

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 7 月 21 日 (21.07.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/152298 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 9/127 (2006.01) *A61K 47/42* (2017.01)

A61K 31/525 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

A61K 47/34 (2017.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/072328

(22) 国际申请日: 2022 年 1 月 17 日 (17.01.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202110065127.1 2021 年 1 月 18 日 (18.01.2021) CN

(71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市相城区经济学路 8 号 5 楼孙周强, Jiangsu 215137 (CN)。

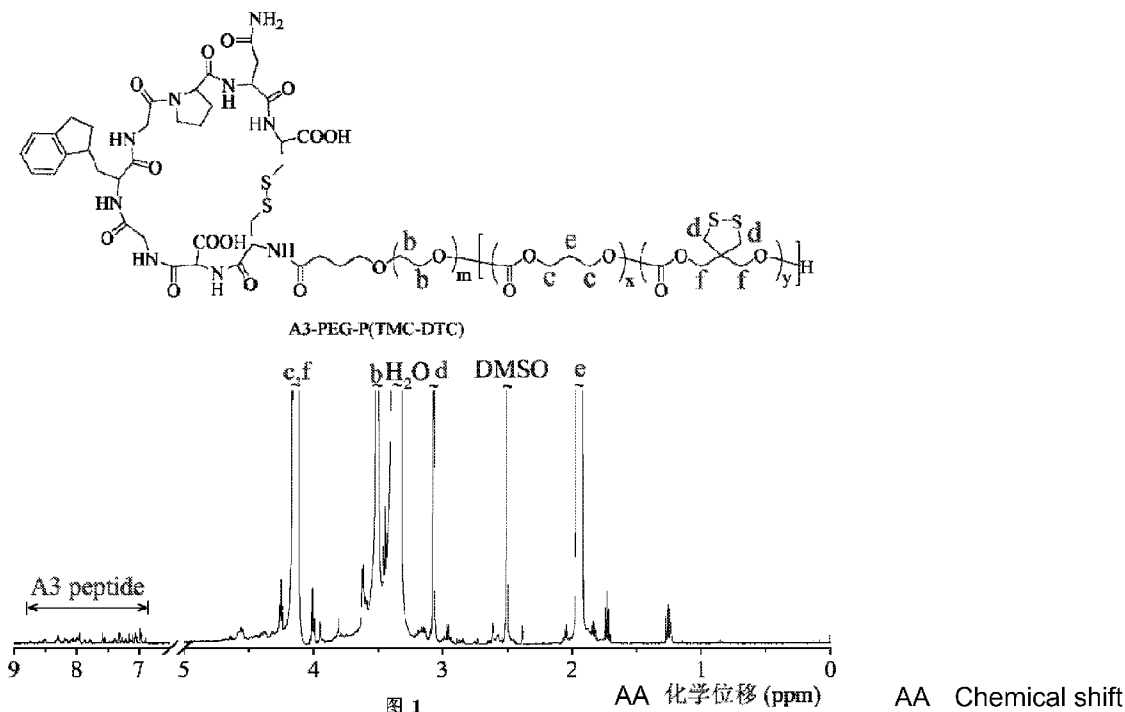
(72) 发明人: 钟志远(ZHONG, Zhiyuan); 中国江苏省苏州市相城区经济学路 8 号, Jiangsu 215137 (CN)。 王哲(WANG, Zhe); 中国江苏省苏州市相城区经济学路 8 号, Jiangsu 215137 (CN)。 夏一枫(XIA, Yifeng); 中国江苏省苏州市相城区经济学路 8 号, Jiangsu 215137 (CN)。 赵松松(ZHAO, Songsong); 中国江苏省苏州市相城区经济学路 8 号, Jiangsu 215137 (CN)。 孟凤华(MENG, Fenghua); 中国江苏省苏州市相城区经济学路 8 号, Jiangsu 215137 (CN)。

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

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

(54) **Title:** POLYMERSOME DRUG LOADED WITH PLK1 INHIBITOR, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 载 PLK1 抑制剂的聚合物囊泡药物及其制备方法与应用



(57) **Abstract:** Disclosed in the present invention are a polymersome drug loaded with a PLK1 inhibitor, a preparation method therefor and the use thereof. PEG-P(TMC-DTC)-based polymersome A3-Ps has a dense disulfide bond cross-linked membrane, resulting in excellent stability and rapid intracellular drug release. In addition, short-chain polyaspartic acid in an inner shell of the vesicle membrane can enhance the ability of a vesicle to load the molecular targeting drug volasertib (Vol), and the A3-Ps has a high drug-loading capacity and drug-loading rate and a small particle size. The Vol-loaded vesicle A3-Ps-Vol reduces the systemic toxicity of Vol while increasing

BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

the antineoplastic activity thereof. The A3-Ps-Vol has the best inhibitory activity against SKOV-3 cells compared with non-targeting Ps-Vol and free drug Vol, with the IC₅₀ being 49 nM, which is 3.5 times lower than that of free drug Vol. The double-targeting nano preparation is a highly efficient low-toxicity therapy for treating ovarian cancer.

(57) 摘要: 本发明公开了载PLK1抑制剂的聚合物囊泡药物及其制备方法与应用; 基于PEG-P(TMC-DTC)的聚合物囊泡 A3-Ps 有着致密的双硫键交联的膜, 带来了卓越的稳定性和快速的细胞内药物释放, 且囊泡膜的内壳的短链聚天冬氨酸能增强该囊泡装载分子靶向药 volasertib (Vol) 的能力, A3-Ps 的载药量、载药率高, 粒径小。载 Vol 囊泡 A3-Ps-Vol 在提升 Vol 抗肿瘤活性的同时减少了其系统毒性, A3-Ps-Vol 和非靶向 Ps-Vol 及自由药 Vol 相比有最好的抑制 SKOV-3 细胞的活性, IC₅₀ 为 49 nM, 比自由药 Vol 低 3.5 倍, 这种双靶向的纳米制剂是一种高效低毒的治疗卵巢癌的疗法。

载PLK1抑制剂的聚合物囊泡药物及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术，具体涉及载PLK1抑制剂的聚合物囊泡药物及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 作为女性疾病中致命的恶性肿瘤，卵巢癌的五年生存率仅为30%-40%。高致死率的原因是晚期卵巢癌病人的复发和频繁化疗（如铂药和taxane）后的耐药性。因而临床上对治疗卵巢癌的药物开发有着迫切的需求。在多种恶性肿瘤治疗方面，有着明确特异性和低毒性的靶向分子药物逐渐成为传统化疗药物的更好的替代品。聚腺苷二磷酸核糖聚合酶（PARP）抑制剂-olaparib在BRCA突变的卵巢癌病例中显示了良好的治疗效果，BRCA突变大约占有卵巢癌病人的10%-15%。研究发现，有26%的卵巢癌病人的Polo样激酶1（PLK1）表达呈阳性，并且PLK1的表达和卵巢癌肿瘤的恶性程度呈正相关性，因此PLK1抑制剂volasertib（Vol）是另一个有望用于治疗卵巢癌的分子靶向药。但是，和其他小分子药类似，Vol通常会被人体快速清除，并且肿瘤的富集有限。此外，耐药性是小分子药物的另一个潜在挑战。

发明概述

技术问题

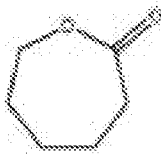
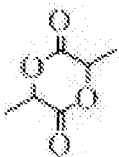
[0003] 目前关于Vol的靶向递送的研究很少，本发明报道了一种新型的策略，将多肽靶向的聚合物囊泡和PLK1抑制剂Vol结合，作为治疗卵巢癌的双重靶向药物。多肽靶向的囊泡A3-Ps通过聚合物PEG-P(TMC-DTC)-PAsp和A3-PEG-P(TMC-DTC)自组装得到，基于PEG-P(TMC-DTC)的聚合物囊泡有着致密的双硫键交联膜层，带来了卓越的稳定性和快速的细胞内药物释放，且囊泡的内壳的短链聚天冬氨酸能增强该囊泡装载Vol的能力，对人卵巢癌细胞，如ES-2，SKOV3和OVCAR3有高亲和力和力。本发明是第一篇关于Vol的靶向递送用于卵巢癌治疗的报道，结果表明，该双重靶向药物显著改善了小鼠SKOV-3 皮下肿瘤的治疗效果。

问题的解决方案

技术解决方案

- [0004] 本发明采用如下技术方案：载PLK1抑制剂的聚合物囊泡，包括聚合物囊泡与PLK1抑制剂；所述聚合物囊泡由PEG-P(T-DTC)-PAsp制备，或者所述聚合物囊泡由PEG-P(T-DTC)-PAsp与A-PEG-P(T-DTC)制备。
- [0005] 本发明还公开了聚合物在制备载PLK1抑制剂的聚合物囊泡中的应用，或者在制备抗肿瘤药物中的应用，尤其在制备治疗卵巢癌药物中的应用；所述聚合物为PEG-P(T-DTC)-PAsp，或者所述聚合物为PEG-P(T-DTC)-PAsp与A-PEG-P(T-DTC)。
- [0006] 本发明进一步公开了上述载PLK1抑制剂的聚合物囊泡在制备抗肿瘤药物中的应用，尤其在制备治疗卵巢癌药物中的应用。
- [0007] 本发明公开了上述载PLK1抑制剂的聚合物囊泡的制备方法，将聚合物溶液与PLK1抑制剂溶液混合，然后孵育，再透析，得到载PLK1抑制剂囊泡。简要地，将100 mL聚合物DMSO溶液（10 mg/mL）与溶解在DMSO中的Vol（20 mg/mL，5 mL）混合；混合溶液加入0.9 mL的HEPES缓冲溶液（5 mM，pH 6.8），200 rpm搅拌5分钟后，分散相被转入摇床（100 rpm，35℃）孵育6 h，再在HEPES（5 mM，pH 7.4）中透析（截留分子量为7000 Da），得到载PLK1抑制剂囊泡。本发明载PLK1抑制剂的聚合物囊泡由聚合物囊泡与PLK1抑制剂组成，为一种纳米药物，经过粒径和Zeta电位的测量，通过紫外分光光度计定量Vol的含量来计算出载药量（DLC）和包封率（DLE）。
- [0008] 本发明中，PLK1抑制剂为volasertib（Vol）；PEG-P(T-DTC)-PAsp、A-PEG-P(T-DTC)中，T为酯单元或者碳酸酯单元，即环酯单体或者环碳酸酯单体开环后的单元，比如TMC、LA、CL；A为多肽靶向分子，比如A3多肽；PAsp为聚天冬氨酸；DTC为二硫戊环三亚甲基碳酸酯单体。
- [0009] DTC、TMC、LA、CL对应单体的化学结构式分别如下，开环聚合形成重复单元：





[0010] 以环酯单体或者环碳酸酯单体作为第一单体、二硫戊环三亚甲基碳酸酯单体为第二单体，以聚乙二醇为引发剂，聚合得到PEG-P(T-DTC)，再通过氯甲酸对硝基苯酯的活化及与聚天冬氨酸偶联反应得到PEG-P(T-DTC)-PAsp；或者以环酯单体或者环碳酸酯单体作为第一单体、二硫戊环三亚甲基碳酸酯单体为第二单体，以带有活性端基的聚乙二醇为引发剂，聚合得到带有活性端基的PEG-P(T-DTC)，再与靶向多肽反应得到A-PEG-P(T-DTC)。

