

(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
2020 年 2 月 27 日 (27.02.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/037752 A1

(51) 国际专利分类号:
C08G 65/334 (2006.01) *A61K 47/60* (2017.01)
A61K 49/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/106522

(22) 国际申请日: 2018 年 9 月 19 日 (19.09.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810959509.7 2018年8月22日 (22.08.2018) CN

(71) 申请人: 东北大学 (NORTHEASTERN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国辽宁省沈阳市浑南区创新路195号, Liaoning 110169 (CN)。

(72) 发明人: 程震 (CHENG, Zhen); 中国辽宁省沈阳市浑南区创新路195号, Liaoning 110169 (CN)。
娄宏跃 (LOU, Hongyue); 中国辽宁省沈阳市浑南区创新路195号, Liaoning 110169 (CN)。 刘

弘光 (LIU, Hongguang); 中国辽宁省沈阳市浑南区创新路195号, Liaoning 110169 (CN)。
索永宽 (SUO, Yongkuan); 中国辽宁省沈阳市浑南区创新路195号, Liaoning 110169 (CN)。

(74) 代理人: 北京易捷胜知识产权代理事务所 (普通合伙) (BEIJING EASY JOY SOON IP AGENT LTD); 中国北京市海淀区苏州街长远天地大厦A2座1212, Beijing 100080 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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,

(54) Title: MODIFIED INDOCYANINE GREEN AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种被修饰的吲哚菁绿及其制备方法和应用

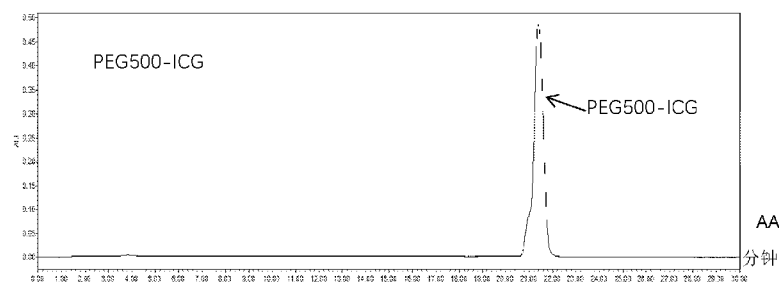


图 2B

AA Minute

(57) Abstract: Disclosed are a modified indocyanine green, a preparation method therefor and the use thereof. One of two sulfonic groups of the molecular structure of indocyanine green is substituted by a modified PEG group, thereby obtaining a new type of indocyanine green (ICG) modified by PEG. By modifying ICG, the plasma half-life of ICG can be prolonged, so that the retention time thereof in blood is notably prolonged, and thereby the performance of uses in multiple aspects, such as angiography, intraoperative navigation, and detection and treatment of tumors, is optimized. The modified ICG shows a similar good fluorescent property and spectral absorption capability to the original unmodified ICG; moreover, the modified ICG has a very good stability, and therefore possesses good application prospects in the field of vascular imaging.

(57) 摘要: 一种被修饰的吲哚菁绿、其制备方法和应用。将吲哚菁绿分子结构中两个磺酸基的其中之一磺酸基被修饰性PEG基团所取代, 得到被PEG修饰的新型吲哚菁绿 (英文缩写ICG)。通过对ICG进行修饰改性, 可延长ICG的血浆半衰期, 使其在血液内滞留时间被显著延长, 从而在血管造影、术中导航、肿瘤的检测与治疗等多方面的应用性能被优化。而且所述被修饰的ICG与原本未被修饰的ICG表现出相当接近的良好的荧光性质和光谱吸收能力, 且被修饰的ICG稳定性非常好, 因而在血管成像领域具有很好应用的前景。

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))。

说 明 书

一种被修饰的吲哚菁绿及其制备方法和应用

技术领域

[0001]. 本发明涉及对血管荧光造影剂的修饰方法,特别是关于用 PEG 修饰的吲哚菁绿及其制备方法和应用。

背景技术

[0002]. 吲哚菁绿 (Indocyanine Green, 缩写 ICG) 是一种分子量为 751.4Da 的三羰花青染料。它是一种负电荷的离子,属于大花菁染料家族。吲哚菁绿结构式参见附图的图 1A,是一种常用来检查肝脏功能和肝有效血流量的染料药。静脉注入体内后,立刻和血浆蛋白结合,随血循环迅速分布于全身血管内,高效率、选择地被肝细胞摄取,又从肝细胞以游离形式排泄到胆汁中,经胆道入肠,随粪便排出体外。由于排泄快,一般正常人静脉注射 20 分钟后约有 97%从血中排除、不参与体内化学反应、无肠肝循环(进入肠管的 ICG 不再吸收入血)、无淋巴逆流、不从肾等其他肝外脏器排泄。

[0003]. ICG 在手术中的血管造影应用广泛,与其他血管造影方法(X 射线, CT, MRI 和 PET) 相比,可以容易且经济地注射 ICG 进行血管造影,例如用于神经外科手术、绕道冠状动脉手术、皮瓣手术、重建手术、创伤手术以及腹腔镜手术中,用以检查血液循环以及术中导航。ICG 推注进入全身血液循环,并在注射后几分钟内完成成像,根据需要通常可以在约 15 分钟后再次注射。

[0004]. ICG 还被用于肿瘤检测与治疗。ICG 的荧光量子产率约 10%,而且荧光和光声信号分别随着荧光量子产率而增加和减少,当一个 ICG 分子被激发时,它可以进一步将能量传递给其他分子。所以 ICG 可以用作荧光成像和光声成像的造影剂。ICG 可以通过 EPR 效应,非特异性在肿瘤聚集,或者靶向修饰,特异性在肿瘤聚集,从

而进行肿瘤的检测、定位以及进行光热治疗和光动力学疗法。

[0005]. 但由于 ICG 在血浆中的半衰期非常短, 限制了 ICG 作为近红外荧光成像材料的应用, 且临床目前都是根据采用多次注射或者缓慢注射的方式, 为临床获得准确的荧光检测结果, 带来困难。例如, 测定肝血流量时, 是以 25mgICG 溶解在尽可能少量的灭菌注射水中, 再用生理盐水稀释成 2.5 ~ 5.0mg/ml 浓度, 静脉注入相当于 3mgICG 的上述溶液。接着, 以每分钟 0.27 ~ 0.49mg 比例持续以一定速度静脉滴注约 50 分钟, 直至采完血样为止(同时需采周围静脉和肝静脉血)。

[0006]. 可见 ICG 在血浆中的半衰期太短, 给它的实际应用带来诸多困难和限制。

[0007]. 因此, 本发明期望通过对现有的 ICG 进行修饰或改性, 用以延长血浆半衰期, 省去在血液荧光造影测试中需要给病患多次注射或缓慢持续注射的麻烦; 同时使被修饰或改性的 ICG 具有与原 ICG 接近或更好的良好的荧光性质和光谱吸收能力, 不影响其在血管荧光造影的应用特性。

发明内容

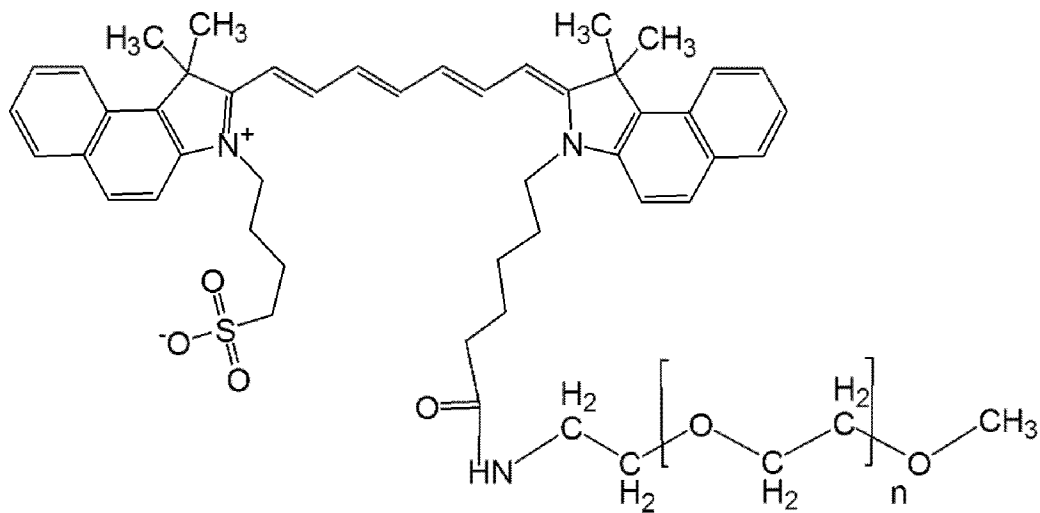
[0008]. 依据本文所公开的第一方面, 提出了一种被修饰的吲哚菁绿, 是将吲哚菁绿分子结构中两个磺酸基的其中一个磺酸基被修饰性 PEG 基团所取代。所述修饰性 PEG 又叫修饰性聚乙二醇, 是经过化学修饰基团或者生物活性基团修饰的 PEG。修饰性 PEG 基团是指修饰性 PEG 丢失 H 原子后所形成的活性基团。

[0009]. 在所公开方法的一些实施方式中, 所述修饰性 PEG 包括但不限于 mPEG (单甲氧基醚 PEG)、mPEG-NH₂ (mPEG-胺基)、mPEG-SS (mPEG-琥珀酰亚胺琥珀酸酯)、mPEG-SC (mPEG-琥珀酰亚胺碳酸酯)、mPEG2-NHS (mPEG2-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、mPEG-SPA (mPEG-琥珀酰亚胺丙酸酯)、mPEG-ALD (mPEG-丙

醛)、mPEG-MAL (mPEG-马来酰亚胺)、HO-PEG-COOH (α -羟基- ω -羧基聚乙二醇)、mPEG-b-PS (聚乙二醇和聚苯乙烯的嵌段共聚物)、mPEG-b-PI (聚乙二醇和聚异戊二烯的嵌段共聚物)、mPEG-b-PAN (聚乙二醇和聚丙烯腈的嵌段共聚物)、mPEG-b-PCL (聚乙二醇和聚 ϵ -己内酯的嵌段共聚物)、mPEG-b-PMMA (聚乙二醇和聚甲基丙烯酸甲酯的嵌段共聚物)、 α -hydroxyl-PEG- ω -amide、双羟基 PEG、HO-PEG-NH₂(α -羟基- ω -氨基聚乙二醇)、mPEG-carboxyl (mPEG-羧基)、mPEG-cyan (mPEG-腈基) 等。

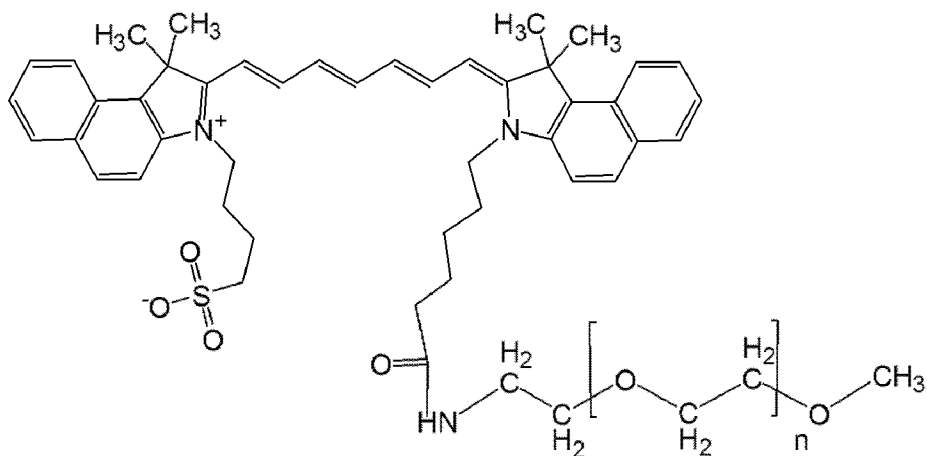
[0010]. 在所公开方法的一些实施方式中, 所述修饰性 PEG 基团的分子量取值范围是 500~20000, 优选为 500、2000、5000 或 10000、20000。

