

• 实验研究 •

β-环糊精聚乙二醇羟基喜树碱高聚物的合成及其载药量研究

孙勇兵¹, 黄花¹, 胡律江^{2*}, 郭晓秋², 胡志方^{3*}

1. 江西中医药大学 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006
2. 江西省中医药大学附属中医院, 江西 南昌 330004
3. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000

摘要: 目的 合成 β-环糊精聚乙二醇羟基喜树碱高聚物 (β-CD-PEG-HCPT) 并研究其载药量。方法 以 β-环糊精和 4-4' 联苯二磺酰氯为起始原料, 通过酰化反应、碘代反应、取代反应、酰化反应得到聚乙二醇-β-环糊精 (β-CD-PEG)。采用羟基喜树碱 (HCPT) 为起始原料, 利用乙酰基对 10 位羟基进行保护, 再利用二氯甲烷/甲醇/乙酰氯这种温和的系统脱去乙酰基, 得到乙酰羟基喜树碱甘氨酸酯 (Ac-HCPT-Gly)。β-CD-PEG 和 Ac-HCPT-Gly 反应得到目标产物 β-CD-PEG-HCPT。结果 合成了目标产物 β-CD-PEG-HCPT, 其结构通过 ¹H-NMR 确证。HCPT 的载药量是 4.3%。结论 改进了 β-CD-PEG-HCPT 的合成工艺, 操作简单、成本低、收率较高。

关键词: β-环糊精聚乙二醇羟基喜树碱高聚物; β-环糊精; 羟基喜树碱; 聚乙二醇; 高聚物

中图分类号: R913; R944 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2018)08-1859-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.08.001

Synthesis of polymer β-CD-PEG-HCPT and its drug loading capacity

SUN Yong-bing¹, HUANG Hua¹, HU Lü-jiang², GUO Xiao-qi², HU Zhi-fang³

1. National Engineering Research Center for Solid Preparation Technology of Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China
2. The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
3. Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 344000, China

Abstract: Objective To synthesize β-CD-PEG-HCPT and study its drug loading capacity. **Methods** β-Cyclodextrin (β-CD) and biphenyl-4,4'-disulfonyl chloride were used as the starting materials to synthesize β-CD-PEG by acylation reaction, iodination reaction, substitution reaction, and acylation reaction. HCPT was used as the starting materials, and 10-OH of HCPT was protected by the acetyl group and deprotected by the system of CH₂Cl₂/CH₃OH/ acetyl chloride to synthesize Ac-HCPT-Gly. β-CD-PEG and Ac-HCPT-Gly were reacted to synthesize the target compound β-CD-PEG-HCPT. **Results** The target compound β-CD-PEG-HCPT was synthesized, and the structure has been confirmed by ¹H-NMR. The drug loading of HCPT was 4.3%. **Conclusion** This study improves the synthesis process of β-CD-PEG-HCPT with simple operation, low cost, and high yield.

Key words: β-CD-PEG-HCPT; HCPT; β-CD; PEG; high molecular weight polymer

羟基喜树碱 (HCPT) 是从喜树 *Camptotheca acuminata* Decne. 中分离得到的具有抗癌活性的喹啉类生物碱。HCPT 通过选择性的抑制 DNA 拓扑异构酶 I, 使肿瘤细胞发生致死性的损伤, 对多种恶

性肿瘤具有良好的疗效^[1], 已经成为临床常用的抗癌药物之一。HCPT 结构的变化受 pH 值的影响较大, 当 pH 值小于 4 时, 羟基喜树碱大多以内酯环 (L-HCPT) 的形式存在, 当 pH 值大于 8 时, 以开

收稿日期: 2018-06-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360485、81560577); 江西省卫计委中医药课题 (2017Z014、2017A322); 江西省教育厅科研课题 (20181110)

作者简介: 孙勇兵 (1980—), 男, 安徽池州人, 副教授, 博士, 主要从事药剂学的研究。E-mail: yongbing_sun@hotmail.com

