

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104013599 A

(43) 申请公布日 2014.09.03

(21) 申请号 201410230829.0

(22) 申请日 2014.05.28

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 阎锡蕴 范克龙 梁敏敏 郑继燕
冯静 杨东玲

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图3页

(54) 发明名称

一种肿瘤特异性靶向给药的药物载体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种肿瘤靶向性药物递送系统,所述系统包括肿瘤靶向性药物载体和肿瘤治疗药物,其中所述肿瘤靶向性药物载体包含全重链人铁蛋白。本发明还公开了所述肿瘤靶向性药物递送系统的制备方法,所述方法包括:使聚合的全重链人铁蛋白解聚;向解聚的全重链人铁蛋白加入所述肿瘤治疗药物以使所述解聚的全重链人铁蛋白与所述肿瘤治疗药物结合;并且使结合有所述肿瘤治疗药物的所述解聚的全重链人铁蛋白重新聚合成纳米颗粒。

1. 肿瘤靶向性药物递送系统,所述系统包括肿瘤靶向性药物载体和肿瘤治疗药物,其中所述肿瘤靶向性药物载体包含全重链人铁蛋白。
2. 根据权利要求1所述的系统,其中全重链人铁蛋白聚合形成具有空腔的纳米颗粒,所述肿瘤治疗药物装载在所述空腔内。
3. 根据权利要求2所述的系统,其中所述系统是通过以下方式制备的:
使聚合的全重链人铁蛋白解聚;
向解聚的全重链人铁蛋白加入所述肿瘤治疗药物以使所述解聚的全重链人铁蛋白与所述肿瘤治疗药物结合;并且
使结合有所述肿瘤治疗药物的所述解聚的全重链人铁蛋白重新聚合成纳米颗粒。
4. 根据权利要求3所述的系统,其中全重链人铁蛋白在高浓度的脲条件下解聚,并且利用浓度递降至零的脲梯度使解聚的全重链人铁蛋白重新聚合。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的系统,其中所述肿瘤治疗药物用于治疗人体的恶性肿瘤和癌症,优选地用于治疗结直肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、胃癌、胰腺癌、膀胱癌、肾癌、前列腺癌、脑癌以及各种造血系统癌如Hodgkin氏疾病、非Hodgkin氏淋巴瘤、白血病。
6. 根据权利要求5所述的系统,其中所述肿瘤治疗药物用于治疗结直肠癌。
7. 根据权利要求1-4中任一项所述的系统,其中所述肿瘤治疗药物选自化疗药物、放射性同位素、细胞因子、核酸、抗肿瘤或抗炎药物,例如是阿霉素。
8. 根据权利要求1-4中任一项所述的系统,其中所述系统通过静脉、皮下、动脉内或局部给药的方式施用于有此需要的患者。
9. 一种制备肿瘤靶向性药物递送系统的方法,所述方法包括:
使聚合的全重链人铁蛋白解聚;
向解聚的全重链人铁蛋白加入肿瘤治疗药物以使所述解聚的全重链人铁蛋白与所述肿瘤治疗药物结合;并且
使结合有所述肿瘤治疗药物的所述解聚的全重链人铁蛋白重新聚合成纳米颗粒。
10. 肿瘤靶向性药物载体,所述载体包含全重链人铁蛋白。

一种肿瘤特异性靶向给药的药物载体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于纳米技术、生物仿生、免疫学和生物医药的交叉领域。特别地,本发明公开了一种肿瘤靶向性药物递送系统,所述系统包括肿瘤靶向性药物载体和肿瘤治疗药物,其中所述肿瘤靶向性药物载体包含全重链人铁蛋白。本发明还公开了所述肿瘤靶向性药物递送系统的制备方法。

背景技术

[0002] 癌症已经成为日益常见且严重威胁人类生命和生活质量的主要疾病之一。由于老龄化人群持续增加,预计癌症的发病率会继续增长。目前治疗癌症的方法主要是手术、放疗和化疗三种。癌症的治疗方式的选择,取决于癌症的类型、位置和散布情况。化疗是利用化学药物杀死肿瘤细胞、抑制肿瘤生长的一种治疗方式,它是一种全身性治疗手段,对原发灶、转移灶和亚临床转移灶均有治疗作用。对于不能进行手术和放疗的癌症,只能借助于化疗。目前临床上常用的化疗抗癌药物因为缺乏靶向性,存在严重的副作用。而这些副作用通常限制了化疗药物的应用并且导致了很多人失去了治疗选择。比如,大部分蒽环类抗肿瘤药物分子以及含铂物质的非特异性毒性造成的严重的副作用,大大限制了这些化疗药物的使用。因此发展一种能够特异性靶向肿瘤组织,降低化疗药物的毒副作用的药物载体是目前癌症的治疗领域所亟需解决的一个难题。

发明内容

[0003] 理想的肿瘤治疗药物载体应该具有以下特点:特异性的靶向肿瘤细胞或肿瘤组织;能够装载高剂量的治疗药物,并能够在肿瘤细胞中释放药物或将药物作用于肿瘤细胞;在生理条件下稳定,拥有良好的体内分布和代谢特征及优秀的生物相容性。但是,把这些所有的特征都整合到一种纳米材料上是非常具有挑战性的。我们实验室的前期工作表明,人H-铁蛋白不用经过任何特异性配体的修饰或者标记,即可通过结合其受体转铁蛋白受体1(Transferrin Receptor1, TfR1)特异性靶向肺癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌、结直肠癌、卵巢癌、食管癌、胃癌、胸腺癌等常见的人体实体瘤肿瘤组织,和T淋巴细胞白血病、红细胞白血病等血液恶性癌变的细胞(Fan等, Nature Nanotech. 2012;中国专利申请201110122433.0)。并且,H-铁蛋白的外径为12nm,粒径均一,有很强的在肿瘤部位的渗透和滞留的效果(Dreher, M. R.等, J Natl Cancer I, 2006),因此,主动靶向和被动靶向兼具,使得人H-铁蛋白在体内对肿瘤的靶向性更佳。H-铁蛋白纳米颗粒具有直径为8nm的空腔,可以通过使蛋白壳解聚-聚合来向其蛋白空腔内部装载小分子药物。研究人员发现,H-铁蛋白纳米颗粒在与肿瘤细胞上的受体TfR1结合后被转运入胞内体,最终进入溶酶体中。这使得利用H-铁蛋白作为药物载体时,能够将药物运输到细胞内部,从而发挥对肿瘤细胞的杀伤作用。更重要的是,人H-铁蛋白是天然存在于人体内的一种储铁蛋白质,因此其天然的生物相容性和低免疫反应性比其他合成类的材料所不能及的。除此之外,人H-铁蛋白可以很方便的在大肠杆菌里面大批量的表达,而且可以很方便利用其耐高温的特性(75℃)

快速、方便的纯化。从人 H- 铁蛋白的这些特点来看,其本身作为一种药物载体即是一种集各种优点于一体的理想的生物纳米材料。

[0004] 本发明的目的是提供一种肿瘤特异性靶向的新型蛋白类化疗药物纳米载体及其应用。

[0005] 本发明所提供的药物载体,由一种天然的存在于人体中的,能够特异识别肿瘤组织及细胞,与受体结合后,能够进入细胞内部溶酶体,将装载在其内部的抗肿瘤活性药物释放的蛋白壳纳米颗粒。

[0006] 本发明所述蛋白壳可以是基因重组的或是天然的去铁蛋白,去铁蛋白由 12 个或是 24 个重链亚基和轻链亚基以任意比例自组装而成,其中天然去铁蛋白可以来源于真核生物、原核生物或哺乳动物。

