



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101891732 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 30

(21) 申请号 201010170790. X

(22) 申请日 2010. 04. 30

(30) 优先权数据

12/433, 693 2009. 04. 30 US

(73) 专利权人 国际商业机器公司

地址 美国纽约阿芒克

专利权人 里兰斯坦福初级大学理事会

(72) 发明人 克里斯蒂娜·B·库利

詹姆斯·L·赫德里克

马修·基斯维特

弗雷德里克·内德伯格

布赖恩·特兰托 罗伯特·韦莫斯

保罗·温德

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 宋莉

(51) Int. Cl.

C07D 319/06 (2006. 01)

C07C 311/40 (2006. 01)

C07C 303/40 (2006. 01)

C08G 64/30 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2003/0092046 A1, 2003. 05. 15, 全文.

US 2007/0213277 A1, 2007. 09. 13, 全文.

US 2008/0248126 A1, 2008. 10. 09, 全文.

Russell C. Pratt, et.al.. Tagging alcohols with cyclic carbonate: a versatile equivalent of (meth)acrylate for ring-opening polymerization. 《Chem. Commun. 》. 2007, 第 114-116 页.

Paul A. Wender, et.al.. An Efficient, Scalable Synthesis of the Molecular Transporter Octaarginine via a Segment Doubling Strategy. 《ORGANIC LETTERS》. 2001, 第 3 卷 (第 21 期), 第 3229-3232 页.

Paul A. Wender, et.al.. Dendrimeric Molecular Transporters: Synthesis and Evaluation of Tunable Polyguanidino Dendrimers That Facilitate Cellular Uptake. 《ORGANIC LETTERS》. 2005, 第 7 卷 (第 22 期), 第 4815-4818 页.

审查员 朱洁

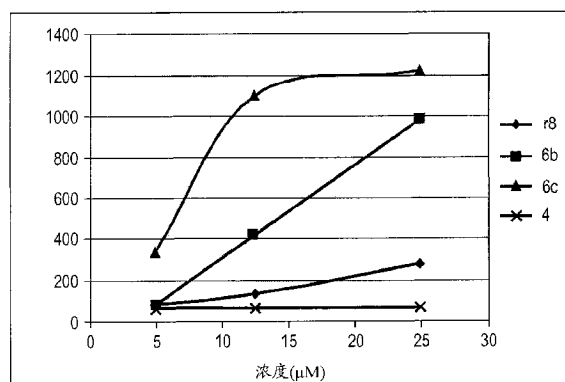
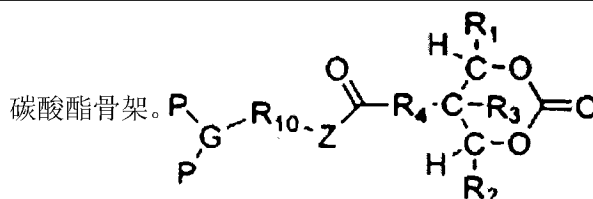
权利要求书2页 说明书15页 附图10页

(54) 发明名称

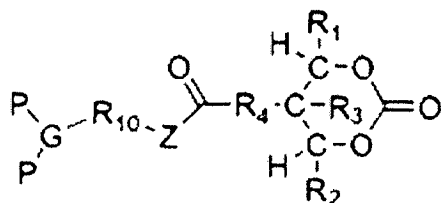
环状碳酸酯单体及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及环状碳酸酯单体及其制备方法。所述环状碳酸酯单体包括下式, 其中 R_1 、 R_2 和 R_3 独立地选自 H, 直链或支化的、取代或未取代的烷基; R_{10} 为连接基团, 其选自直链或支化的、取代或未取代的烷基, 杂烷基, 环烷基, 杂环基, 芳基和杂芳基; R_4 为任选的桥接基团, 其选自直链或支化的、取代或未取代的烷基, 杂烷基, 环烷基, 杂环基, 芳基和杂芳基; Z 选自 O、NH、NR 和 S; G 为胍基团; 并且 P 为保护基团。该环状碳酸酯单体可以与包括药物、候选药物、探针或其它所研究分子在内的引发剂反应以形成低聚物, 在该低聚物中, 所研究分子附着到碳酸酯骨架的一端并且胍基团附着到该



1. 一种环状碳酸酯单体, 包含:



其中,

R_1 和 R_2 为 H, R_3 为 CH_3 ;

R_{10} 为连接基团, 其选自直链或支化的烷基;

R_4 为任选的桥接基团, 其选自直链或支化的烷基;

Z 选自 O;

G 为胍基团; 以及

P 为保护基团。

2. 权利要求 1 的单体, 其中, P 选自 Boc 尿烷和苄基。

3. 权利要求 1 的单体, 其中, 该单体包含桥接基团 R_4 , 且其中, R_4 选自直链或支化的烷基。

4. 权利要求 1 的单体, 其中, R_4 和 R_{10} 为直链烷基, 且 Z 为 O。

5. 脂族碳酸酯低聚物或共聚低聚物, 其得自权利要求 1 的单体与引发剂化合物的反应, 其中, 该引发剂化合物为亲核物质且包含选自氨基、羟基和巯基的官能团。

6. 权利要求 5 的低聚物, 其中, 所述引发剂化合物上的官能团为羟基。

7. 权利要求 5 的低聚物, 其中, 所述引发剂化合物进一步包含选自药物、基因和探针中至少之一的生物载荷。

8. 权利要求 5 的低聚物, 其中, 所述单体和所述引发剂化合物在催化剂的存在下反应, 所述催化剂选自 N-杂环卡宾、TBD、硫脲和胺、磷腈、以及金属烷氧基化合物。

9. 权利要求 8 的低聚物, 其中, 所述金属烷氧基化合物选自 LiOR 、辛酸锡、 Al(OR)_3 和 LZnOR , 其中 R 选自直链或支化的烷基或酰基, L 选自烷氧化物 OR、 β -二酮亚胺化物和三叉二氨基芳氧化物。

10. 权利要求 9 的低聚物, 其中, 所述三叉二氨基芳氧化物为 2,4-二叔丁基-6[2-(二甲基氨基乙基)甲基氨基]甲基酚酯。

11. 权利要求 8 的低聚物, 其中, 所述催化剂为硫脲 $\text{ArNHC(S)NHR}'$ 与叔胺和二胺中至少之一的组合, 其中 Ar 为芳基且 R' 选自芳基和烷基。

12. 权利要求 8 的低聚物, 其中, 所述催化剂为硫脲 $\text{ArNHC(S)NHR}'$ 与叔胺和二胺中至少之一的组合, 其中 Ar 选自 3,5-三氟甲基苯基、3,5-二硝基苯基、和萘基, 且 R' 为选自环己基和环戊基的仲烷基。

13. 权利要求 8 的低聚物, 其中, 所述低聚物得自所述单体、所述引发剂和至少一种第二单体的反应。

14. 权利要求 13 的低聚物, 其中, 所述第二单体包含选自药物、基因和探针中至少之一的生物载荷。

15. 权利要求 13 的低聚物, 其中, 所述单体、所述引发剂和所述至少一种第二单体进一

步与第三单体反应。

16. 脂族聚碳酸酯,其得自权利要求 1 的单体与引发剂的反应,其中,所述引发剂选自胺和醇。

17. 一种方法,其包括使以下 (i) 和 (ii) 反应以形成低聚物:

(i) 权利要求 1-4 中任一项的环状碳酸酯单体;和

(ii) 引发剂,其为亲核物质且包含选自氨基、羟基和巯基的官能团,该引发剂进一步包含选自药物、基因和探针中至少之一的生物载荷,

其中,所述低聚物具有碳酸酯骨架和附着到该碳酸酯骨架的悬垂胍基团,所述生物载荷附着到所述碳酸酯骨架的至少一端。

18. 权利要求 17 的方法,其中,所述引发剂进一步包含受保护的官能团。

19. 权利要求 18 的方法,其中,所述受保护的官能团包含选自羧酸、酰胺、酯、受保护的巯基、胺和羟基基团的官能团。

20. 权利要求 17 的方法,进一步包括使所述环状碳酸酯单体和所述引发剂与第三单体反应,其中,所述第三单体包含选自药物、基因和探针中至少之一的生物载荷。

21. 权利要求 17 的方法,进一步包括使所述低聚物与酸反应以提供在所述碳酸酯骨架上包含胍基团的低聚物分子转运化合物。

22. 权利要求 17 的方法,其中,所述环状碳酸酯单体得自官能环状碳酸酯化合物与官能化胍基化合物的反应。

23. 权利要求 22 的方法,其中,所述官能环状碳酸酯化合物包括羧酸衍生物和具有 5-7 个碳原子的环状碳酸酯。

24. 权利要求 22 的方法,其中,所述官能化胍基化合物包含烷氧基官能团。

25. 权利要求 17 的方法,其中,所述低聚物包含 1 ~ 50 个单体单元。

环状碳酸酯单体及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及碳酸酯组合物, 它们的制备方法, 以及使用它们将治疗剂 (therapeutics)、候选治疗剂、探针或其它所研究分子转运和 / 或输送跨过生物屏障 (barrier) 的方法。

背景技术

[0002] 所研究分子例如, 药物、诊断剂、探针等的细胞或组织摄取可以通过使所研究分子可逆地附着到具有胍鎓官能团的分子转运化合物 (molecular transporter compound) 而进行或增强。所研究分子的细胞摄取可随分子转运化合物上的胍鎓基团的数量和 / 或排布而变化。多种富含胍鎓 (GR) 的分子转运化合物显示出细胞渗透活性, 并且支化的 (树枝状的) GR 分子转运化合物可以将多种生物学上有用的载荷 (cargo) 送入细胞和组织。例如, GR 肽已用于将药物送入人体皮肤和其中的细胞。在另一实例中, 树枝状 GR 分子转运化合物已用于靶向治疗法和成像应用。

[0003] 但是, GR 肽和树枝状 GR 分子转运化合物的合成可能是困难的、费时的和昂贵的。这样一来就限制了它们在基础研究、成像和治疗中的应用。制备 GR 分子转运化合物的简化合成方法可以扩展转运体 (transporter) 在化学治疗、成像、诊断和机械化学生物领域中在输送药物、候选药物、探针和所研究分子上的应用范围。

发明内容

[0004] 环状碳酸酯的有机催化开环低聚可以通过多种亲核物质例如醇、胺或硫醇引发, 这为分子量良好限定且多分散性窄的低聚物提供了一步合成。

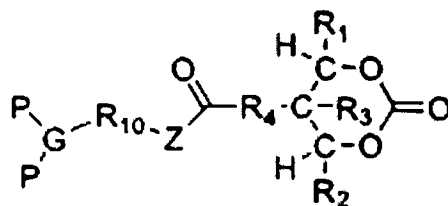
[0005] 在一方面, 本发明涉及用胍基团官能化的能低聚的环状碳酸酯单体。该环状碳酸酯单体可以与引发剂化合物例如药物、候选药物、基因、探针或它们的等价物反应, 产生可以进一步与额外单体或其它单体反应以提供碳酸酯均聚低聚物或共聚低聚物的中间体。得到的低聚物结合所述引发剂以及附着 到低聚碳酸酯骨架的悬垂胍基团。共聚低聚物骨架上受保护的胍基团可以任选地通过与酸反应而去保护, 从而提供分子转运化合物和引发剂的富含胍鎓 (GR) 的偶联物 (conjugate)。GR 分子转运偶联物包括悬垂胍鎓基团, 其可以增强可逆附着的载荷化合物跨过选定的生物屏障的转运和 / 或输送。

