

(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
2018 年 5 月 31 日 (31.05.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/095017 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 41/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/088021

(22) 国际申请日: 2017 年 6 月 13 日 (13.06.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201611055858.3 2016 年 11 月 25 日 (25.11.2016) CN

(71) 申请人: 深圳大学 (SHENZHEN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国广东省深圳市南海大道 3688
号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 张晗 (ZHANG, Han); 中国广东省深圳
市南海大道 3688 号, Guangdong 518000 (CN)。

陶伟 (TAO, Wei); 中国广东省深圳市南海大道 3688 号, Guangdong 518000 (CN)。 张家宜 (ZHANG, Jiayi); 中国广东省深圳市南海大道 3688 号, Guangdong 518000 (CN)。

(74) 代理人: 广州三环专利商标代理有限公司 (SCIHEAD IP LAW FIRM); 中国广东省广州市越秀区先烈中路 80 号汇华商贸大厦 1508 室, Guangdong 510070 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(54) Title: TARGETED PHOTOTHERMAL BLACK PHOSPHORUS NANO PREPARATION AND PREPARATION METHOD AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种靶向光热黑磷纳米制剂及其制备方法和应用

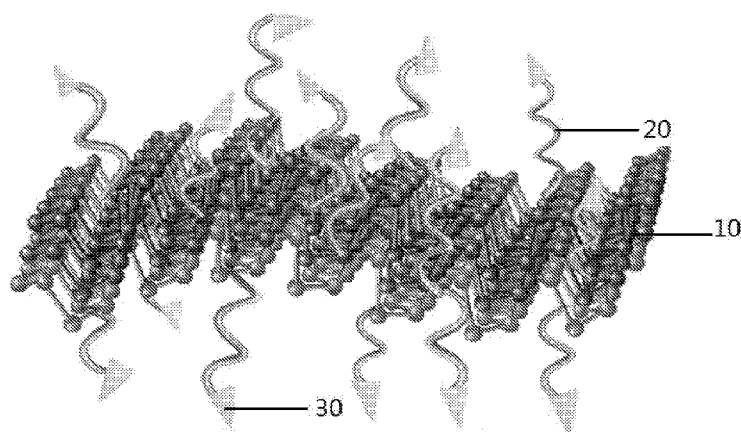


图 1

(57) Abstract: A targeted photothermal black phosphorus nano preparation, comprising: a black phosphorus nano sheet, a polyethylene glycol adsorbed onto a surface of the black phosphorus nano sheet by electrostatic attraction, and a folic acid linked to the polyethylene glycol by an amide bond. One end of the polyethylene glycol is an amino group, and the other end is an imino group. A nitrogen atom of the imino group is linked to a carbonyl carbon atom of the folic acid to form the amide bond. The folic acid is disposed at an outermost layer of the nano preparation. Also disclosed is a preparation method of the targeted photothermal black phosphorus nano preparation and an application thereof for preparing a drug that treats cancer with targeted photothermal treatment at cellular levels.

(57) 摘要: 一种靶向光热黑磷纳米制剂, 包括黑磷纳米薄片、通过静电引力吸附在所述黑磷纳米薄片表面的聚乙二醇、以及通过酰胺键连接在所述聚乙二醇上的叶酸, 所述聚乙二醇的一端为氨基, 另一端为亚氨基, 所述亚氨基的氮原子与所述叶酸中的羰基碳原子相连构成所述酰胺键, 所述叶酸暴露在所述纳米制剂的最外层。该靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法和其用于制备在细胞层面进行癌症的靶向光热治疗的药物中的应用。

PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

一种靶向光热黑磷纳米制剂及其制备方法和应用

本申请要求了 2016 年 11 月 25 日提交中国专利局的，申请号 201611055858.3，发明名称为“ 一种靶向光热黑磷纳米制剂及其制备方法和应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明涉及生物医用纳米材料技术领域，特别是涉及一种靶向光热黑磷纳米制剂及其制备方法和应用。

背景技术

作为威胁人类健康的重大恶性疾病之一，癌症的治疗无论是化学治疗、手术治疗或放射治疗都是对身体有极大副作用的，并且在发生恶性转移以后，无论采用上述何种方式都难以彻底治愈。虽然已有大量的人力、物力、财力已经投入到癌症的研究，但进展十分有限、并且其有效治疗仍然是人类面对的极大考验。

有研究表明，将纳米技术应用到癌症诊断治疗领域，具有广阔的前景及临床价值。光热治疗作为一种新型的癌症治疗方式，利用光热转换产生的热效应以杀死癌细胞、对肿瘤部位进行热消融治疗，其照射用的激发光一般采用近红外光，是一种非侵入性的癌症治疗方式，能够有效穿透人体正常组织到达癌症部位，极大程度地减少对正常组织的损害。

近期研究发现，黑磷二维材料由于具有低毒性、高消光系数和高光热转换效率，在生物医用领域，尤其是癌症的光热治疗方面具有极大的应用潜力。然而，

现有方式制备的单纯黑磷纳米材料在直接应用于癌症的光热治疗时，其在生理状态下稳定性较差，并且血液循环时间不长，且在癌症部位的富集效果有待改善。

发明内容

鉴于此，本发明第一方面提供了一种靶向光热黑磷纳米制剂，该靶向光热黑磷纳米制剂稳定性高、靶向识别能力好、光热性能优异、能够有效杀死癌细胞，可在细胞层面进行癌症的靶向光热治疗。

第一方面，本发明提供了一种靶向光热黑磷纳米制剂，包括黑磷纳米薄片、通过静电引力吸附在所述黑磷纳米薄片表面的聚乙二醇、以及通过酰胺键连接在所述聚乙二醇上的叶酸，所述聚乙二醇的一端为氨基，另一端为亚氨基，所述亚氨基的氮原子与所述叶酸中的羰基碳原子相连构成所述酰胺键，所述叶酸暴露在所述纳米制剂的最外层。

本发明通过采用聚乙二醇对黑磷纳米薄片进行修饰，并同时采用叶酸进行靶向修饰，其中，聚乙二醇可以有效避免黑磷纳米薄片发生聚集，且聚乙二醇兼具亲水特性和极性，可以显著抑制免疫系统的识别，减少单核-吞噬细胞系统的吞噬，并有效延长纳米薄片的血液长循环时间，从而增强纳米制剂的生物利用度和癌症部位的富集。而叶酸暴露在所述纳米制剂最外层提供靶向配体，所述靶向配体可以和癌细胞特异性结合，提高纳米制剂对癌细胞的靶向特异性，进一步增强纳米制剂在癌症部位的聚集，显著提高光热治疗效果。

可选地，所述靶向光热黑磷纳米制剂通过将黑磷纳米薄片、双氨端聚乙二醇、叶酸按质量比（1~3）：（5~12）：（2~6）配比制得。

本发明中，所述黑磷纳米薄片的尺寸为 50nm-200nm。

本发明中，所述黑磷纳米薄片的厚度为 2nm-3nm。

本发明中，所述双氨端聚乙二醇的重均分子量为 550-30000。

本发明第一方面提供的所述靶向光热黑磷纳米制剂，稳定性高、靶向识别能力好、光热性能优异、能够有效杀死癌细胞，可在细胞层面进行癌症的靶向光热治疗，从而可显著减少黑磷纳米薄片的体内清除；且该靶向光热黑磷纳米制剂具有良好的生物相容性，可通过生物降解或者正常的生理途径排出体外，对生物体无毒副作用、生物安全性高。

第二方面，本发明提供了一种靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，包括以下步骤：

提供黑磷纳米薄片；

将羧基琥珀酰亚胺活化叶酸加入到双氨端聚乙二醇的二甲基亚砷溶液中，并加入适量催化剂，得到混合溶液，所述混合溶液在室温、避光条件下进行搅拌反应 16-32 小时，反应完成后过滤，得到叶酸修饰的聚乙二醇，所述叶酸通过酰胺键连接在聚乙二醇上，所述聚乙二醇的一端为氨基，另一端为亚氨基，所述亚氨基的氮原子与所述叶酸中的羰基碳原子相连构成所述酰胺键；

依次采用探针超声、磁力搅拌的方式，在所述黑磷纳米薄片的表面包覆叶酸修饰的聚乙二醇，得到靶向光热黑磷纳米制剂，所述叶酸修饰的聚乙二醇通过静电引力吸附在所述黑磷纳米薄片表面，所述叶酸暴露在所述靶向光热黑磷纳米制剂的最外层。

本发明中，可选地，所述黑磷纳米薄片、双氨端聚乙二醇、叶酸按质量比 (1~3) : (5~12) : (2~6) 投料。

本发明中，所述催化剂可以是三乙胺。所述催化剂与反应体系的体积比为 1:75-85。

本发明中，可选地，所述探针超声的时间为 20-40 分钟，所述探针超声过程中，持续超声 45 秒-1 小时，及等待 15 秒-1 小时为一个周期，功放为 12%-20%。

本发明中，可选地，所述磁力搅拌的转速可以为 800rpm-1200rpm，持续时间为 3-4 小时。

本发明中，所述黑磷纳米薄片采用溶液剥离结合探针超声法制备，并采用离心管离心方式收集、纯化，所述探针超声的超声时间为 12-18 小时，所述探针超声过程中，持续超声 45 秒-1 小时，及等待 15 秒-1 小时为一个周期，功放为 20%-30%，所述离心的速率为 1000 rpm -2000rpm，时间为 6-15 分钟，温度为 4℃。