[0011]. 在所公开方法的一些实施方式中, 所述被 PEG 修饰的吲哚菁绿的分子结构式表示如下:



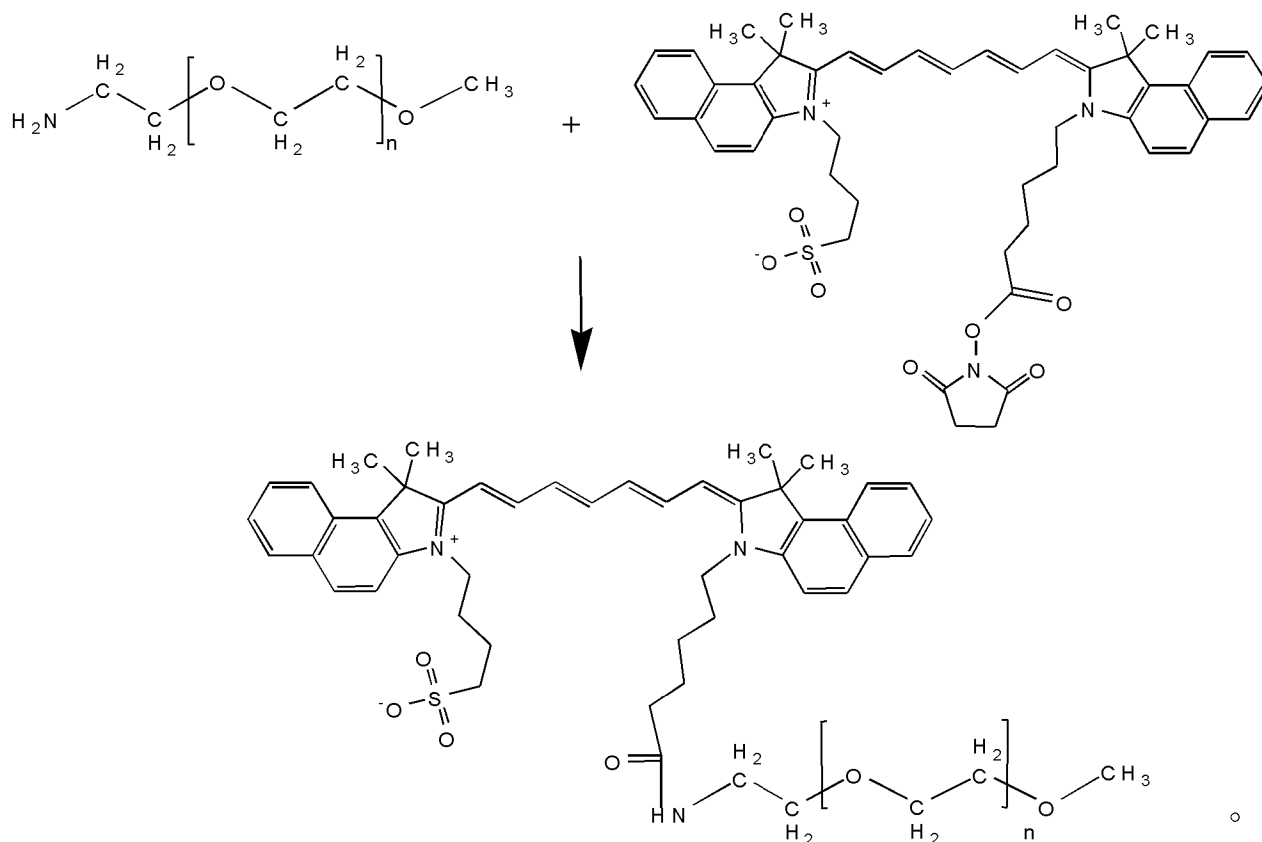
其中, $n=9\sim450$ 。

[0012]. 依据本文所公开的第一方面, 提出了一种制备被修饰的吲哚菁绿的方法, 所述被修饰的吲哚菁绿的分子结构式表示如下:



其中 $n=9\sim 450$ ；所述方法包括：

采用被-CO-NHS 酯基所修饰的 ICG 衍生物和 mPEG-NH₂ 为反应物，其中 mPEG-NH₂ 与该 ICG 衍生物中-CO-NHS 发生酯取代反应，脱去一分子 N-羟基琥珀酰亚胺，制得被 mPEG-NH-修饰的新型 ICG（见结构式 C）；其反应过程表示为：



结构式 C

[0013]. 在所公开方法的一些实施方式中, 上述反应过程的反应条件为: 所述经-CO-NHS 酯基修饰的 ICG 衍生物与 mPEG-NH₂ 按摩尔比 1: 5 混合, 在 pH = 7.0 ~ 8.0 的 PBS 中, 室温搅拌下反应 5~12h, 经 HPLC 等纯化处理, 得到 PEG-ICG, (见结构式 C)。

[0014]. 总之, 本发明的主要发明在于将吲哚菁绿分子结构两个磺酸基的其中一个磺酸基被修饰性 PEG 基团所取代, 用于延长 ICG 的血浆半衰期, 同时不影响甚至还进一步加强 ICG 在血管造影、血管荧光成像、EPR 效应等方面的应用性能。但是合成时, ICG 的磺酸基难以直接反应替换为修饰性 PEG, 因而本发明的制备方法是采用被 -CO-NHS 酯基修饰的 ICG 衍生物为反应物而非 ICG 【该被 CO-NHS 酯基修饰的 ICG 衍生物可自行合成, 亦可商业购买】, 是由于其中的 -CO-NHS 酯基活性较强, 很容易与 mPEG-NH₂ 发生酯交换, 脱去一分子 NHS, 将 mPEG-NH- 连接至羰基-C=O-上, 由此而制得一种被 PEG 修饰的新型 ICG, 完成 ICG 被 PEG 修饰的过程。其中, 若使用不同分子量的 mPEG-NH₂ 为反应物, 则反应结束后, 使得各种不同分子量的 mPEG-NH- 键接到-C=O-上, 达到完成不同分子量 PEG 修饰过程的目的, 反应可控性强、可根据需要设计反应产物, 反应条件温和 (室温)。此外, 该合成路径具有较高的选择性、收率, 易转化用于产业化生产。

[0015]. 本发明以修饰性 PEG 基团取代 ICG 的其中一个磺酸基 -SO₃H, 从而达到显著延长 ICG 在人体血浆中的半衰期的作用。对小鼠尾静脉注射 PEG-ICGs 与 ICG, 对小鼠股静脉进行近红外 II 区荧光成像并拍照, 根据荧光强度的比值, 计算出 PEG-ICGs 与 ICG 在血浆中各自的代谢时间, 发现半衰期由未修饰 ICG 的 0.06421 h 延长至 1.12731 h~6.2413 h, 因此比起未修饰 ICG, 用分子量 500、2000、5000、10000、20000 的修饰性 PEG 基团改性的 ICG, 在血液内滞留时间被显著延长, 使其在血管造影, 术中导航, 肿瘤的检测与治疗等多方面的应用得以优化。同时, 经过对修饰后的 PEG-ICGs 进行吸收光谱强

度检测, 可发现修饰和未修饰的 ICG 具有基本一致的光谱吸收能力, 并且在近红外I区 (波长 650nm-900nm) 和II区 (波长 900nm-1200nm) 均具有良好的荧光性质, 且与未被修饰的 ICG 的吸收及发射光谱性质一致。由此说明, PEG-ICGs 具有与 ICG 一样的近红外I区和II区成像的应用价值。此外, 经测试, 所述被修饰的 PEG-ICGs 在 pH7.4 的 PBS(磷酸缓冲盐溶液)和 FBS (胎牛血清) 均表现出良好的稳定性, 因此本发明被修饰的 PEG-ICGs 具有商业化生产和应用的前景。

附图说明

[0016]. 图 1A 为吲哚菁绿 ICG 的分子结构式, 图 1B 为本发明被修饰的 PEG-ICGs 的分子结构式。

[0017]. 图 2A 为修饰 ICG 的中间产物 ICG-NHS 经高效液相色谱分析纯化并在 780 nm 通道下检测吸收峰。

[0018]. 图 2B、图 2C、图 2D、图 2E、图 2F 分别为经分子量 500、2000、5000、10000、20000 的 mPEG-NH₂ 修饰 ICG 所得的 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 经高效液相色谱分析纯化并在 780 nm 通道下检测吸收峰。

[0019]. 图 3 为浓度 20 μ g/ml 的未被修饰的 ICG 和被修饰的 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 在波长 600nm~950nm 的相对吸收光谱。

[0020]. 图 4 为未被修饰的 ICG 和被修饰的 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 在近红外I区 (波长 650nm-900nm) 的相对荧光强度。

[0021]. 图 5 为未被修饰的 ICG 和被修饰的 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 在近红外II区 (波长 900nm-1200nm) 的相对荧光强度。

[0022]. 图 6 为被修饰的 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 在 pH7.4 的 PBS(成

分为 Na_2HPO_4 和 NaH_2PO_4) 中荧光强度下降率随时间变化曲线。

[0023]. 图 7 为被修饰的 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 在 FBS (胎牛血清) 中荧光强度下降率随时间变化曲线。

[0024]. 图 8 为未被修饰的 ICG 和被修饰的 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 在按 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 尾静脉注射小鼠后, 在近红外 II 区荧光成像的照片组。

[0025]. 图 9 为对患有肿瘤的小鼠分别尾静脉注射未被修饰的 ICG 和被修饰的 PEG5000-ICG, 经不同时间后在近红外 II 区荧光成像的照片, 测试被修饰的 PEG5000-ICG 的 EPR 效应。

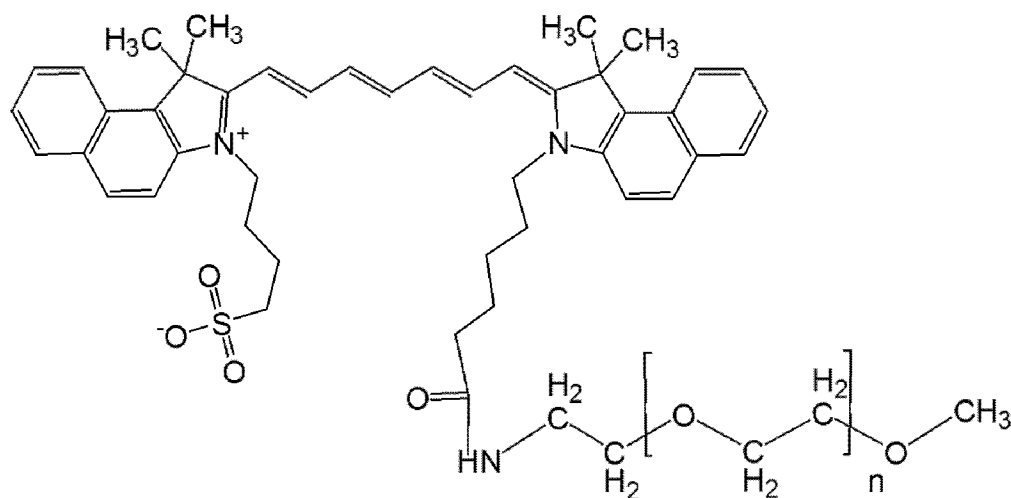
[0026]. 应当注意的是, 附图并未按比例绘制, 且为了说明目的, 在所有附图中通常使用相同的参考符号表示具有类似结构或功能的元件。还应当注意的是, 附图仅仅旨在便于描述本发明的优选实施方式。附图并未说明所描述的实施方式的每个方面且并不限制本发明的范围。

