

(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 7 月 2 日 (02.07.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/132980 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 49/00 (2006.01) *A61K 9/51* (2006.01)
A61K 47/34 (2017.01) *A61K 35/74* (2015.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/124022
- (22) 国际申请日: 2018 年 12 月 26 日 (26.12.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (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: 刘陈立 (LIU, Chenli); 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)。黄建东 (HUANG, Jiandong); 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)。臧中盛 (ZANG, Zhongsheng); 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)。常志广 (CHANG, Zhiguang); 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)。

夏霖 (XIA, Lin); 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)。曾正阳 (ZENG, Zhengyang); 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)。王伟 (WANG, Wei); 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(54) Title: BACTERIUM-PHOTOTHERMAL NANOPARTICLE COMPLEX, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 细菌-光热纳米颗粒复合物及制备方法和应用

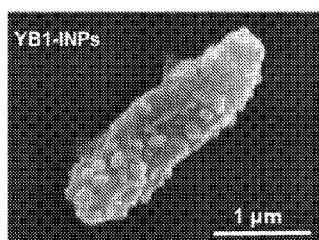


图 3

(57) Abstract: Disclosed are a bacterium-photothermal nanoparticle complex, a preparation method therefor and the use thereof, wherein same relate to the technical field of nanomedicine, the bacterium-photothermal nanoparticle complex comprises a photothermal nanoparticle and a bacterium, and the bacterium and the photothermal nanoparticle are connected by a chemical bond. The present invention improves the existing technical problem of the poor therapeutic effect of using bacteria to treat tumors, and also provides a bacterium-photothermal nanoparticle complex, wherein by chemically bonding a photothermal nanoparticle to a bacterium, the complex not only improves the safety and targeting of the bacterium in bodies, but can also realize the combination of bacterial therapy and photothermal therapy, and at the same time, same can also trace and image bacteria and tumors, and can effectively improve the effectiveness of tumor treatment.

(57) 摘要: 一种细菌-光热纳米颗粒复合物及制备方法和应用, 涉及纳米医学技术领域, 所述细菌-光热纳米颗粒复合物包括光热纳米颗粒和细菌, 所述细菌与所述光热纳米颗粒通过化学键连接。改善现有采用细菌治疗肿瘤, 治疗效果不佳的技术问题, 还提供细菌-光热纳米颗粒复合物, 通过将光热纳米颗粒化学键合于细菌上, 不仅提高了细菌在体内的安全性和靶向性, 而且能够实现细菌治疗和光热治疗的联合, 同时还能够对细菌和肿瘤进行示踪和成像, 能够有效提高肿瘤治疗的有效性。

(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))。

细菌-光热纳米颗粒复合物及制备方法和应用

技术领域

本申请涉及纳米医学技术领域，尤其是涉及一种细菌-光热纳米颗粒复合物及制备方法和应用。

背景技术

癌症严重威胁着人类的健康，目前在临床上的治疗方法包括手术切除、放射性治疗、化学药物治疗以及近年来异军突起的细胞治疗和免疫治疗。尽管这些治疗方法能够延长病人的生存期，提高生存质量，但是依然存在一定的局限性。临床医生和科研人员始终在孜孜不倦地探索新的治疗方法为肿瘤治疗提供更多的选择方案。

细菌在癌症治疗中的应用可以追溯到十九世纪晚期，但是使用细菌来治疗不可手术的肉瘤的审慎尝试也证实了该技术的固有危险，尽管采用细菌能够有效减少肿瘤和淋巴结，但是患者在治疗的9天死亡。因此，如何提高细菌治疗的安全性和有效性，成为人们关注的焦点。

有鉴于此，特提出本申请。

发明内容

本申请的目的之一在于提供一种细菌-光热纳米颗粒复合物，以改善现有采用细菌治疗肿瘤，治疗效果不佳的技术问题。

本申请提供的细菌-光热纳米颗粒复合物，包括光热纳米颗粒和细菌，所述细菌与所述光热纳米颗粒通过化学键连接；

优选地，所述细菌和所述光热纳米颗粒通过共价键连接。

进一步地，所述细菌选自沙门氏菌、李斯特菌、大肠埃希氏菌和乳酸菌中的至少一种，优选为沙门氏菌，进一步优选为减毒沙门氏菌，更进一步优选为 YB1；

和/或，所述光热纳米颗粒包括光敏剂和纳米颗粒，所述光敏剂负载于所述纳米颗粒上，所述光敏剂选自 ICG、PpIX 和 Ce6 中的至少一种，优选为 ICG；所述纳米颗粒选自磷脂聚合物纳米颗粒、PLGA、脂质体、金纳米笼、金纳米棒和介孔硅中的至少一种，优选为 PLGA 和磷脂聚合物纳米颗粒；

优选地，所述光热纳米颗粒的粒径为 40-200 nm，优选为 50-100 nm；

优选地，所述光热纳米颗粒负载有药物，所述药物包括化疗药物和生物活性分子；

优选地，所述化疗药物包括阿霉素类化疗药物、铂类化疗药、紫杉醇类化疗药物、IDO 抑制剂、寡核苷酸 DNA 和脂多糖中的至少一种；

优选地，所述生物活性分子包括免疫检查点蛋白抑制剂、免疫激动剂、干扰素和白介素中的至少一种；

优选地，所述免疫激动剂包括 PD-1 单克隆抗体、PD-L1 单克隆抗体、CTLA-4 单克隆抗体、LAG-3 单克隆抗体、TIM3 单克隆抗体、TIGIT 单克隆抗体和 VISTA 单克隆抗体中的至少一种；

优选地，所述免疫激动剂包括 4-1BB 单克隆抗体和/或 STING 单克隆抗体。

进一步地，所述复合物包括 YB1 和光热纳米颗粒，所述 YB1 和所述光热纳米颗粒通过化学键连接，所述光热纳米颗粒包括 ICG、PLGA 和磷脂聚合物纳米颗粒；

优选地，所述 ICG 和所述 PLGA 包裹于所述磷脂聚合物纳米颗粒的内部，所述磷脂聚合物纳米颗粒和所述 YB1 通过化学键连接；

进一步优选地，所述 ICG 负载于所述 PLGA 上。

本申请的目的之二在于提供细菌-光热纳米颗粒复合物的制备方法，包括如下步骤：将细菌和光热纳米颗粒混合，使得细菌和光热纳米颗粒通过化学键连接，即得到细菌-光热纳米颗粒复合物。

进一步地，所述细菌-光热纳米颗粒复合物的制备方法包括如下步骤：

将细菌溶液、光热纳米颗粒和偶联剂混合均匀，使得细菌和光热纳米颗粒通过共价键连接，得到纳米颗粒复合物；

优选地，所述细菌选自沙门氏菌、李斯特菌、大肠埃希氏菌和乳酸菌中的至少一种，优选为沙门氏菌，进一步优选为减毒沙门氏菌，更进一步优选为 YB1；

优选地,所述光热纳米颗粒包括光敏剂和纳米颗粒,所述光敏剂负载于所述纳米颗粒上;所述光敏剂选自 ICG、PpIX 和 Ce6 中的至少一种,优选为 ICG;所述纳米颗粒选自磷脂聚合物纳米颗粒、PLGA、脂质体、金纳米笼、金纳米棒和介孔硅中的至少一种,优选为磷脂聚合物纳米颗粒和 PLGA;

优选地,所述偶联剂为 EDC 和/或 NHS。

所述光热纳米颗粒和所述细菌溶液的质量比为(0.5-1.5):10,优选为 1:10;优选地,所述细菌溶液的菌落数 $(1-2) \times 10^8$ cfu/mL,优选为 1×10^8 cfu/mL。

进一步地,所述光热纳米颗粒为 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒,所述 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒的制备方法包括如下步骤:

(a) 将大豆卵磷脂溶液、DSPE-PEG-COOH 溶液和 ICG 溶液混合,得到混合溶液;

(b) 将 PLGA 溶液在超声条件下加入上述混合溶液中,得到 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒;其中,ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒中,ICG 和 PLGA 包裹于磷脂聚合物纳米颗粒的内部。

进一步地,PLGA、大豆卵磷脂、DSPE-PEG-COOH 和 ICG 的质量比为(30-35):(2-4):(1-5):(10-17),优选为 33:3:2:15。

本申请的目的之三在于提供上述细菌-光热纳米颗粒复合物在制备肿瘤治疗药物中的应用。

本申请提供的细菌-光热纳米颗粒复合物,通过将光热纳米颗粒化学键合于细菌上,不仅提高了细菌在体内的安全性和靶向性,而且能够实现细菌治疗和光热治疗的联合,同时还能够对细菌和肿瘤进行示踪和成像,从而有效提高肿瘤治疗的有效率。

附图说明

图 1 为实施例 3 提供的 INPs 的 SEM 图;

图 2 为 YB1 的 SEM 图;

图 3 为实施例 8 提供的 YB1-INPs 的 SEM 图;

图 4 为实施例 3 提供的 INPs、YB1 和实施例 8 提供的 YB1-INPs 的粒径分布图;

图 5 为实施例 3 提供的 INPs 的荧光图;

图 6 为 YB1 的荧光图;

图 7 为实施例 8 提供的 YB1-INPs 的荧光图;

图 8 为试验例 6 中偶联在 YB1 上的 INPs 的数量与 INPs 浓度的关系图;

图 9 为试验例 7 中 YB1 培养 24 h 后的活菌检测图;

图 10 为试验例 7 中 YB1-INPs 培养 24 h 后的活菌检测图;

图 11 为试验例 8 中厌氧趋势性测试的装置结构示意图;

图 12 为试验例 8 中在不同培养时间小室内 YB1-INPs 的数量柱状图;

图 13 为试验例 8 中培养 40 min 后,在有氧和缺氧条件下小室内和小室外 YB1-INPs 比例的柱状图;

图 14a 为试验例 8 中培养 40 min 后,在有氧条件下,小室外 YB1-INPs 的荧光图;

图 14b 为试验例 8 中培养 40 min 后,在缺氧条件下,小室外 YB1-INPs 的荧光图;

图 15 为在试验例 9 中不同培养时间小室内 YB1-INPs 的数量柱状图;

图 16 为试验例 9 中培养 40 min 后,在低氨基酸含量培养基和高氨基酸含量的培养基下小室内和小室外 YB1-INPs 比例的柱状图;

图 17a 为试验例 9 中培养 40 min 后,在低氨基酸培养基条件下,小室外 YB1-INPs 的荧光图;

图 17b 为试验例 9 中培养 40 min 后,在高氨基酸培养基条件下,小室外 YB1-INPs 的荧光图;

图 18 为试验例 10 中 3 只小鼠荧光成像图;

图 19 为试验例 10 中注射 72 h 后,3 只小鼠肿瘤部位的荧光强度柱状图;

