



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119139499 A

(43) 申请公布日 2024.12.17

(21) 申请号 202411646842.4

C09K 11/02 (2006.01)

(22) 申请日 2024.11.18

C09K 11/06 (2006.01)

(71) 申请人 广东省大湾区华南理工大学聚集诱导发光高等研究院

B82Y 20/00 (2011.01)

地址 510700 广东省广州市黄埔区开源大道11号科技企业加速器C3栋401室

(72) 发明人 唐本忠 林建慧 刘晓征 王志明
刘勇 龚晚君

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

专利代理人 江裕强

(51) Int.Cl.

A61K 49/00 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

权利要求书4页 说明书13页 附图12页

(54) 发明名称

一种曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒及其制备方法和应用；本发明的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒由AIE荧光纳米颗粒和曲妥珠单抗偶联得到，所述AIE荧光纳米颗粒表面含有羧基和氨基中的至少一种，所述AIE荧光纳米颗粒内部负载有AIE分子；曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的平均粒径为50-300nm，分散系数为0.05-0.25。本发明的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒用于乳腺癌肿瘤荧光靶向，在乳腺癌手术导航的过程中能够有效靶向乳腺癌肿瘤，实时成像，获得高信噪比和分辨率的图像，精准指示乳腺癌的病灶及边缘。



1. 一种曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒，其特征在于，由AIE荧光纳米颗粒和曲妥珠单抗偶联得到，所述AIE荧光纳米颗粒表面含有羧基和氨基中的至少一种，所述AIE荧光纳米颗粒内部负载有AIE分子；

所述曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的平均粒径为50-300nm，分散系数为0.05-0.25。

2. 根据权利要求1所述的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒，其特征在于，所述曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的平均粒径为90-150nm；所述曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的分散系数为0.05-0.1；

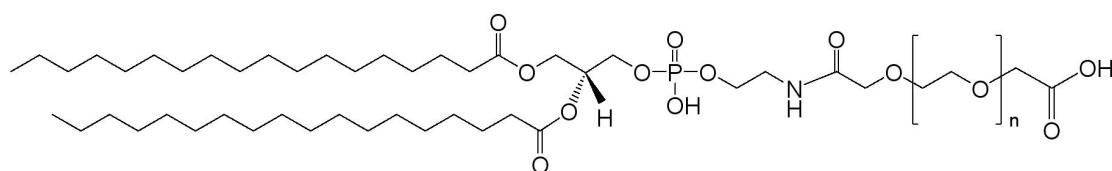
所述AIE荧光纳米颗粒是以两亲性高分子聚合物为载体包裹AIE分子的具有球形结构的AIE荧光纳米颗粒，所述两亲性高分子聚合物含有羧基和氨基中的至少一种；

所述AIE荧光纳米颗粒的平均粒径为90-150nm，变异系数为0.1-0.25；

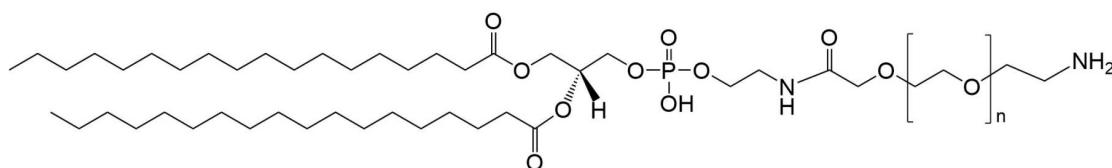
所述AIE荧光纳米颗粒表面的氨基、羧基的总密度为4-20mmol/mL，以2mg/mL AIE荧光纳米颗粒溶液计；

所述AIE分子的最大发射波长大于700nm。

3. 根据权利要求2所述的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒，其特征在于，所述两亲性高分子聚合物包括式I、式II中的至少一种：



