(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114729927 A
(43)申请公布日 2022.07.08

(21)申请号 202080077691.9
(22)申请日 2020.11.12
(30)优先权数据
10-2019-0144581 2019.11.12 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.05
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2020/015922 2020.11.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/096263 KO 2021.05.20
(71)申请人 梨花女子大学校产学协力团
地址 韩国首尔
(72)发明人 金宽默 尹柱荣 车宣信
(74)专利代理机构 北京市中伦律师事务所 11410
专利代理师 钟锦舜
(51)Int.Cl.
G01N 33/52(2006.01)

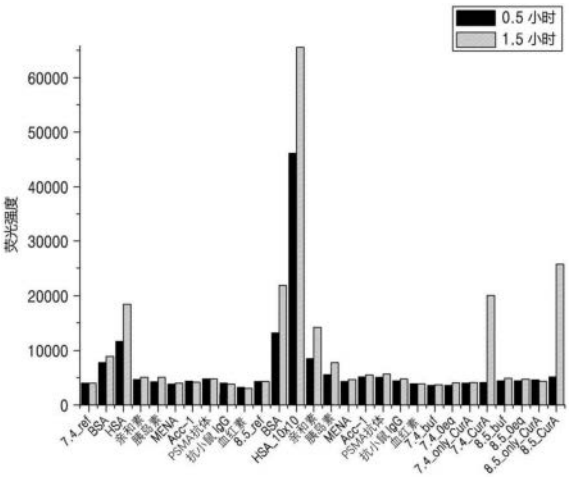
权利要求书4页 说明书19页 附图19页

(54)发明名称

细胞成像组合物及使用其的细胞物质成像方法

(57)摘要

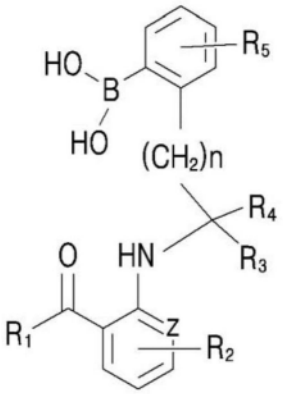
本申请涉及一种包含1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid]或其衍生物作为荧光探针化合物的细胞成像组合物以及使用该组合物的细胞物质成像方法。



CN 114729927 A

1.一种细胞成像组合物，其包含由以下化学式1表示的、1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid]或其衍生物作为荧光探针化合物：

[化学式1]



；

在所述化学式1中，

R_1、R_2、R_3、R_4和R_5各自独立地选自由氢、卤素基、氨基、硝基、氰基、甲酰基、羧基、C_{1-10}烷基、C_{1-10}烷基羰基、C_{6-10}芳基和C_{1-10}烷氧基组成的组，

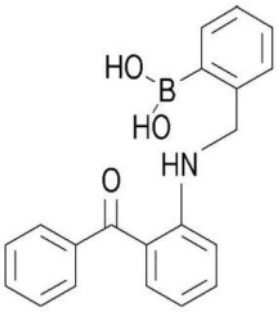
当所述C_{1-10}烷基、所述C_{1-10}烷基羰基、所述C_{6-10}芳基或所述C_{1-10}烷氧基被取代时，由选自由卤素基、羟基、氨基、氰基、硝基和C_{6-10}芳基组成的组中的至少一个取代基取代；

所述Z是-N-、-O-或-CH；

所述n是0至5的整数。

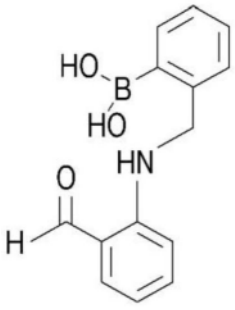
2.根据权利要求1所述的细胞成像组合物，其中所述荧光探针化合物包括以下化合物中的至少一种：

[化合物1]



；

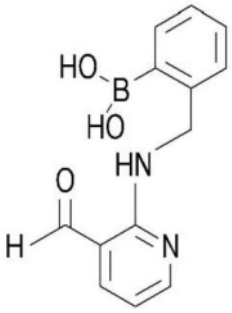
[化合物2]



和

；

[化合物3]



。

3.根据权利要求1所述的细胞成像组合物，其中所述细胞成像组合物用于对活细胞的细胞内物质进行成像。

4.根据权利要求3所述的细胞成像组合物，其中所述细胞内物质包括细胞物质或细胞器。

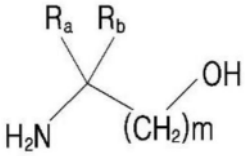
5.根据权利要求3所述的细胞成像组合物，其中所述细胞内物质包括细胞质、线粒体、蛋白质或生物分子。

6.根据权利要求4所述的细胞成像组合物，其中所述细胞器包括线粒体和/或蛋白质，以用于对干细胞、内质网或癌细胞进行成像。

7.根据权利要求3所述的细胞成像组合物，其中所述细胞内物质包括选自由氨基酸、核酸碱基、氨基酸酯、氨基酸酰胺及其组合组成的组中的生物物质，其包括胺类化合物，所述胺类化合物包括氨基醇。

8.根据权利要求7所述的细胞成像组合物，其中所述胺类化合物包括由以下化学式2表示的胺类化合物：

[化学式2]



；

在所述化学式2中，

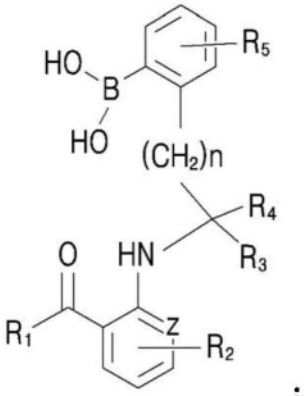
R_a和R_b各自独立地选自由氢、卤素基、氨基、硝基、氰基、甲酰基、羧基、C_{1-10}烷基、C_{1-10}烷基羰基、C_{6-10}芳基和C_{1-10}烷氧基组成的组，

当所述C_{1-10}烷基、所述C_{1-10}烷基羰基、所述C_{6-10}芳基或所述C_{1-10}烷氧基被取代时，由选自由卤素基、羟基、氨基、氰基、硝基和C_{6-10}芳基组成的组中的至少一个取代基取代；

所述m为0至5的整数。

9.一种细胞物质成像方法，包括对通过荧光探针化合物与靶细胞中的物质之间的反应产生的荧光进行测量，其中所述荧光探针化合物为由以下化学式1表示的、1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid]或其衍生物：

[化学式1]



;

在所述化学式1中，

R_1、R_2、R_3、R_4和R_5各自独立地选自由氢、卤素基、氨基、硝基、氰基、甲酰基、羧基、C_{1-10}烷基、C_{1-10}烷基羰基、C_{6-10}芳基和C_{1-10}烷氧基组成的组，

当所述C_{1-10}烷基、所述C_{1-10}烷基羰基、所述C_{6-10}芳基或所述C_{1-10}烷氧基被取代时，由选自由卤素基、羟基、氨基、氰基、硝基和C_{6-10}芳基组成的组中的至少一个取代基取代；

所述Z是-N-、-O-或-CH；

所述n是0至5的整数。

10.根据权利要求9所述的细胞物质成像方法，其中所述靶细胞是活细胞。

11.根据权利要求9所述的细胞物质成像方法，还包括通过测量由所述荧光探针化合物与所述靶细胞中的物质之间的反应产生的荧光来获得所述靶细胞中的物质的图像。

12.根据权利要求9所述的细胞物质成像方法，其中所述靶细胞中的物质包括细胞物质或细胞器。

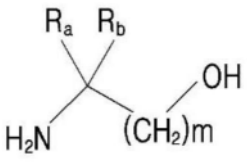
13.根据权利要求9所述的细胞物质成像方法，其中所述靶细胞中的物质包括细胞质、线粒体、蛋白质或生物分子。

14.根据权利要求12所述的细胞物质成像方法，其中所述细胞器包括线粒体和/或蛋白质，以用于对干细胞、内质网或癌细胞进行成像。

15.根据权利要求9所述的细胞物质成像方法，其中所述靶细胞中的物质包括选自由氨基酸、核酸碱基、氨基酸酯、氨基酸酰胺及其组合组成的组中的生物物质，其包括胺类化合物，所述胺类化合物包括氨基醇。

16.根据权利要求15所述的细胞物质成像方法，其中所述胺类化合物包括由以下化学式2表示的胺类化合物：

[化学式2]



;

在所述化学式2中，

R_a和R_b各自独立地选自由氢、卤素基、氨基、硝基、氰基、甲酰基、羧基、C_{1-10}烷基、C_{1-10}烷基羰基、C_{6-10}芳基和C_{1-10}烷氧基组成的组，

当所述C_{1-10}烷基、所述C_{1-10}烷基羰基、所述C_{6-10}芳基或所述C_{1-10}烷氧基被取代时，由选自

由卤素基、羟基、氨基、氰基、硝基和C_{6-10}芳基组成的组中的至少一个取代基取代；

所述m为0至5的整数。

细胞成像组合物及使用其的细胞物质成像方法

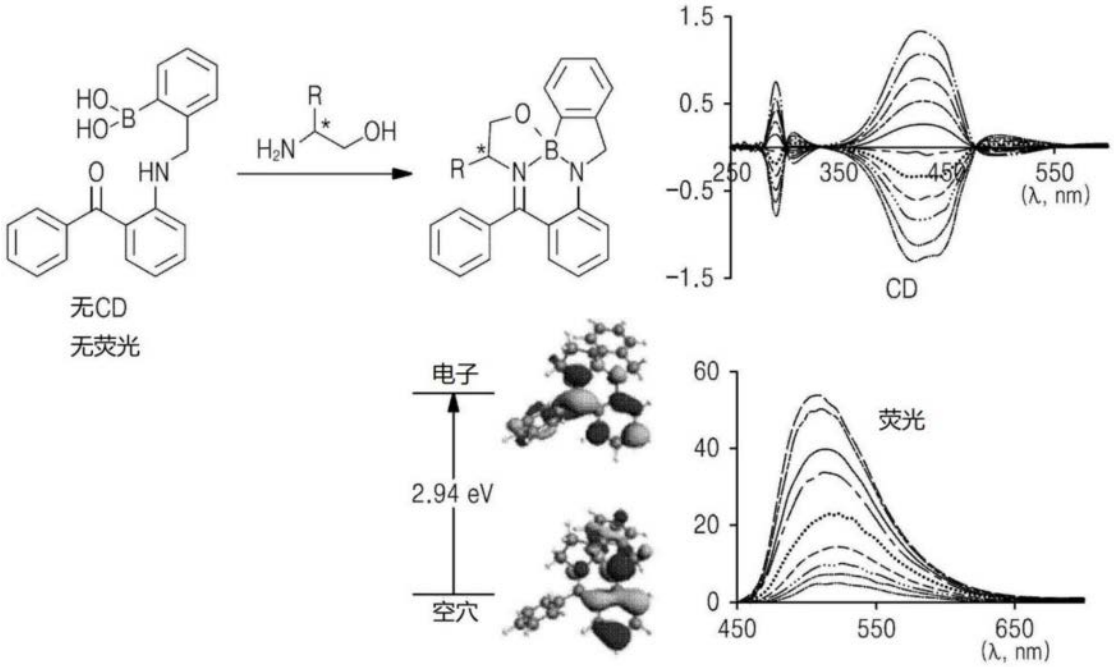
技术领域

[0001] 本申请提供一种包含1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid]或其衍生物作为荧光探针化合物的细胞成像组合物以及使用该化合物的细胞物质成像方法。

背景技术

[0002] 本发明人已开发出一种新化合物,该化合物能够通过与氨基醇选择性反应形成类似于氟硼荧(Bodipy)的结构而产生强圆二色性(circular dichroism,CD)和荧光。

[0003]



[0004] 在作为生命基础的细胞内存在诸如线粒体、内质网、网状体等细胞器以及诸如脂质、氨基酸衍生物和蛋白质等生物分子。对它们在细胞内的位置的实时荧光成像,除了在其自身功能究明方面外,在相关疾病和衰老的诊断和治疗预防研究中也发挥着重要作用。目前,为了对特定蛋白质进行成像,使用在通过基因操作来结合有GFP荧光蛋白的状态下进行表达的方法或注入附有荧光团的抗体的方法。在使用荧光蛋白的情况下,荧光强度和颜色难以控制且需要技术水平高、时间长、成本高,而且由于不能穿过细胞膜,因此具有需要在挤压(squeezing)细胞后溶解细胞膜的不便之处。出于这个原因,已经出现了对能够通过与蛋白质结合来产生荧光的小分子量合成化合物的需求。由于这些化合物可以替代抗体,其可广泛应用于蛋白质功能研究、靶向蛋白质的疾病诊断和治疗。

[0005] 尽管目前已经开发了许多在蛋白质中诱导荧光的化学标签,但这些标签需要复杂的操作,诸如将诸如肽的衔接子引入到靶蛋白中且还改变化学标签本身的结构。(J.Biophotonics(生物光子学杂志)4,No.6,391-402(2011))。

[0006] 最近,一种生物正交共轭(bioorthogonal conjugation)技术正在发展,该技术使用相对简单的有机化合物来针对活体中的蛋白质或特定生物分子特异性地产生荧光。术语

生物正交共轭最早由Carolyn R.Bertozzi使用,通常需要两个操作步骤(Sletten,Ellen M.,Bertozzi,Carolyn R.,"Bioorthogonal Chemistry:Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality(生物正交化学:在功能海洋中寻找选择性)"Angewandte Chemie International Edition(应用化学国际版).2009,48(38),6974-6998)。作为代表性的生物正交共轭,无铜点击化学(copper-free click chemistry)是已知的,其中首先将叠氮化物(azide,-N_3化合物)与靶蛋白或脂质结合,然后添加结合有环辛炔(cyclooctyne)的探针,从而使发生应变促进炔烃-叠氮化物环加成反应(strain-promoted alkyne-azide cycloaddition reaction)(Carpenter,Richard D.,Hausner,Sven H.,Sutcliffe,Julie L.,"Copper-Free Click for PET:Rapid 1,3-Dipolar Cycloadditions with a Fluorine-18Cyclooctyne(用于PET的无铜点击:使用氟-18环辛炔的快速1,3-偶极环加成)",ACS Medicinal Chemistry Letters(ACS药物化学快报).2011,2(12):885-889)。此外,已经开发了几种生物正交共轭技术(Kolb,Hartmuth C.,Finn,M.G.,Sharpless,K.Barry,Angewandte Chemie,International Edition(应用化学国际版)(2001),40(11),2004-2021;Ning,X.H.,Guo,J.,Wolfert,M.A.和Boons,G.-J.Angew.Chem.,Int.Ed.(应用化学国际版)2008,47,2253;Song,W.,Wang,Y.,Qu,J.,Madden,M.M.,和Lin,Q.Angew.Chem.,Int.Ed.(应用化学国际版)2008,47,2832)。

发明内容

[0007] 技术问题

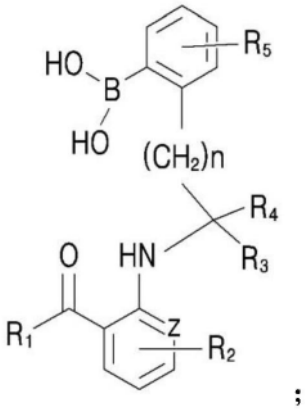
[0008] 本申请提供包含1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid]或其衍生物作为荧光探针化合物的细胞成像组合物以及使用该化合物的细胞物质成像方法。

[0009] 然而,本申请要解决的技术问题不限于上述技术问题,本领域普通技术人员能够通过以下描述清楚地理解其他未提及的技术问题。

[0010] 技术方案

[0011] 本申请的第一方面提供一种细胞成像组合物,其包含由以下化学式1表示的、1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid]或其衍生物作为荧光探针化合物:

[0012] [化学式1]

[0013] 

;

[0014] 在所述化学式1中,

[0015] R_1、R_2、R_3、R_4和R_5各自独立地选自由氢、卤素基、氨基、硝基、氰基、甲酰基、羧基、C_{1-10}烷基、C_{1-10}烷基羰基、C_{6-10}芳基和C_{1-10}烷氧基组成的组，

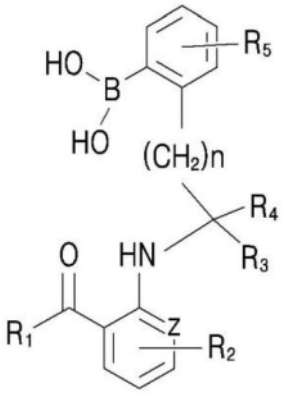
[0016] 当所述C_{1-10}烷基、所述C_{1-10}烷基羰基、所述C_{6-10}芳基或所述C_{1-10}烷氧基被取代时，由选自由卤素基、羟基、氨基、氰基、硝基和C_{6-10}芳基组成的组中的至少一个取代基取代；

[0017] 所述Z是-N-、-O-或-CH；

[0018] 所述n是0至5的整数。

[0019] 本申请的第二方面提供一种细胞物质成像方法，其包括对通过荧光探针化合物与靶细胞中的物质之间的反应产生的荧光进行测量，其中所述荧光探针化合物为由以下化学式1表示的、1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid]或其衍生物：

[0020] [化学式1]

[0021] 

；

[0022] 在所述化学式1中，

[0023] R_1、R_2、R_3、R_4和R_5各自独立地选自由氢、卤素基、氨基、硝基、氰基、甲酰基、羧基、C_{1-10}烷基、C_{1-10}烷基羰基、C_{6-10}芳基和C_{1-10}烷氧基组成的组；

[0024] 当所述C_{1-10}烷基、所述C_{1-10}烷基羰基、所述C_{6-10}芳基或所述C_{1-10}烷氧基被取代时，由选自由卤素基、羟基、氨基、氰基、硝基和C_{6-10}芳基组成的组中的至少一个取代基取代；

[0025] 所述Z是-N-、-O-或-CH；

[0026] 所述n是0至5的整数。

[0027] 发明效果

[0028] 根据本申请的实施方式，所述细胞成像组合物和所述细胞物质成像方法能够用于获得活细胞内物质(例如活细胞的细胞物质或细胞器)的荧光成像。

[0029] 根据本申请的实施方式，所述细胞成像组合物和所述细胞物质成像方法测量通过探针与细胞内物质之间的反应产生的荧光，从而对细胞内物质进行成像，因此能够用于对包括线粒体、DNA、高尔基体、网状质(reticulum)、溶酶体、蛋白质、Hg^{2+}、Cu2^{+}、ATP、氨基酸或ROS(活性氧)等的细胞内物质的荧光成像。