[0011] 本发明PEG-P(T-DTC)-PAsp与A-PEG-P(T-DTC)中，P(T-DTC)为疏水链段；其中，PEG链段的分子量为2000~10000Da；疏水链段的总分子量为PEG链段分子量的2.5~10倍；疏水链段中PDTC链段的分子量占疏水链段总分子量的10%~35%；聚天冬氨酸的分子量为300~5000Da。优选的，PEG链段的分子量为3400~8000Da；疏水链段的总分子量为PEG链段分子量的2.8~6倍；疏水链段中PDTC链段的分子量占疏水链段总分子量的11%~25%；聚天冬氨酸的分子量为1000~2000Da。

发明的有益效果

有益效果

[0012] 作为女性中的高致死率的恶性肿瘤，卵巢癌的五年生存率为30%-40%。因此，

开发高效低毒的卵巢癌治疗方法迫在眉睫。在此，本发明报道了一种靶向多肽（A3）修饰的聚合物囊泡（A3-Ps）装载分子靶向药PLK1抑制剂volasertib（Vo1）的新策略，用于治疗卵巢癌。A3-Ps-Vo1的载药量从7.7%到8.0%，粒径从25 nm到32 nm。在卵巢癌细胞SKOV3的内吞实验中，通过对荧光分子FITC标记的Vo1定量发现，

A3表面密度为20%的A3-Ps有着最佳的靶向效果，分别是非靶组Ps的2.3倍，自由药Vo1-FITC的3.3倍。载Vo1的囊泡A3-Ps-Vo1和非靶组和自由药组相比有着最好的抑制SKOV-3细胞的活性，IC₅₀为49 nM，比自由药Vo1低3.5倍。其在荷SKOV-3皮下瘤的裸鼠治疗实验中显示优异的抗肿瘤活性，有效抑制了肿瘤的生长，而Ps-Vo1或自由药Vo1组的肿瘤则持续生长。A3-Ps-Vo1在提升Vo1抗肿瘤活性的同时减少了其系统毒性。这种双靶向纳米制剂是一种高效、低毒的治疗卵巢癌的药物。

对附图的简要说明

附图说明

[0013] 图 1为A3-PEG-P(TMC-DTC)的核磁氢谱(600 MHz, DMSO-*d*₆)。

[0014] 图 2为(A) A3-Ps-Vo1的冷冻电镜表征；(B)Ps-Vo1和A3-Ps-Vo1（1 mg/mL）在4℃冰箱内储存一个月后囊泡的粒径变化；(C)50倍稀释或添加10%胎牛血清后囊泡的粒径变化；(D) 4℃冰箱内储存一个月的药物泄露量；(E) 10 mM GSH存在条件下volasertib释放（聚合物浓度为0.4 mg/mL）；(F)空囊泡对SKOV-3细胞的毒性。

[0015] 图 3为 (A) A3表面密度为10%、20%或30%的A3-Ps-Vo1、Ps-Vo1及自由Vo1在与SKOV-3细胞孵育72 h后的细胞毒性（n = 4）；(B) SKOV-3细胞与载Vo1-FITC的Ps、A3-Ps孵育4 h的流式细胞仪结果；(C) A3-Ps-Vo1和Ps-Vo1分别与DU145细胞孵育48 h的细胞毒性和蛋白印迹分析 (E) ；(D) 载Vo1-FITC的A3-Ps、Ps与DU145细胞孵育4 h的流式结果。

[0016] 图 4 SKOV-3细胞分别与A3-Ps-Vo1、Ps-Vo1、自由Vo1（200 nM）孵育4 h，后在新鲜培养基中继续孵育20 h的 (A) 细胞周期分析和(B) 细胞凋亡检测。

[0017] 图

5为激光共聚焦显微镜CLSM表征Cy5-A3-Ps-Vol-FITC和Cy5-Ps-Vol-FITC在SKOV-3细胞中的内吞与药物释放。(A) 孵育4h的CLSM图片。比例尺: 25 μm 。(B) 细胞内的FITC和Cy5的荧光信号的半定量分析。 $** p < 0.01$ 。(C) 细胞内FITC和Cy5信号的共定位分析。

[0018] 图6为 (A) 静脉注射Cy5-Ps-Vol或Cy5-A3-Ps-Vol的小鼠在不同时间点的活体成像; (B) 静脉注射Ps-Vol-FITC或A3-Ps-Vol-FITC 48 h后的主要器官离体荧光图; (C) Cy5-Ps-Vol和 Cy5-A3-Ps-Vol (红) 注射48h后的肿瘤荧光切片, 细胞核和血管分别用DAPI (蓝) and CD31-FITC (绿) 染色。比例尺: 50 μm ; (D) 图 6C中囊泡与血管的荧光信号的共定位分析; (E) Ps-Vol-FITC和A3-Ps-Vol-FITC注射到SKOV-3荷瘤小鼠后48 h的生物分布。

[0019] 图7为A3-Ps-Vol治疗荷SKOV-3皮下瘤小鼠的效果和组织学分析。(A) 肿瘤体积变化; (B) 小鼠体重变化; (C) 第16天肿瘤体积变化; (D) 第16天抑瘤率; (E) 不同组的肿瘤切片分析。H&E、PLK1免疫组化 (IHC) 分析和TUNEL。白色和红色标尺分别代表25、 100 μm 。采用单因素方差分析和Tukey多重比较检验进行统计分析。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ 。

[0020] 图8为A3-Ps-Vol、自由Vol分别在两种给药模式: 单针50 mg Vol/kg (A)、6针20 mg Vol/kg (3天一次)下、对健康裸鼠的耐受研究 (B)。# 表示因小鼠死亡导致的实验终止。(C) 单针50 mg Vol/kg剂量下自由 Vol、A3-Ps-Vol组小鼠的血常规分析。

发明实施例

本发明的实施方式

[0021] 作为女性中的高致死率的恶性肿瘤, 卵巢癌的五年生存率为30%~40%。因此, 开发高效低毒的卵巢癌治疗方法迫在眉睫。在此, 本发明报道了一种靶向多肽 (A3) 修饰的聚合物囊泡 (A3-Ps) 装载分子靶向药PLK1抑制剂volasertib (Vol 1) 的新策略, 用于治疗卵巢癌: A3-Ps-Vol的载药量从7.7%到8.0%, 粒径从25 nm到32 nm。在卵巢癌细胞SKOV3的内吞实验中, 通过对荧光分子FITC标记的Vol

定量发现,

A3表面密度为20%的A3-PS有着最佳的靶向效果, 分别是非靶组PS的2.3倍, 自由药Vol-FITC的3.3倍。载Vol的A3-PS和非靶组和自由Vol组先比有着最好的抑制SKOV-3细胞的活性, IC₅₀为49 nM, 比自由药Vol低3.5倍。其在荷SKOV-3皮下瘤的裸鼠治疗实验结果显示了优异的抗肿瘤活性, 有效抑制了肿瘤的生长, 而PS-Vol或自由Vol组的肿瘤则持续生长。A3-PS-Vol在提升Vol抗肿瘤活性的同时减少了其系统毒性。本发明载PLK1抑制剂的聚合物囊泡由聚合物囊泡与PLK1抑制剂组成, 这种双靶向纳米制剂是一种高效、低毒的治疗卵巢癌的疗法。

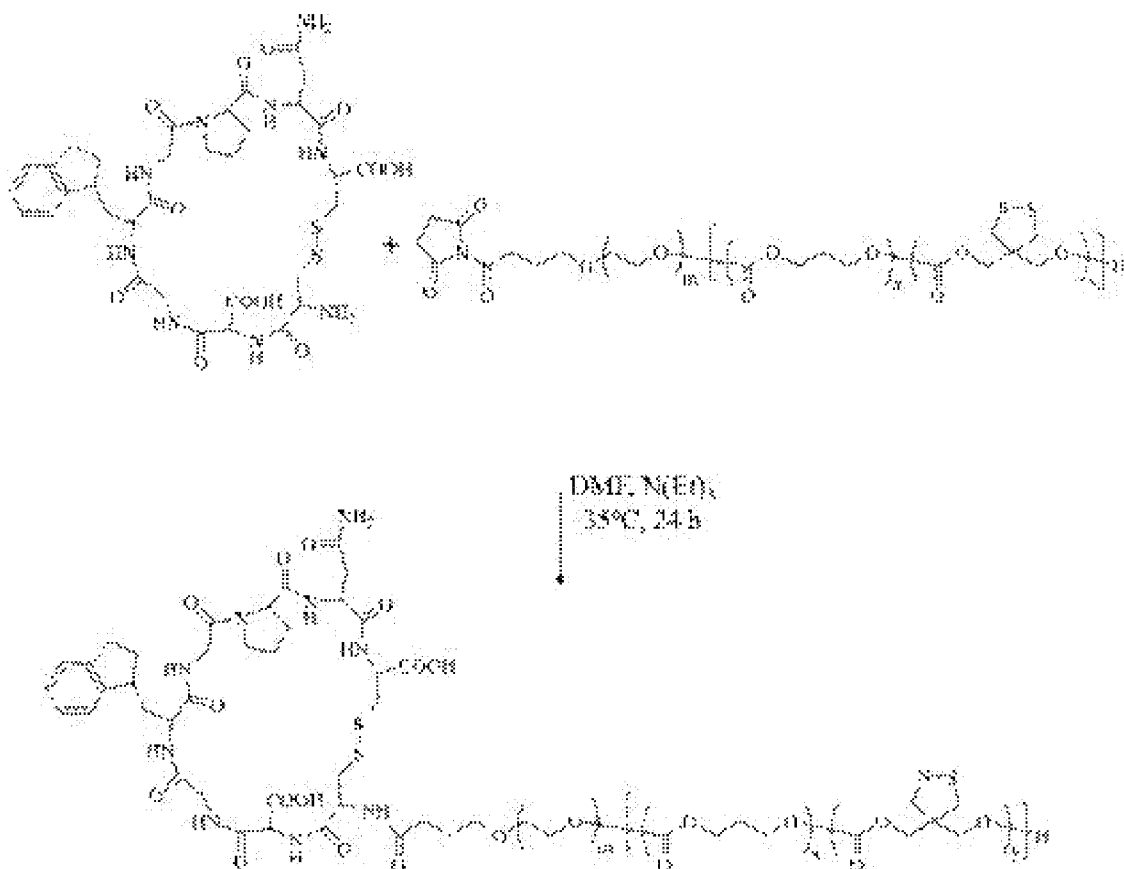
[0022] 本发明所有原料都为市售产品, 具体实验操作方法为常规方法。

[0023] A3多肽(环肽cDGWGPNC, 98%)购买自上海吉尔生化。Volasertib (Vol, > 99.8%, MedChemExpress)、FITC和Cy5 (Lumiprobe) 购买后直接使用。PLK1抗体、GAPDH 抗体(Santa Cruz Biotechnology)、microBCA (Thermo Scientific)都按照制造商说明使用。SKOV-3 细胞购买自中国科学院(中国上海)。BALB/c裸鼠(雌性, 4-6周, 16 ~ 20g)从上海Slac实验动物有限公司(中国上海)购买, 并在SPF条件下喂养。所有动物实验操作均按苏州大学实验动物中心及苏州大学动物护理及使用委员会批准的规程办理。

