



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109395098 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201811450189.9

A61K 41/00(2006.01)

(22)申请日 2018.11.30

A61K 47/64(2017.01)

A61P 35/00(2006.01)

(71)申请人 河南省生物工程技术研究中心有限公司

地址 450001 河南省郑州市高新技术产业
开发区科学大道53号4号楼7层84号

申请人 河南省生物工程技术研究中心

(72)发明人 王云龙 蒋丹丹 李玉林 张怡青
王继创 程蕾 邓黎黎

(74)专利代理机构 郑州铭晟知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 41134

代理人 张鹏

(51)Int.Cl.

A61K 49/00(2006.01)

A61K 47/69(2017.01)

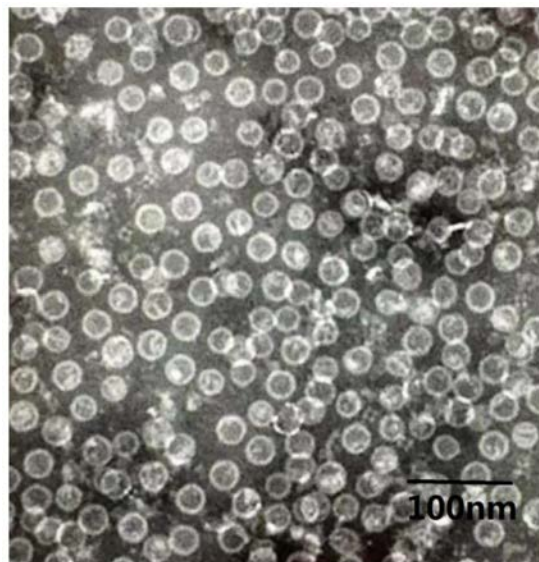
权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图4页

(54)发明名称

一种肿瘤靶向成像纳米颗粒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及肿瘤诊断技术领域,具体涉及一种肿瘤靶向成像纳米颗粒及其制备方法。所述肿瘤靶向成像纳米颗粒,包括靶向载体和装载于所述靶向载体的光敏剂,所述靶向载体包括乙肝病毒样颗粒。其中所述靶向载体可采用大肠杆菌表达生产,经分离提纯后再装载光敏剂,操作简单方便,有广泛的应用前景。



1. 一种肿瘤靶向成像纳米颗粒,其特征在於:包括靶向载体和装载於所述靶向载体的光敏剂,所述靶向载体包括乙肝病毒样颗粒。

2. 根据权利要求1所述的肿瘤靶向成像纳米颗粒,其特征在於,所述乙肝病毒样颗粒选自C端144个氨基酸,其73-82、75-81、78-79、78-81、78-82、78-86、78-89、78-94、81-82或82-83任意位点处的氨基酸序列被RGD序列取代。

3. 根据权利要求2所述的肿瘤靶向成像纳米颗粒,其特征在於,所述RGD序列两端通过连接肽与所述乙肝病毒样颗粒相连。

4. 根据权利要求3所述的肿瘤靶向成像纳米颗粒,其特征在於,所述连接肽为(GGGGS) n , $1 \leq n \leq 5$ 。

5. 根据权利要求1所述的肿瘤靶向成像纳米颗粒,其特征在於,所述光敏剂为吲哚菁绿。

6. 根据权利要求1-4中任意一项所述的肿瘤靶向成像纳米颗粒,其特征在於,所述乙肝病毒样颗粒C端末尾还连接有pH敏感多肽,所述pH敏感多肽为聚组氨酸多肽。

7. 根据权利要求1-5中任意一项所述的肿瘤靶向成像纳米颗粒的制备方法,其特征在於,包括如下步骤:(1)获取编码所述靶向载体的重组基因;(2)将步骤(1)得到的重组基因导入大肠杆菌,诱导大肠杆菌表达靶向载体,分离、纯化得到靶向载体;(3)向靶向载体装载光敏剂。

8. 根据权利要求7所述的肿瘤靶向成像纳米颗粒的制备方法,其特征在於,所述向靶向载体装载光敏剂包括如下步骤:(1)解离:将靶向载体与解离液混合,孵育;(2)将经步骤(1)解离后的靶向载体转移入分子量为8000~14000Da的透析袋中并置于重组缓冲液1中,4℃下过夜透析;更换为重组缓冲液2,透析;(3)取步骤(2)得到的产物与解离液在4℃下孵育;之后,向上述溶液中加入光敏剂,伴随轻微震荡,所得混合溶液共培养;之后,将其移至分子量为8000~14000Da的透析袋中,首先置于重组缓冲液1中并在4℃下过夜透析;将透析袋置于重组缓冲液2中,透析;透析结束即得所述肿瘤靶向成像纳米颗粒。

