



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113956190 B

(45) 授权公告日 2023.05.02

(21) 申请号 202111275445.7

A61K 41/00 (2020.01)

(22) 申请日 2021.10.29

A61P 35/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 王沙沙

申请公布号 CN 113956190 A

(43) 申请公布日 2022.01.21

(73) 专利权人 大连理工大学

地址 116024 辽宁省大连市高新园区凌工
路2号

(72) 发明人 王静云 曾爽 陈麒先 张留伟

(74) 专利代理机构 大连东方专利代理有限责任

公司 21212

专利代理师 房艳萍 李馨

(51) Int. Cl.

C07D 209/62 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

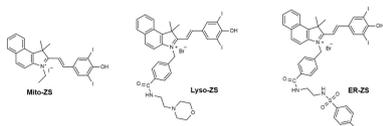
权利要求书2页 说明书13页 附图8页

(54) 发明名称

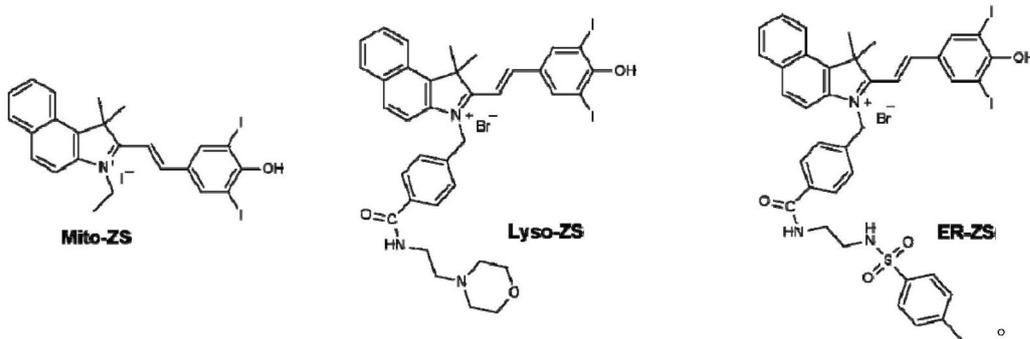
可激活肿瘤细胞焦亡的细胞器靶向光敏剂
及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种可激活肿瘤细胞焦亡的
细胞器靶向光敏剂及其制备方法和应用。所述
Mito-ZS光敏剂为线粒体靶向光敏剂；所述Lyso-
ZS光敏剂为溶酶体靶向光敏剂；所述ER-ZS光敏
剂为内质网靶向光敏剂。所述光敏剂通过对肿瘤
细胞内细胞器精准靶向治疗，激活细胞焦亡通
路，使光动力治疗与免疫治疗策略完美结合，在
癌症治疗领域具有广阔的应用前景。



1. 一种可激活肿瘤细胞焦亡的细胞器靶向光敏剂,其特征在于,所述细胞器靶向光敏剂的结构通式为Mito-ZS、Lyso-ZS或ER-ZS,如下所示:



2. 根据权利要求1所述的可激活肿瘤细胞焦亡的细胞器靶向光敏剂,其特征在于,所述Mito-ZS光敏剂为线粒体靶向光敏剂;所述Lyso-ZS光敏剂为溶酶体靶向光敏剂;所述ER-ZS光敏剂为内质网靶向光敏剂。

3. 权利要求1或2所述的可激活肿瘤细胞焦亡的细胞器靶向光敏剂的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(一)Mito-ZS光敏剂

(1) 化合物1的合成:将2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶与碘乙烷溶于乙腈中,在80-100℃回流20-24小时,得到化合物1;

(2) 化合物Mito-ZS的合成:将上步所得化合物1与3,5-二碘-4-羟基苯甲醛溶于乙醇中,并滴入哌啶,室温反应20-24小时,得到化合物Mito-ZS;

(二)Lyso-ZS光敏剂

(1) 化合物2的合成:将2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶与对溴甲基苯甲酸溶于乙腈中,在80-100℃回流过夜,得到化合物2;

(2) 化合物S-1的合成:将上步所得化合物2与3,5-二碘-4-羟基苯甲醛溶于乙醇中,并滴入哌啶,室温反应20-24小时,得到化合物S-1;

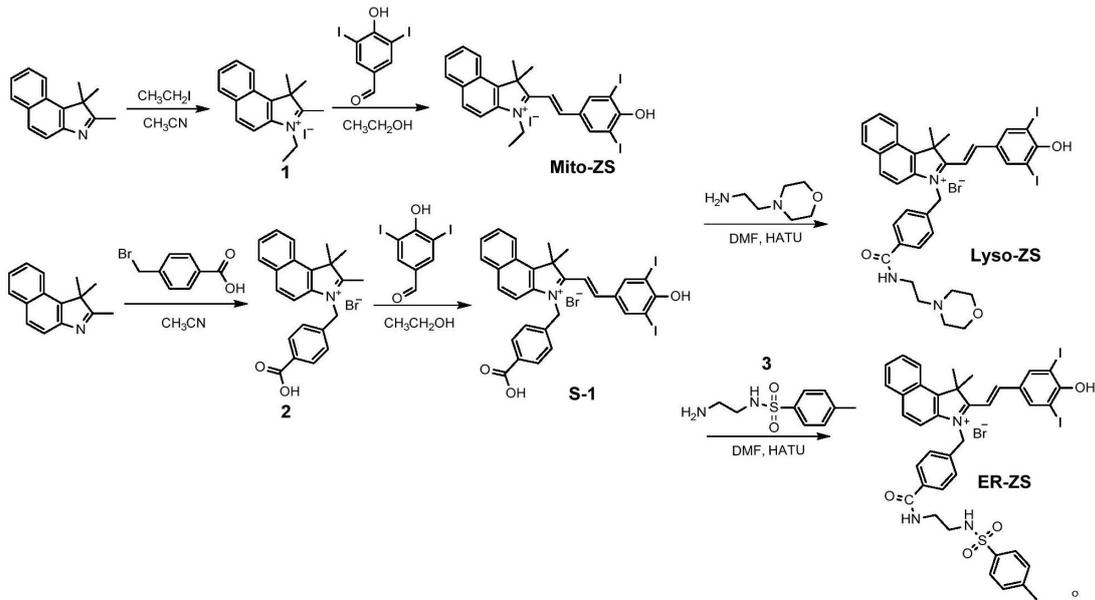
(3) 化合物Lyso-ZS的合成:先将化合物S-1、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯溶于N,N-二甲基甲酰胺中,再加入N,N-二异丙基乙胺,室温搅拌1-2小时后,再加入N-(2-氨基乙基)吗啉并室温反应3-6小时,得到化合物Lyso-ZS;

(三)ER-ZS光敏剂

(1) 化合物3的合成:将乙二胺溶于二氯甲烷中,并将溶于二氯甲烷中的对甲苯磺酰氯滴入反应体系,室温反应20-24小时,得到化合物3;

(2) 化合物ER-ZS的合成:先将化合物S-1、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯溶于N,N-二甲基甲酰胺,再加入N,N-二异丙基乙胺,室温搅拌1-2小时后,再加入化合物3并室温反应3-6小时,得到化合物ER-ZS;

反应式如下:



4. 根据权利要求3所述的可激活肿瘤细胞焦亡的细胞器靶向光敏剂的制备方法,其特征在于,在Mito-ZS光敏剂的制备过程中,所述2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶与碘乙烷的摩尔比为1:1-1.5;所述化合物1与3,5-二碘-4-羟基苯甲醛的摩尔比为1:1-1.5;

在Lyso-ZS光敏剂的制备过程中,所述2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶与对溴甲基苯甲酸的摩尔比为1:1-1.5;所述化合物2与3,5-二碘-4-羟基苯甲醛的摩尔比为1:1-1.5;所述化合物S-1、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯、N,N-二异丙基乙胺与N-(2-氨基乙基)吗啉的摩尔比为1:2:2:1.1

在ER-ZS光敏剂的制备过程中,所述乙二胺与对甲苯磺酰氯的摩尔比为2-10:1;化合物S-1、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯、N,N-二异丙基乙胺与化合物3的摩尔比为1:2:2:1.1。

5. 根据权利要求3所述的可激活肿瘤细胞焦亡的细胞器靶向光敏剂的制备方法,其特征在于,在Mito-ZS光敏剂的制备过程中,所述2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶与乙腈的比例为17mmol:15-20mL;所述化合物1与乙醇的比例关系为0.82mmol:15-20mL;

在Lyso-ZS光敏剂的制备过程中,所述2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶与乙腈的比例关系为5.08mmol:20-25mL;所述化合物2与乙醇的比例为0.47mmol:10-15mL;所述化合物S-1与N,N-二甲基甲酰胺的比例为0.13mmol:3-5mL;

在ER-ZS光敏剂的制备过程中,乙二胺与溶于乙二胺的二氯甲烷的比例为25mmol:90-120mL;对甲苯磺酰氯与溶于对甲苯磺酰氯的二氯甲烷的比例为5mmol:15-20mL;化合物S-1与N,N-二甲基甲酰胺的比例为0.13mmol:3-5mL。

6. 根据权利要求3所述的可激活肿瘤细胞焦亡的细胞器靶向光敏剂的制备方法,其特征在于,在Mito-ZS和Lyso-ZS光敏剂的制备过程中,所述哌啶的用量为乙醇体积的0.5%-1%。

可激活肿瘤细胞焦亡的细胞器靶向光敏剂及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物材料及生物医学技术领域,具体涉及可激活肿瘤细胞焦亡的细胞器靶向光敏剂及其制备方法、光敏剂对肿瘤的光动力治疗及增强肿瘤免疫治疗的应用。

