



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110384657 A

(43)申请公布日 2019.10.29

(21)申请号 201910636099.7

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2019.07.15

(71)申请人 三峡大学

地址 443002 湖北省宜昌市西陵区大学路8号

(72)发明人 赵云 刘朝奇 姜矜君

(74)专利代理机构 宜昌市三峡专利事务所
42103

代理人 成钢

(51) Int. Cl.

A61K 9/127(2006.01)

A61K 47/24(2006.01)

A61K 47/34(2017.01)

A61K 31/7105(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

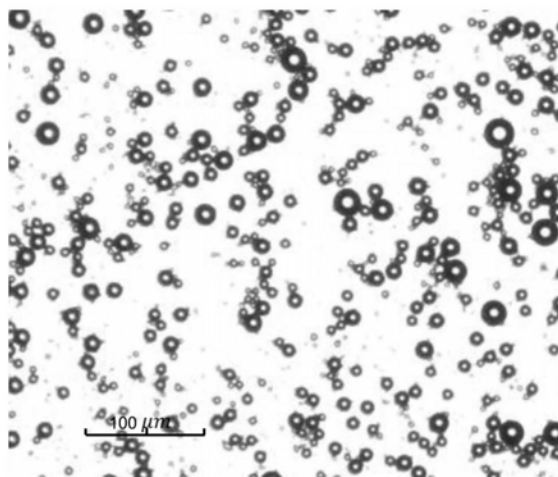
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

靶向PD-L1载miR-34a微泡的制备方法及其在制备抑制宫颈癌的药物上的应用

(57)摘要

本发明涉及一种超声联合靶向PD-L1载miR-34a微泡的制备方法,具体是将生物素化脂质微泡与链酶亲和素孵育,加入生物素化的PD-L1抗体,经孵育后离心得到靶向PD-L1微泡。将所得的靶向PD-L1微泡和miR-34a质粒室温下孵育,再用PBS冲洗,离心,除去未结合在微泡表面的miR-34a质粒,得到靶向PD-L1载miR-34a微泡。本发明将靶向PD-L1载miR-34a微泡应用于制备抑制宫颈癌移植瘤的药物上,结果表明靶向PD-L1载miR-34a微泡具有更高的抑瘤效果,靶向PD-L1载miR-34a微泡的体积抑制率和体重抑制率分别为54.32%和60.14%。



1. 靶向PD-L1载miR-34a微泡的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-生物素、硬脂酸-聚乙酰胺混于玻璃试管中,50-60°C水浴锅预热后,涡旋状态下充入氮气使混合液成膜于试管壁;

(2) 将步骤(1)中成膜后的玻璃管抽真空后,加入Tris缓冲液,水浴超声后置于西林瓶中密封,冲入C₃F₈气体,冷藏保存;

(3) 将步骤(2)中冷藏后的西林瓶经振荡后得到白色乳状液体;将该白色乳状液体移经离心后弃去下层液体即为生物素化脂质微泡;

(4) 向步骤(3)中生物素化脂质微泡中滴加链酶亲和素,在2-4 °C、避光下恒温振荡孵育,得到微泡混悬液;

(5) 将步骤(4)中的微泡混悬液离心后,弃去下清液后,采用PBS缓冲液漂洗、离心、弃下清,得到微泡;

(6) 将生物素化的PD-L1抗体加入步骤(5)的微泡中,在2-4 °C、避光的恒温振荡孵育过夜后离心,弃下清液,加入PBS缓冲液漂洗、离心、弃下清,即可得到靶向PD-L1微泡;

(7) 将步骤(6)所得的靶向PD-L1微泡和miR-34a质粒室温下孵育,再用 PBS冲洗,离心,除去未结合在微泡表面的miR-34a质粒,得到靶向PD-L1载miR-34a微泡。

2. 根据权利要求1所述的靶向PD-L1载miR-34a微泡的制备方法,其特征在于,二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-生物素、硬脂酸-聚乙酰胺摩尔比75-90:3-6:3-6:2-6。

3. 根据权利要求2所述的靶向PD-L1载miR-34a微泡的制备方法,其特征在于,二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-生物素、硬脂酸-聚乙酰胺摩尔比85:5:5:5。

