

## 专家评述

- 379 纳米技术在药物递送中的应用与展望 ..... 周建平

## 药学前沿

- 383 脂质体注射剂的应用现状及其发展趋势 ..... 项心妍/杜爽/丁杨/周建平  
394 无机纳米材料在药物递送中的研究进展 ..... 周叶舒/王燕梅/张倍源/吴帅聪/杨磊/尹莉芳  
406 基于DNA的纳米材料在肿瘤治疗领域的研究进展 ..... 陈焱/尹骏/姚文兵/高向东  
418 靶向肿瘤纳米晶体的研究进展 ..... 唐克琴/林华庆/李舒虹/董理心/鲁泊宏/蒋鸿  
425 淋巴靶向药物递送系统在抗肿瘤转移治疗中的研究进展 ..... 冯旻/徐霄/莫然  
433 蛋白及多肽类药物长效化制剂学技术研究进展 ..... 丁源/陈新/涂家生/孙春萌

## 论 文

- 441 ALK5抑制剂的设计、合成及其生物学活性评价 ..... 许涛/王小伟/刘晓蓉/王亚洲/李志裕  
449 米拉贝隆的合成工艺改进 ..... 韩成群/邹巧根/孙茜/夏云燕  
454 滇重楼地上部分化学成分研究 ..... 陶俊杰/杨杰/闻晓东  
461 透明质酸修饰天冬酰胺酶自组装仿生纳米囊的稳定性及其  
体内药代动力学 ..... 刘煜莹/李瑶/杨强/陈冉/李开铃/张景勃  
466 盐酸利多卡因注射剂遗传毒性杂质研究 ..... 冼芷然/孙春萌/骆雪芳/钟文英  
472 GC-MS法测定甲磺酸中3种甲磺酸烷基酯类遗传毒性杂质 ..... 陈忆铃/冯江江/杨海雪/时雅萍/李龙因/冯芳  
479 鹿瓜多肽注射剂质量评价与研究 ..... 苏喆/周朝东/马冰/张晶/伏圣青/王冲/税凤春/黄哲甦  
488 苯甲酸阿格列汀中未知杂质的分离与鉴定 ..... 张贻伦/赵心怡/董淑波/董超/沈文斌/董海娟  
494 黄芪对小鼠心脑血管系统代谢稳态的影响 ..... 邓小颖/杨旭萍/刘佩芳/张尊建/黄寅

## 综 述

- 502 神经递质在肿瘤发生发展中的作用研究进展 ..... 田州彤/倪嘉平/胡唯伟

## 信 息

### 本刊讯

《中国药科大学学报》再次入选中国科学引文数据库(CSCD)核心库(393)

### 校园信息

中国药科大学2020年1~7月获授权专利情况(417; 424; 493)

奚涛课题组在 *Journal of Hematology & Oncology* 发表最新研究成果(432)

### 征订启事

欢迎订阅2020年《中国药科大学学报》(501)

【期刊基本参数】 CN 32-1157/R\*1956\*b\*A4\*128\*zh\*P\*40.00\*2000\*17\*2020-08

责任编辑: 陈玲 顾凯 邹栩

绘图: 巢静妍

英文审校: 张静



## Commentary

- 379 Application and prospect of nanotechnology in the drug delivery system ..... ZHOU Jianping

## Forward Pharmaceutical Sciences

- 383 Application and development of liposome injection ..... XIANG Xinyan/DU Shuang/DING Yang/ZHOU Jianping  
394 Research progress of inorganic nanomaterials in drug delivery system  
..... ZHOU Yesu/WANG Yanmei/ZHANG Beiyuan/WU Shuaicong/YANG Lei/YIN Lifang  
406 Advances of DNA-based nanomaterials in tumor therapy ..... CHEN Ye/YIN Jun/YAO Wenbing/GAO Xiangdong  
418 Advances in tumor targeted nanocrystals ..... TANG Keqin/LIN Huaqing/LI Shuhong/DONG Lixin/  
LU Bohong/JIANG Hong  
425 Advances in lymphatic targeted drug delivery system for treatment of tumor metastasis ... FENG Yang/XU Xiao/MO Ran  
433 Progress in technology of long-acting preparations of protein and peptide drugs  
..... DING Yuan/CHEN Xin/TU Jiasheng/SUN Chunmeng

## Original Articles

- 441 Design, synthesis and biological evaluation of ALK5 inhibitors  
..... XU Tao/WANG Xiaowei/LIU Xiaorong/WANG Yazhou/LI Zhiyu  
449 Improvement of synthesis process of mirabegron ..... HAN Chengqun/ZOU Qiaogen/SUN Qian/XIA Yunyan  
454 Studies on the chemical constituents in the aerial parts of *Paris polyphylla*  
var. *Yunnanensis* ..... TAO Junjie/YANG Jie/WEN Xiaodong  
461 Stability and pharmacokinetics of hyaluronic acid-modified asparaginase  
self-assembled biomimetic nanocapsule ..... LIU Yuying/LI Yao/YANG Qiang/CHEN Ran/  
LI Kailing/ZHANG Jingqing  
466 Profiling of genotoxic impurities in a lidocaine hydrochloride injection  
..... XIAN Zhiran/SUN Chunmeng/LUO Xuefang/ZHONG Wenying  
472 Determination of genotoxic impurities of alkyl methanesulfonates in  
methanesulfonic acid by gas chromatography-mass spectrometry ..... CHEN Yiling/FENG Jiangjiang/YANG Haixue/  
SHI Yaping/LI Longnan/FENG Fang  
479 Quality evaluation and specification research of Cervus and Cucumis  
polypeptide injection ..... SU Zhe/ZHOU Chaodong/MA Bing/ZHANG Jing/FU Shengqing/  
WANG Chong/SHUI Fengchun/HUANG Zhesu  
488 Isolation and identification of unknown impurities of alogliptin benzoate ..... ZHANG Yilun/ZHAO Xinyi/DONG Shubo/  
DONG Chao/SHEN Wenbin/DONG Haijuan  
494 Effect of *Astragalus membranaceus* on metabolic homeostasis of cardio-cerebrovascular  
system in mice ..... DENG Xiaoying/YANG Xuping/LIU Peifang/ZHANG Zunjian/HUANG Yin

## Review

- 502 Research progress on the role of neurotransmitters in tumorigenesis and development  
..... TIAN Zhoutong/NI Jiaping/HU Weiwei

· 专家评述 ·

## 纳米技术在药物递送中的应用与展望

周建平

(中国药科大学药学院药剂系, 南京 210009)



[专家介绍] 周建平:教授、博士生导师,中国药科大学药剂学科带头人,江苏省教学名师,教育部优秀骨干教师,兼任国家药典委员会药剂专委会主任委员,江苏省和南京药学会药剂专委会主任委员,江苏省政协委员、九三学社中国药科大学支社主委员,科技部及国家自然科学基金委等项目审评专家等。长期从事药物新制剂、新剂型和新技术,尤其是缓释和速释给药系统新技术等研究;近年来特别关注于脂质体、脂蛋白、高聚物胶束等微粒给药系统与抗肿瘤活性载体领域的研究。主持完成了国家重大新药创制、国家科技重大专项、国家自然科学基金、国家药典委综改项目等40余项,发表科研论文400余篇,其中SCI论文146篇(H-index 35),连续6年(2014—2019年)入选Elsevier发布的中国高被引用学者榜单;获新药证书5本,申请发明专利80余项,已授权37项,软件著作权1本,主编出版教材和专著8部。获江苏省科学技术奖及国家优秀教学成果等16项省部级以上教学科研成果奖。

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0379-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200401

近年来纳米技术的蓬勃发展,特别是新型纳米材料的出现为许多重大疾病治疗提供了新思路、新方法。与传统药物递送系统相比,纳米药物递送系统因其尺寸、形状、材料等特殊性质,可有效改善药物的药代动力学和药效学性能,提高疗效。巨大的发展潜力与广阔的应用前景受到了广大制剂开发者与药品生产企业的广泛关注,越来越多的纳米药物开始步入临床试验阶段,走入市场。本期组织了纳米技术在药物递送中的应用这一专题,紧紧跟踪国际上前沿领域的最新进展,从不同学科领域不同角度介绍和总结了该领域最新技术,相信一定会对新药研究人员有所借鉴、有所启发。

### 1 纳米材料在药物递送中的应用现状

2014年6月,美国FDA颁布一系列有关应用纳米技术的产品的指南性文件,文件中将纳米材

料界定为尺寸小于100 nm的粒子或尺寸小于1 μm但能表现出纳米颗粒性质的材料。纳米材料结构单元一般比细胞体积更小,因而可具有量子尺寸效应、小尺寸效应、表面和界面效应和宏观量子隧道效应等从而表现出独特的功能与性能。目前应用于药物递送的纳米材料按材料组成可以分为有机纳米材料、无机纳米材料、生物纳米材料及复合纳米材料。

脂质纳米材料、聚合物纳米材料等均属于有机纳米材料范畴,可用其制成脂质体、纳米乳、固体脂质纳米粒、聚合物胶束、聚合物纳米凝胶等药物载体。有机纳米材料制备的药物载体具有生物相容性高、靶向性好、毒性低、多药荷载性佳等优势,其中脂质体作为药物载体的研究开始得较早,现在已积累了大量研究经验与临床试验数据,并且已有许多相关产品上市,如盐酸阿霉素脂质体注射液(Doxil)、注射用两性霉素B脂质体冻干粉

(Ambisome)、阿卡米星脂质体吸入悬浮液(Arikayce)、注射用紫杉醇脂质体(力扑素)等。本期专题中《脂质体注射剂的应用现状及其发展趋势》一文介绍了长循环脂质体、阳离子脂质体、配体靶向型脂质体与刺激响应型脂质体的研究进展,分析了已上市脂质体产品的结构功能特性及其临床应用优势,旨在为注射用脂质体的研发、临床转化和监管提供借鉴。

相比有机纳米材料,无机纳米材料可谓生物医药领域的后起之秀,具有制备简便、形状尺寸可控性好、易于表面修饰等优势,并且材料自身独特的光、电、磁性质赋予其潜在的成像显影、靶向递送和协同药物治疗等功能。常用的无机纳米材料有碳纳米材料、二氧化硅纳米粒、钙纳米材料、金纳米粒、磁性纳米粒、上转换纳米粒和量子点,目前已有基于无机纳米材料的相关产品进入临床试验,如具有PEG涂层的二氧化硅金纳米药物AuroLase可用于红外触发的实体瘤热消融治疗。本期专题中由中国药科大学药学院尹莉芳教授课题组撰写的《无机纳米材料在药物递送中的研究进展》一文概括总结了常用的无机纳米材料在药物递送方面的研究进展以及相关产品的临床转化情况,旨为无机纳米药物递送载体走向临床提供参考。

人体许多生理现象、疾病均发生在纳米水平,蛋白质作为生命活动的承担者,核酸作为遗传信息的携带者,承担了机体内大部分生理活动,是理想的天然的药物载体材料。随着生物组学领域的蓬勃发展,更多研究者将目光转向了生物相容性好、易降解、安全性高、具有一定靶向功能的生物纳米材料方面。生物纳米材料包括内源性天然纳米材料和仿生型纳米材料,如脂蛋白、DNA纳米材料等。脂蛋白纳米药物递送系统是基于脂质代谢和转运功能、两亲性结构形成的药物-载体一体化递送系统,现已有产品进入临床阶段。本期专题中由中国药科大学江苏省生物药物成药性研究重点实验室高向东教授课题组撰写的《基于DNA的纳米材料在肿瘤治疗领域的研究进展》一文列举了DNA纳米材料作为药物递送载体在化疗、基因治疗、免疫治疗和光动力疗法中的应用进展,并对其未来发展进行展望。作为新型纳米平台,DNA纳米载体在肿瘤治疗领域显示出巨大的潜力,与此同时,潜在的免疫反应、载体的体内特性还需受

到更多的关注。

基于上述有机纳米材料、无机纳米材料的优越性而制备成的复合纳米材料(或称为有机-无机杂化纳米材料)也开始成为诸多研究的焦点,比如使用有机材料对无机纳米材料进行改性或修饰,以期改善其理化特性和体内动力学行为,或者在脂质或聚合物纳米材料中引入无机金属纳米材料来制备同时含有造影剂和药物的多功能纳米系统,实现一体化。纳米材料是纳米生物医药领域的奠基石,具有卓越的应用价值,新型纳米材料的开发将不断推动着纳米技术的进步。

## 2 基于纳米技术的制剂改良策略

常规的抗肿瘤化学药物缺乏靶向性,易致患者出现骨髓移植性等许多较为严重的不良反应。纳米技术的迅速发展给恶性肿瘤的靶向治疗提供了新策略。纳米药物载体可通过在纳米颗粒表面修饰选择性配体主动靶向至肿瘤细胞,或通过实体瘤的高通透性和滞留效应EPR效应介导的被动靶向作用,提高药物对肿瘤细胞的特异选择性,增加靶区药物浓度,降低其在非靶向部位的分布,减少不良反应。然而常用的一线化疗药物如紫杉醇、阿霉素、喜树碱等大多存在水溶性差等特点。纳米晶体又称纳米混悬剂,可有效改善难溶性药物溶解度与体内药物分布。与传统纳米材料载体不同,它含药量高、且不需要使用大量表面活性剂或载体材料,可通过粒径控制、表面改性或修饰靶向蓄积于肿瘤部位。本期专题中由广东药科大学药学院林华庆教授课题组撰写的《靶向肿瘤纳米晶体的研究进展》一文综述了近5年纳米晶体靶向肿瘤的策略,主要为延长纳米晶体体内循环时间、增加对肿瘤细胞的亲和力、实现对内外刺激的响应这3大方面,文中还探讨了纳米晶体应用于靶向抗肿瘤药物的优势及面临的困难。众所周知,在恶性肿瘤治疗时,除化疗药物本身带来的毒性外,肿瘤转移也是导致肿瘤病死率居高不下的主要原因之一。一旦发生肿瘤转移,多个转移灶的出现使得传统的手术切除治疗和放疗徒劳无功。近年来基于淋巴靶向的纳米药物递送系统在抗肿瘤转移治疗中展现出巨大的发展潜力。本期专题中,中国药科大学药物科学研究院莫然教授课题组综述了淋巴靶向药物递送系统在抗肿瘤转移治疗中

的研究进展。

肿瘤微环境是肿瘤细胞与其周围环境所组成的高度异质性且随着肿瘤发展而不断进化的微小生态系统。肿瘤组织由于肿瘤细胞生长失控、基因表达异常等特点,因而表现出与正常组织显著不同的生理特征。基于肿瘤组织与正常组织微环境的特殊差异,设计肿瘤微环境响应型纳米载药系统,利用载体本身独特的光热电磁等性质,通过化学键断裂或结构解聚的方式,响应性释放药物,从而有效解决纳米载体的体内稳定转运、靶向递送、高渗透、定位释药等难题。

除肿瘤靶向外,脑靶向药物递送系统在治疗帕金森病、阿尔茨海默病、脑胶质瘤等脑部疾病方面也显示出巨大的发展潜力。脑部疾病治疗迄今为止药物发展受限的主要原因之一是绝大多数药物难以通过血脑屏障。血脑屏障在保护中枢神经系统的同时阻碍了药物向脑内的递送。设计可通过血脑屏障的载药系统,实现药物跨血脑屏障转运和在脑内递释,有望在重大脑部疾病中发挥出意想不到的治疗效果。常用的脑靶向策略有细胞穿膜肽、主动靶向分子、吸附以及磁靶向等机制。近年来,脑靶向递药系统受到了越来越多的关注,特别是双级靶向系统的提出,解决了目前单一靶向递药系统脑靶向效率低、药物入脑后分布不明的载药系统缺陷,其可有效富集病灶区药物浓度,提高治疗效果,降低中枢神经系统不良反应以及不良反应发生率。

蛋白及多肽类药物多为内源性生物大分子,对靶点的亲和力高、选择性好、疗效高,现已成为当前新药研发的“新星”。但此类药物口服易降解,通常需要采用患者顺应性更差的注射给药途径,同时蛋白及多肽类药物半衰期短、血浆清除率高,使用时多采用增强多肽抵抗酶解的能力或增加其流体力学半径来延长体内半衰期。本期专题中由中国药科大学药用辅料及仿创药物研发评价中心涂家生教授课题组等撰写的《蛋白及多肽类药物长效化制剂学技术研究进展》一文介绍了通过制剂学手段对蛋白及多肽类药物进行长效化改造的策略,将其制成缓释脂质体、注射用微球、微针贴剂等改良剂型,并分析其缓释机制、研究进展和优缺点,旨在为此类药物的长效化研究提供思路。

基因治疗是一类在疾病发生的最根本层面上实现相应治疗的手段。随着基因组学的发展和多种疾病发病基因机制的阐明,基因药物的研发受到了研究者的广泛关注,基因药物成为了继抗体药物之后的新一代生物药物。在过去 20 年间,虽有大量基因药物进入临床阶段,但鲜有上市品种。基因治疗药物研发难点,多集中于基因载体发展滞后这一行业现状。常用基因载体主要有病毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体安全性较低,基因荷载量有限,具有免疫原性,因而发展受阻。非病毒载体,如阳离子脂质体、聚乙烯亚胺(PEI)等高分子聚合物、无机纳米材料等,安全性高、基因荷载量大且易于扩大生产,近年来受到了越来越多研究者的青睐。2018 年,由美国 Alnylam 公司开发生产的全球首个 siRNA 药物 Onpatro (Patisiran 阳离子脂质体注射液)获批上市,标志着高效精准的基因治疗策略不再是神话。

现代材料科学的迅速发展使得制备具有特定性质与功能的药物载体材料成为可能;蛋白质组学和基因组学方面不断取得的重大进展让精准化、个性化用药不再遥远。随着现代纳米技术的深入研究和发 展,纳米技术与物理化学、生物技术、医学和药学等领域、多学科融合有望将基于纳米技术的药物制剂向着更有效、更智能的精准医疗方向发展。

### 3 纳米递药技术产业化的困境

随着对纳米药物载体研究的进一步深入,纳米材料潜在的安全性问题引发了业内广泛的讨论,“纳米毒性源于物理损伤”学说应运而生。物理损伤是指纳米载体降解后的纳米颗粒通过物理阻塞微循环造成细胞损伤,从而引发细胞功能障碍或炎症反应等一系列毒性反应。载体造成的物理损伤主要是由于纳米载体不具备可生物降解性,易于在机体组织内堆积、自由移动,从而造成持续性物理损伤。因此随着“纳米毒性源于物理损伤”新学说的广泛被认可,生物可降解性和生物相容性成为了纳米材料能得以安全应用的前提。设计开发具有良好生物可降解性和生物相容性的纳米药物载体是实现纳米递药系统产业化的第一座大山。

首先,除安全性问题尚待商榷外,国内外已被

批准可用于纳米药物制剂的优质辅料种类较少(只有部分脂质和人血清白蛋白),极大地限制了其进一步的应用。其次,在制备工艺方面,纳米药物的研发技术壁垒较高,制备过程复杂且无法使用常规的方法进行监测,但制备过程中的细微变化即可引起最终产品质量的较大变化,产品的不确定性较高。再次,工艺放大困难,纳米制剂生产通常会涉及复杂的多单元操作,在工艺放大过程中受设备、操作条件和工艺参数的影响较大。最后,纳米制剂产品重现性差,大规模生产中设备、原材料等原因都容易导致产品质量不均。

目前,纳米药物制剂的临床转化仍处于起步阶段,面临着巨大挑战,但随着质量源于设计(QbD)理念、微流控技术和过程分析技术在纳米制剂制造、放大和评估中的应用,更智能、更安全、质量可控且易于放大生产的纳米药物制剂将成为下一步纳米药物制剂的研发方向,为通过制剂学手

段实现更多疾病的治疗提供新的解决方案。

#### 4 展 望

随着科技的进步,国内外制剂学水平得到了显著性的提升,纳米载药系统的出现更是制剂发展史上里程碑式的创新与突破,其广阔的发展前景吸引着越来越多的研究者致力于此。但挑战与机遇并存,如何从分子水平设计出质量可靠、具有特定功能且生物安全性高的纳米药物制剂还需进一步的研究。此外,目前已获临床批准的纳米制剂多为抗肿瘤活性小分子药物,而新型基因治疗药物(如 siRNA 和 mRNA 等)和新型分子实体(如激酶抑制剂等)也被纳入了新一代纳米药物的研发中。随着纳米技术研究的深入,将基于分子水平的科学设计与过程工程学的精密控制相结合,有望攻克纳米药物载体研发的核心技术,从而打开纳米药物递送系统的新局面。

引用本文 周建平. 纳米技术在药物递送中的应用与展望[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 379-382.

Cite this article as: ZHOU Jianping. Application and prospect of nanotechnology in the drug delivery system[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(4): 379-382.

· 药学前沿 ·

## 脂质体注射剂的应用现状及其发展趋势

项心妍<sup>1</sup>, 杜爽<sup>2</sup>, 丁杨<sup>1\*</sup>, 周建平<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学药学院药剂系, 南京 211198; <sup>2</sup>南京圣和药业股份有限公司, 南京 211135)

**摘要** 脂质体注射剂是应用纳米技术增强药物治疗效果并降低药物毒性最成功的注射剂之一, 自第1个载有阿霉素的脂质体注射剂上市以来, 涉及脂质体的新技术与新产品不断涌现。本文总结了Stealth脂质体技术和阳离子脂质体技术的原理与研究进展, 从制剂学角度分析了已经上市的脂质体产品的结构功能特性与临床应用优势, 介绍了当前新型脂质体的研究热点, 以及分析了国内外脂质体注射剂的监管现状, 以期对脂质体注射剂的研发、临床转化和监管提供理论参考。

**关键词** 脂质体注射剂; 临床应用; 监管; Stealth脂质体技术; 阳离子脂质体技术; 进展

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0383-11

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200402

引用本文 项心妍, 杜爽, 丁杨, 等. 脂质体注射剂的应用现状及其发展趋势[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 383 - 393.

Cite this article as: XIANG Xinyan, DU Shuang, DING Yang, et al. Application and development of liposome injection [J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(4): 383 - 393.

### Application and development of liposome injection

XIANG Xinyan<sup>1</sup>, DU Shuang<sup>2</sup>, DING Yang<sup>1\*</sup>, ZHOU Jianping<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;

<sup>2</sup>Nanjing Sanhome Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 211135, China

**Abstract** Liposome injection is one of the most successful special injections that use nanotechnology to enhance drug efficacy and reduce accompanied toxicity. New liposomes with special structures and functions have emerged since the first liposome injection containing doxorubicin was marketed. This review summarized the principles and research progress of Stealth liposome technology and cationic liposome technology, analyzed the structural and functional characteristics and clinical application advantages of liposome products that have been marketed from the perspective of pharmacology, introduced current research hotspots of new liposomes, and analyzed the current regulatory status of liposome injection at home and abroad, thereby providing theoretical reference for the research and development(R&D), clinical translation and supervision of liposome injection.

**Key words** liposome injection; clinical application; supervision; Stealth liposome technology; cationic liposome technology; advances

纳米脂质体是第1个被成功应用于临床的纳米药物递送系统, 它是由天然无毒的磷脂和胆固醇等脂质分子通过有序排列形成的含有水性核心和脂质双层的球型囊泡。1965年, Alec Bangham首次将脂质体作为研究生物膜的模型提出, 而后因其具有粒径可塑、生物相容性好、毒性和免疫原

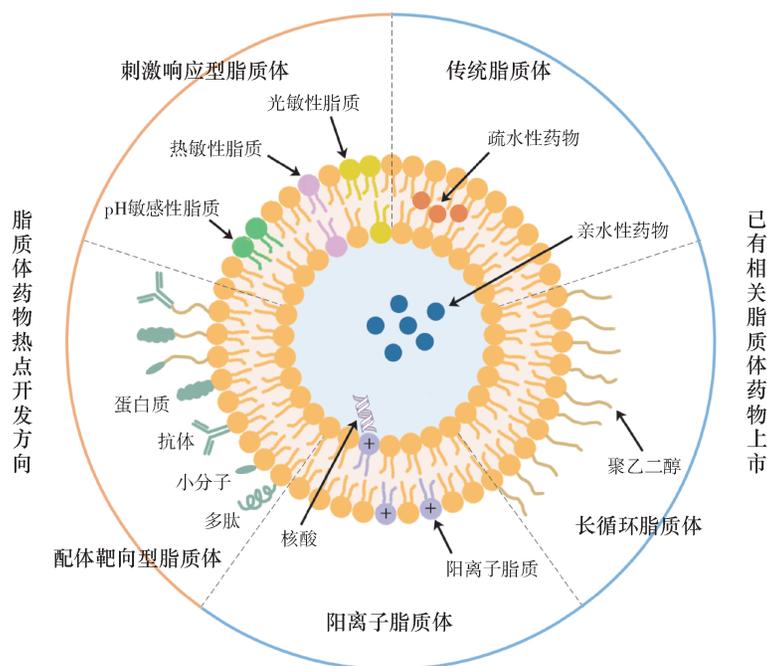
性低等优点, 以及可负载亲水性和疏水性药物的能力, 脂质体从最初的人造细胞模型演变为如今成功应用于临床的药物递送系统, 在制药领域受到越来越广泛的关注。据统计, 1973年至2015年间FDA受理了359项纳米制剂产品申请(包括IND、NDA和ANDA), 其中占比最高的是脂质体

收稿日期 2020-04-20 通信作者 \*Tel: 13913882339 E-mail: dydszyzf@163.com

\*\*Tel: 025-83271102 E-mail: zhoujianp60@163.com

(33%),其二为纳米晶(23%)<sup>[1]</sup>。现已开发出多种给药途径(如注射、口服、经皮、经鼻、经肺、眼用等)的脂质体制剂,在市售与临床研究中最常用的仍然是注射途径。本文总结了目前临床可用的脂

质体注射剂所涉及的新技术与新产品,介绍了新型脂质体的研究热点(图1),并针对国内外脂质体注射剂的监管现状进行了分析。



## 1 已有相关产品上市的新型脂质体技术

由于血浆中调理素的作用以及网状内皮系统(RES)的摄取,第1代传统脂质体在注射后容易被快速清除,因此许多新型脂质体技术通过调节传统脂质体的脂质组成、结构、电荷等特性来改变药物的药代动力学和体内生物分布特征。目前有两种新型脂质体技术开发得较为成熟并且已有相应的产品上市,分别是Stealth脂质体技术和阳离子脂质体技术。

### 1.1 Stealth脂质体技术

早期的Stealth技术是指在传统脂质体表面掺入二硬脂酰磷脂酰乙醇胺的聚乙二醇化衍生物(DSPE-mPEG2000),使其交错重叠形成一定的空间位阻,该衍生物的高亲水性和柔韧性会干扰脂质体与血浆蛋白之间的疏水相互作用,从而减少RES对脂质体的吸收,即发挥了隐形效果,实现脂质体在体内的长循环功能,通常该脂质体被称为长循环脂质体或隐形脂质体。此外,由于肿瘤脉

管系统的渗漏性质,具有长循环特性的纳米制剂能够通过增强的渗透和滞留效应(EPR)被动地靶向肿瘤组织<sup>[2]</sup>。

运用Stealth技术开发出了全球首个抗肿瘤脂质体产品Doxil<sup>®</sup>(阿霉素脂质体注射液),游离阿霉素的消除半衰期为0.2 h, AUC为3.81  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ ,而Doxil<sup>®</sup>的消除半衰期可达41~70 h, AUC为902  $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ <sup>[3]</sup>,同时临床研究表明它可以减少在心肌释药以降低阿霉素的毒性<sup>[4]</sup>。此后,Sun制药也使用Stealth技术开发出了Doxil的仿制药Lipodox<sup>®</sup>,我国也有3款阿霉素长循环脂质体的仿制产品,分别为上海复旦张江生物医药股份有限公司的里葆多、石药控股集团有限公司的多美素和常州金远药业制造有限公司的立幸。顺铂和奥沙利铂等铂类药物也利用Stealth技术开发出了一系列处于临床试验不同阶段的长循环脂质体制剂,例如顺铂脂质体Lipoplatin、SPI-077、LiPlaCis;奥沙利铂脂质体Lipoxal、MBP-426;L-NDDP(奥沙利铂脂溶性衍生物)脂质体Aroplatin等,以上脂质体的处

方中都含有不同比例的 DSPE-mPEG2000,可不同程度地延长循环时间并降低铂类药物的全身毒性。顺铂脂质体 Lipoplatin 的循环时间比游离药物高 20 倍,双分子层中的阴离子脂质 DPPG 促进脂质体通过细胞内吞或直接与细胞膜融合而内化,并克服跨膜转移引起的耐药性,而另一种顺铂脂质体 SPI-077 无法跨膜,需要经脂肪酶降解磷脂双分子层后才可释药,药物难以释放导致临床疗效有限<sup>[5]</sup>。还有在临床阶段的喜树碱脂质体 S-CKD602,将喜树碱半合成类似物 CKD602 装载于长循环脂质体中,使得 AUC 增加 50 倍,治疗指数提高 3~10 倍<sup>[6]</sup>,此外越来越多的药物通过 Stealth 技术制成长循环脂质体,有效地改善了药物的疗效。

然而现在有一些研究报道了 PEG 化脂质体存在“加速血液清除”(ABC)现象,对同一受试者多次注射 PEG 化脂质体后,它会与脾脏产生的抗 PEG IgM 抗体结合激活补体系统,被补体 C3 片段快速调理后由 Kupffer 细胞从体循环中清除<sup>[7]</sup>。目前已提出了几种减弱 ABC 现象的方法,比如使用聚甘油、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮或聚丙烯酰胺等聚合物替代 PEG,结构的改变可以减少聚合物对脾脏 B 细胞的刺激<sup>[8]</sup>;将具有免疫抑制作用的神经节苷脂插入 PEG 化脂质体,使反应性 B 细胞产生耐受性而减少抗 PEG IgM 抗体产生<sup>[9]</sup>;临床上还可以改变给药方案,先服用较高剂量的空白脂质体并延长给药间隔<sup>[10]</sup>。此外,PEG 化脂质体也会通过激活补体系统而释放 C5a 和 C3a 等过敏毒素,从而激活巨噬细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞分泌各种过敏原,引发“补体激活相关的假性过敏反应(CARPA)”,导致一系列心肺反应。有研究表明可以使用补体抑制调节因子 FH 或使用空白 PEG 化脂质体消耗超敏反应的早期介体,中断信号传导从而减轻 CARPA 反应<sup>[11]</sup>。Stealth 技术的出现改善了传统脂质体的稳定性和有效性,提高了脂质体药物的临床转化率,但长循环脂质体显示出的一些安全性问题仍需要进一步的研究。

## 1.2 阳离子脂质体技术

随着脂质体技术的不断发展,研究者们致力于开发新型的合成脂质以提高脂质体的载药能力,于是阳离子脂质应运而生,用于有效装载带负电的药物,尤其是对于核酸药物的递送备受关注。

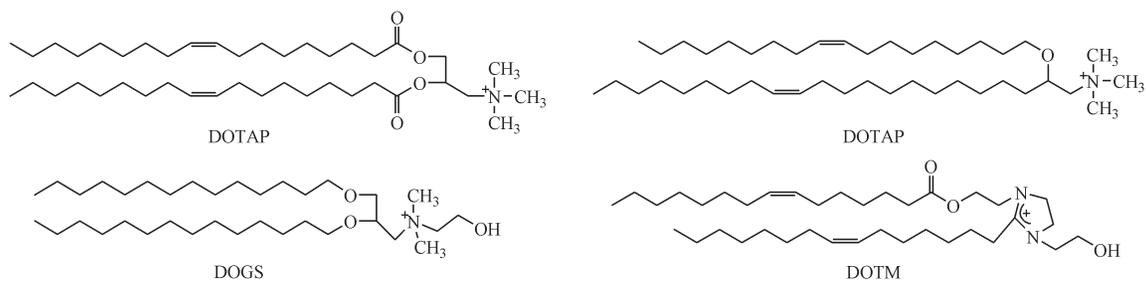
常用的永久带电的阳离子脂质有 3 类:单价阳离子脂质 DOTAP、DOTMA、DIMRIE 和 DOTIM,多价阳离子脂质 DOGS 和 DOSPA,阳离子胆固醇衍生物 DC-Chol 和 BGTC(图 2)。阳离子脂质一般由带正电的头基通过连接键(如酰胺键、酯键和醚键)与疏水尾基(胆固醇或脂肪链)相连组成,其结构是决定细胞毒性和转染效率的重要因素。

永久带电的阳离子脂质的缺陷在于它会通过激活 Toll 样受体 4(TLR4),刺激产生炎症因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$ ,从而引发免疫反应。目前的解决方法是着力于开发不饱和的可电离的阳离子脂质,将可质子化的胺基作为头基,用不饱和酰基链提高转染效率<sup>[12]</sup>。第 1 代  $pK_a$  为 6.5 的可电离阳离子脂质 1,2-二羟基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-DMA)在 pH 4 条件中带正电可有效封装带负电的药物,静脉注射后在 pH 7.4 的生理条件下接近中性可防止与血清蛋白的非特异性相互作用并改善循环时间,通过吸附内源性载脂蛋白 E(ApoE)触发肝细胞表面受体的摄取,经内吞作用进入肝细胞,在细胞内体酸性环境中质子化并与带负电的内源性脂质相互作用导致内体膜失稳从而逃逸至细胞质。在 DLin-DMA 的基础上,修改长度和不饱和度得到了许多可用的阳离子脂质(图 3),其中二油甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(Dlin-MC3-DMA,简称 MC3)是目前用来递送 siRNA 最有效的脂质,载体的进一步优化可通过掺入内体逃逸促进剂(如 pH 敏感的聚合物或肽)或设计更安全有效的可电离脂质来实现。

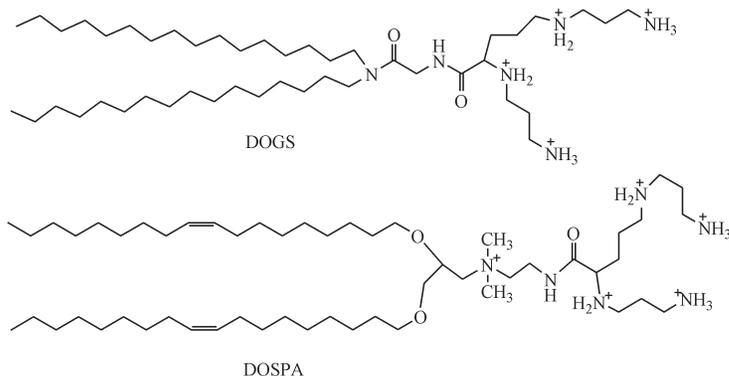
全球首个 siRNA 药物 Onpatro<sup>®</sup>(Patisiran 阳离子脂质体注射液)于 2018 年获批上市,这也是首个用于治疗转甲状腺素蛋白淀粉样变性(hATTR)引起的神经损伤的药物,这款药物中使用的关键脂质即为可电离阳离子脂质 MC3。此外,也有许多阳离子脂质体药物进入临床试验,如递送纺锤体驱动蛋白(KSP)-siRNA 和血管内皮生长因子(VEGF)-siRNA 的 ALN-VSP02 脂质体,递送分化簇 31(CD31)-siRNA 和血管生成素(TIE-2)-siRNA 的 AtuPLEX 脂质体<sup>[13]</sup>,以及 MediGene 公司的 EndoTAG-1(紫杉醇阳离子脂质体)和石药控股集团有限公司的紫杉醇阳离子脂质体。

由于肝脏不连续脉管系统的内在蓄积,阳离子脂质体已被证明可有效治疗肝脏相关疾病(如

## 单价阳离子脂质



## 多价阳离子脂质



## 阳离子胆固醇衍生物

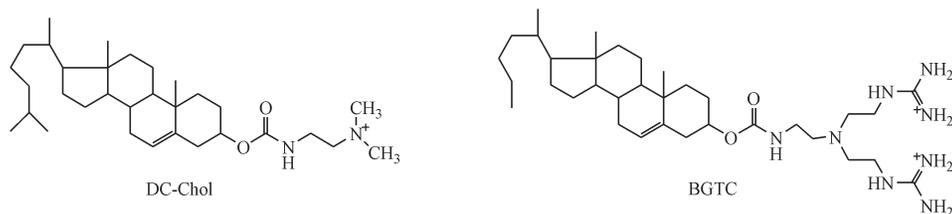


图2 阳离子脂质的分类

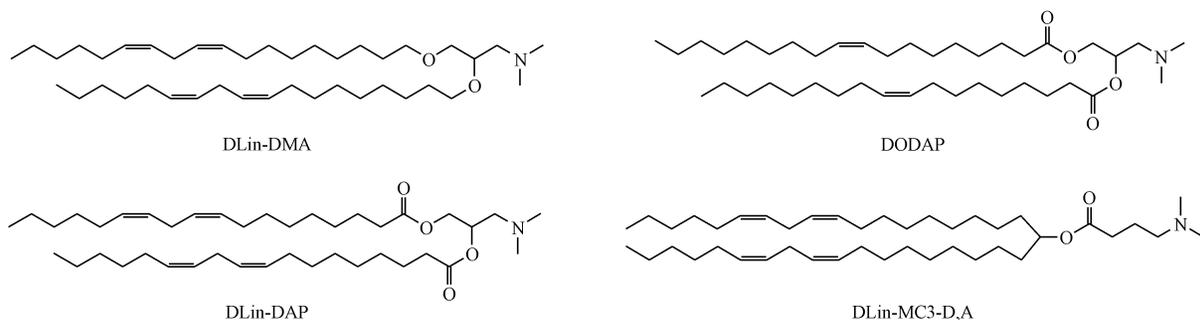


图3 可电离阳离子脂质的结构

hATTR 和脂质代谢疾病),而对于肝外递送,靶向配体的修饰是较有希望的研究方向。Chen 等<sup>[14]</sup>用阳离子脂质体包载低氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ )-siRNA,通过掺入叶酸/油酸-二酰化低聚壳聚糖实现叶酸配体的修饰,免疫印迹实验和凋亡测试表明此脂质体显著减少了 HIF1 $\alpha$  相关蛋白的产生并诱导了耐缺氧黑色素瘤细胞的凋亡,显著增强了 HIF1 $\alpha$ -

siRNA 的抗黑色素瘤活性。此外,核酸与化药的共递送系统也是目前的研究热点,比如 Wang 等<sup>[15]</sup>将一线化疗药物吉西他滨和骨髓细胞白血病蛋白 1 (Mcl-1)- siRNA 共载于阳离子脂质体,结果显示协同增强的抗肿瘤作用并克服了吉西他滨的耐药性。阳离子脂质体技术的发展对核酸药物的开发意义重大,可以展望今后若能对患者转录组进行

