

(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 2022/016770 A1

(51) 国际专利分类号:
C07D 401/06 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/133634

(22) 国际申请日: 2020 年 12 月 3 日 (03.12.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010711275.1 2020 年 7 月 22 日 (22.07.2020) CN

(71) 申请人: 山东大学 (SHANDONG UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250100 (CN)。

(72) 发明人: 于晓强 (YU, Xiaoqiang); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250100

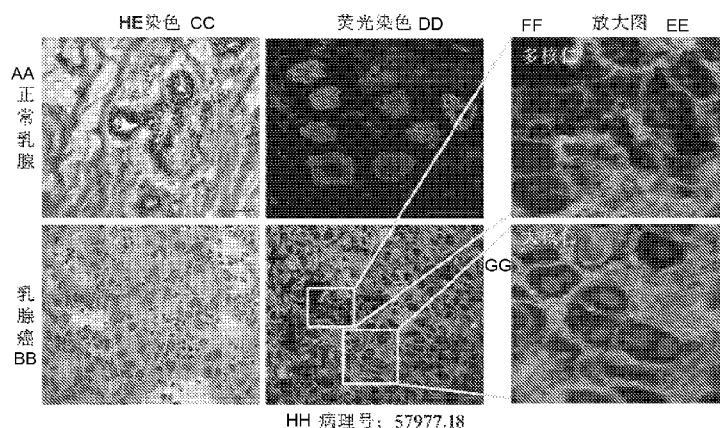
(CN)。高鹏 (GAO, Peng); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250100 (CN)。何秀全 (HE, Xiuquan); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250100 (CN)。孟芳芳 (MENG, Fangfang); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250100 (CN)。贺峻祎 (HE, Junyi); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250100 (CN)。刘志强 (LIU, Zhiqiang); 中国山东省济南市历城区山大南路 27 号, Shandong 250100 (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,

(54) Title: RNA FLUORESCENT PROBE FOR QUICKLY DISTINGUISHING CANCER FROM NORMAL TISSUES BY MEANS OF CHANGES IN NUCLEOLAR MORPHOLOGY

(54) 发明名称: 一种利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针



AA Normal breast
BB Breast cancer
CC HE staining
DD Fluorescent staining
EE Enlarged view
FF Multiple nucleoli
GG Large nucleoli
HH Pathology number: 57977.18

图 3

(57) Abstract: The present invention discloses an RNA fluorescent probe for quickly distinguishing cancer from normal tissues by means of changes in nucleolar morphology. The probe is (E)-1-(3-aminopropyl)-4-(2-(9-ethyl-carbazol-3-alkenyl)vinyl)pyridine dibromide, called CAPY-AP for short; the RNA fluorescent probe can display RNA and nucleolar distribution in both living cells and normal tissues or cancer tissues; the determining index for quickly distinguishing cancer from normal tissues by means of changes in nucleolar morphology is that only a single inconspicuous nucleolus exists in normal tissues, but multiple nucleoli and large nucleoli

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, 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))。

exist in cancer tissues. Compared with other existing RNA probes, the probe provided by the present invention has high RNA affinity and ultrahigh permeability, and facilitates imaging RNA and nucleoli in tissue sections. In addition, the probe provided by the present invention has the characteristics of good membrane permeability, strong color development, and strong light stability, and is expected to be deeply applied to preparation of rapid pathological diagnosis reagents in tumor surgery.

(57) 摘要: 本发明公开了一种利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的RNA荧光探针, 该探针为(E)-1-(3-氨基丙基)-4-(2-(9-乙基-咪唑-3-烯基)乙烯基)吡啶二溴盐, 简称CAPY-AP; 所述RNA荧光探针能同时显示活细胞和正常组织或癌组织中的RNA与核仁分布, 所述利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的判断指标是正常组织中只有单个不明显的核仁, 而癌组织中存在多核仁以及大核仁的现象; 与现有其他RNA探针相比, 本发明所述的探针具有较高的RNA亲和力以及超高的渗透性, 能够轻松地对组织切片内的RNA和核仁成像。另外, 本发明所述探针具有膜通透性好、显色强、光稳定性较强的特点, 有望在制备肿瘤术中快速病理诊断试剂中得到深入应用。

一种利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针

技术领域

本发明涉及一种能同时显示活细胞和正常组织或癌组织中 RNA 的荧光探针及其应用,尤其涉及一种利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针及其在制备肿瘤术中快速病理诊断试剂中的应用。

背景技术

重大疾病的诊断试剂、方法和技术,历来是国际高科技角逐的主要领域。我国是人口大国,居民中肿瘤发病率常年居高不下,平均每天有万人以上被确诊罹患肿瘤疾病,其中很多人被确诊为恶性肿瘤(癌症)。据 2019 年 1 月份最新统计数据显示,2015 年我国平均每天有超过 1 万人被确诊为癌症,即每分钟有 7.5 人被确诊为癌症。近十多年来,恶性肿瘤发病率每年保持 3.9%增幅,而死亡率每年保持 2.5%增幅。

手术切除肿瘤病变组织是目前普遍采用的有效治疗手段。但良性肿瘤和癌症的手术方案完全不同,必须严格区分:良性肿瘤行局部切除;恶性肿瘤行大范围根治性切除加淋巴结清扫。如果癌症误判为良性,则可能需要对患者二次手术;反之则是重大医疗事故。因此帮助外科医生决定手术方案的术中病理诊断不可或缺,它在判断肿瘤性质、确定手术术式(mode)中发挥着重要的作用。术中诊断是患者在手术台上全身麻醉开刀后,进行实时、现场取材,其优势是病理样本取材大、部位准确、取材过程不会造成内出血等医疗风险。但由于患者正在手术台等待病理诊断结果,确定肿瘤良恶性的报告必须在 30 分钟之内给出,因此术中诊断也被称为快速诊断。正是由于必须在 30 分钟之内出具诊断报告这一严格的时间要求,一百多年来,除 HE 染色外,尚无其他染色方法可在如此短时间内提供有价值的诊断信息,造成病理科医生仅依据 HE 染色结果就得做出快速病理诊断的困难局面。

