



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109364272 A

(43)申请公布日 2019. 02. 22

(21)申请号 201811454616.0  
 (22)申请日 2018.11.30  
 (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 丁辉 范克龙 杨明  
 (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 49/22(2006.01)  
 A61K 47/62(2017.01)  
 A61K 31/519(2006.01)  
 A61P 35/00(2006.01)

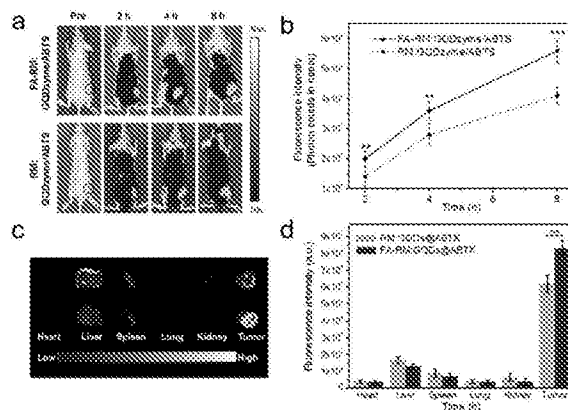
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

## (54)发明名称

纳米酶小体在催化光声成像中的应用

## (57)摘要

本发明涉及一种装载纳米酶和连氮二铵盐造影剂的纳米酶仿生小体及其应用,所述的纳米酶仿生小体的制备方法包括如下步骤:(1)制备纳米酶和连氮二铵盐造影剂;(2)制备仿生小体;(3)将纳米酶和连氮二铵盐复合体造影剂装入仿生小体制备纳米酶仿生小体。所述的纳米酶仿生小体可以制备肿瘤光成像造影剂或肿瘤靶向给药制剂。



1. 一种制备装载纳米酶和连氮二铵盐造影剂的纳米酶仿生小体的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:
  - (1) 制备纳米酶和连氮二铵盐造影剂;
  - (2) 制备仿生小体;
  - (3) 将纳米酶和ABTS复合体造影剂装入仿生小体制备纳米酶仿生小体。
2. 根据权利要求1所述方法,其中所述纳米酶是碳点纳米酶(GQDzyme)。
3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,步骤(1)所述的制备造影剂的方法为:
  - 1) 将聚丙烯腈碳纤维加入到浓硫酸和硝酸的混合溶液中;超声混合溶解,升温至100℃并搅拌充分;
  - 2) 截留分子量3KD超滤溶液并冻干,制得GQDzyme;
  - 3) 将GQDzyme与连氮二铵盐(ABTS)在水溶液中混合并过夜搅拌,超滤、冻干得GQDzyme/ABTS造影剂。
4. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于,步骤(2)所述的制备仿生小体的方法为:
  - 1) 将红细胞加入预冷的低渗缓冲液中,混匀后置于4℃中1~2h,使之完全溶血;
  - 2) 于4℃下离心去除血红蛋白上清,沉淀即为红细胞膜;
  - 3) 重复离心洗涤3~5次,制得粒径较大的仿生小体;
  - 4) 将仿生小体进行超声处理,制得粒径约为400nm的仿生小体。
5. 根据权利要求2或3所述的方法,其特征在于,步骤(3)所述的将GQDzyme/ABTS造影剂装入仿生小体的方法为:使用物理挤压的方式将GQDzyme/ABTS造影剂装载入仿生小体中获得纳米酶仿生小体。
6. 使用权利要求1-5任一所述方法制备获得的造影剂或包含所述造影剂的纳米酶仿生小体。
7. 根据权利要求6所述的造影剂、仿生小体或纳米酶仿生小体,其特征在于,所述的造影剂的粒径大小约为10nm,所述的仿生小体的粒径大小约为100nm,所述的纳米酶仿生小体的粒径大小约为50nm。
8. 权利要求6或7所述的造影剂或包含所述造影剂的纳米酶仿生小体在制备肿瘤靶向制剂中的应用,  
所述的肿瘤靶向制剂为:将肿瘤治疗制剂装载于所述的纳米酶仿生小体中,  
所述的肿瘤治疗制剂为抗体、多肽、核酸适配体、或功能型蛋白。优选的,所述的功能型蛋白是叶酸。
9. 权利要求6或7所述的造影剂或包含所述造影剂的纳米酶仿生小体在制备肿瘤光成像造影剂中的应用,所述的肿瘤为实体性肿瘤。
10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述的肿瘤光成像造影剂为通过静脉给药的方式标注实体性肿瘤的病灶部位的造影剂。

