



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107224592 A

(43)申请公布日 2017. 10. 03

(21)申请号 201710334634.4

(22)申请日 2017.05.12

(71)申请人 北京大学

地址 100191 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

(72)发明人 王凡 史继云 高翰男 梁晓龙 贾兵

(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 郑俊彦

(51)Int.Cl.

A61K 51/12(2006.01)

A61K 51/04(2006.01)

A61K 103/10(2006.01)

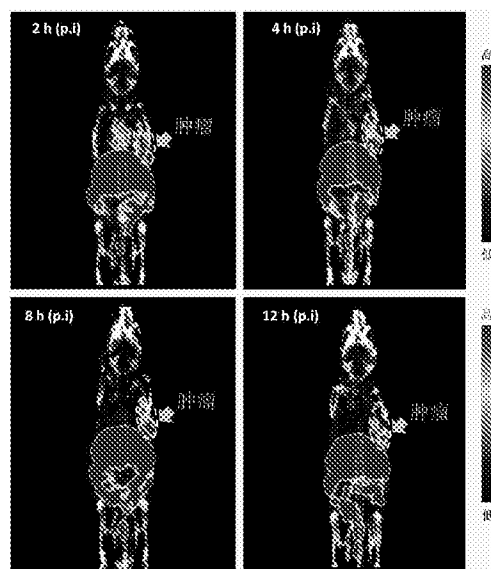
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54)发明名称

一种卟啉脂质体放射性药物^{99m}Tc-Texaphyrin NPs及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种卟啉脂质体放射性药物^{99m}Tc-Texaphyrin NPs及其制备方法,所述卟啉脂质体放射性药物^{99m}Tc-Texaphyrin NPs包括纳米材料和放射性核素^{99m}Tc,所述纳米材料是由Texaphyrin-lipid组成的脂质体纳米脂质体,即Texaphyrin NPs,所述放射性核素^{99m}Tc标记在不需要连接任何小分子多功能螯合剂的情况下实现自身标记形成^{99m}Tc-Texaphyrin NPs。该药物能够以被动靶向的方式浓聚到具有EPR效应的肿瘤部位中,利用核医学的SPECT显像技术,可对肿瘤或其他具有EPR效应的疾病进行显像诊断和检测。



1. 一种卟啉脂质体放射性药物^{99m}Tc-*Texaphyrin* NPs, 其特征在于, 包括纳米材料和放射性核素^{99m}Tc, 所述纳米材料是由*Texaphyrin-lipid*组成的脂质体纳米脂质体, 即*Texaphyrin* NPs, 所述放射性核素^{99m}Tc标记在不需要连接任何小分子多功能螯合剂的情况下实现自身标记形成^{99m}Tc-*Texaphyrin* NPs, 所述放射性药物^{99m}Tc-*Texaphyrin* NPs为淡黄色透明注射针剂。

2. 一种如权利要求1所述的卟啉脂质体放射性药物^{99m}Tc-*Texaphyrin* NPs的制备方法, 其特征在于, 所述制备方法包括以下步骤:

1) *Texaphyrin* NPs纳米材料的制备

将德克萨斯卟啉-溶血磷脂(*Texaphyrin-lipid*)、胆固醇、氢化大豆磷脂和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000 (DSPE-PEG2000)充分溶于三氯甲烷中, 通过减压旋转蒸发仪缓慢蒸干溶剂并在茄型瓶内壁上均匀形成磷脂薄膜, 在真空干燥器中过夜除去任何有机溶剂, 在瓶中加入pH为5.5的醋酸铵缓冲溶液, 水化在55摄氏度的水浴超声中进行, 直至脂膜溶解, 制备粗制的脂质体溶液, 将所述粗制的脂质体溶液通过装有双层100 nm孔径聚碳酸酯膜的Morgec LE-15脂质体挤出器进行多次挤出, 挤出温度为55摄氏度, 挤出液用pH为5.5的醋酸铵缓冲溶液配置成浓度为0.4 mg/mL的*Texaphyrin* NPs溶液, 最后经过PVDF滤膜过滤进行无菌分装, 即得到所述*Texaphyrin* NPs纳米材料;

2) ^{99m}Tc-*Texaphyrin* NPs的制备

将步骤1)制备得到的*Texaphyrin* NPs纳米材料置于1.5 mL的小管中, 加入TPPTS和Na [^{99m}TcO₄], 将反应液置于60 °C的空气浴或金属浴加热器中反应15-20分钟, 反应结束后室温冷却10分钟, 加入1 mL磷酸盐缓冲液, 制成所述的卟啉脂质体放射性药物^{99m}Tc-*Texaphyrin* NPs, 通过超滤方法进行纯化, 经过放射性薄层层析或放射性高效液相色谱鉴定标记物的放射化学纯度。

