

(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
2015 年 2 月 5 日 (05.02.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/014092 A1

- (51) 国际专利分类号:
C09K 11/06 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/000332
- (22) 国际申请日: 2014 年 3 月 27 日 (27.03.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310323209.7 2013 年 7 月 29 日 (29.07.2013) CN
- (71) 申请人: 中国科学院大连化学物理研究所 (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号杜伟, Liaoning 116023 (CN)。
- (72) 发明人: 杨凌 (YANG, Ling); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 崔京南 (CUI, Jingnan); 中国辽宁省大连市甘井子区凌

工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。 葛广波 (GE, Guangbo); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 刘兆明 (LIU, Zhaoming); 中国辽宁省大连市沙河口区中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 冯磊 (FENG, Lei); 中国辽宁省大连市甘井子区凌工路 2 号, Liaoning 116024 (CN)。

(74) 代理人: 沈阳晨创科技专利代理有限责任公司 (SHENYANG CHENCHUANG TECHNICAL PATENT AGENT LTD); 中国辽宁省沈阳市浑南新区沈营路 3 号瑞宝国际花苑 2 号楼 1 单元 5-1 室, Liaoning 110013 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,

[见续页]

(54) Title: SPECIFIC FLUORESCENT PROBE SUBSTRATE OF HUMAN CARBOXYLESTERASE SUBTYPE AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种人羧酸酯酶亚型的特异性荧光探针底物及其应用

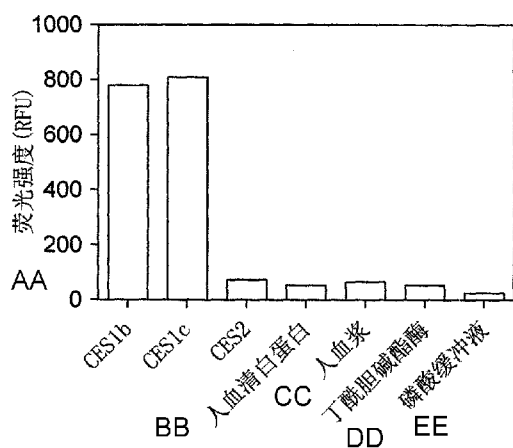


图 5 /Fig.5

AA Fluorescence intensity
BB Human serum albumin
CC Human plasma
DD Butyrylcholinesterase
EE Phosphate buffer solution

(57) Abstract: A specific fluorescent probe substrate of a human carboxylesterase subtype and a use thereof. The specific fluorescent probe substrate is an ester derivative of 2-(2'-carboxyl-3'-methoxyphenyl) benzothiazole (HMBT) compound 2'-carboxyl. The specific fluorescent probe substrate can be used for detecting whether CES1 exists in different biological samples and can be used for quantitative measurement of the activity of the CES1. A process of enzymatic activity measurement is also follows: selecting an ester derivative of an HMBT hydrolysis reaction as a probe reaction, and detecting the activity of CES1 in a biological sample, a cell, a body and a whole organ by detecting the production of a hydrolytic metabolism product in quantitative measurement unit time in a linear reaction interval. The present invention can be used for quantitative evaluation of the enzyme activity of CES1 from different biological samples, and can be used to detect trace CES1 existing in a patient suffering a liver disease (especially an early liver cancer). In addition, by means of the probe reaction, an inhibitor of CES1 can be rapid screened in vitro.

(57) 摘要:

[见续页]



WO 2015/014092 A1



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。

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)。

- (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, 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,

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

一种人羧酸酯酶亚型的特异性荧光探针底物及其应用, 该特异性探针底物是 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基) 苯并噻唑 (HMBT) 类化合物 2'-羟基的酯类衍生物, 其可用于检测不同生物样品中 CES1 的存在与否及其活力的定量测定。酶活测定流程如下: 选择 HMBT 酯类衍生物水解反应为探针反应, 在线性反应区间内通过定量检测单位时间内其水解代谢产物 HMBT 的生成量来测定各生物样品、细胞、在体及整体器官中 CES1 酶的活性。本发明可用于不同来源生物样本中 CES1 酶活的定量评估, 以及用于检测肝脏疾病 (尤其是早期肝癌) 患者血中存在的微量 CES1。此外, 借助该探针反应还可用于体外快速筛选 CES1 的抑制剂。

说明书

一种人羧酸酯酶亚型的特异性荧光探针底物及其应用

技术领域

本发明属于医药技术领域，具体涉及一种人羧酸酯酶 1（CES1）的特异性荧光探针底物及其应用。

背景技术

羧酸酯酶（Carboxylesterase, CES）是机体内重要的一相水解代谢酶，其催化酯类化合物发生酯键断裂，并生成具有极性基团（羟基或羧基）的两个产物，后者可进一步被体内 UGTs 等其他代谢酶催化代谢，使其更易排出体外。羧酸酯酶不仅参与脂肪酸等内源性物质的代谢，还是多种外源性物质，如伊立替康（CPT-11）、奥司他韦（达菲）等酯类结构前体药物以及结构中含有酯键的其他化合物的主要代谢酶【J Pharmacol Exp Ther. 2006 Dec;319(3):1477-84. & J Pharmacol Exp Ther. 2006 Dec;319(3):1467-76.】。许多前体药物都需要经羧酸酯酶催化途径进行活化或代谢消除。

人体内介导药物代谢的羧酸酯酶目前主要有 2 个家族：CES1 和 CES2，其中 CES1 又可继续被分为 CES1b 和 CES1c 两种亚型【Mamm Genome. 2010 Oct;21(9-10):427-41.】。CES1 和 CES2 具有不同的组织分布特异性及底物选择性，肝脏中主要表达 CES1，同时表达少量 CES2，而小肠中则以 CES2 亚型为主，只有少量的 CES1 分布【Life Sci. 2007, 81(11): 924-932】。近年来有学者研究发现肝癌患者血浆中的 CES1 含量会显著升高【Proteomics. 2009 Aug;9(16):3989-99】，血

