



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111840250 A
(43)申请公布日 2020.10.30

(21)申请号 201910355025.6

(22)申请日 2019.04.29

(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 赵帅

(74)专利代理机构 北京市诚辉律师事务所
11430

代理人 梁婧文

(51)Int.Cl.

A61K 9/51(2006.01)

A61K 47/42(2017.01)

A61K 33/26(2006.01)

A61P 33/06(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

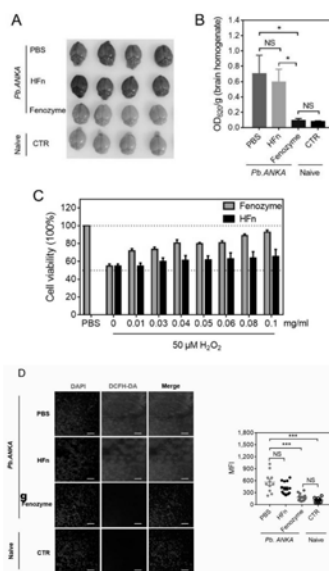
权利要求书1页 说明书8页
序列表1页 附图6页

(54)发明名称

一种用于恶性脑瘤治疗的新型试剂及方法

(57)摘要

本发明提供了一种可以用于恶性脑型疟疾治疗的新型试剂。该试剂是由24个蛋白亚基自组装形成的空腔蛋白壳和具有过氧化氢酶活性的铁基纳米酶组成,可特异性靶向脑部微血管内皮细胞并清除ROS。首先,因该试剂蛋白壳上有铁离子通道,可以在其空腔内合成粒径均一的纳米铁核。纳米铁核具有过氧化氢酶催化活性,能够催化过氧化氢分解。其次,铁蛋白外壳可以靶向脑内皮细胞,同时促进肝脏中巨噬细胞增殖和向M1亚型极化,增强其对感染红细胞的吞噬功能。因此,该试剂能够用于治疗脑型疟疾。



1. 一种脑型疟疾治疗制剂,其特征在于,所述制剂由蛋白壳及无机纳米核组成;所述蛋白壳能够特异识别脑微血管内皮细胞;所述无机纳米核具有过氧化氢酶催化活性,能够分解过氧化氢产生水和氧气。

2. 根据权利要求1所述的脑型疟疾治疗制剂,其特征在于,所述蛋白壳选自:去铁铁蛋白、热休克蛋白(Heat Shock Proteins,HSPs)、Dps蛋白(细胞饥饿状态下DNA保护蛋白,DNA binding protein from starved cells)或具有纳米空腔结构的病毒蛋白壳。

3. 根据权利要求2所述的脑型疟疾治疗制剂,其特征在于,所述去铁铁蛋白由12个或是24个重链亚基或/和轻链亚基任意比例自组装而成;优选的,去铁铁蛋白由全重链亚基自组装而成;更优选的,去铁铁蛋白由24个重链亚基自组装而成。

4. 根据权利要求2或3任一项所述的脑型疟疾治疗制剂,其特征在于,所述去铁铁蛋白是天然的或基因重组制备获得;所述天然去铁铁蛋白来源于真核生物、原核生物或哺乳动物;优选的,所述去铁铁蛋白为重组人源铁蛋白。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的脑型疟疾治疗制剂,其特征在于,所述无机纳米核选自以下一种或多种的组合:氧化铁磁性纳米颗粒、硫化铁纳米颗粒、贵金属掺杂氧化铁纳米颗粒、水铁矿颗粒或/和氧化铈纳米颗粒;优选氧化铁磁性纳米颗粒。

6. 根据权利要求1所述的脑型疟疾治疗制剂,其特征在于,所述蛋白壳为基因重组的人源全重链亚基铁蛋白,所述无机纳米核为氧化铁磁性纳米颗粒,上述制剂命名为铁蛋白纳米酶;优选的,所述蛋白壳由24个重链亚基自组装而成。

7. 权利要求6所述脑型疟疾治疗制剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 基因重组制备人源全重链铁蛋白壳;优选的,基因重组使用的人源全重链亚基铁蛋白基因序列如SEQ ID NO.1所示;

(2) 将铁离子转载进入步骤(1)制备获得的人源全重链铁蛋白壳后,将铁离子氧化为氧化铁纳米颗粒;优选的,将浓度100mM的氯化钠溶液除气,同纯化后的铁蛋白壳加入氮气环境下的密闭反应器中,反应温度维持在65℃,pH值稳定在8.5,按照每个铁蛋白壳1000-5000个Fe的比率加入 $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,双氧水作为氧化剂和Fe同时加入,加入的量按照 $\text{H}_2\text{O}_2:\text{Fe}^{2+}=1:3$,双氧水和Fe加完后体系继续反应5分钟,加热200μL浓度300mM的柠檬酸钠络合剩余的Fe;

(3) 收集步骤(2)产品经排阻色谱纯化,去除变性的杂蛋白,得到磁化的全重链亚基的铁蛋白纳米酶。

8. 权利要求1-6任一项所述脑型疟疾治疗制剂在制备治疗和/或辅助治疗脑型疟疾的药物、以及治疗寄生虫血症的药物中的用途。

9. 权利要求1-6任一项所述脑型疟疾治疗制剂在制备脑型疟疾的MRI成像检测试剂中的用途;优选的,所述MRI成像检测试剂为权利要求1-7任一项所述脑型疟疾治疗制剂的蛋白壳化学偶联或基因融合抗体、多肽、核酸适配体靶向分子、荧光标记、放射核素信号分子和/或酶类催化分子;所述荧光标记优选FTIC、PE、Cy5.5、Cy5;所述放射核素信号分子优选 I^{125} ;所述酶类催化分子优选HRP。

10. 权利要求1-6任一项所述脑型疟疾治疗制剂在制备促进巨噬细胞增殖和/或促进巨噬细胞吞噬功能的制剂中的用途。

一种用于恶性疟疾治疗的新型试剂及方法

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,本发明提供一种集脑型疟疾特异识别、症状缓解与促进机体免疫功能于一体的脑型疟疾治疗的方法。

背景技术

[0002] 疟疾是目前对人类健康威胁最为严重的一种热带传染病。根据世界卫生组织估计,在2017年有超过2亿人患有疟疾,其中超过40万人死于疟疾^[1]。在目前5种以人为宿主的疟原虫中,恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)是最主要的威胁。恶性疟原虫感染导致的脑型疟疾是一种致死率较高的类型。尽管目前根据抗疟药青蒿素发展的青蒿素联合疗法用于治疗疟疾特别是恶性疟疾取得了很好的结果,但脑型疟疾仍然还有15-30%的死亡率。而且有10-24%幸存的脑型疟疾患者表现出神经障碍和记忆损伤^[2,3]。尽管目前脑型疟疾的发病机制还没有研究清楚,但是血脑屏障(BBB)的主要成分内皮细胞已经被证实是在脑型疟疾的过程中扮演关键的角色^[4-6]。有报道称从感染红细胞破裂释放出来的游离血红素可以产生过量的活性氧(ROS),可导致BBB的破坏^[7]。针对产生的ROS所采取的抗氧化治疗策略实验性脑型疟疾模型中可以明显改善生存率和认知障碍。但是由于缺少针对BBB的靶向性,这些策略在临床试验中都失败了^[8]。到目前为止,针对脑型疟疾还没有发展出有效的辅助治疗方法。脑型疟疾的治疗是当前疟疾研究人员最关心的课题和遇到的难题。