[0030] 根据本申请的实施方式，所述细胞成像组合物和所述细胞物质成像方法能够用于对干细胞、内质网或癌细胞等的荧光成像。

[0031] 根据本申请的实施方式，所述细胞成像组合物和所述细胞物质成像方法能够通过对细胞内的线粒体和/或蛋白质进行成像来用于对干细胞、内质网或癌细胞进行荧光成像，因此能够用于诊断和/或治疗疾病(尤其是肿瘤疾病或癌症)。

[0032] 根据本申请的实施方式,所述细胞成像组合物和所述细胞物质成像方法能够根据诸如pH条件等环境设置选择性地感测多种蛋白质。例如,所述细胞成像组合物和所述细胞物质成像方法在各种蛋白质中对HAS(人血清白蛋白)具有优异的选择性,因此能够选择性地检测包括HSA在内的细胞。

附图说明

[0033] 图1示出在本申请的一实施例中在使用化合物1作为探针时关于(a)化合物1+乙醇胺(ethanolamine)、(b)化合物1+丙氨醇(alaninol)、(c)化合物1+苯丙氨醇(phenylalaninol)、(d)化合物1+氨基丁醇(aminobutanol)、(e)化合物1+缬氨醇(valinol)、(f)化合物1+亮氨醇(leucinol)、(g)化合物1+色氨醇(tryptophanol)以及(h)对比(化合物1+丙氨醇、亮氨醇、氨基丁醇、苯丙氨醇)(可省略)的荧光光谱变化。

[0034] 图2示出在本申请的一实施例中(a)关于化合物1与乙醇胺之间的反应的1:1加合物形成的^{1}H NMR和(b)化合物1的^{1}H NMR。

[0035] 图3示出在本申请的一实施例中(a)关于化合物1与乙醇胺之间的反应的1:1加合物形成的^{13}C NMR和(b)化合物1的^{13}C NMR。

[0036] 图4示出在本申请的一实施例中(a)关于化合物1与乙醇胺之间的反应的1:1加合物形成的^{11}B NMR和(b)化合物1的^{11}B NMR。

[0037] 图5作为本申请的比较例示出(a)关于比较化合物1与乙醇胺之间的反应的1:5加合物形成的^{1}H NMR、(b)比较化合物1的^{1}H NMR、(c)关于比较化合物2与乙醇胺之间的反应的1:5加合物形成的^{1}H NMR以及(d)比较化合物2的^{1}H NMR。

[0038] 图6示出在本申请的一实施例中关于化合物1与丙氨醇(=氨基丙醇)之间的反应的(a)2:1加合物形成的^{1}H NMR、(b)1:2加合物形成的^{1}H NMR、(c)1:5加合物形成的^{1}H NMR、(d)基于化合物1和丙氨醇的当量变化的^{11}B NMR以及(e)关于化合物1与其他氨基醇之间的反应的2:1加合物形成的^{1}H NMR。

[0039] 图7示出在本申请的一实施例中在乙腈溶液中与HeLa细胞和10μM探针一同分别添加(a)0μM、(b)10μM、(c)100μM以及(d)1000μM乙醇胺后通过共聚焦显微镜观察到的细胞内线粒体的荧光成像。

[0040] 图8示出在本申请的一实施例中在DMSO(二甲基亚砜)溶液中与HeLa细胞和10μM探针分别添加(a)0μM、(b)10μM、(c)100μM以及(d)1000μM乙醇胺后通过共聚焦显微镜观察到的细胞内线粒体的荧光成像。

[0041] 图9示出在本申请的一实施例中在将HeLa细胞分别与(a)10μM探针以及(b)10μM探针+40μM CCCP一同培养30分钟后通过共聚焦显微镜观察到的细胞内线粒体的荧光成像。

[0042] 图10示出在本申请的一实施例中在将HeLa细胞、10μm化合物1和50nM的MitoTracker Deep Red(线粒体深红色荧光探针)一同培养30分钟后使用共聚焦显微镜获得的(a)线粒体通过化合物1的荧光成像(激发波长:405nm/发射波长:490-590nm)、(b)线粒体通过MitoTracker Deep Red的荧光成像(激发波长:635nm/发射波长:655-755nm)、(c)线粒体通过化合物1和MitoTracker Deep Red的组合荧光成像、(d)化合物1和MitoTracker Deep Red的共定位分析图(通道1:化合物1;通道2:MitoTracker deep red)以及(e)ROI(感兴趣区域)的荧光强度分布(深灰色:化合物1;阴影线:MitoTracker Deep Red;比例尺:20μ

m;皮尔逊系数(Pearson's coefficient):0.81±0.02)。

[0043] 图11示出在本申请的一实施例中在将HeLa细胞与10μM化合物1和1μM的ER(内质网)-Tracker Red(内质网红色荧光探针)一同培养30分钟后使用共聚焦显微镜获得的(a)线粒体通过化合物1的荧光成像(激发波长:405nm/发射波长:490-590nm)、(b)线粒体通过ER-Tracker Red的荧光成像(激发波长:559nm/发射波长:576-675nm)、(c)线粒体通过化合物1和ER-Tracker Red的组合荧光成像、(d)化合物1和ER-Tracker Red的共定位分析图(通道1:化合物1;通道2:ER-Tracker Red)以及(e)ROI(感兴趣区域)的荧光强度分布(深灰色:化合物1;阴影线:ER-Tracker Red;比例尺:20μm;皮尔逊系数:0.85±0.01)。

[0044] 图12示出在本申请的一实施例中在将HeLa细胞用10μm化合物1和50nM的MitoTracker Deep Red进行染色(共染色)30分钟后通过共聚焦显微镜获得的(a)上方:线粒体通过化合物1的荧光成像;下方:线粒体通过MitoTracker Deep Red的荧光成像(比例尺:20μm)以及(b)基于扫描次数的线粒体荧光强度分布(深灰色:化合物1;阴影线:MitoTracker Deep Red)。

[0045] 图13示出在本申请的一实施例中将用多种浓度的化合物1处理24小时的HeLa细胞在含有MTT的培养基中培养4小时后获得的基于化合物1浓度的细胞活力(cell viability)。

[0046] 图14a示出在本申请的一实施例中在DMSO溶液中将多种类型的蛋白质分别与3μM化合物1一同分别培养0.5小时和1.5小时后测得的荧光强度分布(狭缝:10nm×20nm,激发波长:410nm)。

[0047] 图14b示出在本申请的一实施例中在DMSO溶液中将多种类型的蛋白质分别与3μM化合物1一同培养0.5小时后测得的每种蛋白质在每种条件下的荧光强度分布(狭缝:10nm×20nm;激发波长:410nm)。

[0048] 图14c示出在本申请的一实施例中在DMSO溶液中将多种类型的蛋白质分别与3μM化合物1一同培养1.5小时后测得的每种蛋白质在每种条件下的荧光强度分布(狭缝:10nm×20nm;激发波长:410nm)。

[0049] 图14d示出在本申请的一实施例中在DMSO溶液中将多种类型的蛋白质分别与3μM化合物1一同分别培养0.5小时和1.5小时后测得的荧光成像(激发波长:410nm)。

[0050] 图15a示出在本申请的一实施例中将化合物1和HSA蛋白分别在不同pH的缓冲溶液中培养后测得的荧光强度分布。

[0051] 图15b示出在本申请的一实施例中将化合物1和HSA蛋白分别在不同pH的缓冲溶液中培养后的测得的荧光成像(①参考MES缓冲液,pH5.5;②含HSA的MES缓冲液,pH5.5;③含HSA的PBS缓冲液,pH5.5;④参考PBS缓冲液,pH7.5;⑤含HSA的PBS缓冲液,pH7.5;⑥参考Tris缓冲液,pH8.5;⑦含HSA的Tris缓冲液,pH8.5;以及⑧含HSA的PBS缓冲液,pH8.5)。

具体实施方式

[0052] 在下文中,将参照附图详细描述本申请的实施例,以便本申请所属领域的普通技术人员能够容易地实施它们。然而,本申请可以以多种不同的形式实现,并且不限于本文描述的实施例。另外,为了在附图中清楚地描述本申请,省略了与描述无关的部分,并且在整个说明书中用相似的附图标记表示相似的部分。

[0053] 在本申请的整个本说明书中，当提到某个部分与另一部分“连接”时，它不仅包括“直接连接”的情况，而且还包括在两者之间隔着另一组成部分而形成“电连接”的情况。

[0054] 在本申请的整个说明书中，当提到某个构件位于另一构件“上”时，这不仅包括该构件与另一构件接触的情况，还包括在两者之间存在又一构件的情况。

[0055] 在本申请的整个说明书中，当提到某个部件“包括”某个组成部分时，它意味着可以进一步包括其他组成部分而不是排除其他组成部分，除非另有特别相反的说明。如在本申请的整个说明书中所使用的术语“约”、“基本上”等在提出对所提及含义固有的制造和材料公差时以等于或接近相应数值的含义使用，并且旨在防止恶意侵权者不正当地使用为了帮助理解本申请而提及精确或绝对的数字的公开内容。如在本申请的整个说明书所使用的术语“(操作)的步骤”或“的步骤”并不意味着“用于...的步骤”。

[0056] 在本申请的整个说明书中，包括在马库什形式的表述中的术语“其组合(多个组合)”是指选自由在马库什形式的表述中记载的多个组成部分组成的组中的至少一种混合或组合，即表示包括选自由所述组成部分组成的组中的至少一种。

[0057] 在本申请的整个说明书中，“A和/或B”的记载是指“A、或B、或A和B”。

[0058] 在本申请的整个说明书中，术语“烷基(基团)”可以分别包括直链或支链的饱和或不饱和C_{1-20}烷基(基团)，例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基或它们的任何可能的异构体，但不限于此。

[0059] 在本申请的整个说明书中，术语“烯基(基团)”是指在如上定义的烷基(基团)当中具有至少2个碳原子的烷基(基团)中包含至少一个碳-碳双键的单价烃基，其可以包括直链或支链的C_{2-20}烯基(基团)，但不限于此。

[0060] 在本申请的整个说明书中，术语“炔基(基团)”是指在如上定义的烷基(基团)当中具有至少2个碳原子的烷基(基团)中包含至少一个碳-碳三键的单价烃基，其可以包括直链或支链的C_{2-20}炔基(基团)，但不限于此。

[0061] 在本申请的整个说明书中，术语“芳基(基团)”是指通过去除芳烃的至少一个环中存在的氢原子来形成的单价官能团，例如苯基、联苯基、三联苯、萘基、蒽基、菲基、芘基或其所有可能的异构体，但不限于此。芳烃是具有芳环的烃基，并且可以包括单环或多环烃基，多环烃基可以包括至少一个芳环，并且可以包括芳环或非芳环作为附加环，但不限于此。

[0062] 在本申请的整个说明书中，术语“环烷基(基团)”呈具有饱和烃环的单价官能团的形态，并且可以包括C_{3-8}环烷基(基团)，例如，环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基或其所有可能的异构体，但不限于此。

[0063] 在本申请的整个说明书中，术语“烷氧基(基团)”呈如上定义的烷基与氧原子结合的形态，并且可以包括C_{1-20}烷氧基(基团)，例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基、己氧基、庚氧基、辛氧基、壬氧基、癸氧基、十一烷氧基、十二烷氧基、十三烷氧基、十四烷氧基、十五烷氧基、十六烷氧基、十七烷氧基、十八烷氧基、十九烷氧基、二十烷氧基或其所有可能的异构体，但不限于对此。

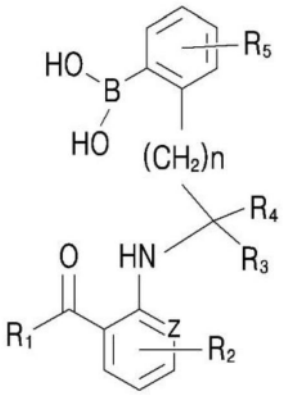
[0064] 在本申请的整个说明书中，术语“卤素基”是指属于元素周期表第17族的卤素元素以官能团的形式包含在化合物中，并且该卤素元素例如可以是F、Cl、Br或I，但不限于此。

[0065] 在下文中，将参照附图详细描述本申请的实施方式和实施例。然而，本申请可以不

限于这些实施方式和实施例以及附图。

[0066] 本申请的第一方面提供一种细胞成像组合物，其包含由以下化学式1表示的、1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid]或其衍生物作为荧光探针化合物：

[0067] [化学式1]

[0068] 

；

[0069] 在所述化学式1中，

[0070] R_1、R_2、R_3、R_4和R_5各自独立地选自由氢、卤素基、氨基、硝基、氰基、甲酰基、羧基、C_{1-10}烷基、C_{1-10}烷基羰基、C_{6-10}芳基和C_{1-10}烷氧基组成的组，

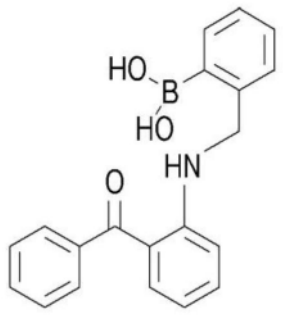
[0071] 当所述C_{1-10}烷基、所述C_{1-10}烷基羰基、所述C_{6-10}芳基或所述C_{1-10}烷氧基被取代时，由选自由卤素基、羟基、氨基、氰基、硝基和C_{6-10}芳基组成的组中的至少一个取代基取代；

[0072] 所述Z是-N-、-O-或-CH；

[0073] 所述n是0至5的整数。

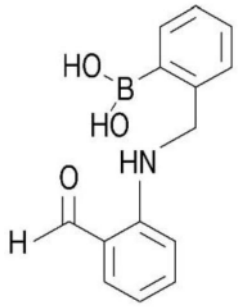
[0074] 在本申请的一实施方式中，所述荧光探针化合物可以包括以下化合物中的至少一种：

[0075] [化合物1]

[0076] 

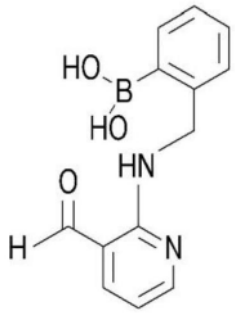
；

[0077] [化合物2]

[0078]  和

;

[0079] [化合物3]

[0080] 

。

[0081] 在本申请的一实施方式中,所述细胞成像组合物用于对活细胞的细胞内物质进行成像,但不限于此。

[0082] 在本申请的一实施方式中,所述细胞成像组合物用于通过测量由所述荧光探针化合物与细胞内物质之间的反应产生的荧光来对进行细胞内物质进行成像,但不限于此。

[0083] 在本申请的一实施方式中,所述细胞内物质包括但不限于细胞物质或细胞器。

[0084] 在本申请的一实施方式中,所述细胞内物质包括但不限于细胞质、线粒体、蛋白质或生物分子。

[0085] 在本申请的一实施方式中,所述细胞内物质包括线粒体、DNA、高尔基体、网状质(reticulum)、溶酶体、蛋白质、Hg^{2+}、Cu^{2+}、ATP、氨基酸或ROS(活性氧),但不限于此。

[0086] 在本申请的一实施方式中,所述细胞器包括线粒体和/或蛋白质,以用于对干细胞、内质网或癌细胞进行成像,但不限于此。

[0087] 在本申请的一实施方式中,所述细胞成像组合物和所述细胞物质成像方法能够通过对细胞内的线粒体和/或蛋白质进行成像来用于对干细胞、内质网或癌细胞进行荧光成像,因此能够用于诊断和/或治疗疾病(尤其是肿瘤疾病或癌症)。根据本申请的一实施方式,所述细胞成像组合物和所述细胞物质成像方法能够根据诸如pH条件等环境设置选择性地感测多种蛋白质,且在所述细胞成像组合物和所述细胞物质成像方法的应用方面,能够根据实验和/或培养环境扩展可感测的蛋白质的种类,因此并不特别受蛋白质种类的限制。

[0088] 在本申请的一实施方式中,所述化学式1的化合物在对所述蛋白质当中HSA的荧光成像中表现出优异的效果,并且对HSA表现出优越的荧光强度和选择性,从而能够选择性地感测含有HSA的细胞。

[0089] 在本申请的一实施方式中,用于用所述细胞成像组合物对HSA进行选择性荧光成像的适当pH范围可以是约pH7至约pH11,但不限于此。例如,pH范围可以为约pH7至约pH11、约pH7至约pH10、约pH7至约pH9、约pH7至约pH8.5、约pH7.5至约pH11、约pH7.5至约pH10、约pH7.5至约pH9、或约pH7.5至约pH8.5,但不限于此。在本申请的一实施方式中,用于用所述

细胞成像组合物对HSA进行选择性荧光成像的合适pH范围可以是约pH7.5至约pH8.5。

[0090] 在本申请的一实施方式中，在用于所述细胞物质或所述细胞器的荧光成像方法中，推测所述1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸或其衍生物允许对所述线粒体进行荧光成像的机制的原因在于通过与所述线粒体膜中存在的磷脂酰乙醇胺的反应产生的荧光团。

[0091] 在本申请的一实施方式中，当用所述细胞成像组合物处理细胞时，它表现出在线粒体器官中产生特异性荧光的特性，因此可以用作确定线粒体形态和线粒体活性的探针。

[0092] 在本申请的一实施方式中，所述细胞内物质包括选自由氨基酸、核酸碱基、氨基酸酯、氨基酸酰胺及其组合组成的组中的生物物质，其包括包括氨基醇的胺类化合物，但不限于此。

[0093] 在本申请的一实施方式中，所述荧光探针化合物与所述细胞内物质中包含的胺类化合物中包含的氨基形成亚胺键，并且所述荧光探针化合物中包含的硼(B)将所述荧光探针化合物中包含的氮(N)原子与所述胺类化合物中包含的氮(N)原子连接，以原位(in-situ)形成包含含有N-B-N键的杂环的荧光团，而且可利用该荧光团分别或同时分析荧光和圆二色性(CD)，但不限于此。

