



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115300638 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 21

(21) 申请号 202210815681.1

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.07.12

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 109125740 A, 2019.01.04

申请公布号 CN 115300638 A

CN 112245575 A, 2021.01.22

US 2021330600 A1, 2021.10.28

(43) 申请公布日 2022.11.08

Yingchao Hao et al.. "A tumor

(73) 专利权人 东华大学

microenvironment-responsive poly

地址 201620 上海市松江区人民北路2999号

(amidoamine) dendrimer nanoplatfom for

hypoxia-responsive chemo/chemodynamic

(72) 发明人 史向阳 沈思妍 高悦 欧阳智俊 贾兵洋

therapy". 《Journal of Nanobiotechnology》

.2022, 第20卷卷(第第1期期), 第1-15(43)页.

(74) 专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务所(普通合伙) 31233

Chongyi Liu et al.. "A boronic acid-rich dendrimer with robust and

unprecedented efficiency for cytosolic

protein delivery and CRISPR-Cas9 gene

专利代理师 黄志达

editing". 《Science Advances》.2019, 第第2019

卷卷(第第5期期), 第1-11页.

(51) Int. Cl.

A61K 47/59 (2017.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 41/00 (2020.01)

审查员 彭翠莲

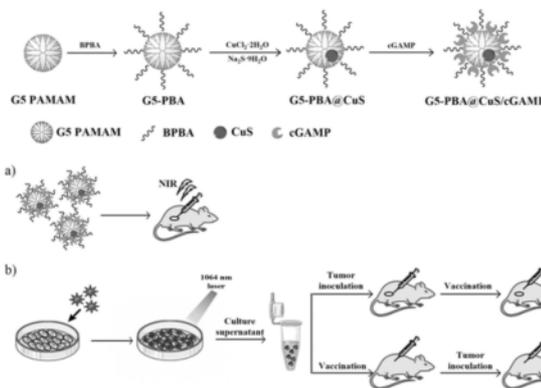
权利要求书1页 说明书14页 附图13页

(54) 发明名称

一种基于树状大分子包裹硫化铜纳米颗粒的肿瘤疫苗及其制备和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种基于树状大分子包裹硫化铜纳米颗粒的肿瘤疫苗及其制备和应用,所述复合材料为纳米载体负载干扰素基因刺激因子激动剂cGAMP;其中纳米载体为表面修饰苯硼酸PBA分子、内部包裹硫化铜纳米颗粒的第五代聚酰胺-胺树状大分子G5.NH₂。本发明操作简单,反应条件温和,易于纯化,所用的合成原料均为环境友好型材料,所开发的纳米疫苗可将光热治疗和免疫治疗两种治疗模式集中在一个纳米平台上用于肿瘤的治疗和预防,具有良好的应用潜力和产业化实施前景。



1. 一种可用于纳米疫苗的苯硼酸修饰树状大分子复合材料,其特征在于,所述复合材料为纳米载体负载干扰素基因刺激因子激动剂cGAMP;其中纳米载体为表面修饰苯硼酸PBA分子、内部包裹硫化铜纳米颗粒的第五代聚酰胺-胺树状大分子G5.NH₂。

2. 一种苯硼酸修饰树状大分子复合材料的制备方法,包括:

(1) 将4-溴甲基苯硼酸BPBA溶液、第五代聚酰胺-胺树状大分子G5.NH₂溶液混合,搅拌反应,透析,冷冻干燥,得到修饰有苯硼酸PBA的第五代聚酰胺-胺PAMAM树状大分子G5-PBA;其中溶液的溶剂均为二甲基亚砷DMSO;所述4-溴甲基苯硼酸BPBA与第五代聚酰胺-胺树状大分子G5.NH₂的摩尔比为40~50:1;所述步骤(1)中搅拌反应温度为70~80℃,搅拌反应时间为24~36小时;

(2) 将G5-PBA的水溶液中加入CuCl₂·2H₂O水溶液搅拌,再加入Na₂S·9H₂O水溶液反应,透析,冷冻干燥,得到修饰有苯硼酸PBA的内部包裹硫化铜纳米颗粒CuS的第五代聚酰胺-胺PAMAM树状大分子G5-PBA@CuS;其中G5-PBA、CuCl₂·2H₂O和Na₂S·9H₂O的摩尔比为1:40~50:40~100;所述搅拌时间为15~30min;反应温度为70~80℃,反应时间为10~20min;

(3) 将G5-PBA@CuS溶液、cGAMP溶液混合,共同孵育,得到苯硼酸修饰树状大分子复合材料G5-PBA@CuS/cGAMP。

3. 根据权利要求2所述制备方法,其特征在于,所述步骤(3)中溶液的溶剂均为PBS溶液;所述共同孵育时间为15~30 min。

4. 根据权利要求2所述制备方法,其特征在于,所述步骤(1)~(2)中透析的条件为:用截留分子量为8000~14000的透析袋透析2~3天。

5. 一种纳米疫苗,其特征在于,权利要求1所述苯硼酸修饰树状大分子复合材料吸附肿瘤抗原形成疫苗。

6. 一种纳米疫苗的制备方法,包括:

收集对数生长期的B16-F10细胞,按照 $8 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞每孔的密度接种在培养皿上,于37℃、5% CO₂环境中培养12~24 h;

待B16-F10细胞贴壁后更换含权利要求1所述苯硼酸修饰树状大分子复合材料G5-PBA@CuS/cGAMP的无血清DMEM培养基,使用1064 nm激光照射5~8 min,48~60 h后离心收集细胞悬液,用截留分子量为100 kD的超滤离心管进行分离,收集离心管下方的悬液,即得纳米疫苗。

7. 根据权利要求6所述制备方法,其特征在于,所述离心条件为:8000~10000 r/min,离心时间为5~8分钟。

8. 一种权利要求5所述纳米疫苗在制备黑色素瘤的光热/免疫联合治疗药物中的应用。

一种基于树状大分子包裹硫化铜纳米颗粒的肿瘤疫苗及其制备和应用

技术领域

[0001] 本发明属于功能性纳米材料领域,特别涉及一种基于树状大分子包裹硫化铜纳米颗粒的肿瘤疫苗及其制备和应用。

背景技术

[0002] 免疫治疗逐渐成为应对恶性肿瘤的一大重要手段,其通过激活机体免疫系统,识别并杀死特定的肿瘤细胞,能够产生免疫记忆效应,具有更为持久的疗效,包括免疫检查点阻断、嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T)、T细胞受体工程化T细胞疗法(TCR-T)等在内的免疫疗法已取得巨大成功。近年来,肿瘤疫苗作为免疫疗法的新兴成员,引发了广泛关注。肿瘤疫苗一般是将特异性且具有免疫原性的肿瘤抗原辅以激活性免疫佐剂一起导入患者和体内,激活或加强机体的抗肿瘤免疫反应,进而杀伤和清除肿瘤细胞,并对肿瘤的发生进行预防。然而,目前传统的肿瘤疫苗存在抗原/佐剂包载效率低、淋巴结回流能力较差、体内利用率低和功能单一化等缺点,导致疗效不佳。随着纳米技术的快速发展,基于各类生物材料的纳米载体已经成为肿瘤治疗的强大平台,将纳米载体应用于肿瘤疫苗的开发有望为上述问题提供解决方案。纳米载体可以通过静电相互作用、疏水相互作用、共价结合作用等多种方式实现对抗原和佐剂的高效包载。同时,纳米载体易于多功能化,有助于实现不同治疗方式与免疫治疗的联合,克服单一肿瘤治疗模式存在的缺点。

[0003] 在众多的纳米载体材料中,树状大分子具有高度支化、结构稳定可控,表面高官能度,低细胞毒性、无免疫原性等优势和特点,是优良的载体基材。其中,特别表面具有丰富氨基的聚酰胺-胺(PAMAM)树状大分子,已被广泛应用于肿瘤的治疗和诊断研究中。PAMAM树状大分子是表面呈正电荷阳离子型多聚物,因而在构建肿瘤疫苗上具有潜力,一方面其能与表现为负电荷的抗原及免疫佐剂产生良好相互作用,另外蛋白质上的羧酸阴离子可以通过离子相互作用与阳离子有效结合。通过特定的功能化修饰或杂化过程,可以进一步加强PAMAM树状大分子与生物物质的相互作用力。

[0004] 目前,检索国内外相关文献和专利,未见基于树状大分子包裹硫化铜纳米颗粒的肿瘤疫苗的相关研究报道。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种基于树状大分子包裹硫化铜纳米颗粒的肿瘤疫苗及其制备和应用,以填补现有技术的空白。

[0006] 本发明的一种苯硼酸修饰树状大分子复合材料,所述复合材料为纳米载体负载干扰素基因刺激因子(STING)激动剂cGAMP;其中纳米载体为表面修饰苯硼酸PBA分子、内部包裹硫化铜纳米颗粒的第五代聚酰胺-胺树状大分子G5.NH₂。

[0007] 本发明提供一种苯硼酸修饰树状大分子复合材料的制备方法,包括:

[0008] (1) 将4-溴甲基苯硼酸BPBA溶液、第五代聚酰胺-胺树状大分子G5.NH₂溶液混合,

搅拌反应,透析,冷冻干燥,得到修饰有苯硼酸PBA的第五代聚酰胺-胺PAMAM树状大分子G5-PBA;

[0009] (2) 将G5-PBA的水溶液中加入 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 水溶液搅拌,再加入 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 水溶液反应,透析,冷冻干燥,得到修饰有苯硼酸PBA的内部包裹硫化铜纳米颗粒CuS的第五代聚酰胺-胺PAMAM树状大分子G5-PBA@CuS;

[0010] (3) 将G5-PBA@CuS溶液、cGAMP溶液混合,共同孵育,得到苯硼酸修饰树状大分子复合材料G5-PBA@CuS/cGAMP。

[0011] 上述制备方法的优选方式如下:

[0012] 所述步骤(1)中溶液的溶剂均为二甲基亚砜DMSO;所述4-溴甲基苯硼酸BPBA与第五代聚酰胺-胺树状大分子G5.NH₂的摩尔比为40~50:1;所述步骤(1)中搅拌反应温度为70~80℃,搅拌反应时间为24~36小时。

[0013] 所述步骤(2)中G5-PBA、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 的摩尔比为1:40~50:40~100;所述步骤(2)中搅拌时间为15~30min;反应温度为70~80℃,反应时间为10~20min。

[0014] 所述步骤(3)中溶液的溶剂均为PBS溶液;所述共同孵育时间为15~30min。

[0015] 所述步骤(1)~(2)中透析的条件为:用截留分子量为8000~14000的透析袋透析2~3天。

[0016] 本发明提供一种纳米疫苗,所述苯硼酸修饰树状大分子复合材料吸附肿瘤抗原形成疫苗。

[0017] 本发明提供一种纳米疫苗的制备方法,包括:

[0018] 收集对数生长期的B16-F10细胞,按照 $8 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞每孔的密度接种在培养皿上,于37℃、5%CO₂环境中培养12~24h;

[0019] 待B16-F10细胞贴壁后更换含权利要求1所述苯硼酸修饰树状大分子复合材料G5-PBA@CuS/cGAMP的无血清DMEM培养基,使用1064nm激光照射5~8min,48~60h后离心收集细胞悬液,用截留分子量为100kD的超滤离心管进行分离,收集离心管下方的悬液,即得纳米疫苗。

[0020] 所述离心条件为:8000~10000r/min,离心时间为5~8分钟。

[0021] 本发明的一种所述纳米疫苗在制备黑色素瘤的光热/免疫联合治疗药物中的应用。

[0022] 本发明操作简单,反应条件温和,易于纯化,所用的合成原料均为环境友好型材料,所开发的纳米疫苗可将光热治疗和免疫治疗两种治疗模式集中在一个纳米平台上用于肿瘤的治疗和预防,具有良好的应用潜力和产业化实施前景。

[0023] 本发明基于第五代PAMAM树状大分子为基材,表面修饰PBA分子,内部包裹硫化铜纳米颗粒构建纳米载体,最后静电吸附cGAMP,形成复合物,进行体外纳米疫苗和光热诱导肿瘤原位疫苗的构建和应用研究。

[0024] 本发明使用核磁共振氢谱(¹H NMR)、紫外可见吸收光谱(UV-Vis)、电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-OES)、动态光散射(DLS)和透射电镜(TEM)测试等方法表征制备得到的纳米载体,并评价了该材料作为光热治疗试剂在近红外激光(1064nm)照射下的升温效果。然后以牛血清白蛋白(BSA)模拟抗原进行体外蛋白吸附试验评价了载体的蛋白吸附性能,通过CCK8法来评价纳米载体的细胞毒性,利用BCA试剂盒评价该纳米材料的体外抗原

吸附能力,再利用ICP-OES评价该材料的细胞吞噬情况,利用流式细胞仪来评价该材料的细胞凋亡情况。吸附cGAMP免疫佐剂后,利用激光共聚焦显微镜和相应的检测试剂盒评价了所得复合物引起肿瘤细胞免疫原性死亡的效果。最后在小鼠体内评价纳米疫苗介导的肿瘤治疗效果和肿瘤预防效果。具体测试结果如下:

[0025] (1) ^1H NMR表征

[0026] 氢谱分析结果如图2所示,图2a为G5-PBA氢谱图,7.0-8.0ppm处是PBA分子的特征峰,2.2-3.4ppm处是G5的亚甲基特征峰,经积分可得每个G5上修饰了36.2个PBA基团。图2b为对照材料(乙酰化修饰的G5,即G5-NHAc)的氢谱图,1.8ppm处是乙酰基的特征峰,2.2-3.4ppm处是G5的亚甲基特征峰,经积分可得每个G5上修饰了35.9个乙酰基。对照材料的乙酰化修饰度与G5-PBA材料的PBA修饰度相近。

[0027] (2) UV-Vis测试结果

[0028] UV-Vis测试结果如图3所示,分析结果可知,硫化铜纳米颗粒在1000nm左右有吸收峰,此结果说明成功合成了在近红外II区具有独特吸收峰的纳米硫化铜颗粒。

[0029] (3) TEM测试

[0030] TEM测试结果如图4所示,分析G5-PBA@CuS(图4a)和G5-NHAc@CuS(图4b)结果可知,载体材料G5-PBA@CuS和对照材料G5-NHAc@CuS的CuS内核尺寸均一、分散性良好,平均粒径分别为3.6nm和3.7nm。

[0031] (4) 体外光热升温效果实验

[0032] 材料光热转换性能测试结果如图5所示,与对照组(超纯水组)相比,实施例1中G5-PBA@CuS(图5a)和G5-NHAc@CuS(图5c)在Cu浓度0.3到1.5mM范围内,G5-PBA@CuS(图5a)和G5-NHAc@CuS(图5b)表现出优异的光热转换能力,随着光照时间的延长,G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS水溶液的温度明显升高,而且升温效果随着浓度的增加而提高。在照射五分钟后,G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS([Cu]=1.5mM)水溶液温度分别达到了67.2°C和69.7°C。通过计算单个循环升温降温曲线,可得G5-PBA@CuS(图5b)和G5-NHAc@CuS(图5d)光热转换效率分别达到44.0%和45.1%,说明CuS纳米颗粒具有良好的光热转换性能。

[0033] (5) 体外蛋白吸附实验

[0034] 以BSA模拟肿瘤抗原,通过将实施例1中制备的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS进行蛋白吸附实验测试,测定材料蛋白吸附的效果。BSA在278nm处有吸收峰。称取实施1中制备的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS各3mg,配置成浓度为1.5mg/mL的PBS溶液,并梯度稀释。称取BSA 2mg,配置成1mg/mL的PBS溶液。吸取0.5mL的BSA溶液分别加入配置好的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS的溶液中,充分混匀后,分别测试其在278nm处的紫外吸收值。将混合溶液放置于37°C培养箱中孵育4h后,8000rpm离心5min,然后去除沉淀,再次测量其在278nm处的紫外吸收值。将G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS所对应的孵育离心前后紫外吸收值相减即得紫外吸收差值。从图6可以看出,在最高浓度时,G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS的紫外吸收差值分别为1.09和0.03,相比之下,经过PBA修饰的材料能够很好地吸附蛋白。

[0035] (6) cGAMP吸附实验

[0036] cGAMP在260nm波长处有特征紫外吸收峰。按照不同的G5-PBA@CuS与cGAMP质量比,将cGAMP加入到G5-PBA@CuS溶液中,孵育20min后离心,收集上清液,然后用紫外吸收光谱仪,测定其在260nm处的紫外吸收值,通过与free cGAMP的标准曲线对比计算cGAMP的包封

率和上载率。结果如表1所示,所得纳米颗粒表面均带正电荷,有利于与肿瘤细胞的相互作用。由于强静电吸附,G5-PBA@CuS/cGAMP表现出较高的包封率。

[0037] (7) CCK8细胞毒性实验

[0038] 使用B16-F10小鼠黑色素瘤细胞进行实验。如图7所示,与对照组(PBS组)相比,实施例1中的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS在Cu浓度0.1-0.8mM范围内,对B16-F10细胞活力没有产生明显影响,细胞活力均保持在85%以上,在达到最高浓度0.8mM时,B16-F10经材料G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS处理后的细胞活力分别为87.8%和88.9%,这充分说明实施例1中合成的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS具有良好的细胞相容性。

[0039] 将B16-F10细胞分为两组(一组细胞在1064nm激光下照射5min,另一组细胞不予激光照射),接着用PBS清洗3次,每孔加90 μ L的无血清(FBS)培养基和10 μ L的CCK8溶液,继续在37 $^{\circ}$ C培养箱中培养,4小时后在450nm处测吸光值,并根据此值计算细胞活力。结果如图8所示,与PBS组相比,实施例1中的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS在Cu浓度0.1-0.8mM范围内,未经过1064nm激光照射的细胞均保持较高的细胞活力;而激光照射组随着Cu浓度的增加,细胞活力逐渐降低,表明2个材料对B16-F10细胞均具有很好的光热消融效果。当材料的Cu浓度达到0.8mM时,G5-PBA@CuS+激光照射组的细胞活力为31.1%,而G5-NHAc@CuS+激光照射组的细胞活力为34.9%。

[0040] (8) 细胞吞噬实验

[0041] 收集对数生长期的B16-F10细胞,按照 1×10^5 个细胞每孔的密度接种在12孔板上,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境中培养12小时,待细胞贴壁后,更换新鲜的含G5-PBA@CuS或G5-NHAc@CuS(Cu浓度为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8mM)的培养基,与细胞共同孵育6小时,弃掉原培养基,用PBS洗三遍,胰酶消化收集孔内细胞,离心去上清液,用1mL王水消化24小时。最后再向每个样品中加入3mL超纯水并对混合溶液中的Cu进行ICP-OES检测(如图9所示)。由于PBA具有靶向肿瘤细胞表面唾液酸的作用,在Cu浓度范围内,与G5-NHAc@CuS相比,G5-PBA@CuS能更好地被B16F10细胞所吞噬。

[0042] (9) 抗原吸附实验

[0043] 收集对数生长期的B16-F10细胞,按照 1×10^6 个细胞每孔的密度接种在6孔板上,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境中培养12小时,待细胞贴壁后更换含材料G5-PBA@CuS或G5-NHAc@CuS(Cu浓度为0.1、0.2、0.4、0.8mM)的DMEM培养基,以PBS组作为对照,光照组使用1064nm激光(功率0.6W/cm²)照射5min。48h后离心收集细胞悬液,用BCA试剂盒测定细胞悬液中的总蛋白浓度。细胞悬液用截留分子量为100kD的超滤离心管进行分离,收集离心管下方的细胞悬液,继续使用BCA试剂盒测定其蛋白浓度,两次数据的差值则为吸附在材料上的蛋白量(如图10所示)。通过纳米粒度分析仪(DLS)验证材料吸附肿瘤相关抗原前后的粒径和电势的变化(如表2所示)。实验结果表明,孵育前后二者的粒径和电位均发生了改变,意味着材料成功捕获了肿瘤细胞抗原。通过BCA对吸附抗原的定量发现,G5-PBA@CuS纳米载体吸附抗原的能力远高于对照载体材料G5-NHAc@CuS。

[0044] (10) 体外免疫原性死亡(ICD)效应评价

[0045] 以 2×10^5 /孔的密度将B16-F10细胞种于激光共聚焦专用培养皿中,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培养过夜。替换含有G5-PBA@CuS或G5-PBA@CuS/cGAMP的新鲜培养基(cGAMP终浓度为1 μ g/mL)孵育6小时,光照组使用1064nm激光(功率0.6W/cm²)照射5min。用预冷的PBS洗涤3次。

每个孔中加入2.5%多聚甲醛固定15分钟。用PBS洗3次,加入免疫染色封闭液,封闭60分钟后,加入稀释后的兔抗鼠钙网蛋白(CRT)一抗孵育1小时,洗涤3次。随后加入稀释后的二抗,室温孵育1小时后,洗涤5分钟,共洗涤3次。加入DAPI染细胞核3分钟,PBS洗涤3次。用激光共聚焦扫描显微镜观察细胞中CRT外翻情况。如图11a所示,在PBS对照组的癌细胞中几乎检测不到CRT的荧光,这是由于在正常状态下CRT表达在细胞内质网中。纯载体材料G5-PBA@CuS在无光照条件下对癌细胞CRT的表达几乎无影响。相反,经G5-PBA@CuS或G5-PBA@CuS/cGAMP复合物处理的B16-F10细胞,激光照射处理后,其表面有明显的CRT的荧光信号;与G5-PBA@CuS组相比,G5-PBA@CuS/cGAMP复合物则展现出更强的CRT的荧光强度。

[0046] 以 1×10^5 /孔的密度将B16-F10细胞种于24孔板中,于37℃、5%CO₂培养过夜。替换含有G5-PBA@CuS或G5-PBA@CuS/cGAMP的新鲜培养基(cGAMP终浓度为1μg/mL)孵育24小时,光照组使用1064nm激光(功率0.6W/cm²)照射5min。取细胞上层培养液,在96孔板中加入100μL三磷酸腺苷(ATP)检测工作液,放置3-5分钟后在孔中加入20μL培养液样品,混匀后通过多功能酶标仪测定胞外ATP含量。如图11b所示,发现G5-PBA@CuS+激光照射组和G5-PBA@CuS/cGAMP+激光照射组的胞外ATP释放量显著高于其它组,释放的ATP将有利于促进树突细胞对凋亡肿瘤细胞的吞噬作用,加强抗肿瘤免疫响应。G5-PBA@CuS/cGAMP+激光照射组与不含cGAMP组相比,具有更高的胞外ATP释放量。同时,收集细胞培养液,参照HMGB-1的ELISA试剂盒的操作步骤检测高迁移率族蛋白-1(HMGB-1)的含量,如图11c所示,G5-PBA@CuS/cGAMP+激光照射组细胞培养液中的HMGB-1含量显著高于其它组,释放的HMGB-1可促进肿瘤抗原提呈给T细胞。很明显,在相同条件下,cGAMP的加入产生了更强的癌细胞免疫原性,主要是由于cGAMP的加入,进一步激活cGAS-STING通路,降低抗凋亡蛋白Bcl2的表达,并上调促凋亡蛋白Bax的表达,促进癌细胞凋亡。

[0047] (11)体外免疫效应评价

[0048] 收集对数生长期的B16-F10细胞,按照每孔 2×10^5 个细胞的密度种在Transwell1孔板的上室中。待细胞贴壁生长后,加入含G5-PBA@CuS或G5-PBA@CuS/cGAMP的培养液培养,cGAMP的浓度为1μg/mL。24小时后,将孔板中的溶液倒干净,并用1mL无菌的PBS溶液清洗每个孔3次,之后向每个孔中加入1mL新鲜培养基。随后将上室细胞转移到以 1×10^5 个树突细胞(DC)的密度接种的下室中共孵育。同时,对上室B16-F10细胞进行1064nm激光照射处理(0.6W/cm²,5min)。之后将上室癌细胞与下室的DC细胞共孵育24h。培养结束后,将DC细胞取出,消化,离心,加入PBS重悬细胞,根据抗体标记说明书分别对提取的DC细胞进行CD80、CD86荧光抗体的标记,在4℃条件下避光标记15-20min。在标记结束后,PBS洗涤三次除去过量未结合的抗体。将DC细胞重悬于400μL的PBS中并转移到流式管中,通过流式细胞仪分别检测CD80、CD86的荧光强度。结果如图12所示,DC表面的活化标志物CD80和CD86表达上调,说明凋亡的肿瘤细胞可促进树突细胞活化。与G5-PBA@CuS+Laser(光照)组相比,G5-PBA@CuS/cGAMP+Laser(光照)组活化程度最高,进一步表明cGAMP的加入有助于提升癌细胞的免疫原性。

[0049] (12)体内抗肿瘤效果评价

[0050] 实验用的4周雌性C57BL/6小鼠购自上海斯莱克实验动物中心(中国,上海)。将 1×10^6 个B16-F10细胞接种到小鼠的右腿,待肿瘤体积达到约50-80mm³左右时,将小鼠随机分为5组(每组6只),随后通过瘤内注射的方式向每只小鼠注射100μLPBS溶液:第一组PBS

(对照组),第二组G5-PBA@CuS(载体组),第三组G5-PBA@CuS并用激光照射5min(载体+光照组),第四组G5-PBA@CuS/cGAMP(载体/免疫佐剂复合物组),第五组G5-PBA@CuS/cGAMP并用激光照射5min(载体/免疫佐剂复合物+光照组)。之后,记录14天内小鼠的肿瘤体积和小鼠体重。实验结果如图13所示,对照组和载体组小鼠肿瘤随着时间迅速增长,载体/免疫佐剂复合物和载体+光照组肿瘤生长受到了一定的抑制,而载体/免疫佐剂复合物+光照组治疗的小鼠肿瘤生长明显得到抑制。实验结果证明本发明中合成的G5-PBA@CuS/cGAMP复合物能应用于小鼠体内的肿瘤治疗,明显抑制肿瘤生长。

