



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114246946 A

(43) 申请公布日 2022.03.29

(21) 申请号 202111615038.6 *A61P 35/00* (2006.01)
(22) 申请日 2021.12.27 *B82Y 5/00* (2011.01)
(71) 申请人 重庆医科大学附属第一医院 *B82Y 30/00* (2011.01)
地址 400042 重庆市渝中区袁家岗友谊路1 *B82Y 40/00* (2011.01)
号 *C01G 49/00* (2006.01)
(72) 发明人 向覃言秋 王志刚 罗远利 杨超
(74) 专利代理机构 重庆强大凯创专利代理事务
所(普通合伙) 50217
代理人 伍琴琴

(51) Int. Cl.
A61K 41/00 (2020.01)
A61K 47/60 (2017.01)
A61K 33/26 (2006.01)
A61K 49/12 (2006.01)
A61K 49/22 (2006.01)

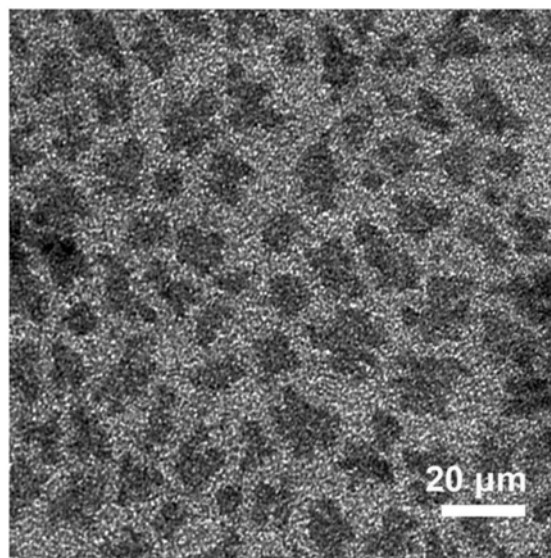
权利要求书1页 说明书7页 附图10页

(54) 发明名称

一种用于诊疗一体化的纳米造影剂及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及纳米药物呈递系统以及造影剂技术领域,具体涉及一种用于诊疗一体化的纳米造影剂及制备方法。一种用于诊疗一体化的纳米造影剂,包括铁钨氧化物纳米片,其中铁元素和钨元素的质量比为1:1.13。本技术方案将钨源和铁源在二苯醚作为溶剂、1,2-十二烷二醇作为还原剂以及油酸油胺作为表面活性剂的条件下,进行高温反应获得铁钨氧化物纳米片FWO NSs,并进一步进行表面的PEG修饰,得到水溶性良好的FWO-PEG NSs。本方案的纳米片在实现光热、光动力及化学动力治疗的同时,还能实现MRI/CT/PA三重成像的监控,是一种具有医学成像手段实时监测调控的纳米药物呈递系统和造影剂,具有广阔的应用前景。



1. 一种用于诊疗一体化的纳米造影剂,其特征在于:包括铁钨氧化物纳米片,所述铁钨氧化物纳米片中铁元素和钨元素的质量比为1:1.13。

2. 根据权利要求1所述的一种用于诊疗一体化的纳米造影剂,其特征在于:所述铁钨氧化物纳米片外包裹有DSPE-PEG 2000,形成FWO-PEG NSs。

3. 根据权利要求2所述的一种用于诊疗一体化的纳米造影剂,其特征在于:FWO-PEG NSs的平均水合粒径为102.6nm。

4. 根据权利要求3所述的一种用于诊疗一体化的纳米造影剂,其特征在于:FWO-PEG NSs的吸收光谱的吸收峰位于1000-1700nm处。

5. 根据权利要求4所述的一种用于诊疗一体化的纳米造影剂的制备方法,其特征在于:包括以下依次进行的步骤:

S1:合成铁钨氧化物纳米片;

S2:将铁钨氧化物纳米片和DSPE-PEG 2000分别溶解于三氯甲烷,分别获得纳米片分散液和PEG分散液;

S3:将PEG分散液滴加入纳米片分散液中,并同时纳米片分散液进行超声处理,获得超声分散混合液;

S4:对超声分散混合液进行搅拌和干燥处理,获得FWO-PEG NSs。

6. 根据权利要求5所述的一种用于诊疗一体化的纳米造影剂的制备方法,其特征在于,所述铁钨氧化物纳米片由如下方法制备:制备含二苯醚、1,2-十二炔二醇和六碳基钨的混合液I;将混合液I升温后加入油酸和油胺,获得混合液II;将混合液II升温后加入乙酰丙酮亚铁,经反应获得混合液III,所述混合液III中含有所述铁钨氧化物纳米片。

7. 根据权利要求6所述的一种用于诊疗一体化的纳米造影剂的制备方法,其特征在于,在混合液I中,二苯醚、1,2-十二炔二醇和六碳基钨的比例为20ml:1.5g:1mmol。

8. 根据权利要求7所述的一种用于诊疗一体化的纳米造影剂的制备方法,其特征在于,将混合液I在氮气环境中升温至120℃后加入油酸和油胺,获得混合液II;将混合液II在氮气环境中升温至260℃后加入乙酰丙酮亚铁,经30分钟反应获得混合液III;六碳基钨同乙酰丙酮亚铁的摩尔比为1:1。

9. 根据权利要求1-4中任一项所述的一种用于诊疗一体化的纳米造影剂在制备肿瘤治疗药物中的应用。

10. 根据权利要求1-4中任一项所述的一种用于诊疗一体化的纳米造影剂在制备CT造影剂、MRI造影剂或者光声成像造影剂中的应用。

一种用于诊疗一体化的纳米造影剂及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米药物呈递系统以及造影剂技术领域,具体涉及一种用于诊疗一体化的纳米造影剂及制备方法。

背景技术

[0002] 光疗法(PDT和PTT)是一种由光敏剂作为介导,在外加激光下,分别通过升温的光热效应及毒性活性氧生成的光动力效应,有效致死肿瘤细胞,由于其微创性、非入侵性等优点,已成功应用于临床,然而光热治疗导致肿瘤发生抵抗,光动力治疗受到瘤内缺氧环境的影响,单一的治疗方式,其抗肿瘤的效果不甚理想。另外,化学动力疗法(CDT)利用某些物质对低pH和丰富的 H_2O_2 水平的肿瘤微环境同时响应的效应,来进行肿瘤治疗。其中,金属(常见的Fe、Cu、Mn等)可同肿瘤内 H_2O_2 发生原位的化学芬顿/类芬顿反应,而产生毒性羟基自由,成为了一种潜在的肿瘤治疗策略,然而由于其较缓慢的反应速度,单一的CDT治疗往往也不太理想。因此,如何有效的结合光热、光动力、化学动力治疗的策略,进而研发出一种集上述治疗模式于一体的纳米药物呈递系统,成为目前研究的热点。

[0003] 另外,CT成像由于密度分辨力高、组织结构影像无重叠往往能够清晰显示密度差别小的软组织结构和器官,然而由于其放射性,不能大量反复使用。MRI成像因其无放射毒性以及良好的软组织对比度,在评估疗效及指导后续计划方面发挥重要作用。光声成像(PA)由于结合了纯光学组织成像中高选择特性和纯超声组织成像中深穿透特性的优点,可得到高分辨率和高对比度的组织图像。如何将上述成像方式的优点集中于一种纳米系统,将不同模态影像中的信息对应结合,得到更全面直观的信息,对医疗检测具有深远意义。并且,如果能够将多种治疗策略和多种诊断方式集成于同一纳米药物呈递系统中,这将极大地推进肿瘤诊断和治疗的技术的发展。在纳米造影剂介导的肿瘤治疗中,到达肿瘤内部的纳米粒数量、分布、代谢等对治疗结果十分重要,因此,研发出一种诊疗一体化的具有医学成像手段实时监测调控的纳米药物呈递系显得十分必要。

