



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107837404 A

(43)申请公布日 2018.03.27

(21)申请号 201711113966.6

A61K 51/02(2006.01)

(22)申请日 2017.11.13

A61K 41/00(2006.01)

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所

A61P 35/00(2006.01)

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

A61K 103/30(2006.01)

申请人 北京大学 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 49/22(2006.01)

A61K 51/12(2006.01)

A61K 51/04(2006.01)

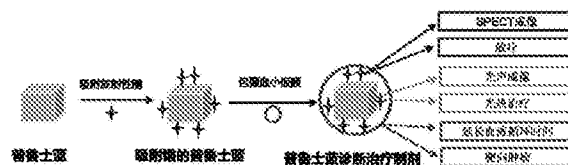
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54)发明名称

一种纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂及其制备方法和应用,该制剂使用生物相容性好的普鲁士蓝纳米粒子吸附放射性稀土元素镧离子,并在表面包覆血小板膜。该制剂使用的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,具有放射性的稀土元素镧离子还可以实现SPECT成像以及放疗的功能。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. 一种纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂,其特征在于:所述制剂包含有一种复合纳米粒子;所述复合纳米粒子包括普鲁士蓝纳米粒子、普鲁士蓝纳米粒子吸附的放射性镱离子、及在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所述的纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂,其特征在于:所述的制剂同时具有SPECT成像、光声成像、放射治疗及光热治疗功能。

3. 根据权利要求1所述的纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂,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所述的纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂,其特征在于:所述的普鲁士蓝的吸收波长在500-1100 nm。

5. 根据权利要求1所述的纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂,其特征在于:所述的普鲁士蓝纳米粒子的粒径范围在1-1000 nm之间。

6. 根据权利要求1所述的纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂,其特征在于:所述放射性镱为 $^{177}\text{Lu}$ 。

7. 权利要求1所述的纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂的其制备方法,其特征在于:其中的复合纳米粒子包括以下制备步骤:

1) 通过水热方法制备柠檬酸修饰的普鲁士蓝纳米粒子:将二价铁盐与三价铁盐的柠檬酸溶液水浴加热搅拌后冷却至室温,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;

2) 吸附放射性镱离子:将普鲁士蓝纳米粒子在室温下使用吸附方法包载放射性镱离子,得到吸附有放射性镱离子的普鲁士蓝纳米粒子,并去除未包载的放射性镱离子;

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)所得的吸附有放射性镱离子的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7所述的纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂的其制备方法,其特征在于:步骤1)中所述的二价铁盐包括但不限于 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,三价铁盐包括但不限于 $\text{FeCl}_3$ ;步骤2)中去除未包载的放射性镱离子所使用的去除方法包括但不限于透析、超滤管超滤、超滤膜超滤;步骤3)中提取动物血液所使用的动物包括但不限于大鼠、小鼠、兔子、豚鼠;步骤3)中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所述的纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂的应用,其特征在于:所述的制剂应用于SPECT成像、光声成像、放射治疗及光热治疗。

10. 根据权利要求9所述的纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂的应用,其特征在于:光热治疗中所用激光的波长范围在 500-1100 nm之间。

## 一种纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001]

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,具体涉及一种纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 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] 放疗是利用放射线治疗肿瘤的一种局部治疗方法,是治疗肿瘤时常用的治疗手段,过半的肿瘤患者在治疗的过程中需要用到放疗,因此对于放疗的研究具有很好的现实意义。放疗主要使用包括放射性同位素产生的 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 射线和各类加速器产生的x射线、电子线、质子束及其他粒子束等。放射治疗可以通过多种途径杀死肿瘤组织,具有痛苦小、见效快的特点。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。而将光热治疗和放疗相联合,可以有效的降少放射性药物的剂量,并降低光热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,从而实现了对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。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是为了得到一种具有肿瘤靶向作用、SPECT成像与光声成像双模态成像功能以及放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多模态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。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