9. 根据权利要求8所述的肿瘤靶向成像纳米颗粒的制备方法,其特征在於,所述解离液包括30-60mM pH 8.0Tris-HCl、120-180mM NaCl和6.0-10.0M的尿素。

10. 根据权利要求8所述的肿瘤靶向成像纳米颗粒的制备方法,其特征在於,所述重组缓冲液1包括40-60mM pH 8.0Tris-HCl、140-160mM NaCl、9-12%甘油和0.5-1.5%甘氨酸;所述重组缓冲液2包括45-60mM pH 8.0Tris-HCl、135-160mM NaCl和0.5-2%甘氨酸。

一种肿瘤靶向成像纳米颗粒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤诊断技术领域,具体涉及一种肿瘤靶向成像纳米颗粒及其制备方法。

背景技术

[0002] 近年来,恶性肿瘤(癌症)已成为危害人类健康的重大疾病之一。对癌症诊断与治疗已经成为现代医学研究的一大热点。

[0003] 以乳腺癌为例,乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,近年来其发病率有逐渐上升的趋势,乳腺癌的诊断及治疗仍是当前要面临的问题。然而,对于区分恶性和正常组织的类型,视诊和触诊并不完全准确。乳腺癌的常规的检测方法主要包括X线钼靶、超声检查、CT和磁共振成像等。这些常规影像学方法只能发现直径 $\geq 1\text{cm}$ 的结构节(约1g),相当于 10^9 个肿瘤细胞。而乳腺癌从单细胞发展到临床能检出1cm小肿块,其生长期一般已逾3年,此时常常已发生组织或器官的转移。而光学成像作为非侵入性、实时和高分辨率的肿瘤诊断方式,正在逐步应用于肿瘤的早期诊断。在光学成像中,近红外荧光(near-infrared fluorescence, NIRF)组织渗透性好、穿透能力强、激发的荧光受生物组织本底影响小,可检测到深层组织的荧光信号,越来越多的应用到肿瘤的诊疗中。

[0004] 目前,既能保证人体安全,又能用于肿瘤的早期诊断、治疗而被批准用于临床的近红外成像染料只有吲哚菁绿。吲哚菁绿是美国食品药品监督管理局(FDA)唯一批准用于临床的近红外造影剂。其具有光热、光声和光动力响应,在光照环境下会加速分解。但ICG在水溶液中的不稳定性及在血浆中的快速清除率、缺少靶向等缺点限制了它在荧光成像、目标组织定位方面的应用。Guan等将ICG与金纳米颗粒连接以后,包裹在脂质体壳中。能显示出很高的生物相容性和稳定性,以及在小鼠原位肝癌模型中对肿瘤具有很高的识别和成像能力。Magdassi等将ICG与脂质体相连后,通过静脉注入种植了直肠癌的小鼠模型体内。实验结果表明其可以在肿瘤组织中明显浓聚,表明ICG与脂质体结合后可以更好的对肿瘤组织进行定位。贺玲利用FDA批准的近红外荧光染料ICG与西妥昔单抗共价结合成功构建了靶向EGFR的荧光分子探针ICG-Cetuximab,验证了ICG-Cetuximab对结肠癌的靶向性和荧光效率。但由于这些载体具有难修饰、明显的细胞毒性及非特异性荧光很强等问题从而限制了在临床方面的应用。

发明内容

[0005] 本发明提供一种肿瘤靶向成像纳米颗粒,该肿瘤靶向成像纳米颗粒易于获取,光敏剂包封率高,可提高肿瘤成像的特异性。

[0006] 本发明还提供了该肿瘤靶向成像纳米颗粒的制备方法,通过基因工程的手段可在大肠杆菌内大量表达所述肿瘤靶向成像纳米颗粒的载体,再利用乙肝病毒样颗粒具有自组装的特性,在体外装载ICG。

[0007] 本发明的肿瘤靶向成像纳米颗粒采用如下技术方案:一种肿瘤靶向成像纳米颗

粒,包括靶向载体和装载于所述靶向载体的光敏剂,所述靶向载体包括乙肝病毒样颗粒。

[0008] 优选的,所述乙肝病毒样颗粒选自C端144个氨基酸,其73-82、75-81、78-79、78-81、78-82、78-86、78-89、78-94、81-82或82-83任意位点处的氨基酸序列被RGD序列取代。