[0007] 本发明所述蛋白壳还可以是热休克蛋白 (Heat Shock Proteins, HSPs)、Dps 蛋白 (DNA protection during starvation) 或是具有纳米空腔结构的病毒蛋白壳。

[0008] 本发明所述蛋白壳可以化学偶联或基因融合抗体、多肽或核酸适配体 等靶向分子或荧光、放射核素等信号分子。

[0009] 本发明所述装载在蛋白壳内部的抗肿瘤活性药物可以选自化疗药物、放射性同位素、细胞因子、核酸、抗肿瘤或者抗炎症药物。

[0010] 本发明所述的蛋白类靶向性纳米药物载体特别指的是重组的全重链人铁蛋白 (H- 铁蛋白)。这种铁蛋白外壳能够特异结合肿瘤细胞和肿瘤组织,无需抗体、多肽等靶向分子修饰,而且与其受体 TfR1 结合后,能够进入肿瘤细胞之中。

[0011] 本发明所述肿瘤靶向性蛋白类纳米药物载体的药物装载方式可以是两种:抗肿瘤活性小分子药物与金属离子结合后,通过蛋白壳上的金属离子通道进入蛋白壳内部;利用 pH 或者脲使蛋白壳解聚-聚合的方法,在蛋白壳聚合的过程中,加入抗肿瘤药物,实现药物在蛋白壳内的装载。

[0012] 本发明所述肿瘤靶向性蛋白类纳米药物载体所作用的肿瘤性疾病为人体的恶性肿瘤和癌症,其中优选的是结直肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤。尤其是人体实质性肿瘤(例如,肺、卵巢癌,乳腺、肠胃、结肠、胰腺、膀胱、肾、前列腺、脑等)以及各种造血系统癌(例如,Hodgkin 氏疾病、非 Hodgkin 氏淋巴瘤、白血病等)。

[0013] 本发明所述肿瘤靶向性蛋白类纳米药物载体可以通过静脉、皮下、动脉内给药或者局部给药的方式给予患恶性肿瘤的患者。

[0014] 本发明的肿瘤靶向性蛋白类纳米药物载体及抗肿瘤应用具有巨大的社会效益和经济效益,也具有好的应用前景。

[0015] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0016] 1. 肿瘤靶向性药物递送系统,所述系统包括肿瘤靶向性药物载体和肿瘤治疗药物,其中所述肿瘤靶向性药物载体包含全重链人铁蛋白。

[0017] 2. 根据 1 所述的系统,其中全重链人铁蛋白聚合形成具有空腔的纳米颗粒,所述肿瘤治疗药物装载在所述空腔内。

[0018] 3. 根据 2 所述的系统,其中所述系统是通过以下方式制备的:

[0019] 使聚合的全重链人铁蛋白解聚;

[0020] 向解聚的全重链人铁蛋白加入所述肿瘤治疗药物以使所述解聚的全重链人铁蛋

白与所述肿瘤治疗药物结合 ;并且

[0021] 使结合有所述肿瘤治疗药物的所述解聚的全重链人铁蛋白重新聚合成纳米颗粒。

[0022] 4. 根据 3 所述的系统,其中全重链人铁蛋白在高浓度的脲条件下解聚,并且利用浓度递降至零的脲梯度使解聚的全重链人铁蛋白重新聚合。

[0023] 5. 根据 1-4 中任一项所述的系统,其中所述肿瘤治疗药物用于治疗人体的恶性肿瘤和癌症,优选地用于治疗结直肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、胃癌、胰腺癌、膀胱癌、肾癌、前列腺癌、脑癌以及各种造血系统癌如 Hodgkin 氏疾病、非 Hodgkin 氏淋巴瘤、白血病。

[0024] 6. 根据 5 所述的系统,其中所述肿瘤治疗药物用于治疗结直肠癌。

[0025] 7. 根据 1-4 中任一项所述的系统,其中所述肿瘤治疗药物选自化疗药物、放射性同位素、细胞因子、核酸、抗肿瘤或抗炎药物,例如是阿霉素。

[0026] 8. 根据 1-4 中任一项所述的系统,其中所述系统通过静脉、皮下、动脉内或局部给药的方式施用于有此需要的患者。

[0027] 9. 一种制备肿瘤靶向性药物递送系统的方法,所述方法包括 :

[0028] 使聚合的全重链人铁蛋白解聚 ;

[0029] 向解聚的全重链人铁蛋白加入肿瘤治疗药物以使所述解聚的全重链人铁蛋白与所述肿瘤治疗药物结合 ;并且

[0030] 使结合有所述肿瘤治疗药物的所述解聚的全重链人铁蛋白重新聚合成纳米颗粒。

[0031] 10. 肿瘤靶向性药物载体,所述载体包含全重链人铁蛋白。

[0032] 11. 全重链人铁蛋白用作肿瘤靶向性药物载体的用途。

附图说明

[0033] 图 1 为肿瘤靶向性纳米药物载体的制备及表征。图 1a 为肿瘤靶向性纳米药物载体 H- 铁蛋白 (H-Ferritin, HF_n) 装载药物阿霉素 (Doxorubicin, Dox) 的过程示意图 ;图 1b 为装载药物阿霉素前后,药物载体的冷冻电镜表征图 ;图 1c 为装载药物阿霉素前后,药物载体的动态光散射表征粒径分布图。

[0034] 图 2 为装载药物的靶向性纳米载体 (HF_n-Dox) 的稳定性研究。图 2a 为在生理盐水及正常小鼠血清条件下,装载药物后的纳米载体 (HF_n-Dox) 的稳定性 ;图 2b 为 HF_n-Dox 在酸性条件下 (pH = 5) 和中性条件下 (pH = 7.4) 的药物释放。

[0035] 图 3 为装载药物后的靶向性纳米载体 HF_n-Dox 纳米颗粒在体外、体内通过其受体 TfR1 实现对肿瘤细胞特异性靶向性的研究。图 3a 为荧光标记的 HF_n 蛋白和 HF_n-Dox 与肿瘤细胞的特异性结合 ;图 3b 显示 HF_n 蛋白与肿瘤细胞的特异性结合可以被 HF_n 蛋白或者 HF_n-Dox 特异性的竞争性抑制。而且抑制曲线基本上没有区别 ;图 3c 为抗 TfR1 的抗体可以特异性的阻断 HF_n-Dox 与肿瘤细胞的结合 ;图 3d 为放射性标记的 HF_n-Dox 纳米颗粒在体内对肿瘤的特异性靶向成像。

[0036] 图 4 为激光共聚焦研究 HF_n-Dox 进入细胞内部的过程。其中蛋白壳用 Cy5.5 标记 ;溶酶体的 marker 分子 LAMP-1 用 Alexa-488 标记 ;Dox 则是观察其本身的荧光信号。

[0037] 图 5 为 HF_n-Dox 纳米颗粒在体内的药代动力学、组织分布及体内清除的研究。图

5a 为 HF_n-Dox 纳米颗粒与 Free Dox 的药物半衰期研究 ;图 5b 和 c 为 HF_n-Dox 纳米颗粒与 Free Dox 药物分别在肿瘤组织和心脏组织中积累量的研究 ;图 5d 为 HF_n-Dox 纳米颗粒与 Free Dox 在体内清除的研究。

[0038] 图 6 为装载阿霉素的 HF_n-Dox 纳米颗粒对裸鼠结直肠癌的治疗效果。图 6a 为对肿瘤生长的抑制曲线 ;图 6b 为对荷瘤小鼠的生存时间的统计结果 ;图 6c 为给药后,荷瘤小鼠的体重变化。