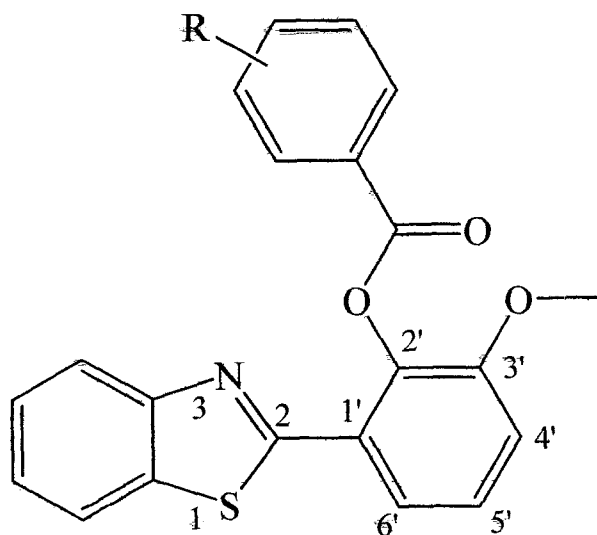
浆中 CES1 有望成为一个临床肝癌诊断的潜在标记物。

本发明提供了一类 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT)类化合物 2'-羟基的酯类衍生物及其作为 CES1 酶探针底物的应用, 其经羧酸酯酶 CES1 水解后可生成荧光发射波谱不同于原型的水解产物。该酶促反应具有选择性高、代谢产物易检测、酶活及抑制活性评价快速省时等特点。

发明内容

本发明的目的在于提供一种人羧酸酯酶 1 (CES1) 的特异性荧光探针底物及其应用, 该底物原型和水解产物的荧光发射波长具有明显差异, 且产物更易检测。利用该探针反应可对多种生物体系中 CES1 的分布和功能进行定量评价。

本发明提供了一种人羧酸酯酶 1 的特异性荧光探针底物, 该底物的酯键可被 CES1 特异性水解为相应水解产物并显示与底物不同的发射波谱; 该底物为 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT)类化合物 2'-羟基的酯类衍生物, 其结构通式如式 (1) 所示, 其中, R 为-H 或 -CH₃、-CF₃、-C₂H₅、-C₃H₆ 等烷基或-OCH₃、-OC₂H₅ 中的一种, 或-Br、-Cl、-F 等卤素取代基中的一种。R 基团在苯环的邻、间或对位都可以。



式 (1)

当R为-H时,该底物为2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯。

本发明还提供了人羧酸酯酶1的特异性荧光探针底物的应用,该底物作为CES1的特异性底物,发生水解反应,通过定量检测单位时间内水解产物的生成量来测定酶或细胞制备液等生物样品及细胞中CES1的活性;具体测定方法为:

——体系中以2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT)类化合物2'-羟基的酯类衍生物作为特异性探针底物;底物浓度选择 $1/10 \sim 10 K_m$;单点测定时底物浓度优选 K_m 。

——在PBS或Tris-HCl等常用缓冲液中,反应温度为 20°C 至 60°C 之间,优选 37°C 为最优反应时间;孵育体系pH介于5.5~10.5之间,优选pH7.4为最优反应pH值;

——反应时间为5~120分钟,在确保以上底物相应的水解产物达

到定量限且底物转化率不超过 20%时终止反应；

——测定单位时间内水解产物生成量作为羧酸酯酶 CES1 活性的评价指标。

本发明提供的人羧酸酯酶 1 的特异性荧光探针底物的应用，所述底物消除率或水解产物的生成率应介于 0.1%~20%之间。

本发明提供的人羧酸酯酶 1 的特异性荧光探针底物的应用，探针底物及其水解产物均具有荧光属性，可采用荧光检测器实现产物及底物的快速灵敏检测；荧光检测条件为：激发波长 304 nm，在 450~560 nm 进行荧光发射谱的检测。

本发明提供的人羧酸酯酶 1 的特异性荧光探针底物的应用，该特异性探针底物及相应 CES1 活性检测过程不会受生物体系基质及杂质的干扰，可用于各种生物体系中 CES1 酶活的定量测定。

本发明提供的人羧酸酯酶 1 的特异性荧光探针底物的应用，该特异性探针底物及其水解反应还可用于人羧酸酯酶 CES1 抑制剂的快速筛选及抑制能力的定量评价。

本发明提供了所述特异性荧光探针底物的应用，该特异性探针底物用于重组羧酸酯酶、人及动物组织制备液及各类组织细胞中 CES1 酶活的定量测定，以及利用该探针反应快速筛选 CES1 酶的抑制剂。

采用重组羧酸酯酶 CES1 单酶，肝微粒体孵育体系进行考察，通过相关性分析，特异性抑制实验，重组单酶代谢反应，以及酶反应动力学几方面的证据，证明 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT)类化合物 2'-羟基的酯类衍生物可特异性的经羧酸酯酶 CES1 代谢(如

图 5-图 8 所示), 生成 C-2' 位酯键断裂的水解产物。进一步采用各种哺乳动物的新鲜提取的肝细胞、原代培养肝细胞、肝切片、肝灌流等代谢评价体系进行考察, 发现该代谢反应具有非常良好的特异性。

作为高特异性的羧酸酯酶 CES1 的荧光探针底物, 该化合物可以用来检测羧酸酯酶 CES1 的活性, 尤其适合用于对细菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞以及酵母菌克隆表达体系生产的羧酸酯酶 CES1 重组酶的酶活测定, 以及多种哺乳动物组织器官来源的组织微粒体、S-9 等制备物中 CES1 的活性标定。

选用本发明所述羧酸酯酶 CES1 的特异性探针底物检测羧酸酯酶 CES1 酶体外活性具有以下突出优势:

(1) 高特异性: 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT)类化合物 2'-羟基的酯类衍生物可被羧酸酯酶 CES1 高特异性地代谢成一个代谢产物, 即 C-2' 位酯键断裂的水解产物。

(2) 廉价易得: 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT)类化合物 2'-羟基的酯类衍生物及其水解产物均可经化学合成获得, 合成工艺简单易行。

