

(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
2023 年 10 月 26 日 (26.10.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/202092 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 47/58 (2017.01) **A61K 31/295** (2006.01)

A61K 47/60 (2017.01) **A61K 41/00** (2020.01)

A61K 47/69 (2017.01) **A61P 35/00** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/137412

(22) 国际申请日: 2022 年 12 月 8 日 (08.12.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202210428584.7 2022 年 4 月 22 日 (22.04.2022) CN

(71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTE 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: 龚萍 (GONG, Ping); 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)。马功成 (MA, Gongcheng); 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)。张鹏飞 (ZHANG, Pengfei); 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)。蔡林涛 (CAI, Lintao); 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)。刘中轲 (LIU, Zhongke); 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: 北京中巡通大知识产权代理有限公司 (BEIJING ZHONG XUN TONG DA INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国北京市西城区西直门外大街1号院2号楼7层7C1, Beijing 100044 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

(54) **Title:** NANOPARTICLE CAPABLE OF RELEASING CARBON MONOXIDE IN A RESPONSIVE MANNER, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种响应释放一氧化碳的纳米颗粒及其制备方法和应用

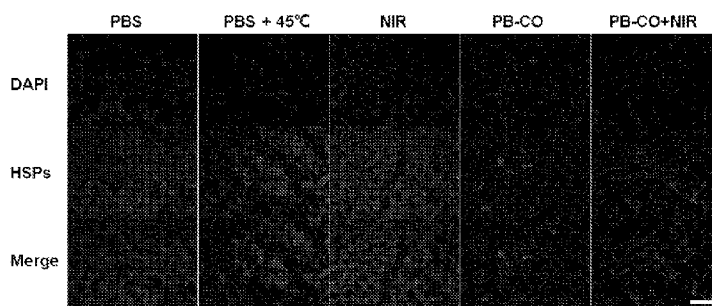


图 7

(57) **Abstract:** Disclosed in the present invention are a nanoparticle capable of releasing carbon monoxide in a responsive manner, a preparation method therefor and the use thereof. The nanoparticle comprises a shell and an inner core, wherein the shell comprises a carbonyl iron compound and a thiol-terminated polymer, the carbonyl iron compound and the thiol-terminated polymer are connected through a coordination reaction, and the inner core is a photo-thermal conversion agent. The preparation process of the present invention is simple and easy to implement and convenient to operate and popularize. The nanoparticle has a low toxicity to normal tissues while killing tumor tissues. The present invention provides a way for inhibiting heat shock protein by utilizing carbon monoxide gas molecules for the first time, thereby improving the effect of low-temperature photothermal therapy.

(57) 摘要: 本发明公开了一种响应释放一氧化碳的纳米颗粒及其制备方法和应用, 所述纳米颗粒包括外壳和内核, 所述外壳包括羰基铁类化合物和硫醇端基聚合物, 所述羰基铁类化合物和所述硫醇端基聚合物通过配位反应连接; 所述内核为光热转化剂。本发明的制备过程简便易行, 便于操作推广。该纳米颗粒在杀伤肿瘤组织的同时, 对正常组织毒性很低。本发明首次提出了利用一氧化碳气体分子抑制热休克蛋白, 进而提高低温光热治疗效果的途径。

GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))。

一种响应释放一氧化碳的纳米颗粒及其制备方法和应用

技术领域

5 本发明涉及纳米医学领域，特别涉及一种响应释放一氧化碳的纳米颗粒及其制备方法和应用。

背景技术

热疗是一种通过提高身体受癌症影响区域的温度进行治疗的策略。光热疗法（PTT）是热疗的光学版本，它利用光热转换剂将光能转换为热能以消融癌细胞。随着材料科学技术的飞速发展，各种近红外吸收能力强、转换效率高的光热剂被开发出来。例如，Halas将激光激发的金硅纳米壳（GSN）与磁共振-超声融合成像相结合，用于局部切除前列腺内的中低级别肿瘤。蔡林涛的团队制造了阿霉素（DOX）和吲哚菁绿（ICG）纳米颗粒（DINPs），它们可以同时将DOX和ICG输送到肿瘤区域进行联合化疗光热疗法。刘伟的研究小组利用白蛋白结合荧光团纳米粒的制备已成功用于原位小鼠结肠肿瘤和转移病灶的术中NIR-II荧光成像，在NIR-II荧光成像的指导下，经优化的PTT可完全治愈结肠癌小鼠。然而，高温PTT对周围的健康组织造成不可避免的威胁，并且由于难以阻止热扩散，可能诱发不良炎症。此外，在癌症治疗中，高温热消融会产生一些不良的生物学效应。

10

15

为了克服这些瓶颈，低温PTT被提出，它优先消除肿瘤，并在低温下促进伤口愈合，对正常组织的伤害不大。大量研究表明，低温PTT可以实现出色的治疗性能，从而实现实际的生物医学应用。虽然低温PTT有不同的温度阈值，人们认识到，大多数低温热疗都是在48℃以下的温度下进行的。人们普遍认为，由于热休克蛋白（HSPs）的表达升高，能够修复热损伤并通