[0051] 治疗后14天,刨取小鼠肿瘤,进行H&E、TUNEL和Ki-67染色观察肿瘤组织的坏死、凋亡和增殖情况。结果如图14所示,H&E、TUNEL和Ki-67染色结果表明,G5-PBA@CuS/cGAMP+光热组在各组中,能够产生最大程度的肿瘤细胞的坏死、凋亡和增殖抑制。同时我们对主要组织器官进行H&E染色,结果如图15所示,各组织中的细胞形态与对照组中细胞形态无异,材料的注射以及光照并未对正常组织器官产生明显毒副作用。

[0052] (14)原位疫苗的构建和体内抗肿瘤效果评价

[0053] 将 1×10^6 个B16-F10细胞接种到小鼠的右腿,将 5×10^5 个B16-F10细胞接种到小鼠的左腿,待小鼠右腿肿瘤体积达到约 $50-80\text{mm}^3$ 左右时,将小鼠随机分为3组(每组6只),随后通过瘤内注射的方式向每只小鼠右腿注射 $100\mu\text{L}$ PBS溶液:第一组PBS(对照组),第二组G5-PBA@CuS并用激光照射5min(载体+光照组),第三组G5-PBA@CuS/cGAMP并用激光照射5min(载体/免疫佐剂复合物+光照组)。之后,记录14天内小鼠远端的肿瘤体积和小鼠体重。实验结果如图16所示,首先各组处理小鼠后,没有对小鼠的体重产生明显的影响,证明制备的载体或载体/免疫佐剂复合物没有明显的生物毒性(图16a)。如图16b所示,对照组小鼠远端肿瘤随着时间迅速增长,载体+光照组和载体/免疫佐剂复合物+光照组肿瘤生长受到了一定的抑制。其中,载体/免疫佐剂复合物+光照组的治疗小鼠获得了最高的抗肿瘤活性。实验结果证明本发明中合成的G5-PBA@CuS/cGAMP可在小鼠体内形成原位疫苗,实现体内的远端抗肿瘤治疗应用。

[0054] (15)体外疫苗的构建和体内抗肿瘤及肿瘤预防效果评价

[0055] 首先进行疫苗的肿瘤治疗效果评价,通过收集体外B16-F10细胞经光热处理后获得的吸附癌细胞抗原形成的复合物悬液,构建体外疫苗。将 1×10^6 个B16-F10细胞接种到小鼠的右腿,待小鼠肿瘤体积达到约 $50-80\text{mm}^3$ 左右时,将小鼠随机分为2组(每组6只),随后通过瘤内注射的方式分别在第0、4、7天向每只小鼠注射 $100\mu\text{L}$ PBS溶液:第一组PBS,第二组注射体外构建的疫苗,即G5-PBA@CuS/cGAMP-抗原复合物。之后,记录20天内小鼠的肿瘤体积和小鼠体重。实验结果如图17所示,纳米疫苗的处理没有引起小鼠体重的明显变化,这说明疫苗本身具有很好的生物相容性(图17a);PBS组小鼠肿瘤随着时间迅速增长,而疫苗组肿瘤生长则受到了明显的抑制(图17b)。

[0056] 取疫苗治疗第14天的PBS组和疫苗瘤内注射组小鼠各一只,无菌条件下取出其脾脏组织,剪碎研磨经400目滤网过滤,得到细胞悬液,通过尼龙毛柱获取T淋巴细胞悬液,将上述获取的T细胞分别用anti-CD4与anti-CD8抗体进行标记,通过流式细胞仪对脾脏组织中 CD4^+ T细胞与 CD8^+ T细胞进行定量分析。结果如图18所示,经过疫苗瘤内注射治疗后的小鼠的脾脏浸润性 CD4^+ T与 CD8^+ T细胞含量明显高于PBS组,说明疫苗可以有效促进T细胞的免疫应答。

[0057] 随后通过腹腔注射和肌肉注射两种方式研究疫苗的肿瘤预防效果。将小鼠随机分为3组(每组6只),分别在第0、4、7天向每只小鼠注射100 μ L PBS溶液:第一组腹腔注射PBS,第二组腹腔注射纳米疫苗,第三组肌肉注射纳米疫苗。在第7天将 1×10^6 个B16-F10细胞接种到小鼠的右腿,记录26天内小鼠的肿瘤体积和小鼠体重。实验结果如图18所示,和PBS对照组相比,腹腔和肌肉注射纳米疫苗都不会对小鼠的体重变化产生明显的影响(图19a)。如图19b所示,PBS组小鼠肿瘤在接种第6天后开始增长,并随着时间迅速增长,肌肉疫苗组肿瘤在第10天后开始增长,而腹腔疫苗组在接种第16天后才开始有小鼠长出肿瘤,且肿瘤生长受到明显的抑制。实验结果证明该疫苗可有效预防体内肿瘤的生长,腹腔注射疫苗的效果明显优于肌肉注射疫苗,这可能是由于腹腔注射疫苗可以更有效且快速的激起小鼠体内的全身抗肿瘤免疫反应。

[0058] 取疫苗治疗第20天的PBS组、腹腔注射疫苗组和肌肉注射疫苗组小鼠各一只,无菌条件下取出其脾脏组织,剪碎研磨经400目滤网过滤,得到细胞悬液,通过尼龙毛柱获取T淋巴细胞悬液,将上述获取的T细胞分别用anti-CD4与anti-CD8抗体进行标记,通过流式细胞仪对脾脏组织中CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞进行定量分析。如图20所示,疫苗注射对于肿瘤的预防有一定的效果,且腹腔注射的效果优于肌肉注射,其脾脏浸润性CD4⁺T与CD8⁺T细胞含量也明显高于其他组。

[0059] 有益效果

[0060] (1)本发明操作简单,反应条件温和,易于纯化,具有产业化实施前景;

[0061] (2)本发明制备的PBA修饰树状大分子包裹的纳米硫化铜颗粒载体材料具有良好的水溶性和生物相容性。

[0062] (3)本发明的载体材料联合免疫佐剂可以把光热治疗和免疫治疗两种治疗模式集中在一个纳米平台上,增强了对癌细胞和肿瘤的治疗效果,为联合治疗提供一种新方法,具有良好的应用潜力;

[0063] (4)本发明的纳米载体能够构建原位和体外疫苗应用于肿瘤治疗和预防,具有良好的应用潜力。

附图说明

[0064] 图1为本发明PBA修饰树状大分子包裹硫化铜纳米颗粒/cGAMP复合物的合成流程和应用示意图。

[0065] 图2为本发明制备的G5-PBA(a)和G5-NHAc(b)的¹H NMR图谱。

[0066] 图3为本发明制备的G5-PBA@CuS在不同浓度下的UV-Vis图谱。

[0067] 图4为本发明制备的G5-PBA@CuS(a)和G5-NHAc@CuS(b)高分辨TEM图片以及对应的粒径分布图。

[0068] 图5为本发明制备的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS的光热升温曲线(a,c)和单个升降温循环曲线图(b,d),其中(a)、(b)为G5-PBA@CuS,(c)、(d)为G5-NHAc@CuS。

[0069] 图6为本发明制备的不同浓度的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS与BSA(1mg/mL)孵育离心前后紫外吸收差值。

[0070] 图7为本发明制备的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS(Cu浓度为0-0.8mM)与B16-F10细胞处理24h后通过CCK8法测得的细胞活力。

[0071] 图8为本发明制备的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS (Cu浓度为0-0.8mM) 与B16-F10细胞在有/无激光照射下的细胞活力测试。

[0072] 图9为本发明制备的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS (Cu浓度为0-0.8mM) 与B16-F10细胞共孵育6h后对Cu元素的吞噬情况。

[0073] 图10为本发明制备的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS用BCA对不同Cu浓度处理后抗原吸附量。

[0074] 图11为本发明制备的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS分别与B16-F10细胞共孵育6h后, 在有/无激光照射情况下的B16-F10细胞CRT的表达情况图 (a) 以及孵育24小时后在有/无激光照射情况下的细胞培养液中ATP含量的定量分析图 (b) 与HMGB-1含量的定量分析图 (c)。

[0075] 图12为本发明制备的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS分别与B16F10细胞共孵育后, 在有/无激光照射情况下, 该实验的示意图 (a), 树突细胞的CD80、CD86的定量分析柱状图 (b) 和流式细胞表达分析图 (c)。

[0076] 图13为PBS或本发明制备的G5-PBA@CuS和G5-PBA@CuS/cGAMP通过瘤内注射入小鼠肿瘤部位, 经光照或不光照, 14天内小鼠体重 (a) 和小鼠肿瘤相对体积 (b) 变化。

[0077] 图14为本发明制备的G5-PBA@CuS和G5-PBA@CuS/cGAMP分别通过瘤内注射入小鼠的肿瘤部位, 经光照或不光照, 第14天的小鼠肿瘤部位的H&E、TUNEL和Ki-67染色结果。

[0078] 图15为本发明制备的G5-PBA@CuS和G5-PBA@CuS/cGAMP分别通过瘤内注射入小鼠的肿瘤部位, 经光照或不光照, 第14天的小鼠主要组织器官的H&E染色结果。

[0079] 图16为PBS或本发明制备的G5-PBA@CuS和G5-PBA@CuS/cGAMP分别通过瘤内注射入小鼠肿瘤部位光照后, 14天内小鼠体重 (a) 和小鼠远端肿瘤相对体积 (b) 变化。

[0080] 图17为PBS或本发明制备的纳米疫苗通过瘤内注射入小鼠肿瘤部位后, 20天内小鼠体重 (a) 和小鼠肿瘤相对体积 (b) 变化。

[0081] 图18为PBS或本发明制备的纳米疫苗通过瘤内注射入小鼠的肿瘤部位, 第14天小鼠脾脏T淋巴细胞的流式细胞表达分析图 (a), CD4⁺T淋巴细胞的定量分析柱状图 (b) 和CD8⁺T淋巴细胞的定量分析柱状图 (c)。

[0082] 图19为PBS或本发明制备的纳米疫苗通过腹腔注射和肌肉注射入小鼠肿瘤部位后, 26天内小鼠体重 (a) 和小鼠肿瘤相对体积 (b) 变化。

[0083] 图20为PBS或本发明制备的纳米疫苗通过腹腔注射、肌肉注射入小鼠体内后接种肿瘤, 第20天小鼠脾脏T淋巴细胞的流式细胞表达分析图 (a), CD4⁺T淋巴细胞的定量分析柱状图 (b) 和CD8⁺T淋巴细胞的定量分析柱状图 (c)。

具体实施方式

[0084] 下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。此外应理解, 在阅读了本发明讲授的内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0085] 实施例1

[0086] (1) 称取20mg的G5.NH₂和8.3mg的BPBA, 先将G5.NH₂和BPBA分别溶于2mL DMSO中, 使其充分溶解, 将BPBA溶液加入G5.NH₂溶液中, 置于70℃水浴锅中, 搅拌反应24小时得到G5-

PBA产物,用截留分子量为8000~14000的透析袋透析三天,冷冻干燥,得到G5-PBA粉末。

[0087] (2)分别称取G5-PBA 20mg、 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4.2mg、 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 11.8mg,将G5-PBA溶解于2mL水中,加入溶于1mL水的 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,搅拌15~30分钟,继续加入溶于1mL水的 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$,70℃搅拌10~20分钟,溶液变成墨绿色,用截留分子量为8000~14000的透析袋透析三天,冷冻干燥,得到G5-PBA@CuS。

[0088] 实施例2

[0089] 称取实施例1中的G5-PBA和对比例1中的G5-NHAc各5mg,分别溶于500 μL D_2O 中,进行核磁氢谱图分析(如图2所示)。如图2a所示,其中7.0-8.0ppm处是PBA分子的特征峰,2.2-3.4ppm处是G5的亚甲基特征峰,经积分可得每个G5上修饰了36.2个PBA基团。如图2b所示,其中1.8ppm处是乙酰基的特征峰,2.2-3.4ppm处是G5的亚甲基特征峰,经积分可得每个G5上修饰了35.9个乙酰基。对照材料的乙酰化修饰度与G5-PBA材料的PBA修饰度相近。

[0090] 实施例3

[0091] 称取实施例1中的G5-PBA@CuS配置成1mg/mL的母液,之后梯度稀释成0.5mg/mL和0.25mg/mL的溶液,测量紫外吸收,结果如图3所示。分析结果可知,硫化铜纳米颗粒在1000nm左右有吸收峰,此结果说明成功合成了在近红外II区具有独特吸收峰的纳米硫化铜颗粒。

[0092] 实施例4

[0093] 为了对制备得到的纳米颗粒的形貌和尺寸进行表征,分别取本发明实施例1制备的G5-PBA@CuS或对比例1中的G5-NHAc@CuS各1mg溶解在1mL超纯水中配成纳米颗粒悬浮液,并取悬浮液5 μL 滴在铜网表面,充分干燥后进行TEM测试。结果可知,载体材料G5-PBA@CuS(图4a)和G5-NHAc@CuS(图4b)的CuS内核尺寸均一、分散性良好,平均粒径分别为3.6nm和3.7nm。

