基于纳米分子影像探针的癌症微创介入诊疗导航技术

戴志飞

北京大学工学院生物医学工程系, 北京 100871

E-mail: zhifei.dai@pku.edu.cn

2016-08-30 收稿, 2016-09-14 修回, 2016-09-18 接受, 2016-09-27 网络版发表

国家重点研发计划纳米科技专项(2016YFA0201400)资助

摘要 癌症微创介入治疗具有不开腹、创伤小、术后恢复快等诸多优势, 是医学发展的趋势与研究热点. 分子影像导航为癌症微创介入治疗的发展提供了契机; 而肿瘤特异性分子探针是分子影像手术导航的核心. 与小分子探针相比, 纳米探针不仅具有更长的成像时间, 而且具有优异的信号放大和载药功能. 因此, 高灵敏、高特异性的纳米探针是分子影像手术导航的发展方向. 为实现癌症诊疗的“精确、高效、微创”的目标, 围绕肿瘤边界识别和淋巴结转移判断这个关键科学问题, 拟解决3个关键技术: (1) 实现纳米探针在肿瘤部位的有效富集; (2) 增加纳米探针对于肿瘤细胞的敏感性; (3) 发展与纳米探针匹配的高精度成像方法. 纳米分子影像探针不仅可用于成像和诊断, 而且在介入治疗方面可能有更大的潜在价值. 尤其重要的是, 纳米探针将促进高端荧光共聚焦内镜、分子影像导航系统和微创介入治疗系统的研制和推广应用, 从而加速我国在重大医疗设备关键技术上的突破.

关键词 分子影像, 纳米探针, 癌症, 微创介入治疗

癌症微创介入治疗是医学发展的趋势与研究热点^[1~3], 具有不开腹、创伤小、术后恢复快等诸多优势, 大大降低了手术风险, 尤其适合那些不能开刀的患者, 比如肿瘤远处转移者、年老体弱以及有重要脏器功能障碍的人, 从而成为我国重大且迫切的健康需求. 微创介入治疗技术有很多种, 比如射频消融、微波消融、光热治疗^[4~7]、光动力治疗^[8]和超声治疗^[9]等已经在临床上得到广泛应用. 据临床统计, 60%以上中晚期癌症患者可通过微创手术得到根治机会.

恶性肿瘤常常呈浸润性生长, 边界不清, 导致一部分健康组织被切除, 造成一定的术后后遗症和功能障碍^[10]. 而且, 对于卵巢癌和胃癌这样生长部位隐秘的肿瘤, 很多患者在确诊时已发生盆腹腔转移或淋巴结转移而处于晚期^[2,11]. 要想实施微创介入治疗手术, 对肿瘤进行定点清除, 必须对肿瘤精确定位, 而这离不开影像导航. 传统影像无法发现<5 mm

的微小肿瘤(原发灶和转移灶), 难以判别肿瘤边界和淋巴结转移^[12]. 利用光学分子影像来导航, 使我们能够在术中发现小于~1 mm的微小肿瘤^[11]. 因此, 分子影像导航为癌症微创介入治疗的发展提供了契机.

肿瘤特异性分子探针是分子影像手术导航的核心^[13]. 美国哈佛医学院医学影像中心主任Frangioni指出, 研制高特异性分子探针并发展其对肿瘤边界与微小转移灶的高精度成像方法是未来分子影像手术导航技术的研究重点^[14]. 荷兰莱顿大学医疗中心Vahrmeijer教授指出, 研制分子影像探针的最大挑战在于每个探针在临床应用前均要得到管理部门的批准^[15]. 因此, 解决分子探针问题是实现分子影像技术在手术导航中的临床转化与应用的关键. 目前在临床上使用的都是小分子探针, 比如吲哚菁绿, 存在成像时间短、靶向效果差、信噪比低等缺点. 而纳米探针克服了这些缺点, 不仅具有更长的成像时间, 而