[0009] 优选的,所述RGD序列两端通过连接肽与所述乙肝病毒样颗粒相连。

[0010] 优选的,所述连接肽为(GGGGS)_n, $1 \leq n \leq 5$ 。

[0011] 优选的,所述光敏剂为吡啶菁绿。

[0012] 优选的,所述乙肝病毒样颗粒C末端还连接有pH敏感多肽;所述pH敏感多肽为聚组氨酸多肽。

[0013] 如上述任意一项所述的肿瘤靶向成像纳米颗粒的制备方法,包括如下步骤:(1)获取编码所述靶向载体的重组基因;(2)将步骤(1)得到的重组基因导入大肠杆菌,诱导大肠杆菌表达靶向载体,分离、纯化得到靶向载体;(3)向靶向载体装载光敏剂。

[0014] 优选的,所述向靶向载体装载光敏剂包括如下步骤:(1)解离:将靶向载体与解离液混合,孵育;(2)将经步骤(1)解离后的靶向载体转移入分子量为8000~14000Da的透析袋中并置于重组缓冲液1中,4℃下过夜透析;更换为重组缓冲液2,透析;(3)取步骤(2)得到的产物与解离液在4℃下孵育;之后,向上述溶液中加入光敏剂,伴随轻微震荡,所得混合溶液共培养;之后,将其移至分子量为8000~14000Da的透析袋中,首先置于重组缓冲液1中并在4℃下过夜透析;将透析袋置于重组缓冲液2中,透析;透析结束即得所述肿瘤靶向成像纳米颗粒。

[0015] 优选的,所述解离液包括30-60mM pH 8.0Tris-HCl、120-180mM NaCl和6.0-10.0M的尿素。

[0016] 优选的,所述重组缓冲液1包括40-60mM pH 8.0Tris-HCl、140-160mM NaCl、9-12%甘油和0.5-1.5%甘氨酸;所述重组缓冲液2包括45-60mM pH 8.0Tris-HCl、135-160mM NaCl和0.5-2%甘氨酸。

[0017] 本发明的有益效果是:本发明的肿瘤靶向纳米颗粒生物相容性好,毒副作用低,具有自组装特性,纳米材料本身即为蛋白类,易于在体内生物降解。本发明所述的靶向载体可通过主动靶向性富集于肿瘤部位。

[0018] 通过选取乙肝病毒样颗粒C端144个氨基酸为主体,并在其抗原决定区插入RGD序列,使得所述靶向载体不仅可靶向肿瘤细胞,还可有效避免乙肝病毒样颗粒造成的免疫反应。

[0019] 还可在在乙肝病毒样颗粒C末端连接pH敏感多肽,使得所述靶向载体在肿瘤部位的弱酸性环境中,纳米药物的纳米粒子形态解聚,装载药物被有效释放,以达到肿瘤靶向成像的作用,提高了肿瘤诊断及切除的准确度。

[0020] 本发明的肿瘤靶向纳米颗粒适用于黑色素瘤、结肠癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、脑癌或头颈癌等多种细胞表面整合素高表达的肿瘤。

[0021] 本发明通过基因工程的手段,使所述靶向载体可以在大肠杆菌中大量生产,生产工艺简单,成本低廉,具有广阔的应用前景。还利用了乙肝病毒样颗粒具备的自组装的特性,在分离、纯化得到靶向载体后通过解离、重组再装载光敏剂,对光敏剂的包封率高。

附图说明

[0022] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0023] 图1为本发明的实施例一得到的靶向载体进行SDS-PAGE电泳的电泳图;

[0024] 图2为透射电镜检测到的实施例一得到的靶向载体的形态结构图;

[0025] 图3为透射电镜检测到的实施例一得到的肿瘤靶向纳米颗粒的形态结构图;

[0026] 图4为以实施例一得到的肿瘤靶向纳米颗粒溶液的浓度为横坐标,以紫外吸光度为纵坐标得到的标准曲线图;

[0027] 图5为实施例一得到的靶向载体和肿瘤靶向纳米颗粒在不同pH下的粒径的曲线图;

[0028] 图6为以实施例一制备得到的肿瘤靶向纳米颗粒的浓度为横坐标,以细胞活力为纵坐标的CCK-8检测结果图;

[0029] 图7为MCF-7乳腺癌细胞对本发明实施例一制得的肿瘤靶向成像纳米颗粒摄取及靶向性成像的检测效果图。

具体实施方式

[0030] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0031] 实施例一:

[0032] 1. 获取重组基因:通过NCBI数据库下载乙肝病毒抗原(HBc)序列(NCBI登录号为ABC97614.1),得到HBc前144个氨基酸病毒样颗粒HBc-144序列和HBcAg全长HBc-183序列,结合大肠杆菌密码子偏爱性,选取HBcAg前144个氨基酸病毒样颗粒HBc-144序列作为本发明的肿瘤靶向成像纳米颗粒的载体的主要组成部分;将编码RGD序列的基因序列插入到编码HBcAg主要免疫区(C端)第73-82、75-81、78-79、78-81、78-82、78-86、78-89、78-94、81-82或82-83任意位置处的氨基酸的基因序列位置处(取代编码原73-82、75-81、78-79、78-81、78-82、78-86、78-89、78-94、81-82或82-83位置处的氨基酸的基因序列),并在编码RGD序列的基因序列两端与其插入到编码乙肝病毒样颗粒的基因序列之间分别连接上编码连接肽(GGGGSGGGSGGGGSGGGGS)的基因序列;在编码HBc-144氨基酸的基因序列的尾部(C端末尾)插入6个组氨酸的基因序列。

