



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102740875 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 17

(21) 申请号 201080062918. 9

哈根·冯布里森 西尔维娅·瓦格内

(22) 申请日 2010. 12. 08

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

(30) 优先权数据

责任公司 11219

61/285, 902 2009. 12. 11 US

代理人 张颖 谢丽娜

12/941, 350 2010. 11. 08 US

(51) Int. Cl.

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61K 38/38 (2006. 01)

2012. 08. 01

A61K 38/18 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

A61K 31/54 (2006. 01)

PCT/US2010/059364 2010. 12. 08

A61K 31/40 (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

A61K 49/00 (2006. 01)

W02011/071968 EN 2011. 06. 16

A61P 35/00 (2006. 01)

(71) 申请人 拜莱泰克制药市场有限公司

地址 马来西亚拉布安

(72) 发明人 克劳斯·兰格尔 马蒂亚斯·瓦克尔

比特·罗德 安格莱特·普鲁斯

沃科尔·阿尔布莱奇特

苏珊娜·格拉菲 阿诺·维厄

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 6 页

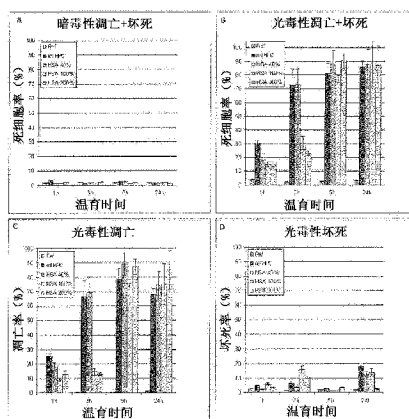
(54) 发明名称

基于人血清白蛋白的用于光动力疗法的纳米粒子载体系统

(57) 摘要

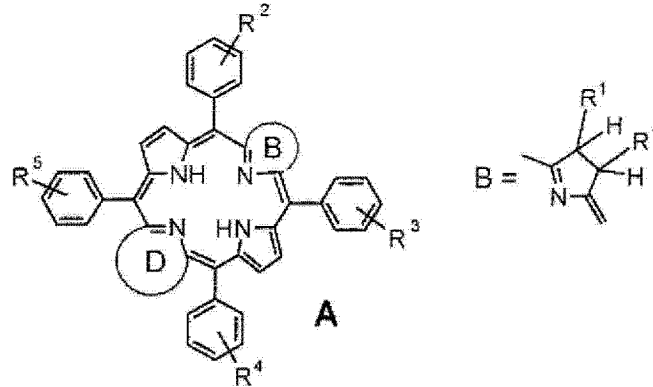
本发明提供了储存稳定的组合物和用于光动力疗法的基于药物的纳米粒子制剂的生产方法,所述制剂包含疏水性光敏剂、人血清白蛋白(HSA)、和稳定剂。这些纳米粒子制剂提供了用于胃肠外施用的治疗有效量的光敏剂(PS)。具体来说,可以使用四吡咯衍生物作为光敏剂,通过这种纳米粒子制剂增强所述四吡咯衍生物的功效和安全性。本发明还提供了在无菌条件下制备基于HSA的纳米粒子的方法。在本发明的一个优选实施方式中,将疏水性PS替莫卞吩配制为用于胃肠外施用的纳米粒子。所述制剂可用于治疗增生性和肿瘤性病症、炎性问题、和更特别是靶向肿瘤细胞。

CN 102740875 A



1. 用于光动力疗法临床应用的纳米粒子药物制剂,其包含:
  - 直径在小于 500nm 范围内的基于人血清白蛋白的纳米粒子;
  - 治疗有效量的基于四吡咯的疏水性光敏剂;
  - 稳定剂;

其中所述光敏剂是式 A 的二氢卟吩或菌绿素衍生物



其中:

$R^1$  是 :H 或 OH

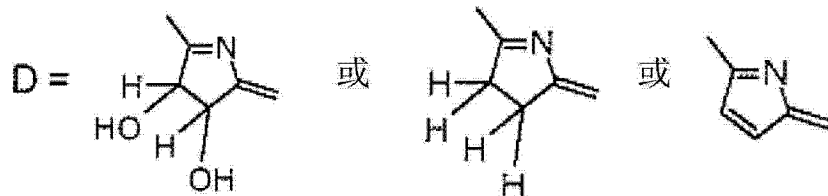
$R^2$  至  $R^5$  是苯环的间位或对位的取代基,且  $R^2$  至  $R^5$  相互独立地选自以下取代基: -OH、-COOH、-NH<sub>2</sub>、-COOX、-NHX、OX、-NH-Y-COOH、或 -CO-Y-NH<sub>2</sub>,

其中:

X 是  $(CH_2CH_2O)_nCH_3$  的聚乙二醇残基,其中  $n=1-30$ ;或碳水化合物部分

Y 是肽或寡肽,其中  $n=1-30$ ,

环 D 具有以下结构:



其中所述稳定剂选自包括戊二醛、甲醛及其组合的典型的稳定剂。

2. 权利要求 1 的纳米粒子药物制剂,其中光敏剂的治疗有效浓度在 10 至 50  $\mu$ g/毫克 HSA 纳米粒子的范围内可变,这相当于水悬液中粒子含量为 5-25mg/ml。

3. 权利要求 1 的纳米粒子药物制剂,其中所述光敏剂是替莫卟吩(mTHPC)、或 2,3-二羟基-5,10,15,20-四(3-羟基苯基)-二氢卟吩(mTHPD-OH)、或 5,10,15,20-四(3-羟基苯基)-卟啉(mTHPP)。

4. 权利要求 1 的纳米粒子药物制剂,其中所述载药纳米粒子在低温保护剂存在下冷冻干燥,所述低温保护剂选自葡萄糖、海藻糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、及其组合。

5. 权利要求 1 的纳米粒子药物制剂,其中优选通过胃肠外手段施用所述制剂,所述胃肠外手段包括静脉内注射。

6. 在无菌条件下制备权利要求 1 的纳米粒子药物制剂的方法,其包括以下步骤:

- a. 将含有氯化钠和调整后的 pH 的人血清白蛋白水溶液中的蛋白质去溶剂化;
- b. 将所述溶液通过过滤装置过滤;

- c. 稳定并纯化所产生的纳米粒子；
  - d. 通过吸附性结合在粒子表面上、掺入性结合、以及两者的组合来荷载光敏剂。
7. 权利要求 6 的制备方法,其中蛋白质去溶剂化的步骤包括受控添加选自乙醇、甲醇、异丙醇、丙酮及其组合的亲水性有机溶剂。
8. 权利要求 6 的制备方法,其中蛋白质去溶剂化的步骤包括加入聚乙二醇浓溶液。
9. 权利要求 6 的制备方法,其中稳定化步骤包括至少一个热过程,并使用至少一种稳定剂。
10. 权利要求 1 的纳米粒子药物制剂在光动力疗法中的应用。
11. 权利要求 10 的纳米粒子药物制剂在肿瘤和其它肿瘤性疾病以及相关病症的光动力疗法中的应用。
12. 权利要求 10 的纳米粒子药物制剂在皮肤病、眼病、或泌尿系病以及相关病症的光动力疗法中的应用。
13. 权利要求 10 的纳米粒子药物制剂在关节炎和类似的炎性疾病、细菌感染的组织、以及相关病症的光动力疗法中的应用。

## 基于人血清白蛋白的用于光动力疗法的纳米粒子载体系统

[0001] 发明人：克劳斯·兰格尔；马蒂亚斯·瓦克尔；比特·罗德；安格莱特·普鲁斯；沃科尔·阿尔布莱奇特；苏珊娜·格拉菲；阿诺·维厄；哈根·冯布里森；卡林·洛和西尔维娅·瓦格内。

[0002] 受让人：拜莱泰克制药市场有限公司

[0003] 1. 发明背景

[0004] 根据 35 USC 119(e) 条的优先权

[0005] 本申请要求由 Klaus Langer 等在 2009 年 12 月 11 日提交的序号为 61/285,902 的美国临时申请的权益和优先权，所述申请题为“基于人血清白蛋白的用于光动力疗法(PDT)的纳米粒子载体系统(NANOPARTICLE CARRIER SYSTEMS BASED ON HUMAN SERUM ALBUMIN FOR PHOTODYNAMIC THERAPY(PDT))”，其通过参考结合于此。

### 2. 发明领域

[0006] 本发明涉及疏水性光敏剂的药物制剂。具体来说，本发明涉及含有疏水性光敏剂的纳米粒子制剂、它们的制备方法、和它们利用静脉内施用在用于破坏不想要的细胞或组织的光动力疗法、更特别是光动力肿瘤疗法中的应用。

[0007] 3. 发明公开状态

[0008] 光动力疗法(PDT)是目前正在开发用于各种医疗应用的最有前途的新技术之一，其特别是用于破坏肿瘤的公认疗法。光动力疗法利用光和光敏剂(染料)来达到它预期的医疗效果。大量天然存在和合成的染料已被评估为用于光动力疗法的潜在光敏剂。研究得最广泛的光敏剂类别也许是四吡咯大环化合物。其中，特别测试了卟啉和二氢卟吩的 PDT 功效。

[0009] 卟啉是具有连接吡咯形成特征性的四吡咯环结构的一碳原子桥的大环化合物。有许多不同类的卟啉衍生物，包括那些含有二氢吡咯单元的卟啉衍生物。二氢卟吩和菌绿素是分别含有一个二氢吡咯单元或两个二氢吡咯单元的卟啉衍生物。

[0010] 二氢卟吩在电磁波谱的红光区和近红外区域具有吸收谱。由于波长较长的光能更深地穿透入组织中，因此，如果采用 PDT 用于肿瘤治疗时，有可能处理更扩大和更深的肿瘤。二氢卟吩可源自于天然来源或源自于全合成。