## 纳米酶小体在催化光声成像中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药生物技术领域,具体而言,涉及一种装载碳点纳米酶和连氮二铵盐造影剂的纳米酶仿生小体及其应用。

### 背景技术

[0002] 光声成像结合了纯光学成像的高对比度和纯超声成像的高穿透深度优点,能够提供高分辨率和高对比度的组织成像,是目前非常有应用前景的一种成像模式。光声成像造影剂是决定光声成像性能的关键,它通过改变病灶组织的光学和声学特性,提高成像对比度和分辨率,成为当前生物影像学领域研究热点。比较常见的光声成像造影剂包括金纳米材料,碳纳米管,染料纳米材料。随着纳米材料的快速发展,纳米酶作为具有酶活性的纳米材料的发现,促进了纳米材料家族的进一步发展。这种兼具纳米材料基本性质和酶催化能力的特性,使其在免疫检测、肿瘤诊断和生物传感等生物医学领域都展现出广泛的应用前景。目前纳米颗粒大多仅是应用于实验室研究,多种因素限制纳米制剂从基础研究到临床的转化,如转运效率、生物相容性及长期使用安全性等。近两年,Nature等国际顶级期刊连续深度剖析了纳米药物的研究与临床转化现状,并且认为纳米药物的生物安全性是临床转化失败的重要原因。因此,发展一种能够具有较高生物安全性的纳米酶光声成像造影剂,是实现纳米酶肿瘤光声成像的必要条件。

[0003] 理想的光声成像造影剂应该具有以下特点:优秀地光热信号与声信号转换能力;灵敏地反映生物体的生理结构的性能;良好地体内分布和代谢特征及优良的生物相容性。纳米酶是具有将这些特征都整合到一种纳米材料的潜力。

[0004] 纳米酶过氧化物酶的催化特性:在富含 $H_2O_2$ 的肿瘤区域,可以高效催化连氮二铵盐(ABTS)转化成具有近红外光吸收能力的 $ABTS \cdot ^+$ ,吸收光能后释放的热能导致吸肿瘤组织局部温度升高,温度升高后导致热膨胀而产生压力波,继而形成光声信号,通过探测光声信号能重建出组织中的光吸收分布图像,实现肿瘤的光声成像诊断。

[0005] 此外研究表明,纳米酶在近红外区较强的光吸收作用,可以进一步增强光声信号。然而由于生物机体的极端复杂性,经过精心设计的纳米药物制剂在最终临床试验中的表现往往与前期体外实验结果存在较大差异,所以很难进行临床转化。

### 发明内容

[0006] 为了解决上述纳米酶在实际应用中的问题,本专利发明人利用天然红细胞膜制备仿生小体,对纳米酶光声造影剂进行生物仿生包被,以提升造影剂在血液系统中的稳定性,以及机体的生物相容性。

[0007] 本发明首先涉及一种制备装载纳米酶和连氮二铵盐造影剂的纳米酶仿生小体的方法,所述方法包括如下步骤:

[0008] (1) 制备纳米酶和连氮二铵盐造影剂;

[0009] (2) 制备仿生小体;