[0024] 聚合物的核磁表征以DMSO-d₆为溶剂、在600 M ¹H NMR核磁仪(DirectDrive2)中测定, 根据残留DMSO (δ 2.50 ppm)校准化学位移。囊泡的粒径和粒径分布是在25℃下, 通过配备633nmHe-Ne激光的动态激光光散射仪Zetasizer Nano-ZS (Malvern) 在PB中测定, 通过U形电泳槽测定Zeta电位。Volasertib载药量通过紫外分光光度计(UH5300, HITACHI)测定在330 nm波长的紫外吸光度和标准曲线来测定。用Pierce-BCA分析法(Thermo-Fisher Scientific)通过酶标仪(Multiscan FC, Thermo)测定聚合物上偶联的多肽。细胞的CLSM图像是在共聚焦激光扫描显微镜(LSM710, Leica)上拍摄的。细胞的流式分析通过流式细胞仪(BD, FACS Calibur flow cytometer)测定。活体和离体荧光成像通过近红外荧光成像系统(IVIS Lumina II)测定。volasertib-FITC在各组织中的生物分布通过荧光光度计(Cary Eclipse, ex. 480 nm, em. 560 nm)来定量。

- [0025] 呈现的数据以平均值±标准差 (SD) 表示。采用单因素方差分析和Tukey多重比较检验分析各组间差异。* $p < 0.05$ 为显著，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 为高度显著。
- [0026] 实施例1中，载药囊泡、自由药、空囊泡等相关实验的制剂，均是在HEPES (pH 7.4, 5 mM) 的缓冲液中。
- [0027] 实施例1：PEG-P(TMC-DTC)-PA_{sp} ($M_n = 5.0 - (15.0 - 2.0) - 1.29 \text{ kg/mol}$) 按照现有报道合成，比如CN2019104726138 (还原敏感可逆交联的具有不对称膜结构的聚合物囊泡及其在制备治疗肝癌药物中的应用) 实施例1-PEG-P(TMC-DTC)-KD10；N-羟基丁二酰亚胺功能化的嵌段聚合物 NHS-PEG-P(TMC-DTC) ($M_n = 7.5 - (15.0 - 2.0) \text{ kg/mol}$, $M_w/M_n = 1.1$) 按照现有报道合成，比如CN2020105763476 (载小分子药物的碳酸酯聚合物囊泡及其制备方法与应用) 制备例NHS-PEG-P(TMC-DTC)。
- [0028] A3-PEG-P(TMC-DTC)通过A3多肽(cDGWGPNC)和上述NHS-PEG-P(TMC-DTC)的酰胺化反应获得。简言之，NHS-PEG-(TMC-DTC) (200 mg, 6.2 μmol) 溶解于2 mL DMF中，氮气保护下将其逐滴加入溶有A3多肽(13.6 mg, 12.4 μmol)和三乙胺(10.3 μL , 74.4 μmol)的1 mL DMF中，保持搅拌，滴加时间共30 min，然后移入35℃下反应24 h。之后，反应液逐滴加入到20倍体积的冰乙醇和冰乙醚的混合液 (1:1, v/v) 沉淀、抽滤、真空干燥得到A3-PEG-P(TMC-DTC)。产率为87%。通过 ^1H NMR 图谱 (图1) 中A3的特征峰的出现 (6.8–8.8 ppm)、2.83 ppm处的NHS信号峰消失来定性分析A3的成功偶联。A3官能度的定量通过MicroBCA试剂盒测定为92.5%。A3-PEG-P(TMC-DTC)通过A3与NHS-PEG-P(TMC-DTC) 通过酰胺化反应合成，如下。

[0029]



[0030] 将第一单体TMC更换为LA或CL，得到不同疏水链段的聚合物。将A3更换为Cy5-NH₂，得到Cy5标记聚合物PEG-P(TMC-DTC)-Cy5。

[0031] 实施例二 Ps-Vol和A3-Ps-Vol的制备：将上述浓度为10 mg/mL的PEG-P(TMC-DTC)-PAsp、A3-PEG-P(TMC-DTC)的DMSO溶液以质量比80：20混合，取100 mL与Vol的DMSO溶液（20 mg/mL，5 mL）混合，再加入0.9 mL的HEPES（5 mM，pH 6.8）缓冲液，200 rpm搅拌5分钟后，转入摇床（100 rpm，35°C）孵育6 h，然后在HEPES（5 mM，pH 7.4）中透析（透析袋截留分子量为7000 Da），得到A3表面密度20%的载Vol的囊泡20A3-Ps-Vol。除额外标注，后续实验中所提到的A3-Ps-Vol都是表面密度20%的载Vol囊泡。通过DLS和电泳以及紫外吸收分别测定了囊泡的粒径、Zeta电位和Vol载药量（DLC）和包封率（DLE）。

[0032] 通过进一步调整PEG-P(TMC-DTC)-PAsp、A3-PEG-P(TMC-DTC)质量比，比如100：0、90：10、70：30，采用相同的制备方法，分别得到Ps-Vol、10A3-Ps-Vol

、30A3-Ps-Vol。

[0033] 通过DLS检测Ps-Vol和A3-Ps-Vol的长期储存、50倍稀释和血清存在条件下的囊泡粒径的变化来表征囊泡的稳定性。A3-Ps-Vol在4℃的HEPES (pH 7.4, 5 mM) 存储不同时间后, 透析1小时测定紫外吸光度以表征药物Vol的装载稳定性。

[0034] 载Vol靶向囊泡 (A3-Ps-Vol) 通过PEG-P(TMC-DTC)-PAsp、A3-PEG-P(TMC-DTC) 和Vol在HEPES (pH 6.8, 5 mM) 中自组装得到, 在HEPES (pH 7.4, 5 mM) 中进行以下表征。理论载药量 (DLC) 设置为10 wt.%且A3-PEG-P(TMC-DTC)的比例从10%, 20%到30%变化, 得到不同A3密度的囊泡, 分别表示为: 10A3-Ps-Vol、20A3-Ps-Vol和30A3-Ps-Vol。所有A3-Ps-Vol的粒径均非常小, 随着A3-PEG-P(TMC-DTC)含量的增大, 粒径从24增加到32 nm (粒径分布为0.06 ~ 0.10) (表1)。冷冻电镜也佐证了A3-Ps-Vol有着小的粒径和均匀的分布 (图2A)。另外, 所有A3-Ps-Vol展现了高载药量 (DLC: 7.7 ~ 8 wt.%) 和包封率 (DLE: 83% ~ 87%)。A3-Ps-Vol的Zeta电位略呈负 (-4.3 ~ -5.5 mV)。而仅由PEG-P(TMC-DTC)-PAsp自组装得到的非靶组Ps-Vol, 有相似的尺寸、DLC和Zeta电位。

[0035] A3-Ps-Vol和Ps-Vol在高倍数的稀释后 (0.02 ~ 1 mg/mL), 粒径几乎没有变化, 展现了极好的稳定性; 在10% FBS存在下或4℃冰箱存储一个月也能保持稳定 (图2B, C)。在4℃存储一个月后, 仅不到5%的药物泄露 (图2D)。其高稳定性来源于囊泡中基于PEG-P(TMC-DTC)的双硫交联的囊泡膜, 另外, Vol和PAsp的静电相互作用也起到了稳定装载的作用。

[0036] 通过在Ps-Vol和A3-Ps-Vol中添加GSH (10 mM) 来研究还原响应性的vol释放。简言之, 囊泡 (0.4 mg/mL) 装入释放袋 (MWC0: 7000 Da) 中, 分别放入含或不含GSH (10 mM) 的PBS中, 然后置于37℃、200 rpm的摇床中。在预设的时间点, 取5 mL释放介质用于HPLC检测 (280 nm) Vol, 并补充新鲜透析介质5 mL。

[0037] Ps-Vol和A3-Ps-Vol在GSH (10 mM) 条件下, 24 h可分别释放76%和79%的vol。而无GSH的囊泡则保持稳定, 仅不到10%的vol释放, 展现了良好的还原响应性释放特质 (图2E)。另外, 空囊泡对SKOV-3细胞未展现出细胞毒性, 说明了良好的生物相容性 (图2F)。

[0038] 另外, 未偶联PAsp的PEG-P(TMC-DTC) (5-15-2 kg/mol)

聚合物囊泡或PEG-P(CL-DTC) (5-4-2

kg/mol)胶束来装载Vol, 制剂名称分别为Ps (5152) 和Ms。表1结果发现, 两者的装载效率均< 15%, 最终装载量均 ≤ 2.0

wt. %, 证明了PEG-P(TMC-DTC)-PAsp载Vol的优越性。

[0039] 表1 Ps-Vol、A3-Ps-Vol表征(HEPES, pH 7.4, 5 mM)。

[0040]

序号	样品名	DLC (wt%)		DLE (%)	粒径 (nm)	PDI	ζ (mV)
		理论	实测				
1	Ps-Vol	10	8.3	91	24	0.09	-6.8
2	10A3-Ps-Vol	10	8.0	87	25	0.06	-5.7
3	20A3-Ps-Vol	10	7.8	85	29	0.10	-5.2
4	30A3-Ps-Vol	10	7.7	83	32	0.10	-4.1
5	Ps (5152)	5	0.7	9.1	154	0.10	2.3
6	Ps (5152)	10	0.9	11.0	159	0.10	2.4
7	Ms	9.3	1.4	14.9	39	0.10	0.9
8	Ms	15.5	2.0	13.3	39	0.1	0.8

。

[0041] ^a UV-vis光谱测得。 ^bDLS测得 (25 ° C)。 ^c

配备标准毛细管电泳池的Zetasizer Nano-ZS (25 ° C) 测得。

[0042] 实施例三细胞层面的抗肿瘤活性和内吞研究: A3-Ps-Vol对SKOV3细胞的靶向性通过流式细胞仪和激光共聚焦显微镜CLSM来研究, 以标记了FITC的Vol (Vol-FITC) 为荧光探针。简要地, SKOV3细胞铺至6孔板中, 每孔30万, 过夜贴壁后, 加入载Vol-FITC的不同A3密度的A3-Ps-Vol、Ps-Vol和自由Vol-FITC孵育4 h (Vol浓度为200 nM)。之后PBS清洗, 胰酶消化、离心 (1000 rpm, 3 min), 并重新分散在PBS中用于流式细胞仪测量。为了证明A3-Ps-Vol靶向的特异性, 以DU145细胞为阴性对照。

[0043] CLSM实验中, SKOV3细胞被铺至12孔板中 (含小圆片), 每孔5万, 过夜贴壁后

，加入Ps-Vol-FITC或A3-Ps-Vol-FITC（Vol浓度为200 nM）孵育4 h。而后用罗丹明染色50 min，用4 %多聚甲醛固定细胞15 min，DAPI染细胞核5 min。每步之间用PBS清洗3次。有细胞的小圆片用于CLSM观察。另外，为了监测Cy5-Ps-Vol-FITC和Cy5-A3-Ps-Vol-FITC的细胞内吞情况，SKOV3细胞被分别与上述制剂孵育1、2、4、8、16小时，DAPI染色用CLSM观察。Cy5和FITC的荧光信号通过Image J软件半定量分析荧光强度和共定位。