[0006] 官能环状碳酸酯化合物和用胍部分官能化的化合物可以反应以可再现地合成多分散性范围窄的环状碳酸酯单体产物。当环状碳酸酯单体与引发剂化合物反应时, 碳酸酯共聚低聚物反应产物中含碳酸酯的骨架的长度, 即过程中结合的单体数量, 可以容易地通过调节引发剂 - 单体的比例来控制。共聚低聚物反应产物具有窄的多分散性, 所述多分散性定义为重均分子量与数均分子量之比 ($M_w/M_n = PDI$)。优选地, PDI 低于 1.5, 最优选低于 1.2。得自碳酸酯共聚低聚物的 GR 分子转运化合物的存储稳定且是水溶性的, 并且当在生物检测中较短时间使用或以治疗浓度长时间使用时, 对细胞没有急性毒性。本文中描述的分子转运化合物表现出的细胞易摄取性以及可以制备短到长链的低聚物和混合的低聚

物的简易性,对药物 / 探针输送来说、特别是对生物载荷来说是有利的。

[0007] 在一方面,本发明涉及环状碳酸酯单体,包括:

[0008]



[0009] 其中,

[0010] R_1 、 R_2 和 R_3 独立地选自 H, 直链或支化的、取代或未取代的烷基;

[0011] R_{10} 为连接基团,其选自直链或支化的、取代或未取代的烷基,杂烷基,环烷基,杂环基,芳基和杂芳基;

[0012] R_4 为任选的桥接基团,其选自直链或支化的、取代或未取代的烷基,杂烷基,环烷基,杂环基,芳基和杂芳基;

[0013] Z 选自 O、NH、NR 和 S;

[0014] G 为胍基团;且

[0015] P 为保护基团。

[0016] 在另一方面,本发明涉及一种方法,其包括使以下物质反应以形成包含碳酸酯骨架和附着到该碳酸酯骨架的胍基团的低聚物,其中,下述生物载荷 附着到该碳酸酯骨架的至少一端:

[0017] (i) 环状碳酸酯单体,其包括环状碳酸酯骨架和至少一个从所述骨架悬垂的胍基团;和

[0018] (ii) 引发剂,其包括选自药物、基因和探针中至少之一的生物载荷。

[0019] 本发明的一种或多种实施方式的细节在附图和以下说明中给出。从说明书、附图和权利要求来看,本发明的其它特征、目的和优点将是明显的。

附图说明

[0020] 图 1 为反应 2 中的化合物 5b 的 RI 和 UV 检测器图谱的 GPC 叠置。

[0021] 图 2 为反应 2 中的化合物 5b 的 ^1H NMR 图谱。

[0022] 图 3 显示了 MTC-乙基胍-boc(反应 2 中的化合物 3)(上部, CDCl_3)、PMTc-胍-boc(反应 2 中的化合物 5)(中部, CDCl_3) 和 PMTC-胍(反应 2 中的化合物 6)(下部, DMSO-d_6) 的层叠 ^1H -NMR 图谱。

[0023] 图 4 为 r8 丹酰在 D_2O 中的 ^1H NMR 图谱。

[0024] 图 5A 为丹酰乙醇在水中的校正曲线。

[0025] 图 5B 为丹酰乙醇在辛醇中的校正曲线。

[0026] 图 6 为利用 r8 丹酰、反应 2 中的化合物 6a 或 6b、和反应 2 中的化合物 4 进入 Jurkat 细胞的细胞摄取的浓度依赖性的图。

[0027] 图 7 为利用 r8 丹酰、反应 2 中的化合物 6b、和反应 2 中的化合物 4 在 pH 7.2PBS 或 K+PBS 中进入 Jurkat 细胞的细胞摄取的浓度依赖性的图。

[0028] 图 8 为流式细胞计量术确定的反应 2 中的化合物 6a、6b, r8 丹酰和反应 2 中的化

合物 4 在 PBS 中进入 Jurkat 细胞的细胞摄取的图。

[0029] 图 9 为流式细胞计量术确定的反应 2 中的化合物 6a、6b, r8 丹酰和反应 2 中的化合物 4 在有 / 无 NaN_3 的存在下在 PBS 中进入 Jurkat 细胞的细胞摄取的图。

[0030] 图 10 为流式细胞计量术确定的反应 2 中的化合物 6a、6b, r8 丹酰和反应 2 中的化合物 4 在 PBS 或 $[\text{K}^+]\text{PBS}$ 中进入 Jurkat 细胞的细胞摄取的图。

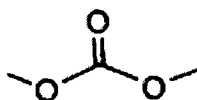
[0031] 图 11 显示了通过使用双光子激发的荧光显微镜可视化的反应 2 中的化合物 6b 进入 Jurkat 细胞的细胞摄取。图板 A-O 显示了在整个细胞上 (从顶部到底部) 的变化 Z- 切面 (Z-cut), 而图板 P 显示了相同细胞的明视场图像。

具体实施方式

[0032] 在一方面, 本发明涉及用胍基团或受保护的胍基团官能化的能低聚的环状碳酸酯单体。该单体为官能环状碳酸酯化合物和官能化的胍基化合物的反应产物。

[0033] 所述官能环状碳酸酯化合物包括具有 5-7 个碳原子的环状碳酸酯部分。在本申请中, 术语碳酸酯是指包含以下式 1 中所示的碳酸根离子的化合物, 并且术语环状碳酸酯化合物是指包含该碳酸根离子的环状部分:

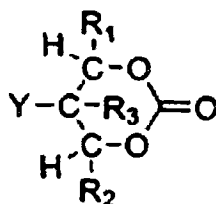
[0034]



[0035] 式 1

[0036] 在以下式 2 所示的优选的实施方式中, 官能环状化合物包括具有 6 元环的环状碳酸酯部分:

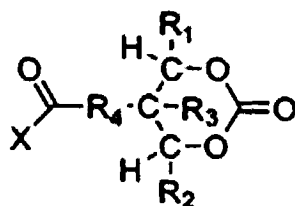
[0037]



[0038] 式 2

[0039] 在式 2 中, R_1 、 R_2 和 R_3 可独立地选自 H, 直链或支化的、取代或未取代的烷基, 或者芳基。 R_1 和 R_2 优选地为 H, 且 R_3 优选为 CH_3 。再参考式 2, Y 为可以根据胍基化合物的官能度而广泛变化的官能团, 所述环状碳酸酯化合物将与该胍基化合物反应。合适的官能团包括酰基基团如羧酸、酰氯、酐、酰胺、酯等。例如, 对式 2 的环状碳酸酯化合物来说, 优选的官能团 Y 为示于以下式 3 的羧酸衍生物:

[0040]

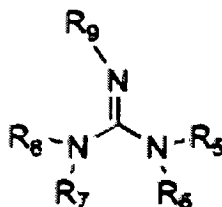


[0041] 式 3

[0042] 在式 3 中, R_4 为任选的桥接基团, 其可为直链或支化的、取代或未取代的烷基, 杂烷基, 环烷基, 杂环基, 芳基和杂芳基, 并且优选地 R_4 为直链烷基或环烷基。在式 3 中, X 可为, 例如, OH、OC(O)R、Cl、Br、I、OR、或使羧酸衍生物为活化酯的某些其它官能团。

[0043] 官能化胍基化合物包括至少一个胍基团和至少一个官能团。在本申请中, 术语胍或胍基基团是指具有以下式 4 中所示结构的部分, 并且术语胍鎓基团是指其带正电的共轭酸形式:

[0044]

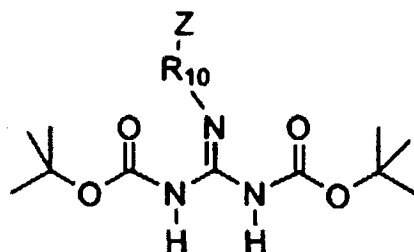


[0045] 式 4

[0046] 在式 4 中, R_6 和 R_7 优选地为 H, 而 R_5 和 R_8 优选地为选自例如, Boc 尿烷 (Boc urethane) ($\text{Boc} = \text{C}(\text{O})\text{OtBu}$)、或苄基 (CH_2Ph) 的保护基团。

[0047] 在式 4 中, R_9 可以根据期望的应用而广泛地变化, 并且, 在该官能化胍基化合物中, R_9 为选择成与以上式 2 的环状碳酸酯化合物上的官能团 Y 反应的官能团。例如, 如果酰氯选作环状碳酸酯化合物 (式 2) 上的官能团 Y, 则对于该胍基化合物来说, 合适的官能团 R_9 包括至少一个羟基、巯基或氨基, 优选地为直链或支化的、取代或未取代的脂族羟基、巯基或氨基。示例性的胍基化合物示于以下式 5 中:

[0048]

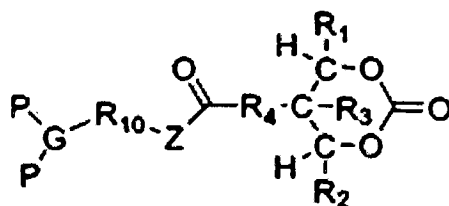


[0049] 式 5

[0050] 在式 5 中, R_{10} 为直链的取代或未取代的烷基, 并且 Z 为 OH、 NH_2 或 SH。

[0051] 所述官能环状碳酸酯化合物和官能胍基化合物可进行反应以产生被胍基团官能化的能低聚的环状碳酸酯单体。所述环状碳酸酯单体包括环状碳酸酯和至少一个从该环状碳酸酯悬垂的胍基团。例如, 如果以上式 3 的化合物与以上式 5 的化合物反应, 则所得环状碳酸酯单体为式 6 中所示的:

[0052]



[0053] 式 6

[0054] 在式 6 中, R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_{10} 独立地选自 H, 直链或支化的、取代或未取代的烷基, 其中

R_1 和 R_2 优选地为 H, R_3 优选地为 CH_3 , 且 R_{10} 优选地为烷基。任选的桥接基团 R_4 可为直链或支化的、取代或未取代的烷基, 杂烷基, 环烷基, 杂环基, 芳基和杂芳基, 并且 R_4 优选为烷基。G 为胍基团, 且 P 为选自 Boc 尿烷或苄基的保护基团, 且 Z 为 O、NH 或 S, 其中 Z 优选地为 O。

[0055] 胍基官能的能低聚的环状碳酸酯单体可在合适的催化剂和引发剂化合物的存在下进行低聚。在该反应中, 环状碳酸酯单体骨架上的环状环打开, 并且第一和第二单体连接以提供具有碳酸酯骨架、附着到该骨架的悬垂胍基团以及在低聚物一端的引发剂的均聚低聚物或共聚低聚物。

[0056] 所述引发剂化合物应为亲核物质并可以包括任何氨基、羟基或巯基官能团以引发开环低聚步骤。合适的实例包括胺, 醇, 硫醇和氨基醇 (包括但不限于脂族直链氨基醇), 以及多官能支化体系 (例如, 二乙醇胺), 含有氨基、羟基或巯基官能团的超支化的和树枝状体系, 氨基苯酚, 胺官能的肽和相关的生物分子, 取代的烷氧基胺, 官能化的氨基脲, 官能化的胍, 氨基烷氧基硅烷, 氨基或羟基封端的低聚物, 例如, (甲基) 丙烯酸酯, 苯乙烯, 聚醚例如, PEG、THF 和 PPO-Jeffamine, 以及聚丁二烯和可以容易地合成的类似物。

