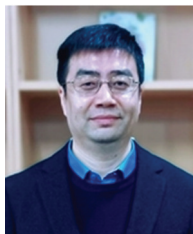


• 基础研究 •



专家介绍:

王磊,河北医科大学教授、博士研究生导师。本科及硕士毕业于中国药科大学药物化学专业,博士毕业于美国 Duquesne University 药物化学专业。现任河北医科大学药学院副院长,兼任药理学国家级实验教学示范中心主任,河北省药学会药物化学专业委员会主任委员,河北医科大学药物化学学科/专业负责人。入选河北省“三三三人才工程”。主要从事药物分子设计与合成、药物作用的分子机制和新药研究。主持国家自然科学基金、教育部科学技术研究重点项目、河北省科技厅重点研发计划项目、河北省自然科学基金重点项目

等。在 European Journal of Medicinal Chemistry, Journal of Medicinal Chemistry, Organic Letters, Biomaterials 等期刊发表 SCI 论文十余篇。

## 新型叶酸受体靶向荧光探针的设计及结构优化

张一宁<sup>1</sup>, 罗子俊<sup>1</sup>, 郭利霄<sup>1</sup>, 郭炳豪<sup>1</sup>, 刘玉衡<sup>2</sup>, 王磊<sup>1\*</sup>

(1.河北医科大学药学院药物化学教研室,河北石家庄 050017; 2.河北医科大学药学院医用化学教研室,河北石家庄 050017)

**[摘要]** 目的 筛选多种具有高亲和力的小分子叶酸类似物作为靶向配体以及多种不同的连接基团,总结叶酸受体靶向荧光探针的合理分子设计,开发出一种优秀的新型叶酸受体靶向荧光探针。方法 通过多种化学合成反应得到目标荧光探针。流式细胞术探究荧光探针对接酸受体的选择性,荧光显微成像实验评价荧光探针对接肿瘤细胞的靶向成像能力。结果 得到了目标荧光探针产物 8 个,其中荧光探针 GT-FITC-1 能够特异性结合叶酸受体并进入细胞实现荧光成像。引入谷氨酸侧链会降低细胞摄取的相对平均荧光强度,GT-FITC-2 相较于 GT-FITC-1 下降了约 17%,GT-FITC-5 相较于 GT-FITC-4 下降了约 15%,含有刚性苯环连接基团的荧光探针 GT-FITC-7 和 GT-FITC-8 相较于 GT-FITC-4 均增加了 2~3 倍,并且 GT-FITC-8 表现出最大的相对平均荧光强度。结论 本研究设计合成的一系列荧光探针均表现出对接酸受体的高度特异性,发现了对叶酸受体具有优异亲和力的荧光探针 GT-FITC-8。

**[关键词]** 分子探针;荧光素;叶酸受体 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2024.10.002

**[中图分类号]** R914.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2024)10-1129-10

### Design and structural optimization of novel folate receptor-targeted fluorescent probe

ZHANG Yi-ning<sup>1</sup>, LUO Zi-jun<sup>1</sup>, GUO Li-xiao<sup>1</sup>, GUO Bing-hao<sup>1</sup>,  
LIU Yu-heng<sup>2</sup>, WANG Lei<sup>1\*</sup>

(1. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Medical Chemistry, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**[Abstract]** **Objective** To screen a variety of high-affinity small molecule folate analogs as targeting ligands and different linkers, to summarize the rational molecular design of folate

[收稿日期] 2024-07-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82073681);河北省自然科学基金生物医药联合基金项目(H2022206327, B2022206008);河北省研究生创新项目(CXZZBS2023106)

[作者简介] 张一宁(1997-),男,辽宁锦州人,河北医科大学讲师,理学博士,从事药物化学研究。

\* 通信作者。E-mail: hmuwanglei@hebm.u.edu.cn

receptor-targeted fluorescent probes, and develop a new type of excellent folate receptor-targeted fluorescent probe. **Methods** The target fluorescent probe was obtained through various chemical synthesis reactions. Flow cytometry was used to investigate the selectivity of fluorescent probes for folate receptors, and fluorescence microscopy was conducted to evaluate the targeted imaging ability of fluorescent probes on tumor cells. **Results** Eight targeted fluorescent probe products were obtained, among which the fluorescent probe GT-FITC-1 could specifically bind to folate receptor and enter cells to achieve fluorescent imaging. The introduction of glutamic acid side chains reduced the relative average fluorescence intensity of cell uptake. GT-FITC-2 decreased by about 17% compared with GT-FITC-1, and GT-FITC-5 decreased by approximately 15% compared with GT-FITC-4. The fluorescence intensity of the fluorescent probes GT-FITC-7 and GT-FITC-8 containing rigid benzene ring linkers increased by 2-3 times compared with GT-FITC-4, and GT-FITC-8 showed the largest relative average fluorescence intensity. **Conclusion** A series of fluorescent probes designed and synthesized in this study all show high specificity for folate receptors, and the fluorescent probe GT-FITC-8 with excellent affinity for folate receptors is discovered.

[Key words] molecular probes; fluorescein; folate receptor

癌症一直是困扰人类的世纪性难题,虽然癌症的治愈率很低,但如果早期诊断并及时治疗,可以显著提高患者的生存率<sup>[1]</sup>。荧光探针具有非侵入性、快速响应性、高度敏感和选择性等优点,逐渐引起人们极大的兴趣,一直是近年来的研究热点,并已被广泛用于科学研究以及癌症诊断的应用中<sup>[2-3]</sup>。叶酸受体(folate receptor, FR)是参与叶酸摄入的膜蛋白,共有4种亚型,研究发现其中叶酸受体 $\alpha$ (folate receptor- $\alpha$ , FR- $\alpha$ )在许多人类癌症中上调,尤其是在恶性肿瘤如卵巢癌和乳腺癌中,而在正常组织中不表达<sup>[4-5]</sup>。因此,FR作为一个理想受体靶标,已经被积极研究用于开发了多种用于癌症诊断的受体靶向荧光探针<sup>[6-15]</sup>。然而,在以往针对FR开发的靶向荧光探针中,研究人员通常采用相同的天然小分子叶酸作为靶向配体,而针对靶向配体以及连接基团的分子结构优化鲜有报道,仍需对其进行进一步的研究。近年来,报道了一系列具有肿瘤靶向潜力的6-取代吡咯并[2,3-*d*]嘧啶类叶酸拮抗剂<sup>[16-18]</sup>,能够选择性靶向FR而不被还原性叶酸载体(reduced folate carrier, RFC)所转运,并且相对于叶酸,对FR- $\alpha$ 具有更高水平的靶向性,暗示了它们可以作为靶向配体的潜力。荧光素5-异硫氰酸酯(fluorescein isothiocyanate, FITC),具有高敏感度、高吸收率、优良的荧光量子产率和经济性等优点<sup>[19]</sup>,并且分子中异硫氰酸酯基团具有高反应活性,有利于其与其他分子进行共价连接,因此是体外研究应用最为广泛的荧光基团之一<sup>[20]</sup>。基于此,本研究以FITC作为荧光基团,进行一系列新型FR

