



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113683737 B

(45) 授权公告日 2022.06.21

(21) 申请号 202110973106.X

G01N 21/64 (2006.01)

(22) 申请日 2021.08.24

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113683737 A

CN 108033907 A, 2018.05.15

CN 111040060 A, 2020.04.21

US 6048982 A, 2000.04.11

(43) 申请公布日 2021.11.23

CN 111393544 A, 2020.07.10

(73) 专利权人 合肥工业大学

CN 108383960 A, 2018.08.10

CN 104448108 A, 2015.03.25

地址 230000 安徽省合肥市屯溪路193号

(72) 发明人 张燕 何涛 杨正川 夏彬  
曹葆强 孙天赐 黄吟秋

楚宁宁等. 吡啶七甲川类荧光探针在生物体应用的研究现状.《化学学报》.2013, (第11期), 第1459-1476页.

(74) 专利代理机构 合肥昊晟德专利代理事务所  
(普通合伙) 34153

Li, YL等. Development of a water-soluble near-infrared fluorescent probe for endogenous cysteine imaging.

专利代理师 王林

《Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy》.2019, 第226卷 117544.

(51) Int. Cl.

C08F 283/06 (2006.01)

C08F 236/22 (2006.01)

C09K 11/02 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

审查员 聂聪

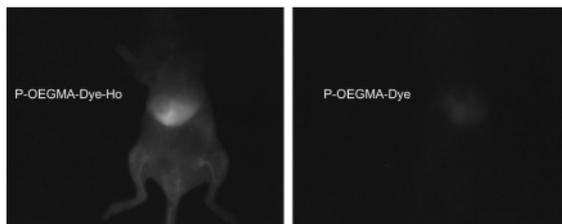
权利要求书1页 说明书4页 附图4页

## (54) 发明名称

一种聚合物荧光探针、制备方法及其应用

## (57) 摘要

本发明涉及荧光探针技术领域,具体涉及一种聚合物荧光探针、制备方法及其应用。通过自由基聚合将亲水性单体、菁类染料单体共聚为亲水性染料聚合物,再通过取代反应接枝上镧系元素的配合物,通过镧系元素与菁类染料能量转移作用,实现菁类染料在近红外二区的尾峰发射增强。该聚合物荧光探针具有良好的水溶性和生物相容性,拥有优良近红外二区荧光成像效果。



1. 一种聚合物荧光探针的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1:制备菁类染料单体:通过取代反应在菁类染料上引入含双键基团,使其能够参与自由基聚合;

S2:制备染料聚合物:通过自由基聚合,将步骤S1中得到的菁类染料单体与亲水性单体共聚,得到亲水性的染料聚合物,所述亲水性单体为重均分子量 $M_w=300$ 的聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯、重均分子量 $M_w=360$ 的聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟乙酯中的任意一种;

S3:制备镧系配合物:将螯合物和镧系元素的盐溶于去离子水中,升温并调节pH至7~8后搅拌,得到镧系配合物;

S4:制备聚合物荧光探针:通过取代反应,在步骤S2中得到的亲水性的染料聚合物上引入步骤S3中得到的镧系配合物,通过透析除去未反应的镧系配合物后,干燥得到聚合物荧光探针。

2. 如权利要求1所述的一种聚合物荧光探针的制备方法,其特征在于,所述步骤S1中菁类染料为IR-783, IR-808, ICG, IR-820及IR-783、IR-808、ICG、IR-820衍生物中的任意一种。

3. 如权利要求1所述的一种聚合物荧光探针的制备方法,其特征在于,所述步骤S2中菁类染料单体和亲水性单体的摩尔比为1:50~50000。

4. 如权利要求1所述的一种聚合物荧光探针的制备方法,其特征在于,所述步骤S2中得到的菁类染料聚合物的平均分子量为2000~40000。

5. 如权利要求1所述的一种聚合物荧光探针的制备方法,其特征在于,所述步骤S3中螯合物为DTPA、DOTA、DO3A、NOTA、NTA、EDTA及DTPA、DOTA、DO3A、NOTA、NTA、EDTA衍生物中的任意一种。

