



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109350742 B

(45) 授权公告日 2021.04.23

(21) 申请号 201811413898.X

(22) 申请日 2018.11.26

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109350742 A

(43) 申请公布日 2019.02.19

(73) 专利权人 中南大学湘雅三医院

地址 410000 湖南省长沙市河西岳麓区桐

梓坡路138号中南大学湘雅三医院

(72) 发明人 康健 陈依慧 欧好 张薇薇

周大维 王臻 陈静 黄进华

鲁建云 郭爱元 谢媛媛 马思祺

(74) 专利代理机构 长沙正奇专利事务所有限责
任公司 43113

代理人 魏国先 蒋尊龙

(51) Int.Cl.

A61K 41/00 (2020.01)

A61K 47/54 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G07D 421/14 (2006.01)

A61K 31/4178 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 108164570 A, 2018.06.15

CN 108129475 A, 2018.06.08

CN 107708671 A, 2018.02.16

CN 104623662 A, 2015.05.20

CN 107759642 A, 2018.03.06

WO 2006032848 A1, 2006.03.30

Oleg E. Akilov et. al. The Role of
Photosensitizer Molecular Charge and
Structure on the Efficacy of Photodynamic
Therapy against Leishmania Parasites.
《Chemistry & Biology》.2006, 第13卷

审查员 郑召磊

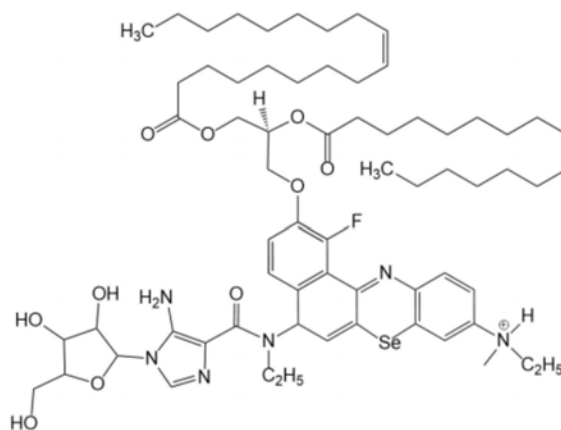
权利要求书4页 说明书12页 附图5页

(54) 发明名称

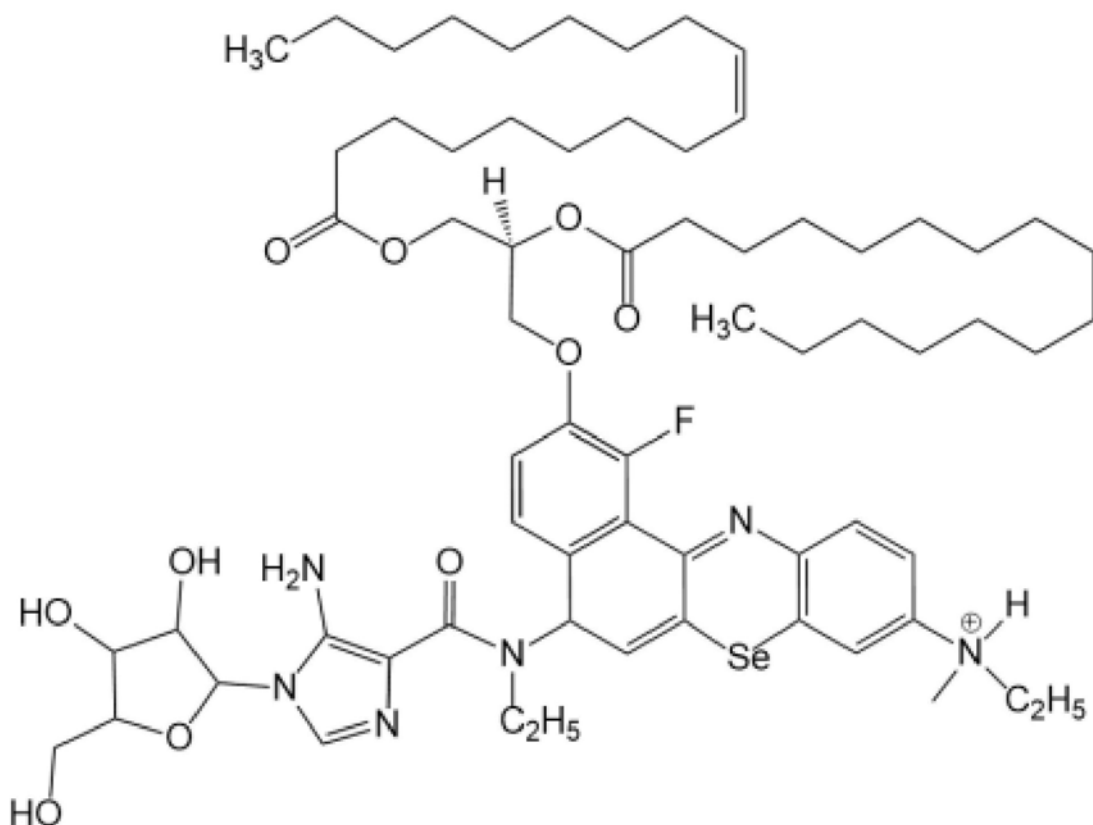
一种双极性光敏剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种双极性光敏剂及其制备方法,所述双极性光敏剂为铵盐,所述铵盐中的阳离子的化学结构式如图所示。本发明的双极性光敏剂还包含甘油酯酰残基,其作为疏水基团与EtNBSe光敏剂以共价键结合,构成了一端亲水一端疏水的结构,所述结构类似于组成生物膜的必需成分一磷脂酰胆碱,由于相似相溶原理,所述双极性光敏剂更易于进入癌细胞,极大地增大了所述光敏剂的摄取率,摄取率提高了约46.1%,基于此使得所述光敏剂药物中的重量百分比可适当降低,从而在减小药物副作用的同时也极大地提高了所述双极性光敏剂的治疗效果。



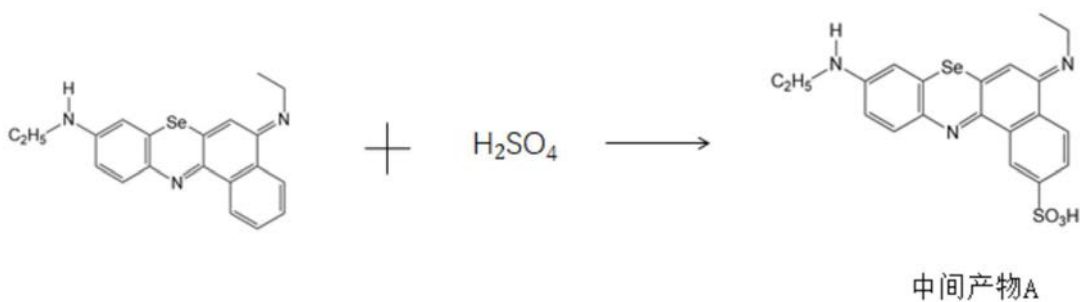
1.一种双极性光敏剂,其特征在于,所述双极性光敏剂为铵盐,所述铵盐中的阳离子为:



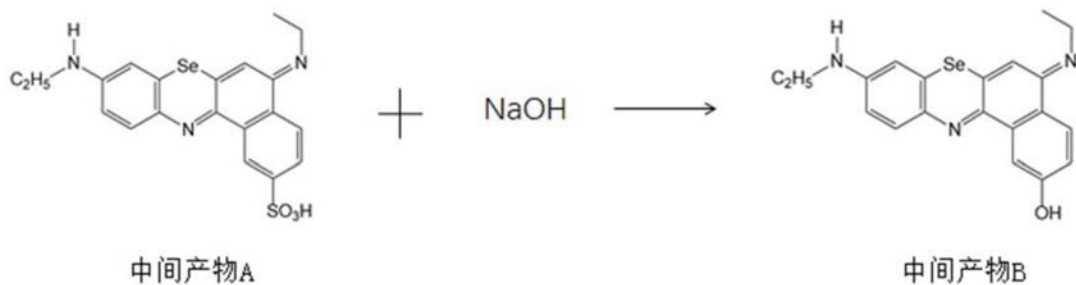
2.如权利要求1所述的双极性光敏剂,其特征在于,其中铵盐中的阴离子为氯离子。

3.一种如权利要求1所述的双极性光敏剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

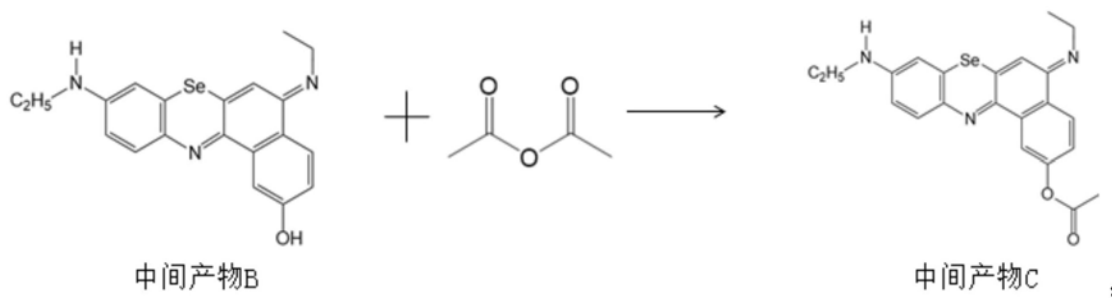
S1:将含硒苯并吩恶嗪光敏剂溶于无水甘油之中,再滴加质量分数98%的浓硫酸,搅拌,生成中间产物A,其反应式为:



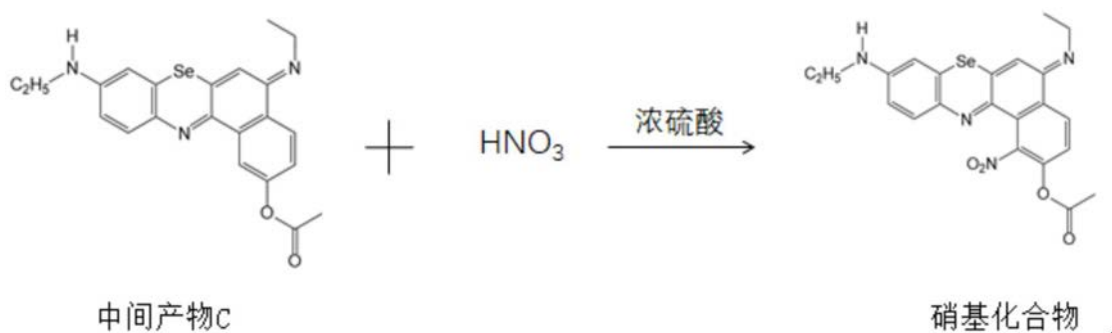
S2:向S1步骤所得的反应液中加入氢氧化钠溶液,并用加压至相对压力为4-7MPa,升温,反应生成中间产物B,其反应式为:



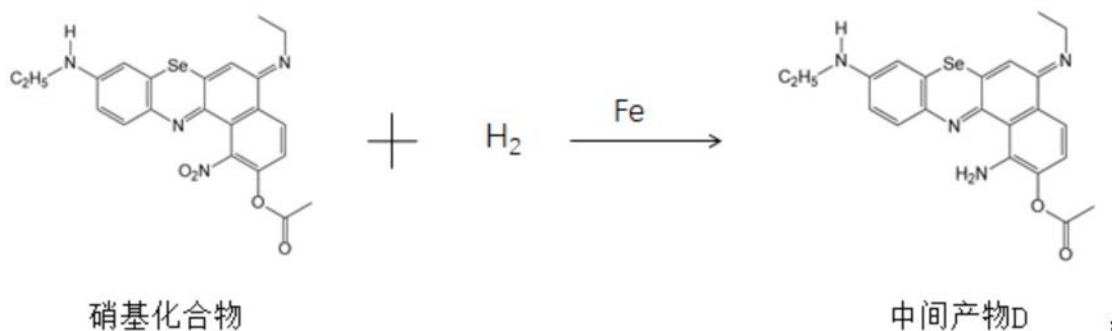
待反应液冷却至80℃以下时,减压排气,随后加入醋酸酐,生成中间产物C,其反应式为:



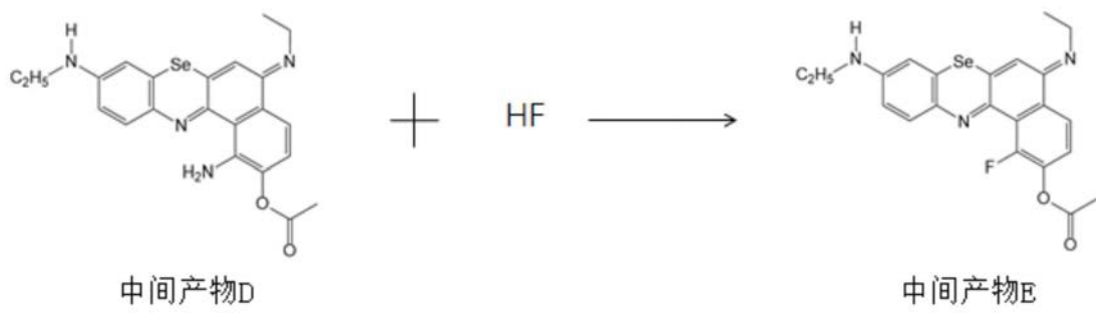
S3:往S2步骤所得的反应液中加入浓硝酸,随后补加浓硫酸,加热,生成硝基化合物,其反应式为:



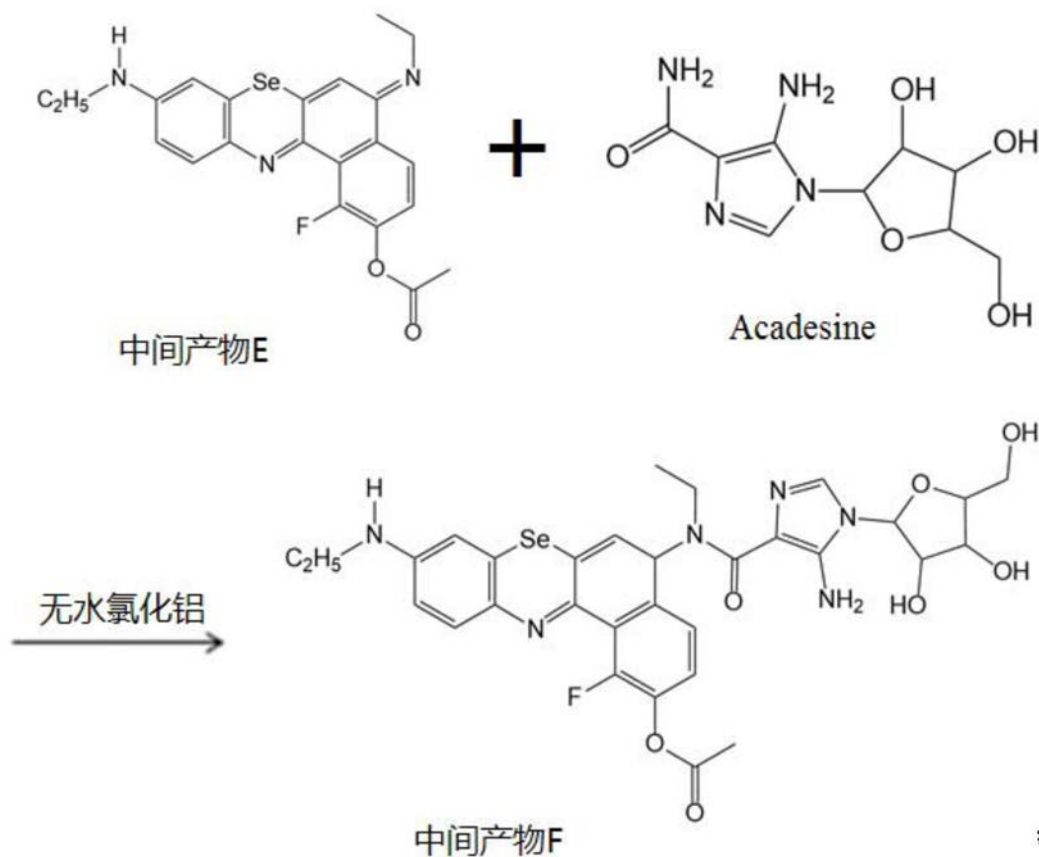
再加入Fe,持续通入氢气,将所述硝基化合物还原成中间产物D,其反应式为:



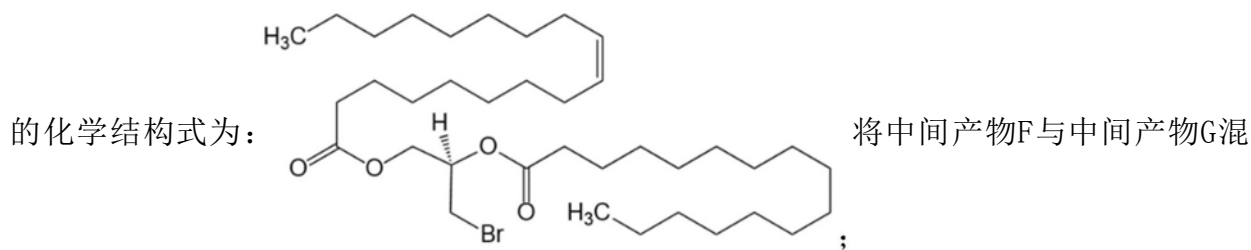
S4:向S3步骤所得反应液中加入亚硝酸钠溶液,再向上述反应液中通入氟化氢气体,生成中间产物E,其反应式为:



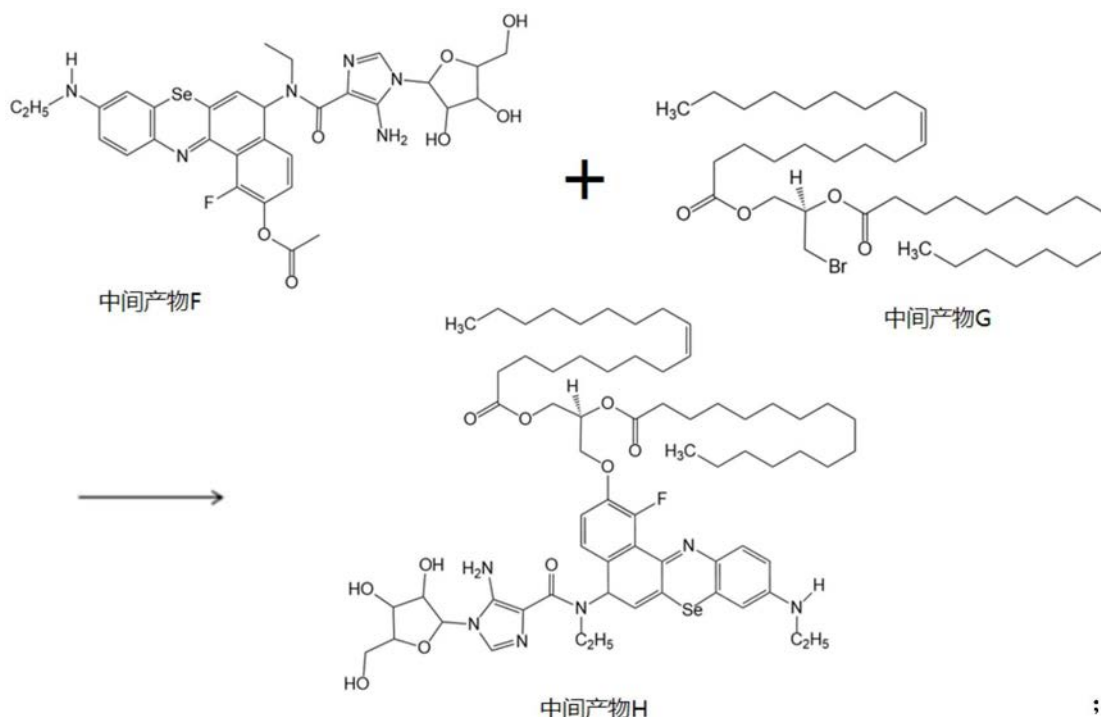
S5: 向S4步骤所得的反应液中加入催化剂无水氯化铝, 并通入HCl气体, 随后再向反应液中加入细胞信号通路激活剂Acadesine, 得到中间产物F;



