

(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
2014年1月9日 (09.01.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/005383 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 49/04 (2006.01) A61K 49/16 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) A61K 49/14 (2006.01)
A61K 49/12 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/082578
- (22) 国际申请日: 2012年10月8日 (08.10.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210230833.8 2012年7月3日 (03.07.2012) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中国科学院宁波材料技术与工程研究所 (NINGBO INSTITUTE OF MATERIALS TECHNOLOGY AND ENGINEERING, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国浙江省宁波市镇海区庄市大道 519 号, Zhejiang 315201 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (71) 申请人 (仅对美国): 沈折玉 (SHEN, Zheyu) [CN/CN]; 中国浙江省宁波市镇海区庄市大道 519 号 A509, Zhejiang 315201 (CN)。 吴爱国 (WU, Aiguo) [CN/CN]; 中国浙江省宁波市镇海区庄市大道 519 号 A510, Zhejiang 315201 (CN)。
- (74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, 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, 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, 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))。

(54) Title: INVISIBLE RADIOGRAPHY MATERIAL FOR EARLY TUMOUR DIAGNOSIS AND PREPARATION METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 肿瘤早期诊断用隐形造影材料及其制备方法

(57) Abstract: Disclosed are an invisible radiography material for early tumour diagnosis and the preparation method thereof. The method comprises the following steps: employing a biodegradable nanosphere to embed a medical contrast medium; coupling a target molecule which specifically interacts with a tumour cell on the surface of the nanosphere; and grafting a pH sensitive macromolecule which is a macromolecule compound contracted between pH 5.0-6.0.

(57) 摘要: 一种肿瘤早期诊断用隐形造影材料及其制备方法, 采用可生物降解纳米球包埋医学造影剂、在纳米球的表面偶联与肿瘤细胞有特异性相互作用的靶分子、并接枝 pH 敏感型高分子, 所述 pH 敏感型高分子为在 pH5.0-6.0 范围内发生收缩的高分子化合物。



WO 2014/005383 A1

发明名称：肿瘤早期诊断用隐形造影材料及其制备方法

技术领域

- [1] 本发明涉及纳米造影材料，尤其是涉及一种具有高特异性靶向功能的纳米造影材料及其制备方法。

背景技术

- [2] 恶性肿瘤（癌症）是严重威胁人类健康的主要疾病之一，到目前为止，人类还没有找到治疗各种恶性肿瘤的有效方法。公认的降低癌症死亡率的方法是，早发现、早治疗，在癌细胞扩散前对其进行检测，并进行有效治疗。目前，各类恶性肿瘤的主要诊断技术只能发现尺寸大于 1 厘米 的肿瘤，对更小的肿瘤却无能为力，如磁共振成像（MRI）[Biomaterials, 2011; 32: 5167-5176]、计算机 X 射线断层成像（CT）和正电子发射断层成像（PET）。医学造影剂能提高这些诊断技术的检测灵敏度与空间分辨率，为了实现对各种恶性肿瘤的早期检测与诊断，需要发展各类高性能的医学造影剂 [Nat. Nanotechnol., 2010; 5: 815-821]。

- [3] 第一种商用 MRI 造影剂是德国 Schering 公司 H.J.Weinmenn 研制开发的 Gd-DTPA，它是二乙三胺五乙酸（DTPA）与 Gd（III）的配合物 [Angew. Chem. Int. Edit., 2010; 49: 1231-1233]。随后，研究较多的是超顺磁性造影剂。超顺磁性造影剂的磁矩和磁化率均远大于人体组织结构，也远大于顺磁性螯合物，但因其水溶性极小，只能采用匀浆或胶体的形式给药。由于此类造影剂多具有趋肝、脾肿瘤的性能且肾毒性小，故倍受人们的重视，工作重点是选择适当的载药介质、配方、剂型和制备方法，并进行性质试验 [Biomaterials, 2011; 32: 4584-4593]。中国科学院化学研究所高明远研究员课题组用 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 成功地制备了尺寸形貌可控的磁性纳米晶体材料，还深入探索了以 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 为单一原料制备 Fe_3O_4 纳米晶体的机理，该磁性纳米晶体可以很好地应用于磁共振成像 [Angew. Chem. Int. Ed., 2005; 44: 123-126]；随后，他们采用‘一锅反应法’合成了共价键结合的磁性 MPEG-COOH（monocarboxyl-terminated poly (ethylene

glycol) 纳米晶体, 活体大鼠 MRI 实验结果表明 MPEG 修饰的磁性纳米颗粒具有非常好的生物相容性, 作为 MRI 造影剂具有很大的潜能 [Adv. Mater., 2005; 17: 1001-1005]; 用一步反应制备出的表面修饰有羧基 PEG 的磁性纳米微粒不仅具有优异的 MRI 造影功能, 而且表现出较长的血液循环时间和低生物毒性 [Adv. Mater., 2006; 18: 2553-2556]。东南大学顾宁教授课题组制备了一种具有 PLA/PVA 双层聚合物外壳 (厚度为 50-70 nm) 的包膜微泡, 并成功用其包埋 12 nm 的超顺磁性氧化铁纳米粒子 (SPION), 显著提高了包膜微泡的磁化率, 体内 MRI 实验证明了其作为造影剂的良好效果 [Biomaterials, 2009; 30: 3882-3890]。具有超顺磁性的纳米颗粒由于其独特的磁学和电学性能、具有大的比表面积、高的化学稳定性等优点, 在 MRI 造影剂领域表现出诱人的应用前景。

- [4] 近几年, 有研究将靶分子 (能靶向作用于癌细胞的化合物, 如单克隆抗体、叶酸和半乳糖胺等配体) 与超顺磁性氧化铁纳米粒子 (SPION) 结合, 提高了 SPION 对肿瘤组织的靶向性。例如, 东华大学史向阳教授课题组采用热分解法成功地制备了表面镀有硅的超顺磁性氧化铁核壳型纳米粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ NPs), 然后将其表面氨化、共价偶联顺磁性钆复合物 (Gd-DTPA, DTPA: 二乙三胺五乙酸) 与精氨酸 - 甘氨酸 - 天冬氨酸寡肽 (RGD), 体内 MRI 实验表明该多功能 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2(\text{Gd-DTPA})\text{-RGD}$ 纳米粒子能特异性靶向表面表达有 $\alpha v \beta 3$ 整合素的癌细胞 [Biomaterials, 2011; 32: 4584-4593]。西班牙萨拉戈萨大学 Miguel-Sancho 教授课题组在三甘醇中高温热解乙酰丙酮铁, 制备了水溶性的 SPION, 并在 SPION 表面偶联了一种模型抗体, 用酶联免疫法 (ELISA) 检测了抗体 -SPION 复合物的免疫反应, 该研究表明, 在 SPION 表面嫁接一种针对癌细胞表面抗原的单克隆抗体, 可以制得一种对肿瘤组织具有靶向性的 MRI 造影剂 [Chem. Mater., 2011; 23: 2795-2802]。新加坡国立大学康燕堂教授课题组通过原子转移自由基聚合法 (ATRP) 在 SPION 表面偶联了聚甲基丙烯酸缩水甘油酯 - 聚乙二醇甲基丙烯酸酯共聚物 (P(GMA-co-PEGMA)), PEGMA 起到稳定纳米粒子、延长其体内循环时间的作用, 通过 GMA 来嫁接能靶向癌细胞的配体叶酸, 从而制得一种能主动靶向作用于肿瘤组织的 MRI 造影剂 [Langmuir,

2012; 28: 563-571]。天津大学常津教授课题组用偶联有配体叶酸的聚合物磷脂包裹 SPION，并进一步评估了其作为靶向型 MRI 造影剂的效果 [Pharmacol. Res., 2011; 64: 410-419]。这些研究都通过靶分子（单克隆抗体或配体）与 SPION 的结合，在提高 SPION 对肿瘤组织的靶向性方面做出了贡献，对恶性肿瘤的早期诊断具有重要的科学意义与社会经济价值。