测序,基于RNA疗法的个性化医学指日可待。

## 2 已上市脂质体注射剂的制剂学分析

表 1 列举了国内外获批上市的脂质体注射剂,目前大多仍是传统脂质体,长循环脂质体和阳离

子脂质体仅占少数。脂质体注射剂主要应用于抗肿瘤、抗真菌和镇痛等领域,每一款产品都根据药物不同的性质并通过独特的手段改善了药物的治疗效果。

表 1 国内外获批上市的脂质体注射剂

| 应用领域     | 商品名        | 活性成分      | 脂质组成                       | 研发公司          | 批准时间    |
|----------|------------|-----------|----------------------------|---------------|---------|
| 抗肿瘤      | Doxil      | 阿霉素       | HSPC,胆固醇,DSPE-PEG          | Sequus        | 1995    |
|          | Myocet     | 阿霉素       | EPC,胆固醇                    | Elan          | 2000    |
|          | 里葆多        | 阿霉素       | HSPC,胆固醇,DSPE-PEG          | 上海复旦张江        | 2009    |
|          | 多美素        | 阿霉素       | HSPC,胆固醇,DSPE-PEG          | 石药集团          | 2012    |
|          | 立幸         | 阿霉素       | HSPC,胆固醇,DSPE-PEG          | 常州金远          | 2012    |
|          | Lipodox    | 阿霉素       | HSPC,胆固醇,DSPE-PEG          | SunPharm      | 2013    |
|          | DaunoXome  | 柔红霉素      | DSPC,胆固醇                   | NeXstar       | 1996    |
|          | DepoCyt*   | 阿糖胞苷      | DOPC,DPPG,胆固醇,三油酸甘油酯       | Pacira        | 1999    |
|          | 力扑素        | 紫杉醇       | 卵磷脂,胆固醇                    | 绿叶思科          | 2003    |
|          | Mepact     | 米伐木肽      | POPC,DOPS                  | Takeda        | 2009    |
|          | Marqibo    | 长春新碱      | 蛋黄鞘磷脂,胆固醇                  | Talon         | 2012    |
|          | Onivyde    | 伊立替康      | DSPC,DSPE-PEG,胆固醇          | Merrimack     | 2015    |
|          | Vyxeos     | 阿糖胞苷/柔红霉素 | DSPC,DSPG,胆固醇              | Jazz          | 2017    |
|          | 抗真菌        | Ambisome  | 两性霉素 B                     | HSPC,DSPG,胆固醇 | NeXstar |
| Abelcet  |            | 两性霉素 B    | DMPC,DMPG                  | Enzon         | 1995    |
| Amphotec |            | 两性霉素 B    | 硫酸胆固醇                      | Ben Venue     | 1996    |
| 锋克松      |            | 两性霉素 B    | 卵磷脂,胆固醇                    | 上海新亚          | 2003    |
| 镇痛       | DepoDur*   | 硫酸吗啡      | DOPC,DPPG,胆固醇,三油酸甘油酯       | Pacira        | 2004    |
|          | Exparel    | 布比卡因      | DPPG,DEPC,胆固醇,三辛酸甘油酯       | Pacira        | 2011    |
|          | Nocita     | 布比卡因      | DPPG,DEPC,胆固醇,三辛酸甘油酯       | Aratana       | 2017    |
| 光动力疗法    | Visudyne   | 维替泊芬      | EPG,DMPC                   | Novartis      | 2000    |
| 疫苗       | Epaxal     | 甲肝疫苗      | DOPC,DOPE                  | Crucell Berna | 1993    |
|          | Inflexal V | 流感疫苗      | DOPC,DOPE                  | Crucell Berna | 1997    |
|          | Mosquirix  | 疟疾疫苗      | DOPC,胆固醇                   | GSK           | 2015    |
|          | Shingrix   | 带状疱疹疫苗    | DOPC,胆固醇                   | GSK           | 2017    |
| RNAi     | Onpattro   | Patisiran | MC3,DSPC,PEG2000-C-DMG,胆固醇 | Alnylam       | 2018    |

\*已撤市。HSPC:氢化大豆磷脂酰胆碱;DSPE-PEG:二硬脂酰磷脂酰乙醇胺的PEG化衍生物;EPC:蛋黄磷脂酰胆碱;DSPC:二硬脂酰磷脂酰胆碱;DOPC:二油酰磷脂酰胆碱;DPPG:二棕榈酰磷脂酰甘油;POPC:1-棕榈酰基-2-油酰基-卵磷脂;DOPS:二油酰基磷脂酰丝氨酸;DSPG:二硬脂酰磷脂酰甘油;DMPC:二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱;DMPG:二肉豆蔻酰磷脂酰甘油;DEPC:二芥酰磷脂酰胆碱;EPG:蛋黄磷脂酰甘油;DOPE:二油酰基磷脂酰乙醇胺;MC3:二油甲基-4-二甲基氨基丁酸酯;PEG2000-C-DMG:1-甲氧基聚乙二醇2000-2,3-二肉豆蔻酰甘油。

### 2.1 载化学药物的脂质体

2.1.1 亲水性化学药物脂质体 盐酸阿霉素脂质体 Doxil<sup>®</sup>是最经典的水溶性抗肿瘤化药脂质体,脂质组成为高相变温度的 HSPC、胆固醇和 DSPE-PEG,物质的量比为 56.4:38.3:5.3,由于 HSPC 和胆固醇的最佳比例,在小于等于 37 °C 时脂质体可以形成柔性双层以保留更多的药物,DSPE 掺入脂

质体双层中,亲水性 PEG 长链用于延长脂质体的体内循环时间。制备时使用硫酸铵梯度法实现主动载药,阿霉素在亲水内核中与硫酸根离子结合形成晶状硫酸盐沉淀,包封率可达 97% 左右,并且药物不易泄漏<sup>[16]</sup>。阿霉素隐形脂质体的成功开发有效地降低了游离阿霉素的肝脏毒性,多款仿制产品相继上市,但临床应用情况表明 PEG 化脂质

体较长的循环时间导致阿霉素的皮肤毒性蓄积,患者用药后发生手足综合征(HFS)的概率大幅增加,于是改良的非PEG化的阿霉素柠檬酸盐脂质体 Myocet<sup>®</sup>面世,与环磷酰胺联合用于成年女性转移性乳腺癌的一线治疗。该产品由阿霉素冻干粉、空白脂质体分散液和缓冲液组成,使用时需现配现用,通过pH梯度法主动载药,包封率可达99%左右,粒径(150~250 nm)较大,进入体内后迅速被单核吞噬细胞系统(MPS)识别与捕获,随后形成储库缓慢释药,半衰期为2~3 h,不具有被动靶向肿瘤的能力<sup>[16]</sup>。

另一个葱环类药物是柔红霉素柠檬酸盐脂质体 DaunoXome<sup>®</sup>,也通过梯度法载药,处方中的DSPC与胆固醇赋予其结构较强的物理刚性,改善了柔红霉素易代谢的不稳定性并将其与血清蛋白的结合最小化,较小的粒径(45 nm)降低RES对它的摄取,使药物的半衰期从0.77 h延长至4~5.6 h, AUC变为传统柔红霉素制剂的11~12倍<sup>[17]</sup>。

阿糖胞苷脂质体 DepoCyt<sup>®</sup>通过 DepoFoam<sup>™</sup>技术将药物封装在多囊脂质体中,运用该技术要求是制剂处方中需要包含甘油三酯成分并利用二次乳化法制备,形成了由多个无同心内部水室组成的蜂窝状球形脂质体结构,每个水室由双层膜隔开使其从外向里逐层缓慢释药,给药间隔从2日1次延长至2周1次。此外,应用于镇痛领域的硫酸吗啡脂质体 DepoDur<sup>®</sup>和布比卡因脂质体 Exparel<sup>®</sup>也通过 DepoFoam<sup>™</sup>技术分别延长其镇痛效果至48和72 h<sup>[18]</sup>,减少了注射次数,极大地改善了患者的顺应性。

阿糖胞苷和柔红霉素的复方脂质体 Vyxeos<sup>®</sup>通过梯度载药法以5:1的物质的量比共囊化这两种药物,粒径约为100 nm。这种复方脂质体是肿瘤化疗领域中的一大突破,在急性髓系白血病(AML)的治疗中可实现最大程度的协同作用,成为首款针对特定高风险的AML患者群体获批的药物,接受此复方脂质体治疗的患者中位总生存期为9.56个月,而对照组(接受阿糖胞苷和柔红霉素普通制剂的直接治疗)为5.95个月<sup>[19]</sup>。

长春新碱是细胞周期阶段特异性化疗药物,长时间在肿瘤部位暴露有效浓度阈值以上对于其治疗效果至关重要。长春新碱脂质体 Marqibo<sup>®</sup>使用了特制空白脂质体 Optisome<sup>™</sup>,它由鞘磷脂和胆

固醇(物质的量比,58:42)构成,粒径约为100 nm,该制剂改善了游离长春新碱治疗窗窄、血浆清除率快的问题,实现了将药物安全剂量提高至2倍并渗漏至肿瘤部位缓慢释放的功能<sup>[20]</sup>。

伊立替康是天然生物碱喜树碱的水溶性半合成类似物,其化学结构在酸性条件下为具有抗肿瘤活性的内酯形式,而在生理条件下为无活性的羧酸盐形式。伊立替康脂质体 Onivyde<sup>®</sup>利用蔗糖八硫酸盐使药物在水相中呈胶凝状态或沉淀状态而被稳定包载,药脂比高达800 g药物每物质的量磷脂,半衰期长达56.8 h<sup>[6]</sup>。Onivyde<sup>®</sup>联合氟尿嘧啶与甲酰四氢叶酸已被FDA批准用于治疗吉西他滨疗效不佳的转移性胰腺癌患者。

2.1.2 疏水性化学药物脂质体 力扑素(紫杉醇脂质体注射液)是国内外第1个上市的紫杉醇脂质体产品,通过薄膜分散法和冷冻技术制备,使用脂质体载药而避免使用聚氧乙烯蓖麻油和无水乙醇复合溶媒,成功解决了紫杉醇溶解度低、毒性大以及溶质引起超敏反应这三大问题<sup>[21]</sup>。此外,有2款临床阶段的紫杉醇脂质体注射液也备受瞩目,临床Ⅲ期的紫杉醇脂质体 EndoTAG-1中含有阳离子脂质 DOTAP 和中性脂质 DOPC,该阳离子脂质体与肿瘤生长所需的带负电荷的新生血管内皮细胞相互作用而不影响正常组织,临床研究显示它与吉西他滨联用可提高胰腺癌患者的存活率<sup>[6]</sup>。临床Ⅱ期的紫杉醇脂质体 LEP-ETU 中含有关键成分磷脂,它能与亲脂性的紫杉醇剧烈作用,将其稳定地嵌在脂质体磷脂膜中,从而提高载药效率和稳定性。

注射用两性霉素B脂质体冻干粉 Ambisome<sup>®</sup>是全球首款脂质体药物,利用负电磷脂 DSPG 与药物结构中带正电的海藻糖胺结合将其稳定装载于双分子膜上,使其在体内缓慢释放,有效降低药物的肾毒性<sup>[22]</sup>。两性霉素B脂质体 Amphotec<sup>®</sup>是由胆固醇的天然代谢产物胆固醇硫酸钠与两性霉素B形成的热力学稳定的胶体复合物,两者物质的量比为1:1,脂质体粒径小于100 nm,两性霉素B与胆固醇硫酸钠强烈的相互作用减少了循环中游离的两性霉素B从而显著降低了肾毒性,国内上市的锋克松(注射用两性霉素B脂质体冻干粉)为 Amphotec<sup>®</sup>的仿制产品,对真菌感染的应答率比普通制剂更高。

## 2.2 载生物药物的脂质体

**2.2.1 核酸脂质体** 随着全基因组测序的进步以及完整核苷酸序列数据库的建立,核酸药物的研发愈发受人们关注,有希望通过抑制起始基因的表达对抗当前无法治愈的疾病,但核酸所涉及的沉默效率、脱靶、稳定性和递送载体方面仍是技术难题,尤其是较大的相对分子质量(约 13.5 kD)和高负电荷性质导致常用的递送技术无法适用,Onpattro®(Patisiran 阳离子脂质体注射液)的成功上市彰显了脂质体递送核酸药物的巨大潜力。通常,带负电的核酸容易与永久带正电的脂质形成静电复合物而封装进脂质体,但是这种带正电的系统因免疫活化和细胞毒性作用在体内诱导出明显的毒性,因此 Alnylam 公司开发了胺基阳离子脂质 DLin-DMA,通过其 pH 敏感的可电离特性降低毒性。处方进一步的优化过程中发现 siRNA 基因沉默效率与阳离子脂质的  $pK_a$  及其对 ApoE 的吸附能力密切相关,其最佳  $pK_a$  约为 6.4,最终开发出阳离子脂质 MC3,制成的脂质体基因沉默效率比用 DLinDMA 的高两个数量级以上<sup>[12]</sup>。此外,PEG 化脂质的类型会影响脂质体的大小及其与靶细胞膜的相互作用,因此选用具有相对短的 C14 酰基链的 PEG 化脂质以达到最佳的转染效果,同时加入中性脂质 DSPC 与胆固醇提高脂质体的结构稳定性,于是 Onpattro 的最终脂质组成为 MC3、DSPC、PEG2000-C-DMG 和胆固醇,质量比为 13:3.3:1.6:6.2<sup>[23]</sup>。

**2.2.2 多肽脂质体** 首个治疗非转移性骨肉瘤的药物 Mepact®(米伐木肽脂质体冻干粉)是粒径小于 100 nm 的多层脂质体,米伐木肽由胞壁酰三肽(MTP)与二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)复合而成,磷脂的加入提高了 MTP 的亲脂性并有助于将其掺入脂质体,疗效优于胞壁酰二肽(MDP)脂质体,这是多肽药物二次开发的成功案例。

**2.2.3 疫苗脂质体** 在疫苗领域,Epaxal®(甲肝疫苗脂质体)是第 1 个上市的脂质体疫苗,基于病毒体技术平台 Virosome 将甲肝病毒糖蛋白嵌插在磷脂双分子层上,疫苗株 RG-SB 结合在脂质体表面,粒径约 150 nm,处方中不含有铝盐和硫柳汞作为佐剂,因此耐受性较高、注射部位疼痛感及不良反应较小,免疫效果长达 20 年<sup>[6]</sup>。Inflexal V®(流感疫苗脂质体)也使用了 Virosome 技术将流感病

毒 A 和 B 的血凝素表面分子装载于磷脂双分子上,临床上显示出优越的免疫原性和耐受性。

## 3 脂质体注射剂开发的新趋势

目前脂质体注射剂的临床应用面临许多挑战,首先 EPR 效应的临床异质性导致脂质体在肿瘤中的蓄积产生较大的可变性,其次肿瘤细胞外基质产生的物理屏障限制了脂质体载体从肿瘤血管周围空间的渗透,此外尽管脂质体药物在肿瘤中的蓄积明显增加,但能从载体中释放出的药物量较少,疗效受到了限制。因此为了更有效地调控脂质体药物在病灶部位的富集与释放,许多新型的脂质体被开发出来。

### 3.1 配体靶向型脂质体

在脂质体表面结合一些功能性配体如抗体、多肽、蛋白质和碳水化合物等,可以使脂质体被过量表达相应受体的细胞选择性地吸收,以此提高药物在病灶部位的蓄积并减少脱靶毒性从而改善治疗效果。例如许多肿瘤细胞中会过表达叶酸受体(FAR)和转铁蛋白受体(TfR),相应的配体可以与这些受体特异性结合以实现主动靶向功能。Gazzano 等<sup>[24]</sup>制备的用叶酸修饰的硝化阿霉素脂质体(LNDF)可以更有效地靶向 Dox 耐药的 FAR 阳性/P-gp 阳性乳腺癌细胞,另外硝化阿霉素具有的线粒体定位功能使其在线粒体中蓄积,从而损害线粒体能量代谢并触发线粒体依赖性细胞凋亡。Zheng 等<sup>[25]</sup>制备了基于转铁蛋白和细胞穿透肽的双功能阿霉素脂质体(TTD),由于 TfR 在血脑屏障(BBB)和神经胶质瘤细胞中过表达,在 BBB 模型中 BCEC 细胞对 TTD 的摄取量比普通阿霉素脂质体高 11 倍,离体生物分布试验中 TTD 在脑瘤大鼠大脑中的蓄积量显著提高,并且在肝和肾的浓度降低。

免疫脂质体(IL)是抗体或抗体片段偶联的脂质体,旨在选择性地靶向表达抗原的细胞,与抗体-药物偶联物(ADC)相比,IL 具有更大的载药量,另外它还可用于免疫测定、免疫治疗和成像。但由于不良的药代动力学和免疫原性,IL 的体内性能有限,新一代的免疫脂质体将抗体的靶标特异性与 PEG 的空间稳定性相结合产生循环的免疫脂质体<sup>[26]</sup>,并且 PEG 末端抗体的随机方向比脂质体双层上的抗体能更有效地促进抗原识别与结

合<sup>[27]</sup>。Arabi 等<sup>[28]</sup>用抗 CD44 单克隆抗体修饰长循环脂质体阿霉素(PLD), 在小鼠 C-26 结肠癌模型中其抑制肿瘤生长的作用明显高于普通 PLD, 并在心脏、肾脏等细胞中蓄积减少。MM-302 是 Merri-mack 公司开发的靶向 HER2 阳性肿瘤细胞的脂质体药物, 它将抗 HER2 单链抗体偶联到阿霉素脂质体的表面, MM-302 与曲妥珠单抗可以靶向 HER2 受体的不同结构域, 在 I 期临床试验中两者联用表现出在 HER2 阳性乳腺癌晚期患者中的协同抗肿瘤活性, 提高了患者的缓解率(12%)和无进展生存期(7.6 个月)<sup>[29]</sup>, 并且由于心肌细胞中 HER2 的表达水平低, 对阿霉素基本无摄取, 临床试验中未观察到心脏毒性的不良事件<sup>[30-31]</sup>。

目前越来越多主动靶向的脂质体已被报道表现出一定的靶向性和增强的抗肿瘤活性, 但临床转化过程中仍有许多问题待解决, 包括疾病相关的解剖学和生理学障碍、靶标可及性、制剂稳定性和体内重复性等因素, 不过不可否认的是, 为了提高脂质体的应用效果主动靶向是脂质体注射剂未来发展的重要方向。

### 3.2 刺激响应型脂质体

大量研究报道使用特殊脂质成分或表面修饰物制备的脂质体通过外部刺激(如温度、超声、电磁和光)或内部刺激(如 pH 和酶)可以控制药物在特定部位释放, 实现更精准的治疗。

早期的热敏脂质体(TSL)释药完全依赖于脂质双层渗透性的增加, 这是由于在加热至高于脂质混合物的平均相变温度时脂质双层可以从固体凝胶相转变为液晶相, 但缺点是释药缓慢并且最多仅释放 70%。Celsion 公司的 ThermoDox(阿霉素热敏脂质体)是第 1 种可用于临床的热敏脂质体制剂, 它由二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、单硬脂酰磷脂酰胆碱(MSPC)和 DSPE-PEG 组成, 物质的量比为 86:10:4, 其中 MSPC 是溶血磷脂, 在加热至相变温度时脂质双层上会形成孔隙通道而更有效地释药(如 42 °C 时 20 s 内可释药 80%)<sup>[32]</sup>。ThermoDox 与射频消融(RFA)结合用于治疗无法手术的肝细胞癌得到了较好的 I 期临床数据, 但在 III 期 HEAT 试验中并未到达主要终点(PFS 改善小于 33%), 对试验进行失败总结和调整后目前重新进行 III 期临床试验。Dicheva 等<sup>[33]</sup>开发了一种载有阿霉素的阳离子热敏脂质体(CTSL)用于双重靶向肿瘤部位,

结果表明 CTSL 向肿瘤递送阿霉素的量是普通 TSL 递送的 3 倍。另有许多研究在 ThermoDox 的基础上通过改变溶血磷脂的成分与比例、改变加热方式以及利用共载药系统等更有效地提高了释药效率<sup>[34]</sup>。比如, 程紫婷等<sup>[35]</sup>将紫杉醇热敏脂质体和 siCOX-2 金纳米星(GNS)构建成共载药系统, 利用 GNS 的光热效应达到 TSL 相变温度 42.6 °C 后释药, 并通过 GNS 深入肿瘤内部的能力改善了肿瘤细胞对紫杉醇的耐药作用。

光作为触发条件的优点是可以方便地从外部修改各种参数(如曝光时间、波长、光束直径和激光强度)以适应不同的治疗需求。光敏脂质体(LSL)的触发机制有很多种, 包括光聚合、光氧化、光裂解和光异构化, 其中基于光氧化作用的 LSL 通常与光敏剂结合用于光动力疗法(PDT), 通过用 630~820 nm 的光照射光敏剂而产生的单线态氧可以促使缩醛磷脂乙烯基醚键进行光氧化, 缩醛磷脂酰胆碱分解为脂肪醛和溶血脂质, 诱导相转变从而促进膜融合和内容物释放<sup>[36-37]</sup>。Luo 等<sup>[38]</sup>制备了光敏长循环阿霉素脂质体 Dox-PoP, 其中不饱和和磷脂二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和光敏剂卟啉磷脂(PoP)的物质的量比为 53:2, 用 665 nm 的近红外光照射裸鼠肿瘤组织 15 min 后光照组肿瘤对 Dox 的摄取量比未光照组的高 6~7 倍。诺华公司开发的用于 PDT 的 Visudyne(维替泊芬脂质体)中含有一种合成卟啉光敏剂维替泊芬(VPF), 光敏剂与磷脂混合物的物质的量比约为 1:8, 注射后用 692 nm 的非热性二极管激光照射可选择性地清除新生血管膜, 对视网膜和脉络膜组织的损害最小化<sup>[6]</sup>。

pH 敏感性脂质体(PSL)在生理 pH 7.4 时保持稳定, 但在酸性环境(如肿瘤组织)中不稳定, 可以将药物释放到远离跨膜外排泵的胞质溶胶中, 通过防止溶酶体降解来提高药物的利用度, 这种现象被称为“体内逃逸”<sup>[39]</sup>, 并且增加的细胞质药物浓度可能超过药物外排转运蛋白的能力, 从而绕开了肿瘤中耐药性发展的主要机制<sup>[40]</sup>。PSL 通常使用 pH 敏感的锥形脂质二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)和弱酸性两亲物琥珀酸胆固醇酯(CHEMS), CHEMS 可以在生理 pH 条件下稳定 DOPE, 并在酸性 pH 条件下促进膜融合。Zhao 等<sup>[41]</sup>用肿瘤特异性 pH 响应肽 H<sub>7</sub>K(R<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 修饰的

Dox-PSL可在pH 6.5时释放超过80%的Dox,在C6荷瘤裸鼠的体内抗肿瘤活性显著高于普通PLD。Chang等<sup>[42]</sup>用精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)肽修饰包载多西他赛的PSL,在相等时间内RGD-PSL在pH 7.4中释药53.3%,但在pH 5.0中释药超过80%。然而目前要解决的问题是低pH触发的药物释放可能不是肿瘤特异的,因为免疫细胞的体内和溶酶体腔也呈酸性<sup>[2]</sup>。

与光敏性脂质体类似,超声敏感性脂质体所装载的声敏剂可以在超声的作用下产生与脂质体膜反应的活性氧,破坏膜结构而释放药物。不加声敏剂时,超声作用可以在脂质双层的疏水区域形成气泡核,核变大至破坏膜结构而形成一个暂时的小孔释药。磁敏感性脂质体是将磁性纳米粒包载在脂质体的水核中,通过外部磁场将脂质体引导至目标组织或器官中。氧化还原敏感性脂质体中含有二硫键,而肿瘤细胞内生物还原剂谷胱甘肽的浓度比正常细胞高4倍多,该脂质体可以优先在肿瘤细胞内裂解二硫键释放药物。另外,肿瘤细胞中会高表达基质金属蛋白酶(MMP),酶敏感性脂质体中的MMP底物肽在肿瘤细胞中被酶解后可释放药物。此外,随着研究的深入,脂质体递药系统倾向于将配体靶向功能与刺激响应相结合以实现更高效的靶向与控释功能。Chi等<sup>[43]</sup>设计了一种具有透明质酸(HA)亲水壳的氧化还原敏感性阳离子长循环脂质体阿霉素,其中二硫键可在肿瘤的谷胱甘肽环境中裂解而脱去PEG,HA用于靶向CD44过表达的骨肉瘤细胞,结果显示可以增加阿霉素在肿瘤模型内的蓄积量以及增强肿瘤抑制效果。为了满足治疗的需求,新型脂质体的种类日益增多,促进未来的脂质体递送系统趋向于智能化和个性化的精准治疗。

#### 4 脂质体注射剂的监管现状

1990年,全球首个脂质体注射剂Ambisome<sup>®</sup>获批上市,FDA和EMA开始发布关于脂质体产品NDA和ANDA申报要求的指导文件草案。2002年FDA发布了《脂质体药物工业指南》,随后于2010年发布了针对PEG化脂质体阿霉素注射剂的产品指南,2015年又发布了更全面的指南修订草案《脂质体药物CMC、人体药动学和生物等效性研究以及标签管理》,该指南于2018年进一步更新与定

稿。目前,FDA已发布了针对4种脂质体药品(两性霉素B、盐酸阿霉素、柠檬酸柔红霉素和维替泊芬)的具体产品指南,其他脂质体药品的申请可以使用2018年发布的最终指南。目前已被批准的基本上是传统脂质体或长循环脂质体制剂,但随着脂质体系统复杂性的增加,产品渗透性和靶向性机制的不同,脂质体注射剂的监管面临挑战,因此监管机构亟需根据学术与市场的引导而跟上脂质体递送系统快速发展的步伐。

我国目前还没有针对脂质体注射剂的指导文件,脂质体注射剂被归类于特殊注射剂,2019年10月,NMPA发布了《注射剂一致性评价技术要求的征求意见稿》,里面涉及特殊注射剂的评价,随后,2019年11月又发布了《特殊注射剂一致性评价的征求意见稿》,可以看出国内对特殊注射剂的关注度正在不断提高。另外,随着带量采购的进行,注射用紫杉醇(白蛋白结合型)已纳入集中采购,或将会进一步带动特殊注射剂包括脂质体注射剂的迅速发展。同时,医药企业也开始将产品研发管线锚向高端制剂,促进了学术界与产业界之间的协作,有望加快注射用脂质体产品的开发速度。

#### 5 结 语

目前已有许多注射用脂质体制剂进入市场,一定程度上改善了化疗药物的毒性以及患者的依从性。但由于脂质体技术壁垒高、质量控制难、优质原辅料欠缺、产业化设备缺乏等问题,脂质体制剂从实验室到工业化生产的转移速度仍然比较缓慢。新型的配体靶向型脂质体和刺激响应型脂质体在实验室阶段有了一定的研究进展,但肿瘤异质性问题使其临床转化率仍较低,脂质体的复杂性也给生产和监管带来了进一步的挑战。随着质量源于设计(QbD)理念、微流控技术和过程分析技术在制剂制造、放大和评估中的应用<sup>[31]</sup>,脂质体的产品转化率也在不断提高,通过学术界、工业界和监管机构的努力与合作,有望将脂质体开发为安全、有效、可控以及可用于精准治疗的纳米制剂。

#### 参 考 文 献

- [1] D'Mello SR, Cruz CN, Chen ML, *et al.* The evolving landscape of drug products containing nanomaterials in the United States [J]. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12(6):523-529.

- [2] Lee W, Im HJ. Theranostics based on liposome: looking back and forward [J]. *Nucl Med Mol Imaging*, 2019, **53**(4): 242–246.
- [3] Fan Y, Zhang Q. Development of liposomal formulations: from concept to clinical investigations [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2013, **8**(2):81–87.
- [4] Schmitt CJ, Dietrich S, Ho AD, *et al.* Replacement of conventional doxorubicin by pegylated liposomal doxorubicin is a safe and effective alternative in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma patients with cardiac risk factors [J]. *Ann Hematol*, 2012, **91**(3):391–397.
- [5] Arantseva D, Vodovozova E. Platinum-based antitumor drugs and their liposomal formulations in clinical trials [J]. *Russ J Bioorg Chem*, 2018, **44**(6):619–630.
- [6] Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, *et al.* Liposomal formulations in clinical use: an updated review [J]. *Pharmaceutics*, 2017, **9**(2):12.
- [7] Mohamed M, Abu Lila AS, Shimizu T, *et al.* PEGylated liposomes: immunological responses [J]. *Sci Technol Adv Mater*, 2019, **20**(1):710–724.
- [8] Lila ASA, Uehara Y, Ishida T, *et al.* Application of polyglycerol coating to plasmid DNA lipoplex for the evasion of the accelerated blood clearance phenomenon in nucleic acid delivery [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, **103**(2):557–566.
- [9] Mima Y, Lila ASA, Shimizu T, *et al.* Ganglioside inserted into PEGylated liposome attenuates anti-PEG immunity [J]. *J Control Release*, 2017, **250**:20–26.
- [10] Lila ASA, Kiwada H, Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage [J]. *J Control Release*, 2013, **172**(1):38–47.
- [11] Mészáros T, Csincsi ÁI, Uzonyi B, *et al.* Factor H inhibits complement activation induced by liposomal and micellar drugs and the therapeutic antibody rituximab *in vitro* [J]. *Nanomed Nanotechnol*, 2016, **12**(4):1023–1031.
- [12] Rietwyk S, Peer D. Next-generation lipids in RNA interference therapeutics [J]. *ACS Nano*, 2017, **11**(8):7572–7586.
- [13] Barba AA, Bochicchio S, Dalmoro A, *et al.* Lipid delivery systems for nucleic-acid-based drugs: from production to clinical applications [J]. *Pharmaceutics*, 2019, **11**(8):360.
- [14] Chen Z, Zhang T, Wu B, *et al.* Insights into the therapeutic potential of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  small interfering RNA in malignant melanoma delivered via folate-decorated cationic liposomes [J]. *Int J Nanomed*, 2016, **11**:991–1002.
- [15] Wang Y, Gao F, Jiang X, *et al.* Co-delivery of gemcitabine and Mel-1 siRNA via cationic liposome-based system enhances the efficacy of chemotherapy in pancreatic cancer [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2019, **15**(5):966–978.
- [16] Jabir NR, Anwar K, Firoz CK, *et al.* An overview on the current status of cancer nanomedicines [J]. *Curr Med Res Opin*, 2018, **34**(5):911–921.
- [17] Kapoor M, Lee SL, Tyner KM. Liposomal drug product development and quality: current US experience and perspective [J]. *AAPS J*, 2017, **19**(3):1–10.
- [18] He H, Yuan D, Wu Y, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics modeling and simulation systems to support the development and regulation of liposomal drugs [J]. *Pharmaceutics*, 2019, **11**(3):110.
- [19] Beltrán-Gracia E, López-Camacho A, Higuera-Ciajara I, *et al.* Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications [J]. *Cancer Nanotechnol*, 2019, **10**(1):11.
- [20] Harrison TS, Lyseng-Williamson KA. Vincristine sulfate liposome injection [J]. *BioDrugs*, 2013, **27**(1):69–74.
- [21] Stathopoulos GP, Antoniou D, Dimitroulis J, *et al.* Comparison of liposomal cisplatin versus cisplatin in non-squamous cell non-small-cell lung cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, **68**(4):945–950.
- [22] Franze S, Selmin F, Samaritani E, *et al.* Lyophilization of liposomal formulations: still necessary, still challenging [J]. *Pharmaceutics*, 2018, **10**(3):139.
- [23] Akinc A, Maier MA, Manoharan M, *et al.* The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs [J]. *Nat Nanotechnol*, 2019, **14**(12):1084–1087.
- [24] Gazzano E, Rolando B, Chegaev K, *et al.* Folate-targeted liposomal nitrooxy-doxorubicin: an effective tool against P-glycoprotein-positive and folate receptor-positive tumors [J]. *J Control Release*, 2018, **270**:37–52.
- [25] Zheng C, Ma C, Bai E, *et al.* Transferrin and cell-penetrating peptide dual-functionalized liposome for targeted drug delivery to glioma [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, **8**(2):1658–1668.
- [26] Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, *et al.* Advances and challenges of liposome assisted drug delivery [J]. *Front Pharmacol*, 2015, **6**:286.
- [27] Eloy JO, Petrilli R, Trevizan LNF, *et al.* Immunoliposomes: a review on functionalization strategies and targets for drug delivery [J]. *Colloids Surf, B*, 2017, **159**:454–467.
- [28] Arabi L, Badiie A, Mosaffa F, *et al.* Targeting CD44 expressing cancer cells with anti-CD44 monoclonal antibody improves cellular uptake and antitumor efficacy of liposomal doxorubicin [J]. *J Control Release*, 2015, **220**:275–286.
- [29] Espelin CW, Leonard SC, Geretti E, *et al.* Dual HER2 targeting with trastuzumab and liposomal encapsulated doxorubicin (MM-302) demonstrates synergistic antitumor activity in breast and gastric cancer [J]. *Cancer Res*, 2016, **76**(6):1517–1527.
- [30] Merino M, Zalba S, Garrido MJ. Immunoliposomes in clinical oncology: state of the art and future perspectives [J]. *J Control Release*, 2018, **275**:162–176.
- [31] Munster P, Krop IE, LoRusso P, *et al.* Safety and pharmacokinetics of MM-302, a HER2-targeted antibody-liposomal doxo-

- rubicin conjugate, in patients with advanced HER2-positive breast cancer: a phase I dose-escalation study [J]. *Br J Cancer*, 2018, **119**(9):1086-1093.
- [32] Dou Y, Hynynen K, Allen C. To heat or not to heat: Challenges with clinical translation of thermosensitive liposomes [J]. *J Control Release*, 2017, **249**:63-73.
- [33] Dicheva BM, ten Hagen TL, Schipper D, et al. Targeted and heat-triggered doxorubicin delivery to tumors by dual targeted cationic thermosensitive liposomes [J]. *J Control Release*, 2014, **195**:37-48.
- [34] Dou YN, Zheng J, Foltz WD, et al. Heat-activated thermosensitive liposomal cisplatin (HTLC) results in effective growth delay of cervical carcinoma in mice [J]. *J Control Release*, 2014, **178**:69-78.
- [35] Cheng Z, Yao K, Liu W, et al. Preparation and characterization of composite delivery system of paclitaxel-loaded temperature sensitive liposome and siRNA-loaded gold nanostar [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, **48**(4): 445-452.
- [36] Alvarez-Lorenzo C, Bromberg L, Concheiro A. Light-sensitive intelligent drug delivery systems [J]. *Photochem Photobiol*, 2009, **85**(4):848-860.
- [37] Miranda D, Lovell JF. Mechanisms of light-induced liposome permeabilization [J]. *Bioeng Transl Med*, 2016, **1**(3): 267-276.
- [38] Luo D, Carter KA, Razi A, et al. Doxorubicin encapsulated in stealth liposomes conferred with light-triggered drug release [J]. *Biomaterials*, 2016, **75**:193-202.
- [39] Xu H, Paxton JW, Wu Z. Enhanced pH-responsiveness, cellular trafficking, cytotoxicity and long-circulation of PEGylated liposomes with post-insertion technique using gemcitabine as a model drug [J]. *Pharm Res*, 2015, **32**(7):2428-2438.
- [40] Kanamala M, Wilson WR, Yang M, et al. Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: a review [J]. *Biomaterials*, 2016, **85**:152-167.
- [41] Zhao Y, Ren W, Zhong T, et al. Tumor-specific pH-responsive peptide-modified pH-sensitive liposomes containing doxorubicin for enhancing glioma targeting and anti-tumor activity [J]. *J Control Release*, 2016, **222**:56-66.
- [42] Chang M, Lu S, Zhang F, et al. RGD-modified pH-sensitive liposomes for docetaxel tumor targeting [J]. *Colloids Surf B*, 2015, **129**:175-182.
- [43] Chi Y, Yin X, Sun K, et al. Redox-sensitive and hyaluronic acid functionalized liposomes for cytoplasmic drug delivery to osteosarcoma in animal models [J]. *J Control Release*, 2017, **261**:113-125.

## ·本刊讯·

## 《中国药科大学学报》再次入选 中国科学引文数据库(CSCD)核心库

据中国科学院文献情报中心的最新消息,我校主办的学术期刊《中国药科大学学报》再次被中国科学引文(CSCD)数据库(2019-2020)收录为来源期刊,并进入核心库(全国药学期刊仅9种入选核心库)。

中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database,简称CSCD)由中国科学院文献情报中心与中国学术期刊(光盘版)电子杂志社联合主办,并由清华同方光盘电子出版社正式出版。通过清华大学和中国科学院资源与技术的优势结合和多年的数据积累,CSCD已发展成为我国规模最大、最具权威性的科学引文索引数据库,为中国科学文献计量和引文分析研究提供了强大工具。

经过中国科学引文数据库(CSCD)定量遴选、专家定性评估,2019-2020年度中国科学引文数据库收录来源期刊1230种,其中中国出版的英文期刊229种,中文期刊1001种。CSCD数据库来源期刊分为核心库和扩展库两部分,其中核心库908种(备注栏中标记C);扩展库322种(备注栏中标记E)。

(本刊编辑部)

## 无机纳米材料在药物递送中的研究进展

周叶舒, 王燕梅, 张倍源, 吴帅聪, 杨磊, 尹莉芳\*

(中国药科大学药学院药剂系, 南京 210009)

**摘要** 将药物、蛋白或基因高效且安全地递送到治疗部位一直是药学研究的热点。无机纳米材料以其良好的稳定性、优异的生物相容性以及较高的药物负载能力成为药物递送系统的理想材料。本文从已报道的研究以及临床试验入手, 对常用的无机纳米材料如碳纳米材料、二氧化硅纳米粒、钙纳米材料、金纳米粒、磁性纳米粒、上转换纳米粒和量子点在药物递送和临床转化方面的应用进行综述, 为无机纳米药物递送载体在新药研发上的应用提供理论参考, 对无机纳米材料进入临床应用进行了展望。

**关键词** 无机材料; 药物递送; 临床转化; 纳米技术; 进展

**中图分类号** R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)04-0394-12

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200403

**引用本文** 周叶舒, 王燕梅, 张倍源, 等. 无机纳米材料在药物递送中的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 394 - 405.

**Cite this article as:** ZHOU Yeshu, WANG Yanmei, ZHANG Beiyuan, *et al.* Research progress of inorganic nanomaterials in drug delivery system[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(4): 394 - 405.

## Research progress of inorganic nanomaterials in drug delivery system

ZHOU Yeshu, WANG Yanmei, ZHANG Beiyuan, WU Shuaicong, YANG Lei, YIN Lifang\*

*Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China*

**Abstract** Efficient and safe delivery of drugs, proteins or genes to the targeted sites has been the focus of pharmaceutical research. Inorganic nanomaterials are ideal materials for drug delivery systems due to their good stability, excellent biocompatibility and high drug loading capacity. Inorganic nanomaterials are ideal materials for drug delivery systems due to their good stability, high biocompatibility and excellent drug loading capacity. In this review, we started with reported researches and clinical trials to discuss the researches and clinical transformation of these inorganic nanoparticles in application of drug delivery, including carbon nanomaterials, silica nanoparticles, calcium nanomaterials, gold nanoparticles, magnetic nanoparticles, upconversion nanoparticles and quantum dots, providing theoretical reference for application of inorganic drug delivery carriers in the development of new drugs, looking to the prospects of inorganic nanomaterials in clinical application.