S6: 将磷脂酰胆碱溶于环己烷中, 加水, 通入过量HBr, 振荡, 生成中间产物G; 中间产物G



合, 加入 K_2CO_3 , 加热, 进行Williamson反应, 生成中间产物H, 其反应式为:



S7: 对S6步骤得到的反应液进行蒸发浓缩, 用去离子水洗涤, 收集洗液, 调至碱性, 进行甲基化, 再进行萃取, 萃取液加入去离子水, 随后加入酸调节溶液pH至酸性, 生成双极性光敏剂。

4. 如权利要求3所述的制备方法, 其特征在于, 步骤S7中, 加入盐酸调节溶液pH至酸性, 生成双极性光敏剂。

5. 如权利要求3所述的制备方法, 其特征在于, 按质量份, 步骤S1合成中间产物A的反应中, 加入含硒苯并吩恶嗪光敏剂5份, 质量分数98%浓硫酸0.5份, 在120~128℃下反应10-15min。

6. 如权利要求3所述的制备方法, 其特征在于, 按质量份, 步骤S2合成中间产物B的反应中, 氢氧化钠溶液3份, 浓度为1.0mol/L, 温度控制在297-302℃, 反应30min; 步骤S2合成中间产物C的反应中, 醋酸酐3份, 浓度为2.5mol/L, 反应5min。

7. 如权利要求3所述的制备方法, 其特征在于, 按质量份, 步骤S3合成硝基化合物的反应中, 浓硝酸1份, 其质量分数为68%; 浓硫酸1份, 其质量分数为98%, 反应温度为145-150℃。

8. 如权利要求3所述的制备方法, 其特征在于, 按质量份, 步骤S3合成中间产物D的反应中, 加入Fe的量为每升反应液0.5mol, 氢气流速为1.5-2L/min, 持续通入5min; 步骤S4合成中间产物E的反应中, 亚硝酸钠溶液3份, 其浓度为3.2mol/L, 控制氟化氢气体流速0.3-0.8L/min, 10-13℃反应8min。

9. 如权利要求3所述的制备方法, 其特征在于, 按质量份, 步骤S5合成中间产物F的反应中, 加入无水氯化铝的量为每升反应液0.3-0.6mol, Acadesine 3份, 控制HCl的流速为1-2L/min, 维持pH为0.5。

10. 如权利要求3所述的制备方法, 其特征在于, 按质量份, 步骤S6合成中间产物G的反应中, 磷脂酰胆碱4份, 其浓度为0.5~1.0mol/L; 步骤S6合成中间产物H的反应中, 维持反应液pH为10-13之间, 反应温度为75-77℃。

一种双极性光敏剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种双极性光敏剂及其制备方法,具体涉及作为光敏剂的EtNBS_e衍生物利用光动力效应来杀死特定的肿瘤细胞,并且通过联合AMPK信号通路激活剂来提高这一杀伤效应,属于生物医药领域。

背景技术

[0002] 由于近年来由于环境和不良的生活习惯等原因,人群中以鳞状细胞癌为首的皮肤癌的患病率的升高。鳞状细胞癌是皮肤高发癌症之一,严重时可向深部组织发展蔓延,从而危及生命,其已成为常见的危害人类生命健康的一大疾病。所以快速有效的介入治疗就显得尤为重要。

[0003] 光动力疗法是一种近年治疗癌症的新型技术,其利用特定波长的激光照射肿瘤组织,被肿瘤细胞吸收的光敏剂在光的激发下把能量传递给周围的氧,生成活性很强的单态氧,单态氧和相邻的生物大分子发生氧化反应,产生细胞毒性作用,进而导致肿瘤细胞受损乃至死亡。光动力疗法对鳞状细胞癌尤为有效,相较于化疗、外科手术切除、电烧术、液氮冷冻等其他常见治疗方案而言,光动力疗法副作用小,治疗过程中患者不必承受痛苦,无较大刺激反应;治疗后不会留下瘢痕;医生操作简单;治疗更精确,根治率更高;在临床治疗中有较大优势。但是,光动力疗法仍有其缺陷。

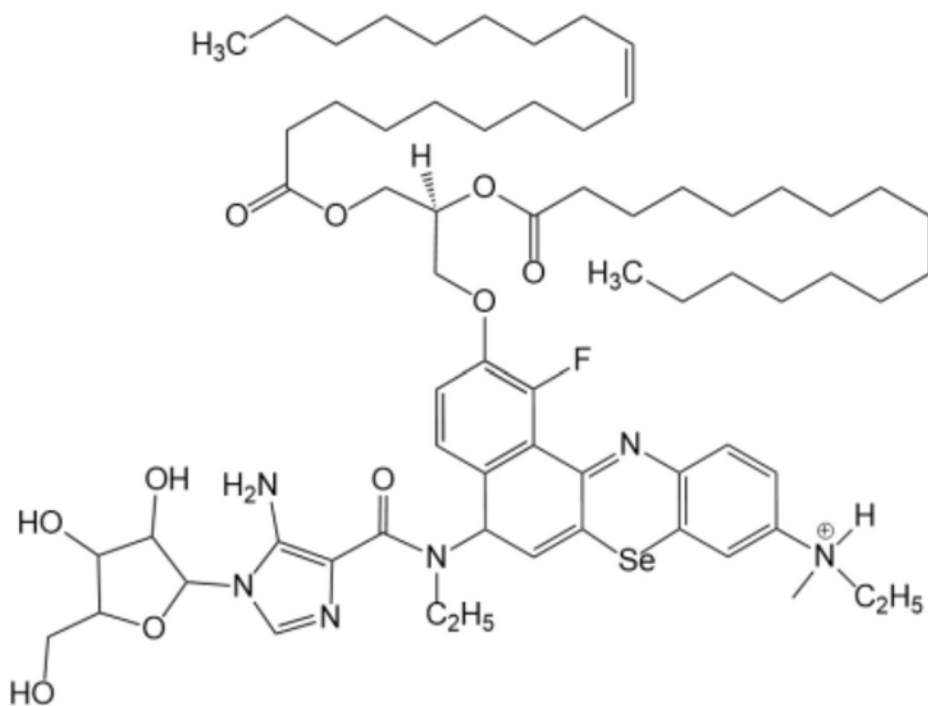
[0004] 通常,光敏剂的性能很大程度上决定了光动力疗法的疗效。而第一、二代光敏剂如血卟啉衍生物,成分复杂且最大吸收光波波长较小,而波长较小的光波透过人体组织的深度有限,无法对更深层的组织细胞进行治疗。如发明专利《一种新型光敏剂竹红菌乙素的制备方法》(申请号:200910154644.5、公开号:CN 102070432 A)中竹红菌乙素的主要吸收波长较短,在近红外光波长吸收能力较弱,难以针对深部组织治疗。其次还存在着进入肿瘤细胞率较低,不利于光敏剂在肿瘤细胞内的聚集等问题。如发明专利《5-氨基酮戊酸及其衍生物的组合物及其用途》(申请号:200810044109.X、公开号:CN 101745102 A)中5-氨基酮戊酸及其衍生物的组合物的亲水性影响了光敏剂穿过细胞膜进入细胞的效率,且靶向选择性低,难以使光敏剂在肿瘤细胞内大量聚集以达到理想的治疗效果。

发明内容

[0005] 针对上述背景技术中的相关问题,本发明的目的是提供副作用很小的一种双极性高渗透光敏剂和AMPK信号通路激活剂的耦联药物,大大增强光动力治疗的疗效,以下为本发明的具体技术方案。

[0006] 本发明的技术方案是,提供一种双极性光敏剂,所述双极性光敏剂为铵盐,所述铵盐中的阳离子为:

[0007]

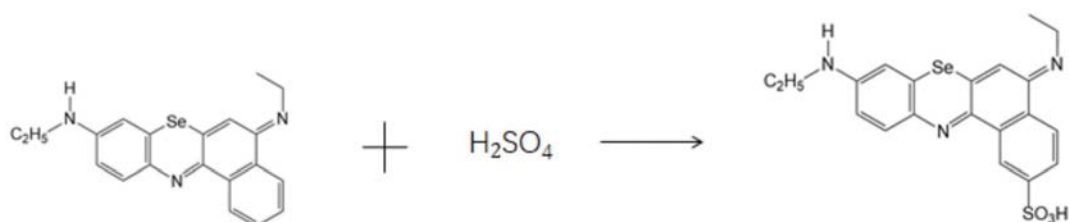


[0008] 优选地,其中铵盐中的阴离子为氯离子。

[0009] 本发明还提供上述双极性光敏剂的制备方法,包括以下步骤:

[0010] S1:将含硒苯并吩恶嗪光敏剂(简称EtNBSe光敏剂)溶于无水甘油之中,再滴加质量分数98%的浓硫酸,搅拌,生成中间产物A,其反应式为:

[0011]

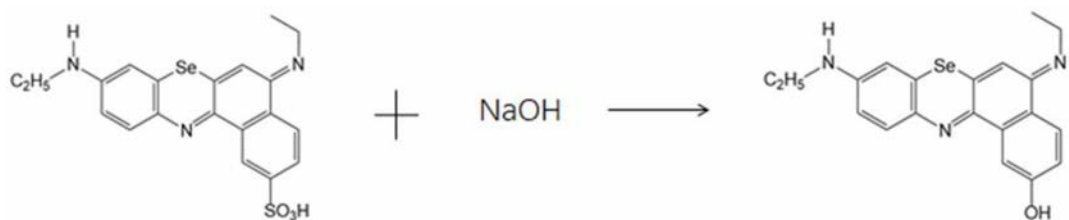


中间产物A

;

[0012] S2:向S1步骤所得的反应液中加入氢氧化钠溶液,并用加压至相对压力为4-7MPa,升温,反应生成中间产物B,其反应式为:

[0013]



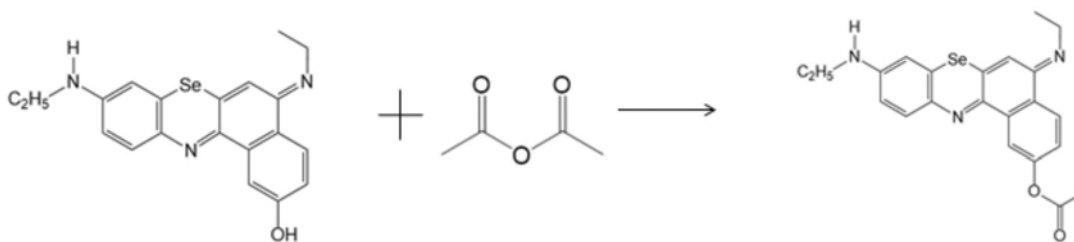
中间产物A

中间产物B

;