3. 根据权利要求2所述的卟啉脂质体放射性药物^{99m}Tc-*Texaphyrin* NPs的制备方法, 其特征在于, 步骤1)中所述德克萨斯卟啉-溶血磷脂(*Texaphyrin-lipid*)、胆固醇、氢化大豆磷脂和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000, 各组分的摩尔比例分别为30%:30%:35%:5%。

4. 根据权利要求2所述的卟啉脂质体放射性药物^{99m}Tc-*Texaphyrin* NPs的制备方法, 其特征在于: 步骤2)中所述放射性薄层层析的方法为: 展开纸选用长10 cm、宽1.5 cm的Agilent ITLC-SG硅胶玻璃纤维快速展开纸, 样品点于1 cm处, 用生理盐水溶液进行展开, 展开至9 cm处将纸条取出自然晾干, 展开后的纸条用BioScan AR-2000进行检测, 其中, 原点为^{99m}Tc的标记物, 前沿为游离的^{99m}Tc离子。

5. 根据权利要求2所述的卟啉脂质体放射性药物^{99m}Tc-*Texaphyrin* NPs的制备方法, 其特征在于: 步骤2)中所述放射性高效液相色谱检测方法为: 使用安捷伦1260 Infinity HPLC系统配备Superose-12排阻柱, 流动相为1mL/min的0.01M, pH为7.0的醋酸铵缓冲液, 淋洗时间为30 min, ^{99m}Tc标记的纳米标记物的保留时间为7分钟, 游离的^{99m}Tc的保留时间为15分钟。

一种卟啉脂质体放射性药物^{99m}Tc-*Texaphyrin* NPs及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤诊断放射性药物,特别涉及一种卟啉脂质体放射性药物^{99m}Tc-*Texaphyrin* NPs及其制备方法。

背景技术

[0002] 分子探针是分子影像技术的核心研究内容之一。近年来,用放射性核素、荧光染料、顺磁和超顺磁材料等标记的用于不同显像模态的分子探针的研究成几何量级增长。与传统小分子探针相比,纳米分子探针具有整合多元化功能与设计、药物包裹于运载、体内循环时间长及能够通过EPR (Enhanced Permeability and Retention effect) 效应被动靶向肿瘤等特点,从而可以增加药物的抗癌功效并减小毒副作用。基于纳米分子探针的多功能特性可以为临床医学提供一个集早期诊断、实时监测、定位诊断与个性化干预于一体的诊治系统。纳米探针的研究已经成为现代医学发展的重要方向之一,但是过去的纳米材料绝大多数是无机的,不仅难以降解,而且对人体会有微量毒性。脂质分子作为生物体组成的主要成分具有无可比拟的生物相容性,其自组装形成的纳米结构无论从均一性、稳定性,以及重复性方面,都有很大的优势。在美国食品与药物管理局(FDA) 现已批准使用和投入市场的若干种类的纳米材料中,脂质体是目前应用最为普及的纳米药物制剂形式。

[0003] 2011年,加拿大多伦多大学的郑岗教授研究组构建了一种全新的、无毒的、可生物降解、具有高度灵敏度、由卟啉双分子层自组装形成的新型脂质体-卟啉纳米囊泡(命名为porphysome)。Porphysome的内层和外层都是由磷脂类物质构成,具有极好的酶生物降解性;而中间夹层中起作用的是天然卟啉衍生物,无毒可降解,对人体无害。Porphysome的多功能特征体现在:一方面它本身是一种光敏剂,可用于PDT治疗(光动力治疗),当这种有机纳米药物到达肿瘤部位后,用激光照射肿瘤部位,这种药物可以让肿瘤组织中存在的基态氧转为杀伤力极强的激发态氧,对肿瘤产生杀伤。另一方面,这种纳米颗粒由8万多个分子组成,密度很高,本身又具有光热性功能,能用于光热治疗。此外,porphysome还可以用于癌症的早期诊断。其组成成分之一的卟啉分子(此处为四氮环卟啉),一方面有荧光特征,能进行荧光成像。另一方面它也是优良的金属螯合剂,其中心的四个氮原子可以与许多二价金属离子结合生成非常稳定的有机络合物。郑岗课题组将porphysome标记了放射性核素⁶⁴Tc,并在原位前列腺肿瘤小鼠模型成功进行了PET显像(Positron Emission Computed Tomography,正电子发射计算机断层显像)。Porphysome有非常良好的生物安全性及理化性质,在开发诊治结合的多功能分子探针方面有极大的应用前景。但是目前所用的porphyrin(四氮环卟啉)不能与核磁增强剂Gd及放射性核素¹⁷⁷Lu等3价金属离子形成稳定的络合物,限制了它在核磁成像以及核医学显像和治疗等领域的进一步开发。

