



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107890566 A

(43)申请公布日 2018.04.10

(21)申请号 201711115044.9

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2017.11.13

(71)申请人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号

申请人 中国科学院生物物理研究所

北京大学第三医院

(72)发明人 王凡 李小达 梁晓龙 史继云

贾兵 马晓途 高瀚男 张欣

姚美男 邵楠 张旭 侯睿

(74)专利代理机构 北京国林贸知识产权代理有

限公司 11001

代理人 李瑾 李连生

(51)Int.Cl.

A61K 41/00(2006.01)

A61K 49/22(2006.01)

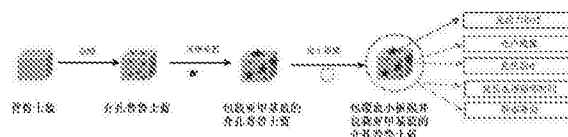
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种肿瘤诊断治疗制剂及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种肿瘤诊断治疗制剂及其制备方法和应用。该制剂内部使用生物相容性好的介孔普鲁士蓝纳米粒子吸附光动力药物，表面包覆具有肿瘤靶向功能的血小板膜。该材料使用的介孔普鲁士蓝纳米粒子可以用于光声成像，在实时监测诊疗制剂的同时，通过近红外激光照射产生能量从而提高温度杀伤肿瘤细胞，进行光热治疗。同时，吸附的光动力药物还可以实现光动力治疗的功能。而纳米粒子表面包覆的血小板膜可以显著提高对肿瘤组织的识别力，实现靶向肿瘤的功能。此外，该纳米诊断治疗制剂的生物安全性高，对肿瘤的靶向性好，制备的方法简单、成本低廉、重复性好，将其用于肿瘤的诊断和治疗领域具有广阔的应用前景。



1. 一种肿瘤诊断治疗制剂,其特征在于:所述制剂中包括复合纳米粒子,所述复合纳米粒子包括介孔普鲁士蓝纳米粒子、介孔普鲁士蓝纳米粒子吸附的光动力治疗药物、及介孔普鲁士蓝纳米粒子表面包覆的血小板膜。

2. 根据权利要求1所述的肿瘤诊断治疗制剂,其特征在于:所述的制剂同时具有光声成像、光动力治疗及光热治疗功能。

3. 根据权利要求1所述的肿瘤诊断治疗制剂,其特征在于:所述的复合纳米粒子在波长为500-1100 nm的近红外区域具有强吸收。

4. 根据权利要求1所述的肿瘤诊断治疗制剂,其特征在于:所述的介孔普鲁士蓝的吸收波长在500-1100 nm。

5. 根据权利要求1所述的肿瘤诊断治疗制剂,其特征在于:所述的介孔普鲁士蓝纳米粒子的粒径范围在10-1000 nm之间。

6. 根据权利要求1所述的肿瘤诊断治疗制剂,其特征在于:所述的光动力治疗药物包括亚甲基蓝,血卟啉衍生物,porfimersodium,verteporfin和5-氨基酮戊酸。

7. 权利要求1所述的肿瘤诊断治疗制剂的制备方法,其特征在于:其中复合纳米粒子的制备包括以下步骤:

1) 通过水热方法制备聚乙烯吡咯烷酮修饰的普鲁士蓝纳米粒子及介孔普鲁士蓝纳米粒子:

将聚乙烯吡咯烷酮与 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶于强酸溶液中,搅拌得澄清溶液,将溶液密封后放入水浴中反应,得深蓝色液体,离心清洗后放入冷冻干燥机内冻干成冻干粉,即为聚乙烯吡咯烷酮修饰的普鲁士蓝纳米粒子晶体;将聚乙烯吡咯烷酮修饰的普鲁士蓝纳米粒子晶体、聚乙烯吡咯烷酮溶于强酸溶液中,搅拌后,放入高压反应釜中,再将反应釜放入烘箱中,在高温下反应,取出后冷却至室温,离心清洗后放入冷冻干燥机内冻干成冻干粉,即为介孔普鲁士蓝纳米粒子;

2) 吸附光动力治疗药物:使用步骤1)所得的介孔普鲁士蓝纳米粒子在室温下使用吸附方法包载光动力治疗药物,得到吸附光动力学药物的介孔普鲁士蓝纳米粒子,并去除未包载的光动力治疗药物;

