

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 1 月 27 日 (27.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/016690 A1

(51) 国际专利分类号:

C07D 513/04 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)

C07B 59/00 (2006.01) G01N 21/76 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/114873

(22) 国际申请日: 2020 年 9 月 11 日 (11.09.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010705758.0 2020 年 7 月 21 日 (21.07.2020) CN

(71) 申请人: 山东大学 (SHANDONG UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国山东省济南市历下区文化西路 44 号, Shandong 250012 (CN)。

(72) 发明人: 李敏勇 (LI, Minyong); 中国山东省济南市历下区文化西路 44 号, Shandong 250012 (CN)。
杜吕佩 (DU, Lvpai); 中国山东省济南市历下区文化西路 44 号, Shandong 250012 (CN)。 陈新新

(CHEN, Xinxin); 中国山东省济南市历下区文化西路 44 号, Shandong 250012 (CN)。

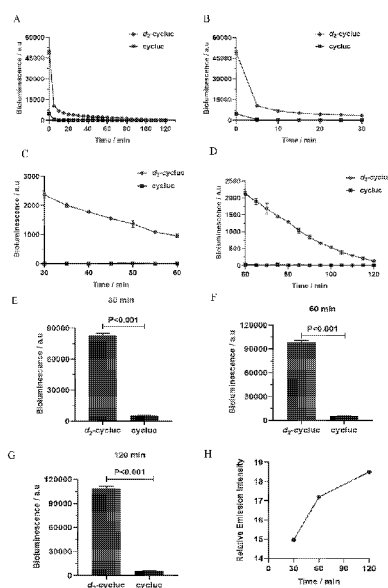
(74) 代理人: 济南圣达知识产权代理有限公司 (JINAN SHENGDA INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国山东省济南市经十路 17703 号华特广场 B308 室, Shandong 250061 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

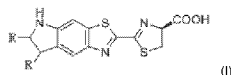
(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) Title: LUCIFERASE SUBSTRATES, PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种萤光素酶底物及其制备方法和应用



[8] 9



(57) Abstract: Provided are luciferase substrates, a preparation method therefor and an application thereof. The luciferase substrates have the advantages of good selectivity, high sensitivity, a low detection line and good biocompatibility, and so on; and further research shows that d₂-cycluc has stronger bioluminescence intensity and longer bioluminescence duration than cycluc in in vitro, cell, and in vivo environments. In addition, both luciferase substrates have a good concentration dependence, and the preparation method for the luciferase substrates is simple, has strong operability, low costs, and has good practical application values.

(57) 摘要: 提供一种萤光素酶底物及其制备方法和应用。所述萤光素酶底物具有选择性好、灵敏性高、检测线低及良好生物相容性等优点; 进一步研究证明, 在体外、细胞、体内环境中, d₂-cycluc 比 cycluc 的生物发光强度强, 生物发光时间长, 且两种萤光素酶底物都具有良好的浓度依赖性, 并且所述萤光素酶底物的制备方法简单, 可操作性强, 成本较低, 具有良好的实际应用价值。

NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种萤光素酶底物及其制备方法和应用

技术领域

本发明属于萤光素酶底物制备技术领域，具体涉及一种萤光素酶底物及其制备方法和应用。

背景技术

公开该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解，而不必然被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已经成为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

许多药物都是基于碳的，碳氢键与理解药物分子的重要特性特别相关。氘化是指选择性取代氢同位素在小分子药物中的位置，从而实现氘氢同位素药物的过程。一方面，药物的氘化最有可能影响药代动力学特性，例如代谢，而不是药效学作用。因此，氘代时某些药物的代谢可能受到有利影响。可以从氘化作为改变药物药代动力学的策略中获益，在一系列微生物学和生化分析中，氘化似乎并未损害药物的疗效。另一方面，使用氘化时，放置不当会导致明显的主要同位素效应。当与重同位素的键是反应（或代谢转化）中的限速步骤时，就会发生主要的同位素效应，分子与重同位素的反应将进行得更慢，由于轻和重同位素之间的质量差异而产生了标记。

氘表现出独特的理化性质，并且在所有其他元素中具有最强的动力学同位素效应。此外，在经氘处理过的细胞和生物体中已观察到各种各样的形态和生理变化，包括诸如细胞分裂或能量代谢等基本过程的变化。氘化作用改善了代谢谱，同时不影响药物的药理作用，并且降低了药物之间的相互作用，它们在体外显示出明显增强的稳定性。通常，氘最常用于增加药物的稳定性，从而增加其半衰期，并降低其形成反应性代谢产物的倾向，同时增加其安全性或改善药物的分布方式。氘化药物项目的巨大优势是可获得来自其非氘化变体的人类临床试验数据，这使得该过程的财务需求降低了。尽管我们仍未完全了解氘的所有后果，但很显然，在科学应用、生物技术、药理学等领域具有利用这些效应的巨大潜力。此外，动力学同位素效应的表现是其他元素中无与伦比的，此类应用的首选同位素。

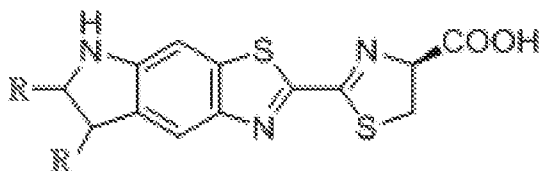
生物发光现象是自然界广泛存在的一种发光现象，一些生物可以通过一系列氧化反应将化学能转化为光能。在该过程中，可以在没有外部光激发的情况下有效地产生发光信号。在过去的十年中，生物发光方法作为荧光的替代方法得到了广泛应用，大大推动了生物学相关研究。目前生物发光成像技术已得到广泛的应用，主要应用于食品，肿瘤，重金属，各种离子，酶和有害气体检测等多个领域，然而，发明人发现，基于生物发光现象对动力学同位素效应的研究仍然较少。

发明内容

针对目前现有技术的不足，本发明提供一种合成的环状烷基氨基萤光素，其允许使用修饰的萤光素酶 Ultra-Glo 发出稳定的红移光，并且发光强度很强，因此它是一种非常有应用价值的生物发光探针。本发明根据环状烷基氨基萤光素发光的优越性，对其进行氘代修饰，将环状烷基氨基萤光素中的部分碳氢键替换为碳氘键，经试验证明其具有更强的生物发光强度和更长的生物发光时间，从而展现出更加良好的生物发光优势，因此具有良好的实际应用之价值。

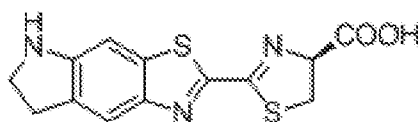
为了实现上述技术目的，本发明的技术方案如下：

本发明的第一个方面，提供一种荧光素酶底物，所述荧光素酶底物结构式为：

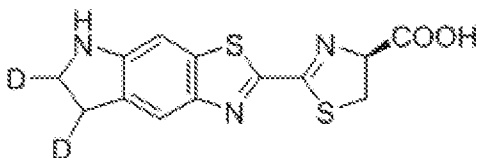


其中，R 取氢或氘，优选为氘；

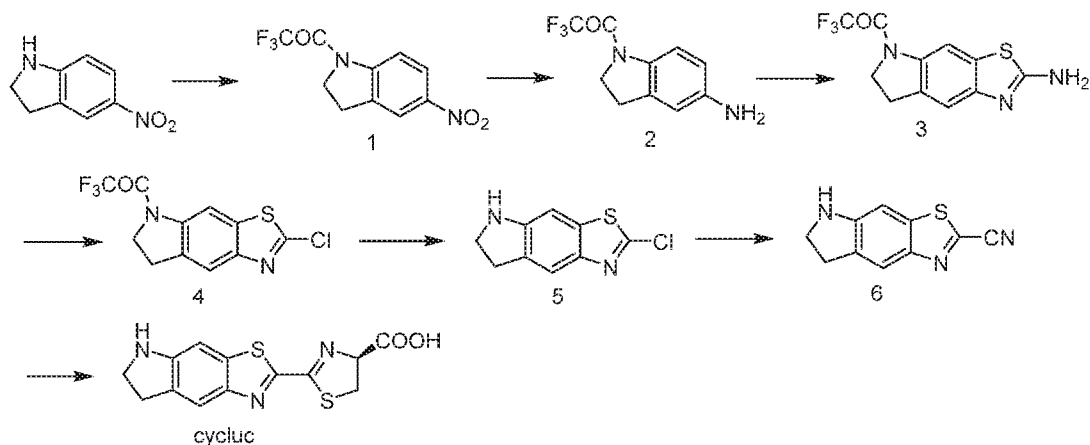
当 R 取自氢时，所述荧光素酶底物为 cycluc，其结构式为：



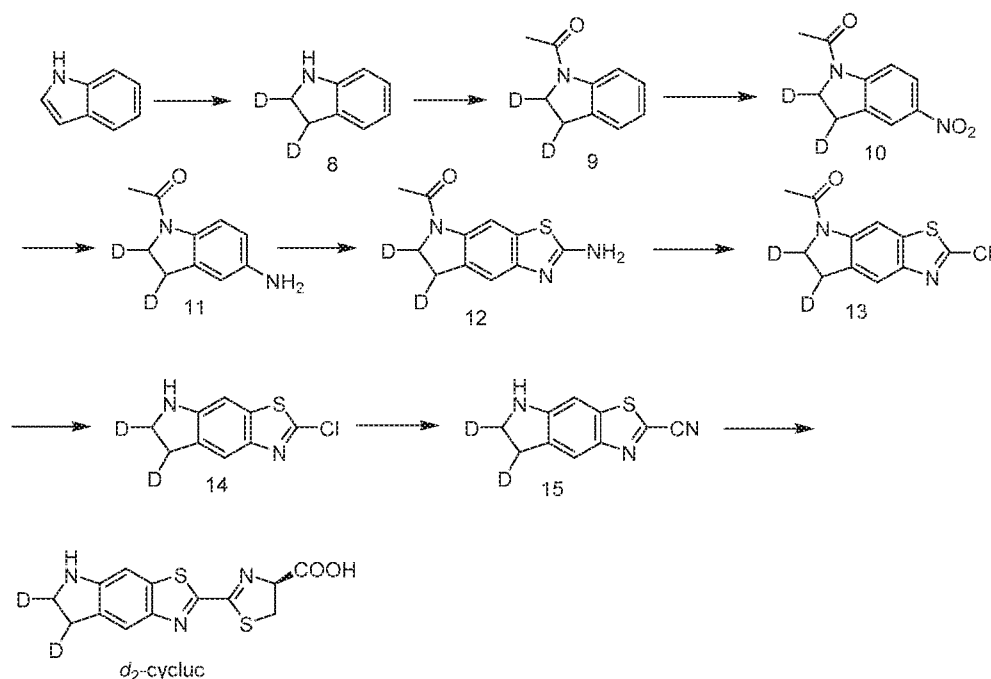
当 R 取自氘时，所述荧光素酶底物为 d_2 -cycluc，其结构式为：



本发明的第二个方面，提供上述荧光素酶底物的制备方法，所述制备方法包括：



；或，



具体的，所述 cycluc 的合成步骤为：

(1) 以 5-硝基吲哚为原料和三乙胺反应，同时滴加三氟乙酸酐，将该混合物搅拌反应得到中间体 1；

(2) 中间体 1 和 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 进行反应，得到中间体 2；

(3) 中间体 2、硫氰酸钾的冰醋酸溶液和液溴进行反应，得到中间体 3；

(4) 中间体 3、亚硝酸叔丁酯和氯化亚铜进行反应，得到中间体 4；

(5) 中间体 4 和 NaBH_4 进行反应，得到中间体 5；

(6) 中间体 5、氰基三甲基硅烷和四丁基氟化铵进行反应，得到中间体 6；

(7) 中间体 6、无机碱和 D-半胱氨酸盐酸盐进行反应，得到 cycluc；

所述 d_2 -cycluc 的具体合成步骤为：

(8) 1H-吲哚和钯碳在氩气条件下进行反应，得到中间体 8；

(9) 中间体 8 和乙酰氯进行反应，得到中间体 9；

(10) 中间体 9 和 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 进行反应，得到中间体 10；

(11) 中间体 10 和氯化铵、锌粉进行反应，得到中间体 11；

(12) 中间体 11 和硫氰酸钾进行反应，得到中间体 12；

(13) 中间体 12、亚硝基叔丁酯和氯化亚铜进行反应，得到中间体 13；

(14) 中间体 13 和 LiAlH_4 进行反应，得到中间体 14；

(15) 中间体 14、氰基三甲基硅烷和四丁基氟化铵进行反应，得到中间体 15；

(16) 中间体 15、碳酸钾和 D-半胱氨酸盐酸盐进行反应，得到中间体 15；

优选的，上述各反应步骤均在溶剂条件下进行。

优选的，所述步骤 (1) 中，

所述溶剂可以为二氯甲烷、乙腈、甲醇或乙醇；进一步优选为二氯甲烷；

反应温度为 10~30 °C，反应时间为 1~3h；

所述 5-硝基咪唑啉、三乙胺、三氟乙酸酐的摩尔比为 1: (1-1.5): (1-1.5)。

优选的，所述步骤（2）中，

所述溶剂为二氯甲烷、乙腈、甲醇或乙醇，进一步优选为乙醇；

反应温度为 50~70 °C，反应时间为 3~5 h；

所述中间体 1、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为 1: (1-1.5)。

优选的，所述步骤（3）中，

所述溶剂为冰醋酸或盐酸，进一步优选为冰醋酸；

反应温度为 10~30 °C，反应时间为 15~25 h；

所述中间体 2、液溴和硫氰酸钾的摩尔比为 1: 1: (2-3)。

优选的，所述步骤（4）中，

所述溶剂为二氯甲烷、乙腈、甲醇或乙醇；进一步优选为乙腈；

反应温度为 40~70 °C，反应时间为 1~3 h；

所述中间体 3、亚硝酸叔丁酯和氯化亚铜的摩尔比为 1: 2: (1-3)。

优选的，所述步骤（5）中，

所述溶剂为甲醇、二氯甲烷或乙腈；进一步优选为甲醇；

反应温度为 10~30 °C，反应时间为 5~30min；

所述化合物 4、 NaBH_4 的摩尔比为 1: (3-5)。

优选的，所述步骤（6）中，

所述溶剂为二氯甲烷、乙腈、甲醇或乙醇；进一步优选为乙腈；

反应温度为 50~100 °C，反应时间为 1~3 h；

所述化合物 5、氰基三甲基硅烷、四丁基氟化铵的摩尔比为 1: (3-5): (3-5)。

优选的，所述步骤（7）中，

所述溶剂为甲醇、二氯甲烷与水以任意比例互溶的有机溶剂；

所述无机碱为碳酸钾、碳酸铯、碳酸钠、碳酸氢钠；进一步优选碳酸钾；

反应温度为 20~50°C，反应时间为 1~5 h；

所述中间体 6、碳酸钾、D-半胱氨酸盐酸盐的摩尔比为 1: (1-3): (1-3)。

优选的，所述步骤（8）中，

所述溶剂为氘代甲醇、氘代乙腈；进一步优选为氘代甲醇；

反应温度为 30~70 °C，反应时间为 50~80 h；

所述 1H-咪唑、钯碳的摩尔比为 10: 1。

优选的，所述步骤（9）中，

所述溶剂为冰醋酸或盐酸；进一步优选为冰醋酸；

反应温度为 50~100 °C，反应时间为 1~3 h；

所述中间体 8、乙酰氯的摩尔比为 1: (4-6)。

优选的, 所述步骤 (10) 中,

所述溶剂为二氯甲烷、乙腈、甲醇或乙醇; 进一步优选为乙腈;