引用格式: 戴志飞. 基于纳米分子影像探针的癌症微创介入诊疗导航技术. 科学通报, 2016, 61: 3246–3251

Dai Z F. Multifunctional nanoprobes for minimally invasive interventional diagnosis and therapy of cancer based on molecular imaging navigation (in Chinese). Chin Sci Bull, 2016, 61: 3246–3251, doi: 10.1360/N972016-01026

且具有优异的信号放大和载药功能。因此,高灵敏、高特异性的纳米探针是分子影像手术导航的发展方向^[16]。

围绕肿瘤边界与淋巴结转移的判别、局部微创介入治疗和疗效评估等关键难题,设计构建具有自主知识产权的安全高效的纳米分子影像探针与相关纳米材料;研制既能实现肿瘤分子成像又可增强介入治疗效果的诊疗一体化纳米探针;阐明纳米探针的构建原理、转运与增效机制及其生物安全性;建立切实可行的制备技术平台和体内、体外评价体系,实现新型纳米影像探针向临床应用的转化;研制纳米成像的共聚焦荧光内窥镜及纳米增效的肿瘤微创介入诊疗设备;建立肿瘤微创介入治疗及疗效评估方法。通过完成国家重点研发计划纳米科技专项“基于纳米分子影像探针的癌症微创介入诊疗导航技术”,对引领未来纳米科学技术发展和解决国家重大需求做出贡献,提升我国在纳米生物医药方面的创新能力和国际竞争力,凝聚一批高素质、高层次的交叉学科人才,培养一批具有国际影响的学术带头人。

1 各课题内容

本项目围绕肿瘤边界识别和淋巴结转移判断这一关键科学问题,拟解决3个关键技术:(1)实现纳米探针在肿瘤部位的有效富集;(2)增加纳米探针对于肿瘤细胞的敏感性;(3)发展与纳米探针匹配的成像方

法与设备。以卵巢癌和胃癌为实例,设计制备荧光成像、超声成像、荧光/超声双模态成像、肿瘤微环境响应型、荧光成像/光热治疗、荧光成像/光动力治疗、荧光成像/声动力治疗、超声成像/声动力治疗、超声成像/光动力治疗和超声成像/光热治疗等10种不同类型的纳米探针,并研制与纳米探针匹配的介入治疗和影像导航系统,最终实现癌症诊疗的“精确、高效、微创”的目标(图1)。

通过全链条式设计,设立重点突出、内容相互交叉但又递进的4个相对独立的研究课题(图2)。

1.1 肿瘤纳米分子影像探针的设计与构建

根据肿瘤纳米成像的微创介入诊疗手术导航的需要,设计筛选对肿瘤细胞和微环境(酸性pH、温度、氧化还原氛围、过氧化氢和酶等)具有特异性高灵敏响应的触发基元、传递基元和信号报告/诊疗功能基元,如近红外菁染料、光敏剂二氢卟吩和声敏剂镱卟啉等。应用可控聚合等高分子合成化学新方法,制备具有可控组成和程序化自降解高分子,如聚氨基甲酸酯、聚苄醚、二硫键桥联的聚酯和聚乙二醇的嵌段聚合物、脲键桥联的聚乳酸和聚乙二醇的嵌段聚合物等。探讨程序化自降解高分子在外界模拟刺激作用下的自降解动力学过程,阐明各种因素(触发方式、连接模块、高分子链降解机制等)对自降解动力学过程的影响。通过分子设计,采用多步有机反应合成新型

图1 (网络版彩色)主要研究思路

Figure 1 (Color online) Main research ideas

图2 (网络版彩色)四个课题及相互之间的关系

Figure 2 (Color online) Four topics and their relationship

荧光染料、光敏剂和声敏剂等诊疗分子, 脂质分子以及诊疗分子功能化的脂质材料。

利用所合成的化合物、磷脂、白蛋白、聚乳酸-羟基乙酸共聚物等材料, 采用复乳法、薄膜水化法等, 负载不同信号分子、光敏剂、声敏剂和热敏剂等, 构建荧光纳米探针以及集荧光成像和光动力(或光热、或声动力)于一体的纳米探针, 包括纳米凝胶聚集体、聚合物胶束、纳米脂质体、固体脂质纳米粒、聚合物纳米粒等(图3)。利用磷脂、白蛋白、聚乳酸-羟基乙酸共聚物等作为成膜材料, 包埋全氟烷烃等, 制备超声微泡或氟碳纳米粒子; 在制备过程中引入荧光成像物质, 如菁染料等, 可得荧光/超声双模态成像探针; 引入光敏剂二氢卟吩和声敏剂镱卟啉等, 可得集超声成像和光动力(或声动力)治疗于一体的纳米探针。