- [5] 计算机 X 射线断层成像（CT）利用人体不同组织对 X 射线的透过率的不同，可以对人体和组织进行成像 [Nature Medicine, 1996; 2: 473-475]。CT 造影剂的使用更是极大地增加了靶组织与周围组织的区分度 [Physics in Medicine and Biology, 2002; 47: 3369-3385]。目前的 X 射线造影剂有包入脂质体的碘造影剂 [Academic Radiology, 2003; 10: 475-483]，镓 -DTPA- 右旋糖苷聚合物 [Academic Radiology, 2002; 9: 784-792]，PEG 包裹的碘聚合物 [Advanced Drug Delivery Reviews, 2002; 54: 235-252]，荧光溴化物 [Academic Radiology, 1994; 1: 151-153]，以及连接到聚乙烯壳的碘 [Academic Radiology, 1999; 6: 61-65] 等，其中，基于有机小分子碘的造影剂的应用更为普遍。这是因为碘具有较高的 X 射线吸收系数 [Advanced Drug Delivery Reviews, 1999; 37: 159-173]。然而，这些含碘物质由于迅速被肾脏清除而使得造影时间很短，具有肾毒性，而且，X 射线会诱导含碘物质电离出碘离子，造成毒性。随着纳米材料技术和生物纳米技术的发展，新型基于纳米颗粒的 CT 造影剂有望改善上述缺点 [Small, 2007; 3: 333-341]。纳米颗粒的尺寸小（1 ~ 100 nm），可以进入微米尺寸内径的毛细血管 [Journal of Artificial Organs, 2005; 8: 77-84]，因此能更多地进入组织；而且，由于癌变组织部位毛细血管的通透性增强 [American Journal of Pathology, 2000; 156: 1363-1380]，纳米颗粒可以通过渗漏作用更多地沉积在癌变组织上，从而更好地对癌变区域成像 [CT 理论与应用研究，2009；18：15-25]。

- [6] 另外，正电子发射断层成像（PET）已广泛应用于多种恶性肿瘤的诊断，对肿瘤患者的诊断价值也越来越引起关注。近 20 年来，核素 ¹⁸F 标记的 2-（氟-¹⁸）-2-脱氧葡萄糖（FDG）正电子发射断层成像（PET）检查方法渐渐发展起来。FDG-PET 可以显示病灶的代谢特征，有助于区别病灶的良恶性，且对肿瘤的分期也有一定的帮助 [中华结核和呼吸杂志，2005；28：221-224]

。文献报道 ^{18}F -FDG PET 显像较 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -亚甲基二磷酸盐显像更灵敏 [Radiology, 1999; 212: 803-809]。

- [7] 相对于 MRI、CT 和 PET 等成像模式而言，光学成像具有无辐射、低成本的特点，尤其是近红外荧光成像，可以部分实现对深层组织和器官的探测和成像，在光学成像方面具有特定的优势 [Nature Methods, 2009; 6: 465-469]。光学成像的核心是荧光素造影剂，主要面临的问题包括深层次光的传输和采集以及荧光素造影剂的发光量子效率、抗漂白性、良好的生物相容性和靶向性 [Biomaterials, 2009; 30: 5592-5600]。含四吡咯基团的近红外荧光染料（如酞菁）是近年来关注的焦点，因具有良好的光物理行为使其在近红外探针方面具有较好的应用前景 [J. Am. Chem. Soc., 2009; 131: 2432-2433]。在荧光素造影剂的设计中，靶向性是一个关键问题，最为常见的是利用细胞表面的受体设计主动靶向肿瘤细胞的给药系统 [高等学校化学学报, 2011; 32: 1010-1012]。

- [8] 根据上述医学造影材料的国内外研究现状分析，合成对肿瘤组织具有靶向性的造影材料、减小造影剂的用药剂量、降低毒性和制备成本是研究的主要趋势。目前，靶向造影材料的制备一般是通过在造影剂上结合靶分子（单克隆抗体或配体），从而实现对癌细胞的特异性。然而，正常的细胞表面也存在着非特异性抗原或者受体，这些抗原或受体也能与靶分子（单克隆抗体或配体）结合，从而影响了各种诊断技术的检测灵敏度与空间分辨率，因此，发展出具有更高特异性靶向功能的造影剂是目前迫切需要解决的问题。

对发明的公开

技术问题

- [9] 本发明提供了一种肿瘤早期诊断用隐形造影材料及其制备方法，所述的隐形造影材料能高特异性靶向输送至肿瘤部位。

问题的解决方案

技术解决方案

- [10] 一种肿瘤早期诊断用隐形造影材料，由可生物降解的纳米球、包埋于所述纳米球内部的医学造影剂、连接于所述纳米球表面的 pH 敏感型高分子和靶分子构成。

- [11] 所述的 pH 敏感型高分子在 pH5.0~6.0 范围内易于发生转变，由线形伸展状态变成收缩状态，使得所述的靶分子能够暴露出来，同时对细胞具有较小的毒性，所述的 pH 敏感型分子优选为异丙基丙烯酰胺-丙烯酸共聚物和异丙基丙烯酰胺-甲基丙烯酸共聚物中的至少一种，分子量范围为 2k-1000k。
- [12] 本发明的上述肿瘤早期诊断用隐形造影材料特异性靶向肿瘤细胞的原理如图 1 所示。在正常生理条件下，机体的 pH 值在 7.3 ~ 7.4 之间，所述的纳米球表面的靶分子隐藏在线形伸展状态的 pH 敏感型高分子之中，不能与正常细胞的非特异性抗原或受体发生相互作用，故该隐形造影材料不能被正常细胞非特异性摄取；而在肿瘤组织环境下，pH 值约为 5.5，pH 敏感型高分子会发生相转变而收缩，使纳米球表面的靶分子暴露出来，与肿瘤细胞表面的抗原或受体发生特异性相互作用，隐形造影材料被肿瘤细胞摄取，从而实现将造影剂高精度地靶向输送至肿瘤部位，提高了检测灵敏度与空间分辨率，降低造影剂的用药剂量、毒副作用和成本。
- [13] 所述的医学造影剂的作用是用来提高成像分辨率，本领域人员熟知的 MRI 造影剂、CT 造影剂、PET 造影剂或荧光素造影剂都能应用于本发明，为了使得所述的造影剂能顺利地包埋于可生物降解纳米球（简称纳米球）内部，造影剂粒径优选为 15nm 以下。
- [14] 所述的 MRI 造影剂为具有 MRI 造影功能的材料，优选为 T₂ 类 MRI 造影剂和 T₁ 类 MRI 造影剂，所选材料需要具有良好的水溶性，所述的 T₂ 类 MRI 造影剂进一步优选为超顺磁性氧化铁纳米粒子（SPION），所述的 T₁ 类 MRI 造影剂进一步优选为有较大的有效磁矩的 Gd³⁺、Dy³⁺、Mn²⁺ 或 Fe³⁺ 等小分子顺磁性造影剂，或与适当的配体形成稳定的螯合物的大分子顺磁性造影剂，如 Gd-DTPA 配合物、Gd-DOTA 配合物和 Gd₂O₃ 纳米粒子中的至少一种，其中，DTPA 为二乙三胺五乙酸，DOTA 为 1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N-四乙酸。
- [15] 所述的 CT 造影剂是一种具有 CT 造影功能的材料，所选材料需要具有良好的水溶性，优选为具有 CT 造影功能的纳米粒子或小分子化合物，进一步优选为金纳米颗粒、金纳米棒、金纳米笼子、碘海醇和 BaSO₄ 中的至少一种。

- [16] 所述的PET造影剂为能提高PET成像分辨率的一类化合物，优选为¹⁸F-FDG（2-（氟-18）-2-脱氧葡萄糖）、⁶⁴Cu、¹²⁴I和⁹⁴C中的至少一种。
- [17] 所述的荧光素造影剂为能提高近红外光学分子成像的近红外荧光染料，优选为酞菁。
- [18] 所述的纳米球作为载体，包埋造影剂实现缓释、控释的作用，对人体毒害性小，可生物降解的无毒的天然大分子或人工合成高分子都可以应用于本发明，所用材料优选为蛋白质、寡肽、多糖、聚醚类或聚酯类高分子中的至少一种，进一步优选为白蛋白和壳聚糖；所述的造影材料一般通过静脉注射的方式使用，粒径不能太大，所述的纳米球的粒径优选为500 nm以下，同时为了在所述的纳米球表面连接上所述的pH敏感型高分子和靶分子，粒径不能太小，所述的纳米球的粒径进一步优选为50-200 nm。
- [19] 所述的靶分子为与肿瘤细胞有特异性相互作用的化合物，能靶向作用于癌细胞，优选为单克隆抗体、叶酸或半乳糖胺中至少一种。
- [20] 本发明中，纳米球表面所述的pH敏感型高分子与靶分子的数目比为0.2-5.0，此时，在正常的细胞组织中，所述的靶分子能够隐藏在所述的pH敏感型高分子之中，在肿瘤组织环境中，所述的靶分子能够暴露出来。
- [21] 本发明还提供了所述的肿瘤早期诊断用隐形材料的制备方法，包括如下步骤：
- [22] （1）制备包埋有医学造影剂的可生物降解纳米球；
- [23] （2）通过共价偶联反应将所述的靶分子连接到步骤（1）中得到的可生物降解纳米球的表面上，得到中间体；
- [24] （3）在步骤（2）得到的中间体的表面上，采用活性自由基聚合技术合成所述的pH敏感型高分子，得到所述的肿瘤早期诊断用隐形材料。
- [25] 步骤（1）中包埋有医学造影剂的可生物降解纳米球可以通过超声乳化法或者脱溶剂法制备，其中超声乳化法又包括油包水法、水包油法和W/O/W复乳法，下面分别进行介绍。
- [26] 油包水法：用溶解了亲水性医学造影剂和亲水性膜材的水溶液作为水相，用溶解了油溶性乳化剂的有机溶剂作为油相，将水相与油相混合搅拌进行粗分散后，再用超声波细胞破碎机进行乳化，获得油包水型纳米乳液，再在磁力搅拌下