发明内容

[0004] 本发明意在提供一种用于诊疗一体化的纳米造影剂,以解决现有技术中缺少具有光热、光动力、化学动力治疗功能以及多种诊断方式集成纳米药物呈递系统或造影剂的技术问题。

[0005] 为达到上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种用于诊疗一体化的纳米造影剂,包括铁钨氧化物纳米片,所述铁钨氧化物纳米片中铁元素和钨元素的质量比为1:1.13。

[0007] 采用上述技术方案的原理以及有益效果在于:本方案使用材质为 $FeWO_4$ 的铁钨氧化物纳米片作为纳米造影剂的原料,同时实现了诊断和治疗目的。铁和钨元素具有光热转化的功效,可实现光热治疗和光声成像。而氧化铁材料具有核磁共振成像特性,氧化钨材料可进行CT显像,本方案将两者结合在一起使用,赋予铁钨氧化物纳米片更多的成像能力,可

以同时实现核磁共振成像和CT显像。铁离子可以同肿瘤内 H_2O_2 发生原位的化学反应,而产生毒性羟基自由,进而杀灭肿瘤细胞,实现化学动力治疗效果。纳米造影剂为片状结构,片状结构纳米材料较颗粒状的纳米粒,其暴露于肿瘤细胞内的表面积更大,暴露于肿瘤环境中的 H_2O_2 的Fe原子更多,化学动力治疗的反应效率更大。

[0008] 另外,铁钨氧化物纳米片在激光作用下也会产生活性氧,有效致死肿瘤细胞,实现光动力学治疗效果。本方案的用于诊疗一体化的纳米造影剂,在实现光热、光动力及化学动力治疗的同时,还能实现MRI/CT/PA三重成像的监控。

[0009] 本方案的纳米造影剂在近红外二区(1000-1700nm)也有高的吸收系数,二区的光源的穿透能力更强(3-5cm),能有效辐照肿瘤内部组织,提升肿瘤治疗效果。而现有的大部分材料(纳米粒)仅在近红外一区(700-1000nm)内具有红外吸收,近红外一区的激光的穿透能力有限,不能有效辐照肿瘤内部组织,限制肿瘤治疗效果。

[0010] 该纳米造影剂还具有尺寸小、肝肾代谢快、毒性小、生物安全性好等优点具有良好的应用前景,解决了现有技术中缺少具有光热、光动力、化学动力治疗功能以及多种诊断方式集成纳米药物呈递系统或造影剂的技术问题。

[0011] 进一步,所述铁钨氧化物纳米片外包裹有DSPE-PEG 2000,形成FWO-PEG NSs。为了使得铁钨氧化物纳米片具有更好的水溶性以及生物相容性,在FWO NSs表面修饰DSPE-PEG2000,生成了最终产物水溶性良好的FWO-PEG NSs。

[0012] 进一步,FWO-PEG NSs的平均水合粒径为102.6nm。

[0013] 在DSPE-PEG 2000修饰之后,纳米造影剂的粒径略有增大,但也适合于作为纳米药物呈递到肿瘤部位,并通过实体瘤的高通透性和滞留效应,进入肿瘤组织,实现对肿瘤的治疗和诊断的目的。

[0014] 进一步,FWO-PEG NSs的吸收光谱的吸收峰位于1000-1700nm处。

[0015] 本方案的纳米造影剂在近红外二区(1000-1700nm)具有较高吸收,可作为二区的光热治疗剂,二区的光源具有较为理想的穿透效果(3-5cm),能有效辐照肿瘤内部组织,提升肿瘤治疗效果。

[0016] 本方案还提供了一种用于诊疗一体化的纳米造影剂的制备方法,包括以下依次进行的步骤:

[0017] S1:合成铁钨氧化物纳米片;

[0018] S2:将铁钨氧化物纳米片和DSPE-PEG 2000分别溶解于三氯甲烷,分别获得纳米片分散液和PEG分散液;

[0019] S3:将PEG分散液滴加入纳米片分散液中,并同时为纳米片分散液进行超声处理,获得超声分散混合液;

[0020] S4:对超声分散混合液进行搅拌和干燥处理,获得FWO-PEG NSs。

[0021] 采用上述技术方案,为了使得铁钨氧化物纳米片具有更好的水溶性以及生物相容性,在FWO NSs表面修饰DSPE-PEG 2000,生成了最终产物水溶性良好的FWO-PEG NSs。上述方法可以实现DSPE-PEG 2000对FWO NSs稳定地表面修饰。

[0022] 进一步,所述铁钨氧化物纳米片由如下方法制备:制备含二苜醚、1,2-十二炔二醇和六碳基钨的混合液I;将混合液I升温后加入油酸和油胺,获得混合液II;将混合液II升温后加入乙酰丙酮亚铁,经反应获得混合液III,所述混合液III中含有所述铁钨氧化物纳米片。

[0023] 铁钨氧化物纳米片由高温分解法合成,提供钨源的六羰基钨及提供铁源的乙酰丙酮亚铁作为前驱体,二苯醚作为高温有机溶剂,1,2-十二烷二醇作为还原剂,油酸油胺作为表面活性剂。两前驱体首先在有机相内中充分分解,随后,在高温下进行反应,生成了片状铁钨氧化物纳米片(FWO NSs)。

[0024] 进一步,在混合液I中,二苯醚、1,2-十二烷二醇和六羰基钨的比例为20ml:1.5g:1mmol。二苯醚的体积对纳米材料的形态的形成非常重要,当体积减小反应体系减少,更多的反应物可以参与到纳米材料的生长阶段,生成的纳米粒尺寸会增大,不符合纳米药物呈递系统的要求。另外,1,2-十二烷二醇的使用对获得片状的纳米材料非常重要,碳链较短的1,2-十二烷二醇对纳米颗粒的各向异性生长起主要作用,让反应产物以不同的方式聚集生长,利于纳米片状结构形成。现有技术合成单独的铁纳米粒的时候,使用1,2-十六烷二醇作为还原剂,而未使用本技术方案的1,2-十二烷二醇,获得的纳米粒呈颗粒状,而不是本方案的片状结构。

[0025] 进一步,将混合液I在氮气环境中升温至120℃后加入油酸和油胺,获得混合液II;将混合液II在氮气环境中升温至260℃后加入乙酰丙酮亚铁,经30分钟反应获得混合液III;六羰基钨同乙酰丙酮亚铁的摩尔比为1:1。

[0026] 反应温度和时间对纳米材料的形态具有显著影响,纳米材料的形态变化会影响其催化活性、光热转化活性等性能。采用本方案的反应温度和时间,可以成功合成片状的铁钨氧化物纳米材料。在实施例1中,发明人尝试将260℃反应的时间缩短,也尝试了将该反应温度稍稍提升,但是结果显示,并不能合成片状的纳米材料。可见获得本技术方案的铁钨氧化物纳米片必须采用260℃30分钟的合成反应条件。在本技术方案中,六羰基钨和乙酰丙酮亚铁前驱体的摩尔比为1:1,比例过高或者过低时,获得的纳米材料不能呈现较均一的纳米片形态。

[0027] 本方案还提供了一种用于诊疗一体化的纳米造影剂在制备肿瘤治疗药物中的应用,以及一种用于诊疗一体化的纳米造影剂在制备CT造影剂、MRI造影剂或者光声成像造影剂中的应用。

[0028] 在实现光热、光动力及化学动力治疗的同时,还能实现MRI/CT/PA三重成像的监控。本申请文件的实施例2-4分别展示了纳米复合材料(纳米造影剂)的光热、光动力及化学动力治疗性能;实施例5-实施例7分别展示了纳米复合材料的核磁共振成像(MRI)、光声成像(PA)和CT成像的性能。并且,发明人将本方案制备的纳米复合材料应用在乳腺癌细胞的体外处理中,纳米造影剂显示出了理想的治疗效果。

