



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119405802 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 11

(21) 申请号 202411538103.3

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2024.10.31

A61K 49/00 (2006.01)

(71) 申请人 云南省肿瘤医院(昆明医科大学第三附属医院)

地址 650000 云南省昆明市西山区昆州路519号

(72) 发明人 张国君 何悦洋 李阳 白静雯

(74) 专利代理机构 昆明今威专利商标代理有限公司 53115

专利代理师 孙敏

(51) Int.Cl.

A61K 41/00 (2020.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/52 (2017.01)

A61K 47/46 (2006.01)

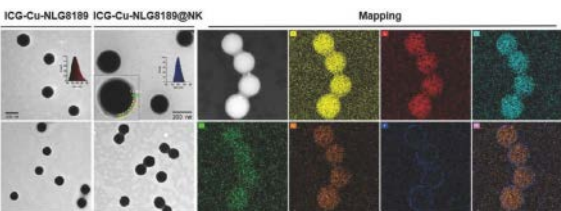
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

一种纳米颗粒及其制备方法和在肿瘤光热-免疫联合治疗中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种纳米颗粒及其制备方法和在肿瘤光热-免疫联合治疗中的应用,其通过金属配位驱动自组装的方法以 Cu^{2+} 为媒介将ICG和NLG8189配位结合且外层修饰NK细胞膜制备得目标纳米颗粒ICG-Cu-NLG8189@NK,并将该纳米颗粒用于肿瘤治疗,精确引导局部光热治疗的实施,诱导肿瘤细胞发生ICD,激活肿瘤部位的免疫反应,帮助解除肿瘤微环境中的局部免疫抑制状态,实现肿瘤免疫微环境的激活,与光热所导致的ICD相协同,实现全身性抗肿瘤效应。



1. 一种纳米颗粒,其特征在于,所述纳米颗粒是以 Cu^{2+} 为媒介将ICG和NLG8189配位结合且外层修饰NK细胞膜的球形自组装纳米颗粒ICG-Cu-NLG8189@NK。

2. 一种根据权利要求1所述的一种纳米颗粒的应用,其特征在于,所述球形自组装纳米颗粒ICG-Cu-NLG8189@NK在光热-免疫联合治疗肿瘤的纳米诊疗剂中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述诊疗剂在肿瘤NIR- II 荧光成像引导精准光热-免疫联合治疗中的应用。

4. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述诊疗剂在抑制肿瘤生长中的应用。

5. 一种根据权利要求1所述的一种纳米颗粒的应用,其特征在于,所述球形自组装纳米颗粒ICG-Cu-NLG8189@NK在激活肿瘤免疫微环境中的应用。

6. 一种根据权利要求1所述的一种纳米颗粒的应用,其特征在于,所述球形自组装纳米颗粒ICG-Cu-NLG8189@NK在构建综合性的精准诊疗体系中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述体系包括利用纳米颗粒的近红外荧光成像功能进行光热靶区的精确勾画。

8. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述体系包括通过局部光热治疗触发肿瘤部位的免疫反应。

9. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述体系包括借助NLG8189的作用,逆转肿瘤部位免疫抑制微环境,进一步激活全身免疫反应。

10. 一种根据权利要求1所述的一种纳米颗粒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1,按照2mg ICG:0.2mg $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的配比将ICG和 $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 分散在5mL无水乙醇中,并置于磁力搅拌器上搅拌8-14h;

S2,对上述反应液进行离心,转速15000rpm,温度 0°C ,离心20min后去上清,获得沉淀物;

S3,将沉淀物溶于无水乙醇中,超声充分分散;

S4,按照1mg NLG8189:0.5mL无水乙醇的配比称取NLG8189溶解于无水乙醇中,超声充分分散,将二者混合,置于磁力搅拌器上搅拌8-14h得到反应液A;

S5,对上述反应液进行离心,转速15000rpm,温度 0°C ,离心20min后去除上清,得到沉淀,在其中加入超纯水,超声充分分散,置于磁力搅拌器上低速搅拌4h得到反应液B;

S6,取NK细胞膜,加入2mL无菌PBS,使用超声破碎仪在冰浴的条件下间断超声1min得到反应液C;

S7,将上述S5和S6的反应液B和反应液C混合,超声分散10min得到反应液D;

S8,将上述S7的反应液D置于脂质体挤出器中,依次通过 $0.8\mu\text{m}$ 、 $0.45\mu\text{m}$ 、 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜挤出获得目标纳米颗粒ICG-Cu-NLG8189@NK。

一种纳米颗粒及其制备方法和在肿瘤光热-免疫联合治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及纳米颗粒合成及应用领域,具体的涉及一种纳米颗粒及其制备方法和在肿瘤光热-免疫联合治疗中的应用,尤其涉及通过金属配位驱动自组装制备纳米颗粒的方法和应用,尤其是一种用于肿瘤NIR- II 荧光成像引导下的精准光热-免疫联合治疗的纳米颗粒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 现如今,恶性肿瘤的发病率及死亡率居高不下,严重威胁人类生命安全。传统的肿瘤治疗方式包括手术、放疗和化疗,存在着创伤大、不良反应严重等诸多局限性。

[0003] 作为一种非侵入性的治疗方法,光热治疗可在外部光源的照射下通过光敏剂将光能转化为热能,从而杀死对温度更为敏感的肿瘤细胞,实现治疗目的。相比于传统治疗方式,光热治疗具有针对性强、不良反应小、治疗时间短、可重复治疗等诸多优点,且光热治疗引起的肿瘤细胞的免疫原性细胞死亡(Immunogenic CellDeath,ICD)可激活局部免疫反应,与免疫治疗相协同可产生“1+1>2”的作用。在诸多光敏剂中,吲哚菁绿(Indocyanine Green, ICG)已被FDA批准应用于临床。作为光敏剂,其光热转化效率高,是兼具成像诊断和光热治疗效应的明星“诊疗小分子”,而作为发光元件,其量子产率高,具有较好的发光及成像效果。

