

(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
2020 年 11 月 5 日 (05.11.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/220218 A1

(51) 国际专利分类号:

C07D 209/10 (2006.01) C07F 9/572 (2006.01)
C07D 271/12 (2006.01) C09K 11/06 (2006.01)
C07D 311/84 (2006.01) G01N 21/31 (2006.01)
C07D 417/06 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/085051

(22) 国际申请日: 2019 年 4 月 29 日 (29.04.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。上海泰辉生物科技有限公司 (SHANGHAI TAYWELL BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市杨浦区国权北路湾谷科技园 A8 座 904B 室, Shanghai 200438 (CN)。

(72) 发明人: 李富友 (LI, Fuyou); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。周晓波 (ZHOU, Xiaobo); 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。吴勇 (WU, Yong);

中国上海市杨浦区国权北路湾谷科技园 A8 座 904B 室, Shanghai 200438 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市西城区阜成门外大街 2 号万通新世界广场 8 层, Beijing 100037 (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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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,

(54) Title: COMPOUND, PRODUCT CONTAINING COMPOUND AND USE THEREOF IN γ -GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE DETECTION

(54) 发明名称: 一种化合物、含有所述化合物的产品及其在 γ -谷氨酰转肽酶检测中的用途

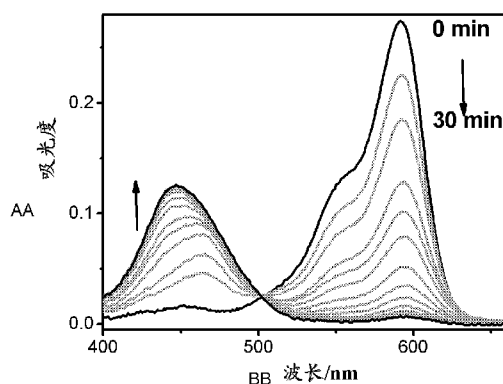


图 2

(57) Abstract: The present invention relates to a compound having the structure of formula (1) below, a product containing the compound, a preparation method therefor and the use thereof in γ -glutamyl transpeptidase detection.

(57) 摘要: 涉及具有下述式 (1) 结构的化合物、含有所述化合物的产品及它们的制备方法和在 γ -谷氨酰转肽酶检测中的用途。

[见续页]

WO 2020/220218 A1

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))。

一种化合物、含有所述化合物的产品 及其在 γ -谷氨酰转肽酶检测中的用途

技术领域

- 5 本发明属于荧光检测领域。具体地，本发明涉及一种化合物、含有所述化合物的产品及它们的制备方法和在 γ -谷氨酰转肽酶检测中的用途。

背景技术

- 在临床肿瘤切除手术过程中，对肿瘤部位的准确定位并切除有利于病人术后生活质量的保证及相对良好的预后。在临床医学诊断和基础生物医学研究中，组织切片分析被广泛的用于确定切缘位置以及术后的病理分析。冷冻切片准确性较高，是目前临床中用途最为广泛的切片分析方法，然而这种方法比较耗费时间和人力，难以应用于术中肿瘤定位。荧光成像技术成像速度快、灵敏度高，这些优点使荧光成像技术能够对组织中与肿瘤相关的生物分子实现快速、准确的定
- 10 量，进而达到对肿瘤组织快速诊断的目的。

- γ -谷氨酰转肽酶（GGT）是一种分布在细胞膜上的蛋白酶，其在生物体内的谷胱甘肽的代谢过程中具有重要的作用。在临床上， γ -谷氨酰转肽酶是诊断肝胆疾病的重要指标，被广泛用途于肝病及其它脏器疾病的诊断和预后检测。组织局部微环境的 γ -谷氨酰转肽酶表达异常升高常常与一些恶性肿瘤相关，在肝癌、
- 20 卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌等肿瘤组织都检测到 γ -谷氨酰转肽酶的高表达。因此，对生物样品中 γ -谷氨酰转肽酶进行定量检测具有重要的意义。免疫化学的方法是目前准确度和灵敏度最高的 GGT 检测方法，但是其操作繁琐，成本高，耗时较长；比色法是目前 IFCC 推荐使用的办法，其商业化用途最为广泛，其问题在于无法用于对相对复杂的生物环境如活体组织中或者细胞 GGT 含量的测
- 25 定。目前商品化的荧光检测试剂盒主要是基于香豆素、萘酰亚胺等荧光分子的产品，请参见图 1（Luo Z 等人 ChemBioChem, 2019, 20, 474-487），这类荧光分子在相对复杂的生物样品中容易受到背景荧光信号和组织散射的干扰，难以实现对生物样品中 GGT 含量的准确检测。Luo 等人[c1]报道了多种不同结构的 GGT 检测分子，这类分子通常是“Turn on”型荧光探针，其对 GGT 的响应呈现单个波段

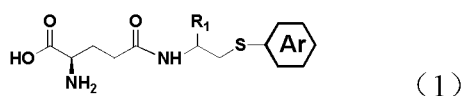
荧光强度升高的特点。这导致这类分子用于组织中 GGT 含量的检测时，其检测信号容易受到探针浓度的影响，使检测的准确性降低。

因此，现有技术中的试剂盒都是采用比色法和荧光增强法对 GGT 进行检测，这两种方法在生物样品（特别是组织）中应用时，难以消除探针浓度、激发光功率等外界环境因素对检测信号的影响，难以对所述生物样品（特别是组织）中的 GGT 含量进行准确的检测。相比于以单波长强度变化对待测物进行检测的方法，比率荧光检测方法在荧光检测中通常是以一个波段的光信号作为内参，另一个波段的光信号作为检测信号，以两个波段的荧光强度的比值作为输出信号，从而可以在一定程度上消除外界环境的变化对输出信号数值的干扰。因此，在相对复杂的生物体系中，利用比率检测方法对待测物进行检测，具有更高的准确性，且以双波长荧光比率变化作为检测信号将有利于构建对复杂生物体系中的 GGT 进行定量检测的方法。目前，用于比率检测 GGT 的荧光探针鲜有报道，并且这些荧光探针响应速度慢、荧光比率变化倍数低，因此这些探针难以用于对组织样本中含量的检测。现有技术中存在对 GGT 检测具有反应快速和高灵敏度的作为荧光探针的化合物以及含有所述化合物的新型的高灵敏度、抗干扰能力强的检测生物样品（特别是组织）中 GGT 的产品的迫切需求。

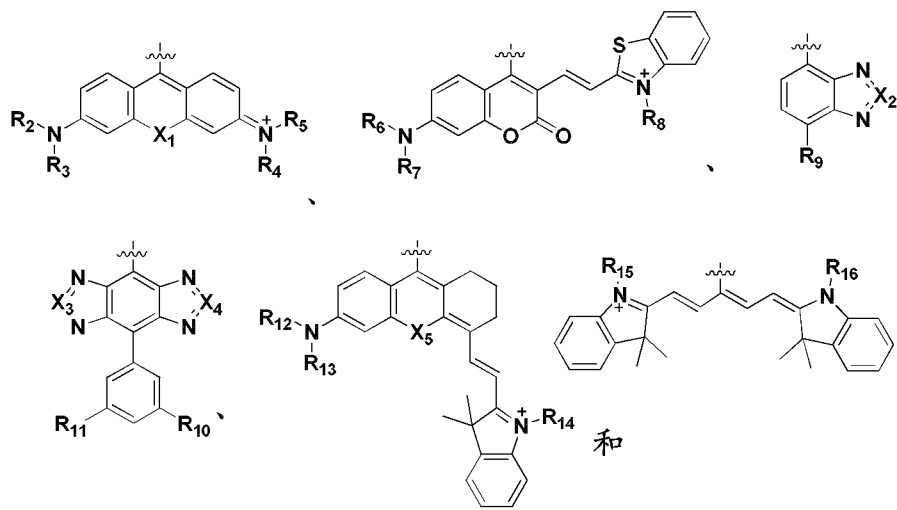
发明内容

为解决上述技术问题，本发明的目的在于提供一种新的作为荧光探针的化合物、含有所述化合物的产品及其制备方法和在生物样品中（特别是组织）GGT 检测中的用途。本发明荧光探针（即，本发明的式（I）化合物，下同）反应快速且具有高灵敏度，且含有本发明荧光探针的产品通过荧光比率检测的方法对组织中 GGT 的含量进行检测，它不仅可以在一定程度上消除外界环境对检测信号的干扰，在检测准确度上有很大的提升，而且其比率信号变化倍数能达到 170 倍，这使得荧光探针的灵敏度得到显著地提高。另外，更重要的是，本发明荧光探针对 GGT 的响应速度非常快，在 10 min 内即可完全响应，这使得本发明产品可以应用于旁床检测（point-of-care testing）组织中的 GGT 含量。

在本发明的第一方面，提供一种化合物，所述化合物具有下述式（1）结构；



其中,  选自:



R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 可以相同地或不同地选自:

H、卤素、 ---CH_3 、 ---COOH 、 ---CN 、 $\text{---(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$

$\text{---(CH}_2\text{)}_n\text{OH}$ 、 $\text{---(CH}_2\text{)}_n\text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{CH}_3$ 、 $\text{---(CH}_2\text{)}_n\text{COOH}$ 、 $\text{---(CH}_2\text{)}_n\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{---(CH}_2\text{)}_n\text{PO}_3\text{H}_2$

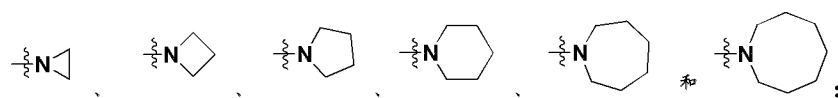
$\text{---C(=O)---(CH}_2\text{)}_n\text{OH}$ 、 $\text{---C(=O)---(CH}_2\text{)}_n\text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{CH}_3$ 、 $\text{---C(=O)---(CH}_2\text{)}_n\text{COOH}$ 、 $\text{---C(=O)---(CH}_2\text{)}_n\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{---C(=O)---(CH}_2\text{)}_n\text{PO}_3\text{H}_2$

$\text{---C(=O)O---(CH}_2\text{)}_n\text{OH}$ 、 $\text{---C(=O)O---(CH}_2\text{)}_n\text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{CH}_3$ 、 $\text{---C(=O)O---(CH}_2\text{)}_n\text{COOH}$ 、 $\text{---C(=O)O---(CH}_2\text{)}_n\text{SO}_3\text{H}$ 、 $\text{---C(=O)O---(CH}_2\text{)}_n\text{PO}_3\text{H}_2$

5 $\text{---C(=O)NH---(CH}_2\text{)}_n\text{OH}$ 、 $\text{---C(=O)NH---(CH}_2\text{)}_n\text{O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_m\text{CH}_3$ 、 $\text{---C(=O)NH---(CH}_2\text{)}_n\text{COOH}$ 、 $\text{---C(=O)NH---(CH}_2\text{)}_n\text{SO}_3\text{H}$ 和 $\text{---C(=O)NH---(CH}_2\text{)}_n\text{PO}_3\text{H}_2$;

m 和 n 可以相同地或不同地为 1-18 的整数; 或

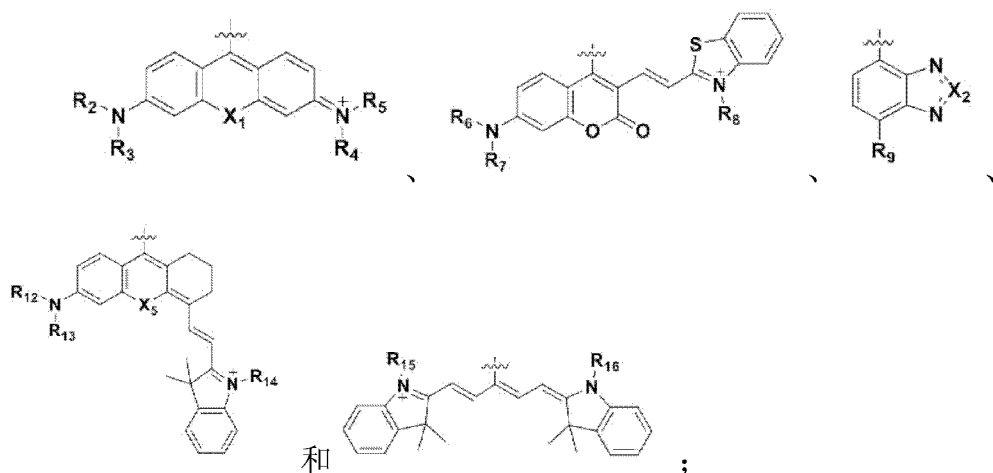
$\text{---N(R}_2\text{)(R}_3\text{)---N(R}_5\text{)(R}_4\text{)---N(R}_6\text{)(R}_7\text{)---N(R}_{12}\text{)(R}_{13}\text{)}$ 也可以相同地或不同地选自:



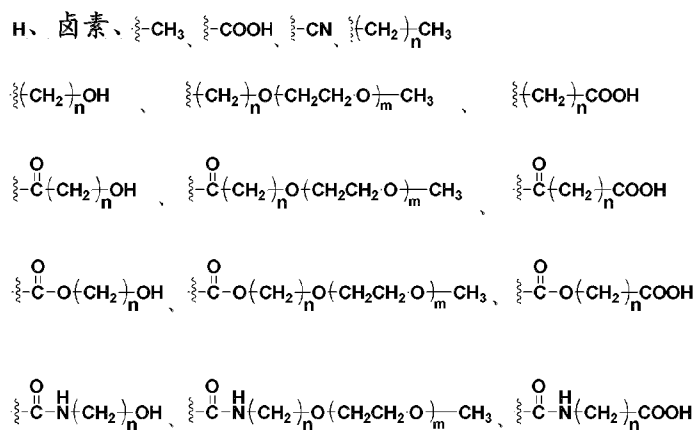
X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 可以相同地或不同地选自: NH、NCH₃、O、S、Se、

10 C(CH₃)₂ 和 Si(CH₃)₂。

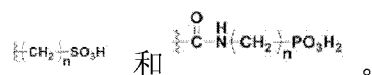
进一步地, 在所述式 (1) 化合物中,  选自:



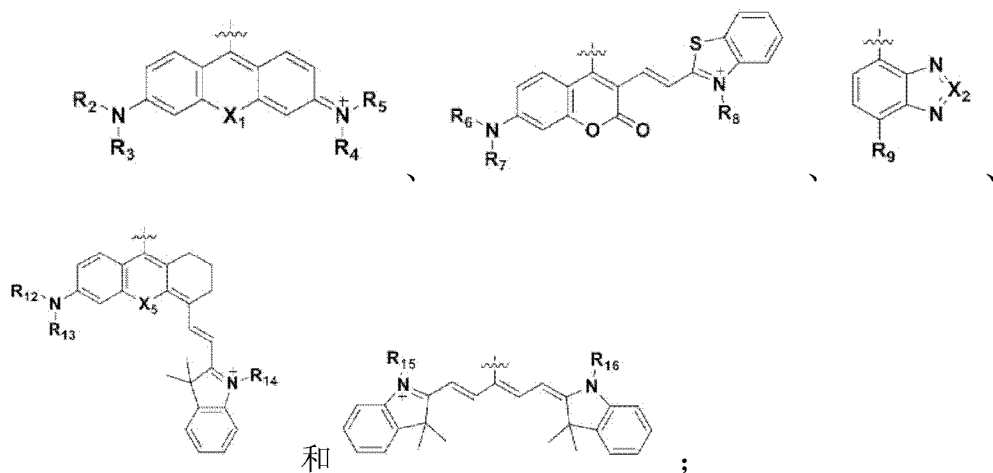
R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 可以相同地或不同地选自：



5



进一步地，在所述式 (1) 化合物中， Ar 选自：



10

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 可以相

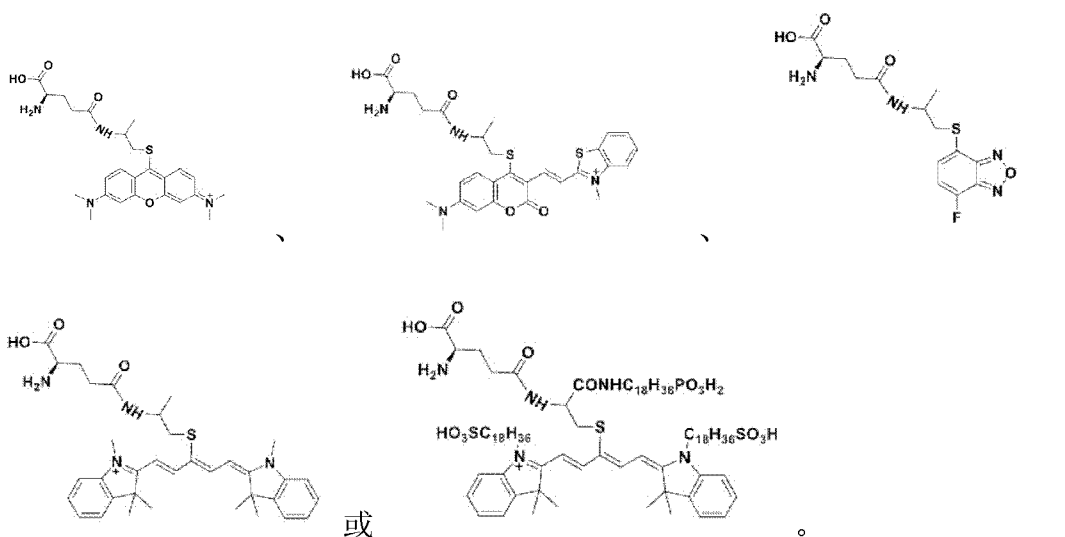
同地或不同地选自：

卤素、 ---CH_3 、 $\text{---CH}_2\text{---CH}_3$ 、 $\text{---CH}_2\text{---SO}_3\text{H}$ 和 $\text{---C(=O)NH---CH}_2\text{---PO}_3\text{H}_2$ ，