本发明中，所述羟基琥珀酰亚胺活化叶酸采用如下方式制备：将叶酸溶解于无水二甲基亚砷（DMSO）中，再加入羟基琥珀酰亚胺和 N,N'-二环己基碳酰亚胺得到混合液，所述混合液在室温、避光和三乙胺催化条件下进行搅拌反应 16-32 小时，反应完成后过滤，得到所述羟基琥珀酰亚胺活化叶酸。

本发明中，所述靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法进一步包括采用超滤膜离心的方式对所得靶向光热黑磷纳米制剂进行至少一次纯化、筛选，得到优化粒径大小的纯净靶向光热黑磷纳米制剂，所述超滤膜离心的速率为 2000-4000 rpm，时间为 30-60 分钟，温度为 4-8℃。

本发明第二方面提供的靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，通过将黑磷纳米薄片与叶酸修饰的聚乙二醇通过静电吸附的方式包覆结合，制得靶向光热黑磷纳米制剂，制备过程简单易操作。

第三方面，本发明提供了一种上述的靶向光热黑磷纳米制剂在制备癌症光热消融治疗药物中的应用。所述靶向光热黑磷纳米制剂应用于癌症的靶向光热消融治疗。所述光热消融治疗通过 808 nm 近红外波段激光激发。所述 808 nm 近红外波段激光具有很强的皮肤穿透能力，能够有效到达深层组织及癌症部位。

同时, 所述靶向光热黑磷纳米制剂具有很好的生物相容性、无毒副作用。

综上所述, 本发明有益效果包括以下几个方面:

(1) 本发明所述的靶向光热黑磷纳米制剂可以有效防止黑磷纳米薄片的聚集, 提高黑磷纳米薄片的稳定性, 延长血液循环时间, 增强黑磷纳米薄片的靶向效果;

(2) 本发明方法制备过程简单易操作, 制备的靶向光热黑磷纳米制剂具备优异生物相容性、无毒副作用;

(3) 本发明制备的所述靶向光热黑磷纳米制剂可以应用于癌症的靶向光热治疗。

附图说明

图 1 为本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 (BP-PEG-FA) 的结构示意图;

图 2 为本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 的扫描透射电子显微镜 (STEM) 和 X 射线能量色散谱 (EDS mapping);

图 3 为本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 的粒径分布图;

图 4 为本发明实施例 1 靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在制备过程中 Zeta 电位的变化图;

图 5 为本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 的傅里叶红外光谱图 (FT-IR);

图 6 为不同浓度的本发明实施例 2 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在 808 nm 近红外激光照射下随时间变化的光热曲线图谱;

图 7 为本发明实施例 2 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在多次 808nm 近红外激光照射下的光热稳定性, 其中黑磷浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$;

图 8 为本发明实施例 2 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在不同制备时间下的光热曲线图谱, 其中黑磷浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$;

图 9 为激光共聚焦扫描电子显微镜 (CLSM) 观察本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 的 Hela 细胞摄取图片;

图 10 为本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在不同癌症细胞中的毒性结果;

图 11 为本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在 Hela 细胞中的体外靶向光热治疗效果。

具体实施方式

以下所述是本发明实施例的优选实施方式, 应当指出, 对于本技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明实施例原理的前提下, 还可以做出若干改进和润饰, 这些改进和润饰也视为本发明实施例的保护范围。

本发明实施例提供了一种靶向光热黑磷纳米制剂, 包括黑磷纳米薄片、通过静电引力吸附在所述黑磷纳米薄片表面的聚乙二醇、以及通过酰胺键连接在所述聚乙二醇上的叶酸, 所述聚乙二醇的一端为氨基, 另一端为亚氨基, 所述亚氨基的氮原子与所述叶酸中的羰基碳原子相连构成所述酰胺键, 所述叶酸暴露在所述纳米制剂的最外层。

可选地, 所述靶向光热黑磷纳米制剂通过将黑磷纳米薄片、双氨端聚乙二醇、叶酸按质量比 (1~3) : (5~12) : (2~6) 配比制得。进一步可选地, 所述靶向光热黑磷纳米制剂通过将黑磷纳米薄片、双氨端聚乙二醇、叶酸按质量比

1:4.2:2.1 配比制得。适合的黑磷纳米薄片、双氨端聚乙二醇、叶酸质量比，有利于形成结构稳定的靶向光热黑磷纳米制剂，可有效避免黑磷纳米薄片的聚集，提高纳米光热制剂的稳定性和靶向效果。

本发明中，所述黑磷纳米薄片表面带负电，因此可通过静电引力与氨基封端的聚乙二醇相结合，聚乙二醇为靶向光热黑磷纳米制剂提供了亲水性表面。

本发明中，可选地，所述黑磷纳米薄片的尺寸为 50nm-200nm。适合的黑磷纳米薄片尺寸，可以有效增强纳米制剂的 EPR 效应，增加纳米制剂在癌症部位的富集，同时保证其在血液循环过程中不易被人体网状内皮组织清除。可选地，黑磷纳米薄片的尺寸为 50nm-150nm、100nm-150nm、120nm-180nm、160nm-200nm。

本发明中，所述黑磷纳米薄片的厚度为 2nm-3nm。黑磷纳米薄片适合的厚度能够显著提高纳米制剂的表面积-质量比，强化纳米制剂的光热治疗效果。厚度越薄，表面积-质量比比值越大。相同质量的黑磷纳米薄片制剂，比表面越大，光热效果越好；反之，光热效果下降。

本发明中，所述黑磷纳米薄片具有非常高的表面积-质量比，一方面能够最大限度地吸收近红外激发光，产生优异的光热性能；另一方面黑磷纳米薄片表面充满负电荷，能够增强与聚乙二醇之间的静电吸附能力，增强叶酸修饰的聚乙二醇表面负载量，加强靶向光热黑磷纳米制剂的稳定性和靶向效果。

本发明中，所述双氨端聚乙二醇的重均分子量为 550-30000。

本发明第一方面提供的所述靶向光热黑磷纳米制剂，稳定性高、靶向识别能力好、光热性能优异、能够有效杀死癌细胞，可在细胞层面进行癌症的靶向光热治疗，从而可显著减少黑磷纳米薄片的体内清除；且该靶向光热黑磷纳米制剂具有良好的生物相容性，可通过生物降解或者正常的生理途径排出体外，对

生物体无毒副作用、生物安全性高。

相应地，本发明实施例还提供了一种靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，包括以下步骤：

(1) 提供黑磷纳米薄片；

(2) 将羟基琥珀酰亚胺活化叶酸加入到双氨端聚乙二醇的二甲基亚砷溶液中，并加入适量催化剂，得到混合溶液，所述混合溶液在室温、避光条件下进行搅拌反应 16-32 小时，反应完成后过滤，得到叶酸修饰的聚乙二醇，所述叶酸通过酰胺键连接在聚乙二醇上，所述聚乙二醇的一端为氨基，另一端为亚氨基，所述亚氨基的氮原子与所述叶酸中的羰基碳原子相连构成所述酰胺键；

(3) 依次采用探针超声、磁力搅拌的方式，在所述黑磷纳米薄片的表面包覆叶酸修饰的聚乙二醇，得到靶向光热黑磷纳米制剂，所述叶酸修饰的聚乙二醇通过静电引力吸附在所述黑磷纳米薄片表面，所述叶酸暴露在所述靶向光热黑磷纳米制剂的最外层。

本发明实施例步骤 (1) 中，可选地，所述黑磷纳米薄片的尺寸为 50nm-200nm。适合的黑磷纳米薄片尺寸，可以有效增强纳米制剂的 EPR 效应，增加纳米制剂在癌症部位的富集，同时保证其在血液循环过程中不易被人体网状内皮组织清除。可选地，黑磷纳米薄片的尺寸为 50nm-150nm、100nm-150nm、120nm-180nm、160nm-200nm。可选地，所述黑磷纳米薄片的厚度为 2nm-3nm。黑磷纳米薄片适合的厚度能够显著提高纳米制剂的表面积-质量比，强化纳米制剂的光热治疗效果。

本发明实施例步骤 (1) 中，所述黑磷纳米薄片可采用溶液剥离结合探针超声法制备，并采用离心管离心方式收集、纯化，所述探针超声的超声时间为 12-18 小时，所述探针超声过程中，持续超声 45 秒-1 小时，及等待 15 秒-1 小时为一

个周期，功放为 20%-30%，所述离心的速率为 1000 rpm -2000rpm，时间为 6-15 分钟，温度为 4℃。离心操作是为了沉淀分离未被剥离的块状黑磷，以提纯分离黑磷纳米薄片。

本发明实施例步骤（2）中，可选地，所述双氨端聚乙二醇的重均分子量为 550-30000。可选地，所述催化剂可以是三乙胺。所述催化剂与反应体系的体积比为 1:75-85。所述搅拌反应过程中的搅拌速度为 300-600rpm。