背景技术

[0002] 癌症由于其易复发、易侵袭以及远端迁移等特性,在临床治疗中仍具有巨大挑战,并且是造成人类死亡人数最多的疾病之一^[1]。在传统治疗方法中,除手术治疗外,化疗作为抑制癌症的一线临床方案占据着重要地位。但是,目前常用的化疗药物大多都是通过促进细胞凋亡实现治疗肿瘤的目的。然而,癌细胞本身固有的抗凋亡能力以及多重耐药性是导致临床化疗失败的主要原因^[2]。此外,凋亡被仍为是一种非免疫原性的死亡方式,因此为了达到理想的抗肿瘤效果,需要大剂量对肿瘤进行治疗,这也使得药物毒副作用显著。因此,通过改变肿瘤细胞死亡途径,从而规避凋亡过程中的内在障碍,并激活细胞免疫原性死亡,从而增强肿瘤免疫治疗对于肿瘤治疗具有重要意义。

[0003] 焦亡,是近年来新发现的一种细胞程序性死亡,细胞焦亡的形态学特征、发生及调控机制等均不同于凋亡、坏死等其他细胞死亡方式^[3]。细胞焦亡主要依靠炎症小体激活 caspase 家族的部分蛋白,使其切割 gasdermin 蛋白,而活化的 gasdermin-N 端转位到细胞膜上,形成孔洞,从而使细胞肿胀,胞质外流,最终导致细胞膜破裂^[4]。与凋亡相比,焦亡会不受控制地释放细胞内源物(如乳酸脱氢酶、炎症因子等)促使细胞发生免疫原性死亡,从而进一步激活天然免疫,更重要得是焦亡也不会引起凋亡相关的耐药性。因此,在肿瘤治疗中,具有免疫刺激功能的焦亡被认为是一种优越的程序性细胞死亡途径。

[0004] 与手术、化疗等传统肿瘤治疗方法相比,光动力疗法(Photodynamic therapy, PDT)作为一种创伤和毒副作用小、能在时间及空间上精确可控的肿瘤治疗方法一直倍受关注^[5]。富集在肿瘤组织的光敏剂在特定波长辐射能作用下,能够将能量充分地传递给临近的三线态氧(3O_2),产生高反应活性的单线态氧(1O_2)或者生成羟基自由基($\cdot OH$)和超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)等活性氧。这些活性氧的强氧化性可使细胞蛋白、DNA、细胞膜等遭到破坏,引发肿瘤细胞死亡、杀死肿瘤^[6]。而在 PDT 过程中,光敏剂受激光产生的活性氧寿命极短(如 20~40ns),扩散距离短,因而有效作用范围窄(如 20-100nm),只能对产生 ROS 部位附近区域的细胞成分造成损伤^[7]。因此迫切需要使光敏剂在肿瘤细胞内对重要亚细胞器(如溶酶体、线粒体、内质网等)具有优异的靶向性,从而显著提高 PDT 的疗效。此外,ROS 也是激活炎症小体并引发焦亡的重要因素,而重要细胞器在执行细胞死亡通路中扮演着重要的角色,因此设计合成一系列具有细胞器靶向的光敏剂对于改变细胞死亡途径、提高肿瘤光动力治疗效率及增强肿瘤免疫治疗具有重要意义。而在目前临床治疗中,光敏剂 PDT 治疗主要导致细胞凋亡,还未见报道现有光敏剂是以促细胞焦亡途径进行治疗。

[0005] 参考文献

[0006] (1) Siegel, R.; Ma, J.; Zou, Z.; Jemal, A., Cancer statistics, 2014. CA Cancer J

Clin 2014,64,9-29.

[0007] (2) Li, Z.; Jiang, J.; Wang, Z.; Zhang, J.; Xiao, M.; Wang, C.; Lu, Y.; Qin, Z., Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. *Cancer Res* 2008,68,8687-8694.

[0008] (3) Wang, Y.Y.; Liu, X.L.; Zhao, R., Induction of Pyroptosis and Its Implications in Cancer Management. *Front Oncol* 2019,9,971.

[0009] (4) Chen, X.; He, W.T.; Hu, L.; Li, J.; Fang, Y.; Wang, X.; Xu, X.; Wang, Z.; Huang, K.; Han, J., Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell Res* 2016,26,1007-1020.

[0010] (5) Li, M.; Shao, Y.; Kim, J.H.; Pu, Z.; Zhao, X.; Huang, H.; Xiong, T.; Kang, Y.; Li, G.; Shao, K.; Fan, J.; Foley, J.W.; Kim, J.S.; Peng, X. Unimolecular photodynamic O₂-economizer to overcome hypoxia resistance in phototherapeutics. *J. Am. Chem. Soc.* 2020,142,5380-5388.

[0011] (6) Jiang, J.; Qian, Y.; Xu, Z.; Lv, Z.; Tao, P.; Xie, M.; Liu, S.; Huang, W.; Zhao, Q., Enhancing singlet oxygen generation in semiconducting polymer nanoparticles through fluorescence resonance energy transfer for tumor treatment. *Chem Sci* 2019,10,5085-5094.

[0012] (7) Han, K.; Lei, Q.; Wang, S.B.; Hu, J.J.; Qiu, W.-X.; Zhu, J.Y.; Yin, W.-N.; Luo, X.; Zhang, X.Z., Dual-Stage-Light-Guided tumor inhibition by mitochondria-targeted photodynamic therapy. *Advanced Functional Materials* 2015,25,2961-2971.

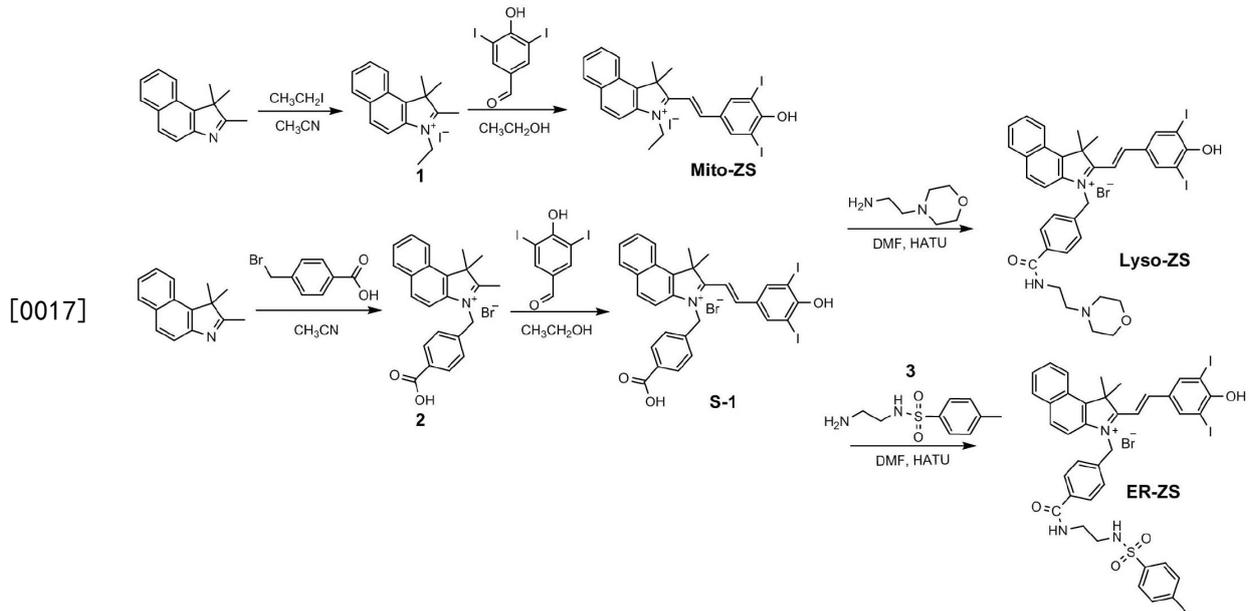
发明内容

[0013] 本发明所要解决的技术问题是提供一类具有不同细胞器靶向且可激活肿瘤细胞焦亡的光敏剂及其制备方法。并且进一步提供其在小鼠活体肿瘤治疗中的应用,由于上述光敏剂具有激活肿瘤细胞焦亡的功能,从而不仅对原位瘤具有较好的PDT疗效,还激活了机体天然免疫,实现对远端瘤的抑制。

[0014] 所述不同细胞器靶向且可激活肿瘤细胞焦亡的光敏剂以菁类染料为荧光团母体,并通过重原子修饰使其具有光照下生成活性氧的能力,并利用线粒体内膜的负电性,设计合成出亲脂性阳离子分子实现线粒体靶向;选用对溶酶体具有高度靶向的基团(氨基吗啉)对分子进行修饰,实现溶酶体靶向;选用对内质网具有高度靶向的基团(对甲基苯磺酰胺)对分子进行修饰,实现内质网靶向。所述不同细胞器靶向且可激活肿瘤细胞焦亡的光敏剂的结构式如下所示:



[0016] 所述不同细胞器靶向且可激活肿瘤细胞焦亡的光敏剂分别记为Mito-ZS(线粒体靶向)、Lyso-ZS(溶酶体靶向),ER-ZS(内质网靶向)。上述光敏剂的制备方法以及反应式如下:



[0018] 1.Mito-ZS(线粒体靶向)光敏剂的合成路线:

[0019] (1) 化合物1的合成:将2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶与碘乙烷溶于乙腈中,在80-100℃回流20-24小时;反应结束后,冷却至室温,将沉淀过滤,并用乙醚冲洗沉淀,干燥后得到化合物1。

[0020] 基于以上技术方案,优选的,所述2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶与碘乙烷的摩尔比为1:1-1.5,优选为1:1.2,例如:2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶为1eq.,碘乙烷为1-1.5eq.。

[0021] 基于以上技术方案,优选的,所述2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶与乙腈的比例为17mmol:15-20mL,优选为17mmol:15mL。

[0022] (2) 化合物Mito-ZS的合成:将上步所得化合物1与3,5-二碘-4-羟基苯甲醛溶于乙醇中,并滴入吡啶,室温反应20-24小时;反应结束后,将沉淀过滤,并用冰无水乙醇冲洗沉淀,干燥后得到化合物Mito-ZS。

[0023] 基于以上技术方案,优选的,所述化合物1与3,5-二碘-4-羟基苯甲醛的摩尔比为1:1-1.5,优选为1:1.2,例如:化合物1为1eq.,3,5-二碘-4-羟基苯甲醛为1.2eq.。