具体实施方式

[0039] 下面用实施例来具体说明本发明的内容,这些实施例不应理解为任何意义上的对本发明的限制。本发明人经过广泛而深入的研究,在本实验室前期的工作 (Fan 等, Nature Nanotech. 2012) 和中国发明专利申请 201110122433.0 的基础上,将利用基因工程的方法重组表达的人 H- 铁蛋白用于癌症的诊断和治疗。在此基础上,完成了本项发明。

[0040] 实施例 1、肿瘤靶向性纳米药物载体 HF_n-Dox 的制备及表征

[0041] 作为一种药物载体,首先要解决的是药物的装载问题。如上文所述,目前常用的方式是 pH 值控制下的蛋白壳解聚 - 聚合来向蛋白空腔内装载药物。而实际上,因为 H- 铁蛋白的稳定性,使得其在 pH = 2 的条件下才会解聚。在如此强烈的酸性条件下处理铁蛋白蛋白壳,会使得铁蛋白亚基在 pH 值恢复到中性条件下时,不能完全地重新组装为原来的蛋白壳,而是会造成一些“缺口”(Kim, M. 等, Biomacromolecules, 2011)。这会造成装载药物后,铁蛋白纳米颗粒不稳定,包药得率下降。而且蛋白壳的不完整性会影响其对肿瘤的靶向性。另一种向铁蛋白内部装载药物的方法是,利用金属离子作为药物添加辅料,化疗药物与金属离子结合后,利用铁蛋白蛋白壳上的亲水性通道进入蛋白壳内部。使用这种方法虽然会将药物装载在蛋白壳内部,但同时会引入金属离子,大部分为重金属元素。利用这种方法装载药物后,在进行肿瘤治疗时,会加重代谢器官的负担,造成重金属中毒。为了解决装载药物的问题,本发明利用相对温和的脲变性复性的方法,成功制备出载药量高的 H- 铁蛋白 - 阿霉素纳米颗粒 (HF_n-Dox)。人 H- 铁蛋白壳在高浓度脲 (例如,大于 6M) 的条件下,蛋白壳实现解聚,同时向溶液中加入阿霉素 (Dox)。然后用梯度脲透析的方法实现人 H- 铁蛋白对 Dox 的装载。因为 Dox 的 pK_a 值为 8.2 (Yang, S. C. 等, J Appl Polym Sci, 2000), 因此,在将 H- 铁蛋白壳解聚 - 聚合的过程中,依靠 Dox 分子与 H- 铁蛋白壳内部表面的静电吸附作用 (Harrison, P. M. & Arosio, P. Biochim Biophys Acta, 1996), 即可将 Dox 分子包裹在 H- 铁蛋白壳内部。通过冷冻电镜,动态光散射等方法鉴定,装载 Dox 前后,人 H- 铁蛋白纳米颗粒的结构没有任何变化。具体实施例如下:

[0042] 首先,以高表达 H- 铁蛋白的 HeLa 细胞系的 cDNA 为模板,设计人 H- 铁蛋白的全长引物,将人 H- 铁蛋白的 cDNA (ATGACGACCGCGTCCACCTCGCAGGTGCGCCAGAACTACCACCAGGACTCAGAGCCGCCATCAACCGCCAGATCAACCTGGAGCTCTACGCCTCCTACGTTTACCTGTCCATGTCTTACTACTTTGACCGCGATGATGTGGCCTTGAAGAAGCTTTGCCAAATACTTCTTCACCAATCTCATGAGGAGAGGGAACATGCTGAGAACTGATGAAGCTGCAGAACCAACGAGGTGGCCGAATCTTCCTTCAGGATATCAAGAAACCAGACTGTGATGACTGGAGAGCGGGCTGAATGCGATGGAGTGTGCATTACATTTGGAATAAATGTGAATCAGTCACTACTGGAAGTGCACAAACTGGCCACTGACAAAAATGACCCCATTTGTGTGACTTCAATGAGACACATTACC TGAATGAGCAGGTGAAAGCCATCAAAGAATTGGGTGACCACGTGACCAACTGCGCAAGATGGGAGCGCCGAATCCGGCTTGGCGGAATATCTCTT

TGACAAGCACACCCTGGGAGACAGTGATAATGAAAGCTAG, 552bp) 构建到表达载体 pET30a (Novagen) 上; 然后利用原核表达系统, 将 HF_n-pET30a 转化入表达菌株 BL21 (DE3) (Novagen), 利用 IPTG 诱导表达, 之后对人 HF_n 蛋白进行纯化 (关于人 H- 铁蛋白的分子构建、表达和纯化请参见 Fan 等, Nature Nanotech. 2012 和中国发明专利申请 201110122433.0)。

[0043] 然后, 将人 HF_n 蛋白加入到 8mol/L 的脲中至终浓度为 1mg/mL。室温反应 30min, 使 HF_n 蛋白壳彻底解聚。然后加入阿霉素试剂, 至终浓度为 1mg/mL。避光反应 10 分钟后, 将反应液转移到透析袋 (截留分子量为 3kDa) 中, 然后在避光, 4 度条件下, 对反应液进行梯度脲 (7-5-3-2-1mol/L, 每个梯度 4 小时) 透析复性。最后透析到生理盐水中。反应完毕后, 将得到的 HF_n-Dox 纳米颗粒经过 Superdex20010/300GL 分子筛纯化, 得到单分散的单体纳米颗粒进行进一步分析。图 1a 为利用脲的方法向靶向性药物载体 HF_n 蛋白中装载药物阿霉素的示意图。

[0044] 为对装载药物的 HF_n 纳米颗粒进行冷冻电镜表征, 相同浓度的 HF_n 蛋白和 HF_n-Dox (20 μL, 0.25mg/mL) 样品用 FEI Vitrobot Mark VI (FEI, Oregon) 包埋后, 用装备有 Gatan UltraScan4000 (model895) 16- 兆像素的 CCD 镜头的冷冻电镜 FEI300-kV Titan Krios (FEI, Oregon) 对样品进行表征。HF_n 蛋白和 HF_n-Dox 纳米颗粒均在放大 96,000 倍的条件下成像, 每个视野的电子束约为 $20 \text{ e}^-/\text{\AA}$ 。图 1b 为装载药物前后的 HF_n 蛋白的冷冻电镜表征图。结果发现, HF_n-Dox 的构象与装载药物前的 HF_n 蛋白基本上没有任何区别。

[0045] 对装载药物前后的 HF_n 蛋白的动态光散射表征是在带温控的 DynaPro Titan (Wyatt Technology) 完成的。等量的 HF_n 蛋白和 HF_n-Dox 在 25°C 条件下完成测定。图 1c 为动态光散射的方法对装载药物前后的 HF_n 蛋白进行表征。发现装载药物后, HF_n-Dox 的分散性好, 粒径均一。与 HF_n 蛋白基本上没有区别。

[0046] 实施例 2、装载药物的纳米药物载体 HF_n-Dox 体外释放及稳定性研究

[0047] (1) 为研究装载药物后的靶向性药物载体 HF_n-Dox 的稳定性, 我们将 HF_n-Dox 纳米颗粒 (500 μmol/L, 以 Dox 量计, 500 μL) 放入透析管 D-tube (截留分子量 6 ~ 8kDa, Novagen) 中, 然后放入生理盐水或者正常小鼠血清中 37°C 进行孵育。分别在孵育时间 0、1、2、4、8、12、24、36、48、60 小时取样, 利用 HPLC 方法进行阿霉素的量的测定。测定结果以解离百分率表示。药品保留百分率 = 100% - 解离百分率。