[0004] 良好的光热治疗效果离不开精准的治疗靶区勾画,唯有精准施加光源锁定照射范围才能在最大程度上杀死肿瘤细胞并保护周围正常组织,从而减少不良反应。光学成像技术作为一种较为新型的成像方式相比于传统X射线、超声、CT及MRI等的成像方式具有无电离辐射、直观易操作等优势。其较高的灵敏度和成像分辨率在肿瘤的实时在体观测方面独具优势。相比于可见光,近红外荧光(NearInfrared, NIR)灵敏度更高,穿透深度更深。尤其是近红外二区(NIR- II),其相比于近红外一区(NIR- I)具有“组织透明窗口”的独特性,在组织中具有更低的散射和吸收,可进一步提高成像的空间分辨率和组织穿透深度,“点亮”肿瘤部位,为光热治疗靶区的勾画提供可靠依据。然而作为一种局部治疗手段,光热治疗范围局限在肿瘤部位,虽可诱发ICD但免疫激活作用十分有限,加之“冷肿瘤”抑制性的免疫微环境,难以实现全身性的肿瘤治疗。

[0005] 免疫治疗作为一种新兴的全身性疗法为肿瘤患者带来希望,随着科研人员对肿瘤免疫微环境研究的不断深入,他们发现肿瘤微环境中吲哚胺-(2,3)-双加氧酶(Indoleamine2,3-dioxygenase, IDO)的过表达是肿瘤抑制性免疫微环境形成的关键原因。IDO能够催化色氨酸转化为犬尿氨酸,造成微环境中色氨酸的缺乏,进而抑制了效应T细胞和NK细胞的活性,同时增强了Treg细胞的作用,为肿瘤提供了免疫逃逸的机会。NLG8189 (Indoximod, 1-MT)是甲基化的色氨酸,作为IDO通路抑制剂,可有效逆转由IDO介导的免疫抑制效应,逆转抑制性免疫微环境,使得“冷肿瘤”变“热肿瘤”,与光热治疗所导致的ICD相协同,可在体内诱发全身性抗肿瘤免疫作用。

发明内容

[0006] 基于上述现有技术的缺陷,本发明提出了一种创新的治疗策略:在NIR-II成像的引导下实现肿瘤的精准光热-免疫治疗。具体为通过构建ICG-Cu-NLG8189@NK纳米颗粒,实现NIR-II荧光成像技术引导的精准光热治疗,并将光热治疗诱导的ICD局部“促激活”效应与NLG8189的全身“防抑制”作用相结合,激活肿瘤免疫微环境,从而实现全身性抗肿瘤作用,大大提升肿瘤治疗效果。

[0007] 具体技术方案如下:

[0008] 一种纳米颗粒,所述纳米颗粒是以 Cu^{2+} 为媒介将ICG和NLG8189配位结合且外层修饰NK细胞膜的球形自组装纳米颗粒ICG-Cu-NLG8189@NK。

[0009] 一种纳米颗粒的应用,所述球形自组装纳米颗粒ICG-Cu-NLG8189@NK在光热-免疫联合治疗肿瘤的纳米诊疗剂中的应用。

[0010] 进一步地,所述诊疗剂在肿瘤NIR-II荧光成像引导精准光热-免疫联合治疗中的应用。

[0011] 进一步地,所述诊疗剂在抑制肿瘤生长中的应用。

[0012] 进一步地,所述球形自组装纳米颗粒ICG-Cu-NLG8189@NK在激活肿瘤免疫微环境中的应用。

[0013] 进一步地,所述球形自组装纳米颗粒ICG-Cu-NLG8189@NK在构建综合性的精准诊疗体系中的应用。

[0014] 再进一步地,所述体系包括利用纳米颗粒的近红外荧光成像功能进行光热靶区的精确勾画。

[0015] 再进一步地,所述体系包括通过局部光热治疗触发肿瘤部位的免疫反应。

[0016] 再进一步地,所述体系包括借助NLG8189的作用,逆转肿瘤部位免疫抑制微环境,进一步激活全身免疫反应。

[0017] 一种纳米颗粒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0018] S1,按照2mg ICG:0.2mg $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的配比将ICG和 $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 分散在5mL无水乙醇中,并置于磁力搅拌器上搅拌8-14h;

[0019] S2,对上述反应液进行离心,转速15000rpm,温度 0°C ,离心20min后去上清,获得沉淀物;

[0020] S3,将沉淀物溶于无水乙醇中,超声充分分散;

[0021] S4,按照1mg NLG8189:0.5mL无水乙醇的配比称取NLG8189溶解于无水乙醇中,超声充分分散,将二者混合,置于磁力搅拌器上搅拌8-14h得到反应液A;

[0022] S5,对上述反应液进行离心,转速15000rpm,温度 0°C ,离心20min后去除上清,得到沉淀,在其中加入超纯水,超声充分分散,置于磁力搅拌器上低速搅拌4h得到反应液B;

[0023] S6,取NK细胞膜,加入2mL无菌PBS,使用超声破碎仪在冰浴的条件下间断超声1min得到反应液C;

[0024] S7,将上述S5和S6的反应液B和反应液C混合,超声分散10min得到反应液D;

[0025] S8,将上述S7的反应液D置于脂质体挤出器中,依次通过 $0.8\mu\text{m}$ 、 $0.45\mu\text{m}$ 、 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜挤出获得目标纳米颗粒ICG-Cu-NLG8189@NK。

