

(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
2019 年 8 月 8 日 (08.08.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/148802 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 47/10* (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/100582

(22) 国际申请日: 2018 年 8 月 15 日 (15.08.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810089749.6 2018 年 1 月 30 日 (30.01.2018) CN

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

(72) 发明人: 张晗(ZHANG, Han); 中国广东省深圳市南
山区南海大道 3688 号, Guangdong 518055 (CN)。

陈世优(CHEN, Shiyu); 中国广东省深圳市南山区
南海大道 3688 号, Guangdong 518055 (CN)。 谢
中建(XIE, Zhongjian); 中国广东省深圳市南山区
南海大道 3688 号, Guangdong 518055 (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: NANO-TITANIUM PHOTOTHERMAL AGENT AND PREPARATION METHOD AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 纳米钛光热制剂及其制备方法和应用

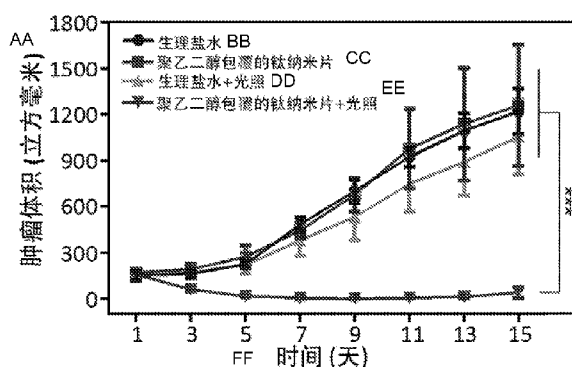


图 16

AA Tumor volume (cubic millimeter)
BB Normal saline
CC Titanium nanosheet covered with polyethylene glycol
DD Normal saline + light irradiation
EE Titanium nanosheet covered with polyethylene glycol
+ light irradiation
FF Time (days)

(57) Abstract: A nano-titanium photothermal agent, a preparation method thereof, and an application of the same in preparing a photothermal therapeutic drug. The nano-titanium photothermal agent comprises a two-dimensional titanium nanosheet and a biocompatible material coated on a surface of the two-dimensional titanium nanosheet. The preparation method comprises: providing a titanium raw material, exfoliating the titanium raw material by liquid-phase exfoliation to obtain a two-dimensional titanium nanosheet, providing a biocompatible material, and mixing the two-dimensional titanium nanosheet with the biocompatible material at 10-30 ° C for 3-6 h to obtain a nano-titanium photothermal agent.

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))。

(57) 摘要: 一种纳米钛光热制剂、其制备方法及其在制备光热治疗药物中的应用, 该纳米钛光热制剂包括二维钛纳米片和包覆在二维钛纳米片表面的生物相容性材料, 其制备方法包括: 提供钛原料, 采用液相剥离的方法对所述钛原料进行剥离, 得到二维钛纳米片; 提供生物相容性材料, 将二维钛纳米片和生物相容性材料在10-30℃下混合3-6h, 得到纳米钛光热制剂。

纳米钛光热制剂及其制备方法和应用

5 本发明要求于 2018 年 01 月 30 日递交的申请号为 201810089749.6, 发明名称为“纳米钛光热制剂及其制备方法和应用”的在先申请的优先权, 上述在先申请的内容以引入的方式并入本文本中。

技术领域

本发明涉及生物医用纳米材料领域, 具体涉及一种纳米钛光热制剂及其制备方法和应用。

背景技术

10 目前, 对于癌症的治疗, 在传统的手术治疗、放射性治疗和化疗之外, 又开发出了免疫疗法、细胞疗法等新型疗法。但是, 目前的疗法虽然能够在一定程度上延长患者的生命, 仍有其局限性, 如副作用大、无法完全清除肿瘤细胞、无法治愈等等。因此, 开发新的疗法仍然是癌症领域的热点。

15 基于纳米材料的近红外光疗是一种新型的, 有潜力的疗法, 特别是近红外光响应的光热治疗, 解决了紫外光以及可见光等短波长光疗中光波易被吸收、易散射、具有核酸毒性, 以及组织穿透力差的问题。近红外光波长大约在 700-1000 纳米之间, 具有低吸收、高穿透性的优点 (1 厘米以上)。

20 目前常规的光热治疗材料主要有金纳米颗粒、碳纳米管以及石墨烯等等。但现有的光热材料往往无法兼顾光热转换效率以及生物相容性。

因此, 亟需寻找一种光热转换效率高、生物相容性好、安全无毒的光热材料, 用于包括肿瘤在内的光热治疗。

发明内容

25 为解决上述问题, 本发明提供了一种光热转换效率高、生物相容性好, 安全无毒的纳米钛光热制剂。

本发明第一方面提供了一种纳米钛光热制剂，包括二维钛纳米片和包覆在所述二维钛纳米片表面的生物相容性材料。

其中，所述二维钛纳米片和所述生物相容性材料的质量比为1:1-10。

其中，所述二维钛纳米片和所述生物相容性材料的质量比为1:1。

5 其中，所述二维钛纳米片的厚度为1-50nm。

其中，所述二维钛纳米片的厚度为3-5nm。

其中，所述二维钛纳米片的长宽尺寸为10-50nm。

其中，所述二维钛纳米片的长宽尺寸为30-40nm。

其中，所述生物相容性材料包括透明质酸、葡聚糖及其衍生物、壳聚糖及其衍生物、果胶、羧甲基纤维素、白蛋白、脂质体、细胞膜、聚乙烯吡咯烷酮、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、聚乙烯亚胺、聚丙烯酸和聚乙二醇及其衍生物中的一种或多种。

其中，所述生物相容性材料为聚乙二醇及其衍生物，所述聚乙二醇及其衍生物的分子量为200-20000。

15 其中，所述聚乙二醇的末端由氨基修饰。

其中，所述生物相容性材料通过静电作用吸附在所述二维钛纳米片的表面。

其中，所述纳米钛光热制剂还包括靶向材料，所述靶向材料通过化学键连接在所述二维钛纳米片或连接在所述生物相容性材料上。

20 其中，所述靶向材料为叶酸，所述叶酸通过酰胺键连接在所述聚乙二醇及其衍生物上。

本发明第一方面提供的纳米钛光热制剂，光热转换效率较高、生物相容性良好，安全无毒，可用于包括肿瘤在内的光热治疗。

本发明第二方面提供了一种纳米钛光热制剂的制备方法，包括：

25 提供钛原料，采用液相剥离的方法对所述钛原料进行剥离，得到二维钛纳米片；

提供生物相容性材料，将所述二维钛纳米片和生物相容性材料在10-30℃

下混合搅拌3-6h，得到纳米钛光热制剂。

其中，所述纳米钛光热制剂的制备方法具体包括：将生物相容性材料溶于适量的第一溶剂中后，得到生物相容性材料溶液，将所述二维钛纳米片分散于适量的第二溶剂中，得到二维钛纳米片分散液，将所述生物相容性材料溶液与
5 所述二维钛纳米片分散液在10-30℃下混合后搅拌3-6h，得到纳米钛光热制剂。

其中，所述搅拌速率为100转/min-700转/min。

其中，所述液相剥离的方法具体包括以下操作：

将所述钛原料加入至溶剂中，在冰浴环境下采用探头超声8-15h；所述探头超声结束后，继续采用水浴超声，所述水浴超声时间为3-10h，所述水浴的
10 温度保持5-15℃；超声后，进行离心和干燥得到二维钛纳米片。

其中，所述探头超声的功率为200-250W，所述水浴超声功率为300-380W。

其中，所述离心的操作包括：首先采用1800-2200g的离心力，离心20-35min，取上清液；然后将所述上清液采用10000-13000g的离心力继续离心，得到沉淀即为二维钛纳米片。

