

(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
2020 年 6 月 11 日 (11.06.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/114460 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 9/51 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/123329
- (22) 国际申请日: 2019 年 12 月 5 日 (05.12.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201811494357.4 2018 年 12 月 7 日 (07.12.2018) CN
- (71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。
- (72) 发明人: 郑海荣 (ZHENG, Hairong); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。胡德红 (HU, Dehong); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。盛宗

海 (SHENG, Zonghai); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。刘新 (LIU, Xin); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 深圳市科进知识产权代理事务所 (普通合伙) (SHENZHEN KEJIN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国广东省深圳市南山区粤兴三道二号虚拟大学园产业化基地 A701 室, Guangdong 518055 (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, JO, JP, KE, KG, KH, 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,

(54) **Title:** MULTIMERIC ALBUMIN NANOSPHERE, PREPARATION METHOD THEREFOR, USE THEREOF, DRUG-LOADED MULTIMERIC ALBUMIN NANOSPHERE, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 多聚体白蛋白纳米球及其制备方法和应用、载药多聚体白蛋白纳米球及其制备方法和应用

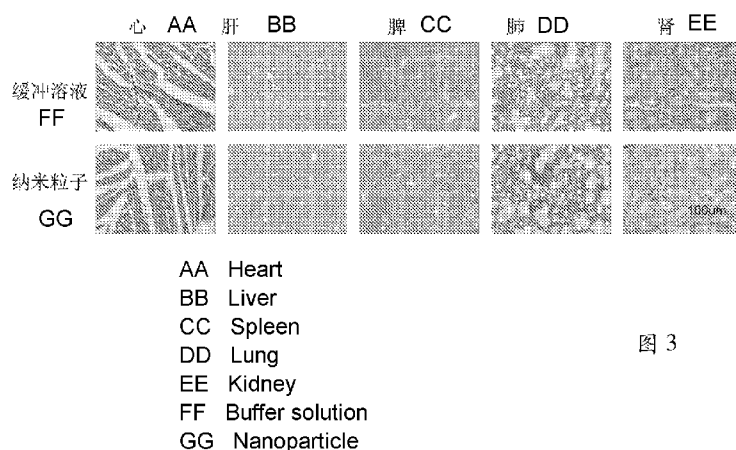


图 3

(57) **Abstract:** A multimeric albumin nanosphere, a preparation method therefor, use thereof, a drug-loaded multimeric albumin nanosphere, a preparation method therefor and use thereof, relating to the technical field of biomedical materials. The multimeric albumin nanosphere is mainly formed by means of aggregation of a plurality of albumin molecules, the plurality of albumin molecules are linked by means of disulfide bonds, and the particle size of the multimeric albumin nanosphere is 10 to 100 nm. The technical problem of poor stability and possible toxic side effects of albumin nanospheres in the prior art is alleviated. The multimeric albumin nanosphere is composed of a plurality of albumin molecules linked by disulfide bonds, has a small particle size, narrow distribution, uniform size, and good dispersibility, and is a good carrier for drug delivery, achieving technical effects of effective, safe and stable drug release in patients for a long time.



WO 2020/114460 A1

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,
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)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 一种多聚体白蛋白纳米球及其制备方法和应用、载药多聚体白蛋白纳米球及其制备方法和应用, 涉及生物医药材料技术领域, 多聚体白蛋白纳米球主要由多个白蛋白分子聚集而成, 所述多个白蛋白分子之间通过二硫键连接, 且所述多聚体白蛋白纳米球的粒径为10~100nm, 缓解现有技术中存在的白蛋白纳米球稳定性差且可能存在有毒副作用的技术问题, 达到了多聚体白蛋白纳米球由多个白蛋白分子通过二硫键连接而成, 粒径小, 分布窄, 尺寸均一, 分散性好, 是运载药物的良好载体, 有利于在患者体内长时间有效、安全稳定地释放药物的技术效果。

多聚体白蛋白纳米球及其制备方法和应用、载药多聚体白蛋白纳米球及其制备方法和应用

技术领域

本申请涉及生物医药材料技术领域,尤其是涉及一种多聚体白蛋白纳米球及其制备方法和应用、载药多聚体白蛋白纳米球及其制备方法和应用。

背景技术

纳米技术的兴起使得基于高分子纳米微粒的药物输送得到了广泛的关注,白蛋白具有可生物降解、无毒、无抗原性等诸多特点,被认为是一个理想的药物载体。而通常单个白蛋白分子的尺寸在几个纳米以内,不适合直接用于载药,超声乳化法和去溶剂法可制得粒径小于1 μm 的白蛋白纳米球,可用于运载药物,但由于白蛋白分子的水溶性高,该类方法制得的白蛋白纳米球载体的释药性能不易于控制,如何使白蛋白纳米颗粒在水中有良好的稳定性,且在稀释条件下不溶解是目前制备技术上的难点。

戊二醛等交联剂常被用来稳定得到的纳米球,但戊二醛会非选择性的结合白蛋白表面的氨基位点,在生物体内会释放出醛类残基,对生物体有着显著毒副作用。因此,有必要提供一种安全、稳定性高的白蛋白纳米球以进行药物运载。

有鉴于此,特提出本申请。

发明内容

本申请的目的一在于提供一种多聚体白蛋白纳米球,以缓解了现有技术中存在的白蛋白纳米球稳定性差且可能存在有毒副作用的技术问题。

本申请提供的多聚体白蛋白纳米球，主要由多个白蛋白分子聚集而成，所述多个白蛋白分子之间通过二硫键连接，且所述多聚体白蛋白纳米球的粒径为10~100nm，优选为30~50nm。

进一步的，所述白蛋白分子为人血清白蛋白分子、牛血清白蛋白分子、猪血清白蛋白分子和重组白蛋白分子中的至少一种。

本申请的目的之二在于提供上述多聚体白蛋白纳米球的制备方法，包括如下步骤：

(a) 提供白蛋白的水溶液，向白蛋白的水溶液中加入带巯基的还原剂，制得还原型白蛋白的水溶液；

(b) 将还原型白蛋白的水溶液分散后，加入有机溶剂混合均匀，即制得多聚体白蛋白纳米球；

优选地，步骤(a)中，白蛋白水溶液的pH值为7~12；

优选地，步骤(a)中，白蛋白水溶液的体积质量浓度为0.01~300mg/mL；

优选地，白蛋白的水溶液与带巯基的还原剂的混合时间为0.05~12h；

优选地，在步骤(a)中，白蛋白的水溶液与带巯基的还原剂的混合温度为0~60℃；

优选地，在步骤(b)中，还原型白蛋白的水溶液的在0~60℃下分散；

优选地，在步骤(b)中，还原型白蛋白的水溶液与有机溶剂的混合温度为0~60℃；

优选地，步骤(b)中，通过超声波细胞破碎仪将还原型白蛋白的水溶液进行分散；进一步优选地，超声波细胞破碎仪的功率为1~1000W；

优选地，在步骤(b)中，有机溶剂的加入速度为0.01~1000 mL/s；

优选地，在步骤(b)中，还原型白蛋白水溶液与有机溶剂的混合时间为

5-240min。

进一步的，在步骤（a）中，带巯基的还原剂与白蛋白的摩尔比为（10~5000）:1；

优选地，带巯基的还原剂选自谷胱甘肽、二硫苏糖醇、巯基乙醇、半胱氨酸或同型半胱氨酸中的至少一种。

进一步的，在步骤（b）中，有机溶剂与还原型白蛋白水溶液的体积比为（0.1~100）:1；

优选地，所述有机溶剂选自二甲基亚砷、N-甲基吡咯烷酮、N,N-二甲基甲酰胺和环丁砜中的至少一种。

进一步的，在步骤（b）中，还原型白蛋白的水溶液与有机溶剂混合均匀后，得到多聚体白蛋白纳米球的水溶液，将多聚体白蛋白纳米球的水溶液依次进行纯化和干燥，得到多聚体白蛋白纳米球。

优选地，采用透析进行纯化，进一步优选地，在 0~60℃ 进行透析；进一步优选地，在 pH 值为 7~12 的条件下进行透析；更进一步优选地，采用 pH 值为 7~12 的缓冲液进行透析；

优选地，采用冻干进行干燥，进一步优选地，先在 -20~0℃ 下预冻 1~48h，再在 -80~-20℃ 下冷冻 2~48h，然后再在冷冻干燥机中冷冻干燥 12~120h。

本申请的目的是之三在于提供一种载药多聚体白蛋白纳米球，包括多聚体白蛋白纳米球和药物，所述药物包载于所述多聚体白蛋白纳米球中，所述药物包括抗癌药物和/或造影剂，且载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为 10~100nm，优选为 30~50nm；

优选地，所述抗癌药物选自铂及铂的配合物、5 β ,20-环氧-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -六羟基紫杉烷-11-烯-9-酮-4,10-二乙酸酯-2-苯甲酸酯-13[(2' R,3' S)-N-苯甲酰-3-苯基异丝氨酸酯]、(7S: 9S)-9-羟乙酰基-4-甲氧基-7,8,9,10-四氢

-6,7,9,11-四羟基-7-0-(2',3',6',-三去氧-3'-氯基-a-1-来苏已吡喃基)-5,12-萘二酮、(E,E)-1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮、1,3,5,8-四甲基-2,4-二(a-羟乙基)卟吩-6,7-二丙酸、4-乙基-4,12-二氧-4-羟-1H-吡喃(3',4',6,7)吡啶啉(1,2-6)喹啉-3,14-二酮、(2S-反式)-18-羧基-20-(羧甲基)-13-乙基-2,3-二氢3,7,12,17-四甲基-8-乙烯基-21H,23H-卟吩-2-丙酸、IR700 碘化物和 11-氯-1,1'-二正丙基-3,3,3',3'-四甲基-10,12-三亚甲基吡啶三碳花青碘盐中的至少一种；

优选地，所述造影剂选自四氟硼酸、4-[2-[2-氯-3-[(2,6-二苯基-4H-噻喃-4-亚基)亚乙基]-1-环己烯-1-基]乙烯基]-2,6-二苯基硫代吡喃，2,7-双[1,3-二氢-1,1-二甲基-3-(4-磺丁基)-1,3,5-庚三烯单钠盐、对-[(2,4-二氨基喋啶-6)-N-甲基甲氨基]苯甲酰谷氨酸、3,7-双(二甲氨基)吩噻嗪-5-翁氯化物、6,6'-[[3,3'-二甲基(1,1'-二苯基)-4,4'-二基]双(偶氮基)]双(4-氨基-5-羟基-1,3-萘二磺酸)四钠盐、2-((4-二乙氨基)苯)(4-(二乙氨基)环己烷-2,5-二烯)甲烷)苯基-1,4-二磺酸盐、4,4'-双(二乙氨基)三苯脱水甲醇-2",4"-二磺酸单钠和金属纳米粒子中的至少一种。

