋₈ 烷基如甲基、哌嗪基、磺酰基等取代；

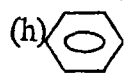
或 Lig. e 如通式 Lig. e² 所示

Lig. e²

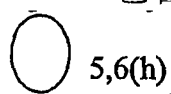


其中，任意或各自的游离环原子或其取代基可以包含连接位点或官能团 J，如上所述；

各螺环任选包含零或一个或多个杂原子 h，它们较好是 N，更好的是，



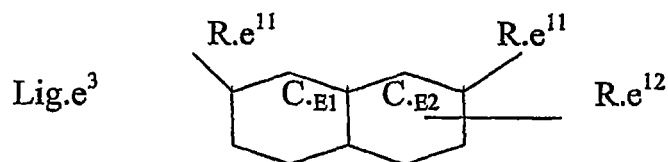
包含 0 或 1 个 N 杂原子；和



包含 0、1 或 2 个 N 杂原子，并且是不饱和的，或包含一个或两个 C=C-或-C=N-基团；和

其中，各环任选被一个或多个氧代、CO、COOH、C₁₋₆ 烷基或线型或环状烷氧基如甲氧基、乙氧基或环戊氧基取代，任选被一个或多个氧代、CO、COOH、CN 或 C₁₋₆ 脂环族或胺基团、胺或一个或多个螺环或稠合的杂环取代；

或 Lig. e 如通式 Lig. e³ 所示



式中，任意或各 Re¹¹-Re¹²，或环 C 或杂原子或环取代基可以包含连接位点或官能团 J，如上所述。

C. E₁ 和 C. E₂ 各独立地选自 C₅₋₆ 芳基、杂芳基、环烷基和杂环，更好选自苯基，或包含 1 或 2 个环杂原子的芳基、或包含 1 个环杂原子 和/或 1 个环 - C=C-基团的杂环；

至多 7 个 R. e¹¹ 各自是环碳或环杂原子的取代基，且各独立地选自饱和或不饱

和、取代的或未取代的 C_{1-20} 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们中任一个可以包含一个或多个杂原子，选自 N、O、S、P，其中任选的取代基选自任意 C_{1-12} 脂族、芳族或脂环族取代基，它们中任一个可以包含一个或多个以上所述的杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、胍、氧代、氰基等，如=O、 OCH_3 、 $CH_2Ph(OCH_3)_2$ 、 $O(CH_2)_3CON(CH_3)c.hex$ 、 $N(CH_2CH_2OH)_2$ 、 $c.hex$ 、 $COOCH_2CH_3$ 、 CH_2CH_3 ；

或任意两个或多个 $R.e^{11}$ 形成单环、二环或三环稠合的环状结构，较好包括稠合的三环芳基、5-杂环、具有与稠合双环 $Lig.e^3$ 结构共有的 4 个环原子的 6-杂环结构；

$R.e^{12}$ 是以上 $R.e^{11}$ 所定义的部分；

较好的是， $Lig.e$ 如通式 $Lig.e^1$ 所示，如上所述，特别是当 $R.e^2$ 和 $R.e^3$ 分别为丙基和丁基时；

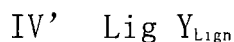
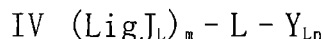
$L.e$ 可包含以上所述的连接位点或官能团 J，适合如以上对 $L.a$ 所述的。

16. 如权利要求 1-15 任一项所述的库，其特征在于，F1 选自染料，尤其是包括荧光素、荧光素衍生物，包括 FITC 和荧光素样分子，如 Oregon Green™ 及其衍生物、Texas red™、7-硝基苯-2-氧代-1,3-二唑(NBD)及其衍生物、香豆素和衍生物、萘(包括衍生物)、丹磺酰氯或其类似物或衍生物、Cascade Blue™、EvoBlue 及其荧光衍生物、芘和吡啶基噁唑衍生物、菁蓝染料、dyomics(DY 染料和 ATTO 染料)及其荧光衍生物、Alexaflu 染料及其衍生物、BDI 染料，包括市售的 Bodipy™ 染料、赤藓红、曙红、芘、葱、吡啶、荧光藻胆蛋白及其共轭物和荧光化微珠、若丹明及其荧光衍生物，包括若丹明 Green™，包括四甲基若丹明、X-若丹明和 Texas Red 衍生物、以及 Rhodol 绿™，使用异氰酸酯、琥珀酰亚胺基酯或二氯三嗪基活性基团偶联到胺基上，以及其它红、蓝或绿的吸收荧光染料，尤其是红色吸收染料，如 Buschmann V 等、Bioconjugate Chemistry (2002)，ASAP 文章所述。

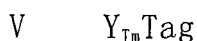
17. 如权利要求 16 所述的库，其特征在于，包括 BODIPY™ 结构的 $J_{r-t}-F1$ 的特征在于双吡咯亚甲基硼二氟化物芯，任选通过一个或两个稠合的环进行修饰，任选用一个或几个取代基如烷基、烷氧基、芳基、杂环等取代，其中，一个取代基 - t-如上所述用于连接上述配体前体，所述取代基 - t- 任选包含最接近的不饱和或芳基部分，包括中短、中等或长链炔基或环烷基部分，且包含以上所述通过活性基团连接的部分，如羧基、磺酸酯或杂原子如 O 或 S 或来自烷基卤化物处连接的亚甲基，如甲基溴、卤代乙酰胺、磺酸酯等亲电基团。

18. 一种用于制备以上所述库的方法，包括使许多配体前体中的一个或各个与包含接头部分或配体、标记物以及接头前体的标记前体反应，其中，如上所述，连接可以在不同化合物中的相同或不同活性位点处。

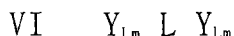
19. 如权利要求 18 所述的方法，它是一个组方法；所述方法较好包括使通式 IV 和/或 IV' 所示一种或多种配体前体与通式 V 和/或 V' 所示许多分析标记底物中的一种或多种以及任选的一种或多种连接种类 VI 或 VI' 或 VI'' 反应：



其中，所述配体包含一个或多个，或不同活性基团 Y_L 或 $\text{Y}_{L_{1g}}$ ，如上所述形成连接官能团 J、 J_L 或 J_T ；



其中，所述分析标记底物包含一个或多个，或不同活性基团 Y_T ，如上所述形成连接官能团 J 或 J_T ；



其中，Lig、J、L、 J_T 和 Tag 以及各 m 独立地如上所述；

其中，通式 IV 或 IV' 所示各化合物能与通式 V 或 V' 所示各化合物反应，任选通过各种类 VI 或 VI' 或 VI'' 如上所述形成通式 I 所示许多化合物。

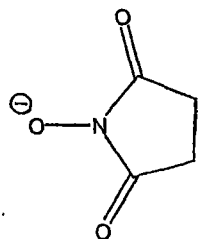
20. 如权利要求 18 或 19 所述的方法，其特征在于，如以上所述，例如通过取代反应或加成或加成-消去反应， $\text{Y}_{L_{1g}}$ 、 Y_L 和 Y_T 具有用于连接的合适活性基团官能团。

21. 如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，取代反应选自如以上所述的亲电和亲核反应位点的反应：

亲电 Y	亲核 Y	所得共价键，J	离去基团
羧酸	醇	酯	-OH, -H
羧酸	胺	甲酰胺	-OH, -H
羧酸	肼	酰肼	-OH, -H
烷基卤化物	醇	醚	-Hal, -H
烷基卤化物	硫醇	硫代醚	-Hal, -H
烷基卤化物	胺	烷基胺	-Hal, -H
烷基卤化物	COOH	酯	-Hal, -H

卤代乙酰胺	硫醇	硫代醚	-Hal, -H
磺酸酯类	胺	烷基胺类	RSO ₃ ⁻ , -H
磺酸酯类	醇	醚	RSO ₃ ⁻ , -H
磺酸酯类	硫醇类	硫代醚类	RSO ₃ ⁻ , -H
磺酰基卤化物	胺	磺酰胺类	-Hal, -H
磺酰基卤化物	醇	磺酸酯类	-Hal, -H
琥珀酰亚胺酯	醇	酯	-OSu*, -H
琥珀酰亚胺酯	羟氧化物类	酯	-OSu*, H 或 M ⁺
琥珀酰亚胺酯	硫醇类	硫代酯类	-OSu*, -H
琥珀酰亚胺酯	胺	甲酰胺	-OSu*, -H
琥珀酰亚胺酯	肼	酰肼	-OSu*, -H

其中, *是



加成反应适合选自在以上所述 IV 和 V 中的亲电和亲核反应位点的环加成或加成-消去反应:

亲电 Y	亲核 Y	共价连接, J	离去基团
叠氮化物	炔	三唑*	无
2-酰基环单 -/ 二 - 酮 (5 或 6 元环)	二亲核, 例如酰肼	6, 7-二氢-1H-吡唑-4(5H)-酮 4, 5, 6, 7-四氢-1H-吡唑 1, 4, 5, 6-四氢环戊[c]吡唑 5, 6-二氢环戊[c]吡唑-4(1H)-酮	H ₂ O H ₂ O H ₂ O H ₂ O

其中, *是[3+2]双极性环加成。

22. 一种制备如权利要求 1-17 任一项所述通式 I 所示化合物的方法, 所述方法包括如上所述使通式 IV 或 IV'所示化合物与通式 V 或 V'所示化合物以及任选还有通式 VI 所示化合物反应。

23. 一种制备如权利要求 18-21 任一项所述通式 IV 所示化合物的方法, 所述方法包括通过购买或者本领域已知的方法制得配体前体 Lig, 若需要的话, 与接头前体 VI" 或其组分反应, 和/或产生一个或多个反应位点 Y 或 Y_{Lig} 或 Y_L 。

24. 由以上所述库选择通式 I 所示化合物的方法, 所述方法包括使用以上所述方法合理设计以上所述通式 I 所示化合物库, 确定所述库中许多或所有化合物的药效, 并选择具有所需药效的化合物。

25. 如权利要求 24 所述的方法, 其特征在于, 所述方法包括制备化合物的预备库, 进行筛选以评定结合、抑制、转运等, 选择在筛选中确定具有有益性能的化合物, 并基于筛选的指示根据连接部分的性质或连接位置进行修饰或官能化, 制备优化的库。本发明的具体优点在于, 来自筛选的分子药效和光化学反馈到所述库的设计中。

26. 如权利要求 1-17 任一项中所述通式 I 或 I' 所示的化合物, 其特征在于, 所述化合物和涉及其药效性能的信息相关, 所述药效以激发最大值和发射最大值表示的光谱性能、荧光寿命和发射量子产率、以及以表达以上所述 GPCR 受体或表达细胞内酶如环核苷酸磷酸二酯酶的细胞, 或以上所述药物转运蛋白限定的药效来表示, 并加之以受体结合或受体官能团的抑制或拮抗以及抑制 (pK_B) 或拮抗 (pK_I) 结合常数的值, 以及任选连同在单个活细胞中药理结合的用于说明所述抑制或拮抗的荧光图像; 较好的是, 所述药效性能以激动剂刺激的 EC_{50} 值或者 pK_i 值 (激动剂刺激第二信使产生的拮抗作用) 或底物 K_m 值或拮抗剂 K_i 值 (用于刺激或抑制细胞内酶或药物转运蛋白)。

27. 如权利要求 1-17 任一项中通式 I 或 I' 所示的化合物, 它选自以上所述通式 Lig. a_m L. a-Fl. a_n 到 Lig. e_m -L. eFl. e_n :

其条件是:

a) 当 Lig 是 Lig. a 中的 XAC ie 时, 当 $R.a^1$ 和 $R.a^2$ 各自是丙基时, $R.a^3$ 是 H, $R.a^4$ 是 $-Ph-OCH_2CONH(CH_2)_2NH-$, L 是单键, 或 L 是 gly, $n=3$; 或 L 是 NCS, F1 不是荧光素; 或

当 Lig 是 XAC, L 是单键或 NCS 时, F1 不是荧光素或 NBD;

当 Lig 是腺苷时, F1 不是 Fmoc (CA134: 04756); 或

当 Lig 是 ADAC, 即 $R.b^1$ 是 CH_2OH 时, $R.b^2$ 和 $R.b^3$ 是 H, L 是 $-(Ph-CH_2CONH)_2(CH_2)_2-$, 或 L 是单键, F1 不是荧光素、NBD 或若丹明; 或

当 Lig 是 NECA (结合部分 $-(CH_2)_m$), 即 $R.b^2$ 和 $R.b^3$ 是 H, L 是单键, 或是

- (CH₂)_m; 当 m 是 2, 4, 6, 8 或 10, 那么 F1 不是 NBD, 或当 m 是 3, 4, 6, 8, 10 或 12, 那么 F1 不是丹磺酰基; 或

当 Lig 是 N⁶-[2-(4-氨基苯基)乙基]腺苷, L 是 (CH₂)₂PhNH 时, F1 不是 FITC (CA 131: 56155(8))

d) 当 Lig 是 CGP12177, L(R. d²) 是单胺薄荷烷时, F1 不是 BODIPY[®] TMR; 或当 Lig 是 CGP12177, L 是 1, 1, 4, 4-四甲基丁基胺, 即 C(CH₃)₂(CH₂)₂C(CH₃)₂NH- 时, F1 不是 BODIPY[®] FL; 或当 L 是 C(CH₃)₂(CH₂)₂C(CH₃)₂NHCSNH- 时, 那么 F1 不是 FITC、曙红或赤藓红; 或当 L 是单胺薄荷烷时, F1 不是 FITC (CA 131: 56155(4)); 或

当 Lig 是 CGP12177, L 是单键时, F1 不是 NBD; 或

当 Lig 是阿普洛尔, 即 o-2-丙烯苯基, L 是 -C(CH₃)₂- 或单键时, F1 不是 t NBD; 此外, 任选

a) 当 Lig 是 XAC 即在 Lig. a 中, 当 R. a¹ 和 R. a² 各自是丙基, R. a³ 是 H, R. a⁴ 是 -Ph-OCH₂CONH(CH₂)₂NH-, L 是单键时, F1 不是 BODIPY[™] 630/650; 或

b) 当 Lig 是 ABEA, 即 m 是 4 和 L 是单键时, F1 不是 BODIPY[™] 630/650。

28. 如权利要求 18-21 任一项中通式 IV 或 IV' 所示化合物或其库, 它用于连接到任意合适的通式 V 或 V' 所示的标记物上, 其条件是:

当 Lig 是 Lig. a, 并是以上所述 1, 3-二烷基黄嘌呤, 式中 X¹ 和 X² 是=O, R. a³ 是 H, R. a¹ 和 R. a² 均为 CH₃ 或均为 n-C₃H₇, 那么 R. a⁴ 不是 4-羟基苯酚或 PhOCH₂CO₂H; 或

当 R. a¹ 和 R. a² 均是 n-C₃H₇, 那么 R. a⁴ 不是 PhOCH₂OCNHP₃OH、PhOCH₂OCONsuccin、PhOCH₂CONH₂、PhOCH₂CONH(CH₂)₂NH₂、PhOCH₂CONH(CH₂)₆NH₂、PhOCH₂COHNNH₂ 或 PhOCH₂CONH(CH₂)₂N(CH₂CH₃. HOAc)CH₂PhOH; 或

当 Lig 是 CGP12177, 那么 L 不是 -C(CH₃)₂(CH₂)₂C(CH₃)₂NH₂ (CA 121: 103486; 或

当 Lig 是 aden, L 不是 -(CH₂)₂S(CH₂)₂NH₂ (CA 125: 218348; 或 L 不是 (CH₂)₆NH₂ 或 CH₂CONH(CH₂)₆NH₂ (CA 134 : 2043) ; 或 L 不是 (CH₂)₂NH₂ 或 (CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂NH₂ (CA 135: 25706); 或 L 不是 (CH₂)_nNH₂, 式中 n 是 2-12 (CA 108: 715);

或当 Lig 是阿普洛尔时, L 不是 (CH₂)₈NH₂; 或当 Lig 是心得安时, L 不是 (CH₂)₄NH₂ (CA 124: 8848);

或当 Lig 是阿普洛尔时, L 不是 $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2$ (CA 108: 215827);

或当 Lig 是 ICI 118551 时, L 不是 $(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$; 或当 Lig 是心得安时, L 不是 $(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ (CA 98: 4564)。

29. 如权利要求 18-21 任一项所述的通式 V 或 V' 所示的荧光团接头。

30. 一种试剂盒, 它包含配体前体、接头前体和权利要求 18-21、27 或 28 任一项中通式 IV、IV'、V、V' 和/或 VI 所示的标记前体, 用于制备权利要求 1-17 任一项中通式 I 所示化合物的库。

31. 如权利要求 1-17 任一项中通式 I 或 I' 所示荧光配体或其库用于显影受体或受体结合、评定荧光配体的药效性能、在结合到靶受体的新化学实体的高通量筛选中、在抑制细胞内酶或抑制药物转运蛋白或药物转运蛋白的底物中, 在研究适于转运的药物转运蛋白或药物, 在区分健康组织或患病组织等中的应用。

32. 用于受体结合或抑制、细胞内酶抑制或药物转运或抑制以及显影的方法, 所述方法包括使权利要求 1-17 或 27 任一项通式 I 或 I' 所述化合物和样品接触, 便于其结合或抑制或由此转运, 并检测荧光或其位置的变化。

33. 如权利要求 32 所述的方法, 其特征在于, 样品包括细胞材料, 选自细胞、细胞提取物、细胞均浆、纯化的或重建的蛋白质、重组蛋白质或合成蛋白质等, 并包括通式 I 所示化合物的靶标。

34. 如权利要求 32 和 33 任一项所述的方法, 其特征在于, 样品包括活细胞材料, 更好包括单个细胞或亚细胞隔室, 最好是包括活细胞中的 GPCR、细胞内酶或药物转运蛋白、包含这些蛋白质的膜、增溶的受体、酶或药物转运蛋白或 GPCR 阵列。

35. 如权利要求 32-34 任一项所述的方法, 其特征在于, 在接触荧光配体前, 细胞材料可以标记, 例如通过用 GFP 例如 GFP 标记的 GPCR、GFP 标记的细胞内酶以及 GFP 标记的药物转运蛋白, 或者天然受体、细胞内酶或药物转运蛋白, 荧光抗体已经靶向该转运蛋白, 使细胞受体、酶或转运蛋白显影, 并覆盖所述荧光配体。

36. 荧光靶标例如, 绿荧光蛋白质标记的受体、细胞内酶或药物转运蛋白在权利要求 32-35 任一项所述方法中的应用。

37. 如权利要求 36 所述的应用, 其特征在于, 交叉关联的荧光相关光谱或荧光强度测量能在单独测量中定量分析配体-受体、配体-酶、配体-药物转运蛋白或药物转运相互作用。

38. 一种细胞表面 GPCR，在其 N-端或天然产生域上进行修饰，以表达用于活细胞中市售黄光抗体的短表位标记物，提供对荧光配体-受体相互作用的两色分析。

39. 表达细胞表面 GPCR 的 CHO 细胞，如权利要求 38 所述进行修饰，标记物序列的荧光抗体用在活细胞中，提供对荧光配体-受体相互作用的两色分析。

40. 一种试剂盒，它包含权利要求 1-17 或 27 任一项所述通式 I 或 I' 所示的化合物以及作为细胞系、表达 GPCR、细胞内酶或药物转运蛋白、包含来自这种细胞系的这些蛋白质的膜增溶受体、酶或药物转运蛋白或来自所述细胞系的 GPCR 阵列。

41. 如权利要求 40 所述的试剂盒，其特征在于，所述来自细胞的材料可以作为三种形式中的一种提供：(1) 来自表达绿荧光蛋白质标记的受体、细胞内酶或药物转运蛋白的细胞；(2) 来自表达表位标记物的细胞，用于市售的荧光抗体；或者 (3) 野生型蛋白质，也提供了特异性荧光抗体。

42. 如权利要求 39 或 40 所述的试剂盒，其特征在于，它包含权利要求 1-17 或 27 任一项通式 I 或 I' 所示的化合物以及对天然蛋白质的荧光抗体，它可以用在天然(非重组)细胞中。

