

(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
2022 年 1 月 27 日 (27.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/016555 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 9/14 (2006.01) *A61K 31/282* (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01) *A61P 35/00* (2006.01)

A61K 31/409 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/104637

(22) 国际申请日: 2020 年 7 月 24 日 (24.07.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 苏州大学(SOOCHOW UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区仁
爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。

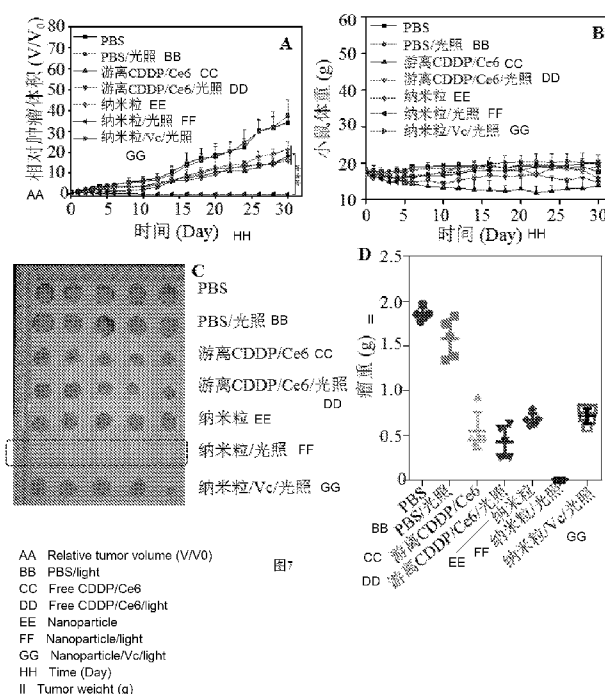
(72) 发明人: 杨红(YANG, Hong); 中国江苏省苏州市
工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。 徐
涛(XU, Tao); 中国江苏省苏州市工业园区仁

路199号, Jiangsu 215123 (CN)。 陈华兵(CHEN,
Huabing); 中国江苏省苏州市工业园区仁
爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。 张米娅(ZHANG,
Miya); 中国江苏省苏州市工业园区仁爱路199号,
Jiangsu 215123 (CN)。 陈亮(CHEN, Liang); 中国
江苏省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu
215123 (CN)。 邓益斌(DENG, Yibin); 中国江苏
省苏州市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215123
(CN)。 姚佳璐(YAO, Jialu); 中国江苏省苏州
市工业园区仁爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。
罗嘉丽(LUO, Jiali); 中国江苏省苏州市工业园
区仁爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。 翟艳华
(ZHAI, Yanhua); 中国江苏省苏州市工业园区
仁爱路199号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 苏州创元专利商标事务所有限公司
(SUZHOU CREATOR PATENT AND TRADEMARK

(54) Title: PLATINUM-BASED DRUG-/PHOTOSENSITIZER-LOADED PROTEIN NANOPARTICLE, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒及其制备方法和应用



(57) Abstract: A platinum-based drug-/photosensitizer-loaded protein nanoparticle, and a preparation method therefor and an application thereof. The platinum-based drug-/photosensitizer-loaded protein nanoparticle comprises a platinum-based drug/photosensitizer complex, and a protein that encapsulates the platinum-based drug/photosensitizer complex. The prepared nanoparticles have a small particle size, are evenly dispersed and round in shape, and have good chemical stability, light stability, and high active oxygen genera-

[见续页]

AGENCY, LTD); 中国江苏省苏州市姑苏区干将西路93号5楼孙周强, Jiangsu 215002 (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, IT, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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))。

tion capability when irradiated by near-infrared light; in cell experiments and animal experiments, it is verified that strong cytotoxicity to tumor cells and good in vivo tumor targeting are achieved, a synergistic effect is exerted, toxic and side effects are reduced, the use of chemotherapy and photodynamic therapy in combination to treat tumors is achieved, and metastasis of tumors is inhibited.

(57) 摘要: 一种载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒及其制备方法和应用, 包括铂类药物/光敏剂配合物, 以及包裹铂类药物/光敏剂配合物的蛋白质。制备的纳米粒粒径较小、分散均匀、形态圆整, 具有良好的化学稳定性、光照稳定性, 在近红外光的照射下具有较高的活性氧产生能力, 在细胞实验和动物实验中, 验证了对肿瘤细胞具有较强的细胞毒性和良好的体内肿瘤靶向性, 发挥协同增效的作用, 降低毒副作用, 实现了化学疗法和光动力疗法联合治疗肿瘤, 并抑制肿瘤的转移。

载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及包载铂类药物和光敏剂的具有双重治疗效果的白蛋白纳米粒的制备，并作为抗肿瘤药新剂型，实现肿瘤的联合治疗，并抑制肿瘤的转移。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤是威胁人类健康的严重疾病，临床治疗中需要治疗和抑制转移并重。

[0003] 目前作为纳米载药系统研究的材料多种多样，以生物大分子蛋白质为载体制备纳米材料，具有生物相容性好，安全无毒的优点，作为药物的载体材料可将药物选择性的靶向病变部位，有效降低其对正常组织的毒副作用，因此在纳米药物载体和抗肿瘤方面的药剂学研究中具有重要地位和研究价值。

[0004] 白蛋白（Albumin）又称清蛋白，是血浆中含量最丰富的蛋白质。人血清白蛋白（Human Serum Albumin, HSA）是目前结构最清晰的白蛋白，分子量为66 kD。非糖基化的单链多肽包含585个氨基酸，等电点为4.7~4.9的酸性蛋白质，易溶于水，在血浆中其浓度为42 g/L，约占血浆总蛋白的60%。

[0005] 铂类药物的研究已有50多年历史。1965年，美国学者Rosenberg等偶然发现顺铂类配合物可以抑制细胞繁殖，能够用作抗肿瘤药物。此后，铂类药物迅速引起人们的关注，铂类抗肿瘤药物的研究也成为热点。时至今日，铂类药物的研究已发展到第四代，其中顺铂、卡铂和奥沙利铂已用于临床，合成这些铂类药物的重要前体为二水二氨合铂硝酸盐，故：二水二氨合铂离子亦称为顺铂前体离子。顺铂（又称顺-二氯二氨合铂，Cis-Dichlorodiammine platinum(II)，简称CDDP），作为经典的铂类抗肿瘤药物，在肿瘤化疗中占有重要地位。顺铂抗癌谱及其应用范围很广，临床主要用于治疗睾丸癌、卵巢癌、膀胱癌、头颈部癌、食管癌以及小细胞肺癌。当和阿霉素，紫杉醇，5-氟尿嘧啶（5-Fu）等联合用药时可治疗头颈部癌以及胃癌。但临床的大剂量和长期使用受限于其严重的毒副反应、低溶解性及耐药性。

[0006] 肿瘤治疗中的光动力疗法（Photodynamic therapy，简称PDT）是在肿瘤组织

摄取光敏剂后，利用光动力反应进行疾病诊断与疾病治疗的新技术。PDT有3个重要因素：激发光源、光敏剂和活性氧。其作用机制为：光敏剂分子吸收相应波长光的光子能量，由基态变为单重激发态，激发态光敏剂分子可通过物理退激过程回到基态，并产生荧光用于临床诊断，即荧光诊断；也可转化为三重激发态，将能量转移给邻近的分子氧产生活性氧簇（Reactive oxygen species, 简称ROS）诱导靶器官细胞发生自噬、凋亡与坏死。

[0007] 由于“叶绿素a”的衍生物，在红光区域具有高消光系数和高单重态氧量子产率，所以已被广泛用作光敏剂。其中，PDT常用Ce6，它通过近红外光(NIR)光激活，能相对快速地从体内消除，以及具有高的活性氧产生效率，且Ce6还可用作NIR荧光成像，波长范围为650~900 nm，以避免内源性发色团在体内的干扰。但是，Ce6在生理条件下的稳定性差，且荧光量子产率（ Φ_f ）和光敏效果较差。因此，为增强光敏剂的稳定性和对肿瘤组织的靶向性，除开发新一代光敏剂外，为了提高PDT效率开发各类纳米载体为Ce6提供新平台，以及有效整合不同治疗方式，改善肿瘤治疗效果是非常必要的。

发明概述

技术问题

[0008] 为解决以上技术问题，本发明的目的是提供一种载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒及其制备方法和应用。本发明在温和的反应条件下制备HSA纳米粒，尤其是通过合适的处方和工艺，实现粒径的有效控制，提高肿瘤靶向性和疗效。本发明基于蛋白质模板，通过仿生合成制备具有化疗/光动力联合治疗效果的蛋白纳米粒进行研究。以HSA为蛋白质模板，将化疗药顺铂前体离子和光敏剂Ce6在白蛋白内腔中共沉淀，并进一步成核生长，制备得到具有化疗/光动力治疗作用的双功能的小粒径白蛋白纳米粒，改善两种水溶性不强的药物的递送效率，增强肿瘤细胞的药物摄取能力和药物在细胞内的累积。此蛋白纳米粒进入肿瘤细胞溶酶体后，在近红外光激发下Ce6产生显著的光动力，还可通过ROS诱导溶酶体破裂，同时促进铂类药物转运进入胞浆进而进入细胞核，并以二价铂的活性形式存在，增强化疗作用，从而实现肿瘤的联合治疗起到协同增效作用；而在体内运用时呈现出较好体内肿瘤靶向性，且在发挥铂类药物化疗作用抑制肿瘤生

长的同时，联合光动力治疗，达到完全消除肿瘤和抑制肿瘤转移的效果；尤其是纳米粒在生物体内可因小粒径（ $<10\text{ nm}$ ）产生的肾清除效应被有效代谢，具有良好的生物安全性。

