铁蛋白装载“铁-阿霉素”新策略

向建全^{1†}, 周彩玉^{2†}, 张若飞², 曾凡才¹, 范克龙^{2*}

1. 西南医科大学基础医学院, 生物化学与分子生物学教研室, 泸州 646000;

2. 中国科学院生物物理研究所, 中国科学院纳米酶工程实验室, 北京 100101

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: fankelong@ibp.ac.cn

收稿日期: 2021-05-10; 接受日期: 2021-06-09; 网络版发表日期: 2021-07-13

国家自然科学基金(批准号: 31900981)、中国科学院交叉团队(批准号: JCTD-2020-08)和中国科学院青年创新促进会(批准号: 2019093)资助

摘要 铁蛋白具备独特的笼状结构、自组装特性、内在的肿瘤靶向性、良好的生物相容性以及易于规模化生产等优势, 是一种具有良好转化前景的纳米药物载体。目前, 关于铁蛋白装载抗肿瘤药物阿霉素(doxorubicin, Dox)的研究较多, 装载策略包括被动装载和主动内化两类, 其中, 预先螯合金属离子形成“金属-阿霉素”复合物以促进其主动进入铁蛋白内腔的装载方法具有装载量高、杀伤效应强等特点, 然而, 此类方法仍存在铁蛋白回收率低、蛋白完整性受损等缺陷。为此, 本文结合温度孵育法, 利用人重组重链铁蛋白(human heavy chain ferritin, human HFn)发展了一种基于铁离子的“金属-阿霉素”装载新策略, 成功构建了“铁蛋白-铁-阿霉素”(HFn(Fe-Dox), HFeD)药物递送系统, 该系统具有高装载量(80~100个/HFn)、高包封率(50%~63%)和高蛋白回收率(80%~90%)的特点。同时, 该策略很好地保留了铁蛋白的结构完整性、肿瘤靶向性和药物释放可控性, 因而保证了HFeD对肿瘤细胞的特异靶向和杀伤。该方法的报道有望增加HFeD成药的可能性, 推动铁蛋白药物载体的发展与应用。

关键词 铁蛋白, 铁-阿霉素, 药物递送, 肿瘤

铁蛋白是一类天然存在的储铁蛋白, 在多种生物体内广泛表达, 具有调控机体铁代谢稳态以及维持胞内氧化还原平衡的生理学功能^[1], 参与炎症、血管疾病以及肿瘤的发生发展等病理学过程^[2]。铁蛋白具有较为保守的三维结构, 通常由24个亚基自组装形成外径12 nm、内径8 nm的笼状结构; 蛋白壳自身存在6个四重对称的疏水通道以及8个三重对称的亲水通道, 直径约为0.4~0.5 nm, 疏水通道允许有机小分子及O₂分子通过, 亲水通道介导金属离子和H₂O分子进入^[3~5]。同时, 铁蛋白还具备一些独特的性质, 包括高热稳定

性、均一性以及能够敏感地响应pH值完成解聚(pH 2)和自组装过程(pH 7)^[6], 特异性靶向转铁蛋白受体1(transferrin receptor1, TfR1)进而识别肿瘤细胞^[7], 因而易于表达纯化和保存^[8]。基于以上特点, 铁蛋白及其突变体是一类理想的纳米药物递送载体, 在疾病诊疗方面具有广泛的应用前景^[9~11]。

目前在以铁蛋白作为药物载体的研究中, 关于阿霉素(doxorubicin, Dox)装载的研究最多且最为深入。Simsek和Akif Kilic^[12]于2005年首次报道了利用铁蛋白装载Dox, 他们通过改变pH调控铁蛋白的解聚以及

引用格式: 向建全, 周彩玉, 张若飞, 等. 铁蛋白装载“铁-阿霉素”新策略. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 871–878

Xiang J Q, Zhou C Y, Zhang R F, et al. A new strategy of loading ferritin with “iron-Dox” complex (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 871–878, doi: 10.1360/SSV-2021-0134