[0094] 实施例5

[0095] 为了评价本发明制备的纳米材料在近红外激光照射下的升温效果,取实施例1中所得产品用超纯水配置1.5mM的母液,之后梯度稀释成1.2、0.9、0.6和0.3mM的溶液,并对一系列浓度的材料在1064nm激光照射下(5min)进行光热转换性能测试。以超纯水作为空白对照,结果如图5所示,在Cu浓度范围内,G5-PBA@CuS(图5a)和G5-NHAc@CuS(图5c)表现出优异的光热转换能力,随着光照时间的延长,G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS水溶液的温度明显升高,而且升温效果随着浓度的增加而提高。在照射五分钟后,G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS([Cu]=1.5mM)水溶液温度分别达到了67.2℃和69.7℃。通过计算单个循环升温降温曲线,可得G5-PBA@CuS(图5b)和G5-NHAc@CuS(图5d)光热转换效率分别为44.0%、45.1%,说明CuS纳米颗粒具有良好的光热转换性能。

[0096] 实施例6

[0097] 以BSA模拟肿瘤抗原,通过将实施例1中制备的G5-PBA@CuS和对比例1制备的G5-NHAc@CuS进行蛋白吸附实验测试,测定材料蛋白吸附的效果。BSA在278nm处有吸收峰。称取实施例1中制备的G5-PBA@CuS和对比例1制备的G5-NHAc@CuS各3mg,配置成浓度为1.5mg/mL的PBS溶液,然后分别稀释成1.0mg/mL、0.5mg/mL、0.25mg/mL和0.125mg/mL。称取BSA 2mg,配置成1mg/mL的PBS溶液。吸取0.5mL的BSA溶液分别加入刚刚配置好的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS的溶液中,充分混匀后,分别测试其在278nm处的紫外吸收值。将混合溶液放置于

37℃培养箱中孵育4h后,8000rpm离心5min,然后去除沉淀,再次测量其在278nm处的紫外吸收值。将G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS所对应的孵育离心前后紫外吸收值相减即得紫外吸收差值。从图6可以看出,在最高浓度时,G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS的紫外吸收差值分别为:1.09和0.03,相比之下,经过PBA修饰的材料能够很好地吸附蛋白。

[0098] 实施例7

[0099] 按照不同的G5-PBA@CuS与cGAMP质量比,将cGAMP加入到G5-PBA@CuS的水溶液中,孵育20min后离心,收集上清液,然后用紫外吸收光谱仪,测定其在260nm处的紫外吸收值,通过与free cGAMP的标准曲线对比计算cGAMP的包封率和上载率。结果如表1所示,所得纳米颗粒表面均带正电荷,有利于与肿瘤细胞的相互作用。由于强静电吸附,G5-PBA@CuS/cGAMP表现出较高的包封率。

[0100] 表1.G5-PBA@CuS与cGAMP在不同质量比条件下cGAMP的电势、包封率及上载率

G5-PBA@CuS 与 cGAMP 的质量比	电势 (mV)	包封率 (%)	上载率 (%)
0.5: 1	3.84±0.56	51.03±0.30	75.54±0.07
1: 1	6.15±0.98	42.69±0.30	85.37±0.06
5: 1	9.95±1.20	15.60±0.02	93.61±0.14
10: 1	13.8±2.19	8.74±0.01	96.17±0.07
20: 1	14.6±1.04	4.67±0.03	98.02±0.09

[0102] 实施例8

[0103] 通过CCK8法,以B16-F10细胞为模型评价实施例1制备的G5-PBA@CuS和对比例1制备的G5-NHAc@CuS材料对细胞增殖的影响。用无菌PBS配置不同浓度的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS的PBS溶液。将B16-F10细胞按 5×10^3 细胞/孔的密度种植于96孔板上,待细胞贴壁后,分别更换新鲜的含G5-PBA@CuS或G5-NHAc@CuS (Cu浓度为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8mM)的培养基,在37℃下与细胞共培养24h,弃掉原培养基,用PBS洗三遍,每孔加90μL的无血清培养基和10μL的CCK8溶液,继续在37℃下培养4小时,然后在450nm处测其吸光值,并根据此值计算细胞的活力(如图7)。与对照组(PBS)相比,实施例1中的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS在Cu浓度0.1-0.8mM范围内,对B16-F10细胞活力没有产生明显影响,细胞活力均保持在85%以上,在达到最高浓度0.8mM时,B16-F10经材料G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS处理后的细胞活力分别为87.8%和88.9%,说明实施例1中合成的G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS具有良好的细胞相容性。

[0104] 实施例9

[0105] 以B16-F10细胞为模型细胞,在1064nm激光照射下评价G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS对细胞的杀伤作用。将B16-F10细胞按 5×10^3 细胞/孔的密度种植于96孔板上,每孔体积为100μL。待细胞贴壁后,分别更换新鲜的含G5-PBA@CuS或G5-NHAc@CuS (Cu浓度为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8mM)的培养基,在37℃下与细胞共培养24h,弃掉原培养基,用PBS清洗三次,之后将B16F10细胞分为两组(一组实验在1064nm激光下照射5min,另一组实验不进行激光照

射),接着用PBS清洗3次,每孔加90 μ L的无血清培养基和10 μ L的CCK8溶液,继续培养在37 $^{\circ}$ C下,培养4小时后,在450nm处测其吸光值,并根据此值计算细胞的活力。结果如图8所示,与对照组(PBS组)相比,实施例1中的G5-PBA@CuS和对比例中的G5-NHAc@CuS在Cu浓度0.1-0.8mM范围内,未经过1064nm激光照射的细胞均保持较高的细胞活力;而激光照射组随着Cu浓度的增加,细胞活力逐渐降低,表明2个材料对B16-F10细胞均具有很好的光热消融效果。当材料的Cu浓度达到0.8mM时,G5-PBA@CuS+激光照射组细胞活力为31.1%,而G5-NHAc@CuS+激光照射组的细胞活力为34.9%。

[0106] 实施例10

[0107] 收集对数生长期的B16-F10细胞,按照 1×10^5 个细胞每孔的密度接种在12孔板上,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境中培养12小时,待细胞贴壁后,更换新鲜的含G5-PBA@CuS或G5-NHAc@CuS(Cu浓度为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8mM)的培养基,与细胞共同孵育6小时,弃掉原培养基,用PBS洗三遍,胰酶消化收集孔内细胞,离心去上清液,用1mL王水消化24小时。最后再向每个样品种添加3mL超纯水并对混合溶液中的Cu进行ICP-OES检测(如图9所示)。由于PBA具有靶向肿瘤细胞表面唾液酸的作用,在相同Cu浓度时,与G5-NHAc@CuS相比,G5-PBA@CuS能更好地被B16-F10细胞所吞噬。

[0108] 实施例11

[0109] 收集对数生长期的B16-F10细胞,按照 1×10^6 个细胞每孔的密度接种在6孔板上,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境中培养12小时,待细胞贴壁后更换含材料G5-PBA@CuS或G5-NHAc@CuS(Cu浓度为0.1、0.2、0.4、0.8mM)的DMEM培养基,以PBS组作为对照,光照组使用1064nm激光(功率0.6W/cm²)照射5min。48h后离心收集细胞培养悬液,用BCA试剂盒测定细胞悬液中的总蛋白浓度。细胞悬液用截留分子量为100kD的超滤离心管进行分离,收集离心管下方的悬液,继续使用BCA试剂盒测定其蛋白浓度,两次数据的差值则为吸附在材料上的蛋白量(如图10所示)。通过DLS验证材料吸附肿瘤相关抗原前后的粒径和电势的变化(如表2所示)。实验结果表明,孵育前后两种材料的粒径和电位均发生了改变,意味着材料成功捕获了肿瘤蛋白抗原。通过BCA对吸附抗原的量发现,G5-PBA@CuS吸附抗原的能力远高于对照载体材料G5-NHAc@CuS。

[0110] 表2.G5-PBA@CuS和G5-NHAc@CuS吸附抗原后粒径和电势的变化

样品名称	吸附抗原前		吸附抗原后	
	粒径 (nm)	电势 (mV)	粒径 (nm)	电势 (mV)
[0111] G5-PBA@CuS	64.43 \pm 1.26	16.63 \pm 0.35	449.60 \pm 40.22	7.63 \pm 0.71
G5-NHAc@CuS	84.76 \pm 9.10	15.57 \pm 0.40	182.30 \pm 12.16	11.90 \pm 0.29

[0112] 实施例12

[0113] 以 2×10^5 /孔的密度将B16-F10细胞种于激光共聚焦专用培养皿中,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培养过夜。替换含有实施例1中合成的G5-PBA@CuS或G5-PBA@CuS/cGAMP的新鲜培养基(cGAMP终浓度为1 μ g/mL)孵育6小时,光照组使用1064nm激光(功率0.6W/cm²)照射5min。用预冷的PBS洗涤3次。每个孔中加入2.5%多聚甲醛固定15分钟。用PBS洗3次,加入免

疫染色封闭液,封闭60分钟后,加入稀释后的兔抗鼠CRT一抗孵育1小时,洗涤3次。随后加入稀释后的二抗,室温孵育1小时后,洗涤5分钟,共洗涤3次。加入DAPI染细胞核3分钟,PBS洗涤3次。用激光共聚焦扫描显微镜观察细胞中CRT外翻情况。如图11a所示,在PBS对照组的癌细胞中几乎检测不到CRT的荧光,这是由于在正常状态下CRT表达在细胞内质网中。纯载体G5-PBA@CuS在无光照条件下对癌细胞CRT的表达几乎无影响。相反,经G5-PBA@CuS或G5-PBA@CuS/cGAMP复合物处理的B16-F10细胞,激光照射处理后,其表面有明显的CRT的荧光信号;与G5-PBA@CuS组相比,G5-PBA@CuS/cGAMP复合物则展现出更强的CRT的荧光强度。

[0114] 以 1×10^5 /孔的密度将B16-F10细胞种于12孔板中,于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养过夜。替换含有G5-PBA@CuS或G5-PBA@CuS/cGAMP的新鲜培养基(cGAMP终浓度为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$)孵育24小时,光照组使用 1064nm 激光(功率 $0.6\text{W}/\text{cm}^2$)照射 5min 。取细胞上层培养液,在96孔板中加入 $100\mu\text{L}$ ATP检测工作液,放置3-5分钟后在孔中加入 $20\mu\text{L}$ 培养液样品,混匀后通过多功能酶标仪测定胞外ATP含量。如图11b所示,发现G5-PBA@CuS+激光照射组和G5-PBA@CuS/cGAMP+激光照射组的胞外ATP释放量显著高于其它组,释放的ATP将有利于促进树突细胞对凋亡肿瘤细胞的吞噬作用,加强抗肿瘤免疫响应。G5-PBA@CuS/cGAMP+激光照射组与不含cGAMP组相比,具有更高的胞外ATP释放量。同时,收集细胞培养液,参照HMGB-1的ELISA试剂盒的操作步骤检测HMGB-1的含量。如图11c所示,G5-PBA@CuS/cGAMP+激光照射组细胞培养液中的HMGB-1含量显著高于其它组,释放的HMGB-1可促进肿瘤抗原提呈给T细胞。很明显,在相同条件下,cGAMP的加入产生了更强的癌细胞免疫原性,主要是由于cGAMP的加入,进一步激活cGAS-STING通路,降低抗凋亡蛋白Bcl2的表达,并上调促凋亡蛋白Bax的表达,促进癌细胞凋亡。

[0115] 实施例13

[0116] 收集对数生长期的B16-F10细胞,按照每孔 2×10^5 个细胞的密度种在Transwell1孔板的上室中。待细胞贴壁生长后,加入含G5-PBA@CuS或G5-PBA@CuS/cGAMP的培养液培养,cGAMP的浓度为 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 。24小时后将孔板中的溶液倒干净,并用 1mL 无菌的PBS溶液清洗每个孔3次,之后向每个孔中加入 1mL 新鲜培养基。随后将上室细胞转移到以 1×10^5 个DC细胞的密度接种的下室中共孵育。同时,对上室B16F10细胞进行 1064nm 激光照射处理($0.6\text{W}/\text{cm}^2$, 5min)。之后将上室癌细胞与下室的DC细胞共孵育 24h 。培养结束后,将DC细胞取出,消化,离心,加入PBS重悬细胞,根据抗体标记说明书分别对提取的DC细胞进行CD80、CD86抗体标记,在 4°C 条件下避光标记 $15-20\text{min}$ 。在标记结束后,PBS洗涤三次除去过量未结合的抗体。将DC细胞重悬于 $400\mu\text{L}$ 的PBS中并转移到流式管中,通过流式细胞仪分别检测CD80、CD86的荧光强度。结果如图12所示,DC表面熟化标志物CD80和CD86表达上调,说明凋亡的肿瘤细胞可促进树突细胞熟化。与G5-PBA@CuS+Laser(光照)组相比,G5-PBA@CuS/cGAMP+Laser(光照)组熟化程度最高,进一步表明cGAMP的加入有助于提升癌细胞的免疫原性。