向所得纳米乳液中加入交联剂进行交联固化，除去过量的交联剂和乳化剂即可获得。

[27] 水包油法：用溶解了疏水性医学造影剂和疏水性膜材的有机溶剂作为油相，用溶解了水溶性乳化剂的水溶液作为水相，将油相与水相混合搅拌进行粗分散后，再用超声波细胞破碎机进行乳化，获得水包油型纳米乳液，再在磁力搅拌下向所得纳米乳液中加入交联剂进行交联固化，除去过量的交联剂和乳化剂即可获得包埋有医学造影剂的可生物降解纳米球。

[28] W/O/W 复乳法：用溶解了亲水性医学造影剂的水溶液作为水相，用溶解了疏水性膜材和油溶性乳化剂的有机溶剂作为油相，将水相与油相混合搅拌进行粗分散后，再用超声波细胞破碎机进行乳化，获得油包水型纳米乳液，再将所得油包水型纳米乳液加入溶有水溶性乳化剂的水相中进行超声乳化，从而获得 W/O/W 型纳米乳液，再在磁力搅拌下向所得 W/O/W 型纳米乳液中加入交联剂进行交联固化，除去过量的交联剂和乳化剂即可获得包埋有医学造影剂的可生物降解纳米球。

[29] 脱溶剂法：将水溶性医学造影剂和纳米球材料寡肽或蛋白质溶于 NaCl 水溶液中，然后滴加乙醇，滴加过程持续磁力搅拌，当溶液变成乳白色悬浊液后加入戊二醛交联固化纳米球，除去过量的交联剂即可获得包埋有医学造影剂的可生物降解纳米球。

[30] 步骤（2）中所述的共价偶联反应为靶分子末端的官能团与纳米球表面的官能团形成共价化学键的反应，例如：在 EDAC（1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺）的催化下，羧基和氨基形成酰胺基团的化学反应。

[31] 当纳米球的材料含有羧基时（如聚谷氨酸、聚天门冬氨酸、含有谷氨酸和天门冬氨酸的多肽和蛋白质、以及含有羧基的多糖等），可以选择含有氨基的单克隆抗体或半乳糖胺等配体作为靶分子，然后用 EDAC 和 NHS（N-羟基丁二酰亚胺）活化纳米球表面的羧基，再滴加带有末端氨基的靶分子溶液，使活化的羧基与靶分子的氨基共价反应形成稳定的酰胺键；当纳米球的材料含有氨基时（如聚赖氨酸、聚精氨酸、含有赖氨酸和精氨酸的多肽和蛋白质、以及含有氨基的多糖等），可以选择含有羧基的单克隆抗体或叶酸等配体作为靶分子，然

后采取以上方法活化靶分子的羧基后使之嫁接于纳米球表面上；对于既不含有羧基、又不含有氨基的可生物降解材料（如聚醚类和聚酯类高分子），可以采用共聚法使之带有一些氨基或者羧基，制作成纳米球之后采用以上相同方法可使靶分子嫁接于纳米球表面上。

[32] 步骤（3）所述的活性自由基聚合技术（又称为可控聚合）是本领域中比较成熟的技术，在本发明中可以按照以下步骤进行：

[33] 首先，利用 EDAC 的催化在步骤（2）得到的纳米球表面偶联 4-氯甲基苯甲酸（CBA），然后将二乙基二硫代氨基甲酸钠（NaDC）固定至所述的 CBA 上的苄位甲基上，最后通过紫外线引发单体异丙基丙烯酰胺（NIPAM）、丙烯酸（AA）或甲基丙烯酸（MAA）在纳米球表面的活性自由基接枝聚合反应。其中，高分子发生相转变而收缩的 pH 点可以通过 AA（或 MAA）与 NIPAM 之间的摩尔比控制，当所述的摩尔比在 1：1~50 范围内，可以控制所述的 pH 敏感型高分子在 pH5.0~6.0 范围内发生转变。高分子的嫁接密度可以通过纳米球表面 CBA 的偶联量控制，而纳米球表面 CBA 的偶联量可以通过 CBA 的初始浓度和反应时间来控制；高分子的链长长度（分子量）可以通过合成时单体的浓度和聚合反应时间来控制。

[34] 步骤（3）还可以通过共价偶联反应实现，例如，通过羧基官能团与氨基官能团的反应将 pH 敏感型高分子共价偶联至步骤（2）得到的纳米球表面之上。首先，pH 敏感型高分子的合成方法采用以 AIBN 为引发剂的自由基聚合法，此时采用嵌段共聚法使 pH 敏感型高分子的一端具有数个丙烯酰胺（或丙烯酸），从而使得热敏型高分子的末端具有数个氨基（羧基）。然后，在 EDAC 的催化下，利用羧基与氨基的反应将 pH 敏感型高分子共价偶联至纳米球表面之上。

发明的有益效果

有益效果

[35] 同现有技术相比，本发明的有益效果体现在：

[36] （1）通过 pH 敏感型高分子的作用，提高了对造影材料对肿瘤细胞的靶向功能；

[37] （2）降低了造影剂的用量，减少了毒副作用和制造成本。

对附图的简要说明

附图说明

- [38] 图 1 为本发明所述的肿瘤早期诊断用隐形造影材料特异性靶向癌细胞的机理图；
- [39] 图 2 为实施例 1 中利用活性自由基接枝聚合技术在可生物降解纳米球表面合成异丙基丙烯酰胺 - 甲基丙烯酸共聚物 (PNIPAM-MAA) 的反应示意图；
- [40] 图 3 为实施例 1 中所制备的白蛋白纳米球的透射电镜照片；
- [41] 图 4 为实施例 1 中所制备的白蛋白纳米球 (a) 和表面偶联有 pH 敏感型高分子的白蛋白纳米球 (b) 的透射电镜照片对比图；
- [42] 图 5 为实施例 6 中所制备的肿瘤早期诊断用隐形造影材料被肝癌细胞 HepG2 摄取的定量分析图；
- [43] 图 6 为实施例 11 中所制备的肿瘤早期诊断用隐形造影材料被宫颈癌细胞 HeLa 摄取的定量分析图。

发明实施例

本发明的实施方式

[44] 实施例 1

- [45] (1) 具有 MRI 造影功能的超顺磁性氧化铁纳米粒子 (SPION) 的制备
- [46] 将 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5.4 g, 20 mmol) 和油酸钠 (18.3 g, 60 mmol) 溶于 40 mL 乙醇、30 mL 去离子水和 70 mL 正己烷的混合溶剂中, 加热至 70°C 反应 4 h, 然后将混合溶液转移至分液漏斗中, 除去下层水相, 上层油相用 30 mL 去离子水洗涤三次, 将正己烷蒸发之后获得油酸铁复合物的固体。将油酸铁复合物 (18 g, 20 mmol) 和油酸 (2.8 g, 10 mmol) 溶于 1-十八烷烯 (30 g) 之中, 再将混合物加热至 320 °C (升温速率为 3.3 °C/min), 在氩气保护下反应 1 h 之后, 室温冷却溶液, 再加入乙醇 (250 mL), 离心 (6000 rpm) 十分钟即可获得粒径约为 14 nm 的单分散的 SPION, 最后将所得 SPION 真空干燥, 低温保存 (0 - 4 °C)。

- [47] (2) 可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 SPION 的包埋
- [48] 配制 pH 10.8 的 10 mM NaCl 水溶液, 再用该溶液配制浓度为 20 mg/mL 的牛

血清白蛋白 (BSA) 水溶液, 然后向 2.0 mL BSA 水溶液中加入 2.0 mL 无水乙醇, 磁力搅拌 10 min 后以 2.0 mL/min 的滴加速度添加 4.0 mL 乙醇 (总乙醇添加量与 BSA 水溶液的体积比为 3.0), 滴加过程持续磁力搅拌, 乙醇滴加结束后立即加入 8% 的戊二醛水溶液 (戊二醛 -BSA 质量比为 0.24) 交联固化 24 h, 然后加入 1.0 mL 甘氨酸 (40 mg/mL) 来中和过量的戊二醛, 反应 2.0 h 后, 对样品进行离心 (20,000×g, 20min), 所得样品用 10mM NaCl 水溶液洗涤两次, 最后冷冻干燥 48 h 即可获得可生物降解的白蛋白纳米球。将第一步制得的 MRI 造影剂 SPION 分散至 20 mg/mL 的 BSA 水溶液中, 采用上述同样方法即可制得包埋有造影剂 SPION 的白蛋白纳米球。

