(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 5 月 19 日 (19.05.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/099565 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 7/64 (2006.01) *C09K 11/06* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/128480

(22) 国际申请日: 2020 年 11 月 12 日 (12.11.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 史海斌 (SHI, Haibin); 中国江苏省苏州市苏州工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 2151236 (CN)。 叶舒岳 (YE, Shuyue); 中国江苏省苏州市苏州工业园区仁爱路 199 号, Jiangsu 215123 (CN)。

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

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, 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,

WO 2022/099565 A1

(54) **Title:** RED-LIGHT-MEDIATED NUCLEIC ACID ANCHORING-TYPE FLUORESCENT PROBE, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 红光介导的核酸锚定型荧光探针及其制备方法和应用

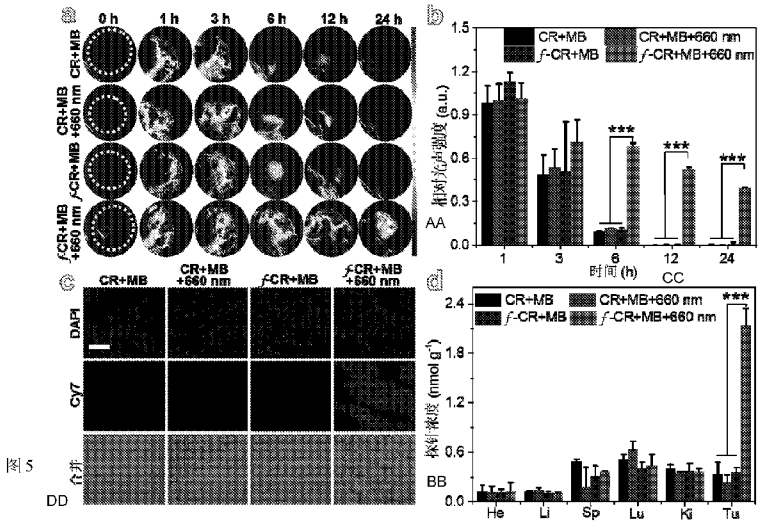


图 5

AA Relative photoacoustic intensity (a.u.)
BB Probe concentration (nmol g-1)
CC Time (h)
DD Combination

(57) **Abstract:** A red-light-mediated nucleic acid anchoring-type fluorescent probe, and a preparation method therefor and the use thereof. The fluorescent probe has the capability of taking a crosslinking reaction with RNA in cytoplasm under singlet oxygen mediation, and imaging of tumor tissues in a long window period is achieved. Moreover, it is found that by means of the probe, after crosslinking of RNA, a severe apoptosis phenomenon of tumor cells occurs, and the integration of diagnosis and treatment of tumors is achieved.

[见续页]

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))。

(57) **摘要**：一种红光介导的核酸锚定型荧光探针及其制备方法和应用，荧光探针具有在单线态氧介导下与细胞质中RNA发生交联反应的能力，实现了肿瘤组织长窗口期的成像；同时发现交联RNA后使得肿瘤细胞发生严重的细胞凋亡现象，实现对肿瘤的诊疗一体化。

红光介导的核酸锚定型荧光探针及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于小分子荧光探针生物成像和肿瘤治疗的技术领域，具体涉及新型锚定型分子探针及其制备方法，以及该探针在多模态成像和肿瘤治疗上的应用。

背景技术

[0002] 众所周知，癌症是威胁人类生命健康的最主要疾病之一，对经济社会的健康发展造成了极大的阻碍。根据国家癌症中心发布的数据，我国的肿瘤发病率逐年增长，并且呈现年轻化趋势，发展肿瘤诊断及治疗的材料、新技术迫在眉睫。近年来，研究者设计出各种针对肿瘤成像和治疗的材料，然而材料常常不能够在肿瘤组织长时间富集，从而极大的降低了材料的生物利用度。因此，开发新型的针对克服肿瘤组织高代谢的探针，具有明显的临床意义。生物交联反应是指在某些外源条件的刺激下，化合物能够与生物体内的大分子发生化学反应形成共价键。

发明概述

技术问题

[0003] 为了克服上述现有材料及技术中存在的问题，本发明构建一种新型锚定型分子探针，利用其具有交联能力基团，较好的生物相容性，主动靶向整合素和近红外发射的优势，进行长时间活体荧光、光声成像和肿瘤治疗。

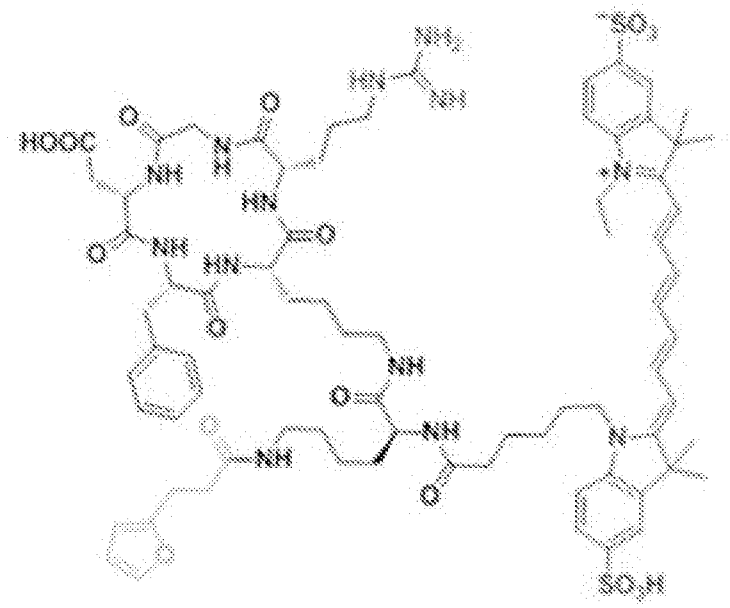
问题的解决方案

技术解决方案

[0004] 本发明采用以下技术方案。

[0005] 一种新型红光介导的核酸锚定型荧光探针，其具有如下化学结构式。

[0006]



。

[0007] 上述红光介导的核酸锚定型荧光探针的制备方法，包括以下步骤。

[0008] （1）叔丁氧羰基-苏甲氧羰基-赖氨酸脱保护后与3-(2-呋喃)丙酸反应得到化合物1。

[0009] （2）化合物1活化羧基后与环肽cRGD反应，得到化合物2，再脱保护得到化合物3。

[0010] （3）化合物3与Cy 7 SE反应，得到所述红光介导的核酸锚定型荧光探针。

[0011] 上述红光介导的核酸锚定型荧光探针的制备方法，具体包括以下步骤。

[0012] （1）叔丁氧羰基-苏甲氧羰基-赖氨酸在含三氟乙酸的二氯甲烷溶液中脱保护后与3-(2-呋喃)丙酸反应得到化合物1。

[0013] （2）化合物1利用N-羟基琥珀酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐活化羧基后与环肽cRGD反应，得到化合物2。

[0014] （3）化合物2在含有哌啶的N,N-二甲基甲酰胺溶液中脱保护得到化合物3。

[0015] （4）化合物3与Cy 7 SE反应，得到所述红光介导的核酸锚定型荧光探针f-CR。

[0016] 本发明公开了一种红光介导的探针锚定细胞方法，包括以下步骤。

[0017] （1）叔丁氧羰基-苏甲氧羰基-赖氨酸脱保护后与3-(2-呋喃)丙酸反应得到化合物1。

[0018] （2）化合物1活化羧基后与环肽cRGD反应，得到化合物2，再脱保护得到化合物3。

[0019] （3）化合物3与Cy 7 SE反应，得到所述红光介导的核酸锚定型荧光探针。

[0020] （4）将所述红光介导的核酸锚定型荧光探针、亚甲基蓝、细胞共孵育，实现探针锚定细胞；其中，共孵育在光照下、培养基中进行，优选的，红光介导的核酸锚定型荧光探针、亚甲基蓝的摩尔比为100：（0.8～1.2），优选100：1。

[0021] 上述技术方案中，叔丁氧羰基-芴甲氧羰基-赖氨酸（Boc-Lys (Fmoc)-OH）、三氟乙酸与3-(2-呋喃)丙酸在有机溶剂中进行反应，得到化合物1；化合物1与N-羟基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和cRGD在有机溶剂中进行，得到化合物2；化合物2与哌啶在有机溶剂中反应得到化合物3；化合物3与Cy 7 SE反应在有机溶剂中进行反应得到锚定型分子探针f-CR；叔丁氧羰基-芴甲氧羰基-赖氨酸、3-(2-呋喃)丙酸的摩尔比为1：（1～1.5）；优选的，叔丁氧羰基-芴甲氧羰基-赖氨酸，三氟乙酸与3-(2-呋喃)丙酸反应的摩尔比为1：10：1.2，化合物1与N-羟基琥珀酰亚胺，1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和cRGD的摩尔比为1：1.2：1.5：1.1，化合物C-1-4与哌啶的摩尔比为1：10，化合物3与Cy 7 SE的摩尔比为1：1.1。