靶向荧光探针的分子设计及结构优化。评估3种不同的6-取代吡咯并[2,3-*d*]嘧啶类叶酸拮抗剂作为靶向配体的潜力,并通过筛选不同的连接基团,鉴定出能够最大程度保持配体亲和力的连接基团,研究FR靶向荧光探针的靶向配体部分和连接基团的构效关系,填补目前该领域的研究空白。

## 1 材料与 方法

1.1 仪器与试剂 Rf+Lumen型快速制备色谱仪、5600+Triple TOF型液质联用仪、600 MHz核磁共振仪、T9S紫外可见分光光度计、RF-6000荧光分光光度计、FV1200MPE双光子激光扫描显微镜、BD FACVerse流式细胞仪。所有使用的化学试剂均为分析纯(analytical reagent, AR)试剂。2,4-二氨基-6-羟基嘧啶、乙酸钠、4-氯乙酰乙酸乙酯、氢氧化钠、1-羟基苯并三唑、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐、甘氨酸甲酯盐酸盐、三乙胺、1-溴-5-己炔-2-酮、4-碘苯甲酸甲酯、5-碘噻吩-2-甲酸甲酯、四(三苯基膦)钯、碘化亚铜、钯碳、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N, N', N''*-四甲基脲六氟磷酸酯、*N, N*-二异丙基乙胺、三氟乙酸均购自安徽安耐吉科技有限公司; *N*-叔丁氧羰基乙二胺、FITC、*N*-(6-氨基己基)氨基甲酸叔丁酯、*N*-[4-(氨基甲基)苄基]氨基甲酸叔丁酯、(苄氧羰基)-*L*-酪氨酸叔丁酯、*N*-(2-溴乙基)氨基甲酸叔丁酯均购自上海毕得医药科技有限公司;胎牛血清、青霉素-链霉素、RPMI-1640培养基等相关细胞培养材料均购于武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.2 靶向配体的合成方法 选用了3种不同的6-取代吡咯并[2,3-*d*]嘧啶类叶酸拮抗剂,包括化合物A、化合物B和化合物C作为靶向配体的合成参考(图1),通过图2的合成路线得到靶向配体4b、8b和9b。

1.2.1 靶向配体4b的合成 ①取500 mL两口圆底烧瓶,将2,4-二氨基-6-羟基嘧啶(6.93 g, 55 mmol)和乙酸钠(4.10 g, 50 mmol)溶于150 mL水中,组装冷凝回流装置,加热至100 ℃,随后将4-氯乙酰乙酸乙酯(7.41 mL, 55 mmol)滴加到回流的反应液中,反应1 h出现大量白色沉淀物,将混合物加热回流18 h,冷却至室温,减压抽滤,滤饼用水(2×50 mL)和丙酮(2×50 mL)洗涤,取滤饼真空干燥得到化合物2,为类白色粉末状固体(7.01 g, 产率54%)。②取250 mL圆底烧瓶,将化合物2(4.72 g, 20 mmol)溶于100 mL 1 mol/L氢氧化钠溶液中,将所得溶液在室温下反应1.5 h。将反应液冷却至0 ℃,在0 ℃下,滴加3 mol/L盐酸将反应的pH调至2~3,有大量固体产生,减压抽滤,用20 mL水洗涤滤饼,取滤饼真空干燥得到化合物3,为灰白色粉末状固体(3.37 g, 产率81%)。③取100 mL圆底烧瓶,将化合物3(1.04 g, 5 mmol), 1-羟基苯并三唑(0.80 g, 6 mmol), 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(1.20 g, 6 mmol)和甘氨酸甲酯盐酸盐(1.30 g, 10 mmol)依次溶于20 mL无水DMF中,再将三乙胺(1.00 g, 10 mmol)加入至烧瓶中,于室温下搅拌反应5 h,减压下蒸发溶剂,向混合物中加入50 mL碳酸钠溶液搅拌1 h,减压抽滤,取滤饼得到化合物4a,不经过柱纯化用于下一步反应。④取250 mL圆底烧瓶,将化合物4a滤饼溶于100 mL的1 mol/L氢氧化钠溶液中,将所得溶液在室温下反应1.5 h。将反应液冷却至0 ℃,在0 ℃下,滴加3 mol/L盐酸将反应的pH调至2~3,有大量固体产生,减压抽滤,用20 mL水洗涤滤饼,取滤饼真空干燥得到靶向配体4b,为灰色粉末状固体(0.86 g, 产率65%)。

1.2.2 靶向配体8b、9b的合成 ①取100 mL圆底烧瓶,将1-溴-5-己炔-2-酮(1.50 g, 8.6 mmol), 2,4-二氨基-6-羟基嘧啶(1.19 g, 9.5 mmol),依次溶于20 mL无水DMF中,氮气保护,于室温反应72 h。将溶剂在减压下蒸发除去,通过硅胶柱色谱法(DCM:MeOH=30~10:1)进行分离纯化得到化合物5,为白色粉末状固体(1.25 g, 产率72%)。②取250 mL三口圆底烧瓶,将4-碘苯甲酸甲酯(1.96 g,

7.5 mmol),四(三苯基膦)钯(0.92 g, 0.8 mmol),三乙胺(5.05 g, 50 mmol),依次溶于30 mL无水DMF中,避光,氮气保护,加热至60 ℃。将化合物5(1.00 g, 5 mmol),碘化亚铜(152 mg, 0.8 mmol)溶于5 mL无水DMF中,缓慢滴加至上述反应液中,于60 ℃氮气保护避光反应12 h。将溶剂在减压下蒸发除去,通过硅胶柱色谱法(DCM:MeOH=40~10:1)进行分离纯化得到化合物6,为白色粉末状固体(1.10 g, 产率66%)。采用相同的合成方法,将原料4-碘苯甲酸甲酯替换为5-碘噻吩-2-甲酸甲酯得到化合物7,为浅黄色粉末状固体(935 mg, 产率55%)。③取1 L氢化反应釜专用耐压反应瓶,将化合物6(1.10 g, 3.3 mmol)溶于200 mL MeOH,加入钯碳(10%)(1.06 g, 10 mmol),于室温氢化摇摆釜(40 psi)加氢反应36 h。将反应液通过硅藻土过滤除去钯碳,滤液减压浓缩蒸去甲醇得到化合物8a,为白色固体,未经纯化可直接用于下一步反应。将得到的化合物8a置于100 mL圆底烧瓶中,加入10 mL MeOH溶解,于0 ℃下加入10 mL 1 mol/L氢氧化钠溶液,转移至室温反应6 h,减压蒸除MeOH,溶液于0 ℃下加入1 mol/L盐酸溶液调节pH至2~3,有大量白色固体析出,减压抽滤,取滤饼,干燥,得到靶向配体8b,为浅粉色固体(686 mg, 产率70%)。9b采用相同的合成方法,棕色固体(540 mg, 产率59%)。