本发明实施例步骤（2）中，所述羟基琥珀酰亚胺活化叶酸可采用如下方式制备：将叶酸溶解于无水二甲基亚砷(DMSO)中，再加入羟基琥珀酰亚胺(NHS)、三乙胺和 N,N'-二环己基碳酰亚胺(DCC)得到混合液，所述混合液在室温、避光条件下进行搅拌反应 16-32 小时，反应完成后过滤，得到所述羟基琥珀酰亚胺活化叶酸。

本发明步骤(2)中，反应完成后的过滤操作具体可以是：采用透析袋(MWCO: 3000)透析除去未反应的羟基琥珀酰亚胺活化叶酸。

本发明实施例中所得叶酸修饰的聚乙二醇对细胞膜有较强的亲和力，可以很好地促进纳米制剂进入细胞内，有利于提高靶向光热黑磷纳米制剂的后续癌症光热治疗效果。

本发明中，可选地，所述黑磷纳米薄片、双氨端聚乙二醇、叶酸按质量比（1~3）：（5~12）：（2~6）投料。进一步可选地，所述黑磷纳米薄片、双氨端聚乙二醇、叶酸按质量比 1：4.2：2.1 投料。

本发明步骤（3）中，先采用探针超声方式对所述黑磷纳米薄片进行预包覆，再采用磁力搅拌方式进行进一步包覆。可选地，所述探针超声的时间为 20-40 分钟，所述探针超声过程中，持续超声 45 秒-1 小时，及等待 15 秒-1 小时为一个周期，功放为 12%-20%。所述磁力搅拌的转速可以为 800rpm-1200rpm，持续

时间为 3-4 小时。

本发明步骤 (3) 中, 进一步包括采用超滤膜离心的方式对所得靶向光热黑磷纳米制剂进行至少一次纯化、筛选, 得到优化粒径大小的纯净靶向光热黑磷纳米制剂, 所述超滤膜离心的速率为 2000-4000 rpm, 时间为 30-60 分钟, 温度为 4-8℃。

进一步可选地, 所述靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法包括重复多次的所述超滤膜离心操作, 具体为: 每次超滤膜离心操作结束后, 用生理盐水重悬超滤膜上的靶向光热黑磷纳米制剂, 然后进行下一次所述超滤膜离心操作。

本发明上述各个步骤中超声及离心持续时间、周期、转速及功放等各指标的参数设置不局限于上述的限定。

本发明第二方面提供的靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法, 通过将黑磷纳米薄片与叶酸修饰的聚乙二醇通过静电吸附的方式包覆结合, 制得靶向光热黑磷纳米制剂, 制备过程简单易操作。

第三方面, 本发明提供了一种上述的靶向光热黑磷纳米制剂在制备癌症光热消融治疗药物中的应用。所述靶向光热黑磷纳米制剂应用于癌症的靶向光热消融治疗。所述光热消融治疗通过 808 nm 近红外波段激光激发。所述 808 nm 近红外波段激光具有很强的皮肤穿透能力, 能够有效到达深层组织及癌症部位。同时, 所述靶向光热黑磷纳米制剂具有很好的生物相容性、无毒副作用。

下面分多个实施例对本发明实施例进行进一步的说明。其中, 本发明实施例不限于以下的具体实施例。在不变主权利的范围, 可以适当的进行变更实施。

实施例 1

一种靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法, 包括以下步骤:

(1) 采用溶液剥离结合探针超声法制备黑磷纳米薄片：取 50 mg 块状黑磷材料，置于 100 mL 超纯水中，进行探针超声，所述探针超声法的超声时间为 12 小时，过程为持续超声 45 秒，等待 15 秒为一个周期，功放为 20%；超声结束后，取棕黑色剥离液置于离心管中，1000 rpm 离心 10 分钟，温度为 4℃，沉淀未被剥离的块状黑磷，并小心分离沉淀的块状黑磷和上清液中的黑磷纳米薄片，以进一步提纯分离黑磷纳米薄片；

(2) 在溶解有叶酸(1.0 g, 2.27 mmol)的 40 mL 的无水 DMSO 中加入三乙胺 (0.5 mL)，NHS (0.52 g, 5.00 mmol) 以及 DCC (0.50 g, 2.50 mmol)，得到混合液，该混合液在室温、避光条件下磁力搅拌反应 24h 后，过滤除去不溶的副产物和未反应的原料，得到 NHS 活化叶酸。在三乙胺存在的前提下，将 2.5 mL 的 NHS 活化叶酸加入到双氨端聚乙二醇（分子量为 3000）的无水 DMSO 溶液中，两者（NHS 活化后叶酸：双端氨聚乙二醇）摩尔比为 1:2，得到混合溶液。该混合溶液在室温、避光条件下磁力搅拌反应 24h，通过耦合氨端共聚物，合成叶酸修饰的聚乙二醇 FA-PEG-NH₂，在蒸馏水中透析（MWCO: 1000），以除去未反应的叶酸，对 FA-PEG-NH₂ 进行纯化；

(3) 采用探针超声与磁力搅拌的相结合的方式，在黑磷纳米薄片的表面包覆叶酸修饰的聚乙二醇制备靶向光热黑磷纳米制剂；其中黑磷纳米薄片和叶酸修饰的聚乙二醇的质量比为 1:6.3。具体地，先采用探针超声方式对黑磷纳米薄片进行叶酸修饰的聚乙二醇预包覆，探针超声过程在二者悬液中进行，探针超声的时间为 40 分钟，过程为持续超声 45 秒，等待 15 秒为一个周期，功放为 15%。然后采用在室温下磁力搅拌的方式对黑磷纳米薄片进行叶酸修饰的聚乙二醇进一步包覆，磁力搅拌转速为 800 rpm，持续时间为 4 小时；单纯聚乙二醇包覆的黑磷纳米光热制剂（无叶酸修饰）可以通过相同的方式制备，制备原料由叶酸

修饰的氨端聚乙二醇替换为无修饰的氨端聚乙二醇；

(4) 采用超滤膜离心的方式纯化、筛选步骤(3)所得靶向光热黑磷纳米制剂，得到优化粒径大小的纯净靶向光热黑磷纳米制剂：取步骤(3)中反应混合液加入到超滤管(MWCO 100kDa; Millipore)中离心，分离未包覆的叶酸修饰的聚乙二醇和制备得到的靶向光热黑磷纳米制剂；超滤膜离心的速率为 4000 rpm，时间为 30 分钟，温度为 4℃。超滤膜离心后，用生理盐水重悬滤膜上的靶向光热黑磷纳米制剂，重复超滤膜离心和生理盐水重悬 3 次，即可得到纯净的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA。

图 1 为本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 的结构示意图，包括黑磷纳米薄片 10、通过静电引力吸附在黑磷纳米薄片 10 表面的聚乙二醇 20 和通过酰胺键连接在聚乙二醇 20 上的叶酸 30；聚乙二醇 20 的一端为氨基，另一端为亚氨基，所述亚氨基的氮原子与叶酸 30 中的羰基碳原子相连构成所述酰胺键，所述叶酸 30 暴露在纳米制剂的最外层。

图 2(a) 和图 2(b)分别为本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 的扫描透射电子显微镜(STEM)和 X 射线能量色散谱(EDS mapping)，从图中可看出，本实施例制得的 BP-PEG-FA 粒径大约为 100 nm 左右，粒径范围适合产生较好的 EPR 效应，并且可以获知本实施例制得的 BP-PEG-FA 的元素构成为碳、氮、氧、磷四种元素，初步验证靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 制备成功。

图 3 为本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 的粒径分布图，与图 2 中结果具有很好的一致性。

图 4 为本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在制备过程中 Zeta 电位的变化图。黑磷纳米薄片 BP NSs 的 Zeta 电位在 -14 mV 左右，表

面负电绝对值较高，能够有效与氨基端聚乙二醇发生相互作用，进行聚乙二醇包覆。聚乙二醇包覆后的黑磷光热纳米制剂（包括无叶酸修饰 BP-PEG NSs 和有叶酸修饰 BP-PEG-FA NSs）的 Zeta 电位在 -10 mV~-18mV 之间，维持了较高的绝对值，纳米制剂之间相互排斥作用较强，因而在分散相中高度稳定。

图 5 为本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 的傅里叶红外光谱图（FT-IR）。从图中可以看出，在 $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰来自靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 中聚乙二醇部分的 CH 振动峰和 C-O 振动峰，在 ~ 1637 到 $\sim 1653\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰来自叶酸部分的酰胺结合，进一步验证了靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 制备成功。

实施例 2

一种靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，包括以下步骤：

（1）采用溶液剥离结合探针超声法制备黑磷纳米薄片：取 50 mg 块状黑磷材料，置于 100 mL 超纯水中，进行探针超声，所述探针超声法的超声时间为 18 小时，过程为持续超声 1 小时，等待 1 小时为一个周期，功放为 20%。超声结束后，取棕黑色剥离液置于离心管中，2000 rpm 离心 6 分钟，温度为 4°C ，沉淀未被剥离的块状黑磷，并小心分离沉淀的块状黑磷和上清液中的黑磷纳米薄片，以进一步提纯分离黑磷纳米薄片；