[0048] 结果如图 2a 所示, 稳定性试验结果表明, HF_n-Dox 药物载体系统在 37°C 条件下, 小鼠血清中非常稳定。60 小时后解离了不足 10%。这表明 HF_n-Dox 在通过尾静脉给小鼠之后, 可以稳定的存在于小鼠血清之中。

[0049] (2) 为研究 HF_n-Dox 的药物释放行为, 我们用 pH7.4 的 PBS 模拟生理条件, 用 pH5.0 的醋酸缓冲液模拟细胞内容酶体环境, 将 HF_n-Dox 纳米颗粒 (500 μmol/L, 以 Dox 量计, 500 μL) 放入透析管 D-tube (截留分子量 6 ~ 8kDa, Novagen) 中, 在 37°C 条件下分别孵育在 PBS 和醋酸缓冲液中, 分别在孵育时间 0、1、2、4、8、12、24、36、48、60 小时取样, 利用 HPLC 方法进行阿霉素的量的测定。测定结果以药品解离百分率表示。

[0050] 结果如图 2b 所示, pH5.0 的条件下孵育 60 小时后, 所有装载在 HF_n 蛋白壳中的阿霉素都释放出来。而生理条件下, 基本上没有释放。因此, 装载药物的载体 HF_n-Dox 的药物释放形式是依赖于 pH 值条件的。

[0051] 实施例 3、装载化疗药物的纳米药物载体 HF_n-Dox 对肿瘤细胞的体外和体内的靶

向性研究

[0052] 为了研究装载化疗药物阿霉素前后, 药物载体 HFn 蛋白壳在体外和体内对肿瘤细胞的靶向性是否受到影响, 选取常见的人结直肠癌细胞 HT-29 (ATCC :HTB-38) 进行研究。在体外, HT-29 肿瘤细胞与荧光分子标记的仿生铁蛋白进行孵育, 应用细胞流式及激光共聚焦的方法检测仿生铁蛋白与肿瘤细胞的结合情况。在体内, 使用放射性 ^{125}I 标记的 HFn-Dox 纳米颗粒, 对荷瘤小鼠进行尾静脉注射给药。进一步研究放射性标记的 HFn-Dox 在体内对 HT-29 移植瘤的靶向性是否收到影响。

[0053] 实验方法如下: 按照说明书提供的标记方法, 将 NHS 活化的 Cy5.5 (Cy5.5-NHS, 购自 GE Healthcare) 标记到空 HFn 蛋白壳和装载药物后的 HFn-Dox 蛋白壳上。培养 HT-29 细胞至 1×10^5 左右, 胰酶消化, 0.3% 的 BSA/PBS 洗细胞三次, 加入 $50 \mu\text{g/ml}$ 的 Cy5.5 标记的 HFn 蛋白颗粒及 HFn-Dox 纳米蛋白颗粒, 4°C 孵育 45 分钟。然后再用 0.3% 的 BSA/PBS 洗细胞三次, 最后重悬于 PBS 中, 流式检测样品荧光。结果如图 3a 所示, 装载阿霉素后的 HFn-Dox 对肿瘤细胞 HT-29 的结合与装载药物前的 HFn 蛋白壳没有区别。即, 经过脲变性复性对 HFn 装载阿霉素的操作没有影响 HFn 蛋白壳对肿瘤细胞的结合。

[0054] 为定量的研究 HFn-Dox 与 HFn 蛋白与肿瘤细胞的结合能力, 选择合适浓度的 FITC 标记的 HFn, 作竞争结合抑制实验。同样当细胞至 1×10^5 左右, 胰酶消化, 缓冲液清洗后, 同时加入一定浓度的 FITC 标记 HFn 和过量的未标记 HFn 以及未标记的装载阿霉素药物的 HFn-Dox, 4°C 孵育 45 分钟, 洗细胞三次, 最后重悬于 PBS 中, 流式检测样品荧光。结果如图 3b 所示, 标记 HFn 和细胞的结合, 大部分能够被过量的未标记 HFn 蛋白和 HFn-Dox 给竞争下来, 而且竞争性抑制曲线是几乎一样的。进一步说明 HFn-Dox 与癌细胞的结合是特异的, 而且 HFn 蛋白与 HFn-Dox 对肿瘤细胞的结合能力没有区别。

[0055] 文献 (Li 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2010) 报道人 H 铁蛋白的受体是 TfR1。为证实 TfR1 介导 HFn-Dox 与癌细胞的相互作用, 我们用过量的抗 TfR1 的抗体与 FITC 标记的 HFn-Dox 竞争细胞表面受体。具体实验方法如下: 肿瘤细胞 HT-29 爬片 (BD Biosciences), 置于六孔板中培养至密度为 60% 左右时, 开始实验。共同加入过量的鼠抗人 TfR1 的抗体 CD71 (购自 BDPharmingen) 和 FITC 标记的 HFn-Dox 或者单独加入 FITC 标记的 HFn-Dox, 37°C 孵育 45 分钟, 用 0.3% 的 BSA/PBS 洗细胞三次, 最后用 4% 多聚甲醛固定, PBS 洗三次后, DAPI (Roche Applied Science) 室温染核 10 分钟。PBS 再次洗三次后, 防荧光淬灭封片剂封片。激光共聚焦 (Olympus FluoView FV-1000, Tokyo, Japan) 观察。结果见图 3c, FITC 标记的 HFn-Dox 与肿瘤细胞 HT-29 的大部分结合可以被抗 TfR1 的抗体特异性的竞争下来, 说明 TfR1 介导 HFn-Dox 与癌细胞的相互作用。

[0056] 为研究体内 HFn-Dox 对移植瘤 HT-29 的靶向性, 首先用 Iodo-gen 法 ^{125}I 标记 HFn。标记溶液经 PD-10 柱纯化后测定放射化学纯度。 ^{125}I -HFn 标记率为 $\sim 78.1\%$, 纯化后放射化学纯度 $>98.0\%$ 。然后对 HT-29 荷瘤小鼠经尾静脉注射 $100 \mu\text{L}$ ($400 \mu\text{Ci}$, 约含 $18.5 \mu\text{g}$ 蛋白) ^{125}I -HFn-Dox 生理盐水稀释液, 分别于注射后 1、2、4 和 24h 用单光子发射计算机断层显像仪器 (SPECT) 进行平面 γ 显像。结果如图 3d 所示, 放射性 ^{125}I 标记的 HFn-Dox 纳米颗粒迅速的聚集在肿瘤部位, 注射后 1h 肿瘤就能清晰被显像。而其他器官的非特异性聚集则在 24 小时内迅速的通过体内代谢清除掉。这表明 HFn-Dox 纳米颗粒, 在小鼠体内不仅能够非常特异性的靶向肿瘤组织, 而且在其他器官中的非特异性结合会很快通过代谢排出体

外。也就是说,我们新发展的这种 H- 铁蛋白纳米药物载体能够将装载的药物在体内特异性的输送到肿瘤部位;同时,在健康的器官中能够内有效的得到清除,从而避免了对健康器官的毒性副作用

[0057] 实施例 4、纳米药物载体 HF_n-Dox 杀伤肿瘤细胞的机理研究

[0058] 化疗药物阿霉素分子杀伤肿瘤的原理是阿霉素分子进入细胞核后,嵌在 DNA 双螺旋中,抑制 DNA 的复制和转录,从而诱导肿瘤细胞发生凋亡。即,阿霉素要发挥杀伤肿瘤的效果,前提是要能够进入肿瘤细胞的细胞核。为研究,HF_n-Dox 进入细胞的过程和进入细胞后,能否将装载在其内部的阿霉素释放出来,进入细胞核,我们利用荧光标记的 HF_n-Dox 和激光共聚焦的手段,进行观察。