反应温度为 40~70 °C, 反应时间为 1~3 h;

所述中间体 9、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为 2: 1。

优选的, 所述步骤 (11) 中,

所述溶剂为二氯甲烷、乙腈或乙醇; 进一步优选为乙醇;

反应温度为 10~30 °C, 反应时间为 1~3 h;

所述中间体 10、氯化铵、锌粉的摩尔比为 1: 10: 20。

优选的, 所述步骤 (12) 中,

所述溶剂为二氯甲烷、乙腈、甲醇或乙醇; 进一步优选为乙腈;

反应温度为 10~30 °C, 反应时间为 10~30 h;

所述中间体 11、硫氰酸钾、液溴的摩尔比为 1: 3~4: 1。

优选的, 所述步骤 (13) 中,

所述溶剂为二氯甲烷、无水乙腈、甲醇或乙醇; 进一步优选为无水乙腈;

反应温度为 40~70 °C, 反应时间为 1~3 h;

所述中间体 12、亚硝基叔丁酯、氯化亚铜的摩尔比为 1: 1~2: 1.5。

优选的, 所述步骤 (14) 中,

所述溶剂为四氢呋喃、二氯甲烷、DMF、甲醇或乙醇; 进一步优选为四氢呋喃;

反应温度为 -40~-100 °C, 反应时间为 1~2 h;

所述中间体 13、 LiAlH_4 的摩尔比为 1~2: 1。

优选的, 所述步骤 (15) 中,

所述溶剂为无水乙腈、二氯甲烷、DMF、甲醇或乙醇; 进一步优选为无水乙腈;

反应温度为 40~100 °C, 反应时间为 1~2 h;

所述中间体 14、氰基三甲基硅烷、四丁基氟化铵的摩尔比为 1~2: 1: 2.5。

优选的, 步骤 (16) 中,

所述溶剂优选为甲醇、二氯甲烷与水以任意比例互溶的有机溶剂,

所述无机碱为碳酸钾、碳酸铯、碳酸钠或碳酸氢钠; 进一步优选为碳酸钾;

反应温度为 20~50 °C, 反应时间为 1~5 h;

所述中间体 15、碳酸钾、D-半胱氨酸盐酸盐的摩尔比为 1: 1~2: 2.5。

本发明的第三个方面, 提供上述荧光素酶底物在荧光产品和/或制备荧光产品中的应用。

所述荧光产品包括但不限于荧光探针和荧光检测试剂盒。

本发明的第四个方面, 提供一种荧光探针, 所述荧光探针包含上述荧光素酶底物。

本发明的第五个方面, 提供一种荧光检测试剂盒, 所述荧光检测试剂盒包括上述荧光素酶底物或荧光探针。

本发明的第六个方面，提供上述萤光素酶底物、荧光探针和/或荧光检测试剂盒在如下中的应用：

- 1) 环境检测；
- 2) 分析化学；
- 3) 生物分析和检测。

其中，所述生物分析和检测包括但不限于对生物个体水平、器官水平、组织水平和细胞水平的分析与检测；优选为细胞水平。

所述生物包括但不限于鱼、小鼠、大鼠、豚鼠、鸡、兔、狗、猫、猴、猩猩和人等。

进一步的，所述生物分析和检测包括利用上述萤光素酶底物、荧光探针和/或荧光检测试剂盒对细胞进行荧光标记、利用流式细胞仪或荧光显微镜对荧光标记细胞进行分选和利用体内荧光成像装置观察生物体内的荧光标记的细胞。

经试验证明，本申请中萤光素酶底物细胞毒性较低，具有良好的生物相容性，且在细胞水平上都呈现出浓度依赖性，同时 d_2 -cycluc 相较于 cycluc 在低浓度时对萤光素酶有着较高的灵敏度，同时在细胞中有更强的生物发光强度；因此两者均可用于活体成像，并且由于 d_2 -cycluc 具有更强的生物发光强度和更长的生物发光时间，在活体成像时会有更佳的成像效果。

上述技术方案的有益技术效果：

上述技术方案提供的萤光素酶底物具有选择性好、灵敏性高、检测线低及良好生物相容性等优点；进一步研究证明，在体外、细胞、体内环境中， d_2 -cycluc 比 cycluc 的生物发光强度高，生物发光时间长，且两种萤光素酶底物都具有良好的浓度依赖性，同时上述技术方案提供的制备方法简单，可操作性强，成本较低，因此具有良好的实际应用之价值。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案，下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图仅仅是本发明的实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据提供的附图获得其他的附图。

图 1 为实施例 1 所制备的萤光素酶底物 cycluc 的核磁共振氢谱；

图 2 为实施例 1 所制备的萤光素酶底物 cycluc 的核磁共振碳谱；

图 3 为实施例 1 所制备的萤光素酶底物 cycluc 的高分辨质谱；

图 4 为实施例 1 所制备的萤光素酶底物 cycluc 的 HPLC；

图 5 为实施例 2 所制备的萤光素酶底物 d_2 -cycluc 的核磁共振氢谱；

图 6 为实施例 2 所制备的萤光素酶底物 d_2 -cycluc 的核磁共振碳谱；

图 7 为实施例 2 所制备的萤光素酶底物 d_2 -cycluc 的高分辨质谱；

图 8 为实施例 2 所制备的萤光素酶底物 d_2 -cycluc 的 HPLC；

图 9 为实施例 3 萤光素酶底物 d_2 -cycluc、cycluc 的体外代谢研究；其中，A 为 0~120min 内萤光素酶底物 d_2 -cycluc、cycluc 在体外的生物发光强度变化图，B 为 0~30min 内萤光素酶底物 d_2 -cycluc、cycluc 在体外的生物发光强度变化图，C 为 30~60min 内萤光素酶底物 d_2 -cycluc、cycluc 在体外的生物发光强度变化图，D 为 60~120min 内萤光素酶底物 d_2 -cycluc、cycluc 在体外的生物发光强度变化图，E

为化合物 cycluc 和 d_2 -cycluc 在 30 min、时的生物发光强度差异, F 为化合物 cycluc 和 d_2 -cycluc 在 60 min 时的生物发光强度差异, G 为化合物 cycluc 和 d_2 -cycluc 在 120 min 时的生物发光强度差异, H 为化合物 d_2 -cycluc 与 cycluc 生物发光强度比值在 30 min、60 min、120 min 内的变化曲线;

图 10 为实施例 5 萤光素酶底物 d_2 -cycluc、cycluc 的体外浓度依赖性研究; 其中, A 为不同浓度 d_2 -cycluc、cycluc 的体外成像图, B 为不同浓度 d_2 -cycluc 与生物发光强度的关系, C 为不同浓度 cycluc 与生物发光强度的关系;

图 11 为实施例 6 萤光素酶底物 d_2 -cycluc、cycluc 的细胞毒性研究; 其中, A 为不同浓度 d_2 -cycluc 对 ES-2-Fluc 细胞的存活率, B 为不同浓度 cycluc 对 ES-2-Fluc 细胞的存活率;

图 12 为实施例 7 萤光素酶底物 d_2 -cycluc、cycluc 的细胞浓度依赖性研究; 其中, A 为不同浓度 d_2 -cycluc、cycluc 的细胞成像, B 为不同浓度 d_2 -cycluc 与生物发光强度的关系, C 为不同浓度 cycluc 与生物发光强度的关系, D 为两种化合物浓度为 5 μ M 时, 在 1-60 min 的生物发光强度, E 为两种化合物浓度为 0-100 μ M 时, d_2 -cycluc 与 cycluc 生物发光强度相对比值;

图 13 为实施例 8 萤光素酶底物 d_2 -cycluc 的 FVB-luc⁺小鼠体内浓度依赖性研究; 其中, A 为不同浓度 d_2 -cycluc 与生物发光强度的关系, B 为不同浓度 d_2 -cycluc 的小鼠成像结果;

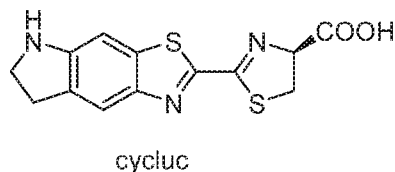
图 14 为实施例 9 萤光素酶底物 d_2 -cycluc、cycluc 的 FVB-luc⁺小鼠体内对比研究, 其中, A 为 FVB-luc⁺小鼠腹腔注射 cybluc 和 d_2 -cycluc (100 μ M, 100 μ L) 在 60 min, B 为 FVB-luc⁺小鼠腹腔注射 cybluc 和 d_2 -cycluc (100 μ M, 100 μ L) 在 120 min, C 为 FVB-luc⁺小鼠腹腔注射 cybluc 和 d_2 -cycluc (100 μ M, 100 μ L) 在 240 min 时体内光子数, D 为 FVB-luc⁺小鼠腹腔注射 cybluc 和 d_2 -cycluc (100 μ M, 100 μ L) 在 480 min 时体内光子数, E 为 FVB-luc⁺小鼠腹腔注射 cycluc 和 d_2 -cycluc (100 μ M, 100 μ L) 在 1 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、35 min、40 min、45 min、50 min、60 min、120 min、240 min、480 min 时体内光子数总和, F 为在 FVB-luc⁺小鼠腹腔注射 1 min、30 min、60 min、120 min、240 min、480 min 时, 化合物 d_2 -cycluc 与 cycluc (100 μ M, 100 μ L) 在 FVB-luc⁺小鼠体内的光子数比值随时间的变化趋势, G 为 FVB-luc⁺小鼠腹腔注射化合物 cycluc 和 d_2 -cycluc (100 μ M, 100 μ L) 在 1 min、60 min、120 min、240 min、480 min 时成像结果。

具体实施方式

应该指出, 以下详细说明都是例示性的, 旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明, 本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义。

需要注意的是, 这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式, 而非意图限制根据本发明的示例性实施方式。如在这里所使用的, 除非上下文另外明确指出, 否则单数形式也意图包括复数形式, 此外, 还应当理解的是, 当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时, 其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。应理解, 本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案; 还应当理解, 本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案, 而不是为了限制本发明的保护范围。

以下通过实施例对本发明做进一步解释说明, 但不构成对本发明的限制。应理解这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

实施例 1: 制备化合物 cycluc**2,2,2-trifluoro-1-(5-nitroindolin-1-yl)ethan-1-one (中间体 1)**

在 5-硝基吲哚啉 (4 g, 24.3 mmol) 和三乙胺 (2.6 g, 26.8 mmol) 中加入二氯甲烷 (20 mL) 进行搅拌, 同时滴加三氟乙酸酐 (5.6 g, 26.8 mmol)。将该混合物搅拌 45 分钟, 然后加入水 (50 mL), 搅拌 10 分钟后, 将混合物用 5 M HCl 酸化, 有机层用盐水洗涤, 干燥并浓缩得到中间体 1, 为黄色固体 6 g, 产率为 94%, mp: 136-138 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.23 (d, J = 10.9 Hz, 3H), 4.40 (t, J = 8.3 Hz, 2H), 3.36 (d, J = 8.2 Hz, 2H)。

1-(5-aminoindolin-1-yl)-2,2,2-trifluoroethan-1-one (中间体 2)

将 SnCl₂·2H₂O (14.2 g, 63.1 mmol) 添加到中间体 1 (5.5 g, 21.5 mmol) 的乙醇 (20 mL) 溶液中, 并将反应混合物 60 °C 加热回流 4 小时。冷却至室温后, 减压浓缩溶剂。将得到的残余物溶于饱和 NaHCO₃ 并用乙酸乙酯 (2×100 mL) 萃取, 然后用盐水洗涤, 减压浓缩有机溶剂, 并通过快速色谱法纯化 (10% 乙酸乙酯: 石油醚), 得到中间体 2, 为白色固体 3 g, 产率为 61%。mp: 175-176 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.76 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.44 (dd, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 4.19 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 3.11 (t, J = 8.1 Hz, 2H)。

1-(2-amino-6,7-dihydro-5H-thiazolo[4,5-f]indol-5-yl)-2,2,2-trifluoroethan-1-one (中间体 3)

中间体 2 (2 g, 8.695 mmol) 和硫氰酸钾 (3.37 g, 34.78 mmol) 的冰醋酸溶液 (20 mL) 中在 20 °C 下搅拌 10 分钟。在 20 分钟内将液溴 (1.3 g, 8.695 mmol) 缓慢滴加到上述溶液中, 反应混合物在室温下进一步搅拌 21 小时, 将反应混合物倒在碎冰上, 并使用 NH₄OH 把 pH 调节至 8。所得沉淀物真空过滤并干燥, 得到中间体 3 其无需进一步纯化即可用于下一步骤, 为黄色固体 2.3 g, 产率为 92%, mp: 179-181 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.33 (s, 1H), 7.54 (s, 2H), 7.29 (s, 1H), 4.28 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 3.24 (t, J = 8.0 Hz, 2H)。

1-(2-chloro-6,7-dihydro-5H-thiazolo[4,5-f]indol-5-yl)-2,2,2-trifluoroethan-1-one (中间体 4)

在 1 小时内向亚硝酸叔丁酯 (1.45 g, 14.1 mmol), 氯化亚铜 (1.16 g, 11.28 mmol) 和乙腈 (10 mL) 的混合物中分批加入中间体 3 (2.2 g, 7.66 mmol)。在室温下搅拌 2 h, 然后移至 65 °C 加热回流反应 1 h。将混合物过滤并将滤液倒入 6 M HCl 中, 并用乙酸乙酯 (2×50 mL) 萃取。浓缩后, 将粗产物通过快速色谱法纯化 (15% 乙酸乙酯: 石油醚), 得到中间体 4, 为粉红色固体粉末 1.6 g, 产率为 68%, mp: 231-233 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.76 (s, 1H), 8.03 – 7.77 (m, 1H), 4.38 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 3.39 (t, J = 8.2 Hz, 2H)。