（2）在溶解有叶酸(1.0 g, 2.27 mmol)的 40 mL 的无水 DMSO 中加入三乙胺 (0.5 mL)，NHS (0.52 g, 5.00 mmol) 以及 DCC (0.50 g, 2.50 mmol)，得到混合液，该混合液在室温、避光条件下磁力搅拌反应 24h 后，过滤除去不溶的副产物和未反应的原料，得到 NHS 活化叶酸。在三乙胺存在的前提下，将 2.5 mL 的 NHS 活化叶酸加入到双氨基端聚乙二醇（分子量为 5000）的 DMSO 溶液中，

两者等摩尔比，得到混合溶液。该混合溶液在室温、避光条件下磁力搅拌反应 24h，通过耦合氨端共聚物，合成叶酸修饰的聚乙二醇 FA-PEG-NH₂，在蒸馏水中透析（MWCO: 3000），以除去未反应的叶酸，对 FA-PEG-NH₂ 进行纯化；

（3）采用探针超声与磁力搅拌的相结合的方式，在黑磷纳米薄片的表面包覆叶酸修饰的聚乙二醇制备靶向光热黑磷纳米制剂，其中黑磷纳米薄片和叶酸修饰的聚乙二醇的质量比为 1:5。具体地，先采用探针超声方式对黑磷纳米薄片进行叶酸修饰的氨端聚乙二醇进行预包覆，探针超声过程在二者悬液中进行，探针超声的时间为持续 30 分钟，功放为 12%；再在室温下采用磁力搅拌的方式对黑磷纳米薄片进行叶酸修饰的聚乙二醇的进一步包覆，磁力搅拌转速为 1000 rpm，持续时间为 4 小时；单纯聚乙二醇包覆的黑磷纳米光热制剂（无叶酸修饰）可以通过相同的方式制备，制备原料由叶酸修饰的氨端聚乙二醇替换为无修饰的氨端聚乙二醇；

（4）采用超滤膜离心的方式纯化、筛选步骤（3）所得靶向光热黑磷纳米制剂，得到优化粒径大小的纯净靶向光热黑磷纳米制剂：取步骤（3）中反应混合液加入到超滤管（MWCO 100kDa; Millipore）中离心，分离未包覆的叶酸修饰的聚乙二醇和制备得到的靶向光热黑磷纳米制剂；超滤膜离心的速率为 4000 rpm，时间为 30 分钟，温度为 4℃。超滤膜离心后，用生理盐水重悬滤膜上的靶向光热黑磷纳米制剂，重复超滤膜离心和生理盐水重悬 4 次，即可得到纯净的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA。

图 6 为本发明实施例 2 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在 808 nm 近红外激光照射下随时间变化的光热曲线图谱。从图中可以看出，本发明实施例靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 具有很好的光热特性，在强度为 1.0 W/cm² 的 808 nm 激光照射下，浓度为 100 μg/mL 的靶向光热黑磷纳米制剂的温度在 10

分钟内上升了约 26℃。

图 7 为本发明实施例 2 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在多次 808 nm 近红外激光照射下的光热稳定性。从图中可以看出，本发明实施例靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在多次 808 nm 近红外激光照射下温度变化稳定，近红外激光激发的光稳定性好。

图 8 为本发明实施例 2 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在不同制备时间下的光热曲线图谱。从图中可以看出，制备一周后与刚刚制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在相同条件下的近红外激光激发后温度变化一致，因此，表明本发明实施例制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 可以储备放置后使用。

实施例 3

一种靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，包括以下步骤：

(1) 采用溶液剥离结合探针超声法制备黑磷纳米薄片，取 50 mg 块状黑磷材料，置于 100 mL 超纯水中，进行探针超声，所述探针超声法的超声时间为 16 小时，过程为持续超声 1 小时，等待 1 小时为一个周期，功放为 25%。超声结束后，取棕黑色剥离液置于离心管中，1000 rpm 离心 15 分钟，温度为 4℃，沉淀未被剥离的块状黑磷，并小心分离沉淀的块状黑磷和上清液中的黑磷纳米薄片，以进一步提纯分离黑磷纳米薄片；

(2) 在溶解有叶酸(1.0 g, 2.27 mmol)的 40 mL 的无水 DMSO 中加入三乙胺 (0.5 mL)，NHS (0.52 g, 5.00 mmol) 以及 DCC (0.50 g, 2.50 mmol)，得到混合液，该混合液在室温、避光条件下磁力搅拌反应 24h 后，过滤除去不溶的副产物和未反应的原料，得到 NHS 活化叶酸。在三乙胺存在的前提下，将 2.5 mL

的 NHS 活化叶酸加入到双氨端聚乙二醇（分子量为 550）的 DMSO 溶液中，两者等摩尔比，得到混合溶液。该混合溶液在室温、避光条件下磁力搅拌反应 24h，通过耦合氨端共聚物，合成叶酸修饰的聚乙二醇 FA-PEG-NH₂，在蒸馏水中透析（MWCO: 500），以除去未反应的叶酸，对 FA-PEG-NH₂ 进行纯化；

（3）采用探针超声与磁力搅拌的相结合的方式，在黑磷纳米薄片的表面包覆叶酸修饰的聚乙二醇制备靶向光热黑磷纳米制剂，其中黑磷纳米薄片和叶酸修饰的聚乙二醇的质量比为 1:8。具体地，先采用探针超声方式对黑磷纳米薄片进行叶酸修饰的氨端聚乙二醇进行预包覆，探针超声过程在二者悬液中进行，探针超声的时间为持续 30 分钟，功放为 15%；再在室温下采用磁力搅拌的方式对黑磷纳米薄片进行叶酸修饰的聚乙二醇的进一步包覆，磁力搅拌转速为 850 rpm，持续时间为 4 小时；单纯聚乙二醇包覆的黑磷纳米光热制剂（无叶酸修饰）可以通过相同的方式制备，制备原料由叶酸修饰的氨端聚乙二醇替换为无叶酸修饰的氨端聚乙二醇；

（4）采用超滤膜离心的方式纯化、筛选步骤（3）所得靶向光热黑磷纳米制剂，得到优化粒径大小的纯净靶向光热黑磷纳米制剂：取步骤（3）中反应混合液加入到超滤管（MWCO 100kDa; Millipore）中离心，分离未包覆的叶酸修饰的聚乙二醇和制备得到的靶向光热黑磷纳米制剂；超滤膜离心的速率为 4000 rpm，时间为 40 分钟，温度为 4℃。超滤膜离心后，用生理盐水重悬滤膜上的靶向光热黑磷纳米制剂，重复超滤膜离心和生理盐水重悬 5 次，即可得到纯净的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA。

实施例 4

一种靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，包括以下步骤：

(1) 采用溶液剥离结合探针超声法制备黑磷纳米薄片, 取 50 mg 块状黑磷材料, 置于 100 mL 超纯水中, 进行探针超声, 所述探针超声法的超声时间为 14 小时, 过程为持续超声 0.5 小时, 等待 0.5 小时为一个周期, 功放为 30%。超声结束后, 取棕黑色剥离液置于离心管中, 2000 rpm 离心 10 分钟, 温度为 4℃, 沉淀未被剥离的块状黑磷, 并小心分离沉淀的块状黑磷和上清液中的黑磷纳米薄片, 以进一步提纯分离黑磷纳米薄片;

(2) 在溶解有叶酸(1.0 g, 2.27 mmol)的 40 mL 的无水 DMSO 中加入三乙胺 (0.5 mL), NHS (0.52 g, 5.00 mmol) 以及 DCC (0.50 g, 2.50 mmol), 得到混合液, 该混合液在室温、避光条件下磁力搅拌反应 24h 后, 过滤除去不溶的副产物和未反应的原料, 得到 NHS 活化叶酸。在三乙胺存在的前提下, 将 2.5 mL 的 NHS 活化叶酸加入到双氨端聚乙二醇 (分子量为 30000) 的 DMSO 溶液中, 两者等摩尔比, 得到混合溶液。该混合溶液在室温、避光条件下磁力搅拌反应 24h, 通过耦合氨端共聚物, 合成叶酸修饰的聚乙二醇 FA-PEG-NH₂, 在蒸馏水中透析 (MWCO: 3000), 以除去未反应的叶酸, 对 FA-PEG-NH₂ 进行纯化;

(3) 采用探针超声与磁力搅拌的相结合的方式, 在黑磷纳米薄片的表面包覆叶酸修饰的聚乙二醇制备靶向光热黑磷纳米制剂, 其中黑磷纳米薄片和叶酸修饰的聚乙二醇的质量比为 1:12。具体地, 先采用探针超声方式对黑磷纳米薄片进行叶酸修饰的氨端聚乙二醇进行预包覆, 探针超声过程在二者悬液中进行, 探针超声的时间为持续 20 分钟, 功放为 20%; 再在室温下采用磁力搅拌的方式对黑磷纳米薄片进行叶酸修饰的聚乙二醇的进一步包覆, 磁力搅拌转速为 1200 rpm, 持续时间为 3 小时; 单纯聚乙二醇包覆的黑磷纳米光热制剂 (无叶酸修饰) 可以通过相同的方式制备, 制备原料由叶酸修饰的氨端聚乙二醇替换为无修饰的氨端聚乙二醇;