图3 (网络版彩色)多功能纳米探针示意图

Figure 3 (Color online) Schematic multifunctional nanoprobe

应用遗传密码子扩展技术, 通过在靶向癌细胞的抗体上精准定点引入具有生物正交反应活性的非天然人工合成氨基酸, 以实现在不影响抗体靶向活性下对抗体进行修饰和组装, 确保抗体修饰的纯度和专一性, 从而达到临床应用的标准。利用羧基与氨基偶联反应、或醛基缩合反应、或点击化学, 将延时肽或聚乙二醇, 以及靶分子, 如叶酸、精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸、可识别卵泡激素受体的多肽和抗体等连接到纳米探针上, 使之能够在肿瘤组织或细胞中特异性富集, 提高纳米探针针对肿瘤转移病灶部位和新生淋巴管靶向性, 实现对胃癌和卵巢癌的特异性成像和靶向治疗。

1.2 肿瘤纳米分子影像探针的药学、药理与毒理研究

在明确理化性质及生物学性质的基础上, 结合手术导航及诊疗的临床治疗需求选择纳米影像探针, 进一步研究其规模化制备工艺与质量标准控制, 解决纳米探针向临床应用转化的关键技术, 包括处方工艺、质量和稳定性等研究, 以及临床研究资料的准备和申报等。依据无菌保证水平、杂质的控制水平、工艺的可行性、临床使用的方便等, 从中选择纳米探针的最优剂型, 并进行辅料相容性试验、处方筛选、初步验证工艺。正式确定处方工艺后拟定中试生产和工艺验证。

研究纳米探针与肿瘤细胞的结合/黏附、摄取、胞内滞留和转运等过程与经时变化规律, 揭示纳米探针及相关材料的组成、结构和特性等对其入胞过程、细胞分裂、增殖、凋亡、信号传导通路的影响。采用模型动物(小鼠、大鼠、犬), 结合放射性核素及荧光检测技术, 建立生物样本中不同形式探针(游离或与血浆蛋白结合)浓度的测定方法, 测定纳米探针在不同时间、不同器官和组织中的浓度, 研究卵巢癌与胃癌靶向的纳米探针体内分布规律及代谢途径。重点考察纳米探针的化学组成与理化特性对其整体和局部药物动力学行为和清除的影响, 在整体动物和局部组织层次上构建药物动力学模型, 阐明纳米探针的理化特性与体内过程的相关性。

采用毒理学的方法, 在整体动物(小鼠、大鼠、兔、犬、猴子等)水平上考察纳米探针的急性毒性、长期毒性、神经系统毒性和免疫原性等; 采用代谢组学技术对各组织器官损伤的标志物进行分析, 评价纳米

探针的潜在毒性;综合不同层次和不同途径的分析与研究结果,评价纳米探针对于生物体的安全程度和进一步开发的可能性.研究超声探针辅助的诊断超声所产生的生物效应与探针给药方法及剂量、成像帧周期等之间的关系,进一步确定由医用超声气体活化和惯性空化带来的生物效应的范围.

1.3 基于纳米探针的分子影像诊疗设备

共聚焦内窥镜是目前临床上唯一能够分辨细胞形态的内窥镜设备,对基于黏膜细胞的各种疾病检测有重要意义.现有的共聚焦内窥镜采用蓝绿光源,不能激发近红外荧光纳米影像探针.本项目拟采用近红外光做光源,自主设计和研发一套近红外共聚焦内窥镜(图4),与自主研制的近红外荧光纳米影像探针结合,从而提高系统的成像深度和对比度,改善可见光成像时深度受限及散射严重的问题.配合常规胃镜或其他内窥镜,实现胃部或其他腔道的黏膜细胞成像.

