

(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
2025 年 1 月 9 日 (09.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/007776 A1

(51) 国际专利分类号:
C07D 403/14 (2006.01) **A61K 49/00** (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01) **G01N 21/64** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/101326

(22) 国际申请日: 2024 年 6 月 25 日 (25.06.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310818545.2 2023年7月5日 (05.07.2023) CN

(71) 申请人: 上海内瑟汐医疗科技有限公司 (SHANGHAI FLUORESOMA MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市奉贤区金海公路 6055 号 28 幢 1 层, Shanghai 201400 (CN)。

(72) 发明人: 黄楚森 (HUANG, Chusen); 中国上海市奉贤区金海公路 6055 号 28 幢 1 层, Shanghai 201400 (CN)。宣集高 (XUAN, Jigao); 中国上海市奉贤区金海公路 6055 号 28 幢 1 层, Shanghai 201400 (CN)。

贾能勤 (JIA, Nengqin); 中国上海市奉贤区金海公路 6055 号 28 幢 1 层, Shanghai 201400 (CN)。

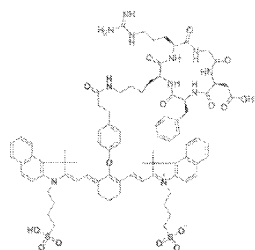
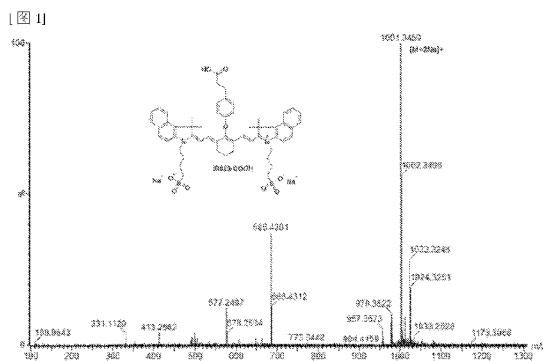
(74) 代理人: 北京超凡宏宇知识产权代理有限公司 (CHOFN INTELLECTUAL PROPERTY); 中国北京市海淀区北四环西路 68 号左岸工社 1215-1218 室, Beijing 100080 (CN)。

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚

(54) Title: FLUORESCENT COMPOUND BASED ON NEW INDOCYANINE GREEN IR820, PREPARATION AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种基于新吲哚菁绿 IR820 的荧光化合物及其制备和应用



(1)

(57) Abstract: The present disclosure relates to the technical field of fluorescent compounds. Specifically, a fluorescent compound based on new indocyanine green IR820, and a preparation and an application thereof, are provided. The molecular structure of the fluorescent compound is as shown in formula (1). Compared with existing technology, the fluorescent probe of the present invention has near-infrared fluorescence emission, good tumor targeting and biocompatibility, low cytotoxicity, and strong biological tissue penetration. It can be applied to targeted fluorescence imaging of tumor cells and live tumors, and is expected to be further applied to fluorescence surgical navigation.

(57) 摘要: 本公开涉及荧光化合物技术领域, 具体而言, 提供了一种基于新吲哚菁绿 IR820 的荧光化合物及其制备和应用, 该荧光化合物的分子结构式如式 (1) 所示: 与现有技术相比, 本发明的荧光探针具有近红外荧光发射、良好的肿瘤靶向性、生物相容性, 细胞毒性低、生物组织穿透力强, 可以应用于肿瘤细胞、活体肿瘤的靶向荧光成像, 有望进一步应用于荧光手术导航。

(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, ME, 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))。

说明书

发明名称: 一种基于新吡啶菁绿IR820的荧光化合物及其制备和应用

[0001] 相关公开的交叉引用

[0002] 本公开要求于2023年07月05日提交中国专利局的公开号为202310818545.2、名称为“一种基于新吡啶菁绿IR820的荧光化合物及其制备和应用”的中国专利公开的优先权，其全部内容通过引用结合在本公开中。

技术领域

[0003] 本公开涉及荧光化合物技术领域，具体而言，涉及一种基于新吡啶菁绿IR820的荧光化合物及其制备和应用。

背景技术

[0004] 荧光成像已在生物学基础研究和肿瘤术中精准切除等临床转化方面展现出广阔的应用前景。荧光成像最核心的技术之一是创制能用于成像的荧光探针分子。荧光探针分子可以在分子水平上动态跟踪各种生理、病理过程和疾病的发生、发展。尤其在肿瘤可视化成像领域，由于荧光探针分子能够在术中实时点亮癌细胞，因此可以帮助医生更精准地判断肿瘤边界、发现转移灶。虽然目前学术论文上有大量关于肿瘤成像用荧光探针的报道。但是目前真正能被FDA批准用于临床上肿瘤成像的探针分子很少，主要是由于目前构建荧光探针的大多数荧光染料的生物毒性导致其临床使用受限。至今，被FDA批准用于临床的荧光染料只有荧光素、亚甲基蓝和吡啶菁绿(ICG)。而荧光素和亚甲基蓝由于其荧光发射波长限制在700nm以内，用于肿瘤荧光成像时容易受到生物自发背景荧光信号干扰，同时其生物组织穿透能力也较弱，因此，基于荧光素和亚甲基蓝开发的荧光探针只适合用于开腹手术中，而且很容易受到生物背景荧光信号干扰。ICG由于其发射波长能到800nm左右，目前是唯一被FDA批准用于荧光手术导航的荧光染料。因此，基于ICG染料的荧光探针分子开发一直是肿瘤荧光成像的聚焦点。然而ICG用于生物体内肿瘤荧光成像存在两个主要问题：1)没有靶向性，需要在瘤内注射或者注射后需要利用其被动靶向(在肿瘤区域存在高渗透滞留效应(EPR))聚集在肿瘤区，并将游离染料代谢后才能实现肿瘤的高对比度荧

光成像。这会导致肿瘤成像时候操作的复杂性。2) ICG染料在长时间激发后其容易被光漂白，因此ICG的光稳定性不够，在肿瘤荧光成像中不能长时间被激发，导致其应用受到一定限制。

[0005] 为解决以上问题，目前有报道直接在ICG的侧链上链接肿瘤靶向基团解决肿瘤靶向性问题。另一方面，在ICG长链共轭部分引入了一个稳定的六元环结构，可以极大地提高染料的光稳定性获得一系列ICG衍生染料比如IRDye800CW和ZW800-1染料。但是IRDye800CW染料由于在苯环上引入了两个磺酸基，ZW800-1染料在侧链上引入了两个带正电荷的季铵盐，使其与ICG结构在带电方式上存在较大不同(ICG带两个负电荷，存在于侧链上)，因此在生物相容性方面可能会有一定改变，还需要临床进一步验证，不能与已经被FDA批准使用很长时间、并被验证过较好生物相容性的ICG相比。进一步的，染料带电方式不同，会直接影响背景信号(主要来自于非特异性吸附到生物大分子)的大小。IR820又被称为新吲哚菁绿，相比于其他基于ICG类似物荧光染料如IRDye800CW和ZW800-1，其结构在带电荷方式和化学结构上完全保留了ICG的带电方式和母核结构。因此在生物相容性方面最接近已经被FDA批准并被临床长时间验证过较好生物相容性的ICG。目前基于IR820设计的肿瘤靶向荧光探针较多，然而这些探针都是基于纳米材料与IR820的包载作用来合成。这些基于IR820合成出来的纳米探针虽然在肿瘤成像方面展现有一定的潜力，但是纳米探针由于具有较大的尺寸(纳米级)，相比于有机小分子探针，纳米探针在生物代谢方面可能存在较大的肾、肝毒性。基于IR820染料的肿瘤靶向标记小分子荧光探针较少，而目前没有针对肿瘤细胞表面高表达整合素(尤其是整合素 $\alpha v \beta 3$)设计的基于IR820的有机小分子荧光探针。另一方面，靶向基团跟IR820偶联中，IR820的中位氯取代是其唯一能够用来偶联的基团。但是在偶联的时候，IR820的中位氯基团很容易被氨基和巯基等基团取代(Sci.China Chem.2020,63,699-706)，因此偶联反应副反应很多，导致在合成上利用IR820中位氯的取代反应直接引入靶向基团合成目标探针存在较大的挑战。同时，在利用IR820进行后续偶联反应中，由于其带有两个磺酸基，导致纯化存在一定困难。因此，每一步偶联产物往往采用反相HPLC进行分离，需要大型反相制备HPLC设备，需要耗费大量溶剂和时间。探