[49] (4) 白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成

[50] 采用活性自由基接枝聚合技术 (可控聚合) 在白蛋白纳米球 (包埋有 SPION、且表面偶联有配体叶酸) 的表面合成一种 pH 敏感型高分子, 即异丙基丙烯酰胺 - 甲基丙烯酸共聚物 (PNIPAM-MAA), 如图 2 所示。配制 5 mg/mL 的 CBA 溶液, 将 50 mg EDAC 溶于 10 mL CBA 溶液 (冰浴), 然后加入 90 mL 白蛋白纳米球悬浊液 (5.0 mg/mL), 将混合液置于室温下磁力搅拌, 反应 24 小时, 对样品进行离心 (20,000×g, 20min), 将所得样品分散于 100 mL 超纯水中, 加入 3.0 g NIPAM 和 200 mg MAA, 在 400W 紫外灯 (紫外光波长 300-500 nm, 峰值 350 nm) 下照射 1-5 小时, 将所得复合纳米粒子离心、洗涤、冻干, 从而制得一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料, 可用作 T₂ 加权的 MRI 造影剂。

[51] 图 3 为实施例 1 中所制备的白蛋白纳米球的透射电镜照片;

[52] 图 4 为实施例 1 中所制备的白蛋白纳米球 (a) 和表面偶联有 pH 敏感型高分子的白蛋白纳米球 (b) 的透射电镜照片对比图, (b) 中纳米球表面的印迹圈是纳米球表面成功偶联 pH 敏感型高分子的证据。

[53] 实施例 2

[54] (1) 具有 MRI 造影功能的顺磁性 Gd-DTPA 配合物的制备

[55] 取 3 g Gd₂O₃ 和 7.3 g DTPA 混合, 加水 40 mL, 加热并搅拌回流 16 h, 待反应物全部溶解后温度降至室温, 用滤膜滤去杂质后, 加入 120mL 丙酮, 析出白

色凝胶状沉淀，以丙酮洗涤 3 次，烘干至恒重，收率为 80%。在配合物的合成中，选择金属氧化物为原料，分离时可以将未反应的 Gd_2O_3 过滤除去。

[56] (2) 可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 1 相同，即可制得一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[57] 实施例 3

[58] (1) 具有 CT 造影功能的金纳米颗粒的制备

[59] 第一步，配制 10 mM 的 $NaBH_4$ 水溶液、10 mM 的 $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ 水溶液和 75 mM 的 CTAB 水溶液，将 0.125 mL 的 $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ 水溶液加入 4.375 mL 的 CTAB 水溶液混合均匀，然后加入 0.500 mL 冰浴的 $NaBH_4$ 水溶液，倒置混合 2 h 制成 5 mL 金种子液。第二步，配制 6.258 mM 的 L-抗坏血酸水溶液，取 9.587 mL 的 L-抗坏血酸水溶液加入 0.213 mL 的 75 mM 的 CTAB 水溶液，然后再加入 0.2 mL 的 10 mM 的 $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ 水溶液，温和搅拌，制成 10 mL 的生长液，当生长液的颜色从橙色变为无色，立即加入 5 μ L 的金种子液，倒置混合直至混合液颜色慢慢变红。最后，将混合液静置 24 h。

[60] (2) 可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 CT 造影剂金纳米颗粒的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 1 相同，即可制得一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[61] 实施例 4

[62] 将实施例 1 步骤 (1) 中 MRI 造影剂 SPION 改为 PET 造影剂，选 ^{18}F -FDG 作为医学造影剂，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 1 相同，即可制得一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[63] 实施例 5

[64] 将实施例 1 步骤 (1) 中 MRI 造影剂 SPION 改为荧光素造影剂, 选含四吡咯基团的近红外荧光染料酞菁作为医学造影剂, 可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对荧光素造影剂酞菁的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 1 相同, 即可制得一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料, 可用作荧光素造影剂。

[65] 实施例 6

[66] 将实施例 1 步骤 (3) 中白蛋白纳米球表面偶联的靶分子改为半乳糖胺, 在 EDAC 的催化下, 利用半乳糖胺的氨基与白蛋白纳米球表面的羧基之间的化学反应, 在白蛋白纳米球表面偶联能够特异性靶向作用于肝癌的配体半乳糖胺。具体制备方法简述如下: 用 PBS 作溶剂配制 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的半乳糖胺溶液, 将 50 mg EDAC 溶于 10 mL 半乳糖胺溶液 (冰浴), 然后加入 90 mL 溶于 PBS 的包埋有医学造影剂的白蛋白纳米球悬浊液 (5.0 mg/mL), 将混合液置于室温下磁力搅拌, 反应 24 小时, 对样品进行离心 (20,000 \times g, 20min), 所得样品用 PBS 洗涤两次, 最后冷冻干燥 48 h 即可获得表面偶联有配体半乳糖胺、且内部包埋有医学造影剂的白蛋白纳米球。其他步骤与实施例 1 相同, 即可制得一种肝癌早期诊断用隐形造影材料, 可用作 T_2 加权的 MRI 造影剂。

[67] 所制肿瘤早期诊断用隐形造影材料被肝癌细胞 HepG2 摄取的定量分析见图 5, 其中, SPION-AN-GAL-PM 代表内部包埋有造影剂 SPION、表面偶联有靶分子 GAL 和 pH 敏感型高分子 PNIPAM-MAA (PM) 的白蛋白纳米球 (AN); SPION-AN 代表仅包埋有造影剂 SPION 的白蛋白纳米球 (AN)。如图 5 所示, HepG2 细胞在 pH5.5 时摄取 SPION-AN-GAL-PM 的量比 pH7.4 时摄取 SPION-AN-GAL-PM 的量要明显高得多、也明显高于 pH5.5 时摄取 SPION-AN 的量。该结果表明, SPION-AN-GAL-PM 在 pH5.5 时能被肝癌细胞大量特异性摄取, 而在 pH7.4 时由于靶分子隐藏于高分子之中而只能被肝癌细胞少量摄取, 这就说明 pH 敏感型高分子能防止靶分子被正常细胞非特异性摄取。

[68] 实施例 7

[69] 将实施例 2 中白蛋白纳米球表面偶联的靶分子改为半乳糖胺, 具体制备方法与

实施例 6 相同，其他步骤与实施例 2 相同，即可制得一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[70] 实施例 8

[71] 将实施例 3 中白蛋白纳米球表面偶联的靶分子改为半乳糖胺，具体制备方法与实施例 6 相同，其他步骤与实施例 3 相同，即可制得一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[72] 实施例 9

[73] 将实施例 4 中白蛋白纳米球表面偶联的靶分子改为半乳糖胺，具体制备方法与实施例 6 相同，其他步骤与实施例 4 相同，即可制得一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[74] 实施例 10

[75] 将实施例 5 中白蛋白纳米球表面偶联的靶分子改为半乳糖胺，具体制备方法与实施例 6 相同，其他步骤与实施例 5 相同，即可制得一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作荧光素造影剂。

[76] 实施例 11

[77] 将实施例 1 步骤 (5) 中 pH 敏感型高分子合成时的单体甲基丙烯酸 (MAA) 改为丙烯酸 (AA)，从而在白蛋白纳米球表面合成一种 pH 敏感型高分子异丙基丙烯酰胺 - 丙烯酸共聚物 (PNIPAM-AA)，其他实验方法与条件均与实施例 1 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_2 加权的 MRI 造影剂。

[78] 所制肿瘤早期诊断用隐形造影材料被宫颈癌细胞 HeLa 摄取的定量分析见图 6，其中，SPION-AN-FA-PA 代表内部包埋有造影剂 SPION、表面偶联有靶分子 FA 和 pH 敏感型高分子 PNIPAM-AA (PA) 的白蛋白纳米球 (AN)，SPION-AN 代表内部包埋有造影剂 SPION 的白蛋白纳米球 (AN)。如图 6 所示，HeLa 细胞在 pH5.5 时摄取 SPION-AN-FA-PA 的量比 pH7.4 时摄取 SPION-AN-FA-PA 的量要明显高得多、也明显高于 pH5.5 时摄取 SPION-AN 的量。该结果表明，SPION-AN-FA-PA 在 pH5.5 时能被宫颈癌细胞大量特异性摄取，而在 pH7.4 时由于靶分子隐藏于高分子之中而只能被宫颈癌细胞少量摄取