本申请的目的之四在于提供一种上述载药多聚体白蛋白纳米球的制备方法，包括如下步骤：

(A) 提供白蛋白的水溶液，向白蛋白的水溶液中加入带巯基的还原剂，制得还原型白蛋白的水溶液；

(B) 将还原型白蛋白的水溶液分散后，加入有机溶剂混合均匀，还原型白蛋白通过二硫键连接，即制得载药多聚体白蛋白纳米球，其中，白蛋白的水溶液中溶解有药物和/或有机溶剂中溶解有药物；

优选地，药物与白蛋白的质量比为 (0.0002~5):1；优选为 (0.0002~0.5):1；进一步优选为 (0.0008~0.5):1，更进一步优选为 (0.008~0.5):1；

优选地，在步骤(A)中，带巯基的还原剂与白蛋白的摩尔比为(10~5000):1；

优选地，在步骤(B)中，有机溶剂与还原型白蛋白水溶液的体积比为

(0.1~100) :1;

优选地,带巯基的还原剂选自谷胱甘肽、二硫苏糖醇、巯基乙醇、半胱氨酸或同型半胱氨酸中的至少一种;

优选地,所述有机溶剂选自二甲基亚砷、N-甲基吡咯烷酮、N,N-二甲基甲酰胺和环丁砜中的至少一种;

优选地,步骤(A)中,白蛋白水溶液的pH值为7~12;

优选地,步骤(A)中,白蛋白水溶液的体积质量浓度为0.01~300mg/mL;

优选地,白蛋白的水溶液与带巯基的还原剂的混合时间为0.05~12h;

优选地,在步骤(A)中,白蛋白的水溶液与带巯基的还原剂的混合温度为0~60℃;

优选地,在步骤(B)中,还原型白蛋白的水溶液的在0~60℃下分散;

优选地,在步骤(B)中,还原型白蛋白的水溶液与有机溶剂的混合温度为0~60℃;

优选地,步骤(B)中,通过超声波细胞破碎仪将还原型白蛋白的水溶液进行分散;进一步优选地,超声的功率为1~1500W;

优选地,在步骤(B)中,有机溶剂的加入速度为0.01~1000mL/s;

优选地,在步骤(B)中,还原型白蛋白水溶液与有机溶剂的混合时间为5~240min。

在步骤(B)中,还原型白蛋白的水溶液与有机溶剂混合均匀后,得到载药多聚体白蛋白纳米球的水溶液,将载药多聚体白蛋白纳米球的水溶液依次进行纯化和干燥,得到载药多聚体白蛋白纳米球;

优选地,采用透析进行纯化,进一步优选地,在0~60℃进行透析;进一步优选地,在pH值为7~12的条件下进行透析;更进一步优选地,采用pH值

为 7~12 的缓冲液进行透析；

优选地，采用冻干进行干燥，进一步优选地，先在-20~0℃下预冻 1~48h，再在-80~-20℃下冷冻 2~48h，然后再在冷冻干燥机中冷冻干燥 12~120h。

本申请的目的是五在于提供上述多聚体白蛋白纳米球或载药多聚体白蛋白纳米球在制备预防、治疗或诊断癌症的药物中的应用。

本申请提供的多聚体白蛋白纳米球，白蛋白分子之间通过二硫键连接，在水中具有良好的稳定性，同时多聚体白蛋白纳米球的粒径为 10~100nm，粒径小，分布窄，尺寸均一，分散性好，是运载药物的良好载体，有利于在患者体内长时间有效、稳定地释放药物。另外，本申请提供的多聚体白蛋白纳米球主要由白蛋白聚集而成，生物相容性好，无明显组织毒性，安全性好。

本申请提供的多聚体白蛋白纳米球的制备方法工艺简单，反应条件温和，反应重现性良好，制得的多聚体白蛋白纳米球粒径小，分散性好。

本申请提供的载药多聚体白蛋白纳米球，将药物包载在多聚体白蛋白纳米球中，能够稳定存在于生物体内血液系统中，从而避免药物在血液循环系统传输过程中无效释放，同时本申请提供的载药多聚体白蛋白纳米球具有主动靶向肿瘤组织的能力，能够在肿瘤组织区域有效稳定释放药物，从而显著提高治疗效果。

本申请提供的载药多聚体白蛋白纳米球的制备方法，工艺简单，反应条件温和，反应重现性良好，制得的多聚体白蛋白纳米球粒径小，分散性好。

附图说明

为了更清楚地说明本申请具体实施方式或现有技术中的技术方案，下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图是本申请的一些实施方式，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1 为本申请实施例 13 提供的载药多聚体白蛋白纳米球的扫描电子显微镜图像；

图 2 为本申请实施例 13 提供的载药多聚体白蛋白纳米球注射荷瘤裸鼠后的近红外二区荧光成像图；

图 3 为本申请实施例 13 提供的载药多聚体白蛋白纳米球注射荷瘤裸鼠后的组织切片图。

具体实施方式

下面将结合附图对本申请的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本申请一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本申请保护的范围。

白蛋白是一种生物内源性蛋白，具有可生物降解、无毒等优点，被认为是一个理想的药物载体，但是白蛋白在稀释条件下会溶解，在生物体内不稳定，不能有效运载药物分子进入靶器官。

根据本申请的一个方面，本申请提供了一种多聚体白蛋白纳米球，主要由多个白蛋白分子聚集而成，多个白蛋白分子之间通过二硫键连接，且多聚体白蛋白纳米球的粒径为 10~100nm，优选为 30-50nm。

如本申请所述的，“多聚体白蛋白纳米球”由白蛋白分子之间通过二硫键相互连接，由于单体白蛋白分子中含有至少一个巯基或二硫键，若该白蛋白单体分子中的巯基或二硫键在形成多聚体白蛋白纳米球时没有发生反应，则有可能保留在了多聚体白蛋白球中，因此，本申请提供的多聚体白蛋白纳米球可含有巯基、二硫键、或者同时含有巯基和二硫键，即本申请提供的多聚体白蛋白纳米球可含有巯基和/或二硫键。

由于白蛋白单体分子易溶性，物理方法团聚的白蛋白纳米球容易解体，纳米球中包载的药物很容易被过早地释放，不利于药物等目标投递物在人体循环系统内的运输，即物理方法团聚的白蛋白纳米球载体的释药性能的可控性不高，而本申请提供的多聚体白蛋白纳米球由多个白蛋白单体分子通过分子间的二硫键相互连接，这种化学键稳定的多聚体结构比通过物理方法聚集的蛋白纳米球更稳定，不易被人体体液稀释、溶解而解体，有助于保证靶向部位足够的给药浓度。

在生物医学医用中，纳米药物载体的粒径比较重要，不同粒径代谢途径也不一样，小粒径通过肾代谢，大粒径通过肝代谢；其中，20~200nm 的粒子对肿瘤有被动靶向作用，在此粒径范围内的纳米药物载体运载药物时，可以降低药物本身的毒副作用，同时也增强了疗效。

在本申请的一种优选实施方式中，多聚体白蛋白纳米球的粒径为10~20nm。

在本申请的一种优选实施方式中，多聚体白蛋白纳米球的粒径为20~30nm。

在本申请的一种优选实施方式中，多聚体白蛋白纳米球的粒径为30~40nm。

在本申请的一种优选实施方式中，多聚体白蛋白纳米球的粒径为40~50nm。

在本申请的一种优选实施方式中，多聚体白蛋白纳米球的粒径为50~100nm。

本申请提供的多聚体白蛋白纳米球，白蛋白分子之间通过二硫键连接，在水中具有良好的稳定性，同时多聚体白蛋白纳米球的粒径为为10~100nm，粒

径小，分布窄，尺寸均一，分散性好，是运载药物的良好载体，有利于在患者体内长时间有效、稳定地释放药物。另外，本申请提供的多聚体白蛋白纳米球主要由白蛋白聚集而成，生物相容性好，无明显组织毒性，安全性好。

本申请提供的多聚体白蛋白纳米球粒径小且尺寸均一，分散性好，用该纳米球投递药物在生物医学应用方面有较大优势，有利于纳米球通过 EPR 效应进入肿瘤内部并通过 GP60 通路靶向到肿瘤细胞。

本申请提供的多聚体白蛋白纳米球由多个白蛋白单体分子通过二硫键连接而成，分子量高于自由蛋白质分子的分子量，不易被肾小球滤过，从而有效提高了药物等目标投递物的投递效率。

在本申请的一种优选实施方式中，白蛋白分子为人血清白蛋白分子、牛血清白蛋白分子、猪血清白蛋白分子和重组白蛋白分子中的至少一种。

在本申请中，白蛋白分子中至少含有一个巯基或二硫键，以使得白蛋白分子之间能够通过二硫键连接以形成多聚体白蛋白纳米球。

根据本申请的第二个方面，本申请提供了上述多聚体白蛋白纳米球的制备方法，包括如下步骤：

(a) 提供白蛋白的水溶液，向白蛋白的水溶液中加入带巯基的还原剂，制得还原型白蛋白的水溶液；

(b) 将还原型白蛋白的水溶液进行分散，并加入有机溶剂，还原型白蛋白通过二硫键连接，即制得多聚体白蛋白纳米球。

本申请提供的多聚体白蛋白纳米球的制备方法工艺简单，反应条件温和，反应重现性良好，制得多聚体白蛋白纳米球粒径小，分散性好。

在本申请的一种优选实施方式中，在步骤 (a) 中，先将白蛋白的水溶液调节至 pH 值为 7-12，再向白蛋白的水溶液中加入带巯基的还原剂，以提高白

蛋白的还原效率。

在本申请的该实施方式中，调节后的白蛋白水溶液的典型但非限制性的pH值为7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5或12。

在本申请的一种优选实施方式中，在步骤(a)中，白蛋白的水溶液的体积质量浓度为0.01~300mg/mL，以利于制备多聚体白蛋白纳米球。

在本申请该优选实施方式中，白蛋白水溶液的典型但非限制性的体积质量浓度为0.05、0.1、0.5、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290或295。

在本申请的一种优选实施方式中，在步骤(a)中，向白蛋白的水溶液中加入带巯基的还原剂，然后在0~60℃下轻轻摇动反应0.05~12h，以使得白蛋白的还原反应进行的更加完全。

在本申请的该优选实施方式中，进行步骤(a)的典型但非限制性的温度为0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55或60℃。

