



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106668879 B

(45)授权公告日 2019.07.16

(21)申请号 201710004818.4

A61K 49/04(2006.01)

(22)申请日 2017.01.04

A61K 41/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106668879 A

(56)对比文件

CN 102717095 A,2012.10.10,

CN 104874811 A,2015.09.02,

CN 104607240 A,2015.05.13,

杨艳.“基于Cu₃BiS₃的多功能纳米材料在生物成像和光热治疗上的应用”.《上海师范大学-硕士学位论文》.2015,第15,37-52,67页.

(43)申请公布日 2017.05.17

(73)专利权人 武汉大学中南医院

地址 430071 湖北省武汉市武昌区东湖路169号

审查员 鲁众阳

(72)发明人 徐海波 吴波 陆树婷 黄世文

程震 廖如芳 喻会 李玉爽

(74)专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司

公司 42104

代理人 徐绍新

(51)Int.Cl.

A61K 49/22(2006.01)

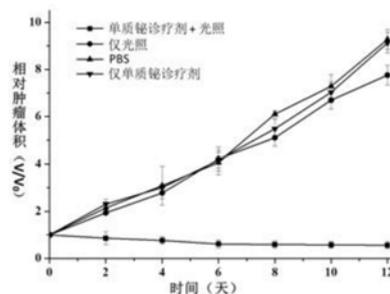
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种同时用于CT/PAT造影和光热治疗的纳米单质铋诊疗剂的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种同时用作CT/PAT造影和光热治疗的纳米单质铋诊疗剂的制备方法,将疏水性还原性有机溶剂与Bi(NO₃)₃反应,生成疏水性分子包裹的纳米单质铋晶体,然后在疏水性有机溶剂与水的混合溶液内与两亲性聚合物反应。本发明制备的纳米单质铋诊疗剂同时具有CT成像增强及PAT成像增强的功能,此外还发现具有较好的光热效果,可同时实现肿瘤术前诊断、术中追踪及术后评价等一体化诊疗过程,具有较好的发展潜力。



1. 一种同时用作CT/PAT造影和光热治疗的纳米单质铋诊疗剂的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 将疏水性还原性有机溶剂与 $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ 按1:1~20的摩尔比混合,然后加热至170~180℃发生反应,自然冷却至20~40℃,过滤,所得固体经乙醇及氯仿洗脱后,即为疏水性分子包裹的纳米单质铋晶体;

2) 将纳米单质铋晶体分散到疏水性有机溶剂与水的混合溶液内,所述混合溶液中纳米单质铋晶体的浓度为20~100mg/ml,加入两亲性聚合物,超声反应10~30min,旋蒸除去疏水性溶剂,得到的溶液即为纳米单质铋诊疗剂,

所述疏水性还原性有机溶剂为正十二硫醇、叔十二硫醇,油胺中的至少一种;

所述两亲性聚合物为磷脂聚乙二醇、聚乙二醇、巯基聚乙二醇中的至少一种;

所述混合溶液中疏水性有机溶剂与水的体积比为1:1~5。

2. 如权利要求1所述纳米单质铋诊疗剂的制备方法,其特征在于:所述混合溶液中纳米单质铋晶体的浓度为50~80mg/ml。

一种同时用于CT/PAT造影和光热治疗的纳米单质铋诊疗剂的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于纳米材料及分子医学技术领域,具体涉及一种纳米单质铋诊疗剂的制备方法。

背景技术

[0002] 针对肿瘤患者的治疗,传统三大治疗手段放疗、化疗和手术治疗的局限性越来越明显,如缺乏对病变部位的选择性,创伤大,无法实现个体化治疗等,因此迫切需要开发新型的治疗手段来予以解决。目前光热治疗(photothermal therapy, PTT)是近年来迅速发展的一种微创肿瘤治疗技术,被认为是一种极具潜力替代手术的肿瘤治疗方法。靶向肿瘤部位的光敏剂在入射光激发下,利用其光热转换效应产生热,可使肿瘤局部温度升高并达到一定温度(42℃以上),从而实现杀伤肿瘤细胞的作用。由于利用靶向纳米光敏剂的肿瘤靶向传输以及对肿瘤部位选择性的照射,可显著降低全身系统毒性,同时,由于用于激发的近红外光组织穿透能力强,整个治疗过程完全由激光控制,并且可以和影像学手段结合,在给出病变组织影像的同时定点清除病灶,形成了兼具诊断和治疗能力的诊疗一体化载体,引起了肿瘤学治疗领域的广泛关注。