，这就说明 pH 敏感型高分子能防止靶分子被正常细胞非特异性摄取。

[79] 实施例12

[80] 将实施例 2 中 pH 敏感型高分子合成时的单体甲基丙烯酸 (MAA) 改为丙烯酸 (AA)，从而在白蛋白纳米球表面合成一种 pH 敏感型高分子异丙基丙烯酰胺 - 丙烯酸共聚物 (PNIPAM-AA)，其他实验方法与条件均与实施例 2 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T₁ 加权的 MRI 造影剂。

[81] 实施例 13

[82] 将实施例 3 中 pH 敏感型高分子合成时的单体甲基丙烯酸 (MAA) 改为丙烯酸 (AA)，从而在白蛋白纳米球表面合成一种 pH 敏感型高分子异丙基丙烯酰胺 - 丙烯酸共聚物 (PNIPAM-AA)，其他实验方法与条件均与实施例 3 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[83] 实施例 14

[84] 将实施例 4 中 pH 敏感型高分子合成时的单体甲基丙烯酸 (MAA) 改为丙烯酸 (AA)，从而在白蛋白纳米球表面合成一种 pH 敏感型高分子异丙基丙烯酰胺 - 丙烯酸共聚物 (PNIPAM-AA)，其他实验方法与条件均与实施例 4 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[85] 实施例 15

[86] 将实施例 5 中 pH 敏感型高分子合成时的单体甲基丙烯酸 (MAA) 改为丙烯酸 (AA)，从而在白蛋白纳米球表面合成一种 pH 敏感型高分子异丙基丙烯酰胺 - 丙烯酸共聚物 (PNIPAM-AA)，其他实验方法与条件均与实施例 5 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作荧光素造影剂。

[87] 实施例16

[88] 将实施例 6 中 pH 敏感型高分子合成时的单体甲基丙烯酸 (MAA) 改为丙烯酸 (AA)，从而在白蛋白纳米球表面合成一种 pH 敏感型高分子异丙基丙烯酰胺

胺 - 丙烯酸共聚物 (PNIPAM-AA), 其他实验方法与条件均与实施例 6 相同, 即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料, 可用作 T_2 加权的 MRI 造影剂。

。

[89] 实施例 17

[90] 将实施例 7 中 pH 敏感型高分子合成时的单体甲基丙烯酸 (MAA) 改为丙烯酸 (AA), 从而在白蛋白纳米球表面合成一种 pH 敏感型高分子异丙基丙烯酰胺 - 丙烯酸共聚物 (PNIPAM-AA), 其他实验方法与条件均与实施例 7 相同, 即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料, 可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[91] 实施例 18

[92] 将实施例 8 中 pH 敏感型高分子合成时的单体甲基丙烯酸 (MAA) 改为丙烯酸 (AA), 从而在白蛋白纳米球表面合成一种 pH 敏感型高分子异丙基丙烯酰胺 - 丙烯酸共聚物 (PNIPAM-AA), 其他实验方法与条件均与实施例 8 相同, 即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料, 可用作 CT 造影剂。

[93] 实施例 19

[94] 将实施例 9 中 pH 敏感型高分子合成时的单体甲基丙烯酸 (MAA) 改为丙烯酸 (AA), 从而在白蛋白纳米球表面合成一种 pH 敏感型高分子异丙基丙烯酰胺 - 丙烯酸共聚物 (PNIPAM-AA), 其他实验方法与条件均与实施例 9 相同, 即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料, 可用作 PET 造影剂。

[95] 实施例 20

[96] 将实施例 10 中 pH 敏感型高分子合成时的单体甲基丙烯酸 (MAA) 改为丙烯酸 (AA), 从而在白蛋白纳米球表面合成一种 pH 敏感型高分子异丙基丙烯酰胺 - 丙烯酸共聚物 (PNIPAM-AA), 其他实验方法与条件均与实施例 10 相同, 即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料, 可用作荧光素造影剂。

[97] 实施例 21

[98] 将实施例 1 中可生物降解的白蛋白纳米球改为壳聚糖纳米球, 其制备以及对医学造影剂的包埋方法如下: 配制 0.2% (w/v) 的壳聚糖溶液, 溶剂为 1% (w/v) 的醋酸, 将医学造影剂 (与实施例 1 相同) 分散至壳聚糖溶液中, 用氢氧化钠将该溶液的 pH 值调至 4.7-4.8; 配制 0.3% (w/v) 的三聚磷酸钠 (TPP)

水溶液；在磁力搅拌下，向 0.5mL 的上述壳聚糖溶液中加入 0.1mL 的 TPP 溶液，从而制得离子交联的包埋了医学造影剂的壳聚糖纳米球。其他实验方法与条件与实施例 1 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T₂ 加权的 MRI 造影剂。

[99] **实施例 22**

[100] 将实施例 2 中可生物降解的白蛋白纳米球改为壳聚糖纳米球，其制备以及对医学造影剂（与实施例 2 相同）的包埋方法与实施例 21 相同，其他实验方法与条件与实施例 2 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T₁ 加权的 MRI 造影剂。

[101] **实施例 23**

[102] 将实施例 3 中可生物降解的白蛋白纳米球改为壳聚糖纳米球，其制备以及对医学造影剂（与实施例 3 相同）的包埋方法与实施例 21 相同，其他实验方法与条件与实施例 3 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[103] **实施例 24**

[104] 将实施例 4 中可生物降解的白蛋白纳米球改为壳聚糖纳米球，其制备以及对医学造影剂（与实施例 4 相同）的包埋方法与实施例 21 相同，其他实验方法与条件与实施例 4 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[105] **实施例 25**

[106] 将实施例 5 中可生物降解的白蛋白纳米球改为壳聚糖纳米球，其制备以及对医学造影剂（与实施例 5 相同）的包埋方法与实施例 21 相同，其他实验方法与条件与实施例 5 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作荧光素造影剂。

[107] **实施例 26**

[108] 将实施例 11 中可生物降解的白蛋白纳米球改为壳聚糖纳米球，其制备以及对医学造影剂（与实施例 11 相同）的包埋方法与实施例 21 相同，其他实验方法与条件与实施例 11 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、

子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_2 加权的 MRI 造影剂。

[109] 实施例27

[110] 将实施例 12 中可生物降解的白蛋白纳米球改为壳聚糖纳米球，其制备以及对医学造影剂（与实施例 12 相同）的包埋方法与实施例 21 相同，其他实验方法与条件与实施例 12 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[111] 实施例 28

[112] 将实施例 13 中可生物降解的白蛋白纳米球改为壳聚糖纳米球，其制备以及对医学造影剂（与实施例 13 相同）的包埋方法与实施例 21 相同，其他实验方法与条件与实施例 13 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[113] 实施例 29

[114] 将实施例 14 中可生物降解的白蛋白纳米球改为壳聚糖纳米球，其制备以及对医学造影剂（与实施例 14 相同）的包埋方法与实施例 21 相同，其他实验方法与条件与实施例 14 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[115] 实施例30

[116] 将实施例 15 中可生物降解的白蛋白纳米球改为壳聚糖纳米球，其制备以及对医学造影剂（与实施例 15 相同）的包埋方法与实施例 21 相同，其他实验方法与条件与实施例 15 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作荧光素造影剂。

[117] 实施例31

[118] 将实施例 2 中的 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物改成已经商业化的 Gd-DOTA 配合物，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd-DOTA 配合物的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 2 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌

、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[119] 实施例 32

[120] 将实施例 7 中的 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物改成已经商业化的 Gd-DOTA 配合物，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd-DOTA 配合物的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 7 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[121] 实施例 33

[122] 将实施例 12 中的 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物改成已经商业化的 Gd-DOTA 配合物，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd-DOTA 配合物的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 12 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[123] 实施例 34

[124] 将实施例 17 中的 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物改成已经商业化的 Gd-DOTA 配合物，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd-DOTA 配合物的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 17 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[125] 实施例 35

[126] 将实施例 22 中的 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物改成已经商业化的 Gd-DOTA 配合物，可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd-DOTA 配合物的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 22 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[127] 实施例 36

[128] 将实施例 27 中的 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物改成已经商业化的 Gd-DOTA 配合物，可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd-DOTA 配合物的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 27 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[129] 实施例 37

[130] 将实施例 2 中的 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物改成 Gd_2O_3 纳米粒子，具体制备方法如下：将 6.0 mmol $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ 加入 30 mL 的 DEG 中，持续磁力搅拌，在硅油油浴中 140-160 °C 加热 1 h，然后加入 30 mL 含有 7.5 mmol NaOH 的 DEG 溶液，在反应物完全溶解后，将油浴温度升温至 180 °C，在快速搅拌下反应 4 h。

[131] 可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd_2O_3 纳米粒子的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 2 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[132] 实施例 38

