



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110859805 A

(43)申请公布日 2020.03.06

(21)申请号 201911009987.2

(22)申请日 2019.10.23

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号  
申请人 北京大学

(72)发明人 王凡 史继云 马晓途

(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 9/127(2006.01)

A61K 47/24(2006.01)

A61K 47/54(2017.01)

A61K 41/00(2020.01)

A61P 35/00(2006.01)

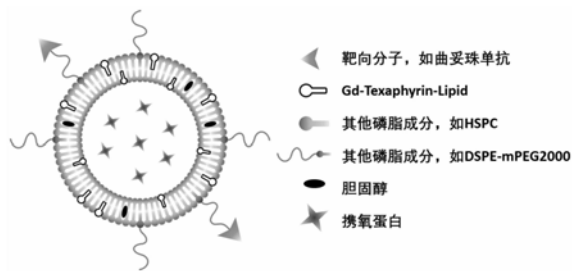
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂及其制备方法,所制备的制剂为钆离子配位的德克萨斯卟啉脂质体(Gd-Nanotexaphyrin),同时具有增强磁共振成像和放疗增敏的效果。该制剂的亲水腔内部可以包载携氧蛋白,携带氧气,改善肿瘤缺氧,提高Gd-Texaphyrin的“无效氧化还原循环”效应,增强Gd-Texaphyrin的放疗增敏效果。该制剂的表面可以修饰靶向分子,借助靶向分子的主动靶向能力和脂质体本身的被动靶向效果,该制剂可以浓集于肿瘤部位,提高了Gd-Texaphyrin在肿瘤的摄取量,进一步增强了Gd-Texaphyrin的放疗增敏效果。



1. 一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂,其特征在于:为钆离子配位的德克萨斯卟啉脂质体,其结构包括外层的磷脂双分子层和内部的亲水空腔;所述磷脂双分子层的组成包括钆离子配位的德克萨斯卟啉-溶血磷脂;所述德克萨斯卟啉-溶血磷脂为德克萨斯卟啉与溶血磷脂的共价结合物。

2. 根据权利要求1所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂,其特征在于:所述溶血磷脂为十八烷酰基溶血磷脂酰胆碱、十六烷酰基溶血磷脂酰乙醇胺、亚油酸酰基溶血磷脂酰丝氨酸、油酸酰基溶血磷脂酰胆碱中任意一种。

3. 根据权利要求1所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂,其特征在于:所述磷脂双分子层的组成还包括除溶血磷脂以外的其他磷脂或磷脂衍生物;所述除溶血磷脂以外的其他磷脂或磷脂衍生物为蛋黄卵磷脂、氢化大豆卵磷脂、羟基化大豆卵磷脂、氢化溶血卵磷脂、二硬脂酰基磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000、二油酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇5000中的一种或几种。

4. 根据权利要求1所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂,其特征在于:所述磷脂双分子层的组成还包括胆固醇。

5. 根据权利要求1所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂,其特征在于:所述亲水空腔内包载有携氧蛋白;所述携氧蛋白为血红蛋白、肌红蛋白、脑红蛋白、血蓝蛋白中任意一种或几种。

6. 根据权利要求1所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂,其特征在于:所述脂质体的表面修饰有肿瘤靶向分子;所述靶向分子为抗体及其片段、多肽、叶酸、透明质酸、适配体中任意一种或几种。

7. 根据权利要求1~6中任意一项所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 钆离子配位的德克萨斯卟啉-溶血磷脂的合成:将三价钆盐、德克萨斯卟啉-溶血磷脂、有机胺在反应溶剂中混合,30-90°C加热反应,反应产物经色谱柱纯化,得到纯化后的钆离子配位的德克萨斯卟啉-溶血磷脂;

2) 以薄膜水化法或乙醇注入法制备钆离子配位的德克萨斯卟啉脂质体。

8. 根据权利要求7所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂的制备方法,其特征在于:

步骤2) 中薄膜水化法的制备流程如下所示:将步骤1)得到的钆离子配位的德克萨斯卟啉-溶血磷脂单独或与其他成分在三氯甲烷或三氯甲烷-甲醇溶液中溶解,所述其他成分为除溶血磷脂以外的其他磷脂或磷脂衍生物以及胆固醇中的任意一种或几种;使用旋转蒸发器旋干或氮气吹干溶液,使析出的固体呈一层薄膜状;真空条件下进一步干燥;加入去离子水或含有携氧蛋白的水溶液,30-90°C加热水化一段时间后,水浴超声使固体完全溶解;将水浴超声后的溶液用高压挤出器挤出,挤出器滤膜的孔径为10-500 nm,或者使用探头超声,将水浴超声后的溶液制备成粒径均一的脂质体;

步骤2) 中乙醇注入法的制备流程:将步骤1)得到的钆离子配位的德克萨斯卟啉-溶血磷脂单独或与其他成分在乙醇溶液中溶解,所述其他成分为除溶血磷脂以外的其他磷脂或磷脂衍生物以及胆固醇中的任意一种或几种;在水浴超声条件下,注入到去离子水或携氧

蛋白的水溶液中;将水浴超声后的溶液用高压挤出器挤出,挤出器滤膜的孔径为10-500 nm,或者使用探头超声,将水浴超声后的溶液制备成粒径均一的脂质体。

9. 根据权利要求7所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂的制备方法,其特征在于:如果步骤2)中加入的是含有携氧蛋白的水溶液,还需要进行步骤3),步骤3)为:使用透析法、凝胶排阻法、超滤法中任意一种对步骤2)制备的脂质体进行纯化,以除去没有包载到脂质体中的携氧蛋白;所述透析法为:将步骤2)制备的脂质体装入分子截留量为10-1000 kDa的透析袋中,置于0.02 M pH=7.2 的磷酸盐缓冲液中透析;所述凝胶排阻法为:使用分子截留量为10-1000 kDa的凝胶排阻柱分离脂质体和未经脂质体包载的携氧蛋白;所述超滤法为:使用分子截留量为10-1000 kDa的超滤管滤除未经脂质体包载的携氧蛋白。

10. 根据权利要求7所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂的制备方法,其特征在于:步骤1)中所述三价钆盐为醋酸钆、硝酸钆、氯化钆中任意一种;步骤1)所述有机胺为二乙胺、三乙胺、N,N-二异丙基乙胺中任意一种或几种;步骤1)所述反应溶剂为N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丙二醇中任意一种或几种,步骤1)所述色谱柱为硅胶基正向色谱柱、C4或C18基反向色谱柱中任意一种。