*通信作者 胡律江 (1986—), 男, 江西南昌人, 副教授, 博士, 主要从事中药制剂的研究。E-mail: hulvjian@mail@163.com

胡志方 (1959—), 男, 江西南昌人, 教授, 主要从事中药炮制研究。E-mail: huzhifang59@163.com

环的羧酸盐形式 (C-HCPT) 为主^[2]。HCPT 的两种结构都具有抗癌活性, 但内酯环型在体内的抗癌效果大概是羧酸盐型的 2 倍, 两种结构在人体内易发生相互转化, 这严重限制了 HCPT 的疗效和临床应用^[3-5]。 β -环糊精 (β -CD) 和聚乙二醇 (PEG) 通过半胱氨酸形成的线性高分子聚合物 β -CD-PEG, 具有很好的水溶性和较低的毒性, 能够和多种小分子药物自组装成粒径小于 100 nm 的纳米粒, 已经成为抗癌药物靶向给药的重要载体^[6]。

本研究拟将 HCPT 的 20-羟基通过化学键与 β -CD-PEG 结合在一起, 形成含药的高分子聚合物 β -CD-PEG-HCPT, β -CD-PEG-HCPT 能够在水性介质中自组装成纳米粒, 通过控制纳米粒的粒径, 利用 EPR 效应实现聚合物纳米粒在肿瘤部位的靶向分布, 从而降低 HCPT 的副作用, 同时提高 HCPT 的水溶性和稳定性。本研究首先合成了聚合物 β -CD-PEG-HCPT, 并利用核磁和质谱进行了结构验证, 且测定了 HCPT 的载药量。

1 仪器和试剂

Waters 2487 型制备液相色谱仪 (美国 Waters 公司); LGJ-20F 型真空冷冻干燥机 (北京松源华兴科技发展有限公司); D2010W 型电动搅拌器 (上海越众仪器设备有限公司); 集热式恒温加热磁力搅拌器 (郑州予华仪器制造有限公司); Micro Pure 超纯水仪 (Thermo Fisher Scientific); 再生纤维素透析袋 (上海原叶生物科技有限公司)。

β -环糊精 (相对分子质量 1140.5, 上海紫一试剂厂, 产品批号 20161204); 4-4'联苯二磺酰氯 [梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司]; *N,N*-二异丙基乙酰胺、碘化钾、吡啶、无水碳酸钠和 4-二甲氨基吡啶均由西陇科学股份有限公司提供; 四氟乙烯、*L*-半胱氨酸、二甲基亚砷均由国药集团化学试剂有限公司提供; 聚乙二醇-双丙酸琥珀酰亚胺酯 (上海炎怡科技有限公司); 羟基喜树碱 [产品批号 CL-170202, 质量分数 $\geq 99.0\%$, 凯立德生物医药技术 (上海) 有限责任公司]; Boc-甘氨酸 [吉尔生化 (上海) 有限公司]; 所购买的试剂均为色谱纯或分析纯。

2 方法和结果

2.1 β -CD-PEG 高分子聚合物的合成

2.1.1 联苯-4,4'二磺酸 β -环糊精酯的合成 取干燥的 β -CD (13.0 g, 11.45 mmol) 置 500 mL 三口烧瓶中, 加入 300 mL 无水吡啶, 搅拌使其充分溶解; 在氩气条件下, 缓慢加入 4-4'联苯二磺酰氯 (3.6 g,