[0011] 通过将叶绿素或细菌叶绿素衍生化获得来自天然化合物的二氢卟吩。通过全合成制备二氢卟吩和菌绿素的方法通常使用卟啉，然后转化成二氢卟吩或菌绿素系统。例如可以通过用原位产生的二亚胺还原或通过二羟基化来执行该转化步骤，分别产生二氢或二羟基取代的二氢卟吩或菌绿素。

[0012] Raymond Bonnett 等在他们的专利 No. EP 00337601 B1 中公开了通过还原相应的卟啉制备光敏剂的方法。公开了替莫卟吩(化学名称：(间四羟基苯基-二氢卟吩))——一种二氢卟吩的全合成。在欧洲，替莫卟吩(Foscan®)被成功地用作头颈癌 PDT 治疗的光敏剂。类似地，David Dolphin 等的专利申请 WO 09613504 A1 和 Jill MacIpine 等的专利申请 WO 00061584 A1 教导了制备具有改良的性质的新型光敏剂的还原方法。

[0013] 卟啉可以被直接用作 PDT 的光敏剂,或者作为通过让吡咯和醛接受缩合反应合成二氢卟吩的前体。在本领域中,用于该缩合的适当方法早就是已知的。

[0014] 由于光敏剂(PS)的固有特点,PDT 用于治疗各类疾病的应用受到限制。所述光敏剂的固有特点包括它们的高成本、在宿主有机体中的长时间滞留、显著的皮肤光毒性、在生理溶液中的低溶解度、以及较低的靶向有效性,所述在生理溶液中的低溶解度降低了它们血管内施用的有用性,由此导致血栓栓塞意外。这些缺点,特别是现有技术中 PS 的缺点,已导致施用非常高剂量的光敏剂,这大大增加了光敏剂在正常组织中蓄积的可能性,并伴随着影响正常部位的风险。

[0015] 减少成本和降低背景毒性的工作已在进行之中,但与本发明的开发无关。针对改善在生理溶液中的溶解度、皮肤光毒性效应、在宿主有机体中的滞留的工作,以及针对靶向有效性程度较低的工作,在这些领域中,本发明对于 PDT 治疗各种肿瘤形成、增生、和相关疾病的应用提供了新的和不明显的改善。

[0016] 成功应用于光动力肿瘤疗法的大多数物质是亲脂性物质,由于所述物质固有的在水中的低溶解度,它们需要以适当的方式进行配制。因此,非常需要基于四吡咯的光敏剂的新制剂,以提高它们在体内的摄取和它们的生物利用度。

[0017] 集中研究了纳米粒子作为亲脂性药物载体(N. P. Preatorius, T. K. Mandal, 癌症治疗中的工程纳米粒子(Engineered Nanoparticles in Cancer Therapy), Recent Patents on Drug Delivery & Formulation, 2007, 1, 37-51 ;M. N. V. Ravi Kumar, 癌症治疗中的工程纳米粒子(Engineered Nanoparticles in Cancer Therapy), J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 2000, 3, 234-258)。欧洲和美国监管当局已批准了抗癌药物紫杉醇基于人血清白蛋白(HSA)的纳米粒子制剂。

[0018] 在 PCT 公布 No. WO 01/21 174 A1 中, Anand Burman 等公开了紫杉醇抗癌药物及其衍生物和类似物包埋在共聚物胶粒的纳米粒子中的药物制剂的制备方法。通过聚合方法形成所述纳米粒子;但是,大多数基于聚合反应的方法需要使用大量的有机溶剂或不安全的稳定剂如可导致毒副作用的表面活性剂。

[0019] 在现有技术中,纳米粒子被用于包裹/包埋/吸附用于生物医学应用的大分子、其它治疗剂和诊断剂。大多数纳米粒子由聚合物材料制备,并且为了它们的制备,使用了大量有机溶剂和有毒的表面活性剂,而这些需要被完全去除以避免在患者中任何可能的副作用。一些纳米粒子组合物遇到的问题之一是结晶性药物粒子组分的溶解和随后的重结晶。纳米粒子活性剂制剂中的晶体生长和粒子聚集是高度不希望的。在纳米微粒活性剂组合物中存在大晶体可引起不希望的副作用,特别是当制剂为注射剂型时。由粒子聚集和重结晶形成的较大的粒子还可以妨碍血流,导致肺栓塞和死亡。

[0020] 纳米粒子通常是在 10nm 至 1000nm 的大小范围内的固体胶态粒子,并用在一些药物递送系统中。纳米粒子由大分子材料组成,活性成分被溶解、包埋、或包裹在所述大分子材料中,和/或活性成分被吸附或附着在所述大分子材料上。已研究了许多不同种类的纳米粒子材料,例如量子点、基于二氧化硅的纳米粒子、光子晶体、脂质体、基于天然和合成来源的不同聚合物的纳米粒子、和基于金属的纳米粒子。纳米粒子在形状和组成两方面是多样化的。

[0021] 作为光敏剂的载体系统,最吸引人的的是由生物相容性材料组成的纳米粒子。这种

载体系统可以显著改善光动力疗法的治疗方案。具有这种已知的高生物相容性的载体系统是例如人血清白蛋白(HSA)。HSA 材料已被成功配制为纳米粒子(参见 K. Langer 等,在 Int. J. Pharm., 2007, 347, 109-117 中)。

[0022] 作为水不溶性药理活性剂载体的基于蛋白质的纳米粒子在本领域中已知有一些实例。

[0023] 在美国专利 No. US 5, 916, 596 中, Desai 等公开了用于以包被有蛋白质的悬浮粒子的形式递送疏水性抗癌药物紫杉醇的组合物和方法。所述专利公开了直径小于 200nm 大小的基于蛋白质的纳米粒子用于药物递送, 并且这些纳米粒子是无菌过滤的。尺寸更小的纳米粒子在储存期间具有更高的聚集。这项现有技术描述了包被有蛋白质的悬浮的药物粒子, 所述蛋白质起到稳定剂的作用, 但这项专利与本发明无关。

[0024] 用于胃肠外施用的纳米粒子制剂在临床实践中的应用要求能确保根据药典规范所述的制剂的无菌性。此外, 对于临床应用来说, 希望可以将制剂冷冻干燥并在以后在水性介质中复溶。由于纳米粒子基质材料的不稳定性以及光敏剂的不稳定性, 包含 HSA 的纳米粒子光敏剂制剂的无菌性是富有挑战的。常规的灭菌方法(高压蒸汽灭菌、使用环氧乙烷、 $\gamma$  射线照射)与本发明的光敏剂制剂不相容(参见 K. A. Athanasiou 等, Biomaterials, 1996, 17, 93-102 ;C. Volland 等, J. Contr. Rel., 1994, 31, 293-305)。

[0025] Eric Allemann 等在他们的专利申请 WO 03097096 A1 中公开了使用含有聚酯聚合物的可桥联纳米粒子进行胃肠外或局部递送光敏剂的组合物和方法。所述专利申请还公开了这种纳米粒子的制备和应用。使用过滤方法将所述纳米粒子灭菌。然而, 该方法有它的缺点, 并且通常与作为本发明主题的纳米粒子不相容。用于无菌过滤的孔径通常不大于  $0.22\ \mu\text{m}$  ( $\geq 220\text{nm}$ ), 而本发明的纳米粒子基本上集中在 100 和 500nm 之间的总体大小范围内。因此, 无菌过滤有它的缺点, 并且通常与作为本发明主题的纳米粒子不相容。

[0026] 特别是, 在本发明的二氢卟吩或菌绿素型(即携带一个或两个二氢吡咯单元的四吡咯)光敏剂的情况下, 开发无菌纳米粒子制剂和适合于冷冻干燥的纳米粒子制剂是很困难的, 因为这种系统对纳米粒子制备经常使用的操作条件所引起的氧化和光化学改性特别敏感(Y. Hongying 等, Dyes Pigm, 1999, 43, 109-117 ;C. Hadjur 等, J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 1998, 45, 170-178 ;R. Bonnett 等, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1999, 325-328)。这些分别具有一个或两个二氢吡咯单元的二氢卟吩或菌绿素型光敏剂在它们的化学和物理行为上与它们相应的卟啉显著不同(R. Bonnett 等, J. Chem. Soc. Perkin Tras. 2, 1999, 325-328 ;R. Bonnett 等, J. Porphyrins Phthalocyanines, 2001, 5, 652-661)。

[0027] 关于被用作光敏剂载体的基于 HSA 的纳米粒子的已知现有技术未解决与基于 HSA 的纳米粒子的无菌性和冷冻干燥相关的问题, 并且所研究的光敏剂由于它们的化学结构更稳定, 在这方面是不太成问题的。

[0028] 由于疏水性光敏剂固有的在水中的低溶解度, 需要使用适当的载体对其进行配制。因此, 非常需要基于四吡咯的光敏剂的新制剂来增加它们在体内的摄取和它们的生物利用度。由于光敏剂(PS)的固有特点, PDT 用于治疗各类疾病的应用已受到限制。所述光敏剂的固有特点包括它们的高成本、在宿主有机体中的长时间滞留、显著的皮肤光毒性、在生理溶液中的低溶解度、以及较低的靶向有效性, 所述在生理溶液中的低溶解度降低了它们用于血管内施用的有用性, 由此导致血栓栓塞意外。

[0029] 本发明通过提供由天然材料制成的药物相容性纳米粒子作为药物递送系统并用于胃肠外施用而消除了疏水性光敏剂制剂中观察到的上述问题。本发明还提供了提高敏感的疏水性 PS 的生物利用度、稳定性和溶解度的方法。