[0033] 2. 分离、纯化靶向载体并对得到的靶向载体进行检测:

[0034] 2.1将重组基因导入大肠杆菌BL21(DE3)表达并经过硫酸铵沉淀初纯、DEAE离子交换色谱纯化、分子筛Sepharose CL 4B纯化、蛋白透析及浓缩,最终分离纯化预期的靶向载体。具体步骤如下:

[0035] (1) 使大肠杆菌BL21(DE3)在LB液体培养基中37℃培养8-10h;

[0036] (2) 加入0.1M IPTG,20℃诱导表达18h;

[0037] (3) 收集菌体:表达菌体4000rpm/min,离心10min,弃上清,菌体用20ml高盐裂解液重悬;

[0038] (4) 超声破碎:再加入20ml纯化水,300W,超声20s,停20s,超声二十个循环;

[0039] (5) 硫酸铵沉淀:12000rpm/min,离心10min,上清转入一三角瓶,在磁力搅拌下缓慢加入饱和硫酸铵,4℃反应5-10min,9000rpm/min,离心10min,弃去上清,沉淀用20mM Tris-HCl,pH=8.0、300mM NaCl重悬;

[0040] (6) 离子交换柱色谱纯化,采用DEAE树脂柱,流动相为20mM Tris-HCl (pH8.0)的缓冲液;

[0041] (7) 透析:根据蛋白电泳结果,合并蛋白,转入透析袋(3.5KDa)中,扎紧透析袋,放入干净托盘中,底部和表面撒上PEG 6000,直至体积浓缩至一半左右,即得纯化的靶向载体;

[0042] 2.2对得到的靶向载体进行检测:

[0043] (1) 采用SDS-PAGE电泳验证本发明制得的靶向载体:如说明书附图图1所示,本发明的靶向载体的条带位于靠近25KDa的位置处(矩形框内的条带)。

[0044] (2) 利用透射电镜和激光粒度仪对得到的靶向载体进行形态以及粒径表征,结果表明制备得到的靶向载体呈球形,颗粒大小较均一,水合粒径分布为30~40nm,平均粒径约为 36.5 ± 2.1 nm(如说明书附图图2所示)。

[0045] 根据本发明的方法制备得到的其中一种靶向载体的氨基酸序列如下所示:

[0046] MDIDHYKEFGASVELLSFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPHEHCSPHHTALRQAILCWGELMNLATWVGSNLEDGGGSGGGSGGGSGGGSGRDSGGGSGGGSGGGSGGGGRELVVGYNVNMGLKIRQILWFHISCLTFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPHHHHHH

[0047] 本领域技术人员根据实施例一中1、2部分的记载,可以毫无疑问地得出其他的氨基酸序列,且氨基酸序列末尾的组氨酸的数量也可以为5-15中除6外的其他数字。

[0048] 3. 光敏剂的装载

[0049] (1) 解离:取10 μ L步骤2得到的靶向载体(~10mg/mL)与上述配制好的解离液在4℃下孵育3h。其中,解离液为:50mM pH 8.0Tris-HCl、150mM NaCl、8.0M的尿素(urea),上述任一组分的浓度均为终浓度。

[0050] (2) 重组:将经步骤(1)处理得到的靶向载体溶液移入分子量为8000~14000Da的透析袋中并置于100mL重组缓冲液1中并在4℃下过夜透析,12h后更换为重组缓冲液2。透析时间总共为48h,期间更换缓冲液2次。其中:重组缓冲液1为:50mM pH 8.0Tris-HCl、150mM NaCl、10%甘油(体积分数)和1%甘氨酸(质量分数),上述任一组分的浓度均为终浓度;重组缓冲液2:50mM pH 8.0Tris-HCl、150mM NaCl和1%甘氨酸(质量分数),上述任一组分的浓度均为终浓度。

[0051] (3) ICG装载

[0052] 取1mL步骤(2)处理得到的靶向载体(~1mg/mL),与预先配制好的解离液(同(1)中的解离液)在4℃下孵育2.5h,溶液总体积为10mL。此时向上述解离液中加入500mgICG,伴随轻微震荡,所得混合溶液继续共培养30min。之后,将其移至分子量为8000~14000Da的透析袋中,首先置于重组缓冲液1(与(2)中的重组缓冲液1相同)中并在4℃下过夜透析,12h后更换为重组缓冲液2(与(2)中的重组缓冲液2相同)。透析时间总共为48h,期间更换缓冲液2