[0027]. 具体实施方式

[0028]. 本发明主要是用修饰性 PEG 基团对血管荧光成像材料 ICG 进行修饰, 以延长其在血液内的半衰期。修饰性 PEG 又叫修饰性聚乙二醇, 是经过化学修饰基团或者生物活性基团修饰的 PEG, 即常规 PEG 改变其端部基团, 用具有生物亲和性的 -OH、-COOH、-NH₂、甲氧基、腈基等取代或连接。修饰性 PEG 基团是指修饰性 PEG 丢失端部的 H 原子后所形成的活性基团。修饰性 PEG 包括但不限于 mPEG (单甲氧基醚 PEG)、mPEG-NH₂ (mPEG-胺基)、mPEG-SS (mPEG-琥珀酰亚胺琥珀酸酯)、mPEG-SC (mPEG-琥珀酰亚胺碳酸酯)、mPEG2-NHS (mPEG2-N-羟基琥珀酰亚胺酯)、mPEG-SPA (mPEG-琥珀酰亚胺丙酸酯)、mPEG-ALD (mPEG-丙醛)、mPEG-MAL (mPEG-马来酰亚胺)、HO-PEG-COOH (α -羟基- ω -羧基聚乙二醇)、mPEG-b-PS (聚乙二醇和聚苯乙烯的嵌段共聚物)、mPEG-b-PI (聚乙

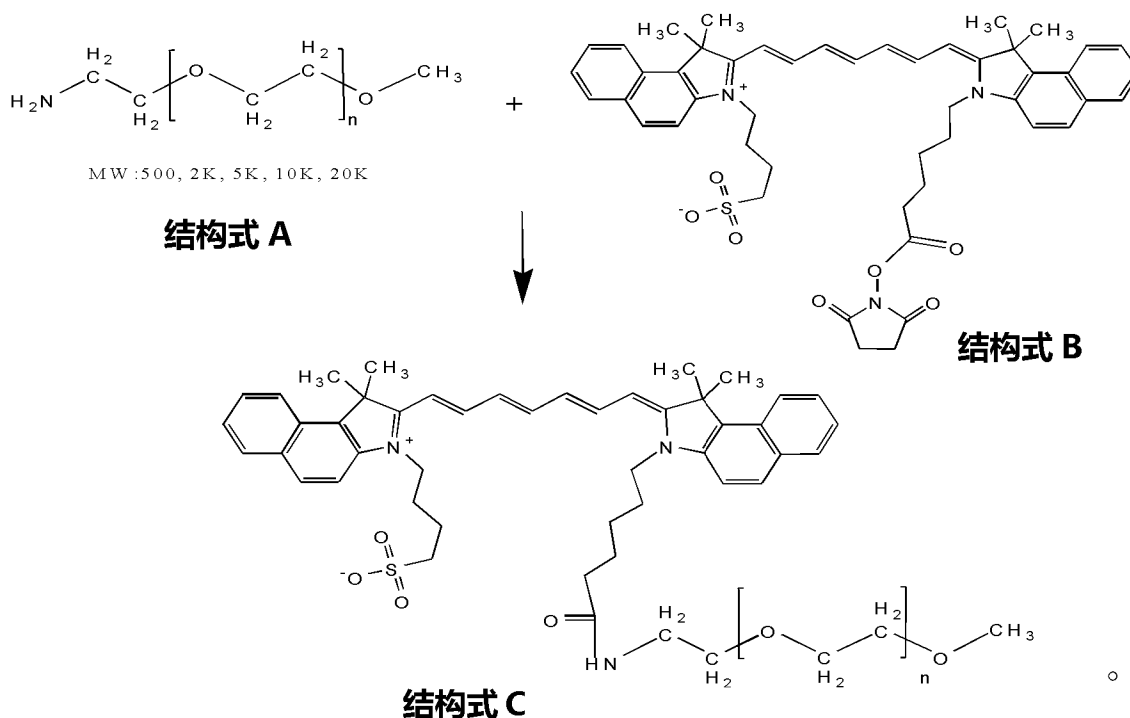
二醇和聚异戊二烯的嵌段共聚物)、mPEG-b-PAN (聚乙二醇和聚丙烯腈的嵌段共聚物)、mPEG-b-PCL (聚乙二醇和聚 ϵ -己内酯的嵌段共聚物)、mPEG-b-PMMA (聚乙二醇和聚甲基丙烯酸甲酯的嵌段共聚物)、 α -hydroxyl-PEG- ω -amide、双羟基 PEG、HO-PEG-NH₂(α -羟基- ω -氨基聚乙二醇)、mPEG-carboxyl (mPEG-羧基)、mPEG-cyan (mPEG-腈基) 等。其中, 修饰性 PEG 基团的分子量取值范围是 500~20000, 优选为 500、2000、5000、10000 或 20000。

[0029]. 优选地, 本发明被修饰的吲哚菁绿的分子结构式表示如下:



其中, $n=9\sim450$ 。

[0030]. 优选地, 制备上述被PEG修饰的吲哚菁绿的方法: 采用被-CO-NHS酯基所修饰的ICG衍生物和mPEG-NH₂为反应物, 其中mPEG-NH₂与该ICG衍生物中-CO-NHS发生酯取代反应, 脱去一分子N-羟基琥珀酰亚胺, 制得被mPEG-NH-修饰的新型ICG (见结构式C); 其反应过程表示为:



[0031]. 优选地, 上述反应过程的反应条件为: 将-NHS 修饰的 ICG 衍生物 (结构式 B) 分别与不同分子量的 mPEG-NH₂ (结构式 A) 按摩尔比 1: 5 的比例, 在 pH=7.0~8.0 的 PBS 中, 室温摇床反应 5~12 h, 经 HPLC 纯化, 得到 PEG-ICG, 即 (见结构式 C) 所表示的产物。

[0032]. 本发明经修饰性 PEG 基团改性的 ICG (见结构式 C), 在血液内滞留时间被显著延长, 使其在血管造影, 术中导航, 肿瘤的检测与治疗等多方面的应用得以优化。

[0033]. 按照上述方法, 以下举出具体的制备例和测试例。

[0034]. 制备实施例 1

[0035]. 制备方法: 将经-CO-NHS 酯基修饰的 ICG 衍生物 (结构式 B, 购自 Intrace Medical SA) 与分子量 500 的 mPEG-NH₂ (结构式 A) 按摩尔比 1: 5 的比例, 在 pH=7.4 的 PBS 中, 室温摇床反应 12 h, 经 HPLC 纯化, 得到 PEG-ICG (见结构式 C), 如图 1B 所示。

[0036]. 制备实施例 2

[0037]. 本例与制备例 1 相同, 只是使用分子量约为 2000 的

mPEG-NH₂参与反应。产物记为PEG2000-ICG。

[0038]. 制备实施例3

[0039]. 本例与制备例1相同，只是使用分子量约为5000的mPEG-NH₂参与反应。产物记为PEG5000-ICG。

[0040]. 制备实施例4

[0041]. 本例与制备例1相同，只是使用分子量约为10000的mPEG-NH₂参与反应。产物记为PEG10000-ICG。

[0042]. 制备实施例5

[0043]. 本例与制备例1相同，只是使用分子量约为20000的mPEG-NH₂参与反应。产物记为PEG20000-ICG。

[0044]. 产物性质测试

[0045]. 1.产物合成表征测试

[0046]. 以下对制备实施例1~5所制得的PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG和PEG20000-ICG经高效液相色谱分析仪(HPLC)纯化，选择分离柱(C4 Column, 300 Å, 3.5 μm, 4.6 mm × 250 mm)，在780 nm通道下检测吸收峰。程序如表1：

[0047]. 表1：

时间 (min)	流速(ml·min ⁻¹)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1	95	5
3	1	95	5
23	1	5	95
26	1	5	95
27	1	95	5
30	1	95	5

[0048]. 参见图 2A~图 2F 所示。其中图 2A 为结构式 B 的反应物 ICG-NHS (经-CO-NHS 酯基修饰的 ICG) 的 HPLC 图, 在分离柱里的保留时间为 22.4943 min, ICG-NHS 具有极性小, 亲脂性, 水溶性差等特点。

[0049]. 图 2B 为制备例 1 的 PEG500-ICG 的 HPLC 图, 出峰时间为 20.7236 min 早于 ICG-NHS, 说明由于 ICG 的 PEG 化, 极性相对变大, 水溶性变好, 证明 mPEG-NH₂ 与 ICG 连接成功。由于未与 ICG 连接的 mPEG-NH₂ 没有特定吸收峰, 故 HPLC 检测不到 mPEG-NH₂。而图 2B 的出峰时间早于 ICG-NHS, 证明 mPEG-NH₂ 与 ICG 连接成功。

[0050]. 图 2C 为制备例 2 的 PEG2000-ICG 的 HPLC 图, 出峰时间为 19.6685 min 早于 ICG-NHS 和 PEG500-ICG, 同样说明由于 mPEG-NH₂ 的分子量更大, 进一步极化 ICG, 水溶性变好, 所以 PEG2000-ICG 的出峰时间比 PEG500-ICG 更早, 证明 mPEG-NH₂ 与 ICG 连接成功。

[0051]. 图 2D 为制备例 3 的 PEG5000-ICG 图的 HPLC 图, 出峰时间为 19.2725 min 早于 ICG-NHS、PEG500-ICG、PEG2000-ICG, 同理证明 mPEG-NH₂ 与 ICG 连接成功。

[0052]. 图 2E 为制备例 4 的 PEG10000-ICG 的 HPLC 图, 出峰时间为 19.6829 min 早于 ICG-NHS, 但是出峰时间晚于 PEG5000-ICG, 可能因为连接的 mPEG-NH₂ 分子量过大, 受在柱中位置的影响, 所以虽然水溶性变好但是出峰时间却晚于 PEG5K-ICG。但同样的, 未与 ICG 连接成功的 mPEG-NH₂ 是没有特定吸收峰的, 所以图 2E 可证明 mPEG-NH₂ 与 ICG 连接成功。

[0053]. 图 2F 为制备例 5 的 PEG20000-ICG 的 HPLC 图, 出峰时

间为 19.4424 min, 出峰早于 ICG-NHS, 出峰时间晚于 PEG5K-ICG。也可能是由于连接的 PEG 分子量过大, 所以虽然水溶性变好但是出峰时间却晚于 PEG5K-ICG。但同样的道理, 图 2F 可证明 mPEG-NH₂ 与 ICG 连接成功。

[0054]. 由 PEG-ICGs 只有连接成功才能被检测到, 且出峰时间比 ICG-NHS 的出峰时间早, 说明连接成功, 且连接成功后的 PEG-ICGs 相较于 ICG-HNS 具有更好的水溶性。

[0055]. 2.产物光谱性质测试

[0056]. 对制备例 1-5 制备的 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 分别测试其光谱性质 (包括吸收光谱性质和发射光谱性质), 并与未被修饰的 ICG 进行比较。具体地操作如下:

[0057]. 使用 UV-Vis-NIR 光谱仪 cary 5000, 在光谱范围 500nm-1000nm 内分别测 ICG、PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 的光谱吸收强度。参见图 3 所示。其中加重连续曲线代表 PEG20000-ICG, 灰度连续线代表 ICG、深色加重虚线代表 PEG500-ICG、细虚线代表 PEG2000-ICG、单点划线代表 PEG5000-ICG, 双点划线代表 PEG10000-ICG。由图 3 可知, 被修饰的 PEG-ICGs 表现出与未修饰 ICG 基本一致的光谱吸收能力。