其中当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 为 $\text{---CH}_2\text{---CH}_3$ 时， $n=1-5$ ；当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、

5 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 相同地或不同地选自 $\text{---CH}_2\text{---SO}_3\text{H}$ 和 $\text{---C(=O)NH---CH}_2\text{---PO}_3\text{H}_2$ 时， $n=12-18$ 。

进一步地，在所述式（1）化合物中，所述化合物为：



在本发明的第二方面，提供一种产品，所述产品包含上述本发明第一方面所定义的化合物。

进一步地，所述产品还包含添加剂和使用指南。

进一步地，所述添加剂选自下述的一种或多种：叠氮化钠、甘油、硫柳汞和吐温。

进一步地，所述产品为试剂盒。

15 进一步地，所述化合物和所述每一种添加剂各自呈单独制剂形式存在，或者所述化合物和所述每一种添加剂呈组合物的形式存在。

在本发明的第三方面，提供一种用途，其包括：

上述本发明第一方面所定义的化合物在制备用于检测生物样品中的 γ -谷氨酰转肽酶含量的产品中的用途。

20 上述本发明第一方面所定义的化合物在制备用于生物样品中的 γ -谷氨酰转

肽酶荧光成像的产品中的用途。

在本发明的第四方面，提供上述本发明的第一方面所定义的化合物或上述本发明第二方面所定义的产品，所述化合物或产品用于检测生物样品中的 γ -谷氨酰转肽酶含量或用于生物样品中的 γ -谷氨酰转肽酶荧光成像。

5 在本发明的第五方面，提供一种生物样品中的 γ -谷氨酰转肽酶含量的检测方法，其中使用上述本发明第一方面所定义的化合物或上述本发明第二方面所定义的产品，包括如下步骤：

(1) 制作标准曲线：在激发光激发下，测定一系列不同浓度 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液在不同发射波长处的荧光强度，记为 F_1 和 F_2 ，取两者之间的比率值，记为 R ，以 γ -谷氨酰转肽酶的浓度 C 为横坐标，比率值 R 为纵坐标，绘制标准曲线；和

10

(2) 测定生物样品中 γ -谷氨酰转肽酶的含量：将待测生物样本与所述化合物的储备液或在所述产品中的所述化合物的储备液孵育，经过一段时间（优选地 5-30 分钟），取出待测生物样品，洗涤后（例如，用 PBS 洗涤），用荧光成像仪

15

分别记录不同通道（例如，荧光通道 F_1 通道和 F_2 通道）的荧光成像图，对两个荧光通道的荧光成像图进行比率处理，读取得到的比率图像中不同位置处的比率值，即根据标准曲线算出生物样品不同位置处 γ -谷氨酰转肽酶的含量。

进一步地，其中所述化合物或所述产品中的所述化合物的浓度范围为 0.01-10 mM。

20 进一步地，所述一系列不同浓度的 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液中，所述 γ -谷氨酰转肽酶的浓度为 1-500 mU/mL；所述一系列不同浓度的 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液的体积均为 0.1-10 mL；所述一系列不同浓度的 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液中，所述化合物的储备液的摩尔浓度为 0.01-10 mM，体积均 5-200 μ L，且在孵育过程中还任选地使用叠氮化钠，所述叠氮化钠的摩尔浓度为 0.01-10 mM，

25

体积为 5-200 μ L；所述 γ -谷氨酰转肽酶的标准反应液由 γ -谷氨酰转肽酶标准储备液溶于水中配成，所述 γ -谷氨酰转肽酶标准储备液的浓度为 1000-20000 mU/mL。

进一步地，所述方法可用于临床生物样品分析。

进一步地，所述临床样品为组织和组织切片，所述化合物的浓度为 10 nM-50 μ M。

进一步地，所述方法用于 γ -谷氨酰转肽酶检测的检测范围为 0.01-1000 mU/mL。

有益效果：

(1) 本发明作为荧光探针（即，本发明的式 (I) 化合物，下同）具有高灵敏度，在溶液中检测限可达到 10 mU/L，且含有本发明荧光探针的产品双通道比率荧光信号的收集，可以在一定程度上降低由于探针浓度、组织散射等问题对成像信号造成的干扰，通过荧光比率检测的方法对生物样品（特别是组织）中 γ -谷氨酰转肽酶的含量进行检测，它不仅可以在一定程度上消除外界环境对检测信号的干扰，在检测准确度上有很大的提升，其比率信号变化倍数能达到 170 倍，这使得荧光探针的灵敏度得到显著提高。

(2) 本发明荧光探针对 γ -谷氨酰转肽酶的响应速度非常快，在 10 min 内即可完全响应，这使得本发明产品可以应用于旁床检测组织中的 γ -谷氨酰转肽酶含量。

(3) 本发明荧光探针是紫色的固体，在溶液中呈深紫色，与 γ -谷氨酰转肽酶反应后，肉眼即可观察到溶液变为明显的浅黄色。

(4) 本发明荧光探针具有较高的荧光量子效率，应用时显色反应仅在 γ -谷氨酰转肽酶存在的条件下发生，其它常见的无机盐、氨基酸、水解酶等均不产生干扰，同时本发明荧光探针具备好的生物相容性，对 γ -谷氨酰转肽酶的响应呈线性关系，可以用于该酶的定量测定。

(5) 本发明荧光探针溶解性好，其用有机溶剂配成的母液产品可直接用于缓冲体系中 γ -谷氨酰转肽酶的检测。

附图说明

图 1 显示目前商品化的荧光检测试剂盒中的荧光分子的产品。

图 2 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒对 γ -谷氨酰转肽酶响应随时间变化的紫外-可见吸收光谱。

图 3 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒对 γ -谷氨酰转肽酶响应随时间变化的发射光谱。

图 4 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒对不同浓度 γ -谷氨酰转肽酶的荧光响

应图，图中 γ -谷氨酰转肽酶的浓度从上到下依次为 0、1、5、10、20、25、30、40、50、75 和 100 U/L。

图 5 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒的比率值对 γ -谷氨酰转肽酶浓度的工作曲线。

5 图 6 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒的比率值对 γ -谷氨酰转肽酶检测的抗干扰性测试（在 5 μ W 激发光功率下的发射光谱）。

图 7 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒的比率值对 γ -谷氨酰转肽酶检测的抗干扰性测试（在 20 μ W 激发光功率下的发射光谱）。

10 图 8 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒的比率值对 γ -谷氨酰转肽酶检测的抗干扰性测试（在 40 μ W 激发光功率下的发射光谱）。

图 9 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒的比率值对 γ -谷氨酰转肽酶检测的抗干扰性测试，不同激发光功率下的比率值。

15 图 10 含有化合物 C3 的本发明试剂盒配成探针浓度为 10 μ M 的溶液对不同浓度 γ -谷氨酰转肽酶的荧光响应图，图中 γ -谷氨酰转肽酶的浓度从上到下依次为 0、1、5、10、20、25、30、40、50、75 和 100 U/L。

图 11 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒配成探针浓度为 10 μ M 的溶液测得的荧光比率值对 γ -谷氨酰转肽酶浓度的工作曲线。

20 图 12 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒配成探针浓度为 2 μ M 的溶液对不同浓度 γ -谷氨酰转肽酶的荧光响应图，图中 γ -谷氨酰转肽酶的浓度从上到下依次为 0、1、5、10、20、25、30、40、50、80 U/L。

图 13 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒配成探针浓度为 2 μ M 的溶液测得的荧光比率值对 γ -谷氨酰转肽酶浓度的工作曲线。

图 14 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒与商业化 GGT 检测试剂盒检测临床样本中 GGT 含量对比。

25 图 15 为含化合物 C3 的本发明试剂盒和商业化 GGT 检测试剂盒对 GGT 响应的荧光强度值随时间变化的曲线。

图 16 为含化合物 C3 的本发明试剂盒和商业化 GGT 检测试剂盒与 GGT 作用的参数对比。

图 17 为商业化 GGT 检测试剂盒的荧光强度随 GGT 变化的工作曲线。

图 18 为含有化合物 C3 的本发明试剂盒分别用于 HOSEpiC 和 SKOV3 细胞的共聚焦成像图。

图 19 显示本发明检测系统对临床卵巢癌患者切除手术中切除组织的荧光成像图。图中四张图片从左至右依次为组织明场成像图、绿光通道成像图（收集光
5 信号波段为 510-560 nm）、红光通道成像图（收集光信号波段为 620-690 nm）和比率成像图（根据绿光通道光信号强度与红光通道信号强度的比值导出的比率成像图）。

图 20 显示本发明检测系统对临床卵巢癌患者切除手术中切除组织的荧光成像图。图中四张图片从左至右依次为组织明场成像图、绿光通道成像图（收集光
10 信号波段为 510-560 nm）、红光通道成像图（收集光信号波段为 620-690 nm）和比率成像图（根据绿光通道光信号强度与红光通道信号强度的比值导出的比率成像图）。

图 21 显示本发明检测系统对临床卵巢癌患者切除手术中切除组织的荧光成像图。图中四张图片从左至右依次为组织明场成像图、绿光通道成像图（收集光
15 信号波段为 510-560 nm）、红光通道成像图（收集光信号波段为 620-690 nm）和比率成像图（根据绿光通道光信号强度与红光通道信号强度的比值导出的比率成像图）。

图 22 显示本发明检测系统对临床卵巢癌患者切除手术中切除组织的荧光成像图。图中四张图片从左至右依次为组织明场成像图、绿光通道成像图（收集光
20 信号波段为 510-560 nm）、红光通道成像图（收集光信号波段为 620-690 nm）和比率成像图（根据绿光通道光信号强度与红光通道信号强度的比值导出的比率成像图）。

图 23 显示本发明检测系统对临床卵巢癌患者切除手术中切除组织的荧光成像图。图中四张图片从左至右依次为组织明场成像图、绿光通道成像图（收集光
25 信号波段为 510-560 nm）、红光通道成像图（收集光信号波段为 620-690 nm）和比率成像图（根据绿光通道光信号强度与红光通道信号强度的比值导出的比率成像图）。

图 24 显示本发明检测系统对临床子宫囊肿患者切除手术中切除组织的荧光成像图。图中四张图片从左至右依次为组织明场成像图、绿光通道成像图（收集

光信号波段为 510-560 nm)、红光通道成像图(收集光信号波段为 620-690 nm)和比率成像图(根据绿光通道光信号强度与红光通道信号强度的比值导出的比率成像图)。

图 25 显示本发明检测系统对临床子宫囊肿患者切除手术中切除组织的荧光
5 成像图。图中四张图片从左至右依次为组织明场成像图、绿光通道成像图(收集光信号波段为 510-560 nm)、红光通道成像图(收集光信号波段为 620-690 nm)和比率成像图(根据绿光通道光信号强度与红光通道信号强度的比值导出的比率成像图)。

图 26 显示本发明检测系统对临床子宫囊肿患者切除手术中切除组织的荧光
10 成像图。图中四张图片从左至右依次为组织明场成像图、绿光通道成像图(收集光信号波段为 510-560 nm)、红光通道成像图(收集光信号波段为 620-690 nm)和比率成像图(根据绿光通道光信号强度与红光通道信号强度的比值导出的比率成像图)。

图 27 显示本发明检测系统对临床子宫囊肿患者切除手术中切除组织的荧光
15 成像图。图中四张图片从左至右依次为组织明场成像图、绿光通道成像图(收集光信号波段为 510-560 nm)、红光通道成像图(收集光信号波段为 620-690 nm)和比率成像图(根据绿光通道光信号强度与红光通道信号强度的比值导出的比率成像图)。

图 28 显示本发明检测系统对临床卵巢癌患者切除手术中切除组织的荧光成
20 像图。图中四张图片从左至右依次为组织明场成像图、绿光通道成像图(收集光信号波段为 510-560 nm)、红光通道成像图(收集光信号波段为 620-690 nm)和比率成像图(根据绿光通道光信号强度与红光通道信号强度的比值导出的比率成像图)。

图 29 显示本发明检测系统对临床卵巢癌患者切除手术中切除组织的荧光成
25 像图。图中四张图片从左至右依次为组织明场成像图、绿光通道成像图(收集光信号波段为 510-560 nm)、红光通道成像图(收集光信号波段为 620-690 nm)和比率成像图(根据绿光通道光信号强度与红光通道信号强度的比值导出的比率成像图)。

图 30 显示本发明检测系统对临床卵巢癌切除手术中切除组织的荧光成像

图。图中四张图片从左至右依次为组织明场成像图、绿光通道成像图（收集光信号波段为 510-560 nm）、红光通道成像图（收集光信号波段为 620-690 nm）和比率成像图（根据绿光通道光信号强度与红光通道信号强度的比值导出的比率成像图）。

5

发明详述

定义

除非另外定义，否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

10 在本文中使用的术语“生物样品”是指得自患者（例如，患有癌症的患者）或正常个体的各种样品类型，包括任意的细胞或细胞外液，例如血液、血清、血浆、尿或其它液体样品，例如唾液、腹膜液或胸膜液、脑脊髓液、胃液或结肠直肠流体、淋巴液、滑液、间隙液、羊膜液、生理分泌物、泪液、粘液、汗液、乳、精液、阴道分泌物和来自溃疡和其它表面渗出的流体。术语“生物样品”还包括组
15 织，所述组织包括但不限于肿瘤（包括良性肿瘤（例如，囊肿，包括但不限于：卵巢囊肿和子宫囊肿）或恶性肿瘤（即，癌症））组织，或者正常器官组织或肿瘤器官组织（例如，心、肝、脾、肺、肾、脑等），或者所述组织的组织切片。术语“生物样品”还包括构成生物体内胞外隔室的胞外基质和细胞外液。它不仅包括临床样品（例如，所述组织和组织切片），而且包括细胞培养物和组织培养物
20 和来源于它们的细胞及其子代。

在本文中使用的术语“癌症”是指由异常的不受控制的细胞生长引起的新生物或肿瘤。术语“癌症”包括同时涉及恶化前癌细胞和恶性癌细胞的疾病。非限制性的例子包括：脑癌、肺癌、肝癌、脾癌、肾癌（例如肾细胞癌和肾骨盆癌）、淋巴结癌、小肠癌、胰腺癌、血细胞癌、骨癌、结肠癌/结肠直肠癌、
25 胃癌、乳腺癌、子宫内膜癌、宫颈癌、前列腺癌、睾丸癌、卵巢癌、中枢神经系统癌、皮肤癌、头颈癌、食管癌、骨髓癌或鳞状细胞癌，或者血液性癌症，例如白血病（例如，急性和慢性白血病或急性早幼粒细胞性白血病）淋巴瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良、骨髓组织增生性疾病或顽固性贫血。

在本文中使用的术语“旁床检测（point-of-care testing）”是指在患者旁边

进行的临床检测或床边检测，也称作床旁检测或即时检测。

在本文使用的术语“卤素”是指氟、氯、溴和碘，优选地为氟或氯。

在本文中使用的术语“吐温”是指聚山梨酯（聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯），包括、但不限于：吐温 20(TWEEN-20)、吐温 21(TWEEN-21)、吐温 40(TWEEN-40)、吐温 60(TWEEN-60)、吐温 61(TWEEN-61)、吐温 80(TWEEN-80)、吐温 81(TWEEN-81)、吐温 85(TWEEN-85)。

在本文中使用的术语“患者”或“个体”是指人类、伴侣动物(如狗、猫及马)、可食用动物（如奶牛、猪、羊）、动物园动物、海洋动物、禽类及其它类似动物种类。

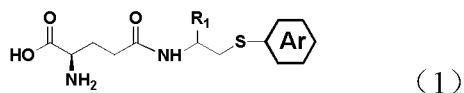
在本文使用的术语“比率值”是指不同荧光波段（例如，在（510-560 nm 和 620-690 nm））测得的生物样品（例如，组织）的荧光成像图中的信号强度的比值。当所述比值处于 0.2-0.8 之间，则所述生物样品被认为是正常组织（阴性），当所述比值处于 1.2 以上将其判断为肿瘤组织（阳性）。如果所述比值处于 0.8-1.2 之间，则为无法判断的组织。

在本文中使用的术语“室温”是指 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。同时，若没有具体指明实验温度，均为室温。

在本文中使用的术语“约”是指该术语所修饰的数值的 $\pm 10\%$ ，更优选为 $\pm 5\%$ ，最优选为 $\pm 2\%$ ，因此本领域的普通技术人员能够清楚地根据所修饰的数值确定术语“约”的范围。