众所周知,疾病诊断是一个高难度的工作,利用孤证做诊断是医学上的大忌,但由于缺乏可用的技术,在肿瘤术中快速病理诊断中却只能如此,这不仅增加了病理科医生的诊断难度,而且给病理医生带来巨大的心理压力,是病理医生工作中的痛点。因此亟需创立一个与 HE 并行的术中快速病理诊断新技术,解决术中快速判断肿瘤良恶性只能依靠已使用百年的 HE 染色方法这一个共性技术难题,打破目前孤证诊断困局。但百年来再没有一项新技术能够突破 30 分钟做出病理诊断的瓶颈。

HE 染色的原理是利用苏木素和伊红两种染料与组织内的物质发生酸碱反应而完成染色,由于这一染色原理的限制,HE 染色只能显示组织内与酸碱度有关的结构。相比于正常细胞,肿瘤细胞发生的诸多生物分子水平的变化并未导致病理组织酸碱性的显著变化,因此 HE 染

色不能显示这些分子层次上的变化。

核糖核酸(RNA)在生物进化中扮演着重要的角色，尤其在遗传信息的翻译中起着决定性的作用，主要功能是实现遗传信息在蛋白质上的表达。在细胞中，根据结构与功能的不同，RNA 主要分三类，即信使 RNA(mRNA)，转运 RNA(tRNA)，核糖体 RNA(rRNA)，近年的研究显示，RNA 在肿瘤的生物学行为中发挥重要作用。

作为 rRNA 发生地的核仁虽然已经发现了有 100 多年，但是它的生物功能并没有得到完全阐明。人们普遍认为，核仁只是细胞核中 rRNA 转录、加工、装配的场所。随着技术的发展，癌变组织细胞中核仁的变化越来越引起医学界的高度重视。最近的研究发现，和正常细胞相比，癌症细胞中不仅是细胞核的尺寸和形状发生变化，其核仁的大小、形状和数量也发生了特征性的变化。研究发现，核仁异常是癌细胞的普遍特征。例如，巨大核仁已成为大细胞肺癌与 Hodgkin 病的一个重要诊断依据；前列腺上皮内瘤细胞中也有大尺寸核仁现象；相反的也有：超小尺寸核仁则是宫颈上皮内瘤病变和小细胞退行发育肺癌的一个诊断依据。下表中汇总了与癌症关联的细胞核仁的变化特征。

表 1 与癌症相关联的细胞核仁变化

核仁变化	癌症类型
大核仁	许多癌症的共性特征
同种细胞核仁数量与大小显著变化	许多癌症的共性特征
微小核仁	宫颈上皮内瘤病变和小细胞退行发育肺癌

因此，基于 RNA 与核仁在肿瘤学领域的重要性，开发能够显示细胞中尤其是病理组织中核仁形态、并能够利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针具有巨大的生物学与医学价值。

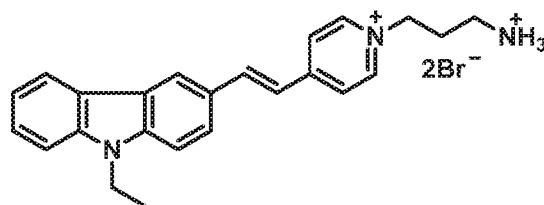
利用HE（苏木素/伊红）染色，可以将病理组织中的生物构造在光学显微镜下显示出来，其中细胞核着蓝黑色，细胞浆着粉红色，软骨着蓝色等，病理专家依据染色图谱做出诊断。其依据的信息有：细胞的异型性，包括细胞的形态、大小、以及是否规则；细胞核的大小、特别是细胞核与细胞浆的核浆比；核仁的大小、形态、数量，以及核仁的酸碱度等。但是由于染色的选择性差，无法清晰给出核仁的整体轮廓，导致与核仁有关的图像判读全凭医生的经验。遗憾的是，尽管目前有很多的RNA荧光探针能够在体外孤立培养的活细胞中成像RNA以及核仁，但是他们在组织中的应用并不理想。SYTO RNA-Select作为唯一可用于活细胞RNA成像的商用染料，不仅其分子结构未公布，其在组织中的实用性也尚未得到广泛证实。如能突破瓶颈，设计、开发出能够在人体病理组织切片，特别是冰冻切片中快速、原位、高

选择性地染色RNA、并进一步精准地成像核仁的RNA荧光探针，进而制备肿瘤术中快速病理诊断试剂，则极有可能解决术中快速判断肿瘤良恶性只能依靠已使用百年的HE染色方法这一个共性技术难题，打破长期存在的孤证诊断困局。

发明内容

针对现有技术的不足，本发明要解决的问题是提供一种利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针及其在制备肿瘤术中快速病理诊断试剂中的应用。

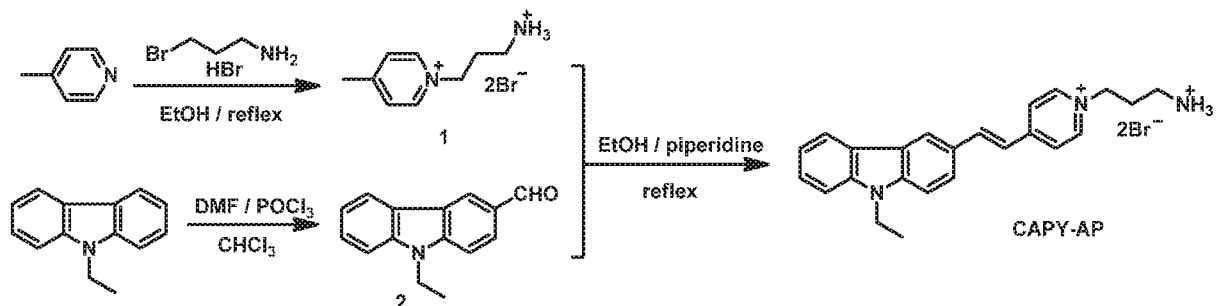
本发明所述的利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针，其特征在于：所述 RNA 荧光探针的化学名称为：(E)-1-(3-氨基丙基)-4-(2-(9-乙基-吡啶-3-烯基)乙烯基)吡啶二溴盐，简称 CAPY-AP，其化学结构式如式 (I) 所示；所述 RNA 荧光探针能同时显示活细胞和正常组织或癌组织中的 RNA 与核仁分布，所述利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的判断指标是正常组织中只有单个不明显的核仁，而癌组织中存在多核仁以及大核仁的现象；