[0058]. 使用分光光度计 Spectronic 200, 设定激发光 808 nm, 分别测试 ICG、PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 在近红外I区 (650nm-900nm 范围内) 的相对荧光强度。测试结果参见图 4 所示。其中加重连续曲线代表 PEG20000-ICG, 灰度连续线代表 ICG、深色加重虚线代表 PEG500-ICG、细虚线代表 PEG2000-ICG、单点划线代表 PEG5000-ICG, 双点划线代表 PEG10000-ICG。由图 4 可知, 在近红外I区, 修饰产物 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、

PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 具有与未被修饰的 ICG 相当的良好
的荧光性质。可见, 修饰性 PEG 对 ICG 的改性, 并没有影响原 ICG
所具有的荧光性质。

[0059]. 使用光谱仪 NIRQuest512 和 CVH100/M, 设定激发光 808
nm, 分别测试 ICG、PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、
PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 在近红外II区(900nm-1200nm 范围
内) 的相对荧光强度。测试结果参见图 5 所示。其中加重连续曲线代
表 PEG20000-ICG, 灰度连续线代表 ICG、深色加重虚线代表
PEG500-ICG、细虚线代表 PEG2000-ICG、单点划线代表
PEG5000-ICG, 双点划线代表 PEG10000-ICG。由图 5 可知, 在近红
外II区, 修饰产物 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、
PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 具有与未被修饰的 ICG 相当的良好
的荧光性质。

[0060]. 通过以上光谱性质测试表明, 被 mPEG-NH₂ 所修饰的
ICG, 在近红外I区和II区具有良好的荧光性质, 且与 ICG 的吸收及发
射光谱性质一致。因此, PEG-ICGs 具有与 ICG 相当的近红外I区和II
区成像的应用价值。

[0061]. 3. 产物稳定性测试

[0062]. (1) 中性溶液下稳定性测试

[0063]. 分别取制备例 1-5 所制备的修饰产物 PEG500-ICG、
PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 溶
于 pH7.4 的 PBS 溶液中得到 5 个测试样品, 浓度为 20 微克/mL。PBS
缓冲溶液成分为 Na₂HPO₄ 和 NaH₂PO₄。在恒温箱中避光静置以上 5
个测试样品, 分别在 3h、6h、9h、12h、15h、18h、21h、24h 时, 测
试 5 个溶液样品的荧光强度, 并计算下降率。测试使用分光光度计
Spectronic 200, 设定激发光 808 nm。测试结果如图 6 所示。结果表
明, 除 PEG500-ICG 的荧光强度下降在 1~12 小时内略显较快外, 其
他 PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG

的荧光强度随时间的推移都处于稳定状态。由此说明，修饰产物 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 在接近中性环境中，稳定性较好。

[0064]. **(2) 体外血清稳定性测试**

[0065]. 分别取制备例 1-5 所制备的修饰产物 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 溶于 FBS (胎牛血清, 购自 SAILY BIO 的 SR01C-500) 中得到 5 个测试样品(浓度为 20 微克/mL)。

[0066]. 在恒温箱中静置以上 5 个测试样品, 分别在 3h、6h、9h、12h、15h、18h、21h、24h 时, 测试 5 个测试样品的荧光强度, 并计算下降率。测试使用分光光度计 Spectronic 200, 设定激发光 808 nm。测试结果如图 7 所示。结果表明, 5 个测试样品的荧光强度随时间的推移都处于非常稳定状态。由此说明, 修饰产物 PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG 在血清中, 稳定性较好。以上结果均表明, 修饰产物 PEG-ICGs 具有较好的实际应用前景, 具备商业化条件。

[0067]. **4. 血浆半衰期测试**

[0068]. 将 18 只健康的小鼠 (20 g 左右), 分为 6 组, 每组 3 只。6 组小鼠分别按组分中 ICG 的量 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (注射量为 $0.1\text{-}1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 均可, 注射液中含 ICG 浓度均为 20 微克/mL) 尾静脉注射 ICG、PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG、和 PEG20000-ICG。再分别于 3min、8min、30min、120min、240min、270min、600min 后, 通过近红外 II 区荧光成像, 通过血管荧光成像比较 ICG 及以上 5 种 mPEG-ICG 的血液清除速率。具体操作方法和计算按如下进行:

[0069]. 成像拍照条件: 由 808 nm 激光器激发, 900nm 长波通滤光片 FELH0900 将激发光与发射光分开, 由 SWIR 近红外相机成像拍照。

[0070]. 小鼠由动物麻醉系统 VIP3000 麻醉, 尾静脉注射五种 PEG-ICGs (PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG、和 PEG20000-ICG) 和 ICG 后, 分别在相同的时间点 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 7 min, 8 min, 12 min 对小鼠股静脉进行近红外 II 区荧光成像并拍照, 并参见后附的图 8 所示照片组。

[0071]. 计算 ICG 或 PEG-ICGs 在血浆中半衰期, 是将图像照片中的血管部位的荧光强度与腿部皮肤部分荧光强度进行比较求出比值, 以反映出 PEG-ICGs 与 ICG 的血液代谢时间。其中, ICG 组小鼠在注射后 3 min 后腿内侧静脉血管清晰可见, 8 min 左右血管部分的荧光信号消失, 计算得到 ICG 的 $T_{(1/2)} = 0.06421$ h。

[0072]. PEG500-ICG 组小鼠在注射后 3 min 后腿内侧静脉血管也是清晰可见, 12 min 左右荧光信号消失, 计算得到 PEG500-ICG 的 $T_{(1/2)} = 0.16121$ h。相比较 ICG 组小鼠而言, PEG500-ICG 组小鼠体内 PEG500-ICG 的代谢时间并没有非常地得到延长。

[0073]. PEG2000-ICG 组小鼠在注射后 135 min 左右血管处荧光信号消失, 计算得到 $T_{(1/2)} = 1.12731$ h。比单纯注射 ICG 和 PEG500-ICG 的血液滞留时间延长。

[0074]. PEG5000-ICG 组小鼠在注射后 240 min 左右血管处荧光信号消失, 计算得到 $T_{(1/2)} = 2.417$ h。比单纯注射 ICG、PEG500-ICG 和 PEG2000-ICG 的血液滞留时间延长。

[0075]. PEG10000-ICG 组小鼠在注射后 270 min 左右血管处荧光信号依然微弱可见, 计算得到 $T_{(1/2)} = 2.6667$ h。比单纯注射 ICG、PEG500-ICG、PEG2000-ICG 和 PEG5000-ICG 的血液滞留时间延长。

[0076]. PEG20000-ICG 组小鼠在注射后 5 h 左右荧光信号还能检测到, 可持续到 10 h。计算得到 $T_{(1/2)} = 6.2413$ h。比单纯注射 ICG、PEG500-ICG、PEG2000-ICG、PEG5000-ICG 和 PEG10000-ICG 的血液滞留时间延长。

[0077]. 由此说明，通过本发明方法修饰 ICG 得到的 PEG2000-ICG、PEG5000-ICG、PEG10000-ICG 和 PEG20000-ICG，相对未修饰的 ICG，其动物体血浆中停留的时间被显著地延长。从而通过对 ICG 的修饰，使其在血管造影、术中导航，肿瘤的检测与治疗等多方面的应用得以优化。

[0078]. 5. 在动物体内的 EPR 效应测试

[0079]. EPR 效应，即实体瘤的高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect)。具体而言指的是，相对于正常组织，某些尺寸的分子或颗粒更趋向于聚集在肿瘤组织的性质。主要原因是正常组织中的微血管内皮间隙致密、结构完整，大分子和脂质颗粒不易透过血管壁，而实体瘤组织中血管丰富、血管壁间隙较宽、结构完整性差，淋巴回流缺失，造成大分子类物质和脂质颗粒具有选择性高通透性和滞留性，这种现象被称作实体瘤组织的高通透性和滞留效应，简称 EPR 效应。衡量药物或诊断材料是否适于用于肿瘤的检测，一个重要的指标就是 EPR 效应。在此，对本发明制备的 PEG-ICGs 的 EPR 效应进行测试。测试方法如下：

[0080]. 准备 skov-3 肿瘤细胞(购自 EK-Bioscience)和体重为 300g/只的小鼠 2 只，按每只肿瘤 2000000 个细胞，皮下注射，3-4 周后，肿瘤大小至 5mm-10mm。将 2 只长有肿瘤的小鼠由动物麻醉系统 VIP3000 麻醉，以含 ICG 的量计（由于 ICG 和 PEG5000-ICG 分子量不同，此处 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以所含的 ICG 的量来计算；注射时，ICG 和 PEG5000-ICG 溶于 pH7.4 的 PBS 中），每只 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 尾静脉注射 ICG 和 PEG5000-ICG。注射 ICG 的小鼠在 3min、4h 和 6h 通过近红外 II 区荧光成像，注射 PEG5000-ICG 的小鼠在 3min、12h 和 48h 通过近红外 II 区荧光成像。成像拍照条件：由 808 nm 激光器激发，900nm 长波通滤光片 FELH0900 将激发光与发射光分开，由 SWIR 近红外相机成像拍照。所拍照片如图 9 所示。

[0081]. 其中，注射 PEG5000-ICG 的小鼠，3min 后，肿瘤处血管

非常清晰、12h 时肿瘤处荧光信号明显，存在很强的 EPR 效应，比注射 IEG 的小鼠 3min 时的成像更为清晰。注射 PEG5000-ICG 的小鼠 48h 后的成像接近注射 IEG 的小鼠 3min 的成像。由此可见，本发明的 PEG-ICGs 具有很强的 EPR 效应，可应用于对动物体肿瘤的检测。

[0082]. 本发明前述内容已证明，采用 mPEG-NH₂ 对 ICG 进行修饰改性，可显著延长 ICG 在血液中的半衰期，从而显著地延长 ICG 在血液内滞留时间，优化其在血管造影、术中导航、肿瘤的检测与治疗等多方面的应用性能。

[0083]. 同样地，相比 mPEG-NH₂，其他修饰性 PEG 具有类似于 mPEG-NH₂ 的性质，例如 mPEG、mPEG-SS、mPEG-SC、mPEG2-NHS、mPEG-SPA、mPEG-ALD、mPEG-MAL、HO-PEG-COOH、mPEG-b-PS、mPEG-b-PI、mPEG-b-PAN、mPEG-b-PCL、mPEG-b-PMMA、 α -hydroxyl-PEG- ω -amide、HO-PEG-OH、HO-PEG-NH₂、mPEG-carboxyl、mPEG-cyan 等，因此，在本发明中，也可以选用这些修饰性 PEG 对 ICG 进行修饰或改性。修饰反应的过程/条件可能因修饰性 PEG 分子结构或端部基团不同而有所差别，但对本领域技术人员来说，可理解地，基于本发明所记载的事实和产物性质测试所证实的内容，一些被其他修饰性 PEG 所修饰的 ICG 同样应具有与被 mPEG-NH₂ 修饰的 ICG 相近的半衰期和血液代谢性质、可在血液内停留较长时间，并且同样地与未修饰型 ICG 表现出相当/甚至更优的荧光性质和光谱吸收能力，能够应用于血管造影、术中导航、肿瘤检测等方面，优化 ICG 的应用性能。

[0084]. 本发明所描述的实施方式很容易有各种修改和替代形式，且其特定示例和方法已在附图中举例说明并在本文中进行了详细描述。然而，应当理解的是，本发明并不限制于所公开的特殊形式或方法，恰恰相反，所公开的实施方式旨在覆盖所有修改、等效形式和替代选择。