15 本发明第二方面提供了一种纳米钛光热制剂的制备方法，制备方法简单易操作，制得的纳米钛光热制剂光热转换效率高、生物相容性好。

本发明第三方面提供了如上述所述的纳米钛光热制剂在制备光热治疗药物中的应用。

20 综上，本发明有益效果包括以下几个方面：

1、本发明提供的纳米钛光热制剂，光热转换效率高、生物相容性好，安全无毒，可用于包括肿瘤在内的光热治疗；

2、本发明提供的纳米钛光热制剂的制备方法，方法简单易操作。

25 附图说明

图1为实施例1制得的二维钛纳米片的透射电镜图片；

图2为实施例1制得的二维钛纳米片的原子力显微图片；

图3为实施例1中二维钛纳米片的液相剥离过程的吸收光谱图；

图4为不同浓度的二维钛纳米片水分散液照片；

图5为不同浓度的二维钛纳米片水分散液的吸收光谱图；

图6为二维钛纳米片水分散液的消光系数；

5 图7为不同浓度的二维钛纳米片水分散液的升温曲线；

图8为二维钛纳米片水分散液的光热转换效率；

图9为二维钛纳米片的细胞毒性测定结果图；

图10为二维钛纳米片对小鼠体重的影响；

图11为二维钛纳米片对引起小鼠组织器官损伤影响图；

10 图12为不同浓度的二维钛纳米片对细胞的光热杀伤能力效果图；

图13为50 ppm浓度的PEG2000包覆的二维钛纳米片在不同光照时间下对细胞的杀伤能力的测定；

图14为小鼠肿瘤光热治疗时肿瘤部位温度的变化；

图15为小鼠肿瘤光热治疗时肿瘤部位温度变化的曲线；

15 图16为荷瘤小鼠接受光热治疗后肿瘤的体积变化。

具体实施方式

以下所述是本发明的优选实施方式，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的保护范围。

本发明提到的“二维钛纳米片”、“钛纳米颗粒”或“钛”，除特殊说明，均指的是单质钛。

本发明第一方面提供了一种纳米钛光热制剂，包括二维钛纳米片和包覆在所述二维钛纳米片表面的生物相容性材料。

25 本发明实施方式中，所述二维钛纳米片的厚度为 1-50nm。可选地，所述二维钛纳米片的厚度为 3-5nm。可选地，所述二维钛纳米片的厚度为 5-10nm。可选地，所述二维钛纳米片的厚度为 10-50nm。进一步可选地，所述二维钛纳

米片的厚度为 1nm、5nm、10nm、15nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm 或 50nm。

本发明实施方式中，所述二维钛纳米片的长宽尺寸为 10-50nm。可选地，所述二维钛纳米片的长宽尺寸为 30-40nm。可选地，所述二维钛纳米片的长宽尺寸为 10-30nm。进一步可选地，所述二维钛纳米片的长宽尺寸为 10nm、15nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm 或 50nm。

本发明实施方式中，所述二维钛纳米片和所述生物相容性材料的质量比为 1:1-10。可选地，所述二维钛纳米片和所述生物相容性材料的质量比为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9 或 1:10。

10 本发明实施方式中，所述二维钛纳米片具有从可见光区到近红外光区的吸收。可选地，所述二维钛纳米片的光吸收波长范围为 200-2000nm。

本发明实施方式中，所述二维钛纳米片的光热转换效率为大于或等于 70%。

15 本发明第一方面提供的二维钛纳米片具有环境友好、生物兼容性、全光谱的强吸收和较高的光热转换效率等优点，具有优良的光热性能。

本发明实施方式中，所述生物相容性材料包括透明质酸、葡聚糖及其衍生物、壳聚糖及其衍生物、果胶、羧甲基纤维素、白蛋白、脂质体、细胞膜、聚乙烯吡咯烷酮、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、聚乙烯亚胺、聚丙烯酸和聚乙二醇及其衍生物中的一种或多种。进一步可选地，所述生物相容性材料包括聚乙二醇及其衍生物、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、白蛋白、脂质体和细胞膜中的至少一种。进一步可选地，所述生物相容性材料包括聚乙二醇及其衍生物，所述聚乙二醇及其衍生物的分子量在 200-20000 之间。可选地，所述聚乙二醇的末端可以由氨基修饰。可选地，所述生物相容性材料通过静电作用吸附在所述二维钛纳米片的表面。

25 本发明实施方式中，所述纳米钛光热制剂还包括靶向材料，所述靶向材料通过化学键连接在所述二维钛纳米片或连接在所述生物相容性材料上。可选地，所述靶向材料为叶酸，所述叶酸通过酰胺键连接在所述聚乙二醇上。

本发明实施方式中,所述纳米钛光热制剂可以分散在生理盐水、磷酸盐缓冲液或去离子水中用于后续应用。

本发明第一方面提供的纳米钛光热制剂,光热转换效率高、生物相容性好,安全无毒,可用于包括肿瘤在内的光热治疗。

5 本发明第二方面提供了一种纳米钛光热制剂的制备方法,包括:

提供钛原料,采用液相剥离的方法对所述钛原料进行剥离,得到二维钛纳米片;

提供生物相容性材料,将所述二维钛纳米片和所述生物相容性材料在10-30℃下混合搅拌3-6 h,得到纳米钛光热制剂。

10 本发明实施方式中,将二维钛纳米片和生物相容性材料在25℃下混合3-6h。

本发明实施方式中,所述纳米钛光热制剂的具体制备方法包括:将生物相容性材料溶于适量的第一溶剂中后,得到生物相容性材料溶液,将二维钛纳米片分散于适量的第二溶剂中,得到二维钛纳米片分散液,将所述生物相容性材料溶液与所述二维钛纳米片分散液在10-30℃下混合后搅拌3-6h,得到纳米钛光热制剂。

可选地,所述第一溶剂为可以溶解生物相容性材料的溶剂,如当生物相容性材料为聚乙二醇时,第一溶剂可以选择去离子水。

可选地,所述第二溶剂包括去离子水。

20 本发明实施方式中,所述搅拌速率为100转/min-700转/min。

本发明实施方式中,搅拌后,将所得混合物离心干燥后,得到生物相容性材料包覆的二维钛纳米片,即得纳米钛光热制剂。

本发明实施方式中,所述液相剥离的方法具体包括以下操作:

25 将所述钛原料加入至溶剂中,在冰浴环境下采用探头超声 8-15h;所述探头超声结束后,继续采用水浴超声,所述水浴超声时间为 3-10h,水浴温度保持 5-15℃;超声后,进行离心和干燥得到二维钛纳米片。

可选地,所述溶剂包括异丙醇、乙醇、水和甲基吡咯烷酮(即 N-甲基吡

咯烷酮, NMP) 中的至少一种。

可选地, 所述钛原料在所述溶剂中的浓度为 1-7mg/mL。

可选地, 所述探头超声的功率为 200-250W。进一步可选地, 所述探头超声的功率为 240W。

5 可选地, 所述探头超声的时间为 10h。

可选地, 所述探头超声是非连续超声, 选择超声开/关时间为 2/4s, 即先超声 2s, 然后关闭超声探头保持 4s, 在继续超声 2s, 以此类推。

可选地, 所述水浴超声功率为 300-380W。进一步可选地, 所述水浴超声功率为 360W。

10 可选地, 所述水浴超声的时间为 8h。

可选地, 所述水浴温度保持 10℃。

可选地, 超声后, 进行离心, 所述离心的操作包括: 首先采用 1800-2200g 的离心力, 离心 20-35min, 取上清液; 然后将所述上清液采用 10000-13000g 的离心力继续离心, 得到沉淀即为二维钛纳米片。进一步可选地, 首先采用
15 2000g 的离心力, 离心 30min, 取上清液; 然后将所述上清液采用 12000g 的离心力继续离心, 得到沉淀, 将所得沉淀干燥后即得二维钛纳米片。可选地, 所述干燥的方式不限, 例如可为真空干燥。

现有技术通常采用液相剥离法用来剥离二维层状材料。而本发明首次采用液相剥离法剥离二维非层状金属材料, 并取得成功。

20 本发明第二方面提供了一种纳米钛光热制剂的制备方法, 制备方法简单易操作, 制得的纳米钛光热制剂光热转换效率较高、生物相容性良好。

本发明实施方式第三方面提供了一种如上述所述的纳米钛光热制剂在制备光热治疗药物中的应用。

25 实施例1:

一种纳米钛光热制剂的制备方法, 包括:

(1) 制备二维钛纳米片;

将500mg的钛粉加入100ml的异丙醇中。然后选择探头超声240W，超声10h。选择超声开/关时间为2/4s，并且是在冰浴环境下进行超声。探头超声完后，接着采用水浴超声。水浴超声功率为360W。超声时间为8h。水浴温度保持10℃。

5 超声过后采用离心的办法得到需要的金属单质钛纳米片。首先采用2000g的离心力，离心30min。取上清，然后将上清采用12000g继续离心，得到沉淀。该沉淀，真空干燥后即得二维钛纳米片。

10 (2) 提供PEG2000溶液，将步骤(1)制得的二维钛纳米片分散在适量水中得到二维钛纳米片分散液，将二维钛纳米片分散液与PEG2000溶液混合，其中，二维钛纳米片与PEG2000的质量比为1:1，在25℃下混合搅拌5h，离心干燥后，得到PEG2000包覆的二维钛纳米片即得纳米钛光热制剂。

15 如图1所示，图1为步骤(1)制得的二维钛纳米片的电镜形貌图。其尺寸小于50nm。图2显示的是原子力显微图片。由图可以看出，二维钛纳米片的厚度在3nm左右。因此通过透射电镜和原子力显微镜的观察，通过液相剥离法确实可以剥离出二维金属单质钛纳米片。

20 如图3a所示，分别为异丙醇(IPA)和水中剥离的，相同浓度的二维钛纳米片的吸收光谱。很明显，IPA中剥离的二维钛纳米片的吸收光谱具有更高的吸收值和更大的斜率(即图3a中上面的一条曲线)。这说明IPA中可以充分将比较大的钛颗粒剥离成较小的钛纳米片。进一步，比较了相同浓度的金属单质钛的不同剥离时间(指的是水浴超声时间)的吸收值(如图3b所示)，发现随着剥离时间的增加，吸收光谱在不断增加，而且会出现一个饱和的状态。

实施例2:

一种纳米钛光热制剂的制备方法，包括:

25 (1) 制备二维钛纳米片;

将500mg的钛粉加入100ml的异丙醇中。然后选择探头超声200W，超声15h。选择超声开/关时间为2/4s，并且是在冰浴环境下进行超声。探头超声完

后,接着采用水浴超声。水浴超声功率为300W。超声时间为10h。水浴温度保持15℃;

超声过后采用离心的办法得到需要的金属单质钛纳米片。首先采用1800g的离心力,离心35min。取上清,然后将上清采用10000g继续离心,得到沉淀,真空干燥后即得二维钛纳米片。

(2) 提供PEG2000溶液,将步骤(1)制得的二维钛纳米片分散在适量水中得到二维钛纳米片分散液,将二维钛纳米片分散液与PEG2000溶液混合,其中,二维钛纳米片与PEG2000的质量比为1:10,在30℃下混合搅拌3h,离心干燥后,得到PEG2000包覆的二维钛纳米片即得纳米钛光热制剂。

实施例3:

一种纳米钛光热制剂的制备方法,包括:

(1) 制备二维钛纳米片;

将500mg的钛粉加入100ml的异丙醇中。然后选择探头超声250W,超声8h。选择超声开/关时间为2/4s,并且是在冰浴环境下进行超声。探头超声完后,接着采用水浴超声。水浴超声功率为380W。超声时间为3h。水浴温度保持5℃;

超声过后采用离心的办法得到需要的金属单质钛纳米片。首先采用2200g的离心力,离心20min。取上清,然后将上清采用13000g继续离心,得到沉淀,真空干燥后即得二维钛纳米片。

(2) 提供PEG2000溶液,将步骤(1)制得的二维钛纳米片分散在适量水中得到二维钛纳米片分散液,将二维钛纳米片分散液与PEG2000溶液混合,其中,二维钛纳米片与PEG2000的质量比为1:5,在10℃下混合搅拌6h,离心干燥后,得到PEG2000包覆的二维钛纳米片即得纳米钛光热制剂。

效果实施例

(1) 吸收光谱和光热性能的测试

配制不同浓度的二维钛纳米片水分散液测量吸收光谱和光热性能。吸收光

谱采用紫外-分光光度计测量。光热实验采用 808nm 激光。分别配制 10,25,50 和 100ppm 的二维钛纳米片水分散液（如图 4 所示）。将配制的水分散液分别装入石英比色皿中，放入紫外分光光度计卡槽中测量吸收度。不同浓度的吸收曲线如图 5 所示。根据 808nm 处的吸收可以得到二维钛纳米片的消光系数为 $20.8\text{Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ （如图 6 所示）。该值高于黑磷（ $14.8\text{Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）。对于光热实验的测量，取 1ml 二维钛纳米片水分散液加入比色皿中，采用 808nm 激光进行照射，并同时用热电偶记录温度曲线。图 7 显示的是不同浓度的温度随激光照射时间的升温图。通过定量的计算，可以得到二维钛纳米片的光热转换效率为 73.4%（如图 8 所示）。

本发明的二维钛纳米片的光热转换效率（73.4%）在所有报道的光热剂中最高，高于传统的金纳米颗粒（21%）新兴的二维光热剂，包括 MoS_2 （24.4%）黑磷量子点（28.4 %） Ti_3C_2 纳米片（30.6%）和碲量子点（45.5%），因此，二维钛纳米片光热转换效率值明显高于其他当前正在研究的光热剂。因此，本发明制得的二维钛纳米片光热性能良好。

（2）二维钛纳米片的生物毒性测试

将不同质量的二维钛纳米片分散于细胞培养基，再与不同的细胞共孵育，再测定细胞的活力。首先将肝细胞癌细胞 SMMC-7721、黑色素瘤细胞 B16 以及巨噬细胞 J774A.1 分别铺到 96 孔板中，待细胞贴壁后，准备用于实验。以 DMEM 高糖培养基分别配制 0,10,25,50,100ppm 浓度的二维钛纳米片分散液，取 100 μl 分散液，置换前述 96 孔板中的培养基，在孵育 24 小时之后，使用 CCK8 试剂盒测定每个孔里面细胞的活力，每一组实验设置 3 个平行孔。如图 9 所示，在多种细胞中，随着二维钛纳米片浓度的提高（从 0 到 100ppm），和未加纳米片的实验组对比，其细胞活力并无明显的下降。这说明二维钛纳米片没有明显的细胞毒性。

本发明实施例也在模式动物中检测了二维钛纳米片的毒性。分别将二维钛纳米片和 PEG2000 包覆的二维钛纳米片分散于生理盐水，得到 100ppm 的分散液备用。取 6 周龄的雌性 Balb/c 裸鼠，通过皮下注射的方式将 100 μl 的生理盐水

(对照)、100 μ l的100ppm二维钛纳米片(图中以“钛纳米片”表示)分散液和100 μ l的100ppm PEG包覆的二维钛纳米片(图中以“聚乙二醇包覆的钛纳米片”表示)分散液注射到小鼠右前肢下方的皮下。分别在注射后的第1,3,5,7,9,11,13,15天测定小鼠的体重,并且在第15天时将小鼠处死,取其主要5 脏器官心肝脾肺肾,进行H&E染色,观察纳米片是否导致小鼠组织器官损伤。如图10所示,二维钛纳米片不会影响其体重的变化;如图11所示,二维钛纳米片也不会对小鼠组织器官造成损伤。

综上所述,二维钛纳米片在体外条件下对癌细胞、正常细胞,以及在体内条件下都没有毒性,显示了其生物相容性以及安全无毒的优点。

10 (3) 二维钛纳米片光热效应的细胞杀伤能力测定

将SMMC-7721、B16以及J774A.1细胞分别铺于96孔板,细胞贴壁后,将不同浓度的分散于细胞培养基的二维钛纳米片与细胞孵育,二维钛纳米片浓度为分别0,5,10,20,30,50 ppm,每个实验组设置3个平行孔。孵育2小时后,用808nm的激光,以1W cm⁻²的功率照射10分钟,照射之后24小时,用CCK8试剂盒测定15 细胞的活力。如图12所示,低浓度(5ppm)二维钛纳米片的光热效应就有部分的细胞杀伤能力,在10ppm条件下,杀伤能力已经非常显著(对于癌细胞可达到20%,对于巨噬细胞可达到80%),在30ppm以上的浓度,二维钛纳米片的光热效应已经基本可以完全杀死细胞。而且PEG2000包覆的或者未包覆的二维钛纳米片其光热效应杀伤能力一致。