[0044] PLK1蛋白的表达：SKOV3细胞铺于6孔板，50万每孔，过夜贴壁。加入A3-Ps-Vol、Ps-Vol或自由Vol（Vol浓度为200 nM）孵育4 h后，更换培养基继续孵育20 h。PBS清洗后，在冰浴中RIPA裂解15 min，12000 rpm离心15 min。取上清，通过Nanodrop测量蛋白浓度。每个样品调整到相同蛋白浓度后煮沸5 min，通过10%SDS-PAGE分离，后将蛋白转至PVDF膜上。5%的奶粉溶液用于封闭（1.5 h，25℃），之后与PLK1抗体和GAPDH抗体分别在4℃孵育过夜。后PVDF膜经TBST冲洗，与HRP二抗室温共孵育1.5 h。最终通过电化学发光法测定PLK1蛋白浓度。

[0045] 细胞周期实验：SKOV3细胞铺于6孔板，每孔50万细胞，过夜贴壁后，加入A3-Ps-Vol、Ps-Vol、自由Vol（200 nM）孵育4 h后移除培养基，加入新鲜培养基培养44 h。然后消化、固定、-24℃存放过夜，再用碘化丙啶（PI）和RNA酶处理30 min用于流式细胞仪检测细胞周期。

[0046] 细胞凋亡实验：与上述细胞周期实验条件相同，细胞凋亡实验也在200 nM和4+44 h的条件下进行。PBS、自由药Vol和Ps-Vol为对照组。细胞经不含EDTA的胰酶消化，并通过碘化丙啶（PI）和 Annexin V-Alexa Flour 647双染色，流式细胞仪检测。

[0047] MTT实验：SKOV3细胞铺于96孔板，3000每孔，贴壁生长24 h后，加入20 mL自由Vol、Ps-Vol或A3-Ps-Vol（表面A3密度分别为10%，20%和30%）。孔内终浓度从0.1 nM至10 μM。共孵育72 h后，加入10 μL MTT（5.0 mg/mL）3 h。移去上清，加入150 μL DMSO溶解20 min后即用酶标仪在570 nm测定，与PBS对照组

(100%) 相除得细胞存活率。DU145细胞为阴性对照。空囊泡的毒性通过聚合物在浓度为0.5、0.2、0.1、0.05 mg/mL下与SKOV-3细胞共同孵育72 h后测定MTT得到。

[0048] A3-Ps-Vo1、Ps-Vo1和自由Vo1对SKOV-3细胞的抗肿瘤MTT实验结果表明, 20%A3表面密度的A3-Ps-Vo1有着最好的抗卵巢癌肿瘤活性, IC₅₀为49 nM, 分别比Ps-Vo1和自由Vo1低3.4 ~

3.5倍(图3A)。以装载奥沙利铂Oxaliplatin或培美曲塞Pemetrexed的A3-Ps(制备方式同实施例二)作为对比例, 进行上述同样的MTT实验, 得到IC₅₀分别为180 nM、和150 nM。可以看出, 本发明A3-Ps-Vo1比载其他两种药对SKOV-3细胞的毒性强。

[0049] 细胞摄取实验通过细胞内的FITC-Vo1的信号进行分析, 不同组别的内吞量按以下顺序递减: 20A3-Ps > 10A3-Ps ≈ 30A3-Ps > Ps >

自由Vo1(图3B)。其中20A3-Ps-Vo1-FITC是Ps-Vo1-FITC的2.3倍, 自由Vo1-FITC 3.3倍, 而在阴性对照DU145细胞中, 有无A3多肽在毒性实验和细胞内吞实验中并未显现出靶向差异性, 证实了A3-Ps-Vo1对SKOV-3细胞的特异性靶向(图3C, D)。蛋白印迹实验(图3E)展现了SKOV-3细胞的PLK1表达在A3-Ps-Vo1(200 nM)孵育后大幅减少, 而Ps-Vo1和自由Vo1仅有温和的作用, 证明了A3-Ps-Vo1对PLK1蛋白的特异性抑制能力。

[0050] 细胞周期实验结果显示, 和Vo1制剂(200 nM)孵育后, SKOV-3细胞发生了显著的G2/M期阻滞和G1、S期的减少(图

4A)。A3-Ps-Vo1将35%的细胞阻滞在G2/M期, 是自由Vo1的2.7倍。在图4B中, A3-Ps-Vo1引发了显著的SKOV-3细胞晚凋(33.9%), 是自由Vo1和Ps-Vo1的3.4倍。因此, A3-Ps-Vo1可以比自由Vo1更容易与PLK1的ATP结合域结合, 调控细胞有丝分裂, 扰乱纺锤体形成, 阻滞细胞在G2/M期, 同时, 也使得肿瘤细胞中的PLK1失活, 导致细胞凋亡。

[0051] 为了更加直观地呈现A3-Ps的靶向效果, 用Cy5标记的聚合物PEG-P(TMC-DTC)-Cy5、FITC标记的Vo1制备囊泡, 通过CLSM来研究A3的靶向性, 以及跟踪载体和药物在SKOV-3细胞内的释放行为。图5A展示了孵育4

h后A3-Ps-Vo1组相较于Ps-Vo1有明显增强的细胞内Cy5和FITC信号。通过对Cy5和FITC定量分析表明,直至16 h, A3-Ps-Vo1的靶向效果带来的内吞增强趋于稳定,是Ps-Vo1的2倍。值得注意的是,随着孵育时间的延长, Cy5与FITC的共定位率在4 h的时候降至20%,说明了Vo1在细胞内的快速释放 (图5B, C)。这些结果表明, A3-Ps-Vo1有着明确的针对SKOV-3细胞的靶向性和增强的细胞内吞以及细胞内响应性释放。

[0052] 实施例四活体成像和生物分布: 为了研究A3-Ps-Vo1的肿瘤富集, 常规法制备的Cy5 (ex. 649, em. 670) 标记的载药囊泡Cy5-Ps-Vo1和Cy5-A3-Ps-Vo1, 通过静脉注射至荷SKOV3皮下瘤裸鼠体内, 0.06 mg Cy5 每只小鼠。SKOV3肿瘤模型通过右后背部皮下注射500万SKOV3细胞建立。在注射后的2、4、12、24、48小时, 通过小动物活体成像系统 (IVIS Lumina II) 来追踪Cy5信号。另外, 为了观察A3-Ps-Vo1在肿瘤的穿透效果, 在注射后的48 h, 处死小鼠, 取出肿瘤并用4%多聚甲醛固定, 切片, 并用DAPI染细胞核、用FITC标记的CD31染血管, 通过激光共聚焦 (LSM710, Leica) 观察药物在肿瘤组织内的分布。

[0053] 图6A 展示了在肿瘤处逐渐增强的A3-Ps-Vo1组的Cy5信号。12小时A3-Ps-Vo1组表现出区别于Ps-Vo1的显著优势, 并且48 h的荧光强度是Ps-Vo1组的2.5倍。相似的, 离体的器官和肿瘤的荧光信号也证实了A3-Ps的靶向性。通过载Vo1-FITC, 正常组织和肿瘤组织内的Vo1富集被可视化。A3-Ps-Vo1在肿瘤部位的富集是Ps-Vo1组的2倍 (图6B)。另外, 肿瘤切片显示, Cy5标记的A3-Ps-Vo1在肿瘤内分布很广, 而Ps-Vo1则仅分布在肿瘤血管及其周围 (图6C, D), 表明了本发明纳米药物A3-Ps-Vo1能够促进Vo1的肿瘤穿透, 不仅能增强SKOV-3细胞的摄取, 还靶向肿瘤间质。对Vo1的定量分析发现, SKOV-3肿瘤内Vo1的富集量为4.8% ID/g, 明显高于肝脏和肾等组织 (图6E)。而Ps-Vo1在肿瘤的富集则低了2倍, 且在肾和肝脏富集更高。因此, A3-Ps-Vo1在治疗多种恶性肿瘤方面存在潜力。

[0054] 实施例五活体抗肿瘤实验: SKOV3肿瘤模型通过皮下注射500万SKOV3细胞建立; 在接种后的第28天, 荷瘤鼠被随机分为5组, 每组5只 (肿瘤体积为75 mm³左右)。200 μL的自由Vo1 (10 mg Vo1/kg)、Ps-Vo1 (10 mg

Vol/kg)、A3-Ps-Vol (10 or 20 mg Vol/kg) 和PBS通过尾静脉分别注射至裸鼠体内, 该天被标记为第0天。以上制剂在第0, 3, 6, 9, 12, 15天给药。肿瘤体积和体重每2天测量一次, 肿瘤尺寸通过游标卡尺测量, 体积经公式 $V=0.5 \times a \times b^2$ 计算得出(a为长, b为宽)。以初始体积和初始体重为标准计算相对值。在第17天处死小鼠, 取出肿瘤, 称重、拍照和进行病理分析。抑瘤率(TIR)通过以下公式计算: $TIR(\%) = (1 - \text{肿瘤治疗组重量}/\text{PBS组肿瘤重量}) \times 100$ 。

[0055] 肿瘤和主要脏器肝、心、脾、肺、肾收集处理用于H&E染色。肿瘤切片也被用于TUNEL分析, 研究肿瘤细胞的凋亡情况。为了研究肿瘤内的PLK1的抑制情况, 肿瘤切片通过PLK1抗体标记PLK1蛋白, 再通过苏木精染色, 最后通过显微镜观察。

[0056] 结果实验(图7A)表明, A3-Ps-Vol (10 mg/kg) 显著抑制了肿瘤的生长, 优于Ps-Vol和自由Vol, 证明了A3多肽在SKOV-3肿瘤治疗中的重要性。值得注意的是, 剂量提高至20 mg/kg, A3-Ps-Vol的抑瘤效果进一步提升(* $p < 0.05$), 肿瘤体积降至初始治疗时的一半。Ps-Vol和自由Vol组均表现出部分的肿瘤抑制。令人兴奋的是, 各组小鼠体重没有下降(图7B), 说明A3-Ps-Vol不仅能够很好地抑制SKOV-3肿瘤的生长, 同时避免了毒副作用。小鼠在第16天处死, 离体肿瘤照片(图7C)清晰显示了A3-Ps-Vol (20 mg/kg) 组有着最小的肿瘤尺寸, 取得了最好的抗肿瘤效果。值得注意的是, A3-Ps-Vol在10和20 mg Vol/kg剂量下分别取得了80%和91%的抑瘤率(TIR), 显著高于自由Vol (50%) 和Ps-Vol (58%) (图7D)。