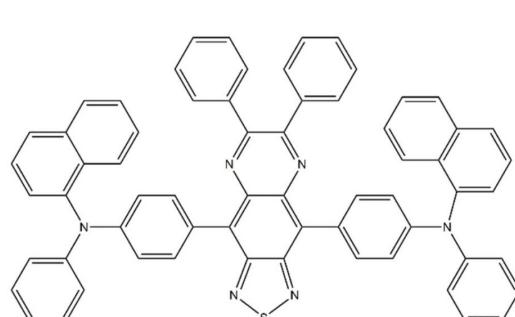
式I



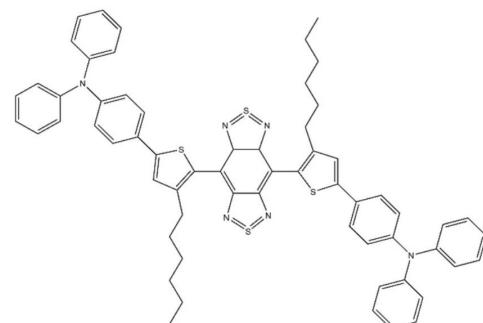
式II

式I、式II中，n各自独立为≥45的整数；

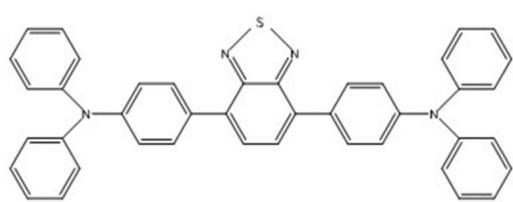
所述AIE分子选自AIE-1分子到AIE-15分子中的至少一种；



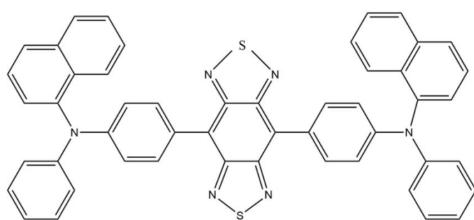
AIE-1分子



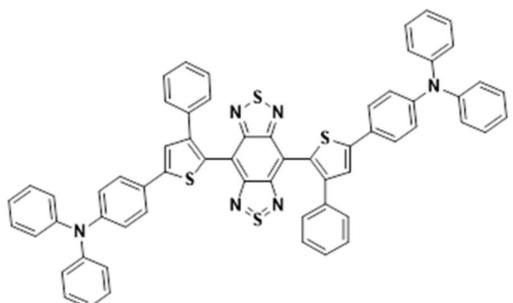
AIE-2分子



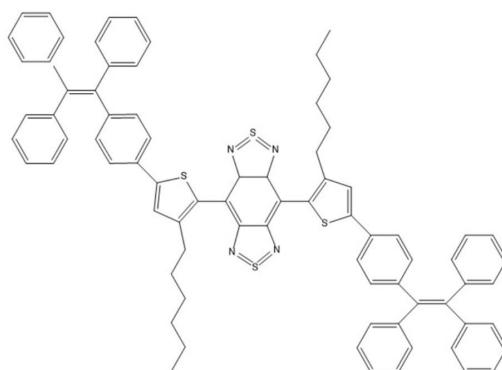
AIE-3分子



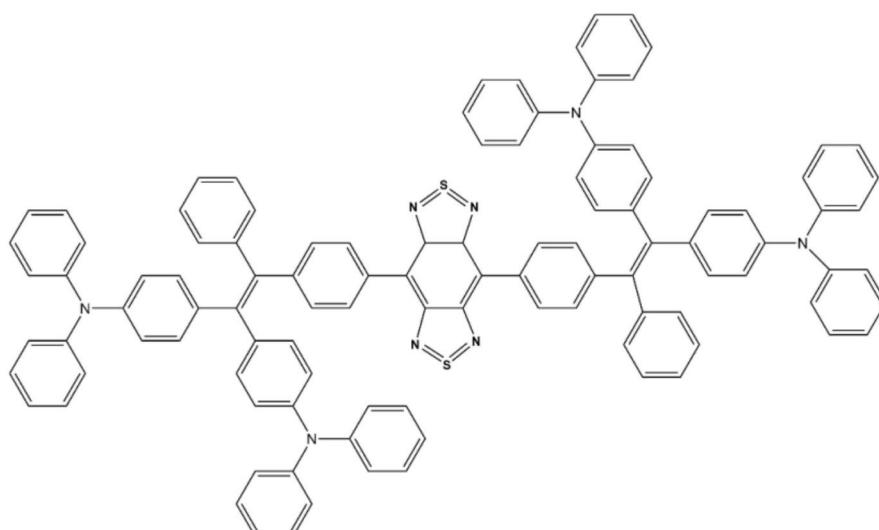
AIE-4分子



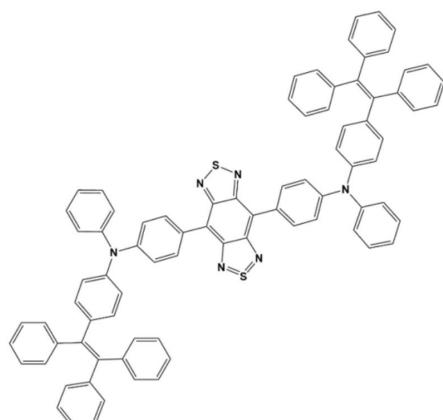
AIE-5分子



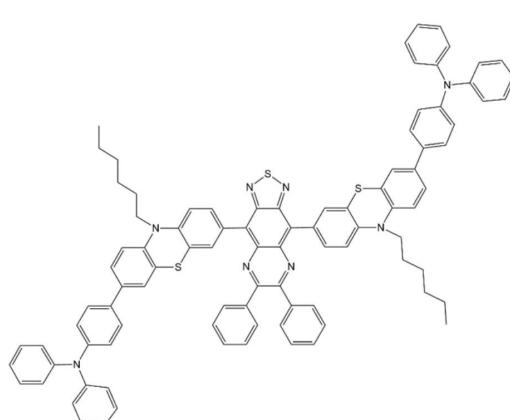
AIE-6分子



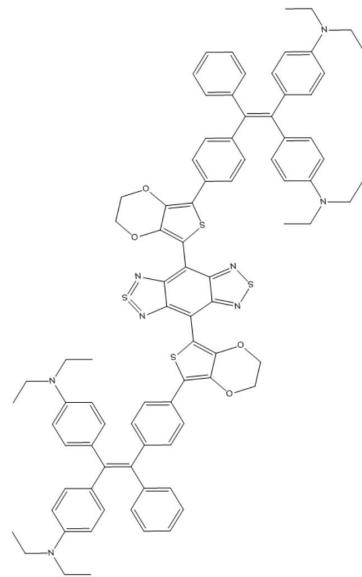
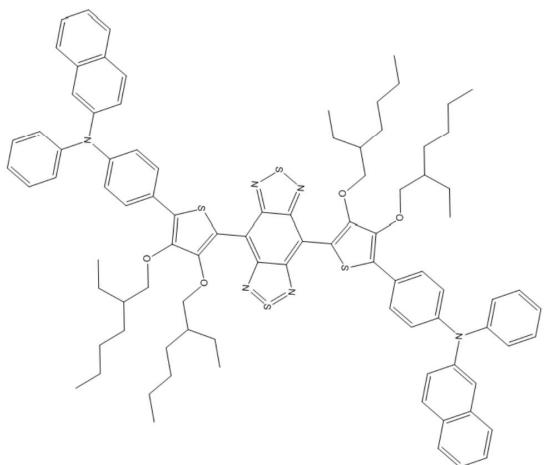
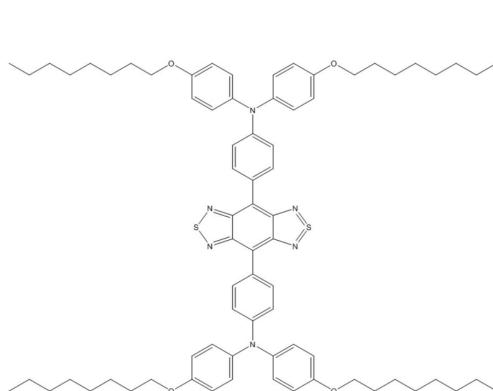
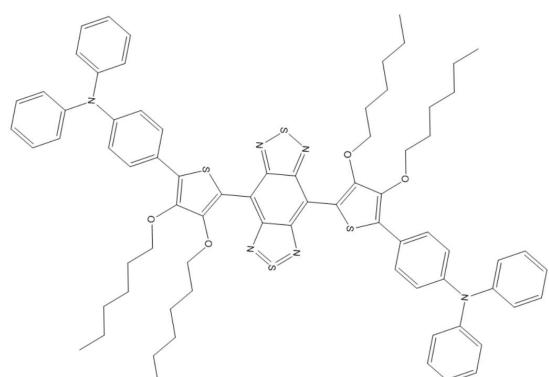
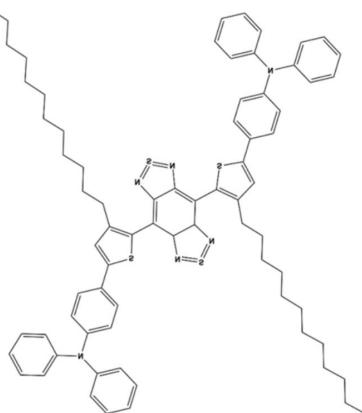
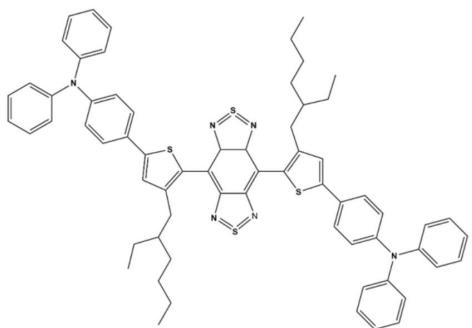
AIE-7分子



AIE-8分子



AIE-9分子



4. 根据权利要求1所述的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒，其特征在于，所述AIE荧光纳米颗粒的制备方法包括以下步骤：

- (1) 将AIE分子和两亲性高分子聚合物溶于挥发性有机溶剂中，得到有机相溶液；
- (2) 将有机相溶液在超声和混合搅拌条件下加至去离子水中；超声结束后，搅拌下除去挥发性有机溶剂，过滤，得到AIE荧光纳米颗粒。

5. 根据权利要求4所述的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒,其特征在于,步骤(1)中,所述的AIE分子和两亲性高分子聚合物的质量用量比为1:(0.3-10);所述的挥发性有机溶剂为四氢呋喃或二氯甲烷;所述AIE分子的质量和挥发性有机溶剂的体积比为1mg:(0.5-5)mL;

步骤(2)中,挥发性有机溶剂的体积用量为去离子水的2%-10%;所述超声的功率为60W-90W,超声的时间为2min~5min,混合搅拌的转速为600rpm-800rpm;

步骤(2)中,所述搅拌的转速为600rpm-800rpm,搅拌的时间为12h-24h;所述过滤为使用水相过滤器过滤,水相过滤器的滤膜孔径为0.4~0.45μm;

步骤(1)和步骤(2)在室温下进行。

6. 权利要求1-5任一项所述的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将AIE荧光纳米颗粒加入缓冲液中,加入EDC和NHS进行活化,离心重悬后再加入曲妥珠单抗水溶液进行反应,反应结束后,得到粗产物,经纯化后得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒;所述缓冲液不含-NH₂。

7. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,

所述AIE荧光纳米颗粒和曲妥珠单抗的质量比为1:(0.01-0.08);

所述缓冲液为MES缓冲液,所述缓冲液的pH为6.0-6.5,所述缓冲液的浓度为0.020-0.050mM;

所述AIE荧光纳米颗粒的质量和缓冲液的体积的用量比为(0.007~0.010)g:10mL;

所述EDC和NHS的质量比为1:(1-15);

所述AIE荧光纳米颗粒和EDC的质量比为0.007:(0.00015~0.0225);

所述活化的时间为0.5~1h;

所述反应的时间为2~4h;

所述纯化采用差速离心法纯化;

所述制备方法在室温下进行。

8. 根据权利要求7所述的制备方法,其特征在于,所述差速离心法为:将粗产物先于真空条件下4000-5000rpm离心5-10min,去掉沉淀留上清;再于真空条件下10000-12000rpm离心10-20min,去掉上清留沉淀后加超纯水复溶;之后在真空条件下5000-6000rpm离心5-10min,去掉沉淀留上清,得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒。

9. 一种AIE荧光造影剂,其特征在于,包括权利要求1-5任一项所述的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒。

10. 权利要求1-5任一项所述的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒或权利要求9所述的AIE荧光造影剂在非疾病诊断和/或治疗目的的乳腺癌肿瘤荧光靶向的应用。

一种曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于医学影像技术领域,具体涉及一种曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 乳腺癌的治疗手段多种多样,但目前最有效且根治性治疗的方式依然是手术切除。肿瘤组织的彻底切除以避免复发,同时最大限度地保留肿瘤邻近的健康组织以避免不必要的医源性损伤,是肿瘤手术治疗的根本目标。因此,在乳腺癌肿瘤切除手术的过程中能够实时精准识别肿瘤病灶及其边缘至关重要。由于早期与进展期肿瘤的微小病灶还不具备典型的形态结构,因此肿瘤与健康组织之间的微小区别难以依靠医生肉眼观测和手部触诊的反馈进行精准识别。

基于荧光成像技术的手术导航系统可对肿瘤及其它病灶组织进行实时动态成像,具有多角度、高通量和动态连续获取影像数据和结构的功能优势,为外科手术提供了更为精准、安全的解决方案。但是,目前能用于乳腺癌手术导航系统的荧光造影剂发展还不充分。这主要是源于乳腺癌本身的生物学特性及荧光成像技术的局限性:1、乳腺癌肿瘤具有高度异质性,荧光探针难以对所有肿瘤细胞实现精准识别和定位,导致成像结果存在一定的误差和不确定性;2、乳腺癌肿瘤及活体组织具有自发荧光特性,在荧光成像过程中,与荧光探针的荧光信号重叠,会导致成像结果出现伪影和模糊现象,干扰荧光成像的准确性;3、乳腺癌一般位于乳房深部,由于活体组织对光的吸收和散射作用,随着成像深度的增加,荧光信号的强度会逐渐减弱,导致成像质量下降,这使得乳腺癌荧光成像要求更深的穿透深度;4、乳腺癌肿瘤微环境复杂,活体肿瘤原位靶向荧光成像容易受到影响,可能导致荧光信号在肿瘤组织中的分布不均匀,影响靶向精准度。

[0003] 目前临床使用的荧光造影剂主要为吲哚菁绿(ICG),但是其在乳腺癌造影中存在一定的假阳性/假阴性比率,在乳腺癌手术导航使用具有较大的局限性。故亟需开发一种能够适用乳腺癌肿瘤活体荧光靶向技术的荧光造影剂,实现乳腺癌肿瘤的精准识别,满足乳腺癌手术导航使用需求,对于乳腺癌的早期诊断和有效治疗具有重要意义。

发明内容

[0004] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的是提供一种曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒及其制备方法和应用,在手术导航的过程中可实时精准的指示乳腺癌的病灶及边缘,降低手术难度,有效预防术后复发。

[0005] 本发明的目的至少通过以下技术方案之一实现。

[0006] 一种曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒,由AIE荧光纳米颗粒和曲妥珠单抗偶联得到,所述AIE荧光纳米颗粒表面含有羧基和氨基中的至少一种,所述AIE荧光纳米颗粒内部负载有AIE分子;