## 一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医用材料领域,具体涉及一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 癌症的治疗是全球人类面临的难题。放疗是癌症治疗的重要手段。然而,低剂量的放射性射线的治疗效果有限,提高放射性射线的剂量又会增加正常组织和器官的损伤,限制了放疗的肿瘤治疗效果。因此,多种多样的放疗增敏剂被研发出来,用于提高放射性射线的肿瘤杀伤效果。放疗增敏剂的研发目前仍然面临着一些问题,比如,顺铂、紫杉醇、五氟尿嘧啶等化疗药物,虽然具有一定的放疗增敏效果,但是体内毒性较高;高压氧的临床治疗效果有限,并且增加了正常组织和器官的放疗损伤;表皮生长因子受体阻断药物仅对少数的肿瘤表皮生长因子阳性的患者有一定的放疗增敏效果;纳米金、纳米钛等无机重金属纳米材料体内无法降解,存在长期生物安全性的隐患。目前,国内批准上市的放疗增敏药物只有马蔺子素、甘氨双唑钠等极少数药物,新型放疗增敏剂的研发是非常有意义的。

[0003] 德克萨斯卟啉(Texaphyrin)是一类三吡咯五氮杂环卟啉衍生物,由1988年美国德克萨斯大学(奥斯汀分校)的J.L. Sessler教授领导的研究小组合成。Texaphyrin相比于四氮杂环卟啉类化合物,可以与三价金属离子形成稳定的配位化合物。三价钆离子( $Gd^{3+}$ )配位的Texaphyrin(Gd-Texaphyrin)不但可以作为增强磁共振成像的造影剂,并且具有一定的放疗增敏效果。Gd-Texaphyrin类化合物中,最具有代表性的药物是美国Pharmacyclics公司开发的、已经开展过多项临床试验的莫特沙芬钆(Motexafin Gadolinium)。在临床前研究中,莫特沙芬钆在多种动物模型中展示出优异的增强磁共振成像性能和明显的放疗增敏效果。I期临床试验表明,莫特沙芬钆有较好的安全性,剂量限制性毒性为可逆的肾小管坏死,最大耐受剂量为22.3 mg/kg,没有明显的血液毒性。然而,III期临床试验表明,莫特沙芬钆只有有限的放疗增敏效果。虽然,对于北美组亚群的患者,莫特沙芬钆可以增加实体瘤早期脑转移的放疗效果,使肿瘤的中位进展时间从8.8个月延长到24.2个月,但是,更大群体的患者的总生存时间没有明显的改善。因此,莫特沙芬钆,这一体内安全性较高的、曾经展示出巨大潜力的放疗增敏剂,最终没有被美国食品药品监督管理局批准上市。如何提高莫特沙芬钆这一类药物的放疗增敏效果成为亟待解决的难题。

[0004] 放疗增敏类药物在肿瘤的摄取量不足是限制其增敏效果的主要因素之一。莫特沙芬钆等小分子形式的Gd-Texaphyrin,在体内的血液循环半衰期较短,代谢、排泄速度快。延长Gd-Texaphyrin的血液循环时间可以一定程度地增加其在肿瘤的摄取量。

[0005] 多伦多大学的郑岗教授领导的研究团队在2016年报道了一种Texaphyrin与溶血磷脂酰胆碱的共价结合物,命名为Texaphyrin-lipid。两亲性的Texaphyrin-lipid可以自组装形成均一、稳定的卟啉脂质体,命名为Nanotexaphyrin。郑岗团队在2016年报道了二价锰离子配位的Nanotexaphyrin(Mn-Nanotexaphyrin)可以用于体内的增强磁共振成像,在2018年报道了三价放射性镧离子 $^{111}Ln$ 配位的Nanotexaphyrin( $^{111}Ln$ -Nanotexaphyrin)可以

用于体内的单光子发射计算机断层扫描(single-photon emission computed tomography, SPECT)成像。Nanotexaphyrin在一定程度上能提高 Texaphyrin的高载药量。但是该技术仍存在改进的空间。

[0006] “无效氧化还原循环(Futile Redox Cycling)”是Gd-Texaphyrin的放疗增敏的主要机制之一。Gd-Texaphyrin被肿瘤细胞摄取后,与细胞中的抗坏血酸、NADPH、还原型谷胱甘肽等还原型物质发生反应,消耗了肿瘤细胞的还原型物质,提高了肿瘤细胞的活性氧(reactive oxygen species, ROS)的水平,削弱了肿瘤细胞对放疗的抵抗能力,与此同时,Gd-Texaphyrin被还原成不稳定的自由基中间态。在有氧条件下,自由基中间态与氧气反应,生成过氧化氢,并且自由基中间态重新被氧气氧化为最初形式的Gd-Texaphyrin。Gd-Texaphyrin像催化剂一样,不断地循环参与上述的氧化还原反应,不断消耗肿瘤细胞的还原型物质,不断地产生过氧化氢。过氧化氢本身也具有放疗增敏的效果。但是,在缺氧条件下,不稳定的自由基中间态会发生变质反应,不能重新产生最初形式的Gd-Texaphyrin,氧化还原循环被终止,既不能不断地消耗还原型物质,又不能不断地生成过氧化氢。因此,Gd-Texaphyrin的放疗增敏效果具有氧气依赖性,在有氧条件下的放疗增敏效果要优于缺氧条件下的放疗增敏效果。

[0007] 很多实体瘤的内部都处于缺氧的状态,肿瘤乏氧是实体瘤的肿瘤微环境的普遍特征之一。由于Gd-Texaphyrin的放疗增敏效果具有氧气依赖性,改善肿瘤的乏氧就可以提高Gd-Texaphyrin的放疗增敏效果。与此同时,氧气本身也具有放疗增敏的效果,肿瘤的普遍乏氧是造成放疗效果不佳的主要因素之一。但目前关于增加Gd-Texaphyrin的“无效氧化还原循环”效应技术方面鲜有报道。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的之一是通过将Gd-Texaphyrin制备成脂质体的形式,延长Gd-Texaphyrin的血液循环时间,并且通过脂质体的被动靶向和主动靶向能力,进一步提高Gd-Texaphyrin在肿瘤的摄取量,提高其放疗增敏的效果。

[0009] 本发明的目的之二是通过脂质体向肿瘤递送氧气,利用脂质体实现Gd-Texaphyrin和氧气的同时递送。通过改善肿瘤的乏氧状态,增加Gd-Texaphyrin的“无效氧化还原循环”效应,增加Gd-Texaphyrin消耗肿瘤细胞还原型物质的能力,提高肿瘤细胞的ROS水平,增加过氧化氢的产生量,从而增强其放疗增敏效果。