附图说明

[0029] 图1为本发明实施例1的FWO NSs的XPS全谱分析图。

[0030] 图2为本发明实施例1的FWO NSs的XRD图谱。

[0031] 图3为本发明实施例1的FWO NSs的EDS线扫图。

[0032] 图4为本发明实施例1的FWO NSs的mapping图。

[0033] 图5为本发明实施例1的FWO NSs的TEM图。

[0034] 图6为本发明实施例1的FWO-PEG NSs的TEM图。

[0035] 图7为本发明实施例1的FWO-PEG NSs的粒径分布图。

- [0036] 图8为本发明实施例1的FWO NSs和FWO-PEG NSs的电位图。
- [0037] 图9为本发明实施例1的FWO-PEG NSs的吸收光谱图。
- [0038] 图10为本发明实施例1的对比纳米材料I的TEM图。
- [0039] 图11为本发明实施例1的对比纳米材料II的TEM图。
- [0040] 图12为本发明实施例2的不同浓度FWO-PEG NSs的光热升温图。
- [0041] 图13为本发明实施例3的不同激光辐照时间的体系中DPBF的紫外曲线。
- [0042] 图14为本发明实施例4的体系孵育不同时间后TMB的紫外曲线。
- [0043] 图15为本发明实施例5的不同浓度FWO-PEG NSs的体外MRI成像及标准曲线。
- [0044] 图16为本发明实施例6的不同浓度FWO-PEG NSs的体外PA成像及标准曲线。
- [0045] 图17为本发明实施例7的不同浓度FWO-PEG NSs的体外CT成像及标准曲线。
- [0046] 图18为本发明实施例8的FWO-PEG NSs的体外乳腺癌治疗凋亡评价实验结果。
- [0047] 图19为本发明实施例9的FWO-PEG NSs的生物安全性评价结果。

具体实施方式

[0048] 下面结合实施例对本发明做进一步详细的说明,但本发明的实施方式不限于此。若未特别指明,下述实施例以及实验例所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,且所用的材料、试剂等,均可从商业途径得到。

[0049] 实施例1:纳米造影剂的制备

[0050] 1.取由二苳醚、1,2-十二炔二醇,六碳基钨组成的混合液I,置于剧烈磁搅拌的三颈烧瓶中,氮气保护下,升温加热。二苳醚、1,2-十二炔二醇和六碳基钨三者的用量比为20ml:1.5g:1mmol。

[0051] 2.当体系温度加热到120℃时,向混合液I中加入油酸和油胺(油酸、油胺和二苳醚的体积比为1:1:20),获得混合液II,随后继续加热升温。

[0052] 3.当混合液II温度升高至260℃,然后向混合液II中添加乙酰丙酮亚铁,并持续反应30分钟,获得混合液III。其中,六碳基钨同乙酰丙酮亚铁的摩尔比为1:1。

[0053] 步骤1-3的整个过程需要隔离空气,在氮气的保护下进行。

[0054] 4.反应完成后,将混合液III冷却至室温,加入过量无水乙醇(保证无水乙醇相对于混合液III的体积过量即可),析出混合液III中的纳米片状物质,离心取固相。然后用环己烷重悬上述固相,目的是为了洗去纳米片状物质表面过量的油酸和油胺,方便后续PEG的修饰。然后再在环己烷中加入过量无水乙醇(体积比保持在1:1-1:2),析出纳米片状物质,离心取固相。上述无水乙醇析出和环己烷重悬的过程再重复进行一次,获得未修饰的纳米造影剂铁钨氧化物纳米片(FeWO_4 nanosheets,简称为FWO NSs)。

[0055] 5.接下来将亲油相的FWO NSs进一步修饰,以向水相转移。未修饰的FWO NSs和双亲性的DSPE-PEG 2000分别溶于三氯甲烷中分别获得纳米片分散液和PEG分散液,前者(纳米片分散液)置于超声波清洗仪中,后者(PEG分散液)滴加于前者,边滴加边超声,完成滴加之后继续超声至30分钟。FWO NSs和三氯甲烷的用量比为10mg:2mL,DSPE-PEG 2000和三氯甲烷的用量比为40mg:2mL。

[0056] 6.然后,在室温($25 \pm 2^\circ\text{C}$)下将混合物搅拌2小时并用氮气干燥,获得修饰后纳米造影剂即FWO-PEG NSs。

[0057] 7. 将获得的FWO-PEG NSs溶解在去离子水中,并使用孔径为0.22 μ m的微孔注射器过滤器过滤。

[0058] 该纳米造影剂由高温分解法合成,提供钨源的六羰基钨及提供铁源的乙酰丙酮亚铁作为前驱体,二苄醚作为高温有机溶剂,1,2-十二烷二醇作为还原剂,油酸和油胺作为表面活性剂。两前驱体首先在有机相内中充分分解,随后,在高温下进行反应,生成了片状铁钨氧化物纳米片(FWO NSs)。为了使得该材料具有更好的水溶性以及生物相容性,在FWO NSs表面修饰DSPE-PEG 2000,生成了最终产物水溶性良好的FWO-PEG NSs。

[0059] 取合成后的FWO NSs,经过冷冻干燥后制成粉末样,取粉末经X射线光电子能谱(XPS)分析元素分析,实验结果参见图1,元素分析可见,材料中铁Fe,钨W,氧O三种元素均有效存在。FWO NSs的XRD图谱参见图2,可见FWO NSs中的铁钨氧化物的化学式为 $FeWO_4$ 。FWO NSs的EDS线扫图参见图3,三种元素的mapping图参见图4,也证明了材料中铁Fe,钨W,氧O三种元素均有效存在。根据ICP-OES测得,Fe:W质量之比为1:1.13。

[0060] FWO NSs电镜图参见图5,可见在透射电镜下,可见铁钨双氧化物成片状结构。FWO-PEG NSs电镜图参见图6,可见在透射电镜下,可见经过PEG修饰后的铁钨双氧化物呈类圆形,分散性良好。FWO NSs的平均粒径为40nm左右;FWO-PEG NSs的粒径分布图参见图7,其粒径为102.6nm。FWO NSs和FWO-PEG NSs的电位图参见图8。图9为FWO-PEG NSs的紫外吸收光谱图,可见其在1060nm具有吸收峰,说明本方案的纳米造影剂在近红外二区(1000-1700nm)也有高的吸收系数,二区的光源的穿透能力更强(3-5cm),能有效辐照肿瘤内部组织,提升肿瘤治疗效果。而现有的大部分材料(纳米粒)仅在近红外一区(700-1000nm)内具有红外吸收,近红外一区的激光的穿透能力有限,不能有效辐照肿瘤内部组织,限制肿瘤治疗效果。

[0061] 发明人在研究本纳米造影剂的合成方法时,尝试了多种技术参数,其中,在步骤“3”中,采用如下技术方案:混合液II温度升高至260 $^{\circ}$ C,然后向混合液II中添加乙酰丙酮亚铁,并持续反应20分钟。其余的合成过程和前文最佳条件一致。由此方案获得的纳米材料(对比纳米材料I)的透射电镜图参见图10,可见部分棒状的分解前驱体,由于时间不足,未合成纳米片的形态。另外,发明人还在步骤“3”中,采用如下技术方案:混合液II温度升高至260 $^{\circ}$ C,然后向混合液II中添加乙酰丙酮亚铁,并持续反应30分钟。其余的合成过程和前文的最佳条件一致。由此方案获得的纳米材料(对比纳米材料II)的透射电镜图参见图11,可见合成纳米粒成球形,不再是片状结构,Nano measure粒径软件测得纳米粒粒径约8.69nm。由此可见,步骤“3”的反应温度和时间对纳米材料的形态具有显著影响,纳米材料的形态变化会影响其催化活性、光热转化活性等性能。