次,即得本发明的肿瘤靶向成像纳米颗粒,保存于-20℃下。

[0053] 在透射电子显微镜下观察,证明了本发明构建得到的肿瘤靶向成像纳米颗粒有效组装成形貌均一的单分散颗粒。激光粒度仪进一步验证了其粒径为30~40nm的颗粒结构(详见说明书附图图3)。

[0054] 实施例二:

[0055] 1. 获取重组基因:通过NCBI数据库下载乙肝病毒抗原(HBc)序列(NCBI登录号为ABC97614.1),得到HBc前144个氨基酸病毒样颗粒HBc-144序列和HBcAg全长HBc-183序列,结合大肠杆菌密码子偏爱性,选取HBcAg前144个氨基酸病毒样颗粒HBc-144序列作为本发明的肿瘤靶向成像纳米颗粒的载体的主要组成部分;在编码RGD序列的基因序列两端分别连接上编码连接肽(GGGSGGGSGGGSGGGGS)的基因序列;将编码RGD序列的基因序列插入到编码HbcAg主要免疫区(C端)第73-82、75-81、78-79、78-81、78-82、78-86、78-89、78-94、81-82或82-83位氨基酸的基因序列之间。

[0056] 2. 在此基础上,将重组基因导入大肠杆菌BL21(DE3)表达并经过硫酸铵沉淀初纯融合蛋白、DEAE离子交换色谱纯化、融合蛋白分子筛Sepharose CL 4B纯化、蛋白透析及浓缩(具体步骤同实施例一),最终分离纯化预期的靶向载体。

[0057] 3. 光敏剂的装载:同实施例一

[0058] 实施例三、

[0059] (1) 检测实施例一得到的肿瘤靶向成像纳米颗粒包封ICG率:

[0060] 将实施例一得到的靶向成像纳米颗粒离心三次(30min/次,23000rpm,去离子水重悬),离心完用5mL去离子水重悬并冻干样品。配制1.25、2.5、5.0、7.5、10.0、15.0、20.0ug/ml的ICG,于紫外分光光度计(775nm)下测量吸光度,并绘制标准曲线(详见说明书附图图4)。取适量实施例一样品,加入纯水稀释后测定ICG的吸光度。并根据标准曲线计算包封率。

[0061] 包封率按照以下公式计算:

[0062] 包封率(%) = (实际包载药物量) / (实际投药量) × 100%;

[0063] 其中,实际包载药物量 = 根据标准曲线确定的浓度 × ICG加纯水稀释后的体积;实际投药量 = 所取用的肿瘤靶向成像纳米颗粒的质量 / 实施例二制备得到的肿瘤靶向成像纳米颗粒 × 所用的ICG的量。

[0064] 结果显示,本发明实施例一制得的肿瘤靶向纳米颗粒的包封率达82.5%。

[0065] (2) 考察实施例一制备得到的肿瘤靶向成像纳米颗粒在不同pH下的粒径稳定性:

[0066] 将实施例一制备得到的靶向载体(装载ICG之前,RGD-HBc)与实施例一制备得到的肿瘤靶向成像纳米颗粒(装载ICG后,RGD-HBc/ICG)不同pH值(8.0、7.4、6.4、5.8、5、4)的磷酸盐缓冲溶液共孵育12h,采用激光粒度仪测定其水合粒径。以pH为横坐标,粒径为纵坐标,画图,详见说明书附图图5。

[0067] 从图5可知,在pH小于等于5时,所制备靶向载体(装载ICG之前,RGD-HBc)和肿瘤靶向成像纳米颗粒(装载ICG后,RGD-HBc/ICG)粒径发生明显变大,超过100nm。而在生理pH条件下,RGD-HBc和RGD-HBc/ICG的粒径没有发生明显变化。这说明在酸性溶液中,所制备的肿瘤靶向成像纳米颗粒和靶向载体不再是纳米球状,由于其内部质子化,使得纳米球结构产生排斥力,导致其发生不可逆解聚。

[0068] 实施例四:

[0069] 考察本发明实施例一制备得到的肿瘤靶向成像纳米颗粒对MCF-7乳腺癌细胞的细胞毒性。

[0070] 取对数生长期的MCF-7细胞用0.125%的胰蛋白酶消化制备单细胞悬液,以 1×10^4 个每孔的密度接种于96孔板中,培养过夜使细胞贴壁。将本发明实施例一制备得到的肿瘤靶向成像纳米颗粒与细胞共培养24小时,加入含CCK-8的培养液孵育3小时,通过酶标仪测量空白组(A0)、PBS组(A1)和肿瘤靶向成像纳米颗粒组(A2)的紫外吸收光度值($\lambda=450\text{nm}$),通过公式(4)计算细胞活力(Cell Viability)。