20

在本发明的第一方面，提供一种化合物，所述化合物具有下述式（1）结构；



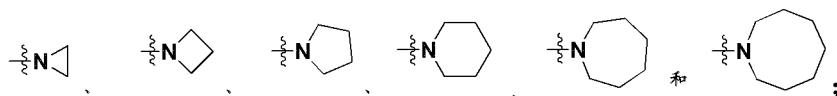
其中， 选自：


$$\sim \text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{OH}, \sim \text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{CH}_3, \sim \text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{COOH}, \sim \text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H} \text{ 和 } \sim \text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{PO}_3\text{H}_2;$$

10

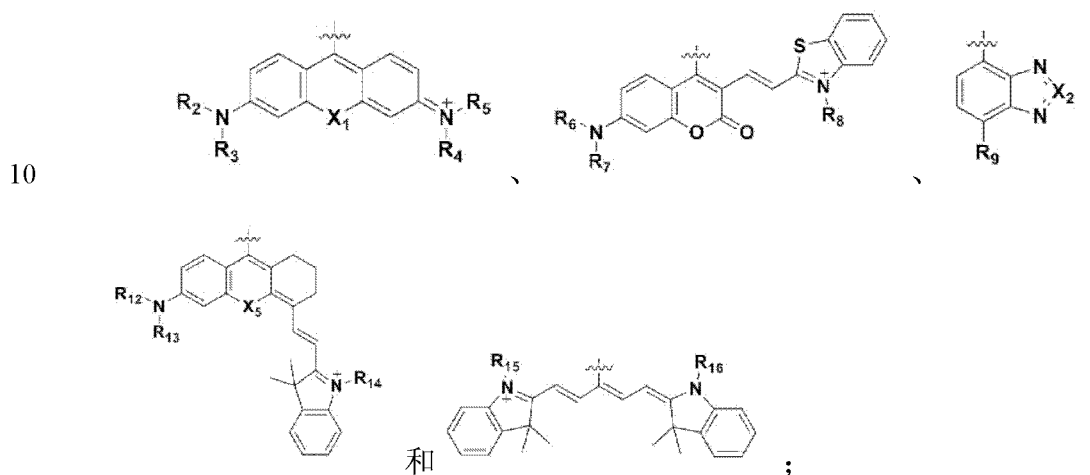
10-13、10-14、10-15、10-16、10-17、10-18、11-12、11-13、11-14、11-15、11-16、11-17、11-18、12-13、12-14、12-15、12-16、12-17、12-18、13-14、13-15、13-16、13-17、13-18、14-15、14-16、14-17、14-18、15-16、15-17、15-18、16-17、16-18或17-18；

5 $\begin{matrix} \sim N^{\text{R}_2} \\ \sim N^{\text{R}_3} \end{matrix} \sim N^{\text{R}_5} \sim N^{\text{R}_6} \sim N^{\text{R}_{12}} \sim N^{\text{R}_{13}}$ 也可以相同地或不同地选自：

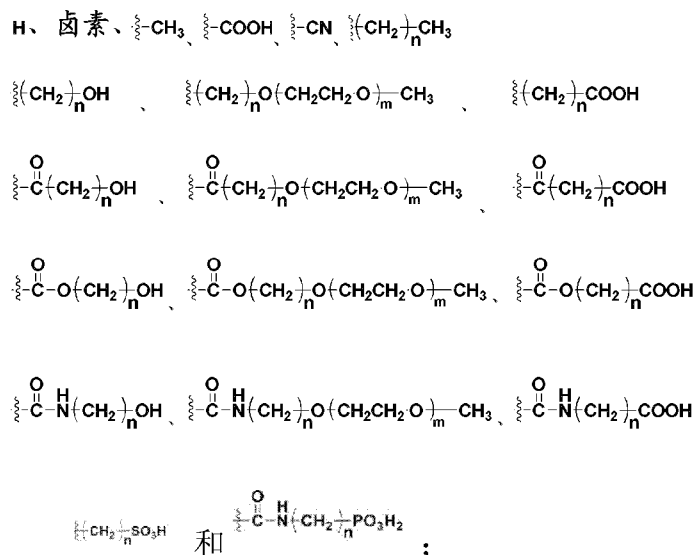


X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 可以相同地或不同地选自： NH 、 NCH_3 、 O 、 S 、 Se 、 $C(CH_3)_2$ 和 $Si(CH_3)_2$ 。

进一步地，在所述式（1）化合物中， Ar 选自：



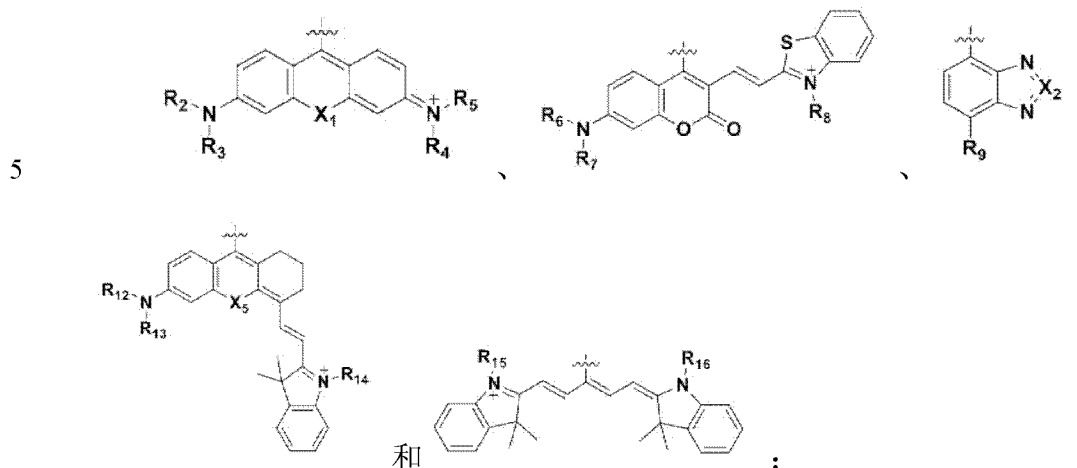
R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 可以相同地或不同地选自：



m 和 n 的定义如上所述;

X₁、X₂ 和 X₅ 可以相同地或不同地选自: NH、NCH₃、O、S、Se、C(CH₃)₂ 和 Si(CH₃)₂。

进一步地, 在所述式 (1) 化合物中,  选自:



R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₂、R₁₃、R₁₄、R₁₅ 和 R₁₆ 可以相同地或不同地选自:

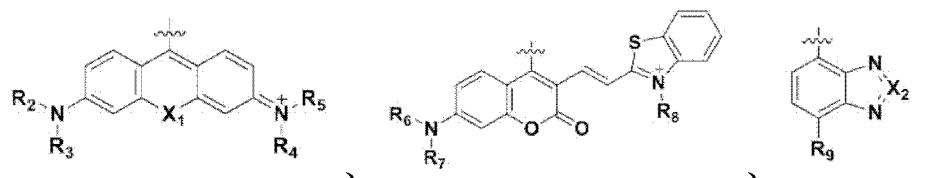
H、卤素、 --CH_3 、 --COOH 、 --CN 、 $\text{--(CH}_2\text{)}_n\text{--CH}_3$ 、 $\text{--(CH}_2\text{)}_n\text{SO}_3\text{H}$ 和 $\text{--C(=O)NH(CH}_2\text{)}_n\text{PO}_3\text{H}_2$, 其中

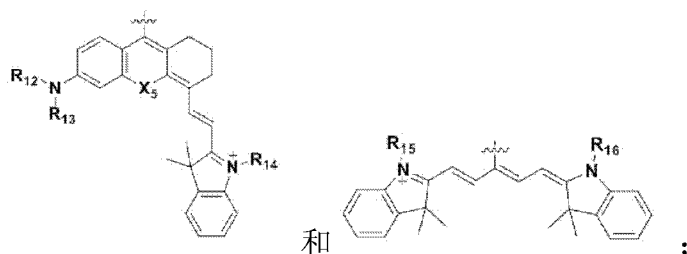
10 当 R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₂、R₁₃、R₁₄、R₁₅ 和 R₁₆ 为 $\text{--(CH}_2\text{)}_n\text{--CH}_3$ 时, n=1-5, 而当 R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、R₁₂、R₁₃、R₁₄、R₁₅

和 R₁₆ 相同地或不同地选自 $\text{--(CH}_2\text{)}_n\text{SO}_3\text{H}$ 和 $\text{--C(=O)NH(CH}_2\text{)}_n\text{PO}_3\text{H}_2$ 时, n=12-18, 优选 n=13-18、14-18、15-18、16-18、17-18 或 18;

进一步地, 所述卤素为氟或氯。

15 进一步地, 在所述式 (1) 化合物中,  选自:





和 ;

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 可以相同地或不同地选自:

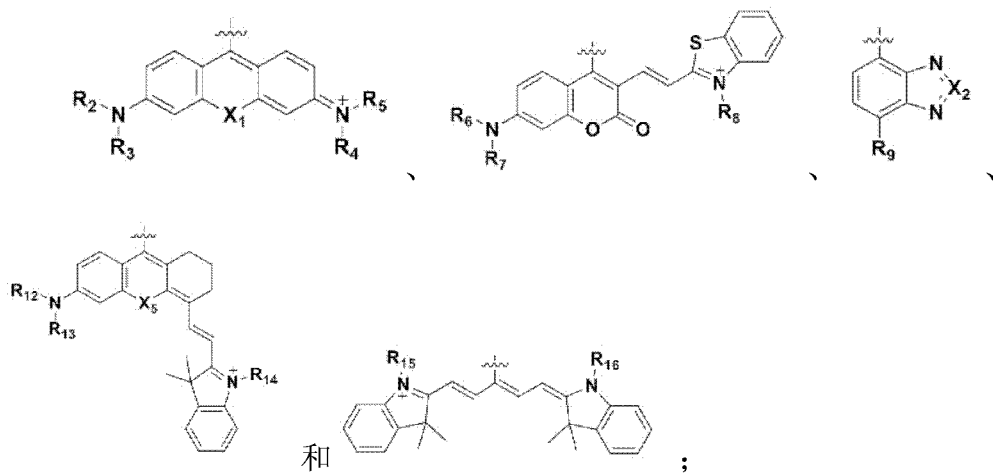
卤素、 ---CH_3 、 $\text{---CH}_2\text{---CH}_3$ 、 $\text{---CH}_2\text{---SO}_3\text{H}$ 和 $\text{---C(=O)NH---CH}_2\text{---PO}_3\text{H}_2$, 其中当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、

5 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 为 $\text{---CH}_2\text{---CH}_3$ 时, $n=1-5$, 而当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 相同地或不同地

选自 $\text{---CH}_2\text{---SO}_3\text{H}$ 和 $\text{---C(=O)NH---CH}_2\text{---PO}_3\text{H}_2$ 时, $n=12-18$, 优选 $n=13-18$ 、 $14-18$ 、 $15-18$ 、 $16-18$ 、 $17-18$ 或 18 ;

进一步地, 所述卤素为氟或氯。

10 进一步地, 在所述式 (1) 化合物中, Ar 选自:



和 ;

R_9 为卤素, 优选为氟或氯;

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 可以相同地

15 或不同地选自:

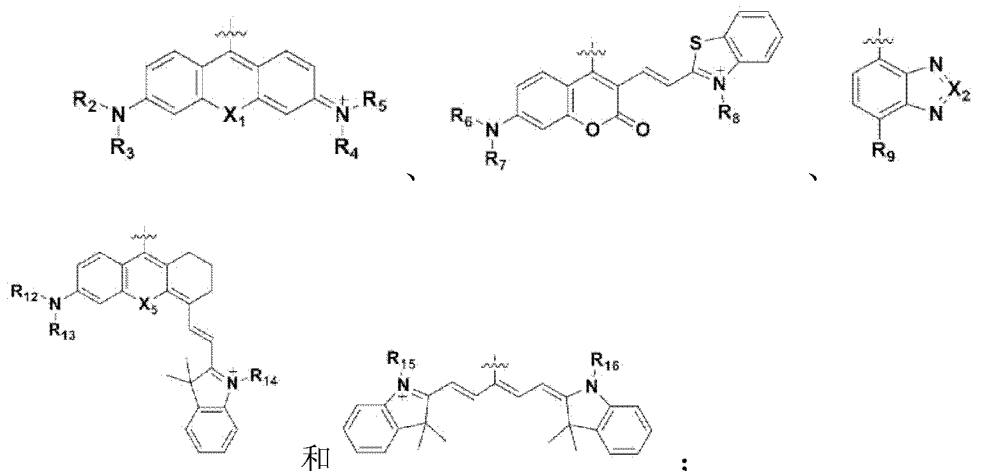
---CH_3 、 $\text{---CH}_2\text{---CH}_3$ 、 $\text{---CH}_2\text{---SO}_3\text{H}$ 和 $\text{---C(=O)NH---CH}_2\text{---PO}_3\text{H}_2$, 其中当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、

R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 为 $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 时, $n=1-5$, 而当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 相同地或不同地选自 $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$

和 $\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N}(\text{H})\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{PO}_3\text{H}_2$ 时, $n=12-18$, 优选 $n=13-18$ 、 $14-18$ 、 $15-18$ 、 $16-18$ 、 $17-18$ 或 18 ;

X_1 、 X_2 和 X_5 可以相同地或不同地选自: NH 、 NCH_3 、 O 和 S 。

5 进一步地, 在所述式(1)化合物中, Ar 选自:



R_9 为氟;

R_1 为 ---CH_3 、 $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 或 $\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N}(\text{H})\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{PO}_3\text{H}_2$, 其中当 R_1 为 $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 时, $n=1-5$,

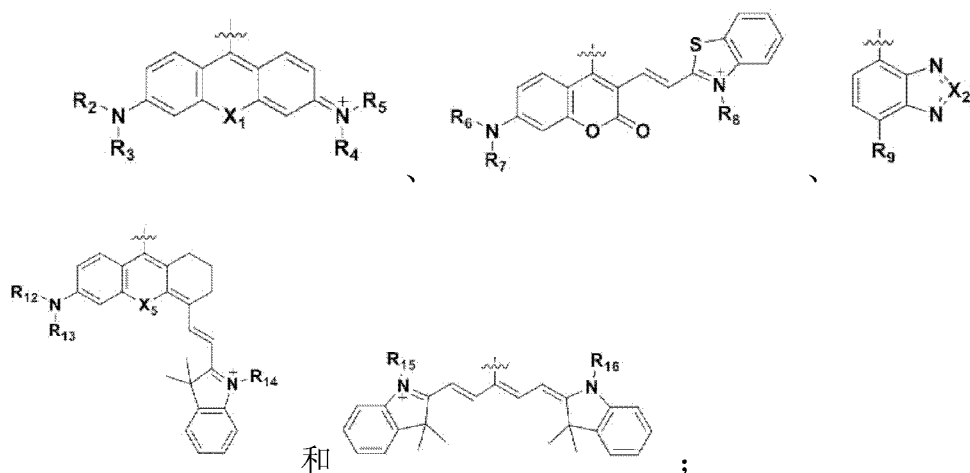
10 且当 R_1 为 $\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{N}(\text{H})\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{PO}_3\text{H}_2$ 时, $n=12-18$, 优选 $n=13-18$ 、 $14-18$ 、 $15-18$ 、 $16-18$ 、 $17-18$ 或 18 ;

R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_{12} 、 R_{13} 和 R_{14} 可以相同地或不同地选自: ---CH_3 和 $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, 其中 $n=1-5$;

R_{15} 和 R_{16} 均为 $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$, $n=12-18$, 优选 $n=13-18$ 、 $14-18$ 、 $15-18$ 、 $16-18$ 、
15 $17-18$ 或 18 ;

X_1 、 X_2 和 X_5 可以相同地或不同地选自: O 和 S 。

进一步地, 在所述式(1)化合物中, Ar 选自:



R_9 为氟;

R_1 为 ---CH_3 或 $\text{---C(=O)NH(CH}_2\text{)}_n\text{PO}_3\text{H}_2$, 其中当 R_1 为 $\text{---C(=O)NH(CH}_2\text{)}_n\text{PO}_3\text{H}_2$ 时, $n=12-18$, 优

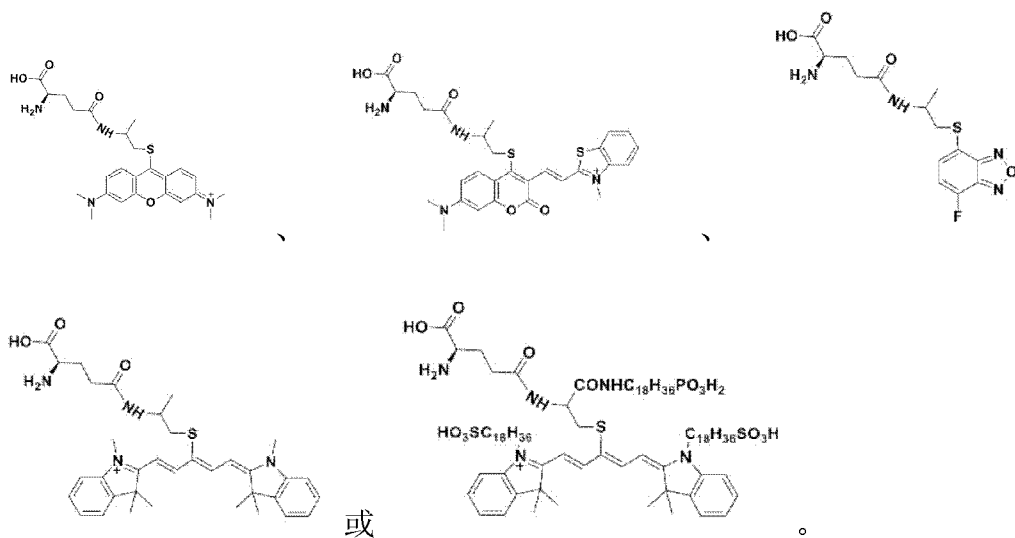
5 选 $n=13-18$ 、 $14-18$ 、 $15-18$ 、 $16-18$ 、 $17-18$ 或 18 ;