43. 在说明书、实施例和/或附图中所述的库、化合物、前体、工艺、方法、靶标材料或试剂盒。

荧光标记的配体

本发明涉及一种标记的非肽配体库，它包含一个或多个配体部分，它们各自连接到一个或多个不同标记部分；其制备方法；合理设计库以及由标记配体库进行选择的方法；包含用于制备标记的非肽配体库的活性非肽配体以及活性标记底物的试剂盒；伴随其药理学信息产生的标记的非肽配体；新的标记的配体；新的配体前体及其制备方法；已知的和新的标记的配体以及标记的配体库在研究受体结合中的用途，所述受体结合如 G-蛋白质偶联受体(GPCR)结合或者细胞内酶抑制如环核苷酸磷酸二酯酶抑制以及将药物结合到药物转运蛋白(例如，核苷转运蛋白或者 ATP 结合盒转运蛋白)；更具体地是使用如共焦显微术和荧光激活分选以及荧光相关显微镜的技术研究细胞群或单细胞如急性分散细胞中的这些相互作用。

所述腺苷-A₁受体(A₁-AR)是 GPCR，它是在各种组织(包括脑、心脏、脂肪组织以及肌肉)中发现的，并且已经在各种病症的病理生理学中提到(Ralevic, V. 和 Burnstock, J(1998) Pharmacol. Rev. 50, 415)。

目前，A₁-AR 药理学的研究仅可以在细胞中很好的进行，所述细胞可以使用例如放射性配体结合的技术大量生长。放射自显影法能进行单独的细胞研究，但是不能直接判读结合情况，而且要花费至多 4-6 周来使胶片显影，得到结合的结果。为了克服这一问题，已经采用很少的荧光配体来使受体显像，并使用共焦显微术(CSLM)、共焦板读数器、荧光偏振板读数器以及荧光相关光谱(FCS)在单细胞中获得定量的受体-配体结合的数据。共焦显微术可以显示细胞的剖面，荧光团在细胞边缘的浓度显示膜受体的结合。FCS 分析荧光种类的扩散特征，快速扩散的游离配体可以不同于缓慢扩散的受体结合配体，并在容积定位到于细胞膜上时同时进行定量。

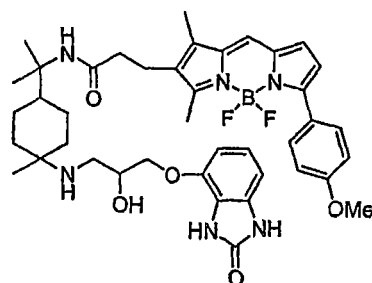
McGrath 等 TiPS, 1996 年 11 月(卷 17) 393-399 讲述了使用荧光配体代替更多常规放射性配体来研究细胞受体的可能性，使用共焦光谱学和荧光激活细胞分选(FACS)来记录指示受体数的配体-受体复合物的量。他之处为了识别其结合位点(主要目的在于受体的定位，而不是研究其性质)，已经作出很多努力来将荧光分子共轭到受体配体上。已经报道一些化合物在结合到受体上时发荧光，但是在水

相中则产生低的背景噪声。所报道的目的是生产荧光药物，当结合到受体上时仍能保持荧光，而且，当洗去未结合的药物时仍能保持结合。因此，需要很高的受体结合亲和性。评论性的工作包括结合到烟碱受体、 β -肾上腺素受体、阿片样 GPCR 型受体、组胺、神经加压素和 α -肾上腺素受体的荧光配体。所述出版物也评论了共焦显微术的优点。只有在很少的上述情况下报道了研究配体的药理学性质的努力。

但是，很少使受体和受体类显像的努力起到作用。药理学性质通常在一定程度上受到将荧光团连接到任意受体结合配体的影响，并且包括结合亲和性改变以及受体(即激动剂或拮抗剂的性质)的活化等。为了量化所观察到的结合效果，在任何研究中了解荧光配体的药理学是重要的。

事实上，合成用于 GPCR 的非肽荧光配体存在严重的问题。少数合成的用于细胞表面受体的市售非肽荧光配体包括阻胺-BODIPY™ FL 和(以下图示)CGP12177-BODIPY™ TMR(分子探针)：

所述 BODIPY™ (BDI) 荧光团最初设计用于附着于蛋白质，所述蛋白质具有更加均一的附着可能性。可以得到一种试剂盒，它包含荧光团和一组普遍附着于大多数蛋白质的试剂。



这些非特异性附着于感兴趣蛋白质的任意活性位点，通常不需要知道附着结合的性质或位置。但是，这些蛋白质是比非肽配体更大的分子，包括本发明所提到的药物如 XAC(黄嘌呤胺同类物)等。许多 GPCR 受体的配体结合位点也通常在受体跨膜区域内的深处，因此，困难在于连接到荧光团上，以便保持药理活性。这些 BDI 荧光团中没有一个涉及在 GPCR 处具有规定性质的荧光激动剂/拮抗剂的具体设计，而是涉及作为”累加”探针的荧光团。

因此，荧光配体的有效性，具体是适于 FCS 和 CM 结合研究的非肽荧光配体实际上是不存在的。这种化合物的制备不同于常规，而且几乎没有做过努力来确立药理学。以上 McGrath 仅着眼于少数研究的受体类型。

而且，在许多现有技术中没有任何统一的途径。单独的研究针对荧光配体系

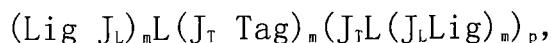
统，它限于具体的药物类型，或者限于使用具体的荧光团。这种系统在所获得的信息以及可研究的系统数量上都是有限的。

因此，需要用于在所需受体上结合的新型选择性荧光配体，提供可靠和有效的受体显形以及具有确定药效的受体选择性(在亲和性以及激动剂和拮抗剂性质方面)。

现在，我们已经将多种学科方法使用到荧光配体设计上，提供合理设计的荧光标记配体库及其制备方法，它们可以用在选择荧光标记配体的方法中，所述配体对所需 GPCR 具有选择性，具有所需的规定药理特性。

所述库较好由非肽配体前体制得，所述前体包含用于连接到任意荧光团的化学官能团，提供在所需位点具有接头部分的已知或新型荧光配体，它们能选择荧光配体，同时保留受体的结合能力，并且以不会干扰受体结合能力或者以已知方式改变结合能力的方式连接。所述接头前体在连接到荧光部分或任何其它所需非亲水探针上也提供改进的性能，如水溶性。

在本发明最广泛的方面中，提供了一种库，它包含许多通式(I)所示标记非肽配体：



及其盐，

它包含一个或多个相同或不同的配体部分 Lig，它们各自通过相同或不同的接头 L 以及相同或不同的连接位点或连接官能团 J_T 和 J_L 连接到一个或多个相同或不同的标记部分 Tag；其中，Lig 包含 GPCR 配体，细胞内酶或底物的抑制剂，或者药物转运蛋白的抑制剂；

L 是单键或者是选自如 N、O、S、P 的杂原子、支链或直链饱和或不饱和的，任选包含杂原子的 C_{1-600} 烃基及其组合的任意接头部分，它们可以是单体、具有 2-30 个低聚重复的低聚物、具有超过 30 到至多 300 个聚合重复的聚合物；

Tag 是任何已知或新的标记底物；

m 各独立地选自 1-3 的整数；

p 是 0-3；

其特征在于，连接是在包含不同 Lig、 J_L 、L、 J_T 和/或-Tag 的化合物中的相同或不同的连接位点上，以及在包含相同 Lig、 J_L 、L、 J_T 和/或-Tag 的化合物中的不同连接位点上。

所述库优选不包括 Lig NECA，Tag 丹磺酰胺或 NBD，各 J 为单键，L 是 C3-12

的亚甲基链。

本发明的创新之处涉及具体标记的配体或”药物”，例如，具有已知或可选择的药效性质的荧光配体或”药物”。这一成功的关键在于各标记或荧光团对所得产物的药效具有具体的影响，并且假设所述化合物将保持所述前体药物的性质是不正确的。较好的是，所述库由合理设计的代表连接位点和配体部分改变的库成员构成，它们可以作为选择保持前体配体性能的标记或荧光配体的基础。较好的是，所述库包括许多规定的和表征良好的标记配体，具有和那些非标记配体对应的核实性能。

GPCR 配体选自任何能有效作为腺苷受体、 β -肾上腺素受体、蕈毒碱受体、阻胺受体、阿片受体、大麻素受体、趋化因子受体、 α -肾上腺素受体、GABA 受体、前列腺素类受体、5-HT(血清素)受体、刺激性氨基酸受体(例如，谷氨酸盐)、多巴胺受体、蛋白酶活化受体、神经激肽受体、血管紧张肽受体、催产素受体、白细胞三烯受体、核苷酸受体(嘌呤和嘧啶)、钙传感(sensing)受体、甲状腺-刺激激素受体、神经降压肽受体、血管降压肽受体、嗅觉受体、核碱基受体(例如，腺苷)、溶血磷脂酸受体、鞘脂受体、酪胺受体(痕量胺类)、游离脂肪酸受体以及环核苷酸受体等的激动剂或拮抗剂的化合物，较好是用于 GPCR 受体，例如 a) 腺苷受体拮抗剂，b) 腺苷受体激动剂，c) β -肾上腺素受体激动剂和 d) β -肾上腺素受体拮抗剂的化合物。配体较好是非肽配体。

细胞内酶的抑制剂较好是 e) 细胞内酶的抑制剂，如环核苷酸磷酸二酯酶的抑制剂，或者它们的衍生物或同系物。

药物转运蛋白的底物是任意通过转运蛋白进入或离开细胞的药物。药物转运蛋白的抑制剂是任何结合到转运蛋白并防止底物转移的化合物。因此，标记的抑制剂可以结合到转运蛋白上，并定位在其上。本发明标记的底物可以跟踪转运进入或离开细胞，并测试抑制剂药物是否防止标记底物的转运。底物或抑制剂较好选自基于任意平衡的药物转运蛋白或 ATP 驱动泵如儿茶酚胺转运蛋白、核苷转运蛋白、ATP-结合盒转运蛋白、环核苷酸转运蛋白等的底物或抑制剂。

较好的是，所述库提供标记的配体，它们适于表面细胞受体结合或者用于细胞内结合，或者用于渗入或离开活细胞。因此，所述库代表合理设计的化合物，它们预计具有适于具体结合应用的保留药效和性质。

各 Tag 可以独立地选自标记分子领域中已知的任意实体，形成用于检测分子并可用于配体分析研究(尤其是显形)中的标记或报道基团，包括但不限于本领域

其中, 各 J_L 和 J_T 包含上述的 J , 它们可以相同或不同, 并且可以源自在 Lig 或 L , 以及 Tag 或 L , 或它们组合中最初存在的官能团, 其特征在于, 在包含不同 Lig 、 J_L 、 L 、 J_T 和/或 Tag 化合物中, 连接是在相同或不同的连接位点, 并且在任意两种或多种化合物包含相同 Lig 、 J_L 、 L 、 J_T 和/或 Tag 的情况下, 所述连接是在不同的连接位点。

在一个优选实施方式中, 所述发明包含以上所述通式 I 所示的化合物库, 其中, Lig 、 J_L 、 L 、 J_T 和 Tag 在所有化合物中相同, 并且所述化合物差别是其连接位点。

在更优选的实施方式中, 所述发明包含以上所述通式 I 或 I' 所示的化合物库, 其中, Lig 和 J_L 在所有化合物中相同, L 和 J_T 在所有化合物中相同或类似, Tag 在一些或所有化合物中不同。

在更优选的实施方式中, 所述发明包含以上所述通式 I 或 I' 所示的化合物库, 其中, Lig -和- Tag 在所有化合物中相同, $-L$ 在所有化合物中不同。

所述库可以包含 3-250 个标记的配体。所述库较好由包含 3-25 个标记配体 1-10 个类组成, 各个类包含普通配体类型和 3-25 个不同标记部分类型的配体部分, 上述标记部分中至少一个是荧光标记, 更好是不同的荧光标记; 或者所述库包含 5-250 个不同配体类型和不同荧光类型的荧光标记配体。

提供包含不同 $F1$ 的荧光配体的库可用于研究结合、抑制或者和不同颜色荧光转运, 例如, 用于区别相同颜色的自然荧光或者区别许多类型的结合位点、酶、转运蛋白等。

已知通过连接到荧光团上进行修饰的配体通常会改变结合亲和性、抑制或转运特征, 并且本发明所述库适于包括各化合物的药效的描述, 包括对某种 GPCR、细胞内酶或药物转运蛋白的结合亲和性或抑制或转运。所述库较好包括该库中所含各标记配体的信息, 涉及用于连接或抑制 GPCR 受体或抑制细胞内酶如环核苷酸磷酸二酯酶, 或药物转运蛋白的抑制或通过药物转运蛋白转运的药效(包括作为激动剂、拮抗剂、底物或抑制剂的指示以及亲和性或抑制性等的测量), 这样就能将结论量化。

在配体制备方法的现有技术中, 在许多情况下所述连接位点是非特异性的或未知的, 如在分子探针配体的情况下, 或者至多是特异性的或已知的, 但是其所需的效果不是预定的, 设计的或理性推断的。在本发明的库中, 标记的配体较好包含在许多连接位点处连接的荧光团; 在连接位点处, 很大程度上保持了配体受

体结合、抑制或转运，或者改变或抑制到很小的程度。所述库较好包含标记配体，它设计自活性前体配体和活性荧光团的反应，用于位点特异性反应和连接，所述活性荧光团具有活性位点化学官能团且适于和相关试剂反应，其中，所述设计是对所有或许多可能连接位点和所得药理学特性的广泛研究以及对一种或多种连接组合的选择结果，提供有利的结合、抑制或转运特征。

Lig 较好选自

a) 黄嘌呤样结构，包括 XAC、茶碱、咖啡因、可可碱、dyphilline、恩丙茶碱等；或稠合的二芳基结构，包括罂粟碱、二氢奎尼酮如西洛酰胺、潘生丁、长春西汀等；以及它们的类似物；

b) 腺苷样结构，包括 ADAC、NECA 以及它们的类似物；

c) 乙醇胺样结构，包括沙莫特罗、沙丁胺醇、特布他林、噻丙那林、柳胺心定、心得怡、班布特罗、非诺特罗、reprotolol、妥洛特罗、克仑特罗以及它们的类似物；

d) 氧代丙醇胺样结构，包括 CGP12177、心得安、心得宁、acebutalol、倍他索洛尔、ICI 118551、阿普洛尔、塞利洛尔(塞利托尔)、美托洛尔(倍他洛克)、CGP20712A、阿替洛尔、比索洛尔、misaprolol、卡维地洛、布新洛尔、艾司洛尔、纳多洛尔、萘比洛尔、氧烯洛尔、扎莫特罗、吲哚洛尔、噻吗咯尔以及它们的类似物；

e) 黄嘌呤样结构，包括 XAC、茶碱、咖啡因、可可碱、dyphilline、恩丙茶碱、西登那菲、EHNA(赤-9-(2-羟基-3-壬基)腺嘌呤)、扎普司特等；或螺二环结构，包括吡啶 s 如氨利酮、咪唑啉类如 CI930、二氢吡嗪酮类如 indolan、咯利普兰、SB207499、等；或稠合的二芳基结构，包括罂粟碱、二氢奎尼酮如西洛酰胺、潘生丁、长春西汀等 以及它们的类似物。

接头 L 可以发挥许多功能，包括在通过直接连接 Lig 和 F1 进行的修饰会干扰配体结合、抑制或转运时，通过拉开荧光团部分和配体结构之间的距离来防止配体在变为包含荧光部分时损失亲和性，在这种情况下，因为合适接头 L 可以设计成短的、中等或长的链结构。

通式 I 或 I' 所示的库化合物任选包含下文所述的官能团 J，它源自通过反应接头前体或其组分的一种或多种反应基团(提供接头部分)与一种或多种配体前体的活性基团(提供配体部分)的合成以及接头前体的一种或多种其它活性基团和一种或多种标记前体如荧光标记前体的活性基团(提供标记部分)的反应。

本发明的具体优势在于当各部分基团非活性时，或者当立体化学或其它影响会抑制连接，或者当市售前体配体和荧光团中已有的活性基团的反应需要加入本文中官能团的保护基团时，接头 L 和/或连接位点或官能团 J 便于连接荧光部分和配体，上述情况中，接头通常来自短的、中等的或长的链结构。更好地是，接头 L 可以来自三，四，五或六功能性前体，连接 3 个或更多配体 Lig 和标记 F1，能修饰或更复杂的结合、抑制或转运以及相关的药理学，例如，连接到许多受体位点来研究受体的二聚反应，如均二聚或杂二聚反应。在本发明更有利的方面中，接头 L 可以按需赋予便于穿过细胞膜的性质、疏水性、亲水性等，在这种情况下，接头通常是任何官能化的结构。

L 较好选自饱和或不饱和单键或双键、-O-、-S-、胺、COO-、酰胺、-NN- 肼；以及饱和或不饱和、取代的或未取代的 C_{1-600} 、较好是 C_{1-300} 、更好是 C_{1-100} 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们中任一个可以包含一个或多个杂原子，选自 N、O、S、P，其中，任选的取代基选自任意的 C_{1-20} 脂族、芳族或脂环族取代基，它们中任一个包含一个或多个上述杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、肼、氧代、氰基、羰基等。

L 更好选自单键、-O-、-S-、氨基；和支链或直链 C_{1-50} 烷基、链烯基、炔基、烷氧基、氨基、环烷基、杂环、芳基、杂芳基以及它们的组合如芳烷基、芳烷基氨基、芳烷基酰胺基等，任选包含一个或多个杂原子，其中杂原子如以上所述，任选如上所述进行取代，所述取代基选自 C_{1-12} 脂族、芳族或脂环族取代基、羟基、硫醇、卤素、胺、氧代、羰基等。

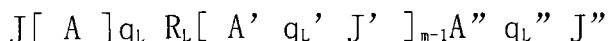
J_L 和 J_T 可以包含官能团，来自连接到荧光团和/或配体上的活性基团或位点，选自饱和或不饱和单键或双键、-O-、-S-、氨基、酰胺基、肼、羰基、氧代、烷基、链烯基、炔基、烷氧基、硫氧基等。

在包含单键或双键时， J_L 和 J_T (若存在的话) 可以包含来自用于连接接头和荧光团的活性基团或位点的官能团，上述荧光团来自荧光部分和/或配体部分。

较好是，所述部分 $J_L J_T$ 包含单、二、三、四、五或六氨基、烷硫基、烷氧基、羧酸以及它们的组合，更好是单、二或三氨基烷硫基、氨基烷氧基、烷氧基羧酸、烷氧基胺等。较好是， $J_L J_T$ 选自单、二或三氨基薄荷烷、氨基乙烷、硫代乙烷、乙烷、氨基酰基，选自多肽，或选自单或聚醚衍生物，例如二胺或二硫代如单或聚乙二醇二胺或三胺或硫代。

较好是，以上所述接头部分 $J_L J_T$ 包含单键或双键或上述单原子或基团，或

包含通式 - L. I-所示的单-、二-、三- 或四、五、六官能化直链或支链或环取代的或未取代的烃基，



式中，J-J'' 各自是上述的连接位点或者官能团，独立地选自单键、亚甲基、炔、烯烃、NR、O、NRCO、S、CO、NCO、CHHal、P 等，其中，R 是 H 或 C₁₋₈ 烷基 或环烷基，或形成具有 N 的环的部分，Hal 是任意卤素，选自氯、碘、溴；并且存在于基团 A-A'' 的任意合理位置；A-A'' 各自是选自 -O-、-C(=O)-、C₁₋₁₂ 烷氧基、醇基(alkoyl)、环烷基、杂环、烷基、链烯基、芳基、芳基酰胺、芳基胺、氨基、硫代烷基、杂芳基(如上所述)以及它们的组合等的基团，任选被独立地选自 C₁₋₃ 烷基、C₁₋₅ 烷氧基等的基团取代；

q_L-q_L'' 各独立地选自 0 或 1，或显示为低聚的重复，且为 2-30，或显示为聚合重复，为 31 到至多 300。

R_L 是 C、N 或 S 原子或是 CR_L'、NR_L'、烷基、环烷基、杂环、芳基杂芳基、胺或硫代部分，并当 p 是 1 或 2 时形成支链；其中，R_L' 是 H 或 C₁₋₃ 烷基；和 p 如以上所述，为 0、1 或 2。