索新型简便的合成工艺有利于节省基于IR820开发的荧光试剂的成本，也为其市场化奠定基础。

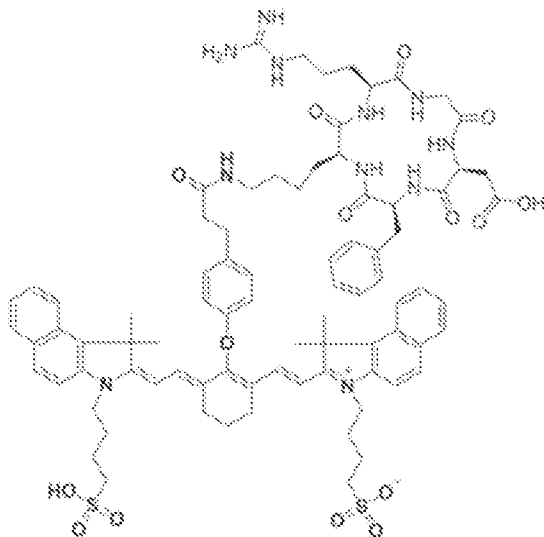
[0006] 基于IR820的引入靶向肿瘤细胞表面高表达整合素(尤其是高表达整合素 $\alpha_v\beta_3$) 的cRGD环肽来靶向制备方法也未见报道。同时，IRDye800CW和ZW800-1的发射波长在800nm左右，虽然达到近红外区域，但是比新吡啶菁染料(IR820)的发射(820nm)波长短20nm左右，因此，基于以上两种染料开发的贝伐单抗-IRDye800CW和cRGD-ZW800-1的生物组织穿透能力比IR820弱。

[0007] 公开内容

[0008] 本公开的目的包括，提供一种基于新吡啶菁IR820的荧光化合物及其制备和应用，

[0009] 为了实现本公开的上述目的中的至少一个目的，特采用以下技术方案：

[0010] 第一方面，本公开提供一种提供了一种基于新吡啶菁IR820的荧光化合物，其分子结构式如式(1)所示：



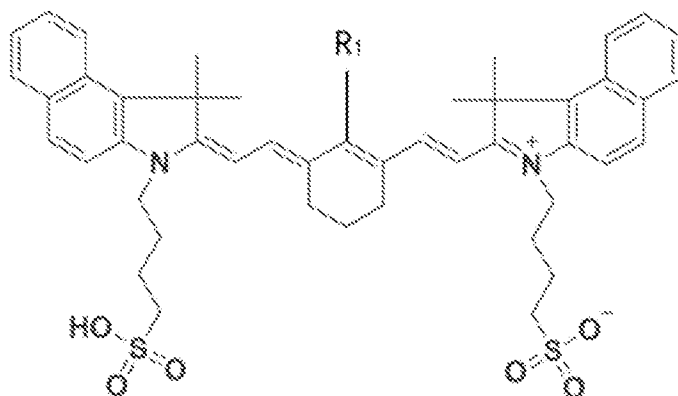
式 (1)

。

[0011] 第二方面，本公开提供一种基于新吡啶菁IR820的荧光化合物的制备方法，使式(2)所示化合物依次与连接臂的前驱体、cRGD反应，从而得到目标产物；

[0012] 其中，式(2)所示化合物的分子结构式如下：

[0013]

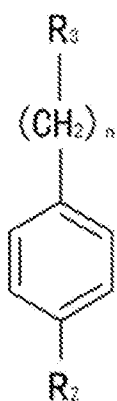


式 (2)

其中， R_1 选自卤族元素；

[0014] 所述连接臂的前驱体包括具有式(3)所示结构的化合物：

[0015] 其中， R_2 包括羟基、 R_3 包括羧基， n 为1~10。



式 (3)

[0016] 进一步的， R_1 为Cl。

[0017] 进一步的， R_2 为羟基、 R_3 为羧基， $n=2$ 。

[0018] 进一步的，式(2)所示化合物、连接臂的前驱体、cRGD的摩尔比为1：(1-10)：(1-3)，具体可为1：1：1，或1:10:3，或1:5:2等此范围内的任意中间点值。

[0019] 进一步的，式(2)所示化合物依次与连接臂的前驱体在有机溶剂体系(例如DMF)反应，反应体系中还加入有氢化钠，反应温度为室温，反应时间为3-5h。

[0020] 进一步的，式(2)所示化合物与连接臂的前驱体反应所得的中间产物先在NMP或DMF溶剂中采用EDC和NHS活化处理后，再与cRGD反应，反应温度为室温。

- [0021] 第三方面，本公开提供一种基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物在制备手术荧光导航探针中的应用。
- [0022] 第四方面，本公开提供一种荧光组合物，其包括如上所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物，以及药学上可接受的载体。
- [0023] 第五方面，本公开提供一种荧光成像系统，包括荧光检测设备及荧光探针，所述荧光探针包括如上所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物。
- [0024] 另外，本公开还提供了基于非诊疗目的的荧光成像方法，其包括：向受试对象施用荧光探针，之后对受试对象进行荧光成像；其中，所述受试对象包括活细胞、动物的活性生理组织或活体动物；所述荧光探针包括所述荧光化合物。
- [0025] 第六方面，本公开提供一种所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物在特异性结合整合素中的应用。
- [0026] 第七方面，本公开提供一种所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物在靶向肿瘤细胞表面高表达整合素中的应用。
- [0027] 进一步的，本公开提供一种所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物在靶向肿瘤细胞表面高表达整合素 $\alpha v \beta 3$ 中的应用。
- [0028] 第八方面，本公开提供一种所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物在肿瘤部位荧光造影中的应用。
- [0029] 进一步的，所述肿瘤包括整合素高表达的肿瘤。
- [0030] 进一步的，所述肿瘤包括整合素 $\alpha v \beta 3$ 高表达的肿瘤。
- [0031] 进一步的，所述肿瘤包括但不限于乳腺癌肿瘤和/或脑胶质肿瘤。
- [0032] 与现有技术相比，本公开的有益效果包括：
- [0033] (1)本公开基于ICG母核结构的靶向肿瘤荧光探针，相比于FDA批准的ICG，本公开的荧光探针具有较好的肿瘤靶向性和光稳定性好。
- [0034] (2)本公开相比于目前报道的基于ICG类似物如IRDye800CW和ZW800-1开发的荧光探针贝伐单抗-IRDye800CW、cRGD-ZW800-1，本公开的荧光探针在带电荷方式和化学结构上完全保留了ICG的带电方式和母核结构。因此在生物相容性方面会最接近已经被FDA批准并被临床长时间验证过较好生物相容性的ICG。