[0030] 发明的目的和概要

[0031] 本发明的目的是解决用于光动力疗法的疏水性光敏剂的适当的纳米粒子制剂的问题,所述制剂满足了在临床实践中用于胃肠外施用的必需条件。

[0032] 本发明的另一个目的是提供用于光动力疗法的疏水性光敏剂基于生物相容性 HSA 材料的纳米粒子药物制剂。

[0033] 本发明的又一个目的是提供四吡咯型疏水性光敏剂、即二氢卟吩和菌绿素基于人血清白蛋白(HSA)和稳定剂的纳米粒子制剂,所述稳定剂优选为戊二醛、甲醛、或热处理。

[0034] 本发明的再一个目的是能够将无菌的基于 HSA 的纳米粒子冷冻干燥并在需要时在水性介质中复溶。

[0035] 本发明的又一个目的是提供基于 HSA 的纳米粒子光敏剂制剂在 PDT 中的应用方法。

[0036] 简单地说,本发明提供了储存稳定的组合物和用于光动力疗法的基于药物的纳米微粒制剂的生产方法,所述制剂包含疏水性光敏剂、人血清白蛋白(HSA)、和稳定剂。这些纳米粒子制剂提供了用于胃肠外施用的治疗有效量的光敏剂(PS)。具体来说,可以使用四吡咯衍生物作为光敏剂,通过这种纳米粒子制剂增强所述四吡咯衍生物的功效和安全性。还提供了在无菌条件下制备基于 HSA 的纳米粒子的方法。在本发明的一个优选实施方式中,将疏水性 PS 替莫卟吩配制为用于胃肠外施用的纳米粒子。所述制剂可用于治疗增生性和肿瘤性疾病、炎症问题、并且更特别是靶向肿瘤细胞。

[0037] 结合附图阅读以下说明,本发明的上述和其它主题、特点、和优点将变得显而易见。

[0038] 附图和表的说明

[0039] 表 I :荷载 5, 10, 15, 20, - 四(间羟基苯基)-卟啉(mTHPP)的 HSA 纳米粒子的物理化学特性(平均值  $\pm$  S. D. ;n=6)

[0040] 表 II :在乙醇中的 mTHPP 以及在水溶液中存在 0.75% 和 2.0% 可溶性 HSA 的条件下荷载 mTHPP 的 HSA 纳米粒子形式的荧光寿命

[0041] 表 III :在乙醇中的孟加拉红(Rose Bengal)以及在水溶液中存在 0.75% 和 2.0% 可溶性 HSA 的条件下荷载 mTHPP 的 HSA 纳米粒子形式的单线态氧产生和三重态参数

[0042] 表 IV :荷载 5, 10, 15, 20, - 四(间羟基苯基)-二氢卟吩(mTHPC)的 HSA 纳米粒子的物理化学特性(平均值  $\pm$  S. D. ;n=3)

[0043] 图 1 与 5, 10, 15, 20, - 四(间羟基苯基)-卟啉(mTHPP) (○, 平均值  $\pm$  S. D. ;n=6) 和 5, 10, 15, 20, - 四(间羟基苯基)-二氢卟吩(mTHPC) (●, 平均值  $\pm$  S. D. ;n=6) 孵育的 HSA 纳米粒子依赖于溶解的 HSA 浓度(0.75%-2.0%)的载药量。

[0044] 图 2 具有 mTHPP (○) 和 mTHPC (●) 的 HSA 纳米粒子在存在 1.5% 可溶性 HSA 的条件下依赖于在 5 和 10 之间范围内的 pH 值的载药量(平均值  $\pm$  S. D. ;n=3)。

[0045] 图 3 在存在 1.5% 溶解的 HSA 的条件下在 34.4% (V/V) 乙醇中制备的用于药物吸附过程的荷载了 mTHPP 的 HSA 纳米粒子的透射电镜图像。

[0046] 图 4A-D 具有光敏剂 5, 10, 15, 20, - 四 (3- 羟基苯基) - 卟啉 (mTHPP) 的基于 HSA 的纳米粒子的细胞摄取分析

[0047] 图 5A-D 具有光敏剂 5, 10, 15, 20, - 四 (3- 羟基苯基) - 二氢卟吩 (mTHPC) 的基于 HSA 的纳米粒子的细胞摄取分析。

[0048] 图 6A-D 5 个不同样品在孵育不同时间后对 Jurkat 细胞的暗毒性和光毒性效应。

[0049] 图 7 Jurkat 细胞在孵育不同时间后对 3  $\mu$  M mTHPC 和不同的荷载 mTHPC 的 HSA 纳米粒子的细胞内摄取。

## 具体实施方式

[0050] 本发明提供了适合于胃肠外施用的光敏剂基于蛋白质的纳米粒子药物制剂。当与现有技术的基于聚合物的纳米粒子相比时,所述基于蛋白质的纳米粒子是可生物降解的、无毒的、长期稳定的、无抗原性的,并促进细胞摄取。本发明还提供了适当的方法来制备如疏水性光敏剂(PS)二氢卟吩和菌绿素这样的敏感化合物的基于蛋白质的纳米粒子,所述疏水性光敏剂通常在溶解度和稳定性方面具有问题,从而产生重大的配制障碍,特别是对于胃肠外施用来说。

[0051] 本发明还提供了使用优选主要选自二氢卟吩和菌绿素型的光敏剂制备含光敏剂纳米粒子的药物制剂的方法。本发明的方法还可以用于本领域已知的多种其它疏水性 PS。

[0052] 本发明还提供了供 PDT 中临床应用的基于 HSA 纳米粒子的疏水性光敏剂制剂的应用方法。使用基于纳米粒子的制剂,从而使疏水性 PS 变成可溶以供静脉内施用。所述应用方法包括施用包埋了 PS 的纳米粒子、它们蓄积在靶组织中、和通过特定波长的光激活光敏剂。优选通过胃肠外手段例如但不限于静脉内注射来施用。与其它递送系统相比,纳米粒子更有利于静脉内递送,因为最小的毛细血管在 5-6  $\mu$  m 的范围内。

[0053] 基于 HSA 的纳米粒子药物制剂的治疗应用包括但不限于皮肤病、眼病、泌尿系病、和炎性疾病例如关节炎。更优选的是用于治疗肿瘤组织、肿瘤形成、增生和相关病症的应用。

[0054] 用于制备荷载光敏剂的纳米粒子的材料

[0055] 1 人血清白蛋白(HSA):

[0056] 人血清白蛋白(HSA)是人体血浆中最丰富的蛋白质。它是可溶的和单体的。本发明中使用的白蛋白优选来自人源或人血清白蛋白的重组形式(rHSA)。血浆蛋白 HSA 具有超过用于纳米粒子制备的其它材料的明显优势,因为它们是可生物降解的并易于以确定的尺寸制备。此外,它们可以带有反应性基团例如巯基、氨基、和羧基基团,使得它们适合于配体结合和表面改性。包埋了药物的 HSA 可以很容易地被蛋白酶代谢,并可以定量载药量。

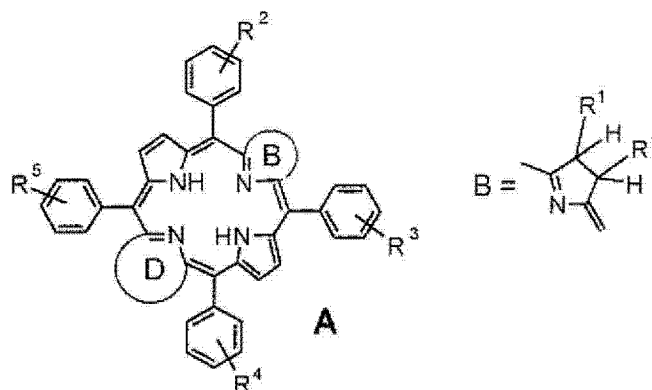
[0057] 用于本发明潜在制剂的 HSA 得自 Sigma-Aldrich (通过琼脂糖凝胶电泳测得的纯度为 96-99%)。检测该产品的 HIV I 和 HIV II、HCV、和 HbsAg 为阴性。所述蛋白质以低压冻干形式提供。

[0058] 2. 光敏剂:

[0059] 本发明所使用的光敏剂优选为二氢卟吩和菌绿素型四氢吡咯,即分别为二氢卟啉和四氢卟啉。这种光敏剂可源自于天然来源或通过全合成。通过首先合成卟啉,然后将它转化成二氢卟吩或菌绿素系统,可以执行二氢卟吩和菌绿素的全合成。

[0060] 本发明所使用的二氢卟吩和菌绿素具有以下优选结构：

[0061]



[0062] 其中：

[0063]  $R^1$  是 H 或 OH

[0064]  $R^2$  至  $R^5$  是苯环的间位或对位的取代基，且  $R^2$  至  $R^5$  相互独立地选自以下取代基： $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOX$ 、 $-NHX$ 、 $OX$ 、 $-NH-Y-COOH$ 、或  $-CO-Y-NH_2$

