



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108785673 A

(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201810738650.4

(22)申请日 2018.07.06

(71)申请人 重庆医科大学

地址 400016 重庆市渝中区医学院路1号

(72)发明人 张良珂 冯滔

(51)Int.Cl.

A61K 41/00(2006.01)

A61K 31/337(2006.01)

A61K 33/00(2006.01)

A61K 9/14(2006.01)

A61K 49/22(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图6页

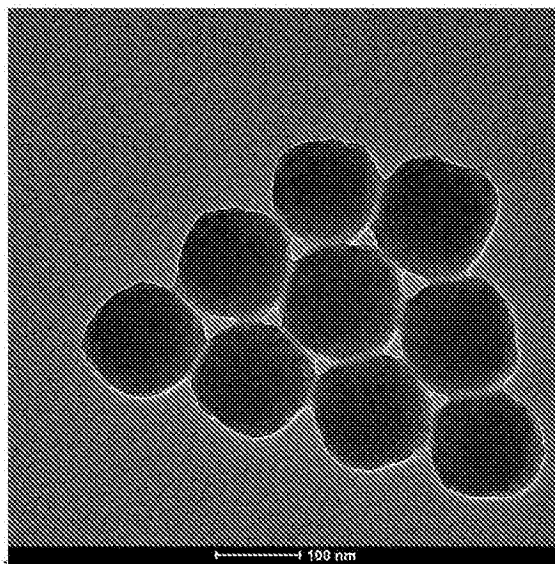
(54)发明名称

一种硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂及其制备方法。通过水热反应法制备的硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂粒径约为205.4nm,可通过肿瘤部位EPR效应实现被动靶向。在近红外激光的照射下,该纳米光热治疗剂不仅可以通过优良的光热转换效率诱导光热消融肿瘤细胞,还可以控制NO释放,从而改善EPR效应,增加纳米粒肿瘤内递送。同时,NO还可以通过诱导肿瘤细胞凋亡,阻止血管生成,逆转多药耐药性等来抑制肿瘤进展。另一方面,由于硝普钠与铁氰化钾的结构差异,导致纳米粒晶格缺陷,从而增加该纳米光热治疗剂的载药量。因此,携带化疗药物之后,在近红外光的照射下,可以实现剂量可控的NO释放,光热治疗和化疗的联合肿瘤治疗。此外,本发明的硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂还具有良好的光热稳定性以及一定的

光声造影性能。



1. 一种硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂,其特征在于制剂中各组分重量百分比为:铁氰化钾10~20份,药物1~3份,硝普钠10~150份,聚乙烯吡咯烷酮500~600份,36%浓盐酸8~80份,乙醇1000~2000份,水8000~20000份。

2. 如权利要求1所述的硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂的制备方法,其特征在于该方法包括以下步骤:(1)称取处方量的铁氰化钾、硝普钠和聚乙烯吡咯烷酮于一定量盐酸溶液中,搅拌均匀,将得到的混合液置于水浴锅中,于60℃~80℃下搅拌反应一定时间,从得到的产物中收集沉淀,用水超声洗涤沉淀数次,即得到硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒;(2)将步骤(1)得到的硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒分散在处方量的水中,加入处方量脂溶性药物的乙醇溶液,然后室温搅拌反应12小时,将反应所得的混合溶液于旋转蒸发仪上挥去溶剂,离心,收集沉淀并用水洗涤数次,除去未包载的药物,即得到硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂。

3. 如权利要求1,2所述的硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂,其特征在于所述盐酸溶液浓度在0.01M~1M范围内。

4. 如权利要求1,2所述的硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂,其特征在于所述铁氰化钾与硝普钠的摩尔比在0.1:9.9~9.9:0.1范围内。

5. 如权利要求1,2所述的硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂,其特征在于所述硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂粒径范围为50~1000nm。

一种硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗药物领域,具体涉及硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂及其制备方法。

背景技术

[0002] 一氧化氮(NO)是由一氧化氮合酶内源性产生的重要信号分子。它在心血管,神经,呼吸,胃肠和免疫等各种生物系统中发挥着至关重要的作用。近年来,NO对肿瘤增殖,凋亡和转移的影响逐渐引起人们的关注。值得注意的是,NO的抗肿瘤作用强烈依赖于其在靶点的浓度。例如,皮摩尔NO通过刺激肿瘤细胞生长和增强血管生成来促进肿瘤进展,而微摩尔NO通过诱导肿瘤细胞凋亡,阻止血管生成,逆转多药耐药性来抑制肿瘤进展。因此,精确时空控制NO在生理环境中的释放并提高其生物利用度的策略对于优化NO的治疗效果至关重要。最常见的方法是光激发无活性前体释放NO,通过调节光激发信号实现剂量可控的NO释放到特定的生理目标,而对非靶点组织影响很小。与紫外和可见光相比,近红外光在NO的光生成方面具有独特的优势,是因为其具有较大的穿透深度并且对组织相对温和。

[0003] 光热疗法是最近开发的一种有前途的肿瘤治疗技术。其利用光热转化材料将光子能量转换为热能,从而快速提高组织温度来消融肿瘤细胞。通过局部施加微创近红外光照射,可以控制由光热疗法引起的高热以最小化对非靶向组织的损伤。然而,由于肿瘤组织内热量的不均匀分布,单独使用光热疗法难以完全消除肿瘤,这必然导致肿瘤复发和转移。与单独使用光热疗法相比,联合化疗策略可以发挥显著的协同效应,并大大提高治疗效果。