[0010] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂,为钆离子配位的德克萨斯卟啉脂质体(Gd-Nanotexaphyrin),其结构包括外层的磷脂双分子层和内部的亲水空腔;所述磷脂双分子层的组成包括钆离子配位的德克萨斯卟啉-溶血磷脂(Gd-Texaphyrin-Lipid);所述德克萨斯卟啉-溶血磷脂(Texaphyrin-Lipid)为德克萨斯卟啉(Texaphyrin)与溶血磷脂的共价结合物。所述肿瘤靶向型放疗增敏剂的实体直径为5纳米至500纳米。

[0011] 进一步的,所述溶血磷脂为十八烷酰基溶血磷脂酰胆碱、十六烷酰基溶血磷脂酰乙醇胺、亚油酸酰基溶血磷脂酰丝氨酸、油酸酰基溶血磷脂酰胆碱中任意一种。

[0012] 进一步的,所述磷脂双分子层的组成还包括除溶血磷脂以外的其他磷脂或磷脂衍生物;所述除溶血磷脂以外的其他磷脂或磷脂衍生物为蛋黄卵磷脂、氢化大豆卵磷脂

(HSPC)、羟基化大豆卵磷脂、氢化溶血卵磷脂、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二棕榈酰基磷脂酰丝氨酸(DPPS)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-mPEG2000)、二油酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇5000(DOPE-mPEG5000)中的一种或几种。

[0013] 进一步的,所述磷脂双分子层的组成还包括胆固醇。

[0014] 胆固醇和其他磷脂成分可以调节脂质体的体内稳定性、调节脂质体的粒径分布,但是,胆固醇和其他磷脂成分不是所述肿瘤靶向型放疗增敏剂的必需成分。没有添加胆固醇和其他磷脂成分的该制剂同样具有放疗增敏的效果。

[0015] 进一步的,所述亲水空腔内包载有携氧蛋白;所述携氧蛋白是可以与氧气可逆结合的蛋白分子,在氧气浓度较高时,携氧蛋白可以与氧气结合,在氧气浓度降低时,携氧蛋白可以将氧气释放出来;所述携氧蛋白为血红蛋白、肌红蛋白、脑红蛋白、血蓝蛋白中任意一种或几种。

[0016] 进一步的,所述脂质体的表面修饰有肿瘤靶向分子。所述靶向分子为抗体及其片段、多肽、叶酸、透明质酸、适配体中任意一种或几种。所述靶向分子与磷脂双分子层中的Gd-Texaphyrin-Lipid或其他磷脂成分相连接。

[0017] 一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 钆离子配位的德克萨斯卟啉-溶血磷脂(Gd-Texaphyrin-Lipid)的合成:将三价钆盐、德克萨斯卟啉-溶血磷脂(Texaphyrin-lipid)、有机胺在反应溶剂中混合,30至90摄氏度加热反应,反应产物经色谱柱纯化,得到纯化后的钆离子配位的德克萨斯卟啉-溶血磷脂(Gd-Texaphyrin-Lipid);

2) 以薄膜水化法或乙醇注入法制备钆离子配位的德克萨斯卟啉脂质体(Gd-Nanotexaphyrin)。

[0018] 进一步的,步骤2)中薄膜水化法的制备流程如下所示:将步骤1)得到的钆离子配位的德克萨斯卟啉-溶血磷脂(Gd-Texaphyrin-Lipid)单独或与其他成分在三氯甲烷或三氯甲烷-甲醇溶液中溶解,所述其他成分为除溶血磷脂以外的其他磷脂或磷脂衍生物以及胆固醇中的任意一种或几种;使用旋转蒸发器旋干或氮气吹干溶液,使析出的固体呈一层薄膜状;真空条件下进一步干燥;加入去离子水或含有携氧蛋白的水溶液,30-90°C加热水化一段时间后,水浴超声使固体完全溶解;将水浴超声后的溶液用高压挤出器挤出,挤出器滤膜的孔径为10-500 nm,或者使用探头超声,将水浴超声后的溶液制备成粒径均一的脂质体;

步骤2)中乙醇注入法的制备流程:将步骤1)得到的钆离子配位的德克萨斯卟啉-溶血磷脂(Gd-Texaphyrin-Lipid)单独或与其他成分在乙醇溶液中溶解,所述其他成分为除溶血磷脂以外的其他磷脂或磷脂衍生物以及胆固醇中的任意一种或几种;在水浴超声条件下,注入到去离子水或携氧蛋白的水溶液中;将水浴超声后的溶液用高压挤出器挤出,挤出器滤膜的孔径为10-500 nm,或者使用探头超声,将水浴超声后的溶液制备成粒径均一的脂质体。

[0019] 进一步的,如果步骤2)中加入的是含有携氧蛋白的水溶液,还需要进行步骤3),步骤3)为:使用透析法、凝胶排阻法、超滤法中任意一种对步骤2)制备的脂质体进行纯化,以

除去没有包载到脂质体中的携氧蛋白；所述透析法为：将步骤2) 制备的脂质体装入分子截留量为10-1000 kDa的透析袋中，置于0.02 M pH=7.2 的磷酸盐缓冲液中透析；所述凝胶排阻法为：使用分子截留量为10-1000 kDa的凝胶排阻柱分离脂质体和未经脂质体包载的携氧蛋白；所述超滤法为：使用分子截留量为10-1000 kDa的超滤管滤除未经脂质体包载的携氧蛋白。

[0020] 进一步的，步骤1) 中所述三价钆盐为醋酸钆、硝酸钆、氯化钆中任意一种；步骤1) 所述有机胺为二乙胺、三乙胺、N,N-二异丙基乙胺中任意一种或几种；步骤1) 所述反应溶剂为N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷、甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丙二醇中任意一种或几种，步骤1) 所述色谱柱为硅胶基正向色谱柱、C4或C18基反向色谱柱中任意一种。

[0021] 本发明的有益效果：

本发明的优点之一是将Gd-Texaphyrin制备成脂质体的形式，利用脂质体的主动靶向和被动靶向能力，可以增加Gd-Texaphyrin在肿瘤的摄取量，提高Gd-Texaphyrin的放疗增敏效果。

[0022] 本发明的优点之二是将Gd-Texaphyrin制备成脂质体的形式，利用脂质体可以延长Gd-Texaphyrin的血液循环时间，从而增加Gd-Texaphyrin在肿瘤的摄取量，提高Gd-Texaphyrin的放疗增敏效果。