权 利 要 求 书

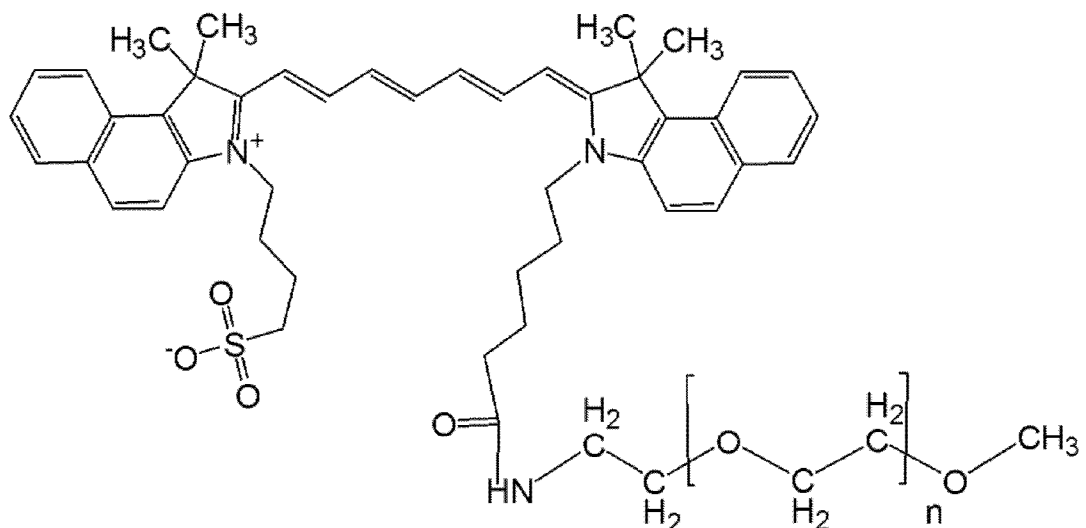
1. 一被修饰的吡啶菁绿，其特征是，吡啶菁绿分子结构中两个磺酸基的其中一个磺酸基被修饰性 PEG 基团所取代。

2. 根据权利要求 1 所述的被修饰的吡啶菁绿，其特征在于，所述修饰性 PEG 基团为选自 mPEG、mPEG-NH₂、mPEG-SS、mPEG-SC、mPEG2-NHS 、 mPEG-SPA 、 mPEG-ALD 、 mPEG-MAL 、 HO-PEG-COOH 、 mPEG-b-PS 、 mPEG-b-PI 、 mPEG-b-PAN 、 mPEG-b-PCL 、 mPEG-b-PMMA 、 α -hydroxyl-PEG- ω - amide 、 HO-PEG-OH、HO-PEG-NH₂、mPEG-carboxyl 及 mPEG- cyan 中任一种修饰性 PEG 缺失 H 所形成的基团。

3. 根据权利要求 1 所述的被修饰的吡啶菁绿，其特征在于，所述修饰性 PEG 基团的分子量取值范围是 500~20000。

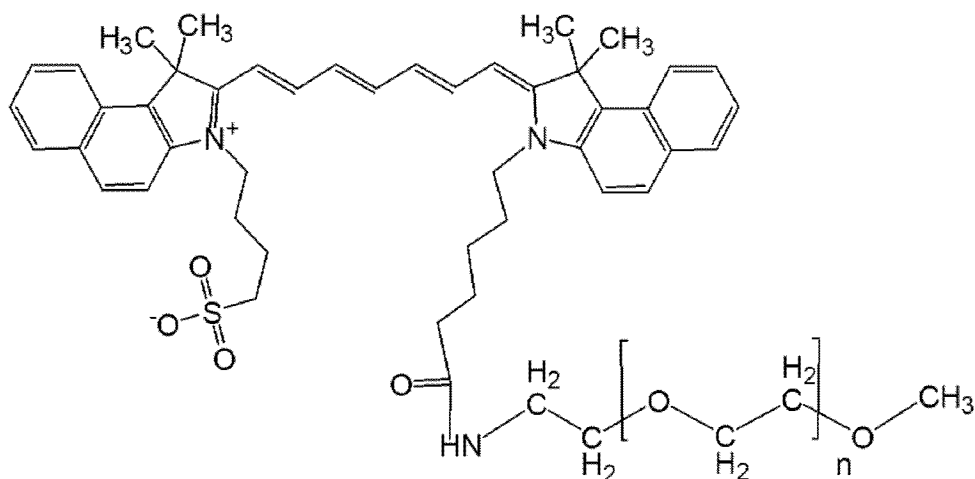
4. 根据权利要求 3 所述的被修饰的吡啶菁绿，其特征在于，所述修饰性 PEG 基团的分子量为 500、2000、5000、10000 或 20000。

5. 根据权利要求 1 所述的被修饰的吡啶菁绿，其特征在于，所述被修饰的吡啶菁绿的分子结构式表示如下：

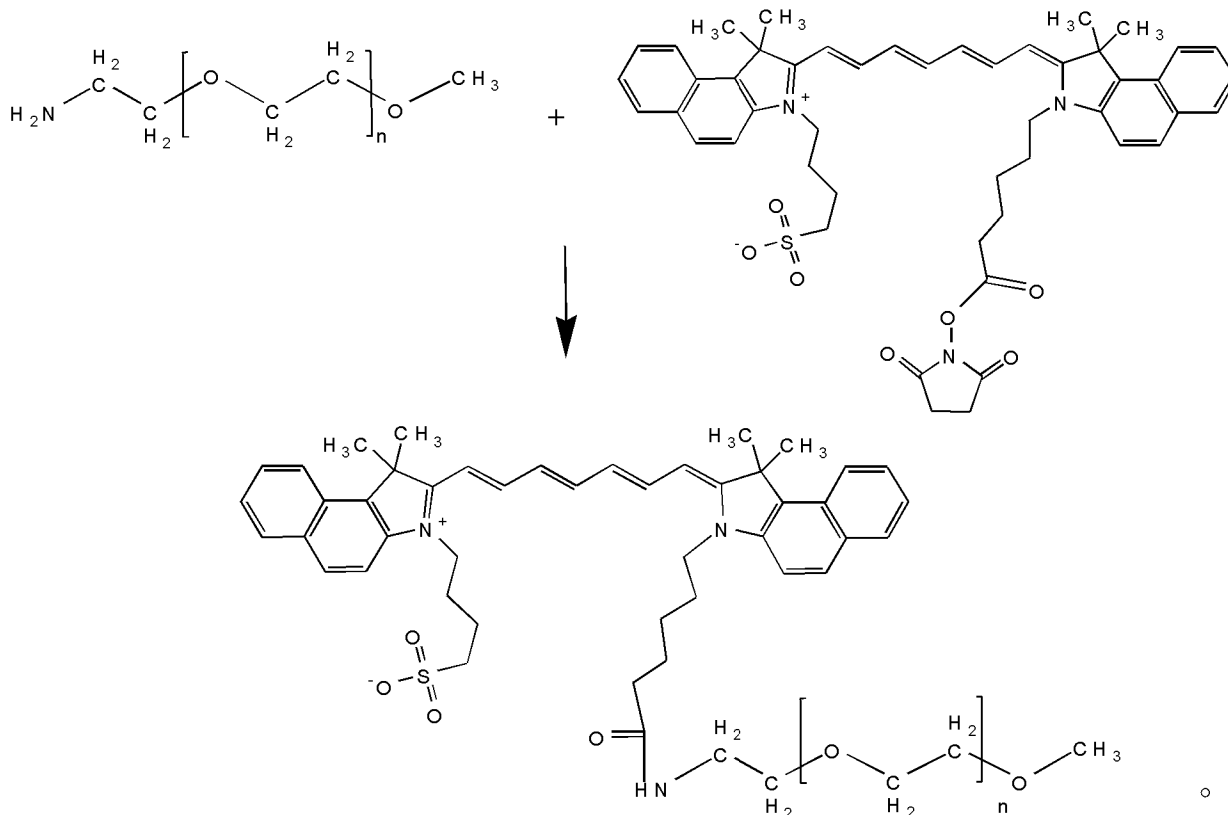


其中， $n=9\sim 450$ 。

6. 一种制备被修饰的吲哚菁绿的方法，所述被修饰的吲哚菁绿的分子结构式表示如下：



其中 $n=9\sim 450$ ；所述方法包括：采用被-CO-NHS 酯基所修饰的 ICG 衍生物和 mPEG-NH₂ 为反应物，mPEG-NH₂ 与该 ICG 衍生物中 -CO-NHS 发生酯取代反应，脱去一分子 N-羟基琥珀酰亚胺，制得被 mPEG-NH-修饰的新型 ICG（见结构式 C）；其反应过程表示为：



结构式 C

7、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述方法的反应条件为：所述被-CO-NHS 酯基修饰的 ICG 衍生物与 mPEG-NH₂ 以摩尔比 1：5 的比例相混合，在 pH =7.0~8.0 的 PBS 中，室温搅拌下反应 5~12h，制得一种被 mPEG-NH-修饰的新型 ICG。

8、一种被修饰性 PEG 修饰的新型 ICG，在血管造影、术中导航和肿瘤检测中的应用。

9、根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述修饰性 PEG 包括但不限于 mPEG、mPEG-NH₂、mPEG-SS、mPEG-SC、mPEG2-NHS、mPEG-SPA、mPEG-ALD、mPEG-MAL、HO-PEG-COOH、mPEG-b-PS、mPEG-b-PI、mPEG-b-PAN、mPEG-b-PCL、mPEG-b-PMMA、 α -hydroxyl-PEG- ω - amide、HO-PEG-OH、HO-PEG-NH₂、mPEG-carboxyl 及 mPEG- cyan 中的任一种。

10、根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述修饰性 PEG 分子量为 500~20000。

