



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105769818 B

(45)授权公告日 2019.03.01

(21)申请号 201610148434.5

(22)申请日 2016.03.16

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105769818 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(73)专利权人 华东师范大学  
地址 200241 上海市闵行区东川路500号

(72)发明人 王依婷 丁晓铃 汉琳 孙磊  
闫志强 朱建中 王镜 俞磊

(74)专利代理机构 上海蓝迪专利商标事务所  
(普通合伙) 31215

代理人 徐筱梅 张翔

(51)Int.Cl.

A61K 9/51(2006.01)

A61K 47/46(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 103550223 A,2014.02.05,

CN 103857387 A,2014.06.11,

许冉达 等.红细胞膜在肿瘤研究中的作用  
与地位.《黑龙江医药》.2015,第28卷(第6期),

Hu C.M.J.,et al..'Marker-of Oself'  
functionalization of nanoscale particles  
through a top-down cellular membrane  
coating approach.《Nanoscale》.2013,第5卷第  
2664-2668页.

Hu C.M.J.,et al..Erythrocyte  
membrane-camouflaged polymeric  
nanoparticles as a biomimetic delivery  
platform.《Proc Natl Acad Sci USA》.2011,第  
108卷(第27期),第10980-10985页.

孙雅楠 等.基于红细胞的载药系统研究进  
展.《中国药科大学学报》.2015,第46卷(第4期),

审查员 魏秀丽

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

用于抗体药物递送的红细胞膜包裹的抗体  
纳米粒子及制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于抗体药物递送的天  
然红细胞膜包裹抗体纳米粒子及制备方法。本发  
明中的红细胞膜提取自实验鼠,在经过处理后去  
除了大部分内容物和无关蛋白,并用得到的红细  
胞膜包裹抗体形成的蛋白纳米粒子。这种方法适  
用于红细胞膜包裹各种抗体形成的纳米粒子,可  
以提高游离型抗体的稳定性、体内循环时间,并  
降低机体免疫清除率。

1. 一种用于抗体药物递送的纳米粒子,其特征在于,其蛋白核心为等电点沉淀制成的抗体纳米粒子,外包装红细胞膜;其中,所述抗体为抗-hTERT单克隆抗体。

2. 一种权利要求1所述用于抗体药物递送的纳米粒子的制备方法,其特征在于,该方法包括以下具体步骤:

1) 制备红细胞膜

完全麻醉SD大鼠后心脏取血,将血转移至含肝素钠的 EP 管中;全血离心,弃去上层清液,留下暗红色沉淀,PBS 洗涤,离心机离心,再洗涤数次;弃去上层清液,留下沉淀,取PBS吹散,取0.2mM EDTA放入离心管混匀,充分溶血后,加入20\*PBS,离心,再溶血离心数次;弃去上层清液,沉淀即为红细胞膜;

2) 等电点沉淀制备抗体纳米粒子

将抗体装入透析袋,在超纯水中透析,收集透析袋中的抗体,冻干,-20℃保存;取冻干抗体,溶于含Tween80的HCl溶液中,在磁子搅拌下逐滴加入NaOH溶液,直至出现的烟雾样沉淀至最大量;离心,小心移除上清,得到抗体纳米粒子;其中,所述Tween80浓度为0.2%,HCl浓度范围为0.005M-0.5M,NaOH浓度范围为0.005M-0.5M;

3) 制备红细胞膜包裹的抗体纳米粒子

将红细胞膜与抗体纳米粒子混合,加入1\*PBS重悬,超声下加入20\*PBS使PBS终浓度至1\*PBS,即得红细胞膜包裹的抗体纳米粒子。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述红细胞膜包裹的抗体纳米粒子粒径范围为50nm-500nm。

## 用于抗体药物递送的红细胞膜包裹的抗体纳米粒子及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及抗体药物和纳米医药技术领域,具体地说是一种用于抗体药物递送的红细胞膜包裹的抗体纳米粒子及制备方法。