在本申请的一种优选实施方式中，在步骤(a)中，带巯基的还原剂与白蛋白的摩尔比为(10-5000):1；以保证白蛋白分子上的巯基被完全还原。

在本申请的该优选实施方式中，带巯基的还原剂与白蛋白的摩尔比为10:1、20:1、50:1、100:1、200:1、500:1、1000:1、1500:1、2000:1、2500:1、3000:1、3500:1、4000:1、4500:1或5000:1。

进一步优选地，带巯基的还原剂选自谷胱甘肽、二硫苏糖醇、巯基乙醇、半胱氨酸或同型半胱氨酸中的至少一种。

在本申请的一种优选实施方式中，在步骤(b)中，有机溶剂与还原型白蛋白水溶液的体积比为(0.1~100):1；

在本申请的该优选实施方式中,有机溶剂与还原型白蛋白水溶液的体积比为 0.1:1、0.5:1、1:1、5:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1 或 100:1。

进一步优选地,所述有机溶剂选自二甲基亚砷、N-甲基吡咯烷酮、N,N-二甲基甲酰胺和环丁砜中的至少一种。

在本申请的该优选实施方式中,通过在还原型白蛋白的水溶液中。

加入有机溶剂能够将蛋白质分子析出,从而使得白蛋白分子间因二硫键的形成而聚集形成多聚体白蛋白纳米球。

在本申请的一种优选实施方式中,在步骤(b)中,可以采用超声波细胞破碎仪进行分散,超声波细胞破碎仪分散在 0~60℃ 的条件下进行,超声波细胞破碎仪的功率范围为 1~1500W,同时在所述超声波细胞破碎仪处理的溶液中以 0.01~1000mL/s 的速度加入有机溶剂,在 0~60℃ 的条件下反应 5~240min 后得到含多聚体白蛋白纳米球的溶液。

在本申请的该优选实施方式中,进行步骤(a)的典型但非限制性的温度为 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55 或 60℃。

在本申请的该优选实施方式中,超声功率的典型但非限制性的功率为 1、5、10、50、100、200、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400 或 1500W。

在本申请的该优选实施方式中,有机溶剂的典型但非限制性的加入速度为 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100、200、400、500、600、700、800、900 或 1000mL/s。

在本申请的该优选实施方式中,在步骤(b)中,还原型白蛋白水溶液与有机溶剂的典型但非限制性的混合时间为 5、10、20、30、40、50、60、70、

80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230 或 240min。

在本申请的优选实施方式中,通过超声波细胞破碎仪处理以增加溶液中白蛋白的分散性,并使之充分接触,该步骤可以采用行业内其他混合方式,比如超声或搅拌。

控制好还原剂的加入量、超声功率的大小和有机溶剂的加入速度,可以控制所制备的多聚体白蛋白纳米球的粒径,这是因为,当还原剂的加入量小,超声功率大,二甲基亚砜的注入速度小,所得的多聚体白蛋白纳米球的粒径就小;反之,当还原剂的加入量大,超声功率小,二甲基亚砜的注入速度大,所得的多聚体白蛋白纳米球的粒径就大。因此,本申请提供的多聚体白蛋白纳米球的制备方法不但能获得多聚体白蛋白纳米球,而且能得到粒径可控的多聚体白蛋白纳米球,本申请提供的方法可以制备出粒径在 10~100nm 之间的多聚体白蛋白纳米球。

在本申请的一种优选实施方式中,在步骤(b)中,还原型白蛋白的水溶液与有机溶剂混合均匀后,得到多聚体白蛋白纳米球的水溶液,将多聚体白蛋白纳米球的水溶液依次进行纯化和干燥,得到多聚体白蛋白纳米球。

优选地,采用透析进行纯化,进一步优选地,在 0~60℃ 进行透析;进一步优选地,在 pH 值为 7~12 的条件下进行透析;更进一步优选地,采用 pH 值为 7~12 的缓冲液中进行透析;

优选地,采用冻干进行干燥,进一步优选地,先在-20~0℃ 下预冻 1~48h,再在-80~-20℃ 下冷冻 2~48h,然后再在冷冻干燥机中冷冻干燥 12~120h。

在本申请的一种优选实施方式中,进行透析的典型但非限制性的温度为 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55 或 60℃。

在本申请的一种优选实施方式中,进行透析的缓冲液的典型但非限制性的pH值为7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5或12。

在本申请的一种优选实施方式中,进行预冻的典型但非限制性的时间为1、2、5、10、12、15、18、20、22、25、28、30、32、35、38、40、42、45或48h。

在本申请的一种优选实施方式中,进行预冻的典型但非限制性的温度为-20、-19、-18、-17、-16、-15、-14、-13、-12、-11、-10、-9、-8、-7、-6、-5、-4、-3、-2、-1或0℃。

在本申请的一种优选实施方式中,进行冷冻的典型但非限制性的温度为-80、-75、-70、-65、-60、-55、-50、-45、-40、-35、-30、-25、或-20℃。

在本申请的一种优选实施方式中,冷冻的典型但非限制性的时间为2、5、8、10、12、15、18、20、22、25、28、30、32、35、38、40、42、45、46或48h。

在本申请的一种优选实施方式中,在冷冻干燥机中冷冻干燥的典型但非限制性的时间为12、15、18、20、22、25、28、30、32、35、38、40、42、45、48、50、52、55、58、60、62、65、68、70、72、75、78、80、85、90、95、100、105、110、115或120h。

在本申请的一种典型但非限制性的实施方式中,将步骤(b)制得的未进行纯化的多聚体白蛋白纳米球溶液进行透析,得到多聚体白蛋白纳米球纯化溶液;再将多聚体白蛋白纳米球纯化溶液进行干燥脱水处理,得到多聚体白蛋白纳米球。

在本申请的进一步优选实施方式中,进行透析的方法为:将步骤(b)中所制得的多聚体白蛋白纳米球的溶液置于pH值为7~12的缓冲液中透析,得

到多聚体白蛋白纳米球纯化溶液。

在本申请的进一步优选实施方式中，用于透析的缓冲液为 PBS 缓冲液或 Tris 缓冲液。

在本申请的更进一步优选实施方式中，透析时间为 10~300h。

在本申请的该优选实施方式中，透析的典型但非限制性的时间为 10、20、50、80、100、120、150、180、200、220、250、280 或 300h。

在本申请的更进一步优选实施方式中，多聚体白蛋白纳米球溶液先在 pH 值为 7~12 的缓冲液中透析后，再置于双蒸水内透析。

更进一步优选地，置于双蒸水内透析的时间为 1~24h。

在本申请的优选实施方式中，本申请采用 pH 值为 7~12 的 PBS 缓冲液进行透析，一方面可以去除含多聚体白蛋白纳米球的溶液中的无机小分子等杂质，更重要的是，团聚的含多聚体白蛋白纳米球在碱性条件下能分散为粒径更小的纳米球，从而获得分散、粒径均匀的多聚体白蛋白纳米球。

本申请提供的多聚体白蛋白纳米球粒径范围在 10~100nm 之间，然而，这不是同一批次制备的多聚体白蛋白纳米球的粒径分布，相反，采用本申请提供多聚体白蛋白纳米球的制备方法获得的每个批次的多聚体白蛋白纳米球的粒径分布范围较窄，比如在 20~30nm 之间，因此，本申请制备的多聚体白蛋白纳米球的粒径比较均匀，大小可控。

在本申请的一种优选实施方式中，透析温度为 4~60℃。

在本申请的一种优选实施方式中，对纯化后的多聚体白蛋白纳米溶液进行干燥脱水处理的方式为冷冻干燥、喷雾干燥或减压蒸馏。

在本申请的进一步优选实施方式中，冷冻干燥的步骤为：将纯化后的多聚体白蛋白纳米球溶液置于 -20~0℃ 下预冻 1~48h 后转移至 -80~-20℃ 下冷冻

2~48h, 然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 12~120h, 即可得到多聚体白蛋白纳米球。

在本申请的优选实施方式中, 通过控制白蛋白和带巯基的还原剂的摩尔比, 各步骤的 pH, 透析缓冲液的 pH, 以及有机相和水相混合的速度获得了粒径小、粒径分布范围较窄、粒径可控的多聚体白蛋白纳米球。

根据本申请的第三个方面, 本申请提供的多聚体纳米球在制备预防、治疗或诊断癌症的药物中的应用。

如本文所用的, “癌症” 包括肿瘤。

本申请提供的多聚体白蛋白纳米球及其制备方法和应用具有如下有益效果:

(1) 本申请提供的多聚体白蛋白纳米球由不同的白蛋白分子通过分子之间二硫键相互连接形成纳米球团, 在水、磷酸盐缓冲液、乙醇、血清、培养基等溶剂稀释条件下, 比物理结合白蛋白载体具有更高的稳定性;

(2) 与使用化学交联剂如戊二醛等稳定的白蛋白载体相比, 本申请提供的白蛋白纳米球采用了蛋白质分子本身的二硫键来获得稳定的纳米球, 因此本分明提供的白蛋白纳米球更加安全;

(3) 本申请提供的多聚体白蛋白纳米球的粒径为 10~100nm, 且其尺寸均一, 分散性好, 是运载药物或造影剂等目标投递物的良好载体, 有利于在患者体内长时间有效、安全、稳定地释放投递物;

(4) 本申请提供的多聚体白蛋白纳米球可用于制备预防、治疗或诊断癌症的药物。

根据本申请的第四个方面, 本申请提供了一种载药多聚体白蛋白纳米球, 包括本申请提供的多聚体白蛋白纳米球和药物, 多聚体白蛋白纳米球中包载有

药物，所述药物包括抗癌药物和/或造影剂，且载药多具体白蛋白纳米球的粒径为 10~100nm，优选为 30~50nm。

在本申请的一种优选实施方式中，抗癌药物抗癌药物选自铂及铂的配合物、 5β ,20-环氧-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -六羟基紫杉烷-11-烯-9-酮-4,10-二乙酸酯-2-苯甲酸酯-13[(2' R,3' S)-N-苯甲酰-3-苯基异丝氨酸酯]（紫杉醇）、(7S:9S)-9-羟乙酰基-4-甲氧基-7,8,9,10-四氢-6,7,9,11-四羟基-7-O-(2',3',6',-三去氧-3'-氯基-a-1-来苏己吡喃基)-5,12-萘二酮（阿霉素）、(E,E)-1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮（姜黄素）、1,3,5,8-四甲基-2,4-二(a-羟乙基)卟吩-6,7-二丙酸（血卟啉）、4-乙基-4,12-二氧-4-羟-1H-吡喃（3',4',6,7）吡啶啉（1,2-6）喹啉-3,14-二酮（喜树碱）、(2S-反式)-18-羧基-20-(羧甲基)-13-乙基-2,3-二氢3,7,12,17-四甲基-8-乙烯基-21H,23H-卟吩-2-丙酸（二氢卟吩 e6）、IR700 碘化物和 11-氯-1,1'-二正丙基-3,3,3',3'-四甲基-10,12-三亚甲基吡啶三碳花青碘盐（IR780）中的一种或几种；