(4) 采用超滤膜离心的方式纯化、筛选步骤(3)所得靶向光热黑磷纳米制剂,得到优化粒径大小的纯净靶向光热黑磷纳米制剂:取步骤(3)中反应混合液加入到超滤管(MWCO 100kDa; Millipore)中离心,分离未包覆的叶酸修饰的聚乙二醇和制备得到的靶向光热黑磷纳米制剂;超滤膜离心的速率为 4000 rpm,时间为 40 分钟,温度为 4℃。超滤膜离心后,用生理盐水重悬滤膜上的靶向光热黑磷纳米制剂,重复超滤膜离心和生理盐水重悬 4 次,即可得到纯净的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA。

应用实施例

使用含有 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液培养 Hela 细胞于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱中。待细胞铺满细胞培养瓶底部后,弃去陈旧培养基,用 PBS 冲洗一次,加入 1 mL 0.25%的胰蛋白酶,37℃消化 1-2 分钟,加入少量含有血清的完全培养基,用弯头吸管轻轻吹打使细胞脱离瓶壁成为单细胞悬液。将此单细胞悬液均匀接种于 6 孔细胞培养板中,再加入 1 mL 培养基,37℃、5 % CO₂ 孵箱中培养 24 小时。于细胞中加入本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA,继续培养 4 小时。用冰冷的 PBS 冲洗三次,加入甲醇固定细胞 20 min,弃去甲醇,加入 DAPI 染液孵育 5 min,再用 PBS 冲洗三次,于 FV-1000 激光共聚焦显微镜下观察细胞摄取情况。观察 DAPI 所用激发光波长为 340 nm,通过 Bright 通道观察靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 的摄取情况。

待正常培养于 10 %胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中的 Hela 细胞铺满细胞培养瓶底部后,弃去陈旧培养基,用 PBS 冲洗一次,加入 1 mL 0.25 %的胰蛋白酶,37℃消化 1-2 分钟,加入少量含有血清的完全培养基,轻轻吹打使细胞脱离瓶壁成为单细胞悬液。将此悬液进行细胞计数、稀释后按 5000 个细胞/孔的密度

均匀接种于 96 孔细胞培养板中，于 37℃，5% CO₂ 的培养箱中继续培养 24 小时使细胞贴壁。用完全培养基分散本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA（浓度分别是 10，25，50 μg/mL）作为待测样品；不含靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 的完全培养基培养的 Hela 细胞作为对照组。待接种于 96 孔细胞培养板中的 Hela 细胞培养 24 h 贴壁后，弃去陈旧培养基，用 PBS 冲洗一次，加入不同浓度的实验组和对照组分别培养 4 小时，随后在强度为 1.0 W/cm² 的 808 nm 激光照射 10 分钟，弃去陈旧培养基，用 PBS 冲洗一次后，加入完全培养基，37℃ 孵育过夜后，通过 MTT 法（每个组均设置 5 个复孔）测定不同组的细胞活性以测定靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 体外癌症光热治疗效果。

图 9 为激光共聚焦扫描电子显微镜（CLSM）观察本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 的 Hela 细胞摄取图片。具体地图 9（a）、图 9（b）、图 9（c）分别为细胞核用 DAPI 染成蓝色，依次通过 DAPI 通道、Bright 通道和混合通道观察的图像。从图中可以看出，本发明实施例的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 能够有效进入癌症细胞，进而能够在细胞内部发生光热治疗效果。

图 10 为本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在不同癌症细胞（Hela、MCF-7、HepG2 和 PC3）中的毒性结果。从图中可以看出，本发明实施例的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在无激光照射情况下不具备细胞毒性，生物安全性好、无毒副作用。

图 11 为不同浓度的本发明实施例 1 制备的靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 在 Hela 细胞中的体外靶向光热治疗效果。图 11 中横坐标黑磷浓度是指黑磷靶向光热制剂中含有黑磷的浓度。Control 指未做任何处理细胞，作为

空白参照。从图中可以看出，在强度为 1.0 W/cm^2 的 808 nm 激光照射下，与未经靶向修饰的黑磷纳米薄片（BP NSs）和黑磷光热纳米制剂（BP-PEG NSs）相比，靶向光热黑磷纳米制剂 BP-PEG-FA 具有更为优异的体外靶向光热治疗效果，能够有效杀死癌细胞，并且只在近红外激光的照射部位产生治疗效果，从而极大程度上减少了对正常细胞、组织及器官的伤害，具有针对性。

需要说明的是，根据上述说明书的揭示和和阐述，本发明所属领域的技术人员还可以对上述实施方式进行了变更和修改。因此，本发明并不局限于上面揭示和描述的具体实施方式，对本发明的一些等同修改和变更也应当在本发明的权利要求的保护范围之内。此外，尽管本说明书中使用了一些特定的术语，但这些术语只是为了方便说明，并不对本发明构成任何限制。

权利要求

1、一种靶向光热黑磷纳米制剂，其特征在于，包括黑磷纳米薄片、通过静电引力吸附在所述黑磷纳米薄片表面的聚乙二醇、以及通过酰胺键连接在所述聚乙二醇上的叶酸，所述聚乙二醇的一端为氨基，另一端为亚氨基，所述亚氨基的氮原子与所述叶酸中的羰基碳原子相连构成所述酰胺键，所述叶酸暴露在所述纳米制剂的最外层。

2、如权利要求1所述的靶向光热黑磷纳米制剂，其特征在于，所述靶向光热黑磷纳米制剂通过将黑磷纳米薄片、双氨端聚乙二醇、叶酸按质量比(1~3)：(5~12)：(2~6)配比制得。

3、如权利要求1所述的靶向光热黑磷纳米制剂，其特征在于，所述黑磷纳米薄片的长宽尺寸为100nm-200nm；所述黑磷纳米薄片的厚度为2nm-3nm。

4、如权利要求2所述的靶向光热黑磷纳米制剂，其特征在于，所述双氨端聚乙二醇的重均分子量为550-30000。

5、一种靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：
提供黑磷纳米薄片；

将羧基琥珀酰亚胺活化叶酸加入到双氨端聚乙二醇的二甲基亚砷溶液中，并加入适量催化剂，得到混合溶液，所述混合溶液在室温、避光条件下进行搅拌反应16-32小时，反应完成后过滤，得到叶酸修饰的聚乙二醇，所述叶酸通过酰胺键连接在聚乙二醇上，所述聚乙二醇的一端为氨基，另一端为亚氨基，所述亚氨基的氮原子与所述叶酸中的羰基碳原子相连构成所述酰胺键；

依次采用探针超声、磁力搅拌的方式，在所述黑磷纳米薄片的表面包覆叶酸修饰的聚乙二醇，得到靶向光热黑磷纳米制剂，所述叶酸修饰的聚乙二醇通

过静电引力吸附在所述黑磷纳米薄片表面，所述叶酸暴露在所述靶向光热黑磷纳米制剂的最外层。

6、如权利要求 5 所述的靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，其特征在于，所述黑磷纳米薄片、双氨端聚乙二醇、叶酸按质量比 (1~3) : (5~12) : (2~6) 投料。

7、如权利要求 5 所述的靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，其特征在于，所述催化剂包括三乙胺，所述催化剂与反应体系的体积比为 1:75-85。

8、如权利要求 5 所述的靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，其特征在于，所述探针超声的时间为 20-40 分钟，所述探针超声过程中，持续超声 45 秒-1 小时，及等待 15 秒-1 小时为一个周期，功放为 12%-20%。

9、如权利要求 5 所述的靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，其特征在于，所述磁力搅拌的转速为 800rpm-1200rpm，持续时间为 3-4 小时。

10、如权利要求 5 所述的靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，其特征在于，所述黑磷纳米薄片采用溶液剥离结合探针超声法制备，并采用离心收集、纯化，所述探针超声的超声时间为 12-18 小时，所述探针超声过程中，持续超声 45 秒-1 小时，及等待 15 秒-1 小时为一个周期，功放为 20%-30%，所述离心的速率为 1000 rpm -2000rpm，时间为 6-15 分钟，温度为 4℃。

11、如权利要求 5 所述的靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，所述羟基琥珀酰亚胺活化叶酸采用如下方式制备：将叶酸溶解于无水二甲基亚砷中，再加入羟基琥珀酰亚胺和 N,N'-二环己基碳酰亚胺得到混合液，所述混合液在室温、避光和三乙胺催化条件下进行搅拌反应 16-32 小时，反应完成后过滤，得到所述羟基琥珀酰亚胺活化叶酸。

12、如权利要求 5 所述的靶向光热黑磷纳米制剂的制备方法，其特征在于，

进一步包括采用超滤膜离心的方式对所得靶向光热黑磷纳米制剂进行至少一次纯化、筛选，得到优化粒径大小的纯净靶向光热黑磷纳米制剂，所述超滤膜离心的速率为 2000-4000 rpm，时间为 30-60 分钟，温度为 4-8℃。