6. 如权利要求1所述的一种聚合物荧光探针的制备方法,其特征在于,所述步骤S3中镧系元素的盐为 $CeCl_3$ 、 $NdCl_3$ 、 $SmCl_3$ 、 $EuCl_3$ 、 $GdCl_3$ 、 $TbCl_3$ 、 $DyCl_3$ 、 $HoCl_3$ 、 $ErCl_3$ 、 $TmCl_3$ 、 $YbCl_3$ 及 $CeCl_3$ 、 $NdCl_3$ 、 $SmCl_3$ 、 $EuCl_3$ 、 $GdCl_3$ 、 $TbCl_3$ 、 $DyCl_3$ 、 $HoCl_3$ 、 $ErCl_3$ 、 $TmCl_3$ 、 $YbCl_3$ 水合物中的任意一种。

7. 如权利要求1所述的一种聚合物荧光探针的制备方法,其特征在于,所述步骤S4中染料聚合物和镧系配合物的摩尔比为1:1~500。

8. 一种采用如权利要求1~7任一项所述的制备方法制得的聚合物荧光探针。

9. 一种如权利要求8所述的聚合物荧光探针在近红外二区生物成像领域中的应用。

## 一种聚合物荧光探针、制备方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及荧光探针技术领域,具体涉及一种聚合物荧光探针、制备方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 近年来,近红外二区光学窗口(NIR-II,1000-1700nm)荧光成像在生物医学等领域得到了广泛的研究与应用,例如肝功能的评估,监测性关节炎中的治疗反应,非特异性肿瘤靶向和图像介导肿瘤治疗等。

[0003] 与波长较短的可见光区域(VIS,400-650nm)和近红外一区(NIR-I,650-1000nm)相比,近红外二区成像能够减少生物组织光散射,降低组织自发荧光,因此极大地提高了信噪比(SNR)、成像分辨率和组织穿透深度,开发新的近红外二区荧光成像材料已经成为研究的热点。目前近红外二区荧光成像材料可分为无机材料和有机材料,其中有机材料包括有机小分子和共轭聚合物。无机材料通常含有重金属离子或常用两亲性聚合物包覆,在体内应用时易发生泄漏和分离,具有不可忽略的潜在毒性;有机小分子因其具有较好的生物相容性、易于体内排泄等优势已被应用于近红外二区成像中。然而,目前可用的有机小分子在水溶液中易产生聚集而导致严重的荧光猝灭;共轭聚合物因其具有高摩尔消光系数、易于制备等优点而受到广泛关注,但是目前大部分共轭聚合物荧光探针的水溶性较差;这些缺点很大程度上限制了荧光探针在近红外二区生物成像中的应用。

[0004] 鉴于上述缺陷,本发明创作者经过长时间的研究和实践终于获得了本发明。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于解决目前近红外二区荧光成像材料中有机小分子在水溶液中易产生聚集而导致严重的荧光猝灭,共轭聚合物荧光探针水溶性较差限制了荧光探针在近红外二区生物成像中的应用的的问题,提供了一种聚合物荧光探针、制备方法及其应用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明公开了一种聚合物荧光探针的制备方法,包括以下步骤:

[0007] S1:制备菁类染料单体:通过取代反应在菁类染料上引入含双键基团,使其能够参与自由基聚合;

[0008] S2:制备染料聚合物:通过自由基聚合,将步骤S1中得到的菁类染料单体与亲水性单体共聚,得到亲水性的染料聚合物;

[0009] S3:制备镧系配合物:将螯合物和镧系元素的盐溶于去离子水中,升温并调节pH至7~8后搅拌,得到镧系配合物;