(3) 高灵敏度: 具有 HMBT 母核结构的化合物均具有良好的荧光发射光谱特性 (430~650 nm), 该底物及其水解代谢产物具有不同的荧光发射光谱特征, 能较好的进行区分检测, 同时可经比率法通过绘制标准曲线进行定量测定。

附图说明

图 1. 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT)类化合物 2'-羟基

的酯类衍生物的结构通式；

图 2. 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图；

图 3 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯的 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱图；

图 4 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯的高分辨质谱；

图 5 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯的人重组单酶筛选试验结果；

图 6 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基对甲基苯甲酰酯的人重组单酶筛选试验结果；

图 7 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基对甲氧基苯甲酰酯的人重组单酶筛选试验结果；

图 8 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基对溴苯甲酰酯的人重组单酶筛选试验结果；

图 9 2'-羟基苯甲酰酯化取代的 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT)脱苯甲酰代谢产物的荧光发射强度（在 304 nm 进行激发）随羧酸酯酶 CES1b 和 CES1c 两种亚型蛋白浓度的增大而增加；

图 10 脱苯甲酰水解代谢产物的生成量随孵育时间变化的线性拟合；

图 11 2'-羟基苯甲酰酯化取代的 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT)被 CES1 催化水解的代谢通路；

图 12 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯的合成步骤。

具体实施方式

下面的实施例将对本发明予以进一步的说明,但并不因此而限制本发明。

实施例 1. 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯的化学合成

(1) 向 10 mL 含有 0.5 mmol 的 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT)和 0.625 mmol 三乙胺的四氢呋喃溶液中, 缓慢滴加 0.6 mmol 的苯甲酰氯(溶于 5mL 的四氢呋喃中), 控制温度在 0℃;

(2) 混匀 1 h 后, 加热反应溶液至室温, 过夜反应(见图 12);

(3) 反应液经过减压除去溶剂, 残留的固体采用硅胶色谱法进行纯化, 采用乙酸乙酯-正己烷(1:3 v/v)进行洗脱, 得 113 mg 白色固体粉末状纯品;

(4) 采用高分辨质谱和核磁进行化合物结构的表征(见图 2-图 4)。

实施例 2. 重组表达的人单酶中的选择性

(1) 预先准备 99 μ l 代谢反应体系, 包括 pH 7.4 的 PBS 缓冲液(10 mM)、重组表达的人 CES1b (5 μ g/ml) /CES1c (5 μ g/ml) /血清白蛋白 (500 μ g/ml) /血浆 (1%) /丁酰胆碱酯酶 (25U/L) /磷酸缓冲液, 于 37℃ 条件下震荡预孵 10 分钟;

(2) 向反应体系中加入 1 μ l 终浓度为 25 μ M 的 2-(2'-羟基-3'-

甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯/对甲基苯甲酰酯/对甲氧基苯甲酰酯/对溴苯甲酰酯起始反应;

(3) 30 分钟后, 加入 100 μ l 冰乙腈, 剧烈震荡后, 终止反应;

(4) 进行荧光检测 ($E_x=304$ nm, $E_m=490$ nm); 计算各体系中荧光强度 (见图 5-图 8);

实施例 3. 重组单酶中 CES1b 或 CES1c 的线性蛋白浓度

(1) 预先准备 99 μ l CES1 代谢反应体系, 包括 pH 7.4 的 PBS 缓冲液 (10 mM)、重组人 CES1b 或 1c (0-100 μ g/ml), 于 37°C 条件下震荡预孵 10 分钟;

(2) 向反应体系中加入 1 μ l 终浓度为 25 μ M 的 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯起始反应;

(3) 30 分钟后, 加入 100 μ l 冰乙腈, 剧烈震荡后, 终止反应;

(4) 进行荧光检测 ($E_x=304$ nm, $E_m=490$ nm); 计算重组人 CES1b 或 1c 酶的线性蛋白浓度 (见图 9)。

实施例 4. 重组单酶 CES1b 或 CES1c 中的线性孵育时间

(1) 预先准备 99 μ l CES1 代谢反应体系, 包括 pH 7.4 的 PBS 缓冲液 (10 mM)、重组人 CES1b 或 1c (5/10/15/20 μ g/ml), 于 37°C 条件下震荡预孵 10 分钟;

(2) 向反应体系中加入 1 μ l 终浓度为 25 μ M 的 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯起始反应;

(3) 每隔 5 分钟进行一次荧光扫描检测 ($E_x=304$ nm, $E_m=490$ nm); 计算重组人 CES1b 或 1c 酶的线性反应时间 (见图 10)。

实施例 5. 体外定量测定重组单酶中 CES1b 或 CES1c 的酶活

(1) 预先准备 99 μ l CES1 代谢反应体系, 包括 pH 7.4 的 PBS 缓冲液 (10 mM)、重组人 CES1b 或 1c (2 μ g/ml), 于 37°C 条件下震荡预孵 10 分钟;

(2) 向反应体系中加入 1 μ l 终浓度为 25 μ M 的 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯起始反应;

(3) 30 分钟后, 加入 100 μ l 冰乙腈, 剧烈震荡后, 终止反应;

(4) 进行荧光检测 ($E_x=304$ nm, $E_m=490$ nm); 计算重组人 CES1b 或 1c 酶的最大催化速率为 1401 ± 350 nmol/min/mg 和 2451 ± 135 nmol/min/mg。

实施例 6. 体外定量测定人肠微粒体中 CES1 的酶活

(1) 预先准备 99 μ l 人小肠微粒体代谢反应体系, 包括 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mM)、人小肠微粒体 (20 μ g/ml), 于 37°C 条件下震荡预孵 10 分钟;

(2) 向反应体系中加入 1 μ l 终浓度为 25 μ M 的 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯起始反应;

(3) 30 分钟后, 加入 100 μ l 冰乙腈, 剧烈震荡后, 终止反应;

(4) 进行荧光检测 ($E_x=304$ nm, $E_m=490$ nm); 计算人小肠中对该探针化合物的最大催化速率为 442 ± 43 nmol/min/mg。