[0004] 1988年美国德克萨斯大学(奥斯汀)的J.L. Sessler教授领导的研究小组合成出一种称为*Texaphyrin*(原意为德克萨斯卟啉)的扩展卟啉。*Texaphyrin*是一类三吡咯五氮杂环的卟啉衍生物(也可简称为5N卟啉),它能与三价金属Gd³⁺螯合获得一种螯合有Gd的卟啉

衍生物gadolinium texaphyrin (Gd-Tex)。Gd-Tex可以选择性地在肿瘤组织聚集,能用于磁共振成像(MRI, Magnetic Resonance Imaging)进行体内组织定位。相对之前提到的4N卟啉, Texaphyrin具有五氮杂环,能够与超过28种金属离子形成稳定的1:1化合物,其中不但包括许多二价过渡金属,也包括许多特别是三价的镧系金属离子。最近,一种新型锰(II)-5N卟啉-磷脂脂质体被用于MRI的成像研究,同时5N卟啉磷脂也被证实可以与多种金属离子形成稳定的化合物。目前,尚没有5N卟啉-磷脂脂质体使用单光子发射核素直接标记方法,也没有5N卟啉-磷脂脂质体放射性标记物在单光子断层成像(Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT)领域中的的体内应用。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种卟啉脂质体放射性药物 ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs及其制备方法,所述放射性药物以德克萨斯卟啉-磷脂化合物、胆固醇、大豆氢化磷脂和磷脂-聚乙二醇2000为原料,且该药物的制备过程中不需要连接在常规标记中所需要的任何双功能螯合剂,如DTPA(二乙基三胺五乙酸)、HYNIC(6-叔丁氧羰基烟酸)等,放射性核素 ^{99m}Tc 标记在不需要连接任何小分子多功能螯合剂的情况下实现自身标记形成 ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs。该药物能够以被动靶向的方式浓聚到具有EPR效应的肿瘤部位中,利用核医学的SPECT显像技术,可对肿瘤或其他具有EPR效应的疾病进行显像诊断和检测。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

一种卟啉脂质体放射性药物 ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs,包括纳米材料和放射性核素 ^{99m}Tc ,所述纳米材料是由Texaphyrin-lipid组成的脂质体纳米脂质体,即Texaphyrin NPs,所述放射性核素 ^{99m}Tc 标记在不需要连接任何小分子多功能螯合剂的情况下实现自身标记形成 ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs,所述Texaphyrin NPs放射性药物为淡黄色透明注射针剂。

[0007] 所述的卟啉脂质体放射性药物 ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs的制备方法,包括以下步骤:

1) Texaphyrin NPs纳米材料的制备

将德克萨斯卟啉-溶血磷脂(Texaphyrin-lipid)、胆固醇、氢化大豆磷脂和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG2000)充分溶于三氯甲烷中,通过减压旋转蒸发仪缓慢蒸干溶剂并在茄型瓶内壁上均匀形成磷脂薄膜,在真空干燥器中过夜除去任何有机溶剂,在瓶中加入pH为5.5的醋酸铵缓冲溶液,水化在55摄氏度的水浴超声中进行,直至脂膜溶解,制备粗制的脂质体溶液,将所述粗制的脂质体溶液通过装有双层100 nm孔径聚碳酸酯膜的Morgec LE-15脂质体挤出器进行多次挤出,挤出温度为55摄氏度,挤出液用pH为5.5的醋酸铵缓冲溶液配置成浓度为0.4 mg/mL的Texaphyrin NPs溶液,最后经过PVDF滤膜过滤进行无菌分装,即得到所述Texaphyrin NPs纳米材料;

2) ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs的制备

将步骤1)制备得到的Texaphyrin NPs纳米材料置于1.5 mL的小管中,加入TPPTS和Na [$^{99m}\text{TcO}_4$],将反应液置于60 °C的空气浴或金属浴加热器中反应15-20分钟,反应结束后室温冷却10分钟,加入1 mL磷酸盐缓冲液,制成所述的卟啉脂质体放射性药物 ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs,通过超滤方法进行纯化,经过放射性薄层层析或放射性高效液相色谱鉴定标记物的放射化学纯度。

[0008] 进一步的,步骤1)中所述德克萨斯卟啉-溶血磷脂(Texaphyrin-lipid)、胆固醇、

氢化大豆磷脂和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000, 各组分的摩尔比例分别为30%:30%:35%:5%。