[0022] 本发明公开了上述锚定型分子探针在制备光声、荧光成像试剂中和肿瘤抑制的应用。

[0023] 根据本发明技术方案，其中：步骤（1）中，化合物叔丁氧羰基-芴甲氧羰基-赖氨酸与三氟乙酸反应在二氯甲烷中进行，叔丁氧羰基-芴甲氧羰基-赖氨酸与三氟乙酸反应的摩尔比为1：10；优选的，反应在室温下进行反应0.5 h。

[0024] 步骤（2）中，化合物1、cRGD的摩尔比为1：（1～1.2）；优选的，化合物1与N-羟基琥珀酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐在N，N-二甲基甲酰胺中进行，化合物1与N-羟基琥珀酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的摩尔比为1：1.2：1.5；优选的，反应在0 ºC进行0.5 h后室温反应2 h。随后加入cRGD反应在在含有N,N-二异丙基乙胺的N，N-二甲基甲酰胺溶剂中进行，cRGD和N,N-二异丙基乙胺的摩尔比为1：1.1：1；优选的，反应在室温下继续进行2 h。

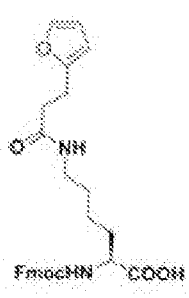
[0025] 步骤（3）中，化合物2与哌啶反应在N，N-二甲基甲酰胺溶剂中进行，化合物2与哌啶的摩尔比为1∶10；优选的，反应为室温反应0.2h。

[0026] 步骤（4）中，化合物3与Cy 7 SE反应在含有N,N-二异丙基乙胺的N，N-二甲基甲酰胺溶剂中进行；化合物3与Cy 7 SE的摩尔比为1∶（1～1.2），优选的，化合物3，Cy 7 SE和N,N-二异丙基乙胺的摩尔比为1：1.1：1；优选的，反应为室温反应1 h。

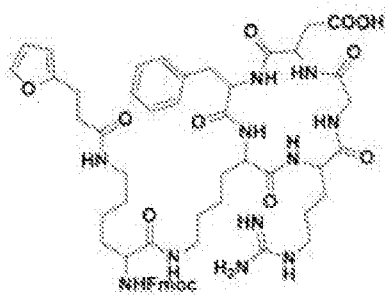
[0027] 步骤（5）中，cRGD与Cy 7 SE反应，含有N,N-二异丙基乙胺的N，N-二甲基甲酰胺溶剂中进行；化合物cRGD，Cy 7 SE和N,N-二异丙基乙胺的摩尔比为1∶1.1∶1；优选的，室温反应1 h。

[0028] 本发明中，化合物1、化合物2、化合物3、化合物CR、化合物f -CR的化学结构式分别如下。

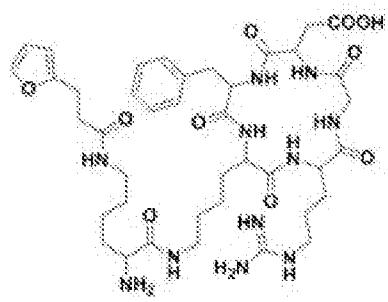
[0029]



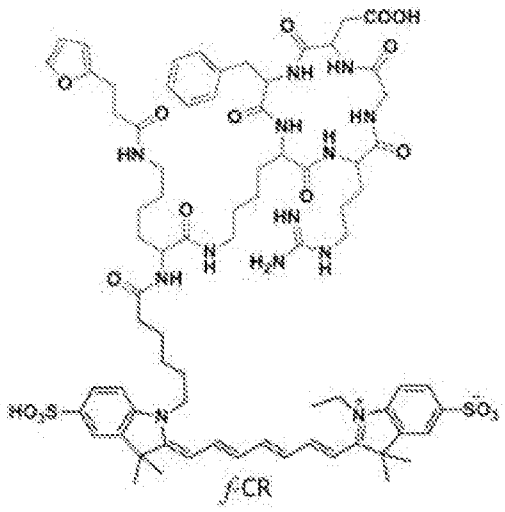
1



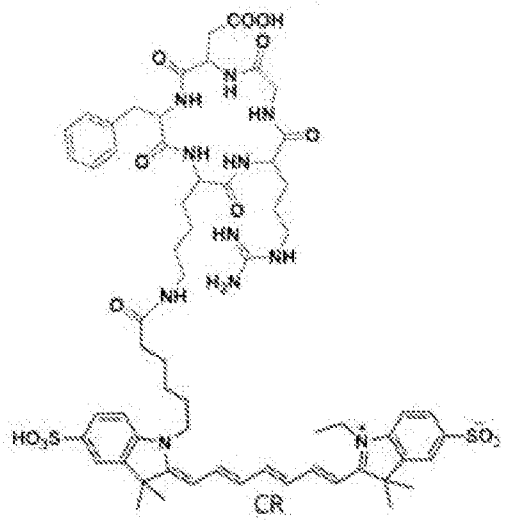
2



3



f-CR



CR

。

[0030] 本发明化合物CR和f-CR都是内盐的形式，为本领域常规表示方法。

[0031] 本发明公开了上述红光介导的核酸锚定型荧光探针在活体荧光成像或者光声成像中延长成像时间和肿瘤抑制中的应用；或者上述新型锚定型分子探针在制备长时间荧光成像试剂，光声成像试剂或者肿瘤抑制试剂中的应用；或者上述新型锚定型分子探针在肿瘤细胞内与RNA交联延长肿瘤细胞荧光成像的应用；或者上述新型锚定型分子探针在制备肿瘤细胞内与RNA交联从而抑制肿瘤细胞生长中的应用。

发明的有益效果

有益效果

[0032] 由于上述技术方案的运用，本发明与现有技术相比具有如下优点。

[0033] （1）本发明中设计合成了一种新型锚定型分子探针f－CR，在红光介导产生单线态氧下，可以长时间活体荧光及光声成像。

[0034] （2）本发明中目标探针可在红光介导产生单线态氧下的细胞内与RNA发生交联反应从而延长探针分子在细胞内的滞留时间。

[0035] （3）本发明中目标探针对肿瘤细胞内RNA交联后具有良好的促进肿瘤细胞凋亡的能力。

[0036] （4）本发明中目标探针在体内发生交联反应后对荷瘤小鼠的肿瘤生长具有抑制能力。

对附图的简要说明

附图说明

[0037] 图1为实施例1中新型锚定型分子探针的合成示意图。

[0038] 图2为实施例2中（a）实验组探针f－CR和对照组探针CR的化学结构，（b）实验组探针f－CR在水溶液中的紫外吸收和荧光发射图片，（c）实验组探针f－CR在水溶液中的TEM及粒径统计数据。

[0039] 图3为（b）RNA与f－CR发生交联反应凝胶电泳图，（c）实验组f－CR和对照组探针CR分别与4T1细胞孵育6小时后再孵育RNA Select的共聚焦图片及共定位率（d），（e）通过RNA总体试剂盒提取的细胞总RNA的荧光及定量图片，（f）通过细胞核&细胞质RNA提取试剂盒提取的总细胞质RNA的凝胶电泳图。

[0040] 图4（a）实验组探针f－CR和对照组探针CR分别MB和4T1细胞孵育6小时后进行

光照，随后通过共聚焦图片观察探针在细胞内的滞留变化及荧光强度定量（b），（c）动物实验示意图，（d）首先瘤内注射MB随后尾静脉注射实验组探针f－CR和对照组探针CR，一小时后给予光照观察探针在肿瘤组织滞留变化和荧光强度定量（e）。

[0041] 图5（a）相同实验条件下实验组探针f－CR和对照组探针CR，在肿瘤内光声信号变化及光声强度定量（b），（c）离体组织切片观察材料在肿瘤组织的富集量，（d）离体各组织（心，肝，脾，肺，肾，肿瘤）的探针定量。

[0042] 图6（a）实验组探针f－CR和对照组探针CR分别与MB和4T1细胞共孵育12 h后细胞毒性变化，（b）实验组探针f－CR和对照组探针CR分别与MB和4T1细胞共孵育12 h后再给予光照（660 nm 50 mW/cm ^{2} 3 min）后细胞毒性变化，（c）实验组探针f－CR和对照组探针CR分别与MB和4T1细胞共孵育12 h后再给予光照（660 nm 50 mW/cm ^{2} 3 min）分别用live-dead和细胞明场，观察细胞凋亡变化，（d）GFP-mRNA分别与实验组探针f－CR和对照组探针CR在体外发生交联反应后转染到4T1细胞中通过共聚焦观察GFP的表达情况，用流式细胞仪观察GFP表达情况（e），（f）细胞凋亡的机理图。