[0059] 具体实施例如下:首先对 HF_n-Dox 纳米颗粒进行 Cy5.5 修饰。HT-29 细胞爬片培养 12 小时后,分别用 1 μM Cy5.5-HF_n-Dox 于培养箱中孵育 1 分钟,24 小时,48 小时和 72 小时。PBS 洗三次后用 4% 多聚甲醛固定 5 分钟。然后用 0.1% Triton X-100 对细胞进行通透处理。PBS 再次洗后,细胞用 5% 羊血清室温封闭 30 分钟。然后在 37℃ 孵育 Alexa-488 标记的溶酶体标志分子 Lamp1 抗体 (1:200, clone H4A3; Invitrogen) 一个小时。最后用 DAPI (1 μg/mL, Roche Applied Science) 室温染核 10 分钟。最后,用激光共聚焦显微镜 (Olympus FluoView FV-1000, Tokyo, Japan) 观察。结果如图 4 所示, HF_n-Dox 纳米颗粒中的蛋白壳用 Cy5.5 标记,溶酶体的 marker 分子 LAMP-1 用 Alexa-488 标记;Dox 则是观察其本身的荧光信号。通过观察 HF_n 在细胞内的行为,我们发现, HF_n 与膜蛋白上的受体结合后,由受体介导内吞,被转入胞内体,最终进入溶酶体。这个与文献报道是一致的 (Li, L. 等, Proc Natl Acad Sci USA, 2010)。HF_n-Dox 纳米颗粒在与肿瘤细胞上的受体 TfR1 结合后,与 HF_n 相同,都是被转运入胞内体,最终进入溶酶体中。然后 HF_n-Dox 纳米颗粒降解, HF_n 蛋白外壳降解为氨基酸片段,而释放出来的 Dox,则游离出溶酶体,最终进入细胞核中,发挥对肿瘤细胞的杀伤作用。

[0060] 实施例 5、肿瘤靶向性纳米药物载体 HF_n-Dox 的体内药代动力学研究

[0061] 为研究 HF_n-Dox 在体内的药物代谢动力学,并与游离阿霉素进行比较,我们将等量阿霉素 (10mg/kg 小鼠体重) 的游离阿霉素和 HF_n-Dox 纳米颗粒通过尾静脉注射到雌性 BALB/c 小鼠中 (每组 6 只)。然后,在给药后 5 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、8 小时、10 小时和 24 小时,通过静脉取血的方式取 10 ~ 15 μL 小鼠的血样并立即加入含有肝素 (1000U/mL) 的 PBS 缓冲液中。接下来,我们利用酸性异丙醇萃取法,对血样中阿霉素含量的测定。将血样与酸性异丙醇混匀后,置于 -20℃,避光、萃取过夜。然后彻底震荡萃取液,离心后,取上清置于不透光 96 孔板 (Corning) 中。然后在荧光读数仪器 (Varioskan Flash Spectral Scanning Multimode Reader, ThermoFisher Scientific),使用激发波长 485nm,发射波长 590nm 来测定血样中阿霉素的特异性荧光读数。通过与标准阿霉素样品的荧光值曲线来测量出血样中阿霉素的含量。结果如图 5a 所示,对 HF_n-Dox 纳米颗粒在小鼠体内的药代动力学研究发现,在注射同等剂量的 Dox 条件下, HF_n-Dox 纳米颗粒注射组中,由人 H- 铁蛋白包裹的 Dox 的血液半衰期是游离阿霉素注射组的 12.2 倍。血液半衰期浓度 - 时间的曲线下面积 (AUC), HF_n-Dox 组是游离阿霉素组的 209 倍。这显著增加的血液半衰期和更高的曲线下面积说明 HF_n-Dox 纳米颗粒在系统循环中,有更长的药物滞留时间。这也使得药物可以持续的在肿瘤部位得到聚集。

[0062] 实施例 6、肿瘤靶向性纳米药物载体 HF_n-Dox 的体内分布研究

[0063] 体外和体内药代动力学结果表明, HF_n-Dox 能够在体外有效地杀死肿瘤细胞并具有良好的体内代谢行为。那么 HF_n-Dox 在体内能否特异性的聚集在肿瘤部位? 为进一步研究这个问题, 我们进行了 HF_n-Dox 的体内分布研究。

[0064] 具体实施例如下: 24 只荷 HT-29 移植瘤的 BALB/c 裸鼠随机分成两组 (游离阿霉素处理组和 HF_n-Dox 给药组)。待肿瘤体积 (体积 = 0.5 × 长 × 宽 × 宽) 达到 300 立方毫米时, 开始进行试验。给两组小鼠注射等量阿霉素的游离阿霉素和 HF_n-Dox (10mg/kg 小鼠体重)。然后在给药后的 1 小时、4 小时和 24 小时 (每个时间点 4 只小鼠) 处死小鼠, 取肿瘤、血样和主要的组织器官。血样中的阿霉素含量用酸性异丙醇萃取法测量。对肿瘤和组织中的阿霉素含量的测量, 则采用如下处理。首先, 对肿瘤或者器官组织进行称重, 然后用匀浆。所以的操作在冰上, 并避光的环境下完成。然后取 100 μL 匀浆液进行酸性异丙醇萃取处理。阿霉素浓度测定的方法与体内药代动力学部分一样。结果如图 5b, 5c 所示, 在对 HT-29 移植瘤小鼠注射等剂量的 Dox 前提下, HF_n-Dox 纳米颗粒给药组与游离的 Dox 给药组在小鼠体内器官和肿瘤组织内的 Dox 累积量的差异非常大。HF_n-Dox 给药组给药后, 在肿瘤中 Dox 的含量是游离 Dox 给药组的十倍以上。在以 H- 铁蛋白为药物载体装载阿霉素后, 在肿瘤部位明显的增多的 Dox 的含量, 是 HF_n-Dox 纳米颗粒长的血液半衰期, 主动的肿瘤靶向和受体介导的内吞综合因素的结果。同等重要的是, H- 铁蛋白壳装载阿霉素后, HF_n-Dox 纳米颗粒显著的降低了 Dox 在健康器官中的积累量。特别的是, 将 Dox 封装在 H- 铁蛋白内部, 大大降低了 Dox 在心脏器官中的浓度, 相比游离的 Dox, 大约降低了 7.8 倍, 从而降低了 Dox 药物对心脏的严重毒性。化疗药物 Dox 在肿瘤部位的富集和在健康器官中分布的减少充分表明 H- 铁蛋白是一个非常有效的 Dox 药物载体。

[0065] 从图 3d 可以看出, 没有靶向到肿瘤部分的纳米颗粒很快的从体内清除。为研究清楚 HF_n-Dox 通过何种途径排出体外, 进行了药物在小鼠体内的消除实验。具体实施例如下: 10 只健康的 BALB/c 小鼠随机的分为两组。所有小鼠均在代谢笼中饲养。给两组小鼠尾静脉注射相同剂量的游离阿霉素和 HF_n-Dox (10mg/kg 小鼠体重)。在饲养过程中, 收集小鼠的尿液和粪便。培养 24 小时后, 处死小鼠, 取小鼠的主要组织器官。用酸性异丙醇萃取法测所有排泄物和小鼠主要组织器官中阿霉素的含量。结果如图 5d 所示, HF_n-Dox 纳米颗粒在健康小鼠中的代谢的进一步的研究发现, 大部分的药物通过粪便和尿液排出体外, 滞留在体内的很少。这也进一步的确认了 HF_n-Dox 纳米颗粒可以有效的被体内的健康器官排出体外, 从而避免了对健康器官的毒副作用。