3) 包覆血小板膜:提取动物的血液,经梯度离心方法提取其中的血小板膜;经反复冻融法和超声法使血小板膜均匀包覆在步骤2)所得的吸附光动力学药物的介孔普鲁士蓝纳米粒子表面,从而制得所述复合纳米粒子。

8. 根据权利要求1所述的肿瘤诊断治疗制剂的制备方法,其特征在于:步骤1)中所述强酸包括但不限于盐酸、硝酸、硫酸、磷酸;步骤2)所使用的光动力药物包括但不限于亚甲基蓝及血卟啉,所使用的去除未包载的光动力治疗药物的方法包括但不限于透析、超滤管超滤、超滤膜超滤;步骤3)所使用的动物包括但不限于大鼠、小鼠、兔子、豚鼠;所使用的超声法包括但不限于水浴超声和探头超声。

9. 权利要求1所述的肿瘤诊断治疗制剂的应用,其特征在于:所述的制剂应用于光声成像、光动力治疗及光热治疗。

10. 根据权利要求9所述的肿瘤诊断治疗制剂的应用,其特征在于:光热治疗和光动力治疗中所用激光的波长范围在 500-1100 nm之间。

一种肿瘤诊断治疗制剂及其制备方法和应用

[0001] 技术领域 本发明涉及生物医用材料技术领域,尤其涉及肿瘤诊断治疗制剂技术领域,具体涉及一种肿瘤诊断治疗制剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 肿瘤疾病严重危及人类生命安全,影响病人生存质量,是一种尚未完全攻克的致死性疾病,随着全球老龄化社会的来临,对于肿瘤治疗的需求也在逐渐增加。近年来对于肿瘤治疗的研究已经成为材料化学、生物物理学、药学、放射医学、医学影像学等学科的热点研究课题,但其临床治疗的效果仍然并不理想。为了更好的治疗肿瘤,有必要应用材料学、物理学和生物医学最新的技术方法和设计理念,设计智能化的靶向药物载体,并通过医学影像学的技术成像手段来进行实时检测,并将各种治疗方法取长补短,联合使用以更好的治疗肿瘤。

[0003] 光动力治疗(PDT)是一种临床广泛使用的治疗浅表肿瘤的有效方法,已被证明对于治疗早期的肿瘤如肺癌、食道癌、膀胱癌和皮肤癌等有较好的治疗效果。光动力治疗主要是通过肿瘤部位富集的光敏剂,在可见光照射下产生单线态氧,杀死肿瘤细胞。该方法痛苦小,保护脏器,可以显著改善患者的生活治疗,因此选择光动力方法治疗肿瘤具有巨大的优势。但由于光敏剂需要可见光激活产生单线态氧来杀死肿瘤细胞,而可见光对皮肤的穿透力较弱,因此对于用该方法治疗较大体积的肿瘤的效果较差。为了更好的治疗肿瘤,目前研究较多的是使用近红外激光来激发光热转换材料,通过光热转换材料接受光照后升高温度的方法来加热肿瘤组织,从而治疗肿瘤。其中研究比较广泛的光热转换材料包括碳纳米管、氧化石墨烯、聚吡咯、金纳米棒、金纳米壳、有机染料以及普鲁士蓝纳米粒子等,这些材料可以吸收近红外激光的能量来升高温度,从而杀死肿瘤细胞。而将光热治疗和光动力治疗相联合,可以有效的降少注射药物的剂量,并降低光热治疗和光动力治疗时使用的激光的强度,从而可以更加安全、有效的治疗肿瘤。

[0004] 为了提高药物在肿瘤部位的浓度,降低药物对于人体的毒性,从而实现肿瘤组织的靶向运输并定点杀伤,近年来对药物载体的靶向性研究获得了越来越多的关注。而现在研究较多的如微胶囊、脂质体、聚合物胶束等纳米载体系统普遍存在免疫原性高、载药量较低、药物容易泄漏、靶向功能差以及容易产生聚集等问题。

[0005]

发明内容

[0006] 本发明的目的是为了提供一种具有肿瘤靶向作用、光声成像引导以及光动力治疗和光热治疗联合治疗肿瘤的纳米诊断-治疗联用制剂,解决现有的药物载体通过肿瘤靶向和光声成像引导来治疗肿瘤仍存在诸多不足,肿瘤的治疗过程进行可视化监测,并对肿瘤的治疗效果进行评估,从而提高肿瘤治疗效果。