自组装, 从而成功装载Dox用于肿瘤治疗, 但装载量(原文报道5个/HFn)仍然有待改进. 后续研究在提升Dox的装载量方面做了很多尝试^[8], 目前重链铁蛋白(heavy chain ferritin, HFn)装载Dox的策略可以分为3类: (i) 被动装载, 以pH法^[13~16]和尿素法^[17~19]为代表, 利用铁蛋白解聚后自组装的特性进行Dox装载, 装载量约为29~90个/HFn, 但存在装载量局限和蛋白回收率相对较低的缺陷; (ii) 主动内化, 通过提高反应温度^[20,21], 增加反应压力^[22], 构建特定的铁蛋白突变体^[23]以及螯合金属^[24,25]来促进Dox主动从铁蛋白表面天然的亲疏水通道进入内腔沉积, 装载量被提高到90~165个/HFn; 其中由阎锡蕴团队^[20]于2020年首次报道的温度孵育法最为简单高效, 该方法具有较高的装载量和蛋白回收率, 是近年来发现的较为优良的装载策略; (iii) 偶联Dox至蛋白壳表面, 但该方法为个例被报道^[26].

为保证铁蛋白阿霉素系统的成药性继而推进临床转化, 除了提高药物的装载量, 也需要保证铁蛋白结构和功能的完整性、装载策略工业化生产的可行性, 进一步优化阿霉素的体内释放以及有效联合其他抗肿瘤药物. “金属-阿霉素”复合物无疑是其中一个突破口, 其潜在优势包括: (i) 能够提高Dox装载量; (ii) 减缓内腔Dox药物释放速率; (iii) 协同Dox杀伤^[9,27]. 在已报道的研究中, 顺铂是首个被装载的含金属肿瘤药物^[28], 其后有研究者参考其思路用于装载Dox, 预先利用铜、铁、锰、镁及锌等金属螯合Dox后进行装载, 虽成功装载但仍然存在腔内药物稳定性欠缺、释放过快、蛋白沉淀现象严重、靶向性未知、策略繁杂不易扩大生产等缺陷^[23~25,29].

本研究整合温度孵育法以及Dox螯合铁离子两种HFn装载策略, 首次报道了一种简单、高效的“铁蛋白-铁-阿霉素”(HFn(Fe-Dox), HFeD)合成新策略, 表征了该递送系统的理化特性, 总结了实现该策略的关键条件, 并证实了这种合成方法能够很好地保证铁蛋白结构和功能的稳定性.

1 材料和方法

1.1 实验材料

人HFn质粒(氨基酸序列NP_002023.2, 载体pET 30a)、感受态菌株BL21(TransGene, 北京)、Isopropyl

β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG(Sigma-Aldrich, 美国)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sagon Biotech, 上海)、 FeCl_3 (Sigma-Aldrich)、Dox(BBI Life Sciences, 上海)、Tris(Scientific Chemical, 美国)、超滤离心管(Merck, 美国)、Bradford蛋白定量试剂盒(Solarbio, 北京)、Fluorescein isothiocyanate, FITC(Thermo Fisher Scientific, 美国)、CCK8试剂盒(Dojindo, 上海)、MDA-MB-231(ATCC, 美国)、HT-29(ATCC)、MX-1(上海CTCC细胞库)、细胞培养皿(Corning, 美国).

1.2 实验仪器

AKTA液相色谱仪(GE Healthcare, 美国)、阴离子柱(GE Healthcare)、分子筛(GE Healthcare)、Nanodrop 2000(Thermo Fisher Scientific)、Zetasizer Nano ZS90(Thermo Fisher Scientific)、Chirascan Plus CD(英国应用光物理公司)、透射电子显微镜Spirit 120kV(FEI, 美国)、多功能酶标仪Spectra Max M4(Molecular Devices, 美国)、共聚焦显微镜LSM700(ZIESS, 德国)、流式细胞仪Calibur(BD, 美国).

1.3 蛋白表达和纯化

人重组重链铁蛋白的质粒构建、原核表达及纯化方法参照实验室之前的研究^[20].