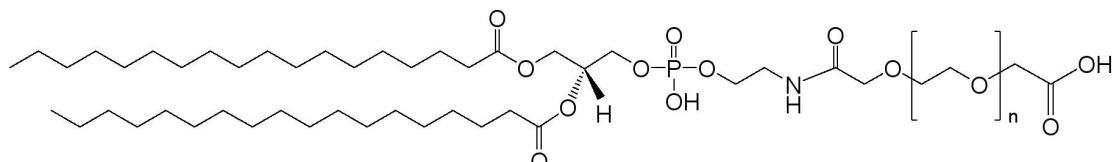
所述曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的平均粒径为50-300nm,分散系数为0.05-0.25。

[0007] 优选地,所述曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的平均粒径为90-150nm;

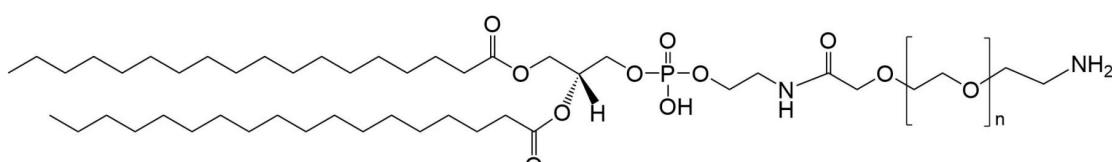
优选地,所述曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的分散系数为0.05-0.1;

优选地,所述AIE荧光纳米颗粒是以两亲性高分子聚合物为载体包裹AIE分子的具有球形结构的AIE荧光纳米颗粒,所述两亲性高分子聚合物含有羧基和氨基中的至少一种。

[0008] 进一步优选地,所述两亲性高分子聚合物包括式I、式II中的至少一种:



[0009] 式I



[0010] 式II

式I、式II中,n各自独立为≥45的整数。

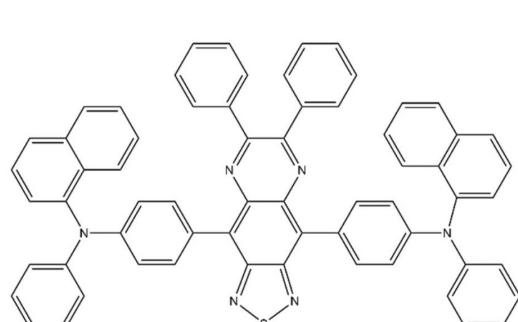
[0011] 优选地,所述AIE荧光纳米颗粒的平均粒径为90-150nm,变异系数为0.1-0.25;

优选地,所述AIE荧光纳米颗粒表面的氨基、羧基的总密度为4-20mmol/mL,以2mg/mL AIE荧光纳米颗粒溶液计;

优选地,所述AIE分子的最大发射波长大于700nm。

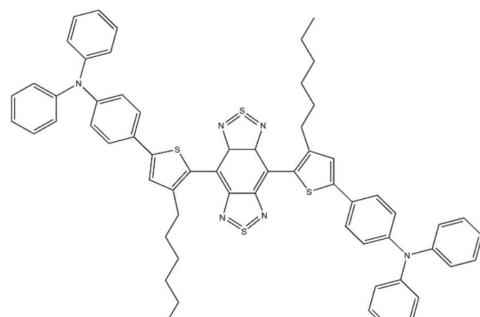
[0012] 进一步优选地,所述AIE分子的最大发射波长为700~1200nm。

[0013] 进一步优选地,所述AIE分子选自AIE-1分子到AIE-15分子中的至少一种;



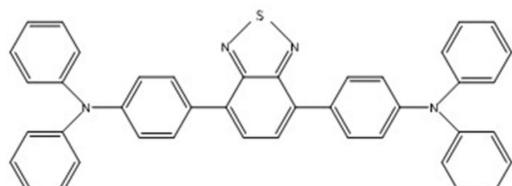
[0014]

AIE-1分子



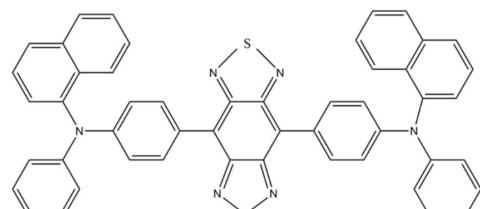
AIE-2分子

[0015]



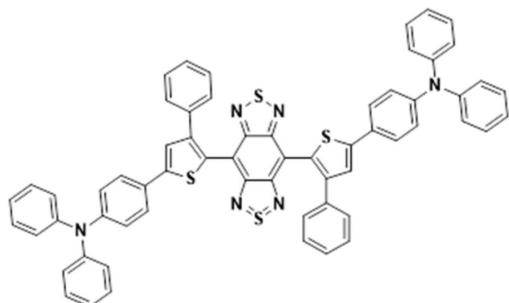
[0016]

AIE-3分子



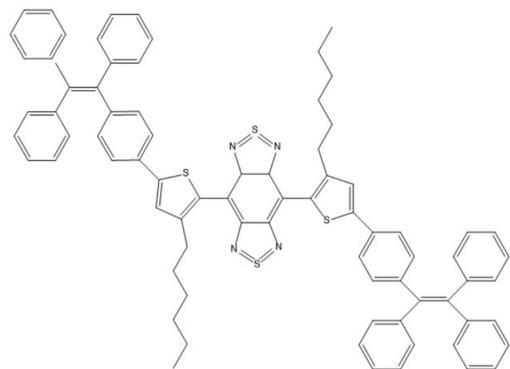
AIE-4分子

[0017]



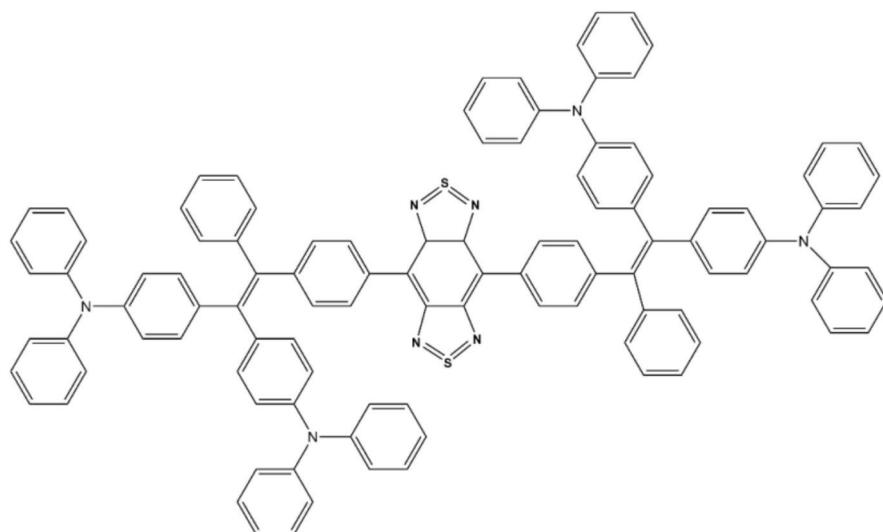
[0018]

AIE-5分子



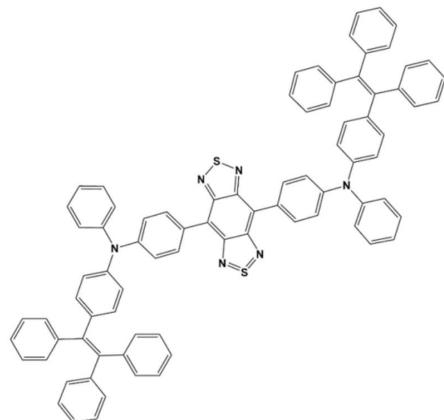
AIE-6分子

[0019]



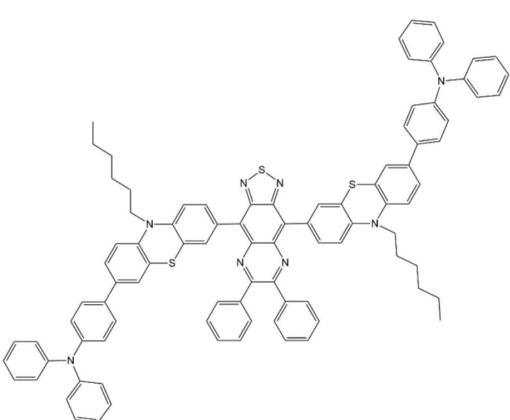
[0020]

AIE-7分子

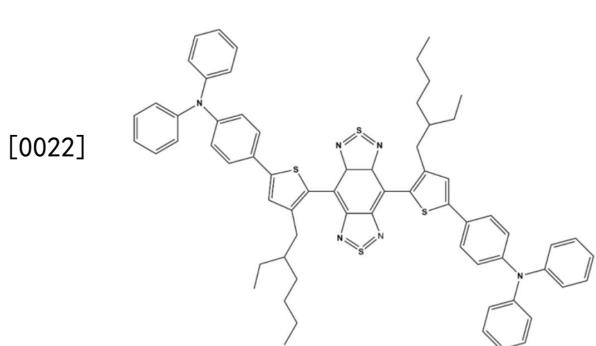


[0021]