[0057] 肿瘤切片通过H&E、免疫组化和TUNEL染色分析(图7E)。H&E的肿瘤切片结果和治疗效果一致。A3-Ps-Vol组肿瘤里显示出最多、最大范围的肿瘤坏死。免疫组化图片显示出PBS组有丰富的PLK1表达, 而自由Vol和Ps-Vol组对PLK1产生了有效的抑制, A3-Ps-Vol组对PLK1的抑制更加显著。A3-Ps-Vol (20 mg Vol/kg) 组不仅PLK1抑制得最佳, 也导致了细胞凋亡, 呈现了大量的松散零碎的肿瘤细胞核。TUNEL图片展示了A3-Ps-Vol比自由Vol和Ps-Vol能显著加强了肿瘤细胞的凋亡。

[0058] 实施例六耐受实验: A3-Ps-Vol的耐受通过健康小鼠对制剂的反应观察。健康

裸鼠通过尾静脉分别注射单剂量A3-Ps-Vol和自由Vol（50 mg Vol/kg），或6针20 mg Vol/kg 每3天一针（第0，3，6，9，12，15天给药），每组3只。监测体重变化、行为变化和生存期来评估Vol和A3-Ps-Vol的毒性。在注射50 mg Vol/kg的24 h后，取血测试血常规，以观测volasertib和A3-Ps-Vol的血液学毒性。

[0059] 图8A和图8B展示了A3-Ps-Vol的良好的耐受性，单剂量和多剂量模式中小鼠体重都基本不变，小鼠行为无异常；而自由Vol尽管在单剂量组有好的耐受，但在多剂量给药组中，5针后引发了小鼠急性的死亡。另外，图8C血常规结果表明，A3-Ps-Vol比自由Vol有更低的血液学毒性。因此，A3-Ps-Vol比自由Vol有更好的耐受。

[0060] 在现有技术中，Vol带来有限的治疗效果和一定的毒副作用，比如现有文献[R0 S-Responsive Polymeric Micelles for Triggered Simultaneous Delivery of PLK1 Inhibitor/miR-34a and Effective Synergistic Therapy in Pancreatic Cancer]公开了载vol纳米粒的粒径为90 nm，表面电荷为 35.5 ± 2.7

mV，其循环时间短，24h内肿瘤富集一直在下降；因而高效和低毒的A3-Ps-Vol是一种非常有前景的卵巢癌治疗方法，相比较而言，本发明的载药囊泡载药量高、尺寸小、表面电荷低，尤其是在体内的稳定性更好，且循环时间长，肿瘤富集多，在48

h内，肿瘤富集持续增长。本发明公开的靶向多肽修饰的囊泡（A3-Ps）可以递送Vol至裸鼠的SKOV-3皮下肿瘤，达到高效肿瘤抑制的同时减少副作用的疗效。这是第一篇针对卵巢癌靶向递送Vol的研究。该双靶向策略（囊泡的肿瘤靶向和Vol的分子靶向）是一种非常有前景的卵巢癌治疗方式：1. 和传统药物相比，该药物有高的特异性和低的系统毒性；2，A3-Ps极大地改善了Vol的循环时间，肿瘤摄取和肿瘤穿透，巧妙地解决了Vol低肿瘤富集的问题。该Vol靶向递送系统A3-Ps还有可能解决临床中的耐药问题。因而该双靶纳米制剂在卵巢癌的靶向治疗中展现了应用潜力。

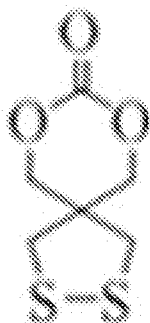
权利要求书

- [权利要求 1] 载PLK1抑制剂的聚合物囊泡，其特征在于，所述载PLK1抑制剂的聚合物囊泡包括聚合物囊泡与PLK1抑制剂；所述聚合物囊泡由PEG-P(T-DTC)-PAsp制备，或者所述聚合物囊泡由PEG-P(T-DTC)-PAsp与A-PEG-P(T-DTC)制备。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述载PLK1抑制剂的聚合物囊泡，其特征在于，PLK1抑制剂为volasertib。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述载PLK1抑制剂的聚合物囊泡，其特征在于，PEG-P(T-DTC)-PAsp与A-PEG-P(T-DTC)中，PEG链段的分子量为2000~10000 Da；疏水链段的总分子量为PEG链段分子量的2.5~10倍；疏水链段中PDTC链段的分子量占疏水链段总分子量的10%~35%；聚天冬氨酸的分子量为300~5000Da。
- [权利要求 4] 聚合物在制备载PLK1抑制剂的聚合物囊泡中的应用，或者在制备抗肿瘤药物中的应用；所述聚合物为PEG-P(T-DTC)-PAsp，或者所述聚合物为PEG-P(T-DTC)-PAsp与A-PEG-P(T-DTC)。
- [权利要求 5] 权利要求1所述载PLK1抑制剂的聚合物囊泡在制备抗肿瘤药物中的应用。
- [权利要求 6] 根据权利要求5所述的应用，其特征在于，所述肿瘤为卵巢癌。
- [权利要求 7] 权利要求1所述载PLK1抑制剂的聚合物囊泡的制备方法，其特征在于，将聚合物溶液与PLK1抑制剂溶液混合，然后孵育，再透析，得到载PLK1抑制剂的聚合物囊泡。
- [权利要求 8] 根据权利要求7所述载PLK1抑制剂的聚合物囊泡的制备方法，其特征在于，以环酯单体或者环碳酸酯单体作为第一单体、双硫环碳酸酯单体为第二单体，以聚乙二醇为引发剂，聚合得到PEG-P(T-DTC)，再通过氯甲酸对硝基苯酯活化后与聚天冬氨酸偶联反应得到PEG-P(T-DTC)-PAsp；以环酯单体或者环碳酸酯单体作为第一单体、双硫环碳酸酯单体为第二单体，以带有活性端基的聚乙二醇为引发剂，聚合得到带有活性端基的PEG-P(T-DTC)，再与靶向多肽反应得到A-PEG-P(T-DTC)

。

[权利要求 9] 根据权利要求8所述PLK1抑制剂的聚合物囊泡载的制备方法，其特征在于，T为酯单元或者碳酸酯单元；A为多肽靶向分子。

[权利要求 10] 根据权利要求8所述载PLK1抑制剂的聚合物囊泡的制备方法，其特征在于，环酯单体为CL或者LA，环碳酸酯单体为TMC；双硫环碳酸酯单体为DTC，其化学结构式如下：