- [0010] (3) 将纳米酶和ABTS复合体造影剂装入仿生小体制备纳米酶仿生小体。
- [0011] 步骤(1)所述的制备纳米酶优选为碳点纳米酶(GQDzyme),所述的造影剂优选是碳点纳米酶和ABTS复合体,所述的碳点纳米酶和ABTS复合体的制备方法为:
- [0012] 1) 将聚丙烯腈碳纤维加入到浓硫酸和硝酸的混合溶液中;超声混合溶解,升温至100℃并搅拌充分;
- [0013] 2) 截留分子量3KD超滤溶液并冻干,制得GQDzyme;
- [0014] 3) 将GQDzyme与ABTS在水溶液中混合溶解,过夜搅拌后超滤、冻干即可得GQDzyme/ABTS;
- [0015] 步骤(2)所述的制备仿生小体的方法为:
- [0016] 1) 将红细胞加入预冷的低渗缓冲液中,混匀后置于4℃中1~2h,使之完全溶血;
- [0017] 2) 于4℃下离心去除血红蛋白上清,沉淀即为红细胞膜;
- [0018] 3) 重复离心洗涤3~5次,制得粒径较大的仿生小体;
- [0019] 4) 将仿生小体进行超声处理,制得粒径约为400nm的仿生小体。
- [0020] 步骤(3)所述的将GQDzyme/ABTS造影剂装入仿生小体的方法为:
- [0021] 使用物理挤压的方式将GQDzyme/ABTS造影剂装载入仿生小体中获得纳米酶仿生小体。
- [0022] 本发明还涉及使用所述方法制备获得的GQDzyme/ABTS造影剂或包含所述GQDzyme/ABTS造影剂的纳米酶仿生小体。
- [0023] 所述的GQDzyme/ABTS造影剂的粒径大小约为10nm,所述的仿生小体的粒径大小约为100nm,所述的纳米酶仿生小体的粒径大小约为50nm。
- [0024] 本发明还涉及所述的GQDzyme/ABTS造影剂或包含所述GQDzyme/ABTS造影剂的纳米酶仿生小体在制备肿瘤靶向制剂中的应用,所述的肿瘤靶向制剂为:将肿瘤治疗制剂装载于所述的纳米酶仿生小体中,所述的肿瘤治疗制剂为抗体、多肽、核酸适配体、或功能型蛋白。优选的,所述的功能型蛋白是叶酸。
- [0025] 本发明还涉及所述的GQDzyme/ABTS造影剂或包含所述GQDzyme/ABTS造影剂的纳米酶仿生小体在制备肿瘤光成像造影剂中的应用,所述的肿瘤为实体性肿瘤。
- [0026] 所述的肿瘤光成像造影剂为通过静脉给药的方式标注实体性肿瘤的病灶部位的造影剂。

## 附图说明

- [0027] 图1、外泌体仿生小体包裹的碳点纳米酶光声造影剂的制备及表征:
- [0028] 图1a碳点纳米酶与ABTS光声造影剂复合体(GQDzyme/ABTS)透射电镜成像图;
- [0029] 图1b红细胞膜经过低渗处理制备成粒径较小的外泌体仿生小体;
- [0030] 图1c物理挤压的方式装载GQDzyme/ABTS复合体的外泌体仿生小体;
- [0031] 图1d为碳点纳米酶催化不同浓度ABTS转化的 $ABTS \cdot ^+$ 在近红外处的光吸收图谱;
- [0032] 图1e GQDzyme/ABTS复合体在808nm处光吸收与对 $H_2O_2$ 依赖关系;
- [0033] 图1f溶液中光声信号强度与浓度成正相关性。
- [0034] 图2、不同剂型的纳米酶光声成像造影剂稳定性考察:
- [0035] 图2a各组造影剂光声成像照片;

- [0036] 图2b光声信号强度随时间变化图。
- [0037] 图3、特殊标记的外泌体仿生小体修饰的纳米酶光声成像造影剂对鼻咽癌细胞的识别能力以及鼻咽癌细胞的内吞情况：
- [0038] 图3a激光共聚焦成像分析CNE-2细胞膜和NIH3T3细胞膜叶酸受体表达；
- [0039] 图3b CNE-2鼻咽癌细胞对纳米酶颗粒RM:GQDzyme/ABTS和FA-RM:GQDzyme/ABTS (RM,红细胞膜;FA-RM,叶酸修饰的红细胞膜)内吞激光共聚焦成像；
- [0040] 图3c CNE-2鼻咽癌细胞对靶向分子修饰的光声成像造影剂内吞的透射电镜成像图；
- [0041] 图3d溶酶体共定位激光共聚焦成像表征CNE-2鼻咽癌细胞对靶向分子修饰的光声成像造影剂内吞进入细胞内的情况。
- [0042] 图4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>响应的外泌体仿生小体修饰的纳米酶光声成像造影剂在鼻咽癌荷瘤小鼠体内的光声成像：
- [0043] 图4a造影剂尾静脉注射到荷瘤小鼠体内前或注射后2h,4h,8h时肿瘤部位光声成像分析；
- [0044] 图4b不同时间点肿瘤部位的光声信号定量分析。
- [0045] 图5、通过荧光成像考察不同纳米酶光声成像造影剂体内分布和相应的组织分布：
- [0046] 图5a 8h内,不同药物在小鼠体内实时分布结果；
- [0047] 图5b荧光定量分析肿瘤组织区域的荧光值；
- [0048] 图5c荷瘤小鼠离体组织荧光成像结果；
- [0049] 图5d各组织的造影剂荧光数值分布。