### 背景技术

[0002] 与传统小分子抗癌药相比,由于具有高特异性和强亲和力,抗体正日益成为最重要的抗癌药物之一。与其相比,尽管小分子抗癌药有一定的药效,并目前在化疗中仍然使用广泛,但其仍存在非特异性毒性(因针对所有分化细胞)和治疗窗小等缺点。另外,小分子抗癌药的耐药性也是其临床使用中常出现的问题,这些缺点给化疗病人带来了许多痛苦。而抗体因其对非特异性细胞毒性低、人体免疫原性低、生物可降解和生物相容性好等优点,已经越来越受到重视。

[0003] 随着对不同类型癌细胞异常信号通路的研究进一步发展,肿瘤标志物中许多关键的调节因子也逐渐成为了分子靶向治疗的靶点。但由于抗体难以穿透细胞膜进入细胞内部,导致目前发现的许多细胞内的有效靶点如TERT、磷酸酶 / 激酶转录因子等不能用抗体阻断,很大程度上阻碍了针对细胞内部抗原的抗体的成药性。游离抗体的体积过大影响了其穿透肿瘤的能力,高间隙压阻止了大分子在肿瘤中的扩散,这些因素进一步影响了肿瘤细胞对抗体药物的摄取,成为阻碍治疗进展的关键问题之一。抗体作用的靶点分为细胞内和细胞外,人们通常将注意放到细胞外靶点上以获得更高的抗体-抗原接触机会,而对细胞内靶点的药物研究少之又少。实际上,胞内靶点是一个巨大的资源,因为他们既有更高的特异性,在与抗体接触后又有很高的杀伤率。但目前极少人尝试以细胞内抗原为靶点探讨抗体纳米粒子的摄取和作用。

[0004] 另一方面,抗体是一种不稳定的蛋白,其暴露在外部的结构很容易受外界环境影响而失活,因此许多抗体在静脉注射后体内滞留时间短,这也阻碍了抗体药物的发展和运用。为了增加抗体半衰期,人们做了很多努力。如PEG化已经成为增加循环时间的金标准,但同时也存在一些问题,如产物纯度不够、对修饰分子的选择性高、可能增加药物毒性、大分子PEG排出体外困难等等。对于如何增加抗体循环时间仍需要有更深入的研究。

[0005] 再则,一定粒径的外源性粒子在体内易被网状内皮系统识别并清除,这在一定程度上大大减少了大分子药物在体内的作用时间。粒子的粒径、表面电荷等对于这一问题都有着很大的影响。而红细胞膜身为体内内源性物质,由于其表面携带一些特定蛋白如CD47,可以帮助其逃脱网状内皮系统的吞噬。我们可以利用红细胞膜这一特点,给大分子药物穿上“外衣”,以降低巨噬细胞吞噬,延长体内作用时间。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种纳米粒子的制备方法,利用该方法可制备出抗体纳米粒子,再用处理好的红细胞膜包裹,以期得到一种红细胞膜包裹的抗体纳米粒子。

[0007] 本发明的另一目的是提供一种纳米粒子在药物递送中的应用,即针对抗肿瘤药物的临床应用限制,利用上述红细胞膜包裹的抗体纳米粒子,可提高抗体的疗效和生物利用度,同时此纳米粒子具有高癌细胞摄取率、低网状内皮系统清除率,及明显延长体内作用时间的特点。

[0008] 实现本发明目的的具体技术方案是:

[0009] 一种用于抗体药物递送的纳米粒子,特点在于其蛋白核心为等电点沉淀制成的抗体纳米粒子,外包装红细胞膜。

[0010] 一种上述用于抗体药物递送的纳米粒子的制备方法,该方法包括以下具体步骤:

[0011] 1) 制备红细胞膜

[0012] 完全麻醉SD大鼠后心脏取血,将血转移至含肝素钠的 EP 管中;全血离心,弃去上层清液,留下暗红色沉淀,PBS 洗涤,离心机离心,再洗涤数次;弃去上层清液,留下沉淀,取PBS吹散,取0.2mM EDTA放入离心管混匀,充分溶血后,加入20\*PBS,离心,再溶血离心数次;弃去上层清液,沉淀即为红细胞膜;