图 20 为试验例 10 中注射 72 h 后,3 只小鼠肿瘤部位的免疫组化图;

图 21 为试验例 10 中注射 72 h 后,第二只小鼠和第三只小鼠心、肝、脾、肺、肾脏和肿瘤组织的 YB1 含量图;

图 22 为试验例 10 中注射 72 h 后,第二只小鼠和第三只小鼠肿瘤组织中 YB1 数量的柱状图;

图 23 为试验例 11 中注射 72 h 后,三只小鼠部位温度和近红外激光照射时间的关系图;

图 24 为试验例 12 中 4 只小鼠在不同时间的肿瘤部位状态图；

图 25 为试验例 13 中 4 组小鼠肿瘤平均体积和时间的关系图；

图 26 为试验例 14 中 4 组小鼠生存率和时间的关系图；

图 27 为试验例 15 中 2 只小鼠心、肝、脾、肺和肾脏组织染色图。

具体实施方式

下面将对本申请的技术方案进行清楚且完整地描述，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。

根据本申请的一个方面，本申请提供了一种细菌-光热纳米颗粒复合物，包括光热纳米颗粒和细菌，所述细菌与所述光热纳米颗粒通过化学键连接。

在本申请中，细菌-光热纳米颗粒复合物中的“-”含义为“和”。

在本申请中，化学键连接包括但不限于离子连接、共价键连接和金属键连接。

典型但非限制性的实现化学键连接的方式有：细菌和光热纳米颗粒均修饰有功能基团，细菌和光热纳米颗粒通过各自功能基团实现化学键连接。

本申请提供的细菌-光热纳米颗粒复合物，通过将光热纳米颗粒化学键合于细菌上，不仅提高了细菌在体内的安全性和靶向性，而且能够实现细菌治疗和光热治疗的联合，同时还能够对细菌和肿瘤进行示踪和成像，从而有效提高肿瘤治疗的有效率。

在本申请的一种优选实施方式中，细菌-光热纳米颗粒复合物中，细菌和光热纳米颗粒通过共价键连接。通过将细菌和光热纳米颗粒通过共价键连接，使得细菌和光热纳米颗粒之间的连接更为牢固，从而使得细菌-光热纳米颗粒复合物在体内的稳定性更佳。

在本申请的一种优选实施方式中，细菌包括但不限于沙门氏菌（*Salmonella Typhimurium*）、李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）、大肠埃希氏菌（*E. coli*）和乳酸菌（*Lactic acid bacteria*）。

在本申请的一种优选实施方式中，细菌为沙门氏菌，优选为减毒沙门氏菌，更优选为 YB1。减毒沙门氏菌制备抗肿瘤药物，安全性更好，而 YB1 在有氧环境中无法生长会裂解死亡，在肿瘤的厌氧区域环境下才能够生长，所以 YB1 具有实体肿瘤具有靶向性，对正常组织器官的毒性小，安全性好。在本申请的一种优选实施方式中，光热纳米颗粒包括光敏剂和纳米颗粒，所述光敏剂负载于所述纳米颗粒上，光敏剂包括 ICG（吲哚菁绿）、PpIX（原卟啉）和 Ce6 中的一种或几种，如光敏剂为 ICG 和 PpIX、PpIX、Ce6 或 ICG。

在本申请的优选实施方式中，通过将光敏剂负载于纳米颗粒上，以提高光敏性的稳定性，使其能够实现纳米颗粒的示踪功能和光热治疗功能。

在本申请的优选实施方式中，光敏剂为 ICG。ICG 常作为血管造影剂使用，其安全性高。在本申请的优选实施方式中，将 ICG 用于制备细菌-光热纳米颗粒复合物，不仅安全性好，而且具有较高的光热转化效率，从而能够有效提高细菌-光热纳米颗粒复合物的治疗效果。

在本申请的一种优选实施方式中，纳米颗粒选自 PLGA（聚乳酸-羟基乙酸共聚物）、脂质体、金纳米笼、金纳米棒和介孔硅中的至少一种，如纳米颗粒为 PLGA 和脂质体、金纳米笼和脂质体或脂质体和介孔硅。

在本申请的进一步优选实施方式中，纳米颗粒为 PLGA 和磷脂聚合物纳米颗粒。PLGA 和磷脂聚合物纳米颗粒能够在体内生物降解，而金纳米笼、金纳米棒和介孔硅作为纳米颗粒不易在体内代谢，因此，选用 PLGA 和磷脂聚合物纳米颗粒作为负载细菌的载体时，更易于在体内进行生物降解，其作为载体负载细菌时进入体内治疗肿瘤时，其生物相容性更佳。

在本申请的一种优选实施方式中，光热纳米颗粒的粒径为 40-200 nm，优选为 50-100 nm。在本申请的优选实施方式中，光热纳米颗粒的典型但非限制性的粒径如为 40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、180 或 200 nm。

通过将光热纳米颗粒的粒径控制为 40-200 nm，以提高光热纳米颗粒的靶向性，当光热纳米颗粒的粒径小于 40 nm 时，容易发生团聚，不易于与细菌进行化学键连接，而且肿瘤被动靶向富集效果差（EPR

效应)。如果光热纳米颗粒的粒径超过 200 nm, 则容易被体内的免疫细菌捕获, 无法到达肿瘤部位。尤其是当光热纳米颗粒的粒径为 50-100 nm 时, 其作为细菌载体在体内的靶向性更佳。

在本申请的一种优选实施方式中, 光热纳米颗粒包载有药物, 药物包括但不限于化疗药物和具有生物活性的分子。

在本申请的优选实施方式中, 通过采用光热纳米颗粒包载药物, 使得细菌-光热纳米颗粒能够同时实现细菌治疗、光热治疗和药物治疗, 从而进一步提高肿瘤的治疗效果。

在本申请的一种优选实施方式中, 所述药物包括化疗药物和生物活性分子;

在本申请的进一步优选实施方式中, 所述化疗药物包括但不限于阿霉素类化疗药物, 铂类化疗药, 紫杉醇类化疗药物、IDO 抑制剂, 寡核苷酸 DNA 和脂多糖中的一种或几种。

在本申请的进一步优选实施方式中, 所述生物活性分子包括但不限于免疫检查点蛋白抑制剂, 如 PD-1/PD-L1 单克隆抗体, CTLA-4 单克隆抗体, LAG-3 单克隆抗体, TIM3 单克隆抗体, TIGHT 单克隆抗体, VISTA 单克隆抗体, 免疫激动剂, 如 4-1BB 单克隆抗体, STING 单克隆抗体; 具有治疗效果的干扰素和白介素等。

在本申请的一种优选实施方式中, 细菌-光热纳米颗粒复合物包括 YB1 和光热纳米颗粒, 所述 YB1 和所述光热纳米颗粒通过化学键连接。通过选用 YB1 与光热纳米颗粒通过化学键连接后治疗肿瘤, 其安全性更佳。

在本申请的一种优选实施方式中, YB1 上设有功能基团, 光热纳米颗粒上也设有功能基团, YB1 和光热纳米颗粒通过各自的功能基团实现化学键连接。

在本申请的典型但非限制性的实施方式中, YB1 上设置有氨基, 光热纳米颗粒上设置有羧基, YB1 和光热纳米颗粒通过氨基和羧基之间的形成酰胺基连接。

在本申请的一种优选实施方式中, 光热纳米颗粒包括 ICG、PLGA 和脂质体, 其中, ICG 和所述 PLGA 包裹于脂质体的内部, 所述脂质体和所述 YB1 通过化学键连接。通过采用脂质体包裹 ICG 和 PLGA, 以提高 ICG 的稳定性, 避免其在体内发生淬灭, 影响示踪功能和光热治疗功能。

在本申请的进一步优选实施方式中, ICG 负载于 PLGA 上。通过采用 PLGA 负载 ICG, 以进一步提高 ICG 的稳定性, 从而进一步提高 YB1-ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒在体内的示踪稳定性和光热治疗效果。

根据本申请的第二个方面, 本申请提供了一种细菌-光热纳米颗粒复合物的制备方法, 包括如下步骤:

将细菌和光热纳米颗粒混合, 使得细菌和光热纳米颗粒通过化学键连接, 即得到细菌-光热纳米颗粒复合物。

在本申请的典型但非限制性的实施方式中, 细菌和光热纳米颗粒上均修饰有功能基团, 细菌和光热纳米颗粒通过各自功能基团之间的相互作用, 实现化学键连接。

在本申请中, 化学键连接包括但不限于离子连接、共价键连接和金属键连接。本申请提供的细菌-光热纳米颗粒的制备方法, 工艺简单, 操作方便, 能够进行批量生产, 降低制备成本。

在本申请的一种优选实施方式中, 细菌-光热纳米颗粒复合物的制备方法包括如下步骤:

将细菌溶液、光热纳米颗粒和偶联剂混合均匀, 使得细菌和光热纳米颗粒通过共价键连接, 得到纳米颗粒复合物。

在本申请的优选实施方式中, 通过加入偶联剂, 以活化细菌上的功能基团和光热纳米颗粒上的功能基团, 从而使得细菌和光热纳米颗粒通过共价键连接。

在本申请的一种优选方式中, 细菌的选择和光热纳米颗粒的选择如前所述, 在此不再赘述。

在本申请的一种优选实施方式中, 偶联剂为 EDC 和/或 NHS, 其中, EDC 为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐, NHS 为 N-羟基琥珀酸亚胺。

在本申请的一种优选实施方式中, 复合物由 YB1 溶液、ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒和偶联剂制备而成, 其制备方法包括如下步骤: 将 YB1 溶液、ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒和偶联剂混合均匀, 得到 YB1-ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒复合物。

在本申请的优选实施方式中, YB1 修饰有氨基, ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒带有羧基, 通过加

入偶联剂,以使得 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒表面的羧基和 YB1 上的氨基发生反应,形成酰胺键,从而得到 YB1 和 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒通过酰胺键连接的 YB1-ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒复合物。

在本申请的一种优选实施方式中,光热纳米颗粒和细菌溶液的质量比为(0.5-1.5):10,以提高 YB1-ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒复合物中光热纳米颗粒的负载率,从而进一步提高肿瘤的光热治疗效果。

典型但非限制性地,光热纳米颗粒和细菌溶液的质量比如为 0.5:10、0.6:10、0.7:10、0.8:10、0.9:10、1:10、1.1:10、1.2:10、1.3:10、1.4:10 或 1.5:10。

在本申请的一种优选实施方式中,细菌溶液的菌落数为 $(1-2) \times 10^8$ cfu/mL。

典型但非限制性地,细菌溶液的菌落数为 1×10^8 cfu/mL、 1.1×10^8 cfu/mL、 1.2×10^8 cfu/mL、 1.3×10^8 cfu/mL、 1.4×10^8 cfu/mL、 1.5×10^8 cfu/mL、 1.6×10^8 cfu/mL、 1.7×10^8 cfu/mL、 1.8×10^8 cfu/mL、 1.9×10^8 cfu/mL 或 2×10^8 cfu/mL。