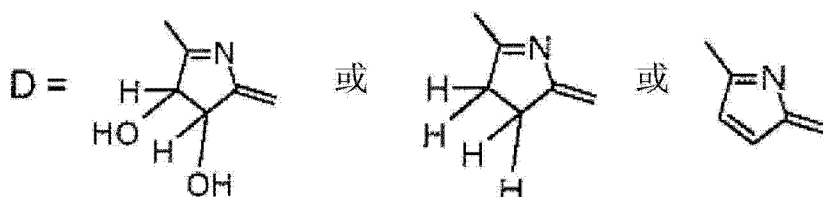
[0065] 其中：

[0066] X 是  $(CH_2CH_2O)_nCH_3$  的聚乙二醇残基，其中  $n=1-30$ ；或碳水化合物部分

[0067] Y 是肽或寡肽，其中  $n=1-30$ 。

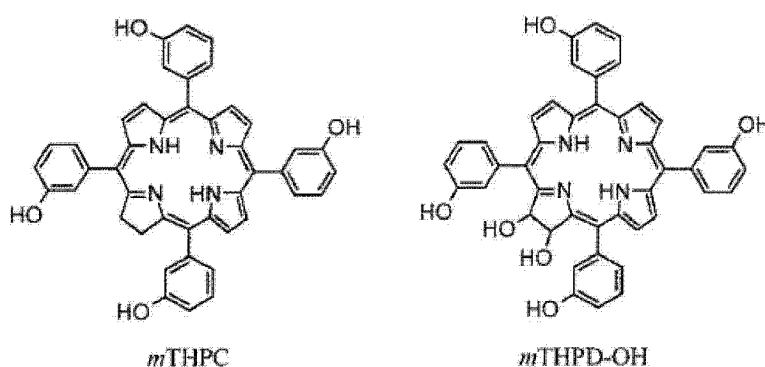
[0068] 环 D 具有以下结构：

[0069]



[0070] 被配制在本发明的纳米粒子中的特别优选的二氢卟吩具有以下结构：

[0071]



[0072] 通过下文公开的方法制备的纳米粒子具有可预见的大小和均匀度(用粒度分布表示)。在无菌制造过程中制备纳米粒子。优选的基于 HSA 的纳米粒子具有小于 500nm 直径的平均尺寸。术语“直径”并不旨在表示纳米粒子必须具有球形。该术语是指纳米粒子的近似平均宽度。

[0073] 对于临床应用来说，纳米粒子必须不含任何有毒物质，因此通常通过本领域已知的不同手段例如高压蒸汽灭菌、使用环氧乙烷、和  $\gamma$  射线照射将纳米粒子灭菌。然而，这些

常规的灭菌方法与本发明的光敏剂制剂不相容。对于这种化学和热敏感的材料来说,备选方法是通过预定大小的膜滤器无菌过滤。在本发明中,按医疗应用所要求的,在完全无菌条件下制备纳米粒子。

[0074] 在本发明特别优选的实施方式中,基于 HSA 的纳米粒子具有小于 500nm 的平均粒度,并且光敏剂是替莫唑吩 5, 10, 15, 20- 四 (3- 羟基苯基)- 二氢卟吩(mTHPC)。在本发明另一个实施方式中,基于 HSA 的纳米粒子具有小于 500nm 的平均粒度,并且光敏剂是 2, 3- 二羟基 -5, 10, 15, 20- 四 (3- 羟基苯基)- 二氢卟吩(mTHPD-OH)。在本发明的又一个实施方式中,使用 5, 10, 15, 20- 四 (间羟基苯基)- 卟啉(mTHPP) 作为光敏剂。

[0075] 可以将本发明的纳米粒子脱水以提高储存稳定性。优选的脱水方法是冷冻干燥或冻干。任选地,可以使用低温保护剂作为添加剂,以提高冷冻干燥期间和在水性介质中复溶期间的稳定性(Anhorn, M. G., Mahler, H.-C., Langer, K., 具有不同赋形剂的人血清白蛋白(HSA)的纳米粒子的冷冻干燥(Freeze-drying of human serum albumin(HSA)-nanoparticles with different excipients), Int. J. Pharm. 2008, 363, 162-169.)

[0076] 通过去溶剂化程序制备本发明基于 HSA 的纳米粒子。原则上,通过控制加入亲水性有机溶剂例如乙醇、甲醇、异丙醇、和(或)丙酮引起 HSA 水溶液的蛋白质去溶剂化。作为备选,可以利用加入聚乙二醇浓溶液(在水中  $\geq 20\%$ ; 优选实施方式为 40%) 用于去溶剂化。通过热过程或通过使用双官能醛(即戊二醛)或甲醛来稳定所产生的纳米粒子。

[0077] 在存在溶解的白蛋白的条件下执行光敏剂吸附到预成型的纳米粒子上。可以在存在低温保护剂的条件下将载药纳米粒子冷冻干燥,所述低温保护剂包括但不限于葡萄糖、海藻糖、蔗糖、山梨醇、和甘露醇等

[0078] 在本发明中,光敏剂的治疗有效浓度为约 10 至 50  $\mu\text{g}/\text{毫克}$  HSA 纳米粒子,这相当于水悬液中粒子含量为 5-25mg/ml,典型地为 8mg/ml。可以在存在光敏剂并使用聚乙二醇作为去溶剂化剂的条件下通过 HSA 去溶剂化来执行在 HSA 纳米粒子中掺入药物。在无菌条件下执行整个纳米粒子制备过程。

[0079] 通过以下实施例进一步说明本发明,但本发明不受此限制。

[0080] 实施例 1a:

[0081] 具有光敏剂 5, 10, 15, 20- 四 (间羟基苯基)- 卟啉(mTHPP) 的基于 HSA 的纳米粒子的制备和表征; 吸附性结合于粒子表面(见表 1)

[0082] 通过去溶剂化方法制备基于人血清白蛋白(HSA)的纳米粒子。原则上,将 100mg HSA 溶解在 1ml 10mM 的氯化钠溶液中。将 pH 调整到 8, 并将溶液通过 0.22  $\mu\text{m}$  的过滤装置(Schleicher und Schüll, Dassel, 德国)预先过滤。该过滤过程足以基本上去除所有细菌。通过在室温和持续搅拌(380rpm)下连续加入 4.0ml 乙醇来形成纳米粒子。使用泵送装置(Ismatec IPN, Glattbrugg, 瑞士)以 1ml/ 分钟的速率加入确定量的乙醇。在蛋白质去溶剂化完成后,加入 57.76  $\mu\text{L}$  8% 戊二醛水溶液,以通过化学交联稳定所产生的蛋白质纳米粒子。所使用的戊二醛浓度相当于 100mg HSA 中的氨基基团 100% 化学计量交联。然后将粒子搅拌 1 小时,并通过 3 个周期的 20,817xg 离心 10 分钟进行纯化,并将沉淀物重新分散在 1.0ml 水中。在超声浴中 5 分钟来执行重新分散步骤。通过微重力测量法测定纳米粒子含量,并将纳米粒子含量调整成 15.0mg/ml。

**[0083] 载药**

[0084] 典型地,将 100mg HSA 溶解在 1ml 10mM 氯化钠溶液中。将 pH 滴定到 8.0,并将溶液通过 0.22  $\mu$ m 的过滤装置(Schleicher und Schüll, Dassel, 德国)过滤。向 333.0  $\mu$ L 纯化的 HSA 纳米粒子悬液(15mg/ml)中分别加入 56.3、75.0、93.8、12.5、131.3、和 150.0  $\mu$ L (0.75–2.0%)所产生的 HSA 水溶液。图 1 示出了基于 HSA 的纳米粒子针对系统中溶解 HSA 的浓度的载药量。用纯水将悬液调整到 500.0  $\mu$ L,然后加入 112.5  $\mu$ L mTHPP 乙醇储存液(乙醇 96% (V/V), 1mg/ml)和 137.5  $\mu$ L 96% (V/V)乙醇。在 5 和 10 之间的 pH 值下执行孵育(见图 2)。在持续振荡(15°C, 660rpm)下将样品孵育 2h。将粒子通过在 15°C 下以 20,817xg 重复离心 10 分钟进行纯化,并在超声浴中 5 分钟来重新分散在 1ml 水中。在图 2 中,示出了具有 mTHPP (o) 和 mTHPC (•) 的基于 HSA 的纳米粒子在存在 1.5% 可溶性 HSA 的条件下取决于在 5 和 10 之间范围内的 pH 值的载药量(平均值  $\pm$  S. D. ;n=3)。图 1 和 2 显示,基于 HSA 的纳米粒子的载药量取决于 HSA 的浓度和它的 pH。pH 值可以影响载药量。

[0085] 用于制备粒子的所有溶液均是无菌的,并通过孔径为 0.22  $\mu$ m 的膜预先过滤。将所使用的所有器械在 121°C 下高压蒸汽灭菌超过 20 分钟。在空气层流柜中执行用于制备粒子的所有操作步骤。因此,在完全无菌条件下配制本发明基于 HSA 的纳米粒子,以确保生产用于治疗应用的无菌纳米粒子。

[0086] 使用 Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments, Malvern, UK),通过光子相关光谱法测量平均粒度和多分散性。通过微重力测量法测定纳米粒子含量。通过透射电镜(TEM)测定粒子的形态。图 3 描绘了在在 34.4% (V/V)乙醇中存在 1.5% 溶解的 HSA 的条件下制备的用于药物吸附过程的荷载 mTHPP 的 HSA 纳米粒子通过 TEM 产生的图像。

[0087] 间接定量程序:在分光光度计法定量纳米粒子上清液中未结合的药物后,计算纳米粒子的 mTHPP 荷载量。

[0088] 直接定量程序:将 10mg 胃蛋白酶溶解在 1ml 1% 甲酸水溶液中。将含有 1.0mg 荷载了光敏剂的 HSA 纳米粒子的一小份试样加入到 250  $\mu$ L 胃蛋白酶溶液中。用纯水将混合物调整到 500.0  $\mu$ L。在持续振荡下将样品孵育 2h。在孵育后,加入 1.0ml 96% (V/V)乙醇,然后将溶液离心(15°C, 20,817g, 30 分钟)。向 800.0  $\mu$ L 上清液中加入 200.0  $\mu$ L 量的 50mM 碳酸氢盐缓冲液(pH=9)。在 512nm 下以光度计法测量溶液的 mTHPP (在 mTHPC 的情况下为 517nm),以测定与纯化的纳米粒子附着的光敏剂的含量。