[0057] 所述引发剂化合物可以任选地包括生物载荷例如, 药物、基因、探针、或其它生物学上有用的化合物, 它们可附着到所述骨架的一端或两端。

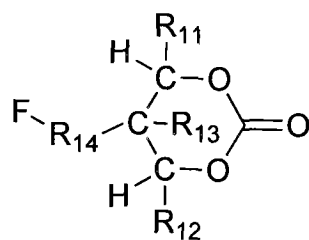
[0058] 合适的催化剂包括: 任何有机催化剂类型, 包括 N-杂环卡宾、1,5,7-三氮杂二环 [4.4.0] 癸-5-烯 (TBD)、硫脲 / 胺、磷腈; 或者本领域已知的任何金属烷氧基化合物类型, 如 $LiOR$ 、辛酸锡、 $Al(OR)_3$ 、 $LZnOR$ 等, 其中 R 选自直链或支化的取代或未取代的烷基或酰基, 且 L 选自烷氧化物 OR; β -二酮亚胺化物 (β -diketiminate) $[ArNCH(R)CH(R)NAr]$, 其中 Ar 选自取代或未取代的芳基; 或者三叉二氨基芳氧化物 (tridentate diamino aryloxide) 如 2,4-二叔丁基-6-[2-(二甲基氨基乙基)甲基氨基]甲基酚酯 (2,4-diterbutyl-6-[2-(dimethylaminoethyl)methylamino]methyl phenolate)。

[0059] 优选地, 用于低聚的催化剂为硫脲 $ArNHC(S)NHR'$ 、与叔胺或二胺的组合, 其中 Ar 可以为任何取代或未取代的芳基且 R' 可以为任何取代或未取代的芳基或烷基。最优选地, 所述硫脲得自芳基化合物, 如 3,5-三氟甲基苯基、3,5-二硝基苯基、萘基, 并且 R' 为仲烷基, 如环己基、环戊基等。

[0060] 为了形成均聚低聚物或共聚低聚物, 胍基官能的环状碳酸酯单体还可任选地与至少一种第二单体反应。该第二单体可以包括多种官能团, 例如, 受保护的巯基、胺、羟基或酸官能团。或者, 该第二单体可以包括药物、基因、探针、或其它生物学上有用的化合物。胍基官能的环状碳酸酯单体、或通过使该胍基环状碳酸酯单体与该第二单体反应而形成的共聚低聚物可任选地进一步与第三单体反应, 该第三单体具有选择为改性和 / 或增强均聚低聚物或共聚低聚物的性能的官能团, 并且所述第三单体不是必须包括生物载荷。

[0061] 在优选的实施方式中, 该第二或第三单体为官能化的或非官能化的 5-7 元环状碳酸酯。示例性的单体具有式 7 中所示的结构:

[0062]



[0063] 式 7

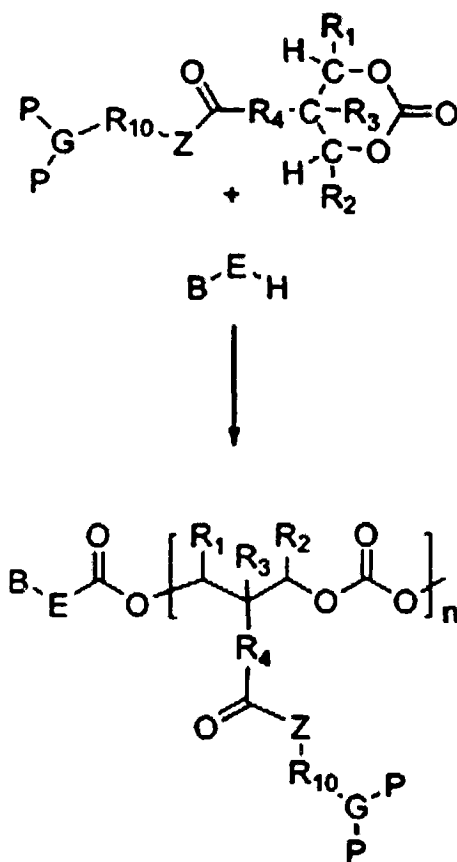
[0064] 在式 7 中, R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 可独立地选自 H, 直链或支化的、取代或未取代的烷基或芳基, 且 R_1 和 R_2 优选为 H, 且 R_{13} 优选为 CH_3 。任选的桥接基团 R_{14} 可为直链或支化的、取代或未取代的烷基, 杂烷基, 环烷基, 杂环基, 芳基和杂芳基, 且 R_4 优选为烷基。F 为这样的官能团, 其可以广泛地变化以能够与肽、蛋白质或其它生物试剂偶联, 或控制 GR 低聚碳酸酯转运体的溶解性。合适的官能团包括酰基基团如羧酸、酰胺、酯等, 以及受保护的巯基、胺、或羟基。或者, F 可以包括药物、基因、探针、或其它生物学上有用的化合物。

[0065] 上述低聚反应优选提供 4 ~ 350 的低聚度 (DP), 其中特别优选 6 ~ 25 的 DP。

[0066] 在优选的实施方式中, 胍官能的环状碳酸酯单体与引发剂化合物反应。所述引发剂化合物包括氨基、羟基或巯基官能团, 并且任选地进一步包括生物载荷例如, 药物、基因、探针、或其它生物学上有用的化合物或它们的等价物。

[0067] 例如, 如以下反应 1 中所示, 如果式 6 的单体与包含生物学上有用的化合物 (B) 的引发剂反应, 得到的碳酸酯共聚低聚物反应产物包括多个从含有碳酸酯的骨架架子悬垂的受保护的胍基基团, 以及在该骨架的至少一端上的生物学上有用的载荷化合物。

[0068]



[0069] 反应 1

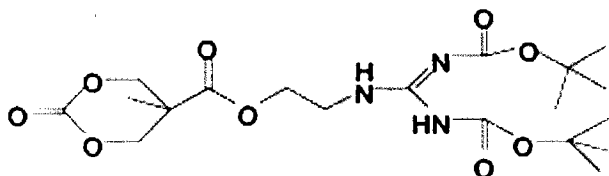
[0070] 在反应 1 中, R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_{10} 独立地选自 H, 直链或支化的、取代或未取代的烷基, 其中 R_1 和 R_2 优选地为 H 且 R_3 优选地为 CH_3 , R_4 为任选的桥接基团, 其可为烷基、取代或未取代的烷基、或芳基, 优选地为烷基, G 为胍基基团, P 为保护基团, 其选自, 例如, Boc 尿烷 ($Boc = C(O)OtBu$) 或苄基 (CH_2Ph), E 为 O、S 或 NH, 优选地为 O, 且 B 为生物学上有用的基团。

[0071] 根据所选择的反应物和所采用的反应条件, 碳酸酯共聚低聚物可包括少量单体单元 (在本文中也称为低聚物, 如二聚体、三聚体和四聚体), 多个单体单元 (在本文中一般称为低聚物), 和 / 或本身具有多个支链的化合物。

[0072] 例如, 反应 1 的碳酸酯共聚低聚物中的 n 可从约 4 到约 350 广泛地变化, 典型地, n 的范围在约 1 到约 50, 更优选在约 5 到约 25, 且最优选在约 8 到约 22。

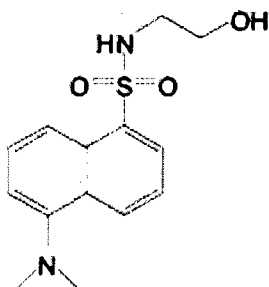
[0073] 作为更详细的实例, 在以下实施例中详细讨论的实施方式中, 式 8 的胍基官能的能低聚的环状碳酸酯单体 MTC-乙基胍-BOC 可与式 9 的氨基官能的引发剂化合物 5-(二甲基氨基)-N-(2-羟乙基) 萘-1-磺酰胺反应以生产式 10 的低聚碳酸酯化合物 PMTC-胍-boc:

[0074]



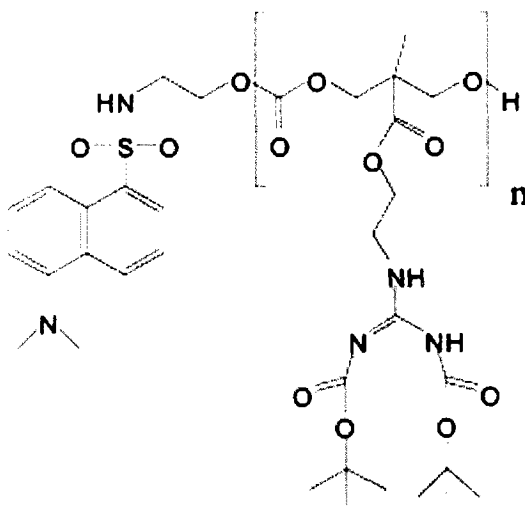
[0075] 式 8

[0076]



[0077] 式 9

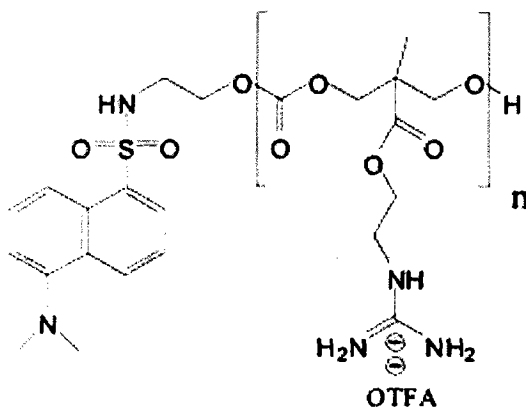
[0078]



[0079] 式 10

[0080] 碳酸酯共聚低聚物可任选地与酸反应以除去胍基团上的保护基团 P (式 6 和反应 1), 产生富含胍鎓 (GR) 的分子转运偶联化合物 (conjugate compound) 作为反应产物。例如, 如以下式 11 中所示的, 在与作为酸的四氟乙酸 (TFA) 反应后, 得自式 10 的碳酸酯低聚物的 GR 分子转运偶联化合物包括悬垂的胍鎓基团, 其可以使可逆附着的载荷化合物跨过选定的生物屏障的转运和 / 或输送增强。

[0081]

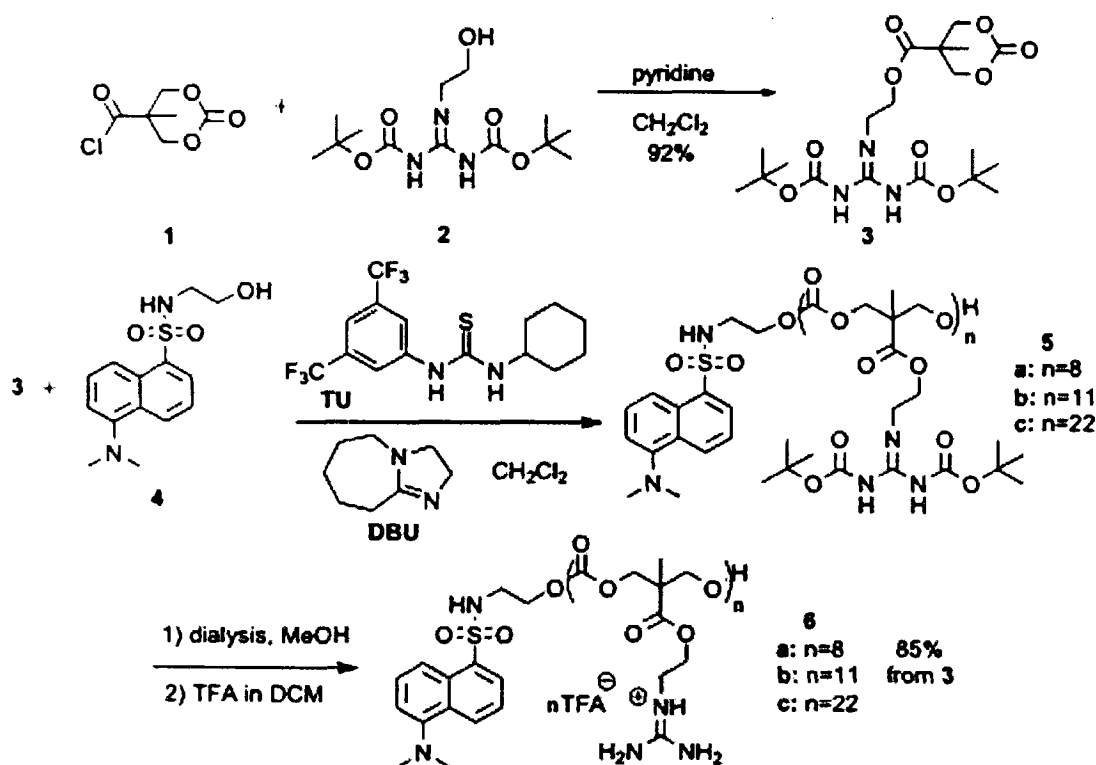


[0082] 式 11

[0083] 以上式 11 中所示的分子转运偶联化合物结合了在细胞摄取研究中以前未探索过的骨架架子 (碳酸酯) 和侧链间隔 (1,7)。这些化合物在 37°C 下 Hepes 缓冲盐水 (pH 7.4) 中可稳定数小时, 这是它们给药所需的, 并且在生物检测的条件 ($\leq 25 \mu\text{M}$, 5 分钟温浴, 存活率大于 80%) 下或当以治疗浓度较长暴露时间使用时未在 Jurkat 细胞系中表现出急性毒性。如同它们的低聚精氨酸相应物, 这些转运体是高度水溶性的, 但它们在用月桂酸钠即膜模型组分 (model membrane constituent) 处理时易于分配到辛醇 (膜极性替代物 (membrane polarity surrogate)) 中。