[0003] 靶向性显影一直以来都是CT成像技术的弱项,单纯的有机碘对比剂细胞吞噬量极低,且没有明显选择性,无法实现这一目的。近年来出现无机金属纳米粒子CT造影剂的出现,在一定程度上解决了这个问题。然而,当前金属纳米造影剂普遍存在价格昂贵、制备工艺复杂、生物相容性不足等问题。铋作为一种最便宜的重金属元素,已被广泛应用于临床制剂,如胶态次枸橼酸铋,是一种非常安全可靠的选择。Bi₂S₃纳米已被证明具有较好的CT成像效果,而本发明构建了一种单质铋纳米颗粒,并利用进行了亲水性改造,降低了毒性,具有很好的生物相容性。相较于前期研究,具有明显改进。同时本发明首次发现了单质铋纳米颗粒具有较好的光热效果及光声成像效果,大大拓宽了其临床应用,具有更大的临床意义。

发明内容

[0004] 针对以上需求,本发明的目的在于提供一种同时用于CT/PAT造影和光热治疗的纳米单质铋诊疗剂的制备方法。

[0005] 本发明提供的制备方法包括以下步骤:

[0006] 1) 将疏水性还原性有机溶剂与Bi(NO₃)₃按1:1~20的摩尔比混合,然后加热至170~180℃发生反应,自然冷却至20~40℃,过滤,所得固体经乙醇及氯仿洗脱后,即为疏水性分子包裹的纳米单质铋晶体;

[0007] 2) 将纳米单质铋晶体分散到疏水性有机溶剂与水的混合溶液内,所述混合溶液中纳米单质铋晶体的浓度为20~100mg/ml,加入两亲性聚合物,超声反应10~30min,旋蒸除去疏水性溶剂,得到的溶液即为纳米单质铋诊疗剂。

[0008] 优选地,所述疏水性还原性有机溶剂为正十二硫醇、叔十二硫醇,油胺中的至少一

种。

[0009] 优选地,所述两亲性聚合物为磷脂聚乙二醇、聚乙二醇、巯基聚乙二醇中的至少一种。

[0010] 优选地,所述混合溶液中疏水性有机溶剂与水的体积比为1:1~5,最佳为1:3。

[0011] 优选地,所述混合溶液中纳米单质铋晶体的浓度为50~80mg/ml,最佳为60mg/ml。

[0012] 本发明提供的诊疗剂以疏水性分子包裹的纳米单质铋晶体为内核,外层再包裹一层两亲性聚合物(分子结构中同时含有亲水基团和疏水基团的聚合物)分子,内核的粒径<50nm,两亲性聚合物包裹后的粒径为100-200nm。

[0013] 本发明在CT/PAT成像造影及光热治疗诊疗剂具有明显的优势,如1.单质铋具有较大的相对原子质量,X射线吸收能力强,X射线衰减系数大,CT组织分辨率高;2.单质铋对近红外波段有较强的吸收,可同时用作光热治疗及PAT成像的造影剂。3.单质铋合成原料廉价易得,合成工艺简单易行。

[0014] 本发明以单质铋为基体吸收近红外光,可转换为高能量的热能使其具有较好的光热治疗及光声成像效果、同时铋本身具有CT造影剂的效果。两亲性聚合物的存在克服了纳米单质铋晶体本身的毒副作用及疏水性,使其具有良好的分散性及生物相容性,可广泛应用于肿瘤特异性的诊断和治疗,在临床应用中具有巨大价值,可同时实现肿瘤术前诊断、术中追踪及术后评价等一体化诊疗过程,具有较好的发展潜力。