(I)。

上述利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针的制备方法是：

首先将 4-甲基吡啶与 3-溴丙胺氢溴酸盐混合反应得到化合物 1。然后通过 vilsmeier 反应合成化合物 2。将化合物 1 与 2 混合，哌啶做催化剂，回流反应制备终产物。最后通过柱色谱法获得纯化的红色固体产物 CAPY-AP。反应式如下：



本发明所述利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针在标记或显示活细胞内 RNA 与核仁分布的应用。

其中：所述活细胞优选为 SiHa 癌细胞。

本发明所述利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针在标记或显示正

常组织或癌组织中 RNA 与核仁分布的应用。

其中：所述正常组织优选是正常乳腺组织的冰冻病理切片，所述癌组织优选是乳腺癌组织的冰冻病理切片。进一步的，所述乳腺是指人体乳腺正常组织或病理组织。

本发明所述利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针在制备肿瘤术中快速病理诊断试剂中的应用。

实验结果证实，本发明所述的荧光探针 CAPY-AP 在标记 SiHa 细胞后，在激光扫描共聚焦显微镜下，用 488nm 的激光照射细胞得到显微图片显示，在细胞质和核仁区有明显的绿光分布，明确提示所述探针能够在活细胞中专一性的成像胞质 RNA 和核仁，并且在与经 RNase 消化实验后的细胞进行对比试验后也得到进一步的证实。另外，将本发明所述的荧光探针 CAPY-AP 与商用细胞核荧光探针 Hoechst 33342 组合，并用本发明提供的染色工艺在乳腺肿瘤病理组织的冰冻切片中进行实验，获得了高度清晰的荧光图像，并且将其与 HE 染色图像进行了对照研究。从实验得到的荧光图片中可以看出，本发明的荧光探针 CAPY-AP 能够染色胞质 RNA，并且核仁的形态清晰可见。说明本发明所述的荧光探针具有好的渗透性能够穿过组织内部进入细胞核进而靶向到核仁中，克服了现有其他 RNA 探针无法实现的功能。另外，通过对比正常乳腺和乳腺癌组织的冰冻切片 HE 图像和荧光图像发现，在分辨率、细节的丰富程度上本发明的荧光染色显示出明显的优势。不仅从新角度提供 HE 染色所表达的全部信息，而且能够提供更多的细节信息，可以清楚地呈现出组织中核仁的结构，而这些信息在冰冻切片的 HE 图像中几乎是缺失的。通过对比申请人还有重要发现：正常乳腺组织中只有单个不明显的核仁，而乳腺癌组织中存在多核仁以及大核仁的现象。这一发现为利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织提供了判断依据。总之，通过总结冰冻切片 HE 染色与荧光染色在乳腺组织中的诊断判据，可以看出本发明的荧光探针 CAPY-AP 及荧光染色结果具有显著的优势，仅利用核仁形态变化这一诊断参数就能轻易地区分乳腺癌组织与正常组织，实现了简单、量化、精准诊断。

本发明提供的利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针能同时显示活细胞以及组织中 RNA 与核仁的分布，为其在制备肿瘤术中快速病理诊断试剂中的应用奠定了基础。大量的实验证明，本发明所述的荧光探针 CAPY-AP 能够在活细胞和组织中高保真的成像 RNA 以及核仁。特别是在人体乳腺病理组织中，探针 CAPY-AP 能够清晰成像核仁，并且给出组织中核仁的大小、数量以及形态。与现有其他 RNA 探针相比，本发明所述的吡啶嘧啶盐类化合物 CAPY-AP 具有超高的 RNA 亲和力以及超高的渗透性，能够轻松地对组织切片内的 RNA 和核仁成像。另外，本发明所述探针具有膜通透性好、显色强、光稳定性

较强的特点,预示其作为 RNA 和核仁荧光探针具有广泛的应用,尤其是成像组织中的核仁,有望开发为 RNA 和核仁相关的生理和病理学研究所用的简捷、直观的生物检测试剂。

附图说明

图 1: 探针 CAPY-AP 对活性 SiHa 细胞染色的共聚焦荧光照片。

获得方法: 用 CAPY-AP 探针孵育 SiHa 细胞 30min 后, 在激光扫描共聚焦显微镜下, 用 488nm 的激光照射细胞得到显微图片。其中 a 图是探针 CAPY-AP 在 488nm 激发下, 采集 500-600nm 绿色通道的照片, b 图是明场激光扫描的微分干涉显微照片, c 图为 a、b 两图的合并图(共定位图)。

荧光图像显示在细胞质和核仁区有明显的绿光分布, 明确提示本发明的探针 CAPY-AP 能够在活细胞中专一性的成像胞质 RNA 和核仁。

图 2: 对固定的 SiHa 细胞经核糖核酸酶(RNase)处理后, 用 CAPY-AP 对 SiHa 细胞进行染色的共聚焦荧光照片。

获得方法: 用 CAPY-AP 对 RNase 处理后的固定 SiHa 细胞染色。在激光扫描共聚焦显微镜下, 用 488nm 的激光照射细胞得到显微图片。其中 a 图是探针 CAPY-AP 在 488nm 激发下, 采集 500-600nm 绿色通道的照片, b 图是明场激光扫描的微分干涉显微照片, c 图为 a、b 两图的合并图(共定位图)。

结果发现经 RNase 处理后的细胞在显微镜下的荧光较弱, 几乎看不到核仁和细胞质中的荧光。

图 3: 乳腺病患(病理号: 57977.18)癌症与癌旁正常组织冰冻切片的 HE 染色与荧光染色对比图。

获得方法: 探针 CAPY-AP 与 Hoechst 33342 对乳腺癌与癌旁正常组织的冰冻切片染色后, 在激光扫描共聚焦显微镜下, 分别用 488nm 和 405nm 的激光照射组织, 收取两个通道的叠加图得到荧光图片。同一组织冰冻切片用 HE 染色获得 HE 染色图片。

