

(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
2018 年 11 月 15 日 (15.11.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/205286 A1

(51) 国际专利分类号:

C07D 311/16 (2006.01) *A61K 47/62* (2017.01)
C07D 405/06 (2006.01) *A61K 47/54* (2017.01)
C07H 15/252 (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/585 (2006.01)

201710317186.7 2017年5月8日 (08.05.2017) CN

(71) 申请人: 中国科学技术大学 (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) [CN/CN]; 中国安徽省合肥市金寨路 96 号, Anhui 230026 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/084503

(22) 国际申请日: 2017 年 5 月 16 日 (16.05.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201710317704.5 2017年5月8日 (08.05.2017) CN
201710316952.8 2017年5月8日 (08.05.2017) CN

(72) 发明人: 刘世勇(LIU, Shiyong); 中国安徽省合肥市金寨路96号, Anhui 230026 (CN)。 刘固寰(LIU, Guhuan); 中国安徽省合肥市金寨路96号, Anhui 230026 (CN)。 姜琰琰(JIANG, Yanyan); 中国安徽省合肥市金寨路96号, Anhui 230026 (CN)。

(74) 代理人: 北京集佳知识产权代理有限公司 (UNITALEN ATTORNEYS AT LAW); 中国北京市朝阳区建国门外大街22号赛特广场7层, Beijing 100004 (CN)。

(54) Title: CONJUGATE AND BLOCK COPOLYMER CONTAINING FLUORESCENT CHROMOPHORE AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 含荧光发色团的缀合物、嵌段共聚物及其制备方法和应用

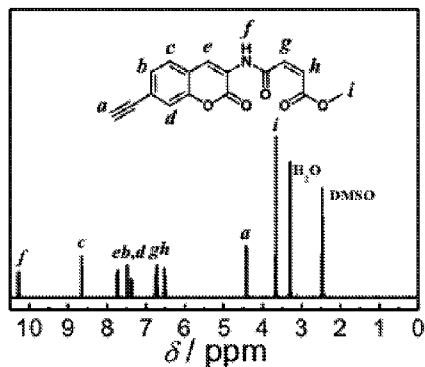
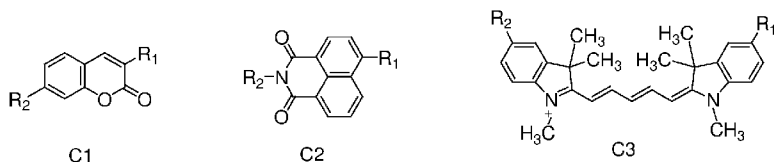


图 1

(57) Abstract: Provided is a conjugate containing a fluorescent chromophore, which has any structure selected from C1 to C3. The conjugate containing the fluorescent chromophore provided by the present invention comprises one fluorescent chromophore and two highly reactive groups R1 and R2 linked to the fluorescent chromophore by a covalent bond. The fluorescent chromophore in the conjugate initially has no or only weak fluorescence emission

(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, 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, 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))。

capability, and only after the two highly reactive groups react together with the corresponding molecule, the fluorescent chromophore has strong fluorescence emission. Therefore, the efficiency of conjugation of drug molecules to targeting molecules can be monitored *in situ* by the infrared fluorescence emission intensity and applied to the target-mediated drug delivery.

(57) 摘要: 本发明提供了一种含荧光发色团的缀合物, 具有C1~C3任一结构。本发明提供的上述含荧光发色团的缀合物, 包含一个荧光发色团和通过共价键连接在荧光发色团上的两个高反应活性基团R₁与R₂, 所述缀合物中的荧光发色团初始不具有或者仅具有弱的荧光发射能力, 仅当两个高反应活性基团共同与相应分子反应后, 荧光发色团才具有强的荧光发射, 因此可以通过红外荧光发射强度原位监控药物分子与靶向分子缀合效率, 并应用于靶向介导的药物传输。

含荧光发色团的缀合物、嵌段共聚物及其制备方法和应用

本申请要求于 2017 年 05 月 08 日提交中国专利局、申请号为 201710317704.5、发明名称为“含荧光发色团的缀合物、嵌段共聚物、靶向药物及其制备方法和应用”，和 2017 年 05 月 08 日提交中国专利局、申请号为 201710316952.8、发明名称为“具有荧光发射性质的抗体-药物/探针缀合物及其制备方法和应用”，和 2017 年 05 月 08 日提交中国专利局、申请号为 201710317186.7、发明名称为“具有荧光发射性质的蛋白质/多肽-聚合物缀合物及其制备方法和应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

10 技术领域

本发明涉及有机桥接分子技术领域，尤其涉及一种含荧光发色团的缀合物、嵌段共聚物及其制备方法和应用。

背景技术

多肽、蛋白质及抗体与合成聚合物、药物和成像探针的共价功能化形成了重要的可应用于临床治疗的生物偶联物，与蛋白质-聚合物偶联物，抗体-药物偶联物一起，成为典型的例子。蛋白质-聚合物偶联物可追溯到 1970 年，Davis, Abuchowski 和合作者报道了聚乙二醇（PEG）与牛血清白蛋白的偶联。这项技术现在被称为 PEGylation 且延伸到了许多聚合物类型上，如，响应性聚合物和两性离子聚合物。合成的聚合物接到蛋白质上如 PEGylation 能带来许多优点，包括增强蛋白质的溶解性和稳定性，减少免疫原性，增加血液循环半衰期，目前至少 PEGylated 蛋白质已被美国食品与药物管理局（FDA）认证。另一方面，抗体药物偶联物（ADCs）与能特异性靶向病变部位的单克隆抗体的结合能杀死癌细胞。两种 FDA 认证的 ADCs，brentuximabvedotin（商品名，Adcetris）和曲妥单抗（商品名，Kadcyla），是目前可商购的，目前临床上使用的 ADCs 约 40 种。

蛋白质-聚合物偶联物通过长出支链（graft from）、嫁接支链（graft to）和大单体共聚接枝（graft through）的方法来制备。抗体-药物偶联物和蛋白质-聚合物的制备都依赖于选择合适的高效的偶联反应和连接基元。对于蛋白质/抗体偶联物来说，选择不影响蛋白质/药物活性和抗体功能是最好的。典型的，

可以通过蛋白质/抗体组织工程天然蛋白质特异性位点的改性（如，二硫键的还原，碳末端的改性，或多糖的氧化），和直接利用特定氨基酸的特异性反应来实现。合成的功能性聚合物/药物共价接到蛋白质/抗体上主要利用了正交的click反应，如 Staudinger 反应，铜催化的叠氮-炔环加成（CuAAC），张力促进的叠氮-环炔烃的环加成（SPAAC），D-A 加成，迈克尔加成，和由醛和酮形成肟/腙。新的设计原则的引入，如，模块化设计，温和的合成方式，光学示踪和多功能集成的能力，进一步促进了该领域的发展。

值得注意的是，即使是最优设计的蛋白质-聚合物偶联物，蛋白质功能和活性的明显减弱是不可避免的。一种解决方法是制备可断裂的生物偶联物，在体内随着时间的增加释放出天然的蛋白质。在细胞内化的过程中，ADCs 应能有效释放出其活性的药物负载，以展现出细胞毒性。然而，监测发现蛋白质-聚合物偶联物和抗体-药物偶联物的偶联和随后释放蛋白质/药物的程度主要依赖于传统的非原位技术，如，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），质谱（MS），高效液相色谱（HPLC），和体积排除色谱（SEC）。这阻止了对聚合物/药物偶联物在体外和细胞水平上的释放过程的实时监测。

另外，抗体定向的光学分子的成像在医学诊断和治疗响应评价中展现出巨大的潜力；也可直接与手术或内窥镜过程结合。用荧光探针标记的靶向抗体可以在体内实时高分辨成像，可用于初期的检测和手术中残留癌症组织的监测。然而，一直有荧光的探针也有本质的缺陷，如背景干扰和低的信噪比。

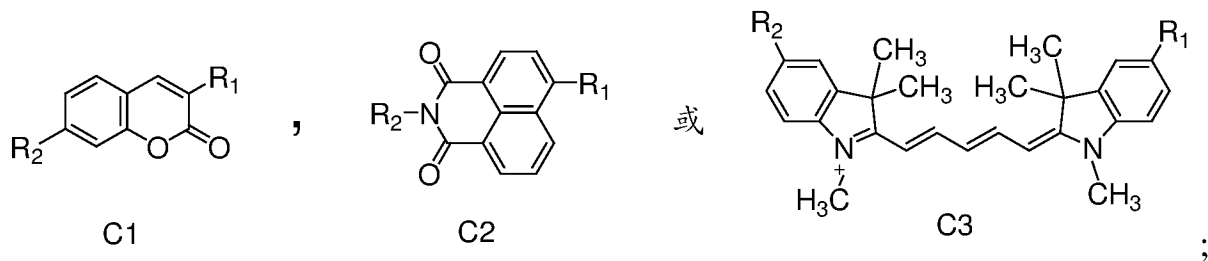
抗体-药物缀合物能够降低体系毒性和增强偶联药物的治疗效率。在抗体-药物缀合物中连接键的设计至关重要，因为它不仅要求能够为遮蔽药物在体循环提供充足的稳定性，而且在肿瘤细胞内应能快速有效地释放药物。触发性可断裂连接键常被用来连接药物和抗体。然而，目前偶联效率和触发后释放程度的定量大多依赖于非原位技术，如高效液相色谱、凝胶电泳、体积排除色谱以及质谱。目前尚不能实现对抗体-药物缀合物在体外和细胞水平上的释放过程的实时监测。

发明内容

有鉴于此，本发明要解决的技术问题在于提供一种含荧光发色团的缀合

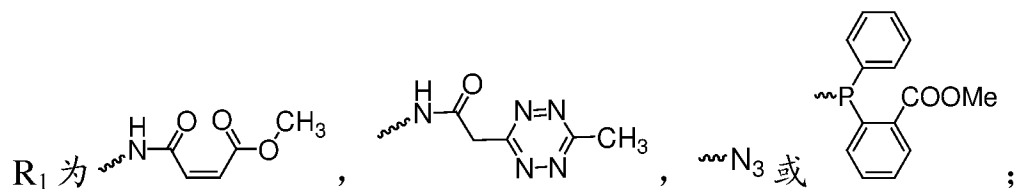
物、嵌段共聚物及其制备方法和应用，能够通过红外荧光发射强度原位监控缀合物的缀合效率，并应用于靶向介导的药物传输，或多肽与抗癌药物的传输。

本发明提供了一种含荧光发色团的缀合物，具有以下任一结构：

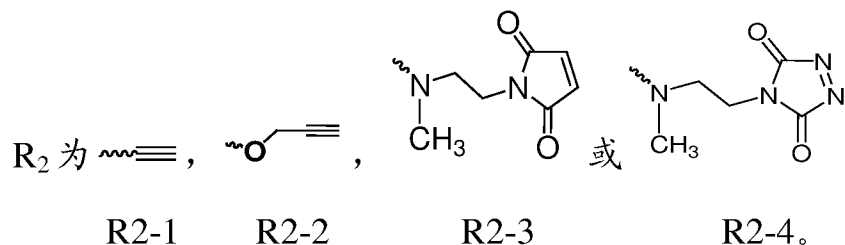


5 其中， R_1 和 R_2 为能够淬灭荧光发色团荧光并且能够进行“点击”反应的基团。

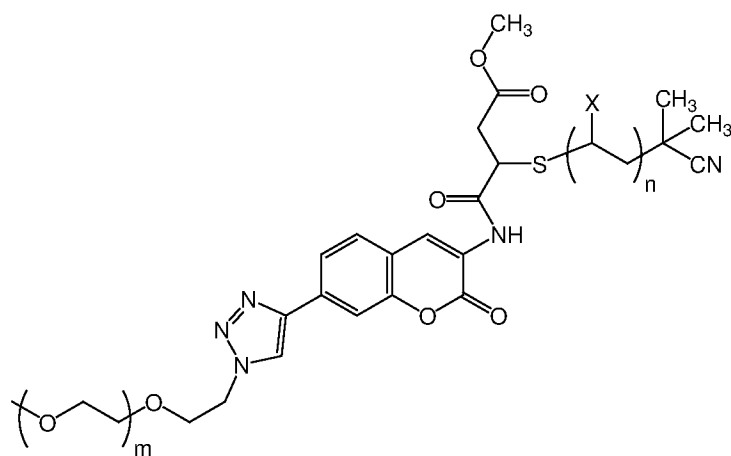
优选的，



10 R1-1 R1-2 R1-3 R1-4

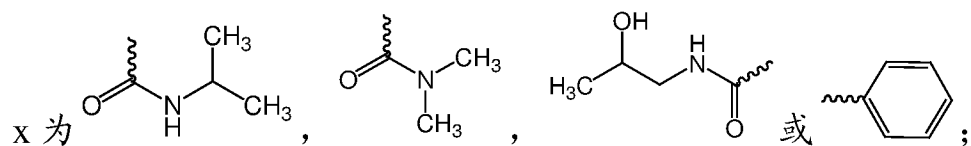


本发明提供了一种具有荧光发射性质的嵌段共聚物，其特征在于，具有式 I-1 所示结构：



式I-1;

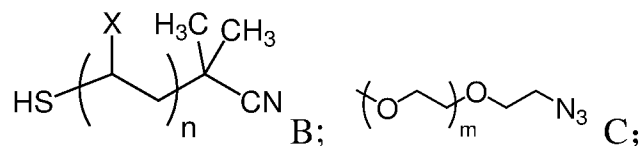
其中,



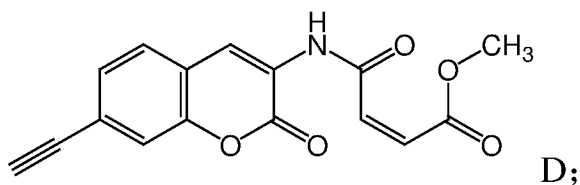
m 为 23~445, n 为 10~150。

- 5 本发明提供了上述具有荧光发射性质的嵌段共聚物的制备方法, 包括以下步骤:

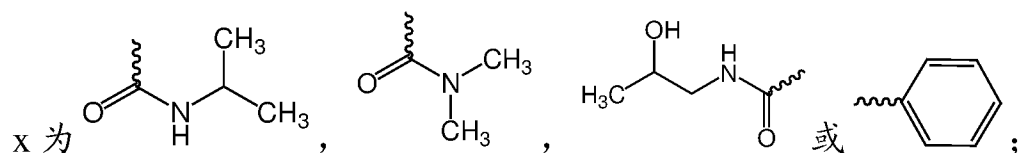
含有巯基端基的聚合物 B 和含有叠氮基的聚合物 C 与化学缀合分子 D 进行 Michael 反应与点击反应, 得到式I-1 所示嵌段共聚物;



10



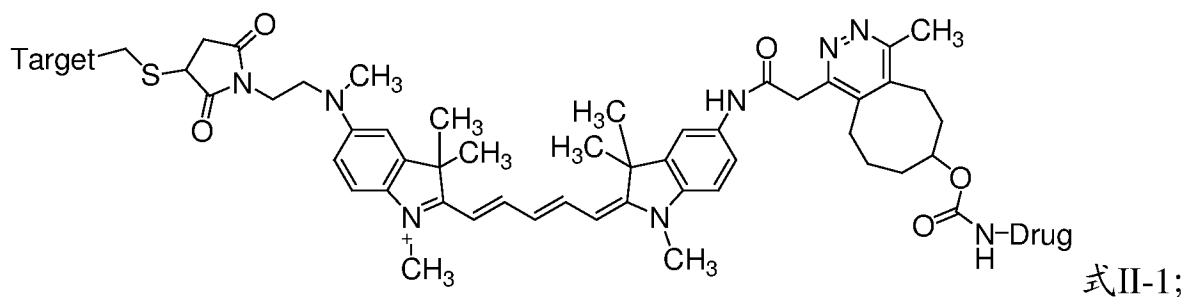
其中,



m 为 23~445, n 为 10~150。

优选的, 通过荧光发射强度原位监控嵌段共聚物的缀合效率。

本发明提供了一种具有荧光发射性质的靶向药物, 具有式II-1 所示结构:



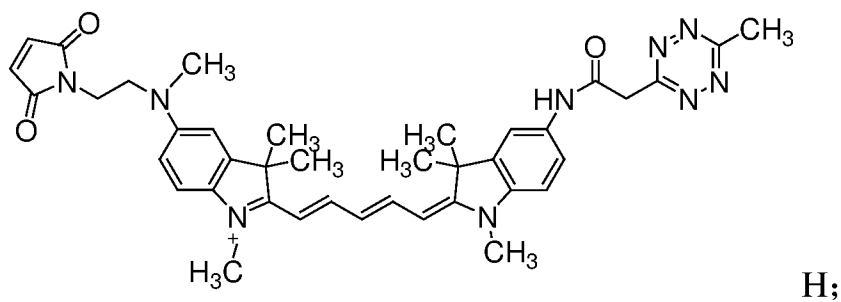
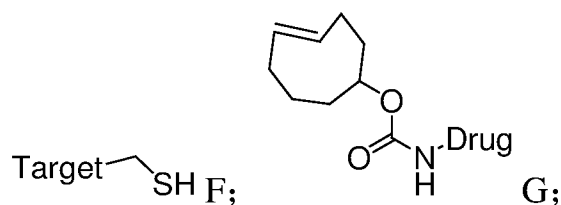
5 其中,

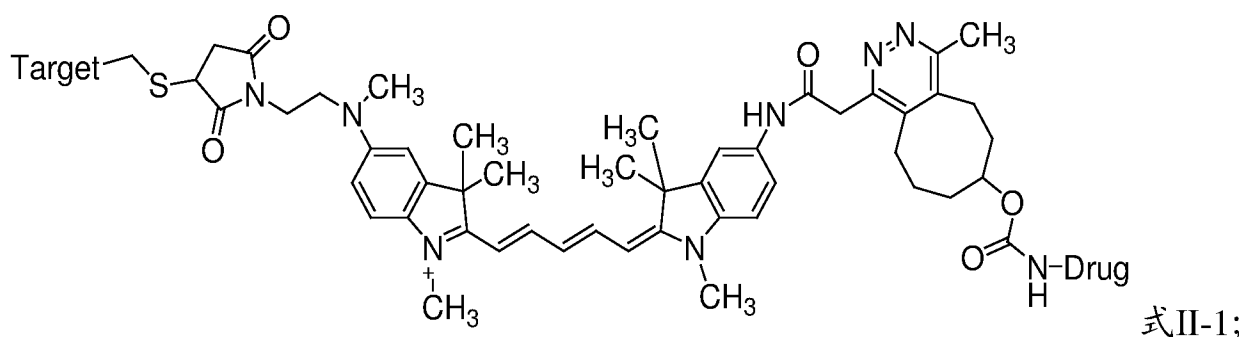
Target 为环状 RGD 多肽、叶酸或磺酰胺;

Drug 为阿霉素、喜树碱或紫杉醇。

本发明提供了上述具有荧光发射性质的靶向药物的制备方法, 包括以下步骤:

10 靶向分子 F、药物分子 G 和化学缀合分子 H 进行 Michael 反应和反向 D-A 加成反应, 得到式II-1 所示靶向药物;





其中,

Target 为环状 RGD 多肽、叶酸或磺酰胺;

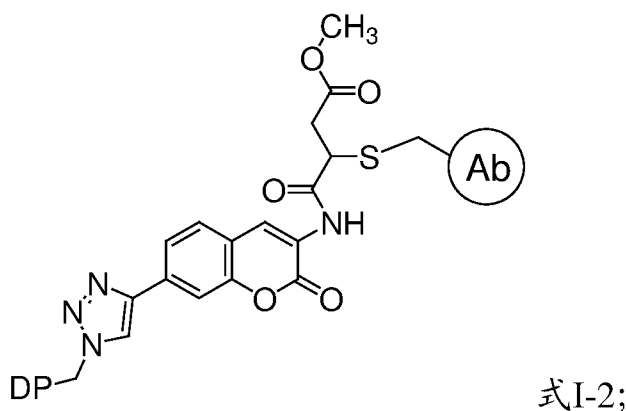
Drug 为阿霉素、喜树碱或紫杉醇。

- 5 优选的, 通过红外荧光发射强度原位监控药物分子和靶向分子的缀合效率。

本发明提供了上述靶向药物在靶向介导药物传输中的应用。

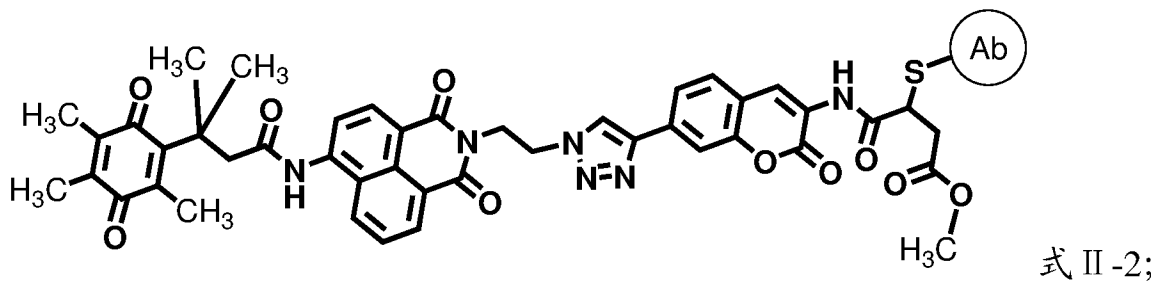
- 10 本发明提供的上述含荧光发色团的缀合物, 包含一个荧光发色团和通过共价键连接在荧光发色团上的两个高反应活性基团 R_1 与 R_2 , 所述缀合物中的荧光发色团初始不具有或者仅具有弱的荧光发射能力, 仅当两个高反应活性基团共同与相应分子反应后, 荧光发色团才具有强的荧光发射, 因此可以通过红外荧光发射强度原位监控药物分子与靶向分子缀合效率, 并应用于靶向介导的药物传输, 用于对聚合物/药物偶联物在体外和细胞水平上的释放过程的实时监测。

- 15 本发明提供了一种具有荧光发射性质的抗体-药物/探针缀合物, 具有式I-2所示结构:



其中, Ab 为抗体, DP 为荧光探针或药物分子。

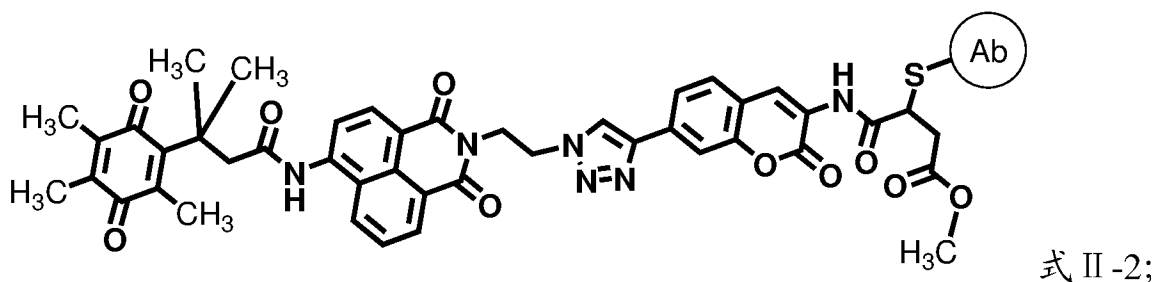
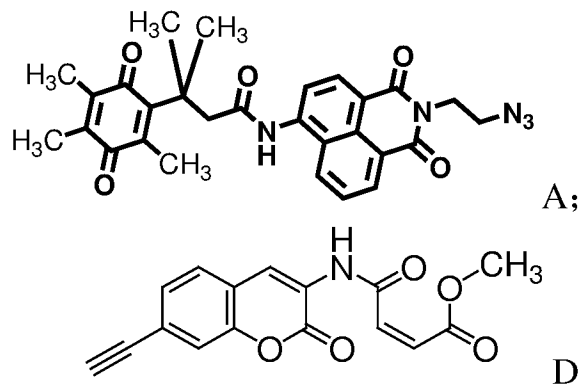
本发明提供了一种具有荧光发射性质的抗体-探针缀合物，具有式 II-2 所示结构：



其中，Ab 为癌胚抗原单抗或赫赛丁。

5 本发明提供了上述抗体-探针缀合物的制备方法，包括以下步骤：

单克隆抗体、含叠氮基元的荧光探针 A 与双官能荧光分子 D 进行 Michael 反应和点击反应，得到式 II-2 所示抗体-探针缀合物；

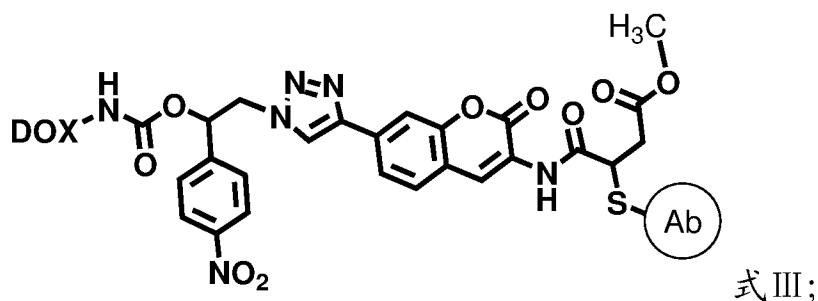


其中，所述单克隆抗体为含巯基的癌胚抗原单抗或赫赛丁。

优选的，通过荧光发射强度原位监控抗体-探针缀合物的缀合效率。

本发明提供了上述抗体-探针缀合物或上述制备方法制备的抗体-探针缀合物作为抗原与醌氧化还原酶反应指示剂的应用。

15 本发明提供了一种具有荧光发射性质的抗体-药物缀合物，具有式 III 所示结构：

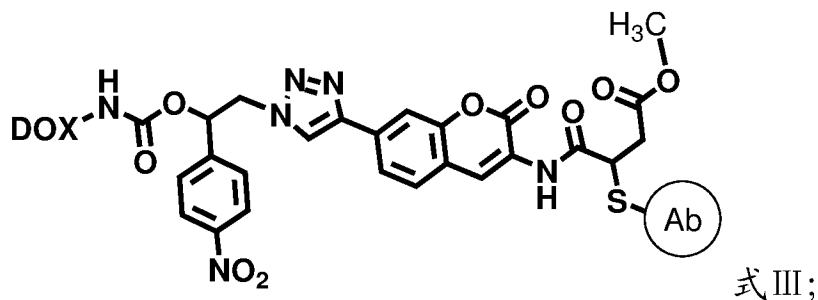
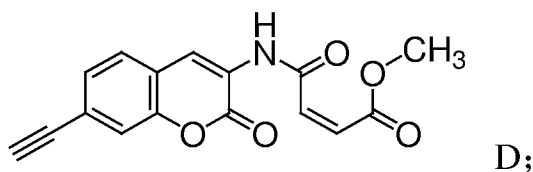
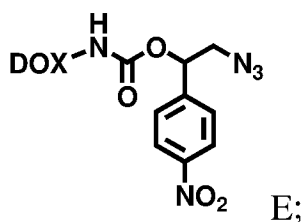


其中, DOX 为阿霉素, Ab 为癌胚抗原单抗或赫赛丁。

本发明提供了上述抗体-药物缀合物的制备方法, 包括以下步骤:

单克隆抗体、含叠氮基元的前药分子 E 与双官能荧光分子 D 进行 Michael

5 反应和点击反应, 得到式 III 所示抗体-药物缀合物;



其中, DOX 为阿霉素, 单克隆抗体为含巯基的癌胚抗原单抗或赫赛丁。

10 优选的, 通过荧光发射强度原位监控抗体-药物缀合物的缀合效率。

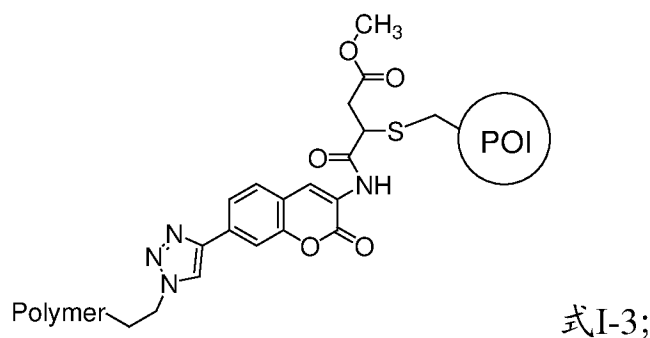
本发明提供了上述抗体-药物缀合物或上述制备方法制备的抗体-药物缀合物作为荧光指示剂实时监控药物释放的应用。

本发明提供了上述抗体-药物缀合物或上述制备方法制备的抗体-药物缀合物作为靶向药物释放载体的应用。

15 本发明提供的抗体-药物/探针缀合物具有自报告缀合效率特征, 其由双官

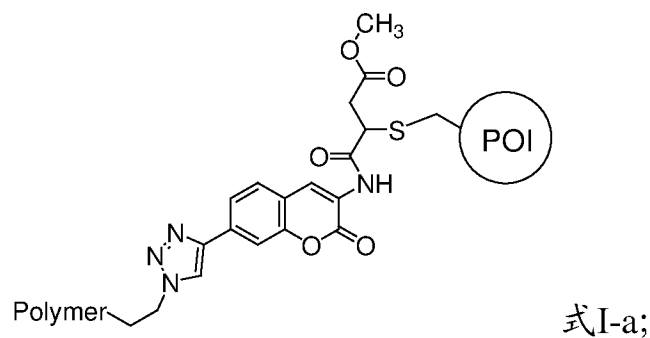
能度荧光分子桥接抗体与探针/药物分子，所述的双官能度荧光分子本身不具有或者仅具有弱的荧光发射能力，仅当抗体-探针/药物缀合后荧光分子才具有强的荧光发射，因此能够通过荧光监测的方法原位监控缀合过程，并应用于治疗多肽与抗癌药物的传输。

- 5 本发明提供了一种具有荧光发射性质的蛋白质/多肽-聚合物缀合物，具有式I-3所示结构：



其中，POI 为蛋白质或多肽；Polymer 为聚合物。

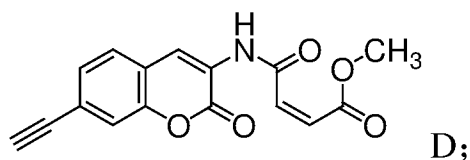
- 10 本发明提供了一种具有荧光发射性质的蛋白质-聚合物缀合物，具有式I-a所示结构：

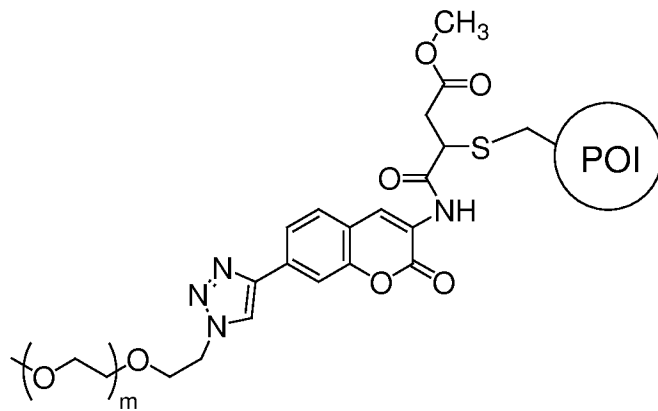


其中，所述 POI 为牛血清蛋白或鲑鱼降钙素，所述 Polymer 为聚乙二醇。

本发明提供了上述蛋白质-聚合物缀合物的制备方法，包括以下步骤：

- 15 含巯基的牛血清蛋白、叠氮端基的聚乙二醇和化合物 D 进行 Michael 反应和点击反应，制备得到式I-a 所示的蛋白质-聚合物缀合物；





式I-a;

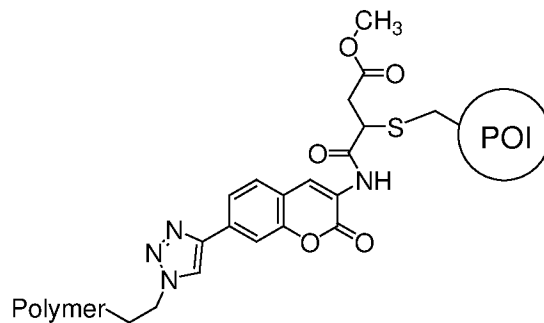
其中, POI 为牛血清蛋白, m 为 23~445;

或者包括以下步骤:

- 5 含巯基的鲑鱼降钙素、叠氮端基的聚乙二醇和化合物 D 进行 Michael 反应和点击反应, 制备得到式I-a 所示的蛋白质-聚合物缀合物;

其中, POI 为鲑鱼降钙素; m 为 23~445。

本发明提供了一种具有荧光发射性质的多肽-聚合物缀合物, 具有式I-b 所示结构:



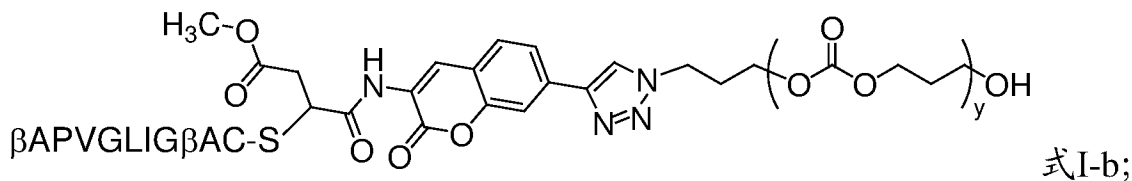
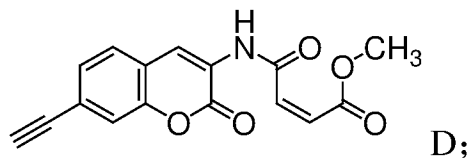
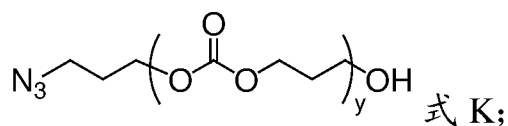
式I-b;

- 10 其中, 所述 POI 为基质金属蛋白酶可切断多肽, 所述 Polymer 为聚三亚甲基碳酸酯。

本发明提供了上述多肽-聚合物缀合物的制备方法, 包括以下步骤:

- 15 式 J 所示的基质金属蛋白酶可切断多肽、式 K 所示的叠氮端基的聚三亚甲基碳酸酯和化合物 D 进行 Michael 反应和点击反应, 制备得到式I-b 所示的多肽-聚合物缀合物;





其中, y 为 10~55。

5 优选的, 上述制备方法中, 通过荧光发射强度原位监控缀合物的缀合效率。

本发明提供了上述多肽-聚合物缀合物或上述制备方法制备的多肽-聚合物缀合物组成的聚合物囊泡。

优选的, 所述聚合物囊泡粒径为 60~150nm。

上述聚合物囊泡具有基质金属酶响应特性。

10 本发明提供了上述聚合物囊泡作为药物载体的应用, 或作为荧光指示剂实时监控药物释放的应用。

15 本发明提供的蛋白质/多肽-聚合物缀合物由双官能度荧光分子桥接蛋白质/多肽与聚合物, 所述的双官能度荧光分子本身不具有或者仅具有弱的荧光发射能力, 仅当蛋白质/多肽-聚合物缀合后荧光分子才具有强的荧光发射, 因此所述蛋白质/多肽-聚合物缀合物的缀合过程可以通过荧光变化原位监控, 并且所述蛋白质/多肽-聚合物缀合物可应用于治疗多肽与抗癌药物的传输。

附图说明

图 1 为本发明制备的 C1 的核磁氢谱图;

图 2 为本发明制备的 C1 的核磁碳谱图;

20 图 3 为本发明制备的 C1 的电喷雾质谱图;

图 4 为本发明制备 C1 过程中荧光变化与高效液相色谱曲线;

图 5 为本发明制备 C1 过程中荧光变化与缀合效率的关系曲线;

图 6 为本发明实施例 5 制备的嵌段聚合物的凝胶渗透色谱图;

图 7 为本发明实施例 5 制备嵌段聚合物反应过程中的荧光变化;

图 8 为本发明实施例 5 制备嵌段聚合物缀合过程中荧光变化与缀合效率的关系;

图 9 为实施例 6 制备的前药分子的核磁共振氢谱图;

5 图 10 为实施例 6 制备的前药分子的电喷雾质谱图;

图 11 为实施例 7 制备的荧光探针 A 的核磁共振氢谱图;

图 12 为实施例 7 制备的荧光探针 A 的电喷雾质谱图;

图 13 为实施例 8 制备抗体-探针缀合物反应过程中的荧光变化过程曲线图;

10 图 14 为实施例 8 制备抗体-药物缀合物反应过程中的荧光变化过程曲线图;

图 15 为实施例 8 制备的抗体-探针缀合物的酶检测过程荧光变化过程;

图 16 为实施例 8 制备的抗体-探针缀合物的细胞内癌胚抗原与醌氧化还原酶检测;

15 图 17 为实施例 8 制备的抗体-药物缀合物的硝基还原酶触发药物释放过程荧光变化过程;

图 18 为实施例 9 制备的抗体-药物缀合物的含癌胚抗原的细胞内硝基还原酶触发药物释放过程;

20 图 19 为实施例 10 制备牛血清蛋白-聚乙二醇缀合物的缀合过程荧光变化过程曲线图;

图 20 为实施例 10 制备牛血清蛋白-聚乙二醇缀合物的荧光变化与缀合效率之间关系图;

图 21 为实施例 10 制备牛血清蛋白-聚乙二醇缀合物的十二磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳图;

25 图 22 为实施例 11 制备鲑鱼降钙素-聚乙二醇缀合物的缀合过程荧光变化过程曲线图;

图 23 为实施例 11 制备鲑鱼降钙素-聚乙二醇缀合物的体积排除色谱图;

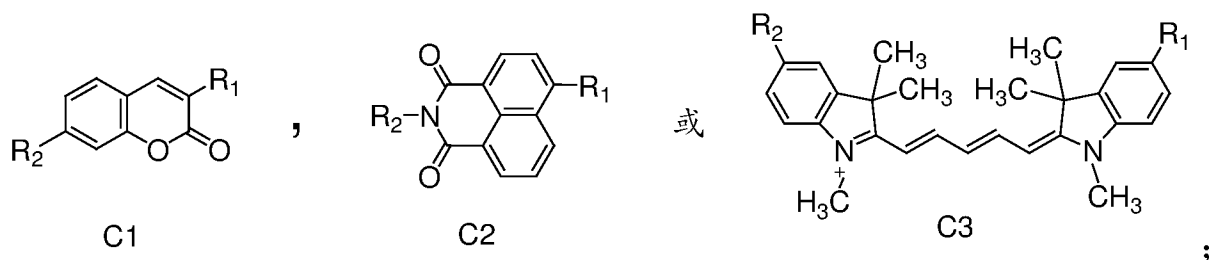
图 24 为实施例 11 制备鲑鱼降钙素-聚乙二醇缀合物的十二磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳图;

图 25 为实施例 14 制备的囊泡在水中的透射电镜图;

图 26 为实施例 15 的药物控释曲线图。

具体实施方式

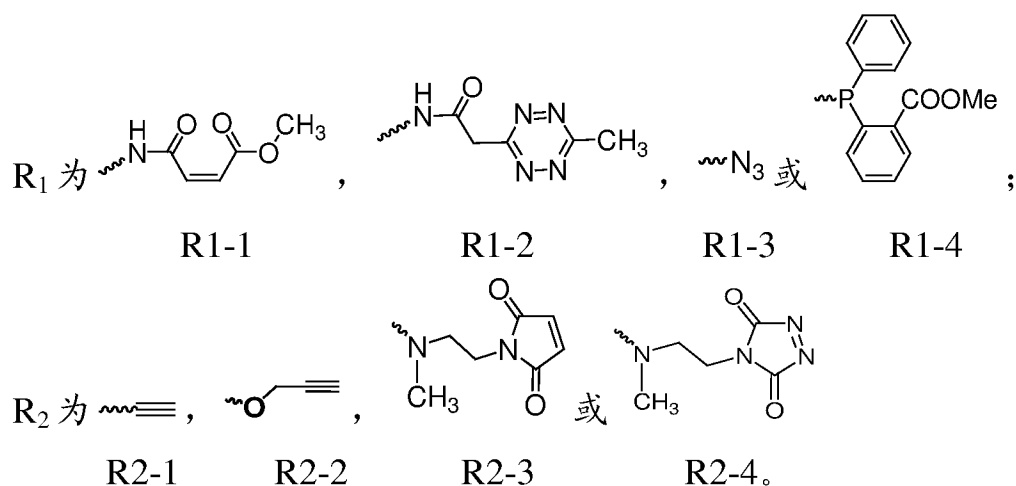
5 本发明提供了一种含荧光发色团的缀合物, 具有以下任一结构:



其中, R_1 和 R_2 为能够淬灭荧光发色团荧光并且能够进行“点击”反应的基团。

10 本发明提供的上述含荧光发色团的缀合物, 包含一个荧光发色团和通过共价键连接在荧光发色团上的两个高反应活性基团 R_1 与 R_2 , 所述缀合物中的荧光发色团初始不具有或者仅具有弱的荧光发射能力, 仅当两个高反应活性基团共同与相应分子反应后, 荧光发色团才具有强的荧光发射, 所述缀合物如上式 C1~C3 所示, 其中, C1 中的荧光发色团为香豆素基元, C2 中的荧光发色团为萘二酰亚胺基元, C3 中的荧光发色团为五甲川基元。

15 优选的,



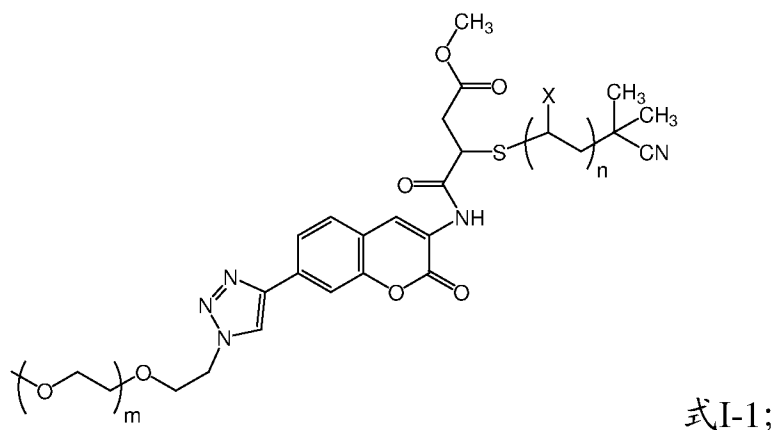
20 本发明中, 弯线表示连接键。

本发明中, 与上述缀合物反应的分子种类根据 R_1 和 R_2 的不同而有所区别,

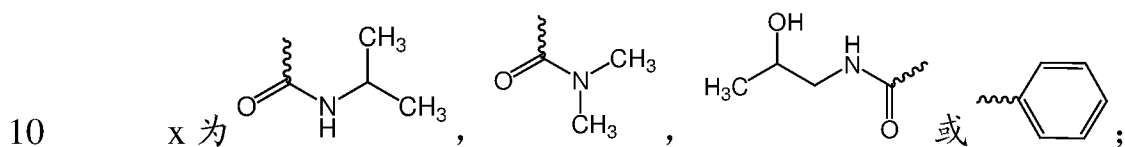
R1-1 与 R2-3 对应于含有巯基的分子, R1-2 对应于含反式环辛烯基的分子, R1-3 对应于含炔基的分子, R1-4 与 R2-1、R2-2 对应含叠氮基的分子, R2-4 对应含丁二烯基的分子。

5 本发明采用含有上述特定反应基团的聚合物、靶向分子或药物分子与上述缀合物进行反应, 得到具有荧光发射性质的嵌段聚合物或靶向药物。

具体的, 本发明提供了一种具有荧光发射性质的嵌段共聚物, 采用上述缀合物作为桥连分子制备而成, 具有式I-1 所示结构:



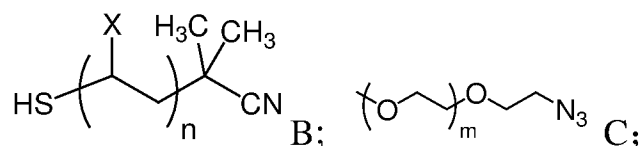
其中,

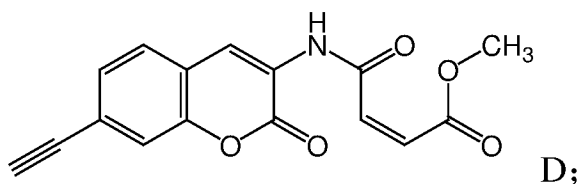


m 优选为 23~445, n 优选为 10~150。

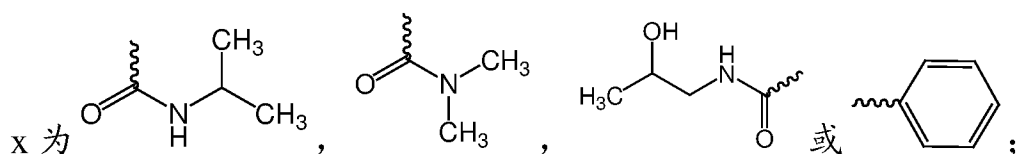
本发明还提供了上述具有荧光发射性质的嵌段共聚物的制备方法, 包括以下步骤:

15 含有巯基端基的聚合物 B 和含有叠氮基的聚合物 C 与化学缀合分子 D 进行 Michael 反应与点击反应, 得到式I-1 所示嵌段共聚物;





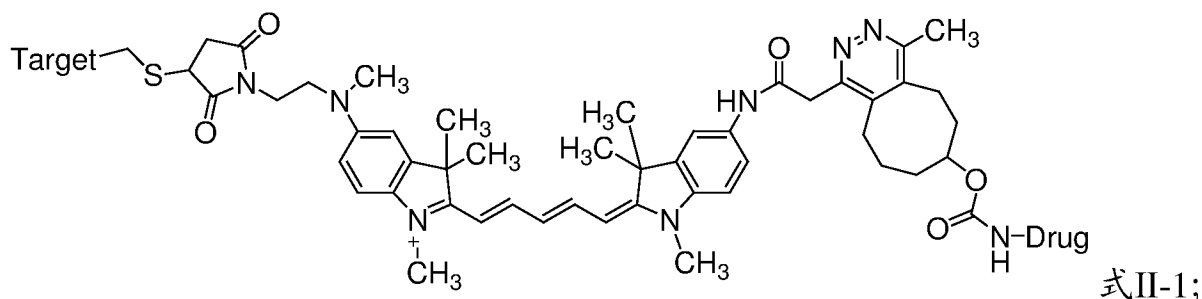
其中,



m 为 23~445, n 为 10~150。

- 5 本发明优选的, 上述反应过程中, 通过荧光发射强度原位监控嵌段共聚物的缀合效率。

本发明还提供了一种具有荧光发射性质的靶向药物, 采用上述缀合物作为桥连分子制备而成, 具有式II-1 所示结构:



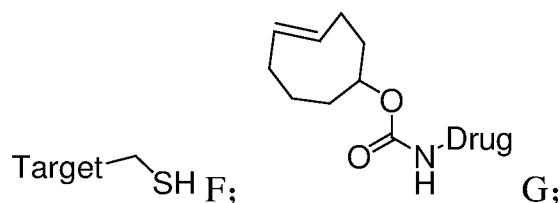
- 10 其中,

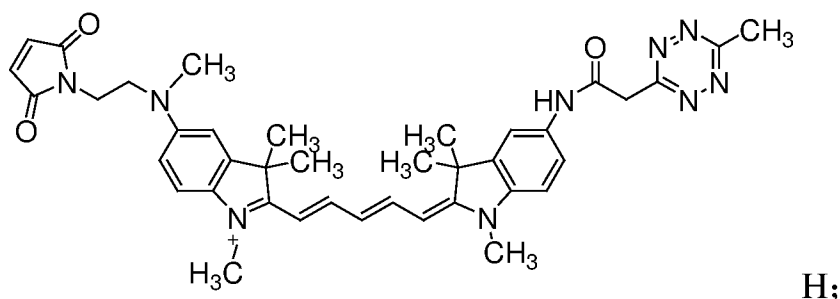
Target 为靶向基团, 包括: 环状 RGD 多肽、叶酸或磺酰胺;

Drug 为药物基团, 包括: 阿霉素、喜树碱或紫杉醇。

本发明还提供了上述具有荧光发射性质的靶向药物的制备方法, 包括以下步骤:

- 15 靶向分子 F、药物分子 G 和化学缀合分子 H 进行 Michael 反应和反向 D-A 加成反应, 得到式II-1 所示靶向药物;





其中,

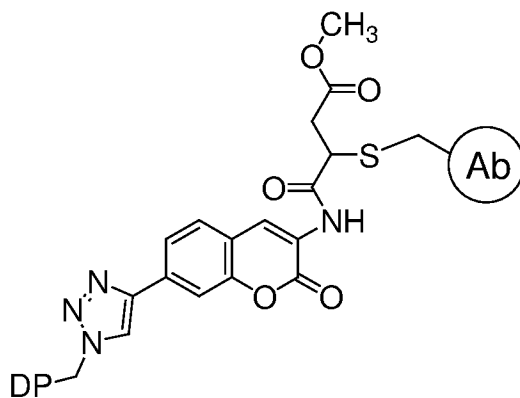
Target 为靶向基团, 包括: 环状 RGD 多肽、叶酸或磺酰胺;

Drug 为药物基团, 包括: 阿霉素、喜树碱或紫杉醇。

5 本发明优选的, 上述反应过程中, 通过红外荧光发射强度原位监控药物分子和靶向分子的缀合效率。

本发明还提供了上述靶向药物在靶向介导药物传输中的应用。

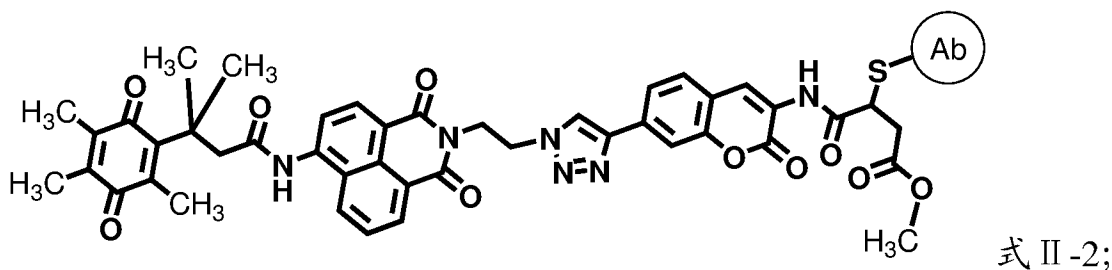
本发明提供了一种具有荧光发射性质的抗体-药物/探针缀合物, 具有式I-2所示结构:



其中, Ab 为抗体, DP 为荧光探针或药物分子。

15 本发明提供的抗体-药物/探针缀合物具有自报告缀合效率特征, 其由双官能度荧光分子桥接抗体与探针/药物分子, 所述的双官能度荧光分子本身不具有或者仅具有弱的荧光发射能力, 仅当抗体-探针/药物缀合后荧光分子才具有强的荧光发射, 因此能够通过荧光监测的方法原位监控缀合过程, 并应用于治疗多肽与抗癌药物的传输。

具体的, 当 DP 为荧光探针时, 本发明提供了一种具有荧光发射性质的抗体-探针缀合物, 具有式 II-2 所示结构:



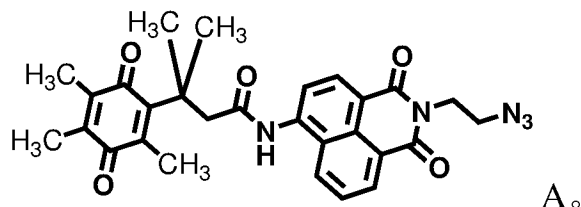
其中, Ab 为癌胚抗原单抗或赫赛丁。

本发明还提供了上述抗体-探针缀合物的制备方法, 包括以下步骤:

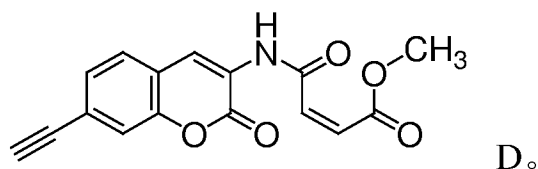
单克隆抗体、含叠氮基元的荧光探针 A 与双官能荧光分子 D 进行 Michael 反应和点击反应, 得到式 II -2 所示抗体-探针缀合物。

所述单克隆抗体为含巯基的癌胚抗原单抗或赫赛丁。

所述含叠氮基元的荧光探针 A 如下式 A 所示:



所述双官能荧光分子 D 如下式 D 所示:

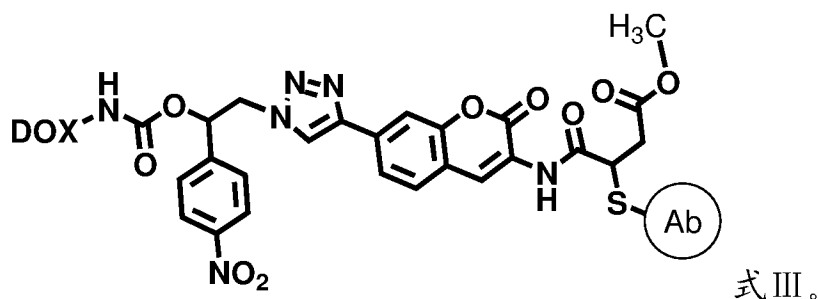


本发明对上述反应的原料配比、反应条件并无特殊限定, 可以为本领域常规的 Michael 反应和点击反应的配比和条件。

本发明优选的, 通过荧光发射强度原位监控抗体-探针缀合物的缀合效率。

本发明提供的上述抗体-探针缀合物具有醌氧化还原酶作用下的荧光变化, 因此可以作为抗原与醌氧化还原酶反应指示剂应用。

当 DP 为药物分子时, 本发明提供了一种具有荧光发射性质的抗体-药物缀合物, 具有式 III 所示结构:



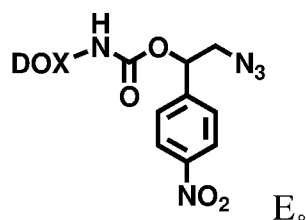
其中, DOX 为阿霉素, Ab 为癌胚抗原单抗或赫赛丁。

本发明还提供了上述抗体-药物缀合物的制备方法, 包括以下步骤:

- 单克隆抗体、含叠氮基元的前药分子 E 与双官能荧光分子 D 进行 Michael 反应和点击反应, 得到式 III 所示抗体-药物缀合物;

所述单克隆抗体为含巯基的癌胚抗原单抗或赫赛丁。

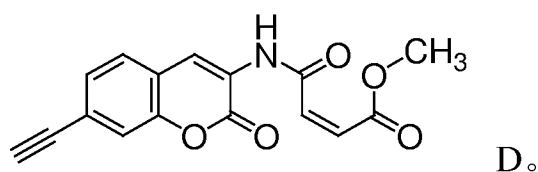
所述含叠氮基元的前药分子 E 如下式 E 所示:



式 E 中, DOX 为阿霉素。

- 式 E 中的氨基为阿霉素四氢吡喃环上的氨基。

所述双官能荧光分子 D 如下式 D 所示:



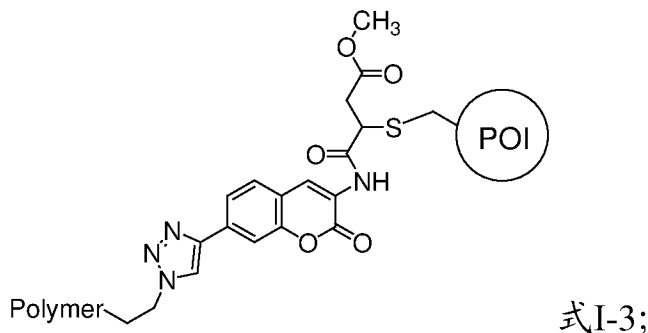
本发明对上述反应的原料配比、反应条件并无特殊限定, 可以为本领域常规的 Michael 反应和点击反应的配比和条件。

- 本发明优选的, 通过荧光发射强度原位监控抗体-药物缀合物的缀合效率。

本发明提供的上述抗体-药物缀合物具有硝基还原酶作用下的原药阿霉素释放, 因此可以作为荧光指示剂实时监控药物释放, 或者作为靶向药物释放载体。

本发明提供了一种具有荧光发射性质的蛋白质/多肽-聚合物缀合物, 具有

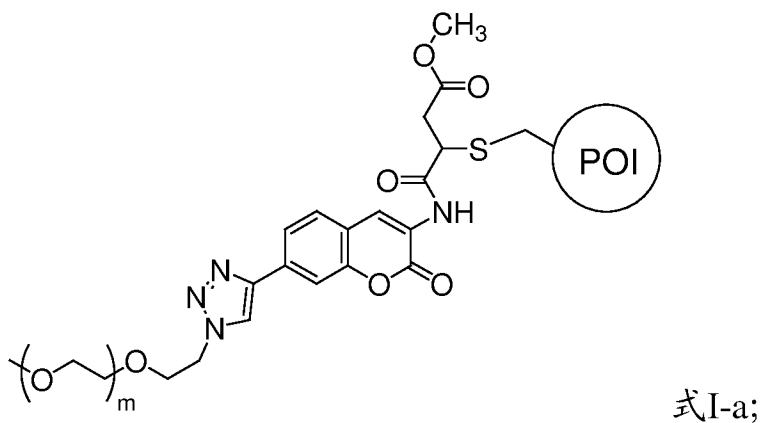
式I-3 所示结构:



其中, POI 为蛋白质或多肽; Polymer 为聚合物。

5 所述蛋白质/多肽-聚合物缀合物由双官能度荧光分子桥接蛋白质/多肽与
聚合物, 所述的双官能度荧光分子本身不具有或者仅具有弱的荧光发射能力,
仅当蛋白质/多肽-聚合物缀合后荧光分子才具有强的荧光发射, 因此所述蛋白
质/多肽-聚合物缀合物的缀合过程可以通过荧光变化原位监控, 并且所述蛋白
质/多肽-聚合物缀合物可应用于治疗多肽与抗癌药物的传输。

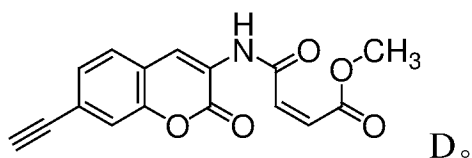
10 在本发明的某些具体实施例中, 所述 POI 为牛血清蛋白, 所述 Polymer
为聚乙二醇, 其结构如式I-a 所示:



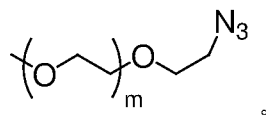
其中, m 为 23~445。

上述蛋白质-聚合物缀合物优选按照以下方法制备:

15 含巯基的牛血清蛋白、叠氮端基的聚乙二醇和化合物 D 进行 Michael 反应
和点击反应, 制备得到式I-a 所示的蛋白质-聚合物缀合物;



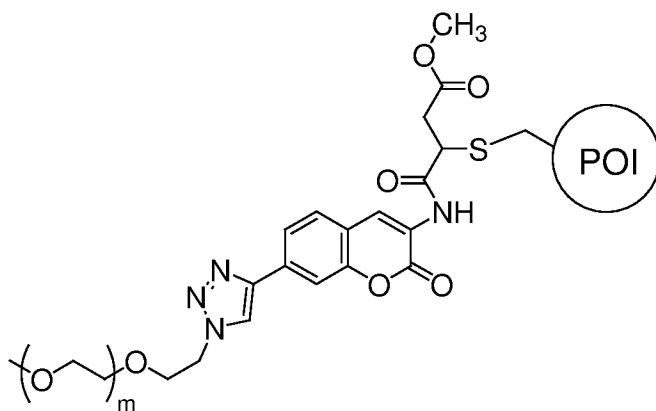
所述叠氮端基的聚乙二醇结构如下:



本发明对上述反应的原料配比、反应条件并无特殊限定,可以为本领域常规的 Michael 反应和点击反应的配比和条件。

5 本发明优选的,通过荧光发射强度原位监控上述蛋白质-聚合物缀合物的缀合效率。

在本发明的另外一些具体实施例中,所述 POI 为鲑鱼降钙素,所述 Polymer 为聚乙二醇,其结构如式I-a 所示:



式I-a;

10 其中, m 为 23~445。

上述蛋白质-聚合物缀合物优选按照以下方法制备:

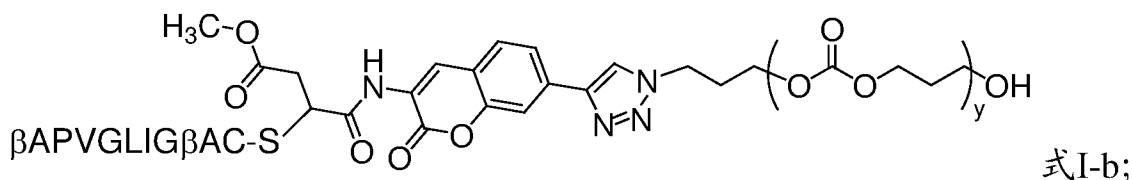
含巯基的鲑鱼降钙素、叠氮端基的聚乙二醇和化合物 D 进行 Michael 反应和点击反应,制备得到式I-a 所示的蛋白质-聚合物缀合物。

所述叠氮端基的聚乙二醇和化合物 D 同上,在此不再赘述。

15 本发明对上述反应的原料配比、反应条件并无特殊限定,可以为本领域常规的 Michael 反应和点击反应的配比和条件。

本发明优选的,通过荧光发射强度原位监控上述蛋白质-聚合物缀合物的缀合效率。

20 在本发明的另外一些具体实施例中,所述 POI 为基质金属蛋白酶可切断多肽,其序列为 β APVGLIG β AC-SH, 其中, SH 为巯基(巯基位于碳端半胱氨酸残基),上述多肽购自上海强耀生物科技公司,所述 Polymer 为聚三亚甲基碳酸酯。其结构如式I-b 所示:

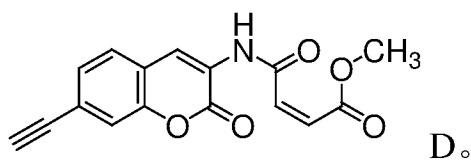
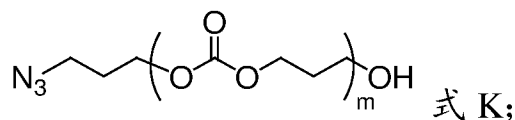


其中, y 为 10~55。

其制备方法优选为:

式 J 所示的基质金属蛋白酶可切断多肽、式 K 所示的叠氮端基的聚三亚甲基碳酸酯和化合物 D 进行 Michael 反应和点击反应, 制备得到式 I-b 所示的多肽-聚合物缀合物;

β APVGLIG β AC-SH 式 J;



10 本发明对上述反应的原料配比、反应条件并无特殊限定, 可以为本领域常规的 Michael 反应和点击反应的配比和条件。

本发明优选的, 通过荧光发射强度原位监控上述蛋白质-聚合物缀合物的缀合效率。

15 本发明还公开了一种囊泡, 由上述多肽-聚合物缀合物或上述制备方法制备的多肽-聚合物缀合物组成。

本发明对所述囊泡的制备方法并无特殊限定, 可以为本领域技术人员熟知的制备方法。本发明优选的, 将上述多肽-聚合物缀合物溶解于 DMSO 中, 加去离子水, 然后用去离子水透析即可。

20 本发明提供的上述聚合物囊泡分散均匀, 且粒径分布均匀, 其粒径分布为 60~150nm。

上述聚合物囊泡具有基质金属酶响应特性, 因此可以作为药物载体应用, 或作为荧光指示剂实时监控药物释放。

为了进一步说明本发明, 下面结合实施例对本发明提供的用作布鲁顿酪氨

双封的香豆素 (C1-C3) 的制备

5



22

^1H NMR (CDCl_3 , δ , ppm, TMS): 11.0 (s, 1H, 苯-OH), 9.87 (s, 1H, -CHO), 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 芳香氢), 7.07 (m, 2H, 芳香氢), 0.26 (s, 9H, -Si(CH₃)₃).

将 **2** (2.85 g, 13.1 mmol) 溶于干燥的 THF (40 mL) 中, 然后加入 20 mL 含有 KOH (0.74 g, 13.2 mmol) 的 MeOH 溶液, 反应体系在室温下搅拌过夜, 然后旋发移除所有溶剂, 残存物重新分散在水中, 加入 1.0 mL 乙酸并用 3 x 200 mL 氯仿萃取。合并有机相并用无水硫酸镁干燥, 过滤后移除所有溶剂得到棕色固体, 正己烷中重结晶两次得到黄色固体 **3** (1.02 g, 收率: 53.2 %, >95% HPLC 纯度)。

^1H NMR (CDCl_3 , δ , ppm, TMS): 11.0 (s, 1H, 苯-OH), 9.89 (s, 1H, -CHO), 7.52 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 芳香氢), 7.12 (m, 2H, 芳香氢), 3.29 (s, 1H, -C $\equiv$ CH).

将苯磺酰氯 (2.51 g, 14.3 mmol), Et_3N (2.15 g, 21.3 mmol) 和 *N*-乙酰甘氨酸 (0.88 g, 7.5 mmol) 溶于 THF 并在室温下搅拌过夜。移除不溶性盐后, 化合物 **3** (1.02 g, 7.0 mmol) 添加到反应体系中并在 80 °C 搅拌 10 h, 然后冷却到 0 °C, 得到沉淀 **4** (1.09 g, 收率: 68.5%, >95% 纯度)。

^1H NMR (CDCl_3 , δ , ppm, TMS): 9.80 (s, 1H, -CO-NH-), 8.57 (s, 1H, 芳香氢), 7.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, 芳香氢), 7.35 (m, 2H, 芳香氢), 4.40 (s, 1H, -C $\equiv$ CH), 2.14 (s, 3H, -COCH₃).