[0023] 本发明的优点之三是所述制剂具有“诊治一体化”的功能，同时具有增强磁共振成像和放疗增敏的效果，可以通过影像手段实时、动态、无创地监测所述制剂在体内分布、代谢、排泄情况，确定Gd-Texaphyrin在肿瘤和正常脏器在不同时间点的分布情况，从而确定给予放射性照射的最佳时间点和照射的肿瘤的具体位置，实现影像引导下的定时、定点放疗。

[0024] 本发明的优点之四是所述制剂将携氧蛋白和Gd-Texaphyrin组合在一起，实现了携氧蛋白和Gd-Texaphyrin在肿瘤时间、空间上的同时递送，利用携氧蛋白提供氧气，改善肿瘤缺氧，增加Gd-Texaphyrin的放疗增敏效果。

[0025] 本发明的优点之五是利用脂质体的形式将携氧蛋白递送到肿瘤，提高了携氧蛋白的肿瘤靶向性、血液循环时间，减少了携氧蛋白在血液中的酶促降解，增加了携氧蛋白的肿瘤的摄取量。脂质体包裹的携氧蛋白和未经脂质体包裹的携氧蛋白相比，前者可以将更多的氧气递送到肿瘤，更加显著地改善肿瘤的缺氧。

[0026] 本发明的优点之六是以Gd-Texaphyrin-Lipid的形式自组装形成Gd-Nanotexaphyrin，实现了脂质体对Gd-Texaphyrin的超高载药量。在Gd-Nanotexaphyrin单个脂质体很小的空间范围内，富集了高浓度的Gd-Texaphyrin，相比于莫特沙芬钆等小分子形式的Gd-Texaphyrin，可以显著提高磁共振成像和放疗增敏效果。

[0027] 在莫特沙芬钆的III期临床试验失败后，如何提高Gd-Texaphyrin类药物的放疗增敏效果成为亟待解决的难题。本发明所述制剂以脂质体的形式实现了Gd-Texaphyrin的超高载药量、提高了Gd-Texaphyrin的肿瘤靶向性、延长了Gd-Texaphyrin的血液循环时间，从而提高了Gd-Texaphyrin在肿瘤的摄取量，并且，通过氧气的协同递送、改善肿瘤缺氧，增强Gd-Texaphyrin的“无效氧化还原”效应。通过以上几个方面的共同作用，所述制剂增加了Gd-Texaphyrin的放疗增敏效果，为解决这一难题提供了新的方案。

[0028]

### 附图说明

[0029] 图1:Texaphyrin-Lipid(图1A和图1B所示)和Gd-Texaphyrin-Lipid(图1C和图1D所示)的几种可能的化学结构。图1A和图1C所示的溶血磷脂为十四烷酰基溶血磷脂酰胆碱,图1B和图1D所示的溶血磷脂为十八烷酰基溶血磷脂酰乙醇胺。

[0030] 图2:本发明所述一种肿瘤靶向型放疗增敏制剂的结构示意图。

[0031] 图3:左图为实施例1所得到的该制剂的透射电镜图(该制剂为球形纳米粒子,实体直径分布于10-100纳米)。右图为动态光散射仪检测出的实施例1所得到的该制剂的水化直径的粒径分布图,该制剂的平均水化直径约为90纳米,多分散度(Polydispersity Index, PDI)小于0.2,粒径分布均匀。

[0032] 图4:尾静脉注射实施例1制备的该制剂后,荷瘤鼠的横切面的T1加权磁共振成像图。具体实验流程如实施例6所述。注射该制剂后的24小时内,肿瘤部位的磁共振信号逐渐增强,并最终达到了良好的增强T1加权磁共振成像效果。

[0033] 图5:实施例1和实施例2制备的该制剂对荷瘤鼠的皮下移植瘤的治疗效果评价,纵坐标为测量当日肿瘤体积。具体实验流程如实施例7所述,没有包载携氧蛋白的该制剂的取得了显著的放疗增敏效果,包载携氧蛋白的该制剂的放疗增敏效果进一步增加。

### 具体实施方式

[0034] 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。

#### [0035] 实施例1

本发明中所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂的一种制备方法包括以下步骤:

(1) Gd-Texaphyrin-Lipid粗产物的制备:向5 mL圆底烧瓶中加入1 mL甲醇,再加入10 mg Texaphyrin-Lipid(根据文献的制备方法制备,文献的DOI检索号:10.1002/adhm.201800857),6 mg 水合醋酸钆,9 mg 三乙胺,搅拌溶解后,50 °C加热搅拌3小时。随后,将甲醇用氮气吹干,向剩余的固体加入10 mL的环己烷,搅拌洗涤固体后,离心收集固体沉淀。重复三次洗涤固体后,最终得到深绿色的粗产物。

[0036] (2) Gd-Texaphyrin-Lipid粗产物的纯化:使用硅胶正向色谱柱对粗产物进行纯化。上样后,首先使用甲醇-氯仿流动相梯度洗脱10分钟以上,甲醇和氯仿的体积比从0:1不断升高到1:4,洗除极性小的杂质。再用氯仿-甲醇-水(体积比35:14:1)流动相将产物洗脱下来,得到较为纯净的Gd-Texaphyrin-Lipid,旋干后-20°C保存。

[0037] (3) 包载肌红蛋白的Gd-Nanotexaphyrin的制备:称取2 mg Gd-Texaphyrin-Lipid、1.032 mg氢化大豆卵磷脂(HSPC)、0.424 mg胆固醇、0.614 mg二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-mPEG2000)加入圆底烧瓶中,加5 mL的氯仿充分溶解,各组分的摩尔比例分别为40%:30%:25%:5%。使用旋转蒸发器将烧瓶中的氯仿旋干,让析出的固体在烧瓶底部呈一层薄膜状。将烧瓶放入真空干燥器中干燥12小时,除去痕量的氯仿。向烧瓶中加入2 mL 20 mg/mL的骨骼肌肌红蛋白,40°C水浴加热30分钟后,水浴超声30分钟。使用高



压挤出器制备粒径均一的脂质体,将水浴超声后的溶液用100 nm的双层聚碳酸酯滤膜高压挤出3次,挤出器的温度维持在40°C。将挤出后的溶液装入分子截留量为1000 kDa的透析袋中,在0.02 M pH=7.2磷酸盐缓冲液中透析72小时,以除去没有包载到脂质体中的肌红蛋白。在透析过程中不断更换新的磷酸盐缓冲液,最终得到较为纯净的包载肌红蛋白的Gd-Nanotexaphyrin,于4 °C条件下保存。