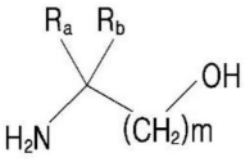
[0094] 在本申请的一实施方式中，所述化合物1的合成方法可以采用本领域公知的方法，例如可以通过以下反应式1的方法合成，但不限于此：

[0095] [反应式1]

[0096] 

[0097] 在本申请的一实施方式中，所述包括氨基醇的胺类化合物可以包括由以下化学式2表示的胺类化合物，但不限于此：

[0098] [化学式2]

[0099] 

;

[0100] 在所述化学式2中，

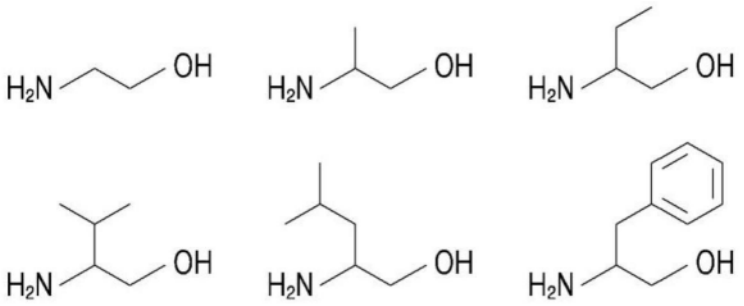
[0101] R_a和R_b各自独立地选自由氢、卤素基、氨基、硝基、氰基、甲酰基、羧基、C_{1-10}烷基、C_{1-10}烷基羰基、C_{6-10}芳基和C_{1-10}烷氧基组成的组，

[0102] 当所述C_{1-10}烷基、所述C_{1-10}烷基羰基、所述C_{6-10}芳基或所述C_{1-10}烷氧基被取代时，由选自由卤素基、羟基、氨基、氰基、硝基和C_{6-10}芳基组成的组中的至少一个取代基取代；

[0103] 所述m为0至5的整数。

[0104] 在本申请的一实施方式中，所述胺类化合物可以包括以下化合物中的至少一种，

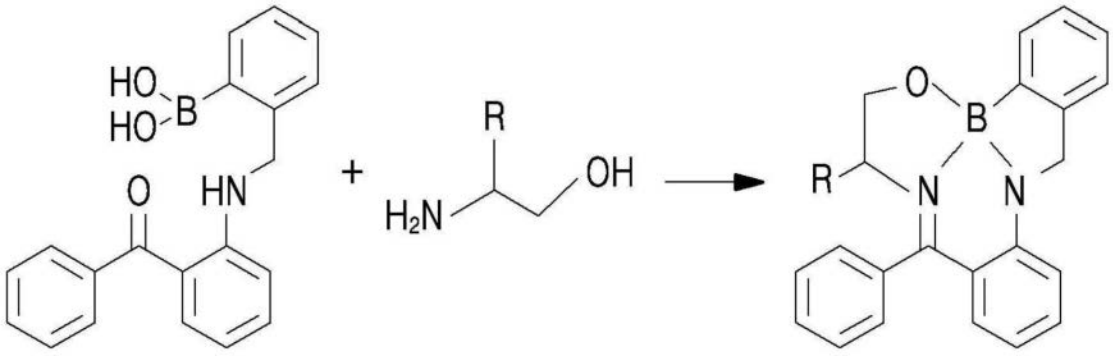
但不限于此：

[0105] 

。

[0106] 在本申请的一实施方式中，具有羰基(C＝O)、硼酸基(-B(OH)$_2$)和氨基的所述化学式1的化合物本身不具有荧光团，然而如以下反应式2所示，能够通过与所述包括氨基醇的胺类化合物形成亚胺键，形成含有N-B-N键的杂环以产生荧光信号。例如，具有羰基(C＝O)、硼酸基(-B(OH)$_2$)和氨基的根据所述化学式1的化合物1本身不具有荧光团，因此无法产生荧光信号，然而如以下反应式2所示，能够通过所述化合物1与包括氨基醇的胺类化合物之间的亚胺键形成含N-B-N键的杂环以产生荧光信号(图1)。

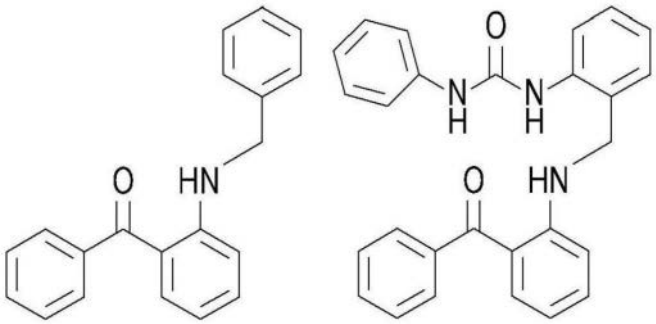
[0107] [反应式2]

[0108] 

[0109] 即，所述化合物1能够如所述反应式2所示与氨基醇形成亚胺键，并且通过硼连接N和N来形成具有含N-B-N键的杂环的荧光团以产生荧光信号。以这种方式从氨基醇产生荧光是新颖的，未曾在任何文献中有过报道。即，根据所述化学式1的1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸或其衍生物具有作为能够通过与各种氨基反应形成亚胺的官能团的羰基(C＝O)，并且它还含有用于形成亚胺的硼酸基(-B(OH)$_2$)。

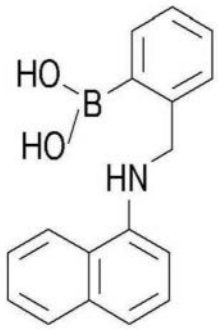
[0110] 在本申请的一实施方式中，所述化学式1的化合物的羰基(C＝O)、硼酸基(-B(OH)$_2$)和氨基醇生成如所述反应式2所示的具有含N-B-N键的杂环结构的加合物的这一事实可以从在如所述化合物1的根据所述化学式1的化合物与乙醇胺之间的反应中所示的HRMS数据和^{11}B NMR、^{1}H NMR、^{13}C NMR等数据中推测到(图2至图4)。

[0111] 另一方面，在与所述化合物1相似但不具有硼酸[boric acid(-B(OH)$_2$)]官能团的如下比较化合物1和比较化合物2的情况下，虽然具有羰基(C＝O)，但在通常的室温条件下无法与氨基醇进行亚胺形成反应(图5)，因此既不产生荧光信号也不产生CD信号。所述比较化合物2的脲基(ureyl)具有诸如硼酸的路易斯酸的性质，但无法与氨基醇反应，由此能够确认所述化合物1的硼酸在亚胺形成和N-B-N杂环形成中起特殊作用。

[0112] 

<比较化合物1> <比较化合物2> ;

[0113] 此外,在如下比较化合物3的情况下,虽然具有萘氨基的荧光团,但在通常条件下处于荧光由N中存在的孤对电子猝灭(quenching)的状态,并且即使在所述氨基醇的存在下也没有产生任何显着的荧光或CD变化。由此可见,所述化合物1在氨基醇的存在下产生荧光或CD的这一事实与N-B-N杂环的形成密切相关。

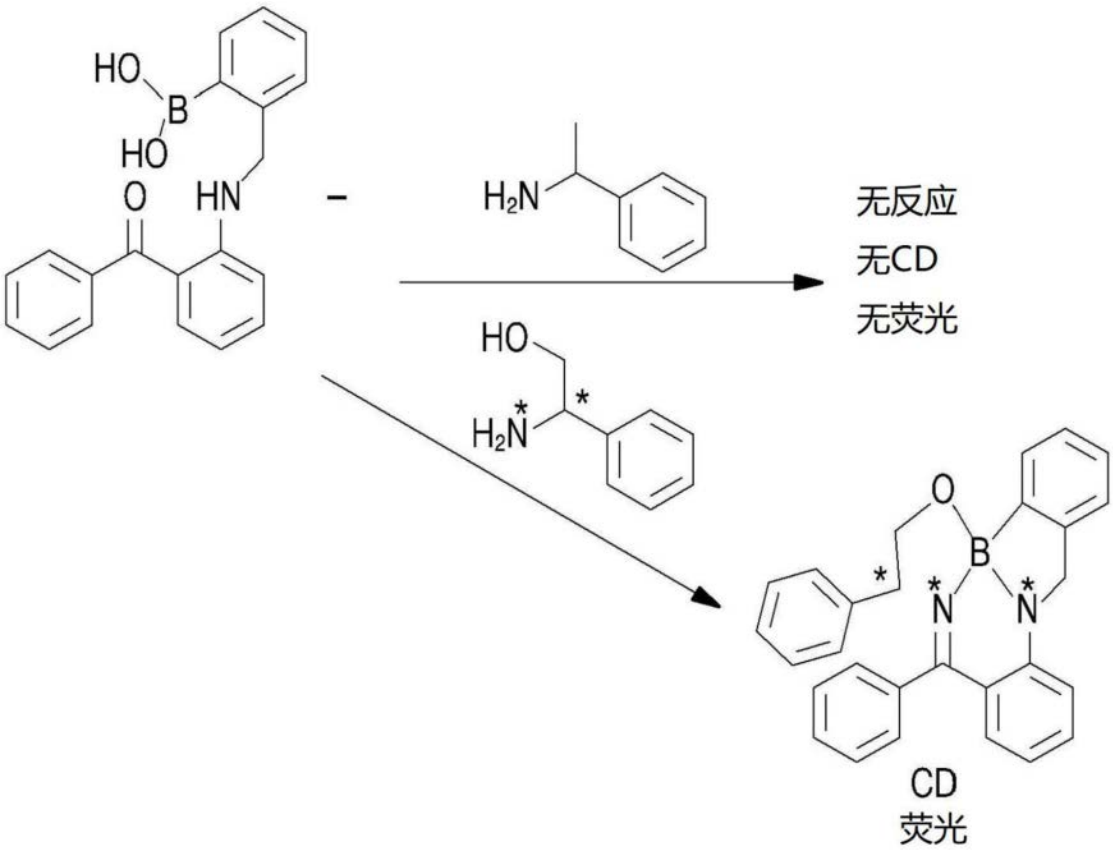
[0114] 

<比较化合物3> ;

[0115] 在本申请的一实施方式中,所述化合物1并不与不另外含有能够与硼相互键合的诸如-OH或-NH等官能团的胺形成亚胺。例如在常温条件下不与甲胺、乙胺、苯乙胺等发生反应。结果,所述化合物1能够区分另外具有诸如-OH或-NH等官能团的胺类化合物和不具有这样的官能团的胺类化合物(反应式3)。

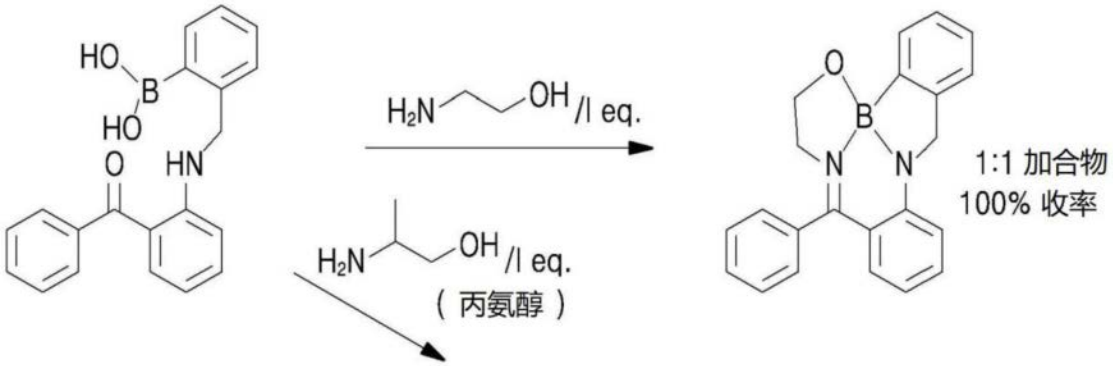
[0116] [反应式3]

[0117]



[0118] 在本申请的一实施方式中，由于根据所述包括氨基醇的胺类化合物的类型，所呈现的荧光也有所不同，这表明当使用所述化合物1作为探针化合物时，还可以区分底物的类型(反应式4)。

[0119] [反应式4]



[0120]

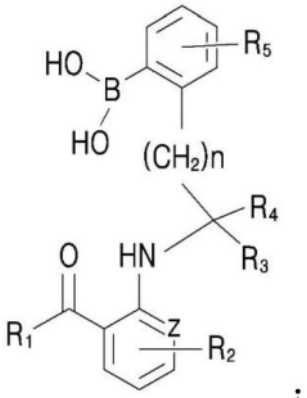


[0121] 在本申请的一实施方式中，所述化学式1的化合物本身不具有荧光团，但通过与包括氨基醇的胺类化合物的反应来形成荧光团。结果，当在胺类化合物中存在氨基醇部分时和不存在氨基醇部分时，荧光强度存在非常大的差异。因此，这样的结果表明所述化学式1的化合物作为荧光传感器非常有用。

[0122] 在本申请的一实施方式中，作为能够通过与1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸或其衍生物发生反应而产生荧光信号的底物，包括由所述化学式2表示的氨基醇，其指选自由氨基酸、核酸碱基、氨基酸酯、氨基酸酰胺及其组合组成的组中的生物物质。

[0123] 本申请的第二方面提供一种细胞物质成像方法，包括对通过荧光探针化合物与靶细胞中的物质之间的反应产生的荧光进行测量，其中所述荧光探针化合物为由以下化学式1表示的、1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid]或其衍生物：

[0124] [化学式1]

[0125] 

;

[0126] 在所述化学式1中，

[0127] R_1、R_2、R_3、R_4和R_5各自独立地选自由氢、卤素基、氨基、硝基、氰基、甲酰基、羧基、C_{1-10}烷基、C_{1-10}烷基羰基、C_{6-10}芳基和C_{1-10}烷氧基组成的组；

[0128] 当所述C_{1-10}烷基、所述C_{1-10}烷基羰基、所述C_{6-10}芳基或所述C_{1-10}烷氧基被取代时，由选自由卤素基、羟基、氨基、氰基、硝基和C_{6-10}芳基组成的组中的至少一个取代基取代；

[0129] 所述Z是-N-、-O-或-CH；

[0130] 所述n是0至5的整数。

[0131] 尽管省略了对与本申请的第一方面重复的部分的详细描述，但是关于本申请的第一方面描述的内容在本申请的第二方面中同样适用，即便省略了对其的描述。

[0132] 在本申请的一实施方式中，所述靶细胞是活细胞，但不限于此。

[0133] 在本申请的一实施方式中，所述细胞物质成像方法还包括通过测量由所述荧光探针化合物与所述靶细胞中的物质之间的反应产生的荧光来获得所述靶细胞中的物质的图像，但是不限于此。

[0134] 在本申请的一实施方式中，所述靶细胞中的物质包括但不限于细胞物质或细胞器。

[0135] 在本申请的一实施方式中，所述靶细胞中的物质包括但不限于细胞质、线粒体、蛋白质或生物分子。

[0136] 在本申请的一实施方式中，所述靶细胞中的物质包括但不限于线粒体、DNA、高尔

基体、网状质、溶酶体、蛋白质、Hg^{2+}、Cu^{2+}、ATP、氨基酸或ROS(活性氧)。

[0137] 在本申请的一实施方式中,所述细胞器包括线粒体和/或蛋白质,以用于对干细胞、内质网或癌细胞进行成像,但不限于此。

[0138] 在本申请的一实施方式中,所述细胞成像组合物和所述细胞物质成像方法能够通过对细胞内的线粒体和/或蛋白质进行成像来用于对干细胞、内质网或癌细胞进行荧光成像,因此能够用于诊断和/或治疗疾病(尤其是肿瘤疾病或癌症)。根据本申请的一实施方式,所述细胞成像组合物和所述细胞物质成像方法能够根据诸如pH条件等环境设置选择性地感测多种蛋白质,且在所述细胞成像组合物和所述细胞物质成像方法的应用方面,能够根据实验和/或培养环境扩展可感测的蛋白质的种类,因此并不特别受蛋白质种类的限制。

[0139] 在本申请的一实施方式中,所述化学式1的化合物在对所述蛋白质当中HSA的荧光成像中表现出优异的效果,并且对HSA表现出优越的荧光强度和选择性,从而能够选择性地感测含有HSA的细胞。

[0140] 在本申请的一实施方式中,用于用所述细胞成像组合物对HSA进行选择性荧光成像的适当pH范围可以是约pH7至约pH11,但不限于此。例如,pH范围可以为约pH7至约pH11、约pH7至约pH10、约pH7至约pH9、约pH7至约pH8.5、约pH7.5至约pH11、约pH7.5至约pH10、约pH7.5至约pH9、或约pH7.5至约pH8.5,但不限于此。在本申请的一实施方式中,用于用所述细胞成像组合物对HSA进行选择性荧光成像的合适pH范围可以是约pH7.5至约pH8.5。

[0141] 在本申请的一实施方式中,在用于所述细胞物质或所述细胞器的荧光成像方法中,推测所述1-(邻苯甲酰苯基氨基烷基)-苯基硼酸或其衍生物允许对所述线粒体进行荧光成像的机制的原因在于通过与所述线粒体膜中存在的磷脂酰乙醇胺的反应产生的荧光团。

[0142] 在本申请的一实施方式中,当用所述细胞成像组合物处理细胞时,它表现出在线粒体器官中产生特异性荧光的特性,因此可以用作确定线粒体形态和线粒体活性的探针。

[0143] 在本申请的一实施方式中,所述靶细胞中的物质包括选自由氨基酸、核酸碱基、氨基酸酯、氨基酸酰胺及其组合组成的组中的生物物质,其包括包括氨基醇的胺类化合物,但不限于此。