1.4 药物装载及定量

向含Dox的水溶液中加入 FeCl_3 溶液, 使Dox和 FeCl_3 终浓度均为2 mmol/L, 室温共孵育5 min以获得Fe-Dox复合物, 取100 μL 该复合物加入700 μL 铁蛋白溶液(Tris-HCl, pH 9.3), 令Fe-Dox最终浓度为250 $\mu\text{mol/L}$ (0.15 mg/mL), HFn为2 $\mu\text{mol/L}$ (1 mg/mL). 60℃水浴2 h后12400 $\times$ g离心5 min取上清, 过滤后4℃保存, 过程避光. 探究不同“Fe-Dox:HFn”摩尔浓度比例对装载的影响时, 保证铁蛋白终浓度为2 $\mu\text{mol/L}$ (1 mg/mL), 分别取上述2 mmol/L的Fe-Dox复合物溶液200, 150, 120, 100 μL 使摩尔浓度比分别为250:1, 188:1, 150:1和125:1进行孵育装载. 蛋白浓度定量采用Bradford法和SDS-PAGE进行测定(BCA法受到Dox干扰); Dox用Nanodrop测定488 nm处的吸光度值来定量, 但因Dox与Fe螯合后在488 nm处的最大吸收峰下降、600 nm处升高^[30], 故定量较为粗略, 细胞实验以蛋白定量为准. 装载个数为Dox与HFn的摩尔浓

度比, 包封率为Dox装载前后的摩尔浓度比, 蛋白回收率为装载前后的HFn摩尔浓度比。

1.5 理化特性表征

“紫外-可见光”吸收光谱: 利用AKTA液相色谱仪测定蛋白及药物在280 nm(铁蛋白)、488 nm(Dox)、600 nm(Fe-Dox)的吸收峰图谱。

透射电镜-蛋白负染: 向覆有碳镀支持膜的铜载网上滴加30 μ L浓度为0.1 mg/mL的蛋白样品, 用2%醋酸双氧铀负染色1 min后镜下观测蛋白形态和分散性。

Zeta电势和圆二色谱: 样品稀释至0.2 mg/mL, 分别用圆二色谱仪检测蛋白壳二级结构完整性, 用激光粒度仪测定酸性(pH 5)、中性(pH 7)以及碱性(pH 9)条件下蛋白表面电势。

Native-PAGE检测: 配制5%分离胶和3.6%浓缩胶, 加入8 μ g蛋白, 恒压110 V电泳1~2 h, 考马斯亮蓝染色1 h后脱色。

药物释放: 将HFeD分别加入PBS(pH 7.4)、醋酸盐缓冲液(pH 4.5)以及PBS-5 mmol/L EDTA(pH 2), 总体积0.5 mL, Dox终浓度为10 μ mol/L, 4 $^{\circ}$ C避光孵育; 分别在第0, 1, 2, 4, 8, 16, 18, 22以及24 h从总体积中取出50 μ L用多功能酶标仪检测缓冲液中游离Dox的荧光值(激发光波长488 nm, 散射光波长595 nm)。药物释放率为PBS或醋酸盐溶液中所释放的游离Dox荧光值与PBS-5 mmol/L EDTA溶液中完全释放的游离Dox荧光值的比值。

1.6 肿瘤靶向性验证

FITC标记: 将溶解于DMSO中的FITC加入含1~2 mg/mL HFn的0.1 mol/L碳酸盐缓冲液中(pH 9), 4 $^{\circ}$ C避光孵育12 h, 其后利用超滤管将溶液置换成PBS, 分装后-80 $^{\circ}$ C保存。

免疫细胞荧光: 向20 mm的confocal皿中铺种 3×10^5 个细胞, 12 h后分别加入10 μ g/mL FITC-HFn以及FITC-HFeD, 孵育12 h后镜下观测(FITC与Dox激发光波长均为488 nm, 散射光波长FITC最大值为520 nm, Dox最小值为570 nm)。