#### [0038] 实施例2

本发明中所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂的一种制备方法包括以下步骤:

(1) Gd-Texaphyrin-Lipid粗产物的制备:向5 mL圆底烧瓶中加入1 mL甲醇,再加入10 mg Texaphyrin-Lipid,6 mg 水合醋酸钆,9 mg 三乙胺,搅拌溶解后,50 °C加热搅拌3小时。随后,将甲醇用氮气吹干,向剩余的固体加入10 mL的环己烷,搅拌洗涤固体后,离心收集固体沉淀。重复三次洗涤固体后,最终得到深绿色的粗产物。

[0039] (2) Gd-Texaphyrin-Lipid粗产物的纯化:使用硅胶正向色谱柱对粗产物进行纯化。上样后,首先使用甲醇-氯仿流动相梯度洗脱10分钟以上,甲醇和氯仿的体积比从0:1不断升高到1:4,洗除极性小的杂质。再用氯仿-甲醇-水(体积比35:14:1)流动相将产物洗脱下来,得到较为纯净的Gd-Texaphyrin-Lipid,旋干后-20°C保存。

[0040] (3) 没有包载携氧蛋白的Gd-Nanotexaphyrin的制备:称取2 mg Gd-Texaphyrin-Lipid、1.032 mg氢化大豆卵磷脂(HSPC)、0.424 mg胆固醇、0.614 mg二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-mPEG2000)加入圆底烧瓶中,加5 mL的氯仿充分溶解,各组分的摩尔比例分别为40%:30%:25%:5%。使用旋转蒸发器将烧瓶中的氯仿旋干,让析出的固体在烧瓶底部呈一层薄膜状。将烧瓶放入真空干燥器中干燥12小时,除去痕量的氯仿。向烧瓶中加入2 mL 去离子水,40°C水浴加热30分钟后,水浴超声30分钟。使用高压挤出器制备粒径均一的脂质体,将水浴超声后的溶液用100 nm的双层聚碳酸酯滤膜高压挤出3次,挤出器的温度维持在40°C。最终得到没有包载携氧蛋白的Gd-Nanotexaphyrin,于4 °C条件下保存。

#### [0041] 实施例3

本发明中所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏脂质体纳米制剂的一种制备方法包括以下步骤:

(1) Gd-Texaphyrin-Lipid粗产物的制备:向5 mL圆底烧瓶中加入1 mL N,N-二甲基甲酰胺,再加入10 mg Texaphyrin-Lipid,6 mg 水合硝酸钆,9 mg N,N-二异丙基乙胺,搅拌溶解后,60 °C加热搅拌5小时。随后,将N,N-二甲基甲酰胺减压蒸干,向剩余的固体加入5 mL的冰乙醚,搅拌洗涤固体后,离心收集固体沉淀。重复三次洗涤固体后,最终得到深绿色的粗产物。

[0042] (2) Gd-Texaphyrin-Lipid粗产物的纯化:使用高效液相色谱法和C4反向色谱柱对粗产物进行纯化。使用安捷伦1260 Infinity II HPLC系统配备C4高效液相反向色谱柱,流动相A相为含有0.05%三氟乙酸的去离子水,B相为含有0.05%三氟乙酸的乙腈,流速。线性梯度洗脱:0分钟,B=20%;5分钟,B=20%;30分钟,B=100%;35分钟,B=100%。Gd-Texaphyrin-Lipid的出峰时间为28分钟, Texaphyrin-Lipid的出峰时间为32分钟。收集Gd-Texaphyrin-Lipid,冷冻干燥后-20°C保存。

[0043] (3) 靶向肿瘤整合素受体的、包载肌红蛋白的Gd-Nanotexaphyrin的制备:以“精氨

酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)”作为肿瘤靶向分子制备可以靶向肿瘤整合素受体蛋白的包载肌红蛋白的Gd-Nanotexaphyrin。称取2 mg Gd-Texaphyrin-Lipid、1.032 mg二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)、0.424 mg胆固醇、1.348 mg二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇5000-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(DSPE-mPEG5000-RGD)加入圆底烧瓶中,加1 mL的氯仿-甲醇(体积比4:1)充分溶解,各组分的摩尔比例分别为40%:30%:25%:5%。使用旋转蒸发仪将烧瓶中的氯仿-甲醇旋干,让析出的固体在烧瓶底部呈一层薄膜状。将烧瓶放入真空干燥器中干燥12小时,除去痕量的氯仿-甲醇。向烧瓶中加入4 mL 10 mg/mL的人骨骼肌肌红蛋白,37°C水浴加热40分钟后,水浴超声20分钟。使用高压挤出器制备粒径均一的脂质体,将水浴超声后的溶液用200 nm的双层聚碳酸酯滤膜高压挤出5次,挤出器的温度维持在37°C。将挤出后的溶液装入分子截留量为1000 kDa的透析袋中,在0.02 M pH=7.2磷酸盐缓冲液中透析72小时,以除去没有包载到脂质体中的肌红蛋白。在透析过程中不断更换新的磷酸盐缓冲液,最终得到较为纯净的包载肌红蛋白的、靶向肿瘤整合素受体的Gd-Nanotexaphyrin,于4 °C条件下保存。

#### [0044] 实施例4

本发明中所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏制剂的一种制备方法包括以下步骤:

(1) Gd-Texaphyrin-Lipid粗产物的制备:向5 mL圆底烧瓶中加入1 mL N,N-二甲基甲酰胺,再加入10 mg Texaphyrin-Lipid,6 mg 水合硝酸钆,9 mg N,N-二异丙基乙胺,搅拌溶解后,60 °C加热搅拌5小时。随后,将N,N-二甲基甲酰胺减压蒸干,向剩余的固体加入5 mL的冰乙醚,搅拌洗涤固体后,离心收集固体沉淀。重复三次洗涤固体后,最终得到深绿色的粗产物。

[0045] (2) Gd-Texaphyrin-Lipid粗产物的纯化:使用高效液相色谱法和C4反向色谱柱对粗产物进行纯化。使用安捷伦1260 Infinity II HPLC系统配备C4高效液相反向色谱柱,流动相A相为含有0.05%三氟乙酸的去离子水,B相为含有0.05%三氟乙酸的乙腈,流速。线性梯度洗脱:0分钟,B=20%;5分钟,B=20%;30分钟,B=100%;35分钟,B=100%。Gd-Texaphyrin-Lipid的出峰时间为28分钟, Texaphyrin-Lipid的出峰时间为32分钟。收集Gd-Texaphyrin-Lipid,冷冻干燥后-20°C保存。