20

过多种途径保护细胞免受凋亡，因此低温热疗的疗效可能会受到严重影响导致肿瘤热耐受的应激相关途径。

抑制HSPs在肿瘤中的表达一直是温和PTT的核心问题。在以前的研究中已经开发了一些HSPs抑制剂。一些小分子热休克蛋白抑制剂，如藤黄酸、雷公藤内酯醇、瑞替宁、STA-9090和17-AAG，已被设计为PCA，以增强肿瘤细胞中温和PTT蛋白（HSPs）的治疗效果，使其对热应激更敏感，提高癌细胞的PTT效率。在上游节点引入HSP-70 siRNA也可以阻断HSP的作用。最近，朱海良的团队引入了Hsp-70 siRNA，以阻断上游节点Hsps的影响，避免了传统HSPs抑制剂的副作用。刘军提出了一种创新策略，首次报道了基于单原子纳米酶（SAzyme）的铁下垂促进轻度PTT，使Pd-SAzyme介导的温和PTT成为可能。蔡林涛的团队开发了智能DC（IDC），负载有光热剂（IR-797）并涂有成熟DC膜的纳米颗粒组成。IDC进入淋巴结并刺激T细胞，活化的T细胞降低了HSPs的表达。但溶解度差、急性细胞毒性和血清不稳定性使这些抑制剂难以在复杂的肿瘤生理环境中完全沉默HSPs。

近年来，气体疗法在癌症治疗中越来越受到重视。气体疗法利用治疗/治疗辅助气体或其前体药物来抑制癌细胞的增殖和转移。作为一种信号分子，血红蛋白降解过程中产生的一氧化碳（CO）可以在应激和炎症中触发一系列细胞保护机制。正常机体通过血红素加氧酶-1（HO-1）基因的表达在压力增加的情况下产生CO，然而，该基因在癌细胞中无效。在合适的浓度范围内，CO可以逆转Warburg效应，选择性诱导细胞凋亡，抑制癌细胞的转移，而正常细胞则被诱导进入休眠状态，免受细胞毒性的影响。气体疗法以前曾用于癌症的治疗。例如何前军的团队开发了一种多级组装/拆卸策略，通过将线粒体靶向和线粒体内微环境-响应性前药封装在介孔二氧化硅纳米颗粒内，并通过逐步静电组装进一步包覆透明质酸，从而构建一种新的智能纳米药物，以分步分解的方式实现肿瘤组织-细胞-线粒体-靶向多

级输送和CO的控制释放。然而，还没有关于气体疗法抑制热休克蛋白的报道。

5 综上，光热疗法(PTT)是一种很有前途的肿瘤治疗方法。低温治疗(低于43℃)只能暂时抑制肿瘤生长，但不能完全使其消融。因此，在PTT过程中，需要组织温度超过50℃，以确保肿瘤完全死亡。然而高温热疗不仅破坏了癌细胞，而且通过热扩散破坏病变周围的正常组织，而低温光热对癌细胞的损伤很容易被应激诱导的热休克蛋白(HSPs)修复。因此，如何同时调节肿瘤组织中热休克蛋白的抑制水平，并且可以提供低温治疗的材料成为PTT研究的热点。基于此，开发一种具有光热转换和热休克蛋白消除能力
10 的简单纳米材料作为低温PTT的治疗剂势在必行。

发明内容

针对现有技术中的缺陷，本发明提出了一种能够响应癌症环境中过表达的过氧化氢释放CO，并且同时具有高光热转化效率和二区荧光转化效率的响应释放一氧化碳的纳米颗粒及其制备方法和应用。

15 本发明提供一种响应释放一氧化碳的纳米颗粒，包括外壳和内核，所述外壳包括羰基铁类化合物和硫醇端基聚合物，所述羰基铁类化合物和所述硫醇端基聚合物通过配位反应连接；所述内核为光热转化剂。

进一步的，所述羰基铁类化合物选自三羰基铁、五羰基铁、九羰基铁、十二羰基三铁中的任意一种。

20 进一步的，所述硫醇端基聚合物选自聚乙二醇类聚合物、聚丙烯类聚合物、聚苯乙烯类聚合物、聚丙烯乙酯类聚合物中的任意一种。

进一步的，所述硫醇端基聚合物的分子量为1000~8000。随着硫醇端基聚合物分子量的增加，载体中CO的负载量降低，随着硫醇端基聚合物的降低，则相反。硫醇端基聚合物和CO负载量相对比设值为X。随着硫醇端基
25 聚合物分子量和CO负载量变化时，载体的两亲性会发生变化。当X增加

时，载体会更加亲水，反之更加疏水，两种状态都不利于载体的使用。硫醇端基聚合物分子量小于 1000 时，载体水溶性不好，不易溶解。硫醇端基聚合物分子量大于 8000 时，载体的疏水端占比太小，不能有效载药。所以硫醇端基聚合物的分子量需要在 1000-8000 之间。

- 5 进一步的，所述光热转化剂为 Bodipy 类，七甲川菁类，AIE 类或聚合物类的二区荧光素中的任意一种。

所述 Bodipy 类选自 1,3,5,7-四甲基-8-苯基-4,4-二氟二氮杂丁烷，二氟{2-[1-(3,5-二甲基-2 H -吡咯-2-亚基- N)乙基]-3,5-二甲基-1 H -吡咯并- N }硼，Fmoc-Trp-BODIPY，WinterGreen carbamoyl imidazole photocage 等。

- 10 所述七甲川菁类选自 Cy5，Cy5.5，Cy7，IR-780，IR-820 等。

所述 AIE 类选自 MCH-PPV，PBPTB，TPA，TPE 等。

所述聚合物类的二区荧光素选自 PBPTV，PBTv，PCFDP 等。

本发明还提供所述的纳米颗粒的制备方法，包括如下步骤：

- 15 (1) 羰基铁类化合物和硫醇端基聚合物溶于四氢呋喃中，并在氮气流下搅拌；反应结束时，溶液由深蓝色变为棕黄色；冷却至室温，加入液态烷烃获得棕色沉淀，用有机溶剂洗涤并干燥后获得羰基铁载体；