10.25 mmol) (30 min 内分 4 次加入), 在 60 °C 条件下反应 5 h。反应结束后减压蒸去溶剂得到粗产物, 流动相是甲醇-水 (20:80), 制备液相分离纯化得到联苯-4,4'二磺酸 β -环糊精酯, 收率 35.3%。ESI-MS m/z : 1 411.2 [M-H]⁻, 1 429.3 [M+H₂O-H]⁻。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.19~8.13 (m, 4H), 8.09 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.90 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 4.98~4.91 (m, 5H), 4.85 (d, $J=3.4$ Hz, 1H), 4.77 (d, $J=3.3$ Hz, 2H), 4.41 (q, $J=10.3$ Hz, 2H), 4.19~4.15 (m, 1H), 4.09 (d, $J=11.6$ Hz, 1H), 3.95 (d, $J=11.7$ Hz, 1H), 3.94~3.90 (m, 1H), 3.87 (d, $J=11.5$ Hz, 2H), 3.79 (dd, $J=12.2, 5.6$ Hz, 1H), 3.71~3.65 (m, 6H), 3.63~3.56 (m, 4H), 3.55~3.45 (m, 4H), 3.41~3.31 (m, 10H), 3.26~3.21 (m, 2H), 3.20~3.15 (m, 2H), 3.10 (d, $J=4.0$ Hz, 2H), 3.00 (dd, $J=9.6, 2.9$ Hz, 1H), 2.92 (d, $J=9.6$ Hz, 1H)。¹³C-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 163.52, 143.22, 143.05, 137.67, 135.75, 128.77, 128.46, 127.64, 127.19, 127.13, 126.81, 102.86, 102.37, 102.13, 102.01, 100.99, 83.38, 83.34, 82.38, 81.09, 80.52, 79.20, 74.44, 73.41, 73.31, 73.20, 73.17, 72.83, 72.81, 72.76, 72.74, 72.67, 72.56, 72.46, 72.40, 72.35, 72.24, 72.02, 70.52, 70.13, 69.45, 61.74, 60.63, 59.60, 59.52, 59.34, 40.43, 40.32, 40.18, 40.04, 39.90, 39.76, 39.62, 39.48。

2.1.2 双碘- β -环糊精 (di-I- β -CD) 的合成 精密称取联苯-4,4'二磺酸 β -环糊精酯 (5.2 g, 3.68 mmol) 溶解于 100 mL 无水 DMF 溶液中, 充分搅拌溶解后, 在氩气条件下加入干燥的碘化钾 (16.8 g, 0.1 mol)。在 80 °C 条件下搅拌回流 4 h。反应完毕后, 溶液冷却至室温, 滤过, 除去多余的碘化钾, 减压蒸去溶剂得到粗产物, 在冰浴条件下往粗品中加入 58 mL 水和 5.8 mL 四氯乙烯溶液析出黄色固体, 滤过, 得到 di-I- β -CD, 收率为 87.5%。¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 4.86 (dq, $J=23.3, 4.5, 4.1$ Hz, 7H), 3.77~3.74 (m, 1H), 3.69~3.62 (m, 13H), 3.58~3.51 (m, 7H), 3.43~3.36 (m, 14H), 3.31 (td, $J=6.4, 3.2$ Hz, 6H), 3.21~3.18 (m, 1H)。¹³C-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 162.81, 120.39, 102.68, 102.54, 102.43, 102.07, 86.40, 86.35, 82.29, 81.98, 81.73, 81.66, 73.56, 73.46, 73.22, 73.17, 72.92, 72.87, 72.84, 72.78, 72.75, 72.72, 72.70, 72.66, 72.64, 72.51,

72.49, 72.42, 69.93, 60.51, 60.43, 60.36, 37.27, 36.29, 31.27。ESI-MS m/z : 1343.5 $[M-H]^-$ 。

2.1.3 L-半胱氨酸-β-环糊精 (L-Cys-β-CD) 的合成 将70 mL脱气的0.1 mol/L碳酸钠缓冲溶液加入到250 mL圆底烧瓶中,再加入L-半胱氨酸(0.85 g, 7.02 mmol)反应得到di-I-β-CD,在搅拌条件下加入di-I-β-CD(4.37 g, 3.23 mmol),80 °C下搅拌回流5 h,直至溶液澄清。反应完毕后,反应溶液用透析袋(相对分子质量为500~1 000)在5 L去离子水中透析1 d(每隔1 h换一次去离子水),透析后溶液真空干燥得到白色产物,收率为54%。¹H-NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ : 6.00 (s, 7H), 5.86 (s, 6H), 5.09 (s, 1H), 4.86 (d, $J=9.1$ Hz, 2H), 4.81 (d, $J=8.9$ Hz, 4H), 3.90 (dt, $J=26.9, 11.9$ Hz, 2H), 3.78 (t, $J=10.2$ Hz, 1H), 3.74 (s, 12H), 3.69 (qd, $J=15.5, 10.0, 8.9$ Hz, 7H), 3.62 (s, 14H), 3.58~3.38 (m, 19H), 3.31 (t, $J=9.0$ Hz, 8H), 3.22 (dq, $J=15.9, 8.7$ Hz, 2H), 3.10 (dt,