[0004] 普鲁士蓝作为美国食品药品监督管理局批准用于治疗放射性暴露的解毒剂而广为人知,其显示出良好的生物相容性和生物安全性。最近,由于普鲁士蓝在近红外光窗口中显示出高吸光度的特征,已经引起许多研究人员的注意将其作为近红外光驱动的光热治疗剂之一。然而,由于肿瘤的不均匀性和穿透性差,导致纳米颗粒在肿瘤组织中累积较少。

[0005] 硝普钠通过在血管平滑肌中的代谢产生NO发挥其强大的血管舒张作用,并且是用于治疗高血压急症和急性左心衰竭的常用药物。值得注意的是,硝普钠是一种NO供体,而且它与介孔普鲁士蓝合成过程中的原料铁氰化钾结构相似。因此,在介孔普鲁士蓝的合成过程中,加入硝普钠使其嵌入晶体结构中,制备硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物。

[0006] 在本发明中采用水热合成法所制备的硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂粒径较小且分散均匀,可通过肿瘤部位EPR效应实现被动靶向。在近红外激光的照射下,该纳米光热治疗剂不仅可以通过优良的光热转换效率诱导光热消融肿瘤细胞,还可以控制NO释放,从而改善EPR效应,增加纳米粒肿瘤内递送。同时,NO还可以通过诱导肿瘤细胞凋亡,阻止血管生成,逆转多药耐药性等来抑制肿瘤进展。另一方面,由于硝普钠与铁氰化钾的结构差异,导致纳米粒晶格缺陷,从而增加该纳米光热治疗剂的载药量。因此,携带化疗药物之后,在近红外光的照射下,实现剂量可控的NO释放,光热治疗和化疗的联合肿瘤治疗。然而关于硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂及其制备方法,目前还

没有报道。

发明内容

[0007] 针对现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供一种硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂及其制备方法。该新型纳米光热治疗剂粒径较小且分散均匀,可通过肿瘤部位EPR效应实现被动靶向。在近红外激光的照射下,该纳米光热治疗剂不仅可以通通过优良的光热转换效率诱导光热消融肿瘤细胞,还可以控制NO释放,从而改善EPR效应,增加纳米粒肿瘤内递送。同时,NO还可以通过诱导肿瘤细胞凋亡,阻止血管生成,逆转多药耐药性等来抑制肿瘤进展。另一方面,由于硝普钠与铁氰化钾的结构差异,导致纳米粒晶格缺陷,从而增加该纳米光热治疗剂的载药量。因此,携带化疗药物之后,在近红外光的照射下,实现剂量可控的NO释放,光热治疗和化疗的联合肿瘤治疗。联合治疗的优点不仅不会损失单一疗法的效果,而且还可以显着提高治疗效果,缩短治疗周期,减少不良副作用。此外,本发明的纳米光热治疗剂还具有良好的光热稳定性以及一定的光声造影性能。采用水热合成法制备硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂,工艺简单方便,所采用的材料经济实惠且生物相容性好,具有广阔的应用前景。

[0008] 本发明的目的可以通过以下技术方案实现:

[0009] 步骤1:称取适量的铁氰化钾、硝普钠和聚乙烯吡咯烷酮于一定量盐酸溶液中,在磁力搅拌器下搅拌一定时间使其分散均匀,得到混合溶液。

[0010] 步骤2:将步骤1得到的混合溶液置于水浴锅中,于60℃~80℃下搅拌反应一定小时。

[0011] 步骤3:从步骤2得到的产物中收集沉淀。用水超声洗涤沉淀数次,即得到硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒。

[0012] 步骤4:将步骤3得到的硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒分散在一定量的水中,加入一定量脂溶性药物的乙醇溶液,于室温下搅拌反应12小时。将反应所得的混合溶液于旋转蒸发仪上挥去乙醇溶剂,离心,收集沉淀并用水洗涤数次,除去未加载的药物,即得到硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂。

[0013] 本发明应用水热合成法成功制备了硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米粒,该合成方法原料价格低廉易得,制备工艺简单、耗时少,易于大规模批量生产,制备所得的纳米粒粒径均一且具有良好的生物相容性和生物安全性,以及优良的光热转化性能和光热稳定,同时,在近红外光的照射下,能够实现对NO的控制释放,载药后可以实现对肿瘤的光热治疗,化疗和NO治疗三者的协同治疗。

附图说明

[0014] 图1为本发明实施例1中硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒透射电镜图。

[0015] 图2为本发明实施例1中硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒粒径分布图。

[0016] 图3为本发明实施例1中硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒傅里叶红外光谱图。

[0017] 图4为本发明实施例2中0.2mg/mL硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒在不同功率密度的808nm激光照射10分钟的升温曲线。

[0018] 图5为本发明实施例3中在0.8W/cm²、808nm激光照射下不同浓度的硝普钠缀合的

普鲁士蓝类似物纳米粒升温曲线。

[0019] 图6为本发明实施例4中硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒在不同功率密度的808nm激光照射下NO的释放情况。

[0020] 图7为本发明实施例5中硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒在脉冲式808nm激光照射下NO的释放情况。

[0021] 图8为本发明实施例6中硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米粒的累积释药行为。

[0022] 图9为本发明实施例7中不同浓度的硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒对4T1细胞的毒性。

[0023] 图10为本发明实施例8中以硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒为载体,在细胞层面实现热疗、化疗和NO治疗三者的协同肿瘤治疗。

[0024] 图11为本发明实施例9中不同浓度的硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒和硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米粒在不同激光照射时间下对4T1细胞的毒性。