[0043] 图7（a）实验组探针f－CR和对照组探针CR和空白组PBS分别对于肿瘤抑制的连续13天变化曲线，（b）第十三天小鼠背部肿瘤对比大小，（c）第13天离体肿瘤尺寸大小，（d）治疗后48 h通过免疫荧光和免疫组化，分别考察Tunel，H&E，Caspase 3的变化。

发明实施例

本发明的实施方式

[0044] 下文将结合附图和具体实施例来进一步阐述本发明。应当理解的是，这些实施例仅用于解释和说明本发明中的技术方案，而并非旨在限制本发明的范围。此外，除非另有说明，下列实施例中所使用的材料、试剂、仪器等均可通过商业手段获得；具体制备方法与测试方法都为本领域常规方法。

[0045] 本发明构建、合成肿瘤锚定型诊疗一体化的步骤如下：叔丁氧羰基-芴甲氧羰基-赖氨酸在含三氟乙酸的二氯甲烷溶液中脱保护后与3-(2-呋喃)丙酸反应得到化合物1，化合物1利用与N-羟基琥珀酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二

亚胺盐酸盐活化羧基后与环肽cRGD反应，得到化合物2，化合物2，在含有哌啶的N,N-二甲基甲酰胺溶液中脱保护得到化合物3，化合物3与Cy 7 SE反应，得到锚定型分子探针f-CR。

[0046] 环肽cRGD与Cy 7 SE反应，得到对照组探针CR。

[0047] 利用上述新型锚定型分子探针进行长时间荧光活体成像的方法，包括以下步骤，首先将亚甲基蓝（MB）预先瘤内注射，随后将新型锚定型分子探针f-CR和对照组CR的水溶液尾静脉注射入荷瘤小鼠的体内，麻醉状态下观察不同时间点活体荧光，光声成像效果。

[0048] 利用上述将新型锚定型分子探针f－CR和对照组CR的水溶液，分别与肿瘤细胞共孵育并在不同时间点观察肿瘤细胞内荧光强度。

[0049] 利用上述将新型锚定型分子探针f－CR和对照组CR的水溶液，分别与肿瘤细胞共孵育48 h后观察肿瘤细胞的凋亡情况。

[0050] 利用上述新型锚定型分子探针进行体内肿瘤抑制实验的方法，包括以下步骤，首先将亚甲基蓝预先瘤内注射，随后将所述新型锚定型分子探针f-CR和对照组CR的水溶液尾静脉注射入荷瘤小鼠的体内，1 h后给予光照连续观察记录肿瘤抑制情况。

[0051] （1）新型肿瘤锚定型诊疗一体化探针的活体荧光成像：将MB（浓度：0.1 μM，体积：50 μL）瘤内注射0.5小时后，将上述获得的实验组探针f－CR和对照组探针CR分别溶于PBS溶液中（浓度：100 μM，体积：200 μL），以尾静脉注射的方式将探针注入荷瘤（4T1小鼠乳腺癌）的BALB/c雌鼠体内，随后置于小动物活体光学成像系统/IVIS Spectrum(PerkinElmer)，并于1小时后给予肿瘤部位光照（660 nm 50 mW/cm ^{2} 3 min），实时观察成像效果，最终通活体成像分析软件计算小鼠的肿瘤部位在不同时间点的荧光强度。

[0052] （2）新型肿瘤锚定型诊疗一体化探针的活体光声成像： 将MB（浓度：0.1 μM，体积：50 μL）瘤内注射0.5小时后，将上述获得的实验组探针f－CR和对照组探针CR分别溶于PBS溶液中（浓度：100 μM，体积：200 μL），以尾静脉注射的方式将探针注入荷瘤（4T1小鼠乳腺癌）的BALB/c雌鼠体内，同时打开小动物光声断层扫描成像系统，待光声成像仪水浴池中的水温达37℃时，放入麻

醉好的小鼠，扫描小鼠的肿瘤部位图像。并于1小时后给予肿瘤部位光照（660 nm，50 mW/cm ^{2}，3 min），实时观察成像效果，最终通活体成像分析软件计算小鼠的肿瘤部位在不同时间点的荧光强度。之后将获得的光声成像数据使用MSOT InSight/inVision分析软件进行重建分析。

[0053] （3）新型肿瘤锚定型诊疗一体化探针的肿瘤抑制实验： 将左右双侧背部荷瘤（4T1小鼠乳腺癌）的BALB/c雌性小鼠（肿瘤体积约20 mm ^{3} ）随机分成3组（n＝5）：尾静脉注射PBS（10 mM, 200 μL）的小鼠左侧肿瘤（第1组，简写PBS），660 nm激光照射处理的右侧肿瘤（第2组，简写PBS+660 nm）；仅尾静脉注射CR（200 μM, 200 μL）并预先瘤内注射MB（浓度：0.1 μM，体积：50 μL）左侧肿瘤（第3组，简写CR+MB），右侧肿瘤预先瘤内注射MB（浓度：0.1 μM，体积：50 μL）并660 nm激光照射处理的小鼠（第4组，简写CR+MB+660 nm）；尾静脉注射f－CR（200 μM, 200 μL）并预先瘤内注射MB（浓度：0.1 μM，体积：50 μL）左侧肿瘤（第3组，简写f－CR+MB），右侧肿瘤预先瘤内注射MB（浓度：0.1 μM，体积：50 μL）并660 nm激光照射处理的小鼠（第4组，简写f－CR+MB+660 nm）。治疗后，每隔一天记录小鼠肿瘤体积变化并绘制小鼠存活率曲线。

[0054] 实施例1：新型肿瘤锚定型诊疗一体化探针CR和f－CR合成。

[0055] 合成化合物1：Boc-Lys (Fmoc)-OH (0.5 g, 1.07 mmol)溶解于二氯甲烷10 mL同时加入三氟乙酸2 mL在室温下搅拌10 min脱去BOC，随后收集产物，随后加入3-(2-呋喃)丙酸(0.2 g, 1.43 mmol)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(0.82 g, 1.43 mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(0.2 g, 1.71 mmol)于室温搅拌4 h后加入N,N-二异丙基乙胺(5 μL) 继续反应3 h。反应结束后用乙酸乙酯萃取三次再浓缩，随后通过硅胶柱洗脱得到纯产物化合物1（0.56 g, 80%）。$C_{28}H_{30}N_{2}O_{6}$ ([M+H] $^{+}$): 489.2021, found ESI-MS: m/z 489.2031；化合物2合成 ：cRGD (10 mg, 16.57 μmol) and 1 (19.47 mg, 33.13 μmol)溶解于DMF(5 mL)在0℃搅拌10 min随后同时缓慢加入DIPEA (2

μL)。室温反应两小时后收集产物利用制备型HPLC分离产物得到产物化合物2 $C_{55}H_{69}N_{11}O_{12}$ ([M-H]$^-$): 1076.5190, found ESI-MS: m/z 1076.5187；化合物3合成：化合物2 (10 mg, 9.29 μmol) 溶解于 DMF/二乙胺 (6 mL, 5:1, v/v) 溶液中室温反应1 h。浓缩粗产物后利用制备型HPLC分离产物得到产物化合物3 $C_{40}H_{59}N_{11}O_{10}$ ([M-H]$^-$): 852.4374, found ESI-MS: m/z 852.4370；化合物f-CR合成：化合物3 (5 mg, 5.86 μmol), Cy7-SE (4.24 mg, 5.86 μmol)溶解于DMF（2 mL）中在0℃搅拌10 min同时滴加到反应体系中，恢复室温继续反应2 h后利用制备型HPLC分离样品得到终产物。$C_{75}H_{99}N_{13}O_{17}S_2$ ([M-H]$^-$): 1516.6651, found ESI-MS: m/z 1516.6664。

[0056] 对照组化合物CR合成 cRGD (5 mg, 8.27 μmol), Cy7-SE (5.99 mg, 8.27 μmol)溶解于DMF (2 mL)缓慢加入DIPEA于0℃搅拌10 min随后恢复室温继续搅拌2 h收集粗产物，利用制备型HPLC分离得到对照组产物。$C_{62}H_{81}N_{11}O_{14}S_2$ ([M-H]$^-$): 1266.5339, found ESI-MS: m/z 1266.5321。

[0057] 上述反应示意图以及涉及各部产物的化学结构式如图1中的所示。

[0058] 实施例2：新型肿瘤锚定型诊疗一体化探针的物理化学性质：将实施例1中制得的对照组探针CR和实验组探针f-CR用超纯水稀释至浓度为10 μM（可完全溶解），并使用紫外可见近红外分光光度计及荧光分光光度计测其紫外可见近红外光谱及荧光光谱。如图2（a）（b）所示，结果表明，探针CR和f-CR的最大吸收在747 nm，最大发射在789 nm；同时对照组探针没有发现组装，没有纳米结构，而实验组探针则发现组装成纳米结构，尺寸大于为7.2±0.9 nm左右，如图2（c）（d）。