图 4: 乳腺病患(病理号: 60551.18)癌症与癌旁正常组织冰冻切片的 HE 染色与荧光染色对比图。

获得方法: 探针 CAPY-AP 与 Hoechst 33342 对乳腺癌与癌旁正常组织的冰冻切片染色后, 在激光扫描共聚焦显微镜下, 分别用 488nm 和 405nm 的激光照射组织, 收取两个通道的叠加图得到荧光图片。同一组织冰冻切片用 HE 染色获得 HE 染色图片。

图 5: 乳腺病患(病理号: 61864.18)癌症与癌旁正常组织冰冻切片的 HE 染色与荧光染色对比图。

获得方法: 探针 CAPY-AP 与 Hoechst 33342 对乳腺癌与癌旁正常组织的冰冻切片染色后, 在激光扫描共聚焦显微镜下, 分别用 488nm 和 405nm 的激光照射组织, 收取两个通道的叠加图得到荧光图片。同一组织冰冻切片用 HE 染色获得 HE 染色图片。

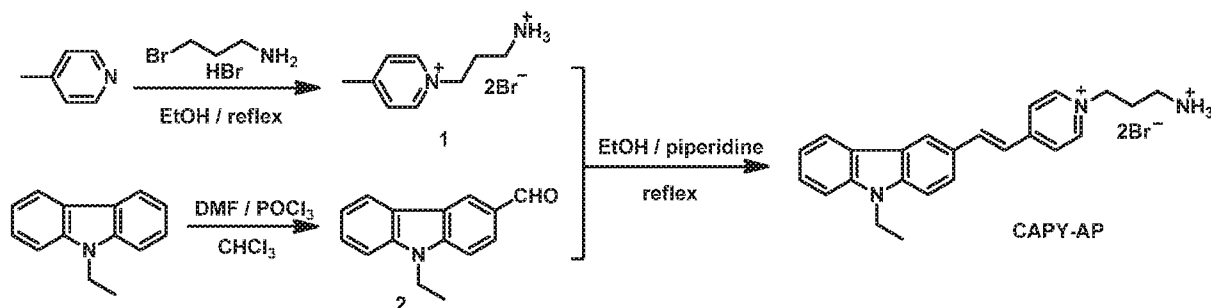
图 3 至图 5 的结果均发现荧光图像显示探针 CAPY-AP 能够在人体乳腺病理组织的冰冻切片中专一性的成像胞质 RNA 和核仁。另外, 通过对荧光图中方框区域放大可以看到, 探针可以清晰地成像核仁的形态、大小以及数量。同时发现乳腺癌组织中存在多核仁以及大核仁的现象, 而正常组织中的核仁较小, 不如癌组织中的明显。而在癌症与正常组织的 HE 染色图像中核仁并不明显。

具体实施方式

下面结合具体附图和实施例对本发明内容进行详细说明。如下所述例子仅是本发明的较佳实施方式而已, 应该说明的是, 下述说明仅仅是为了解释本发明, 并非对本发明作任何形式上的限制, 凡是依据本发明的技术实质对实施方式所做的任何简单修改, 等同变化与修饰, 均属于本发明技术方案的范围。

下述实施例中, 涉及的组织冰冻切片由合作单位山东大学齐鲁医院病理科提供, 所使用的材料、细胞、试剂等, 如无特殊说明, 均从商业途径得到。

实施例 1: 探针 CAPY-AP 的合成。



具体合成如下:

化合物 1 的合成: 将 4-甲基吡啶 (0.93 g, 10 mmol)、3-溴丙胺氢溴酸盐(2.41 g, 11mmol) 溶解于 20mL 乙醇中, 85℃加热回流反应 12 小时。反应结束后, 出现白色固体。过滤, 石油醚洗涤, 得纯净的白色化合物 1。产率 70%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 8.938 (d, J = 6 Hz, 2H), 8.047 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 7.797 (s, 3H), 4.628-4.582 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.860-2.794 (m, 2H), 2.622 (s, 3H), 2.220-2.124 (m, 2H)。

化合物 2 的合成: 冰浴条件下, 将 POCl₃(9.2 mL, 100 mmol) 缓慢加入到干燥的 DMF(7.7 mL, 100 mmol)中, 搅拌 30 分钟后出现粘稠状。然后将溶解在 CH₃Cl 的 N-乙基咔唑(2.94 g, 10

mmol) 加入体系中, 继续搅拌 1 小时后将混合物于 80℃加热, 反应 12 小时。冷却至室温后将混合物倒入冰水中, 用 NaOH 调节体系 pH 至中性。然后用 CH₂Cl₂ 萃取, 将有机相水洗两次, 并用无水硫酸镁干燥 3 小时。最后用乙酸乙酯/石油醚 (1:8, V/V) 作为洗脱液通过柱色谱分离提纯, 获得淡黄色纯净物。产率为 50%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 10.07 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.31 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.02-7.989 (m, 1H), 7.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.55 (t, *J* = 7.65 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.53 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 1.34 (t, *J* = 7.05 Hz, 3H).

化合物 CAPY-AP 的合成: 将化合物 1(0.52 g, 1.67 mmol)和化合物 2(0.45 g, 2mmol)溶于 15mL 乙醇中, 得黄色透明溶液, 加 3-4 滴哌啶, 溶液迅速变红色。加热回流反应过夜, 有红色固体析出。冷却, 过滤, 乙醇洗涤。最后用二氯甲烷/甲醇 (20:1) 作为洗脱液通过柱色谱法获得纯化的红色固体产物即为 CAPY-AP, 产率 40%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 8.94 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.61 (s, 1H), 8.30-8.19 (m, 4H), 7.93-7.90 (m, 4H), 7.86 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.75-7.29 (m, 2H), 7.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.59 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.52 (m, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.22 (m, 2H) 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 154.26, 144.43, 143.36, 141.5, 140.64, 129.21, 126.94, 126.86, 126.71, 123.71, 123.24, 122.62, 121.75, 120.97, 120.43, 120.43, 120.16, 114.36, 110.34, 110.19, 56.87, 37.74, 36.14, 28.96, 14.21. HRMS: *m/z* (C₂₄H₂₇Br₂N₃), found: 356.2184 [M-2Br-H]²⁺.