[0014] 待反应液冷却(选择自然冷却)至80℃以下时,减压排气,随后加入醋酸酐,生成中间产物C,其反应式为:

[0015]



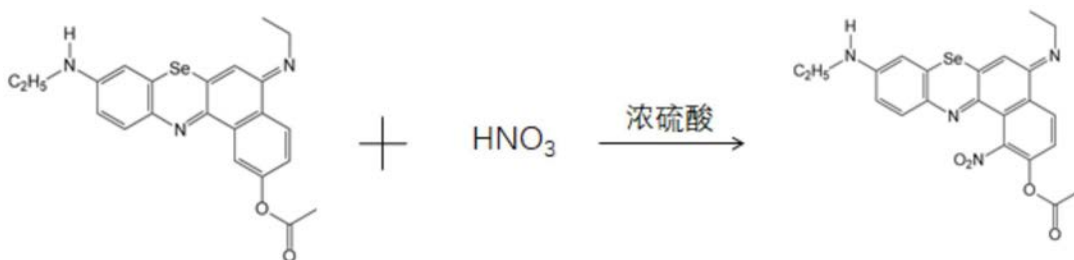
中间产物B

中间产物C

;

[0016] S3: 往S2步骤所得的反应液中加入浓硝酸, 随后补加浓硫酸, 加热, 生成硝基化合物, 其反应式为:

[0017]



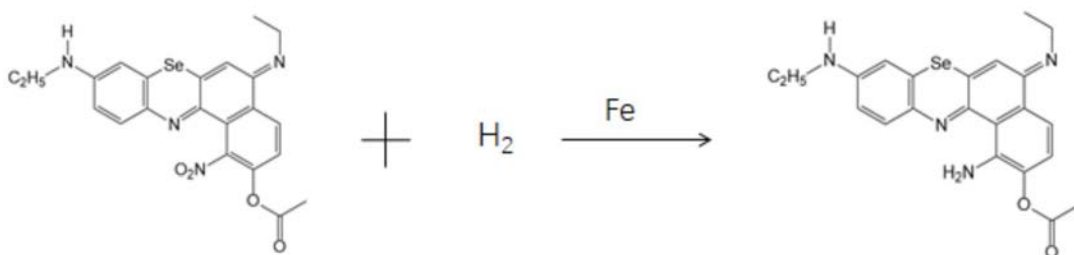
中间产物C

硝基化合物

;

[0018] 再加入Fe, 持续通入氢气, 将所述硝基化合物还原成中间产物D, 其反应式为:

[0019]



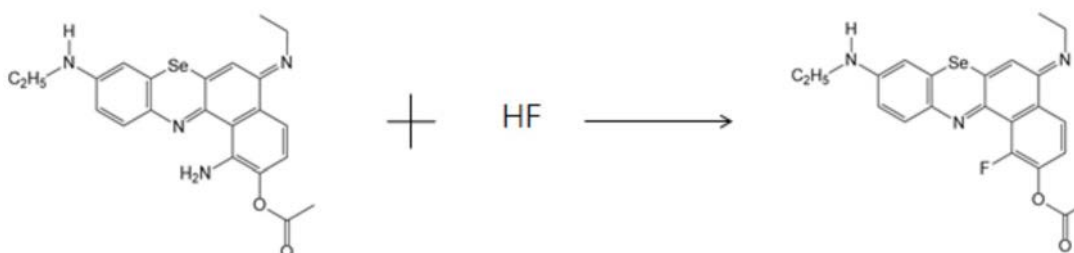
硝基化合物

中间产物D

;

[0020] S4: 向S3步骤所得反应液中加入亚硝酸钠溶液, 再向上述反应液中通入氟化氢气体, 生成中间产物E, 其反应式为:

[0021]

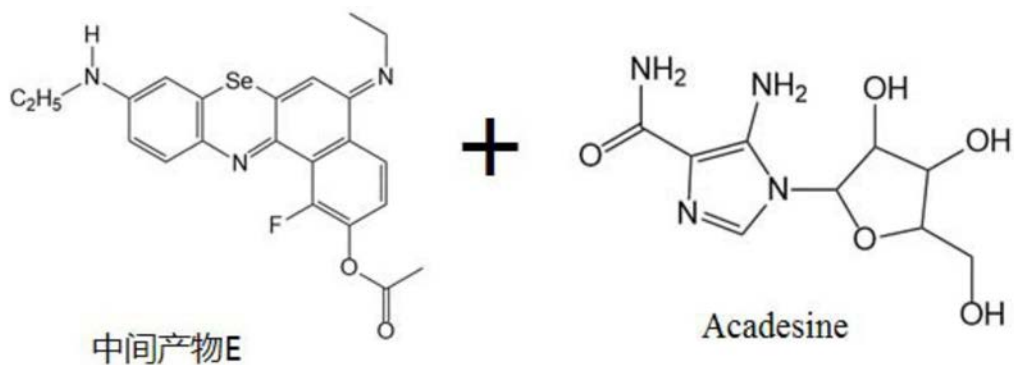


中间产物D

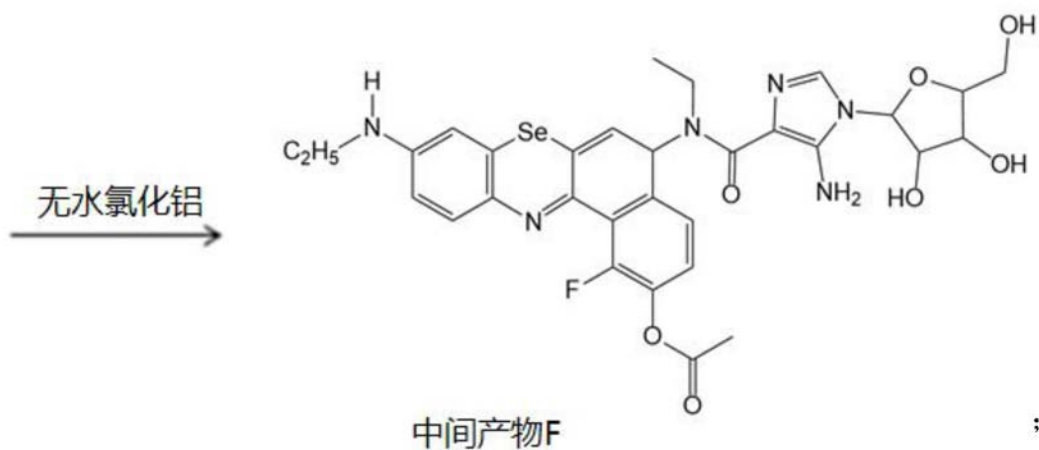
中间产物E

;

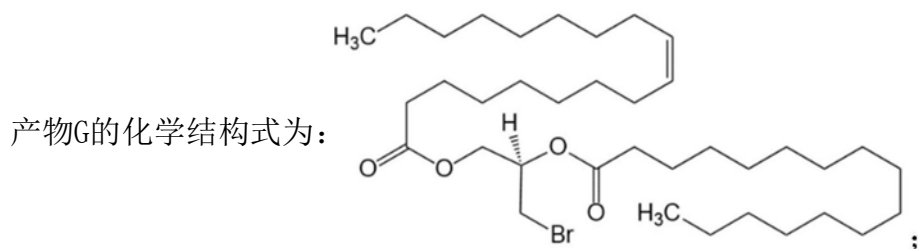
[0022] S5: 向S4步骤所得的反应液中加入催化剂无水氯化铝, 并通入HCl气体, 随后再向反应液中加入细胞信号通路激活剂Acadesine, 得到中间产物F;



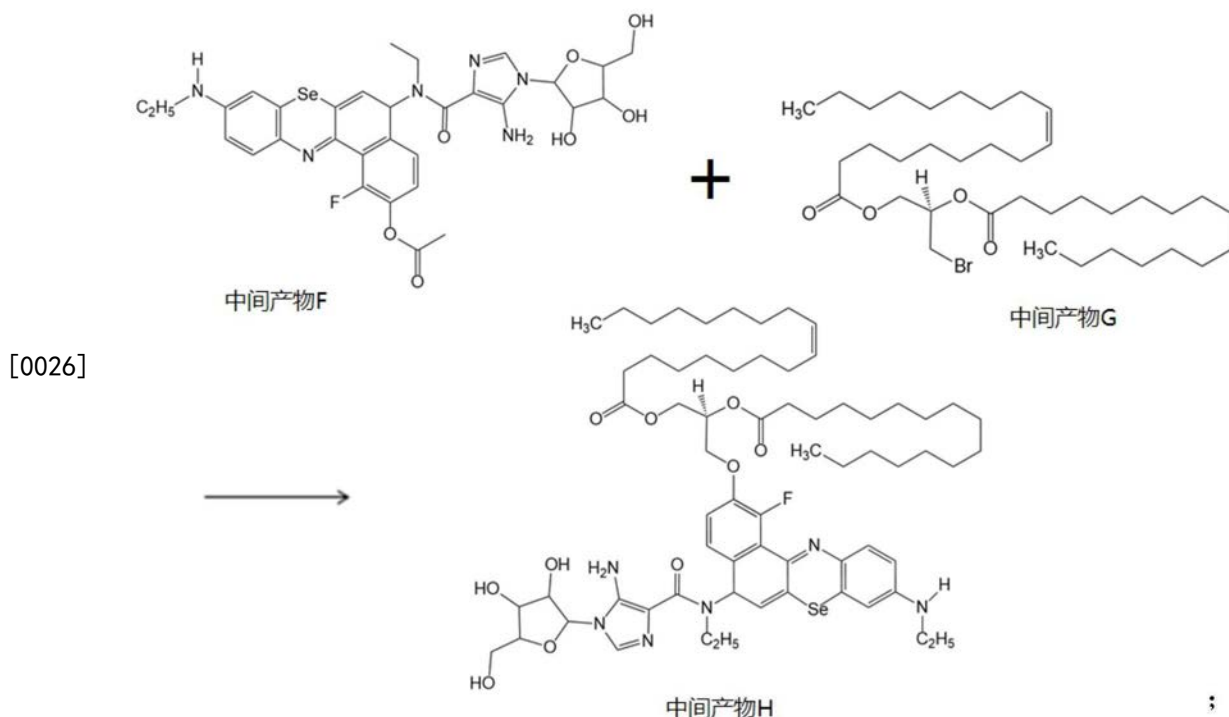
[0023]