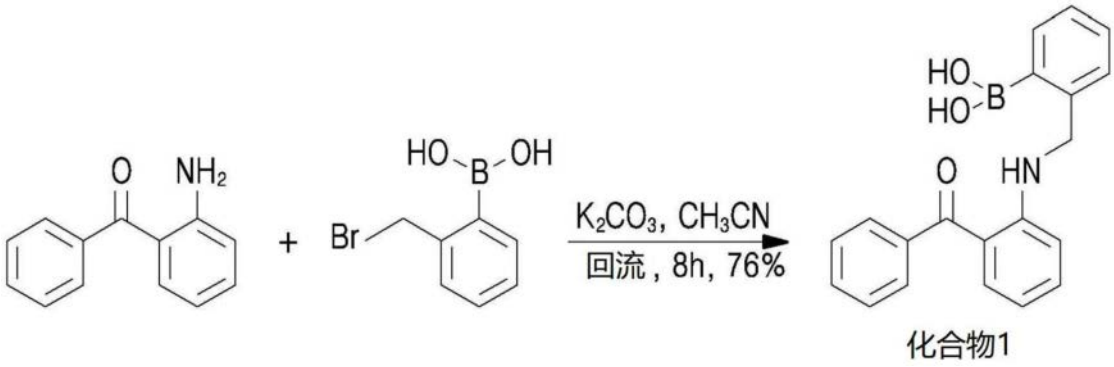
[0144] 在本申请的一实施方式中,所述荧光探针化合物与所述细胞内物质中包含的胺类化合物中包含的氨基形成亚胺键,并且所述荧光探针化合物中包含的硼(B)将所述荧光探针化合物中包含的氮(N)原子与所述胺类化合物中包含的氮(N)原子连接,以原位(in-situ)形成包含含有N-B-N键的杂环的荧光团,而且可利用该荧光团分别或同时分析荧光和圆二色性(CD),但不限于此。

[0145] 在下文中,将通过本申请的实施例更详细地描述本发明,但以下实施例仅用于帮助理解本申请,本申请的内容不限于以下实施例。

[0146] 用于实施本发明的方式

[0147] [实施例]

[0148] <实施例1:化合物1的合成>

[0149] 

化合物1

[0150] 将2-氨基二苯甲酮(2-Aminobenzophenone)(2.00g,10.1mmol)、2-溴甲基苯基硼酸(2-bromomethylphenyl boronic acid)(2.59g,12.1mmol)、碳酸钾(potassium carbonate)(1.39g,10.1mmol)添加到乙腈溶剂(15mL)中并回流了8小时。使用蒸发器(evaporator)将反应溶液干燥后,立即使用EA/己烷(1/4)作为显色剂(developer)通过硅胶柱获得了化合物1(2.5g,7.6mmol)。

[0151] 收率:76%。^{1}H NMR(300MHz,CD_3CN):δ7.64-7.61(m,1H)、7.60-7.59(m,1H)、7.58-7.55(m,2H)、7.53-7.52(m,1H)、7.51-7.47(m,1H)、7.43-7.39(m,2H)、7.38-7.33(m,2H)、7.30-7.25(m,1H)、6.88(d,1H,9Hz)、6.59-6.54(m,1H)、4.65(s,2H)。^{13}C NMR(125MHz,$CDCl_3$):199.58、151.38、143.75、140.62、135.42、135.20、134.56、131.24、129.91、129.11、128.39、128.01、126.77、114.63、112.68、46.99。HRMS(EI):对$C_{20}H_{19}N_1O_1B_1[M+H]^+$的计算值:332.1850;实测值:332.2168。

[0152] <实施例2:化合物1和氨基醇混合物的荧光光谱测量>

[0153] 使用的仪器:Scinco FS-2

[0154] 化合物1的浓度:1.5mM

[0155] 结果:图1。

[0156] 参照图1的荧光光谱,可以确认化合物1作为探针时的荧光光谱的变化:(a)化合物1+乙醇胺、(b)化合物1+丙氨醇、(c)化合物1+苯丙氨醇、(d)化合物1+氨基丁醇、(e)化合物1+缬氨醇、(f)化合物1+亮氨醇、(g)化合物1+色氨醇以及(h)比较(化合物1+丙氨醇、亮氨醇、氨基丁醇、苯丙氨醇)(可省略)。

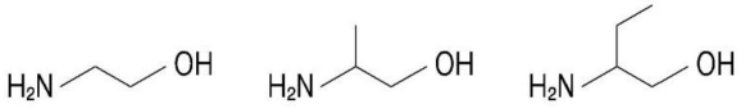
[0157] <实施例3:化合物1与其他胺之间的反应和荧光光谱的测量>

[0158] 使用的仪器、浓度和参数与乙醇胺和丙氨醇的情况相同。

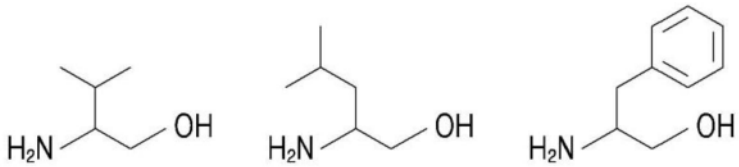
[0159] 结果:图1。

[0160] <实施例4:化合物1与氨基醇之间的反应性比较>

[0161] 在将所述化合物1(30mg)溶解在1mL的$CDCl_3$中后,依次添加0.5当量、1当量、2当量、5当量以及10当量的氨基醇,在每次搅拌30分钟后获得了^{1}H NMR谱(图2a)。实验中所使用的氨基醇如下:



[0162]



[0163] 作为比较例，在分别溶解有所述比较化合物1、2和3的小瓶中即使添加了10当量的氨基丙醇也没有发生任何反应。对于所述比较化合物1、2和3中的每一种与氨基丙醇的混合物测量CD和荧光，但仍然没有发生任何变化。

[0164] 参考图2，可以确认(a)关于化合物1与乙醇胺之间的反应的1:1加合物形成的^{1}H NMR和(b)化合物1的^{1}H NMR。

[0165] 参照图3，可以确认(a)关于化合物1与乙醇胺之间的反应的1:1加合物形成的^{13}C NMR和(b)化合物1的^{13}C NMR。

[0166] 参照图4，可以确认(a)关于化合物1与乙醇胺之间的反应的1:1加合物形成的^{11}B NMR和(b)化合物1的^{11}B NMR。

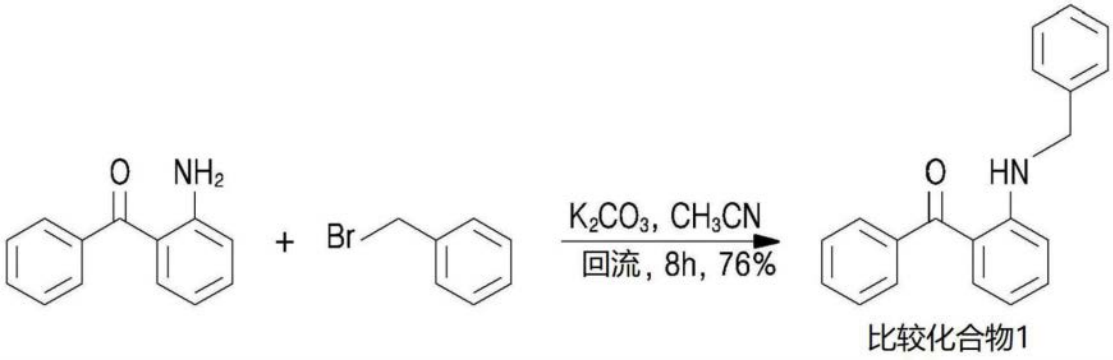
[0167] 参考图6，可以确认关于化合物1与丙氨醇(＝氨基丙醇)之间的反应的(a)2:1加合物形成的^{1}H NMR、(b)1:1加合物形成^{1}H NMR、(c)1:5加合物的形成的^{1}H NMR、(d)基于化合物1和丙氨醇的当量变化的^{11}B NMR和(e)关于化合物1与另一种氨基醇之间的反应的2:1加合物形成的^{1}H NMR。添加了1当量丙氨醇时与乙醇胺的情况不同，^{1}H NMR显示出非常复杂的形态。

[0168] 所述化合物1根据与氨基连接的碳的空间性质表现出反应性差异。在乙醇胺的情况下，由于没有空间位阻，它与所述化合物1很快形成1:1加合物(图2至图4)，但在丙氨醇的情况下，空间位阻的存在使得更容易形成2:1(化合物1:丙氨醇)加合物，而不是1:1加合物，当增加丙氨醇当量时，形成1:1至1:2加合物(图6)。

[0169] 根据包括氨基醇的胺类化合物的类型，所呈现的荧光也有所不同，特别是，CD光谱根据氨基醇的类型呈现出很大的差异，使得能够彼此区分。这表明当所述化合物1用作探针时，甚至能够区分底物的类型(所述反应式4)。

[0170] <比较例1:比较化合物1的合成>

[0171]



[0172] 将2-氨基二苯甲酮(0.10g，0.51mmol)、苄基溴(benzylbromide)(0.24g，1.4mmol)、碳酸钾(0.17g，1.2mmol)添加到乙腈(1.5mL)中并回流了8小时。使用EA/己烷(1/

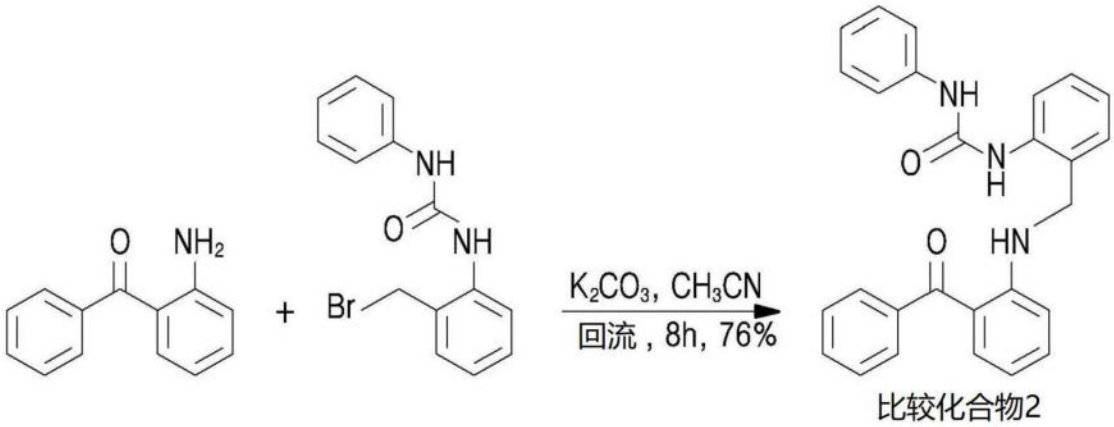
50)作为显色剂通过硅胶柱获得了化合物2(0.083g,0.29mmol)。

[0173] 收率:57%。^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):δ9.11(t,J=3Hz,1H)、δ7.72-6.59(m,14H)、δ4.58(d,J=6Hz,2H)。

[0174] 作为比较例,参见图5,可以确认(a)关于比较化合物1与乙醇胺之间的反应的1:5加合物形成的^{1}H NMR、(b)比较化合物1的^{1}H NMR、(c)关于比较化合物2与乙醇胺之间的反应的1:5加合物形成以及(d)比较化合物2的^{1}H NMR。其中示出了与化合物1相似但不含硼的比较化合物1、由脲基(而不是硼)取代的比较化合物2与氨基醇之间的反应性。可以确认在没有硼的情况下,不会与氨基醇发生反应。可以确认,在所述脲基的情况下,虽然它具有与硼相似的路易斯酸性质,但并不对亚胺的形成作出贡献。

[0175] <比较例2:比较化合物2的合成>

[0176]



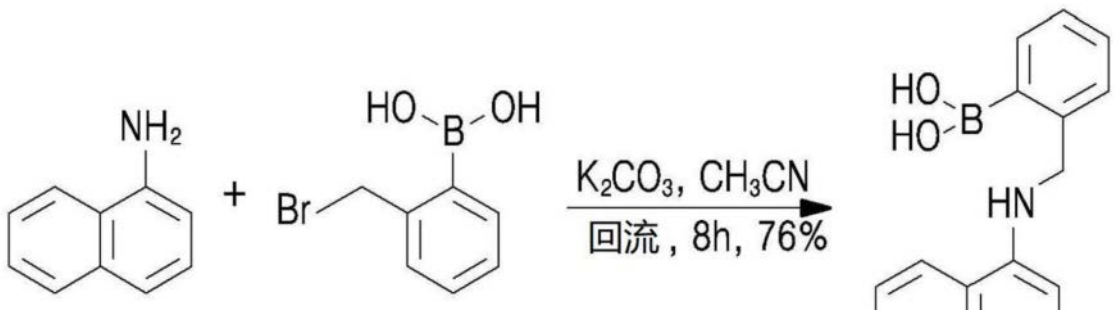
比较化合物2

[0177] 将1-溴甲基-2-苯基脲基苯(1-bromomethyl-2-phenylurylbenzene)(0.92g,3.0mmol)化合物和碳酸钾(0.41g,3.0mmol)在ACN(3mL)溶液中添加到2-氨基二苯甲酮(0.50g,2.5mmol)中,并在85℃下搅拌了8小时。在反应结束后观察了TLC检测,并使用EA/己烷(1:9)作为显色剂通过硅胶柱层析获得了比较化合物2(0.60mg,1.4mmol)。

[0178] 收率:56%。^{1}H NMR(300MHz,$CDCl_3$):δ8.91(br,1H)、δ7.62-6.57(m,20H)、δ4.34(s,2H)。

[0179] <比较例3:比较化合物3的合成>

[0180]



比较化合物3

[0181] 将2-(溴甲基)苯基硼酸[2-(bromomethyl)phenyl boronic acid](0.150g,0.70mmol)和碳酸钾(0.19g,1.37mmol)在ACN(1.5mL)溶液中添加到1-萘胺(1-Naphthylamine)(0.10mg,0.70mmol)中,并在室温下搅拌了8小时。使用EA/己烷(1:9)作为

显色剂通过硅胶柱获得了比较化合物3(0.04g,0.14mmol)。

[0182] 收率:20%。^{1}H NMR(300MHz,CD_3CN):δ7.98-6.79(m,11H)、δ4.53(s,2H)。

[0183] <实施例5:使用化合物1的线粒体荧光成像测试>

[0184] 将HeLa细胞与10μM探针一同培养了30分钟,然后去除了残留的探针。之后,将(a)0μM、(b)10μM、(c)100μM和(d)1000μM的乙醇胺添加了30分钟,然后用DPBS洗涤,并通过共聚焦显微镜示出了体内的线粒体的荧光成像(激发波长:405nm/发射波长:490nm至590nm)。

[0185] 参考图7,可以确认所示出的是:在将HeLa细胞与10μM探针一同在乙腈溶液中培养了30分钟后去除了残留探针,然后将(a)0μM、(b)10μM、(c)100μM以及(d)1000μM的乙醇胺添加30分钟后用DPBS洗涤,然后通过共聚焦显微镜观察到的细胞中线粒体的荧光成像。

[0186] 参考图8,可以确认所示出的是:在将HeLa细胞与10μM探针一同在DMSO溶液中培养了30分钟后去除了残留探针,然后将(a)0μM、(b)10μM、(c)100μM以及(d)1000μM的乙醇胺添加30分钟后用DPBS洗涤,然后通过共聚焦显微镜观察到的细胞中线粒体的荧光成像。

[0187] <实施例6:使用化合物1的线粒体荧光成像测试-用解偶联剂处理>

[0188] 在将HeLa细胞分别与(a)10μM探针和(b)10μM探针+40μM CCCP一同培养30分钟后用DPBS洗涤,然后通过共聚焦显微镜示出了细胞内线粒体的荧光成像(激发波长:405nm/发射波长:490-590nm)。

[0189] 参考图9,所示出的是:在将HeLa细胞分别与(a)10μM探针和(b)10μM探针+40μM CCCP培养30分钟后用DPBS洗涤,然后通过共聚焦显微镜观察到的细胞内线粒体的荧光成像。可以确认,所示出的是:在使用cccp作为解偶联剂来处理所述细胞内线粒体后使用所述化合物1作为探针进行细胞成像的实验结果。

[0190] <实施例7:基于化合物1和MitoTracker Deep Red的线粒体荧光成像比较>

[0191] 参考图10,在将HeLa细胞分别与10μM的化合物1和50nM的MitoTracker Deep Red一同培养30分钟后,通过共聚焦显微镜获得了细胞内线粒体的荧光成像。基于化合物1和MitoTracker Deep Red获得的线粒体荧光成像呈现约81%的一致性(Pearson相关系数:0.81±0.02)。

[0192] <实施例8:基于化合物1与ER(内质网)-Tracker Red的线粒体荧光成像对比实验>

[0193] 参考图11,在将HeLa细胞分别与10μM的化合物1和1μM的ER-Tracker Red一同培养30分钟后,通过共聚焦显微镜获得了细胞内线粒体的荧光成像。基于化合物1和ER-Tracker Red获得的线粒体荧光成像呈现约85%的一致性(Pearson相关系数:0.85±0.01)。

[0194] <实施例9:基于化合物1与MitoTracker Deep Red的线粒体荧光的光稳定性比较实验>

[0195] 参考图12,为了比较基于化合物1和MitoTracker Deep Red的线粒体荧光的光稳定性,在分别用10μm化合物1和50nM的MitoTracker Deep Red将HeLa细胞染色(共染色)30分钟后,通过扫描90次(20秒/扫描)获得了荧光图像和荧光强度,使用Olympus Fluoview Ver.4.0b软件分析了荧光强度。通过基于扫描次数和时间的荧光成像和荧光强度确认了化合物1的光稳定性,根据图13b,所示出的化合物1的荧光强度与MitoTracker Deep Red相比更高。

[0196] <实施例10:化合物1的细胞毒性实验>

[0197] 参考图13,在用多种浓度的化合物1将HeLa细胞处理24小时并在含有MTT的培养基

中培养4小时后，确认了基于化合物1浓度的细胞的存活能力。当将未用化合物1处理的样品的吸光度作为100％基准进行测量时，确认到用30μM化合物1处理的细胞存活约80％。

[0198] 〈实施例11：基于化合物1的蛋白质荧光成像的对比实验〉

[0199] 在DMSO中与3μM化合物1一同分别培养多种类型的蛋白质0.5小时和1.5小时后，比较了基于蛋白质类型的荧光强度分布和荧光成像。

[0200] 参考图14a至图14d，可以确认化合物1对于HSA表现出特异性荧光成像性能和选择性。

[0201] 〈实施例12：在多种pH条件下基于化合物1的HSA蛋白的荧光成像比较〉

[0202] 在多种pH条件的缓冲溶液中培养化合物1和HSA蛋白后，比较了基于pH的荧光强度分布和荧光成像。

[0203] 参考图15a和15b，在pH7.4、pH7.5和pH8.5下，化合物1对HSA蛋白表现出特异性荧光成像性能。

[0204] 本申请的上述描述旨在例示，本申请所属领域的普通技术人员可以理解，在不改变本申请的技术构思或必要特征的情况下，可以很容易地变型为其他具体形态。因此，应当理解，上述实施例在所有方面都是示例性的，而不是限制性的。例如，描述为单一类型的每个组成部分可以实施成分布式，同样描述为分布式的组成部分也可以实施成组合的形态。