实施例2: SiHa细胞培养。

将SiHa细胞贴壁培养于内含10%胎牛血清培养液中, 在37℃, 5%CO₂的饱和湿度孵箱中培养, 每2-3天换液传代1次。待细胞生长到对数期, 接片培养: ①将盖玻片于无水乙醇中浸泡30min, 酒精灯烘干后放入一次性35mm培养皿中, 备用; ②将100mL细胞瓶中长满的细胞用PBS洗三遍, 用1mL0.25%胰酶消化3-5分钟, 小心地倒出胰酶, 加入新鲜培养液吹打均匀并细胞计数, 以培养液的添加量控制细胞密度, 使细胞终浓度为每毫升1×10⁵, 然后接种至内上述含盖玻片的培养皿中, 放入5%CO₂培养箱中培养, 使细胞爬片生长。待SiHa细胞爬片生长并长满盖玻片后, 用于实验。

实施例 3: 探针 CAPY-AP 对活性 SiHa 细胞的染色观察。

首先配制 5mM 探针 CAPY-AP 的 DMSO 溶液作为母液。待 SiHa 细胞爬片长满盖玻片后, 移除其培养皿中的培养基, 用干净的 PBS 冲洗含有 SiHa 细胞的盖玻片 3 次, 用 5μM CAPY-AP

染色细胞，在 CO₂ 培养箱中孵育 30min。染色后的爬片取出，洗去多余的探针，细胞生长面朝下盖在载玻片上，在激光扫描共聚焦荧光显微镜下（用 488nm 的激光照射细胞）观察细胞着色位置，荧光分布及亮度变化等。

结果见图 1。其中 a 图是探针 CAPY-AP 在 488nm 激发下，采集 500-600nm 绿色通道的照片，b 图是明场激光扫描的微分干涉显微照片，c 图为 a、b 两图的合并图（共定位图）。荧光图像显示在细胞质和核仁区有明显的绿光分布，明确提示本发明的探针 CAPY-AP 能够在活细胞中专一性的成像胞质 RNA 和核仁。

实施例 4：探针 CAPY-AP 对经核糖核酸酶（RNase）处理后的 SiHa 细胞（RNase 消化实验）的染色观察。

固定细胞制备：首先将实施例 2 制备的长满 SiHa 细胞的盖玻片（爬片）浸泡于 4%多聚甲醛溶液 30min，然后用 0.5%Triton X-100 室温通透 2min，得待染色的固定细胞。

取上述一组固定细胞，加入 25mg/mL RNase 在培养箱中消化 2h，然后用 PBS 清洗 3 遍，并同时用 5μM CAPY-AP 染色细胞，在 CO₂ 培养箱中孵育 30min。将染色后的细胞爬片取出，洗去未结合的多余染液，细胞生长面朝下盖在载玻片上，在激光扫描共聚焦显微镜下观察（用 488nm 的激光照射细胞），记录细胞中着色部位，荧光分布及亮度变化等。

结果见图 2，其中 a 图是探针 CAPY-AP 在 488nm 激发下，采集 500-600nm 绿色通道的照片，b 图是明场激光扫描的微分干涉显微照片，c 图为 a、b 两图的合并图（共定位图）。发现经 RNase 处理后的细胞在显微镜下的荧光较弱，几乎看不到核仁和细胞质中的荧光。由于 RNase 能水解掉细胞中的 RNA，因此，从此角度可以证实并验证本发明的探针能够选择性成像细胞中的 RNA。

实施例 5：对乳腺病患(病理号：57977.18)的癌症与癌旁正常组织的冰冻切片进行荧光染色，并将荧光图片与相应的 HE 染色图像进行对比，同时给出各自的诊断判据。

从山东大学齐鲁医院病理科获取术中乳腺病患(病理号：57977.18)的癌症与癌旁正常组织的冰冻切片。将其浸入到含有 10μM 探针 CAPY-AP 与 10μM Hoechst 33342 的 PBS 缓冲溶液（含 10% EtOH）中染色 10min，然后在激光扫描共聚焦显微镜下进行观察（分别用 488nm 和 405nm 的激光照射组织）获取荧光染色图片，并与病理科提供的相应的 HE 染色图片进行对比。

结果见图 3 和表 2。

图 3：荧光图像显示在细胞质和核仁区有明显的绿光分布，而在细胞外基质中没有荧光。

明确提示本发明的探针能够在人体乳腺癌组织中专一性的成像胞质 RNA 和核仁。另外，从放大的荧光图片中可以发现核仁的数量、大小以及形态都能够清晰显示出来。通过对比正常乳腺和乳腺癌组织的冰冻切片 HE 图像和荧光图像发现，荧光染色结果显示出明显的优势。可以清楚地呈现出组织中核仁的结构，而在冰冻切片的 HE 图像中核仁并不清楚。另外我们还发现：正常乳腺组织中只有单个不明显的核仁，而乳腺癌组织中存在多核仁以及大核仁的现象。

表 2.冰冻切片 HE 染色与荧光染色乳腺组织的诊断判据。

方法	诊断判据	正常乳腺	乳腺癌	
HE	组织结构和细胞形态	形态正常	形态异常	图像的判读全凭医生的经验，且只有高资历医师可以签发冰冻切片报告
	细胞及细胞核大小形态	相对一致，核染色质均匀，核仁不明显，核膜薄而光滑规则	大小不一，形态各异，核增大，染色质不均匀，呈粗块状，核膜增厚不规则	
	核浆比	正常	增大	
荧光	提供 HE 染色展示的全部信息，重点利用核仁变化进行判断	只存在含有单个不明显核仁的细胞	存在含有多核仁、大核仁明显的细胞	容易且准确地做出判断，大幅度降低医务人员的经验、年资限制