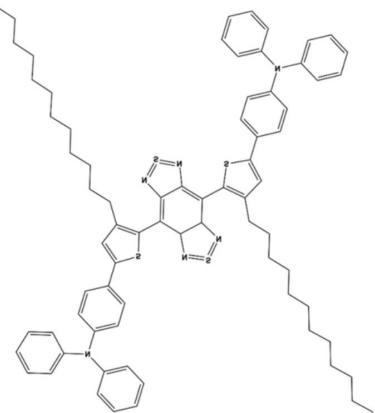
AIE-8分子



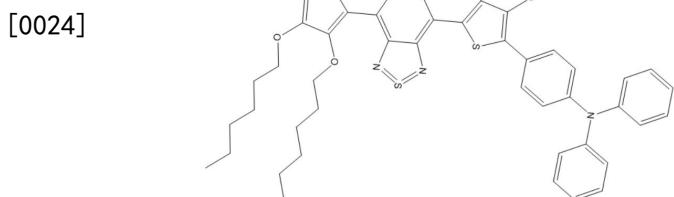
AIE-9分子



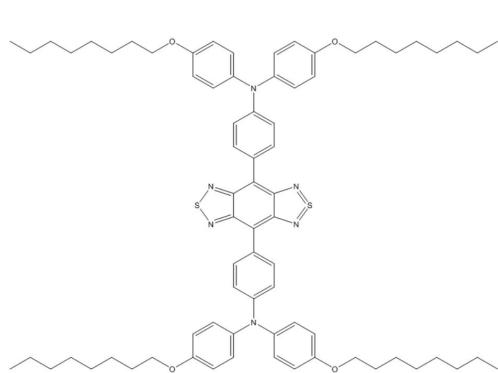
[0023] AIE-10分子



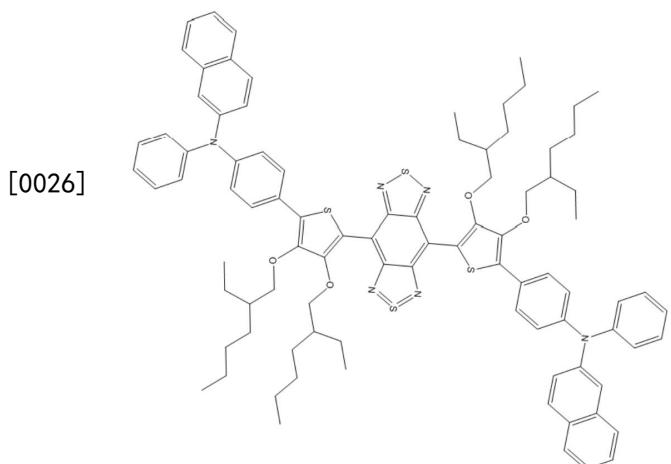
AIE-11分子



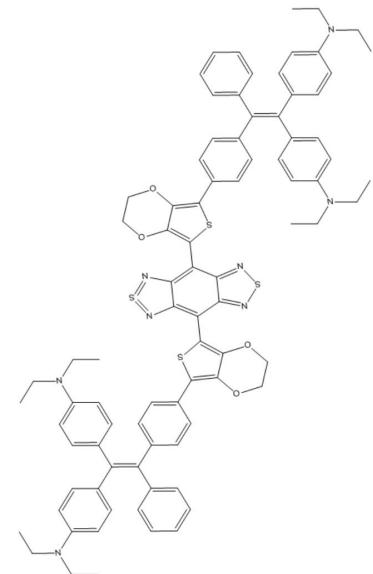
[0025] AIE-12分子



AIE-13分子



[0027] AIE-14分子



AIE-15分子。

[0029] 所述AIE荧光纳米颗粒可通过市购或自制获得。

[0030] 优选地，所述AIE荧光纳米颗粒通过纳米沉淀法制备得到。

[0031] 优选地，所述AIE荧光纳米颗粒的制备方法包括以下步骤：

- (1) 将AIE分子和两亲性高分子聚合物溶于挥发性有机溶剂中，得到有机相溶液；
- (2) 将有机相溶液在超声和混合搅拌条件下加至去离子水中；超声结束后，搅拌下

除去挥发性有机溶剂,过滤,得到AIE荧光纳米颗粒。

[0032] 进一步优选地,步骤(1)中,所述的AIE分子和两亲性高分子聚合物的质量用量比为1:(0.3-10);更优选为1:1。

[0033] 进一步优选地,步骤(1)中,所述的挥发性有机溶剂为四氢呋喃(THF)或二氯甲烷(DCM);

进一步优选地,步骤(1)中,所述AIE分子的质量和挥发性有机溶剂的体积比为1mg:(0.5-5)mL;

进一步优选地,步骤(2)中,挥发性有机溶剂的体积用量为去离子水的2%-10%;进一步优选为2%-5%。

[0034] 进一步优选地,步骤(2)中,所述超声的功率为60W-90W,超声的时间为2min~5min,混合搅拌的转速为600rpm-800rpm;

进一步优选地,步骤(2)中,所述搅拌的转速为600rpm-800rpm,搅拌的时间为12h-24h;所述过滤为使用水相过滤器过滤,水相过滤器的滤膜孔径为0.4~0.45μm;

进一步优选地,步骤(1)和步骤(2)在室温(20±5℃)下进行。

[0035] 上述的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备方法,包括以下步骤:

将AIE荧光纳米颗粒加入缓冲液中,加入EDC(1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)进行活化,离心重悬后再加入曲妥珠单抗水溶液进行反应,反应结束后,得到粗产物,经纯化后得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒;所述缓冲液(其中的缓冲对)不含NH₂。

[0036] 优选地,所述缓冲液为MES(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)缓冲液,所述缓冲液的pH为6.0-6.5,所述缓冲液的浓度为0.020-0.050mM;

优选地,所述AIE荧光纳米颗粒的质量和缓冲液的体积的用量比为(0.007~0.010)g:10mL;

优选地,所述EDC和NHS的质量比为1:(1-15);进一步优选为1:(3-5);

优选地,所述AIE荧光纳米颗粒和EDC的质量比为0.007:(0.00015~0.0225);

优选地,所述EDC在活化体系中的浓度为1-150mg/mL;所述NHS在活化体系中的浓度为1-650mg/mL;

优选地,所述AIE荧光纳米颗粒为AIE荧光纳米颗粒溶液,浓度为2-10mg/mL;

优选地,所述AIE荧光纳米颗粒和曲妥珠单抗的质量比为1:(0.01-0.08);进一步优选为1:(0.02-0.04)。

[0037] 优选地,所述活化的时间为0.5~1h;

优选地,所述反应的时间为2~4h;

优选地,所述制备方法在室温(20±5℃)下进行。

[0038] 优选地,所述纯化采用差速离心法纯化;

进一步优选地,所述差速离心法为:将粗产物先于真空条件下4000-5000rpm离心5-10min,去掉沉淀留上清;再于真空条件下10000-12000rpm离心10-20min,去掉上清留沉淀后加超纯水复溶;之后在真空条件下5000-6000rpm离心5-10min,去掉沉淀留上清,得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒。

[0039] 一种AIE荧光造影剂,包括上述的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒。

[0040] 上述的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒或上述的AIE荧光造影剂在非疾病诊断和/或治疗目的的乳腺癌肿瘤荧光靶向的应用。

[0041] 本发明的AIE荧光造影剂适用于乳腺癌肿瘤活体荧光靶向技术,在乳腺癌手术导航的过程中能够实时精准指示乳腺癌的病灶及边缘,降低手术难度,有效预防术后复发。

[0042] 与现有技术相比,本发明具有以下优势:

(1) 本发明的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒适用于乳腺癌肿瘤活体荧光靶向技术,在乳腺癌手术导航的过程中能够有效靶向乳腺癌肿瘤,实时成像,获得高信噪比和分辨率的图像,精准指示乳腺癌的病灶及边缘,帮助医生对病灶进行更加准确的判断和治疗,降低手术难度,有效预防术后复发。

[0043] (2) 本发明的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒具有长循环、生物相容性好的特点,注入体内后在血液中的循环时间长,有效增加造影剂与乳腺癌细胞的接触时间和机会,从而能够精准靶向乳腺癌细胞,实现对乳腺癌肿瘤病灶及其边缘的精准识别。

[0044] (3) 本发明的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒具有高荧光强度、优异的光稳定性和更深的组织穿透深度,能够在活体中精准靶向乳腺癌肿瘤细胞,有利于进行更长时间的体内深层实时成像。

附图说明

[0045] 图1是实施例1制备的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的粒径分布和扫描电镜图;

图2是实施例2制备的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的粒径分布和扫描电镜图;

图3是实施例3制备的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的粒径分布和扫描电镜图;

图4是AIE NPs 1的HCC1954乳腺癌3D细胞球摄取图;

图5是实施例1中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的HCC1954乳腺癌3D细胞球摄取图;

图6是实施例2中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的HCC1954乳腺癌3D细胞球摄取图;

图7是实施例3中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的HCC1954乳腺癌3D细胞球摄取图;

图8是AIE NPs 1(对照组)与实施例1中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒(实验组)的HCC1954乳腺癌细胞的流式细胞仪荧光分布图;

图9是实施例1中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954皮下瘤裸鼠的靶向成像图;

图10是实施例1中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像图;

图11是实施例2中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像图;

图12是实施例3中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸

鼠的靶向成像图；

图13是实施例1中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像局部图；

图14是对比例1制备的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的粒径分布和扫描电镜图；

图15是对比例1中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的HCC1954乳腺癌3D细胞球摄取图；

图16是对比例1中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像图；

图17是对比例2中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像图；

图18是对比例3中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像图；

图19是对比例4中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像图；

图20是对比例5中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像图；

图21是对比例6中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像图；

图22是对比例7中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像图；

图23是对比例8中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像图；

图24是对比例1中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像局部图；

图25是对比例2中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像局部图；

图26是对比例3中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像局部图；

图27是对比例4中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像局部图；

图28是对比例5中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像局部图；

图29是对比例6中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像局部图；

图30是对比例7中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像局部图；

图31是对比例8中曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠的靶向成像局部图。

具体实施方式

[0046] 下面结合实例对本发明进行具体地描述,但本发明的实施方式和保护范围不限于以下实施例。

[0047] 以下实例所用AIE荧光纳米颗粒的制备如下。

[0048] AIE NPs1的制备方法:

称取0.001g AIE-1分子(最大发射波长为1100nm),0.001g DSPE-PEG2000-COOH分子溶解在1mL四氢呋喃溶剂中,为溶液A;室温下,在超声和混合搅拌(600rpm)下将溶液A快速注入50mL去离子水中,超声功率为90W,超声2min,放入通风橱中搅拌(600rpm)过夜除去有机溶剂,使用0.45μm针头过滤器过滤,得到AIE纳米颗粒溶液。平均粒径90nm,变异系数0.12。