[0007] 为达到上述目的,本发明的技术方案为:

一种肿瘤诊断治疗制剂,所述制剂中包括复合纳米粒子(一种高效吸附光动力治疗药

物的介孔普鲁士蓝纳米粒子),所述复合纳米粒子包括介孔普鲁士蓝纳米粒子、介孔普鲁士蓝纳米粒子吸附的光动力治疗药物、及介孔普鲁士蓝纳米粒子表面包覆的血小板膜。

[0008] 进一步的,所述的制剂同时具有光声成像、光动力治疗及光热治疗功能;其中的介孔普鲁士蓝纳米粒子用于光声成像及光热治疗功能;其中的介孔普鲁士蓝可以用于包载药物,光声成像及光热治疗。

[0009] 进一步的,所述的复合纳米粒子在波长为500-1100 nm的近红外区域具有强吸收。

[0010] 进一步的,所述的介孔普鲁士蓝的吸收波长在500-1100 nm。

[0011] 进一步的,所述的介孔普鲁士蓝纳米粒子的粒径范围在10-1000 nm之间。

[0012] 进一步的,所述的光动力治疗药物为亚甲基蓝、血卟啉。

[0013] 所述的肿瘤诊断治疗制剂的制备方法,其中复合纳米粒子的制备包括以下步骤:

1)通过水热方法制备聚乙烯吡咯烷酮修饰的普鲁士蓝纳米粒子及介孔普鲁士蓝纳米粒子:

将聚乙烯吡咯烷酮与 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶于强酸溶液中,搅拌得澄清溶液,将溶液密封后放入水浴中反应,得深蓝色液体,离心清洗后放入冷冻干燥机内冻干成冻干粉,即为聚乙烯吡咯烷酮修饰的普鲁士蓝纳米粒子晶体;将聚乙烯吡咯烷酮修饰的普鲁士蓝纳米粒子晶体、聚乙烯吡咯烷酮溶于强酸溶液中,搅拌后,放入高压反应釜中,再将反应釜放入烘箱中,在高温下反应,取出后冷却至室温,离心清洗后放入冷冻干燥机内冻干成冻干粉,即为介孔普鲁士蓝纳米粒子;

2)吸附光动力治疗药物:使用步骤1)所得的介孔普鲁士蓝纳米粒子在室温下使用吸附方法包载光动力治疗药物,得到吸附光动力学药物的介孔普鲁士蓝纳米粒子,并去除未包载的光动力治疗药物;

3)包覆血小板膜:提取动物的血液,经梯度离心方法提取其中的血小板膜;经反复冻融法和超声法使血小板膜均匀包覆在步骤2)所得的吸附光动力学药物的介孔普鲁士蓝纳米粒子表面,从而制得所述复合纳米粒子。

[0014] 进一步的,步骤1)中所述强酸包括但不限于盐酸、硝酸、硫酸、磷酸;步骤2)所使用的光动力药物包括但不限于亚甲基蓝及血卟啉,所使用的去除未包载的光动力治疗药物的方法包括但不限于透析、超滤管超滤、超滤膜超滤;步骤3)所使用的动物包括但不限于大鼠、小鼠、兔子、豚鼠;所使用的超声法包括但不限于水浴超声和探头超声。

[0015] 所述肿瘤诊断治疗制剂应用于光声成像、光动力治疗及光热治疗。光热治疗和光动力治疗中所用激光的波长范围在 500-1100 nm之间。

[0016] 为了克服上述缺点,本发明选用红细胞膜等生物膜结构来修饰纳米粒子以实现肿瘤的靶向治疗,本发明使用血小板膜对纳米粒子进行了表面修饰以制备药物载体,使用血小板膜包被药物载体具有很多独特优势:包被后的载体具有较低的免疫原性,具有较长的血液循环时间,并由于血小板膜上的P-selectin可以特异性的结合肿瘤细胞表面高表达的CD44受体,因此可以实现载体的靶向肿瘤功能。而普鲁士蓝是经过FDA认证的临床上正在使用的解毒剂,具有生物相容性高的特点,并且介孔普鲁士蓝纳米粒子可以高效携带药物,从而可以使用血小板膜来包覆介孔普鲁士蓝,使其成为肿瘤治疗的靶向药物载体。