**Key words** inorganic nanomaterials; drug delivery; clinical transformation; nanotechnology; advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81603051, No. 81673377 and No. 81871477); the National Science and Technology Major Project for Drug Innovation (No. 2017ZX09101001-004); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20160760 and No. BK20170748); the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2016ZPY015); and the "333" High Level Talents Cultivation Project of Jiangsu Province

**收稿日期** 2019-11-18 \* **通信作者** Tel: 025-83271018 E-mail: lifangyin@163.com

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目 (No. 81603051, No. 81673377, No. 81871477); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (No. 2017ZX09101001-004); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20160760, BK20170748); 中央高校基本科研业务费专项资助 (No. 2016ZPY015); 江苏省“333”高层次人才培养计划

纳米技术在生物医学研究的科学创新中起着关键作用。无机纳米材料以其良好的生物相容性、易于制备合成和表面共轭化学范围广等特点渐渐成为了研究热点<sup>[1]</sup>。无机纳米材料是一类可以通过物理或化学方法合成的具有多种形态、粒径范围在 1~100 nm 的纳米粒。无机纳米材料不仅易于进行表面修饰,还可通过不同方式与药物分子结合,例如静电相互作用、疏水相互作用、酶敏感基团的共价键等,从而达到响应性释放的目的,使其成为药物递送的理想之选。与其他纳米材料相比,无机纳米材料在药物递送方面具有制备简便、载药率高、生物相容性好、易于表面修饰等优点,因此可以达到增强治疗效果的目的。除此之外,无机纳米材料还在生化传感、生物成像、化学催化和能量等领域中有广泛的应用前景<sup>[2]</sup>。近年来,基于无机纳米材料的肿瘤疗法得到了广泛研究。在开发基于无机纳米粒的肿瘤治疗系统时,通常使用包括光动力疗法、光热疗法和药物递送在内的各种技术,无机纳米材料作为药物载体具有其独特优势。本文总结了无机纳米材料在药物递送系统方面的应用和临床研究进展,为新药研发及临床转化提供参考。

## 1 药物递送

### 1.1 碳纳米材料

碳纳米材料包括 0D 富勒烯和碳量子点,1D 碳纳米管/纳米角和石墨烯纳米带,2D 石墨烯和氧化石墨烯以及 3D 纳米金刚石。碳纳米材料的可调光学和电子特性,简单的合成技术以及与各种配体和生物分子的兼容性,使得其在体外和体内生物传感、生物成像和药物递送中具有广泛应用前景<sup>[3]</sup>。

**1.1.1 氧化石墨烯** 由于碳纳米材料本身具有高表面积、低毒性、良好的生物相容性等优点,使其在药物递送方面具有非常广泛的应用。基于石墨烯的碳纳米材料中被研究最多的是氧化石墨烯(GO)。作为纳米载体,氧化石墨烯不仅可以有效递送各种化疗药物,还可以增强光热或光动力效应。虽然 GO 在近红外光的吸收不高,但由于其良好的分散性,使其具有较高的光热效率,因此可以在近红外光的照射下导致温度升高。另外,GO 介导的光热效应还包括通过氧化应激和线粒体膜去

极化作用从而诱导细胞凋亡<sup>[4]</sup>。此外,氧化石墨烯易于用亲水基团(例如羧基、羟基、环氧基团等)进行表面修饰,从而使其具有更高的生物相容性。GO 的大表面积和六角环结构可显著提高含芳香环结构药物如阿霉素和喜树碱的装载率。Miao 等<sup>[5]</sup>报道了 PEG 功能化的 GOs(pGOs)用作有效的抗肿瘤药物载体和光敏剂,用于肿瘤光动力治疗。将 pGOs 与 Ce6 偶联显著提高了药物递送入肿瘤细胞的效率。流式细胞仪检测结果显示,当 DOX 与 Ce6 之比为 1:2 时,Ce6 的细胞递送率高达(96.2±1.7)%。且 Ce6/DOX/pGO 可以在肿瘤部位积聚超过 72 h。Islami 等<sup>[6]</sup>通过将超支链 PG(HPG)共价接枝到 GO 表面合成了一种基于 GO 的有效控释榭皮素(Qu)的药物递送系统。HPG 作为超支化聚合物,可以增大 GO 纳米片之间的距离,使得药物分子被截留在空腔中,进而提高 Qu 的载药量且使得药物释放更加可控。Liu 等<sup>[7]</sup>设计了一种新型的还原型 GO(rGO)包裹的纳米泡(NB),该复合物连接在新型肝肿瘤细胞(HCC)生物标记物——硫酸肝素蛋白聚糖磷脂酰肌醇聚糖-3(GPC3)上,该纳米泡对 HCC 具有高效靶向性,且可以增加光热治疗的效果。

**1.1.2 碳纳米管** 除了 GO 之外,碳纳米管(CNT)也是用于药物递送比较有前景的一类碳纳米材料,其表面的载药效率和载药量主要受结构类型(单壁或多壁)或是接枝不同的亲水性分子控制。功能化的 CNT 纳米载体不仅可以提高细胞的摄取效率,还可通过控制体外药物的释放方式降低细胞毒性。Bhatnagar 等<sup>[8]</sup>开发了一种以壳寡糖(COS)为封端剂的单壁碳纳米管(SWCNT)药物输送载体。将 COS 通过 EDC 偶联反应接枝在 SWCNT 表面,增强生物相容性,降低 CNT 载体的内在毒性。将不同的靶向分子如 FA, p53 和溶菌酶偶联到 SWCNT 表面,以实现针对不同肿瘤细胞的选择性靶向,该研究中的模型药物为胶质毒素(GTX)。体外释放研究表明这些药物载体可以控制药物的释放。此外,SWCNTs-COS-GTX-FA, SWCNTs-COS-GTX-p53 和 SWCNTs-COS-GTX-溶菌酶药物纳米载体均提高了细胞凋亡率,其中,SWCNTs-COS-GTX-p53 诱导细胞凋亡的能力最强,这可能是由于肿瘤细胞中 p53 蛋白的过量表达。结果表明功能化的 SWCNTs 载体可以增加细胞凋

亡率。Wu等<sup>[9]</sup>制备了含有PEI和前列腺干细胞抗原(PSCA)单克隆抗体(mAb)的多壁碳纳米管(MWCNT),用于特异性靶向过度表达前列腺干细胞抗原的肿瘤细胞。该MWCNT-PEI-mAb纳米复合物生物相容性良好,且对表达前列腺干细胞抗原的肿瘤细胞具有高度的靶向性。此外,阿霉素从该复合物中的释放具有pH响应性,在pH 5.0左右释放增加。

**1.1.3 碳纳米角** 单壁碳纳米角(SWCNH)具有CNT类似的结构,还可在内、外壁上实现靶向配体和药物分子的连接。在氧化后,SWCNHs的孔可以被打开,并且其内部充满功能性羧基,其边缘可作为不同药物共价结合的位点。与CNT相比,SWCNHs的细胞毒性更低,且其生产过程中不需要金属催化剂,污染少。此外SWCNH在生物溶液中仅组装成平均直径小于100 nm的球形共轭物,更容易实现细胞摄取和肿瘤细胞的靶向递送。Chen等<sup>[10]</sup>采用两亲性脱氧胆酸修饰的羟丙基壳聚糖(DCA-HPCHS)功能化修饰了负载DOX的SWCNHs,并实现了近红外光对DOX的光动力释放。在1~10 μg/mL质量浓度范围内SWCNH-DOX对肿瘤细胞的毒性作用较低;但在808 nm光辐射下,质量浓度为5 μg/mL的SWCNHs-DOX细胞生存率降低了73%。Yang等<sup>[11]</sup>将DOX和顺铂依次负载到双重聚合物修饰的SWNHs上,设计合成了一种高效的化疗-光热治疗体系(图1)。该双化疗药物递送系统SWNHs/C<sub>18</sub>PMH/mPEG-PLA-DOX-Pt具有pH响应和缓释特性,并可通过EPR效应在原发性肿瘤及其转移结节中聚积。

**1.1.4 碳点** 具有荧光特性的碳点(CD)成为纳米药物载体的研究热点,CD具有良好的水溶性、高生物相容性、低毒性以及可调节的吸收和发射峰波长。更重要的是,CD合成通常比较简便且不需要有毒有机溶剂,对环境污染小<sup>[12]</sup>。CD常用的合成材料是无毒的碳源如碳水化合物、柠檬酸、氨基酸等。Wang等<sup>[13]</sup>设计构建了PEG-壳聚糖功能化的CD达到双光子荧光成像并可通过NIR光照射/pH调节控制药物的释放的目的。覆盖在CD表面上的壳聚糖对pH敏感,可以在pH从7.4向5.0变化的过程中由非溶胀变为溶胀状态从而释放药物。CD载体上的非线性PEG纳米凝胶网络的聚合使药物释放具有热敏性,因此通过NIR照射可

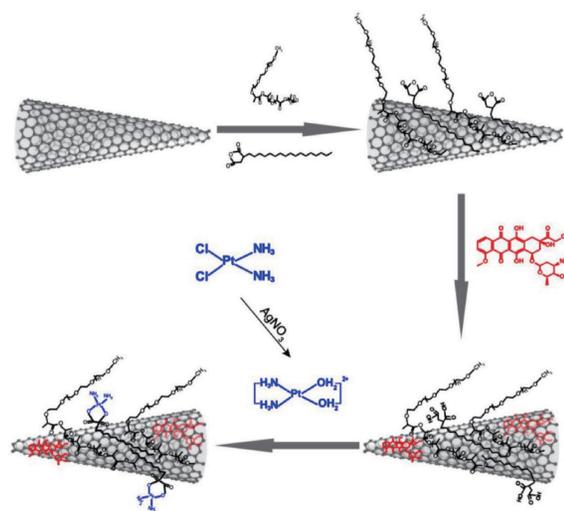


Figure 1 Schematic illustration of the preparation of dual drug-loaded SWNHs<sup>[11]</sup>

以在CD上产生热量从而增加释放的药物。在pH 5.0释放介质中,96 h释放达49.2%,而在pH 6.2和7.4介质中分别仅释放25.4%和20.8%,且采用NIR光照射5 min就可使溶液温度升高23℃,从而进一步加快药物释放速度。Tang等<sup>[14]</sup>报道了用于FRET细胞成像和药物释放监测的碳点药物递送系统(FRET-C-dots-DDS)。在该系统中碳点既作为药物载体,又是FRET对中供体的一部分,聚乙二醇接枝的碳点与叶酸共价连接,达到主动靶向肿瘤细胞的效果。Jung等<sup>[15]</sup>开发了靶向肿瘤细胞核的多功能两性离子碳点(图2)。作者采用一步合成法引入两性离子,并通过钝化剂β-丙氨酸促进碳点的细胞质吸收,两性离子配体促进其进入细胞核,提高在肿瘤细胞的聚积和细胞核靶向性,在核靶向药物递送方面具有良好的前景。

除此之外,碳纳米材料在药物-基因共递送方面也有广泛的应用。由于其自身荧光性质,还可用于体内成像,因此碳纳米材料的视疗一体化研究也十分深入。

## 1.2 二氧化硅纳米粒

二氧化硅纳米粒(SNP)具有多孔结构可调,比表面积大等优点使其在药物递送领域得到广泛研究。目前SNP被用于递送如布洛芬、阿霉素、喜树碱、顺铂、阿仑膦酸盐、肽类药物、蛋白质药物和基因药物等<sup>[16]</sup>。

部分药物口服肠道吸收差、生物利用度低,限

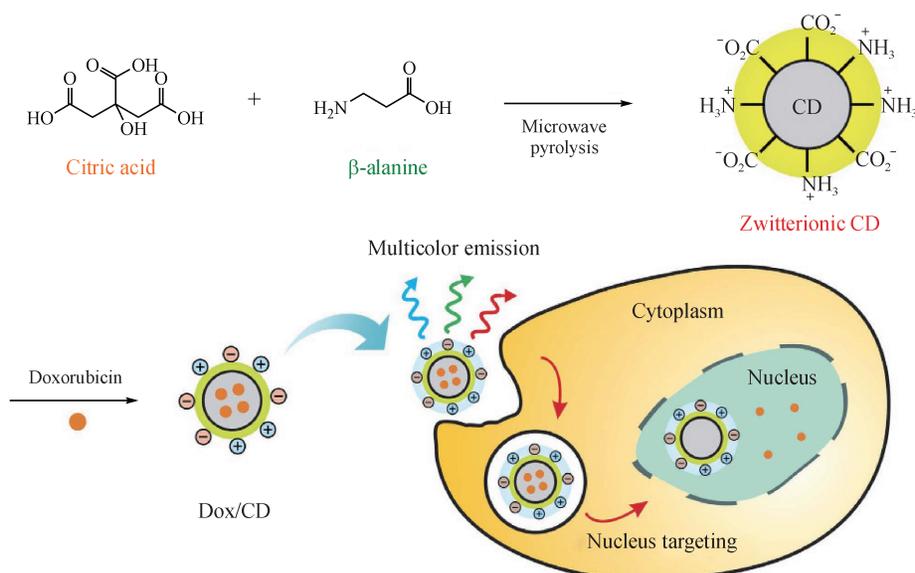


Figure 2 Schematic illustration of multifunctional zwitterionic carbon dot drug delivery system<sup>[15]</sup>

制了其临床应用。Mellaerts 等<sup>[17]</sup>使用 SNP 作为难溶性药物依他康唑的药物载体,显著提高了依他康唑在新西兰兔中的生物利用度。由于具有多孔性和稳定性,SNP 作为药物载体可提高生物大分子的稳定性,避免其降解。对于大多数不可渗透膜的天然蛋白质,SNP 也可将其递送到细胞质中。如 Slowing 等<sup>[18]</sup>采用 5.4 nm 孔径的 SNP 负载细胞色素 C,并成功将其递送到 HeLa 细胞中,细胞摄取实验证实了从 SNP 中释放的酶在催化其底物方面仍具有较高的活性。基因递送载体中,非病毒载体免疫原性低、毒性小,但非病毒性载体转染效率偏低。SNP 的多孔结构和孔径可调性便于装载基因分子,基因分子在 SNP 内部,可避免被核酸酶降解。为增加对负电性核酸的负载能力,可将 SNP 表面采用阳离子聚合物进行改性。目前,与 SNP 组装用于基因递送的阳离子聚合物包括聚酰胺(PAMAM)、聚乙烯亚胺(PEI)和甘露糖基化聚乙烯亚胺(MP)等。表面正电荷不仅可以增加 SNP 与带负电荷的基因之间的静电相互作用,还可促进其通过“质子海绵效应”从细胞内体逃逸。Xia 等<sup>[19]</sup>发现,PEI 与 SNP 非共价结合不仅会为 DNA/siRNA 的附着提供表面正电荷,而且还会增加细胞对纳米粒的摄取。

此外,SNP 亦可用于涂覆在其他纳米结构的表面,如 SNP 涂覆金纳米棒用于制备 NIR 响应的纳米级药物递送系统。Zhang 等<sup>[20]</sup>设计构建了一种基

于介孔二氧化硅包被的金纳米棒并装载阿霉素的新型治疗平台。近红外光可有效触发阿霉素从纳米棒中释放,同时由于金纳米棒的高 NIR 光吸收系数,还具有良好的光热治疗效果,该体系将化学疗法和光热疗法有机结合显著提高了抗肿瘤效率。

### 1.3 钙纳米材料

钙主要以生物矿物质的形式存在,包括骨骼和牙齿等生物硬组织中的磷酸钙、碳酸钙、硅酸钙和氟化钙。由于其优异的生物相容性、生物活性和生物可降解性,包括磷酸钙、碳酸钙、硅酸钙和氟化钙在内的合成钙纳米材料已被广泛研究用于各种生物医学应用<sup>[21]</sup>。钙纳米材料可溶解并参与生物体的正常代谢,可克服其他材料的不良生物降解性和长期毒性等难题。通过将钙纳米材料与治疗剂结合,可以实现多种治疗方法,包括化学疗法、基因疗法、热疗法、光动力疗法和放射疗法等;将钙纳米材料与造影剂结合使用,可以用于各种成像与疾病诊断。

1.3.1 磷酸钙纳米材料 磷酸钙(CaP)纳米材料由于其生物相容性和生物降解性而被广泛用于生物学和医学。磷酸钙的优势是其骨诱导性,常用作组织植入物和骨替代材料。此外,磷酸钙还经常用作药物和其他生物活性分子的递送载体,其在生理 pH 条件下维持矿物质结构,在细胞内内体(pH 5.0)与溶酶体(pH 4.5)中可被溶解,进而控

制药物在细胞中的递送<sup>[22]</sup>。磷酸钙载体溶解后,形成的钙离子可防止粒子积聚并诱导细胞内药物的释放。Zhang等<sup>[23]</sup>设计开发了CaP/siRNA纳米粒与聚阳离子脂质体结合的siRNA递送系统,称为聚阳离子脂质体/磷酸钙/siRNA复合物(PLCP)。由于其具有高效率的靶基因沉默能力以及强大的内体逃逸能力和低细胞毒性使得PLCP纳米粒在递送治疗性siRNA的应用中表现出良好潜力。作者进一步研究了PLCP在体外和体内VEGF siRNA的递送效率。结果表明,PLCP递送的VEGF siRNA

表现出优异的基因沉默能力,且显著抑制了血管生成和肿瘤生长<sup>[24]</sup>。Liu等<sup>[25]</sup>开发了一种新型的硫酸鱼精蛋白改性的磷酸钙纳米粒(PS-CaP),可有效地将DNA递送到细胞中。Qiu等<sup>[26]</sup>合成了pH响应的阿仑膦酸-透明质酸接枝聚合物(AHA)作为外壳的磷酸钙纳米粒用作CD44介导的肿瘤靶向药物递送(图3)。该递送系统可以有效地控制CaP NPs的过度生长并保护siRNA免受酶降解,利用其pH响应特性迅速释放siRNA,并最终在A549肿瘤细胞中蓄积并发挥基因沉默的作用。

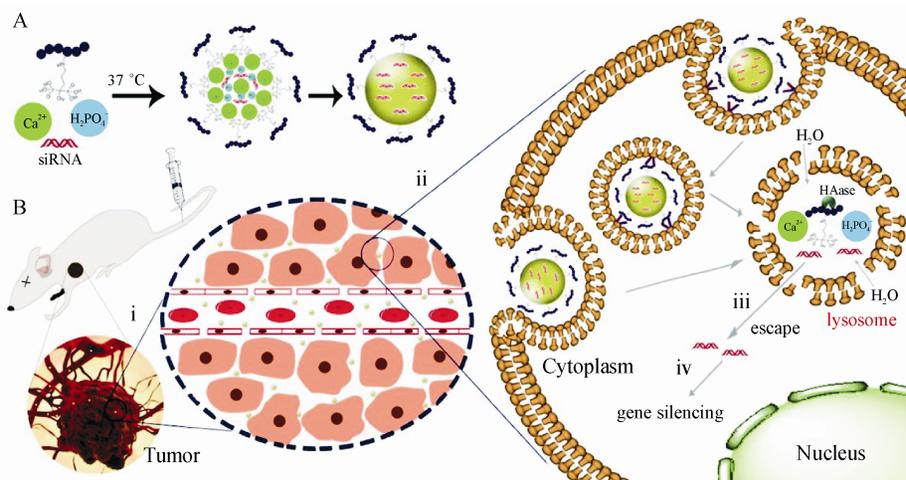


Figure 3 Schematic illustration of core-shell type CaP-AHA/siRNA nanoparticles<sup>[26]</sup>

A: Preparation process; B: After injection via intravenous route

1.3.2 碳酸钙纳米材料 碳酸钙纳米材料也是药物递送方面的一大研究热点。碳酸钙以方解石、文石和球霏石等形式存在,其中球霏石型因其具有大孔隙率、高表面积以及能在相对温和的条件下快速溶解的优点,具有良好的药物递送前景。Zhao等<sup>[27]</sup>设计并合成了一种具有生物相容性和生物降解性的超顺磁性碳酸钙晶体用于药物-基因共递送。具有多孔结构的碳酸钙晶体负载了阿霉素(DOX), Au-DNA和 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @二氧化硅纳米粒,具有较高的细胞摄取效率,且DOX与基因有效靶向在肿瘤部位,集生物学成像和药物递送于一体。Abdullahi等<sup>[28]</sup>开发了pH响应的碳酸钙纳米晶用于多种化疗药物的递送,具有高载药率,并且能特异性将药物递送至肿瘤细胞,其在正常生理pH下药物释放较少,在模拟肿瘤微环境下释放较完全。Wu等<sup>[29]</sup>在碳酸钙载体的基础上开发了由阿霉素和其他疏水性药物组成的多组分递药系统,该双

重药物负载的纳米粒可显著增强肿瘤细胞抑制作用,且对耐药肿瘤细胞同样具有良好的杀灭效果。

1.3.3 硅酸钙纳米材料 基于硅酸钙的药物递送系统具有较长的药物释放时间,可显著延长药物的治疗效果。另外其具有pH响应药物释放特性,可以作为靶向药物递送的理想平台。Wu等<sup>[30]</sup>开发了一种通过无表面活性剂的声化学合成法构建的层状硅酸钙水合物多级纳米结构介孔微球。该载体比表面积大、孔体积大,布洛芬分子与其强相互作用显著提高了布洛芬的负载率,且实现了药物在体内的缓慢释放,延长了药效。Wu等<sup>[31]</sup>报道了一种负载抗生素——氨苄西林的生物活性介孔硅酸钙纳米粒,其药物负载率高,并且药物从硅酸钙纳米粒中的释放缓慢而持久,两周后累积释放仅30%。

#### 1.4 金纳米粒

金纳米粒(Au NP)由于其生物相容性和独特

的光学特性,被认为是当今纳米医学中使用最广泛的金属纳米粒,金纳米粒包括纳米球、纳米棒、纳米壳和纳米笼等<sup>[32]</sup>。Au NP在尺寸和形状上具有高度可调性,可满足装载不同药物(如蛋白质、核酸或小分子药物)需要的尺寸<sup>[33-34]</sup>。此外,其高表面积和良好的表面可修饰性不仅有助于装载大分子药物,还有助于装载其他如靶向分子、配体、造影剂等<sup>[35]</sup>。

Au NP在小分子药物递送方面具有非常广的应用和研究。例如, Tomuleasa等<sup>[36]</sup>研究了分别装载阿霉素,顺铂或卡培他滨的不同 Au NPs对肝癌的治疗效果,药物分子与天冬氨酸包被的 Au NPs非共价结合。与游离药物相比, Au NP-药物结合物显著提高了对肿瘤细胞的治疗效果,且对耐药细胞同样有效。Heo等<sup>[37]</sup>设计构建了基于 Au NP的多功能治疗策略,包括靶向配体生物素,抗肿瘤药物紫杉醇,用于荧光检测的罗丹明 B和可以增加生物相容性的 PEG,实现了同时进行治疗和诊断。另外将环糊精附着在 Au NP表面用于非共价包合紫杉醇。作者将 Au NPs在体外使用3种不同的肿瘤细胞系(HeLa, A549, MG63)进行了药效评估。结果表明,用 Au NPs处理24 h后,肿瘤细胞的存活率显著降低。

Au NP还可被用于基因递送。Lee等<sup>[38]</sup>设计了表面涂覆阳离子磷脂的金纳米棒用于递送基因药物,其带正电荷的磷脂表面可与带负电荷的基因药物静电结合。Shim等<sup>[39]</sup>将 siRNA通过酸敏感的缩酮连接基团与 Au NPs相连,从而形成一个聚集体。其中,缩酮连接基团可在低 pH下裂解,从而释放 siRNA和 Au NPs。作者利用聚集体变为单个粒子的光学性质变化,使用光学相干断层扫描检测该聚集体在肿瘤部位的裂解情况。作者也证实了在低 pH条件下的基因沉默,说明该 Au NP能够成功递送 siRNA。

### 1.5 磁性纳米粒

1956年, Gilchrist首次将磁性纳米粒应用于生物医学研究中,利用纳米粒的感应加热来治疗肿瘤部位附近的淋巴结<sup>[40]</sup>。1963年, Meyer等<sup>[41]</sup>报道了利用磁靶向技术将氧化铁纳米粒应用于药物靶向递送。磁性药物递送系统的设计和组装可以是单个粒子的表面修饰,也可以是对磁性纳米粒的空心结构和杂化结构的修饰。磁性纳米粒可以在

涂覆二氧化硅、金或聚合物后成为具有核-壳结构的磁性纳米粒,更利于其表面修饰和药物负载。

1.5.1 氧化铁磁性纳米粒 Lee等<sup>[42]</sup>设计了基于磁性核-壳纳米粒(MCNP)的递药系统,实现了化疗-热疗联合作用,提高了恶性脑瘤细胞和转移性乳腺癌细胞的凋亡率。其中,该磁性核心表面涂有金纳米壳,可促进两亲性尾部锚定肽(ATAP)和 Arg-Gly-Asp(RGD)肽的结合,且磁性核心对于 MCNP-ATAP递药系统的靶向递送以及局部热疗至关重要。此外, MCNP-ATAP可进入线粒体并引起线粒体功能障碍,诱导细胞色素 C从线粒体中释放,细胞色素 C与 Apaf-1结合,在 ATP/dATP的介导下激活 Caspase-3,最终导致肿瘤细胞凋亡。作者在体外和体内均证实了 MCNP-ATAP递药系统对肿瘤细胞良好的杀伤作用。

氧化铁磁性纳米粒也可用于修饰其他药物递送载体以达到磁性靶向的目的。例如,磁性纳米粒修饰的碳纳米管被证明是递送抗肿瘤药物的有效载体。Chen等<sup>[43]</sup>将 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米粒修饰到碳纳米管上,并证实治疗部位进行交变磁场(AMF)处理可将药效提高两倍,表明在药物递送系统中加入磁性纳米粒可以改善治疗效果并减少化疗药物的剂量。除了高载药率和磁性靶向治疗外,混合磁性纳米结构可用于负载多种肿瘤靶向治疗药物。如阿霉素和紫杉醇之类的药物常用于磁性靶向药物递送的研究。四环素、青霉素和环丙沙星的抗生素也可负载于磁性药物递送载体中,以达到在感染部位进行局部治疗的目的。此外,放射性同位素也可利用磁靶向载体进行抗肿瘤治疗。研究证明带有 β-发射体 90Y的磁性微球可定位于肿瘤区域并使肿瘤体积减小一半<sup>[44]</sup>。

除了利用其靶向作用,氧化铁磁性纳米粒还可用于控制药物释放。Langer等<sup>[45-46]</sup>证实了在 AMF激发下可以使含有氧化铁珠的聚合物纳米复合材料的药物释放增加。研究证明,在 AMF激发下氧化铁珠的运动会在聚合物基质中产生“微裂纹”,从而使包裹在纳米复合物中的药物分子得以释放。

1.5.2 氧化锰磁性纳米粒 中空氧化锰纳米粒(HMON)十分适用于 MRI的 T1造影剂。HMON也可用作药物递送,与氧化铁纳米粒相比,其表面积更大,载药率更高,有更长的体内循环时间。Bae

等<sup>[47]</sup>利用3,4-二羟基-1-苯丙氨酸(DOPA)作为表面修饰剂设计合成了一种多功能HMON。在此项研究中,DOPA先与支化PEI共轭,再固定至HMON表面上,再与Herceptin抗体结合,以实现肿瘤特异性靶向。该HMON被证实能将siRNA特异性地递送到肿瘤细胞中,并可用于MRI靶向肿瘤检测。Zheng等<sup>[48]</sup>报道了一种基于MnO<sub>2</sub>的纳米粒,其具有MRI和近红外荧光成像及药物递送的能力,可用于心肌梗死的检测和治疗。近红外荧光成像表明,该纳米粒优先聚集在梗死的心肌细胞中,这使其成为治疗心肌梗死的理想药物载体。Yang等<sup>[49]</sup>设计了基于中空MnO<sub>2</sub>纳米壳的智能化治疗系统,将光敏剂Ce6和抗肿瘤药物阿霉素(DOX)共同装载到该中空H-MnO<sub>2</sub>-PEG纳米系统中(H-MnO<sub>2</sub>-PEG/C&D),以用于肿瘤靶向的药物递送。该递药系统不仅可以通过超敏pH触发达到控释药物的目的,还能通过肿瘤微环境响应生成氧气从而克服肿瘤缺氧。

#### 1.6 上转换纳米粒

上转换纳米粒(UCP)具有多种独特的性质,如超强光稳定性、深层组织穿透性和对生物样品的最小光损伤性,这使其具有广泛的生物学应用,包括成像,检测和治疗。UCP的一般合成方法是共沉淀,水热合成和热分解。近年来,UCP已被用作药物递送载体以及光动力治疗剂。例如,生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯(TPGS)功能化的UCP用于阿霉素的转运。TPGS可以抑制P-糖蛋白的表达并促进细胞内药物的积累,因此该纳米系统对阿霉素耐药的MCF-7细胞具有强大的杀伤力。另有多项研究报道,UCP适用于PDT,因为UCP可以被近红外光激发并发出UV可见光,从而激活光敏剂<sup>[50]</sup>。

上转换纳米粒主要是由镧系离子和活化离子构成。掺杂有镧系离子(Ln<sup>3+</sup>, Er<sup>3+</sup>, Tm<sup>3+</sup>, Ho<sup>3+</sup>等)的UCP具有很高的稳定性,可用于光动力治疗。Zhang等<sup>[51]</sup>设计了一种用于光动力治疗的负载花青素540、介孔二氧化硅涂层的UCP。体外实验中证明了该UCP对肿瘤细胞的有效杀伤。Zeng等<sup>[52]</sup>还证明了叶酸(FA)功能化,负载光敏剂(PS)的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@NaYF<sub>4</sub>:Yb/Er(FA-NPs-PS)纳米复合材料的NIR PDT在体外和体内的治疗效果。Cui等<sup>[53]</sup>将FA修饰的壳聚糖(FASOC)应用于负载光敏剂

的UCP涂层,以构成用于深层组织治疗的PDT递药系统。其中,UCP为油酸封端的NaYF<sub>4</sub>:Yb,Er(OA-UCNPs)。另外,FASOC修饰的上转换纳米粒(FASOC-UCP)可靶向蓄积在肿瘤中并在NIR照射后激活相邻的锌酞菁锌(ZnPc),产生光动力治疗效果。Wang等<sup>[54]</sup>设计了水溶性的UCP-Ce6超分子纳米复合物,该复合物在NIR激发下可以通过荧光共振能量转移产生单线态氧。该UCP-Ce6复合物暴露于NIR后能进入肿瘤细胞并诱导细胞死亡。与传统PDT相比,该UCP实现的NIR触发的PDT显示出更深的组织穿透深度。

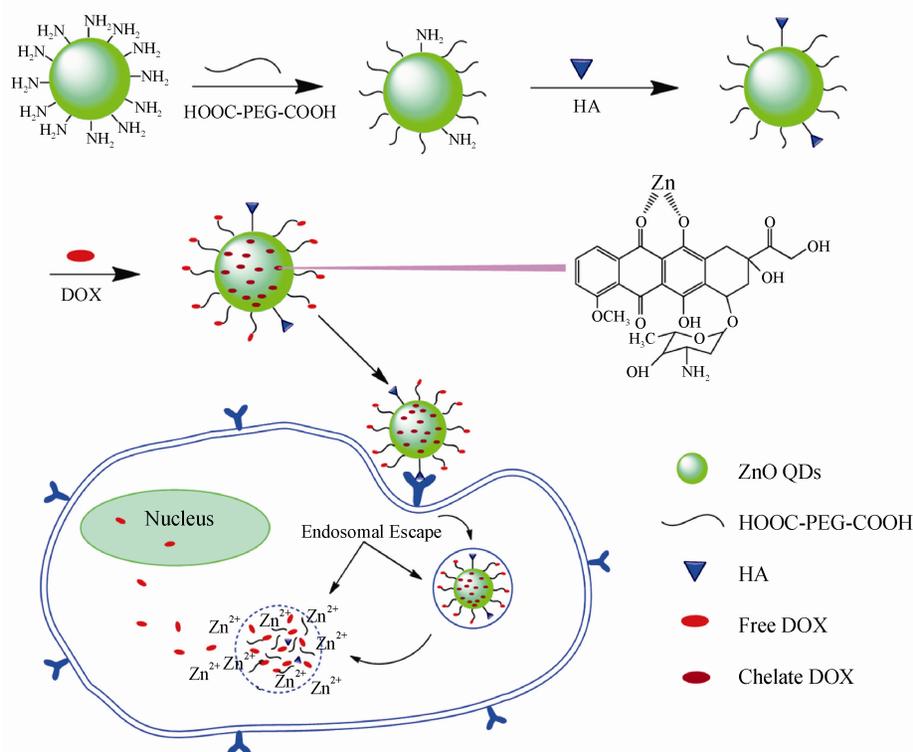
#### 1.7 量子点

量子点(QD)是直径在2~10 nm的荧光纳米粒,一般由半导体材料组成,包括CdSe, ZnS, PbSe, PbS, InP, GaAs, Au@CdSe, FePt@CdSe, CdTeSe, CdHgTe, CdHgTe/ZnS, ZnTe/CdSe等。由于量子点具有良好的荧光特性、高量子产率,因此被广泛应用于生物成像、传感和检测。QD具有较高的比表面积,且易于表面修饰,将QD应用于药物递送可以实现对纳米粒的生物分布和药物释放实时监控。将诊断和治疗能力整合到同一药物递送系统一直是近年来研究的热点。量子点则是这类药物递送系统的“潜力股”,因为它们不仅可以充当药物递送载体,还可以作为纳米递送系统的荧光标记<sup>[55]</sup>。

Bagalkot等<sup>[56]</sup>报道了一种量子点-配体-阿霉素共轭物[QD-Apt(Dox)]用于肿瘤的成像和靶向治疗。该递药系统能够实现表达PSMA蛋白的肿瘤细胞的特异性靶向和成像。此外,阿霉素和量子点之间存在荧光共振能量转移(FRET)效应,可以通过QD的荧光来感应阿霉素的释放。Byrne等<sup>[57]</sup>制备了巯基乙酸(TGA)稳定的CdTe QD,并证明这些QD可以穿透THP-1巨噬细胞膜并到达核膜,在成像和治疗领域具有很大的应用前景。更重要的是,通过这种QD递药系统可以实现监控药物递送到活细胞中的细胞内过程。Cai等<sup>[58]</sup>合成了一种pH敏感的ZnO-Gd-DOX递药系统,由于PEG的保护,该递药系统在生理pH下可以保持稳定,且HA分子使其可以实现肿瘤细胞靶向(图4)。在酸性环境下,ZnO QD遭到破坏,DOX被释放,而溶解后的ZnO QD也显示出抗肿瘤活性,因此DOX与ZnO QD的联合显著增强了肿瘤细胞的凋亡。为了增

强氟尿嘧啶(5-FU)的靶向递送, Bwatanglang 等<sup>[59]</sup>提出了一个叶酸(FA)功能化的模型。作者将 Mn: ZnS QDs 封装在壳聚糖(CS)生物聚合物中,并用叶

酸进行表面修饰。体内评价结果表明该递药系统与仅用 5-FU 治疗相比,显示出更强的抗肿瘤生长以及肺转移抑制效果。



**Figure 4** Schematic illustration of the hyaluronic acid-ZnO quantum dots-dicarboxyl-terminated poly(ethyleneglycol) (HA-ZnO-PEG) drug delivery system<sup>[58]</sup>

## 2 临床转化

无机纳米材料在临床转化方面还具有许多挑战,最大的问题就是体内长期毒性。无机纳米材料虽然被大量研究证实急性毒性较低,但其能否从体内清除,是否会造成长期毒性还无法验证。在碳纳米材料的临床应用中,最大的难题是它的长期潜在毒性以及低清除率。只有解决了碳纳米材料的体内清除问题,它才有应用于临床研究的可能。将 QD 转化到临床应用中的主要障碍是 QD 诱导的细胞毒性。由于 QD 由有毒的金属原子组成,因此它们会通过光子诱导的自由基和胶体作用诱导细胞毒性。最常用的量子点核心元素为镉,由于核心具有电子活性并且易于发生光和空气氧化,因此可以通过促进自由基的形成来进一步产生细胞毒性。另有数据表明,游离镉离子的细胞毒性与自由基的产生有关,并且无论是否存在光子活化,都可能进一步导致 DNA 损伤<sup>[60]</sup>。尽

管 UCP 在肿瘤的诊疗方面的研究很多,进展很快,但是 UCP 仍面临着许多问题。由于其激发波长约为 980 nm,而这一波长范围的光会被水吸收产生较强的热效应,从而对正常组织细胞产生伤害。因此,如何减少对机体正常组织的损伤应加大研究力度。另一方面,现阶段 UCP 尚未有相关的临床研究,若要将其应用于临床,还需对其毒性进行进一步的研究确证。目前已进入临床研究的无机纳米材料主要为金纳米粒和氧化铁纳米粒(表 1)。

### 2.1 金纳米粒

Au NP 在临床转化方面已有许多研究,一些 Au NP (例如与肿瘤坏死因子结合的 Au NP)已经完成了关键的临床试验。尽管还没有临床批准的 Au NP 产品,但多种用于不同治疗应用(从治疗实体瘤到治疗痤疮)的 Au NPs 正在临床研究中。AuroLase<sup>®</sup>(表 1)是由 Nanospectra 公司开发的一类

**Table 1** Clinical trials for inorganic nanoparticles which are currently active or approved by FDA [62]

| Name                            | Material  | Application  | ClinicalTrials.gov identifier  |
|---------------------------------|---|--|--|
| CYT-6091 (Aurimune)             | PEGylated colloidal GoldrhTNF (recombinant human tumor necrosis factor)               | Solid tumors   | NCT00356980  |
| AuroShell                       | Silica core coated with gold shell  | Ablation of prostate tissue  | NCT02680535  |
| AuroLase®                       | Silica core coated with gold shell  | Head and neck cancer; primary and/or metastatic lung tumors  | NCT00848042; NCT01679470   |
| Magnablate I                    | Iron NPs; magnetic responsive for thermoablation                                      | Prostate cancer  | NCT02033447  |
| NanoTherm (MFL AS1)             | Aminosilane-coated iron oxide NPs in magnetite form (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) | Thermal ablation; hyperthermia therapy; local ablation in glioblastoma   |  |
| Feraheme®; Rienso®; Ferumoxytol | Iron oxide nanoparticles (coated with polyglucose sorbitol carboxymethylether)        | Imaging; multiple sclerosis and demyelinating diseases; bone sarcomas and osteomyelitis; triple negative breast, non small cell lung, colorectal, pancreatic, ovarian, gastric, head and neck, lymph node, prostate, bladder, kidney, and thyroid cancers; neuroinflammation in epilepsy; type 1 diabetes progression; peripheral arterial disease; heart inflammation; myocardial infarction; carotid atherosclerosis; whole body imaging for cancer staging; kidney transplant rejection | Imaging: NCT00978562, NCT00103038, NCT01973517, NCT01336803, NCT01770353, NCT00659126, NCT02084303, NCT01895829, NCT01815333, NCT01521520, NCT02189889, NCT02141490, NCT01927887, NCT02253602, NCT00707876, NCT02319278, NCT01995799, NCT01674257, NCT01542879, NCT02359097, NCT02006108 |

涂有聚乙二醇(PEG)的二氧化硅金纳米壳,用于 NIR 触发刺的实体瘤热消融治疗。这项研究表明 AuroLase®可用于:(1)在受到 NIR 能量刺激后,在体外诱导光热细胞死亡和(2)提高实体瘤温度,从而在瘤内注射后对小鼠产生不可逆的热损伤<sup>[61]</sup>。经过这些研究,AuroLase®进入了两项单独的临床试验。据报道,第一项实验已在 2014 年 9 月(NCT00848042)完成,用于治疗难治性和/或复发性头颈癌。另一个进行中的临床试验研究 AuroLase®在治疗气道阻塞的原发性和/或转移性肺部肿瘤方面的应用。

## 2.2 磁性纳米粒

氧化铁纳米粒(IONP)被广泛地用作与磁共振成像(MRI)相结合的非侵入性诊断成像的造影剂。目前,多种 IONP 已被批准在临床上用作诊断和成像剂。尽管 IONP 在临床研究中获得了很大成功,但大多数已批准的 IONP 均已停产。当前,临床应用最多的 IONP 是 Ferumoxytol(表 1),其在美国和欧洲的商品名分别为 Feraheme®和 Rienso®。Ferumoxytol 由 AMAG Pharmaceuticals®公司研发,最初是作为 MRI 造影剂进行研究的,但其在 2009 年被 FDA 批准用于治疗慢性肾脏疾病导致的铁缺

乏症,并且在影像学 and 贫血方面都已进行了最完整的临床研究。在临床前水平上,Ferumoxytol 还具有多种其他应用,包括放射性标记 Ferumoxytol 和将其作为化疗药物载体等。与仅使用游离药物相比,Ferumoxytol 载药系统的体内治疗效果更好<sup>[62]</sup>。

## 2.3 二氧化硅纳米粒

尽管一种应用于肿瘤成像和诊断的 SNP 目前正在临床试验研究中,但由 SNP 组成的纳米药物递送系统尚未在临床转化上取得成功。SNP 面临的主要挑战之一是无法从体内清除,SNP 将在体内进行长循环。由于其通过调节物理参数合成不同的独特结构组合数量较多,因此 SNP 要特别关注的另一个挑战是确定 SNP 单一的大小、形状和孔隙率,从而为特定疾病带来最佳的治疗。

## 2.4 钙纳米材料

目前将钙纳米材料作为药物载体的临床研究尚少,但是由于钙纳米材料的高生物相容性,通常在临床上被用作骨科的治疗材料和口腔科的治疗药物,许多临床研究也将磷酸钙或碳酸钙作为钙补充剂。

### 3 结论与展望

无机纳米粒近年来在生物医学领域已成为研究热点,但其在临床转化应用方面仍存在一些问题和挑战。无机纳米粒虽然在粒径大小、合成方法、表面修饰和生物相容性等方面具有一定的优势,但是在将这些纳米递药系统应用于临床之前,对其在体内的行为、毒性、生物分布和清除方式的研究仍是一大挑战。目前已有部分无机纳米粒应用于临床,仍有大量处于临床试验阶段,但多是应用于体内成像,用作药物递送的较少。因此,将无机纳米粒作为递药系统的临床转化,是无机纳米材料开发需要重点解决的问题。

无机纳米粒组分与有机纳米粒组分相结合可能是将无机纳米材料应用于临床的有效途径,可以将无机纳米粒子纳入主要由有机材料组成的递药系统以获得增强治疗效果和诊断能力的功能。例如具有 IONP 功能化的磁响应聚合物纳米粒,可用于靶向治疗或成像的目的。因此无机纳米粒有望在成像、诊断和某些疾病的临床应用中产生巨大影响。

