(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
2023 年 5 月 25 日 (25.05.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/087482 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 5/083 (2006.01) *A61K 49/10* (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01) *A61K 49/14* (2006.01)
A61K 41/00 (2020.01) *A61K 49/18* (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/69 (2017.01) *B82Y 5/00* (2011.01)
A61K 49/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/140245

(22) 国际申请日: 2021 年 12 月 21 日 (21.12.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202111389745.8 2021年11月22日 (22.11.2021) CN

(71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市相城区济学路8号5楼孙周强, Jiangsu 215137 (CN)。

(72) 发明人: 史海斌 (SHI, Haibin); 中国江苏省苏州市相城区济学路8号, Jiangsu 215137 (CN)。 王安娜 (WANG, Anna); 中国江苏省苏州市相城区济学路8号, Jiangsu 215137 (CN)。

(74) 代理人: 苏州创元专利商标事务所有限公司 (SUZHOU CREATOR PATENT AND TRADEMARK AGENCY, LTD); 中国江苏省苏州市姑苏区干将西路93号5楼孙周强, Jiangsu 215002 (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,

(54) **Title:** LEUCINE AMINOPEPTIDASE AND GLUTATHIONE DUAL-STIMULATION RESPONSE TYPE PROBE, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针及其制备方法和应用

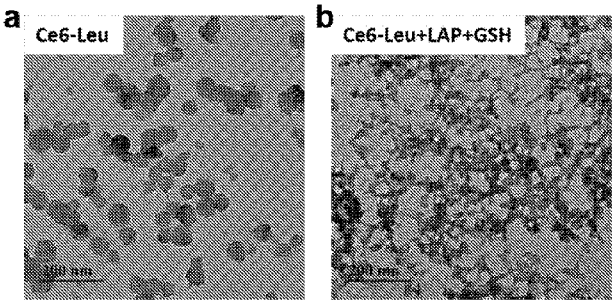


图3

(57) **Abstract:** Provided are a leucine aminopeptidase and glutathione dual-stimulation response type probe, a preparation method therefor, and an application thereof. The probe Ce6-Leu is subjected to a click condensation reaction under the stimulation of a tumor microenvironment, and then nanoparticles are recombined into nanofibers; specifically, the probe Ce6-Leu exposes original amino and sulfydryl in a cysteine structure under the stimulation of leucine aminopeptidase and glutathione which are overexpressed in tumor cells, then the click condensation reaction is performed to form an amphiphilic dimer, and the nanofibers are formed by recombination; the distance between Ce6 structures is increased, and quenching between the Ce6 structures is weakened, such that fluorescence signals and ROS generation capacity are enhanced, thereby implementing specific fluorescence imaging and photodynamic therapy of a tumor. and diagnosis and treatment integration of the tumor. The present invention has important scientific and economic value.

(57) 摘要: 提供了一种亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针及其制备方法与应用。所述探针Ce6-Leu在肿瘤微环境的刺激下发生点击缩合反应，继而从纳米颗粒重组装成纳米纤维，具体的，探针Ce6-Leu在肿瘤细胞内过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的刺激下，暴露半胱氨酸结构中原有的氨基和巯基，进而发生点击缩合反应形成两亲性的二聚体，并重组装形成纳米纤维，Ce6结构之间的距离变大，彼此之间的淬灭减弱从而荧光信号和产生ROS的能力增强，进而实现肿瘤的特异性荧光成像和光动力治疗，以及肿瘤的诊疗一体化，具有重要的科研及经济价值。

WO 2023/087482 A1

[见续页]

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, 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))。

一种亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤微环境介导的重组装技术领域，涉及一种亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 癌症已经成为严重危害人类健康的疾病之一，因此，近些年来，用于癌症诊断和治疗的分子影像技术得到了飞速的发展。应用分子影像诊断技术可以对癌症患者进行早期的诊断，并且为癌症的分类、预后评估及治疗方案的选择提供重要的信息，为人类攻克癌症提供新的机会。

[0003] 诊疗一体化作为一种将疾病的诊断、监测和治疗结合的新兴肿瘤诊疗策略，为克服癌症带来了新的希望；并且该策略效率高，毒副作用小的优点有望推动癌症诊断和治疗技术的快速发展。目前科学家们已经研发出各类造影剂，其中纳米尺寸的造影剂，如纳米乳剂、脂质体、树状聚合物以及基于金、钽、镧系、铋等重金属材料设计的无机纳米多功能造影剂。这类纳米粒子造影剂具有血液循环时间长，肾清除率和毛细血管渗漏率低的优点，能够通过实体瘤的高通透性和滞留作用（enhanced permeation and retention effect，EPR）被动积累在肿瘤部位。但是现在大多数这类造影剂仍处于临床前研究阶段，缺乏生物毒性、药代动力学和体内分布的实验评估，距离临床应用仍有一定的距离。

发明概述

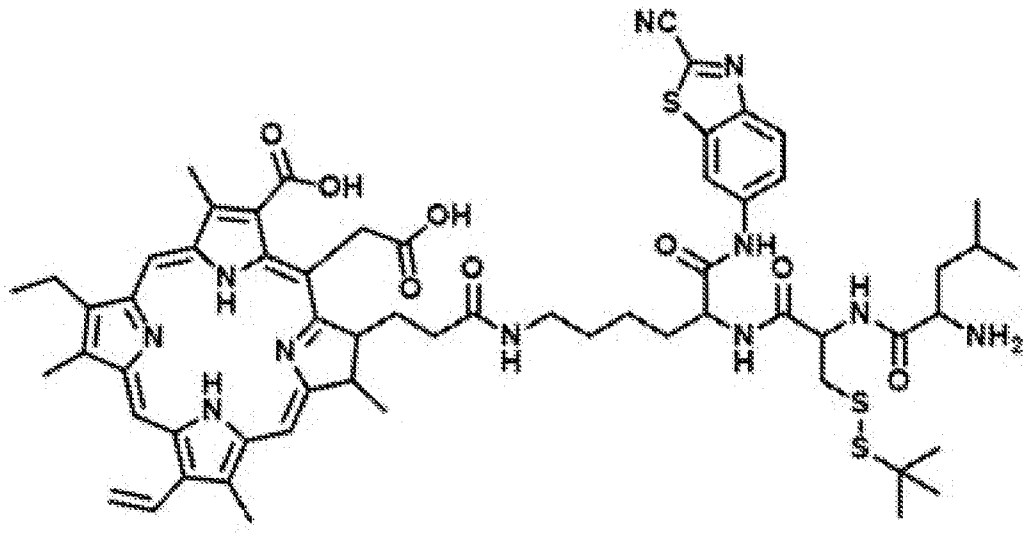
技术问题

[0004] 为了克服上述现有造影剂中存在的问题，本发明利用肿瘤微环境中过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的刺激，设计并开发了一种亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针，实现探针在肿瘤内的特异性响应，进而有效的改善在体肿瘤的成像及治疗效果；该方法为改善传统分子探针成像背景噪声高、诊断准确性低等缺点提供了新的策略与手段。

问题的解决方案

技术解决方案

[0005] 本发明采用以下技术方案：一种亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针，具有如下化学结构式：



。

[0006] 上述亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针在制备肿瘤诊断和/或治疗试剂中的应用。

[0007] 上述亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针的制备方法，包括以下步骤：（1）化合物1与NH_2-CBT进行酰胺缩合反应得到化合物2；（2）化合物2脱掉保护基得到化合物3；（3）化合物3与N-芴甲氧羰基-S-叔丁硫基-L-半胱氨酸进行酰胺缩合反应，得到化合物4；（4）化合物4脱去保护基团得到化合物5；（5）化合物5与光敏剂反应，得到化合物6；（6）化合物6脱掉保护基得到化合物7；（7）化合物7与N-叔丁氧羰基-L-亮氨酸进行酰胺缩合反应得到化合物8；（8）化合物8脱掉保护基得到亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针。

[0008] 本发明公开的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针在体外自组装成球形纳米颗粒，并且荧光淬灭；当纳米颗粒循环到肿瘤部位后，在肿瘤细胞中过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的刺激下，选择性在肿瘤细胞内通过分子间CBT缩合反应重新组装成纳米纤维，完成近红外分子探针在肿瘤内的响应，荧

光恢复。并且，亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针在肿瘤部位发生响应后，产生ROS的能力恢复，经660 nm激光器照射，完成近红外小分子光敏剂用于肿瘤的光动力治疗。肿瘤部位荧光信号最强的时间点为3小时；660 nm激光器照射时，照射强度为0.15 W/cm ^{2}，照射时间为10分钟。

[0009] 上述技术方案中，将亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针溶于PBS（磷酸缓冲盐，pH=7.2～7.4）缓冲液中（浓度为100μM），在37℃的振荡器中反应，使其自组装成球形纳米颗粒。随后尾静脉注入荷瘤鼠体内，探针循环到肿瘤部位后，在肿瘤细胞中过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的刺激下，选择性在肿瘤细胞内通过分子间CBT缩合反应重组装成纳米纤维，完成近红外分子探针在肿瘤内的响应，荧光恢复。并且，探针循环到肿瘤部位后，在肿瘤细胞中过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的刺激下，选择性在肿瘤细胞内通过分子间CBT缩合反应重组装成纳米纤维，完成近红外分子探针在肿瘤内的响应，荧光逐渐恢复，并且产生ROS的能力逐渐变强。待探针在肿瘤部位荧光信号达到最强，经660 nm激光器照射后，完成近红外小分子光敏剂用于肿瘤的治疗。

[0010] 上述技术方案中，步骤（1）中，化合物1与NH_2-CBT的摩尔比为1∶1.2；酰胺缩合反应在N-甲基吗啡和氯甲酸异丁酯存在下进行；酰胺缩合反应为室温反应15～24小时。

[0011] 上述技术方案中，步骤（2）中，化合物2脱去保护基团在N,N-二甲基甲酰胺/哌啶混合溶剂中进行；N,N-二甲基甲酰胺、哌啶的体积比为4∶1。

[0012] 上述技术方案中，步骤（3）中，化合物3与N-芴甲氧羰基-S-叔丁硫基-L-半胱氨酸的摩尔比为1:1.2；酰胺缩合反应在1-羟基苯并三氮唑、O-苯并三氮唑-四甲基脲六氟磷酸盐和二异丙基乙胺存在下进行；酰胺缩合反应为室温反应2～4小时。