[0003] 1.本课题组于2018年发现铁蛋白具有靶向脑微血管内皮细胞的性质,即铁蛋白可以与微血管内皮细胞结合并穿过BBB。基于这一发现我们使用铁蛋白包载阿霉素实现对脑胶质瘤的治疗^[9]。

[0004] 2.恶性脑型疟疾的治疗:目前针对恶性脑型疟疾的治疗,常规的治疗手段是用青蒿琥酯静脉滴注用于对危重病人的抢救。但是青蒿琥酯的治疗机制是杀死红细胞内的疟原虫,对脑型疟疾所表现出的炎症细胞的聚集,脑水肿等症状没有针对性的治疗作用,所以不能及时的缓解症状。而且由于青蒿素的大量使用,目前在东南亚大湄公河流域地区已经出现了青蒿素耐药的恶性疟原虫株^[10,11]。在脑型疟疾的治疗过程中,人们愈来愈希望能进行针对性的有效治疗,即通过治疗能杀死疟原虫,又快速缓解脑型疟疾造成的致命症状,改善预后效果,这也是当前脑型疟疾治疗的一个非常重要的努力方向。

[0005] 3.铁蛋白在脑型疟疾治疗应用方面的优势:铁蛋白Ferritin是人体内储存铁离子的一类蛋白,其对体内铁代谢平衡有着重要作用。因为铁蛋白是人体本身的蛋白,因此将其发展为纳米药物载体便不存在免疫原的问题。

[0006] 因为铁蛋白特殊的结构,赋予了其在很多应用上的天然优势。由24个H亚基构成的H-铁蛋白是研究的最多的铁蛋白。24个亚基构成了内径为8nm,外径为12nm的蛋白壳。从纳米材料的角度看,这个天然的蛋白壳,内部空间可以填充药物、荧光小分子。可以利用H亚基的催化氧化作用向蛋白壳空腔内部装载铁离子,从而形成由蛋白壳包裹的、粒径均一的,超顺磁性纳米颗粒。而蛋白壳外可以利用基因工程的手段,融合表达小分子抗体,将其作为抗

体或者疫苗展示平台。

[0007] 最重要的是,已经有报道的H-铁蛋白的受体是转铁蛋白受体1(TfR1)。TfR1作为铁代谢很重要的一个分子,广泛的表达在铁代谢最旺盛的器官和组织,特别是脑组织上。已经有文献报道,脑微血管内皮细胞上有TfR1的高表达。而本课题组的前期工作已经证明,脑微血管内皮细胞上有TfR1的特异性高表达。

[0008] 因此,我们利用生物仿生原理,合成的铁蛋白纳米酶,其外壳能够特异性靶向脑微血管内皮,内核具有过氧化氢酶活性。我们将这种双功能铁蛋白纳米酶应用到脑型疟疾治疗上,将会给发展脑型疟疾的辅助治疗方法带来新制剂、新技术、新思路。

[0009] 4.本课题组于2007年首次发现氧化铁纳米颗粒具有类似过氧化物酶的催化活性,即在过氧化氢存在下,氧化铁纳米颗粒能够与DAB,TMB等辣根过氧化物酶的底物反应,生成与过氧化物酶相同的反应产物,从而产生与过氧化物酶相类似的催化作用。基于这一发现我们提出了氧化铁纳米颗粒模拟酶的概念(Gao L,Zhuang J,Yan X,et al.,(2007)Nature Nanotech.,2:577-583;中国专利200610057413.9)。2016年樊春海等人发现氧化铁纳米颗粒在中性条件下具有过氧化氢酶活性,通过喂食果蝇发现可以改善由氧化损伤造成的神经退行性疾病以及衰老等^[12]。

[0010] 参考文献:

[0011] [1]World Health Organization World Malaria Report 2018[J].2018,

[0012] [2]OLUWAYEMI I O,BROWN B J,OYEDEJI O A,et al.Neurological sequelae in survivors of cerebral malaria[J].Pan Afr Med J,2013,15(88).

[0013] [3]MURPHY S C,BREMAN J G.Gaps in the childhood malaria burden in Africa:cerebral malaria,neurological sequelae,anemia,respiratory distress,hypoglycemia,and complications of pregnancy[J].Am J Trop Med Hyg,2001,64(1-2 Suppl):57-67.

[0014] [4]COBAN C,LEE M S J,ISHII K J.Tissue-specific immunopathology during malaria infection[J].Nature reviews Immunology,2018,

[0015] [5]HOWLAND S W,POH C M,RENIA L.Activated Brain Endothelial Cells Cross-Present Malaria Antigen[J].PLoS pathogens,2015,11(6):e1004963.

[0016] [6]GORDON E B,HART G T,TRAN T M,et al.Targeting glutamine metabolism rescues mice from late-stage cerebral malaria[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2015,112(42):13075-80.

[0017] [7]PAMPLONA A,FERREIRA A,BALLA J,et al.Heme oxygenase-1and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria[J].Nature medicine,2007,13(6):703-10.

[0018] [8]VARO R,CROWLEY V M,SITOE A,et al.Adjunctive therapy for severe malaria:a review and critical appraisal[J].Malaria journal,2018,17(1):

[0019] [9]FAN K L,JIA X H,ZHOU M,et al.Ferritin Nanocarrier Traverses the Blood Brain Barrier and Kills Glioma[J].Acs Nano,2018,12(5):4105-15.

[0020] [10]DONDORP A M,NOSTEN F,YI P,et al.Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria.[J].New Engl J Med,2009,361(5):455-67.

[0021] [11]NOEDL H,SE Y,SCHAECHER K,et al.Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia[J].New Engl J Med,2008,359(24):2619-20.

[0022] [12]ZHANG Y,WANG Z,LI X,et al.Dietary Iron Oxide Nanoparticles Delay Aging and Ameliorate Neurodegeneration in Drosophila[J].Adv Mater,2016,28(7):1387-93.

发明内容

[0023] 本发明利用纳米材料的过氧化氢酶活性,结合脑微血管内皮细胞识别蛋白,提供了一种新型脑型疟疾治疗制剂及方法。

[0024] 本发明提供了一种脑型疟疾治疗制剂,所述制剂由蛋白壳及无机纳米核组成;所述蛋白壳能够特异识别脑微血管内皮细胞,所述无机纳米核具有过氧化氢酶催化活性,在中性条件下能够分解过氧化氢产生水和氧气。

[0025] 本发明所述蛋白壳选自:去铁铁蛋白、热休克蛋白(Heat Shock Proteins,HSPs)、Dps蛋白(细胞饥饿状态下DNA保护蛋白,DNA binding protein from starved cells)或具有纳米空腔结构的病毒蛋白壳。

[0026] 本发明所述蛋白壳可以化学偶联或基因融合抗体、多肽、核酸适配体等靶向分子、或荧光、放射核素等信号分子、或酶类催化分子;所述荧光标记优选FTIC、PE、Cy5.5、Cy5;所述放射核素信号分子优选I¹²⁵;所述酶类催化分子优选HRP。