[0026] 本发明的工作原理:本申请通过金属配位驱动自组装制备了一种以 Cu^{2+} 为媒介将

ICG和NLG8189配位结合且外层修饰NK细胞膜的球形自组装纳米颗粒,并利用纳米颗粒的近红外荧光成像功能进行光热靶区的精确勾画,以及通过局部光热治疗触发肿瘤部位的免疫反应,并借助NLG8189的作用,逆转肿瘤部位免疫抑制微环境,进一步激活全身免疫反应,从靶区定位到局部光热再到全身免疫激活的全方位、精准化诊疗,为肿瘤治疗提供了新的有效策略。

[0027] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0028] (1) 制备了一种具有高效肿瘤富集效应的诊疗纳米颗粒

[0029] ICG-Cu-NLG8189@NK;

[0030] (2) 能够精确引导局部光热治疗的实施,诱导肿瘤细胞发生ICD,激活肿瘤部位的免疫反应;

[0031] (3) NLG8189的免疫微环境调节作用可帮助解除肿瘤微环境中的局部免疫抑制状态,实现肿瘤免疫微环境的激活,与光热所导致的ICD相协同,实现全身性抗肿瘤效应。

附图说明

[0032] 图1为ICG-Cu-NLG8189、ICG-Cu-NLG8189@NK的电镜和ICG-Cu-NLG8189@NK的mapping元素分析。

[0033] 图2为不同样品的紫外吸收光谱及红外光谱;其中:

[0034] (A) 为ICG、NLG8189、ICG-NLG8189、ICG-Cu-NLG8189、ICG-Cu-NLG8189@NK的紫外吸收光谱;

[0035] (B) 为NLG8189、 $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、NLG8189与 $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 粉末的混合物以及NLG8189- Cu^{2+} 配位物的红外吸收光谱。

[0036] 图3为ICG-Cu-NLG8189@NK的体外光热升温曲线,其中:

[0037] (A) 为ICG-Cu-NLG8189@NK在不同浓度下的光热升温曲线;

[0038] (B) 为ICG-Cu-NLG8189@NK在不同功率下的光热升温曲线;

[0039] (C) 为光热稳定性曲线。

[0040] 图4为细胞摄取及对4T1细胞的杀伤检测效果图;其中:

[0041] (A) ICG-Cu-NLG8189@NK与4T1细胞共孵育0,1,2,4,6h后细胞的荧光显微镜照片;

[0042] (B) 流式细胞术检测4T1细胞在不同处理后的凋亡情况,L代表Laser,即激光照射。

[0043] 图5为免疫荧光检测免疫原性死亡标志物的激光共聚焦图片;其中:

[0044] (A) 为钙网蛋白(Calreticulin,CRT)的免疫荧光图片;

[0045] (B) 为高迁移率族蛋白B1(HighMobility Group Protein 1, HMGB1)的免疫荧光图片。

[0046] 图6为在体荧光成像及热成像图;其中:

[0047] (A) 皮下移植瘤小鼠在尾静脉注射ICG、ICG-NLG8189@NK、ICG-Cu-NLG8189、ICG-Cu-NLG8189@NK后不同时间点的在体荧光成像图片;

[0048] (B) 皮下移植瘤小鼠在尾静脉注射PBS、ICG、ICG-NLG8189@NK、ICG-Cu-NLG8189@NK后在808nm激光照射下的在体热成像图片。

[0049] 图7为单侧瘤抑制实验结果图;其中:

[0050] (A) 不同组小鼠肿瘤生长曲线;

- [0051] (B) 第16天各组代表性小鼠白光照片。
- [0052] 图8为生物安全性检测结果;其中:
- [0053] (A) 不同浓度的纳米颗粒的体外溶血检测;
- [0054] (B) 在基于ICG-Cu-NLG8189@NK纳米颗粒的光热-免疫治疗后采集小鼠血清进行肝肾功能检测的结果。

具体实施方式

[0055] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明了,下面结合具体实施方式并参照附图,对本发明进一步详细发明。应该理解,这些描述只是示例性的,而并非要限制本发明的范围。此外,在以下发明中,省略了对公知结构和技术的描述,以避免不必要地混淆本发明的概念。

[0056] 实施例1:纳米颗粒的制备

[0057] 本申请的纳米颗粒是一种以 Cu^{2+} 为媒介将ICG和NLG8189配位结合且外层修饰NK细胞膜的球形自组装纳米颗粒,其主要通过金属配位驱动自组装,具体步骤如下:

[0058] (1) 称取2mg ICG和0.2mg $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 在5mL无水乙醇中分散,置于磁力搅拌器上搅拌8-14h。

[0059] (2) 对上述反应液进行离心,转速15000rpm,温度 0°C ,离心20min。

[0060] (3) 离心后小心去除上清,得到的沉淀,将其溶于0.5mL无水乙醇中,超声30s左右使充分分散;称取1mgNLG8189溶于0.5mL无水乙醇中,超声30s左右使充分分散,将二者混合,置于磁力搅拌器上搅拌8-14h。

[0061] (4) 对上述反应液进行离心,转速15000rpm,温度 0°C ,离心20min。

[0062] (5) 离心后小心去除上清,得到沉淀,在其中加入1mL超纯水,超声分散1min左右使充分分散。置于磁力搅拌器上低速搅拌4h。

[0063] (6) 在EP管中称取0.5mgNK细胞膜,加入2mL无菌PBS,使用超声破碎仪在冰浴的条件下间断超声1min。

[0064] (7) 将(5)和(6)中的反应液混合,超声分散10min。

[0065] (8) 将上述反应液置于脂质体挤出器中,依次通过 $0.8\mu\text{m}$ 、 $0.45\mu\text{m}$ 、 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜挤出挤出即可得到目标纳米颗粒ICG-Cu-NLG8189@NK。