[0059] 将实施例1中制得的对照组探针CR和实验组探针f-CR用超纯水稀释至浓度为10 μM，加入定制序列RNA（5`-ACAUCGGGAUAGCGAAGUUGAGAGAGAGGGAG-3`）5 μM，MB 10 μM 混合后于4℃振荡，给予660 nm光照（50 mW/cm^2，10分钟）或者不光照（避光），将反应液直接用RNA非变性凝胶电泳分离，如图3b可以发现实验组探针f-CR在加入RNA，MB，并给予光照后能明显的标记上RNA，其他组则没有明显的Cy7的红色荧光。另外将对照组探针CR和实验组探针f-CR加入培养基（HyClone DMEM高糖液体培养基含10%FBS）中，浓度为10 μM，加入MB 0.1

μM，分别加入到4T1细胞中培养6h后，给予660 nm光照（50 mW/cm ^{2}，10分钟）或者不光照（避光），随后再用商用RNA染料SYTO™ RNASelect™ green fluorescent cell stain（Thermo Fisher）分别染色如图3d，在探针的共定位实验中发现在实验组（f－CR+MB+660 nm）共定位率要大于其他各组；随后通过Trizol法提取出细胞内的总RNA，并通过荧光定量发现实验组（f－CR+MB+660 nm）的荧光强度远大于其他组如图3e；随后通过细胞质&细胞核总提试剂盒提取出细胞质RNA并通过RNA非变性胶分析发现实验组（f－CR+MB+660 nm）具有明显的红色荧光，其他组则没有明显的荧光产生如图3f。

[0060] 对照组探针CR和实验组探针f－CR加入培养基（HyClone DMEM高糖液体培养基含10%FBS）中，浓度为10 μM，加入MB 0.1 μM，分别加入到4T1细胞中培养6h后，给予660 nm光照（50 mW/cm ^{2}，10分钟）或者不光照（避光）观察材料在细胞内滞留的情况，发现实验组（f－CR+MB+660 nm）滞留实验远远大于其它各组如图4a和4b；随后考察探针在小鼠肿瘤内的滞留实验，对照组探针CR和实验组探针f－CR用PBS至浓度为100 Mm 200 μL，提前0.5h将MB（PBS，0.1 μM 50 μL）瘤内注射到小鼠肿瘤内，随后给予尾静脉注射CR或f－CR，在1 h后给予660 nm光照（50 mW/cm ^{2}，3分钟）或者不光照（避光），通过IVIS观察探针在个时间点肿瘤内代谢情况如图4c，4d和4e，发现实验组（f－CR+MB+660 nm）在体内的滞留时间远大于其他各组。

[0061] 对照组探针CR和实验组探针f－CR用PBS至浓度为100 μM 200 μL，提前0.5h将MB（PBS，0.1 μM 50 μL）瘤内注射到小鼠肿瘤内，随后给予尾静脉注射CR或f－CR，在1 h后给予660 nm光照（50 mW/cm ^{2}，3分钟）或者不光照（避光），同时通过光声成像系统考察各时间点的光声信号变化情况，光声成像数据使用MSOT InSight/inVision分析软件进行重建分析，发现相较于其他组，实验组（f－CR+MB+660 nm）具有长时间的光声信号，图5a和5b；与上述相同的实验方法，在探针注射12 h后将分别将小鼠各主要脏器取出，并将肿瘤组织冰冻切片图5c，所有脏器组织匀浆定量荧光强度图5d，发现实验组（f－CR+MB+660 nm）在肿瘤内的富集量要远大于其他各组。

[0062] 对照组探针CR和实验组探针f－CR用培养基（HyClone DMEM高糖液体培养基含10%FBS）稀释至浓度为100，50，20，10，1，0.1 μM，加入MB 0.1 μM，分别加入到4T1细胞中培养12 h后，发现CR和f－CR均没有明显的毒性如图6a，相同实验条件在给予660 nm光照（50 mW/cm ^{2}，3分钟）后继续培养48 h，发现实验组（f－CR+MB+660 nm）展现出一定的细胞毒性如图6b；同时通过Live-dead试剂和细胞明场的形态可以看出实验组（f－CR+MB+660 nm）展现出使得肿瘤细胞凋亡能力。

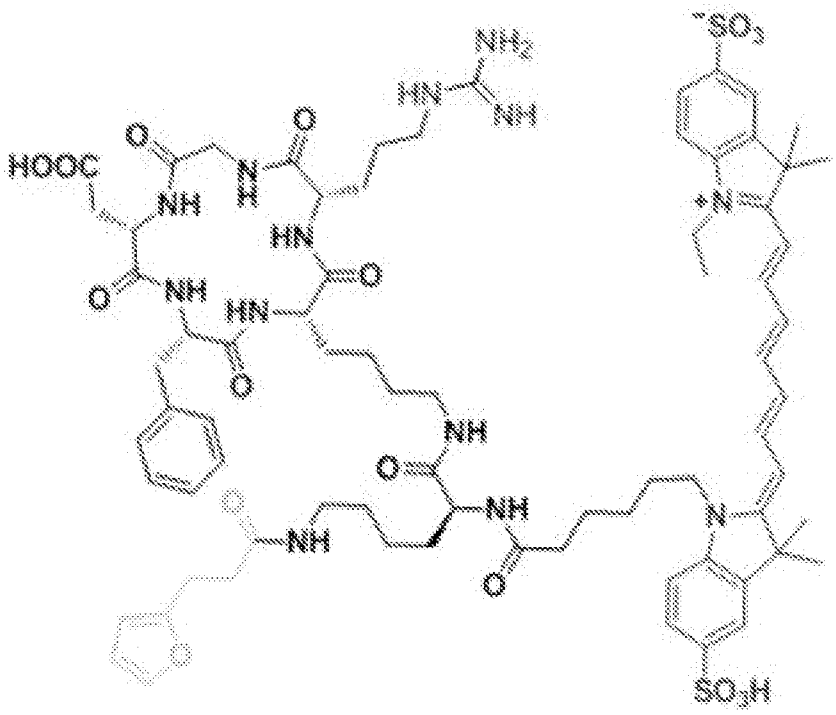
[0063] 利用商用GFP-mRNA 2 μM，对照组探针CR和实验组探针f－CR用PBS稀释至浓度为10 μM，加入MB 0.1 μM，分别于4℃常规振荡，同时给予660 nm光照（50 mW/cm ^{2}，3分钟）或者不光照（避光），随后将各混合溶液通过脂质体转染试剂盒转染至细胞内继续培养24 h，在细胞共聚焦图片下实验组（f－CR+MB+660 nm）展现出GFP在细胞内表达明显下降图6d，收集细胞通过流式细胞仪分析实验组（f－CR+MB+660 nm）展现出GFP表达量的下降如图6e。

[0064] 肿瘤抑制实验，对照组探针CR和实验组探针f－CR用PBS至浓度为200 μM 200 μL，提前0.5h将MB（PBS，0.1 μM 50 μL）瘤内注射到小鼠肿瘤内，随后给予尾静脉注射CR或f－CR，在1 h后给予660 nm光照（50 mW/cm ^{2}，3分钟）或者不光照（避光），随后每天量取肿瘤尺寸如图7a，第十三天处死小鼠如图7b，并取下肿瘤如图7c发现，实验组（f－CR+MB+660 nm）具有良好的肿瘤抑制能力，同时相同条件下在第一天取小鼠肿瘤，进行H&E，Tunnel和Caspase-3的免疫组化和免疫荧光分析得到，实验组（f－CR+MB+660 nm）探针能够引起肿瘤组织发生凋亡坏死。

[0065] 本发明锚定型分子探针利用红光介导的生物交联，用于提高分子在肿瘤组织的滞留时间和抑制肿瘤生长。通过IVIS观察探针在个时间点肿瘤内代谢情况，发现实验组（f－CR+MB+660 nm）在体内的滞留时间远大于其他各组。

权利要求书

[权利要求 1] 一种红光介导的核酸锚定型荧光探针，其特征在于，所述红光介导的核酸锚定型荧光探针具有如下化学结构式：



。

[权利要求 2] 权利要求1所述红光介导的核酸锚定型荧光探针在活体荧光、光声成像和抑制肿瘤中的应用；或者权利要求1所述红光介导的核酸锚定型荧光探针在制备活体荧光、光声成像试剂和肿瘤抑制试剂应用；或者权利要求1所述红光介导的核酸锚定型荧光探针在提高探针在肿瘤组织的滞留时间和抑制肿瘤中的应用。

[权利要求 3] 权利要求1所述红光介导的核酸锚定型荧光探针的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

（1）叔丁氧羰基-芴甲氧羰基-赖氨酸脱保护后与3-(2-呋喃)丙酸反应得到化合物1；

（2）化合物1活化羧基后与环肽cRGD反应，得到化合物2，再脱保护得到化合物3；

（3）化合物3与Cy 7 SE反应，得到所述红光介导的核酸锚定型荧光探针。

[权利要求 4] 根据权利要求3所述红光介导的核酸锚定型荧光探针的制备方法，其特征在于，叔丁氧羰基-芴甲氧羰基-赖氨酸在含三氟乙酸的二氯甲烷溶液中脱保护；化合物1利用与N-羟基琥珀酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐活化羧基。