[0205] 本申请的范围不是由上述详细的说明来表示，而是由所附的权利要求书表示，凡是从权利要求书的含义和范围及其等同概念所产生的修改或变型，均应理解为包含在本申请的范围内。

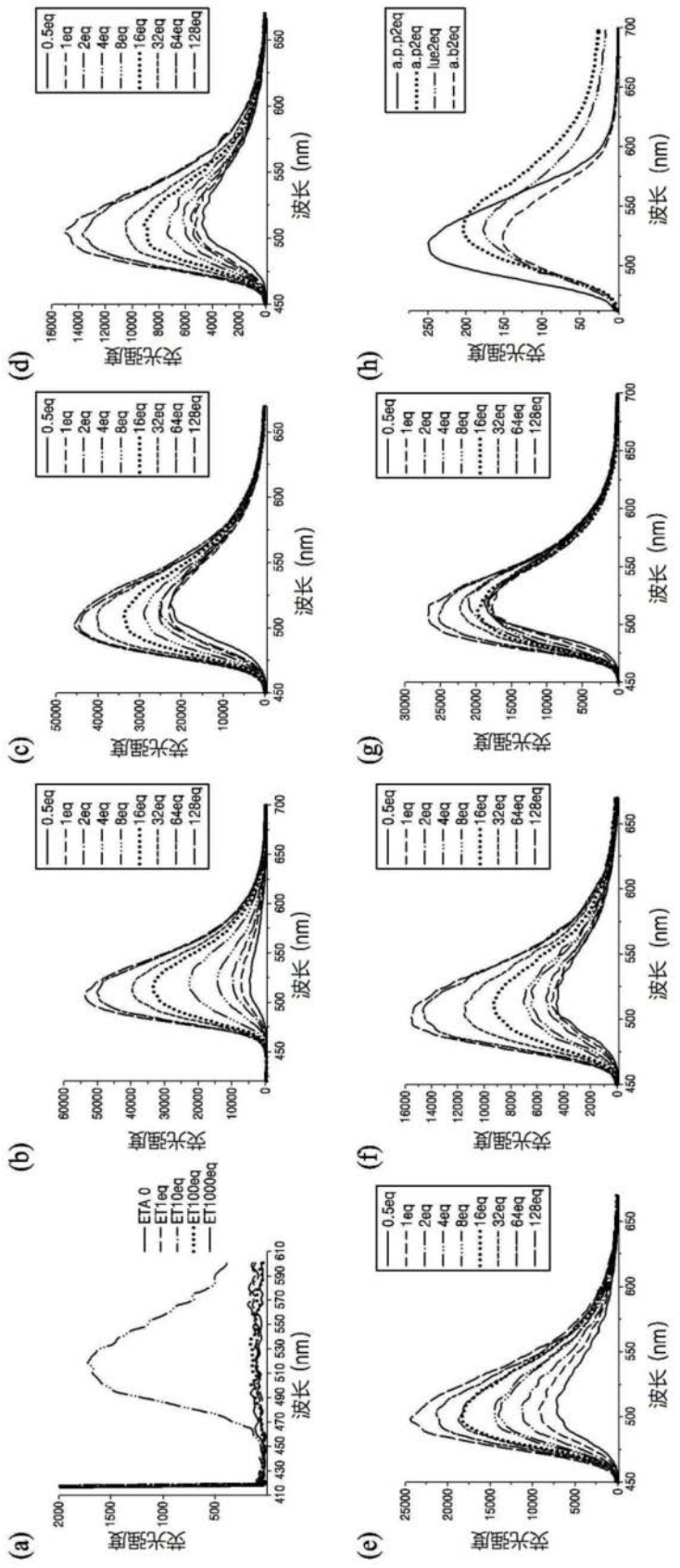

(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
荧光强度
波长 (nm)
ETA 0
ET1eq
ET10eq
ET100eq
ET1000eq
0.5eq
1eq
2eq
4eq
8eq
16eq
32eq
64eq
128eq
a.p.p2eq
a.p2eq
lue2eq
a.b2eq