[0062] 除此之外,现有技术合成单独的铁纳米粒的时候,使用1,2-十六烷二醇作为还原剂,而未使用本技术方案的1,2-十二烷二醇,获得的纳米粒呈颗粒状,而不是本方案的片状结构。发明人分析原因在于:碳链较短的1,2-十二烷二醇对纳米颗粒的各向异性生长起主要作用,让反应产物以不同的方式聚集生长,利于纳米片状结构形成。并且,在本技术方案中,六羰基钨和乙酰丙酮亚铁前驱体的摩尔比为1:1,比例过高或者过低时,获得的纳米材料不能呈现较均一的纳米片形态。二苄醚的体积对纳米材料的形态的形成非常重要,当体积减小反应体系减少,更多的反应物可以参与到纳米材料的生长阶段,生成的纳米粒尺寸会增大,不符合纳米药物呈递系统的要求。

[0063] 实施例2:纳米造影剂的光热性能

[0064] 用激光辐照不同浓度的FWO-PEG NSs水溶液(0、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)对纳米造影剂的光热性能进行了评价,用IVIS光谱成像系统监控液体中的温度,并严格记录。实验结果参见图12,不同浓度的FWO-PEG NSs置于96孔板中,在1060nm(1.0W/cm²)的激光辐照下,记录溶液在不同时间点的温度,随辐照时间的增加,溶液温度逐渐升高,而且浓度越高,升温速率越快,说明FWO-PEG NSs优异的光热转换性能。

[0065] 实施例3:纳米造影剂的光动力性能

[0066] 采用DPBF(二苯基异苯并呋喃)法检测纳米造影剂的光动力性能。将FWO-PEG NSs与DPBF混合添加于PBS缓冲液(pH 6.0)中(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的FWO-PEG NSs和15 μL 1mg/mL DPBF混合添加于1mL的PBS体系中),然后在激光辐照下不同时间(0、5、10、15、20、25和30min)。并采用紫外分光光度计观测体系在418nm处观察吸光度改变。实验结果参见图13(图中曲线从上至下依次代表辐照时间为0、5、10、15、20、25和30min的测试结果),¹O₂能同试剂DPBF特异性反应,使其特征峰下降。体系在1060nm(0.5W/cm²)的激光辐照不同时间下,DPBF于418nm的特征峰逐渐下降,证明随辐照时间延长,体系内的¹O₂产量上升,同辐照时间呈正相关,纳米造影剂的光动力性能优异。

[0067] 实施例4:纳米造影剂的化学动力治疗性能

[0068] 采用TMB(四甲基联苯胺)作为指示剂检测纳米造影剂化学动力治疗性能。将TMB同FWO-PEG NSs和H₂O₂添加于PBS缓冲液(pH 6.0)中(4 μL TMB(80mM)加入1mL PBS中,其中PBS中含有500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FWO-PEG NSs和10mM H₂O₂)。在不同的反应时间(0、0.5、1、2、4和6h)后,采用紫外分光光度计观察TMB在652nm处的峰值变化。实验结果如图14所示(图中曲线从下至上依次代表反应时间为0、0.5、1、2、4和6h的测试结果), $\cdot\text{OH}$ 能同试剂TMB特异性反应,使其652nm处吸光度上升。体系共同孵育不同时间下,TMB于652nm的特征峰峰值上升,证明随辐照时间延长,体系内的 $\cdot\text{OH}$ 产量上升,同孵育时间呈正相关,证明了纳米造影剂的有效化学动力治疗性能。

[0069] 实施例5:纳米造影剂的MRI成像

[0070] 配制用不同浓度的FWO-PEG NSs分散于生理盐水中,于磁共振成像仪下测定MRI信号,获得浓度与信号值的标准曲线。实验结果如图15所示,不同浓度的FWO-PEG NSs经过MRI成像仪扫描后,可见随浓度上升其信号值增加,线性相关性良好,证明纳米造影剂具有优异的MRI成像性能。

[0071] 实施例6:纳米造影剂的光声PA成像

[0072] 配制不同浓度的FWO-PEG NSs水溶液,于光声成像仪下检测纳米造影剂体外光声信号,获得浓度与信号值的标准曲线。实验结果如图16所示,不同浓度的FWO-PEG NSs经过光声成像仪扫描后,可见随浓度上升其信号值增加,线性相关性良好,证明纳米造影剂具有优异的PA成像性能。

[0073] 实施例7:纳米造影剂的CT成像

[0074] 配制用不同浓度的FWO-PEG NSs分散于生理盐水中,与螺旋CT成像仪下测定CT信号,获得纳米造影剂浓度与信号值的标准曲线。实验结果如图17所示,不同浓度的FWO-PEG NSs经过螺旋CT成像仪器扫描后,可见随浓度上升其CT信号值增加,线性相关性良好,证明纳米造影剂具有CT成像性能。

[0075] 实施例8:纳米造影剂治疗乳腺癌细胞的凋亡评价

[0076] 鼠源性乳腺癌4T1细胞于六孔板中培养24小时,各治疗组加入配制好的纳米造影剂FWO-PEG NSs ($400\mu\text{g mL}^{-1}$)并孵育4小时,随后,CDT组加入 H_2O_2 ($100\mu\text{M}$),PDT组接受功率密度为 $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ (1060nm)的激光照射10min作为PDT条件,PTT组接受 $1.0\text{W}/\text{cm}^2$ (1060nm)的激光照射5min作为PTT条件,CPP组即三种治疗协同组,该组先同纳米造影剂及 H_2O_2 共同孵育,随后接受两种激光辐照,激光辐照下结束后,继续孵育30min,随后收集处理后的细胞,重悬于 $200\mu\text{L}$ PBS中,通过流式细胞术进行定量检测,评价细胞凋亡情况。流式细胞检测结果如图18所示,纳米造影剂的体外抗乳腺癌细胞凋亡可见,对照组,Laser, H_2O_2 三组细胞无明显凋亡,证明了安全性,其中单球FWO-PEG NSs组由于纳米造影剂的加入,有微小的细胞凋亡,但是存活细胞仍然大于80%,证明了纳米造影剂的安全性。CDT组凋亡数为17.75%,PDT组由于光动力治疗的协同凋亡细胞上升至25.04%,PTT组由于光热治疗的协同凋亡细胞有效上升至27.67%,最终由于CDTT/PDT/PTT三者协同的CPP组,其细胞凋亡数最高,高达59.26%,证明了纳米造影剂介导的治疗优异效果。

[0077] 实施例9:生物安全性测试

[0078] 取雌性昆明鼠共30只,每组5只,尾静脉给予 $200\mu\text{L}$ 的FWO-PEG NSs ($4\text{mg}/\text{mL}$),对照组,给予 $200\mu\text{L}$ 生理盐水,分别于给药的1/3/5/7/14天处死老鼠,取心肝脾肺肾进行HE观察。给予纳米造影剂后,各组小鼠脏器未见细胞结构形态组织学异常,证明纳米造影剂的体内安全性良好,可进一步应用于体内治疗,实验结果参见图19,标尺为 $50\mu\text{m}$ 。

[0079] 以上所述的仅是本发明的实施例,方案中公知的具体技术方案和/或特性等常识在此未作过多描述。应当指出,对于本领域的技术人员来说,在不脱离本发明技术方案的前提下,还可以作出若干变形和改进,这些也应该视为本发明的保护范围,这些都不会影响本发明实施的效果和专利的实用性。本申请要求的保护范围应当以其权利要求的内容为准,说明书中的具体实施方式等记载可以用于解释权利要求的内容。