附图说明

[0015] 图1是正十二硫醇包裹的纳米单质铋晶体的透射电镜图像。

[0016] 图2是纳米单质铋诊疗剂的透射电镜图像。

[0017] 图3是正十二硫醇包裹的纳米单质铋晶体和纳米单质铋诊疗剂的粒径分布图。

[0018] 图4是纳米单质铋诊疗剂在不同光强下的温度变化曲线。

[0019] 图5是纳米单质铋诊疗剂对C6细胞(胶质瘤细胞)存活率的影响。

[0020] 图6是纳米单质铋诊疗剂在不同浓度的CT值曲线。

[0021] 图7是纳米单质铋诊疗剂在不同浓度的PAT信号值曲线。

[0022] 图8是荷瘤鼠肿瘤在不同处理条件下的的相对增长曲线。

具体实施方式

[0023] 下面通过实施例对本发明进行详细地说明。

[0024] 实施例1

[0025] 一种纳米单质铋诊疗剂的制备方法,包括以下步骤:

[0026] 1) 将正十二硫醇与 $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 按1:3的摩尔比混合,使用加热套加热至178℃,保持一分钟,自然条件下降温至30℃,整个过程在搅拌状态下进行同时通氮气。过滤,将所得固体用无水乙醇洗脱3次(转速8000r/min,15min/次),氯仿洗脱1次(转速3000r/min,8min/次),40℃蒸干除去氯仿,得到的产物即为正十二硫醇包裹的纳米单质铋晶体。

[0027] 2) 将所得正十二硫醇包裹的纳米单质铋晶体分散于环己烷与水的混合溶剂(环己烷与水的体积比1:3)中,使晶体浓度为60mg/ml,超声30min后,加入磷脂聚乙二醇(DSPE-PEG₂₀₀₀),磷脂聚乙二醇与单质铋的摩尔比为1:5,超声反应30min,反应液经0.45um的滤膜

过滤,除去大的团聚体,滤液旋蒸除去环己烷,剩下的溶液即为纳米单质铋诊疗剂。

[0028] 从图1、图2的透射电镜图中可以看出,步骤1)制得的纳米单质铋晶体和步骤2)制得的纳米单质铋诊疗剂粒径较为均一,形状为规则的圆形,且分散性较好。

[0029] 从图3的粒径分布图中可以看出,本实施例制得的纳米铋材料粒径均一,单分散性(PDI)较小,均小于0.1。

[0030] 实施例2

[0031] 一种纳米单质铋诊疗剂的制备方法,包括以下步骤:

[0032] 1)将油胺与 $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 按1:7的摩尔比混合,使用加热套加热至 170°C ,保持2分钟,自然条件下降温至 40°C ,整个过程在搅拌状态下进行同时通氮气。过滤,将所得固体用无水乙醇洗脱2次,氯仿洗脱2次,蒸干除去氯仿,得到的产物即为油胺包裹的纳米单质铋晶体。

[0033] 2)将所得油胺包裹的纳米单质铋晶体分散于氯仿与水的混合溶剂(氯仿与水的体积比1:1)中,使晶体浓度为 20mg/ml ,超声30min后,加入巯基聚乙二醇,巯基聚乙二醇与单质铋的摩尔比为1:1,超声反应20min,反应液经 $0.45\mu\text{m}$ 的滤膜过滤,除去大的团聚体,滤液旋蒸除去氯仿,剩下的溶液即为纳米单质铋诊疗剂。

[0034] 实施例3

[0035] 一种纳米单质铋诊疗剂的制备方法,包括以下步骤:

[0036] 1)将叔十二硫醇与 $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 按1:1的摩尔比混合,使用加热套加热至 180°C ,保持1分钟,自然降温至 20°C ,整个过程在搅拌状态下进行同时通氮气。过滤,将所得固体用无水乙醇洗脱1次,氯仿洗脱1次,蒸干除去氯仿,得到的产物即为叔十二硫醇包裹的纳米单质铋晶体。

[0037] 2)将所得叔十二硫醇包裹的纳米单质铋晶体分散于甲苯与水的混合溶剂(甲苯与水的体积比1:5)中,使晶体浓度为 100mg/ml ,超声30min后,加入磷脂聚乙二醇,磷脂聚乙二醇与单质铋的摩尔比为1:8,超声反应10min,反应液经滤膜过滤,除去大的团聚体,滤液旋蒸除去甲苯,剩下的溶液即为纳米单质铋诊疗剂。