[0046] (3) 包载肌红蛋白的Gd-Nanotexaphyrin的制备:称取2 mg Gd-Texaphyrin-Lipid,加1 mL的乙醇充分溶解。向烧瓶中加入4 mL 10 mg/mL的人骨骼肌肌红蛋白,浸入水浴超声仪中。在水浴超声条件下,将Gd-Texaphyrin-Lipid 的乙醇溶液注入肌红蛋白溶液中,继续水浴超声20分钟。使用探头超声制备粒径均一的脂质体:将超声探头浸入水浴超声后的溶液中,使用50%的输出功率,探头超声10分钟。使用分子截留量为1000 kDa的凝胶排阻柱,分离脂质体和没有包载到脂质体中的肌红蛋白:将探头超声后的溶液上样后,使用磷酸盐缓冲液洗脱,脂质体先被洗脱下来,没有包载到脂质体中的肌红蛋白之后被洗脱下来。收集包载肌红蛋白的Gd-Nanotexaphyrin,于4 °C条件下保存。

#### [0047] 实施例5

本发明中所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏制剂的一种制备方法包括以下步骤:

(1) Gd-Texaphyrin-Lipid粗产物的制备:向5 mL圆底烧瓶中加入1 mL甲醇,再加入10 mg Texaphyrin-Lipid,6 mg 水合醋酸钆,9 mg 三乙胺,搅拌溶解后,50 °C加热搅拌3小时。随后,将甲醇用氮气吹干,向剩余的固体加入10 mL的环己烷,搅拌洗涤固体后,离心收

集固体沉淀。重复三次洗涤固体后,最终得到深绿色的粗产物。

[0048] (2) Gd-Texaphyrin-Lipid粗产物的纯化:使用硅胶正向色谱柱对粗产物进行纯化。上样后,首先使用甲醇-氯仿流动相梯度洗脱10分钟以上,甲醇和氯仿的体积比从0:1不断升高到1:4,洗除极性小的杂质。再用氯仿-甲醇-水(体积比35:14:1)流动相将产物洗脱下来,得到较为纯净的Gd-Texaphyrin-Lipid,旋干后-20°C保存。

[0049] (3) 包载血红蛋白的Gd-Nanotexaphyrin的制备:称取2 mg Gd-Texaphyrin-Lipid、1.032 mg氢化大豆卵磷脂(HSPC)、0.424 mg胆固醇、0.614 mg二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-mPEG2000)加入圆底烧瓶中,加5 mL的氯仿充分溶解,各组分的摩尔比例分别为40%:30%:25%:5%。使用旋转蒸发仪将烧瓶中的氯仿旋干,让析出的固体在烧瓶底部呈一层薄膜状。将烧瓶放入真空干燥器中干燥12小时,除去痕量的氯仿。向烧瓶中加入2 mL 20 mg/mL的牛血红蛋白,40°C水浴加热30分钟后,水浴超声30分钟。使用高压挤出器制备粒径均一的脂质体,将水浴超声后的溶液用100 nm的双层聚碳酸酯滤膜高压挤出3次,挤出器的温度维持在40°C。将挤出后的溶液装入分子截留量为1000 kDa的透析袋中,在0.02 M pH=7.2磷酸盐缓冲液中透析72小时,以除去没有包载到脂质体中的血红蛋白。在透析过程中不断更换新的磷酸盐缓冲液,最终得到较为纯净的包载血红蛋白的Gd-Nanotexaphyrin,于4 °C条件下保存。

[0050] (4) 靶向肿瘤HER-2蛋白的、包载血红蛋白的Gd-Nanotexaphyrin的制备:以“曲妥珠单抗(Herceptin)”作为肿瘤靶向分子制备可以靶向肿瘤HER-2蛋白的包载血红蛋白的Gd-Nanotexaphyrin。称取20 mg二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-曲妥珠单抗(DSPE-mPEG2000-Herceptin),加入到步骤(3)制备的包载血红蛋白的Gd-Nanotexaphyrin溶液中,在冰水浴条件下探头超声20分钟以上,直至溶液变为澄清透明,没有肉眼可见的沉淀为止。

#### [0051] 实施例6

本发明所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏制剂的T1加权增强磁共振成像效果的一种评价方法,主要包括如下步骤:

(1) 小鼠皮下瘤模型的建立:将LLC(Lewis Lung Cancer)细胞以每只小鼠  $5 \times 10^6$  个细胞的量接种于C57BL/6小鼠的大腿外侧皮下,小鼠于SPF级环境下饲养;

(2) 肿瘤大小长到约200 mm<sup>3</sup>时,经尾静脉注射200 μL 50 mg/mL的实施例1制备的该制剂,分别在给药前和给药后的不同时间后,用7.0 T小动物磁共振成像系统检测肿瘤部位的光声信号。

[0052] 成像结果如附图4所示,注射该制剂后,肿瘤部位的磁共振成像效果逐渐增强,在24小时,肿瘤部位的信号达到最强,且弥散于整个肿瘤部位,相对于给药前,肿瘤可以清晰成像,说明该制剂具有很好的增强磁共振成像的效果。

#### [0053] 实施例7

本发明所述的一种肿瘤靶向型放疗增敏制剂的一种治疗效果评价,主要步骤如下所述:

(1) 小鼠皮下瘤模型的建立:将LLC细胞以每只裸鼠  $5 \times 10^6$  个细胞的量接种于6周龄的C57BL/6小鼠的大腿外侧皮下,小鼠于SPF级环境下饲养;

(2) 当肿瘤大小达到约100 mm<sup>3</sup>时,将小鼠平均分为6组,每组5只,每组经尾静脉分别

注射200  $\mu\text{L}$  的磷酸盐缓冲液(PBS组、RT + PBS组),200  $\mu\text{L}$  20  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  (以Texaphyrin的摩尔量计)的实施例1所述的、由Gd-Texaphyrin-Lipid制备的、包载肌红蛋白(Myoglobin, Mb)的该制剂(RT + Mb@Gd-Nanotexaphyrin组),20  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 由Texaphyrin-Lipid制备的、没有螯合Gd的、没有包载肌红蛋白的该制剂(RT + Nanotexaphyrin组),20  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 由Texaphyrin-Lipid制备的、没有螯合Gd的、包载肌红蛋白的该制剂(RT + Mb@Nanotexaphyrin组),20  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 由实施例2所述的、由Gd-Texaphyrin-Lipid制备的、没有包载肌红蛋白的该制剂(RT + Gd-Nanotexaphyrin组)。其中,组名中的“RT”代表需要给予放疗的实验组。