流式细胞术: 向12孔板中铺种 4×10^5 个细胞, 12 h后加入10 μ g/mL HFeD, 孵育2或12 h后检测Dox的荧光变化。

1.7 细胞杀伤

向96孔板中铺种 8×10^3 个细胞, 12 h后分别加入100 μ L 浓度为0, 0.39063, 0.78125, 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/mL的HFeD, 孵育72 h, CCK8检测前用PBS清洗2次, 加入CCK8后检测450 nm处的吸光度值。

2 结果

2.1 Fe-Dox复合物的装载及理化表征

本研究整合了温度孵育法和螯合铁离子两种HFn载药策略, 通过优化孵育温度、Fe-Dox与蛋白配比以及铁离子价态等装载条件, 在人重组重链铁蛋白内腔成功装载了Fe-Dox复合物(图1A)。层析结果表明, 所制备的HFeD在经过分子筛时, 铁蛋白的出峰位置(280 nm)具有明确的Fe-Dox的吸收峰(488和600 nm)(图1B); 肉眼可直接观察到铁离子与Dox孵育形成的Fe-Dox复合物会发生明显的沉淀, 而当孵育体系中加入铁蛋白后, 沉淀量明显减少(图2A)。以上证据表明, Fe-Dox与铁蛋白发生了相互作用, 并且抑制了Fe-Dox自身的聚集。进一步地, 实验结果证实, 这种相互作用是由于Fe-Dox被载入HFn内腔而非结合在蛋白壳表面: (i) Native-PAGE结果显示, 在HFeD的蛋白条带位置明显观测到紫褐色的Fe-Dox复合物, 且HFeD的条带位置与HFn基本一致, 但与蛋白壳表面标记有FITC的HFn有明显差异(图2C)^[31]; (ii) Zeta电势结果显示, HFeD表面电荷与HFn一致(图1D)。同时, 以下证据证实该装载过程并未损伤铁蛋白天然结构: (i) TEM电镜结果及Zeta电势结果表明, HFn蛋白载药前后均表现出良好的分散性和形态学结构特征(图1C和D); (ii) 圆二色谱分析显示, 蛋白壳 α 螺旋的天然结构并无明显改变(图1E)^[31]。定量分析结果表明, 每个HFeD装载80~100个Dox, 药物包封率为50%~63%, 蛋白回收率为80%~90%。综上, 本研究采用的策略能够简洁高效地装载Fe-Dox且不影响HFn正常的理化特性。但不可否认的是, 由于“金属-阿霉素”易沉淀的特性, 电镜下观测到仍有极少部分蛋白形态改变、体积增大(图1C, 红色箭头所示), Native-PAGE胶孔道下方也有少量蛋白残留(图2C), 推测是由于Fe-Dox结合在部分蛋白外表面介导蛋白产生了多聚体。

图 1 HFeD装载示意图及表征。A: 装载示意图; B: “紫外-可见光”吸收光谱, $A_{280\text{ nm}}$, $A_{488\text{ nm}}$ 和 $A_{600\text{ nm}}$ 分别为HFn、游离Dox以及Fe-Dox复合物的最大吸收峰; C~E: 透射电子显微镜(C)、Zeta电势(D)以及圆二色谱(E)分别表征HFeD的粒径和分散性、表面电荷以及蛋白壳二级结构的完整性

Figure 1 Schematic and characteristics of HFeD loading. A: Schematic of HFeD loading; B: “UV-Vis” absorption spectra at 280, 488 and 600 nm represents HFn, free Dox and Fe-Dox complex, respectively; C~E: transmission electron microscopy (C), Zeta potential analyses (D) and circular dichroism (E) characterizes the particle size and dispersion, surface charge, and integrity of secondary structure of HFeD, respectively