R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_{12} 、 R_{13} 和 R_{14} 为 ---CH_3 ;

R_{15} 和 R_{16} 均为 $\text{---CH}_2\text{---SO}_3\text{H}$, $n=12-18$, 优选 $n=13-18$ 、 $14-18$ 、 $15-18$ 、 $16-18$ 、 $17-18$ 或 18 ;

X_1 、 X_2 和 X_5 可以相同地或不同地选自: O 和 S, 优选为 O。

10 进一步地, 在所述式 (1) 化合物中, 所述化合物为:



在本发明的第二方面, 提供一种产品, 所述产品包含上述本发明第一方面所定义的化合物。

进一步地，所述产品还包含添加剂和使用指南。

进一步地，所述添加剂选自下述的一种或多种：叠氮化钠、甘油、硫柳汞和吐温。

进一步地，所述产品为试剂盒。

- 5 进一步地，所述化合物和所述每一种添加剂各自呈单独制剂形式存在，或者所述化合物和所述每一种添加剂呈组合物的形式存在。

进一步地，所述使用指南涉及下述本发明第五方面所述的具体步骤。

在本发明的第三方面，提供一种用途，其包括：

- 10 上述本发明第一方面所定义的化合物在制备用于检测生物样品中的 γ -谷氨酰转肽酶含量的产品中的用途。进一步地，所述生物样品是正常细胞、肿瘤细胞、正常组织或肿瘤组织。进一步地，所述生物样品是癌症组织，如在上述关于癌症定义中所述的那些癌症的组织，例如选自卵巢癌、肝癌、肺癌、鳞状细胞癌、子宫内膜癌、宫颈癌的组织。

- 15 上述本发明第一方面所定义的化合物在制备用于生物样品中的 γ -谷氨酰转肽酶荧光成像的产品中的用途。进一步地，所述生物样品是正常细胞、肿瘤细胞、正常组织或肿瘤组织。进一步地，所述生物样品是癌症组织，如在上述关于癌症定义中所述的那些癌症的组织，例如选自卵巢癌、肝癌、肺癌、鳞状细胞癌、子宫内膜癌、宫颈癌的组织。

- 20 上述本发明第一方面所定义的化合物在制备用于肿瘤检测的产品中的用途。进一步地，所述肿瘤检测包括对在上述定义部分所定义的良性肿瘤和恶性肿瘤（即，癌症，所述癌症如在上述定义部分所定义）的检测。进一步地，所述肿瘤检测是指卵巢癌、肝癌、肺癌、鳞状细胞癌、子宫内膜癌、宫颈癌等的旁床检测。

- 25 在本发明的第四方面，提供上述本发明的第一方面所定义的化合物或上述本发明第二方面所定义的产品，所述化合物或产品用于检测生物样品中的 γ -谷氨酰转肽酶含量或用于生物样品中的 γ -谷氨酰转肽酶荧光成像或用于肿瘤检测。进一步地，所述肿瘤检测包括对在上述定义部分所定义的良性肿瘤和恶性肿瘤（即，癌症，所述癌症如在上述定义部分所定义）的检测。进一步地，所述肿瘤检测是指卵巢癌、肝癌、肺癌、鳞状细胞癌、子宫内膜癌、宫颈癌等的旁床检测。

在本发明的第五方面，提供一种生物样品中的 γ -谷氨酰转肽酶含量的检测方

法, 其中使用上述本发明第一方面所定义的化合物或上述本发明第二方面所定义的产品, 包括如下步骤:

(1) 制作标准曲线: 在激发光激发下, 测定一系列不同浓度 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液在不同发射波长处 (例如, 510-560 nm 和 620-690 nm) 的荧光强度, 记为 F_1 和 F_2 , 取两者之间的比率值, 记为 R , 以 γ -谷氨酰转肽酶的浓度 C 为横坐标, 比率值 R 为纵坐标, 绘制标准曲线; 和

(2) 测定生物样品中 γ -谷氨酰转肽酶的含量: 将待测生物样本与所述化合物的储备液或在所述产品中的所述化合物的储备液孵育, 经过一段时间 (优选地 5-30 分钟), 取出待测生物样品, 洗涤后 (例如, 用 PBS 洗涤), 用荧光成像仪分别记录不同通道 (例如, 荧光通道 F_1 通道和 F_2 通道) 的荧光成像图, 对两个荧光通道的荧光成像图进行比率处理, 读取得到的比率图像中不同位置处的比率值, 即根据标准曲线算出生物样品不同位置处 γ -谷氨酰转肽酶的含量。

进一步地, 其中所述化合物或所述产品中的所述化合物的浓度范围为 0.01-10 mM。

进一步地, 所述一系列不同浓度的 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液中, 所述 γ -谷氨酰转肽酶的浓度为 1-500 mU/mL (例如, 5、10、15、20、25、30、40、50、80、100、200、300、400 mU/mL 以及它们之间的任意范围, 包括但不限于: 5-400 mU/mL、5-300 mU/mL、5-200 mU/mL、5-100 mU/mL); 所述一系列不同浓度的 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液的体积均为 0.1-10 mL (例如, 1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL、8 mL、9 mL 或 10 mL); 所述一系列不同浓度的 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液中, 所述化合物的储备液的摩尔浓度为 0.01-10 mM, 体积均 5-200 μ L (例如, 50 μ L、100 μ L 或 200 μ L) 且在孵育过程中还任选地使用叠氮化钠, 所述叠氮化钠的摩尔浓度为 0.01-10 mM, 体积为 5-200 μ L (例如, 50 μ L、100 μ L 或 200 μ L); 所述 γ -谷氨酰转肽酶的标准反应液由所述 γ -谷氨酰转肽酶标准储备液溶于水中配成, 所述 γ -谷氨酰转肽酶标准储备液的浓度为 1000-20000 mU/mL (例如, 10000 mU/mL)。

进一步地, 所述方法可用于临床生物样品分析。

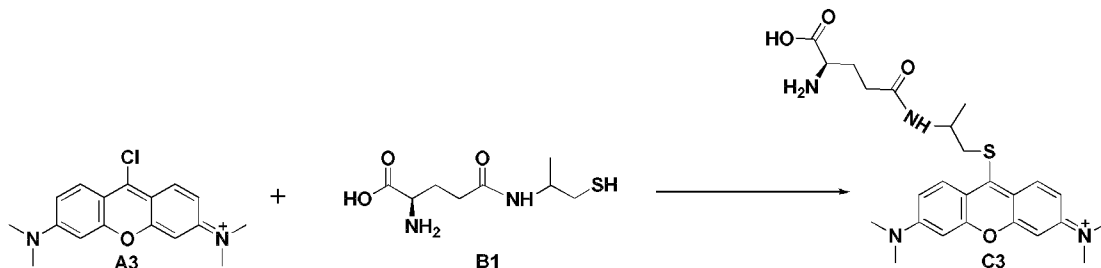
进一步地, 所述临床样品为组织和组织切片, 所述化合物的浓度为 10 nM-50 μ M。

进一步地, 所述方法用于 γ -谷氨酰转肽酶检测的检测范围为 0.01-1000 mU/mL。

具体实施方式

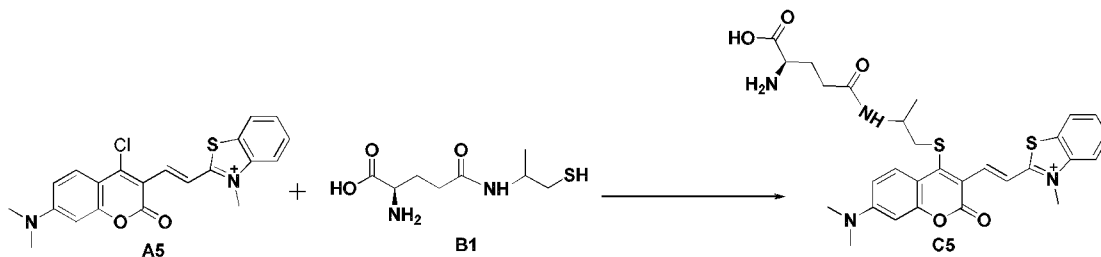
- 5 为了更好的理解本发明专利的内容, 下面通过具体的实施例和附图来进一步说明本发明的技术方案, 具体包括合成、性质测定、光谱实验以及成像实验。但这些实施实例并不限于本发明。

实施例 1、 γ -谷氨酰转肽酶响应型荧光探针 C3 的制备



- 10 化合物 A3 (0.5 克) 溶于 20 毫升甲醇溶液中, 室温下加入 B1 (0.35 克) 的水溶液 (10 毫升) 于其中, 室温下继续反应 12 小时。反应结束后, 旋蒸除去溶剂, 所测粗产物通过高效液相色谱 (乙腈/水=2/1) 分离提纯得到化合物 C1 (0.21 克, 产率 28%)。结构确证如下: ^1H NMR (400 MHz, D_2O , δ) 7.77 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 6.87 (dd, $J = 9.6$ Hz, $J = 2$ Hz, 2H), 6.46 (d, $J = 2$ Hz, 2H), 4.31 (dd, $J = 8$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 1 H), 3.6-3.2 (m, 12 H), 2.3-2.05 (m, 3H), 1.9-1.8 (m, 12H)。
- 15

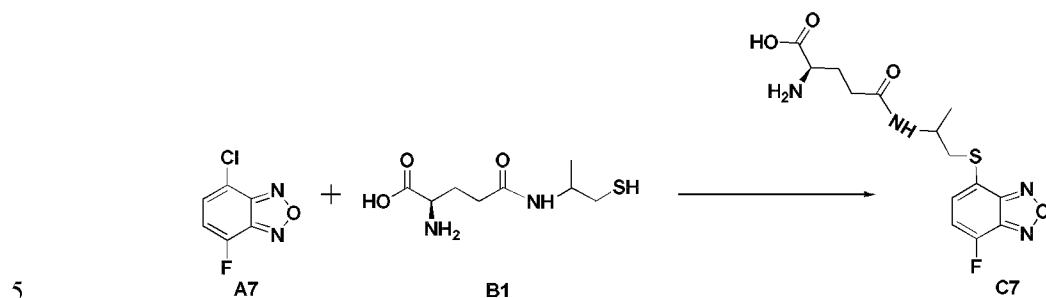
实施例 2、 γ -谷氨酰转肽酶响应型荧光探针 C5 的制备



- 20 化合物 A5 (0.46 克) 溶于 20 毫升甲醇溶液中, 室温下加入 B1 (0.35 克) 的水溶液 (12 毫升) 于其中, 室温下继续反应 12 小时。反应结束后, 旋蒸除去溶剂, 所测粗产物通过高效液相色谱 (乙腈/水=3/2) 分离提纯得到化合物 C5 (0.1 克, 产率 29%)。结构确证如下: ^1H NMR (400 MHz, D_2O , δ) 8.37 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.29(d, $J = 15$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 8.06 (d, $J = 15$ Hz, 1H), 7.84 (t, J

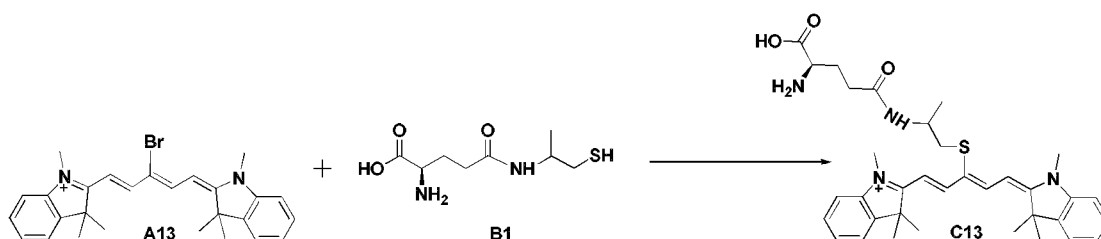
=8.3 Hz, 1H), 7.76 (m, 2H), 6.95 (dd, J₁ = 2.4 Hz, J₂ = 9.6 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 4.22 (s, 3H), 4.03 (m, 1 H), 3.6-3.2 (m, 9 H), 2.06 (t, 2H), 1.9-1.7 (m, 2H), 1.32(d, J = 7.2 Hz, 3H)。

实施例 3、 γ -谷氨酰转肽酶响应型荧光探针 C7 的制备



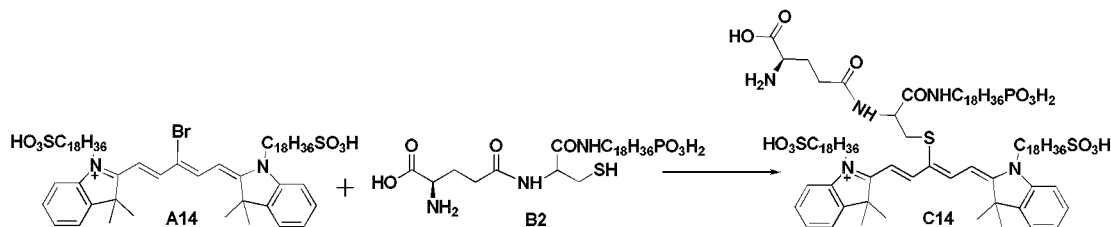
化合物 A7 (0.4 克) 溶于 20 毫升甲醇溶液中, 室温下加入 B1 (0.45 克) 的水溶液 (8 毫升) 于其中, 室温下继续反应 24 小时。反应结束后, 旋蒸除去溶剂, 所测粗产物通过高效液相色谱 (乙腈/水=4/1) 分离提纯得到化合物 C7 (0.1 克, 产率 23%)。结构确证如下: ¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ) 7.28 (d, J = 9.6 Hz, 1H),
 10 6.77 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 4.04 (m, 1 H), 3.6-3.2 (m, 3 H), 2.05 (t, 2H), 1.9-1.8 (m, 2H), 1.32(d, J = 7.2 Hz, 3H).

实施例 4、 γ -谷氨酰转肽酶响应型荧光探针 C13 的制备



化合物 A13 (0.5 克) 溶于 20 毫升甲醇溶液中, 室温下加入 B1 (0.55 克) 的水溶液 (8.2 毫升) 于其中, 室温下继续反应 18 小时。反应结束后, 旋蒸除去溶剂, 所测粗产物通过高效液相色谱 (乙腈/水=3/1) 分离提纯得到化合物 C13 (0.1 克, 产率 23%)。结构确证如下: ¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ) 8.92 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.02 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.48 (m, 4H), 6.97 (d, J = 7.6 Hz, J = 2 Hz, 2H), 6.27 (dd, J = 2 Hz, 2H), 4.03 (m, 1 H), 3.6-3.2 (m, 3 H), 2.27 (s, 6H) 2.06 (t, 2H),
 20 1.9-1.7 (m, 2H), 1.32(d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.02(s, 12H).