问题的解决方案

技术解决方案

- [0009] 本发明采用如下技术方案。
- [0010] 载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒，包括铂类药物/光敏剂配合物，以及包裹铂类药物/光敏剂配合物的蛋白质。进一步的，蛋白质为白蛋白，优选人血清白蛋白；铂类药物为二水二氨合铂离子，光敏剂为二氢卟吩e6。
- [0011] 本发明包载二水二氨合铂离子的纳米粒中，采用铂元素定量测定，用顺铂作对照，结果可靠；细胞和体内实验，用顺铂作对照，得到可靠的结果。现有技术无法直接制成包载二水二氨合铂离子的蛋白纳米粒，也未能制得同时包载顺铂与Ce6的纳米粒。经过创造性的劳动，本发明采用安全的HSA将二水二氨合铂离子和光敏剂Ce6共包载，具有条件温和、工艺简单、粒径小且可控、生物相容性好、肿瘤靶向性和滞留性好等优势，是整合了化疗和光动力治疗手段的新型白蛋白纳米粒，实现了肿瘤高效低毒治疗并抑制肿瘤转移的白蛋白纳米粒的制备和应用。
- [0012] 本发明公开了上述载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒的制备方法，包括以下步骤，将二氢卟吩e6溶液加入二水二氨合铂离子与蛋白的混合溶液中，反应后超滤离心，得到载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒。本发明选用蛋白纳米载体，同时包载铂类药物和光敏剂，实现在一个纳米载药平台结合化疗毒性和光毒性对肿瘤的双重靶向治疗作用。载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒的粒径为 $2\sim 50\text{ nm}$ ，水合粒径 $20\sim 150\text{ nm}$ 。
- [0013] 本发明中，蛋白、二水二氨合铂离子、二氢卟吩e6的用量比为 $100\text{ mg}:(20\sim 50\text{ }\mu\text{mol}):(3\sim 15\text{ }\mu\text{mol})$ ，优选为 $100\text{ mg}:(25\sim 40\text{ }\mu\text{mol}):(5\sim 10\text{ }\mu\text{mol})$ ；将二氢卟吩e6溶液加入二水二氨合铂离子与蛋白的混合溶液中，调节至pH为 $4.0\sim 8.0$ ，优选 $5.0\sim 6.5$ ，然后于 $25\sim 60^{\circ}\text{C}$ 反应 $1\sim 8\text{ h}$ ；超滤离心的转速为 $1500\sim 4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

- [0014] 本发明采用安全的HSA制备的蛋白纳米粒，粒径、化学稳定性、光照稳定性及活性氧产生能力，均较为理想，在肿瘤治疗中具有较大的应用前景。
- [0015] 本发明公开了上述载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒在制备药物中的应用，具体为抗肿瘤药物，进一步为化疗/光动力治疗双重抗肿瘤药物。
- [0016] 本发明制备的纳米粒肿瘤靶向性好，在肿瘤的滞留好，并显示出对肿瘤细胞的强毒性，在近红外光照条件下联合化疗/光动力治疗具有协同作用，光动力治疗损伤细胞并增强了化疗效果，可有效消除肿瘤，显著抑制肿瘤生长及转移，展示了兼具化疗和光动力治疗的高效低毒抗肿瘤作用，是安全有效的纳米新制剂。
- [0017] 本发明中，HSA是内源性物质，不会产生毒性和炎症反应，具有良好的稳定性和独特的空间结构，增加难溶性药物的溶解度，对易氧化药物具有较好的保护作用，可显著延长药物半衰期，提高靶向性，显著降低药物毒性，并且由于肿瘤生长所需能量和营养源依赖白蛋白，所以内源性白蛋白在肿瘤组织中有聚集作用，HSA作为药物载体制备给药系统优势显著：与药物结合能力高，稳定性好（在pH 4~9，60℃条件下10 h不产生有害物质），具有很好的生物相容性和生物可降解性，良好的肿瘤靶向性，高效低毒治疗肿瘤，故研究价值极高。
- [0018] 本发明设计蛋白纳米给药系统包载二水二氨合铂离子，与DNA形成加合物，从而抑制DNA复制和转录，导致DNA断裂和错码，抑制细胞有丝分裂，故研发相关新制剂很有意义。
- [0019] 联合治疗是将不同的抗癌药物或不同治疗方式联合，多管齐下达到协同抗癌功效，以克服、减轻耐药性和毒副作用，提高药物疗效的有效抗肿瘤策略。目前临床已有的铂类联合治疗策略，多是不同化疗药物的联合应用，但是不少情况下，联合治疗效果不佳，现有药物的直接联合虽然能在给药时调整剂量，但其代谢不同导致效果不尽如人意，有时产生的毒性更大。本发明的纳米药物有较小的毒性和不良反应，创伤小、疗效确切、无耐药性，光敏剂（在PDT中的细胞毒性剂）能够吸收特定波长的光并将其转化为有用能量，在较长波长处（600~850 nm）具有高消光系数的强吸光度，光的组织穿透性大，并有足够活力以产生ROS

，具有优异的光化学反应性，具有高三重态产率和长三重态寿命，并能够有效地产生ROS，具有最小的暗毒性，并且在光的存在下仅为细胞毒性，优先被靶组织保留，从身体迅速排泄，引起的全身毒性低。

发明的有益效果

有益效果

[0020] 现有技术蛋白包载有机分子，粒径难以控制在理想范围，而且现有报道的蛋白纳米粒，需要采用强碱性条件（比如pH 12），比如牛血清白蛋白BSA制备包载Gd₂O₃/Ce6纳米粒的诊疗一体化研究。目前尚未见有制备白蛋白纳米粒同时包载铂类药物和光敏剂的报道，尤其是现有技术还未见有采用HSA在近中性条件，可以制备包载2种化合物用于化疗和光动力治疗的蛋白纳米粒，实现联合治疗肿瘤并抑制转移的效果。

对附图的简要说明

附图说明

- [0021] 图1 纳米粒的形态表征图：A、纳米粒的透射电镜图；B、纳米粒的动态粒径分布图；C、纳米粒的负染电镜图。
- [0022] 图2 纳米粒的结构表征图：A. XPS分析图谱；B. EDX分析图谱；C. FTIR分析图谱。
- [0023] 图3 活性氧产生的归一化吸收变化图：A. 纳米粒；B. 游离光敏剂。
- [0024] 图4 纳米粒的体外稳定性考察结果图：A. 化学稳定性；B. 光照稳定性。
- [0025] 图5 纳米粒对4T1细胞的细胞毒性结果图。
- [0026] 图6 纳米粒小鼠体内组织分布结果图。
- [0027] 图7 纳米粒对小鼠皮下瘤抑瘤实验结果图。
- [0028] 图8 纳米粒抑制小鼠原位乳腺癌的肺转移肿瘤结果图。
- [0029] 图9尾静脉注射纳米粒后铂元素在小鼠体内各组织中的长期分布。
- [0030] 图10（A）静脉注射纳米粒后不同时间小鼠血清中ALT、AST、ALP以及（B）Urea、Crea的水平（C）静脉注射顺铂后不同时间小鼠血清中ALT、AST、ALP以及（D）Urea、Crea的水平。
- [0031] 图11纳米粒制备示意图。

[0032] 图12化疗/光动力协同作用机理。

发明实施例

本发明的实施方式

[0033] 本发明涉及包载铂类药物（如顺铂前体离子二水二氨合铂离子）和光敏剂（如二氢卟吩e6）的双重治疗效果的白蛋白纳米粒的制备，并作为抗肿瘤药新剂型，增强药物对肿瘤的毒性和靶向性，发挥协同增效作用，降低全身毒副作用，从而实现肿瘤的联合治疗，并抑制肿瘤的转移。

[0034] 本发明将二氢卟吩e6溶液加入二水二氨合铂离子与蛋白的混合溶液中，反应后超滤离心，得到载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒。具体如下。

[0035] （1）顺铂和硝酸银溶液反应，合成得到二水二氨合铂硝酸盐水溶液，然后将二水二氨合铂离子的溶液与蛋白溶液混合，所述二水二氨合铂溶液的浓度为 $8 \sim 32 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ；所述蛋白溶液的浓度为 $5 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

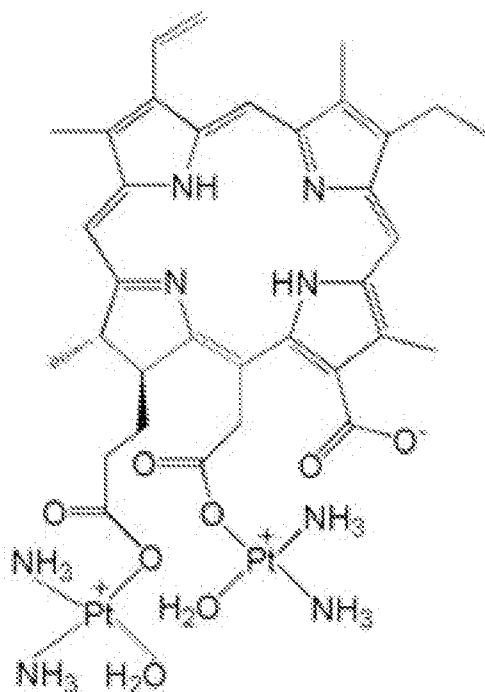
[0036] （2）将Ce6溶液加入步骤（1）中的混合溶液中，调节至pH 4.0~8.0，所述Ce6溶液的浓度为 $2 \sim 8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，然后将混合溶液于 $25 \sim 60^\circ\text{C}$ 反应1~8 h。

[0037] （3）将步骤（1）反应得到的混合物置于超滤离心管中，以 $1500 \sim 4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速，超滤离心除去游离小分子至下层滤液无色。

[0038] 本发明中二水二氨合铂离子与Ce6作用形成配合物，并共沉淀在蛋白空腔中，得到纳米粒。

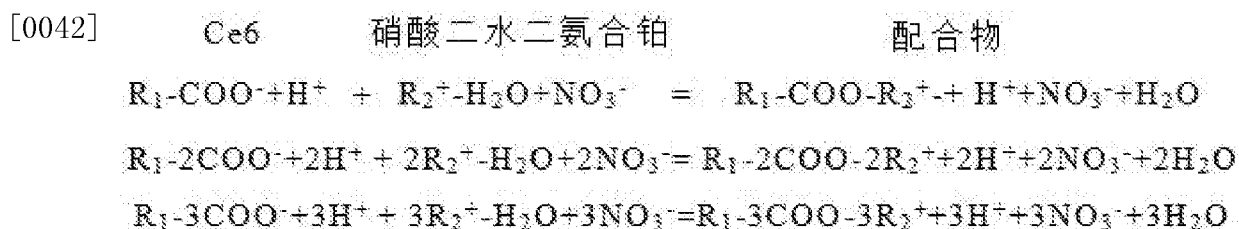
[0039] 本发明中，铂类药物/光敏剂配合物的化学结构式如下。

[0040]



。

[0041] 铂原子外围的电子是4f14 5d10 6s1，二价铂离子为4f14 5d9，四价铂离子为4f14 5d7；二价铂4f14 5d9与1个-COO⁻作用，得一价铂离子外层为4f14 5d10；光敏剂与二水二氨合铂离子反应示意如下。