4. 根据权利要求1所述的靶向PD-L1载miR-34a微泡的制备方法,其特征在于,链酶亲和素的加入量相对于生物素化脂质微泡的加入量过量;生物素化的PD-L1抗体的加入量相对于微泡的加入量过量,miR-34a质粒的加入量相对于靶向PD-L1微泡的加入量过量。

5. 根据权利要求1-4任一项所制备得到的靶向PD-L1载miR-34a微泡在制备抑制宫颈癌的药物上的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述的靶向PD-L1载miR-34a微泡在制备抑制U14宫颈癌细胞的药物上的应用。

7. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述的靶向PD-L1载miR-34a微泡的浓度为 1×10^7 - 1.5×10^9 个/ml。

靶向PD-L1载miR-34a微泡的制备方法及其在制备抑制宫颈癌的药物上的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种脂质微泡,具体为靶向PD-L1载miR-34a微泡,并将其应用于制备治疗宫颈癌。

背景技术

[0002] 宫颈癌是全世界女性最常见的妇科恶性肿瘤之一,发病率仅次于乳腺癌高居妇科恶性肿瘤第二位,发病率高且逐渐趋于年轻化,严重危害女性健康。宫颈癌主要是由于人乳头瘤病毒(HPV)感染造成,目前认为高危型HPV持续感染、机体的免疫功能下降及宫颈癌局部微环境之间的相互作用,促进宫颈癌的发生发展。当前治疗方法包括手术切除、放疗、化疗。手术是治疗宫颈癌的主要方法之一,虽然手术能暂时切除病灶,但肿瘤细胞具有很强的侵袭性和转移性,病灶并不能完全切除。辅助化疗在临床上被广泛用于术前和术后治疗,能够有效地降低肿瘤分期、减少宫旁浸润,为手术提供了良好的条件,但化疗的靶向性差,易产生耐药,全身毒副作用明显。宫颈癌是放射敏感性肿瘤,放疗对于中晚期患者和复发患者的效果是得到肯定的,但其严重的并发症给治疗带来极大的困难。因此探索宫颈癌的发病机制,寻找宫颈癌治疗的新靶点,对宫颈癌的早期诊断、治疗及预后评估具有重要的临床意义。

发明内容

[0003] 针对上述技术问题,本发明提供一种靶向PD-L1载miR-34a微泡,并将其应用于制备抑制宫颈癌移植瘤的药物。进一步优选方案中,应用于制备抑制U14宫颈癌细胞的药物。

[0004] 所述的靶向PD-L1载miR-34a微泡是通过薄膜水化法及机械震荡法制备的生物素化脂质微泡,具体步骤包括如下:

[0005] (1) 二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG2000)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-生物素(DSPE-PEG2000-Biotin)、硬脂酸-聚乙酰胺(PEI-600)混于玻璃试管中,60℃水浴锅预热后,涡旋状态下充入氮气使混合液成膜于试管壁;

[0006] 所述的二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-生物素、硬脂酸-聚乙酰胺摩尔比75-90:3-6:3-6:2-6。优选方案中,所述的二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-生物素、硬脂酸-聚乙酰胺摩尔比85:5:5:5。

[0007] 二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-生物素、硬脂酸-聚乙酰胺均为美国Avanti公司购买。

[0008] (2) 将步骤(1)中成膜后的玻璃管抽真空(抽真空3h以上,使液体充分挥发)后,加入Tris缓冲液,水浴超声(使玻璃管壁上的薄膜充分溶解于Tris缓冲液中,液体澄清后停止水浴超声)后置于西林瓶中密封,冲入C₃F₈气体,冷藏保存;

[0009] (3) 将步骤(2)中冷藏后的西林瓶经振荡后得到白色乳状液体(一般震荡25-30s);将该白色乳状液体移经离心(在1000rpm的离心速度下离心3min)后弃去下层液体即为生物素化脂质微泡(下层液体为游离的脂质和杂质);

[0010] (4) 向步骤(3)中生物素化脂质微泡滴加链酶亲和素(美国Avanti公司购买),在2-4℃、避光下恒温振荡孵育,得到微泡混悬液;