#### 参考文献

- [1] Bogart LK, Pourroy G, Murphy CJ, *et al.* Nanoparticles for imaging, sensing, and therapeutic intervention[J]. *ACS Nano*, 2014, **8**(4): 3107–3122.
- [2] Cho EC, Glaus C, Chen J, *et al.* Inorganic nanoparticle-based contrast agents for molecular imaging [J]. *Trends Mol Med*, 2010, **16**(12): 561–573.
- [3] Panwar N, Soehartono AM, Chan KK, *et al.* Nanocarbons for biology and medicine: sensing, imaging, and drug delivery [J]. *Chem Rev*, 2019, **119**(16): 9559–9656.
- [4] Markovic ZM, Harhaji-Trajkovic LM, Todorovic-Markovic BM, *et al.* *In vitro* comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes [J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(4): 1121–1129.
- [5] Miao W, Shim G, Lee S, *et al.* Safety and tumor tissue accumulation of pegylated graphene oxide nanosheets for co-delivery of anticancer drug and photosensitizer[J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(13): 3402–3410.
- [6] Islami M, Zarrabi A, Tada S, *et al.* Controlled quercetin release from high-capacity-loading hyperbranched polyglycerol-functionalized graphene oxide [J]. *Int J Nanomed*, 2018, **13**: 6059–6071.
- [7] Liu Z, Zhang J, Tian Y, *et al.* Targeted delivery of reduced graphene oxide nanosheets using multifunctional ultrasound nanobubbles for visualization and enhanced photothermal therapy [J]. *Int J Nanomed*, 2018, **13**: 7859–7872.
- [8] Bhatnagar I, Venkatesan J, Kiml SK. Polymer functionalized single walled carbon nanotubes mediated drug delivery of gliotoxin in cancer cells[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2014, **10**(1): 120–130.
- [9] Wu H, Shi H, Zhang H, *et al.* Prostate stem cell antigen antibody-conjugated multiwalled carbon nanotubes for targeted ultrasound imaging and drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(20): 5369–5380.
- [10] Chen D, Wang C, Jiang F, *et al.* *In vitro* and *in vivo* photothermally enhanced chemotherapy by single-walled carbon nanohorns as a drug delivery system [J]. *J Mater Chem B*, 2014, **2**(29): 4726–4732.
- [11] Yang J, Su H, Sun W, *et al.* Dual chemodrug-loaded single-walled carbon nanohorns for multimodal imaging-guided chemophotothermal therapy of tumors and lung metastases [J]. *Theranostics*, 2018, **8**(7): 1966–1984.
- [12] Chien YH, Chan KK, Anderson T, *et al.* Advanced near-infrared light-responsive nanomaterials as therapeutic platforms for cancer therapy [J]. *Adv Ther*, 2019, **2**(3): 1800090.
- [13] Wang H, Di J, Sun Y, *et al.* Biocompatible PEG-chitosan@carbon dots hybrid nanogels for two-photon fluorescence imaging, near-infrared light/pH dual-responsive drug carrier, and synergistic therapy [J]. *Adv Funct Mater*, 2015, **25**(34): 5537–5547.
- [14] Tang J, Kong B, Wu H, *et al.* Carbon nanodots featuring efficient FRET for real-time monitoring of drug delivery and two-photon imaging [J]. *Adv Mater*, 2013, **25**(45): 6569–6574.
- [15] Jung YK, Shin E, Kim BS. Cell nucleus-targeting zwitterionic carbon dots [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 18807–18807.
- [16] Tang F, Li L, Chen D. Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery [J]. *Adv Mater*, 2012, **24**(12): 1504–1534.
- [17] Mellaerts R, Mols R, Jammaer JA, *et al.* Increasing the oral bioavailability of the poorly water soluble drug itraconazole with ordered mesoporous silica [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, **69**(1): 223–230.
- [18] Slowing II, Trewyn BG, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles for intracellular delivery of membrane-impermeable proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, **129**(28): 8845–8849.
- [19] Xia T, Kovoichich M, Liang M, *et al.* Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs [J]. *ACS Nano*, 2009, **3**(10): 3273–3286.
- [20] Zhang Z, Wang L, Wang J, *et al.* Mesoporous silica-coated gold nanorods as a light-mediated multifunctional theranostic platform for cancer treatment [J]. *Adv Mater*, 2012, **24**(11): 1418–1423.
- [21] Qi C, Lin J, Fu H, *et al.* Calcium-based biomaterials for diag-

- nosis, treatment, and theranostics [J]. *Chem Soc Rev*, 2018, **47**(2): 357–403.
- [22] Li WM, Chiang CS, Huang WC, *et al.* Amifostine-conjugated pH-sensitive calcium phosphate-covered magnetic-amphiphilic gelatin nanoparticles for controlled intracellular dual drug release for dual-targeting in HER-2-overexpressing breast cancer [J]. *J Control Release*, 2015, **220**(Pt A): 107–118.
- [23] Zhang J, Sun X, Shao R, *et al.* Polycation liposomes combined with calcium phosphate nanoparticles as a non-viral carrier for siRNA delivery [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2015, **30**(Part A): 1–6.
- [24] Chen J, Sun X, Shao R, *et al.* VEGF siRNA delivered by polycation liposome-encapsulated calcium phosphate nanoparticles for tumor angiogenesis inhibition in breast cancer [J]. *Int J Nanomed*, 2017, **12**: 6075–6088.
- [25] Liu Y, Wang T, He F, *et al.* An efficient calcium phosphate nanoparticle-based nonviral vector for gene delivery [J]. *Int J Nanomed*, 2011, **6**: 721–727.
- [26] Qiu C, Wei W, Sun J, *et al.* Systemic delivery of siRNA by hyaluronan-functionalized calcium phosphate nanoparticles for tumor-targeted therapy [J]. *Nanoscale*, 2016, **8**(26): 13033–13044.
- [27] Zhao Y, Lu Y, Hu Y, *et al.* Synthesis of superparamagnetic CaCO<sub>3</sub> mesocrystals for multistage delivery in cancer therapy [J]. *Small*, 2010, **6**(21): 2436–2442.
- [28] Shafiu KA, Ismail M, Tengku Ibrahim TA, *et al.* A pH-sensitive, biobased calcium carbonate aragonite nanocrystal as a novel anticancer delivery system [J]. *Biol Med Res Int*, 2013, **2013**(3): 587451–587451.
- [29] Wu JL, He XY, Jiang PY, *et al.* Biotinylated carboxymethyl chitosan/CaCO<sub>3</sub> hybrid nanoparticles for targeted drug delivery to overcome tumor drug resistance [J]. *RSC Adv*, 2016, **6**(73): 69083–69093.
- [30] Wu J, Zhu YJ, Cao SW, *et al.* Hierarchically nanostructured mesoporous spheres of calcium silicate hydrate: surfactant-free sonochemical synthesis and drug-delivery system with ultra-high drug-loading capacity [J]. *Adv Mater*, 2010, **22**(6): 749–753.
- [31] Wu C, Chang J, Fan W. Bioactive mesoporous calcium-silicate nanoparticles with excellent mineralization ability, osteostimulation, drug-delivery and antibacterial properties for filling apex roots of teeth [J]. *J Mater Chem*, 2012, **22**(33): 16801–16809.
- [32] Yuan Z, Lu F, Peng M, *et al.* Selective colorimetric detection of hydrogen sulfide based on primary amine-active ester cross-linking of gold nanoparticles [J]. *Anal Chem*, 2015, **87**(14): 7267–7273.
- [33] Hostetler MJ, Green SJ, Stokes JJ, *et al.* Monolayers in three dimensions: synthesis and electrochemistry of  $\omega$ -functionalized alkanethiolate-stabilized gold cluster compounds [J]. *J Am Chem Soc*, 1996, **118**(17): 4212–4213.
- [34] Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology [J]. *Chem Rev*, 2004, **104**(1): 293–346.
- [35] Mieszawska AJ, Mulder WJM, Fayad ZA, *et al.* Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease [J]. *Mol Pharm*, 2013, **10**(3): 831–847.
- [36] Tomuleasa C, Soritau O, Orza A, *et al.* Gold nanoparticles conjugated with cisplatin/doxorubicin/capecitabine lower the chemoresistance of hepatocellular carcinoma-derived cancer cells [J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2012, **21**(2): 187–196.
- [37] Heo DN, Yang DH, Moon HJ, *et al.* Gold nanoparticles surface-functionalized with paclitaxel drug and biotin receptor as theranostic agents for cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(3): 856–866.
- [38] Lee SE, Sasaki DY, Perroud TD, *et al.* Biologically functional cationic phospholipid-gold nanoplasmonic carriers of RNA [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(39): 14066–14074.
- [39] Shim MS, Kim CS, Ahn YC, *et al.* Combined multimodal optical imaging and targeted gene silencing using stimuli-transforming nanotheragnostics [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(24): 8316–8324.
- [40] Gilchrist RK, Medal R, Shorey WD, *et al.* Selective inductive heating of lymph nodes [J]. *Ann Surg*, 1957, **146**(4): 596–606.
- [41] Meyers PH, Cronin F, Nice CM, *et al.* Experimental approach in the use and magnetic control of metallic iron particles in the lymphatic and vascular system of dogs as a contrast and isotopic agent [J]. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, 1963, **90**: 1068–1077.
- [42] Shah BP, Pasquale N, De G, *et al.* Core-shell nanoparticle-based peptide therapeutics and combined hyperthermia for enhanced cancer cell apoptosis [J]. *ACS Nano*, 2014, **8**(9): 9379–9387.
- [43] Chen ML, He YJ, Chen XW, *et al.* Quantum dots conjugated with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-filled carbon nanotubes for cancer-targeted imaging and magnetically guided drug delivery [J]. *Langmuir*, 2012, **28**(47): 16469–16476.
- [44] Hafeli UO. Magnetically modulated therapeutic systems [J]. *Int J Pharm*, 2004, **277**(1/2): 19–24.
- [45] Chen H, Langer R. Magnetically-responsive polymerized liposomes as potential oral delivery vehicles [J]. *Pharm Res*, 1997, **14**(4): 537–540.
- [46] Edelman ER, Langer R. Optimization of release from magnetically controlled polymeric drug release devices [J]. *Biomaterials*, 1993, **14**(8): 621–626.
- [47] Bae KH, Lee K, Kim C, *et al.* Surface functionalized hollow manganese oxide nanoparticles for cancer targeted siRNA delivery and magnetic resonance imaging [J]. *Biomaterials*, 2011,

- 32(1): 176–184.
- [48] Zheng Y, Zhang H, Hu Y, *et al.* MnO nanoparticles with potential application in magnetic resonance imaging and drug delivery for myocardial infarction [J]. *Int J nanomed*, 2018, **13**: 6177–6188.
- [49] Yang G, Xu L, Chao Y, *et al.* Hollow MnO<sub>2</sub> as a tumor-micro-environment-responsive biodegradable nano-platform for combination therapy favoring antitumor immune responses [J]. *Nat commun*, 2017, **8**(1): 902.
- [50] Wang F, Li C, Cheng J, *et al.* Recent advances on inorganic nanoparticle-based cancer therapeutic agents [J]. *Inter J Env Res Pub Heal*, 2016, **13**(12): 1182.
- [51] Zhang P, Steelant W, Kumar M, *et al.* Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, **129**(15): 4526–4527.
- [52] Zeng L, Luo L, Pan Y, *et al.* *In vivo* targeted magnetic resonance imaging and visualized photodynamic therapy in deep-tissue cancers using folic acid-functionalized superparamagnetic-upconversion nanocomposites [J]. *Nanoscale*, 2015, **7**(19): 8946–8954.
- [53] Cui S, Yin D, Chen Y, *et al.* *In vivo* targeted deep-tissue photodynamic therapy based on near-infrared light triggered upconversion nanoconstruct [J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(1): 676–688.
- [54] Wang C, Tao H, Cheng L, *et al.* Near-infrared light induced *in vivo* photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(26): 6145–6154.
- [55] Matea CT, Mocan T, Tabaran F, *et al.* Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications [J]. *Int J nanomed*, 2017, **12**: 5421–5431.
- [56] Bagalkot V, Zhang L, Levy-Nissenbaum E, *et al.* Quantum dot–aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer [J]. *Nano Lett*, 2007, **7**(10): 3065–3070.
- [57] Byrne S, Corr S, Rakovich T, *et al.* Optimisation of the synthesis and modification of CdTe quantum dots for enhanced live cell imaging [J]. *J Mater Chem*, 2006, **16**(28): 2896.
- [58] Cai X, Luo Y, Zhang W, *et al.* pH-sensitive ZnO quantum dots-doxorubicin nanoparticles for lung cancer targeted drug delivery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, **8**(34): 22442–22450.
- [59] Bwatanglang IB, Mohammad F, Yusof NA, *et al.* *In vivo* tumor targeting and anti-tumor effects of 5-fluorouracil loaded, folic acid targeted quantum dot system [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2016, **480**: 146–158.
- [60] Singh RD, Shandilya R, Bhargava A, *et al.* Quantum dot based nano-biosensors for detection of circulating cell free miRNAs in lung carcinogenesis: from biology to clinical translation [J]. *Front Genet*, 2018, **9**: 616.
- [61] Hirsch LR, Stafford RJ, Bankson JA, *et al.* Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**(23): 13549–13554.
- [62] Anselmo AC, Mitragotri S. A review of clinical translation of inorganic nanoparticles [J]. *AAPS J*, 2015, **17**(5): 1041–1054.

## 基于DNA的纳米材料在肿瘤治疗领域的研究进展

陈 焯<sup>1,2</sup>, 尹 骏<sup>1,2</sup>, 姚文兵<sup>1,2</sup>, 高向东<sup>1,2\*</sup>

(1中国药科大学江苏省生物药物成药性研究重点实验室, 南京 210009; 2中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

**摘要** 肿瘤治疗药物通常存在水溶性差、靶向性低、稳定性差、不易被肿瘤细胞摄取等不足, 开发一种理想的药物递送载体仍是肿瘤治疗领域亟待解决的重要问题。由于具有良好的序列可编程性、生物相容性和生物可降解性, 基于DNA的纳米材料已被广泛用作肿瘤治疗的药物递送载体。大量研究表明, DNA纳米材料可以有效装载肿瘤治疗药物, 实现肿瘤组织靶向递送、高效细胞摄取与刺激响应性药物释放。本文从DNA纳米技术的历史与发展入手, 例举DNA纳米材料作为药物递送载体在化疗、基因治疗、免疫治疗和光动力疗法中的应用进展, 并对其未来发展进行展望, 以期为该领域其他研究工作者提供参考。

**关键词** DNA纳米材料; 药物递送系统; 肿瘤; 进展

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0406-12

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200404

引用本文 陈焯, 尹骏, 姚文兵, 等. 基于DNA的纳米材料在肿瘤治疗领域的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 406 - 417.

Cite this article as: CHEN Ye, YIN Jun, YAO Wenbing, et al. Advances of DNA-based nanomaterials in tumor therapy [J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(4): 406 - 417.

## Advances of DNA-based nanomaterials in tumor therapy

CHEN Ye<sup>1,2</sup>, YIN Jun<sup>1,2</sup>, YAO Wenbing<sup>1,2</sup>, GAO Xiangdong<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Jiangsu Key Laboratory of Druggability of Biopharmaceuticals, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;<sup>2</sup>School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Antitumor drugs usually have deficiencies such as poor water solubility, low targeting, poor stability, and difficulty in being taken up by tumor cells. The development of an ideal drug delivery vehicle is still an urgent problem to be solved in the field of cancer therapy. Due to their excellent sequence programmability, biocompatibility and biodegradability, DNA-based nanomaterials have been widely used as drug delivery vehicles for cancer treatment. Numerous studies have shown that DNA nanomaterials can effectively load cancer therapeutic agents, and achieve tumor targeted delivery, efficient cellular internalization as well as stimuli-responsive drug release. Starting from the history and development of DNA nanotechnology, this review illustrates the application progress of DNA nanomaterial as drug delivery vehicle in chemotherapy, gene therapy, immunotherapy and photodynamic therapy, and the future development is prospected so as to provide some reference for other researchers in this field.

**Key words** DNA nanomaterials; drug delivery system; tumor; advances

This study was supported by the Innovation Team of the "Double-First Class" Disciplines (No. CPU2018GF08)

目前, 肿瘤导致的死亡在发达国家中占比21%, 在发展中国家占比9.5%, 且呈逐年上升趋势, 肿瘤已成为全球第二大死因<sup>[1]</sup>。化疗是最成熟

的肿瘤治疗方法之一, 但一般的化疗药物缺乏肿瘤靶向能力, 通常会引起强烈的不良反应。同时, 基因治疗、免疫治疗与光动力疗法(photodynamic

收稿日期 2020-04-23 \*通信作者 Tel: 025-83271543 E-mail: xdgao@cpu.edu.cn

基金项目 “双一流”学科创新团队资助项目(No. CPU2018GF08)

therapy, PDT)作为新兴的肿瘤治疗手段正处于快速发展阶段。基因治疗通常涉及到反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)、小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 和微小 RNA (microRNA, miRNA)<sup>[2-4]</sup>,可用于治疗肿瘤、神经退行性疾病和血友病等一系列疾病。在免疫治疗中,含有非甲基化 CpG 序列的寡核苷酸(CpG ODN)是一类具有免疫调节作用的 DNA 序列,可以作为外源性抗原刺激机体免疫系统,通过产生抑制肿瘤细胞增殖的细胞因子对肿瘤进行治疗<sup>[5]</sup>。但 siRNA 等基因治疗药物与 CpG ODN 等免疫治疗药物均存在不易被细胞摄取、血清稳定性差等问题,导致疾病的治疗无法取得理想的效果<sup>[6-7]</sup>。PDT 包含光敏剂、光照与氧三要素,可有效治疗肿瘤、心血管疾病、皮肤病与眼科疾病<sup>[8]</sup>。但典型的光敏剂具有较强的疏水性,在水溶液中易聚集,严重影响治疗效果。因此,开发理想的药物递送载体,保护药物免受酶类降解并实现高效靶向递送具有至关重要的作用。

理想的药物载体需具备以下特性:(1)在血清等生理环境中保持稳定,并保护所载药物免于降解;(2)可以通过共价连接、非共价连接等方式装载一种或多种药物;(3)可以靶向递送至肿瘤组织并被肿瘤细胞成功摄取;(4)可以响应近红外光等外部刺激、肿瘤微环境与溶酶体内较低的 pH、细胞质高浓度谷胱甘肽等内部条件特异性释放药物;(5)具有良好的生物相容性,可以在完成药物递送后被降解与清除。

DNA 纳米材料作为近年来新兴的药物递送载体,具有良好的序列可编程性、生物相容性与生物可降解性,在肿瘤治疗领域具有光明的前景。DNA 纳米材料能够有效装载多种药物,在某些功能元件的帮助下实现肿瘤部位靶向递送,提高细胞摄取效率并实现刺激响应性药物释放,在提高药物抗肿瘤活性的同时降低对正常组织器官的损伤。

本文从 DNA 纳米技术的历史与发展入手,例举 DNA 纳米材料作为药物递送载体在化疗、基因治疗、免疫治疗和光动力学中的应用进展,并对其未来发展进行展望,以期涉及多学科研究领域的 DNA 纳米材料蓬勃发展,并最终使更多患者受益。

## 1 DNA 纳米技术

DNA 作为遗传信息的载体,在调节生物体的生物学功能中发挥至关重要的作用。在发现 DNA 双螺旋结构近 30 年后,1982 年,Seeman<sup>[9]</sup>提出 DNA 可以基于 Watson-Crick 碱基配对原则构建精确有序的多功能纳米结构,为 DNA 纳米技术领域的发展奠定了基础。通过合理的设计,DNA 分子能够自组装成各种尺寸与形状的 2D 或 3D 纳米结构。随着纳米技术的飞速发展,DNA 已被广泛应用于纳米材料领域,并在近几十年引起了人们的广泛关注。

### 1.1 DNA Tile 自组装

纳米结构的制造方法包括自上而下和自下而上两种。自下而上的制备方法通常是将小的、简单的成分结合在一起以形成大而复杂的结构,这种方法制备的结构具有良好的可预测性。在过去的 30 年里,自下而上制备 DNA 纳米结构的方法快速发展,其中 DNA Tile 自组装是最先发展起来的一种策略,成为 DNA 纳米技术领域中不可或缺的一部分。Tile 自组装制备的 DNA 结构由一组短的、人工合成的单链 DNA 组装而成,这些 DNA 链经过合理的设计可在指定部位相互杂交(图 1-A),组装成 DX (double crossover) tiles、TX (triple crossover) tiles、点星图样等结构,随后进一步相互结合,组装成大型复杂纳米结构<sup>[10]</sup>。

### 1.2 滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)

RCA 是新近发展起来的一种扩增 DNA 的方法,可以在等温条件下以单链环状 DNA 为模板,在 Phi29 DNA 聚合酶的催化下连续延伸互补的单链 DNA(图 1-B),产物较长且具有重复序列<sup>[11]</sup>。

RCA 已被用于开发各种类型的 DNA 纳米结构。Y 型 DNA 作为一种简单的 DNA 纳米结构,是树枝状 DNA 结构与 DNA 水凝胶的组成部分。Hong 等<sup>[12]</sup>报道了一种利用 RCA 技术高效生产 Y 形 DNA 的方法。将一条能够自组装为包含 3 个发卡环结构的 Y 形 DNA 作为模板,通过 Phi29 DNA 聚合酶扩增与核酸内切酶的位点特异性切割,获得大量 DNA 片段,经退火自组装为 Y 形 DNA 纳米结构。类似地,Yata 等<sup>[13]</sup>使用 RCA 高效扩增多末端 DNA 纳米结构,经限制性内切酶切割与 DNA 自组装过程可最终获得 DNA 水凝胶。因此,RCA 技术

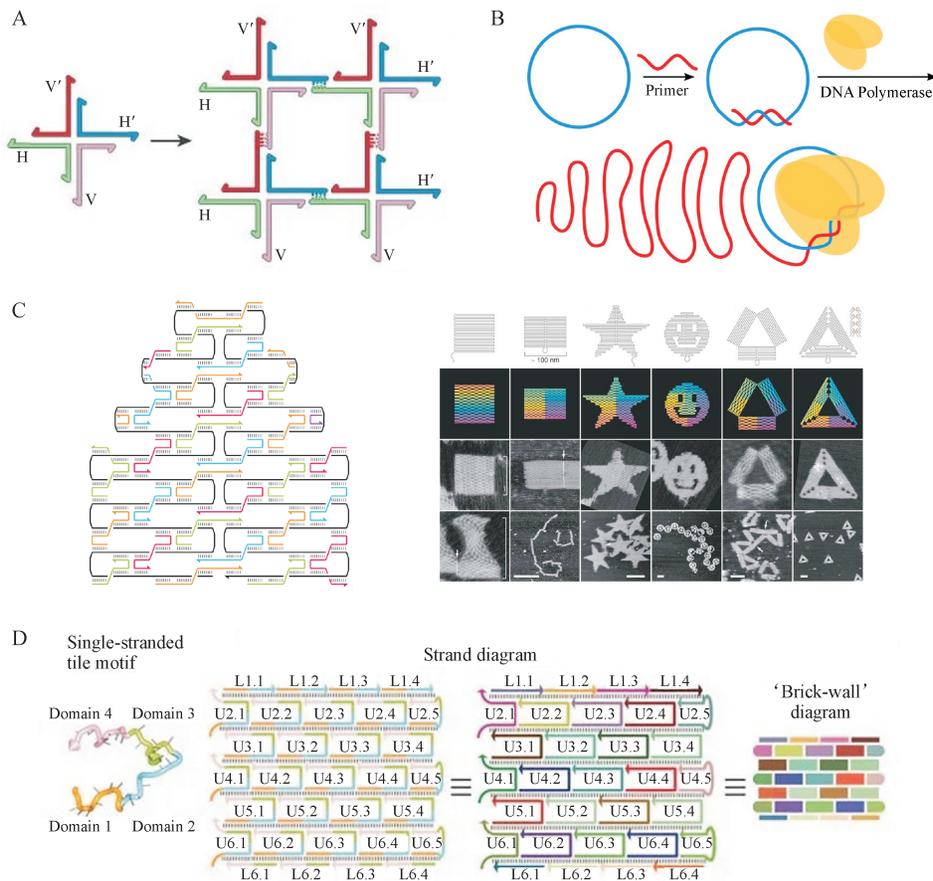
可以成为一种低成本高产量制备DNA纳米结构的新方法。

### 1.3 DNA折纸术(DNA origami)

2006年, Rothemund<sup>[14]</sup>开发了一种称为“DNA折纸术”的独特方法,可以使长的脚手架链在数百条短订书钉链的帮助下折叠成预先设计的形状(图1-C)。这些订书钉链经过合理设计,可以与脚手架链在特定区域互补,从而指导自组装过程。由于DNA脚手架链较长,通过DNA折纸术制备的纳米结构直径通常可达几十或数百纳米。该方法是DNA纳米技术的里程碑之一,人们可以凭借丰富的想象力使用DNA折纸术制备高度组织化的复杂2D或3D结构。虽然其功能强大,但是由于每种设计都需要合成数百条不同的DNA链,导致实验的复杂性与成本明显升高,限制了大规模生产应用。

### 1.4 单链DNA Tile (single-stranded tile, SST) 自组装

SST自组装是DNA纳米技术中另一个重要的设计策略<sup>[15]</sup>。与乐高积木类似,SST自组装采用一系列短的DNA单链,每条单链都包含4个短结合域,这些结合域仅能够与相邻tile的特定序列通过碱基互补配对彼此连接,从而通过在tile/tile界面处形成DNA双链进行自组装(图1-D)。利用SST自组装技术可以生产具有不同图案和形状的2D或3D DNA结构。与DNA折纸术相比,SST自组装所采用的DNA链较短,不涉及长的脚手架链,因此不存在所制备结构的尺寸被脚手架链长度所限的问题。虽然其大小设计更为灵活,但随着所需结构的尺寸增加,成本仍将逐步提高,且序列设计与优化的复杂性也将逐步增加。



**Figure 1** Introduction of DNA nanotechnology

A: Self-assembly of four-armed junctions<sup>[16]</sup>; B: Schematic illustration of the principles of RCA<sup>[11]</sup>; C: Schematic illustration of the principles and applications of DNA origami<sup>[14]</sup>; D: Schematic illustration of the principles of SST<sup>[15]</sup>

与常规的单链或双链 DNA 相比,自组装 DNA 纳米结构在生理环境中更稳定,可抵抗一定程度的降解作用。目前,基于 DNA 的纳米材料呈现出多种新颖的生物学功能,包括药物递送、生物成像、生物传感以及诊断学应用<sup>[17-20]</sup>。

## 2 基于 DNA 纳米技术的药物递送载体在肿瘤治疗领域的应用

DNA 纳米技术的新兴应用之一是肿瘤纳米医学,通过利用纳米颗粒的独特特性递送并增强肿瘤治疗药物的抗肿瘤功效。

### 2.1 化学治疗

化学治疗是目前临床上应用最广泛的肿瘤治疗方法之一。然而,化疗药物较差的水溶性与全身非特异性分布影响了药物到达肿瘤组织的效率,并且可能会引起严重的不良反应,例如骨髓抑制、胃肠道不适、脱发和器官损伤,降低病人的生存质量并可能导致化疗失败。为了克服这些缺点,DNA 纳米材料被开发用于抗肿瘤化疗药物的递送,以提高化疗的安全性及有效性。

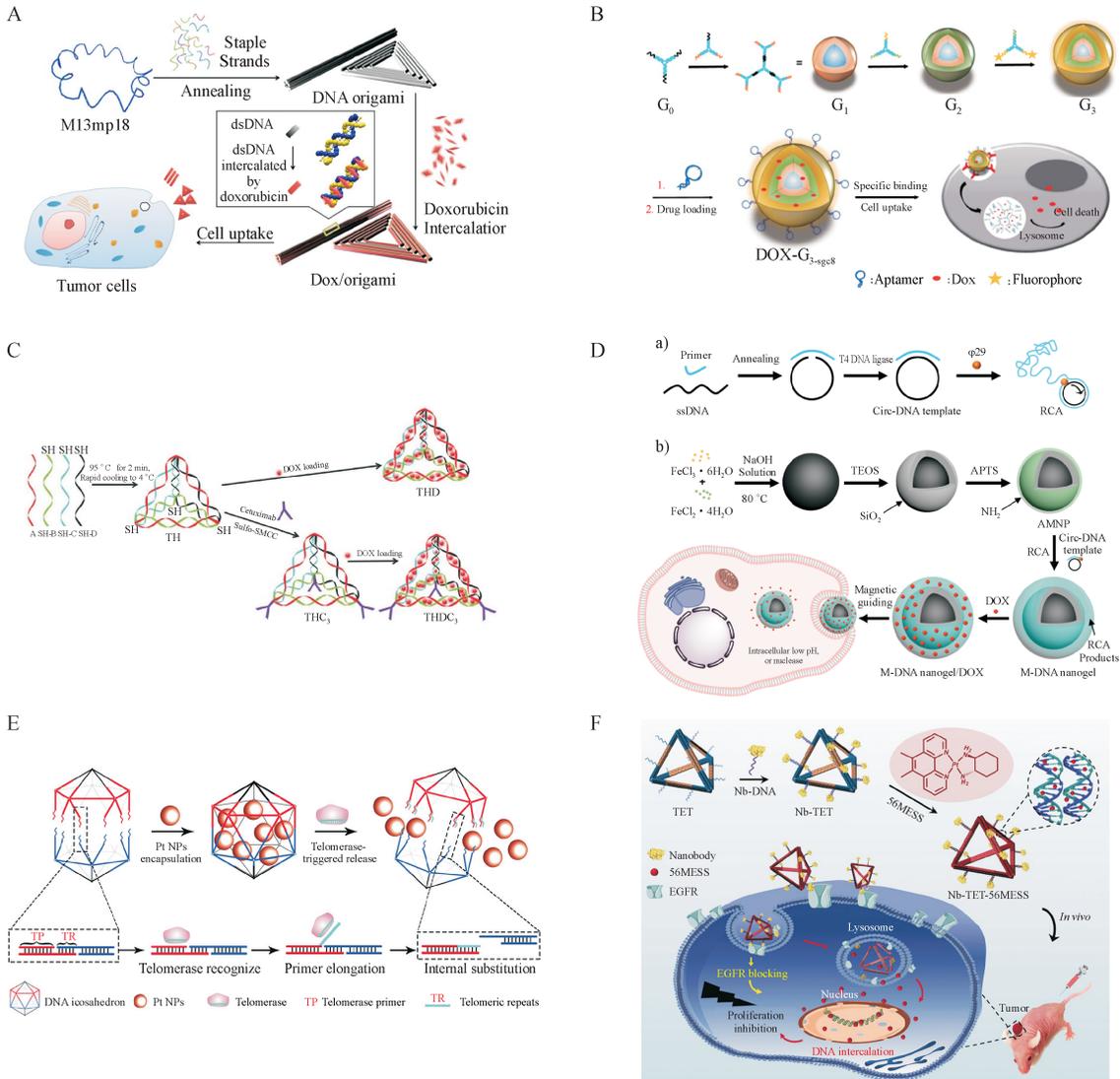
阿霉素(doxorubicin, DOX)是一种广谱抗肿瘤药物,可通过抑制 DNA 合成治疗包括实体瘤和血液瘤在内的多种肿瘤。由于其可插入 DNA 双链鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)碱基对中,研究人员采用 DNA 纳米技术制备多种形状的载体用于 DOX 的高效递送,包括 DNA 四面体<sup>[21]</sup>、树枝状 DNA 大分子<sup>[22]</sup>、基于 DNA 折纸术的纳米结构<sup>[23-24]</sup>、基于 RCA 的纳米结构<sup>[25]</sup>等。Liu 等<sup>[24, 26]</sup>基于 DNA 折纸术开发了一系列纳米载体用于药物递送,例如使用管状与三角形 DNA 纳米结构递送 DOX<sup>[27]</sup>(图 2-A)。与非结构化的 DNA 双链相比,基于 DNA 折纸术的纳米结构的 DOX 载量可提高一倍。与正方形和管状结构相比,三角形 DNA 纳米结构由于合理的几何形状与尺寸(每侧约 120 nm)表现出最佳的肿瘤被动靶向作用。基于 DNA 折纸术的 DOX 递送系统在体内表现出良好的抗肿瘤活性,且未引起明显的毒副作用。该研究证明了 DNA 折纸纳米结构作为创新平台在体内安全、高效递送化疗药物的潜力<sup>[28]</sup>。Zhang 等<sup>[29]</sup>将靶向药物递送与荧光成像相集成(图 2-B),制备的树枝状 DNA 纳米结构具有灵活的模块化设计、出色的生物稳定性和生物相容性、高载药量以及良好的细胞摄取效率。树枝

状 DNA 分子是由 Y 形 DNA 单体通过逐层自组装构建而成,经 sgc8 适配体修饰的树枝状 DNA 大分子可以选择性识别 PTK7(一种细胞膜蛋白),随后被递送至 PTK7 过表达的细胞系中,G-C 碱基对中装载的 DOX 可响应溶酶体内酸性环境迅速释放。通过与支链 DNA 单体连接可将荧光基团引入树枝状 DNA 大分子,有利于多功能生物学应用。Setyawati 等<sup>[21]</sup>使用 DNA 四面体共递送 DOX 与西妥昔单抗(图 2-C),用于乳腺癌的靶向治疗。西妥昔单抗可特异性识别乳腺癌细胞表面的表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)。四面体的顶点被用于连接西妥昔单抗,以尽可能在空间上均匀隔开西妥昔单抗,从而增加其与肿瘤细胞表面 EGFR 结合的机会。每个四面体可连接 1~3 个西妥昔单抗,连接的单抗数越多,细胞摄取效率越高,抗肿瘤活性越强。Yao 等<sup>[30]</sup>开发了一种新颖的磁性 DNA 纳米凝胶用于 DOX 的靶向递送和可控释放(图 2-D)。该纳米凝胶以磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米颗粒为核心,以 RCA 产生的交联单链 DNA 为外壳,具有合适的粒径和良好的生物相容性。在外部磁场的帮助下,该纳米凝胶可靶向肿瘤细胞,并被肿瘤细胞有效摄取,通过响应多种刺激(包括温度、pH 和核酸酶)精确释放 DOX。该系统实现了远程磁铁控制的药物递送和刺激触发的药物释放,获得了较好的治疗效果且未引起明显的不良反应,为精密医学的发展提供了新策略。

顺铂及基于铂的药物已是临床上治疗各种肿瘤的一线化疗药物。铂类药物的抗肿瘤活性主要来自与 DNA 碱基对的共价和非共价(例如嵌入)相互作用。化疗期间,患者通常需承受严重的不良反应,包括药物引起的肾毒性、耳毒性和神经毒性。铂类药物的靶向递送将改善治疗效果并降低药物毒性。Ma 等<sup>[31]</sup>设计了端粒酶响应性 DNA 二十面体(图 2-E),可实现肿瘤靶向递送与药物精确释放,用于顺铂耐药肿瘤的治疗。该 DNA 二十面体由两个金字塔形 DNA 纳米笼构建而成,通过端粒酶引物和端粒重复序列连接,铂纳米药物被封装于二十面体中。该系统可响应肿瘤细胞内的端粒酶精确释放笼中铂纳米药物,从而增强对顺铂耐药肿瘤的治疗效果,并减少对正常组织的毒性。Wu 等<sup>[32]</sup>将铂类药物 56MESS 嵌入 DNA 四面体双链,并将抗 EGFR 的纳米抗体与 DNA 四面体偶联,

实现肿瘤的多药联合治疗(图2-F)。该纳米结构可阻断EGFR高表达细胞中EGFR相关信号转导,表现出显著的抗肿瘤活性,且未引起明显的不良

反应。该多功能药物递送系统为肿瘤靶向性化疗开辟了新途径,为蛋白质等其他功能组件的联合递送提供了指导。



**Figure 2** Application of DNA nanostructure in tumor chemotherapy

A: DNA triangle and tube origami structures for DOX delivery<sup>[27]</sup>; B: Aptamer-based dendritic DNA nanostructure with the capability of cancer cell recognition, imaging and DOX delivery<sup>[29]</sup>; C: DNA tetrahedron for DOX and cetuximab co-delivery<sup>[21]</sup>; D: Magnetic DNA nanogels for targeting DOX delivery under external magnetic field and multistimuli triggered DOX release<sup>[30]</sup>; E: Illustration of platinum nanoparticles encapsulation and telomerase-triggered release from the DNA icosahedra<sup>[31]</sup>; F: Schematic illustration of a nanobody-conjugated DNA tetrahedron for targeted platinum drug delivery<sup>[32]</sup>

## 2.2 基因治疗

随着基因编辑、基因沉默等基因操作技术的不断发展,人们可以位点特异性地上调或下调目标基因的表达以治疗各种疾病。近年来,基因治疗在肿瘤治疗领域引起人们的广泛关注。一系列肿瘤相关基因,例如Ras、Myc和polo样激酶1(polo-

like kinase 1, PLK1)等已被验证并用于临床试验<sup>[33]</sup>。下调这些肿瘤相关基因是一种有前景的肿瘤治疗策略。然而,基因治疗药物不易被细胞摄取,且在体内循环过程中较不稳定。因此,基因治疗的成功很大程度上取决于基因递送载体的安全性与有效性。基因治疗载体主要包括两类:病毒

载体与非病毒载体。考虑到可能的插入诱变和免疫原性,病毒载体的使用受到限制<sup>[34]</sup>。因此,目前基因治疗的一大挑战是设计一种非病毒载体,实现基因的安全高效递送。由于 DNA 纳米结构具有负载能力强、生物相容性高等优点,研究者们将 DNA 纳米结构作为非病毒载体候选物,期望实现有效的靶向基因治疗。

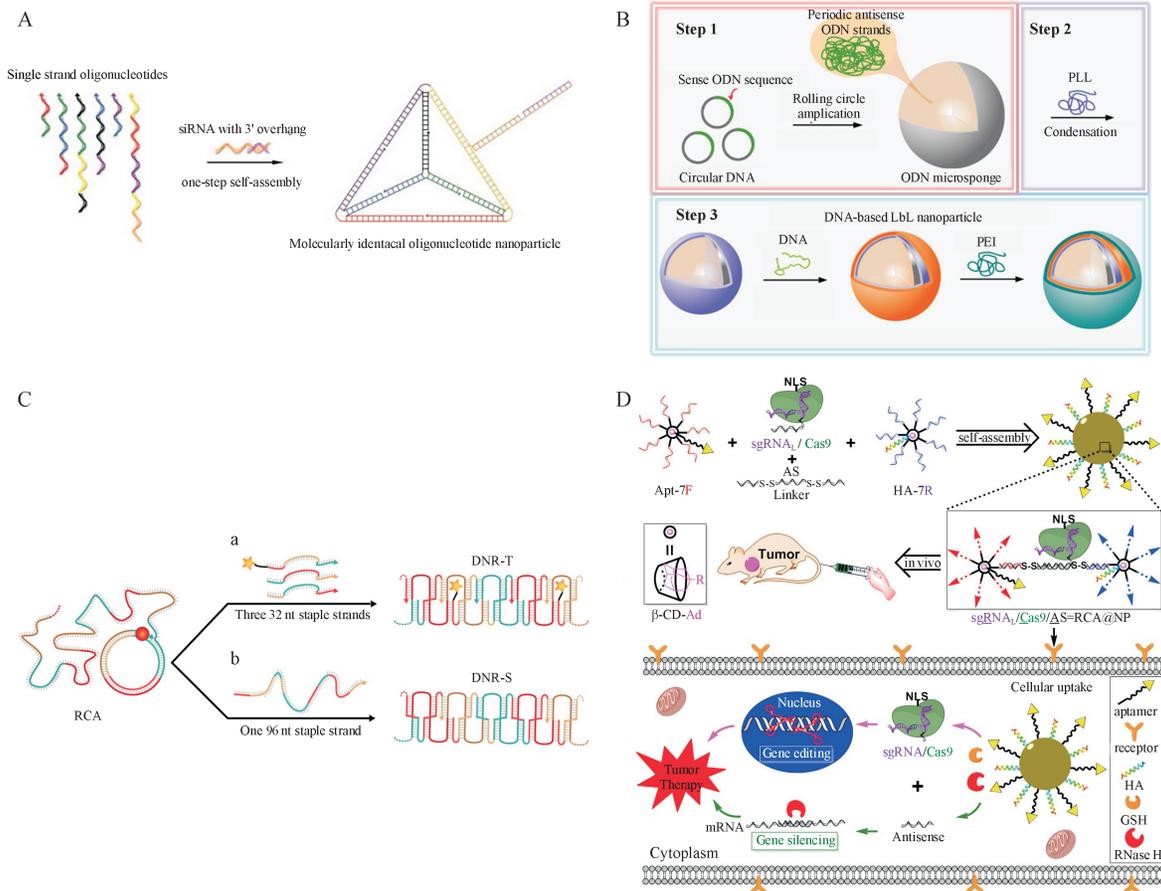
Lee 等<sup>[35]</sup>制备了用于 siRNA 装载与靶向递送的 DNA 四面体(图 3-A)。6 条 DNA 链自组装成四面体框架,带有悬臂的 siRNA 通过碱基互补配对与四面体连接。该纳米粒的流体动力学尺寸约为 28.6 nm,有利于细胞摄取。经叶酸修饰后, DNA 四面体具有显著的肿瘤靶向能力。体内分布检测发现,该 DNA 四面体主要集中在肿瘤与肾脏,在心、肝、脾、肺中积累较少。对裸鼠给药后,在肿瘤部位可观察到 siRNA 的基因沉默效应。该纳米粒未引起明显的免疫反应,且血液循环半衰期显著长于单独的 siRNA。在各种功能元件的帮助下, DNA 四面体有望成为通用 siRNA 递送平台。Roh 等<sup>[36]</sup>介绍了一种通过 RCA 自组装的海绵样 DNA 微球用于 ASO 递送(图 3-B)。该 DNA 微球由长单链 DNA 构成,包含由 RCA 产生的大量重复 ASO 序列。使用阳离子聚合物包裹后,微球尺寸从约 1.8  $\mu\text{m}$  缩小至约 212 nm。该微球的尺寸有利于细胞摄取,并能够避免肾脏的清除作用。与传统的基于脂质的转染策略(例如 lipofectamine)相比,该微球能够更显著地抑制靶基因表达,且毒性极低。Chen 等<sup>[37]</sup>结合 RCA 与 DNA 折纸术设计了 DNA 纳米带(图 3-C),用于细胞内基因沉默。与传统 DNA 折纸术动辄需要数百条订书钉链不同,结合了 RCA 的 DNA 纳米带仅需少量订书钉链,大大降低了生产成本,从而有可能消除 DNA 纳米结构实际应用中受成本限制引起的障碍。由于独特的形状与结构刚性, DNA 纳米带能够被细胞有效摄取并发生内体逃逸,实现高效 siRNA 递送。该研究为基于 DNA 纳米技术的 siRNA 递送系统提供了巧妙的设计思路,并有望成为递送其他药物的候选载体。Liu 等<sup>[33]</sup>构建了基于分支 DNA 的纳米平台,用于基因编辑与基因沉默工具的共递送(图 3-D)。基因编辑工具 sgRNA/Cas9 可作用于细胞核中的 DNA,基因沉默工具 antisense 可作用于细胞质中的 mRNA。分支 DNA 结构通过自组装有效装载

sgRNA/Cas9/antisense 复合物,实现对肿瘤相关基因 PLK1 的编辑与沉默。该结构引入了用于靶向递送的适配体与用于内体逃逸的流感血凝素肽,且可响应谷胱甘肽(glutathione, GSH)和 RNase H 有效释放药物,表现出良好的肿瘤治疗效果,且未引起明显的不良反应。这种具有生物相容性的多功能 DNA 纳米载体为基因治疗的发展提供了新策略。