2.2 影响装载的关键因素

已有报道表明, 反应温度、蛋白药物比例、pH值以及孵育时间是温度法装载游离Dox的关键因素^[20,21]。基于此, 此项工作首次报道了装载Fe-Dox复合物的关键影响因素, 包括“Fe-Dox:HFn”摩尔浓度比和铁离子价态。实验结果表明, 当“Fe-Dox:HFn”摩尔比为125~150:1时装载效果最佳(图2A)(不同于“Dox:HFn”摩尔比为250:1时装载效率和蛋白回收率最高)。进一步地, 本研究首次报道了铁价态对装载的影响, 结果显示: (i) 三价铁与Dox螯合更完全, 已有报道中Dox与Fe螯合后在488 nm处的最大吸收峰下降、600 nm处升高^[30]; 本研究的“紫外-可见光”吸收光谱结果显示, 二价铁与Dox螯合后600 nm处上升的程度明显不及三价铁(图2B)。 (ii) 三价铁装载的蛋白结构完整、更均一稳定, Native-PAGE表明, 二价铁装载蛋白孔道及其下方的高聚物残留更加明显(图2C); 同时, 电子显微镜与Zeta电势结果显示, 装载二价铁后, 铁蛋白在溶液中的稳定性欠佳、表面电荷改变明显(图2D和E); 圆二色谱分析证实, 装载二价铁后, 铁蛋白的二级结构也有轻微改变(图2F)。综上, HFn成功装载Fe-Dox复合物的关键因素包括,

(i) 采用三价铁与Dox螯合; (ii) “Fe-Dox:HFn”摩尔浓度为125~150:1; (iii) 反应温度为60°C^[20]。

2.3 HFeD能够特异识别并杀伤高表达TfR1的肿瘤细胞

由于铁蛋白能够特异性识别TfR1受体, 因此本研究利用高表达TfR1的HT-29细胞系和MDA-MB-231细胞系以及不表达TfR1的MX-1细胞系^[32,33]验证了该药物递送系统的靶向性、药物释放可控性以及抗肿瘤杀伤功能。靶向性方面, 免疫细胞荧光结果显示, 与天然铁蛋白一致, 标记FITC的HFeD(绿色荧光)能够选择性进入高表达TfR1的MDA-MB-231细胞并完成药物释放(Dox发生聚集或与金属螯合后荧光会发生可逆性淬灭, 因此在蛋白内腔时无荧光信号; MX-1细胞中微弱的Dox荧光推测为胞外释放后进入胞内, 因在胞内未检测到FITC代表的蛋白信号)(图3A); 进一步地, 流式细胞术表明, 经由TfR1受体进入MDA-MB-231细胞中HFeD的总量具有时间依赖性(MX-1细胞中少量的荧光信号与免疫细胞荧光结果相印证)(图3B)。在药物可控释放方面, 体外利用醋酸缓冲液模拟溶酶体环

图 2 HFeD装载的关键因素。A: “Fe-Dox:HFn”摩尔浓度比和反应温度影响装载效率; B~E: Fe的价态影响装载效率在“紫外-可见光”光谱(B)、Native-PAGE电泳(C)、透射电子显微镜(D)、Zeta电势(E)以及圆二色谱(F)检测中均存在差异。HFe²⁺D: HFn(Fe²⁺-Dox); HFe³⁺D: HFn(Fe³⁺-Dox)

Figure 2 Key factors for HFeD loading. A: The ratio of molar concentration of “Fe-Dox:HFn” and temperature affect the loading process; B~E: “UV-Vis” spectroscopy (B), Native-PAGE (C), transmission electron microscopy (D), Zeta potential analyses (E) and circular dichroism (F) illustrates that the valence state of Fe ion plays a vital role on loading efficiency

境、PBS模拟细胞外环境观察药物释放, 结果显示, 在酸性环境中, 该系统能够在1~2 h内快速响应释放腔内70%以上的药物。而在中性环境中, 该系统24 h内释放药物约10%(图3C)。肿瘤杀伤效果与上述结果一致, HFeD能够识别并杀伤高表达TfR1的MDA-MB-231细胞和HT-29细胞, 但对不表达TfR1的MX-1细胞则无杀伤作用(图3D)。综上所述, 利用该策略合成的HFeD能够特异识别高表达TfR1的肿瘤细胞, 入胞后快速响应溶酶体环境完成可控药物释放, 最终完成对肿瘤细胞的特异性杀伤。