[0011] (5) 将步骤(4)中的微泡混悬液离心(在1000rpm的离心速度下离心3min)后,弃去下清液(以除去游离的链酶亲和素)后,采用PBS缓冲液漂洗、离心、弃下清(优选方案为重复PBS缓冲液漂洗、离心、弃下清的步骤3次),得到微泡;

[0012] (6) 将生物素化的PD-L1抗体(美国eBioscience公司购买)加入步骤(5)的微泡中,在2-4℃、避光的恒温振荡孵育过夜后离心(在1000rpm的离心速度下离心3min),弃下清液(以除去游离的生物素化PD-L1抗体),加入PBS缓冲液漂洗、离心、弃下清(优选方案为重复PBS缓冲液漂洗、离心、弃下清的步骤3次),即可得到靶向PD-L1微泡。

[0013] (7) 将所得的靶向PD-L1微泡和miR-34a质粒室温下孵育,再用PBS冲洗,离心(在1000rpm的离心速度下离心3min),除去未结合在微泡表面的miR-34a质粒,得到靶向PD-L1载miR-34a脂质微泡,即为靶向PD-L1载miR-34a微泡。

[0014] 所得靶向微泡通过血球计数板计数,粒度仪测量粒径,显微镜下观察微泡形态;通过激光扫描共聚焦荧光显微镜观察。

[0015] 所述的链酶亲和素的加入量相对于生物素化脂质微泡的加入量过量;生物素化的PD-L1抗体的加入量相对于微泡的加入量过量;miR-34a质粒的加入量相对于靶向PD-L1微泡的加入量过量。

[0016] 本发明将所制备得到的靶向PD-L1载miR-34a微泡在制备抑制宫颈癌移植瘤的药物上的应用。

[0017] 所述的靶向PD-L1载miR-34a微泡在制备抑制U14宫颈癌细胞的药物上的应用。

[0018] 所述的靶向PD-L1载miR-34a微泡的浓度为 1×10^7 - 1.5×10^9 个/ml。

[0019] 将所得靶向PD-L1载miR-34a微泡与PD-L1高表达的HeLa宫颈癌细胞共同孵育,经PBS反复洗涤后,光学显微镜下观察靶向PD-L1微泡在细胞水平上的靶向聚集性。将制备的靶向微泡和空微泡(未载入PD-L1抗体和miR-34a)尾静脉注射到荷瘤小鼠体内,通过超声诊断仪观察微泡在小鼠移植瘤内的超声成像效果。

[0020] 实施本申请的技术方案所采用的小鼠和细胞系的情况如下:

[0021] SPF级BALB/c小鼠,雌性,18g左右,由三峡大学动物实验中心提供,饲养于三峡大学动物实验中心无特定病原体屏障环境中,严格SPF级实验动物操作规程。U14宫颈癌细胞瘤株,由三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室提供。

[0022] 小鼠宫颈癌移植瘤的建立及分组处理

[0023] 从荷U14宫颈癌细胞的小鼠腹腔内抽取腹水,调整细胞浓度约 2×10^7 /ml于小鼠右前腋皮下接种0.2ml,一周后形成约0.5cm皮下肿瘤结节。将成功建立的小鼠U14宫颈癌皮下移植瘤模型,随机分为5组,每组10只:对照组、空微泡组、靶向微泡组。根据分组给予不同种类微泡制剂的注射,每两天经尾静脉注射(0.2ml/只)及超声辐照瘤体一次,辐照条件:频率1MHZ,功率 $1W/cm^2$,占空比50%,辐照时间90s/只,其中对照组给予相同剂量的生理盐水处理,并于治疗前测量瘤体长径(a)短径(b),按公式 $V = 1/2ab^2$ 计算肿瘤体积,绘制肿瘤生长

曲线。治疗5次后处死部分小鼠,剥离瘤体,计算肿瘤体积及质量抑瘤率。剩余小鼠继续治疗,隔天每组取一只小鼠处死,取脾脏,分离脾细胞。

[0024] 乳酸脱氢酶释放法检测NK细胞免疫杀伤活性

[0025] 本发明的试验数据采用SPSS18.0软件进行统计学分析,结果用($x \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差别具有统计学意义。