2-chloro-6,7-dihydro-5H-thiazolo[4,5-f]indole (中间体 5)

将化合物 4 (1.5 g, 4.9 mmol) 在甲醇 (5 mL) 中搅拌, 5 分钟内分批添加 NaBH₄ (0.725 g,

19.6 mmol)。将混合物搅拌 15 分钟，用水（50 mL）稀释，并用乙酸乙酯（2×50 mL）萃取。有机层用盐水洗涤并减压浓缩，得到中间体 5，为白色固体粉末 500 mg，产率为 48%，mp: 207-209 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.56 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 3.51 (t, J = 8.4 Hz, 2H), 3.09 – 2.97 (m, 2H)。

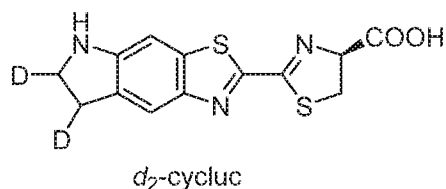
6,7-dihydro-5H-thiazolo[4,5-f]indole-2-carbonitrile (中间体 6)

将化合物 5 (0.5 g, 1.0 mmol) 溶于无水乙腈中，加入氰基三甲基硅烷 (1.18 g, 5.0 mmol) 和四丁基氟化铵 (3.11 g, 5.0 mmol) 于 90 °C 条件下加热回流反应，用 TLC 进行实时监测，反应不完全进行后处理，旋干反应液后加入适量的水用乙酸乙酯进行萃取，过滤，旋干，进行色谱柱分离纯化，选择层析液为石油醚：乙酸乙酯=5：1，浓缩液体得中间体 6，为黄色固体粉末 250 mg，产率为 52.4%，mp: 195-196 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.76 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 3.61 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 3.11 (t, J = 8.2 Hz, 2H)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.01, 144.90, 137.95, 134.26, 127.44, 120.06, 115.00, 96.85, 47.06, 28.58。

(S)-2-(6,7-dihydro-5H-thiazolo[4,5-f]indol-2-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (终产物 cycluc)

将中间体 6 (40 mg, 0.199 mmol) 溶于 10 mL 二氯甲烷、10 mL 无水甲醇中，在氮气保护下，滴加用 2 mL 无水甲醇、2 mL 蒸馏水溶解的碳酸钾 (70 mg)、D-半胱氨酸盐酸盐 (41 mg, 0.238 mmol)，在室温条件下反应，反应时间为 1 h，旋干，用 1 mol 盐酸调 pH 至 7 析出固体，过滤，滤液为终产物，粗产物用二氯甲烷和乙酸乙酯进行打浆，过滤得到固体粉末终产物 7 为 50 mg，产率为 48%，mp: 145-147 °C。¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ 7.68 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 5.17 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 3.79 – 3.55 (m, 4H), 3.35 (s, 1H), 3.13 (t, J = 8.1 Hz, 2H)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.43, 152.19, 145.03, 142.89, 135.96, 131.19, 118.44, 98.76, 47.16, 29.17, 25.78。HRMS (AP-ESI) *m/z* Calcd for C₁₃H₁₁N₃O₂S₂ [M+H]⁺ 306.0365 Found: 306.0368。

实施例 2：制备化合物 *d*₂-cycluc：



indoline-2,3-*d*₂ (中间体 8)

1H-吲哚 (20.0 g, 170.7 mmol) 加入到圆底烧瓶中，用氘代甲醇进行溶解，加入钯碳 (2.0 g, 18.7 mmol)，并且鼓入氘气在 40 °C 下加热回流反应，并用高压反应釜施加八个大气压的压力，用 TLC 进行监测，大约反应 72 小时，仍反应不完全。进行过滤除去钯碳，旋干反应液，加入水用乙酸乙酯萃取，得黄色液体 11 g，产率为 50%，旋干直接投下一步。

1-(indolin-1-yl)-2,3-*d*₂ethan-1-one (中间体 9)

将中间体 8 (5 g, 41.3 mmol) 溶于冰醋酸中, 在室温下将乙酰氯 (19.5 mL, 247.6 mmol) 一滴滴加入到溶液中, 然后将反应液移至 90 °C 进行加热回流反应, 搅拌 1.5 小时, TLC 进行监测, 反应完全。旋干反应液, 加入水用乙酸乙酯萃取, 拌样过柱子, 得到固体粉末 4 g, 产率为 60%, mp: 167-169 °C。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.20 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.20 – 7.14 (m, 2H), 7.02 – 6.97 (m, 1H), 4.00 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 3.16 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 2.19 (s, 3H)。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 168.76, 142.92, 131.08, 127.52, 124.57, 123.58, 116.93, 48.68, 27.87, 24.22.

1-(5-nitroindolin-1-yl-2,3-*d*₂)ethan-1-one (中间体 10)

将中间体 9 (1.4 g, 8.58 mmol) 溶于无水乙腈中, 加入 Fe(NO₃)₃·9H₂O (1.7 g, 4.29 mmol), 在 50 °C 进行加热回流反应, TLC 进行监测, 反应完全。减压浓缩反应液, 用乙酸乙酯溶解, 加入水进行萃取, 加入硅胶旋干溶剂过柱子, 得到白色固体粉末 0.5 g, 产率为 30%, mp: 143-145 °C。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 8.10 (dt, J = 10.8, 5.4 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 4.19 (dd, J = 10.2, 3.3 Hz, 1H), 3.44 – 3.15 (m, 1H), 2.27 (d, J = 9.7 Hz, 3H)。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.61, 148.37, 143.50, 132.41, 124.70, 120.31, 116.14, 49.37, 27.25, 24.30.

1-(5-aminoindolin-1-yl-2,3-*d*₂)ethan-1-one (中间体 11)

将中间体 10 (1.0 g, 4.8 mmol) 溶于无水乙醇中, 加入用水溶解的氯化铵 (2.6 g, 48 mmol), 再加入活化的锌粉 (6.3 g, 96 mmol), 室温搅拌反应, 反应很快, 大概 1 小时反应完全。过滤除掉锌粉, 旋干反应液, 用乙酸乙酯打浆, 过滤, 干燥, 得黄色固体产物 0.9 g, 产率为 70%, mp: 156-156 °C。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.00 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.55 – 6.49 (m, 2H), 3.97 (t, J = 6.5 Hz, 1H), 3.08 (t, J = 6.8 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H)。¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 167.65, 142.80, 117.74, 113.84, 111.68, 48.72, 28.02, 23.92.

1-(2-amino-6,7-dihydro-5H-thiazolo[4,5-f]indol-5-yl-6,7-*d*₂)ethan-1-one (中间体 12)

将中间体 11 (0.9 g, 5.05 mmol) 和硫氰酸钾 (2.6 g, 20.1 mmol) 溶于冰醋酸中, 搅拌 10 分钟, 滴加用冰醋酸稀释的液溴 (1.1 g, 5.05 mmol), 缓慢滴加 10 分钟, 室温搅拌反应 15 小时。旋干反应液, 加水溶解, 用氢氧化钠溶液调 pH=8, 过滤, 干燥, 得红色固体粉末 0.9 g, 产率为 80.1%, mp: 185-187 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.29 (s, 1H), 7.29 (s, 2H), 7.19 (s, 1H), 4.09 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 3.15 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 2.14 (s, 3H).

1-(2-chloro-6,7-dihydro-5H-thiazolo[4,5-f]indol-5-yl-6,7-*d*₂)ethan-1-one (中间体 13)

将亚硝基叔丁酯 (0.92 g, 8.97 mmol) 和氯化亚铜 (0.7 g, 7.01 mmol) 用无水乙腈进行溶解, 分批次加入中间体 12 (1.1 g, 4.67 mmol), 5 分钟加完, 于室温反应 2 小时, 再移至 65 °C 继续加热回流反应 1 小时。将反应液过滤, 滤液倒入 6 M HCl 中, 用乙酸乙酯进行萃取, 干燥, 浓缩, 用柱色谱进行分离纯化, 层析液选择石油醚: 乙酸乙酯=5: 1, 浓缩干燥得黄色固体粉末 780.6 mg, 产率为 76.3%, mp: 156-158 °C。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.65 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 4.20 – 4.15 (m, 1H), 3.31 – 3.25 (m, 1H), 2.20 (s, 3H)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.55, 150.71, 146.86, 141.81, 135.16, 133.46, 118.90, 108.39, 49.19, 35.29, 24.50.

2-chloro-6,7-dihydro-5H-thiazolo[4,5-f]indole-6,7-*d*₂ (中间体 14)

用干燥的 THF 溶解中间体 13 (300 mg, 712.2 mmol), 在 -70 °C 条件下, 滴加用 THF 稀释的 1 M 的 LiAlH_4 (27 mg, 712.2 mmol) 混悬液, 搅拌反应, 反应很快。用 TLC 进行监测, 30 min 反应完全。(LiAlH₄ 的后处理过程: X g 的 LiAlH_4 , 加入 X mL 的水, 再加入 X mL 15% NaOH 溶液, 最后加入 3 X mL 水, 搅拌 30 min, 加硅藻土进行过滤), 旋干, 用薄层色谱板进行层析, 层析液选择石油醚: 乙酸乙酯=7: 1, 浓缩干燥得粉红色固体粉末 200 mg, 产率为 71%, mp: 207-209 °C。¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.60 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 3.65 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 3.22 – 3.12 (m, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 152.17, 145.05, 142.90, 135.96, 131.10, 118.45, 98.75, 47.17, 29.07.

6,7-dihydro-5H-thiazolo[4,5-f]indole-2-carbonitrile-6,7- d_2 (中间体 15)

将中间体 14 (300 mg, 423.9 mmol) 溶于无水乙腈中, 加入氰基三甲基硅烷 (2.13 mol, 211.8 mg) 和四丁基氟化铵 (2.13 mol, 558.6 mg), 于 90 °C 条件下加热回流反应, 用 TLC 进行实时监测, 反应不完全, 进行后处理, 旋干反应液, 加入适量的水用乙酸乙酯进行萃取, 过滤, 旋干, 进行色谱柱分离纯化, 选择层析液为石油醚: 乙酸乙酯=5: 1, 浓缩液体, 得黄色固体粉末即为产物 200 mg, 产率为 64.7%, mp: 195-196 °C。¹H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.64 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 3.67 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 3.14 (t, J = 8.2 Hz, 1H).

(4R)-2-(6,7-dihydro-5H-thiazolo[4,5-f]indol-2-yl-6,7- d_2)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylic acid (终产物 d_2 -cycluc)

将中间体 15 (500 mg, 1.0 mmol) 溶于 10 mL 二氯甲烷、10 mL 无水甲醇中, 在氮气保护下, 滴加用 2 mL 无水甲醇、2 mL 蒸馏水溶解的碳酸钾 (370 mg)、D-半胱氨酸盐酸盐 (450 mg, 2.0 mmol), 在室温条件下反应, 反应时间为 1 h, 旋干, 用 1 mol 盐酸调 pH 至 7 析出固体, 过滤, 滤液为终产物。粗产物用二氯甲烷和乙酸乙酯进行打浆, 过滤得到目标产物黄色固体粉末 544.4 mg, 产率为 78.1%, mp: 145-147 °C。¹H NMR (400 MHz, $\text{MeOD}-d_4$) δ 7.68 (s, 1H), 6.99 (s, 1H), 5.17 (t, J = 9.1 Hz, 1H), 4.00–3.95 (m, 1H), 3.67 (m, 2H), 3.35 (s, 1H), 3.13 (t, J = 8.1 Hz, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 152.46, 149.17, 143.94, 142.58, 135.82, 132.77, 118.39, 98.43, 47.44, 29.17, 24.30. HRMS (AP-ESI) m/z Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{D}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 308.0491 Found: 308.0495.

实施例 3: 萤光素酶底物 cycluc、 d_2 -cycluc 的体外代谢实验研究

在全黑色 96 孔板中加入化合物 cycluc 和 d_2 -cycluc (20 μM , 50 μL), 再加入 50 μL 含 2 mM ATP 的萤光素酶溶液, 立即开始拍摄, 每隔 5 min 拍摄一次, 记录光子数至 120 min 结束, 用多功能荧光酶标仪 (CLARIOstar®) 测量生物发光强度, 每组实验重复三次, 并用 Graphpad 进行统计学计算。

由图 9 可知, 萤火虫萤光素酶底物 cycluc 和 d_2 -cycluc 在体外的生物发光强度随着时间的延长而减弱, 并且由图 9A-D 可知 d_2 -cycluc 的生物发光强度远远大于 cycluc。在 120 min 内, d_2 -cycluc 与 cycluc 的生物发光强度比值最小达到 10.4 倍, 最大达到 158.1 倍, 可见 d_2 -cycluc 的生物发光强度远远大于 cycluc, 并且生物发光时间也有很大的改善。由图 9E-H 可知, 在 30 min、60 min 和 120 min 时的生物发光强度具有极显著性差异, 由 30 min 内的 14.9 倍增加到 120 min 内的 18.5 倍, 这预示着 d_2 -cycluc 比 cycluc 的生物发光强度更强, 时间更长, 更有利于用于活体成像实验。

实施例 4: 萤火虫萤光素酶底物 cycluc 和 d_2 -cycluc 的体外动力学研究

将 50 μL 不同浓度的化合物溶液 (0.01 μM 、0.05 μM 、0.1 μM 、0.25 μM 、0.5 μM) 加入全黑色 96 孔板中, 再加入 50 μL 含 2 mM ATP 的萤光素酶溶液, 立即用小动物活体成像仪测生物发光强度, 并用 Graphpad 中的 Lineweaver-Burk 公式计算 V_{max} 和 K_{m} 。

由表 1 可见, d_2 -cycluc 与 cycluc 相比反应速度增加, 亲和力明显增加, 这预示着 d_2 -cycluc 可能会在低浓度时对萤光素酶有着较高的灵敏度, 更适合进行细胞和活体实验研究。

表 1 生物发光性质

	cycluc	d_2 -cycluc
$V_{\text{max}}(\text{s}^{-1}) \times 10^9$	2.56	3.15
$K_{\text{m}}(\text{mol/L}) \times 10^{-7}$	863	235