[0066] 实施例 7、肿瘤靶向性纳米药物载体 HF_n-Dox 抗肿瘤的药效学研究

[0067] 作为一种肿瘤靶向性纳米药物载体, 最直接的检验效果就是看对肿瘤的杀伤和抑制作用。具体实施例如下: 40 只移植 HT-29 肿瘤的雌性 BALB/c 裸鼠随机分为五组。在移植瘤体积到 100 立方毫米左右的时候, 所有的荷瘤小鼠通过尾静脉注射药物。其中对照组为 PBS、HF_n 蛋白组。给药组为游离阿霉素、HF_n-Dox 组和临床用的脂质体阿霉素药物 Doxil 组。小鼠对游离阿霉素的最大耐受剂量为 5mg/kg 小鼠体重, 因此游离阿霉素组给药剂量为 5mg/kg 小鼠体重。HF_n-Dox 给药量为 20mg/kg 小鼠体重。为定量对比研究 Doxil 的副作用与 HF_n-Dox 的副作用, Doxil 注射剂量同为 20mg/kg 小鼠体重。小鼠的体重和肿瘤测量为每周三次。在治疗过程中, 如果小鼠的体重下降超过 15% 或者肿瘤体积超过 1000 立方毫

米,则将处死。

[0068] 实验结果如图 6 所示。在对癌症病人的治疗中,给药的剂量及给药次数是很重要的。但是限于化疗药物的毒副作用,往往会使癌症的治疗变为少量多次给药。然而少量多次给药往往不能有效的杀伤肿瘤细胞。因此,如果能增强机体对化疗药物的耐受剂量,即降低化疗药物的毒副作用,也是药物载体的一个发展方向。研究人员通过实验发现,对健康小鼠来说,在单次给药的前提下,小鼠对 HFn-Dox 的最大耐受剂量为 Dox 等量的 20mg/kg,而对游离阿霉素的耐受剂量为 5mg/kg。这表明, H- 铁蛋白作为药物载体,不仅仅具有靶向性,降低器官的毒副作用,而且可以将小鼠对 Dox 的耐受剂量提高 4 倍。

[0069] 如图 6a 所示,游离阿霉素给药组、PBS 组及 H- 铁蛋白壳组的肿瘤增长的非常快,在第 18 天的时候,平均肿瘤体积就已经超过 1000mm³ 了。而 HFn-Dox 纳米颗粒以最大耐受剂量 (Dox 等量 20mg/kg) 给药组治疗的小鼠,肿瘤的生长,在观察期内得到了非常明显的抑制。临床化疗药物脂质体阿霉素 Doxil 在与 HFn-Dox 同等剂量的条件下,对小鼠的毒副作用非常大。如图 6b, c 所示,一次性给 Doxil 之后,小鼠的体重出现明显的下降。而且随着时间增加,体重下降更多。与对照组相比, Doxil 表现出明显的抑瘤效果,但是因为其副作用,使得其生存时间仍旧没有明显改善。PBS、游离 Dox 及 H- 铁蛋白壳给药组的荷瘤小鼠,平均存活时间分别为 17、18、18 天。而 Doxil 处理组则是 23 天。以小鼠对游离阿霉素的耐受剂量 5mg/kg 单次给药治疗,几乎对肿瘤的生长没有抑制作用。相反的,在 40 天的实验窗口内,最大耐受剂量单次给药的 HFn-Dox 纳米颗粒明显抑制了肿瘤的生长。因此,以 H- 铁蛋白作为化疗药物 Dox 的药物载体,仅仅靠单次给药,就能够有着非常明显的抑瘤效果。

[0070] 在癌症的治疗过程中,精确的将药物输送到病灶部位并降低化疗药物的毒副作用将会提高癌症的治疗疗效。本发明证实,拥有内径为 8nm 空腔的天然人 H- 铁蛋白纳米颗粒可以将高剂量的化疗药物 Dox 特异性的输送到肿瘤部位,仅单次给药,就能够显著的抑制肿瘤的生长。这中天然的纳米药物载体表现出了理想的理化性质和高特异性的肿瘤靶向性,能够在降低化疗药物 Dox 毒副作用的同时,通过增加在肿瘤部位药物的积累量来改善抗肿瘤效果。

[0071] 与已经被广泛用于临床治疗的纳米药物输送载体 (Jain, K. K. *Bmc Med*, 2010), 脂质体类 (Doxil) 或者聚合物类纳米颗粒相比,本发明所描述的人 H- 铁蛋白纳米载体拥有以下的几点优势:(1) 主动靶向性:天然的人 H- 铁蛋白纳米颗粒,无需任何配体功能化的修饰,即可通过与高表达在肿瘤细胞表面的受体 TfR1 特异性的结合,通过受体介导的内吞途径,将 Dox 送达肿瘤细胞。与很多临床上常用的聚合物类或者脂质体药物输送载体相比,这种主动靶向肿瘤的特性和受体介导的内吞机制使得药物特异性的在肿瘤部位滞留和被吸收,从而使得在肿瘤内部具有高浓度的药物分布,并能够有效地抑制肿瘤的生长(图 6a)。传统的纳米药物载体大多是靠被动的 EPR (enhanced permeability and retention effect, 增强的滞留和渗透) 效应来实现将治疗性药物输送到肿瘤部位。这种被动靶向治疗策略往往呈现出有限的治疗效果并能够导致药物的渗漏和诱导药物抗性的产生 (Barenholz, Y. *J Control Release*, 2012 ;Wang, R. B. et al., *J Nanomater*, 2013 ;Kieler-Ferguson, H. M. et al. *Wires Nanomed Nanobi*, 2013)。(2) 良好的药代动力学特征和安全性:HFn-Dox 纳米颗粒与游离的阿霉素相比,表现出了更长的血液半衰期和更高的 AUC 积累,更高的肿瘤药物

积累以及更低的健康器官的药物分布,并能最终从健康组织中排出体外。这些特征使得 HFn-Dox 纳米颗粒在治疗肿瘤时,在降低药物的毒副作用的同时,可以极大的改善肿瘤的治疗效果。更重要的是, H- 铁蛋白是天然存在于人体内的一种蛋白质,不含任何潜在的毒性成分,因而不会激起集体的炎症或者是免疫反应,并展现出优异的生物相容性。(3) 极好的抗肿瘤活性: HFn-Dox 纳米颗粒仅仅靠单次注射治疗,就能够抑制住肿瘤的生长。这种治疗效果要比临床上常用的聚合物类或者脂质类药物载体高效的多。传统的纳米药物载体往往需要多次剂量的治疗才能够达到抑制肿瘤生长的目的 (Tang, N. 等, *J Natl Cancer Inst*, 2007 ;Kaminskas, L. M. 等, *Mol Pharmaceut*, 2012 ;Hrkach, J. 等, *Sci Transl Med*, 2012)。(4) 易于大批量生产和纯化:天然的 H- 铁蛋白纳米载体完全是由基因重组,大肠杆菌表达出来的蛋白质,表达量高,易于纯化 (Fan, K. 等, *Nat Nanotechnol*, 2012)。其主动靶向肿瘤的特性使得无须任何配体的修饰或者理化性质的调整,从而避免了复杂的往往是高成本、低产出、和重复性差等特点的人工修饰过程。除此之外, Dox 装载到 H- 铁蛋白纳米笼里面可以通过简单的使铁蛋白壳解聚-聚合操作来实现。本发明的 HFn-Dox 纳米颗粒的合成过程很容易实现在临床层次的应用时需要的标准药物生产条件。我们相信,正是这些得天独厚的特性使得本发明的 H- 铁蛋白纳米颗粒成为一种理想的肿瘤靶向药物输送载体。