[0066] 实施例2:合成的ICG-Cu-NLG8189@NK纳米颗粒的表征

[0067] (1) ICG-Cu-NLG8189@NK的形貌、元素组成

[0068] 将合成的纳米颗粒以合适浓度稀释在溶液中并滴在铜网上晾干。之后在JEM-2100F透射电镜仪器上进行透射电镜图像采集,在Tallos F200场发射透射电镜上进行mapping元素分布的图像采集。

[0069] 如图1左侧的电镜结果数据可见,ICG-Cu-NLG8189核心纳米颗粒呈均匀的球形,分散性良好,粒径约为190nm。ICG-Cu-NLG8189@NK电镜可见其表面成功修饰了一层薄膜,厚度约12nm,表明NK细胞膜的成功修饰。由于外层细胞膜的修饰,ICG-Cu-NLG8189@NK的粒径相比于ICG-Cu-NLG8189略有增加,约为200nm。对其作进一步表征,结果如图1右侧的mapping元素分析所示:C、N、O、Cu、S元素均匀地分布在纳米颗粒内,这表明在 Cu^{2+} 的介导下,ICG与NLG8189成功自组装形成球形实心纳米颗粒。此外,细胞膜的代表性元素P元素在球形颗粒

表面均匀分布,这进一步表明了NK细胞膜在纳米颗粒表面的成功修饰。

[0070] (2) 紫外吸收光谱及红外光谱检测

[0071] 将不同样品溶于超纯水后于Cary 5000紫外可见近红外分光光度计仪器上检测其紫外吸收光谱。将不同的样品粉末于Nicolet iS 50傅立叶变换红外光谱仪上检测其红外光谱。

[0072] 如图2A所示,ICG的特征性紫外吸收峰约在780nm。相比于此,ICG-NLG8189及ICG-Cu-NLG8189的特征性紫外吸收峰明显红移,这表明 Cu^{2+} 及NLG8189可以与ICG之间可以产生相互作用力。此外,相比于ICG-Cu-NLG8189,ICG-Cu-NLG8189@NK的紫外吸收波谱未发生明显变化,这表明NK细胞膜的外层修饰不影响ICG与NLG8189之间的相互作用力及配位自组装。为进一步研究NLG8189与 Cu^{2+} 之间是否存在相互作用力,分别检测了NLG8189、 $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、NLG8189与 $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 粉末的混合物以及NLG8189- Cu^{2+} 配位物的红外光谱。如图2B所示,NLG8189与 $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 粉末的混合物所呈现出的红外光谱是NLG8189纯品和 $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 纯品的加权平均,无特征峰的出现和偏移。这说明在物理混合后,NLG8189与 $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 并不发生相互作用力。相比之下NLG8189- Cu^{2+} 配位物的红外吸收光谱在1690nm及1610nm处出现了特征峰,这进一步证实了NLG8189与 Cu^{2+} 之间相互作用力的存在。

[0073] (3) ICG-Cu-NLG8189@NK的光热性能研究

[0074] 通过热成像仪检测了ICG-Cu-NLG8189@NK纳米颗粒的体外光热性能。

[0075] 结果如图3A所示,在固定的激光照射功率下,随着ICG-Cu-NLG8189@NK纳米颗粒浓度的增加,光热升温速度和平台温度逐渐增加。在固定的ICG-Cu-NLG8189@NK纳米颗粒浓度下,随着808nm激光照射功率的提升,这些纳米颗粒的光热升温速率和最终温度不断上升(3B)。此外,通过不断开光激光器的升降温实验进一步验证了ICG-Cu-NLG8189@NK纳米颗粒出色的光热稳定性(3C)。

[0076] 实施例3:细胞摄取及细胞杀伤实验

[0077] 细胞摄取检测实验中将4T1细胞以合适密度均匀铺在含有细胞爬片的12孔板中并孵育12h使细胞贴壁,之后将培养基弃去换为含ICG-Cu-NLG8189@NK的新鲜培养基,孵育0、1、2、4、6h后将培养基弃去,用PBS洗涤3次后将细胞用多聚甲醛进行固定、用麦胚凝集素(WGA)-Rho对细胞膜进行染色、用DAPI对细胞核进行染色之后用抗荧光淬灭剂封片,于莱卡正置荧光显微镜下进行观察拍照。流式细胞凋亡检测实验中依照说明书步骤使用碧云天AnnexinV FITC/PI Kit试剂盒对细胞凋亡情况进行检测。

[0078] 如图4A激光共聚焦显微镜拍摄的细胞摄取图像显示,随着时间的推移,纳米颗粒在细胞内的摄取逐渐增多。流式细胞术的结果表明,相比于其他组,在激光照射下,ICG-Cu-NLG8189@NK纳米颗粒组能够展现出显著的细胞杀伤效果(4B)。

[0079] 实施例4:光热治疗诱导ICD检测

[0080] 利用免疫荧光技术,检测了细胞免疫原性死亡标志物CRT和HMGB1的变化。具体而言,将4T1细胞以合适密度均匀铺在含有细胞爬片的12孔板中并孵育12h使细胞贴壁。之后将培养基弃去换为含有不同样品的新鲜培养基共孵育。然后对需要进行光照的组进行808nm激光照射。4h后用PBS洗涤细胞,用4%多聚甲醛固定,用0.1% Triton X-100溶液通透(观察CRT不需要通透,观察HMGB1需要通透)。然后,置于3%的BSA阻断缓冲液中1h以封闭非特异性结合。然后与抗CRT或HMGB1的一抗(CRT:ab92516,1:500;HMGB1:ab18256,1:1000)在

4℃下孵育过夜。随后与偶联到AlexaFluor488的二抗室温孵育1小时。之后用PBS洗涤,用DAPI染细胞核。最后用抗荧光淬灭剂封片并在Nikon激光共聚焦显微镜下观察和拍照。