化合物 **4** (1.09 g, 4.8 mmol), DMAP (0.11 g, 0.96 mmol), $(\text{Boc})_2\text{O}$ (2.11 g, 9.8 mmol) 溶解在 40 mL THF 中, 反应体系在 70 °C 搅拌 4 h, 然后冷却至室温, 添加 MeOH (10 mL) 和 $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.96 g, 19.2 mmol), 反应体系再搅拌 4h。加入 CH_2Cl_2 , 然后反应混合物用 1 M HCl 溶液水洗, 收集有机相并用无水 MgSO_4 干燥。过滤除掉不溶性的 MgSO_4 , 所有溶剂都用旋转蒸发移除, 残存物溶解到 CH_2Cl_2 (40 mL) 和 TFA (10 mL) 的混合溶剂中, 搅拌 2 h 后用 NaHCO_3 溶液水洗, 有机相用 MgSO_4 干燥, 滤除 MgSO_4 后, 旋转蒸发除掉溶剂得到目标产物 **5** (0.76 g), 立刻用于合成 **C1**, 具体如下:

化合物 **5** (0.76 g, 4.1 mmol) 和马来酸酐 (2.01 g, 20.5 mmol) 溶解在 100 mL 丙酮中, 回流过夜, 冷却到 0 °C 得到黄色固体沉淀。上述黄色固体沉淀 (1.03 g) 和一水合对甲苯磺酸 (154 mg) 溶解在 30 mL 甲醇中回流过夜, 冷却到 0 °C 得到粗产物黄色沉淀, 用 EtOAc/DCM ($v/v = 1/2$) 作为洗脱剂通过柱层析进一步

纯化, 得到黄色固体 **C1** (480 mg, 收率:39.4%, >95% HPLC 纯度)。

¹H NMR (*d*₆-DMSO, δ , ppm, TMS): 10.28 (s, 1H, -CONH-), 8.65 (s, 1H, 芳香氢), 7.73 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 芳香氢), 7.49 (s, 1H, 芳香氢), 7.38 (s, 1H, 芳香氢), 6.74 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, -NHCOCH=CH-), 6.51 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, -CH=CH-COO-), 4.43 (s, 1H, -C $\equiv$ CH), 3.66 (s, 3H, -COO-CH₃), 其核磁氢图谱见图 1。

¹³C NMR (CDCl₃, δ , ppm TMS): 167.5, 164.2, 157.6, 149.9, 131.9, 129.7, 128.8, 128.6, 125.3, 124.0, 123.1, 120.7, 119.2, 83.8, 83.0, 52.1, 其核磁碳谱图见图 2。

10 RP-HPLC 分析: 4.4 min (流动相: MeOH/H₂O v/v 4/1)。

ESI-MS: *m/z* calc. for C₁₆H₁₂NO₅: 298.06 [M+H]⁺; found: 298.0705, 其电喷雾质谱图见图 3。

在反应过程中, 通过荧光发射强度监控嵌段共聚物的缀合效率, 结果见图 4 和图 5, 其中, 图 4 为上述反应过程中, 荧光变化与高效液相色谱曲线; 图 5 为荧光变化与缀合效率的关系曲线。

实施例 2 **C2** 的合成

2,4-二羟基苯甲醛(**6**, 10.0 g, 72.4 mmol), 溴丙炔(8.33 g, 70.0 mmol), K₂CO₃ (19.35 g, 140.0 mmol) 加入到 100 mL 丙酮中, 回流过夜后恢复至室温, 过滤并移除所有溶剂, 残余物溶于 CH₂Cl₂ 并用水洗, 收集有机相并用无水 MgSO₄ 干燥, 然后过滤旋发, 粗产物利用 EtOAc/PE(v/v = 1:2) 作为洗脱剂通过柱层析进一步纯化, 得到白色粉末 **7**(3.2 g, 收率: 25.9%, >95% HPLC 纯度)。

¹H NMR (CDCl₃, δ , ppm, TMS): 11.45 (s, 1H, 苯-OH), 9.75 (s, 1H, -CHO), 7.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 芳香氢), 6.61 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 芳香氢), 6.53 (s, 1H, 芳香氢), 4.75 (s, 2H, -OCH₂C $\equiv$ CH), 2.58 (s, 1H, -OCH₂C $\equiv$ CH)。

25 N-乙酰甘氨酸(2.23 g, 19.1 mmol), 无水乙酸钠 (4.48 g, 54.6 mmol), 化合物 **7** (3.21 g, 18.2 mmol) 加入到 100 mL 干的乙酸酐中, 反应体系在 150 °C 搅拌 12 h, 冷却到室温后将反应混合物倒入到冰水里面(300 mL), 得到黄色沉淀, 过滤出黄色固体, 在浓盐酸和乙醇的混合溶液中(v:v = 2:1)回流两个小时, 反应体系然后倒入到冰水里面 (100 mL), 将 pH 值用 NaOH 溶液调到 5~6, 体系

浓缩到约 30 mL, 得到粗产物沉淀。最后, 从乙醇中两次重结晶得到产物 **8** (3.49g, 纯度:89.2%, >95% HPLC 纯度)。

¹H NMR (*d*₆-DMSO, δ , ppm, TMS): 10.22 (s, 1H, -CONH-), 8.67 (s, 1H, 芳香氢), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 芳香氢), 7.03 (m, 2H, 芳香氢), 6.63 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, -COCHH=CH-), 6.42 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, -CH=CHHCOOH), 4.92 (s, 1H, -OCH2C $\equiv$ CH), 2.50 (m, 1H, -OCH₂C $\equiv$ CH)。

化合物 **8** (2.15 g, 10.0 mmol) 和马来酸酐(2.01 g, 20.5 mmol) 溶解在 CHCl₃ (50 mL) 中, 反应回流 6 h 后冷却至 0 °C, 得到黄色固体(2.76 g), 与一水合对甲苯磺酸 (190 mg) 溶解在 200 mL 甲醇中回流过夜, 冷却至 0 °C 得到粗产物沉淀, 利用 EtOAc/DCM (v/v = 1/3) 作为洗脱剂通过柱层析进一步纯化, 得到黄色固体 **C2**(1.81g, 纯度:55.4%, >95% HPLC 纯度)。

¹H NMR (CDCl₃, δ , ppm, TMS): 9.98 (s, 1H, -CONH-), 8.75 (s, 1H, 芳香氢), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, 芳香氢), 6.93 (m, 2H, 芳香氢), 6.41 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, -COCHH=CH-), 6.25 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, -CH=CHHCO-), 4.74 (d, 2H, -OCH2C $\equiv$ CH), 3.85 (s, 3H, -COOCH3), 2.55 (m, 1H, -OCH₂C $\equiv$ CH)。

¹³C NMR (*d*₆-DMSO, δ , ppm TMS): 167.7, 163.8, 159.3, 157.9, 151.8, 131.7, 129.8, 129.6, 126.0, 122.2, 113.8, 113.6, 102.1, 79.4, 79.0, 56.5, 52.2。

ESI-MS: *m/z* calc. for C₁₇H₁₄NO₆: 328.07 [M+H]⁺, C₁₇H₁₃NO₆Na: 350.08 [M+Na]⁺; 理论值分别为: 328.081, 350.0916。

20 实施例 3 **C3** 的合成

乙酰乙酸乙酯 (3.19 g, 24.5mmol), 化合物 **7** (3.52 g, 20.0mmol), 哌啶催化剂 (0.1 g) 和乙酸(0.1 mL) 添加到 15 mL 无水乙醇中, 反应混合物回流 12 h, 冷却至室温得到亮黄色沉淀为粗产物, 通过在水乙醇中重结晶得到亮黄色晶体 **9** (3.12 g, 收率: 64.5%, >95% HPLC 纯度)。

¹H NMR (CDCl₃, δ , ppm, TMS): 8.49 (s, 1H, 芳香氢), 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, 芳香氢), 6.97 (m, 2H, 芳香氢), 4.80 (s, 2H, -OCH2C $\equiv$ CH), 2.71 (s, 3H, -COCH3), 2.61 (t, 1H, -OCH₂C $\equiv$ CH)。

化合物 **9** (2.25 g, 9.3 mmol) 和 2-吡啶甲醛(2.21 g, 20.6 mmol) 溶解在 EtOH/CH₃CN (80 mL, 1:1 v/v) 中, 0.4 g 哌啶作为催化剂加入, 在氮气氛围下

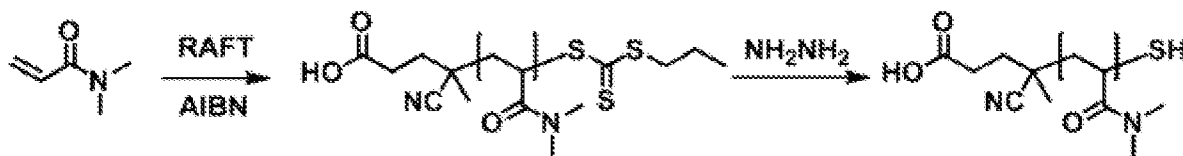
回流 24 后, 旋发除掉溶剂, 粗产物在无水乙醇中多次重结晶得到黄色固体 C3(1.25g, 收率: 40.6%, >95% HPLC 纯度)。

^1H NMR (CDCl_3 , δ , ppm, TMS): 8.68 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, 芳香氢), 8.56 (s, 1H, 芳香氢), 8.30 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, $-\text{COCH}=\text{CH}-$), 7.80 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, $-\text{COCH}=\text{CH}-$), 7.70 (m, 1H, 芳香氢), 7.59 (m, 2H, 芳香氢), 7.28 (m, 1H, 芳香氢), 6.97 (m, 2H, 芳香氢), 4.80 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.61 (t, 1H, $-\text{OCH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$)。

^{13}C NMR (CDCl_3 , δ , ppm TMS): 186.8, 162.9, 159.3, 157.5, 153.5, 150.3, 148.3, 143.1, 136.7, 131.4, 127.8, 124.6, 124.3, 121.9, 114.3, 112.8, 101.7, 56.4。

ESI-MS: m/z calc. for $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{NO}_4$: 332.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$; found: 332.0911。

实施例 4 HS-PDMA₃₈ 的合成



在一个带有搅拌子的封管中加入带电荷的二甲基丙烯酰胺(DMA) (2.0 g, 20.2 mmol), 4-氰基-4-(丙硫基硫代甲酰硫基)戊酸(223 mg, 0.8 mmol), 2,2'-二偶氮异丁腈(AIBN) (16 mg, 0.98 mmol)和二氧六环(4 mL)。封管通过冻结-泵抽-解冻操作三次进行脱气, 然后在处于真空下密封, 在恒温油浴锅中 70 °C 反应 6 h 后, 反应用液氮立即淬灭, 解封, 用 THF 稀释后在过量的乙醚中沉淀重复三次, 将产物放到真空干燥箱中干燥得到黄色粉末 PDMA(1.63 g, 86%收率)。

^1H NMR (CDCl_3 , δ , ppm, TMS: 2.8~3.2 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1.1~2.8 (主链), 1.0 ($-\text{S}-\text{CH}_2-$)。

PDMA 嵌段的实际聚合度通过 ^1H NMR 计算是 38, 因此将产物缩写为 PDMA₃₈。

PDMA₃₈(500 mg, 0.22 mmol) 溶解在干的 CH_2Cl_2 中, 将 $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (55 mg, 1.1 mmol) 逐滴加入到反应管中 2 h 后, 浓缩溶液并用过量的乙醚沉淀三次, 真空干燥箱干燥得到白色粉末 HS-PDMA₃₈(420mg, 收率 93.8 %)。

实施例 5 通过 C1 介导的 HS-PDMA₃₈ 和 PEG₄₅-N₃ 的荧光共轭物

HS-PDMA₃₈ (35 mg, 17.5 μmol), PEG₄₅-N₃ (350 mg, 175 μmol),

PEG₂₂₇(external standard, 300 mg) 溶解在去离子水中(45 mL, pH 7.0), 然后加入 C1 (5.2 mg, 17.5 μ mol, 溶解于 5 mL DMSO) 和 CuSO₄/维生素 C (1/5 摩尔比)。反应体系在 25 °C 搅拌不同的时间, 达到既定时间后约 1.0 mL 反应溶液被抽样取出, 稀释到 9.0 mL THF 中。快速加入铜离子吸附树脂(美国海洋化学公司, 200 mg) 移除铜离子, 然后震荡 5 min, 在进一步荧光和 GPC 测试之前, 上清液通过 0.22 μ m 无菌针筒过滤器滤出。

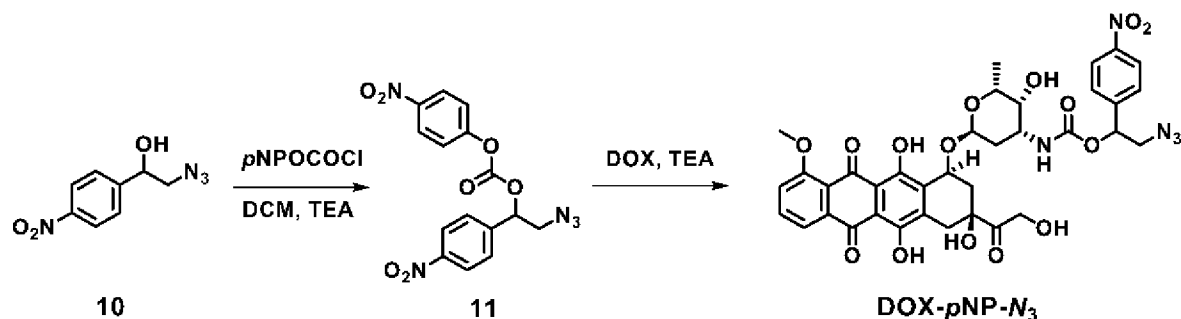
通过荧光发射强度监控嵌段共聚物缀合效率, 结果见图 6~图 8, 其中, 图 6 为凝胶渗透色谱图, 图 7 为反应过程中的荧光变化曲线, 图 8 为反应过程中荧光变化与缀合效率的关系曲线。

由图 6~图 8 可知荧光发色团荧光的增强与嵌段共聚物的缀合效率线性相关, 因此, 通过原位实时监控荧光的变化测定嵌段聚合物的缀合效率。

由上述实施例可知, 本发明能够通过红外荧光发射强度原位监控上述聚合物的缀合效率。

实施例 6 C1 介导靶向药物的合成

合成路线如下:



化合物 **10** (4.16 g, 20.0 mmol) 和 NEt₃ (3.22 g, 31.9 mmol) 加入到 100 mL 干的 DCM 中, 冷却至 0 °C, 4-硝基氯甲酸苯酚酯(6.12 g, 30.4 mmol, 20 mL DCM 溶液)逐滴加入, 在 0 °C 反应 12 h。过滤后溶液用水洗, 有机相用无水 MgSO₄ 干燥, 滤除 MgSO₄ 后旋发得到粗产物, 利用 EtOAc/PE (v/v = 1:8) 作为洗脱剂通过柱层析进一步纯化, 得到白色粉末 **11** (3.82 g, 收率: 51.2%, 纯度 > 95%, HPLC 纯度)。

¹H NMR (CDCl₃, δ , ppm, TMS): 8.29 (t, 4H, 芳香氢), 7.64 (d, 2H, 芳香氢), 7.38 (d, 2H, 芳香氢), 5.74 (m, 1H, >CH-CH₂N₃), 3.5~3.8 (m, 2H, >CH-CH₂N₃)。

化合物 **11** (186mg, 0.5 mmol), DOX-HCl (58mg, 0.1 mmol)和 NEt₃ (120 mg, 1.18 mmol)溶解在干的 DMF (10 mL)中, 室温下搅拌 24 h, 抽滤除去盐后, 旋发掉溶剂得到粗产物, 利用 CHCl₃/MeOH (v/v = 100:0 到 90:10)作为洗脱剂通过柱层析进一步纯化, 得到红色粉末 DOX-*p*NB-N₃ (43mg, 收率: 55.3%, 纯度>95%)。

¹H NMR (DMSO-d₆, δ, ppm): 7.6~8.2 (broad, 5H, 芳烃氢), 7.42 (d, 2H, 芳烃氢), 5.95 (m, 1H, >CH-CH₂N₃), 5.49 (d, 2H, >CH-OH & C-OH), 5.31 (s, 1H, -CH₂OH), 4.92 (m, 2H, >CH-O-CH<), 4.62 (d, 2H, -CH₂OH), 4.15 (m, 1H, >CH-OH), 3.95 (s, 3H, -OCH₃), 3.5~3.9 (m, 3H, >CH-CH₂N₃ & >CH-NHCO-), 2.8~3.1 (m, 1H, >CHCH₃), 1.6~2.2 (m, 4H, -CH₂-), 1.12 (d, 3H, >CHCH₃)。其核磁共振氢谱图如图 9 所示。

RP-HPLC 分析: 3.7 min (淋洗液: MeOH/H₂O v/v 1/3)。

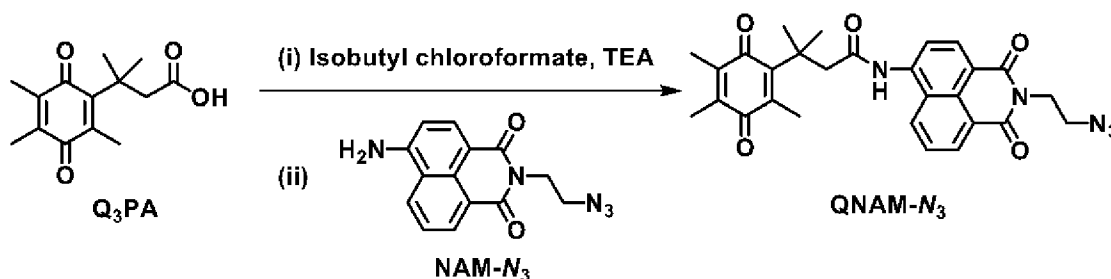
ESI-MS: m/z calc. for C₃₆H₃₆N₅O₁₅: 778.21 [M+H]⁺; found: 778.2109。其电喷雾质谱图如图 10 所示。

200 μLC1 的 DMSO 溶液(含 0.2 μmolC1), DOX-*p*NB-N₃ (10.0 mg, 1.0 μmol) 和 CuSO₄/Na-抗坏血酸盐 (1/5 摩尔比) 添加 HS-cRGD (0.1 μmol, 溶解于 1.8 mL PBS 缓冲溶液)中, 在 25 °C 搅拌不同的时间, 通过原位观测在~420 nm 处荧光发射强度的改变检测耦联进程, 4 h 后, 快速添加铜离子吸附树脂(美国海洋化学公司, 100 mg)移除铜离子, 震荡 5 min 后, 上清液通过 0.22 μm 无菌针筒过滤器滤出。

实验结果表明, 荧光发色团荧光的增强与靶向药物的缀合效率线性相关, 因此, 可以通过原位实时监控荧光的变化测定靶向药物的缀合效率。

实施例 7 荧光探针 A (QNAM-N₃) 的合成

合成路线如下:



Q₃PA (0.51 g, 2.0 mmol) 和三乙胺(0.61 g, 6.0 mmol)溶解在 60 mL 的二氯甲烷中, 将混合物降温到 0°C, 然后缓慢滴加氯甲酸异丁酯(0.31 g, 2.2 mmol), 反应 1 小时后, 加入 NAM-N₃ (0.49 g, 1.75 mmol)。反应体系在 0°C 下继续反应 5 小时。反应结束后, 通过抽滤除去所有的无机盐, 旋蒸除去所有的溶剂后得到粗产物。纯产物通过柱色谱分离(使用乙酸乙酯/正己烷 (v/v = 1/5)为流动相)得到。

¹H NMR (CDCl₃, δ, ppm): 8.37 (d, 1H, 芳烃氢), 8.22 (d, 1H, 芳烃氢), 7.92 (d, 1H, 芳烃氢), 7.24 (t, 1H, 芳烃氢), 7.04 (broad, 1H, -CONH-), 6.29 (d, 1H, 芳烃氢), 3.81 (t, 2H, -CH₂-CH₂N₃), 3.47 (t, 2H, -CH₂N₃), 2.82 (m, 9H, 醌-(CH₃)₃), 1.95 (s, 2H, -CH₂-CONH-), 1.38 (s, 6H, >C(CH₃)₂), 其核磁共振氢谱图见图 11。

RP-HPLC 分析: 10.7 min (流动相: MeOH/H₂O v/v 7/3)。

ESI-MS: m/z calc. for C₂₈H₂₈N₅O₅: 514.20 [M+H]⁺; found: 514.22, 其电喷雾质谱图见图 12。

实施例 8 通过双官能荧光分子 C1 介导的 Anti-CEA 抗体和 DOX-pNB-N₃ 或 QNAM-N₃ 的荧光缀合物

二硫苏糖醇(DTT, 154 mg, 100μmol) 溶解在磷酸缓冲液 (PBS) 中(10 mL, pH 8.0, 50 mM), 然后取 10 μL 上述溶液(含 0.1μmol DTT) 添加到含有 anti-CEA 抗体的(ACEA, 1 mg) PBS (1 mL, pH 8.0, 50 mM)溶液中, 在 37 °C 搅拌 30 min, 产物通过超滤纯化(离心-0.5, 微孔, 截留分子量 10 kDa), 使用之前要将其重新溶解到 PBS 中(2.0mg/mL, pH 7.0, 50 mM), 利用 5,5'-二巯基(2-硝基苯甲酸)(DNTB)作为探针确定巯基含量, 每个抗体分子中巯基数约为 4。

10μL 双官能荧光分子 C1 的 DMSO 溶液 (0.5μmol C1), 10μL DOX-pNB-N₃(0.5μmol)或 QNAM-N₃ 溶液(0.5μmol)和 CuSO₄/Na-抗坏血酸盐 (1/5 摩尔比)添加到 ACEA 溶液中 (0.2 mg, in 180μL PBS, pH 7.0), 温度保持在 25 °C, 共轭合过程利用荧光原位监测, 共培养 6 h 后, 共轭物利用超滤进一步纯化(Amicon Ultra-0.5, Millipore, 截留分子量 10 kDa), 得到抗体-探针缀合物或抗体-药物缀合物。