[0084] 反应 2 展示了根据本发明的一个方面的一步低聚策略的优选实施方式。该策略能够在同一合成操作中直接引入探针并同样地直接引入药物部分。

[0085]



[0086] 反应 2

[0087] 例如,上述单体(例如,以上反应 2 中的化合物 3)可作用于转运体-偶联物合成的试剂盒试剂,并且该碳酸酯分子转运偶联化合物(以上反应 2 中的化合物 6)显示出与母体精氨酸相当的或更好的摄取。本文所述化合物显示出的细胞易摄取性以及可以制备短的到长的低聚物(和共聚低聚物)的简易性,为药物/探针输送,特别是为生物载荷,提供了许多优点。

[0088] 现在将参考以下非限制性的实施例来描述本发明的实施方式。

[0089] 实施例

[0090] 总的实验信息

[0091] 除非另有说明,所有化学品均购自 Aldrich 并直接使用。

[0092] 根据 Pratt 等人的 *Macromolecules*, 2006, 39, 7863-7871 中概述的工序制备 1-(3, 5-双-三氟甲基-苯基)-3-环己基-硫脲(TU),并根据 Wender 等人的 *Org. Lett.*, 2001, 3, 3229-3232 中概述的书面工序制备八精氨酸(octoarginine)(r8)。

[0093] 丹酰氨基己酸 NHS 酯是从 Invitrogen, Carlsbad, CA 获得的。

[0094] 二氯甲烷在 CaH_2 上搅拌过夜,通过三次冷冻-抽气-解冻(freeze-pump-thaw)循环而脱气,并真空输送到直火干燥的弹形器具(flame-dried bomb)中。

[0095] 在配备四个串接的 $5 \mu\text{m}$ 水柱($300\text{mm} \times 7.7\text{mm}$)的水色谱仪上以 $1.0\text{mL}/\text{min}$ 的流速在四氢呋喃(THF)中进行凝胶渗透色谱法(GPC)。

[0096] 采用 Viscotek(Houston, TX) S3580 折射率检测器和 Viscotek GPCmax 自动采样器。该系统使用单分散聚苯乙烯标准物(Polymer Laboratories and Varian, Inc., Palo Alto, CA)校正。

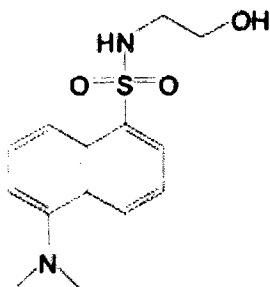
[0097] 以 Varian INOVA 500MHz 和 Varian Mercury 400MHz 磁共振波谱仪记录 NMR 图谱。

[0098] 合成工序

[0099] 1. 5-(二甲基氨基)-N-(2-羟乙基)萘-1-磺酰胺

[0100] (反应 2 中的化合物 4)

[0101]

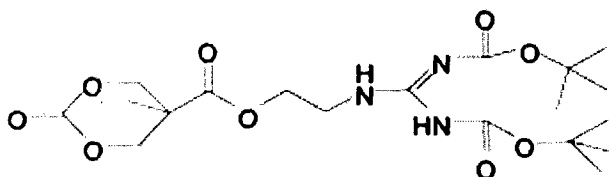


[0102] 在氮气下,将丹酰氯 (5.05g, 18.72mmol) 置于配备有搅拌棒的干燥 250mL 圆底烧瓶中。将干燥的二氯甲烷 (50mL) 经由注射器加入,该烧瓶与滴液漏斗连接并将系统冷却到 0℃。将乙醇胺 (1.25g, 1.24mL, 20.59mmol)、三乙基胺 (2.27g, 3.13mL, 22.46mmol) 和 75mL 的干燥二氯甲烷加入到该滴液漏斗,并在 30 分钟内在搅拌下滴加该溶液。将溶液再搅拌额外的 30 分钟,之后除去冰浴,使该溶液达到环境温度并再搅拌额外的 14 小时。

[0103] 使用快速色谱法将产物分离,首先用二氯甲烷洗脱,然后将极性逐渐提高到二氯甲烷中 5% 的甲醇。除去溶剂后,获得黄色油状物,其在静置后固化。产量 5.0g (83%)。¹H-NMR(CDCl₃) δ : 8.6-7.2 (m, 6H, ArH-), 5.45 (t, 1H, -NH), 3.62 (m, 2H, -CH₂OH), 3.07 (m, 2H, -NHCH₂-), 2.90 (s, 6H, (-CH₃)₂), 2.25 (bs, 1H, -OH)。

[0104] 2. MTC-乙基胍-BOC (反应 2 中的化合物 3)

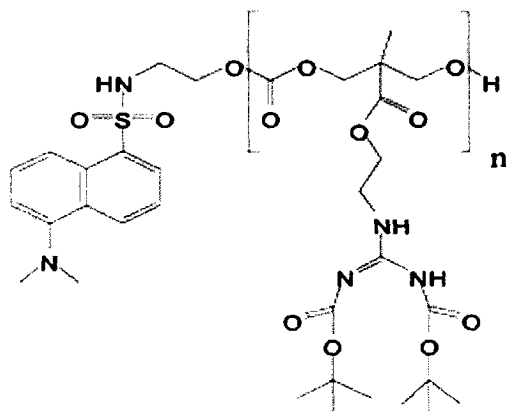
[0105]



[0106] 首先,按 Pratt 等人的 Chem. Commun., 2008, 114-116 中所概述的,采用标准工序用草酰氯将 5-甲基-2-氧-[1,3]二噁烷-5-羧酸 (MTC-OOH) (1.26g, 7.9mmol) 转化成 MTC-Cl。在配备有搅拌棒的干燥的 250mL 圆底烧瓶中,将形成的中间体溶于 75mL 干燥的二氯甲烷中。在氮气流下,连接滴液漏斗,将 1,3-二-boc-2-(2-羟乙基)胍 (2.0g, 5.59mmol)、吡啶 (0.55g, 0.56mL, 6.92mmol) 和 30mL 干燥的二氯甲烷加入该滴液漏斗。将该烧瓶冷却到 0℃,并在 30 分钟内滴加该溶液。将形成的溶液再搅拌额外的 30 分钟,之后除去冰浴,并将溶液在氮气下再搅拌额外的 4 小时。将粗产物直接置于二氧化硅凝胶柱上,并通过用 100% 的乙酸乙酯进行洗脱来分离产物。将产物馏分除去并将溶剂蒸除以产生呈白色晶体的产物。产量 2.70g (92%)。¹H-NMR(CDCl₃) δ : 11.5 (s, 1H, NH), 8.65 (t, 1H, NH), 4.70 (d, 2H, CH₂), 4.35 (t, 2H, CH₂), 4.23 (d, 2H, CH₂), 3.75 (q, 2H, CH₂), 1.55 (s, 18H, CH₃), 1.45 (s, 3H, CH₃)。HR-MS-ESI : m/z 对于 C₁₉H₃₁N₃O₉+Na, 计算值 468.45, 实测值 468.1952。

[0107] 3. (PMTc-胍-boc) (反应 2 中的化合物 5) 的合成:

[0108]



[0109] 代表性实施例 5b

[0110] 在使用直火干燥的玻璃器皿的具有 N_2 气氛的手套箱中, 将 TU (21mg, $56 \mu\text{mol}$)、1, 8-二氮杂二环 [5.4.0] 十一碳-7-烯 (DBU) (8.5mg, $56 \mu\text{mol}$) 和化合物 4 (33mg, $112 \mu\text{mol}$) 加入到配备有搅拌棒的 20mL 玻璃小瓶中。加入少量的二氯甲烷, 将形成的溶液搅拌 10 分钟。将 MTC-脲-boc (0.5g, 1.12mmol) (化合物 3) 溶于足够的额外 DCM 中使最终浓度为 1M 单体, 将其加入该催化剂 / 引发剂溶液, 并将得到的溶液持续搅拌三小时 (通过 ^1H NMR 分析来研究转化率)。加入苯甲酸 (15mg, $120 \mu\text{mol}$) 以使催化剂猝灭。将粗反应溶液转移到透析袋 ($1,000\text{g/mol}$ 截止), 用甲醇透析 48 小时, 并在 24 小时后更换甲醇溶液。蒸除剩余的溶剂, 产生呈灰白色固体的反应 2 中的化合物 5b (0.425g, 5b)。

[0111] 化合物 5b 的 ^1H -NMR 图谱 (CDCl_3) 示于图 2, 其中在所选择的共振下方显示积分。通过端基共振 (即 b 和 e) 对低聚物骨架 g 和 g' 的积分来确定低聚度。 δ : 11.49 (s, 1H, NH), 8.66 (t, 1H, NH), 8.32 (d, 1H, ArH), 8.26 (d, 1H, ArH), 7.58 (m, 2H, ArH), 7.34 (m, 1H, ArH), 7.23 (d, 1H, ArH), 4.30 (m, 65H, polyMTC- CH_2), 4.14 (t, 2H, CH_2), 3.75 (m, 22H, polyMTC- CH_2), 3.22 (q, 2H, CH_2), 2.92 (s, 6H, CH_3), 1.51 (s, 200H, CH_3 -boc), 1.28 (s, 3H, polyMTC- CH_3)。

[0112] 类似地进行化合物 5a 和 5c (反应 2) 的合成。对于 5a, 化合物 4 的量 = 41.5mg ($141 \mu\text{mol}$)。对于 5c, 丹酰乙醇的量 = 15.0mg ($51 \mu\text{mol}$)。

[0113] 表 1: 对 PMTC-脲-boc 低聚物的表征

[0114]

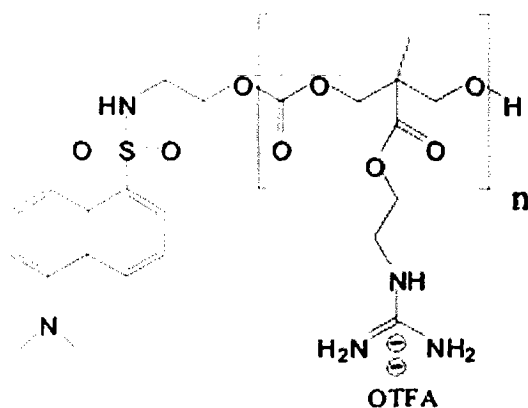
	n	Mn (NMR)	Mn (GPC)	PDI ^a
5a	8	3,854	3,029	1.16
5b	11	5,189	3,160	1.11
5c	22	10,084	4,692	1.15