在本申请的一种优选实施方式中，造影剂选自四氟硼酸 4-[2-[2-氯-3-[(2,6-二苯基-4H-噻喃-4-亚基)亚乙基]-1-环己烯-1-基]乙烯基]-2,6-二苯基硫代吡喃（IR1061）、2,7-双[1,3-二氢-1,1-二甲基-3-(4-磺丁基)-1,3,5-庚三烯单钠盐（吡啶青绿）、对-[(2,4-二氨基喋啶-6)-N-甲基甲氨基]苯甲酰谷氨酸（甲氨蝶呤）、3,7-双（二甲氨基）吩噻嗪-5-磺氯化物（美蓝）、6,6'-[[3,3'-二甲基(1,1'-二苯基)-4,4'-二基]双(偶氮基)]双(4-氨基-5-羟基-1,3-萘二磺酸)四钠盐（伊文思蓝）、2-((4-二乙氨基)苯)(4-(二乙氨基)环己烷-2,5-二烯)甲烷)苯基-1,4-二磺酸盐（异硫蓝）、4,4'-双(二乙氨基)三苯脱水甲醇-2'',4''-二磺酸单钠（专利蓝）和金属纳米粒子中的一种或几种。

金属纳米粒子包括但不限于纳米金、纳米银和纳米硫化铜中的一种或几

种。

本申请提供的载药多聚体白蛋白纳米球,将药物包载在多聚体白蛋白纳米球中,能够稳定存在于生物体内血液系统中,从而避免药物在血液循环系统传输过程中无效释放,同时本申请提供的载药多聚体白蛋白纳米球具有主动靶向肿瘤组织的能力,能够在肿瘤组织区域有效稳定释放药物,从而显著提高治疗效果。

在本申请的一种优选实施方式中,当载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为20~200nm时,对肿瘤有被动靶向作用,在此粒径范围内的载药多聚体白蛋白纳米球可以降低药物本身的毒副作用,同时也增强了疗效。

本申请提供的载药多聚体白蛋白纳米球,是在本申请提供的多聚体白蛋白纳米球基础上的改进,通过本申请提供的多聚体白蛋白纳米球包载药物制备而成,上述多聚体白蛋白纳米球所描述的技术方案和有益效果也属于本申请,在此不再赘述。

本申请提供的载药多聚体白蛋白纳米球,既可以携带抗癌药物也可以携带造影剂,还可以同时携带抗癌药物和造影剂,从而不仅能够将抗癌药物投递至肿瘤组织进行有效释放,而且能够用于实时、无创地监测治疗前纳米粒子在体内的输送行为,治疗后可通过成像对疗效进行实时评估,实现成像引导的治疗。

根据本申请的第五个方面,本申请提供了上述载药多聚体白蛋白纳米球的制备方法,包括如下步骤:

(A) 提供白蛋白的水溶液,向白蛋白和药物的混合溶液中加入带巯基的还原剂,制得还原型白蛋白和药物的混合溶液;

(B) 将还原型白蛋白和药物的混合溶液进行分散,并加入有机溶剂,还原型白蛋白通过二硫键连接,同时对药物进行包载,即制得载药多聚体白蛋白

纳米球；其中，白蛋白的水溶液中溶解有药物和/或有机溶剂中溶解有药物。

本申请提供的载药多聚体白蛋白纳米球的制备方法，工艺简单，反应条件温和，反应重现性良好，制得的多聚体白蛋白纳米球粒径小，分散性好。

本申请提供的载药多聚体白蛋白纳米球的制备方法，与多聚体白蛋白纳米球制备方法的不同之处在于，白蛋白的水溶液中溶解有药物和/或有机溶剂中溶解有药物。

通过将药物溶解在白蛋白的水溶液中，使得白蛋白水溶液和药物先充分混合，使得白蛋白在包载药物之前就与药物充分接触，能够有效提高白蛋白包载药物的效率。

通过将药物溶解于有机溶剂中，再加入还原型白蛋白的水溶液中，能够提高药物在还原型白蛋白水溶液中的溶解度，使药物在还原型白蛋白溶液中溶解均匀，以使得制备而成的载药多聚体白蛋白纳米球的粒径更加均一。

当采用的有机溶剂为二甲基亚砜时，药物的溶解度更大，在还原型白蛋白溶液中溶解的更均匀。

在本申请的一种优选实施方式中，药物与白蛋白的质量比为(0.0002~5):1，优选为(0.0002~0.5):1；进一步优选为(0.0008~0.5):1，更进一步优选为(0.008~0.5):1。

在本申请的优选实施方式中，药物与白蛋白的典型但非限制性的质量比为：0.0002:1、0.0005:1、0.008:1、0.001:1、0.002:1、0.005:1、0.008:1、0.01:1、0.05:1、0.1:1、0.5:1、1:1 或 5:1。

通过控制药物与白蛋白的质量比以提高多聚体白蛋白纳米球的药物包载率，减少药物浪费，增强疗效。

根据本申请的第六个方面，本申请提供了上述载药多聚体白蛋白纳米球在

制备预防、治疗或诊断癌症的药物中的应用。

本申请提供的载药多聚体白蛋白纳米球靶向性好,一方面肿瘤组织的生长失控增加了大分子类物质和脂质粒子的选择性、高通透性和滞留性(EPR 效应),为载药多聚体白蛋白纳米球提供了一种被动靶向肿瘤组织的能力;另一方面,肿瘤组织细胞膜表面富含 GP60、GP30、GP18 等白蛋白受体,为载药多聚体白蛋白纳米球提供了一种主动靶向肿瘤组织的能力。二者的结合,提高了载药多聚体白蛋白纳米球的靶向性。另外,当本申请提供的载药多聚体白蛋白纳米球在包载有抗癌药物和造影剂时,其同时具有近红外二区荧光成像能力,可用于实时、无创地监测治疗前载药多聚体白蛋白纳米球在体内输送的行为。

下面结合实施例和对比例对本申请提供的技术方案做进一步的描述。

实施例 1

本实施例提供了一种多聚体白蛋白纳米球,其制备方法包括如下步骤:

(1) 取 2mL 体积质量浓度为 0.01 (w/v, mg/mL) 的猪血清白蛋白溶液,然后采用 1mol/L 的 NaOH 溶液调节所述白蛋白混合液的 pH 值到 7;

(2) 向步骤 (1) 所得的所述 pH 值为 7 的白蛋白混合液中加入半胱氨酸得反应液,然后在 60°C 下轻轻摇动反应 0.05h,在所述反应液中,所述半胱氨酸的摩尔数为白蛋白摩尔数的 10 倍;

(3) 将步骤 (2) 反应后的溶液在 60°C 的条件下采用超声波细胞破碎仪进行处理,超声波细胞破碎仪的功率为 10W,同时在所述超声的溶液中以 50ml/s 的速度注入的 2mL 二甲基亚砷溶液,所述溶液在 60°C 的条件下反应 20min 后得到含多聚体白蛋白纳米球的溶液;

(4) 将步骤 (3) 所得的含多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋,保持

温度为 30℃ 的条件下, 将透析袋置于 1L pH 为 7 的 PBS 缓冲液内透析 10h, 期间每 12h 换液 1 次, 每次都采用 1L pH 为 7 的 PBS 缓冲液, 然后再将透析袋置于 5L 双蒸水内透析 1h, 得到多聚体白蛋白纳米球溶液;

(5) 将步骤 (4) 所得的多聚体白蛋白纳米球溶液置于-0℃ 下预冻 1h 后转移至-20℃ 下冷冻 2h, 然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 12h, 得到多聚体白蛋白纳米球, 多聚体白蛋白纳米球的粒径为 40~60nm。

实施例 2

本实施例提供了一种多聚体白蛋白纳米球, 其制备方法包括如下步骤:

(1) 取 2mL 体积质量浓度为 300 (w/v, mg/mL) 的重组血清白蛋白溶液, 然后采用 2mol/L 的 NaOH 溶液调节所述白蛋白混合液的 pH 值到 12;

(2) 向步骤 (1) 所得的所述 pH 值为 12 的白蛋白混合液中加入二硫苏糖醇得反应液, 然后在 30℃ 下轻轻摇动反应 12h, 在所述反应液中, 所述二硫苏糖醇的摩尔数为白蛋白摩尔数的 5000 倍;

(3) 将步骤 (2) 反应后的溶液在 30℃ 的条件下采用超声波细胞破碎仪进行处理, 超声波细胞破碎仪的功率为 100W, 同时在所述超声的溶液中以 1000 ml /s 的速度注入的 200mL 二甲基亚砷溶液, 所述溶液在 30℃ 的条件下反应 240min 后, 得到含多聚体白蛋白纳米球的溶液;

(4) 将步骤 (3) 所得的含多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋, 保持温度为 60℃ 的条件下, 将透析袋置于 1L pH 为 12 的 PBS 缓冲液内透析 300h, 每次都采用 1L pH 为 12 的 PBS 缓冲液, 期间每 12h 换液 1 次, 然后再将透析袋置于 5L 双蒸水内透析 24h, 得到多聚体白蛋白纳米球溶液;

(5) 将步骤 (4) 所得的多聚体白蛋白纳米球溶液置于-4℃ 下预冻 48h 后转移至-80℃ 下冷冻 36h, 然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 96h, 得到多聚体白蛋

白纳米球，多聚体白蛋白纳米球的粒径为 30~40nm。

实施例 3

本实施例提供了一种多聚体白蛋白纳米球，其制备方法包括如下步骤：

(1) 取 2mL 体积质量浓度为 150 (w/v, mg/mL) 的白蛋白溶液，然后采用 2mol/L 的 NaOH 溶液调节所述白蛋白混合液的 pH 值到 9；

(2) 向步骤 (1) 所得的所述 pH 值为 9 的白蛋白混合液中加入 β -巯基乙醇得反应液，然后在 0℃ 下轻轻摇动反应 17h，在所述反应液中，所述 β -巯基乙醇的摩尔数为白蛋白摩尔数的 2500 倍；

(3) 将步骤 (2) 反应后的溶液在 0℃ 的条件下采用超声波细胞破碎仪进行处理，超声波细胞破碎仪的功率为 10W，同时在所述超声的溶液中以 100ml/s 的速度注入的 100mL 二甲基亚砷溶液，所述溶液在 0℃ 的条件下反应 5min 后得到含多聚体白蛋白纳米球的溶液；

(4) 将步骤 (3) 所得的含多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋，保持温度为 0℃ 的条件下，将透析袋置于 1L pH 为 9 的 PBS 缓冲液内透析 144h，每次都采用 1L pH 为 12 的 PBS 缓冲液，期间每 12h 换液 1 次，然后再将透析袋置于 5L 双蒸水内透析 12h，得到多聚体白蛋白纳米球溶液；