[0024] 基于以上技术方案,优选的,所述化合物1与乙醇的比例关系为0.82mmol:15-

20mL, 优选为0.82mmol:16mL。

[0025] 基于以上技术方案, 优选的, 所述哌啶的用量为乙醇体积的0.5%-1%。

[0026] 2. Lyso-ZS(溶酶体靶向)光敏剂的合成路线:

[0027] (1) 化合物2的合成: 将2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶与对溴甲基苯甲酸溶于乙腈中, 在80-100℃回流过夜; 反应结束后, 冷却至室温, 将沉淀过滤, 并用冷丙酮冲洗沉淀, 干燥后得到化合物2。

[0028] 基于以上技术方案, 优选的, 所述2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶与对溴甲基苯甲酸的摩尔比为1:1-1.5, 优选为1:1.1, 例如: 2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶为1eq., 碘乙烷为1.1eq.。

[0029] 基于以上技术方案, 优选的, 所述2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吡啶与乙腈的比例关系为5.08mmol:20-25mL, 优选为5.08mmol:24mL。

[0030] (2) 化合物S-1的合成: 将上步所得化合物2与3,5-二碘-4-羟基苯甲醛溶于乙醇中, 并滴入哌啶, 室温反应20-24小时; 反应结束后, 将沉淀过滤, 并用冰无水乙醇冲洗沉淀, 干燥后得到化合物S-1。

[0031] 基于以上技术方案, 优选的, 所述化合物2与3,5-二碘-4-羟基苯甲醛的摩尔比为1:1-1.5, 优选为1:1.2, 例如: 化合物1为1eq., 3,5-二碘-4-羟基苯甲醛为1.2eq.。

[0032] 基于以上技术方案, 优选的, 所述化合物2与乙醇的比例为0.47mmol:10-15mL, 优选为0.47mmol:10mL。

[0033] 基于以上技术方案, 优选的, 所述哌啶的用量为乙醇体积的0.5%-1%。

[0034] (3) 化合物Lyso-ZS的合成: 先将化合物S-1、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 再加入N,N-二异丙基乙胺(DIPEA), 室温搅拌1-2小时后, 再加入N-(2-氨基乙基)吗啉并室温反应3-6小时。反应结束后, 减压旋蒸除去溶剂, 并利用硅胶柱提纯得出终产物化合物Lyso-ZS。

[0035] 基于以上技术方案, 优选的, 化合物S-1、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯、N,N-二异丙基乙胺与N-(2-氨基乙基)吗啉的摩尔比为1:2:2:1.1; 例如化合物S-1为1eq., 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯为2eq., N,N-二异丙基乙胺为2eq., N-(2-氨基乙基)吗啉为1.1eq.。

[0036] 基于以上技术方案, 优选的, 所述化合物S-1与N,N-二甲基甲酰胺的比例为0.13mmol:3-5mL, 优选为0.13mmol:5mL。

[0037] 3. ER-ZS(内质网靶向)光敏剂的合成路线:

[0038] (1) 化合物3的合成: 将乙二胺溶于二氯甲烷中, 并将溶于二氯甲烷中的对甲苯磺酰氯在1-2小时内逐滴滴入反应体系, 室温反应20-24小时; 反应结束后, 减压旋蒸除去二氯甲烷, 并利用硅胶柱提纯得出终产物化合物3。

[0039] 基于以上技术方案, 优选的, 乙二胺与对甲苯磺酰氯的摩尔比为2-10:1, 优选为5:1, 例如乙二胺为5eq., 对甲苯磺酰氯为1eq.。

[0040] 基于以上技术方案, 优选的, 乙二胺与溶于乙二胺的二氯甲烷的比例为25mmol:90-120mL, 优选为25mmol:100mL; 对甲苯磺酰氯与溶于对甲苯磺酰氯的二氯甲烷的比例为5mmol:15-20mL, 优选为5mmol:20mL。

[0041] (2) 化合物ER-ZS的合成: 先将化合物S-1、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四

甲基脒六氟磷酸酯(HATU)溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF),再加入N,N-二异丙基乙胺(HATU),室温搅拌1-2小时后,再加入化合物3并室温反应3-6小时;反应结束后,减压旋蒸除去溶剂,并利用硅胶柱提纯得出终产物化合物ER-ZS。化合物S-1为Lyso-ZS(溶酶体靶向)的合成路线中制备的化合物S-1。

[0042] 基于以上技术方案,优选的,化合物S-1、2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯、N,N-二异丙基乙胺与化合物3的摩尔比为1:2:2:1.1,例如化合物S-1为1eq.,2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯为2eq.,N,N-二异丙基乙胺为2eq.,N-(2-氨基乙基)吗啉为1.1eq.。

[0043] 基于以上技术方案,优选的,化合物S-1与N,N-二甲基甲酰胺的比例为0.13mmol:3-5mL,优选为0.13mmol:5mL。

[0044] 本发明还涉及保护上述光敏剂在肿瘤治疗中的应用,尤其是在光动力肿瘤治疗中的应用,所述肿瘤为宫颈癌、乳腺癌、肝癌等。

[0045] 本发明的有益效果是:

[0046] 1) 光敏剂的合成步骤少,且原料经济,后处理过程相对简单;

[0047] 2) 本发明合成的三例光敏剂在580nm激光照射下,可在620nm处具有最大荧光发射,因此可与商用细胞器靶向荧光探针在细胞内共孵育通过激光共聚焦荧光显微镜确定细胞器靶向定位能力。上述三例光敏剂在肿瘤细胞中与商用线粒体、溶酶体、内质网荧光探针的共定位系数分别为0.96、0.84与0.87,表明上述光敏剂分别对不同细胞器具有优异的靶向性能;

[0048] 3) 本发明合成的三例光敏剂在580nm激光照射下,可有效的在溶液中或在细胞内生成单线态氧,并且不同细胞器靶向光敏剂可以对肿瘤细胞造成不同程度焦亡,有效改变细胞常规凋亡途径;

[0049] 4) 本发明合成的三例光敏剂在PDT过程中引发的焦亡具有促进机体免疫功能,在小鼠活体肿瘤治疗中不仅对原位瘤具有显著治疗效果,同时还对于未进行PDT治疗的远端瘤也具有显著抑制。故而,本发明所述光敏剂通过对肿瘤细胞内细胞器精准靶向治疗,激活细胞焦亡通路,使光动力治疗与免疫治疗策略完美结合,在癌症治疗领域具有广阔的应用前景。

附图说明

[0050] 图1是在二甲基亚砜(DMSO)介质中,实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS的紫外光谱图。

[0051] 图2是在DMSO介质中,实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS的荧光发射谱图。

[0052] 图3是在含有1,3-二苯基苯并咪唑(DPBF,单线态氧探针)的不同细胞器靶向光敏剂(实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS)溶液中,在415nm处的吸收值与光照时间的关系。

[0053] 图4是在单纯含2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA,活性氧荧光探针)的不同细胞器靶向光敏剂(实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS)水溶液中,在525nm的荧光强度与光照时间的关系。

[0054] 图5是将三例不同细胞器靶向光敏剂实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS以及不同商用细胞器靶向染料分别与Hela细胞共孵育成像图(标尺尺寸:20 μ m),以及Mito-ZS与商用线粒体定位染料共定位系数,Lyso-ZS与商用溶酶体定位染料共定位系数,ER-ZS与商用内质网定位染料共定位系数。

[0055] 图6是在4T1细胞内,利用2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA,活性氧荧光探针)对光照后三例光敏剂(实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS)产生 1O_2 的检测图(标尺尺寸:20 μ m)。

[0056] 图7是本发明三例光敏剂(实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS) PDT治疗后4T1以及Hela细胞的形态学变化图(标尺尺寸:20 μ m)。

[0057] 图8是通过MTT测试本发明所述三例光敏剂(实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS)对4T1细胞的暗毒以及光毒性。图9是本发明三例光敏剂(实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS)对4T1细胞PDT治疗后上清液中乳酸脱氢酶(LDH)含量的影响。

[0058] 图10是用Western Blot法检测本发明三例光敏剂(实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS)对4T1细胞PDT治疗后细胞GSDMD及其裂解产物GSDMD-N端的表达。

[0059] 图11是通过流式细胞术测定不同光敏剂(实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS)加光照处理的癌细胞对树突细胞的影响。

[0060] 图12是利用不同光敏剂(实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS)对荷瘤小鼠进行光动力治疗后14天原位瘤生长情况。

[0061] 图13是利用不同光敏剂(实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS)对荷瘤小鼠的原位瘤进行光动力治疗后14天远端瘤生长情况。

[0062] 图14是利用不同光敏剂(实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS)对荷瘤小鼠进行光动力治疗14后天取每组小鼠肿瘤对比照片。

[0063] 图15是利用不同光敏剂(实施例1制备的化合物Mito-ZS、实施例2制备的化合物Lyso-ZS,实施例3制备的化合物ER-ZS)对每组小鼠治疗后的心、肝、脾、肺、肾等组织进行HE切片染色的影响。

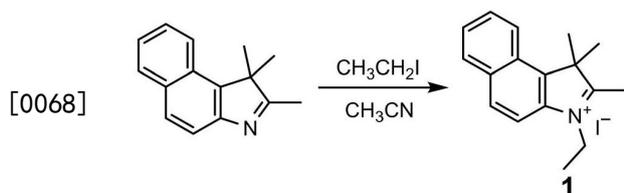
具体实施方式

[0064] 下面结合实施例和附图对本发明做进一步的详细说明。

[0065] 实施例1

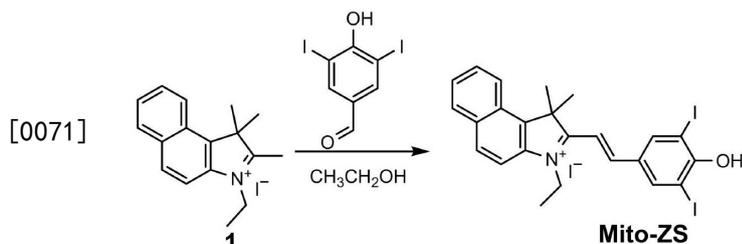
[0066] 线粒体靶向光敏剂Mito-ZS的制备:

[0067] (1)化合物1的合成



[0069] 将2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吲哚 (3.57g, 17mmol) 与碘乙烷 (3.21g, 20.6mmol) 溶于15mL乙腈中, 在90℃下回流过夜。用TCL板检测反应, 反应完全后, 冷却至室温后将沉淀过滤, 并用乙醚冲洗沉淀3次, 干燥后得到化合物1, 产率81.18%。

[0070] (2) 化合物Mito-ZS的合成

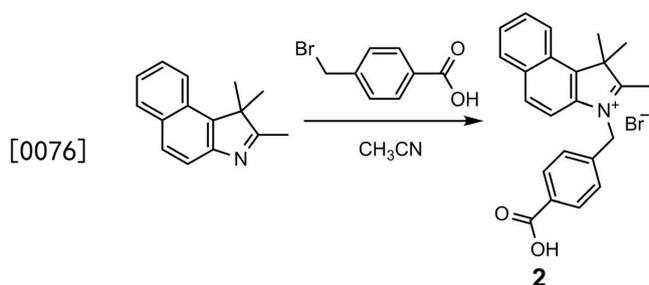


[0072] 将化合物1 (300mg, 0.82mmol) 与3,5-二碘-4-羟基苯甲醛 (368mg, 0.98mmol) 溶于16mL无水乙醇中, 并滴入3滴哌啶 (150μL)。室温反应过夜, 反应结束后, 将沉淀过滤, 并用冰无水乙醇冲洗沉淀3次, 干燥后得到化合物Mito-ZS, 产率50%。

[0073] 实施例2

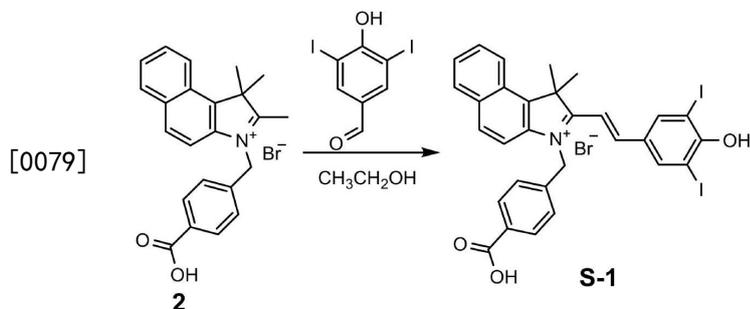
[0074] 溶酶体靶向光敏剂Lyso-ZS的制备:

[0075] (1) 化合物2的合成



[0077] 将2,3,3-三甲基-3H-苯并[g]吲哚 (1.06g, 5.08mmol) 与对溴甲基苯甲酸 (1.21g, 5.59mmol) 溶于24mL乙腈中, 在85℃下回流过夜。用TCL板检测反应, 反应完全后, 冷却至室温后将沉淀过滤, 并用冷丙酮冲洗沉淀3次, 干燥后得到化合物2, 产率40%。

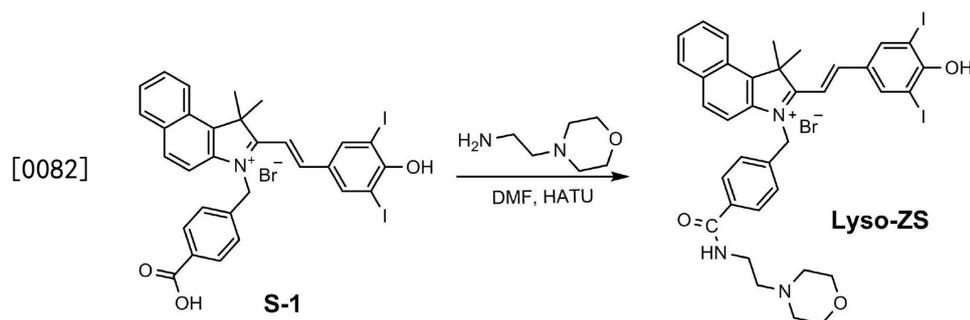
[0078] (2) 化合物S-1的合成



[0080] 将化合物2 (200mg, 0.47mmol) 与3,5-二碘-4-羟基苯甲醛 (211mg, 0.56mmol) 溶于10mL无水乙醇中, 并滴入3滴哌啶 (150μl)。室温反应过夜, 反应结束后, 将沉淀过滤, 并用冰

无水乙醇冲洗沉淀3次,干燥后得到化合物S-1,产率51%。

[0081] (3) 化合物Lyso-ZS的合成

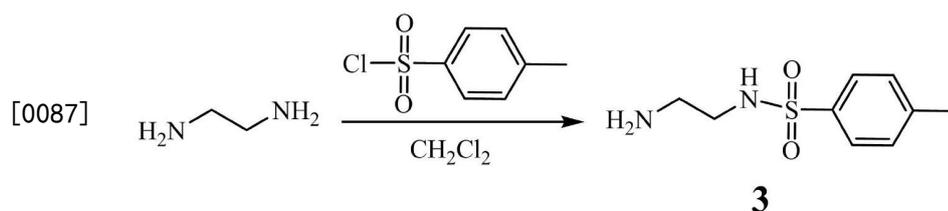


[0083] 将化合物S-1 (100mg, 0.13mmol) 与2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(99mg, 0.26mmol)溶于5mLN,N-二甲基甲酰胺中,再加入N,N-二异丙基乙胺(48 μ L, 0.26mM),室温搅拌1h后,再加入N-(2-氨基乙基)吗啉(21 μ L, 0.14mmol)并室温反应4h。反应结束后,减压旋蒸除去溶剂,并利用硅胶柱提纯得出终产物化合物Lyso-ZS,产率49%。

[0084] 实施例3

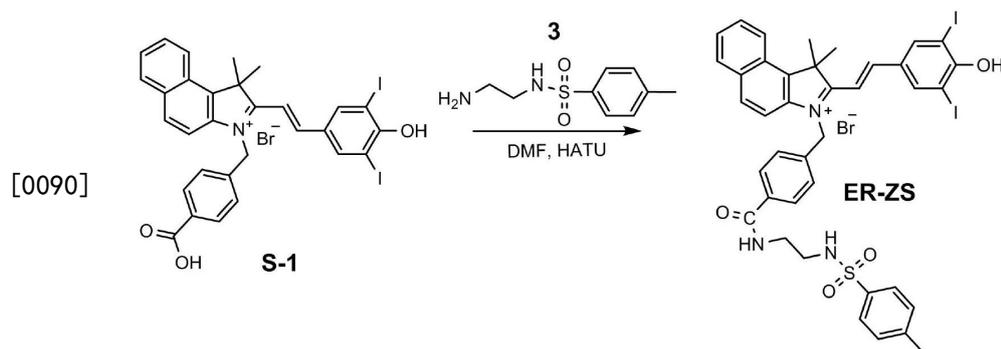
[0085] 内质网靶向光敏剂ER-ZS的制备:

[0086] (1) 化合物3的合成



[0088] 将乙二胺(1.5g, 25mmol)溶于100mL二氯甲烷中,再将对甲苯磺酰氯(0.953g, 5mmol)溶于20mL二氯甲烷中并用恒速漏斗在2小时内滴入反应体系中,室温过夜反应。反应结束后,减压旋蒸除去二氯甲烷,并利用硅胶柱提纯得出终产物化合物3,产率79%。

[0089] (2) 化合物ER-ZS的合成



[0091] 将化合物S-1 (100mg, 0.13mmol) 与2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(99mg, 0.26mmol)溶于5mL N,N-二甲基甲酰胺中,再加入N,N-二异丙基乙胺(48 μ L, 0.26mM),室温搅拌1小时后,再加入化合物3(21 μ L, 0.14mmol)并室温反应4小时。反应结束后,减压旋蒸除去溶剂,并利用硅胶柱提纯得出终产物化合物ER-ZS,产率47%。

[0092] 实施例4

[0093] 不同细胞器靶向光敏剂的紫外、荧光光谱测试

[0094] (1) 实验方法

[0095] 光谱表征具体步骤如下,取适量终产物(实施例1制得的化合物Mito-ZS、实施例2制得的化合物Lyso-ZS、实施例3制得的化合物ER-ZS)溶于二甲基亚砜(DMSO)制成浓度为1mM的测试母液备用。从测试母液中吸取30 μ L至PE管,加入DMSO至终体积为3mL,此时浓度为10 μ M。将溶液移至比色皿中,分别在紫外-可见光谱仪及荧光光谱仪上,测试各种不同光敏剂在溶剂中的光谱性质。

[0096] (2) 实验结果

[0097] 紫外光谱结果显示在DMSO介质中,Mito-ZS、Lyso-ZS,ER-ZS具有相似的紫外光谱,其吸收谱带范围为500-625nm,且均在550nm以及580nm有显著的紫外吸收峰(见图1);荧光光谱显示在DMSO介质中,Mito-ZS、Lyso-ZS,ER-ZS在580nm激发下,溶液荧光发射谱带范围为590-750nm,在620nm处有显著荧光发射峰。这一结果表明三例光敏剂具有近红外成像潜能(见图2)。

[0098] 实施例5

[0099] 不同细胞器靶向光敏剂在溶液中生成活性氧测试

[0100] (1) 实验方法

[0101] 分别用1,3-二苯基苯并呋喃(DPBF)、2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)两种探针来分别检测不同光敏剂(实施例1制得的化合物Mito-ZS、实施例2制得的化合物Lyso-ZS、实施例3制得的化合物ER-ZS)产生单线态氧的能力。DPBF的检测步骤是:在比色皿中配备含有一定浓度光敏剂(5 μ M)及DPBF(10 μ M)的溶液(溶剂为二氯甲烷),随后于580nm波长单色光下照射(光功率:10mW/cm²),每隔1min,测定相应紫外吸收光谱。无光敏剂的DPBF的二氯甲烷溶液以及含有光敏剂但无光照的作为阴性对照组。DPBF是利用吸收光谱法检测¹O₂的捕获剂,其特点是在¹O₂存在的溶液体系中,DPBF可被快速氧化,共轭体系被破坏,因而其在415nm处的紫外吸收会大幅降低,利用该现象可定性指示光敏剂在溶液体系中¹O₂的产生效率。