实施例 5、 γ -谷氨酰转肽酶响应型荧光探针 C14 的制备



化合物 A14 (0.8 克) 溶于 20 毫升甲醇溶液中, 室温下加入 B2 (0.45 克) 的水溶液 (20 毫升) 于其中, 室温下继续反应 36 小时。反应结束后, 旋蒸除去溶剂, 所测粗产物通过高效液相色谱 (乙腈/水=1/1) 分离提纯得到化合物 C14

5 (0.27 克, 产率 27%)。结构确证如下: ^1H NMR (400 MHz, D_2O , δ) 8.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.48 (m, 4H), 6.97 (d, $J = 7.6$ Hz, $J = 2$ Hz, 2H), 6.27 (dd, $J = 2$ Hz, 2H), 4.04 (m, 1 H), 3.8-3.2 (m, 3 H), 2.59-2.22 (m, 12H), 2.05 (t, 2H), 2.0-1.6 (m, 8H), 1.32(d, $J = 7.2$ Hz, 3H). 1.25-0.89 (m, 104H)

实施例 6、 γ -谷氨酰转肽酶检测试剂盒的制备

10 称取化合物 C3 (4.8 mg, 0.01 mmol)、叠氮化钠 (0.01 mg)、甘油 (1 mg)、硫柳汞 (0.05 mg)、吐温-20 (0.01 mg), 溶于 40 mL 超纯水中, 配成荧光探针储备液(又称母液, 探针浓度: 250 μM), 即得到 γ -谷氨酰转肽酶检测试剂盒一。

称取化合物 C13 (4.9 mg, 0.01 mmol) 和叠氮化钠 (0.01 mg), 溶于 200 mL 超纯水中, 配成荧光探针储备液 (探针浓度: 50 μM), 即得到 γ -谷氨酰转肽酶
15 检测试剂盒二。

实施例 7. 实施例 6 所述试剂盒一用于检测溶液中 γ -谷氨酰转肽酶

本发明试剂盒检测 γ -谷氨酰转肽酶具体按照以下步骤进行:

(1) 荧光探针光谱响应性质研究: 将 20 μL 的上述试剂盒母液滴加到 2 mL 的 50 mU/mL γ -谷氨酰转肽酶溶液和 0.01 M 磷酸盐缓冲溶液中, 37 $^\circ\text{C}$ 下反应, 测量紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱随反应时间的变化。荧光发射光谱测定时以 488 nm 为激发光; 激发和发射狭缝宽度均为 10 nm; 电压 400 V。吸收光谱由 Perkin-Elmer 公司 Lamda750 型紫外可见吸收光谱仪测得; 荧光光谱由 PTI 公司 QM40 荧光光谱仪测得。如图 2 和图 3 所示分别为本发明试剂盒对 γ -谷氨酰转肽酶的紫外可见吸收及荧光发射光谱响应图。图 2 为探针溶液与 γ -谷氨酰转肽酶(50 mU/mL) 反应后的吸收光谱变化, 图 3 为探针溶液与 γ -谷氨酰转肽酶(50 mU/mL) 反应后的发射光谱变化。
25

(2) 制作标准曲线:

在激发光激发下, 测定浓度分别为 0、5、10、15、20、25、30、40、50、80 和 100 mU/mL 的 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液的发射光谱 (如图 4), 在不同发光波段 (510-560 nm 和 620-690 nm) 的荧光强度的比值, 记为 R (510-560 nm 波段的荧光强度比 620-690 nm 波段的荧光强度)。以 γ -谷氨酰转肽酶的浓度 C 为横坐标, 比率值 R 为纵坐标, 绘制标准曲线 (如图 5)。

(3) 检测待测样品中 γ -谷氨酰转肽酶的含量:

将上述步骤 (1) 中 γ -谷氨酰转肽酶标准储备溶液替换为待测样品, 按照上述步骤 (2) 所述方法检测所述待测样品不同发射波段 (510-560 nm 和 620-690 nm) 的荧光强度比率值, 记为 R', 将所述 R' 带入所述步骤 (2) 所得标准曲线, 即可得到待测样品中 γ -谷氨酰转肽酶的含量。

(4) γ -谷氨酰转肽酶检测试剂盒检测 GGT 含量的可靠性研究

将上述步骤 (1) 中 γ -谷氨酰转肽酶标准储备溶液作为待测样品。在不同激发光功率下, 测试样品的发射光谱。按照上述步骤 (2) 所述方法检测所述待测样品不同发射波段 (510-560 nm 和 620-690 nm) 的荧光强度比率值。如图 6 至图 8 所示, 510-560 nm 波段荧光信号的强度随激发光功率的增加而增加, 同时 510-560 nm 波段的荧光强度也随 GGT 含量的增加而增加。这表明根据单个波段荧光强度的变化检测 GGT 含量的方法容易受到激发光功率的影响, 而导致检测结果出现偏差。而本试剂盒所采用的比率检测方法证明 (图 9) 该方法所得出的检测结果相比于单波段荧光变化检测 GGT 的方法, 受到激发光功率的影响小得多。因此, 相比于单波长信号变化的荧光探针, 本试剂盒中使用的比率荧光探针的输出信号不受激发光功率变化的影响, 具有更高的稳定性。

将上述步骤 (1) 中 γ -谷氨酰转肽酶标准储备溶液作为待测样品。配置不同浓度的探针溶液, 测试样品对不同浓度 GGT 响应后的荧光光谱。按照上述步骤 (2) 所述方法检测所述待测样品不同发射波长处 ((510-560 nm 和 620-690 nm) 的荧光强度比率值。比较图 4 (测试所用探针浓度为 5 μ M)、图 10 和图 12 中 510-560 nm 波段荧光信号的强度变化, 不难发现, 在相同 GGT 浓度的条件下, 随着使用的溶液中探针浓度的增加, 该波段荧光强度也相应增加。而根据图 5 (测试所用探针浓度为 5 μ M)、图 11 和图 13 中所示的荧光比率值对 GGT 浓度变化

的工作曲线可以得出,探针浓度的变化对工作曲线的斜率以及得出的检测结果都没有明显的影响。这说明本试剂盒所述的比率检测 GGT 的方法,可以消除探针浓度变化对检测结果准确性的影响。

将上述步骤(1)中 γ -谷氨酰转肽酶标准储备溶液替换为临床血清样本。按照上述步骤(2)所述方法检测所述待测样品不同发射波段(510-560 nm 和 620-690 nm)的荧光强度比率值。将本试剂盒测出的 GGT 含量与用目前商业化的单波长荧光检测 GGT 的试剂盒(购自 Sigma-Aldrich 公司,货号: MAK090)及 ELISA 检测 GGT 试剂盒(购自上海酶研生物科技有限公司,货号: EK-H10297)检出的 GGT 含量进行比较(图 14)。该结果表明,比率探针对实际样本中 GGT 含量的检测结果与 ELISA 方法检出的结果更为接近,也具有更低的标准偏差。

(5) γ -谷氨酰转肽酶检测试剂盒与商用试剂盒检测速度和灵敏度比较

将上述步骤(1)中 γ -谷氨酰转肽酶标准储备溶液作为待测样品。配置不同浓度的探针溶液,通过测试探针溶液的荧光光谱,测试样品对不同浓度 GGT 的响应时间。按照上述步骤(2)所述方法检测所述待测样品不同发射波段(510-560 nm 和 620-690 nm)的荧光强度比率值随时间变化的趋势。在同样条件下,测试商用试剂盒(购自 Sigma-Aldrich 公司,货号: MAK090)对不同浓度 GGT 的响应时间,按照上述步骤(2)所述方法,探测商用试剂盒样品在 460 nm(激发波长 405 nm)处的荧光强度数值随时间变化的趋势。如图 15 所示,在 GGT 过量的情况下,本发明所述试剂盒在 10 分钟内即可反应完全,并且比率变化倍数能够达到 170 倍,而商用试剂盒响应完全所需时间为 25 分钟,荧光强度的变化倍数为 30 倍。该结果表明,本发明试剂盒所述荧光探针对 GGT 的响应速度和荧光变化的灵敏度都要显著优于该商用试剂盒。另外,如图 16 所示,通过上述响应速度测试得到本发明试剂盒所用荧光探针和商用试剂盒所用荧光探针与 GGT 相互作用的各项参数。本发明试剂盒对 GGT 具有更高的响应速度是由于本发明试剂盒所用探针在酶催化下具有更高的最大反应速率($V_{\max}$)和更高的酶催化效率(K_{cat})。根据图 5 和图 17 可知,本发明试剂盒所述探针对 GGT 检测限为 10 mU/L,而测得商用试剂盒的检测限为 53 mU/L。上述结果表明,本发明所述试剂盒比商用荧光法 GGT 检测试剂盒具有显著更高的灵敏度和检测速度。

实施例 8、实施例 6 所述 γ -谷氨酰转肽酶检测试剂盒一在肿瘤细胞检测中的

用途

本发明试剂盒检测细胞中 γ -谷氨酰转肽酶具体按照以下步骤进行：

i、在 37°C 和 5% CO₂ 条件下，用含有 10% (v/v) 胎牛血清 (FBS)、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 的链霉素的 DMEM 培养基培养细胞 (培养的细胞为人卵巢上皮细胞 HOSEpiC 和人卵巢癌细胞 SKOV3)。细胞使用之前用 DMEM 清洗。

ii、在细胞中加入 1 mL DMEM，再加入实施例 6 所述 γ -谷氨酰转肽酶检测试剂盒一的母液 (10 μ L) 孵育 0.5 h 后进行共聚焦荧光成像 (激光共聚焦扫描显微镜厂家为 Olympus，型号为 Fluo View FV1000)，在激发光激发下，收集不同荧光波段 (510-560 nm 和 620-690 nm) 的荧光强度。比率信号为不同波段荧光信号强度的比值。根据上述实施例 7 中所述的荧光比率值对 γ -谷氨酰转肽酶浓度的工作曲线，我们可以测得细胞中的 γ -谷氨酰转肽酶含量。

如图 18 所示为本发明试剂盒分别用于人卵巢上皮细胞 HOSEpiC (γ -谷氨酰转肽酶低表达)、人卵巢癌细胞 SKOV3 (γ -谷氨酰转肽酶高表达) 和 GGT 抑制剂 (GGs Top，购自上海源溪生物科技有限公司) 处理后的人卵巢癌细胞 SKOV3 的共聚焦成像图，以上细胞均购自通派 (上海) 生物科技有限公司。不同分组 (SKOV3、20 μ M 抑制剂培养的 SKOV3、100 μ M 抑制剂培养的 SKOV3 以及正常细胞 HOSEpiC) 中的细胞成像图所测得的平均比率值分别为 3.12, 1.48, 0.33 和 0.87。上述结果说明，不同分组成像图中细胞的平均比率值的不同是由于不同分组细胞中 GGT 活性的不同造成的。基于肿瘤细胞和正常细胞中 GGT 含量的不同，上述结果表明本发明试剂盒可以通过对细胞中的 γ -谷氨酰转肽酶含量的测定对肿瘤细胞进行良好地识别。

实施例 9、实施例 6 中所述的 γ -谷氨酰转肽酶检测试剂盒一在旁床检测卵巢癌中的用途

本发明试剂盒检测组织中卵巢癌具体按照以下步骤进行：

1. 从临床肿瘤切除手术中取下的肿瘤组织，将所得组织均匀切分，清洗几遍后，用试剂盒母液稀释后配成的含荧光探针 (0-50 μ M) 的溶液孵育 1-10 min。

2. 用活体成像仪 (成像仪为课题组自行搭建成像系统，参见专利的专利号为 CN2013394004Y，该专利全部内容通过引用并入本文) 对组织进行荧光成像，收集不同荧光波段 ((510-560 nm 和 620-690 nm)) 的荧光信号。比率信号为不

同荧光波段信号强度的比值。

3. 对已通过病理分析确认为肿瘤组织和正常组织的临床样本，按照步骤（1）和（2）中所述方法对组织进行荧光成像，统计不同组织的成像图中比率信号的平均比率值（图 19-27）。将所得数据统计后可得，肿瘤组织成像图中比率值为

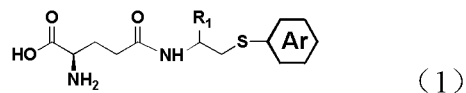
5 3.1±0.5，正常组织成像图中的比率值为 0.5±0.3。

4. 将上述步骤 3 中所述已通过病理确认过的组织替换为待测临床样本。按照步骤（1）和（2）中所述方法对组织进行荧光成像（图 28-30）。将测得的组织成像图的比率值与步骤（3）中所得的已知病理的组织的比率值进行对比，如果其数值大小处于在 0.2-0.8 之间，则该组织被认为是正常组织（阴性），如果其数值大小处于 1.2 以上将其判断为肿瘤组织（阳性）。如果数值落在 0.8-1.2 之间，
10 则为无法判断的组织。

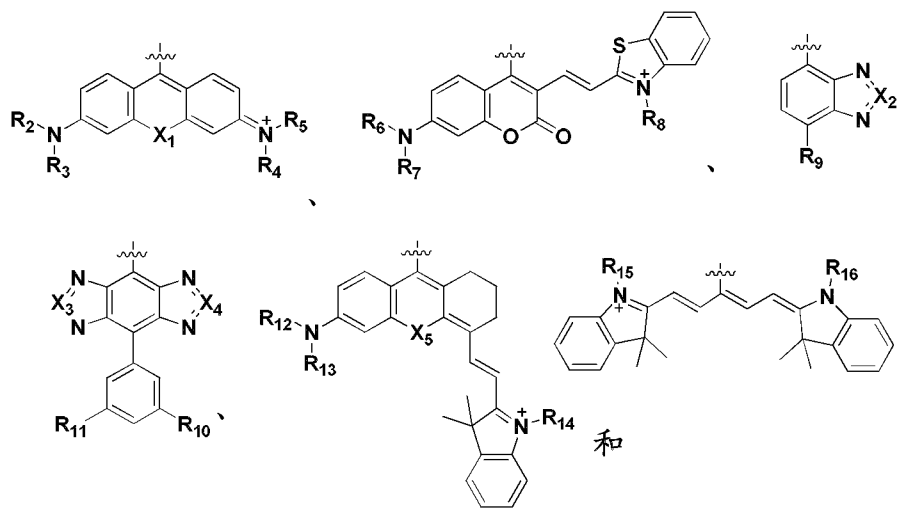
如图 19-30 所示为本发明试剂盒（实施例 6 所述试剂盒一）用于卵巢癌和子宫囊肿患者手术切除组织 GGT 含量的检测。其中图 19-23 为卵巢癌患者手术切除的组织的成像图（图 19-23 的比率值依次为 3.25、2.73、2.94、3.12、3.19），
15 并且所述图 19-23 中的组织已经通过临床病理分析被确定织为肿瘤组织；图 24-27 为子宫囊肿患者手术切除的组织的成像图（图 24-27 的比率值依次为 0.37、0.28、0.33、0.39），并且所述图 24-27 中的组织已经通过临床病理率分析被确定为非肿瘤组织。在图 28-30 中，组织比率成像图中的比率值分别为 2.3、1.9 和 0.35。按照本试剂盒所述方法进行判断，图 28-30 中的组织依次为肿瘤组织、肿瘤组织和
20 非肿瘤组织，该结果与临床病理分析得出的结果一致。上述结果表明利用本发明所述的试剂盒具有反应迅速、高灵敏度和抗干扰能力强等特点，可以用于对肿瘤组织和非肿瘤组织精确辨别的旁床检测。

权 利 要 求

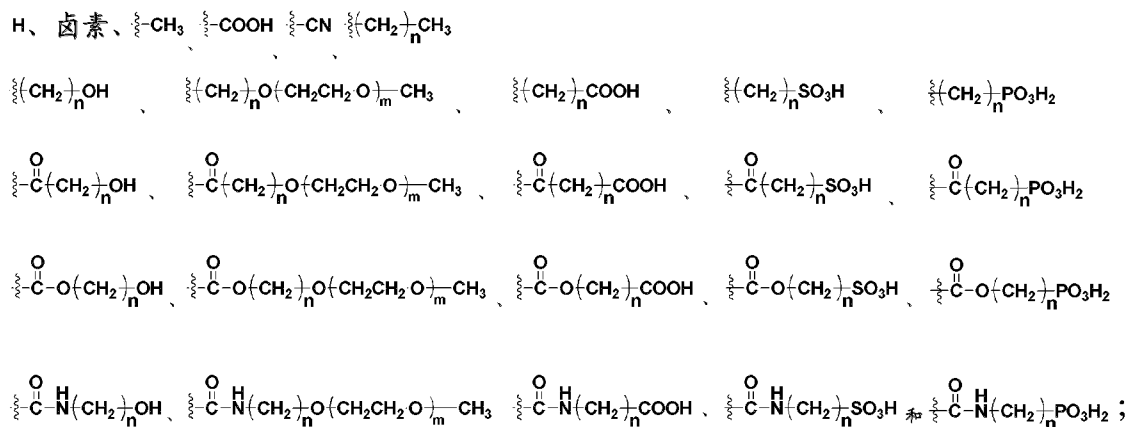
1、化合物，所述化合物具有下述式(1)结构；



其中，选自：

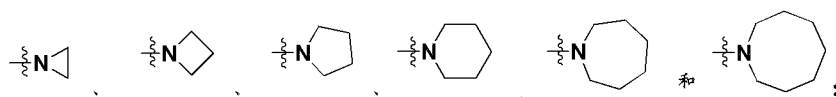


R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 可以相同地或不同地选自：



m 和 n 可以相同地或不同地为1-18的整数；或

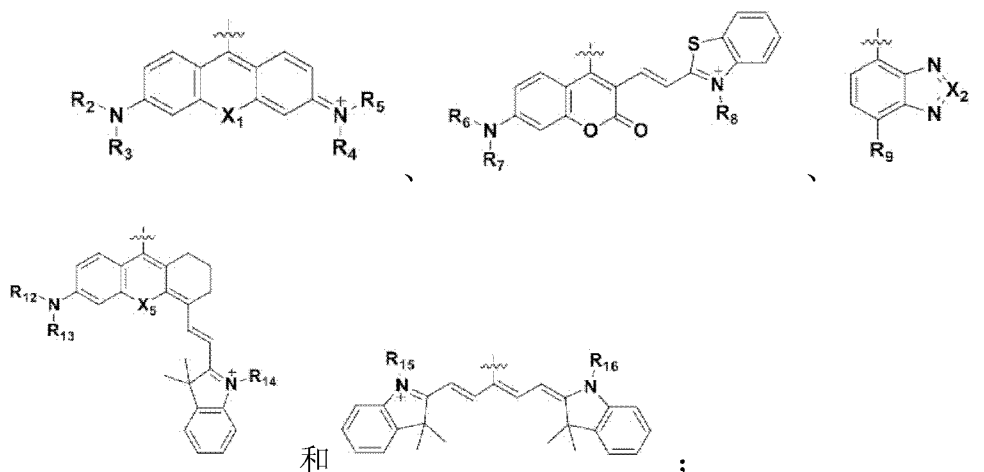
$\text{---N}^{\text{R}_2}_{\text{R}_3}\text{---N}^{\text{R}_5}_{\text{R}_4}\text{---N}^{\text{R}_6}_{\text{R}_7}\text{---N}^{\text{R}_{12}}_{\text{R}_{13}}$ 也可以相同地或不同地选自：