[0013] 2) 等电点沉淀制备抗体纳米粒子

[0014] 将抗体装入透析袋,在超纯水中透析,收集透析袋中的抗体,冻干,-20℃保存;取冻干抗体,溶于含Tween80的HCl溶液中,在磁子搅拌下逐滴加入NaOH溶液,直至出现的烟雾样沉淀至最大量;离心,小心移除上清,得到抗体纳米粒子;其中,所述Tween80浓度范围为0.01%-5%,HCl浓度范围为0.005M-0.5M,NaOH浓度范围为0.005M-0.5M;

[0015] 3) 制备红细胞膜包裹的抗体纳米粒子

[0016] 将红细胞膜与抗体纳米粒子混合,加入1\*PBS重悬,超声下加入20\*PBS使PBS终浓度至1\*PBS,既得红细胞膜包裹的抗体纳米粒子。

[0017] 所述红细胞膜包裹的抗体纳米粒子粒径范围为50nm-500nm。

[0018] 本发明的抗体纳米粒子具有符合增强渗透滞留效应(即EPR效应)的粒径范围,高稳定性,高癌细胞摄取率、低网状内皮系统清除率,及明显延长体内循环作用时间的特点,提高了抗体疗效和生物利用度。

## 附图说明

[0019] 图1为本发明红细胞膜包裹的纳米粒子制备流程图;图中,1为红细胞;2为游离抗体;3为抗体纳米粒子;4为红细胞膜包裹的抗体纳米粒子;

[0020] 图2为本发明红细胞膜包裹的抗体纳米粒子的粒径分布图;

[0021] 图3为本发明红细胞膜包裹的抗体纳米粒子的TEM图;

[0022] 图4为本发明红细胞膜包裹的抗体纳米粒子的HeLa细胞摄取情况对比图(流式细胞仪观察结果);

[0023] 图5为本发明红细胞膜包裹的抗体纳米粒子的巨噬细胞Raw 264.7摄取情况对比示意图;

[0024] 图6为本发明红细胞膜包裹的抗体纳米粒子的SD大鼠体内长循环实验结果示意图。

## 具体实施方式

[0025] 为了更好的理解本发明,下面用实施例来进一步阐明本发明,但本发明的内容不仅仅局限于下面实例。

### [0026] 实施例1

#### [0027] 抗-hTERT单克隆抗体纳米粒子的制备

[0028] 将抗-hTERT单克隆抗体原材料装入10kD透析袋,在超纯水中透析,并在2h,4h后换水,并透析过夜。收集透析袋中的抗体,冻干,-20℃保存。取3mg冻干抗体,溶于0.5mL的含0.2% Tween80的0.01N HCl中,在磁子搅拌下逐滴加入0.01N NaOH,直至出现的烟雾样沉淀至最大量。6500 rpm离心5分钟,小心移除上清,得到抗-hTERT单克隆抗体纳米粒子。

### [0029] 实施例2

#### [0030] 红细胞膜包裹的抗-hTERT单克隆抗体纳米粒子的制备

[0031] 用2%戊巴比妥钠溶液完全麻醉SD大鼠后,剖开剑突及以上部位,暴露心脏后,从左心室进针,取用0.5%肝素钠荡洗过的注射器取血1mL,取血后转移至2mL含肝素钠的EP管中。将全血放入4℃离心机中900g离心20min,弃去上层清液,留下暗红色沉淀,取沉淀3倍体积的1\*PBS放入,并均匀吹散,放入4℃离心机离心2500g,15min,此为第一次洗涤。放入离心机离心2500g,15min,此为第二次洗涤。再次重复以上步骤,此为第三次洗涤。弃去上层清液,留下沉淀,取沉淀等量的1\*PBS放入离心管中吹散,取950ul的0.2mM EDTA放入离心管混匀,待充分溶血后,加入50ul 20\*PBS,4℃离心机离心21000g,7min,此为第一次溶血洗涤。再次取950ul的0.2mM EDTA放入离心管混匀,待充分溶血后,加入50ul 20\*PBS,4℃离心机离心21000g,7min,此为第二次溶血洗涤。重复以上步骤,此为第三次溶血洗涤。弃去上层清液,留下沉淀于离心管中,加入950ul 0.2mM的EDTA,充分混匀,4℃离心机离心21000g,7min。弃去上层清液,得到红细胞膜。