### 具体实施方式

- [0050] 实施例1、外泌体仿生小体包裹的纳米酶光声造影剂的制备及表征
- [0051] 1、化学氧化剥离法制备GQDzyme
- [0052] 为了制备具有过氧化氢酶活性的纳米酶,我们以聚丙烯腈碳纤维为原料,通过化学氧化剥离法制备GQDzyme,具体过程如下：
- [0053] (1) 将0.2g聚丙烯腈碳纤维加入到浓硫酸(40mL)和硝酸(12mL)的混合溶液中；超声混合溶解2h,升温至100℃搅拌24h；
- [0054] (2) 超滤(分子截留量3000Da)冻干后制得GQDzyme。
- [0055] 结果如图1a所示,将冻干后的GQDzyme能够重新均匀的分散在水中,形成透明的淡黄色溶液,表明GQDzyme具有良好的水溶性。透射电镜分析所制得GQDzyme尺寸约为10nm,并且尺寸均一。
- [0056] 2、使用静电相互作用和 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用力完成对ABTS的吸附装载,制备GQDzyme/ABTS显影剂
- [0057] (1) 将10mg GQDzyme与2mg的ABTS在水溶液中混合超声混合溶解2h,过夜搅拌；
- [0058] (2) 超滤(分子截留量3000Da)、冻干即可得GQDzyme/ABTS。
- [0059] ABTS在适当的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用下被GQDzyme在近红外光区域具有光吸收的ABTS<sup>•+</sup>。为了考察该过程与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的关系,我们在不同H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度ABTS和GQDzyme混合水溶液中,检测ABTS<sup>•+</sup>光吸收与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的关系。进一步通过无H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和过氧化氢酶(CAT)前处理的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组,验证纳米

酶光声造影剂对 $H_2O_2$ 的依赖性。并且利用不同浓度的 $H_2O_2$ 考察这种依赖性对光声信号强弱的影响。结果如图1d-f所示,在 $H_2O_2$ 存在的情况下,ABTS才能被GQDzyme催化转化成 $ABTS \cdot ^+$ ,并且 $ABTS \cdot ^+$ 在近红外区域的光吸收随 $H_2O_2$ 的浓度增加,光吸收值逐渐增强,光声信号也与 $H_2O_2$ 的浓度呈正相关性。

### [0060] 3、制备仿生小体

[0061] (1) 利用小鼠摘眼球取血方法取BALB/c小鼠全血2mL;

[0062] (2) 置于5mL含有0.5mL抗凝剂(3.8wt.%柠檬酸钠溶液)的离心管中,充分混合后;

[0063] (3) 于4℃下3000rpm离心20min,吸除丢弃上层血液绒毛层;

[0064] (4) 将底层的红细胞置于4℃预冷的3倍体积量的等渗磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中,重悬后于4℃下离心洗涤3次(15min×5000rpm);

[0065] (5) 将离心洗净后的红细胞按照1:40的比例加入预冷的10mmol/L低渗Tris-HCl缓冲液(pH 7.4),加的过程中需要缓慢搅拌,随后置于4℃冰箱中1~2h,使之完全溶血;

[0066] (6) 于4℃下9000rpm离心15min,去除血红蛋白上清,沉淀即为红细胞膜;

[0067] (7) 重复离心洗涤3~5次,制得粒径较大的外泌体仿生小体;

[0068] (8) 将大粒径红细胞小体经过额定功率为60W水浴超声20min后,制得粒径约为400nm的外泌体仿生小体。

[0069] 通过低渗处理去除血红蛋白形成空心囊泡结构,形成粒径约为3 $\mu$ m的红细胞囊泡,经过实验发现,在水浴超声20min后,结果如图1b所示,微米尺寸的红细胞囊泡即可变为粒径~400nm的外泌体仿生小体。

### [0070] 4、将GQDzyme/ABTS显影剂装载入仿生小体中

[0071] 仿生小体较完整保留生物活性的同时,能有效地降低或屏蔽其免疫原性,提高生物相容性,避免内皮网状系统识别和清除,提升纳米颗粒的水溶性和稳定性,显著延长体内循环时间。接下来,使用制备得到的仿生小体装载GQDzyme/ABTS显影剂,将制得100nm的外泌体仿生小体和GQDzyme/ABTS按浓度比为1:1共混,通过孔径为50nm的MINI挤压器连续过膜挤压7~10次,形成包被有红细胞膜的GQDzyme/ABTS(RM:GQDzyme/ABTS)。利用同样的方法,RM:GQDzyme/ABTS和FA按浓度比1:10共混后通过MINI挤压器挤压10~15次,制得标记有FA的RM:GQDzyme/ABTS。