在本申请的一种优选实施方式中,光热纳米颗粒为 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒,其制备方法包括如下步骤:

(a) 将大豆卵磷脂溶液、DSPE-PEG-COOH 溶液和 ICG 溶液混合均匀,得到混合溶液;

(b) 将 PLGA 溶液在超声条件下加入上述混合溶液中,得到 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒;其中,ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒中,ICG 和 PLGA 包裹于磷脂聚合物纳米颗粒的内部。

在本申请的一种优选实施方式中,PLGA、大豆卵磷脂、DSPE-PEG-COOH 和 ICG 的质量比为(30-35):(2-4):(1-5):(10-17),优选为 33:3:2:15。

在本申请的优选实施方式中,通过磷脂聚合物纳米颗粒包裹 ICG 和 PLGA,以进一步提高 ICG 在体内的稳定性,避免其发生淬灭,从而进一步提高 YB1-ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒在体内的示踪稳定性和光热治疗功能。

通过控制 PLGA、大豆卵磷脂、DSPE-PEG-COOH 和 ICG 的质量比,以使得 ICG 和 PLGA 纳米颗粒被完全包覆于磷脂聚合物纳米颗粒中。

在本申请的一种优选实施方式中,在步骤(a)中,ICG 溶液的溶剂为乙醇和水的混合溶液,其中,乙醇和水体积比为(3-6):(94-97),优选为 4:96。通过选用乙醇和水的混合溶液作为 ICG 的溶剂,以提高 ICG 的溶解性。

在本申请的优选实施方式中,ICG 溶液的溶剂中,乙醇和水的典型但非限制性的体积比如为 3:97、4:96、5:95 或 6:94。

在本申请的一种优选实施方式中,PLGA 溶液的溶剂为乙腈。

在本申请的一种优选实施方式中,在步骤(b)中,大豆卵磷脂溶液的溶剂为氯仿和甲醇的混合溶液,其中,氯仿和甲醇的体积比为(8-10):1。通过选用氯仿和甲醇的混合溶液作为大豆卵磷脂的溶剂,以提高大豆卵磷脂的溶解性。

在本申请的优选实施方式中,大豆卵磷脂溶液的溶剂中,氯仿和甲醇的典型但非限制性的体积比为 8:1、9:1 或 10:1。在本申请的一种优选实施方式中,DSPE-PEG-COOH 溶液的溶剂为乙醇和水的混合溶液,其中,乙醇和水的体积比为(2-8):(92-98)。通过选用乙醇和水的混合溶液作为 DSPE-PEG-COOH 的溶剂,以提高 DSPE-PEG-COOH 的溶解性。

在本申请优选实施方式中,DSPE-PEG-COOH 溶液的溶剂中,乙醇和水的典型但非限制性的体积比如为 2:98、3:97、4:96、5:95、6:94、7:93 或 8:92。在本申请的一种优选实施方式中,YB1 溶液的溶剂为 PBS 溶液。

在本申请的一种优选实施方式中,在步骤(a)中,超声的功率为 35-45 W,频率为 15-25 Hz,时间为 2-5 min。通过控制超声的功率为 35-45 W,频率为 15-25 Hz,时间为 2-5 min,以使得 ICG 和 PLGA 充分接触,提高 PLGA 上负载的 ICG 的数量,尤其是当超声的功率为 38-40 W,频率为 18-22 Hz,时间为 2-4 min,ICG 和 PLGA 接触得更加充分,PLGA 上负载的 ICG 的数量更多。

在本申请的优选实施方式中,超声的典型但非限制性的功率如为 35、36、37、38、39、40、41、42、

43、44 或 45 W；典型但非限制性的频率如为 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 Hz；典型但非限制性的时间如为 2、3、4 或 5 min。根据本申请的第三个方面，本申请提供了细菌-光热纳米颗粒复合物在制备肿瘤治疗药物中的应用。

下面结合实施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 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒（以下简称 INPs），其按照如下步骤制备而成：

（1）将 PLGA 溶解于乙腈中，得到浓度为 2 mg/mL 的 PLGA 溶液；将 ICG 溶解于乙醇和水的混合溶液（乙醇浓度为 4%）中，得到浓度为 0.75 mg/mL 的 ICG 溶液；大豆卵磷脂溶解于氯仿和甲醇的混合溶液（氯仿和甲醇体积比为 9:1）中，得到大豆卵磷脂溶液；将 DSPE-PEG-COOH 溶解于乙醇和水的混合溶液（乙醇浓度为 4%）中，得到 DSPE-PEG-COOH 溶液；

（2）在超声条件下，将大豆卵磷脂溶液、DSPE-PEG-COOH 溶液和 ICG 溶液混合，得到混合溶液；

（3）将 PLGA 溶液在超声条件下加入上述混合溶液中，得到 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒；

其中，PLGA、大豆卵磷脂、DSPE-PEG-COOH 和 ICG 的质量比为 30:3:5:17。

实施例 2

本实施例提供了一种 INPs，其制备方法与实施例 1 的不同之处在于，在步骤（3）中，PLGA、大豆卵磷脂、DSPE-PEG-COOH 和 ICG-PLGA 纳米颗粒的质量比为 35:4:3:10。

实施例 3

本实施例提供了一种 INPs，其制备方法与实施例 1 的不同之处在于，在步骤（3）中，大豆卵磷脂、DSPE-PEG-COOH 和 ICG-PLGA 纳米颗粒的质量比为 33:3:2:15。

实施例 4

本实施例提供了一种 INPs，其制备方法与实施例 1 的不同之处在于，在步骤（3）中，PLGA、大豆卵磷脂、DSPE-PEG-COOH 和 ICG-PLGA 纳米颗粒的质量比为 20:3:2:15。

实施例 5

本实施例提供了一种 INPs，其制备方法与实施例 1 的不同之处在于，在步骤（3）中，PLGA、大豆卵磷脂、DSPE-PEG-COOH 和 ICG-PLGA 纳米颗粒的质量比为 20:3:2:5。

试验例 1

将实施例 1-5 提供的 INPs 通过透射电镜和马尔文颗粒表征分析仪进行检测，结果显示，实施例 1-3 提供的 INPs 的粒径均一性更好，粒径分布在 80-120 nm，且光热纳米颗粒全部被包覆于脂质体中，而实施例 4-5 提供的 INPs 的粒径均一性稍差，粒径分布在 50-200 nm，且有部分光热纳米颗粒未被完全包覆，这说明在制备 INPs 时，PLGA、大豆卵磷脂、DSPE-PEG-COOH 和 ICG-PLGA 纳米颗粒的质量比为 (30-35):(2-4):(1-5):(10-17) 时，制备得到的 INPs 的粒径分布更均一，光热纳米颗粒包覆更完全。

实施例 6

本实施例提供了一种 YB1-ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒复合物（以下简称 YB1-INPs），其由实施例 3 提供的 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒和 YB1 制备而成，具体包括如下步骤：

将 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒、EDC 和 YB1 溶液混合均匀，得到 YB1-INPs，其中，YB1 溶液的菌落数为 1×10^8 cfu/mL；ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒和 YB1 溶液的质量比为 1:10。

实施例 7

本实施例提供了一种 YB1-INPs，其制备方法与实施例 6 的不同之处在于，ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒和 YB1 溶液的质量比为 0.5:10。

实施例 8

本实施例提供了一种 YB1-INPs，其制备方法与实施例 6 的不同之处在于，ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒和 YB1 溶液的质量比为 1.5:10。

实施例 9

本实施例提供了一种 YB1-INPs，其制备方法与实施例 6 的不同之处在于，ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒和 YB1 溶液的质量比为 0.2:10。

实施例 10

本实施例提供了一种 YB1-INPs，其制备方法与实施例 6 的不同之处在于，ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒和 YB1 溶液的质量比为 5:10。

试验例 2

将实施例 6-10 提供的 YB1-INPs 利用激光共聚焦显微镜观察荧光，结果显示实施例 6-8 提供的 YB1-INPs 的荧光强度大于实施例 9-10 提供的 YB1-INPs，这说明实施例 6-8 提供的 YB1-INPs 中细菌上负载的 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒高于实施例 9-10，这说明在制备 YB1-INPs 时，ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒和 YB1 溶液的质量比为(0.5-1.5):10，且 YB1 溶液的菌落数为 $(1-2) \times 10^8$ cfu/mL 时，其制备得到的 YB1-INPs 负载的 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒更高，其对肿瘤的治疗效果更好。

试验例 3

将实施例 3 提供的 INPs、YB1 和实施例 8 提供的 YB1-INPs 采用扫描电镜进行观测，其结果如图 1-3 所示，其中图 1 为实施例 3 提供的 INPs 的 SEM 图；图 2 为 YB1 的 SEM 图；图 3 为实施例 8 提供的 YB1-INPs 的 SEM 图；从图 1 可以看出，INPs 具有明显的核壳结构，且其粒径为 100 nm 左右；从图 2 可以看出，YB1 的粒径为 1 μ m 左右；从图 3 可以看出，YB1-INPs 的粒径为 1 μ m 左右，且 YB1 表面有凸起状纳米颗粒，这说明 INPs 成功负载于 YB1 表面。

试验例 4

将实施例 3 提供的 INPs、YB1 和实施例 8 提供的 YB1-INPs 分别采用马尔文颗粒表征分析仪进行分析，结果如图 4 所示，从图 4 可以看出，实施例 3 提供的 INPs 粒径分布在 50-100 nm，YB1 和实施例 8 提供的 YB1-INPs 的粒径分布在 800-1200 nm。

试验例 5

将实施例 3 提供的 INPs、YB1 和实施例 8 提供的 YB1-INPs 分别采用激光共聚焦显微镜观察荧光，结果如图 5-7 所示，其中，图 5 为实施例 3 提供的 INPs 的荧光图；图 6 为 YB1 的荧光图；图 7 为实施例 8 提供的 YB1-INPs 的荧光图；从图 5-7 可以看出，INPs 具有荧光示踪功能，YB1 没有荧光示踪功能，YB1-INPs 具有荧光示踪功能。

试验例 6

将实施例 3 提供的 INPs 分别配置成浓度为 0、50 μ g/mL、100 μ g/mL 和 150 μ g/mL，其分别和 10^8 cfu/g 的 YB1 在平板上进行孵育，孵育 2 h 后，偶联在 YB1 上的 INPs 的数量与 INPs 浓度的关系如图 8 所示，从图 8 可以看出，当 INPs 的浓度为 0-100 μ g/mL 时，随着 INPs 浓度的增高，偶联在 YB1 上的 INPs 数量增加，但是当 INPs 的浓度为 100-150 μ g/mL 时，偶联在 YB1 上的 INPs 数量没有明显变化。