[0115] $\text{PDI} = \text{Mw}/\text{Mn}$

[0116] 图 1 显示了化合物 5b 的 RI 和 UV 检测器图谱的 GPC 叠置。

[0117] 4. PMTC-脲 (反应 2 中的化合物 6) 的合成

[0118]

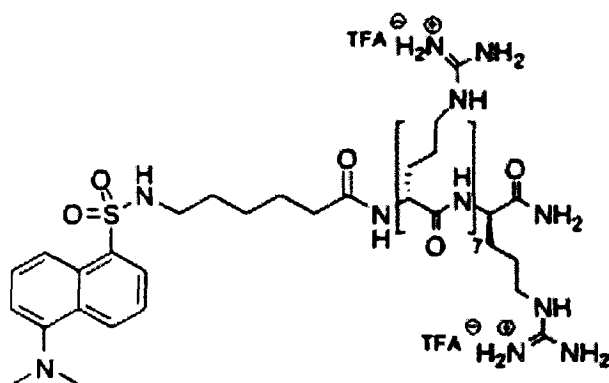


[0119] 将 PMTC-胍-boc (反应 2 中的化合物 5b) (0.23g, 46 μ mol) 加入配备有搅拌棒的 100mL 圆底烧瓶中并溶于 18mL 的二氯甲烷中。加入三氟乙酸 (TFA) (2mL) 并将该烧瓶密封, 并在搅拌下置于环境温度 18 小时。使氮气鼓泡通过该溶液 30 分钟, 并通过旋转蒸发蒸除剩余的溶剂, 产生呈淡黄色蜡状固体的化合物 6b (0.20g, 85%)。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 8.40 (d, 1H, ArH), 8.20 (m, 2H, ArH), 7.90 (bs, 11H, polyMTC-NH), 7.55 (m, 2H, ArH), 7.25 (bs, 44H, polyMTC-NH), 7.18 (m, 44H, polyMTC-CH₂), 4.02 (m, 22H, polyMTC-CH₂), 3.92 (t, 2H, CH₂), 3.37 (m, 22H, polyMTC-CH₂), 2.99 (q, 2H, CH₂), 2.79 (s, 6H, CH₃), 1.10 (s, 33H, polyMTC-CH₃)。

[0120] 图 3 显示了 MTC-乙基胍-boc (化合物 3) (上部, CDCl₃)、PMTC-胍-boc (化合物 5) (中部, CDCl₃) 和 PMTC-胍 (化合物 6) (下部, DMSO- d_6) 的层叠 $^1\text{H-NMR}$ 图谱。

[0121] 5. 丹酰-r8 的合成

[0122]



[0123] 将八精氨酸 (25mg, 0.01834mmol) 加入具有搅拌棒和去离子水的小锥形瓶中, 然后冻干。将丹酰氨基己酸 NHS 酯 (10mg, 0.021668mmol, Invitrogen) 溶于 100 μ L DMF 中并加入到该锥形瓶。在用氮气流吹走 DMF 时, 加入二异丙基乙胺 (2.8 μ L, 0.16251mmol) 并将反应在室温搅拌 22.4 小时。加入乙腈 (0.5mL) 和去离子水 (1.5mL), 然后加入三氟乙酸 (1.7 μ L, 20 当量), 通过反相 HPLC (H₂O:CH₃CN, 5-60% 梯度) 纯化该反应。

[0124] 收集含有馏分的产物并将其冻干以产出呈白/黄色非晶固体的丹酰 r8 (25mg, 90%) ; Prep RP-HPLC (H₂O:CH₃CN) > 95% 纯度。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, D₂O) : δ = 8.652 (d, J = 8.70Hz, 2H), 8.424 (d, J = 8.74, 1H), 8.306 (d, J = 6.98, 2H), 7.93 (d, J = 7.71, 1H), 7.85-7.80 (m, 3H), 4.33-4.18 (m, 8H), 3.354 (s, 6H), 3.18-3.11 (m, 14H), 2.896 (t, J = 6.61, 2H), 2.116 (t, J = 7.17, 3H), 1.84-1.58 (m, 29H), 1.38-1.29 (m, 4H), 1.137 (d, J = 7.39, 3H) ppm。MALDIMS: [M]⁺ 对于 C₆₆H₁₂₉N₃₅O₁₁S (无 TFA), 计算值 1620.04 ; 实测值 1615.365。

[0125] 图 4 显示了 r8 丹酰在 D₂O 中的 ¹H NMR 图谱。

[0126] 6. 辛醇 - 水分配

[0127] 为进行下述分配实验,首先分别得到丹酰乙醇在水和辛醇中的校正曲线(参见图 5A-5B)。使用 Agilent 8453 分光光度计(Agilent, Inc., Santa Clara, CA)在 $\lambda = 335\text{nm}$ 下记录 UV- 可见光图谱。由校正曲线得到理想的低聚物浓度,其允许 1.0-1.5 仪器吸光度单位(AU)的吸光度,这对应于 $\sim 0.1\text{mM}$ (在水中)的初始低聚物浓度。在该低聚物溶于水(1mL)中后,加入辛醇(1mL)并记录水和辛醇层中的 UV 图谱。加入月桂酸钠(相对于总的胍浓度为 1.2eq),轻微摇动该瓶,并记录水和辛醇层中的 UV 图谱。分配后,水和辛醇层分离,之后冻干水相,并用 ¹H-NMR 分析其成分。

[0128] 化合物 6b(n = 11 丹酰官能化的聚(MTC-胍))在加入月桂酸钠和进行 UV 激发后完全分配进入辛醇层。

[0129] 7. 通过流式细胞计量术进行的细胞摄取检测

[0130] 丹酰标记的低聚物和八精氨酸对照在 pH 7.2 的 PBS 缓冲液中以 5 μM 、12.5 μM 和 25 μM 的浓度培养。RPMI 介质 1640(+谷氨酰胺)中的 10% FBS 中生长的 Jurkat 细胞用于细胞摄取实验。将细胞以 3.0×10^6 细胞/mL 和 200 μL /孔铺板在微量滴定板上。将该板进行离心(1300rpm, 3 分钟),除去介质,并将细胞再悬浮在 PBS 缓冲液中两次。

[0131] 各种浓度的化合物 6(a-c) 和 r8 对照与细胞在 23°C 培育 5 分钟。将微量滴定板进行离心并分离细胞,用 PBS 洗涤并在含有碘化丙锭(3 $\mu\text{g/mL}$, 0.01%) 的 PBS 中再悬浮。使用配备有用于激发丹酰荧光团的 UV 激光器的荧光流式细胞器(Vantoo, Stanford University)对细胞进行分析,并且将用碘化丙锭染色的细胞排除在分析之外。给出的数据是所分析的 20,000 个细胞的平均荧光信号。

[0132] 图 6 显示了在 pH 7.2PBS 中进入 Jurkat 细胞的细胞摄取的浓度依赖性,所述 Jurkat 细胞在 23°C 用 r8 丹酰、低聚物化合物 6a 或 6b、或丹酰醇引发剂化合物 4 培育 5 分钟。

[0133] 8. 在 4°C 或在叠氮化钠(NaN₃)存在下的细胞摄取检测

[0134] 在 4°C 进行如上所述的摄取检测,除了将溶液在 4°C 预冷却并将细胞在冰上培育。在叠氮化钠存在下的摄取检测按如上所述进行,除了在添加荧光标记的低聚物之前将所使用的细胞用 2% FBS/PBS 缓冲液中的 0.5% 叠氮化钠预培育 30 分钟,并用 PBS 缓冲液中的 0.5% 叠氮化钠洗涤细胞。

[0135] 9. 在高钾[K⁺]缓冲液的存在下的细胞摄取检测

[0136] 通过混合 136.9mmol KCl、1.5mmol KH₂PO₄ 和 8.3mmol K₂HPO₄ · 7H₂O 来制备高钾 PBS 缓冲液,并将其滴定至 pH = 7.2。在该高钾 PBS 缓冲液中制备所有低聚物的储备溶液。按如上所述进行摄取检测,除了用该高钾缓冲液洗涤细胞两次。然后,将细胞暴露于高[K⁺]缓冲液中的低聚物,用相同缓冲液洗涤,最后在该缓冲液中再悬浮以进行分析。

[0137] 图 7 是在 pH 7.2PBS 或 K+PBS 中进入 Jurkat 细胞的细胞摄取的浓度依赖性的图,该 Jurkat 细胞在 23°C 用 r8 丹酰、两个单独批次的低聚物化合物 6b(1 或 2)、或丹酰醇引发剂化合物 4 培育 5 分钟。

[0138] 图 8 为流式细胞计量术确定的低聚碳酸酯化合物 6a、6b, r8 丹酰和丹酰醇引发剂化合物 4 在 PBS 中的细胞摄取的图。Jurkat 细胞用各种转运体在 23°C 或 4°C 培育 5 分钟。

[0139] 图 9 为流式细胞计量术确定的低聚碳酸酯化合物 6a、6b, r8 丹酰和丹酰醇引发剂化合物 4 在 PBS 中的细胞摄取的图。Jurkat 细胞在有 / 无 NaN_3 存在下用各种转运体在 23℃ 培育 5 分钟。

[0140] 图 10 为流式细胞计量术确定的低聚碳酸酯化合物 6a、6b, r8 丹酰和丹酰醇化合物 4 在 PBS 或 $[\text{K}^+]$ PBS 中的细胞摄取的图。Jurkat 细胞用各种转运体在 23℃ 培育 5 分钟。

[0141] 10. 细胞摄取检测的结果

[0142] 与不进入 Jurkat 细胞的单独的丹酰引发剂 4 相反, 丹酰-低聚碳酸酯偶联化合物 6a-6b 在所研究的浓度范围内以类似于丹酰化 r8 阳性对照的方式表现出浓度依赖性摄取。扩链的低聚物化合物 6c 显示出摄取, 但还与细胞-细胞粘着行为竞争, 并排除在进一步分析之外。相对于化合物 6a, 在较高浓度下对化合物 6b 观测到的摄取显著提高与对具有不断提高的胍含量 (最高达 $n = 15$)¹⁸ 的分子转运化合物观测到的摄取的提高是一致的, 并提供了本发明的这些实施方式中的 GR-低聚碳酸酯在功能上类似于低聚精氨酸的进一步证据。

[0143] 并非不同于其它多胍基化 (polyguanidinylated) 分子转运化合物的性质, 化合物 6a-6b 的摄取随着膜电位的降低而降低。该作用是通过检测用改性 PBS 培育过的细胞中的化合物 6 的摄取而确定的, 在该改性 PBS 中所有的钠离子用钾离子替换, 这是消除细胞膜电压电位的已知方案。

[0144] 此外, 用 NaN_3 培育细胞是已知干涉 ATP 依赖性过程的条件, 其导致能测量的摄取下降。

[0145] 最后, 对 4℃ 培育的细胞观测到摄取的下降 (18-37%), 这表明胞吞作用可能发挥作用的混合机理途径。

[0146] 11. 荧光显微研究

[0147] 按如上所述, 将细胞洗涤、用低聚物培育并悬浮以进行分析, 除了在分析之前不用碘化丙锭对细胞进行染色。在 Zeiss LSM 510 上用双光子激发用的 Ti: 蓝宝石激光器激发丹酰荧光团进行分析。