[0081] 如图5所示, ICG-Cu-NLG8189@NK纳米颗粒在光照条件下荧光信号增强, 说明其能够显著引发CRT的外翻(5A); 于此同时HMGB1荧光信号减弱, 说明其可促进核内HMGB1的迁移(5B)。这些结果表明, 该纳米颗粒在光照条件下能够有效诱导肿瘤细胞的免疫原性死亡从而激活免疫反应。

[0082] 实施例5: ICG-Cu-NLG8189@NK纳米颗粒在小鼠体内的肿瘤靶向富集能力及光热升温能力研究

[0083] 将100μL ($7 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) 4T1细胞注射入小鼠右侧后肢皮下构建皮下移植瘤小鼠模型。7天后待瘤子长到一定体积时, 将不同样品经尾静脉注入小鼠体内于900/1700NIR-II荧光成像系统进行在体荧光成像, 或是使用热成像仪在808nm激光照射下进行在体热成像。

[0084] 结果如图6所示, 通过尾静脉注射入小鼠体内后, 该纳米颗粒能够在肿瘤部位实现长时间的高效富集, 从而实现精准的肿瘤成像和高效的药物递送, 这也是后续实现精准诊疗的关键(6A)。在体的热成像结果验证了其强大的在体光热升温性能, 这一方面归功于纳米颗粒在肿瘤部位的高效富集, 另一方面是由于纳米颗粒优异的在体升温性能(6B)。

[0085] 实施例6: 肿瘤抑制实验

[0086] 将100μL ($7 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) 4T1细胞注射入小鼠右侧后肢皮下构建皮下移植瘤小鼠模型。待瘤子长到约80-100mm³时, 将不同样品经尾静脉注入小鼠体内并对需要光照的小鼠的肿瘤部位激光照射。隔天测量小鼠肿瘤大小(体积=长×宽²×0.5)及体重一次, 持续16天, 并在第16天拍摄小鼠白光照片。

[0087] 结果如图7所示, 从肿瘤生长曲线可见, 在激光照射下, ICG-Cu-NLG8189@NK纳米颗粒相较于单纯的ICG以及未添加铜离子的纳米颗粒, 展现出了更为显著的肿瘤生长抑制效果(7A)。此外, 从第16天的小鼠白光图上可以直观地看到ICG-Cu-NLG8189@NK+L组优异的肿瘤生长抑制效果(7B)。这有力地证明了基于ICG-Cu-NLG8189@NK的光热-免疫治疗在肿瘤治疗中的优势。

[0088] 实施例7: 纳米颗粒的生物安全性评估

[0089] 溶血实验中, 取健康小鼠血液用PBS清洗并离心分离红细胞, 将红细胞重新溶于PBS中形成红细胞悬液。将不同浓度ICG-Cu-NLG8189@NK的PBS溶液与红细胞悬液混合, 以PBS为阴性对照组, 以纯水为阳性对照组, 一段时间后离心并观察上清。小鼠肝肾功能评估实验中, 将各个组治疗后的鼠经眼眶取全血, 待静置凝血后离心取上层血清进行肝肾功能各项指标的检测。

[0090] 结果如图8所示, 体外溶血实验的结果表明, 与PBS组相比, 含有ICG-Cu-NLG8189@NK组的的红细胞并未表现出明显的溶血效应(8A)。此外, 通过对治疗后不同组的小鼠血清样品进行检测。检测结果表明, ICG-Cu-NLG8189@NK组及各个治疗组分处理组的小鼠肝肾功能都在正常范围内(8B)。这在一定程度上说明了该纳米颗粒具备良好的生物安全性, 为其未来的临床应用提供了重要的安全保障。

[0091] 应当理解的是, 本发明的上述具体实施方式仅仅用于示例性发明或解释本发明的原理, 而不构成对本发明的限制。因此, 在不偏离本发明的精神和范围的情况下所做的任何修改、等同替换、改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。此外, 本发明所附权利要求旨