[0038] 实施例4

[0039] 单质铋纳米材料的光热转换能力评价:

[0040] 取 1mL (1mg/mL) 实施例1制得的纳米单质铋诊疗剂于PE管内,分别在 $0.5, 1.0, 1.5\text{W/cm}^2$ 的光强下经 808nm 激光照射,利用近红外成像系统记录观察时间内不同时间点的温度,绘制温度时间曲线。

[0041] 从图4可以看出:在 1W/cm^2 及 1.5W/cm^2 的光强下,1分钟内该纳米材料的温度上升 30°C 以上,说明该材料在上述光强条件下具有良好的光热转换能力,能够很好的用于光热治疗及光声成像。

[0042] 实施例5

[0043] 纳米单质铋诊疗剂用作CT/PAT光声成像:

[0044] 配置不同浓度($12.0, 9.0, 6.0, 4.0, 1.0\text{mg/mL}$)的实施例1制得的纳米单质铋诊疗剂,纯水作对照,分别取 1mL 于PE管内,利用小动物成像CT测得不同浓度纳米单质铋诊疗剂的Hu值。

[0045] 配置不同浓度($10, 5, 2.5, 1.25, 0.625\text{mg/mL}$)的实施例1制得的纳米单质铋诊疗

剂,分别取1mL至于玻璃管内,利用PA system Endra Nexus128测得光声信号值。

[0046] 从图6可以看出:纳米单质铋诊疗剂在体外的CT值大小随浓度呈线性增加,最大浓度对应的CT值与纯水对比,相差700Hu,说明该纳米诊疗剂能够较好的用于CT成像。

[0047] 从图7可以看出:纳米单质铋诊疗剂在体外的PAT信号值大小随浓度呈线性增加,在最大浓度时约为9000a.u.,说明该纳米材料具有很好的光声成像能力。

[0048] 实施例6

[0049] 纳米单质铋诊疗剂用于光热治疗:

[0050] 1. 体外光热效果及细胞毒性评价:C6细胞接种于两个96孔板内,待细胞长至20000个/孔,加入100uL不同浓度(100, 25, 12.5, 6.25, 3.125ug/mL)的纳米单质铋诊疗剂同培养24小时后,一个96孔板接受光强为 $1\text{W}/\text{cm}^2$ 的808nm激光照射15分钟,同时未加入纳米单质铋诊疗剂的孔接受相同的光照处理,光照后加20mL MTT共培养4小时,取出含MTT的培养基,加150mL DMSO,涡旋振荡2分钟,酶标仪测量96孔板在570nm的吸光度,计算存活率。

[0051] 2. 体内光热治疗效果评价:将16只荷瘤小鼠随机分为四组,第一组每隔一天尾静脉注射200uL PBS;第二组每隔一天在强度为 $1\text{W}/\text{cm}^2$ 的808nm激光下照射15分钟;第三组每隔一天尾静脉注射浓度为10mg/mL的纳米单质铋诊疗剂(10mg/mL 200uL);第四组首先每隔一天尾静脉注射浓度为(10mg/mL 200uL)的纳米单质铋诊疗剂,半小时至一小时后在强度为 $1\text{W}/\text{cm}^2$ 的808nm激光下照射15分钟。经6次不同条件处理,每次接受处理之后需测量每个肿瘤的长径及短径(a:长径,b:短径),计算其体积大小($V=a*b^2/2$),记录并处理数据,得到相对肿瘤体积(V/V_0)的曲线。

[0052] 从图5可以看出:通过测得的细胞存活率得到该诊疗剂体外细胞毒性及体外光热疗效。经光照处理的细胞,在最高浓度 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ C6细胞仅存活20%;同时未经光照处理的细胞,与最高浓度 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 单质铋纳米材料共培养中,存活率可达到85%以上。说明此纳米诊疗剂不但细胞毒性低,还具有很好地体外光热杀肿瘤细胞的作用。

[0053] 从图8可以看出:经6次单质铋纳米材料与光照同时处理后,肿瘤生长得到明显抑制,甚至逐渐减小。而其他三组对照组的肿瘤基本呈直线增长模式,是实验组肿瘤大小的10倍以上。证实了该纳米材料具有很好地体内光热治疗效果,能够很好地抑制肿瘤生长。