较好是，各 J、J' 和 J'' 各自是单键或双键、NR_L、-O 或 -S 或 -C(O) 或 -NRC(O) 或 -C(O)NR，如上所述；

A 是烷氧基，较好是 CH₂CH₂O(PEG) 及其低聚物，或是芳烷基胺、芳烷基酰胺、芳烷氧基，或是烷基，较好是 (CH₂)₁₋₁₂；

当 p 是 1 或 2 时，R_L 是包括或包含一个或两个支链碳原子的 C₁₋₅ 烷基链；

p 是 0、1 或 2；

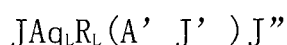
A' 和 A'' 各独立地选自 C₁₋₈ 烷基、胺、苯胺、苯酰胺；和

q_L 是 0、1、2-30 或 31-300，且 q_L' 和 q_L'' 是 0 或 1。

更好的是，J_{Lm}LJ_m 是单键或具有如下通式



式中，各 J 和 J'' 是胺或 -O-，A 是 CH₂CH₂O，q_L 是 1-30 或 31-300，R_L 是 CH₂CH₂ 或具有如下通式



式中，各 J、J' 和 J'' 单独是胺、-O 或单键，q_L 是 1、2 或 3-30 或 31-300，A 是 CH₂CH₂O 或 HNCH₂CO，或 q_L 是 1，A 是 C(O) 或 (CH₂)₁₋₈，或 q_L 是 0，R_L 是 CH 或 CH₂CH，q_L' 是 0，或 q_L' 是 1，A' 是 CH₂，q_L'' 是 0。

较好是 $O(CH_2CH_2O)_{q_1}CH_2CH_2NH$ 、 $O(CH_2CH_2O)_{q_1}CH_2CH(CH_2NH)NH$ 、 $OCH(CH_2NH)NH$ 、 $-CH(CH_2NH)NH$ 、 $-C(O)NH-$ 、 $-(CH_2)_{1-8}-$ 、 $(-HNCH_2CO-)_{1-3}$ (= $-gly_{1-3}-$) 等。

更好的是，以上通式 I 或 I' 所示各化合物包含部分 Lig 和 L，如下所述：

其中，Lig. a_m 较好为以下任一形式所示的通式，包括其任意可能的连接构型或位点：

Lig. a 1m



其中，任意或各 Ra^1 - Ra^4 、 X^1 和 X^2 可以包含连接位点或官能团 J，如以上所述；

X^1 和 X^2 各独立地选自 H、O、OR. a、NR. a、NHR. a；

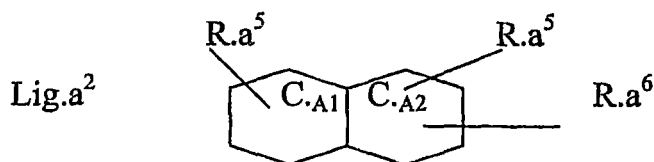
X^1 和 X^2 各自较好是 O；

R. a、 $R. a^1$ 、 $R. a^2$ 和 $R. a^3$ 各独立地选自 H 或 C_{1-4} 直链或支链烷基，较好是 H、甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基 或异丁基，任选被单或多羟基或卤素取代，如 CH_2OH 、 CH_2F 或 $CH_2CHOHCH_2OH$ ；

$R. a^4$ 选自杂原子 O、S 或取代的或未取代的胺或饱和或不饱和，取代的或未取代的 C_{1-20} 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们中任一个可以包含一个或多个杂原子，选自 N、O、S、P；其中任选的取代基选自任意 C_{1-12} 脂族、芳族 或脂环族取代基，任意一个可以包含一个或多个以上所述的杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、胍、氧代、氰基等；

较好的是， $R. a^4$ 选自任选取代的芳基、环烷基、烷基、酮、(二)胺、(二)酰胺，更好是任选取代的烷氧基、环烷基、胺、酰胺、羧酸，或任选 o-、m- 或 p- 取代的苯基，其中所述取代基包括芳基、烷基、环烷基、杂芳基或杂烷基、胺、酰胺、羧基、羰基等，例如，所述取代基包括，或 $R. a^4$ 包含环己基、环戊基、乙氧基、 $(CH_2)_2PhPh$ 、 CH_2Ph 、 $CONH(CH_2)_nCONH$ 、 $CH_2CONH(CH_2)_2NH$ 、 $CH_2PhNHCOCH_2$ 、 $CH_2CH_2OCOCH_2$ 、琥珀酰亚氨基酯、 $NHCOCH_2$ 、 $CH_2(CH_3)NCOCH_2$ 、 $H_2N(CH_2)_2NHCOCH_2$ 、 $H_2N(CH_2)_8NHCOCH_2$ 、 $H_2NNHCOCH_2$ 、 $CH_2CONH(CH_2)_2NHCOCH_2$ 、 $HOPhCH_2N(CH_2CH_3.HOAc)(CH_2)_2NHCOCH_2$ 、杂环 $-(CH_2)_4CONH(CH_2)_2NHCOCH_2$ 、杂环 $-NHCON(杂环)COCH_2$ 等；

或 Lig. a 具有通式 Lig. a²-



式中，任意或各 $R.a^5$ - $R.a^6$ ，或环 C 或杂原子可以包含连接位点或官能团 J，如以上所述；

$C.A1$ 和 $C.A2$ 各独立地选自 C_{5-6} 芳基、杂芳基、环烷基和杂环，更好选自 苯基、或包含 1 或 2 个环杂原子的芳基、或包含 1 个环杂原子和/或 1 个环 - C=C-基团的杂环；

各至多 7 个 $R.a^5$ 是环碳原子或环杂原子的取代基，并且独立地选自 H、卤素、羟基、硫醇、胺、COOH、肼、氰基、饱和或不饱和，取代的或未取代的 C_{1-20} 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们中任一个可以包含一个或多个杂原子，选自 N、O、S、P，式中任选的取代基选自任意 C_{1-12} 脂族、芳族或脂环族取代基，它们任一个可以包含一个或多个以上所述的杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、肼、氧代、氰基等，如 =O、 OCH_3 、 CH_2Ph (OCH_3)₂、 $O(CH_2)_3CON(CH_3)c. hex$ 、 $N(CH_2CH_2OH)_2$ 、 $c. hex$ 、 $COOCH_2CH_3$ 、 CH_2CH_3 ；

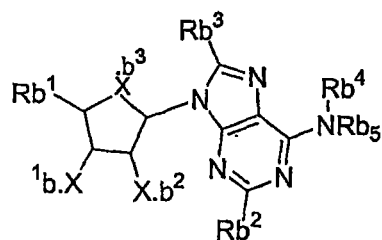
或者，任意两个或多个 $R.a^5$ 形成一个、两个或三个环的稠合环状结构，较好包含稠合的 3 个环芳基、5-杂环、具有与稠合双环 Lig.a 结构共有的 4 个环原子的 6-杂环结构；

$R.a^6$ 是以上针对 $R.a^5$ 所述的部分；

L.a 如以上针对 L 或 J_L L J_T 所述的，并且较好是以上所述的通式 L.I 或子通式，更好选自单键、氨基酸或酰胺，如肽或多肽，例如，gly 或 gly3、通式 $-(CH_2)_n$ 所示的烷基，其中 n 是 3-8，较好是 3、4 或 6，任选包括一个或多个杂原子或不饱和基团，如 -O- 或 -S- 或 -CH=CH- 等；

Lig.b 较好如通式 Lig.b 所示，包括任意可能的连接构型或位点：

Lig.b



式中，任意或各 Rb^1 - Rb^5 或 Xb^1 - Xb^3 可以包含以上所述的连接位点或官能团 J。

环取代基 X. b¹ 和 X. b² 独立地选自烃如烷基或 SR_x、NR_{x 2} 和 OR_x，其中，(各) R_x 选自 H、C₁₋₅ 烷基、链烯基；

环杂原子 X. b³ 选自 -S-、-O- 和 -CH₂-；

Rb¹ 选自饱和或不饱和，取代的或未取代的 C₁₋₄ 脂族、或 C₁₋₃ 脂环族，任选包括一个或多个杂原子 N、O、S、P，其中所述取代基选自一个或多个环烷基、杂环、羟基、氧代、卤素、胺；较好的是，R. b¹ 包含被 H、烷基或直链或环状伯、仲或叔胺取代的羰基、取代的 C₁₋₃ 烷基、环烷基或酰胺，更好是环丙基或 CONHC₁₋₃ 烷基如 CONHEt 或 CH₂OH；

各 R. b² 和 R. b³ 选自 H、卤素、羟基、硫醇、胺、COOH、CHO、胍、氰基或饱和或不饱和，取代的或未取代的 C₁₋₂₀ 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们任一个可以包含一个或多个杂原子，选自 N、O、S、P；其中任选的取代基选自任意 C₁₋₁₂ 脂族、芳族 或脂环族取代基，它们任一个可以包含一个或多个以上所述杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、胍、氧代、氰基等，较好选自 H、卤素或羟基，较好是 H 或 Cl；

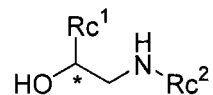
Rb⁴ 是 H；

Rb⁵ 是 H 或烷基；

L. b 可以包含连接位点或官能团 J，如以上所述；并且如以上针对 L 或其子通式所述的，更好是饱和或不饱和取代的或未取代的 C₁₋₁₂ 脂族或 C₁₋₂₄ 芳族，如针对 L 所述的，较好包括一个或多个杂原子 O、S 或 N、环状或杂环基团，更好是通式 L. I 或子通式所示，最好是 (CH₂)_m，其中 m 是 2-12，较好是 3、4、6 或 8，或是 (Ph-CH₂CONH)₂(CH₂)₂；

Lig. c 较好是通式 Lig. c 所示的非肽，包括任意可能的连接构型或位点：

Lig. c HOC*(R. c¹)CH₂NH-R. c²

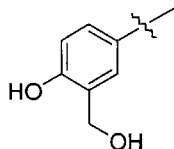


在此，任意或各 Rc¹-Rc² 或 OH，或链 C 或 N 可以包含连接位点或官能团 J，如以上所述；

*表示旋光中心，且

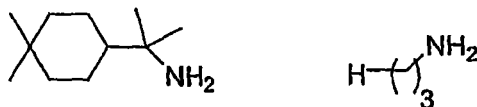
其中，R. c¹ 是 C₆₋₁₄ 芳基，任选包括一个或多个杂原子，选自 H、O，任选被 OH、Hal(例如 Cl)、NH₂、NHC₁₋₃ 烷基、磺酰胺、氧代胺(-CONH₂) 等取代，更好是单、二或三取代的苯基或喹啉，其中，所述取代基包括 OH、Cl 或 NH₂，更好是 m-CH₂OH、

p-OH 苯基、m-, p-二羟基苯酚或 m-, m-二羟基苯酚, m-, m-二 Cl、p-NH₂ 苯酚、p-OH、m-CO₂H 苯酚或 5-OH、8-喹啉等, 如



R. c² 选自饱和或不饱和, 取代的或未取代的 C₁₋₂₀, 较好是 C₁₋₁₂ 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合, 它们中任一个可以包含一个或多个杂原子选自 N、O、S、P; 其中, 任选的取代基选自任意任取代的 C₁₋₁₂ 脂族、芳族或脂环族取代基, 它们任一个可以包含一个或多个以上所述杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、肼、氧代、氰基等以及它们的组合;

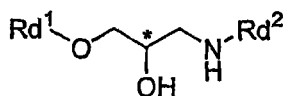
较好的是, R. c² 选自 C₁₋₆ 支链或直链脂族、任选被 OH 取代的 C₆₋₁₀ 芳代脂肪族 (araliphatic), 以及任选包括杂原子, 选自 N、O, 较好是包括醚 O、如选自 -(CH₂)₆OCH((CH₂)₃Ph)、CHCH₃(CH₂)₂Ph、CHCH₃CH₂PhOH、C(CH₃)₂CH₂, 或选自如下所示结构:



L. c 可以作为 R. c² 存在, 或可以包含以上所述连接位点或官能团 J, 并且如针对 L 所述的, 较好是具有以上所述通式 L. I 或其子通式, 更好选自 C₁₋₁₂ 烷基、酰胺等;

Lig. d 较好是通式 Lig. d 所示的非肽, 包括任意可能的连接构型或位点:

Lig. d R. d¹ OCH₂C*HOHCH₂NH-R. d²

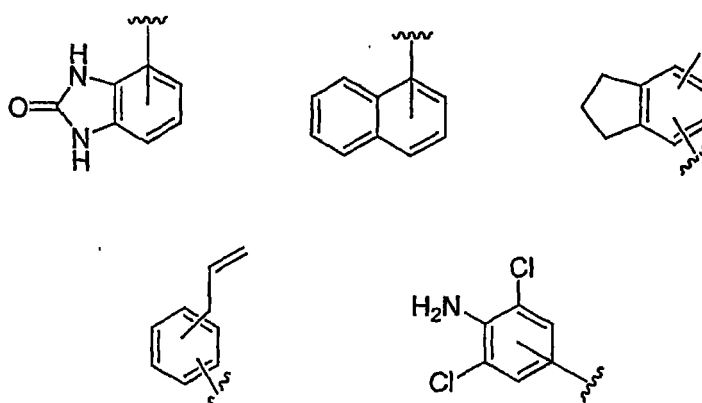


式中, 任意或各 Rd¹-Rd² 或 OH, 链 C 或 N 可以包含连接位点或官能团 J, 如上所述;

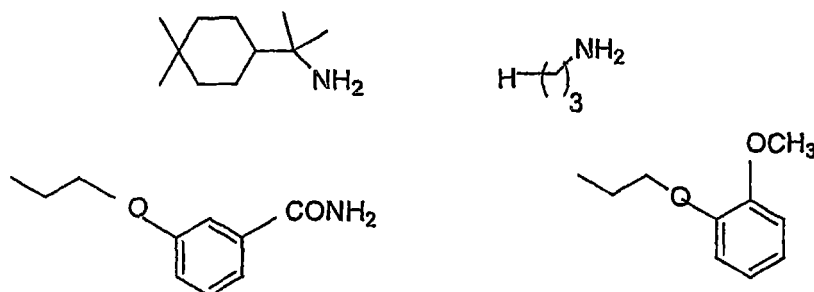
*表示旋光中心;

其中, R. d¹ 是饱和或不饱和、取代的或未取代的 C₁₋₂₀ 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合, 它们中任一个可以包含一个或多个杂原子, 选自 N、O、S、P; 式中, 任选的取代基选自任意 C₁₋₁₂ 脂族、芳族或脂环族取代基, 它们任一个可以包含一个或多个以上所述的杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、肼、氧代、氰基等;

较好的是, R. d¹ 是取代的或未取代的 C₁₋₂₄ 芳烷基或杂芳烷基, 包括单环和稠合的环系统, 具有(杂)芳基或环烷基环, 其中任选的取代基包括 C₁₋₆ 烷基、烷氧基、醚、羰基、链烯基、胺、酰胺, 各自任选用羰基、酰胺、卤素或 OH substituted, 或卤素如氯或 OH, R. d¹ 较好是未取代的或取代的烷基、链烯基、卤素、胺、酰胺、羰基、酮、醚取代的苯基或萘基, 如以下所述, 最好是单-、二-、三- 或四取代的单环或多环稠合的芳基或环芳基或杂环芳基如苯基、咪唑或以下所示的结构, 或螺环体系, 最好是单-、二-、三- 或四烷氧基烷基、烷氧基烷氧基烷基或 CF₃ 取代的苯基或未取代的或单取代的萘或 5, 6 环体系, 最好是如下所示的结构:



R. d² 是取代的或未取代的胺、饱和或不饱和, 取代的或未取代的 C₁₋₁₂ 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合, 它们任一个可以包含一个或多个杂原子, 选自 N、O、S、P; 其中, 任选的取代基选自任意的 C₁₋₁₂ 脂族、芳族或脂环族取代基, 它们中任一个可以包含一个或多个以上所述的杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、肼、氧代、氰基等, 更好是胺、C₁₋₆ 支链或直链烷基, 任选包括醚 O, 且任选被 C₆₋₁₀ 芳基取代, 例如, i. pr、i. bu、或以下通式所示:



L. d 可以作为 R. c² 存在, 或可以包含以上所述的连接位点或官能团 J, 并且如针对 L 及其子通式所述的, 较好是以上通式 L. I 及其子通式所示, 更好是单键或如针对 L. a 所述的;

Lig. e 包括细胞渗透部分, 或和细胞渗透 L 或 F1 部分相关, 并且较好如以下

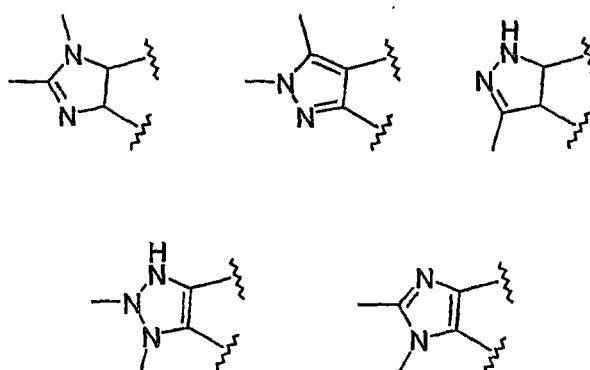
所列形式的通式所示, 包括任意可能的连接构型或位点:

Lig. e¹

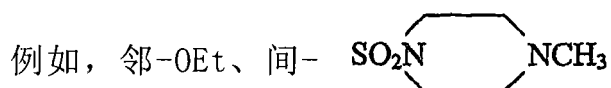


其中, 任意或各自 Re¹-Re⁴、X 和环 C 或 N 可以包含以上所述的连接位点或官能团 J;

h 选自



各自任选被 R. e³-R. e⁴ 取代, 其中, R. e¹-R. e⁴ 如以上所述的 R. a¹-R. a⁴, R. e³ 是 C₅₋₉ 直链或支链烷基、任选单或多羟基或卤素取代的, 或是任选被烷氧基、磺酰基等取代的芳基:



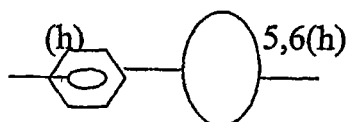
各 X 独立地选自 H、O、-OR. e²、N、HN、NR. e⁵、HR. e⁶ 以及任选被醚取代的芳基; 或 X 是任选被烷基或烷氧基取代的芳基, 如 Ph-邻-OCH₂CH₂CH₃ ;

当 R. e⁵ 如对于以上 R. e¹ 的所述, 或形成具有相邻环 N 原子的稠环; 较好是 1 或 2 稠合的 5 元环;

R. e⁶ 如对于以上 R. e¹ 的所述, 或选自任选取代的苯基, 其中任选的取代基包括醚如 o-乙氧基或 o-丙氧基、烷基、OH 等、磺酰基、羰基等, 它们被杂环、或环 C₅₋₈ 烷基如甲基、哌嗪基、磺酰基等取代;

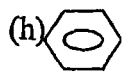
或 Lig. e 如通式 Lig. e² 所示

Lig. e²



其中，任意或各自的游离环原子或其取代基可以包含连接位点或官能团 J，如上所述；

各螺环任选包含零或一个或多个杂原子 h，它们较好是 N，更好的是，



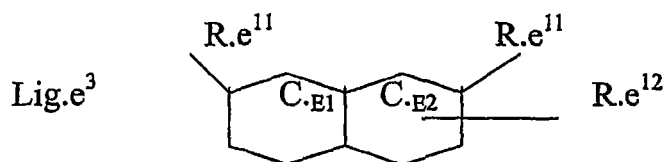
包含 0 或 1 个 N 杂原子； 和



包含 0、1 或 2 个 N 杂原子，并且是不饱和的，或包含一个或两个 C=C-或-C=N-基团； 和

其中，各环任选被一个或多个氧代、CO、COOH、C₁₋₆烷基或线状或环状烷氧基如甲氧基、乙氧基或环戊氧基取代，任选被一个或多个氧代、CO、COOH、CN 或 C₁₋₆脂环族或胺基团、胺或一个或多个螺环或稠合的杂环取代；