[0025] 图12为本发明实施例10中小鼠的肿瘤体积生长曲线。

具体实施方式

[0026] 以下结合附图实施例对本发明进行详细描述,但本发明并不仅限于下述实施例。

[0027] 实施例1

[0028] 1. 硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒(m-PB-NO)的制备

[0029] 称取60mg铁氰化钾,488.7mg硝普钠和3g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)于40mL 0.1M的盐酸溶液中,搅拌20分钟使其分散均匀。并将其转移至水浴锅中,于80℃搅拌反应12小时。离心收集沉淀,并用水超声洗涤3次,即得到硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒。

[0030] 2. 硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米粒的制备(DTX@m-PB-NO)

[0031] 以多西他赛(DTX)为模型药物,将10mg硝普钠缀合的普鲁士蓝类似物纳米粒分散于10mL水中,加入1mL 1.5mg/mL多西他赛乙醇溶液,搅拌反应12小时。将反应所得的混合溶液于旋转蒸发仪上挥去乙醇溶剂,离心,收集沉淀并用水洗涤数次,除去未包载的药物,即得到硝普钠缀合的载药普鲁士蓝类似物纳米光热治疗剂。

[0032] 将制备成的m-PB-NO稀释一定的倍数,用透射电镜观察其形态,如图1所示,m-PB-NO为类立方体结构。采用马尔文激光粒度分析仪测量其粒径,粒径分布结果见图2,m-PB-NO的平均粒径为 205 ± 10.25 nm。傅里叶红外分析验证硝普钠的成功缀合,如图3所示,从介孔普鲁士蓝(m-PB)和m-PB-NO观察到氰基基团在 2086cm^{-1} 处的强伸缩振动。从硝普钠和m-PB-NO观察到 1944cm^{-1} 处的亚硝基的吸收峰,结果表明SNP能够镶嵌在m-PB骨架结构中以形成m-PB-NO

[0033] 实施例2

[0034] 取实施例1中制备的m-PB-NO分散于水中形成0.2mg/mL混悬液,取1mL的混悬液于石英比色皿中。使用功率密度为 $0.8\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $1.0\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $1.5\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $2.0\text{W}/\text{cm}^2$ 、 $2.5\text{W}/\text{cm}^2$ 的808nm激光分别照射10分钟,使用热电偶探针温度计记录不同时间点的温度变化情况如图4所示,随着照射时间的延长,溶液温度逐渐升高,同时随着激光功率增加,溶液升温速度增加,当激光功率为 $2.5\text{W}/\text{cm}^2$ 时,溶液的温度升高到了 63.4°C ,说明m-PB-NO具有优异的光热转化效

率。

[0035] 实施例3

[0036] 取实施例1中制备的m-PB-NO分散于水中,取0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.5mg/mL、1mg/mL的m-PB-NO混悬液1mL于石英比色皿中,以水作为空白对照。使用功率密度为0.8W/cm²的808nm激光分别照射10分钟,使用热电偶探针温度计记录不同时间点的温度变化情况如图5所示,随着照射时间的延长,溶液温度逐渐升高,同时随着m-PB-NO浓度的增加,溶液升温速度越快,当m-PB-NO浓度为1mg/mL时,溶液的温度升高到了47.5℃,说明m-PB-NO具有优异的光热转化效率。

[0037] 实施例4

[0038] 取实施例1中制备的m-PB-NO分散于PBS中,取1mL 1mg/mL的m-PB-NO悬浮液加入石英比色杯中,使用功率密度为1.5W/cm²、2.0W/cm²、2.5W/cm²的808nm激光分别照射20分钟,以未照射的作为空白对照。使用NO检测试剂盒测定样品中NO的释放量如图6所示,随着照射时间的延长,NO的释放量逐渐增加,同时随着激光功率增加,NO的释放速率也增加,结果表明m-PB-NO在近红外光激光的照射下能够释放一定量的NO。

[0039] 实施例5

[0040] 取实施例1中制备的m-PB-NO分散于PBS中,取1mL 1mg/mL的m-PB-NO悬浮液加入石英比色杯中,首先使用使用功率密度为2.5W/cm²的808nm激光照射5分钟,然后关闭激光5分钟,然后再进行两次激光周期,在选定的时间间隔,使用NO检测试剂盒测定样品中NO的释放量如图7所示,当激光打开时,m-PB-NO迅速释放出NO,而随着激光关闭后,NO的释放量几乎没有增加,结果表明m-PB-NO能够刺激响应近红外激光信号,通过调节激光信号,可是实现对NO的控制释放。

[0041] 实施例6

[0042] 取实施例1中制备的DTX@m-PB-NO和游离DTX样品分散在PBS中并置于透析袋中,将其浸入含有0.5% (v/v)吐温80的PBS溶液中。在37℃下旋转速度为120转/分的摇床中振摇。在不同时间点取出2mL的溶液,然后加入相同量的新鲜PBS,采用高效液相色谱法测定其累计释放的DTX。测试结果如图8所示,由于DTX的水溶性差,DTX悬浮液在36小时的累积释放率仅为50.65%,表现出相对缓慢的释放速率。而在DTX@m-PB-NO中,由于DTX的分散性增加,12小时累计释放率为69.92%,24小时为81.45%,具有相对较快的释放速率。

[0043] 实施例7

[0044] 取实施例1中制备的m-PB-NO,用含有10%胎牛血清的RPMI-1640细胞培养基配制成0.0063mg/mL、0.0125mg/mL、0.025mg/mL、0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.5mg/mL浓度,用噻唑蓝(MTT)法评价不同m-PB-NO载体浓度对4T1细胞的毒性。结果如图9所示,结果表明,m-PB-NO即使在浓度高达0.5mg/mL时,4T1细胞的存活率仍高达90%以上,证明m-PB-NO对细胞是没有毒性的。