图1

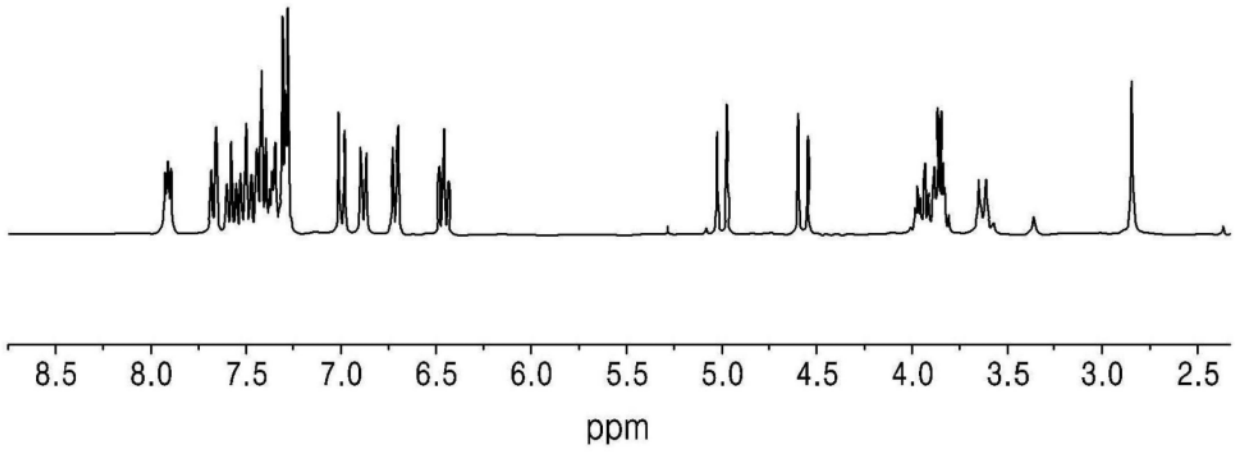

8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
ppm

图2a

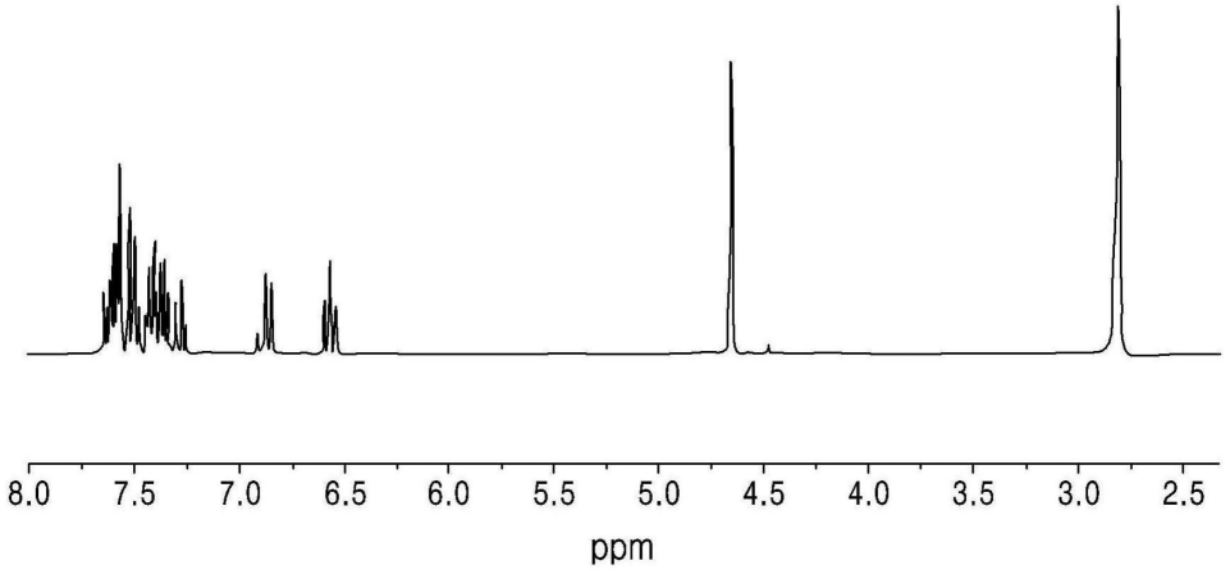

8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
ppm

图2b

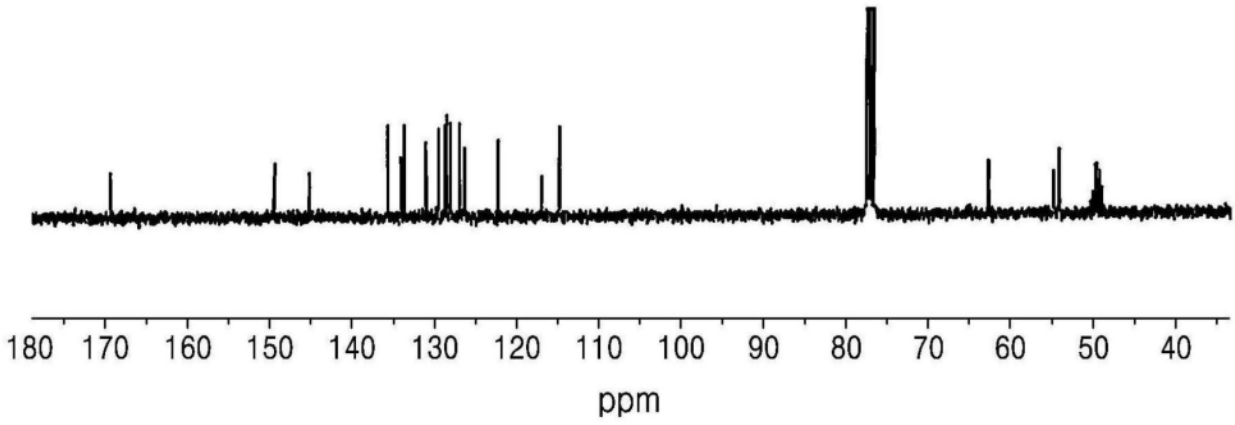

180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40
ppm

图3a

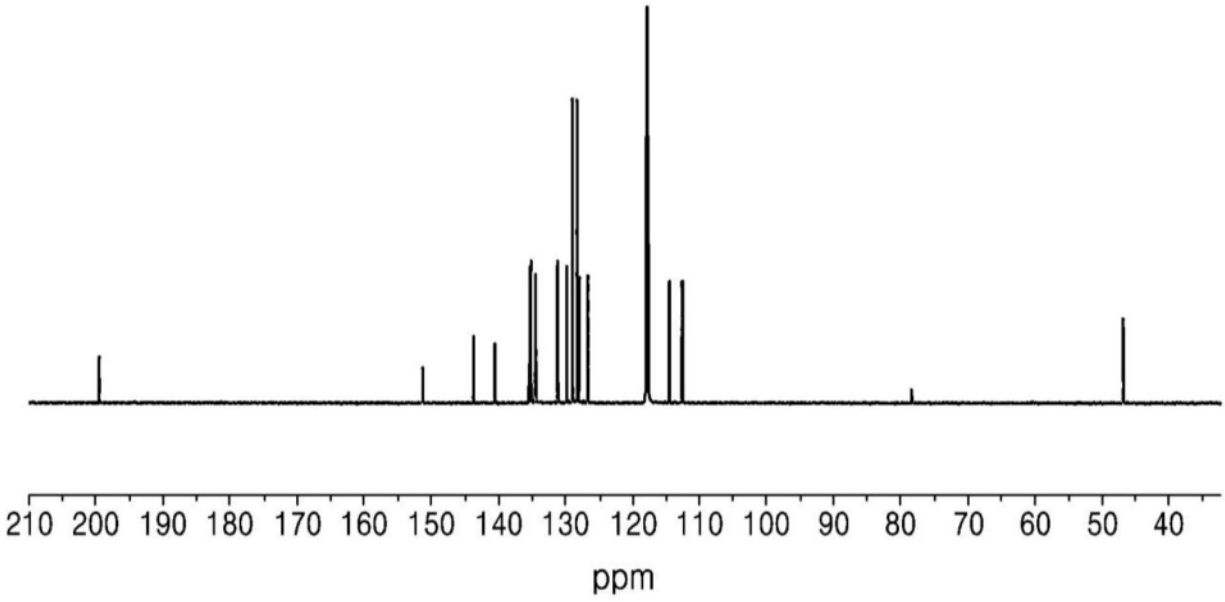

210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40
ppm

图3b

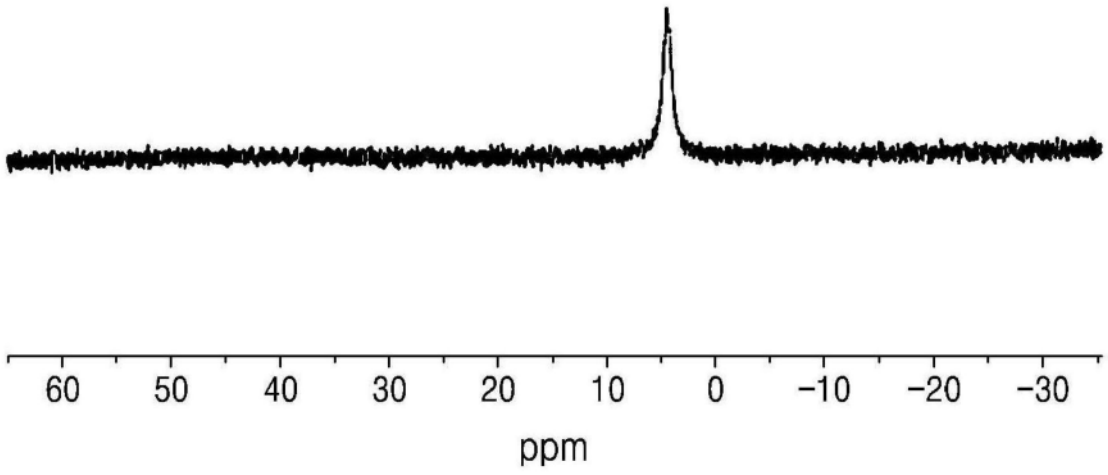


图4a

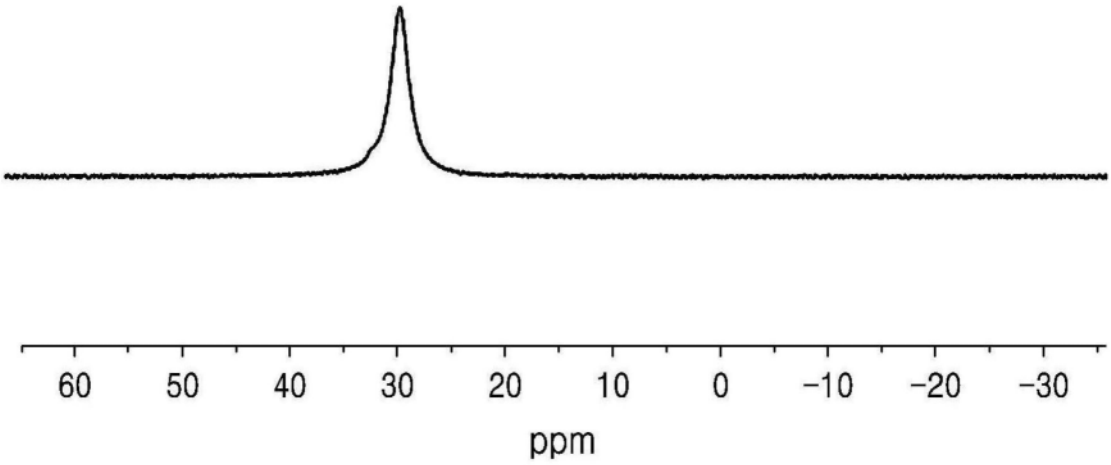


图4b

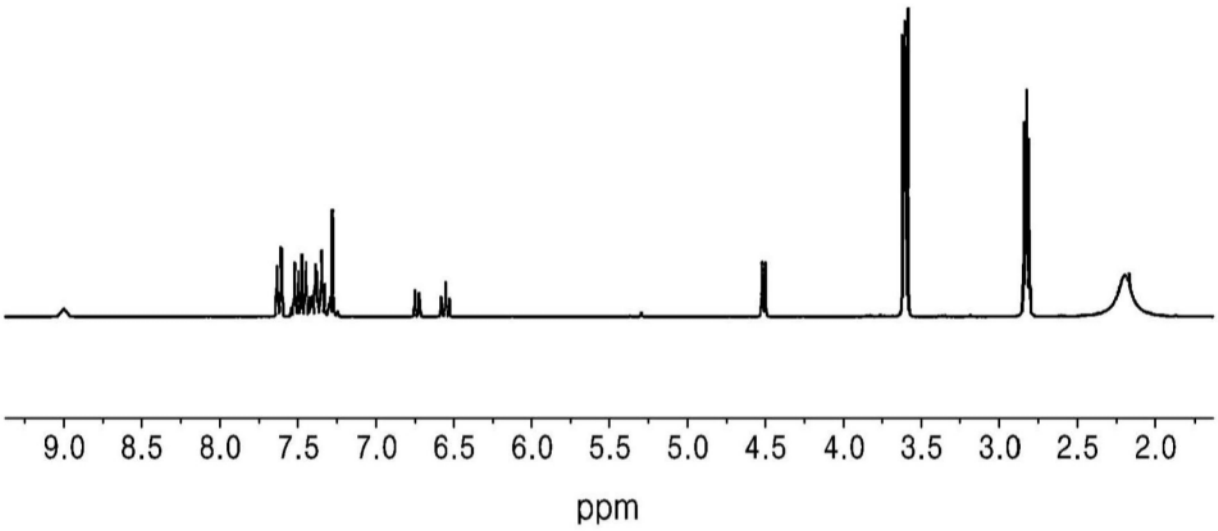

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0
ppm

图5a

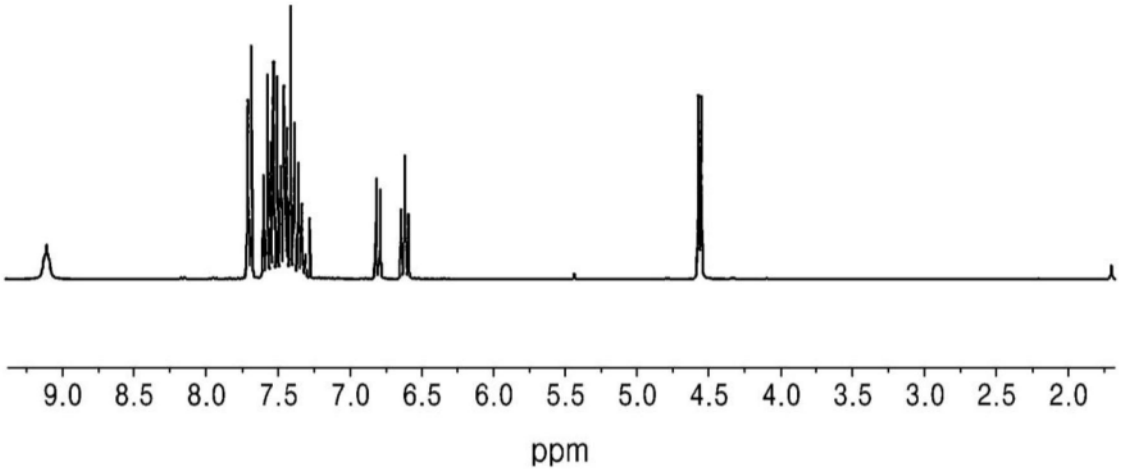

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0
ppm

图5b

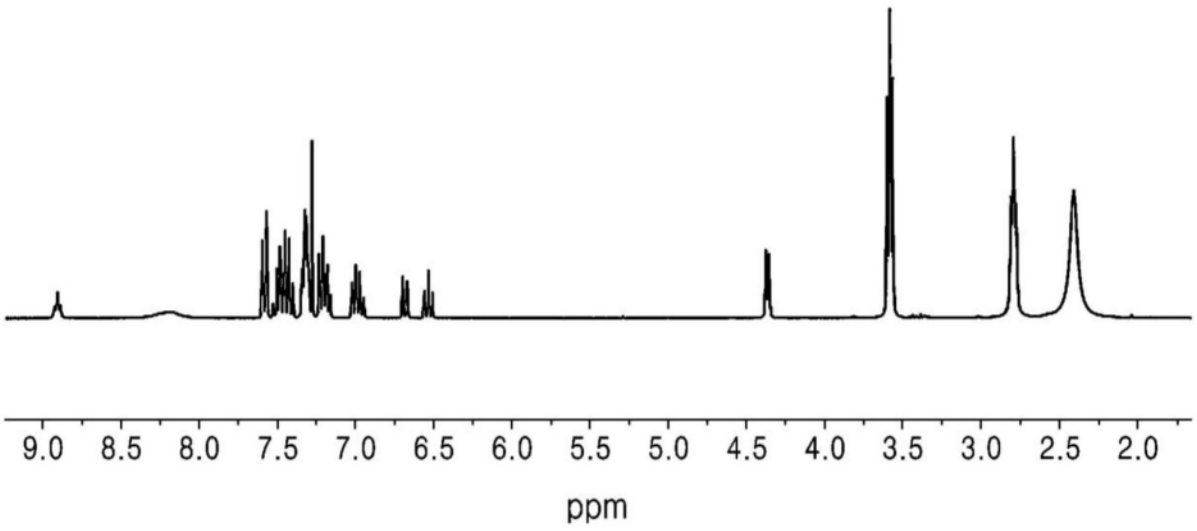

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0
ppm

图5c

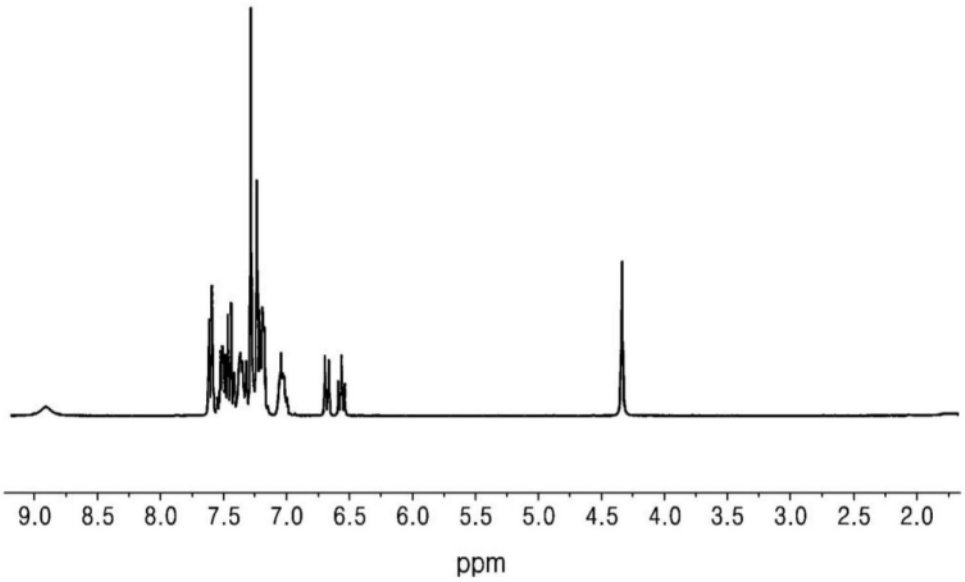

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0
ppm

图5d

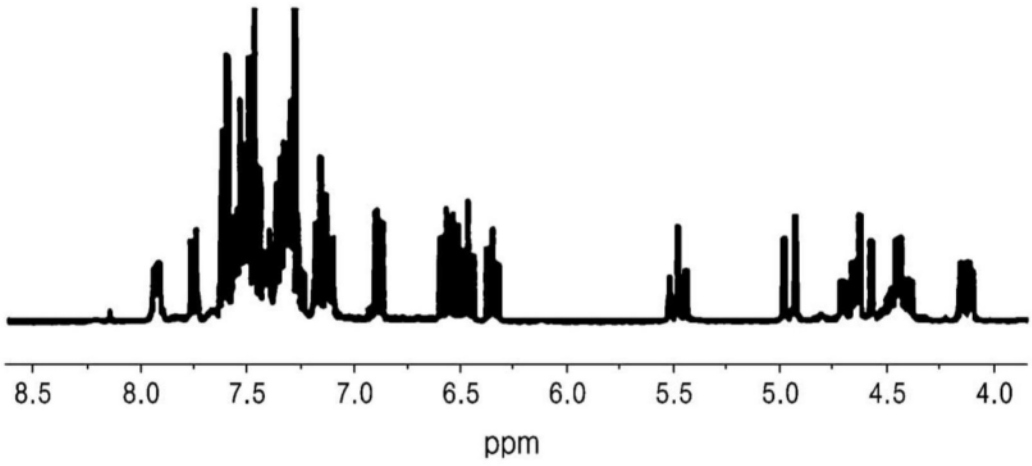

8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
ppm

图6a

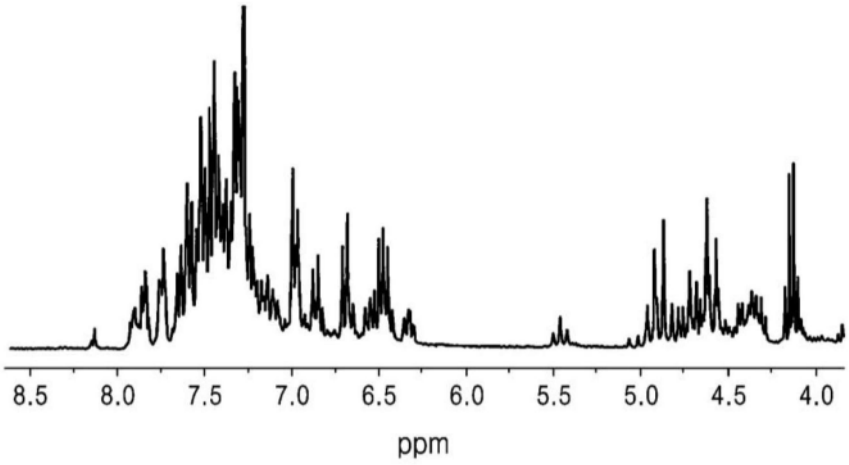

8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
ppm

图6b

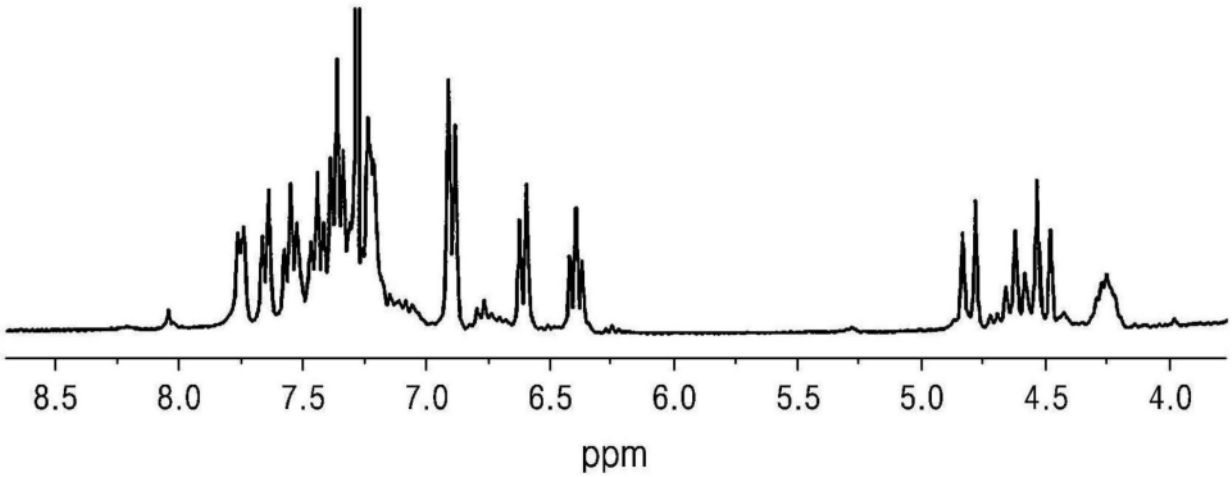

8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
ppm

图6c

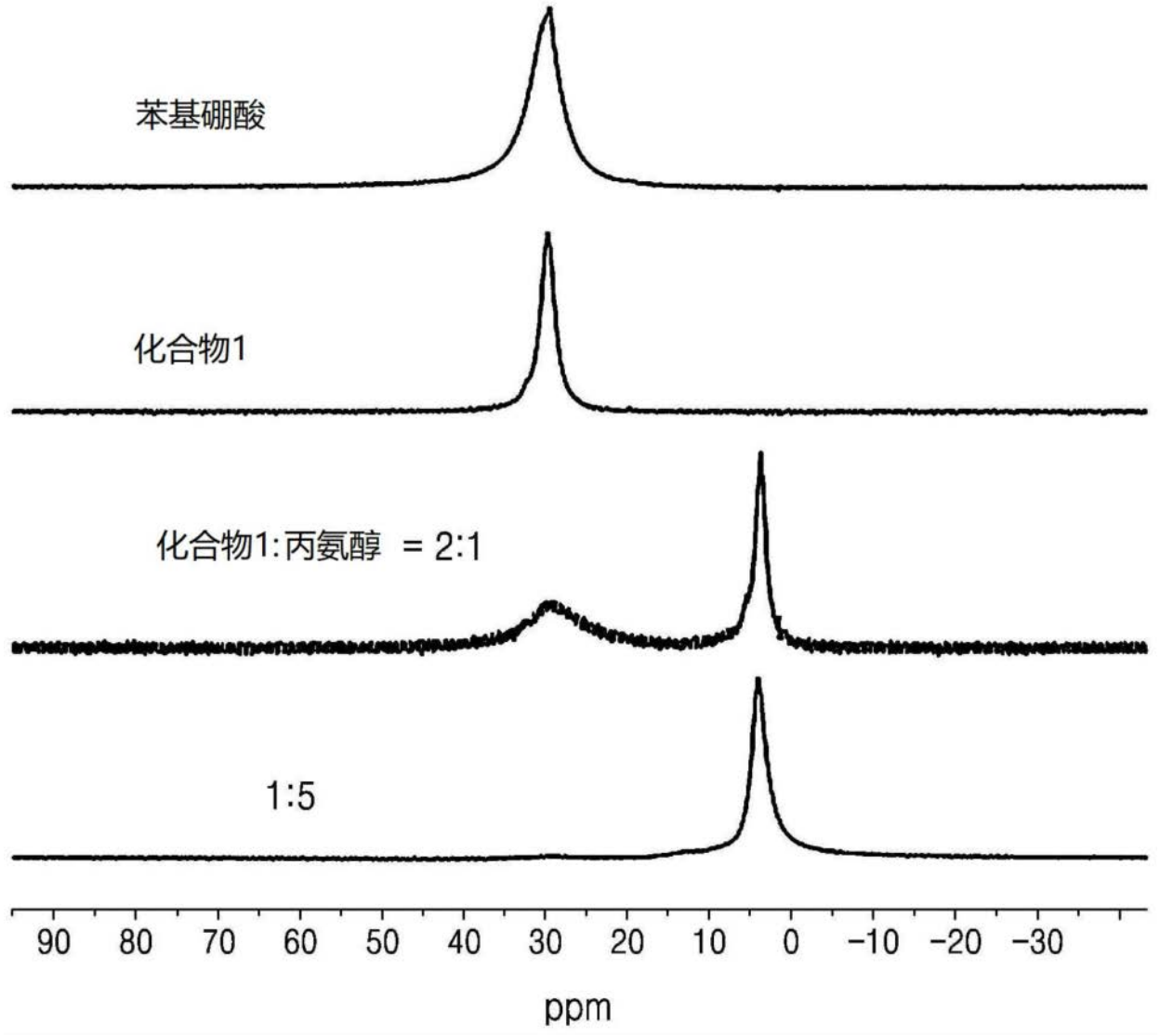


图6d

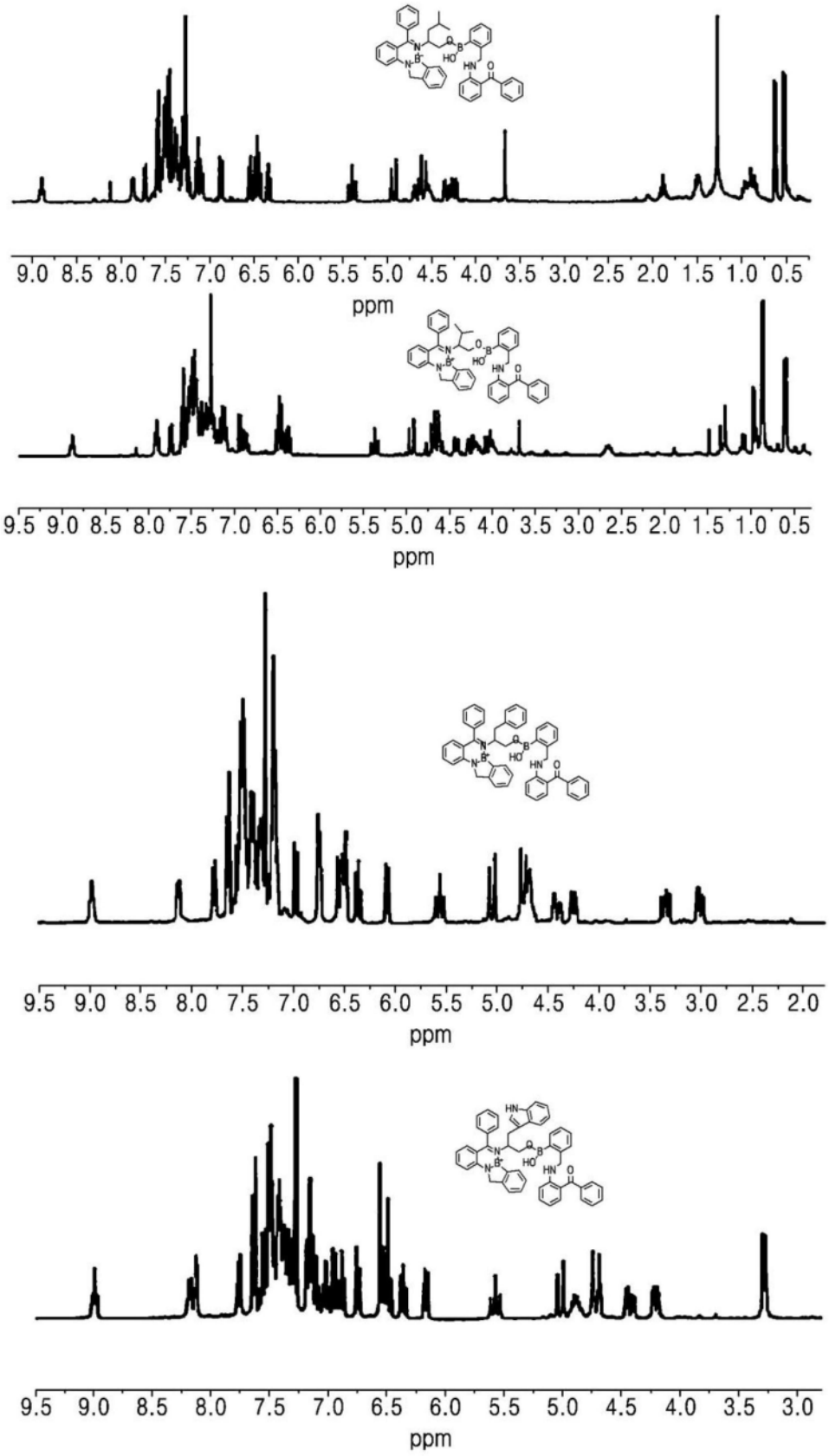

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5
ppm
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5
ppm
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0
ppm
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0
ppm