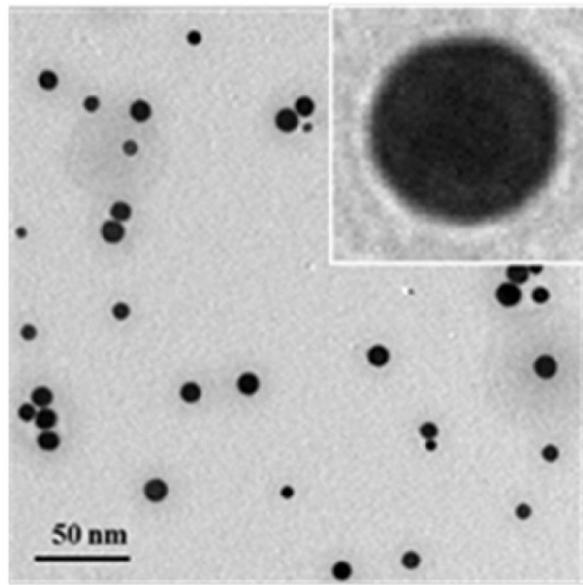


图1

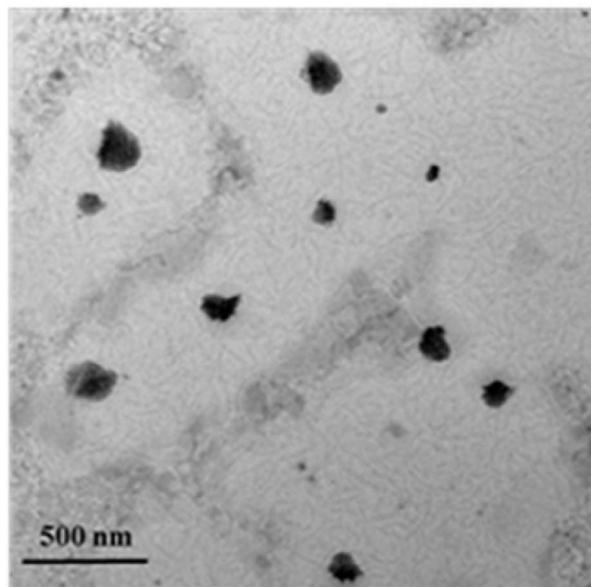


图2

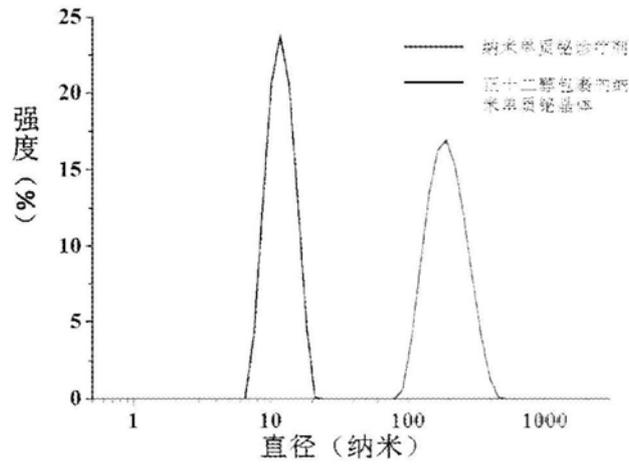


图3

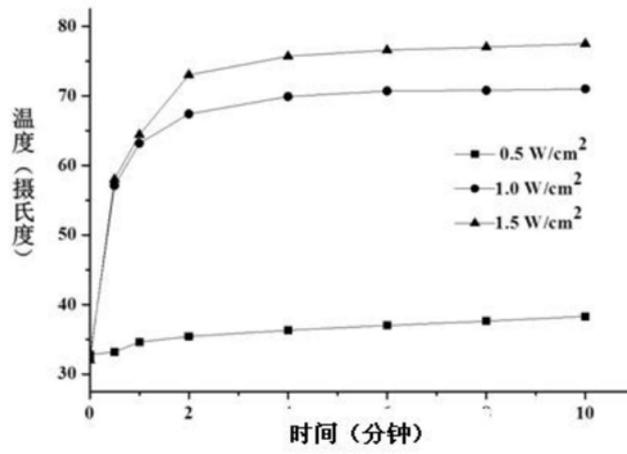


图4