1.3 荧光探针终产物的通用合成方法 将合成得到的靶向配体(1 mmol),市售的Boc保护的Linker化合物(1.5 mmol),2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(1 mmol),依次溶于10 mL无水DMF中,搅拌至溶解澄清后加入*N,N*-二异丙基乙胺(2 mmol),于室温反应4 h,将溶剂在减压下蒸发除去,通过硅胶柱色谱法(DCM:MeOH=20~5:1)进行分离纯化(产率70%~85%)。再将所得产物于二氯甲烷:三氟乙酸=1:1的体系中反应4 h脱去Boc及叔丁基保护基,裸露出氨基后,于二甲基亚砜中与FITC在*N,N*-二异丙基乙胺的作用下进行亲核加成反应得到荧光探针终产物(产率25%~35%),见图3。所有探针的具体结构见图4:GT-FITC-1( $R=R_1$ , Linker=L<sub>1</sub>),GT-FITC-2( $R=R_1$ , Linker=L<sub>2</sub>),GT-FITC-3( $R=R_2$ , Linker=L<sub>1</sub>),GT-FITC-4( $R=R_3$ , Linker=L<sub>1</sub>),GT-FITC-5( $R=R_3$ , Linker=L<sub>2</sub>),GT-FITC-6( $R=R_3$ , Linker=L<sub>3</sub>),GT-FITC-7( $R=R_3$ , Linker=L<sub>4</sub>),GT-FITC-8( $R=R_3$ , Linker=L<sub>5</sub>)。

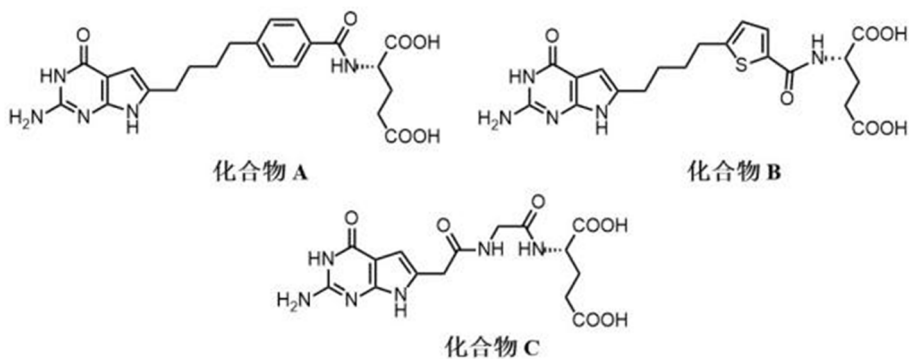
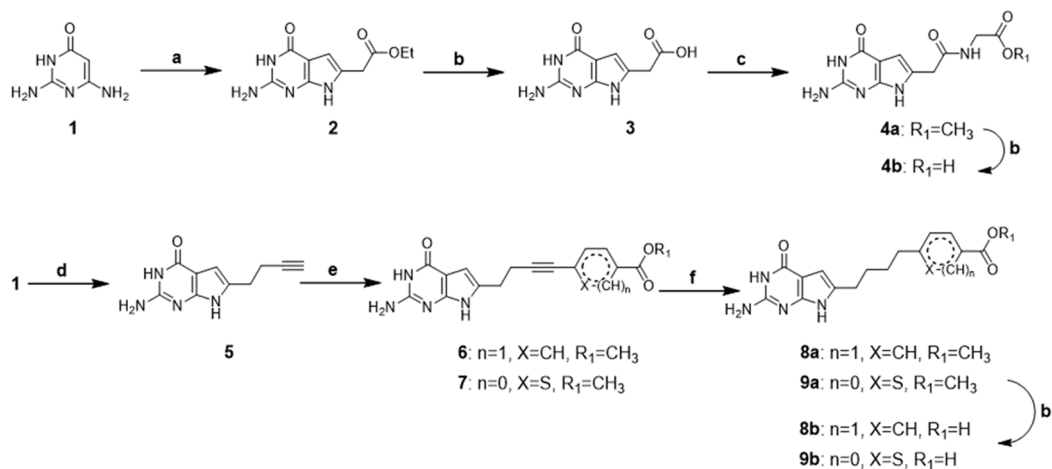


图 1 小分子叶酸拮抗剂结构示意图

Figure 1 Schematic diagram of the structure of small molecule antifolates



(a) Ethyl 4-Chloroacetoacetate, NaOAc, H<sub>2</sub>O, reflux, 18 h; (b) i) 1 N NaOH, RT, 1.5 h, ii) 1 N HCl; (c) Methyl glycinate, EDCI, HOBT, Et<sub>3</sub>N, DMF, RT, 5 h; (d) 1-Bromo-5-hexyne-2-one, RT, 72h.; (e) Methyl 4-iodobenzoate or Methyl 5-iodothiophene-2-carboxylate, CuI, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Et<sub>3</sub>N, DMF, 60°C, 12 h; (f) H<sub>2</sub>, 40 psi, Pd/C, MeOH, 36 h.