[0013] 上述技术方案中，步骤（4）中，化合物4脱去保护基团在二氯甲烷/三氟乙酸混合溶剂中进行；二氯甲烷、三氟乙酸的体积比为4∶1。

[0014] 上述技术方案中，步骤（5）中，化合物5与光敏剂的摩尔比为1.1∶1；所述光敏剂为NHS活化的二氢卟吩E6（Ce6-NHS）。

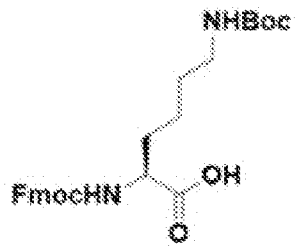
[0015] 上述技术方案中，步骤（6）中，化合物6脱去保护基团在N,N-二甲基甲酰胺/

哌啶混合溶剂中进行；N,N-二甲基甲酰胺、哌啶的体积比为4：1。

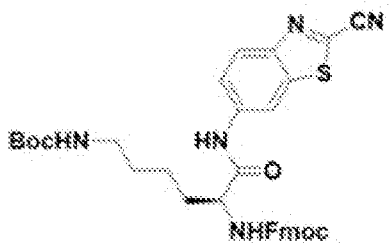
[0016] 上述技术方案中，步骤（7）中，化合物7与N-叔丁氧羰基-L-亮氨酸的摩尔比为1：1.2；酰胺缩合反应在1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺和二异丙基乙胺存在下进行；酰胺缩合反应为室温反应8～12小时。

[0017] 上述技术方案中，步骤（8）中，化合物8脱去保护基团在二氯甲烷/三氟乙酸混合溶剂中进行；二氯甲烷、三氟乙酸的体积比为4：1。

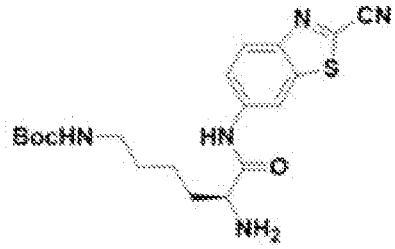
[0018] 上述技术方案中，化合物1、化合物2、化合物3、化合物4、化合物5、化合物6、化合物7、化合物8的化学结构式分别如下：



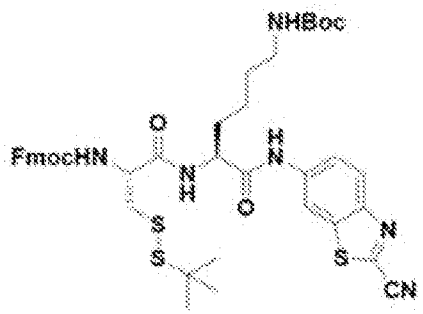
1



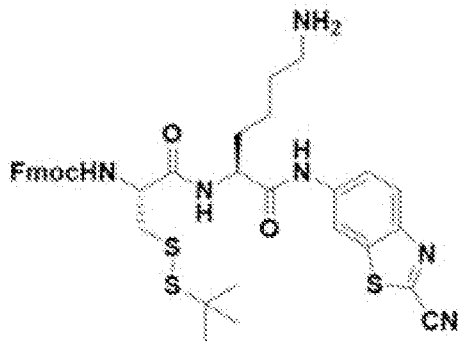
2



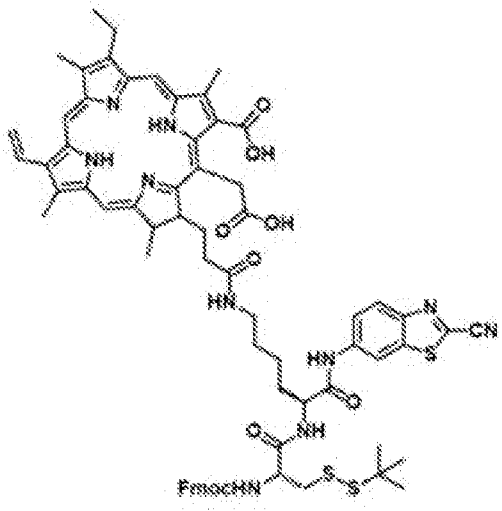
3



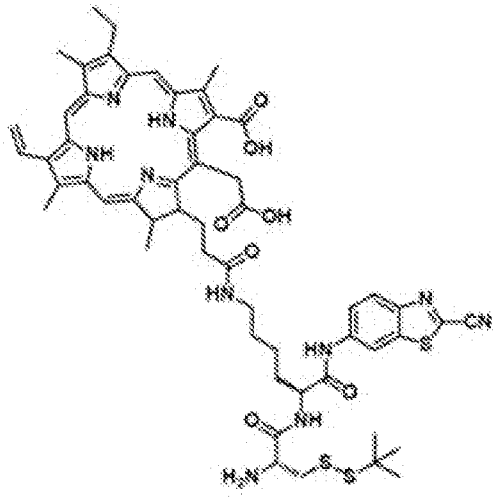
4



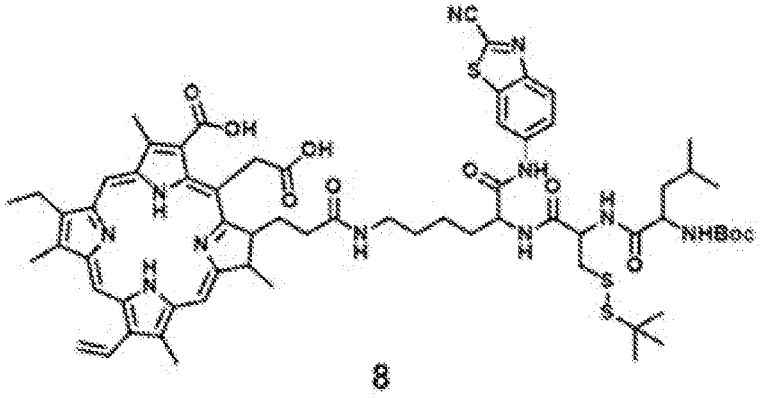
5



6



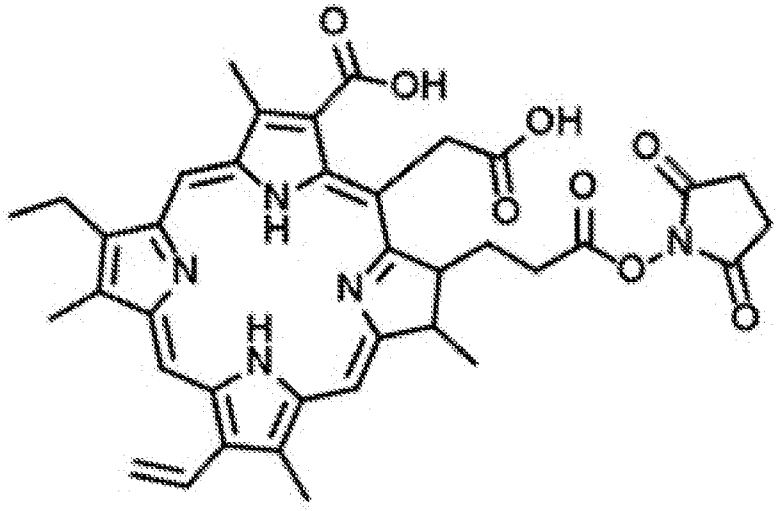
7



8

。

[0019] NHS活化的光敏剂二氢卟吩E6的化学结构式如下：



。

[0020] 本发明中，化合物8进行脱保护后，使用半制备型高效液相色谱分离提纯，得到亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针，产物为墨绿色的固体粉末，为常规技术。优选的，所述的高效液相色谱分离方法为：C18柱，3.5 μm，4.6×100 mm；流动相：A是水；B是乙腈；流速：3 mL/min；线性梯度洗脱程序：0 min，A∶B = 95∶5；13 min，A∶B = 0∶100。

[0021] 本发明的探针通过肿瘤微环境中过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的双重刺激，使得纳米颗粒探针重新组装成纳米纤维，实现探针的荧光和产生ROS能力的恢复，从而达到肿瘤的特异性荧光成像和光动力治疗。

发明的有益效果

有益效果

[0022] 由于上述技术方案的运用，本发明与现有技术相比具有如下优点：（1）本发明中使用2-氰基苯并噻唑与1,2-氨基硫醇发生快速高效的点击缩合反应形成两亲性的二聚体，并通过分子间作用力的改变使得纳米颗粒重新组装成纳米纤维。

[0023] （2）当探针进入肿瘤细胞后，在肿瘤细胞内过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的刺激下，暴露半胱氨酸结构中原有的氨基和巯基，从而与2-氰基苯并噻唑（CBT）的氰基发生点击缩合反应，且不受外界环境影响。

[0024] （3）该肿瘤微环境响应的智能型探针的诊断和治疗功能只有在特殊的肿瘤微环境触发下才能被激活，即使被正常组织截留，其诊断和治疗功能不会被激活，因此不会对癌症的诊断和治疗带来干扰。所以，肿瘤微环境响应的智能诊疗试剂能有效的提高癌症诊断的精准度和治疗的效果。

对附图的简要说明

附图说明

[0025] 图1为实施例1中亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac的合成流程图。

[0026] 图2为实施例2中亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu（a）和对照组探针Ce6-Ac（b）的高分辨质谱表征。

[0027] 图3为实施例3中亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu在亮

氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽溶液中反应前后的TEM图像。

[0028] 图4为实施例4中亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu在亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽溶液中反应前后紫外吸收和荧光光谱的变化情况，a是紫外吸收的变化，b是荧光信号的变化。

[0029] 图5为实施例5中亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu在亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽溶液中反应前后产生ROS能力的变化情况。

[0030] 图6为实施例6中亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac在肿瘤细胞内荧光强度的变化。

[0031] 图7为实施例7中亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac在肿瘤细胞内产生ROS能力的比较。

[0032] 图8为实施例8中亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac光动力杀死肿瘤细胞能力的比较。

[0033] 图9为实施例9中不同时间内，亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac尾静脉注射后小鼠荧光成像照片（a）和对应的荧光信号值（b）。

[0034] 图10为实施例10中亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac小鼠光动力治疗效果研究。