3 讨论

在已报道的研究中, 研究者通过整合铜离子或改造铁蛋白来装载“金属-阿霉素”复合物, 虽成功装载但

均存在一定的缺陷。其中, Xie团队^[24]2013年通过筛选多种过渡金属与Dox螯合发现, 相比锰、镁、铁和锌离子, 整合铜离子具有更高的包封率(天然铁蛋白, 30.4%; 表面修饰的铁蛋白, 73.49%)和蛋白回收率(天然铁蛋白, 76.2%; 表面修饰的铁蛋白, 33%), 该研究展示了HFn(Cu-Dox)在体内外良好的肿瘤抑制效果, 但药物释放结果表明80%药物在10 h内泄漏, 这是由于铜离子本身与Dox结合不稳定, 极易受到干扰解聚^[29,34,35]; 另外, 在改造铁蛋白方面, Jung团队^[23]通过扩大铁蛋白四重轴通道直径成功装载Fe-Dox复合物, 装载个数最高达129个/HFn, 蛋白回收率最高为81%, 是目前装载效果较好的策略, 但其缺陷在于实际应用可行性, 一方面该递送系统在体内环境中不可避免地会发生药物泄漏, 另一方面, 改造铁蛋白的策略本身均会不同程度地影响天然铁蛋白在生物相容性、稳定

图 3 HFeD特异识别并杀伤高表达TfR1的肿瘤细胞。A和B: 免疫细胞荧光(A)和流式细胞术(B)表明, HFeD特异识别高表达TfR1的细胞系MDA-MB-231; C和D: 体外模拟HFeD进入溶酶体后响应酸性环境释放内腔装载的Dox(C)并完成特异杀伤(D)

Figure 3 HFeD specifically recognizes and then kills tumor cells highly expressing TfR1. A and B: Immunofluorescence (A) and flow cytometry (B) demonstrate that HFeD specifically binds to cell line MDA-MB-231 highly expressing TfR1; C and D: mimic responding to acidic environment, releasing Dox in the lysosome (C) and thus accomplishing specific killing of tumor *in vitro* (D)

性和均一性等方面的优势。

本文通过整合温度孵育法和螯合铁离子两种HFn载药策略, 优化关键装载条件, 首次报道了一种简单高效的Fe-Dox复合物装载策略, 该策略同时具备高装载量(80~100个/HFn)、高包封率(50%~63%)和高蛋白回收率(80%~90%)的特点, 并保证了HFn结构和功能的完整性, 为“金属-阿霉素”复合物的装载提供了一个新的途径, 为铁蛋白载药的临床应用提供了新的思路。

此外, 本研究仍存在一些局限, 需要进一步的工作

去解释, 包括: (i) Fe-Dox进入铁蛋白腔内的机制, 本研究使用的 Fe^{3+} 与游离Dox螯合比例为 $\text{Fe}:\text{Dox}=1:1\sim 3$ ^[36], 故推测其可能与游离Dox类似, 通过四重轴^[21]或二重轴^[20]通道主动进入腔内, 但需进一步工作证实; (ii) HFeD递送系统的杀伤机制, 其中Fe-Dox复合物中铁的价态鉴定以及入胞后是否能够很好地引起铁死亡协同Dox杀伤肿瘤仍有待考究; (iii) HFeD体内分布和代谢情况, 在体内是否仍具备良好的肿瘤靶向性, 药物能否可控释放以及进一步的毒理学、药代学评估仍需深入探究。

致谢 感谢中国科学院生物物理研究所, 中国科学院纳米酶工程实验室贺久洋博士对英文摘要及图注的写作指导, 金奕良博士参与文章校对, 方龙博士、马龙博士在实验方面的帮助, 赵越博士在投稿过程中的帮助。

