

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2018 年 6 月 7 日 (07.06.2018)



(10) 国际公布号  
**WO 2018/098705 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
A61K 49/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 49/12 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/108073
- (22) 国际申请日: 2016 年 11 月 30 日 (30.11.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 硕英生医股份有限公司(SAGABIO CO., LTD.) [CN/CN]; 中国台湾省台北市大同区酒泉街34-1号6楼, Taiwan (CN)。
- (72) 发明人: 陈震宇(CHEN, Cheng-Yu); 中国台湾省台北市信义区吴兴街250号, Taiwan 110 (CN)。 亚米德·阿提夫亚米德·阿里(AHMED ALLI, Ahmed Atef); 中国台湾省台北市信义区吴兴街250号, Taiwan 110 (CN)。 许斐婷(HSU, Fei-Ting); 中国台湾省台北市信义区吴兴街250号, Taiwan 110 (CN)。 黄旭山(HUANG, Hsu-Shan); 中国台湾省台北市信义区吴兴街250号, Taiwan (CN)。

- (74) 代理人: 北京汇信合知识产权代理有限公司 (BEIJING HUI & XIN IP LAW OFFICE); 中国北京市海淀区中关村东路66号世纪科贸大厦C座12层, Beijing 100190 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: DEXTRAN-MAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLE, PREPARATION AND USE IN TREATING CANCER AND AS CONTRAST

(54) 发明名称: 葡聚糖磁性铁纳米颗粒、制备及在治疗癌症与造影的用途

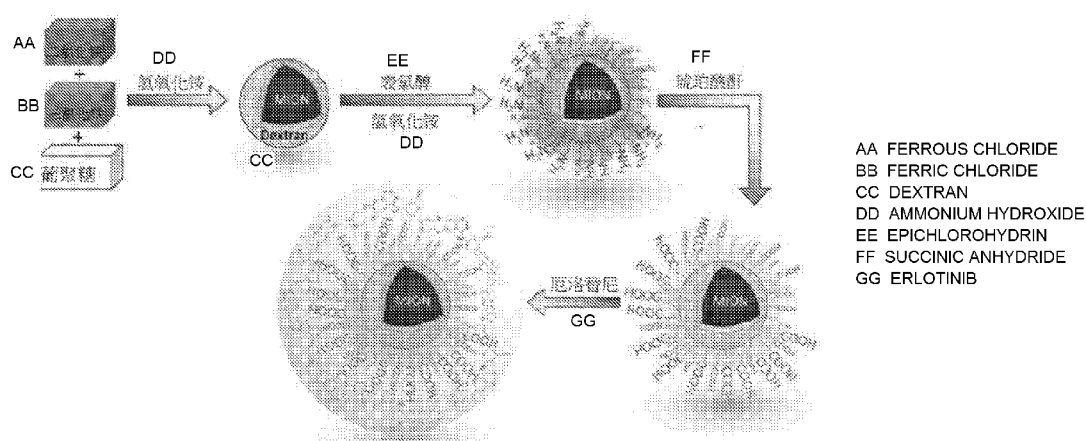


图 1

(57) Abstract: A dextran-magnetic iron oxide nanoparticle, comprising a dextran layer, a magnetic iron oxide nanoparticle and an active drug, the dextran being thinly coated on the outside of the magnetic iron oxide nanoparticle, and the active drug being conjugated to the dextran layer by means of a non-covalent bond; the active drug may be erlotinib, and the dextran-magnetic iron oxide nanoparticle may be used to treat cancer and as contrast.

(57) 摘要: 一种葡聚糖磁性铁纳米颗粒, 包括葡聚糖层、磁性铁纳米颗粒与活性药物, 该葡聚糖为薄层包覆在该磁性铁纳米颗粒之外, 该活性药物以非共价键结与该葡聚糖层缀合, 该活性药物可为厄洛替尼, 该葡聚糖磁性铁纳米颗粒可以用于治疗癌症与造影的用途。

[见续页]



WO 2018/098705 A1

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明：

- 关于不损害新颖性的公开或丧失新颖性的例外  
(细则4.17(v))

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

## 葡聚糖磁性铁纳米颗粒、制备及在治疗癌症与造影的用途

### 技术领域

本发明关于一种缀合小分子活性药物的葡聚糖磁性铁纳米颗粒用于治疗癌症与造影的用途。

### 背景技术

表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 是具有酪氨酸激酶 (tyrosine kinase) 活性的跨膜糖蛋白, EGFR 影响与癌细胞生长、凋亡、血管生成、侵袭性和侵袭性相关的多种关键信号传导途径。EGFR 在多种实性肿瘤中过度表达, 包括肺、直肠癌、乳腺癌、卵巢癌和头颈癌, EGFR 表达与治疗的不良反应有关联性 (参考文献1、2、3、4)。抑制 EGFR 的最有效的靶策略之一是使用小分子酪氨酸激酶抑制剂, 例如厄洛替尼, 厄洛替尼已被证明对 EGFR 酪氨酸激酶具有高度选择性, 会导致细胞周期停滞、抑制癌症的增殖且可以引起凋亡 (参考文献4、5、6、7)。但患者对厄洛替尼治疗的反应有显著变化 (参考文献8) 且在治疗过程中会出现的后天的抗药性 (acquire resistance) (参考文献9), 因此需要诊断工具来分类、识别肿瘤类型, 并且在治疗期间定期监测治疗反应。

非侵入性核磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 是临床应用中用于癌症的诊断、分级、分期和随访的一种重要技术, MRI 成像需要利用对比探针, 如氧化铁、氧化锰、金、银和钆 (gadolinium) 纳米颗粒 (参考文献10)。

新兴的“诊治”纳米颗粒, 具有治疗和诊断性质, 具有诊断成像能力以及靶药物递送的优势。纳米颗粒载有赋予靶能力的药物, 包括单株抗体、肽、适体 (aptamer) 和小分子等, 与其他类型的靶分子相比, 小分子因为小尺寸、多样结构、稳定性和低生产成本, 使小分子在靶抗癌纳米颗粒治疗领域更适合用于临床应用 (参考文献11、12)。

因此, 如何设计出一种装载有小分子药物的纳米颗粒, 具有治疗、靶性质, 更可以直接监测治疗反应, 同时具有诊治 (theranostic) 的功效, 即成为本发明在此欲解决的一重要课题。

## 发明内容

本发明的目的即在于提供一种葡聚糖磁性铁纳米颗粒，包括葡聚糖层、磁性铁纳米颗粒与活性药物，葡聚糖为薄层包覆在所述磁性铁纳米颗粒之外，所述活性药物以非共价键结与所述葡聚糖层缀合。

为达前述发明目的，所述磁性铁纳米颗粒为单晶层磁性铁纳米颗粒。

为达前述发明目的，包覆于磁性铁纳米颗粒外的所述葡聚糖层厚度小于3奈米。

为达前述发明目的，所述葡聚糖磁性铁纳米颗粒的粒径仲数小于50奈米。

为达前述发明目的，所述葡聚糖磁性铁纳米颗粒的粒径仲数小于10奈米。

为达前述发明目的，所述活性药物具有胺基。

为达前述发明目的，所述活性药物为厄洛替尼。

本发明的另一目的即在于提供一种葡聚糖磁性铁纳米颗粒的制备方法，制备步骤如下：

步骤1：将冰冷的氨加入 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和葡聚糖的水溶液中，于惰性气体环境中置于冰上搅拌，再加热至 $85^\circ\text{C}$ 维持1小时，搅拌至冷却，以Milli-Q水进行透析3天；

步骤2：葡聚糖(dextran)涂层使用环氧氯丙烷/氢氧化钠(Epichlorohydrin/NaOH)交联，用Milli-Q水进行透析3天，产生稳定的FeD NP；

步骤3：FeD NPs用氨处理以在奈米颗粒的表面上产生一级氨官能基，随后用Milli-Q水进行透析3天，产生FeDN NP；

步骤4：FeDN NP与琥珀酸酐(succinic anhydride)在缓冲溶液（ $\text{pH} = 8.5$ ， $0.1\text{M NaHCO}_3$ ）中反应，随后用Milli-Q水进行透析3天以充分透析，然后通过加入4-吗啉乙磺酸(Morpholineethanesulfonic acid)和氯化钠缓冲溶液，产生FeDC NP；

步骤5：将过量的活性药物加入FeDC NP中，超音波处理，并在 $25^\circ\text{C}$ 的控制温度下搅拌2天，使用 $0.22\mu\text{M}$  MCE过滤器灭菌且移除没有接合上的活性药物，产生FeDC-E NP。

为达前述发明目的，所述活性药物为厄洛替尼。

本发明的再一目的即在于提供一种如上述葡聚糖磁性铁纳米颗粒用于制备医学造影组合物的用途。

为达前述发明目的，所述医学造影用于癌症造影。

为达前述发明目的，所述癌症为表现EGFR的癌症。

为达前述发明目的，所述癌症包括脑癌、肺癌、大肠癌、结肠直肠癌、乳癌、摄护腺癌、肝癌、胰脏癌、膀胱癌、胃癌、肾癌、唾腺癌、卵巢癌、子宫体癌、子宫颈癌、口腔癌、皮肤癌、脑癌、恶性淋巴瘤或白血病。

本发明的又一目的即在于提供一种上述葡聚糖磁性铁奈米颗粒用于制备治疗癌症医药组合物的用途。

为达前述发明目的，所述癌症为表现EGFR的癌症。

为达前述发明目的，所述癌症包括脑癌、肺癌、大肠癌、结肠直肠癌、乳癌、摄护腺癌、肝癌、胰脏癌、膀胱癌、胃癌、肾癌、唾腺癌、卵巢癌、子宫体癌、子宫颈癌、口腔癌、皮肤癌、脑癌、恶性淋巴瘤或白血病。

为达前述发明目的，所述葡聚糖磁性铁奈米颗粒可以利用外加磁场移动且停滞于所述癌症位置。

## 附图说明

图1为FeDC-E NPs合成步骤示意图；

图2为奈米颗粒的红外线光谱(FT-IR)分析图；

图3为奈米颗粒表面物质变化对zeta电位影响；

图4为以TEM观察奈米颗粒的影像及示意图；

图5为以高分辨率TEM观察葡聚糖涂覆的磁性铁奈米颗粒；

图6为以DLS及TEM分析FeDC-E NP粒径分布；

图7为奈米颗粒对CL1-5-F4、Jurkat细胞毒性影响；

图8为以普鲁士蓝分析奈米颗粒进入CL1-5-F4细胞；

图9为以TEM观察奈米颗粒经由胞吞进入CL1-5-F4细胞；

图10为于不同pH环境对FeDC-E NP厄洛替尼释出的影响；

图11为奈米颗粒对CL1-5-F4细胞T2加权性MRI影像及T2弛缓时间(T2 relaxation times)的影响；

图12为奈米颗粒对CL1-5-F4细胞T2信号强度的影响；

图13为奈米颗粒对CL1-5-F4细胞分子信号的影响；

图14为以免疫化学荧光成像分析奈米颗粒对NF- $\kappa$ B核位移的影响；

图15为FeDC-E NP抑制EGFR-ERK-NF $\kappa$ B途径的可能机制；

图16为奈米颗粒对CL1-5-F4细胞迁移能力的影响；

图17为奈米颗粒对CL1-5-F4细胞侵袭能力的影响；

图18为奈米颗粒对携带异种CL1-5 -F4细胞植入的雄性BALB / c裸鼠肿瘤尺寸的影响；

图19为奈米颗粒对携带异种CL1-5 -F4细胞植入的雄性BALB / c裸鼠体重的影响；

图20为以MRI观察奈米颗粒对携带异种CL1-5 -F4细胞植入的雄性BALB / c裸鼠肿瘤的T2加权性影像及T2信号强度。

## 具体实施方式

本发明以下面的实施例予以示范阐明，但本发明不受下述实施例所限制。

### 奈米颗粒合成

单晶层氧化铁奈米颗粒(monocrystalline iron oxide nanoparticles, MION)合成利用碱性共沉淀法(如图1所示)，简言之，将冰冷的氨加入FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O和葡聚糖的水溶液中，于惰性气体环境中置于冰上搅拌，再加热至85℃维持1小时，搅拌至冷却，以Milli-Q水进行透析3天。葡聚糖(dextran)涂层使用环氧氯丙烷/氢氧化钠(Epichlorohydrin/ NaOH)交联，用Milli-Q水进行透析3天，产生稳定的FeD NP(葡聚糖涂层磁性铁奈米颗粒)。FeD NPs用氨处理以在奈米颗粒的表面上产生一级氨官能基，随后用Milli-Q水进行透析3天，产生FeDN NP(表层有氨基的葡聚糖涂层磁性铁奈米颗粒)。FeDN NP与琥珀酸酐(succinic anhydride)在缓冲溶液(pH = 8.5, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>)中反应，随后用Milli-Q水进行透析3天以充分透析，然后通过加入4-吗啉乙磺酸(Morpholineethanesulfonic acid)和氯化钠缓冲溶液，产生FeDC NPs(表层有羧基的葡聚糖涂层磁性铁奈米颗粒)。将过量的厄洛替尼(erlotinib)加入FeDC NP中，超音波处理并在25℃的控制温度下搅拌2天，使用0.22 $\mu$ M MCE过滤器灭菌且移除没有接合的厄洛替尼，产生FeDC-E NP(表层有厄洛替尼的葡聚糖涂层磁性铁奈米颗粒)。