另外，在图 8 中插图分别为浓度为 0、50 μ g/mL、100 μ g/mL 和 150 μ g/mL 和 10^8 cfu/mL 的 YB1 在平板上孵育 2 h 后的近红外照相后的图像，从插图也可以看出，当 INPs 的浓度为 0-100 μ g/mL 时，随着 INPs 浓度的增高，偶联在 YB1 上的 INPs 数量增加，但是当 INPs 的浓度为 100-150 μ g/mL 时，偶联在 YB1 上的 INPs 数量没有明显变化。

试验例 7

取 YB1 和实施例 8 提供的 YB1-INPs 分别培养 24 h，其中 YB1 和 YB1-INPs 具有相同活菌数量，结果如图 9-10 所示，图 9 为 YB1 培养 24 h 后的活菌检测图；图 10 为 YB1-INPs 培养 24 h 后的活菌检测图；在图 9 和图 10 中，上部为细菌原液点板，下部为细菌原液稀释 10 倍后的点板，从图 9 和图 10 可以看出，YB1 和实施例 8 提供的 YB1-INPs 分别培养 24 h 后，其活菌数量相当，这说明在 YB1 上偶联 INPs 后，不会影响 YB1 的生长。

试验例 8

将实施例 8 提供的 YB1-INPs 进行厌氧趋势性测试，测试步骤如下：

- (1) 在 6 孔板中铺设小鼠乳腺癌细胞系 4T1；
- (2) 在 6 孔板中插入侵袭小室，如图 11 所示，侵袭小室的底部设置有碳酸酯膜，侵袭小室中加入一定数量的 YB1-INPs，通过碳酸酯膜将 YB1-INPs 和 6 孔板下层的肿瘤细胞分隔；
- (3) 分别在有氧和缺氧条件下，将 YB1-INPs 和肿瘤细菌共培养 40 min，然后利用流式细胞仪对小

室内和小室外的 YB1-INPs 进行计数统计。

图 12 为在不同培养时间小室内 YB1-INPs 的数量柱状图, 其中 Normoxia 代表有氧条件, Hypoxia 代表缺氧条件, 从图 12 可以看出, 在缺氧条件下小室中 YB1-INPs 的数量显著低于有氧条件下小室中 YB1-INPs 的数量, 这说明在缺氧条件下, YB1-INPs 更容易穿透碳酸酯膜, 进入小室外, 靶向肿瘤细胞。

图 13 为培养 40 min 后, 在有氧和缺氧条件下小室内和小室外 YB1-INPs 比例的柱状图, 其中, Supernatant 代表小室内, Bottom chamber 代表小室外, Normoxia 代表有氧条件, Hypoxia 代表缺氧条件; 从图 12 可以看出, 在缺氧条件下, 小室外的 YB1-INPs 的比例为 52%, 小室内的 YB1-INPs 的比例为 48%, 而在有氧条件下, 小室外的 YB1-INPs 的比例为 20%, 小室内的 YB1-INPs 的比例为 80%, 这也说明在缺氧条件下, YB1-INPs 更容易穿透碳酸酯膜, 进入小室外, 靶向肿瘤细胞。

图 14a 和图 14b 分别为培养 40 min 后, 在有氧和缺氧条件下, 小室外 YB1-INPs 的荧光图, 其中, Normoxia 代表有氧条件, Hypoxia 代表缺氧条件; 从图 14a 和图 14b 可以看出, 在缺氧条件下小室外的荧光强度高于有氧条件下小室外的荧光强度, 这说明在缺氧条件下, YB1-INPs 更容易穿透碳酸酯膜, 进入小室外, 靶向肿瘤细胞。

试验例 9

将实施例 8 提供的 YB1-INPs 进行厌氧趋势性测试, 测试步骤如下:

- (1) 在 6 孔板中铺设小鼠乳腺癌细胞系 4T1;
- (2) 在 6 孔板中插入侵袭小室, 其结构同图 11, 侵袭小室的底部设置有碳酸酯膜, 侵袭小室中加入一定数量的 YB1-INPs, 通过碳酸酯膜将 YB1-INPs 和 6 孔板下层的肿瘤细胞分隔;
- (3) 分别将 6 孔板中的培养基更换为低氨基酸含量培养基和高氨基酸含量的培养基, 将 YB1-INPs 和肿瘤细菌共培养 40 min, 然后利用流式细胞仪对小室内和小室外的 YB1-INPs 进行计数统计。

图 15 为在不同培养时间小室内 YB1-INPs 的数量柱状图, 其中 Nutrition 代表高氨基酸含量的培养基, PBS 代表低氨基酸含量培养基, 从图 15 可以看出, 在使用高氨基酸含量的培养基时, 小室中 YB1-INPs 的数量显著高于使用低氨基酸含量的培养基下小室中 YB1-INPs 的数量, 这说明在低氨基酸含量培养基培养时, YB1-INPs 更容易穿透碳酸酯膜, 进入小室外, 靶向肿瘤细胞。

图 16 为培养 40 min 后, 在低氨基酸含量培养基和高氨基酸含量的培养基下小室内和小室外 YB1-INPs 比例的柱状图, 其中, Supernatant 代表小室内, Bottom chamber 代表小室外, Nutrition 代表高氨基酸含量的培养基, PBS 代表低氨基酸含量培养基; 从图 16 可以看出, 在高氨基酸含量的培养基培养下, 小室外的 YB1-INPs 的比例为 52%, 小室内的 YB1-INPs 的比例为 48% 左右, 而在低氨基酸含量的培养基培养下, 小室外的 YB1-INPs 的比例为 80%, 小室内的 YB1-INPs 的比例为 20%, 这也说明在高氨基酸含量的培养基培养条件下, YB1-INPs 更容易穿透碳酸酯膜, 进入小室外, 靶向肿瘤细胞。

图 17a 和图 17b 为培养 40 min 后, 在低氨基酸含量培养基和高氨基酸含量的培养基条件下, 小室外 YB1-INPs 的荧光图, 其中 Nutrition 代表高氨基酸含量的培养基, PBS 代表低氨基酸含量培养基; 从图 17a 和 17b 可以看出, 在高氨基酸含量的培养基条件下小室外的荧光强度高于低氨基酸含量的培养基条件下小室外的荧光强度, 这说明在高氨基酸含量的培养基条件下, YB1-INPs 更容易穿透碳酸酯膜, 进入小室外, 靶向肿瘤细胞。

试验例 10

取具有相同肿瘤, 且肿瘤体积相同的同种类小鼠 3 只, 第一只小鼠注射 INPs 溶液, 第二只小鼠注射 YB1-INPs 溶液, 第三只小鼠注射 YB1-INPs 溶液, 其中, 三种注射液的荧光强度相同, 注射量相同, 且第三只小鼠在注射 12 h, 采用近红外激光照射 5 分钟 (808 纳米, 1.18 W/cm²)。

分别在 3 只小鼠注射后 1 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h 对小鼠进行荧光成像, 且在 72 h 后, 将三只小鼠处死, 并分别将肿瘤组织取出进行荧光成像, 如图 18 所示, 其中, INPs 代表第一只小鼠, YB1-INPs 代表第二只小鼠, YB1-INPs(+)代表第三只小鼠。

从图 18 可以看出, 第一只小鼠注射 INPs 后, INPs 进入小鼠体内, 大部分被免疫系统阻挡, 在 72 h 后仅有极少数 INPs 在肿瘤部位聚集; 第二只小鼠注射 YB1-INPs 后, 部分 YB1-INPs 被免疫系统阻挡, 但是有部分 YB1-INPs 聚集在肿瘤部位; 这三只小鼠注射 YB1-INPs 后, 小部分 YB1-INPs 被免疫系统阻

挡,大部分 YB1-INPs 聚集在肿瘤部位;这说明采用 YB1-INPs 更易于靶向于肿瘤部位,尤其是在注射 YB1-INPs 后,辅以近红外激光照射更能够提高 YB1-INPs 在肿瘤部位的聚集率,提高治疗效果。

图 19 为注射后 72 h, 3 只小鼠肿瘤部位的荧光强度柱状图,其中,INPs 代表第一只小鼠,YB1-INPs 代表第二只小鼠,YB1-INPs(+)代表第三只小鼠;从图 19 可以看出,第一只小鼠肿瘤部位的荧光强度很弱,这说明仅有极少数 INPs 在肿瘤组织聚集;第二只小鼠肿瘤部位的荧光强度明显高于第一只小鼠,这说明第二只小鼠肿瘤部位聚集的 YB1-INPs 的数量显著高于第一只;第三只小鼠肿瘤部位的荧光强度明显高于第二只小鼠,这说明在进行细菌治疗时,辅以近红外激光照射更能够提高 YB1-INPs 在肿瘤部位的聚集率,从而提高治疗效果。

图 20 为注射后 72 h, 3 只小鼠肿瘤部位的免疫组化图,其中箭头表示 YB1 所在位置,从图 20 可以看出,第一只小鼠肿瘤部位未发现 YB1,第二只小鼠肿瘤部位存在 YB1,但其 YB1 数量明显低于第三只小鼠肿瘤部位的 YB1 数量,这说明 YB1-INPs 比 INPs 更易于在肿瘤部位聚集,尤其辅以红外激光照射时,YB1-INPs 在肿瘤部位的聚集率更高,治疗效果更好。

在注射 72 h 后,分别将第二只小鼠和第三只小鼠处死,并取出心、肝、脾、肺、肾脏和肿瘤组织进行 YB1 含量检测,结果如图 21 所示,其中,YB1-INPs 代表第二只小鼠,YB1-INPs+Laser 代表第三只小鼠,从图 21 可以看出,第三只小鼠中聚集在肿瘤部位的 YB1 的数量显著高于第二只小鼠,辅以红外激光照射时,YB1-INPs 在肿瘤部位的聚集率更高,治疗效果更好。

图 22 为注射 72 h 后,第二只小鼠和第三只小鼠肿瘤组织的 YB1 数量的柱状图,其中,YB1-INPs 代表第二只小鼠,YB1-INPs+Laser 代表第三只小鼠,从图 22 可以看出,第三只小鼠中聚集在肿瘤部位的 YB1 的数量显著高于第二只小鼠,辅以红外激光照射时,YB1-INPs 在肿瘤部位的聚集率更高,治疗效果更好。

试验例 11

取具有相同肿瘤,且肿瘤体积相同的同种类小鼠 3 只,第一只小鼠注射 PBS 溶液,第二只小鼠注射 INPs 溶液,第三只小鼠注射 YB1-INPs 溶液,其中三只小鼠的注射量相同,且三只小鼠在注射 12 h 和 72 h,分别采用近红外激光照射 450 s,(808 纳米,1.18 W/cm²)。