图6e

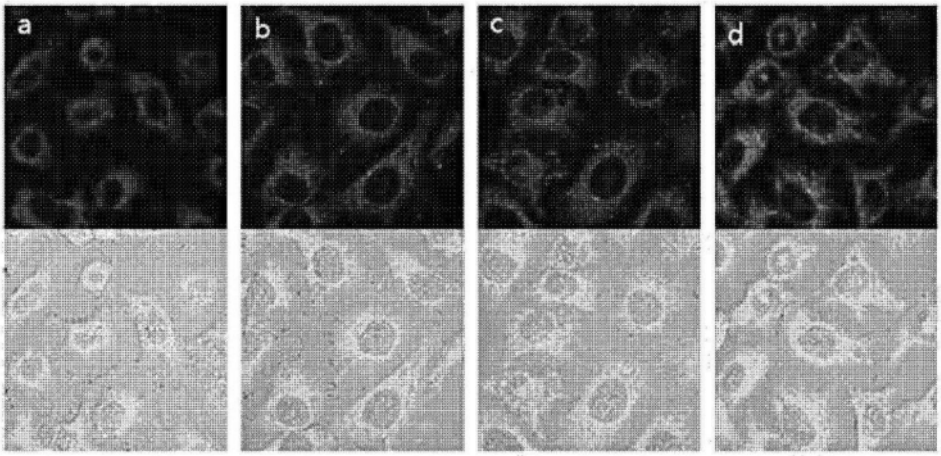


图7

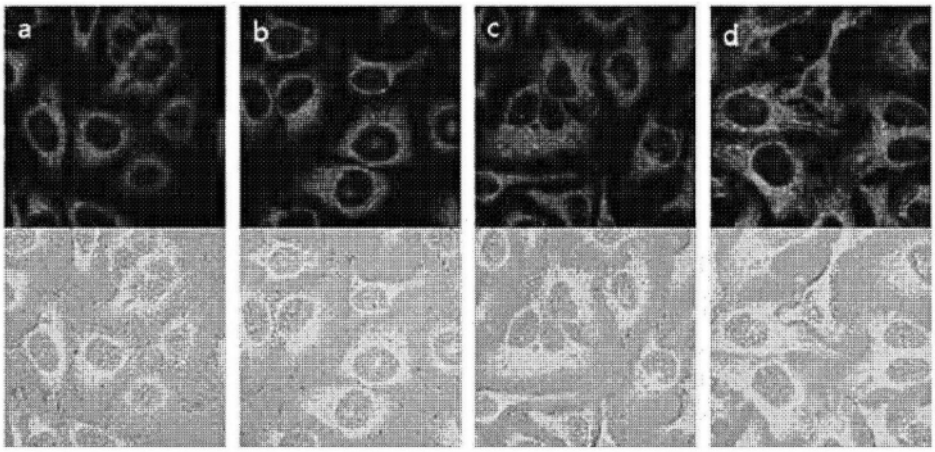


图8

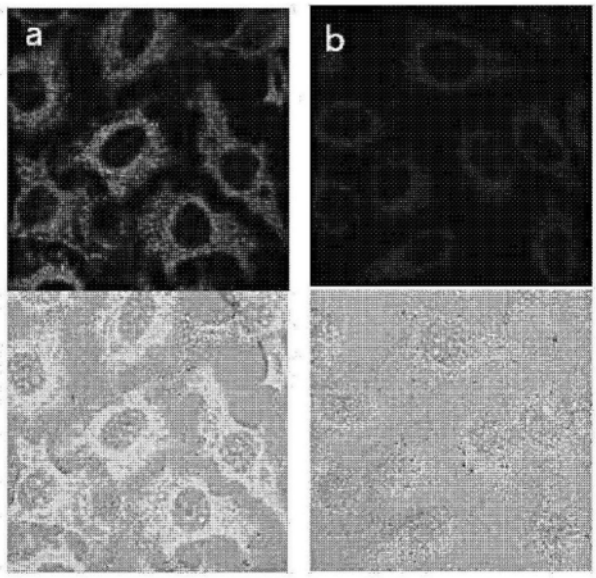


图9

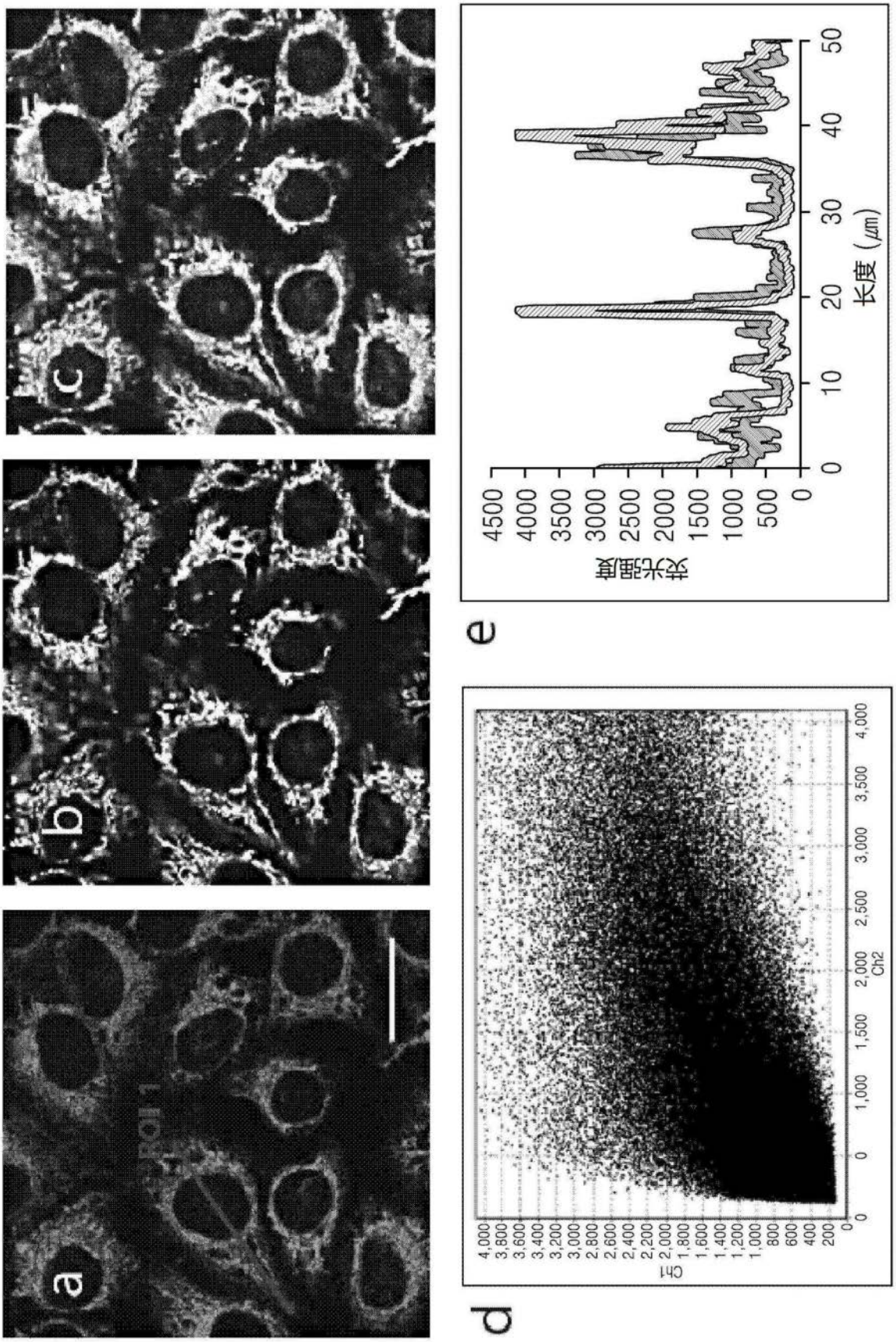


图10

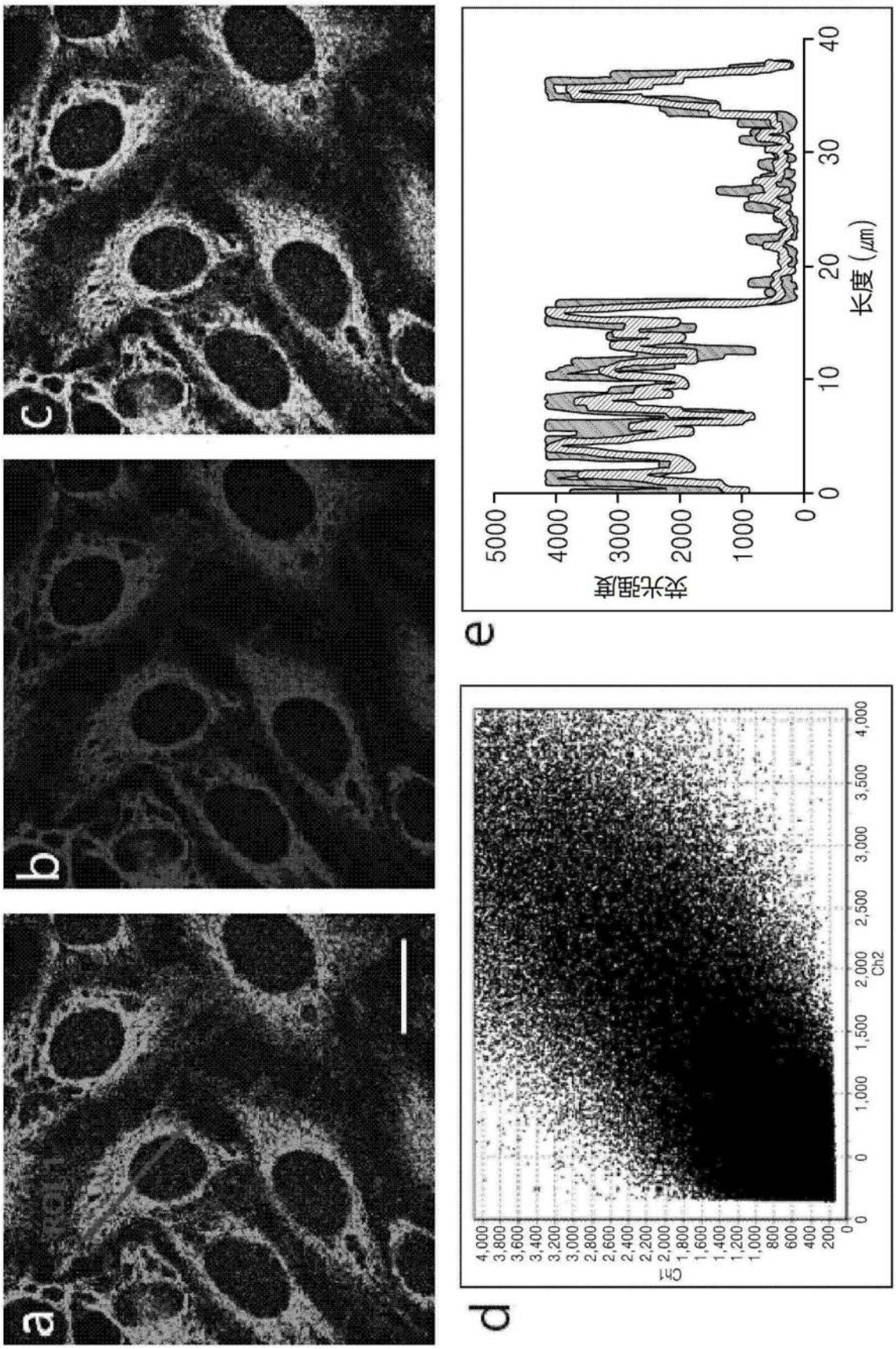


图11

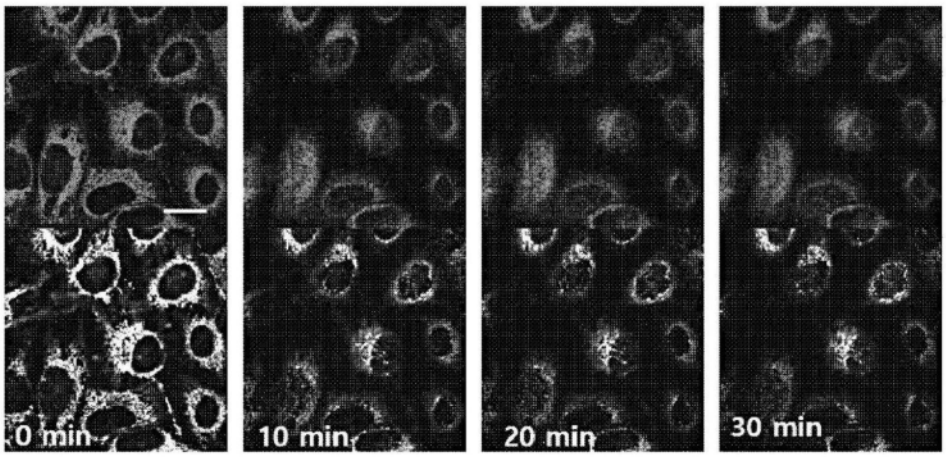

0 min
10 min
20 min
30 min

图12a

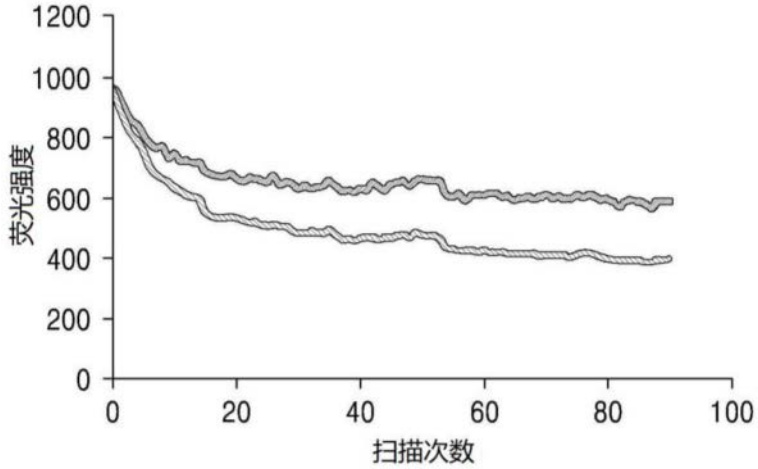

1200
1000
800
600
400
200
0
荧光强度
0
20
40
60
80
100
扫描次数

图12b

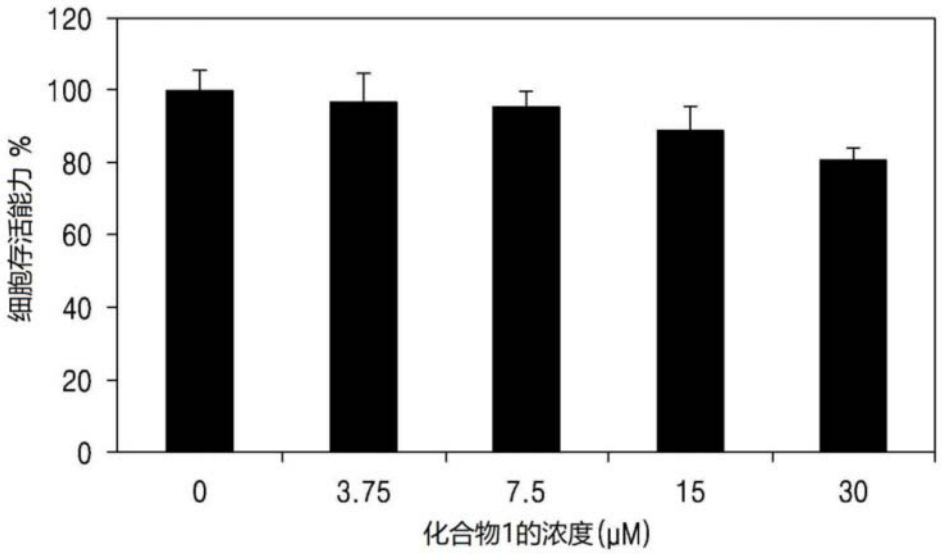

120
100
80
60
40
20
0
细胞存活能力 %
0
3.75
7.5
15
30
化合物1的浓度(μM)

图13

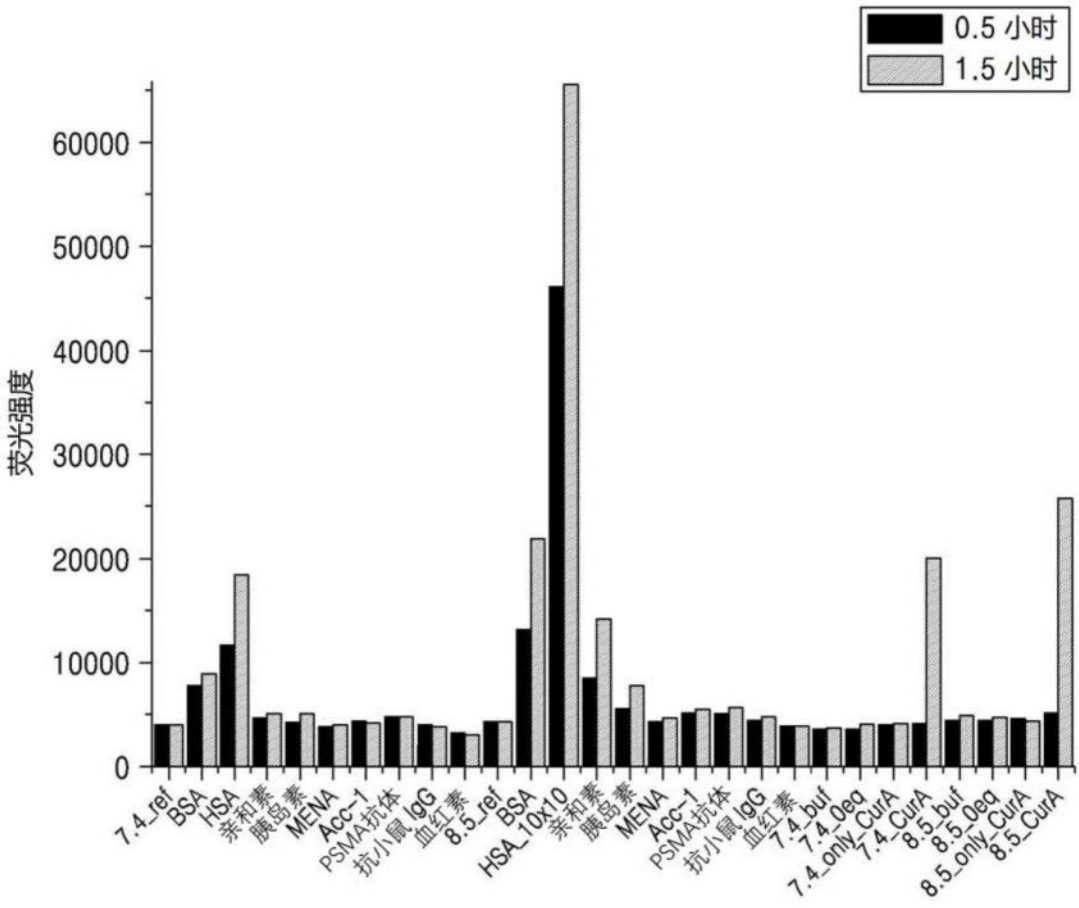

0.5 小时
1.5 小时
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
荧光强度
7.4_ref
BSA
HSA
茶和素
腰岛素
MENA
Acc-1
PSMA抗体
抗小鼠 IgG
血红素
8.5_ref
BSA
HSA_10x10
茶和素
腰岛素
MENA
Acc-1
PSMA抗体
抗小鼠 IgG
血红素
7.4_buf
7.4_0eq
7.4_only_CurA
7.4_CurA
8.5_buf
8.5_0eq
8.5_only_CurA
8.5_CurA