除厄洛替尼外，任何含氨基药物，如阿司匹林、类固醇等，皆可以其胺基与FeDC NPs的羧基利用非共价键形式缀合。

## 奈米颗粒的厄洛替尼释出实验

取1毫升FeDC-E NPs溶液置于透析袋，透析袋的截留尺寸为分子量12000-14000，透析液为200毫升PBS缓冲液(pH5或pH7.4)，在37℃的控制温度下透析，定时将透析液置换为新鲜PBS缓冲液，厄洛替尼累积释放量的计算公式为：

$$Q_n = C_n + V_0 \sum_{i=1}^{n-1} C_i \cdot V_i$$

其中， $Q_n$ 为单位时间(分钟)的厄洛替尼累积量( $\mu\text{g/mL}$ )， $C_n$ 为每个监测时间点培养基中的药物浓度， $C_i$ 为第*i*个监测时间点样本的药物浓度， $V_0$ 为溶解的培养基的体积， $V_i$ 为样本的体积。

### 实施例1、合成奈米颗粒的结构与物理、化学特性

在合成奈米颗粒时面临的主要挑战之一是保留厄洛替尼在与奈米颗粒缀合后的生物活性。如前面所述，使用碱性共沉淀法合成单晶磁性铁奈米粒子(MION)，随后在奈米粒子表面上交联上薄的葡聚糖涂层，奈米颗粒的表面修饰为羧基并与厄洛替尼缀合，合成过程的细节在方法呈现在图1。为了证实奈米颗粒结构，葡聚糖与合成的MION的配位，以红外线光谱(FT-IR)分析非葡聚糖包覆的奈米颗粒、葡聚糖和葡聚糖包覆的磁性铁奈米颗粒(FeD NP)(图2)，其中，非葡聚糖涂覆奈米颗粒的光谱显示在3300和1600 $\text{cm}^{-1}$ 附近有吸收峰，分别表示O-H伸缩和H-O-H弯曲也就是颗粒表面吸附着水，且在600 $\text{cm}^{-1}$ 处的宽吸收带，表示Fe-O振动。葡聚糖的光谱显示在3300和1600 $\text{cm}^{-1}$ 附近的水O-H伸缩峰和H-O-H弯曲峰，以及在2900 $\text{cm}^{-1}$ 附近的C-H伸缩峰和在1000 $\text{cm}^{-1}$ 处的强C-O峰，表示葡聚糖的 $\alpha$ -吡喃葡萄糖环( $\alpha$ -glucopyranose ring)。FeD NP的光谱波峰显示葡聚糖的特征，特别是在指纹区域中，波峰的强度和特征具有轻微变化，显示葡聚糖与奈米颗粒表面磁性铁的配位。

将奈米颗粒溶液置于强力磁铁上一个星期检查溶液的沉淀物及聚集体来测试奈米颗粒的物理稳定性和聚集力。结果没有葡聚糖涂覆的磁性铁奈米颗粒全部都沉淀且聚集，而FeD NP没有沉淀或聚集，FeD NP完全分散且为澄清的红棕色溶液，表明由于葡聚糖涂层使奈米颗粒具有强的物理稳定性，但施加外部磁场可以移动管中的全部奈米颗粒溶液。医疗应用上可使用磁床、磁版、磁衣、磁帽等作为外加磁场，于治疗期间穿戴，使磁性铁奈米颗粒集中

固定。

为了进一步测试葡聚糖稳定于产品上的时效，将FeDC-E NPs溶液在密封的玻璃管中在25℃下储存一年，经过一年储存后，目视和TEM显微镜检查结果发现奈米颗粒仍然完全分散，没有颗粒聚集或沉淀，进一步说明了这种葡聚糖涂层的物理稳定性。

以zeta电位测量确定的奈米颗粒的表面电荷(图3)，FeD NPs的表面电荷接近零为 $-0.3 \pm 0.1 \text{ mV}$ ，FeDN NPs的zeta电位反转到正值 $8.6 \pm 0.5 \text{ mV}$ ，FeDC NPs因为羧基官能化反转的zeta电位为高负值 $-11.4 \pm 1.2 \text{ mV}$ ，缀合上厄洛替尼碱的FeDC-E NPs的zeta电位降低至 $-2.4 \pm 0.4 \text{ mV}$ ，这是由于FeDC NPs的羧基被厄洛替尼碱的N原子中和，产生稳定的载有厄洛替尼碱的奈米颗粒。

微波电浆原子放射光谱仪(Microwave plasma - atomic emission spectrometry, MP-AES)分析FeDC-E NP溶液中铁含量为 $1.913 \text{ mg/mL}$ ，高效液相层析仪(high performance liquid chromatography, HPLC)分析FeDC-E NP溶液中厄洛替尼含量为 $151.32 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ，较厄洛替尼的水中溶解度( $14.02 \text{ } \mu\text{g/mL}$ )更高，可以知道本发明将厄洛替尼缀合MION的结果十分有效，可以在奈米颗粒中加载大量的厄洛替尼（超过其水溶性的十倍）。

本实施例将厄洛替尼与奈米颗粒缀合，保持厄洛替尼在FeDC-E NP的生物活性，避免因为其他共价连接方法改变药物的化学结构并阻碍其生物活性。

## 实施例2、合成奈米颗粒的型态分析

以穿透式电子显微镜(Transmission Electron Microscopy, TEM)观察合成奈米颗粒的型态，没有葡聚糖涂覆的磁性铁奈米颗粒聚集成不规则的形状和尺寸（图4）；相反的，葡聚糖涂覆的FeD NP成分散且没有聚集，FeD NP的形状为规则球形且尺寸小于没有葡聚糖涂覆的奈米颗粒。高分辨率TEM(HRTEM)影像显示出FeD NP的单颗粒晶格面的清楚的规则条纹，显示FeD NP是单晶层的（图5）。根据TEM结果与ImageJ软件分析，FeDC-E NPs是磁性铁核心加上单分散同位素颗粒(monodisperse isotopic-shaped particles)，其平均直径为 $4.28 \pm 1.1 \text{ nm}$ ，多分散指数(polydispersity index, PDI)为0.07，以动态光散射(dynamic light scattering, DLS)测定的FeDC-E NP粒径为 $6.06 \pm 0.9 \text{ nm}$  (narrow log-normal size distribution)、PDI为0.02，与TEM结果一致（图6）所述葡聚糖磁性铁奈米颗粒的粒径仲数小于50奈米，优选小于10奈米，仲数是指出现频

率最多的颗粒粒径。

根据结果分析，MION核心外约有1-2 nm的葡聚糖涂层，与Kumar等人利用碱性共沉淀法合成的奈米粒子相比，本发明利用高浓度葡聚糖、在冰上反应以减慢反应速率等有利的合成条件，使葡聚糖瞬间吸附在新形成的MION的表面上，限制奈米颗粒周围空间与进一步聚集，而产生稳定且超小尺寸的奈米颗粒，在溶液中可以完全分散，奈米颗粒表面上的葡聚糖涂层可预防MION合成时产生的聚集。

### 实施例3、奈米颗粒的标靶与治疗效果

诊治探针（Theranostic probe）的特色是具有标靶、治疗与成像能力，为了研究FeDC-E NPs与厄洛替尼药物的标靶能力与治疗效果，我们以WST-1分析奈米颗粒处理对于CL1-5-F4细胞(过度表现EGFR)、Jurkat细胞的存活率的影响。CL1-5-F4细胞由人类肺腺癌细胞演化而得，过度表现EGFR，具有高度侵袭(invasive)和迁移(migrative)的细胞；Jurkat细胞为人类淋巴癌细胞，常用于作为没有表现EGFR的代表细胞。

本实施例测试了两种EGFR状态细胞对厄洛替尼的敏感性，图7结果显示厄洛替尼对高度EGFR表现的CL1-5-F4细胞造成毒性作用，且具有浓度相关性，相反的，高浓度厄洛替尼对无EGFR表现的Jurkat细胞没有造成毒性作用。不含厄洛替尼的FeDC NP在CL1-5-F4、Jurkat两种细胞上都没有细胞毒性，显示FeDC NPs奈米颗粒的生物兼容性。含厄洛替尼的FeDC-E NP对细胞上的毒性，与单独厄洛替尼的效果相似，FeDC-E NP对CL1-5-F4细胞存活有明显抑制，与对Jurkat的细胞毒性有统计上的显著差异。由细胞存活结果显示与奈米颗粒缀合不影响厄洛替尼的活性，且FeDC NP本身没有细胞毒性，此外，FeDC-E NPs具有选择性细胞毒性效应表示FeDC-E NP可用于辨识过度表现EGFR的肿瘤细胞。

### 实施例4、以细胞摄食实验观察奈米颗粒的标靶能力

为了研究厄洛替尼对奈米颗粒标靶能力的影响，本实施例使用普鲁士蓝染色(Prussian blue staining)测试了奈米颗粒的细胞摄取的能力（图8），于CL1-5-F4细胞，控制组与厄洛替尼处理的细胞都没有显示任何蓝色染色斑且染色试剂不沉淀，表明细胞内没有内源性铁存在。FeDC NPs处理的细胞有几个蓝色斑点，染色密度为10.69%(代表细胞摄取的FeDC NP的量)。FeDC-E NPs

处理的细胞，其奈米颗粒的摄取增加4倍，显微镜下观察到的强蓝色斑点、染色密度为42.53%。

厄洛替尼与奈米颗粒的缀合增加奈米颗粒摄取量，这可能是由于厄洛替尼对表现EGFR细胞的标靶能力。由于这种普鲁士蓝染色搭配显微镜检查不能排除奈米颗粒位于细胞表面而非经摄入而进入细胞内，因此进一步以TEM确认这些奈米颗粒是否真的进入细胞中。

#### 实施例5、以TEM检测的奈米颗粒的细胞摄入

为了检测奈米颗粒的细胞定位以确认前述实施例中从普鲁士蓝实验获得的细胞摄取结果，本实施例利用TEM（图9）检查各个处理组的CL1-5-F4细胞，其中，未处理和厄洛替尼处理的细胞显示透明细胞和核膜而没有任何电子密集区域的。FeDC NPs处理的细胞有奈米颗粒的电子密集的内吞囊泡（高电子密集是由于奈米颗粒的磁性铁核心），FeDC-E NPs处理的细胞有相似的奈米颗粒的电子密集内吞囊泡(endocytotic vesicles)且数量比FeDC NPs处理的细胞更多。

本实施例结果支持前述实施例普鲁士蓝染色结果，证明厄洛替尼增加奈米粒子的吞噬，这些TEM结果说明摄取的奈米颗粒位在细胞的内吞囊泡(endocytotic vesicles)内，而不是聚集于细胞外；此外，也证实厄洛替尼与奈米颗粒的缀合可以显著增加奈米颗粒的细胞摄取（以普鲁士蓝实验证明有4倍增加），证明于厄洛替尼赋予奈米颗粒标靶能力。

#### 实施例6、pH值影响奈米粒子的厄洛替尼释放

FeDC-E NPs被细胞吞噬到内吞囊泡(endocytotic vesicles)中，体液和细胞外的环境的pH值为7.4，细胞内晚期胞内体(late endosomes)的pH值约为5，本实施例模拟于不同细胞生理环境中，FeDC-E NPs将厄洛替尼释出的影响。于内吞囊泡模拟液（pH = 5），140分钟后厄洛替尼累积释放76.7%，而在细胞外环境模拟液（pH = 7.4），相同的140分钟时，累积厄洛替尼释放60.8%，统计上具有显著差异（图10）。这样的差异说明，奈米颗粒在血液中循环期间，从FeDC-E-NPs释放的厄洛替尼较低，直到其到达肿瘤部位被细胞吞噬置至内吞囊泡的低pH环境才会高速释放厄洛替尼，也就是说，FeDC-E NPs具有根据pH调整的智能释放系统，可以增加药物传递到肿瘤细胞并减少系统效应、优化整体治疗结果。