- [0035] (3)目前基于IR820荧光染料并采用cRGD作为靶向基团的肿瘤靶向有机小分子荧光探针没有，本公开提供了一种基于IR820荧光染料的新型肿瘤靶向有机小分子荧光探针。
- [0036] (4)本公开提供的IR820-cRGD作为一种有机小分子荧光探针，相比于现有技术公开的基于IR820的纳米探针和IR820偶联的抗原或者抗体探针(抗体-IR820偶联物)，IR820-cRGD具有有机小分子探针的优势，即，IR820-cRGD可以高效率地穿透细胞膜进入细胞，从而实现更高效的肿瘤部位成像。
- [0037] (5)本公开采用在IR820中位氯中先引入带酚羟基的连接臂，利用连接臂再进一步跟所需要靶向基团偶联，这样利用酚羟基先取代IR820上的氯，形成稳定的酚取代IR820，避免了IR820直接跟靶向基团偶联时候其上氯原子很容易被带氨基或者巯基等偶联辅助试剂影响，导致偶联合成不成功。因此，本公开提供了一种IR820与靶向基团成功偶联的合成方法。
- [0038] (6)本公开目前IR820偶联基团后，每一步反应大多数采用反相HPLC制备纯化得到产物，本公开采用柱层析(展开剂，二氯甲烷：甲醇=10:1~5:1)得到IR820-COOH纯品，减少了仪器、设备和人力的损耗，并且收率接近于反相HPLC制备。

附图说明

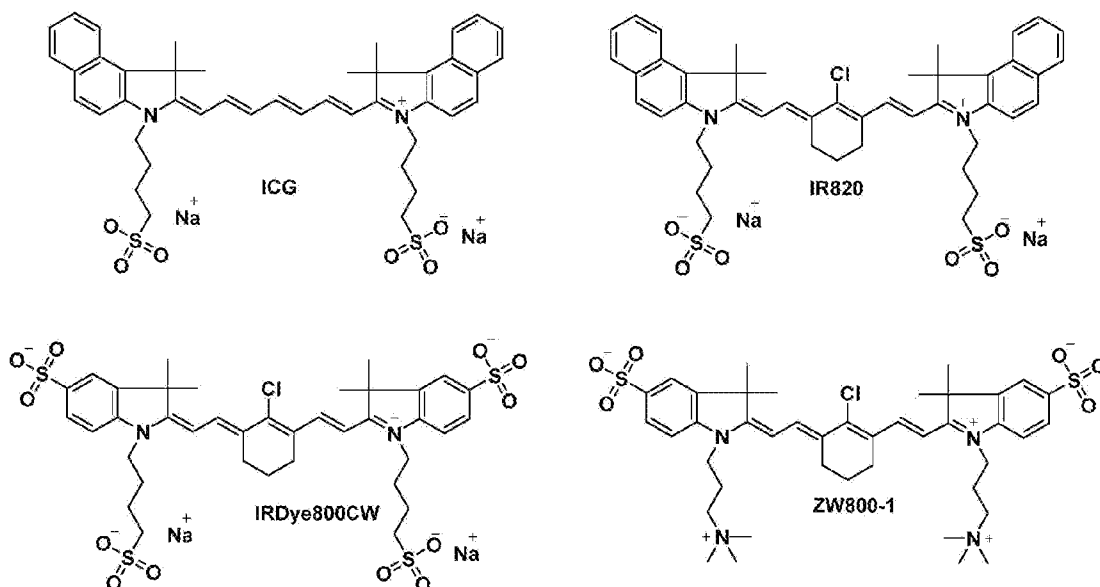
- [0039] 图1是本公开实施例中一种IR820-COOH的质谱图
- [0040] 图2是本公开实施例中一种IR820-cRGD的质谱图。
- [0041] 图3是本公开实施例中一种IR820-cRGD的HPLC图。
- [0042] 图4是本公开实施例中一种IR820-cRGD与不同细胞的荧光及明场照片。
- [0043] 图5是本公开实施例中一种IR820-cRGD与在小鼠肿瘤中的活体荧光成像图。
- [0044] 图6是本公开实施例中不同浓度的IR820-cRGD在小鼠肿瘤部位内荧光信号随时间变化的曲线图。
- [0045] 图7是本公开实施例中IR820-cRGD在小鼠原位乳腺癌部位的6小时的荧光成像图。

具体实施方式

[0046] 下面将结合实施例对本公开的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将会理解，下列实施例仅用于说明本公开，而不应视为限制本公开的范围。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。