### 2.3 免疫治疗

在过去的几十年中,作为一种相对新颖的肿瘤治疗方法,免疫治疗取得了令人鼓舞的突破。该疗法通过调节免疫系统治疗肿瘤,具有不良作用低、特异性高等特点。CpG 在微生物基因组中极为常见,但在脊椎动物基因组中较少见。含有 CpG 基序的细菌 DNA 和人工合成的寡核苷酸被哺乳动物先天免疫系统识别为危险信号,并可能引发强烈的免疫反应<sup>[38]</sup>。CpG ODN 可以通过与 Toll 样受体 9(toll-like receptor 9, TLR9)相互作用刺激树突状细胞、B 细胞和巨噬细胞产生肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 、白介素(interleukin, IL)-6 等促炎细胞因子,激活哺乳动物先天免疫系统,增强抗肿瘤活性。因此, CpG ODN 作为一种安全有效的疫苗佐剂,在肿瘤免疫治疗的基础研究和临床试验中被广泛使用。然而, CpG ODN 进胞效率低,且易被核酸酶降解,稳定性较差<sup>[7]</sup>。为了解决这些问题,研究人员开发出各种方法,包括对 CpG 核苷酸主链进行硫代磷酸修饰,以增强 CpG 抵抗核酸酶降解的稳定性,然而却发现巯基修饰可能引起免疫反应减弱、淋巴滤泡受损等不良反应<sup>[38]</sup>。

近年来,人们已经探索利用 DNA 纳米结构作为 CpG 递送载体。由于它们固有的相容性,富含 CpG 的序列可以轻松整合至 DNA 纳米结构中,以增强其稳定性和靶向性。Rattanakit 等<sup>[39]</sup>通过逐层连接含有 CpG 序列的 Y 形分支 DNA 单体制备树枝状 DNA 纳米结构,用于 CpG 的高效递送(图 4-A)。树枝状 DNA 纳米结构诱导 RAW264.7 巨噬细胞产生 TNF- $\alpha$  的量比 Y 形分支 DNA 单体高约 50 倍,产生 IL-6 的量比 Y 形分支 DNA 单体高约 5 倍。研究人员推断,分支纳米结构能够保护 CpG ODN 减少降解,并增加其被 TLR 识别的机会,从而诱导更强烈的免疫反应。该设计为 CpG ODN 的安全有



**Figure 3** Application of DNA nanostructure in cancer gene therapy

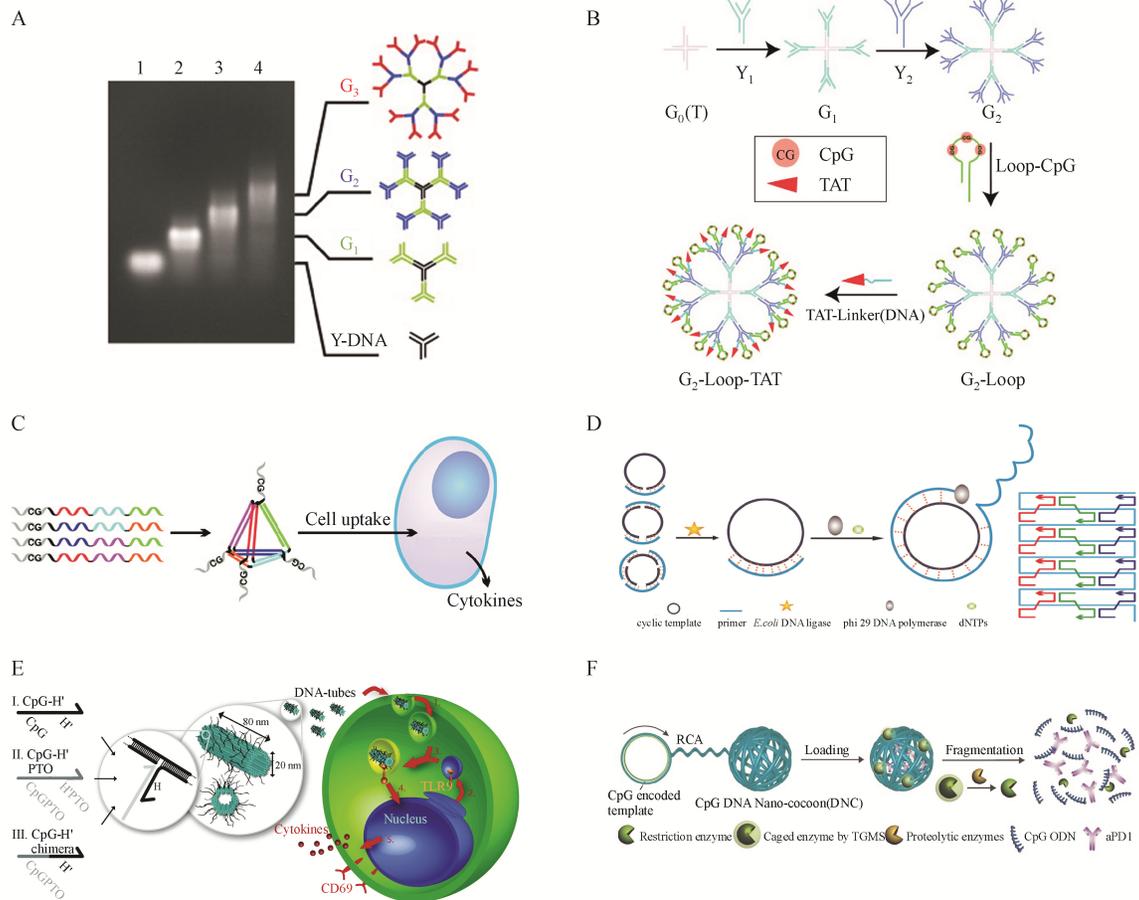
A: DNA tetrahedron nanoparticles for siRNA loading and targeted delivery<sup>[35]</sup>; B: DNA microsponge particles for efficient ASOs delivery<sup>[36]</sup>; C: DNA nanoribbons synthesized by a modified DNA origami method and RCA as an efficient siRNA delivery vehicle<sup>[37]</sup>; D: A branched DNA-based nanoplat-form for codelivery of gene editing and gene silencing components for synergistic tumor therapy<sup>[33]</sup>

效递送开辟了新途径。Qu等<sup>[40]</sup>同样开发了一种树枝状DNA大分子,可有效递送CpG ODN并增强细胞因子的产生(图4-B)。将含有CpG序列的发夹环状DNA加至X形与Y形分支DNA形成的框架中,可提高其对核酸内切酶的抵抗能力。在树枝状大分子的最外层进一步修饰穿膜肽TAT可增加细胞对CpG的摄取。与单纯的CpG或树枝状DNA结构相比,该独特的CpG递送系统能够引起更强的免疫反应,且无显著的细胞毒性,进一步证明了树枝状DNA大分子作为CpG递送载体的安全性与有效性。Li等<sup>[41]</sup>将CpG ODN装载于DNA四面体顶点处(图4-C),DNA四面体具有一定的核酸酶抵抗能力,在胎牛血清和细胞中可完整保持数小时。装载于DNA四面体的CpG ODN可被RAW264.7细胞有效摄取而无需转染试剂的帮助,随后诱导

大量促炎细胞因子的分泌,效果显著优于单独的CpG ODN。随着DNA四面体上装载的CpG ODN数量的增加,产生的细胞因子的量也随之增加,从而增强了免疫刺激效果。Ouyang等<sup>[42]</sup>还合成了基于RCA的DNA纳米带以高效递送CpG序列(图4-D)。理论上,该DNA纳米带的每个周期单元可偶联一个CpG序列。研究表明,DNA纳米带的长度和浓度与TNF- $\alpha$ 的产量高度相关。对于10 nmol/L浓度下长度约为1  $\mu\text{m}$ 的DNA纳米带,所含CpG足以刺激约5 100 pg/mL TNF- $\alpha$ 的产生,免疫刺激效果显著。Schuller等<sup>[43]</sup>基于DNA折纸术设计了纳米管,并将CpG ODN锚定在中空DNA纳米管表面(图4-E)。DNA纳米管骨架的稳定性与致密性使其能够抵抗血清中核酸酶的降解,并有效递送大量CpG ODN。通过监测细胞因子的产生和免疫细

胞的活化,研究人员发现这种新型DNA材料比等量的裸CpG ODN具有更显著的免疫刺激效果,且无明显毒性。Wang等<sup>[44]</sup>开发了一种创新型DNA纳米载体,可响应炎症条件控制释放负载的抗程序性死亡受体1(programmed cell death protein 1, PD-1)抗体和CpG ODN,用于术后抗肿瘤免疫治疗(图4-F)。该载体以RCA技术产生的长单链DNA为基础,引入CpG序列与限制性内切酶*Hha* I切割位点,在此基础上装载抗PD-1抗体以及被三聚甘油单硬脂酸酯包被的限制性内切酶*Hha* I。手术后伤口部位高表达的酯酶和基质金属蛋白酶能够

裂解三聚甘油单硬脂酸酯,释放包被的*Hha* I,该酶可消化载体,产生多个CpG片段,并随之释放抗PD-1抗体。PD-1是活化的T细胞表达的关键免疫检查点受体,可介导免疫抑制。PD-1及其配体1和2(PD-L1/2)之间的相互作用是肿瘤抑制免疫反应的关键途径。因此,通过抗PD-1抗体破坏PD-1和PD-L1之间的相互作用可增强针对癌细胞的免疫应答。这种双重免疫疗法能够引起比单一的游离CpG ODN或抗PD-1抗体更强的免疫反应,在小鼠体内表现出显著的肿瘤抑制效果。该设计为肿瘤治疗中药物的局部响应性释放提供了新策略。



**Figure 4** Application of DNA nanostructure in cancer immunotherapy

A: Dendrimer-like DNA containing CpG sequence for enhanced immunostimulatory activity<sup>[39]</sup>; B: DNA dendrimeric nanoparticles for efficient CpG ODNs delivery<sup>[40]</sup>; C: The assembly of CpG-bearing DNA tetrahedron and its immunostimulatory effect<sup>[41]</sup>; D: Preparation of long, single-stranded scaffold DNA by RCA and schematic illustration of the folding pathway of the single-stranded RCA product to form DNA nanoribbon<sup>[42]</sup>; E: Hollow DNA origami tubes for CpG ODNs delivery<sup>[43]</sup>; F: DNA nanococoon based on RCA for CpG ODNs and anti-PD-1 antibody co-delivery<sup>[44]</sup>

## 2.4 PDT

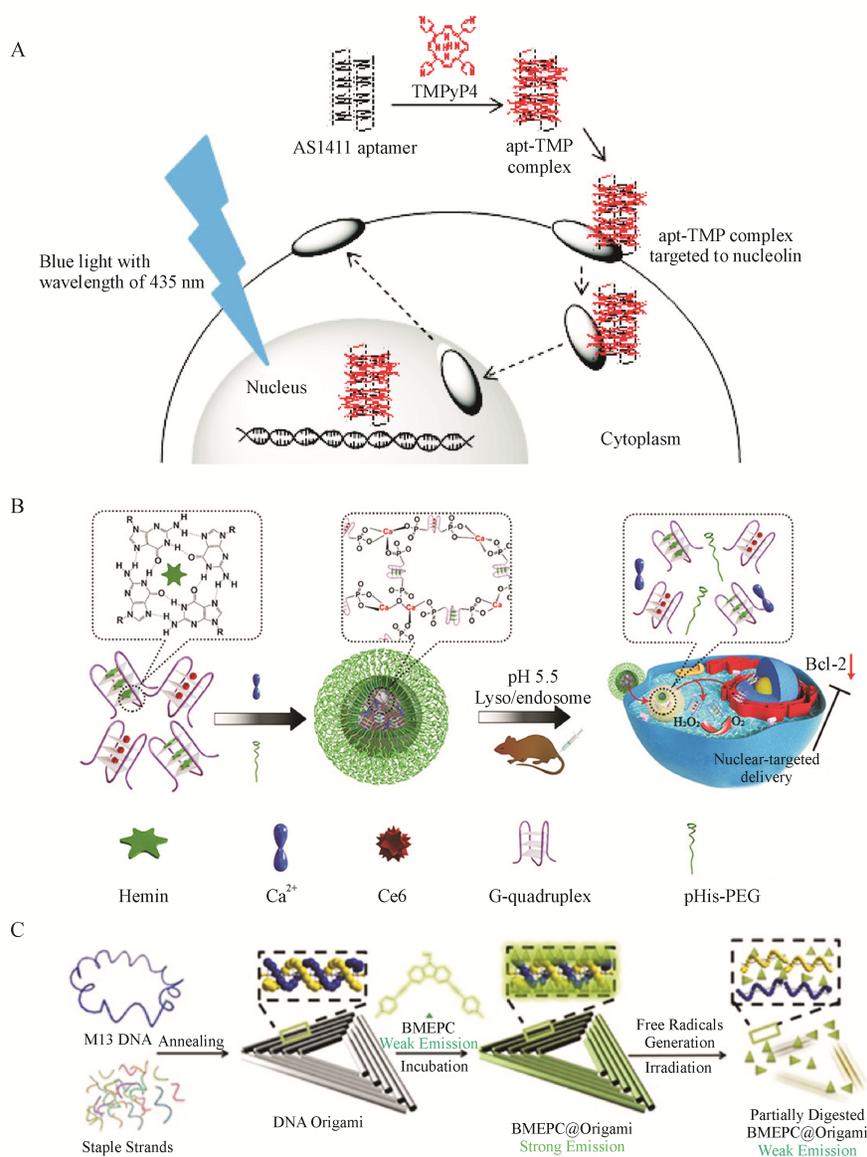
PDT是一种利用光敏剂与光照治疗肿瘤的新技术。经特定波长光照后,光敏剂可将能量传递

给周围的氧,从而生成活性氧(reactive oxygen species, ROS)。ROS可以氧化脂质、氨基酸和蛋白质,对细胞膜和重要的细胞器造成不可逆转的损伤,

通过凋亡、坏死或自噬诱导细胞死亡<sup>[45]</sup>。PDT已被证实是临床上治疗肿瘤的最有前景的无创性方法之一,具有不良反应小、适用性广、无耐药风险等优点<sup>[46]</sup>。典型的光敏剂如卟啉衍生物、咪唑衍生物等具有较强的疏水性,在水溶液中易聚集,从而影响治疗效果<sup>[45, 47]</sup>。为此,研究者们开发了多种DNA纳米结构用于光敏剂的高效递送。

G-四链体由于能够携带卟啉衍生物TMPyP4等光敏剂而成为最具吸引力的DNA纳米载体之一。Shieh等<sup>[48]</sup>使用富含鸟嘌呤的由26个核苷酸组成的适配体AS1411作为药物载体递送TMPyP4

(图5-A)。AS1411能够形成二聚体G-四链体结构,具有主动靶向肿瘤组织的能力。实验结果显示,AS1411-TMPyP4复合物表现出良好的肿瘤靶向性,肿瘤细胞内TMPyP4积累量显著高于正常细胞。Yang等<sup>[49]</sup>同样基于AS1411构建多功能纳米递送系统(图5-B)。由于AS1411能够与细胞核中的核仁素特异性结合,该递送系统可将光敏剂直接递送至细胞核,以更有效地破坏肿瘤细胞DNA。同时,该递送系统还能够下调Bcl-2表达量,并触发内源性过氧化氢的分解以改善肿瘤缺氧状态,克服缺氧诱导的PDT耐受。多重机制导致该纳米



**Figure 5** Application of DNA nanostructure in PDT

A: A G-quadruplex forming AS1411 aptamer for TMPyP4 delivery<sup>[48]</sup>; B: Nanoscale coordination polymers based on the AS1411 aptamer for enhanced PDT<sup>[49]</sup>; C: Triangular-shaped DNA origami for BMEPC delivery<sup>[45]</sup>

复合物能够在低剂量下实现高效协同抗肿瘤作用。对荷瘤小鼠给药后发现,该载药系统表现出出色的肿瘤靶向性与光触发的肿瘤抑制效果。Zhuang 等<sup>[45]</sup>基于 DNA 折纸术制备三角形 DNA 纳米结构,用于肿瘤细胞内低分子量唑啉衍生物 BMEPC 的递送(图 5-C)。载体 DNA 紧密的结构为 BMEPC 提供了大量致密的插入位点。与载体结合后,BMEPC 的水溶性、光动力效率与细胞内的光漂白现象得到显著改善。装载 BMEPC 的三角形 DNA 纳米结构可被人乳腺癌细胞 MCF-7 成功摄取,进入细胞后,该复合物可以同时发挥成像剂与光敏剂的作用,光照产生的 ROS 最终将导致细胞死亡。该系统为细胞内成像与光动力疗法提供了新思路。

### 3 展 望

药物递送是 DNA 纳米技术的重要应用,与其他递送系统(如脂质体或聚合物)相比,DNA 纳米载体具有可预先设计的尺寸与形状、可编程的纳米结构、良好的生物相容性,是一种极具希望的药物递送载体。尽管研究者们已成功开发并评估了各种基于 DNA 的纳米载体,但为推进 DNA 纳米材料在肿瘤治疗领域的进一步应用,必须阐明其体内特性,包括循环半衰期、药代动力学和清除机制。此外,还需关注潜在的免疫反应。在超过 90% 的研究中,M13mp18 噬菌体 DNA 被用于制备 DNA 折纸纳米结构的支架,这种特殊的序列可能存在免疫原性<sup>[50]</sup>。

作为新型纳米平台,DNA 纳米结构能够递送多种药物以实现肿瘤联合治疗。DNA 纳米结构的流体动力学尺寸通常为 10~200 nm,因此能够利用高渗透长滞留(enhanced permeability and retention effect, EPR)效应实现肿瘤组织的被动靶向,在适配体等功能元件的帮助下还能够通过主动靶向进一步提高肿瘤靶向能力。某些巧妙的设计能够使 DNA 纳米结构在特定区域触发结构重组,暴露包被的药物,实现可控的药物释放。这种递送策略能够显著提高药物的安全性与肿瘤治疗效果。

尽管基于 DNA 的药物递送系统尚未进入临床应用,但它们目前正处于快速发展阶段,并且在肿瘤治疗领域显示出巨大的潜力。为促进 DNA 纳米技术的临床应用,需合理设计纳米颗粒,使用较少

量的载体提供大量活性药物,并确定胞内运输途径、内体逃逸情况以及药物释放情况。相信随着纳米技术的飞速发展,基于 DNA 的独特纳米材料将为有效治疗肿瘤提供强有力的手段,并在生物医学领域具有更广泛的应用。

### 参 考 文 献

- [1] Mohammad IS, He W, Yin L. Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, **100**: 335-348.
- [2] Liu J, Zhang Y, Zeng Q, et al. Delivery of RIPK4 small interfering RNA for bladder cancer therapy using natural halloysite nanotubes[J]. *Sci Adv*, 2019, **5**(9): eaaw6499.
- [3] Bhaskaran V, Yao Y, Bei F, et al. Engineering, delivery, and biological validation of artificial microRNA clusters for gene therapy applications[J]. *Nat Protoc*, 2019, **14**(12): 3538-3553.
- [4] Xu J, Sun J, Ho PY, et al. Creatine based polymer for codelivery of bioengineered microRNA and chemodrugs against breast cancer lung metastasis[J]. *Biomaterials*, 2019, **210**: 25-40.
- [5] Chen L, Zhou L, Wang C, et al. Tumor-targeted drug and CpG delivery system for phototherapy and docetaxel-enhanced immunotherapy with polarization toward M1-type macrophages on triple negative breast cancers [J]. *Adv Mater*, 2019, **31**(52): e1904997.
- [6] Mirza Z, Karim S. Nanoparticles-based drug delivery and gene therapy for breast cancer: recent advancements and future challenges[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019. doi:10.1016/j.semcancer.2019.10.020.
- [7] Zhao H, Zhao B, Wu L, et al. Amplified cancer immunotherapy of a surface-engineered antigenic microparticle vaccine by synergistically modulating tumor microenvironment [J]. *ACS Nano*, 2019, **13**(11): 12553-12566.
- [8] Liu JN, Bu W, Shi J. Chemical design and synthesis of functionalized probes for imaging and treating tumor hypoxia [J]. *Chem Rev*, 2017, **117**(9): 6160-6224.
- [9] Seeman NC. Nucleic acid junctions and lattices [J]. *J Theor Biol*, 1982, **99**(2): 237-247.
- [10] Zuo H, Mao C. A minimalist's approach for DNA nanoconstructions[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, **147**: 22-28.
- [11] Mohsen MG, Kool ET. The discovery of rolling circle amplification and rolling circle transcription [J]. *Acc Chem Res*, 2016, **49**(11): 2540-2550.
- [12] Hong CA, Jang B, Jeong EH, et al. Self-assembled DNA nanostructures prepared by rolling circle amplification for the delivery of siRNA conjugates [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2014, **50**(86): 13049-13051.

- [13] Yata T, Takahashi Y, Tan M, *et al.* Efficient amplification of self-gelling polypod-like structured DNA by rolling circle amplification and enzymatic digestion [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 14979.
- [14] Rothmund PW. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns [J]. *Nature*, 2006, **440**(7082): 297–302.
- [15] Wei B, Dai M, Yin P. Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles [J]. *Nature*, 2012, **485** (7400) : 623–626.
- [16] Seeman NC. DNA in a material world [J]. *Nature*, 2003, **421** (6921): 427–431.
- [17] Ouyang C, Zhang S, Xue C, *et al.* Precision-guided missile-like DNA nanostructure containing warhead and guidance control for aptamer-based targeted drug delivery into cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Am Chem Soc*, 2020, **142**(3): 1265–1277.
- [18] Di Z, Zhao J, Chu H, *et al.* An acidic-microenvironment-driven DNA nanomachine enables specific ATP imaging in the extracellular milieu of tumor [J]. *Adv Mater*, 2019, **31** (33) : e1901885.
- [19] Dutta PK, Zhang Y, Blanchard AT, *et al.* Programmable multivalent DNA-origami tension probes for reporting cellular traction forces [J]. *Nano Lett*, 2018, **18**(8): 4803–4811.
- [20] Liu Z, Pei H, Zhang L, *et al.* Mitochondria-targeted DNA nanoprobe for real-time imaging and simultaneous quantification of Ca<sup>2+</sup> and pH in neurons [J]. *ACS Nano*, 2018, **12**(12) : 12357–12368.
- [21] Setyawati MI, Kutty RV, Leong DT. DNA nanostructures carrying stoichiometrically definable antibodies [J]. *Small*, 2016, **12**(40): 5601–5611.
- [22] Wu SY, Chou HY, Yuh CH, *et al.* Radiation-sensitive dendrimer-based drug delivery system [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2018, **5**(2): 1700339.
- [23] Ge Z, Guo L, Wu G, *et al.* DNA origami-enabled engineering of ligand-drug conjugates for targeted drug delivery [J]. *Small*, 2020, **16**(16) : e1904857.
- [24] Liu J, Song L, Liu S, *et al.* A tailored DNA nanoplatform for synergistic RNAi-chemotherapy of multidrug-resistant tumors [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, **57**(47): 15486–15490.
- [25] Zhao H, Yuan X, Yu J, *et al.* Magnesium-stabilized multifunctional DNA nanoparticles for tumor-targeted and pH-responsive drug delivery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, **10**(18) : 15418–15427.
- [26] Liu J, Song L, Liu S, *et al.* A DNA-based nanocarrier for efficient gene delivery and combined cancer therapy [J]. *Nano Lett*, 2018, **18**(6) : 3328–3334.
- [27] Jiang Q, Song C, Nangreave J, *et al.* DNA origami as a carrier for circumvention of drug resistance [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(32): 13396–13403.
- [28] Zhang Q, Jiang Q, Li N, *et al.* DNA origami as an *in vivo* drug delivery vehicle for cancer therapy [J]. *ACS Nano*, 2014, **8** (7): 6633–6643.
- [29] Zhang H, Ma Y, Xie Y, *et al.* A controllable aptamer-based self-assembled DNA dendrimer for high affinity targeting, bioimaging and drug delivery [J]. *Sci Rep*, 2015, **5**: 10099.
- [30] Yao C, Yuan Y, Yang D. Magnetic DNA nanogels for targeting delivery and multistimuli-triggered release of anticancer drugs [J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2018, **1**(6) : 2012–2020.
- [31] Ma Y, Wang Z, Ma Y, *et al.* A telomerase-responsive DNA icosahedron for precise delivery of platinum nanodrugs to cisplatin-resistant cancer [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2018, **57** (19) : 5389–5393.
- [32] Wu T, Liu J, Liu M, *et al.* A nanobody-conjugated DNA nanoplatform for targeted platinum-drug delivery [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, **58**(40) : 14224–14228.
- [33] Liu J, Wu T, Lu X, *et al.* A self-assembled platform based on branched DNA for sgRNA/Cas9/antisense delivery [J]. *J Am Chem Soc*, 2019, **141**(48) : 19032–19037.
- [34] Wen AM, Steinmetz NF. Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy [J]. *Chem Soc Rev*, 2016, **45**(15) : 4074–4126.
- [35] Lee H, Lytton-Jean AK, Chen Y, *et al.* Molecularly self-assembled nucleic acid nanoparticles for targeted *in vivo* siRNA delivery [J]. *Nat Nanotechnol*, 2012, **7**(6) : 389–393.
- [36] Roh YH, Lee JB, Shopsowitz KE, *et al.* Layer-by-layer assembled antisense DNA microspoon particles for efficient delivery of cancer therapeutics [J]. *ACS Nano*, 2014, **8** (10) : 9767–9780.
- [37] Chen G, Liu D, He C, *et al.* Enzymatic synthesis of periodic DNA nanoribbons for intracellular pH sensing and gene silencing [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, **137**(11) : 3844–3851.
- [38] Hu Q, Li H, Wang L, *et al.* DNA nanotechnology-enabled drug delivery systems [J]. *Chem Rev*, 2019, **119**(10) : 6459–6506.
- [39] Rattanakit S, Nishikawa M, Funabashi H, *et al.* The assembly of a short linear natural cytosine-phosphate-guanine DNA into dendritic structures and its effect on immunostimulatory activity [J]. *Biomaterials*, 2009, **30**(29) : 5701–5706.
- [40] Qu Y, Yang J, Zhan P, *et al.* Self-assembled DNA dendrimer nanoparticle for efficient delivery of immunostimulatory CpG motifs [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, **9**(24) : 20324–20329.
- [41] Li J, Pei H, Zhu B, *et al.* Self-assembled multivalent DNA nanostructures for noninvasive intracellular delivery of immunostimulatory CpG oligonucleotides [J]. *ACS Nano*, 2011, **5** (11) : 8783–8789.
- [42] Ouyang X, Li J, Liu H, *et al.* Rolling circle amplification-based DNA origami nanostructures for intracellular delivery of immunostimulatory drugs [J]. *Small*, 2013, **9** (18) : 3082–3087.

- [43] Schuller VJ, Heidegger S, Sandholzer N, *et al.* Cellular immunostimulation by CpG-sequence-coated DNA origami structures [J]. *ACS Nano*, 2011, **5**(12): 9696–9702.
- [44] Wang C, Sun W, Wright G, *et al.* Inflammation-triggered cancer immunotherapy by programmed delivery of CpG and anti-PD1 antibody[J]. *Adv Mater*, 2016, **28**(40): 8912–8920.
- [45] Zhuang X, Ma X, Xue X, *et al.* A photosensitizer-loaded DNA origami nanosystem for photodynamic therapy [J]. *ACS Nano*, 2016, **10**(3): 3486–3495.
- [46] Chang K, Tang Y, Fang X, *et al.* Incorporation of porphyrin to pi-conjugated backbone for polymer-dot-sensitized photodynamic therapy[J]. *Biomacromolecules*, 2016, **17**(6): 2128–2136.
- [47] Park J, Jiang Q, Feng D, *et al.* Size-controlled synthesis of porphyrinic metal-organic framework and functionalization for targeted photodynamic therapy [J]. *J Am Chem Soc*, 2016, **138**(10): 3518–3525.
- [48] Shieh YA, Yang SJ, Wei MF, *et al.* Aptamer-based tumor-targeted drug delivery for photodynamic therapy [J]. *ACS Nano*, 2010, **4**(3): 1433–1442.
- [49] Yang Y, Zhu W, Feng L, *et al.* G-quadruplex-based nanoscale coordination polymers to modulate tumor hypoxia and achieve nuclear-targeted drug delivery for enhanced photodynamic therapy[J]. *Nano Lett*, 2018, **18**(11): 6867–6875.
- [50] Auvinen H, Zhang H, Nonappa, *et al.* Protein coating of DNA nanostructures for enhanced stability and immunocompatibility [J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, **6**(18): 1700692.

## · 校园信息 ·

## 中国药科大学 2020 年 1~7 月获授权专利情况(1)

| 申请(专利)号          | 名 称                                      | 发明(设计)人                           |
|------------------|--|-----------------------------------|
| CN201910513544.0 | 一种 2-位双取代咪唑啉-3-酮类化合物及其不对称合成方法            | 杜鼎,房帅帅                            |
| CN201810026871.9 | 一种苯-吡咯戊烷类化合物、其制备方法及其肝纤维化用途               | 张灿,王聪,王斌,康子圣,薛玲静,杜俊杰,郝玫茜,韩晓琳      |
| CN201810103737.4 | 一种医用氧化石墨烯抗菌剂的制备方法                        | 刘秀峰,刘吉华,郭蕊琳                       |
| CN201510333514.3 | 一种修饰的重组人内皮抑素及其应用                         | 姚文兵,田滋,许向阳,李海瑞,童玥,高向东             |
| CN201910170129.X | 一种降糖肽及其应用                                | 钱海,徐丹,黄文龙,蔡星光,李承业                 |
| CN201910076670.4 | 一种蛋白靶向降解嵌合分子、制备方法及应用                     | 尤启冬,姜正羽,汪艳,金雨辉,陆滕辰,徐晓莉,郭小可        |
| CN201710879128.3 | 咪唑[3,2-b]吡啶-2(1H)-酮类化合物、制备方法和医药用途        | 向华,刘林义,石冰玉,黄阿丽,蔡学融,王向前            |
| CN201810648374.2 | 一种双黄酮类化合物及其用途                            | 汪豪,胡晓龙,熊非,叶文才                     |
| CN201710366131.5 | 一种基于蛋白质印迹法提取并显现血潜指纹的方法                   | 刘鄂湖,许林茹,吕志敏                       |
| CN201711265478.7 | 以植物环肽为有效成分的肿瘤细胞异常脂代谢抑制剂及其应用              | 谭宁华,王玉荣,宋立华                       |
| CN201811534024.X | 一种含有 SUMO 抑制剂的组合物及应用                     | 郝海平,王洪,周济宇,王广基,崔双,潘晓洁,郭怡彤,黄宁宁     |
| CN201710130531.6 | 与细胞膜标记相关的亲和肽                             | 顾月清,韩智豪,芮雅兰                       |
| CN201910170119.6 | 一种降糖肽及其应用                                | 钱海,徐丹,黄文龙,蔡星光,李承业                 |
| CN201910673326.3 | 一种萘磺酰胺类化合物、制备方法和应用                       | 尤启冬,姜正羽,刘雨亭,陆滕辰,邵红丽,赵静,徐晓莉,郭小可,王磊 |
| CN201811102995.7 | 一种 Fe <sup>3+/2+</sup> -NO 供体混价配位聚合物及其应用 | 丁娅,黄张建,胡益辉,吕田                     |
| CN201710875653.8 | 抗菌多肽 EC1-17KV 及其用途                       | 马菱蔓,周丽,孙鹏博,史翔宇,林健,安胜祥,窦洁,周长林      |
| CN201810144265.7 | 可交联的两亲性天然多糖及其应用                          | 莫然,朱秋文,陈晓杰,章颖                     |
| CN201811232027.8 | 白桦脂酸用作区分栀子-连翘药对单煎混合液和混煎液的标志物的用途          | 周伟,毛晨程,吴漂女,殷爱玲                    |
| CN201710396333.4 | 苯并恶嗪酮衍生物及其制备方法和用途                        | 王进欣,高彪,赵丽,毕晓玲                     |
| CN201711081724.3 | 新型水溶性丹参酮 IIA 多肽类水凝胶纳米载药体系                | 舒畅,罗筠,胡赵良,戚大可,丛亚文,王羽蕊             |
| CN201510675827.7 | 重组聚多肽及其应用                                | 姚文兵,尹骏,高向东,田滋,包立晨,邵美              |
| CN201610479054.X | 一种丹参酮 IIA 高分子化合物及其制备和应用                  | 王进欣,赵丽,官志博,丁黎,尤启冬                 |
| CN201510038299.4 | 10-取代吡啶-3(10)-酮类化合物、其制备方法及其用途            | 孙宏斌,程勇,温小安                        |

(图书与信息中心 顾东蕾)

## 靶向肿瘤纳米晶体的研究进展

唐克琴, 林华庆\*, 李舒虹, 董理心, 鲁泊宏, 蒋 鸿

(广东药科大学广东省药物新剂型重点实验室, 广州 510006)

**摘要** 纳米晶体是以少量表面活性剂或高分子聚合物为稳定剂, 将难溶性药物粒子分散于水或油中形成的纳米级(1~1 000 nm)分散体系。纳米晶体含药量高, 制备工艺简单成熟。目前, 已上市的24个纳米晶体制剂主要集中在改善难溶性药物溶解性以及提高生物利用度上。近几年来, 关于纳米晶体通过控制粒径或表面修饰实现靶向给药的研究逐渐成为热点。本文主要介绍了用于延长纳米晶体体内循环时间、增加对肿瘤细胞的亲和力、实现对内外刺激的响应的3种靶向策略, 并探讨了纳米晶体技术应用于靶向抗肿瘤药物存在的瓶颈, 为纳米晶体制剂的开发提供参考。

**关键词** 纳米晶体; 纳米混悬剂; 靶向; 肿瘤; 表面修饰; 应用; 进展

**中图分类号** R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)04-0418-07

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200405

**引用本文** 唐克琴, 林华庆\*, 李舒虹, 等. 靶向肿瘤纳米晶体的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 418 - 424.

**Cite this article as:** TANG Keqin, LIN Huaqing\*, LI Shuhong, *et al.* Advances in tumor targeted nanocrystals[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(4): 418 - 424.

## Advances in tumor targeted nanocrystals

TANG Keqin, LIN Huaqing\*, LI Shuhong, DONG Lixin, LU Bohong, JIANG Hong

*Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China*

**Abstract** Nanocrystals are nanoscale (1-1 000 nm) dispersion systems in which small numbers of surfactants or polymers are used as stabilizers to disperse insoluble drug particles in water or oil. Nanocrystals enjoy not only high drug content, but also a simple and mature preparation process. At present, 24 nanocrystals products that have been marketed mainly focus on enhancing the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs. And recent years have witnessed an increasing number of research reports on target drug delivery of nanocrystals through particle size control and surface modification. This paper mainly introduces three targeting strategies for prolonging the in vivo circulation time of nanocrystals, increasing the affinity for tumor cells and achieving the response to internal and external stimuli, and discusses the current challenges in the application of nanocrystal technology to targeted anti-tumor drugs.