### 实施例7、以MRI分析研究奈米颗粒的标靶能力

为了验证本发明的奈米颗粒可以有效用于核磁共振摄影 (magnetic resonance imaging, MRI) 和确认其标靶能力, 本实施例以不同奈米颗粒处理 CL1-5-F4 细胞进行体外 (in vitro) MRI 实验, 测量 T2 弛缓时间 (T2 relaxation times) 变化和的信号强度 (图 11)。未处理的细胞的 T2 弛缓时间的中间值为 103.9 ms, FeDC NPs 处理的细胞的 T2 弛缓时间中间值为 92.5 ms, 这表明细胞吸收的铁量在 MRI 可产生对比。用 FeDC-E NPs 处理细胞显著降低 T2 弛缓时间中间值至 84.2 ms (与 FeDC NPs 处理的细胞结果有显著差异, 图 11)。三个处理组别的 T2 信号强度在回讯时间 (echo time) 8.5 ms 时差异最大, 其中未处理细胞的 T2 信号强度中间值为 191.4, FeDC NPs 处理的细胞的 T2 信号强度中间值为 183.5, FeDC -E NPs 处理细胞的 T2 信号中间值强度为 159.8 (FeDC-E NPs 处理细胞与未处理和 FeDC NPs 处理细胞的 T2 强度在统计上有显著差异, 图 12)。

MRI 图像中证明了三个处理组之间的差异。这些结果表示 FeDC-E NPs 经由细胞摄入和累积于细胞内而足以由 MRI 追踪, 因此适合用作诊治探针 (Theranostic probe), 此外, 具标靶力的 FeDC-E NPs 处理细胞与不具标靶力 FeDC NP 处理细胞的 T2 结果进一步证实了通过厄洛替尼的缀合赋予奈米颗粒标靶能力。

### 实施例8、奈米颗粒抑制 EGFR 和 ERK 信号传导途径

厄洛替尼是一种高选择性小分子药物, 其特征在于 EGFR 的酪氨酸激酶 (tyrosine kinase) 结构域, 可有效抑制 EGFR 信号途径, EGFR 与癌症发生的许多下游信号途径有关。细胞外训号调节激酶 (extracellular-signal-regulated kinase, ERK) 途径可作为 EGFR 抑制剂活化的生物标志。EGFR 引起的 ERK 阶梯式活化涉及通过 Ras、Raf 和 mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK) 的信号传导, 称为 EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK 信号途径。在 CL1-5-F4 细胞中, ERK 途径的活化导致转录因子 NF- $\kappa$ B 的活化, 与许多调节参与癌症进展的基因表现有关, 例如侵入和迁移强化 matrix metalloproteinase 9 (MMP-932), 血管生成刺激血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和 X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), 可能抑制肿瘤细胞增殖。

为了研究 FeDC-E NPs 处理后经由这些途径的细胞信号改变, 本实施例通

过西方墨点转渍法分析CL1-5-F4细胞中EGFR及其磷酸化(p-EGFR)的表现, 结果发现未处理的细胞有EGFR和p-EGFR两种形式的受体。厄洛替尼处理不影响EGFR的表现, 但会抑制EGFR磷酸化, 这也是该药物作为酪氨酸激酶抑制剂的主要机制(图13)。FeDC-E NPs处理的细胞显示EGFR没有改变的表现, 但抑制EGFR的磷酸化, 表示FeDC-E NPs能够抑制EGFR信号。

在EGFR抑制后, 其下游ERK信号被抑制。图13结果证明erlotinib、FeDC-E NPs处理使细胞p-ERK 1/2表现明显降低(与未处理组、FeDC NPs处理组相比), 四个处理组别的ERK 1/2表现都没有改变。

实施例9、奈米颗粒抑制NF- $\kappa$ B信号途径及其调节的肿瘤促进蛋白

转录因子NF- $\kappa$ B是Rel家族蛋白质的异二聚体复合物(heterodimeric complex), Rel家族包括RelA (p65) 次单元是在细胞中最常见的NF- $\kappa$ B的二聚体次单元。在细胞质中NF- $\kappa$ B通常与I $\kappa$ B抑制蛋白结合呈现无活性状态; 被激活后, 抑制性I $\kappa$ B被降解, 使NF- $\kappa$ B移位到细胞核并结合到DNA的启动子区, 启动NF- $\kappa$ B目标基因的转录和表现。

为了研究奈米颗粒对EGFR和ERK下游的NF- $\kappa$ B途径的抑制, 本实施例利用西方墨点印渍法分析CL1-5-F4细胞核萃取物中NF- $\kappa$ B p65次单元的量, 并使用免疫细胞化学荧光成像分析NF- $\kappa$ B p65次单元的从CL1-5 F4细胞的细胞质移位到细胞核的成像。图13结果显示, 未处理细胞的细胞核中有高量的NF- $\kappa$ B p65次单元, 表现高活性NF- $\kappa$ B, FeDC NPs处理细胞组与未处理细胞组显示相似的结果, 表示不含药物的奈米颗粒不影响NF- $\kappa$ B途径, 厄洛替尼和FeDC-E NPs处理组都显示出核中的NF- $\kappa$ B p65次单元量降低, 表示药物处理后NF- $\kappa$ B途径被抑制。图14免疫细胞化学成像结果显示, 在未处理及FeDC NPs处理的CL1-5-F4细胞NF- $\kappa$ B p65次单元驻留于细胞核, 证明NF- $\kappa$ B核移位途径被活化。然而, 厄洛替尼以及FeDC-E NPs处理的细胞, NF- $\kappa$ B p65次单元在细胞质中明显聚积, 显示NF- $\kappa$ B的核移位被抑制, 药物处理抑制NF- $\kappa$ B活性。

本实施例进一步分析奈米颗粒处理对NF- $\kappa$ B转录活性调节蛋白质XIAP和MMP-9表现的影响, XIAP和MMP-9与癌症发展进度有关。厄洛替尼、FeDC-E NP1处理CL1-5-F4细胞中XIAP的表现显著降低(与未处理和FeDC NPs处理的组细胞相比(图13))。另外, MMP-9酶于高侵袭性和迁移性细胞中大量表现, 而能够降解IV型胶原蛋白的细胞基底膜和细胞外基质, 促进其侵入和迁移;

厄洛替尼、FeDC-E NP处理CL1-5-F4细胞中MMP-9的表现显著降低 (与未处理和FeDC NPs处理的组相比)。为了了解MMP-9表现降低对CL1-5-F4细胞的迁移和侵袭能力的影响, 于后面实施例将进行迁移和侵袭实验。

#### 实施例10、奈米粒子经由分子信号途径产生抗癌活性

基于前述实施例中关于由于奈米颗粒处理而改变的分子信号途径的结果发现, 图15 显示, FeDC-E NP经由抑制EGFR的酪氨酸激酶的结构域而产生有效的抗癌活性, 抑制下游ERK信号信号途径。抑制ERK导致NF- $\kappa$ B活性的抑制, 抑制了NF- $\kappa$ B从细胞质移位至细胞核。NF- $\kappa$ B目标基因的负调节, 与癌症促进和进展中有关, NF- $\kappa$ B转录活性被抑制会进一步抑制的XIAP (抗细胞凋亡) 和MMP-9 (迁移和侵袭) 蛋白质。

#### 实施例11、奈米颗粒抑制CL1-5-F4细胞的迁移和侵袭能力

在多种癌症中, 活化的MMP-9表现诱导细胞的迁移和侵袭。先前实施例发现FeDC-E NPs处理CL1-5-F4细胞降低MMP-9的表现, 因此本实施例使用通透性培养皿(transwell)观察奈米颗粒对迁移和侵袭的影响, CL1-5-F4细胞会高度迁移至transwell的膜的下面, FeDC NPs处理的细胞迁移率较未处理的细胞更少(但统计上没有显著差异), 厄洛替尼处理的细胞的迁移率只有未处理细胞的21.75%, 而FeDC-E NPs处理细胞几乎完全抑制细胞的迁移能力, 迁移率为未处理细胞的3.26%(图16)。与先前实施例中MMP-9表现的结果一致, FeDC-E NPs有效抑制细胞的迁移。

本实施例进一步以Matrigel包覆的transwell观察奈米颗粒对细胞侵袭能力的影响, 未处理的CL1-5-F4细胞显示有大量的侵袭通过Matrigel到transwell的膜的下侧, FeDC NPs处理的细胞显示较小的侵袭潜力(与未处理细胞结果在统计学上没有显著差异), 厄洛替尼处理的细胞显示其侵袭率的显著降低至未处理细胞的32.37%, FeDC-E NPs处理细胞的侵袭率是未处理细胞的15.57%(图17), 较厄洛替尼更低。

依据本实施例结果, 我们发现FeDC-E NPs比相同浓度的厄洛替尼更显著抑制CL1-5 F4细胞的侵袭和迁移能力。

#### 实施例12、奈米颗粒的In vivo治疗效果

为了证实先前实施例中in vitro实验中FeDC-E NP对CL1-5-F4细胞的毒性作用, 并进一步研究其in vivo抗肿瘤活性, 本实施例使用携带异种CL1-5 -F4

细胞植入的雄性BALB / c裸鼠模式，分别处理Ctrl(未处理)、厄洛替尼、FeDC NP、FeDC-E NP，与未处理组相比，FeDC NPs处理的小鼠的肿瘤体积没有任何统计学显著差异，表明奈米颗粒没有抑制肿瘤生长的内在活性；与未处理组相比，厄洛替尼处理的小鼠显著抑制的肿瘤生长，表示肿瘤细胞对厄洛替尼敏感，FeDC-E NP处理显著抑制小鼠肿瘤生长，表示FeDC-E NP具有治疗效果（图18），FeDC-E NPs对肿瘤抑制略小于厄洛替尼，但没有统计上的显著差异，表明FeDC-E NP在配制过程后保留了厄洛替尼的治疗活性。

整个实验期间，各处理组之间没有观察到小鼠体重有显著改变，显示药物处理对小鼠没有毒性迹象（图19），表示本发明使用的奈米颗粒具有生物兼容性。

实施例13、in vivo非侵入性核磁共振成像测试的奈米颗粒的MRI对比增强和标靶能力

为了确定先前实施例中用FeDC-E NPs观察到in vitro的MRI对比增强是否可以在in vivo实行，并且确认FeDC-E NP的标靶能力，本实施例使用携带异种CL1-5 -F4细胞植入的雄性BALB / c裸鼠进行in vitro非侵入性MRI实验。图20显示本实施例的4个处理组（Ctrl、Erlotinib、FeDC NP、FeDC-E NP）肿瘤成像，在处理前和处理后对肿瘤感兴趣区域（regions of interest，ROI）的T2加权标准化MRI信号强度(Normalized T2-weighted MRI signal intensities)进行定量，未处理和厄洛替尼处理组的肿瘤的标准化信号强度在处理没有显著变化，FeDC NPs-和FeDC-E NPs-处理组分别在平均标准化信号强度有约1.6倍和2.8倍的降低，FeDC-E NPs处理组的标准化信号强度的降低较其他三个处理组有统计上的显著差异，表明与非靶向FeDC NP相比，FeDC-E NPs在肿瘤中的标靶聚积增强。

这样的in vivo标靶MRI对比增强进一步支持本发明的FeDC-E NPs于临床上作为诊治探针（Theranostic probe）的可能性。

综合上述实施例结果，本发明是第一个公开小分子厄洛替尼作为奈米颗粒的标靶药剂的研究，本发明的奈米颗粒表现出对高度侵袭性和迁移性癌细胞的显著的智能治疗和标靶性质，并且可以通过MRI监测。此外，奈米颗粒抑制EGFR-ERK-NF- $\kappa$ B信号途径以及相关肿瘤促进蛋白MMP-9和XIAP的表现，并随后抑制癌细胞的迁移和侵袭能力。并以携带异种移植物的老鼠确认奈米

粒子在体内标靶、治疗和成像能力。最后，本发明的奈米颗粒制剂的超小尺寸使其有可能用于转移性脑肿瘤的MRI。

上列详细说明针对本发明的可行实施例的具体说明，惟该实施例并非用以限制本发明的专利范围，凡未脱离本发明技艺精神所为的等效实施或变更，均应包括于本案的专利范围中。

上述多项功效，实属充分符合新颖性及进步性的法定专利要件，爰依法提出申请，恳请贵局核准本件发明专利申请案，以励发明。

参考文献：

1. Qin, X. *et al.* Novel morpholin-3-one fused quinazoline derivatives as EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 1571–1575 (2016).
2. Dienstmann, R., De Dosso, S., Felip, E. & Tabernero, J. Drug development to overcome resistance to EGFR inhibitors in lung and colorectal cancer. *Mol. Oncol.* **6**, 15–26 (2012).
3. Tu, Y. *et al.* Design, synthesis, and docking studies of afatinib analogs bearing cinnamamide moiety as potent EGFR inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 1495–1503 (2016).
4. Herbst, R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* **59**, 21–26 (2004).
5. Sette, G. *et al.* Tyr1068-phosphorylated epidermal growth factor receptor (EGFR) predicts cancer stem cell targeting by erlotinib in preclinical models of wild-type EGFR lung cancer. *Cell Death Dis.* **6**, e1850 (2015).
6. Tabernero, J. The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Mol. Cancer Res.* **5**, 203–220 (2007).
7. Smith, J. Erlotinib: small-molecule targeted therapy in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Clin. Ther.* **27**, 1513–1534 (2005).
8. Lindeman, N. I. *et al.* Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung

*Cancer, and Association for Molecular Pathology. J. Thorac. Oncol.* **8**, 823–859 (2013).