实施例 7. 定量测定人肺腺癌 A549 细胞中 CES1 的活性

(1) 人肺腺癌 A549 细胞系培养于盖玻片上, 采用的培养基是 DMEM 培养基 (含 10% 小牛血清) 以及 100 μ g/ml 的双抗, 培养环境

为 37℃ 的 5% 二氧化碳培养箱中。

(2) 使用之前, 贴壁细胞采用不含血清的 DMEM 培养基冲洗 3 次, 加入终浓度为 10 μ M 的 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯, 于 37℃ 温孵 30 分钟。

(3) 之后, 采用 PBS 缓冲液冲洗 3 次。在激光共聚焦显微镜下观察细胞, 通过荧光分布位置与强度来显示细胞中 CES1 的分布及其相对含量多少。

实施例 8. 定量测定人血中 CES1 含量

(1) 向 380 μ l 的经 PBS 稀释的 10% 正常人血浆中加入 CES1c 重组表达单酶 (100 μ g/mL) 20 μ l, 于 37℃ 条件下震荡预孵 10 分钟;

(2) 向反应体系中加入 1 μ l 终浓度为 25 μ M 的 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯起始反应;

(3) 30 分钟后, 加入 400 μ l 冰乙腈, 剧烈震荡后, 终止反应;

(4) 进行荧光检测 (Ex=304 nm, Em=490 nm); 计算信噪比 S/N>10, 血浆中 CES1 的定量限为 50 μ g/mL。

实施例 9. 体外快速筛选 CES1 的抑制剂

(1) CES1b/CES1c 重组表达单酶 (5 μ g/mL) 196 μ l, 于 37℃ 条件下震荡预孵 10 分钟;

(2) 向反应体系中加入 2 μ l 中药 95% 乙醇提取液, 继续孵育 10 分钟;

(3) 加入 2 μ l 的终浓度为 10 μ M 的 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT) 2'-羟基苯甲酰酯起始反应;

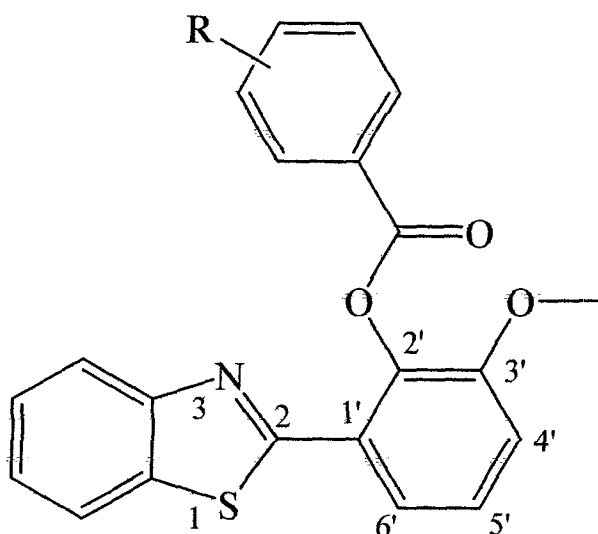
(3) 30 分钟后, 加入 200 μ l 冰乙腈, 剧烈震荡后, 终止反应;

(4) 进行荧光检测 ($E_x=304$ nm, $E_m=490$ nm); 计算荧光强度, 根据中药提取液组 490 nm 下的荧光强度与 DMSO 组的荧光强度比值计算 CES1 的抑制强度。

权利要求书

1、一种人羧酸酯酶 1 的特异性荧光探针底物，其特征在于：该底物的酯键可被 CES1 特异性水解为相应水解产物并显示与底物不同的发射波谱；

该底物为 2-(2'-羟基-3'-甲氧苯基)苯并噻唑(HMBT)类化合物 2'-羟基的酯类衍生物，其结构通式如式 (1) 所示，其中，R 为-H、-CH₃、-CF₃、-C₂H₅、-C₃H₆、-OCH₃、-OC₂H₅、-Br、-Cl、-F 取代基中的一种。



式 (1)

2、权利要求 1 所述人羧酸酯酶 1 的特异性荧光探针底物的应用，其特征在于：该底物作为 CES1 的特异性底物，发生水解反应，通过定量检测单位时间内的水解产物的生成量来测定不同酶源中 CES1 的活性。

3、按照权利要求 2 所述人羧酸酯酶 1 的特异性荧光探针底物的

应用，其特征在于：所述的酶源为重组表达的 CES1 单酶、人或动物组织制备液、或各类组织细胞生物体系。

4、按照权利要求 2 所述人羧酸酯酶 1 的特异性荧光探针底物的应用，其特征在于：所述水解反应体系为磷酸或 Tris-HCl 缓冲液，探针底物的浓度介于 $1/10 \sim 10 K_m$ 之间；孵育体系 pH 介于 5.5~10.5 之间；反应温度介于 20~60℃ 之间。

5、按照权利要求 2 所述人羧酸酯酶 1 的特异性荧光探针底物的应用，其特征在于：所述水解产物的生成率应介于 0.1%~20% 之间。

6、按照权利要求 2 所述人羧酸酯酶 1 的特异性荧光探针底物的应用，其特征在于：探针底物及其水解产物均具有荧光属性，可采用荧光检测器实现产物及底物的快速灵敏检测；荧光检测条件为：激发波长 304 nm，在 450~560 nm 进行荧光发射谱的检测。

7、按照权利要求 2 所述人羧酸酯酶 1 的特异性荧光探针底物的应用，其特征在于：该特异性探针底物及其水解反应还可用于人羧酸酯酶 CES1 抑制剂的快速筛选及抑制能力的定量评价。