[0027] 本发明所述去铁铁蛋白由12个或是24个重链亚基或/和轻链亚基任意比例自组装而成;优选的,去铁铁蛋白由全重链亚基自组装而成;更优选的;去铁铁蛋白由24个重链亚基自组装而成。

[0028] 本发明所述去铁铁蛋白是天然的或基因重组制备获得;所述天然去铁铁蛋白来源于真核生物、原核生物或哺乳动物;优选的,所述去铁铁蛋白为重组人源铁蛋白。

[0029] 本发明所述无机纳米核具有过氧化氢酶催化活性,能够分解过氧化氢产生水和氧气,包括但不限于:氧化铁磁性纳米颗粒、硫化铁纳米颗粒、贵金属掺杂氧化铁纳米颗粒、水铁矿纳米颗粒或氧化铈纳米颗粒;优选氧化铁磁性纳米颗粒。

[0030] 本发明提供一种铁蛋白纳米酶,所述铁蛋白纳米酶由蛋白壳和无机纳米核组成,所述蛋白壳为基因重组的人源全重链亚基铁蛋白,所述无机纳米核为氧化铁磁性纳米颗粒;优选的,所述蛋白壳由24个重链亚基自组装而成。这种铁蛋白纳米酶的蛋白外壳能够特异结合脑微血管内皮细胞,无需抗体、多肽等靶向分子修饰,而其氧化铁内核具有过氧化氢酶活性,能够分解过氧化氢产生水和氧气。

[0031] 本发明提供了一种所述脑型疟疾治疗制剂的制备方法,包括以下步骤:

[0032] (1) 基因重组制备人源全重链铁蛋白壳;优选的,基因重组使用的人源全重链亚基铁蛋白基因序列如SEQ ID NO.1所示ATGACGACCGCGTCCACCTCGCAGGTGCGCCAGA ACTACCACCAG GACTCAGAGGCCGCGCATCAACCGCCAGATCAACCTGGAGCTCTACGCTCCTACGTTTACCTGTCCATGTCTTACT ACTTTGACCGCGATGATGTGGCTTTGAAGAACTTTGCCAAATACTTTCTTACCAATCTCATGAGGAGAGGGAACA TGCTGAGAACTGATGAAGCTGCAGAACCAACGAGGTGGCCGAATCTTCCTTCAGGATATCAAGAAACCAGACTGT GATGACTGGGAGAGCGGGCTGAATGCAATGGAGTGTGCATTACATTTGAAAAAAAATGTGAATCAGTCACTACTGG AACTGCACAACTGGCCACTGACAAAAATGACCCCATTTGTGTGACTTCATTGAGACACATTACCTGAATGAGCA

GGTGAAAGCCATCAAAGAATTGGGTGACCACGTGACCAACTTGCGCAAGATGGGAGCGCCCGAATCTGGCTTGGCG
GAATATCTCTTTGACAAGCACACCCTGGGAGACAGTGATAATGAAAGCTAA;

[0033] (2) 将铁离子转载进入步骤(1)制备获得的人源全重链铁蛋白壳后,将铁离子氧化为氧化铁纳米颗粒;优选的,将浓度100mM的氯化钠溶液除气,同纯化后的铁蛋白壳加入氮气环境下的密闭反应器中,反应温度维持在65°C, pH值稳定在8.5,按照每个铁蛋白壳1000-5000个Fe的比率加入(NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O,双氧水作为氧化剂和Fe同时加入,加入的量按照H₂O₂:Fe²⁺=1:3,双氧水和Fe加完后体系继续反应5分钟,加热200μL浓度300mM的柠檬酸钠络合剩余的Fe;

[0034] (3) 收集步骤(2)产品经排阻色谱纯化,去除变性的杂蛋白,得到磁化的全重链亚基的铁蛋白纳米酶。

[0035] 本发明提供了一种所述脑型疟疾治疗制剂在制备治疗和/或辅助治疗脑型疟疾的药物、以及治疗寄生虫血症的药物中的用途。

[0036] 本发明提供了一种所述脑型疟疾治疗制剂在制备脑型疟疾的MRI成像检测试剂中的用途;优选的,所述MRI成像检测试剂为上述任一项所述脑型疟疾治疗制剂的蛋白壳化学偶联或基因融合抗体、RGD多肽或核酸适配体等靶向分子或FITC, Cy5.5等荧光、I¹²⁵等放射核素等信号分子或者如HRP等酶类催化分子。

[0037] 本发明提供了一种所述脑型疟疾治疗制剂在制备促进巨噬细胞增殖和/或促进巨噬细胞吞噬功能的制剂中的用途。

[0038] 本发明所述方法可应用于对青蒿素治疗疟疾的辅助治疗方法。

[0039] 本发明所述脑型疟疾治疗制剂、铁蛋白纳米酶可应用于对青蒿素治疗疟疾的辅助治疗。

附图说明

[0040] 图1:铁蛋白纳米酶的特征。(A) 铁蛋白纳米酶的TEM电镜图;(B) 铁蛋白纳米酶具有过氧化氢酶活性,分解过氧化氢产生氧气反应。

[0041] 图2:小鼠脑微血管内皮细胞和铁蛋白纳米酶的相互作用。(A) 小鼠脑组织切片免疫荧光显示脑内皮细胞与铁蛋白纳米酶结合,CD31为血管内皮;(B) 流式分析铁蛋白纳米酶与脑微血管内皮细胞结合;(C) 流式分析过量抗转铁蛋白受体(Human ferritin receptor, HFR)的抗体阻断铁蛋白纳米酶与其受体结合;(D) Western blot检测铁蛋白纳米酶受体HFR在脑微血管内皮细胞上的表达。

[0042] 图3:铁蛋白纳米酶对实验性小鼠脑型疟疾的生存率及临床评分改善作用。(A) 铁蛋白纳米酶对脑型疟疾小鼠生存率改善;(B) 铁蛋白纳米酶对脑型疟疾小鼠临床评分改善。

[0043] 图4:铁蛋白纳米酶通过清除ROS保护脑微血管内皮细胞及BBB。(A-B) Evans Blue实验显示铁蛋白纳米酶保护脑型疟疾小鼠BBB的完整性;(C) 在氧化压力下,铁蛋白纳米酶对脑微血管内皮细胞的保护;(D) 脑型疟疾小鼠的脑切片ROS水平。

[0044] 图5:铁蛋白纳米酶抑制小鼠的寄生虫血症。(A) 血涂片吉姆萨染色显示铁蛋白和铁蛋白纳米酶对寄生虫感染的抑制作用,PBS为对照;(B) 感染红细胞占总红细胞的统计结果。

[0045] 图6:铁蛋白纳米酶促进小鼠肝脏巨噬细胞增殖。(A) 铁蛋白纳米酶处理后肝脏组

织切片巨噬细胞免疫组化分析；(B) 免疫组化每个视野内巨噬细胞的数目统计结果；(C) 铁蛋白纳米酶对巨噬细胞的增殖实验。

[0046] 图7:铁蛋白纳米酶促进巨噬细胞吞噬功能。(A) BMDM吞噬红细胞免疫荧光实验；(B) BMDM内部感染红细胞的数目统计结果。图8:铁蛋白纳米酶促进巨噬细胞向M1亚型极化。(A) 流式细胞术分析铁蛋白处理后巨噬细胞M1相关标记分子CD16/32、CD11c、MHCII与M2亚型相关标记分子CD206的表达水平；(B) A图相应的平均荧光强度统计分析结果；(C) 铁蛋白纳米酶处理后的巨噬细胞内ROS水平上升。