[0035] 图11为各组小鼠存活时间比较。

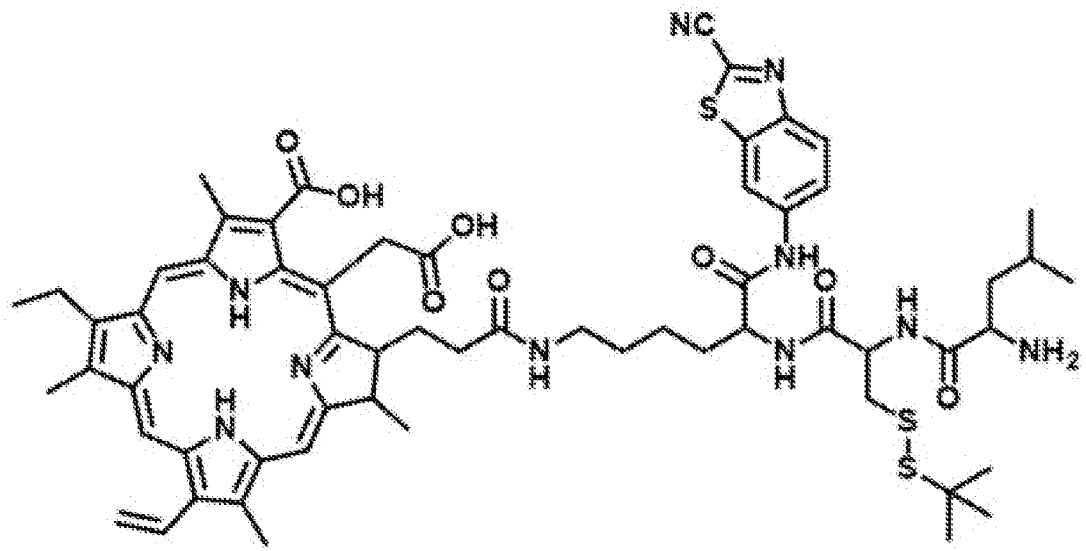
发明实施例

本发明的实施方式

[0036] 本发明开发了一种集荧光成像及光动力治疗于一体的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双响应型智能分子探针，具有重大的研究及应用价值，该造影剂可以在肿瘤微环境的刺激下从球形纳米颗粒重新组装为纳米纤维，并且荧光以及产生ROS的能力恢复，从而实现体肿瘤的特异性荧光成像和光动力治疗。

[0037] 具体而言，本发明提供的方法，其步骤如下：（1）构建、合成双重刺激响应型探针：按照设计的合成步骤：首先化合物1与NH_2-CBT发生酰胺缩合反应，随后用20%的哌啶（N,N-二甲基甲酰胺：哌啶 = 4：1，v/v）脱去保护基团Fmoc；接着与N-芴甲氧羰基-S-叔丁硫基-L-半胱氨酸发生酰胺缩合反应，随后用20%的

三氟乙酸（二氯甲烷：三氟乙酸 = 4：1，v/v）将中间体化合物的Boc保护基团脱掉；接着与已经用NHS活化好的光敏剂二氢卟吩E6反应，所得的中间体化合物再用20%的哌啶（N,N-二甲基甲酰胺：哌啶 = 4：1，v/v）脱去保护基团Fmoc所得的中间体与N-叔丁氧羰基-L-亮氨酸反应得到产物再20%的三氟乙酸（二氯甲烷：三氟乙酸= 4：1，v/v）将Boc保护基团脱掉得到最终的探针Ce6-Leu，结构式如下：



。

[0038] （2）亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu在肿瘤细胞内的响应情况：将步骤（1）中获得的所述亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针溶于细胞培养基中，加入到HepG2细胞培养皿中（浓度：20 μM），放入培养箱培养，分子探针在肿瘤细胞内过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的刺激下，通过分子间CBT缩合反应重新组装成纳米纤维，完成近红外分子探针在肿瘤细胞内的响应，荧光恢复，有利于实现对肿瘤细胞的的特异性成像。

[0039] （3）亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu在实体肿瘤内的响应性荧光成像：将步骤（1）中获得的所述亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu溶于PBS缓冲液中（浓度：100 μM）使其自组装成纳米颗粒，然后以尾静脉注射的方式将探针注入荷有HepG2肝癌肿瘤的雌性裸鼠体内。纳米颗粒循环到肿瘤部位后，选择性在肿瘤细胞内进行亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的响应并通过分子间CBT缩合反应重新组装成纳米纤维，完成近红外分子探

针在肿瘤内响应性荧光成像，从而实现对在体肿瘤的特异性荧光成像。

[0040] （4）亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu用于在体肿瘤的光动力治疗：将步骤（1）中获得的所述亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针溶于PBS缓冲液中（浓度：200 μM），以尾静脉注射的方式将探针注入荷有HepG2肝癌肿瘤的雌性裸鼠体内。探针循环到肿瘤部位进行酶和谷胱甘肽的响应后，选择性在肿瘤细胞内通过分子间CBT缩合反应重组装成纳米纤维，完成近红外分子探针在肿瘤内的响应，荧光逐渐恢复，并且产生ROS的能力逐渐变强。待探针在肿瘤部位荧光信号达到最强，经660 nm激光(0.15 W/cm ^{2})照射10分钟后，完成近红外小分子光敏剂用于肿瘤的治疗。

[0041] 下文将结合附图和具体实施例来进一步阐述本发明。应当理解的是，这些实施例仅用于解释和说明本发明中的技术方案，而并非旨在限制本发明的范围。此外，除非另有说明，下列实施例中所使用的材料、试剂、仪器等均可通过商业手段获得。

[0042] 实施例1：亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac的合成与表征：（1）将化合物1（400 mg，0.85 mmol）溶于10 mL四氢呋喃中，再滴加入N-甲基吗啡（130 mg，1.28 mmol），然后将圆底烧瓶置于冰盐浴中，冷却至0 °C，随后再滴加入氯甲酸异丁酯（175 mg，1.28 mmol），活化半小时后，再加入用干燥的四氢呋喃溶解的2-氨基-6-氰基苯并噻唑（NH_2-CBT，179 mg，1.00 mmol），保持0 °C反应1小时，然后室温搅拌过夜。反应结束后，通过旋转蒸发仪旋干溶剂，然后将残留固体复溶在乙酸乙酯（50 mL）中，并用碳酸氢钠的水溶液萃取三次，有机相用Na2SO4干燥后进行抽滤，旋干溶剂。以石油醚（PE）和乙酸乙酯（EA）= 2:1的体积比为洗脱液，用硅胶色谱柱纯化粗产物，得到中间体1（其结构如图1中的化合物2所示）（531.88 mg，产率：85%）；^{1}H NMR (600 MHz, Methanol-d4) δ 8.59 (s, 1H), 8.04 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.63 (dt, J = 14.8, 5.0 Hz, 3H), 7.33 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.26 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 4.36 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 4.24 (dd, J = 9.0, 5.4 Hz, 1H), 4.17 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.02 (dt, J = 9.8, 4.5 Hz, 2H), 1.83 (dp, J = 15.1, 5.4 Hz, 1H),

1.73 (tq, J = 11.7, 7.9, 6.3 Hz, 1H), 1.48 (p, J = 9.4, 8.3 Hz, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.30 - 1.18 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, Methanol-d4) δ 172.33, 157.18, 148.38, 143.84, 143.70, 141.80, 141.14, 139.09, 136.58, 135.25, 127.33, 126.72, 124.76, 124.49, 120.82, 119.49, 112.63, 111.40, 78.44, 66.51, 55.84, 47.00, 39.57, 31.51, 29.20, 27.36, 22.80；（2）将中间体1(500 mg，0.80 mmol)溶于8 mL DMF中，然后将反应瓶放置在冰水浴中，随后滴加入2 mL哌啶，保持0 ℃反应5分钟，反应结束后，旋蒸除去溶剂和哌啶。以二氯甲烷(DCM)和甲醇(MeOH)= 80:1的体积比为洗脱液，用硅胶色谱柱纯化粗产物，得到中间体2（其结构如图1中的化合物3所示）(290.18 mg，产率：90%)； ^{1}H NMR (600 MHz, Methanol-d4) δ 8.59 - 8.45 (m, 1H), 8.07 - 7.93 (m, 1H), 7.73 - 7.54 (m, 1H), 3.47 (q, J = 6.7 Hz, 1H), 3.06 - 2.97 (m, 2H), 1.85 - 1.58 (m, 2H), 1.49 (h, J = 7.1 Hz, 3H), 1.37 (d, J = 5.9 Hz, 9H), 1.26 (d, J = 3.5 Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, Methanol-d4) δ 174.81, 161.86, 157.07, 149.04, 141.79, 137.45, 137.07, 123.84, 119.90, 112.02, 78.37, 55.30, 39.62, 34.65, 29.43, 27.32, 22.52；（3）在20 mL的圆底烧瓶中加入中间体2（250 mg，0.62 mmol），然后用干燥的DMF溶清，随后再加入HBTU（282.15 mg，0.74 mmol），HOBT（100.44 mg，0.74 mmol）和DIPEA（213.68 μL），搅拌15分钟后再加入化合物N-芴甲氧羰基-S-叔丁硫基-L-半胱氨酸（321.04 mg，0.74 mmol）。继续搅拌，室温反应2小时，反应结束后通过旋蒸除去溶剂，然后再加入25 mL乙酸乙酯复溶粗产物，随后有机相用25 mL的超纯水，饱和碳酸氢钠，氯化钠水溶液各洗一次。有机相用无水硫酸钠干燥后旋蒸除去溶剂，以石油醚（PE）和乙酸乙酯（EA）= 2:1的体积比为洗脱液，用硅胶色谱柱纯化粗产物，得到中间体3（其结构如图1中的化合物4所示）（405.26 mg，产率：80%）； ^{1}H NMR (600 MHz, Methanol-d4) δ 8.37 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.71 (dd, J = 9.0, 2.1 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.52 (dd, J = 11.0, 7.6 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.38 - 7.27 (m, 1H), 7.22 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 7.16 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 4.52 (dd, J