或 Lig. e 如通式 Lig. e³ 所示



式中，任意或各 Re¹¹-Re¹²，或环 C 或杂原子或环取代基可以包含连接位点或官能团 J，如上所述。

C. E₁ 和 C. E₂ 各独立地选自 C₅₋₆ 芳基、杂芳基、环烷基和杂环，更好选自苯基，或包含 1 或 2 个环杂原子的芳基、或包含 1 个环杂原子 和/或 1 个环上 -C=C-基团的杂环；

至多 7 个 R. e¹¹ 各自是环碳或环杂原子的取代基，且各独立地选自饱和或不饱和、取代的或未取代的 C₁₋₂₀ 支链或直链脂族、芳族、脂环族以及它们的组合，它们中任一个可以包含一个或多个杂原子，选自 N、O、S、P，其中任选的取代基选自任意 C₁₋₁₂ 脂族、芳族或脂环族取代基，它们中任一个可以包含一个或多个以上所述的杂原子、羟基、硫醇、卤素、胺、肼、氧代、氰基等，如=O、OCH₃、CH₂Ph (OCH₃)₂、O(CH₂)₃CON(CH₃)c. hex、N(CH₂CH₂OH)₂、c. hex、COOCH₂CH₃、CH₂CH₃；

或任意两个或多个 R. e¹¹ 形成单环、二环或三环稠合的环状结构，较好包括稠合的三环芳基、5-杂环、具有与稠合双环 Lig. e³ 结构共有的 4 个环原子的 6-杂环结构；

R. e¹² 是以上 R. e¹¹ 所定义的部分；

较好的是, Lig. e 如通式 Lig. e¹所示(如上所述, 特别是当 R. e²和 R. e³分别为丙基和丁基)时

L. e 可以包含如上所述的连接位点或官能团 J, 较好是如以上对于 L. a. 所述。

以上所述连接位点宜具有任意性质和位置, 即不会抑制结合、抑制或转运的任意位点。受体连接是复杂的, 并且需要得到特异性结合位点, 和/或需要特异性荧光配体构型。

本发明库的荧光配体的特征在于以上所述不同连接位点连接配体和荧光部分。从对结合、抑制或转运行为以及特异性靶位点(在本发明荧光配体中保持不变)的综合知识, 我们已经能确定选择合适连接位点以保持结合、抑制或转运以及药效性质的方法。较好的是, 通式 I 或 I' 所示的化合物包括表示所有有效的连接构型的化合物, 所述构型显示可能的结合、抑制或转运。

F1 可以包括任意红、绿、近红外、蓝等吸收染料和其它类型的染料。较好的是, F1 选自染料, 尤其是包括荧光素、荧光素衍生物, 包括 FITC 和荧光素样分子, 如 Oregon Green™ 和其衍生物、Texas red™、7-硝基苯-2-氧代-1,3-二唑(NBD)及其衍生物、香豆素和衍生物、萘(包括衍生物)、丹磺酰氯或其类似物或衍生物、Cascade Blue™、EvoBlue 及其荧光衍生物、芘和吡啶基噁唑衍生物、菁蓝染料、dyomics(DY 染料和 ATTO 染料)及其荧光衍生物、Alexaflu 染料及其衍生物、BDI 染料, 包括市售的 Bodipy™ 染料、赤藓红、曙红、芘、葱、吡啶、荧光藻胆蛋白及其共轭物和荧光化微粒、若丹明及其荧光衍生物, 包括若丹明 Green™, 包括四甲基若丹明、X-若丹明和 Texas 红衍生物、以及 Rhodol Green™, 使用异氰酸酯、琥珀酰亚胺基酯或二氯三嗪基活性基团偶合到胺基上, 以及其它红、蓝或绿的吸光荧光染料, 尤其是红色吸收染料, 如 Buschmann V 等、Bioconjugate Chemistry(2002), ASAP 文章所述。

更好的是, F1 选自荧光素衍生物和荧光素样分子, 如 Oregon Green™ 和其衍生物、Texas red™、7-硝基苯-2-氧代-1,3-二唑(NBD)及其衍生物、香豆素及其衍生物、萘(包括其衍生物)、丹磺酰氯或其类似物或其衍生物、Cascade Blue™、EvoBlue 及其荧光衍生物、芘和吡啶基噁唑衍生物、菁蓝染料、dionics(DY 染料和 ATTO 染料)及其荧光衍生物、Alexaflu 或染料及其衍生物、BDI 染料, 包括市售的 Bodipy™ 染料、赤藓红、曙红、FITC、芘、葱、吡啶、荧光藻胆蛋白及其共轭物和荧光化微粒、若丹明及其衍生物, 包括若丹明 Green™, 包括四甲基若丹明、X-若丹明和 Texas 红衍生物以及 Rhodol Green™。

更好的是，F1 包括荧光素、Texas Red™、Cy5.5 或 Cy5 或其类似物、BODIPY™ 630/650 以及它们的类似物、DY-630、DY-640、DY-650 或 DY-655 或其类似物、ATTO 655 或 ATTO 680 或其类似物、EvoBlue 30 或其类似物、Alexa 647 或其类似物。

F1 较好来自以上任意市售的荧光团，包括或修饰成包含便于通过以上部分连接到配体上的活性基团。较好的是，F1 包括上述任意市售的荧光团，它修饰形成适于使上述包含 J_T-t -F1 的库中的配体结合、抑制或转运显影的衍生物或衍生物基团，其中 J_T 如上所述，且包括来自连接到上述前体配体的官能团，且任选包含连接基团 $-t-$ ，是最接近的不饱和或芳基部分，包括中短、中等或长链炔基或环烷基部分，且包括通过以上活性基团连接的部分，如羧基、磺酸盐，或作为杂原子如 O 或 S 或亚甲基，来自在烷基卤化物如甲基溴化物、卤代乙酰胺、磺酸酯等亲电基团的连接。

例如，F1 可以包括取代基 $-t-$ ，它起到荧光修饰的功能，例如，是杂芳基或链烯基如单-、二- 或三-烯基团，它们将化合物的荧光移到光谱的红区，并提高吸收的最大值，或发挥连接功能。

优选的 BODIPY™ (4,4-二氟-4-硼-3a,4a-二氮-s-苯并二茚) 荧光团包括跨过可见光谱的那些，且包括在美国专利 No. 4,774,339；美国专利 No. 5,187,288；美国专利 No. 5,248,782；美国专利 No. 5,274,113；美国专利 No. 5,433,896；美国专利 No. 5,451,663 中所列的那些。在该组中优选选自任意杂芳基取代的 BODIPY™ 染料，如以上专利中所述的，其内容参考引用于此。

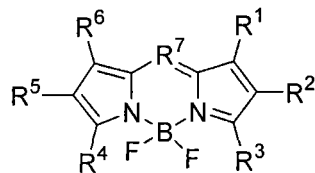
合适的是，包括 BODIPY™ 结构的 J_T-t -F1 的特征在于双吡咯亚甲基硼二氟化物芯，任选通过一个或两个稠合的环进行修饰，任选用一个或几个取代基如烷基、烷氧基、芳基、杂环等取代，其中，一个取代基 $-t-$ 如上所述用于连接上述配体前体，所述取代基 $-t-$ 任选包含最接近的不饱和或芳基部分，包括中短、中等或长链炔基或环烷基部分，且包含以上所述通过活性基团连接的部分，如羧基、磺酸酯或杂原子如 O 或 S 或来自烷基卤化物处连接的亚甲基，如甲基溴、卤代乙酰胺、磺酸酯等亲电基团。

F1 可以包括以上所述的取代基 $-t-$ ，它们是杂芳基或链烯基，如单-、二-或三-烯基，使化合物的荧光移到光谱的红区，并提高吸收最大值，如 US 5187288 所述；或可以包括连接到一个或多个芳基、羰基等的链烯基取代基，较好连接到脂肪酸的侧链上，所述侧链包含 $(CH_2)_nCO_2H$ ，其中 $n = 5-22$ ，如 US 5330854 所述，

更好是通过芳氧基亚甲基连接到羰基上，或者可以包括芳基链烯基芳基，如 US 6005113 所述。

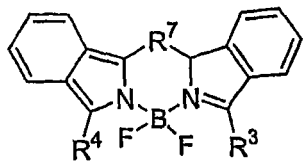
更好的是，-F1 如通式-F1¹所示：

F1¹ 双吡咯基亚甲基硼二氟化物类似物，包括任意可能的连接构型或位点：



其中，任意或各 R1-R7，或环原子可以包含连接位点或官能团 J，如上所述
R7 是 N 或 C-R8；

取代基 R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶ 和 R⁸ 可以相同或不同，为 H、卤素、硝基、磺基、氰基、烷基、全氟烷基、烷氧基、链烯基、炔基、环烷基、芳基烷基、或酰基，其中，各自的烷基部分包含少于 20 个碳；或取代的或未取代的芳基或杂芳基；较好的是，至少 4 个 R¹-R⁸ 不是氢，或者邻接的取代基 R¹ 和 R² 组合在一起，以及邻接的取代基 R⁵ 和 R⁶ 组合在一起形成稠合的 6-元(杂)芳族环，或



包括任意可能的连接构型或位点：

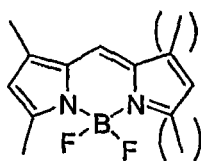
其中，任意或各 R₃、R₄ 或 R₇，或环原子可以包含连接位点或官能团 J，如上所述

各稠合的环任选和单独被 H、卤素、硝基、磺基、氰基、烷基、全氟烷基、烷氧基、链烯基、炔基、环烷基、烷硫基、烷基酰胺基、氨基、(单或二烷基)氨基(其中，各自的烷基部分包含少于 20 个的碳)、或取代的或未取代的芳基、杂芳基、芳基酰胺基、杂芳基酰胺基、芳氧基、杂芳氧基、芳基氨基或杂芳基氨基取代；或者被 1-2 个其它稠合的苯并或杂芳族环(任选取代或未取代的)取代。

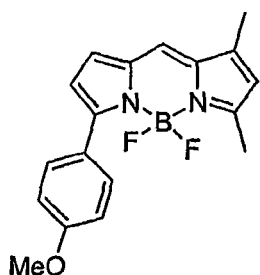
较好的是，任意或所有的 R_{2,3}-R_{4,5} 是杂芳基，更好是单环单杂原子如吡咯、噁吩、呋喃或单环二杂原子结构如噁唑、异噁唑、氧代二唑、咪唑，或多环如苯并噁唑、苯并噁唑、苯并咪唑，或多环单杂原子结构如苯并呋喃、吲哚，较好是噁吩基。

更好的是，F1 选自通式 FL.A1 或 FL.A2 所示的 BODIPY 核心结构，如下文所示。在这种情况下，=表示侧链的连接位点，包括任意可能的连接构型或位点：

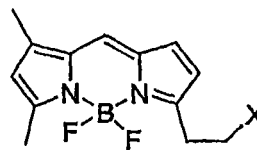
F1. A1



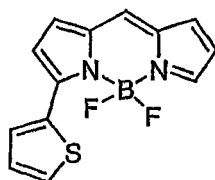
较好的是，包括或来自 BODIPY TMR 或 BODIPY FL (4, 4-二氟-5, 7-二甲基-4-硼-3a, 4a-二氮杂-s-苯并二茛-3-丙酸) 或 BODIPY FL 乙二胺，包括任意可能的连接构型或位点：



BODIPY TMR

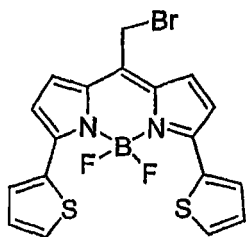
BODIPY FL 乙二胺(X 是 $\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$)
或 BODIPY FL (X 是 COOH)

或 F1. A2，包括任意可能的连接构型或位点：

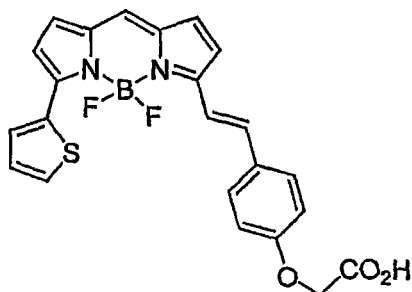


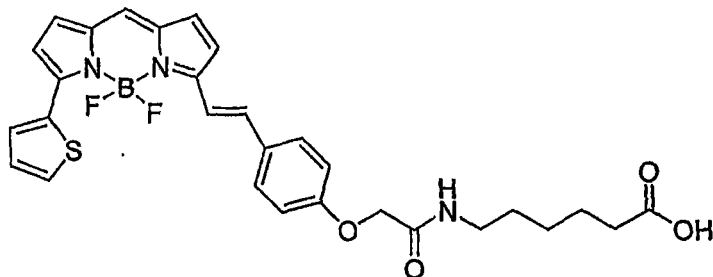
BODIPY 630/650 甲基溴

BODIPY 630/650



BODIPY 630/650 X

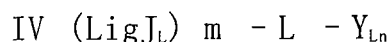




最好是其琥珀酰亚胺基酯，例如，BODIPY 630/650 X-SE。

在本发明的另一方面，提供一种用于制备以上所述库的方法，包括使许多配体前体中的一个或各个与包含接头部分或配体、标记物以及接头前体的标记前体反应，其中，如上所述，连接可以在不同化合物中的相同或不同活性位点处。

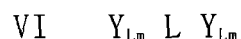
较好的是，所述方法是一个组方法。所述方法较好包括使通式 IV 和/或 IV' 所示一种或多种配体前体与通式 V 和/或 V' 所示许多分析标记底物中的一种或多种以及任选的一种或多种连接种类 VI 或 VI' 或 VI'' 反应：



其中，所述配体包含一个或多个，或不同活性基团 Y_L 或 $\text{Y}_{L_{1g}}$ ，如上所述形成连接官能团 J、 J_L 或 J_T ；



其中，所述分析标记底物包含一个或多个，或不同活性基团 Y_T ，如上所述形成连接官能团 J 或 J_T ；



其中，Lig、J、L、 J_T 和 Tag 以及各 m 单独如上所述；

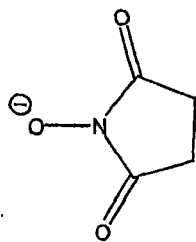
其中，通式 IV 或 IV' 所示各化合物能与通式 V 或 V' 所示各化合物反应，任选通过各种类 VI 或 VI' 或 VI'' 形成通式 I 所示许多化合物，如上所述。

较好的是，在通式 V 或 V' 所示一些或各化合物中，Tag 是如上所述的 F1，在此，所述方法是用于制备包含许多化合物的库的方法，所述化合物中的一个或多个或所有的均如以上通式 I' 所示。

合适的活性基团 $\text{Y}_{L_{1g}}$ 、 Y_L 和 Y_T 具有用于连接的合适活性基团官能团，如以上所述，例如通过取代反应或加成或加成-消去反应。取代反应宜选自亲电和亲核反应位点的反应，如上所述，例如：

亲电 Y	亲核 Y	所得共价键, J	离去基团
羧酸	醇	酯	-OH, -H
羧酸	胺	甲酰胺	-OH, -H
羧酸	肼	酰肼	-OH, -H
烷基卤化物	醇	醚	-Hal, -H
烷基卤化物	硫醇	硫代醚	-Hal, -H
烷基卤化物	胺	烷基胺	-Hal, -H
烷基卤化物	COOH	酯	-Hal, -H
卤代乙酰胺	硫醇	硫代醚	-Hal, -H
磺酸酯类	胺	烷基胺类	RSO ₃ ⁻ , -H
磺酸酯类	醇	醚	RSO ₃ ⁻ , -H
磺酸酯类	硫醇类	硫代醚类	RSO ₃ ⁻ , -H
磺酰基卤化物	胺	磺酰胺类	-H
磺酰基卤化物	醇	磺酸酯类	-Hal, -H
琥珀酰亚胺酯	醇	酯	-OSu*, -H
琥珀酰亚胺酯	羟氧化物类	酯	-OSu*, H 或 M ⁺
琥珀酰亚胺酯	硫醇类	硫代酯类	-OSu*, -H
琥珀酰亚胺酯	胺	甲酰胺	-OSu*, -H
琥珀酰亚胺酯	肼	酰肼	-OSu*, -H

其中, *是



加成反应宜选自在以上所述 IV 和 V 中的亲电和亲核反应位点的环加成或加成-消去反应:

亲电 Y	亲核 Y	共价连接, J	离去基团
叠氮化物	炔	三唑*	无
2-酰基环单 -/ 二-酮 (5 或 6 元环)	二亲核, 例如酰肼	6, 7-二氢-1H-吡唑-4(5H)-酮	H ₂ O
		4, 5, 6, 7-四氢-1H-吡唑	H ₂ O
		1, 4, 5, 6-四氢环戊[c]吡唑	H ₂ O
		5, 6-二氢环戊[c]吡唑-4(1H)-酮	H ₂ O

其中, *是[3+2]双极性环加成。

通式 IV 或 IV' 所示化合物较好没有保护基, 且能任选通过通式 VI 所示化合物与通式 V 或 V' 所示化合物反应, 无需通过选择反应和各反应位点来降低官能度; 或者通式 IV 或 IV' 所示化合物包含一个或多个保护基, 所述保护基能在室温条件(例如, 中性 pH, 室温等)下除去。较好的是, 所述方法包括其中反应基团 Y 选择能与完全脱保护的配体反应即无需脱保护基的反应, 或者能与在温和条件下可以除去的保护基反应, 例如, Y_{Lig} 或 Y_L 或 Y_T 中一个包含胺或醇或硫醇, 且其它包含琥珀酰亚胺酯。

在活性基团的选择需要保护通式 IV 或 IV' 所示的化合物的情况下, 保护基较好能在温和条件下除去, 较好包含苄氧基羰基等, 它能在环境条件如室温或在不损害官能团如 Lig. b 中的糖苷基团的条件下除去。

本发明方法的特征在于, 如上所述, 借助使用化学选择性, 通式 I 或 I' 所示化合物的产率高, 并且比使用非化学选择性反应基团或保护基团而对产率不利的已知方法优越。

较好的是, 通式 I 或 I' 所示的化合物通过如下所述制得:

在室温下, 在溶剂中使以上所述通式 IV 所示的化合物未保护的伯烷基胺基与包含活性琥珀酰亚胺酯基的通式 V 所示化合物反应, 无需进行后续的脱保护。本发明特别的优点在于所述方法提供了比已有技术的方法较大的产率。

通式 IV, IV', V', V' 或 VI 所示的化合物可以是市售的, 或者可以通过已知方法制得。接头可以作为独立的实体行安装; 或者如以上所述作为合成方法的部分构建, 较好的是, 在其反应之前作为配体部分或荧光部分上的加成取代基进行合成。

本发明另一方面提供一种制备以上所述通式 I 所示化合物的方法, 所述方法

包括如上所述使通式 IV 或 IV'所示化合物与通式 V 或 V'所示化合物以及任选还有通式 VI 所示化合物反应。

本发明另一方面提供了制备以上所述通式 IV 所示化合物的方法,包括通过购买或者本领域已知的方法制得配体前体 Lig, 若需要的话,与接头前体 VI"或其组分反应,和/或形成一个或多个反应位点 Y 或 Y_{Lig} 或 Y_L 。在反应之后需要除去反应过程中存在的任意保护基的情况下需要保护 IV, 并任选用保护基替换,该保护基可以在环境条件下除去。活性基团 Y 或 Y_{Lig} 或 Y_L 较好选自以上所述的基团。

较好的是,所述方法包括:

a), e) 在酸性条件下,用氯化铁将 5,6-二氨基-1,3-二烷基尿嘧啶和取代的醛进行闭环,

b) 使包含保护的肌苷衍生物的 Lig. b 与氯化剂反应,并连接具有适当保护的胺活性接头 H-L-PL 的胺基的氯代衍生物(其中,PL 包含 N-苄氧基羰基-),形成 Lig. b-L- P_L , 并去除 P_L , 产生 Lig. b-L. b; 较好的是, $R. b^1$ 包含 OH 封端基,保护的肌苷包含酰基保护基,或 $R. b^1$ 包含稳定基团,如胺或酰胺,且保护的肌苷包含 2,2-二甲氧基丙烷保护基;较好的是,所述保护的肌苷和氧化剂及保护的烷基胺(即 N-烷基甲酰胺)反应,除去胺保护基,产生活性配体;

c), d) 在酸催化条件下使 p-羟基苯甲醛和甲醛反应,用二甲氧基丙烷保护所得的 4-羟基-3-羟基甲基苯甲醛,产生所得的丙酮化合物。将苯甲醛转化成其对应的环氧化物,并用适当保护的接头如 Boc-L. c-H 进行开环,提供 Lig. m-L-PL。最后,在酸条件下进行脱保护反应,提供用于偶联到合适标记物上的 Lig. cLc 或 Lig. dLd。