9. Riely, G. J. *et al.* *Prospective assessment of discontinuation and reinitiation of erlotinib or gefitinib in patients with acquired resistance to erlotinib or gefitinib followed by the addition of everolimus. Clin. Cancer Res.* **13**, 5150–5155 (2007).

10. Ahmed, N., Fessi, H. & Elaissari, A. *Theranostic applications of nanoparticles in cancer. Drug discovery today* **17**, 928–934 (2012).

11. Wang, A. Z. *et al.* *Biofunctionalized targeted nanoparticles for therapeutic applications. Expert Opin. Biol. Ther.* **8**, 1063–1070 (2008).

12. Tassa, C., Shaw, S. Y. & Weissleder, R. *Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles: A Versatile Platform for Targeted Molecular Imaging, Molecular Diagnostics, and Therapy. Acc. Chem. Res.* **44**, 842–852 (2011).

## 权利要求书

1.一种葡聚糖磁性铁奈米颗粒，其特征在于，包括葡聚糖层、磁性铁奈米颗粒与活性药物，葡聚糖为薄层包覆在所述磁性铁奈米颗粒之外，所述活性药物以非共价键结与所述葡聚糖层缀合。

2.如权利要求1所述的葡聚糖磁性铁奈米颗粒，其特征在于，所述磁性铁奈米颗粒为Milli-Q铁奈米颗粒。

3.如权利要求1所述的葡聚糖磁性铁奈米颗粒，其特征在于，包覆于磁性铁奈米颗粒外的所述葡聚糖层厚度小于3奈米。

4.如权利要求1所述的葡聚糖磁性铁奈米颗粒，其特征在于，所述葡聚糖磁性铁奈米颗粒的粒径仲数小于50奈米。

5.如权利要求1所述的葡聚糖磁性铁奈米颗粒，其特征在于，所述葡聚糖磁性铁奈米颗粒的粒径仲数小于10奈米。

6.如权利要求1所述的葡聚糖磁性铁奈米颗粒，其特征在于，所述活性药物具有胺基。

7.如权利要求1所述的葡聚糖磁性铁奈米颗粒，其特征在于，所述活性药物为厄洛替尼。

8.一种磁性铁奈米颗粒的制备方法，其特征在于，制备步骤如下：

步骤1：将冰冷的氨加入 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和葡聚糖的水溶液中，于惰性气体环境中置于冰上搅拌，再加热至 $85^\circ\text{C}$ 维持1小时，搅拌至冷却，以Milli-Q水进行透析3天；

步骤2：葡聚糖(dextran)涂层使用环氧氯丙烷/氢氧化钠(Epichlorohydrin/NaOH)交联，用Milli-Q水进行透析3天，产生稳定的FeD NP；

步骤3：FeD NPs用氨处理以在奈米颗粒的表面上产生一级氨官能基，随后用Milli-Q水进行透析3天，产生FeDN NP；

步骤4：FeDN NP与琥珀酸酐(succinic anhydride)在缓冲溶液（ $\text{pH} = 8.5$ ， $0.1\text{M NaHCO}_3$ ）中反应，随后用Milli-Q水进行透析3天以充分透析，然后通过加入4-吗啉乙磺酸(Morpholineethanesulfonic acid)和氯化钠缓冲溶液，产生FeDC NP；

步骤5：将过量的活性药物加入FeDC NP中，超音波处理，并在 $25^\circ\text{C}$ 的控制温度下搅拌2天，使用 $0.22\mu\text{M}$  MCE过滤器灭菌且移除没有接合上的活性药物，产生FeDC-E NP。

9. 如权利要求8所述的置备方法,其特征在于,所述活性药物为厄洛替尼。

10. 一种如权利要求1-7中任一项所述葡聚糖磁性铁纳米颗粒用于制备医学造影组合物的用途。

11. 如权利要求10所述的用途,所述医学造影用于癌症造影。

12. 如权利要求11所述的用途,其特征在于,所述癌症为表现EGFR的癌症。

13. 如权利要求11所述的用途,其特征在于,所述癌症包括脑癌、肺癌、大肠癌、结肠直肠癌、乳癌、摄护腺癌、肝癌、胰脏癌、膀胱癌、胃癌、肾癌、唾液腺癌、卵巢癌、子宫体癌、子宫颈癌、口腔癌、皮肤癌、脑癌、恶性淋巴瘤或白血病。

14. 一种如权利要求1-7中任一项所述葡聚糖磁性铁纳米颗粒用于制备治疗癌症医药组合物的用途。

15. 如权利要求14所述的用途,其特征在于,所述癌症为表现EGFR的癌症。

16. 如权利要求15所述的用途,其特征在于,所述癌症包括脑癌、肺癌、大肠癌、结肠直肠癌、乳癌、摄护腺癌、肝癌、胰脏癌、膀胱癌、胃癌、肾癌、唾液腺癌、卵巢癌、子宫体癌、子宫颈癌、口腔癌、皮肤癌、脑癌、恶性淋巴瘤或白血病。