一种纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂(高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂),所述制剂包含有一种复合纳米粒子;所述复合纳米粒子包括普鲁士蓝纳米粒子、普鲁士蓝纳米粒子吸附的放射性镧离子、及在普鲁士蓝纳米粒子表面包覆的血小板膜。

[0007] 进一步的,所述的制剂同时具有SPECT成像、光声成像、放射治疗及光热治疗功能;其中的普鲁士蓝纳米粒子用于光声成像及光热治疗功能;其中的放射性稀土元素镧用于SPECT成像及放射治疗功能。

[0008] 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。

[0009] 进一步的,所述的普鲁士蓝的吸收波长在500-1100 nm。

[0010] 进一步的,所述的普鲁士蓝纳米粒子的粒径范围在1-1000 nm之间。

[0011] 进一步的,所述放射性镧为 $^{177}\text{Lu}$ 。

[0012] 所述纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂的其制备方法,其中的复合纳米粒子包括以下制备步骤:

1)通过水热方法制备柠檬酸修饰的普鲁士蓝纳米粒子:将二价铁盐与三价铁盐的柠檬酸溶液水浴加热搅拌后冷却至室温,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;

2)吸附放射性镧离子:将普鲁士蓝纳米粒子在室温下使用吸附方法包载放射性镧离子,得到吸附有放射性镧离子的普鲁士蓝纳米粒子,并去除未包载的放射性镧离子;

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)所得的吸附有放射性镧离子的普鲁士蓝纳米粒子表面,从而制得所述复合纳米粒子。

[0013] 进一步的,步骤1)中所述的二价铁盐包括但不限于 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,三价铁盐包括但不限于 $\text{FeCl}_3$ ;步骤2)中去除未包载的放射性镧离子所使用的去除方法包括但不限于透析、超滤管超滤、超滤膜超滤;步骤3)中提取动物血液所使用的动物包括但不限于大鼠、小鼠、兔子、豚鼠;步骤3)中的超声法包括但不限于水浴超声和探头超声。

[0014] 所述的制剂可应用于SPECT成像、光声成像、放射治疗及光热治疗。光热治疗中所用激光的波长范围在 500-1100 nm之间。

[0015] 本发明的有益效果:

本研究制备的纳米粒子将具备多种功能,包括SPECT/光声成像的显像剂及造影剂功能,将光热治疗与放疗联合,在减少放射性药物剂量及降低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。

[0016] 本发明的优点之一是所制备的高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂以普鲁士蓝纳米粒子为载体,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。

[0017] 本发明的优点之二是所制备的高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂用普鲁士蓝纳米粒子吸附放射性的 $^{177}\text{Lu}$ ,放射性稀土元素镧可以用于SPECT成像及放射治疗。

[0018] 本发明的优点之三是所制备的高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂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。

[0019] 本发明的优点之四是所制备的高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂具备多种功能,包括SPECT/光声成像的显像剂及造影剂功能,将光热治疗

与放疗联合,在减少放射性药物剂量及降低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。

[0020] 为了克服本领域现有技术的缺陷,本发明选用生物膜结构来修饰纳米粒子以实现肿瘤的靶向治疗,使用血小板膜对纳米粒子进行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普鲁士蓝,使其成为肿瘤治疗的靶向药物载体。