(2) 将制备得到羰基铁载体的复溶在四氢呋喃中，冻存，将析出的结晶过滤后得到纯化的羰基铁载体；

- 20 (3) 将步骤(2)纯化后的羰基铁载体和光热转化剂溶解于四氢呋喃中。超声后，加入去离子水，用氮气吹出四氢呋喃，共沉淀；用超滤管离心并重复洗涤，共沉淀，形成稳定且均匀的纳米颗粒。

进一步的，步骤(1)中所述羰基铁类化合物和所述硫醇端基聚合物的质量比为 1：(4~8)。

- 25 进一步的，步骤(3)中所述纯化后的羰基铁载体和所述光热转化剂的质量比为 (5~15)：1。

进一步的，步骤（1）所述氮气流温度为 50-120℃，搅拌时间为 1-12 h。

本发明还提供一种抑制热休克蛋白的方法，包括使用所述的纳米颗粒。热休克蛋白是一种保护蛋白，抑制一些微生物或者细菌中的热休克蛋白也能够起到杀死它们的作用。研究领域通过抑制热休克蛋白来进行生理研究，
5 比如通过抑制热休克蛋白，研究大脑，心脏等各种组织部位对外界刺激（高温，寒冷，电刺激，气体等）的应激反应。因此，热休克蛋白的激活或者抑制状态不与疾病直接相关。

本发明还提供所述的纳米颗粒在制备抗肿瘤药物中的应用。

综上，与现有技术相比，本发明达到了以下技术效果：

- 10 1. 本发明的制备方法简便易行，仅需两步便可成功制备，便于操作推广。
2. 本发明的纳米颗粒在杀伤肿瘤组织的同时，对正常组织毒性很低。
3. 本发明制备的纳米颗粒在正常环境中能够稳定存在，7 天后未出现沉降、凝絮现象。
- 15 4. 本发明首次提出了利用一氧化碳气体分子抑制热休克蛋白，进而提高低温光热治疗效果的途径。

附图说明

为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案，下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍，应当理解，以下附图仅示出了本发明的某些
20 实施例，因此不应被看作是对范围的限定，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相关的附图。

图 1 为本发明实施例 1 中 PBCO 的制备流程图；

图 2 为本发明实施例 2 中 PBCO 的紫外光谱图；

图 3 为本发明实施例 2 中水合粒径分析仪下 PBCO 的粒径；

图 4 为本发明实施例 3 中 PBCO 的光热转化效率；

图 5 为本发明实施例 4 中 CCK-8 实验证明 PBCO 对癌细胞的细胞毒性；

图 6 为本发明实施例 5 中 PBCO 对原位乳腺癌瘤的治疗效果；

图 7 为本发明实施例 6 中 PBCO 抑制肿瘤中 HSP 的表达结果。

5 具体实施方式

为了使本技术领域的人员更好地理解本发明方案，下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分的实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例，都应当属于本发明保护的范围。

本发明首先通过配位反应构建了基于羰基金属的聚合物载体。该载体能够同时存储和响应活性氧簇释放 CO。通过硫醇与羰基金属络合物的配位反应，对聚合物末端的羰基铁化合物进行改性，得到了一种新型两亲性聚合物 PG-CO。由于金属络合物的强疏水性，PG-CO 在氯仿中分散成分子状态，而在水中聚集成纳米颗粒。在活性氧(ROS)存在的情况下，PG-CO 会通过类 Fenton 反应释放出足够的 CO 气体，羰基铁侧会氧化为氧化铁，导致颗粒沉积。由于缺乏 ROS，PG-CO 在正常细胞组织中不会释放 CO，而在 ROS 过度表达的肿瘤微环境中，PG-CO 会逐渐释放 CO 并沉积在肿瘤部位进行长期治疗。

之后，将光热转化剂(PB)与聚合物载体 PG-CO 自组装构建了一种响应释放一氧化碳的纳米颗粒。它不仅具有近红外双区(NIR-II)荧光和高光热效率，而且能响应肿瘤微环境中过度表达的过氧化氢进而选择性地释放 CO。释放的 CO 不仅能够抑制癌细胞的增殖和转移，还能有效抑制热休克蛋白(HSPs)表达，显著降低了热休克蛋白的水平，在温和 PTT 过程中破坏肿瘤热阻，诱导肿瘤细胞凋亡，大大提高了低温 PPT 的疗效。

本发明的纳米颗粒提供了一种有效进行低温 PTT 的治疗手段，这是首次利用 CO 气体抑制 PTT 治疗过程中表达的 HSPs，从而提高治疗效果的技术。

本发明的纳米颗粒的制备方法，如图 1 所示，步骤如下：

5 (1) 羰基铁类化合物和硫醇端基聚合物溶于四氢呋喃中，并在氮气流下搅拌；反应结束时，溶液由深蓝色变为棕黄色；冷却至室温，加入液态烷烃获得棕色沉淀，用有机溶剂洗涤并干燥后获得羰基铁载体。

(2) 将制备得到羰基铁载体的复溶在四氢呋喃中，在-20℃环境中冻存 5-24 h，将析出的结晶过滤后得到纯化的羰基铁载体。

10 (3) 将步骤(2)纯化后的羰基铁载体和光热转化剂溶解于四氢呋喃中。超声后，加入去离子水，用氮气吹出四氢呋喃，共沉淀；用超滤管离心并重复洗涤，共沉淀，形成稳定且均匀的纳米颗粒。

其中，羰基铁类化合物选自三羰基铁、五羰基铁、九羰基铁、十二羰基三铁中的任意一种。以下实施例以十二羰基三铁为例，三羰基铁、五羰基铁、九羰基铁均具有相似的理化性质，因此本领域技术人员可以知晓采用三羰基铁、五羰基铁、九羰基铁均能实现本发明的技术方案。