[0047] 为了有助于更清楚的理解本公开的内容，现结合具体的实施例详细介绍如下。但这些实施例仅是范例性的，并不对本公开的范围构成任何限制。

[0048] 以下各实施例中，所述及的ICG、IR820、IRDye800CW、ZW800-1的结构式如下：

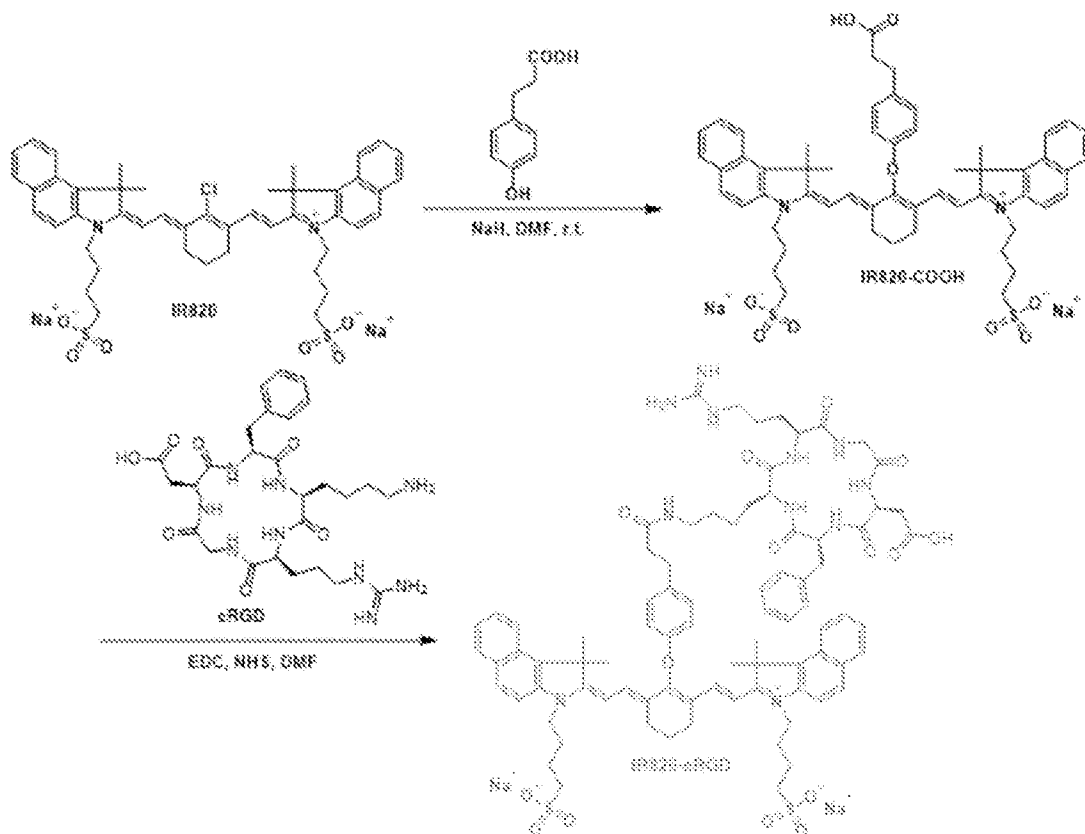


[0049] cRGD购买自西安齐岳生物科技有限公司。

[0050] 其余如无特别说明的原料或处理技术，则表明其均为本领域的常规市售原料或常规处理技术。

[0051] 实施例1

[0052] 本实施例所提供的一种荧光化合物可以被命名为IR820-cRGD，其合成路线如下：



[0053] 具体的，该荧光化合物的合成方法包括如下步骤：

[0054] (1)中间体IR820-COOH的合成：

[0055] 332mg对羟基苯丙酸溶解在10ml无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶剂中，加入氢化钠47mg，氮气保护下，室温搅拌半小时。加入IR820 170mg，继续在室温下搅拌反应4小时。TLC显示原料IR820消失，新点出现。停止反应，将反应液加入甲基叔丁基醚中，出现大量墨绿色固体。离心得到固体。用丙酮或者乙酸乙酯10ml清洗三次。得到固体在真空干燥下干燥得到粗品。进一步柱层析(展开剂，二氯甲烷：甲醇=10:1~5:1)得到纯品显金属光泽浅绿色，收率32%。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ 8.87(dJ=14.1Hz,2H),8.26(dJ=8.5Hz,2H),8.07-8.03(m,4H),7.75(dJ=9.0Hz,2H),7.63(t,8.5,2H),7.49(tJ=7.5Hz,2H),7.11(dJ=8.6Hz,2H),6.59(dJ=8.5Hz,2H),6.37(dJ=14.2Hz,2H),4.30(s,4H),3.53(s,2H),2.75(dJ=5.9Hz,4H),2.63(dJ=8.8Hz,4H),2.58(tJ=7.3Hz,4H),2.10-1.66(m,22H).¹³C NMR(101MHz,DMSO-d₆) δ 172.24,151.56,146.96,144.03,139.17,132.82,132.66,130.69,129.75,1

29.25,128.06,127.08,126.87,124.23,121.65,120.46,114.47,111.10,100.52
,54.25,50.07,49.87,43.12,39.43,39.38,39.22,39.17,39.01,38.96,38.80,38.76,38.55,38.34,
38.13,26.35,25.69,25.26,21.80,21.12.

[0056] HRMS(ES⁺,m/z):calcd for C₅₅H₅₉N₂O₉S₂⁺:1001.3452,found:1001.3459。其质谱图请参阅图1。

[0057] (2)IR820-cRGD的合成:

[0058] 将100mg IR820-COOH溶解在NMP或者DMF中,加入10倍当量的EDC和NHS,活化半小时后,加入等当量的cRGD,继续在室温下搅拌反应过夜。TLC显示原料IR820-COOH消失,新点出现。结束反应。HPLC分离得到绿色液体,冷冻干燥获得草绿色固体,即为目标产物IR820-cRGD,收率约20%

[0059] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ 8.15(d,J=8.4Hz,2H),8.04-7.95(m,5H),7.74(d,J=8.8Hz),7.62-7.58(m,6H),7.49-7.45(m,2H),7.28(d,J=8.0Hz,2H),7.16(d,J=8.0Hz,2H),6.71(s,br,1H),6.26(d,J=12.4Hz,2H),4.27(s,4H),4.25-4.17(m,2H),4.12-4.05(q,J₁=7.5Hz,J₂=13.5Hz,2H),3.92(s,4H),3.89-3.82(q,J₁=6.0Hz,J₂=15.0Hz,2H),3.73-3.65(m,4H),3.13(s,6H),3.04(s,2H),2.77(s,4H),2.65-2.64(m,4H),2.46-2.45(m,6H),2.35-2.21(m,4H),2.10-2.06(m,8H),1.96-1.80(m,6H),1.88(d,J=6.0Hz,1H),1.40(s,2H),1.07-0.99(m,6H),1.22(s,12H).

[0060] LC-MS(ES⁺,m/z):[M+H]²⁺,772.21;通过HPLC测定其纯度约95%(缓冲液A:0.1%TFA in H₂O;缓冲液B:0.1%TFA in乙腈)。其质谱图请参阅图2,HPLC如图3所示。

[0061] 实施例2

[0062] IR820-cRGD在活细胞中的荧光成像

[0063] 细胞成像所用的仪器型号Leica TCS SP5II confocal laser scanning microscope using a HC × PLAPO 63 × oil objective(NA:1.40)。

[0064] 实验分三组进行,一组在正常的细胞CHO,一组乳腺癌细胞MCF-7,一组宫颈癌细胞Hela。成像测试前首先将培养好的细胞培养液吸净,并用PBS缓冲液洗涤次,再用DMEM或者1640洗涤一次。将配制好的探针浓度1mM DMSO母液量取10 μL到2ml含有新鲜DMEM或者1640培养基的培养皿中。培养结束后,首先移除多

余的培养液,再用PBS缓冲液(pH7.4)洗涤掉多余的探针,再分别用共聚焦荧光显微镜进行成像测试。图4为探针在三种细胞种的荧光成像图。可以显示探针对于肿瘤细胞有较大的选择性荧光信号。显示探针用于肿瘤成像的潜力。

[0065] 实施例3

[0066] IR820-cRGD在活体小鼠中的荧光成像

[0067] 三只荷瘤鼠通过尾静脉分别注射10 μ M浓度的IR820-cRGD纯水溶液, 含有等当量探针浓度的DMSO纯水溶液以及IR820纯水溶液。2小时后, 通过小动物活体成像仪器观察小鼠肿瘤部位成像情况。如图5所示, IR820-cRGD在小鼠肿瘤部位显示非常亮的荧光信号, 相反, 纯水溶液没有荧光信号, 而没有靶向的IR820只有微弱的荧光信号。结果说明靶向探针IR820-cRGD极大地提高了IR820染料对于活体肿瘤的成像效果。

[0068] 实施例4

[0069] 与实施例1相比, 绝大部分都相同, 除了调整IR820、对羟基苯丙酸、cRGD的摩尔比为1: 1: 1。

[0070] 实施例5

[0071] 与实施例1相比, 绝大部分都相同, 除了调整IR820、对羟基苯丙酸、cRGD的摩尔比为1: 10: 3。

[0072] 实施例6

[0073] IR820-cRGD在活体小鼠原位乳腺癌的荧光成像

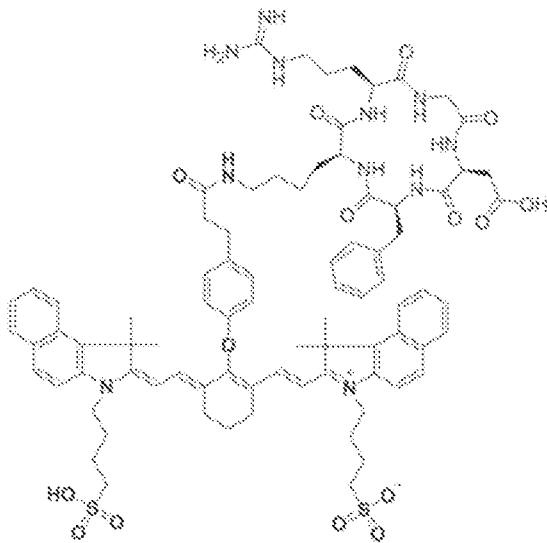
[0074] 与实施例3相比, 肿瘤采用MDA-MB-231-LD诱导的原位乳腺癌。通过尾静脉分别注射纯生理盐水、IR820和三个浓度的IR820-cRGD生理盐水溶液。通过小动物活体成像仪器观察小鼠肿瘤部位不同时间内荧光信号。结果说明, 靶向探针IR820-cRGD极大地提高了IR820染料对于原位乳腺癌的成像效果。发现最佳成像时间在6小时, 最合适浓度10nmol(图6所示)。如图7直观展示了6小时的成像效果, 6小时后, IR820-cRGD在小鼠原位乳腺癌部位显示非常亮的荧光信号, 相反, 纯生理盐水没有荧光信号, 而没有靶向的IR820只有微弱的荧光信号。