[0102] DCFH-DA的检测步骤:DCFH-DA本身无荧光,但经过水解处理后可变成DCFH。在活性氧存在的条件下,DCFH被氧化生成荧光物质DCF,具有显著的绿色荧光发射。因此,可以根据光照前后,DCF绿色荧光的强度,可定性评价光敏剂产生活性氧的能力。首先取适量DCFH-DA溶于0.5mL乙醇,终浓度为1mM。将其加入至2mL NaOH(1 \times 10⁻²M)溶液中,室温下静置30min使DCFH-DA充分水解成DCFH。在加入10mL PBS(1 \times)使溶液pH调至7.4。在比色杯中配备含有一定浓度的光敏剂(5 μ M)及DCFH(10 μ M)的水溶液,随后将比色杯置于580nm波长单色光下照射(光功率:10mW/cm²),每隔1min,测定溶液荧光发射光谱,通过观察DCFH溶液在525nm处荧光强度的变化判断有无活性氧产生。无光敏剂的DCFH水溶液以及含有光敏剂但无光照的水溶液作为阴性对照组。

[0103] (2) 实验结果

[0104] 在含有DPBF的不同细胞器靶向光敏剂溶液,其在415nm处的吸收值随着光照时间增长,逐渐下降,且三例光敏剂具有相似的下降幅度,表明三例光敏剂具有相同的生成单线态氧能力(见图3)。为了验证三例光敏剂生成活性氧能力一致,进一步选用了DCFH作为活性氧检测探针。在单纯含有DCFH的水溶液,其在525nm的荧光强度几乎不随着光照时间而改变,而含有同样浓度DCFH的不同细胞器靶向光敏剂溶液,随着光照时间增长,其在525nm的

荧光强度逐渐增强,且增长幅度相似,表明生成活性氧能力一致(见图4)。

[0105] 实施例6

[0106] 不同细胞器靶向光敏剂在肿瘤细胞中亚细胞器共定位荧光成像

[0107] 人宫颈癌细胞(HeLa)细胞用含有10%灭活胎牛血清(FBS)、100U/mL链霉素、100U/mL青霉素的DMEM培养基,置于5%CO₂、95%湿度,37℃的培养箱内进行培养。培养瓶HeLa细胞的细胞密度长到90%左右,注意传代培养。

[0108] 小鼠乳腺癌细胞(4T1)用含有10%灭活胎牛血清(FBS)、100U/mL链霉素、100U/mL青霉素的RPMI-1640培养基,置于5%CO₂、95%湿度,37℃的培养箱内进行培养。培养瓶4T1细胞的细胞密度长到90%左右,注意传代培养。

[0109] (1) 实验方法

[0110] 选用HeLa细胞为研究对象。细胞先用不同细胞器靶向光敏剂(实施例1制得的化合物Mito-ZS、实施例2制得的化合物Lyso-ZS、实施例3制得的化合物ER-ZS)(10μM)上述的DMEM培养基培养20min后,加入1μM不同细胞器靶向商业化染料分子(Mito-Tracker Green、Lyso-Tracker Green、ER-Tracker Green购买于Thermo(invitrogen))继续孵育20min之后,用无血清DMEM洗3遍后加入2mL上述新鲜的DMEM培养基,最后置于激光共聚焦下进行成像(FV3000,Olympus)。采集完荧光图像之后,用Image J软件进行叠加或者同区域荧光强度变化对比,进行亚细胞器位置的确定。

[0111] (2) 实验结果

[0112] 将三例不同细胞器靶向光敏剂Mito-ZS、Lyso-ZS、ER-ZS以及不同商用细胞器靶向染料分别与HeLa细胞共孵育成像后,Mito-ZS与商用线粒体定位染料共定位系数为0.96, Lyso-ZS与商用溶酶体定位染料共定位系数为0.84,ER-ZS与商用内质网定位染料共定位系数为0.87。上述结果表明,三例光敏剂可分别精准靶向至细胞内线粒体、溶酶体以及内质网等细胞器(见图5)。

[0113] 实施例7

[0114] 不同细胞器靶向光敏剂在肿瘤细胞中活性氧荧光成像

[0115] 细胞内活性氧检测使用2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA,活性氧荧光探针)来完成。DCFH-DA是一种膜通透性无荧光染料,当其进入细胞内环境,在胞浆内酯酶的水解作用下会被转变为无荧光衍生物DCFH,该极性结构无法正常透过细胞膜,因此被截留在细胞内部。在活性氧的作用下,DCFH被氧化脱氢,转化为强绿色荧光DCF,从而可根据细胞内绿色荧光信号强度判断活性氧产生水平。

[0116] (1) 实验方法

[0117] 取100μL 4T1细胞悬液(1×10^5 个/mL)置于含有2mL上述新鲜的RPMI-1640培养基的共聚焦皿中,37℃、5%CO₂环境下培养24h至对数生长期,随后加入不同细胞器靶向光敏剂(实施例1制得的化合物Mito-ZS、实施例2制得的化合物Lyso-ZS、实施例3制得的化合物ER-ZS)(5μM)与DCFH-DA(10μM)共孵育30min后,弃掉培养液,用无血清RPMI 1640培养基清洗3次除去多余的光敏剂及DCFH-DA染料。加入2mL上述新鲜的RPMI-1640培养基,用特定波长单色光照射5min后,共聚焦显微镜下观察细胞内绿色荧光信号。DCFH-DA激发波长:488nm,荧光发射接收波长:500-530nm.L为用580nm光源光照的简称。

[0118] (2) 实验结果

[0119] 在4T1细胞内,利用活性氧探针DCFH-DA对光照后 1O_2 的产生进行了检测,在活性氧的作用下,DCFH-DA被氧化为强绿色荧光DCF。4T1细胞摄取Mito-ZS、Lyso-ZS,ER-ZS后,利用580nm光源照射5min ($10\text{mW}/\text{cm}^2$)后放置共聚焦荧光显微镜成像,可在细胞内观察到强烈绿色荧光,说明细胞内有大量的 1O_2 产生;而在相同的条件下,无光敏剂组以及含有光敏剂无光照组孵育的4T1细胞内仅能观测到相对微弱的绿色荧光(见图6)。

[0120] 实施例8

[0121] 不同细胞器靶向光敏剂在激活肿瘤细胞焦亡的形态学观察

[0122] (1) 实验方法

[0123] 取100 μL HeLa或者4T1细胞悬液(1×10^5 个/mL)置于含有2mL上述新鲜培养基的共聚焦皿中, 37°C 、5% CO_2 环境下培养24h至对数生长期,随后加入不同细胞器靶向光敏剂(实施例1制得的化合物Mito-ZS、实施例2制得的化合物Lyso-ZS、实施例3制得的化合物ER-ZS)($5\mu\text{M}$)共孵育30min后,弃掉培养液,用无血清培养基清洗3次除去多余的光敏剂。加入2mL上述新鲜培养基,用580nm波长单色光照射10min后,继续放入培养箱孵育1h后,放置共聚焦显微镜下成像,对照组为不加入光敏剂的癌细胞,L为用580nm光源光照的简称。

[0124] (2) 实验结果

[0125] 与正常细胞相比,经过不同细胞器靶向光敏剂PDT治疗后的HeLa或者4T1细胞出现细胞肿胀、显著膜鼓泡(白色箭头),为焦亡特征形态(见图7)。

[0126] 实施例9

[0127] 不同细胞器靶向光敏剂的MTT细胞毒性实验

[0128] (1) 实验方法

[0129] 将4T1细胞以 1×10^5 个/mL密度种植在细胞培养板上,在5% CO_2 、 37°C 培养24h后,换成含有不同量光敏剂(浓度分别为0、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4 μM)的上述培养基,孵育2小时,随后换回正常培养基,用580nm光源照射10min ($40\text{mW}/\text{cm}^2$),细胞再孵育24h,弃掉培养液,每孔加入100 μL MTT溶液(终浓度为0.5mg/mL)在5% CO_2 、 37°C 培养4h。对照组为不加入光敏剂的4T1细胞。

[0130] (2) 实验结果

[0131] 三例光敏剂在测试浓度范围内对细胞无显著暗毒性,但在580nm光源照射10min ($40\text{mW}/\text{cm}^2$)后,对细胞具有显著光毒性,三例光敏剂浓度为 $2\mu\text{M}$ 时对细胞活性抑制可达90%(见图8)。

[0132] 实施例10

[0133] 不同细胞器靶向光敏剂PDT后细胞LDH释放实验

[0134] 乳酸脱氢酶(LDH)是活细胞胞浆内含酶之一。在正常情况下,不能透过细胞膜。当细胞膜出现破损时,LDH可释放至介质中,而焦亡的一个特征就是细胞膜上形成孔洞,因此LDH释放量是焦亡特征指标之一。

[0135] (1) 实验方法

[0136] 将4T1细胞以一定的细胞密度(1×10^5 个/mL)种植在96孔细胞培养板上,在5% CO_2 、 37°C 培养24h后,随后加入不同细胞器靶向光敏剂(实施例1制得的化合物Mito-ZS、实施例2制得的化合物Lyso-ZS、实施例3制得的化合物ER-ZS)($5\mu\text{M}$)共孵育60min后,用无血清培养基清洗3次除去多余的光敏剂。光组用580nm LED灯以 $10\text{mW}/\text{cm}^2$ 的功率密度照射10分钟并放