[0021] 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。普鲁士蓝纳米粒子是光声成像的造影剂,使用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。临床上经常将功能成像的手段与结构成像的方法相结合,如SPECT/CT、PET/MR等多模态成像的应用不仅可以实现对肿瘤组织的精确定位和结构重建,而且能够从分子水平检测肿瘤的生物信息,继而实现肿瘤治疗过程中的全程监测和疗效评估,为个性化治疗方法的制定和精准医疗的开展起到了重要作用。放射性核素 $^{177}\text{Lu}$ 具有优良的放射化学性质,能够发射能量适中的 $\gamma$ 射线,可以用于SPECT显像,同时 $^{177}\text{Lu}$ 还发射对肿瘤有杀伤作用的中能 $\beta^-$ 粒子(0.5 MeV),能通过内照射的方法用于较小肿瘤的靶向放射治疗。而普鲁士蓝纳米粒子可以高效吸附稀土元素,因此可以通过普鲁士蓝吸附稀土元素 $^{177}\text{Lu}$ ,从而实现SPECT成像和放射治疗诊疗一体的功能。使用普鲁士蓝纳米粒子吸附放射性 $^{177}\text{Lu}$ ,并在其表面包覆一层血小板膜,从而实现SPECT成像和光声成像共同引导治疗并随时监测疗效,光热治疗和放疗相结合以靶向治疗肿瘤。

[0022] 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药物载体,将放疗与光热治疗相结合以减少对正常组织的损伤,并通过SPECT/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。

[0023]

## 附图说明

[0024] 图1是吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂制备方法的示意图;

图2是柠檬酸修饰的普鲁士蓝纳米粒子的透射电镜图;

图3是高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的紫外-可见吸收光谱图;

图4是高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的透射电镜图;

图5是高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的SPECT/CT成像图;

图6是高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的体内光声成像图;

图7是高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子治疗老鼠的肿瘤大小随时间变化图;

图8是高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子治疗老鼠的各个脏器的HE染色

图。

### 具体实施方式

[0025] 本发明提供一种纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂即一种高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂,所述制剂包含有一种复合纳米粒子(即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普鲁士蓝纳米粒子、普鲁士蓝纳米粒子吸附的放射性镧离子、及在普鲁士蓝纳米粒子表面包覆的血小板膜。

[0026] 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。

#### [0027] 实施例1:

本发明的纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂(高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂)的制备过程如附图1所示,以普鲁士蓝纳米粒子、放射性稀土元素镧和血小板膜为例进行说明,包括如下步骤:

(1)通过水热法制备柠檬酸修饰的普鲁士蓝纳米粒子:将二价铁盐与三价铁盐的柠檬酸溶液水浴加热搅拌后冷却至室温,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。调整制备工艺,使制备的纳米粒子粒径约为100 nm,且大小均一,分散性良好。

[0028] (2)吸附放射性镧离子:使用普鲁士蓝纳米粒子吸附 $^{177}\text{Lu}$ ,通过离心过滤方法去除溶液中未吸附的 $^{177}\text{Lu}$ ,再用缓冲液冲洗离心后,用偶氮肿III法测定未吸附的 $^{177}\text{Lu}$ 的含量,从而测定纳米粒子吸附的 $^{177}\text{Lu}$ 的浓度。

[0029] (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。

#### [0030] 实施例2:

本发明的纳米粒子肿瘤诊断治疗联用制剂(高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂)的表征数据如下:

通过水热法制备了柠檬酸修饰的普鲁士蓝纳米粒子溶液的吸收光谱的峰值约为700 nm,其为普鲁士蓝纳米粒子的特征吸收峰。其水合半径为 $95.72 \pm 3.44$  nm,表面电位为 $-27.86 \pm 0.90$  mV,普鲁士蓝纳米粒子水溶液均匀稳定,未见聚集现象。通过透射电镜对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100 nm左右,如附图2所示。

[0031] 通过对高效吸附放射性稀土元素镧的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,发现在其波长500-800 nm处有广谱的吸收,并且在波长700 nm处有最大吸收,如附图3所示。其水合半径为 $99.6 \pm 36.35$  nm,表面电位为 $-28.41 \pm 0.74$  mV,高效吸附放射性稀土元素镧的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正六面体,表面有膜材料包覆,粒径为100nm左右,如附图4所示。

#### [0032] 实施例3

体内SPECT/CT成像,具体包括如下步骤:

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

[0033] (2) 尾静脉注射浓度为 $10 \text{ mg mL}^{-1}$ 的高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子 $100 \mu\text{L}$ 。