[0117] 实施例14

[0118] 实验用的4周雌性C57BL/6小鼠购自上海斯莱克实验动物中心(中国,上海)。将 1×10^6 个B16-F10细胞接种到小鼠的右腿,待肿瘤体积达到约 $50-80\text{mm}^3$ 左右时,将小鼠随机分为5组(每组6只),随后通过瘤内注射的方式向每只小鼠注射 $100\mu\text{L}$ PBS溶液:第一组PBS(对照组),第二组G5-PBA@CuS(载体组),第三组G5-PBA@CuS并用激光照射 5min (载体+光照组),第四组G5-PBA@CuS/cGAMP(载体/免疫佐剂复合物组),第五组G5-PBA@CuS/cGAMP并用激光照射 5min (载体/免疫佐剂复合物+光照组)。之后,记录14天内小鼠的肿瘤体积和小鼠

体重。实验结果如图13所示,对照组和载体组小鼠肿瘤随着时间迅速增长,载体/免疫佐剂复合物组和载体+光照组肿瘤生长受到了一定的抑制。其中,载体/免疫佐剂复合物+光照组治疗的小鼠获得了最高的抗肿瘤活性。实验结果证明本发明中合成的G5-PBA@CuS/cGAMP能应用于小鼠体内的肿瘤治疗,明显抑制肿瘤生长。

[0119] 治疗后14天,刨取小鼠肿瘤,进行H&E、TUNEL和Ki-67染色观察肿瘤组织的坏死、凋亡和增殖情况。结果如图14所示,H&E、TUNEL和Ki-67染色结果表明,G5-PBA@CuS/cGAMP+光照组在各组中,能够产生最大程度的肿瘤细胞的坏死、凋亡和增殖抑制。同时对主要组织器官进行H&E染色,结果如图15所示,各组织中的细胞形态与对照组中细胞形态无异,材料的注射以及光照并未对正常组织器官产生明显毒副作用。

[0120] 实施例15

[0121] 实验用的4周雌性C57BL/6小鼠购自上海斯莱克实验动物中心(中国,上海)。将 1×10^6 个B16-F10细胞接种到小鼠的右腿,同时将 5×10^5 个B16-F10细胞接种到小鼠的左腿,待小鼠右腿肿瘤体积达到约 $50-80\text{mm}^3$ 左右时,将小鼠随机分为3组(每组6只),随后通过瘤内注射的方式向每只小鼠右腿注射 $100\mu\text{L}$ 溶液:第一组PBS(对照组),第二组G5-PBA@CuS并用激光照射5min(载体+光照组),第三组G5-PBA@CuS/cGAMP并用激光照射5min(载体/免疫佐剂复合物+光照组)。之后,记录14天内小鼠的远端肿瘤体积和小鼠体重。实验结果如图16所示,首先各组处理小鼠后,没有对小鼠的体重产生明显的影响,证明制备的载体或载体/免疫佐剂复合物没有明显的生物毒性(图16a)。如图16b所示,对照组小鼠远端肿瘤随着时间迅速增长,载体+光照组和载体/免疫佐剂复合物+光照组肿瘤生长受到了一定的抑制。其中,载体/免疫佐剂复合物+光照组的治疗小鼠获得了最高的抗肿瘤活性。实验结果证明本发明中合成的G5-PBA@CuS/cGAMP可在小鼠体内形成原位疫苗,实现体内的远端抗肿瘤治疗应用。

[0122] 实施例16

[0123] 实验用的4周雌性C57BL/6小鼠购自上海斯莱克实验动物中心(中国,上海)。收集对数生长期的B16-F10细胞,按照 $8 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞每孔的密度接种在培养皿上,于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 环境中培养 $12 \sim 24\text{h}$,待B16-F10细胞贴壁后更换含G5-PBA@CuS/cGAMP的无血清DMEM培养基,使用 1064nm 激光照射 $5 \sim 8\text{min}$, $48 \sim 60\text{h}$ 后离心收集细胞悬液,用截留分子量为 100kD 的超滤离心管在 $8000 \sim 10000\text{r}/\text{min}$ 条件下,离心时间为 $5 \sim 8$ 分钟,收集离心管下方的悬液,即为吸附肿瘤抗原形成的复合物悬液,以此构建体外疫苗。将 1×10^6 个B16-F10细胞接种到小鼠的右腿,待小鼠肿瘤体积达到约 $50-80\text{mm}^3$ 左右时,将小鼠随机分为2组(每组6只),随后通过瘤内注射的方式分别在第0、4、7天向每只小鼠注射 $100\mu\text{L}$ 溶液:第一组PBS,第二组注射体外构建的疫苗,即G5-PBA@CuS/cGAMP-抗原复合物。之后,记录20天内小鼠的肿瘤体积和小鼠体重。实验结果如图17所示,纳米疫苗的处理没有引起小鼠体重的明显变化,这说明疫苗本身具有很好的生物相容性(图17a);PBS组小鼠肿瘤随着时间迅速增长,而疫苗组肿瘤生长则受到了明显的抑制(图17b)。

[0124] 取疫苗治疗第14天的PBS组和疫苗瘤内注射组小鼠各一只,无菌条件下取出其脾脏组织,剪碎研磨经400目滤网过滤,得到细胞悬液,通过尼龙毛柱获取T淋巴细胞悬液,将上述获取的T细胞分别用anti-CD4与anti-CD8抗体进行标记,通过流式细胞仪对脾脏组织中 CD4^+ T细胞与 CD8^+ T细胞进行定量分析。结果如图18所示,经过疫苗瘤内注射治疗后的小鼠

的脾脏浸润性CD4⁺T与CD8⁺T细胞含量明显高于PBS组,说明疫苗可以有效促进T细胞的免疫应答。

[0125] 将小鼠随机分为3组(每组6只),分别在第0、4、7天向每只小鼠注射100 μ L溶液:第一组腹腔注射PBS,第二组腹腔注射纳米疫苗,第三组肌肉注射纳米疫苗。在第7天将 1×10^6 个B16-F10细胞接种到小鼠的右腿,记录26内小鼠的肿瘤体积和小鼠体重。实验结果如图18所示,和PBS对照组相比,腹腔和肌肉注射纳米疫苗都不会对小鼠的体重变化产生明显的影响(图19a)。如图19b所示,PBS组小鼠肿瘤在接种第6天后开始增长,并随着时间迅速增长,肌肉疫苗组肿瘤在第10天后开始增长,而腹腔疫苗组在接种第16天后才开始有小鼠长出肿瘤,且肿瘤生长受到明显的抑制。实验结果证明该疫苗可有效预防体内肿瘤的生长,腹腔注射疫苗的效果明显优于肌肉注射疫苗,这可能是由于腹腔注射疫苗可以更快速且有效的激起小鼠体内的抗全身肿瘤免疫反应。

[0126] 取疫苗治疗第20天的PBS组、腹腔注射疫苗组和肌肉注射疫苗组小鼠各一只,无菌条件下取出其脾脏组织,剪碎研磨经400目滤网过滤,得到细胞悬液,通过尼龙毛柱获取T淋巴细胞悬液,将上述获取的T细胞分别用anti-CD4与anti-CD8抗体进行标记,通过流式细胞仪对脾脏组织中CD4⁺T细胞与CD8⁺T细胞进行定量分析。如图20所示,疫苗注射对于肿瘤的预防有一定的效果,且腹腔注射的效果优于肌肉注射,其脾脏浸润性CD4⁺T与CD8⁺T细胞含量也明显高于其他组。

[0127] 对比例1

[0128] (1)称取20mg的G5.NH₂溶于2mL DMSO中,先加入5.6 μ L三乙胺,搅拌30分钟,继续加入2.8 μ L乙酸酐,搅拌反应24小时得到G5-NHAc粗产物,用截留分子量为8000~14000的透析袋透析,先用PBS透析三次,后用纯水透析三次,冷冻干燥,得到G5-NHAc。

[0129] (2)分别称取G5-NHAc 20mg、CuCl₂·2H₂O 5.0mg、Na₂S·9H₂O 14.1mg,将G5-NHAc溶解于2mL水中,加入溶于1mL水的CuCl₂·2H₂O,搅拌15~30分钟,继续加入溶于1mL水的Na₂S·9H₂O,70℃搅拌10~20分钟,溶液变成墨绿色,用截留分子量为8000~14000的透析袋透析三天,冷冻干燥,得到G5-NHAc@CuS。