。

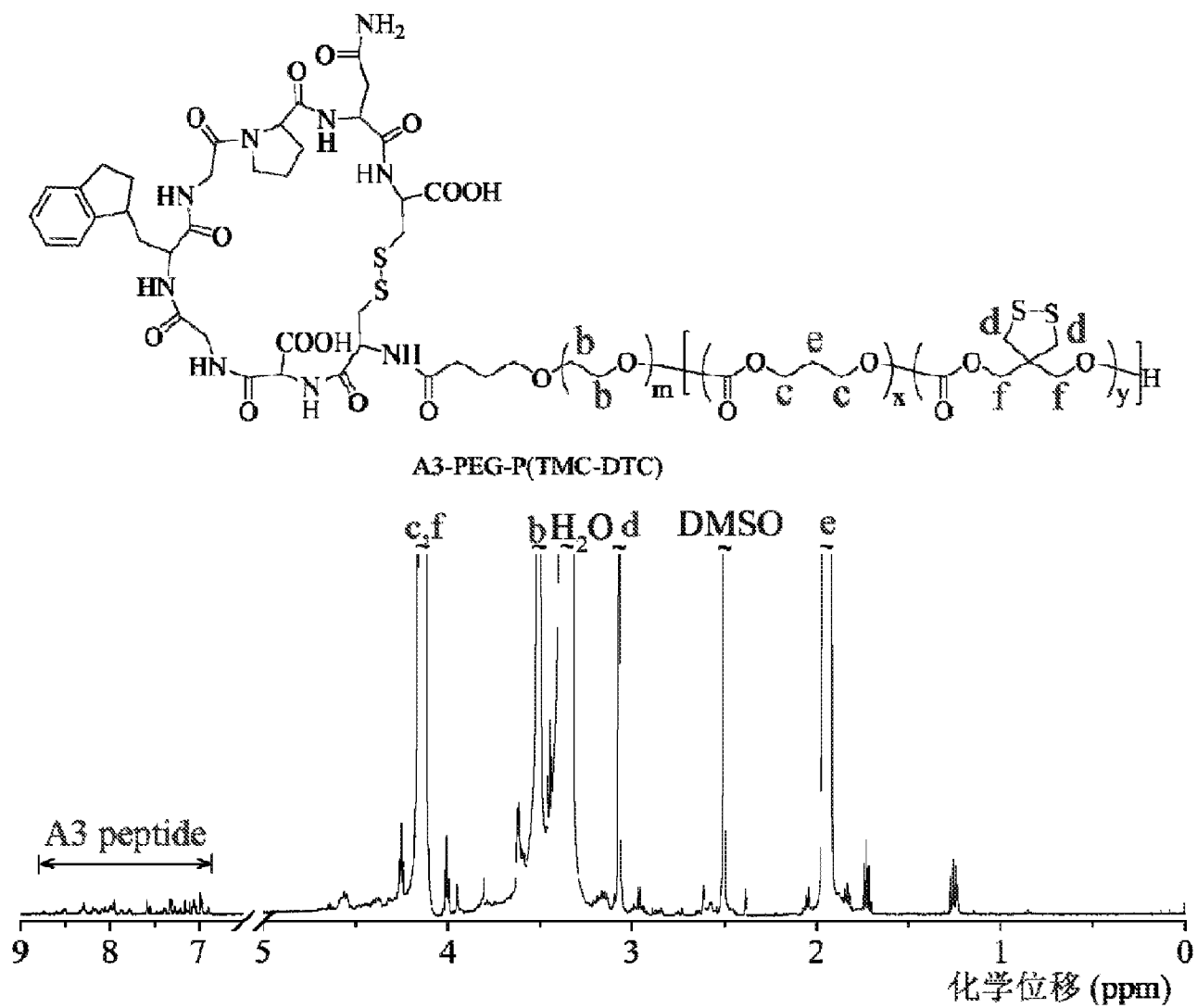


图 1

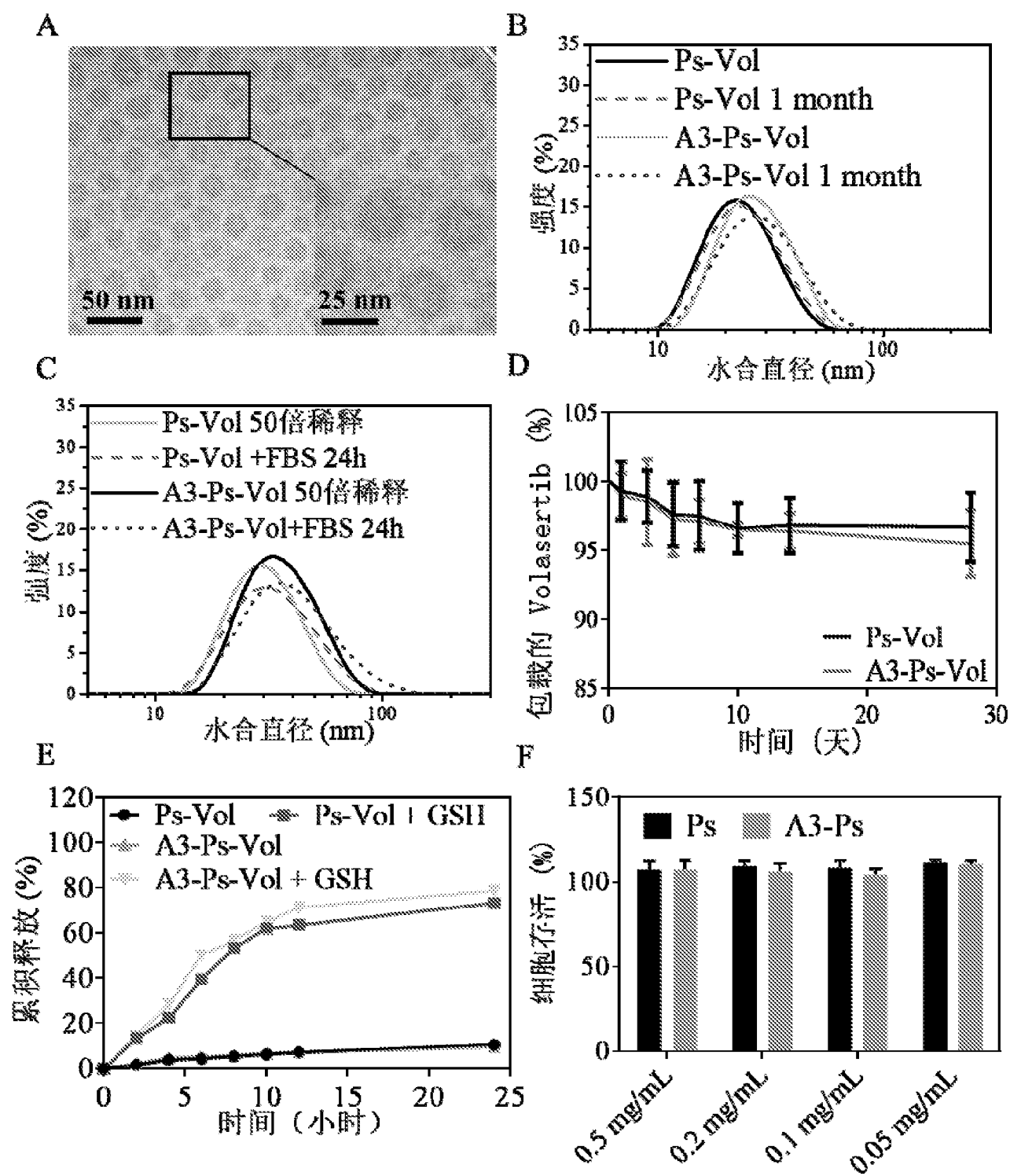


图 2

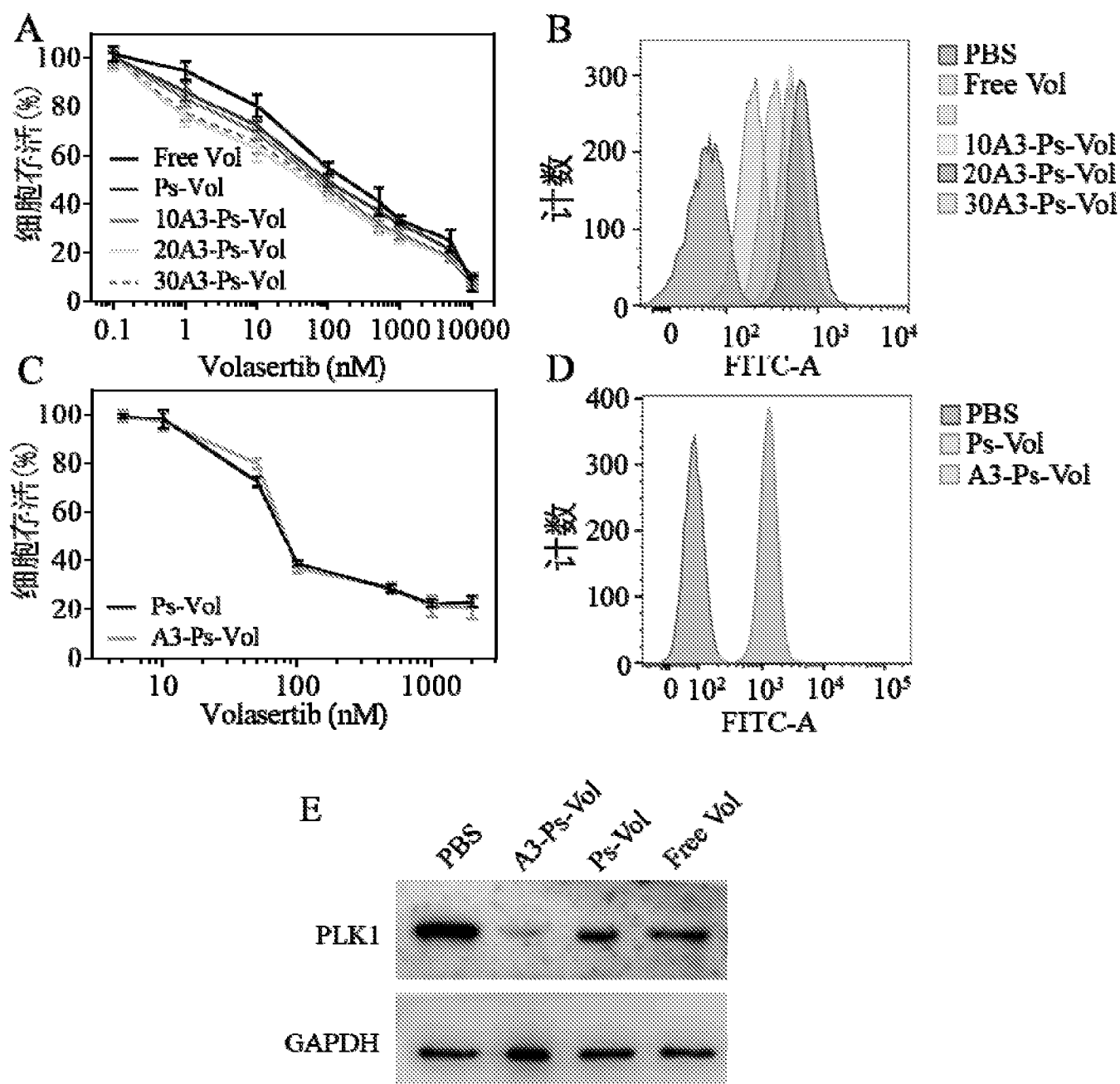


图 3

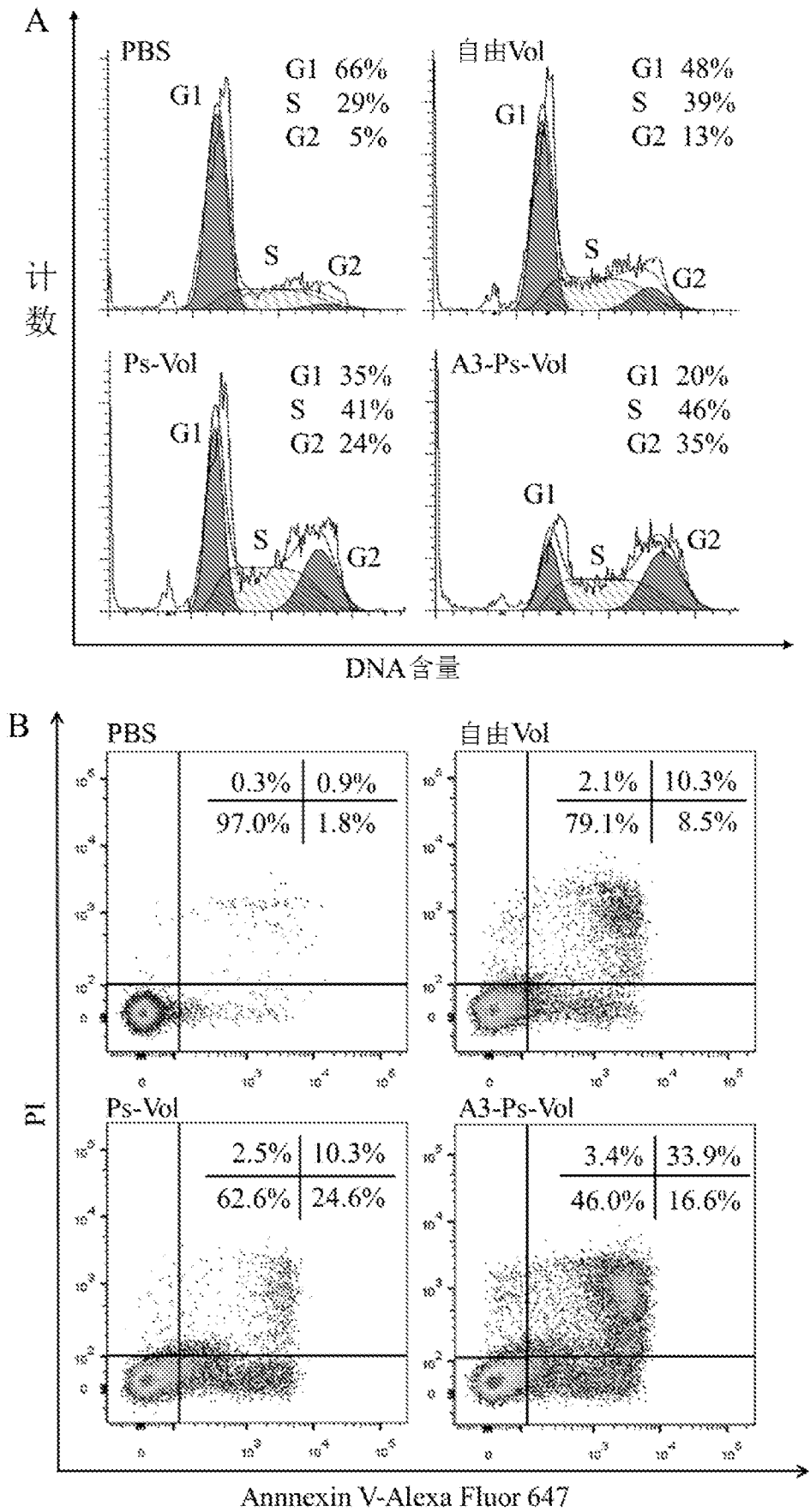


图 4

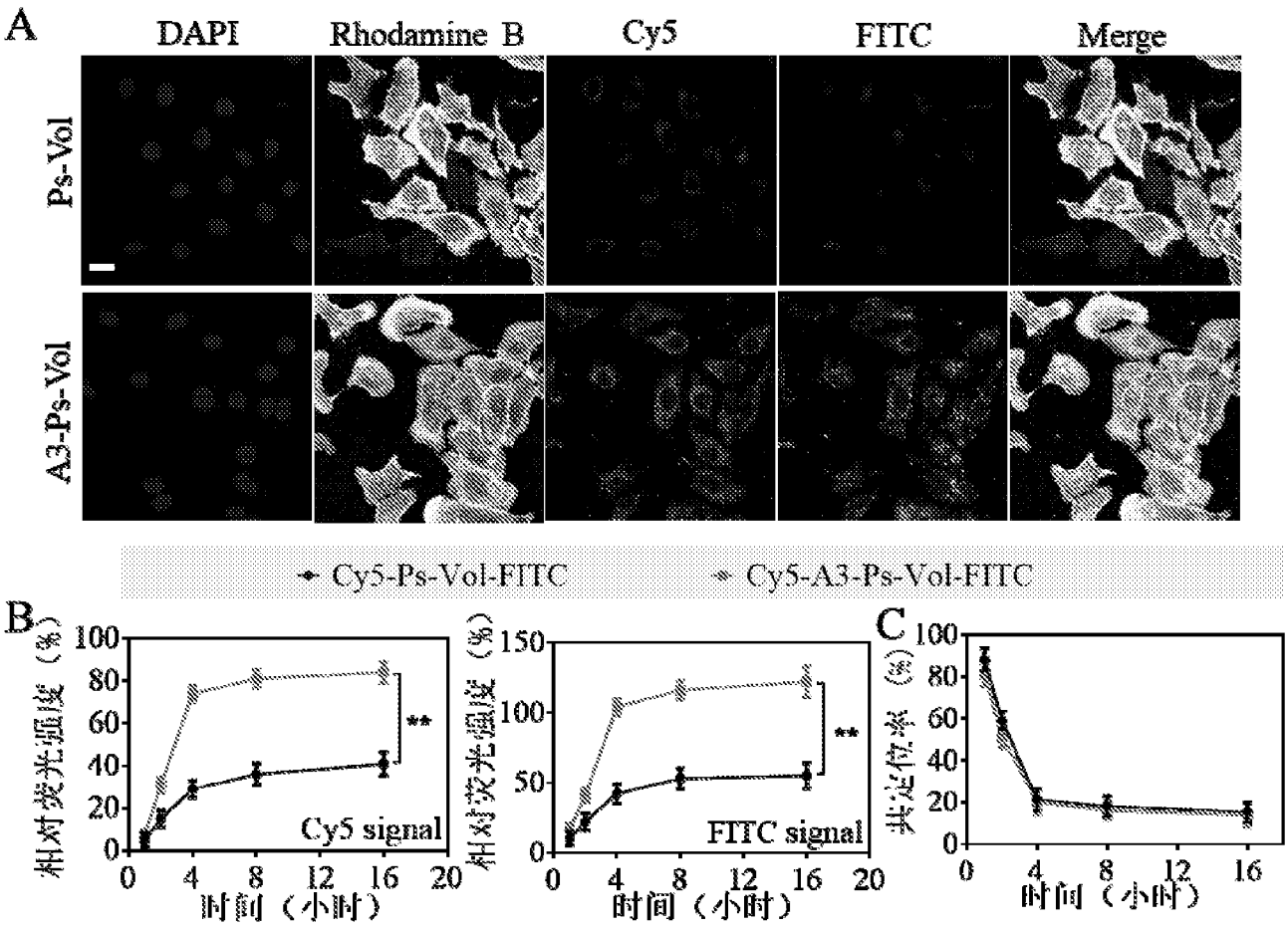


图 5

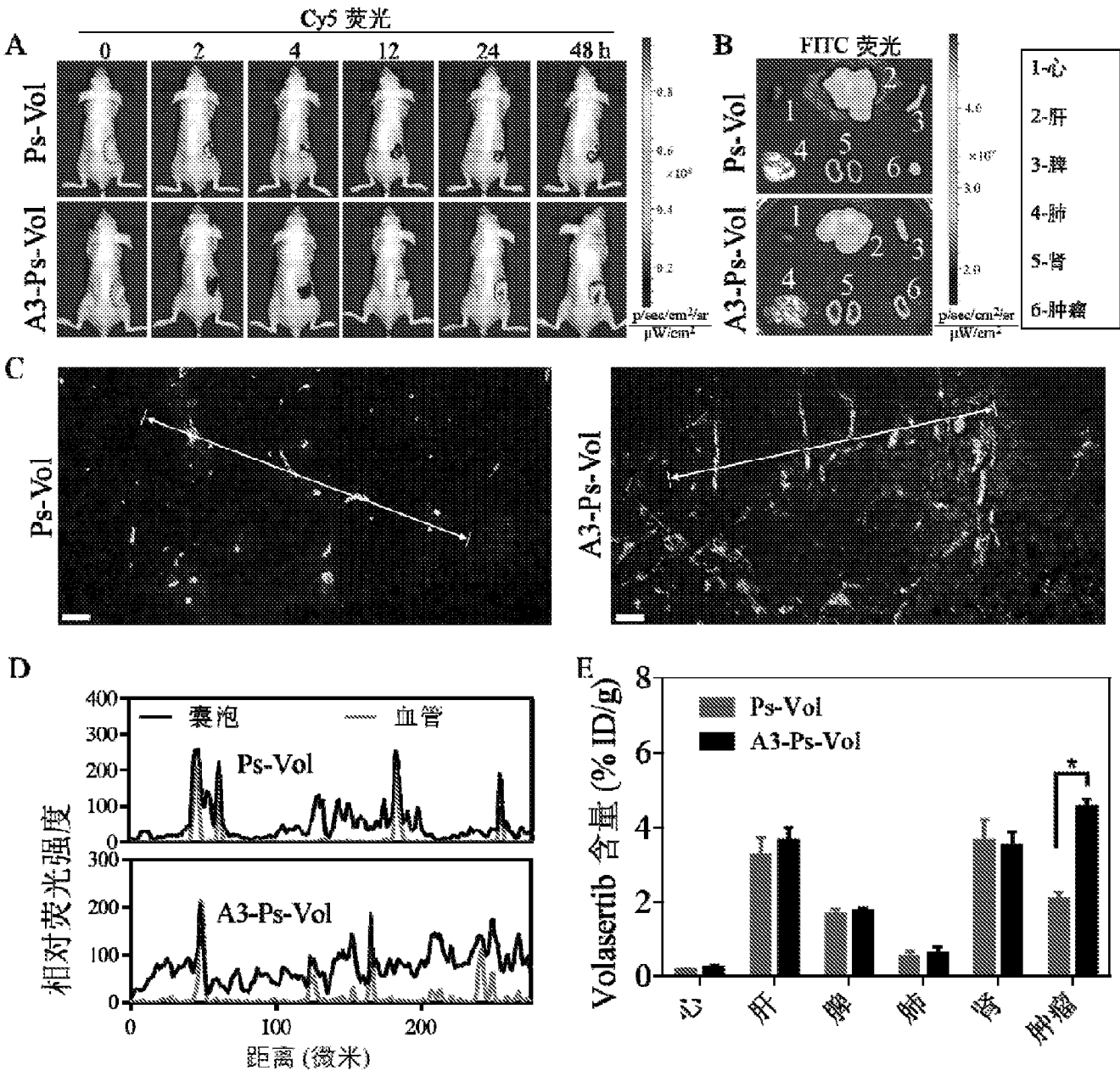


图 6

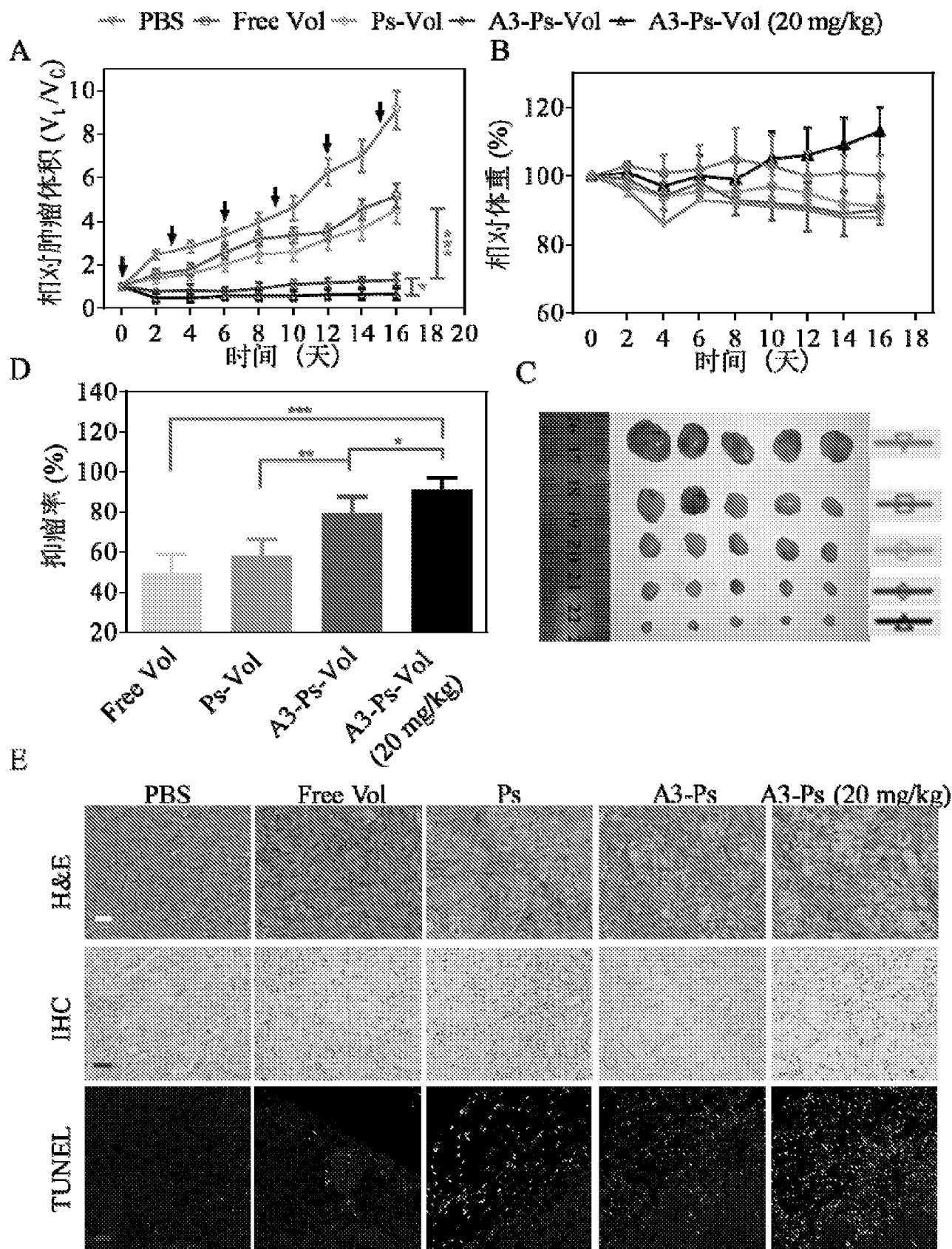


图 7

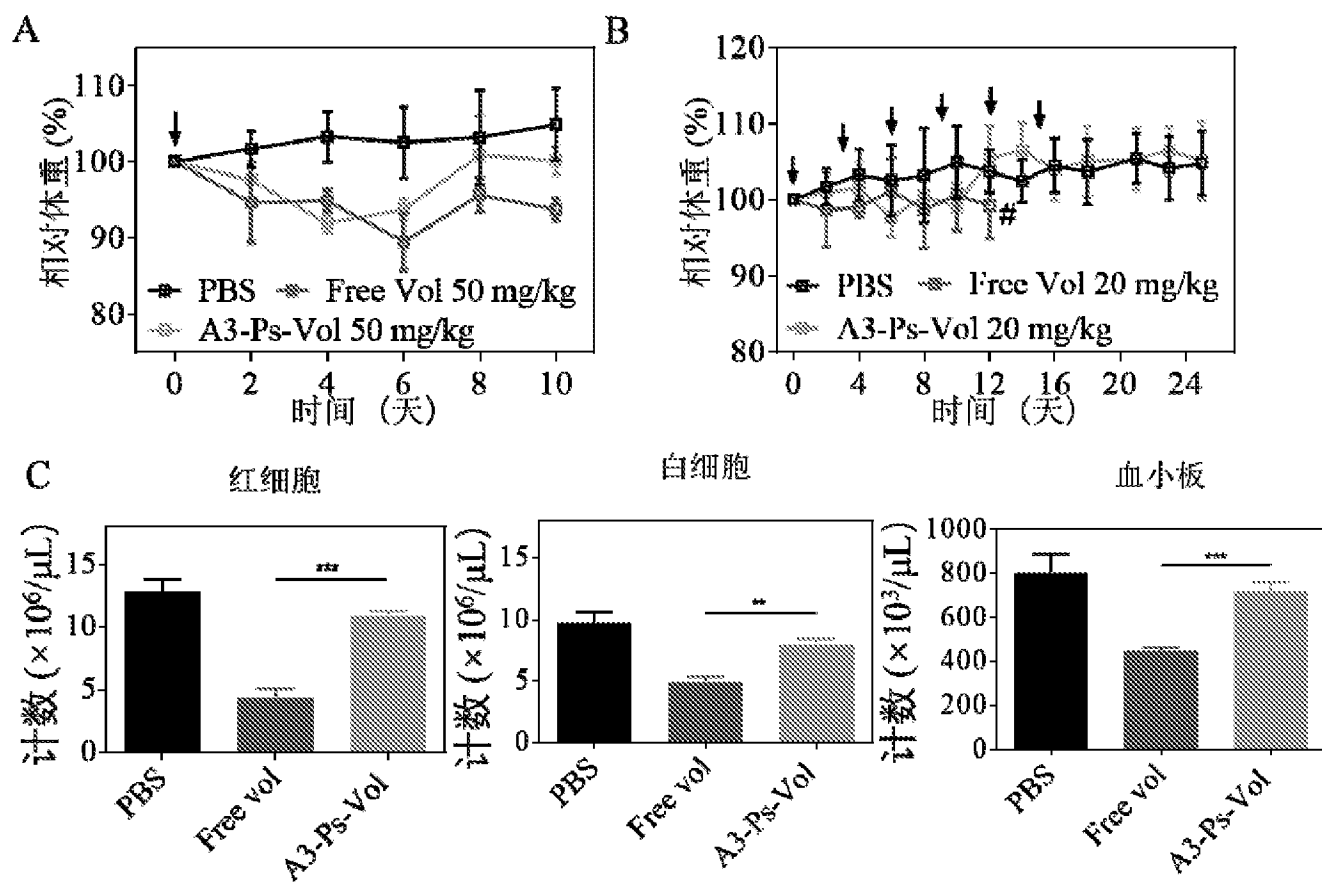


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/072328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/127(2006.01)i; A61K 31/525(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 47/42(2017.01)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)

A61K A61P

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)

CNABS; CNTXT; VEN; ENTXTC; OETXT; ENTXT; WPABSC; CJFD; CNKI; 万方; 读秀学术; ISI Web of Science; Springer; 苏州大学, polo样激酶1, 保罗样激酶1, 抑制剂, 卵巢癌, 肿瘤, 靶向, 多肽, 聚合物囊泡, 疏水, 聚乙二醇, 环酯, 环碳酸酯, 聚天冬氨酸, SOOCHOW university, polo like kinase 1, PLK1, volasertib, VOL, inhibitor, ovarian cancer, tumor, target, polypeptide, polymersome, hydrophobic, polyethylene glycol, cyclic ester, cyclic carbonate, polyaspartic acid, PAsp, PEG-P(TMC-DTC), PEG-P(T-DTC), A3-Ps

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113018263 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 25 June 2021 (2021-06-25) claims 1-10	1-10
PX	WANG, Zhe et al. "α3 Integrin-binding Peptide-Functionalized Polymersomes Loaded with Volasertib for Dually-Targeted Molecular Therapy for Ovarian Cancer" <i>Acta Biomaterialia</i> , Vol. 124, 06 February 2021 (2021-02-06), pages 348-357, abstract, page 349 solution 1, section 2.1, page 356 section 4	1-10
X	WANG, Zhe et al. "Alpha 3 Integrin Binding Peptide-Functionalized Polymersomes Loading PLK1 Inhibitor Volasertib for Dually Targeted Molecular Therapy of Ovarian Cancer In vivo" <i>SSRN</i> , 12 November 2020 (2020-11-12), pages 1-29, pages 1-2 abstract, page 3 paragraph 2, pages 4-5 section 2.1, solution 1, , page 26 paragraph 1	1-10
X	CN 112076159 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 15 December 2020 (2020-12-15) description paragraphs [0004], [0005], [0007], [0008], [0016]	1-10
A	CN 110229323 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 13 September 2019 (2019-09-13) entire document	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 March 2022

Date of mailing of the international search report