附图说明

[0026] 图1为靶向PD-L1载miR-34a微泡光学显微镜图片。

[0027] 图2为琼脂糖凝胶电泳图反映微泡载DNA的数量。

[0028] 图3为靶向PD-L1载miR-34a微泡粒径图。

[0029] 图4靶向PD-L1微泡激光共聚焦图像,其中A为PE标记(链霉亲和素)发射的红色荧光图像,B为FITC标记(抗鼠IgG)的图像,反映微泡上有PD-L1抗体,C为A和B图叠加。

[0030] 图5细胞免疫荧光检测到高表达PD-L1的宫颈癌细胞,其中,A为PD-L1阳性;B为DAPI染色;C为A和B的叠加图。

[0031] 图6为靶向PD-L1载miR-34a微泡与空微泡对宫颈癌细胞的寻靶作用,A为靶向PD-L1载miR-34a微泡,B为空微泡。

[0032] 图7为不同组处理对肿瘤生长的抑制作用。

[0033] 图8为不同组处理诱导肿瘤细胞凋亡,其中,A.Control组;B.MB+US组;C.PD-L1+US组;D.miR-34a+US组;E.PD-L1+miR-34a+US组。

具体实施方式

[0034] 实施例1

[0035] 靶向PD-L1载miR-34a微泡的制备及其特征

[0036] 1) 将二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG2000)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000-生物素(DSPE-PEG2000-Biotin)、硬脂酸-聚乙酰胺(PEI-600)按摩尔比85:5:5:5混于玻璃试管中,轻轻摇晃,充分混匀,60℃水浴锅预热后,将玻璃试管放在涡旋振荡器上,用N₂吹玻璃试管中的液体,边吹边涡旋,在玻璃管壁底部形成一层均质的薄膜。

[0037] 2) 将成膜后的玻璃管连接真空抽气机,抽真空3h,使液体充分挥发。

[0038] 3) 取出玻璃试管后,向其中加入5ml Tris缓冲液,放入超声清洗机中水浴5min,使玻璃管壁上的薄膜充分溶解于Tris缓冲液中,液体澄清后停止水浴超声。使用移液枪将其分装到5个西林瓶中并加盖密封。

[0039] 4) 分别向每个西林瓶中冲入C₃F₈气体,放入4℃冰箱保存。

[0040] 5) 将西林瓶固定在高速振荡仪上,调节振荡时间为30s,振荡后液体呈白色乳状液体;将液体移至离心管中,使用台式低速离心机1000rpm离心3min,离心后弃去下层液体即为普通生物素化脂质微泡,下层液体为游离的脂质和杂质。

[0041] 6) 取生物素化脂质微泡1ml于试管中,向其中缓慢滴加过量的PE标记链霉亲和素,在4℃、避光的恒温振荡器里孵育30min。

[0042] 7) 使用台式低速离心机将上述微泡混悬液以1000rpm离心3min,弃下清液以除去

游离的链酶亲和素;加入PBS缓冲液漂洗、离心、弃下清,如此重复3次。

[0043] 8) 将生物素化的PD-L1抗体加入上述微泡中,在4℃、避光的恒温振荡器里孵育过夜;使用台式低速离心机将孵育后的微泡混悬液以1000rpm离心3min,弃下清液以除去游离的生物素化PD-L1抗体;加入PBS缓冲液漂洗、离心、弃下清,如此重复3次,制备出靶向PD-L1微泡。

[0044] 9) 将所得的靶向PD-L1微泡和miR-34a质粒室温下孵育,再用PBS冲洗,离心(在1000rpm的离心速度下离心3min),除去未结合在微泡表面的miR-34a质粒,得到靶向PD-L1载miR-34a脂质微泡,即为靶向PD-L1载miR-34a微泡。

[0045] 靶向PD-L1联合miR-34a微泡的形态特征

[0046] 本发明通过薄膜水化法和生物素-亲和素法制备出靶向PD-L1微泡,再通过静电吸附法制备出靶向PD-L1载miR-34a微泡,肉眼观察微泡呈白色乳状液体,在光学显微镜下观察(图1)微泡呈圆形,性状规则、粒径分布较均一,无凝聚成团的现象,分散性较好,符合实验要求。