[0049] AIE NPs2的制备方法:

称取0.001g AIE-2分子(最大发射波长为780nm),0.0005g DSPE-PEG2000-COOH分子溶解在1mL四氢呋喃溶剂中,为溶液A;室温下,在超声和混合搅拌(700rpm)下将溶液A快速注入50mL去离子水中,超声功率为90W,超声2min,放入通风橱中搅拌(700rpm)过夜除去有机溶剂,使用0.45μm针头过滤器过滤,得到AIE纳米颗粒溶液。平均粒径110nm,变异系数0.18。

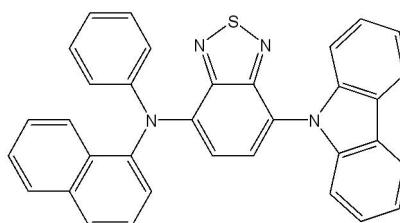
[0050] AIE NPs3的制备方法:

称取0.001g AIE-6分子(最大发射波长为900nm),0.0003g DSPE-PEG2000-NH₂分子,0.0005g DSPE-PEG2000溶解在1mL四氢呋喃溶剂中,为溶液A;室温下,在超声和混合搅拌(800rpm)下将溶液A快速注入50mL去离子水中,超声功率为90W,超声2min,放入通风橱中搅拌(800rpm)过夜除去有机溶剂,使用0.45μm针头过滤器过滤,得到AIE纳米颗粒溶液。平均粒径95nm,变异系数0.20。

[0051] AIE NPs4的制备方法:

称取0.001g AIE-1分子,0.0002g DSPE-PEG2000-COOH分子,0.0006g DSPE-PEG2000溶解在1mL四氢呋喃溶剂中,为溶液A;室温下,在超声和混合搅拌(650rpm)下将溶液A快速注入20mL去离子水中,超声功率为90W,超声2min,放入通风橱中搅拌(650rpm)过夜除去有机溶剂,使用0.45μm针头过滤器过滤,得到AIE纳米颗粒溶液。平均粒径180nm,变异系数0.18。

[0052] AIE NPs5的制备方法:(AIE分子结构:



长为610nm)

称取0.001g AIE分子,0.001g DSPE-PEG2000-COOH 分子溶解在1mL四氢呋喃溶剂中,为溶液A;室温下,在超声和混合搅拌(600rpm)下将溶液A快速注入50mL去离子水中,超声功率为90W,超声2min,放入通风橱中搅拌(600rpm)过夜除去有机溶剂,使用0.45μm针头过滤器过滤,得到AIE纳米颗粒溶液。平均粒径90nm,变异系数0.17。

[0053] 上述制备的AIE NPs1-5的表面官能团及其含量见表1。

[0054] 表1

AIE荧光纳米颗粒	表面官能团及其含量 (mmol/mL)
AIE NPs 1	羧基, 20
AIE NPs 2	羧基, 12
AIE NPs 3	氨基, 4
AIE NPs 4	羧基, 3
AIE NPs 5	羧基, 20

[0055] 其中,表面官能团的含量通过以下方法测得:

取1mL 2mg/mL的AIE纳米颗粒溶液,逐渐滴加0.1 M/L的碱性标准溶液(氢氧化钠)到AIE纳米颗粒溶液中,在滴定过程中,实时测量溶液的电导率,依据电位滴定仪形成的标准曲线,测定两个突跃点差值,依据公式计算羧基含量(氨基同理)。

[0056] 实施例1:曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备与表征

取0.007g固含量的AIE NPs 1溶液(1.75mL, 4mg/mL),加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入150μL EDC(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置)和900μL NHS(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置),在旋转混匀的条件下活化0.5h,离心后收集沉淀,得到羧基活化的AIE纳米颗粒,再加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入0.12mg固含量的曲妥珠单抗溶液(0.0057mL, 21mg/mL, 购自阿拉丁,货号T305227)旋转混匀2h,得到的溶液经超离在真空条件下首先5000rpm,离心10min去掉沉淀,上清经12000rpm,离心20min去掉上清,沉淀用超纯水复溶后经5000rpm,离心5min去掉沉淀,收集上清得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒溶液。

[0057] 通过动态光散射仪和扫描电子显微镜测试曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的表面形貌为规则的球形,平均粒径约为100nm,分散系数PDI为0.07(如图1所示)。

[0058] 实施例2:曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备与表征

取0.007g固含量的AIE NPs 2溶液(1.75mL, 4mg/mL),加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入150μL EDC(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置)和900μL NHS(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置),在旋转混匀的条件下活化0.5h,离心后收集沉淀,得到羧基活化的AIE纳米颗粒,再加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入0.08mg固含量的曲妥珠单抗溶液(0.0038mL, 21mg/mL, 购自阿拉丁,货号T305227)旋转混匀2h,得到的溶液经超离在真空条件下首先5000rpm,离心10min去掉沉淀,上清经12000rpm,离心20min去掉上清,沉淀用超纯水复溶后经6000rpm,离心10min去掉沉淀,收集上清得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒溶液。

[0059] 通过动态光散射仪和扫描电子显微镜测试曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的表面形貌为规则的球形,平均粒径约为50nm,分散系数PDI为0.09(如图2所示)。

[0060] 实施例3:曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备与表征

取0.007g固含量的AIE NPs 3溶液(1.75mL, 4mg/mL),加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入150μL EDC(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置)和900μL NHS(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置),在旋转混匀的条件下活

化0.5h,离心后收集沉淀,得到羧基活化的AIE纳米颗粒,再加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入0.56mg固含量的曲妥珠单抗溶液(0.0267mL, 21mg/mL,购自阿拉丁,货号T305227)旋转混匀2h,得到的溶液经超离在真空条件下首先5000rpm,离心10min去掉沉淀,上清经12000rpm,离心20min去掉上清,沉淀用超纯水复溶后经6000rpm,离心10min去掉沉淀,收集上清得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒溶液。

[0061] 通过动态光散射仪和扫描电子显微镜测试曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的表面形貌为规则的球形,平均粒径约为300nm,分散系数PDI为0.08(如图3所示)。

[0062] 性能测试:

曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对HCC1954人乳腺癌细胞特异性摄取成像

(1) 3D细胞球摄取测试

取AIE NPs 1(对照组)和实施例1-3制备好的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒(实验组),分别用10mM的磷酸盐缓冲液(PBS)配制成50 μ g/mL浓度(以AIE分子含量计)的溶液,加入到事先构建好的HCC1954人乳腺癌细胞(细胞采购自武汉普诺赛生命科技有限公司,以下实施例与此相同)的3D细胞球中进行染色,共孵育4h后,相较于对照组(如图4所示),实验组(如图5-7所示)的3D细胞球摄取的更加明显,表明曲妥珠单抗可以与乳腺癌特异性结合,表现优异的乳腺癌细胞靶向性。

[0063] (2) 流式细胞仪测试

取AIE NPs 1(对照组)和实施例1制备好的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒(实验组),分别用10mM的磷酸盐缓冲液(PBS)配制成50 μ g/mL浓度(以AIE分子含量计)的溶液,加入到密度在60%左右的HCC1954人乳腺癌细胞培养皿中进行染色,共孵育4h后,相较于对照组,实验组的细胞摄取的更加明显(如图8所示),表明曲妥珠单抗可以与乳腺癌特异性结合,表现优异的乳腺癌细胞靶向性。

[0064] 曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒在乳腺癌HCC1954裸鼠体内荧光成像

(1) 乳腺癌HCC1954皮下瘤裸鼠体内荧光成像

取实施例1制备好的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒,用生理盐水配制成1mg/mL浓度(以AIE分子含量计)的溶液,用注射器吸取150 μ L该溶液从尾静脉注射于乳腺癌HCC1954皮下瘤裸鼠(裸鼠采购自珠海百试通生物科技有限公司,以下实施例与此相同)体内,并于给药后5min、3h、5h、24h、48h进行光学信号的采集(使用广州博鹭腾生物科技有限公司的近红外二区小动物活体成像系统,激发光源选择808nm(2W/cm²),发射滤光片选择1300nm LP,曝光时间设置5s,以下实施例与此相同)。给药3h即在乳腺癌皮下瘤的部位检测到明显的信号富集,一直持续到48h,乳腺癌皮下瘤的部位的信号越来越强(如图9所示),表明曲妥珠单抗可以与乳腺癌特异性结合,表现优异的乳腺癌靶向性。

[0065] (2) 乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠体内荧光成像

取实施例1-3制备好的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒,用生理盐水配制成1mg/mL浓度(以AIE分子含量计)的溶液,用注射器吸取150 μ L该溶液从尾静脉注射于乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠体内,并于给药后2h进行光学信号的采集。可在乳腺癌原位瘤的部位检测到明显的信号富集(如图10-12所示),表明本发明的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒具有高荧光强度和更深的组织穿透深度,能够在活体中精准靶向乳腺癌原位瘤细胞,有利于进行更长时间的体内深层实时成像。

[0066] (3) 乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠体内荧光成像

取实施例1制备好的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒,用生理盐水配制成1mg/mL浓度(以AIE分子含量计)的溶液,用注射器吸取150μL该溶液从尾静脉注射于乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠体内,并于给药后1h进行光学信号的采集。可在乳腺癌原位瘤的部位检测到明显的信号富集,且肿瘤边界清晰可见(如图13所示),表明本发明的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒能够在活体中精准靶向乳腺癌原位瘤细胞,可提高乳腺癌成像的信噪比和分辨率,精准指示乳腺癌的病灶及边缘。