15 硫醇端基聚合物选自巯基聚乙二醇、巯基聚丙烯、巯基聚苯乙烯、巯基聚丙烯乙酯中的任意一种。以下实施例以巯基聚乙二醇为例，巯基聚丙烯、巯基聚苯乙烯、巯基聚丙烯乙酯均具有相似的理化性质，因此本领域技术人员可以知晓采用巯基聚丙烯、巯基聚苯乙烯、巯基聚丙烯乙酯均能实现本发明的技术方案。

25 光热转化剂为 Bodipy 类，七甲川菁类，AIE 类或聚合物类的二区荧光素中的任意一种。以下实施例以 PBPTV 染料为例，其他上述光热转化剂均具有相似的理化性质，因此本领域技术人员可以知晓采用其他上述光热转化剂均能实现本发明的技术方案。

实施例 1 本发明的纳米颗粒的制备

本实施例使用十二羰基三铁与硫醇的取代反应来修饰甲基聚乙二醇类聚合物甲氧基聚乙二醇硫醇 (mPEG-SH) 的一端, 来作为活性氧 (ROS) 响应性两亲性聚合物载体 PG-CO。具体的准备过程如下, 十二羰基三铁 (5-100 mg) 和 mPEG-SH (M.W. $\approx$ 2000) (100-600 mg) 溶于四氢呋喃 (THF) 中, 并在 50-120 $^{\circ}$ C 和氮气流下搅拌 1-12 h。反应结束时, 溶液由深蓝色变为棕黄色。冷却至室温, 加入正己烷以获得棕色沉淀, 用乙醚洗涤并干燥后获得 PG-CO。将 PG-CO 复溶在 THF 中, 在 -20 $^{\circ}$ C 环境中冻存 5-24 h, 将析出的结晶过滤后得到新型智能羰基铁载体 PG-CO。PG-CO 是一种棕色固体, 可溶解于水和有机溶液中。其中, mPEG2000-SH 可以替换为 mPEG5000-SH, mPEG8000-SH, SH-mPEG2000-SH 或 SH-mPEG8000-SH 等。

PG-CO 可以用于包覆各种小分子药物、聚合物药物、荧光探针、纳米颗粒等。例如利用 FPG-CO 包覆聚合物荧光探针 TPB、PBPTV, Bodipy 等。首先将 1-50 mg PG-CO 和 5-10 mg PBPTV 染料溶解于 THF 中。超声 5-10 min 后, 加入 10 ml 去离子水, 用氮气吹出 THF, 共沉淀。用超滤管离心 5 分钟并重复洗涤 3 次, 采用共沉淀来形成稳定且均匀的纳米颗粒。

实施例 2 本发明的纳米颗粒的紫外光谱和粒径

将 PB-CO 和 PBPTV 溶于纯水, 终浓度 5-10mM, 取 0.5-1mL 于比色皿, 用紫外分光光度计测量其从 300-650nm 范围内紫外吸收。结果如附图 2。

将纳米颗粒溶于纯水, 终浓度 5-10mM, 取 0.5-1mL 于比色皿, 用 DLS 粒径仪测量其平均粒径。结果如图 3, 纳米颗粒平均粒径 158nm 左右。

实施例 3 本发明的纳米颗粒的光热转化效率

将纳米颗粒溶于纯水, 终浓度 50-100mM, 取 0.5-1mL 于离心管, 用 808nm 激光探头对其照射 3min, 同时用红外摄像头检测纳米颗粒溶液的

温度变化。3min 后关闭激光探头，待其自然冷却，同时记录其温度变化。结果如图 4，可以看到起初 2.5min 溶液升温速度很快，而且升温所需时间基本与降温时间相同。

实施例 4 本发明的纳米颗粒对癌细胞的细胞毒性

5 用 96 孔板培养 4T1 乳腺癌细胞，外圈为 PBS，孔板中间每一列 6 个孔作为一组，在第二天向培养孔中加入 10-20 μL 不同浓度 PBCO 溶液或 PBPTV 染料，其浓度分别为 0,10-20,30-40,40-60,60-80,80-100 $\mu\text{g/mL}$ 。然后培养箱中培养 24h，然后加入 MTT 染料，用酶标仪检测孔板中细胞存活率，作为第一组数据。

10 同上，将 PBCO 溶液换成相同浓度的 PBPTV 溶液或纳米颗粒溶液，检测细胞存活率作为第二、三组数据。

在上述三组实验中，在加入载体 PBCO、染料 PBPTV、纳米颗粒后，用 808nm 激光照射孔板 1-2min，同样培养 24h 检测细胞存活率，依次作为第四、五、六组数据。

15 结果如图 5，横坐标是浓度，从左到右是 0-100，而每个浓度中不同颜色柱子从左到右分别为 PBCO、PBPTV、纳米颗粒、PBCO 加光照、PBPTV 加光照、纳米颗粒加光照。从图中可以看到染料 PBPTV 不管什么浓度对癌细胞生长都没有抑制作用，而 PBCO 和纳米颗粒对癌细胞的抑制作用则随浓度增加而增大。而相同浓度中对癌细胞抑制效果从大到小分别为
20 为纳米颗粒加光照、载体 PBCO 加光照、载体 PBCO、纳米颗粒。

实施例 5 本发明的纳米颗粒对原位乳腺癌瘤的治疗效果

取两组 4T1 荷瘤 BALB/c 小鼠，每组 5 只，一组小鼠只注射 0.5-1mL 浓度 20-30mM 的纳米颗粒溶液，另一组注射 0.5-1mL 浓度 20-30mM 的纳米颗粒溶液，12 小时后，用 808nm NIR 照射每只小鼠的肿瘤部位 1-2min。
25 之后每 2 天记录小鼠肿瘤体积，直到第 18 天处死小鼠。肿瘤体积变化结果如图 6，只注射 PBCO 的小鼠肿瘤体积虽受到抑制但仍然在增长，而注