实施例 5: 萤火虫萤光素酶底物 cycluc 和 d_2 -cycluc 的体外浓度依赖性研究

将 50 μL 不同浓度的化合物溶液 (0.01 μM 、0.05 μM 、0.1 μM 、0.25 μM 、0.5 μM) 加入全黑色 96 孔板中, 再加入 50 μL 含 2 mM ATP 的萤光素酶溶液, 立即用小动物活体成像仪测生物发光强度, 测定 90 min 中内生物发光强度, 并用 Graphpad 进行数据处理。

由图 10 可见, cycluc 和 d_2 -cycluc 的体外生物发光强度呈现浓度依赖性, 随着萤光素酶底物浓度的增加生物发光强度越来越强, 并且相同浓度的 d_2 -cycluc 比 cycluc 在体外的生物发光强度强很多, 说明 d_2 -cycluc 更适合用于细胞和活体实验。

实施例 6: 萤火虫萤光素酶底物对细胞的毒性测定

将对数期的 ES-2-Fluc 细胞消化离心后, 用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基打散吹匀后, 经过细胞计数, 将细胞密度调整为 4×10^4 个/mL, 将细胞用排枪种于透明 96 孔板中间的 60 个孔的区域中 (100 μL /孔), 其中 96 孔板周围一圈以普通培养基填充, 放置在细胞培养箱中孵育。

孵育过夜, 待细胞贴壁, 将萤光素酶底物的浓储液用无血清 RPMI 1640 培养基稀释成不同的浓度梯度 (0、8 μM 、16 μM 、31 μM 、62 μM 、125 μM 、250 μM 、500 μM 、1000 μM 、2000 μM) 加入 96 孔板中, 每个浓度设置三个复孔, 将萤光素酶底物和细胞于细胞培养箱中孵育。

24 h 后, 加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL /孔, (MTT 需现配现用: 取 MTT 50 mg, 溶于 10 mL 的磷酸缓冲液 (PBS) 中, 0.22 μm 滤膜过滤以除去溶液里的细菌)。

4 h 后, 将 96 孔板中的液体用注射器吸掉, 每孔入 DMSO 150 μL , 并置于摇床上振荡 5 min, 使形成的结晶充分溶解, 于酶标仪下扫描 490 nm 处的吸收值。

由图 11 可见, 为了检测萤光素酶底物对细胞的生物毒性较小, 可以进行后续细胞实验研究, 我们进行了细胞 MTT 实验。实验结果表明, 两个萤光素酶底物对细胞的毒性作用均很小, cycluc 的 $\text{IC}_{50} = 855.4 \mu\text{M}$, d_2 -cycluc 的 $\text{IC}_{50} > 5 \times 10^5 \mu\text{M}$, 远大于细胞实验时所采用的萤光素酶底物浓度, 因

此可以用于生物水平的检测。

实施例 7: 细胞生物发光强度对底物浓度依赖性的测定

(1) 培养 ES-2-FLuc 细胞至长满细胞培养瓶底约 90%后, 用含 EDTA 的 0.25%胰酶消化离心, 再用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基将细胞吹打均匀, 取少量混合均匀的细胞悬液, 用细胞计数板进行计数, 细胞计数后将细胞密度调整为 4×10^6 个/mL, 用排枪在全黑色 96 孔板中种入细胞, 每孔加 100 μ L 细胞液 (4 万/孔), 于细胞培养箱中孵育过夜。(96 孔板最外层一圈的孔, 每孔加入 100 μ L 培养基; 第二排孔, 每孔加入 100 μ L 培养基; 第 3-8 排孔, 每孔加入 100 μ L 细胞液)

(2) 次日早晨用排枪吸去培养基 (除最外层一圈的孔), 每孔分别加入 100 μ L 不同浓度 (0 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M、50 μ M、100 μ M) 的萤光素酶底物 cycluc、 d_2 -cycluc, 用小动物活体成像仪进行生物发光成像。

由图 12 可见, 为证明我们设计的萤光素酶底物可以用于活体检测, 我们对化合物进行了细胞水平活性检测。由图 12A、B、C 可知, 两种化合物在细胞水平上都呈现出浓度依赖性; 由图 D 可知, 在两种化合物浓度为 5 μ M 时, 在 1-60 min 内 d_2 -cycluc 相较于 cycluc 在细胞中有更强的生物发光强度; 由图 E 可知, 在 0-100 μ M 范围内 d_2 -cycluc 相较于 cycluc 在细胞中有更强的生物发光强度最低可达 1.98 倍, 最高可达 4.60 倍。因此两者均可用于活体成像并且 d_2 -cycluc 具有更强的生物发光强度和更长的生物发光时间, 在活体成像时可能会有更好的成像效果。

实施例 8: 萤火虫萤光素酶底物 d_2 -cycluc 对 FVB-luc⁺小鼠不同浓度腹腔注射实验

将化合物 d_2 -cycluc 用生理盐水和 DMSO 配置成终浓度为 10 mM、5 mM、1 mM、100 μ M、10 μ M 的溶液, 每只 FVB-luc⁺小鼠 (转录萤光素酶) (约 20 g) 腹腔注射 200 μ L 水合氯醛溶液 (40 mg/mL) 麻醉, 麻醉后腹腔注射 100 μ L 化合物 d_2 -cycluc, 立即用小动物活体成像仪进行成像, 时间记为 1 min。在 1 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、35 min、40 min、45 min、50 min、55 min、60 min 时用小动物活体成像仪拍摄生物发光强度。取 FVB-luc⁺小鼠除尾部以外的其他部分计算 ROI 值, 并用 Graphpad 进行统计学计算。

由图 13 可见, 在 FVB-luc⁺小鼠体内腹腔注射不同浓度的化合物 d_2 -cycluc, FVB-luc⁺小鼠体内生物发光强度随着 d_2 -cycluc 浓度的升高而增强。

实施例 9: 萤火虫萤光素酶底物 cycluc 和 d_2 -cycluc 对 FVB-luc⁺小鼠腹腔注射实验

将 cycluc 和 d_2 -cycluc 用生理盐水和 DMSO 按照 9:1 的比例配置成最终浓度为 100 μ M 的溶液, 取 6 只成年雌性 FVB-luc⁺小鼠 (转录萤光素酶) 并分成 2 组, 每只 FVB-luc⁺小鼠 (转录萤光素酶) (约 20 g) 腹腔注射 200 μ L 水合氯醛溶液 (40 mg/mL) 麻醉, 两组小鼠分别腹腔注射 100 μ L cycluc 和 d_2 -cycluc, 立即用小动物活体成像仪进行成像, 时间记为 1 min。在 1min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、35 min、40 min、45 min、50 min、55 min、60 min、120 min、240 min、480 min 用小动物活体成像仪拍摄生物发光强度。取 FVB-luc⁺小鼠除尾部以外的其他部分计算 ROI

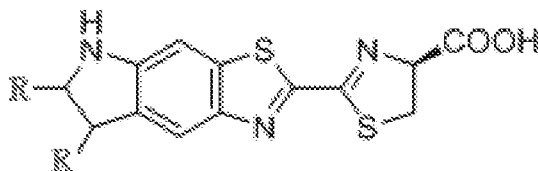
值，并用 Graphpad 进行统计学计算。

由图 14 可见，从图 A-D 中我们可以看出，FVB-luc⁺小鼠体内腹腔注射化合物 cycluc 和 *d*₂-cycluc 在 1 min-480 min 内的发光情况，除了 120 min 时没有显著性差异，其他时间都具有一定的差异性，并且在 60 min 和 480 min 时都具有极显著性差异，在 240 min 时具有显著性差异；从图 E 中我们可以看出，在 1 min-480 min 内的光子数总和具有极显著性差异 ($P < 0.01$)；从图 F 中我们可以看出，随着时间的延长，化合物 *d*₂-cycluc 与 cycluc 在 FVB-luc⁺小鼠体内的光子数比值具有下降的趋势，由腹腔注射后 1 min 时的 5.4 倍降低到腹腔注射后 480 min 时的 1.8 倍，我们可以看出腹腔注射 cycluc 和 *d*₂-cycluc 后，1-480 min 内 *d*₂-cycluc 组生物发光强度始终大于 cycluc 组，可见 *d*₂-cycluc 更适合活体内成像研究。

应注意的是，以上实例仅用于说明本发明的技术方案而非对其进行限制。尽管参照所给出的实例对本发明进行了详细说明，但是本领域的普通技术人员可根据需要对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的精神和范围。

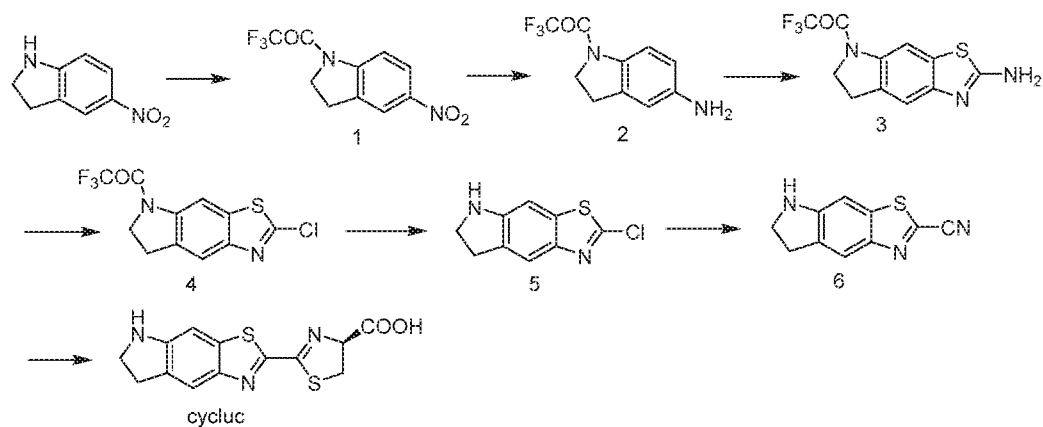
权利要求书

1、一种荧光素酶底物，所述荧光素酶底物结构式为：

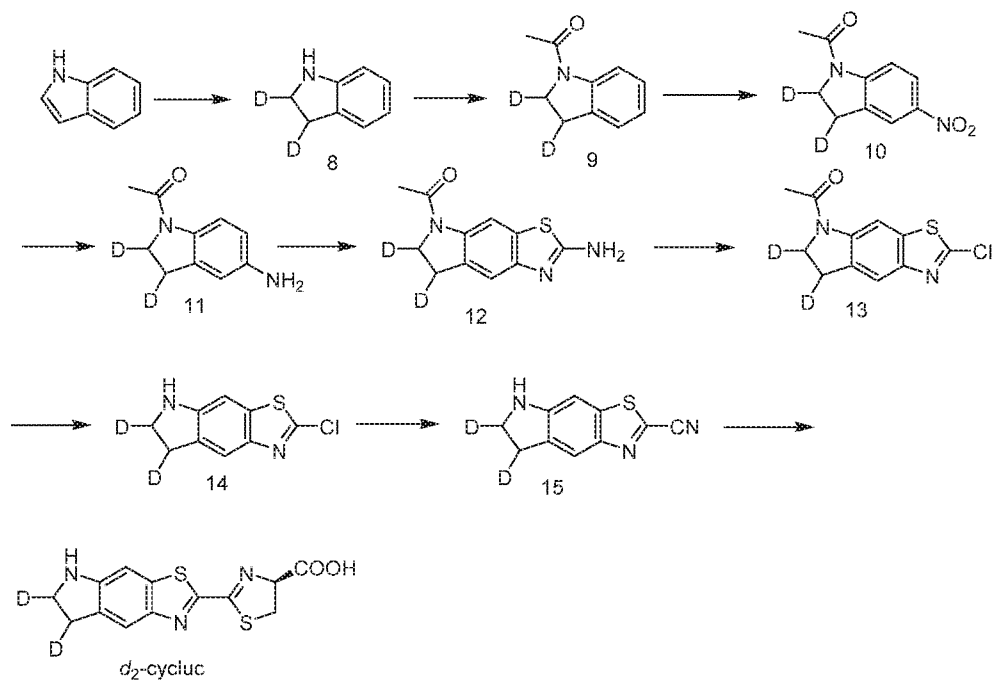


其中，R 取氢或氘。

2、权利要求 1 所述荧光素酶底物的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括：



；或，



3、如权利要求 2 所述的制备方法，其特征在于，

所述 cycluc 的合成步骤为：

(1) 以 5-硝基吲哚啉为原料和三乙胺反应，同时滴加三氟乙酸酐，将该混合物搅拌反应得到中间体 1；

(2) 中间体 1 和 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 进行反应，得到中间体 2；

- (3) 中间体 2、硫氰酸钾的冰醋酸溶液和液溴进行反应，得到中间体 3；
- (4) 中间体 3、亚硝酸叔丁酯和氯化亚铜进行反应，得到中间体 4；
- (5) 中间体 4 和 NaBH_4 进行反应，得到中间体 5；
- (6) 中间体 5、氰基三甲基硅烷和四丁基氟化铵进行反应，得到中间体 6；
- (7) 中间体 6、无机碱和 D-半胱氨酸盐酸盐进行反应，得到 cycluc；

所述 d_2 -cycluc 的具体合成步骤为：

- (8) 1H-吡啶和钯碳在氩气条件下进行反应，得到中间体 8；
- (9) 中间体 8 和乙酰氯进行反应，得到中间体 9；
- (10) 中间体 9 和 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 进行反应，得到中间体 10；
- (11) 中间体 10 和氯化铵、锌粉进行反应，得到中间体 11；
- (12) 中间体 11 和硫氰酸钾进行反应，得到中间体 12；
- (13) 中间体 12、亚硝基叔丁酯和氯化亚铜进行反应，得到中间体 13；
- (14) 中间体 13 和 LiAlH_4 进行反应，得到中间体 14；
- (15) 中间体 14、氰基三甲基硅烷和四丁基氟化铵进行反应，得到中间体 15；
- (16) 中间体 15、碳酸钾和 D-半胱氨酸盐酸盐进行反应，得到中间体 15。