13、如权利要求 1-4 任一项所述的靶向光热黑磷纳米制剂在制备癌症光热消融治疗药物中的应用。

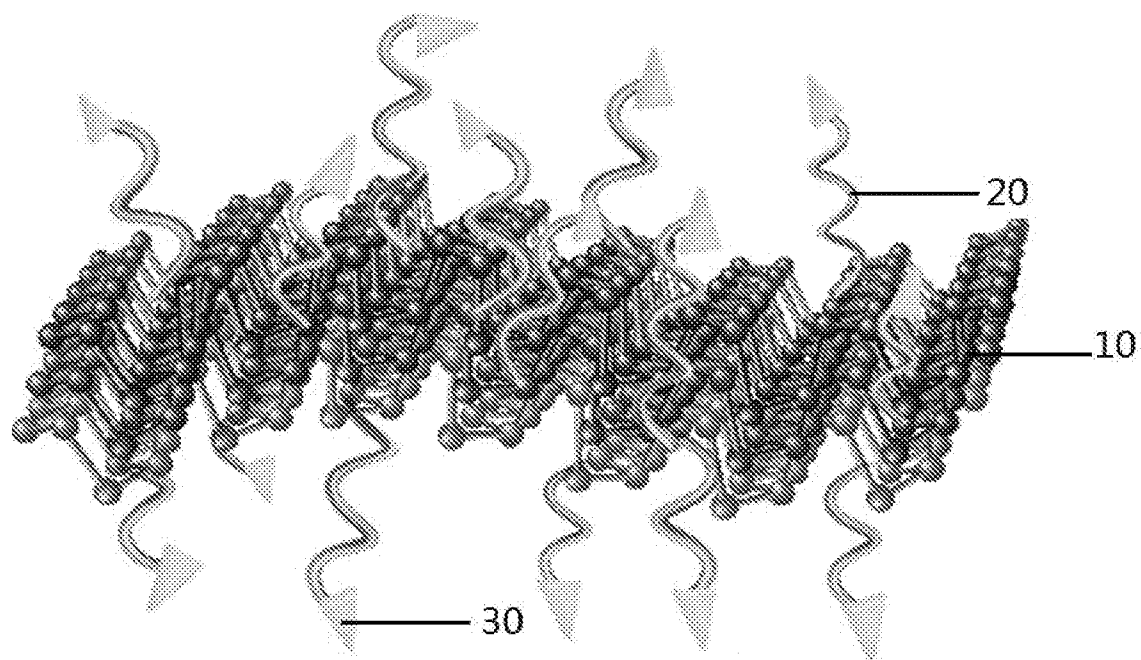


图 1

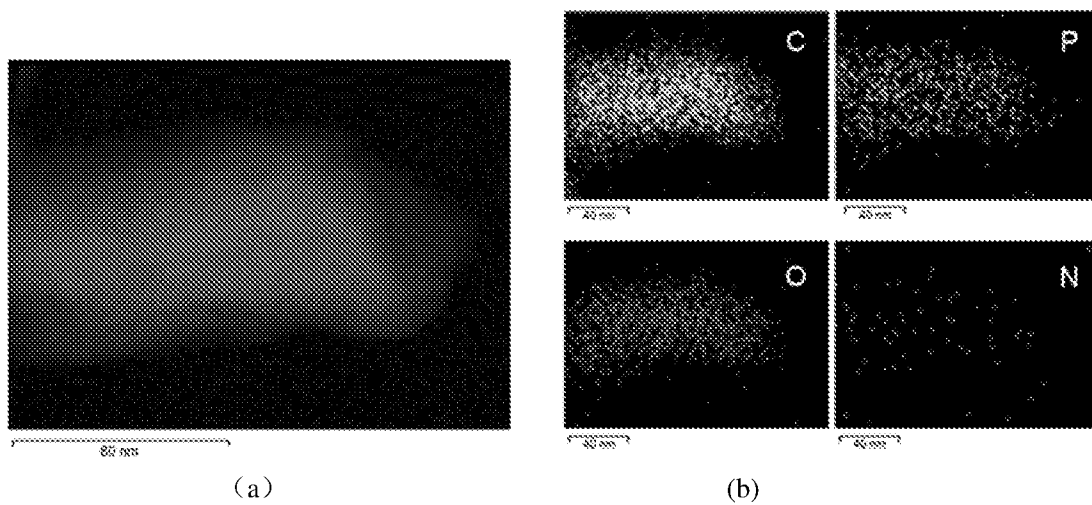


图 2

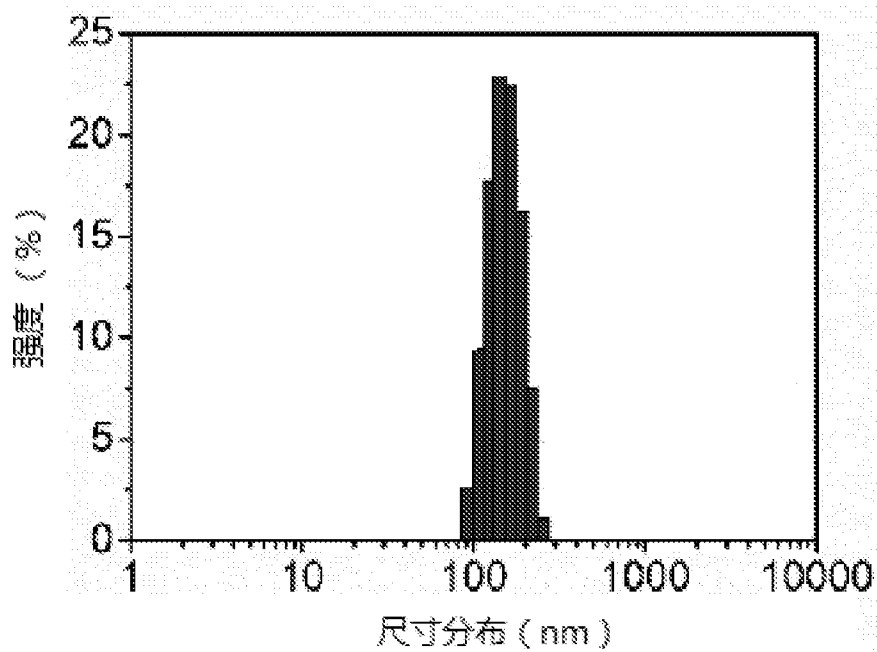


图 3

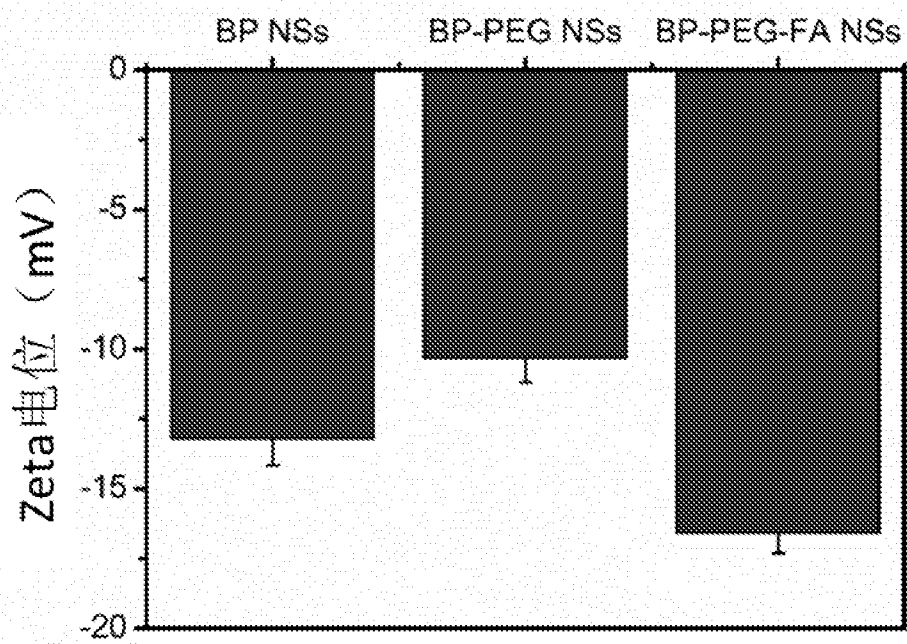


图 4

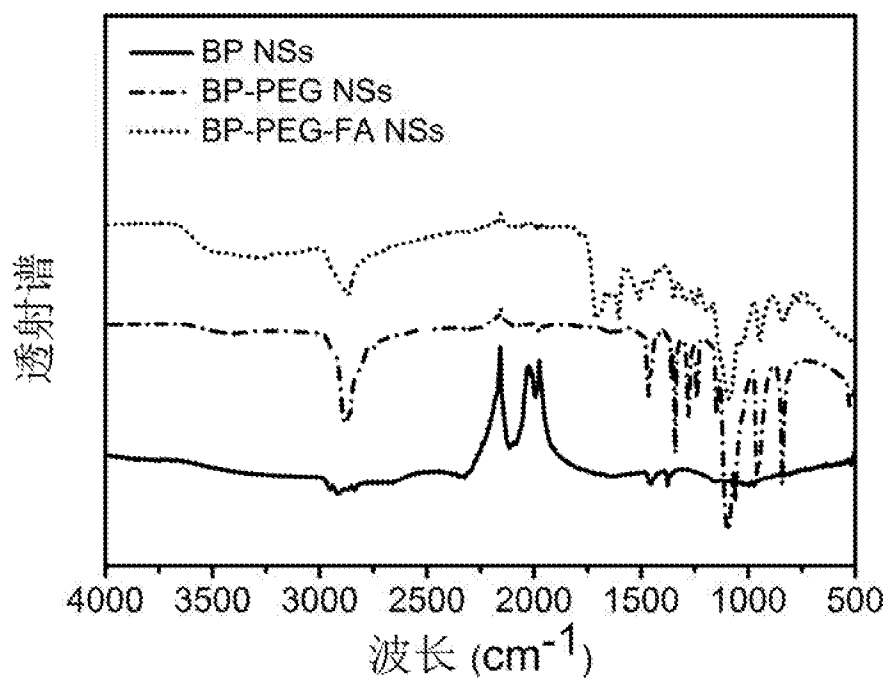


图 5

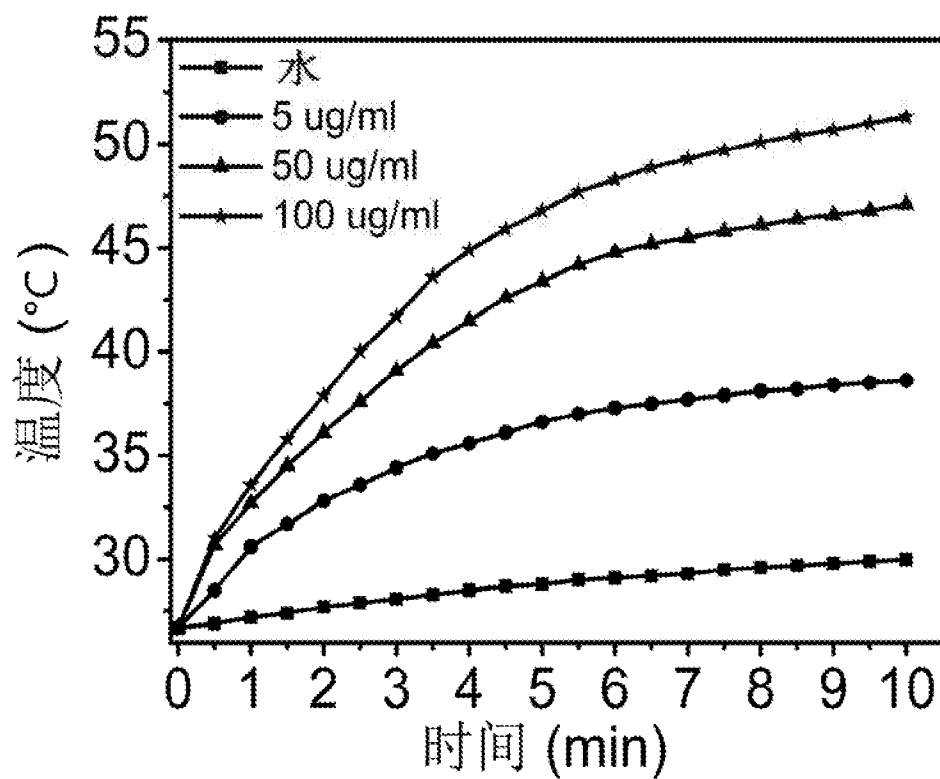


图 6

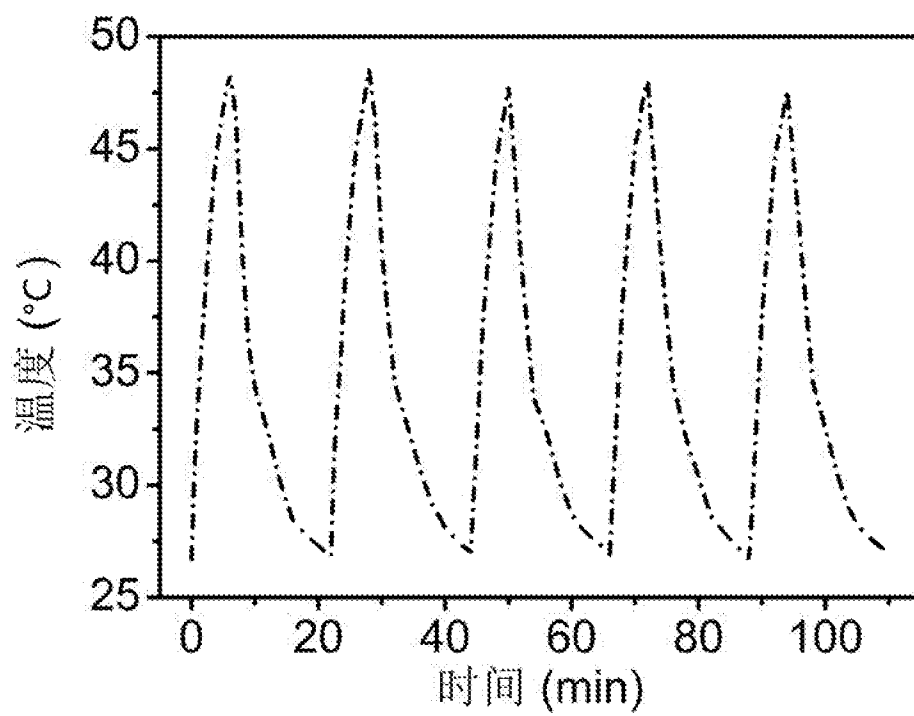


图 7

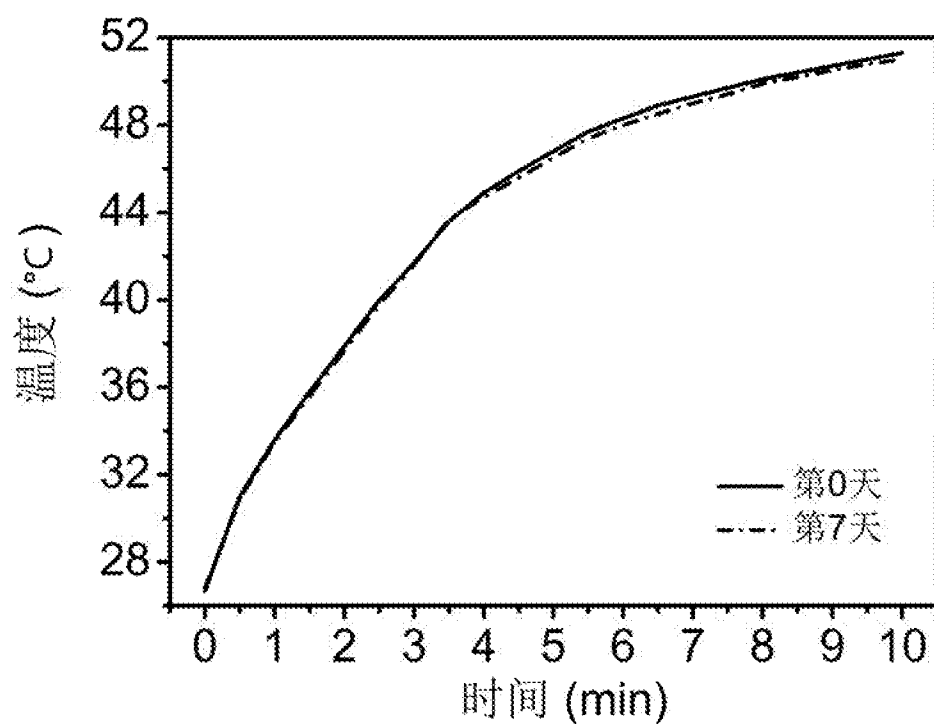


图 8

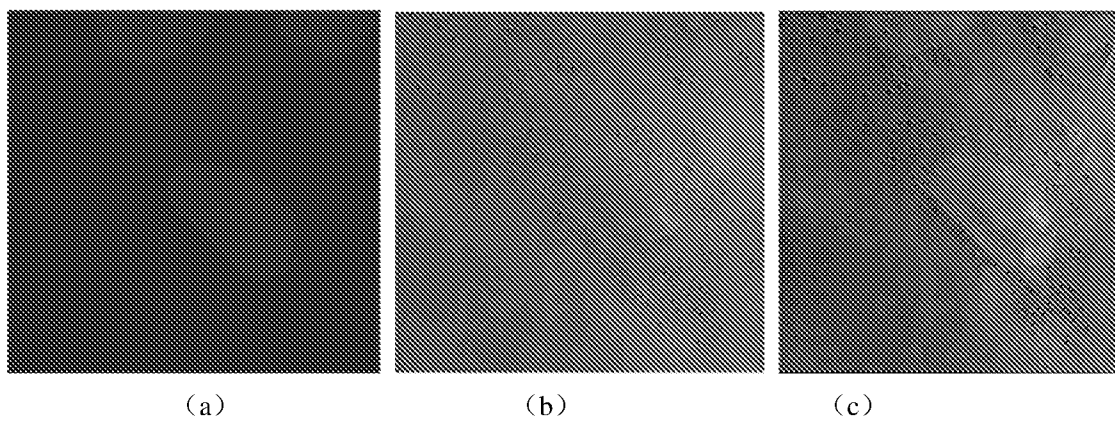


图 9

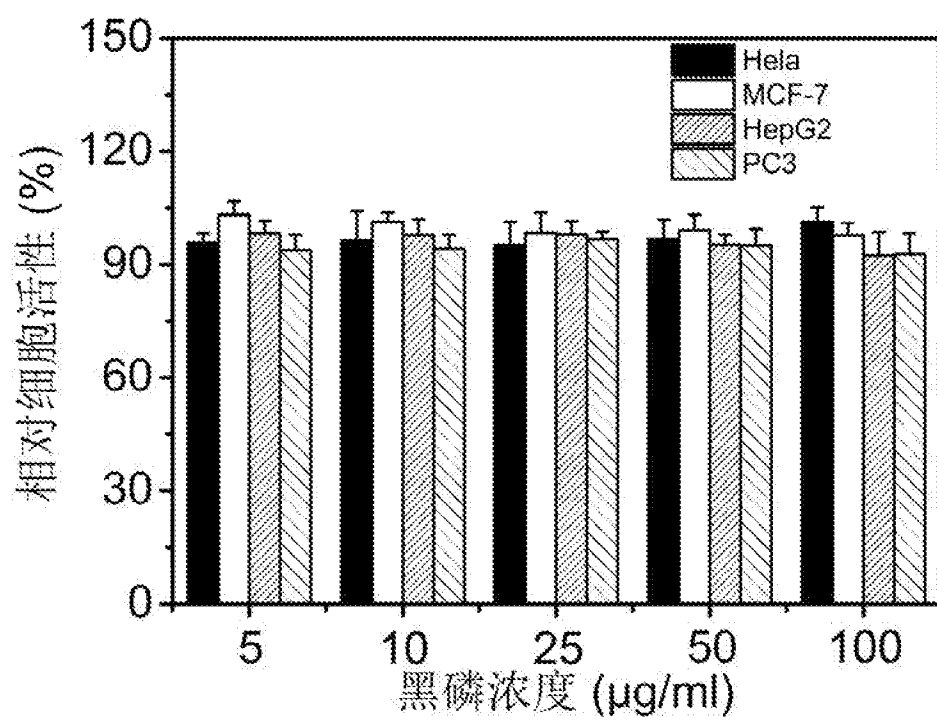


图 10

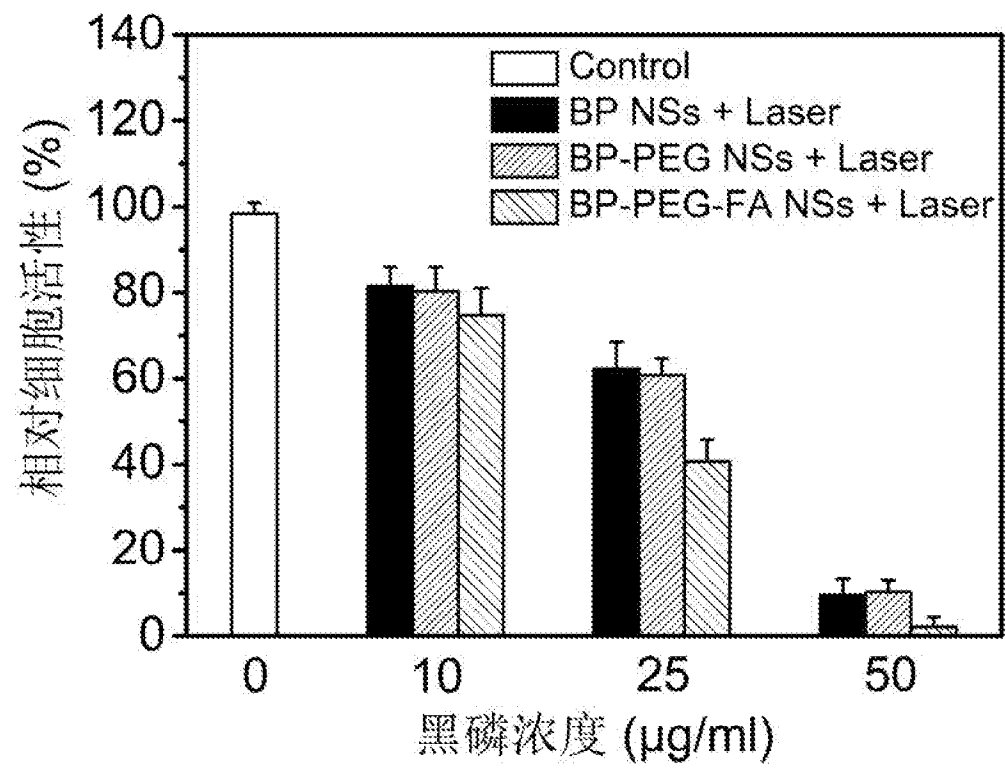


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/088021

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 41/00 (2006.01) i; A61K 47/60 (2017.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

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)

CNXTX, CNABS, CPRSABS, CNMED, CNKI, DWPI, SIPOABS, EPODOC, JPABS, KRABS, CJFD, MEDNPL, SIPONPL, CSCD, Pubmed, Embase: 黑磷, 纳米, 靶向, 叶酸, 聚乙二醇, 包覆, 羧基琥珀酰亚胺, 羧基丁二酰亚胺, 癌症, 肿瘤, 光热, black phosphorus, nano, target, folic acid, folate, PEG, polyethylene glycol, coat, hydroxysuccinimide, 1-hydroxy-2,5-pyrrolidinedione, NHS, cancer, tumour, tumor, photothermal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106620699 A (SHENZHEN UNIVERSITY), 10 May 2017 (10.05.2017), claims 1-13	1-13
X	TAO, Wei et al., "Black Phosphorus Nanosheets as a Robust Delivery Platform for Cancer Theranostics", Advanced Materials, 29(1), 31 October 2016 (31.10.2016), ISSN: 1521-4095, page 1, right-hand column, paragraph 3 to page 2, left-hand column, paragraph 1, page 3, right-hand column, paragraph 2 to page 4, left-hand column, paragraph 1, page 4, right-hand column, paragraph 2 and page 7, right-hand column, paragraph 2, and figure 1a	1, 3, 13