[0045] 实施例8

[0046] 取实施例1中制备的m-PB-NO和DTX@m-PB-NO以及游离DTX,用含有10%胎牛血清的RPMI-1640细胞培养基配制成含有相同DTX量的不同浓度,用噻唑蓝(MTT)法评价不同治疗方法对4T1细胞的毒性。将4T1鼠乳腺癌细胞在含有10% (v/v)胎牛血清和1%青霉素/链霉素的RPMI-1640培养基中于37℃,5%CO₂气氛下培养。将细胞(每孔5×10³个)接种在96孔培

养板中并温育24小时以附着细胞。除去培养基,然后加入不同浓度含有相同DTX量的DTX、m-PB-NO和DTX@m-PB-NO。24小时后,用功率密度为 $1.5\text{W}/\text{cm}^2$ 的808nm激光照射含有m-PB-NO和DTX m-PB-NO的细胞5分钟。再孵育24小时后,用PBS缓冲液洗涤两次后再加入 $10\mu\text{L}$ MTT溶液($5\text{mg}/\text{mL}$)和 $90\mu\text{L}$ 新鲜培养基并将细胞再温育4小时。然后用 $150\mu\text{L}$ 二甲基亚砷(DMSO)代替每孔中的培养基,轻轻振摇后于490nm处测定吸光度并计算其相应的细胞存活率。实验结果如图10所示,随着所含DTX浓度的增加,DTX@m-PB-NO细胞存活率逐渐降低,在激光照射后,相对应的细胞存活率进一步降低,对细胞的杀伤力进一步增强。

[0047] 实施例9

[0048] 取实施例1中制备的m-PB-NO和DTX@m-PB-NO以及游离DTX,用含有10%胎牛血清的RPMI-1640细胞培养基配制成含有相同DTX量的不同浓度,用噻唑蓝(MTT)法评价不同激光照射时间对4T1细胞的毒性。将4T1鼠乳腺癌细胞在含有10%(v/v)胎牛血清和1%青霉素/链霉素的RPMI-1640培养基中于 37°C ,5% CO_2 气氛下培养。将细胞(每孔 5×10^3 个)接种在96孔培养板中并温育24小时以附着细胞。除去培养基,然后加入不同浓度含有相同DTX量的DTX、m-PB-NO和DTX@m-PB-NO。24小时后,用功率密度为 $1.5\text{W}/\text{cm}^2$ 的808nm激光分别照射0分钟、3分钟、5分钟和10分钟,再孵育24小时后,用PBS缓冲液洗涤两次后再加入 $10\mu\text{L}$ MTT溶液($5\text{mg}/\text{mL}$)和 $90\mu\text{L}$ 新鲜培养基并将细胞再温育4小时。然后用 $150\mu\text{L}$ 二甲基亚砷(DMSO)代替每孔中的培养基,轻轻振摇后于490nm处测定吸光度并计算其相应的细胞存活率。实验结果如图11所示,对于游离DTX和空白组,随着激光照射时间的增加,其细胞存活率并不会有多大改变,表明激光对游离DTX和空白组的细胞并没有影响,而对于m-PB-NO和DTX@m-PB-NO组,随着照射时间的增加,其细胞存活率明显下降,表明m-PB-NO和DTX@m-PB-NO有明显光热治疗效果,当携带DTX化疗药物后,能够发挥明显的协同作用,对细胞的杀伤率进一步增加。

[0049] 实施例10

[0050] 将4T1荷瘤雌性BALB/c小鼠随机分成六组:(a)生理盐水;(b)生理盐水+激光;(c)DTX;(d)DTX@m-PB-NO;(e)m-PB-NO+激光;(f)DTX@m-PB-NO+激光(每组 $n=5$)。在小鼠肿瘤大小达到约 130mm^3 后,每两天分别静脉注射生理盐水,游离DTX,m-PB-NO和DTX@m-PB-NO。静脉注射24小时后,来自组b,e和f的小鼠接受808nm激光($1.5\text{W}/\text{cm}^2$)照射5分钟。每2天记录小鼠的肿瘤体积,根据以下等式计算肿瘤体积:体积 $=0.5\times L\times W^2$,其中L和W分别是肿瘤的长度和宽度。在第16天,对小鼠进行尸体解剖,收集肿瘤并对肿瘤称重。实验结果如图12所示,对于用生理盐水和生理盐水+激光治疗组,肿瘤每天持续增加。与游离DTX组相比,用DTX@m-PB-NO处理的小鼠显示出更好的抗肿瘤效力。这表明由于肿瘤组织的EPR效应,DTX@m-PB-NO的肿瘤内递送增加,导致肿瘤组织中的高药物浓度,从而发挥更好的抗肿瘤效果。在NIR照射下,从DTX m-PB-NO释放的NO可降低多药耐药性,从而增强DTX的肿瘤抑制能力。同时,m-PB-NO诱导的热疗可以增加细胞内药物的积累和细胞对药物的敏感性。这表明DTX@m-PB-NO+激光组发挥明显的协同效应可以显著地抑制体内肿瘤的生长。