本发明的优点在于,在所述部分是非活性的,或者立体化学或其它效应抑制连接,或者市售通式 IV 或 IV' 和 V 或 V' 所示化合物中已有活性基团的反应需要加入其中官能团的保护基团时,接头 L 便于连接荧光部分和配体部分,这种情况下,接头通常是双官能化短、中或长链结构。本发明的另一优势在于,接头 L 可以具有便于贯穿细胞膜、疏水性、亲水性等的性质,这种情况下,接头部分通常是任意官能化的结构。

较好的是,以上通式 IV 所示接头前体选自杂原子类,如提供 N、O、S 或 P 的种类,或支链或直链饱和或不饱和的(任选包含杂原子的) C_{1-600} 活性烃以及它们的组合,它们可以是单体、具有 2-30 个低聚重复的低聚物或者具有超过 30 到至多 300 个聚合重复的聚合物,且包含用于连接到配体的活性基团或位点以及荧光团,

所述荧光团选自羟基、烷氧基、硫醇，硫氧基、胺、肼和羰基等。在接头包含单键时，活性位点通常在通式 IV' 所示化合物中存在，由此与通式 V 或 V' 所示化合物反应。

通式 VI 所示化合物较好包含 3 个、4 个、5 个或 6 个活性位点，用于连接 3 个或多个通式 IV 或 V 所示的配体和标记物。接头前体较好选自能产生或提供以上所述部分 L 的任意底物。

通式 VI 所示接头前体较好是短、中等或长链，包含合理构思的官能团，且包含在以上所述部分 L 中提供官能团的活性位点。通式 VI 所示接头前体较好是单、二或混合的胺、羟基、硫醇、羧酸、酰氯、酰氟、酰溴(酰卤)、异氰酸酯 NCO、异硫代氰酸酯 NCS、卤化物、烷基卤化物、醛、环氧化物、磺酰氯 SO_2Cl 或肼 NHNH_2 ，更好是选自单，二或三氨基薄荷烷、氨基乙烷、乙烷硫醇、羟基乙烷、氨基酸，选自多肽，或选自其单或多醚衍生物，例如二胺或二硫醇如单或聚乙二醇二或三胺或硫醇。

通式 VI 所示接头前体较好选自任意 C_{1-12} 取代的或未取代的烷基胺、氨基酸、环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基等，提供一个或多个用于连接 F1 的活性端基，更好选自(二)胺，包括环状或线形胺，更好是二胺薄荷烷、或二氨基乙烯、氨基酸或多肽，或选自单或多醚二胺如聚乙二醇二胺，更好是选自 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NHC}_2\text{H}_5$ 、 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{NHC}_2\text{H}_5$ 、 $\text{H}_2\text{N}((\text{CH}_2)_2\text{O})_2(\text{CH}_2)_2\text{NHC}_2\text{H}_5$ 和 $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{NHBoc}$ ，其中 n 是 2-8。

较好的是，接头前体包含通式 Y_L L. I Y_L 所示具有一个、两个或三个活性位点的线性或支链，或环取代的或未取代的烷基，其中 L. I 如以上所述。

较好的是，各 Y_L 独立地选自 H、 CO_2H 、 NH_2 、O、P、S 和在反应时提供单键的基团、烷基如亚甲基、炔、烯烃、NH、NR、O、NRCO、S、CO、NCO、CHHal、P 等，其中，Hal 是任意卤素，选自氯、碘、溴，或

其中， Y_L 包括保护离去基团 Z_L ，如 $-\text{NHC}_2\text{H}_5$ 、H、OH、SH、卤素、胺、脂肪族、N-烷基甲酰胺、Boc 等；

本发明另一方面提供一种由以上所述库中选择通式 I 所示化合物的方法，包括使用以上所述方法合理设计以上通式 I 所示化合物的库，确定所述库中许多或所有化合物的药效，并选择在所需靶标显示所需药效的化合物。

所述方法较好包括制备化合物的预备库，进行筛选以评定结合、抑制、转运等，选择在筛选中认为具有有利性能的化合物，并基于筛选的指示接头部分的性

质或连接位置进行修饰或官能化，制得优化的库。本发明的具体优势在于，来自筛选的分子药效和光化学反馈到所述库的设计中。

在一些情况下，所述接头的策略对要用的标记物具有特异性，这样修饰标记物要求修饰接头。我们惊奇地发现修饰一个部分而没有随之修饰其它部分会导致产生非活性化合物，例如不能结合。

本发明另一方面提供以上通式 I 或 I' 所示的已知或新的化合物，其中，所述化合物和涉及其药效性能的信息相关，所述药效以激发最大值和发射最大值表示的光谱性能、荧光寿命和发射量子产率、以及以表达以上所述 GPCR 受体或表达细胞内酶如环核苷酸磷酸二酯酶的细胞，或以上所述药物转运蛋白限定的药效来表示，并加之以受体结合或受体官能团的抑制或拮抗以及抑制 (pK_b) 或拮抗 (pK_i) 结合常数的值，以及任选连同在单个活细胞中药理结合说明所述抑制或拮抗的荧光图像。

所述化合物较好与涉及其药效性能的信息相关，其中，药效以细胞或蛋白质的形式限定，所述细胞表达 GPCR、细胞内酶或药物转运蛋白，或者所述蛋白是 GPCR、细胞内酶或药物转运蛋白，较好是 CHO 细胞包含以上所述的 GPCR 受体，较好选自腺苷受体，如 A_1 -、 A_{2A} -、 A_{2B} -和 A_3 -受体、 β -肾上腺素受体如 β_1 -、 β_2 -和 β_3 -肾上腺素受体等受体，或包括细胞内酶的抑制剂，如环核苷酸磷酸二酯酶，或以上所述药物转运蛋白的底物或抑制剂；更好的是 CHO-细胞表达人类腺苷 A_1 -受体或 β -肾上腺素受体，或细胞内酶的抑制剂如细胞内磷酸二酯酶的抑制剂。所述药效以 EC_{50} 值(激动剂刺激)或者 pK_i 值(激动剂刺激第二信使产生的拮抗作用)或底物 K_m 值或拮抗剂 K_i 值(用于刺激或抑制细胞内酶或药物转运蛋白)。

新化合物较好如以上通式 I 或 I' 所示，更好选自通式 Lig. a_n L. a-F1. a_n 到 Lig. e_n L. eF1. e_n，如以上所述。

其条件是：

a) 当 Lig 是 Lig. a 中的 XAC ie 时，当 R. a¹ 和 R. a² 各自是丙基时，R. a³ 是 H，R. a⁴ 是 -Ph-OCH₂CONH(CH₂)₂NH-，L 是单键，或 L 是 gly，n=3；或 L 是 NCS，F1 不是荧光素；或

当 Lig 是 XAC，L 是单键或 NCS 时，F1 不是荧光素或 NBD；

b) 当 Lig 是腺苷时，F1 不是 Fmoc(CA134: 204756)；或

当 Lig 是 ADAC，即 R. b¹ 是 CH₂OH 时，R. b² 和 R. b³ 是 H，L 是 -(Ph-CH₂CONH)₂(CH₂)₂-，或 L 是单键，F1 不是荧光素、NBD 或若丹明；或

当 Lig 是 NECA(结合部分 - (CH₂)_m), 即 R. b² 和 R. b³ 是 H, L 是单键, 或是 - (CH₂)_m; 当 m 是 2, 4, 6, 8 或 10, 那么 F1 不是 NBD, 或当 m 是 3, 4, 6, 8, 10 或 12, 那么 F1 不是丹磺酰基; 或

当 Lig 是 N⁶-[2-(4-氨基苯基)乙基]腺苷, L 是 (CH₂)₂PhNH 时, F1 不是 FITC(CA 131: 56155(8))

d) 当 Lig 是 CGP12177, L(R. d²) 是单胺薄荷烷时, F1 不是 BODIPY® TMR; 或当 Lig 是 CGP12177, L 是 1, 1, 4, 4-四甲基丁基胺, 即 C(CH₃)₂(CH₂)₂C(CH₃)₂NH- 时, F1 不是 BODIPY® FL; 或当 L 是 C(CH₃)₂(CH₂)₂C(CH₃)₂NHCSNH- 时, 那么 F1 不是 FITC、曙红或赤藓红; 或当 L 是单胺薄荷烷时, F1 不是 FITC(CA 131: 56155(4)); 或

当 Lig 是 CGP12177, L 是单键时, F1 不是 NBD; 或

当 Lig 是阿普洛尔, 即 o-2-丙烯苯基, L 是 -C(CH₃)₂- 或单键时, F1 不是 NBD。此外, 任选

a) 当 Lig 是 Lig. a 中的 XAC ie, 当 R. a¹ 和 R. a² 各自是丙基, R. a³ 是 H, R. a⁴ 是 -Ph-OCH₂CONH(CH₂)₂NH-, L 是单键时, F1 不是 BODIPY™ 630/650; 或

b) 当 Lig 是 ABEA, 即 m 是 4 和 L 是单键时, F1 不是 BODIPY™ 630/650。

本发明所述配体或荧光配体较好是激动剂, 它保持其结合亲和性及其官能活性; 或者是拮抗剂, 它保持其在连接时或当连接到荧光部分 F1 时的结合亲和性。荧光配体具有亲和性, 使它们永久、半永久或暂时结合, 即当洗去未结合配体时可以保持结合, 或可以被洗去。

本发明的荧光配体可以本身具有旋光或者可以已知方式官能化成旋光, 且任意这种配体可以作为外消旋物或作为其一个旋光异构体存在。

本发明另一方面提供以上通式 IV 或 IV' 所示新活性配体或其库, 用于连接到以上通式 V 或 V' 所示任意合适的标记物上; 其条件是:

当 Lig 是 Lig. a, 并是以上所述 1, 3-二烷基黄嘌呤, 式中 X¹ 和 X² 是=O, R. a³ 是 H, R. a¹ 和 R. a² 均为 CH₃ 或均为 n-C₃H₇, 那么 R. a⁴ 不是 4-羟基苯酚或 PhOCH₂CO₂H; 或

当 R. a¹ 和 R. a² 均是 n-C₃H₇, 那么 R. a⁴ 不是 PhOCH₂OCNHPhOH、PhOCH₂OCNsuccin、PhOCH₂CONH₂、PhOCH₂CONH(CH₂)₂NH₂、PhOCH₂CONH(CH₂)₈NH₂、PhOCH₂COHNNH₂ 或 PhOCH₂CONH(CH₂)₂N(CH₂CH₃. HOAc)CH₂PhOH; 或

当 Lig 是 CGP12177, 那么 L 不是 -C(CH₃)₂(CH₂)₂C(CH₃)₂NH₂(CA 121: 103486;

或

当 Lig 是 aden, L 不是 $-(\text{CH}_2)_2\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ (CA 125: 218348; 或 L 不是 $(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ 或 $\text{CH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2$ (CA 134: 2043); 或 L 不是 $(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ 或 $(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ (CA 135: 25706); 或 L 不是 $(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, 式中 n 是 2-12 (CA 108: 715);

或当 Lig 是阿普洛尔时, L 不是 $(\text{CH}_2)_8\text{NH}_2$; 或当 Lig 是心得安时, L 不是 $(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ (CA 124: 8848);

或当 Lig 是阿普洛尔时, L 不是 $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2$ (CA 108: 215827);

或当 Lig 是 ICI 118551 时, L 不是 $(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$; 或当 Lig 是心得安时, L 不是 $(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ (CA 98: 4564)。

较好的是, 新配体-接头包含通式 IV 所示化合物, 其中, 组分如上所述, 活性基团 Y_{Lig} 如上所述, 较好是以上通式 Lig L. I 或 Lig LI' 所示的活性基团。

本发明另一方面提供一种以上通式 V 或 V' 所示的新荧光团接头, 或其库。

本发明另一方面提供一种试剂盒, 它包含配体前体、接头前体和以上通式 IV、IV'、V、V' 和/或 VI 所示的标记前体, 用于制备以上通式 I 所示化合物的库。

本发明另一方面提供以上通式 I 或 I' 所示荧光配体或其库用于显影受体或受体结合、评定荧光配体的药效性能、在结合到靶受体的新化学实体的高通量筛选中、在抑制细胞内酶或抑制药物转运蛋白或药物转运蛋白的底物中, 在研究适于转运的药物转运蛋白或药物, 在区分健康组织或患病组织等中的应用。所述应用较好包括使用任意荧光检测技术, 更好是共焦显微术或荧光关联光谱。所述应用较好能计算配体的亲和性常数以及受体类亚群、细胞内酶或药物转运蛋白的浓度, 如以上所述。

本发明另一方面提供用于受体结合或抑制、细胞内酶抑制或药物转运或抑制以及显影的方法, 所述方法包括使以上所述荧光配体和样品接触, 便于其结合或抑制或由此转运, 并检测荧光或其位置的变化。

所述样品可以包括细胞材料、选自细胞、细胞提取物、细胞均浆、纯化的或重建的蛋白质、重组蛋白质或合成蛋白质等, 包括通式 I 所示化合物的靶标。包含细胞材料的样品可以来自植物、动物、真菌、原生生物、细菌、古生菌或来源于这种生物的细胞系。用于制备样品的动物或植物细胞可以是健康的或功能不良的, 且任选用于诊断疾病, 如白血病或癌症。在本发明优选的实施方式中, 所述样品包括哺乳动物的细胞、提取物和均浆。

所述样品较好包括活细胞材料, 更好包括单个细胞或亚细胞隔室, 最好是包

括活细胞中的 GPCR、细胞内酶或药物转运蛋白、包含这些蛋白质的膜、增溶的受体、酶或药物转运蛋白或 GPCR 阵列。细胞材料可以已知方式通过培养细胞或在细胞中表达蛋白质来获得。

在优选的实施方式中,所述细胞材料是表达 GPCR 的细胞、酶或药物转运蛋白。GPCR 可能是目前前瞻性药物治疗所用单个最重要的靶标。

更好地是,所述样品包括 GPCR 受体,选自腺苷 A_1 -、 A_2A -、 A_2B -和 A_3 -受体, β_1 -、 β_2 -和 β_3 -肾上腺素受体,或者包括细胞内酶抑制剂,如环核苷酸磷酸二酯酶,最好是表达人类 CHO-细胞的腺苷 A_1 -受体或 β -肾上腺素受体或细胞内酶的抑制剂,如细胞内磷酸二酯酶的抑制剂。

在接触荧光配体前,细胞材料可以标记,例如通过用 GFP 例如 GFP 标记的 GPCR、GFP 标记的细胞内酶以及 GFP 标记的药物转运蛋白,或者天然受体、细胞内酶或药物转运蛋白(荧光抗体已经靶向该转运蛋白),使细胞受体、酶或转运蛋白显影,并覆盖所述荧光配体。

受体可以在膜样品中,或者在剧烈分散的细胞样品中提供,例如内源生受体如剧烈分散的细胞中的 A_1 -AR。所述腺苷受体结合位点位于受体口袋内的深处,这样具有接头的荧光配体是优选的荧光激动剂(拮抗剂)。同时,改变所述配体并保持拮抗剂结合活性相当自由,更难保持激动剂活化活性,即活化受体对结合的功能。

用于药物转运蛋白的底物的药物转运的方法将在通式 I 所示化合物摄入到细胞溶质之后进行(若所述转运蛋白将药物转移到细胞中),或者在将底物加入所述细胞中或,随之通式 I 所示化合物从细胞中消失,或出现在细胞间介质中(若所述转运蛋白将药物从细胞内转移出来,例如当所述转运蛋白是 ATP-驱动泵时)。所述方法较好包括监控通过平衡转运蛋白将药物转运到细胞中,所述转运蛋白将所述化合物转运到细胞中,然后,施加这种第一平衡转运蛋白的抑制剂,并监控通过 ATP-驱动泵转运蛋白将药物从细胞中输出。

药物转运蛋白抑制的方法可以通过检测结合细胞表面上的转运蛋白来监控。

所述包括检测荧光变化的方法较好包括检测强度的变化、荧光(单光子和多光子)的激发或发射波长分布、荧光寿命、荧光偏振或者它们的组合等。所述光响应通过已知方式来检测,如照相机、胶片、激光扫描器件、荧光计、光电二极管、量子计数器、微型、显微镜、荧光显微镜如落射荧光(epifluorescence)或共焦、细胞计数器、读数器等,较好是 CSLM、共焦板读数器、荧光偏振板读数器或 FCS。

当使用流动细胞计数器检查所述样品时，所述样品检查任选包括按照其荧光响应分选所述样品的组分。

本发明结合或抑制或检测的方法可以在体外或体内进行。

本发明尤其有利的是所述新荧光配体适于和 FCS 组合使用，能在单分子水平上研究配体-受体的结合。由于监控了所述事件的本质，FCS 能理想地用于研究分子在溶液中相互作用的热动力和动力学特征。本发明另一个具体优势在于 FCS 途径可以在单分子水平上使用光子计数荧光强度测量法监控配体-受体的结合。这不需要在共焦体积内移动所述分子。

在配体显示低背景荧光的情况下，不需要通过在进行共焦显微术或 FCS 之前进行洗涤来除去未结合的配体。因此，可以按照依赖于时间和浓度的方式测量随时间变化的荧光情况。

共焦显微术(CSLM)能使细胞的剖面显影，显示在细胞边缘处的荧光团浓度，表明膜受体的结合。显影是具体聚焦的平面，可以观察单个细胞的”薄片”如本领域已知的。可以选择不同的着色通道来显影不同的荧光团类型。

FCS 是一种非侵入性技术，它通过统计分析其光子发射的图案来分析荧光物质通过很小的发射体积($<10^{-15}l$)的扩散特征。这样，快速扩散的游离配体可以和缓慢扩散的受体-结合配体区分开来，并在所述体积位于细胞膜上时同时量化。所述结合 FCS 的方法较好包括在共焦体积 $<10^{-15}l$ 的条件下测量荧光强度的波动。这些波动的统计分析提供了有关扩散速度(即，质量)和荧光分子浓度的信息。因此，游离配体(快速扩散)和结合的配体(缓慢扩散)可以在单细胞上同时量化。

FCS(荧光相关光谱法)涉及颗粒荧光发射对用于研究分子在溶液中相互作用的参数如颗粒质量以及浓度的波动。FCS 基本上通过分析紧密聚焦激光束来监控显微镜检测体积($10^{-15}l$)中荧光标记的分子的自发荧光强度波动。

这些波动提供了有关颗粒扩散速度或扩散时间的信息，它直接取决于给定分子的质量。当小的(因此快速扩散的)分子经过激光通路时，它们产生快速波动的荧光强度图案，而当更大分子经过所述光束时，它们产生更持久的荧光爆炸。因此，当所得生物分子扩散时间增加时，则可以检测到生物分子的质量增加例如由于配体结合的结果。

可以使用荧光显微镜将受体在一定灵敏度和速度下定位在单细胞或亚细胞水平上。在这种方式中，高亲和性标记的配体有助于说明 GPCR 受体亚型的分子特征，如腺苷等受体，其区域分布和细胞定位。

在本发明另一方面中，提供了荧光靶标对荧光配体的用途，例如，绿荧光蛋白质标记的受体、细胞内酶或药物转运蛋白。在这种情况下，所述荧光配体的光谱特征选择用于单独检测荧光配体和荧光受体、细胞内酶或药物转运蛋白的定位。然后，交叉关联的荧光相关光谱或荧光强度测量能在单独测量中定量分析配体-受体、配体-酶、配体-药物转运蛋白或药物转运相互作用。这和已有技术中涉及 GFP-蛋白质转运测定和涉及荧光能量转移(FRET)测定的方法不同。图 1 举例说明了这种方式。