[权利要求 5] 根据权利要求3所述红光介导的核酸锚定型荧光探针的制备方法，其特征在于，步骤（1）中，叔丁氧羰基-芴甲氧羰基-赖氨酸、3-(2-呋喃)丙酸的摩尔比为1：（1～1.5）；反应在室温下进行。

[权利要求 6] 根据权利要求3所述红光介导的核酸锚定型荧光探针的制备方法，其特征在于，步骤（2）中，化合物1、cRGD的摩尔比为1：（1～1.2）；反应在室温下进行。

[权利要求 7] 根据权利要求3所述红光介导的核酸锚定型荧光探针的制备方法，其特征在于，步骤（3）中，化合物3与Cy 7 SE的反应在含有N,N-二异丙基乙胺溶剂中进行；化合物3与Cy 7 SE的摩尔比为1：（1～1.2）。

[权利要求 8] 一种红光介导的探针锚定细胞方法，其特征在于，包括以下步骤：

（1）叔丁氧羰基-芴甲氧羰基-赖氨酸脱保护后与3-(2-呋喃)丙酸反应得到化合物1；

（2）化合物1活化羧基后与环肽cRGD反应，得到化合物2，再脱保护得到化合物3；

（3）化合物3与Cy 7 SE反应，得到所述红光介导的核酸锚定型荧光探针；

（4）将所述红光介导的核酸锚定型荧光探针、亚甲基蓝、细胞共孵育，实现探针锚定细胞。

[权利要求 9] 根据权利要求8所述红光介导的探针锚定细胞方法，其特征在于，共孵育在光照下、培养基中进行。

[权利要求 10] 根据权利要求8所述红光介导的探针锚定细胞方法，其特征在于，红

光介导的核酸锚定型荧光探针、亚甲基蓝的摩尔比为100：（0.8～1.2）。

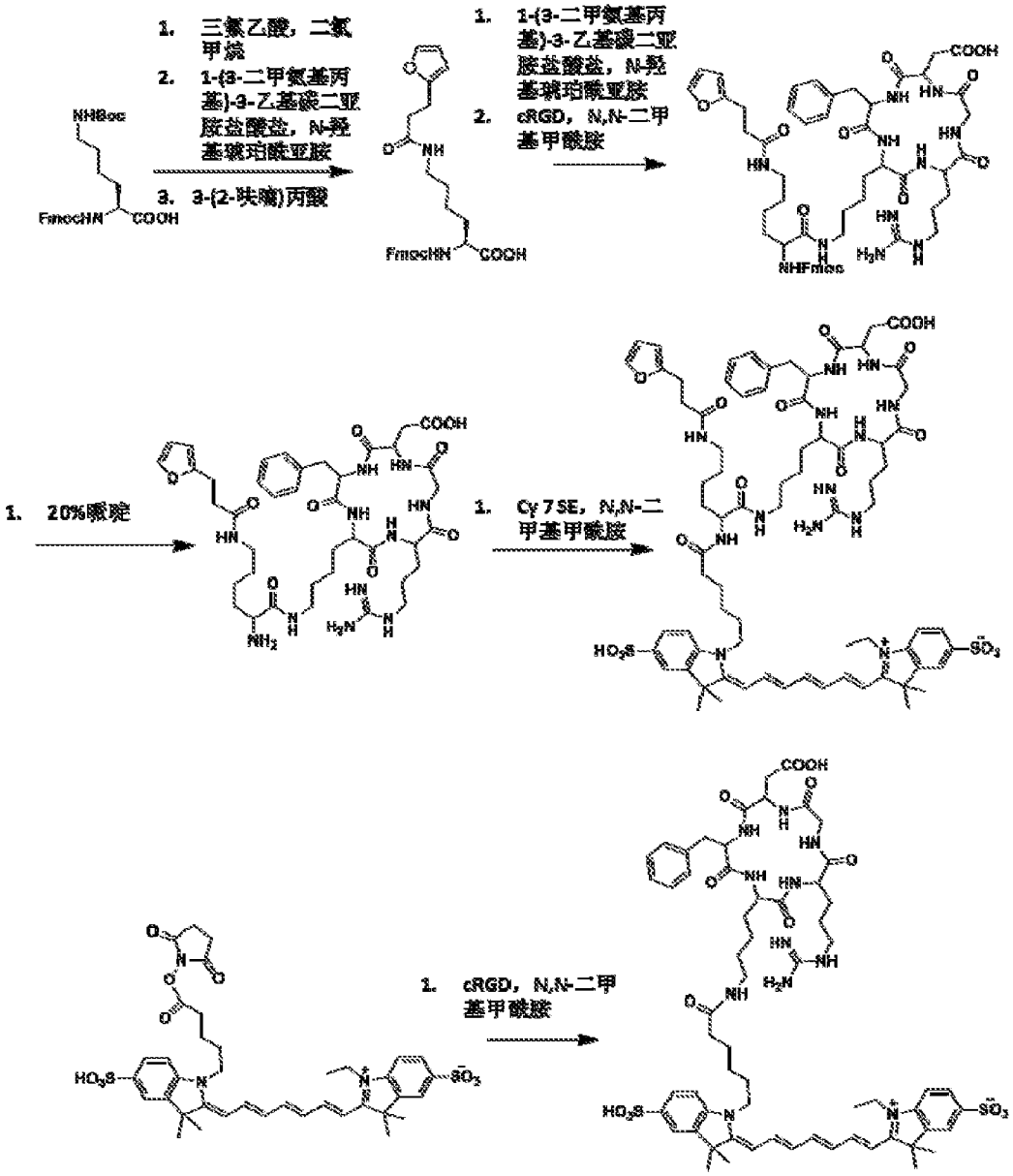

1. 三氯乙酸，二氯甲烷
2. 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，N-羟基琥珀酰亚胺
3. 3-(2-呋喃)丙酸
1. 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐，N-羟基琥珀酰亚胺
2. cRGD，N,N-二甲基甲酰胺
1. 20%哌啶
1. Cy 7 SE，N,N-二甲基甲酰胺
1. cRGD，N,N-二甲基甲酰胺