参考文献

- 1 Harrison P M, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1275: 161–203
- 2 Knovich M A, Storey J A, Coffman L G, et al. Ferritin for the clinician. *Blood Rev*, 2009, 23: 95–104
- 3 Theil E C. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56: 289–315
- 4 Jiang B, Fang L, Wu K, et al. Ferritins as natural and artificial nanozymes for theranostics. *Theranostics*, 2020, 10: 687–706
- 5 Bou-Abdallah F. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800: 719–731
- 6 Kang S, Oltrogge L M, Broomell C C, et al. Controlled assembly of bifunctional chimeric protein cages and composition analysis using noncovalent mass spectrometry. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 16527–16529
- 7 Li L, Fang C J, Ryan J C, et al. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 3505–3510
- 8 He J, Fan K, Yan X. Ferritin drug carrier (FDC) for tumor targeting therapy. *J Control Release*, 2019, 311–312: 288–300
- 9 Truffi M, Fiandra L, Sorrentino L, et al. Ferritin nanocages: A biological platform for drug delivery, imaging and theranostics in cancer. *Pharmacol Res*, 2016, 107: 57–65
- 10 Fan K L, Zhou M, Yan X Y. Novel properties and applications of human ferritin expressed by *Escherichia coli* (in Chinese). *Microbiol China*, 2014, 41: 520–538 [范克龙, 周萌, 阎锡蕴. 细菌生产人铁蛋白的新功能及应用. *微生物学通报*, 2014, 41: 520–538]
- 11 Ma L, Fan K L. The finding and application of the novel properties of nanozyme and ferritin (in Chinese). *Chin J Nat*, 2020, 42: 1–11 [马龙, 范克龙. 纳米酶和铁蛋白新特性的发现和应用. *自然杂志*, 2020, 42: 1–11]
- 12 Simsek E, Akif Kilic M. Magic ferritin: A novel chemotherapeutic encapsulation bullet. *J Magn Magn Mater*, 2005, 293: 509–513
- 13 Kilic M A, Ozlu E, Calis S. A novel protein-based anticancer drug encapsulating nanosphere: apoferritin-doxorubicin complex. *J Biomed Nanotechnol*, 2012, 8: 508–514
- 14 Fracasso G, Falvo E, Colotti G, et al. Selective delivery of doxorubicin by novel stimuli-sensitive nano-ferritins overcomes tumor refractoriness. *J Control Release*, 2016, 239: 10–18
- 15 Falvo E, Tremante E, Arcovito A, et al. Improved doxorubicin encapsulation and pharmacokinetics of ferritin-fusion protein nanocarriers bearing proline, serine, and alanine elements. *Biomacromolecules*, 2016, 17: 514–522
- 16 Damiani V, Falvo E, Fracasso G, et al. Therapeutic efficacy of the novel stimuli-sensitive nano-ferritins containing doxorubicin in a head and neck cancer model. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1555
- 17 Liang M, Fan K, Zhou M, et al. H-ferritin-nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 14900–14905
- 18 Lei Y, Hamada Y, Li J, et al. Targeted tumor delivery and controlled release of neuronal drugs with ferritin nanoparticles to regulate pancreatic cancer progression. *J Control Release*, 2016, 232: 131–142
- 19 Mazzucchelli S, Bellini M, Fiandra L, et al. Nanometronomic treatment of 4T1 breast cancer with nanocaged doxorubicin prevents drug resistance and circumvents cardiotoxicity. *Oncotarget*, 2017, 8: 8383–8396
- 20 Jiang B, Chen X, Sun G, et al. A natural drug entry channel in the ferritin nanocage. *Nano Today*, 2020, 35: 100948
- 21 Inoue I, Chiba M, Ito K, et al. One-step construction of ferritin encapsulation drugs for cancer chemotherapy. *Nanoscale*, 2021, 13: 1875–1883
- 22 Wang Q, Zhang C, Liu L, et al. High hydrostatic pressure encapsulation of doxorubicin in ferritin nanocages with enhanced efficiency. *J Biotech*, 2017, 254: 34–42
- 23 Ahn B, Lee S G, Yoon H R, et al. Four-fold channel-nicked human ferritin nanocages for active drug loading and pH-responsive drug release. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 2909–2913
- 24 Zhen Z, Tang W, Chen H, et al. RGD-modified apoferritin nanoparticles for efficient drug delivery to tumors. *ACS Nano*, 2013, 7: 4830–4837
- 25 Wang Z, Dai Y, Wang Z, et al. Metal ion assisted interface re-engineering of a ferritin nanocage for enhanced biofunctions and cancer therapy. *Nanoscale*, 2018, 10: 1135–1144
- 26 Huang X, Chisholm J, Zhuang J, et al. Protein nanocages that penetrate airway mucus and tumor tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E6595–E6602
- 27 Jabłońska-Trypuc A, Świdorski G, Krętowski R, et al. Newly synthesized doxorubicin complexes with selected metals—Synthesis, structure and anti-breast cancer activity. *Molecules*, 2017, 22: 1106