20 同样地,在50ppm的条件下,将PEG2000包覆的二维钛纳米片与SMMC-7721细胞共孵育,随后用808nm, 1W cm⁻²的功率辐照,在不同的光照时间(0,2,5,8,10分钟)下测定其杀伤能力,如图13所示,仅仅2分钟的光照,就足以完全杀死所有细胞。

综上所述,二维钛纳米片的光热效应可用于细胞杀伤,并且在低浓度、短25 时间的近红外光条件下就能达到良好的细胞杀伤效果,显示了其优异的光热转换效率。

(4) 二维钛纳米片光热效应的肿瘤光热治疗效果测定

将 5×10^6 SMMC-7721细胞皮下注射到雌性Balb/c裸鼠的皮下, 大约10天后, 肿瘤体积达到 $100-200 \text{ mm}^3$, 以此肝癌模型作为二维钛纳米片光热治疗的对象。将PEG2000包覆的二维钛纳米片分散到磷酸盐缓冲液中, 浓度为100ppm。肿瘤治疗时, 瘤内注射100 μl 纳米片分散液, 然后将小鼠麻醉, 利用808纳米波长的激光, 在 1 W cm^{-2} 的功率下照射含有钛纳米片的肿瘤部位5分钟, 以对肿瘤进行光热治疗。图14是用红外线探测仪记录了肿瘤部位每分钟温度的变化情况, 图15则是治疗过程中肿瘤部位的温度变化曲线, 这两个图片说明在进行光热治疗时, 二维钛纳米片导致的温度升高非常快速, 1分钟内可以升高 20°C 。而在大约1分钟后, 温度缓慢上升逐渐保持稳定。随后, 在治疗后的第1,3,5,7,9,11,13,15天分别测定肿瘤体积, 如图16所示, 可知, 经过光热治疗后肿瘤大小迅速降低, 在整个治疗的过程中肿瘤组织被杀伤, 肿瘤生长得到抑制, 取得了良好的治疗效果。

因此, 包含二维钛纳米片的光热制剂可以有效地用于肿瘤的光热治疗。

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式, 其描述较为具体和详细, 但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是, 对于本领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明构思的前提下, 还可以做出若干变形和改进, 这些都属于本发明的保护范围。因此, 本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权 利 要 求

1、一种纳米钛光热制剂，其中，包括二维钛纳米片和包覆在所述二维钛纳米片表面的生物相容性材料。

5 2、如权利要求1所述的纳米钛光热制剂，其中，所述二维钛纳米片和所述生物相容性材料的质量比为1:1-10。

3、如权利要求2所述的纳米钛光热制剂，其中，所述二维钛纳米片和所述生物相容性材料的质量比为1:1。

10 4、如权利要求1所述的纳米钛光热制剂，其中，所述二维钛纳米片的厚度为1-50nm。

5、如权利要求4所述的纳米钛光热制剂，其中，所述二维钛纳米片的厚度为3-5nm。

6、如权利要求1所述的纳米钛光热制剂，其中，所述二维钛纳米片的长宽尺寸为10-50nm。

15 7、如权利要求6所述的纳米钛光热制剂，其中，所述二维钛纳米片的长宽尺寸为30-40nm。

8、如权利要求1所述的纳米钛光热制剂，其中，所述生物相容性材料包括透明质酸、葡聚糖及其衍生物、壳聚糖及其衍生物、果胶、羧甲基纤维素、白蛋白、脂质体、细胞膜、聚乙烯吡咯烷酮、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、聚乙烯
20 亚胺、聚丙烯酸和聚乙二醇及其衍生物中的一种或多种。

9、如权利要求8所述的纳米钛光热制剂，其中，所述生物相容性材料为聚乙二醇及其衍生物，所述聚乙二醇及其衍生物的分子量为200-20000。

10、如权利要求8所述的纳米钛光热制剂，其中，所述聚乙二醇的末端由氨基修饰。

25 11、如权利要求1所述的纳米钛光热制剂，其中，所述生物相容性材料通过静电作用吸附在所述二维钛纳米片的表面。

12、如权利要求8所述的纳米钛光热制剂，其中，所述纳米钛光热制剂还

包括靶向材料,所述靶向材料通过化学键连接在所述二维钛纳米片或连接在所述生物相容性材料上。

13、如权利要求12所述的纳米钛光热制剂,其中,所述靶向材料为叶酸,所述叶酸通过酰胺键连接在所述聚乙二醇及其衍生物上。

5 14、一种纳米钛光热制剂的制备方法,其中,包括:

提供钛原料,采用液相剥离的方法对所述钛原料进行剥离,得到二维钛纳米片;

提供生物相容性材料,将所述二维钛纳米片和所述生物相容性材料在10-30℃下混合后搅拌3-6h,得到纳米钛光热制剂。

10 15、如权利要求14所述的纳米钛光热制剂的制备方法,其中,所述纳米钛光热制剂的制备方法具体包括:将生物相容性材料溶于适量的第一溶剂中后,得到生物相容性材料溶液,将所述二维钛纳米片分散于适量的第二溶剂中,得到二维钛纳米片分散液,将所述生物相容性材料溶液与所述二维钛纳米片分散液在10-30℃下混合后搅拌3-6h,得到纳米钛光热制剂。

15 16、如权利要求15所述的纳米钛光热制剂的制备方法,其中,所述搅拌速率为100转/min-700转/min。

17、如权利要求14所述的纳米钛光热制剂的制备方法,其中,所述液相剥离的方法具体包括以下操作:

20 将所述钛原料加入至溶剂中,在冰浴环境下采用探头超声8-15h;所述探头超声结束后,继续采用水浴超声,所述水浴超声时间为3-10h,所述水浴的温度保持5-15℃;超声后,进行离心和干燥得到二维钛纳米片。

18、如权利要求17所述的纳米钛光热制剂的制备方法,其中,所述探头超声的功率为200-250W,所述水浴超声功率为300-380W。

25 19、如权利要求17所述的纳米钛光热制剂的制备方法,其中,所述离心的操作包括:首先采用1800-2200g的离心力,离心20-35min,取上清液;然后将所述上清液采用10000-13000g的离心力继续离心,得到沉淀即为二维钛纳米片。