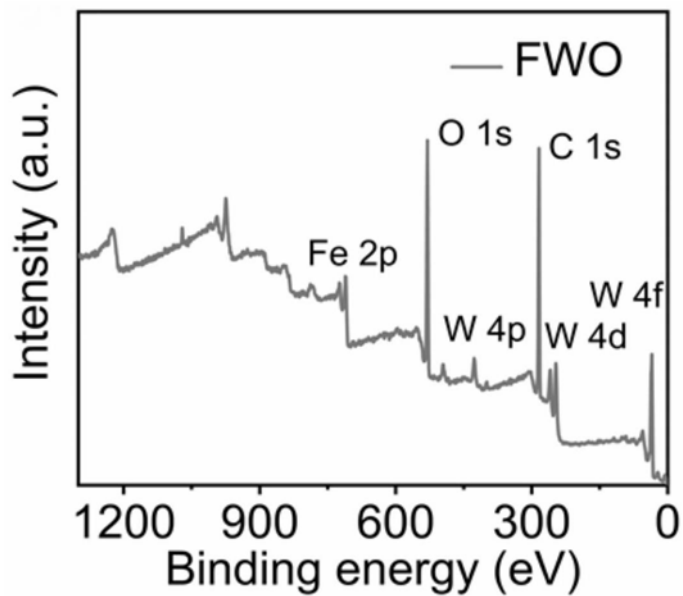


图1

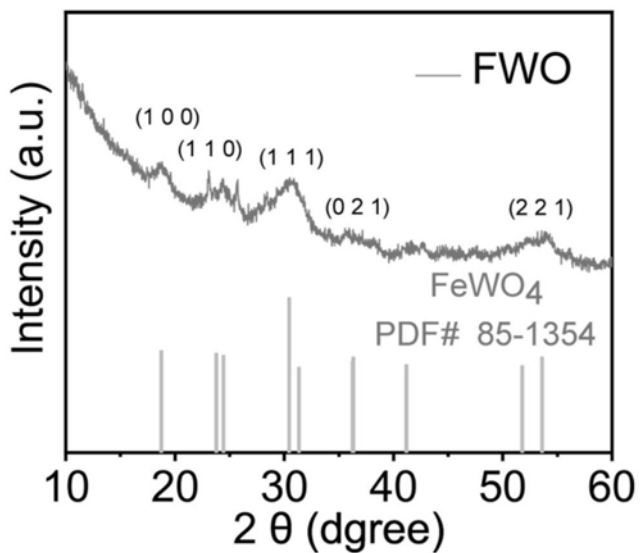


图2

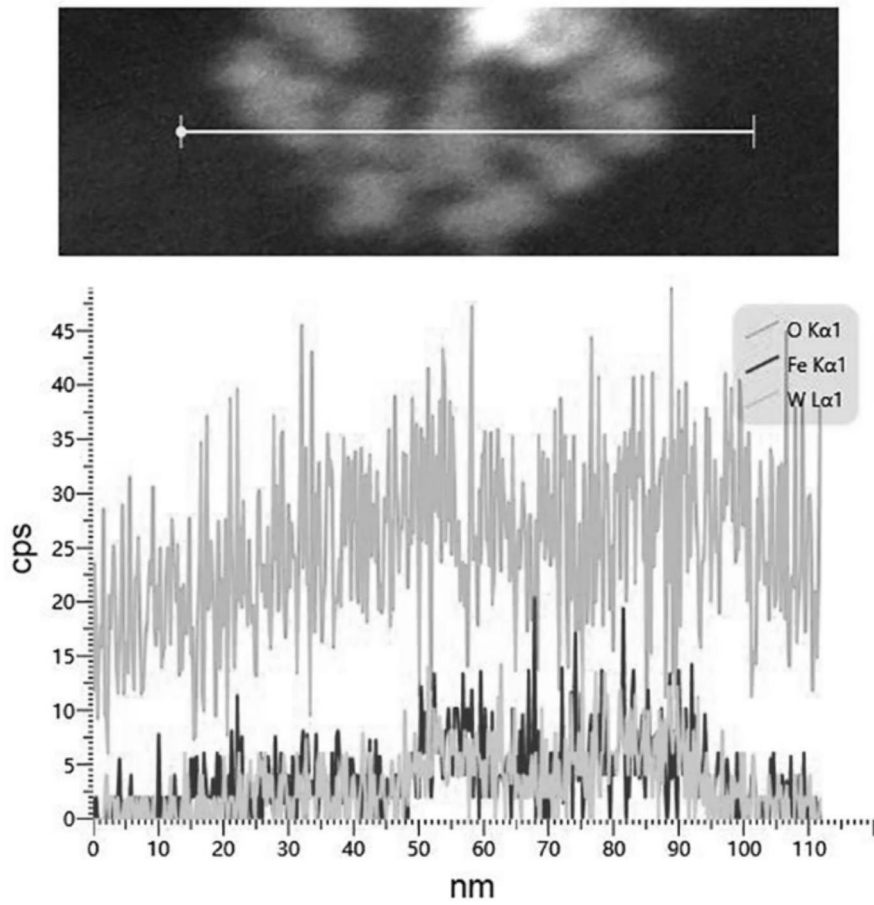


图3

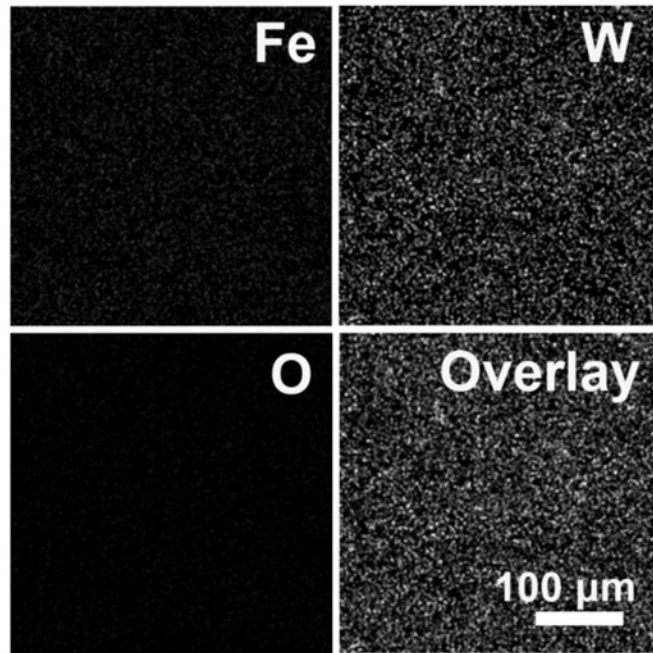


图4

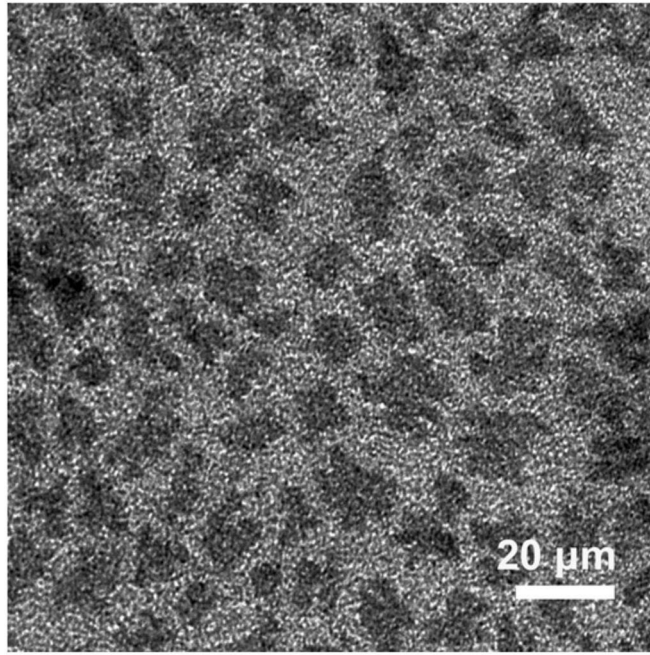