入培养箱继续孵育12小时后根据所购买的LDH测试试剂盒对上清液中LDH含量进行测定。

[0137] (2) 实验结果

[0138] 与未进行光照治疗的4T1细胞相比,光照组上清液中LDH含量均显著升高,线粒体靶向与内质网靶向光敏剂光照后可导致细胞释放更大量的LDH,表明不同细胞器靶向光敏剂可引发不同程度焦亡(见图9)。

[0139] 实施例11

[0140] 不同细胞器靶向光敏剂PDT后促GSDMD蛋白裂解实验

[0141] GSDMD是细胞焦亡的执行蛋白,活化的caspase可切割GSDMD蛋白N端和C端结构域的连接区,释放具有结合膜磷脂上膜打孔活性的N端结构域,进而破坏细胞膜引发细胞焦亡,因此GSDMD蛋白N端高表达是焦亡发生的直接证明。

[0142] (1) 实验方法

[0143] 将4T1细胞以一定的细胞密度(1×10^5 个/mL)种植在96孔细胞培养板上,在5%CO₂、37°C培养24h后,换成含有5μM不同光敏剂(实施例1制得的化合物Mito-ZS、实施例2制得的化合物Lyso-ZS、实施例3制得的化合物ER-ZS)的上述培养基,孵育1h,随后换回正常培养基,用580nm光源照射10min($40\text{mW}/\text{cm}^2$),2小时后收集在光照或黑暗下用不同光敏剂(Mito-ZS、Lyso-ZS和ER-ZS)处理的4T1细胞并进行Western Blot法检测蛋白表达情况。对照组为不含有光敏剂的4T1细胞,光照组为含有光敏剂且进行580nm光源照射处理的4T1细胞,黑暗组为含有光敏剂但无光照处理的4T1细胞。L为光照的简称。

[0144] (2) 实验结果

[0145] 通过Western Blot法检测本发明三例光敏剂对4T1细胞PDT治疗后细胞GSDMD及其裂解产物GSDMD-N端的表达,GSDMD-N端表达是造成细胞焦亡的直接证明。与未进行光照治疗的4T1细胞相比,光照组中GSDMD蛋白表达下降,并且GSDMD-N表达量显著上升;而未光照组几乎不表达GSDMD-N端,表明三例光敏剂对4T1细胞进行PDT治疗后,均能促进GSDMD蛋白裂解生成GSDMD-N端蛋白并引发焦亡(见图10)。

[0146] 实施例12

[0147] 不同细胞器靶向光敏剂PDT后促树突细胞成熟实验

[0148] 树突状细胞是机体功能最强的专职抗原递呈细胞,它能高效地摄取、加工处理和递呈抗原,未成熟DC具有较强的迁移能力,成熟DC能有效激活初始T细胞,处于启动、调控、并维持免疫应答的中心环节。细胞发生焦亡后,由于细胞内容物外释,细胞发生免疫原性死亡,具有促树突细胞成熟的能力,从而促进机体天然免疫的激活。因此促树突细胞成熟实验是评价促进免疫能力的一个重要指标。

[0149] (1) 实验方法

[0150] 从雌性BALB/c小鼠的股骨和胫骨中分离出小鼠骨髓树突细胞(BMDC)。将红细胞裂解后,将细胞接种到含有10mL 1640培养基(包含有10%FBS、1%青霉素-链霉素、20ng/mL GM-CSF和10ng/mLIL-4)的细胞培养皿中。在37°C下放置6天以获得未成熟的DC细胞。将4T1细胞以 1×10^6 个细胞/孔的密度接种到6孔培养板中,并在37°C下培养。在平板上完全生长后,4T1细胞分别用5μM实施例1制得的化合物Mito-ZS、实施例2制得的化合物Lyso-ZS、实施例3制得的化合物ER-ZS处理1小时,然后用1mL上述新鲜培养基洗涤。用580nm LED灯以 $40\text{mW}/\text{cm}^2$ 的功率密度照射光照组10分钟,并继续培养12小时。对于无光照组作为对照组,本

实验不进行光照,其他步骤与光照组一致。随后,收集上清液并与未成熟的BMDCs共培养24小时。分别用抗CD11c-APC、抗CD80-FITC和抗CD86-PE-Cy5.5抗体(购买于BioLegend(San Diego,CA,USA))染色后,将BMDC洗涤并重新悬浮在含有1%FBS的PBS中用于流式分析。

[0151] (2) 实验结果

[0152] 利用经过三例光敏剂处理的4T1细胞与未成熟树突细胞共孵育,如果细胞发生免疫原性死亡则具有促树突细胞成熟功能从而激活天然免疫。CD80与CD86是树突细胞成熟的标志物,从图中可以看出经过PDT治疗组的促树突成熟能力显著优于对照组,并且线粒体靶向光敏剂(Mito-ZS)与内质网靶向光敏剂(ER-ZS)比溶酶体靶向光敏剂(Lyso-ZS)具有更优的促成成熟能力。表明Mito-ZS与ER-ZS经PDT治疗后具有更为显著的免疫治疗效果(见图11)。

[0153] 实施例13

[0154] 不同细胞器靶向光敏剂对于荷瘤小鼠原位瘤以及远端瘤的治疗应用

[0155] (1) 实验方法

[0156] 选用雌性BALB/c小鼠作为活体治疗模型,严格遵循我国关于实验动物福利和实验动物伦理的相关规定,并经大连理工大学动物伦理审查委员会批准。原位瘤制备:将4T1肿瘤细胞株悬液,以 2×10^6 细胞在8周雌性BALB/c小鼠前右胸部注射,当肿瘤长到 100mm^3 体积时,进行相关的实验。远端瘤制备:在原位瘤肿瘤后7天将4T1肿瘤细胞株悬液,以 1×10^5 细胞在小鼠前左胸部注射。光动力疗效测试:瘤体长到一定体积的小鼠随机分成不同处理组,每组5只。对照组为仅注射PBS水溶液的荷瘤小鼠;未光照组为仅注射光敏剂(实施例1制得的化合物Mito-ZS、实施例2制得的化合物Lyso-ZS、实施例3制得的化合物ER-ZS)但不进行光照治疗的荷瘤小鼠;光照治疗组为原位瘤注射光敏剂(实施例1制得的化合物Mito-ZS、实施例2制得的化合物Lyso-ZS、实施例3制得的化合物ER-ZS),并注射2小时后仅对原位瘤用580nm光源($0.1\text{W}/\text{cm}^2$)照射肿瘤部位20min,连续治疗两天。每两天用卡尺测定原位瘤及远端瘤体积大小,考察光敏剂对体内肿瘤的光动力治疗效果。第14天时,安乐处死小鼠,获得肿瘤、心脏、肝、脾、肺、肾等组织,利用H&E染色分析光敏剂对不同器官的系统毒性,即生物安全性评价。上述所有组注射体积为 $100\mu\text{L}$,光敏剂浓度为 $50\mu\text{M}$ 。L为光照的简称。

[0157] (2) 实验结果

[0158] 对于原位瘤而言,对照组以及未光照治疗组在14天后肿瘤体积生长为初始体积的4倍,而经过PDT治疗后,三例不同细胞器靶向光敏剂对原位瘤具有显著的抑制效果,14天后原位瘤体积几乎没有显著增长(见图12)。对于远端瘤而言,线粒体靶向以及内质网靶向光敏剂治疗组具有最佳的远端瘤抑制效果,这也表明引发更大程度的焦亡可以更为显著的激活机体天然免疫,从而实现对远端瘤的免疫治疗(见图13)。荷瘤小鼠在进行光动力治疗14后天取每组小鼠肿瘤对比照片,可以发现经过PDT治疗的小鼠无论是原位瘤还是远端瘤的体积都远小于对照组以及无光照组的肿瘤体积(见图14)。对每组小鼠治疗后的心、肝、脾、肺、肾等组织进行HE切片染色,所有组的组织切片未发现显著异常,表明本发明所述三例光敏剂在治疗过程中具有较好的生物安全性(见图15)。