在反应过程中, 通过荧光发射强度监控嵌段共聚物的缀合效率, 结果见图 13 和图 14, 其中, 图 13 为制备抗体-探针缀合物反应过程中的荧光变化过程

曲线图，图 14 为制备抗体-药物缀合物反应过程中的荧光变化过程曲线图。

图 15 为实施例 8 制备的抗体-探针缀合物的酶检测过程荧光变化过程；QNAM-C1-ACEA 抗体-探针缀合物用 NADPH / NQO1 在水体系中培养，观察到 NAM 发射强度(~530 nm)显著的增加，并伴随着 C1 在~435 nm 发射强度的大幅下降。在约 1 小时的培养时间内，观察到约 20 倍 FRET 比率（两发射峰强度比值）的变化（见插图）。上述结果表明，C1 香豆素连接键和酶促产生的 NAM 残基之间的有效的 FRET 过程的发生。在 QNAM-C1-ACEA 偶联体与 NQO1 作用后 FRET 比率的突变（~20 倍），表明抗体-探针缀合物可用于检测 NQO1 酶浓度。

图 16 为实施例 8 制备的抗体-探针缀合物的细胞内癌胚抗原与醌氧化还原酶检测。将活的 HepG2 细胞（缺少 CEA，缺少 NQO1）、LS180 细胞（CEA 正常，缺少 NQO1）和 HT29 细胞（CEA 正常，NQO1 正常）与 QNAM-C1-ACEA 抗体-探针缀合物共培养。共培养后，CEA 正常和 NQO1 缺乏的 LS180 细胞共聚焦激光扫描显微镜（CLSM）图像显示在细胞内存在 C1 香豆素的间断蓝色发光点和极少的 NAM 绿色发射信号。这些结果表明 QNAM-C1-ACEA 能显著的被细胞摄取和其具有胞内稳定性，这是由于胞质中缺乏 NQO1。对于存在 CEA 和 NQO1 的结肠癌细胞（HT29），绿色通道 NAM 发射明显增强，几乎能与 C1 香豆素连接键的蓝色通道发射共定位。后者的强度由于 FRET 过程发生被显著减小。然而，用 QNAM-C1-ACEA 处理缺乏 CEA 和 NQO1 的 HepG2 细胞显示了非常低的蓝色和绿色发射。由于 NQO1 酶主要位于特定类型癌细胞的胞质中，以上结果表明，QNAM-C1-ACEA 偶联体-探针只能以“AND”逻辑门型方式显示强烈的绿色通道发射（即需要 CEA 和 NQO1 同时存在）。

图 17 为实施例 8 制备的抗体-药物缀合物的硝基还原酶触发药物释放过程荧光变化过程；当用硝基还原酶/还原型辅酶 II 共培养 DOX-C1-ACEA，偶联的阿霉素药物随着时间线性持续释放。阿霉素的释放过程伴随着 C1 连接键在 435 nm 处发射的显著增强和阿霉素在 590 nm 处发射的明显降低，这清楚地表明药物-抗体偶联体的断裂和 FRET 过程破坏。

实施例 9 胞内细胞成像

HT29 or HepG2 细胞($\sim 10^5$) 培养液铺展在 35 mm 玻璃底培养皿中培养过

夜, 然后 DOX-C1-ACEA 与细胞在 37 °C 共培养 24 h, 细胞用 PBS (3 × 1 mL) 和 DMEM 培养液冲洗, 细胞荧光成像需要在 Leica SP5 共聚焦显微镜下进行。样品中含有的 C1 基团激发在 405 nm, 吡啶橙激发在 488 nm, DOX 激发在 543 nm。

5 图 18 为实施例 9 制备的抗体-药物缀合物的含癌胚抗原的细胞内硝基还原酶触发药物释放过程。当用 DOX-C1-ACEA 偶联体与含有 CEA 的 HT29 细胞在正常氧含量下培养时, 共聚焦显微镜观察到在细胞质内有间断的强 C1 绿色发射, 和阿霉素的红色圆点发射, 而且蓝色/绿色发射能彼此共定位。与此相对的是, 对于缺乏 CEA 的 HepG2 细胞 C1 香豆素连接键的蓝色荧光强度仅仅是 HT29 中的 22%。10 用 DOX-C1-ACEA 在缺氧条件下与 HT29 共培养 4 小时, 明显的阿霉素红色发射能与吡啶橙染色的细胞核很好的共定位。除此之外, 非连续的 C1-ACEA 残基的蓝色发射只共定位在细胞质内。以上结果表示某些癌细胞 (如 HT29) 表面的 CEA 抗原有助于 DOX-C1-ACEA 偶联体的细胞摄取, 并且在缺氧环境中胞内很容易酶触发阿霉素的释放, 这能联系上固体瘤组织的微环境。15

由上述实施例可知, 药物-抗体缀合物与探针-抗体缀合物可以通过连接分子 C1 构建, 并通过荧光的方法原位监控缀合效率。

实施例 10 双官能荧光分子 c1 介导的 BSA 和 PEG₂₂₇-N₃ 的荧光缀合物

牛血清蛋白 BSA (498mg, 7.5μmol) 溶解在磷酸缓冲液 (PBS) (70 mL, pH 20 6.5, 0.1 M, 含 1 mM EDTA) 中, 同时将三 (2-氯乙基) 磷酸酯盐酸化物 (TCEP·HCl) (21.5 mg, 75μmol) 溶解在 PBS (2.5 mL) 中, 然后逐滴加入到上述 BSA 溶液中, 4 h 后, 溶液用去离子水透析 24 h (2.0kDa 截留分子量), 然后冻干以获得 BSA_{red}。

BSA 或 BSA_{red} (4 mg, 0.06 μmol) 溶解在 PBS (0.9 mL, pH 7.0, 50 mM) 中, 25 C1 (0.6μmol, 溶解于 0.1 mL DMSO), PEG₂₂₇-N₃ (6 mg, 0.6 μmol) 和 CuSO₄/Na-25 抗坏血酸盐 (1/5 摩尔比) 加入到溶液中, 25 °C 搅拌不同的时间, 通过原位观测在约 420 nm 处荧光发射强度的改变检测耦合并合进程。达到既定时间后, 80μL 的样品溶液被取出, 然后用 2 mL PBS 稀释, 快速添加铜离子吸附树脂 (美国海洋化学公司, 100 mg), 移除铜离子, 震荡 5 min 后, 在进一步 SDS-PAGE 测试

之前，上清液通过 0.22 μm 无菌针筒过滤器滤出。

反应过程中，其荧光变化图如图 19 所示，其荧光变化与缀合效率之间的关系如图 20 所示。

5 凝胶电泳实验：SDS-PAGE 实验在凝胶电泳仪(Bio-Rad)上操作，含有 BSA-PEG 缀合物的溶液(80 μL) 与 20 μL SDS-PAGE 加样缓冲液混合，根据标准方案使用 15.0wt%聚丙烯酰胺凝胶，凝胶电泳带在紫外光(365 nm)或者 UVP EC3 成像系统的白光辐照（染色用考马斯亮蓝）可以直接观察到。

其凝胶电泳图如图 21 所示。

10 实施例 11 双官能荧光分子 c1 介导的鲑降钙素(sCT)和 PEG₂₂₇-N₃ 的荧光缀合物

TCEP·HCl (14.2 mg, 50 μmol) 溶解在 PBS (2 mL, pH 7.0, 50 mM)中，取 40 μL 上述溶液（含 1 μmol TCEP·HCl)添加到含有鲑降钙素(sCT, 1.7 mg, 0.5 μmol PBS (9 mL, pH 7.0, 0.05 M))的小瓶中，在室温下搅拌，RP-HPLC 分析显示 Cys¹-Cys⁷ 二硫键在~30 min 内定量还原。

15 200 μL C1 的 DMSO 溶液(含 0.2 μmol C1)，PEG₂₂₇-N₃ (10.0 mg, 1.0 μmol)和 CuSO₄/Na-抗坏血酸盐 (1/5 摩尔比) 添加到还原的 sCT (0.1 μmol ,溶解于 1.8 mL PBS 缓冲溶液)中，在 25 °C 搅拌不同的时间，通过原位观测在~420 nm 处荧光发射强度的改变检测耦合并合进程，4 h 后，快速添加铜离子吸附树脂(美国海洋化学公司, 100 mg)移除铜离子，震荡 5 min 后，上清液通过 0.22 μm 无菌针筒过滤器滤出。80 μL 溶液用于 SDS-PAGE 实验，其余溶液在做 RP-HPLC 实验之前用去离子水透析 24 h。

反应过程中，其荧光变化图如图 22 所示。

采用体积排除色谱法测定制备的蛋白质-聚合物缀合物分子量，其体积排除色谱图如图 23 所示。

25 凝胶电泳实验：SDS-PAGE 实验在凝胶电泳仪(Bio-Rad)上操作，含有 sCT-PEG 缀合物的溶液(80 μL) 与 20 μL SDS-PAGE 加样缓冲液混合，根据标准方案使用了 15.0wt%聚丙烯酰胺凝胶，凝胶电泳带在紫外光(365 nm)或者 UVP EC3 成像系统的白光辐照（染色用 Coomassie Brilliant Blue）可以直接观察到。

其凝胶电泳图如图 24 所示。

实施例 12 合成叠氮功能化的 PTMC (PTMC- N_3)

重结晶的三亚甲基碳酸酯 (TMC) 单体(500 mg, 4.9 mmol) 溶解在干的 CH_2Cl_2 中(1 mL), 然后逐滴滴加 3-叠氮基-1-丙醇(24 mg, 0.24 mmol)和 1,3-二
5 己基脲(DCU, 8 mg, 0.05 mmol)在干的 CH_2Cl_2 中(1 mL), 反应混合物在室温氮
气氛下搅拌 12 h, 用乙酸淬灭反应, 四氢呋喃稀释, 然后用过量的冷甲醇沉
淀三次, 放进真空干燥箱干燥得到白色粉末 PTMC- N_3 (160mg, 收率 30.5%),
PTMC 的实际聚合度由 ^1H NMR 计算得到, 为 14, 因此缩写为 PTMC $_{14}$ - N_3 。

10 实施例 13 双官能荧光分子 C1 介导的 PVGLIG 多肽和 PTMC $_{14}$ - N_3 的荧光 缀合物

PTMC $_{14}$ - N_3 (7.5 mg, 5.0 μ mol) 和 C1 (1.5 mg, 5.1 μ mol)溶解在 DMSO 中(1.8
mL), PVGLIG(8.1 mg, 10.1 μ mol)和 $CuSO_4$ /抗坏血酸 (1/5 摩尔比)溶于 0.2 mL
去离子水后加入, 反应体系在 25 °C 搅拌, 缀合过程通过荧光原位检测。在共
培养~3 h 后, 快速添加铜离子吸附树脂 (美国海洋化学公司, 100 mg)移除铜离
15 子, 震荡 5 min 后, 上清液通过 0.22 μ m 无菌针筒过滤器滤出, 滤液用过量冷
乙腈沉淀, 离心收集沉淀后真空干燥箱干燥过夜。

实施例 14 制备 PVGLIG-C1-PTMC $_{14}$ 聚合物囊泡

PVGLIG-C1-PTMC $_{14}$ (2 mg)溶于 1 mL DMSO 中, 加入到一个含有磁力搅
拌棒的 15 mL 的小瓶中, 室温下搅拌 3 h, 搅拌条件下在~20 s 内加入 9 mL 去
20 离子水(~500 rpm), 继续搅拌 5 h 后用去离子水透析(截留分子量 3.5kDa) 24 h。

制备的囊泡在水中的透射电镜图如图 25 所示。

实施例 15 PVGLIG-C1-PTMC $_{14}$ 聚合物囊泡包埋阿霉素盐酸盐

PVGLIG-C1-PTMC $_{14}$ (2 mg)溶于 1 mL DMSO 中, 加入到一个含有磁力搅
拌棒的 15 mL 的小瓶中, 搅拌条件下先加入含 DOX·HCl 的去离子水(5 g/L, 2
25 mL), 剩余 7 mL 去离子水同样速度加入, 继续搅拌 5 h 后用去离子水透析(截
留分子量为 3.5kDa) 24 h。DOX 的负载含量~8.0 wt%。

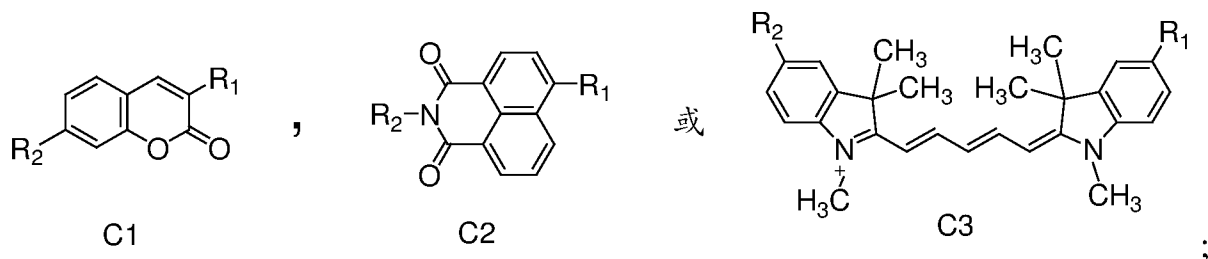
其药物控释应用曲线图如图 26 所示。

由上述实施例可知, 本发明制备的上述蛋白质/多肽-聚合物缀合物可以通
过荧光发射强度原位监控缀合效率, 并且应用于治疗多肽与抗癌药物的传输。

以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

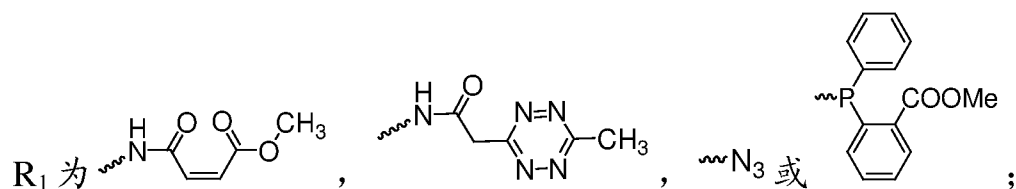
权 利 要 求

1、一种含荧光发色团的缀合物，其特征在于，具有以下任一结构：

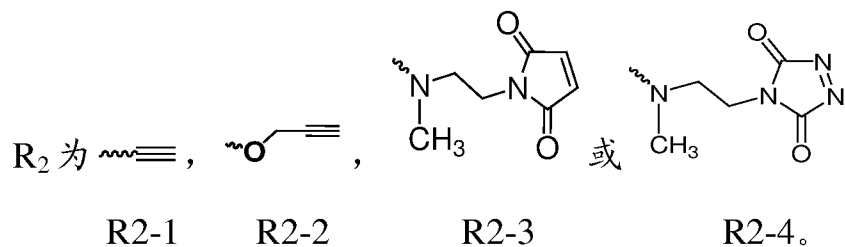


5 其中， R_1 和 R_2 为能够淬灭荧光发色团荧光并且能够进行“点击”反应的基团。

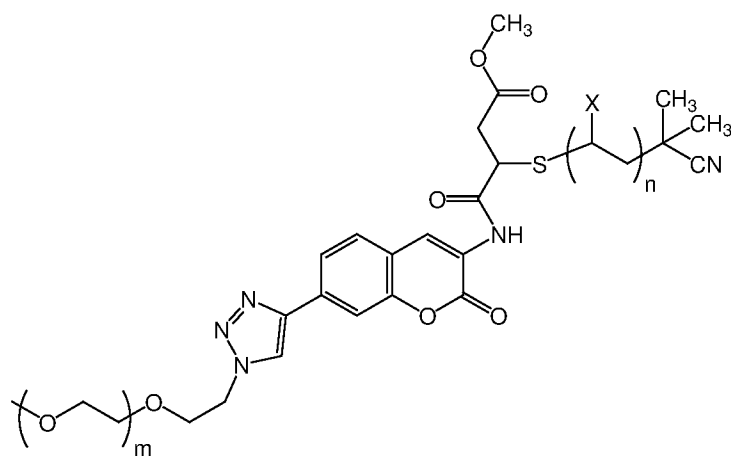
2、根据权利要求 1 所述的缀合物，其特征在于，



10 R_{1-1} R_{1-2} R_{1-3} R_{1-4}

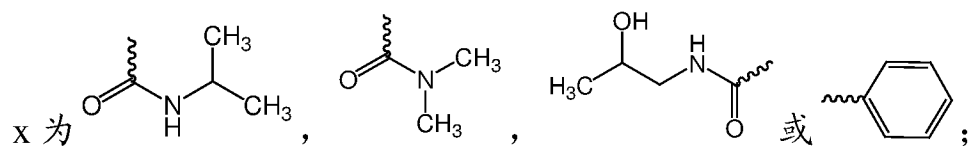


3、一种具有荧光发射性质的嵌段共聚物，其特征在于，具有式 I-1 所示结构：



式I-1;

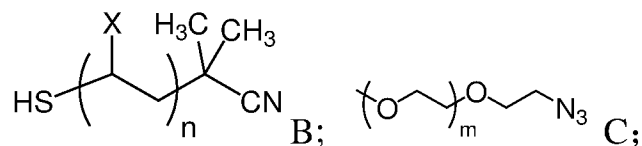
其中,



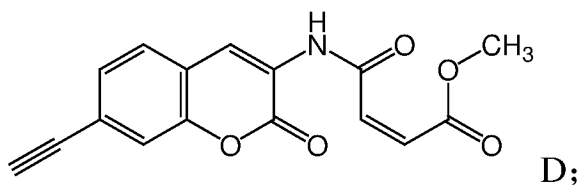
m 为 23~445, n 为 10~150。

- 5 4、权利要求 3 所述的具有荧光发射性质的嵌段共聚物的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

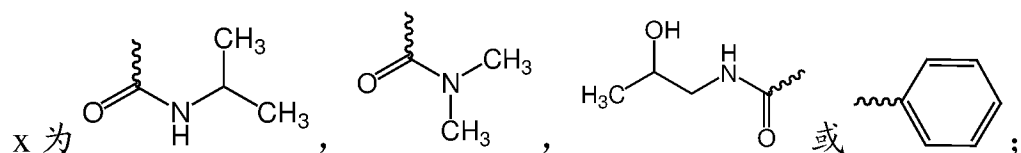
含有巯基端基的聚合物 B 和含有叠氮基的聚合物 C 与化学缀合分子 D 进行 Michael 反应与点击反应, 得到式 I-1 所示嵌段共聚物;



10



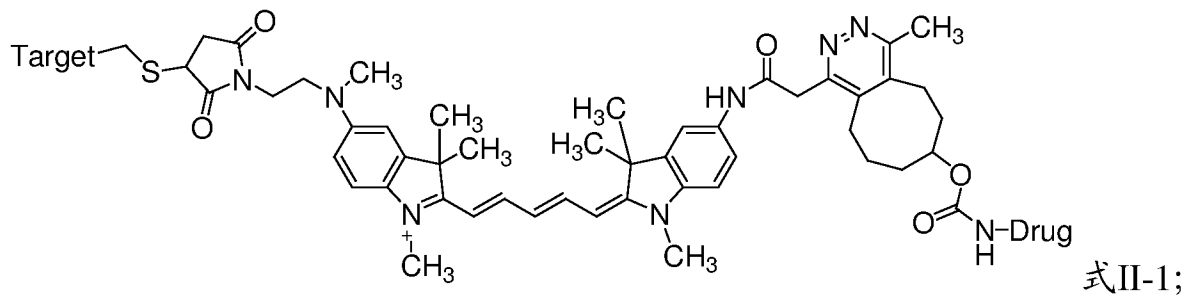
其中,



m 为 23~445, n 为 10~150。

5、根据权利要求 4 所述的制备方法, 其特征在于, 通过荧光发射强度原位监控嵌段共聚物的缀合效率。

6、一种具有荧光发射性质的靶向药物, 其特征在于, 具有式II-1 所示结构:



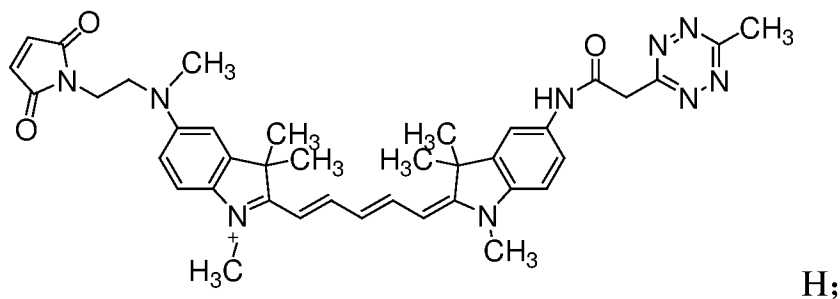
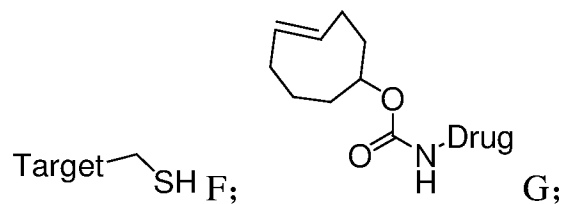
其中,

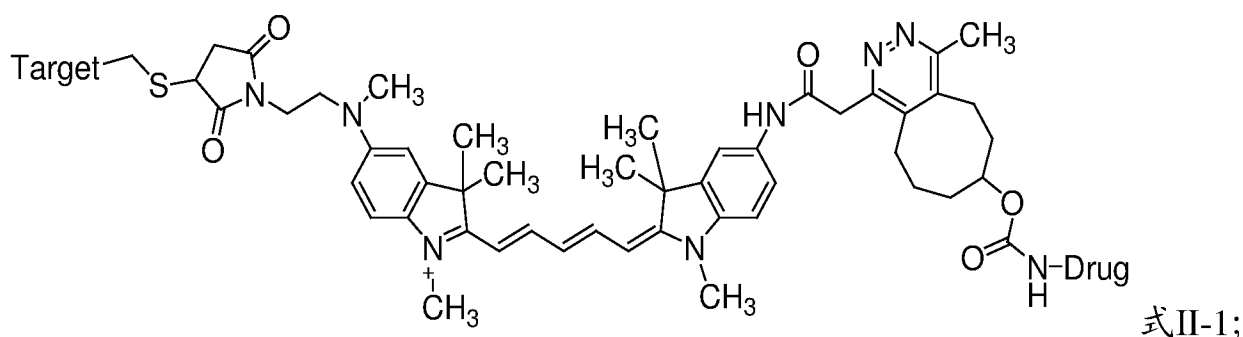
Target 为环状 RGD 多肽、叶酸或磺酰胺;