说明书附图

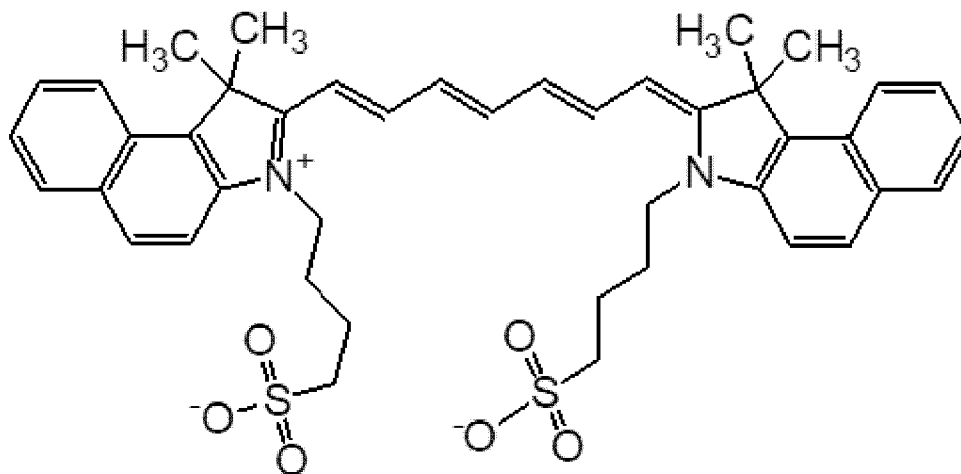


图 1A

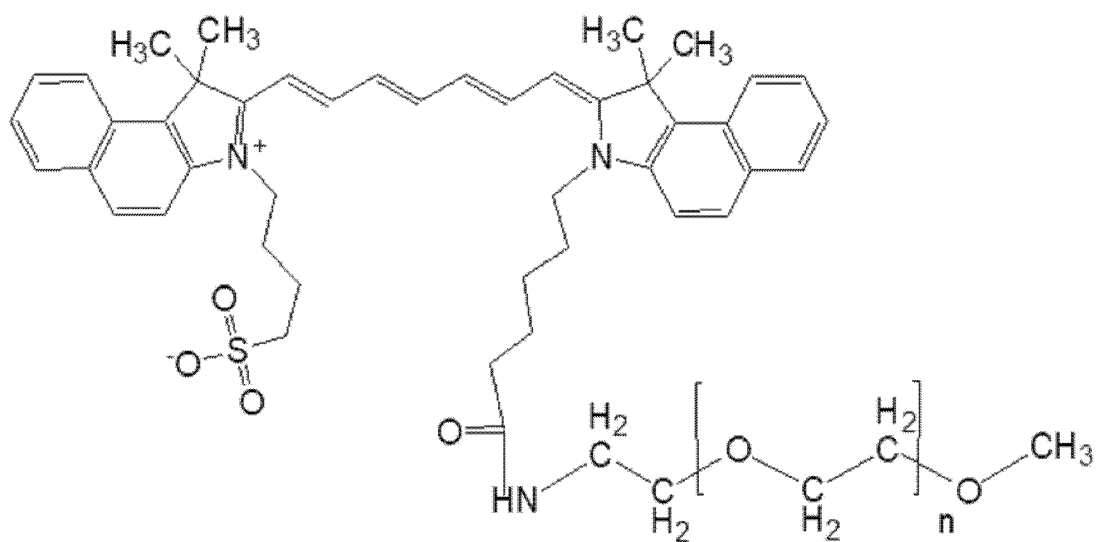


图 1B

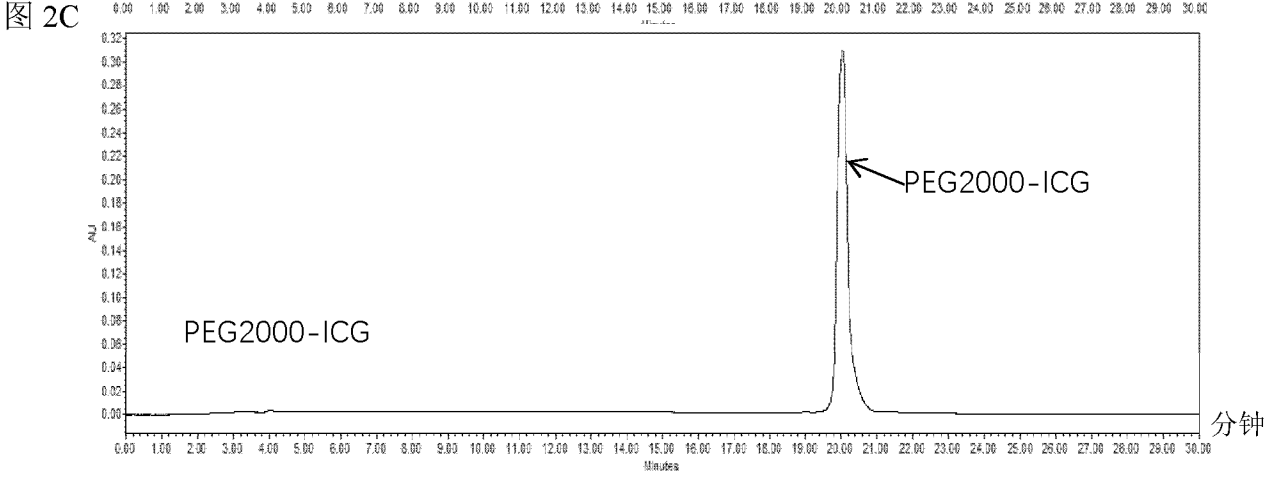
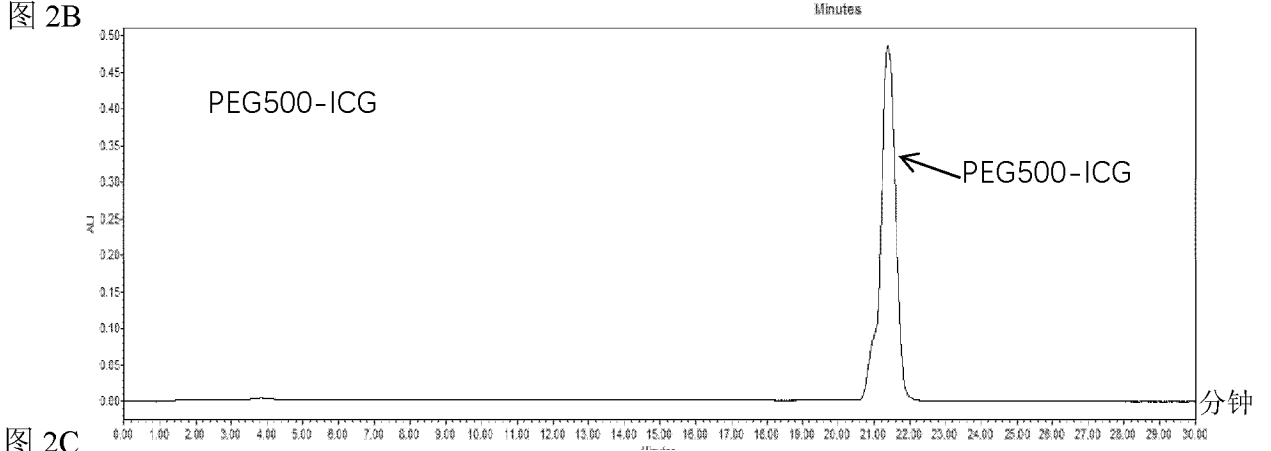
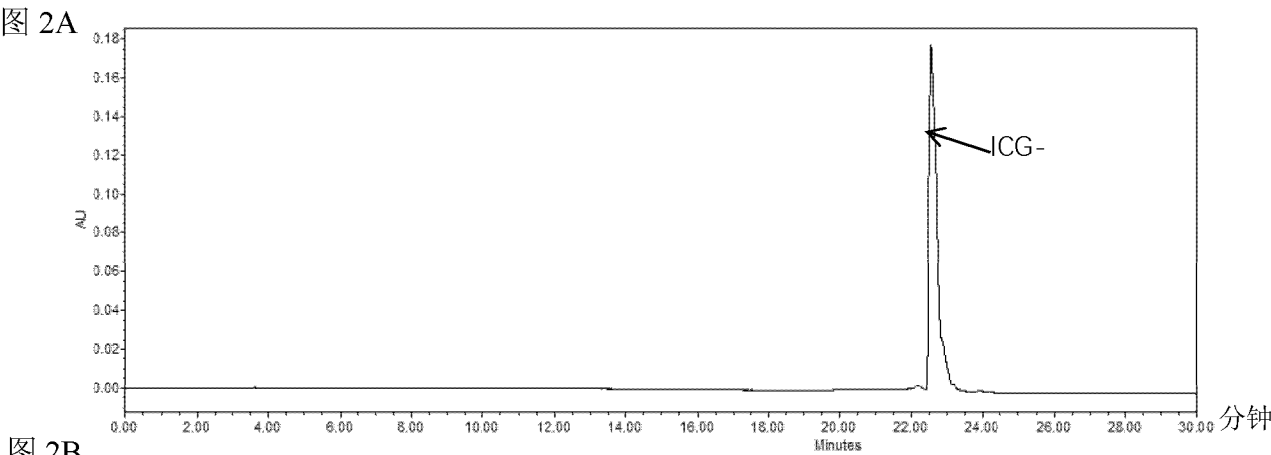


图 2D

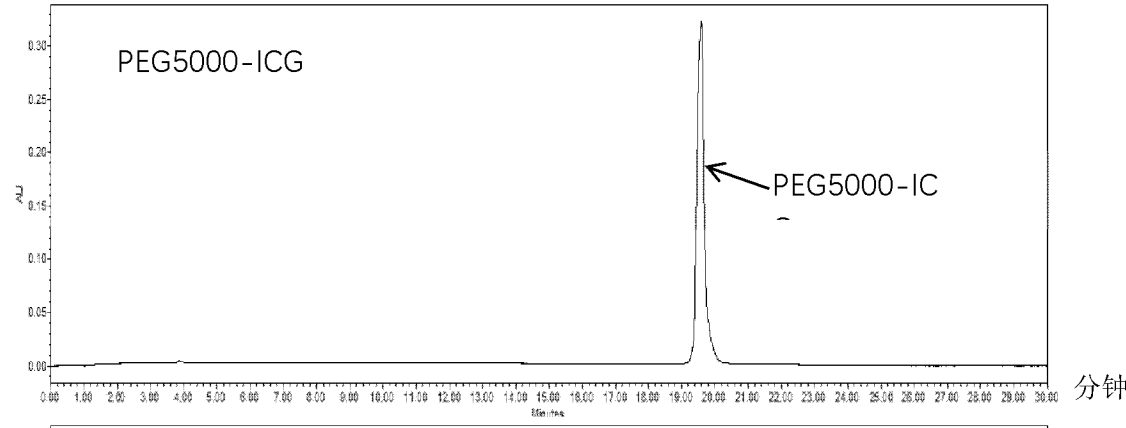


图 2E

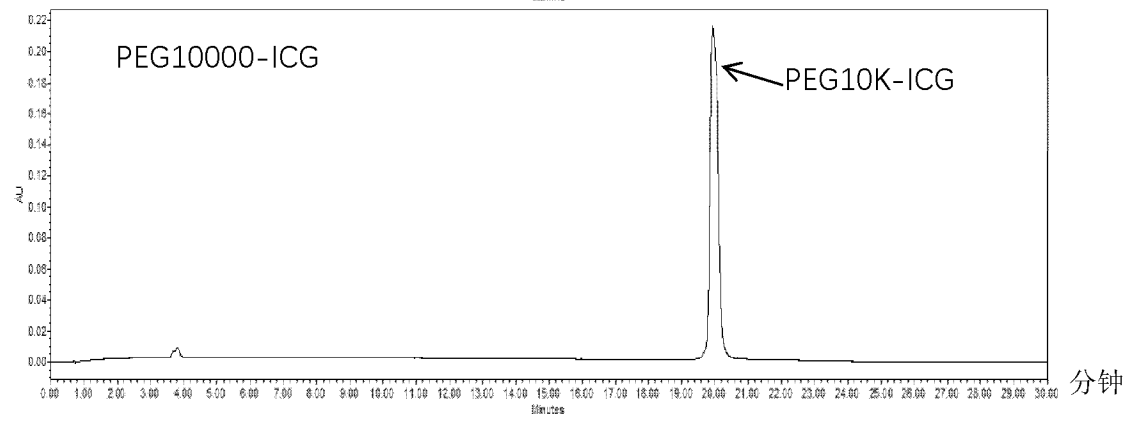
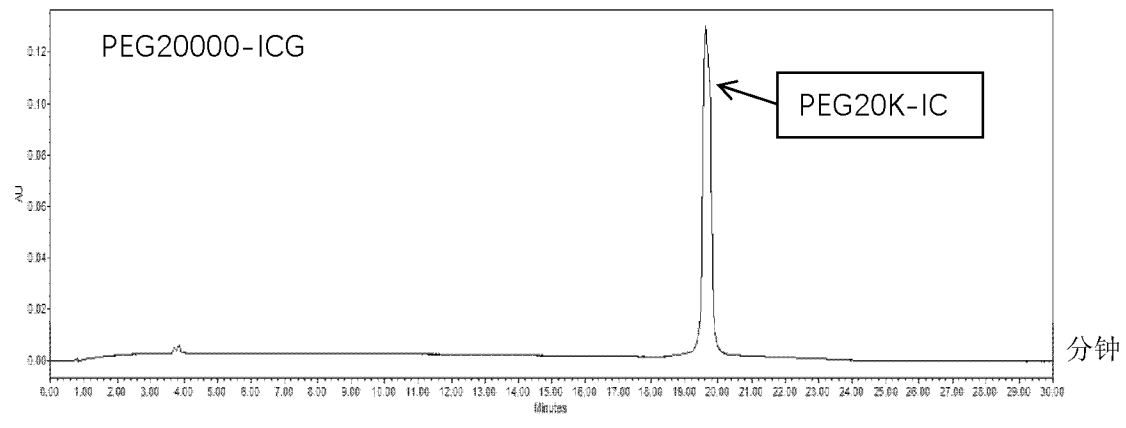