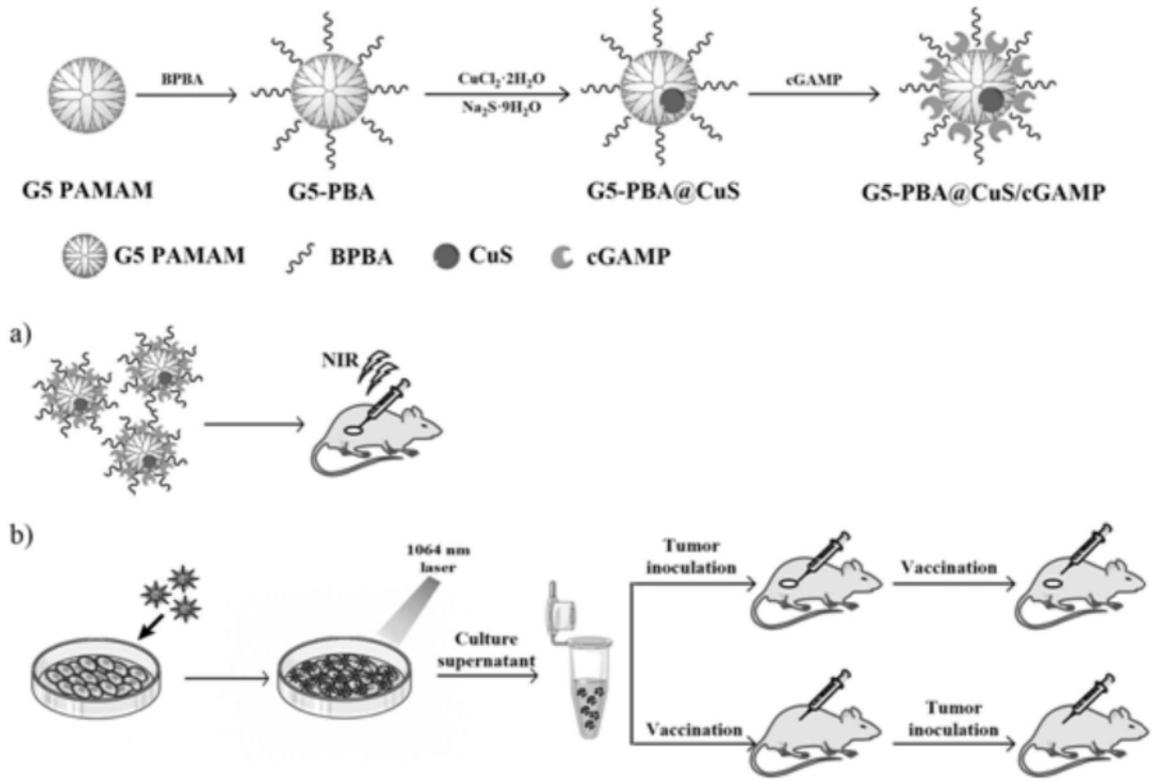


图1

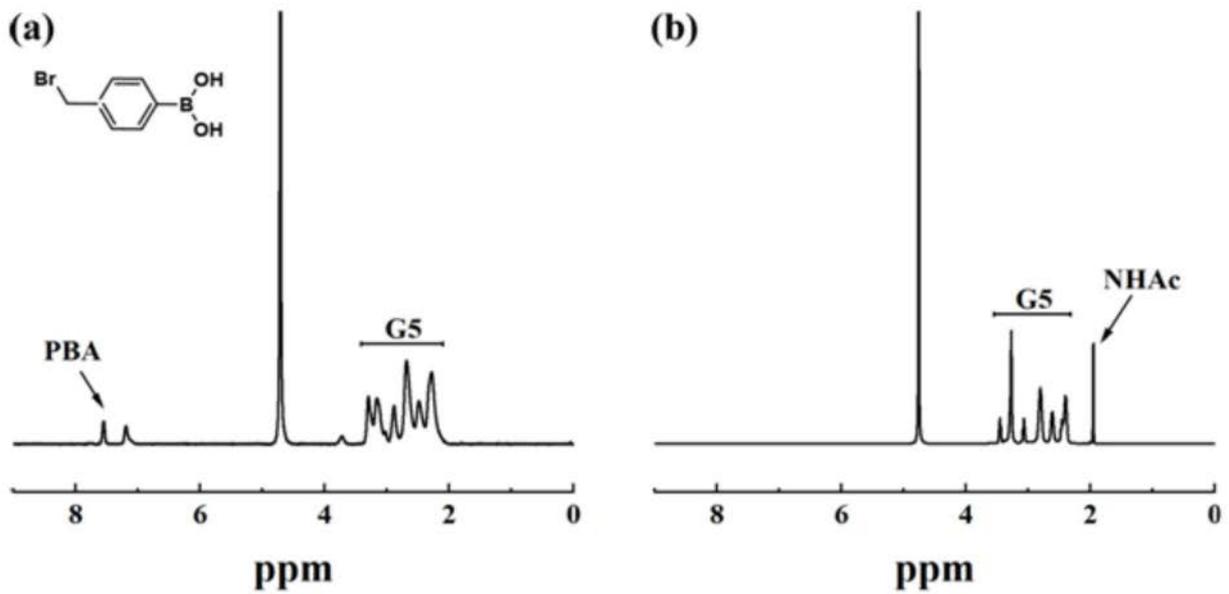


图2

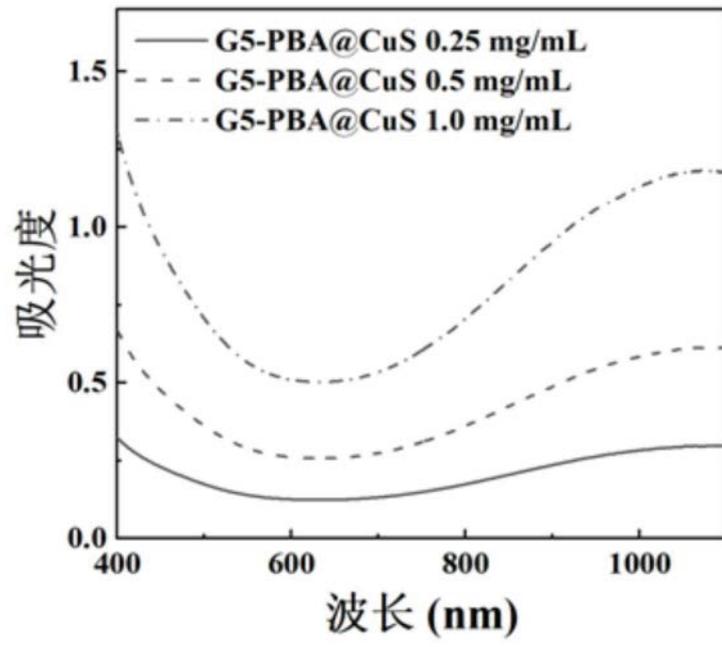


图3

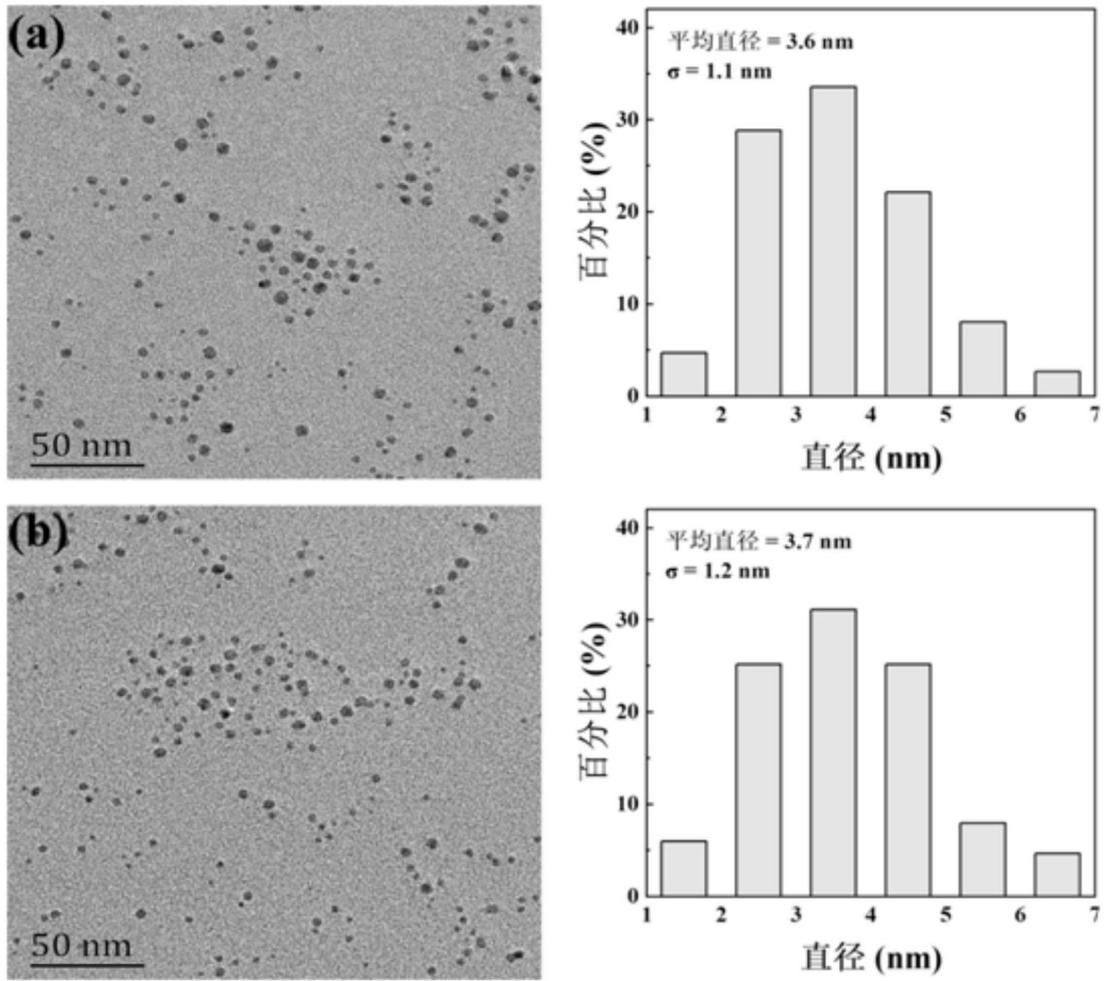


图4

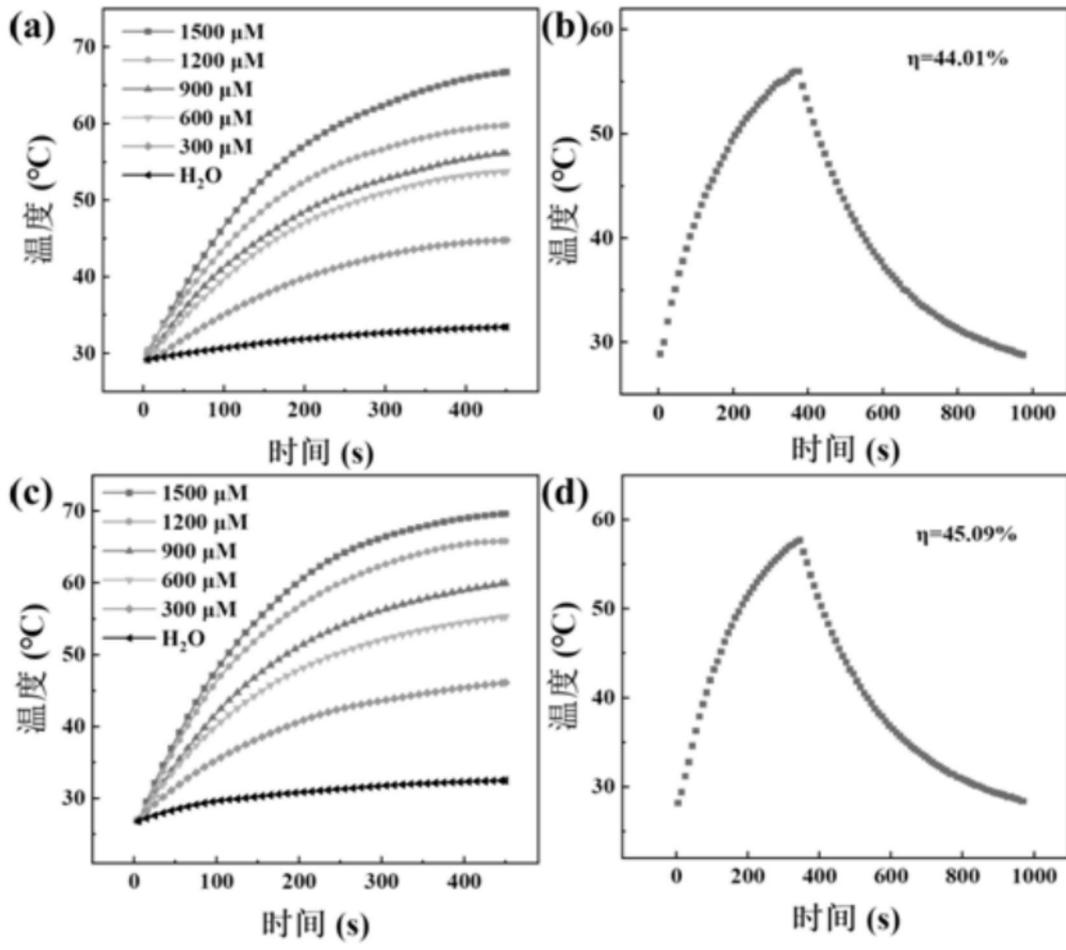


图5

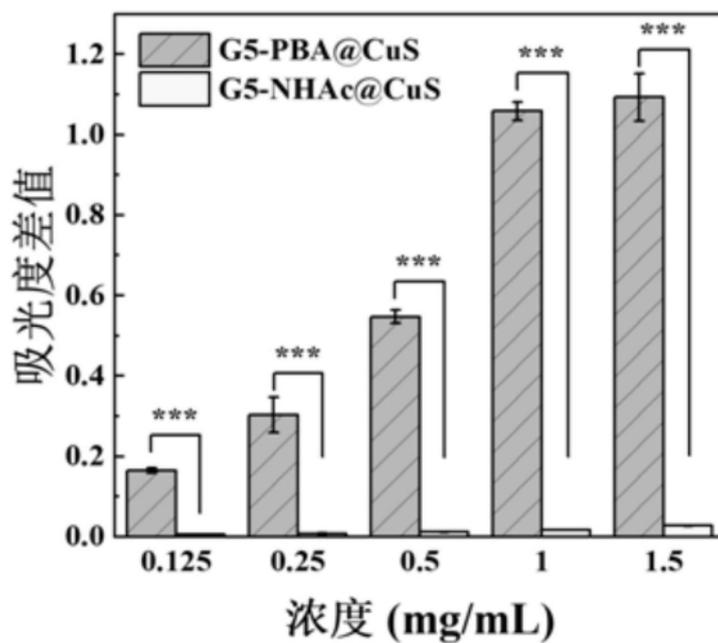


图6

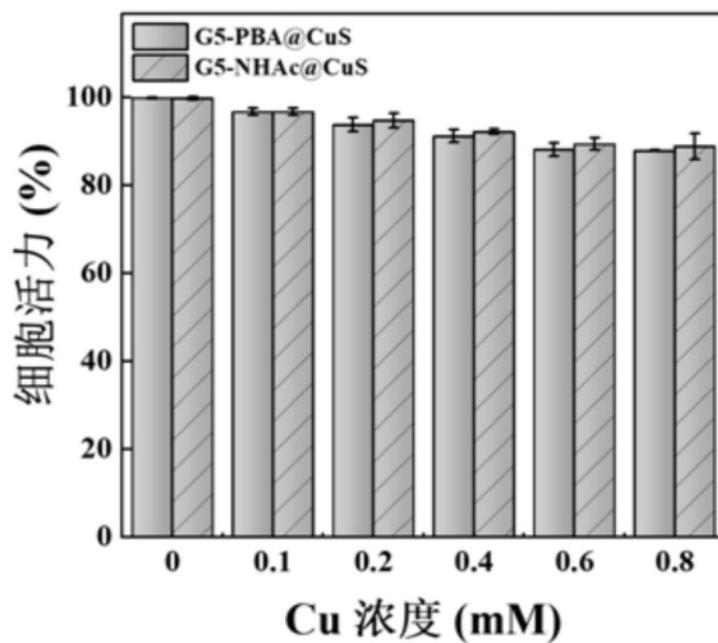