[0047] 靶向PD-L1载miR-34a微泡的一般性状

[0048] 琼脂糖凝胶电泳结果显示,1 μ g质粒大约结合25 μ l微泡(图2)。使用血球计数板测得微泡浓度约为4.6 $\times 10^7$ 个/ml;马尔文粒径仪测得微泡的平均粒径约为938.9 \pm 80nm(图3)。

[0049] 激光共聚焦显微镜下观察靶向PD-L1微泡

[0050] 在激光共聚焦显微镜观察下靶向微泡表面抗体的连接情况,在激光共聚焦显微镜下的同一视野,不同通道观察微泡表面的荧光染色情况,结果显示,PE标记的链酶亲和素与生物素化微泡结合后,可见到微泡周围发红色荧光,FITC标记的山羊抗小鼠荧光二抗与PD-L1抗体后在可见下微泡周围发绿色荧光,二者Merge后红色荧光与绿色荧光完全重合发黄色荧光,表明通过生物素-亲和素的方法成功的制备出靶向PD-L1载miR-34a微泡;而非靶向微泡组的荧光无特异性,非靶向微泡制备的原材料中不含有生物素,无法与链酶亲和素连接,因此制备的微泡不具有靶向性,在激光共聚焦显微镜下观察微泡周无特异性的激发荧光(图4)。

[0051] 将所得的靶向PD-L1微泡和sPD1质粒(pcDNA3.1(-)-sPD1)室温下孵育,再用PBS冲洗,离心(在1000rpm的离心速度下离心3min),除去未结合在微泡表面的sPD1质粒,得到靶向PD-L1载sPD1脂质微泡,即为靶向PD-L1载sPD1微泡。

[0052] 检测宫颈癌细胞表面PD-L1的表达情况

[0053] 通过细胞免疫荧光实验检测宫颈癌细胞表面是否表达PD-L1,如图5所示,红色荧光为PE标记的PD-L1抗体,蓝色荧光为DAPI染细胞核,结果显示宫颈癌细胞周围发红色荧光,表明宫颈癌细胞表面高表达PD-L1。

[0054] 靶向PD-L1微泡与宫颈癌细胞的结合情况

[0055] 在光学显微镜下观察靶向微泡和非靶向微泡对宫颈癌细胞的粘附效果,结果显示(图6)大量靶向PD-L1微泡呈环形围绕在宫颈癌细胞周围,而非靶向微泡在宫颈癌细胞周围没有粘附,证实靶向微泡具有良好的靶向性和寻靶能力。

[0056] 细胞基因转染实验

[0057] 实施例2

[0058] 靶向PD-L1载miR-34a微泡作为制备抑制宫颈癌的药物上的应用

[0059] 不同治疗组对小鼠皮下移植瘤抑制作用的比较

[0060] U14细胞皮下接种于雌性Bab1/c小鼠直至成瘤,小鼠生命体征良好,毛发顺滑,饮食活动正常,生命体征基本稳定。小鼠接种肿瘤细胞一周后在皮下均可触及小结节,质地较硬,表明动物模型建模成功。将建模成功的小鼠随机分组,每组6只。对照组和空微泡(MB)+超声辐射(US)组小鼠,活动度较好,其余三个治疗组[靶向PD-L1、载sPD1基因、靶向PD-L1载sPD1微泡+超声辐射(US)]在每次治疗后,活动度稍减低。在治疗过程中,可见对照组和MB+US组小鼠肿瘤体积明显增大,前肢活动度稍减低,个别小鼠出现跛行,精神状况尚可,其余三组特别是PD-L1+miR-34a+US组肿瘤增大不明显,体型相对消瘦。