Drug 为阿霉素、喜树碱或紫杉醇。

7、权利要求 6 所述的具有荧光发射性质的靶向药物的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

靶向分子 F、药物分子 G 和化学缀合分子 H 进行 Michael 反应和反向 D-A 加成反应, 得到式II-1 所示靶向药物;





其中,

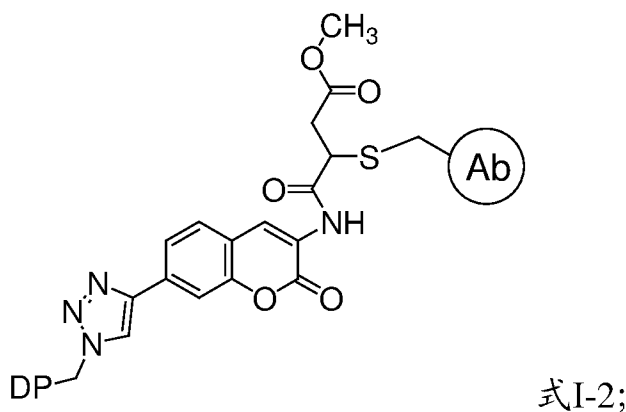
Target 为环状 RGD 多肽、叶酸或磺酰胺;

Drug 为阿霉素、喜树碱或紫杉醇。

5 8、根据权利要求 7 所述的制备方法,其特征在于,通过红外荧光发射强度原位监控药物分子和靶向分子的缀合效率。

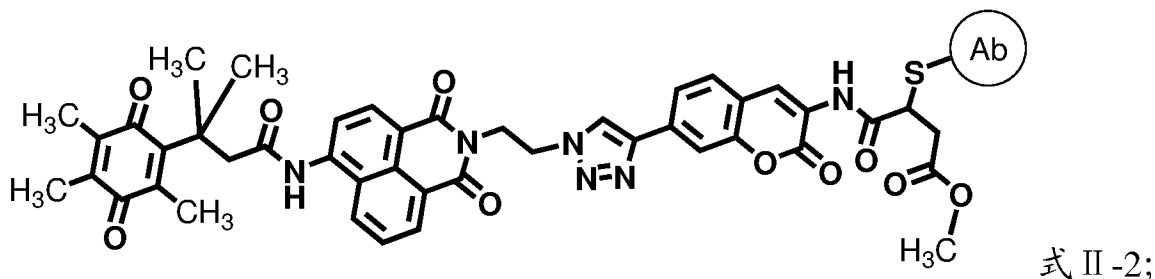
9、权利要求 6 所述的靶向药物在靶向介导药物传输中的应用。

10、一种具有荧光发射性质的抗体-药物/探针缀合物,其特征在于,具有式I-2 所示结构:



其中, Ab 为抗体, DP 为荧光探针或药物分子。

11、一种具有荧光发射性质的抗体-探针缀合物,其特征在于,具有式 II-2 所示结构:

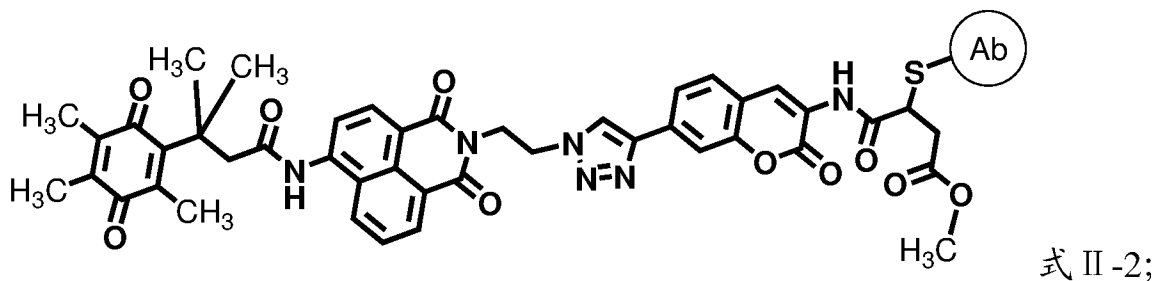
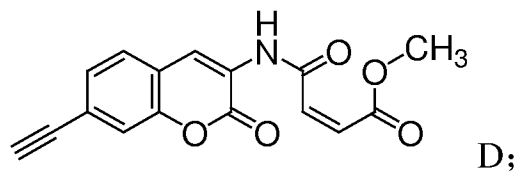
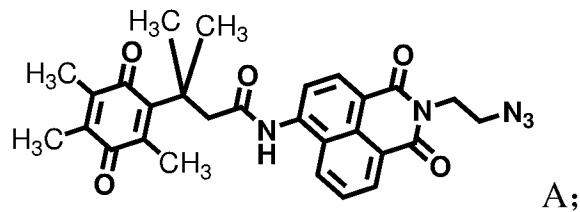


其中, Ab 为癌胚抗原单抗或赫赛丁。

12、权利要求 11 所述的抗体-探针缀合物的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

单克隆抗体、含叠氮基元的荧光探针 A 与双官能荧光分子 D 进行 Michael 反应和点击反应，得到式 II-2 所示抗体-探针缀合物；

5



其中，所述单克隆抗体为含巯基的癌胚抗原单抗或赫赛丁。

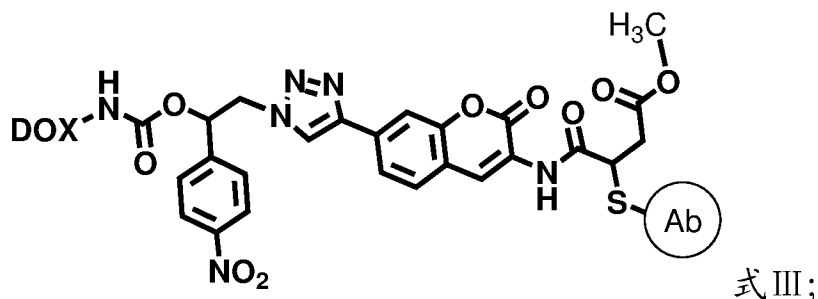
13、根据权利要求 12 所述的制备方法，其特征在于，通过荧光发射强度原位监控抗体-探针缀合物的缀合效率。

10

14、权利要求 11 所述的抗体-探针缀合物或权利要求 12~13 任一项所述的制备方法制备的抗体-探针缀合物作为抗原与醌氧化还原酶反应指示剂的应用。

15

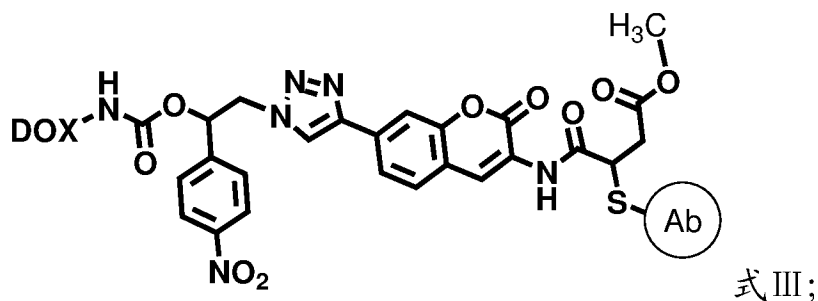
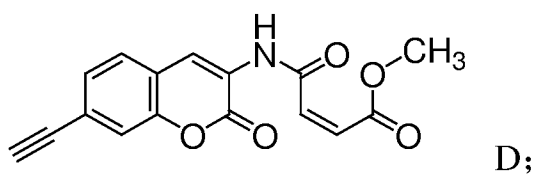
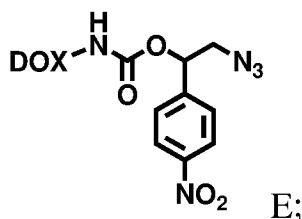
15、一种具有荧光发射性质的抗体-药物缀合物，其特征在于，具有式 III 所示结构：



其中，DOX 为阿霉素，Ab 为癌胚抗原单抗或赫赛丁。

16、权利要求 15 所述的抗体-药物缀合物的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

单克隆抗体、含叠氮基元的前药分子 E 与双官能荧光分子 D 进行 Michael 反应和点击反应，得到式 III 所示抗体-药物缀合物；



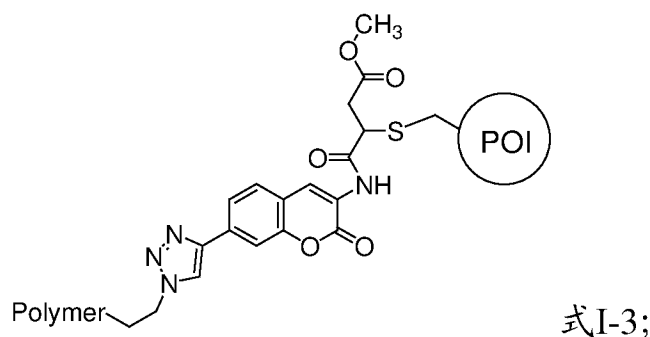
其中，DOX 为阿霉素，单克隆抗体为含巯基的癌胚抗原单抗或赫赛丁。

17、根据权利要求 16 所述的制备方法，其特征在于，通过荧光发射强度原位监控抗体-药物缀合物的缀合效率。

18、权利要求 15 所述抗体-药物缀合物或权利要求 16~17 任一项所述的制备方法制备的抗体-药物缀合物作为荧光指示剂实时监控药物释放的应用。

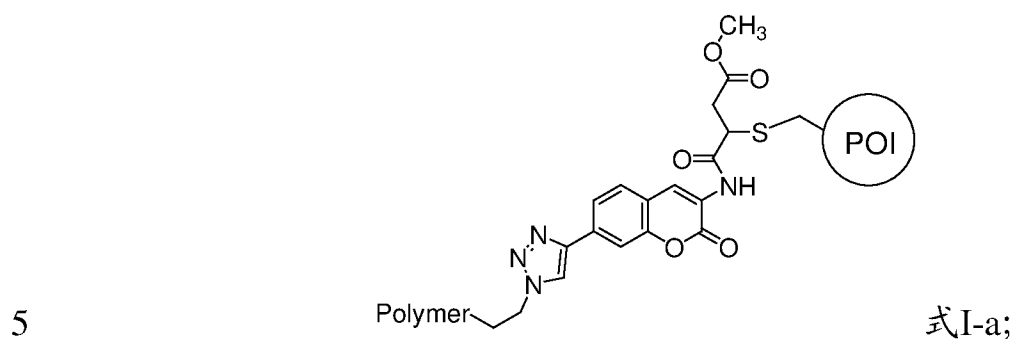
19、权利要求 15 所述抗体-药物缀合物或权利要求 16~17 任一项所述的制备方法制备的抗体-药物缀合物作为靶向药物释放载体的应用。

20、一种具有荧光发射性质的蛋白质/多肽-聚合物缀合物，其特征在于，具有式 I-3 所示结构：



其中, POI 为蛋白质或多肽; Polymer 为聚合物。

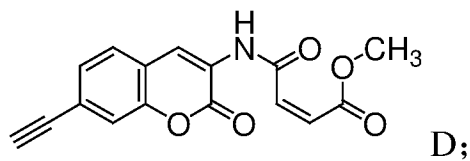
21、一种具有荧光发射性质的蛋白质-聚合物缀合物, 其特征在于, 具有式I-a 所示结构:

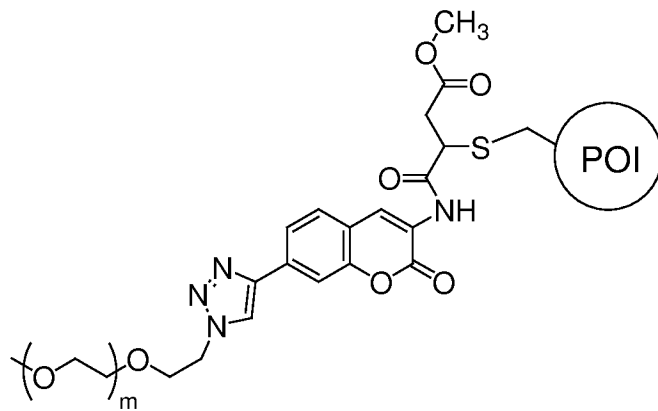


其中, 所述 POI 为牛血清蛋白或鲑鱼降钙素, 所述 Polymer 为聚乙二醇。

22、一种权利要求 21 所述的蛋白质-聚合物缀合物的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

10 含巯基的牛血清蛋白、叠氮端基的聚乙二醇和化合物 D 进行 Michael 反应和点击反应, 制备得到式I-a 所示的蛋白质-聚合物缀合物;





式I-a;

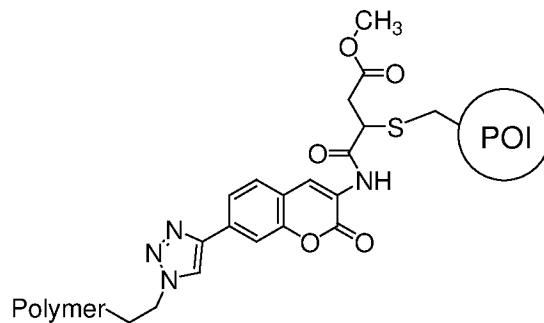
其中, POI 为牛血清蛋白, m 为 23~445;

或者包括以下步骤:

5 含巯基的鲑鱼降钙素、叠氮端基的聚乙二醇和化合物 D 进行 Michael 反应和点击反应, 制备得到式I-a 所示的蛋白质-聚合物缀合物;

其中, POI 为鲑鱼降钙素; m 为 23~445。

23、一种具有荧光发射性质的多肽-聚合物缀合物, 其特征在于, 具有式I-b 所示结构:



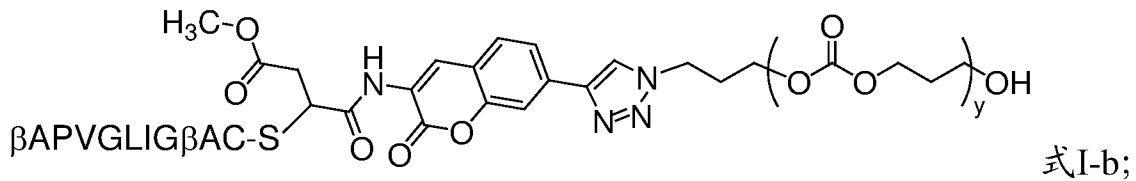
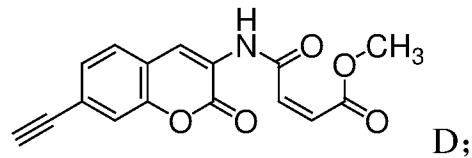
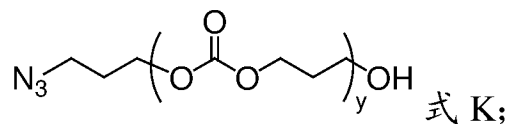
式I-b;

10 其中, 所述 POI 为基质金属蛋白酶可切断多肽, 所述 Polymer 为聚三亚甲基碳酸酯。

24、权利要求 23 所述的多肽-聚合物缀合物的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

15 式 J 所示的基质金属蛋白酶可切断多肽、式 K 所示的叠氮端基的聚三亚甲基碳酸酯和化合物 D 进行 Michael 反应和点击反应, 制备得到式I-b 所示的多肽-聚合物缀合物;