图14a

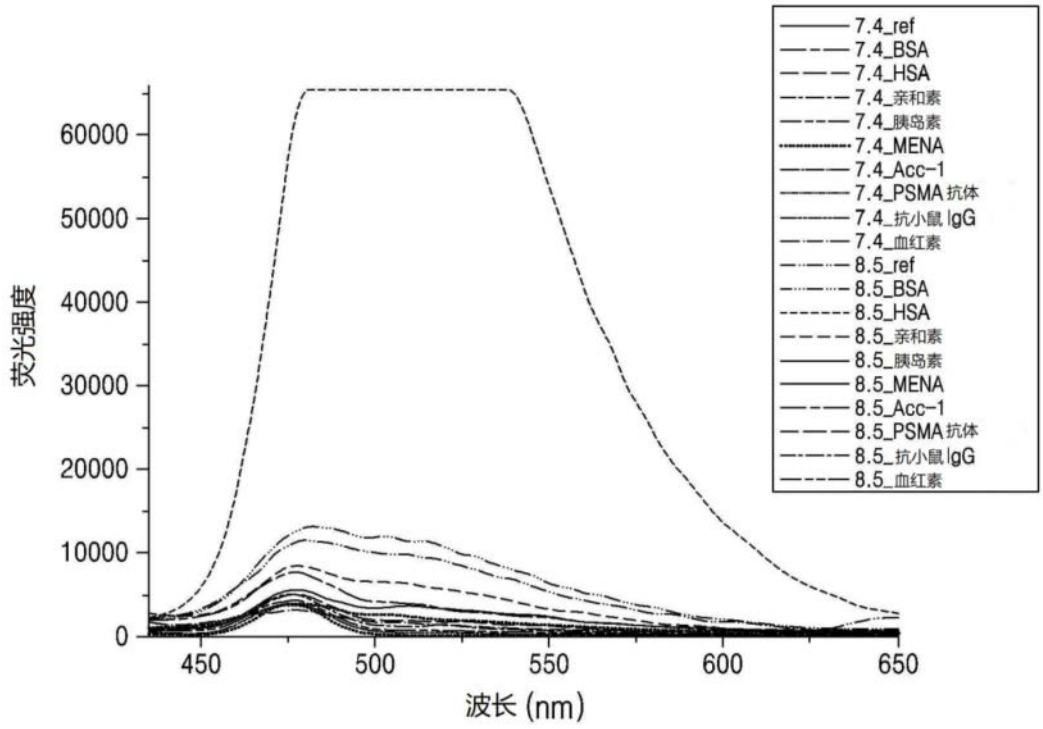

荧光强度
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
450
500
550
600
650
波长 (nm)
7.4_ref
7.4_BSA
7.4_HSA
7.4_亲和素
7.4_胰岛素
7.4_MENA
7.4_Acc-1
7.4_PSMA 抗体
7.4_抗小鼠 IgG
7.4_血红素
8.5_ref
8.5_BSA
8.5_HSA
8.5_亲和素
8.5_胰岛素
8.5_MENA
8.5_Acc-1
8.5_PSMA 抗体
8.5_抗小鼠 IgG
8.5_血红素

图14b

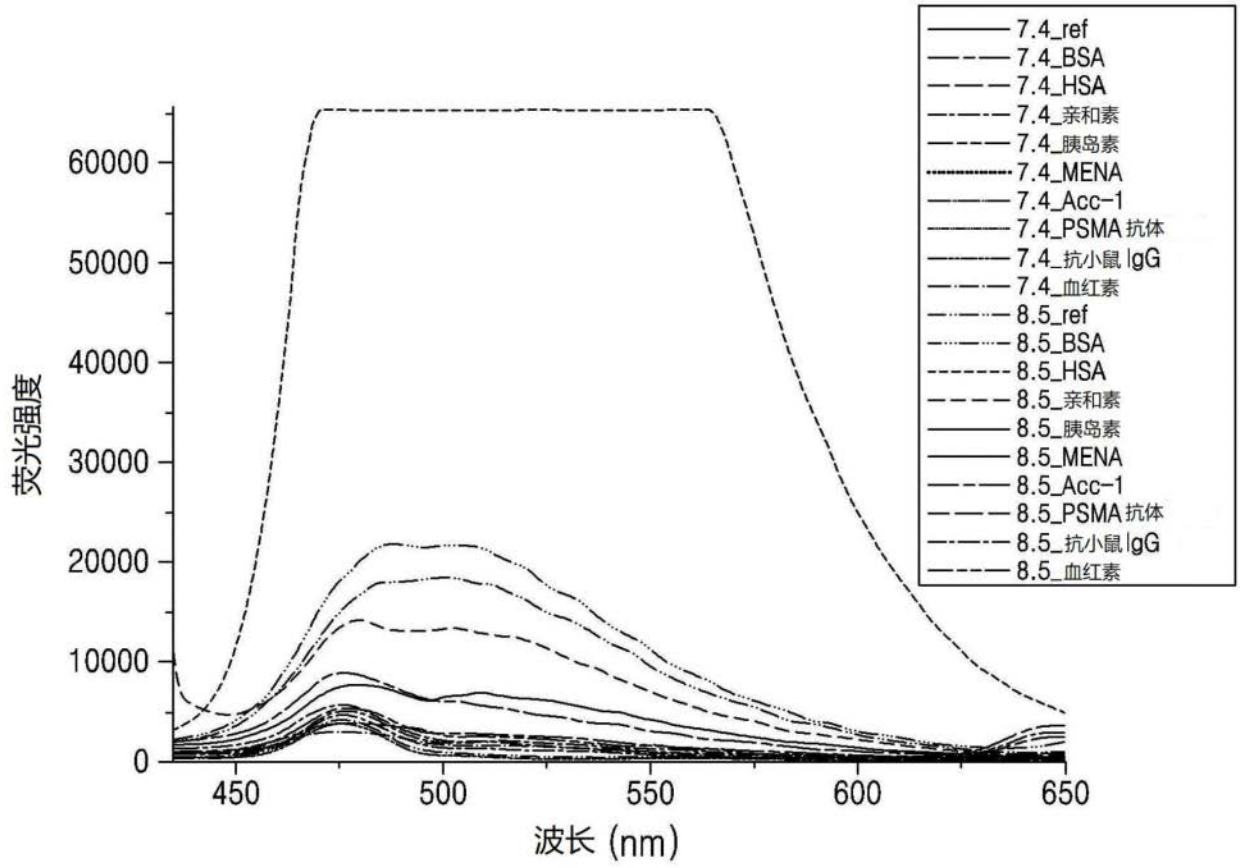

荧光强度
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
450
500
550
600
650
波长 (nm)
7.4_ref
7.4_BSA
7.4_HSA
7.4_亲和素
7.4_胰岛素
7.4_MENA
7.4_Acc-1
7.4_PSMA 抗体
7.4_抗小鼠 IgG
7.4_血红素
8.5_ref
8.5_BSA
8.5_HSA
8.5_亲和素
8.5_胰岛素
8.5_MENA
8.5_Acc-1
8.5_PSMA 抗体
8.5_抗小鼠 IgG
8.5_血红素

图14c

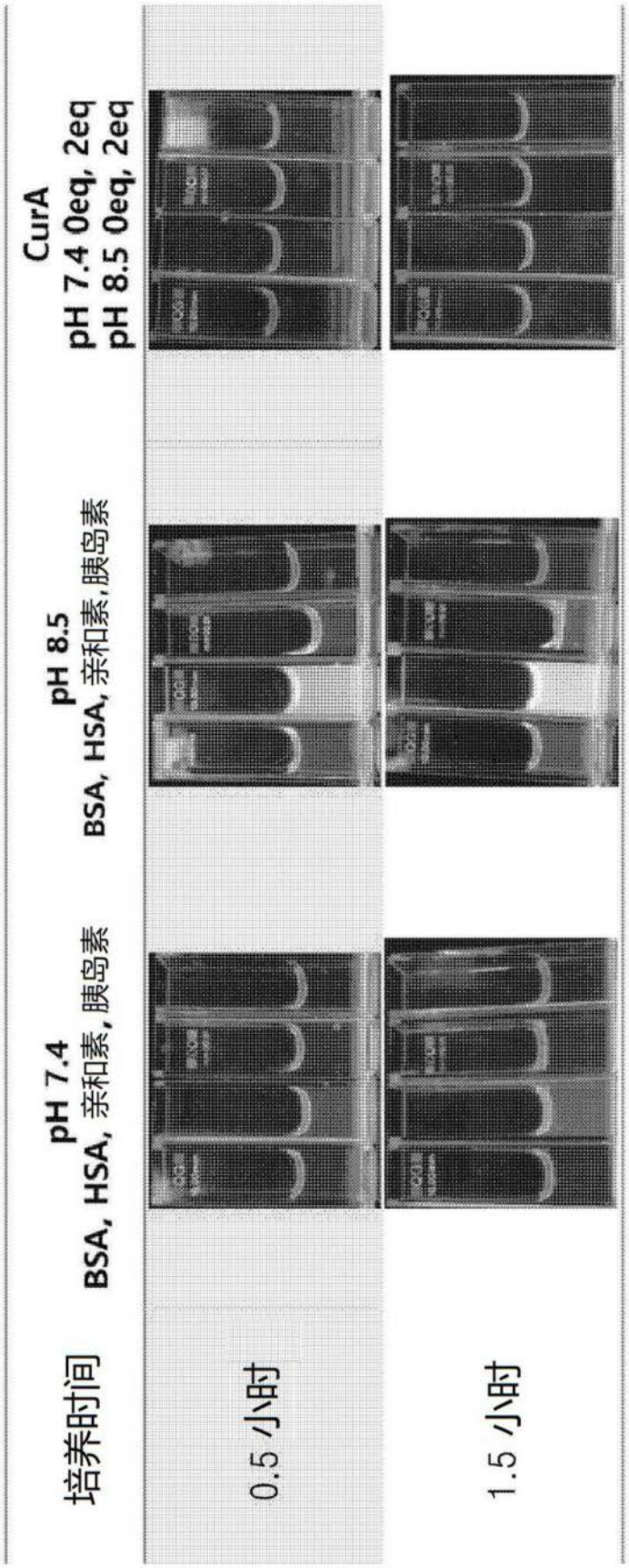

培养时间
pH 7.4
BSA, HSA, 亲和素, 胰岛素
pH 8.5
BSA, HSA, 亲和素, 胰岛素
CurA
pH 7.4 0eq, 2eq
pH 8.5 0eq, 2eq
0.5 小时
1.5 小时

图14d

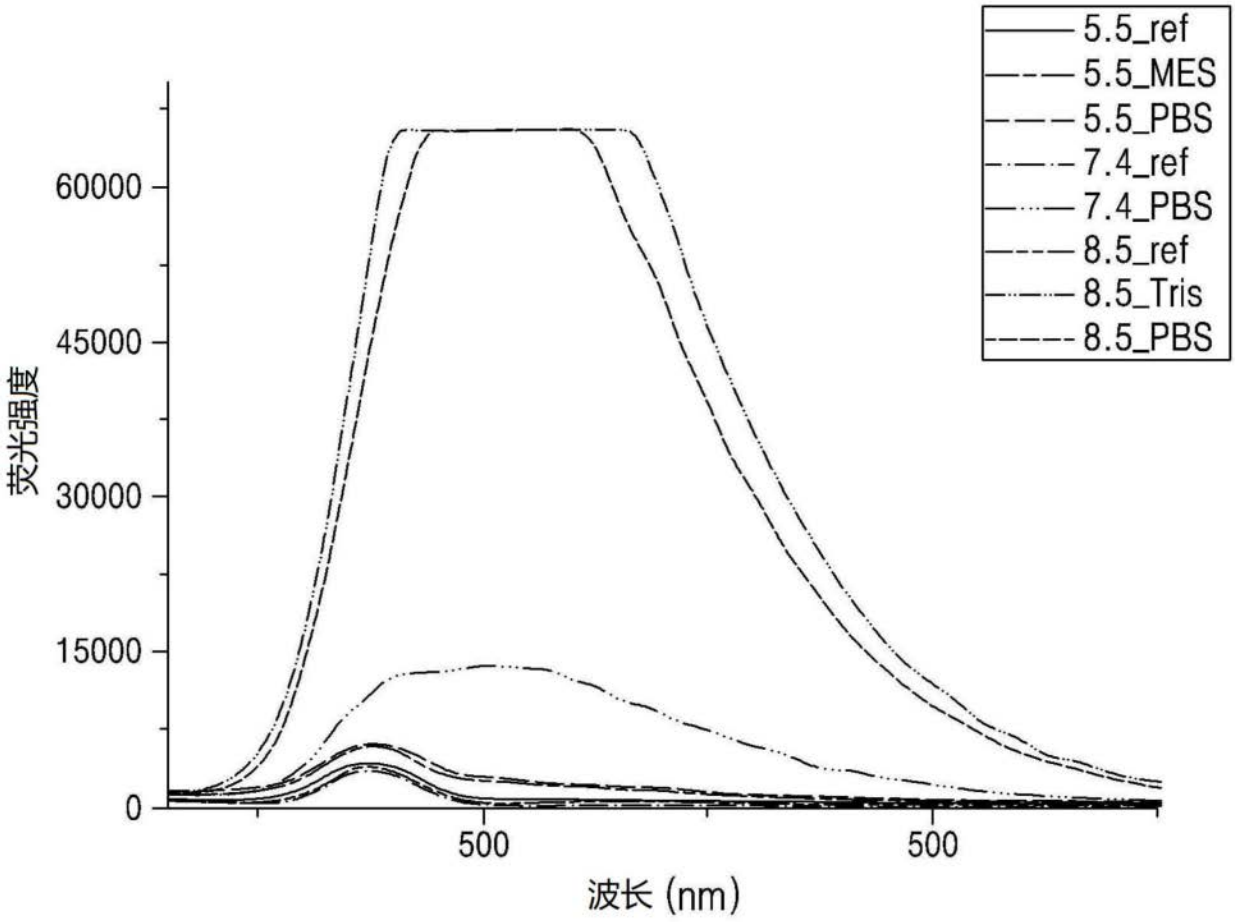

5.5_ref
5.5_MES
5.5_PBS
7.4_ref
7.4_PBS
8.5_ref
8.5_Tris
8.5_PBS
60000
45000
30000
15000
0
荧光强度
500
500
波长 (nm)

图15a

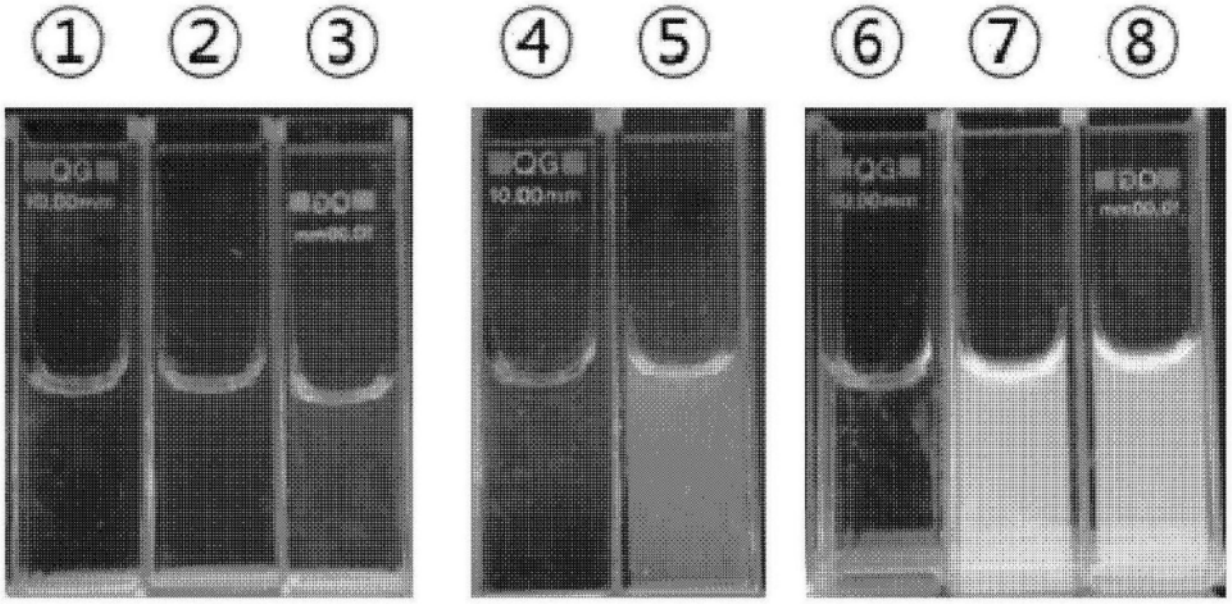

①
②
③
④
⑤
⑥
⑦
⑧

图15b