4、如权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于，各反应步骤均在溶剂条件下进行。

5、如权利要求 4 所述的制备方法，其特征在于，

所述步骤 (1) 中，

所述溶剂可以为二氯甲烷、乙腈、甲醇或乙醇；进一步优选为二氯甲烷；

反应温度为 $10 \sim 30^\circ\text{C}$ ，反应时间为 $1 \sim 3\text{h}$ ；

所述 5-硝基吡啶、三乙胺、三氟乙酸酐的摩尔比为 $1: (1-1.5): (1-1.5)$ ；

所述步骤 (2) 中，

所述溶剂为二氯甲烷、乙腈、甲醇或乙醇，进一步优选为乙醇；

反应温度为 $50 \sim 70^\circ\text{C}$ ，反应时间为 $3 \sim 5\text{h}$ ；

所述中间体 1、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为 $1: (1-1.5)$ ；

所述步骤 (3) 中，

所述溶剂为冰醋酸或盐酸，进一步优选为冰醋酸；

反应温度为 $10 \sim 30^\circ\text{C}$ ，反应时间为 $15 \sim 25\text{h}$ ；

所述中间体 2、液溴和硫氰酸钾的摩尔比为 $1: 1: (2-3)$ ；

所述步骤 (4) 中，

所述溶剂为二氯甲烷、乙腈、甲醇或乙醇；进一步优选为乙腈；

反应温度为 $40 \sim 70^\circ\text{C}$ ，反应时间为 $1 \sim 3\text{h}$ ；

所述中间体 3、亚硝酸叔丁酯和氯化亚铜的摩尔比为 $1: 2: (1-3)$ ；

所述步骤 (5) 中，

所述溶剂为甲醇、二氯甲烷或乙腈；进一步优选为甲醇；

反应温度为 10~30 °C，反应时间为 5~30min；

所述化合物 4、 NaBH_4 的摩尔比为 1: (3-5)；

所述步骤 (6) 中，

所述溶剂为二氯甲烷、乙腈、甲醇或乙醇；进一步优选为乙腈；

反应温度为 50~100 °C，反应时间为 1~3 h；

所述化合物 5、氰基三甲基硅烷、四丁基氟化铵的摩尔比为 1: (3-5): (3-5)；

所述步骤 (7) 中，

所述溶剂为甲醇、二氯甲烷与水以任意比例互溶的有机溶剂；

所述无机碱为碳酸钾、碳酸铯、碳酸钠、碳酸氢钠；进一步优选碳酸钾；

反应温度为 20~50°C，反应时间为 1~5 h；

所述中间体 6、碳酸钾、D-半胱氨酸盐酸盐的摩尔比为 1: (1-3): (1-3)。

6、如权利要求 4 所述的制备方法，其特征在于，

所述步骤 (8) 中，

所述溶剂为氘代甲醇、氘代乙腈；进一步优选为氘代甲醇；

反应温度为 30~70 °C，反应时间为 50~80 h；

所述 1H-吡啶、钯碳的摩尔比为 10: 1；

所述步骤 (9) 中，

所述溶剂为冰醋酸或盐酸；进一步优选为冰醋酸；

反应温度为 50~100 °C，反应时间为 1~3 h；

所述中间体 8、乙酰氯的摩尔比为 1: (4-6)；

所述步骤 (10) 中，

所述溶剂为二氯甲烷、乙腈、甲醇或乙醇；进一步优选为乙腈；

反应温度为 40~70 °C，反应时间为 1~3 h；

所述中间体 9、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为 2: 1；

优选的，所述步骤 (11) 中，

所述溶剂为二氯甲烷、乙腈或乙醇；进一步优选为乙醇；

反应温度为 10~30 °C，反应时间为 1~3 h；

所述中间体 10、氯化铵、锌粉的摩尔比为 1: 10: 20；

优选的，所述步骤 (12) 中，

所述溶剂为二氯甲烷、乙腈、甲醇或乙醇；进一步优选为乙腈；

反应温度为 10~30 °C，反应时间为 10~30 h；

所述中间体 11、硫氰酸钾、液溴的摩尔比为 1: 3~4: 1；

优选的，所述步骤 (13) 中，

所述溶剂为二氯甲烷、无水乙腈、甲醇或乙醇；进一步优选为无水乙腈；

反应温度为 40~70 °C，反应时间为 1~3 h；

所述中间体 12、亚硝基叔丁酯、氯化亚铜的摩尔比为 1: 1~2: 1.5；

优选的，所述步骤（14）中，

所述溶剂为四氢呋喃、二氯甲烷、DMF、甲醇或乙醇；进一步优选为四氢呋喃；

反应温度为-40~-100 °C，反应时间为 1~2 h；

所述中间体 13、LiAlH₄ 的摩尔比为 1~2: 1；

优选的，所述步骤（15）中，

所述溶剂为无水乙腈、二氯甲烷、DMF、甲醇或乙醇；进一步优选为无水乙腈；

反应温度为 40~100 °C，反应时间为 1~2 h；

所述中间体 14、氰基三甲基硅烷、四丁基氟化铵的摩尔比为 1~2: 1: 2.5；

优选的，步骤（16）中，

所述溶剂优选为甲醇、二氯甲烷与水以任意比例互溶的有机溶剂，

所述无机碱为碳酸钾、碳酸铯、碳酸钠或碳酸氢钠；进一步优选为碳酸钾；

反应温度为 20~50°C，反应时间为 1~5 h；

所述中间体 15、碳酸钾、D-半胱氨酸盐酸盐的摩尔比为 1: 1~2: 2.5。

7、权利要求 1 所述萤光素酶底物在荧光产品和/或制备荧光产品中的应用；

优选的，所述荧光产品包括但不限于荧光探针和荧光检测试剂盒。

8、一种荧光探针，其特征在于，所述荧光探针包含权利要求 1 所述萤光素酶底物。

9、一种荧光检测试剂盒，其特征在于，所述荧光检测试剂盒包含权利要求 1 所述萤光素酶底物或权利要求 8 所述荧光探针。

10、权利要求 1 所述萤光素酶底物、权利要求 8 所述荧光探针和/或权利要求 9 所述荧光检测试剂盒在如下中的应用：

- 1) 环境检测；
- 2) 分析化学；
- 3) 生物分析和检测；

优选的，所述生物分析和检测包括对生物个体水平、器官水平、组织水平和细胞水平的分析与检测；进一步优选为细胞水平；

优选的，所述生物包括鱼、小鼠、大鼠、豚鼠、鸡、兔、狗、猫、猴、猩猩和人；

进一步优选的，所述生物分析和检测包括利用所述萤光素酶底物、荧光探针和/或荧光检测试剂盒对细胞进行荧光标记、利用流式细胞仪或荧光显微镜对荧光标记细胞进行分选和利用体内荧光成像装置观察生物体内的荧光标记的细胞。