[0061] 治疗期间,小鼠体重逐渐增加,对照组和MB+US组小鼠肿瘤体积明显增大,治疗结束后剥离肿瘤组织后计算抑瘤率。结果显示,PD-L1+US、miR-34a+US、PD-L1+miR-34a+US三组的体积抑瘤率分别为35.38%、40.50%、54.32%,质量抑瘤率分别35.80%、42.43%、60.14%,与对照组相比较,三组治疗组均能抑制肿瘤体积($P<0.05$)和质量($P<0.05$)的增加,均对肿瘤细胞具有抑制作用,差异具有统计学意义;其中PD-L1+miR-34a+US组的抑制作用更为明显($P<0.01$),差异具有显著统计学意义;MB+US组与对照组相比较,体积抑瘤率和质量抑瘤率无明显差异。PD-L1+miR-34a+US组与其他各组相比较,体积抑瘤率($P<0.05$)和质量抑瘤率($P<0.05$)增加,差异具有统计学意义。各组肿瘤组织的体积抑瘤率和质量抑瘤率见表1和图7(注:对照组和MB+US组肿瘤组织体积增长迅速,呈指数增长,与对照组比较,其余三治疗组体积增长较慢($P<0.05$),以PD-L1+miR-34a+US组更为显著($P<0.01$)。)

[0062] 表1各组肿瘤体积抑瘤率和质量抑瘤率的比较

[0063]

组别	肿瘤体积 (mm ³)	体积抑瘤率 (%)	肿瘤质量 (g)	质量抑瘤率 (%)
对照组	1933.83±694.16	-	2.71±1.55	-
空微泡 (MB) +超声 辐射 (US) 组	1829.31±436.29	5.38	2.63±0.68	2.95
靶向 PD-L1 组	1249.24±448.84	35.38*	1.74±0.91	35.80*
载 sPD1 基因组	1150.11±406.12	40.50*	1.56±0.57	42.43*
靶向 PD-L1 载 sPD1 微 泡+超声辐射 (US) 组	883.11±447.73	54.32** [#]	1.08±0.28	60.14** [#]

[0064] (注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与其它各组比较[#] $P<0.05$)

[0065] TUNEL染色

[0066] TUNEL染色检测各组凋亡细胞的表达(图8),与对照组相比,PD-L1+US组和miR-34a+US组中,凋亡细胞数目表达增多($P<0.05$),差异有统计学意义,以PD-L1+miR-34a+US组凋亡细胞数目增多的更为明显($P<0.01$),差异有显著统计学意义。表明PD-L1抗体和miR-34a均对肿瘤细胞具有一定的抑制作用,而PD-L1联合miR-34a能够协同促进肿瘤细胞发生凋亡。

