



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107530445 B

(45) 授权公告日 2021.01.05

(21) 申请号 201580074565.7

(22) 申请日 2015.11.20

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107530445 A

(43) 申请公布日 2018.01.02

(30) 优先权数据  
62/084,887 2014.11.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.07.26

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2015/061838 2015.11.20

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02016/085808 EN 2016.06.02

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 Y.陆 Y.刘 J.温 G.刘

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105

代理人 张文辉

(51) Int.Cl.

A61K 47/69 (2017.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

C08F 230/02 (2006.01)

C08F 222/38 (2006.01)

审查员 彭翠莲

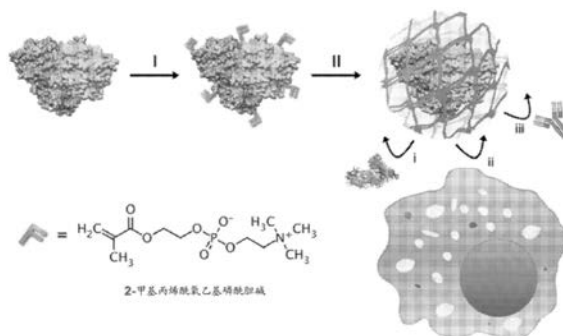
权利要求书1页 说明书16页 附图7页

### (54) 发明名称

用于蛋白质递送的隐形纳米胶囊

### (57) 摘要

本申请涉及用于延长蛋白质的循环半衰期的方法和材料。所述方法包括用可聚合的丙烯酸基缀合蛋白,以及用聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(pMPC)层包封所述蛋白质。所述pMPC包括与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)交联剂聚合的多个2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱单体(MPC)。



1. 一种延长蛋白质的循环半衰期的方法,所述方法包括:  
使蛋白质与不饱和乙烯基缀合;以及  
用聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(pMPC)层包封所述蛋白质,  
其中所述pMPC层包括与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)交联剂聚合的多个2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱单体(MPC),所述不饱和乙烯基为N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(NAS),且所述蛋白质包含赖氨酸残基。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中当与胰蛋白酶一起孵育至少90分钟时,所述被包封的蛋白质保留其活性的至少95%。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中当在37℃孵育至少5天时,所述被包封的蛋白质保留其活性的至少90%。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中被包封的蛋白质不偶联至聚乙二醇。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中用pMPC层包封所述蛋白质在体内延缓了免疫系统对所述蛋白质的清除。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中用pMPC层包封所述蛋白质在体内降低所述蛋白质与调理素、巨噬细胞或抗体的结合。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中选择所述pMPC层以向所述被包封的蛋白质提供两性离子结构。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述pMPC层具有8至11nm的厚度。
9. 一种形成蛋白质纳米胶囊的方法,所述方法包括:  
使蛋白质与不饱和乙烯基缀合;以及  
用聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(pMPC)层包封所述蛋白质,  
其中所述pMPC层包括与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)交联剂聚合的多个2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱单体(MPC),所述不饱和乙烯基为N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(NAS),且所述蛋白质包含赖氨酸残基。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述pMPC层具有8至11nm的厚度。
11. 一种物质组合物,由以下组成:  
负载剂;和  
聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(pMPC);  
其中所述pMPC包封所述负载剂,  
其中所述负载剂为包含赖氨酸残基的蛋白质或多肽,其与N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(NAS)缀合,且所述pMPC包括与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)交联剂聚合的多个2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱单体(MPC)。
12. 根据权利要求11所述的组合物,其中当与胰蛋白酶一起孵育至少90分钟时,所述被包封的蛋白质或多肽保留其活性的至少95%。
13. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述pMPC层具有8至11nm的厚度。

## 用于蛋白质递送的隐形纳米胶囊

[0001] 相关申请参考

[0002] 本申请根据119(e)节要求Yunfeng Lu等人在2014年11月26日提交的、标题为“STEALTH NANOCAPSULES FOR PROTEIN DELIVERY”的美国临时申请序列号62/084,887的优先权,通过引用将其并入本文。

### 技术领域

[0003] 本申请涉及蛋白质纳米胶囊,特别是,延长蛋白质的循环半衰期。

[0004] 发明背景

[0005] 递送治疗水平的蛋白质(可在个体中不存在或不足)的蛋白质疗法被认为是很多无法治愈的疾病最终希望。然而,肽药物和治疗性蛋白质的应用受生理环境中其稳定性和渗透性差的限制。因此,越来越多地努力通过设计可作为递送治疗性蛋白质的载体的纳米结构来规避这些问题。

[0006] 为了系统递送治疗性蛋白质,由于易于控制纳米颗粒的结构和特性,纳米颗粒一直被期望作为理想的载体。此外,纳米颗粒可以用于将治疗剂靶向递送至特定病理部位,使得能在所需部位有剂量增加效应,并降低任何副作用。然而,目前很少有纳米制剂被批准用于临床或临床试验。体内使用纳米颗粒的一个主要障碍是免疫系统快速清除纳米颗粒,这导致不希望的药物动力学和生物分布。这个问题使大多数靶向策略无效,并降低了被批准的纳米制剂和仍在开发中的纳米制剂的功效。

[0007] 目前,延长纳米颗粒循环时间的主要策略是用聚乙二醇(PEG化)覆盖颗粒,以产生模仿细胞糖萼的“隐形”刷(“stealth”brush)。事实上,已发现PEG化延长颗粒在体内的循环时间。然而,已发现高达25%的患者在治疗之前表现出抗-PEG抗体或在首次施用PEG化纳米颗粒后出现抗-PEG抗体。因此,纳米颗粒的PEG化几乎没有成为开发基于纳米颗粒的治疗剂的实用手段的前景。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明涉及延长静脉内施用的治疗性蛋白质的循环时间和/或降低所述蛋白质免疫原性的方法。在多个实施方案中,通过用聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(poly(2-methacryloxyloxyethyl phosphorycholine))(pMPC)包封外来蛋白质而显著延长了它们在体内的循环寿命。通过包封蛋白质,蛋白质表面被pMPC壳完全覆盖,这使与调理素和细胞的粘附将至最低,导致免疫识别和清除的显著延迟。如在下文实施例部分进一步描述的,生物分布研究已发现,在某些实施方案中,超过50%的注射的被pMPC包封的蛋白质(pMPC-蛋白质)停留在血流中,而不是被捕获在器官中(例如,超过50%的注射的被pMPC包封的蛋白质在血流中停留至少1、2、3或4小时)。因此,这些方法为治疗剂的静脉内递送提供了相对于传统基于聚乙二醇(PEG)的策略的更好选择。

[0010] 在本发明的一个方面,提供了延长蛋白质的循环半衰期的方法。该方法包括使蛋白质与不饱和乙烯基缀合,以及用聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(pMPC)层包封该蛋白质。在一个或多个实施方案中,该pMPC层包括与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)交联剂聚合

的多个2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱单体 (MPC)。典型地,该不饱和乙烯基为可聚合的丙烯酰基。在一个实施方案中,选择该pMPC层以向被包封的蛋白质提供两性离子结构。在一个或多个实施方案中,该pMPC层具有8至11nm的厚度。在其它实施方案中,mMPC层具有小于1、2、3、4或5nm的厚度。

[0011] 在一个实施方案中,用pMPC层包封蛋白质在体内延长了该蛋白质的半衰期。在另一实施方案中,用pMPC层包封蛋白质在体内延缓了免疫系统对该蛋白质的清除。在又一实施方案中,用pMPC层包封蛋白质在体内降低了该蛋白质与调理素、巨噬细胞或抗体结合的可能性。在一种情形下,当与胰蛋白酶一起孵育至少90分钟时,被包封的蛋白质保留了其活性的至少95%。在另一种情形下,当在37℃孵育至少5天时,被包封的蛋白质保留了其活性的至少90%。

[0012] 在本发明的另一方面,提供了形成蛋白质纳米胶囊的方法。该方法包括使蛋白质与不饱和乙烯基缀合,以及用聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(pMPC)层包封该蛋白质。在一个或多个实施方案中,该pMPC层通过将多个2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱单体(MPC)与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)交联剂聚合而形成。典型地,该蛋白质是与可聚合的丙烯酰基缀合。在一个实施方案中,选择该pMPC层以向被包封的蛋白质提供两性离子结构。在一个或多个实施方案中,该pMPC层具有8至11nm的厚度。在其它实施方案中,mMPC层具有小于1、2、3、4或5nm的厚度。

[0013] 在本发明的另一方面,提供了物质组合物。该物质组合物包括负载剂(cargo agent)和聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(pMPC),其中该pMPC包封该负载剂。在一个或多个实施方案中,该负载剂为蛋白质或多肽。在一个实施方案中,该pMPC包括与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)交联剂聚合的多个2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱单体(MPC)。典型地,该负载剂是与可聚合的丙烯酰基缀合。在一个或多个实施方案中,该pMPC层具有8至11nm的厚度。在其它实施方案中,mMPC层具有小于1、2、3、4或5nm的厚度。在一种情形下,当与胰蛋白酶一起孵育至少90分钟时,被包封的蛋白质或多肽保留了其活性的至少95%。在另一种情形下,当在37℃孵育至少5天时,被包封的蛋白质或多肽保留了其活性的至少90%。

[0014] 从以下的详细描述,本发明的其它目的、特征和优点将对于本领域技术人员变得显而易见。然而,应当理解,详细描述和具体实施例虽然指出了本发明的一些实施方案,但是给出它们意在阐释而非限制。在不脱离本发明精神下,可以在本发明范围内进行许多改动和修改,并且本发明包括所有这些修改。

[0015] 附图简述

[0016] 现在参考附图,其中相同的附图标记自始至终表示相应的部分:

[0017] 图1为根据本发明一个或多个实施方案的pMPC蛋白质纳米胶囊(pMPC-n蛋白质)的合成示意图。通过两个步骤完成pMPC对蛋白质的包封。通过缀合反应(I)用可聚合的丙烯酰基将蛋白质锚定在的表面上;随后,通过2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱原位聚合用pMPC聚合网络包裹蛋白质(II)。所得的蛋白质纳米胶囊被pMPC壳完全覆盖,所述蛋白质纳米胶囊对于调理素蛋白质(i)、包括巨噬细胞在内的各种类型细胞(ii)以及抗体(iii)是不粘附的(non-fouling)。

[0018] 图2A-F显示了根据本发明一个或多个实施方案的pMPC蛋白质纳米胶囊的结构和独特特性。图2A和2B展示了透视电子显微照片,显示pMPC-nEGFP(a)和pMPC-nOVA(b)的均一

尺寸。图2C显示了HRP、G0x、U0x和A0x在它们天然形式和它们pMPC蛋白质纳米胶囊之间的活性比较。这些酶没有显示出包封后显著的活性丧失。图2D显示了在37℃孵育时天然A0x和pMPC-nA0x的热稳定性。图2E显示当以0.1mg/mL胰蛋白酶在37℃攻击时天然U0x和pMPC-nU0x的活性变化。图2F显示在与小鼠全血清一起孵育后pMPC-nEGFP、pAAm-nEGFP和天然EGFP吸附的蛋白质的量。数据表示来自三个独立实验的均值±均值标准偏差(SEM) (2C、2D和2E) 和均值±标准偏差(SD) (2F)。