$J=34.5, 13.2$ Hz, 3H), 2.64~2.53 (m, 2H)。¹³C-NMR(600 MHz, DMSO- d_6) δ : 102.82, 102.70, 102.57, 102.05, 86.53, 83.80, 83.29, 82.40, 74.03, 73.66, 73.54, 73.35, 73.24, 73.17, 73.03, 72.75, 72.67, 70.12, 68.99, 61.03, 60.77, 54.67, 54.58, 40.43, 35.49, 33.78, 23.82。ESI-MS m/z : 1329.6 $[M-H]^-$ 。

2.1.4 聚乙二醇-β-环糊精 (β-CD-PEG) 的合成 取L-Cys-β-CD(2.3 g, 1.72 mmol)置50 mL圆底烧瓶中,加入聚乙二醇-双丙酸琥珀酰亚胺酯(PEG-DISPA)(5.8 g, 1.71 mmol),在氩气条件下加入40 mL干燥的二甲基亚砜,搅拌10 min后,加入0.7 mL干燥的*N,N*-二异丙基乙胺,反应144 h。反应结束后,反应溶液用透析袋(相对分子质量为10 000)在5 L去离子水中透析24 h,每隔1 h换一次去离子水,透析后溶液真空冷冻干燥得到6.4 g白色产物。¹H-NMR(400 MHz, CD₃Cl) δ : 4.80 (s, 5H), 3.86 (s, 1H), 3.66 (d, $J=5.7$ Hz, 1H), 3.63 (s, 13H)。β-CD-PEG的合成路线图见图1。