图5

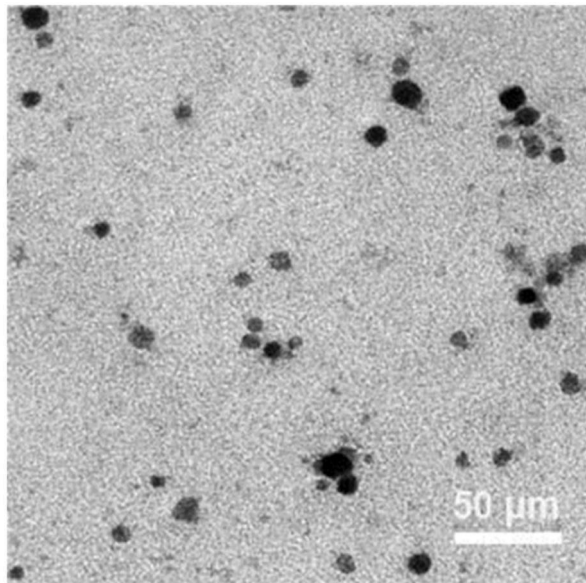


图6

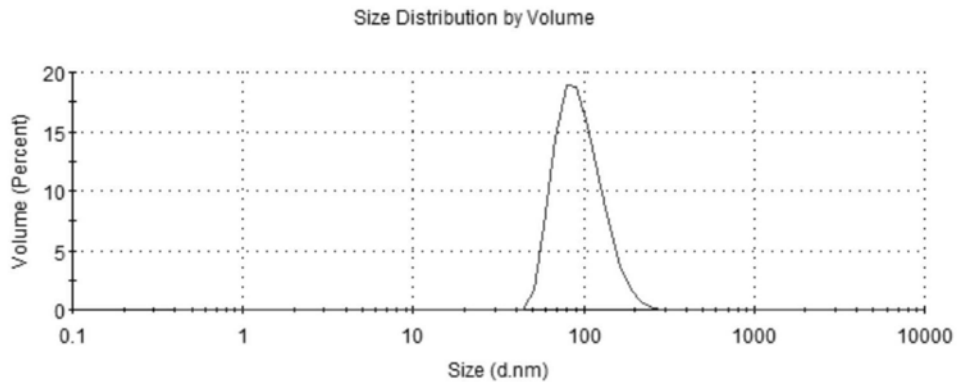


图7

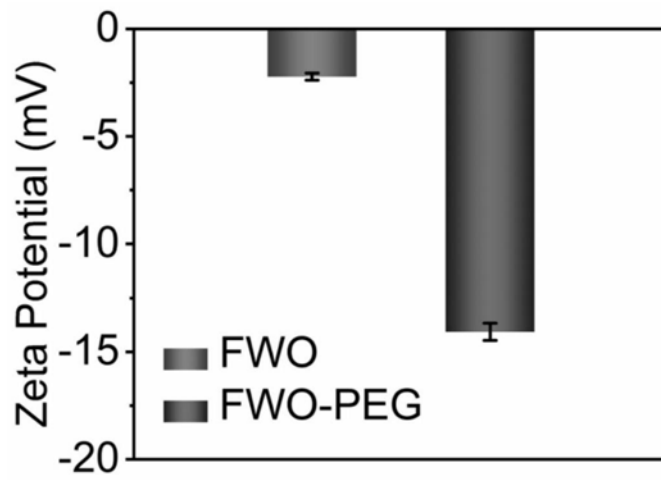


图8

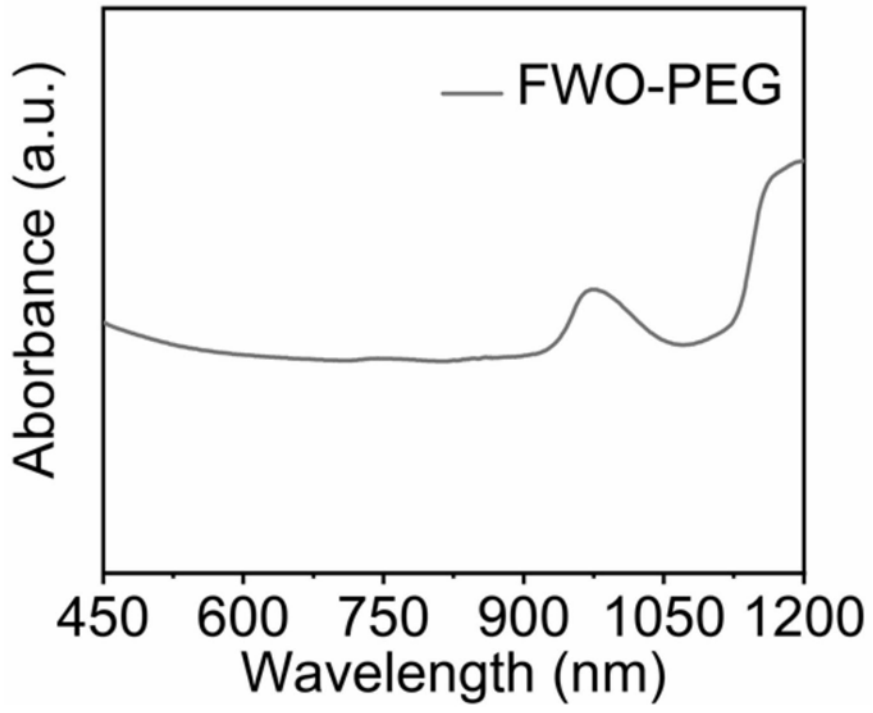


图9

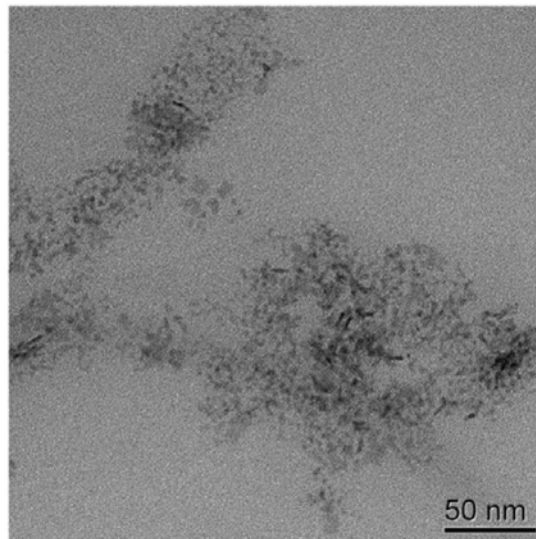