[0010] S4:制备聚合物荧光探针:通过取代反应,在步骤S2中得到的亲水性的染料聚合物上引入步骤S3中得到的镧系配合物,通过透析除去未反应的镧系配合物后,干燥得到聚合物荧光探针。

[0011] 所述步骤S1中菁类染料为IR-783,IR-808,ICG,IR-820及IR-783、IR-808、ICG、IR-

820衍生物中的任意一种。

[0012] 所述步骤S2中亲水性单体为重均分子量 $M_w=300$ 的聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯、重均分子量 $M_w=360$ 的聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸羟乙酯、丙烯酸羟乙酯中的任意一种。

[0013] 所述步骤S2中菁类染料单体和亲水性单体的摩尔比为1:50~50000。

[0014] 所述步骤S2中得到的菁类染料聚合物的平均分子量为2000~40000。

[0015] 所述步骤S3中螯合剂为DTPA、DOTA、D03A、NOTA、NTA、EDTA及DTPA、DOTA、D03A、NOTA、NTA、EDTA衍生物中的任意一种。

[0016] 所述步骤S3中镧系元素的盐为 $CeCl_3$ 、 $NdCl_3$ 、 $SmCl_3$ 、 $EuCl_3$ 、 $GdCl_3$ 、 $TbCl_3$ 、 $DyCl_3$ 、 $HoCl_3$ 、 $ErCl_3$ 、 $TmCl_3$ 、 $YbCl_3$ 及 $CeCl_3$ 、 $NdCl_3$ 、 $SmCl_3$ 、 $EuCl_3$ 、 $GdCl_3$ 、 $TbCl_3$ 、 $DyCl_3$ 、 $HoCl_3$ 、 $ErCl_3$ 、 $TmCl_3$ 、 $YbCl_3$ 水合物中的任意一种。

[0017] 所述步骤S4中染料聚合物和镧系配合物的摩尔比为1:1~500。

[0018] 本发明还公开了一种采用上述制备方法制得的聚合物荧光探针以及这种聚合物荧光探针在近红外二区生物成像领域中的应用。

[0019] 通过上述制备方法制得的镧系配合物增强菁类染料在近红外二区发射的聚合物荧光探针,由于含有大量的亲水性链段,溶解在水中形成大量的氢键,菁类染料倾向于与非水溶性的主链形成组装,从而形成扭曲的分子内电荷转移,导致菁类染料的发射红移。菁类染料由于聚合被固定到聚合物链上,有效地减少了菁类染料在水中的自组装导致的聚集淬灭效应,有效地提升了菁类染料的发射强度。由于镧系元素的4f-4f能级跃迁,发射和吸收与菁类染料产生重叠,导致镧系元素与菁类染料发生荧光共振能量转移。此外,由于亲水性链段可以自由转动,连接到亲水性链段上的镧系配合物与菁类染料发射快速系统间交互,从而产生三线态-三线态的能量转移。相比于游离的菁类染料,这些因素导致了所述的聚合物荧光探针在近红外二区尾峰发射发生大幅度增强,使这些原本在近红外二区发射极弱的菁类染料能够用于近红外二区荧光成像。

[0020] 与现有技术比较,本发明的有益效果在于:

[0021] (1) 本发明利用价格较为低廉的菁类染料作为原料,达到了非常好的近红外二区荧光成像效果,相较于普通的近红外二区有机荧光团,避免了繁复的有机合成步骤;

[0022] (2) 本发明的聚合物荧光探针,具有良好的水溶性和生物相容性;

[0023] (3) 本发明的聚合物荧光探针,可通过调节镧系元素的种类调节荧光强度,以应对不同的应用场景。

## 附图说明

[0024] 图1为本发明实施例1制备的小分子荧光染料单体MA-IR-808的 $^1H$ -NMR图;

[0025] 图2为本发明实施例1制备的染料聚合物P-OEGMA-Dye的 $^1H$ -NMR图;