在涵盖落入所附权利要求范围和边界、或者这种范围和边界的等同形式内的全部变化和修改例。

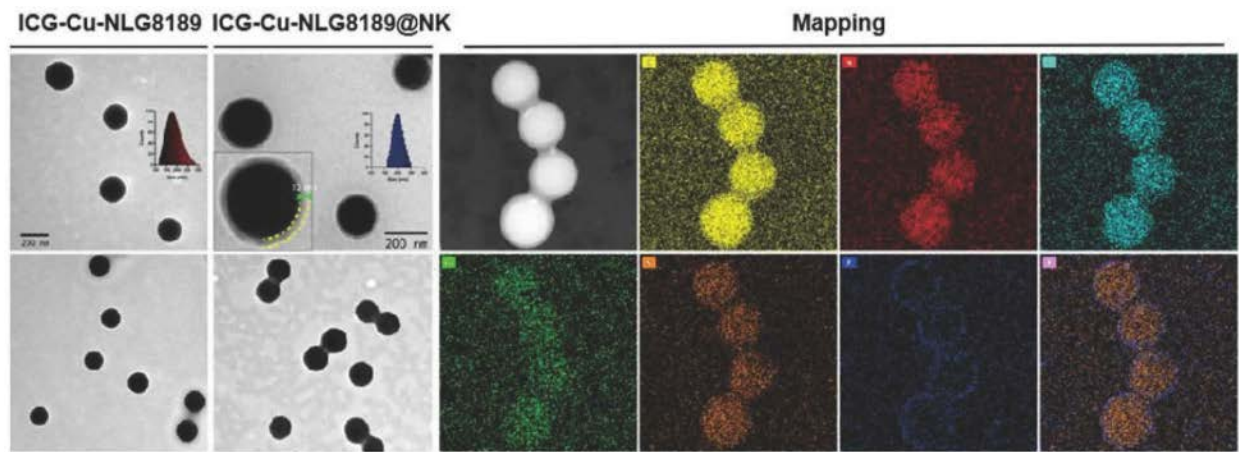


图1

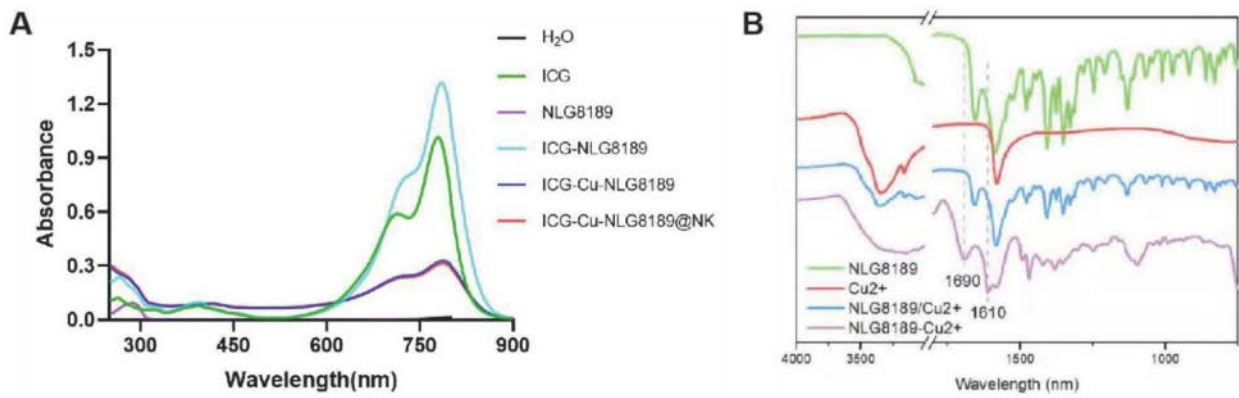


图2