图 2 靶向配体的合成路线图

Figure 2 Synthesis route of targeting ligands

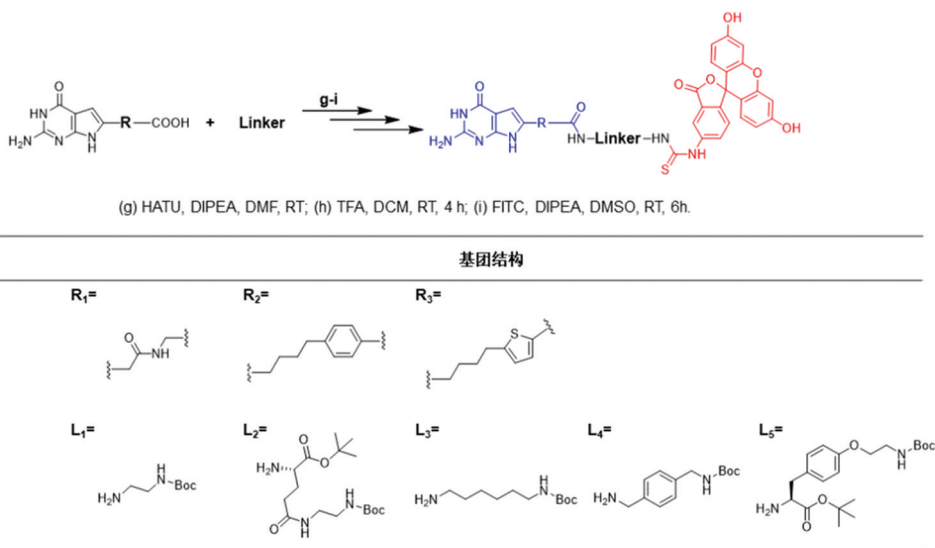


图 3 荧光探针终产物的通用合成路线

Figure 3 General synthesis route of the final product of fluorescent probes

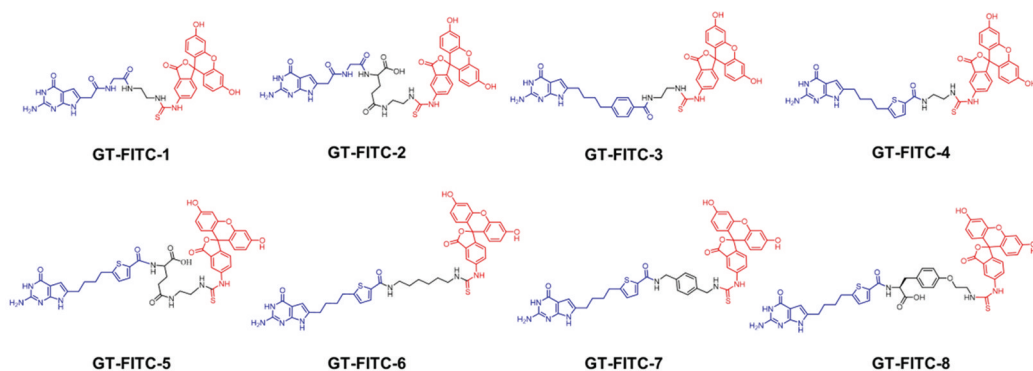


图4 荧光探针终产物的化学结构

Figure 4 Chemical structure of the final product of fluorescent probes

1.4 荧光探针吸收光谱和荧光光谱的测定 采用 T9S 紫外可见分光光度计,以 PBS 为溶剂,在 400~600 nm 波长范围内测定荧光探针(10  $\mu\text{mol/L}$ )和 FITC(10  $\mu\text{mol/L}$ )的吸收光谱。将荧光探针(1  $\mu\text{mol/L}$ )和 FITC(1  $\mu\text{mol/L}$ )溶解在 PBS 溶剂中,用 RF-6000 荧光分光光度计(Shimadzu Corporation, Japan)进行荧光光谱研究,激发和发射的狭缝宽度为 10 nm。所有化合物的发射光谱都是在其相应的最大激发波长处获得的。

1.5 细胞培养 KB 细胞(HeLa/人宫颈癌细胞系的衍生物)和 A549 细胞(人肺上皮细胞)购自中国典型培养物保藏中心(上海)。KB 和 A549 细胞使用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的无叶酸或正常 RPMI-1640 培养基在 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ /95% 空气加湿环境中单层生长至少 6 代,然后用于试验。

1.6 体外荧光显微成像研究 将 KB 和 A549 细胞( $5 \times 10^4$  个细胞/孔, 1 mL)接种到微孔培养皿中(BS-15-GJM,  $\varphi 10$  mm),并在 37  $^{\circ}\text{C}$  (5%  $\text{CO}_2$ ) 的培养箱中孵育过夜。在存在(封闭)或不存在 10 倍过量 FA 的情况下,用含有 GT-FITC-1(500 nmol/L)的新鲜培养基替换用过的培养基,并将细胞在 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 2 h。然后除去培养基,用 PBS 洗涤细胞 3 次,使用 Olympus 显微镜系统(FV 1200 MPE)获得荧光图像。

1.7 体外受体结合测定 通过流式细胞术研究以测量每种探针的结合亲和力。将 KB 细胞以  $5 \times 10^5$  每孔的密度接种在 6 孔板的 2 mL 培养基中,并使其黏附过夜。用 2 mL 含有荧光探针(500 nmol/L)的新鲜培养基替换培养基,孵育 1 h。除去溶液,用冰冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,然后将细胞重悬于 500  $\mu\text{L}$  PBS 中,并进行流式细胞术分析。

1.8 统计学方法 应用 GraphPad Prism 8.0 统计软件分析数据。计量资料比较采用单因素方差分析

和 SNK- $q$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 荧光探针的光学性质 在 PBS 溶液中测量探针的荧光光谱,图 5A 为激发光谱图,图 5B 为发射光谱图。结果显示,不论是具有不同靶向配体的荧光探针 GT-FITC-1~4,还是具有不同 Linker 的探针 GT-FITC-5~8,它们相较于 FITC,其最大激发及发射波长均未发生明显改变,保持在可见光区 480 nm 左右。

### 2.2 叶酸受体选择性研究

2.2.1 体外荧光显微镜研究 通过荧光共聚焦显微镜观察到的结果见图 6,在 KB 细胞中( $\text{FR-}\alpha^+$ )出现了明亮荧光,而在 A549 细胞( $\text{FR-}\alpha^-$ )中未观察到细胞对荧光探针的摄取。当以 10 倍量的叶酸共孵育 KB 细胞来竞争性阻断  $\text{FR-}\alpha$  时,发现 KB 细胞( $\text{FR-}\alpha^+$ )对荧光探针的摄取显著降低,在细胞中仅存在微弱的荧光。以上实验结果,证明了设计得到的荧光探针能够通过特异性结合  $\text{FR-}\alpha$  并进入细胞实现荧光成像。

#### 2.2.2 荧光探针对 $\text{FR-}\alpha$ 亲和力评价

2.2.2.1 不同配体对  $\text{FR-}\alpha$  的亲和力评价 通过流式细胞仪测定荧光探针与 KB 细胞的平均荧光强度,比较不同探针对于  $\text{FR-}\alpha$  亲和力的大小(图 7, 8)。首先测定了 KB 细胞摄取荧光探针 GT-FITC-1~4 后的相对平均荧光强度。具有靶向配体 9b 的探针 GT-FITC-4 表现出最高的荧光强度,表明其对  $\text{FR-}\alpha$  具有最大的相对亲和力;其次是具有靶向配体 8b 的探针 GT-FITC-3,以及具有靶向配体 4b 的探针 GT-FITC-1。通过比较同样具有靶向配体 4b 的探针 GT-FITC-2 和 GT-FITC-1,发现谷氨酸侧链的出现使 KB 细胞摄取的荧光强度下降了约 17%,对靶向荧光探针的 Linker 部分进行筛选优化。