[0072] 透射电镜数据表明,挤压后纳米颗粒表面明显的覆盖了一层完整的膜结构,挤压过程也没有对纳米酶的结构造成影响(如图1c)。

### [0073] 实施例2、不同剂型的纳米酶光声成像造影剂稳定性考察

[0074] 将纳米酶光声成像造影剂悬浮在pH 7.2的PBS和含10%FBS的细胞培养液(DMEM)中,装入中空的琼脂凝胶棒中,通过光声成像仪采集0h,12h,24h,48h时的光声信号,并绘制光声信号强度随时间变化图。结果如图2所示,随着时间的延长(48h以内),三种造影剂的光声成像图像及光声信号强度均无明显的下降趋势,这说明我们制得的外泌体仿生小体包裹的纳米酶光声造影剂具有良好的光声信号稳定性,光声信号不会随着时间的延长而快速泄露到外泌体仿生小体外,这在很大程度上会决定后续应用的可行性,为临床应用奠定了基础。

[0075] 实施例3、体外细胞水平评价外泌体仿生小体包裹的纳米酶光声造影剂靶向及内吞能力

[0076] 尽管外泌体仿生小体的修饰可延长纳米酶光声造影剂在血液中的循环时间,但要

实现纳米颗粒的靶向输送,纳米酶光声造影剂还应该具有提高肿瘤细胞摄取的能力。叶酸分子的主要靶点是叶酸受体,CNE-2细胞表面叶酸受体的表达量将直接影响着造影剂的靶向能力和治疗效果。因此,我们利用激光共聚焦技术检测了CNE-2细胞表面整合素表达情况,并用NIH 3T3作为非肿瘤细胞模型(阴性对照组)。结果如图3a和3b所示,肿瘤细胞CNE-2的确比NIH 3T3细胞表面叶酸受体的表达量高,这将有助于提高FA-RM:GQDzyme/ABTS与肿瘤细胞CNE-2的亲合能力,从而达到促进摄取和提高药效的目的。纳米颗粒经细胞内吞作用进入胞内后的代谢运输途径对其药效发挥起着关键作用。根据数据图3c和3d分析可知,外泌体仿生小体包被的纳米酶绝大多数与溶酶体不共定位。这是因为构建外泌体仿生小体红细胞膜具有流动性容易与肿瘤细胞膜发生融合,另外因红细胞膜流动会增加纳米酶造影剂与细胞接触面积,促使更多的叶酸与肿瘤表面受体结合,最终纳米酶造影剂会逃避溶酶体直接进入肿瘤细胞质中释放药物。

[0077] 实施例4、体内光声成像考察纳米酶造影剂的肿瘤诊断能力

[0078] 为研究FA-RM:GQDzyme/ABTS在体内肿瘤光声成像的效果,我们成功构建鼻咽癌荷瘤小鼠模型后,分别用RM:ABTS, RM:GQDzyme, RM:GQDzyme/ABTS和FA-RM:GQDzyme/ABTS对小鼠进行尾静脉给药,将小鼠用2.5%的异氟烷麻醉,在注射前和注射后2h、4h、8h、用光声成像仪采集小鼠图像。结果如图4所示,FA-RM:GQDzyme/ABTS在肿瘤组织的分布最多,展现出优异的肿瘤靶向性。进一步验证了GQDzyme和ABTS组成的复合体可以作为纳米酶光声造影剂产生光声信号,红细胞膜构建的外泌体仿生小体的包被,延长了载药纳米酶造影剂的血液循环时间,有效的逃避内皮网状系统清除,有更多的时间窗口利用EPR效应进入肿瘤组织。同时发现,GQDzyme在近红外区域的光热吸收性质,也能够产生光声信号,能够进一步增强纳米酶光声造影剂的光声信号。

[0079] 实施例5、体内的近红外荧光成像验证纳米酶光声造影剂的成像效果

[0080] CNE-2荷瘤小鼠通过尾静脉注射造影剂(10 $\mu$ g/100 $\mu$ L),在不同的时间点,麻醉小鼠并使用小动物活体成像系统扫描。最后一次体内成像数据采集结束后处死小鼠,摘取各小鼠肿瘤和组织并做相应的荧光成像。结果如图5所示,外泌体仿生小体链赋予纳米酶造影剂良好的隐形能力,RM:GQDzyme/ABTS和FA-RM:GQDzyme/ABTS没有出现大量累积于小鼠肝和脾脏中情况。由于叶酸靶向分子的引入,提高了纳米酶造影剂靶向肿瘤的能力,因此增加了其在肿瘤部位的累积量。