[0019] 图3A-H显示根据本发明一个或多个实施方案,通过pMPC包封降低蛋白质的细胞摄取和吞噬作用。图3A显示在与天然OVA and pMPC-nOVA一起孵育24小时后细胞活力测定。细胞增殖速率按在相同条件下培养的未处理细胞的增殖速率归一化。用CellTiter Blue测定活力。图3B显示了U87细胞对天然转铁蛋白(Tf)和pMPC-nTf的受体介导的内吞作用(RME)水平。Tf的RME大部分被包封所抑制。图3C显示了具有不同表面的天然EGFP和EGFP纳米胶囊的细胞摄取水平。图3D显示在与J774A.1小鼠巨噬细胞一起孵育1小时后天然OVA(i)而不是pMPC-nOVA(iii)的吞噬作用。在与血清一起孵育后,小鼠血清(+MS)调理素作用增强了天然OVA(ii)的吞噬作用,而从pMPC-nOVA未能观察到明显的吞噬作用。用烟酸己可碱33342对细胞染色,用于细胞核成像。比例尺:50μm。图3E为在与天然OVA、天然OVA+MS、pMPC-nOVA和pMPC-nOVA+MS一起孵育后,比较从巨噬细胞的荧光辅助细胞分选(FACS)分析评估的平均荧光强度的柱状图。图3F显示了来自6个供体的静止的和经刺激的人外周血单核细胞(PBMC)对OVA and pMPC-nOVA摄取的定量分析。图3G和3H说明与用PBS(空白)、天然OVA and pMPC-nOVA处理的小鼠的血液IgG、IgE、OVA特异性IgG(OVA-sIgG)和OVA-sIgE的水平进行比较,表明封装后OVA的免疫原性变小。数据表示来自三个独立实验的均值±SEM(3A)、来自FACS数据的均值±%稳健变异系数(CV)(3E)、来自几个独立实验的均值±SD(对于3B、3C,n=6;对于3F、3G、3H,n=5)。

[0020] 图4A至D显示了根据本发明一个或多个实施方案pMPC蛋白质纳米胶囊在体内的长循环和低免疫原性。图4A显示在以放射性<sup>125</sup>I-pMPC-nEGFP静脉内施用后不同时间动物的单光子发射计算机断层成像术/X射线计算机断层摄影(SPECT/CT)图像。图4B显示不同时间时<sup>125</sup>I-pMPC-nEGFP在血液和器官中的相对量的定量分析。所有的放射性强度都按每只动物在3小时时心脏的强度归一化。图4C为总结注射后不同时间血液和其它主要器官中分布的pMPC-nEGFP与pMPC-nEGFP总量相比较的相对量的柱状图。图4D显示了在全身性施用后小鼠中天然A0x、pAAm-nA0x和pMPC-nA0x的药物动力学(PK)特征。数据表示来自独立实验的均值±SEM(对于4B和4C,n=3,对于4D,n=4)。

[0021] 图5A-K显示了根据本发明一个或多个实施方案的各种pMPC蛋白质纳米胶囊的尺寸分布。图5A显示pMPC-nEGFP(平均直径:12.16nm),图5B显示pMPC-nEGFP(+)(平均直径:11.62nm),图5C显示pAAm-nEGFP(平均直径:13.25nm),图5D显示pAAm-nEGFP(+)(平均直径:10.82nm),图5E显示pMPC-nHRP(平均直径:12.46nm),图5F显示pMPC-nG0x(平均直径:10.61nm),图5G显示pMPC-nTf(平均直径:10.78nm),图5H显示pMPC-nOVA(平均直径:13.46nm),图5I显示pMPC-nU0x(平均直径:9.556nm),图5J显示pMPC-nA0x(平均直径:10.68nm),以及图5K显示pAAm-nA0x(平均直径:10.54nm)。

[0022] 图6A-D显示根据本发明的一个或多个实施方案,经pMPC-nEGFP、pMPC-nOVA、pMPC-nU0x和pMPC-nA0x以及它们对应的天然蛋白质处理的细胞的活力。

[0023] 图7A-B显示了根据本发明一个或多个实施方案,pMPC-nBSA的生物分布。图7A显示不同时间时<sup>125</sup>I-pMPC-nBSA在血液和器官中的相对量的定量分析。所有的放射性强度都按每只动物在3小时时心脏的强度归一化。图7B为总结在注射后不同时间血液和其它主要器官中分布的pMPC-nBSA与pMPC-nBSA总量相比较的相对量的柱状图。

[0024] 发明详述

[0025] 本文描述或参考的许多技术和操作可由本领域技术人员采用传统方法学很好地理解和常规使用。在优选实施方案的描述中,可以参考形成其一部分的附图,并且其中通过说明的方式阐释了可以实施本发明的具体实施方案。应当理解,可以在不脱离本发明范围的情况下使用其它的实施方案,并且进行结构改动。

[0026] 除非另有定义,本文使用的本领域所有术语、符号和其它科学术语或术语旨在具有本发明所属领域技术人员通常理解的含义。在某些情况下,为了清楚和/或方便参考,本文定义了具有通常理解的含义的术语,并且本文中包括这些定义不必被解释为表示与本领域中所通常理解的有显著差异。

[0027] 迄今为止,基于纳米颗粒的治疗已显示出作为革命性的递送策略的巨大潜力,其使得能够稳定不溶性和脆弱的蛋白质。然而,纳米颗粒的应用典型地被短的体内循环时间(它们被免疫系统清除所导致)所限制。目前为基于蛋白质的治疗剂延长循环时间的方法主要通过PEG化来实现,这例如在美国专利No. 4,179,337中有描述。然而,已经发现,大多数人倾向于出现抗PEG应答,这部分地是由于食物和化妆品中广泛使用PEG。

[0028] 从身体去除纳米颗粒(即清除)主要通过单核吞噬细胞系统(MPS)、也称为网状内皮系统(RES)来实现。MPS的巨噬细胞可直接识别外来颗粒,或者通过结合至外来颗粒表面的调理素蛋白质来识别它们。显然,两种途径都由纳米颗粒与诸如巨噬细胞和调理素的生物学内容物的结合所引发的。因此,通过让结合概率最小化,有可能延迟纳米颗粒从血液的MPS清除,由此延长它们的循环寿命和抑制它们的免疫原性。

[0029] 在一个方面,本文公开的本发明提供了蛋白质和多肽纳米胶囊的合理设计,它们能够延长任何蛋白质或多肽在血液中的循环寿命。在另一方面,通过采用简单的湿化学法,为大范围临床应用提供了不粘附的蛋白质纳米胶囊。通常,这通过用聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(pMPC)的薄层包封蛋白质以在蛋白质的顶部产生不粘附表面来实现。

[0030] pMPC包封蛋白质纳米颗粒(pMPC-n蛋白质)的合成策略通过采用蛋白质包封技术的修饰版本来实现。如图1所示,在一个或多个实施方案中,该pMPC-n蛋白质的合成策略在两步骤的方法中完成。首先使蛋白质与不饱和乙烯基缀合(I),接着在水溶液中通过单体(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱,MPC)和交联剂(N,N'-亚甲基双丙烯酰胺,BIS)的共聚合用pMPC聚合网络来包裹(II)。由于pMPC的吸附抵抗特性,该pMPC包衣显著降低了蛋白质与调理素(i)、巨噬细胞(ii)或抗体(iii)结合的可能性,从而延缓了免疫系统清除并延长了所述蛋白质的循环半衰期。此外,该pMPC包衣还防止内部蛋白质与蛋白酶直接相互接触,这增强了蛋白质在血流中循环期间的稳定性(由此延长了已施用蛋白质的个体中蛋白质的循环半衰期的时间)。

[0031] 本发明为大多数治疗蛋白质提供了这样的优点,例如延长的血液循环半衰期和较低的免疫原性。如下文实施例部分所显示的,本发明可显著增加静脉内施用的治疗性蛋白质的循环时间。本发明还采用了生物相容性材料,使得它们在施用后更难以被免疫系统所

识别。这种蛋白质治疗技术可以应用于各种疾病(例如痛风)以及组织重建和再生。与目前技术(例如传统的PEG化策略)相比,本发明提供了更稳定的结构,所用的材料是完全生物相容的,并且不触发免疫应答。结果,本发明使得治疗蛋白质具有更有利的药物动力学特性和更高的生物利用度。

[0032] 在本发明的一个方面,提供了延长蛋白质的循环半衰期的方法。该方法包括使蛋白质与不饱和乙烯基缀合,以及用聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(pMPC)层包封该蛋白质。在一个或多个实施方案中,该pMPC层包括与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)交联剂聚合的多个2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱单体(MPC)。典型地,该不饱和乙烯基为可聚合的丙烯酰基。在一个实施方案中,选择该pMPC层以向被包封的蛋白质提供两性离子结构。在一个或多个实施方案中,该pMPC层具有8至11nm的厚度。在其它实施方案中,mMPC层具有小于1、2、3、4或5nm的厚度。

[0033] 在一个实施方案中,用pMPC层包封蛋白质在体内延长了该蛋白质的半衰期。在另一实施方案中,用pMPC层包封蛋白质在体内延缓了免疫系统对该蛋白质的清除。在又一实施方案中,用pMPC层包封蛋白质在体内降低了该蛋白质与调理素、巨噬细胞或抗体结合的可能性。在一种情形下,当与胰蛋白酶一起孵育至少90分钟时,被包封的蛋白质保留了其活性的至少95%。在另一种情形下,当在37℃孵育至少5天时,被包封的蛋白质保留了其活性的至少90%。

[0034] 在本发明的另一方面,提供了形成蛋白质纳米胶囊的方法。该方法包括使蛋白质与不饱和乙烯基缀合,以及用聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(pMPC)层包封该蛋白质。在一个或多个实施方案中,该pMPC层通过将多个2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱单体(MPC)与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)交联剂聚合而形成。典型地,该蛋白质与可聚合的丙烯酰基缀合。在一个实施方案中,选择该pMPC层以向被包封的蛋白质提供两性离子结构。在一个或多个实施方案中,该pMPC层具有8至11nm的厚度。在其它实施方案中,mMPC层具有小于1、2、3、4或5nm的厚度。

[0035] 在本发明的另一方面,提供了物质组合物。该物质组合物包括负载剂和聚(2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱)(pMPC),其中该pMPC包封该负载剂。在一个或多个实施方案中,该负载剂为蛋白质或多肽。在一个实施方案中,该pMPC包括与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(BIS)交联剂聚合的多个2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱单体(MPC)。典型地,该负载剂是与可聚合的丙烯酰基缀合。在一个或多个实施方案中,该pMPC层具有8至11nm的厚度。在其它实施方案中,mMPC层具有小于1、2、3、4或5nm的厚度。在一种情形下,当与胰蛋白酶一起孵育至少90分钟时,被包封的蛋白质或多肽保留了其活性的至少95%。在另一种情形下,当在37℃孵育至少5天时,被包封的蛋白质或多肽保留了其活性的至少90%。

## 实施例

### [0036] 实施例1:用pMPC壳包封不损害蛋白质结构

[0037] 采用增强型绿色荧光蛋白(EGFP)和卵清蛋白(OVA)证实了pMPC蛋白质纳米胶囊的成功制备。在用pMPC包封后,根据pMPC-nEGFP(图2A)和pMPC-nOVA(图2B)的透射电子显微镜(TEM)图像,该蛋白质纳米胶囊显示出均一的球形形态,平均直径 $25 \pm 5$ nm。考虑到EGFP和OVA的粒径为约8nm,则该pMPC壳的平均厚度为约8-11nm。因为该pMPC包衣是在水性介质中

采用非常温和的反应形成的,所以包封在内的蛋白质能够保留它们的结构和生物学功能。

[0038] 为了验证这一点,用相同的方法将四种酶进行包封,所述酶包括辣根过氧化物酶(HRP)、葡萄糖氧化酶(GOx)、尿酸酶(UOx)和醇氧化酶(AOx),并将它们的酶活性分别与它们的天然对应物进行比较。图2C显示了pMPC-n蛋白质与它们的天然形式相比较的相对催化效率。基于该结果,包封之前和之后在整体催化效率方面无显著差异,尽管所有的pMPC包封的酶与它们的天然版本相比都显示出稍稍降低的活性。这种活性丧失可以归于8nm厚的pMPC包衣,当底物转移跨过该pMPC壳以结合内部的酶时,pMPC包衣降低了扩散性,这导致表观米氏常数(KM)的增加(表1)。KM增加以及无酶活性的显著丧失提示,该包封不损害蛋白质结构。这进一步表明,该pMPC包封方法可普遍地应用于大多数蛋白质和酶,而不损害它们的生物学功能。