[0067] 对比例1:曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备与表征

取0.007g固含量的AIE NPs 1溶液(1.75mL, 4mg/mL),加入10mL 去离子水中,然后加入0.12mg固含量的曲妥珠单抗溶液(0.0057mL, 21mg/mL, 购自阿拉丁,货号T305227),之后加入150μL EDC(浓度为100mg/mL,去离子水配置)和900μL NHS(浓度为100mg/mL,去离子水配置),在旋转混匀的条件下反应4h,得到的溶液经超离在真空条件下首先5000rpm,离心10min去掉沉淀,上清经12000rpm,离心20min去掉上清,沉淀用超纯水复溶后经6000rpm,离心10min去掉沉淀,收集上清得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒溶液。

[0068] 通过动态光散射仪和扫描电子显微镜测试曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的表面形貌为规则的球形,平均粒径约为500nm,分散系数PDI为0.25(如图14所示)。

[0069] 对比例2:曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备与表征

取0.007g固含量的AIE NPs 1溶液(1.75mL, 4mg/mL),加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入150μL EDC(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置)和900μL NHS(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置),在旋转混匀的条件下活化0.5h,离心后收集沉淀,得到羧基活化的AIE纳米颗粒,再加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入0.06mg固含量的曲妥珠单抗溶液(0.00286mL, 21mg/mL, 购自阿拉丁,货号T305227)旋转混匀2h,得到的溶液经超离在真空条件下首先5000rpm,离心10min去掉沉淀,上清经12000rpm,离心20min去掉上清,沉淀用超纯水复溶后经5000rpm,离心5min去掉沉淀,收集上清得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒溶液。平均粒径约为40nm,分散系数PDI为0.23。

[0070] 对比例3:曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备与表征

取0.007g固含量的AIE NPs 1溶液(1.75mL, 4mg/mL),加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入150μL EDC(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置)和900μL NHS(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置),在旋转混匀的条件下活化0.5h,离心后收集沉淀,得到羧基活化的AIE纳米颗粒,再加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入0.6mg固含量的曲妥珠单抗溶液(0.0286mL, 21mg/mL, 购自阿拉丁,货号T305227)旋转混匀2h,得到的溶液经超离在真空条件下首先5000rpm,离心10min去掉沉淀,上清经12000rpm,离心20min去掉上清,沉淀用超纯水复溶后经5000rpm,离心5min去掉沉淀,收集上清得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒溶液。平均粒径约为450nm,分散系数PDI为0.29。

[0071] 对比例4:曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备与表征

取0.007g固含量的AIE NPs 4(表面羧基含量3mmol/mL的AIE荧光纳米颗粒)溶液(1.75mL, 4mg/mL),加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入150μL EDC(浓度

为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置)和900μL NHS(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置),在旋转混匀的条件下活化0.5h,离心后收集沉淀,得到羧基活化的AIE纳米颗粒,再加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入0.12mg固含量的曲妥珠单抗溶液(0.0057mL, 21mg/mL,购自阿拉丁,货号T305227)旋转混匀2h,得到的溶液经超离在真空条件下首先5000rpm,离心10min去掉沉淀,上清经12000rpm,离心20min去掉上清,沉淀用超纯水复溶后经5000rpm,离心5min去掉沉淀,收集上清得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒溶液。平均粒径约为70nm,分散系数PDI为0.1。

[0072] 对比例5:曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备与表征

取0.007g固含量的AIE NPs 1溶液(1.75mL, 4mg/mL),加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入150μL EDC(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置)和900μL NHS(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置),在旋转混匀的条件下活化0.5h,离心后收集沉淀,得到羧基活化的AIE纳米颗粒,再加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入0.12mg固含量的曲妥珠单抗溶液(0.0057mL, 21mg/mL,购自阿拉丁,货号T305227)旋转混匀2h,得到的溶液经超离在真空条件下首先5000rpm,离心5min去掉上清,收集沉淀复溶得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒溶液。平均粒径约为400nm,分散系数PDI为0.26。

[0073] 对比例6:曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备与表征

取0.007g固含量的AIE NPs 1溶液(1.75mL, 4mg/mL),加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入150μL EDC(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置)和900μL NHS(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置),在旋转混匀的条件下活化0.5h,离心后收集沉淀,得到羧基活化的AIE纳米颗粒,再加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入0.12mg固含量的曲妥珠单抗溶液(0.0057mL, 21mg/mL,购自阿拉丁,货号T305227)旋转混匀2h,得到的溶液经超离在真空条件下首先5000rpm,离心10min去掉沉淀,上清经12000rpm,离心20min去掉上清,沉淀用超纯水复溶后经6000rpm,离心10min去掉沉淀,收集上清得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒溶液。平均粒径约为40nm,分散系数PDI为0.22。

[0074] 对比例7:曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备与表征

取0.007g固含量的AIE NPs 5溶液(1.75mL, 4mg/mL),加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入150μL EDC(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置)和900μL NHS(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置),在旋转混匀的条件下活化0.5h,离心后收集沉淀,得到羧基活化的AIE纳米颗粒,再加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入0.12mg固含量的曲妥珠单抗溶液(0.0057mL, 21mg/mL,购自阿拉丁,货号T305227)旋转混匀2h,得到的溶液经超离在真空条件下首先5000rpm,离心10min去掉沉淀,上清经12000rpm,离心20min去掉上清,沉淀用超纯水复溶后经5000rpm,离心5min去掉沉淀,收集上清得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒溶液。平均粒径约为100nm,分散系数PDI为0.09。

[0075] 对比例8:帕妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒的制备与表征

取0.007g固含量的AIE NPs 1溶液(1.75mL, 4mg/mL),加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入150μL EDC(浓度为100mg/mL, pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置)

CN 119139499 A

和900 μ L NHS(浓度为100mg/mL,pH6.5的0.05mM MES缓冲液配置),在旋转混匀的条件下活化0.5h,离心后收集沉淀,得到羧基活化的AIE纳米颗粒,再加入10mL pH6.5的0.05mM MES缓冲液,充分混匀后加入0.12mg固含量的帕妥珠单抗溶液(0.0239mL, 5.02mg/mL,购自Selleck,货号A2008)旋转混匀2h,得到的溶液经超离在真空条件下首先5000rpm,离心10min去掉沉淀,上清经12000rpm,离心20min去掉上清,沉淀用超纯水复溶后经5000rpm,离心5min去掉沉淀,收集上清得到曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒溶液。平均粒径约为100nm,分散系数PDI为0.12。

[0076] 性能测试:

曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒对HCC1954人乳腺癌细胞特异性摄取成像

3D细胞球摄取测试:取对比例1制备好的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒(实验组),分别用10mM的磷酸盐缓冲液(PBS)配制成50 μ g/mL浓度(以AIE分子含量计)的溶液,加入到事先构建好的HCC1954人乳腺癌细胞(细胞采购自武汉普诺赛生命科技有限公司)的3D细胞球中进行染色,共孵育4h后,相较于对照组(如图4所示),实验组(如图15所示)的3D细胞球摄取比较明显,表明在3D细胞球摄取测试中,平均粒径>300nm的曲妥珠单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒也能够表现一定的乳腺癌细胞靶向性。

[0077] 单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒在乳腺癌HCC1954裸鼠体内荧光成像

(1) 乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠体内荧光成像:取对比例1-8制备好的单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒,用生理盐水配制成1mg/mL浓度(以AIE分子含量计)的溶液,用注射器吸取150 μ L该溶液从尾静脉注射于乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠体内,并于给药后2h进行光学信号的采集(如图16-23所示)。可在乳腺癌原位瘤的部位检测到有一定的信号富集,但靶向性不强。

[0078] (2) 乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠体内荧光成像:取对比例1-8制备好的单抗修饰的AIE荧光纳米颗粒,用生理盐水配制成1mg/mL浓度(以AIE分子含量计)的溶液,用注射器吸取150 μ L该溶液从尾静脉注射于乳腺癌HCC1954原位瘤裸鼠体内,并于给药后1h进行光学信号的采集(如图24-31所示)。可在乳腺癌原位瘤的部位检测到信号富集,但肿瘤边界不明显,乳腺癌成像的分辨率和信噪比也较差。