(5) 将步骤 (4) 所得的多聚体白蛋白纳米球溶液置于 -20℃ 下预冻 24h 后转移至 -50℃ 下冷冻 48h，然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 120h，得到多聚体白蛋白纳米球，多聚体白蛋白纳米球的粒径为 30~60nm。

实施例 4

本实施例提供了一种多聚体白蛋白纳米球，本实施例提供的多聚体白蛋白纳米球的制备方法包括如下步骤：

(1) 取 2mL 体积质量浓度为 0.01 (w/v, mg/mL) 的牛血清白蛋白溶液，

采用 1mol/L 的 NaOH 溶液调节所述白蛋白水溶液的 pH 值到 7;

(2) 向步骤 (1) 所得的牛血清白蛋白水溶液中加入半胱氨酸得反应液, 然后在 60°C 下轻轻摇动反应 0.05h, 在所述反应液中, 所述半胱氨酸的摩尔数为白蛋白摩尔数的 10 倍;

(3) 在所述步骤 (2) 所得的溶液中加入的 10mL 二甲基亚砷溶液得到溶液, 所述溶液在 0°C 的条件下反应 10min 后得到含多聚体白蛋白纳米球的溶液;

(4) 将步骤 (3) 所得的含多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋, 保持温度为 25°C 的条件下, 将透析袋置于 5L 双蒸水内透析 12h, 得到多聚体白蛋白纳米球溶液;

(5) 将步骤 (4) 所得的多聚体白蛋白纳米球溶液置于 -20°C 下预冻 2h 后转移至 -80°C 下冷冻 24h, 然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 48h, 得到多聚体白蛋白纳米球, 多聚体白蛋白纳米球的粒径为 10-100nm。

通过上述实施例 1-3 与实施例 4 的对比可以看出, 实施例 4 提供的多聚体白蛋白纳米球粒径分布集中度不高, 不利于其在生物学上的应用, 这说明在步骤 (3) 采用超声波细胞破碎仪处理还原蛋白反应液能够使得多聚体白蛋白纳米球粒径均一, 分布集中度更高。

实施例 5

本实施例提供了一种多聚体白蛋白纳米球, 其制备方法包括如下步骤:

(1) 1mL 体积质量浓度为 0.01 (w/v, mg/mL) 的吲哚青绿的水溶液和 1mL 体积质量浓度为 0.02 (w/v, mg/mL) 的牛血清白蛋白混合, 得到白蛋白混合液;

(2) 向步骤 (1) 所得的所述 pH 值为 7 的白蛋白混合液中加入谷胱甘肽得反应液, 然后在 0°C 下轻轻摇动反应 1h, 在所述反应液中, 所述谷胱甘肽的

摩尔数为白蛋白摩尔数的 10 倍；

(3) 将步骤 (2) 反应后的溶液在 0℃ 的条件下采用超声波细胞破碎仪进行处理，超声波细胞破碎仪的功率为 10W，同时在所述条件下超声的溶液中以 1000mL/s 的速度注入的 4mL 二甲基亚砜得到溶液，所述溶液在 0℃ 的条件下反应 5min 后得到含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液；

(4) 将步骤 (3) 所得的含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋，保持温度为 0℃ 的条件下，将透析袋置于 5L pH 为 10 的 PBS 缓冲液内透析 10h，期间每 12h 换液 1 次，每次都采用 5L pH 为 10 的 PBS 缓冲液，然后再将透析袋置于 5L 双蒸水内透析 1h，得到载药多聚体白蛋白纳米球溶液；

(5) 将步骤 (4) 所得的载药多聚体白蛋白纳米球溶液置于 -20℃ 下预冻 2h 后转移至 -80℃ 下冷冻 12h，然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 12h，得到载药多聚体白蛋白纳米球，载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为 20~30nm。

实施例 6

本实施例提供了一种载药多聚体白蛋白纳米球，其制备方法包括如下步骤：

(1) 取 0.1mL 体积质量浓度为 0.1 (w/v, mg/mL) 阿霉素的水溶液和 2mL 体积质量浓度为 300 (w/v, mg/mL) 的猪血清白蛋白混合，得到白蛋白混合液，然后采用 1mol/L 的 NaOH 溶液调节所述白蛋白混合液的 pH 值到 7；

(2) 向步骤 (1) 所得的所述 pH 值为 7 的白蛋白的混合液中加入二硫苏糖醇得反应液，然后在 60℃ 下轻轻摇动反应 0.05h，在所述反应液中，所述二硫苏糖醇的摩尔数为白蛋白摩尔数的 5000 倍；

(3) 将步骤 (2) 反应后的溶液在 60℃ 的条件下采用超声波细胞破碎仪进行处理，超声波细胞破碎仪的功率为 1W，同时在所述超声的溶液中以 0.01ml

/s 的速度注入的 200mL 含二甲基亚砷溶液, 所述溶液在 60°C 的条件下反应 20min 后得到含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液;

(4) 将步骤 (3) 所得的含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋, 保持温度为 30°C 的条件下, 将透析袋置于 1L pH 为 7 的 PBS 缓冲液内透析 300h, 期间每 12h 换液 1 次, 每次都采用 1L pH 为 7 的 PBS 缓冲液, 然后再将透析袋置于 5L 双蒸水内透析 24h, 得到载药多聚体白蛋白纳米球溶液;

(5) 将步骤 (4) 所得的载药多聚体白蛋白纳米球溶液置于 -0°C 下预冻 1h 后转移至 -20°C 下冷冻 2h, 然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 72h, 得到载药多聚体白蛋白纳米球, 载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为 40~60nm。

实施例 7

本实施例提供了一种载药多聚体白蛋白纳米球, 其制备方法包括如下步骤:

(1) 取 0.5mL 体积质量浓度为 0.5 (w/v, mg/mL) 美蓝的水溶液和 1.5mL 200 (w/v, mg/mL) 的重组血清白蛋白混合, 得到白蛋白混合液, 然后采用 2mol/L 的 NaOH 溶液调节所述白蛋白混合液的 pH 值到 12;

(2) 向步骤 (1) 所得的所述 pH 值为 12 的白蛋白混合液中加入 β -巯基乙醇得反应液, 然后在 30°C 下轻轻摇动反应 12h, 在所述反应液中, 所述 β -巯基乙醇的摩尔数为白蛋白摩尔数的 100 倍;

(3) 将步骤 (2) 反应后的溶液在 30°C 的条件下采用超声波细胞破碎仪进行处理, 超声波细胞破碎仪的功率为 1500W, 同时在所述超声的溶液中以 1000 ml/s 的速度注入的 100mL 含二甲基亚砷溶液, 所述溶液在 30°C 的条件下反应 240min 后得到含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液;

(4) 将步骤 (3) 所得的含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋,

保持温度为 60℃ 的条件下, 将透析袋置于 1L pH 为 12 的 PBS 缓冲液内透析 144h, 每次都采用 1L pH 为 12 的 PBS 缓冲液, 期间每 12h 换液 1 次, 然后再将透析袋置于 5L 双蒸水内透析 12h, 得到载药多聚体白蛋白纳米球溶液;

(5) 将步骤(4)所得的载药多聚体白蛋白纳米球溶液置于-4℃下预冻 48h 后转移至-50℃下冷冻 48h, 然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 96h, 得到载药多聚体白蛋白纳米球, 载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为 30~50nm。

实施例 8

本实施例提供了一种载药多聚体白蛋白纳米球, 其制备方法包括如下步骤:

(1) 取 1mL 体积质量浓度为 1 (w/v, mg/mL) 二氢卟吩 e6 溶液的水溶液和 1mL 300 (w/v, mg/mL) 的血红蛋白溶液混合, 得到白蛋白混合液, 然后采用 0.5mol/L 的 NaOH 溶液调节所述白蛋白混合的 pH 值到 9;

(2) 向步骤(1)所得的所述 pH 值为 9 的白蛋白的水溶液中加入谷胱甘肽得反应液, 然后在 60℃下轻轻摇动反应 0.05h, 在所述反应液中, 所述谷胱甘肽的摩尔数为白蛋白摩尔数的 2500 倍;

(3) 将步骤(2)反应后的溶液在 60℃的条件下采用超声波细胞破碎仪进行处理, 超声波细胞破碎仪的功率为 100W, 同时在所述超声的溶液中以 50ml/s 的速度注入的 22mL 含二甲基亚砜溶液, 所述溶液在 60℃的条件下反应 30min 后得到含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液;

(4) 将步骤(3)所得的含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋, 保持温度为 60℃的条件下, 将透析袋置于 1L pH 为 9 的 PBS 缓冲液内透析 36h, 期间每 12h 换液 1 次, 每次都采用 1L pH 为 9 的 PBS 缓冲液, 然后再将透析袋置于 5L 双蒸水内透析 18h, 得到载药多聚体白蛋白纳米球溶液;

(5) 将步骤(4)所得的载药多聚体白蛋白纳米球溶液置于 -10°C 下预冻24h后转移至 -80°C 下冷冻24h,然后在冷冻干燥机中冷冻干燥120h,得到载药多聚体白蛋白纳米球,载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为50~80nm。

实施例9

本实施例提供了一种载药多聚体白蛋白纳米球,其制备方法包括如下步骤:

(1) 取体积质量浓度为50 mg/mL (w/v) 的牛血清白蛋白水溶液,然后采用0.1mol/L 的NaOH 溶液调节所述白蛋白水溶液的pH 值到7;

(2) 向步骤(1)所得的所述pH 值为7 的白蛋白水溶液中加入谷胱甘肽得反应液,然后在 4°C 下轻轻摇动反应2h,在所述反应液中,所述谷胱甘肽的摩尔数为白蛋白摩尔数的10 倍;

(3) 将步骤(2)反应后的溶液在 4°C 的条件下采用超声波细胞破碎仪进行处理,超声波细胞破碎仪的功率为1000W,同时在所述超声的溶液中以1mL/s 的速度注入二甲基亚砷溶液,该二甲基亚砷溶液中含浓度为1mg/mL 的紫杉醇和浓度为0.1mg/mL 的IR1061,该溶液在 4°C 的条件下反应10min 后得到含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液;二甲基亚砷溶液加入的体积为所述步骤(2)反应后的溶液体积的2 倍;

(4) 将步骤(3)所得的含多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋,保持温度为 4°C 的条件下,将透析袋置于1L pH 为9 的PBS 缓冲液内透析24h,期间每8h 换液1 次,每次都采用1L pH 为9 的PBS 缓冲液,然后再将透析袋置于1L 双蒸水内透析12h,得到载药多聚体白蛋白纳米球溶液;