[0071] $\text{Cell Viability}(\%) = (A2-A0) / (A1-A0) \times 100\%$ (其中,上述公式中A2代表A2组检测得到的紫外吸收光度值、A0代表A0组检测得到的紫外吸收光度值、A1代表的是A1组检测得到的紫外吸收光度值)

[0072] 以本发明实施例一得到的肿瘤靶向成像纳米颗粒的浓度为横坐标、以按照细胞活力(Cell Viability)计算公式计算得到的细胞活力为纵坐标绘图,如说明书附图图6所示。

[0073] 图6所示的实验结果表明,本发明(实施例一)的肿瘤靶向成像纳米颗粒对细胞生长繁殖无影响,说明其具有良好的生物安全性。

[0074] 实施例四:MCF-7乳腺癌细胞对本发明实施例一制得的肿瘤靶向成像纳米颗粒摄取及靶向性成像研究。

[0075] 取对数生长期的MCF-7细胞,用0.125%的胰蛋白酶消化成单细胞悬液,以 8×10^3 个每孔的密度铺于12孔板(含盖玻片)中培养。待细胞贴壁,将本发明实施例一制得的肿瘤靶向成像纳米颗粒(6.2ug/mL,根据标准曲线计算得到的吸光度为0.64)与细胞孵育0.5小时、2小时和6小时,再加入Lysotracker Green和Hoechst 33342染料将溶酶体和细胞核染色,最后用PBS缓冲液洗三遍。通过共聚焦显微镜观察材料被细胞摄取的相对量(以荧光强度表征)。

[0076] 以荧光强度(Fluorescence intensity)为纵坐标,时间为横坐标作图,如说明书附图图7所示,检测到本发明实施例一制得的肿瘤靶向成像纳米颗粒与MCF-7细胞孵育6h(用PBS清洗后)后的荧光强度约为0.21,而本发明实施例一制得的肿瘤靶向成像纳米颗粒的荧光强度约为0.64,故孵育6h后,有32.8%的肿瘤靶向成像纳米颗粒被MCF-7细胞摄取。

[0077] 实施例五:

[0078] 考察RGD-HBc/ICG与ICG在荷瘤BALB/C小鼠的体内成像与生物分布

[0079] 利用ICG本身具有的近红外荧光,用小动物活体成像仪(MaestroTM2MaestroTMEX-RR0,美国CRi MaestroTM)观察RGD-HBc/ICG在体内的肿瘤靶向效应。将小鼠分为2组,命名为:RGD-HBc/ICG、ICG。分别对这2组进行尾静脉。在第24小时对肿瘤和主要器官进行切除,进行近红外荧光成像。通过比较肿瘤或主要器官的平均荧光辐射强度比值,观察RGD-HBc/ICG在肿瘤和各器官中的生物分布情况结果可见,荧光信号主要在肿瘤和肝脏中聚集,肿瘤部位与背景的平均荧光信号强度比在ICG组强、有统计学意义($P < 0.01$)。而肝脏和肾脏也是荧光信号较强的部位,各组之间无统计学差异。提示RGD-HBc/ICG组可能通过肝脏进行代谢。

[0080] 本发明的肿瘤靶向成像纳米颗粒可有效靶向肿瘤细胞,有助于提高肿瘤诊断的灵敏度。

[0081] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精

神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 河南省生物工程技术研究中心有限公司

河南省生物工程技术研究中心

<120> 一种肿瘤靶向成像纳米颗粒及其制备方法

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1           5           10           15
Gly Gly Gly Ser
           20
```

<210> 2

<211> 190

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```
Met Asp Ile Asp His Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu
1           5           10           15
Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp
           20           25           30
Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys
           35           40           45
Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu
           50           55           60
Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Gly Gly
65           70           75           80
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
           85           90           95
Gly Ser Arg Gly Asp Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
           100           105           110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Arg Glu Leu Val Val Gly Tyr
           115           120           125
Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln Ile Leu Trp Phe His
           130           135           140
```

Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg	Glu	Thr	Val	Leu	Glu	Tyr	Leu	Val
145					150					155					160
Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Pro	Ala	Tyr	Arg	Pro	Pro	Asn
				165						170					175
Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	His	His	His	His	His	His		
			180					185							190