[0081] 最后需要说明的是,以上实施例仅用作帮助本领域技术人员理解本发明的实质,不用做对本发明保护范围的限定。

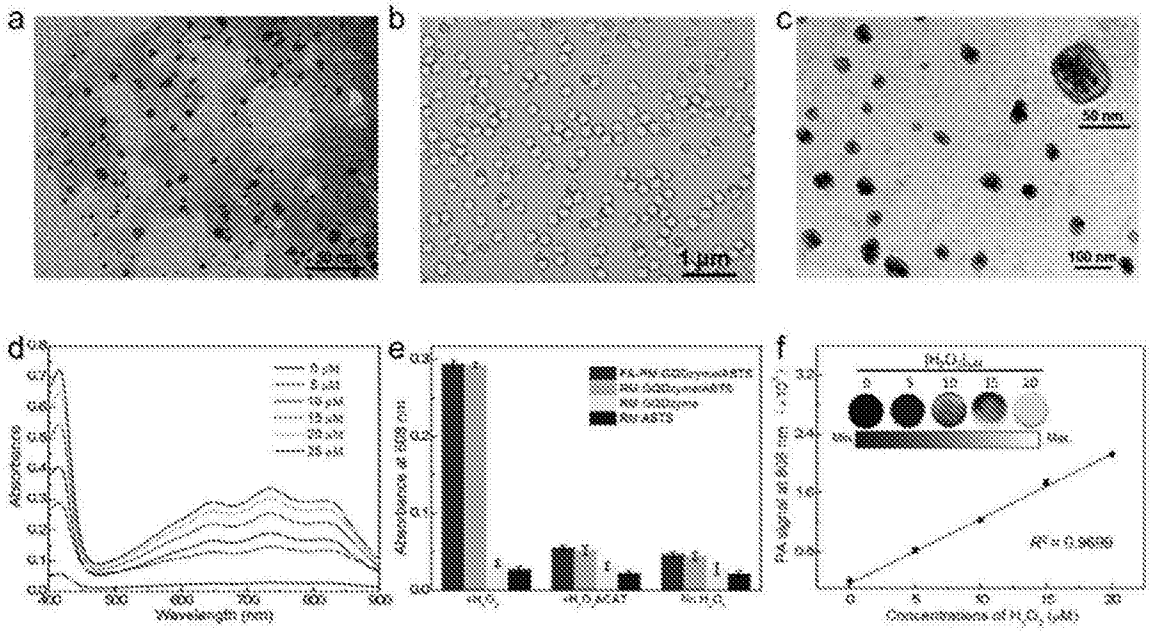