工业实用性

[0075] 本公开提供的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物具有较好的肿瘤靶向性和光稳定性，具有近红外荧光发射、良好的肿瘤靶向性、生物相容性，细胞毒性低、生物组织穿透力强，可以应用于肿瘤细胞、活体肿瘤的靶向荧光成像，具有较大的推广应用价值。

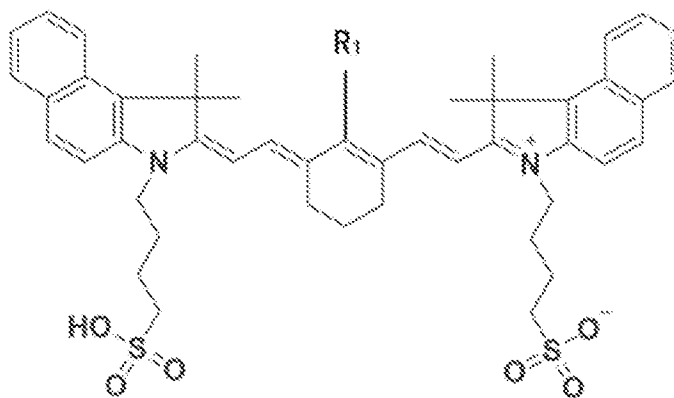
权利要求书

[权利要求 1] 一种基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物，其特征在于，其分子结构式如式(1)所示：



式 (1)

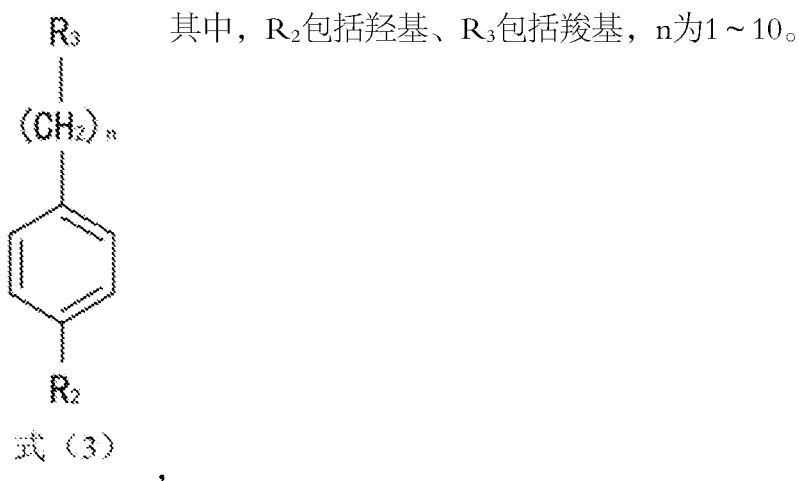
[权利要求 2] 如权利要求1所述的一种基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物的制备方法，其特征在于，使式(2)所示化合物依次与连接臂的前驱体、cRGD反应，从而得到目标产物；
其中，式(2)所示化合物的分子结构式如下：



式 (2)

其中，R₁选自卤族元素；

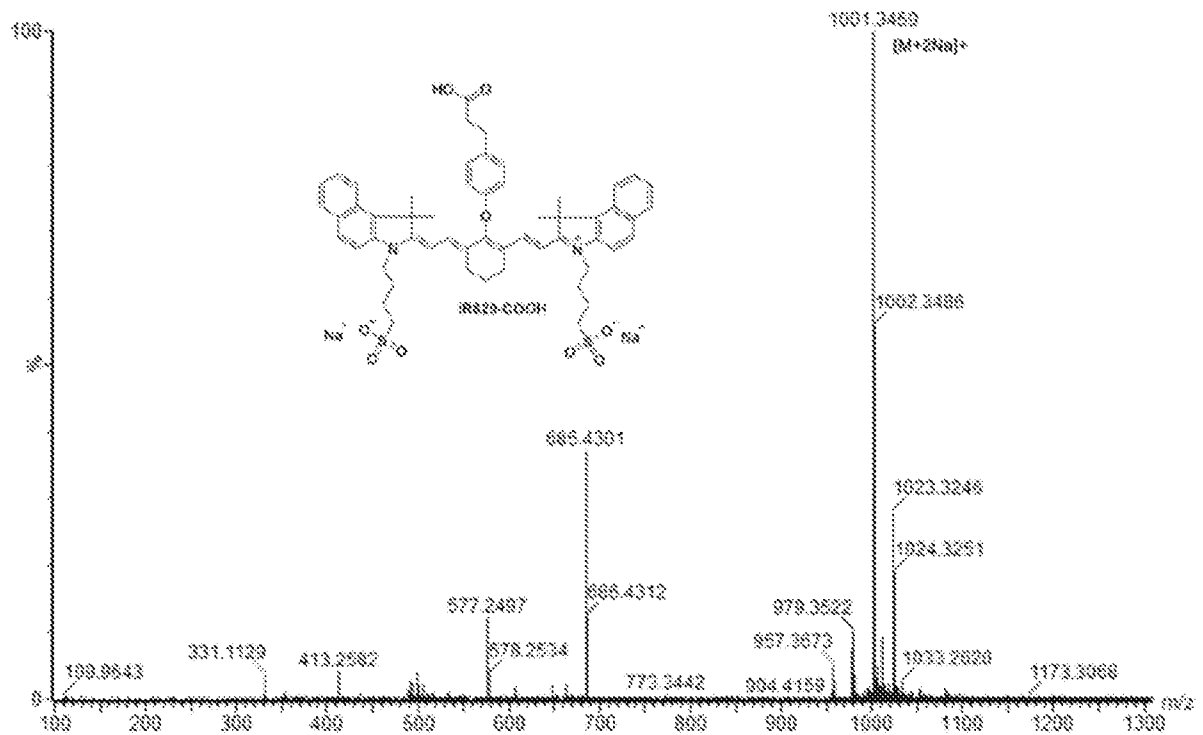
所述连接臂的前驱体包括具有式(3)所示结构的化合物：



- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的一种基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物的制备方法，其特征在于， R_1 为Cl。
- [权利要求 4] 根据权利要求2所述的一种基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物的制备方法，其特征在于， R_2 为羟基、 R_3 为羧基， $n=2$ 。
- [权利要求 5] 根据权利要求2所述的一种基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物的制备方法，其特征在于，式(2)所示化合物、连接臂的前驱体、cRGD的摩尔比为1：(1-10)：(1-3)。
- [权利要求 6] 根据权利要求2所述的一种基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物的制备方法，其特征在于，式(2)所示化合物依次与连接臂的前驱体在有机溶剂体系反应，反应体系中还加入有氢化钠，反应温度为室温，反应时间为3-5h。
- [权利要求 7] 根据权利要求2所述的一种基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物的制备方法，其特征在于，式(2)所示化合物与连接臂的前驱体反应所得的中间产物先在NMP或DMF溶剂中采用EDC和NHS活化处理后，再与cRGD反应，反应温度为室温。
- [权利要求 8] 如权利要求1所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物在制备手术荧光导航探针中的应用。
- [权利要求 9] 一种荧光组合物，其特征在于，其包括如权利要求1所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物，以及药学上可接受的载体。