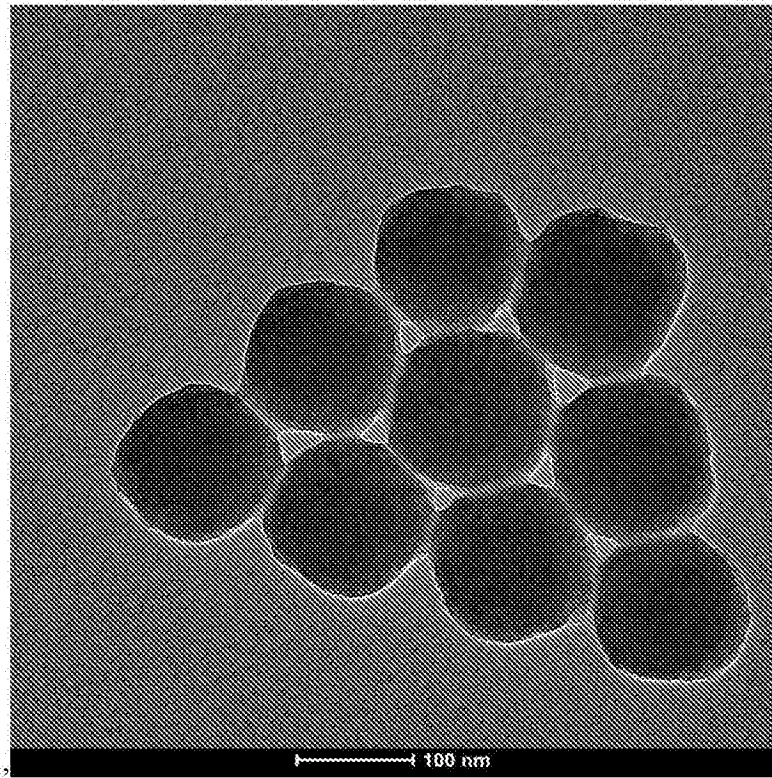


图1

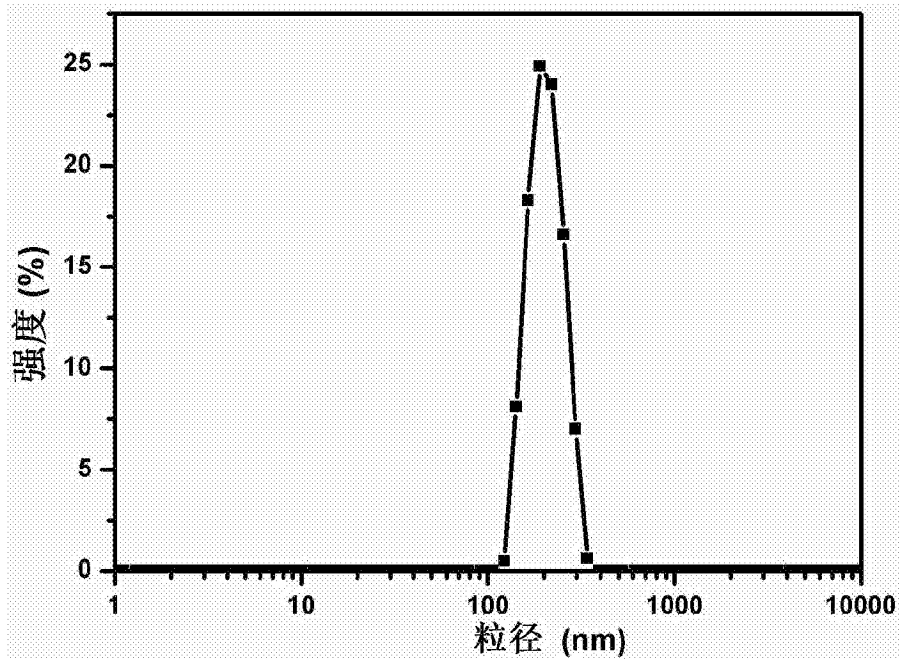


图2

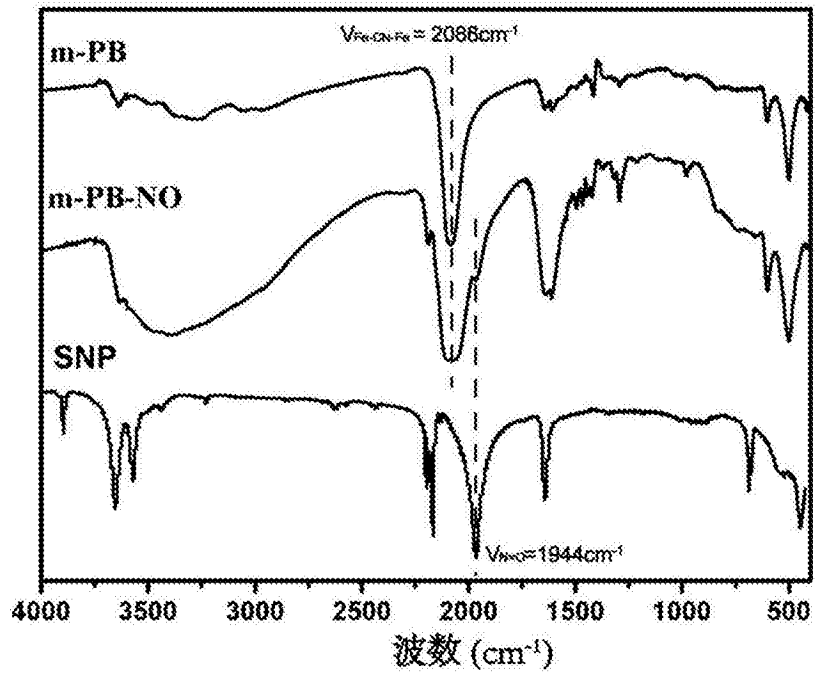


图3