[0032] 将红细胞膜与上述制备的抗-hTERT单克隆抗体纳米粒子混合,用1mL 1\*PBS重悬,超声下加入20\*PBS使PBS终浓度至1\*PBS,超声处理5min,既得红细胞膜包裹的抗-hTERT单克隆抗体纳米粒子。

### [0033] 实施例3 纳米粒子的粒径分布

[0034] 采用制备好的红细胞膜包裹的抗-hTERT单克隆抗体纳米粒子,DLS检测其粒径分布,结果参阅图2。

### [0035] 实施例4 纳米粒子的形态表征

[0036] 采用制备好的红细胞膜包裹的抗-hTERT单克隆抗体纳米粒子,TEM检测其表面形态,结果参阅图3。

### [0037] 实施例5

[0038] 制备红细胞膜包裹的FITC-抗-hTERT单克隆抗体纳米粒子,使用流式细胞仪观察子宫颈癌HeLa细胞对三种粒子的摄取情况,并进行对比:

[0039] a) 异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗h-TERT单克隆抗体:实验全程在避光条件下进行。取3mg抗h-TERT单克隆抗体冻干固体,加入碳酸盐缓冲液,混匀,电磁搅拌(速度适当以不起泡沫为宜)。按每毫克抗体加0.01mg荧光素,边搅拌边将称取的荧光色素渐渐加入抗体溶液中,加毕后,继续搅拌2h。结合期间应保持蛋白溶液于4℃左右。结合完毕后,将溶液装入10kD透析袋中后再置于大烧杯中,超纯水4度透析,2h、4h后换水,再过夜。

[0040] b) 将FITC标记的单克隆抗体制成纳米粒子并用红细胞膜包裹(方法同上),制成红细胞膜包裹的FITC-抗-hTERT单克隆抗体纳米粒子。

[0041] c) 提前一天HeLa细胞铺板,培养过夜。实验日先用1\*PBS洗涤细胞表面3次,加入不含FBS的培养液。分别在不同孔中加入以上三种粒子,另设空白组作为对照。2h后用1\*PBS洗涤细胞表面3次以除去未摄取的荧光抗体,消化细胞后用4%多聚甲醛固定,并用流式细胞仪观察摄取率。以此判断HeLa细胞是否对红细胞膜包裹的抗h-TERT单克隆抗体纳米粒子有更高的摄取率。

[0042] 结果参阅图4;其中,A图为游离FITC-抗-hTERT单克隆抗体的HeLa细胞摄取率,表示有92.52%的细胞有明显的荧光摄取信号,摄取强度为122.58;B图为红细胞膜包裹的抗h-TERT单克隆抗体纳米粒子的HeLa细胞摄取率,表示有93.43%的细胞有明显的荧光摄取信号,摄取强度为874.99;这些数据表明了HeLa细胞对红细胞膜包裹的抗h-TERT单克隆抗体纳米粒子有更高的摄取率及摄取强度。

[0043] 实施例6

[0044] 制备红细胞膜包裹的抗-hTERT单克隆抗体纳米粒子并进行体内外长循环实验评估。

[0045] a) 体外长循环实验评估:

[0046] 根据巨噬细胞Raw 264.7对三种粒子的摄取情况可以初步判断系统对这三种粒子的清除能力,在相同的摄取条件下,摄取率低的粒子不易被体内系统清除,从而更利于体内长时间作用:

[0047] 用FITC标记好单克隆抗体,并制备三种实验材料,方法同上。

[0048] 提前一天Raw 264.7细胞铺板,培养过夜。实验日先用1\*PBS洗涤细胞表面3次,加入不含FBS的培养液。分别在不同孔中加入以上三种粒子,另设空白组作为对照。15min后用1\*PBS洗涤细胞表面3次以除去未摄取的荧光抗体,消化细胞后4%多聚甲醛固定,并用流式细胞仪观察摄取率。

[0049] 结果参阅图5,结果中,巨噬细胞Raw 264.7对红细胞膜包裹的抗h-TERT抗体纳米粒子摄取率最低,且明显低于抗h-TERT抗体纳米粒子,说明红细胞膜包裹抗体纳米粒子后确实能够降低巨噬细胞的识别,减少摄取率。