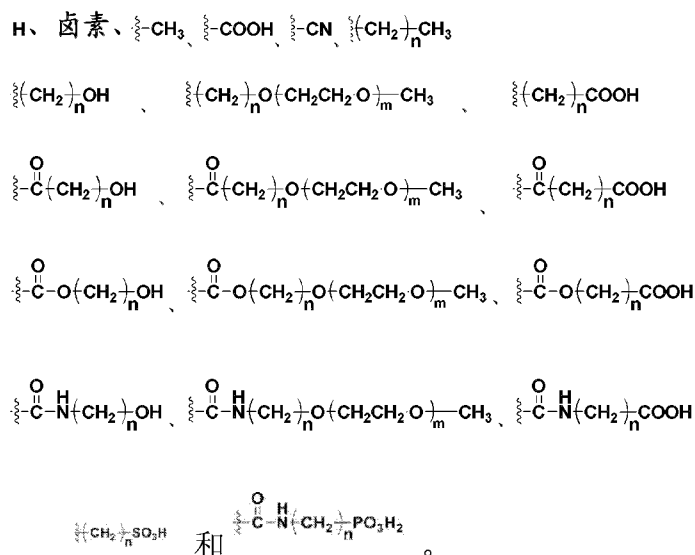
X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 可以相同地或不同地选自：NH、NCH₃、O、S、Se、

$C(CH_3)_2$ 和 $Si(CH_3)_2$ 。

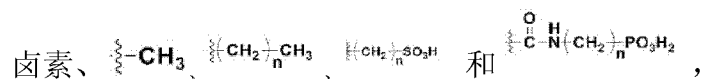
2、根据权利要求 1 所述的化合物，其中 Ar 选自：



R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 可以相同地或不同地选自：



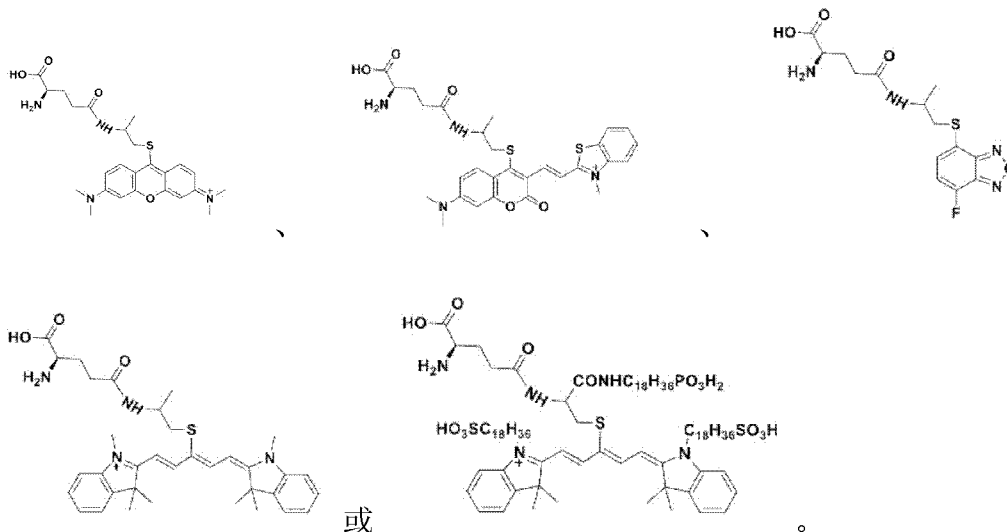
3、根据权利要求 2 所述的化合物，其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 可以相同地或不同地选自：



其中当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 为 $-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ 时， $n=1-5$ ；当 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_{12} 、 R_{13} 、

R_{14} 、 R_{15} 和 R_{16} 相同地或不同地选自 $-(\text{CH}_2)_n\text{SO}_3\text{H}$ 和 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_n\text{PO}_3\text{H}_2$ 时， $n=12-18$ 。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的化合物, 所述化合物为:



5. 产品, 所述产品包含权利要求 1-4 中任一项的化合物。

6. 根据权利要求 5 所述的产品, 所述产品还包含添加剂和使用指南。

7. 根据权利要求 6 所述的产品, 所述添加剂选自下述的一种或多种: 叠氮化钠、甘油、硫柳汞和吐温。

8. 根据权利要求 5-7 中任一项的产品, 所述产品为试剂盒。

9. 根据权利要求 8 所述的产品, 其中所述化合物和所述每一种添加剂各自呈单独制剂形式存在, 或者所述化合物和所述每一种添加剂呈组合物的形式存在。

10. 根据权利要求 1-4 中任一项的化合物在制备用于检测生物样品中的 γ -谷氨酰转肽酶含量的产品中的用途。

11. 根据权利要求 1-4 中任一项的化合物在制备用于生物样品中的 γ -谷氨酰转肽酶荧光成像的产品中的用途。

12. 生物样品中的 γ -谷氨酰转肽酶含量的检测方法, 其中使用权利要求 1-4 中任一项所述的化合物或权利要求 5-9 中任一项所述的产品, 包括如下步骤:

(1) 制作标准曲线: 在激发光激发下, 测定一系列不同浓度 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液在不同发射波长处的荧光强度, 记为 F_1 和 F_2 , 取两者之间的比率值, 记为 R , 以 γ -谷氨酰转肽酶的浓度 C 为横坐标, 比率值 R 为纵坐标, 绘制标准曲线; 和

(2) 测定生物样品中 γ -谷氨酰转肽酶的含量: 将待测生物样本与所述化合物的储备液或在所述产品中的所述化合物的储备液孵育, 经过一段时间, 取出待

测生物样品，洗涤后，用荧光成像仪分别记录不同通道的荧光成像图，对两个荧光通道的荧光成像图进行比率处理，读取得到的比率图像中不同位置处的比率值，即根据标准曲线算出生物样品不同位置处 γ -谷氨酰转肽酶的含量。

13、根据权利要求 12 所述的检测方法，其中所述化合物或所述产品中的所述化合物的浓度范围为 0.01-10 mM。

14. 根据权利要求 13 所述的检测方法，其中所述一系列不同浓度的 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液中，所述 γ -谷氨酰转肽酶的浓度为 1-500 mU/mL；

所述一系列不同浓度的 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液的体积均为 0.1-10 mL；

所述一系列不同浓度的 γ -谷氨酰转肽酶标准反应液中，所述化合物的储备液的摩尔浓度为 0.01-10 mM，体积 5-200 μ L，且在孵育过程中还任选地使用叠氮化钠，所述叠氮化钠的摩尔浓度为 0.01-10 mM，体积为 5-200 μ L。