20、如权利要求 1-13 中任一项所述的纳米钛光热制剂在制备光热治疗药物中的应用。

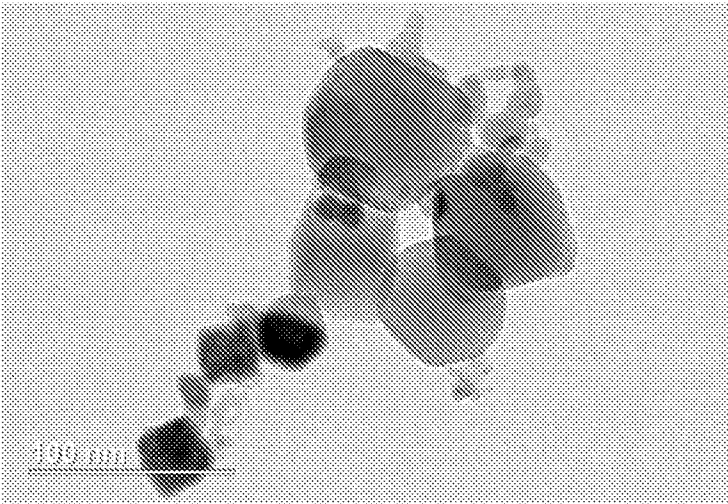


图 1

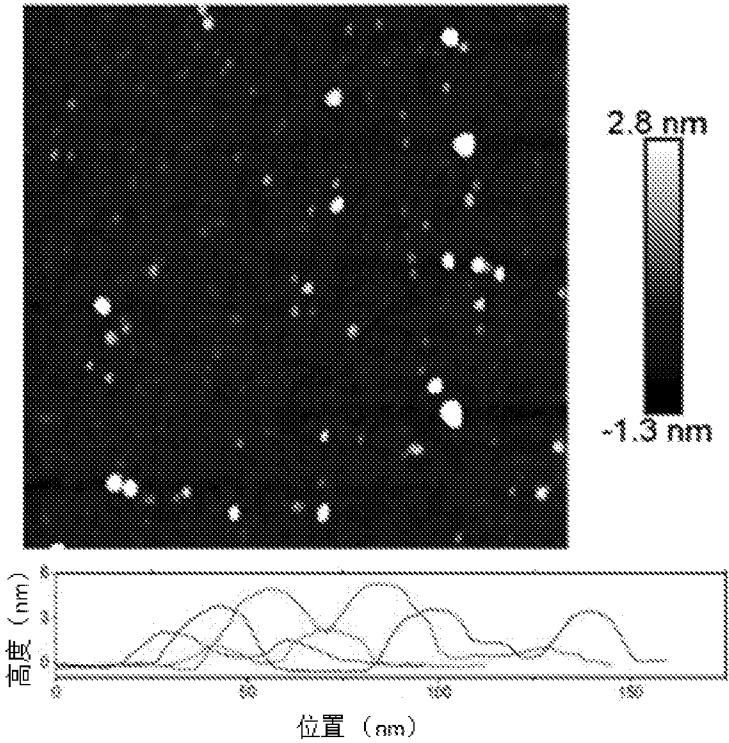


图 2

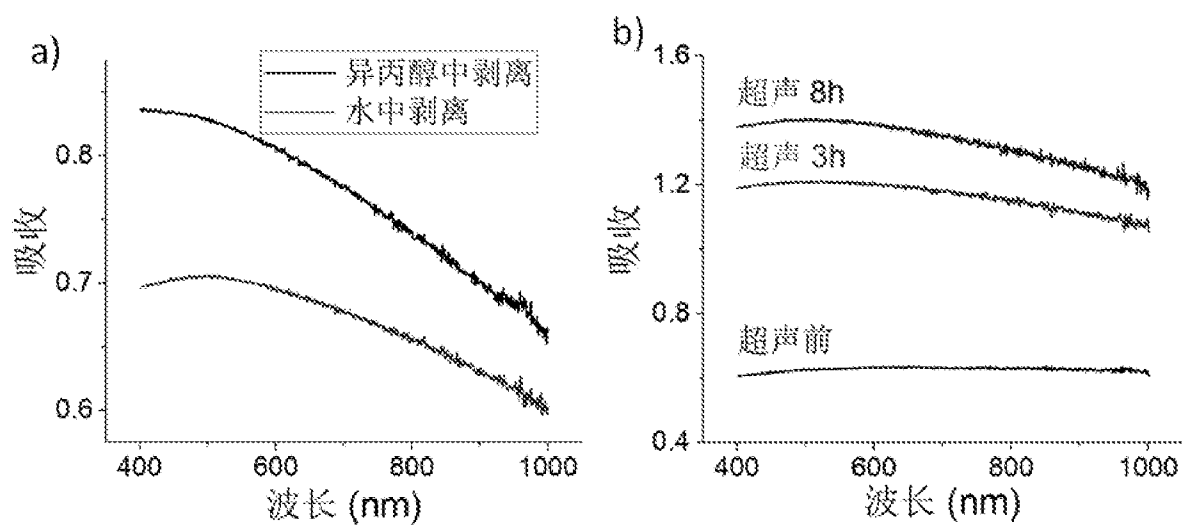


图 3

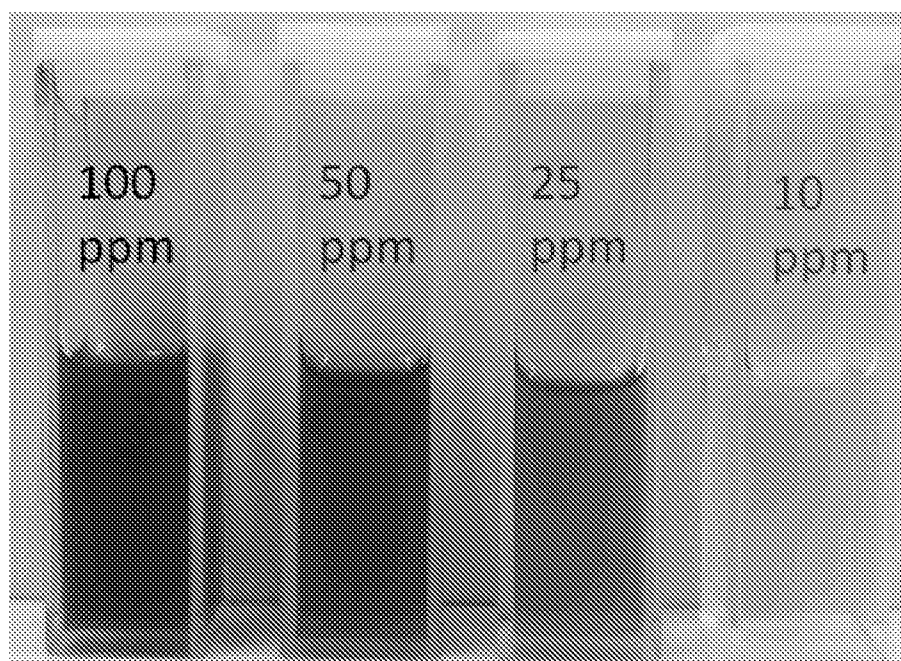


图 4

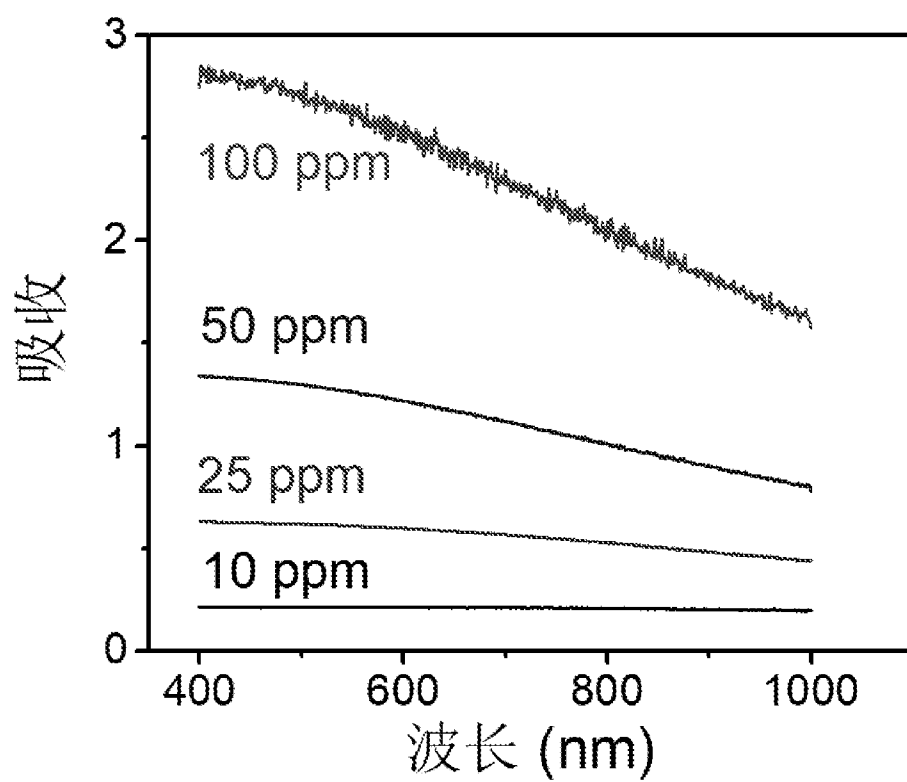


图 5

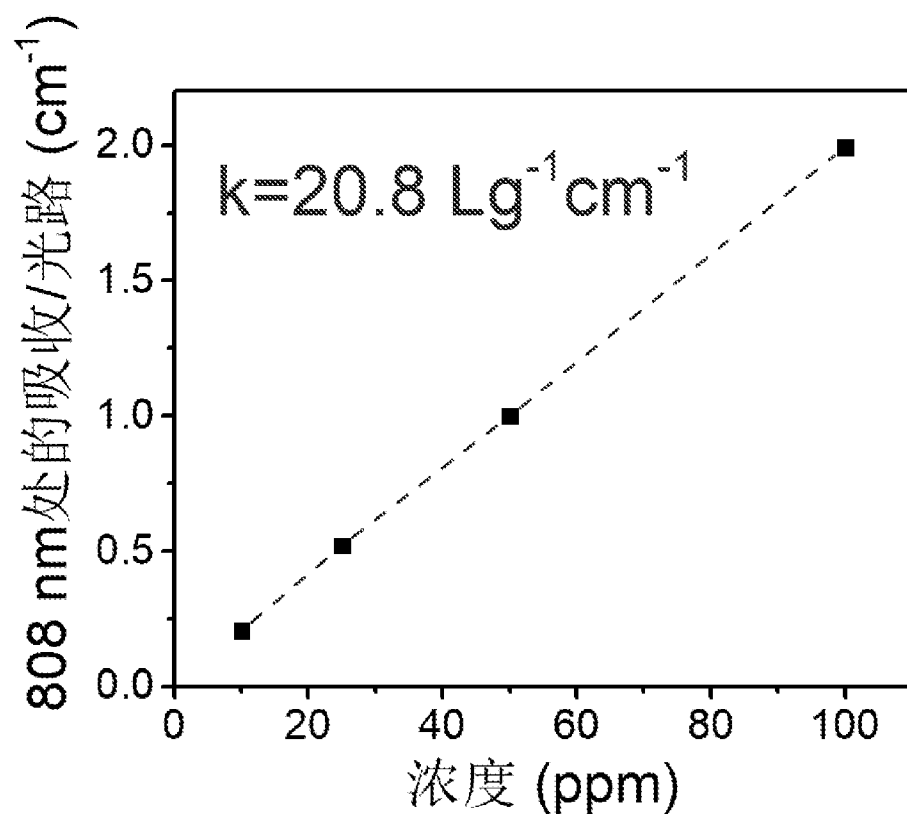


图 6

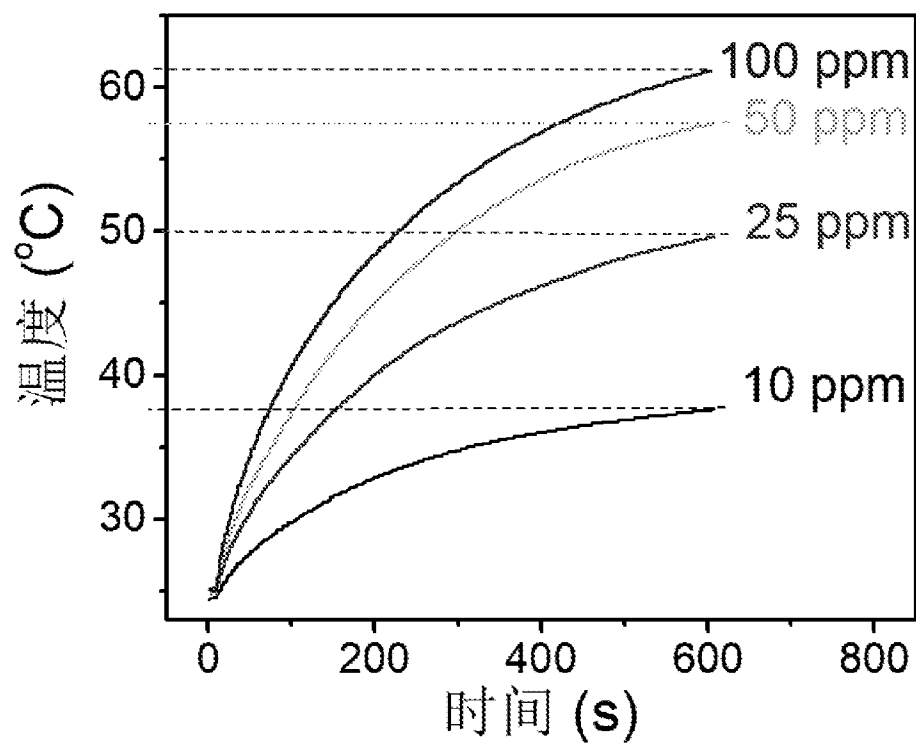


图 7

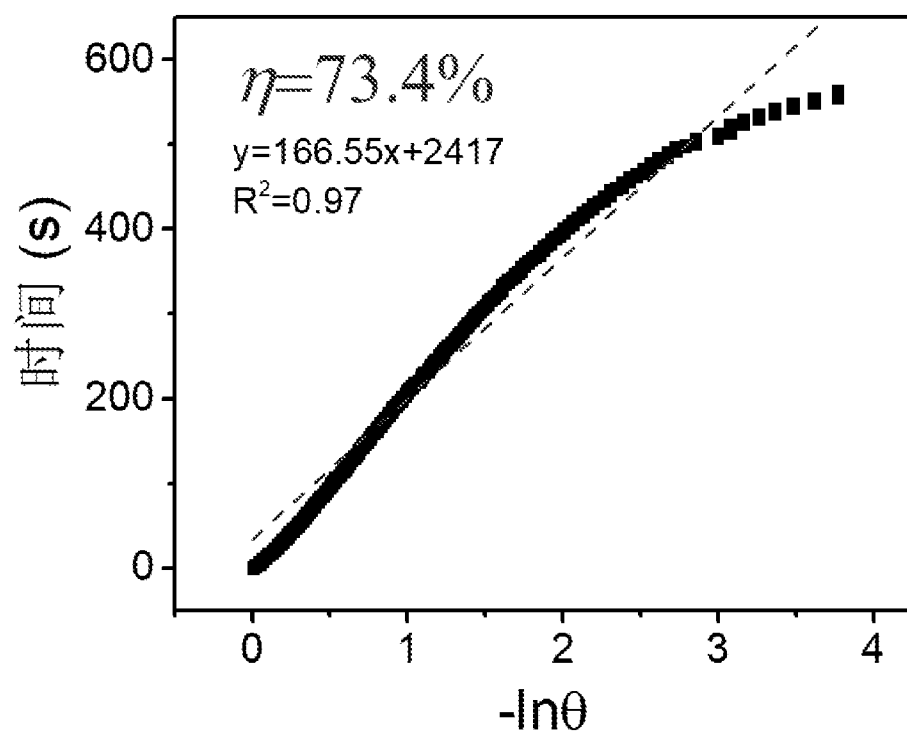


图 8

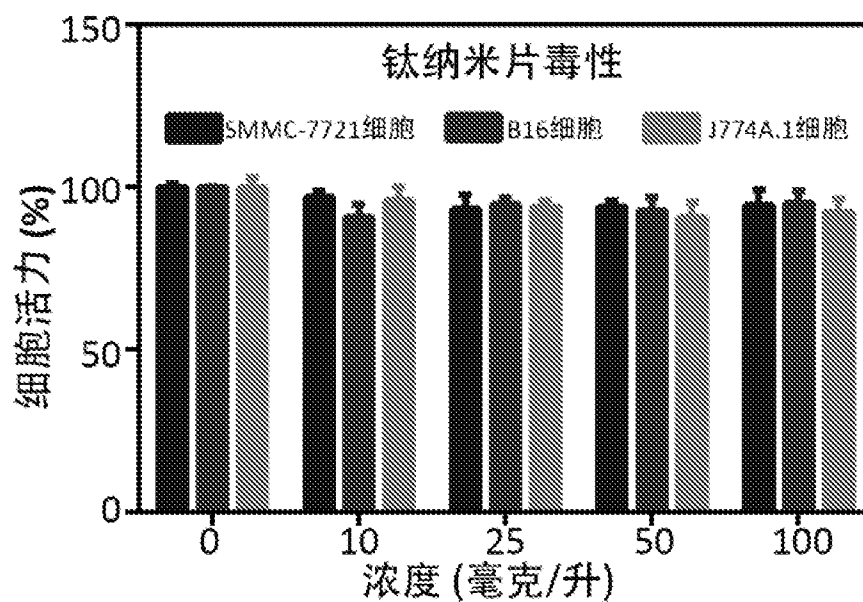


图 9

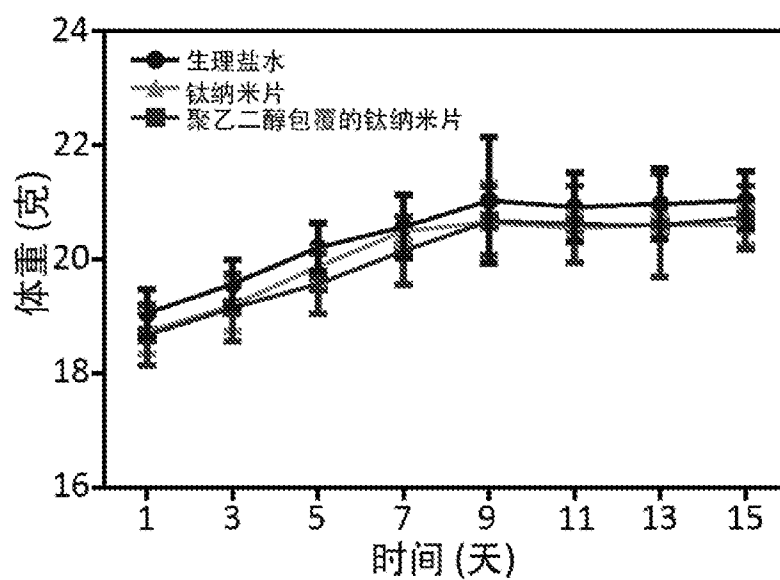


图 10

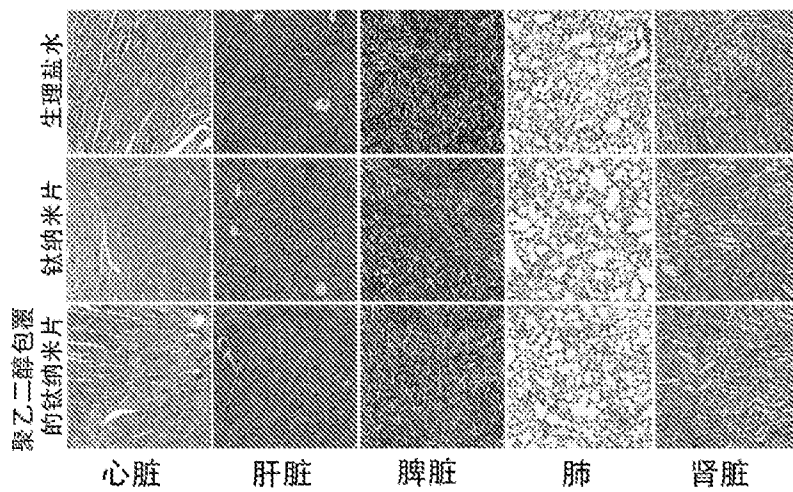


图 11

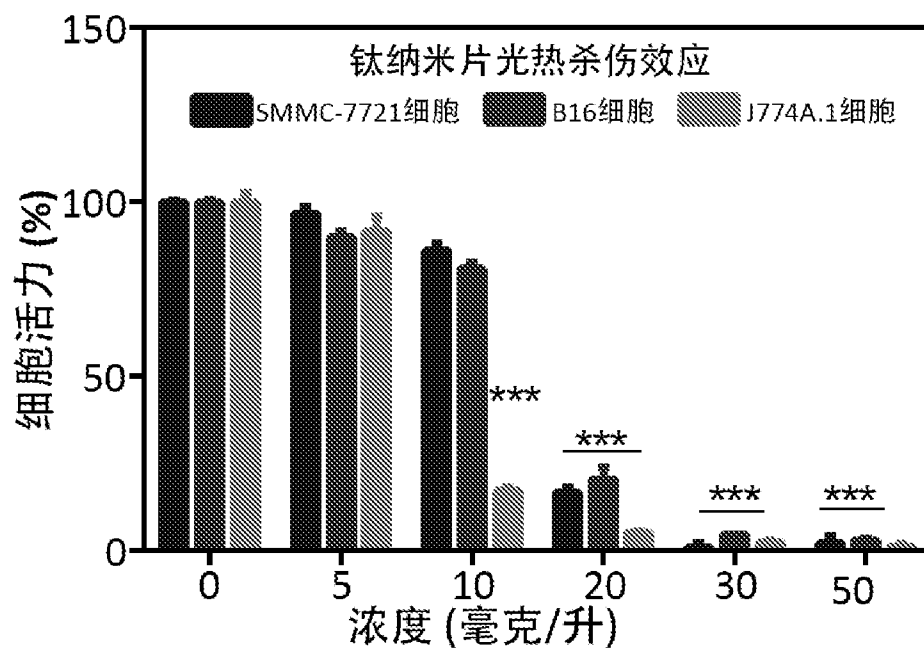


图 12

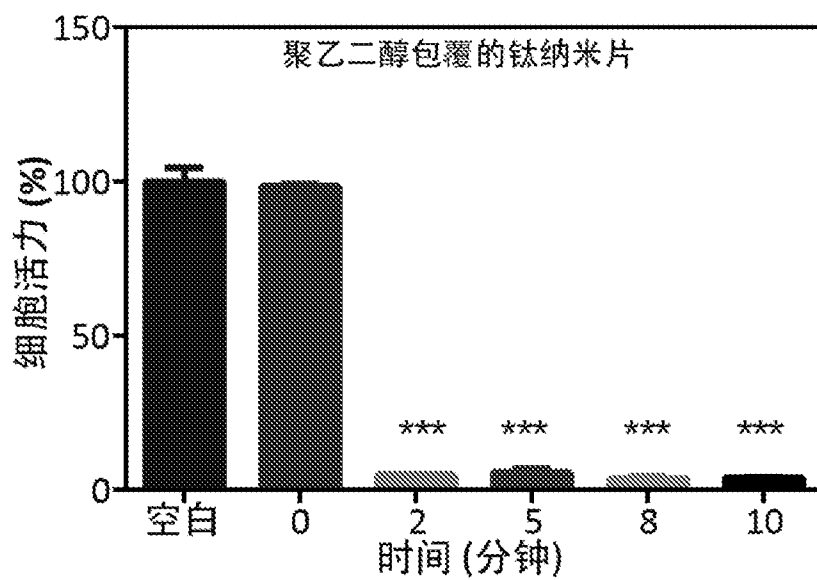


图 13

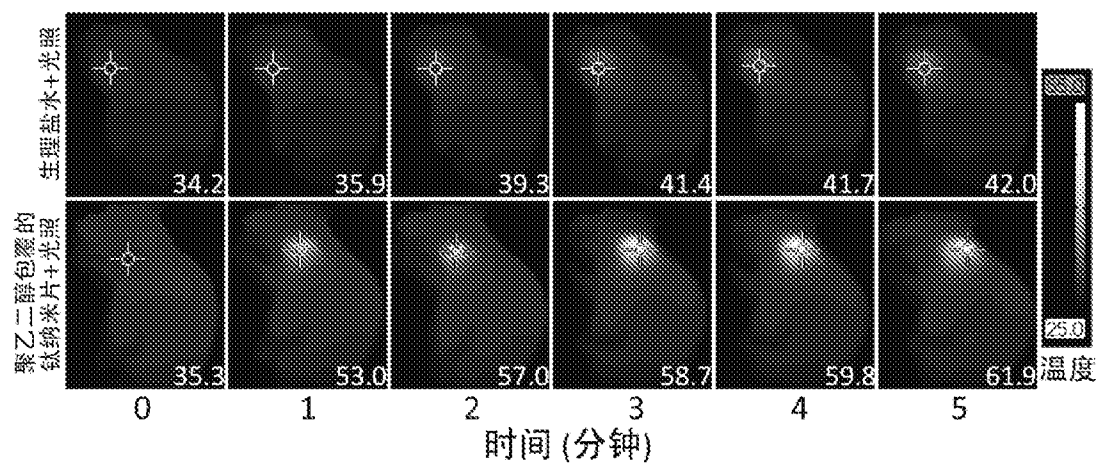


图 14

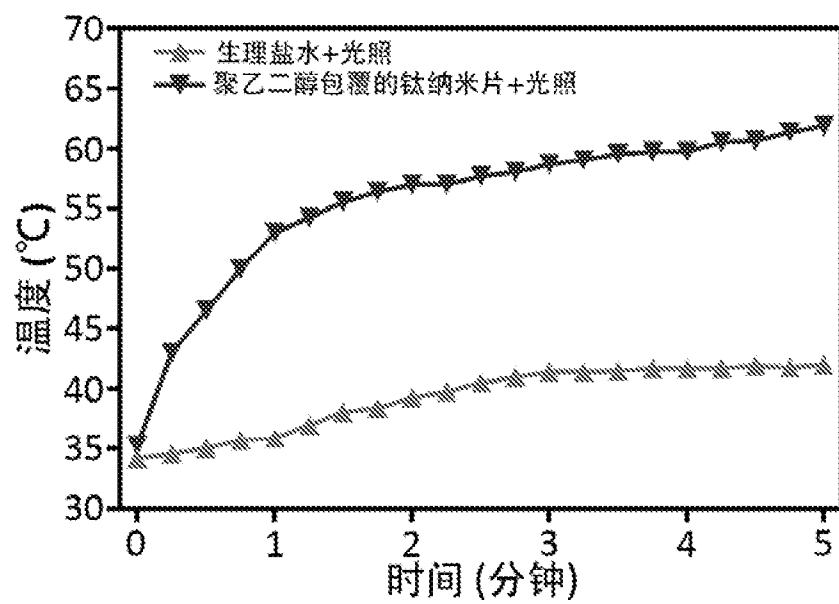


图 15

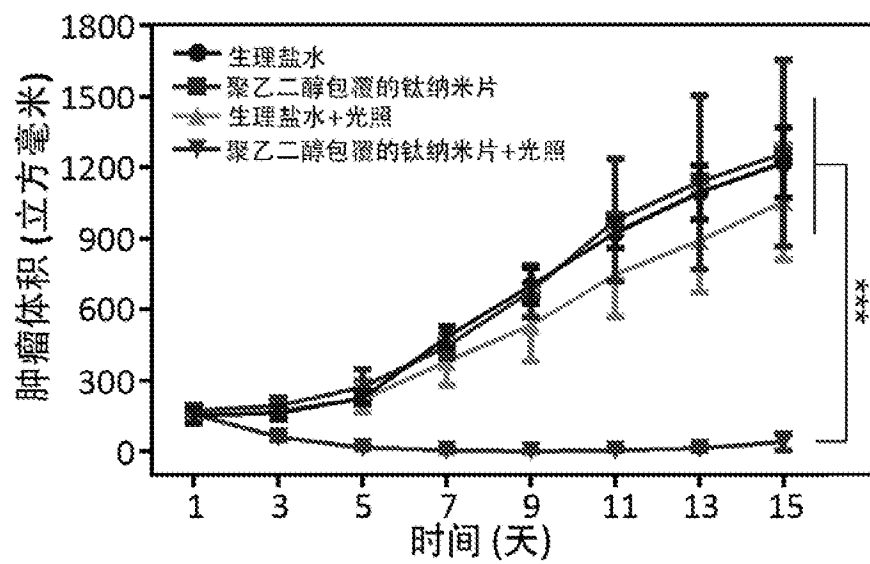


图 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/100582

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/51(2006.01)i; A61K 41/00(2006.01)i; A61K 47/10(2006.01)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)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, CNTXT, SIPOABS, SPRINGERLINK, ELSEVIER SCIENCE DIRECT, ISI WEB OF SCIENCE, GOOGLE scholar, baidu scholar: 纳米, 钛, 二维, 光热, 