。

[0043] 下面结合附图和实施例，对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明，但不局限于此。本发明载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒，简称“纳米粒”。

[0044] 实施例一：称取720 mg顺铂 (Pt(NH₃)₂Cl₂, 2.4 mmol·L⁻¹) 和800 mg 硝酸银 (AgNO₃, 4.7 mmol·L⁻¹)，溶于6.0 mL的蒸馏水中，水浴 (60℃) 避光搅拌3 h后，然后室温搅拌20小时；反应结束后，取出反应液 (反应液清澈无浑浊) 14000 r·min⁻¹离心15 min，除去生成的AgCl沉淀，上清以0.22 μm滤膜过滤后得到二水二氨合铂硝酸 ([Pt(NH₃)₂(H₂O)₂](NO₃)₂) 溶液；用电感耦

合等离子发射光谱仪（ICP-OES）确定其浓度并加水调整终浓度为 $320\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，为储备液浓度，制备纳米粒时用水稀释成 $32\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

[0045] 采用 $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的HAS水溶液 10 mL ，加入浓度为 $32\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二水二氨合铂前体离子溶液 1 mL ，搅拌下加入 1 mL 浓度为 $8\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的Ce6溶液，用氢氧化钠水溶液（ 0.1M ）调节体系pH至5.5后，在 55°C 水浴中搅拌反应 4 h 。反应结束后将反应液离心（ $3000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ， 10 min ）、超滤（MW:100 kD， $2000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ， 10 min ）纯化，以除去游离的二水二氨合铂前体离子和Ce6；最后，将纯化后的反应液用孔径为 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤，即得载铂类药物二水二氨合铂/光敏剂Ce6的白蛋白纳米粒（Pt/Ce6@HSA NPs）溶液，简称纳米粒溶液。

[0046] 纳米粒的形态表征：（1）纳米粒的透射电镜表征：取纳米粒溶液 $20\text{ }\mu\text{L}$ 滴到铜网碳支持膜上，放入干燥器中挥干水分后用 120 kV 透射电镜（TEM）观察形态。结果如图1-A。结果表明，制备的纳米粒为规整的圆形，粒径为 $4.9 \pm 1.0\text{ nm}$ 。

[0047] 由于在重金属存在时，TEM仅显示纳米粒核心的重金属，白蛋白没有成像；通过蛋白染色实验，TEM测得加上蛋白层的纳米粒粒径为 $7.9 \pm 0.4\text{ nm}$ 。

[0048] （2）纳米粒的粒径及其分布表征：取纳米粒溶液 1 mL 采用激光散射粒径仪对其粒径及分布进行分析。结果如图1-B。结果表明制得的蛋白纳米粒为单峰分布，平均水合粒径为 33.1 nm （此粒径包含表面水化层），多分散系数（PDI）为 0.198 ，有利于避免内皮网状细胞拦截，形成血中长循环，发挥被动靶向作用。

[0049] （3）纳米粒的负染电镜图：取纳米粒溶液滴在铜网上， 5 min 后吸去多余液体，滴加 0.2% 的醋酸铀水溶液染色 3 min ，而后用滤纸吸去染色液，待干燥后用 120 kV 电镜观察。结果如图1-C。结果表明，负染后纳米粒蛋白分布在纳米粒外层，为颜色较浅的白色，四周和内核背景较深，纳米粒局部放大后可看到蛋白外层粒径为 8 nm 左右，内核粒径为 5 nm ，而单分子空腔的大小一般为 $6 \sim 8\text{ nm}$ ，说明本发明制备纳米粒的核心存在Ce6与二水二氨合铂离子配合物。

[0050] 以上结果表明，本发明制备的纳米粒为规整的圆形，分散比较均匀，粒径小于

10 nm, 可被肾清除, 具有体内EPR效应和肿瘤靶向性。

[0051] 游离CDDP/Ce6溶液的制备, 将顺铂、Ce6分别用生理盐水和DMSO溶解后, 按照Pt : Ce6=1.5 : 1的摩尔比混合, 在用水稀释至所需浓度, 得到游离CDDP/Ce6溶液。

[0052] 纳米粒的结构表征: (1) 纳米粒Pt 配体的内层电子结合能: 将制得的纳米粒溶液于-80 °C冰箱预冻后放入真空冷冻干燥机中冻干48 h, 然后在研钵中研磨成细腻的粉末, 以X射线光电子能谱(XPS)分析纳米粒和游离物理混合物的原子价态。结果如图2-A。根据Pt元素 $4f$ 轨道在其X射线光电子能谱(XPS)中的峰拟合过程, 发现纳米粒在72.9和76.4 eV处出现峰, 表明纳米粒子中存在二价铂, 与游离二水二氨合铂离子/Ce6混合物的对照组结果一致。

[0053] (2) 纳米粒的元素分析: 取纳米粒溶液滴于超薄碳膜上, 挥干水分后进行能量色散X射线(EDX)分析, 判断其元素组成。结果如图2-B。结果表明纳米粒中有铂元素的存在。

[0054] (3) 纳米粒的配位分析: 取冻干后的纳米粒粉末、游离二水二氨合铂离子/Ce6混合物、Ce6粉末通过傅里叶红外光谱(FTIR)分析, 结果如图2-C。

[0055] 纳米粒的单线态氧产生能力: 利用1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)对单线态氧捕获后的吸光度变化进行测定。将制备好的纳米粒溶液和游离Ce6溶液稀释成Ce6浓度分别为0.5、1.0、2.0、5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品, 分别取2.97 mL到石英比色皿中, 测定初始紫外吸收值。用DMSO配制30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的DPBF溶液, 取30 μL 加入到石英比色皿中, 边搅拌边用660 nm激光器 ($0.15 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) 照射溶液3 min, 期间每隔30 s时测量DPBF在418 nm处的紫外吸收值的变化, 并作归一化后的DPBF变化折线图。结果如图3。A、B分别是纳米粒和游离Ce6溶液中DPBF吸光度值随光照时间变化的归一化图。从图A中可以看出, 纳米粒溶液在低浓度时随光照时间的延长, 即可使DPBF吸光度迅速下降, 并且具有浓度依赖性, 说明有大量单线态氧产生, 纳米粒具有较强的单线态氧产生能力, 在 PDT 应用中具有潜力; 而图B中游离Ce6同浓度下仅产生少量单线态氧。

[0056] 纳米粒的体外稳定性: (1) 纳米粒的化学稳定性: 分别取Ce6浓度为20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的纳米粒及20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 游离Ce6溶液各0.1 mL, 分别加入到2.9 mL的纯

水、pH 5.5的磷酸缓冲液、pH 7.4的磷酸缓冲液，以及含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中。置于室温避光保存，每种环境平行配置3份。采用紫外-可见分光光度计测定72

h内Ce6的吸光度变化。结果如图4A，纳米粒在去离子水、pH为5.5、7.4的磷酸缓冲液、以及含10%胎牛血清的培养基中，72 h之内各时间点紫外吸收基本不变，说明纳米粒有着更优越的稳定性，有助于纳米粒药效的发挥；而游离Ce6组随着时间的变化，其紫外吸收下降20%~40%。

[0057] (2) 纳米粒的光稳定性：分别取Ce6浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的纳米粒及 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 游离Ce6溶液各0.1 mL，分别加入到2.9 mL的纯水，pH 5.5和pH 7.4的磷酸缓冲液，采用660 nm激光器，功率 $0.15 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ，每隔30 s照射一次并立即用紫外-可见分光光度计测定其紫外吸收值，照射直至满5 min。结果如图4B，结果表明Ce6被包裹进蛋白以后，与铂形成配合物，对Ce6具有一定的稳定作用，因而使纳米粒在去离子水中及酸性和中性环境中均具有更好的光照稳定性；而游离Ce6在光照条件下，光漂白较快，有其在酸性环境中120 s内就光漂白完全，溶解度低、稳定性差。

[0058] 因此纳米粒的包载将有利于稳定性提高并在肿瘤酸性环境中发挥PDT作用。

[0059] 纳米粒的细胞毒性：取对数生长期的4T1小鼠乳腺癌细胞单细胞悬液接种于96孔细胞培养板中（ 1.0×10^5 细胞/孔、1640培养基），每孔100 μL ，于37℃恒温细胞培养箱中培养过夜使细胞完全贴壁变形，待细胞长到80%后，去除原培养基。

[0060] 分成游离药物组和纳米粒组，进一步分成非光照组和光照组，分别加入100 μL 相同浓度稀释好的纳米粒以及游离CDDP/Ce6溶液替换原培养基，浓度设置为0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ （按Pt元素的浓度计算），每个浓度4个复孔。

[0061] 为考察纳米粒的细胞化疗毒性，非光照组分别培养4、12、24、48 h后，弃去带药培养基后每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的MTT溶液10 μL 和1640培养基90 μL ，继续培养4 h后弃去液体，每孔加入150 μL DMSO，用酶标仪设置震荡30 s，紫外吸收490 nm，测定吸光度A，取复孔平均值计算得到细胞存活率：细胞存活

率 = 实验组A / 阴性对照组A₀ × 100% (以未加药细胞作为阴性对照组)。结果如图5a。

[0062] 为了探索化疗光动力联合治疗效果, 选取孵育24 h时间点进行光照。光照组加药后培养24 h后每孔用激光照射 (660 nm, 0.15 W · cm⁻², 5 min) 后继续培养24 h继续加MTT等相同的操作过程。结果如图5b。

[0063] 图5结果显示, 在仅有化疗效果存在时纳米粒中的药物在细胞内缓慢释放, 产生长久的细胞毒性, 说明具有高效低毒的潜力; 而光照条件下, 相较于游离药物组, 按Pt元素的浓度计算, 纳米粒组的细胞存活率显著下降, IC₅₀ 从非光照条件下的40.91 μmol · L⁻¹下降至1.91 μmol · L⁻¹, 降低了21.5倍, 而游离组的暗毒性IC₅₀为9.52 μmol · L⁻¹, 光毒性IC₅₀为6.18 μmol · L⁻¹, 仅降低1.5倍。表明该药物发挥的光动力作用对杀死肿瘤细胞具有重大作用, 反映了本发明将化学疗法与光动力疗法相结合的优点。

[0064] 取CN110368374A实施例一制备的纳米粒, 进行如上同样的细胞毒性测试, 按Pt元素的浓度计算, 非光照IC₅₀ 为87.86 μmol · L⁻¹。