= 9.9, 4.5 Hz, 1H), 4.42 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 4.28 (qd, J = 10.6, 7.5 Hz, 2H), 4.08 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 3.18 - 3.02 (m, 2H), 3.02 (s, 2H), 1.99 (s, 1H), 1.77 - 1.68 (m, 1H), 1.53 - 1.42 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.34 (s, 11H). ^{13}C NMR (151 MHz, Methanol-d4) δ 172.13, 171.21, 157.15, 157.05, 148.27, 143.49, 143.32, 141.02, 140.78, 138.75, 136.27, 135.19, 127.25, 126.78, 124.74, 124.18, 120.92, 119.34, 112.64, 111.50, 78.43, 66.92, 55.08, 54.09, 46.76, 40.65, 39.75, 37.46, 30.87, 29.03, 28.86, 27.39, 22.96. MS (ESI) Calcd for: $C_{41}H_{48}N_6O_6S_3$ ([M+H]$^+$) : 817.2800, found: 817.2865; （4）在20 mL含20%（体积比）三氟乙酸的DMF溶液中加入中间体3，室温反应1小时后，通过旋蒸除去溶剂和三氟乙酸，得到中间体4（其结构如图1中的化合物5所示）。中间体4不做进一步纯化。准确称取40毫克中间体4（0.0558 mmol），加入20 mL的无水DMF溶液溶清，再加入45.71毫克Ce6-NHS（0.05 mmol）和7.76毫克DIPEA（0.06 mmol），室温搅拌2小时后，用HPLC进行分离提纯，收集吸收光谱在400 nm处的组分得到中间体5（其结构如图1中的化合物6所示）（45.9 mg，产率：71%）；MS (MALDI-TOF) Calcd for: $C_{70}H_{75}N_{10}O_9S_3$ ([M+H]$^+$): 1295.48, found: 1295.736; （5）将中间体5（45 mg，0.035 mmol）溶于8 mL DMF中，然后将反应瓶放置在冰水浴中，随后逐滴加入2 mL哌啶，保持0 °C反应5分钟，反应结束后，用HPLC进行分离提纯，收集吸收光谱在400 nm处的组分得到中间体6（其结构如图1中的化合物7所示）（26.3 mg，产率：70%）；MS (MALDI-TOF) Calcd for: $C_{55}H_{65}N_{10}O_7S_3$ ([M+H]$^+$): 1073.36, found: 1073.687; （6）在10 mL圆底烧瓶中加入中间体6（26 mg，0.025 mmol），用5 mL无水DMF溶清，然后再加入NHS活化的N-叔丁氧羰基-L-亮氨酸（9.85 mg，0.03 mmol），室温反应2小时后旋蒸除去溶剂，使用半制备型高效液相色谱分离提纯得到中间体7（其结构如图1中的化合物8所示）（19.3 mg，产率：60%）；MS (MALDI-TOF) Calcd for: $C_{66}H_{84}N_{11}O_{10}S_3$ ([M+H]$^+$): 1286.64, found: 1286.896; （7）在5 mL含20%三氟乙酸的二氯甲烷溶液中加入中间体7（19 mg，0.015 mmol），室温反应1小时后，通过旋蒸除去溶剂和三氟乙酸，使用半制备型高效液相色谱分离提

纯得到实验组探针Ce6-Leu（12.25 mg，产率：70%）；MS (MALDI-TOF) Calcd for: $C_{61}H_{76}N_{11}O_8S_3$ ([M+H]$^+$): 1186.520, found: 1186.788；（8）在10 mL圆底烧瓶中加入中间体6（26 mg，0.025 mmol），用5 mL无水DMF溶清，然后再加入乙酸酐（3.06 mg，0.03 mmol），室温搅拌2小时后旋蒸除去溶剂，用HPLC进行纯化分离得到对照组探针Ce6-Ac（22.3 mg，产率：80%）；MS (MALDI-TOF) Calcd for: $C_{57}H_{67}N_{10}O_8S_3$ ([M+H]$^+$): 1115.40, found: 1115.525。

[0043] 实施例2：亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac的高分辨质谱表征：将实施例1中制得的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac用溶剂甲醇稀释到浓度为5 μM后，通过高分辨质谱对探针进行分子量确定。

[0044] 如图2a所示，亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu的理论m/z：1186.520，实际得到高分辨质谱谱图中m/z：1186.788，两者相吻合，即为所要化合物；图2b展示对照组探针Ce6-Ac的理论m/z：1115.40，实际得到高分辨质谱谱图中m/z：1115.525，两者相吻合，即为所要化合物。

[0045] 实施例3：亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽介导双重刺激响应型探针Ce6-Leu从纳米颗粒重组装成纳米纤维：将实施例1中制得的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu加入到含有10 mM的谷胱甘肽和50 U/mL的亮氨酸氨基肽酶的PBS缓冲溶液中，在37℃下反应24小时。利用TEM观察探针反应前后的形貌变化。

[0046] 如图3a所示，单纯的探针Ce6-Leu在PBS溶液中形成粒径大概在79.8±9.3 nm的纳米颗粒，而在亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的刺激下重组装形成纳米纤维（3b）。

[0047] 实施例4：亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac在亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽溶液中反应前后的紫外吸收光谱和荧光光谱的变化情况：将实施例1中制得的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac分别加入到PBS（pH=7.2）和PBS（50 U/mL LAP酶，10 mM GSH）的体系中，使得探针的终浓度为20 μM，然后放置在37℃

的振荡器中反应24小时。分别使用紫外-可见吸收光谱仪和稳态/瞬态荧光光谱仪测量探针的紫外吸收光谱和荧光光谱。

[0048] 如图4所示，探针Ce6-Leu在亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的双重刺激下发生CBT缩合反应重新组装成纳米纤维，Ce6结构之间距离变大，紫外吸收从J-聚体向单体转变，紫外吸收抬高并发生蓝移，并且荧光信号增强。对照组探针Ce6-Ac则不具有酶响应性，不能发生缩合反应，即使在PBS（50 U/mL LAP酶，10 mM GSH）溶液中，仍以聚集的纳米颗粒形式存在，因此紫外吸收和荧光信号无明显变化。

[0049] 实施例5：亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu在亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽溶液中反应前后产生ROS能力的变化情况：将实施例1中制得的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu分别加入到PBS（pH=7.2）和PBS（50 U/mL LAP酶，10 mM GSH）的体系中，使得探针的终浓度为20 μM，然后放置在37 ℃的振荡器中反应24小时。反应结束后，在溶液中加入单线态氧指示剂ABDA，然后用660 nm激光（0.15 W/cm ^{2}）照射。ABDA被单线态氧氧化后其在380 nm纳米处的紫外吸收峰会消失，因此可使用紫外-可见分光光度计对其进行检测。

[0050] 如图5所示，相比于原始探针Ce6-Leu的PBS溶液（5a），发生响应后溶液产生单线态氧的能力明显的变强（5b）。这是由于纳米颗粒在重组装的过程中使Ce6结构之间的距离变大，彼此之间的淬灭减弱从而产生单线态氧的能力恢复。

[0051] 实施例6：亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac在肿瘤细胞HepG2内荧光强度的变化情况：将处在对数生长期的HepG2细胞进行消化、离心，弃去上清后重新加入培养基吹打成细胞悬液，细胞经计数后接种于8孔共聚焦小皿中，每个孔中加入5000个HepG2细胞。随后将8孔共聚焦小皿放在培养箱中继续培养24小时。24小时后，弃去原培养基，分别在每个孔中加入200 μL用培养基溶解的探针Ce6-Leu和Ce6-Ac(20 μM)，放入培养箱中继续培养不同的时间（1 h，2 h，4 h，8 h，12 h）。培养结束后弃去孔中原培养基，用PBS清洗三遍，每次震荡5分钟（洗去未反应的材料）。然后用Hoechst33342溶液染核，室温避光孵育15分钟，之后再用PBS清洗。最后加入新鲜

培养基通过激光共聚焦显微镜观察HepG2细胞内的荧光情况。

[0052] 如图6所示，在不同的孵育时间里，探针Ce6-Leu在HepG2细胞内的荧光信号要明显强于Ce6-Ac在HepG2细胞内的荧光信号，表明在肿瘤细胞内实验组探针的响应性缩合和重组装的能力显著优于对照组探针，因此荧光明显强于对照组。

[0053] 实施例7：亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对比探针Ce6-Ac在肿瘤细胞内产生ROS能力的比较：取对数生长期的HepG2细胞，弃去原培养基后用胰酶消化，离心，加入新鲜培养基后吹打成悬液，然后用计数板计数，并接种于共聚焦小皿中，最终每孔细胞个数为4×10^{5}，继续放入培养箱中培养12小时，12小时后弃去原培养基，之后再加入1.5 mL相同浓度（20 μM）的Ce6-Leu和Ce6-Ac探针的培养基溶液，并设置空白对照组（对照组：未加入探针），放入培养箱继续孵育8小时。等到孵育时间结束后，弃去原先的培养基，用PBS清洗3遍，每遍5分钟，然后在每个孔中加入1.5 mL含有ROS指示剂DCFH-DA的新鲜培养基，继续培养半小时，等到孵育时间结束后，弃去原先的培养基，用PBS清洗，然后在每个孔中加入1.5 mL的新鲜培养基。随后置于660 nm激光器下照射5分钟（对照组+$\lambda_{660\ nm}$：未加探针，单独照射660 nm激光；Ce6-Leu+$\lambda_{660\ nm}$：Ce6-Leu探针孵育8小时后，照射660 nm激光；Ce6-Ac+$\lambda_{660\ nm}$：Ce6-Ac探针孵育8小时后，照射660 nm激光），激光功率为0.15 W/cm^{2}，同时设置实验对照组（对照组：未加探针，未进行660 nm激光照射；Ce6-Leu：Ce6-Leu探针孵育8小时，但未进行660 nm激光照射；Ce6-Ac：Ce6-Ac探针孵育8小时后，但未进行660 nm激光照射）。将上述6组经过不同实验操作的细胞（对照组，Ce6-Ac，Ce6-Leu，对照组+$\lambda_{660\ nm}$，Ce6-Ac+$\lambda_{660\ nm}$，Ce6-Leu+$\lambda_{660\ nm}$）用Hoechst33342溶液染核，室温避光孵育15分钟，之后再用PBS清洗三遍，每次震荡5分钟。最后加入新鲜培养基通过激光共聚焦显微镜观察HepG2细胞内绿色荧光（DCF）的情况。DCFH-DA作为一种活性氧检测荧光探针，其本身没有荧光，可以自由穿过细胞膜，进入细胞后会被细胞内的酯酶水解微DCFH。而DCFH不能透过细胞膜，在活性氧存在的条件下，DCFH被氧化为荧光物质DCF，而绿色荧光的强度与细胞内活性氧的水平成正比。

[0054] 如图7所示，相比于对照组细胞，对照组+$\lambda_{660\ nm}$组细胞尽管进行了660 nm激光照射，但是细胞内并没有产生ROS，说明单纯的660 nm激光照射并不能细胞产生ROS。另外，单纯的Ce6-Ac和Ce6-Leu与细胞孵育并不能使细胞产生ROS。再对比Ce6-Ac+$\lambda_{660\ nm}$组的细胞，只看到细胞内产生少量的ROS，说明Ce6-Ac探针在细胞内仍然以聚集态存在，所以在细胞内产生ROS的量很少。而相比于Ce6-Leu+$\lambda_{660\ nm}$组的细胞，Ce6-Leu探针具有响应性重组装的能力，在肿瘤细胞内过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的刺激下探针可以发生分子间缩合反应而重新组装成纳米纤维，Ce6结构之间的距离变大，彼此之间的淬灭减弱从而产生单线态氧的能力恢复，故经660 nm激光照射后，细胞内产生大量的ROS，从而可以检测到明显的绿色荧光（DCF）。