[0054] (3)对于需要放射治疗(Radiotherapy, RT)的实验组,在每次给药的24 h后,用小动物X射线照射仪辐照肿瘤部位,照射剂量为4 Gy。第一次放疗时间定义为第0天。

[0055] (4)重复步骤(2)和(3),分别在第0、2、4、6、8天给予放射治疗,每次放疗前尾静脉给药。

[0056] (4)从第0天开始,每隔一天用游标卡尺测定肿瘤的长和宽,肿瘤体积近似等于肿瘤宽度的平方乘以肿瘤长度除以二。

[0057] 实验如附图5所示,只注射磷酸盐缓冲液的对照组(PBS组),肿瘤生长迅速。注射磷酸盐缓冲液后,给予放疗,肿瘤的生长受到了轻微的抑制。RT + Nanotexaphyrin组与RT + PBS组的肿瘤生长速度没有显著差别,但是,RT + Gd-Nanotexaphyrin组的肿瘤生长速度明显小于RT + PBS组,两组的肿瘤大小在第16天时有统计学显著差异( $P^{**}<0.01$ ),说明只有螯合Gd的Nanotexaphyrin才有放疗增敏效果。RT + Mb@Nanotexaphyrin组的肿瘤生长速度明显小于RT + PBS组( $P^{*}<0.05$ ),说明脂质体的包载的Mb能改善肿瘤缺氧,从而提高放疗效果。RT + Mb@Gd-Nanotexaphyrin组的治疗效果要远远好于其他治疗组,附图5中的“Predicted additive effect”代表Mb@Nanotexaphyrin和Gd-Nanotexaphyrin在没有协同效应的情况下,由理论计算推导出的两者放疗增敏效果之和,RT + Mb@Gd-Nanotexaphyrin组的治疗效果优于“Predicted additive effect”,说明脂质体包载的Mb和Gd-Nanotexaphyrin的放疗增敏效果存在协同效应,产生了“ $1+1>2$ ”的效果,也就是说,通过脂质体同时递送氧气和Gd-Texaphyrin,大大增加了Gd-Texaphyrin的放疗增敏效果。