[0065] 纳米粒小鼠体内组织分布: (1) 皮下肿瘤模型的建立: 培养4T1肿瘤细胞, 收集对数生长期的肿瘤细胞将其消化离心后, 加入不含血清的培养基洗一次, 离心后加入预冷的PBS制成细胞悬液, 浓度1×10⁷个/mL, 放在冰盒中备用。小白鼠右腿后肢脱毛后, 在肌肉处以注射器挑起表皮, 注射50 μL细胞悬浮液, 待肿瘤体积长到60-100 mm³左右时可进行实验。(瘤体积=长×宽²÷2)。

[0066] (2) 组织分布实验: 取皮下荷瘤小鼠18只, 分为两组, 分别尾静脉注射纳米粒和游离CDDP/Ce6溶液200 μL, 注射剂量为5 mg · kg⁻¹ (按Pt元素的浓度计算), 注射后分别于6、12、24 h后在每组取出3只用生理盐水心脏灌流后脱颈处死并将心、肝、脾、肺、肾及肿瘤解剖取下。取出的组织先通过小动物成像系统观察各时间点的Ce6荧光分布情况。结果如图6A。

[0067] 随后将组织称重、剪碎, 分别放入100 mL锥形瓶中, 做上标记, 加入王水进行高温硝解, 待组织硝解完全之后取出 100 μL 稀释至一定体积过膜之后用ICP-MS对各组织中的铂元素进行定量。结果如图6B。

- [0068] 图6结果表明，静脉注射不同时间后，纳米粒在肿瘤组织的蓄积显著高于游离药物具有良好的肿瘤靶向性，因此具有肿瘤治疗的潜力。
- [0069] 纳米粒的小鼠皮下瘤抑瘤效果：采用如上方法，构建小白鼠皮下荷瘤模型，待肿瘤体积至 60 mm^3 时，按照以下设计给药：
- 将皮下荷瘤小鼠随机分成PBS组、PBS光照组（PBS-irradiation），游离CDDP/Ce6、游离CDDP/Ce6光照组、纳米粒组、纳米粒光照组、纳米粒预注射Vc光照组。分别在第0、2、5天对小鼠进行尾静脉给药，注射剂量为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ （按Pt元素的浓度计算），光照组在每次给药后12 h进行光照（660 nm, $0.15 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ ），光照时长为5 min，纳米粒/Vc光照组每次在光照前半小时瘤内注射Vc溶液（ $25.0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ）。抑瘤时间30天，期间测量记录小鼠体重和肿瘤体积变化。实验结束后，处死小鼠，收集肿瘤并用4%甲醛固定后拍照。结果如图7。
- [0070] 从图7，A、C、D结果可以看出，PBS组光照前后肿瘤生长情况相差不大，与初始体积相比增加了约37倍，说明光照本身并不会抑制肿瘤生长；而游离CDDP/Ce6组，在非光照时仅有化疗作用，但光照后，应兼具化疗/光动力治疗作用，但抑瘤效果却与非光照相似；纳米粒组光照前后所产生的肿瘤抑制作用差异大，3次给药光照后，不仅完全抑制肿瘤生长，而且达到肿瘤消融的效果，证实了本发明纳米粒的包载对于联合化疗/光动力治疗的卓越优势；并且瘤内注射了清除活性氧的还原剂Vc后，抑瘤效果减弱，证实了化疗/光动力联合治疗中，铂类药物与Ce6协同的贡献。
- [0071] 从图7，B、D结果可以看出，由于化疗药物毒性较大，导致小鼠体重比初始体重下降约8 g，严重影响小鼠生存健康，且游离药物加入光动力治疗后也并不能完全消除肿瘤；而纳米粒+光照组，不仅可以完全消除肿瘤，对小鼠体重几乎无影响，说明疗效好、毒性低。综上，纳米粒有着高效低毒的肿瘤治疗效果。
- [0072] 纳米粒抑制小鼠原位乳腺癌的肺转移肿瘤的效果：（1）建立原位乳腺癌肺转移肿瘤模型：培养4T1-Luciferase肿瘤细胞，收集对数生长期的肿瘤细胞将其消化制备成不含血清的预冷的PBS细胞混悬液，浓度 1×10^7 个/mL，放在冰盒中备用。在小鼠乳房垫中注射50 μL 细胞悬浮液，接种后通过小动物活体成像系统检测荧光信号强度。

- [0073] (2) 抑制肿瘤肺转移的效果：待肿瘤部位荧光信号大约为 3×10^5 p/s/cm²/sr时，将原位荷瘤小鼠按照如上皮下抑瘤实验分组、给药、光照。给药后分别在0、2、6、12、18 d使用小动物活体成像系统进行生物发光成像来检测肿瘤部位信号强度，检测前每只小鼠腹腔注射水合氯醛麻醉（剂量为 $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ），同时腹腔注射荧光素钠盐（剂量为 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ），10 min后进行扫描成像，观察肿瘤的生长情况，定量分析各时间点的荧光值，绘制肿瘤生长曲线。最后一天小鼠扫描完成后解剖出肺组织进行生物发光成像并拍摄白光照片。结果如图8。
- [0074] 图8结果表明，PBS处理的小鼠的肿瘤生长较快，肿瘤部位的荧光信号最强，肺部转移灶最多。游离药物非光照组与光照组、纳米粒非光照组，抗肿瘤功效和抑制肿瘤肺转移效果有限，与PBS组相比荧光信号减弱，说明仅有化疗不能完全抑制肿瘤生长和转移，游离化疗药/光敏剂+光照同样效果有限。而纳米粒+光照组，经过三次治疗即可消除肿瘤并有效抑制肿瘤向肺的转移，证明了本发明纳米粒将化疗和PDT结合后，在抑制肿瘤生长以及抑制肿瘤转移方面的显著优势；与皮下瘤实验结果一样，Vc可削弱纳米粒的抑瘤效果。
- [0075] 纳米粒的长期组织分布：将健康Balb/c小白鼠随机分成8组，每组3只，尾静脉注射纳米粒溶液，注射剂量为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ （按Pt元素的浓度计算）。给药后分别在1、3、7、14、21、28、42 d处死小鼠解剖出心、肝、脾、肺、肾、肠，各脏器称重后加入王水和高氯酸进行高温硝解，定容后采用ICP-MS检测各器官中Pt元素含量。结果如图9，注射纳米粒后主要分布在肝和脾中，到42 d时铂的含量已下降约90%。而心、肺、肾、肠中铂的分布逐渐降低，到35 d时发现各器官中Pt元素含量均很少甚至为零，说明纳米粒可以从组织内逐渐清除，不会将重金属蓄积在体内，以免造成长期的毒副反应，具有较好的生物安全性。
- [0076] 纳米粒作用后的生化指标检测考察：为确定药物在体内代谢期间内的毒性，考察了肝肾功能的生化指标：检测肝指标丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）和碱性磷酸酶（ALP）和肾指标尿素（Urea）、肌酐（Crea），并与正常值比较，确定药物对肝肾功能的损伤。
- [0077] 将健康Balb/c小白鼠随机分成3组：PBS组、Pt/Ce6@HSA 纳米粒组、游离CDDP

组，PBS组三只，纳米粒组和游离CDDP组每组12只，分别尾静脉注射纳米粒和游离CDDP溶液200 μL ，注射剂量为 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ （按Pt元素的浓度计算），每隔一天给药一次，总共给药3次。全部给药完毕后，分别在给药后的7、14、21、28 d采取摘取眼球法从小鼠眼眶后静脉丛收集血液样品。PBS组也在28 d眼球取血。将收集的血样置于4℃冰箱过夜，然后用离心机 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min，取出上层血清，用血生化仪分析血清中肝功能指标天门冬氨酸氨基转移酶（AST）、碱性磷酸酶（ALP）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）以及肾功能指标尿素（Urea）和肌酐（Crea）的水平。结果如图10，纳米粒给药组肝肾指标与对照组（PBS组）无显著性差异，说明肝肾功能无明显损伤，而游离CDDP组肝指标变化较大且Urea和Crea肾指标升高迅速，表明CDDP对肾具有一定毒性。综上，从生化指标的测量结果来看，本发明纳米粒药物没有明显的肝肾毒性副作用，具有广阔的临床应用前景。

[0078] 实施例二：在实施例一中制备蛋白纳米粒时，分别将pH调节为5.0、6.0（实施例一中，pH为5.5），其他步骤同实施例一，可制得TEM尺寸为4.5~5.3 nm（因重原子作用，仅反映纳米粒核心的铂原子所在区域大小，下同）的纳米粒。

[0079] 实施例三：将实施例一中蛋白纳米粒制备过程中，分别调节铂元素与Ce6的摩尔比例为1:1、8:1（实施例一中，Pt:Ce6摩尔比为4:1），其他条件与实施例一相同，可制得稳定性良好的Pt/Ce6蛋白纳米粒，TEM尺寸在4.2~4.9 nm之间。

[0080] 将实施例一中蛋白纳米粒制备过程中，调节铂元素与Ce6的摩尔比例为1:2（实施例一中，Pt:Ce6摩尔比为4:1），其他条件与实施例一相同，反应后溶液较浑浊，不可制得稳定性良好的Pt/Ce6蛋白纳米粒。

[0081] 实施例四：将实施例一中蛋白纳米粒制备过程中，分别调节反应温度为25℃、37℃（实施例一中，反应温度为55℃），其他条件与实施例一相同，可制得稳定性良好的Pt/Ce6蛋白纳米粒，TEM尺寸为4.2 nm~5 nm。

[0082] 实施例五：将实施例一中硫化铂蛋白纳米粒的制备过程中反应时间调整为1 h、8 h（实施例一中，反应时间为4 h），其他条件与实施例一相同；反应1 h可制得稳定性良好的Pt/Ce6蛋白纳米粒，TEM尺寸在5 nm左右；如果反应8 h，反应后溶液较浑浊，不可制得稳定性良好的Pt/Ce6蛋白纳米粒。