射 PBCO 后进行光热治疗的小鼠肿瘤体积则几乎没有变化,对肿瘤的生长起到了很大的抑制作用。

实施例 6 本发明的 PBCO 载体对肿瘤中热休克蛋白的抑制作用

4T1 荷瘤 BALB/c 小鼠分为八组,每组五只 12h 后,用 808nm NIR 照射肿瘤区域。每 2 天记录小鼠肿瘤体积和重量。在第 18 天处死这些小鼠,获取主要器官和肿瘤进行组织学检查。

对五只同期种瘤小鼠的肿瘤作不同处理:注射 0.5-1mLPBS;注射 0.5-1mLPBS 且 45℃保持 5-10min;功率 4-5W 的 808nm 激光器照射 3-5min;注射 0.5-1mL 浓度 20-30mM 的 PBCO 溶液;注射 0.5-1mL 浓度 20-30mM 的 PBCO 溶液且用功率 4-5W 的 808nm 激光器照射 3-5min。将小鼠肿瘤组织取出浸入福尔马林液中 40-50 小时,蜡块包埋。制成石蜡切片后常规脱蜡至水,进行抗原热修复。滴加一抗,37℃恒温箱孵育 1 小时,用 PBS 清洗,滴加二抗,37℃恒温箱孵育 1 小时,用 PBS 清洗,滴加 DAPI 染料,37℃恒温箱孵育 10 分钟,用 PBS 清洗,DBA 显色,常规复染后封片。共聚焦显微镜观察,结果如附图 7,表明 PBCO 可以抑制肿瘤中 HSP 的表达。

综合以上实施例,本发明的纳米颗粒在肿瘤组织中能够特异性释放 CO 从而抑制癌症增殖,具有高光热转化效率能够在局部提供有效的光热治疗效果,对正常组织中毒性较低,所提供的 CO 气体能够显著降低低温光热治疗过程中热休克蛋白的表达,从而提高治疗效果。

以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种响应释放一氧化碳的纳米颗粒，其特征在于，包括外壳和内核，所述外壳包括羰基铁类化合物和硫醇端基聚合物，所述羰基铁类化合物和所述硫醇端基聚合物通过配位反应连接；所述内核为光热转化剂。

5 2. 根据权利要求 1 所述的纳米颗粒，其特征在于，所述羰基铁类化合物选自三羰基铁、五羰基铁、九羰基铁、十二羰基三铁中的任意一种。

3. 根据权利要求 1 所述的纳米颗粒，其特征在于，所述硫醇端基聚合物选自聚乙二醇类聚合物、聚丙烯类聚合物、聚苯乙烯类聚合物、聚丙烯乙酯类聚合物中的任意一种。

10 4. 根据权利要求 1 所述的纳米颗粒，其特征在于，所述硫醇端基聚合物的分子量为 1000~8000。

5. 根据权利要求 1 所述的纳米颗粒，其特征在于，所述光热转化剂为 Bodipy 类，七甲川菁类，AIE 类或聚合物类的二区荧光素中的任意一种。

15 6. 权利要求 1-5 任一项所述的纳米颗粒的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

（1）羰基铁类化合物和硫醇端基聚合物溶于四氢呋喃中，并在氮气流下搅拌；反应结束时，溶液由深蓝色变为棕黄色；冷却至室温，加入液态烷烃获得棕色沉淀，用有机溶剂洗涤并干燥后获得羰基铁载体；

20 （2）将制备得到羰基铁载体的复溶在四氢呋喃中，冻存，将析出的结晶过滤后得到纯化的羰基铁载体；

（3）将步骤（2）纯化后的羰基铁载体和光热转化剂溶解于四氢呋喃中，超声后，加入去离子水，用氮气吹出四氢呋喃，共沉淀；用超滤管离心并重复洗涤，共沉淀，形成稳定且均匀的纳米颗粒。

25 7. 根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，步骤（1）中所述羰基铁类化合物和所述硫醇端基聚合物的质量比为 1：（4~8）。

8. 根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，步骤（3）中所述纯化后的羰基铁载体和所述光热转化剂的质量比为（5~15）：1。

9. 根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，步骤（1）中所述氮气流温度为 50-120℃，搅拌时间为 1-12 h。