具体实施方式

[0047] 下列实施例的描述是为了说明目的,而不仅限于限制本发明的范围。

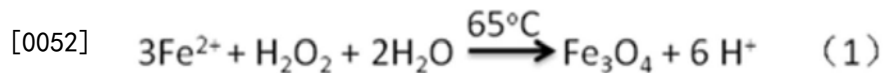
[0048] 实施例1. 铁蛋白纳米酶的制备

[0049] 天然的人铁蛋白是一种球状储铁蛋白,由24个重链或轻链亚基任意比例复合而成,重链和轻链亚基具有高度同源性,分子量分别为21kDa和19kDa(Theil EC., (1987) *Annu.Rev.Biochem.*, 56:289-315)。人体不同器官不同组织中铁蛋白的亚基组成不同,心脏中以重链亚基为主,而肝脏则以轻链亚基较多,两种亚基也会因环境需求作改变,为生物体提供弹性的铁离子供应。然而只有重链亚基才能够利用氧气将二价铁离子转为三价铁离子,使铁离子能顺利进入铁蛋白,所以增加重链亚基,能增加该细胞利用铁的能力;而轻链亚基多的话,能够增加铁储存的效率。铁蛋白球壳之中,铁离子和磷酸盐、氢氧根离子一同形成结晶,与矿物中的水合氧化铁具有类似的化学性质(Harrison PM, et al., (1996) *Biochim.Biophys.Acta* 1275:161-203;Levi S, et al. (1988) *J.Biol.Chem.* 263:18086-18092;Ford GC, et al. (1984) *Philos Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 304:551-565)。

[0050] 通过基因重组全重链人源铁蛋白壳,利用人体生物矿化原理,将铁离子转载进入蛋白壳,再氧化成氧化铁纳米颗粒,我们仿生合成了包裹有磁性氧化铁纳米内核的全重链人铁蛋白(24个亚基组装),命名为铁蛋白纳米酶。具体操作如下:包含有人全重链亚基铁蛋白基因序列(SEQ ID NO.1, ATGACGACCGCGTCCACCTCGCAGGTGCGCCAGAACTACCACCAGGACTCAGAGGCCGCCATCAACCGCCAGATCAACCTGGAGCTCTACGCCTCCTACGTTTACCTGTCCATGTCTTACTACTTTGACCGCGATGATGTGGCTTTGAAGAACTTTGCCAAATACTTTCTTACCAATCTCATGAGGAGAGGGAACATGCTGAGAACTGATGAAGCTGCAGAACCAACGAGGTGGCCGAATCTTCTTCAGGATATCAAGAAACCAGACTGTGATGACTGGAGAGCGGGCTGAATGCAATGGAGTGTGCATTACATTTGGAAAAAATGTGAATCAGTCACTACTGGAAGTGCACAACTGGCCACTGACAAAAATGACCCCATTTGTGTGACTTCATTGAGACACATTACCTGAATGAGCAGGTGAAAGCCATCAAAGAATTGGGTGACCACGTGACCAACTTGCAGCAAGATGGGAGCGCCGAATCTGGCTTGCGCGAATATCTTTTGACAAGCACACCCTGGGAGACAGTGATAATGAAAGCTAA)的重组质粒pET12b-HFn(由意大利布雷西亚大学Paolo Arosio教授提供)转染到表达菌株BL21DE3中,菌液超声裂解后,离心去除大肠杆菌残片,上清液65℃加热10分钟,沉淀杂蛋白,离心去除,上清液在排阻色谱Sepharose 4B柱子上分离纯化,电泳鉴定纯度,BCA测定蛋白浓度。

[0051] 铁蛋白壳生物矿化简述如下:将浓度100mM的氯化钠溶液除气,同纯化后的铁蛋白壳(HFn)加入氮气环境下的密闭反应器中,反应温度维持在65℃,pH值稳定在8.5,按照每个铁蛋白壳1000-5000个Fe的比率加入(NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O,双氧水作为氧化剂和Fe同时加入,加入的量按照H₂O₂:Fe²⁺=1:3,双氧水和Fe加完后体系继续反应5分钟,加热200μL浓度

300mM的柠檬酸钠络合剩余的Fe,铁蛋白纳米酶形成原理见下面公式(1)。收集产品经排阻色谱纯化,去除变性的杂蛋白,得到磁化的全重链亚基的铁蛋白纳米酶(Fenozyme)。



[0053] 图1A为合成的铁蛋白纳米酶(Fenozyme)的TEM电镜表征图,由图可见铁蛋白纳米酶分散均匀,蛋白壳外直径约约为12nm,内径约为8nm。

[0054] 实施例2.铁蛋白纳米酶的过氧化氢酶活性

[0055] 基于樊春海课题组的报道,磁性氧化铁纳米颗粒具有类似过氧化氢酶的催化活性^[12],由于铁蛋白内包裹有氧化铁的内核,因此应当具有类过氧化氢酶的活性,可以分解双氧水产生氧气。我们使用过氧化氢检测铁蛋白纳米酶的酶活性,具体方法如下:在铁蛋白纳米酶中加入0.5mM H₂O₂在PBS(pH=7.4)37℃反应5分钟,观察气泡产生。如图1B,当EP管中加入铁蛋白纳米酶(Fenozyme)和H₂O₂后,液体中产生大量气泡,而铁蛋白壳(HFn)不分解过氧化氢,说明铁蛋白纳米酶具有类过氧化氢酶的活性。

[0056] 实施例3.铁蛋白纳米酶结合脑微血管内皮细胞

[0057] 为了研究铁蛋白纳米酶与小鼠微血管内皮细胞的结合,选取小鼠脑组织石蜡切片和小鼠脑微血管内皮细胞系bEnd.3与荧光分子标记的铁蛋白纳米酶进行孵育,应用激光共聚焦显微镜和细胞流式检测铁蛋白纳米酶与脑微血管内皮细胞的结合。

[0058] 实验方法如下:按照说明书提供的标记方法,将NHS活化的FITC(FITC-NHS,购自GE Healthcare)标记到铁蛋白纳米酶上。按照石蜡切片免疫荧光步骤脱蜡:取出片子,入二甲苯溶液两次,每次10分钟;脱蜡后片子经无水乙醇-95%-80%-70%-50%乙醇梯度后,入蒸馏水中水化,每步骤3分钟;0.01M(pH6.0)柠檬酸缓冲液100℃水浴30分钟修复抗原;PBS洗三次,每次5分钟;5%的羊血清37℃封闭1小时,PBS洗三次,每次5分钟;加入5%的羊血清稀释的CD31一抗和FITC标记的铁蛋白纳米酶,4℃孵育过夜,PBS洗三次,每次5分钟;加入荧光标记的相应二抗37℃避光孵育1h,PBS洗三次,每次5分钟;DAPI染细胞核,室温避光孵育10分钟,PBS避光洗三次,去浮色;抗荧光淬灭封片剂封片;荧光/激光共聚焦显微成像系统拍片保存。