图10

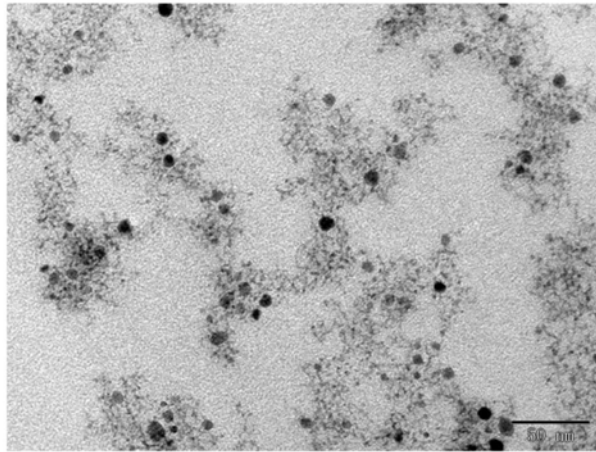


图11

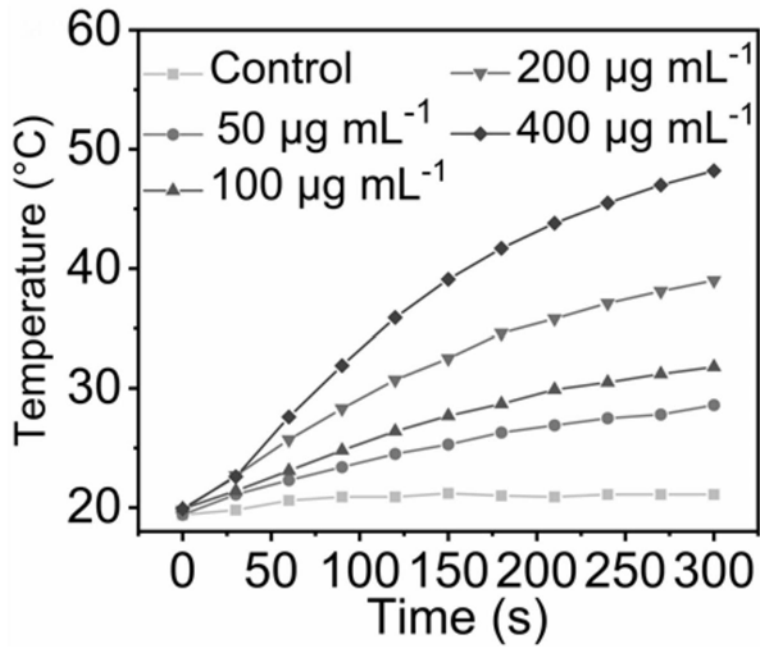


图12

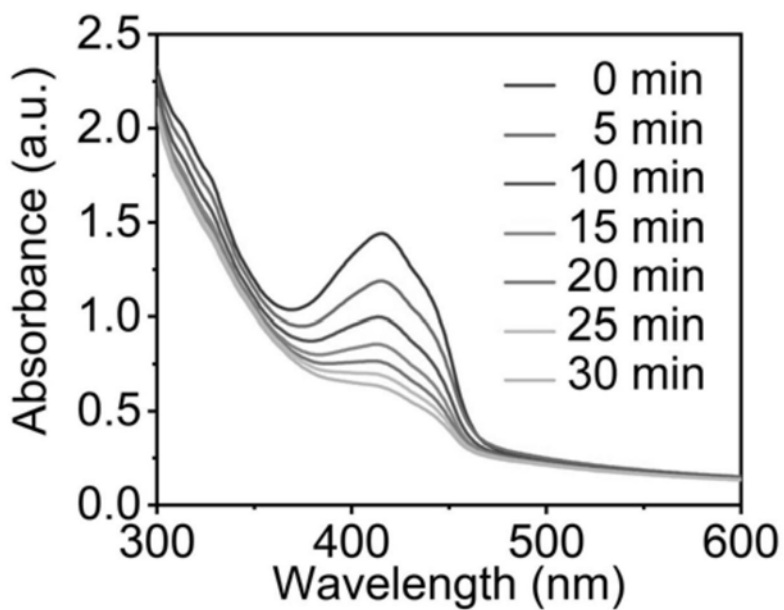


图13

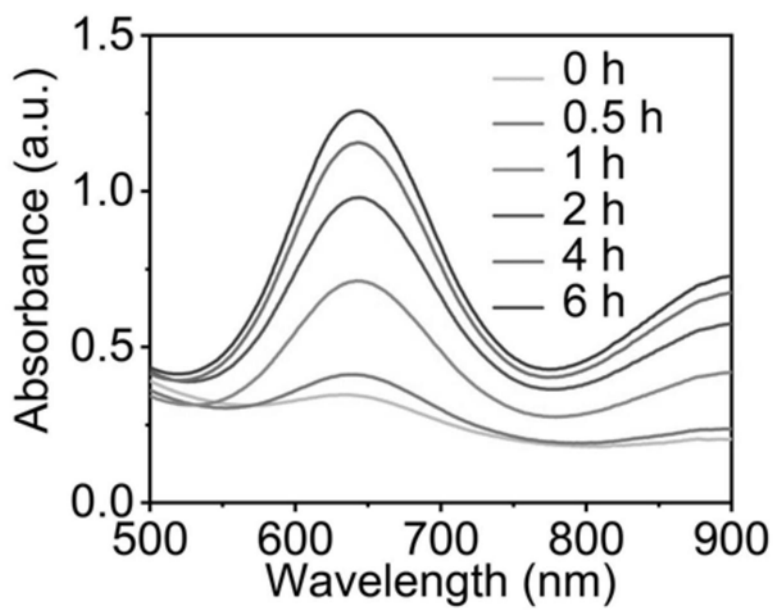


图14