[0089] 可以根据以下方案执行纳米粒子的冻干:

[0090] 将海藻糖以 3% (m/V)的浓度加到纳米粒子样品中,用于冷冻干燥过程。将样品转移到冷冻干燥器中,并以 1°C / 分钟的速率将搁架温度从 5°C 降低至 -40°C。将压力设定为 0.08 毫巴。将这些参数保持 6h。将温度以 0.5°C / 分钟从 -40°C 增加至 -25°C 来完成初次干燥。压力保持不变。在初次干燥的加热升温结束时,执行压力上升试验(PRT)。随着初次干燥的结束,将温度以 0.2°C / 分钟的速率增加至 25°C,继之以二次干燥。在 60mT (=0.08 毫巴)的压力下保持该温度 6h。

[0091] 根据欧洲药典的 2.6.1 专论“无菌性”,证明纳米粒子制剂的无菌性。通过所述专论中描述的直接接种法执行无菌性测试。

[0092] 表 I 显示了用上述方法制备的荷载 5, 10, 15, 20, -四(间羟基苯基)-吡啶(mTHPP)的 HSA 纳米粒子的物理化学特性(平均值  $\pm$  S. D. ;n=6)。

[0093] 表 I :荷载 mTHPP 的 HSA 纳米粒子的物理化学特性(平均值  $\pm$  S. D. ;n=6)

参数	未荷载	0.75% HSA	1.0% HSA	1.25% HSA	1.5% HSA	1.75% HSA	2.0% HSA
粒子直径 (nm)	189.9 $\pm$ 0.4	194.7 $\pm$ 6.4	197.0 $\pm$ 5.0	195.6 $\pm$ 3.0	204.0 $\pm$ 5.2	199.7 $\pm$ 14.3	203.0 $\pm$ 18.0
[0094] 多分散性	0.045 $\pm$ 0.024	0.050 $\pm$ 0.001	0.026 $\pm$ 0.011	0.064 $\pm$ 0.016	0.009 $\pm$ 0.009	0.069 $\pm$ 0.009	0.086 $\pm$ 0.082
mTHPP 荷载量 ( $\mu$ g/mg)	-	21.6 $\pm$ 6.8	21.0 $\pm$ 7.0	21.1 $\pm$ 0.2	20.3 $\pm$ 1.0	18.6 $\pm$ 0.2	17.3 $\pm$ 0.3

[0095] 表 II 显示了用上述方法制备的荷载 5, 10, 15, 20, - 四(间羟基苯基)-卟啉(mTHPP)的 HSA 纳米粒子的荧光寿命。分别在存在 0.75% 和 2.0% 可溶性 HSA 的条件下进行制备。最长组分  $\tau_3$  为 8.2ns, 与 mTHPP 单体的寿命(9.6ns)近似。对于与大单位连接的光敏剂, 例如与树枝状聚合物偶联的脱镁叶绿酸 a 而言, 已报道了这种略为缩短的寿命。 $\tau_3$  的振幅超过荷载 mTHPP 的 HSA 纳米粒子的总荧光强度的 40%。同时, 2.1-2.3ns 的衰变时间  $\tau_2$  显示振幅为约 25%。最短寿命  $\tau_4$  (0.35ns) 对总荧光信号的贡献为 32.9%。

[0096] 表 II :在乙醇中的 mTHPP 以及在水溶液中存在 0.75% 和 2.0% 可溶性 HSA 的条件下荷载 mTHPP 的 HSA 纳米粒子形式的荧光寿命

样品	$\tau_1$ (ns) $\pm$ 0.05	振幅 (%)	$\tau_2$ (ns) $\pm$ 0.05	振幅 (%)	$\tau_3$ (ns) $\pm$ 0.05	振幅 (%)	$\chi^2$
在 EtOH 中的 mTHPP	-	-	-	-	9.6	100	1.01
[0097] HSA 纳米粒子 0.75%可溶性 HSA	0.29	28.7	2.1	25.8	8.2	45.5	0.97
HSA 纳米粒子 2.0%可溶性 HSA	0.35	32.9	2.3	25.5	8.2	41.6	1.02

[0098] 表 III 显示了由参比物孟加拉红(Rose Bengal)和荷载光敏剂的 HSA 纳米粒子制剂产生的三重态和单线态氧的寿命。孟加拉红显示出如同它早先由 Redmond 等(1999)所描述的寿命和量子产率。尽管纳米粒子两种制剂的量子产率均显示出减少, 但观察到了活性氧物质的寿命增加。单线态氧寿命的增加表明光敏剂被保持在单体形式。由于纳米粒子表面的低氧环境, 可以预期到量子产率的降低。可以假定, 在 HSA 纳米粒子降解并释放光敏剂后, 单线态氧的产生增加。

[0099] 表 III :在乙醇中的孟加拉红和在水溶液中存在 0.75% 和 2.0% 可溶性 HSA 的条件下荷载 mTHPP 的 HSA 纳米粒子形式的单线态氧产生和三重态参数

样品	$\tau_T$ ( $\mu$ s)	$\tau_A$ ( $\mu$ s)	$\Phi_A$ ( $\pm$ 0.03)
孟加拉红	3.3 $\pm$ 0.1	64.1 $\pm$ 0.2	0.75
[0100] HSA 纳米粒子 0.75%可溶性 HSA	13.7 $\pm$ 0.2	149 $\pm$ 1	0.04

[0101]	<b>HSA 纳米粒子</b> <b>2.0%可溶性 HSA</b>	<b>8.0±0.1</b>	<b>134±1</b>	<b>0.03</b>
--------	---------------------------------------	----------------	--------------	-------------

[0102] 实施例 1b

[0103] 具有光敏剂 mTHPC 的基于 HSA 的纳米粒子的制备和表征 ;吸附性结合于粒子表面 (表 IV)

[0104] 除了使用 mTHPC 代替 mTHPP 以外,根据实施例 1a 制备纳米粒子。

[0105] 如实施例 1a 所述,对荷载 mTHPC 的纳米粒子进行表征。表 IV 显示了荷载了 5, 10, 15, 20, - 四 (间羟基苯基) - 二氢卟吩 (mTHPC) 的 HSA 纳米粒子的物理化学特性 (平均值 ± S. D. ; n=3)

[0106] 表 IV :荷载 mTHPC 的 HSA 纳米粒子的物理化学特性 (平均值 ± S. D. ; n=3)

参数	未荷载	0.75% HSA	1.0% HSA	1.25% HSA	1.5% HSA	1.75% HSA	2.0% HSA
粒子直径 (nm)	211.6±5.7	200.4±0.9	199.6±0.8	199.0±1.8	203.2±2.2	208.2±2.7	206.9±3.6
[0107] 多分散性	0.038±0.008	0.043±0.018	0.006±0.004	0.044±0.012	0.055±0.018	0.016±0.010	0.081±0.062
mTHPP 荷载量 (µg/mg)	-	24.1±0.5	25.2±0.5	21.7±1.9	23.2±0.8	21.4±2.3	24.2±1.1

[0108] 实施例 1c

[0109] 具有光敏剂 mTHPC 的基于 HSA 的纳米粒子的制备和表征 ;掺入性结合

[0110] 使用聚乙二醇作为去溶剂化剂,通过去溶剂化方法制备基于人血清白蛋白 (HSA) 的纳米粒子。原则上,将 90mg 量的 HSA 溶解在 0.9ml 10mM 的氯化钠溶液中。将 pH 调整到 6-8,并将溶液通过 0.22 µm 的过滤装置 (Schleicher und Schüll, Dassel, 德国) 过滤。以 0.1ml 分别含有 3、7.5、和 15mg/ml mTHPC 的乙醇溶液形式加入 mTHPC。在 15 分钟的孵育时间后,通过在室温和连续搅拌 (400-500rpm) 下连续加入 4.0ml 聚乙二醇 (PEG4000) 水溶液来形成纳米粒子。使用泵送装置 (Ismatec IPN, Glatfbrugg, 瑞士) 以 1ml/ 分钟的速率加入确定量的乙醇。在蛋白质去溶剂化后,加入 78 µL (或分别为 104 和 182 µL) 8% 戊二醛水溶液,以通过化学交联来稳定所产生的蛋白质纳米粒子。所使用的戊二醛浓度相当于 90mg HSA 中氨基基团的 150% (或分别为 200% 和 350%) 化学计量交联。将粒子搅拌 3 小时,并通过 3 个周期的以 20,817g 的速率离心 10 分钟和在超声浴中重新分散在 1.0ml 水中 (5 分钟) 来纯化粒子。通过微量重力测量法测定纳米粒子含量,并将纳米粒子含量调整成 15.0mg/ml。

[0111] 将用于制备粒子的所有溶液均通过孔径为 0.22 µm 的膜无菌过滤。将所使用的所有器械在 121 °C 下高压蒸汽灭菌超过 20 分钟。在空气层流柜中执行用于制备粒子的所有操作步骤。

[0112] 如实施例 1a 所述,对荷载 mTHPC 的纳米粒子进行表征。

[0113] 实施例 2a

[0114] 分析具有光敏剂 5, 10, 15, 20- 四 (3- 羟基苯基) - 卟啉 (mTHPP) 的基于 HSA 的纳米粒子的细胞摄取 (图 4A-D)。