图 2F



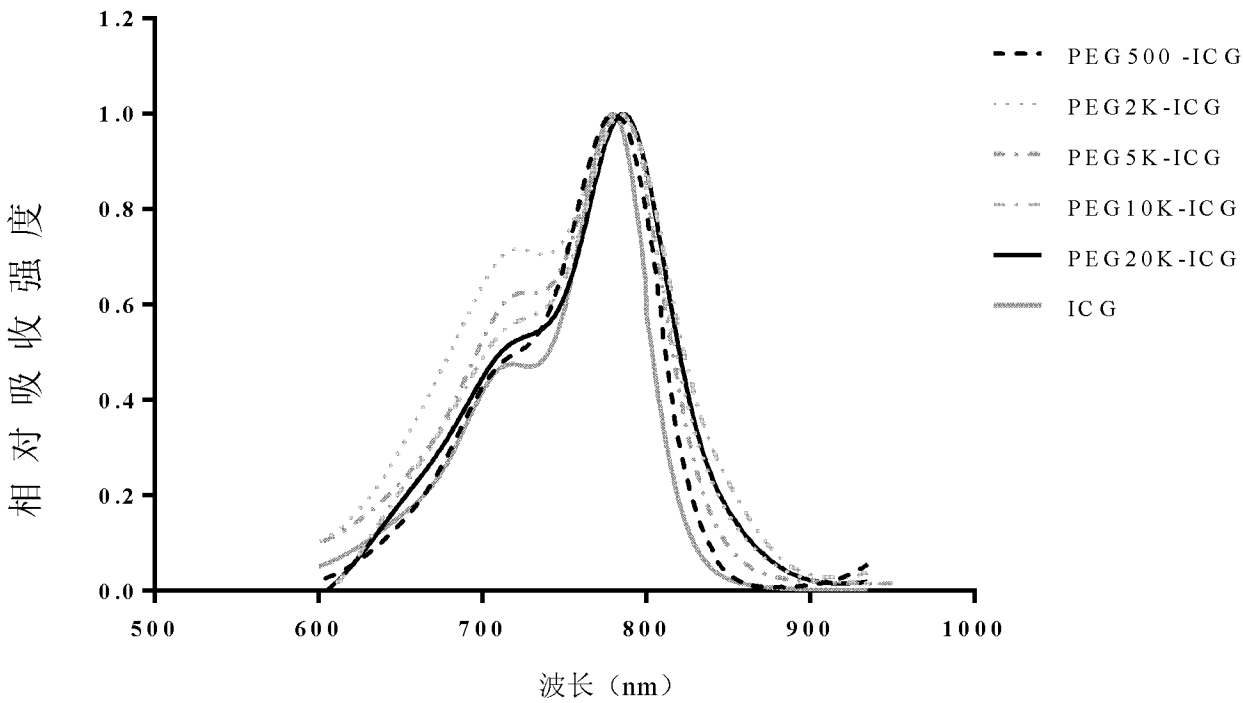
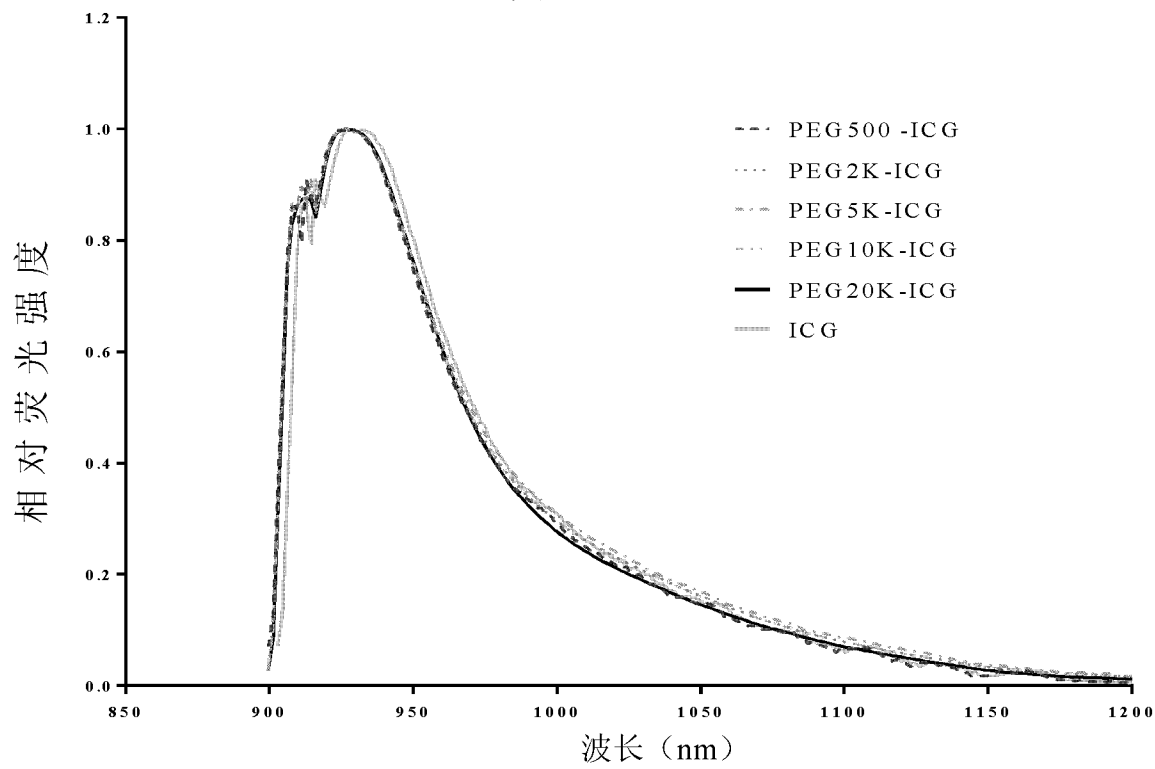
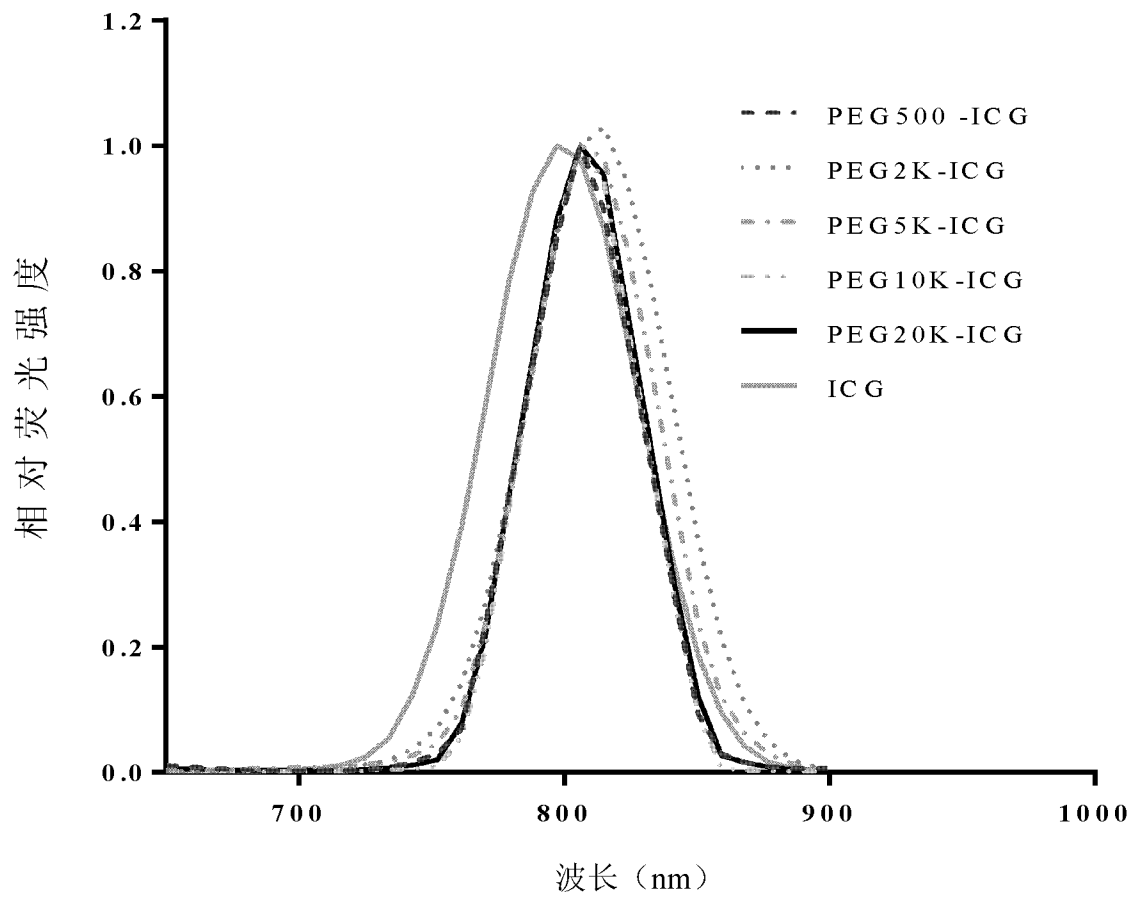