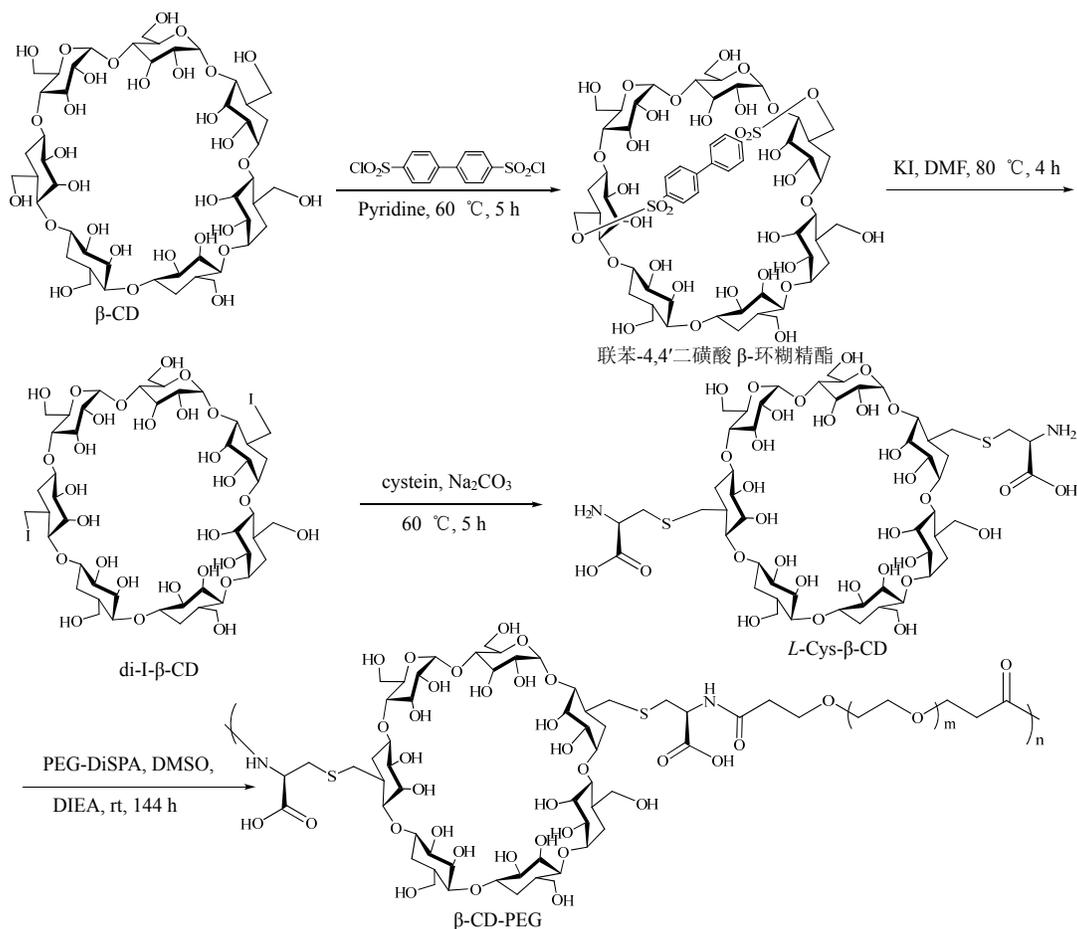


图1 β-CD-PEG的合成路线
Fig. 1 Synthetic route of β-CD-PEG

2.2 HCPT 的结构修饰

2.2.1 HCPT 结构中 10 位羟基的保护 取 HCPT (125 mg, 0.34 mmol) 悬浮于 50 mL 干燥甲苯中, 加入乙酸酐溶液 (0.53 mL, 0.68 mmol) 和吡啶溶液 0.5 mL, 搅拌回流约 5.5 h。反应结束后, 减压蒸去溶剂得粗品, 粗品用 200 mL 甲醇进行重结晶, 得淡黄色固体即为乙酰化的羟基喜树碱 Ac-HCPT, 收率为 95%。ESI-MS m/z : 405.2 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.66 (d, $J=1.4$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J=9.1$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J=2.6$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J=9.1, 2.6$ Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.27 (s, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.88 (dp, $J=19.4, 7.2$ Hz, 2H), 1.29~1.21 (m, 3H), 0.93~0.82 (m, 3H)。 ^{13}C -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 172.90, 169.71, 157.23, 152.97, 150.46, 149.46, 146.32, 145.78, 131.63, 130.86, 130.81, 128.75, 126.53, 119.67, 119.58, 97.15, 72.84, 65.71, 50.67, 40.52, 39.62, 31.75, 30.77, 29.50, 29.48, 29.47, 29.45, 29.17, 22.56, 21.38, 14.42, 8.25。