[133] 将实施例 7 中的 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物改成 Gd_2O_3 纳米粒子，具体制备方法与实施例 37 相同。可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd_2O_3 纳米粒子的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 7 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[134] 实施例 39

[135] 将实施例 12 中的 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物改成 Gd_2O_3 纳米粒子，具体制备方法与实施例 37 相同。可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd_2O_3 纳米粒子的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 12 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌

、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[136] 实施例 40

[137] 将实施例 17 中的 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物改成 Gd_2O_3 纳米粒子，具体制备方法与实施例 37 相同。可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd_2O_3 纳米粒子的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 17 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[138] 实施例 41

[139] 将实施例 22 中的 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物改成 Gd_2O_3 纳米粒子，具体制备方法与实施例 37 相同。可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd_2O_3 纳米粒子的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、壳聚糖纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 22 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[140] 实施例 42

[141] 将实施例 27 中的 MRI 造影剂 Gd-DTPA 配合物改成 Gd_2O_3 纳米粒子，具体制备方法与实施例 37 相同。可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 MRI 造影剂 Gd_2O_3 纳米粒子的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、壳聚糖纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 27 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 T_1 加权的 MRI 造影剂。

[142] 实施例 43

[143] 将实施例 3 中制备金纳米颗粒的还原剂 $NaBH_4$ 改为柠檬酸钠，具体制备方法如下：在 100 mL 的圆底烧瓶中加入 50 mL 超纯水，在快速磁力搅拌下加入 2.5 mL 的 5 mM $HAuCl_4$ 溶液，在沸水浴中加热，然后加入 0.5、0.625、1.0 或 2.0 mL 的柠檬酸钠溶液（1%），反应在沸水浴中持续 10 min，最后在室温下搅拌降温，即可获得粒径分别为 38、35、16、14 nm 的金纳米颗粒。更大的金纳

米颗粒（100 nm）可以 14 nm 的金纳米颗粒为种子进行合成，具体制备方法如下：取 0.75 mL 的 14 nm 的金纳米颗粒加入 97.25 mL 超纯水中，然后加入 1.0 mL 的 1% (w/v) 的 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 溶液，在室温下快速搅拌，加入 0.22 mL 的 1% 柠檬酸钠，再加入 1.0 mL 的 0.03 M 对苯二酚，搅拌过夜，从而制得 100 nm 的金纳米颗粒。

[144] 可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对上述五种不同粒径的金纳米颗粒的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 3 相同，即可制得另外四种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[145] 实施例 44

[146] 将实施例 8 中制备金纳米颗粒的还原剂 NaBH_4 改为柠檬酸钠，具体制备方法与实施例 43 相同。可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对所制五种不同粒径的金纳米颗粒的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 8 相同，即可制得另外四种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[147] 实施例 45

[148] 将实施例 3 中 CT 造影剂金纳米颗粒换为已经商业化的 CT 造影剂碘海醇，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 CT 造影剂碘海醇的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 3 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[149] 实施例 46

[150] 将实施例 8 中 CT 造影剂金纳米颗粒换为已经商业化的 CT 造影剂碘海醇，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 CT 造影剂碘海醇的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 8 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[151] 实施例 47

[152] 将实施例 13 中 CT 造影剂金纳米颗粒换为已经商业化的 CT 造影剂碘海醇，可

生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 CT 造影剂碘海醇的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 13 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[153] 实施例 48

[154] 将实施例 18 中 CT 造影剂金纳米颗粒换为已经商业化的 CT 造影剂碘海醇，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 CT 造影剂碘海醇的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 18 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[155] 实施例 49

[156] 将实施例 23 中 CT 造影剂金纳米颗粒换为已经商业化的 CT 造影剂碘海醇，可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 CT 造影剂碘海醇的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、壳聚糖纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 23 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[157] 实施例 50

[158] 将实施例 28 中 CT 造影剂金纳米颗粒换为已经商业化的 CT 造影剂碘海醇，可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 CT 造影剂碘海醇的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、壳聚糖纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 28 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[159] 实施例 51

[160] 将实施例 3 中 CT 造影剂金纳米颗粒换为已经商业化的 CT 造影剂硫酸钡混悬剂，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 CT 造影剂硫酸钡的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 3 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[161] 实施例 52

[162] 将实施例 8 中 CT 造影剂金纳米颗粒换为已经商业化的 CT 造影剂硫酸钡混悬剂，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 CT 造影剂硫酸钡的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 8 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[163] 实施例 53

[164] 将实施例 13 中 CT 造影剂金纳米颗粒换为已经商业化的 CT 造影剂硫酸钡混悬剂，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 CT 造影剂硫酸钡的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 13 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[165] 实施例 54

[166] 将实施例 18 中 CT 造影剂金纳米颗粒换为已经商业化的 CT 造影剂硫酸钡混悬剂，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 CT 造影剂硫酸钡的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 18 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[167] 实施例 55

[168] 将实施例 23 中 CT 造影剂金纳米颗粒换为已经商业化的 CT 造影剂硫酸钡混悬剂，可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 CT 造影剂硫酸钡的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、壳聚糖纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 23 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[169] 实施例 56

[170] 将实施例 28 中 CT 造影剂金纳米颗粒换为已经商业化的 CT 造影剂硫酸钡混悬剂，可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 CT 造影剂硫酸钡的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、壳聚糖纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 28 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽

癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 CT 造影剂。

[171] 实施例 57

[172] 将实施例 4 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{64}Cu ，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{64}Cu 的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 4 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[173] 实施例 58

[174] 将实施例 9 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{64}Cu ，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{64}Cu 的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 9 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[175] 实施例 59

[176] 将实施例 14 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{64}Cu ，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{64}Cu 的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 14 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[177] 实施例 60

[178] 将实施例 19 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{64}Cu ，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{64}Cu 的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 19 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[179] 实施例 61

[180] 将实施例 24 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{64}Cu ，可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{64}Cu 的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、壳聚糖纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 24 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影

材料，可用作 PET 造影剂。

[181] 实施例 62

[182] 将实施例 29 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{64}Cu ，可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{64}Cu 的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、壳聚糖纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 29 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[183] 实施例 63

[184] 将实施例 4 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{124}I ，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{124}I 的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 4 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[185] 实施例 64

[186] 将实施例 9 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{124}I ，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{124}I 的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 9 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[187] 实施例 65

[188] 将实施例 14 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{124}I ，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{124}I 的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 14 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[189] 实施例 66

[190] 将实施例 19 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{124}I ，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{124}I 的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 19 相同，即可制得另一种

肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[191] 实施例 67

[192] 将实施例 24 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{124}I ，可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{124}I 的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、壳聚糖纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 24 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[193] 实施例 68

[194] 将实施例 29 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{124}I ，可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{124}I 的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、壳聚糖纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 29 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[195] 实施例 69

[196] 将实施例 4 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{94}Tc ，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{94}Tc 的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 4 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[197] 实施例 70

[198] 将实施例 9 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{94}Tc ，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{94}Tc 的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 9 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[199] 实施例 71

[200] 将实施例 14 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{94}Tc ，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{94}Tc 的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 14 相同，即可制得另一种脑

癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[201] 实施例 72

[202] 将实施例 19 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{94}Tc ，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{94}Tc 的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 19 相同，即可制得另一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[203] 实施例 73

[204] 将实施例 24 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{94}Tc ，可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{94}Tc 的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、壳聚糖纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 24 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[205] 实施例 74

[206] 将实施例 29 中 PET 造影剂 ^{18}F -FDG 换为 ^{94}Tc ，可生物降解的壳聚糖纳米球的制备及其对 PET 造影剂 ^{94}Tc 的包埋、壳聚糖纳米球表面配体叶酸的偶联、壳聚糖纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 29 相同，即可制得另一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作 PET 造影剂。

[207] 实施例 75

[208] 将实施例 3 中制备金纳米颗粒改为金纳米笼子，具体制备方法如下：将 3 mL 0.75 mM 的 HAuCl_4 与 3 mL 0.03 M 的 HMT（六亚甲基四胺）混匀，溶液颜色由浅黄变为透明，然后，加入 3 mL 0.3 M 的 PVP（聚乙烯吡咯烷酮）和 100 μL 0.01 M 的 AgNO_3 ，温和搅拌之后加入 50 μL 0.08 M 抗坏血酸，将混合溶液搅拌 10 s，室温静置 12 h 之后离心洗涤，即可得到金纳米笼子。

[209] 可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对上述金纳米笼子的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 3 相同，即可制得另外一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌

等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作CT造影剂。

[210] 实施例 76

[211] 将实施例 8 中制备金纳米颗粒改为金纳米笼子，具体制备方法与实施例 75 相同，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对上述金纳米笼子的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 8 相同，即可制得另外一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作CT造影剂。