图 1

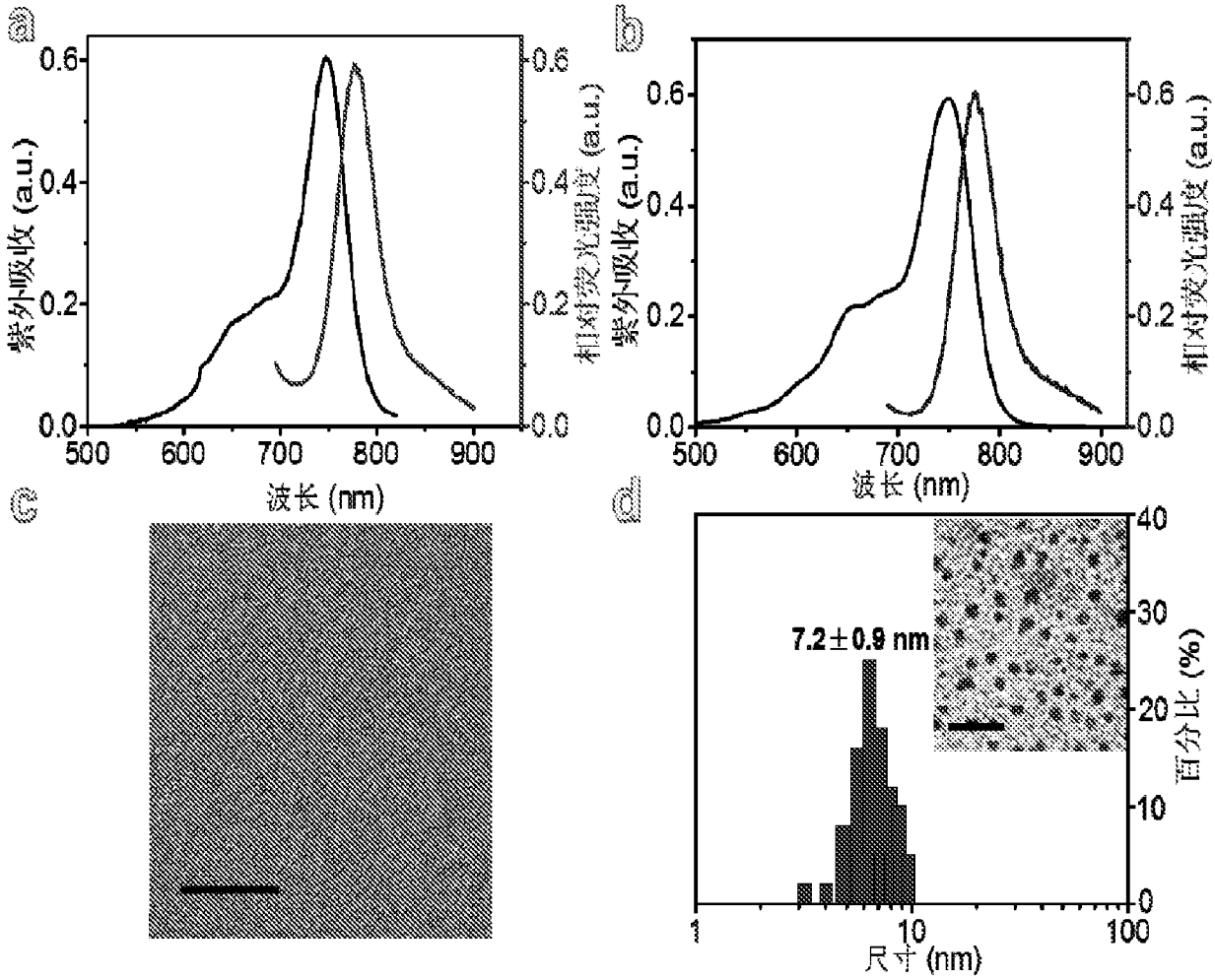

a
紫外吸收 (a.u.)
相对荧光强度 (a.u.)
波长 (nm)
b
紫外吸收 (a.u.)
相对荧光强度 (a.u.)
波长 (nm)
c
d
7.2±0.9 nm
百分比 (%)
尺寸 (nm)

图 2

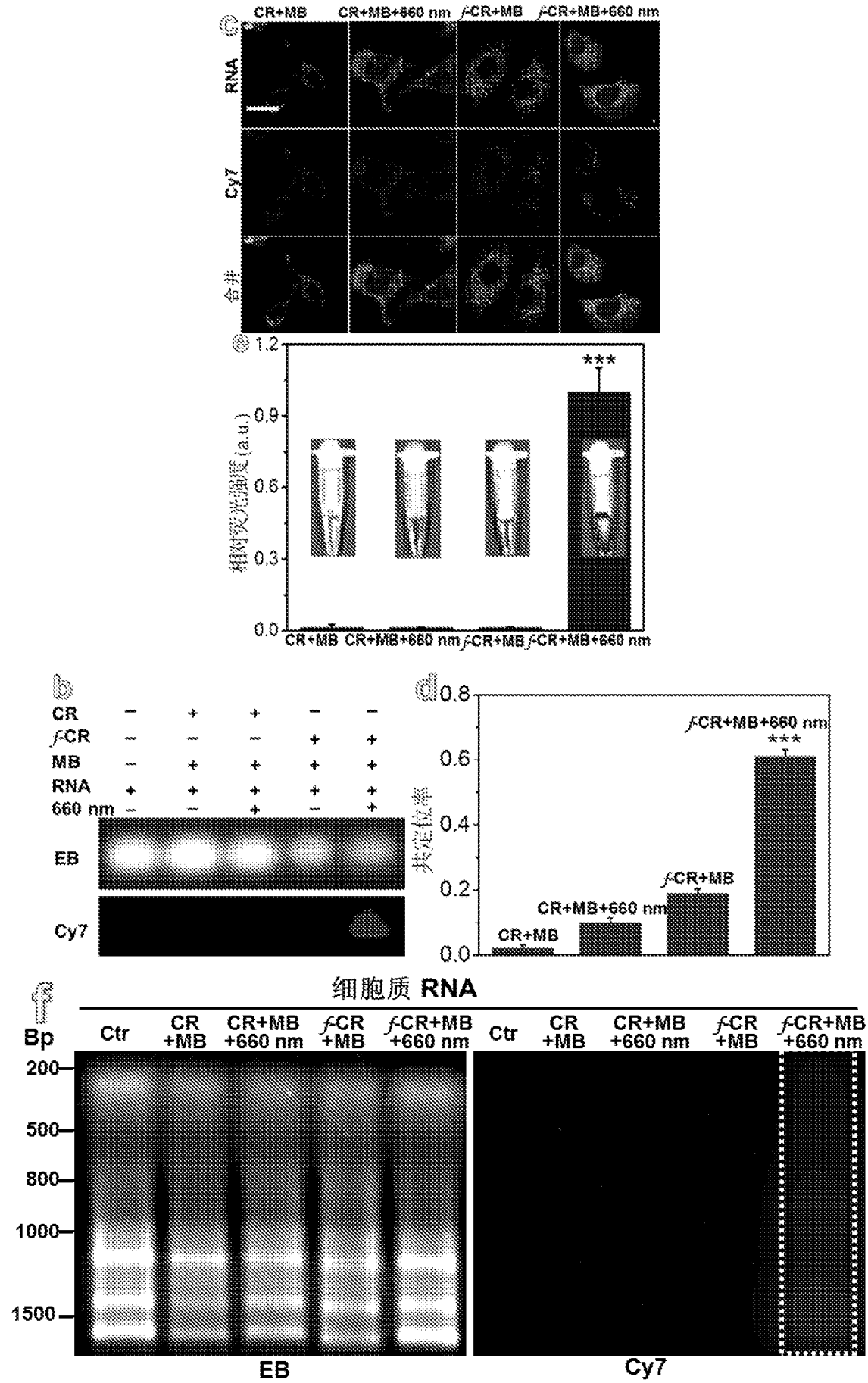

c
CR+MB
CR+MB+660 nm
f-CR+MB
f-CR+MB+660 nm
RNA
Cy7
合并
e
相对荧光强度 (a.u.)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
***
CR+MB
CR+MB+660 nm
f-CR+MB
f-CR+MB+660 nm
b
CR
f-CR
MB
RNA
660 nm
EB
Cy7
d
共定位率
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
f-CR+MB+660 nm
***
f-CR+MB
CR+MB+660 nm
CR+MB
f
细胞质 RNA
Bp
Ctr
CR +MB
CR+MB +660 nm
f-CR +MB
f-CR+MB +660 nm
200
500
800
1000
1500
EB
Cy7