[0072] 参考文献

- [0073] 1. Fan, K. 等, Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues. *Nat Nanotechnol* 7, 459-464 (2012).
- [0074] 2. Dreher, M. R. 等, Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J Natl Cancer I* 98, 335-344 (2006).
- [0075] 3. Kim, M. 等, pH-dependent structures of ferritin and apoferritin in solution: disassembly and reassembly. *Biomacromolecules* 12, 1629-1640 (2011).
- [0076] 4. Yang, S. C. , Ge, H. X. , Hu, Y. , Jiang, X. Q. & Yang, C. Z. Doxorubicin-loaded poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles produced by emulsifier-free emulsion polymerization. *J Appl Polym Sci* 78, 517-526 (2000).
- [0077] 5. Harrison, P. M. & Arosio, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275, 161-203 (1996).
- [0078] 6. Li, L. 等, Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3505-3510 (2010).
- [0079] 7. Jain, K. K. Advances in the field of nanooncology. *Bmc Med* 8 (2010).
- [0080] 8. Barenholz, Y. Doxil (R) -The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release* 160, 117-134 (2012).
- [0081] 9. Wang, R. B. , Billone, P. S. & Mullett, W. M. Nanomedicine in Action: An Overview of Cancer Nanomedicine on the Market and in Clinical Trials. *J Nanomater* (2013).
- [0082] 10. Kieler-Ferguson, H. M. , Frechet, J. M. J. & Szoka, F. C. Clinical developments of chemotherapeutic nanomedicines: polymers and liposomes for delivery of camptothecins and platinum (II) drugs. *Wires Nanomed Nanobi* 5, 130-138 (2013).
- [0083] 11. Tang, N. 等, Improving penetration in tumors with nanoassemblies of

phospholipids and doxorubicin. *J Natl Cancer Inst*99, 1004–1015 (2007).

[0084] 12. Kaminskis, L. M. 等, Doxorubicin-Conjugated PEGylated Dendrimers Show Similar Tumoricidal Activity but Lower Systemic Toxicity When Compared to PEGylated Liposome and Solution Formulations in Mouse and Rat Tumor Models. *Mol Pharmaceut*9, 422–432 (2012).

[0085] 13. Hrkach, J. 等, Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. *Sci Transl Med*4, 128ra139 (2012).