[0050] b) 体内长循环实验评估:

[0051] 用FITC标记好单克隆抗体,并制备三种实验材料,方法同上。

[0052] 准备SD大鼠12只,随机编成3组,每组4只。实验前每只大鼠眼眶取血200 $\mu$ L,置于0.5%肝素钠荡洗过的EP管内。每只大鼠尾静脉注射相同抗体当量及浓度的三种样品,注射后30min,1h,2h,4h,8h,12h,24h及48h后分别眼眶取血200 $\mu$ L并置于0.5%肝素钠荡洗过的EP管内(注意避光)。样品用PBS稀释后用荧光分析仪监测荧光含量,由此判断三种粒子在大鼠体内的循环作用时间。

[0053] 结果参阅图6,结果中,白色点代表游离抗h-TERT单克隆抗体在注射后滞留体内的信号强度,灰色点代表抗h-TERT单克隆抗体纳米粒子在注射后滞留体内的信号强度,黑色点代表红细胞膜包裹的抗h-TERT单克隆抗体纳米粒子在注射后滞留体内的信号强度,可以看出红细胞膜包裹的抗h-TERT单克隆抗体纳米粒子在体内滞留时间明显延长,说明其可以延长作用时间,增加生物利用度。

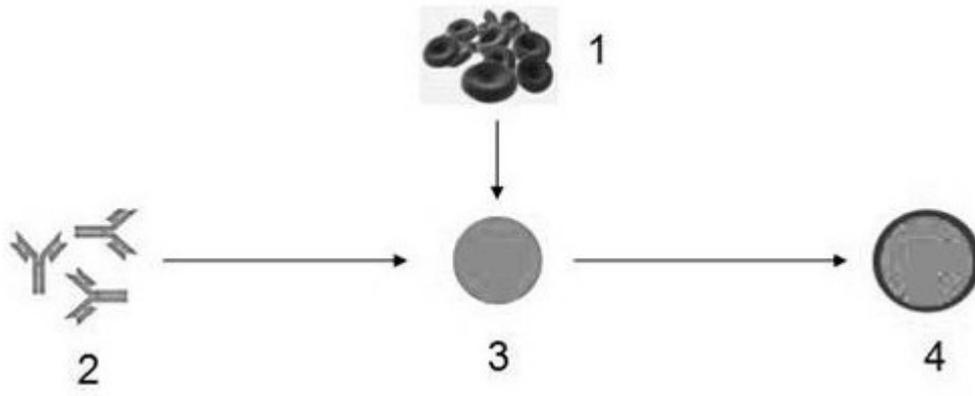