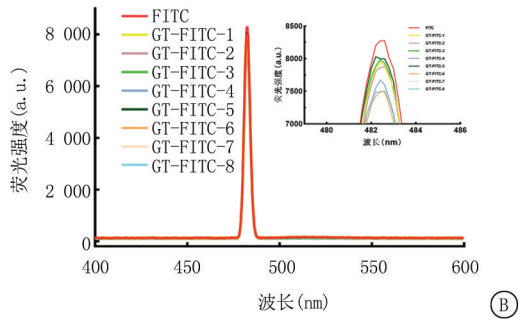
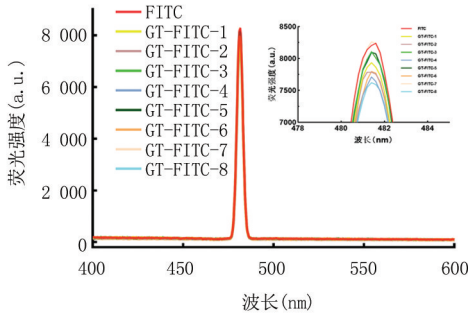


图5 荧光探针 GT-FITC-1~8 的光谱图

A. 激发光谱图; B. 发射光谱图

Figure 5 Spectra of fluorescent probe GT-FITC-1-8

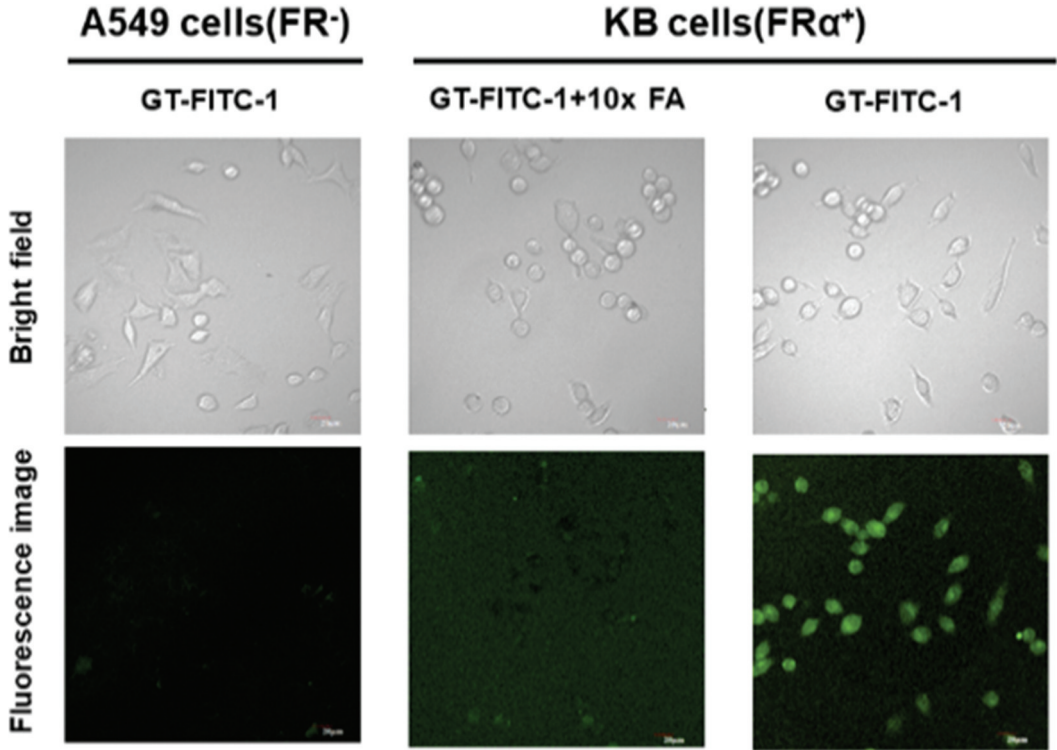


图6 荧光探针的体外细胞荧光成像图

Figure 6 In vitro cell fluorescence imaging of fluorescent probes

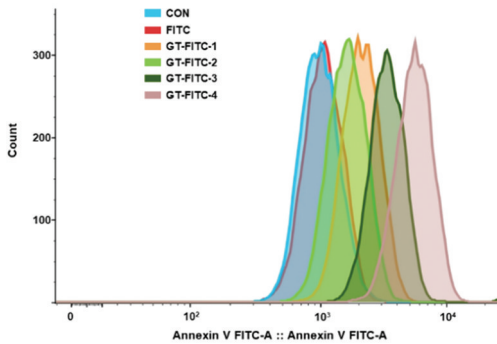


图7 荧光探针 GT-FITC-1~4 流式数据图

Figure 7 Flow cytometry data of fluorescent probe GT-FITC-1-4

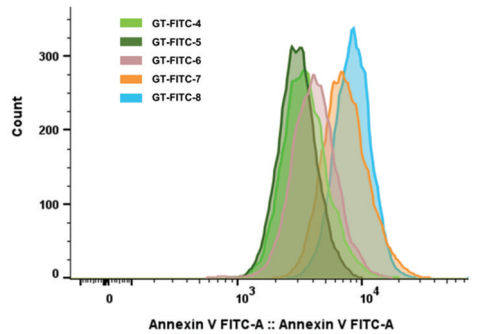


图8 荧光探针 GT-FITC-4~8 流式数据图

Figure 8 Flow cytometry data of fluorescent probe GT-FITC-4-8

2.2.2.2 不同连接基团对 FR- $\alpha$  的亲合力评价 为了筛选最优的连接基团,以具有最佳亲和力的配体 9b 作为小分子配体,通过不同的连接基团连接 FITC,得到荧光探针 GT-FITC-5~8,包括柔性的谷氨酸-乙二胺类似物(GT-FITC-5)和 1,6-己二胺(GT-FITC-6);刚性的苜胺类似物(GT-FITC-7)和酪氨酸类似物(GT-FITC-8),通过流式细胞术研究评价这些含有不同连接基团的化合物在体外对 FR- $\alpha$  的亲合力,并与 GT-FITC-4 进行比较(图 8)。引入谷氨酸侧链的探针 GT-FITC-5 相较于 GT-FITC-4,其相对平均荧光强度下降约 15%。这一结果与图 7 中探针 GT-FITC-2 和 GT-FITC-1 的结果基本一致。同样是柔性 Linker 的探针 GT-FITC-6 其荧光强度与 GT-FITC-4 相差并不大。含有刚性苯环连接基团的荧光探针 GT-FITC-7 和 GT-FITC-8 相较于 GT-FITC-4 均增加了 2~3 倍,并且 GT-FITC-8 表现出最大的相对平均荧光强度。见表 1。