[0017] 在肿瘤的治疗中,需要对肿瘤组织的位置、形态和结构进行综合分析诊断,而通过医学的成像手段来进行肿瘤的诊断和辅助治疗具有独特的优势。介孔普鲁士蓝纳米粒子是

光声成像的造影剂,使用介孔普鲁士蓝纳米粒子作为药物载体,可以实现光声成像,监测肿瘤治疗的全过程。而介孔普鲁士蓝纳米粒子可以高效吸附小分子药物,因此可以通过介孔普鲁士蓝吸附光动力治疗药物,从而实现光声成像和光动力治疗和光热治疗联合治疗肿瘤的诊疗一体的功能。使用介孔普鲁士蓝纳米粒子吸附光动力治疗药物,并在其表面包覆一层血小板膜,从而实现光声成像引导治疗并随时监测疗效,光动力治疗和光热治疗相结合以靶向治疗肿瘤。

现有的药物载体通过肿瘤靶向和多模态成像引导来治疗肿瘤仍存在诸多不足,而本发明以提高肿瘤治疗效果为目的,构建具有靶向功能的介孔普鲁士蓝纳米粒子药物载体,将光动力治疗和光热治疗相结合以减少对正常组织的损伤,并通过光声成像的医学成像手段,对肿瘤的治疗过程进行可视化监测,并对肿瘤的治疗效果进行评估,从而提高肿瘤治疗效果。

[0018] 本发明的有益效果:

本发明制剂中的复合纳米粒子将具备多种功能,包括光声成像的造影剂功能,将光热治疗与放疗联合,在减少药物剂量及降低光动力治疗和光热治疗所需激光能量的基础上,共同治疗肿瘤的治疗功能,以及具有主动靶向肿瘤部位并延长其在体内的半衰期的功能。

[0019] 本发明的优点之一是所制备的一种高效吸附光动力治疗药物的介孔普鲁士蓝纳米粒子,可以用于光声成像及光热治疗功能,并具有很好的生物安全性。

[0020] 本发明的优点之二是所制备的一种高效吸附光动力治疗药物的介孔普鲁士蓝纳米粒子,用介孔普鲁士蓝纳米粒子吸附光动力治疗药物,光动力治疗药物可以用于光动力治疗。

[0021] 本发明的优点之三是所制备的一种高效吸附光动力治疗药物的介孔普鲁士蓝纳米粒子在纳米粒子表面包覆一层血小板膜,该血小板可以实现载体的靶向肿瘤功能。

[0022] 本发明的优点之四是所制备的一种高效吸附光动力治疗药物的介孔普鲁士蓝纳米粒子具备多种功能,包括光声成像的造影剂功能,将光热治疗与光动力治疗联合,在减少药物注射剂量及降低光热治疗和光动力治疗所需激光能量的基础上,共同治疗肿瘤的治疗功能,以及具有主动靶向肿瘤部位并延长其在体内的半衰期的功能。

附图说明

[0023] 图1是复合纳米粒子的制备示意图;

图2是普鲁士蓝纳米粒子的透射电镜图;

图3是复合纳米粒子的紫外-可见吸收光谱图;

图4是复合纳米粒子的透射电镜图;

图5是复合纳米粒子的体内光声成像图;

图6是复合纳米粒子治疗老鼠的肿瘤大小随时间变化图;

图7是复合纳米粒子治疗老鼠的各个脏器的HE染色图。

具体实施方式

[0024] 本发明提供一种肿瘤诊断治疗制剂,所述制剂中包括复合纳米粒子,所述复合纳米粒子包括介孔普鲁士蓝纳米粒子、介孔普鲁士蓝纳米粒子吸附的光动力治疗药物、及介

孔普鲁士蓝纳米粒子表面包覆的血小板膜。

[0025] 本发明具体实施方式所列举的实施例只用于说明本发明,并不限制本发明的内容。

[0026] 实施例1

本发明的复合纳米粒子(一种高效吸附光动力治疗药物的介孔普鲁士蓝纳米粒子)的制备过程如附图1所示,以介孔普鲁士蓝纳米粒子、光动力治疗药物亚甲基蓝及血小板膜为例进行说明,包括如下步骤:

(1)通过水热方法制备聚乙烯吡咯烷酮修饰的普鲁士蓝纳米粒子及介孔普鲁士蓝纳米粒子:将聚乙烯吡咯烷酮与 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶于强酸溶液中,搅拌得澄清溶液,将溶液密封后放入水浴中反应,得深蓝色液体,离心清洗后放入冷冻干燥机内冻干成冻干粉;将得到的聚乙烯吡咯烷酮修饰的普鲁士蓝纳米粒子晶体,聚乙烯吡咯烷酮溶于强酸溶液中,搅拌后,放入高压反应釜中,再将反应釜放入烘箱中,在高温下反应,取出后冷却至室温,离心清洗后放入冷冻干燥机内冻干成冻干粉。调整制备工艺,使制备的纳米粒子粒径约为200nm,且大小均一,分散性良好。通过透射电子显微镜和扫描电子显微镜确定其形貌和大小,通过动态光散射方法确认其水合半径和表面电位。通过透射电镜对介孔普鲁士蓝纳米粒子的形态和大小进行观察发现其形态为正六面体,粒径为200 nm左右,如附图2所示。

[0027] (2)吸附光动力治疗药物:使用介孔普鲁士蓝纳米粒子包载亚甲基蓝,通过超滤离心管离心过滤方法去除未包载的亚甲基蓝,再用缓冲液冲洗离心后,测出滤出液中的亚甲基蓝在650 nm纳米处的紫外吸收值,再通过亚甲基蓝的标准曲线测定滤液中亚甲基蓝的含量,从而测定纳米粒子包载的亚甲基蓝的浓度;

(3)包覆血小板膜:提取大鼠的血液,经梯度离心方法提取其中的血小板膜,经反复冻融法和水浴超声法使血小板膜均匀包覆在纳米粒子表面,从而制得血小板膜包覆的纳米粒子。

[0028] 实施例2

本发明的高效吸附光动力治疗药物亚甲基蓝的介孔普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂的表征数据如下:

通过水热法制备了聚乙烯吡咯烷酮修饰的介孔普鲁士蓝纳米粒子溶液的吸收光谱的峰值约为700 nm,其为介孔普鲁士蓝纳米粒子的特征吸收峰。其水合半径为 212.35 ± 0.08 nm,表面电位为 1.34 ± 1.58 mV,介孔普鲁士蓝纳米粒子水溶液均匀稳定,未见聚集现象。

[0029] 通过对高效吸附光动力治疗药物亚甲基蓝的介孔普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂进行紫外-可见-近红外吸收光谱的测定,发现在其500-800 nm处有广谱的吸收,并且在700 nm处有最大吸收,如附图3所示。其水合半径为 229.86 ± 33.33 nm,表面电位为 -16.94 ± 1.48 mV,高效吸附光动力治疗药物亚甲基蓝的介孔普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂的水溶液均匀稳定,未见聚集现象。通过透射电镜对其形态和大小进行观察发现其形态为介孔正六面体,表面有膜材料包覆,粒径为200nm左右,如附图4所示。

[0030] 实施例3

体内光声成像,具体包括如下步骤:

(1)选取肿瘤大小约为 150 mm^3 的荷瘤裸鼠(肿瘤模型为人结肠癌细胞HT-29模型)。

[0031] (2)注射浓度为 10 mg mL^{-1} 的高效吸附光动力治疗药物亚甲基蓝的介孔普鲁士蓝

纳米粒子100 μ L。

[0032] (3)在不同的时间对注射后的荷瘤裸鼠进行光声图像的采集。

[0033] 实验结果如附图5所示,在药物注射前,肿瘤部位只有微弱的光声信号。注射4小时后,肿瘤部位就能看到光声信号明显的增强,并随着时间的延长而进一步增强,这说明纳米粒子在肿瘤部位有富集作用,具有高效的肿瘤靶向性。

[0034] 实施例4

动物光动力治疗与光热治疗的联合治疗,具体包括如下步骤:

(1)选取肿瘤大小约为150 mm^3 的荷瘤裸鼠(肿瘤模型为人结肠癌细胞HT-29模型)。

[0035] (2)分为八组,每组七只,分别为:对照组,单纯尾静脉注射组,单纯近红外光808 nm组,单纯近红外光650 nm组,单纯近红外光808 nm+单纯近红外光650 nm组,尾静脉注射+近红外光808 nm组,尾静脉注射+近红外光650 nm组,尾静脉注射+近红外光808 nm+近红外光650 nm组。