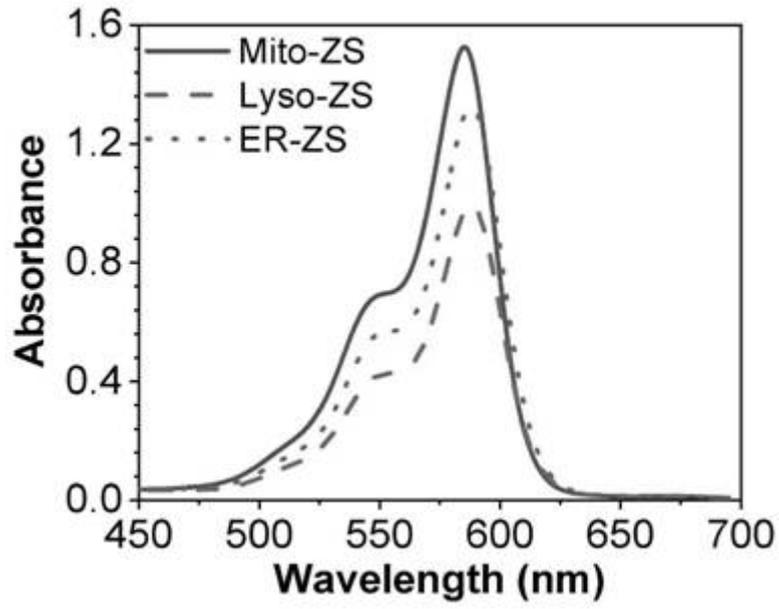


图1

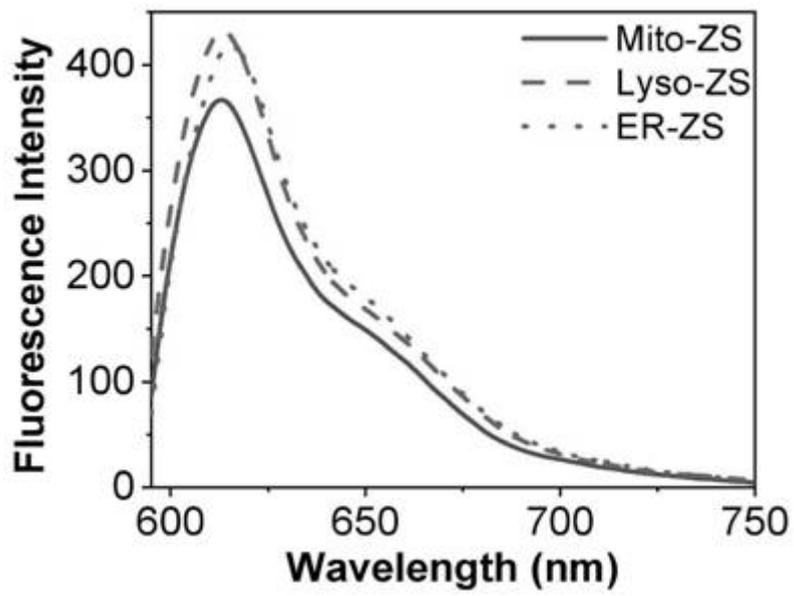


图2

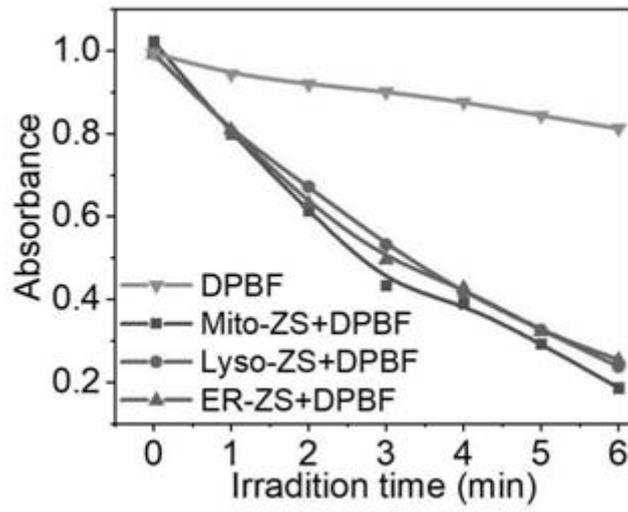


图3

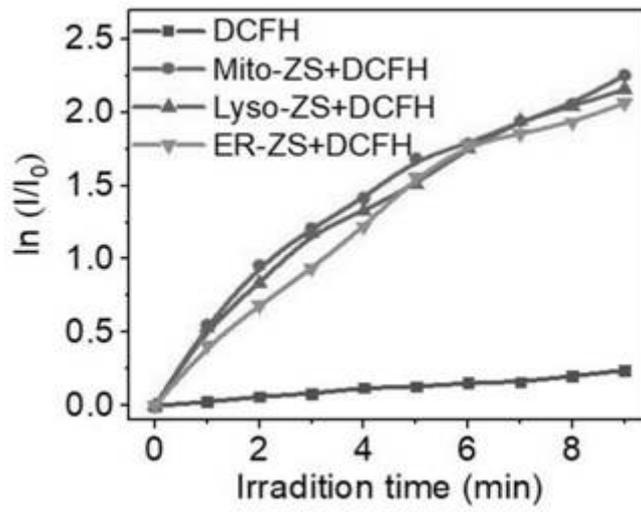


图4

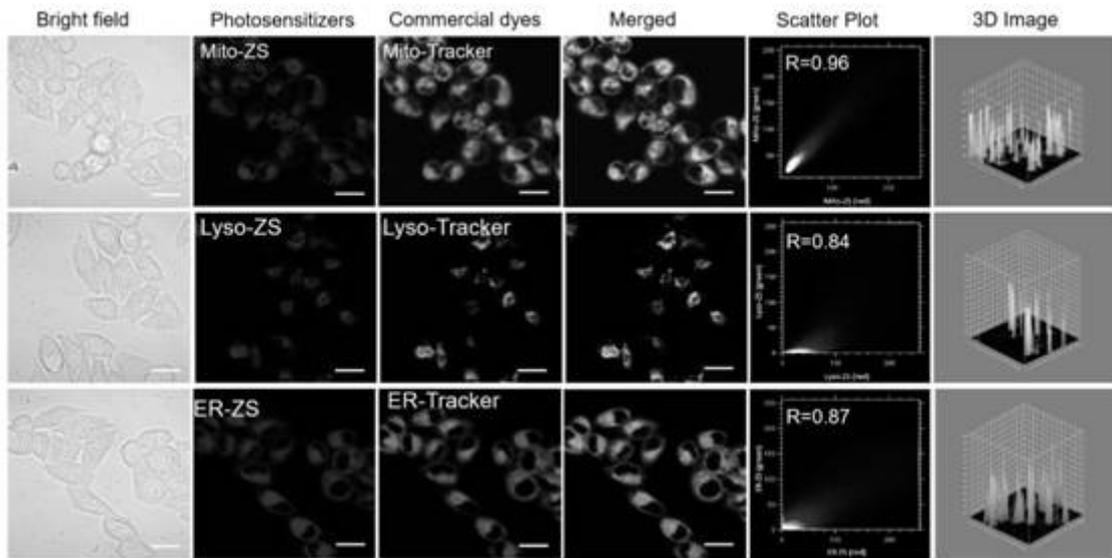


图5

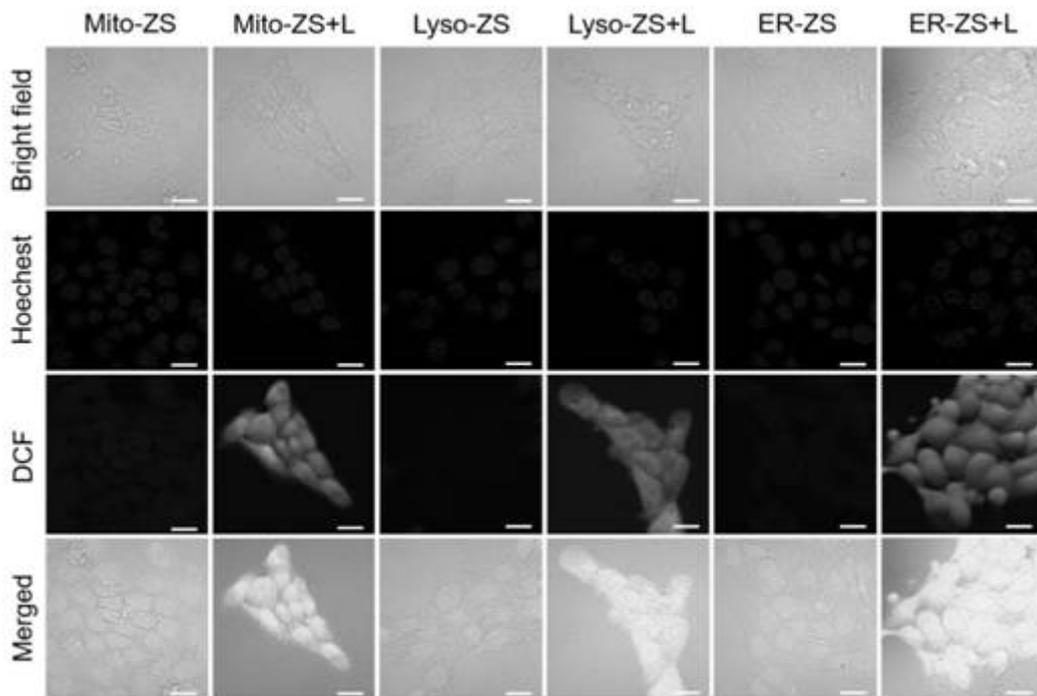


图6

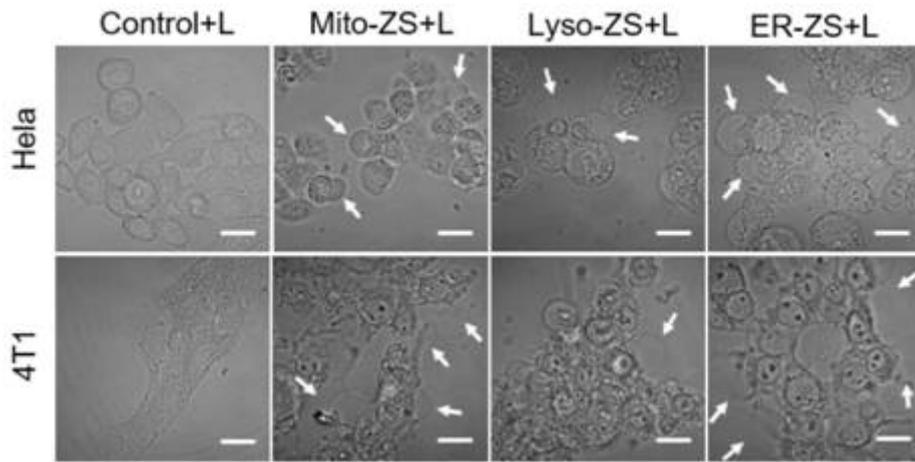


图7

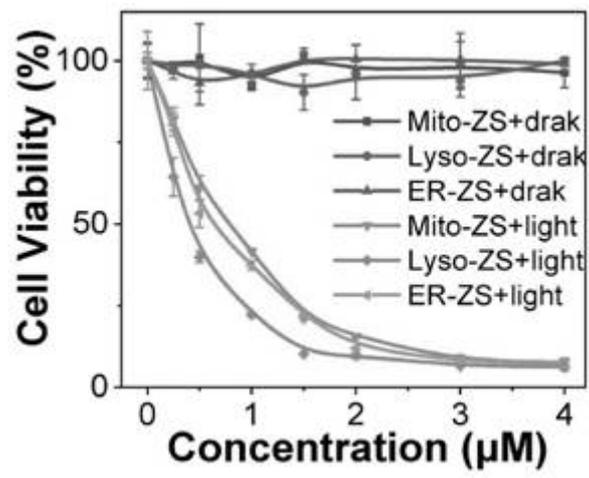