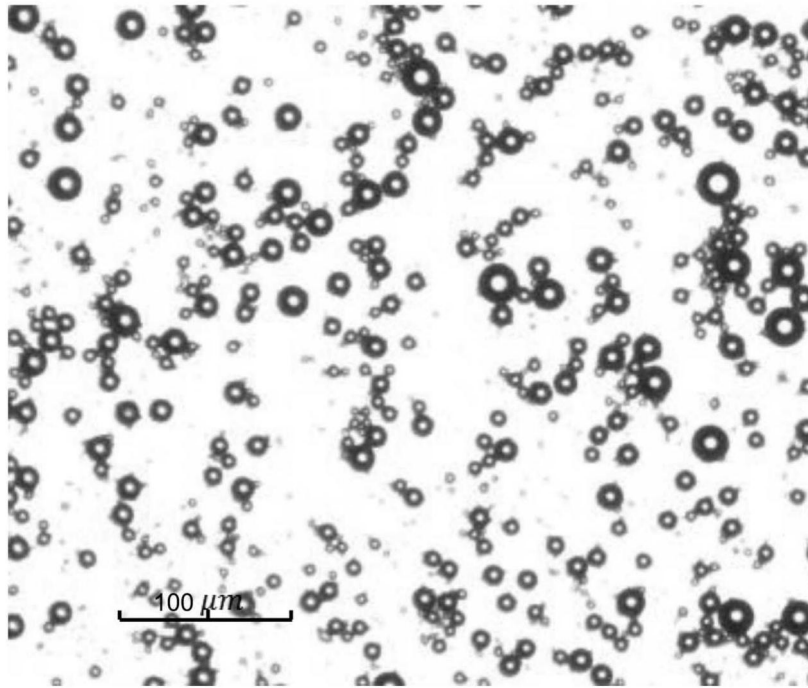


图1

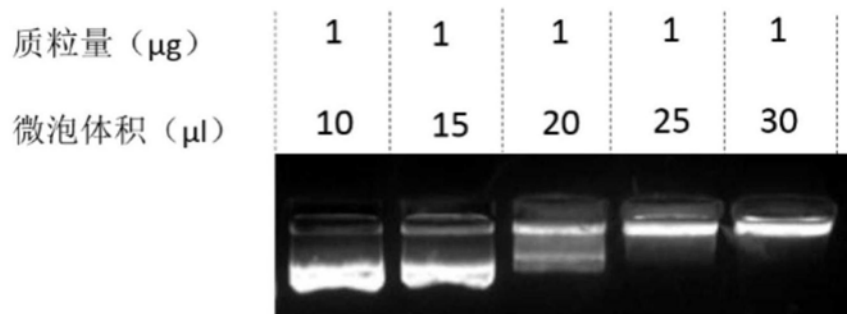


图2

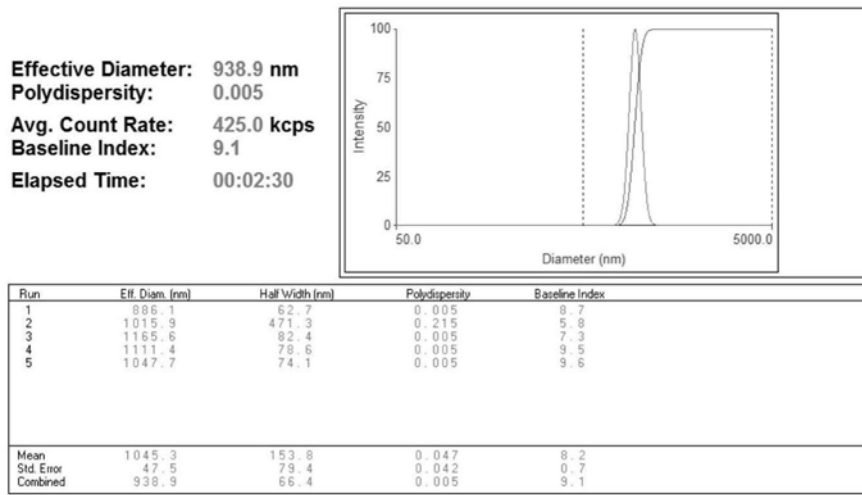


图3

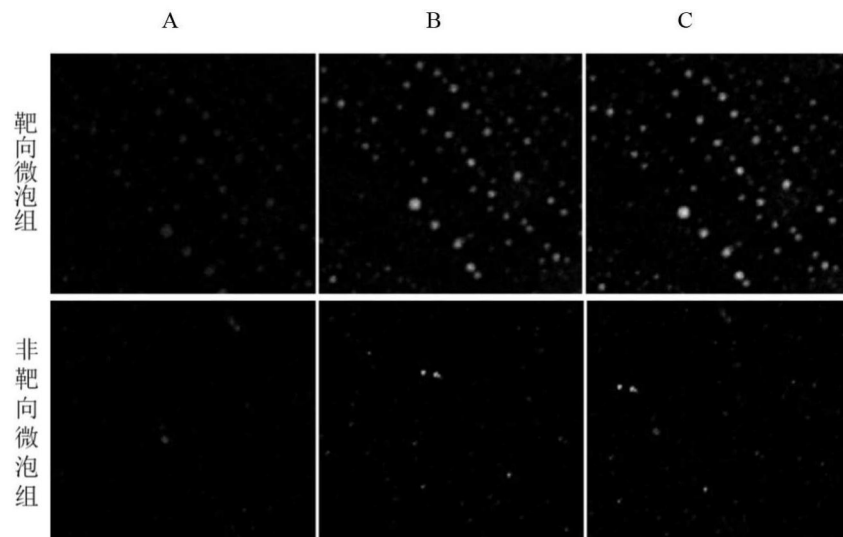


图4