[0036] (3)尾静脉注射后24小时,对肿瘤部位进行全麻下10分钟的808 nm或者650 nm的激光照射,并定期测量裸鼠肿瘤的体积大小。

[0037] 实验结果如附图6所示,对照组,单纯尾静脉注射组,单纯近红外光808 nm组,单纯近红外光650 nm组的肿瘤基本上都以相同的速度增长,从最初的150 mm^3 增长到治疗后第30天的约1900 mm^3 。尾静脉注射+近红外光650 nm组肿瘤的增长则受到了明显的抑制,尾静脉注射+近红外光808 nm组的肿瘤则在第四天时受到了完全抑制,可是又出现了复发。只有尾静脉注射+近红外光808 nm+近红外光650 nm组的肿瘤在治疗第四天时完全抑制并没有出现复发。上述数据表明,高效吸附光动力治疗药物亚甲基蓝的介孔普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂可以通过光热治疗和光动力治疗相结合的方法有效治疗肿瘤。

[0038] 在肿瘤治疗30天后,对各组裸鼠的心、肝、脾、肺和肾进行取材,并进行了HE染色,如图7所示,经显微镜观察,发现各组脏器均未出现明显的损伤,证明治疗过程对小鼠并未出现明显的伤害,我们制备的高效吸附光动力治疗药物亚甲基蓝的介孔普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂具有较好的安全性。