图1

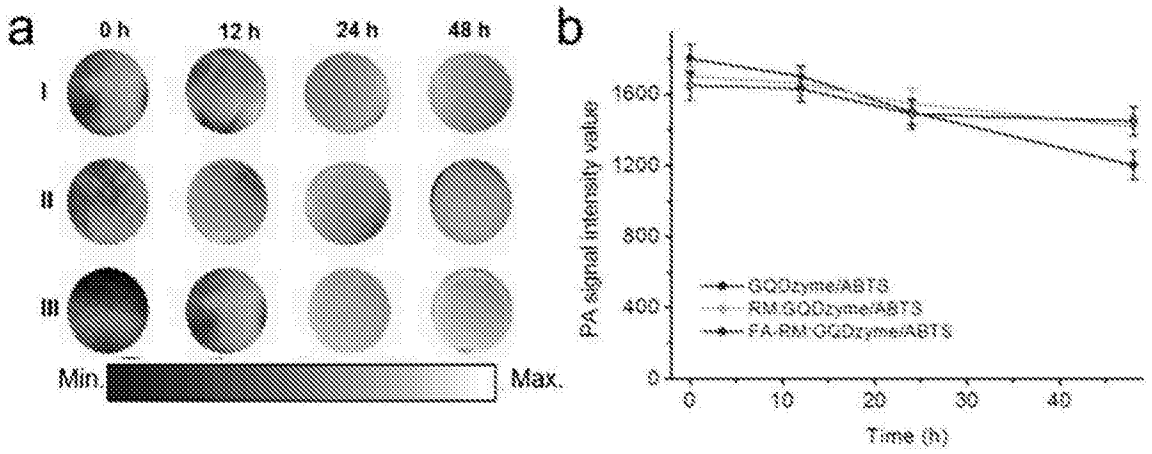


图2



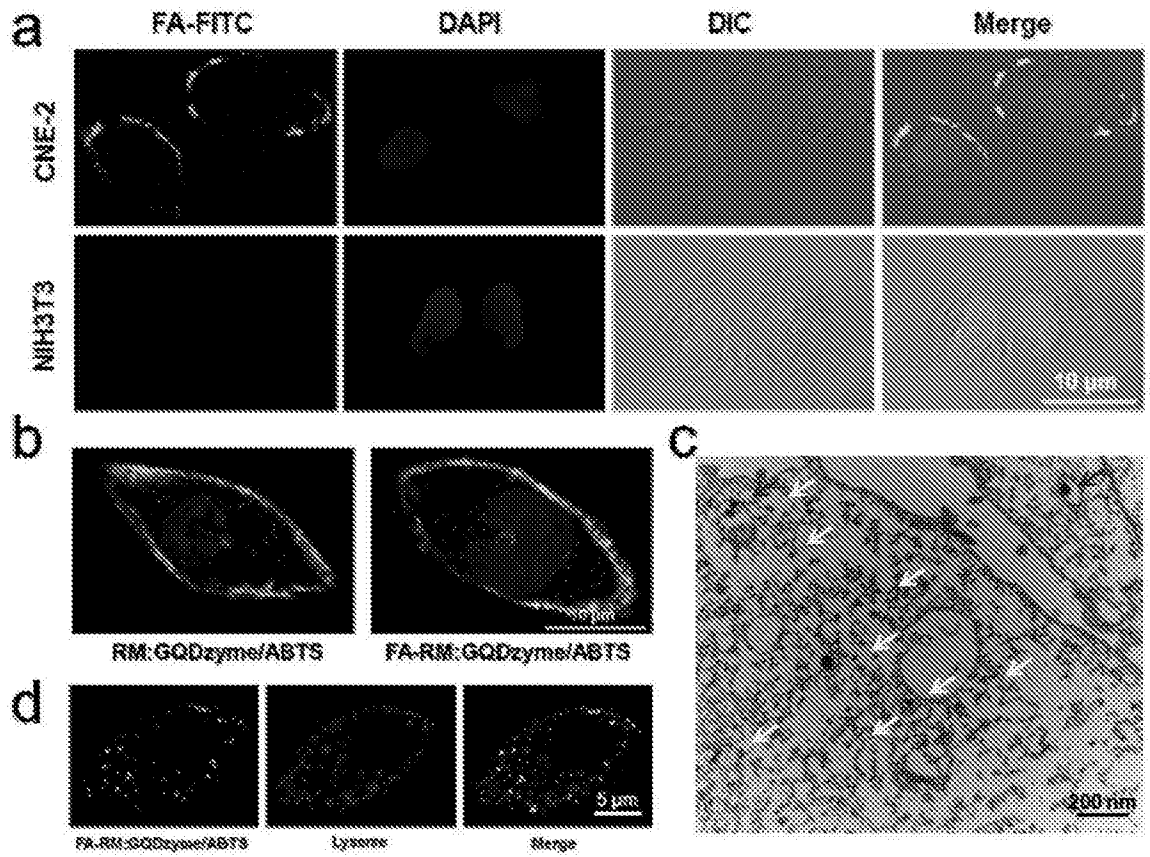