图7

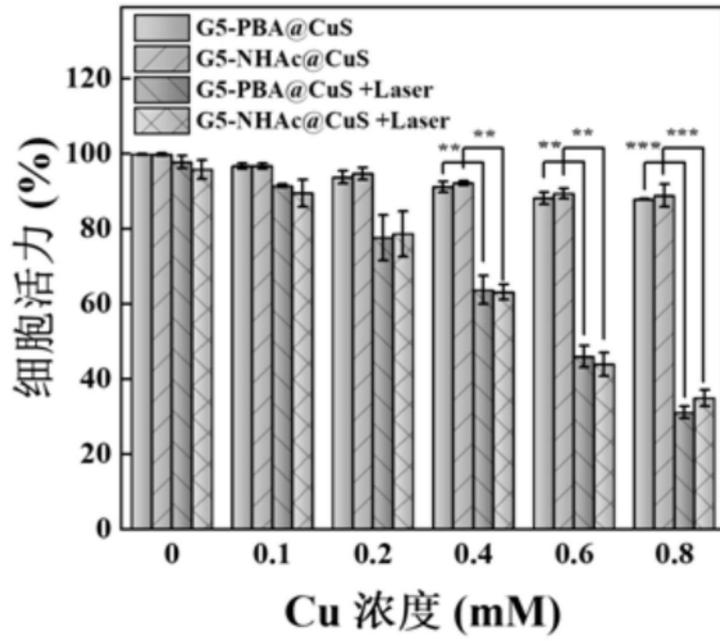


图8

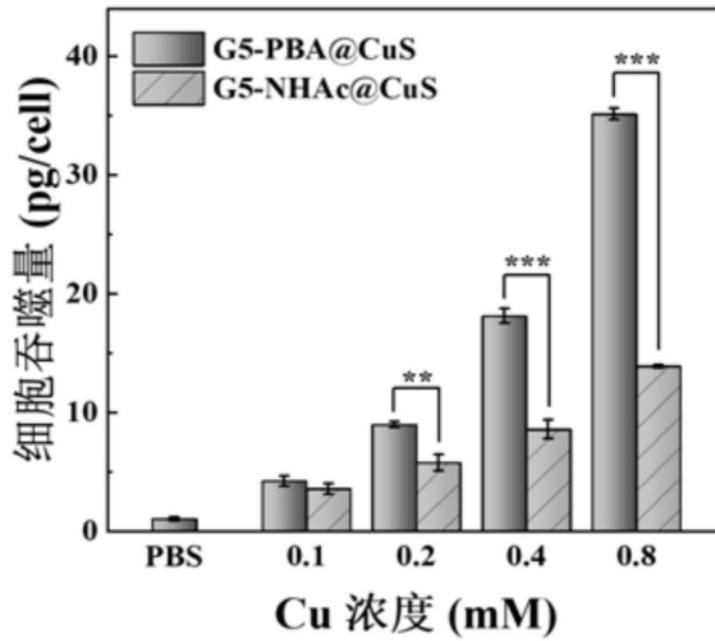


图9

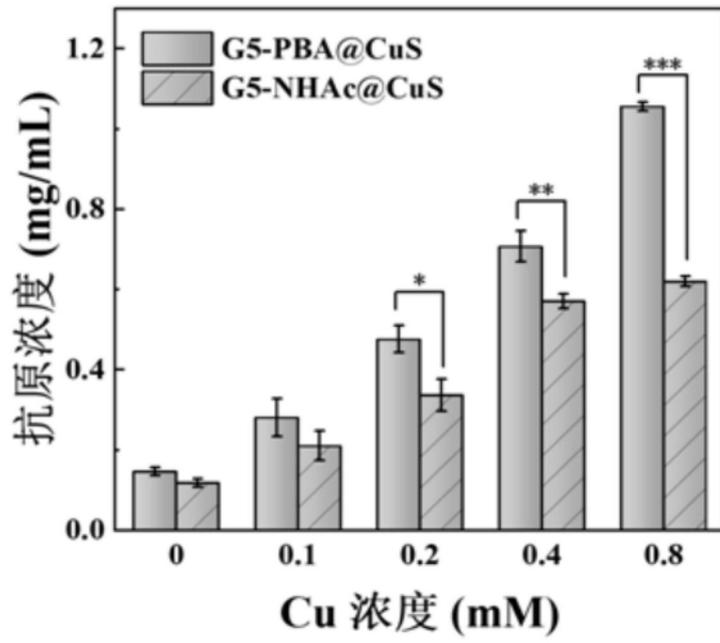


图10

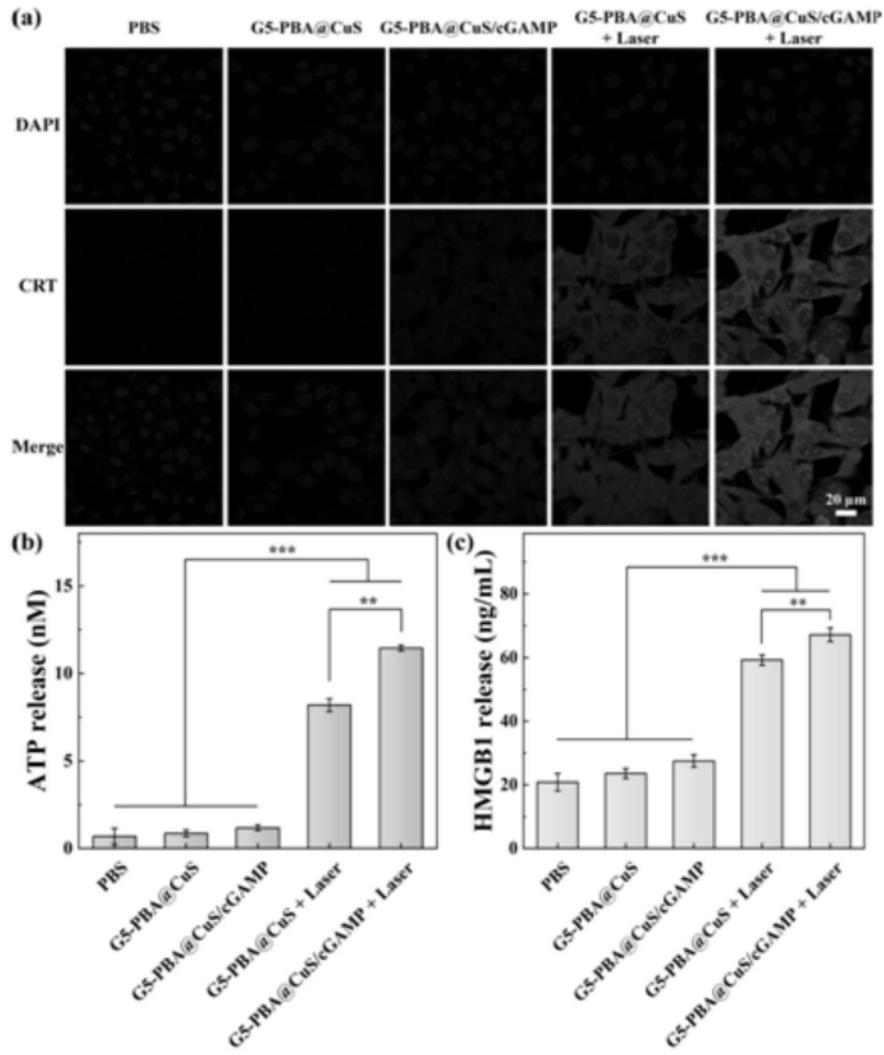


图11

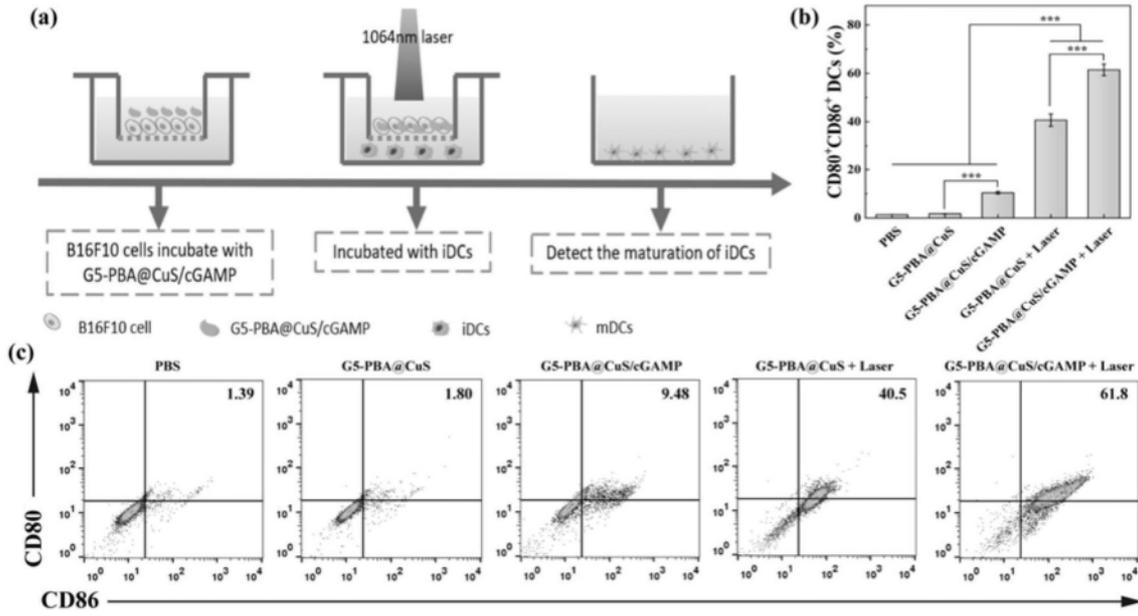


图12

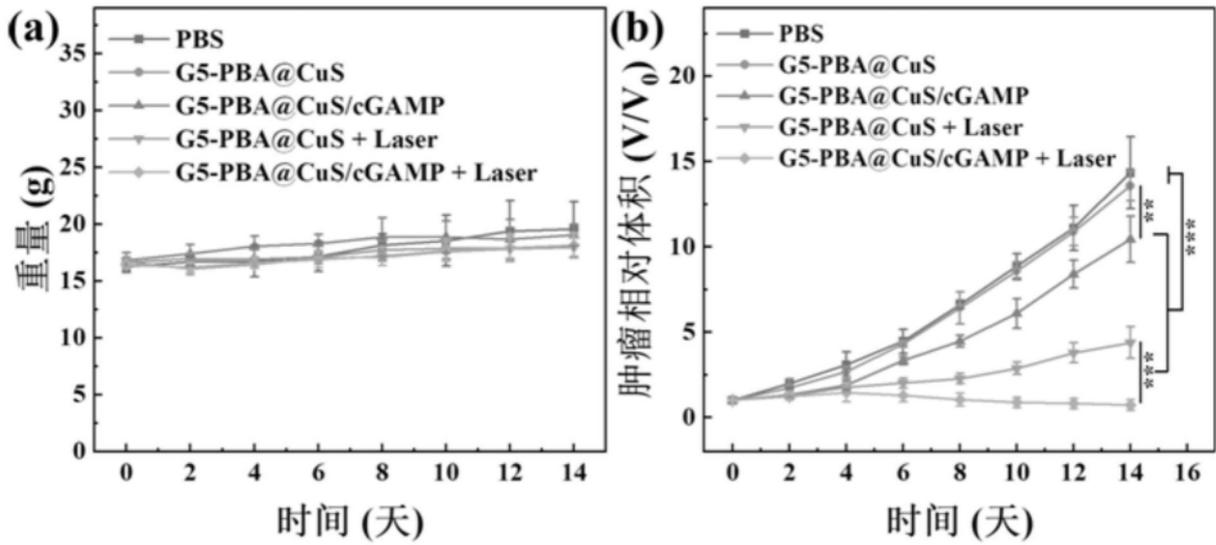


图13