5 10. 一种抑制热休克蛋白的方法，其特征在于，包括使用权利要求 1~5 任一项所述的纳米颗粒。

11. 权利要求 1-5 任一项所述的纳米颗粒在制备抗肿瘤药物中的应用。

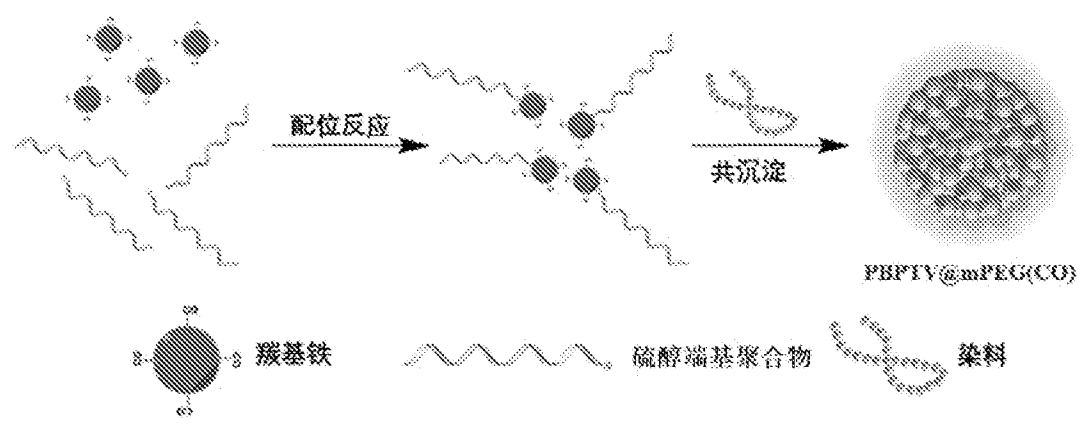


图 1

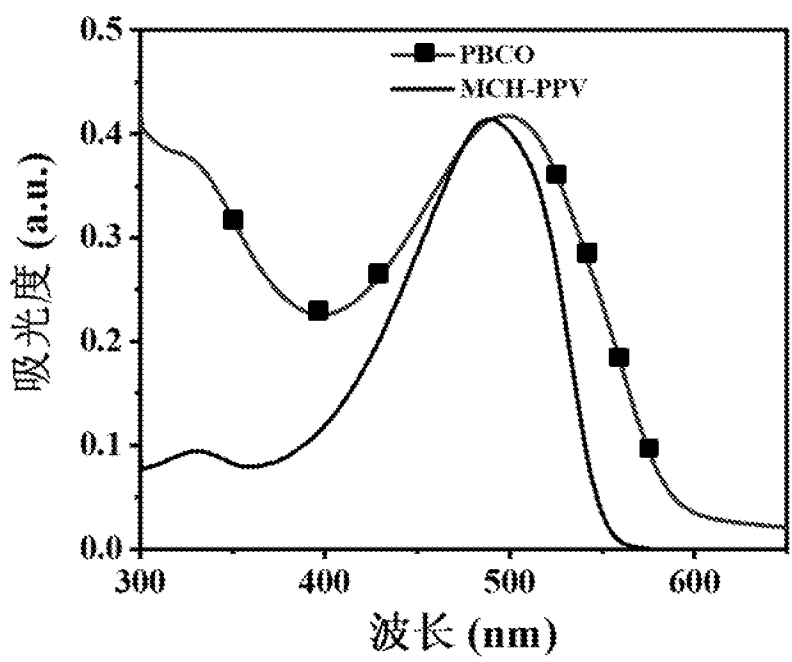


图 2

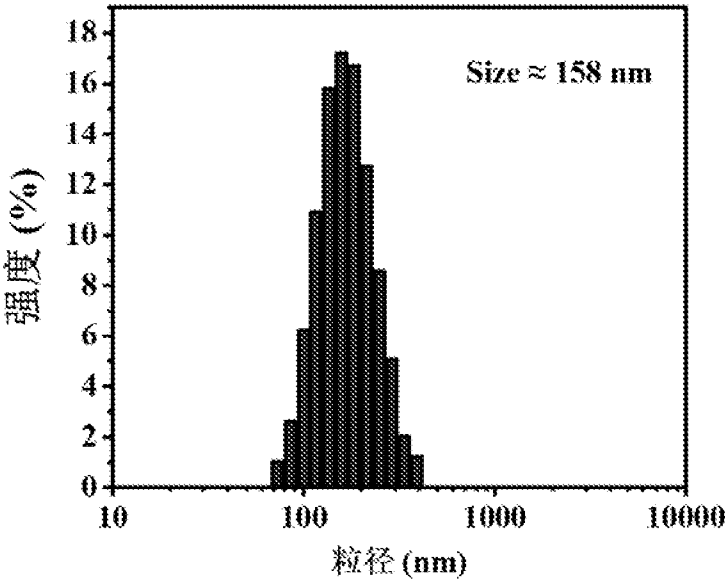


图 3

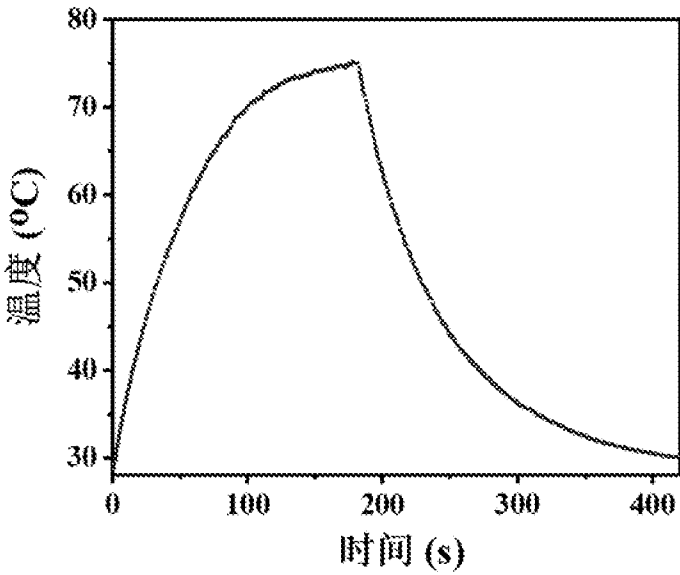


图 4

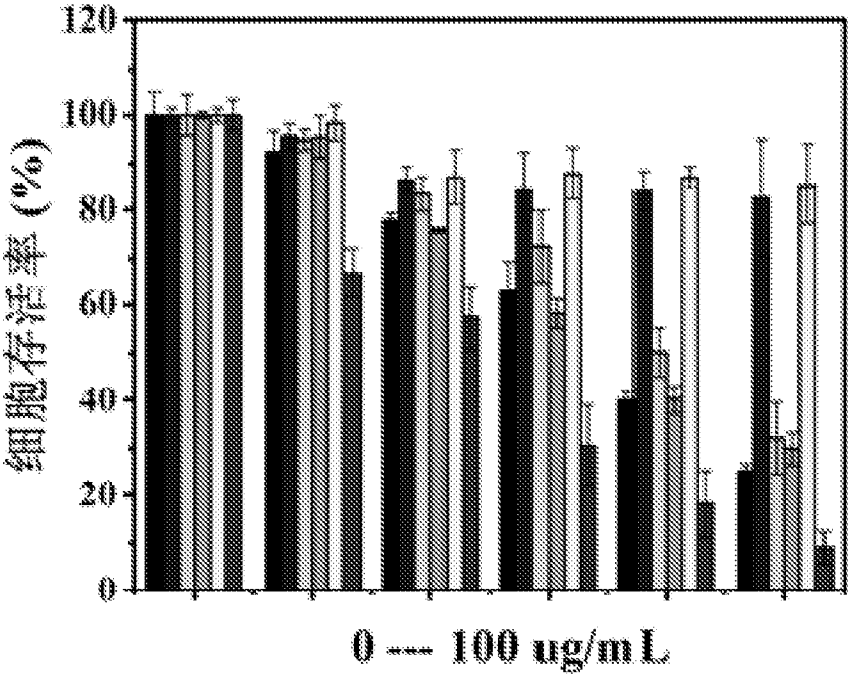


图 5

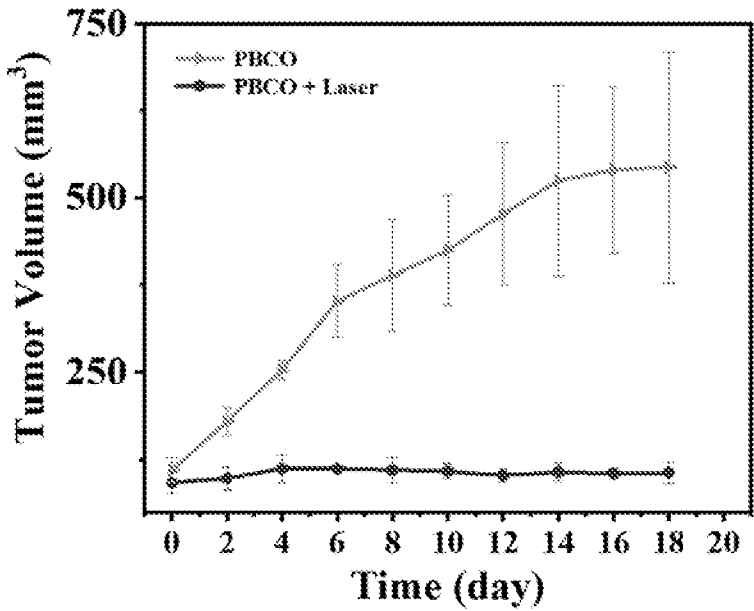


图 6

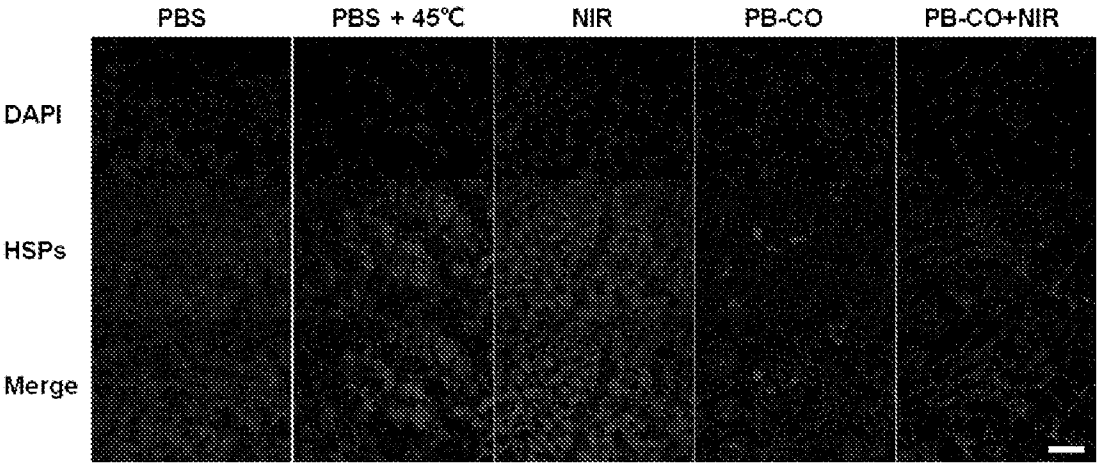


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/137412

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K47/58(2017.01)i;A61K47/60(2017.01)i;A61K47/69(2017.01)i;A61K31/295(2006.01)i;A61K41/00(2020.01)i;A61P35/00(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)

IPC: 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)

CNXTX; CNABS; ENTXTX; WPABSC; VEN; ENTXT; CJFD; CNKI; 万方, Wanfang; 读秀, Duxiu; ISI_Web of Science; Elsevier Science; SpringerLink; PubMed; 深圳先进技术研究, 龚萍, 马功成, 张鹏飞, 蔡林涛, 刘中轲, 一氧化碳, 羰基铁, 羰基, 热休克蛋白, 光热, 低温, 温和, 疏醇, 疏基, 肿瘤, 癌, ShenZhen Institutes of Advanced Technology, Gong Ping, Ma Gongcheng, Zhang Pengfei, Cai Lintao, Liu Zhongke, carbon monoxide, CO, carbonyl, iron, Fe, heat shock protein, HSP, photothermal, hypothermia, mild, PTT, mPTT, thiol, mercapto, mercaptan, sulfhydryl, hydrosulfuryl, hydrosulphonyl, tumor, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114931649 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) 23 August 2022 (2022-08-23) claims 1-11	1-11
PX	CN 115010939 A (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) 06 September 2022 (2022-09-06) description, paragraphs [0004]-[0022], [0032]-[0041], [0055]	1-11
PX	MA, Gongcheng et al. "H ₂ O ₂ -Responsive NIR-II AIE Nanobomb for Carbon Monoxide Boosting Low-Temperature Photothermal Therapy" <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> , Vol. vol. 61, 29 July 2022 (2022-07-29), pp. 1-5	1-11