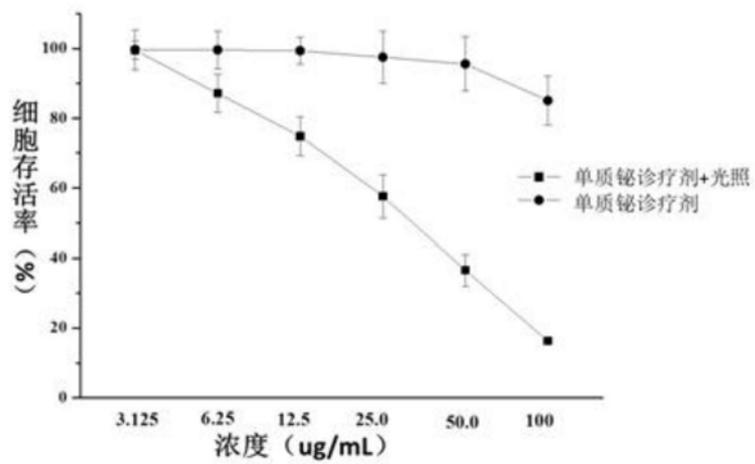


图5

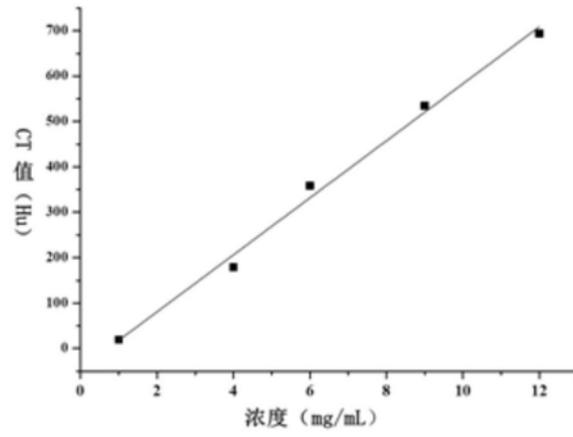


图6

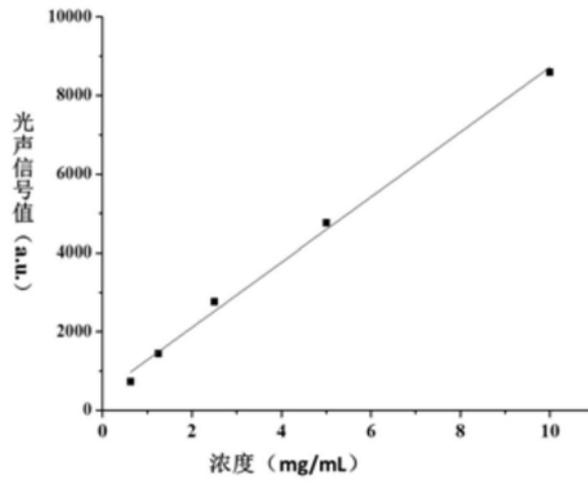


图7

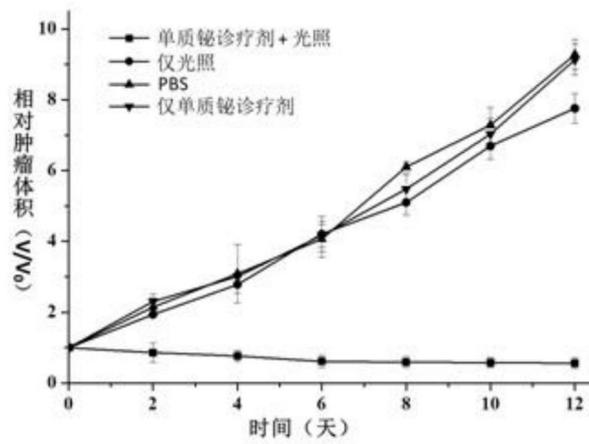


图8