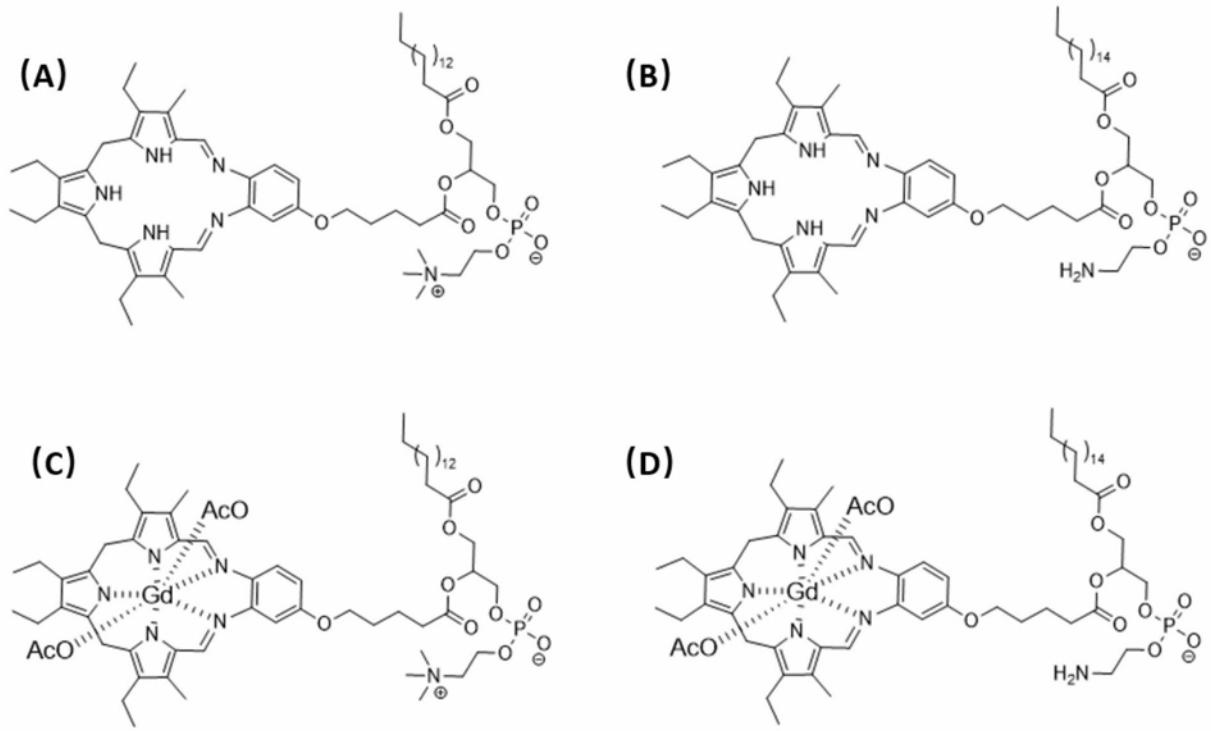


图1

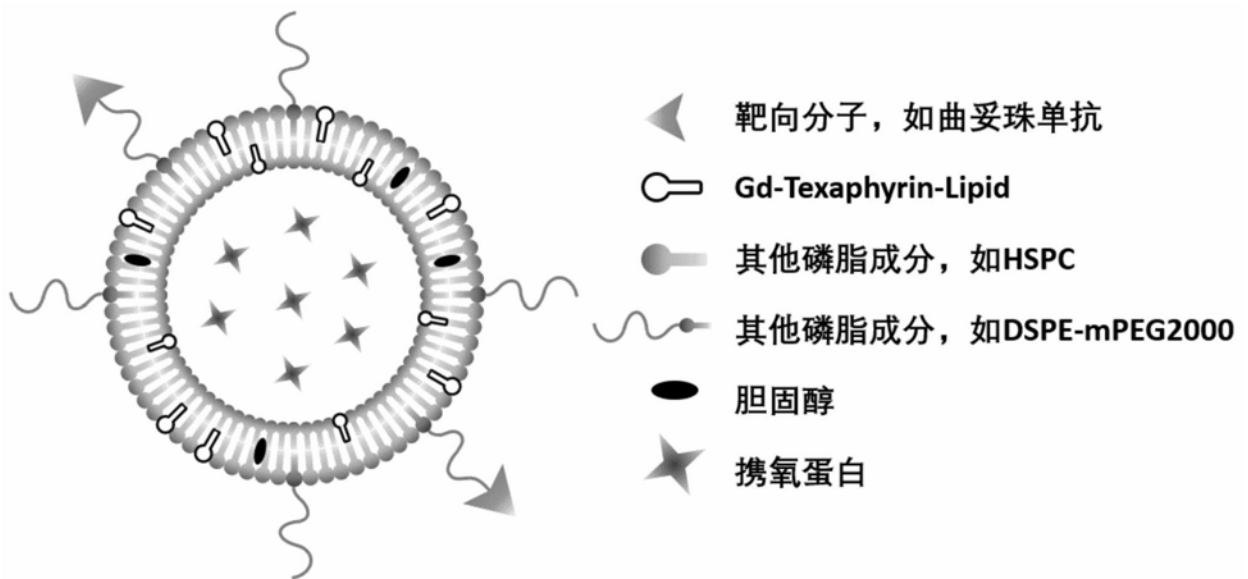


图2

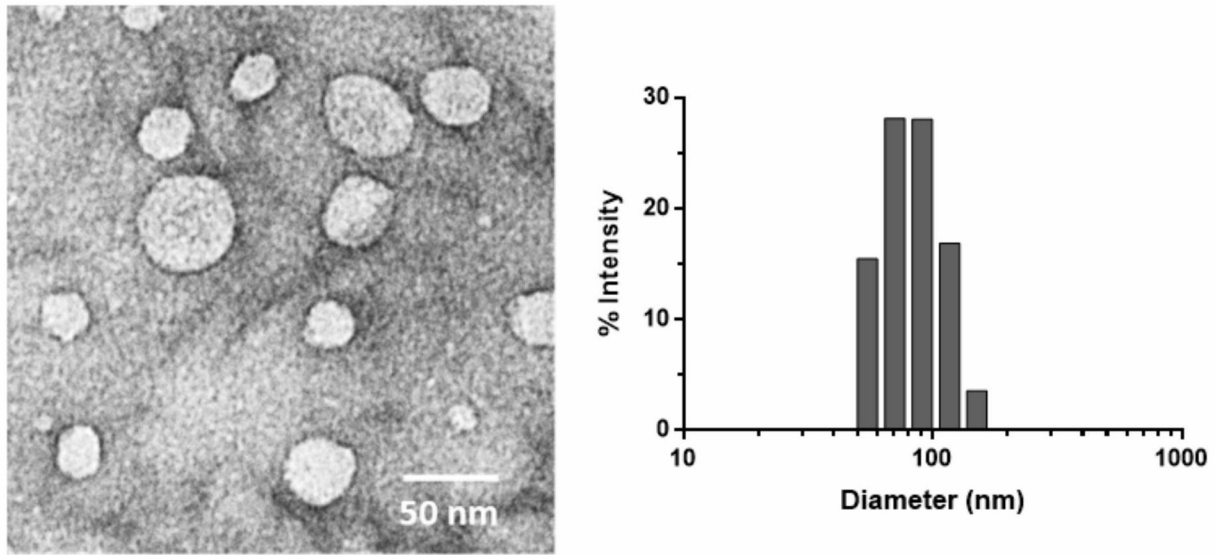


图3

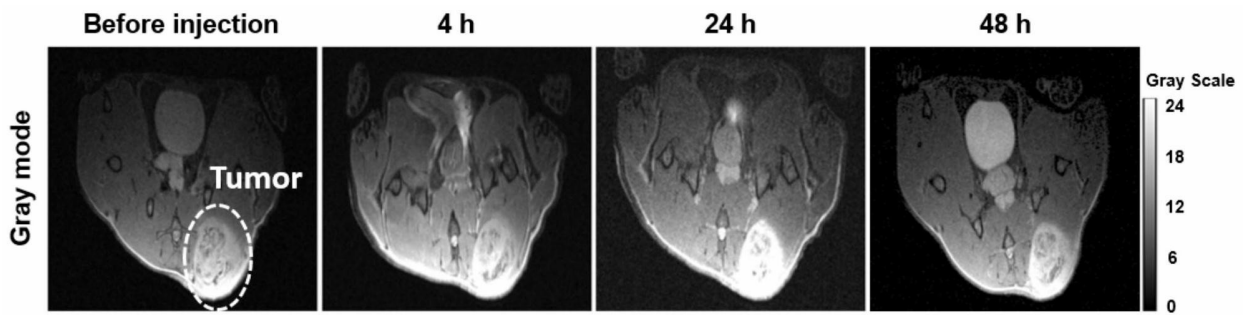


图4

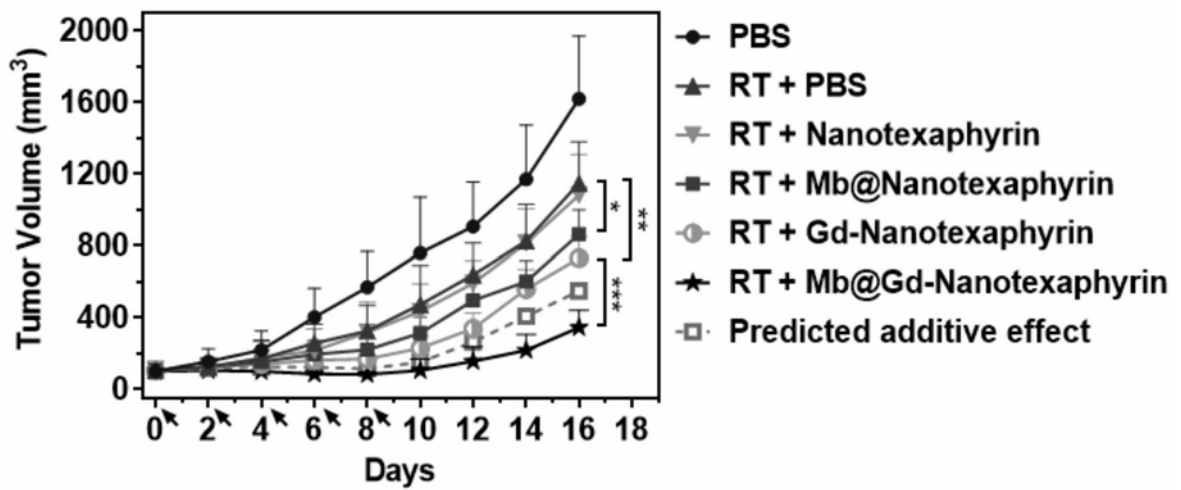


图5