[0115] 为了分析基于 HSA 的纳米粒子的细胞摄取和细胞内分布,使用激光共聚焦扫描

显微镜。将 DiFi 细胞培养在玻片(Becton Dickinson)上,并与纳米粒子制剂在 37°C 下孵育 4h。之后,用 PBS 洗涤细胞两次,并用伴刀豆球蛋白 A AlexaFluor350 (5  $\mu$ g/ml; Invitrogen, Karlsruhe)将膜染色 2 分钟。用 0.4% 多聚甲醛将细胞固定 6 分钟。在固定后,洗涤细胞,然后将细胞包埋在 Vectashield HardSet 封固剂(Axxora, Grünberg)中。用具有 510NLO Meta 装置(Zeiss, Jena)、chameleon 飞秒激光器或氩离子激光器、和 LSM 图像检查软件的 Axiovert 200M 显微镜执行显微镜分析。基于 HSA 的纳米粒子的绿色自发荧光和光敏剂 5, 10, 10, 20- 四(3- 羟基苯基)卟啉(mTHPP)的红色自发荧光被用于测定分布。

[0116] 图 4A-D 示出了通过激光共聚焦扫描显微镜研究的具有光敏剂 5, 10, 15, 20- 四(3- 羟基苯基)-卟啉(mTHPP)的基于 HSA 的纳米粒子(0.75 和 2.00% 可溶性 HSA)的细胞摄取和细胞内分布。将 DiFi 细胞培养在玻片上,并与纳米粒子在 37°C 下孵育 4h。使用光敏剂 mTHPP 的红色自发荧光和纳米粒子的绿色自发荧光。拍摄细胞内切面的照片。(图 4A-B)将细胞与具有 mTHPP 的 HSA 纳米粒子(0.75% 可溶性 HSA)孵育。(图 4C-D)将细胞与具有 mTHPP 的 HSA 纳米粒子(2.00% 可溶性 HSA)孵育。(图 4A)和(图 4C)显示了绿色纳米粒子通道;(图 4B)和(图 4D)显示了红色光敏剂通道。比例尺 =20  $\mu$ m。

[0117] 实施例 2b

[0118] 具有光敏剂 5, 10, 15, 20- 四(3- 羟基苯基)-二氢卟吩(mTHPC)的基于 HSA 的纳米粒子的相应细胞摄取和细胞粘附(图 5A-D)。

[0119] 图 5A-B 示出了通过激光共聚焦扫描显微镜研究的具有光敏剂 5, 10, 15, 20- 四(3- 羟基苯基)-二氢卟吩(mTHPC)的基于 HSA 的纳米粒子(0.75 和 2.00% 可溶性 HSA)的细胞摄取/粘附和细胞内分布。将 DiFi 细胞培养在玻片上,并与纳米粒子在 37°C 下孵育 4h。使用光敏剂 mTHPC 的红色自发荧光和纳米粒子的绿色自发荧光。拍摄细胞内切面的照片。(图 5A-B)将细胞与具有 mTHPC 的 HSA 纳米粒子(0.75% 可溶性 HSA)孵育。(图 5C-D)将细胞与具有 mTHPC 的 HSA 纳米粒子(2.00% 可溶性 HSA)孵育。(图 5A)和(图 5C)显示了绿色纳米粒子通道;(图 5B)和(图 5D)显示了红色光敏剂通道。比例尺 =20  $\mu$ m。

[0120] 除了使用 HSA-mTHPC 代替 HSA-mTHPP 以外,根据实施例 2a 制备样品。

[0121] 实施例 3

[0122] 荷载光敏剂的纳米粒子的细胞内摄取和光动力活性

[0123] mTHPC-HSA- 纳米粒子的细胞内摄取和光毒性:

[0124] 利用在 RPMI 1640 培养基中培养的 Jurkat 细胞悬液研究本发明纳米粒子制剂的细胞内摄取和光毒性。将所有细胞在被荷载到基于不同浓度 HSA 的纳米粒子中的 3  $\mu$ M mTHPC 和 mTHPC 中孵育规定的一段时间(1h、3h、5h、24h)。HSA 浓度不同的基于 HSA 的纳米粒子被用于测定细胞悬液的细胞内摄取和光毒性效应。

[0125] 具有 3 种不同的 HSA 浓度的基于 mTHPC-HSA 的纳米粒子的不同样品包括:

[0126] 1 与戊二醛交联的 HSA 40%

[0127] 2 与戊二醛交联的 HSA 100%

[0128] 3 与戊二醛交联的 HSA 200%

[0129] 在以下 5 个样品中孵育 Jurkat 细胞悬液:

[0130] 1. 参比:不向细胞添加光敏剂

[0131] 2. 仅 3  $\mu$ M mTHPC

[0132] 3. 基于 HSA 40%-mTHPC 的纳米粒子

[0133] 4. 基于 HSA 100%-mTHPC 的纳米粒子

[0134] 5. 基于 HSA 200%-mTHPC 的纳米粒子

[0135] 光毒性

[0136] 将与上述 5 个样品孵育的 Jurkat 细胞悬液在 660nm 照射 2 分钟(使用 LED),光剂量为  $290\text{mJ}/\text{cm}^2$ ,以研究细胞的光毒性效应。

[0137] 使用台盼蓝试验评估坏死细胞,通过细胞形状变化(凋亡泡形成)检测凋亡细胞。

[0138] 图 6A-D 描绘了 5 个不同样品在孵育不同时间后对 Jurkat 细胞的暗毒性和光毒性效应。

[0139] 图 6A 示出了所观察到的暗毒性样品,在此发现几乎为零,表明基于 HSA 的纳米粒子无毒性效应。在各情况下,在 5 个样品中孵育 Jurkat 细胞。在黑暗中孵育 1h、3h、5h、和 24h 后,研究各样品的等份试样。使用台盼蓝试验评估坏死细胞,通过细胞形状变化(凋亡泡形成)检测凋亡细胞。很少或没有发现效应。换言之,对于所使用的 mTHPC 浓度来说,未观察到暗毒性。

[0140] 另一方面,图 6B、6C、6D 分别和共同显示了由于光毒性效应引起的细胞凋亡和坏死效应。与图 6B 相比,图 6C 显示了凋亡率,而图 6D 另行显示了在孵育介质中坏死率。图 6A-D 的每个图中的参比样品表示在没有光敏剂下孵育和照射的细胞。用 LED 在 660nm 照射细胞,暴露时间为 120s,光剂量为  $290\text{mJ}/\text{cm}^2$ 。将实验重复 2 次,对于每次测量来说,在光暴露后 2 小时将细胞数计数 3 次,以得到平均值。误差棒表示 6 次测量( $n=6$ )的标准偏差。图 6C 和 6D 分别示出了细胞在 5 个不同样品中孵育时,在上述不同孵育时间后由于光毒性引起的凋亡和坏死效应。看来,本发明的制剂被用在 PDT 中时,可引发大量的凋亡——一种持久的、温和的细胞死亡和较低量的坏死——一种具有高免疫系统应答的细胞死亡,但在低剂量时是需要的,以防止肿瘤恢复。

[0141] mTHPC 和不同的荷载 mTHPC 的 HSA 纳米粒子的细胞内摄取的定量

[0142] 在  $3\mu\text{M}$  mTHPC 和基于包裹了  $3\mu\text{M}$  mTHPC 的不同浓度 HSA 的纳米粒子中,将在细胞生长介质(RPMI 1640)中的 Jurkat 细胞悬液孵育 1h、3h、5h、24h。在孵育后,将细胞计数(使用血球计)、用磷酸盐缓冲液洗涤(PBS,  $400\text{g}$ , 3 分钟,  $2\times$ ),并将细胞团在  $-20^\circ\text{C}$  储存并冷冻过夜,以破坏细胞膜。利用超声( $>5$  分钟)在乙醇中从这些细胞提取 mTHPC。利用标准的荧光系列通过荧光强度测定乙醇提取物中的 mTHPC 浓度。为了计算细胞内浓度,假定细胞直径为  $10\mu\text{m}$ 。

[0143] 图 7 显示了在孵育不同时间后, Jurkat 细胞对  $3\mu\text{M}$  mTHPC 和不同的荷载 mTHPC 的 HSA 纳米粒子的细胞内摄取。将实验重复 2 次,对于每次测量来说,将细胞数计数 3 次,以得到平均值。误差棒表示 6 次测量( $n=6$ )的标准偏差。

[0144] 已参考附图描述了本发明的优选实施方式,应理解本发明不限于严格的实施方式,并且本领域专业技术人员在背离所附权利要求所定义的本发明的范围下可以实现变化和修改。