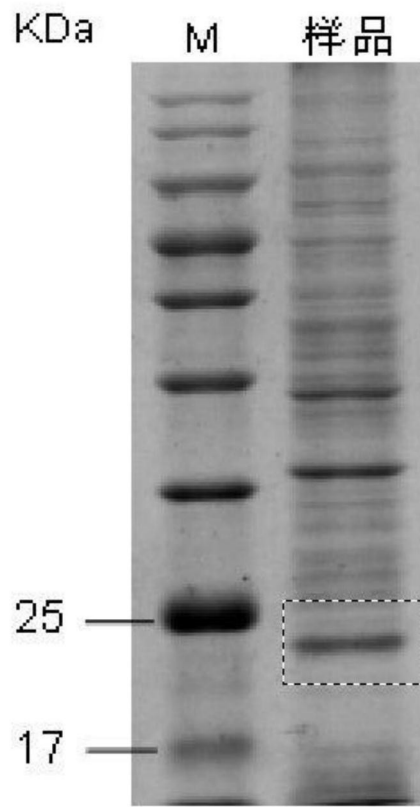


图1

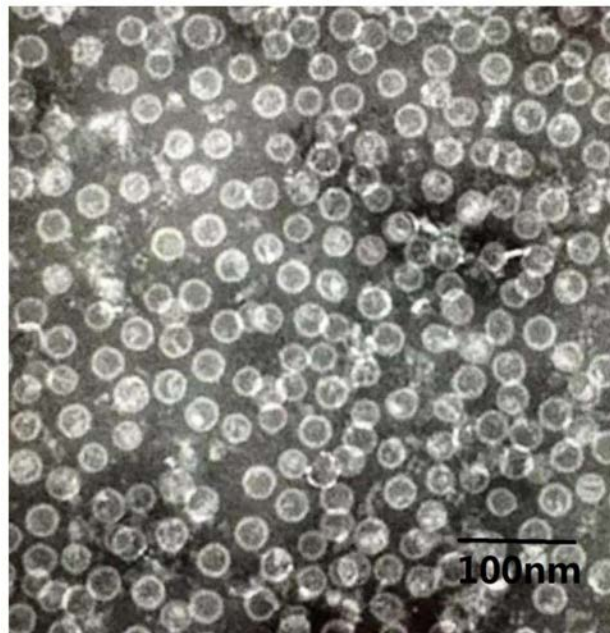


图2

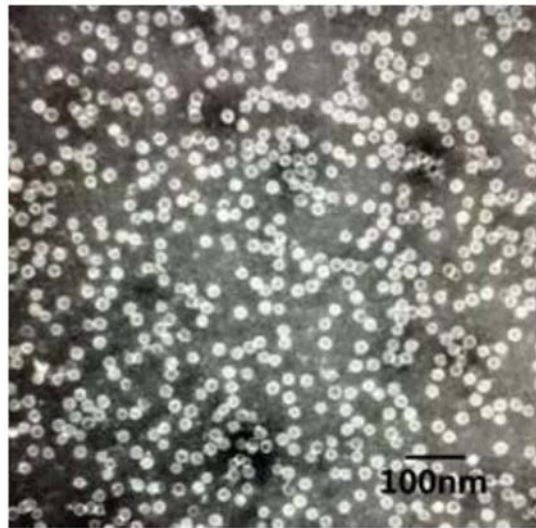


图3

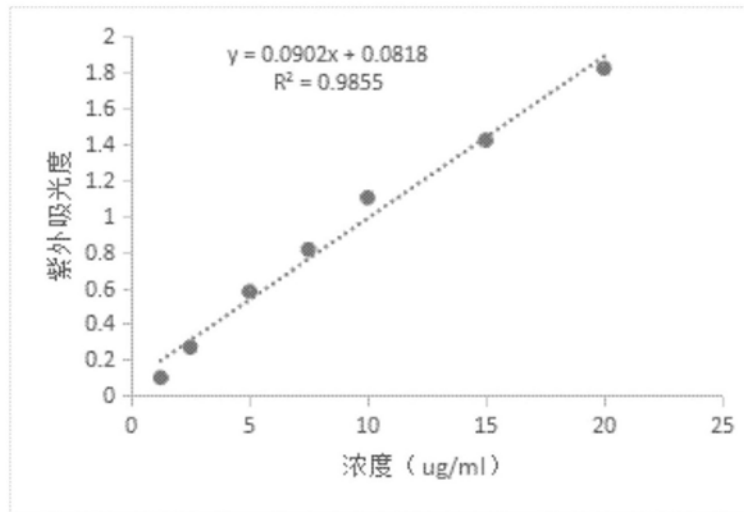