- [0083] 本发明以HSA为蛋白质模板，将难以直接包载的铂类化疗药与光敏剂Ce6通过白蛋白内腔中共沉淀，制得纳米粒Pt/Ce6@HSA，参见图11，从而实现了共包载以及化疗作用/光动力作用联合应用于肿瘤治疗，为进一步研究为临床用药奠定了基础。在纳米粒的制备中，成功获得粒径较小、分散性较好、形态规整的载药蛋白纳米粒。通过XPS、EDX和FTIR等表征证明了二价铂元素的存在以及铂和羧基的成功配位。此纳米粒的光稳定性、化学稳定性良好；同时，该纳米粒具有良好的单线态氧产生能力。此外，释放规律研究结果表明，纳米粒具有一定的缓释作用且有利于到达肿瘤部位发挥作用。
- [0084] 在纳米粒的抗肿瘤效果研究中，细胞水平的实验结果表明：肿瘤细胞对纳米粒的摄取显著增加且具有时间依赖性；摄取的纳米粒主要定位在溶酶体中，光照后细胞内产生大量ROS导致溶酶体破裂，从而促进药物的进一步转运进入胞浆及细胞核，实现了化疗与光动力治疗的协同作用，参见图12；MTT实验说明，纳米粒联合治疗有效地提高了抗肿瘤效力，且药物发挥的光动力作用、化疗作用强，体现了化疗与光动力治疗结合的优势；细胞增殖EdU染色实验结果表明，纳米粒能够显著地抑制肿瘤细胞增殖，并且光照后细胞增殖抑制效果显著增强，进一步佐证了纳米粒的抗肿瘤效果；细胞凋亡、线粒体膜电位染色、铂-DNA加合物及Western blot实验结果发现纳米粒治疗后线粒体膜电位下降，光照后电位下降显著，凋亡水平显著增加，加合物生成增多，凋亡相关蛋白表达变化显著，进一步证明了纳米粒联合两种治疗方法的优势。
- [0085] 小鼠体内的抗肿瘤效果评价结果表明：纳米粒消除半衰期延长，具有更好的长循环能力；纳米粒具有良好的肿瘤靶向性；纳米粒靶向到肿瘤部位后能够有效地产生活性氧，具有良好的PDT效果；纳米粒联合化疗作用/光动力作用治疗后，具有显著的小鼠肿瘤的生长抑制作用和转移抑制作用；切片染色结果表明，纳米粒能够显著损伤肿瘤细胞，抑制肿瘤增殖，证明了联合治疗的优势；纳米粒在小鼠体内能够经过生物代谢排出体外，无长期毒性，对肝肾无显著损伤，生物安全性高。
- [0086] 综上，本发明巧妙设计并成功制备了包载铂类药物和光敏剂的将化疗作用/光动力作用结合的蛋白纳米粒，产生协同抗肿瘤作用肿瘤抑制效果显著。

权利要求书

- [权利要求 1] 载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒，包括铂类药物/光敏剂配合物，以及包裹铂类药物/光敏剂配合物的蛋白质。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒，其特征在于，蛋白质为白蛋白，铂类药物为二水二氨合铂离子，光敏剂为二氢卟吩e6。
- [权利要求 3] 权利要求1所述载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒的制备方法，包括以下步骤，将二氢卟吩e6溶液加入二水二氨合铂离子与蛋白的混合溶液中，反应后超滤离心，得到载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒。
- [权利要求 4] 根据权利要求3所述载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒的制备方法，其特征在于，蛋白、二水二氨合铂离子、二氢卟吩e6的用量比为100mg： $(20\sim 50\ \mu\text{mol})$ ： $(3\sim 15\ \mu\text{mol})$ 。
- [权利要求 5] 根据权利要求4所述载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒的制备方法，其特征在于，蛋白、二水二氨合铂离子、二氢卟吩e6的用量比为100mg： $(25\sim 40\ \mu\text{mol})$ ： $(5\sim 10\ \mu\text{mol})$ 。
- [权利要求 6] 根据权利要求3所述载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒的制备方法，其特征在于，将二氢卟吩e6溶液加入二水二氨合铂离子与蛋白的混合溶液中，调节至pH为4.0~8.0，然后于25~60℃反应1~8 h；超滤离心的转速为1500~4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。
- [权利要求 7] 根据权利要求6所述载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒的制备方法，其特征在于，调节至pH为5.0~6.5；超滤离心时截留分子量为100 kD。
- [权利要求 8] 权利要求1所述载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒在制备药物中的应用。
- [权利要求 9] 根据权利要求8所述的应用，其特征在于，药物为抗肿瘤药物。
- [权利要求 10] 根据权利要求8所述的应用，其特征在于，载铂类药物/光敏剂的蛋白纳米粒的粒径为2~50 nm。