[0039] 表1 | pMPC-nHRP、pMPC-nGOx、pMPC-nUOx、pMPC-nAOx以及它们的天然对应物的动力学参数

	样品	(     )	( <sup>-1</sup> )	/		%
				-1	-1	
[0040]	天然 HRP	0.0925±0.0213	4.03×10 <sup>2</sup>	4356.7±989.0		100±22.7
	pMPC-nHRP	0.121±0.0340	4.80×10 <sup>2</sup>	3966.9±1114.7		91.1±28.1
	天然 GOx	18.00±6.21	87.9	4.883±1.684		100±34.5
	pMPC-nGOx	21.56±6.70	77.6	3.600±1.119		73.7±31.1
	天然 UOx	0.0219±0.0017	3.36	153.4±11.8		100±7.7
	pMPC-nUOx	0.0259±0.0043	3.59	138.6±22.9		90.4±16.5
	天然 AOx	3.109±0.720	18.8	6.047±1.428		100±23.61
	pMPC-nAOx	5.120±1.433	23.4	4.570±1.279		75.6±28.00

[0041] 实施例2:用pMPC壳包封增强蛋白质稳定性

[0042] 如在方案中所显示的,在蛋白质外部包裹的pMPC壳是直接从MPC单体合成的。与用于覆盖蛋白质的传统的自组装和“接枝(graft-on)”方法不同,这种聚合方法制备交联的和密集的聚合网络,这保证了在血液中(这里剪切力大并且生理学条件是不断变化的)循环期间对内部蛋白质的完全覆盖。因此,本文公开的纳米胶囊为内部蛋白质提供了稳定的微环境,这有效地增强了蛋白质稳定性。

[0043] 为了验证这一点,首先针对热变性攻击蛋白质纳米胶囊的稳定性。将AOx作为模型蛋白质,将天然AOx和pMPC-nAOx在37℃下孵育5天,并在不同时间监测它们的酶学活性。根据活性比较(图2D),天然AOx丧失了其活性的大于60%,提示在孵育期间其结构有损害。然而,pMPC-nAOx保留了其活性的90%,表明该包封确实增强了蛋白质稳定性。

[0044] 实施例3:用pMPC壳包封防止蛋白水解和降低蛋白质吸附

[0045] 该pMPC壳还将被包封的蛋白质与外部环境分隔开。在循环期间,蛋白质、细胞、组织和器官必须与该pMPC壳而不是内部蛋白质的表面相互作用,这在分子水平上为延长蛋白质的循环寿命提供了两个主要优点。第一,该pMPC壳通过抑制蛋白酶的结合保护蛋白质免受蛋白水解。以UOx为例(图2E),当与胰蛋白酶一起孵育时,天然UOx在40分钟内完全丧失了其活性,而pMPC-nUOx甚至在90分钟孵育后保留了其活性的大于95%。第二,该pMPC壳用两性离子结构替换了蛋白质表面,导致较少蛋白质吸附在该pMPC蛋白质纳米胶囊上。图2F比较了在37℃与小鼠血清(MS)孵育30分钟后不同EGFP样品吸附的蛋白质的量。显然,天然



EGFP吸附了大量的血清蛋白,而pMPC-nEGFP与对照相比没有显示出显著的蛋白质吸附。如所预料的,用非两性离子聚合物(pAAm-nEGFP)包封也导致血清蛋白的显著吸附,证实该pMPC壳在降低蛋白质吸附方面起了关键作用。考虑到蛋白质吸附通常导致加速MPS清除的调理素作用和凝集,该pMPC包衣应显著延缓巨噬细胞对被包封的蛋白质的识别,由此延长被包封的蛋白质在体内的循环半衰期。

#### [0046] 实施例4:用pMPC壳包封改善生物相容性

[0047] 该pMPC壳还为蛋白质纳米胶囊提供更好的生物相容性,这对于保证以最小副反应成功递送的递送策略是重要的。由于pMPC是无毒和生物相容的材料,所以用pMPC包封不引起额外的毒性。这在示例性实验中得到证实,这些实验显示在分别暴露于天然蛋白质和pMPC-n蛋白质24小时后细胞活力可忽略的差异(参见,例如图3A)。此外,pMPC包封防止蛋白质与细胞表面直接相互作用,这显著延缓了它们内化到细胞中。例如,转铁蛋白(Tf)为能够通过受体介导的内吞作用(RME)内化到U87细胞的蛋白质。但是,pMPC包封阻断了Tf和Tf受体(TfR)之间的结合,导致对RME的抑制,这由此降低了Tf内化到U87细胞的量(图3B)。

[0048] 对pMPC蛋白质纳米胶囊和细胞表面之间相互作用的进一步研究通过分别将U87细胞与等量的天然EGFP和EGFP纳米胶囊(具有不同的表面材料和 $\zeta$ 电位)一起孵育来完成。图3C比较了孵育后内化到细胞的EGFP的量。根据该结果,具有负电荷表面(pAAm-nEGFP(-)和pMPC-nEGFP(-))的纳米胶囊对细胞摄取是不利的,这与文献中已有报道是一致的。对于正电荷表面,尽管在两种带正电荷的纳米胶囊上具有相似量的正电荷(pAAm-nEGFP(+),  $\zeta = +1.27\text{mV}$ ; pMPC-nEGFP(+),  $\zeta = +1.08\text{mV}$ ),但pAAm-nEGFP(+)显示出高水平的细胞摄取,而pMPC-nEGFP(+)显示出非常低水平的摄取,与对照(无EGFP)和天然EGFP相比不显著。显然,该pMPC壳延缓了细胞摄取,这可以归于其防止纳米胶囊与细胞膜结合的不粘附特征。没有稳定的结合,细胞就不可能稳定高曲率的细胞膜,而这对于内体的形成是关键性的。

#### [0049] 实施例5:用pMPC壳包封延缓吞噬作用

[0050] 基于pMPC壳可延缓细胞摄取以及抑制调理素作用的事实,设想pMPC包封还可用于延缓巨噬细胞的吞噬作用,而不管调理素的存在与否。为了验证这一点,采用J744A.1小鼠巨噬细胞、若丹明B(RhB)标记的天然OVA and RhB-标记的pMPC-nOVA来评估吞噬作用的水平。在暴露于巨噬细胞之前,分别将天然OVA和pMPC-nOVA与PBS(-MS)和小鼠血清(+MS)一起孵育。

[0051] 如所预料的,在与巨噬细胞一起孵育1小时后,这些样品产生了吞噬作用水平的极大差异。根据显微镜图像(图3D),两种天然OVA样品显示了明显的若丹明B荧光信号(图3D, i&ii),表明高水平的吞噬作用。相比之下,在pMPC-nOVA样品中观察到非常低水平的吞噬作用(图3D, iii&iv)。在与小鼠血清一起孵育后从天然OVA样品也观察到吞噬作用的显著增强,提示天然OVA的调理素作用加速了吞噬作用。然而,在血清孵育后,没有在pMPC-nOVA样品中观察到吞噬作用水平的明显差异,因为pMPC壳的不粘附能力防止了对纳米胶囊的调理素作用,这也通过其低蛋白质吸附而证实(图2F)。荧光激活细胞分选(FACS)分析表明,与分别用天然OVA+MS/-MS处理的那些相比,用pMPC-nOVA+MS/-MS(图3E和表2)处理的巨噬细胞的平均荧光强度降低高至6倍。这也证实了pMPC包封在抑制调理素作用和延缓吞噬作用方面的有效性。由于吞噬作用对于纳米胶囊的MPS清除是关键性的,所以有可能通过pMPC包封延长蛋白质的循环半衰期。

[0052] 表2|FACS结果总结

	样品	事件	%门控	%RhB -	%RhB +	平均荧光	%稳健 CV
[0053]	对照	10000	43.5	99.8	0.207	217	54.9
	天然 OVA	10000	20.3	5.03	95	2558	51.3
	天然 OVA + MS	10000	44.1	0.159	99.8	5229	49.8
	pMPC-nOVA	10000	38.9	63.7	36.3	810	45.4
[0054]	pMPC-nOVA + MS	14508	29.1	48.2	51.8	946	48.5

## [0055] 实施例6:用pMPC壳包封降低免疫原性

[0056] 除了MPC清除,外来蛋白质和它们的纳米制剂也可被适应性免疫系统有效消除,该适应性免疫系统可通过产生相应抗体来识别和中和外来物质。另外,适应性免疫通常生成可直接识别抗原并快速产生抗体的记忆B细胞,导致对外来物质的加速血液清除(ABC)。至今,大多数的静脉内纳米制剂都遭遇到ABC现象,包括广泛使用的PEG化纳米结构。然而,当首次引入外来物质时,适应性免疫系统活化和记忆B细胞的产生需要称作抗原呈递的关键步骤。抗原呈递通过抗原呈递细胞(APC)识别、吞入和消化抗原起始。因此,抑制被APC摄取的纳米制剂能够避免免疫活化,引起免疫原性降低、极少出现ABC现象以及因此血液循环寿命的显著延长。

[0057] 为了评估对pMPC-n蛋白质的吞入,采用了来自6个供体的静止的和经刺激的人外周血单核细胞(PBMC),将细胞分别与RhB标记的天然OVA and RhB标记的pMPC-nOVA一起孵育。图3F总结了结果,表明甚至在刺激后pMPC包封可有效地阻碍PBMC对OVA的吞入。考虑到PBMC由大多数主要类型的APC组成,预期pMPC-n蛋白质将呈现极小的免疫原性,接着通过在小鼠中体内施用pMPC-nOVA和天然OVA后测量抗体水平(IgG和IgE)来评估。图3G比较了用PBS(对照)、天然OVA和pMPC-nOVA处理的小鼠(BALB/C)的IgG和IgE水平。由于OVA的强免疫原性,用天然OVA处理的小鼠在注射后表达高水平的IgG和IgE。然而,在pMPC-nOVA处理组中未观察到IgG和IgE水平的显著升高,提示该pMPC包封确实抑制了免疫活化。在OVA特异IgG和IgE水平(OVA-sIgG和OVA-sIgE)方面也观察到类似结果(图3H),表明包裹在OVA外部的该pMPC壳阻断了APC对它的呈递。通过使巨噬细胞和APC的吞噬作用和吞入最小化,pMPC-n蛋白质也成功地避免了被主要清除途径(包括MPS清除和适应性免疫)识别和中和。因此,pMPC-n蛋白质在静脉内施用后可能显示出延长的血液循环半衰期以及理想的生物分布。

## [0058] 实施例7:评价用pMPC包封的蛋白质的体内循环能力

[0059] 为了评价pMPC-n蛋白质的体内循环能力,用放射性<sup>125</sup>I标记pMPC-nEGFP,并且将纳米胶囊通过尾静脉注射到小鼠(中国昆明小鼠)中。用单光子发射计算机断层成像术(SPECT)追踪pMPC-nEGFP的分布和循环。在图4A中显示了7天内收集的SPECT/X射线计算机断层摄影(CT)图像。从图像(图4A)和柱状图(图4B)中,清楚观察到在注射后72小时时血流中显著部分的pMPC-nEGFP循环。为了更好地理解pMPC-nEGFP的循环行为,将不同组织和器官处的放射性强度按它们相应的总放射性强度归一化,以便得到不同时间pMPC-nEGFP的生物分布(图4C)。显然,pMPC-nEGFP在血液和器官中的分布在不同时间基本上是一致的,并且

pMPC-nEGFP在血液中的量显著高于在肝、脾和肾中检测的量。这在所有的目前基于纳米颗粒的递送策略中是非常独特的分布,通常通过在施用后很快在器官中积累而丧失90%的纳米制剂。