通过设计声动力治疗系统中各声学元件组合配置,满足声敏剂介导下的肿瘤声动力治疗范围需求,降低超声对正常组织的影响,减少声波在声学元件中的损失,提高超声治疗的效率.具体的设备由超声信号源、功率放大器、聚焦换能器、示波器等组成.通过调节超声定位的准确度和稳定性以及辐照强度和

范围,提高治疗精准度.建立超声系统参数与纳米探针用量之间的对应关系,通过调节系统不同的参数(如超声频率、强度、辐照时间等)考察纳米探针产生单线态氧的情况,对收集到的信息进行精确量化,形成纳米探针与声动力治疗装置各参数之间的对应量化关系.

通过设计光动力/光热治疗系统中各光学元件组合配置,满足纳米光吸收剂介导下的光动力/光热治疗需求,降低激光对正常组织的影响,提高治疗的效率.具体的设备由光源、滤光片、功率调节器、光纤等组成.精确控制激光传输的功率、辐照角和时间,提高激光治疗效果.建立激光系统参数与纳米探针用量之间的对应关系,通过调节系统不同的参数(如激光波长、功率、辐照时间等)来考察纳米探针产生单线态氧和光热转化效率的情况,对收集到的信息进行精确量化,形成纳米探针与激光治疗系统各参数之间的对应量化关系.

1.4 基于纳米分子影像探针的肿瘤介入治疗与疗效评价

基于光学分子影像手术导航系统,建立分子成像信号与生物学参数间的定量关系.在光学分子影像特异性引导下,与手术过程紧密结合,在不影响手术操作的前提下,更加精确、有效地引导肿瘤切除术,实现肿瘤的早期发现、精确诊断和有效的治疗.根据组织特异性,将得到的组织光学特性分布与数字非匀质标准生物组织的高分辨结构图像进行配准.利用非特异性吸收校正算法模型,计算正常组织非特异性吸收靶向性纳米探针的浓度以及由非特异性吸收所产生的荧光强度,从而提取出完全由肿瘤处靶向性纳米探针所产生的荧光强度,实现对微小肿瘤的高灵敏精确定位.利用优选的纳米探针,通过共聚焦荧光内窥镜和光学分子影像导航系统,评估早期胃癌侵犯深度和淋巴结转移,以及卵巢癌腹膜后淋巴结转移;并以术后切除病理为金标准,评价纳米成像的敏感性和特异性.

基于诊疗一体化纳米探针,与微创介入手术的需求紧密结合,利用常规内窥镜和近红外共聚焦内窥镜获取分子水平的细胞成像,扫描肿瘤及边界部位.利用纳米成像引导超声和激光准确照射肿瘤,实施精确光动力、光热和声动力等介入治疗.光动力/光热治疗系统可清除黏膜层肿瘤,而声动力治疗系

图4 (网络版彩色)近红外共聚焦内窥镜示意图

Figure 4 (Color online) Schematic near infrared fluorescence confocal microendoscope

统可对深部肿瘤(20 mm)进行治疗. 研究治疗效果的影响因素及最佳的超声、激光辐照方案. 探索将声动力以及光动力/光热等效应结合进行联合治疗的新型诊疗方案, 并对联合治疗的效果进行评价. 研究联合治疗的协同效应和纳米增效作用及其抗肿瘤转移及降低肿瘤细胞耐药性的机制, 从而为纳米探针在胃癌、卵巢癌中的应用研究奠定基础.

2 结语与展望

目前, 癌症的治疗正朝着微创、精确的方向发展. 利用分子影像技术来导航介入诊疗手术, 医生能够在术中发现微小癌灶, 将亚毫米级的病变组织在术中实时显示出来, 从而指导精确切除、局部微创介入治疗和疗效评估. 然而, 由于缺乏特异性的分子影像探针和适合手术导航的高精度分子成像方法与系统, 分子成像引导的癌症介入治疗尚未得到广泛应用. 因此, 研制高特异性纳米探针已成为当前生物医药

领域研究的制高点之一. 以肿瘤微创介入诊疗手术导航为目的, 开展纳米分子影像探针的研究不仅具有重要的科学意义与临床价值, 而且对于开发具有较大市场应用价值的高端荧光共聚焦内镜和分子影像导航系统、加速我国在重大医疗设备关键技术上的突破具有重要的社会与经济效益.