本发明另一方面提供一种细胞表面 GPCR，在其 N-端或天然存在域上修饰，以表达用于市售抗体(例如，myc，血细胞凝集素，FLAG)的短表位标记物。然后，这在 CHO 细胞中表达，标记物序列的荧光抗体用在活细胞中，如以上 GFP-标记蛋白质中所述提供对荧光配体-受体相互作用的两色分析。

本发明另一方面提供表达细胞表面 GPCR 的 CHO 细胞的，如权利要求 37 所述进行修饰，同时，标记物序列的荧光抗体用在活细胞中，如以上 GFP-标记蛋白质中所述提供对荧光配体-受体相互作用的两色分析。

本发明另一方面提供一种试剂盒，它包含以上通式 I 或 I' 所示的化合物以及作为细胞系、来自这种细胞系的膜或者由该细胞系增溶的蛋白质提供的靶标。所述来自细胞的材料可以作为三种形式中的一种提供：(1) 来自表达绿荧光蛋白质标记的受体、细胞内酶或药物转运蛋白的细胞；(2) 来自表达表位标记物的细胞，用于市售的荧光抗体；或者(3) 野生型蛋白质，也提供了特异性荧光抗体。

在另一实施方式中，提供了一种试剂盒，它包含以上通式 I 或 I' 所示的化合物以及对天然蛋白质的荧光抗体，它可以用在天然(非重组)细胞中。

在各情况下，选择通式 I 或 I' 所示化合物以及荧光抗体或绿色荧光蛋白质的光谱特征，以进行最佳的两色交叉相关的荧光相关光谱法(单光子或多光子)。

参考以下附图和实施例以及附带的合成流程以非限制的方式说明了本发明。

在附图中：

图 1 显示了 BODIPY-XAC 结合到表达人 A₁ 受体的 CHO-K1 细胞上的情况，上述受体具有连接到 C 末端的绿色荧光蛋白质标记物。(a) 红色配体的结合；(b) A₁-GFP 受体的位置以及(c) 通过共焦显微术获得的双信号共同定位(黄色)；更具体的是，图 1 显示了 a) 来自结合到 CHO 细胞表面上的受体的 XAC BY-630 的荧光的共焦显微术图像，在红色通道观察到；(b) 来自耦合到人腺苷 A₁-受体(由指示受体位置的 CHO 细胞表达的)的 C 末端的绿色荧光蛋白质的荧光的共焦显微术图像，通过绿

色通道观测到；(c) 来自(a)和(b)显示荧光重叠的图像，因此，证实配体结合对受体具有特异性。图 2 显示 BODIPY-ABEA 结合到表达人 A1 受体的 CHO-K1 细胞上的情况，上述受体具有连接到 C 末端的绿色荧光蛋白质标记物。(a) 红色配体的结合；(b) A1-GFP 受体的位置以及(c) 通过共焦显微术获得的双信号共同定位(黄色)。

在所述流程中：

流程 1 显示腺苷受体拮抗剂 Lig-L-Fl_L 的合成路线。

流程 2 和 3 显示两种腺苷受体激动剂 Lig-L-Fl_L 的合成路线，包括由接头前体 Z_L'-L-Z_L 合成配体前体 Lig-L-Z_L。

流程 4 显示两种 β 肾上腺素受体激动剂 Lig-L-Fl_L 的合成路线，包括由接头前体 Z_L'-L-Z_L 合成配体前体 Lig-L-Z_L。

实施例 A-C

合成以下化合物，或将以下化合物作为模型，并研究其结合亲和性：

实施例 A1/B1/C1 腺苷受体拮抗剂：

XAC-BODIPY 630/650 (1)

实施例 A2/B2 腺苷受体激动剂：

腺苷-BODIPY 630/650 (2)

NECA-BODIPY 630/650 (3) (ABEA-BODIPY 630)

APEA-BODIPY 630/650 (3a)

ABIPEA - BODIPY 630/650 (3b)

实施例 A3/B3 β-肾上腺素受体激动剂

沙莫特罗-BODIPY 630/650 (4)

氨哮素-BODIPY 630/650 (9)

实施例 A4/B4 β-肾上腺素受体拮抗剂

CGP12177-BODIPY 630/650 (5)

心得安-BODIPY 630/650 (6)

ICI118551-BODIPY 630/650 (7)

阿普洛尔-BODIPY 630/650 (8)

实施例 A5/B5 环核苷酸磷酸二酯酶的抑制剂

XAC-BODIPY 630/650(1)

材料和方法

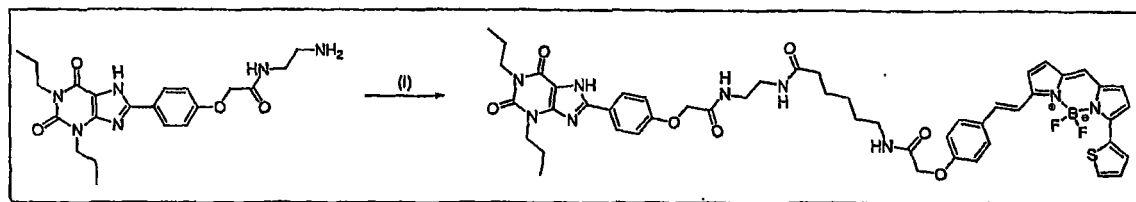
在 Bruker a_m 250 (250 MHz) 光谱仪上在 $CDCl_3$ 或 $DMSO-d_6$ 中获得 1H NMR 的光谱。参考残留溶剂信号/TMS 以 ppm 记录化学偏移 (δ)。以赫兹记录偶合常数 (J)，信号的多样性以 s(单峰)、d(双峰)、dd(两个双峰)、t(三峰)、m(多峰)、br(宽峰) 来表示。在给定条件下，根据同核相关光谱 (COSY-45) 进行分配，所得值与文献值一致 (Jacobsen KA 等, J. Med. Chem. (1985), 28, 1341-6)。

(在 Waters Millenium LC 系统 (996PDA 洗脱检测，用 Vydac C^8 色谱柱 (150mmx 4.6 mm)，流速 1.0mL/分钟) 中进行分析 RP-HPLC。所述移动相为溶剂 A，水(用氦气鼓泡脱气)；溶剂 B，乙腈(用超声波脱气))。

A. 合成

实施例 A1 - 合成腺苷基荧光 A1-受体拮抗剂

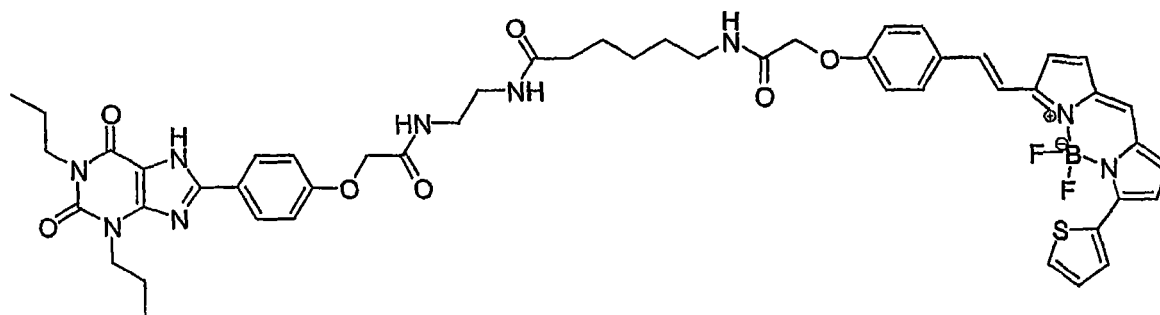
1. XAC-BY630(1)



流程 1

试剂和条件: (i) BODIPY 630/650-X-SE, DMF 2 小时, 室温 (72%)

通过反应 XAC 的伯烷基胺基和 BODIPY®-630/650-X-琥珀酰亚胺基酯 (Molecular Probes) 来合成 XAC-BODIPY 630/650。在室温下，在 N,N-二甲基甲酰胺中搅拌 XAC 和 BY630 2 小时，通过 HPLC 纯化所述产品。通过 Jacobsen 等在 J. Med. Chem 1985, 28, 1334-1340 中所述的方法合成 XAC 和类似物。



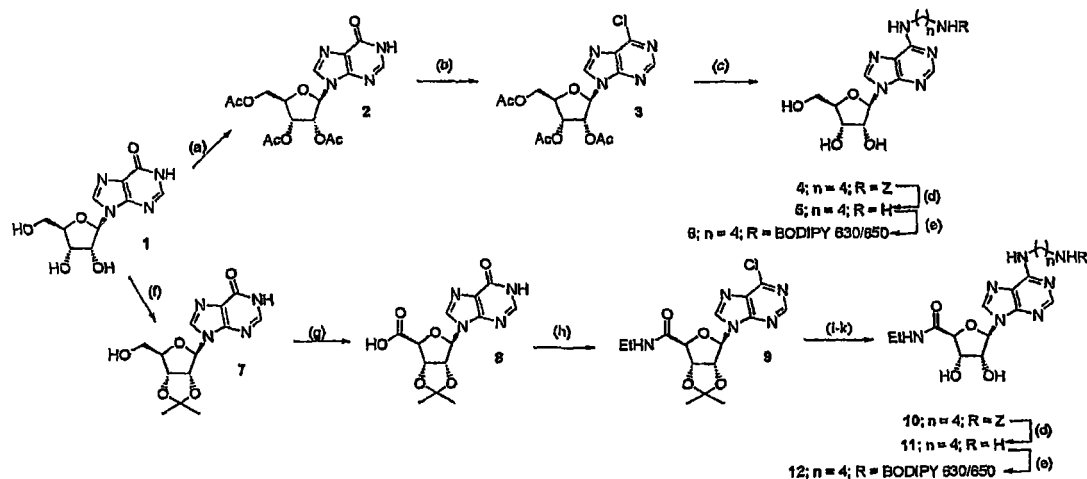
TOF ES+ 测量值 974.3998 ($C_{50}H_{55}BF_2N_9O_7S$ 要求 974.4006)

R_t 12.5 分钟 (35-100% v/v B, 30 分钟)

δH 0.87, 0.90 (6H, 重叠 t, J 9.3, N^1- , N^3 - $CH_2CH_2CH_3$), 1.14-1.25 (2H, m, $C^{24}H_2$), 1.36-1.62 (6H, m, $C^{23}H_2$, $C^{25}H_2$, $N^{1/3}$ - $CH_2CH_2CH_3$), 1.68-1.78 (2H, m, $N^{1/3}$ - $CH_2CH_2CH_3$), 2.04 (2H, t, J 7.3, $C^{22}H_2$), 3.04-3.19 (6H, m, $C^{18}H_2$, $C^{19}H_2$, $C^{26}H_2$), 3.86 (2H, t, J 7.4, $N^{1/3}$ - $CH_2CH_2CH_3$), 4.01 (2H, t, J 7.1, $N^{1/3}$ - $CH_2CH_2CH_3$), 4.52, 4.53 (4H, 2 x s, $C^{15}H_2$, $C^{29}H_2$), 6.95 (1H, d, J 4.2), 7.05-7.10 (4H, m), 7.27-7.30 (3H, m), 7.35-7.40 (2H, m), 7.41 (1H, br s), 7.54-7.65 (3H, m), 7.70 (1H, s), 7.77 (1H, s), 7.80-7.92 (2H, s), 8.01-8.23 (4H, m) (2 x $C^{11}H$, 2 x $C^{12}H$, 2 x $C^{32}H$, 2 x $C^{33}H$, $C^{35}H$, $C^{36}H$, $C^{38}H$, $C^{39}H$, $C^{41}H$, $C^{43}H$, $C^{44}H$, $C^{47}H$, $C^{48}H$, $C^{49}H$, N^9H , $N^{17}H$, $N^{20}H$, $N^{27}H$).

实施例 A2 - 合成在人 A1-腺苷受体 (A_1 -AR) 处的腺苷基荧光激动剂, 基于具有保持功能活性的 5'-N-乙基甲酰胺基腺苷 (NECA) 的受体

化合物 2, 3, 3a 和 3b 通过使适当保护的肌苷衍生物特定地特定地与氯化剂反应, 引入保护的接头来合成。保护基的除去在通过连接基团共轭荧光剂之前进行。

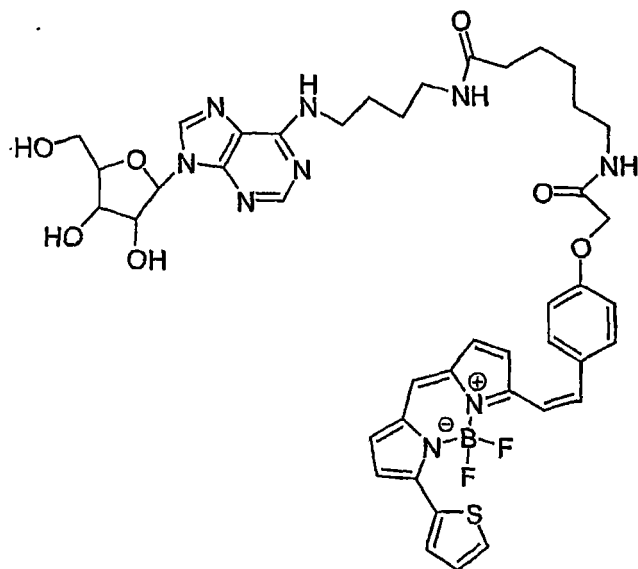


流程 2

试剂和条件: (a) Ac_2O , 吡啶, 40°C , 1 小时, 97%. (b) POCl_3 , N,N-二甲基苯胺, 回流, 5 分钟, 85%. (c) (i) $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NHR}$, DIEA, EtOH, 回流, 18 小时, (ii) 饱和 NH_3/MeOH , 0°C , 2 小时。66%。 (d) H_2 , Pd/C, MeOH: H_2O : AcOH(7: 2: 1), 室温, 2 小时, 80% (e) BODIPY 630/650-SE, DMF, 室温, 3 小时, 63%

1. 腺苷- C^4 - BODIPY 630/650 (ABA-BY630) (2)

使用流程 2 a-e 中所述的方法、试剂和条件合成 ABA-BY630, 其中 R 是 COCH_2Ph 。



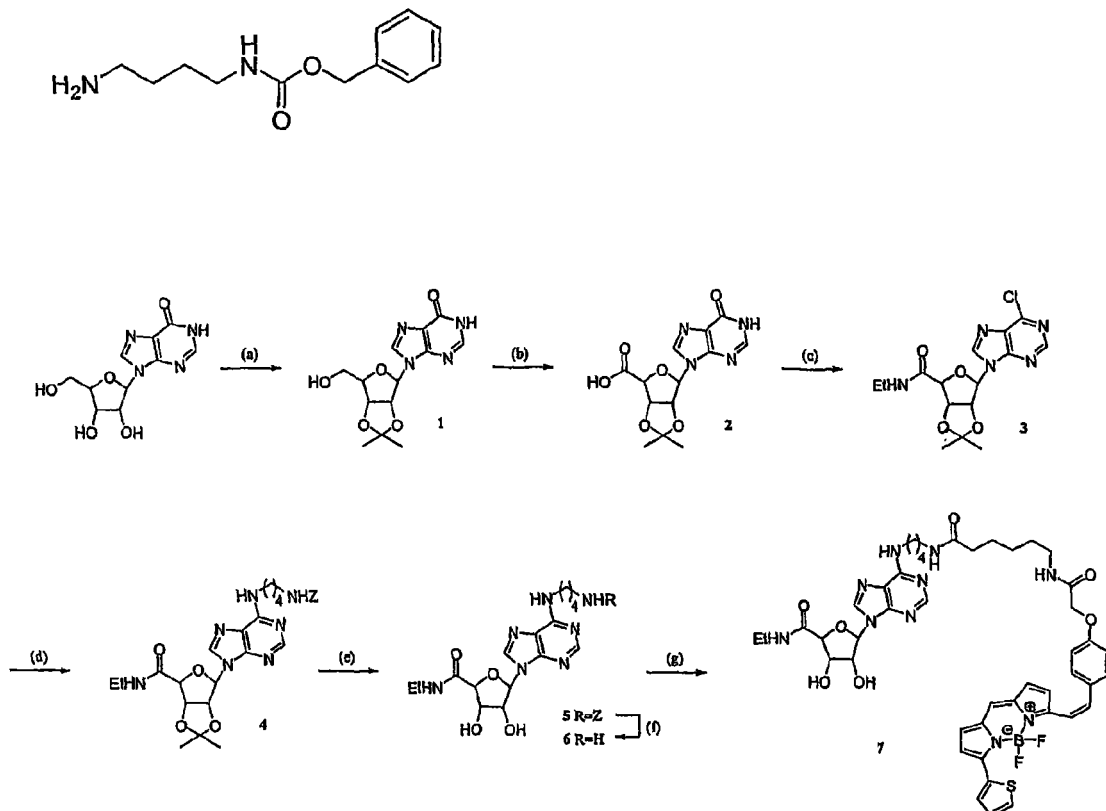
ES+ 测量值 885.4 ($\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{BF}_2\text{N}_9\text{O}_7\text{S}$ 要求 885.4)

Rt 22.5 分钟 (5-100% v/v B, 30 分钟)

2. NECA-C⁴ - BODIPY 630/650 (ABEA-BY630) (3).

由市售的试剂分 6 步合成 N⁶-氨基丁基-5'-脱氧-5'-氧代-5'-乙基氨基腺苷(ABEA)。所述 ABEA 的伯胺基团用荧光团 BODIPY®630/650-X-琥珀酰亚胺基酯(BY-630, Molecular Probes)进行酰化, 制得 BY630-ABEA, 它通过 RP-HPLC 进行纯化(流程 3)。

所述合成步骤如流程 3 所示, 使用通式 H₂N(CH₂)₄HNCOOCH₂Ph 所示的接头前体:



流程 3

试剂和条件: (a) 2,2-二甲氧基丙烷, TsOH, 丙酮, 室温, 18 小时。(b) TEMPO, BAIB, MeCN: H₂O(1: 1), 室温, 4 小时。(c) (i) SOCl₂, DMF, CHCl₃, 回流, 6 小时。(ii) EtNH₂, CHCl₃, 5°C, 30 分钟。(d) H₂N(CH₂)₄NHZ, DIEA, EtOH, 回流, 18 小时。(e) 0.1 M HCl(水溶液), 50°C, 4 小时。(f) H₂, Pd/C, MeOH: H₂O: AcOH(9: 0.9: 0.1), 室温, 3 小时。(g) BODIPY 630/650-X-SE, DMF, 室温, 4 小时。

合成接头修饰的配体, 通式 IV 所示的化合物

2', 3'-异亚丙基肌苷 1: 将肌苷(5.36 g, 0.02 mol)和对甲苯磺酸一水合

物(3.80 g, 0.02 mol)悬浮在2,2-二甲氧基丙烷(50 cm³)和丙酮(200 cm³)的混合物中,并搅拌18小时。加入碳酸氢钠(2.52 g, 0.02 mol)和水(40 cm³),所述悬浮液搅拌15分钟。所述悬浮液蒸发至恒定体积,由残留水中重结晶所述粗产物,制得丙酮化合物1(3.71 g, 60%),为白色针状物;熔点:266-268 °C(从H₂O中)(文献值:266 °C); $[\alpha]^{22D} -67.1(c\ 0.59, MeOH\ 中)$ (文献值: $[\alpha]^{20D} -66.9(c\ 0.8, 在\ MeOH\ 中)$); $\delta_H(250\ MHz; DMSO-d_6)$ 1.31(3 H, s, CH₃), 1.53(3 H, s, CH₃), 3.53(2 H, m, C^{5'}H₂), 4.22(1 H, m, C^{4'}H), 4.93(1 H, dd, J 6.1和2.5, C^{3'}H), 5.26(1 H, dd, J 6.1和2.9, C^{2'}H), 6.10(1 H, d, J 2.9, C^{1'}H), 8.10(1 H, s, 腺嘌呤CH), 8.31(1 H, s, 腺嘌呤CH); $\delta_c(69.2\ MHz; DMSO-d_6)$ 25.2, 27.0(2 x 丙酮化合物), 61.4(C^{5'}), 81.3(C^{4'}), 83.8(C^{3'}), 86.6(C^{2'}), 89.6(C^{1'}), 113.1(4°), 124.4(4°), 138.7(CH), 146.1(CH), 147.8(4°), 156.5(4°); m/z(ES+) 309(MH⁺), 137(M-核糖)。