表 1 不同荧光探针处理后 KB 细胞的相对平均荧光强度

Table 1 Relative mean fluorescence intensity of KB cells treated with different fluorescent probes

( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	平均荧光强度
空白对照	950.0 $\pm$ 70.7
FITC	1 092.0 $\pm$ 12.0
GT-FITC-1	1 716.0 $\pm$ 118.8*
GT-FITC-2	1 424.0 $\pm$ 33.9
GT-FITC-3	2 297.0 $\pm$ 146.4*
GT-FITC-4	3 614.0 $\pm$ 121.6*
GT-FITC-5	3 060.0 $\pm$ 84.1#
GT-FITC-6	3 717.0 $\pm$ 164.8
GT-FITC-7	8 048.0 $\pm$ 74.2#
GT-FITC-8	9 126.0 $\pm$ 178.2#
F 值	928.485
P 值	<0.001

\*  $P$  值<0.05 与空白对照比较 #  $P$  值<0.05 与 GT-FITC-4 比较 (SNK- $q$  检验)

2.3 荧光探针的结构表征 通过 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 和 HRMS 等方法对合成的 8 个目标荧光探针行了结构表征。

**GT-FITC-1:**  $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta=10.88$ (s, 1H), 9.02(s, 2H), 8.30(s, 1H), 8.12(d,  $J=15.3$  Hz, 2H), 7.86-7.74(m, 1H), 7.15(d,  $J=8.3$  Hz, 1H), 6.64(d,  $J=2.2$  Hz, 2H), 6.63(s, 1H), 6.62(s, 1H), 6.55(d,  $J=2.4$  Hz, 2H), 6.54(d,  $J=2.3$  Hz, 2H), 6.07(s, 2H), 6.00(s, 1H), 3.70(d,  $J=5.5$  Hz, 2H), 3.58(s, 2H), 3.43(s, 2H), 3.30(q,  $J=6.1$  Hz, 2H), 3.17(s, 1H);  $^{13}\text{C-NMR}$

(151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta=169.88, 169.18, 159.00, 152.80, 152.59, 151.69, 142.01, 129.66, 125.18, 113.87, 110.54, 102.74, 100.72, 100.37, 49.07, 46.12, 43.84, 42.77, 38.33, 35.42, 31.74, 22.80, 14.42, 11.84$ ; HRMS(ESI): Calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{29}\text{N}_8\text{O}_8\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; 697.1824, found 697.1811。

**GT-FITC-2:**  $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta=10.88$ (s, 1H), 9.91(s, 1H), 8.44(d,  $J=11.2$  Hz, 1H), 8.29-8.20(m, 1H), 7.91(s, 1H), 7.84-7.76(m, 1H), 7.70(dd,  $J=20.2, 6.4$  Hz, 1H), 7.10(d,  $J=8.4$  Hz, 1H), 6.63(s, 1H), 6.62(s, 3H), 6.54(dd,  $J=8.5, 2.3$  Hz, 2H), 6.21(s, 2H), 6.01(s, 1H), 3.95(dt,  $J=19.1, 6.1$  Hz, 1H), 3.73(t,  $J=5.4$  Hz, 1H), 3.66-3.53(m, 2H), 3.44(s, 1H), 3.23(ddt,  $J=26.0, 13.8, 7.1$  Hz, 2H), 2.14(q,  $J=7.7, 7.2$  Hz, 2H), 1.95(dq,  $J=18.9, 9.8, 8.2$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta=181.05, 175.59, 173.74, 172.69, 169.96, 169.38, 168.21, 162.66, 159.17, 155.66, 153.06, 152.74, 151.71, 142.97, 129.71, 125.20, 117.19, 114.23, 110.73, 102.74, 100.75, 100.35, 54.22, 43.80, 42.92, 42.48, 40.88, 38.28, 35.38, 32.22, 28.16, 22.94, 22.84$ ; HRMS(ESI): Calcd for  $\text{C}_{38}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_{11}\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 826.2250, found 826.2251。

**GT-FITC-3:**  $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta=10.79$ (s, 1H), 8.55(t,  $J=5.4$  Hz, 1H), 8.33(s, 1H), 8.23(s, 1H), 7.77(d,  $J=7.9$  Hz, 2H), 7.72(d,  $J=9.6$  Hz, 1H), 7.24(d,  $J=7.8$  Hz, 2H), 7.13(d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 6.67-6.63(m, 2H), 6.62(d,  $J=8.7$  Hz, 2H), 6.54(dd,  $J=8.7, 2.4$  Hz, 2H), 5.96(s, 2H), 5.84(s, 1H), 3.71(s, 2H), 3.49(q,  $J=6.0$  Hz, 2H), 2.62(d,  $J=6.8$  Hz, 2H), 1.63-1.51(m, 4H);  $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta=167.11, 158.93, 152.31, 151.54, 146.21, 132.33, 131.51, 129.63, 128.62, 127.78, 110.47, 102.74, 100.12, 98.30, 44.13, 39.00, 35.15, 30.74, 28.79, 27.46$ ; HRMS(ESI): Calcd for  $\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 758.2391, found 758.2381。

**GT-FITC-4:**  $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta=10.80$ (s, 1H), 10.15(s, 2H), 8.55(t,  $J=5.6$  Hz, 1H), 8.23(s, 2H), 7.74(d,  $J=8.2$  Hz, 1H), 7.59(d,  $J=3.7$  Hz, 1H), 7.15(d,  $J=8.3$  Hz, 1H), 6.84(d,  $J=3.7$  Hz, 1H), 6.71-6.66(m, 2H), 6.61(s, 1H), 6.60(s, 1H), 6.56(dd,  $J=8.7, 2.3$  Hz, 2H), 5.98(s, 2H), 5.86(s, 1H), 3.69(s, 2H), 3.46(d,  $J=6.1$  Hz,

2H), 2.80 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 1.61 (q,  $J = 4.1$ , 3.6 Hz, 4H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 168.98, 162.11, 160.00, 158.94, 152.37, 152.32, 151.57, 150.67, 131.39, 129.52, 128.77, 125.80, 113.08, 110.19, 102.72, 100.12, 98.36, 44.01, 38.79, 31.00, 29.71, 28.51, 27.29$ ; HRMS (ESI): Calcd for  $\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}_2$  [M + H] $^+$ : 764.1956, found 764.1932。