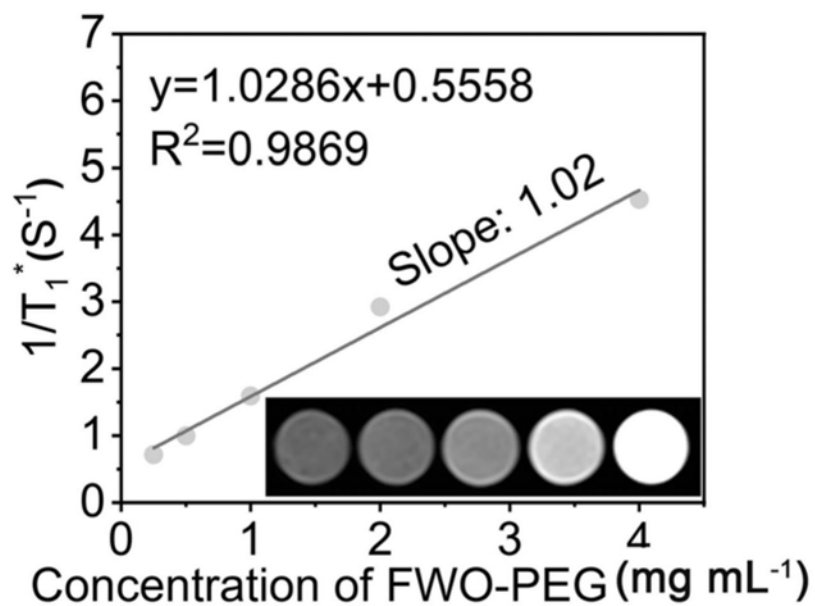


图15

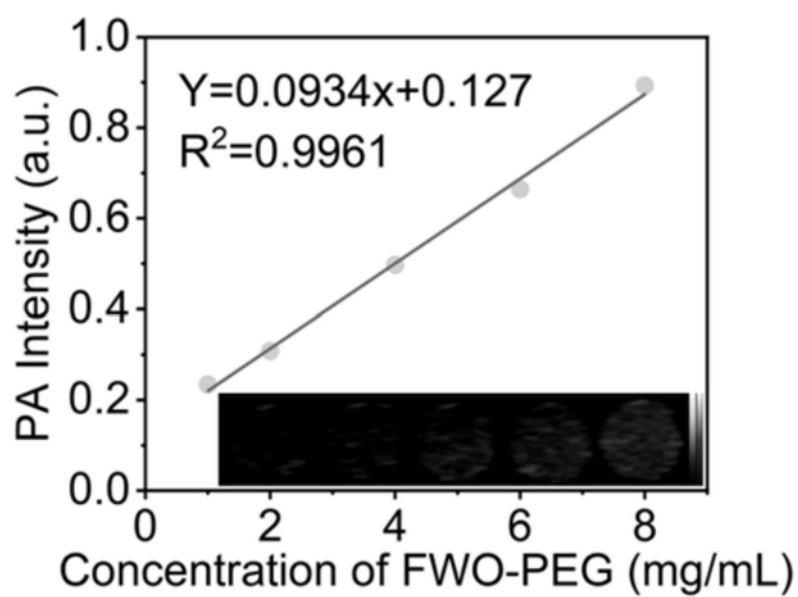


图16

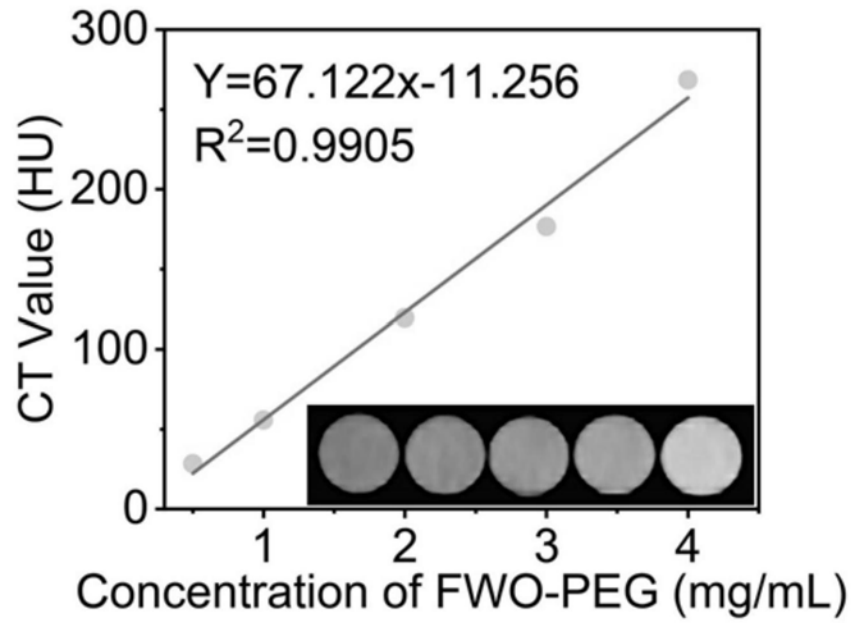


图17

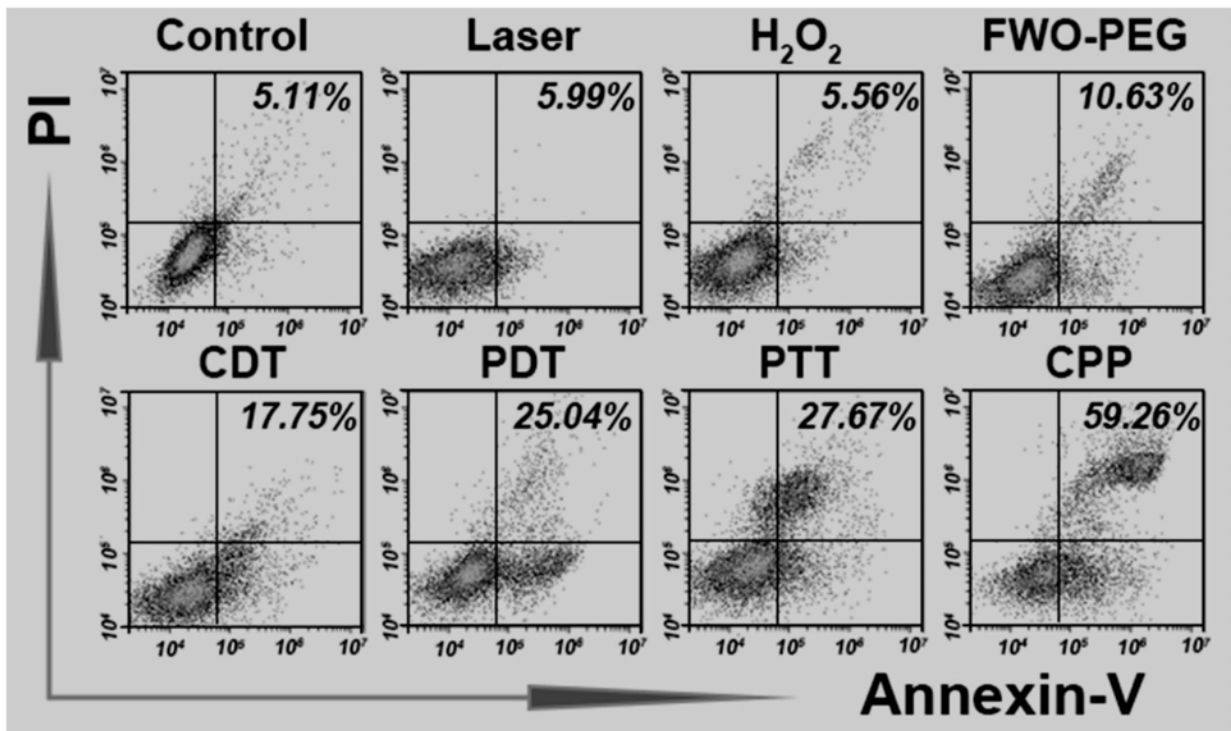


图18

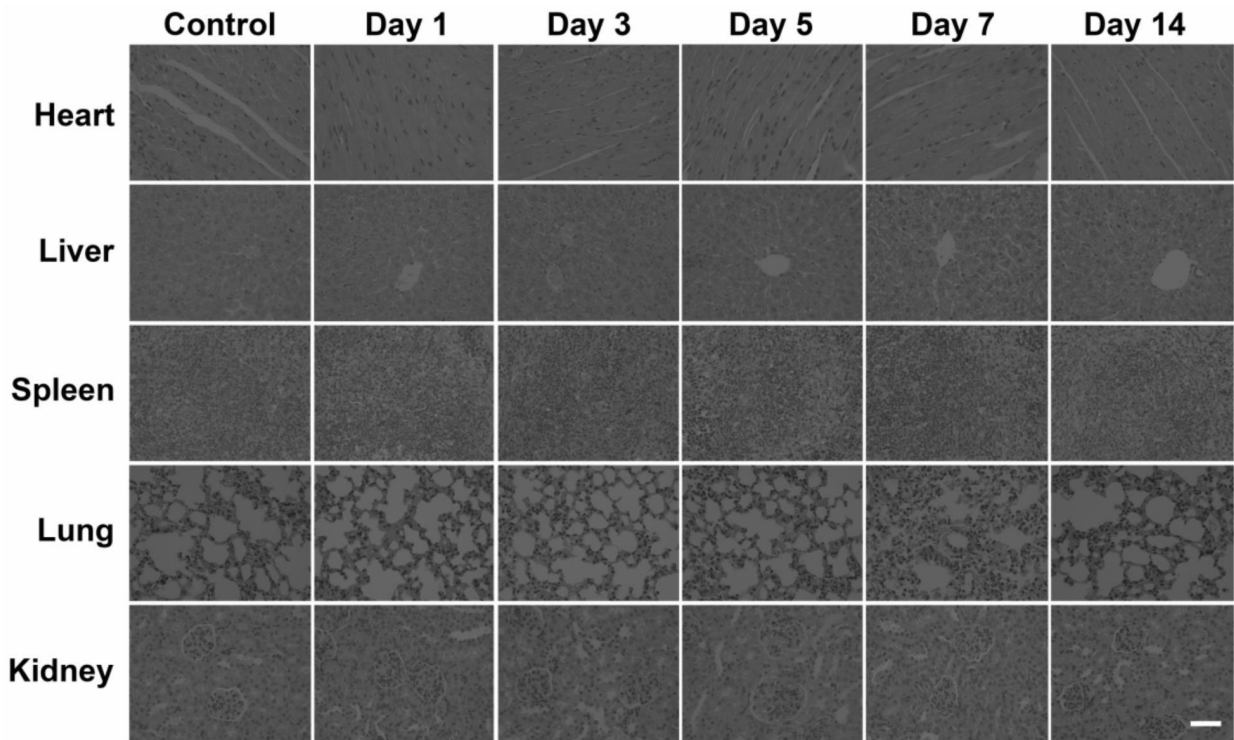


图19