其中, y 为 10~55。

5 25、根据权利要求 22 或 24 所述的制备方法,其特征在于,通过荧光发射强度原位监控缀合物的缀合效率。

26、权利要求 23 所述的多肽-聚合物缀合物或权利要求 24 所述的制备方法制备的多肽-聚合物缀合物组成的聚合物囊泡。

10 27、根据权利要求 26 所述的聚合物囊泡,其特征在于,所述聚合物囊泡粒径为 60~150nm。

28、根据权利要求 26 所述的聚合物囊泡,其特征在于,所述聚合物囊泡具有基质金属酶响应特性。

29、权利要求 26~28 任一项所述的聚合物囊泡作为药物载体的应用,或作为荧光指示剂实时监控药物释放的应用。

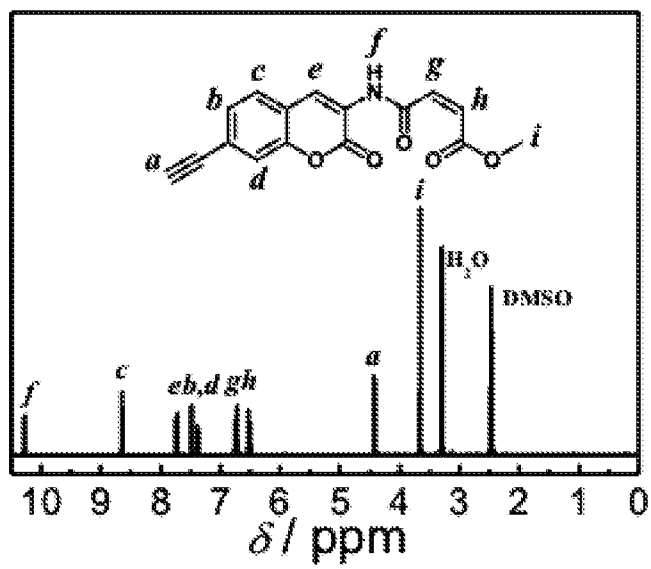


图 1

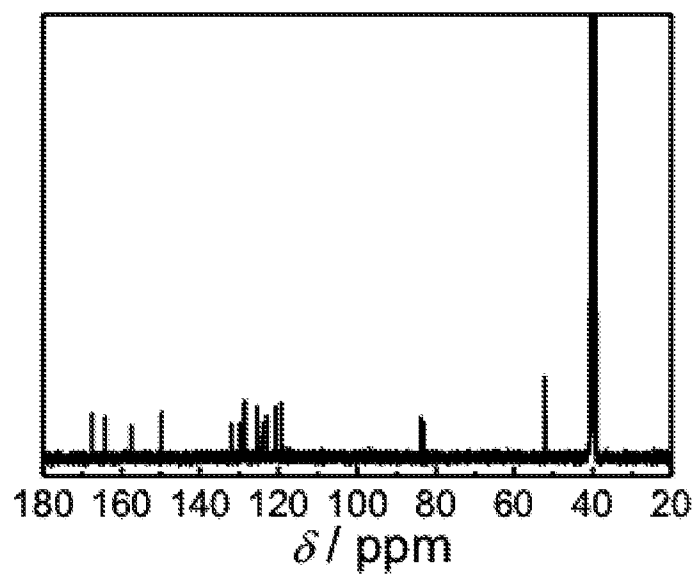


图 2

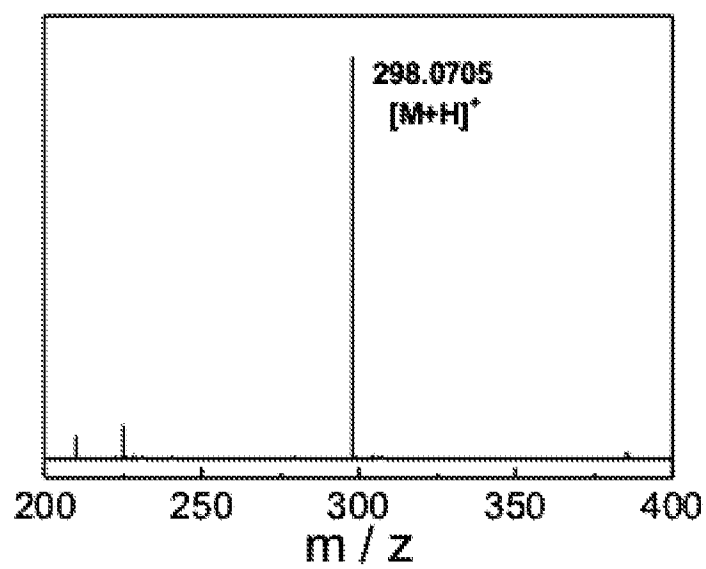


图 3

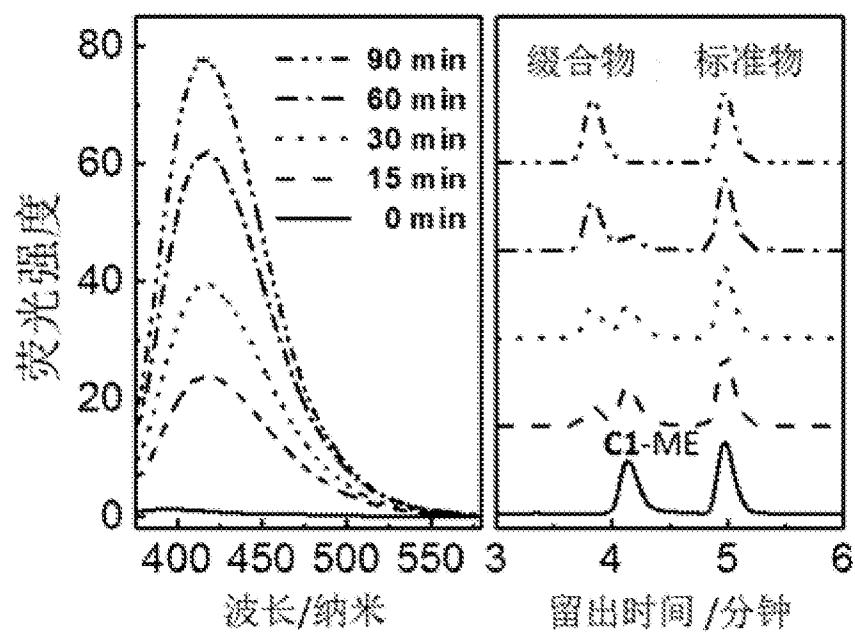


图 4

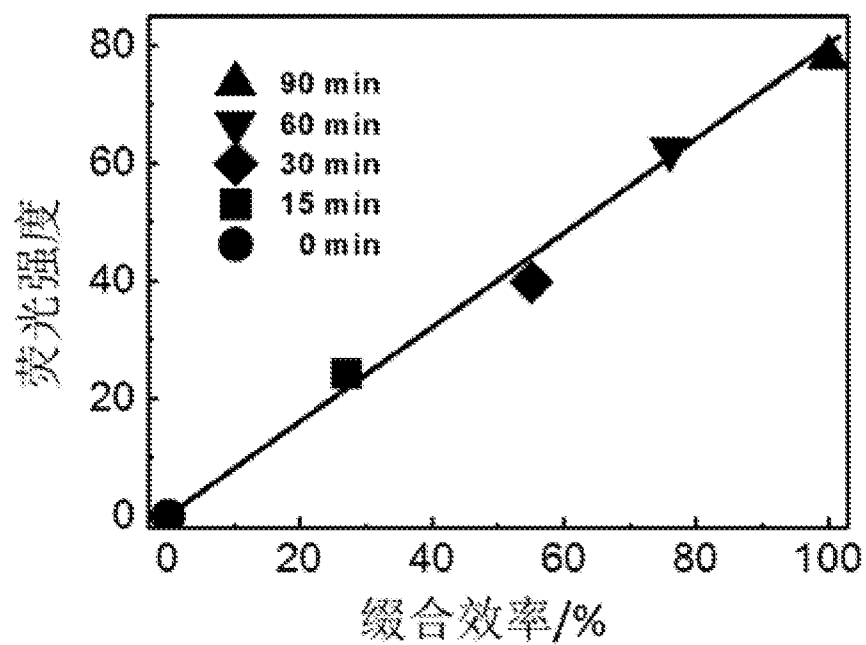


图 5

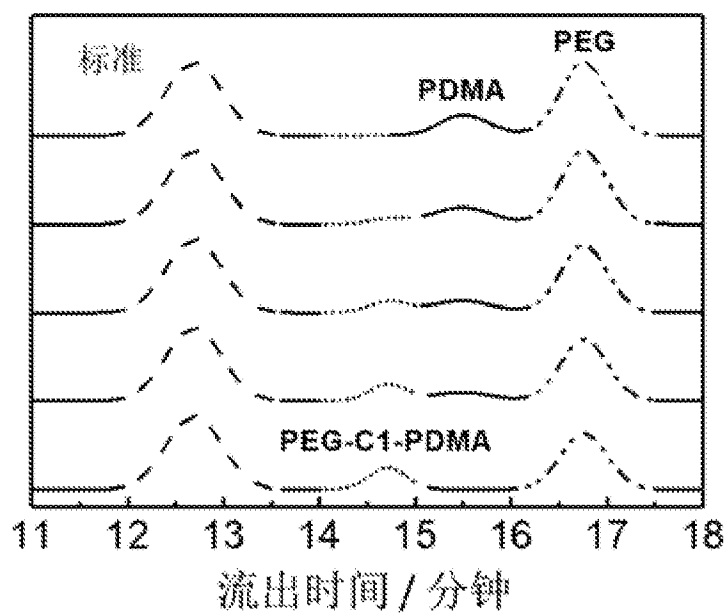


图 6

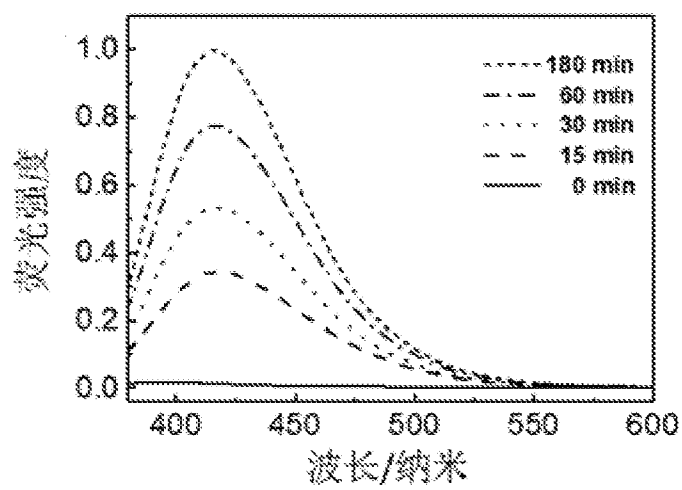


图 7

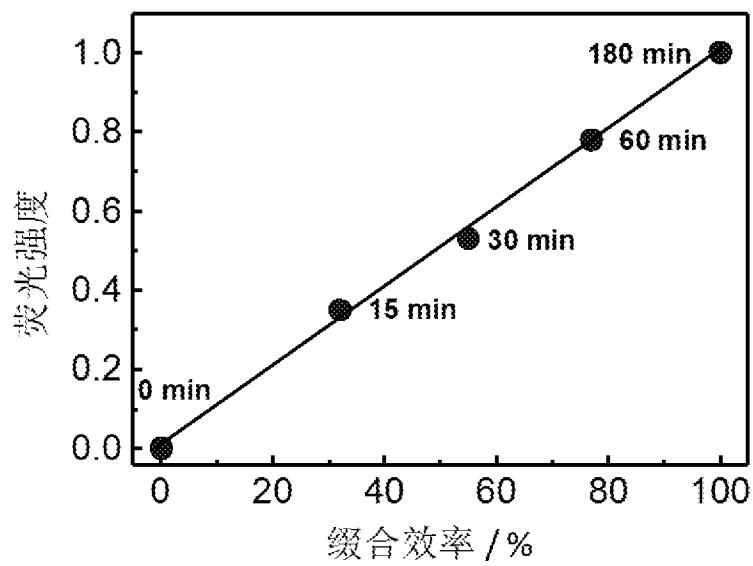


图 8

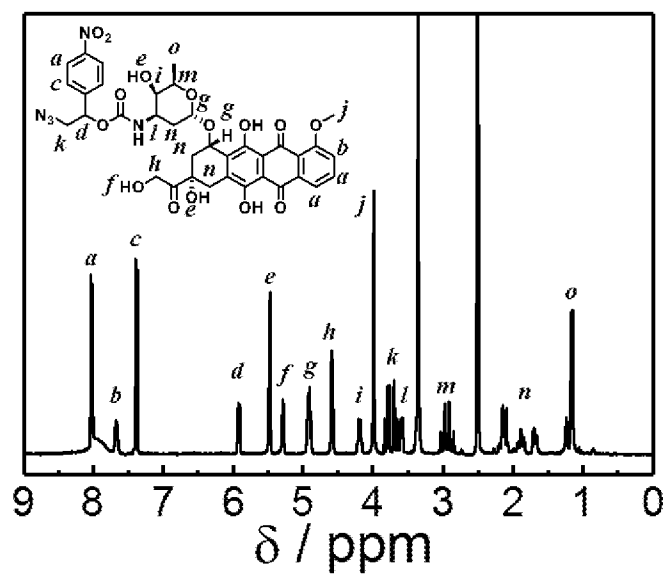


图 9

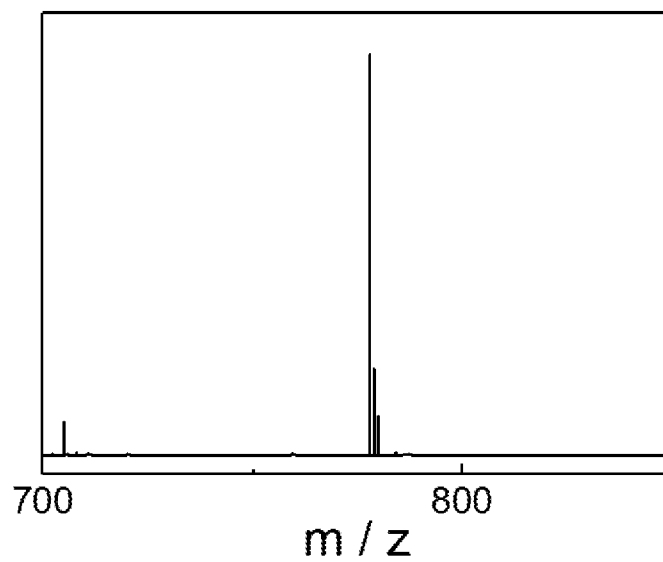


图 10

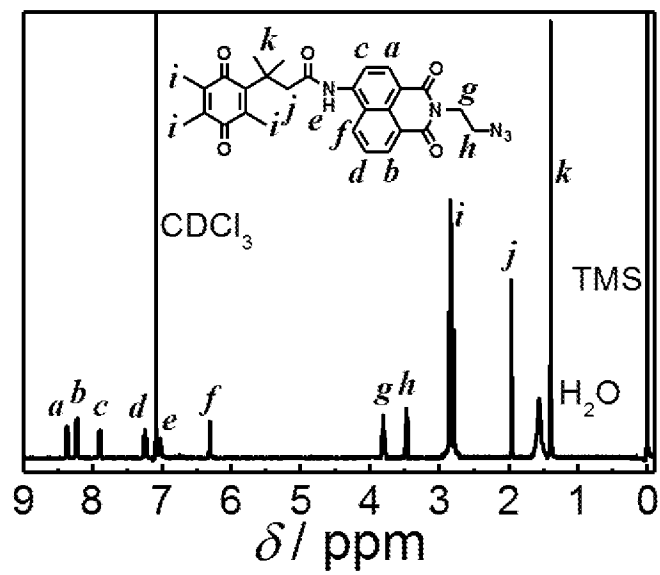


图 11

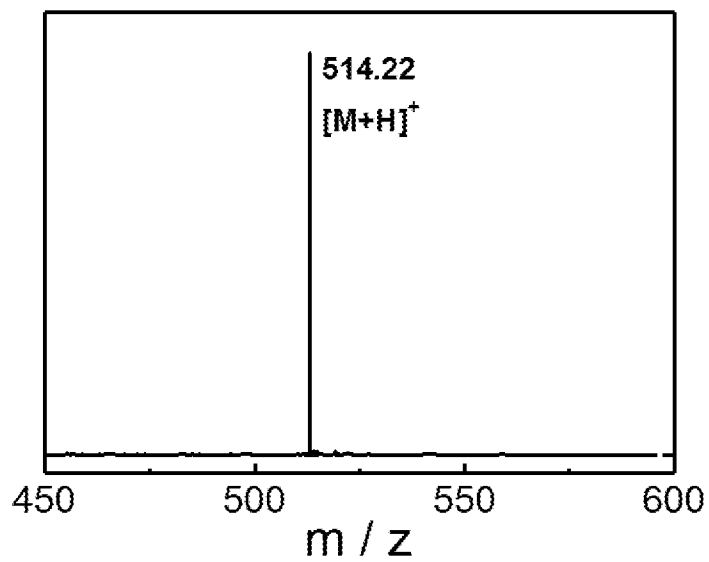


图 12

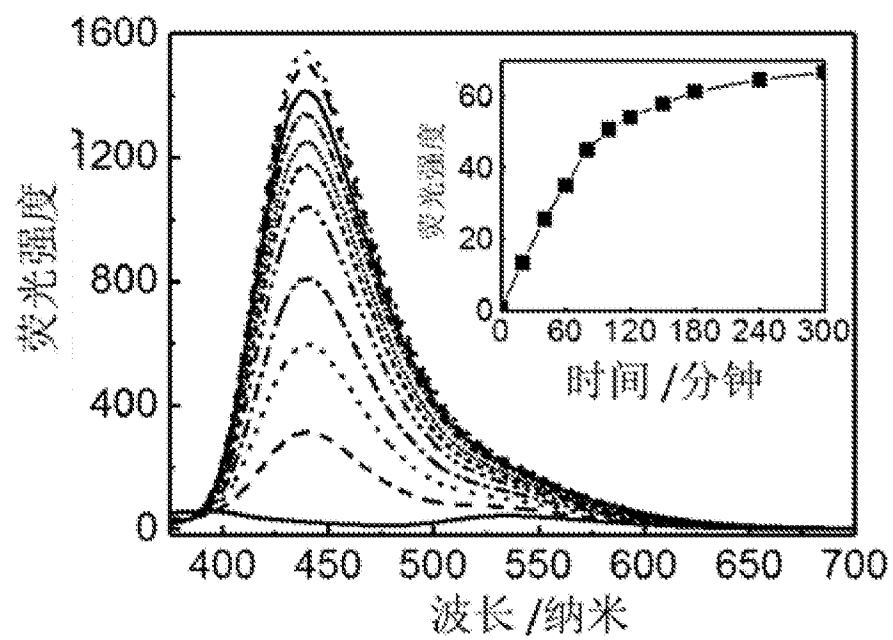


图 13

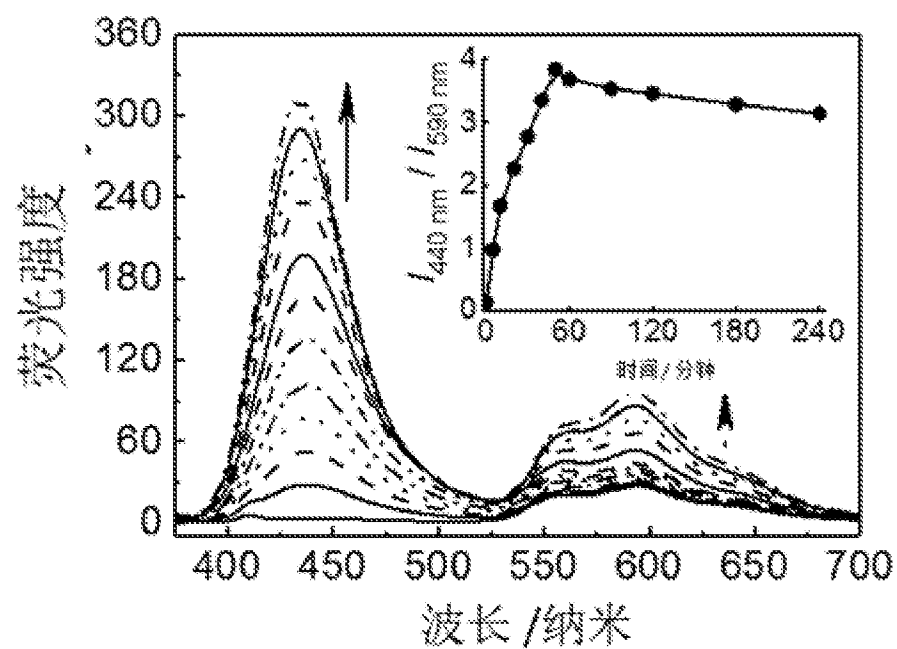


图 14

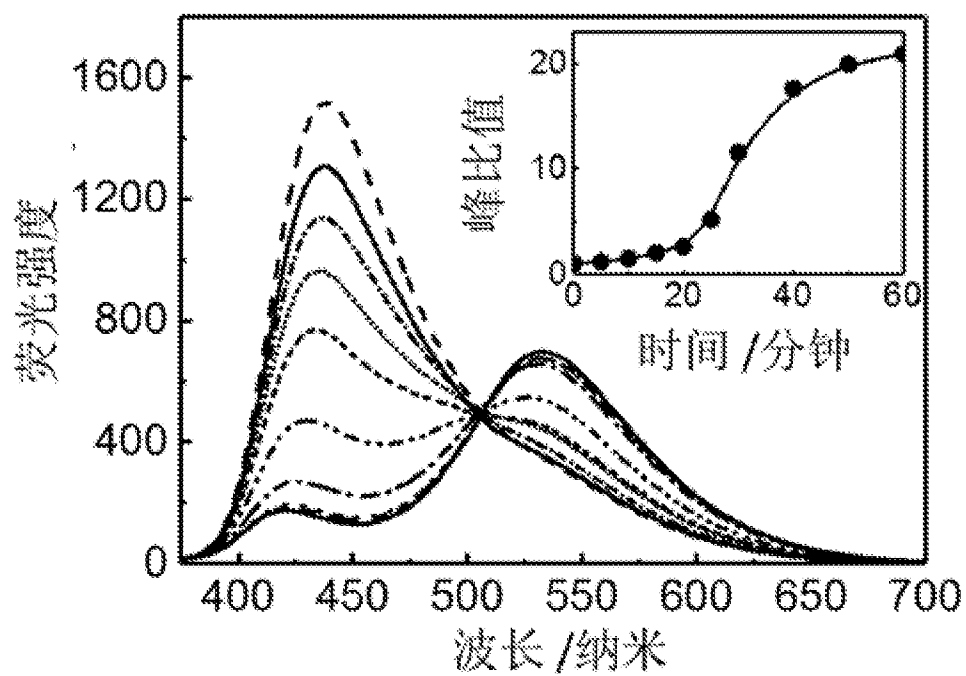
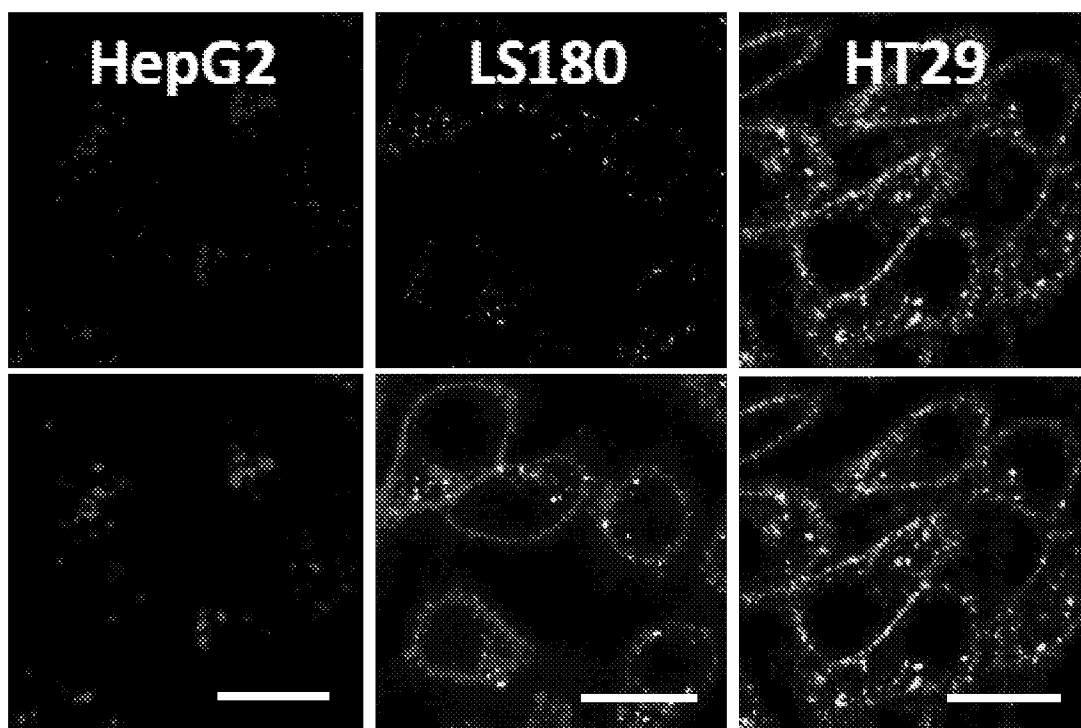


图 15



蓝色通道: 香豆素/ 绿色通道: 酞酰亚胺

图 16

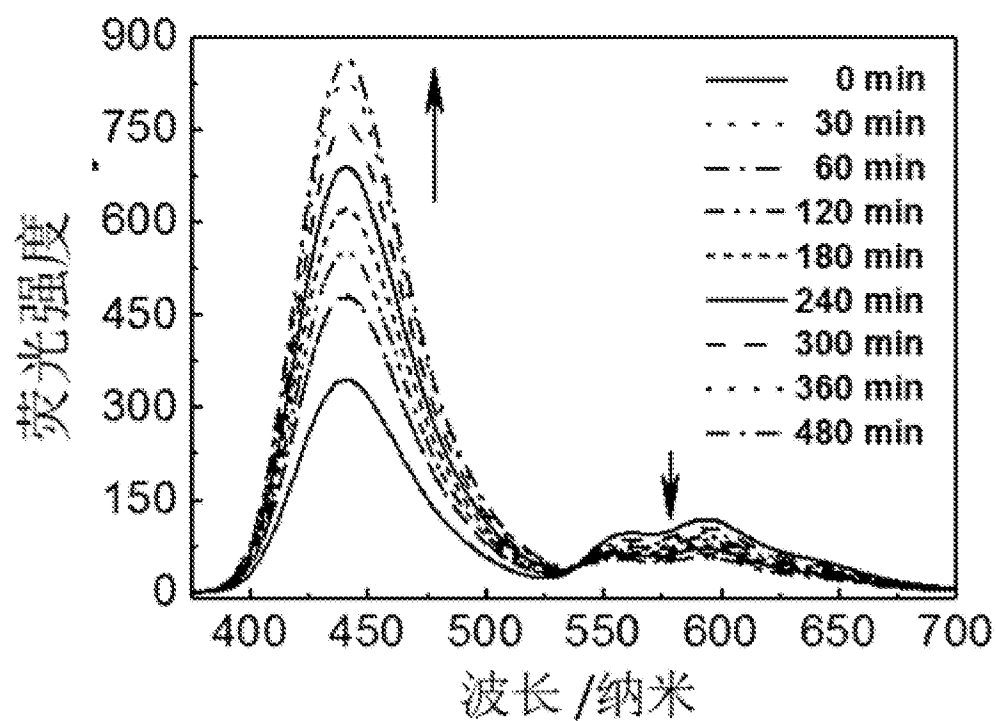
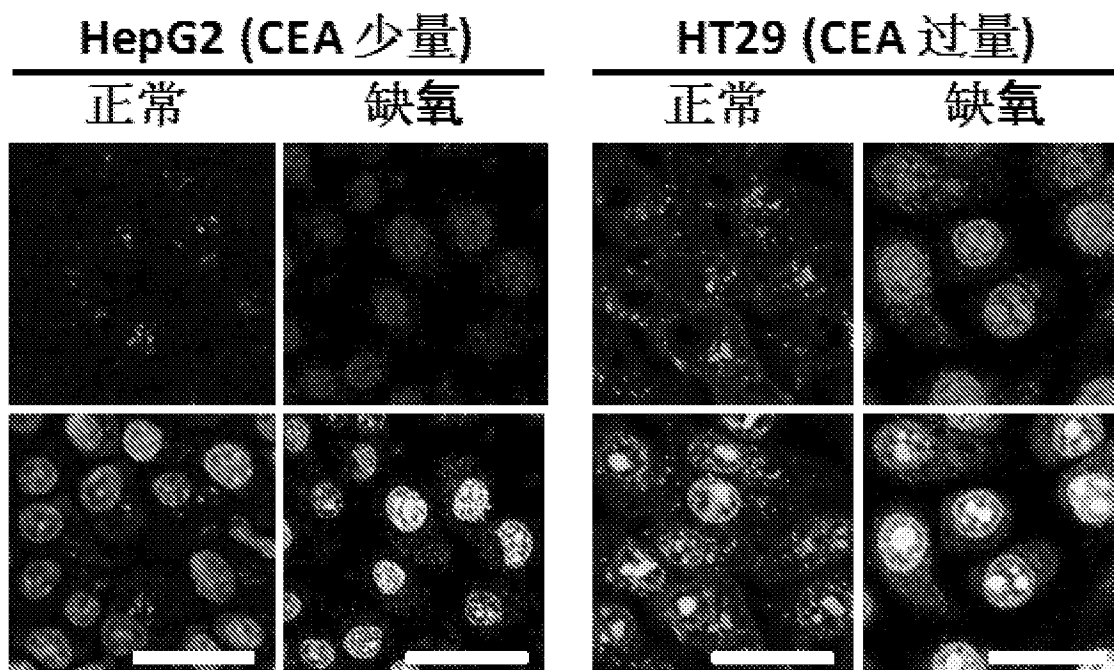