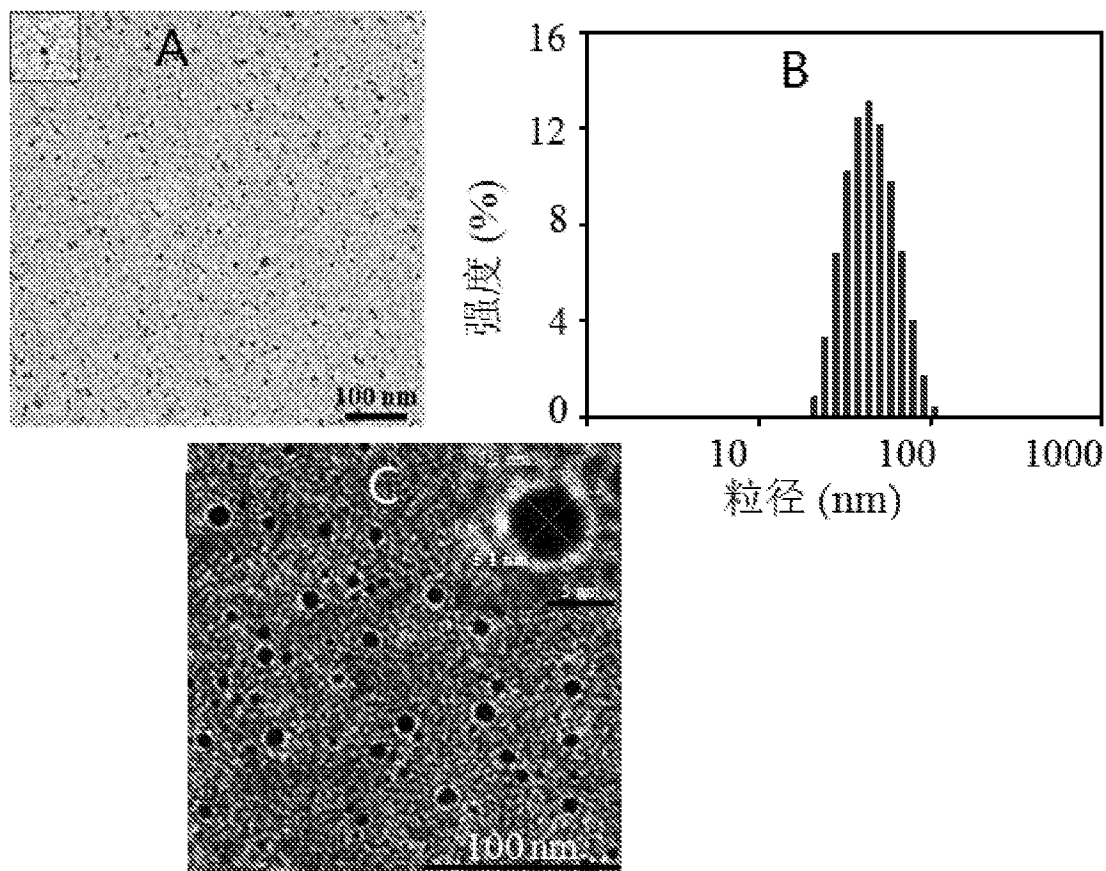


图 1

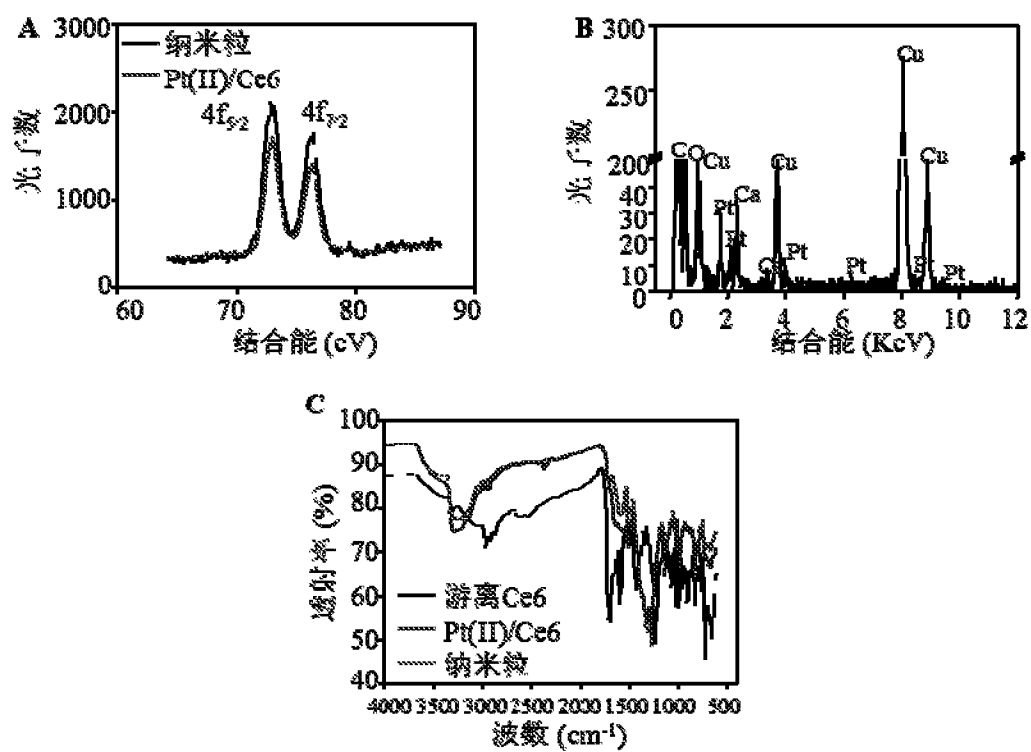


图 2

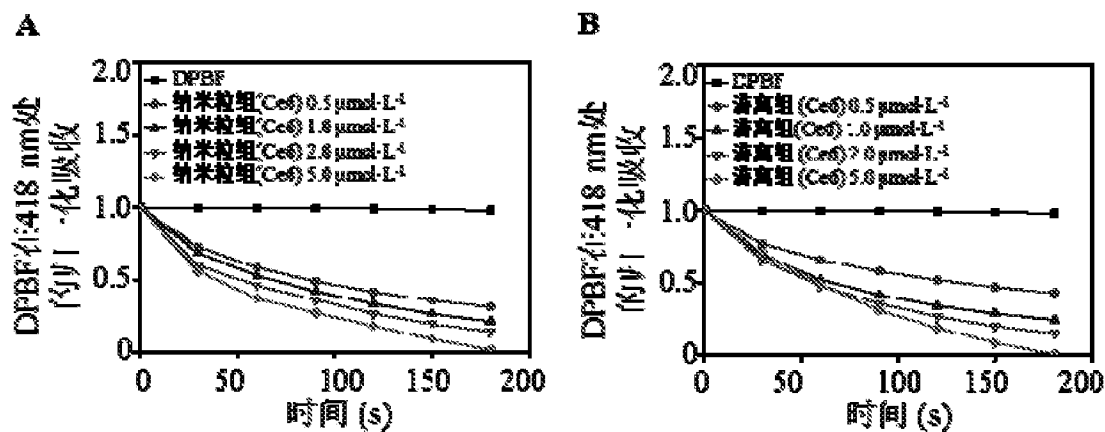


图 3

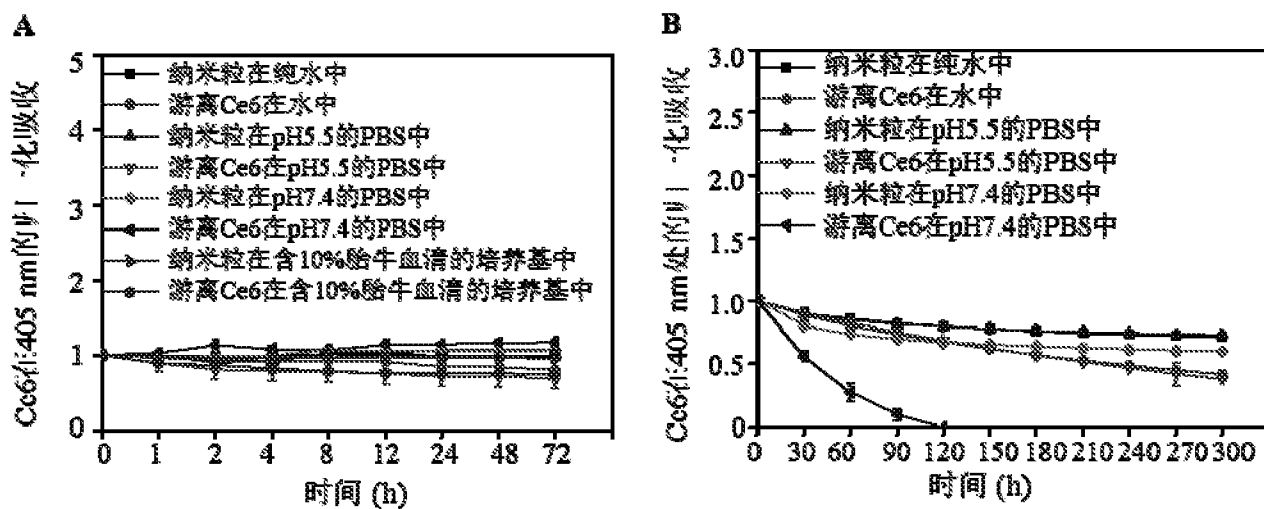


图 4

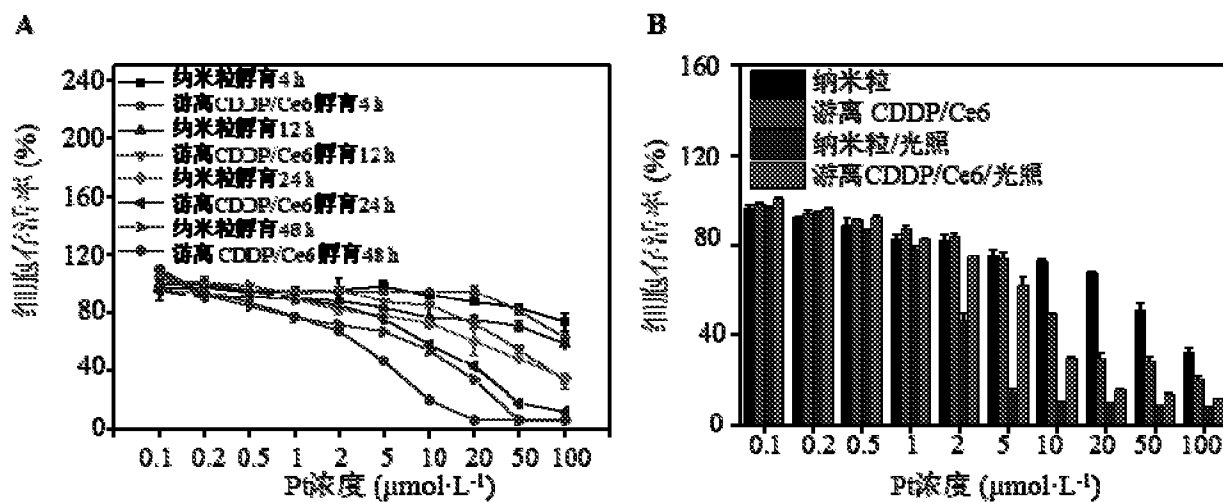


图 5

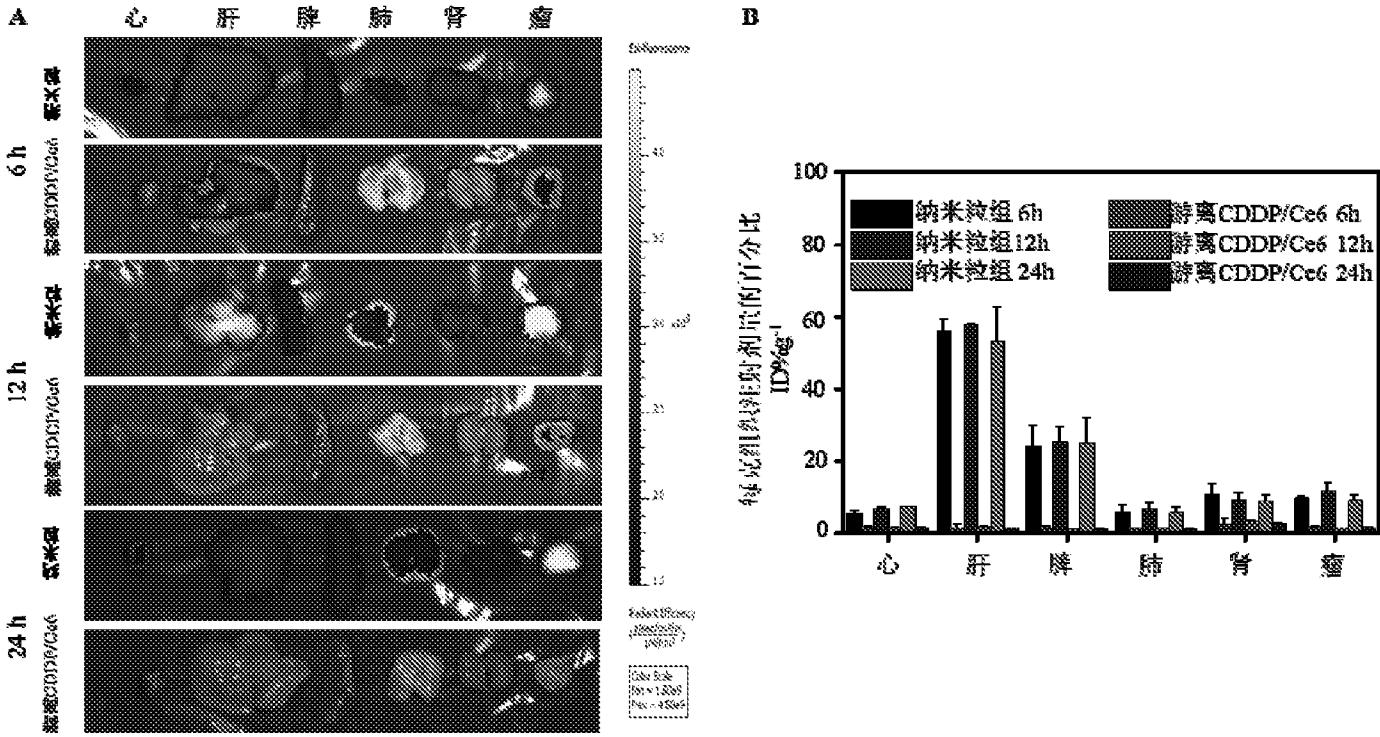


图 6

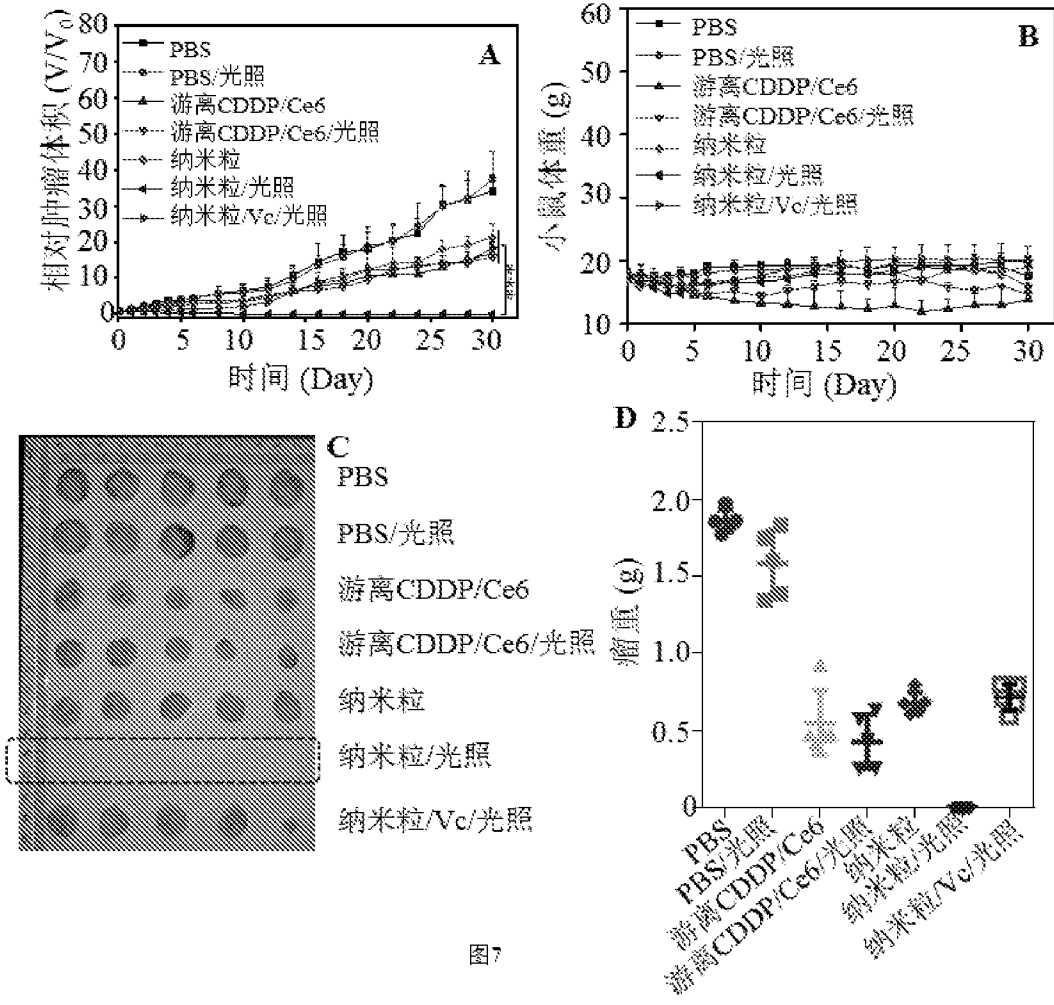


图7

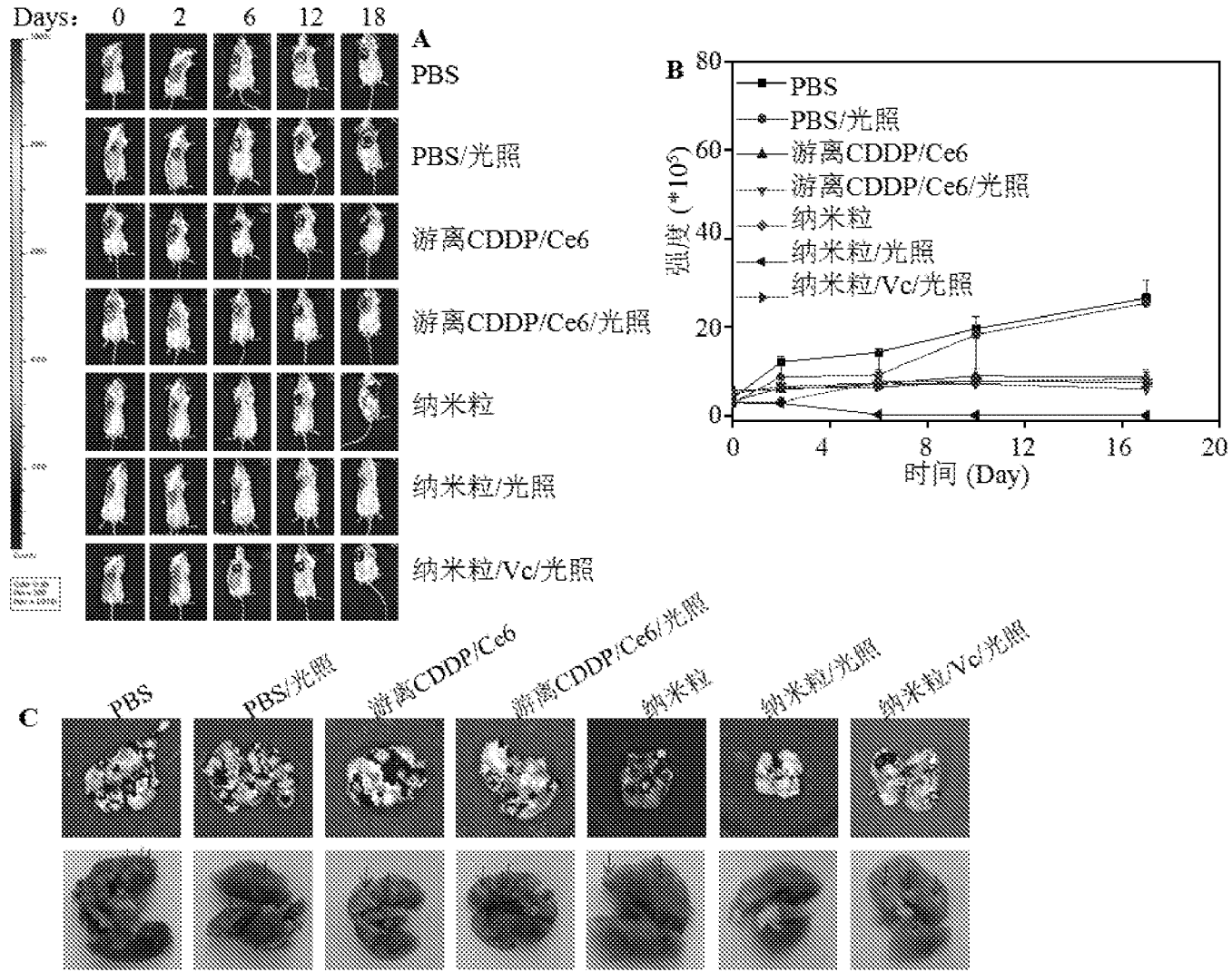


图 8

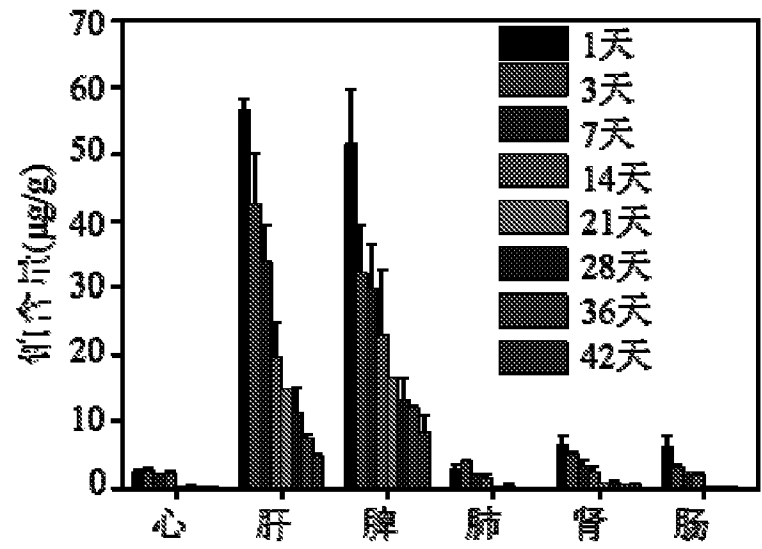


图 9

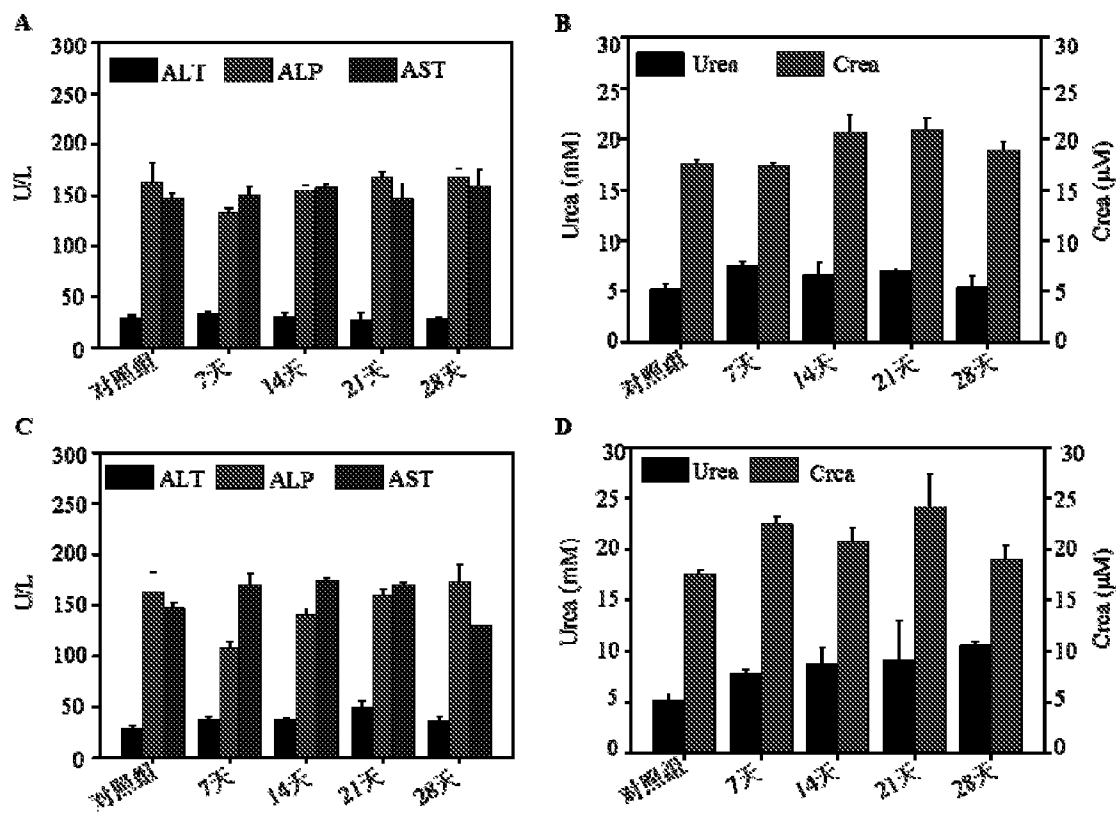


图 10

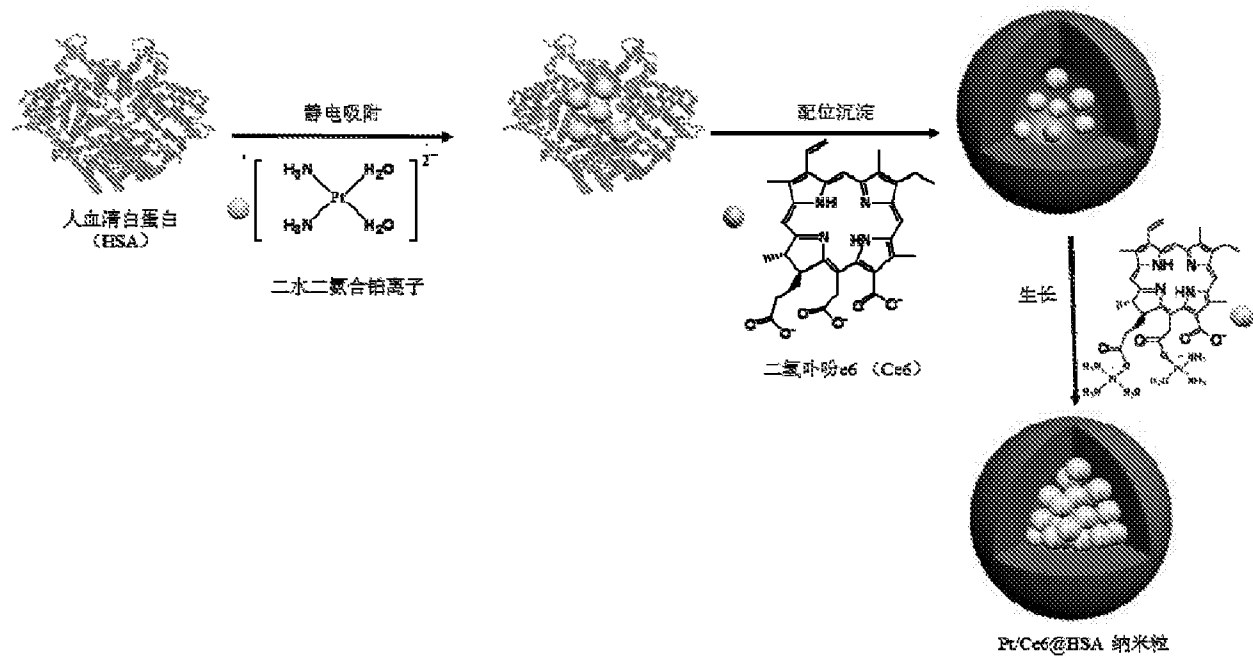


图 11

Pt/Ce6@HSA 纳米粒

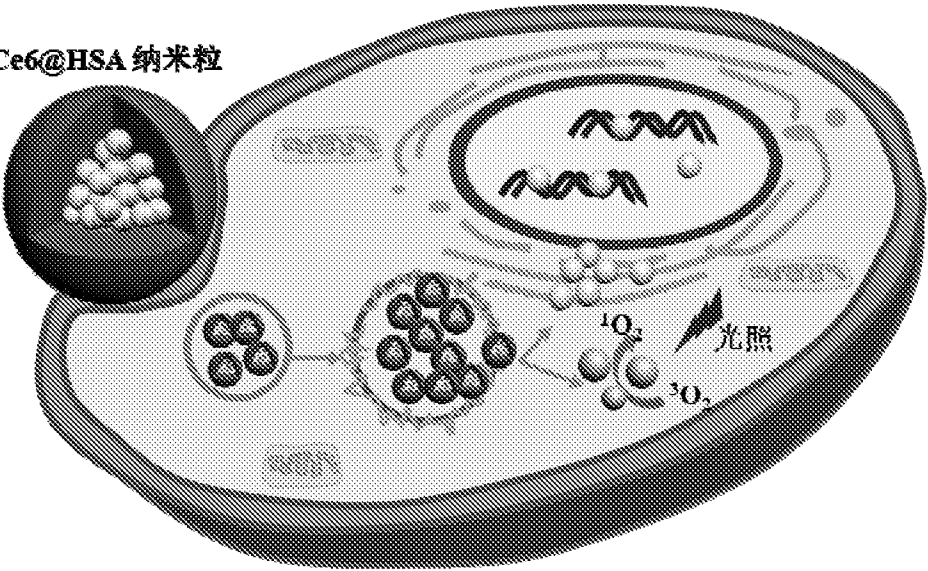


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/104637

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/14(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)i; A61K 31/409(2006.01)i; A61K 31/282(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; SIPOABS; VEN; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; CNKI; 中国药物专利数据库; 百度学术搜索; ISI-WEB OF SCIENCE; Pubmed; 顺铂, 顺氯氨铂铂类配合物, 二氢卟吩E6, 植物绿质, 人血清白蛋白, 人血清清蛋白, 纳米, 癌症, 肿瘤, cisplatin, platinol, DDP, chlorine E6, chlorin E6, Ce6, phytochlorin, phytochlorine, HSA, human serum albumin, nano, cancer, tumor, tumour

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104189916 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 10 December 2014 (2014-12-10) description abstract, claims 1-20, description paragraphs 0005-0206	1, 8-10
Y	CN 104189916 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 10 December 2014 (2014-12-10) description abstract, claims 1-20, description paragraphs 0005-0206	2-7
Y	CN 110368374 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 25 October 2019 (2019-10-25) description abstract, claims 1-10, description paragraphs 0004-0051	2-7
A	HU, Dehong et al. "Activatable albumin-photosensitizer nanoassemblies for triple-modal imaging and thermal-modulated photodynamic therapy of cancer" <i>Biomaterials</i> , Vol. 93, 31 March 2016 (2016-03-31), ISSN: 0142-9612, pp. 10-19	1-10



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

07 April 2021

Date of mailing of the international search report

20 April 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/104637