图1

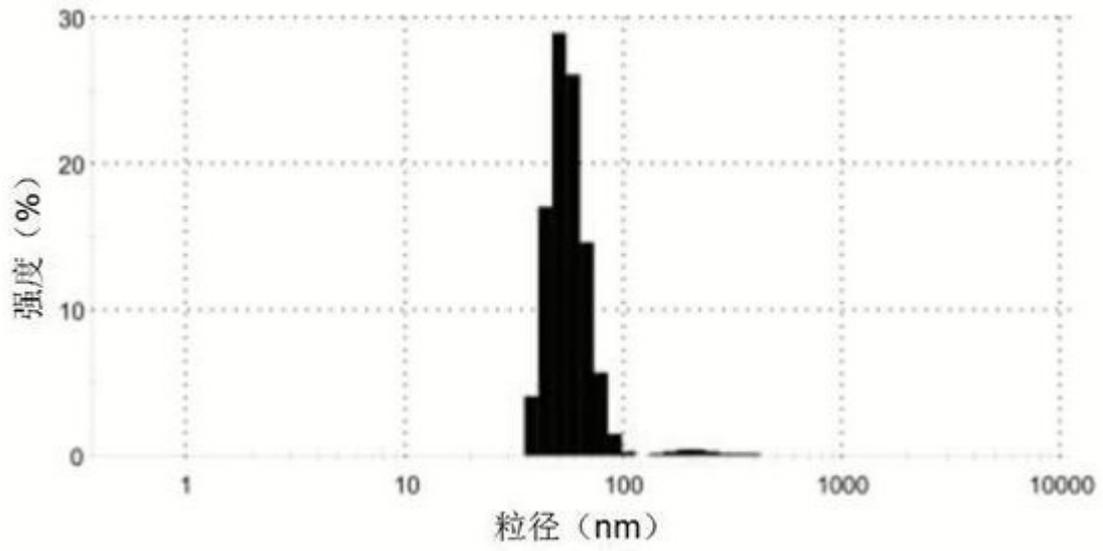


图2

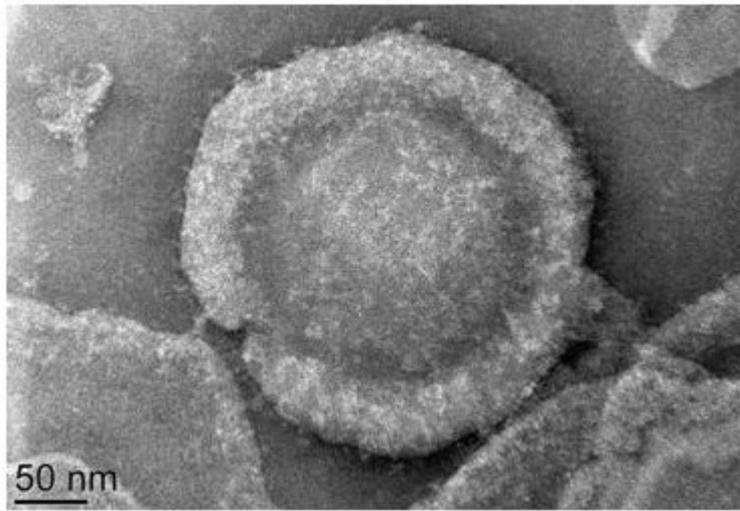


图3

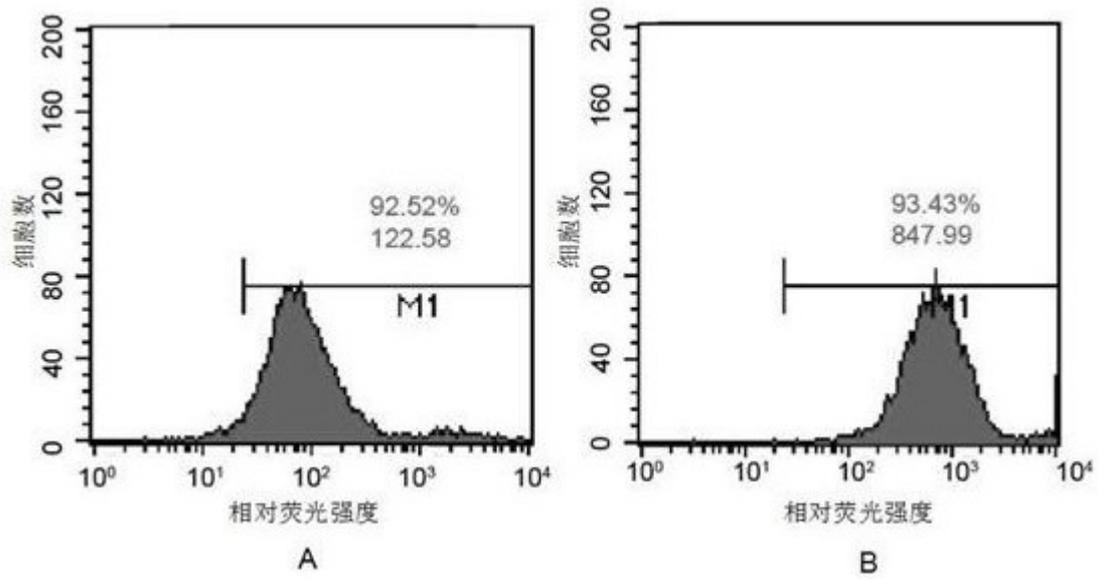


图4

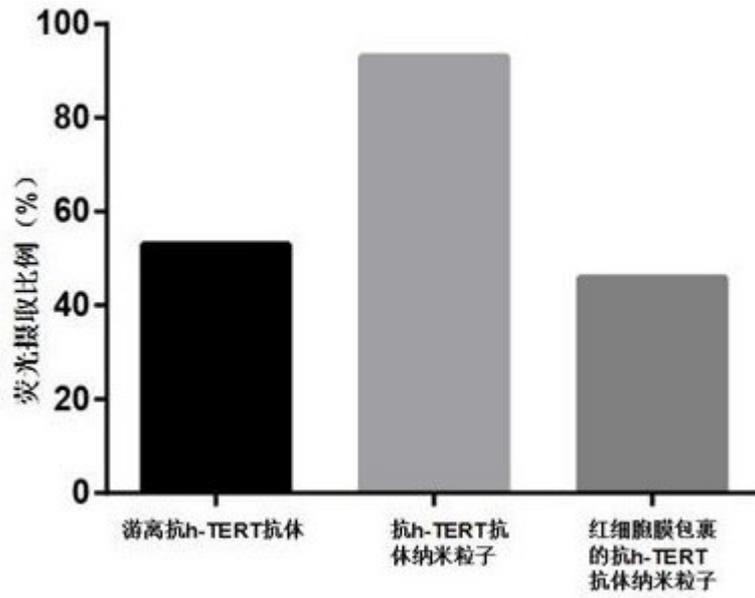


图5

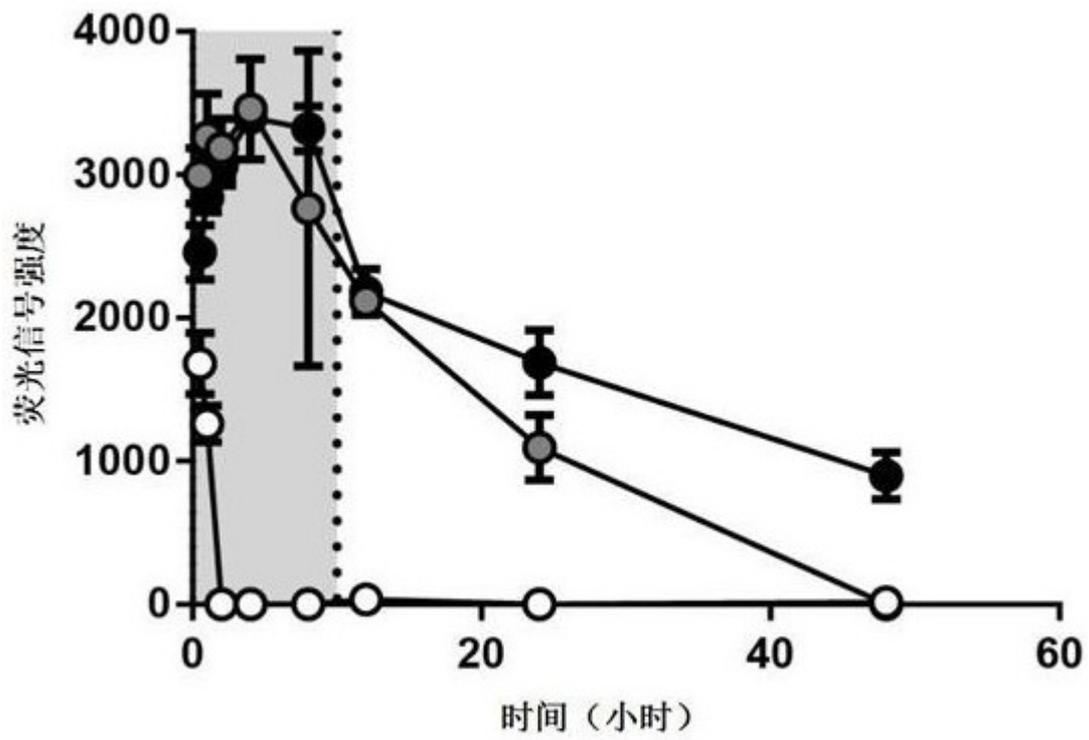


图6