15. 根据权利要求 12-14 中的任一项所述的检测方法，所述方法可用于临床生物样品分析。

16. 根据权利要求 15 所述的检测方法，所述临床样品为组织和组织切片，所述化合物的浓度为 10 nM-50 μ M。

17. 根据权利要求 12-14 和 16 中的任一项所述的检测方法，所述方法用于 γ -谷氨酰转肽酶检测的检测范围为 0.01-1000 mU/mL。

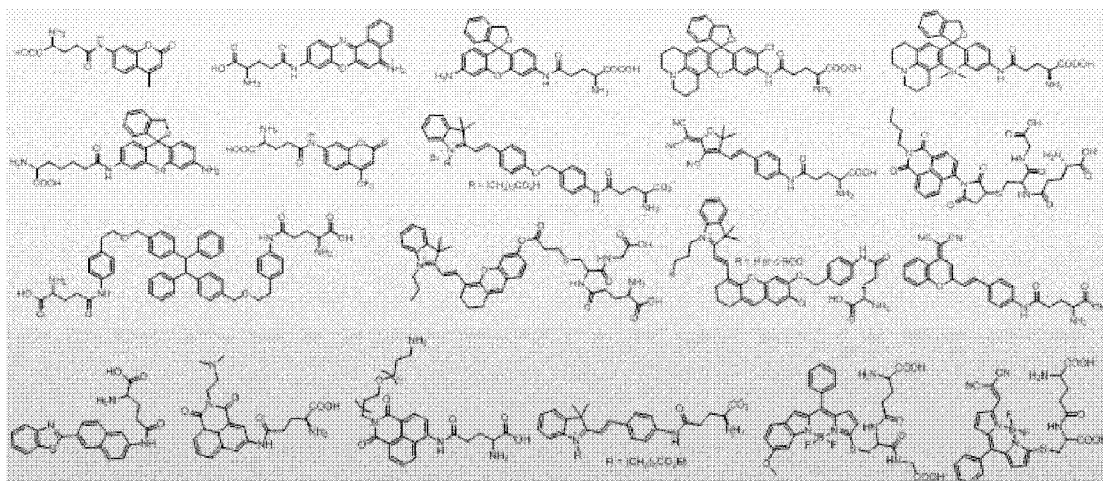


图 1

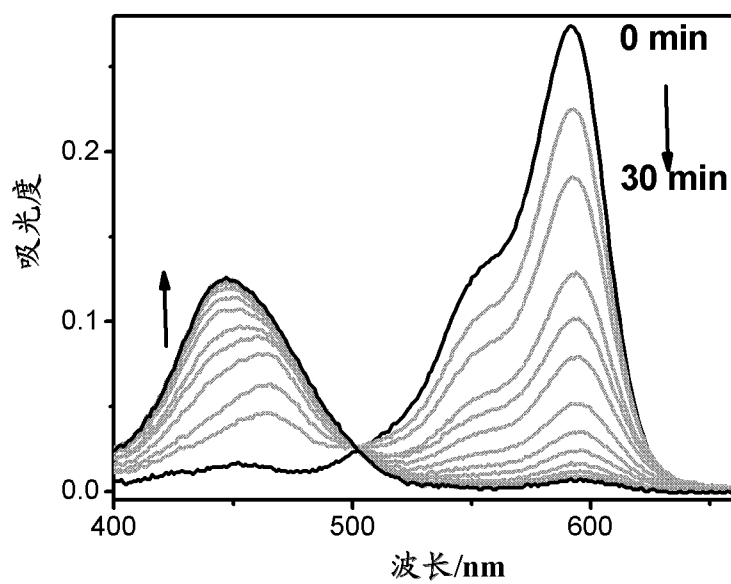


图 2

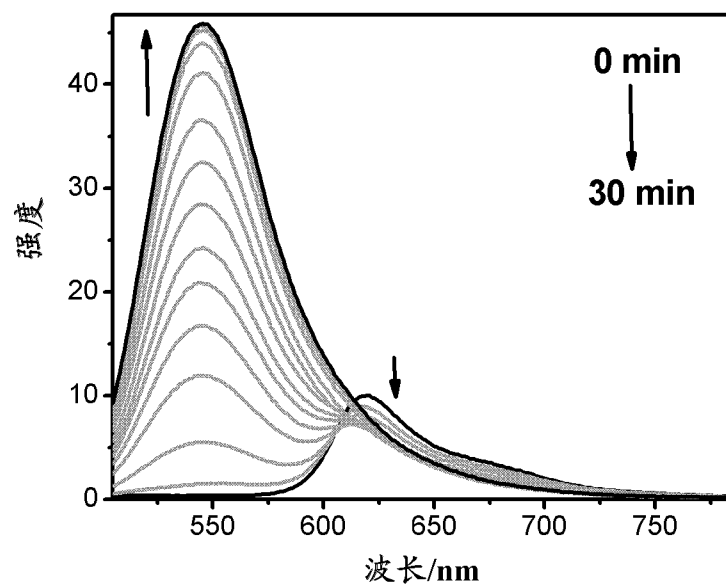


图 3

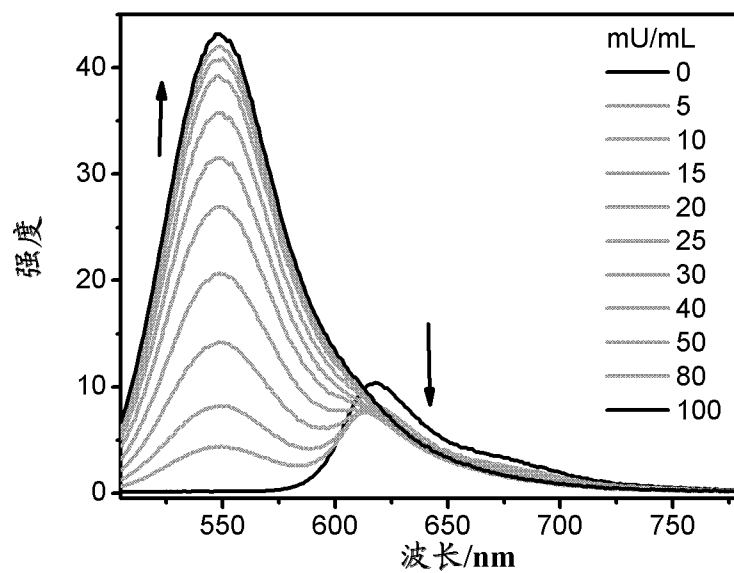


图 4

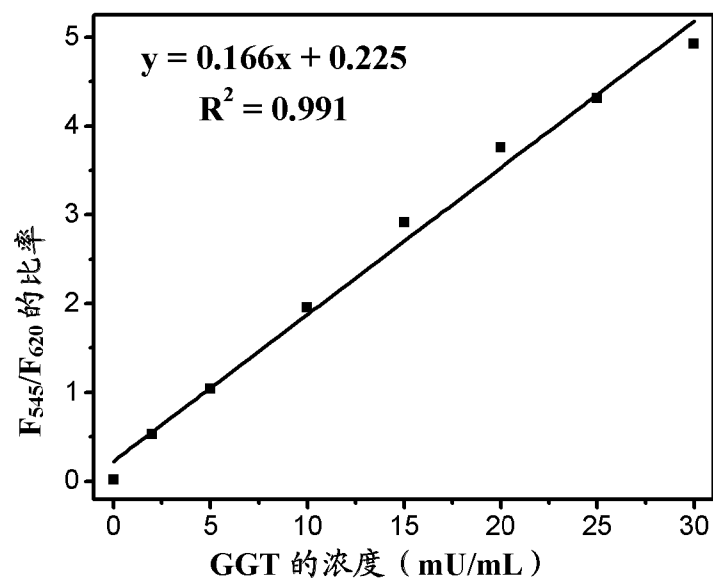


图 5

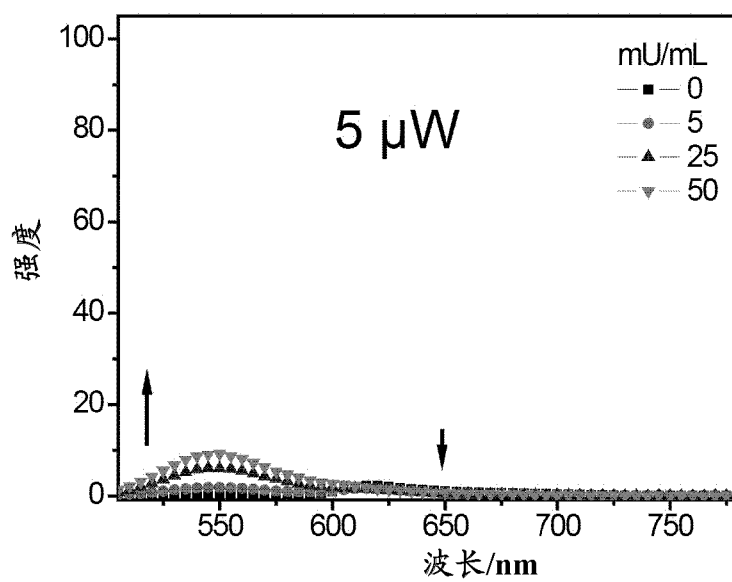


图 6

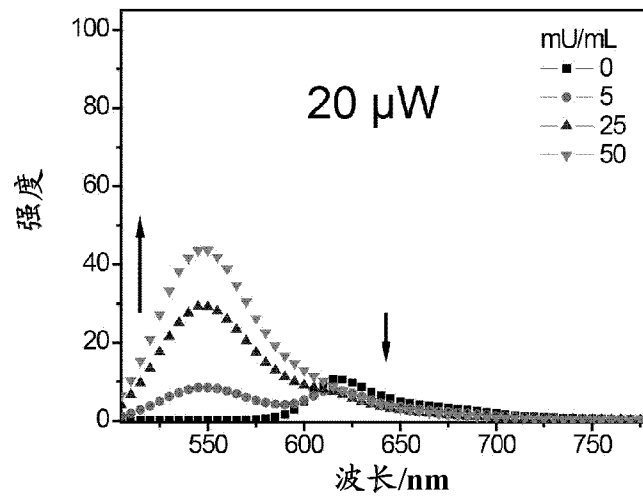


图 7

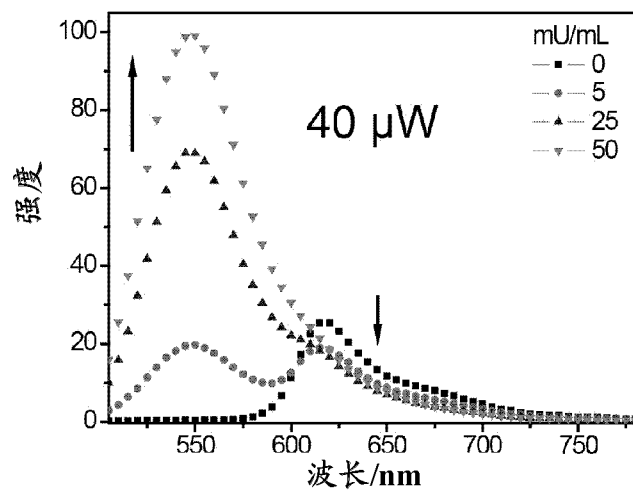


图 8

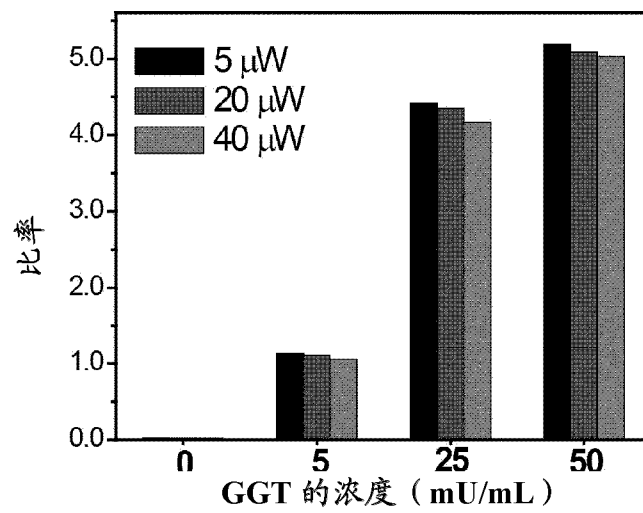


图 9

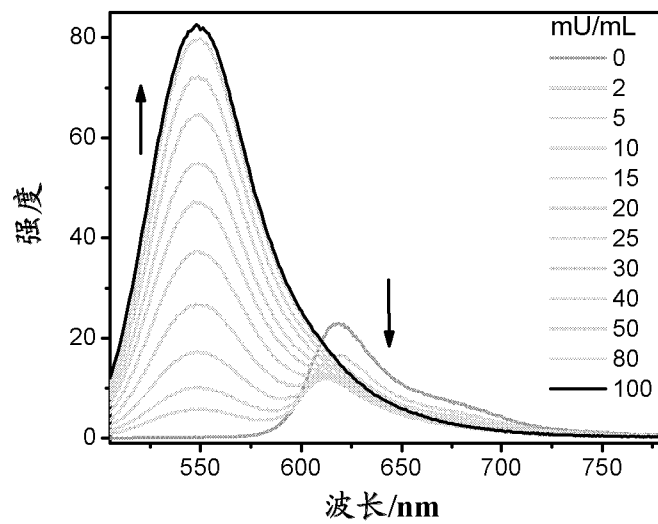


图 10

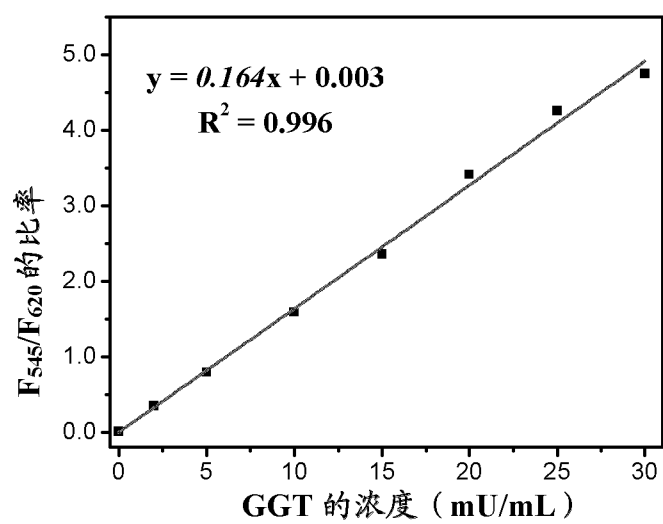


图 11

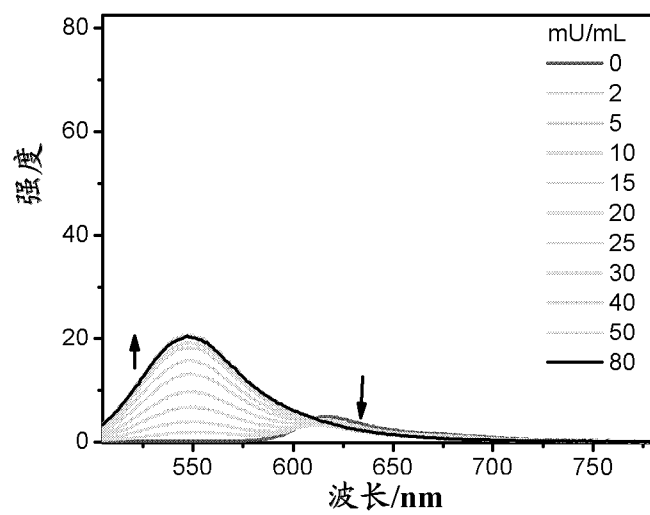


图 12

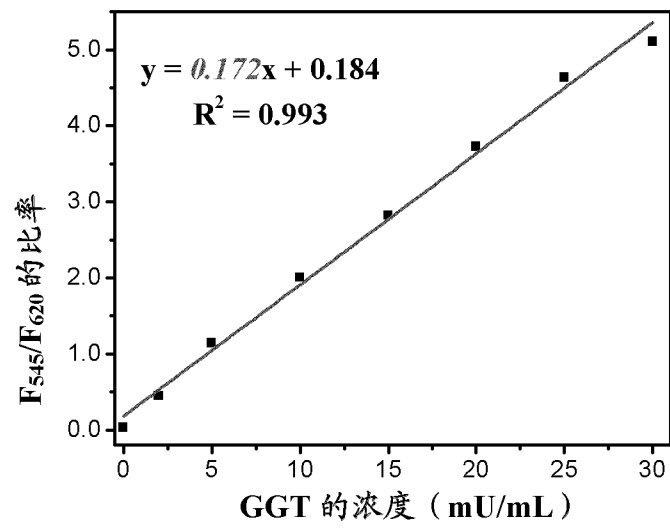


图 13

样品编号	ELISA试剂盒检出的GGT含量 (mU/mL)	荧光试剂盒检出的 含量 (mU/mL)	本试剂盒检出的 GGT含量 (mU/mL)
1	43.69±3.28	40.21±5.88	42.65±2.33
2	78.39±1.16	70.15±9.21	76.25±2.51
3	55.28±2.05	45.68±7.35	55.23±1.25
4	80.56±5.51	81.25±14.21	81.24±3.21
5	50.02±1.38	62.31±11.15	50.67±1.21
6	47.56±2.31	45.36±5.64	47.23±2.11
7	49.25±1.32	46.25±4.65	48.56±3.01
8	48.55±1.11	44.16±4.22	48.26±2.15
9	64.11±2.09	58.16±8.21	63.25±1.26
10	63.15±1.65	55.61±6.21	65.11±1.41
11	54.28±1.05	45.32±5.11	55.21±2.13
12	42.44±1.21	40.12±6.02	42.52±1.08
13	41.55±2.51	49.32±5.11	41.51±2.35
14	56.28±3.21	62.33±4.21	56.31±3.06
15	59.31±1.22	65.33±2.11	59.12±4.15
16	66.21±1.91	61.21±2.35	65.21±1.55
17	62.34±1.55	56.21±3.56	61.51±1.87
18	68.15±1.45	60.23±4.21	68.98±1.45
19	20.45±1.31	25.11±4.21	21.21±4.16
20	21.42±1.65	20.15±1.35	20.42±3.35
21	19.55±1.08	19.75±3.12	19.66±2.38
22	14.33±1.98	12.55±3.12	14.68±2.35
23	16.55±1.75	19.01±4.21	16.59±6.26
24	17.22±1.56	18.11±4.41	19.27±1.26

图 14

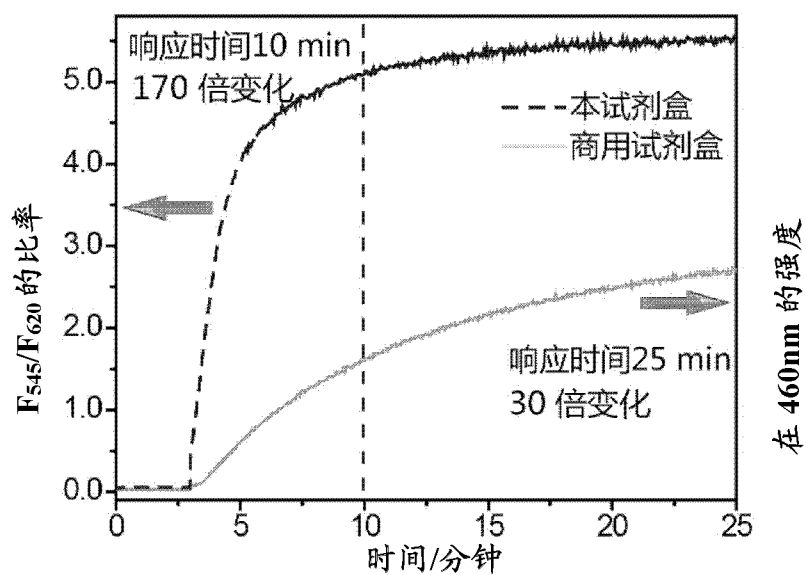


图 15

	本发明试剂盒	商用试剂盒
K_m (μM)	22.6	7.7
V_{max} (nM/s)	29.7	13.9
K_{cat} (s^{-1})	0.453	0.212
K_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$)	20063	27460