[0059] 结果如图2A所示,在所检验小鼠脑石蜡切片中,铁蛋白纳米酶(Fenozyme)与脑微血管内皮细胞的标志分子CD31有很好的共定位。

[0060] 将bEnd.3细胞培养至 1×10^5 左右,胰酶消化,0.3%的BSA/PBS洗细胞三次,加入50 μg/ml的FITC标记的铁蛋白纳米酶,4℃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。对阻断实验先加入抗HFR的抗体与细胞孵育1小时,用0.3%的BSA/PBS洗细胞三次,后面与孵育FITC标记的铁蛋白纳米酶操作一致。

[0061] 结果如图2B-C所示,在所检验的bEnd.3细胞中,铁蛋白纳米酶与其有很好的相互作用,且这种作用是可以被HFR抗体阻断。

[0062] 将bEnd.3细胞培养细胞数至 1×10^6 左右,胰酶消化,收集细胞,用裂解液(Tris-HCl 50mM pH 8.0,NaCl 150mM,EDTA1mM,NP-401%,Glycerol 10%,PMSF 100μg/mL)裂解细胞,4℃12000g离心15分钟,收集上清,100℃煮沸5分钟。制备好的蛋白样品用合适浓度的SDS-PAGE分离,然后湿转至PVDF膜。经封闭液(5%脱脂牛奶/PBST)封闭后,用抗HFR抗体(ab86480,Abcam)和抗β-actin抗体(AM1021b,Abgent),4℃孵育膜过夜,然后用HRP偶联的

羊抗大鼠IgG或者羊抗小鼠IgG二抗(GE Healthcare)室温孵育1小时,用Pierce公司提供的SuperSignal® West Dura Detection Kit检测。结果见图2D,说明bEnd.3细胞表达HF α 的受体HFR。

[0063] 实施例4.铁蛋白纳米酶对实验性脑型疟疾小鼠的治疗作用

[0064] 为研究铁蛋白纳米酶对脑型疟疾小鼠的治疗效果,我们构建了脑型疟疾小鼠模型,并注射铁蛋白纳米酶观察其对脑疟小鼠的生存率和临床评分的影响。

[0065] 具体实验方法如下:将 1×10^6 感染疟原虫的红细胞通过静脉注射到6-8周大的C57BL/6J小鼠体内,该时间标记为day0。在day2、4、6天时将3.75mg/kg浓度的铁蛋白纳米酶(Fenozyme)通过尾静脉注射到小鼠体内,铁蛋白壳(HF α),PBS为对照。

[0066] 结果见图3A,相比于铁蛋白壳和PBS组,铁蛋白纳米酶能将脑疟小鼠的生存率从20%提高到80%,说明铁蛋白纳米酶对脑疟小鼠的治疗作用。临床评分结果如图3B,铁蛋白纳米酶能够显著改善小鼠的临床评分。

[0067] 实施例5.铁蛋白纳米酶通过保护脑微血管内皮即BBB提高脑疟小鼠的生存率

[0068] 为探究铁蛋白纳米酶对脑疟小鼠的治疗机制是否是通过清除ROS实现的,我们检测治疗后的小鼠BBB通透情况和在氧化压力下对内皮细胞的保护,并检测了小鼠脑部ROS的水平。具体实验方法如下:

[0069] 对BBB通透性实验:在day7脑疟小鼠通过静脉注射0.5%EvansBlue (PBS配) 200 μ l,3小时后小鼠麻醉除血,收集小鼠脑,拍照,称重后将小鼠脑用500 μ l甲酰胺在60摄氏度水浴萃取;48-72小时后取萃取液测量OD620吸光值。结果见图4A-B,相比于铁蛋白壳和PBS组,铁蛋白纳米酶能保护BBB的完整性,减少EvansBlue染料透过BBB进入脑里。说明铁蛋白纳米酶对脑疟小鼠BBB的保护作用。

[0070] 对氧化压力细胞实验:将bEnd.3细胞铺96板,2000个/孔;用50 μ MH $_2$ O $_2$ 与不同浓度的铁蛋白纳米酶或铁蛋白壳混合在培养基中,在细胞培养箱中培养24小时;之后按照CCK-8试剂盒的说明书加入10 μ lCCK-8试剂,培养箱孵育30分钟到1小时,用酶标仪检测每孔OD450吸光值。结果见图4C,相比于铁蛋白壳组,铁蛋白纳米酶能将降低ROS对细胞的损伤,提高bEnd.3细胞的活力。说明铁蛋白纳米酶对脑微血管内皮细胞的保护作用。

[0071] 小鼠脑切片ROS水平实验:day7脑疟小鼠通过麻醉除血,用4%PFA灌流固定,收集小鼠脑,4%PFA固定24小时,之后用10%-20%-30%的蔗糖溶液脱水,冰冻包埋液包埋,切片;小鼠脑切片用PBS洗三次,每次3分钟,用10 μ MROS荧光探针DCFH-DA按其说明书孵育30分钟,PBS洗三次;DAPI染核,去浮色;封片,激光共聚焦显微镜拍照,保存图片,用ImageJ软件对图片进行荧光密度分析。结果见图4D,相比于铁蛋白壳和PBS组,铁蛋白纳米酶降低脑疟小鼠脑部ROS的水平。说明铁蛋白纳米酶通过清除脑疟小鼠脑部ROS来保护脑疟小鼠。

[0072] 实施例6.铁蛋白纳米酶抑制脑疟小鼠的寄生虫血症

[0073] 为探究铁蛋白纳米酶对脑疟小鼠的寄生虫血症的影响,我们检测治疗过程中小鼠血液中感染寄生虫的红细胞的水平。具体实验方法如下:在day4、day6天通过小鼠尾尖采血并涂片,待涂片干后用甲醇固定10分钟;待晾干后用Giemsa染色45分钟,流水冲洗;晾干后100倍油镜观察拍片。用ImageJ软件统计感染红细胞占总红细胞的比,并进行统计分析。结果见图5A-B,在day4铁蛋白纳米酶和铁蛋白组相比于对照组PBS感染率无差异,但在day6时铁蛋白纳米酶和铁蛋白组相比于对照组PBS感染率降低了。

[0074] 实施例7. 铁蛋白纳米酶促进巨噬细胞的增殖

[0075] 为探究铁蛋白纳米酶如何影响脑疟小鼠的寄生虫血症,我们检测小鼠肝脏中巨噬细胞水平,以及铁蛋白纳米酶对其增殖功能的影响。具体实验方法如下:

[0076] 小鼠肝脏巨噬细胞整体水平:将石蜡包埋的day6脑疟小鼠肝脏组织、正常小鼠肝脏组织脱蜡处理,消除内源性过氧化物酶,经抗原修复、血清封闭后加入巨噬细胞标志分子F4/80抗体,4度孵育过夜,PBS漂洗,相应HRP标记的二抗孵育45分钟,PBS漂洗,DAB染色,苏木精复染,常规脱水封片,显微镜观察。结果见图6A-B,相比于PBS组和正常小鼠组,铁蛋白纳米酶和铁蛋白组肝脏组织的巨噬细胞显著增多,说明铁蛋白能够引起肝脏巨噬细胞的增多。

[0077] 铁蛋白对巨噬细胞的增殖实验:将Raw264.7细胞铺96板,10000个/孔;用0.05mg/mL铁蛋白纳米酶或铁蛋白壳混合在培养基中,在细胞培养箱中培养24小时;之后按照CCK-8试剂盒的说明书加入10 μ l CCK-8试剂,培养箱孵育30分钟到1小时,用酶标仪检测每孔OD450吸光值。结果见图6C,相比于PBS组,铁蛋白纳米酶或铁蛋白组能显著提高Raw264.7细胞的增殖能力。说明铁蛋白纳米酶或者铁蛋白对巨噬细胞的增殖作用。