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOCANU, M.N. et al. "Ultrasound-assisted interaction between chlorin-e6 and human serum albumin: pH dependence, singlet oxygen production, and formulation effect" <i>Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy</i> , Vol. 190, 13 September 2017 (2017-09-13), ISSN: 1386-1425, pp. 208-214	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/104637

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104189916	A	10 December 2014	CN	104189916	B	10 May 2017
				CN	104162164	B	23 June 2017
				CN	104162164	A	26 November 2014
				CN	104162172	B	23 June 2017
				CN	104162172	A	26 November 2014
				CN	103495179	A	08 January 2014
				CN	104162165	A	26 November 2014
				CN	104162171	B	23 June 2017
				CN	104162171	A	26 November 2014
CN	110368374	A	25 October 2019	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/104637

A. 主题的分类 A61K 9/14(2006.01)i; A61K 47/42(2017.01)i; A61K 31/409(2006.01)i; A61K 31/282(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; SIPOABS; VEN; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; CNKI; 中国药物专利数据库; 百度学术搜索; ISI-WEB OF SCIENCE; Pubmed; 顺铂, 顺氯氨铂铂类配合物, 二氢卟吩E6, 植物绿质, 人血清白蛋白, 人血清清蛋白, 纳米, 癌症, 肿瘤, cisplatin, platinol, DDP, chlorine E6, chlorin E6, Ce6, phytochlorin, phytochlorine, HSA, human serum albumin, nano, cancer, tumor, tumour																	
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>CN 104189916 A (深圳先进技术研究院) 2014年 12月 10日 (2014 - 12 - 10) 说明书摘要, 权利要求1-20, 说明书第0005-0206段</td> <td>1、8-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104189916 A (深圳先进技术研究院) 2014年 12月 10日 (2014 - 12 - 10) 说明书摘要, 权利要求1-20, 说明书第0005-0206段</td> <td>2-7</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 110368374 A (苏州大学) 2019年 10月 25日 (2019 - 10 - 25) 说明书摘要, 权利要求1-10, 说明书第0004-0051段</td> <td>2-7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>HU, Dehong等. "Activatable albumin-photosensitizer nanoassemblies for triple-modal imaging and thermal-modulated photodynamic therapy of cancer" Biomaterials, 第93卷, 2016年 3月 31日 (2016 - 03 - 31), ISSN: 0142-9612, 第10-19页</td> <td>1-10</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	CN 