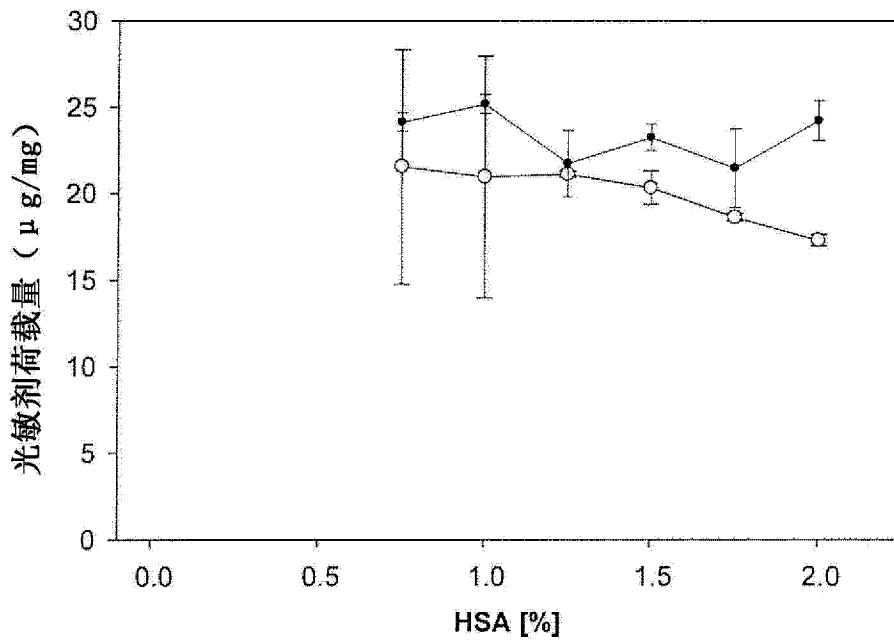


图 1

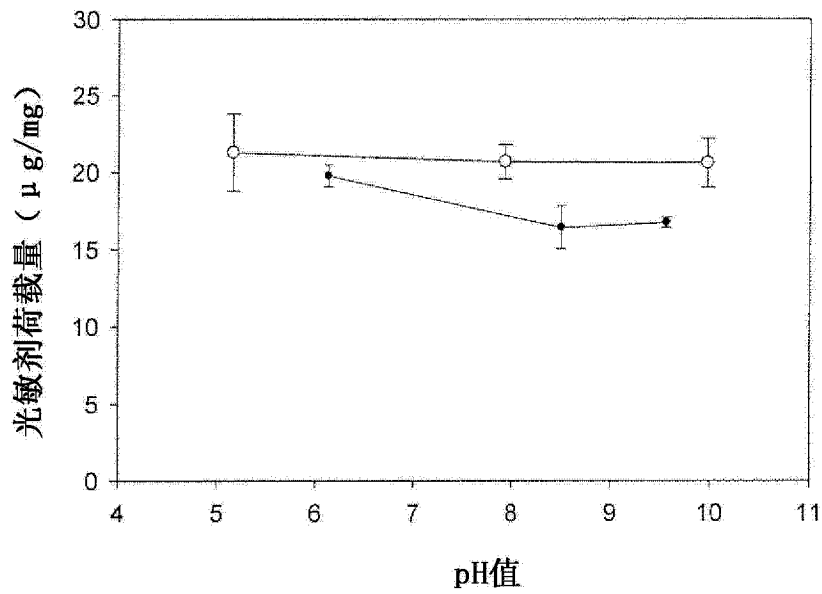


图 2

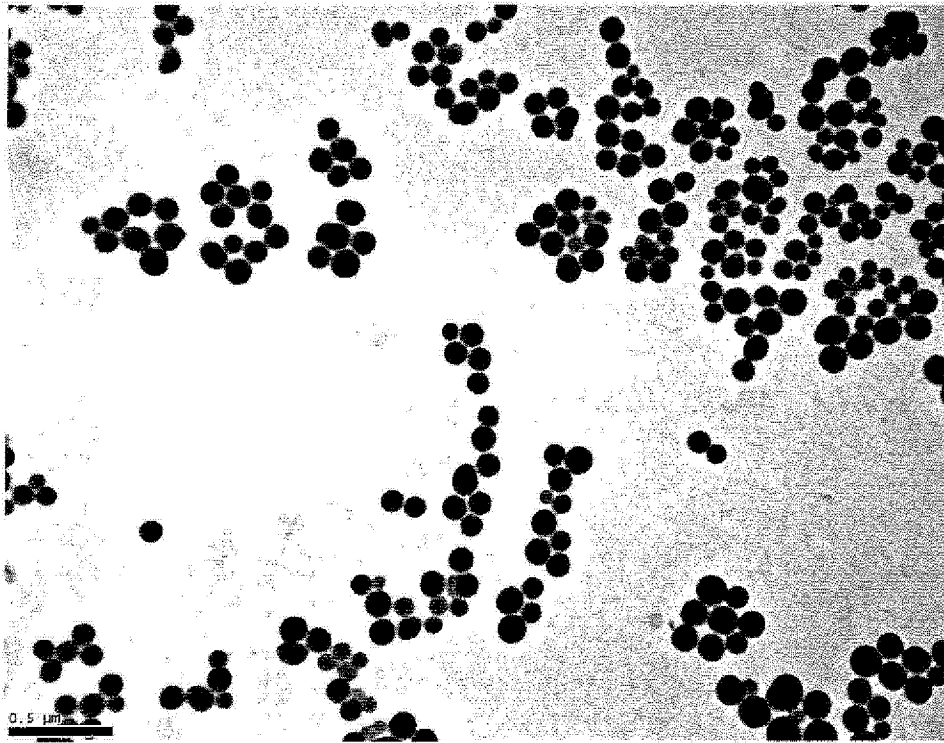


图 3

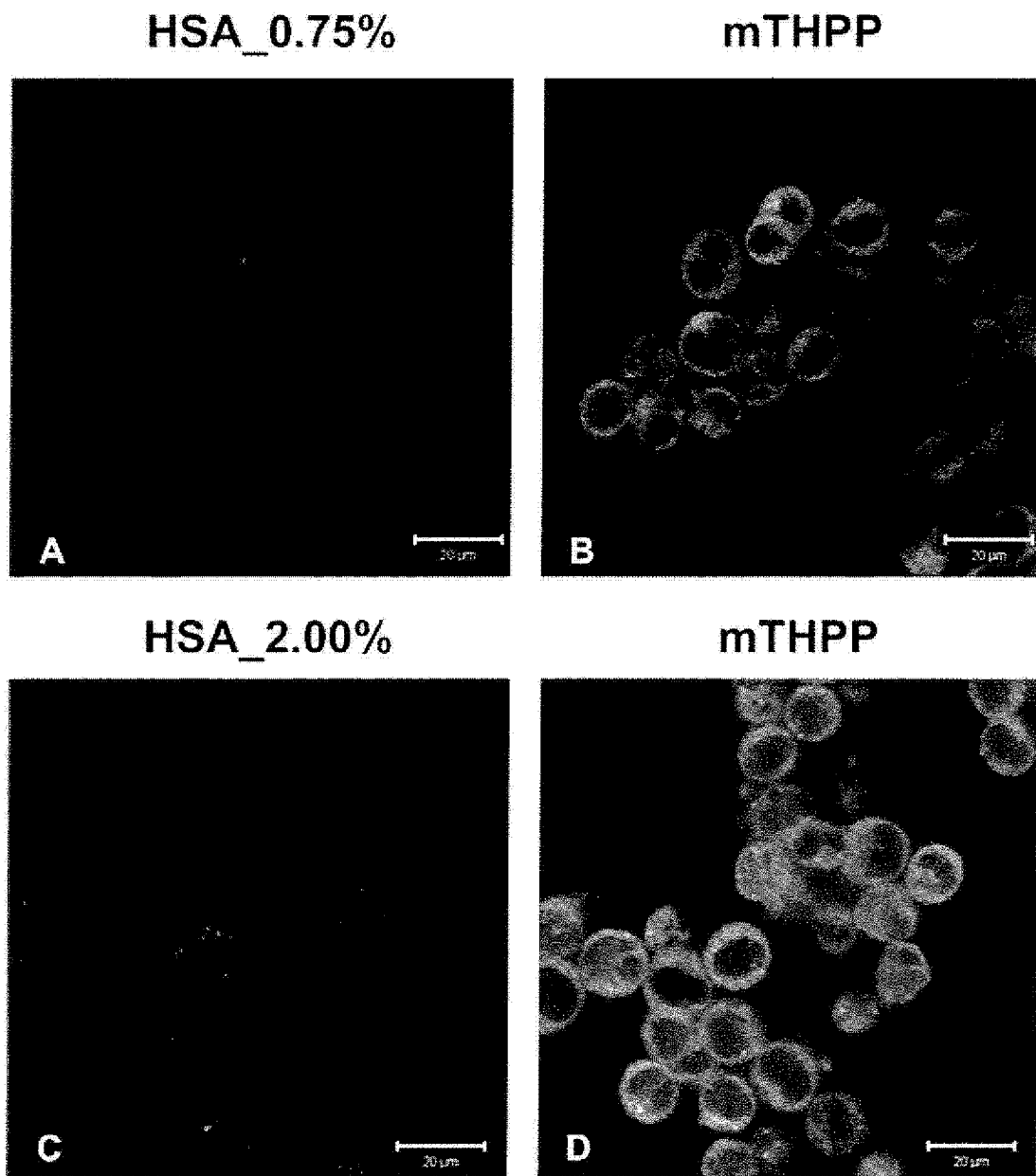