[0009] 进一步的, 步骤2)中所述放射性薄层层析的方法为: 展开纸选用长10 cm、宽1.5 cm的Agilent ITLC-SG硅胶玻璃纤维快速展开纸, 样品点于1 cm处, 用生理盐水溶液进行展开, 展开至9 cm处将纸条取出自然晾干, 展开后的纸条用BioScan AR-2000进行检测, 其中, 原点为^{99m}Tc的标记物, 前沿为游离的^{99m}Tc离子。

[0010] 进一步的, 步骤2)中所述放射性高效液相色谱检测方法为: 使用安捷伦1260 Infinity HPLC系统配备Superose-12排阻柱, 流动相为1mL/min的0.01M, pH为7.0的醋酸铵缓冲液, 淋洗时间为30 min, ^{99m}Tc标记的纳米标记物的保留时间为7分钟, 游离的^{99m}Tc的保留时间为15分钟。

[0011] 这里报道的5N卟啉-磷脂(Texaphyrin-lipid)结构及5N卟啉脂质体的组成为(图1A), 在本发明中设计的5N卟啉具有亲脂性, 溶血磷脂上的羟基与5N卟啉上的羧基共价连接, 形成一头亲水一头亲脂的双亲结构。5N卟啉磷脂具有类似一般磷脂的特点, 可以形成类似脂质体的自组装结构并且也可以作为脂质体的原料之一形成不同的脂质体。5N卟啉脂质体的结构示意图及粒径和电位为(图1B)。5N卟啉具有多种金属核素螯合的潜力并在制备成Texaphyrin NPs纳米探针后可实现^{99m}Tc的固有直接标记并用于体内研究。

[0012] 本发明相比现有技术的有益效果为:

1、本发明所述的卟啉脂质体放射性药物, 在制备过程中不需要连接在常规标记中所需要的任何双功能螯合剂(如DOTA、HYNIC等), 放射性核素^{99m}Tc标记在不需要连接任何小分子多功能螯合剂的情况下实现自身标记形成^{99m}Tc-Texaphyrin NPs;

2、本发明所述的卟啉脂质体放射性药物用于具有EPR效应的疾病中SPECT显像, 实现该新型纳米材料诊治一体化中“诊”的目的;

3、本发明所述的卟啉脂质体放射性药物可药盒化, 在德克萨斯卟啉脂质体中加入还原剂三苯基膦三间磺酸钠盐(3,3',3''-Phosphanetriyltris(benzenesulfonic acid)trisodium salt, TPPTS)和放射性核素^{99m}Tc后进行加热即可实现固有标记;

4、本发明所述的卟啉脂质体放射性药物能够以被动靶向的方式浓聚到具有EPR效应的肿瘤部位中, 利用核医学的SPECT显像技术, 可对肿瘤或其他具有EPR效应的疾病进行显像诊断和检测。

[0013] 以下结合附图及实施例对本发明作进一步说明。

附图说明

[0014] 图1为Texaphyrin NPs纳米材料的组成成分、化学结构及摩尔占比(A)及Texaphyrin NPs纳米探针的自组装示意图和该探针的粒径表征和电位表征(B);

图2为纯化后的Texaphyrin NPs纳米材料与普通脂质体为对照品的放射性HPLC和ITLC结果图(A), ^{99m}Tc-Texaphyrin NPs与对照实验组标记情况对比(B);

图3为^{99m}Tc-Texaphyrin NPs在C57B/L6小鼠路易斯肺癌皮下模型中于注射后4 h和12 h的生物分布;

图4为^{99m}Tc-Texaphyrin NPs在C57B/L6小鼠路易斯肺癌皮下模型中注射后2、4、6和8 h后的NanoSPECT/CT的3D-MIP显像图(虚线圈与箭头指示肿瘤位置)。

具体实施方式

[0015] 实施例1

1 材料:

氢化大豆磷脂 (HSPC) 和胆固醇 (Cholesterol) 购自上海艾韦特医药科技有限公司 (AVT)。德克萨斯卟啉磷脂由多伦多大学医学生物物理学系提供。二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000 购自美国Avanti Polar Lipids公司。醋酸和醋酸铵购自美国Sigma-Aldrich。Tris (3-sulfonatophenyl) phosphine sodium salt (TPPTS) 购自中国J&K百灵威科技有限公司。 $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 购自中国原子高科股份有限公司。

[0016] 2 方法与结果

2.1 放射化学纯度方法

ITLC方法: 选用Agilent ITLC-SG 硅胶玻璃纤维纸, 裁剪为长为10厘米, 宽为1.5厘米的长方形纸条。将样品点于1 cm处, 用生理盐水溶液进行展开, 展开至9 cm处将纸条取出自然晾干。展开后的纸条用BioScan AR-2000进行检测。