[0055] 实施例8：亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对比探针Ce6-Ac依靠光动力杀死肿瘤细胞能力的比较：取对数生长期的HepG2细胞，弃去原培养基后用胰酶消化，离心，加入新鲜培养基后吹打成悬液，然后用计数板计数，并接种于12孔板中，最终每孔细胞个数为4×10^{5}，继续放入培养箱中培养12小时，12小时后弃去原培养基，之后再加入1 mL相同浓度（20 μM）的Ce6-Leu和Ce6-Ac探针的培养基溶液，并设置空白对照组（对照组：未加入探针），放入培养箱继续孵育8小时。等到孵育时间结束后，弃去原先的培养基，用PBS清洗3遍，每遍5分钟，然后在每个孔中加入1 mL新鲜培养基，置于660 nm激光器下照射5分钟（对照组+$\lambda_{660\ nm}$：未加探针，单独照射660 nm激光；Ce6-Ac+$\lambda_{660\ nm}$：Ce6-Ac探针孵育8小时后，照射660 nm激光；Ce6-Leu+$\lambda_{660\ nm}$：Ce6-Leu探针孵育8小时后，照射660 nm激光），激光功率为0.15 W/cm^{2}，同时设置实验对照组（对照组：未加探针，未进行660 nm激光照射；Ce6-Ac：Ce6-Ac探针孵育8小时，但未进行660 nm激光照射；Ce6-Leu：Ce6-Leu探针孵育8小时后，但未进行660 nm激光照射）。将上述6组经过不同实验操作的细胞（对照组、对照组+$\lambda_{660\ nm}$、Ce6-Ac、Ce6-Ac+$\lambda_{660\ nm}$、Ce6-Leu、Ce6-Leu+$\lambda_{660\ nm}$），放入培养箱继续培养24小时，之后分别收集培养基和细胞，以1000 rpm的转数离心5分钟，弃去上清，用PBS重悬细胞后离心，取沉淀，重复此操作两次，然后将细胞吹打成单细

胞悬液，加入Annexin V-FITC/PI双染凋亡检测液（具体操作见试剂盒说明书），培养结束后用流式细胞仪检测肿瘤细胞的凋亡情况。

[0056] 如图8所示，相比于对照组的细胞，对照组+$\lambda_{660\ nm}$的细胞尽管进行了660 nm激光照射，但是细胞的存活情况几乎无影响，说明单纯的660 nm激光照射对细胞活性的影响很小。另外，Ce6-Ac和Ce6-Leu与细胞孵育8小时，几乎不影响细胞的活性，表明两组探针在实验浓度下对细胞的毒性很小，不会引起细胞的死亡。再对比Ce6-Ac+$\lambda_{660\ nm}$的细胞，只看到少量的细胞死亡，说明Ce6-Ac探针在细胞内仍然以聚集态的形势存在，只能产生微量的ROS，不能达到杀死肿瘤细胞的目的。而相比于Ce6-Leu+$\lambda_{660\ nm}$的细胞，Ce6-Leu探针具有响应性重组装的能力，在肿瘤细胞的微环境中探针在亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的刺激下可以发生分子间缩合反应而重新组装成纳米纤维，Ce6结构之间的距离变大，彼此之间的淬灭减弱从而产生单线态氧的能力恢复，故660 nm激光照射后，细胞内产生大量的ROS，导致大量细胞的死亡。

[0057] 实施例9：亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac尾静脉注射后不同时间点的小鼠荧光成像照片和对应的荧光信号值：分别取2组雌性荷有HepG2肿瘤的裸鼠（每组3只），进行气体麻醉后，置于小动物IVIS Lumina XRMS活体成像系统中进行小鼠自身背景荧光成像。然后通过尾静脉给其中一组（实验组）老鼠注射200 μL浓度为100 μM的Ce6-Leu的PBS缓冲溶液，另一组（对照组）小鼠经尾静脉注射200 μL浓度为100 μM的Ce6-Ac的PBS缓冲溶液。之后分别于不同的时间点（1、2、3、6、10、12和24 h）将两组老鼠放在上述小动物活体成像系统中进行成像。成像结束后通过IVIS活体成像分析软件进行图像处理并计算各个时间点两组老鼠肿瘤部位的荧光强度。

[0058] 如图9所示，探针Ce6-Leu在小鼠肿瘤内有较好的荧光增强效果。荧光成像图像（a）显示在3小时处达到荧光信号的高峰，并且图9（b）显示实验组（Ce6-Leu）的信号强度要明显大于对照组（Ce6-Ac）。这说明探针Ce6-Leu具有很好的肿瘤微环境的响应性，在肿瘤细胞中过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的刺激下可以发生响应性分子间缩合反应而重新组装成纳米纤维，Ce6结构之间的距离变大，彼此之间的淬灭减弱从而荧光恢复。

[0059] 实施例10：亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针Ce6-Leu和对照组探针Ce6-Ac在在体肿瘤光动力治疗方面的研究：将36只18 g左右重、后腿处荷有HepG2肿瘤的雌性裸鼠分成6组（每组6只），即Group1、Group2、Group3、Group4、Group5、Group6。

[0060] Group1：通过尾静脉给老鼠注射200 μL PBS溶液。

[0061] Group2：通过尾静脉给老鼠注射200 μL PBS溶液，注射3小时后，用功率为0.15 W/cm ^{2}的660 nm激光在肿瘤部位照射10分钟。

[0062] Group3：通过尾静脉注射的方式给老鼠注射200 μL浓度为200 μM的探针Ce6-Ac的PBS缓冲溶液。

[0063] Group4：通过尾静脉注射的方式给老鼠注射200 μL浓度为200 μM的探针Ce6-Ac的PBS缓冲溶液，注射3小时后，用功率为0.15 W/cm ^{2}的660 nm激光在肿瘤部位照射10分钟。

[0064] Group5：通过尾静脉注射的方式给老鼠注射200 μL浓度为200 μM的探针Ce6-Leu的PBS缓冲溶液。

[0065] Group6：通过尾静脉注射的方式给老鼠注射200 μL浓度为200 μM的探针Ce6-Leu的PBS缓冲溶液，注射3小时后，用功率为0.15 W/cm ^{2}的660 nm激光在肿瘤部位照射10分钟。

[0066] 在进行光动力治疗前，腹腔注射120 μL浓度为4%的水合氯醛水溶液对老鼠进行麻醉。治疗结束后将6组老鼠放置在相同的条件下进行饲养。并在24小时后各取每组老鼠中的一只摘取肿瘤，进行切片、HE染色和TUNEL染色，观察肿瘤细胞的凋亡情况。随后每两天对老鼠进行全身拍照观察，并对老鼠进行称重和测量肿瘤体积大小（肿瘤体积Vm=长×宽 ^{2}/2），观察14天后，对老鼠实施安乐死，然后将肿瘤剥离进行拍照。

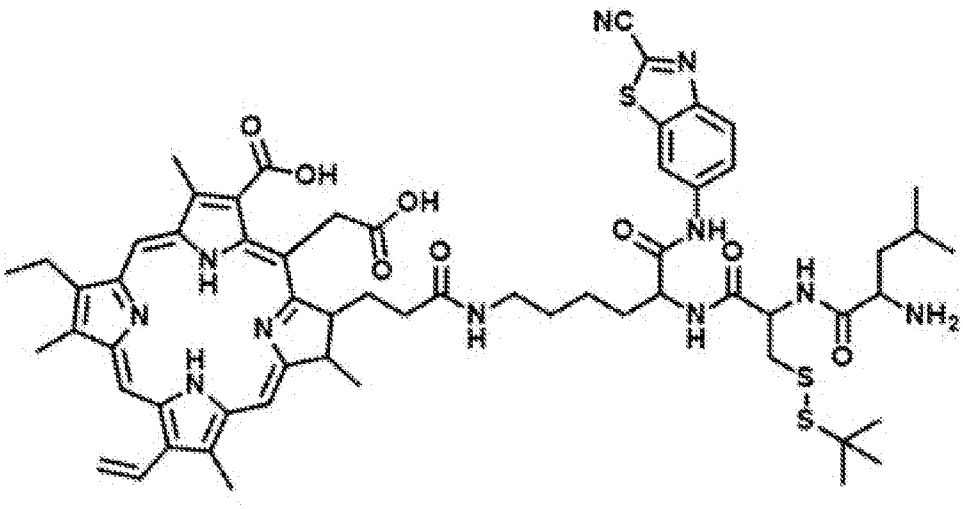
[0067] 如图10a的HE和TUNEL染色结果所示，给予相同功率（0.15 W/cm ^{2}）的660 nm激光照射相同的时间（10分钟），注射探针Ce6-Leu的老鼠（Group6）肿瘤部位的细胞凋亡情况要明显高于注射Ce6-Ac探针的老鼠（Group4）。而Group1、Group2、Group3、Group5组的肿瘤细胞没有出现明显的凋亡现象。该实验结果证明

探针Ce6-Leu在肿瘤部位有较好的响应性，并且通过其优异的ROS产生能力可以对肿瘤进行有效的治疗。从图10b记录的小鼠体重变化可以看出6组小鼠的体重在观察期间均稍有上升但是没有明显的差异，表明探针毒性小以及光动力治疗的损伤小，对小鼠机体没有造成损伤。并从图10d中可以看出在小鼠治疗14天后的离体肿瘤中，对照组、对照组+$\lambda_{660\ nm}$、Ce6-Ac、Ce6-Ac+$\lambda_{660\ nm}$、Ce6-Leu的小鼠肿瘤仍然存在，且体积比较大，而Ce6-Leu+$\lambda_{660\ nm}$组小鼠的肿瘤多数得到了较好的治愈，即便有复发，与其他5组相比明显较小，这与图10c和10e呈现的在体肿瘤测量和拍摄的小鼠照片的结果一致。图11为各组小鼠存活时间比较。上述实验均验证了探针Ce6-Leu是一个优异的光动力治疗试剂。