[0026] 图3为本发明实施例1~2制备的聚合物荧光探针P-OEGMA-Dye-Ln ( $Ln=Sm^{3+}, Eu^{3+}, Tb^{3+}, Ho^{3+}, Tm^{3+}$ ) 在808nm激发下的荧光发射光谱图;

[0027] 图4为本发明实施例1~2制备的聚合物荧光探针P-OEGMA-Dye-Ln ( $Ln=Sm^{3+}, Eu^{3+}, Tb^{3+}, Ho^{3+}, Tm^{3+}$ ) 在808nm激发下的荧光成像图片(1250nm滤光片下);

[0028] 图5为将实施例1获得的P-OEGMA-Dye-Ho和P-OEGMA-Dye按照IR-808有效含量为20

$\mu\text{g}$ 注射入BLAB/c小鼠体内,在近红外二区荧光成像仪下观察成像效果图。

### 具体实施方式

[0029] 以下结合附图,对本发明上述的和另外的技术特征和优点作更详细的说明。

#### [0030] 实施例1

[0031] 本实施例按如下步骤进行小分子荧光染料单体的制备:

[0032] S1:将IR-808 (100mg, 0.12mmol) 以及称取的N,N'-二环己基碳二亚胺 (50mg, 0.24mmol, DCC) 和2-氨基乙基甲基丙烯酸酯盐酸盐 (100mg, 0.6mmol) 溶解在10mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中,并转入连接Schlenk管的聚合瓶。通入氮气保护以排除体系中氧气,40°C下油浴避光反应24h。反应结束后旋干DMF并用10mL去离子水复溶,然后将溶液转入1000D透析袋中水浴避光透析48h。透析结束后旋干水,真空干燥,获得95mg MA-IR-808小分子荧光染料单体。图1为MA-IR-808的 $^1\text{H}$ -NMR图。

[0033] S2:4-氰基-4-(苯基硫代甲酰硫基)戊酸 (70mg, 0.25mmol, CTA-COOH), 聚乙二醇甲基丙烯酸酯单体 (4.5g, 12.5mmol, OEGMA-OH,  $M_w=360$ ), MA-IR-808 (12.5mg, 0.0125mmol) 以及偶氮二异丁腈 (8.2mg, 0.05mmol, AIBN) 溶解在20mL DMF中,并转入连接Schlenk管的聚合瓶。在氮气保护,液氮冷冻条件下,通过标准的冷冻-充氮-除氧-解冻三次冻融循环过程,除氧。操作完成后,70°C下油浴避光聚合12h,反应结束后旋干DMF并用10mL四氢呋喃 (THF) 复溶。然后将溶液缓慢滴加至200mL正己烷中沉降,真空干燥,获得4g P-OEGMA-Dye染料聚合物。图2为P-OEGMA-Dye的 $^1\text{H}$ -NMR图。

[0034] S3:将2g  $\text{HoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和2g DTPA溶于20mL去离子水中,用4M NaOH水溶液调节pH为7~8,60°C搅拌反应12h,即得Ho-DTPA水溶液。

[0035] S4:将Ho-DTPA水溶液与1g P-OEGMA-Dye共溶,加入2g EDC和1g Hobt,40°C搅拌反应24h。反应结束后离心除去不溶物,随后透析48h。充分干燥后即得P-OEGMA-Dye-Ho聚合物荧光探针。

#### [0036] 实施例2

[0037] S1:将IR-808 (200mg, 0.24mmol) 以及称取的N,N'-二环己基碳二亚胺 (100mg, 0.48mmol, DCC) 和2-氨基乙基甲基丙烯酸酯盐酸盐 (200mg, 1.2mmol) 溶解在20mL DMF中,并转入连接Schlenk管的聚合瓶。通入氮气保护以排除体系中氧气,40°C下油浴避光反应24h。反应结束后旋干DMF并用20mL去离子水复溶,然后将溶液转入1000D透析袋中水浴避光透析48h。透析结束后旋干水,真空干燥,获得200mg MA-IR-808小分子荧光染料单体。