图 4

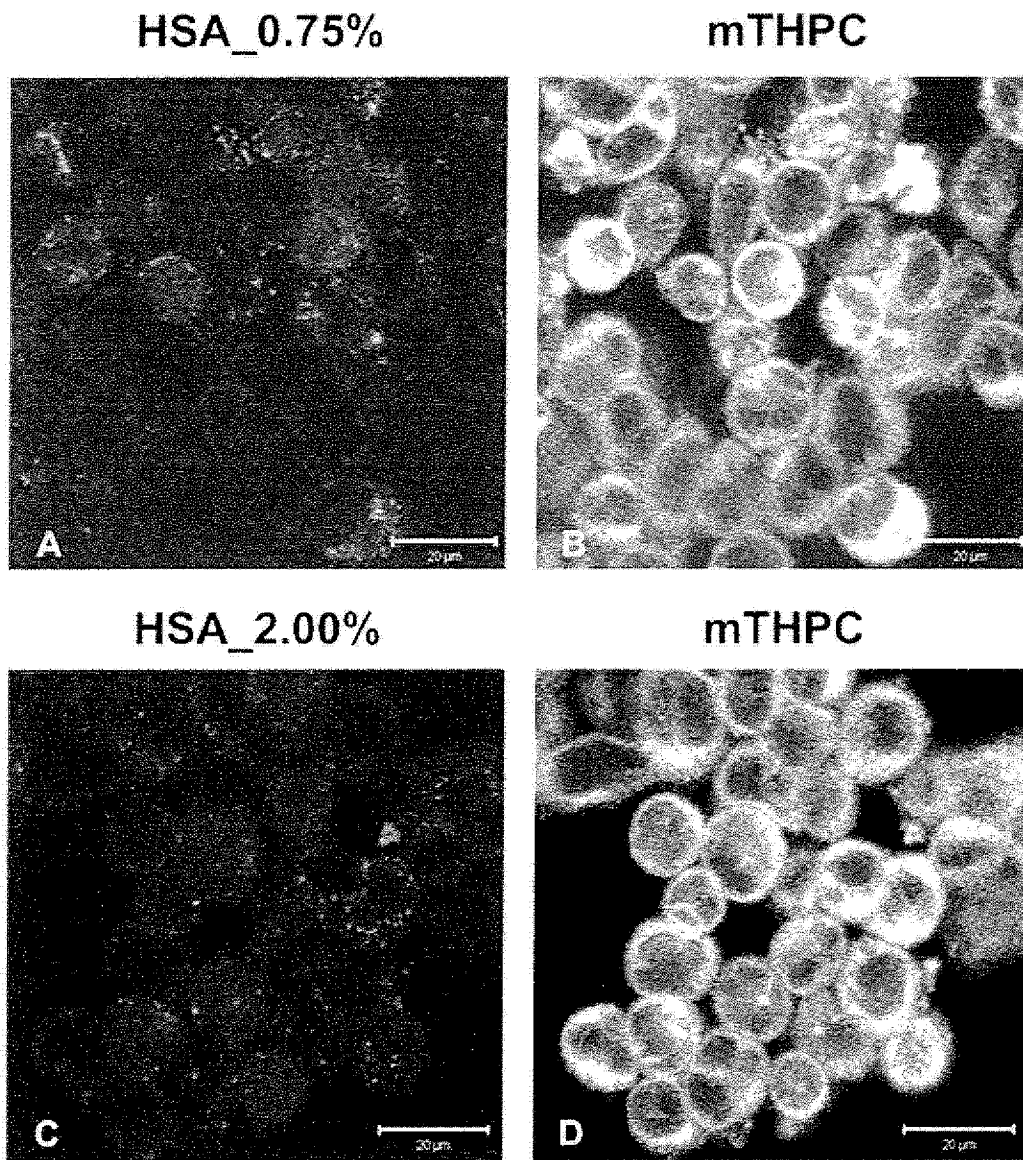


图 5

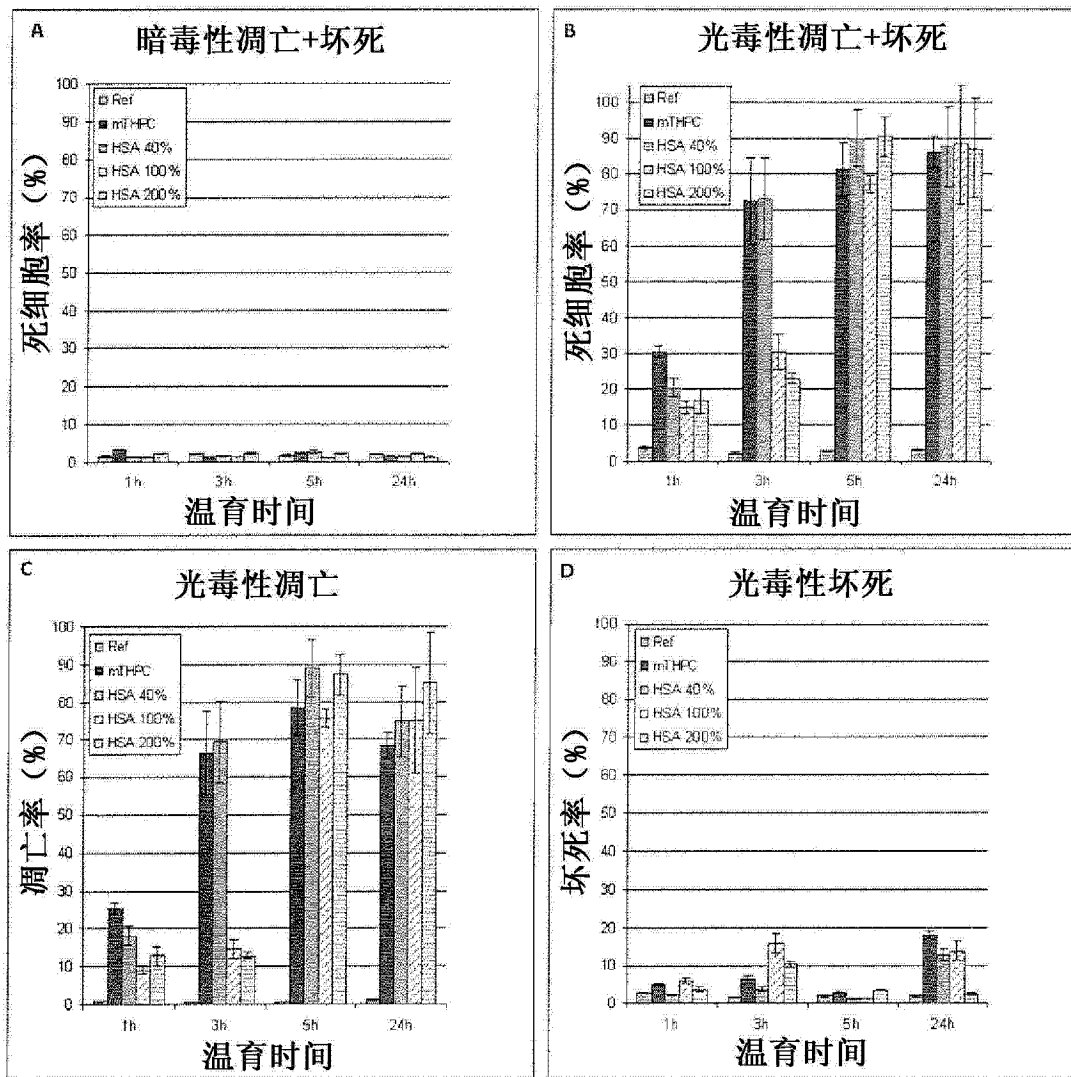


图 6

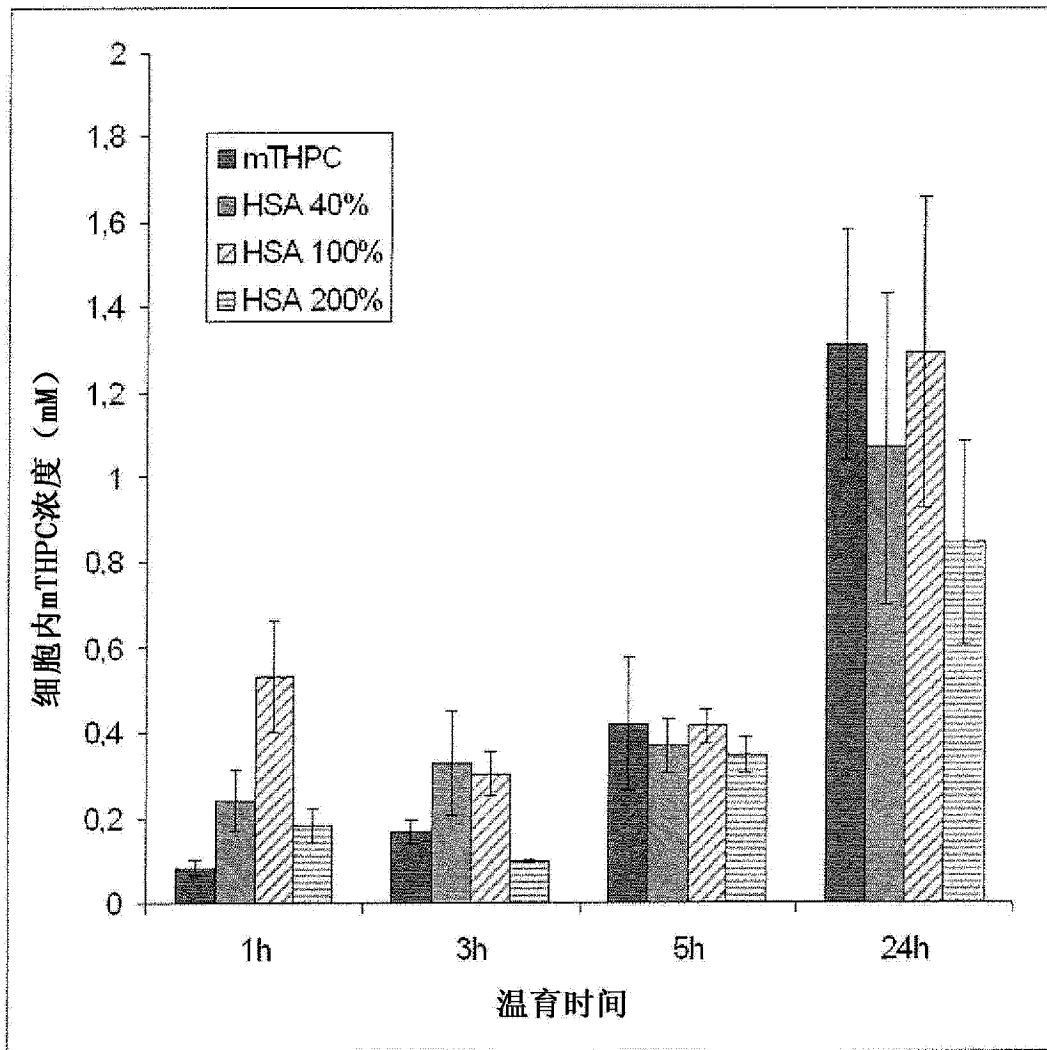


图 7