[0060] 与目前的基于纳米颗粒的媒介物的主要差异在于pMPC-n蛋白质具有非常密集、稳定和不粘附的pMPC壳,pMPC壳在任何时刻都完全地包封内部蛋白质。如此前所讨论的,该pMPC壳能够延缓巨噬细胞的吞噬作用,而巨噬细胞主要位于肝、肾、脾、肺、淋巴结和中枢神经系统中。延缓吞噬作用降低蛋白质纳米胶囊被捕获的可能性,由此降低了它们在器官中的积累并延长了它们在血液中的循环半衰期。用pMPC-nBSA也得到了类似结果(图7A-B),证实了独特的循环和分布行为是归于pMPC壳,而不是被包封的蛋白质。

[0061] 为了证实这一点,将pMPC-nA0x注射到小鼠(C57BL/6)中,且通过在注射后72小时内测量血液中的A0x活性来确定其药物动力学(PK)。作为比较,还平行测量天然A0x和pAAm-nA0x的PK。图4D总结了结果,表明与天然A0x和pAAm-nA0x处理的小鼠相比,在pMPC-nA0x处理小鼠中有高得多的血清A0x浓度。二区室模型数据分析(表3)揭示,pMPC-nA0x的消除半衰期( $t_{1/2, \alpha}$ 相=2.134小时, $t_{1/2, \beta}$ 相=88.11小时)比天然A0x( $t_{1/2, \alpha}$ 相=0.6074小时, $t_{1/2, \beta}$ 相=0.6087小时)和pAAm-nA0x( $t_{1/2, \alpha}$ 相=0.4297小时, $t_{1/2, \beta}$ 相=13.83小时)的半衰期长6倍,证实了pMPC-n蛋白质的长循环能力,这与SPECT/CT结果一致。此外,PK研究还证实,pMPC壳可保持被包封的蛋白质的生物学活性,这对于治疗性蛋白质的递送是关键。

[0062] 表3|天然A0x和纳米胶囊的药物动力学参数

参数	天然 A0x	pAAm-nA0x	pMPC-nA0x
$k_{\alpha}$ 相 ( $h^{-1}$ )	1.141	1.613	0.3248
$t_{1/2, \alpha}$ 相(h)	0.6074	0.4297	2.134
[0063] $\tau_{\alpha}$ 相(h)	0.8763	0.6199	3.079
$k_{\beta}$ 相 ( $h^{-1}$ )	1.139	0.05013	0.007867
$t_{1/2, \beta}$ 相(h)	0.6087	13.83	88.11
$\tau_{\beta}$ 相(h)	0.8782	19.95	127.1

[0064] 总之,已证明了通过用pMPC包封治疗性蛋白质来延长它们的循环半衰期的通用和实际策略。按照这种策略,可用密集、稳定和不粘附的pMPC壳包封蛋白质,这在延长循环半衰期和抑制免疫原性方面要优于目前的隐形策略。考虑到大量的治疗性蛋白质和酶由于它们的低生物利用度和强免疫原性而未进入临床应用,该pMPC包封方法提供了可加速将它们开发为很多疾病的临床治疗剂的直接解决方案。此外,由于长循环已被证实为纳米载体实现治疗剂在特异组织和器官中积累的关键特性,所以本文提供的pMPC包封方法可帮助在先进的靶向递送策略的设计中解决这种基础性问题。

[0065] 实施例8:方法

[0066] 蛋白质吸附的定量

[0067] 用以下方法确定不同样品的蛋白质吸附量。根据上文描述的方法和之前的报道,分别用pMPC和聚丙烯酰胺(pAAm)包封EGFP。将10 $\mu$ L PBS(对照)、pMPC-nEGFP(1mg/mL)、pAAm-nEGFP(1mg/mL)和天然EGFP(1mg/mL)与30 $\mu$ L小鼠全血清混合并在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟。孵育后,过滤样品并用PBS洗涤3次,离心过滤(截留分子量,MWCO=100kDa)除去未吸附的血清

蛋白。在用50 $\mu$ L PBS复原后,每个样品中的EGFP量通过用nanodrop测量它们在450nm波长处的吸光度来确定。为了更好地定量吸附的蛋白质的量,分别向样品中添加特定量的天然EGFP,以保证所有样品中EGFP浓度相同。最终,将BSA用作标准品,用BCA测定通过测量每个样品的总蛋白质浓度来确定吸附的蛋白质的量。采用单向ANOVA后的Tukey事后检验进行统计学分析。 $P<0.05$ 或更小被认为是显著的。

#### [0068] 细胞摄取和吞噬作用研究

[0069] 通过将荧光标记的天然Tf和pMPC-nTf与U87细胞一起孵育,接着通过测量细胞荧光强度来评估摄取,完成了对Tf的受体介导内吞作用(RME)的研究。简言之,在暴露于天然Tf和pMPC-nTf之前一天,将U87细胞以5k个细胞/孔铺板到96孔板中。在37 $^{\circ}$ C孵育4小时后,用PBS (1X) 冲洗细胞三次,以除去过量样品和培养基。采用读板仪 (Fujifilm BAS-5000) 读取细胞的荧光强度。在测量荧光之后,用细胞裂解缓冲液裂解细胞,且将BSA用作标准品,用BCA测定来确定每个孔的细胞的总蛋白质浓度。然后,将每个孔的荧光强度按对应的蛋白质浓度归一化。具有不同表面的EGFP的细胞摄取采用类似方法得到,这在补充信息中有详细说明。采用单向ANOVA后的Tukey事后检验进行所有的统计学分析。 $P<0.05$ 或更小被认为是显著的。

[0070] 将J774A.1小鼠巨噬细胞用作模型细胞,并将若丹明B (RhB) 标记的天然OVA/pMPC-nOVA用作模型蛋白质,来研究吞噬作用。按照标准操作 (含有10%FBS的DMEM,37 $^{\circ}$ C,5%二氧化碳) 培养巨噬细胞,并在吞噬作用研究之前24小时将它们铺板到96孔板 (5k个细胞/孔) 中。因为J774A.1细胞使补体受体 (C3R) 表达,所以还通过在暴露于巨噬细胞之前将天然OVA和pMPC-nOVA分别与小鼠全血清在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟 (天然OVA+MS和pMPC-nOVA+MS) 测试作为调理素作用的主要类型的补体活化。然后将天然OVA、天然OVA+MS、pMPC-nOVA和pMPC-nOVA+MS分别添加至细胞培养物,并孵育1小时。为了更好地成像,将烟酸己可碱33342添加至每孔的细胞,再孵育20分钟以对细胞核染色。孵育后,用PBS (1X) 冲洗细胞三次,并采用荧光显微镜 (Carl Zeiss Axio Observer) 观察。为了更好地定量吞噬作用,我们还在24孔板中以30k个细胞/孔的密度培养J774A.1细胞,然后将它们暴露于上文描述的四种基于OVA的样品。在通过刮擦剥离细胞后,用流式细胞术分析 (BD LSRFortessa细胞分析仪) 评估吞噬作用水平。采用FlowJo分析所有的流式细胞术数据。

#### [0071] 药物动力学和数据分析

[0072] 通过静脉内施用后监测血浆中残留A0x活性来评估天然A0x、pAAm-nA0x和pMPC-nA0x的药物动力学 (PK) 特征。简言之,将12只小鼠 (C57BL/6) 分为3组,并通过尾静脉分别注射天然100 $\mu$ g的天然A0x、pAAm-nA0x和pMPC-nA0x (1mg/mL)。另外3只小鼠注射100 $\mu$ L PBS,作为阴性对照。接着,在注射后1小时、2小时、4小时、8小时、24小时和72小时从尾部取血样 (20 $\mu$ L)。然后将血样以20krpm离心5分钟以除去血细胞,并采用A0x酶活性测定法测量血浆中的A0x活性。在补充信息中提供了详细的实验操作和A0x活性测量。采用双相指数衰减模型通过拟合数据完成对PK数据的分析,约束条件为 $Y_0<0.1$  (最大A0x浓度不能高于0.1mg/mL) 和平台=0.005354 (来自阴性对照的平均本底值)。

#### [0073] 荧光标记卵清蛋白 (OVA) 和转铁蛋白 (Tf)

[0074] 出于成像目的,分别用若丹明B (RhB) 和荧光 (FITC) 荧光标记两种蛋白质OVA和Tf。采用缀合方法完成对这些蛋白质的荧光标记。简言之,首先用水溶解蛋白质,并对碳酸钠缓

冲液 (20mM, pH 8.5) 透析以除去任何通常存在于储存蛋白质粉末中的硫酸铵。透析之后, 用碳酸钠缓冲液 (20mM, pH 8.5) 将蛋白质稀释至 5mg/ml。用 DMSO 分别溶解若丹明 B 异硫氰酸酯 (RhB-TIC) 和荧光异硫氰酸酯 (FITC), 制备 1% (w/v) 储备溶液。然后, 将 RhB-TIC 和 FITC 储备溶液以 5:1 的摩尔比 (染料: 蛋白质) 分别添加到 OVA 和 Tf 溶液中。在 4℃ 保持反应过夜, 然后对碳酸钠缓冲液 (20mM, pH 8.5) 透析以除去未缀合的染料。

#### [0075] 蛋白质的丙烯酰氧化

[0076] 为了能够将蛋白质并入 pMPC 聚合纳米胶囊中, 首先使蛋白质与 N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺 (NAS) 缀合以在它们的表面连接上丙烯酰基。下文描述了用于该缀合的典型程序。首先使蛋白质 (~10mg/mL) 对碳酸钠缓冲液 (20mM, pH 8.5) 透析以除去通常存在于储存蛋白质粉末中的任何硫酸铵。透析后, 用碳酸钠缓冲液 (20mM, pH 8.5) 将蛋白质溶液稀释至 5mg/mL, 接着添加 NAS 溶液 (DMSO 中 10%, m/v) 进行该缀合。所用的 NAS 的量为 20:1 摩尔比 (NAS 与蛋白质), 通过将反应在 4℃ 保持 1 小时完成该缀合。接着用透析管膜 (MWCO=10kDa, Sigma-Aldrich) 将该溶液对 pH 7.0 磷酸缓冲液 (20mM) 充分透析, 以除去任何未反应的 NAS。将丙烯酰化的酶溶液保存在 4℃, 用于进一步的用途。

[0077] 缀合至蛋白质上的丙烯酰基的平均数量通过用荧光胺测定法测量蛋白质分子上残留的 (未反应的) 赖氨酸来确定。简言之, 首先将荧光胺溶解在无水 DMSO 中以制备 3mg/mL 储备溶液。用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH=7.0) 分别将天然蛋白质和其丙烯酰化对应物制备为 1mg/mL 溶液。然后用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH=7) 稀释该天然和丙烯酰化蛋白质, 以制备一系列浓度 0.00781、0.01563、0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5 和 1mg/mL 的溶液; 分别吸取 100  $\mu$ L 的每种溶液至不透明 96 孔板。接着向每个孔添加 30  $\mu$ L 的荧光胺溶液; 然后将板在室温 (25℃) 孵育 1 小时。孵育后, 用读板仪读取荧光强度 ( $E_x=360\text{nm}$ ,  $E_m=465\text{nm}$ )。然后通过比较丙烯酰化和天然酶的荧光强度来评估残留赖氨酸的数量。缀合至蛋白质上的丙烯酰基的数量列在表 4 中。

[0078] 表 4 | 缀合至蛋白质的丙烯酰基的平均数量

	蛋白质	总 Lys 数量	未反应 Lys (%)	缀合的丙烯酰基
				平均数量
[0079]	EGFP	20	42.24%	11.55
	OVA	20	22.27%	15.55
	HRP	5	13.71%	4.32
	GOx	15	44.47%	8.33
	UOx	26	34.69%	16.98
	AOx	38	53.15%	17.80
	Tf	58	68.27%	18.40
	BSA	59	71.64%	16.73