图 3

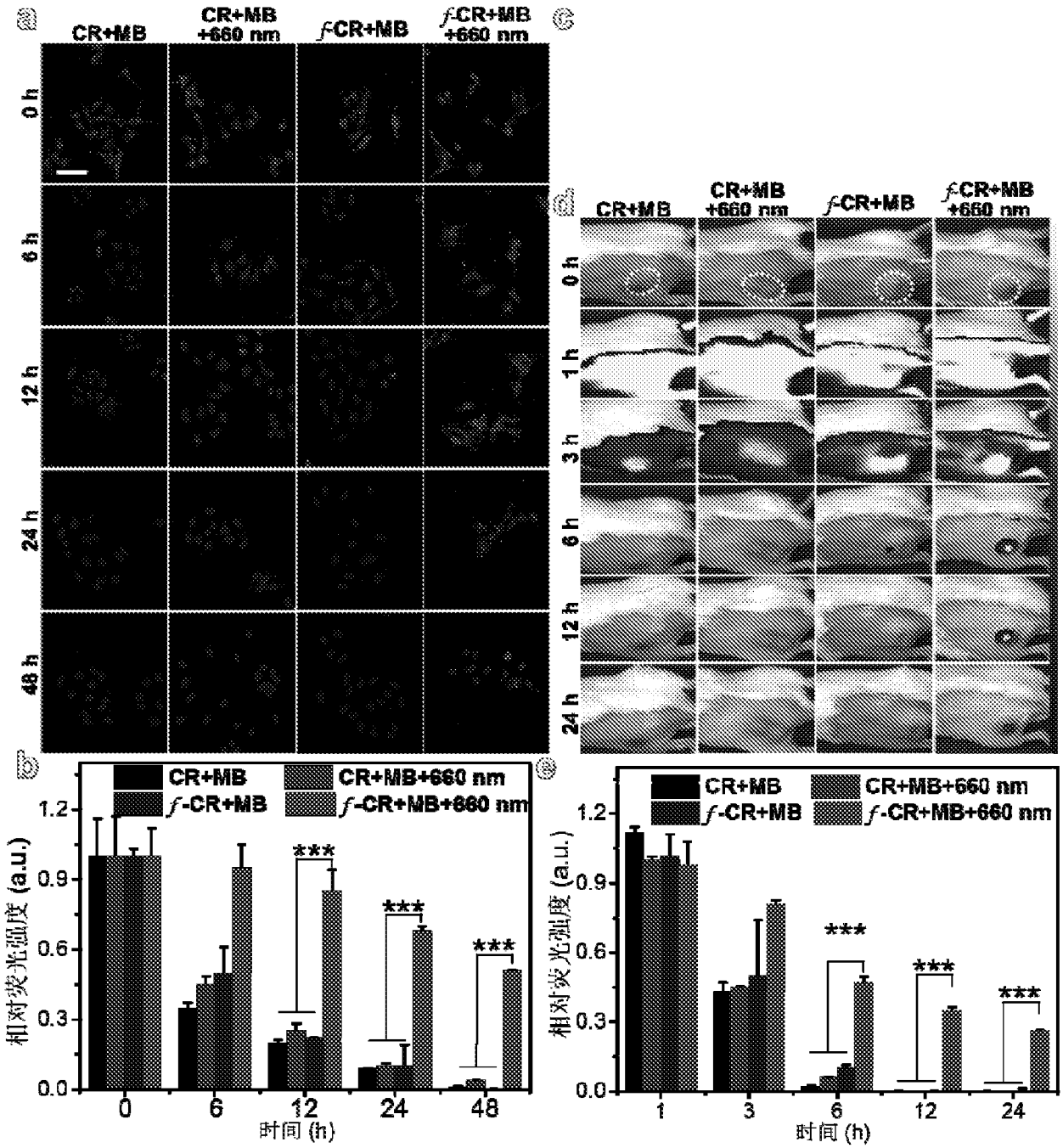

a
CR+MB
CR+MB +660 nm
f-CR+MB
f-CR+MB +660 nm
0 h
6 h
12 h
24 h
48 h
c
CR+MB
CR+MB +660 nm
f-CR+MB
f-CR+MB +660 nm
0 h
1 h
3 h
6 h
12 h
24 h
b
CR+MB
CR+MB+660 nm
f-CR+MB
f-CR+MB+660 nm
相对荧光强度 (a.u.)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
***
0
6
12
24
48
时间 (h)
d
CR+MB
CR+MB+660 nm
f-CR+MB
f-CR+MB+660 nm
相对荧光强度 (a.u.)
1.2
0.9
0.6
0.3
0.0
***
1
3
6
12
24
时间 (h)

图 4

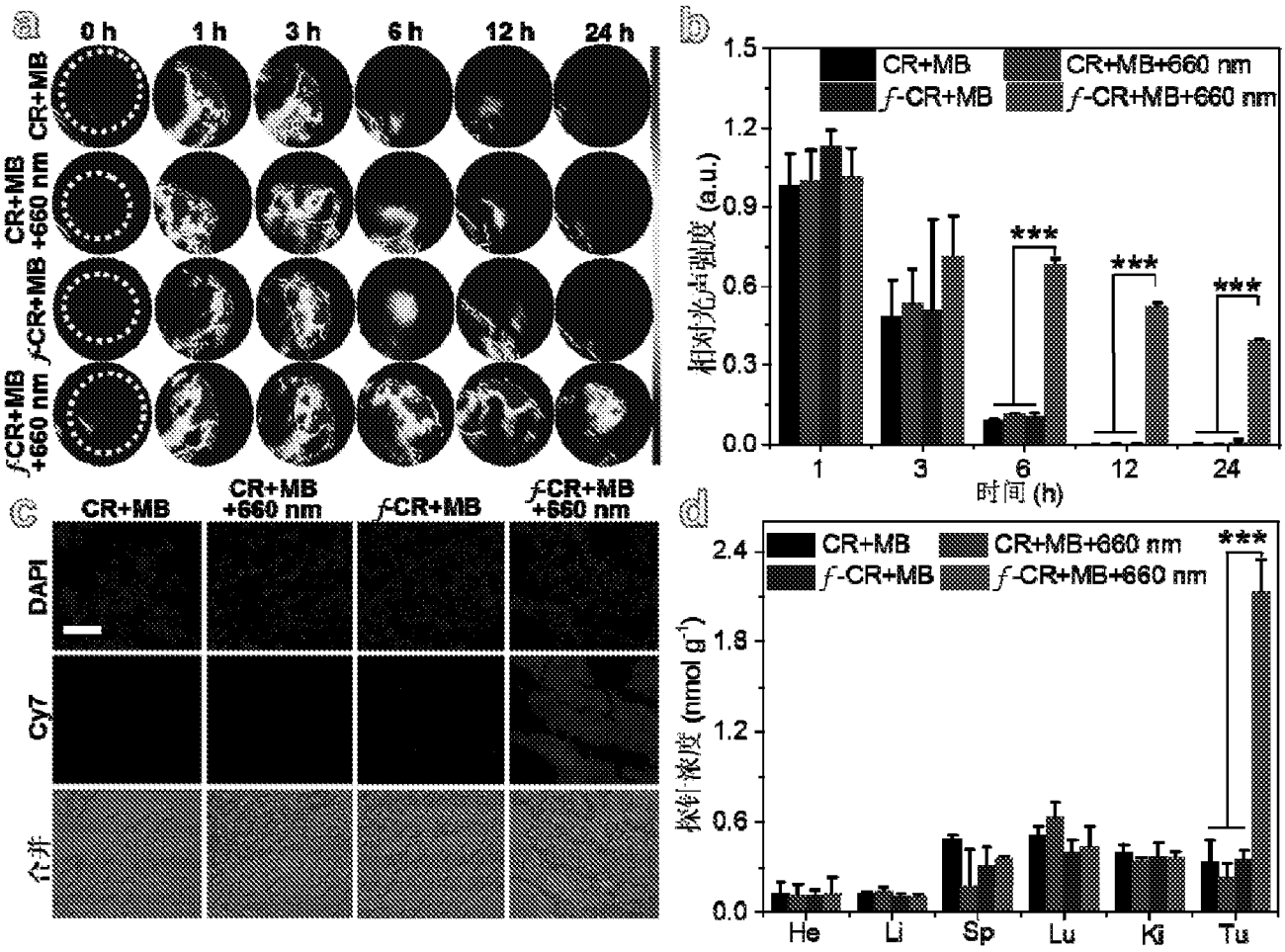

a
0 h
1 h
3 h
6 h
12 h
24 h
CR+MB
CR+MB +660 nm
f-CR+MB
f-CR+MB +660 nm
b
CR+MB
CR+MB+660 nm
f-CR+MB
f-CR+MB+660 nm
相对光声强度 (a.u.)
时间 (h)
***
c
CR+MB
CR+MB +660 nm
f-CR+MB
f-CR+MB +660 nm
DAPI
Cy7
合并
d
探针浓度 (nmol g-1)
He
Li
Sp
Lu
Ki
Tu