17. 如权利要求14所述的用途,其特征在于,所述葡聚糖磁性铁纳米颗粒可以利用外加磁场移动且停滞于所述癌症位置。

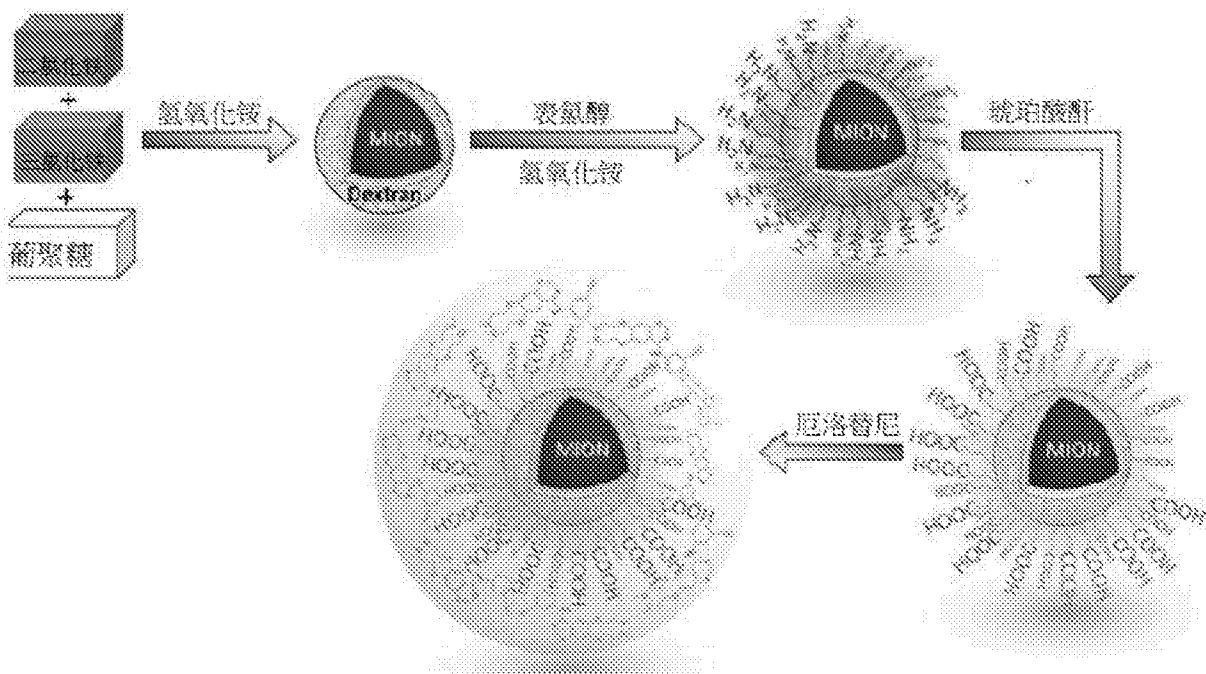


图 1

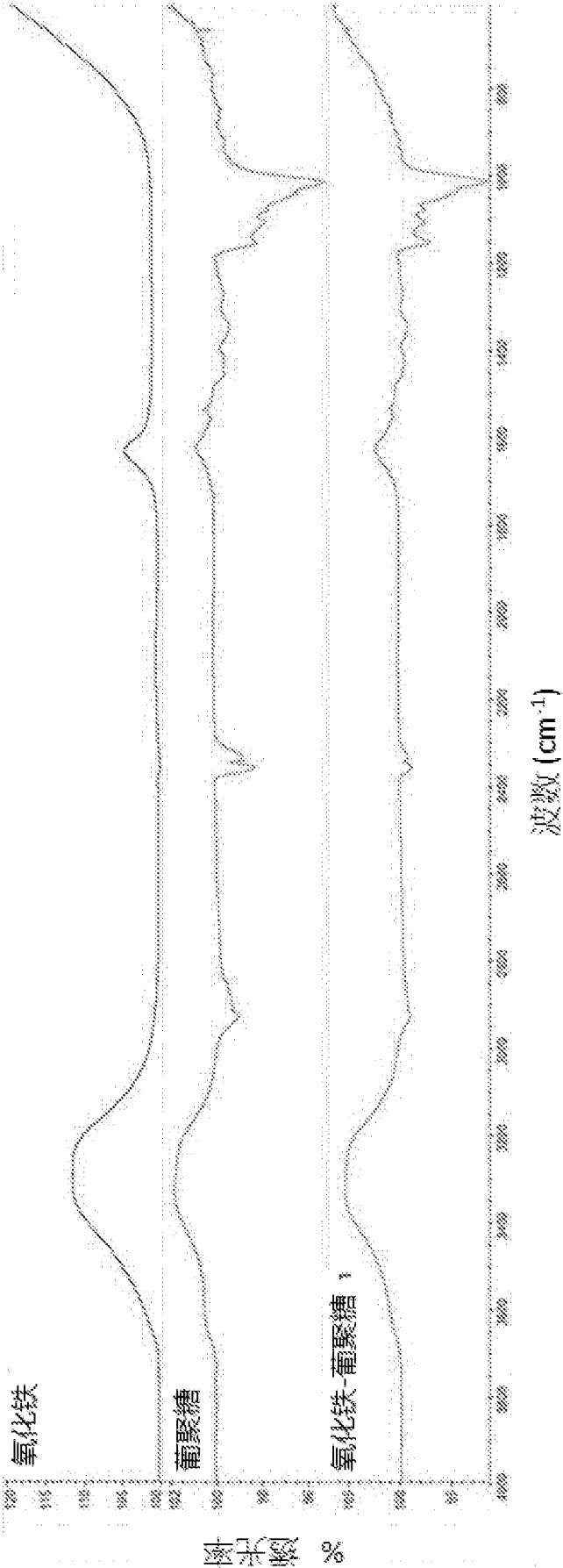


图 2

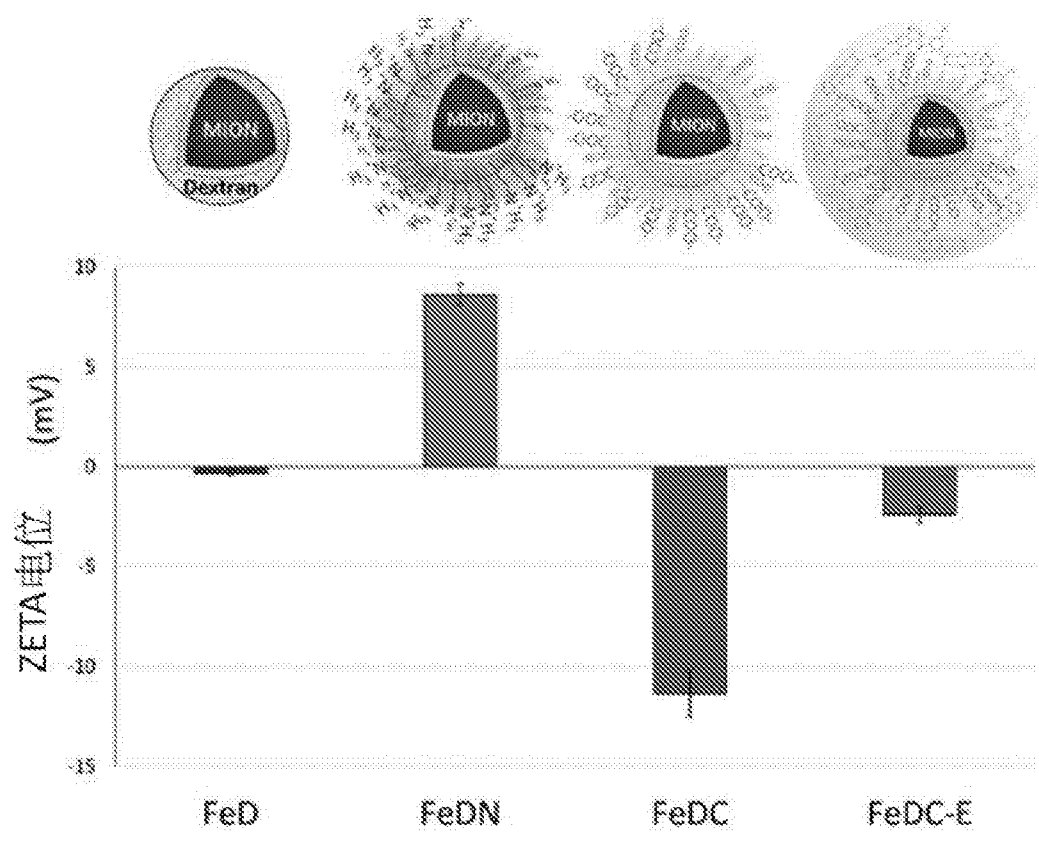
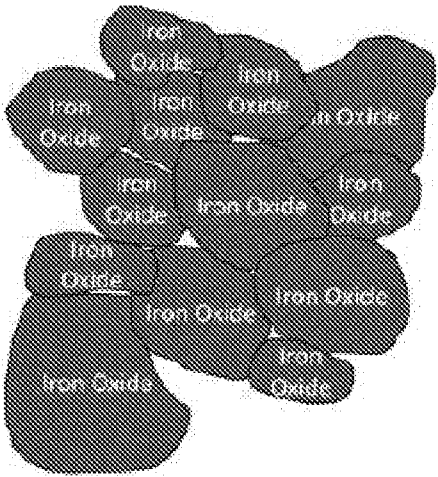
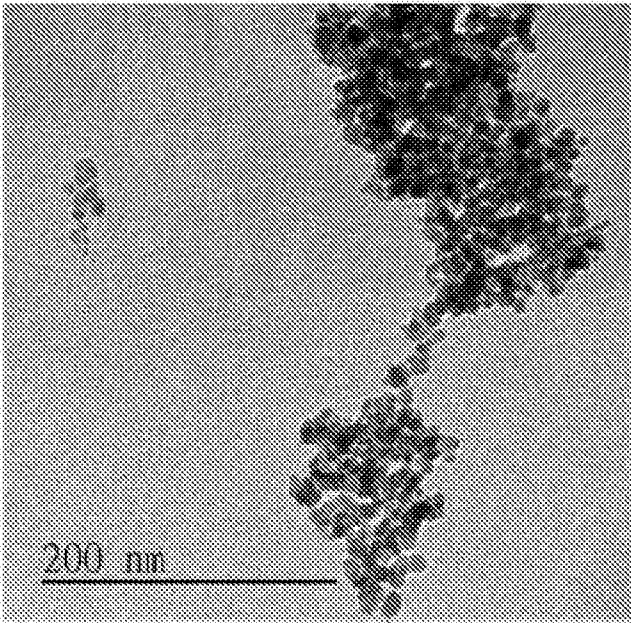


图 3

没有葡聚糖涂覆的氧化铁纳米颗粒



葡聚糖涂覆的氧化铁纳米颗粒

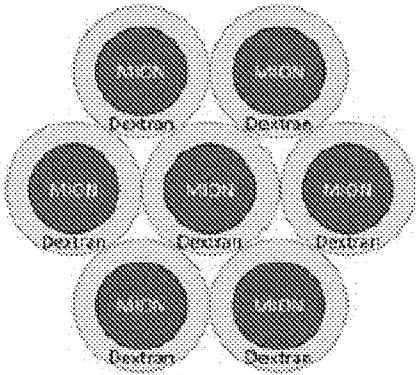
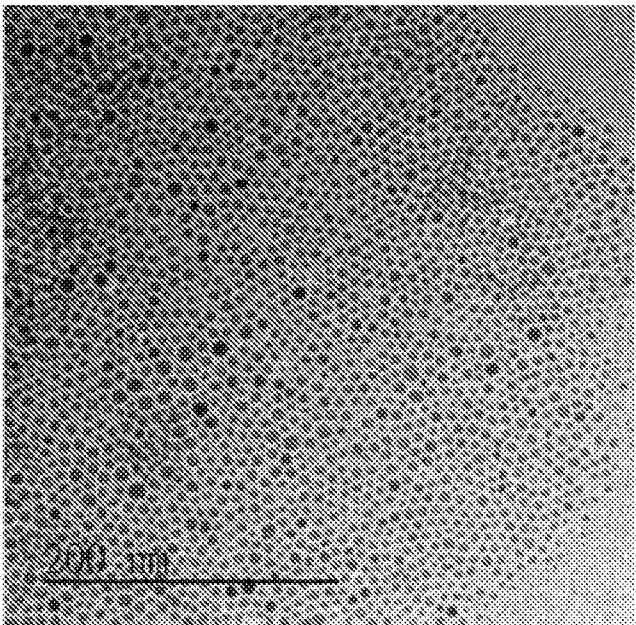