**Key words** nanocrystals; nanosuspensions; targeting; tumor; surface modification; application; advances

This study was supported by the Joint Research Project of Science and Technology Department of Guangdong Province and Guangdong Academy of Chinese Medicine (No. 2016A020226038); and the Scientific and Technological Planning Project of Guangdong Province (No. 2013B090800007)

化学治疗是治疗恶性肿瘤的三大主流手段之一, 但许多抗肿瘤药物(如紫杉醇、姜黄素等)存在溶解性差、非特异性分布导致生物利用度低、不良

反应大等缺陷, 在制剂开发中受到限制<sup>[1-2]</sup>。纳米晶体技术为改善难溶性抗肿瘤药物的溶出以及体内靶向分布提供了新的方法。与传统的纳米球、

**收稿日期** 2019-12-16 \* **通信作者** Tel: 020-39352518 E-mail: huaqing\_@163.com

**基金项目** 广东省科学技术厅-广东省中医药科学院联合科研项目资助(No. 2016A020226038); 广东省省级科技计划项目资助(No. 2013B090800007)

纳米囊不同,纳米晶体不需要使用大量表面活性剂或载体材料,由于含药量高,可满足高剂量抗肿瘤药物的递送需求。纳米晶体的尺寸效应赋予了药物较大的比表面积,增加了难溶性药物的溶出速度;同时,药物的纳米颗粒通过静电吸附、氢键、范德华力等增加了对胃肠道黏膜的生物黏附性,因此可提高生物药剂学Ⅱ类(BCSⅡ:低溶解性、高渗透性)药物的生物利用度。经粒径控制、表面改性或修饰后,纳米晶体具有靶向性而蓄积于靶组织,发挥对靶组织的治疗作用,降低对机体正常组织细胞的不良反应<sup>[3]</sup>。本文从延长纳米晶体体内循环时间、增加对肿瘤细胞的亲和力、实现对内外刺激的响应3个方面入手,总结了近5年纳米晶体靶向肿瘤策略,探讨了纳米晶体应用于靶向抗肿瘤药物存在的瓶颈,以期对纳米晶体制剂的开发提供理论参考。

## 1 延长纳米晶体体内循环时间

纳米晶体的被动靶向是通过肿瘤微环境中增强的渗透滞留(EPR)效应实现的。为了满足肿瘤生长代谢的需求,机体发展出新生血管用于肿瘤细胞的营养摄取、氧气输送、代谢物的排泄。但这些血管内皮细胞大小形状不一、排列紊乱、细胞间隙大、通透性高、无基底膜,因此100~1 000 nm的纳米晶体很容易通过细胞间隙进入肿瘤组织。另外,肿瘤组织内部的淋巴引流系统不完善,使得纳米晶体在肿瘤组织集聚,这种现象被称为EPR效应<sup>[4]</sup>。EPR效应使纳米晶体在肿瘤组织的聚集和滞留成为可能,但在强大且复杂的单核巨噬系统(MPS)面前,EPR效应显得微不足道。统计数据表明,静脉注射5 min内,95%的纳米药物被MPS识别、吞噬,蓄积于肝脾等MPS分布广泛的组织器官,仅有不到0.7%的纳米药物可通过静脉注射到达肿瘤组织<sup>[5-7]</sup>。对于治疗肝脾疾病的药物来说,这一现象相对有利。但同时又带来两个问题:一方面,药物高浓度蓄积于肝脾会产生严重的不良反应,这与靶向药物的增效减毒背道而驰;另一方面,MPS的清除使得药物无法发挥对非肝脾作用部位的治疗作用。因此削弱MPS的作用,增加纳米晶体在体内的循环时间进而提高靶部位药物蓄积浓度成为纳米晶体被动靶向给药系统的关键突破口。

针对这一问题,研究人员开发了表面修饰聚乙二醇(PEGs)、磷脂等的长循环纳米晶体。其中,PEGs化的纳米晶体被认为是最有前景的长循环纳米晶体。PEGs是亲水性非离子型聚合物,且生物相容性好。PEG化的纳米晶体可以降低药物表面的抗原性,减少MPS的摄取,达到“隐身”的目的,增加药物在体内循环的时间<sup>[8]</sup>,从而为EPR效应的发挥提供可能。紫杉醇(paclitaxel, PTX)是细胞有丝分裂抑制剂<sup>[9]</sup>,临床被用于治疗乳腺癌、卵巢癌、非小细胞肺癌等肿瘤,但它水溶性差、无组织分布特异性、体内消除迅速。已上市PTX的产品包括Taxol和Abraxane等。Taxol解决了PTX溶解性差的问题,但引入的增溶剂聚氧乙烯蓖麻油会导致过敏反应、支气管痉挛等不良反应。Abraxane是人血清白蛋白修饰的PTX的主动靶向纳米粒,但Abraxane存在氯仿有机溶剂残留,临床应用会产生慢性毒性。基于以上问题,Yin等<sup>[10]</sup>借助固体分散体技术制备了PEG修饰的人血清白蛋白紫杉醇纳米混悬剂(PEG-HSA-PTX),实验表明,PEG-HSA-PTX的生物利用度分别是Taxol、Abraxane的8.8和4.8倍;平均滞留时间(MRT)分别是Taxol、Abraxane的3.2和1.5倍,肿瘤抑制率比Taxol和Abraxane高出20%,且PEG-HSA-PTX在溶血性实验、静脉注射刺激性实验和急性毒性实验中均显示出更高的安全性,说明PEG修饰的人血清白蛋白紫杉醇减少了MPS的摄取,增加了体内循环时间,优化了紫杉醇的体内分布,因而显示出较好的抗肿瘤效应和较低的体内毒性。

## 2 增加纳米晶体对肿瘤细胞的亲和力

PEG等修饰的纳米晶体虽然增加了药物在体内的循环时间,但对肿瘤组织的特异性低,抗肿瘤效果并不理想,主动靶向给药应运而生。主动靶向给药是利用肿瘤细胞上过度表达的受体或抗原,以相应的配体或抗体为“靶头”,从而增加药物对肿瘤细胞的特异性识别能力和亲和力,将药物定向运送到靶部位发挥疗效,减少对机体其他组织器官的不良反应<sup>[11]</sup>。常用的靶向配体有叶酸、透明质酸、转铁蛋白、RGD肽、单克隆抗体等。

### 2.1 叶酸

叶酸(folate, FA)又名维生素B<sub>11</sub>,参与真核细胞核苷酸的合成。叶酸受体(folate receptor, FR)

是一种糖蛋白,现已发现的FR有4种类型,分别是FR- $\alpha$ 、FR- $\beta$ 、FR- $\gamma$ 和FR- $\sigma$ 。其中FR- $\alpha$ 在一些肿瘤(如卵巢癌、肾癌、子宫癌、睾丸癌等)中高水平表达。叶酸作为配体具有无毒、价廉易得、便于修饰、与叶酸受体结合能力强等优点,并且叶酸分子稳定性好,经过较长时间的体内循环依然可以保持较高的受体亲和力,因此被广泛用作主动靶向的修饰配体<sup>[12]</sup>。Hong等<sup>[13]</sup>通过酰胺键偶联设计合成了叶酸-乙二胺- $\beta$ -环糊精偶联物,制备了叶酸修饰的番茄素纳米混悬剂(FA-ACGs-NSps)。细胞摄取实验表明,高表达叶酸受体的乳腺癌细胞(4T1)对FA-ACGs-NSps的摄取效率显著高于ACGs-NSps;FA-ACGs-NSps对4T1细胞的生长抑制作用显著大于ACGs-NSps( $P < 0.001$ )。然而对叶酸受体阴性的A549细胞,二者却没有差异。组织分布表明,FA-ACGs/DiR-NSps在4T1荷瘤小鼠肿瘤中的分布以及对肿瘤的靶向效率(相对肝脏)都比非靶向组有显著提高。以上结果说明FA-ACGs-NSps对肿瘤细胞亲和力高,对正常细胞杀伤力低,达到增效减毒的目的。

## 2.2 透明质酸

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是天然存在的阴性亲水性多糖,是胞外基质和关节液的组成成分,具有生物相容性好、无毒、无免疫原性、生物可降解的特点。透明质酸受体CD44存在于多种具有高转移活性的恶性肿瘤细胞表面,且有很强的黏附性<sup>[14-15]</sup>。以CD44为靶点,将透明质酸和抗肿瘤药物结合,既能抑制肿瘤细胞的转移,又能提高抗肿瘤药物的治疗效果,降低毒性。Sharma等<sup>[9]</sup>以壳聚糖为稳定剂,通过静电吸附作用制备了透明质酸修饰的紫杉醇纳米晶体(HA-PTX-NCs)。实验表明,表面高表达CD44受体的MDA-MB-231细胞对HA-PTX-NCs的摄取高于PTX-NCs;在小鼠的肺部转移实验中,市售Taxol组小鼠肺部可明显观察到转移的肿瘤细胞,而HA-PTX-NCs组小鼠肺部未受乳腺癌细胞侵袭。拉帕替尼用于治疗转移性乳腺癌,其水溶性差,生物利用度极低,每天需服用相当于1 250 mg的拉帕替尼片。患者依从性差,并且服用高剂量的药物会产生较大的不良反应。为解决这一问题,Agrawal等<sup>[16]</sup>制备了透明质酸修饰的拉帕替尼纳米晶体(HA-LPT-NCs)。荧光标记显示,HA-LPT-NCs细胞体外摄取远高于未

经修饰的拉帕替尼纳米晶体和纯药物( $P < 0.01$ )。蛋白质印迹分析表明,HA-LPT-NCs既能使多种促凋亡蛋白上调,又能使抗凋亡蛋白下调。研究表明HA-LPT-NCs在肿瘤组织内的滞留时间高达24 h,与拉帕替尼普通片剂和纳米晶体相比,HA-LPT-NCs使小鼠肿瘤组织减小74.65%和52.00%,且能够明显减少拉帕替尼的肝毒性。

## 2.3 转铁蛋白

转铁蛋白(transferrin, Tf)大量存在于人血浆中,可与细胞表面的转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)形成复合物,参与铁离子的体内转运。铁离子作为核糖核苷酸还原酶的辅因子,直接参与DNA的合成与修复<sup>[17]</sup>。为满足迅速分裂的肿瘤细胞对铁离子的需求,TfR在多种肿瘤细胞中高度表达,如乳腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、肺癌、黑色素瘤<sup>[18]</sup>。Choi等<sup>[19]</sup>通过吸附法制备了表面修饰转铁蛋白的多西紫杉醇纳米晶体(Tf-DTX-NCs)。实验表明,Tf-DTX-NCs的体外累积溶出率较多西紫杉醇溶液高出50倍,Tf-DTX-NCs的A549细胞摄取率远高于DTX-NCs( $P < 0.01$ ),24 h时,Tf-DTX-NCs的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)比DTX-NCs低2.9倍,说明Tf-DTX-NCs既改善了DTX的溶解性,又增加了DTX的细胞摄取和细胞毒性。Sohn等<sup>[20]</sup>同样利用物理吸附法制备了转铁蛋白修饰的紫杉醇纳米混悬剂,再次证明,药物表面修饰转铁蛋白可增加药物对肿瘤细胞的特异性识别能力和亲和力。

## 2.4 RGD肽

RGD肽(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)是一种能够与表面整合素受体特异性结合的环状三肽。整合素是细胞表面兼具黏附和信号传导功能的受体,除此之外它还介导肿瘤血管生成、生长和转移的进程。整合素,尤其是 $\alpha_v\beta_3$ ,在多种肿瘤细胞表面和新生血管内皮细胞上有高表达,而在成熟血管内皮细胞和绝大多数正常器官系统中不表达或者少量表达<sup>[21]</sup>。RGD肽修饰的抗肿瘤药物纳米晶体可以抑制新生血管的生成,同时可以通过与 $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合,增加肿瘤细胞对抗肿瘤药物的摄取,从而提高抗肿瘤作用。Huang等<sup>[2]</sup>创新性地借助多聚多巴胺(PDA)共价键合制备了RGD肽修饰的PEG化紫杉醇纳米晶体(RGD-PEG-PDA-PTX)。实验表明A549细胞对RGD肽修饰的纳米晶体的摄取显著高于纯紫杉醇的纳米晶体,相应的相同

剂量下,RGD-PEG-PDA-PTX对肿瘤细胞的抑制率是未经修饰的紫杉醇纳米晶体的两倍。小鼠体内实验表明,RGD肽修饰减少了紫杉醇在肝肾内的分布,增加了药物在肿瘤组织的分布和对肿瘤生长的抑制作用。遗憾的是,虽然利用PDA的共价键合作用,可以减少RGD肽的脱靶,但是PDA的存在使得RGD-PEG-PDA-PTX的累积溶出率较紫杉醇纳米晶体小2倍。

### 2.5 单克隆抗体

单克隆抗体(monoclonal antibody, MAb)因兼具靶向和治疗作用,自1995年第1个治疗结直肠癌的单克隆抗体17-1A上市以来,受到广泛关注,目前全球市场共批准20多个上市产品。随着研究的深入,单抗药物也表现出耐药、不良反应、因相对分子质量大难以进入实体肿瘤等问题<sup>[22-23]</sup>。因此,将传统抗肿瘤药物与单抗通过化学偶联,借助单抗对肿瘤抗原的亲亲和性和抗肿瘤药物的强效性,达到增效减毒的作用。同时,通过不同机制抑制肿瘤,还可降低肿瘤治疗中出现的耐药性。Noh等<sup>[24]</sup>通过物理吸附制备了赫赛汀(herceptin, HCT)修饰的紫杉醇纳米晶体(HCT-PTX-NCs),用于HER2过度表达的转移性乳腺癌的联合化疗。与紫杉醇纳米晶体(PTX-NCs)相比,HCT-PTX-NCs对HER2阳性细胞SK-OV-3表现出更高的亲和力(高出23%)和细胞毒性。

### 3 实现纳米晶体对内外刺激响应

针对肿瘤靶向治疗的刺激包括基于肿瘤微环境的内源性刺激:pH、氧化还原梯度、高酶浓度(如,糖苷酶、脂肪酶、磷脂酶等);外源性刺激:光、热、磁、超声<sup>[25]</sup>等。刺激响应型给药系统在20世纪70年代被提出,虽然目前已开发出多种刺激响应型材料用作纳米载体<sup>[26]</sup>,但基于纳米晶体的刺激

响应型给药系统的研究仍然处于初期阶段。为了实现纳米晶体在靶组织的定位,通常是将其稳定剂进行化学改性,使稳定剂既能作为纳米晶体的稳定剂,又具备刺激响应能力。Fuhrmann等<sup>[27]</sup>利用肿瘤组织的高活性氧环境,设计了一种氧化响应两亲嵌段共聚物,制备了多西紫杉醇活性氧刺激响应型纳米晶体,显著提高了多西紫杉醇在肿瘤组织的蓄积能力。Li等<sup>[28]</sup>以Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>晶体为内核,制备了PEG、单克隆抗体修饰的氟尿嘧啶(5-FU)偶联物,考察了联合疗法(化疗和光热疗法)对小鼠膀胱癌的抗肿瘤效果。结果表明,用近红外光的照射肿瘤部位,药物粒子在15 s内迅速从30℃升温到50℃,发挥了对肿瘤细胞的杀伤作用,同时触发了5-FU的释放;与5-FU溶液相比,目标产物抗肿瘤效果显著提高( $P < 0.001$ )。

### 4 总结与展望

与其他纳米载体相比,纳米晶体优势明显,应用前景广泛。具体优势有:(1)剂型优势——纳米晶体可提高BCS II药物的生物利用度;在此基础上,通过控制粒径或表面修饰,纳米晶体还可实现对肿瘤组织的靶向给药<sup>[29]</sup>;纳米晶体含药量高,药物含量几乎可达100%<sup>[3]</sup>;作为一种中间剂型,纳米晶体可经不同途径给药,如口服、注射、眼部、肺部给药<sup>[1]</sup>等。(2)安全性优势——纳米晶体无需加入大量增溶剂、助溶剂等,只需少量稳定剂,可有效避免表面活性剂对机体产生的毒性;纳米晶体应用于眼部、肺部时,可有效避免药物颗粒对眼睛和呼吸道的局部刺激<sup>[3]</sup>。(3)制备工艺优势——纳米晶体制备方法多样且成熟,易实现工业化大规模生产,具有广阔的应用前景<sup>[30]</sup>。自20世纪90年代被提出以来,纳米晶体技术发展迅速,目前已有24个上市产品和10多个临床在研产品(表1~2)<sup>[31-32]</sup>。

Table 1 Nanocrystal-based formulations in market

| Generic      | Indication           | Manufacturer | Generic                  | Indication           | Manufacturer             |
|--------------|----------------------|--------------|--------------------------|----------------------|--------------------------|
| Rapamycin    | Immunosuppressive    | Wyeth        | Tizanidine hydrochloride | Muscle relaxant      | Acorda                   |
| Aprepitant   | Anti-emetic          | Merck        | Naproxen sodium          | Anti-inflammation    | Wyeth                    |
| Fenofibrate  | Hypercholesterolemia | Abbott       | Theophylline             | Bronchial dilation   | Mitsubishi Tanabe Pharma |
| Megestrol    | Anti-anorexic        | Par Pharm    | Fenofibrate              | Hypercholesterolemia | Skye Pharm               |
| Fenofibrate  | Hypercholesterolemia | Sciele Pharm | Paliperidone palmitate   | Anti-depressant      | Johnson & Johnson        |
| Griseofulvin | Anti-fungal          | Novartis     | Silver                   | Anti-microbial       | Nucryst Pharm            |

(Continued)

| Generic                          | Indication         | Manufacturer             | Generic                  | Indication             | Manufacturer  |
|----------------------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|---------------|
| Nabilone                         | Anti-emetic        | Lilly                    | NPI 32101                | Anti-inflammatory      | Nucryst Pharm |
| Verapamil                        | Anti-arrhythmia    | Schwarz Pharm            | Ensulzone and octinoxate | Anti-wrinkle           | Lancome       |
| Dexmethylphenidate hydrochloride | Anti-psychotic     | Novartis                 | Nabilone                 | Antiemetic             | Lilly         |
| Morphine sulfate                 | Anti- chronic pain | King Pharm               | Celecoxib                | Analgesic-antipyretic  | Pfizer        |
| Methylphenidate hydrochloride    | Anti-psychotic     | Novartis                 | Nepafenac                | Analgesic-antipyretic  | Novartis      |
| Diltiazem                        | Anti-angina        | Mitsubishi Tanabe Pharma | Dantrolene sodium        | Malignant hyperthermia | Eagle Pharm   |

**Table 2** Nanocrystal-based formulations under clinical trials

| Generic                         | Indication              | Manufacturer                                      | Status    |
|---------------------------------|-------------------------|---|-----------|
| Silver and silver sulphadiazine | Second-degree burn      | University of Sorocaba                            | Phase IV  |
| Titanium dioxide                | Sunburn                 | Oslo University Hospital                          | Phase IV  |
| Paclitaxel                      | Anti-cancer             | American Pharmaceutical Partners                  | Phase III |
| Silver                          | Anti-bacterial          | Madigan Army Medical Center                       | Phase III |
| Paclitaxel                      | Anti-inflammatory       | Angiotech   | Phase III |
| 2-methoxy estradiol             | Ovarian cancer          | EntreMed  | Phase II  |
| Tamozolomide                    | Anti-cancer             | EntreMed  | Phase II  |
| Bevacizumab                     | Anti-cancer             | EntreMed  | Phase II  |
| Guanylydrazone                  | TNF- $\alpha$ inhibitor | Cytokine Pharm                                    | Phase II  |
| Thymectacin                     | Anti-cancer             | Celmed  | Phase II  |
| Silver                          | Anti-bacterial          | Nucryst Pharm                                     | Phase II  |
| Estradiol and progesterone      | Menopausal syndrom      | University Potiguar and InBios International, Inc | Phase II  |
| Thymectacin                     | Anti-cancer             | Hex oncology                                      | Phase II  |
| Fenofibrate                     | Sleep apnea             | Solvay Pharm                                      | Phase II  |
| Busulfan                        | Anti-cancer             | Supergen  | Phase I   |
| Budesonide                      | Asthama                 | Sheffield Pharm                                   | Phase I   |
| Thymectacin                     | Anti-cancer             | NewBiotics  | Phase I   |

纳米晶体的应用主要集中在改善难溶性药物溶解性上,而作为靶向给药载体仅处于实验室研究阶段,主要原因在于纳米晶体基础研究不足和靶向效率不高。基础研究方面,纳米晶体存在物理稳定性差的问题,需加入空间稳定剂和电荷稳定剂<sup>[33]</sup>。在实际研究中需要通过单因素实验、正交设计、星点设计-效应面法等确定最佳稳定剂的种类和用量,工作量非常大。在人工智能时代,结合机器学习等实现稳定剂的智能选择和精准的粒径、形态、表面电荷及稳定性的预测和控制是非常有价值的研究方向。此外,纳米晶体细胞摄取机制研究尚不深入,体内归宿不明确阻碍了组织分布、药效和毒理学方面的研究。因此,有必要利用放射性或荧光探针等成像技术实现纳米晶体体内实时动态示踪<sup>[31]</sup>。靶向给药的关键是提高靶

向效率,靶向效率影响因素众多。首先,靶点的选择直接关系到药物载体对靶部位的亲和性;其次,配体与药物的连接方式、牢固程度、配体的密度和种类也会影响纳米晶体的粒径、电荷、亲脂性,进而影响单核巨噬细胞对纳米晶体的吞噬作用和肿瘤细胞对纳米晶体的摄取;再次,纯药物的纳米晶体和配体修饰的纳米晶体容易被 MPS 识别,而快速被机体消除,因此,有必要将长循环纳米晶体和主动靶向技术结合,增加药物的体内滞留时间和靶向效率;最后,越来越多的研究表明,同一肿瘤组织有多种细胞分型,因而存在不同的表面受体,经自然选择后部分肿瘤细胞出现耐药性。而在同一药物上修饰多种配体技术难度大,经济成本高,采用多种抗肿瘤药物联合治疗可有效降低肿瘤耐药性的出现<sup>[3,31,34]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Fan M, Geng S, Liu Y, *et al.* Nanocrystal technology as a strategy to improve drug bioavailability and antitumor efficacy for the cancer treatment[J]. *Curr Pharm Des*, 2018, **24**(21): 2416–2424.
- [2] Huang ZG, Lv FM, Wang J, *et al.* RGD-modified PEGylated paclitaxel nanocrystals with enhanced stability and tumor-targeting capability[J]. *Int J Pharm*, 2019, **556**: 217–225.
- [3] Gao L, Liu G, Ma J, *et al.* Drug nanocrystals: *in vivo* performances[J]. *J Control Release*, 2012, **160**(3): 418–430.
- [4] Kalyane D, Raval N, Maheshwari R, *et al.* Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer[J]. *Mater Sci Eng C*, 2019, **98**: 1252–1276.
- [5] Zheng HL, Song YZ, Deng YH. A review for phagocyte system: the executors of nanoparticles clearance[J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2019, **36**(1): 91–102.
- [6] Wilhelm S, Tavares A, Dai Q, *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours[J]. *Nat Rev Mater*, 2016, **1**(5): 1–12.
- [7] Ma YQ, Zhang ZZ, Li G, *et al.* The research progress on nanocrystal technology and its targeted delivery [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2018, **38**(9): 1014–1017.
- [8] Mishra P, Nayak B, Dey RK. PEGylation in anti-cancer therapy: an overview[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2016, **11**(3): 337–348.
- [9] Sharma S, Singh J, Verma A, *et al.* Hyaluronic acid anchored paclitaxel nanocrystals improves chemotherapeutic efficacy and inhibits lung metastasis in tumor-bearing rat model [J]. *RSC Advances*, 2016, **6**(77): 73083–73095.
- [10] Yin TJ, Cai H, Liu JY, *et al.* Biological evaluation of PEG modified nanosuspensions based on human serum albumin for tumor targeted delivery of paclitaxel[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2015, **83**: 79–87.
- [11] Zhao J, Liu YY, Wang LL, *et al.* Functional and modified nanocrystals technology for target drug delivery[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2018, **18**(8): 5207–5221.
- [12] Zhang WP, Chen YW, Zhang K, *et al.* Research of folic acid mediated targeted drug delivery system [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2017, **35**(7): 1855–1859.
- [13] Hong JY, Sun ZH, Li YJ, *et al.* Folate modified annonaceous acetogenins (ACGs) nanosuspensions and improved anti-tumor efficacy[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, **12**: 5053–5067.
- [14] Sun XF, Liu T, Ling Y, *et al.* Advances in research of hyaluronic acid modified nanomicelles for targeting tumor therapy and drug release behavior[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2019, **50**(6): 641–647.
- [15] Wan L, Jiao J, Cui Y, *et al.* Hyaluronic acid modified mesoporous carbon nanoparticles for targeted drug delivery to CD44-overexpressing cancer cells [J]. *Nanotechnology*, 2016, **27**(13): 102–115.
- [16] Agrawal S, Dwivedi M, Ahmad H, *et al.* CD44 targeting hyaluronic acid coated lapatinib nanocrystals foster the efficacy against triple-negative breast cancer[J]. *Nanomedicine*, 2018, **14**(2): 327–337.
- [17] Gomme PT, Mccann KB, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions [J]. *Drug Discov Today*, 2005, **10**(4): 267–273.
- [18] Peng J, Zhang YT, Chen J, *et al.* Structural function and potential clinical value of transferrin[J]. *Chin J Mod Med*(中国现代医学杂志), 2017, **27**(26): 56–60.
- [19] Choi JS, Park JS. Development of docetaxel nanocrystals surface modified with transferrin for tumor targeting[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, **11**: 17–26.
- [20] Sohn JS, Yoon DS, Sohn JY, *et al.* Development and evaluation of targeting ligands surface modified paclitaxel nanocrystals [J]. *Mater Sci Eng C*, 2017, **72**: 228–237.
- [21] Song ZW, Lin Y, Zhang X, *et al.* Cyclic RGD peptide-modified liposomal drug delivery system for targeted oral apatinib administration: enhanced cellular uptake and improved therapeutic effects[J]. *Int J Nanomed*, 2017, **12**: 1941–1958.
- [22] Sun Y. Advances in research on monoclonal antibodies against tumors[J]. *Int J Biologicals*(国际生物制品学杂志), 2016, **39**(3): 128–133.
- [23] Liang NS. New advances in the research and application of monoclonal antibodies against cancer[J]. *J China Pharm*(中国药房), 2010, **21**(14): 19–22.
- [24] Noh JK, Naeem M, Cao J, *et al.* Herceptin-functionalized pure paclitaxel nanocrystals for enhanced delivery to HER2-positive breast cancer cells [J]. *Int J Pharm*, 2016, **513**(1/2): 543–553.
- [25] Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine[J]. *J Control Release*, 2016, **244**: 108–121.
- [26] Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery[J]. *Nat Mater*, 2013, **12**(11): 991–1003.
- [27] Fuhrmann K, Połomska A, Aeberli C, *et al.* Modular design of redox-responsive stabilizers for nanocrystals [J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(9): 8243–8250.
- [28] Li TJ, Huang CC, Ruan PW, *et al.* *In vivo* anti-cancer efficacy of magnetite nanocrystal - based system using locoregional hyperthermia combined with 5-fluorouracil chemotherapy[J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(32): 7873–7883.
- [29] Gao L, Liu GY, Ma JL, *et al.* Application of drug nanocrystal technologies on oral drug delivery of poorly soluble drugs [J]. *Pharm Res*, 2013, **30**(2): 307–324.
- [30] Tuomela A, Saarinen J, Clare J, *et al.* Production, applications and *in vivo* fate of drug nanocrystals[J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2016, **34**: 21–31.
- [31] Mohammad IS, Hu H, Yin L, *et al.* Drug nanocrystals: fabrica-

- tion methods and promising therapeutic applications [J]. *Int J Pharm*, 2019, **562**:187-202.
- [32] Chen ML, John M, Lee SL, *et al.* Development considerations for nanocrystal drug products [J]. *AAPS J*, 2017, **19** (3): 642-651.
- [33] Pawar VK, Singh Y, Mehe JG, *et al.* Engineered nanocrystal technology: *in-vivo* fate, targeting and applications in drug delivery [J]. *J Control Release*, 2014, **183**:51-66.
- [34] Thanuja MY, Anupama C, Ranganath SH. Bioengineered cellular and cell membrane-derived vehicles for actively targeted drug delivery: so near and yet so far [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, **132**:57-80.

## · 校园信息 ·

## 中国药科大学2020年1~7月获授权专利情况(2)

| 申请(专利)号          | 名称                                      | 发明(设计)人                          |
|------------------|---|----------------------------------|
| CN201910682539.2 | 一种负载抗肺纤维化药物和免疫调节剂的纳米制剂及其制备方法            | 姜虎林,常鑫,林伊君,邢磊                    |
| CN201710937405.1 | 一种具有缓释性能的食品抗菌保鲜包装材料及其制备方法               | 曹崇江,孙世旭,黄德春                      |
| CN201711163505.X | 一种肿瘤靶向探针化合物及其合成和应用                      | 陈海燕,魏晨,沈沅芷,陈伊莎                   |
| CN201811248840.4 | 含有取代膦酰胺酯的IDO1抑制剂、其制备方法及应用               | 李志裕,卞金磊,冯袭,马樱赫                   |
| CN201811339367.0 | 盐酸去亚甲基四氢小檗碱在制备预防或治疗酒精性肝病和非酒精性脂肪肝病药物中的应用 | 张玉彬,张元强,朱倩倩,邱贞,李青霞,张森,潘杉,赵亚星,闻婧  |
| CN201710716986.6 | 与PD-L1结合的重叠域锚定蛋白及其用途                    | 高向东,宋潇达,陈晓菲,刘利,田滋,姚文兵            |
| CN201711210572.2 | 三氮唑吡啶甲酰胺甘氨酸类化合物、其法及医药用途                 | 尤启冬,张晓进,蒋真盛,伍悦,李治红               |
| CN201710277753.0 | 4-氨基嘧啶类化合物、其制备方法及其医药用途                  | 赖宜生,章颖溢,肖建虎,金双龙,李月珍,张奕华          |
| CN201610034225.8 | 一种具有抗肿瘤、抗炎和治疗眼科疾病功能的融合蛋白及其制备方法和应用       | 徐寒梅,于健                           |
| CN201510894033.X | 丹皮酚的全新结构活性代谢物                           | 王广基,孙建国,仲云熙,金孝亮,谷世寅,阿基业,彭英,王瑜    |
| CN201810648560.6 | 一种单蒾基姜黄素-香豆素杂合体及其制备方法和用途                | 孔令义,余文颖,张文达                      |
| CN201710057910.7 | 一种鼠李糖乳杆菌胞外多糖的制备及用途                      | 周长林,王志来,郭建,刘洋,李婧文,窦洁,樊泓治,贾源宾     |
| CN201910141539.1 | 一种间苯三酚化合物BF-2在制备治疗类风湿性关节炎药物中的应用         | 严明,汪豪,蔺小兵,安晓飞,张陆勇                |
| CN201910688203.7 | 一种用于肺纤维化的纳米制剂及其制备方法                     | 姜虎林,常鑫,邢磊,林伊君,李玲                 |
| CN201510660666.4 | 碳纳米材料在制备天然产物的用途                         | 李萍,杨华,王锐                         |
| CN201910352239.8 | 一种薯蓣苷元3-OH衍生物及其制备方法和医药用途                | 黄雪峰,尹宏,刘妮,张敏杰,张敏,周靖              |
| CN201910158848.X | 法舒地尔复合盐及其制备方法和用途                        | 黄张建,张奕华,吕田,庞涛,孔辉,解卫平,王虹          |
| CN201710700963.6 | 抗菌肽MSI-1及其用途                            | 周长林,魏杉杉,杨晓倩,马菱蔓,刘含含,贾源宾,窦洁       |
| CN201711201299.7 | 神经氨酸酶及抑制剂在制备抗血栓的药物中的应用                  | 李萍,齐炼文,张蕾                        |
| CN201710627397.0 | 一类茛菪酰胺-川芎嗪杂合物、制备方法及医药用途                 | 张奕华,黄张建,彭司勋                      |
| CN201811507809.8 | 2,2-(4-羧基辛酰胺基)苯甲酸甲酯在制备治疗炎症性疾病药物中的应用     | 胡庆华,李环球,周梦泽                      |
| CN201710069230.7 | 阿替匹林C在制备预防和治疗紫外损伤药物中的应用                 | 吴亮,汪豪,於年琴,汪小燕,廖有为,陈星光,胡蝶,王雨轩,张陆勇 |
| CN201810616241.7 | 一种黄芩素纳米混悬剂及其制备方法                        | 郭青龙,柯学,王卉,陈默                     |
| CN201711201489.9 | 神经氨酸酶及抑制剂在制备治疗肺纤维化和肾纤维化的药物中的应用          | 张蕾,齐炼文,魏婷婷                       |
| CN201710554275.3 | 一种盐酸鲁拉西酮氨基酸的共无定形物                       | 高缘,王晓洁,钱帅,张建军,梁淑君,周生研            |
| CN201710792397.6 | 一种苯并氮杂芳环类化合物及其制备方法和应用                   | 蒋晟,涂正超,郝海平,姚毅武,邱亚涛,姚和权,强磊,陈东     |
| CN201610463432.5 | 三类羧基取代芳香化合物在耐吡嗪酰胺结核病及结核病治疗中的医药用途        | 林克江,支运宝,仲艳雯                      |
| CN201710567840.X | 4-(芳杂环取代)氨基-1H-3-吡啶甲酰胺类FLT3抑制剂及其用途      | 卢帅,王越,支燕乐,尧超,陆涛,李保泉,陈璞洲,鲍吉银      |

(图书与信息中心 顾东蕾)

## 淋巴靶向药物递送系统在抗肿瘤转移治疗中的研究进展

冯 旻, 徐 霄, 莫 然\*

(中国药科大学药物科学研究院 高端药物制剂与材料研究中心, 南京 210009)

**摘要** 淋巴转移是肿瘤转移的主要途径之一, 传统药物治疗肿瘤淋巴转移的局限在于药物在淋巴转移灶的浓度低导致疗效不佳。纳米药物递送系统在增强药物靶向性、提高药物生物利用度、降低药物不良反应等方面发挥着重要作用。本综述介绍了淋巴系统的组成和功能, 阐述了淋巴系统在肿瘤转移中的作用, 列举了现有的抗肿瘤淋巴转移治疗手段及局限性, 重点阐述被动、主动以及抗原递呈细胞介导的淋巴靶向药物递送系统在抗肿瘤转移治疗中的研究进展。

**关键词** 药物递送; 淋巴靶向; 肿瘤转移; 进展

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0425-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200406

引用本文 冯旻, 徐霄, 莫然. 淋巴靶向药物递送系统在抗肿瘤转移治疗中的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 425 - 432.

Cite this article as: FENG Yang, XU Xiao, MO Ran. Advances in lymphatic targeted drug delivery system for treatment of tumor metastasis [J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(4): 425 - 432.

## Advances in lymphatic targeted drug delivery system for treatment of tumor metastasis

FENG Yang, XU Xiao, MO Ran\*

*Center of Advanced Pharmaceuticals and Biomaterials, Institute of Pharmaceutical Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China*

**Abstract** Lymphatic metastasis is one of the main routes of tumor metastasis. The limitation of traditional medicine in the treatment of lymphatic tumor metastasis lies in the low concentration of the drug in lymphatic metastases resulting in poor efficacy. Nanocarrier-based drug delivery system plays an important role in enhancing drug targeting, improving drug bioavailability, and reducing side effects. This review introduces the composition and function of the lymphatic system as well as its role in tumor metastasis, enumerates the present therapeutic means and limitations of anti-tumor lymphatic metastasis, and focuses on the recent advances in the passive, active and antigen-presenting cell-mediated lymphatic targeted drug delivery systems in tumor metastasis are highlighted.

**Key words** drug delivery; lymphatic targeting; tumor metastasis; advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81673381)

肿瘤转移是指肿瘤细胞从原发灶脱落, 经淋巴管或血管等迁移至其他部位继续生长的过程。这一过程包括: (1) 从原位灶上脱落后细胞内渗入淋巴管或血管, 随后进入血液, 形成循环肿瘤细胞; (2) 在逃过免疫系统的监察后, 部分循环肿瘤细胞得以存活; (3) 存活的肿瘤细胞在其他器官

或组织增殖, 形成局部转移; (4) 逐渐适应新环境后, 肿瘤细胞继续增殖形成最终的转移灶<sup>[1]</sup>。

研究显示肿瘤转移是导致肿瘤患者死亡的最主要原因<sup>[2]</sup>。肿瘤细胞的转移往往具有一定方向性, 像“种子”一样, 向着更适合其生长的微环境进行选择迁移。例如, 乳腺癌易发生肺、骨和脑转

收稿日期 2020-06-11 \* 通信作者 Tel: 025-83271159 E-mail: rmo@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81673381)

移,结肠癌易发生肺和肝转移,胰腺癌易发生肝转移<sup>[3-4]</sup>。相较于血行转移,恶性肿瘤更易借助淋巴系统发生转移<sup>[5]</sup>。手术切除、化疗和放疗是传统肿瘤治疗方法。然而,当肿瘤发生转移时,可能会有多个转移灶(如淋巴结转移),通过手术切除和放疗很难根除所有的转移灶,同时对患者损害较大。而系统给药的化疗药物往往驻留在血液或脏器中,很难进入淋巴系统,严重影响对淋巴转移灶的治疗效果。近年来研究发现借助淋巴靶向药物递送系统,可改善药物在淋巴系统中的分布,在抗肿瘤转移治疗中展现出巨大的潜力<sup>[6]</sup>。本综述以肿瘤转移和淋巴系统的关系为切入点,介绍淋巴系统的组成及功能,阐述淋巴系统在肿瘤转移进程中的重要性,并重点介绍靶向淋巴系统的药物递送系统在抗肿瘤转移中的研究进展。

## 1 淋巴系统与肿瘤转移

### 1.1 淋巴系统的组成和功能

淋巴系统由淋巴组织、淋巴器官与淋巴管道构成,不仅是机体重要的循环系统<sup>[7]</sup>,也是重要的防御系统。抗原递呈细胞、淋巴细胞、外周抗原等通过传入淋巴管引流进入淋巴结。淋巴结内滞留着大量包括B、T淋巴细胞、树突状细胞等免疫细胞,对机体的免疫功能起着重要作用<sup>[8]</sup>。

### 1.2 淋巴系统在肿瘤转移中的作用

肿瘤转移主要分为血行转移和淋巴转移两种途径。大量研究表明,淋巴系统可能比血液系统更易于为肿瘤细胞提供转移通道<sup>[5,9]</sup>,其主要原因为:(1)淋巴管的特殊结构。与血管结构相比,淋巴管的内皮细胞间连接较松散,基底膜不够完整,使得肿瘤细胞更易进入淋巴管。(2)淋巴液流速慢。血流速度是淋巴流速的100~500倍<sup>[9]</sup>。较低的淋巴压力降低了机械变形和剪切应力对处于其中的细胞的物理损伤,使得肿瘤细胞在淋巴系统中更易存活。(3)无血清的淋巴环境。血清毒性在一定程度上降低了血液中肿瘤细胞的活力,而淋巴的成分与组织间液十分相近,不存在血清,因而细胞在淋巴液中有更高的活力。(4)趋化因子受体的作用。一些趋化因子及相关受体在转移器官的选择中起着至关重要的作用。例如,趋化因子受体(CXCR3、CXCR4)在淋巴转移的过程中起关键作用<sup>[10-11]</sup>。Kawada等<sup>[12]</sup>利用RNA干扰(RNAi)

技术构建了低表达CXCR3的黑色素瘤细胞,将其接种于小鼠体内后发现,与正常的黑色素瘤细胞比,低表达CXCR3的肿瘤细胞向胸窝淋巴结的迁移明显减少,但并不影响其向肝、肺的血源性转移,证明了某些趋化因子及受体会促进肿瘤细胞的淋巴转移,而对血液转移并无显著影响。总之,淋巴系统在许多实体瘤(如黑色素瘤、乳腺癌等)扩散的主要途径<sup>[13]</sup>。肿瘤发生转移后,治疗难度增大,患者的预后不佳。例如,在黑色素瘤治疗中,患者的转移阳性的淋巴结数目越多,五年生存率越低。因此,抑制肿瘤的淋巴转移成为现今肿瘤治疗领域的研究重点之一<sup>[14]</sup>。

### 1.3 抗肿瘤淋巴转移的治疗手段

淋巴结清扫及放疗是临床上治疗肿瘤转移的常用手段,但侵袭性较大,会导致包括淋巴水肿、淋巴系统循环功能受损等不良反应<sup>[15]</sup>。而通过静脉或口服给药的化疗药物因无法在淋巴系统富集,不能有效杀死转移灶内的肿瘤细胞。Ryan等<sup>[16]</sup>发现大鼠静脉注射游离阿霉素后,几乎所有时间点下淋巴液中阿霉素的浓度都低于血浆中的浓度,表明静脉给药后化疗药物无法有效的浓集于淋巴系统。如何提高药物在淋巴系统中的分布是近年来治疗肿瘤转移的主要研究方向之一。鉴于此,研究者们通过对药物进行化学改性以及利用药物递送系统以期提高淋巴系统中的药物量。一方面,通过将药物与疏水性基团共价偶联提高药物的亲脂性,增加口服给药后药物的肠道淋巴转运<sup>[17]</sup>。但是,许多药物不具备化学修饰的条件或修饰后活性降低,限制了药物的疗效。另一方面,构建淋巴靶向药物递送系统,通过物理包埋或化学偶联将药物荷载于载体中,不仅可改善药物的溶解度,降低药物的毒性,还可通过尺寸效应等富集于淋巴组织,提高药物在淋巴系统中的分布。

## 2 淋巴靶向药物递送系统

纳米药物递送系统是一种以纳米技术为基础的新兴药物递送系统。纳米药物递送系统可增加药物的溶解度,提高药物的生物利用度,降低其不良反应,是提高药物成药性的重要手段之一<sup>[18-21]</sup>。已有多种抗肿瘤药物的纳米制剂用于肿瘤的临床治疗,如阿霉素聚乙二醇化脂质体制剂(Doxil)、紫杉醇白蛋白纳米制剂(Abraxane)等。近年来,基

于纳米载体的药物递送策略用于治疗肿瘤的淋巴转移受到越来越多的关注<sup>[22]</sup>。以间质给药为例,纳米载体借助尺寸效应,通过组织间隙中水通道,优先从间质中通过被动靶向作用进入淋巴管。纳米药物递送系统不仅可用于治疗某些淋巴相关的原发性肿瘤,如原发性淋巴瘤或白血病,也可用于治疗并发淋巴转移的其他肿瘤,如黑色素瘤、乳腺癌等。纳米载体辅助药物进入淋巴管并富集于淋巴结,对治疗肿瘤的淋巴转移有着较好的疗效。