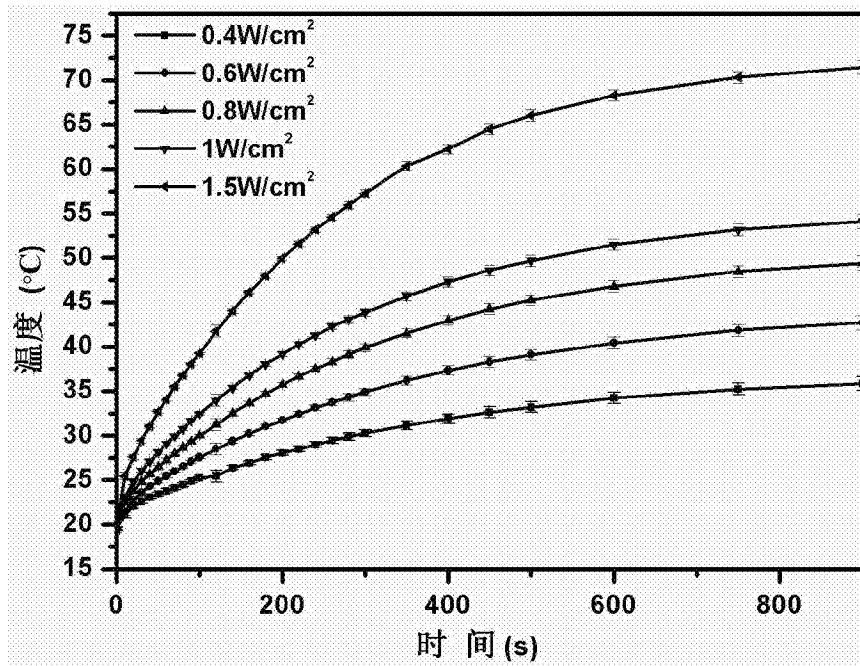


图4

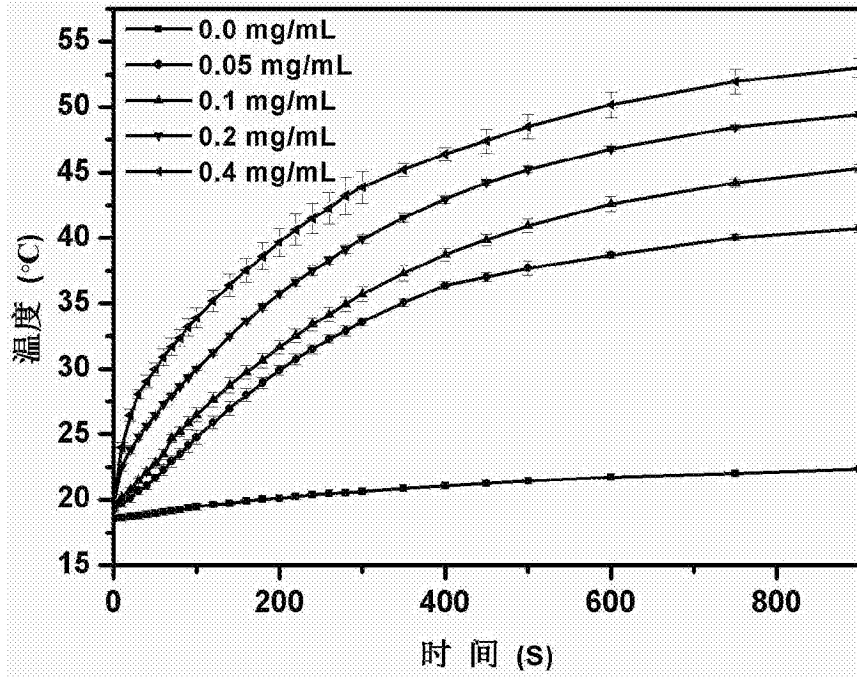


图5

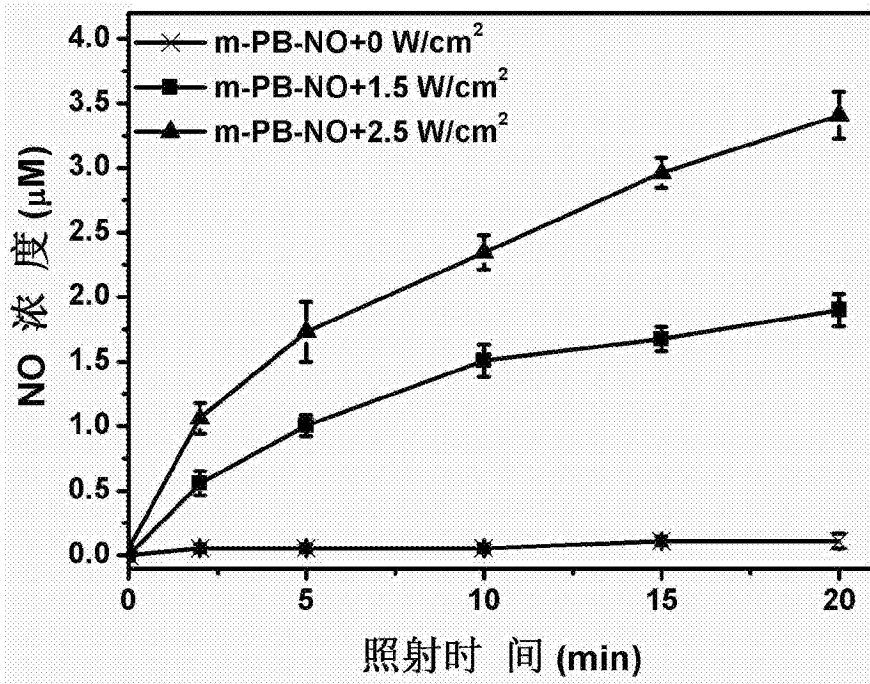


图6