图3

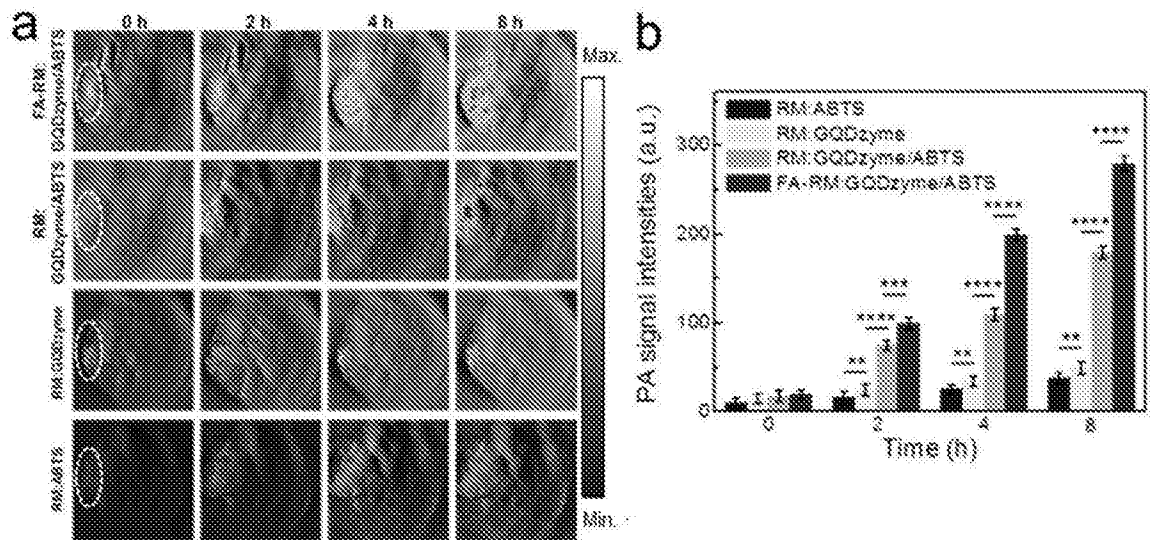


图4

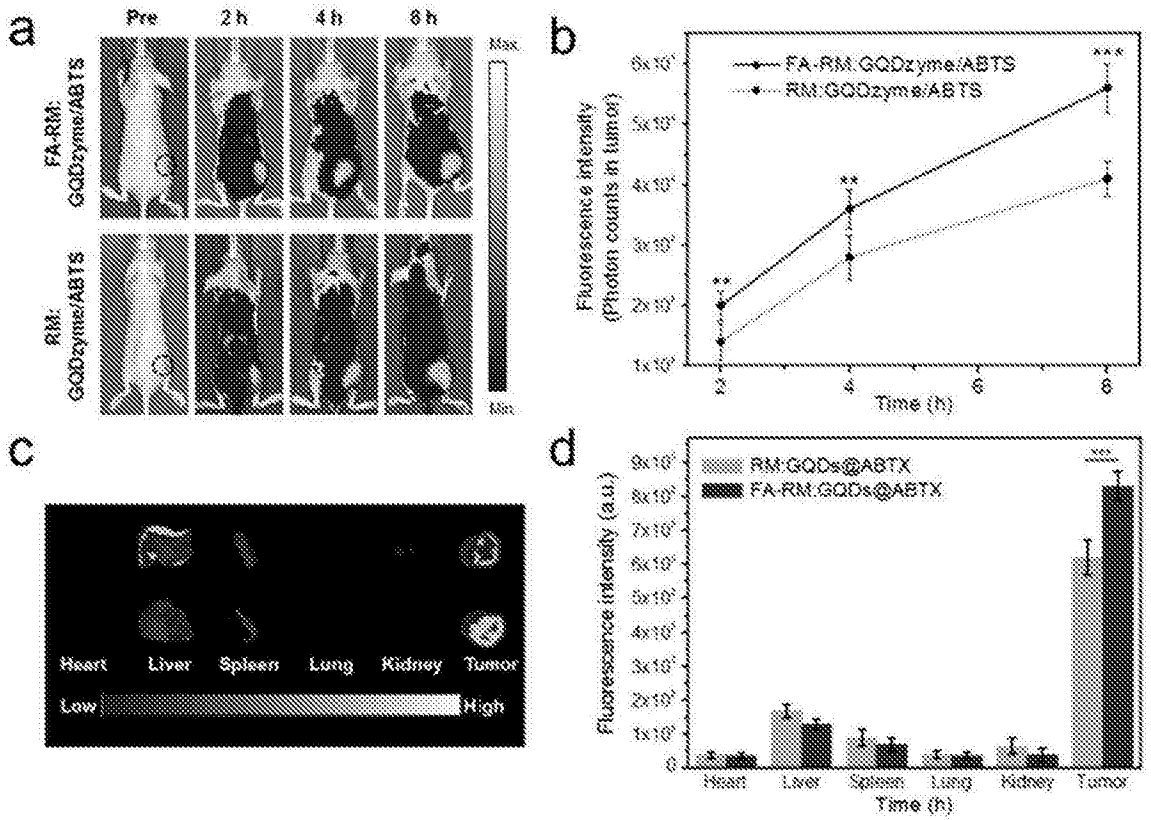


图5