说明书附图

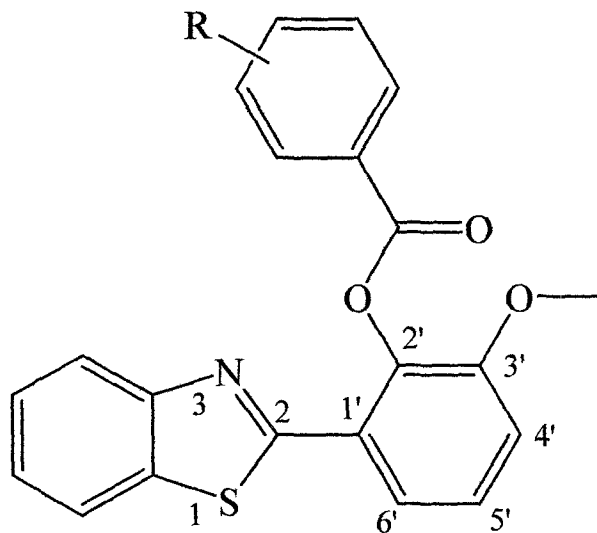
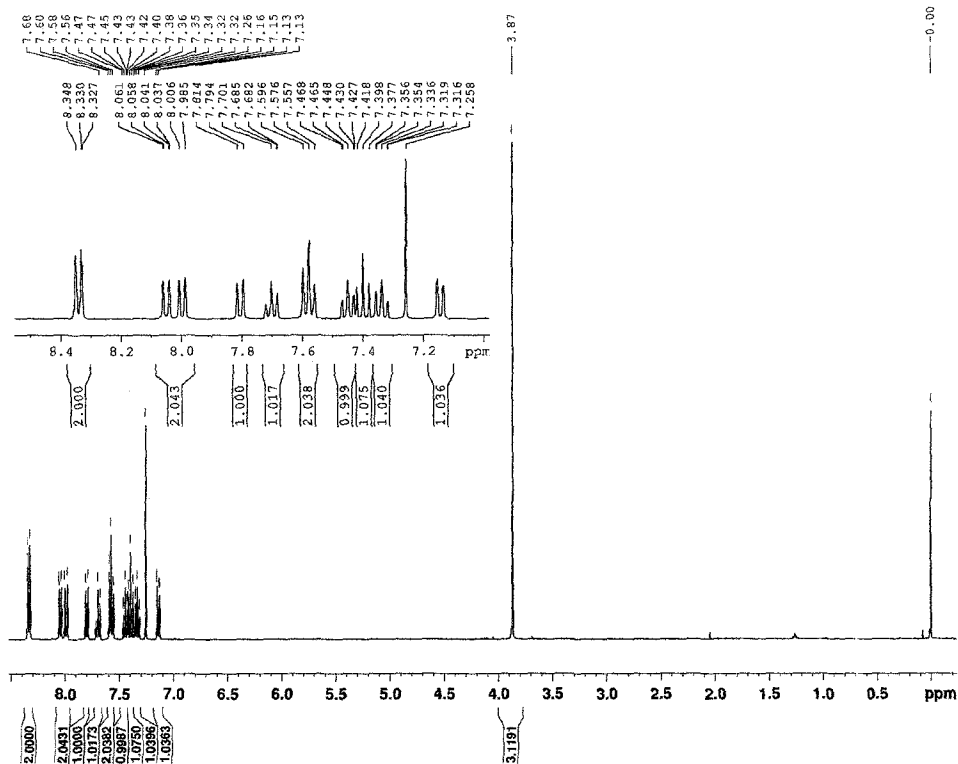


图 1



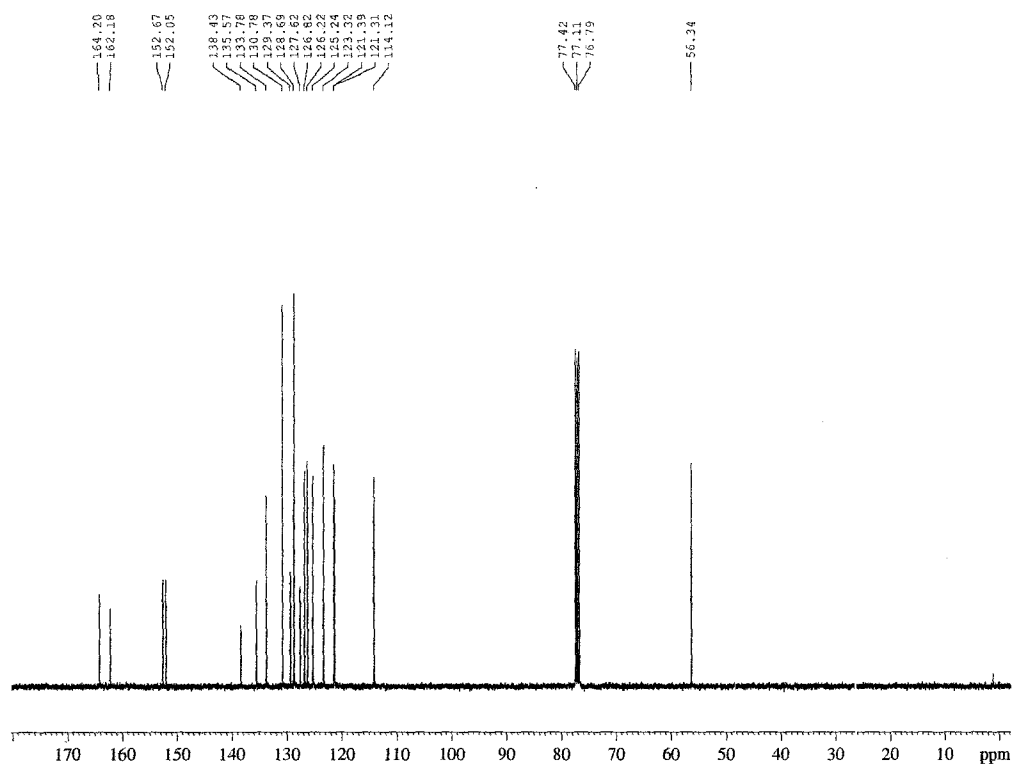


图 3

FL-M361_130412093206 #11-18 RT: 0.08-0.13 AV: 8 NL: 2.50E7
T: FTMS + p ES! Full ms [150.00-800.00]