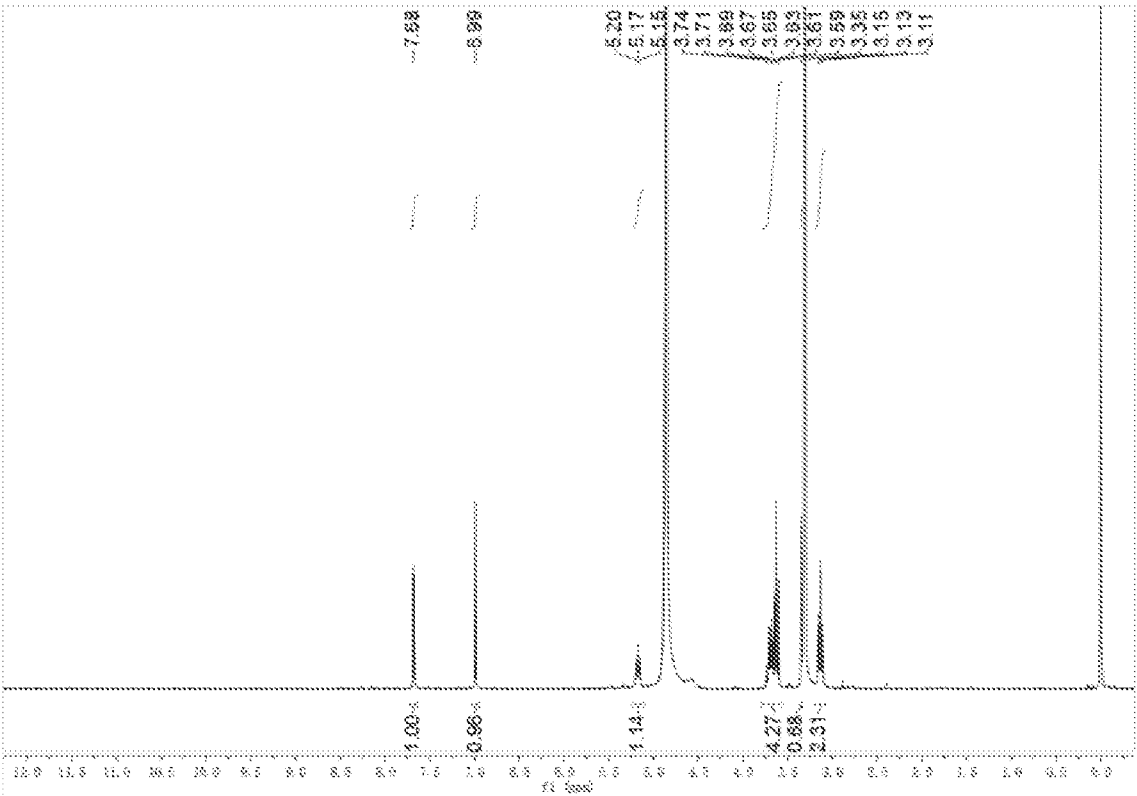


图 1

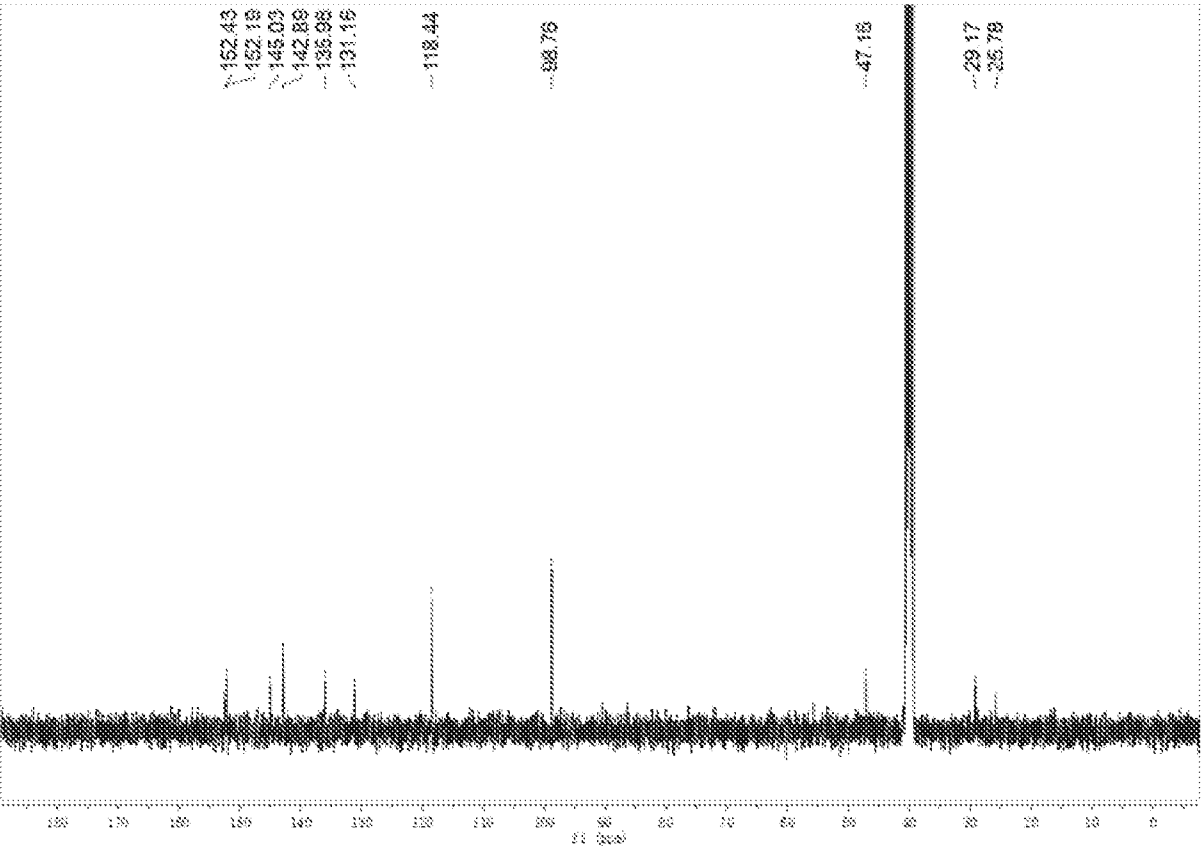


图 2

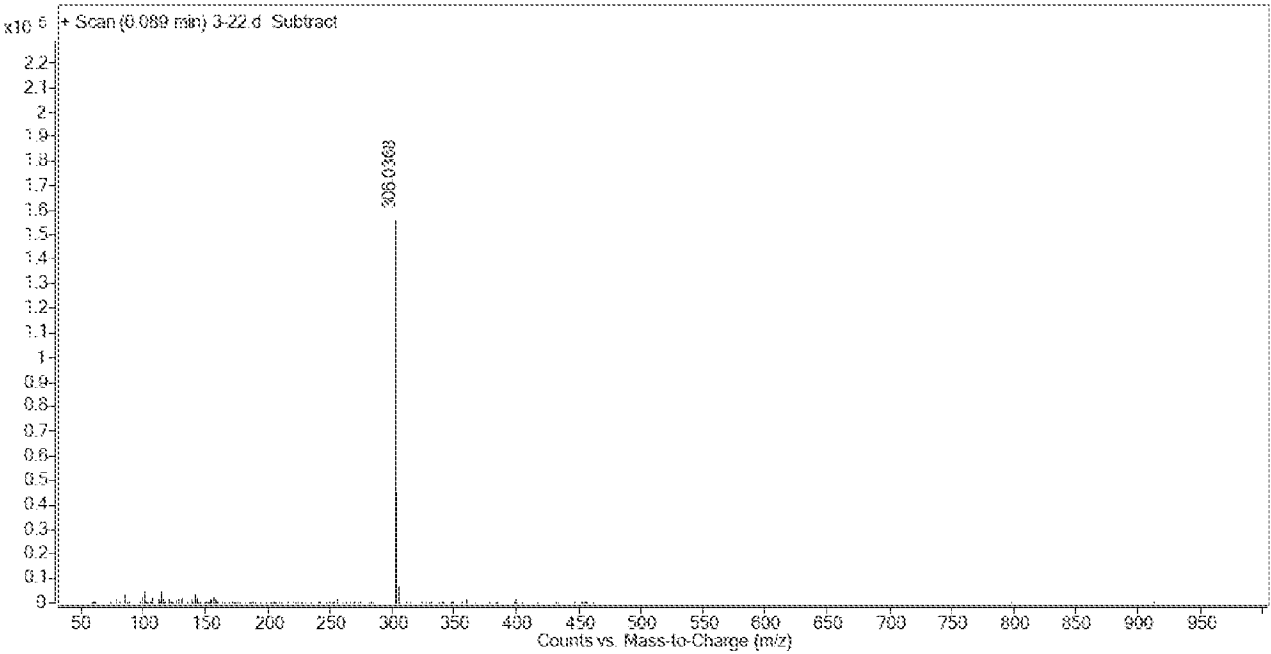


图 3

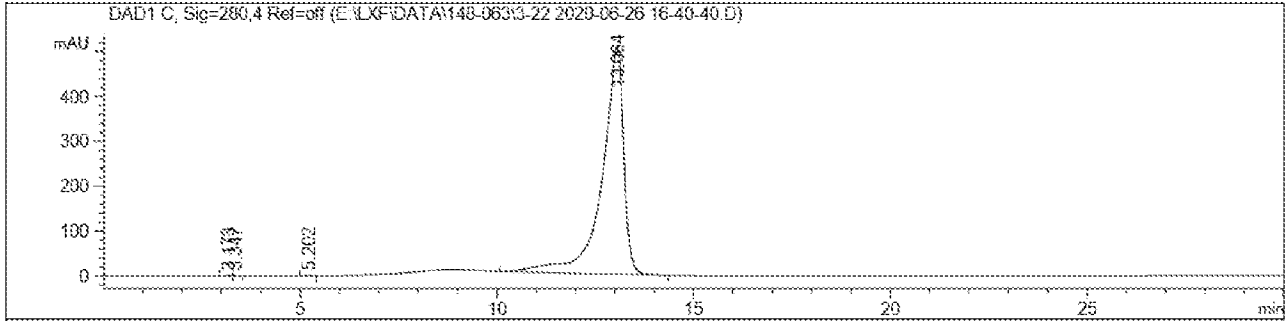


图 4

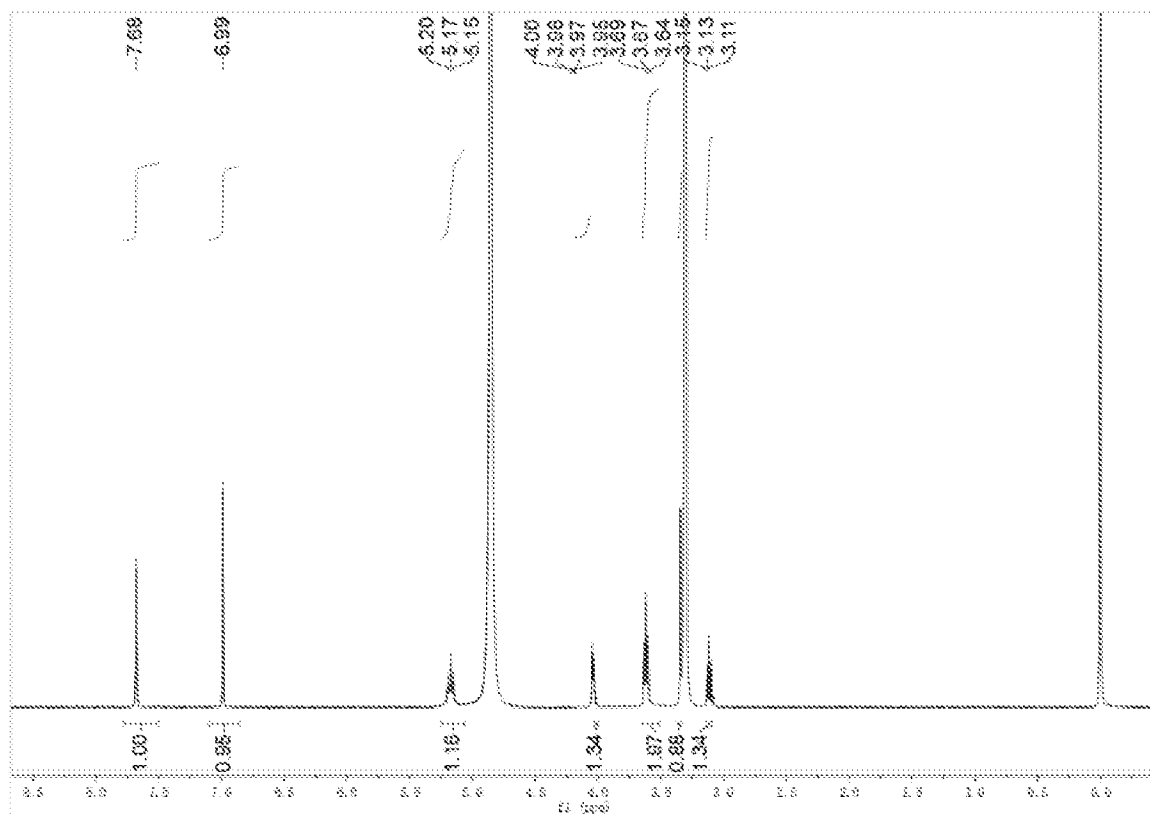


图 5

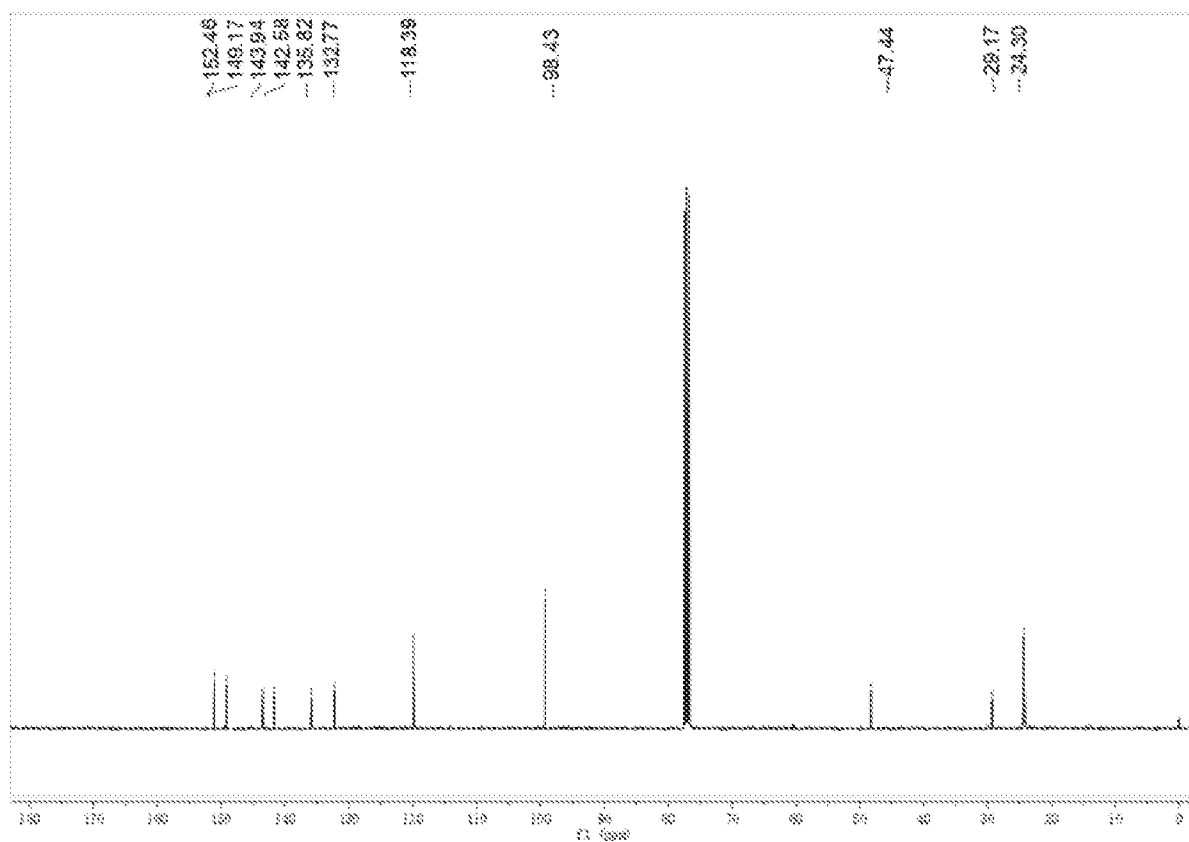


图 6

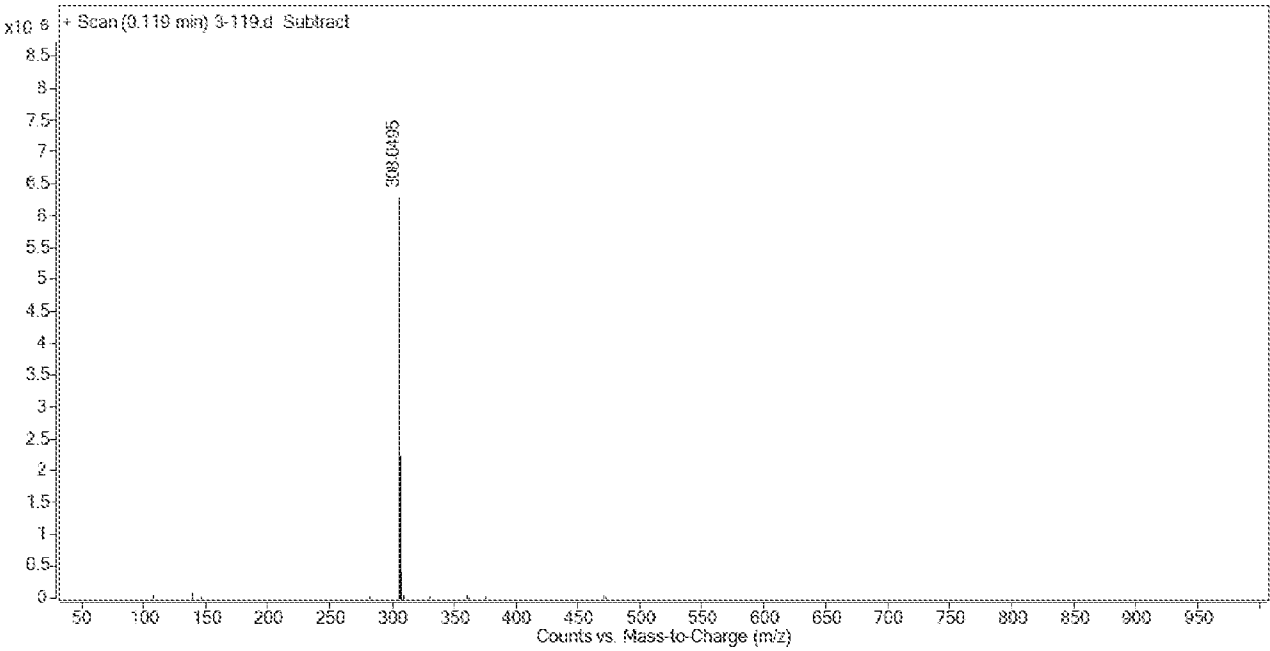


图 7

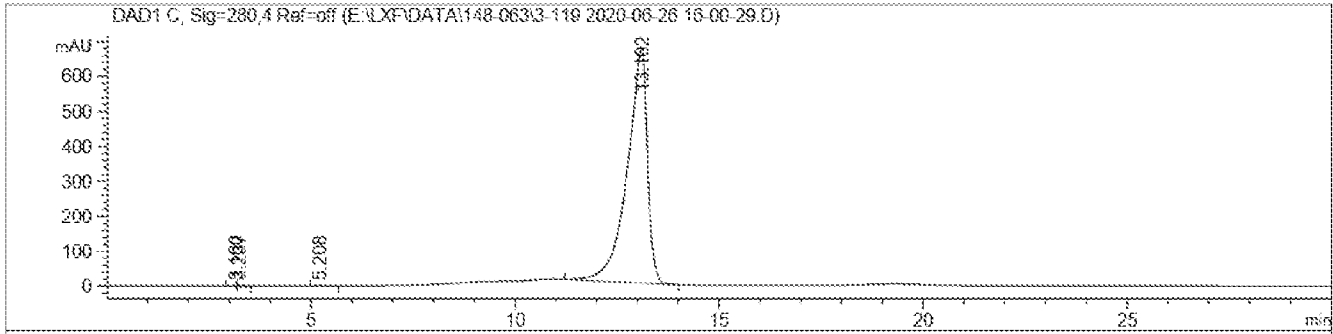


图 8

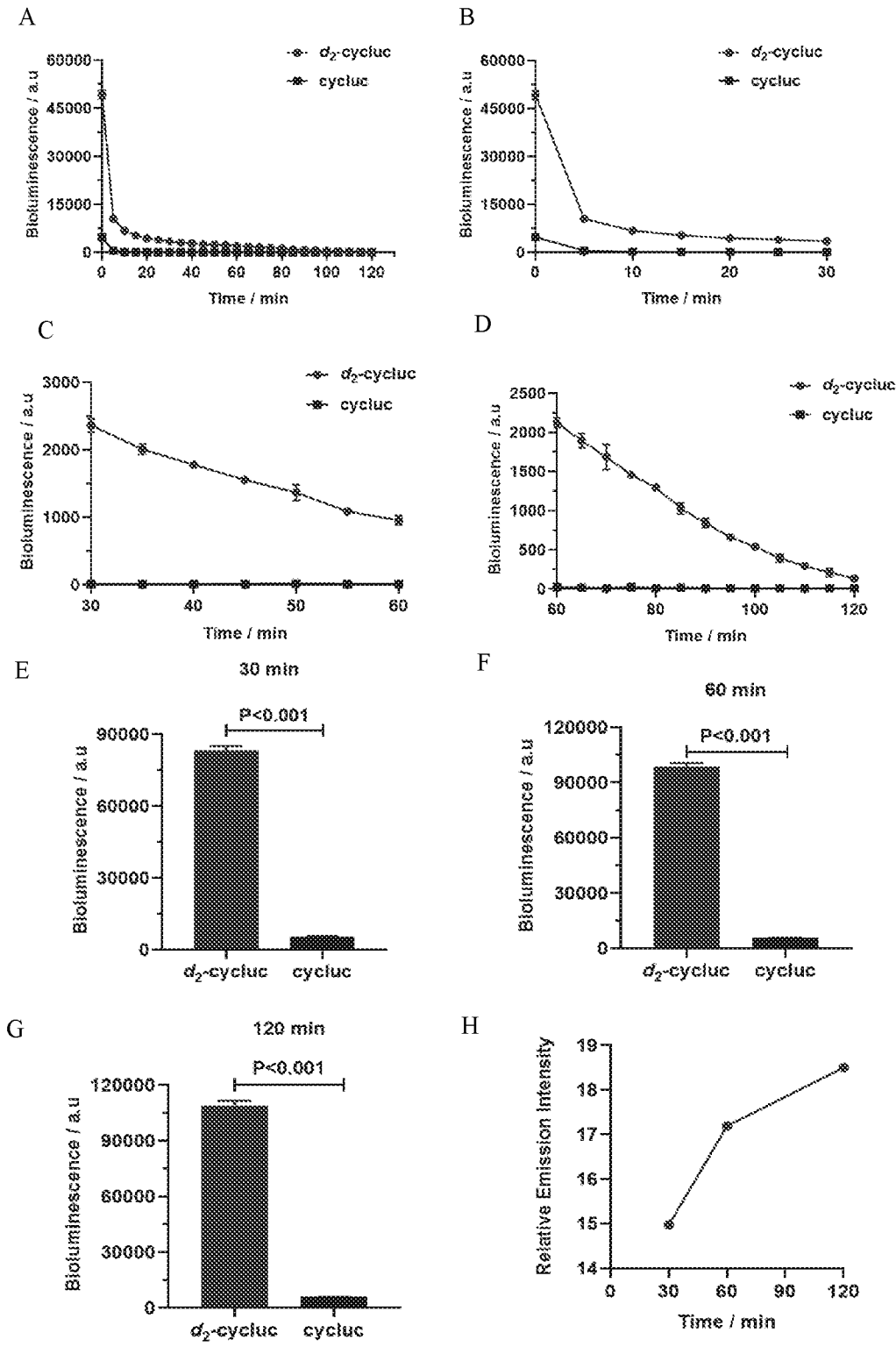


图 9

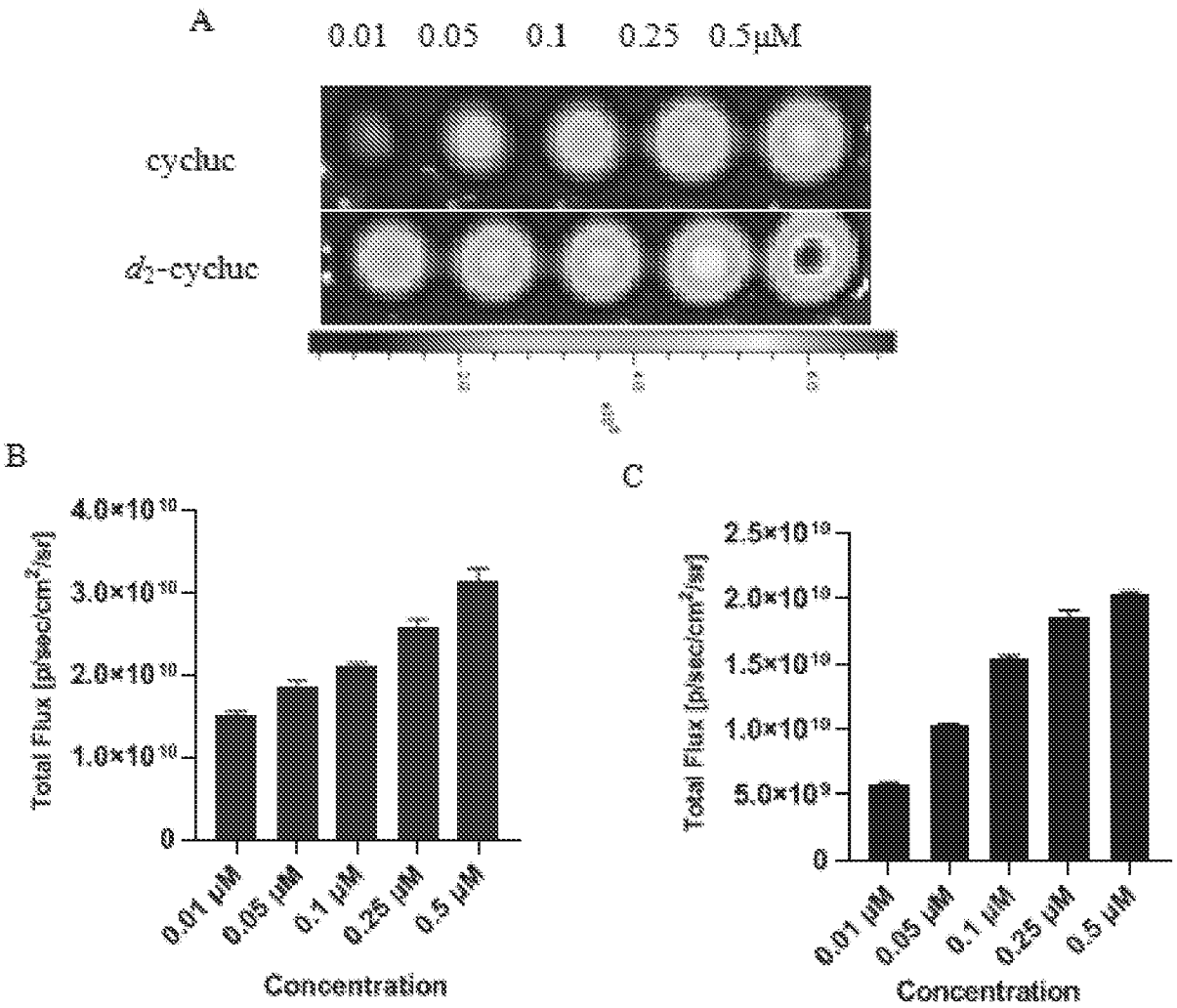


图 10

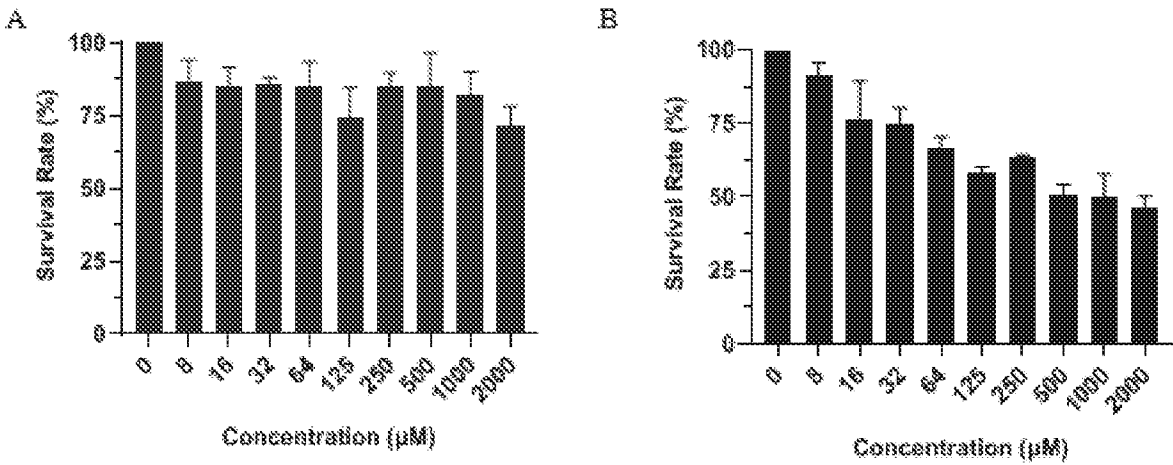


图 11

A

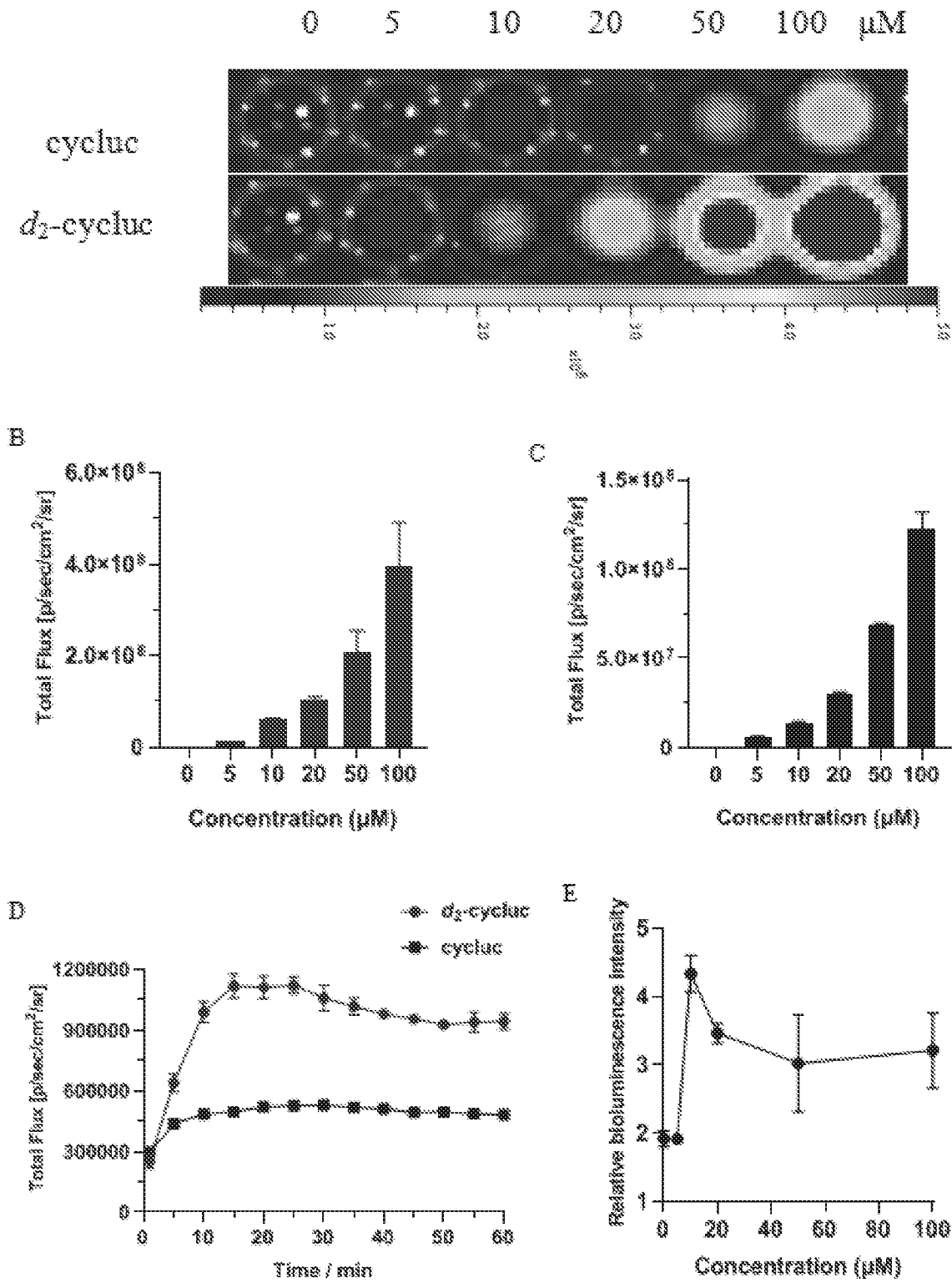


图 12

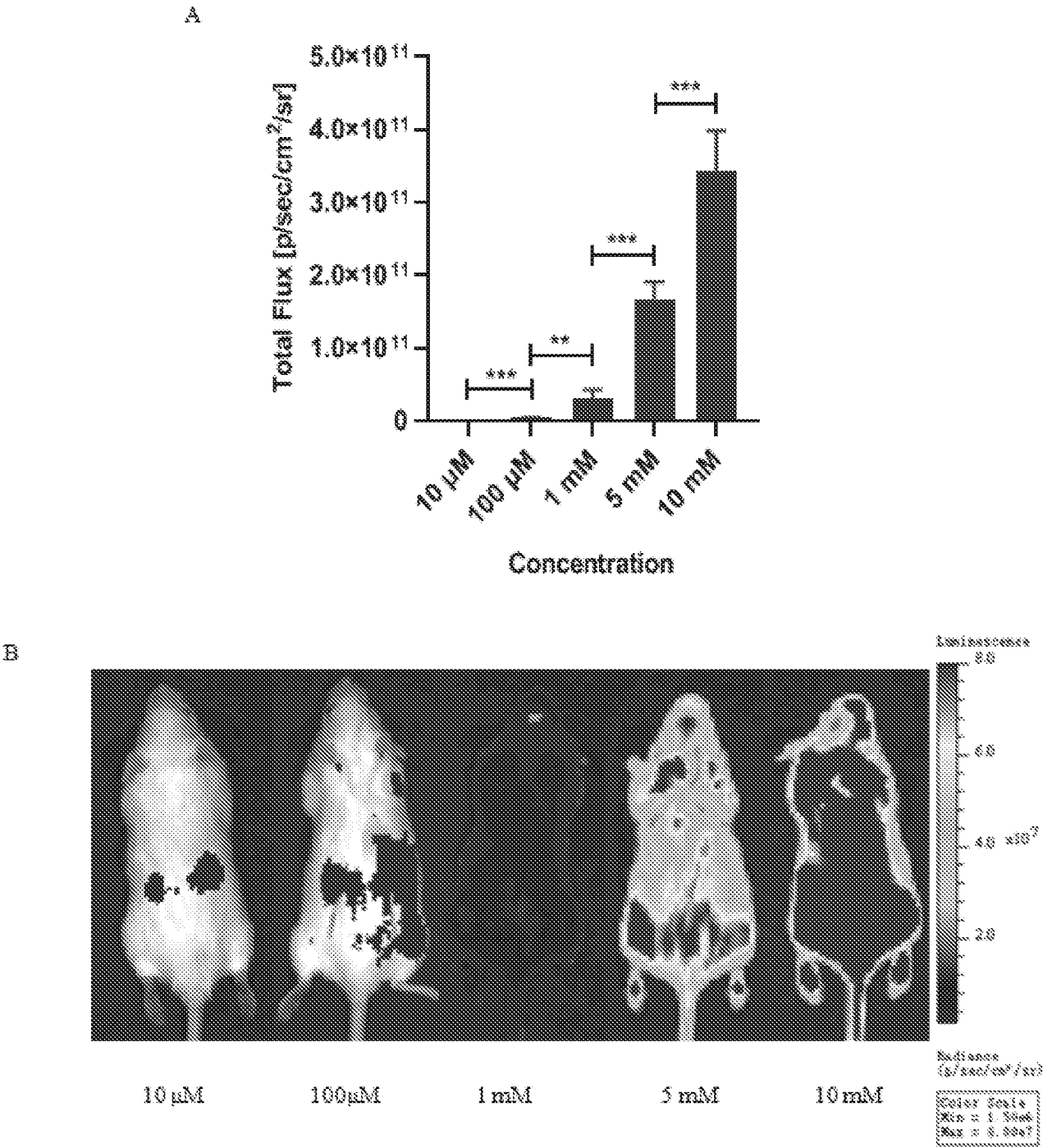
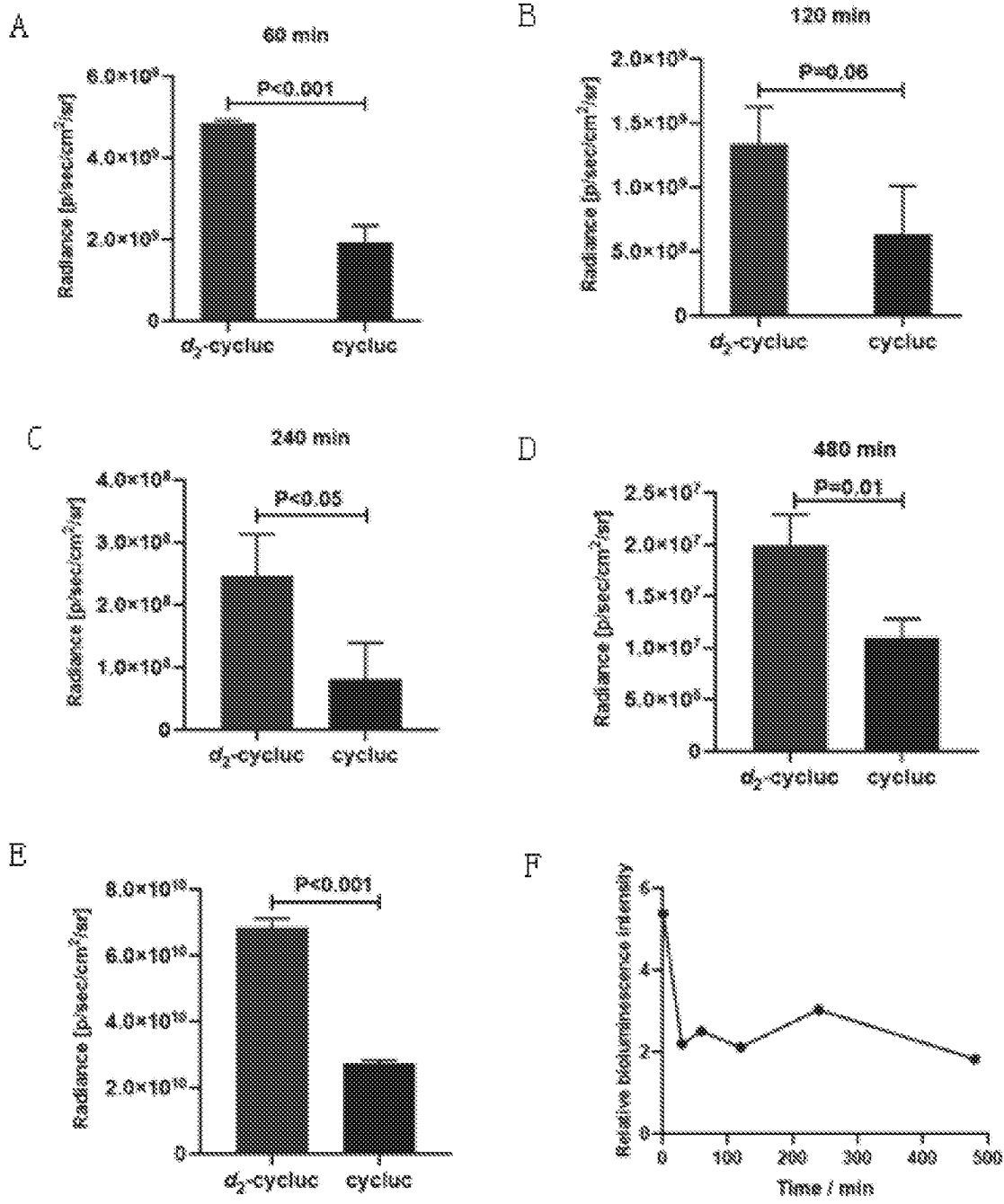


图 13



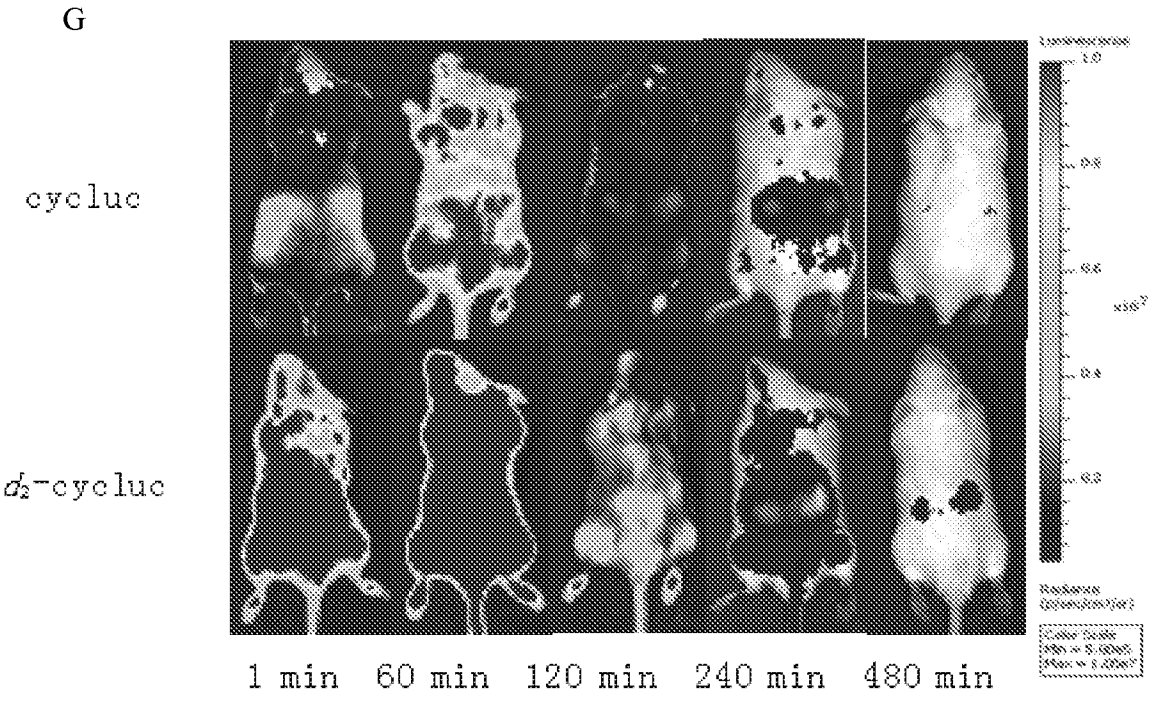


图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/114873

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 513/04(2006.01)i; C07B 59/00(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i; G01N 21/76(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D513/-, C07B59/-, C09K11/-, G01N21/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, ISI Web of Knowledge, Registry, Caplus: 山东大学, 李敏勇, 萤光素酶, 底物, 荧光探针, 荧光检测, 硝基咪唑啉, 噻唑, 咪唑, 羧酸, 试剂盒, luciferase, substrate, fluorescent probe, fluorescence detection, nitroindoline, cycluc, thiazolo+, indol, carboxylic acid, kit

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	REDDY Gadarla Randheer et al. "Robust Light Emission from Cyclic Alkylaminoluciferin Substrates for Firefly Luciferase" <i>Journal of the American Chemical Society</i> , Vol. 132, No. 39, 09 September 2010 (2010-09-09), ISSN: 0002-7863, pp. 13586 and 13587	1 and 2
Y	REDDY Gadarla Randheer et al. "Robust Light Emission from Cyclic Alkylaminoluciferin Substrates for Firefly Luciferase" <i>Journal of the American Chemical Society</i> , Vol. 132, No. 39, 09 September 2010 (2010-09-09), ISSN: 0002-7863, pp. 13586 and 13587	3-5
A	REDDY Gadarla Randheer et al. "Robust Light Emission from Cyclic Alkylaminoluciferin Substrates for Firefly Luciferase" <i>Journal of the American Chemical Society</i> , Vol. 132, No. 39, 09 September 2010 (2010-09-09), ISSN: 0002-7863, pp. 13586 and 13587	6-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 April 2021

Date of mailing of the international search report

23 April 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012109470 A2 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 16 August 2012 (2012-08-16) description, page 4, line 27 to page 5, line 10, and figure 10	1, 7, 9