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
 "D" document cited by the applicant in the international application
 "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

20 February 2023

Date of mailing of the international search report

03 March 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/137412

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LI, Weipeng et al. "Controllable CO Release Following Near-Infrared Light-Induced Cleavage of Iron Carbonyl Derivatized Prussian Blue Nanoparticles for CO-Assisted Synergistic Treatment" <i>ACS Nano</i> , Vol. vol. 10, 29 November 2016 (2016-11-29), pp. 11027-11036, in particular abstract	1-11
A	WANG, Ya et al. "Mitoxantrone as Photothermal Agents for Ultrasound/Fluorescence Imaging-Guided Chemo-Phototherapy Enhanced by Intratumoral H2O2-Induced CO" <i>Biomaterials</i> , 11 May 2020 (2020-05-11), pp. 1-10	1-11
A	CAO, Yuanyuan et al. "Innovative Strategies to Boost Photothermal Therapy at Mild Temperature Mediated by Functional Nanomaterials" <i>Materials & Design</i> , 10 January 2022 (2022-01-10), pp. 1-22	1-11
A	YI, Xiulin et al. "Low-Temperature Photothermal Therapy: Strategies and Applications" <i>Research</i> , Vol. 2021, 07 May 2021 (2021-05-07), pp. 1-38	1-11

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 10 relates to a method for inhibiting a heat shock protein, which comprises a method for treatment of the living human or animal body, and falls within subject matter for which no search is required by the International Searching Authority (PCT Rule 39.1).

With regard to claim 10, the reasonably expected amendment is made as follows:

the use of the nanoparticle of any one of claims 1-5 in the preparation of a heat shock protein inhibitor.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/137412

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	114931649	A	23 August 2022	None	
CN	115010939	A	06 September 2022	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/137412

A. 主题的分类

A61K47/58(2017.01)i;A61K47/60(2017.01)i;A61K47/69(2017.01)i;A61K31/295(2006.01)i;A61K41/00(2020.01)i;
A61P35/00(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)

IPC: 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))

CNXTX;CNABS;ENTXTC;WPABSC;VEN;ENTXT;CJFD;CNKI;万方;读秀;ISI_Web of Science;Elsevier Science;SpringerLink;PubMed; 深圳先进技术研究院, 龚萍, 马功成, 张鹏飞, 蔡林涛, 刘中轲, 一氧化碳, 羰基铁, 羰基, 热休克蛋白, 光热, 低温, 温和, 硫醇, 巯基, 肿瘤, 癌, ShenZhen Institutes of Advanced Technology, Gong Ping, Ma Gongcheng, Zhang Pengfei, Cai Lintao, Liu Zhongke, carbon monoxide, CO, carbonyl, iron, Fe, heat shock protein, HSP, photothermal, hypothermia, mild, PTT, mPTT, thiol, mercapto, mercaptan, sulfhydryl, hydrosulfonyl, hydrosulphonyl, tumor, cancer

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

PX

CN 114931649 A (深圳先进技术研究院) 2022年8月23日 (2022 - 08 - 23)
权利要求1-11

1-11

PX

CN 115010939 A (深圳先进技术研究院) 2022年9月6日 (2022 - 09 - 06)
说明书第[0004]-[0022]、[0032]-[0041]、[0055]段

1-11

PX

MA, Gongcheng 等. "H2O2-Responsive NIR-II AIE Nanobomb for Carbon Monoxide
Boosting Low-Temperature Photothermal Therapy"
Angew. Chem. Int. Ed., 第61卷, 2022年7月29日 (2022 - 07 - 29),
第1-5页

1-11

☒ 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

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“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

2023年2月20日

国际检索报告邮寄日期

2023年3月3日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局

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

李黎

电话号码 (+86) 0512-88996459

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	LI, Weipeng 等. "Controllable CO Release Following Near-Infrared Light-Induced Cleavage of Iron Carbonyl Derivatized Prussian Blue Nanoparticles for CO-Assisted Synergistic Treatment" ACS Nano, 第10卷, 2016年11月29日 (2016 - 11 - 29), 第11027-11036页, 尤其是摘要	1-11
A	WANG, Ya 等. "Mitoxantrone as Photothermal Agents for Ultrasound/Fluorescence Imaging-Guided Chemo-Phototherapy Enhanced by Intratumoral H2O2-Induced CO" Biomaterials, 2020年5月11日 (2020 - 05 - 11), 第1-10页	1-11
A	CAO, Yuanyuan 等. "Innovative Strategies to Boost Photothermal Therapy at Mild Temperature Mediated by Functional Nanomaterials" Materials & Design, 2022年1月10日 (2022 - 01 - 10), 第1-22页	1-11
A	YI, Xiulin 等. "Low-Temperature Photothermal Therapy: Strategies and Applications" Research, 第2021卷, 2021年5月7日 (2021 - 05 - 07), 第1-38页	1-11

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 10
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求10涉及一种抑制热休克蛋白的方法，其中包括对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT细则39.1定义的不要国际检索单位检索的主题。
针对权利要求10合理预期的修改如下：
权利要求1-5任一项所述的纳米颗粒在制备热休克蛋白抑制剂中的应用。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/137412

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	114931649	A	2022年8月23日	无	
CN	115010939	A	2022年9月6日	无	