[0148] 图 11 显示了通过使用双光子激发的荧光显微术可视化的化合物 6b 进入 Jurkat 细胞的细胞摄取, 该 Jurkat 细胞在 23℃、25 μM 培育 5 分钟。图板 A-0 显示整个细胞 (从顶部到底部) 内的变化 Z-切面, 分辨率为 0.9 μm , 切面间间隔 0.7 μm 。图板 P 显示了相同细胞的明视场图像。

[0149] 12. 测量偶联物的水解稳定性的检测:

[0150] 将各偶联物在 1.5mL 微量离心管 (microfuge tube) 内溶于 190 μL HEPES 缓冲盐水 (HBS) pH = 7.4 (1mM), 并用用作内标物的 10mg 1- 萘甲醇在 24mL 甲醇中的溶液 10 μL 在 37℃ 进行培育。在适当的时间点, 将 20 μL 的该溶液除去并通过 RP-HPLC 进行分析。由偶联物的积分峰面积、内标物和各种分解产物来计算分解百分比。

[0151] 13. MTT 毒性检测:

[0152] 将在 RPMI 介质 1640 (+ 谷氨酰胺) 中的 10% FBS 中生长的 Jurkat 细胞以 $5-10 \times 10^4$ 细胞 / mL 铺板在相同介质中的 96-孔微量滴定板上。在第二个 96-孔板中, 将化合物在第 2-11 列的第 1-3 和 5-7 行中的 20 个孔上依次稀释三倍; 典型的稀释跨越 400 μM 到 20nM 的浓度范围。第 1 和 12 列均不含细胞和化合物。第 4 和 8 行含有作为内部对照的依次稀释的秋水仙素; 秋水仙素浓度通常大大低于化合物浓度以获得 EC50 (半数最大有效

浓度)。

[0153] 将化合物添加到含有细胞的板上,并使细胞在 37℃培育 24 小时,这时使板离心,除去化合物,并将细胞再悬浮于新鲜介质中。将细胞培育 24 小时,离心,除去介质,并将 150 μ L 的 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴 (MTT) 溶液 (5mg/mL 介质) 加入到各孔中。将细胞用 MTT 在 37℃培育 3 小时,将 150 μ L 溶解了的溶液 (10% triton X-100, 90% 0.1N HCl, 在异丙醇中) 加入到各孔中,在板读取器上获得比色数据。

[0154] 使用第 1 和 12 列的数值对来自板读取器的数据进行标准化,并使用 Graph Pad Prism 软件进行曲线拟合以获得各化合物的 EC50。

[0155] 得到的化合物 4 和 6a-c 的毒性和稳定性数据示于以下表 2 中。

[0156] 表 2 低聚胍 6a-c 的毒性和稳定性

[0157]

化合物	EC50 (μ M)	稳定性 ($t_{1/2}$, 小时)
丹酰-DP86a	17.85 $\pm$ 1.07	8.3 $\pm$ 1.4
丹酰-DP116b	8.53 $\pm$ 0.75	8.10 $\pm$ 0.14
丹酰-DP226c	2.32 $\pm$ 0.63	15.9 $\pm$ 0.4
丹酰引发剂 4	311	--