注射 72 h 后,分别监测不同照射时间时三只小鼠肿瘤部位的温度,绘制不同照射时间和肿瘤部位温度的关系图,如图 23 所示,其中 PBS(++)代表第一只小鼠,INPs(++)代表第二只小鼠,YB1-INPs(++)代表第三只小鼠。从图 23 可以看出,随着照射时间的延长,第一只小鼠肿瘤部位的温度并无明显变化,第二只小鼠肿瘤部位的温度随着照射时间的延长,稍有升高,但是最高温度仍在 40°C 以下,第三只小鼠随着照射时间的延长,肿瘤部位的温度显著提高,最高温度达到 65°C,这说明采用 YB1-INPs 进行肿瘤治疗,并辅以近红外激光照射时,肿瘤部位的温度最高,肿瘤的治疗效果更好,采用 INPs 进行肿瘤治疗,并辅以近红外激光照射,肿瘤部位温度稍有升高,肿瘤治疗效果显著低于 YB1-INPs,而 PBS 溶液则不会对肿瘤部位的温度产生明显影响。

试验例 12

取具有相同肿瘤,且肿瘤体积相同的同种类小鼠 4 只,第一只小鼠注射 PBS 溶液,第二只小鼠注射 INPs 溶液,第三只小鼠注射 YB1-INPs 溶液,第四只小鼠注射 YB1-INPs 溶液,其中 4 只小鼠的注射量相同,且第一只小鼠、第二只小鼠和第四只小鼠在注射 12 h 和 72 h,分别采用近红外激光照射 5 min,(808 纳米,1.18 W/cm²),四只小鼠在不同时间的代表图,如图 24 所示,其中,PBS(++)代表第一只小鼠,INPs(++)代表第二只小鼠,YB1-INPs 代表第三只小鼠,YB1-INPs(++)代表第四只小鼠,虚线所圈出区域为肿瘤部位。

从图 24 可以看出,第一只小鼠在 14 天内,肿瘤部位持续增大,且在第 21 天死亡,这说明 PBS 溶液对肿瘤没有任何治疗作用;第二只小鼠在 14 天内,肿瘤部位有所增大,且在第 21 天死亡,这说明 INPs 对肿瘤没有明显的治疗作用;第三只小鼠在 0-7 天内,肿瘤部位明显减小,但是在 7-28 天,肿瘤部位又出现反弹,继续增大,但是小鼠未必死亡,这说明 YB1-INPs 对肿瘤具有一定治疗作用,但是无法彻底根治肿瘤;第四只小鼠在第 7 天肿瘤部位全部消失,且到第 28 天并未重新出现肿瘤,这说明采用 YB1-INPs 并辅以近红外激光照射,能够彻底根除肿瘤,并不复发。

试验例 13

取具有相同肿瘤，且肿瘤体积相同的同种类小鼠 20 只，分成 4 组，每组 5 只，第一组小鼠注射 PBS 溶液，第二组小鼠注射 INPs 溶液，第三组小鼠注射 YB1-INPs 溶液，第四组小鼠注射 YB1-INPs 溶液，其中四组小鼠的注射量相同，且第一组小鼠、第二组小鼠和第四组小鼠在注射 12 h 和 72 h，分别采用近红外激光照射 5 min (808 纳米， 1.18 W/cm^2)，分别检测四组小鼠的肿瘤平均体积，并绘制四组小鼠肿瘤平均体积随时间的关系曲线，如图 25 所示，其中，PBS(++)代表第一组小鼠，INPs(++)代表第二组小鼠，YB1-INPs 代表第三组小鼠，YB1-INPs(++)代表第四组小鼠。

从图 25 可以看出，第四组小鼠的肿瘤体积从第 4 天即消失，这说明第四组小鼠的肿瘤全部治愈，且在 28 天未复发；第三组小鼠的肿瘤体积在 8 天时降低到最小值，然后随着时间的延长，肿瘤体积出现反弹，且持续增大；第二组小鼠的肿瘤体积随着时间的延长持续增大，在第 20 天时，小鼠全部死亡；第一组小鼠的肿瘤体积随着时间的延长持续增大，且增大速率高于第一组，在第 18 天，小鼠全部死亡。这说明 PBS 对肿瘤没有治疗作用；INPs 辅以远红外激光照射时，能够减缓肿瘤的生长速度，但是不能抑制肿瘤的生长；而 YB1-INPs 能够有效治疗肿瘤，缩小肿瘤体积，但是后期会出现肿瘤复发；而 YB1-INPs 辅以远红外激光照射时，能够彻底根治肿瘤，且不复发。

试验例 14

分别统计试验例 13 中不同时间时 4 组小鼠的生存率，并绘制小鼠生存率和时间关系曲线，如图 26 所示，其中，PBS(++)代表第一组小鼠，INPs(++)代表第二组小鼠，YB1-INPs 代表第三组小鼠，YB1-INPs(++)代表第四组小鼠。

从图 26 可以看出，第一组小鼠在第 16 天时死亡小鼠 1 只，死亡率为 20%，在第 18 天时，又死亡小鼠 3 只，死亡率达到 80%，至第 24 天，小鼠全部死亡，死亡率达到 100%；第二组小鼠在第 20 天时，死亡小鼠 3 只，死亡率 60%，至第 22 天时，小鼠全部死亡，死亡率达到 100%；第三组小鼠在第 28 天时，死亡小鼠 2 只，死亡率为 40%；第四组小鼠至 28 天时，无小鼠死亡，死亡率为 0%。这说明 PBS 对肿瘤没有治疗作用，在 24 天小鼠全部死亡；INPs 辅以远红外激光照射时，能够减缓肿瘤的生长速度，但是不能抑制肿瘤的生长，在第 22 天时，小鼠全部死亡；而 YB1-INPs 能够有效治疗肿瘤，缩小肿瘤体积，但是后期会出现肿瘤复发，在第 28 天时，小鼠死亡率为 40%；而 YB1-INPs 辅以远红外激光照射时，能够彻底根治肿瘤，在第 28 天时，小鼠死亡率为 0%。

试验例 15

取具有相同肿瘤，且肿瘤体积相同的同种类小鼠 2 只，第一只小鼠注射 PBS 溶液，第二只小鼠注射 YB1-INPs 溶液，其中，2 只小鼠注射量相同，且第二只小鼠在注射 12 h，采用近红外激光照射 5 分钟 (808 纳米， 1.18 W/cm^2)。

在注射 72 h 后，分别将第一只小鼠和第二只小鼠处死，并取出心、肝、脾、肺和肾脏组织进行染色，结果如图 27 所示，其中，PBS 代表第一只小鼠，YB1-INPs(++)代表第二只小鼠。从图 27 可以看出，第一只小鼠和第二只小鼠心、肝、脾、肺和肾脏组织进行染色无明显差别，这说明实施例 8 提供的 YB1-INPs 不会对小鼠体内组织造成损伤，其在体内的安全性良好。

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。

权利要求书

1、一种细菌-光热纳米颗粒复合物，其特征在于，包括光热纳米颗粒和细菌，所述细菌与所述光热纳米颗粒通过化学键连接；

优选地，所述细菌和所述光热纳米颗粒通过共价键连接。

2、根据权利要求1所述的细菌-光热纳米颗粒复合物，其特征在于，所述细菌选自沙门氏菌、李斯特菌、大肠埃希氏菌和乳酸菌中的至少一种，优选为沙门氏菌，进一步优选为减毒沙门氏菌，更进一步优选为 YB1；

和/或，所述光热纳米颗粒包括光敏剂和纳米颗粒，所述光敏剂负载于所述纳米颗粒上，所述光敏剂选自 ICG、PpIX 和 Ce6 中的至少一种，优选为 ICG；

优选地，所述纳米颗粒选自磷脂聚合物纳米颗粒、PLGA、脂质体、金纳米笼、金纳米棒和介孔硅中的至少一种，优选为 PLGA 和磷脂聚合物纳米颗粒；

优选地，所述光热纳米颗粒的粒径为 40-200 nm，优选为 50-100 nm。

3、根据权利要求1所述的细菌-光热纳米颗粒复合物，其特征在于，所述光热纳米颗粒包载有药物，所述药物包括化疗药物和生物活性分子；

优选地，所述化疗药物包括阿霉素类化疗药物、铂类化疗药、紫杉醇类化疗药物、IDO 抑制剂、寡核苷酸 DNA 和脂多糖中的至少一种；

优选地，所述生物活性分子包括免疫检查点蛋白抑制剂、免疫激动剂、干扰素和白介素中的至少一种；

优选地，所述免疫检查点蛋白抑制剂包括 PD-1 单克隆抗体、PD-L1 单克隆抗体、CTLA-4 单克隆抗体、LAG-3 单克隆抗体、TIM3 单克隆抗体、TIGIT 单克隆抗体和 VISTA 单克隆抗体中的至少一种；

优选地，所述免疫激动剂包括 4-1BB 单克隆抗体和/或 STING 单克隆抗体。

4、根据权利要求1-3 任一项所述的细菌-光热纳米颗粒复合物，其特征在于，所述复合物包括 YB1 和光热纳米颗粒，所述 YB1 和所述光热纳米颗粒通过化学键连接，所述光热纳米颗粒包括 ICG、PLGA 和磷脂聚合物纳米颗粒；

优选地，所述 ICG 和所述 PLGA 包裹于所述磷脂聚合物纳米颗粒的内部，所述磷脂聚合物纳米颗粒和所述 YB1 通过化学键连接；

进一步优选地，所述 ICG 负载于所述 PLGA 上。

5、一种细菌-光热纳米颗粒复合物的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：将细菌和光热纳米颗粒混合，使得细菌和光热纳米颗粒通过化学键连接，即得到细菌-光热纳米颗粒复合物。

6、根据权利要求5所述的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

将细菌溶液、光热纳米颗粒和偶联剂混合均匀，使得细菌和光热纳米颗粒通过共价键连接，得到纳米颗粒复合物；

优选地，所述细菌选自沙门氏菌、李斯特菌、大肠埃希氏菌和乳酸菌中的至少一种，优选为沙门氏菌，进一步优选为减毒沙门氏菌，更进一步优选为 YB1；

优选地，所述光热纳米颗粒包括光敏剂和纳米颗粒，所述光敏剂负载于所述纳米颗粒上；所述光敏剂选自 ICG、PpIX 和 Ce6 中的至少一种，优选为 ICG；所述纳米颗粒选自磷脂聚合物纳米颗粒、PLGA、脂质体、金纳米笼、金纳米棒和介孔硅中的至少一种，优选为磷脂聚合物纳米颗粒和 PLGA；