图8

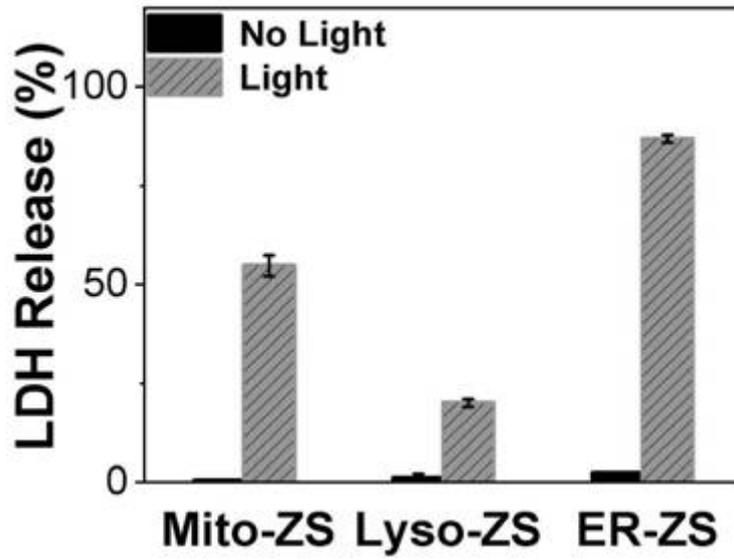


图9

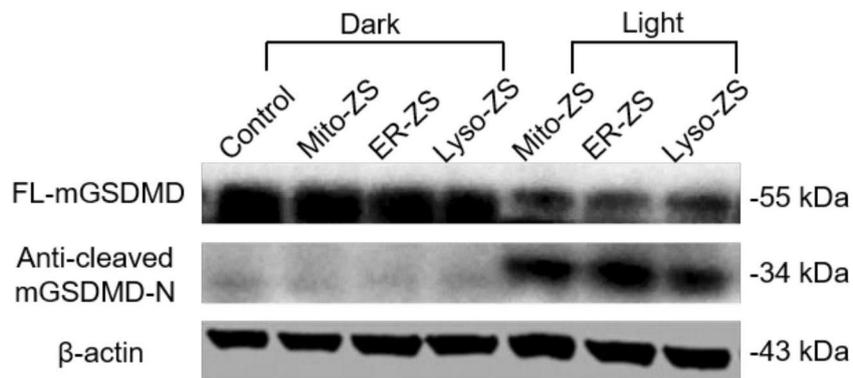


图10

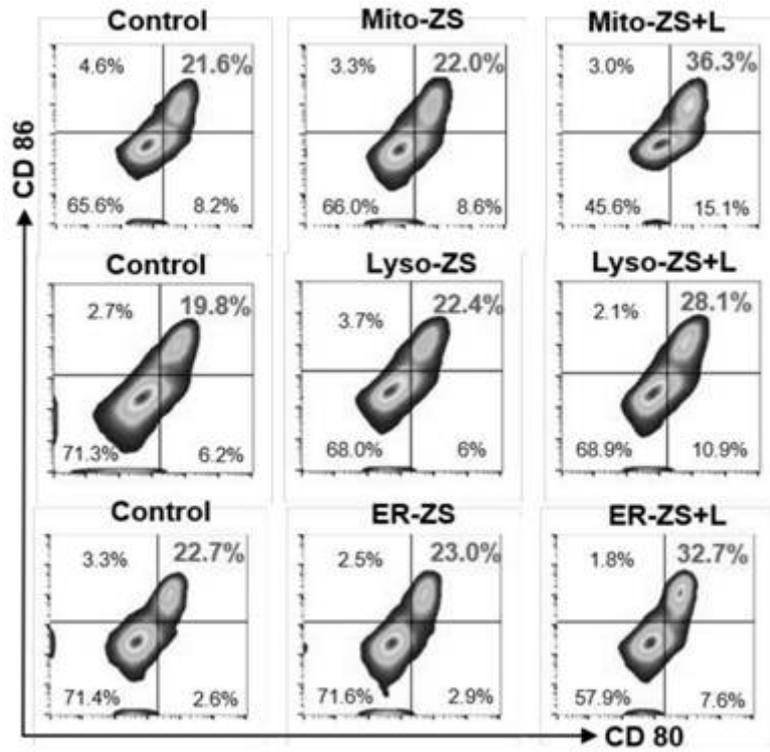


图11

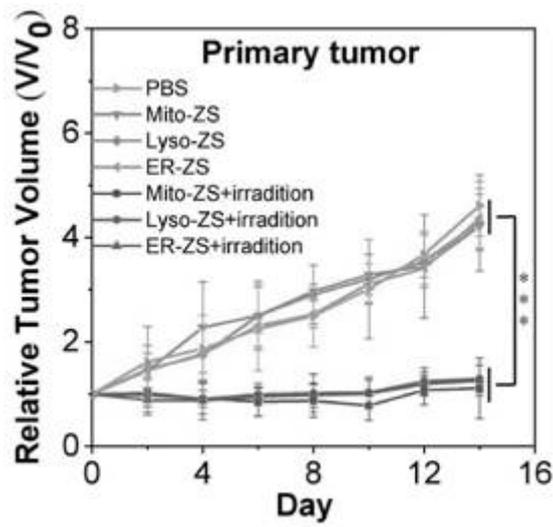


图12

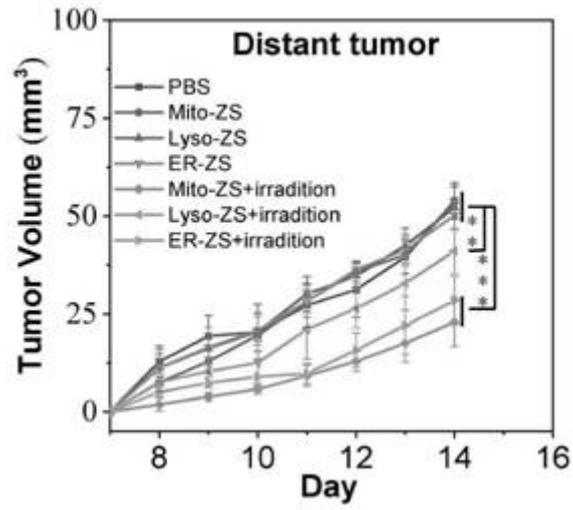


图13

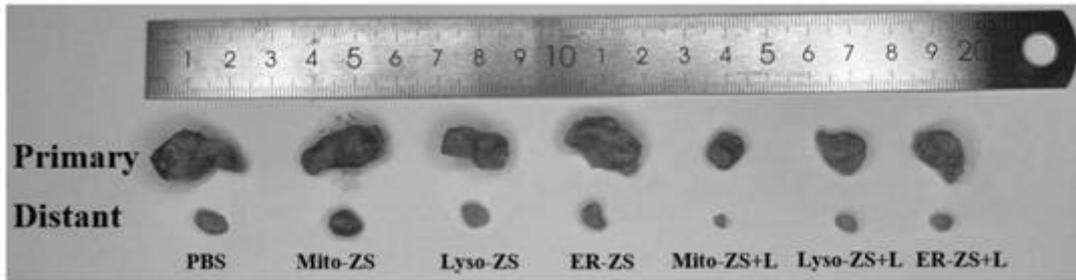


图14

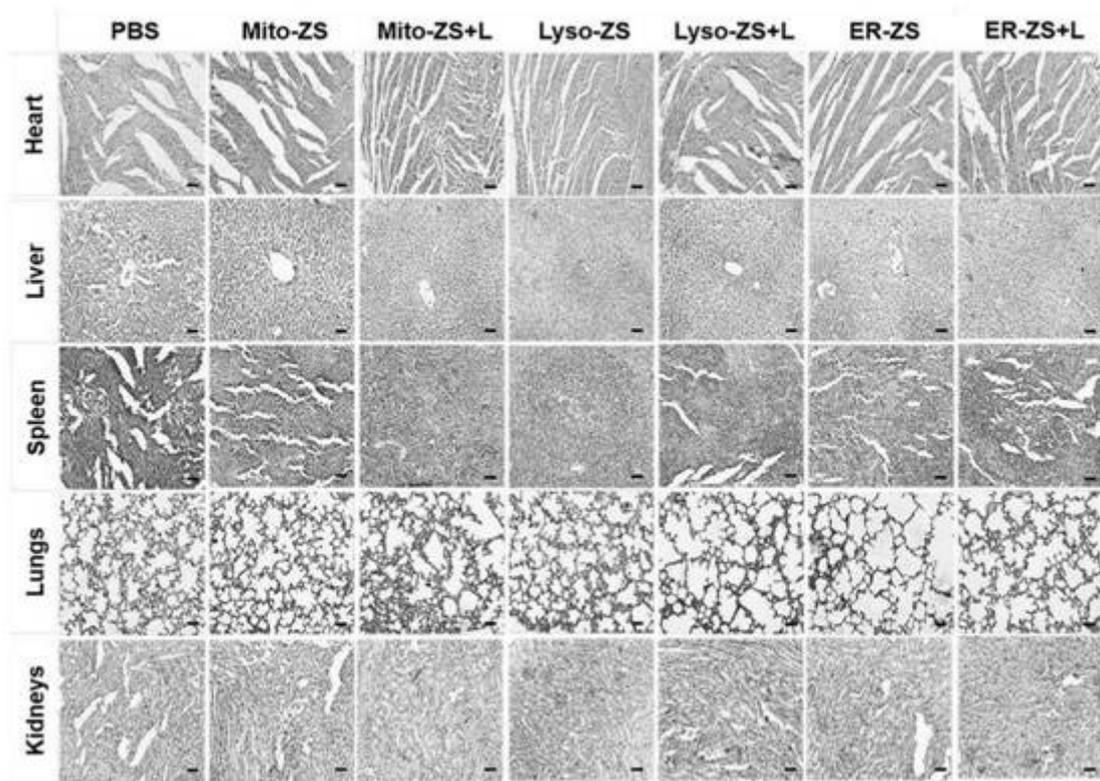


图15