图 4

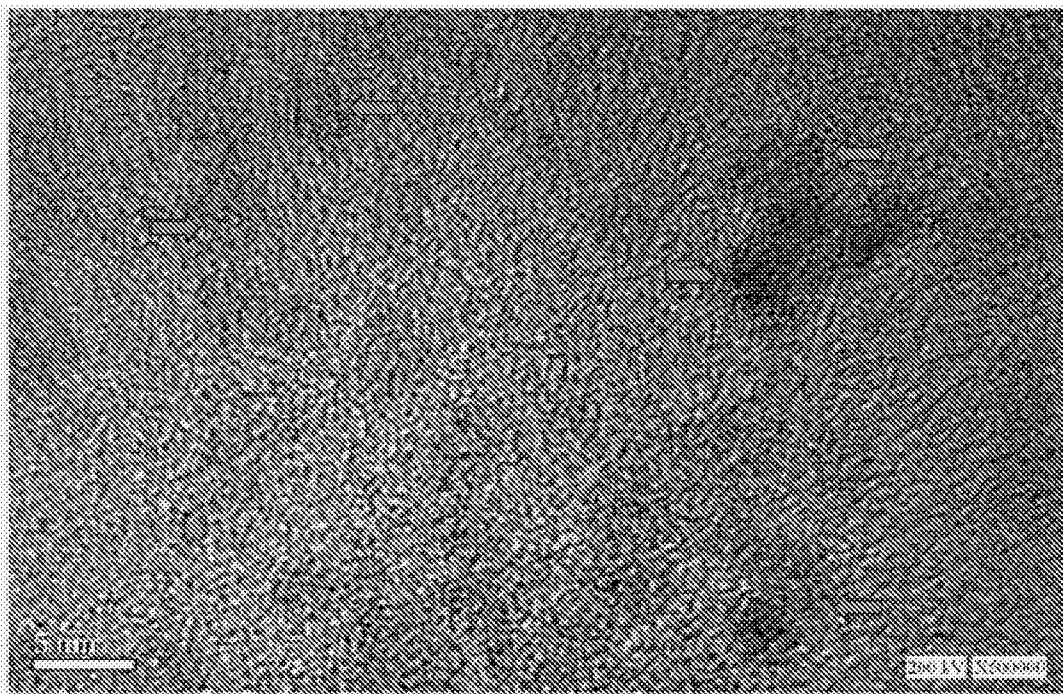


图 5

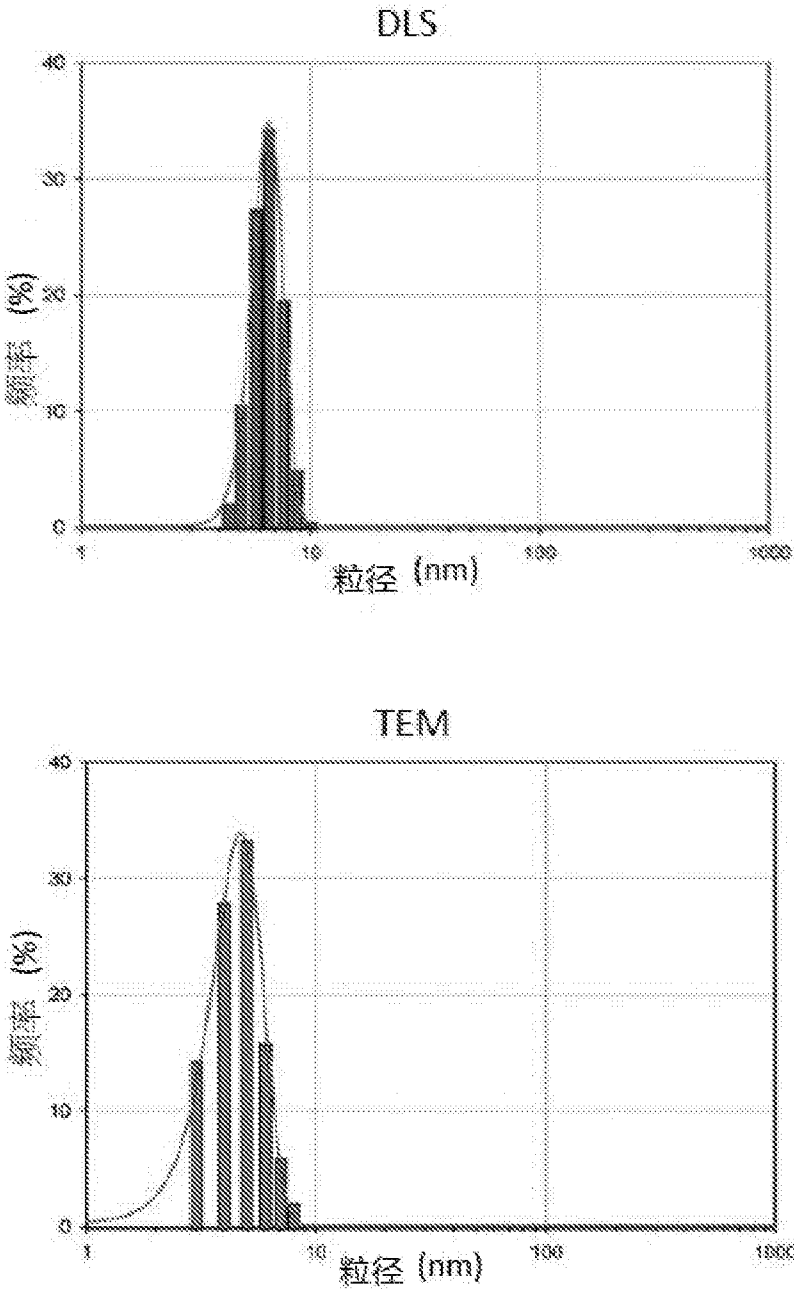


图 6

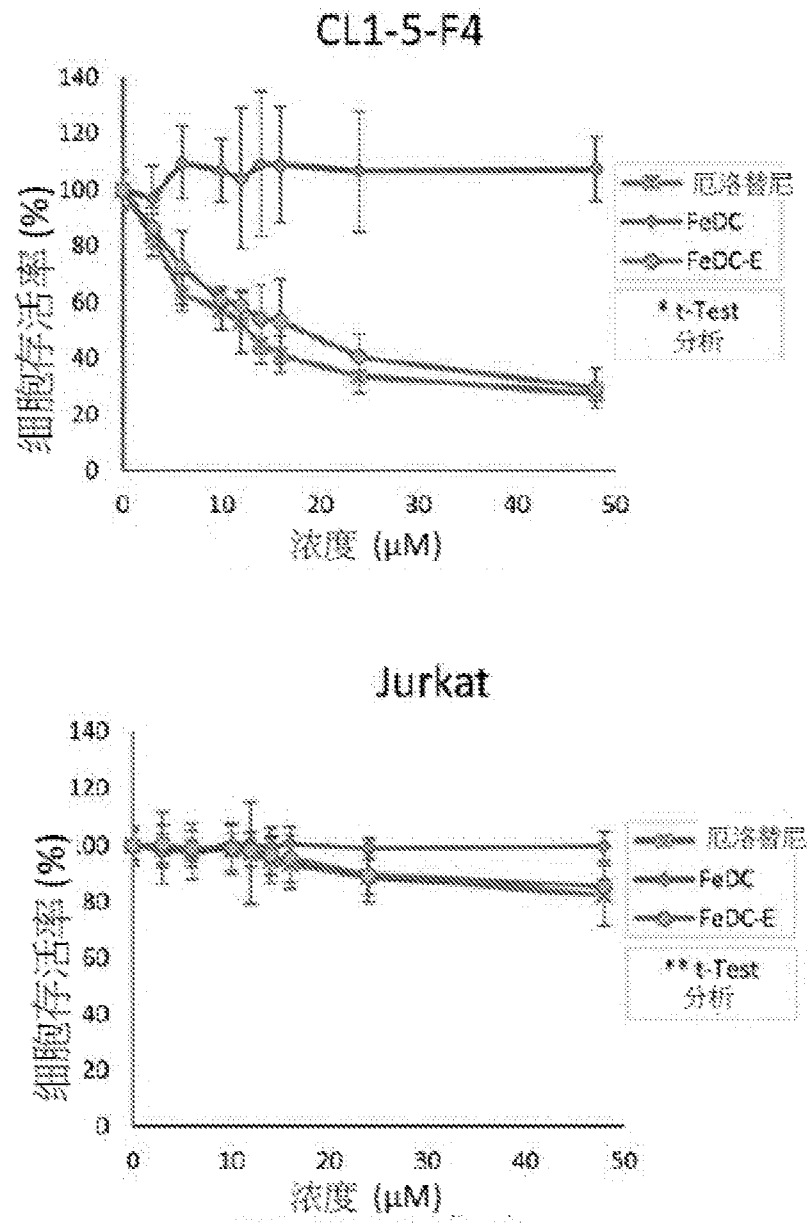


图 7

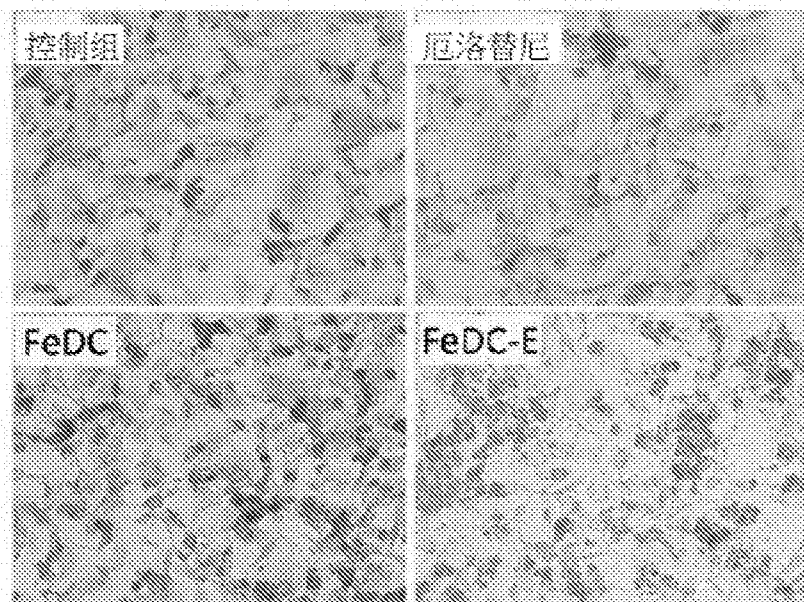
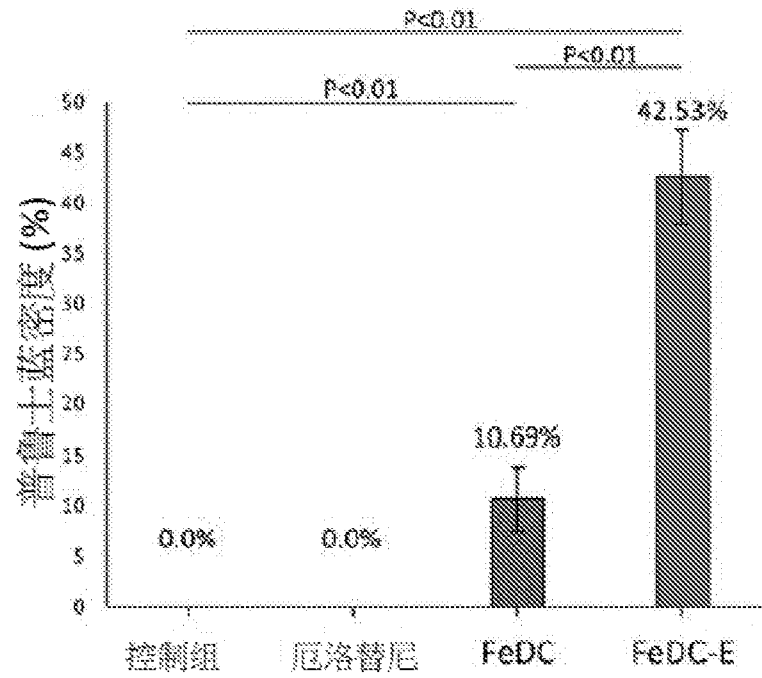