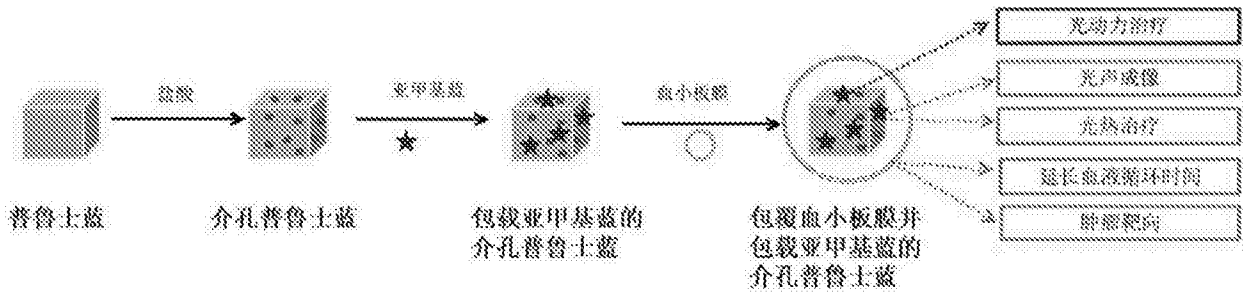


图1

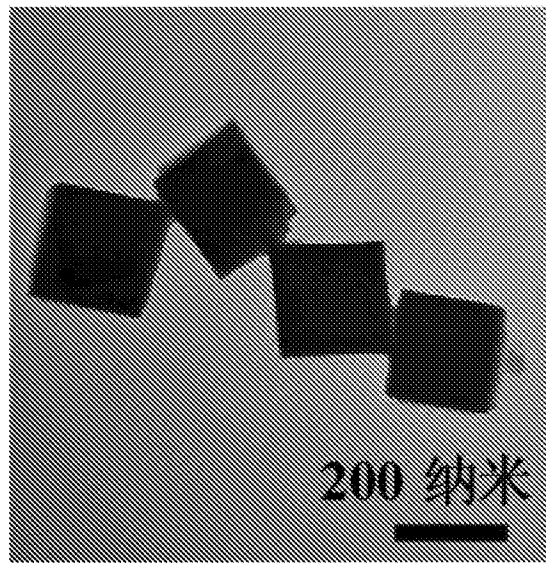


图2

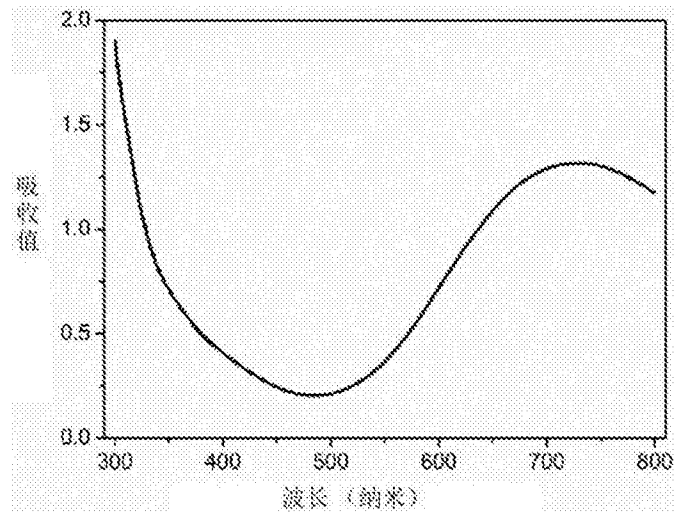


图3

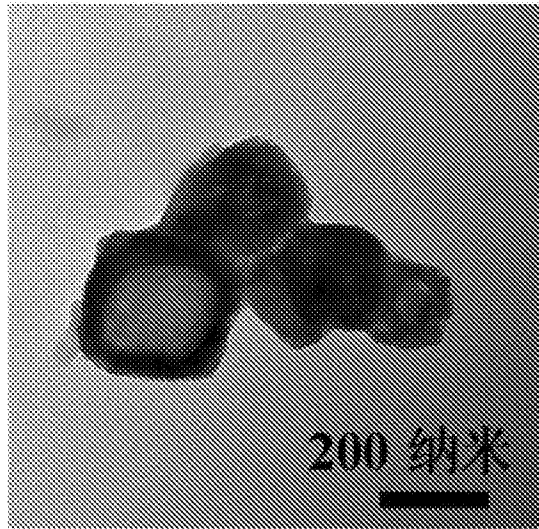