[0024] S6:将磷脂酰胆碱溶于环己烷中,加水,通入过量HBr,振荡,生成中间产物G;中间



[0025] 将中间产物F与中间产物G混合,加入 K_2CO_3 ,加热,进行Williamson反应,生成中间产物H,其反应式为:



[0027] S7:对S6步骤得到的反应液进行蒸发浓缩,用去离子水洗涤,收集洗液,调至碱性,再进行萃取,萃取液加入去离子水,随后加入酸调节溶液pH至酸性,生成双极性光敏剂。

[0028] 优选地,步骤S7中,加入盐酸调节溶液pH至酸性,生成双极性光敏剂。

[0029] 优选地,按质量份,步骤S1合成中间产物A的反应中,加入含硒苯并吩恶嗪光敏剂5份,质量分数98%浓硫酸0.5份,120~128℃下反应10-15min。

[0030] 优选地,按质量份,步骤S2合成中间产物B的反应中,氢氧化钠溶液3份,浓度为1.0mol/L,温度控制在297-302℃,反应30min;步骤S2合成中间产物C的反应中,醋酸酐3份,浓度为2.5mol/L,反应5min。

[0031] 优选地,按质量份,步骤S3合成硝基化合物的反应中,浓硝酸1份,其质量分数为68%;浓硫酸1份,其质量分数为98%,反应温度为145-150℃。

[0032] 优选地,按质量份,步骤S3合成中间产物D的反应中,加入Fe的量为每升反应液0.5mol,氢气流速为1.5-2L/min,持续通入5min;步骤S4合成中间产物E的反应中,亚硝酸钠溶液3份,其浓度为3.2mol/L,控制氟化氢气体流速0.3-0.8L/min,10-13℃反应8min。

[0033] 优选地,按质量份,步骤S5合成中间产物F的反应中,加入无水氯化铝的量为每升反应液0.3-0.6mol,Acadesine 3份,控制HCl的流速为1-2L/min,维持pH为0.5。

[0034] 优选地,按质量份,步骤S6合成中间产物G的反应中,磷脂酰胆碱4份,其浓度为0.5~1.0mol/L;步骤S6合成中间产物H的反应中,维持反应液pH为10-13之间,反应温度为75-77℃。

[0035] 本发明中双极性光敏剂中的“双极性”和EtNBSe光敏剂中的“EtNBSe”仅仅用于区分两种光敏剂。

[0036] 用于保持铵盐氨基氮的极性,稀释所得产物的浓度到100~800μmol/L范围内,以混合溶液作为光敏剂混合液,上述光敏剂混合液与辅助成分混合并制成相应药物形态即得到可应用的药物。

[0037] 本发明的双极性光敏剂的药物辅助成分包含但不限于甘油,微晶纤维素、蔗糖、淀

粉、胶浆、糊精、硬脂酸镁、注射用水中的一种或多种。具体地,本发明所述的双极性光敏剂根据其不同的制药方式采用不同的辅助成分。

[0038] 要求所述照射光的强度可激活所述光敏剂并且不可损伤人体正常组织,可选光的强度范围为 $10\sim 80\text{mJ}/\text{cm}^2$,考虑到光敏剂激活效果、人体的适应情况等多方面因素,优选光强度范围为 $20\sim 30\text{mJ}/\text{cm}^2$ 。所述光的照射时间为 $5\sim 15\text{min}$,具体光照时长应与光强度相适应,光强度较小时需加长光照射时间,光强度相对较大时则可适当减小光照射时长。

[0039] 所述AMPK细胞信号通路激活剂可激活AMPK细胞信号通路,从而促进肿瘤细胞的凋亡,可增强药物组合物的肿瘤细胞靶向杀伤性,提高治疗效果。

[0040] 光敏剂的重量百分比为 $100\sim 255\mu\text{g}/\text{kg}$,从副作用大小、治疗效果等方面考虑,优选重量百分比为 $150\sim 200\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0041] 进一步地,所述AMPK细胞信号通路激活剂在所述双极性光敏剂中的重量百分比为 $135\sim 180\mu\text{g}/\text{kg}$,考虑到AMPK细胞信号通路的激活效果、激活剂的充分利用等多方面因素,优选重量百分比为 $140\sim 155\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0042] 本发明的双极性光敏剂还包含甘油酯酰残基,其作为疏水基团与EtNBSe光敏剂以共价键结合,构成了一端亲水一端疏水的结构,所述结构类似于组成生物膜的必需成分—磷脂酰胆碱,由于相似相溶原理,所述双极性光敏剂更易于进入癌细胞,极大地增大了所述光敏剂的摄取率,摄取率提高了约 46.1% ,基于此使得所述双极性光敏剂在药物中的重量百分比可适当降低,从而在减小药物副作用的同时也极大地提高了所述双极性光敏剂的治疗效果。

[0043] 本发明所述的双极性光敏剂中还包含F原子,所述F原子直接与芳香环相连,因其强吸电子诱导效应,可降低芳香环的芳香性,使得所述光敏剂的吸收光谱向红外方向偏移(红移),增加了激光光能的利用率,既可降低照射光的强度又可减小光照射的时长,可避免光照射给患者正常组织带来的负面影响,节约时间成本,给治疗带来便利。

附图说明

[0044] 图1表示双极性光敏剂和AMPK信号通路激活剂的耦联药物的氢谱图。

[0045] 图2表示双极性光敏剂和AMPK信号通路激活剂的耦联药物的碳谱图。

[0046] 图3为裸鼠左右侧肿瘤随时间变化示意图。

[0047] 图4为梯度剂量双极性光敏剂-PDT处理后,A-431细胞中p-AMPK相对表达量示意图。

[0048] 图5为A-431细胞中p-AMPK相对表达量与双极性光敏剂剂量的柱状关系图。

[0049] 图6为 400nM 双极性光敏剂-PDT处理后,不同时间段A-431细胞中p-AMPK相对表达量示意图。

[0050] 图7为A-431细胞中p-AMPK相对表达量与双极性光敏剂-PDT处理后所经时间的柱状关系图。

[0051] 图8为 400nM EtNBSe、 400nM 所述双极性光敏剂分别单独经照光处理后,MTT分析的A-431细胞活性图。

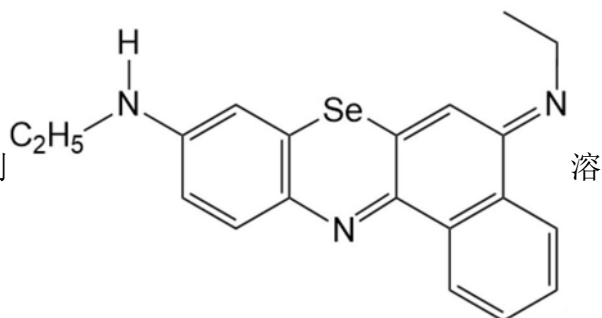
[0052] 图9为本发明双极性光敏剂阳离子的化学结构式。

具体实施方式

[0053] 下面结合实施例对本发明作进一步说明。

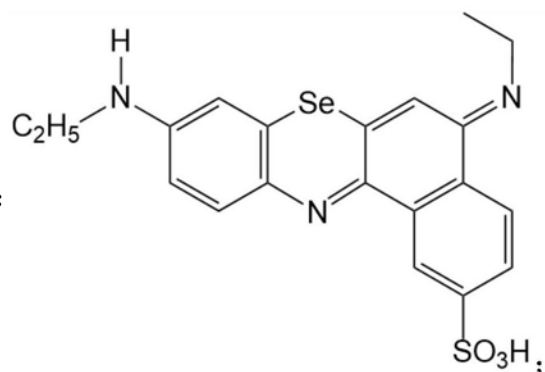
[0054] 实施例1:双极性光敏剂的制备

[0055] S1:将五份的含硒苯并吩恶嗪光敏剂



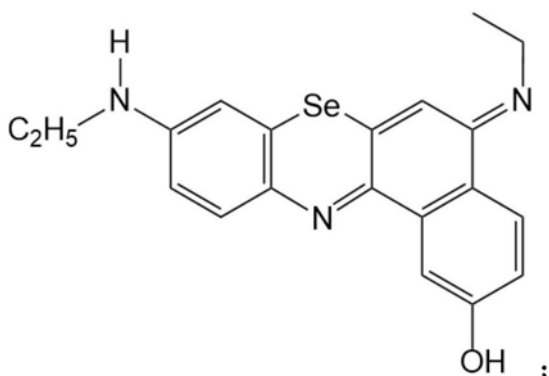
溶于无水甘油之中,向其中缓慢滴加98%的浓硫酸0.5份,用磁力搅拌器搅拌混合液并加热

至120~128℃,反应时间为13min,生成中间产物A:



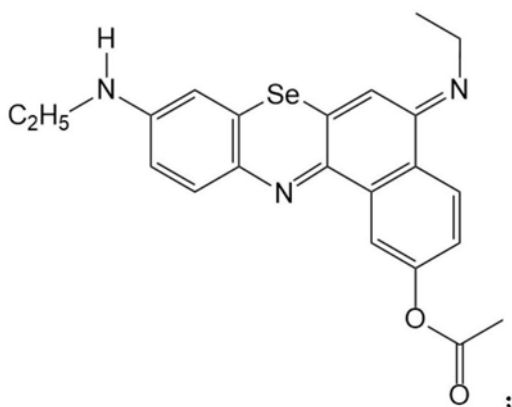
[0056] S2:向所述S1步骤的最终反应液中加入三份1.0mol/L的氢氧化钠溶液,并用耐压釜加压至5MPa,升高至控制温度于297~302℃,与氢氧化钠共融30min,生成中间产物B:

[0057]