X	HARWOOD Katryn R. et al. "Identification of Mutant Firefly Luciferases that Efficiently Utilize Aminoluciferins" <i>Chemistry & Biology</i> , Vol. 18, 23 December 2011 (2011-12-23), ISSN: 1074-5521, pp. 1649-1657	1, 7, 8
X	WO 2014057139 A2 (ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAUSANNE) 17 April 2014 (2014-04-17) description, figure 3D, and claims 6-10	1, 7, 9, 10
X	VREVEN Thom et al. "Computational Investigation into the Fluorescence of Luciferin Analogues" <i>Journal of Computational Chemistry</i> , Vol. 40, 31 December 2019 (2019-12-31), ISSN: 0192-8651, pp. 527-531	1
X	MOFFORD David M. et al. "Aminoluciferins Extend Firefly Luciferase Bioluminescence into the Near-Infrared and Can Be Preferred Substrates over D-Luciferin" <i>Journal of the American Chemical Society</i> , Vol. 136, 28 August 2014 (2014-08-28), ISSN: 0002-7863, pp. 13277-13282	1
Y	WO 2016011390 A1 (BIOGEN MA INC.) 21 January 2016 (2016-01-21) description, page 153, and embodiment 94	3-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/114873

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The subject matter of claim 10 relates to a method of diagnosing a disease (PCT R39.1(iv)).
 - [2] This search report is made on the basis of the subject matter of claim 10 being "the application of fluorophore enzyme substrates in the preparation of fluorescent probes and fluorescent detection kits".
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/114873

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2012109470	A2	16 August 2012	US	9587266	B2	07 March 2017
				US	2014201855	A1	17 July 2014
				WO	2012109470	A3	08 November 2012
WO	2014057139	A2	17 April 2014	EP	2719703	A1	16 April 2014
				WO	2014057139	A3	08 January 2015
WO	2016011390	A1	21 January 2016	AR	101229	A1	30 November 2016
				US	10577367	B2	03 March 2020
				US	2019248787	A1	15 August 2019
				WO	2016011390	A8	07 April 2016
				TW	201613872	A	16 April 2016
				US	10246456	B2	02 April 2019
				US	2017204093	A1	20 July 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/114873

A. 主题的分类 C07D 513/04(2006.01)i; C07B 59/00(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i; G01N 21/76(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07D513/-, C07B59/-, C09K11/-, G01N21/- 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNPAT, CNKI, WPI, EP0DOC, ISI Web of Knowledge, Registry, Caplus: 山东大学, 李敏勇, 萤光素酶, 底物, 荧光探针, 荧光检测, 硝基吲哚啉, 噻唑, 吲哚, 羧酸, 试剂盒, luciferase, substrate, fluorescent probe, fluorescence detection, nitroindoline, cycluc, thiazolo+, indol, carboxylic acid, kit		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	REDDY Gadarla Randheer 等. "Robust Light Emission from Cyclic Alkylaminoluciferin Substrates for Firefly Luciferase" J. AM. CHEM. SOC., 第132卷, 第39期, 2010年 9月 9日 (2010 - 09 - 09), ISSN: 0002-7863, 第13586-13587页	1-2