[0080] pMPC-nEGFP、pMPC-nOVA、pMPC-nHRP、pMPC-nGOx、pMPC-nUOx、pMPC-nAOx、pMPC-nTf 和 pMPC-nBSA 的合成

[0081] 丙烯酰氧化后, 采用原位聚合方法用 pMPC 包封蛋白质。为了聚合, 首先分别在 DI 水和无水 DMSO 中将 2-甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱 (MPC) 和双甲基丙烯酰胺 (BIS) 制备为 10% (w/v) 储备溶液。然后将 MPC 和 BIS 以特定摩尔比 (列在表 5 中) 添加至被包封的蛋白质的

溶液中。通过用磷酸盐缓冲液 (50mM, pH 7.0) 稀释将最终的蛋白质浓度调节至1mg/mL。通过添加过硫酸铵 (APS) 和四甲基乙二胺 (TEMED) 引发聚合作用,并在室温保持2小时。聚合后,将溶液对PBS透析以除去未反应的单体和副产物。pMPC-nEGFP、pMPC-nOVA、pMPC-nHRP、pMPC-nGOx、pMPC-nUOx、pMPC-nAOx、pMPC-nTf和pMPC-nBSA的详细合成参数列在表5中。

[0082] 表5|各种pMPC蛋白质纳米胶囊的合成参数

	样品	丙烯酰氧 基蛋白质	摩尔比			
			MPC	BIS	APS	TEMED
[0083]	pMPC-nEGFP	1	3000	400	250	500
	pMPC-nOVA	1	3000	400	400	800
	pMPC-nHRP	1	3000	400	300	600
	pMPC-nGOx	1	16000	2400	800	1600
	pMPC-nUOx	1	10000	1400	600	1200
	pMPC-nAOx	1	80000	11000	4000	8000
	pMPC-nTf	1	3000	400	400	800
	pMPC-nBSA	1	3000	400	400	800

[0084] \*所有的数字都表示摩尔比。

[0085] 带正电荷pMPC-nEGFP (+) 的合成

[0086] 带正电荷pMPC-nEGFP (+) 的合成类似于pMPC-nEGFP的合成。不是仅使用MPC作为单体,而是在聚合步骤中将摩尔比9:1的MPC和N-(3-氨基丙基) 甲基丙烯酰胺盐酸盐 (APm) 的混合物用作单体。最终的单体对EGFP的摩尔比保持为3000:1。在用磷酸盐缓冲液 (50mM, pH 7.0) 将EGFP浓度调整为1.0mg/mL后,采用APS/TEMED (1:250:500, EGFP:APS:TEMED, n/n/n) 引发聚合步骤,并将反应在室温下保持2小时。然后,使反应溶液对PBS透析,以除去反应副产物。

[0087] pAAm-nEGFP和pAAm-nAOx的合成

[0088] 采用我们之前描述的方法制备pAAm-nEGFP和pAAm-nAOx。这里,将丙烯酰胺 (AAm) 作为单体用于包封EGFP和AOx。简言之,首先将丙烯酰氧基-EGFP和丙烯酰氧基-AOx分别以特定比例与AAm和BIS混合 (EGFP:AAm:BIS=1:2000:300, AOx:AAm:BIS=1:50000:7000)。在用磷酸盐缓冲液 (50mM, pH 7.0) 将蛋白质浓度调整为1.0mg/mL后,分别采用APS/TEMED (EGFP:APS:TEMED=1:250:500, AOx:APS:TEMED=1:4000:8000, n/n/n) 引发反应,并将反应在室温下保持2小时。然后,使反应溶液对PBS透析,以除去反应副产物。

[0089] 带正电荷pAAm-nEGFP (+) 的合成

[0090] 用与pAAm-nEGFP的合成类似的方法完成对带正电荷pAAm-nEGFP (+) 的制备。将摩尔比9:1的AAm和APm的混合物用作包封的单体。将单体与EGFP混合后,EGFP和两种单体的最终摩尔比为1:1800:200 (EGFP:AAm:APm)。在用磷酸盐缓冲液 (50mM, pH 7.0) 将蛋白质浓度调整为1.0mg/mL后,采用APS/TEMED (EGFP:APS:TEMED=1:250:500, n/n/n) 引发聚合步骤,并将反应在室温下保持2小时。然后,使反应溶液对PBS透析,以除去反应副产物。

[0091] 蛋白质纳米胶囊的纯化

[0092] 在透析后,将蛋白质纳米胶囊通过重力穿过柱子以除去未包封的蛋白质。基于不同的物理特性,分别用疏水相互作用柱 (苯基-琼脂糖CL-4B) 和尺寸排阻柱 (琼脂糖-6B) 纯

化基于pMPC的蛋白质纳米胶囊和基于pAAm的蛋白质纳米胶囊。为了纯化pMPC-n蛋白质,通过吸取5mL苯基-琼脂糖CL-4B加入玻璃柱中来制备柱子。在上样前,用2.5M硫酸钠预平衡柱子。首先将pMPC-蛋白质与硫酸钠粉末混合,以得到最终硫酸钠浓度为2.5M。然后,将样品上样至柱子,并用2.5M硫酸钠溶液洗脱。由于pMPC-蛋白质颗粒具有超亲水表面(pMPC),它们与柱子的结合亲和力比天然蛋白质低得多,尤其是在这种高盐浓度条件下(2.5M硫酸钠)。因此,将用2.5M硫酸钠洗脱pMPC包封的蛋白质,而天然蛋白质结合在柱子上。收集含2.5M硫酸钠的洗脱液,并采用离心过滤浓缩。然后将样品对PBS透析以除去硫酸钠,并在4℃保存,用于进一步的研究。

[0093] 采用我们之前描述的方法完成pAAm-n蛋白质的纯化。这通过将样品通过重力穿过琼脂糖-6B柱来完成。通过吸取5mL琼脂糖6B微珠加入玻璃柱来制备琼脂糖柱。然后用PBS预平衡该柱子。在平衡后,将样品上样到柱子中,接着用PBS洗脱。由于琼脂糖-6B的分级范围为10,000-4,000,000Da,所以包封的蛋白质(pAAm-n蛋白质)太大而不能进入琼脂糖微珠的孔中,结果首先在洗脱期间洗脱出。洗脱溶液以每种级分100μL的体积收集,通过将洗脱缓冲液(PBS)用作本底,用UV/Vis测量仪测量每种级分在280nm处的吸光度。收集被包封的蛋白质的级分(第一个A280峰),合并,然后采用离心过滤浓缩。将蛋白质纳米复合物溶液保存在4℃,用于进一步的研究。

[0094] 蛋白质浓度的确定

[0095] 采用BCA微测定法确定蛋白质纳米胶囊的蛋白质浓度,包括pMPC-nOVA、pMPC-nEGFP、pMPC-nEGFP(+)、pAAm-nEGFP、pAAm-nEGFP(+)、pMPC-nHRP、pMPC-nGOx、pMPC-nUOx、pMPC-nAOx、pAAm-nAOx和pMPC-nTf。在测试前,采用以下方案制备两种BCA试剂。通过将0.1g二喹啉甲酸二钠盐合物(BCA)、0.32g碳酸钠、0.01g酒石酸溶解在10mL DI水中,接着用1M NaOH溶液将pH调节至11.25,来制备试剂A。通过将0.2g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 溶解在5mL DI水中来制备试剂B。通过将50体积的试剂A和1体积的试剂B混合在一起来制备BCA工作溶液(BWS)。

[0096] 采用一系列浓度(0.0078125、0.015625、0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5、1mg/mL)的天然蛋白质来建立每种蛋白质的标准曲线。这通过用PBS在384孔板中重复1mg/mL蛋白质溶液的2倍稀释而得到。通过分别向384孔板的每个孔中添加具有不同浓度的10μL天然蛋白质溶液,然后添加10μL的BCA工作溶液(BWS),来进行BCA测定。与此同时,将10μL的蛋白质纳米胶囊溶液也添加到相同板中,然后添加10μL的BWS。接着将板在65℃孵育1小时。采用读板仪读取每个孔在550nm纳米处的吸光度。被包封蛋白质的浓度通过采用其在550nm处的吸光度和同样条件下建立的标准曲线来计算。

[0097] 蛋白质纳米胶囊的TEM和DLS研究

[0098] 通过分别滴涂(drop-coating)2μL pMPC-nEGFP溶液和pMPC-nOVA到碳包覆的铜网格上制备TEM样品。让样品小滴与网格接触45秒,然后用Kimwipes除去过量的样品。然后冲洗网格,并用1%磷钨酸钠在pH 7.0染色。接着再次冲洗网格,然后用kimwipes除去过量的染色剂。真空下干燥网格,用FEI Tecnai T12透射电子显微镜观察。

[0099] 用Malvern Zetasizer Nano仪器完成DLS测量,散射角173'。从DLS获得的粒径总结在图5A-K中。

[0100] pMPC-nHRP、pMPC-nGOx、pMPC-nUOx和pMPC-nAOx的活性测定和稳定性

[0101] 将过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )用作底物,通过监测3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)的氧化率来

确定pMPC-nHRP和天然HRP的活性。简言之,通过用含0.5mM TMB的0.1M醋酸盐缓冲液(pH 5.01)稀释50%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (w/v)来制备浓度为0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.006%、0.008% (w/v)的一系列 $\text{H}_2\text{O}_2$ 储备溶液。在将1mL的底物溶液与1 $\mu\text{L}$ 的pMPC-nHRP (0.1mg/mL)或天然HRP混合后,用UV-Vis光度计监测反应溶液在655nm (A655)处的吸光度3分钟。相对于时间绘制吸收曲线,并计算得自曲线的线性部分的 $\Delta A_{655}/\text{分钟}$ 。用一系列的底物浓度重复该活性测定以得到催化速率,从而通过Lineweaver-Burk曲线获得 $K_M^{\text{app}}$ 和 $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ 。

[0102] 天然G0x、pMPC-nG0x、天然A0x和pMPC-nA0x的活性以类似方法确定。简言之,当将测定溶液与不同浓度的底物一起孵育时,通过分别监测G0x和A0x的TMB氧化速率来确定初始反应速率。对于天然G0x和pMPC-nG0x,通过在0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中混合TMB (0.5mM)、天然HRP (0.001mg/mL)以及不同量的D-葡萄糖(0.005%、0.010%、0.015%、0.020%、0.030%、0.040%, w/v)来制备测定溶液。对于天然A0x和pMPC-nA0x,测定溶液由0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.0)中TMB (0.5mM)、天然HRP (0.001mg/mL)以及不同量的乙醇(0.0025%、0.005%、0.0075%、0.010%、0.020%、0.030%, w/v)构成。通过在1 $\mu\text{L}$ 天然酶或pMPC-n蛋白质(天然G0x和pMPC-nG0x 0.5mg/mL,天然A0x和pMPC-nA0x 1mg/mL)与它们相应的测定溶液孵育期间监测反应溶液的A655,来完成测量。

[0103] 通过在1 $\mu\text{L}$ 天然U0x或pMPC-nU0x (0.714mg/mL)与一系列尿酸盐溶液(pH=8, 0.1M硼酸盐缓冲液,尿酸盐浓度:0.005%、0.010%、0.015%、0.020%、0.030%、0.040%, w/v)孵育期间以UV光度计监测A290下降来确定天然U0x和pMPC-nU0x活性。通过将290nm处的吸光度对时间作图并计算来自曲线的线性部分的 $\Delta A_{290}/\text{分钟}$ 得到初始速率。

[0104] 采用以下程序进行天然A0x和pMPC-nA0x的热稳定性:首先将天然A0x和pMPC-nA0x (1mg/mL, 10mM磷酸盐缓冲液, pH 7.0)的溶液在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一定时间(1-96小时),然后在冰浴上淬火,并恢复到室温。然后用这些样品进行A0x活性测定,以确定天然A0x和pMPC-nA0x的残留活性。