[0068] 本发明属于肿瘤微环境介导的重组装技术领域，涉及一种亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针及其制备方法和应用。主要利用实体瘤中过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽来刺激球形纳米颗粒重组装形成纳米纤维，以此来提高探针在肿瘤细胞及在体成像检测中的特异性和准确性，实现肿瘤的特异性荧光成像，以及有效提高肿瘤的光动力治疗效果。诊疗一体化作为一种将疾病的诊断、监测和治疗结合的新兴肿瘤诊疗策略，为人类克服癌症带来了新的希望；并且该策略效率高，毒副作用小的优点有望推动癌症诊断和治疗技术的快速发展。为了克服传统诊疗分子探针的缺点，构建一种肿瘤微环境响应型近红外分子探针，利用肿瘤细胞中过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽触发缩合反应，进而进行重组装，使得探针在肿瘤部位荧光和产生ROS的能力的特异性恢复，进而有效的改善肿瘤的成像和治疗效果。它具有以下几个优点：首先，该缩合反应高效、温和、速度快、选择性高；第二，当探针进入肿瘤细胞后，在肿瘤细胞中过表达的亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽的刺激下，暴露半胱氨酸结构中原有的氨基和巯基，从而发生点击缩合反应，不受外界环境影响。因而使近红外光敏剂探针在生物等领域有进一步应用。

权利要求书

[权利要求 1] 一种亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针，其特征在于，所述亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针具有如下化学结构式：



。

[权利要求 2] 权利要求1所述亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针在制备肿瘤诊断和/或治疗试剂中的应用。

[权利要求 3] 根据权利要求2所述的应用，其特征在于，所述亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针在肿瘤外为纳米颗粒结构，在肿瘤内为纳米纤维结构。

[权利要求 4] 根据权利要求2所述的应用，其特征在于，所述治疗为光动力治疗。

[权利要求 5] 权利要求1所述亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

（1）化合物1与NH_2-CBT反应得到化合物2；

（2）化合物2脱掉保护基得到化合物3；

（3）化合物3与N-芴甲氧羰基-S-叔丁硫基-L-半胱氨酸反应，得到化合物4；

（4）化合物4脱去保护基团得到化合物5；

（5）化合物5与光敏剂反应，得到化合物6；

（6）化合物6脱掉保护基得到化合物7；

（7）化合物7与N-叔丁氧羰基-L-亮氨酸反应得到化合物8；

（8）化合物8脱掉保护基得到亮氨酸氨基肽酶和谷胱甘肽双重刺激响应型探针。

[权利要求 6] 根据权利要求5所述的制备方法，其特征在于，化合物1与NH_2-CBT的摩尔比为1：1.2；化合物2脱去保护基团在N,N-二甲基甲酰胺/哌啶混合溶剂中进行；化合物3与N-芴甲氧羰基-S-叔丁硫基-L-半胱氨酸的摩尔比为1:1.2。

[权利要求 7] 根据权利要求5所述的制备方法，其特征在于，化合物4脱去保护基团在二氯甲烷/三氟乙酸混合溶剂中进行；化合物5与NHS活化的光敏剂的摩尔比为1.1：1。

[权利要求 8] 根据权利要求5所述的制备方法，其特征在于，所述光敏剂为二氢卟吩E6。

[权利要求 9] 根据权利要求5所述的制备方法，其特征在于，化合物6脱去保护基团在N,N-二甲基甲酰胺/哌啶混合溶剂中进行；化合物7与N-叔丁氧羰基-L-亮氨酸的摩尔比为1：1.2；化合物8脱去保护基团在二氯甲烷/三氟乙酸混合溶剂中进行。

[权利要求 10] 根据权利要求5所述的制备方法，其特征在于，反应在室温下进行。

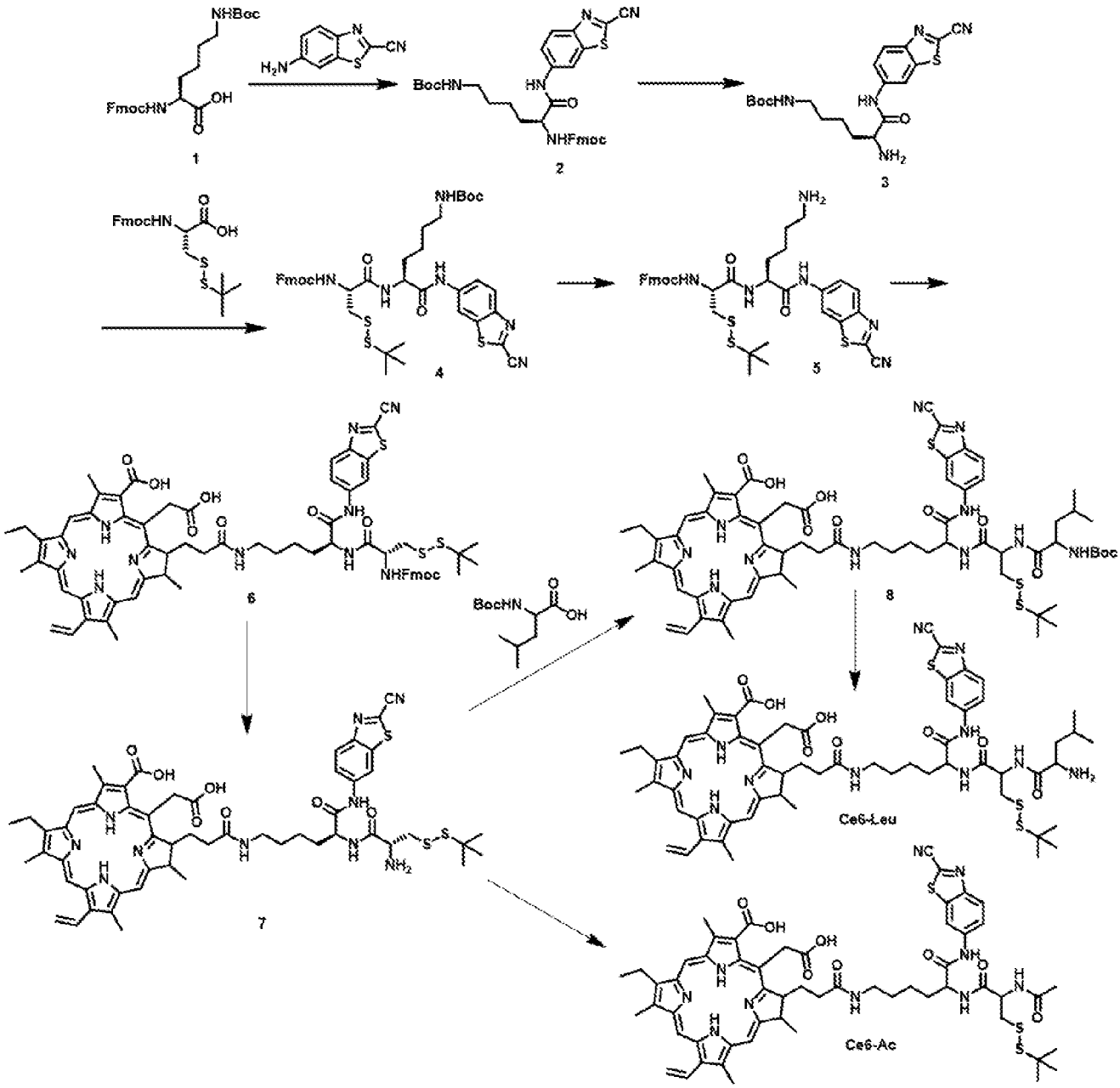

NHBoc
FmocHN
OH
1
H_2N
CN
BocHN
HN
NHFmoc
2
3
NH_2
4
5
6
7
8
Ce6-Leu
Ce6-Ac

图 1

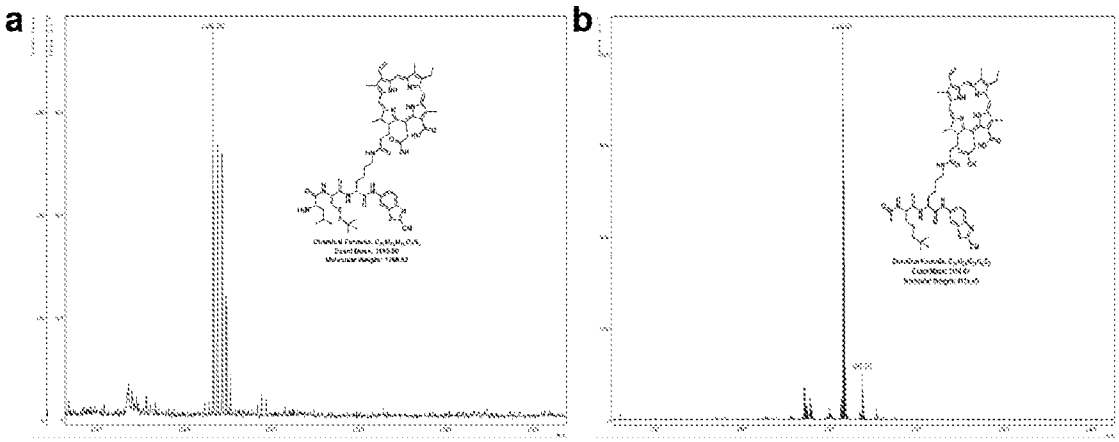

a
b

图 2

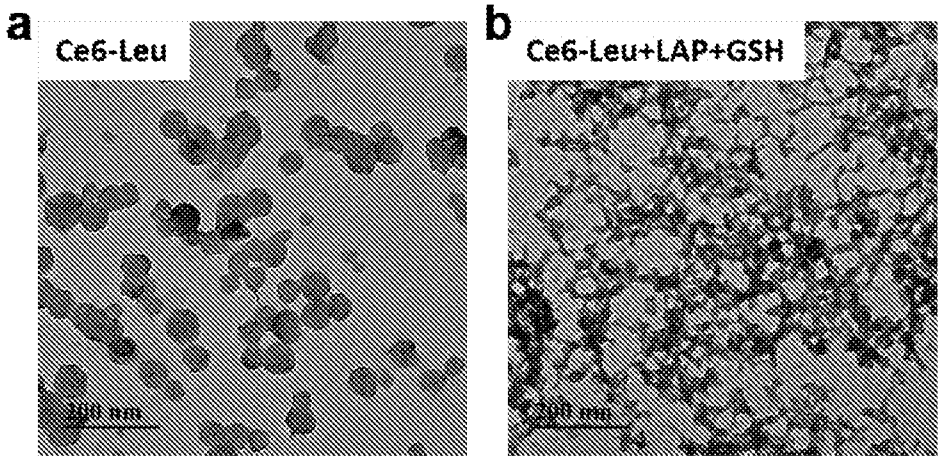

a
Ce6-Leu
200 nm
b
Ce6-Leu+LAP+GSH
200 nm

图3

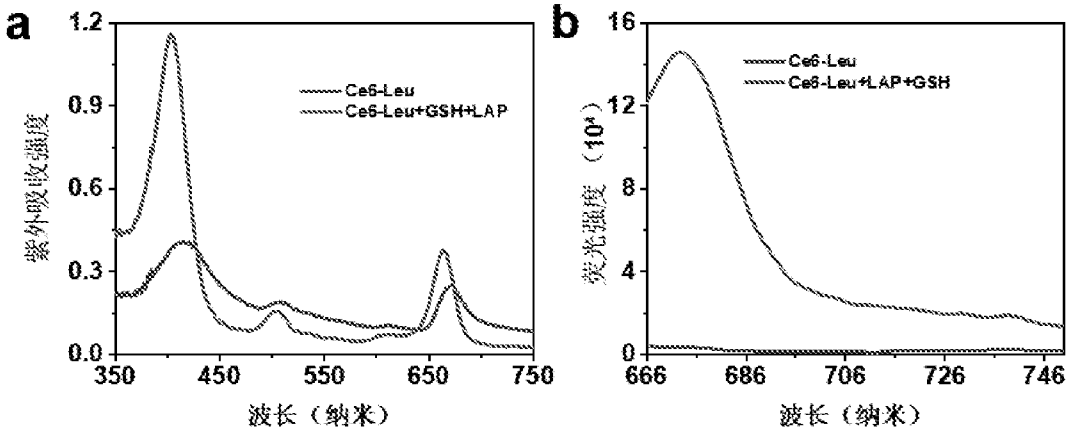

a
紫外吸收强度
Ce6-Leu
Ce6-Leu+GSH+LAP
波长（纳米）
b
荧光强度（10⁴）
Ce6-Leu
Ce6-Leu+LAP+GSH
波长（纳米）