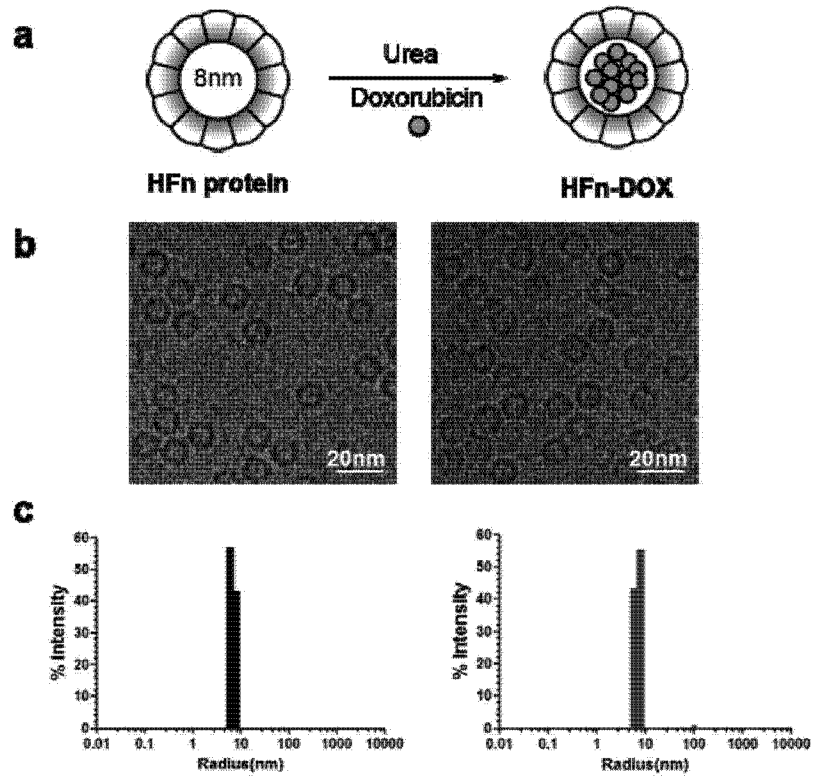


图 1

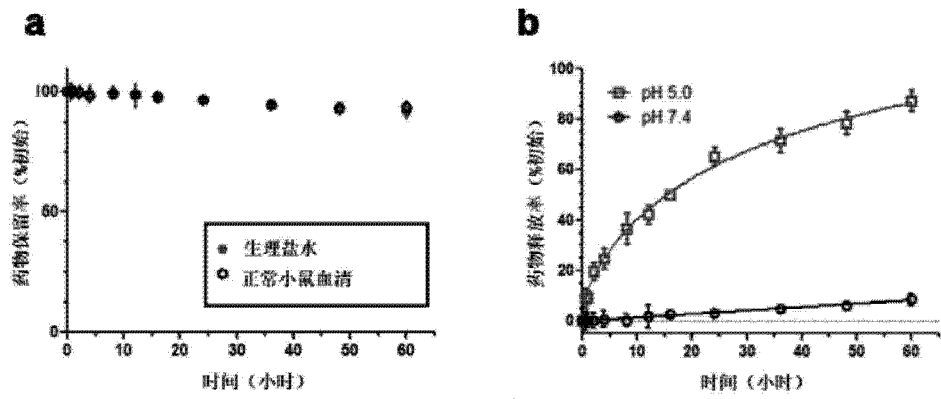


图 2

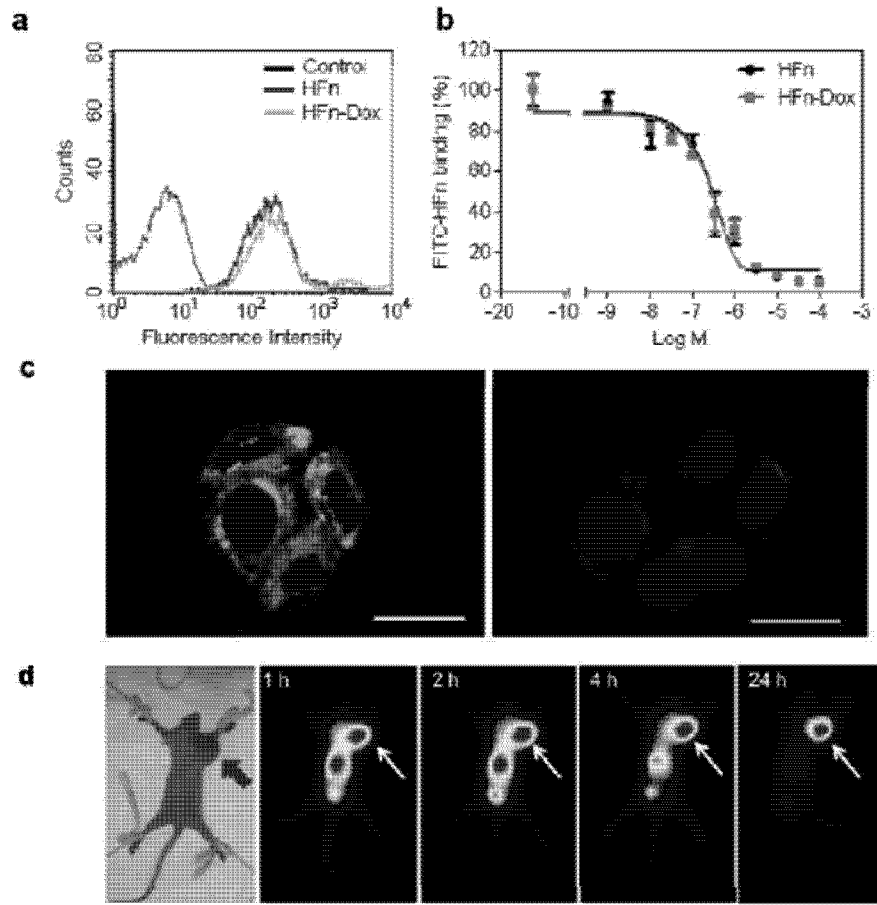


图 3

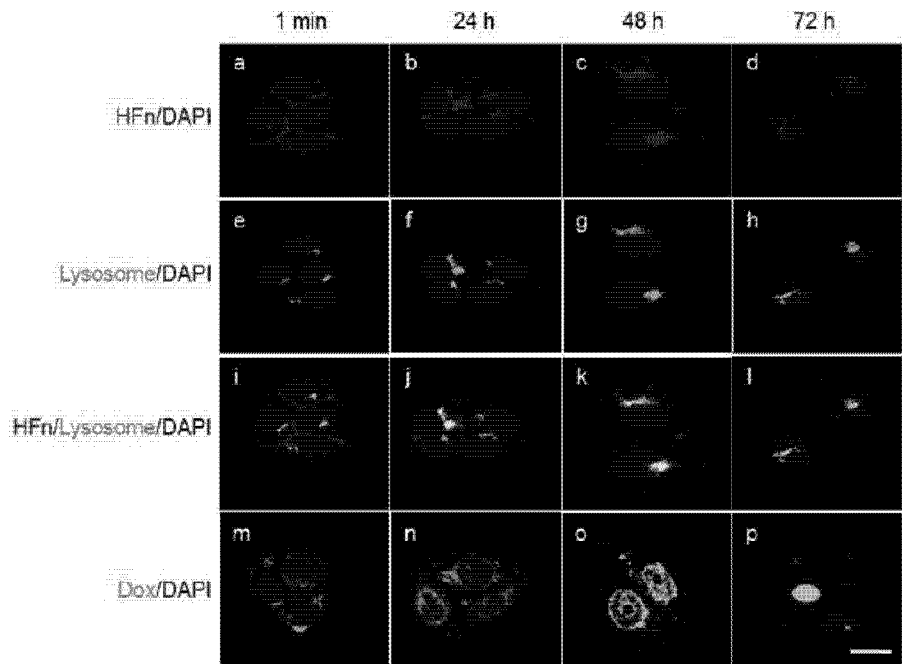


图 4

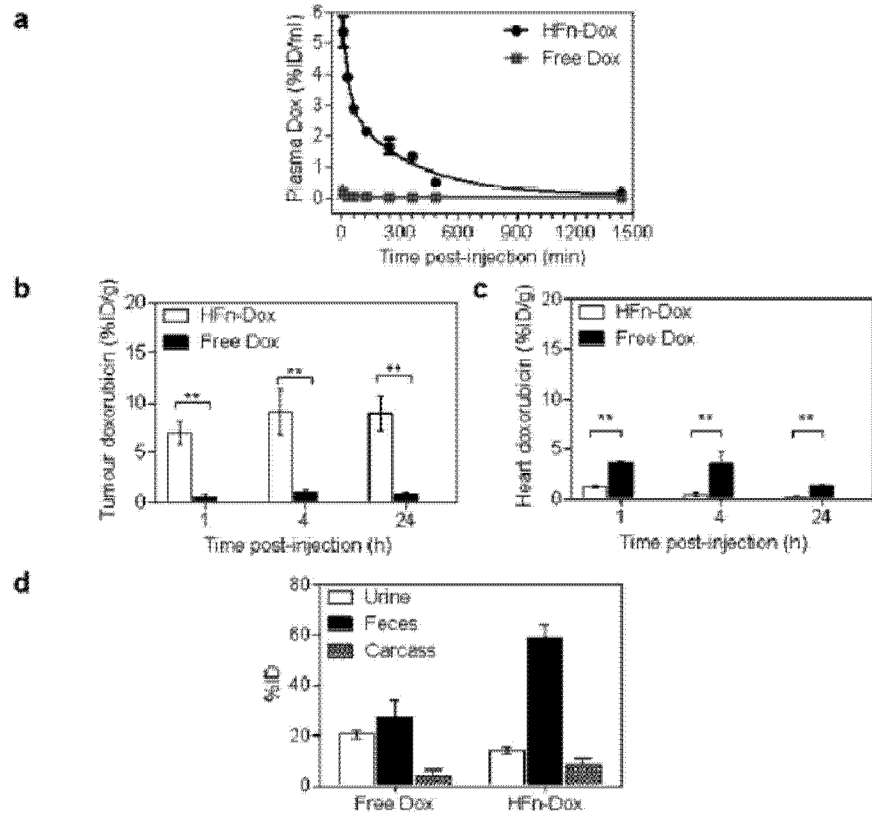


图 5

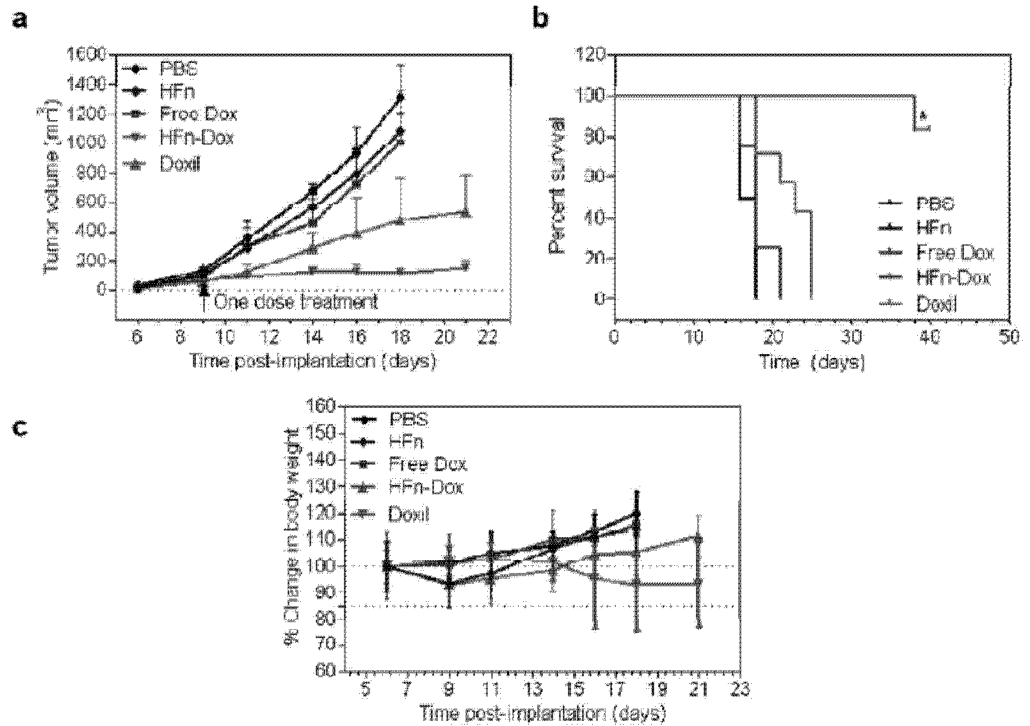


图 6