[212] 实施例 77

[213] 将实施例 3 中制备金纳米颗粒改为金纳米棒，具体制备方法如下：配制 20 mL 含有 0.25 mM HAuCl₄ 和 0.25 mM 柠檬酸钠溶液，边搅拌边加入 0.6 mL 冰浴的 0.1 M NaBH₄ 溶液，加入 NaBH₄ 后溶液会迅速变为紫色，金纳米粒子形成。在合成该金纳米粒子后 2-5 h 内，该金纳米粒子可作为金纳米种子。配制 10 mL 含有 0.25 mM HAuCl₄ 和 0.1 M CTAB（十六烷基三甲基溴化铵）的生长溶液，加入 0.05 mL 的 0.1 M 新制抗坏血酸溶液，然后再加入 0.025 mL 的 3.5 nm 金纳米种子，静置反应 48 h，即可制得金长径比（aspect ratio）为 3.0 的金纳米棒。

[214] 可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对上述金纳米棒的包埋、白蛋白纳米球表面配体叶酸的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 3 相同，即可制得另外一种脑癌、肾癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、鼻咽癌等肿瘤早期诊断用隐形造影材料，可用作CT造影剂。

[215] 实施例 78

[216] 将实施例 8 中制备金纳米颗粒改为金纳米棒，具体制备方法与实施例 77 相同，可生物降解的白蛋白纳米球的制备及其对上述金纳米棒的包埋、白蛋白纳米球表面配体半乳糖胺的偶联、白蛋白纳米球表面 pH 敏感型高分子的合成与实施例 8 相同，即可制得另外一种肝癌早期诊断用隐形造影材料，可用作CT造影剂。

。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种肿瘤早期诊断用隐形造影材料，其特征在于，由可生物降解纳米球、包埋于所述的可生物降解纳米球内部的医学造影剂、连接于所述的可生物降解纳米球表面的靶分子和 pH 敏感型高分子构成。
- [权利要求 2] 根据权利要求 1 所述的肿瘤早期诊断用隐形造影材料，其特征在于，所述的 pH 敏感型高分子为在 pH5.0~6.0 范围内发生收缩的高分子化合物。
- [权利要求 3] 根据权利要求 1 或 2 所述的肿瘤早期诊断用隐形造影材料，其特征在于，所述的 pH 敏感型高分子为 异丙基丙烯酰胺 - 丙烯酸共聚物和异丙基丙烯酰胺 - 甲基丙烯酸共聚物中的至少一种，分子量范围为 2k-1000k。
- [权利要求 4] 根据权利要求 1 所述的肿瘤早期诊断用隐形造影材料，其特征在于，所述的医学造影剂为 MRI 造影剂、CT 造影剂、PET 造影剂或荧光素造影剂，所述的医学造影剂的粒径为 15nm 以下。
- [权利要求 5] 根据权利要求 4 所述的肿瘤早期诊断用隐形造影材料，其特征在于，所述的 MRI 造影剂选自超顺磁性氧化铁纳米粒子、顺磁性 Gd-DTPA 配合物、Gd-DOTA 配合物和 Gd₂O₃ 纳米粒子中的至少一种；
所述的 CT 造影剂选自碘海醇、硫酸钡、金纳米颗粒、金纳米棒和金纳米笼子中的至少一种；
所述的 PET 造影剂选自 ¹⁸F-FDG、⁶⁴Cu、¹²⁴I 和 ⁹⁴C 中的至少一种；
所述的荧光素造影剂为酞菁。
- [权利要求 6] 根据权利要求 1 所述的肿瘤早期诊断用隐形造影材料，其特征在于，所述的可生物降解纳米球的材料选自寡肽、蛋白质、多糖、聚醚类、聚酯类高分子中的至少一种，所述的可生

物降解纳米球的粒径为 500nm 以下。

- [权利要求 7] 根据权利要求 1 所述的肿瘤早期诊断用隐形造影材料，其特征在于，所述的靶分子选自单克隆抗体、叶酸或半乳糖胺中至少一种。
- [权利要求 8] 根据权利要求 1 所述的肿瘤早期诊断用隐形造影材料，其特征在于，所述的 pH 敏感型高分子与靶分子的数目比为 0.2-5.0。
- [权利要求 9] 一种权利要求 1~8 任一所述的肿瘤早期诊断用隐形造影材料的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：
（1）制备包埋有医学造影剂的可生物降解纳米球；
（2）通过共价偶联反应将所述的靶分子连接到步骤（1）中得到的可生物降解纳米球的表面上，得到中间体；
（3）在步骤（2）得到的中间体的表面上，采用活性自由基聚合技术合成所述的 pH 敏感型高分子，得到所述的肿瘤早期诊断用隐形材料。
- [权利要求 10] 根据权利要求 9 所述的肿瘤早期诊断用隐形造影材料的制备方法，其特征在于，步骤（3）替换为：将 pH 敏感型高分子通过共价偶联反应连接到步骤（2）得到的中间体的表面上，得到所述的肿瘤早期诊断用隐形造影材料。