[0105] 采用以下方案进行天然U0x和pMPC-nU0x对蛋白酶的稳定性:让天然U0x和pMPC-nU0x (0.714mg/mL, 10mM硼酸盐缓冲液, pH 8.0, 10mM  $\text{Ca}^{2+}$ )溶液与胰蛋白酶储备溶液(10mg/mL)混合,使最终胰蛋白酶浓度为0.1mg/mL。通过将该储备溶液与体积与胰蛋白酶溶液相同的PBS混合,制备天然U0x和pMPC-nU0x溶液的对照组。这四种溶液的制备在冰浴上进行,以避免活化胰蛋白酶。制备后,让四种溶液在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一定时间段(20-180分钟),然后在冰浴上淬火。然后用这些样品进行U0x活性测定,以确定天然U0x和pMPC-nU0x的残留活性。

[0106] 细胞活力测定

[0107] 通过在U87细胞与不同量的pMPC-n蛋白质(0.01mg/mL、0.05mg/mL、0.10mg/mL、0.20mg/mL)孵育24小时后测量细胞活力,来评估pMPC-n蛋白质(包括pMPC-nEGFP、pMPC-nOVA、pMPC-nU0x和pMPC-nA0x)的毒性。为了更好地比较,也用该相同方法测试天然EGFP、OVA、U0x和A0x的毒性。在暴露于样品前,将U87细胞接种到96孔板( $10^4$ 个细胞/孔, 100 $\mu\text{L}$ /孔)并在DMEM(培养基中葡萄糖正常水平,含10%FBS)中培养一天。在分别添加pMPC-n蛋白质和它们的天然对应物后,将细胞再孵育24小时。孵育后,向每个孔添加CellTiter-Blue (20 $\mu\text{L}$ ),并再孵育3小时。然后将板置于150rpm摇床上5分钟,以充分混合溶液。存活的细胞降低CellTiter Blue,并显示荧光微红色。通过以读板仪测量荧光强度( $E_x=535\text{nm}$ ,  $E_m=585\text{nm}$ )来实现对细胞活力的定量。在数据分析中,将未处理细胞的活力用作100%。



[0108] 具有不同表面的EGFP纳米颗粒的细胞摄取

[0109] 为了评估蛋白质纳米胶囊的表面特性在它们的细胞内化中的影响,我们分别用pAAm和pMPC包封EGFP以得到pAAm-nEGFP (zeta电位 $\zeta = -3.38\text{mV}$ ) 和pMPC-nEGFP (zeta电位 $\zeta = -0.222\text{mV}$ ),还通过在聚合期间引入APm制备了带正电荷的pAAm-nEGFP (+) (zeta电位 $\zeta = +1.27\text{mV}$ ) 和pMPC-nEGFP (+) (zeta电位 $\zeta = +1.08\text{mV}$ )。通过将U87细胞与这些EGFP纳米胶囊一起孵育完成研究。在暴露于样品前,将U87细胞接种到96孔板 ( $10^4$ 个细胞/孔,  $100\mu\text{L}$ /孔) 并在DMEM (培养基中葡萄糖正常水平,含10%FBS) 中培养一天。然后,将EGFP纳米胶囊 (包括pAAm-nEGFP、pAAm-nEGFP (+)、pMPC-nEGFP和pMPC-nEGFP (+)) 添加至细胞 ( $10\mu\text{g}$ /孔) 并在 $37^\circ\text{C}$ 孵育4小时。孵育后,用PBS (1X) 冲洗细胞三次,以除去过量样品和培养基。采用读板仪 (Fujifilm BAS-5000) 读取细胞的荧光强度。在测量荧光之后,用细胞裂解缓冲液裂解细胞,将BSA用作标准品,用BCA测定来确定每个孔的细胞的总蛋白质浓度。然后,将每个孔的荧光强度按对应的蛋白质浓度归一化。采用单向ANOVA后的Tukey事后检验进行所有的统计学分析。 $P < 0.05$ 或更小被认为是显著的。

[0110] 人外周血细胞 (PBMC) 对pMPC-nOVA的内吞

[0111] 首先用若丹明B标记天然OVA和pMPC-nOVA,用于观察和定量。根据UCLA机构审查委员会 (IRB) 批准的协议以及IRB批准的书面同意书,从UCLA艾滋病研究中心 (CFAR) 病毒核心实验室获得人PBMC,无需鉴定信息。在转导前48小时,通过Ficoll从leukopacks分离来自3名供体的PBMC。将半数细胞培养在RPMI培养基、20%FBS、1%GPS (L-谷氨酰胺/青霉素/链霉素) 中以保持静止状态2天,而将另一半在含20单位/ml IL-2和 $25\mu\text{g}/\text{mL}$  PHA的RPMI培养基、20%FBS、1%GPS中刺激2天。将PBMC以 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔的密度铺板到48孔板Opti-MEM培养基中。分别用PBS、天然OVA和pMPC-nOVA转导PBMC 4小时。在FACS缓冲液中洗涤细胞两次,并在含2%甲醛的PBS中固定。在LSRFortessa (BD Biosciences) 上检测荧光强度。通过FlowJo (TreeStar) 软件分析数据。在活细胞门控中,基于FSC-A对FSC-H绘图和FSC-A对SSC-A绘图来分离淋巴细胞群。在淋巴细胞群内进行荧光分析。基于PBS处理的对照样品设置若丹明B阳性门控 (RhB+)。

[0112] pMPC-nA0x在小鼠中的药物动力学研究

[0113] 通过静脉内施用后监测血浆中残留A0x活性,来评估天然A0x、pAAm-nA0x和pMPC-nA0x的药物动力学 (PK) 特征。简言之,将12只小鼠 (C57BL/6) 分为3组,并通过尾静脉分别注射 $100\mu\text{g}$ 的天然A0x、pAAm-nA0x和pMPC-nA0x ( $1\text{mg}/\text{mL}$ )。另外3只小鼠注射 $100\mu\text{L}$  PBS,作为阴性对照。接着,在注射后1小时、2小时、4小时、8小时、24小时和72小时从尾部取血样 ( $20\mu\text{L}$ )。然后将血样以 $20\text{krpm}$ 离心5分钟以除去血细胞,并采用A0x酶活性测定法测量血浆中的A0x活性。通过将 $1\mu\text{L}$ 的血浆与 $100\mu\text{L}$ 测定溶液 ( $0.1\text{M}$ 磷酸盐缓冲液中1%EtOH、 $0.02\text{mg}/\text{mL}$  HRP和 $0.5\text{mM}$  TMB,  $\text{pH} = 7.0$ ) 一起孵育并用读板仪监测 $620\text{nm}$ 处的吸光度,来确定残留A0x活性。接着制备具有不同浓度 ( $0.4688\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.9375\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $1.875\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $3.75\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $7.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的一系列天然A0x储备溶液,并将它们用于建立反应速率和A0x浓度之间的关系。

[0114] 采用双相指数衰减模型通过拟合数据完成对PK数据的分析,约束条件为 $Y_0 < 0.1$  (最大A0x浓度不能高于 $0.1\text{mg}/\text{mL}$ ) 和平台 =  $0.005354$  (来自阴性对照的平均本底值)。采用Graphpad Prism进行所有的数据分析。

[0115] pMPC-nEGFP、pMPC-nBSA、pAAm-nBSA和pAAm-nBSA(+) 在小鼠中的生物分布

[0116] 采用单光子发射计算机断层成像术(SPECT)/X射线计算机断层摄影(CT)图像法评估pMPC-nEGFP、pMPC-nBSA、pAAm-nBSA和pAAm-nBSA(+) 在小鼠中的生物分布。为了够在注射后追踪样品,在注射前用iodogen法以<sup>125</sup>I放射性标记pMPC-nEGFP、pMPC-nBSA、pAAm-nBSA和pAAm-nBSA(+)。然后通过尾静脉分别将样品注射到小鼠(KM),剂量为每只动物100μL(~0.1mg蛋白质)。接着,在施用后3小时、24小时、72小时、120小时和168小时对动物成像。为了成像,首先腹膜内注射100μL的戊巴比妥钠(2.5%)麻醉动物,然后用CT(平均~7分钟)和随后的SPECT扫描(平均~24分钟)成像。CT和SPECT扫描中使用的详细参数描述如下。CT:帧分辨率,256×512;管电压,45kVp;电流,0.15mA;曝光时间,500ms/帧。采用Nucline软件(v1.02,Mediso,Hungary)进行所收集图像的实时3D重建。SPECT:对于高分辨率,具有9针孔板的锥形准直仪;能量峰值,28keV;窗宽,10%;分辨率,1mm/像素;矩阵,256×256;投影,24;扫描时间,60秒/投影。采用HiSPECT(Bioscan,USA)重建三维有序子集期望最大化图像。该重建算法包括四个子集和六阶迭代法,分辨率为0.4mm/像素。

[0117] pMPC-nOVA在小鼠中的免疫原性研究

[0118] 通过在注射pMPC-nOVA后测量小鼠中IgG、IgE、OVA-特异的IgG(OVA-sIgG)和OVA-特异的IgE(OVA-sIgE)来评估pMPC-nOVA的免疫原性。简言之,通过尾静脉分别以PBS(空白对照)、100μg天然OVA(阳性对照)和100μg的pMPC-nOVA(重量表示OVA蛋白质的重量)向3组小鼠(BALB/C,每组5只动物)施用。然后在注射15天后从每只动物取血样。接着离心血样以除去血细胞,并用ELISA测定法确定IgE、IgG、OVA-sIgE、OVA-sIgG的浓度。

[0119] 结论

[0120] 以下结束本发明的优选实施方案的描述。出于阐释和描述的目的,已展示了本发明的一个或多个实施方案的前文描述。无意穷举或将本发明限制为所公开的精确形式。鉴于上述教导,许多修改和变化是可能的。