优选地，所述偶联剂为 EDC 和/或 NHS。

7、根据权利要求6所述的制备方法，其特征在于，所述光热纳米颗粒和所述细菌溶液的质量比为(0.5-1.5):10，优选为 1:10；

优选地，所述细菌溶液的菌落数为 $(1-2) \times 10^8$ cfu/mL，优选为 1×10^8 cfu/mL。

8、根据权利要求5所述的制备方法，其特征在于，所述光热纳米颗粒为 ICG-PLGA-磷脂聚合

物纳米颗粒，所述 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒的制备方法包括如下步骤：

(a) 将大豆卵磷脂溶液、DSPE-PEG-COOH 溶液和 ICG 溶液混合，得到混合溶液；

(b) 将 PLGA 溶液在超声条件下加入上述混合溶液中，得到 ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒；其中，ICG-PLGA-磷脂聚合物纳米颗粒中，ICG 和 PLGA 包裹于磷脂聚合物纳米颗粒的内部。

9、根据权利要求 8 所述的制备方法，其特征在于，PLGA、大豆卵磷脂、DSPE-PEG-COOH 和 ICG 的质量比为(30-35):(2-4):(1-5):(10-17)，优选为 33:3:2:15。

10、根据权利要求 1-4 任一项所述的细菌-光热纳米颗粒复合物或根据权利要求 5-9 任一项所述的制备方法得到的细菌-光热纳米颗粒复合物在制备肿瘤治疗药物中的应用。