- 28 Yang Z, Wang X, Diao H, et al. Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin. *Chem Commun*, 2007, doi: 10.1039/b705326f
- 29 Feng M, Yang Y, He P, et al. Spectroscopic studies of copper(II) and iron(II) complexes of adriamycin. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectr*, 2000, 56: 581–587
- 30 Beraldo H, Garnier-Suillerot A, Tosi L, et al. Iron(III)-adriamycin and Iron(III)-daunorubicin complexes: physicochemical characteristics, interaction with DNA, and antitumor activity. *Biochemistry*, 1985, 24: 284–289
- 31 Jiang B, Zhang R, Zhang J, et al. GRP78-targeted ferritin nanocaged ultra-high dose of doxorubicin for hepatocellular carcinoma therapy. *Theranostics*, 2019, 9: 2167–2182
- 32 Fan K, Cao C, Pan Y, et al. Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues. *Nat Nanotech*, 2012, 7: 459–464
- 33 Corte-Rodríguez M, Blanco-González E, Bettmer J, et al. Quantitative analysis of transferrin receptor 1 (TfR1) in individual breast cancer cells by means of labeled antibodies and elemental (ICP-MS) detection. *Anal Chem*, 2019, 91: 15532–15538
- 34 Shokeen M, Anderson C J. Molecular imaging of cancer with copper-64 radiopharmaceuticals and positron emission tomography (PET). *Acc Chem Res*, 2009, 42: 832–841
- 35 Lin X, Xie J, Niu G, et al. Chimeric ferritin nanocages for multiple function loading and multimodal imaging. *Nano Lett*, 2011, 11: 814–819
- 36 Bachur N R, Friedman R D, Hollenbeck R G. Physicochemical characteristics of ferric adriamycin complexes. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1984, 12: 5–9

A new strategy of loading ferritin with “iron-Dox” complex

XIANG JianQuan¹, ZHOU CaiYu², ZHANG RuoFei², ZENG FanCai¹ & FAN KeLong²

¹ Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;

² CAS Engineering Laboratory for Nanozyme, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Ferritin, owing to its unique nanocage architecture, self-assembling ability, inherent tumor-targeting, excellent biocompatibility and capability to be produced on a large scale, has emerged as a promising nano-drug carrier for clinical translation. Currently, loading of anti-tumor drug, especially doxorubicin (Dox), in ferritin has been widely investigated via either passive encapsulation or active internalization. Among these methods, strategies that pre-complex metal ions with Dox to form “metal-Dox” complexes that promote entry of Dox into the cavity of ferritin actively enable higher loading capacity and enhanced killing effect. However, these ways currently used still suffer from low recovery rate and impaired integrity. In order to overcome these shortcomings, we here report a new loading strategy, a temperature-related and iron ion-depended method, in which we utilized human heavy chain ferritin (human HFn) and successfully constructed the HFn(Fe-Dox) drug delivery system (HFeD), which achieved a high loading capacity (80–100 Dox per HFn), high encapsulation rate (50%–63%) and considerable recovery rate of HFn (80%–90%). Meanwhile, the strategy reported here preserves the structural integrity, tumor-targeting and controlled drug release of HFn, and thus HFeD is able to specifically target and kill tumor cells, which will inform the druggability of HFeD and application of ferritin-based nano-drug carriers.

ferritin, Fe-Dox, drug delivery, tumor

doi: 10.1360/SSV-2021-0134