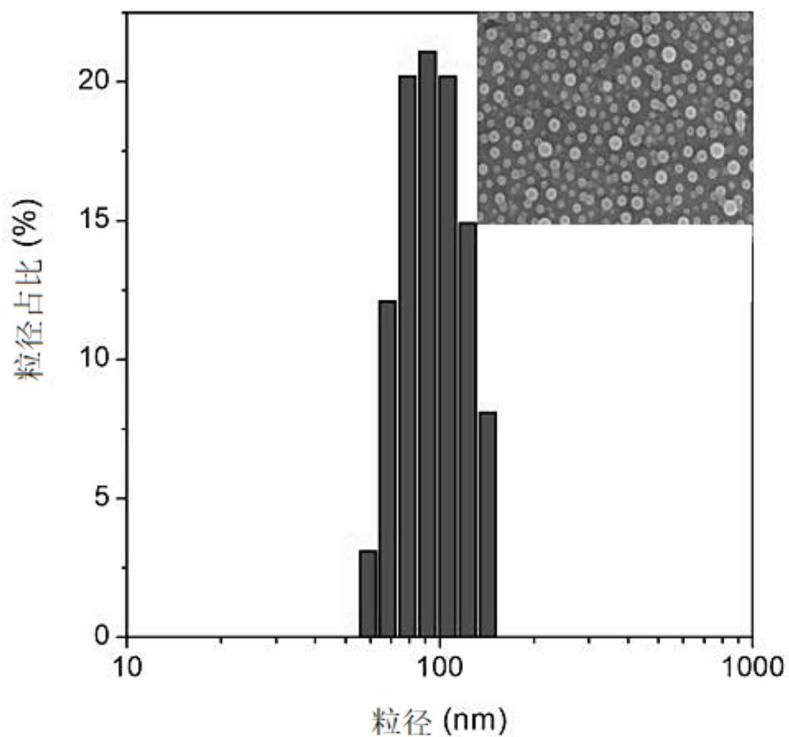


图1

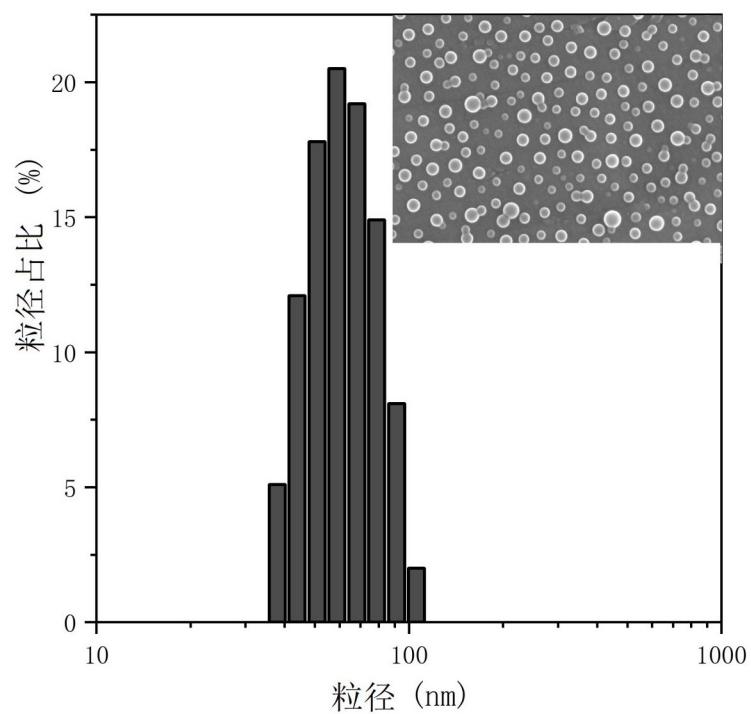


图2

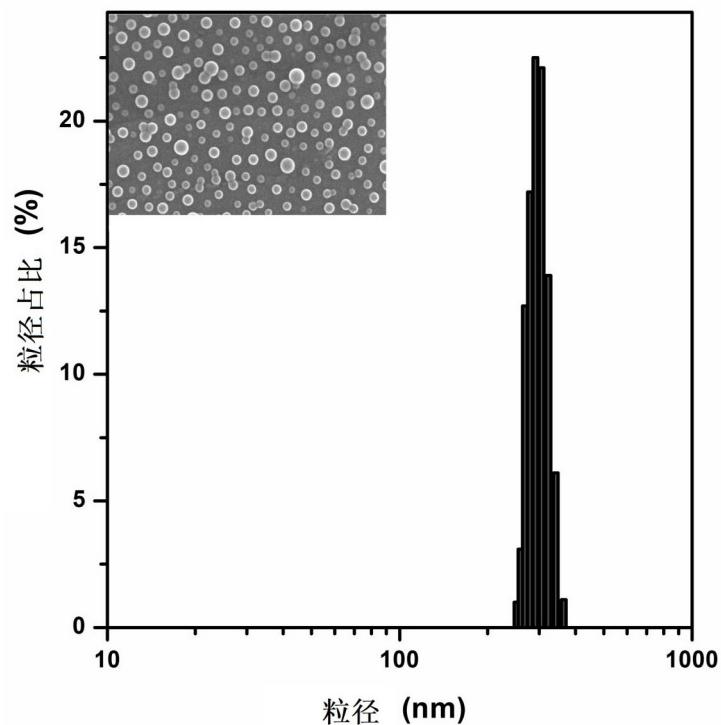


图3

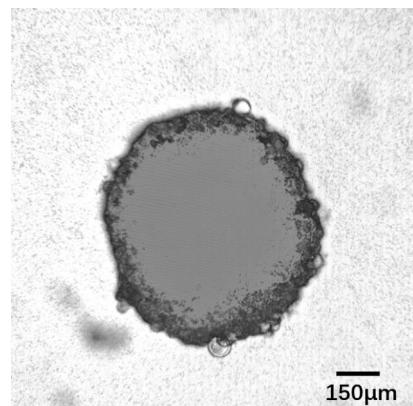


图4

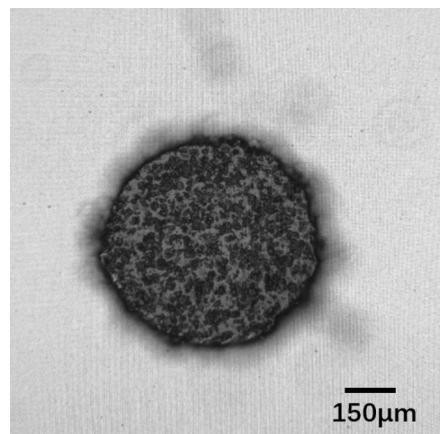


图5

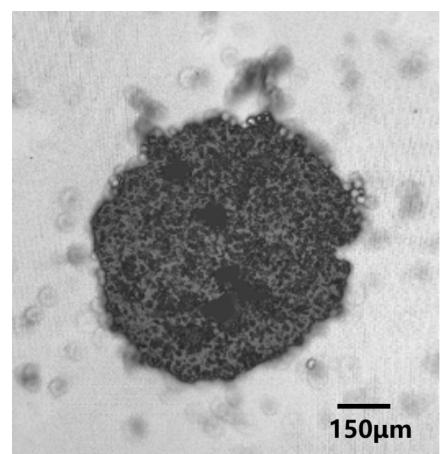


图6

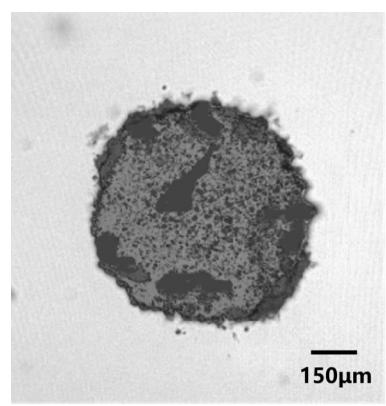


图7

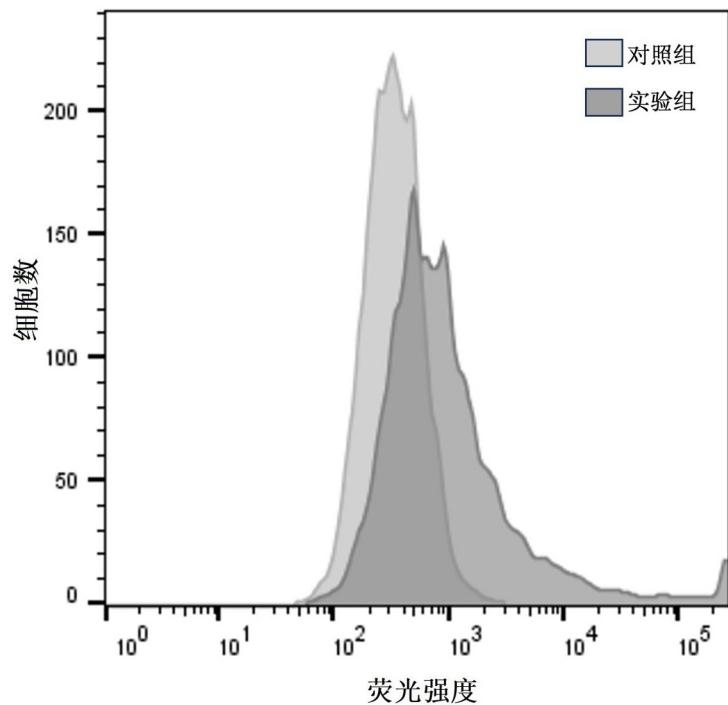


图8

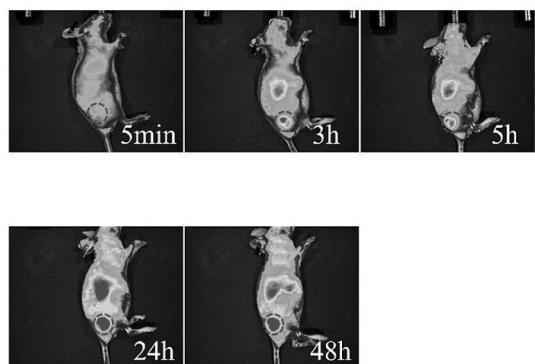


图9

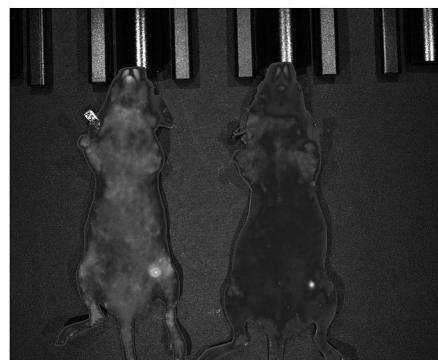


图10

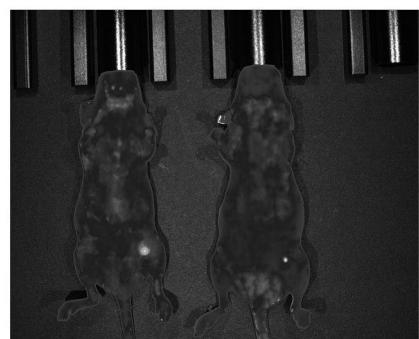


图11

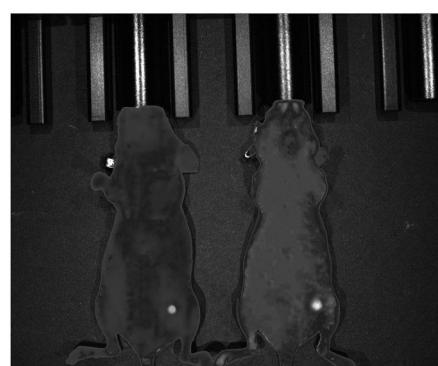


图12

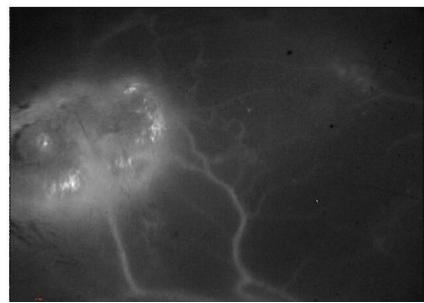


图13