**GT-FITC-5:**  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 11.60$  (s, 1H), 10.80 (s, 1H), 9.59 (s, 2H), 8.47 (s, 1H), 8.03-7.93 (m, 1H), 7.93-7.83 (m, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.10 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.67 (s, 2H), 6.60 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 6.56 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H), 6.01 (s, 2H), 5.86 (s, 1H), 4.14 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 3.63 (d,  $J = 11.4$  Hz, 2H), 3.23 (s, 2H), 3.17 (s, 1H), 2.78 (s, 2H), 2.28-2.12 (m, 2H), 2.08 (d,  $J = 13.0$  Hz, 2H), 1.60 (s, 4H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 181.05, 175.50, 172.74, 169.24, 160.74, 160.11, 159.00, 152.45, 152.35, 151.61, 150.31, 142.91, 137.74, 131.43, 129.56, 128.50, 126.88, 125.75, 124.14, 116.35, 113.15, 110.42, 102.68, 100.12, 98.36, 54.25, 49.07, 43.68, 38.23, 32.29, 31.02, 29.71, 29.49, 29.05, 28.58, 27.80, 27.33, 21.75$ ; HRMS (ESI): Calcd for  $\text{C}_{43}\text{H}_{39}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{S}_2$  [M-H] $^-$ : 891.2236, found 891.2246。

**GT-FITC-6:**  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 10.81$  (s, 1H), 10.12 (s, 2H), 8.34 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.74 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.55 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.83 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 6.65 (s, 2H), 6.63 (s, 1H), 6.56 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 5.87 (s, 1H), 3.51-3.47 (m, 2H), 3.21 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.18 (s, 1H), 2.79 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 1.62 (d,  $J = 4.4$  Hz, 4H), 1.54 (dt,  $J = 28.2, 6.9$  Hz, 4H), 1.34 (s, 4H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 180.82, 169.18, 161.52, 158.96, 152.82, 152.32, 151.57, 150.26, 141.89, 137.93, 131.40, 129.67, 128.24, 125.68, 110.62, 102.76, 100.13, 98.36, 49.07, 44.26, 31.01, 29.71, 29.68, 28.77, 28.53, 27.31, 26.70, 26.68$ ; HRMS (ESI): Calcd for  $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}_2$  [M-H] $^-$ : 818.2436, found 818.2443。

**GT-FITC-7:**  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 10.79$  (s, 1H), 10.14 (s, 2H), 8.90 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.75 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.60 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 7.32 (d,  $J = 8.0$  Hz,

2H), 7.28 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 7.17 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 6.86 (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.62 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 6.57-6.52 (m, 2H), 5.96 (s, 2H), 5.85 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 4.80-4.72 (m, 2H), 4.41 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 2.80 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.65-1.58 (m, 4H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 161.60, 158.92, 152.32, 151.56, 150.68, 138.83, 137.53, 131.35, 129.62, 128.62, 127.93, 127.76, 125.83, 102.74, 100.13, 98.36, 42.68, 31.01, 29.72, 28.52, 27.30, 22.98, 22.56, 14.43$ ; HRMS (ESI): Calcd for  $\text{C}_{44}\text{H}_{36}\text{N}_7\text{O}_7\text{S}_2$  [M-H] $^-$ : 838.2123, found 838.2122。

**GT-FITC-8:**  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 10.78$  (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.77 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.52 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.14 (d,  $J = 8.1$  Hz, 3H), 6.83 (s, 2H), 6.82 (d,  $J = 4.6$  Hz, 2H), 6.68-6.65 (m, 3H), 5.97 (s, 2H), 5.85 (s, 1H), 4.37 (p,  $J = 10.6, 7.1$  Hz, 1H), 4.08 (tt,  $J = 10.2, 5.0$  Hz, 2H), 3.85 (s, 2H), 3.09 (dd,  $J = 13.7, 4.6$  Hz, 1H), 2.96 (dd,  $J = 13.8, 8.5$  Hz, 1H), 2.78 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 1.61 (d,  $J = 6.0$  Hz, 4H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta = 181.26, 174.78, 174.46, 169.04, 161.16, 160.09, 158.97, 157.20, 152.40, 152.35, 151.60, 150.51, 142.00, 137.48, 131.38, 131.28, 130.69, 130.13, 129.50, 128.66, 127.05, 125.76, 124.48, 117.02, 114.54, 113.13, 110.21, 102.71, 100.12, 98.36, 65.94, 55.58, 43.77, 36.49, 35.60, 31.76, 31.02, 29.71, 29.56, 29.50, 29.45, 29.34, 29.30, 29.21, 29.17, 29.05, 28.58, 27.33, 27.03, 25.59, 22.57, 21.65, 14.42$ ; HRMS (ESI): Calcd for  $\text{C}_{47}\text{H}_{42}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S}_2$  [M + H] $^+$ : 928.2429, found 928.2420。

### 3 讨 论

当非靶向性的荧光染料与配体小分子连接后,通常会对接荧光染料的光学性质造成影响,特别是最大发射波长。因此,首先测量了所有探针的荧光光谱。结果显示,与染料 FITC 相比,所有探针的最大发射波长均未发生明显改变,同时荧光强度的变化也不大。上述结果表明,这些具有吡咯并[2,3-*d*]噻啉核心结构的靶向配体和 Linker 基本不会对染料的光学性能造成显著影响,支持了这些荧光探针之后的检测。

体外细胞成像是靶向荧光探针评价的重要指标

之一。为了初步评估荧光探针与活细胞表面 FR- $\alpha$  的特异性结合以及荧光成像的能力,利用高表达 FR- $\alpha$  的 KB 细胞和 FR- $\alpha$  阴性的 A549 细胞,对首先合成的代表性荧光探针 GT-FITC-1 进行了基于细胞的荧光显微镜研究。实验结果表明,设计得到的荧光探针能够通过特异性结合 FR- $\alpha$  并进入细胞实现荧光成像,验证了实验设想,为其他荧光探针的合成及优化提供了坚实的实验基础。

受体选择性是靶向荧光探针必须具备的核心性质,而大基团荧光染料通常会削弱配体分子的受体选择性。为了比较不同探针对于 FR- $\alpha$  的相对结合亲和力,将 KB 细胞与不同的探针共孵育,通过流式细胞术测量它们的相对平均荧光强度,以此来筛选合适的靶向配体和 Linker。首先对具有不同靶向配体的探针 GT-FITC-1~4 进行了评价,发现不同配体之间的相对亲和力确实存在差异。其中,以吡咯并[2,3-*d*]嘧啶侧链上带噻吩结构的叶酸类似物作为靶向配体的探针 GT-FITC-4 对叶酸受体具有最佳的结合亲和力。虽然以另外 2 种小分子叶酸类似物作为配体的探针 GT-FITC-1 和 GT-FITC-3 亲和力相对较弱,但也证明了其能够选择性靶向叶酸受体。同时,这一实验结果提示了靶向配体 9b 对 FR- $\alpha$  具有最高的亲和力,其次是靶向配体 8b,而靶向配体 4b 最差。这一结论与本课题组之前的研究结果保持了一致<sup>[21]</sup>。此外,尽管 GT-FITC-1 与 GT-FITC-2 都具有相同的靶向配体 4b,但是由于谷氨酸侧链的存在,它们的相对亲和力出现了明显差异,这提示了 Linker 部分在靶向荧光探针的受体选择性中同样发挥着关键作用。