纳米分子影像探针不仅可用于诊断, 而且在介入治疗方面可能有更大的潜在价值, 预示其有广阔的市场开发前景. 随着我国新医改的深入推进, 手术、检验等医疗需求稳步上升, 将为纳米分子影像探针市场筑起扩容的基础. 纳米分子影像探针是一个尚未充分开发的领域, 国内外市场均为空白. 国外医疗机构预测纳米分子影像探针不久将成为临床诊断或治疗中的常用试剂, 具有巨大的社会效益和经济效益. 我国与国外处于同一起跑线上, 只要我们及时抓住机遇, 一定能引领纳米影像探针及其影像诊疗设备的发展方向.

参考文献

- Pan Y, Volkmer J P, Mach K, et al. Endoscopic molecular imaging of human bladder cancer using a CD47 antibody. *Sci Transl Med*, 2014, 6: 260ra148
- Shah M A. Gastrointestinal cancer: Targeted therapies in gastric cancer-the dawn of a new era. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11: 10–11
- Thakor A S, Gambhir S S. Nano-oncology: The future of cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63: 395–418
- Ke H T, Wang J R, Dai Z F, et al. Gold nanoshelled microcapsules: A theranostic agent for ultrasound contrast imaging and photothermal therapy. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 3017–3021
- Ma Y, Liang X L, Tong S, et al. Gold nanoshelled nanomicelles for potential mri imaging, light-triggered drug release and photothermal therapy. *Adv Funct Mater*, 2013, 23: 815–822
- Liang X L, Li Y Y, Li X D, et al. PEGylated polypyrrole nanoparticles conjugating gadolinium chelates for dual-modal MRI/photoacoustic imaging guided photothermal therapy of cancer. *Adv Funct Mater*, 2015, 25: 1451–1462
- Zha Z B, Yue X L, Ren Q S, et al. Uniform polypyrrole nanoparticles with high photothermal conversion efficiency for photothermal ablation of cancer cells. *Adv Mater*, 2013, 25: 777–782
- Liang X L, Yue X L, Li X D, et al. Conjugation of porphyrin to nanohybrid cerasomes for photodynamic therapy of cancer. *Angew Chem*, 2011, 50: 11622–11627
- Liang X L, Gao J, Jiang L D, et al. Nanohybrid liposomal cerasomes with good physiological stability and rapid temperature responsiveness for HIFU triggered local chemotherapy of cancer. *ACS Nano*, 2015, 9: 1280–1293
- Kircher M F, de la Zerda A, Jokerst J V, et al. A brain tumor molecular imaging strategy using a new triple-modality MRI-photoacoustic-Raman nanoparticle. *Nat Med*, 2012, 18: 829–834
- van Dam G M, Themelis G, Crane L M, et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: First in-human results. *Nat Med*, 2011, 17: 1315–1319
- Errico C, Pierre J, Pezet S, et al. Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature*, 2015, 527: 499–502
- Asanuma D, Sakabe M, Kamiya M, et al. Sensitive β -galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumors *in vivo*. *Nat Commun*, 2015, 6: 6463
- Hyun H, Park M H, Owens E A, et al. Structure-inherent targeting of near-infrared fluorophores for parathyroid and thyroid gland imaging. *Nat Med*, 2015, 21: 192–197
- Vahrmeijer A L, Hutteman M, van der Vorst J R, et al. Image-guided cancer surgery using nearinfrared fluorescence. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, 10: 507–518
- Wang Y G, Zhou K J, Huang G, et al. A broad nanoparticle-based strategy for tumor imaging by nonlinear amplification of microenvironment signals. *Nat Mater*, 2014, 13: 204–212

Multifunctional nanoprobes for minimally invasive interventional diagnosis and therapy of cancer based on molecular imaging navigation

DAI ZhiFei

Department of Biomedical Engineering, College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

Minimally invasive treatment of cancer can significantly reduce surgery risks due to many advantages, such as no laparotomy, small wound and early recovery and so on. Especially, it is suitable for patients who cannot be operated on due to tumor distant metastasis, oldness, weakness, and major organ dysfunction. According to clinical statistics, more than 60% of patients with mid-advanced cancer can be cured by employing minimally invasive surgery.