## 2.1 影响淋巴吸收的因素

### 2.1.1 给药途径

药物可以通过口服、静脉、间质以及直接注射等给药方式进入淋巴系统。口服的药物和纳米载体都会首先通过肠上皮细胞,随后进入血管或淋巴管。在这一过程中,相比于小分子药物,纳米载体更易进入淋巴系统。Attili-Qadri等<sup>[23]</sup>研究发现口服给药后,与游离多西他赛相比,纳米载体显著提高多西他赛的生物利用度。这是由于纳米载体增加了多西他赛的淋巴转运,减少了首过效应。然而,纳米载体在胃肠中的稳定性及其在胃肠道黏膜上的渗透性会影响其进入淋巴系统的效率。静脉给药能够避免口服给药的首过效应,然而当药物进入血液中后,需要首先渗入组织间质中,随后才能被淋巴系统吸收,这一过程效率很低。间质给药是一种局部给药方式,包括肌肉、皮下、皮内给药。间质给药后,纳米载体富集于组织间质,由于淋巴内皮细胞间的间隙大、缺乏基底膜等特性,纳米载体更易进入淋巴管<sup>[24]</sup>。皮内具有更高的组织间隙压力和较高的淋巴流速,因此在这3种间质给药方式中,皮内给药后淋巴吸收效率最高<sup>[25]</sup>。此外,淋巴结内给药可将药物直接注射至淋巴系统,这种一步到位的方式虽然看似方便,但费时费力,技术难度较大。并且,由于淋巴结的体积很小,一次给药剂量非常有限,无法达到有效药物浓度,导致治疗效果不佳,而多次注射会损伤淋巴结,严重限制了淋巴结内给药方式的实际应用。

### 2.1.2 粒径大小

纳米粒的粒径大小极大影响其进入淋巴管及驻留于淋巴结的效率。间质给药后,小粒径( $<10\text{ nm}$ )的纳米粒更易进入血管,而大粒径( $10\sim 100\text{ nm}$ )的纳米粒由于尺寸限制不能进入血管,而更易进入淋巴管<sup>[26-27]</sup>。但是,粒径更大( $>100\text{ nm}$ )的纳米粒反而不易进入淋巴管,这是因

为间质中用来引流的通道直径为 $100\text{ nm}$ 左右,所以粒径大于 $100\text{ nm}$ 的纳米粒由于对流和扩散能力差会大量保留于注射部位,大多通过抗原递呈细胞摄取后随其一同进入淋巴管<sup>[28]</sup>。Rao等<sup>[29]</sup>合成了粒径分别为 $50$ 、 $100$ 、 $200\text{ nm}$ 的聚合物纳米粒,足垫给药 $6\text{ h}$ 后 $50\text{ nm}$ 的纳米粒在腠窝淋巴结处的聚集显著高于其他两种粒径的纳米粒,证明了粒径的大小极大程度地影响了纳米粒进入淋巴管的效率。纳米粒引流进淋巴管后到达淋巴结,粒径较大的纳米粒更易滞留于淋巴结。Zhang等<sup>[30]</sup>证明了淋巴结中小粒径的纳米粒( $5\sim 15\text{ nm}$ )易被滤泡树突状细胞清除,而大粒径的纳米粒( $50\sim 100\text{ nm}$ )可在淋巴结中保留5周以上,并且抗原递送效果比前者增加了175倍。此外,对于静脉给药的纳米粒,粒径大小也影响其在淋巴系统的富集。Cabral等<sup>[31]</sup>制备了载有(1,2-二氨基环己烷)铂(II)的 $30$ 和 $70\text{ nm}$ 聚合物胶束。静脉注射后, $30\text{ nm}$ 的胶束在发生转移的淋巴结中的蓄积量比 $70\text{ nm}$ 的更高,有效抑制了黑色素瘤的淋巴结转移,这是由于小粒径的胶束更容易从血管壁中渗透进入组织间质,随后进入淋巴管富集于淋巴结。

### 2.1.3 亲疏水性

纳米粒表面的亲水亲脂特性也影响其进入淋巴系统的效率。皮下给药后,具有亲水性表面的纳米粒易于通过组织间隙引流进入淋巴管。Moghimi等<sup>[32]</sup>证明了与mPEG 350脂质修饰的脂质体相比,用相对分子质量更大、链长更长、亲水性更强的mPEG 2000修饰的脂质体表现出更快更强的淋巴引流。纳米粒表面疏水性增强导致其不易从注射部位引流进入淋巴管,而更倾向于被组织间隙的抗原递呈细胞摄取后一同进入淋巴管<sup>[33]</sup>,这一淋巴转运过程速率较慢。

### 2.1.4 表面电荷

表面电荷对于纳米粒引流进入淋巴管也至关重要。组织间质中含大量负电性的糖胺聚糖,因此中性及带负电的纳米粒更易从间质引流入淋巴管,而带正电的粒子在间质中的保留增加,在皮下形成“储库”,粒子缓慢进入淋巴管或被间质中的抗原递呈细胞摄取后一同进入淋巴管。而在纳米粒进一步引流入淋巴结的过程中,表面电荷会对树突状细胞的摄取有一定影响,树突细胞更易于摄取正电性粒子<sup>[34]</sup>。

## 2.2 淋巴靶向药物递送系统

纳米载体从组织间隙进入淋巴管主要有3种

方式(图1):(1)旁细胞转运途径(被动靶向)——通过淋巴管内皮细胞间的间隙扩散进入淋巴管;(2)跨细胞转运途径(主动靶向)——经淋巴管内

皮细胞转胞吞作用进入淋巴管;(3)抗原递呈细胞介导的转运途径——被组织间质中的抗原递呈细胞(如树突状细胞)摄取后进入淋巴管<sup>[35]</sup>。

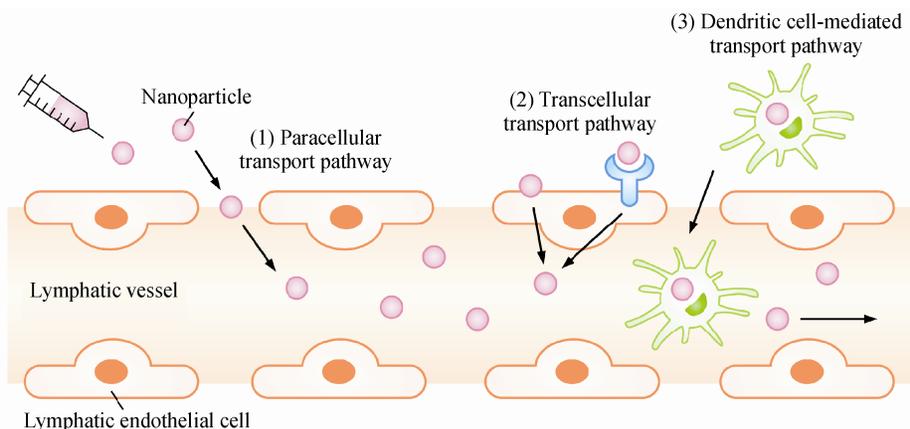


Figure 1 Main pathways of nanocarriers transporting into the lymphatic vessels

2.2.1 被动靶向药物递送系统 相较于血管,淋巴管的内皮细胞之间连接松散,并且基底膜不完整,管腔宽大,因而更易于渗透。基于旁细胞转运途径的被动靶向药物递送系统主要通过调节载体的尺寸及表面性质实现其在淋巴系统的富集。Chen等<sup>[36]</sup>在兔乳腺癌转移模型中评价了皮下、静脉或联合两种给药方式后阿霉素脂质体(约120 nm)的抗肿瘤转移作用。结果显示,静脉给药后,远处转移灶被显著抑制。皮下给药后,腋窝和纵隔淋巴结中的转移灶能得到更有效的抑制。当联合两种途径给药时,不仅可以治疗局部区域淋巴结转移,还对远处肺和肝中的转移灶有显著抑制作用,证明了脂质体能够有效递送药物至淋巴系统,采用联合给药方式能够更有效控制潜伏在局部和远端组织中的肿瘤转移。Doddapeneni等<sup>[37]</sup>制备了聚乙二醇-聚( $\epsilon$ -己内酯)纳米粒,共载了多西他赛、依维莫司、LY294002 3种药物。在接近肿瘤的部位皮下给药后,纳米粒优先进入淋巴系统,有效抑制黑色素瘤的淋巴转移,并显著降低了化疗药物的不良反应。Zhang等<sup>[38]</sup>将黑色素瘤相关的抗原肽(TRP2)和Toll样受体4激动剂(MPLA)共载于由聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)构筑的纳米粒中。肌内给药后发现纳米粒可靶向进入淋巴管,随后引流进入淋巴结,被其中的树突状细胞摄取后引起抗原特异性的T细胞应答,进一步抑制肿瘤进程。Kaminskas等<sup>[39]</sup>构建了聚乙二醇化聚-L-赖氨酸树形分子和非聚乙二醇化树形分子,皮下

给药后由于聚乙二醇化增大了树形分子的亲水性,因而相较于非聚乙二醇化树形分子,聚乙二醇化的树形分子从注射部位向淋巴管引流显著增加。Jiang等<sup>[40]</sup>构建了共载抗原OVA与佐剂CpG的氢氧化铝纳米粒(约90 nm)。皮下给药后,纳米粒不仅可靶向进入淋巴管,还能够被淋巴结内树突状细胞高效摄取,促进树突状细胞的成熟,显著提升IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 的分泌,诱导了CD8<sup>+</sup>T细胞反应,显著抑制了小鼠黑色素瘤的生长。Hong等<sup>[41]</sup>合成了3种不同孔径(12.9、10.3、7.8 nm)的包载OVA的介孔硅纳米粒(约80 nm)。皮下给药后,介孔硅纳米粒借助小粒径从给药部位进入淋巴管。介孔孔径的大小对介孔硅纳米粒的淋巴靶向效率、被树突状细胞的摄取效率以及促进其成熟等方面没有显著影响,但抗原递呈效率随着介孔孔径的增大而增强,导致机体产生细胞免疫应答的强度增强。

2.2.2 主动靶向药物递送系统 为了进一步增强纳米载体靶向淋巴递药的能力,主动靶向递药系统也得到了广泛的研究。主动靶向策略通常是指在纳米粒表面修饰配体,该配体能被组织或细胞上过表达的特异性受体识别并结合,促进纳米粒的内化和转运。

Lyp-1是一种含有9个氨基酸的环肽,可与肿瘤细胞及肿瘤相关淋巴管内皮细胞表面过度表达的P32受体发生特异性的结合,但正常的淋巴管内皮细胞不能与Lyp-1进行结合。因此,Lyp-1可作

为淋巴靶向药物递送系统的靶向配体<sup>[42]</sup>。Yan 等<sup>[43]</sup>合成了缀合 LyP-1 的负载阿霉素聚乙二醇化脂质体。体内近红外荧光成像和体外细胞摄取实验证明, LyP-1 的修饰增加了脂质体在发生转移的淋巴结中的富集, 但并未增加其在正常淋巴结中的富集。体内药效学实验结果显示, LyP-1 修饰脂质体对淋巴转移性肿瘤表现出更强的抑制作用。Luo 等<sup>[44]</sup>也证明了修饰 LyP-1 的纳米粒在转移淋巴结中的富集量是未修饰的 8 倍, 表明 LyP-1 具有高效的靶向肿瘤淋巴转移灶的能力。

乙酰肝素酶 (HPA) 主要参与细胞外基质 (ECM) 的重塑, 可降解 ECM 和血管壁中的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖, 从而促进内皮细胞和肿瘤细胞的迁移和侵袭, 其在高转移肿瘤中过表达<sup>[45-46]</sup>。Dafni 等<sup>[47]</sup>证明了 HPA 在转移的腭窝淋巴结中的表达显著增加, 而在原发性肿瘤中没有表达。低相对分子质量肝素是一种带负电荷、可生物降解的水溶性天然多糖, 可结合并抑制 HPA。Ye 等<sup>[48]</sup>合成了修饰低相对分子质量肝素的脂质体用于多西他赛的淋巴靶向递送, 考察了其在人源宫颈癌 HeLa 细胞的淋巴结转移小鼠模型中皮下注射后的靶向效果, 结果表明: 与未修饰的多西他赛脂质体相比, 皮下注射低相对分子质量肝素修饰的脂质体在转移性淋巴结中的蓄积量显著提高, 靶向效率约为前者的 2.83 倍, 证明了低相对分子质量肝素的修饰可提高纳米载体对转移淋巴结的靶向能力。

Yang 等<sup>[49]</sup>发现 TMTP1 肽可特异性结合多种高转移性肿瘤细胞, 包括前列腺癌 PC-3M-1E8 细胞、肺巨细胞癌 PG-BE1 细胞、乳腺癌 MDA-MB-435S 细胞、胃癌 MKN-45sci 细胞, 但不结合非转移性肿瘤细胞, 如前列腺癌 PC-3M-2B4 细胞、肺巨细胞癌 PG-LH7 细胞、乳腺癌 MCF-7 细胞。Wei 等<sup>[50]</sup>合成了修饰和未修饰 TMTP1 的吡啶菁绿聚合物胶束, 考察了其在人源宫颈癌 HeLa 细胞的淋巴结转移小鼠模型中的靶向效果, 结果表明皮下给药 30 min 后, 前者在腭窝淋巴结中浓度为后者的 4.21 倍。

组织间质中的高密度脂蛋白 (HDL) 主要通过淋巴管进入血液循环。Lim 等<sup>[51]</sup>研究发现, 在小鼠后足垫皮下注射 DiI 荧光标记的 HDL 后, 大量的 HDL 被内化进入淋巴管, 这一过程是由淋巴管内

皮表达的清道夫受体介导的主动转运, 证明了 HDL 是一种体内天然的淋巴靶向的配体, 可用于构建淋巴靶向药物递送系统<sup>[52-53]</sup>。Kuai 等<sup>[53]</sup>应用 DMPC 脂质和载脂蛋白 A1 模拟肽合成了 HDL 纳米盘, 皮下给药后 HDL 纳米盘显著提高了负载的抗原和佐剂在淋巴结的蓄积与滞留, 并且产生的特异性细胞毒 T 淋巴细胞反应比可溶性疫苗高近 47 倍。

2.2.3 靶向抗原递呈细胞的药物递送系统 树突状细胞具有摄取和递呈抗原, 活化和扩增幼稚、记忆性 T 细胞, 从而诱导机体产生强大的免疫反应的能力, 是体内重要的免疫细胞<sup>[54]</sup>。淋巴结内有大量成熟与未成熟的树突状细胞。当纳米粒被树突状细胞摄取后, 可随树突状细胞进入淋巴管, 刺激机体产生特异性免疫反应, 对抗转移性肿瘤。研究报告, CD11c、Dec205、CD40、MUC-1、DC-SIGN、Dectin-1、甘露糖等都可与树突状细胞发生特异性结合<sup>[55-57]</sup>, 可作为靶向树突状细胞的配体。Zhang 等<sup>[58]</sup>合成了可靶向树突状细胞的纳米粒。该纳米粒由 4 部分组成: (1) 两亲性聚合物自组装成纳米粒核心用于包封疏水性的 Toll 样受体 7/8 激动剂咪喹莫特; (2) 核心外层包被了阳离子脂质层, 其中负载了 Toll 样受体 4 激动剂 MPLA; (3) 静电吸附阴离子抗原 OVA; (4) 脂质层上连接了靶向树突状细胞的配体——甘露糖。实验结果表明, 皮下注射修饰和未修饰甘露糖的纳米粒后, 树突状细胞对前者的摄取是后者的 2~3 倍。修饰甘露糖的纳米粒能够更有效地促进树突状细胞成熟、淋巴细胞活化、抗原交叉呈递、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞反应, 从而产生更多的记忆 T 细胞、抗体和干扰素  $\gamma$ , 显著抑制肿瘤生长及转移。Wang 等<sup>[59]</sup>合成了两种递送抗原的载体, 一种是将抗原封装于阳离子脂质体中, 另一种是在上述载体表面修饰了甘露糖。皮下注射后体内荧光成像显示前者注射后 4 h 在引流淋巴结中聚集, 后者在注射后 30 min 就在引流淋巴结中聚集, 并且注射后 4~96 h 后者在淋巴结中聚集量显著比前者高, 这是由于前者带正电大部分聚集在注射部位, 而后者被树突状细胞摄取后可以有效地从注射部位引流进入淋巴结, 并且在给药 3 个月后仍然可以持续的产生抗体, 引起免疫应答。

### 3 总结和展望

淋巴系统是肿瘤转移的重要途径,肿瘤细胞随淋巴管引流进入前哨淋巴结,在此处不断增殖并形成微转移灶,一旦淋巴结被“填满”,肿瘤细胞会扩散到下一个淋巴结,由此形成多个转移灶,扩散至全身,治疗难度大。传统的化疗药物由于无法在淋巴系统中达到有效治疗浓度,对肿瘤的淋巴转移收效甚微。淋巴靶向药物递送系统可以辅助药物进入淋巴管并富集于淋巴结,提高了药物在淋巴系统中的浓度,对治疗肿瘤的淋巴转移有着较好的疗效。但是,淋巴靶向药物递送系统仍存在一些问题和挑战。通过调节载体的尺寸及表面性质可实现其在淋巴系统的富集,然而载体的尺寸的设计是一把“双刃剑”,小粒径纳米粒更易于从注射部位引流进入淋巴管,而大粒径纳米粒更易于滞留于淋巴结。同样,负电荷纳米粒易于从注射部位引流进入淋巴管,而正电荷纳米粒更易被淋巴结内树突状细胞摄取。对于基于配体-受体介导的主动靶向药物递送系统,目前已发现的淋巴管内皮细胞表达的受体不多,并且部分与血管内皮细胞上的受体有重合。靶向抗原递呈细胞的药物递送系统主要是由树突状细胞表面受体与配体相互作用介导的,然而树突状细胞表面有很多受体,选择靶向不同受体是否会对树突状细胞的摄取效率产生影响也需深入研究。

#### 参考文献

- [1] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms [J]. *Cell*, 2011, **147** (2): 275-292.
- [2] Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework [J]. *Cell*, 2006, **127** (4): 679-695.
- [3] Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, **2** (8): 563-572.
- [4] Li MR, Li T, Mo R. Recent progress in targeted drug delivery nanosystems for pancreatic cancer treatment [J]. *APSB*, 2018, **53** (7): 1090-1099.
- [5] Wong SY, Hynes RO. Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? [J]. *Cell Cycle*, 2006, **5** (8): 812-817.
- [6] Cote B, Rao D, Alany RG, et al. Lymphatic changes in cancer and drug delivery to the lymphatics in solid tumors [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2019, **144**: 16-34.
- [7] Ryan TJ. Structure and function of lymphatics [J]. *J Invest Dermatol*, 1989, **93** (2 Suppl): 18s-24s.
- [8] Card CM, Yu SS, Swartz MA. Emerging roles of lymphatic endothelium in regulating adaptive immunity [J]. *J Clin Invest*, 2014, **124** (3): 943-952.
- [9] Swartz MA. The physiology of the lymphatic system [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **50** (1): 3-20.
- [10] Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, et al. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes [J]. *Oncogene*, 2007, **26** (32): 4679-4688.
- [11] Müller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2001, **410** (6824): 50-56.
- [12] Kawada K, Sonoshita M, Sakashita H, et al. Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes [J]. *Cancer Res*, 2004, **64** (11): 4010-4017.
- [13] Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread [J]. *FASEB J*, 2002, **16** (9): 922-934.
- [14] White RR, Stanley WE, Johnson JL, et al. Long-term survival in 2,505 patients with melanoma with regional lymph node metastasis [J]. *Ann Surg*, 2002, **235** (6): 879-887.
- [15] Fife K, Thompson JF. Lymph-node metastases in patients with melanoma: what is the optimum management? [J]. *Lancet Oncol*, 2001, **2** (10): 614-621.
- [16] Ryan GM, Kaminskas LM, Bulitta JB, et al. PEGylated polylysine dendrimers increase lymphatic exposure to doxorubicin when compared to PEGylated liposomal and solution formulations of doxorubicin [J]. *J Control Release*, 2013, **172** (1): 128-136.
- [17] Trevasakis NL, Charman WN, Porter CJ. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: a mechanistic update [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, **60** (6): 702-716.
- [18] Shao K, Singha S, Clemente-Casares X, et al. Nanoparticle-based immunotherapy for cancer [J]. *ACS Nano*, 2015, **9** (1): 16-30.
- [19] Cho K, Wang X, Nie SM, et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, **14** (5): 1310-1316.
- [20] Wang MY, Li T, Jiang SG, et al. Recent advances in liposome-based co-delivery systems for combination cancer therapy [J]. *Chin J Bioprocess Engineer* (生物加工过程), 2018, **16** (5): 33-41.
- [21] Chen X, Kang Y, Wu J, et al. Advances in biodegradable functional polymers based protein drug delivery system [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2017, **48** (2): 142-149.
- [22] Abellan-Pose R, Csaba N, Alonso MJ. Lymphatic targeting of nanosystems for anticancer drug therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, **22** (9): 1194-1209.
- [23] Attili-Qadri S, Karra N, Nemirovski A, et al. Oral delivery sys-

- tem prolongs blood circulation of docetaxel nanocapsules via lymphatic absorption[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110** (43):17498–17503.
- [24] Chen JH, Wang L, Yao Q, *et al.* Drug concentrations in axillary lymph nodes after lymphatic chemotherapy on patients with breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2004, **6** (4) : 474–477.
- [25] Harvey AJ, Kaestner SA, Sutter DE, *et al.* Microneedle-based intradermal delivery enables rapid lymphatic uptake and distribution of protein drugs[J]. *Pharm Res*, 2011, **28**(1): 107–116.
- [26] Oussoren C, Velinova M, Scherphof G, *et al.* Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. IV. Fate of liposomes in regional lymph nodes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1370**(2):259–272.
- [27] Thomas SN, Schudel A. Overcoming transport barriers for interstitial-, lymphatic-, and lymph node-targeted drug delivery [J]. *Curr Opin Chem Eng*, 2015, **7**:65–74.
- [28] Ryan GM, Kaminskas LM, Porter CJ. Nano-chemotherapeutics; maximising lymphatic drug exposure to improve the treatment of lymph-metastatic cancers[J]. *J Control Release*, 2014, **193**:241–256.
- [29] Rao DA, Forrest ML, Alani AW, *et al.* Biodegradable PLGA based nanoparticles for sustained regional lymphatic drug delivery[J]. *J Pharm Sci*, 2010, **99** (4):2018–2031.
- [30] Zhang YN, Lazarovits J, Poon W, *et al.* Nanoparticle size influences antigen retention and presentation in lymph node follicles for humoral immunity[J]. *Nano Lett*, 2019, **19**(10) :7226–7235.
- [31] Cabral H, Makino J, Matsumoto Y, *et al.* Systemic targeting of lymph node metastasis through the blood vascular system by using size-controlled nanocarriers[J]. *ACS Nano*, 2015, **9**(5) : 4957–4967.
- [32] Moghimi SM. The effect of methoxy-PEG chain length and molecular architecture on lymph node targeting of immunopEG liposomes[J]. *Biomaterials*, 2006, **27**(1): 136–144.
- [33] Hawley AE, Davis SS, Illum L. Targeting of colloids to lymph nodes: influence of lymphatic physiology and colloidal characteristics[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995, **17**(1):129–148.
- [34] Zeng Q, Jiang H, Wang T, *et al.* Cationic micelle delivery of Trp2 peptide for efficient lymphatic draining and enhanced cytotoxic T-lymphocyte responses[J]. *J Control Release*, 2015, **200**:1–12.
- [35] Trevaskis NL, Kaminskas LM, Porter CJ. From sewer to savour - targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2015, **14**(11):781–803.
- [36] Chen JH, Ling R, Yao Q, *et al.* Effect of small-sized liposomal adriamycin administered by various routes on a metastatic breast cancer model [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2005, **12**(1) : 93–100.
- [37] Doddapaneni BS, Kyryachenko S, Chagani SE, *et al.* A three-drug nanoscale drug delivery system designed for preferential lymphatic uptake for the treatment of metastatic melanoma[J]. *J Control Release*, 2015, **220**(Pt A):503–514.
- [38] Zhang ZP, Tongchusak S, Mizukami Y, *et al.* Induction of anti-tumor cytotoxic T cell responses through PLGA-nanoparticle mediated antigen delivery [J]. *Biomaterials*, 2011, **32** (14) : 3666–3678.
- [39] Kaminskas LM, Kota J, McLeod VM, *et al.* PEGylation of polylysine dendrimers improves absorption and lymphatic targeting following SC administration in rats[J]. *J Control Release*, 2009, **140**(2):108–116.
- [40] Jiang H, Wang Q, Li L, *et al.* Turning the old adjuvant from gel to nanoparticles to amplify CD8<sup>+</sup> T cell responses [J]. *Adv Sci*, 2017, **5**(1):1700426.doi:10.1002/adv.201700426.
- [41] Hong XY, Zhong XF, Du GS, *et al.* The pore size of mesoporous silica nanoparticles regulates their antigen delivery efficiency [J]. *Sci Adv*, 2020, **6**(25): eaaz4462.
- [42] Laakkonen P, Porkka K, Hoffman JA, *et al.* A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels [J]. *Nat Med*, 2002, **8**(7):751–755.
- [43] Yan ZQ, Wang F, Wen ZY, *et al.* LyP-1-conjugated PEGylated liposomes: a carrier system for targeted therapy of lymphatic metastatic tumor [J]. *J Control Release*, 2012, **157** (1) : 118–125.
- [44] Luo GP, Yu XJ, Jin C, *et al.* LyP-1-conjugated nanoparticles for targeting drug delivery to lymphatic metastatic tumors [J]. *Int J Pharm*, 2010, **385**(1/2): 150–156.
- [45] Jin L, Nakajima M, Nicolson GL. Immunochemical localization of heparanase in mouse and human melanomas [J]. *Int J Cancer*, 1990, **45**(6):1088–1095.
- [46] Parish CR, Freeman C, Hulett MD. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1471**(3):99–108.
- [47] Dafni H, Cohen B, Ziv K, *et al.* The role of heparanase in lymph node metastatic dissemination: dynamic contrast-enhanced MRI of Eb lymphoma in mice [J]. *Neoplasia*, 2005, **7** (3):224–233.
- [48] Ye TT, Jiang XW, Li J, *et al.* Low molecular weight heparin mediating targeting of lymph node metastasis based on nanoliposome and enzyme-substrate interaction [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, **122**:26–38.
- [49] Yang WH, Luo DF, Wang SX, *et al.* TMTP1, a novel tumor-homing peptide specifically targeting metastasis [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(17):5494–5502.
- [50] Wei R, Jiang GY, Lv MQ, *et al.* TMTP1-modified indocyanine green-loaded polymeric micelles for targeted imaging of cervical cancer and metastasis sentinel lymph node *in vivo* [J]. *Theranostics*, 2019, **9**(24):7325–7344.
- [51] Lim HY, Thiam CH, Yeo KP, *et al.* Lymphatic vessels are essential for the removal of cholesterol from peripheral tissues

- by SR-BI-mediated transport of HDL[J]. *Cell Metab*, 2013, **17** (5):671-684.
- [52] Kuai R, Sun XQ, Yuan WM, *et al.* Subcutaneous nanodisc vaccination with neoantigens for combination cancer immunotherapy[J]. *Bioconjugate Chem*, 2018, **29**(3):771-775.
- [53] Kuai R, Ochyl LJ, Bahjat KS, *et al.* Designer vaccine nanodiscs for personalized cancer immunotherapy [J]. *Nat Mater*, 2017, **16**(4):489-496.
- [54] Caminschi I, Maraskovsky E, Heath WR. Targeting dendritic cells *in vivo* for cancer therapy[J]. *Front Immunol*, 2012, **3**:13.
- [55] Tacke PJ, de Vries IJM, Torensma R, *et al.* Dendritic-cell immunotherapy: from *ex vivo* loading to *in vivo* targeting [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, **7**(10):790-802.
- [56] Reddy ST, Swartz MA, Hubbell JA. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines [J]. *Trends in Immunology*, 2006, **27**(12):573-579.
- [57] Huang SQ, Shi M, He YN, *et al.* Construction and *in vitro* evaluation of DC-targeted aptamer-modified *Pseudomonas aeruginosa* DNA vaccine delivery system [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2019, **50**(6):743-752.
- [58] Zhang LH, Wu SJ, Qin Y, *et al.* Targeted codelivery of an antigen and dual agonists by hybrid nanoparticles for enhanced cancer immunotherapy [J]. *Nano Lett*, 2019, **19** (7) : 4237-4249.
- [59] Wang C, Liu P, Zhuang Y, *et al.* Lymphatic-targeted cationic liposomes: a robust vaccine adjuvant for promoting long-term immunological memory [J]. *Vaccine*, 2014, **32** (42) : 5475-5483.

## ·校园信息·

### 奚涛课题组在 *Journal of Hematology & Oncology* 发表最新研究成果

近日,我校生命科学与技术学院奚涛教授、郑禄枫副研究员团队在 *Journal of Hematology & Oncology* (IF 11.05)上发表了题为“Emerging agents that target signaling pathways in cancer stem cells”的文章(全文链接:<https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-020-00901-6>)。肿瘤干细胞已被证实是肿瘤发生、复发、转移和耐药的原因之一,然而,在临床应用中仍然没有靶向肿瘤干细胞的药物。小分子药物的结构表现出良好的空间分散性,其化学性质决定了它具有良好的成药性且小分子药物在药物开发中表现出巨大的优势,在市场上日益流行。信号通路比如 Wnt, Hedgehog, Notch, Hippo, 自噬和铁死亡在肿瘤干细胞发生发展中发挥着关键的作用,靶向这些信号通路可抑制肿瘤干细胞的发生发展。本篇文章主要阐述了靶向上述信号通路且可抑制肿瘤干细胞发生发展的小分子化合物,并重点介绍了一些临床在用或者在研的药物,为开发靶向肿瘤干细胞的药物提供了思路和理论依据。研究生杨月为本文第一作者,奚涛教授和郑禄枫副研究员为本文通讯作者。

(来源:科学技术处)

## 蛋白及多肽类药物长效化制剂学技术研究进展

丁源<sup>1</sup>, 陈新<sup>2</sup>, 涂家生<sup>1\*</sup>, 孙春萌<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学药用辅料及仿创药物研发评价中心, 南京 210009; <sup>2</sup>国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100022)

**摘要** 蛋白及多肽类药物近年来越来越多地应用到疾病的预防、诊断和治疗之中, 然而, 蛋白及多肽类药物通常需要注射给药且缺乏长效剂型, 给需要长期用药的慢性病患者带来困扰。本文综述了通过制剂学手段对蛋白及多肽类药物进行长效化改造的策略, 包括缓释注射剂、植入剂、口服制剂以及经皮给药系统, 并总结其缓释机制、研究进展和优缺点, 以期为此类药物的剂型改良提供研究思路及理论参考。

**关键词** 蛋白及多肽类药物; 长效化; 缓控释; 剂型改良; 进展

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0433-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200407

引用本文 丁源, 陈新, 涂家生, 等. 蛋白及多肽类药物长效化制剂学技术研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 433 - 440.

Cite this article as: DING Yuan, CHEN Xin, TU Jiasheng, *et al.* Progress in technology of long-acting preparations of protein and peptide drugs[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(4): 433 - 440.

### Progress in technology of long-acting preparations of protein and peptide drugs

DING Yuan<sup>1</sup>, CHEN Xin<sup>2</sup>, TU Jiasheng<sup>1\*</sup>, SUN Chunmeng<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Center for Research, Development and Evaluation for Pharmaceutical Excipients and Generic Drugs, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; <sup>2</sup>Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China

**Abstract** As one of the most important biological drugs, protein and peptide drugs have been increasingly used in the prevention, diagnosis and treatment of diseases in recent years. However, most of them need to be injected and lack of long-acting formulations, which brings many troubles to patients suffering from chronic diseases. In this review, we summarized the strategies for engineering long-acting formulations for proteins and peptides via preparation means, including extended-release injection, implant, oral preparations and transdermal drug delivery systems, and analyzed their release mechanisms, research advances, advantages and shortcomings, thereby providing potential approaches for promoting the formulation improvement of these drugs.

**Key words** protein and peptide drugs; long-acting performance; extended- and controlled-release; formulation improvement; advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81972894, No. 81673364), the Chinese Pharmacopoeia Commission "Reform of the Review and Approval System for Drugs and Medical Devices" Project (No. ZG2017-5-03) and the National Science and Technology Major Project for Drug Innovation (No. 2017ZX09101001006)

蛋白及多肽类药物通常具有特定的三维结构和作用位点, 从而能够在体内发挥特异性的治疗作用, 与传统药物相比有更好的临床有效性和安全性。然而, 此类药物大多存在稳定性差、给药剂

收稿日期 2019-11-09 通信作者 \*Tel: 025-83271305 E-mail: jiashengtu@aliyun.com

\*\*Tel: 025-83271305 E-mail: suncm\_cpu@hotmail.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81972894, No. 81673364); 国家药典委员会“药品医疗器械审评审批制度改革专项课题”(No. ZG2017-5-03); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No. 2017ZX09101001006)

量小、体内半衰期短、生物利用度低等问题,尤其是治疗慢性疾病的蛋白及多肽类药物往往需要长期、频繁注射,不仅顺应性低,还可能导致其他不良反应的产生<sup>[1]</sup>。例如,采用贝伐珠单抗(bevacizumab)治疗年龄相关性黄斑病变需要频繁进行玻璃体内注射,易于诱发白内障、视网膜出血和脱离等并发症<sup>[2]</sup>。为延长蛋白及多肽药物的体内半衰期,研究人员通常采用融合长效化片段(与Fc融合<sup>[3-4]</sup>、与人血清白蛋白融合<sup>[5]</sup>)、PEG修饰、缀合脂

肪酸链<sup>[6]</sup>、环化或氨基酸替代<sup>[7]</sup>等策略,并已有多款药物成功上市。除对蛋白质及多肽进行分子改造外,还可通过制剂学手段改善蛋白及多肽类药物的吸收并使其长效化,能够有效缩短药品研发周期、降低药品研发成本。通过制剂学手段对蛋白及多肽类药物进行长效化改造的策略将被着重介绍,以期为促进此类药物的剂型改良提供研究思路。

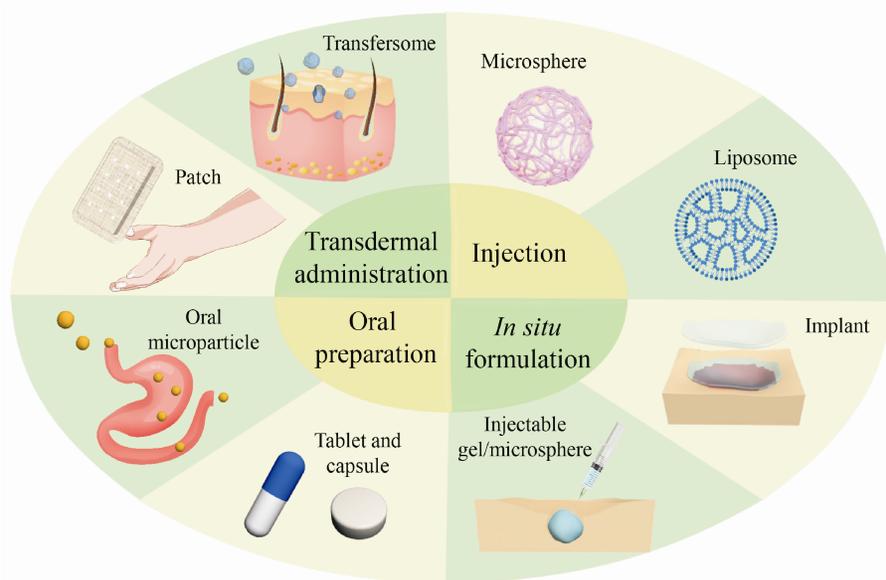


Figure 1 Graphical tablet of major strategies for preparation of long-acting formulations containing proteins and peptides

## 1 注射剂

### 1.1 注射用微球

微球一般通过皮下或肌肉注射给药,并随着载体的缓慢溶蚀而持续释放药物。艾塞那肽是由美国FDA批准的第1个胰高血糖素样肽-1(GLP-1)受体激动剂类多肽药物,用于改善2型糖尿病患者的血糖控制,其普通剂型(商品名Byetta<sup>®</sup>)需每天两次进行皮下注射;随后,Amylin制药公司以聚乳酸-羟基乙酸共聚物[Poly(D, L-lactic-co-glycolic acid), PLGA]为载体,成功开发了每周仅需注射1次的艾塞那肽缓释微球(商品名Bydureon<sup>®</sup>),并于2011年和2012年先后获得欧盟和美国FDA批准<sup>[8]</sup>。注射用微球的上市制剂还包括:注射用醋酸奥曲肽微球(商品名Sandostatin<sup>®</sup> LAR)、注射用帕瑞肽微球(商品名Signifor<sup>®</sup> LAR)、醋酸亮丙瑞林缓释微球(商品名Lupron Depot<sup>®</sup>)等。

随着PLGA的广泛应用,研究人员已可以采用多种手段调控PLGA微球释放速率。首先,可在微球中加入致孔剂,主要包括无机盐类(如 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ <sup>[9]</sup>、 $\text{MgCO}_3$ <sup>[10]</sup>)、非离子表面活性剂类(如Poloxamer188、Tween20<sup>[11]</sup>)以及其他致孔剂(如 $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>[12]</sup>)。例如,以 $\text{NaHCO}_3$ 为致孔剂制备载有神经调节蛋白-1(neuregulin-1, Nrg-1)的PLGA微球,可通过调节 $\text{NaHCO}_3$ 浓度实现不同的药物释放速率<sup>[9]</sup>。而对于非离子表面活性剂,其亲水-疏水平衡(hydrophile-lipophile balance, HLB)值越高,药物释放越快,例如,以等量Poloxamer188(HLB值29)、Tween20(HLB值16.7)或Span80(HLB值4.3)为致孔剂制备胰岛素PLGA微球,释药速率依次降低<sup>[11]</sup>。PLGA微球的粒径对药物的释放速率有多方面的影响<sup>[13]</sup>,随着粒径增大,PLGA微球的自催化降解常数增大,将加速药物释放;但大尺寸也意

味着总表面积减小、药物扩散路径变长,将减缓药物释放,因此应综合考虑选择最佳的微球粒径。再者,PLGA的性质也影响药物释放,例如相对分子质量更小<sup>[14]</sup>、丙交酯比例更低<sup>[15]</sup>的PLGA降解速度和释药速度更快;又例如亲水的PLGA RG 502 H相比于疏水的PLGA RG 503,可以加速药物释放<sup>[10]</sup>。

然而,PLGA微球常常会在给药初期产生显著的突释现象,这可能是由于微球表面存在吸附药物或药物在微球中分布不均<sup>[16]</sup>。研究人员尝试将聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)和葡萄糖敏感的高分子材料p(AAPBA-co-NVCL)交替涂覆在胰岛素PLGA微球表面,不仅解决了突释问题,还实现了葡萄糖浓度响应性释放<sup>[17]</sup>。

除PLGA,其他常见的缓释微球用材料还包括聚乳酸(PLA)、壳聚糖(chitosan, CS)等。例如,采用PLA制备的Lupron Depot<sup>®</sup>可用于治疗晚期前列腺癌<sup>[18]</sup>。CS具有正电性和组织黏附性,并且是

一种天然免疫佐剂,因此用壳聚糖微球包载抗原肽<sup>[19]</sup>可以诱导机体产生长时间有效的免疫反应。

## 1.2 缓释脂质体

在蛋白及多肽类药物缓释脂质体的开发中,采用DepoFoam<sup>®</sup>技术制备的药物递送系统可用于腔内注射(包括鞘内、心室内、玻璃体和硬膜外注射),并帮助药物在近30 d的时间内缓慢释放,这一技术促成了Depocyt<sup>®</sup>、DepoDur<sup>®</sup>及Exparel<sup>®</sup>等长效缓释注射剂的上市<sup>[20-21]</sup>。如图2所示,不同于单层脂质体(unilamellar vesicles, ULVs)和多层脂质体(multilamellar vesicles, MLVs),DepoFoam<sup>®</sup>技术通过双乳化工艺制备的脂质体为多室脂质体(multivesicular liposome, MVLs),呈现紧密堆积的非同心圆囊泡结构,其缓释机制主要是内部囊泡的聚集融合和药物从紧密堆积结构中缓慢渗透<sup>[21]</sup>。同时,通过调整MVLs处方或制备工艺(如甘油三酯类型、内外溶液渗透压),可实现对药物释放速率的调节。