14 March 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/072328**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 111714457 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 29 September 2020 (2020-09-29) entire document	1-10
A	ZHOU, Cheng et al. "GE11 Peptide-installed Chimaeric Polymersomes Tailor-made for High-efficiency EGFR-targeted Protein Therapy of Orthotopic Hepatocellular Carcinoma" <i>Acta Biomaterialia</i> , Vol. 113, 18 June 2020 (2020-06-18), pp. 512-521	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/072328

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	113018263	A	25 June 2021	None	
CN	112076159	A	15 December 2020	None	
CN	110229323	A	13 September 2019	None	
CN	111714457	A	29 September 2020	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/072328

A. 主题的分类 A61K 9/127(2006.01)i; A61K 31/525(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 47/42(2017.01)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) A61K A61P 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)) CNABS;CNTXT;VEN;ENTXTC;OETXT;ENTXT;WPABSC;CJFD;CNKI;万方;读秀学术;ISI Web of Science;Springer: 苏州大学, polo样激酶1, 保罗样激酶1, 抑制剂, 卵巢癌, 肿瘤, 靶向, 多肽, 聚合物囊泡, 疏水, 聚乙二醇, 环酯, 环碳酸酯, 聚天冬氨酸, S00CH0W university, polo like kinase 1, PLK1, volasertib, VOL, inhibitor, ovarian cancer, tumor, target, polypeptide, polymersome, hydrophobic, polyethylene glycol, cyclic ester, cyclic carbonate, polyaspartic acid, PAsp, PEG-P(TMC-DTC), PEG-P(T-DTC), A3-Ps																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 113018263 A (苏州大学) 2021年6月25日 (2021 - 06 - 25) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>WANG, Zhe 等. "α 3 Integrin-binding Peptide-Functionalized Polymersomes Loaded with Volasertib for Dually-Targeted Molecular Therapy for Ovarian Cancer" Acta Biomaterialia, 第124卷, 2021年2月6日 (2021 - 02 - 06), 第348-357页, 摘要、第349页方案1、第2.1节、第356页第4节</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WANG, Zhe 等. "Alpha 3 Integrin Binding Peptide-Functionalized Polymersomes Loading PLK1 Inhibitor Volasertib for Dually Targeted Molecular Therapy of Ovarian Cancer In vivo" SSRN, 2020年11月12日 (2020 - 11 - 12), 第1-29页, 第1-2页摘要、第3页第2段、第4-5页第2.1节、方案 1、第26页第1段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 112076159 A (苏州大学) 2020年12月15日 (2020 - 12 - 15) 说明书第[0004]、[0005]、[0007]、[0008]、[0016]段</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 