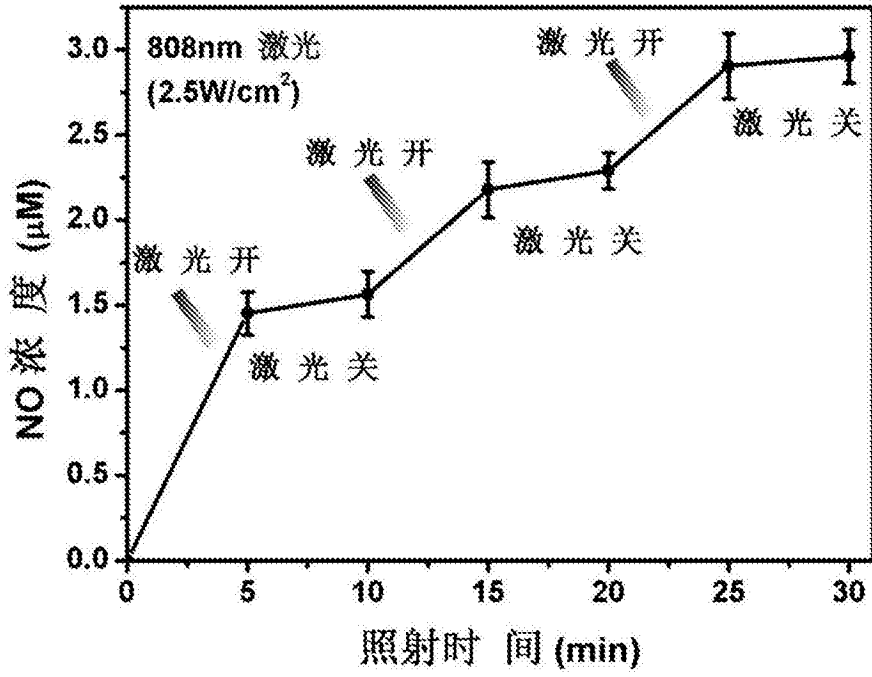


图7

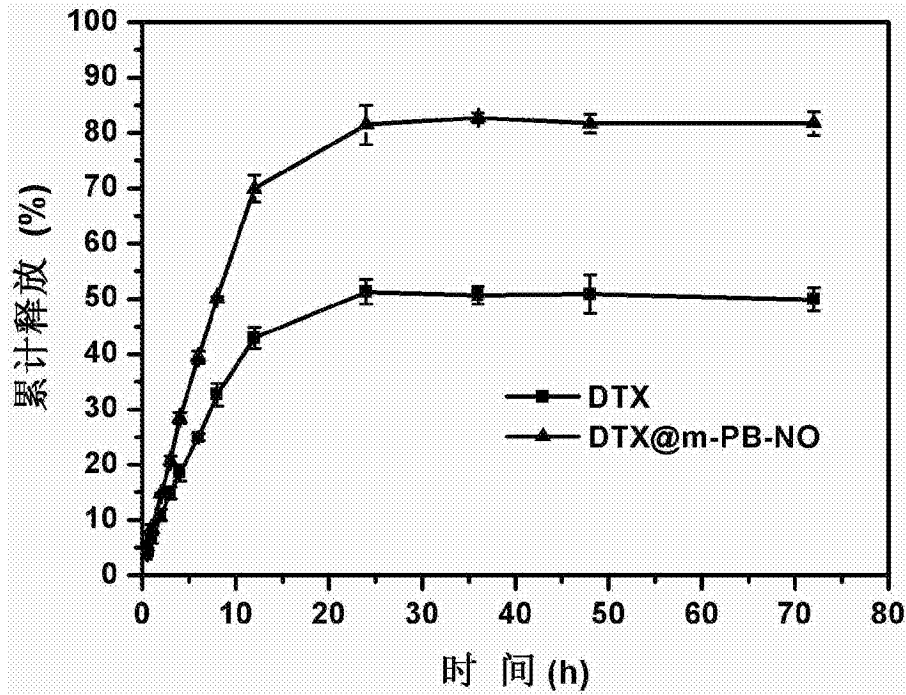


图8

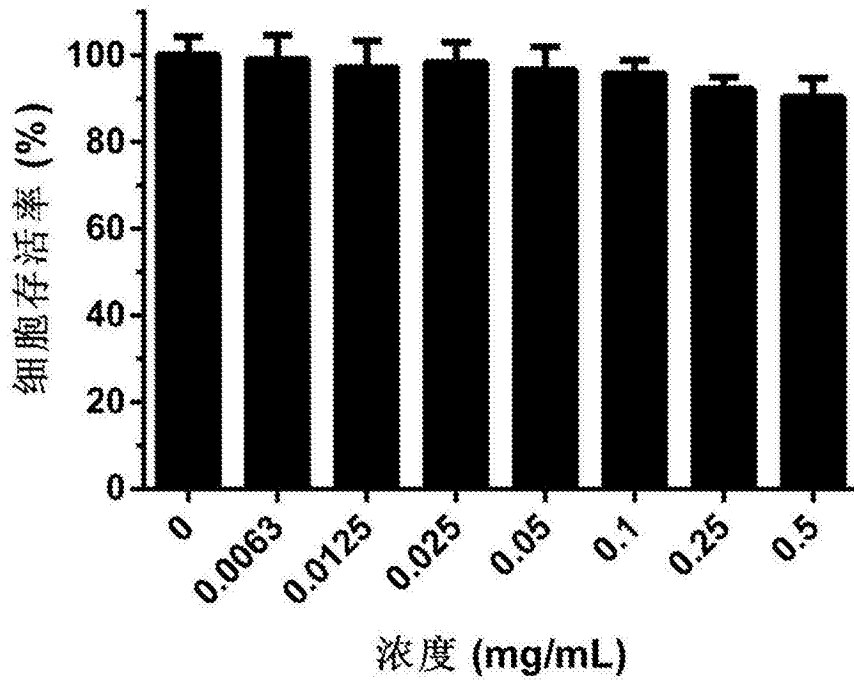


图9