[0034] (3) 通过SPECT/CT监测纳米粒子在24小时的SPECT/CT成像。

[0035] 实验结果如附图5所示,在药物注射24小时后,裸鼠的肿瘤部位能检测到SPECT/CT成像光信号。这表明纳米粒子可以在裸鼠的肿瘤部位大量聚集,并且可以通过SPECT对肿瘤部位进行成像。

[0036] 实施例4:

体内光声成像,具体包括如下步骤:

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

[0037] (2) 注射浓度为 $10 \text{ mg mL}^{-1}$ 的高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子 $100 \mu\text{L}$ 。

[0038] (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。

[0039] 实验结果如附图6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。这一成像结果,与体内SPECT/CT成像是相一致的。

[0040] 实施例5:

动物光热治疗,具体包括如下步骤:

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

[0041] (2) 分为七组,每组七只,分别为:对照组,单纯近红外光组,单纯尾静脉注射组,尾静脉注射+近红外组,局部放疗组,局部注射+近红外治疗组,局部放疗+近红外治疗组。

[0042] (3) 尾静脉注射后24小时,对肿瘤部位进行全麻下10分钟的 $808 \text{ nm}$ 的激光照射,并定期测量裸鼠肿瘤的体积大小。

[0043] 实验结果如附图7所示,对照组肿瘤基本上都以相同的速度增长,从最初的 $150 \text{ mm}^3$ 增长到治疗后第30天的约 $1900 \text{ mm}^3$ 。而尾静脉注射+近红外组和局部放疗组肿瘤的增长则受到了明显的抑制,局部注射+近红外治疗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。只有局部放疗+近红外治疗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,高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂可以通过光热治疗和放射治疗相结合的方法有效治疗肿瘤。

[0044] 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8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,本发明制备的高效吸附放射性稀土元素镧的普鲁士蓝纳米粒子的诊断治疗制剂具有较好的安全性。