[0078] 实施例8. 铁蛋白纳米酶促进巨噬细胞的吞噬功能

[0079] 为了探究铁蛋白是否影响巨噬细胞对感染红细胞的吞噬功能,我们做了巨噬细胞吞噬实验。具体实验方案如下:利用L929细胞培养上清诱导骨髓来源的细胞产生BMDM巨噬细胞。取正常和感染Pb.ANKA的GFP转基因小鼠红细胞100:1巨噬细胞孵育24小时,同时加入铁蛋白或者铁蛋白纳米酶0.05mg/mL。而后去上清固定细胞,通透,PBS漂洗,血清封闭后,加入Red594标记的鬼笔环肽染细胞骨架,室温孵育45分钟,PBS冲洗2次DAPI染核10分钟。放淬灭剂封片,荧光共聚焦观察。结果见图7A-B,相比于PBS组,铁蛋白纳米酶和铁蛋白组处理后的BMDM细胞里吞噬的感染红细胞的数目增多。说明铁蛋白纳米酶促进了巨噬细胞的吞噬作用。

[0080] 实施例9. 铁蛋白纳米酶促进巨噬细胞的M1极化

[0081] 为探究铁蛋白纳米酶如何影响巨噬细胞的功能,我们对蛋白处理后的细胞的M1/2表型进行了分析。具体实验方法如下:对Raw264.7细胞在PBS,HF α 和铁蛋白纳米酶处理24小时后收集细胞,PBS洗一遍,用荧光标记的CD11c、CD16/32、MHCII以及CD206抗体或者ROS探针DCFH-DA染细胞4度孵育45分钟,PBS洗,重悬细胞,BDCalibur检测分析。结果如图8A-C,铁蛋白纳米酶和铁蛋白处理后与M1亚型相关的标记分子CD16/32、CD11c和MHCII分子表达水平上升或者细胞内部ROS水平上升,而与M2亚型相关的CD206分子水平没有变化,这说明巨噬细胞在铁蛋白处理后向M1亚型极化。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 一种用于恶性脑瘤治疗的新型试剂及方法

<130> CP11902237C

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 552

<212> DNA

<213> 人源全重链亚基铁蛋白基因

<400> 1

```
atgacgaccg cgtccacctc gcaggtgcgc cagaactacc accaggactc agaggccgcc 60
atcaaccgcc agatcaacct ggagctctac gctctctacg tttacctgtc catgtcttac 120
tactttgacc gcgatgatgt ggctttgaag aactttgcca aatactttct tcaccaatct 180
catgaggaga gggaacatgc tgagaaactg atgaagctgc agaaccaacg aggtggccga 240
atcttccttc aggatatcaa gaaaccagac tgtgatgact gggagagcgg gctgaatgca 300
atggagtgtg cattacattt ggaaaaaat gtgaatcagt cactactgga actgcacaaa 360
ctggccactg acaaaaatga cccccatttg tgtgacttca ttgagacaca ttacctgaat 420
gagcaggtga aagccatcaa agaattgggt gaccacgtga ccaacttgcg caagatggga 480
gcgcccgaat ctggcttggc ggaatatctc tttgacaagc acaccctggg agacagtgat 540
aatgaaagct aa 552
```