2.2.2 乙酰羟基喜树碱甘氨酸酯 (Ac-HCPT-Gly) 的制备 室温, 将 Boc-甘氨酸 (0.9 g, 4.7 ml) 溶

解在 350 mL 干燥二氯甲烷溶液中, 在冰浴条件下加入 Ac-HCPT (0.637 g, 1.57 mmol)、*N,N*-二异丙基碳二亚胺 (0.75 mL, 4.7 mmol) 和 4-二甲氨基吡啶 (382 mg, 3.13 mmol), 在室温下搅拌反应 16 h, 反应完毕后, 反应液用 pH 2.0 的水溶液萃取, 收集有机层, 用 $MgSO_4$ 干燥, 减压蒸馏干后, 再用甲醇重结晶得亮黄色固体, 将 Ac-HCPT-Gly(Boc) 溶解在二氯甲烷 10 mL 和三氟乙酸 10 mL 混合溶液中, 在室温下搅拌反应 1 h, 减压蒸去溶剂, 残渣用二氯甲烷和乙醚重结晶得黄色固体, 即为 Ac-HCPT-Gly, 收率为 50%。ESI-MS m/z : 462.3 $[M-H]^-$ 。 1H -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.28 (d, $J=7.6$ Hz, 2H), 6.87 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 4.30 (h, $J=6.7$ Hz, 2H), 3.83~3.74 (m, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.66 (d, $J=5.8$ Hz, 1H), 3.33 (d, $J=0.7$ Hz, 2H), 1.34 (s, 3H), 1.24 (s, 2H), 1.11 (d, $J=6.6$ Hz, 3H)。 ^{13}C -NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 168.6, 166.6, 156.5, 152.2, 147.9, 146.2, 144.3, 131.9, 130.6, 129.7, 128.8, 128.6, 128.0, 127.8, 119.0, 95.0, 77.6, 66.6, 50.5, 47.9, 30.2, 15.9, 7.9。Ac-HCPT-Gly 的合成路线见图 2。

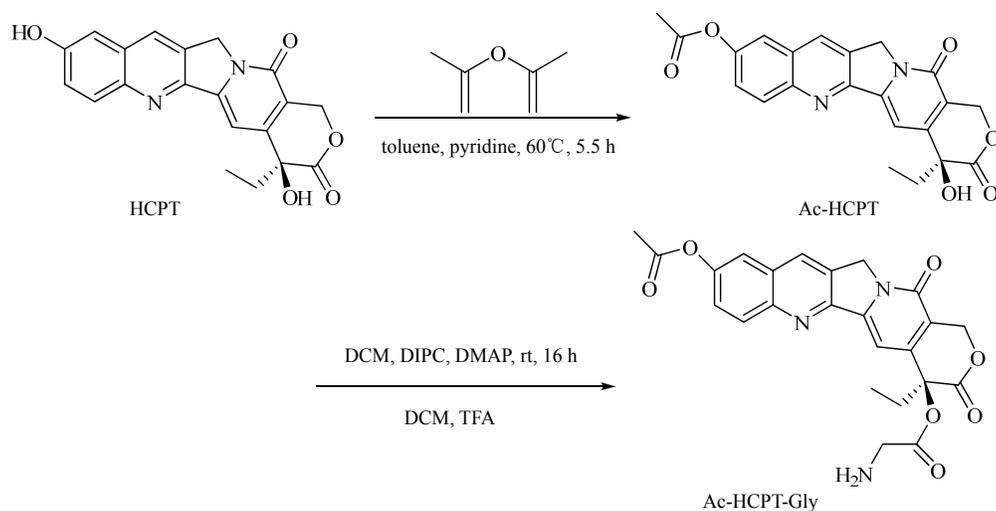


图 2 Ac-HCPT-Gly 的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of Ac-HCPT-Gly

2.3 β -CD-PEG-HCPT 高聚物的合成

取化合物 β -CD-PEG (1.37 g) 溶解在无水 DMSO (136 mL) 中, 溶液搅拌 10 min 后加入 Ac-HCPT-Gly (419 mg)、*N,N*-二异丙基乙胺 (0.092 mL)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (172 mg, 0.903 mmol) 及 *N*-羟基琥珀酰亚胺 (76 mg, 0.662

mmol), 在室温下反应 15 h。反应完毕后, 粗产物用 500 mL 乙醚溶液进行沉淀, 移除乙醚, 沉淀溶解在 100 mL 超纯水中, 不溶解的物体用 0.2 μ m 滤膜滤过, 滤液用截留量为 25 000 的透析袋透析 10 h (每 60 分钟换一次水), 冷冻干燥获得淡黄色固体 β -CD-PEG-HCPT-Ac。

称取 β -CD-PEG-HCPT-Ac 50.5 mg 置于二氯甲烷-甲醇 (1:1) 混合溶液中, 在冰浴条件下加入乙酰氯 50 μ L, 自然恢复至室温, 搅拌过夜, 脱去 HCPT 上的乙酰基。反应结束后, 粗产物在截留量为 25 000 的透析袋中透析 24 h, 得到淡黄色固体, 即为 β -CD-PEG-HCPT。¹H-NMR (600 MHz,