图 8

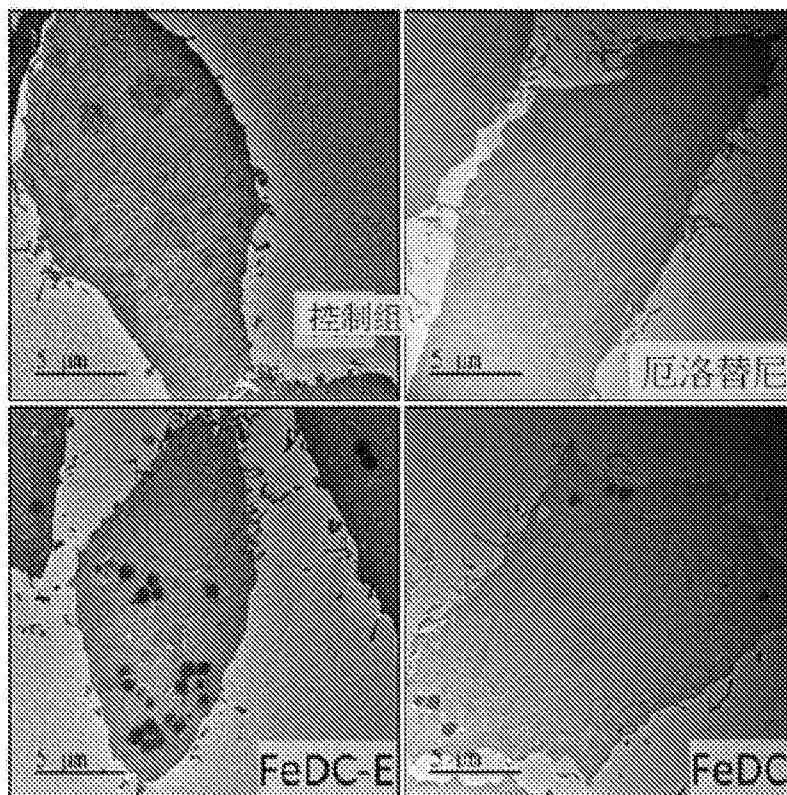


图 9

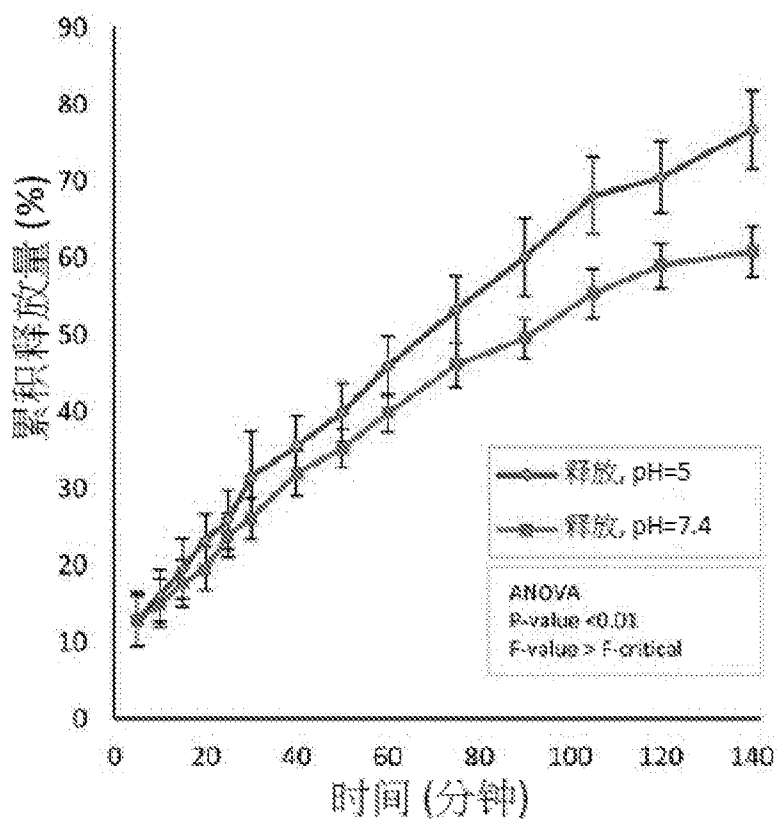


图 10

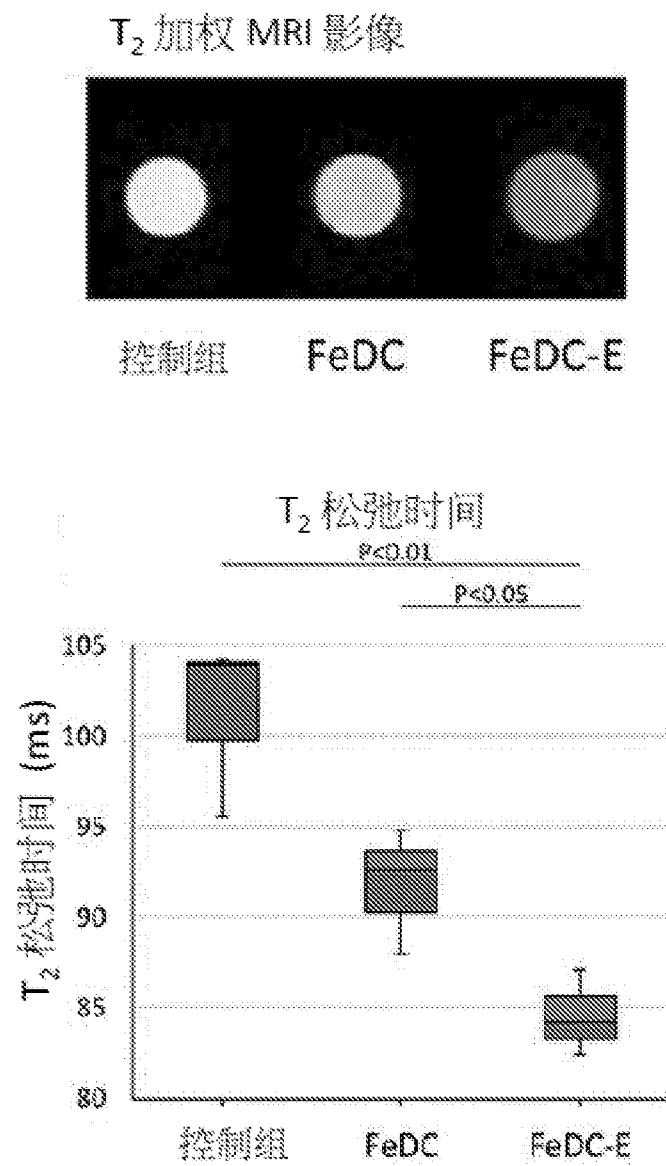


图 11

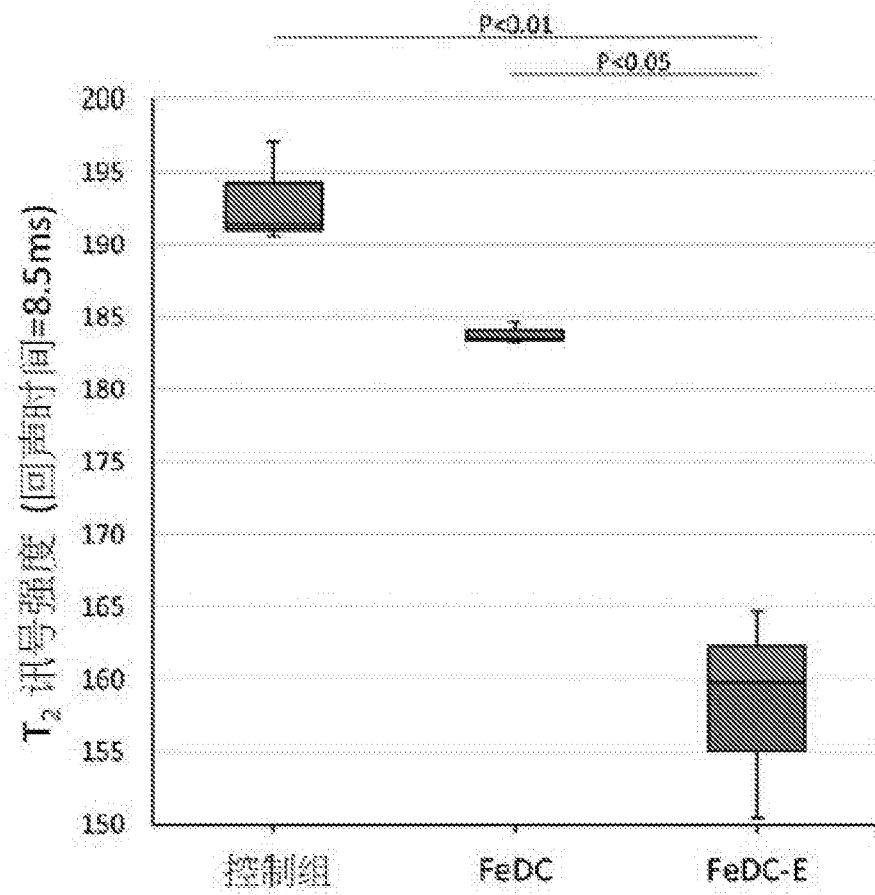


图 12

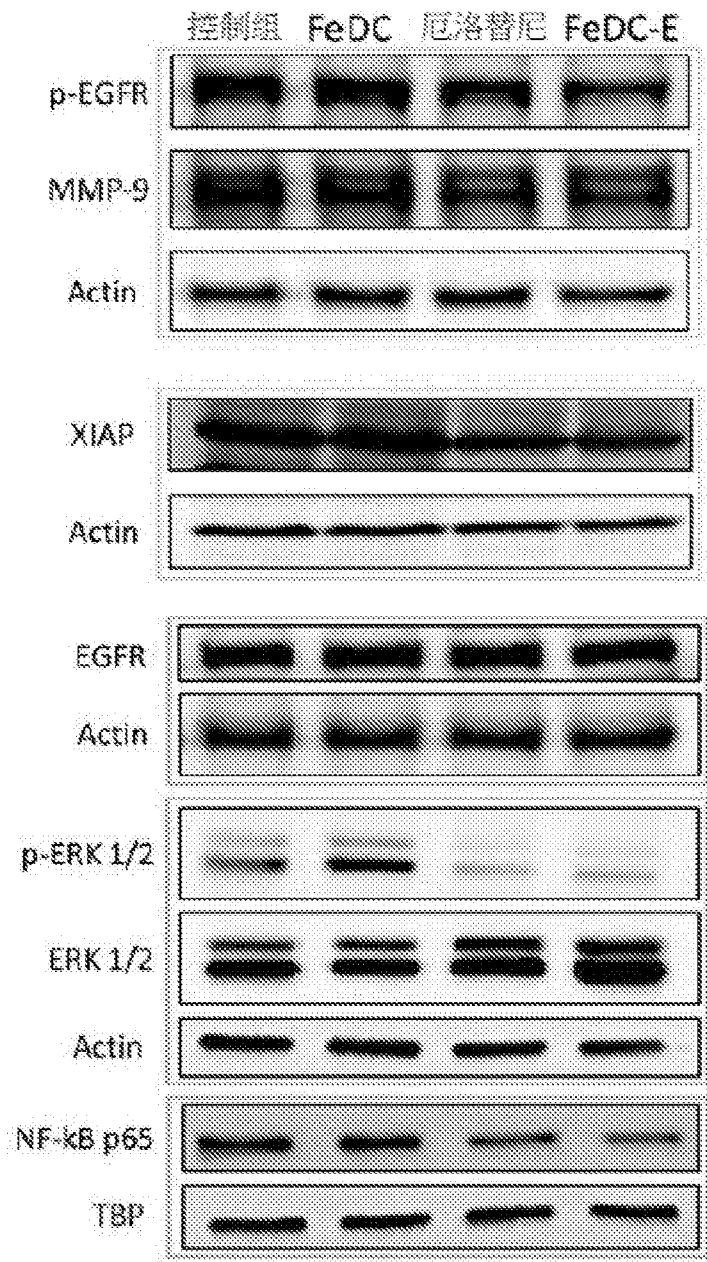


图 13

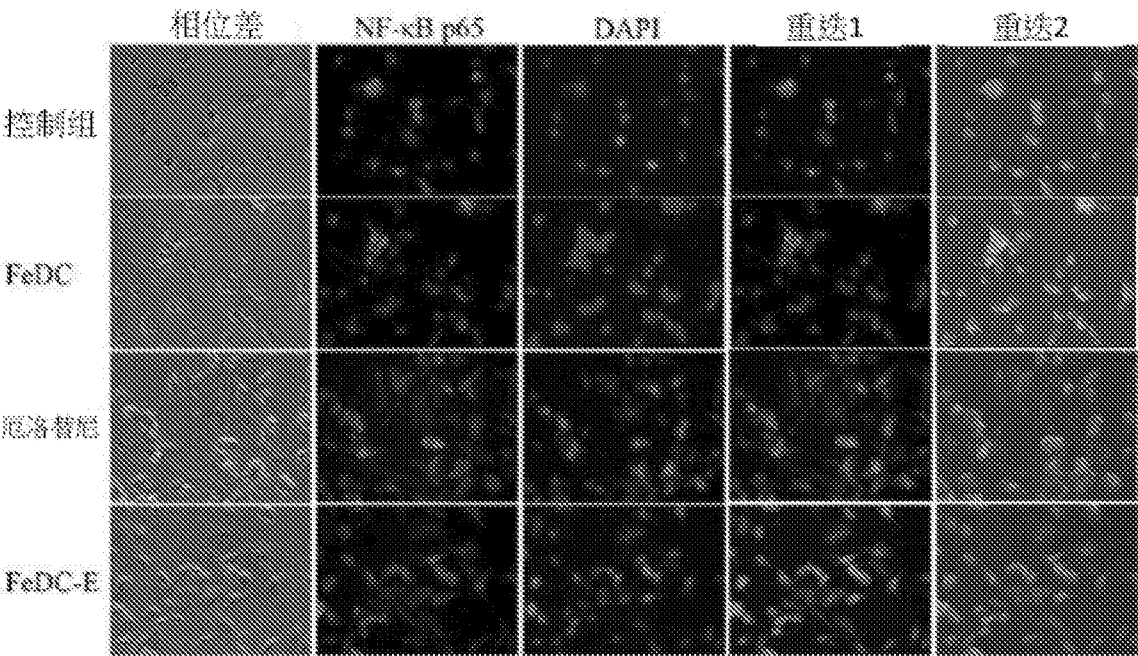


图 14

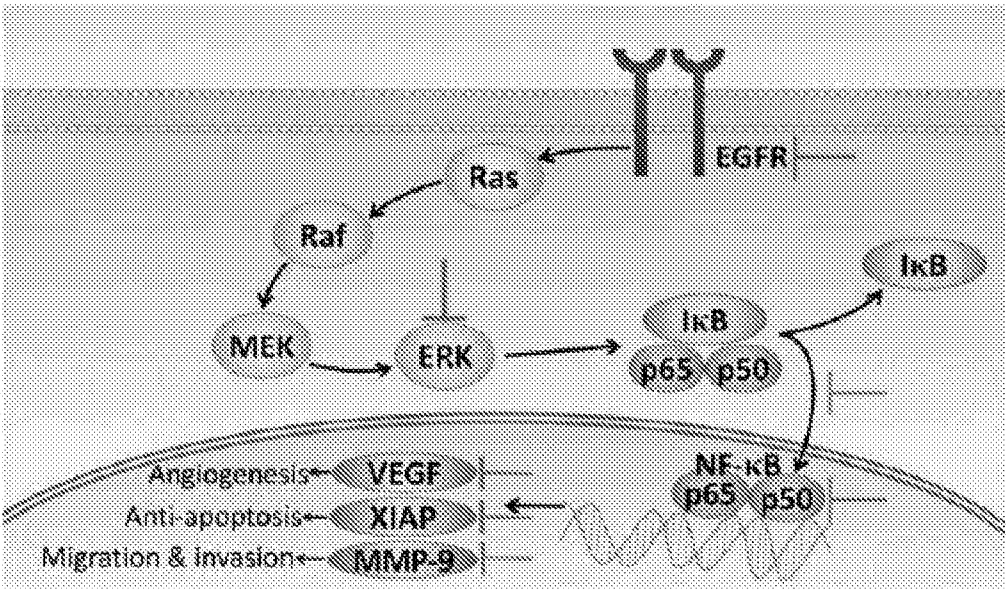


图 15

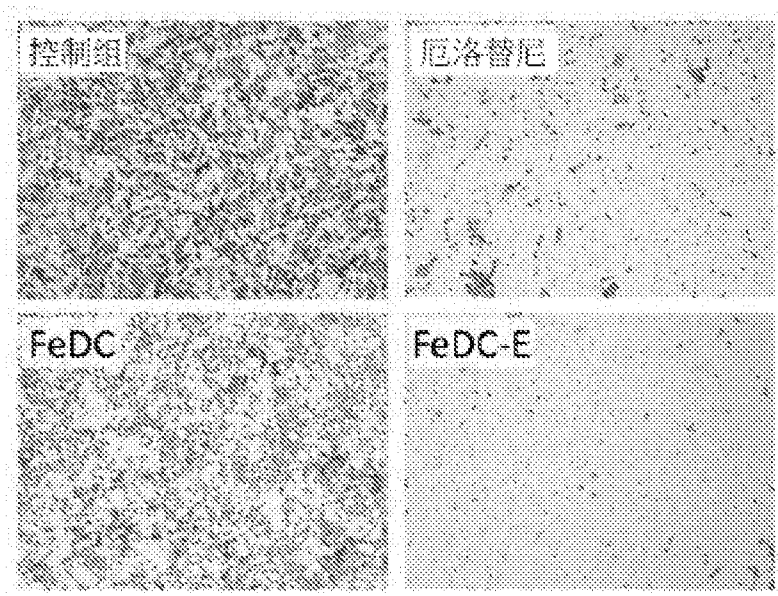
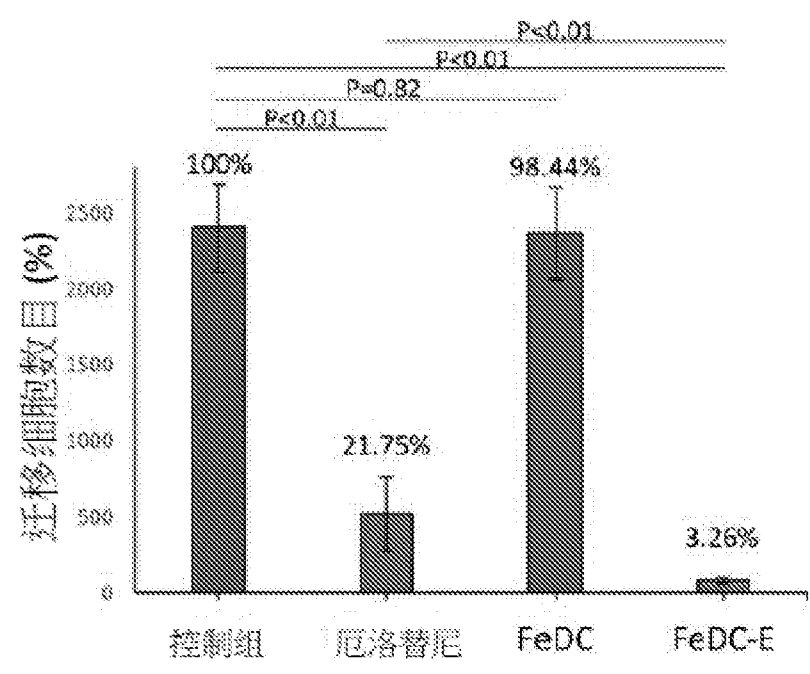