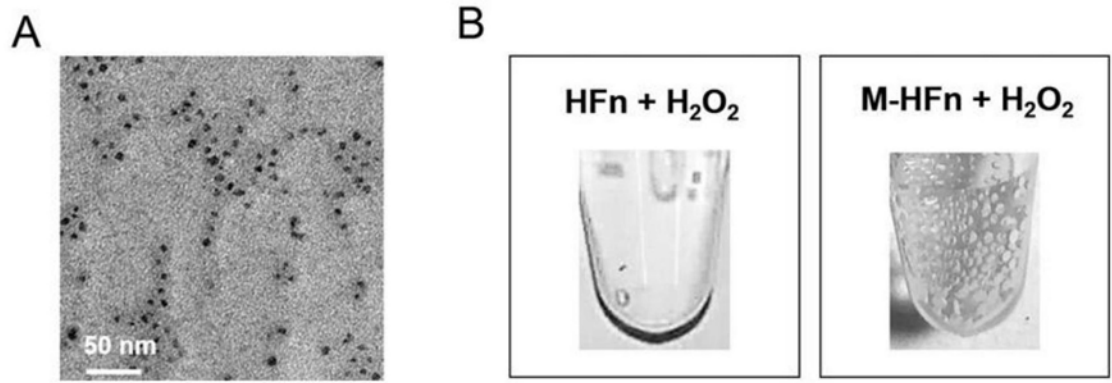


图1

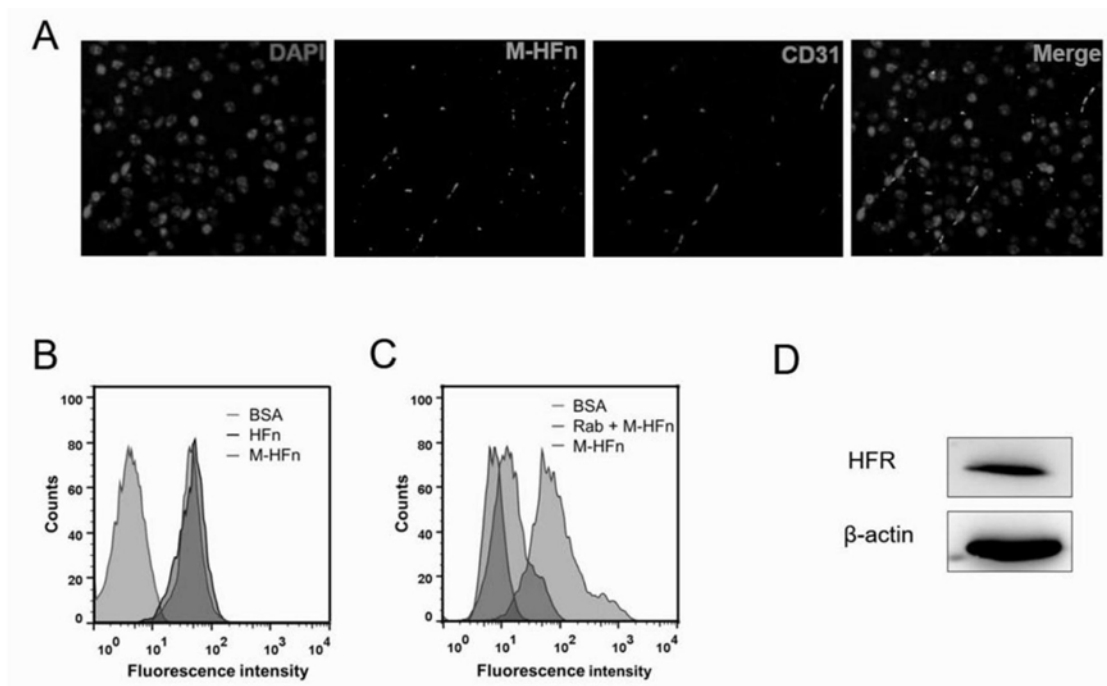


图2

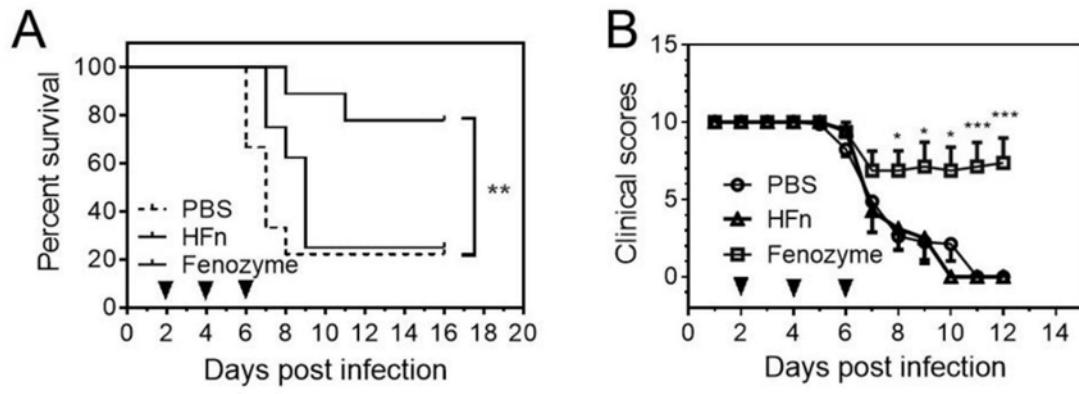


图3

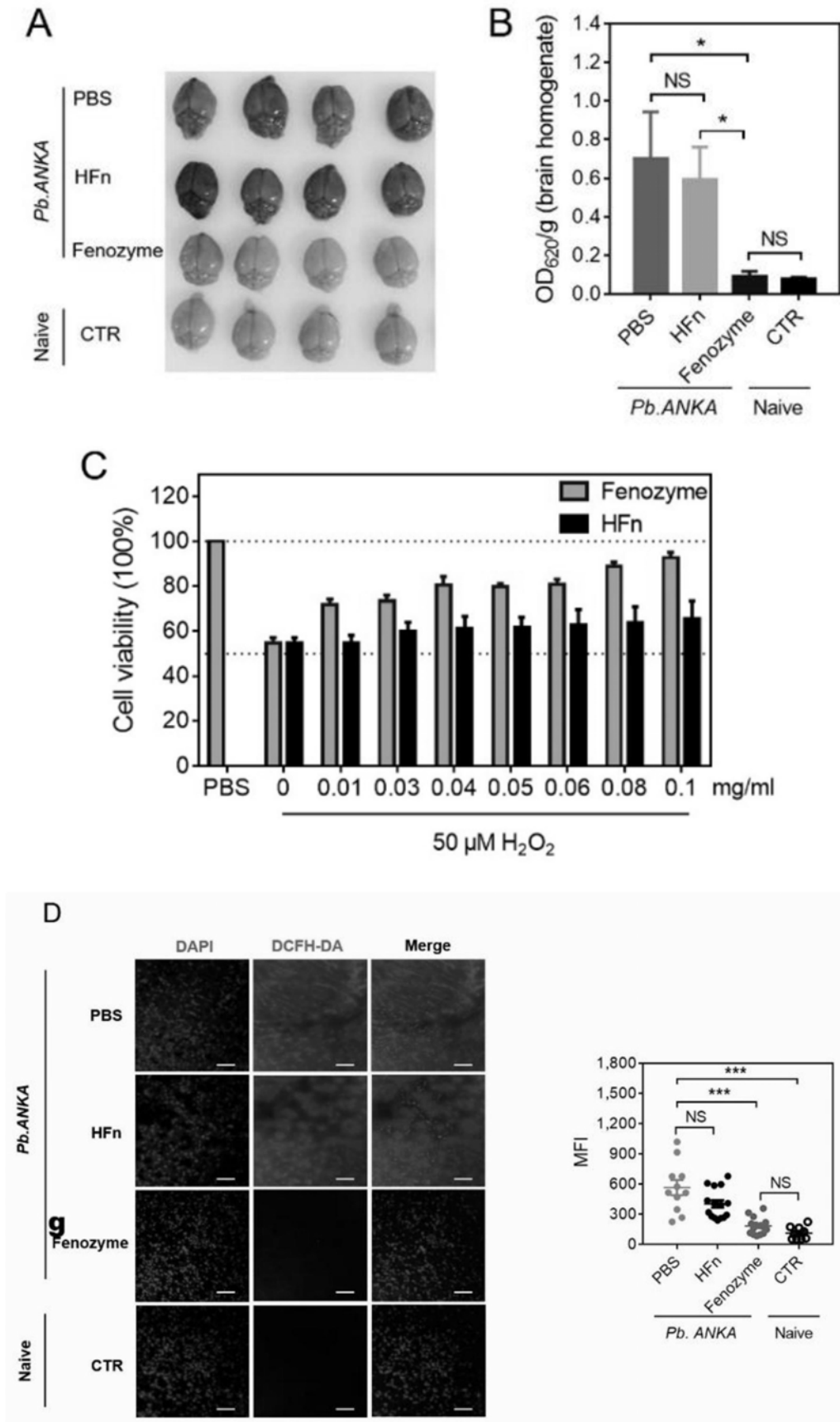