图 16

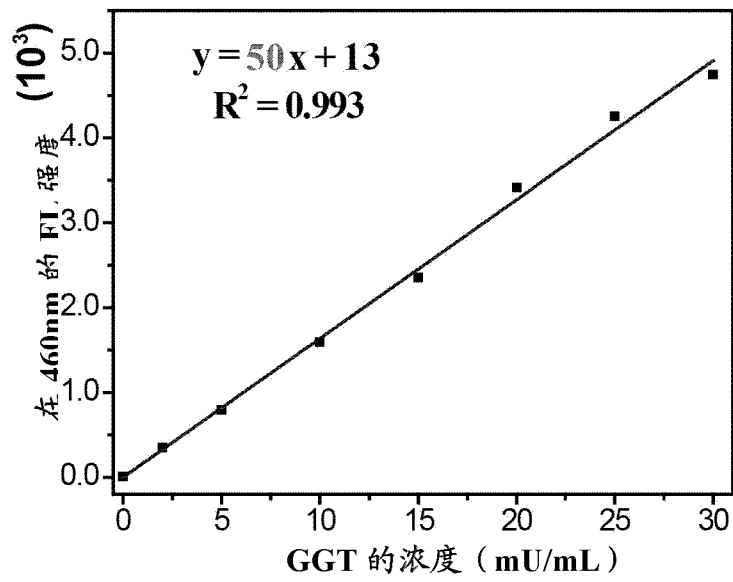


图 17

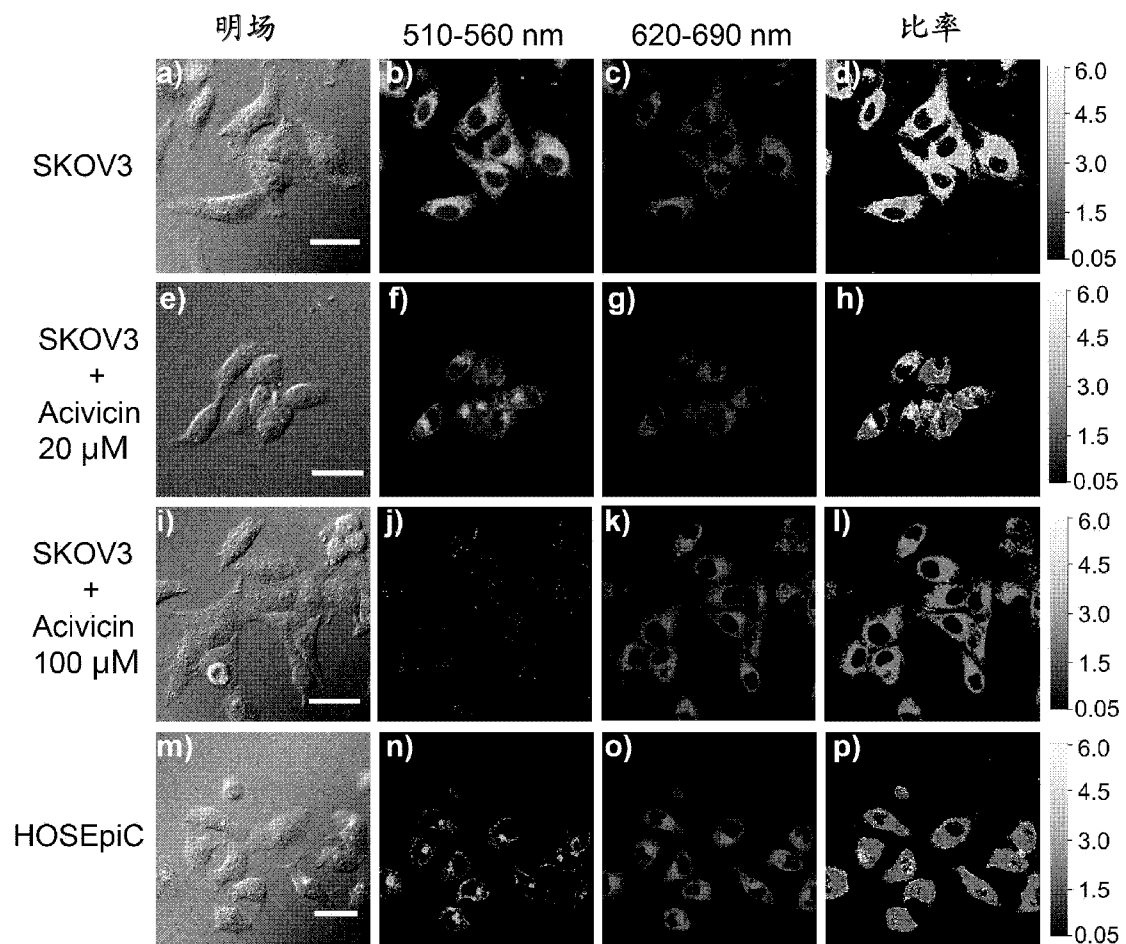


图 18

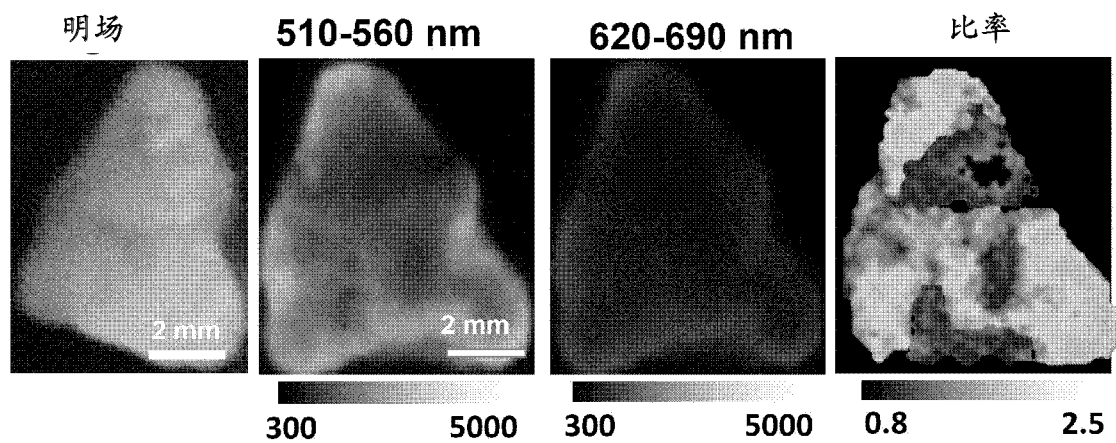


图 19

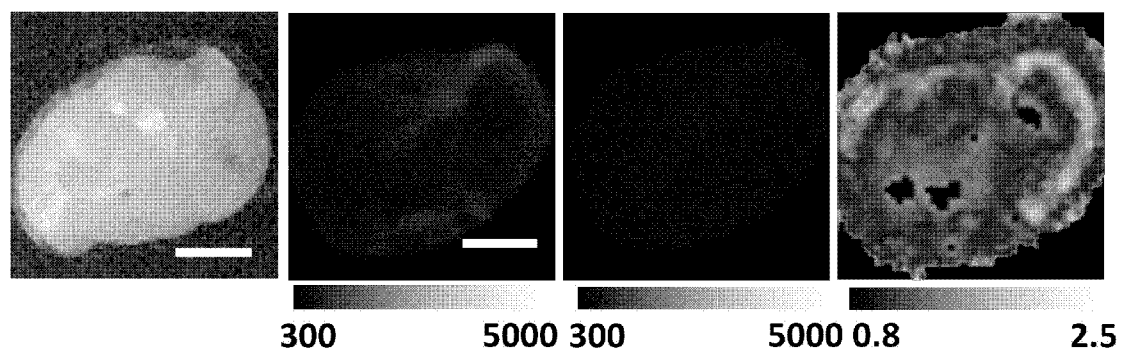


图 20

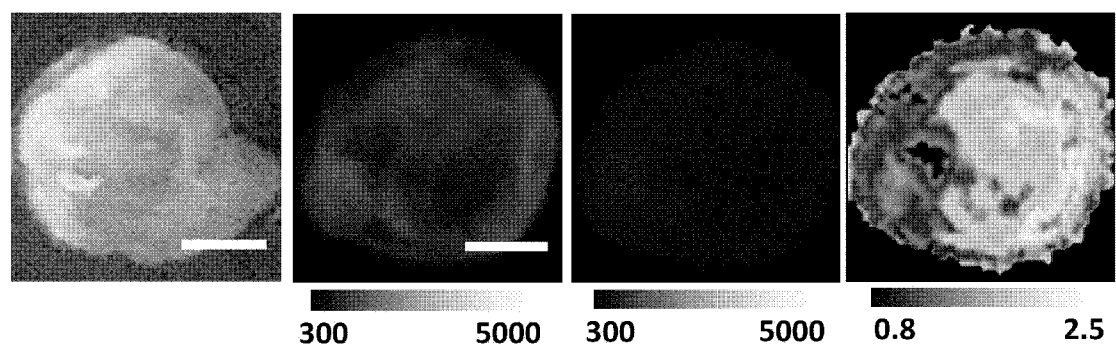


图 21

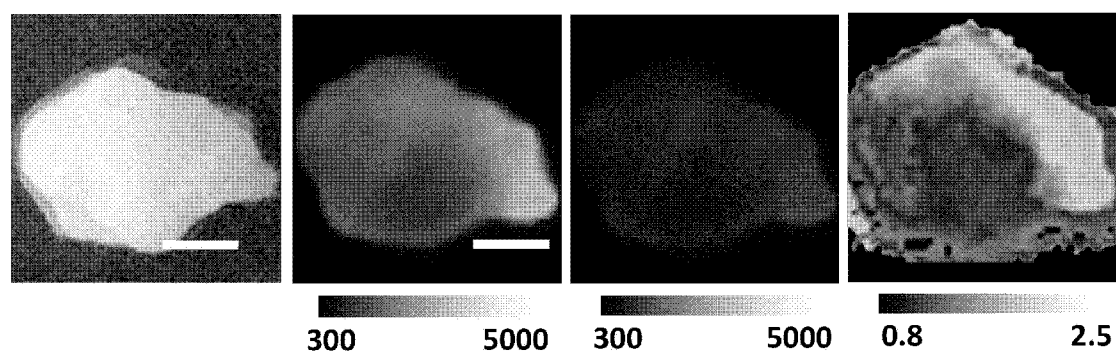


图 22

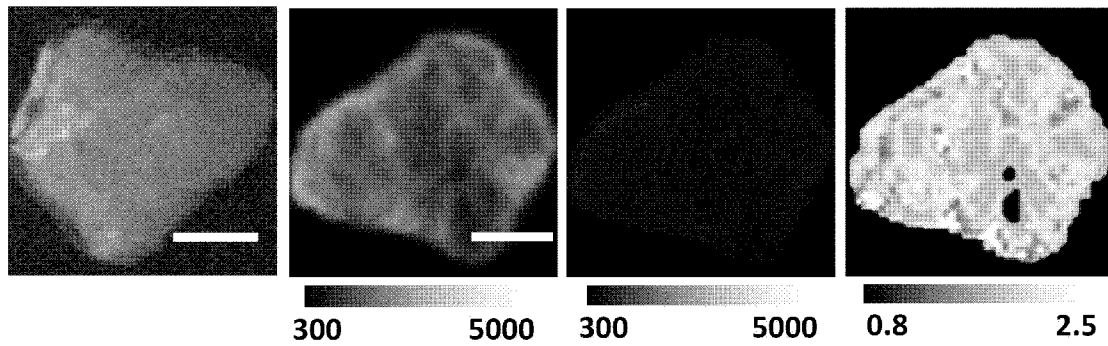


图 23

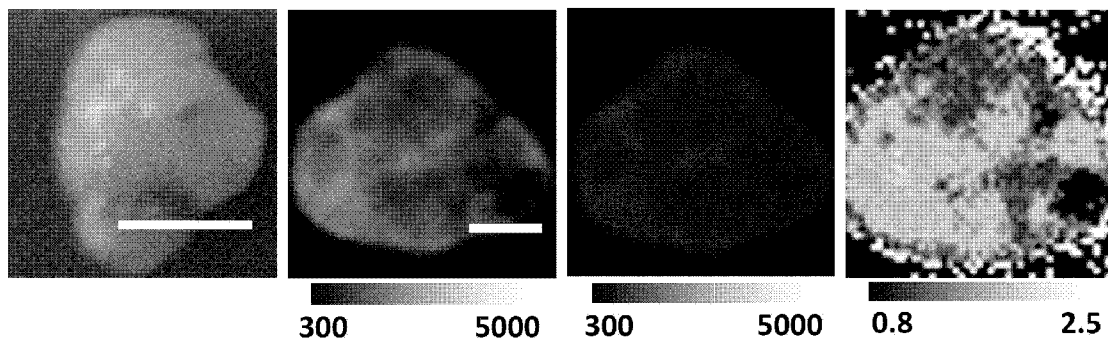


图 24

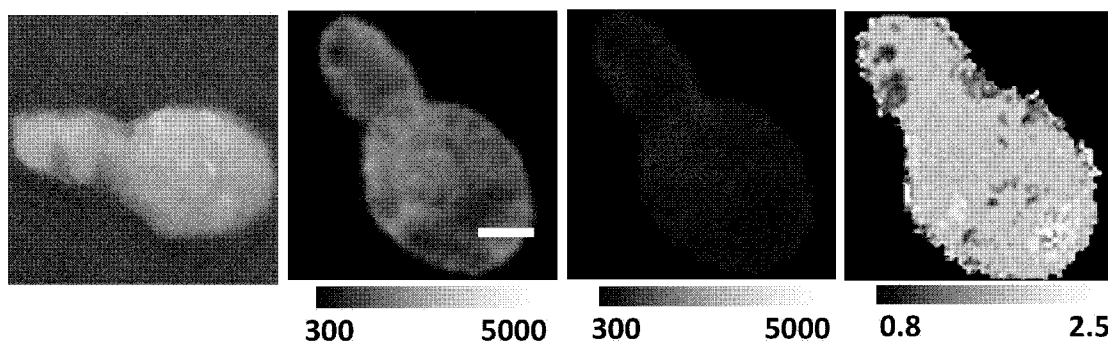


图 25

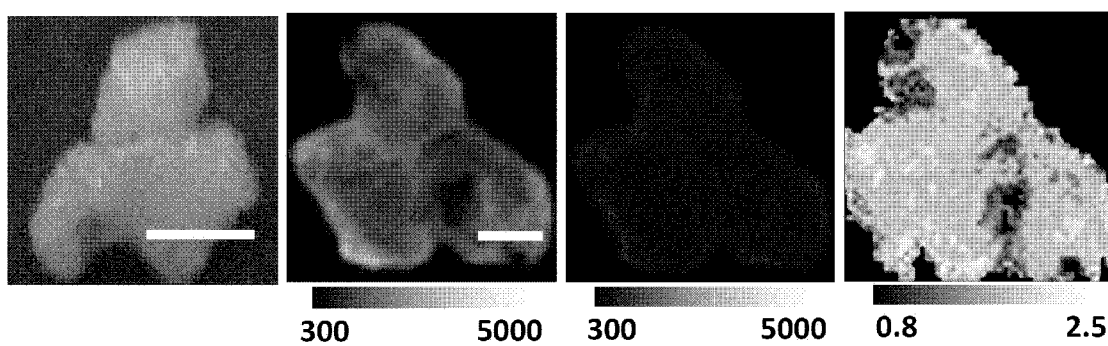


图 26

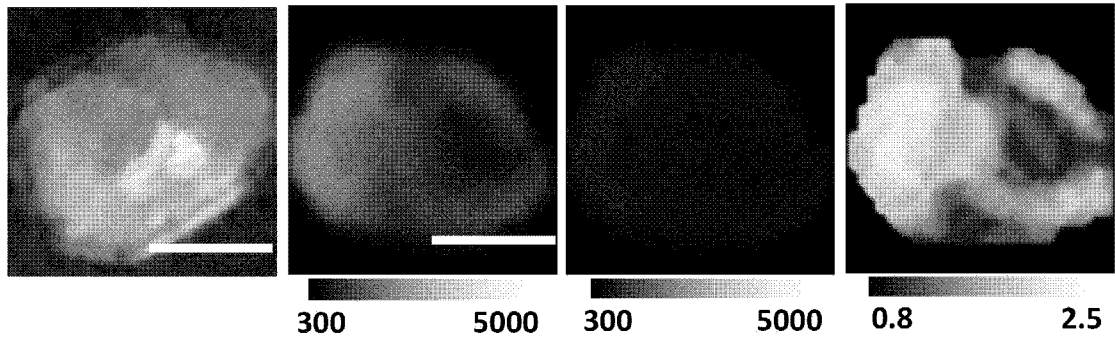


图 27

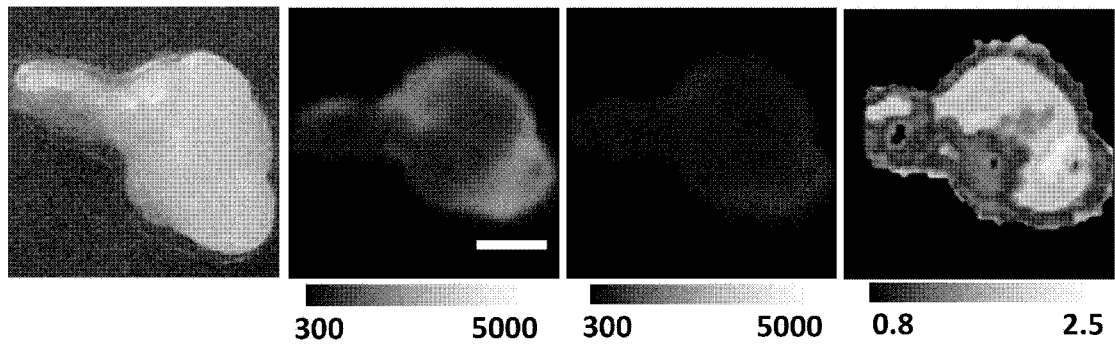


图 28

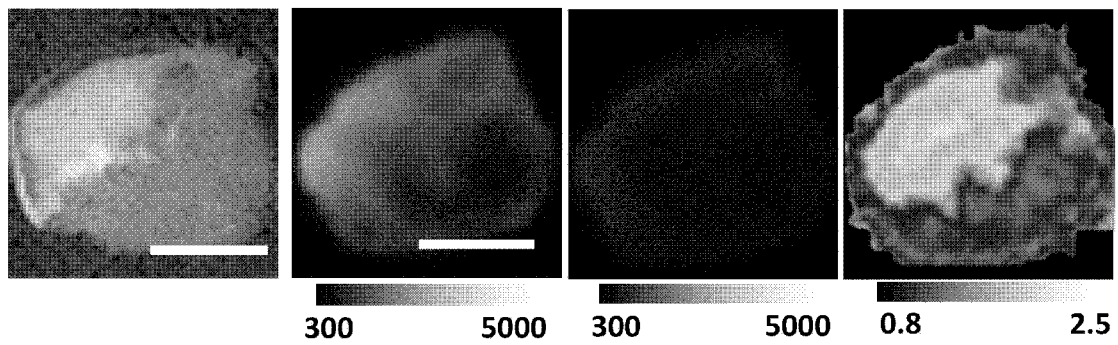


图 29

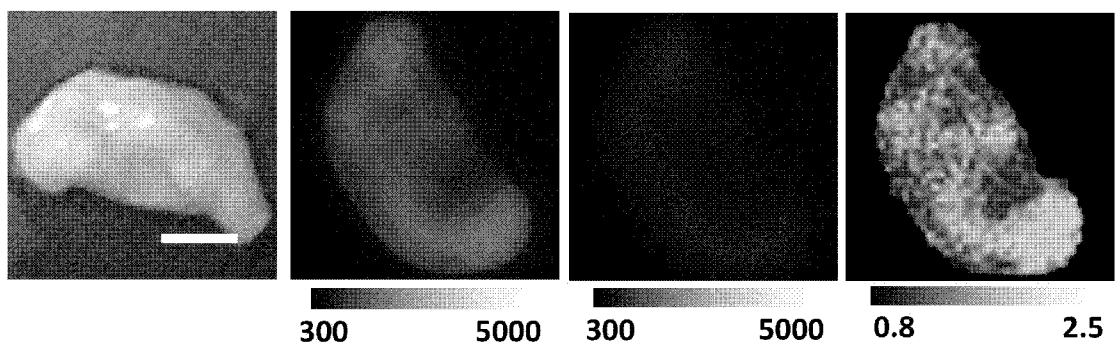


图 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/085051

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07D 209/10(2006.01)i; C07D 271/12(2006.01)i; C07D 311/84(2006.01)i; C07D 417/06(2006.01)i; C07F 9/572(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; G01N 21/31(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; C07F; C09K; 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) CNPAT; CNKI; WPI; EPODOC; CA; STN REGISTRY; STN CAPLUS; 复旦大学; 上海泰辉生物科技有限公司; γ -谷氨酰转肽酶; 检测; 探针; UNIV FUDAN; SHANGHAI TAIHUI BIOTECHNOLOGY CO LTD; gamma-glutamyl transpeptidase; detection; probe. search for structural formula														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>LIU, Jing et al. "Simultaneous Fluorescent Imaging of Cys/Hcy and GSH from Different Emission Channels" <i>Chemical Science</i>, Vol. 5, No. (8), 24 April 2014 (2014-04-24), pp. 3183-3188</td> <td>1-2</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 108424436 A (JILIN UNIVERSITY) 21 August 2018 (2018-08-21) claims 1-8, and description, paragraphs 10-24</td> <td>1-17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104892541 A (INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 09 September 2015 (2015-09-09) claims 1-11</td> <td>1-17</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	LIU, Jing et al. "Simultaneous Fluorescent Imaging of Cys/Hcy and GSH from Different Emission Channels" <i>Chemical Science</i> , Vol. 5, No. (8), 24 April 2014 (2014-04-24), pp. 3183-3188	1-2	X	CN 108424436 A (JILIN UNIVERSITY) 21 August 2018 (2018-08-21) claims 1-8, and description, paragraphs 10-24	1-17	A	CN 104892541 A (INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 09 September 2015 (2015-09-09) claims 1-11	1-17
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	LIU, Jing et al. "Simultaneous Fluorescent Imaging of Cys/Hcy and GSH from Different Emission Channels" <i>Chemical Science</i> , Vol. 5, No. (8), 24 April 2014 (2014-04-24), pp. 3183-3188	1-2												
X	CN 108424436 A (JILIN UNIVERSITY) 21 August 2018 (2018-08-21) claims 1-8, and description, paragraphs 10-24	1-17												
A	CN 104892541 A (INSTITUTE OF CHEMISTRY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 09 September 2015 (2015-09-09) claims 1-11	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 "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 18 January 2020		Date of mailing of the international search report 01 February 2020												
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration 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/CN2019/085051

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.: **12-17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 12-17 relate to a diagnostic method of diseases, and this report is based on the corresponding pharmaceutical use of the compound.
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/CN2019/085051

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	108424436	A	21 August 2018	None	
CN	104892541	A	09 September 2015	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/085051

A. 主题的分类

C07D 209/10(2006.01)i; C07D 271/12(2006.01)i; C07D 311/84(2006.01)i; C07D 417/06(2006.01)i; C07F 9/572(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; G01N 21/31(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; C07F; C09K; 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))

CNPAT; CNKI; WPI; EPODOC; CA; STN REGISTRY; STN CAPLUS; 复旦大学; 上海泰辉生物科技有限公司; γ -谷氨酰转肽酶; 检测; 探针; UNIV FUDAN; SHANGHAI TAIHUI BIOTECHNOLOGY CO LTD; gamma-glutamyl transpeptidase; detection; probe. 结构式检索

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
X	LIU, Jing et al. "Simultaneous fluorescent imaging of Cys/Hcy and GSH from different emission channels" Chemical Science, 第5卷, 第8期, 2014年 4月 24日 (2014 - 04 - 24), 第3183-3188页	1-2
X	CN 108424436 A (吉林大学) 2018年 8月 21日 (2018 - 08 - 21) 权利要求1-8、说明书10-24段	1-17
A	CN 104892541 A (中国科学院化学研究所) 2015年 9月 9日 (2015 - 09 - 09) 权利要求1-11	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

"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

2020年 1月 18日

国际检索报告邮寄日期

2020年 2月 1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

范鑫鑫

电话号码 86-(10)-53962149

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： 12-17
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12-17涉及疾病的诊断方法，本报告是基于该化合物的相应制药用途作出。
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/CN2019/085051

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	108424436	A	2018年 8月 21日	无	
CN	104892541	A	2015年 9月 9日	无	