[0158] 已描述了本发明的各种实施方式。这些和其它实施方式在所附的权利要求的范围内。

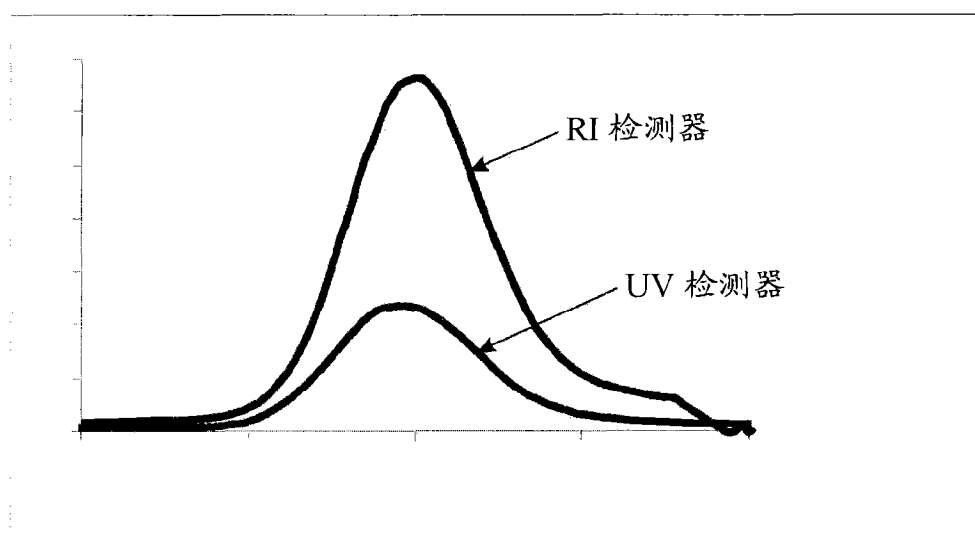


图 1

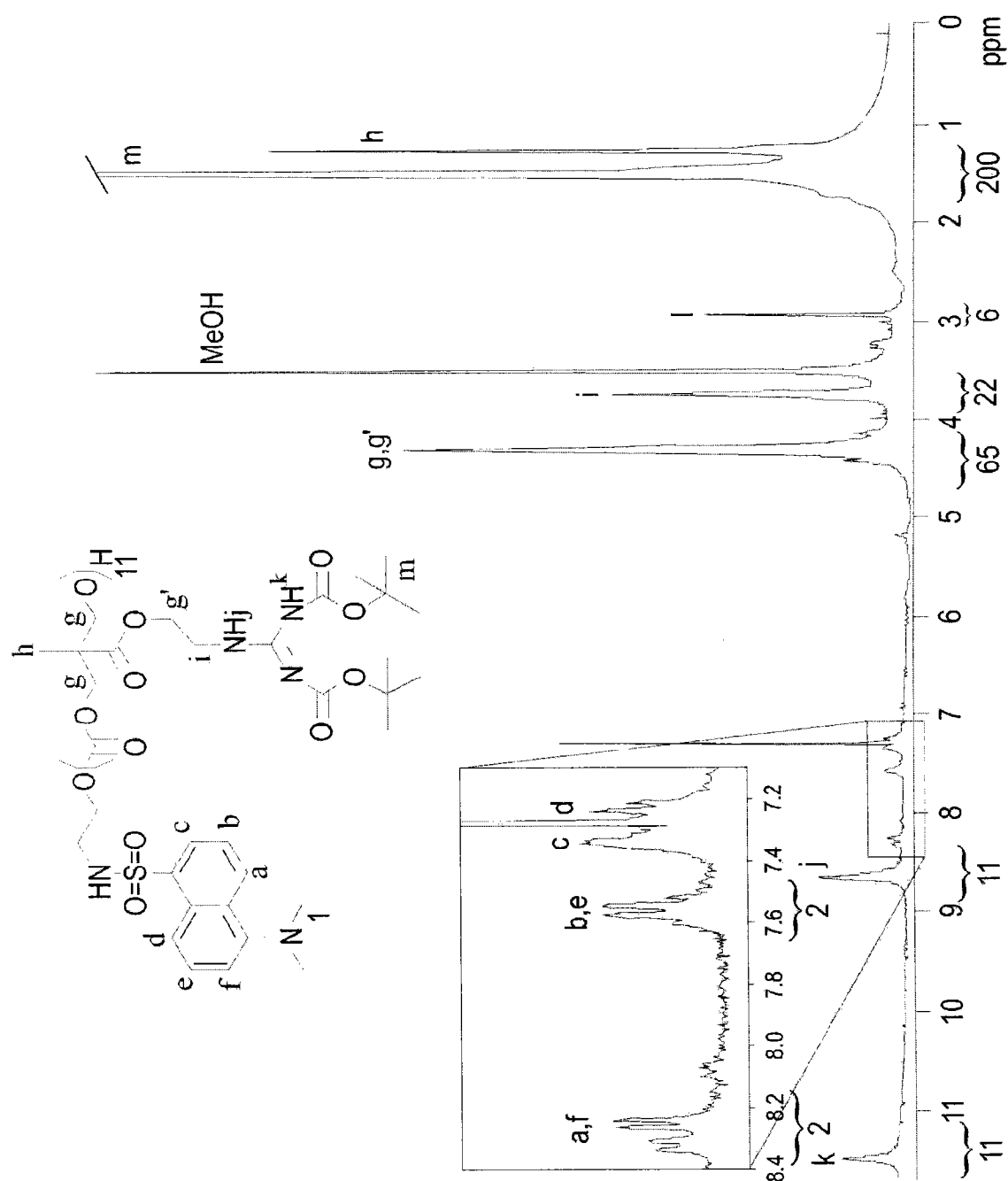


图 2

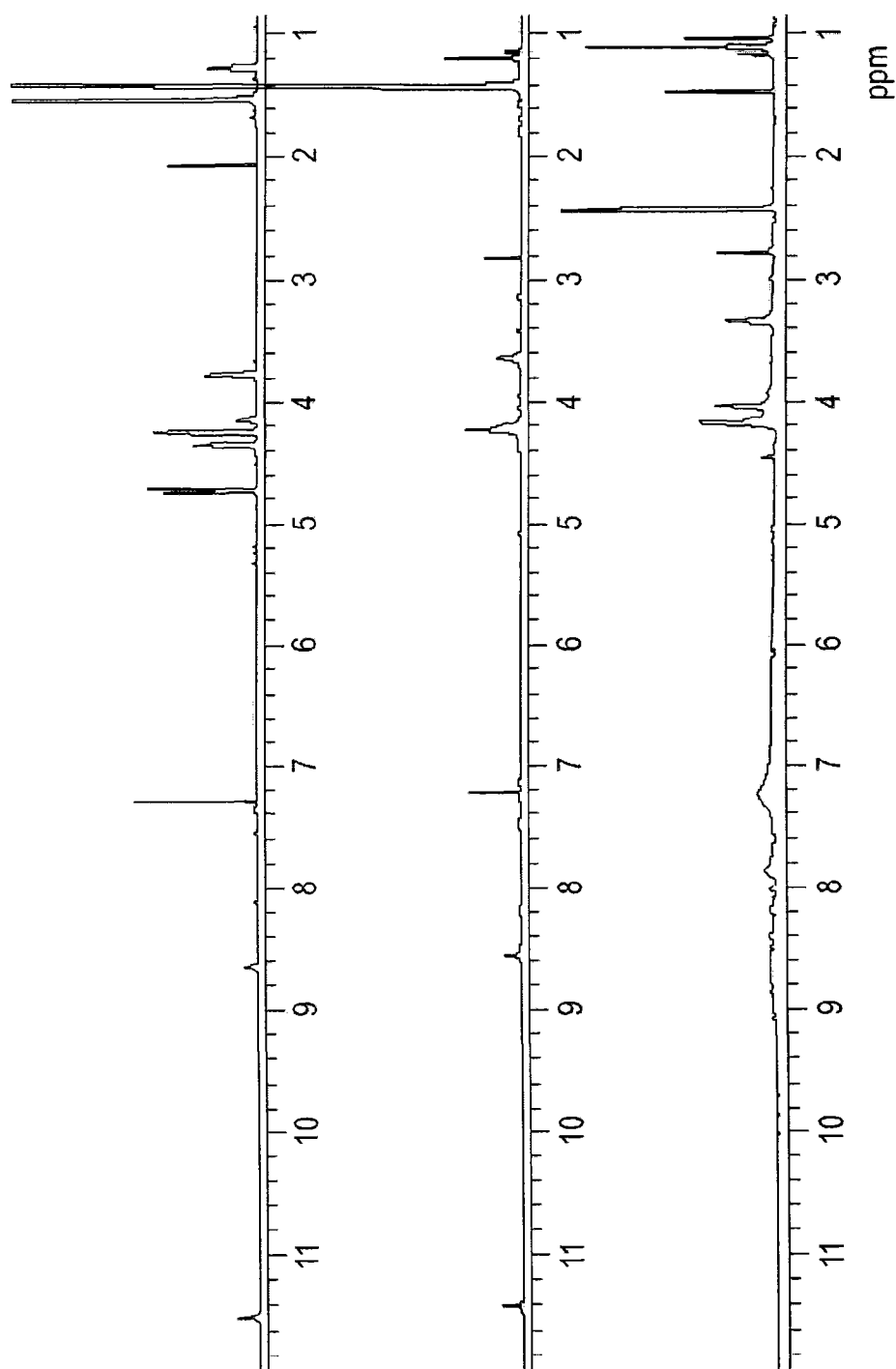


图 3

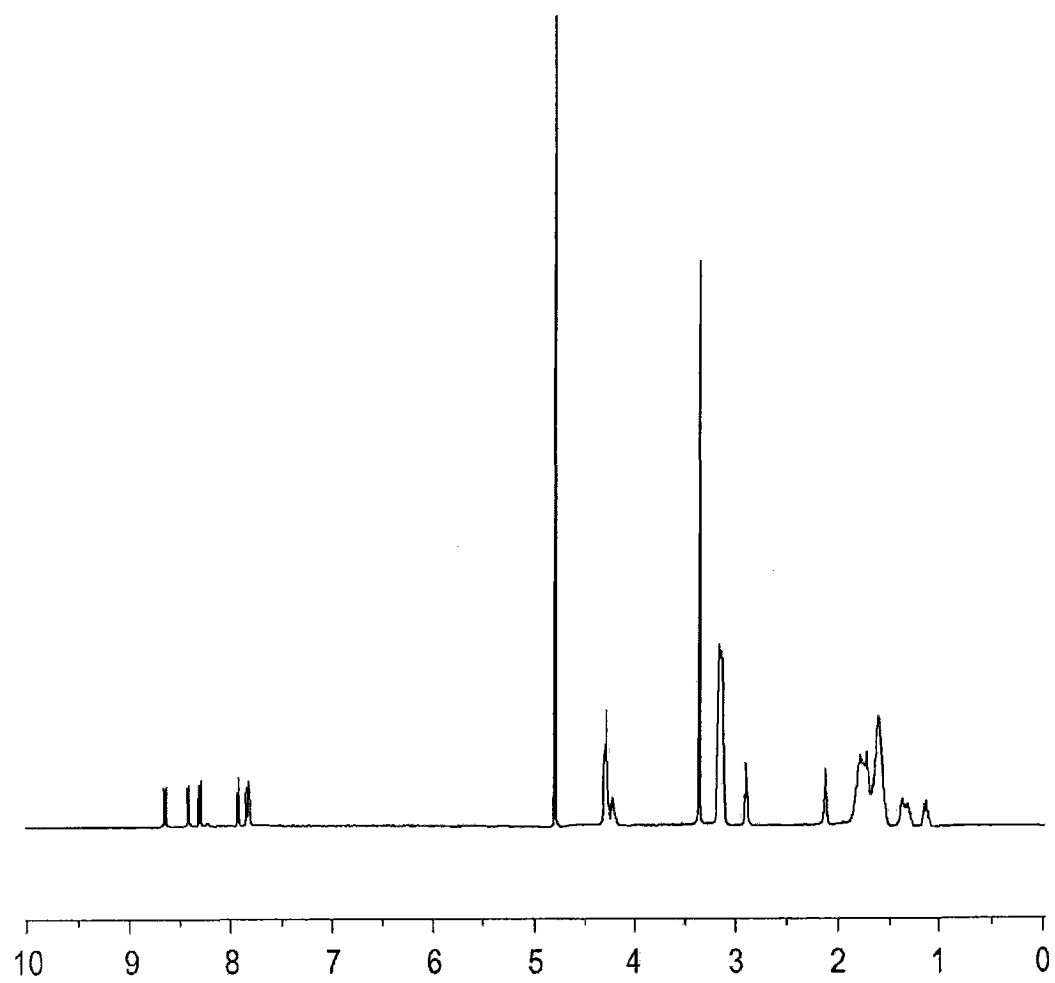
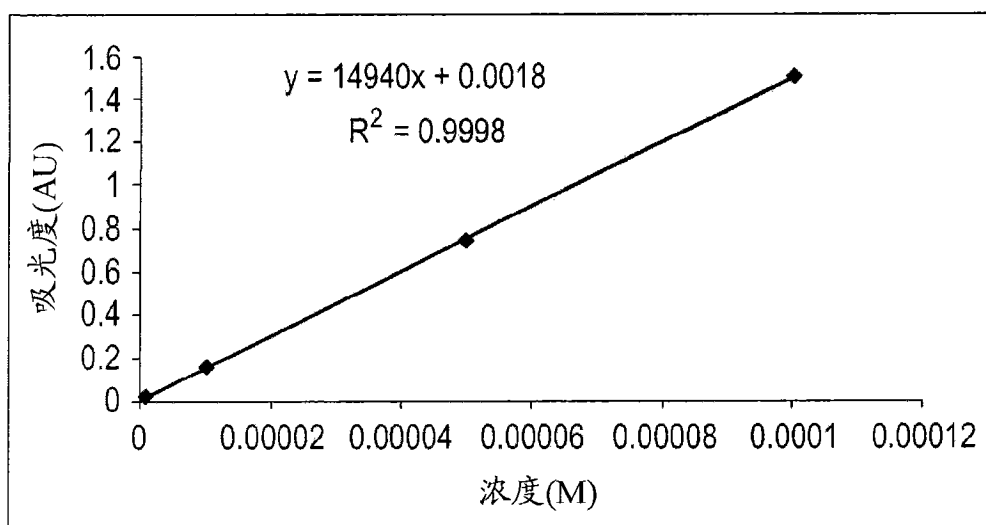
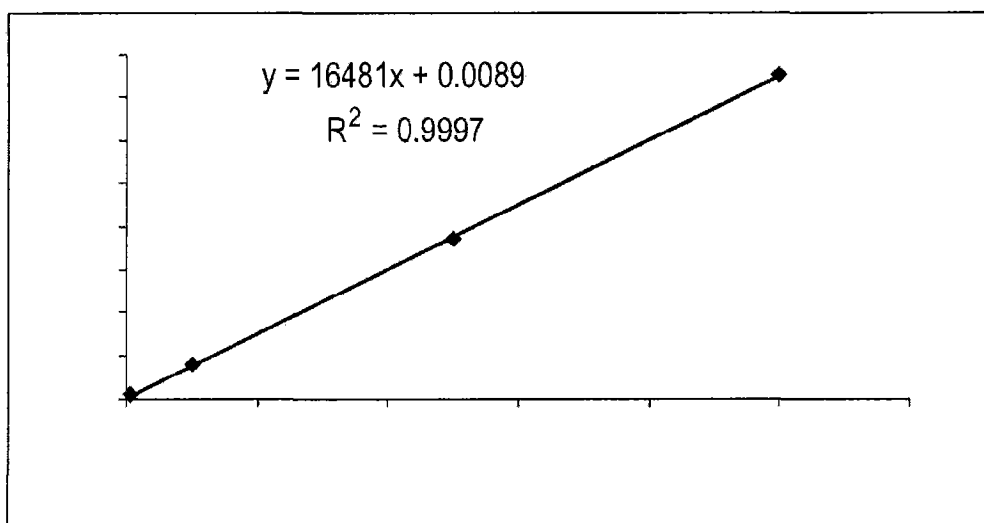