DMSO-*d*₆) δ : 8.17 (s, 1H), 5.75 (s, 2H), 4.83 (s, 1H), 4.48 (s, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.67~3.56 (m, 2H), 3.49 (s, 7H), 3.45~3.38 (m, 1H), 3.37 (s, 17H), 3.34~3.28 (m, 2H), 2.96 (s, 1H), 2.73 (d, *J*=17.2 Hz, 1H), 2.43~2.38 (m, 1H)。 β -CD-PEG-HCPT 的合成路线见图 3。

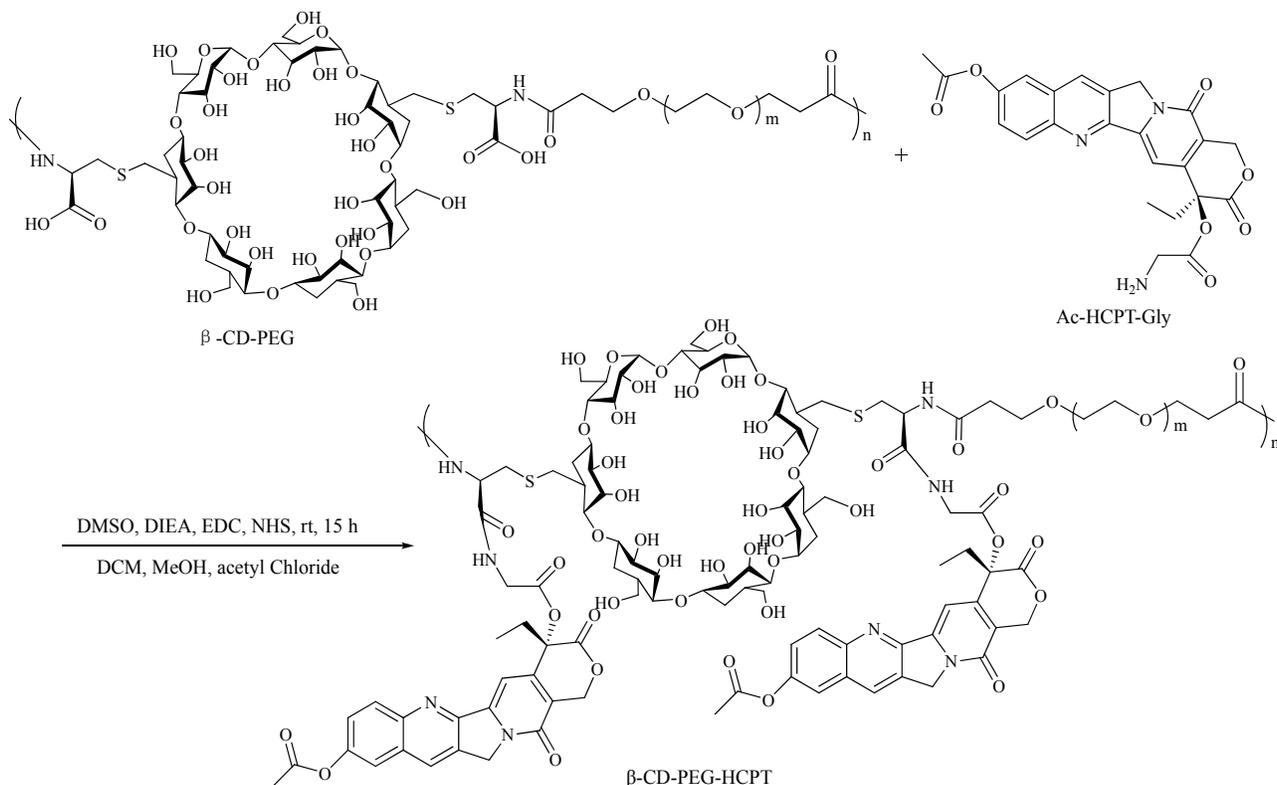


图3 β -CD-PEG-HCPT 高聚物的合成路线
Fig. 3 Synthetic route of β -CD-PEG-HCPT

2.4 β -CD-PEG-HCPT 载药量的测定

2.4.1 色谱条件 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, SPD-M20A DAD 检测器, SIL-20A 自动进样器, LabSolution 色谱工作站 (日本岛津公司); Perkin Elmer C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水 (45:55); 体积流量: 1.0 mL/mL; 检测波长: 266 nm; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。