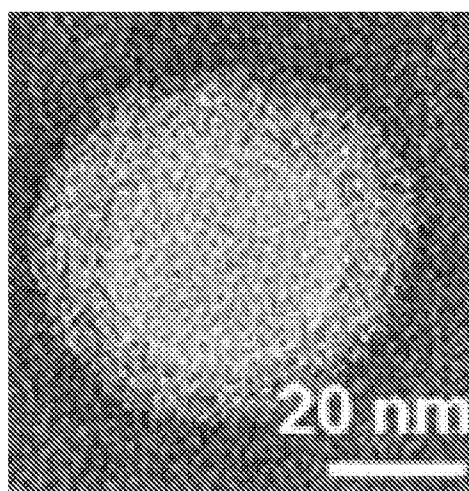


图 1

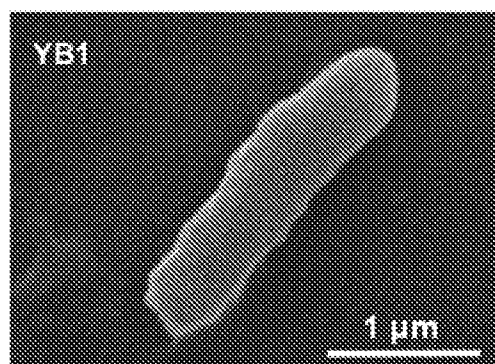


图 2

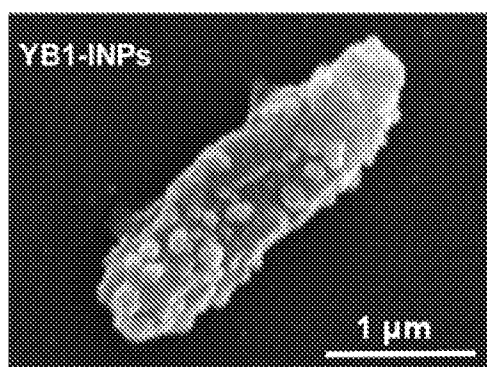


图 3

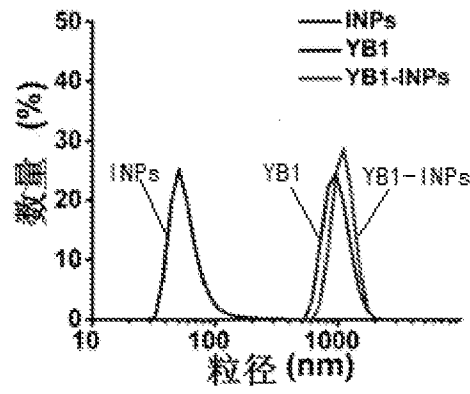


图 4

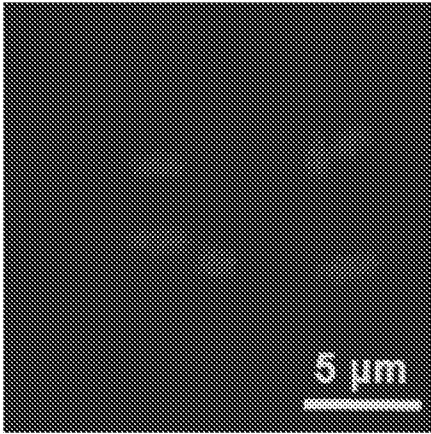


图 5

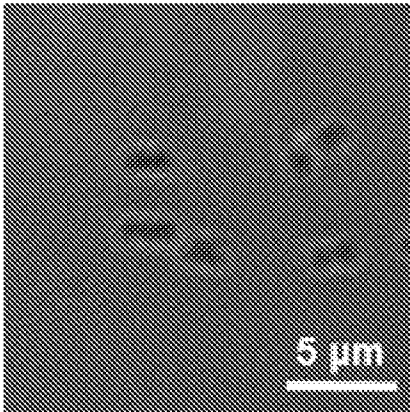


图 6

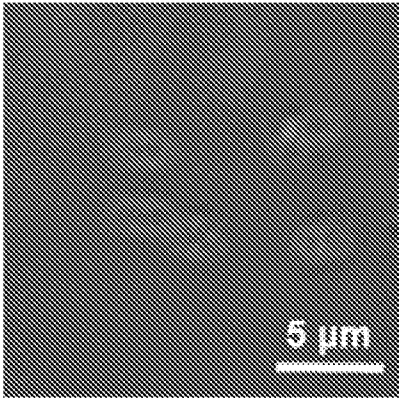


图 7

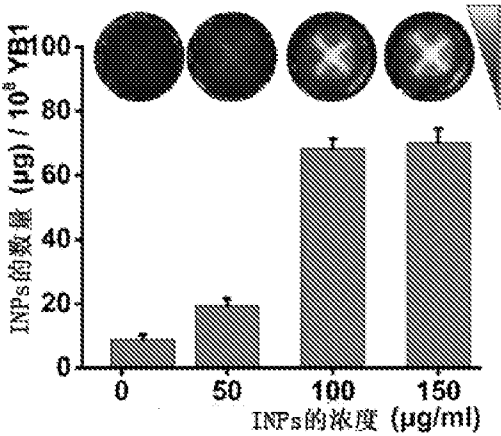


图 8

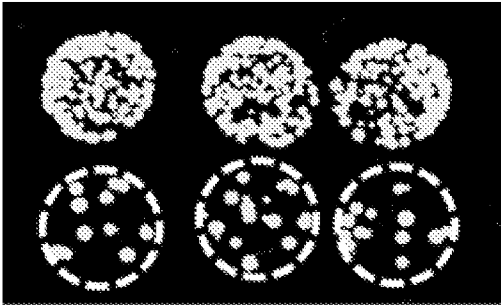


图 9

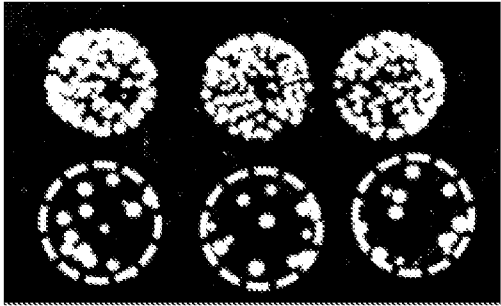


图 10

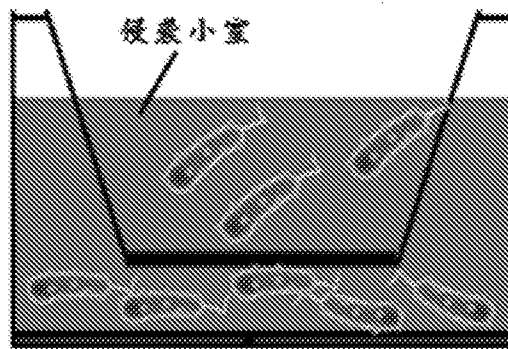


图 11

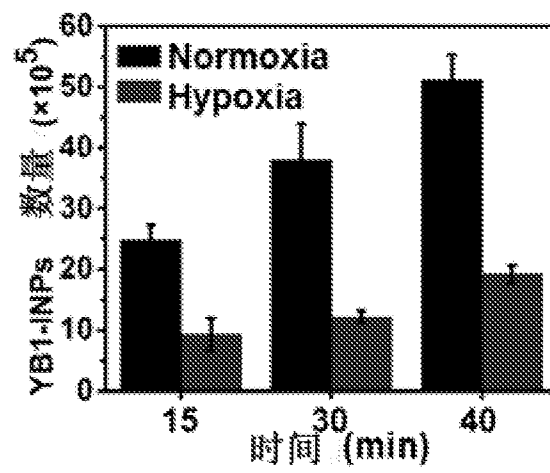


图 12

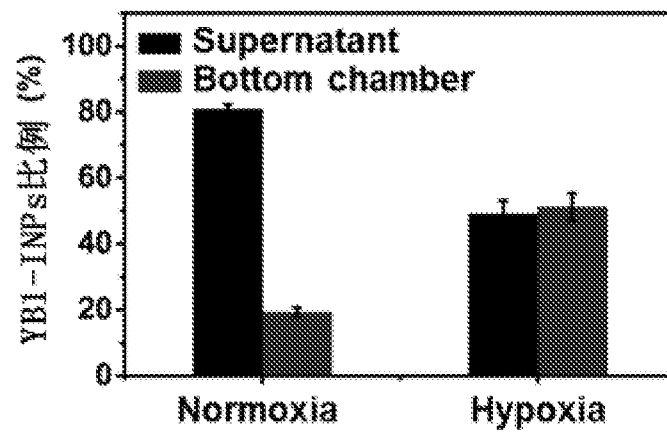


图 13

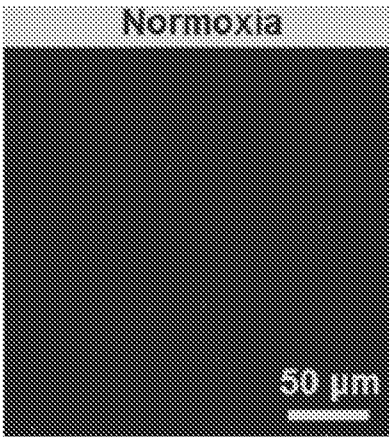


图 14a

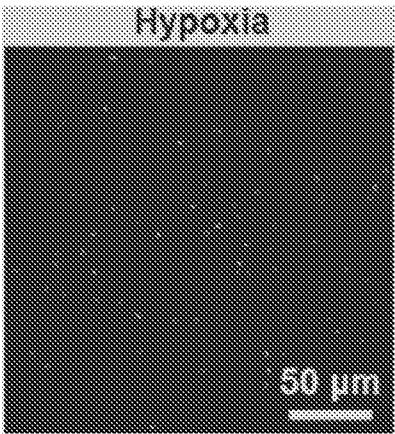


图 14b

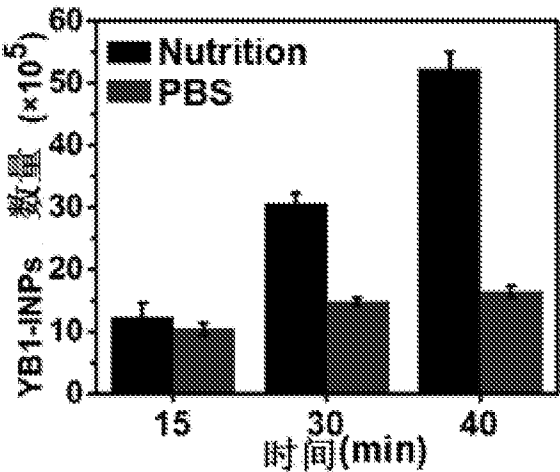


图 15

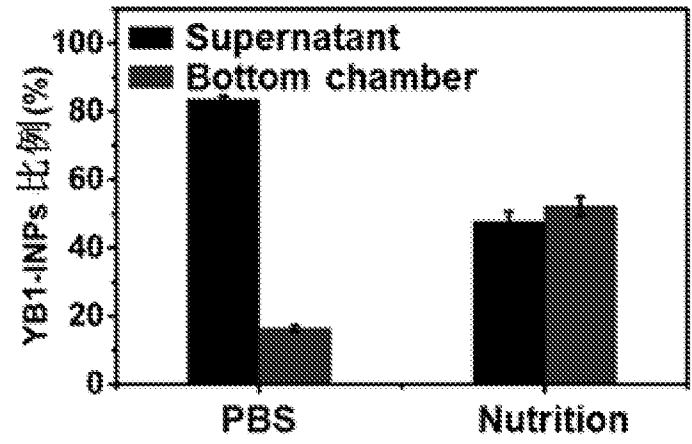


图 16

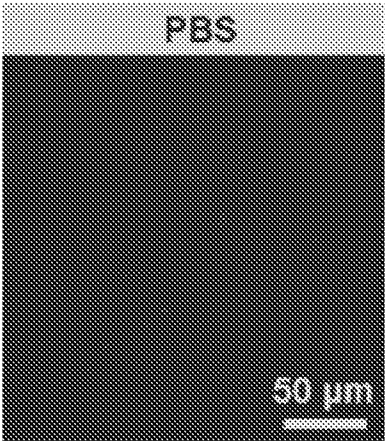


图 17a

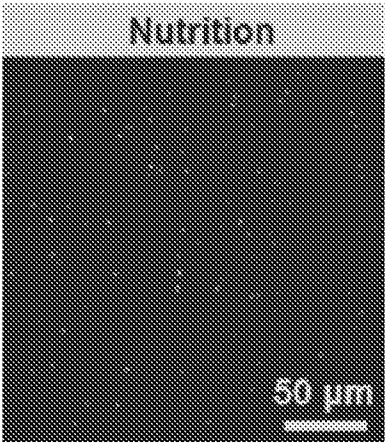


图 17b

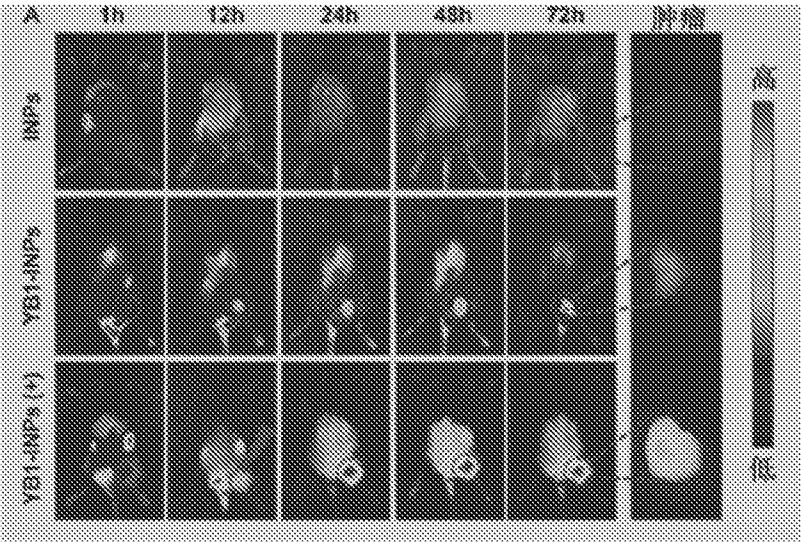


图 18

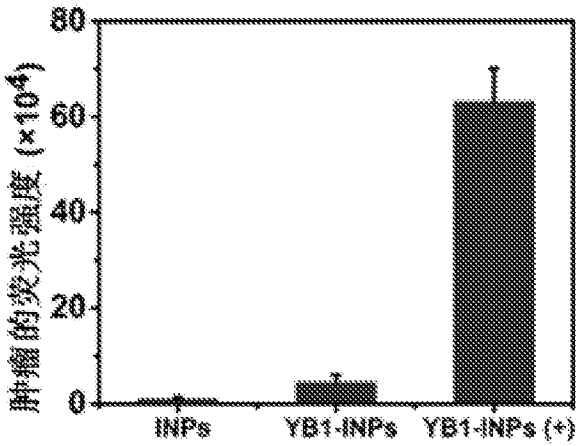


图 19

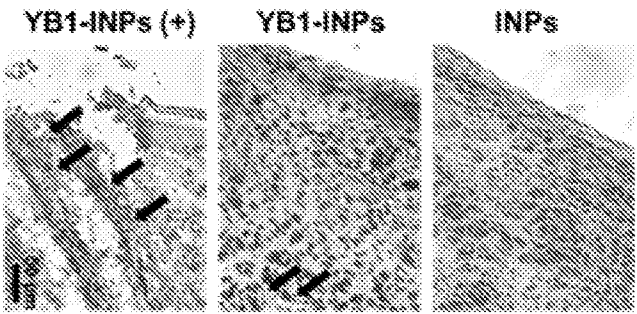


图 20

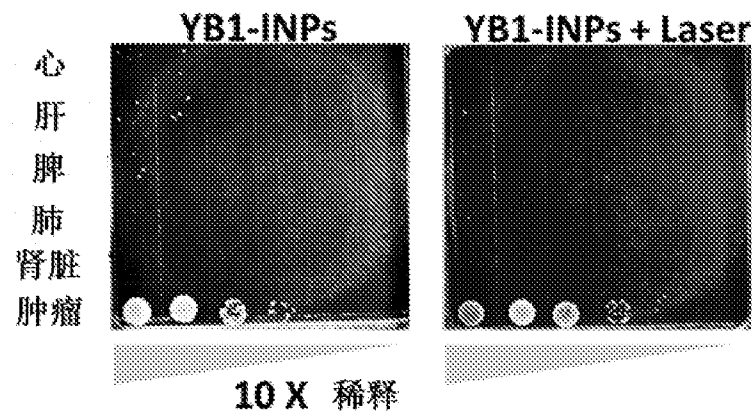


图 21

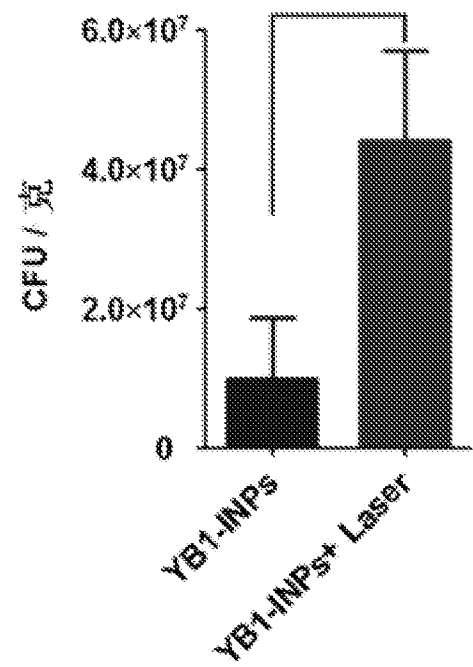


图 22

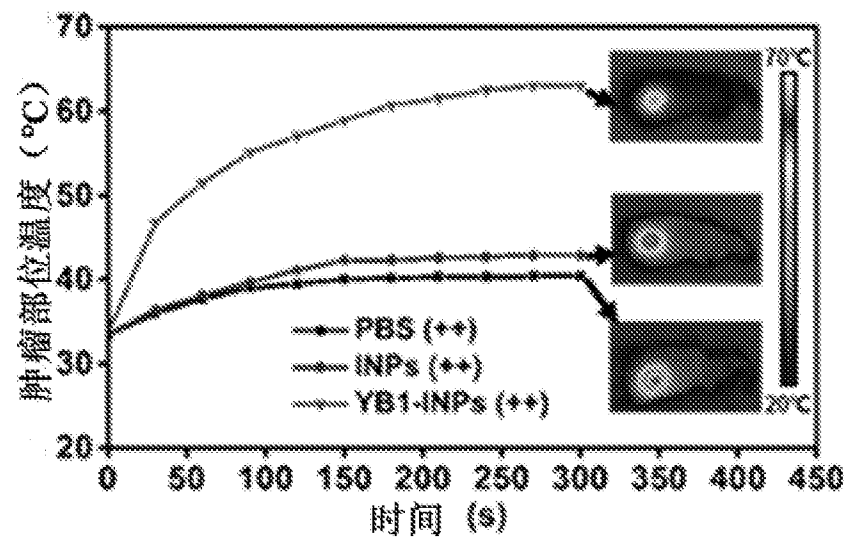


图 23

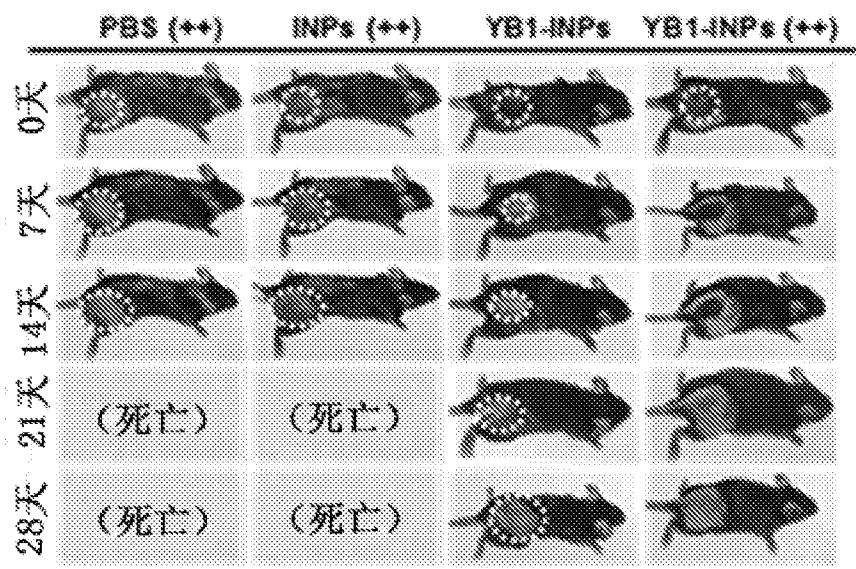


图 24

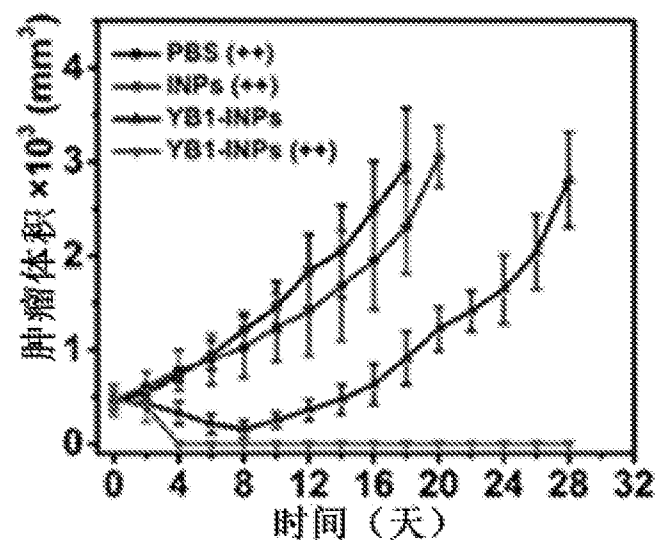


图 25

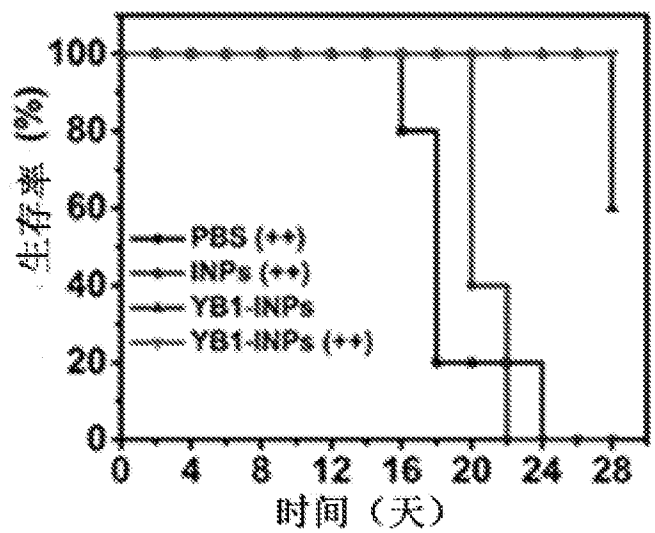


图 26

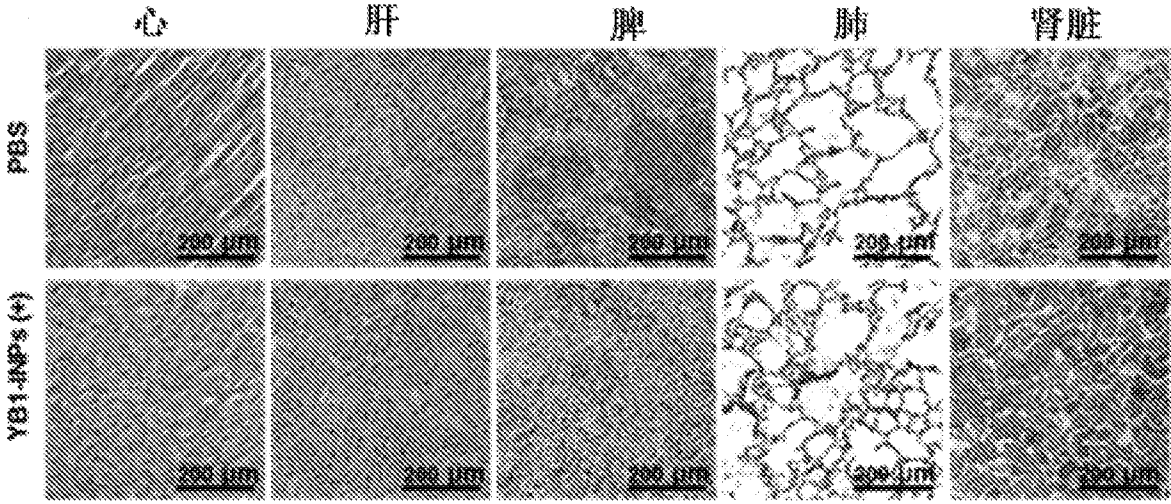


图 27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/124022

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 49/00(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 9/51(2006.01)i; A61K 35/74(2015.01)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

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, CNTXT, DWPI, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, STN next: 刘陈立, 偶联, 载体, 细菌, 光热, 纳米粒, 沙门氏菌, conjugate, cargo, carrier, bacteria, photothermal, nanoparticle, salmonella

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SUH S. et al. "Nanoscale Bacteria-Enabled Autonomous Drug Delivery System (NanoBEADS) Enhances Intratumoral Transport of Nanomedicine" <i>Advanced Science</i> , Vol. 6, No. 3, 05 December 2018 (2018-12-05), 1801309 (1-13)	1-10
Y	ZHANG, Mingbin et al. "Single-Step Assembly of DOX/ICG Loaded Lipid Polymer Nanoparticles for Highly Effective Chemo-photothermal Combination Therapy" <i>ACS Nano</i> , Vol. 7, No. 3, 15 February 2013 (2013-02-15), 2056-2067	1-10
A	WO 2016172046 A1 (OREGON STATE UNIVERSITY) 27 October 2016 (2016-10-27) the abstract, and claims 1-58	1-10
A	WO 9913053 A1 (VION PHARMACEUTICALS, INC.) 18 March 1999 (1999-03-18) claims 1-37	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

18 July 2019

Date of mailing of the international search report

26 July 2019

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/124022

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2016172046	A1	27 October 2016	JP	2018513875	A	31 May 2018
				CA	2981614	A1	27 October 2016
				US	2018028496	A1	01 February 2018
				EP	3285765	A1	28 February 2018