[0038] S2:4-氰基-4-(苯基硫代甲酰硫基)戊酸 (140mg, 0.5mmol, CTA-COOH), 聚乙二醇甲基丙烯酸酯单体 (9g, 25mmol, OEGMA-OH,  $M_w=360$ ), MA-IR-808 (25mg, 0.025mmol) 以及偶氮二异丁腈 (16mg, 0.1mmol, AIBN) 溶解在30mL DMF中,并转入连接Schlenk管的聚合瓶。在氮气保护,液氮冷冻条件下,通过标准的冷冻-充氮-除氧-解冻三次冻融循环过程,除氧。操作完成后,70°C下油浴避光聚合12h,反应结束后旋干DMF并用20mL THF复溶。然后将溶液缓慢滴加至400mL正己烷中沉降,真空干燥,获得8g P-OEGMA-Dye染料聚合物。

[0039] S3:将2g  $\text{SmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和2g DTPA溶于20mL去离子水中,用4M NaOH水溶液调节pH为7~8,60°C搅拌反应12h,即得Sm-DTPA水溶液。Eu-DTPA、Tb-DTPA、Tm-DTPA以相同方法获得。

[0040] S4:将Sm-DTPA水溶液与1g P-OEGMA-Dye共溶,加入2g EDC和1g Hobt,40°C搅拌反

应24h。反应结束后离心除去不溶物,随后透析48h。充分干燥后即得P-OEGMA-Dye-Sm、P-OEGMA-Dye-Eu、P-OEGMA-Dye-Tb和P-OEGMA-Dye-Tm以相同方法获得。

[0041] 将实施例1获得的P-OEGMA-Dye-Ho和实施例2获得的P-OEGMA-Dye-Sm、P-OEGMA-Dye-Eu、P-OEGMA-Dye-Tb、P-OEGMA-Dye-Tm按照IR-808有效浓度为10 $\mu$ g/mL溶于去离子水中,测试荧光发射光谱,测试条件为:808nm激光光源,1W激发光功率,3nm光栅,荧光发射光谱如图3所示。

[0042] 将实施例1获得的P-OEGMA-Dye-Ho和实施例2获得的P-OEGMA-Dye-Sm、P-OEGMA-Dye-Eu、P-OEGMA-Dye-Tb、P-OEGMA-Dye-Tm按照IR-808有效浓度为10 $\mu$ g/mL溶于去离子水中,在近红外二区荧光成像仪下观察成像效果,测试条件为:808nm激光光源,1W激发光功率,50ms曝光时间,1250nm滤光片,成像效果如图4所示。

[0043] 将实施例1获得的P-OEGMA-Dye-Ho和P-OEGMA-Dye按照IR-808有效含量为20 $\mu$ g注射入BLAB/c小鼠体内,在近红外二区荧光成像仪下观察成像效果,测试条件为:808nm激光光源,1W激发光功率,50ms曝光时间,1250nm滤光片,成像效果如图5所示。

[0044] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,对本发明而言仅仅是说明性的,而非限制性的。本专业技术人员理解,在本发明权利要求所限定的精神和范围内可对其进行许多改变,修改,甚至等效,但都将落入本发明的保护范围内。