113018263 A (苏州大学) 2021年6月25日 (2021 - 06 - 25) 权利要求1-10	1-10	PX	WANG, Zhe 等. "α 3 Integrin-binding Peptide-Functionalized Polymersomes Loaded with Volasertib for Dually-Targeted Molecular Therapy for Ovarian Cancer" Acta Biomaterialia, 第124卷, 2021年2月6日 (2021 - 02 - 06), 第348-357页, 摘要、第349页方案1、第2.1节、第356页第4节	1-10	X	WANG, Zhe 等. "Alpha 3 Integrin Binding Peptide-Functionalized Polymersomes Loading PLK1 Inhibitor Volasertib for Dually Targeted Molecular Therapy of Ovarian Cancer In vivo" SSRN, 2020年11月12日 (2020 - 11 - 12), 第1-29页, 第1-2页摘要、第3页第2段、第4-5页第2.1节、方案 1、第26页第1段	1-10	X	CN 112076159 A (苏州大学) 2020年12月15日 (2020 - 12 - 15) 说明书第[0004]、[0005]、[0007]、[0008]、[0016]段	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN 113018263 A (苏州大学) 2021年6月25日 (2021 - 06 - 25) 权利要求1-10	1-10															
PX	WANG, Zhe 等. "α 3 Integrin-binding Peptide-Functionalized Polymersomes Loaded with Volasertib for Dually-Targeted Molecular Therapy for Ovarian Cancer" Acta Biomaterialia, 第124卷, 2021年2月6日 (2021 - 02 - 06), 第348-357页, 摘要、第349页方案1、第2.1节、第356页第4节	1-10															
X	WANG, Zhe 等. "Alpha 3 Integrin Binding Peptide-Functionalized Polymersomes Loading PLK1 Inhibitor Volasertib for Dually Targeted Molecular Therapy of Ovarian Cancer In vivo" SSRN, 2020年11月12日 (2020 - 11 - 12), 第1-29页, 第1-2页摘要、第3页第2段、第4-5页第2.1节、方案 1、第26页第1段	1-10															
X	CN 112076159 A (苏州大学) 2020年12月15日 (2020 - 12 - 15) 说明书第[0004]、[0005]、[0007]、[0008]、[0016]段	1-10															
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期															
2022年3月2日		2022年3月14日															
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员															
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		李小晶 电话号码 (86-512)88996463															

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 110229323 A (苏州大学) 2019年9月13日 (2019 - 09 - 13) 全文	1-10
A	CN 111714457 A (苏州大学) 2020年9月29日 (2020 - 09 - 29) 全文	1-10
A	ZHOU, Cheng 等. "GE11 Peptide-installed Chimaeric Polymersomes Tailor-made for High-efficiency EGFR-targeted Protein Therapy of Orthotopic Hepatocellular Carcinoma" Acta Biomaterialia, 第113卷, 2020年6月18日 (2020 - 06 - 18), 第512-521页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/072328

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	113018263	A	2021年6月25日	无	
CN	112076159	A	2020年12月15日	无	
CN	110229323	A	2019年9月13日	无	
CN	111714457	A	2020年9月29日	无	