				CN	107613975	A	19 January 2018
				EP	3285765	A4	05 December 2018
				WO	2019079201	A3	31 May 2019
				WO	2019079201	A2	25 April 2019
WO	9913053	A1	18 March 1999	NZ	503376	A	25 October 2002
				IL	134936	D0	20 May 2001
				JP	2002500001	A	08 January 2002
				CA	2302866	A1	18 March 1999
				AU	749695	B2	04 July 2002
				EP	1012232	B1	28 October 2009
				CN	1278864	A	03 January 2001
				CN	1253551	C	26 April 2006
				BR	9812079	A	26 September 2000
				US	7354592	B2	08 April 2008
				AU	9380798	A	29 March 1999
				US	6863894	B2	08 March 2005
				EP	1012232	A4	19 January 2005
				CA	2302866	C	21 February 2012
				HK	1033956	A1	17 November 2006
				US	2005255088	A1	17 November 2005
				US	2003109026	A1	12 June 2003
				EP	1012232	A1	28 June 2000

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/124022

A. 主题的分类

A61K 49/00(2006.01)i; A61K 47/34(2017.01)i; A61K 9/51(2006.01)i; A61K 35/74(2015.01)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

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, CNTXT, DWPI, WOTXT, USTXT, EPTXT, ISI Web of Knowledge, STN next:刘陈立, 偶联, 载体, 细菌, 光热, 纳米粒, 沙门氏菌, conjugate, cargo, carrier, bacteria, photothermal, nanoparticle, salmonella

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
Y	SUH S. et al. "Nanoscale Bacteria-Enabled Autonomous Drug Delivery System (NanoBEADS) Enhances Intratumoral Transport of Nanomedicine" ADVANCED SCIENCE, 第6卷, 第3期, 2018年 12月 5日 (2018 - 12 - 05), 1801309(1-13)	1-10
Y	ZHENG M. et al. "Single-Step Assembly of DOX/ICG Loaded Lipid Polymer Nano-particles for Highly Effective Chemo-photothermal Combination Therapy" ACS NANO, 第7卷, 第3期, 2013年 2月 15日 (2013 - 02 - 15), 2056-2067	1-10
A	WO 2016172046 A1 (UNIV. OREGON STATE) 2016年 10月 27日 (2016 - 10 - 27) 摘要, 权利要求1-58	1-10
A	WO 9913053 A1 (VION PHARMACEUTICALS, INC.) 1999年 3月 18日 (1999 - 03 - 18) 权利要求1-37	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

2019年 7月 18日

国际检索报告邮寄日期

2019年 7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

受权官员

吴铁生

电话号码 010-53961870

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/124022

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)
WO	2016172046	A1	2016年 10月 27日	JP	2018513875	A	2018年 5月 31日
				CA	2981614	A1	2016年 10月 27日
				US	2018028496	A1	2018年 2月 1日
				EP	3285765	A1	2018年 2月 28日
				CN	107613975	A	2018年 1月 19日
				EP	3285765	A4	2018年 12月 5日
				WO	2019079201	A3	2019年 5月 31日
				WO	2019079201	A2	2019年 4月 25日
WO	9913053	A1	1999年 3月 18日	NZ	503376	A	2002年 10月 25日
				IL	134936	D0	2001年 5月 20日
				JP	2002500001	A	2002年 1月 8日
				CA	2302866	A1	1999年 3月 18日
				AU	749695	B2	2002年 7月 4日
				EP	1012232	B1	2009年 10月 28日
				CN	1278864	A	2001年 1月 3日
				CN	1253551	C	2006年 4月 26日
				BR	9812079	A	2000年 9月 26日
				US	7354592	B2	2008年 4月 8日
				AU	9380798	A	1999年 3月 29日
				US	6863894	B2	2005年 3月 8日
				EP	1012232	A4	2005年 1月 19日
				CA	2302866	C	2012年 2月 21日
				HK	1033956	A1	2006年 11月 17日
				US	2005255088	A1	2005年 11月 17日
				US	2003109026	A1	2003年 6月 12日
				EP	1012232	A1	2000年 6月 28日