[0017] HPLC检测方法: 使用安捷伦1260 Infinity HPLC系统配备Superose-12排阻柱, 流动相为1mL/min的0.01M, pH为7.0的醋酸铵缓冲液。淋洗时间为30min, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的纳米标记物的保留时间为7分钟, 游离的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的保留实际那为15分钟。

[0018] 2.2 Texaphyrin NPs纳米材料的制备

将2 mg德克萨斯卟啉-溶血磷脂 (Texaphyrin-lipid), 0.86 mg胆固醇, 1.5 mg大豆氢化卵磷脂 (HSPC) 和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000 (DSPE-PEG2000) 充分溶于5 mL三氯甲烷, 各组分的摩尔比例分别为30%:30%:35%:5%。图1-A为Texaphyrin NPs脂质体纳米材料的组成成分、化学结构及摩尔比例(A)。通过减压旋转蒸发仪缓慢蒸干溶剂并在茄型瓶内壁上均匀形成磷脂薄膜, 在真空干燥器中过夜除去任何有机溶剂。在瓶中加入4 mL pH为5.5的醋酸铵缓冲溶液(0.1 M, 经过Chelex 100树脂除离子)。水化在55摄氏度的水浴超声中10分钟, 直至脂膜溶解, 制备粗制的脂质体溶液。将脂质体溶液通过装有双层100 nm孔径聚碳酸酯膜的Morgtec LE-15脂质体挤出器进行多次挤出, 挤出温度为55摄氏度。挤出液用pH为5.5的醋酸铵缓冲溶液(0.1 M) 配置成浓度为0.4 mg/mL的Texaphyrin NPs溶液, 经过0.22 μm 的PVDF滤膜过滤进行无菌分装, 即得到所述的Texaphyrin NPs纳米材料。产物用Nano ZS 90动态光散射仪进行粒径和电位的表征。图1-B为Texaphyrin NPs脂质体纳米材料的自组装示意图和该探针的粒径表征和电位表征, 其粒径为100 nm, 其点位为-29 mV。

[0019] 2.3 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Texaphyrin NPs的制备

将含有100 μg 的所述Texaphyrin NPs纳米材料置于1.5 mL的小管中, 加入2.5 mg的TPPTS和1.1Gq的 $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$, 置于60摄氏度的空气浴加热器中加热20分钟。制备的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Texaphyrin NPs使用超滤的方法进行纯化, 超滤装置为15mL的Millipore (MWC0 = 100 K) 的超滤管。样品用生理盐水稀释至2 mL后进行超滤除游离 $^{99\text{m}}\text{Tc}$, 相对离心力为3000g, 时间为15min。超滤纯化共进行2次。对照样品为使用同样方法制备并标记的普通脂质体(65% 氢化大豆软磷脂, 30% 胆固醇和5% DSPE-PEG2000)。样品通过ITLC方法进行分析并用HPLC方法进行验证。图2-A为 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Texaphyrin NPs和阴性对照标记的普通脂质体Liposomes的放射性HPLC结果图和放射性ITLC结果图。在放射性HPLC检测中, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Texaphyrin NPs的保留

时间为7 min,对照阴性标记物的保留时间为15 min。在放射性ITLC检测中, ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs的相对迁移率(RF)为0,对照阴性标记物的相对迁移率为0.8。图2-B为阴性对照标记的Liposomes, ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs及两种原料(Texaphyrin NPs, TPPTS)的单独标记对照。结合对照实验标记结果表明, ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs标记效率较高,并且Texaphyrin NPs是在TPPTS作为 ^{99m}Tc 还原剂时才能有效标记,说明该标记结果不是通过对高锝酸分子 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 的包裹造成的。

[0020] 2.4 ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs在荷瘤鼠生物分布

将C57B/L6荷Lewis小鼠肺癌皮下模型小鼠随机分成若两组,每组2只。各组实验小鼠分别经尾静脉注射100 mL (740 KBq)的 ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs,于注射后4小时和12小时分别处死实验小鼠,取血及主要脏器,称重并测量放射性计数,经衰变校正后计算每克组织百分注射剂量率(%ID/g)。在小鼠体内,肝和脾ID%/g最高,符合纳米材料的肝脾摄取。在注射后12小时,血液的% ID/g 仍然保持较高的水平,符合PEG2000修饰表面后的隐形脂质体的血液长循环性。在所观察的时间内,肿瘤摄取明显高于肌肉等正常组织。