由表 2 中 HE 与荧光各自的诊断判据中发现，在荧光图像中仅利用核仁这一诊断参数就能轻易地区分乳腺癌组织与正常组织，相比 HE 诊断要容易的多。

实施例 6：对乳腺病患(病理号：60551.18)的癌症与癌旁正常组织的冰冻切片进行荧光染色，并将荧光图片与相应的 HE 染色图像进行对比，同时给出各自的诊断判据。

从山东大学齐鲁医院病理科获取术中乳腺病患(病理号：60551.18)的癌症与癌旁正常组织的冰冻切片。将其浸入到含有 10 μ M 探针 CAPY-AP 与 10 μ M Hoechst 33342 的 PBS 缓冲溶液（含 10% EtOH）中染色 10min，然后在激光扫描共聚焦显微镜下进行观察（分别用 488nm 和 405nm 的激光照射组织）获取荧光染色图片，并与病理科提供的相应的 HE 染色图片进行对比。

结果见图 4。荧光图像显示探针 CAPY-AP 能够在人体乳腺病理组织的冰冻切片中专一性的成像胞质 RNA 和核仁。另外，从放大的图片中可以看到乳腺癌组织中存在多核仁以及大核仁的现象。正常组织中的核仁较小，不如癌组织中的明显。证明该探针在成像病理组织的核仁方面与 HE 染色相比具有显著的优势。

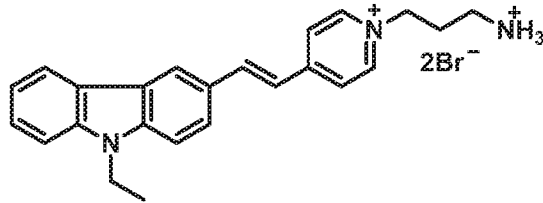
实施例 7: 对乳腺病患(病理号: 61864.18)的癌症与癌旁正常组织的冰冻切片进行荧光染色, 并将荧光图片与相应的 HE 染色图像进行对比, 同时给出各自的诊断判据。

从山东大学齐鲁医院病理科获取术中乳腺病患(病理号: 61864.18)的癌症与癌旁正常组织的冰冻切片。将其浸入到含有 10 μ M 探针 CAPY-AP 与 10 μ M Hoechst 33342 的 PBS 缓冲溶液(含 10% EtOH)中染色 10min, 然后在激光扫描共聚焦显微镜下进行观察(分别用 488nm 和 405nm 的激光照射组织)获取荧光染色图片, 并与病理科提供的相应的 HE 染色图片进行对比。

结果见图 5。荧光图像显示探针 CAPY-AP 能够在人体乳腺病理组织的冰冻切片中专一性的成像胞质 RNA 和核仁。另外, 从放大的图片中可以看到乳腺癌组织中存在多核仁以及大核仁的现象。正常组织中的核仁较小, 不如癌组织中的明显。证明该探针在成像病理组织的核仁方面与 HE 染色相比具有显著的优势。另外在 HE 染色图片中几乎看不到核仁, 再次证明探针 CAPY-AP 在成像病理组织的核仁方面与 HE 染色相比具有显著的优势。

权利要求书

1、一种利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针，其特征在于：所述 RNA 荧光探针的化学名称为：(E)-1-(3-氨基丙基)-4-(2-(9-乙基-吡啶-3-烯基)乙烯基)吡啶二溴盐，简称 CAPY-AP，其化学结构式如式 (I) 所示；所述 RNA 荧光探针能同时显示活细胞和正常组织或癌组织中的 RNA 与核仁分布，所述利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的判断指标是正常组织中只有单个不明显的核仁，而癌组织中存在多核仁以及大核仁的现象；



(I)。

2、权利要求 1 所述的利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针在标记或显示活细胞内 RNA 与核仁分布的应用。

3、如权利要求 2 所述的应用，其特征在于：所述活细胞为 SiHa 癌细胞。

4、权利要求 1 所述的利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针在标记或显示正常组织或癌组织中 RNA 与核仁分布的应用。