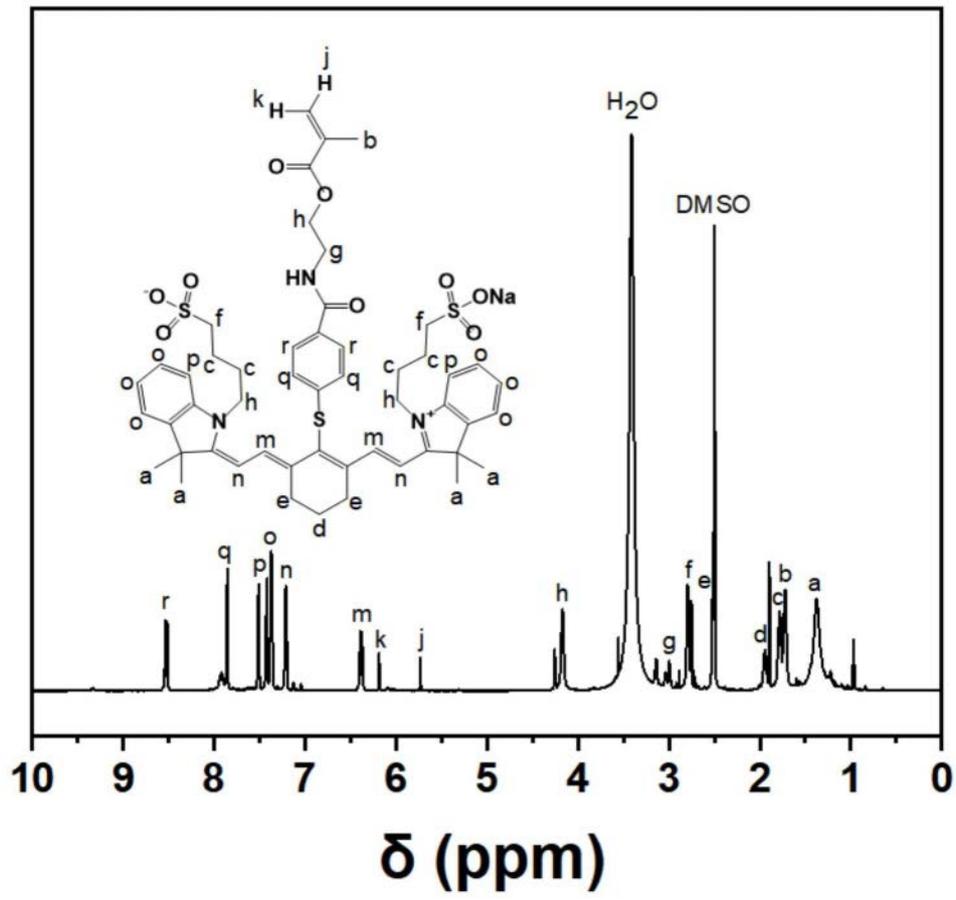


图1

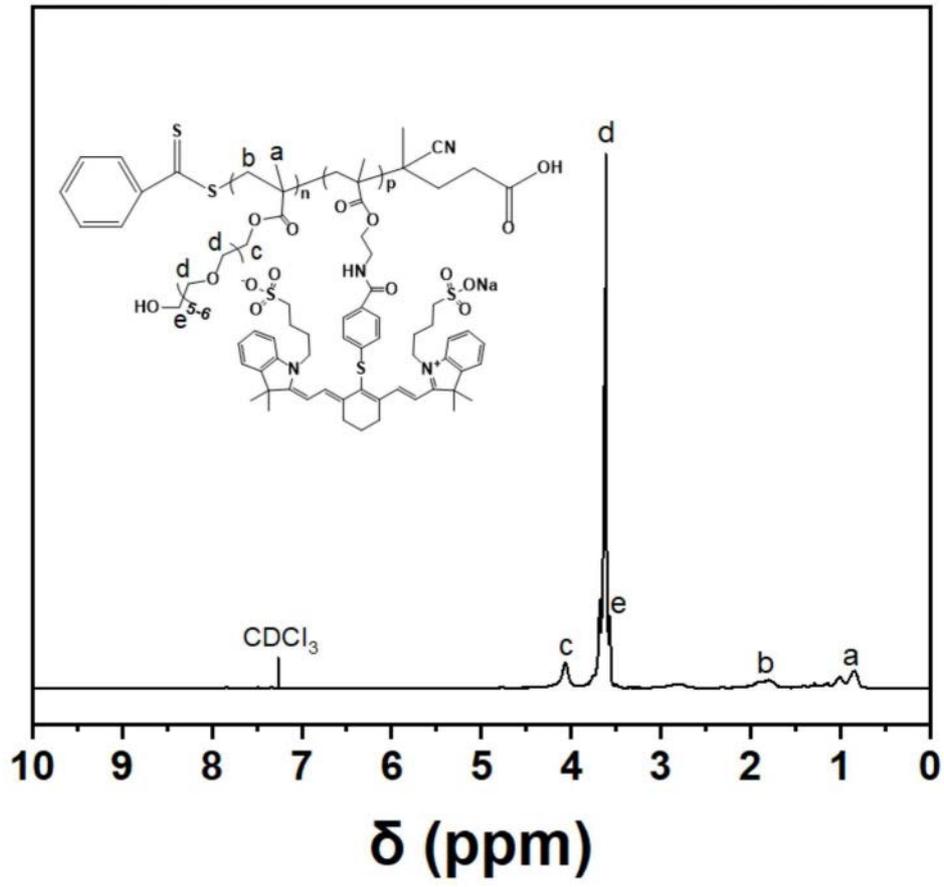