生物相容, 肿瘤, 液相剥离, 超声, nano, sheet, titanium, photothermal, dimension+, biocompatible, tumour tumor, cancer, sonicat+, liquid, phase, strip+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 108187047 A (SHENZHEN UNIVERSITY) 22 June 2018 (2018-06-22) claims 1-10, description, paragraphs [0006]-[0024] and [0043]-[0076], and embodiments 1-3	1-20
Y	CN 106620699 A (SHENZHEN UNIVERSITY) 10 May 2017 (2017-05-10) claims 1-13, description, paragraphs [0042]-[0066], and embodiments 1 and 2	1-13, 20
A	CN 106620699 A (SHENZHEN UNIVERSITY) 10 May 2017 (2017-05-10) claims 1-13, description, paragraphs [0042]-[0066], and embodiments 1 and 2	14-19
Y	CN 107625962 A (MENGCHAO HEPATOBILIARY HOSPITAL OF FUJIAN MEDICAL UNIV) 26 January 2018 (2018-01-26) claims 1-4, description, paragraphs [0002] and [0004]-[0016], and embodiments 1 and 2	1-13, 20
A	CN 107625962 A (MENGCHAO HEPATOBILIARY HOSPITAL OF FUJIAN MEDICAL UNIV) 26 January 2018 (2018-01-26) claims 1-4, description, paragraphs [0002] and [0004]-[0016], and embodiments 1 and 2	14-19
Y	CN 105774120 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 20 July 2016 (2016-07-20) description, paragraphs [0002] and [0008], and embodiment 7	1-13, 20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“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)