5、如权利要求 4 所述的应用，其特征在于：所述正常组织是正常乳腺组织的冰冻病理切片，所述癌组织是乳腺癌组织的冰冻病理切片。

6、权利要求 1 所述的利用核仁形态变化快速区分癌与正常组织的 RNA 荧光探针在制备肿瘤术中快速病理诊断试剂中的应用。

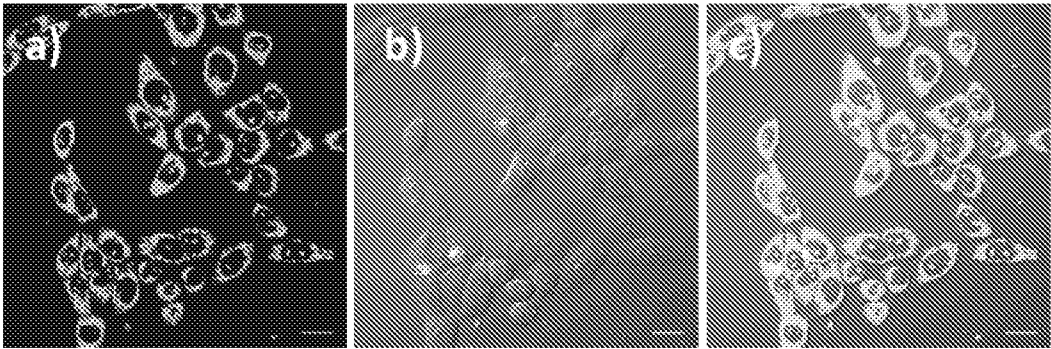


图 1

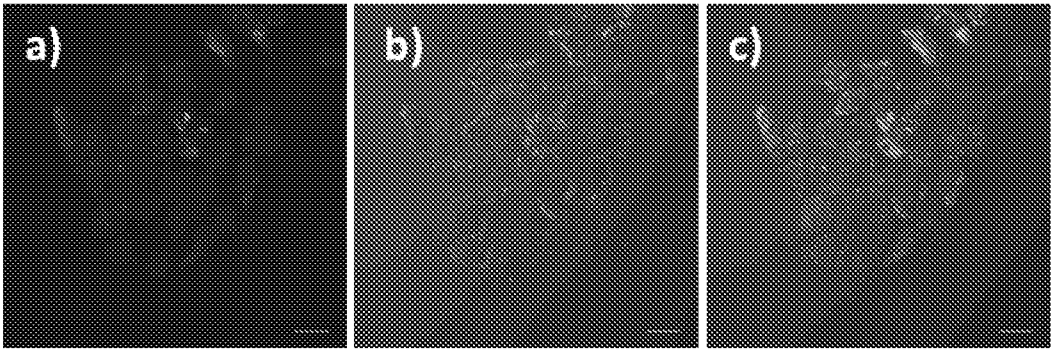


图 2

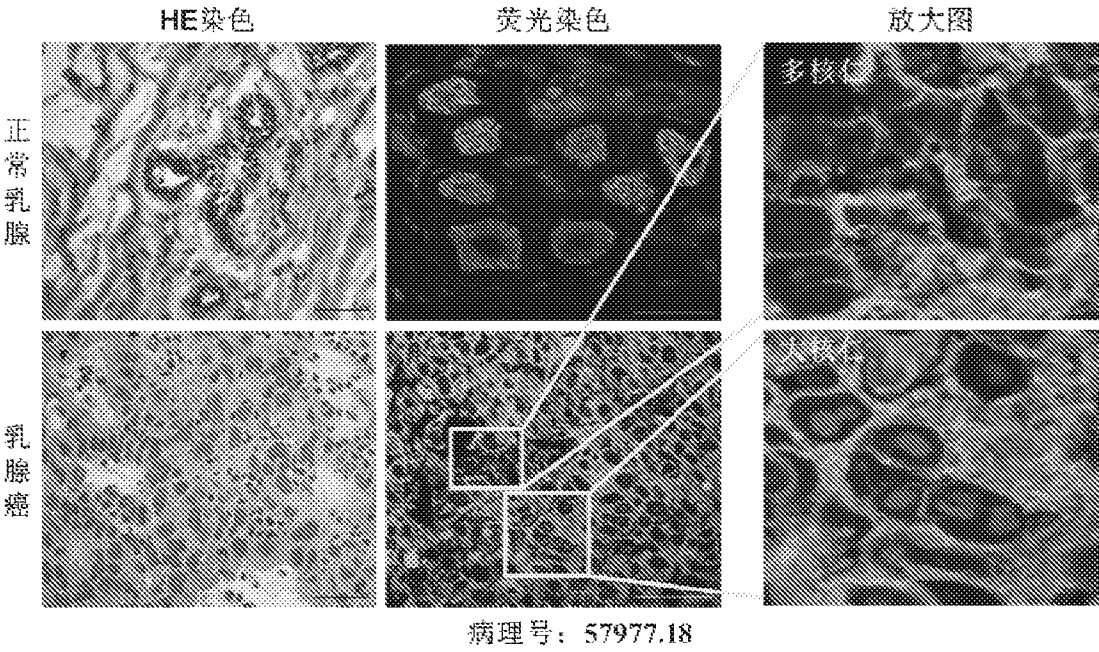


图 3

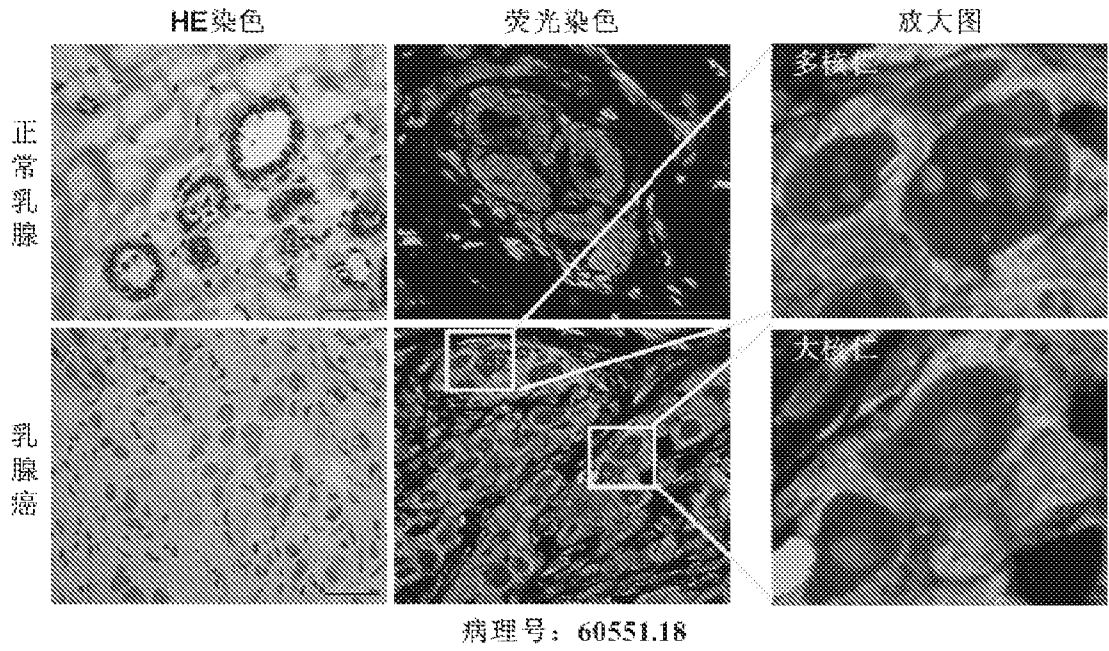


图 4

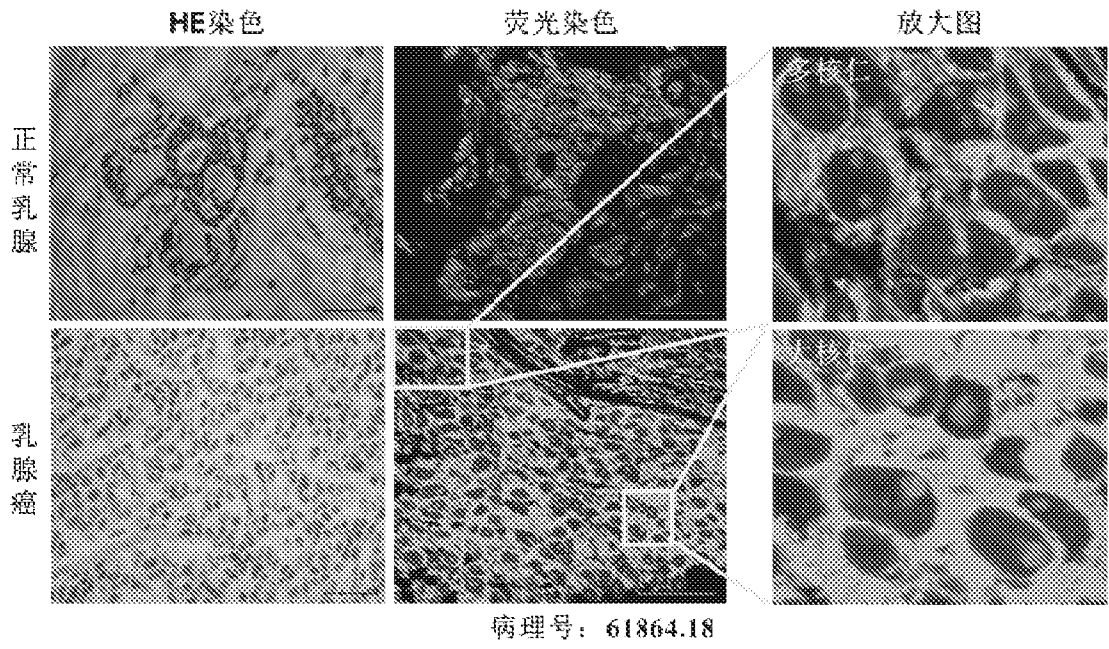


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/133634

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 401/06(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; G01N 21/64(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)

C07D

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)

REGISTRY, CAPLUS, CNABS, CNTXT, DWPI, CNKI: 于晓强, 孟芳芳, 卞喆, 烯, 吡啶, 山东大学, 高鹏, 吡啶, 贺峻祯, 何秀全, 刘志强, 探针, 依据本申请探针的结构进行了检索, searched based on the structural of the probe in this application, RNA, FLUORESCENT INDICATOR, FLUORESCENT PROBE, RSD: 46.156.30, 1839.22.20

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 112239455 A (SHANDONG UNIVERSITY) 19 January 2021 (2021-01-19) claims 1-6	1-6
A	WO 2011025329 A2 (BIONEER CORPORATION) 03 March 2011 (2011-03-03) description, page 4, compound 3	1-6
A	HAO, Guoyan et al. "Studies on Interactions of Carbazole Derivatives with DNA, Cell Image, and Cytotoxicity" <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> , Vol. 26, No. 1, 02 December 2017 (2017-12-02), ISSN: 0968-089, p. 286, Scheme 1, compounds 1 and 2	1-6
A	Krieg, R. et al. "N, N-dialkylaminostyryl Dyes: Specific and Highly Fluorescent Substrates of Peroxidase and their Application in Histochemistry" <i>Journal of Molecular Histology</i> , Vol. 39, No. 2, 29 November 2007 (2007-11-29), ISSN: 1567-2379, p. 179, table 1, compound d	1-6



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

29 March 2021

Date of mailing of the international search report

06 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/133634

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.: **2-5**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 2-5 relate to diagnostic methods performed on the human or animal body (PCT Rule 39.1(iv)).
Nevertheless, a search is made on the basis of the technical subject matter being the use of said