图2

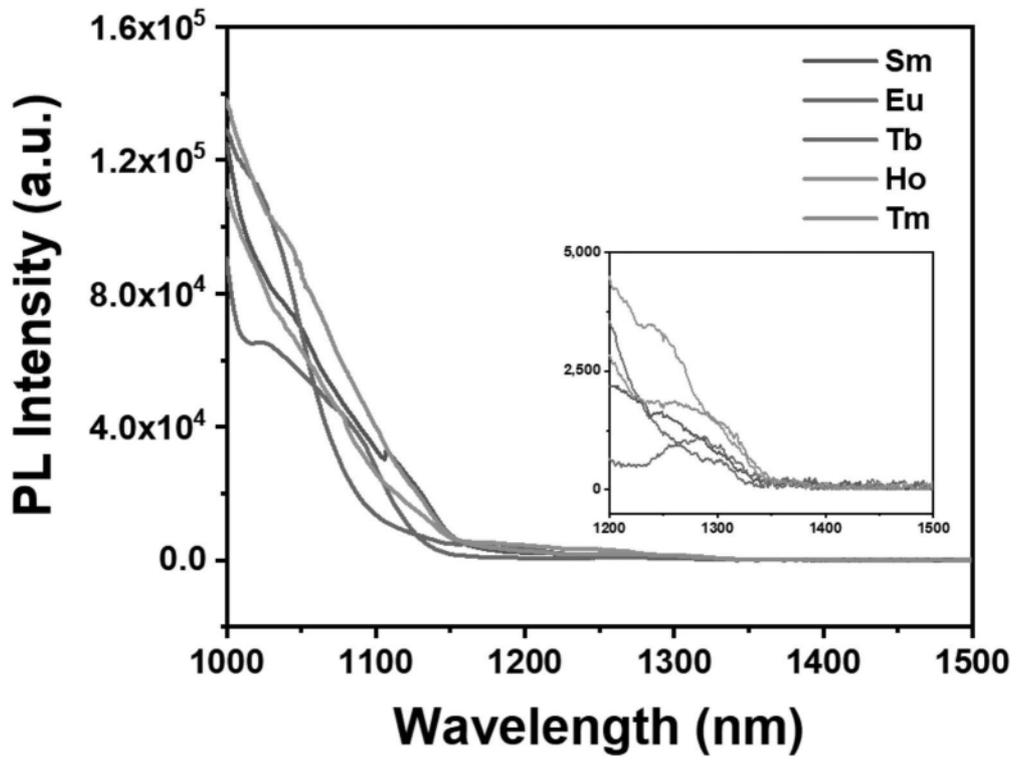


图3