图4

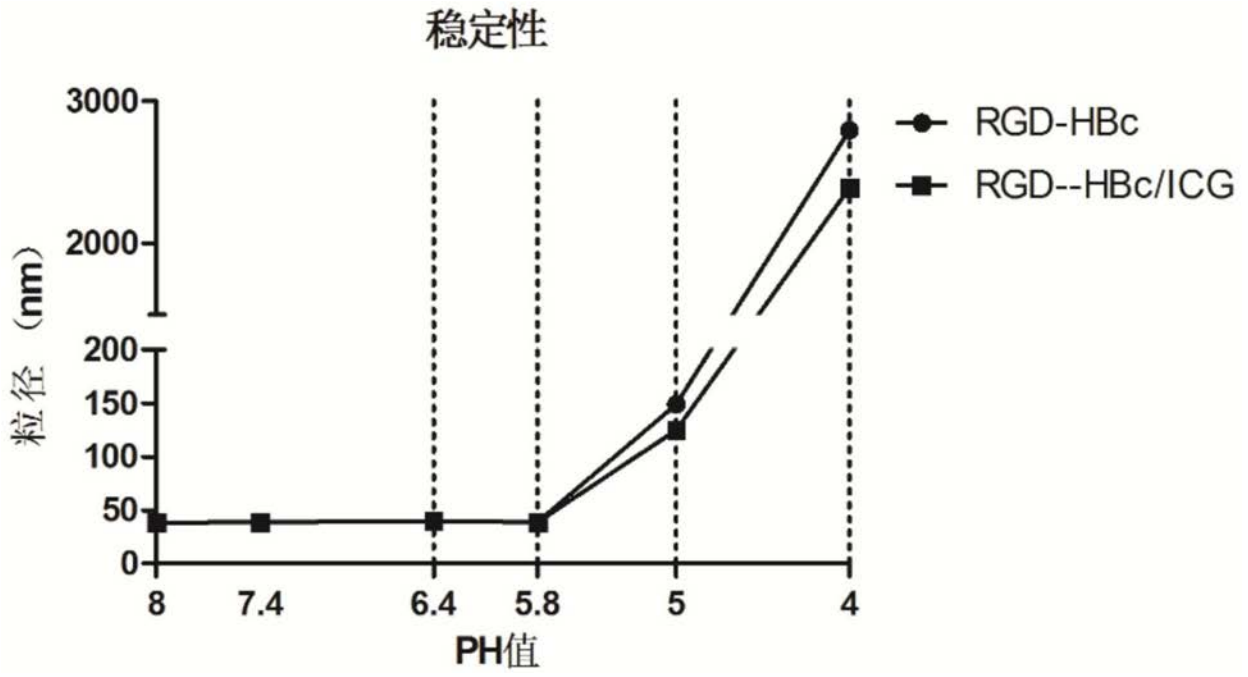


图5

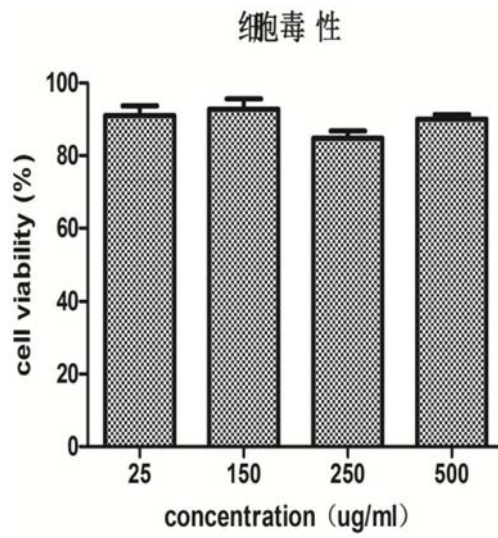


图6

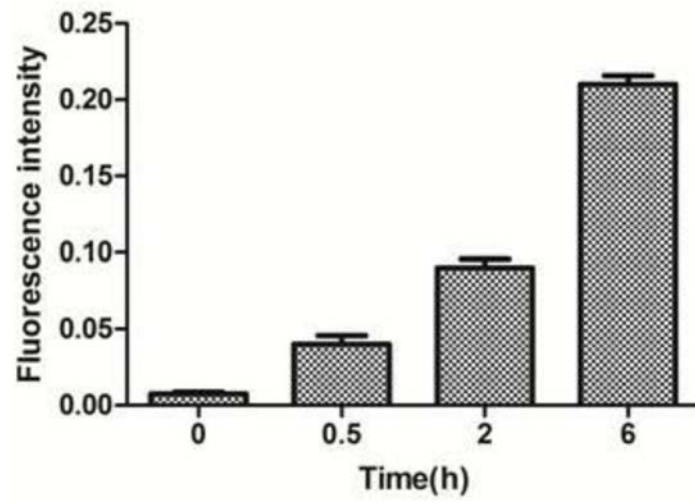


图7