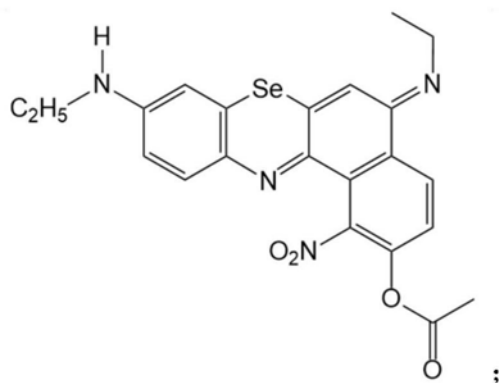
[0058] 待反应液冷却至80℃以下时,减压排气开釜,随后加入三份2.5mol/L的醋酸酐,反应5min,生成中间产物C:

[0059]



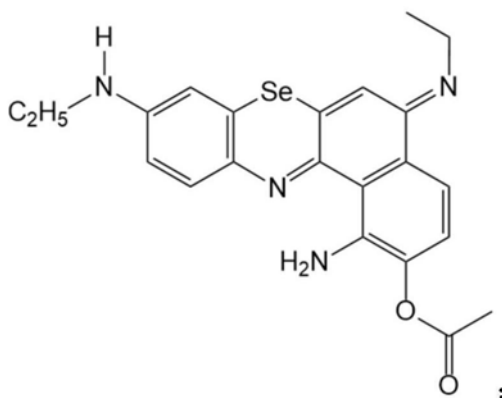
[0060] S3: 往S2反应液中加入1份68%的浓硝酸, 随后缓慢搅拌补加1份浓硫酸, 并将反应液重新加热至145~150℃, 生成硝基化合物:

[0061]



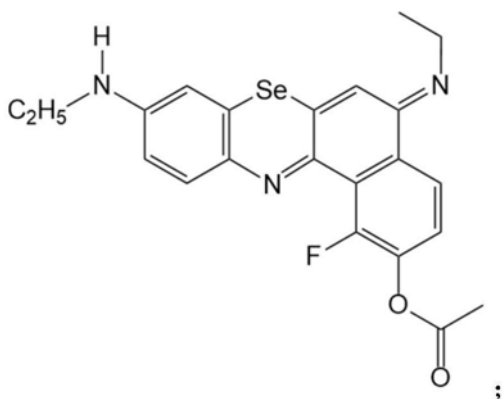
[0062] 再向每升反应液中加入0.5mol Fe, 后平稳地以1.5~2L/min的速度持续通入氢气5min, 将所述硝基化合物还原成中间产物D:

[0063]



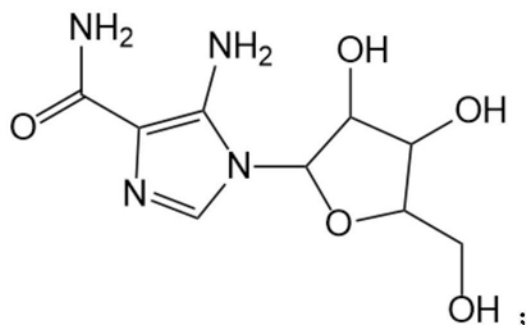
[0064] S4: 向S3所得反应液中加入3份3.2mol/L的亚硝酸钠溶液, 再缓慢恒速地向上述反应液中通入氟化氢气体, 并控制氟化氢气体流速为0.3~0.8L/min, 控制重氮化合物溶液的温度在40℃以下, 优选温度为10~13℃, 反应8min, 收率为79.2%, 生成中间产物E:

[0065]



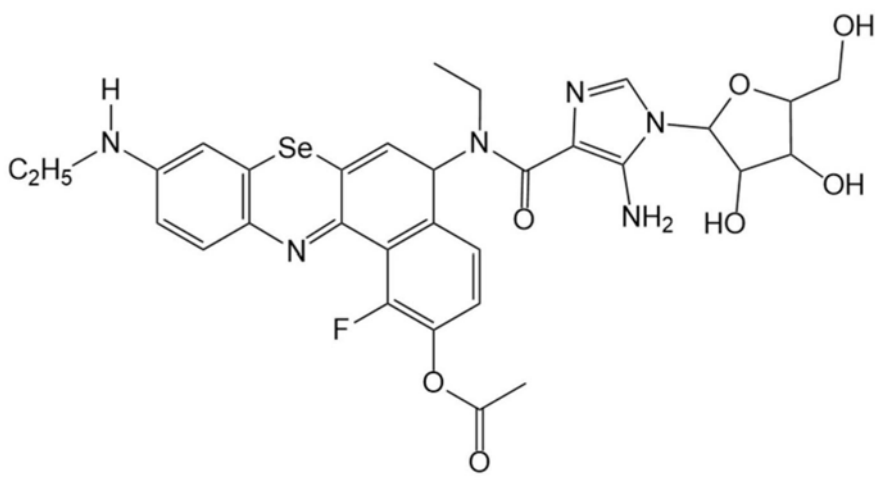
[0066] S5:向上述S4所得每升反应液中加入0.3~0.6mol催化剂无水氯化铝,并以1~2L/mol的速度稳定平缓地通入HCl气体,保持pH维持在0.5,随后再向上述反应液中加入3份所

述AMPK细胞信号通路激活剂Acadesine:



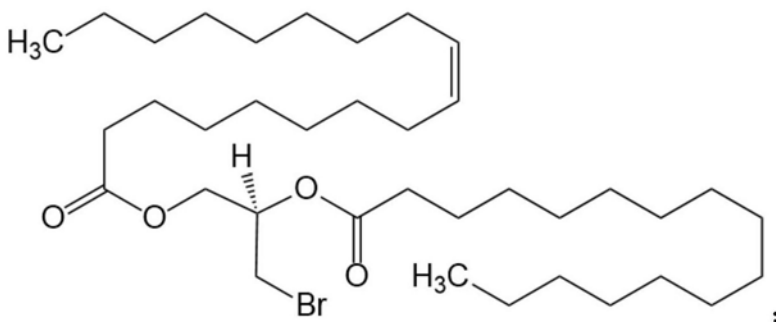
[0067] 在无水氯化铝强路易斯酸的催化下,所述Acadesine以酮基正离子进攻EtNBSe光敏剂,从而得到中间产物F:

[0068]

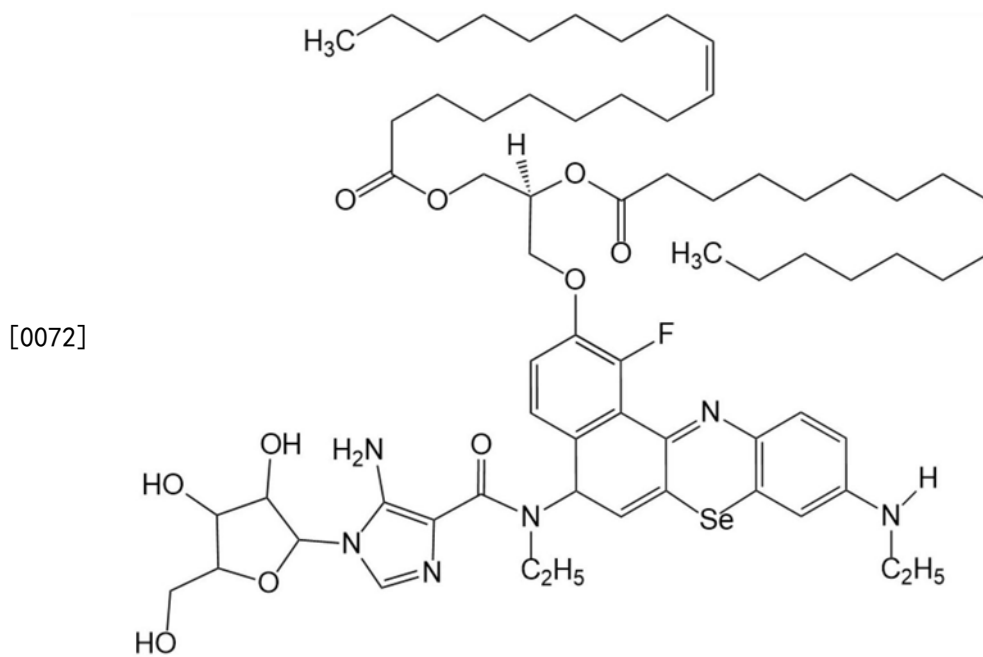


[0069] S6:将4份0.5~1.0mol/L磷脂酰胆碱溶于环己烷中,加入少量水,后大剂量通入过量HBr,剧烈振荡,将磷酸胆碱脱去,并用Br取代,生成中间产物G:

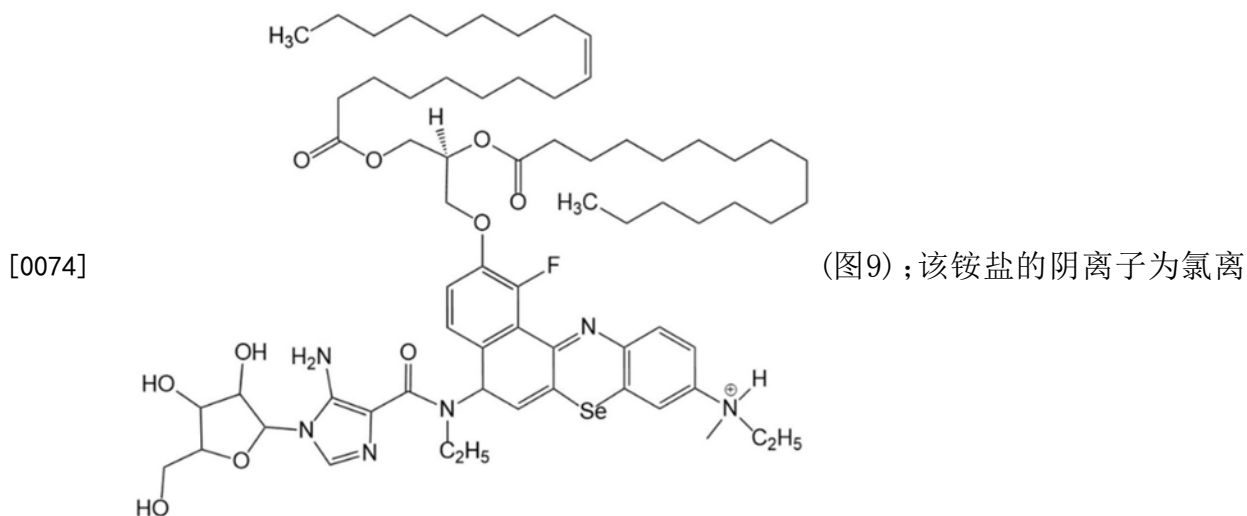
[0070]