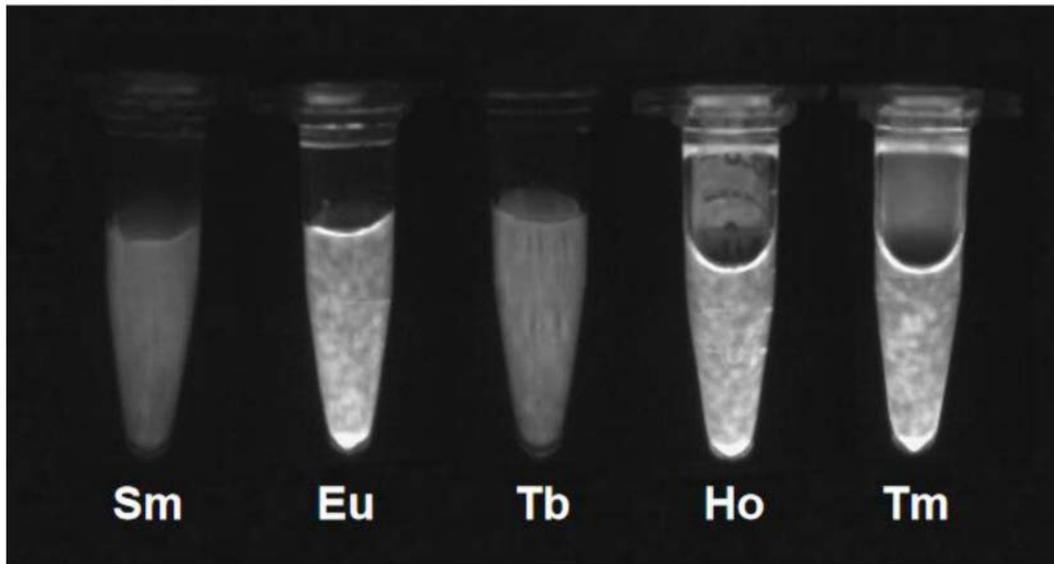


图4

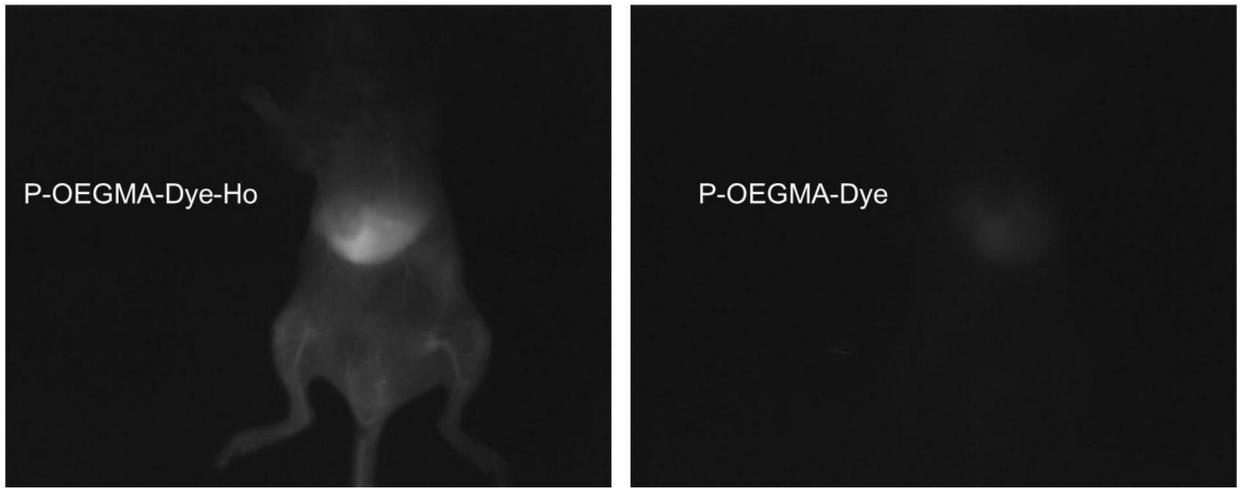


图5