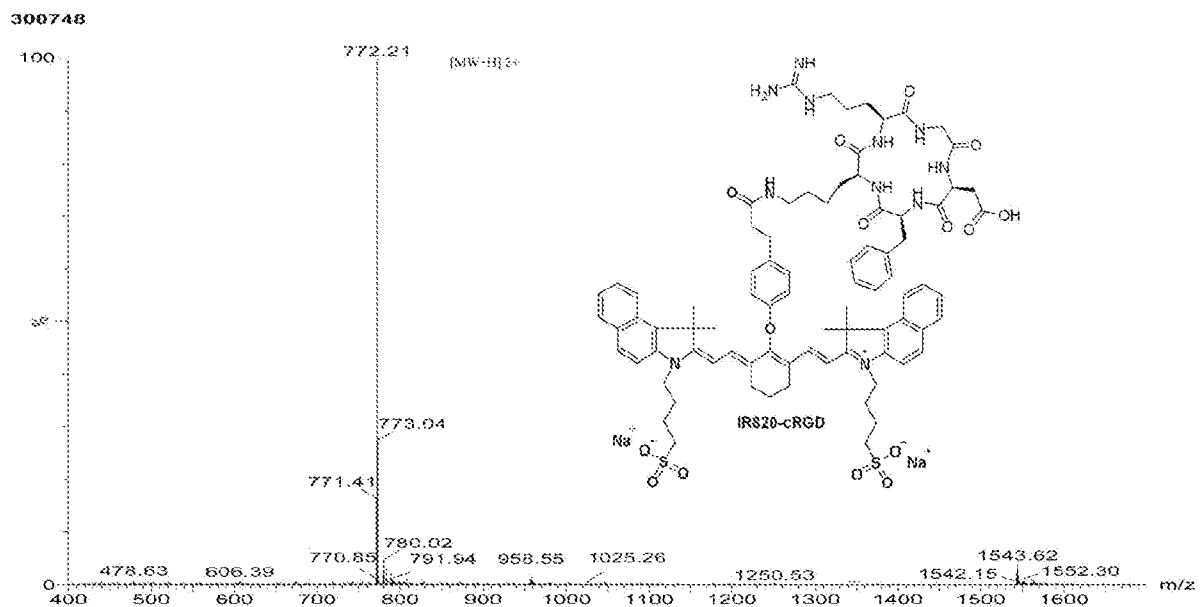
- [权利要求 10] 一种荧光成像系统，包括荧光检测设备及荧光探针，其特征在于，所述荧光探针包括如权利要求1所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物。
- [权利要求 11] 根据权利要求1所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物在特异性结合整合素中的应用。
- [权利要求 12] 根据权利要求1所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物在靶向肿瘤细胞表面高表达整合素中的应用。
- [权利要求 13] 根据权利要求12所述应用，其特征在于，所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物在靶向肿瘤细胞表面高表达整合素 $\alpha v \beta 3$ 中的应用。
- [权利要求 14] 根据权利要求1所述的基于新吲哚菁绿IR820的荧光化合物在肿瘤部位荧光造影中的应用。
- [权利要求 15] 根据权利要求14所述的应用，其特征在于，所述肿瘤包括整合素高表达的肿瘤。
- [权利要求 16] 根据权利要求14或15所述的应用，其特征在于，所述肿瘤包括整合素 $\alpha v \beta 3$ 高表达的肿瘤。
- [权利要求 17] 根据权利要求16所述的应用，其特征在于，所述肿瘤包括乳腺癌肿瘤和/或脑胶质肿瘤。

[图 1]

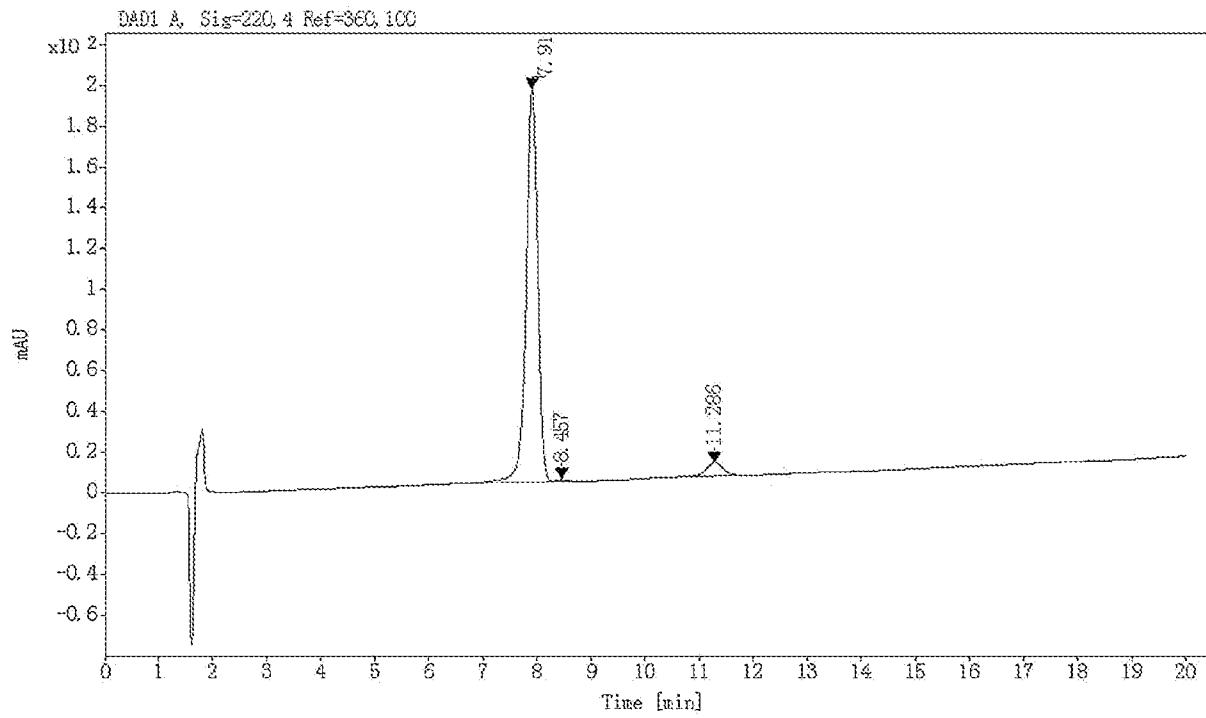


[图 2]