2',3'-异亚丙基-5'-氧代肌苷 2: 将丙酮化合物1(3.08 g, 10 mmol)、TEMPO(313 mg, 2 mmol)和二乙酸亚碘酰苯酯(7.09 g, 22 mmol)溶解在MeCN:H₂O(1:1, 50cm³)中,并搅拌,在遮光条件下进行4小时。从所得悬浮液中仔细蒸发所述溶剂,并用丙酮和二乙醚依次滴定所述反应残留物,制得酸2(2.67 g, 83%),为白色粉末;熔点224-229 °C(从二乙醚中)(文献值:274-276 °C);(测量值:C, 48.55; H, 4.3; N, 17.0. C₁₃H₁₄N₄O₆要求C, 48.45; H, 4.4; N, 17.4%); $\delta_H(250\ MHz; DMSO-d_6)$ 1.33(3 H, s, CH₃), 1.51(3 H, s, CH₃), 4.68(1 H, d, J 1.6, C^{4'}H), 5.36-5.44(2 H, m, C^{2'}H和C^{3'}H), 6.30(1 H, s, C^{1'}H), 8.02(1 H, s, 腺嘌呤CH), 8.27(1 H, s, 腺嘌呤CH), 12.42(1H, br s, NH; $\delta_c(69.2\ MHz; DMSO-d_6)$ 25.1, 26.7(2 x 丙酮化合物), 83.9, 85.8, 90.0(4 x CH), 112.9(4°), 124.4(4°), 140.0(CH), 145.8(CH), 148.2(4°), 156.8(4°), 171.8(C=O); m/z(ES+) 323(MH⁺), 137(M-核糖)。

6-氯-6-脱氧-5'-乙基氨基-2',3'-异亚丙基-5'-氧代-5'-脱氧肌苷 3: (N.B. 极干燥的反应条件,并在惰性气氛下),将酸2(967 mg, 3 mmol)悬浮在CHCl₃(15cm³)中,其中已经加入N,N-DMF(581 μL, 7.5 mmol)和SOCl₂(1.09 cm³, 15mmol)。将所述悬浮液置于热油浴中,并在回流条件下保持6小时。蒸发所得溶液,并在5°C下将黄色油溶解在THF(20 cm³)中。滴加乙胺(在THF中的2.0M溶液,

3.75cm³, 7.5 mmol), 并在 5 °C 下搅拌 15 分钟, 并加热至室温。将所述溶剂蒸发, 并将残留物溶解在 DCM(25cm³)中, 并用水(2×20cm³)和饱和盐水溶液(2×20 cm³)洗涤。将所述有机馏分干燥, 并蒸发留下黄色油, 通过在二氧化硅上柱色谱(5 % MeOH-DCM)进行纯化, 制得标题化合物 3(525 mg, 48%), 为黄色浆液; $[\alpha]^{19D} - 12.9$ (c 0.50, CHCl₃中); δ_H (250 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 0.78(3 H, t, J 7.3, CH₂CH₃), 1.41(3 H, s, CH₃), 1.64(3 H, s, CH₃), 2.90-3.11(2 H, m, CH₂CH₃), 4.74(1 H, d, J 1.9, C^{4'}H), 5.46(1 H, dd, J 6.2 和 2.3, C^{2'}H), 5.54(1 H, dd, J 6.2 和 1.9, C^{3'}H), 6.24(1 H, d, J 2.3, C^{1'}H), 6.28(1 H, br s, NH), 8.35(1 H, s, 腺嘌呤 CH), 8.68(1 H, s, 腺嘌呤 CH); δ_C (69.2 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 14.2(CH₂CH₃), 25.0, 26.9(2 x 丙酮化合物), 33.9(CH₂CH₃), 82.9, 83.4, 86.7, 92.0(4 x CH), 114.6(4°), 132.3(4°), 144.8(CH), 150.9(4°), 151.9(4°), 152.2(CH), 168.1(C=O); m/z(ES-) 366((M-H)-), 153(M-核糖)。

N⁶-(4-苄氧基羰基氨基丁基)-5'-乙基氨基-2', 3'-异亚丙基-5'-氧代-5'-脱氧腺苷 4: 将氯化物 3(337 mg, 0.92 mmol)溶解在 EtOH(10 cm³)中, 往其中加入 N-苄氧基羰基丁基-1,4-二胺(305 mg, 1.37 mmol)和 DIEA(159 μ L, 0.92 mmol)。将所述溶液置于热油浴中, 并在回流条件下保持 18 小时。所得溶液进行蒸发, 并且所述黄色油在二氧化硅上柱色谱(2.5 % MeOH-DCM)进行纯化, 制得标题化合物 4(445 mg, 88%), 为淡黄色胶; δ_H (250 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 0.99(3 H, t, J 7.1, CH₂CH₃), 1.43(3 H, s, CH₃), 1.55-1.71(7 H, m, CH₃和 2 x CH₂), 3.20-3.35(2 H, m, CH₂), 3.55-4.01(4 H, m, CH₂CH₃和 CH₂), 4.81(1 H, s, CH), 5.10(3 H, m, 苄基 CH₂和 CH), 5.51(1 H, d, J 5.9, CH), 5.71(1 H, d, J 5.9, CH), 6.10(1 H, br s, NH), 6.16(1 H, br s, NH), 7.30-7.36(5 H, m, 芳族 s), 7.86(1 H, s, 腺嘌呤 CH), 8.22(1 H, s, 腺嘌呤 CH); δ_C (69.2 MHz; CDCl₃; Me₄Si) 13.7(CH₂CH₃), 25.1, 26.6(2 x 丙酮化合物), 26.8, 27.0, 40.0, 40.4(4 x CH₂), 61.5(CH₂CH₃), 66.6(苄基 CH₂), 84.1, 84.7, 87.0, 91.6(4 x CH), 113.7(4°), 128.1(C), 128.5(CH), 136.7(4°), 139.9(CH), 152.8(CH), 154.9(4°), 156.5(CH), 169.4(C=O); m/z(ES+) 554(MH+), 341(M-核糖)。

N⁶-(4-苄氧基羰基氨基丁基)-5'-乙基氨基-5'-氧代-5'-脱氧腺苷 5: 将腺苷衍生物 4(261mg, 0.47mmol)溶解在 1 M HCl(水溶液):1,4-二噁烷(1:1, 4 cm³)

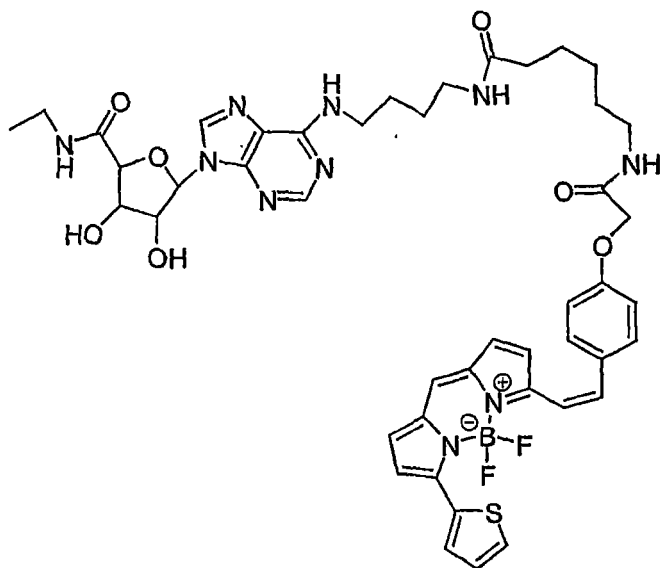
中，置于 50℃ 的油浴中，并搅拌 4 小时。所得溶液调整为 pH 8 (饱和的 NaHCO₃ (水溶液))，用 NaCl 饱和，并用 EtOAc (3 x 5 cm³) 提取。所述混合的有机组分进行干燥，并蒸发，通过制备型层色谱法 (10 % MeOH-DCM) 纯化所述粗产物，制得标题化合物 5 (160 mg, 66%)，为无色油； δ H (250 MHz; DMSO-d₆) 1.08 (3 H, t, J 7.2, CH₂CH₃), 1.45-1.62 (4 H, m, C₂H₂ 和 C₃H₂), 2.98-3.06 (2 H, m, C₁H₂), 3.17-3.26 (2 H, m, CH₂CH₃), 3.37-3.53 (2 H, m, C₄H₂), 4.12-4.16 (1 H, m, C^{3'}H), 4.31 (1 H, d, J 1.1, C^{4'}H), 4.58-4.65 (1 H, m, C₂H), 4.99 (2 H, s, 苄基 CH₂), 5.56 (1 H, d, J 6.5, C^{2'}-OH), 5.76 (1 H, d, J 4.2, C^{3'}OH), 5.96 (1 H, d, J 7.6, C^{1'}H), 7.25-7.34 (6 H, m, 芳族 s 和 NH), 8.01 (1 H, br s, 氨基甲酸酯 NH), 8.27 (1 H, s, 腺嘌呤 CH), 8.39 (1 H, s, 腺嘌呤 CH), 8.94 (1 H, t, J 5.6, 酰胺 NH); δ c (69.2 MHz; DMSO-d₆) 14.9 (CH₂CH₃), 26.6, 27.1, 33.4, 39.5, 40.3 (5 x CH₂), 65.3 (苄基 CH₂), 72.2, 73.3, 84.9, 88.0 (4 x CH), 120.2 (4°), 127.9 (CH), 128.5 (CH), 137.5 (CH), 140.6 (4°), 152.6 (CH), 154.9 (4°), 156.3 (4°), 169.3 (4°); m/z (ES+) 514 (MH+).

N⁶-(4-氨基丁基)-5'-乙基氨基-5'-氧代-5'-脱氧腺苷 (ABEA) 6: 将腺苷衍生物 5 (48 mg, 0.09 mmol) 溶解在 MeOH:H₂O:AcOH (9:0.9:0.1, 5 cm³) 中，往其中加入 10% Pd/C (10mg)。将所述烧瓶排空，并充入氢气 (气球)，并剧烈搅拌 3 小时。所述反应混合物通过硅藻土过滤，并用 MeOH 洗涤所述硅藻土。蒸发所述混合的有机过滤液，并从 MeCN (2 x 15 cm³) 再次蒸发所得油，制得标题化合物 6 (35 mg, 定量)，为无色油； δ H (250 MHz; DMSO-d₆) 1.08 (3 H, t, J 7.2, CH₂CH₃), 1.46-1.88 (6 H, m, 2 x CH₂ 和 NH₂), 2.63 (2H, t, J 6.8, CH₂), 3.16-3.29 (2 H, m, CH₂CH₃), 3.40-3.52 (2 H, m, CH₂), 4.10-4.15 (1 H, m, C^{3'}H), 4.30 (1 H, d, J 1.3, C^{4'}H), 4.53-4.62 (1 H, m, C^{2'}H), 5.96 (1 H, d, J 7.7, C^{1'}H), 8.05 (1 H, br s, NH), 8.27 (1 H, s, 腺嘌呤 CH), 8.39 (1 H, s, 腺嘌呤 CH), 8.95 (1 H, t, J 5.6, 酰胺 NH); m/z (ES+) 380 (MH+).

合成荧光配体，通式 I 所示化合物

ABEA-BY630 (3): 在惰性气氛以及遮光条件下，将 ABEA 6 (5.74 mg, 15.1 μ mmol) 溶解在 N,N-DMF (1 cm³)。加入 Bodipy 630/650-X-琥珀酰亚胺基酯 (Molecular Probes) (5.0 mg, 7.55 μ mmol, 1 cm³ N,N-DMF)，并将所述反应物搅拌 4 小时。

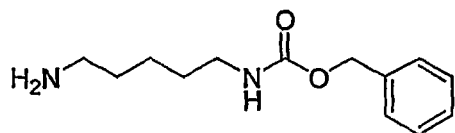
蒸发所述溶液，并通过制备型层色谱法(10 % MeOH-DCM)纯化所述粗产物，制得标题化合物 7(3) (5.24 mg, 75%)，为紫色粉末； m/z (ES+) 测量值：947.37 ($C_{45}H_{51}BF_2N_{10}O_7SNa$ 要求 947.36)。



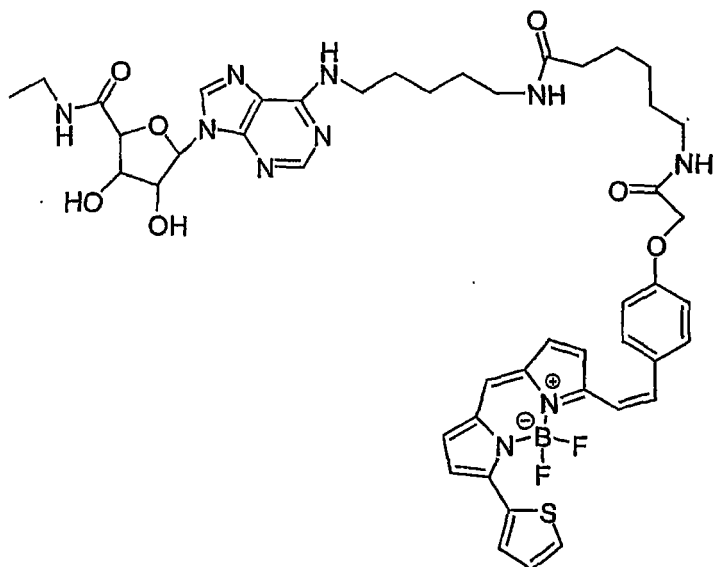
ABEA-BY630

3. NECA-C⁵-BODIPY 630/650 (APEA-BY630) (3a)

使用通式 $H_2N(CH_2)_5NHC(=O)OCH_2Ph$ 所示的接头前体，使用流程 3 所述的方法合成这种化合物(如针对化合物(3)中所述的)：



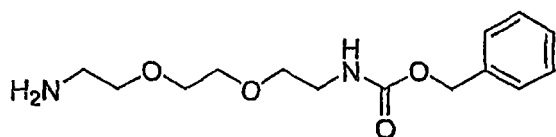
制得 APEA-BY630，它具有如下通式：



R_t 8.6 分钟 (30-100% v/v B, 25 分钟)

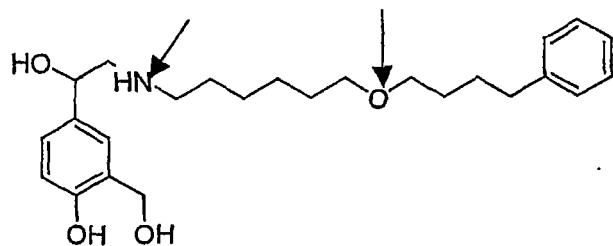
4. NECA-PEG⁸-BODIPY 630/650 (ABIPEA-BY630) (3b)

使用通式 H₂N((CH₂)₂O)₂(CH₂)₂NH COOCH₂Ph 所示的接头前体, 通过流程 3 所述的方法合成这种化合物(如化合物(3)中所述), 其中, 以下中间体 1-3 分别是结构式 4-7 的类似物, 如流程 3 所示:

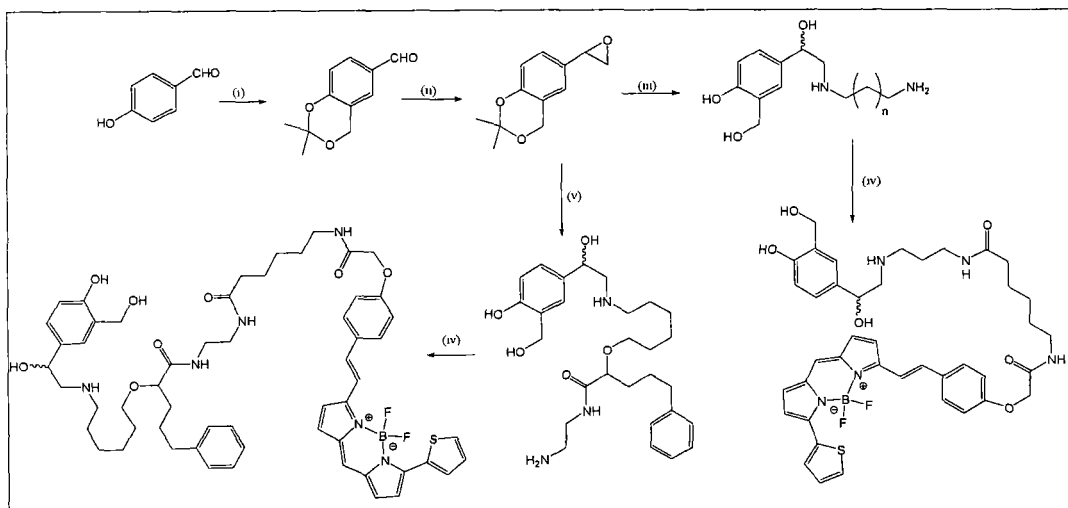


N⁶-(8-苄氧基羰基氨基-3,6-二噁辛基)-5'-乙基氨基-2',3'-异亚丙基-5'-氧代-5'-脱氧腺苷 1: δH(400 MHz; CDCl₃) 0.88(3H, t J 7.3, Et CH₃), 1.38(3H, s, 丙酮化合物 CH₃), 1.62(3H, s, 丙酮化合物 CH₃), 3.03-3.16(2H, m, Et CH₂), 3.40-3.93(14H, m, 6 x 接头亚甲基, C^{3'}H, C^{4'}H), 4.67(1H, s, C^{2'}H), 5.11(2H, s, 苄基 CH₂), 5.32(1H, s, C^{1'}H), 5.80(1H, br s, 氨基甲酸酯 NH), 6.55(1H, br s, C6-NH), 7.02(1H, br s, 酰胺 NH), 7.28-7.37(5H, m, 芳族 CH), 7.64(1H, br s, 腺嘌呤 CH), 8.29(1H, s, 腺嘌呤 CH).