2.4.2 测定方法 取 β -CD-PEG-HCPT 适量, 精密称定, 用水制备成 10 mg/mL 的溶液, 在 1 500 r/min 下搅拌 1 h, 精密量取上述配制的溶液, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液稀释至浓度为 1 mg/mL, 在 37 $^{\circ}$ C 下震荡, 3 h 后量取溶液适量, 用 17% 磷酸溶液配制成浓度为 0.1 mg/mL, 在恒温下震荡 3 h 后, 利用高效液相色谱测定 HCPT 的量。经过计算, HCPT 的

载药量是 4.3%。

载药量=HCPT 的质量/ β -CD-PEG-HCPT 树脂的质量

3 讨论

3.1 关于 β -CD-PEG-HCPT 高聚物的合成

虽然文献中已经报道了 β -CD-PEG 的合成, 本研究在合成过程中改变了一些反应的温度和反应时间, 以提高目标产物的收率。还对样品的后处理方法进行了调整, 利用制备液相色谱分离纯化联苯-4,4'-二磺酸 β -环糊精酯, 和文献报道的结晶法相比, 明显提高了收率和纯度; 利用透析法纯化 L-Cys- β -CD, 简化了操作工艺。

HCPT 10 位羟基的活性明显高于 20 位的羟基, 所以必须将 10 位羟基进行保护。在前期实验中, 采用烯丙基和苄基保护 10 位羟基, 虽然烯丙基和苄基

与羟基形成的酯键很稳定,具有很好的保护作用,但是引入烯丙基的反映收率低和苄基脱去对 HCPT 母环有影响。最终本研究采用乙酰基保护 10 位羟基,利用二氯甲烷/甲醇/乙酰氯这种温和的系统脱去乙酰基,可以避免对 β -CD-PEG-HCPT 结构的破坏,这是本合成研究最大的创新点。

3.2 关于载药量的测定

在前期探索性研究中,考察了酸和碱的加入量、振荡时间和温度等因素对载药量测定的影响,优化出本研究中最优的测定条件。本研究合成的高分子材料中 HCPT 的载药量是 4.3%,适合进行下一步自组装纳米粒的制备。

参考文献

- [1] Yang L, Hong J, Di J, *et al.* 10-Hydroxycamptothecin (HCPT) nanosuspensions stabilized by mPEG₁₀₀₀-HCPT conjugate: high stabilizing efficiency and improved antitumor efficacy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 3681-3695.
- [2] Tsakalozou E, Horn J, Leggas M. An HPLC assay for the lipophilic camptothecin analog AR-67 carboxylate and lactone in human whole blood [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(10): 1045-1051.
- [3] 张尚锁. HCPT 两种构型在 H 肝癌模型小鼠体内分布及其与抗肿瘤药效相关性的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [4] 蒋俊毅, 方 芸, 张海霞. HPLC-FLD 法测定豚鼠肺组织中酯型和盐型羟基喜树碱的含量 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2008, 27(2): 85-88.
- [5] 张晶晶, 方 芸, 谈恒山, 等. HPLC-荧光法测定人血浆中羟基喜树碱的两种构型及其相互间的转化 [J]. *药学与临床研究*, 2005, 13(5): 7-10.
- [6] Cheng J, Khin K T, Jensen G S, *et al.* Synthesis of β -cyclodextrin based polymers and their camptothecin conjugates [J]. *Bioconjug Chem*, 2003, 14(5): 1007-1017.