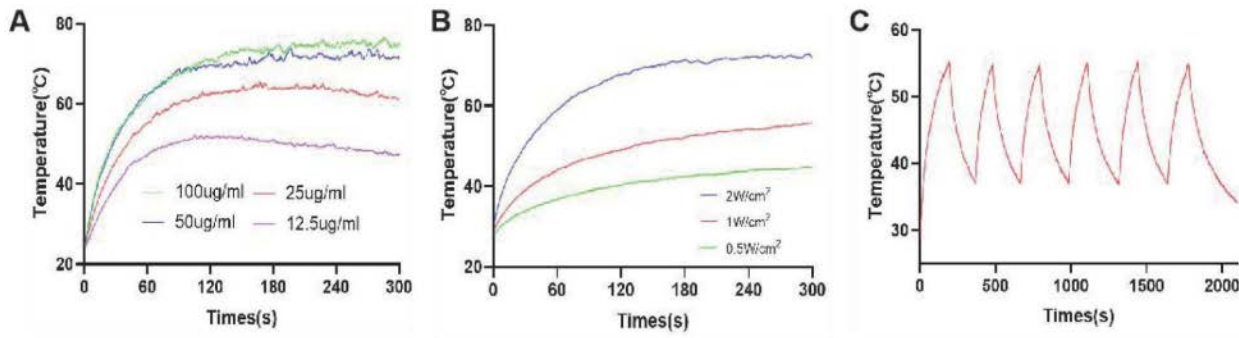


图3

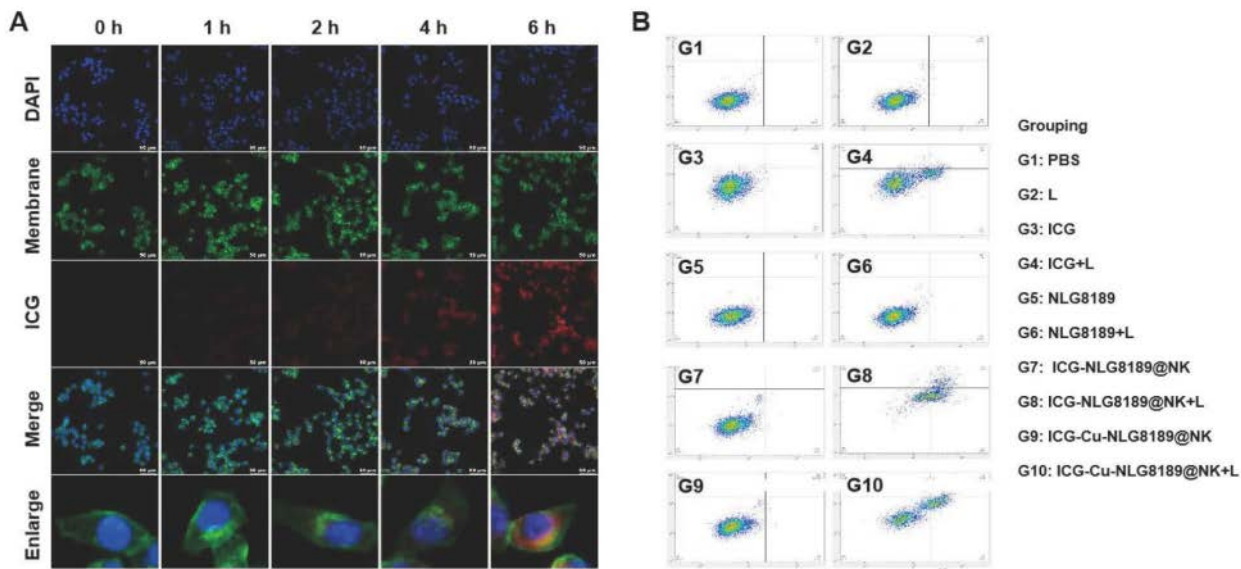


图4

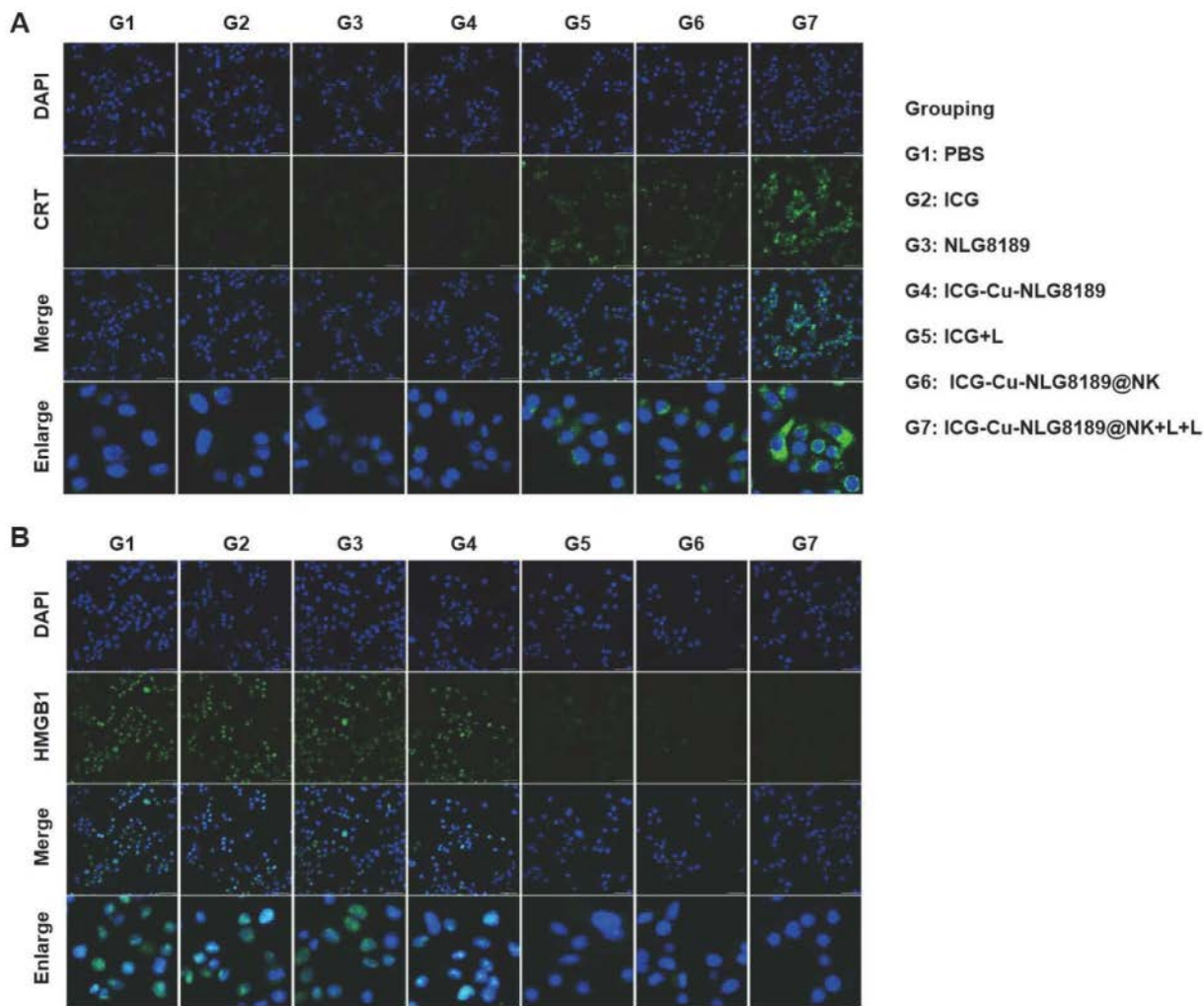


图5