图 17



蓝色通道: 香豆素 / 绿色通道: 吖啶橙 / 红色通道: 阿霉素

图 18

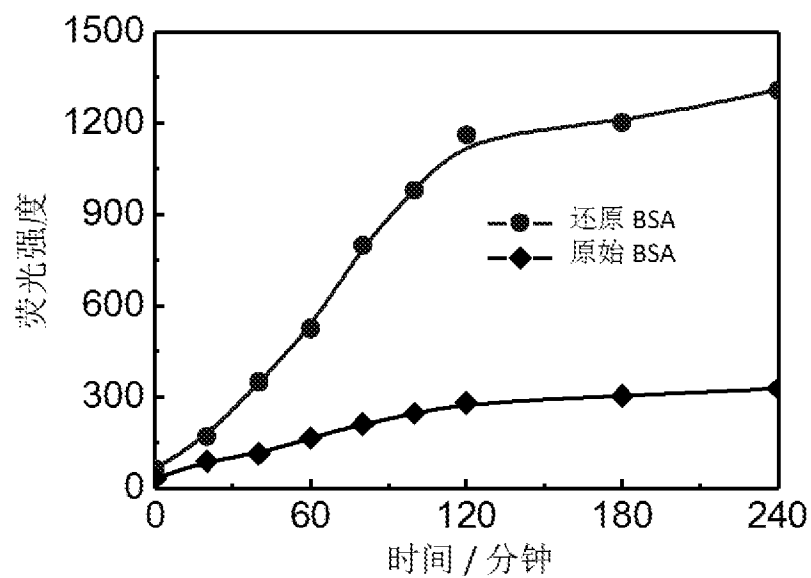


图 19

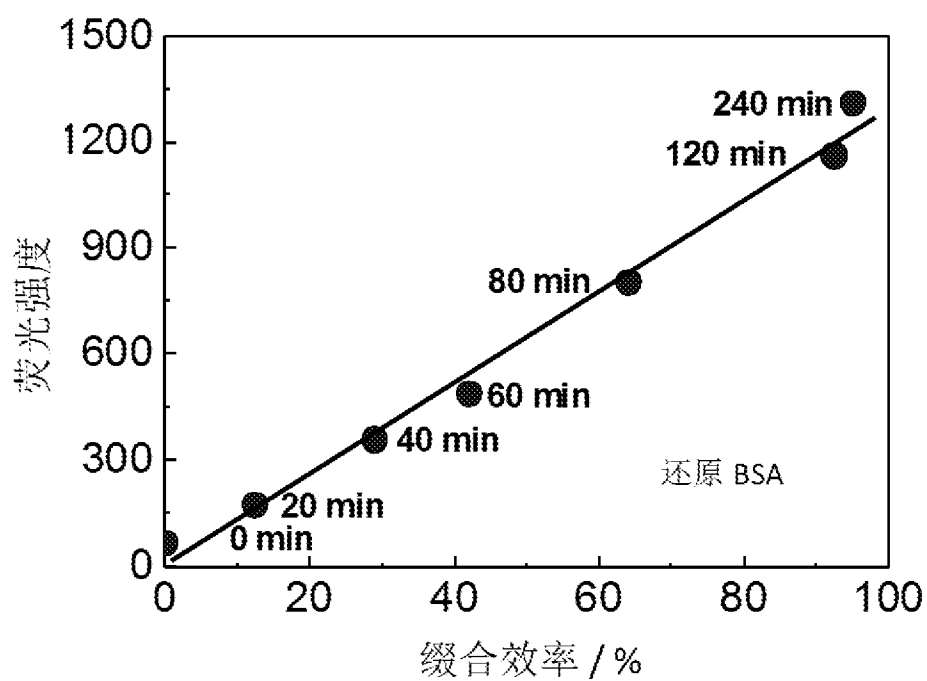


图 20

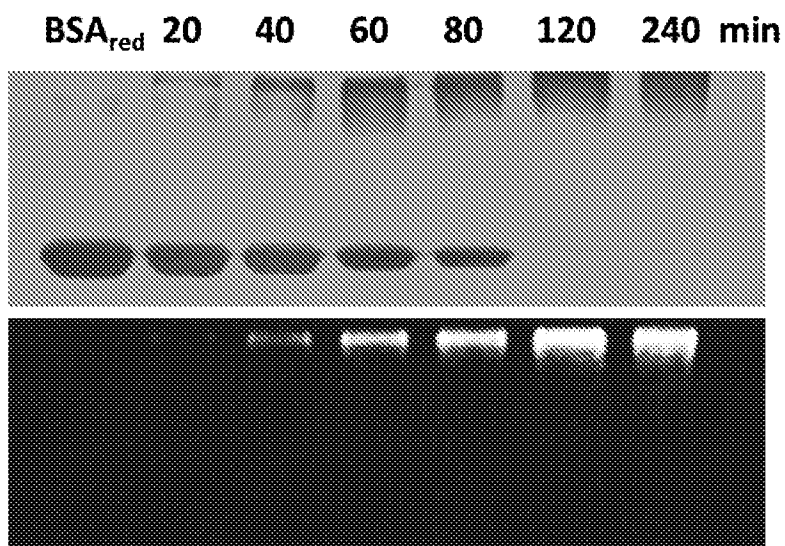


图 21

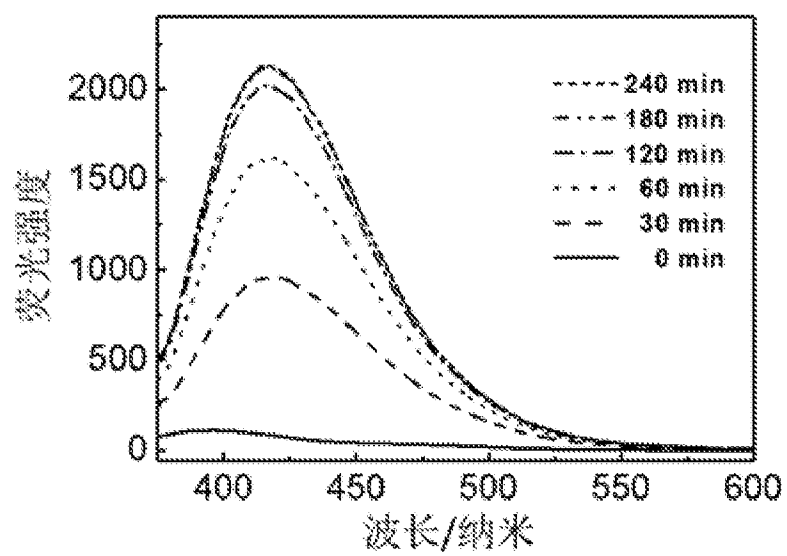


图 22

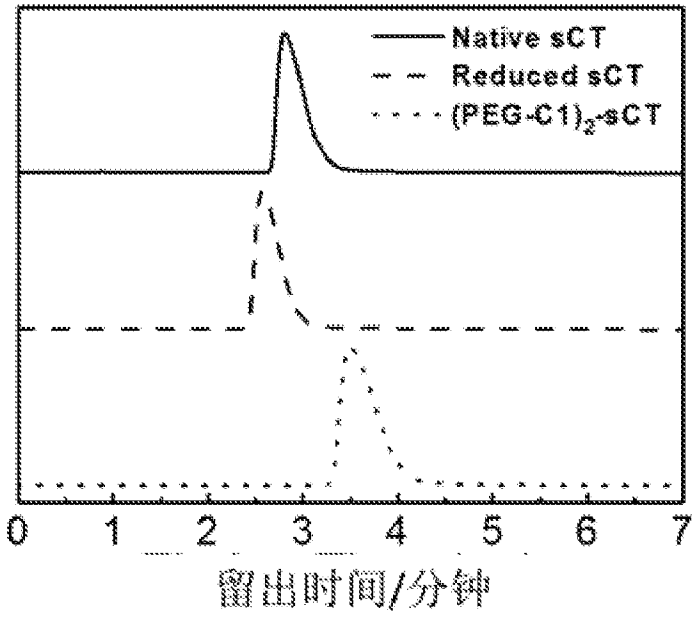


图 23

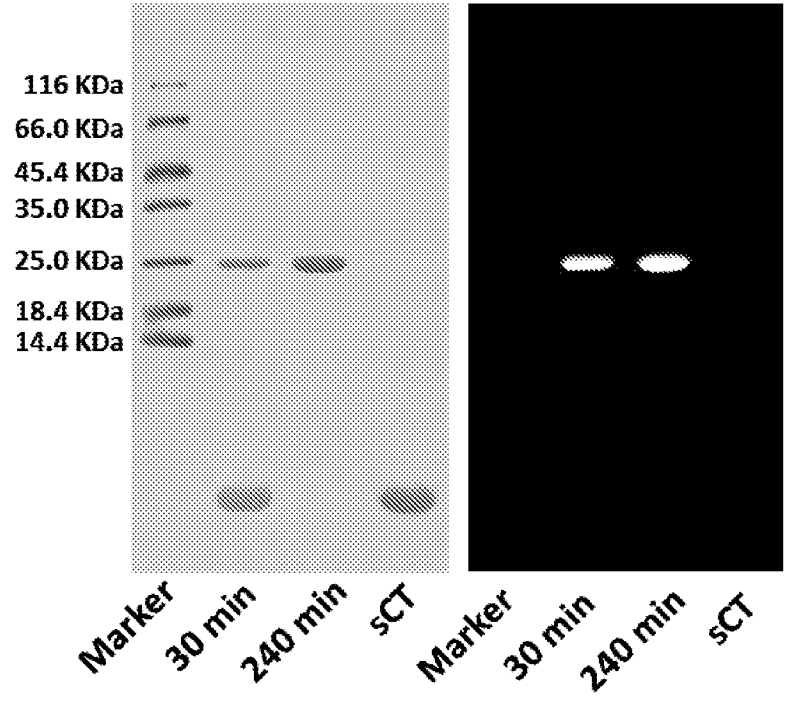


图 24

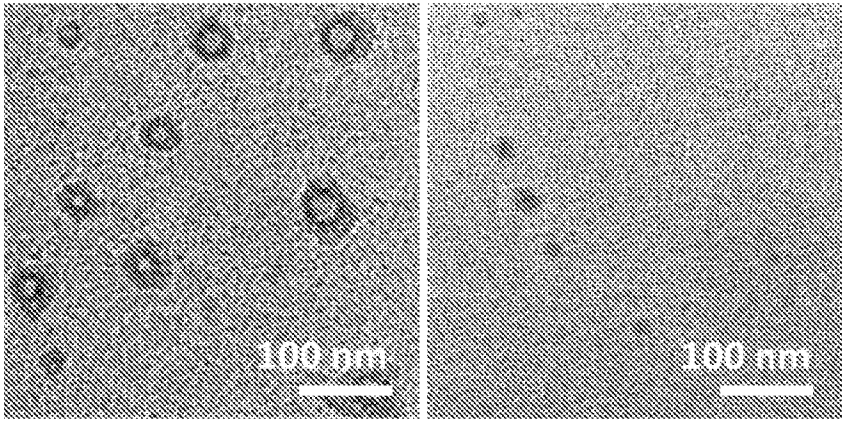


图 25

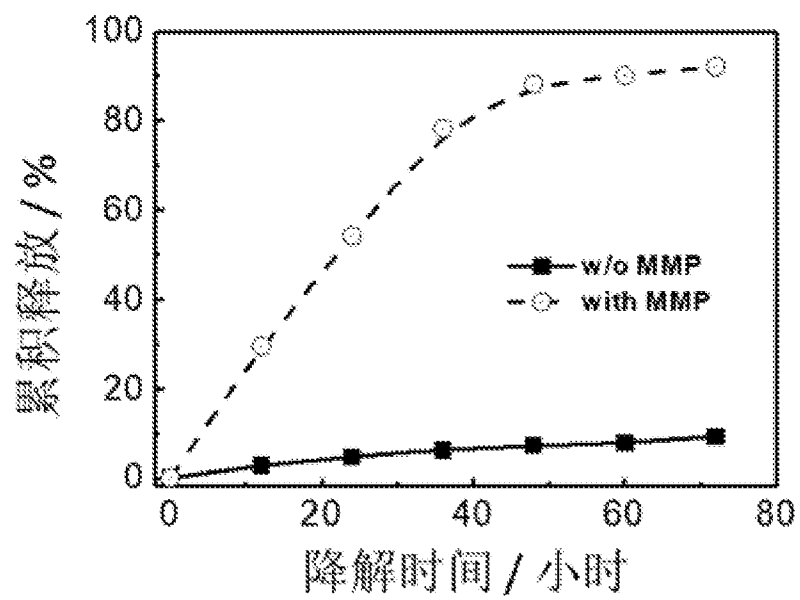


图 26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/084503

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 311/16(2006.01)i; C07D 405/06(2006.01)i; C07H 15/252(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; C07K 14/765(2006.01)i; C07K 14/585(2006.01)i; A61K 47/62(2017.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61K 31/704(2006.01)i; A61P 35/00(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)

C07D311/-; C07D405/-; C07H15/-; C09K11/-; C07K14/-; A61K47/-; A61K49/-; A61K31/-; A61P35/-

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)

CNKI, VEN, DPWI, CNABS, STN (REG, CAPLUS, CASREACT): 荧光, 发色团, 探针, 抗体, 聚合物, 蛋白质, 多肽, 中国科学技术大学, 刘世勇, 刘固襄, 姜琰琰, fluorescence, copolymer, conjugate, antibody, probe, emit+, antigen, protein, polypeptide.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104004149 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 27 August 2014 (2014-08-27) claim 5, and preparation example 1	1
A	CN 104004149 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 27 August 2014 (2014-08-27) claims 1-10	2-5, 10, 15-17, 19-28, 29 (part)
X	WANG, Dehui et al. "Aminonaphthalimide-based Imidazolium Podands for Turn-on Fluorescence Sensing of Nucleoside Polyphosphates" <i>Organic & Biomolecular Chemistry</i> , Vol. vol. 8, 06 May 2010 (2010-05-06), page 2924	1
A	WANG, Dehui et al. "Aminonaphthalimide-based Imidazolium Podands for Turn-on Fluorescence Sensing of Nucleoside Polyphosphates" <i>Organic & Biomolecular Chemistry</i> , Vol. vol. 8, 06 May 2010 (2010-05-06), pages 2923-2924	2, 11-13



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

06 February 2018

Date of mailing of the international search report

13 February 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/084503

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SATO, S. et al. "Synthesis and Spectral Properties of Polymethine-cyanine Dye-nitroxide Radical Hybrid Compounds for Use as Fluorescence Probes to Monitor Reducing Species and Radicals" <i>Spectrochimica Acta Part A</i> , Vol. vol. 71, 31 December 2009 (2009-12-31), pages 2032 and 2034	1
A	SATO, S. et al. "Synthesis and Spectral Properties of Polymethine-cyanine Dye-nitroxide Radical Hybrid Compounds for Use as Fluorescence Probes to Monitor Reducing Species and Radicals" <i>Spectrochimica Acta Part A</i> , Vol. vol. 71, 31 December 2009 (2009-12-31), pages 2032-2035	2, 6-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/084503

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.: 9、14、18、29(部分)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] These claims relate to a method for treatment or diagnosis of the human/animal body under PCT Rule 39.1(iv).
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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] 1. Claims 1 and 2 (part) relate to a compound of formula C1.
- [2] 2. Claims 1 and 2 (part) relate to a compound of formula C2.
- [3] 3. Claims 1 and 2 (part) relate to a compound of formula C3.
- [4] 4. Claims 3-5 relate to a compound of formula I-1 and a preparation method therefor.
- [5] 5. Claims 6-9 relate to a compound of formula II-1, a preparation method therefor and an application thereof.
- [6] 6. Claim 10 relates to a compound of formula I-2.
- [7] 7. Claims 11-14 relate to a compound of formula II-2, a preparation method therefor and an application thereof.
- [8] 8. Claims 15-19 relate to a compound of formula III, a preparation method therefor and an application thereof.
- [9] 9. Claims 20-29 relate to a compound of formula I-3, a compound of formula I-a and a preparation method therefor, a compound of formula I-b and a preparation method therefor, and a polymersome made of a compound of formula I-b and an application thereof.
- [10] In the above-mentioned nine inventions, any two inventions do not have any common technical feature; or although a certain common compound is involved, it is only a very small structural segment in a final compound (for example, the first invention relates to a compound of formula C1 where R1 is R1-1 and R2 is R2-1, and the compound C1 is also used in claim 4 of the fourth invention; however, in the structure of a final compound of formula I-1, the structure of the compound C1 cannot construct a main structure of the compound of formula I-1, and the compound C1 is only a very small structural segment of the entire structure), and is not enough to construct the same or corresponding specific technical feature.
- [11] Therefore, the above-mentioned nine inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, and do not meet the requirement of unity of invention as defined in PCT Rule.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/084503**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/084503

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 104004149 A	27 August 2014	CN 104004149 B	09 November 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/084503

A. 主题的分类

C07D 311/16(2006.01)i; C07D 405/06(2006.01)i; C07H 15/252(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i;
C07K 14/765(2006.01)i; C07K 14/585(2006.01)i; A61K 47/62(2017.01)i; A61K 47/54(2017.01)i; A61K
49/00(2006.01)i; A61K 31/704(2006.01)i; A61P 35/00(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)

C07D311/-; C07D405/-; C07H15/-; C09K11/-; C07K14/-; A61K47/-; A61K49/-; A61K31/-; A61P35/-

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))

CNKI, VEN, DPWI, CNABS, STN(REG, CAPLUS, CASREACT): 荧光, 发色团, 探针, 抗体, 聚合物, 蛋白质, 多肽, 中国科学技术大学, 刘世勇, 刘固寰, 姜琰琰, fluorescence, copolymer, conjugate, antibody, probe, emit+, antigen, protein, polypeptide.

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	CN 104004149 A (中国科学技术大学) 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27) 权利要求5、制备例1	1
A	CN 104004149 A (中国科学技术大学) 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27) 权利要求1-10	2-5、10、15-17、 19-28、29(部分)
X	Dehui Wang等. "Aminonaphthalimide-based imidazolium podands for turn-on fluorescence sensing of nucleoside polyphosphates" Organic & Biomolecular Chemistry, 第8卷, 2010年 5月 6日 (2010 - 05 - 06), 第2924页	1
A	Dehui Wang等. "Aminonaphthalimide-based imidazolium podands for turn-on fluorescence sensing of nucleoside polyphosphates" Organic & Biomolecular Chemistry, 第8卷, 2010年 5月 6日 (2010 - 05 - 06), 第2923-2924页	2、11-13

☒ 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

2018年 2月 6日

国际检索报告邮寄日期

2018年 2月 13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)
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

马良晓

电话号码 (86-10)62086312

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	Shingo Sato等. "Synthesis and spectral properties of polymethine-cyanine dye-nitroxide radical hybrid compounds for use as fluorescence probes to monitor reducing species and radicals" Spectrochimica Acta Part A, 第71卷, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31), 第2032、2034页	1
A	Shingo Sato等. "Synthesis and spectral properties of polymethine-cyanine dye-nitroxide radical hybrid compounds for use as fluorescence probes to monitor reducing species and radicals" Spectrochimica Acta Part A, 第71卷, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31), 第2032-2035页	2、6-8

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： 9、14、18、29(部分)
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 这些权利要求涉及对人体/动物体实施的治疗或诊断方法（细则39.1(iv) PCT）。
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。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] ### 1、权利要求1-2(部分)涉及式C1化合物。
- [2] ### 2、权利要求1-2(部分)涉及式C2化合物。
- [3] ### 3、权利要求1-2(部分)涉及式C3化合物。
- [4] ### 4、权利要求3-5涉及式I-1化合物及其制备方法。
- [5] ### 5、权利要求6-9涉及式II-1化合物、制备方法和应用。
- [6] ### 6、权利要求10涉及式I-2化合物。
- [7] ### 7、权利要求11-14涉及式II-2化合物、制备方法和应用。
- [8] ### 8、权利要求15-19涉及式III化合物、制备方法和应用。
- [9] ### 9、权利要求20-29涉及式I-3化合物、式I-a化合物及其制备方法、式I-b化合物及其制备方法、式I-b化合物组成的聚合物囊泡及其应用。
- [10] 上述9项发明中，任何两项之间均不具有共同的技术特征；或者即便是涉及到了共同的某个化合物，但在最终化合物中仅仅为很小的结构片段(例如第1项发明中涉及到了R1为R1-1、R2为R2-1的式C1化合物，而第4项发明中的权利要求4中也使用了该C1化合物，但在最终式I-1化合物的结构中，化合物C1的结构并不能构成式I-1化合物的主体结构，其仅仅为整个结构的很小结构片段)，并不足以构成相同或相应的特定技术特征。
- [11] ##### 因此，上述9项发明之间不能相互关联，从而不能形成一个总的发明构思，不符合PCT事实细则规定的发明单一性。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第I页第3项)

1. ☒ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- ☒ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际申请号
PCT/CN2017/084503

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	104004149	A	2014年 8月 27日	CN	104004149 B	2016年 11月 9日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)