Malignant tumors often show invasive growth and unclear boundary, resulting in partial removal of healthy tissue during surgery, hence postoperative sequelae and dysfunction. In order to carry out minimally invasive surgery and targeted elimination of tumor, the size and location of the tumors must be accurately identified before therapy, which requires the imaging guidance. By using optical molecular imaging, we can find a small tumor less than ~1 mm. Therefore, the molecular imaging navigation provides a great opportunity for the development of minimally invasive interventional therapy for cancer. Especially, the cancer specific probes are emerging as one of the key technologies of molecular imaging. Compared with small molecular probes, nanoprobes show longer imaging time, remarkable signal multiplication and drug loading capacity. There, specific nanoprobes become the development direction of the molecular imaging navigation technology. Aiming at accuracy, high efficacy and minimal invasiveness of cancer treatments, we need solve two key scientific issues including identification of tumor boundary and predictability of lymph node metastases, and develop three key technologies including: (1) high accumulation of nanoprobes at tumor sites, (2) high sensitivity of nanoprobes to cancer cells, (3) high precision imaging methods based on nanoprobes.

This project will design and construct a variety of safe and efficient nanoprobes and related nanomaterials with independent intellectual property rights. For example, ultra pH (or enzyme)-sensitive fluorescent nanoprobes will be fabricated for the imaging of a broad range of tumours by nonlinear amplification of microenvironment signals. Multifunctional nanoprobes will be developed for simultaneous molecular imaging and interventional therapy of cancer. Fluorescent/ultrasound nanoprobes will be prepared to achieve a bimodal imaging with excellent signal sensitivity and high spatial resolution. Theranostic nanoprobes will be produced for both targeted imaging (diagnosis) and interventional therapy (laser, ultrasound, microwave, radiofrequency or combination etc.). In addition, we will establish a practical and feasible technology platform for large-scale production of nanoprobes, and *in vivo* and *in vitro* evaluation systems for the clinical applications of nanoprobes. It is of crucial importance to investigate the biological influence of nanoprobes on cell division, proliferation, apoptosis and signal transduction pathways, assess *in vivo* transport mechanism across biological barriers, and evaluate biosafety of nanoprobes, such as acute toxicity, long-term toxicity, nervous system toxicity and immunogenicity. Moreover, fluorescence confocal microendoscope and minimally invasive therapeutic devices will be developed based on nanoprobes. Finally, we will assess invasion depth and lymph node metastasis in early gastric cancer, as well as retroperitoneal lymph node metastasis of ovarian cancer by using nanoprobes in combination of fluorescence confocal microendoscope and molecular imaging navigation system. The sensitivity and specificity of molecular imaging nanoprobes are evaluated by using pathology as the gold standard. The precise interventional therapy (photodynamic, photothermal and sonodynamic etc.) will be implemented by irradiating the tumor tissue using laser or ultrasound under the guidance of nanoprobe-enhanced molecular imaging. It is essential to investigate the evaluation methods of therapeutic efficacy. We will explore the synergistic, anti-metastatic and overcoming drug resistance effects of interventional therapy combined with chemotherapy.

In conclusion, molecular imaging nanoprobes can be used not only for imaging and diagnosis, but also for the minimally invasive interventional treatments. In particular, the research and application of nanoprobes will promote the development and application of fluorescence confocal microendoscope, molecular imaging navigation systems and minimally invasive interventional therapy systems. This will accelerate the breakthrough in the key technology of major medical equipment. Undoubtedly, the accomplishment of the project would enhance the innovation capability and international competitiveness of China in nanobiomedicine and medical equipment.

molecular imaging, nanoprobe, cancer, minimally invasive treatment

doi: 10.1360/N972016-01026