Y	REDDY Gadarla Randheer 等. "Robust Light Emission from Cyclic Alkylaminoluciferin Substrates for Firefly Luciferase" J. AM. CHEM. SOC., 第132卷, 第39期, 2010年 9月 9日 (2010 - 09 - 09), ISSN: 0002-7863, 第13586-13587页	3-5
A	REDDY Gadarla Randheer 等. "Robust Light Emission from Cyclic Alkylaminoluciferin Substrates for Firefly Luciferase" J. AM. CHEM. SOC., 第132卷, 第39期, 2010年 9月 9日 (2010 - 09 - 09), ISSN: 0002-7863, 第13586-13587页	6-10
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2021年 4月 2日		国际检索报告邮寄日期 2021年 4月 23日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 李冰 电话号码 86-(10)-53962156

C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2012109470 A2 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 2012年 8月 16日 (2012 - 08 - 16) 说明书第4页第27行至第5页第10行, 说明书附图图10	1、7、9
X	HARWOOD Katryn R. 等. "Identification of Mutant Firefly Luciferases that Efficiently Utilize Aminoluciferins" Chemistry & Biology, 第18卷, 2011年 12月 23日 (2011 - 12 - 23), ISSN: 1074-5521, 第1649-1657页	1、7、8
X	WO 2014057139 A2 (ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAUSANNE) 2014年 4月 17日 (2014 - 04 - 17) 说明书附图图3D, 权利要求6-10	1、7、9、10
X	VREVEN Thom 等. "Computational Investigation into the Fluorescence of Luciferin Analogues" J. Comput. Chem., 第40卷, 2019年 12月 31日 (2019 - 12 - 31), ISSN: 0192-8651, 第527-531页	1
X	MOFFORD David M. 等. "Aminoluciferins Extend Firefly Luciferase Bioluminescence into the Near-Infrared and Can Be Preferred Substrates over D-Luciferin" J. Am. Chem. Soc., 第136卷, 2014年 8月 28日 (2014 - 08 - 28), ISSN: 0002-7863, 第13277-13282页	1
Y	WO 2016011390 A1 (BIOGEN MA INC.) 2016年 1月 21日 (2016 - 01 - 21) 第153页实施例94	3-5

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第I页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 10
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求10的主题涉及疾病的诊断方法(PCT R39.1(iv))。
[2] 本检索报告是基于权利要求10的主题为“荧光素酶底物在制备荧光探针和荧光检测试剂盒中的应用”作出的。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/114873

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2012109470	A2	2012年 8月 16日	US	9587266	B2	2017年 3月 7日
				US	2014201855	A1	2014年 7月 17日
				WO	2012109470	A3	2012年 11月 8日
WO	2014057139	A2	2014年 4月 17日	EP	2719703	A1	2014年 4月 16日
				WO	2014057139	A3	2015年 1月 8日
WO	2016011390	A1	2016年 1月 21日	AR	101229	A1	2016年 11月 30日
				US	10577367	B2	2020年 3月 3日
				US	2019248787	A1	2019年 8月 15日
				WO	2016011390	A8	2016年 4月 7日
				TW	201613872	A	2016年 4月 16日
				US	10246456	B2	2019年 4月 2日
				US	2017204093	A1	2017年 7月 20日