MASS SPECTROMETRY REPORT

细则 26,
26.07.2024细则 26,
14.08.2024

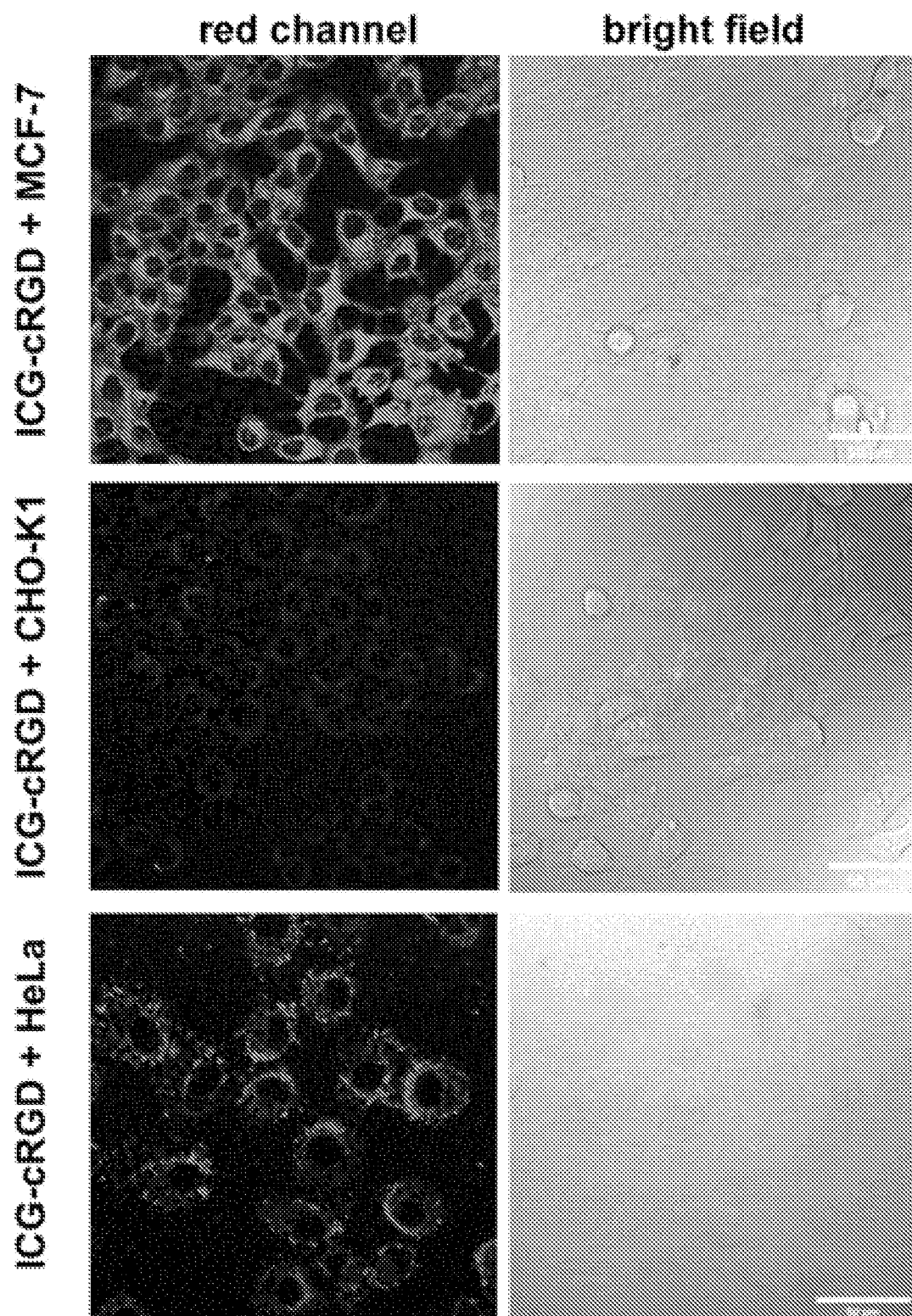
[图 3]

细则 26,
26.07.2024

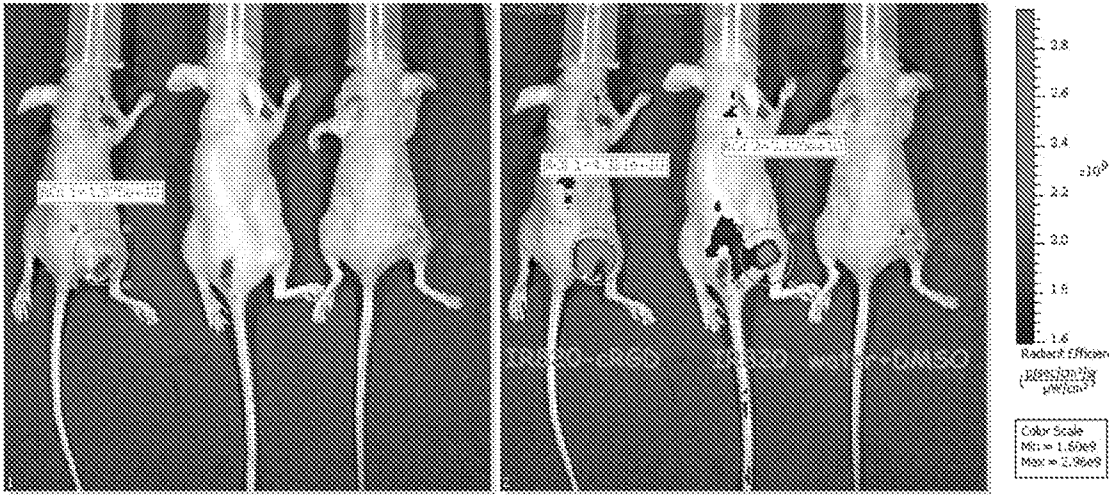
Signal: DAD1 A, Sig=220, 4 Ref=360, 100

RT[min]	Type	Width[min]	Area	Height	Area%	Name
7.910	BV R	0.2299	2879.7737	193.1826	95.1551	
8.457	VB E	0.2287	14.5131	1.0038	0.4795	
11.286	MM	0.3466	132.1145	6.3523	4.3654	

[图 4]

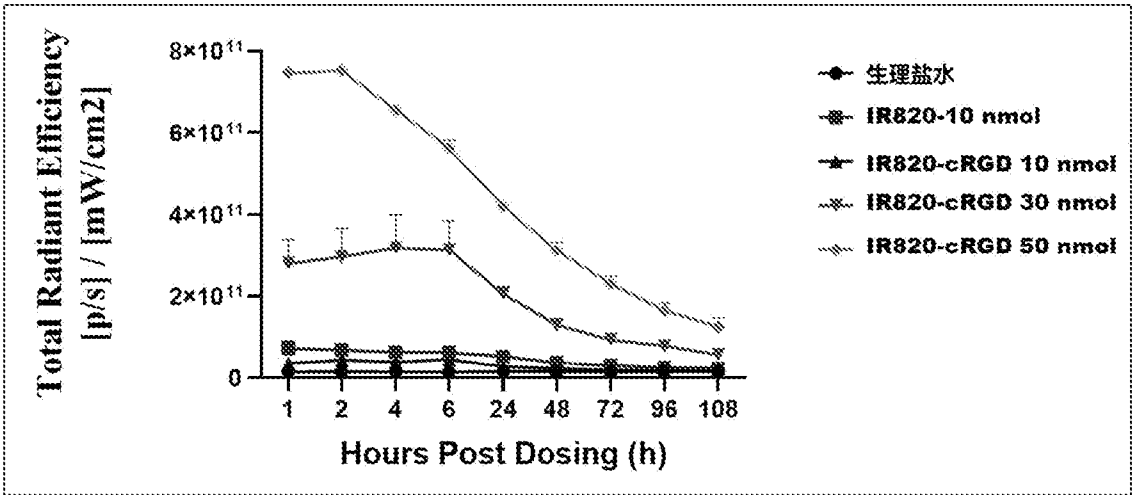


[图 5]