图4

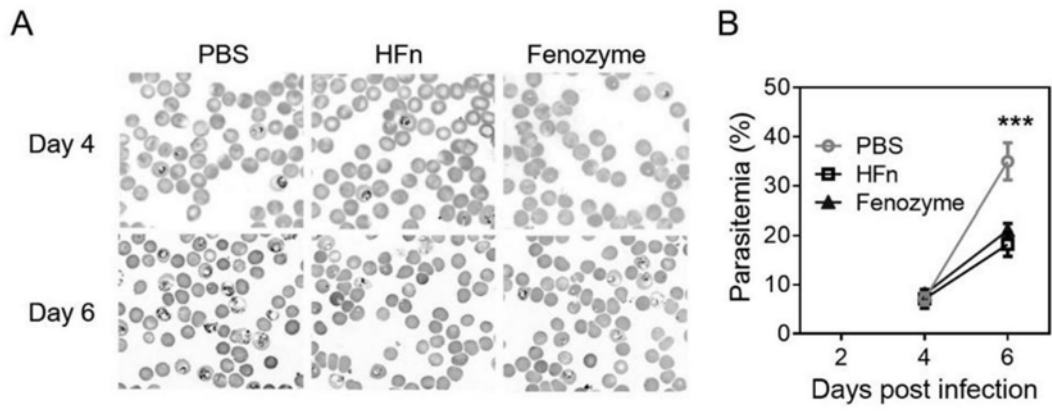


图5

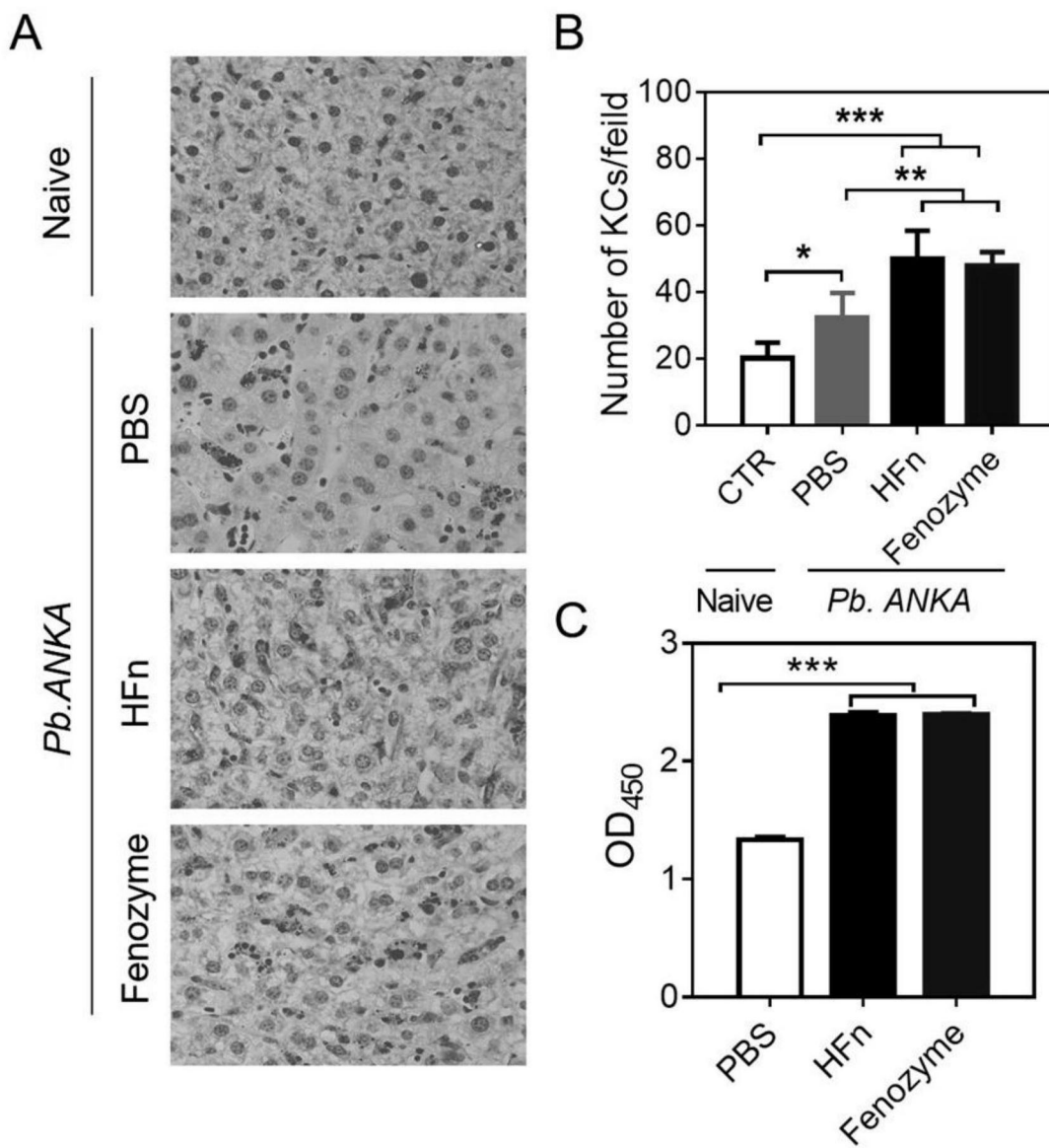


图6

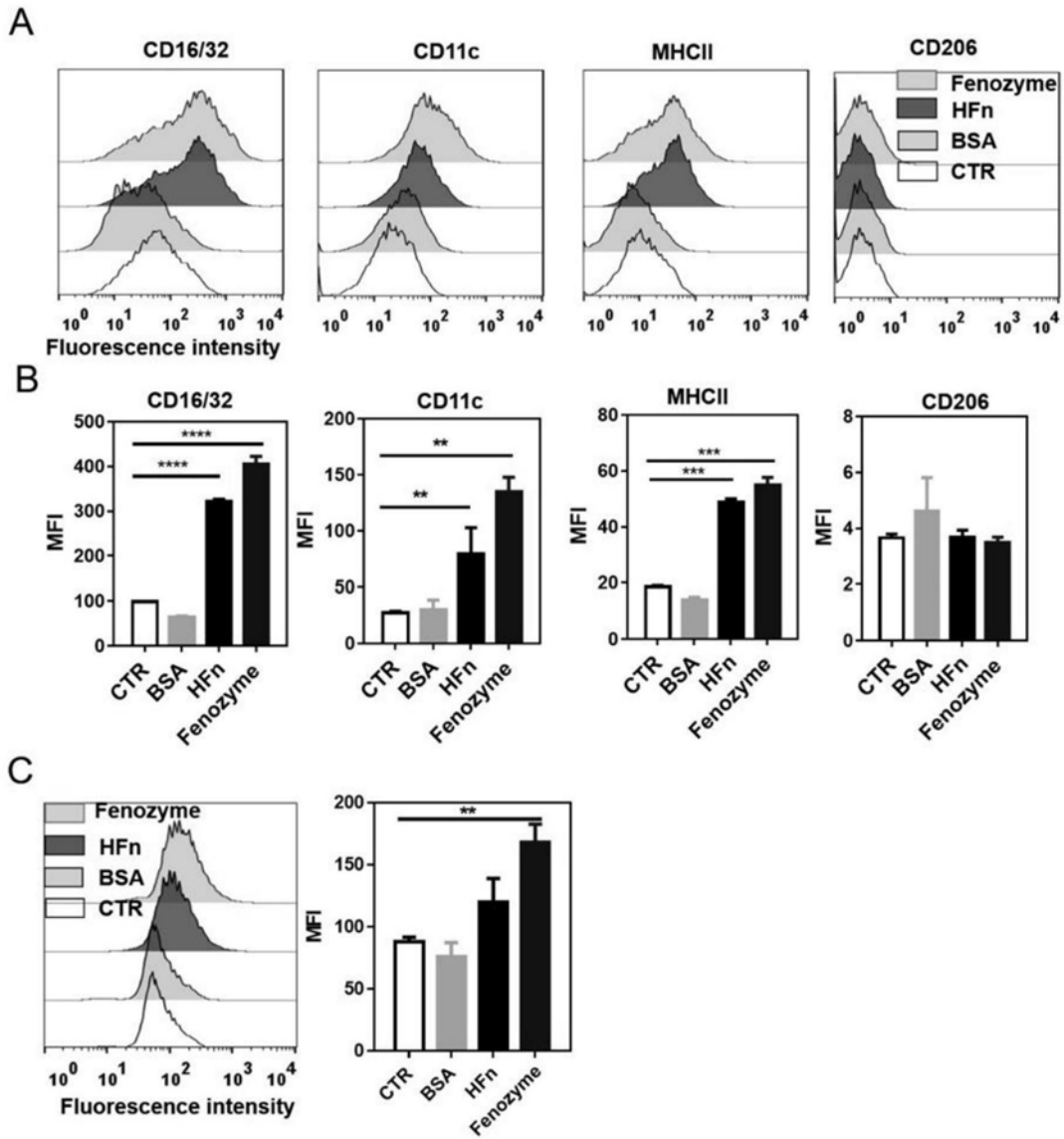


图8