图 16

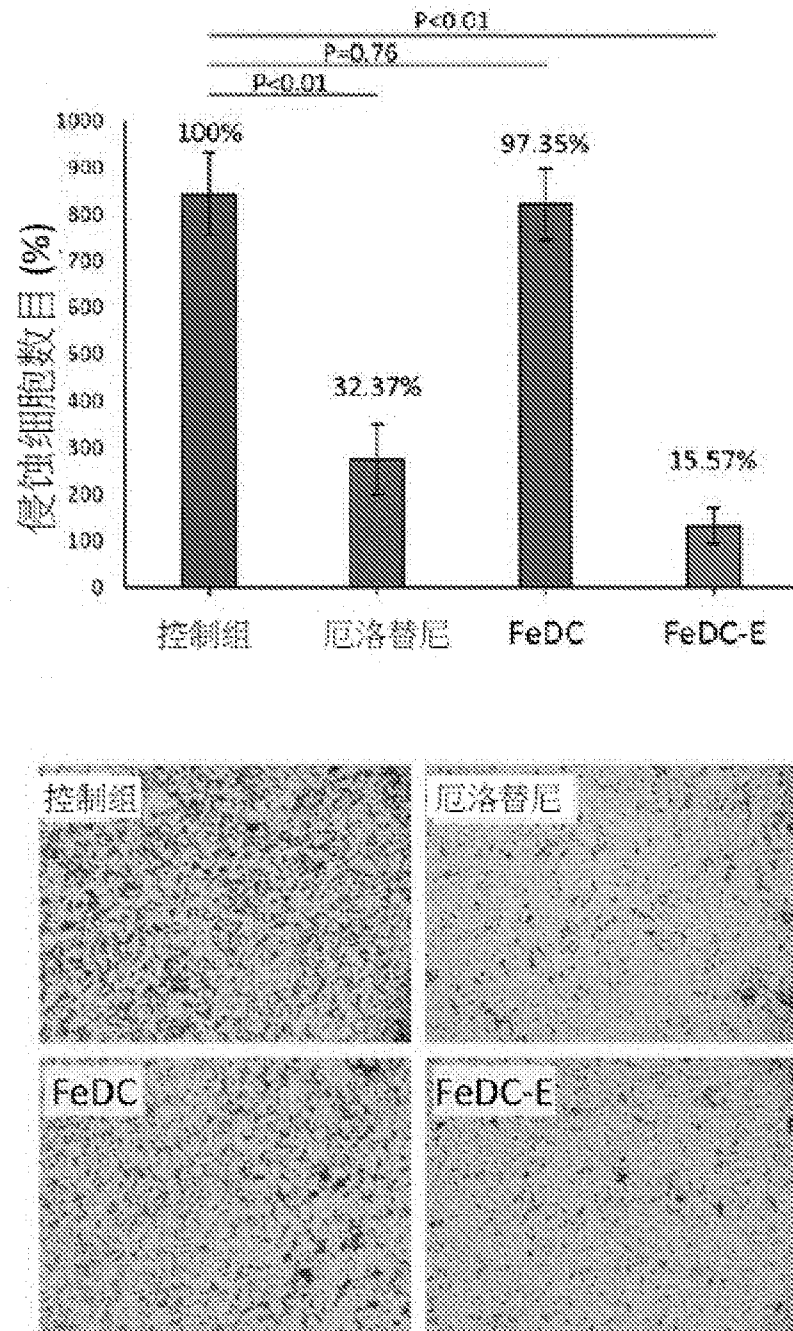


图 17

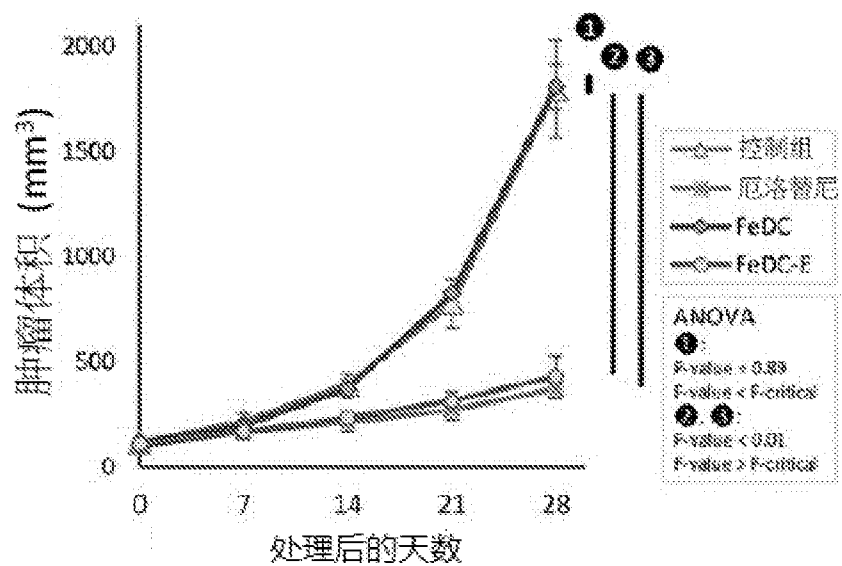


图 18

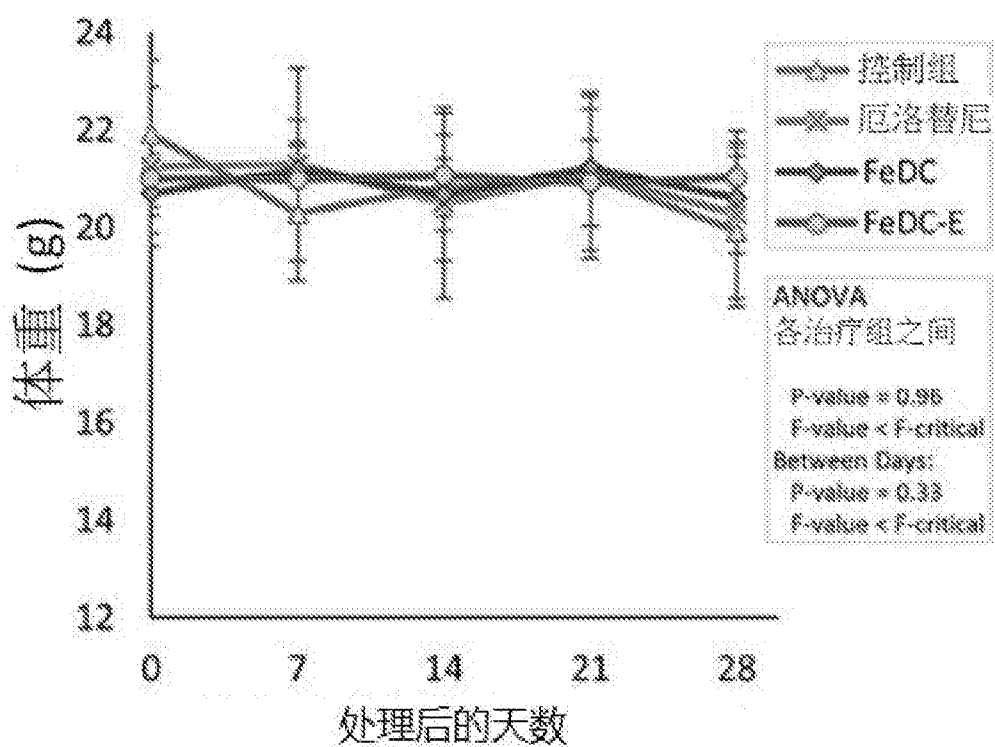
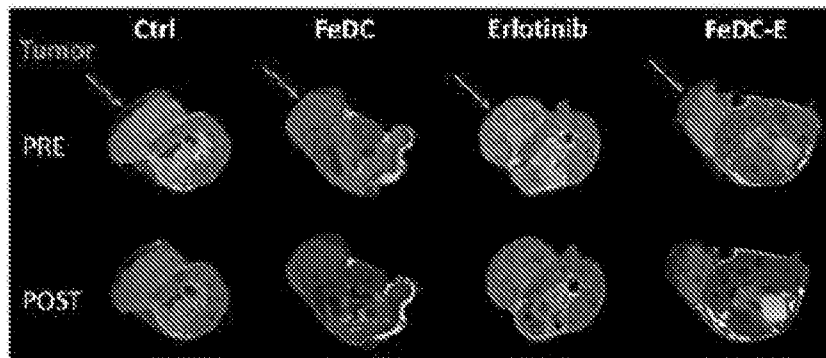


图 19

### T<sub>2</sub> 加权 MRI 影像



### T<sub>2</sub> 加权 MRI 讯号强度

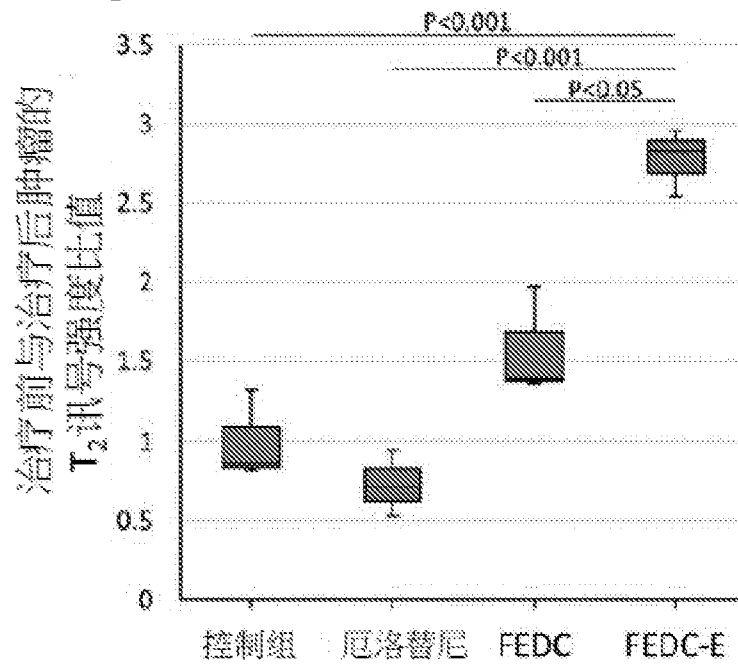


图 20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN2016/108073

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 49/06 (2006.01) i; A61K 49/12 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CPPD, CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, ISI web of knowledge: 陈震宇, 超顺磁性氧化铁, 单晶层氧化铁纳米颗粒, 葡聚糖, 厄洛替替, 表皮生长因子, spio, mion, dextran, erlotinib, EGFR,

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                   | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | ALI, A. A. A. et al. Erlotinib-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles as a Smart Cancer-Targeted Theranostic Probe for MRI. SCIENTIFIC REPORTS, 11 November 2016 (11.11.2016), volume 6 | 1-17                  |
| A         | WO 2004083902 A2 (GEORGIA TECH RESEARCH CORPORATION et al.) 30 September 2004 (30.09.2004), entire document                                                                          | 1-17                  |
| A         | CN 105600832 A (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD. et al.) 25 May 2016 (25.05.2016), entire document                                                                   | 1-17                  |
| A         | CN 102580120 A (HAINAN MEDICAL UNIVERSITY AFFILIATED HOSPITAL) 18 July 2012 (18.07.2012), entire document                                                                            | 1-17                  |
| A         | CN 101698106 A (ZHEJIANG FIRST PEOPLE'S HOSPITAL et al.) 28 April 2010 (28.04.2010), entire document                                                                                 | 1-17                  |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                              |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                     |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date                                                                               | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                             |                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Date of the actual completion of the international search<br>14 August 2017 | Date of mailing of the international search report<br>31 August 2017 |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|

Name and mailing address of the ISA  
State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao  
Haidian District, Beijing 100088, China  
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer  
WU, Tiesheng  
Telephone No. (86-10) 62413770

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2016/108073

| Patent Documents referred<br>in the Report | Publication Date  | Patent Family    | Publication Date |
|--------------------------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| WO 2004083902 A2                           | 30 September 2004 | US 2005130167 A1 | 16 June 2005     |
|                                            |                   | US 7459145 B2    | 02 December 2008 |
|                                            |                   | AU 2003303954 A8 | 11 October 2004  |
|                                            |                   | WO 2004083902 A3 | 30 June 2005     |
|                                            |                   | AU 2003303954 A1 | 11 October 2004  |
| CN 105600832 A                             | 25 May 2016       | WO 2016078576 A1 | 26 May 2016      |
| CN 102580120 A                             | 18 July 2012      | CN 102580120 B   | 02 April 2014    |
| CN 101698106 A                             | 28 April 2010     | None             |                  |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/108073

## A. 主题的分类

A61K 49/06(2006.01)i; A61K 49/12(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

中国期刊全文数据库, 中国药物专利数据库, CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, ISI web of knowledge; 陈震宇, 超顺磁性氧化铁, 单晶层氧化铁纳米颗粒, 葡聚糖, 厄洛替尼, 表皮生长因子, spio, mion, dextran, erlotinib, EGFR,

## C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                                                                | 相关的权利要求 |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| X    | ALI, A.A.A. et al. "Erlotinib-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles as a Smart Cancer-Targeted Theranostic Probe for MRI" SCIENTIFIC REPORTS, 第6卷, 2016年 11月 11日 (2016 - 11 - 11), | 1-17    |
| A    | WO 2004083902 A2 (GEORGIA TECH RESEARCH CORPORATION等) 2004年 9月 30日 (2004 - 09 - 30)<br>全文                                                                                        | 1-17    |
| A    | CN 105600832 A (正大天晴药业集团股份有限公司等) 2016年 5月 25日 (2016 - 05 - 25)<br>全文                                                                                                             | 1-17    |
| A    | CN 102580120 A (海南医学院附属医院) 2012年 7月 18日 (2012 - 07 - 18)<br>全文                                                                                                                   | 1-17    |
| A    | CN 101698106 A (镇江第一人民医院等) 2010年 4月 28日 (2010 - 04 - 28)<br>全文                                                                                                                   | 1-17    |

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2017年 8月 14日

国际检索报告邮寄日期

2017年 8月 31日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)  
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

吴铁生

电话号码 (86-10)010-62413770

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/108073

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|------------|----|----------------|------|------------|----|----------------|
| WO          | 2004083902 | A2 | 2004年 9月 30日   | US   | 2005130167 | A1 | 2005年 6月 16日   |
|             |            |    |                | US   | 7459145    | B2 | 2008年 12月 2日   |
|             |            |    |                | AU   | 2003303954 | A8 | 2004年 10月 11日  |
|             |            |    |                | WO   | 2004083902 | A3 | 2005年 6月 30日   |
|             |            |    |                | AU   | 2003303954 | A1 | 2004年 10月 11日  |
| CN          | 105600832  | A  | 2016年 5月 25日   | WO   | 2016078576 | A1 | 2016年 5月 26日   |
| CN          | 102580120  | A  | 2012年 7月 18日   | CN   | 102580120  | B  | 2014年 4月 2日    |
| CN          | 101698106  | A  | 2010年 4月 28日   | 无    |            |    |                |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)