图 5

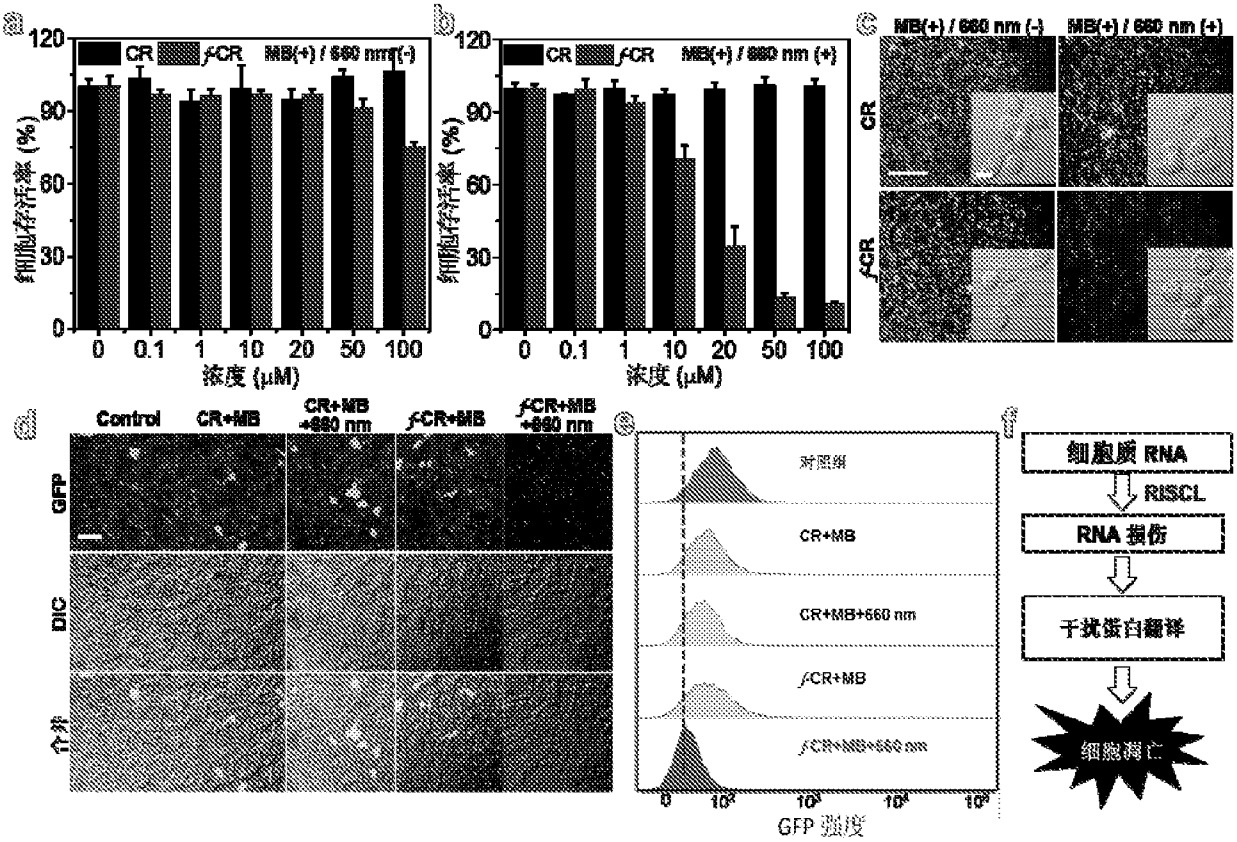

a
b
c
CR
fCR
MB(+) / 660 nm(-)
MB(+) / 660 nm (+)
细胞存活率 (%)
浓度 (μM)
d
Control
CR+MB
CR+MB +660 nm
fCR+MB
fCR+MB +660 nm
GFP
DIC
合并
e
对照组
CR+MB
CR+MB+660 nm
fCR+MB
fCR+MB+660 nm
GFP 强度
f
细胞质 RNA
RISCL
RNA 损伤
干扰蛋白翻译
细胞凋亡

图 6

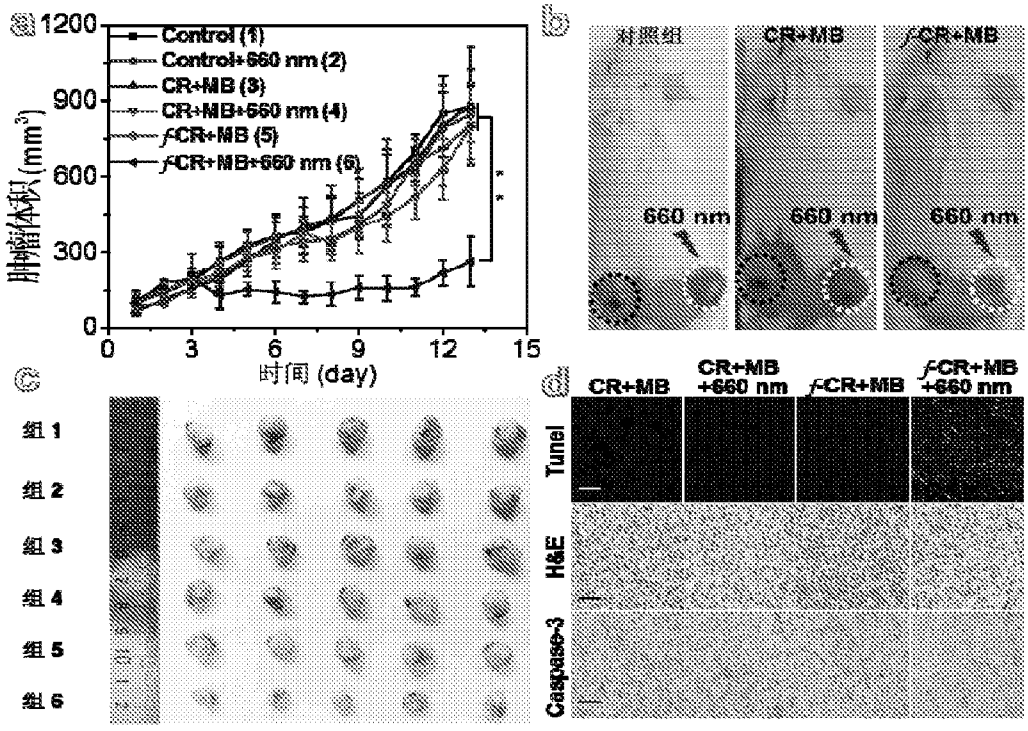

a
Control (1)
Control+660 nm (2)
CR+MB (3)
CR+MB+660 nm (4)
fCR+MB (5)
fCR+MB+660 nm (6)
肿瘤体积 (mm³)
时间 (day)
b
对照组
CR+MB
fCR+MB
660 nm
c
组 1
组 2
组 3
组 4
组 5
组 6
d
CR+MB
CR+MB +660 nm
fCR+MB
fCR+MB +660 nm
Tunel
H&E
Caspase-3

图7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/128480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/64(2006.01)i; C09K 11/06(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)

C07K7/-; C09K11/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC: 苏州大学, 史海斌, 叔丁氧, 叔丁基氧, 羰基, 芴, 甲氧基羰基, 甲氧羰基, 赖氨酸, 呋喃, 环肽, 环肽RGD, 荧光探针, SHI HB, cy7 w SE, cy w "7" w SE, cyclopeptide, cyclic w peptide, cRGD, cycl+ w RGD, lys, lysine, fmoc, Boc, furan, fluore+ w probe

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Mathejczyk, Julia Eva et al. "Spectroscopically Well-Characterized RGD Optical Probe as a Prerequisite for Lifetime-Gated Tumor Imaging" *MOLECULAR IMAGING,* Vol. 10, No. 6, 31 December 2011 (2011-12-31), ISSN: 1536-0121, abstract, page 470 right-hand column paragraph 3 - page 473 left-hand column paragraph 2, page 478 right-hand column paragraphs 2-3	1-10
A	CN 109180680 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 11 January 2019 (2019-01-11) entire document	1-10
A	CN 110684017 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 14 January 2020 (2020-01-14) entire document	1-10
A	WO 2017210246 A2 (TARVEDA THERAPEUTICS, INC.) 07 December 2017 (2017-12-07) entire document	1-10
A	US 10736932 B2 (BRIESEWITZ, Roger et al.) 11 August 2020 (2020-08-11) entire document	1-10

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 July 2021	**28 July 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.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM, Hyunjin et al. "Mini-Platform for Off-On Near-Infrared Fluorescence Imaging Using Peptide-Targeting Ligands" *Bioconjugate Chemistry*, Vol. 31, 02 January 2020 (2020-01-02), ISSN: 1043-1802, pp. 721-728	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/128480

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 109180680 A	11 January 2019	CN 109180680 B	08 May 2020
CN 110684017 A	14 January 2020	None	
WO 2017210246 A2	07 December 2017	None	
US 10736932 B2	11 August 2020	WO 2015179438 A1	26 November 2015
		US 2017304383 A1	26 October 2017
		US 2017112896 A1	27 April 2017
		WO 2015179434 A1	26 November 2015
		US 2021015885 A1	21 January 2021

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/128480

A. 主题的分类

C07K 7/64(2006.01)i; C09K 11/06(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)

C07K7/-; C09K11/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC: 苏州大学, 史海斌, 叔丁氧, 叔丁基氧, 羰基, 芴, 甲氧基羰基, 甲氧羰基, 赖氨酸, 呋喃, 环肽, 环肽RGD, 荧光探针, SHI HB, cy7 w SE, cy w "7" w SE, cyclopeptide, cyclic w peptide, cRGD, cycl+ w RGD, lys, lysine, fmoc, Boc, furan, fluore+ w probe

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	Mathejczyk, Julia Eva 等. "Spectroscopically Well-Characterized RGD Optical Probe as a Prerequisite for Lifetime-Gated Tumor Imaging" MOLECULAR IMAGING, 第10卷，第6期，2011年 12月 31日 (2011-12-31), ISSN：1536-0121, 摘要，第470页右栏第3段-第473页左栏第2段，第478页右栏第2-3段	1-10
A	CN 109180680 A (苏州大学) 2019年 1月 11日 (2019-01-11) 全文	1-10
A	CN 110684017 A (苏州大学) 2020年 1月 14日 (2020-01-14) 全文	1-10
A	WO 2017210246 A2 (TARVEDA THERAPEUTICS, INC.) 2017年 12月 7日 (2017-12-07) 全文	1-10
A	US 10736932 B2 (BRIESEWITZ, Roger 等) 2020年 8月 11日 (2020-08-11) 全文	1-10

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2021年 7月 19日	2021年 7月 28日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
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	王妍
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(10)-53962401

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	KIM, Hyunjin 等. "Mini-Platform for Off-On Near-Infrared Fluorescence Imaging Using Peptide-Targeting Ligands" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, 第31卷, 2020年 1月 2日 (2020-01-02), ISSN: 1043-1802, 第721-728页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/128480

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	109180680	A	2019年 1月 11日	CN	109180680	B	2020年 5月 8日
CN	110684017	A	2020年 1月 14日		无		
WO	2017210246	A2	2017年 12月 7日		无		
US	10736932	B2	2020年 8月 11日	WO	2015179438	A1	2015年 11月 26日
				US	2017304383	A1	2017年 10月 26日
				US	2017112896	A1	2017年 4月 27日
				WO	2015179434	A1	2015年 11月 26日
				US	2021015885	A1	2021年 1月 21日