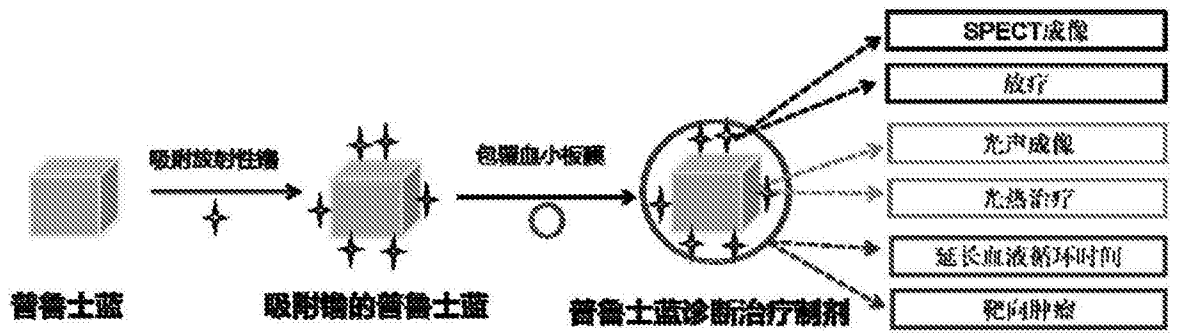


图1

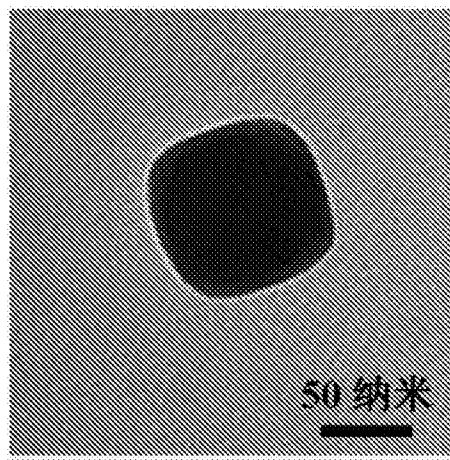


图2

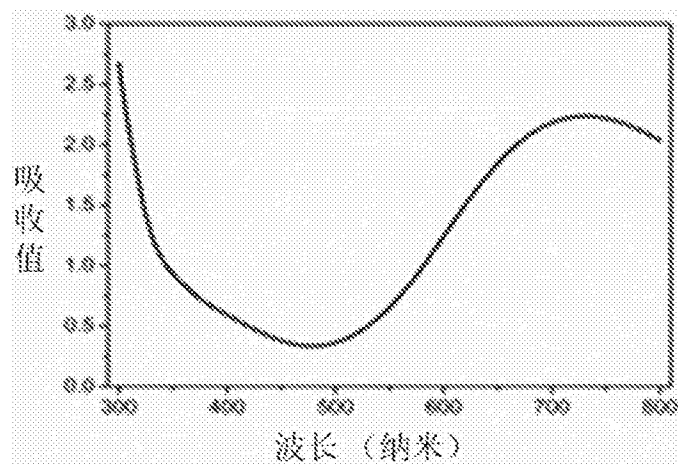


图3



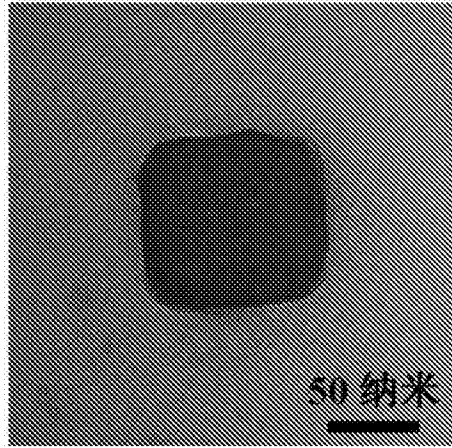