[0021] 2.5 ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs在荷瘤鼠中的SPET/CT成像

将C57B/L6荷Lewis小鼠肺癌皮下模型小鼠随经尾静脉注射100 mL (~37 MBq) ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs,于注射后于注射后2,4,8和12小时在Mediso Nano SPECT/CT显像系统中进行SPECT/CT显像。图4显示了 ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs在C57B/L6小鼠路易斯肺癌皮下模型中注射后2、4、8和12小时的3D-MIP全身显像图。在注射后2小时的显像图中,我们可以看到小鼠心脏部位和颈部血管的血池,说明了药物在体内的长循环性。在小鼠全身3D显像中,可以看到标记物在肿瘤与肝、脾组织有明显摄取。在全部显像时间点中,均能清晰看到标记物在肿瘤部位有明显浓聚,能清晰分辨肿瘤位置。

[0022] 综上所述,基于新型卟啉纳米Texaphyrin NPs的卟啉脂质体放射性药物 ^{99m}Tc -Texaphyrin NPs有用于全身SPET/CT检测肿瘤的应用潜力。

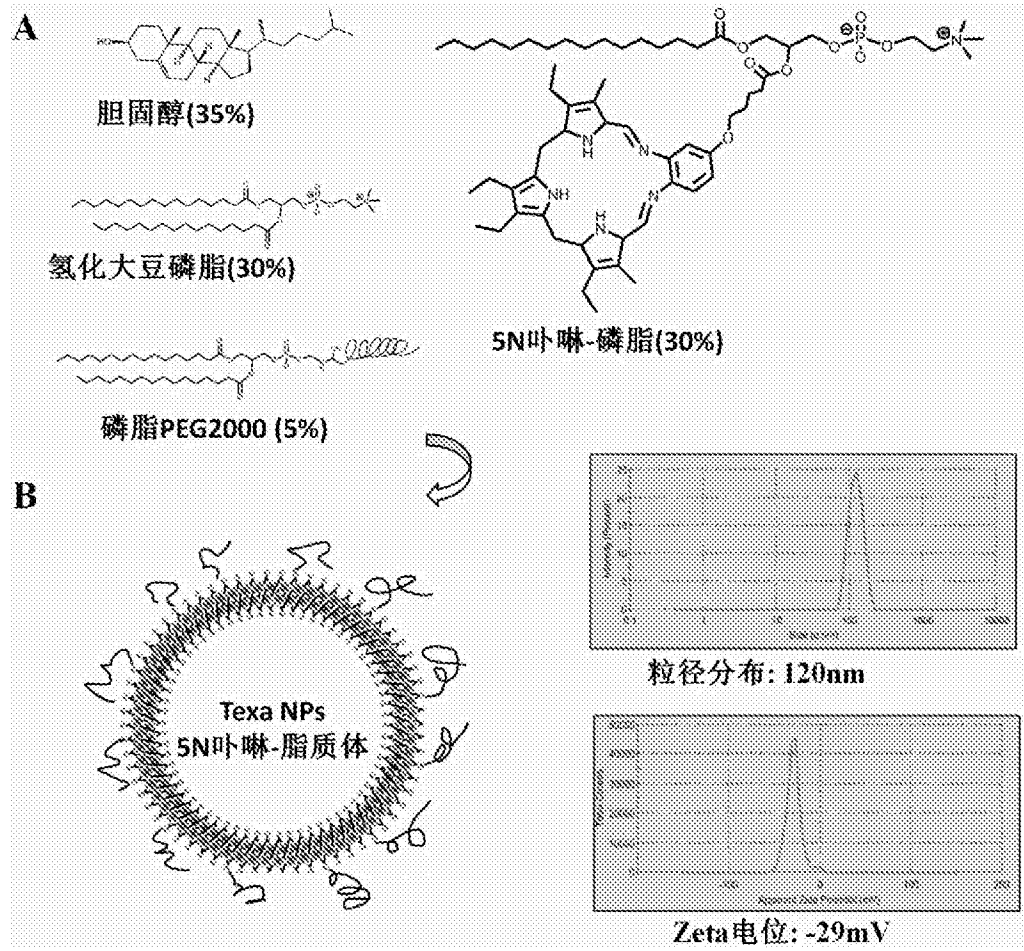


图1

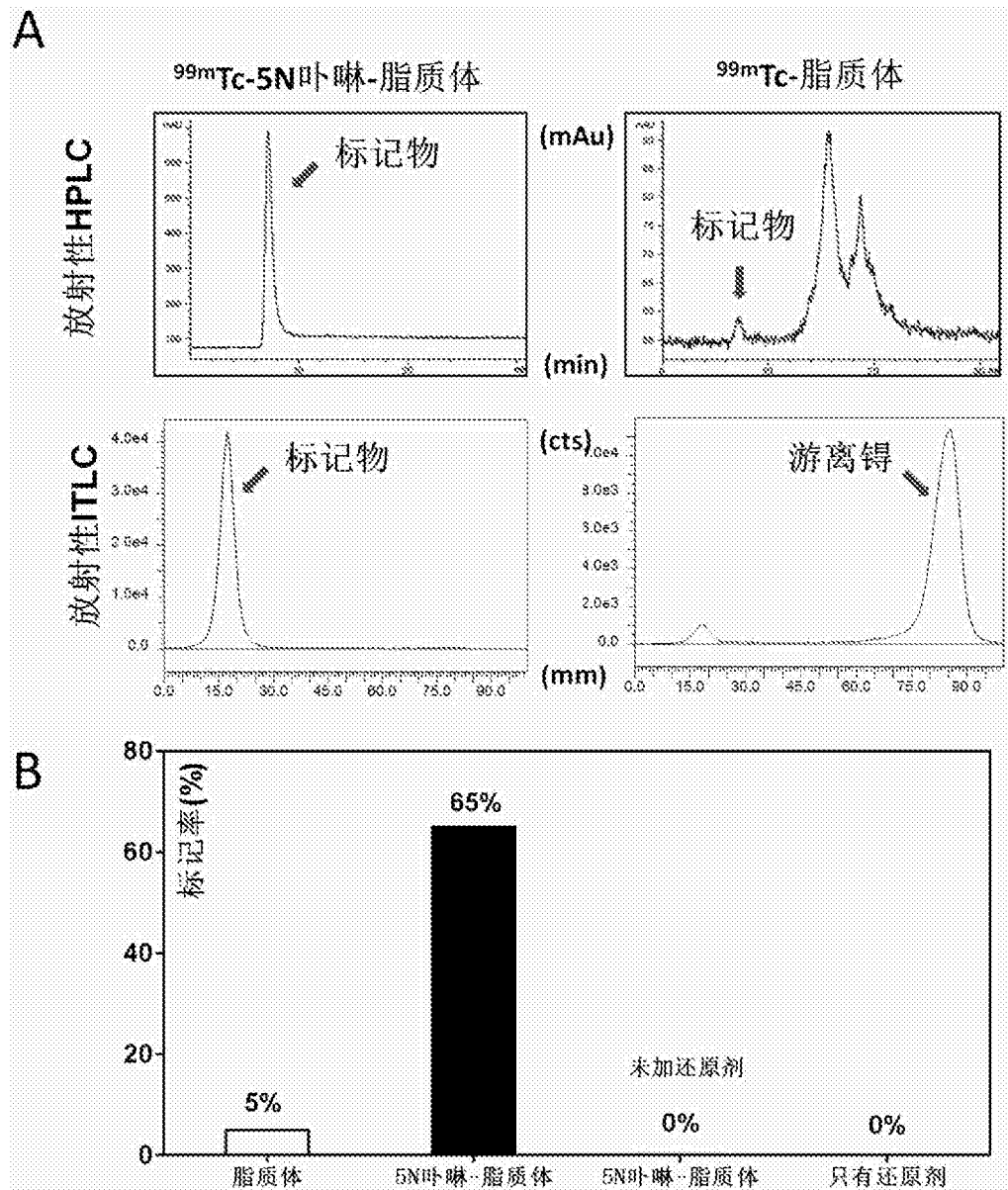


图2

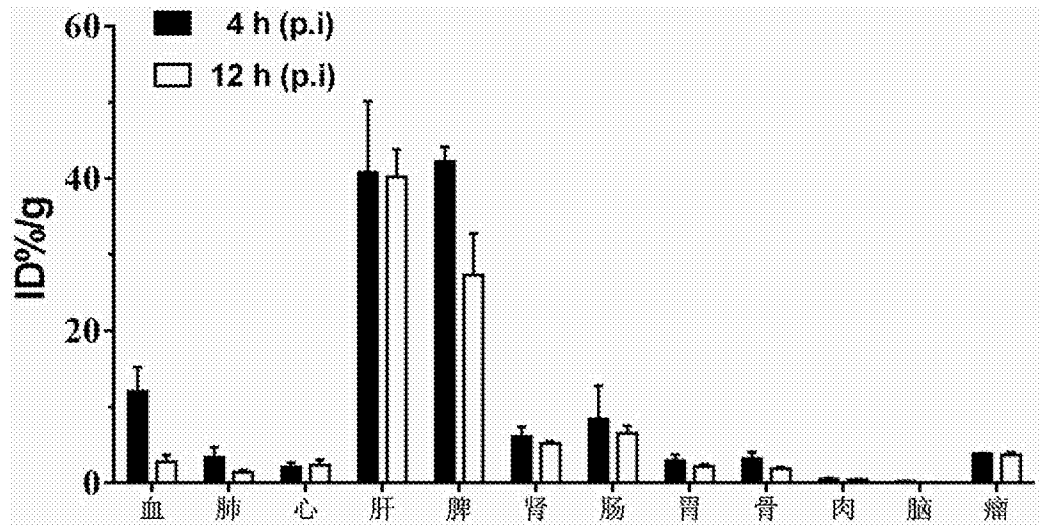


图3

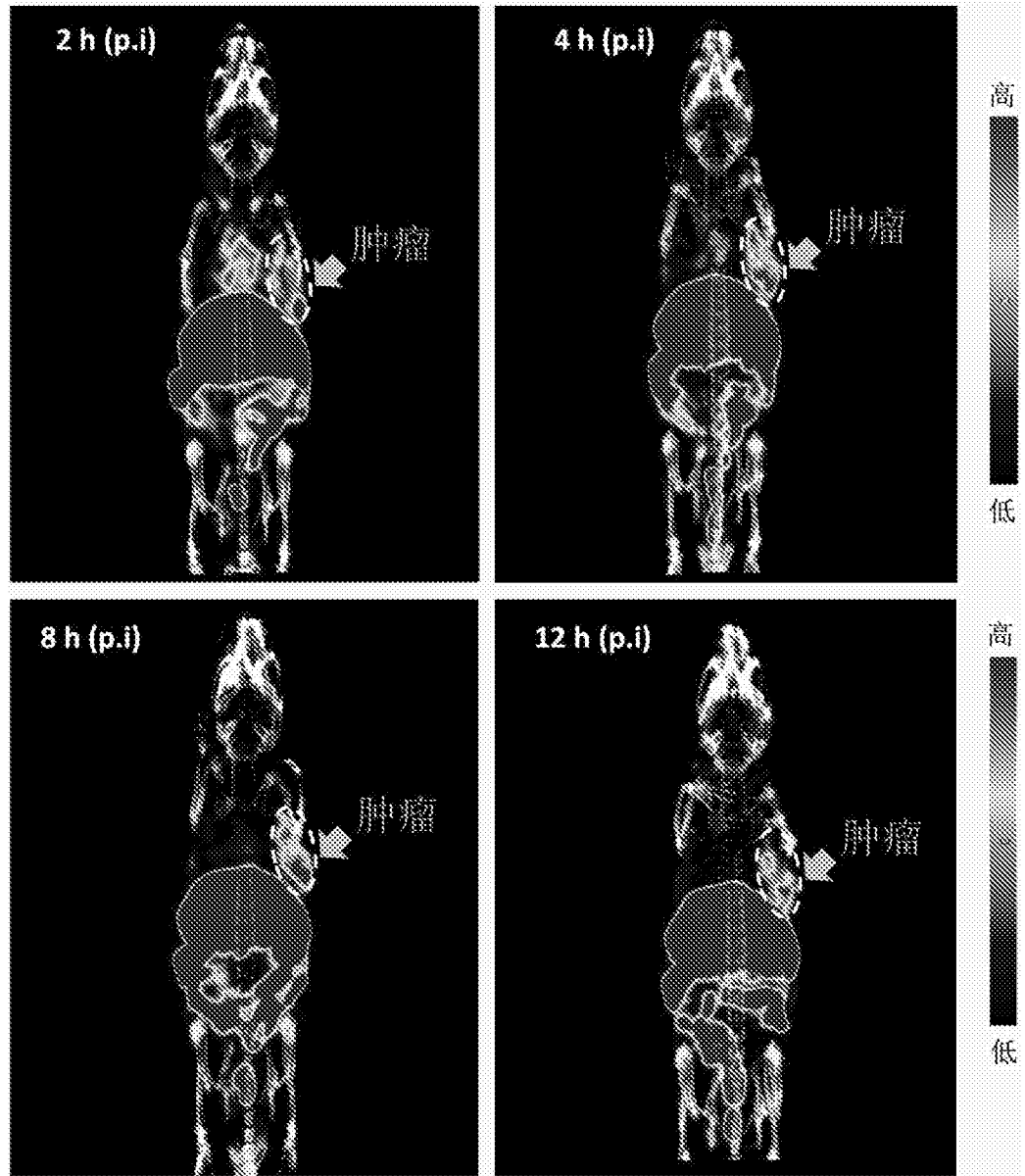


图4