N⁶-(8-苄氧基羰基氨基-3,6-二噁辛基)-5'-乙基氨基-5'-氧代-5'-脱氧腺苷 2: δH(400 MHz; DMSO-d₆) 1.08(3H, t J 7.2, Et CH₃), 3.12-3.17(2H, m, 接头 CH₂), 3.18-3.25(2H, m, Et CH₂), 3.41(2H, t J 6.0, 接头 CH₂), 3.49-3.54(4H, m, 2 x 接头 CH₂), 3.57-3.67(4H, m, 2 x 接头 CH₂), 4.14(1H, br m, C^{3'}H), 4.31(1H,

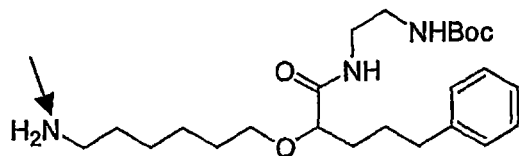


在第一步中，一个接头取代到沙莫特罗侧链上，接着通过它连接所述荧光团。在第二步中，所述沙莫特罗的天然烷基侧链用接头和荧光团代替。在本发明这种情况下，结合、荧光以及活性的保持并不确定，因此必须证实，所述信息由荧光配体提供，以制得有用的化合物。

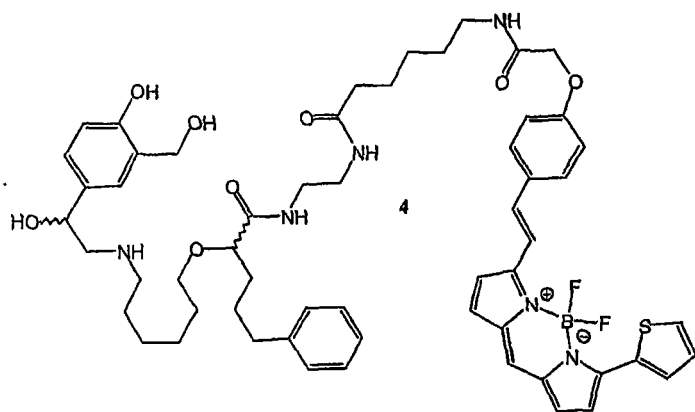


流程 4

试剂和条件：(i) (a) HCHO, HCl(水溶液), 二噁烷, 60°C, (b) 2,2-二甲氧基丙烷, TsOH. (ii) Me₃SI, NaH, THF. (iii) (a) BocNH(CH₂)_nNH₂, EtOH, (b) HCl, Et₂O. (iv) BODIPY 630/650-X-SE, DMF, RT. (v) (a) ZL' YL' -L-YLPL, EtOH, (b) HCl, Et₂O, ZL' YL' -L-YLPL 是

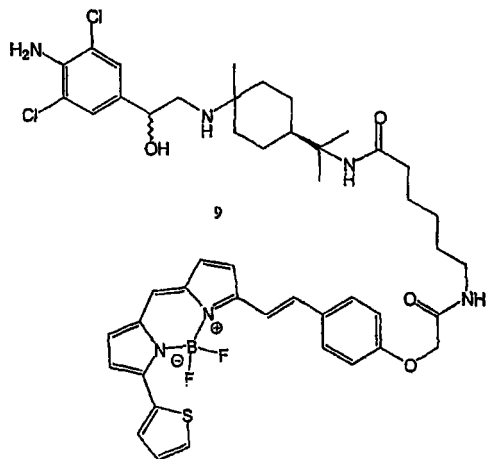


并形成化合物 4a



如流程 4 及以上所述, 以下所有分子取决于相同的两个接头部分的合成, (此时, 所述烃链长度容易变化, 或者化学改变成例如乙二醇结构, 提高溶解性)。

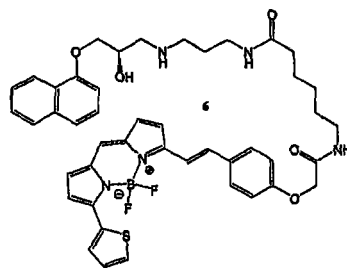
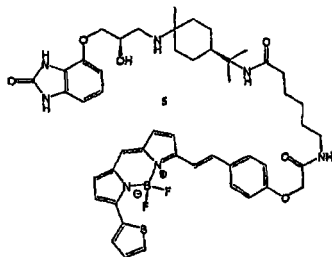
2. 克仑特罗-BODIPY 630/650 (9)



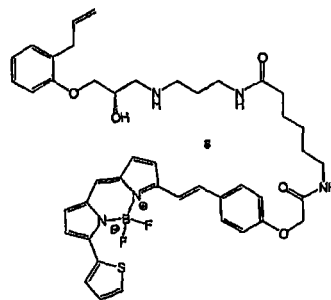
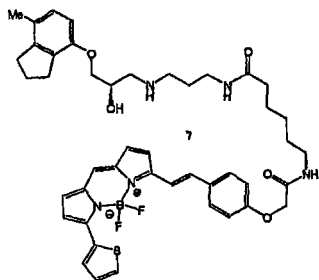
实施例 A4 - 合成 β -肾上腺素受体拮抗剂

如流程 4 及实施例 A3 中所述, 以下所有分子取决于所述相同的两个接头部分的合成, (此时, 所述烃链长度容易变化, 或者化学改变成例如乙二醇结构, 提高溶解性)。

1. CGP 12177-BODIPY 630/650 (5) 2. 心得安-BODIPY 630/650 (6)



3. ICI118551-BODIPY 630/650 (7) 4. 阿普洛尔-BODIPY 630/650 (8)



B. 药理学

实施例 B1 - 腺苷基荧光 A₁-受体拮抗剂的结合

1. XAC-BY630 (1)

所述腺苷-A₁受体 (A₁-AR) 是 G-蛋白偶联受体, 它可以在各种组织包括脑、心脏、脂肪组织和肌肉中发现。通过将 A₁-AR 拮抗剂黄嘌呤胺同源物 (cogener) (XAC) 共轭到荧光团 BODIPY®-630/650 (BY630) 上, 我们合成了荧光 A₁-AR 配体, XAC-BY630, 使这种受体在活细胞中显影。

在表达人 A₁-受体的 CHO-A1 细胞上进行 [³H]DPCPX 结合以及环 AMP 和肌醇磷酸累积试验。按照 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基: 包含 5% 胎牛血清和 2mM 谷氨酰胺的 Ham 氏 F12, 在 8-孔 Labtek™ 平板皿上使用生长至 50% 汇合的 CHO-A1 细胞, 采用 Zeiss LSM510 共焦显微术获得图像。用所述化合物在 22°C 下培育之前, 用 HEPES-缓冲盐水洗涤所述细胞两次。

XAC-BY630 和 BY630 的光谱分析本身显示其峰激发 (分别为 630 和 632nm) 和发射波长 (650, 653nm) 不是完全不同。对 CHO-A1 细胞膜的 [³H]DPCPX 结合研究显示 XAC-BY630 对 A₁-AR 的亲合性比 XAC 更低 (XAC 和 XAC-BY630 各自为 pK_i=7.79±0.13 和 6.82±0.11, 平均值±标准偏差, n=4)。在 cAMP 生产的 5'-N-乙基甲酰胺基腺苷-介导的抑制 (表观 pK_b=6.98±0.15, 与 XAC 的 8.06±0.24 比较, n=3) 和肌醇磷

酸生产的刺激(表观 $pK_B=6.26\pm 0.20$, 与 XAC 的 7.46 ± 0.08 比较, $n=4$)中, XAC-BY630 也起到竞争性 A_1 -AR 拮抗剂的作用。共焦图像显示 XAC-BY630 以依赖于时间和浓度的方式结合到膜-定位的 A_1 -ARs。在 5 分钟之后检测 XAC-BY630 (25-250nM) 的结合, 在培育 30 分钟之后主要位于膜处。XAC-BY630 的膜结合是受体特异性的, 这是因为用 DPCPX (10^{-8} - 10^{-6} M) 进行 30 分钟预培育导致膜结合 (30 分钟, 50nM) 的依赖浓度的抑制作用。

这些研究表明, XAC-BY630 是具有中等亲和性的官能化 A_1 -AR 拮抗剂, 它可以用于使主要组织和细胞系中的 A_1 -AR 显影。

荧光相关光谱法(FCS)

FCS 是非侵入式技术, 它测量在共焦体积小于 10^{-15} l 中荧光强度的波动。这些波动的统计学分析给出了有关扩散速度(即, 质量)和存在的荧光分子的浓度的信息。因此, 在单个细胞上可以同时量化游离配体(快速扩散)和结合配体(缓慢扩散)。我们使用 FCS 来测量荧光配体, 黄嘌呤胺同源物-BODIPY® 630/650 (XAC-BY630) 结合到人腺苷 A_1 受体 (A_1 -AR) 的情况。

表达人 A_1 -AR 或 A_1 -AR-Topaz 融合的 CHO 细胞在玻璃底 8-孔平板皿上培养, 制备用于肝细胞测量。使用安装有 AxioCam CCD 相机(用于 x-y 定位)的 Zeiss Confocor 2 进行 FCS 测量。在 22°C 下, 用配体培育所述细胞一定的时间, 在上膜上定位共焦体积。收集 2×30 秒的数据, 之后 15 秒预漂白, 并使用 Zeiss AIM 软件进行多参数方程式分析。

最初, 在 CHO-A1Tpz 细胞中确定 A_1 -AR-Topaz 融合蛋白质 (A_1 -AR-Tpz) 的扩散特征。自动相关分析显示 A_1 -AR 的扩散时间 (τ_D) 为 15.0 ± 0.9 ms (平均值 \pm 标准误差, $n=84$)。也看到第二组分 ($\tau_D=118\pm 14$ 微秒), 可能由荧光团内的偶发光学时间(“闪光”)引起。缓冲液中 XAC-BY630 的 FCS 分析显示了单个组分扩散 ($\tau_D=60\pm 2$ 微秒, $n=10$)。在用 XAC-BY630 (1-40nM, 10-60 分钟, $n=71$) 培育的 CHO-A1 细胞的上膜上, 除了游离配体以外还检测到其它两种缓慢扩散的种类。所述第一组分具有与 A_1 -AR-Tpz 类似的扩散时间 ($\tau_{D1}=17.4\pm 1.1$ ms; 69/71 细胞), 显示是受体-结合配体。所述第二部分是扩散很缓慢的组分 ($\tau_{D2}=345\pm 41$ ms, 61/71 细胞)。在用 8-环戊基-1, 3-二丙基黄嘌呤(DPCPX) (1M, 30 分钟) 预培育之后, 在 30/31 细胞中存在 t_{D2} , 显示这种组分是非特异性结合的。但是, 所述 t_{D1} 组分仅存在于 17/31 细胞中。此外, 在接触 15nM XAC-BY630 30 分钟的细胞中, τ_{D1} 组分的量从 51.8 ± 14.9

降低到 13.6 ± 5.4 受体/平方微米, DPCPX(分别为 $n=8$ 和 4 , 斯图顿特 t -试验, $P < 0.05$), 进一步提示该组分是 A_1 -AR 结合的配体。

我们使用 FCS 来量化 A_1 -AR 的结合, 并测量在单个肝细胞中的受体扩散。进一步的研究允许内源生 A_1 -AR 在急剧分散的细胞中进行定量受体-配体结合。

这些研究显示 XAC-BY630 是具有中等亲和性的官能化 A_1 -AR 拮抗剂, 它可用于显影和测量在主要组织和细胞系中结合 A_1 -AR 的情况。

实施例 B2 - NECA 基荧光 A_1 -受体激动剂的结合

2. BY630-ABEA(3)

在表达人 A_1 -AR 和 c-fos-pGL3 报道载体(CHO-A1fos 细胞)的 CHO-K1 细胞中进行功能研究。细胞在不含血清的 DMEM/F-12 培养基中培育 24 小时, 然后用激动剂刺激 5 小时, 在一些情况下, 之后用 8-环戊基-1,3-二丙基黄嘌呤(DPCPX)培育 30 分钟。按照制造商的说明书使用 Luclite® 试剂盒量化荧光素酶的表达。在 CHO 细胞上或在表达用绿色荧光蛋白(CHO-A1Tpz)在 C 末端上标记的 A_1 -AR 的 CHO-A1 细胞或 CHO 细胞上进行肝细胞共焦图像。

在 CHO-A1fos 细胞中, BY630-ABEA 和 A_1 -AR 激动剂, N^6 -环戊基腺苷(CPA)以剂量依赖的方式刺激荧光素酶表达(对于 CPA 和 BY630-ABEA, pEC_{50} 分别为 7.01 ± 0.04 ($n=6$) 和 6.76 ± 0.18 ($n=5$), 平均值 \pm 标准偏差)。刺激通过 A_1 -AR 受体介导, 因为浓度响应曲线由于 10nM DPCPX 以竞争的方式偏移到右边, pK_d 值分别为 8.72 ± 0.03 和 9.05 ± 0.10 与 CPA 和 BY630-ABEA 比较 ($n=3$)。更高剂量的 DPCPX(100nM)使 CPA 刺激的 pK_d 值为 8.62 ± 0.02 , 但是完全阻断对 BY630-ABEA ($n=3$) 的响应。对于受体的显影, CHO- A_1 细胞用 100nM BY630-ABEA 培育至多 60 分钟。在 5 分钟之后可以检测到配体结合到膜上, 并在 30 分钟之后结合牢固 ($n=3$)。结合是针对 A_1 -AR 的, 因为通过用 DPCPX($1 \mu M$, 30 分钟)预培育充分降低了。此外, 在 CHO-A1Tpz 细胞中的实验显示在膜上的配体荧光与荧光标记的 A_1 -AR 共同定位。

结果如图 1 所示, 显示 a) 来自结合到 CHO 细胞上的本发明荧光配体的受体结合的共焦显微术图像, 在红色通道观察到; (b) 指示受体位置的 CHO 细胞表达的绿色荧光蛋白质的荧光的共焦显微术图像, 通过绿色通道观察到; (c) 来自 (a) 和 (b) 的显示荧光重叠的重叠图像, 由此证实配体结合对受体是特异的。

总之, 我们成功合成了一种新的用于人 A_1 -AR 的荧光激动剂配体。这种配体可用于监控内源生 A_1 -AR 受体在剧烈分散的细胞和细胞系中的定位。

C. 与药理学数据相关的配体

实施例 C1-用于包含腺苷基荧光 A₁-受体拮抗剂的库/目录化合物的数据表

1. XAC-BY630(1)

性能描述： 荧光腺苷 A₁-受体拮抗剂

合成和分析： 见以上 A1

存储： -20°C (暗)

光谱性能：

激发最大值 638nm

发射最大值 655nm

荧光寿命 4.2 ns

发射量子产率 0.33

药理学：

表达人腺苷 A₁-受体的 CHO-细胞：

³H-DPCPX 结合(膜)的抑制 $pK_b = -6.82 + 0.11$

³H-DPCPX 结合(整个细胞)的抑制 $pK_b = -6.9$

NECA-刺激的 cAMP 累积的拮抗 $pK_i = -6.98 + 0.15$

NECA-刺激的肌醇磷酸酯累积的拮抗 $pK_i = -6.26 + 0.20$

成像：

XAC-BY630/650 结合到 CHO-A1 细胞和 CHO-A1-GFP 细胞的图像

所述图像也显示通过非荧光拮抗剂 DPCPX 置换结合的情况。

实施例 D 具有不同荧光标记的配体的库

D1 集合包含 3 种荧光配体的库，各库包含用荧光团荧光标记的 ABIPEA，提供不同的荧光特性，所述荧光团选自 BODIPY 630/650-X-SE、EvoBlue 30 SE、BODIPY FL 乙二胺等。

荧光标记的配体通过本发明以上所述的方法制得。

所述库包含用于各配体的数据表(以上的 C.)。

D2 集合包含 2 种荧光配体的另一库，各配体包含以上所述的腺苷和 ABIPEA，它们各自分成 3 个样品，并通过结合碳链长度不同的接头(C₃₋₆)进行修饰，此时，通式 IV 所示包含 Y_L的化合物是胺，L 是 (CH₂)₃₋₆，Y_L 是胺。所述化合物与荧光团反应，提供不同的荧光特性，所述荧光团选自 EvoBlue 30 SE 和 BODIPY 630/650 X-SE。

荧光标记的配体通过本发明以上所述的方法来制得。

所述库包含用于各配体的数据表(以上的 C.)。

D3 集合包含 3 种标记配体的另一库，各配体包含用选择本领域已知标记物标记的 ABIPEA，包括用荧光团标记的一种。

所述库包括用于各配体的数据表(以上的 C.)。

如本领域已知，该库可用于进行具有所需荧光团的荧光配体的结合研究，或者选择荧光配体，或者选择其中一种包含所需荧光团的配体。

然后，对所述库进行选择，以筛选用于在所需受体处的结合，并选择一种荧光配体，它为所需受体提供最佳的药效。通过合理设计所述库有利于对要筛选的库进行选择，提供所需的类似物，以产生正选择。

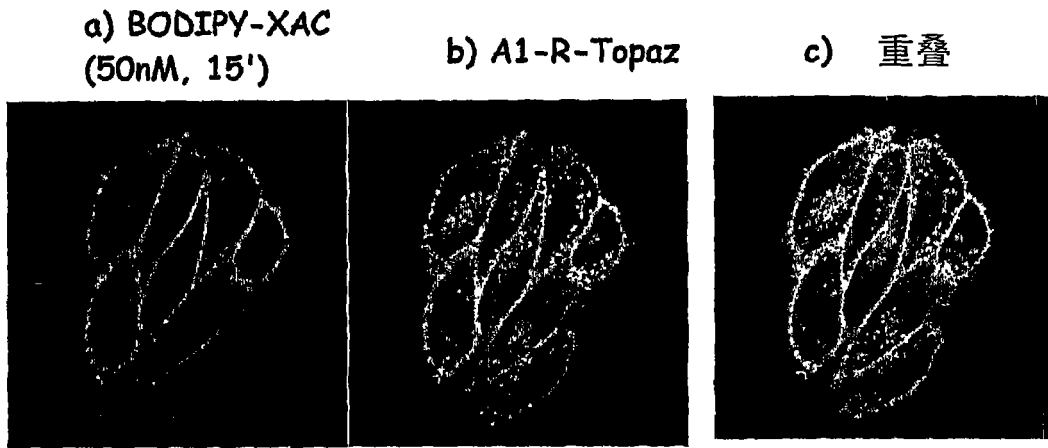


图 1

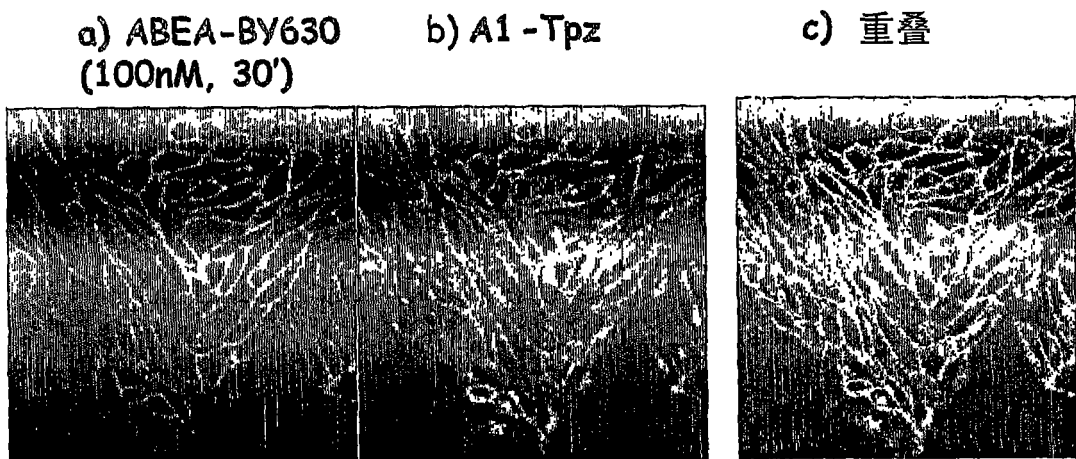


图 2

专利名称(译)	荧光标记的配体		
公开(公告)号	CN1860364A	公开(公告)日	2006-11-08
申请号	CN200480013905.7	申请日	2004-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	诺丁汉大学		
申请(专利权)人(译)	诺丁汉大学		
[标]发明人	M乔治 SJ希尔 B凯拉姆 RJ米德尔顿		
发明人	M·乔治 S·J·希尔 B·凯拉姆 R·J·米德尔顿		
IPC分类号	G01N33/533 A61K38/25 C07B61/00 C07D209/56 C07D333/02 C07D473/00 C07H19/16 C07H19/20		
CPC分类号	C07D209/56 C07D333/02 C07D473/00 C07H19/16 C07H19/20 C40B20/04 C40B30/04 C40B40/04 C40B50/08 C40B70/00 G01N33/533		
代理人(译)	周承泽		
优先权	60/465807 2003-04-28 US 2003007559 2003-04-02 GB		
其他公开文献	CN1860364B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

包含许多通式(I)所示标记非肽配体的库：(LigJL) m L(JTTag) m (JTL (JLLig) m) p，及其盐，它包含一个或多个相同或不同的配体部分Lig，它们各自通过相同或不同的接头L以及相同或不同的连接位点或连接官能团JT和JL连接到一个或多个相同或不同的标记部分Tag；其中，Lig包含GPCR配体，细胞内酶或底物的抑制剂，或者药物转运蛋白的抑制剂；L是单键或者是选自如N、O、S、P的杂原子、支链或直链饱和或不饱和的，并任选包含杂原子的C1 - 600烃基及其组合的任意接头部分，它们可以是单体、具有2 - 30个低聚重复单元的低聚物、具有超过30到至多300个聚合重复的聚合物；Tag是任何已知或新的标记底物；m各独立地选自1 - 3的整数；p是0 - 3；其特征在于，连接是在包含不同Lig、JL、L、JT和/或 - Tag的化合物中的相同或不同的连接位点上，以及在包含相同Lig、JL、L、JT和/或 - Tag的化合物中的不同连接位点上；及其制备方法；制备通式(I)所示库化合物或通式(IV)所示前体的方法；由所述库选择通式(I)所示化合物的方法；与其涉及药效性能的信息相关的通式(I)所示的化合物；通式(I)所示的新化合物或者通式(IV)所示的前体；其用途；与此有关的结合或抑制的方法；与此有关的荧光靶的用途；修饰的细胞表面GPCR和表达它的细胞；以及包含通式(I)所示化合物及其靶的试剂盒。