[0071] 将上述反应液与S5所得反应液混合,加入适量 K_2CO_3 使pH在10~13之间,将上述反应液加热至75~77℃,进行Williamson反应,生成中间产物H:



[0073] S7:对S6产物进行低温蒸发浓缩,用去离子水洗涤上述溶液6次,收集洗液,调至微碱性,进行甲基化,用环戊烷萃取,再用甘油二次萃取环戊烷,加入少量去离子水,随后加入稀盐酸调节溶液pH至酸性,生成铵盐最终产物如下:



子。

[0075] 应用例1

[0076] EtNBSe-PDT治疗皮肤鳞癌细胞瘤实施例

[0077] (1) 动物实验

[0078] 小鼠鳞状细胞瘤模型,选用裸鼠,雄性,18-20g。实验时,取生长良好的A-431细胞,经胰酶消化后用无菌生理盐水按1:10比例稀释后制成肿瘤细胞悬液,于裸鼠左侧肿瘤经皮下注射500uM EtNBSe药剂,右侧肿瘤不处理作为对照,用20J/cm²的红光照射15min,于2天、4天、7天、12天、14天和17天观察肿瘤情况。

[0079] (2) 实验结果

[0080] EtNBS_{Se}-PDT处理后不同时间观察肿瘤变化情况,结果显示EtNBS_{Se}-PDT处理后肿瘤块明显坏死并缩小,说明EtNBS_{Se}-PDT能明显治疗鳞状细胞肿瘤(图3)。

[0081] 应用例2

[0082] EtNBS_{Se}-PDT激活鳞状癌细胞AMPK信号实施例

[0083] (1) 实验方法

[0084] 鳞癌细胞A-431细胞系培养于10%小牛血清的DMEM培养液中,添加100IU/L的青霉素和100mg/L的链霉素,置于37℃,5%CO₂的恒温培养箱中常规培养,待细胞长满瓶底后,弃掉培养液,PBS液冲洗两次,再用0.25%的胰酶和0.02%的EDTA消化5分钟,再分瓶培养,2至3天传代一次,取对数生长期细胞用于实验。

[0085] 取对数生长期的A-431细胞经胰酶消化后接种于六孔培养板中,置于5%CO₂培养箱,37℃培养,待生长至80%~90%融合状态时,在每孔中分别加入EtNBS_{Se}药剂,使终浓度分别为0nM,100nM,200nM,400nM,800nM,孵育1h后,用20J/cm²的红光照射15min,半小时后收集细胞提取总蛋白用Western Blot法检测细胞中p-AMPK的表达。

[0086] 取对数生长期的A-431细胞经胰酶消化后接种于培养皿中,置于5%CO₂培养箱,37℃培养,待生长至80%~90%融合状态时,在每个培养皿中加入400nM EtNBS_{Se}药剂,孵育1h后,用20J/cm²的红光照射15min,分别于EtNBS_{Se}-PDT处理后0.5h、1h、2h、8h和16h收集细胞提取总蛋白用Western Blot法检测细胞中p-AMPK的表达。

[0087] (2) 实验结果

[0088] 梯度剂量EtNBS_{Se}-PDT处理A-431细胞对其p-AMPK表达量Western Blot结果分析发现,p-AMPK表达量随着EtNBS_{Se}剂量增加表达量明显降低,EtNBS_{Se}-PDT能明显抑制p-AMPK信号(图4、图5)。

[0089] EtNBS_{Se}-PDT处理A-431细胞后梯度时间收集蛋白对其p-AMPK表达量Western Blot结果分析发现,p-AMPK表达量在EtNBS_{Se}-PDT处理A-431细胞后0.5h降到最低值,随后逐渐恢复到正常值,甚至在16h时p-AMPK表达量略有升高(图6、图7)。

[0090] 对比例:双极性光敏剂与EtNBS_{Se}光敏剂抑制A-431细胞活性对比

[0091] (1) 实验方法

[0092] 于含10%胎小牛血清的培养液中,将鳞癌细胞A-431细胞系配成单个细胞悬液,并以每孔1000-10000个细胞的标准将所述细胞悬液接种于三个96孔板中,每孔的体积为200ul。随后将生理盐水、EtNBS_{Se} 400nmol以及双极性光敏剂400nmol分别加入上述三个孔板的各孔中,经激光照射1min后,将所述A-431细胞系置于37℃,5%CO₂的恒温培养箱中常规培养3天。

[0093] 培养结束后,向所述孔板的每个孔中加入5mg/ml由PBS配制而成的MTT溶液20ul,并于37℃,5%CO₂的恒温培养箱中孵育4小时。随后,缓慢吸出所述孔内的培养上清液,离心后,再次吸弃孔内的培养上清液。随后,向所述孔板的每个孔中加入150ul DMSO使结晶物充分溶解,振荡10分钟后,选择490nm波长的单色光,在酶联免疫检测仪中测定各孔中液体的吸光度,记录结果。

[0094] (2) 实验结果

[0095] 由EtNBS_{Se}或所述耦联药物单独处理对A-431细胞活性影响的MTT分析结果可知,在激光照射条件下,相较于对照组,经EtNBS_{Se}与双极性光敏剂处理后的A-431细胞活性均很