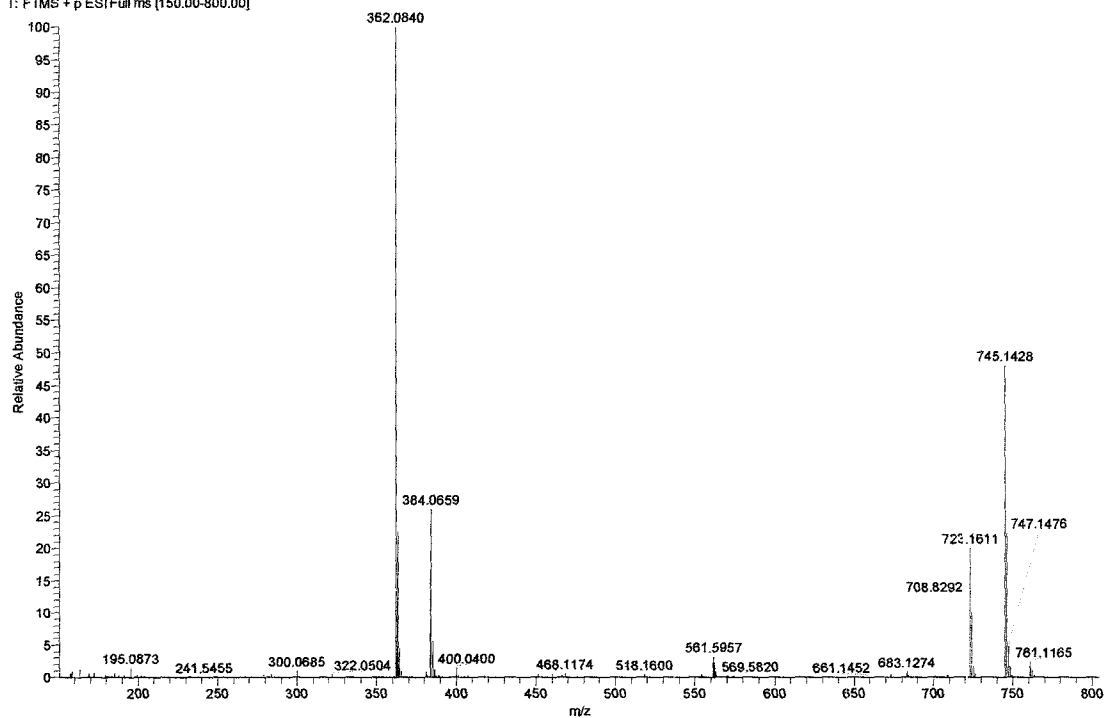


图 4

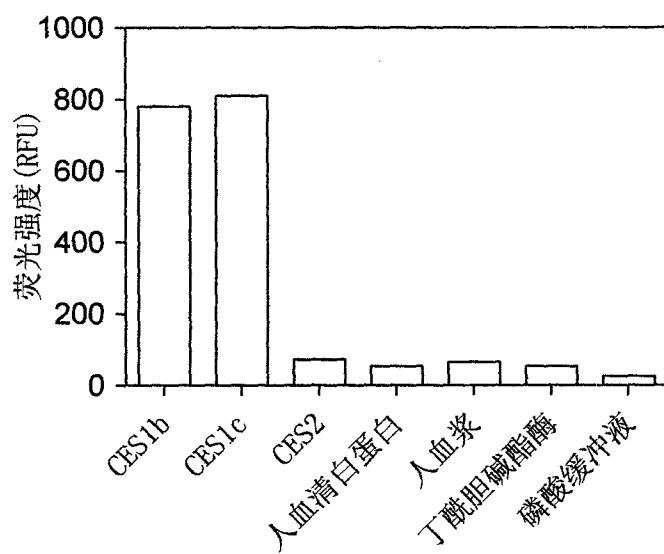


图 5

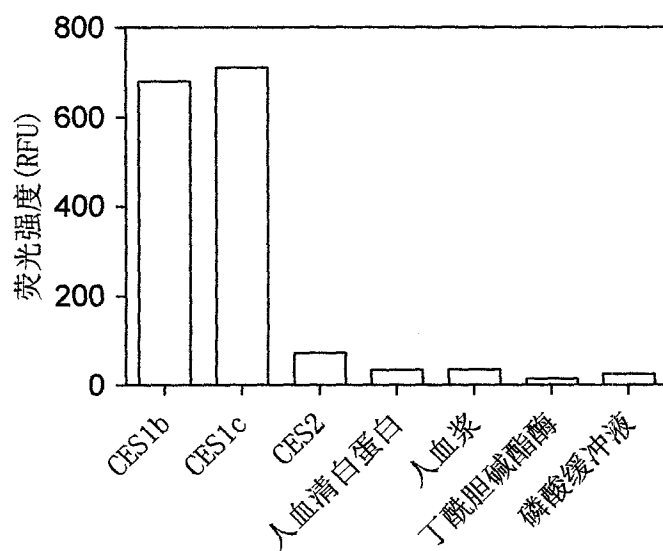


图 6

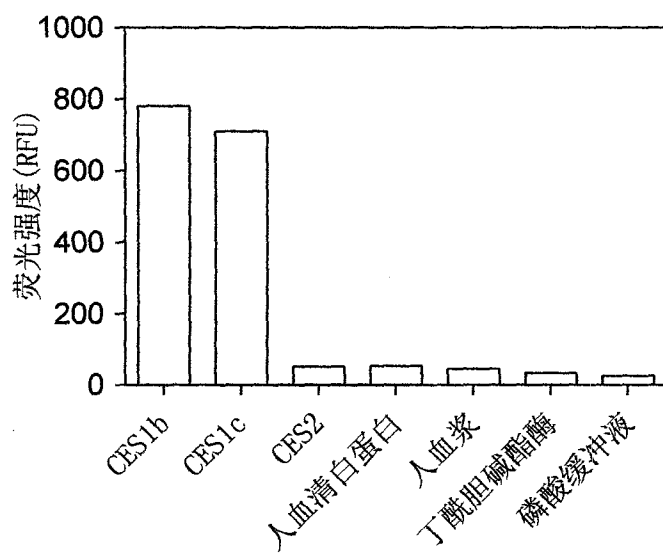


图 7

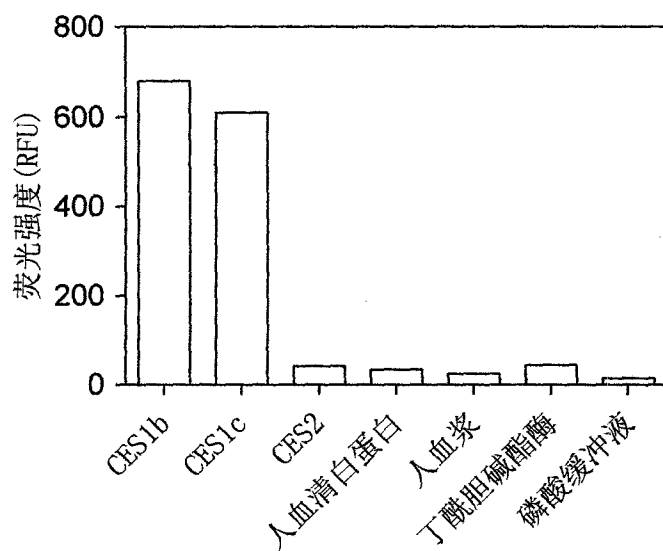


图 8

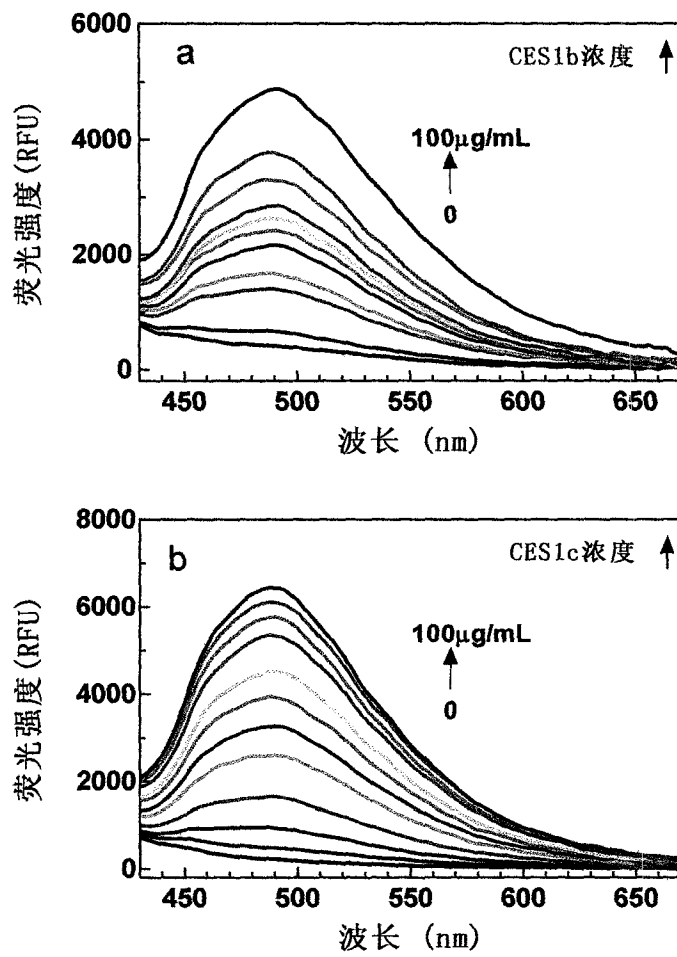


图 9

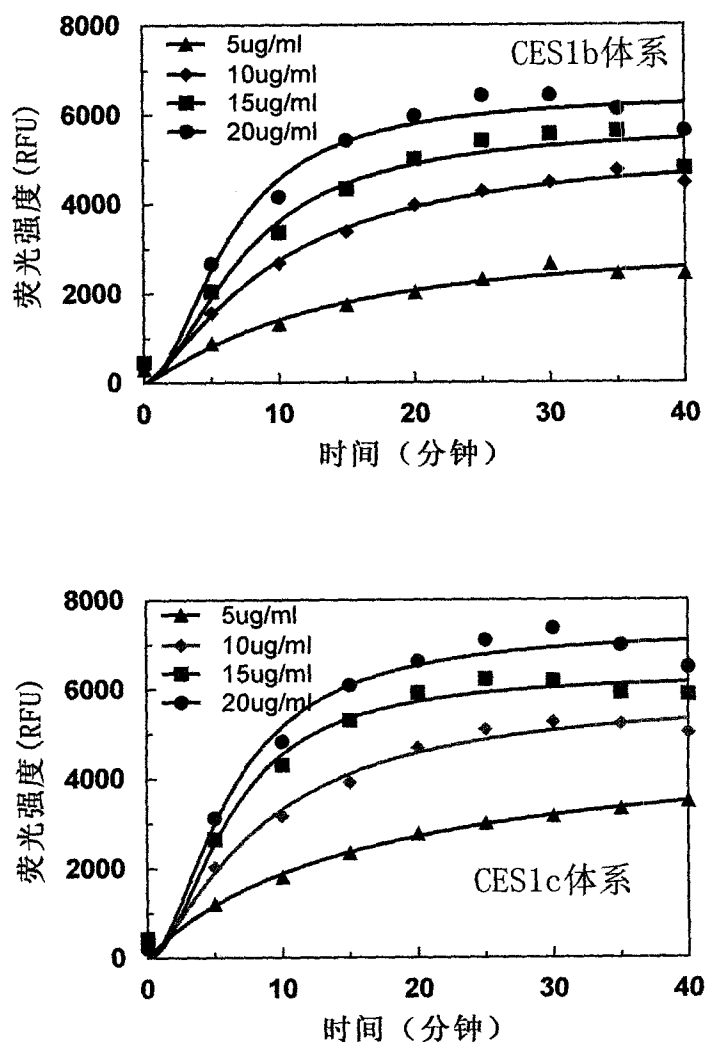


图 10

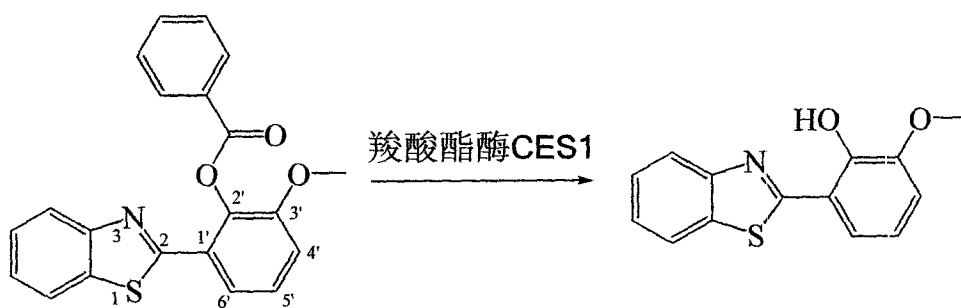


图 11

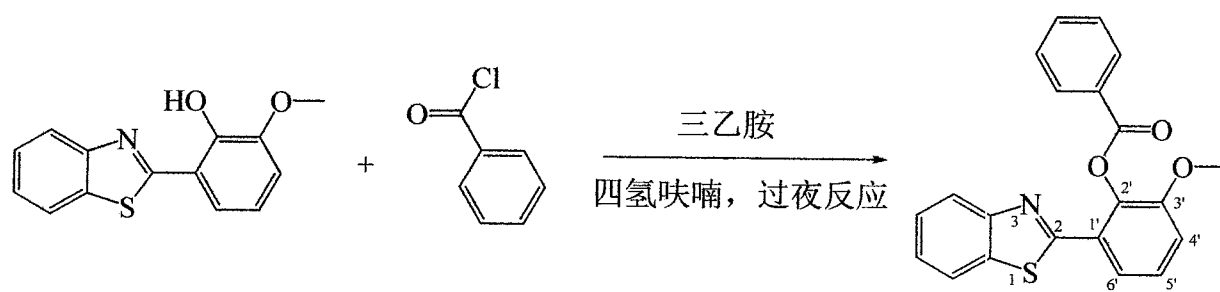


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/000332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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)

C09K 11/06; C07D 277/66; C07C 69/79; C07C 69/773

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, STN(Registry, CAPlus): PROBE, DETECT+, SENSE, CARBOXYLESTERASE, CES, HMBT, BENZOTHAZOLE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHENG Xu et al, A highly selective fluorescent probe for fast detection of hydrogen sulfide in aqueous solution and living cells, Chem. Commun., 14 September 2012 (14.09.2012), vol. 48, page 10872, left column, the first paragraph, the third paragraph and the last paragraph to right column, the third paragraph, figure. 1, scheme 2	1-7