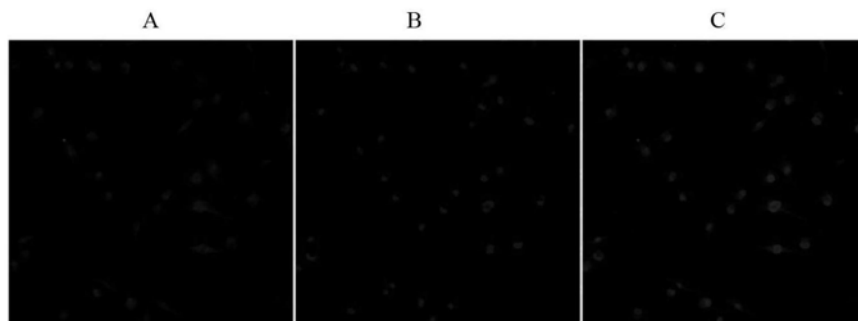


图5

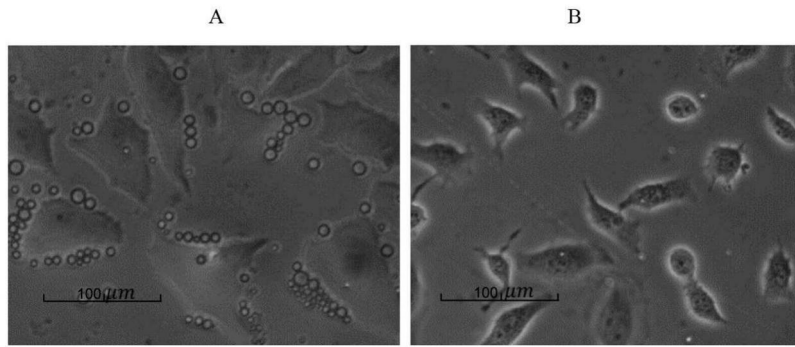


图6

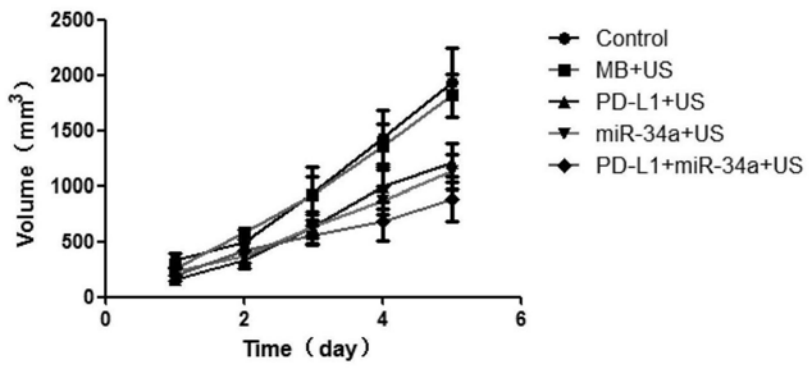


图7

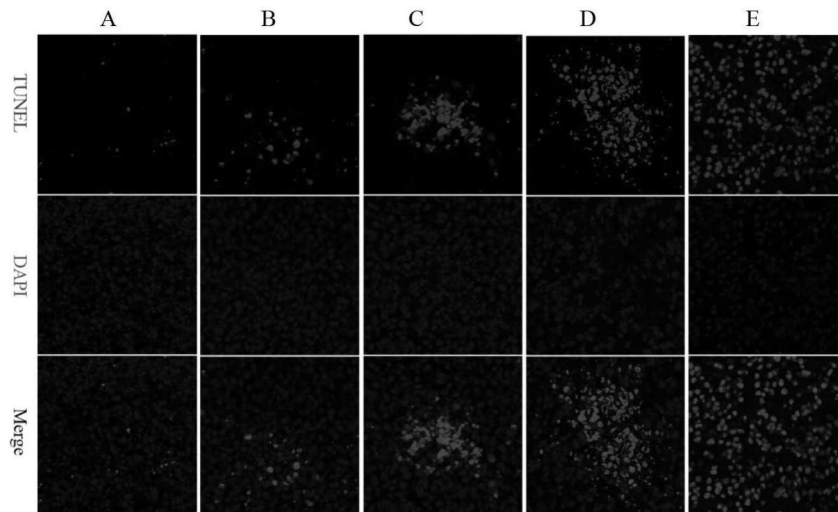


图8