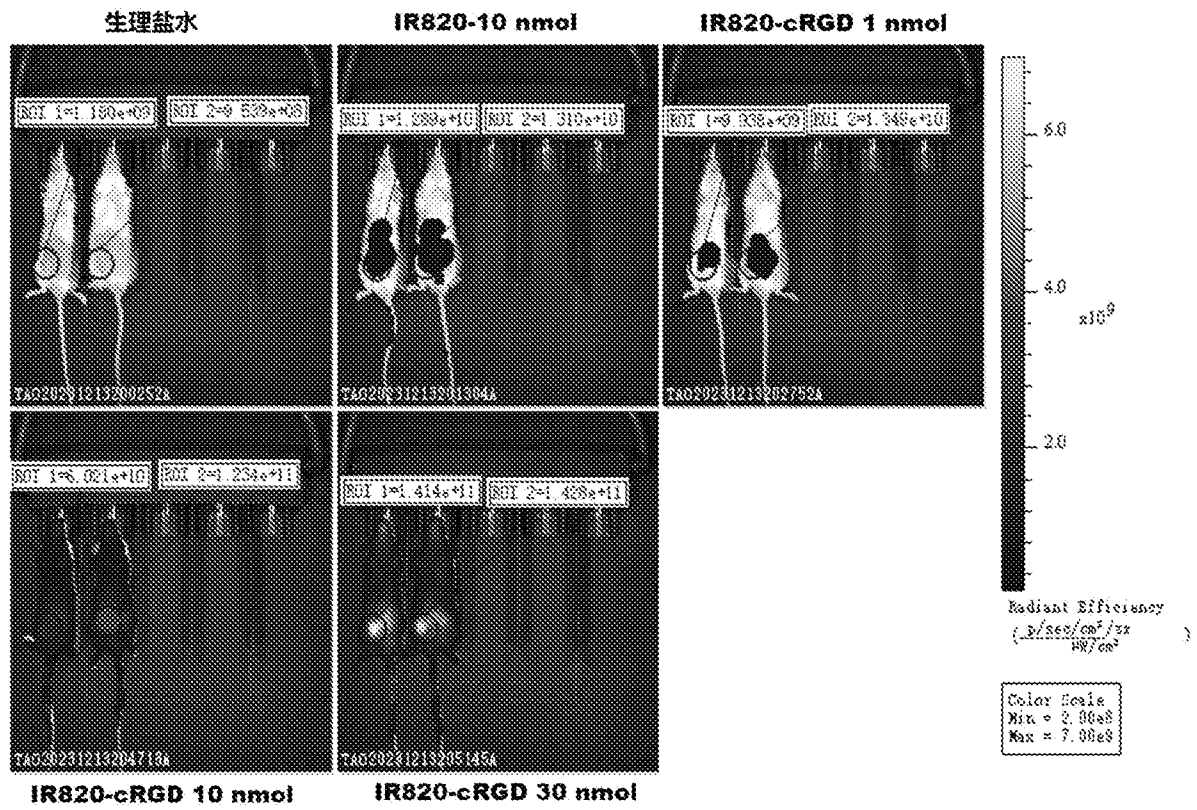
细则 26,
26.07.2024

[图 6]



细则 26,
26.07.2024

[图 7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2024/101326

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D403/14(2006.01)i; C09K11/06(2006.01)i; A61K49/00(2006.01)i; G01N21/64(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)

IPC:C07D C09K A61K G01N

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)

CNABS, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, VEN, WPABSC, CNKI, 百度学术, Baidu Scholar, WEB OF SCIENCE, STN: 吡啶菁绿, IR820, cRGD, 荧光, 肿瘤, 癌, 靶向, 整合素, 生物相容性, 毒性, Indocyanine green, Fluorescence, Tumor, Cancer, Target, Integrin, Biocompatibility, Toxicity.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116947829 A (SHANGHAI NORMAL UNIVERSITY) 27 October 2023 (2023-10-27) claims 1-10, and embodiments 2-3	1-17
A	CN 115490672 A (UNIVERSITY OF SOUTH CHINA) 20 December 2022 (2022-12-20) claims 1-10	1-17
A	CN 105130876 A (HUNAN BRI NEW SPECIAL MEDICINE CO., LTD.) 09 December 2015 (2015-12-09) claims 1-8, and description, paragraphs 2 and 3	1-17
A	CN 109020955 A (SHENZHEN UNIVERSITY) 18 December 2018 (2018-12-18) claims 1-10	1-17
A	US 2023158176 A1 (LINYI UNIVERSITY) 25 May 2023 (2023-05-25) claims 1-10	1-17



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

“D” document cited by the applicant in the international application

“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

05 September 2024

Date of mailing of the international search report

20 September 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Telephone No.

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

2. ☒ Claims Nos.: **11-17**
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:

Claims 11-17 relate to the use of the compound i.e., new indocyanine green IR820. The technical subject matter relates to the diagnosis and treatment of diseases, and falls within subject matter for which an international search is not required as defined in PCT Rule 39.1(iv). The search is performed on the basis that the method is reasonably expected to be the subject matter of a pharmaceutical use claim. That is, the subject matter of independent claim 11 is: the use of the fluorescent compound based on new indocyanine green IR820 according to claim 1 in the preparation of a probe specifically binding to an integrin. The subject matter of independent claim 12 is: the use of the fluorescent compound based on new indocyanine green IR820 according to claim 1 in the preparation of a probe targeting a high-expression integrin on the surface of a tumor cell. The subject matter of independent claim 14 is: the use of the fluorescent compound based on new indocyanine green IR820 according to claim 1 in the preparation of a probe in fluorescein angiography at a tumor site.

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/CN2024/101326

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	116947829	A	27 October 2023	None	
CN	115490672	A	20 December 2022	None	
CN	105130876	A	09 December 2015	None	
CN	109020955	A	18 December 2018	None	
US	2023158176	A1	25 May 2023	None	

A. 主题的分类

C07D403/14(2006.01)i; C09K11/06(2006.01)i; A61K49/00(2006.01)i; G01N21/64(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)

IPC:C07D C09K A61K G01N

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))

CNABS,CNXTX,ENTXT,ENTXTC,VEN,WPABSC,CNKI,百度学术,WEB OF SCIENCE,STN:吡啶菁绿, IR820, cRGD, 荧光, 肿瘤, 癌, 靶向, 整合素, 生物相容性, 毒性, Indocyanine green, Fluorescence, Tumor, Cancer, Target, Integrin, Biocompatibility, Toxicity。

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 116947829 A (上海师范大学) 2023年10月27日 (2023 - 10 - 27) 权利要求1-10和实施例2-3	1-17
A	CN 115490672 A (南华大学) 2022年12月20日 (2022 - 12 - 20) 权利要求1-10	1-17
A	CN 105130876 A (湖南博瑞新特药有限公司) 2015年12月9日 (2015 - 12 - 09) 权利要求1-8和说明书第2和3段	1-17
A	CN 109020955 A (深圳大学) 2018年12月18日 (2018 - 12 - 18) 权利要求1-10	1-17
A	US 2023158176 A1 (UNIV LINYI) 2023年5月25日 (2023 - 05 - 25) 权利要求1-10	1-17

☐ 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

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“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

2024年9月5日

国际检索报告邮寄日期

2024年9月20日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

吴志威

电话号码 (+86) 027-59371677

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1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：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
2. ☒ 权利要求： 11-17
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：
权利要求11-17涉及所述化合物新吡啶菁绿IR820的应用，该技术主题涉及疾病的诊断与治疗，属于细则39.1 (iv) 定义的不要求进行国际检索的主题。检索是基于将该方法合理预期为制药用途权利要求的主题进行的。即独立权利要求11的主题为：根据权利要求1所述的基于新吡啶菁绿IR820的荧光化合物在制备特异性结合整合素的探针中的应用。独立权利要求12的主题为：根据权利要求1所述的基于新吡啶菁绿IR820的荧光化合物在制备靶向肿瘤细胞表面高表达整合素的探针中的应用。独立权利要求14的主题为：根据权利要求1所述的基于新吡啶菁绿IR820的荧光化合物在制备肿瘤部位荧光造影中探针的应用。
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/CN2024/101326

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	116947829	A	2023年10月27日	无	
CN	115490672	A	2022年12月20日	无	
CN	105130876	A	2015年12月9日	无	
CN	109020955	A	2018年12月18日	无	
US	2023158176	A1	2023年5月25日	无	