[0121] 本文引证的所有出版物、专利和专利申请据此通过引用整体并入。

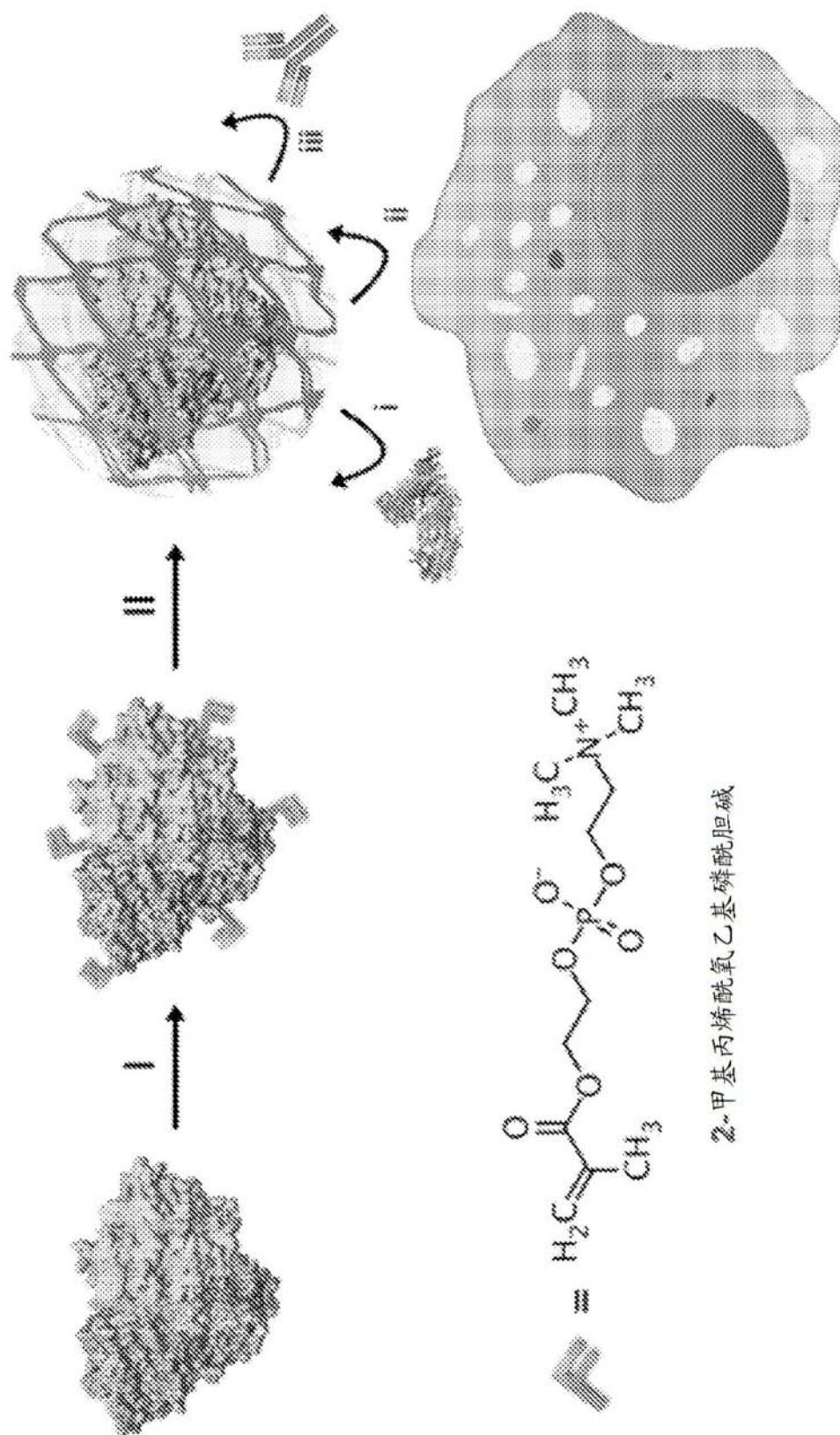


图1

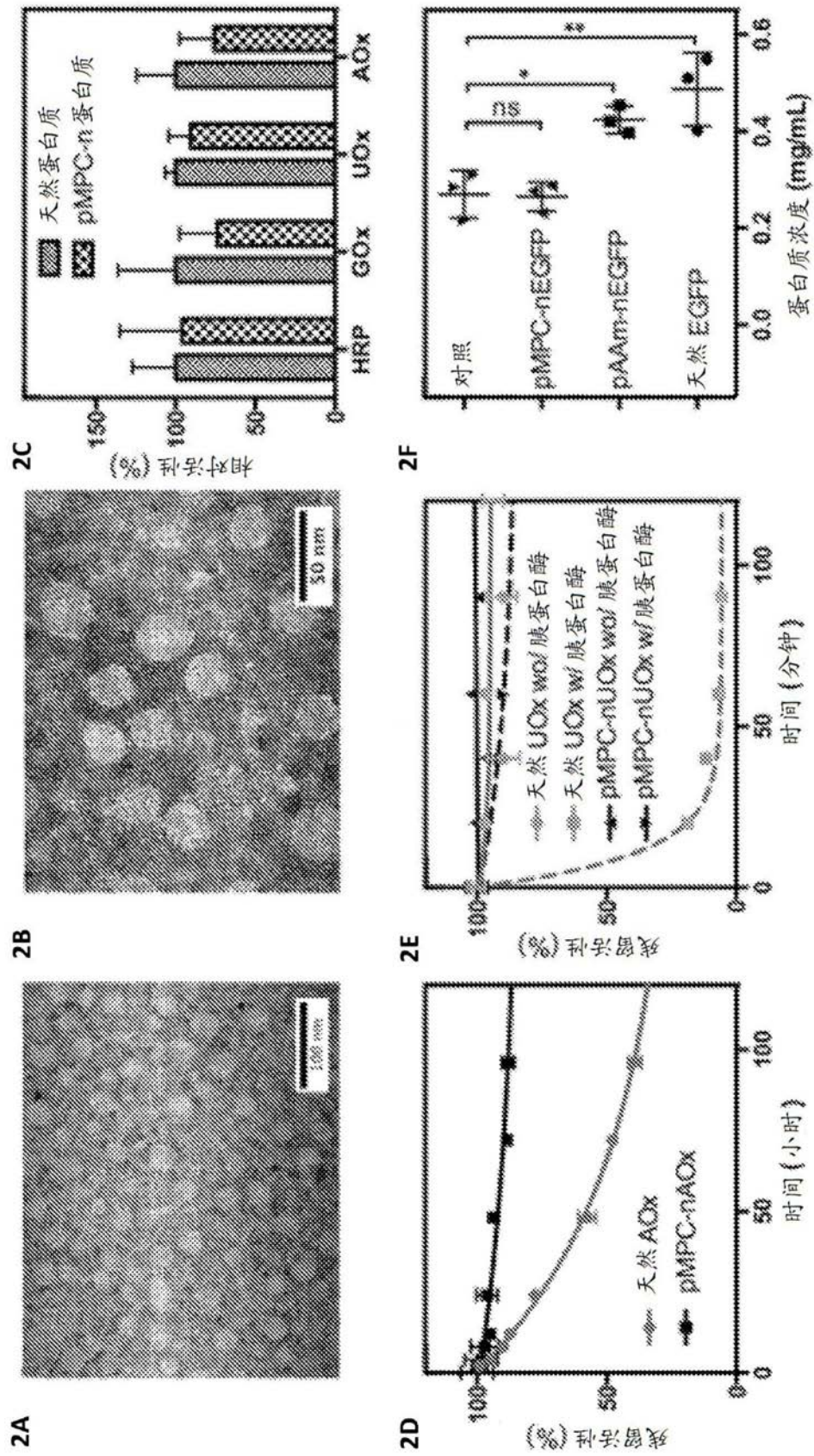


图2A-F



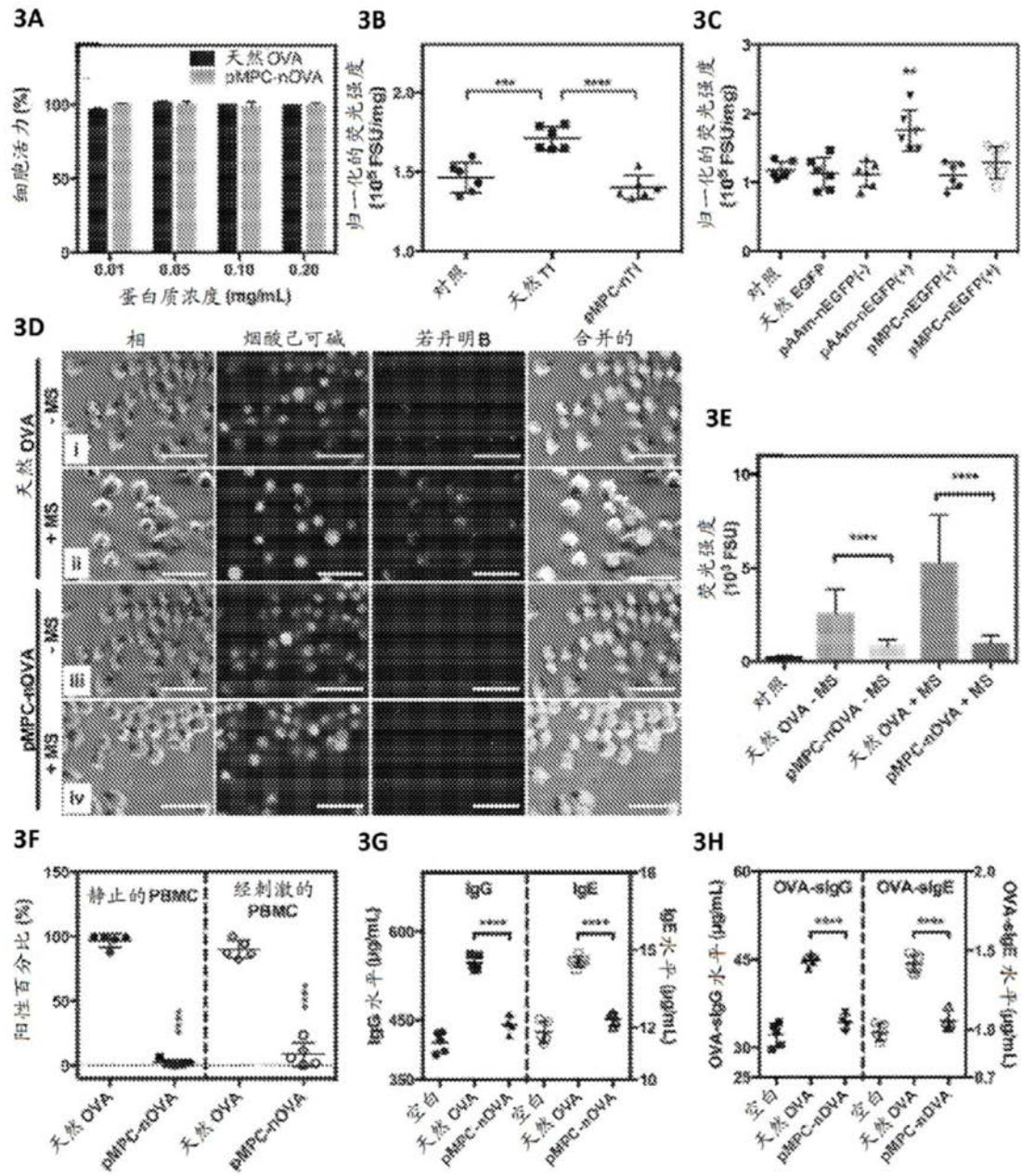


图3A-H