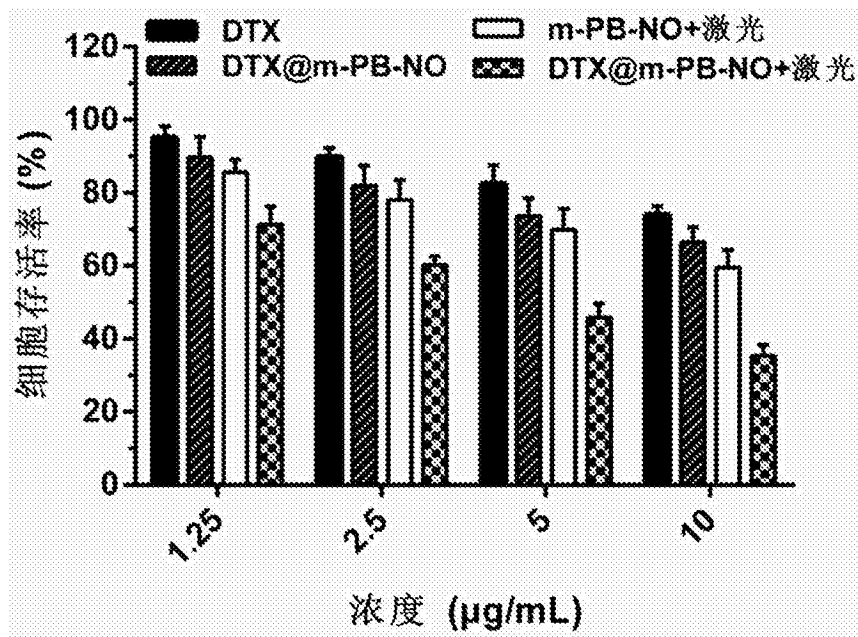


图10

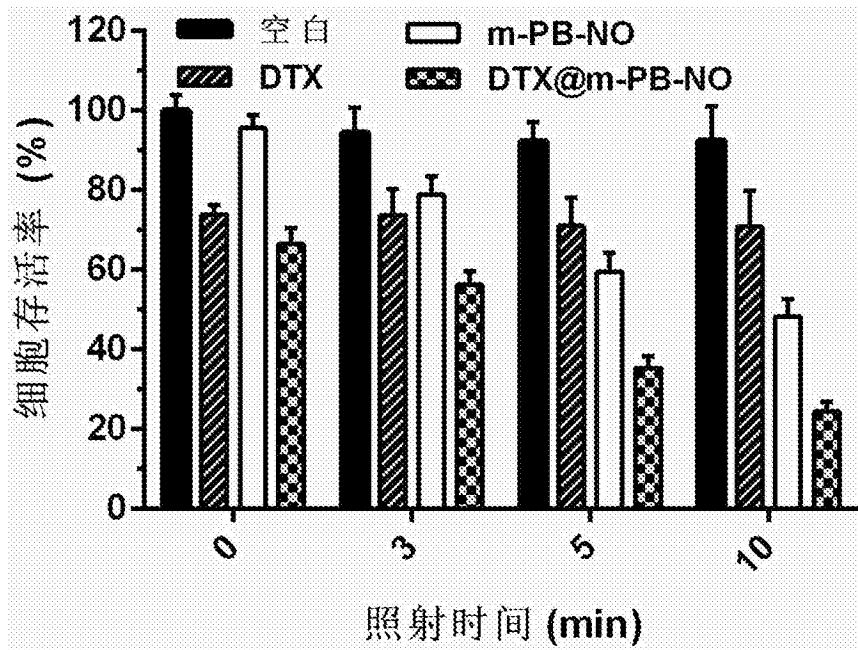


图11

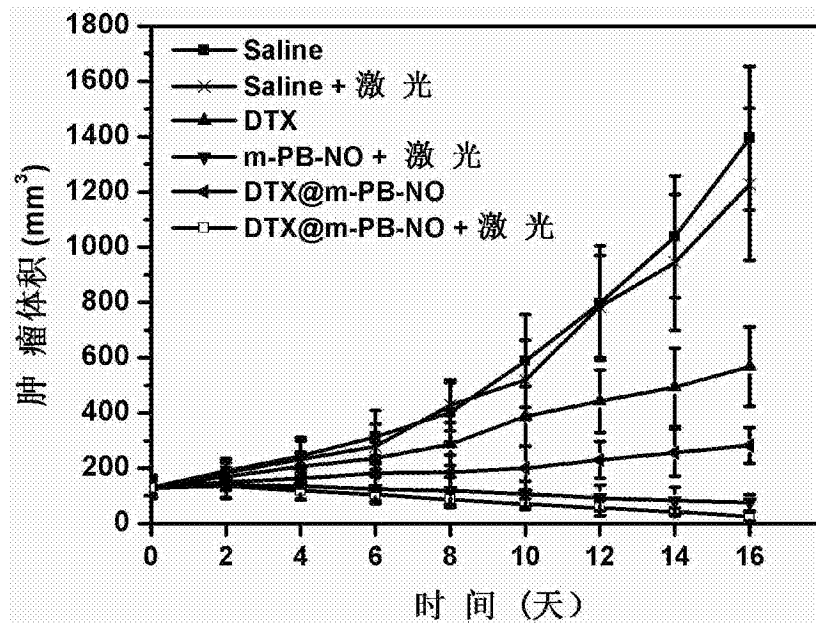


图12