(5) 将步骤(4)所得的载药多聚体白蛋白纳米球溶液置于 -20°C 下预冻2h后转移至 -80°C 下冷冻24 h,然后在冷冻干燥机中冷冻干燥48h,得到载药

多聚体白蛋白纳米球，多聚体白蛋白纳米球的粒径为 10~20nm。

实施例 10

本实施例提供了一种载药多聚体白蛋白纳米球，其制备方法包括如下步骤：

(1) 取白蛋白混合液，白蛋白混合液含有浓度为 300 mg/mL (w/v) 的猪血清白蛋白和浓度为 0.1 mg/mL 的 IR1061，然后采用 10mol /L 的 NaOH 溶液调节所述白蛋白混合液的 pH 值到 12；

(2) 向步骤 (1) 所得的所述 pH 值为 12 的白蛋白的水溶液中加入二硫苏糖醇得反应液，然后在 60℃ 下轻轻摇动反应 240h，在所述反应液中，所述二硫苏糖醇的摩尔数为白蛋白摩尔数的 5000 倍；

(3) 将步骤 (2) 反应后的溶液在 60℃ 的条件下采用超声波细胞破碎仪进行处理，超声波细胞破碎仪的功率为 1W，同时在所述超声的溶液中以 1000ml /s 的速度注入二甲基亚砷溶液，二甲基亚砷溶液中含体积质量浓度为 0.1mg/mL 的紫杉醇和体积质量浓度为 2mg/mL 的 IR1061，所述溶液在 60℃ 的条件下反应 5min 后得到含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液；乙醇溶液加入的体积为所述步骤 (2) 反应后的溶液体积的 50 倍；

(4) 将步骤 (3) 所得的含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋，室温下，将透析袋置于 5L pH 为 12 的 PBS 缓冲液内透析 300h，期间每 12h 换液 1 次，每次都采用 5L pH 为 12 的 PBS 缓冲液，然后再将透析袋置于 5L 双蒸水内透析 12h，得到载药多聚体白蛋白纳米球溶液；

(5) 将步骤 (4) 所得的载药多聚体白蛋白纳米球溶液置于 -0℃ 下预冻 1h 后转移至 -20℃ 下冷冻 2h，然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 72h，得到载药多聚体白蛋白纳米球，载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为 50~100nm。

实施例 11

本实施例提供了一种载药多聚体白蛋白纳米球，其制备方法包括如下步骤：

(1) 取白蛋白混合液，白蛋白混合液含有浓度为 200 mg/mL (w/v) 的猪血清白蛋白和浓度为 5mg/mL 的 IR1061，然后采用 0.1mol /L 的 NaOH 溶液调节所述白蛋白水溶液的 pH 值到 9；

(2) 向步骤 (1) 所得的所述 pH 值为 9 的白蛋白混合液中加入 β -巯基乙醇得反应液，然后在 30°C 下轻轻摇动反应 0.05h，在所述反应液中，所述 β -巯基乙醇的摩尔数为白蛋白摩尔数的 100 倍；

(3) 将步骤 (2) 反应后的溶液在 30°C 的条件下采用超声波细胞破碎仪进行处理，超声波细胞破碎仪的功率为 50W，同时在所述溶液中以 0.01 ml /s 的速度注入二甲基亚砷溶液，二甲基亚砷溶液中含体积质量浓度为 1mg/mL 的紫杉醇，所述溶液在 30°C 的条件下反应 240min 后得到含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液；二甲基亚砷溶液加入的体积为步骤 (2) 反应后的溶液体积的 50 倍；

(4) 将步骤 (3) 所得的含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋，保持温度为 60°C 的条件下，将透析袋置于 100mL pH 为 7 的 PBS 缓冲液内透析 2h，每次都采用 100mL pH 为 7 的 PBS 缓冲液，期间每 1h 换液 1 次，然后再将透析袋置于 100mL 双蒸水内透析 12h，得到载药多聚体白蛋白纳米球溶液；

(5) 将步骤 (4) 所得的载药多聚体白蛋白纳米球溶液置于 -4°C 下预冻 48h 后转移至 -50°C 下冷冻 48 h，然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 96h，得到载药多聚体白蛋白纳米球，载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为 30~40nm。

实施例 12

本实施例提供了一种载药多聚体白蛋白纳米球，其制备方法包括如下步骤：

(1) 取白蛋白混合液，白蛋白混合液含有浓度为 100 mg/mL (w/v) 的猪血清白蛋白、浓度为 1mg/mL 的 IR1061、浓度为 1mg/mL 的紫杉醇和 DMSO，二甲基亚砷和白蛋白混合液中溶剂水的体积比是 0.1:1，然后采用 1mol/L 的 NaOH 溶液调节混合液的 pH 值到 9；

(2) 向步骤 (1) 混合液中加入谷胱甘肽得反应液，然后在 30°C 下轻轻摇动反应 1h，在反应液中，谷胱甘肽的摩尔数为白蛋白摩尔数的 10 倍；

(3) 将步骤 (2) 反应后的溶液在 4°C 的条件下采用超声波细胞破碎仪进行处理，超声波细胞破碎仪的功率为 1000W，同时将超声的溶液中以 0.01mL/s 的速度注入到二甲基亚砷中，得到溶液，所述溶液在 4°C 的条件下反应 10min 后，得到含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液；二甲基亚砷加入的体积为步骤 (2) 反应后的溶液体积的 50 倍；

(4) 将步骤 (3) 所得的含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋，保持温度为 4°C 的条件下，将透析袋置于 100mL pH 为 7 的 PBS 缓冲液内透析 2h，期间每 1h 换液 1 次，每次都采用 100mL pH 为 7 的 PBS 缓冲液，然后再将透析袋置于 100mL 双蒸水内透析 12h，得到载药多聚体白蛋白纳米球溶液；

(5) 将步骤 (4) 所得的载药多聚体白蛋白纳米球溶液置于 -20°C 下预冻 2h 后转移至 -80°C 下冷冻 24h，然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 48h，得到载药多聚体白蛋白纳米球，载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为 10~20nm。

实施例 13

本实施例提供了一种载药多聚体白蛋白纳米球，其制备方法包括如下步

骤:

(1) 取白蛋白混合液, 白蛋白混合液含有浓度为 200 mg/mL (w/v) 的猪血清白蛋白和浓度为 1mg/mL 的紫杉醇和二甲基亚砷, 二甲基亚砷和白蛋白混合液中溶剂水的体积比是 0.1:1, 然后采用 0.1mol/L 的 NaOH 溶液调节混合液的 pH 值到 9;

(2) 向步骤 (1) 所得混合液中加入谷胱甘肽得反应液, 然后在 30°C 下轻轻摇动反应 1h, 在所述反应液中, 所述谷胱甘肽的摩尔数为白蛋白摩尔数的 100 倍;

(3) 将步骤 (2) 反应后的溶液在 4°C 的条件下采用超声波细胞破碎仪进行处理, 超声波细胞破碎仪的功率为 1000W, 同时向超声的溶液中以 0.01mL/s 的速度注入二甲基亚砷溶液, 该二甲基亚砷溶液含体积质量浓度为 1mg/mL 的 IR1061 和二甲基亚砷, 所述溶液在 4°C 的条件下反应 10min 后, 得到含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液; 二甲基亚砷溶液加入的体积为步骤 (2) 反应后的溶液体积的 50 倍;

(4) 将步骤 (3) 所得的含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋, 保持温度为 0°C 的条件下, 将透析袋置于 100mL pH 为 7 的 PBS 缓冲液内透析 2h, 期间每 1h 换液 1 次, 每次都采用 100mL pH 为 7 的 PBS 缓冲液, 然后再将透析袋置于 100mL 双蒸水内透析 12h, 得到载药多聚体白蛋白纳米球溶液;

(5) 将步骤 (4) 所得的载药多聚体白蛋白纳米球溶液置于 -20°C 下预冻 2h 后转移至 -80°C 下冷冻 24 h, 然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 48h, 得到载药多聚体白蛋白纳米球, 载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为 30~40nm。

实施例 14

本实施例提供了一种载药多聚体白蛋白纳米球, 其制备方法包括如下步

骤：

(1) 取 1mL 体积质量浓度为 1(w/v, mg/mL) 的吲哚青绿和 1mL300 (w/v, mg/mL) 的牛血清白蛋白混合，得到白蛋白混合液，然后采用 0.1mol/L 的 NaOH 溶液调节所述白蛋白混合液的 pH 值到 8；

(2) 向步骤 (1) 所得的白蛋白混合液中加入谷胱甘肽得反应液，然后在 60℃ 下轻轻摇动反应 0.05h，在所述反应液中，所述谷胱甘肽的摩尔数为白蛋白摩尔数的 5000 倍；

(3) 在所述步骤 (2) 所得的溶液中加入的 10mL 二甲基亚砷溶液得到溶液，所述溶液在 0℃ 的条件下反应 10min 后得到含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液；

(4) 将步骤 (3) 所得的含载药多聚体白蛋白纳米球的溶液移入透析袋，保持温度为 25℃ 的条件下，将透析袋置于 5L 双蒸水内透析 12h，得到载药多聚体白蛋白纳米球溶液；

(5) 将步骤 (4) 所得的载药多聚体白蛋白纳米球溶液置于 -20℃ 下预冻 2h 后转移至 -80℃ 下冷冻 24 h，然后在冷冻干燥机中冷冻干燥 48h，得到载药多聚体白蛋白纳米球，载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为 10~100nm。

通过实施例 5-13 与实施例 14 的对比可以看出，实施例 14 提供的多聚体白蛋白纳米球粒径分布集中度不高，不利于其在生物学上的应用。这说明在步骤 (3) 采用超声波细胞破碎仪处理还原蛋白反应液能够使得载药多聚体白蛋白纳米球粒径均一，分布集中度更高。

试验例 1

为了说明本申请提供的载药多聚体白蛋白纳米球的有益效果，对实施例 13 提供的载药多聚体白蛋白纳米球进行了扫描电子显微镜检测，图 1 为本申

请实施例 13 提供的载药多聚体白蛋白纳米球的扫描电子显微镜图像；由图 1 可知，实施例 13 提供的载药多聚体白蛋白纳米球尺寸均一，颗粒较为分散。

试验例 2

以 C6 原位脑胶质瘤荷瘤小鼠为模型，通过尾静脉注射实施例 13 制备的多聚体白蛋白纳米球水溶液（浓度为 0.2mg/mL），然后利用利用荧光二区活体成像系统来研究多聚体白蛋白纳米球在小鼠体内的传输过程及对 C6 原位脑胶质瘤组织识别的特异性和灵敏度。