低,然而,二者比较来看,双极性光敏剂的细胞致死率更高,表明在A-431细胞系中,双极性光敏剂具有比EtNBS_e光敏剂更高的稳定性和细胞毒性(图8)。

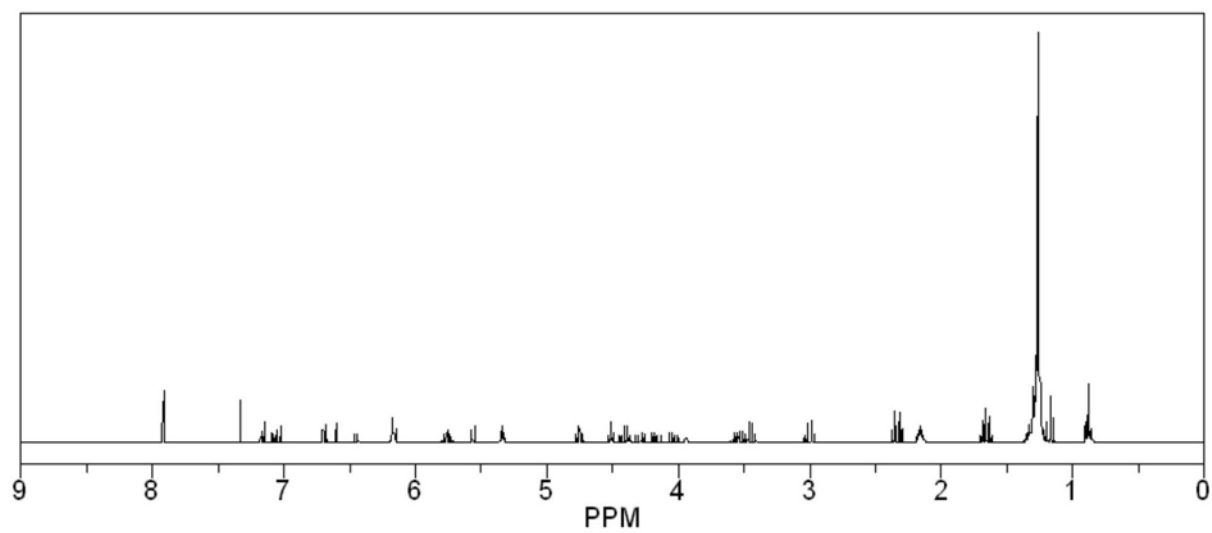


图1

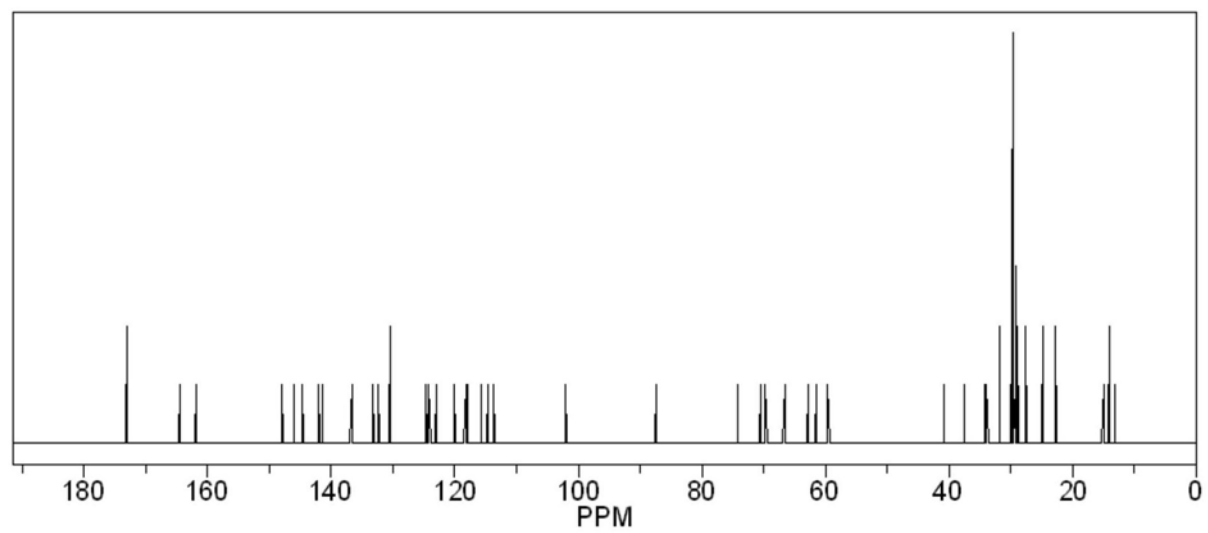


图2

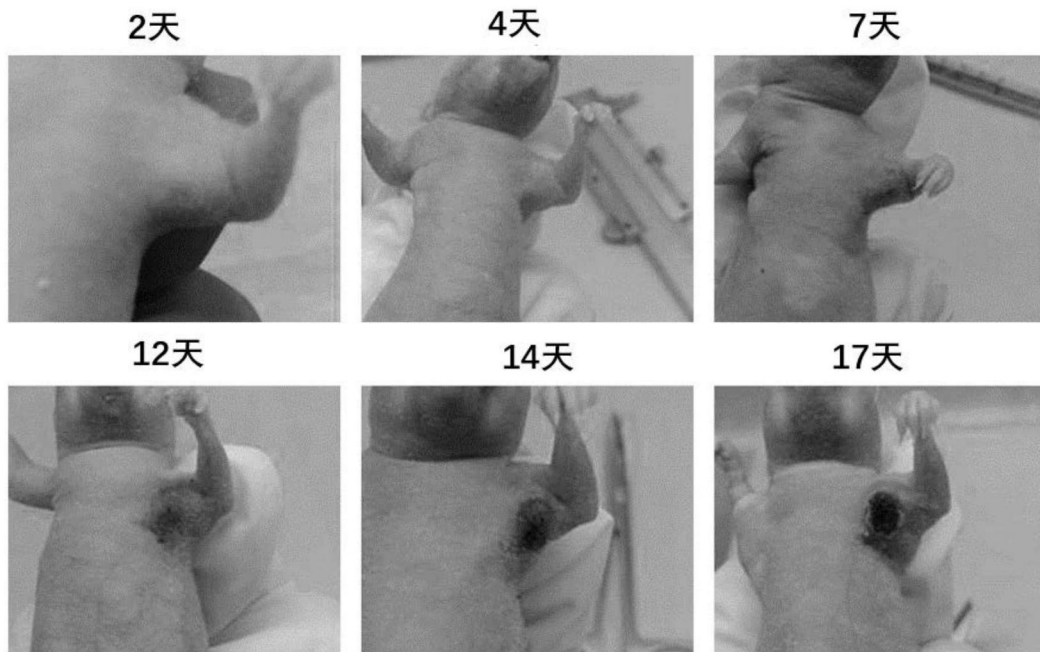


图3

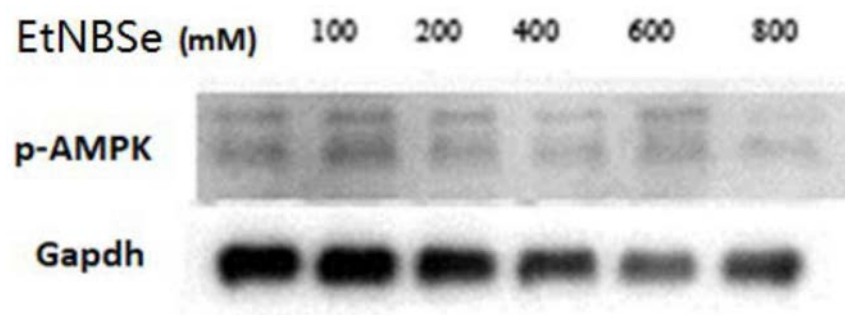


图4

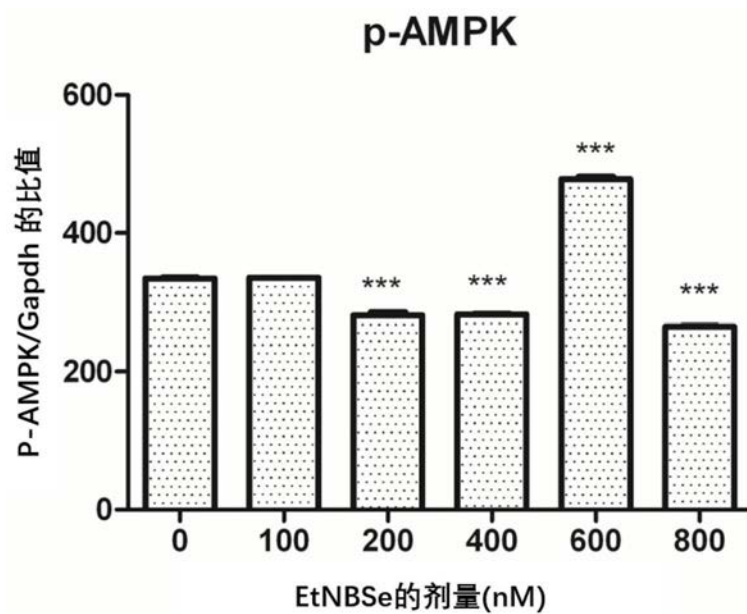


图5

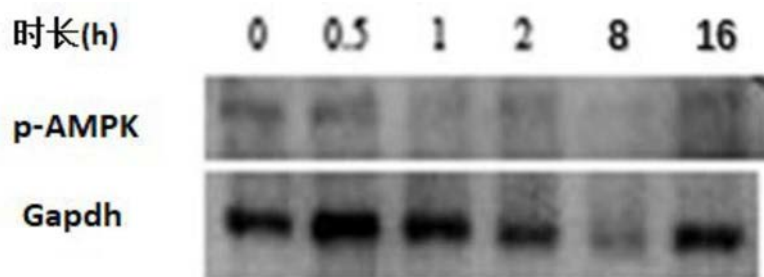


图6

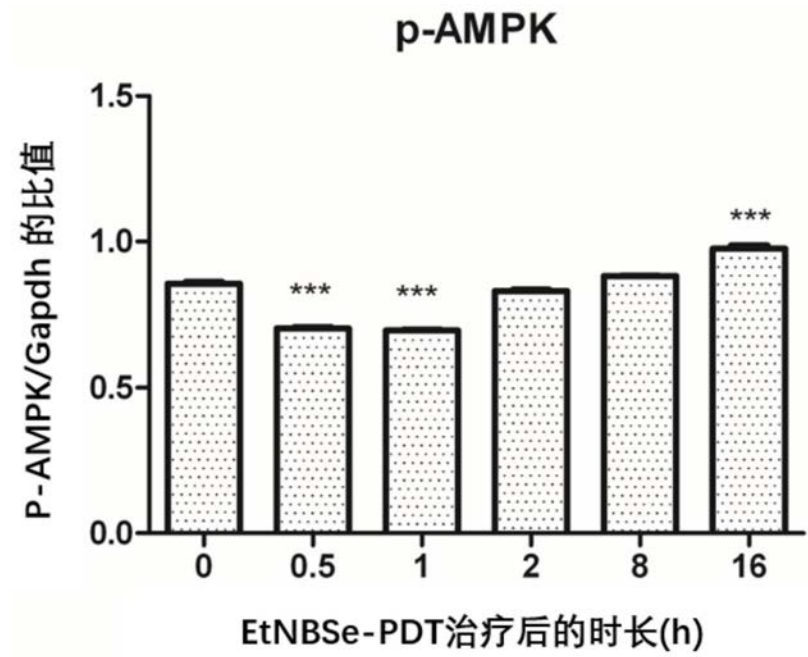


图7

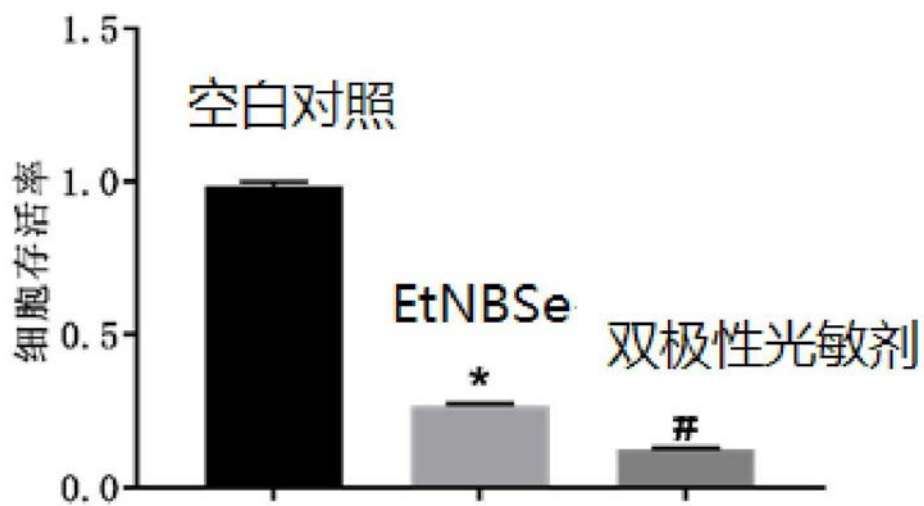


图8

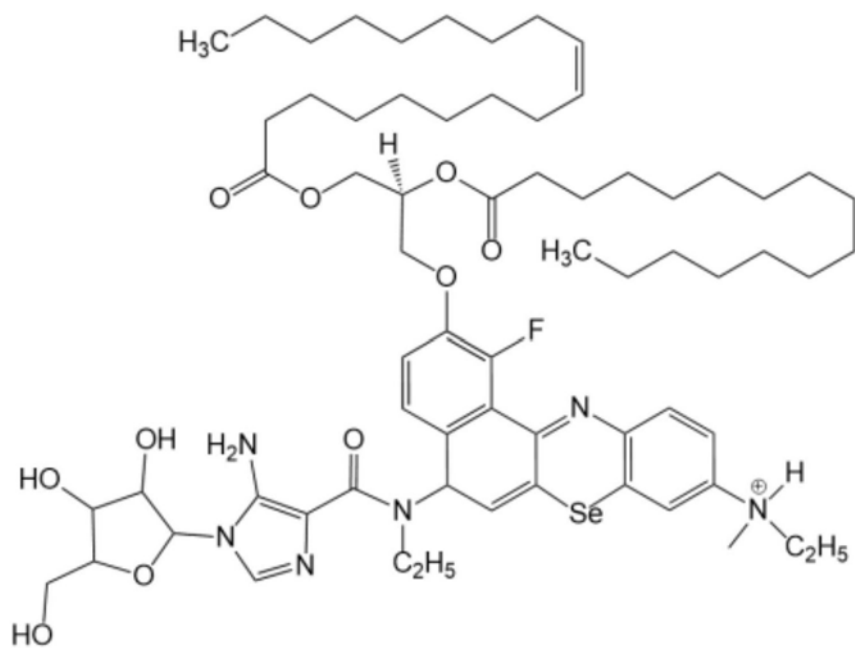


图9