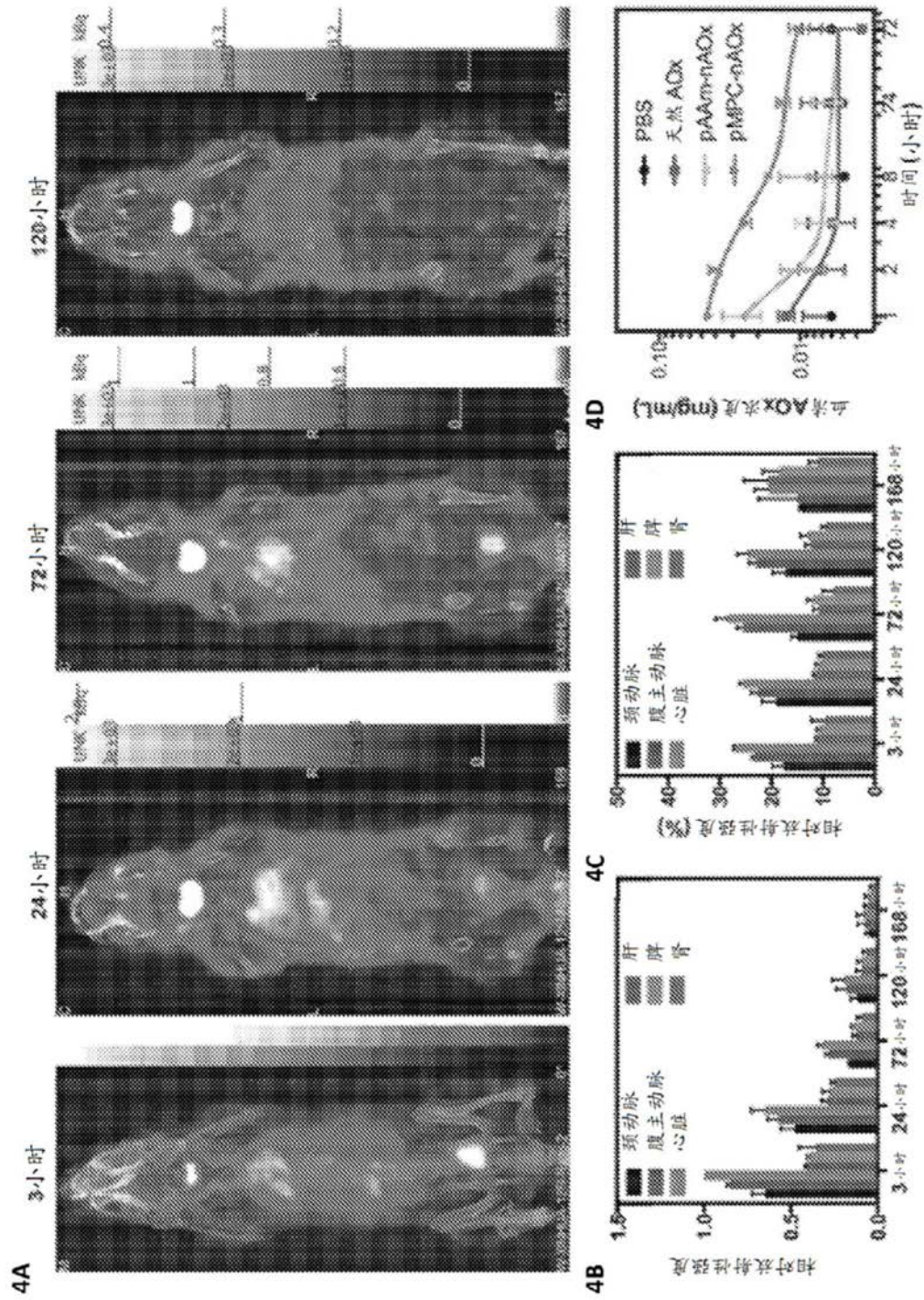


图4A-D



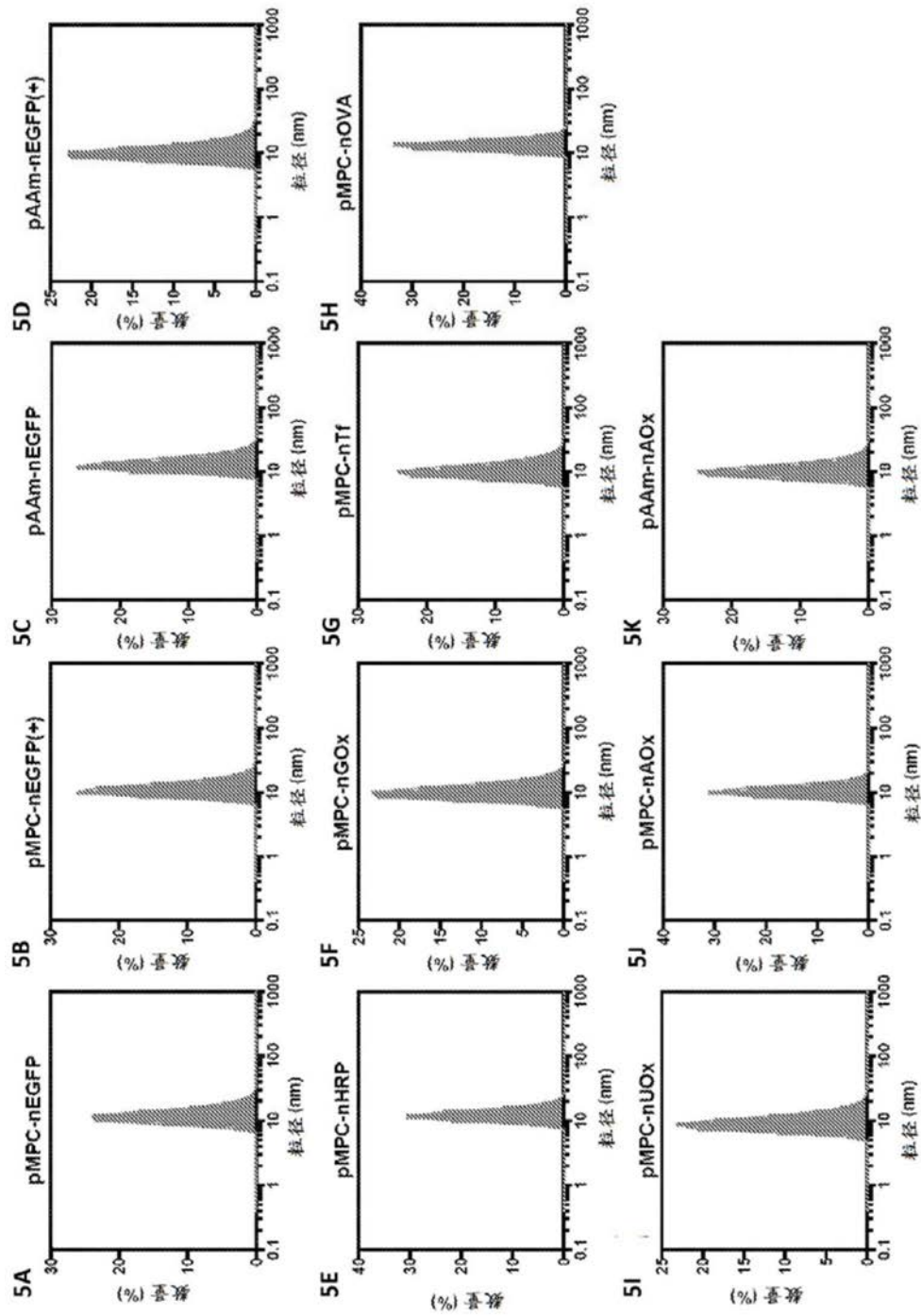


图5A-K

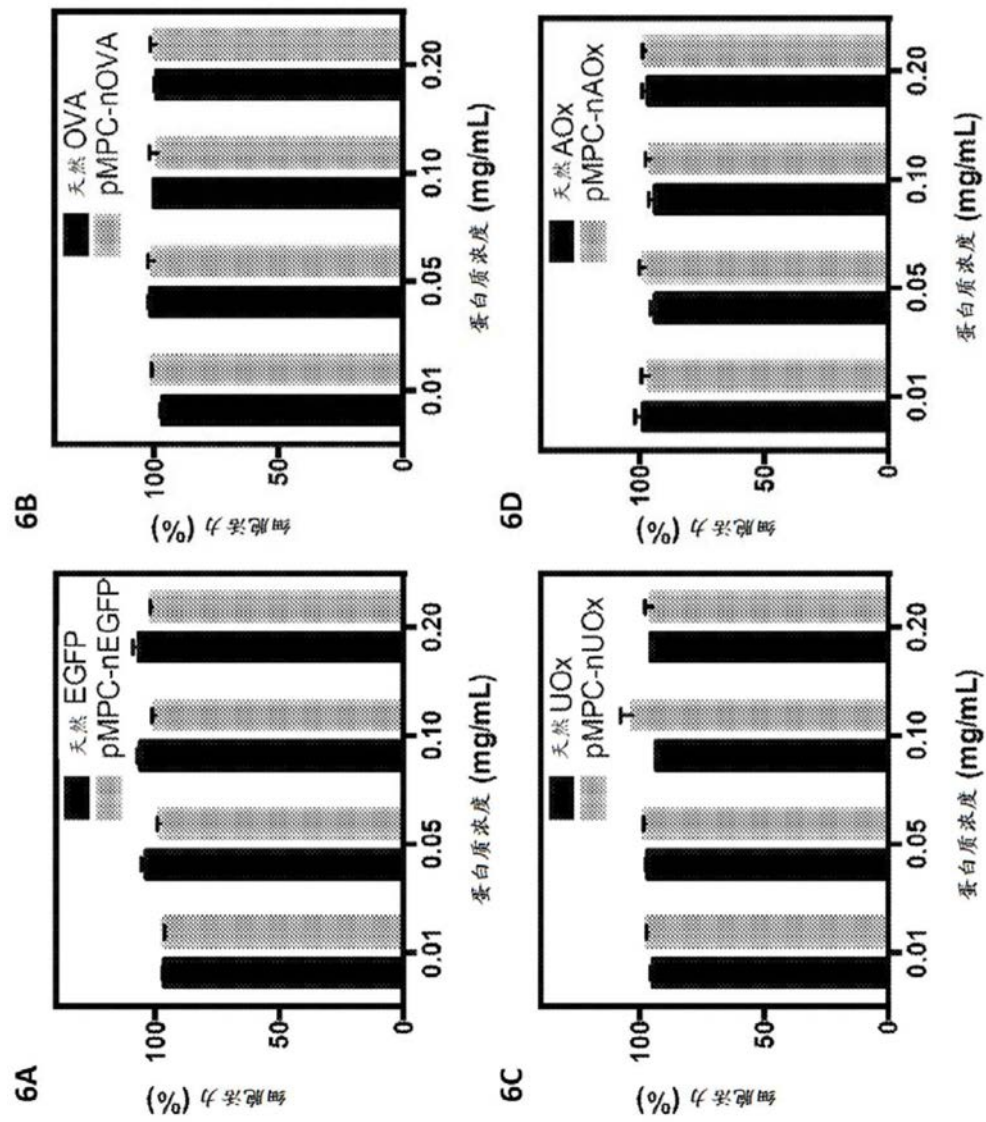


图6A-D



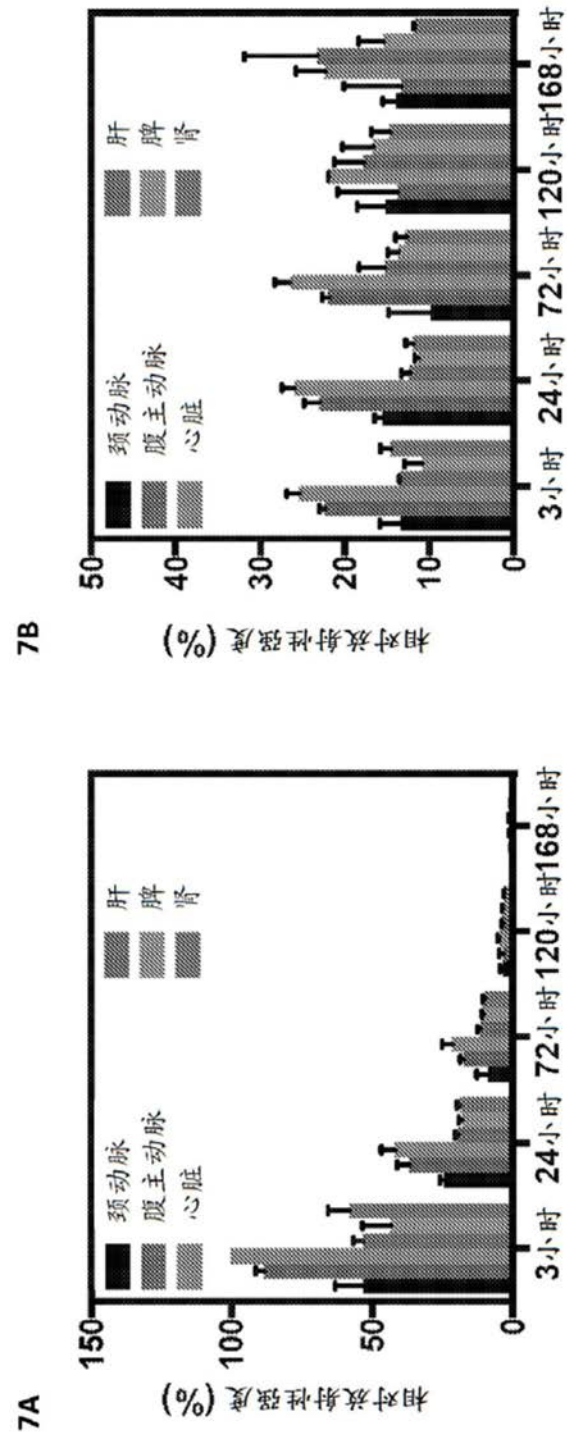


图7A-B