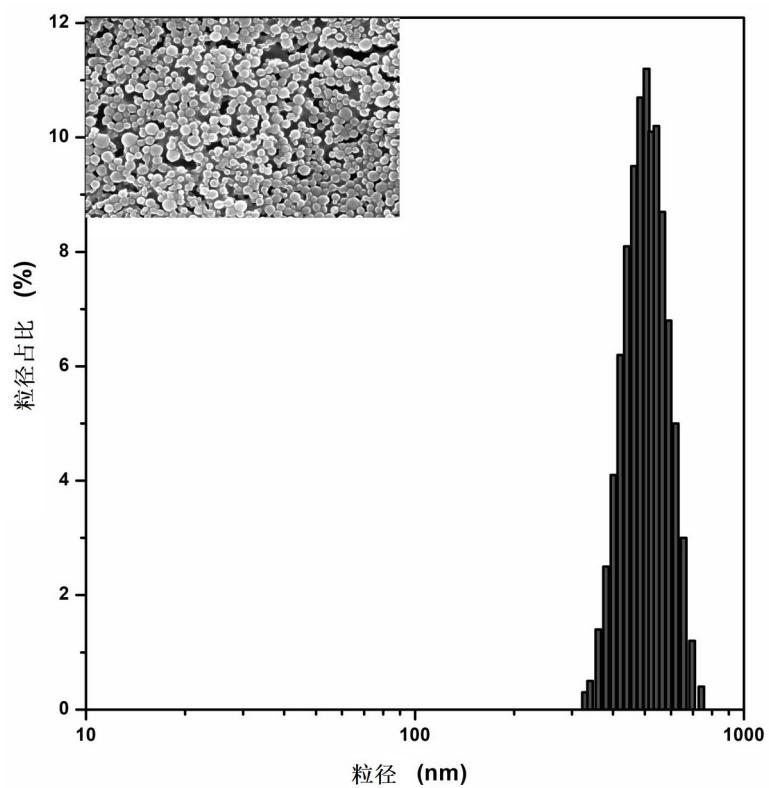


图14

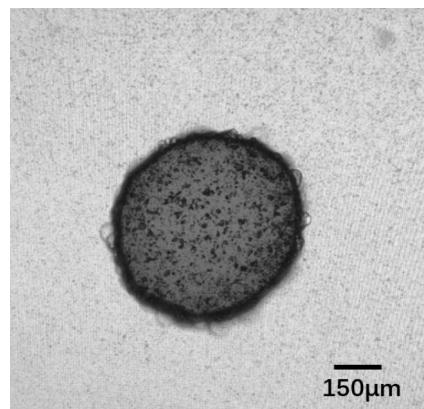


图15

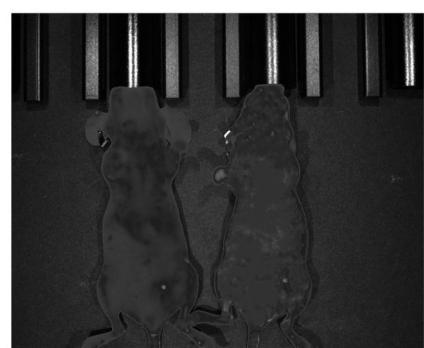


图16

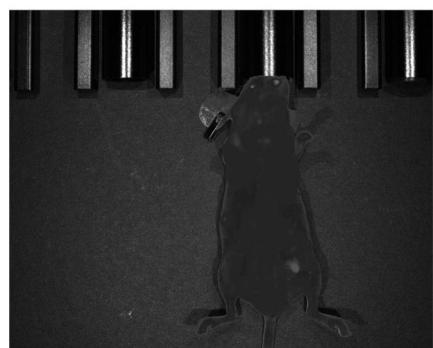


图17



图18

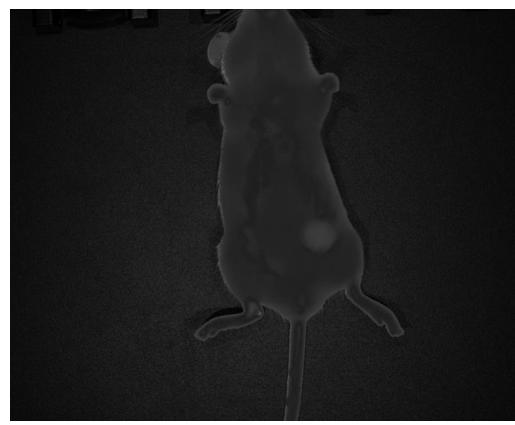


图19



图20

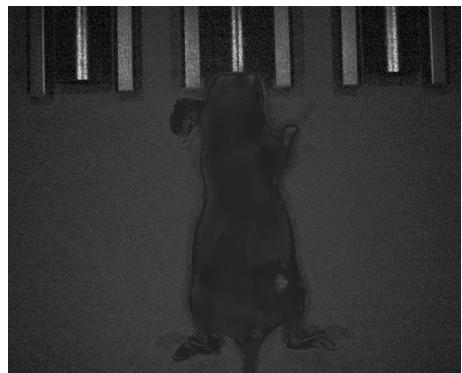


图21



图22

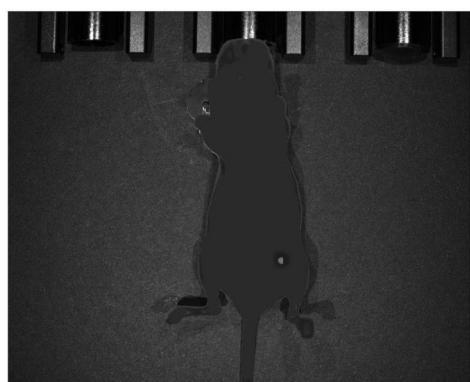


图23

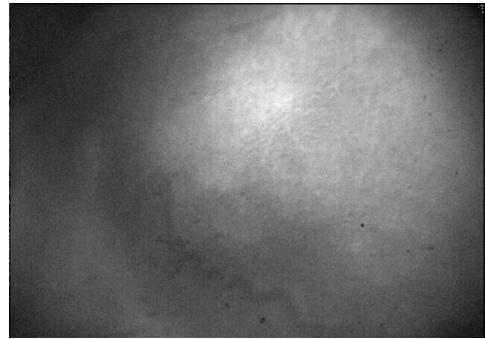


图24

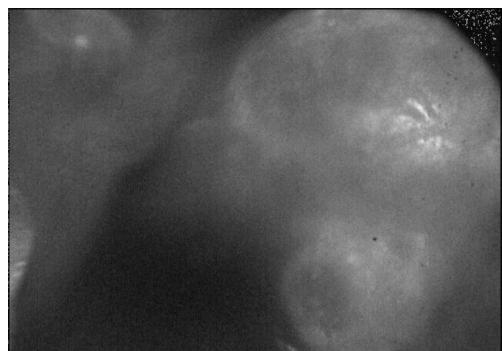


图25

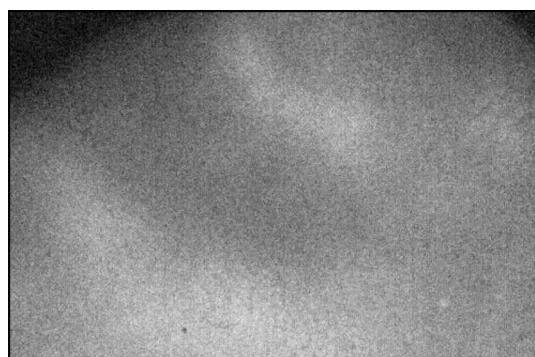


图26

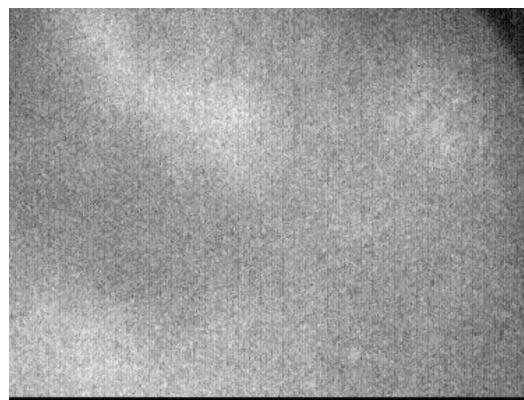


图27



图28

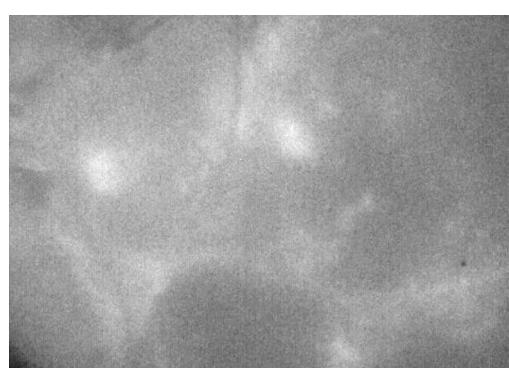


图29

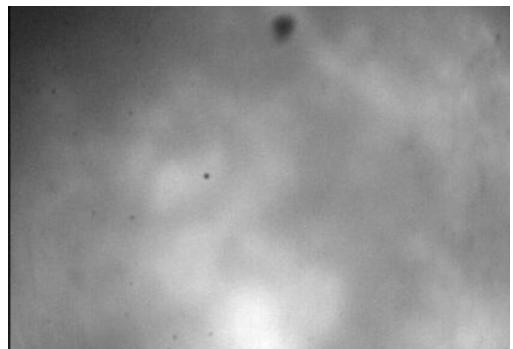


图30



图31