PX	HUANG Qian et al, A ratiometric fluorescent probe for hydrogen sulfide based on an excited-state intramolecular proton transfer mechanism, Dyes and Pigments, 06 Aug. 2013(06.08.2013) vol. 99, page 873 left column, the third paragraph to right column, the third paragraph, figure 1 and 2, scheme 1	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&"document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 21 May 2014 (21.05.2014)	Date of mailing of the international search report 10 June 2014 (10.06.2014)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Dan Telephone No. (86-10) 62086317

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2014/000332

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102788776 A (CHINESE ACAD SCI CHANGCHUN INST APPL CHECHANGCHUN APPLIED CHEMISTRY) 21 November 2012 (21.11.2012) the whole document	1-7
A	WO 2009029321 A1 (MUSCFoundation for Research Development) 05 March 2009 (05.03.2009) the whole document	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2014/000332

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102788776 A	21.11.2012	None	
WO 2009029321 A1	05.03.2009	WO 2009029321 A3	30.12.2009
		US 2011020801 A1	27.01.2011
		EP 2171096 A2	07.04.2010
		IN 201000138 P4	02.07.2010
		WO 2009029321 A2	05.03.2009
		JP 2010528666 A	26.08.2010

A. 主题的分类 C09K11/06(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) C09K11/06, C07D277/66, C07C69/79, C07C69/773 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, STN(Registry, CAplus): 探针, 检测, 苯并噻唑, 羧酸酯酶, PROBE, DETECT +, SENSE, CARBOXYLESTERASE, CES, HMBT, BENZOTHAZOLE		