因此,随后以具有噻吩结构的小分子叶酸类似物作为靶向配体,筛选了多种不同的连接基团对探针整体亲和力的影响,包括柔性和刚性等 Linker。研究发现,增加连接基团柔性碳链的长度并不能使荧光探针对于 FR- $\alpha$  的亲和力增加,甚至引入谷氨酸的荧光探针对于 FR- $\alpha$  的亲和力发生了降低。探针 GT-FITC-6 的结果也同样说明了这一点。相反,在引入了含有刚性苯环的连接基团后,荧光探针对 FR- $\alpha$  的亲和力表现出显著提高,这可能是由于连接基团中的刚性苯环具有较为固定的构象,从而更有利于配体和叶酸受体结合口袋的相互作用。连接基团为酪氨酸类似物的探针 GT-FITC-8 对 FR- $\alpha$  的亲和力最高,可能是由于 GT-FITC-8 的连接基团中的  $\alpha$ -羧基基团与结合口袋发生了相互作用,相较于连接基团中没有羧基的 GT-FITC-7,其对 FR- $\alpha$  的亲和力得到了提高。

综上所述,本研究发现刚性苯环更适用于叶酸受体靶向荧光探针的连接基团设计,其中使用酪氨酸作为连接基团的荧光探针具有对叶酸受体最高的亲和力,即 GT-FITC-8。更重要的是首次对叶酸受体靶向荧光探针的靶向配体以及连接基团进行了结构筛选及构效关系研究,证实了一系列 6-取代的吡咯并[2,3-*d*]嘧啶类叶酸拮抗剂可以替代叶酸作为靶向配体,为开发肿瘤靶向诊断和治疗药物的开发提供了新的研究思路。

#### [参考文献]

- [1] Entenberg D, Oktay MH, Condeelis JS. Intravital imaging to study cancer progression and metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2023, 23(1): 25-42.
- [2] Wang K, Liu C, Zhu H, et al. Recent advances in small-molecule fluorescent probes for diagnosis of cancer cells/tissues[J]. *Coord Chem Rev*, 2023, 477: 214946.
- [3] Tian M, Wu R, Xiang C, et al. Recent advances in fluorescent probes for cancer biomarker detection[J]. *Molecules*, 2024, 29(5): 1168.
- [4] Scaranti M, Cojocaru E, Banerjee S, et al. Exploiting the folate receptor  $\alpha$  in oncology[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(6): 349-359.
- [1] Müller C. Folate-based radiotracers for PET imaging—update and perspectives[J]. *Molecules*, 2013, 18(5): 5005-5031.
- [6] Zhang Y, Li S, Zhang H, et al. Design and application of receptor-targeted fluorescent probes based on small molecular fluorescent dyes[J]. *Bioconjug Chem*, 2021, 32(1): 4-24.
- [7] Srinivasarao M, Galliford CV, Low PS. Principles in the design of ligand-targeted cancer therapeutics and imaging agents[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, 14(3): 203-219.
- [8] Ekiz Kanik F, Ag D, Selecı M, et al. A novel DAD type and folic acid conjugated fluorescent monomer as a targeting probe for imaging of folate receptor overexpressed cells[J]. *Biotechnol Prog*, 2014, 30(4): 952-959.
- [9] Numasawa K, Hanaoka K, Saito N, et al. A fluorescent probe for rapid, high-contrast visualization of folate-receptor-expressing tumors in vivo[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59(15): 6015-6020.
- [10] Sano K, Suzuno N, Bao L, et al. Development of a poly(2-ethyl-2-oxazoline)-based fluorescence imaging probe targeting the folate receptor in tumor tissues[J]. *ACS Appl Polym Mater*, 2021, 3(10): 4889-4895.
- [11] Karan S, Cho MY, Lee H, et al. Near-infrared fluorescent probe activated by nitroreductase for in vitro and in vivo hypoxic tumor detection[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(6): 2971-2981.
- [12] Jo G, Kim EJ, Park MH, et al. Tumor targeting with methotrexate-conjugated zwitterionic near-infrared fluorophore for precise photothermal therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 14127.

- [13] Wang Y, Chen L. Smart fluorescent probe strategy for precision targeting hypoxic tumor[J]. *J Med Chem*, 2021, 64(6):2967-2970.
- [14] Li X, Liu C, Zhu H, et al. Recent advances in small-molecule fluorescent probes with the function of targeting cancer receptors[J]. *Anal Methods*, 2023, 15(44):5947-5977.
- [15] Shi X, Xu P, Cao C, et al. PET/NIR-II fluorescence imaging and image-guided surgery of glioblastoma using a folate receptor  $\alpha$ -targeted dual-modal nanoprobe [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2022, 49(13):4325-4337.
- [16] Deng Y, Wang Y, Cherian C, et al. Synthesis and discovery of high affinity folate receptor-specific glycinamide ribonucleotide formyltransferase inhibitors with antitumor activity[J]. *J Med Chem*, 2008, 51(16):5052-5063.
- [17] Wang L, Cherian C, Desmoulin SK, et al. Synthesis and antitumor activity of a novel series of 6-substituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidine thienoyl antifolate inhibitors of purine biosynthesis with selectivity for high affinity folate receptors and the proton-coupled folate transporter over the reduced folate carrier for cellular entry[J]. *J Med Chem*, 2010, 53(3):1306-1318.
- [18] Xing R, Zhang H, Yuan J, et al. Novel 6-substituted benzoyl and non-benzoyl straight chain pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as potential antitumor agents with multitargeted inhibition of TS, GARFTase and AICARFTase [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 139:531-541.
- [19] Gonçalves MS. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes[J]. *Chem Rev*, 2009, 109(1):190-212.
- [20] Zhou Y, Wang X, Zhang W, et al. Recent advances in small molecule fluorescent probes for simultaneous imaging of two bioactive molecules in live cells and in vivo[J]. *Front Chem Sci Eng*, 2022, 16(1):4-33.
- [21] Zhang Y, Luo Z, Guo L, et al. Discovery of novel tumor-targeted near-infrared probes with 6-substituted pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as targeting ligands [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 262:115914.

(本文编辑:赵丽洁)