图 2 为本申请实施例 13 提供的载药多聚体白蛋白纳米球注射荷瘤裸鼠后的近红外二区荧光成像图；从图 2 可以看出，注射有载药多聚体白蛋白纳米球的荷瘤小鼠 24 h 后肿瘤部位的荧光信号得以增强，说明实施例 13 提供的载药多聚体白蛋白纳米球对肿瘤组织具有很强的靶向性。

图 3 中纳米粒子组为本申请实施例 13 提供的载药多聚体白蛋白纳米球注射荷瘤裸鼠后的组织切片图；缓冲溶液组为 PBS 缓冲溶液注射荷瘤裸鼠后的组织切片图；从图 3 可以看出，相比于缓冲溶液组，注射了实施例 13 提供的载药多聚体白蛋白纳米球的老鼠也没有表现出任何组织毒性。

从图 2 和图 3 还可以看出，本申请实施例 13 提供的载药多聚体白蛋白纳米球能够作为一种近红外二区荧光分子成像探针、化疗于一体的多功能靶向探针使用。

最后应说明的是：以上各实施例仅用以说明本申请的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述各实施例对本申请进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本申请各实施例技术方案的范围。

权 利 要 求

1、一种多聚体白蛋白纳米球，其特征在于，由多个白蛋白分子聚集而成，所述多白蛋白分子之间通过二硫键连接，所述多聚体白蛋白纳米球的粒径为10~100nm。

2、根据权利要求1所述的多聚体白蛋白纳米球，其特征在于，所述多聚体白蛋白纳米球的粒径为30~50nm。

3、根据权利要求1所述的多聚体白蛋白纳米球，其特征在于，所述白蛋白分子为人血清白蛋白分子、牛血清白蛋白分子、猪血清白蛋白分子和重组白蛋白分子中的至少一种。

4、根据权利要求1所述的多聚体白蛋白纳米球的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

(a) 提供白蛋白的水溶液，向白蛋白的水溶液中加入带巯基的还原剂混合均匀，制得还原型白蛋白的水溶液；

(b) 将还原型白蛋白的水溶液分散后，加入有机溶剂混合均匀，即制得多聚体白蛋白纳米球；

步骤(a)中，白蛋白水溶液的pH值为7~12；白蛋白水溶液的体积质量浓度为0.01~300mg/mL；白蛋白的水溶液与带巯基的还原剂的混合时间为0.05~12h；白蛋白的水溶液与带巯基的还原剂的混合温度为0~60℃；

在步骤(b)中，还原型白蛋白的水溶液在0~60℃下分散；还原型白蛋白的水溶液与有机溶剂的混合温度为0~60℃；通过细胞破碎仪将还原型白蛋白的水溶液进行分散；进一步优选地，细胞破碎仪的功率为1~1500W；有机溶剂的加入速度为0.01~1000 mL/s；还原型白蛋白水溶液与有机溶剂的混合时间为

5~240min。

5、根据权利要求3所述的多聚体白蛋白纳米球的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

(a) 提供白蛋白的水溶液，向白蛋白的水溶液中加入带巯基的还原剂混合均匀，制得还原型白蛋白的水溶液；

(b) 将还原型白蛋白的水溶液分散后，加入有机溶剂混合均匀，即制得多聚体白蛋白纳米球；

步骤(a)中，白蛋白水溶液的pH值为7~12；白蛋白水溶液的体积质量浓度为0.01~300mg/mL；白蛋白的水溶液与带巯基的还原剂的混合时间为0.05~12h；白蛋白的水溶液与带巯基的还原剂的混合温度为0~60℃；

在步骤(b)中，还原型白蛋白的水溶液在0~60℃下分散；还原型白蛋白的水溶液与有机溶剂的混合温度为0~60℃；通过细胞破碎仪将还原型白蛋白的水溶液进行分散；进一步优选地，细胞破碎仪的功率为1~1500W；有机溶剂的加入速度为0.01~1000 mL/s；还原型白蛋白水溶液与有机溶剂的混合时间为5~240min。

6、根据权利要求4所述的多聚体白蛋白纳米球的制备方法，其特征在于，在步骤(a)中，带巯基的还原剂与白蛋白的摩尔比为(10~5000):1；

带巯基的还原剂选自谷胱甘肽、二硫苏糖醇、巯基乙醇、半胱氨酸或同型半胱氨酸中的至少一种。

7、根据权利要求4所述的多聚体白蛋白纳米球的制备方法，其特征在于，在步骤(b)中，有机溶剂与还原型白蛋白水溶液的体积比为(0.1~100):1；

所述有机溶剂选自二甲基亚砷、N-甲基吡咯烷酮、N,N-二甲基甲酰胺和环

丁砜中的至少一种。

8、根据权利要求4所述的多聚体白蛋白纳米球的制备方法，其特征在于，在步骤(b)中，还原型白蛋白的水溶液与有机溶剂混合均匀后，得到多聚体白蛋白纳米球的水溶液，将多聚体白蛋白纳米球的水溶液依次进行纯化和干燥，得到多聚体白蛋白纳米球；

采用透析进行纯化，采用pH值为7~12的缓冲液进行透析，在0~60℃进行透析；

采用冻干进行干燥，先在-20~0℃下预冻1~48h，再在-80~-20℃下冷冻2~48h，然后再在冷冻干燥机中冷冻干燥12~120h。

9、一种载药多聚体白蛋白纳米球，其特征在于，包括权利要求1所述的多聚体白蛋白纳米球和药物，所述药物包载于所述多聚体白蛋白纳米球中，所述药物包括抗癌药物和/或造影剂，且载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为10~100nm；

所述抗癌药物选自铂及铂的配合物、5 β ,20-环氧-1,2 α ,4,7 β ,10 β ,13 α -六羟基紫杉烷-11-烯-9-酮-4,10-二乙酸酯-2-苯甲酸酯-13[(2' R,3' S)-N-苯甲酰-3-苯基异丝氨酸酯]、(7S:9S)-9-羟乙酰基-4-甲氧基-7,8,9,10-四氢-6,7,9,11-四羟基-7-0-(2',3',6',-三去氧-3'-氯基-a-1-来苏已吡喃基)-5,12-萘二酮、(E,E)-1,7-双(4-羟基-3-甲氧基苯基)-1,6-庚二烯-3,5-二酮、1,3,5,8-四甲基-2,4-二(a-羟乙基)吡酚-6,7-二丙酸、4-乙基-4,12-二氧-4-羟-1H-吡喃(3',4',6,7)吡啶啉(1,2-6)喹啉-3,14-二酮、(2S-反式)-18-羧基-20-(羧甲基)-13-乙基-2,3-二氢3,7,12,17-四甲基-8-乙烯基-21H,23H-吡吩-2-丙酸、IR700碘化物和11-氯-1,1'-二正丙基-3,3,3',3'-四甲基-10,12-三亚甲基吡啶三碳花青碘盐中的至少一种；

所述造影剂选自四氟硼酸、4-[2-[2-氯-3-[(2,6-二苯基-4H-噻喃-4-亚基)亚乙基]-1-环己烯-1-基]乙烯基]-2,6-二苯基硫代吡喃，2,7-双[1,3-二氢-1,1-二甲基-3-

(4-磺丁基)-1,3,5-庚三烯单钠盐、对-[(2,4-二氨基喋啶-6)-N-甲基甲氨基]苯甲酰谷氨酸、3,7-双(二甲氨基)吩噻嗪-5-磺氯化物、6,6'-[[3,3'-二甲基(1,1'-二苯基)-4,4'-二基]双(偶氮基)]双(4-氨基-5-羟基-1,3-萘二磺酸)四钠盐、2-((4-二乙氨基)苯)(4-(二乙氨基)环己烷-2,5-二烯)甲烷)苯基-1,4-二磺酸盐、4,4'-双(二乙氨基)三苯脱水甲醇-2",4"-二磺酸单钠和金属纳米粒子中的至少一种。

10、根据权利要求9所述的载药多聚体白蛋白纳米球的制备方法，其特征在于，所述载药多聚体白蛋白纳米球的粒径为30~50nm。

11、根据权利要求9所述的载药多聚体白蛋白纳米球的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

(A) 提供白蛋白的水溶液，向白蛋白的水溶液中加入带巯基的还原剂，制得还原型白蛋白的水溶液；

(B) 将还原型白蛋白的水溶液分散后，加入有机溶剂混合均匀，即制得载药多聚体白蛋白纳米球；其中，白蛋白的水溶液中溶解有药物和/或有机溶剂中溶解有药物；

药物与白蛋白的质量比为(0.0002~5):1；

在步骤(A)中，带巯基的还原剂与白蛋白的摩尔比为(10~5000):1；

在步骤(B)中，有机溶剂与还原型白蛋白水溶液的体积比为(0.1~100):1；

带巯基的还原剂选自谷胱甘肽、二硫苏糖醇、巯基乙醇、半胱氨酸或同型半胱氨酸中的至少一种；

所述有机溶剂选自二甲基亚砜、N-甲基吡咯烷酮、N,N-二甲基甲酰胺和环丁砜中的至少一种；

步骤(A)中，白蛋白水溶液的pH值为7~12；

步骤(A)中，白蛋白水溶液的体积质量浓度为0.01~300mg/mL；

白蛋白的水溶液与带巯基的还原剂的混合时间为 0.05~12h;

在步骤 (A) 中, 白蛋白的水溶液与带巯基的还原剂的混合温度为 0~60°C;

在步骤 (B) 中, 还原型白蛋白的水溶液的在 0~60°C 下分散;

在步骤 (B) 中, 还原型白蛋白的水溶液与有机溶剂的混合温度为 0~60°C;

步骤 (B) 中, 通过超声波细胞破碎仪将还原型白蛋白的水溶液进行分散;
进一步优选地, 超声波细胞破碎仪的功率为 1~1500W;

在步骤 (B) 中, 有机溶剂的加入速度为 0.01~1000 mL/s;

在步骤 (B) 中, 还原型白蛋白水溶液与有机溶剂的混合时间为 5-240min。

12、根据权利要求 11 所述的载药多聚体白蛋白纳米球的制备方法, 其特征在于, 在步骤 (B) 中, 还原型白蛋白的水溶液与有机溶剂混合均匀后, 得到载药多聚体白蛋白纳米球的水溶液, 将载药多聚体白蛋白纳米球的水溶液依次进行纯化和干燥, 得到载药多聚体白蛋白纳米球;

采用透析进行纯化, 在 0~60°C 进行透析, 采用 pH 值为 7~12 的缓冲液进行透析;