图4

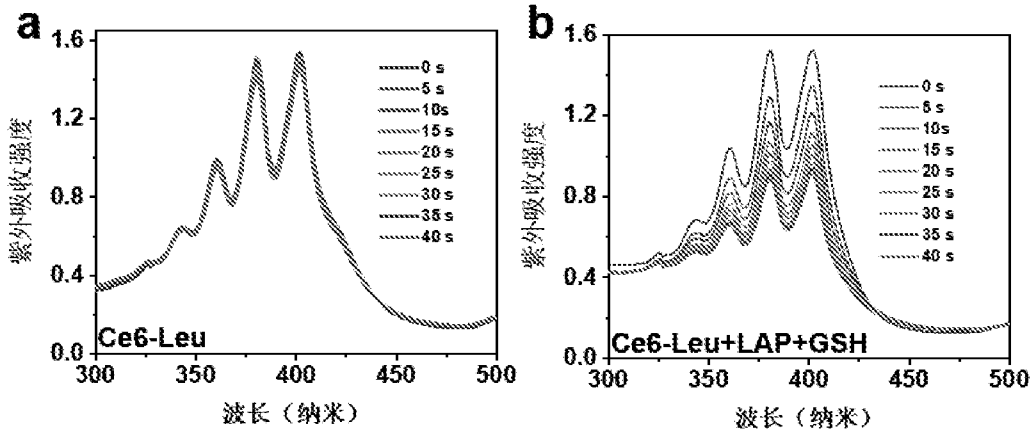

a
紫外吸收强度
0 s
5 s
10s
15 s
20 s
25 s
30 s
35 s
40 s
Ce6-Leu
波长（纳米）
b
紫外吸收强度
Ce6-Leu+LAP+GSH
波长（纳米）

图5

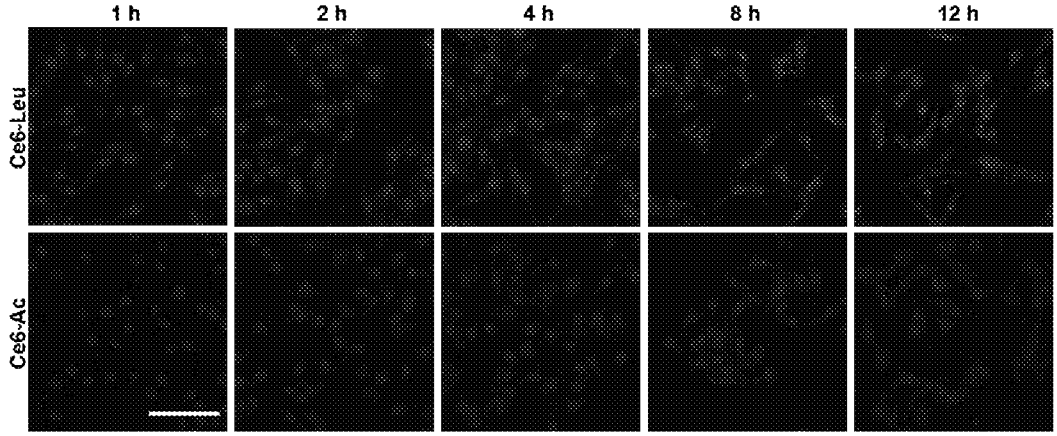

1 h
2 h
4 h
8 h
12 h
Ce6-Leu
Ce6-Ac

图6

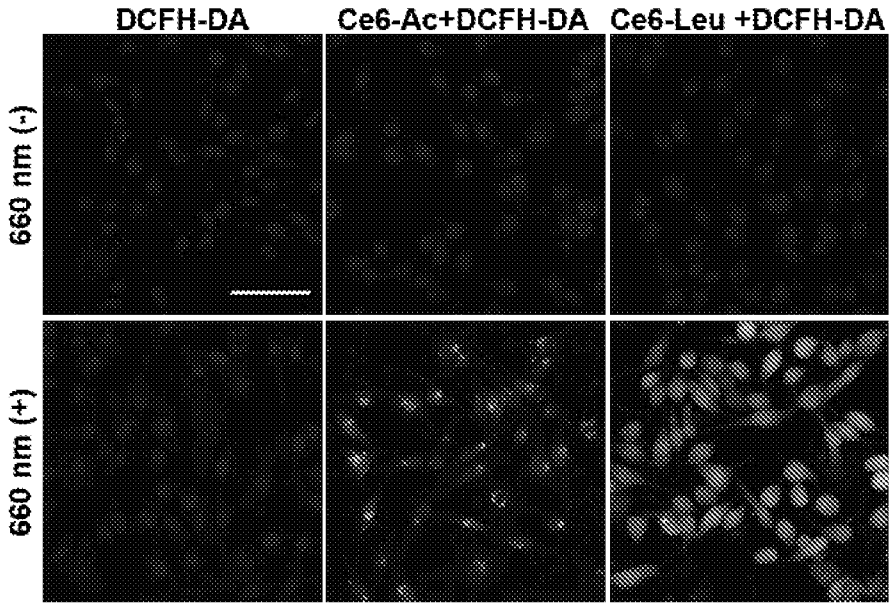

DCFH-DA
Ce6-Ac+DCFH-DA
Ce6-Leu +DCFH-DA
660 nm (-)
660 nm (+)

图7

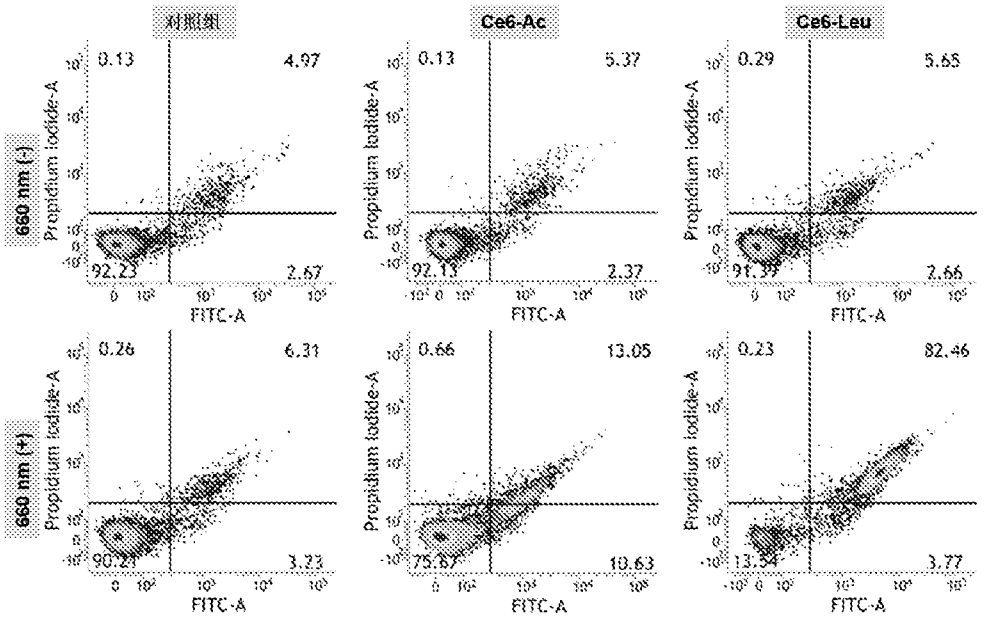

对照组
Ce6-Ac
Ce6-Leu
660 nm (-)
660 nm (+)
Propidium Iodide-A
FITC-A
0.13
4.97
92.23
2.67
0.13
5.37
92.13
2.37
0.29
5.65
91.39
2.66
0.26
6.31
90.27
3.23
0.66
13.05
75.87
10.63
0.23
82.46
13.54
3.77

图8

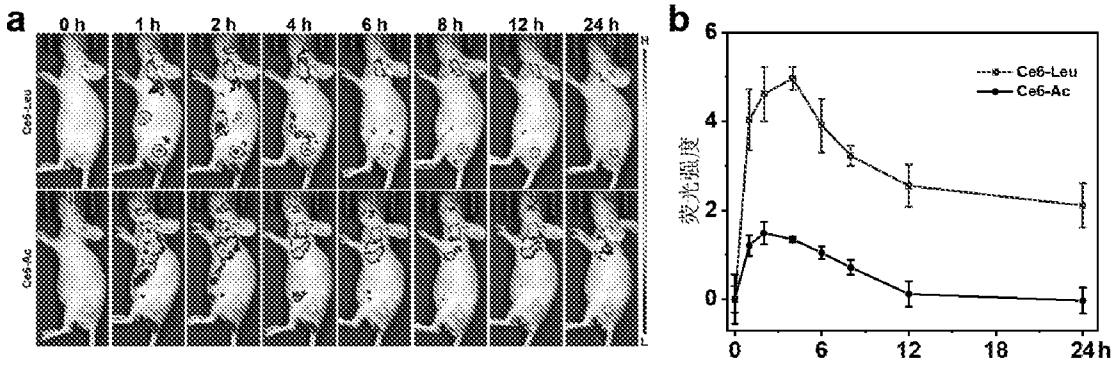

a
0 h
1 h
2 h
4 h
6 h
8 h
12 h
24 h
Ce6-Leu
Ce6-Ac
b
Ce6-Leu
Ce6-Ac
荧光强度
0
2
4
6
0
6
12
18
24h