compounds/compositions in the preparation of the corresponding drugs.
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/CN2020/133634

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112239455	A	19 January 2021	None			
WO	2011025329	A2	03 March 2011	KR	20110023265	A	08 March 2011
				KR	101438747	B1	05 September 2014
				WO	2011025329	A3	21 July 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/133634

A. 主题的分类

C07D 401/06(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; G01N 21/64(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)

C07D

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))

REGISTRY, CAPLUS, CNABS, CNTXT, DWPI, CNKI:于晓强, 孟芳芳, 咻咻, 烯, 吡啶, 山东大学, 高鹏, 吡啶, 贺峻祯, 何秀全, 刘志强, 探针, 依据本申请探针的结构进行了检索, RNA, FLUORESCENT INDICATOR, FLUORESCENT PROBE, RSD: 46.156.30, 1839.22.20

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	CN 112239455 A (山东大学) 2021年 1月 19日 (2021 - 01 - 19) 权利要求1-6	1-6
A	WO 2011025329 A2 (BIONEER CORP) 2011年 3月 3日 (2011 - 03 - 03) 说明书第4页化合物3	1-6
A	Hao, Guoyan等. "Studies on interactions of carbazole derivatives with DNA, cell image, and cytotoxicity" Bioorganic & Medicinal Chemistry, 第26卷, 第1期, 2017年 12月 2日 (2017 - 12 - 02), ISSN: 0968-089, 286页Scheme 1中的化合物1-2	1-6
A	Krieg, R. 等. "N, N-dialkylaminostyryl dyes: Specific and highly fluorescent substrates of peroxidase and their application in histochemistry" Journal of Molecular Histochemistry, 第39卷, 第2期, 2007年 11月 29日 (2007 - 11 - 29), ISSN: 1567-2379, 第179页table1中的化合物d	1-6

☐ 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 3月 29日

国际检索报告邮寄日期

2021年 4月 6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

赵贞贞

电话号码 62086358

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： 2-5
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2-5涉及对人体或动物体实施的诊断方法（PCT细则39.1(iv)）。尽管如此，仍基于所述化合物/组合物在制备相应药物中的用途的技术主题进行了检索。
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/CN2020/133634

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	112239455	A	2021年 1月 19日	无			
WO	2011025329	A2	2011年 3月 3日	KR	20110023265	A	2011年 3月 8日
				KR	101438747	B1	2014年 9月 5日
				WO	2011025329	A3	2011年 7月 21日