图 3



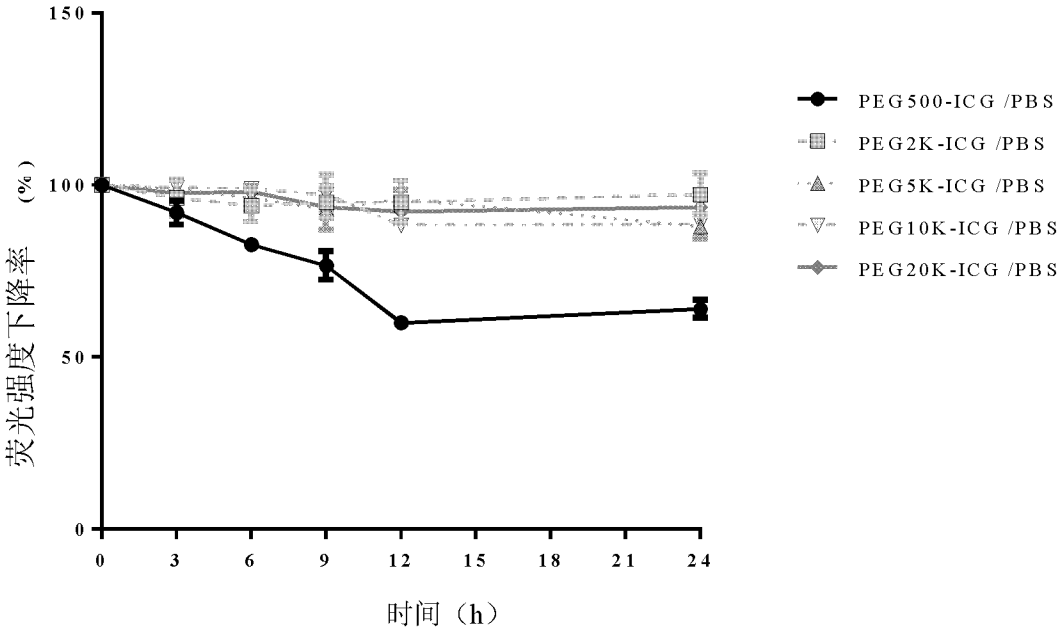


图 6

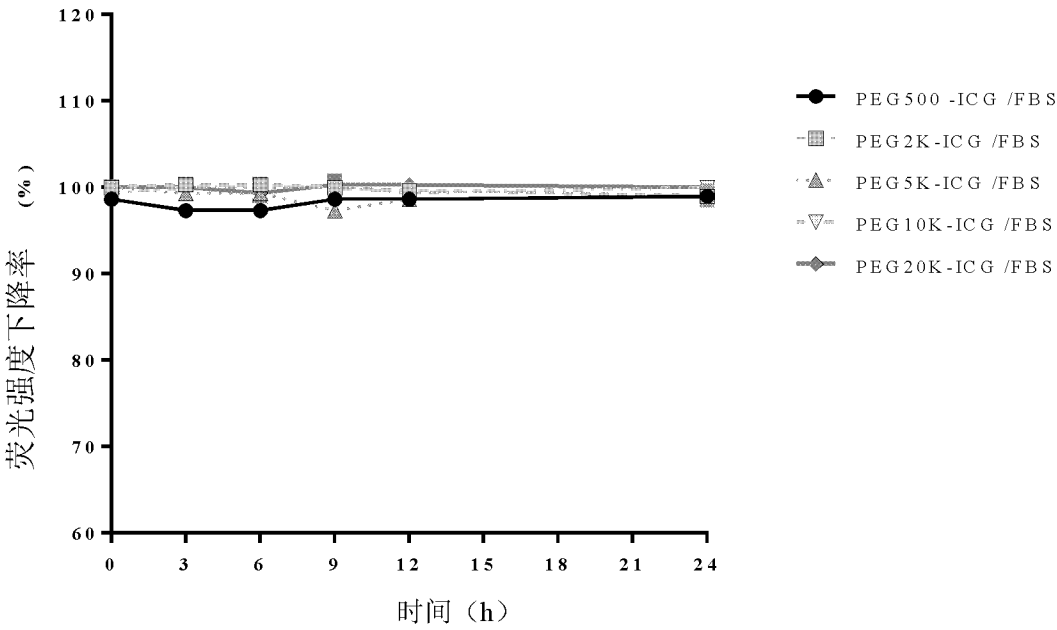


图 7

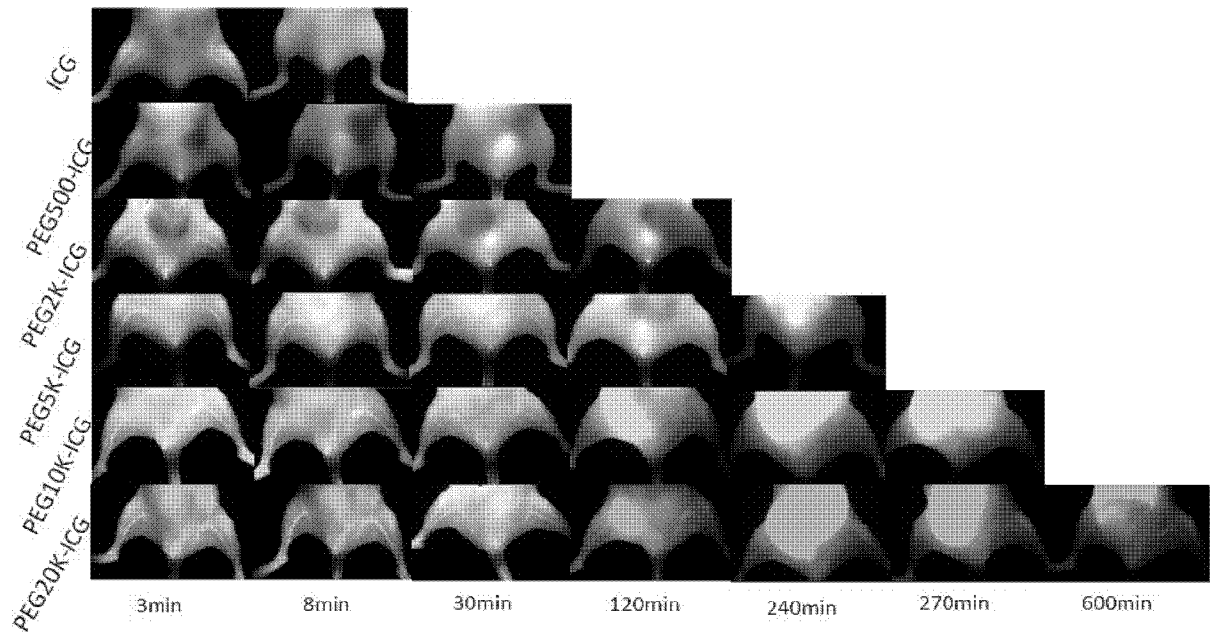


图 8

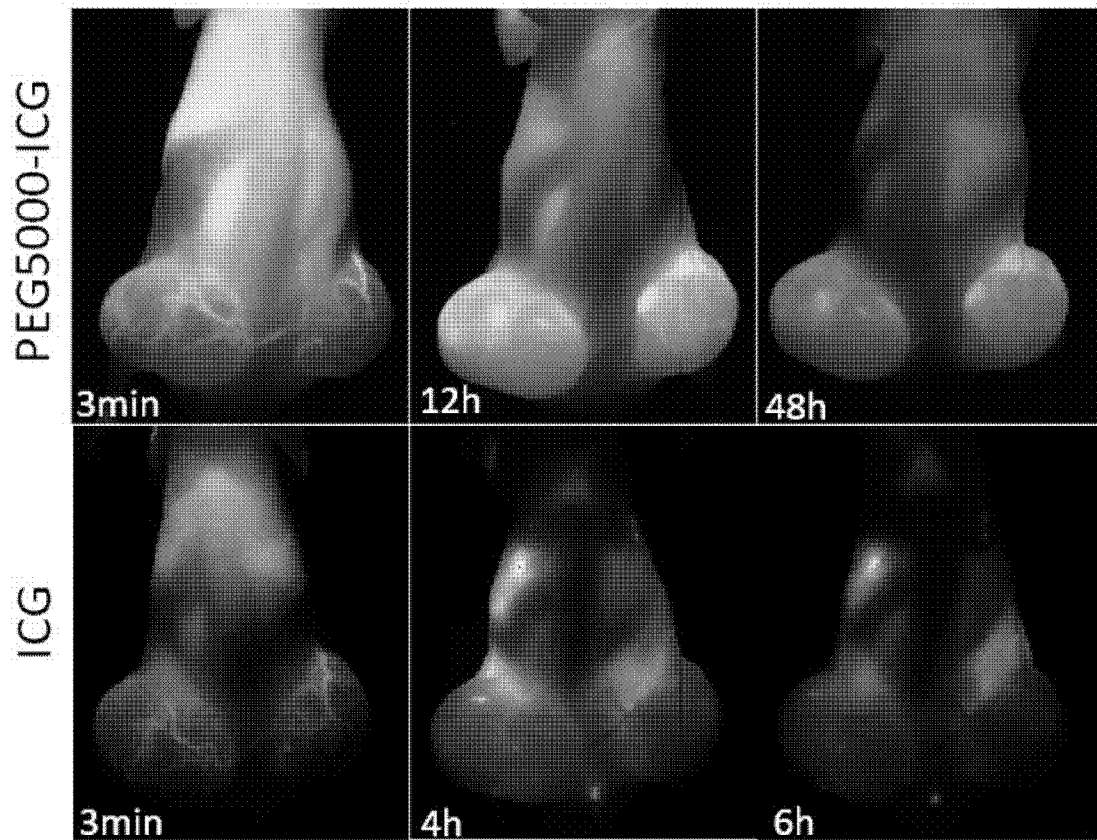


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/106522

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08G 65/334(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61K 47/60(2017.01)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)

C08G65/-, A61K49/-, A61K47/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, ISI Web of Knowledge, STN: 东北大学, 程震, 姜宏跃, 刘弘光, 索永宽, 呋喃菁绿, 聚乙烯醇, 血管造影, 荧光, PEG, Indocyanine Green, phthalocyanine green, ICG, polyethylene glycol, Cytostatic, Angiography, Fluorescence

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2014185312 A (CANON K. K.) 02 October 2014 (2014-10-02) description, page 14, paragraph [0032], page 30, paragraph [0123], page 31, [chem. 39] and pages 32-33, paragraphs [0128]-[0132], embodiments 2-4	1-10
A	CN 104548139 A (SHENZHEN INSTITUTE OF ADVANCED TECHNOLOGY) 29 April 2015 (2015-04-29) claim 1	1-10
A	CN 106729769 A (TIANJIN MEDICAL UNIVERSITY) 31 May 2017 (2017-05-31) claim 1	1-10
A	CN 108130069 A (SHENZHEN UNIVERSITY) 08 June 2018 (2018-06-08) claim 1	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

06 May 2019

Date of mailing of the international search report

20 May 2019

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

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/106522

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
JP	2014185312	A	02 October 2014	JP	6288970 B2	07 March 2018
CN	104548139	A	29 April 2015	None		
CN	106729769	A	31 May 2017	None		
CN	108130069	A	08 June 2018	None		

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/106522

A. 主题的分类 C08G 65/334(2006.01)i; A61K 49/00(2006.01)i; A61K 47/60(2017.01)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) C08G65/-, A61K49/-, A61K47/- 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNPAT, CNKI, WPI, EP0DOC, ISI Web of Knowledge, STN: 东北大学, 程震, 娄宏跃, 刘弘光, 索永宽, 咧咪菁绿, 聚乙烯醇, 血管造影, 荧光, PEG, Indocyanine Green, phthalocyanine green, ICG, polyethylene glycol, Cytostatic, Angiography, Fluorescence																	
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>X</td> <td>JP 2014185312 A (CANON KK) 2014年 10月 2日 (2014 - 10 - 02) 说明书第14页第[0032]段, 第30页第[0123]段, 第31页[化39]、第32-33页第[0128]-[0132]段实施例2-4</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104548139 A (深圳先进技术研究院) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 权利要求1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106729769 A (天津医科大学) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 权利要求1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 108130069 A (深圳大学) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 权利要求1</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	X	JP 2014185312 A (CANON KK) 2014年 10月 2日 (2014 - 10 - 02) 说明书第14页第[0032]段, 第30页第[0123]段, 第31页[化39]、第32-33页第[0128]-[0132]段实施例2-4	1-10	A	CN 104548139 A (深圳先进技术研究院) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 权利要求1	1-10	A	CN 106729769 A (天津医科大学) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 权利要求1	1-10	A	CN 108130069 A (深圳大学) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 权利要求1	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	JP 2014185312 A (CANON KK) 2014年 10月 2日 (2014 - 10 - 02) 说明书第14页第[0032]段, 第30页第[0123]段, 第31页[化39]、第32-33页第[0128]-[0132]段实施例2-4	1-10															
A	CN 104548139 A (深圳先进技术研究院) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 权利要求1	1-10															
A	CN 106729769 A (天津医科大学) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 权利要求1	1-10															
A	CN 108130069 A (深圳大学) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 权利要求1	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 2019年 5月 6日		国际检索报告邮寄日期 2019年 5月 20日															
ISA/CN的名称和邮寄地址 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		受权官员 郝小燕 电话号码 86-(10)-53962321															

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/106522

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)
JP	2014185312	A	2014年 10月 2日	JP 6288970 B2	2018年 3月 7日
CN	104548139	A	2015年 4月 29日	无	
CN	106729769	A	2017年 5月 31日	无	
CN	108130069	A	2018年 6月 8日	无	