图 4



浓度(M)	吸光度(AU)
0.0001	1.5011
0.00005	0.73687
0.00001	0.15813
0.000001	0.016527

图 5A



浓度(M)	吸光度(AU)
0.0001	1.6526
0.00005	0.83922
0.00001	0.18729
0.000001	0.0097547

图 5B

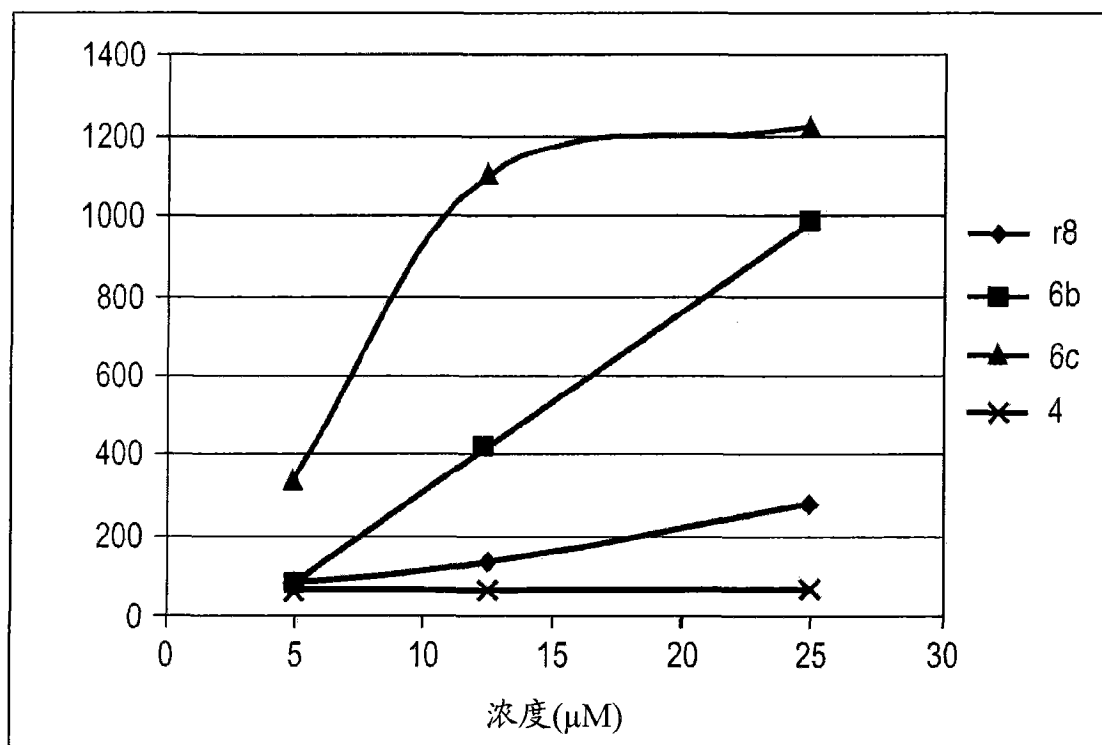


图 6

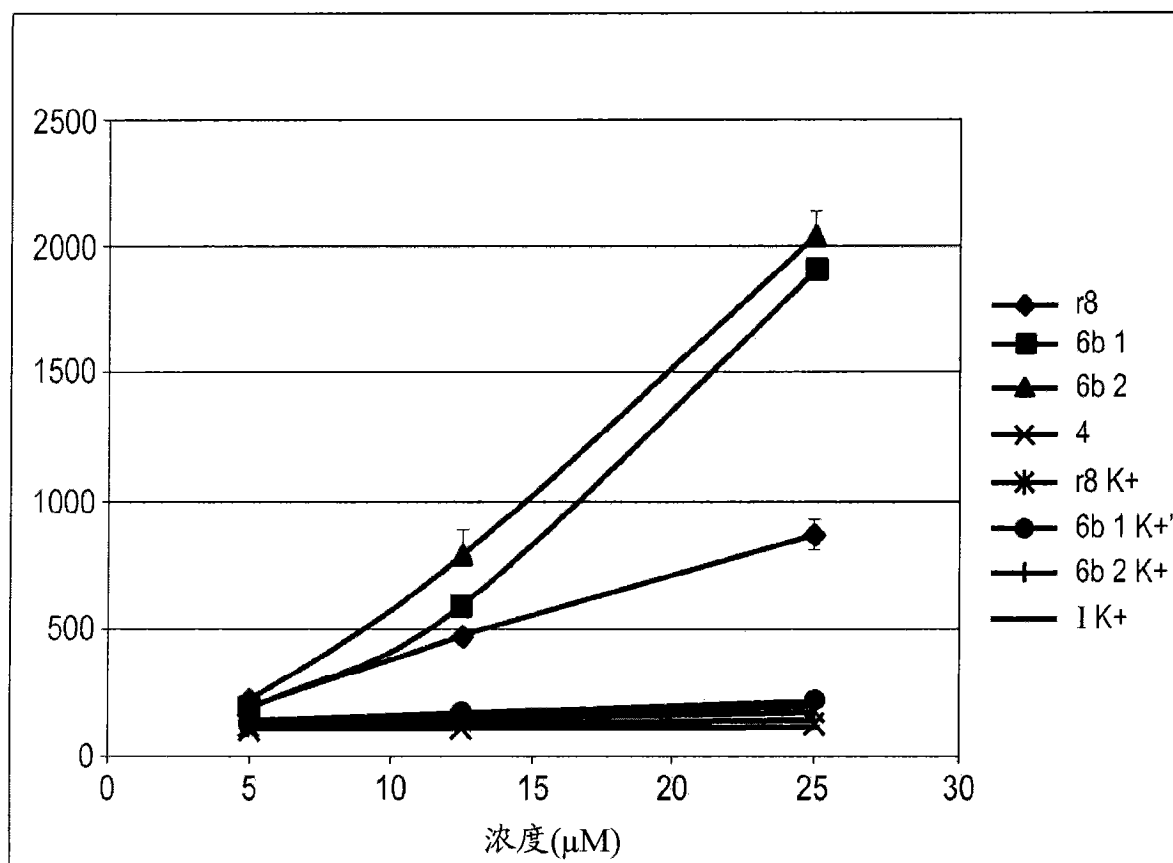


图 7

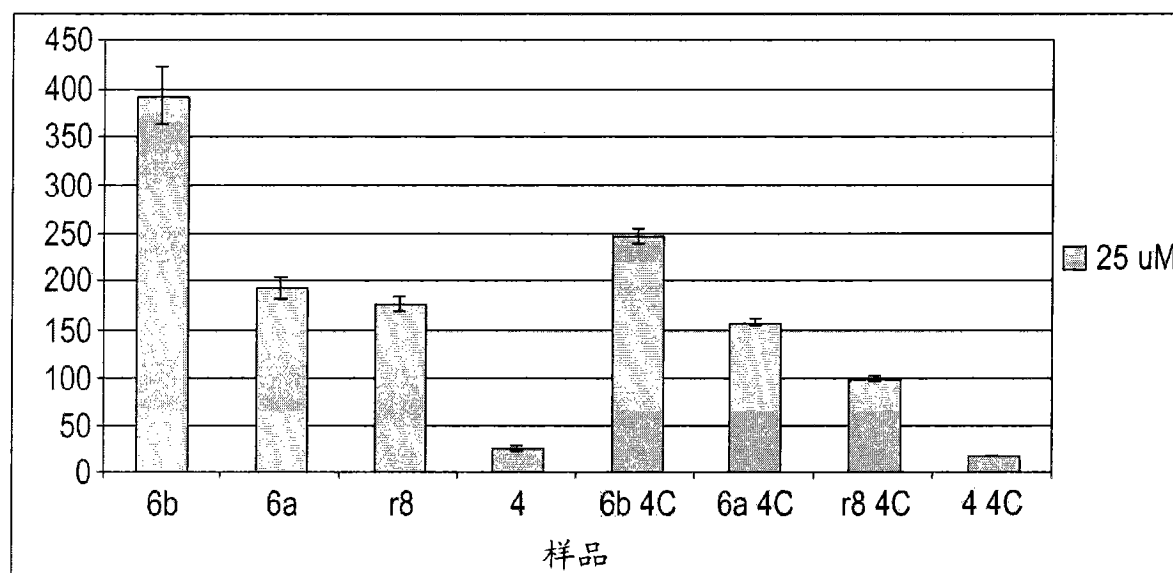


图 8

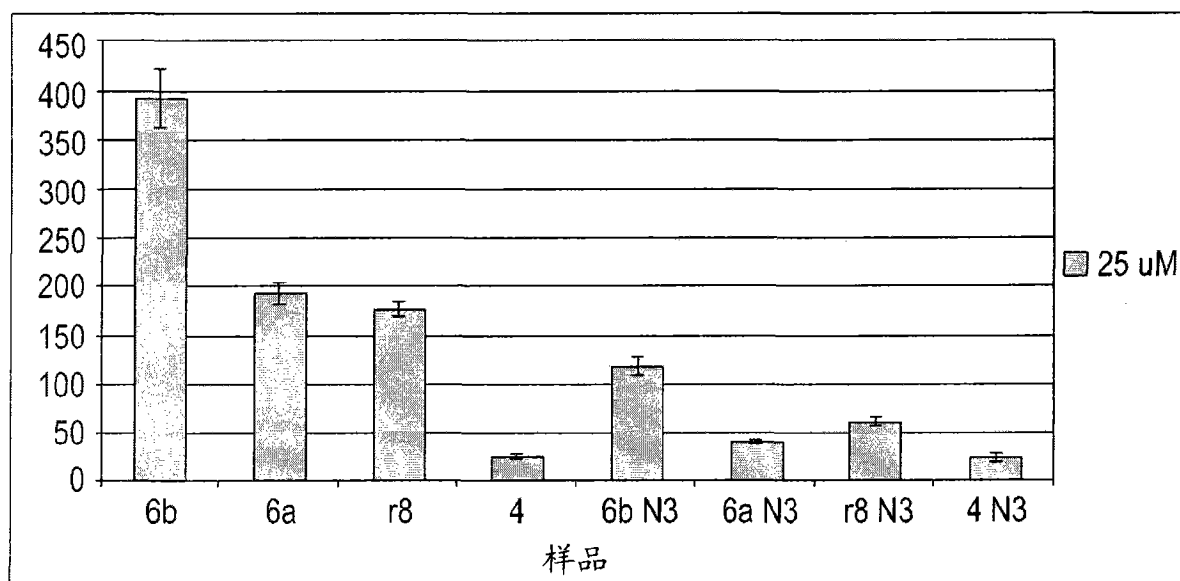


图 9

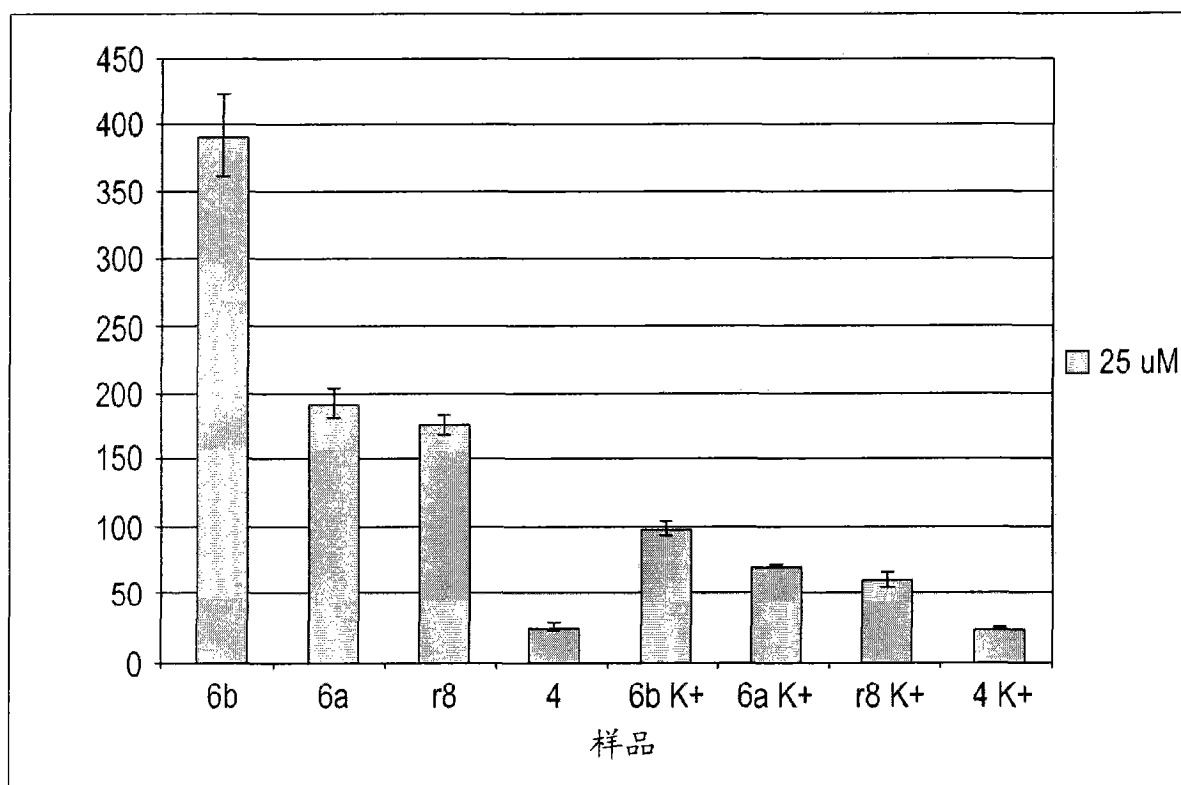


图 10

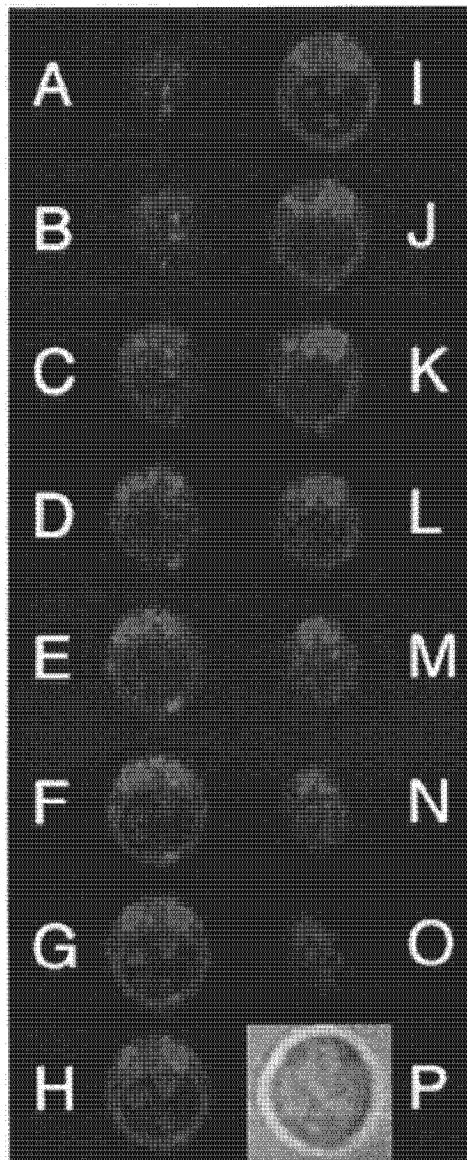


图 11