104189916 A (深圳先进技术研究院) 2014年 12月 10日 (2014 - 12 - 10) 说明书摘要, 权利要求1-20, 说明书第0005-0206段	1、8-10	Y	CN 104189916 A (深圳先进技术研究院) 2014年 12月 10日 (2014 - 12 - 10) 说明书摘要, 权利要求1-20, 说明书第0005-0206段	2-7	Y	CN 110368374 A (苏州大学) 2019年 10月 25日 (2019 - 10 - 25) 说明书摘要, 权利要求1-10, 说明书第0004-0051段	2-7	A	HU, Dehong等. "Activatable albumin-photosensitizer nanoassemblies for triple-modal imaging and thermal-modulated photodynamic therapy of cancer" Biomaterials, 第93卷, 2016年 3月 31日 (2016 - 03 - 31), ISSN: 0142-9612, 第10-19页	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	CN 104189916 A (深圳先进技术研究院) 2014年 12月 10日 (2014 - 12 - 10) 说明书摘要, 权利要求1-20, 说明书第0005-0206段	1、8-10															
Y	CN 104189916 A (深圳先进技术研究院) 2014年 12月 10日 (2014 - 12 - 10) 说明书摘要, 权利要求1-20, 说明书第0005-0206段	2-7															
Y	CN 110368374 A (苏州大学) 2019年 10月 25日 (2019 - 10 - 25) 说明书摘要, 权利要求1-10, 说明书第0004-0051段	2-7															
A	HU, Dehong等. "Activatable albumin-photosensitizer nanoassemblies for triple-modal imaging and thermal-modulated photodynamic therapy of cancer" Biomaterials, 第93卷, 2016年 3月 31日 (2016 - 03 - 31), ISSN: 0142-9612, 第10-19页	1-10															
☒ 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 "&" 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期 2021年 4月 7日		国际检索报告邮寄日期 2021年 4月 20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 陈蕾 电话号码 (86-10)62411158															

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
A	MOCANU, M. N. 等. "Ultrasound-assisted interaction between chlorin-e6 and human serum albumin: pH dependence, singlet oxygen production, and formulation effect" Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 第190卷, 2017年 9月 13日 (2017 - 09 - 13), ISSN: 1386-1425, 第208-214页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/104637

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	104189916	A	2014年 12月 10日		CN	104189916	B	2017年 5月 10日
					CN	104162164	B	2017年 6月 23日
					CN	104162164	A	2014年 11月 26日
					CN	104162172	B	2017年 6月 23日
					CN	104162172	A	2014年 11月 26日
					CN	103495179	A	2014年 1月 8日
					CN	104162165	A	2014年 11月 26日
					CN	104162171	B	2017年 6月 23日
					CN	104162171	A	2014年 11月 26日
CN	110368374	A	2019年 10月 25日		无			