图4



图5

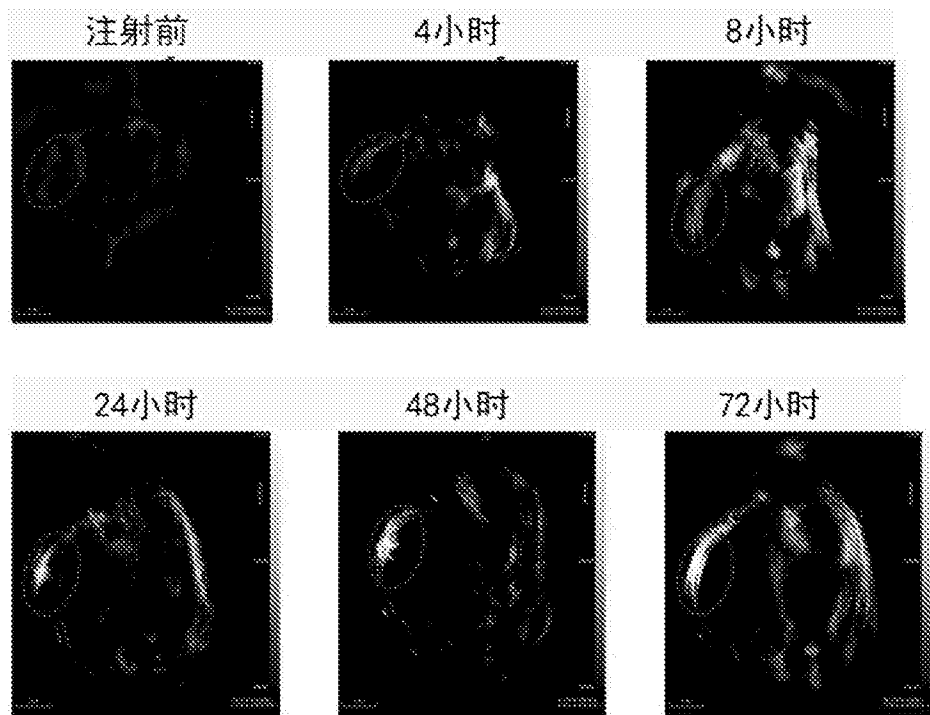


图6

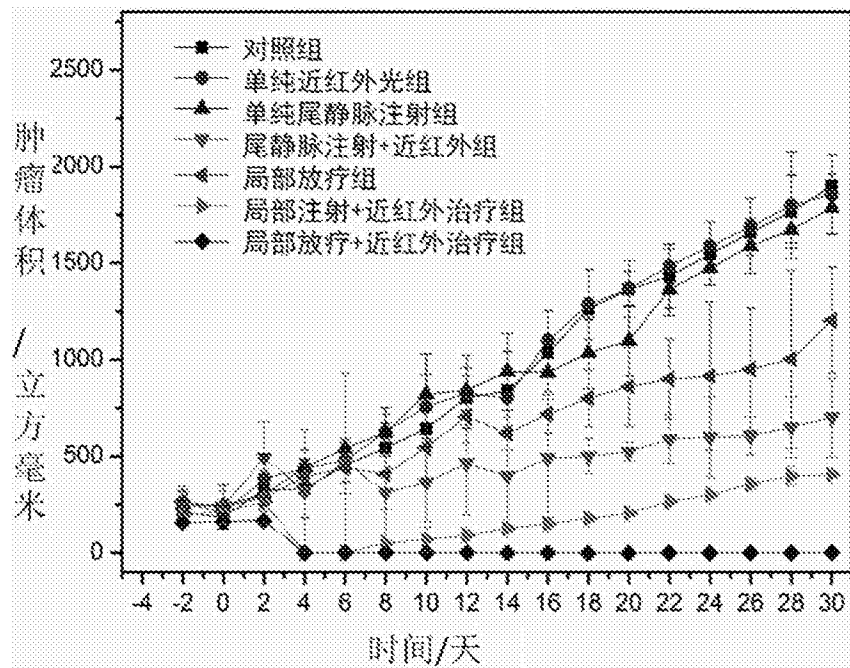


图7

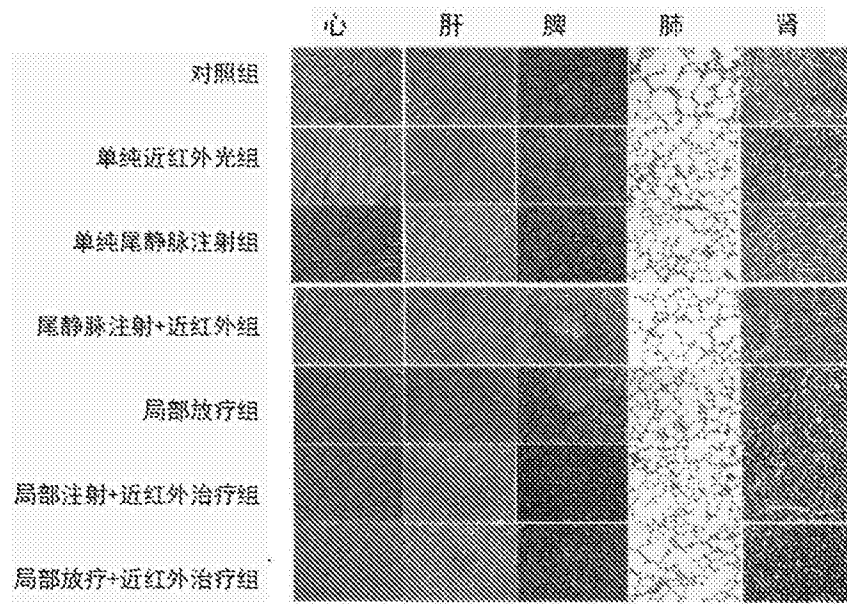


图8