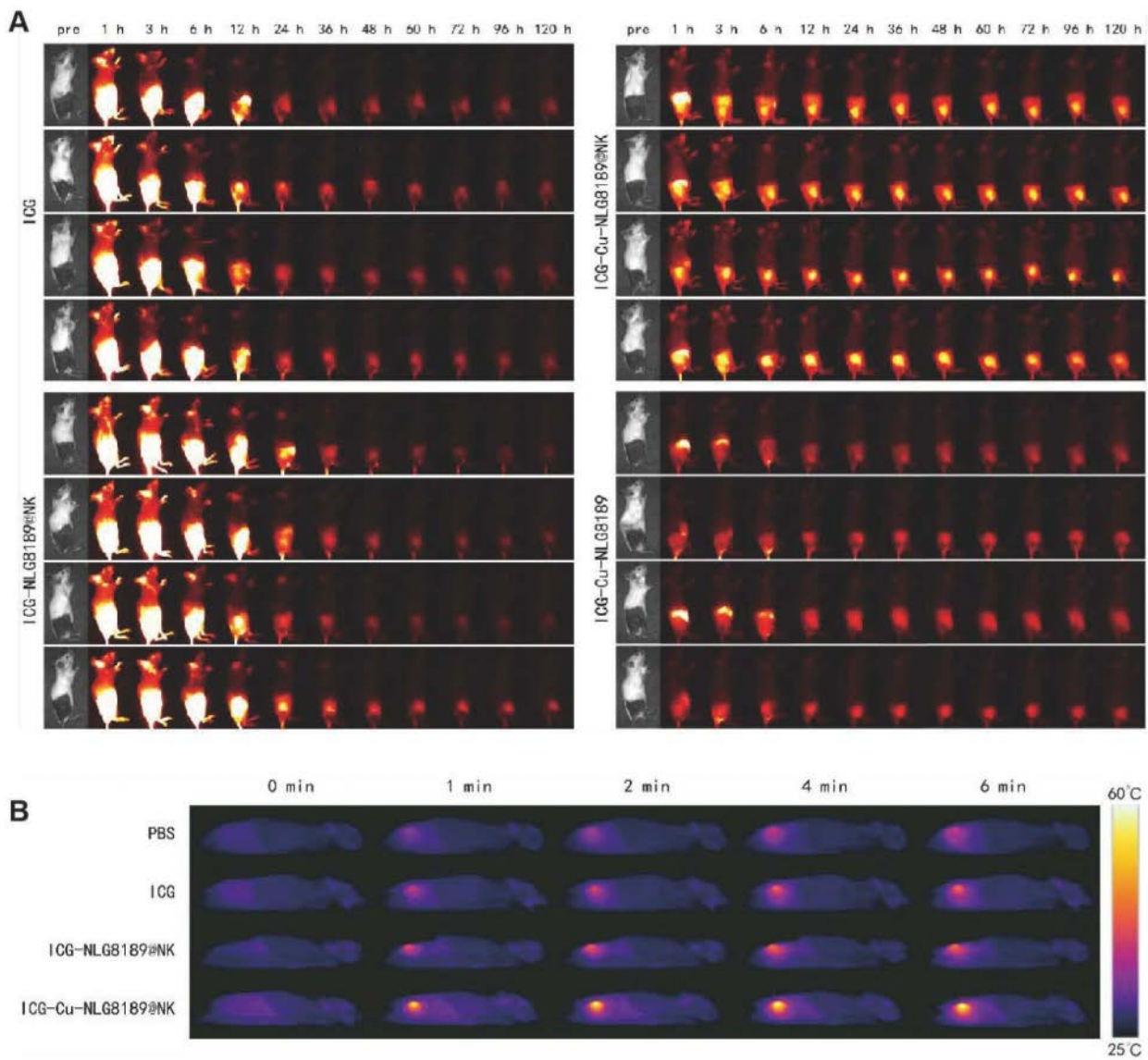


图6

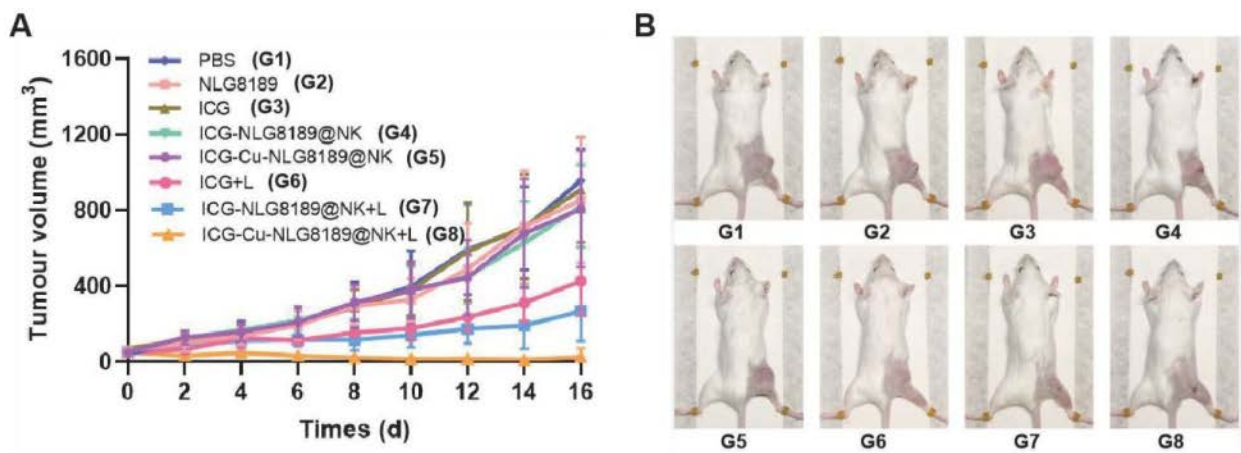


图7

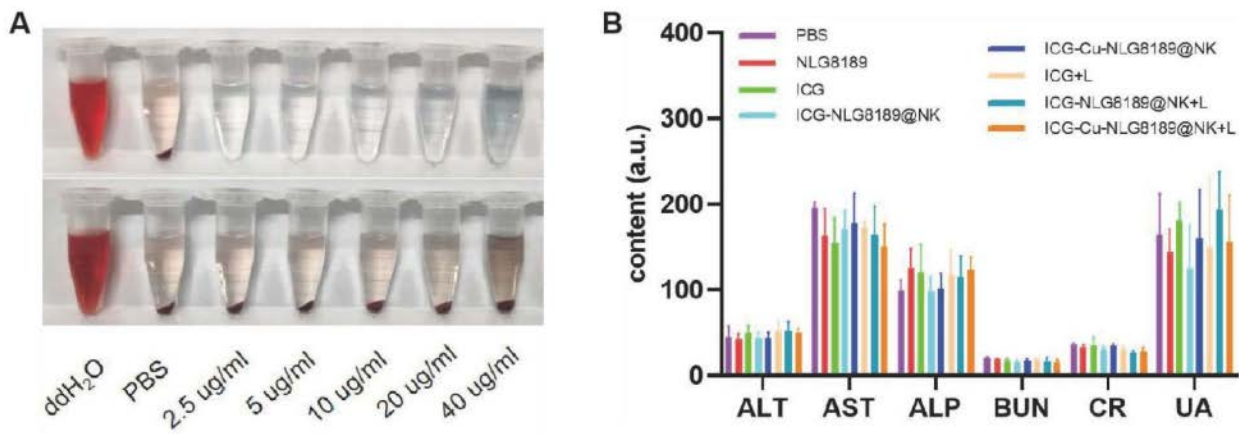


图8