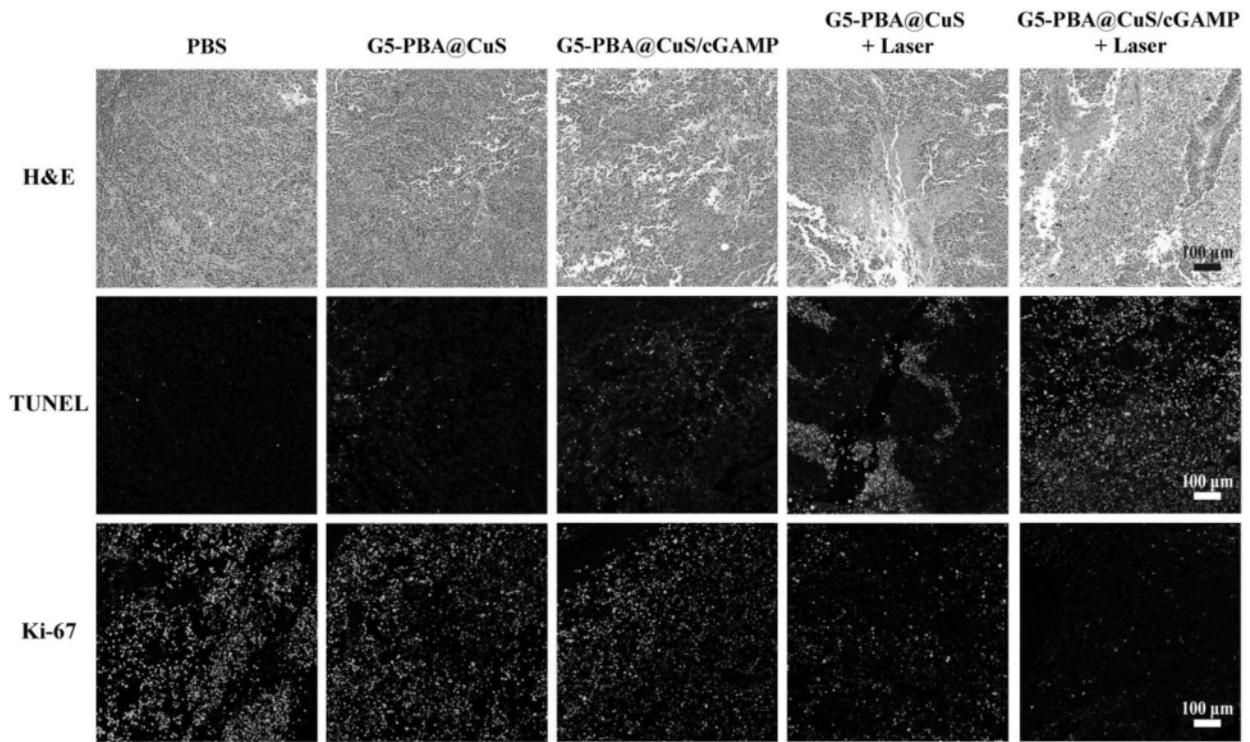


图14

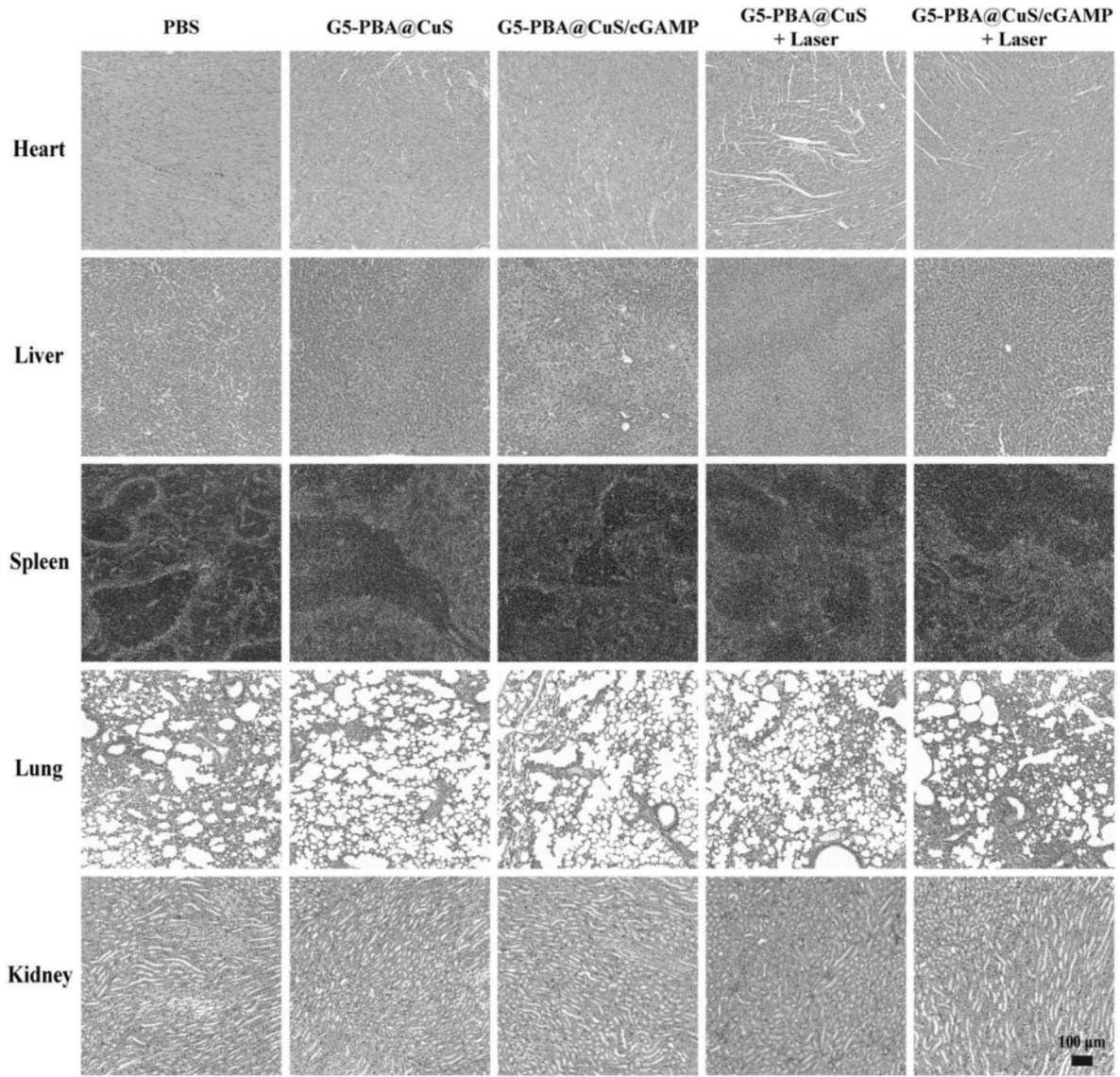


图15

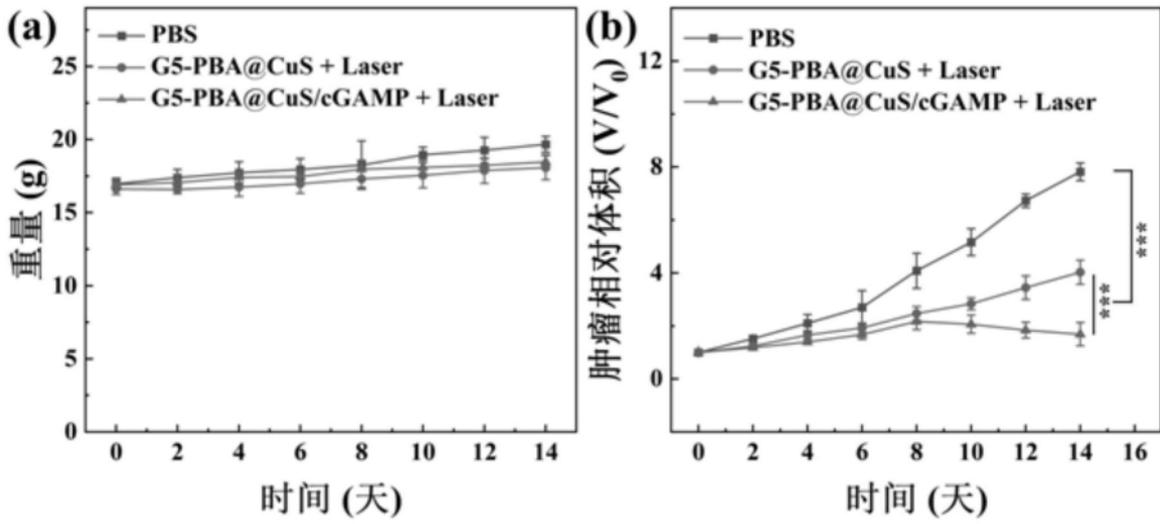


图16

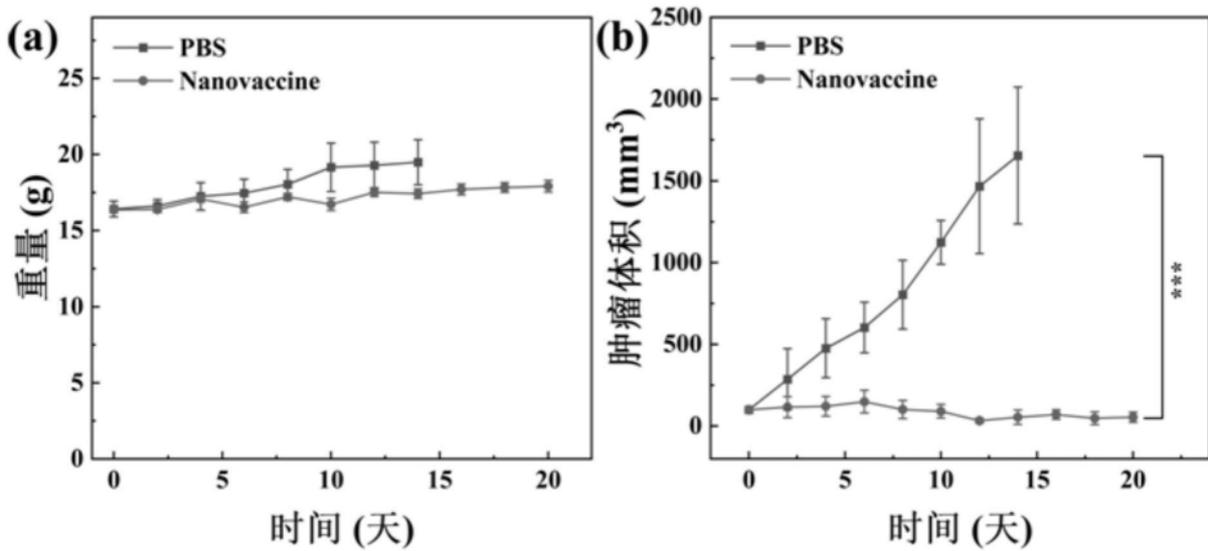


图17

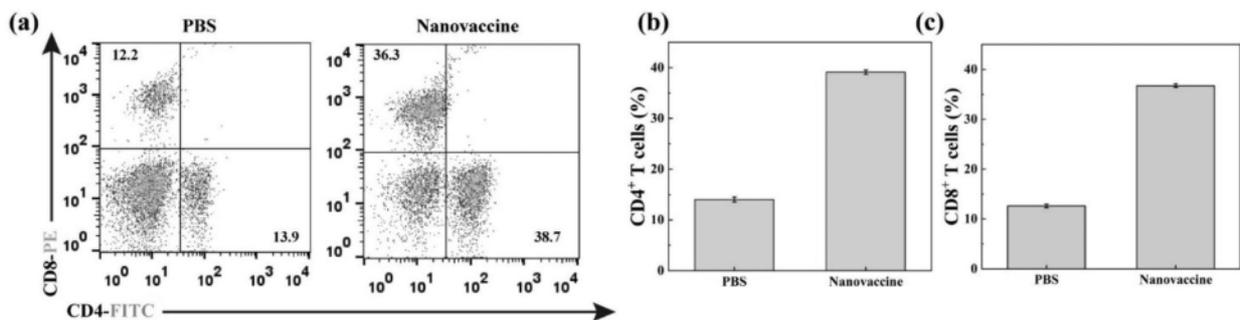


图18

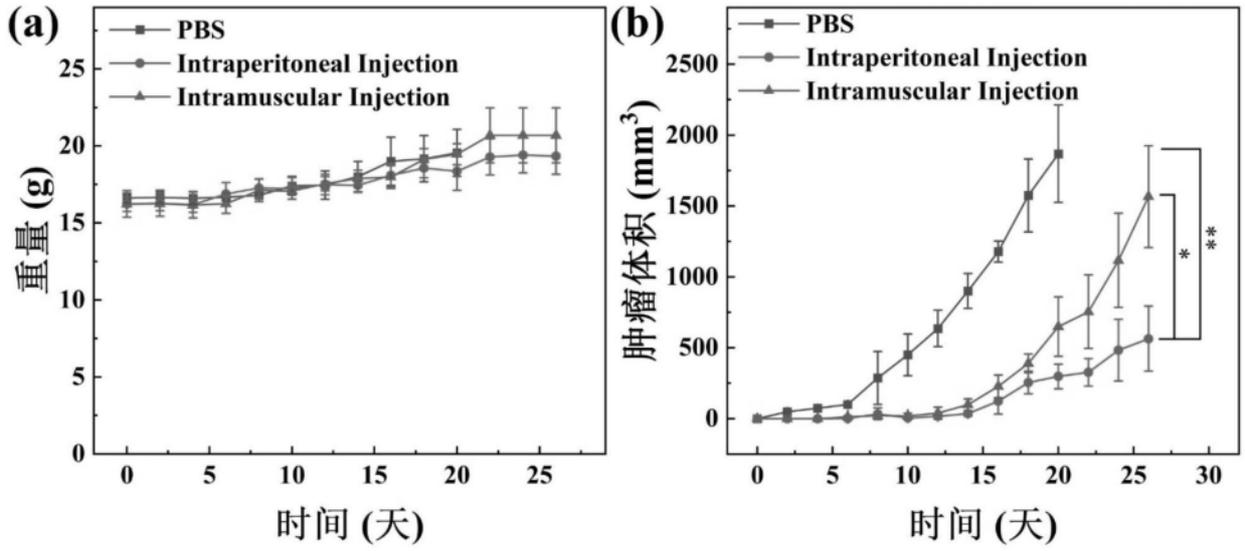


图19

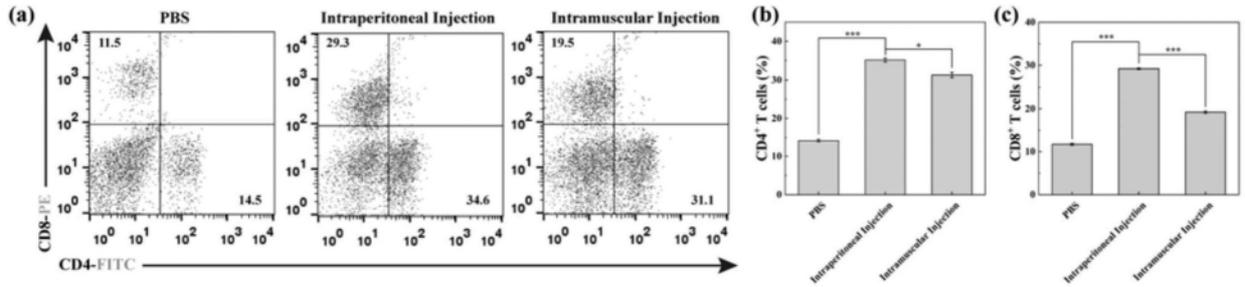


图20