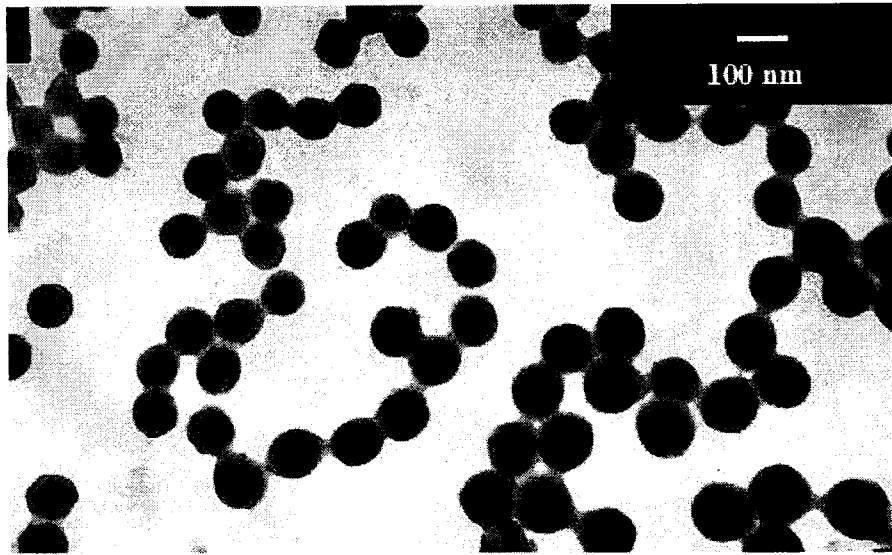


图 3

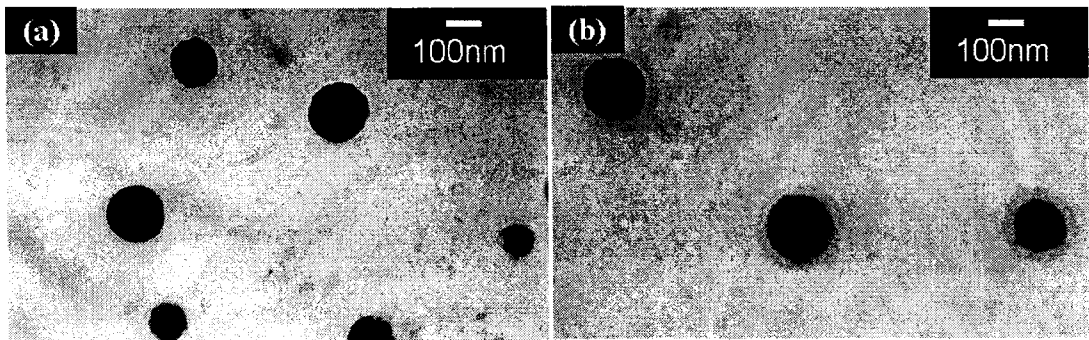


图 4

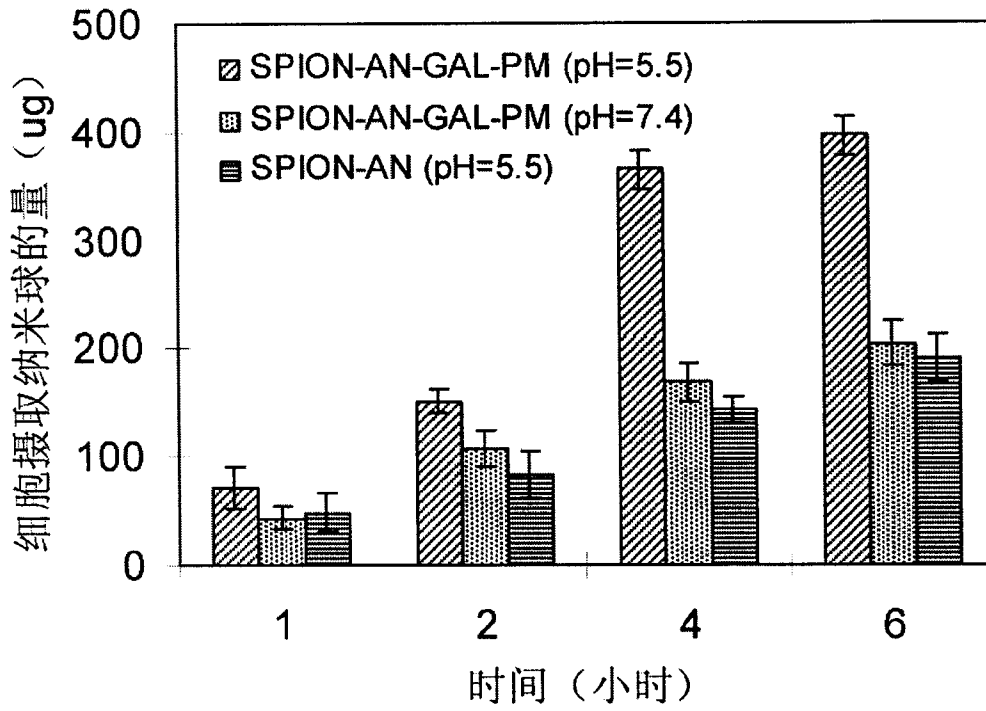


图 5

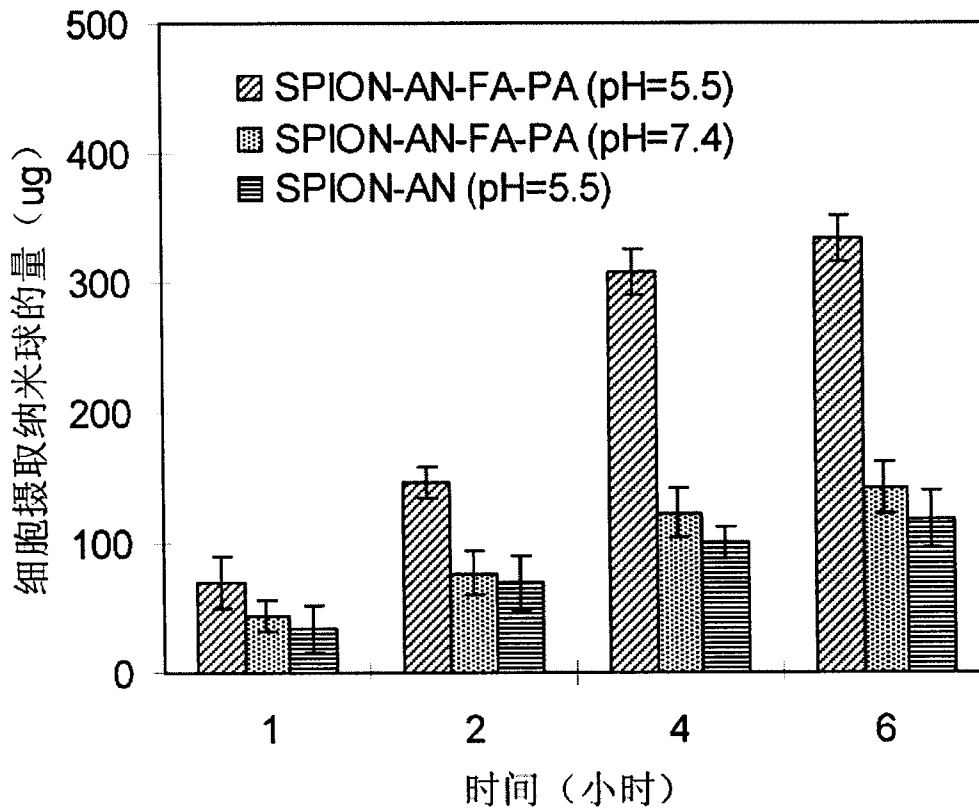


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/082578

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: A61K

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)

CNABS, CPRSABS, CNMED, MOABS, HKABS, TWABS, TWMED, DWPI, SIPOABS, CPEA, AUABS, CNKI: radiography, cancer, tumor, nano, pH-sensitive, albumin, folic acid, acrylic acid, acrylamide, ACR, isopropyl acrylamide, NIPA, preparation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102228425 A (SOUTH CHINA NORMAL UNIVERSITY) 02 November 2011 (02.11.2011) see embodiment 1	1, 4, 7
A	WO 2004012855 A2 (E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY) 12 February 2004 (12.02.2004) see the whole document	1-10
A	LIU, Hai, et al., Evaluation of Effect and Targetability on Folate-conjugated Albumin Nanoparticles, Journal of Guangdong College of Pharmacy, February 2007 (02.2007), vol. 23, no. 1, pp. 50-52, ISSN 1006-8783	1-10
A	Zhang Huifang, Study on Preparation and Properties of Albumin-based Biopolymer Carriers, Chinese Master's Theses Full-text Database Medicine and Health Sciences, 15 June 2010(15.06.2010), no. 6, pp.E080-16, ISSN 1674-0246	1-10
A	Chao Huang, et al., Combined ATRP and 'Click' Chemistry for Designing Stable Tumor-Targeting Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, LANGMUIR, Januray 2012(01.2012), vol. 28, no. 1, pp. 563-571, ISSN 0743-7463	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&”document member of the same patent family</p>
---	--

<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p style="text-align: center;">01 April 2013 (01.04.2013)</p>	<p>Date of mailing of the international search report</p> <p style="text-align: center;">11 April 2013 (11.04.2013)</p>
<p>Name and mailing address of the ISA</p> <p>State Intellectual Property Office of the P. R. China</p> <p>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao</p> <p>Haidian District, Beijing 100088, China</p> <p>Facsimile No. (86-10) 62019451</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;">TIAN, Xiaoming</p> <p>Telephone No. (86-10) 62411130</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/082578

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102228425 A	02.11.2011	CN 102228425 B	16.01.2013
WO 2004012855 A2	12.02.2004	US 2005074551 A1	07.04.2005
		US 7413770 B2	19.08.2008
		JP 2005534810 A	17.11.2005
		WO 2004012855 A3	01.07.2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/082578

Continuation of Part A of the second sheet

A61K 49/04 (2006.01) i

A61K 49/00 (2006.01) i

A61K 49/12 (2006.01) i

A61K 49/16 (2006.01) i

A61K 49/14 (2006.01) i

A. 主题的分类		
参见附加页		
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)		
IPC: A61K		
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))		
CNABS,CPRSABS,CNMED,MOABS,HKABS,TWABS,TWMED,DWPI,SIPOABS,CPEA,AUABS,CNKI,造影, 肿瘤, 纳米, pH 敏感, 白蛋白, 叶酸, 丙烯酸, 丙烯酰胺, 异丙基丙烯酰胺, 制备方法, radiography,cancer,tumor, pH-sensitive, albumin, folic acid, acrylic acid, acrylamide, ACR, isopropyl acrylamide, NIPA		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 102228425 A (华南师范大学) 02.11 月 2011(02.11.2011) 实施例 1	1,4,7
A	WO 2004012855 A2 (E.I. DU PONT DE NEMOURS & COMPANY)12.02 月 2004(12.02.2004) 全文	1-10
A	刘海, 等. 叶酸偶联白蛋白纳米粒的靶向性及药效评价. 广东药学院学报. 02 月 2007, 23 卷, 第 1 期, 第 50-52 页, ISSN 1006-8783	1-10
A	张慧芳. 白蛋白基生物高分子载体的制备及其性能研究. 中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑. 15.06 月 2010, 第 6 期, 第 E080-16 页, ISSN 1674-0246	1-10
A	Chao Huang, ET AL. Combined ATRP and 'Click' Chemistry for Designing Stable Tumor-Targeting Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. Langmuir. 01 月 2012, 28 卷, 第 1 期, 第 563-571 页, ISSN 0743-7463	1-10
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型:		“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
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件		“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
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利		“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
“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)		“&” 同族专利的文件
“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		
国际检索实际完成的日期 01.04 月 2013(01.04.2013)	国际检索报告邮寄日期 11.4 月 2013 (11.04.2013)	
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 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 田晓明 电话号码: (86-10) 62411130	

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/082578

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 102228425 A	02.11.2011	CN 102228425 B	16.01.2013
WO 2004012855 A2	12.02.2004	US 2005074551 A1	07.04.2005
		US 7413770 B2	19.08.2008
		JP 2005534810 A	17.11.2005
		WO 2004012855 A3	01.07.2004

续第 2 页第 A 项

A61K 49/04 (2006.01)i

A61K 49/00 (2006.01)i

A61K 49/12 (2006.01)i

A61K 49/16 (2006.01)i

A61K 49/14 (2006.01)i