Y	TAO, Wei et al., "Black Phosphorus Nanosheets as a Robust Delivery Platform for Cancer Theranostics", Advanced Materials, 29(1), 31 October 2016 (31.10.2016), ISSN: 1521-4095, page 1, right-hand column, paragraph 3 to page 2, left-hand column, paragraph 1, page 3, right-hand column, paragraph 2 to page 4, left-hand column, paragraph 1, page 4, right-hand column, paragraph 2 and page 7, right-hand column, paragraph 2, and figure 1a	2, 4-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search 31 August 2017	Date of mailing of the international search report 20 September 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer CHEN, Lei Telephone No. (86-10) 62411158

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/088021

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VAN STEENIS, J.H. et al., "Preparation and Characterization of Folate-Targeted pEG-Coated pDMAEMA-based Polyplexes", Journal of Controlled Release, 87(1-3), 21 February 2003 (21.02.2003), ISSN: 0168-3659, abstract, pages 169-171, sections 2.3 and 3.2, flowchart 1	2, 4-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/088021

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106620699 A	10 May 2017	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/088021

A. 主题的分类

A61K 41/00(2006.01)i; A61K 47/60(2017.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

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))

CNXTX, CNABS, CPRSABS, CNMED, CNKI, DWPI, SIPOABS, EPODOC, JPABS, KRABS, CJFD, MEDNPL, SIPONPL, CSCD, Pubmed, Embase: 黑磷, 纳米, 靶向, 叶酸, 聚乙二醇, 包覆, 羟基琥珀酰亚胺, 羟基丁二酰亚胺, 癌症, 肿瘤, 光热, black phosphorus, nano, target, folic acid, folate, PEG, polyethylene glycol, coat, hydroxysuccinimide, 1-hydroxy-2,5-pyrrolidinedione, NHS, cancer, tumour, tumor, photothermal

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
PX	CN 106620699 A (深圳大学) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-13	1-13
X	TAO, Wei等. "Black Phosphorus Nanosheets as a Robust Delivery Platform for Cancer Theranostics" Advanced Materials, 第29卷, 第1期, 2016年 10月 31日 (2016 - 10 - 31), ISSN: 1521-4095, 第1页右栏第3段-第2页左栏第1段, 第3页右栏第2段-第4页左栏第1段, 第4页右栏第2段, 第7页右栏第2段, 图1a	1, 3, 13
Y	TAO, Wei等. "Black Phosphorus Nanosheets as a Robust Delivery Platform for Cancer Theranostics" Advanced Materials, 第29卷, 第1期, 2016年 10月 31日 (2016 - 10 - 31), ISSN: 1521-4095, 第1页右栏第3段-第2页左栏第1段, 第3页右栏第2段-第4页左栏第1段, 第4页右栏第2段, 第7页右栏第2段, 图1a	2, 4-13

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 8月 31日

国际检索报告邮寄日期

2017年 9月 20日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

陈蕾

电话号码 (86-10)62411158

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
Y	VAN STEENIS, J. H. 等. "Preparation and characterization of folate-targeted pEG-coated pdMAEMA-based polyplexes" Journal of Controlled Release, 第87卷, 第1-3期, 2003年 2月 21日 (2003 - 02 - 21), ISSN: 0168-3659, 摘要, 第169-171页第2.3, 3.2节, 流程图1	2, 4-13

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/088021

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 106620699 A	2017年 5月 10日	无	