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	ZHENG Xu et al. "A highly selective fluorescent probe for fast detection of hydrogen sulfide in aqueous solution and living cells" Chem. Commun., 第第48卷期, 2012年 9月 14日 (2012 - 09 - 14), 10872页左栏第1段, 第3段, 最后1段-右栏第1段第3段, Fig.1, Scheme 2	1-7
PX	HUANG Qian et al. "A ratiometric fluorescent probe for hydrogen sulfide based on an excited-state intramolecular proton transfer mechanism" Dyes and Pigments, 第第99卷期, 2013年 8月 06日 (2013 - 08 - 06), 873页左栏第3段-右栏第3段, Fig.1-2, Scheme 1	1-7
A	CN 102788776A (中国科学院长春应用化学研究所) 2012年 11月 21日 (2012 - 11 - 21) 全文	1-7
A	WO 2009029321A1 (MUSCFUNDATION FOR RESEARCH DEVELOPMENT) 2009年 3月 05日 (2009 - 03 - 05) 全文	1-7
☐ 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 2014年 5月 21日		国际检索报告邮寄日期 2014年 6月 10日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国 传真号 (86-10)62019451		授权官员 张丹 电话号码 (86-10)62086317

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/000332

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 102788776A	2012年 11月 21日	无	
WO 2009029321A1	2009年 3月 05日	WO 2009029321A3	2009年 12月 30日
		US 2011020801A1	2011年 1月 27日
		EP 217096A2	2010年 4月 07日
		IN 201000138P4	2010年 7月 02日
		WO 2009029321A2	2009年 3月 05日
		JP 2010528666A	2010年 8月 26日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)