“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

“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

“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

“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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 November 2018

Date of mailing of the international search report

23 November 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/100582

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	108187047	A	22 June 2018	None			
CN	106620699	A	10 May 2017	WO	2018095017	A1	31 May 2018
CN	107625962	A	26 January 2018	None			
CN	105774120	A	20 July 2016	CN	105774120	B	28 August 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/100582

A. 主题的分类

A61K 9/51(2006.01)i; A61K 41/00(2006.01)i; A61K 47/10(2006.01)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))

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, CNTXT, SIPOABS, SPRINGERLINK, ELSEVIER SCIENCE DIRECT, ISI WEB OF SCIENCE, GOOGLE scholar, baidu scholar: 纳米, 钛, 二维, 光热, 生物相容, 肿瘤, 液相剥离, 超声, nano, sheet, titanium, photothermal, dimension+, biocompatible, tumour tumor, cancer, sonicat+, liquid, phase, strip+

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 108187047 A (深圳大学) 2018年 6月 22日 (2018 - 06 - 22) 权利要求1-10, 说明书第[0006]-[0024]、[0043]-[0076]段, 实施例1-3	1-20
Y	CN 106620699 A (深圳大学) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-13, 说明书第[0042]-[0066]段, 实施例1-2	1-13, 20
A	CN 106620699 A (深圳大学) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-13, 说明书第[0042]-[0066]段, 实施例1-2	14-19
Y	CN 107625962 A (福建医科大学孟超肝胆医院) 2018年 1月 26日 (2018 - 01 - 26) 权利要求1-4, 说明书第[0002]、[0004]-[0016]段, 实施例1-2	1-13, 20
A	CN 107625962 A (福建医科大学孟超肝胆医院) 2018年 1月 26日 (2018 - 01 - 26) 权利要求1-4, 说明书第[0002]、[0004]-[0016]段, 实施例1-2	14-19
Y	CN 105774120 A (清华大学) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20) 说明书第[0002]、[0008]段, 实施例7	1-13, 20

☐ 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

2018年 11月 8日

国际检索报告邮寄日期

2018年 11月 23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

豆波建

电话号码 62411125

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/100582

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	108187047	A	2018年 6月 22日	无			
CN	106620699	A	2017年 5月 10日	WO	2018095017	A1	2018年 5月 31日
CN	107625962	A	2018年 1月 26日	无			
CN	105774120	A	2016年 7月 20日	CN	105774120	B	2018年 8月 28日