图9

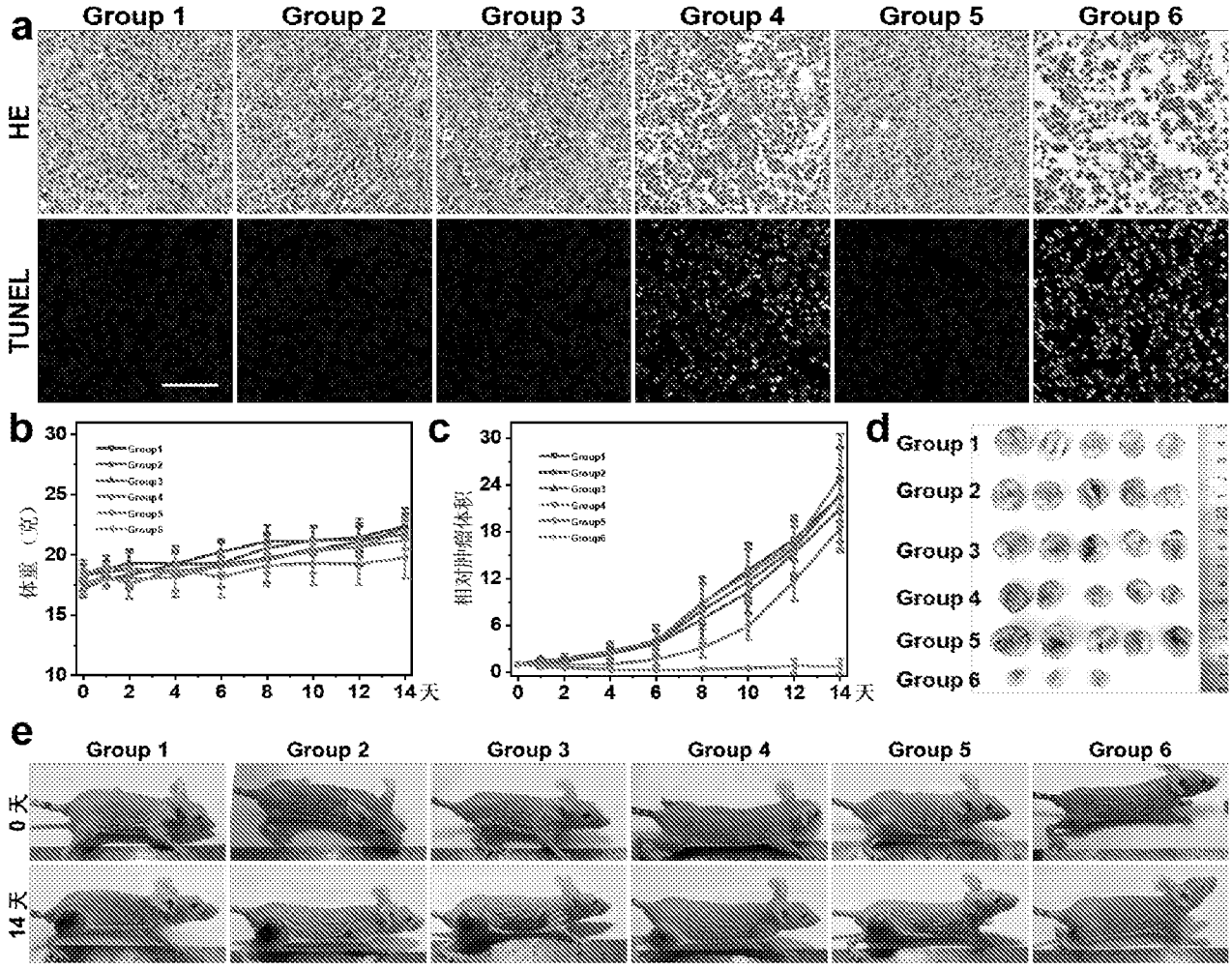

a
Group 1
Group 2
Group 3
Group 4
Group 5
Group 6
HE
TUNEL
b
体重（克）
Group1
Group2
Group3
Group4
Group5
Group6
0 2 4 6 8 10 12 14天
c
相对肿瘤体积
0 2 4 6 8 10 12 14天
d
Group 1
Group 2
Group 3
Group 4
Group 5
Group 6
e
Group 1
Group 2
Group 3
Group 4
Group 5
Group 6
0 天
14 天

图10

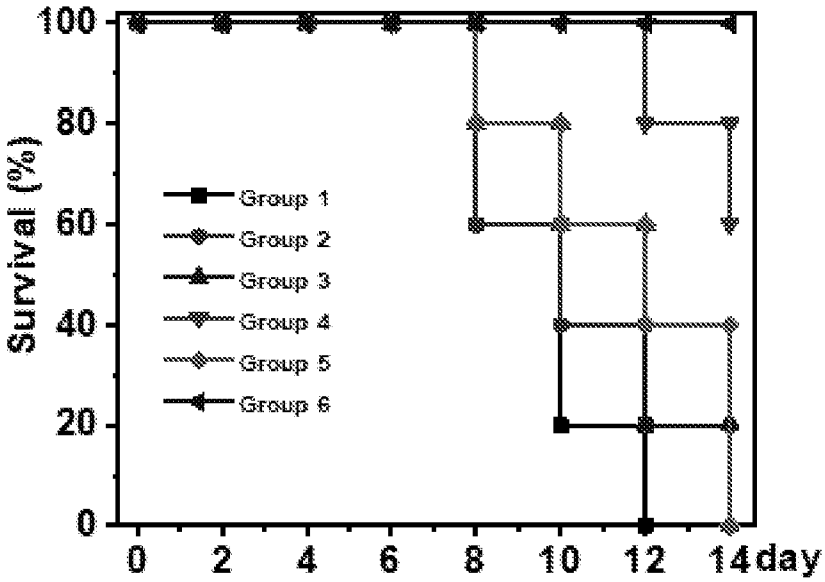

Survival (%)
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
day
Group 1
Group 2
Group 3
Group 4
Group 5
Group 6

图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/140245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 5/083(2006.01)i; C07K 1/107(2006.01)i; A61K 41/00(2020.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61K 47/69(2017.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61K 49/10(2006.01)i; A61K 49/14(2006.01)i; A61K 49/18(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; B82Y 5/00(2011.01)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)

C07K5/-, C07K1/-, A61K41/-, A61K47/-, A61K49/-, A61P35/-, B82Y5/-

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: 苏州大学, 王安娜, 史海斌, 亮氨酸氨基肽酶, 谷胱甘肽, 探针, 纳米颗粒, 亮氨酸, 半胱氨酸, 叔丁硫基, 光敏剂, 二氢卟吩, 癌症, 肿瘤, leucine aminopeptidase, glutathione, LAP, GSH, probe, nanoparticle, leucine, cysteine, tert-butylthio, photosensitizer, chlorin, cancer, tumors, 权利要求1化合物的structural formula search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WANG, Anna et al. "Assembly Transformation Jointly Driven by the LAP Enzyme and GSH Boosting Theranostic Capability for Effective Tumor Therapy" *ACS Applied Materials & Interfaces,* Vol. 13,, No. 50, 13 December 2021 (2021-12-13), ISSN: 1944-8244, 59787-59802	1-10
A	王安娜 (WANG, Anna). "肿瘤微环境响应型智能分子探针的构建及诊疗应用的研究 (Development of Tumor Microenvironment-responsive Probes for Tumor Theranostics Application)" *中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士)工程科技I辑 (Chinese Doctoral Dissertations and Master's Theses Full-text Database (Master), Engineering Sciences I),* No. 06, 15 June 2020 (2020-06-15), ISSN: 1674-0246, B014-941	1-10
A	CN 105694851 A (WUHAN UNIVERSITY) 22 June 2016 (2016-06-22) abstract, and claims 1-10	1-10

☑ 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	Date of mailing of the international search report
01 July 2022	**17 August 2022**
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.
A	WU, Dan et al. "A two-dimensional molecular beacon for mRNA-activated intelligent cancer theranostics" *Chem. Sci.,* Vol. 6, No. 7, 08 April 2015 (2015-04-08), ISSN: 2041-6520, pp. 3839-3844	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/140245

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 105694851 A	22 June 2016	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/140245

A. 主题的分类

C07K 5/083(2006.01)i; C07K 1/107(2006.01)i; A61K 41/00(2020.01)i; A61K 47/64(2017.01)i; A61K 47/69(2017.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61K 49/10(2006.01)i; A61K 49/14(2006.01)i; A61K 49/18(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; B82Y 5/00(2011.01)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)

C07K5/-, C07K1/-, A61K41/-, A61K47/-, A61K49/-, A61P35/-, B82Y5/-

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, EPODOC, ISI Web of Knowledge, Registry, Caplus: 苏州大学，王安娜，史海斌，亮氨酸氨基肽酶，谷胱甘肽，探针，纳米颗粒，亮氨酸，半胱氨酸，叔丁硫基，光敏剂，二氢卟吩，癌症，肿瘤，leucine aminopeptidase, glutathione, LAP, GSH, probe, nanoparticle, leucine, cysteine, tert-butylthio, photosensitizer, chlorin, cancer, tumors，权利要求1化合物的结构式检索

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
PX	WANG, Anna 等. "Assembly Transformation Jointly Driven by the LAP Enzyme and GSH Boosting Theranostic Capability for Effective Tumor Therapy" ACS Applied Materials & Interfaces, 第13卷，第50期，2021年12月13日 (2021-12-13), ISSN: 1944-8244, 59787-59802	1-10
A	王安娜. "肿瘤微环境响应型智能分子探针的构建及诊疗应用的研究" 中国优秀博硕士学位论文全文数据库(硕士) 工程科技Ⅰ辑, 第06期，2020年6月15日 (2020-06-15), ISSN: 1674-0246, B014-941	1-10
A	CN 105694851 A (武汉大学) 2016年6月22日 (2016-06-22) 摘要，权利要求1-10	1-10

☑ 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	国际检索报告邮寄日期
2022年7月1日	2022年8月17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

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/140245

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
A	WU, Dan 等. "A two-dimensional molecular beacon for mRNA-activated intelligent cancer theranostics" Chem.Sci., 第6卷, 第7期, 2015年4月8日 (2015-04-08), ISSN: 2041-6520, 第3839-3844页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/140245

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)
CN 105694851 A	2016年6月22日	无	