采用冻干进行干燥, 先在 -20~0°C 下预冻 1~48h, 再在 -80~-20°C 下冷冻 2~48h, 然后再在冷冻干燥机中冷冻干燥 12~120h。

13、根据权利要求 1 所述的多聚体白蛋白纳米球在制备预防、治疗或诊断癌症的药物中的应用。

14、根据权利要求 3 所述的多聚体白蛋白纳米球在制备预防、治疗或诊断癌症的药物中的应用。

15、根据权利要求 9 所述的载药多聚体白蛋白纳米球在制备预防、治疗或诊断癌症的药物中的应用。

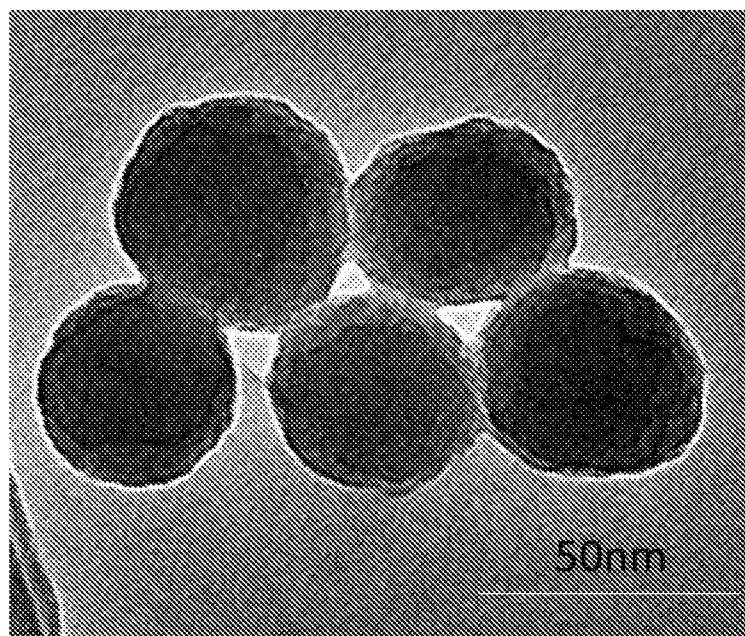


图 1

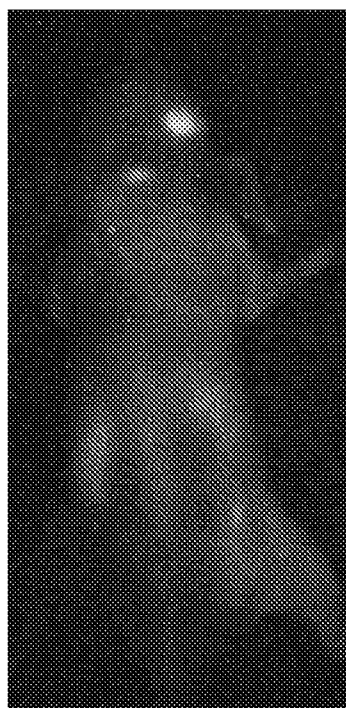


图 2

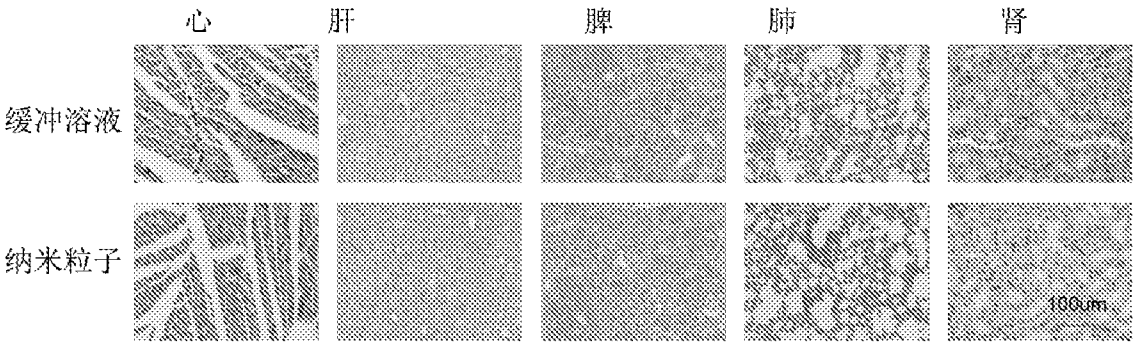


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/123329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/51(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)

CNABS; DWPI; ISI Web of Knowledge: 聚集体, 白蛋白, 二硫键, 还原, aggregate, serum albumin, disulfide bonds, reduce

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	张建军等 (ZHANG, Jianjun et al.). "白蛋白作为药物载体的研究 (Albumin as Drug Carriers)." <i>化学进展 (Progress in Chemistry)</i> , Vol. 23, No. (8), 30 August 2011 (2011-08-30), pages 1747-1754, see page 1752, left-hand column, paragraph 2	1-3, 9-10, 13-15
Y	张建军等 (ZHANG, Jianjun et al.). "白蛋白作为药物载体的研究 (Albumin as Drug Carriers)." <i>化学进展 (Progress in Chemistry)</i> , Vol. 23, No. (8), 30 August 2011 (2011-08-30), pages 1747-1754, see page 1752, left-hand column, paragraph 2	4-8, 11-12
Y	YANG, Mu et al. "Disulfide-Bond Scrambling Promotes Amorphous Aggregates in Lysozyme and Bovine Serum Albumin." <i>The Journal of Physical Chemistry</i> , Vol. 119, No. (10), 17 February 2015 (2015-02-17), pages 1-43, see page 3, paragraph 1	4-8, 11-12
A	CN 104800855 A (FUJIAN INSTITUTE OF RESEARCH ON THE STRUCTURE OF MATTER, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 29 July 2015 (2015-07-29) entire document	1-15
A	WO 2013185032 A1 (HARVARD COLLEGE) 12 December 2013 (2013-12-12) entire document	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 2020

Date of mailing of the international search report

26 February 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/123329

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104800855	A	29 July 2015	CN	104800855	B	29 October 2019
WO	2013185032	A1	12 December 2013	US	2015147276	A1	28 May 2015
				HK	1209021	A1	24 March 2016
				JP	2018172415	A	08 November 2018
				CN	104684546	A	03 June 2015
				EP	2858630	A1	15 April 2015
				JP	2015520194	A	16 July 2015
				CA	2876139	A1	12 December 2013
				EP	2858630	A4	24 February 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/123329

A. 主题的分类 A61K 9/51(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)) CNABS; DWPI; ISI Web of Knowledge: 聚集体, 白蛋白, 二硫键, 还原, aggregate, serum albumin, disulfide bonds, reduce																				
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>张建军等. "白蛋白作为药物载体的研究." 化学进展., 第23卷, 第8期, 2011年 8月 30日 (2011 - 08 - 30), 第1747-1754页. 参见第1752页左栏第2段</td> <td>1-3, 9-10, 13-15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>张建军等. "白蛋白作为药物载体的研究." 化学进展., 第23卷, 第8期, 2011年 8月 30日 (2011 - 08 - 30), 第1747-1754页. 参见第1752页左栏第2段</td> <td>4-8, 11-12</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>YANG M. et al. "Disulfide-Bond Scrambling Promotes Amorphous Aggregates in Lysozyme and Bovine Serum Albumin." The Journal of Physical Chemistry., 第119卷, 第10期, 2015年 2月 17日 (2015 - 02 - 17), 第1-43页. 参见第3页第1段</td> <td>4-8, 11-12</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104800855 A (中国科学院福建物质结构研究所) 2015年 7月 29日 (2015 - 07 - 29) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2013185032 A1 (HARVARD COLLEGE) 2013年 12月 12日 (2013 - 12 - 12) 全文</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	张建军等. "白蛋白作为药物载体的研究." 化学进展., 第23卷, 第8期, 2011年 8月 30日 (2011 - 08 - 30), 第1747-1754页. 参见第1752页左栏第2段	1-3, 9-10, 13-15	Y	张建军等. "白蛋白作为药物载体的研究." 化学进展., 第23卷, 第8期, 2011年 8月 30日 (2011 - 08 - 30), 第1747-1754页. 参见第1752页左栏第2段	4-8, 11-12	Y	YANG M. et al. "Disulfide-Bond Scrambling Promotes Amorphous Aggregates in Lysozyme and Bovine Serum Albumin." The Journal of Physical Chemistry., 第119卷, 第10期, 2015年 2月 17日 (2015 - 02 - 17), 第1-43页. 参见第3页第1段	4-8, 11-12	A	CN 104800855 A (中国科学院福建物质结构研究所) 2015年 7月 29日 (2015 - 07 - 29) 全文	1-15	A	WO 2013185032 A1 (HARVARD COLLEGE) 2013年 12月 12日 (2013 - 12 - 12) 全文	1-15
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	张建军等. "白蛋白作为药物载体的研究." 化学进展., 第23卷, 第8期, 2011年 8月 30日 (2011 - 08 - 30), 第1747-1754页. 参见第1752页左栏第2段	1-3, 9-10, 13-15																		
Y	张建军等. "白蛋白作为药物载体的研究." 化学进展., 第23卷, 第8期, 2011年 8月 30日 (2011 - 08 - 30), 第1747-1754页. 参见第1752页左栏第2段	4-8, 11-12																		
Y	YANG M. et al. "Disulfide-Bond Scrambling Promotes Amorphous Aggregates in Lysozyme and Bovine Serum Albumin." The Journal of Physical Chemistry., 第119卷, 第10期, 2015年 2月 17日 (2015 - 02 - 17), 第1-43页. 参见第3页第1段	4-8, 11-12																		
A	CN 104800855 A (中国科学院福建物质结构研究所) 2015年 7月 29日 (2015 - 07 - 29) 全文	1-15																		
A	WO 2013185032 A1 (HARVARD COLLEGE) 2013年 12月 12日 (2013 - 12 - 12) 全文	1-15																		
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																				
<table border="0"> <tr> <td> * 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 </td> <td> "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 "&" 同族专利的文件 </td> </tr> </table>			* 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 "&" 同族专利的文件																
* 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 "&" 同族专利的文件																			
国际检索实际完成的日期 2020年 2月 17日		国际检索报告邮寄日期 2020年 2月 26日																		
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(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		授权官员 李林 电话号码 86-(010)-53961865																		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/123329

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利		公布日 (年/月/日)	
CN	104800855	A	2015年 7月 29日	CN	104800855	B	2019年 10月 29日		
WO	2013185032	A1	2013年 12月 12日	US	2015147276	A1	2015年 5月 28日		
				HK	1209021	A1	2016年 3月 24日		
				JP	2018172415	A	2018年 11月 8日		
				CN	104684546	A	2015年 6月 3日		
				EP	2858630	A1	2015年 4月 15日		
				JP	2015520194	A	2015年 7月 16日		
				CA	2876139	A1	2013年 12月 12日		
				EP	2858630	A4	2016年 2月 24日		