图4

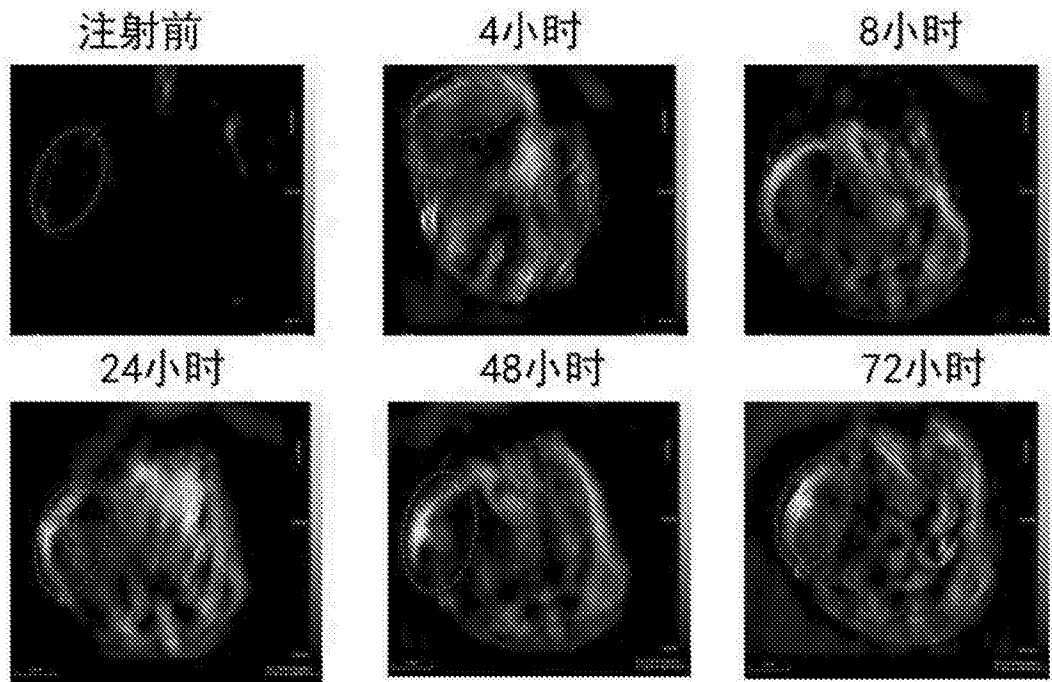


图5

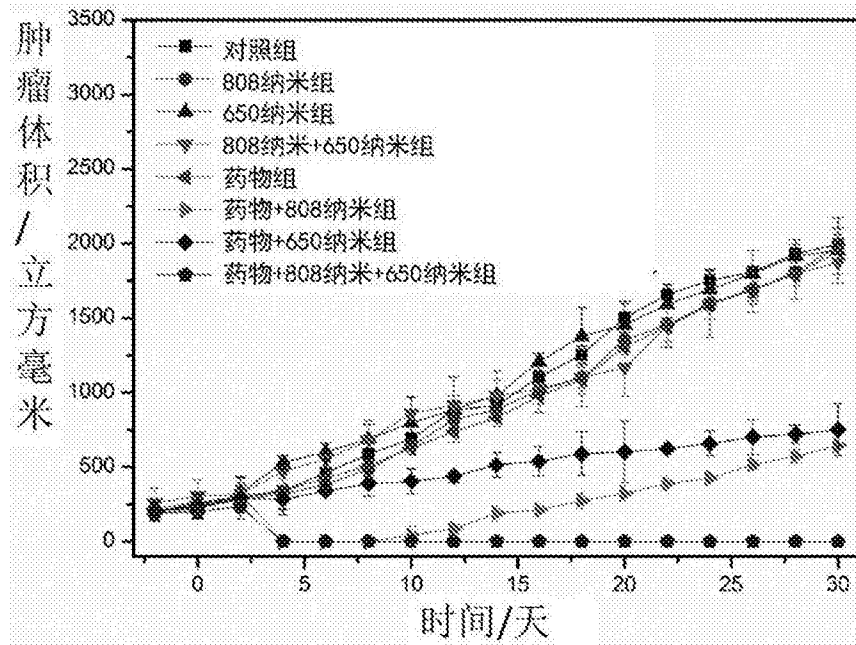


图6

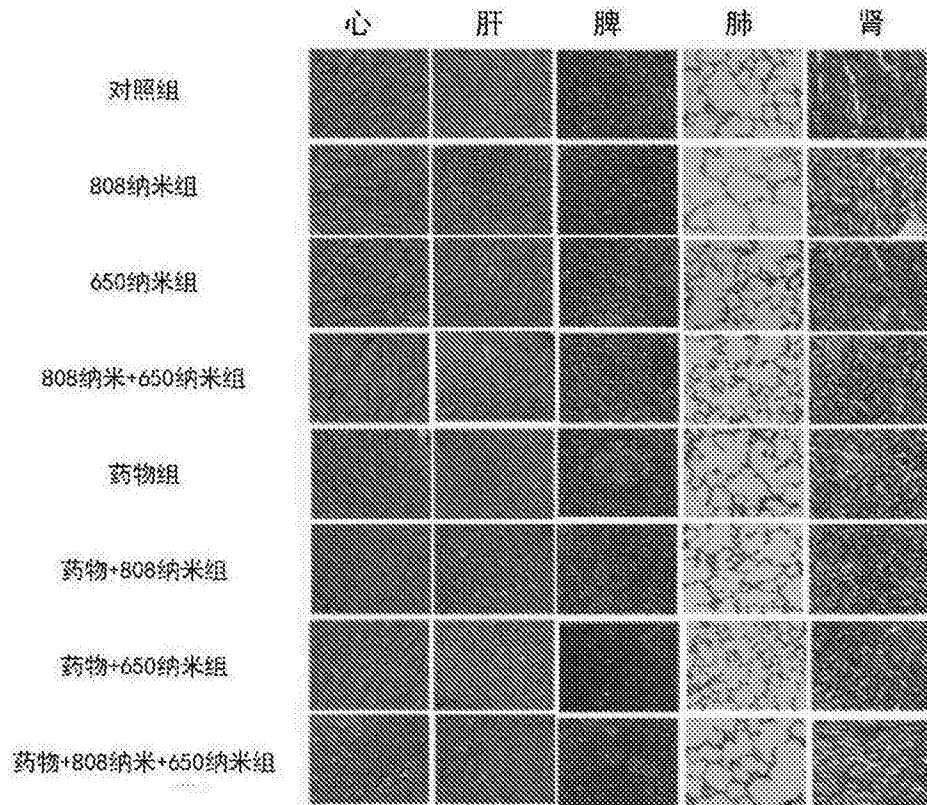


图7