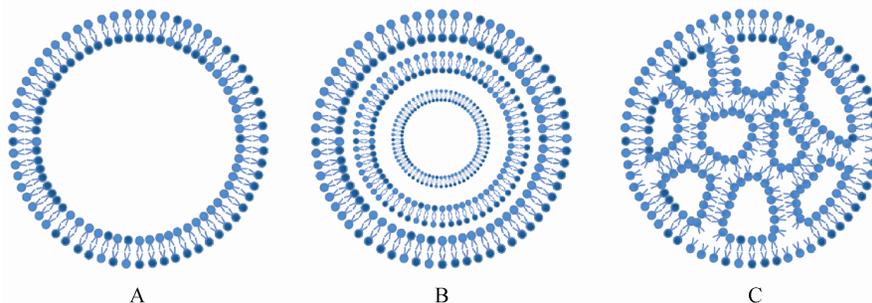


Figure 2 Structures of different kinds of liposomes

A: Unilamellar vesicle (ULV); B: Multilamellar vesicle (MLV); C: Multivesicular liposome (MVL) or DepoFoam<sup>®</sup> particle

## 2 原位制剂

### 2.1 植入剂

植入剂临床使用时需要通过手术将其埋入组织或非手术形式塞入腔道内,相比于微粒形式的储库往往具有更长的释放周期。已上市的蛋白及多肽药物的植入剂包括:组胺瑞林长效植入剂(商品名Vantas<sup>®</sup>)、醋酸戈舍瑞林缓释植入剂(商品名Zoladex<sup>®</sup>)等。临床试验表明,在中枢性早熟儿童体内植入50 mg剂量的Vantas<sup>®</sup>,可在两年内发挥有效治疗作用<sup>[22]</sup>。用于肿瘤治疗的Zoladex<sup>®</sup>是以PLGA为基质的乳白色植入棒,药效持续时间可达1个月<sup>[23]</sup>。

在植入剂的研究中,如何提高载药量、减少药物突释、延长药物作用时间是研究人员关注的重点。多数植入剂具有先快后慢的释药特点,导致植入早期存在发生不良反应的风险,而末期难以维持有效治疗剂量。针对这一问题,有研究人员通过氢键作用交替涂覆PEG化的鲑鱼降钙素和单宁酸形成植入膜,这种夹心膜结构能够在多种条件下实现零级释放<sup>[24]</sup>。

植入剂与人工智能的结合可实现更加精准的药物控释能力。为研究不同药物对动物行为能力的影响,研究人员通过电路设计和材料筛选开发了四通道、光流控、可编程的脑部植入型探针,可在不限制动物行为的情况下,通过遥控精确控制

不同药物的脑部泵注<sup>[25]</sup>。2012年,此类无线遥控的药物智能储库首次用于人体,研究表明,通过编程无线控制人甲状旁腺素(1-34)在体内的脉冲释放,可以维持长达20 d的有效剂量<sup>[26]</sup>。

## 2.2 可相变供注射用缓释制剂

此类制剂可通过液体或半固体形式注射,并在注射处发生相转变形成固态植入物<sup>[1]</sup>,相转变可通过物理因素触发(如溶剂和温度变化等),也可通过化学交联形成固体。供注射用缓释制剂具有创口小、不易感染、患者顺应性好、缓释时间长等优点。

### 2.2.1 溶剂变化触发的制剂固化

此类制剂注射前通常应为具有良好通针性的前体溶液(即将蛋白/多肽、水不溶型载体材料和处方中的其他辅料溶解于可与水混溶的有机溶剂中),原位注射后,有机溶剂扩散和/或被水替代,导致载体材料聚集/固化将蛋白或多肽包裹其中<sup>[27]</sup>。常使用的溶剂包括N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基亚砜(DMSO)、乙醇、乙酸乙酯、三乙酸甘油酯等;常使用的高分子包括PLGA、PLA、聚乙醇酸(PGA)、聚己内酯(PCL)、磷脂/甘油酯组合物等<sup>[1]</sup>。溶剂极性、聚合物的亲水亲油性及相对分子质量均显著影响蛋白或多肽的释放。例如,高极性溶剂形成的植入物孔隙多,可能造成突释;而极性较低的溶剂则相反,易于实现药物的长期平稳释放<sup>[28]</sup>。但由于此类制剂前体溶液中使用的有机溶剂(其中DMSO与NMP最为常见)往往具有一定毒性,因此

在制剂开发时应充分考虑安全性和收益风险比。研究人员以LR12肽为药物、PLGA和PLA为载体、三乙酸甘油酯为溶剂制备了前体溶液,该缓释体系不仅可在体内维持一周以上的持续释放,还可以避免LR12因二硫键交联而产生无活性二聚体<sup>[27]</sup>。

本课题组以乙醇为溶剂、二油酸甘油酯和磷脂为基质制备了可相变脂质凝胶,实现抗PD-L1抗体( $\alpha$ PD-L1)和近红外光热剂IR820的肿瘤原位共递送<sup>[29]</sup>,通过人工光热干预和自然溶蚀,实现长达1个月的药物持续释放,并在多种动物模型表现出良好的抗肿瘤活性<sup>[29]</sup>。

### 2.2.2 温度变化触发的制剂固化

此类制剂的开发基于聚合物溶解度的温敏特性,即一定浓度的聚合物达到特定温度后可发生“溶胶-凝胶(sol-gel)”相转变,而相变温度受聚合物HLB值和混合自由能影响<sup>[30]</sup>。此类制剂的“sol-gel”相转变通常具有可逆性,原理如图3所示,经典的温敏型聚合物具有亲疏水相间的三嵌段结构,当环境温度升高至下临界胶凝温度(lower critical gelation temperature, LCGT),水-聚合物间的相互作用逐渐弱于聚合物-聚合物间的相互作用,从而导致聚合物自发形成混合胶束,发生胶凝化。当温度继续升高到达上临界胶凝温度(upper critical gelation temperature, UCGT)时,聚合物链具有很高的动能,从而变为随机运动,恢复为溶胶态<sup>[31]</sup>。

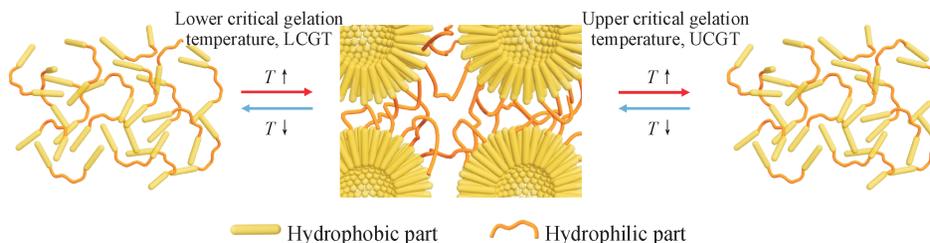


Figure 3 Typical mechanism of thermo-sensitive gelation

泊洛沙姆(poloxamer)是最经典的温敏聚合物,其具有聚氧乙烯-聚氧丙烯-聚氧乙烯(PEO-PPO-PEO)三嵌段结构。然而,泊洛沙姆亲水性强且机械强度较低,在给药初期易发生突释,并且生物相容性较差,易导致蓄积毒性<sup>[32]</sup>。为解决以上问题,研究人员设计了一种可生物降解的新型温敏聚合物PLGA-PEG-PLGA,并通过筛选合适的相

对分子质量和嵌段比使制剂具有理想缓释行为,例如,使用PLGA-PEG1500-PLGA(相对分子质量:5 200)为载体可使鲑鱼降钙素在体内持续稳定释放约30 d<sup>[33]</sup>。

此外,PBLA-PEG-PBLA<sup>[34]</sup>、PEG-PCL-PEG<sup>[35]</sup>、PEG-PLGA-PEG<sup>[36]</sup>、PEG-PCL-PLA-PCL-PEG<sup>[37]</sup>等聚合物在制备温敏缓释制剂中均有应用。

2.2.3 化学交联触发的制剂固化 此类制剂通过化学键合使聚合物交联,从而在注射部位固化。由于化学键合方式灵活多样,因而可根据需求设计响应特定环境的制剂。例如,Wang等<sup>[38]</sup>将ROS敏感链TSPBA与混有抗PD-L1抗体和吉西他滨的PVA溶液同时注射,利用TSPBA将PVA交联形成ROS敏感的凝胶系统,在肿瘤部位可持续3 d释放抗体。此外,利用不同化学键形成混合交联网络<sup>[39]</sup>、形成席夫碱<sup>[40]</sup>、光触发反应<sup>[41]</sup>等技术进行可相变凝胶的制备均有相关研究报道。

### 3 口服长效制剂

蛋白及多肽类药物的口服吸收需要克服低pH环境、酶水解、肠黏膜屏障、首过效应等诸多不利因素,因此,开发蛋白及多肽类药物的口服剂型(尤其是长效缓释剂型)存在较大困难,但长期

以来科研人员仍持续努力,口服长效制剂一直是热点研究方向。

#### 3.1 口服长效片剂/胶囊剂

口服制剂实现长效缓释作用,需要延长其在消化道中的停留时间并避免药物被降解。受到皮肤贴剂的启发,研究人员开发了一类肠黏附药物储库,其作用机制见图4<sup>[42]</sup>。首先制备含药的肠黏附片,并在其一侧进行水不溶性包衣,其到达肠道后,未包衣处的黏附层吸水并通过氢键等作用力与肠黏膜结合,而水不溶的包衣层对肠道中多种蛋白酶有物理隔离作用,防止药物降解。例如,采用卡波普、果胶、羧甲基纤维素钠物理混合物为肠黏附片基质,在单侧包裹乙基纤维素背衬层,可使鲑鱼降钙素的口服吸收显著提高<sup>[43]</sup>。类似的结构还被用来口服递送胰岛素和艾塞那肽<sup>[43-44]</sup>,均能有效增加药物的口服生物利用度。

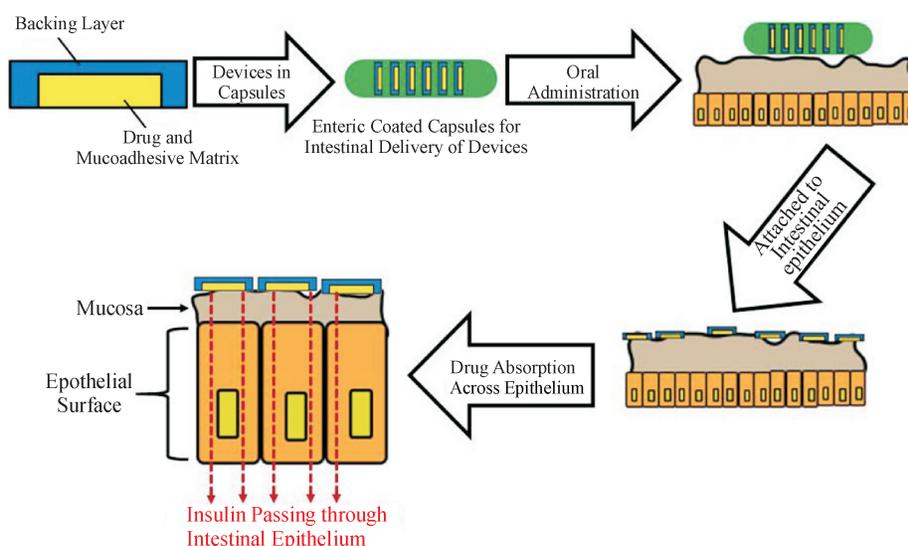


Figure 4 Schematic representation of mechanism of adhesion, drug release and absorption across intestinal epithelium from mucoadhesive devices<sup>[42]</sup>

#### 3.2 口服微粒

口服小粒径、正电荷且具有粗糙表面的微粒更易于在胃肠道滞留和被肠道吸收<sup>[45]</sup>;而对小颗粒进行肠溶包衣则可有效避免酸影响。基于此,研究人员采用聚乙烯亚胺混合胰岛素制备纳米粒,并依次涂覆水溶性聚合物羟丙甲纤维素(hydroxypropyl methylcellulose, HPMC)、混有崩解剂羧甲基淀粉钠的聚甲基丙烯酸酯 Eudragit® NE 和 Aqoat®, 达作用时间 48 h 以上<sup>[45]</sup>; Zhao 等<sup>[46]</sup>采用 SiO<sub>2</sub> 作为胰岛素的口服缓释载体并在外包被肠溶材料,能够在 27 h 内有效控制血糖水平。此外,研

究人员还通过肠内生成气泡、加入蛋白酶抑制剂<sup>[47]</sup>、形成自乳化系统<sup>[48]</sup>等方法提高蛋白及肽类药物的口服生物利用度、延长作用时间。

## 4 经皮给药

#### 4.1 微针贴剂

蛋白和多肽类药物往往具有较高的相对分子质量,难以实现有效的皮肤渗透,而微针的出现有效解决了这一问题。微针贴剂系由微米级的小针组成阵列,并附着在背衬材料上制成的一种透皮制剂。微针的长度可以刺穿角质层,却不

会达到神经末梢,因此不会引起疼痛。微针贴片已应用于多种蛋白及多肽类药物的递送,包括干扰素 $\alpha$ <sup>[49]</sup>、胰岛素<sup>[50]</sup>、肽类疫苗<sup>[51]</sup>等。Qiu等<sup>[52]</sup>制备了交联水合基质微针并载入胰岛素,与皮下注射相比,使胰岛素作用时间延长了3倍以上。

为提高微针在皮肤上固定的稳定性,研究人员开发了可自膨胀微针。Seong等<sup>[53]</sup>利用聚苯乙烯-聚丙烯酸嵌段共聚物吸水膨胀的特性,将其包裹在微针前端,刺入皮肤后尖端膨胀,与皮肤机械嵌合,可延长微针在皮肤中停留时间和模型蛋白的释放时间。

此外,为使微针在体内滞留时间更长,研究人员开发了一类前端可脱落的生物可降解微针。Chen等<sup>[54]</sup>以PLA作为微针基质,使其刺入皮肤后脱落并停留在皮肤中,实现卵清蛋白疫苗持续释放14 d。但这类微针不能够保证针体完全扎入体内,因此也有研究人员制备了刺入皮肤后可自发破碎成小颗粒微球的微针来解决这一问题<sup>[55]</sup>。

#### 4.2 经皮微粒给药系统

脂质体、传递体、固体脂质纳米粒、醇质体等微粒系统也常被应用于护肤品及治疗皮肤疾病药物的开发<sup>[56-57]</sup>。其中,具有脂质双分子层结构的传递体不同于大尺寸、弹性低的传统脂质体,其脂质

膜中掺入单链表面活性剂,具有高弹性可变形的优点,有利于表皮屏障的穿透<sup>[58]</sup>。微粒穿透皮肤主要经历的途径有细胞间脂质途径、跨细胞途径与毛囊途径,有研究表明,虽然毛囊在皮肤组织中占比较小,但微粒可在毛囊中存储10 d以上<sup>[59]</sup>。

## 5 总结与展望

通过缓释注射剂、植入剂、口服制剂、经皮给药等制剂手段可以实现蛋白和多肽药物的长效化,而不同技术手段具有不同的优缺点(表1),研究人员在对此类药物进行剂型改良时除应考虑剂型特点外,应综合考虑药物特性、生物因素、临床需求、生产成本等各方面因素。

经过几十年的发展,目前此类制剂研究仍主要集中于植入剂和注射用微球的开发,制剂开发的难点仍是筛选合适载体、提高药物稳定性、减少突释和实现药物平稳释放。而未来,随着更多新材料、制剂新技术和微型芯片技术在生物医药领域的应用,响应体内生理指标变化的智能释放药物将成为下一代缓控释制剂的主要研究方向,为通过制剂手段实现蛋白及多肽药物的长效化提供更多可选方案。总之,蛋白及多肽类药物的长效递送具有重要临床意义和广阔的市场前景。

**Table 1** Advantages and shortcomings of the current strategies on prolonging the action of protein and peptide therapeutics

| Formulation                          | Advantage  | Disadvantage  |
|--------------------------------------|--|---|
| Microsphere                          | Long-term release when compared with other microparticles  | Burst release   |
| Liposome                             | Suitable for Intraluminal injection  | Shorter release when applied to protein and peptide drugs       |
| Implant                              | Long-term release, easy to adjust release rate, able to be combined with artificial intelligence | Creating wounds, some are non-degradable and need to be removed |
| Sustained-release injectable product | Minimally invasive, easy operation, no easy accompanying infection, small pain for patients      | Toxic potential for some of the organic solvents                |
| Tablet and capsule                   | Good patient compliance  | Shorter release   |
| Oral microparticle                   | Good patient compliance  | Shorter release   |
| Patch                                | Minimally invasive, avoiding first-pass effects  | Incomplete drug release, short retention time on body           |
| Transfersome                         | Convenience, high potential in skincare products   | Low drug-loading rate, low absorption                           |

## 参 考 文 献

- [1] Vaishya R, Khurana V, Patel S, et al. Long-term delivery of protein therapeutics [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2015, **12**(3):415-440.
- [2] Vaishya RD, Khurana V, Patel S, et al. Controlled ocular drug delivery with nanomicelles [J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2014, **6**(5):422-437.
- [3] Jia H, Guo Y, Song X, et al. Elimination of *N*-glycosylation by site mutation further prolongs the half-life of IFN- $\alpha$ /Fc fusion proteins expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Microb Cell Fact*, 2016, **15**(1):209.
- [4] Czajkowsky DM, Hu J, Shao Z, et al. Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, **4**(10):1015-1028.
- [5] Kim D, Jeon H, Ahn S, et al. An approach for half-life exten-

- sion and activity preservation of an anti-diabetic peptide drug based on genetic fusion with an albumin-binding aptide [J]. *J Control Release*, 2017, **256**:114–120.
- [6] Li CY, Huang WL, Qian H. Advances in the research of long-acting strategy of insulin and GLP-1 analogs [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2018, **49**(6):660–670.
- [7] Deyle K, Kong XD, Heinis C. Phage selection of cyclic peptides for application in research and drug development [J]. *Acc Chem Res*, 2017, **50**(8):1866–1874.
- [8] Kim D, MacConell L, Zhuang D, *et al.* Effects of once-weekly dosing of a long-acting release formulation of exenatide on glucose control and body weight in subjects with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2007, **30**(6):1487–1493.
- [9] Oh YJ, Lee JW, Seo JY, *et al.* Preparation of budesonide-loaded porous PLGA microparticles and their therapeutic efficacy in a murine asthma model [J]. *J Control Release*, 2011, **150**(1):56–62.
- [10] Zhang Y, Wischke C, Mittal S, *et al.* Design of controlled release PLGA microspheres for hydrophobic fenretinide [J]. *Mol Pharm*, 2016, **13**(8):2622–2630.
- [11] Rosa GD, Iommelli R, La Rotonda MI, *et al.* Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactants on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres [J]. *J Control Release*, 2000, **69**(2):283–295.
- [12] Bae SE, Son JS, Park K, *et al.* Fabrication of covered porous PLGA microspheres using hydrogen peroxide for controlled drug delivery and regenerative medicine [J]. *J Control Release*, 2009, **133**(1):37–43.
- [13] Casalini T, Rossi F, Lazzari S, *et al.* Mathematical modeling of PLGA microparticles: from polymer degradation to drug release [J]. *Mol Pharm*, 2014, **11**(11):4036–4048.
- [14] Jain RA. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices [J]. *Biomaterials*, 2000, **21**(23):2475–2490.
- [15] Díaz E, Puerto I, Ribeiro S, *et al.* The influence of copolymer composition on PLGA/nHA Scaffolds' cytotoxicity and *in vitro* degradation [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2017, **7**(7):173.
- [16] Yang S, Yuan W, Jin T. Formulating protein therapeutics into particulate forms [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, **6**(10):1123–1133.
- [17] Wu JZ, Williams GR, Li HY, *et al.* Insulin-loaded PLGA microspheres for glucose-responsive release [J]. *Drug Deliv*, 2017, **24**(1):1513–1525.
- [18] Jain A, Kunduru KR, Basu A, *et al.* Injectable formulations of poly (lactic acid) and its copolymers in clinical use [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, **107**:213–227.
- [19] Guo J, Sun X, Yin H, *et al.* Chitosan microsphere used as an effective system to deliver a linked antigenic peptides vaccine protect mice against acute and chronic toxoplasmosis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, **8**:163.
- [20] Mantripragada S. A lipid based depot (DepoFoam® technology) for sustained release drug delivery [J]. *Prog Lipid Res*, 2002, **41**(5):392–406.
- [21] Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, *et al.* Liposomal formulations in clinical use: an updated review [J]. *Pharmaceutics*, 2017, **9**(2):12.
- [22] Lewis KA, Goldyn AK, West KW, *et al.* A single histrelin implant is effective for 2 years for treatment of central precocious puberty [J]. *J Pediatr*, 2013, **163**(4):1214–1216.
- [23] Moore HC, Unger JM, Phillips KA, *et al.* Goserelin for ovarian protection during breast-cancer adjuvant chemotherapy [J]. *N Engl J Med*, 2015, **372**(10):923–932.
- [24] Zhao YN, Xu X, Wen N, *et al.* A drug carrier for sustained Zero-order release of peptide therapeutics [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1):5524.
- [25] Jeong JW, McCall JG, Shin G, *et al.* Wireless optofluidic systems for programmable *in vivo* Pharmacology and optogenetics [J]. *Cell*, 2015, **162**(3):662–674.
- [26] Farra R, Sheppard NF, McCabe L, *et al.* First-in-human testing of a wirelessly controlled drug delivery microchip [J]. *Sci Transl Med*, 2012, **4**(122):122ra121.
- [27] Parent M, Clarot I, Gibot S, *et al.* One-week *in vivo* sustained release of a peptide formulated into *in situ* forming implants [J]. *Int J Pharm*, 2017, **521**(1/2):357–360.
- [28] Brodbeck KJ, DesNoyer JR, McHugh AJ. Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery. Part II. The role of solution thermodynamics and bath-side mass transfer [J]. *J Control Release*, 1999, **62**(3):333–344.
- [29] Huang LP, Li YN, Du YA, *et al.* Mild photothermal therapy potentiates anti-PD-L1 treatment for immunologically cold tumors via an all-in-one and all-in-control strategy [J]. *Nat Commun*, 2019, **10**(1):4871.
- [30] Ruel-Gariepy E, Leroux JC. *In situ*-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, **58**(2):409–426.
- [31] Agarwal P, Rupenthal ID. Injectable implants for the sustained release of protein and peptide drugs [J]. *Drug Discov Today*, 2013, **18**(7):337–349.
- [32] Singh NK, Lee DS. *In situ* gelling pH- and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery [J]. *J Control Release*, 2014, **193**:214–227.
- [33] Liu Y, Chen X, Li S, *et al.* Calcitonin-loaded thermosensitive hydrogel for long-term antiosteopenia therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, **9**(28):23428–23440.
- [34] Xu YR, Shen Y, Xiong YR, *et al.* Synthesis, characterization, biodegradability and biocompatibility of a temperature-sensitive PBLA-PEG-PBLA hydrogel as protein delivery system with low critical gelation concentration [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2014, **40**(9):1264–1275.
- [35] Feng Z, Zhao J, Li Y, *et al.* Temperature-responsive *in situ*

- nanoparticle hydrogels based on hydrophilic pendant cyclic ether modified PEG-PCL-PEG [J]. *Biomater Sci*, 2016, **4** (10):1493-1502.
- [36] Lai MC, Chang KC, Hsu SC, *et al.* *In situ* gelation of PEG-PLGA-PEG hydrogels containing high loading of hydroxyapatite: *in vitro* and *in vivo* characteristics [J]. *Biomed Mater*, 2014, **9**(1):015011.
- [37] Bobbala S, Tamboli V, McDowell A, *et al.* Novel injectable pentablock copolymer based thermoresponsive hydrogels for sustained release vaccines [J]. *AAPS J*, 2016, **18** (1) : 261-269.
- [38] Wang C, Wang J, Zhang X, *et al.* *In situ* formed reactive oxygen species-responsive scaffold with gemcitabine and checkpoint inhibitor for combination therapy [J]. *Sci Transl Med*, 2018, **10**(429):eaan3682.
- [39] Zhao Y, Cui Z, Liu B, *et al.* An injectable strong hydrogel for bone reconstruction [J]. *Adv Healthc Mater*, 2019, **8** (17) : e1900709.
- [40] Nguyen NT, Nguyen LV, Tran NM, *et al.* The effect of oxidation degree and volume ratio of components on properties and applications of *in situ* cross-linking hydrogels based on chitosan and hyaluronic acid [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, **103**:109670.
- [41] Criado-Gonzalez M, Corbella L, Senger B, *et al.* Photoresponsive nanometer-scale iron alginate hydrogels: a study of gel-sol transition using quartz crystal microbalance [J]. *Langmuir*, 2019, **35**(35):11397-11405.
- [42] Gupta V, Hwang BH, Doshi N, *et al.* Delivery of exenatide and insulin using mucoadhesive intestinal devices [J]. *Ann Biomed Eng*, 2016, **44**(6):1993-2007.
- [43] Gupta V, Hwang BH, Lee JH, *et al.* Mucoadhesive intestinal devices for oral delivery of salmon calcitonin [J]. *J Control Release*, 2013, **172**(3):753-762.
- [44] Castro PM, Fonte P, Sousa F, *et al.* Oral films as breakthrough tools for oral delivery of proteins/peptides [J]. *J Control Release*, 2015, **211**:63-73.
- [45] Salvioni L, Fiandra L, Del CMD, *et al.* Oral delivery of insulin via polyethylene imine-based nanoparticles for colonic release allows glycemic control in diabetic rats [J]. *Pharmacol Res*, 2016, **110**:122-130.
- [46] Zhao XH, Shan C, Zu YG, *et al.* Preparation, characterization, and evaluation *in vivo* of Ins-SiO<sub>2</sub>-HP55 (insulin-loaded silica coating HP55) for oral delivery of insulin [J]. *Int J Pharm*, 2013, **454**(1):278-284.
- [47] Chuang EY, Lin KJ, Lin PY, *et al.* Self-assembling bubble carriers for oral protein delivery [J]. *Biomaterials*, 2015, **64**: 115-124.
- [48] Leonaviciute G, Bernkop-Schnurch A. Self-emulsifying drug delivery systems in oral (poly)peptide drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2015, **12**(11):1703-1716.
- [49] Kusamori K, Katsumi H, Sakai R, *et al.* Development of a drug-coated microneedle array and its application for transdermal delivery of interferon alpha [J]. *Biofabrication*, 2016, **8** (1):015006.
- [50] Lau S, Fei J, Liu H, *et al.* Multilayered pyramidal dissolving microneedle patches with flexible pedestals for improving effective drug delivery [J]. *J Control Release*, 2017, **265**: 113-119.
- [51] van der Maaden K, Heuts J, Camps M, *et al.* Hollow microneedle-mediated micro-injections of a liposomal HPV E743-63 synthetic long peptide vaccine for efficient induction of cytotoxic and T-helper responses [J]. *J Control Release*, 2018, **269**: 347-354.
- [52] Qiu YQ, Qin GJ, Zhang SH, *et al.* Novel lyophilized hydrogel patches for convenient and effective administration of microneedle-mediated insulin delivery [J]. *Int J Pharm*, 2012, **437**(1): 51-56.
- [53] Seong KY, Seo MS, Hwang DY, *et al.* A self-adherent, bullet-shaped microneedle patch for controlled transdermal delivery of insulin [J]. *J Control Release*, 2017, **265**:48-56.
- [54] Chen MC, Huang SF, Lai KY, *et al.* Fully embeddable chitosan microneedles as a sustained release depot for intradermal vaccination [J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(12):3077-3086.
- [55] Kim MY, Jung BK, Park JH. Hydrogel swelling as a trigger to release biodegradable polymer microneedles in skin [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(2):668-678.
- [56] Ganesan P, Choi DK. Current application of phytocompound-based nanocosmeceuticals for beauty and skin therapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, **11**:1987-2007.
- [57] Wu PS, Li YS, Kuo YC, *et al.* Preparation and evaluation of novel transfersomes combined with the natural antioxidant resveratrol [J]. *Molecules*, 2019, **24**(3):600.
- [58] Carter P, Narasimhan B, Wang Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases [J]. *Int J Pharm*, 2019, **555**:49-62.
- [59] Desai P, Patlolla RR, Singh M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery [J]. *Mol Membr Biol*, 2010, **27**(7):247-259.

· 论 文 ·

## ALK5 抑制剂的设计、合成及其生物学活性评价

许涛<sup>1,2#</sup>, 王小伟<sup>2#</sup>, 刘晓蓉<sup>2</sup>, 王亚洲<sup>2\*</sup>, 李志裕<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>中国药科大学药学院, 南京 210009; <sup>2</sup>南京圣和药业股份有限公司, 南京 211100)

**摘要** 以 ALK5 抑制剂 LY-3200882 作为先导化合物, 利用生物电子等排和构象限制等药物设计策略, 结合分子对接技术, 设计并合成了 10 个结构新颖的化合物, 其结构经 <sup>1</sup>H NMR、HR-MS 表征。体外活性筛选结果显示, 大多数化合物具有良好的激酶抑制活性。其中, 化合物 **B4** 表现出显著优于 LY-3200882 的 ALK5 抑制活性 (IC<sub>50</sub> = 1.4 nmol/L vs 41.1 nmol/L), 同时对 NIH3T3 细胞中 TGFβ-ALK5-SMAD2/3 信号通路具有良好的抑制活性 (IC<sub>50</sub> = 14.2 nmol/L)。进一步研究表明, 化合物 **B4** 的药代动力学性质良好, 口服暴露量及生物利用度满足成药性要求, 值得进一步开发。

**关键词** LY-3200882; ALK5 抑制剂; 设计; 合成; 生物活性

中图分类号 R914; R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0441-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200408

引用本文 许涛, 王小伟, 刘晓蓉, 等. ALK5 抑制剂的设计、合成及其生物学活性评价[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 441 - 448.

Cite this article as: XU Tao, WANG Xiaowei, LIU Xiaorong, et al. Design, synthesis and biological evaluation of ALK5 inhibitors[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(4): 441 - 448.

## Design, synthesis and biological evaluation of ALK5 inhibitors

XU Tao<sup>1,2#</sup>, WANG Xiaowei<sup>2#</sup>, LIU Xiaorong<sup>2</sup>, WANG Yazhou<sup>2\*</sup>, LI Zhiyu<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

<sup>2</sup>Nanjing Sanhome Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 211100, China

**Abstract** Using ALK5 inhibitor LY-3200882 as a lead compound, ten structurally novel compounds were designed by bioisosterism, conformational restriction and molecular docking technology. All structures were synthesized and confirmed by <sup>1</sup>H NMR and HR-MS. The results of *in vitro* activity screening showed that most compounds had good kinase inhibitory activity. Among them, compound **B4** showed significantly better ALK5 inhibitory activity than LY-3200882 (IC<sub>50</sub> = 1.4 nmol/L vs 41.1 nmol/L), and had good inhibitory activity against TGFβ-ALK5-SMAD2/3 signaling pathway in NIH3T3 cells (IC<sub>50</sub> = 14.2 nmol/L). Besides, compound **B4** had good pharmacokinetic properties, such as oral exposure and bioavailability, which is worthy of further development.

**Key words** LY-3200882; ALK5 inhibitors; design; synthesis; biological activity

This study was supported by the National Science and Technology Major Project for Drug Innovation (No. 2018ZX09301014-006; No. 2019ZX09201001-003-005)

\*XU Tao and WANG Xiaowei contributed equally to this work

收稿日期 2020-04-17 通信作者 \*Tel: 025-81066791 E-mail: wangzyf@sanhome.com

\*\*Tel: 025-86185301 E-mail: zhiyuli@cpu.edu.cn

基金项目 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (No. 2018ZX09301014-006, No. 2019ZX09201001-003-005)

#许涛与王小伟为共同第一作者

转化生长因子家族配体包括TGF- $\beta$ s、抑制素、激活素、骨形成蛋白、生长和分化因子,在细胞增殖、分化、凋亡、迁移、细胞外基质表达和免疫应答等众多过程中都发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。TGF- $\beta$ 活化后,在细胞表面与TGF- $\beta$  RII结合并使其激活,活化的TGF- $\beta$  RII募集并结合TGF- $\beta$  RI (ALK5)形成异源三聚体复合物,通过激活Smad2/3将信号传导至胞浆,Smad2/3再与Smad4结合形成复合物,然后转入细胞核以调节各种靶基因的转录<sup>[3]</sup>。除了经典的Smad途径外,TGF- $\beta$ 还可激活非Smad途径,如促分裂原激活蛋白激酶(MAPK)通路等<sup>[4]</sup>。

以往研究报道,在乳腺癌、结直肠癌、肝细胞癌等多种肿瘤类型中,TGF- $\beta$ 及其信号通路高表

达<sup>[5]</sup>。TGF- $\beta$ 信号转导在介导肿瘤微环境的原发性改变和促进肿瘤细胞转移、侵袭和免疫逃逸过程中发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。作为TGF- $\beta$ 信号通路中的重要节点蛋白,ALK5是治疗TGF- $\beta$ 信号转导异常相关疾病的理想靶标,也是目前针对TGF- $\beta$ 信号通路开发小分子抑制剂的主要靶标。

目前共有6个ALK5小分子抑制剂进入临床研究阶段,其中公开结构的有3个(图1)。LY-3200882是礼来公司开发的新一代ALK5抑制剂,通过ATP竞争结合位点抑制ALK5激酶活性,阻断TGF- $\beta$ 与其受体结合。LY-3200882是一种强效的ALK5激酶抑制剂( $IC_{50} = 90$  nmol/L),在多个实验动物肿瘤模型中也表现出显著的抗肿瘤活性,目前正处于实体瘤治疗的II期临床试验<sup>[8]</sup>。

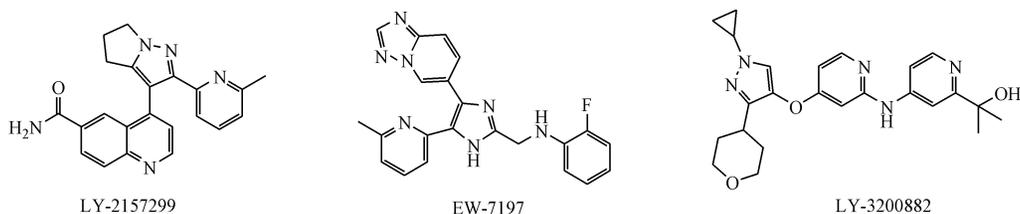


Figure 1 ALK5 inhibitors in clinical phase

为了寻找新型ALK5激酶抑制剂,本研究选取LY-3200882作为先导化合物,通过分析LY-3200882与ALK5蛋白的作用方式(图2),发现母核C区的吡啶氮原子作为氢键受体与激酶铰链区His283骨架的NH之间形成一个关键的氢键作用,

在吡啶环所处的选择性口袋中,存在一个水分子介导的氢键作用。以往研究报道,这两个氢键相互作用分别对化合物的ALK5激酶抑制活性和p38 MAPK选择性至关重要<sup>[9]</sup>。

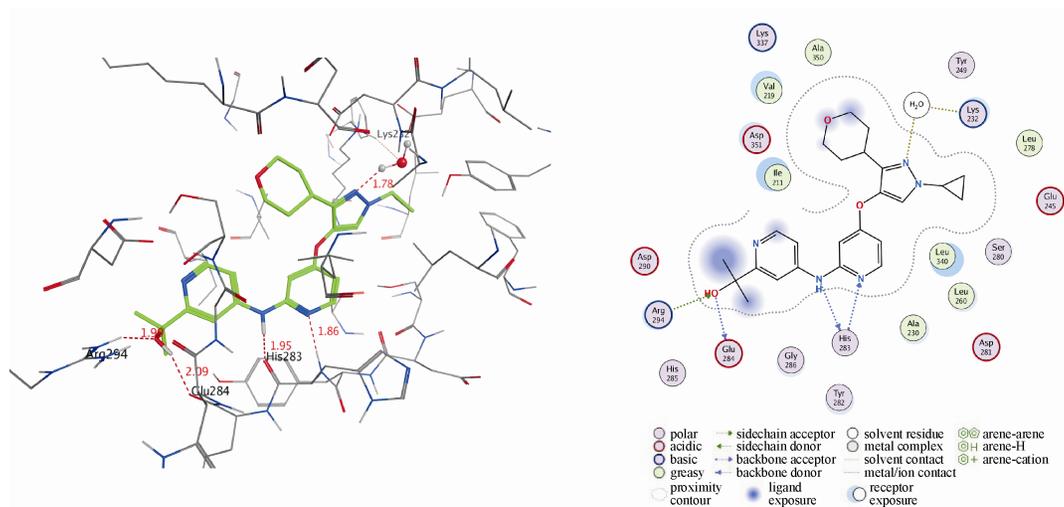


Figure 2 Proposed binding mode of LY-3200882 (pdb code: 2wou)

根据以上分析,对活性起关键作用的母核C区予以保留,利用生物电子等排、构象限制等策略,

结合分子对接技术,设计了两类结构新颖的化合物(图3)。首先,通过改造处在溶剂区的侧链得到

A 系列化合物,探索理化性质对抑制活性的影响,初步确定 A 区优势基团,进而改造另一端侧链得

到 B 系列化合物,以期筛选出活性和成药性更优的化合物。

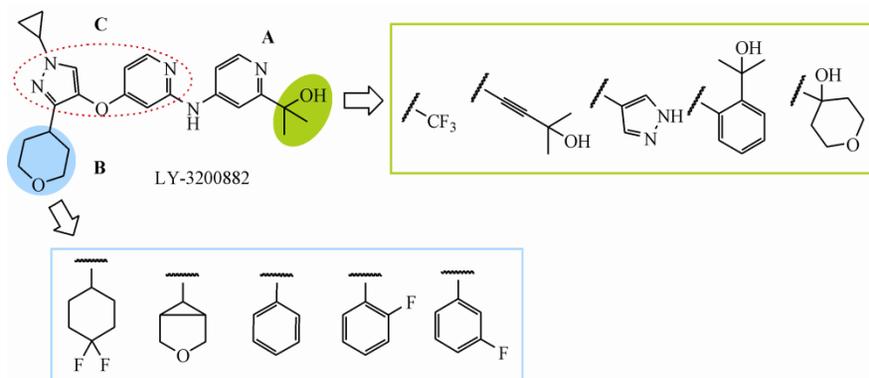
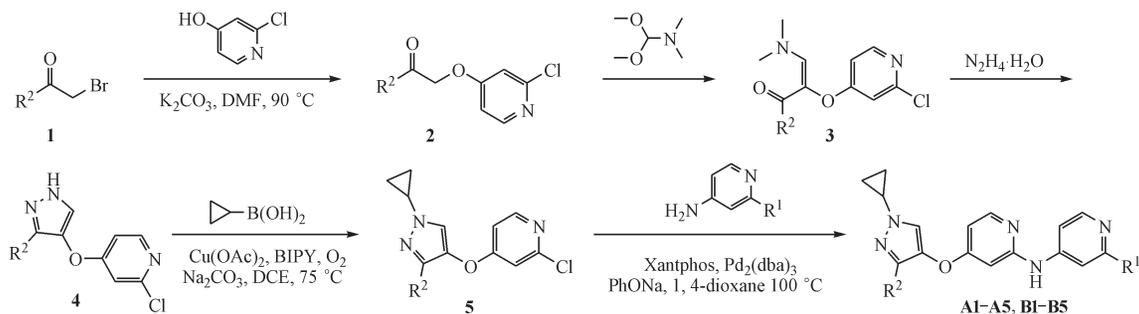


Figure 3 Molecular design based on the structure of LY-3200882

## 1 合成路线

目标化合物的合成如路线 1 所示。化合物 1 与 2-氯吡啶-4-醇在 DMF 中用碳酸钾为碱反应得到化合物 2,再与 DMF-DMA 反应形成化合物 3,经水

合肼关环生成化合物 4,随后与烷基化试剂环丙基硼酸在 Chan-Lam 偶联条件下反应得到化合物 5,最后和相应的胺经 Buchwald-Hartwig 偶联得到目标化合物。



Scheme 1 Synthetic route of the target compounds

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Bruker Avance III HD 400 MHz 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司, TMS 为内标); Q Exactive 高分辨质谱仪(美国 Thermo 公司); MP70 型熔点仪(瑞士 Mettler-Toledo 公司); Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);所用化学试剂均为市售化学纯或分析纯产品,一般均不经纯化直接使用。

ALK5 激酶(Carna 公司,批号 09-141); Bright-Glo Luciferase assay system(美国 Promega 公司); Luc-Smad2/3-NIH3T3 小鼠成纤维细胞,由中国药科大学徐晓军研究员实验室馈赠。

雄性 BALB/c 小鼠,体重(18~22 g),购自常州卡文斯实验动物有限公司,许可证号:SCXK(苏)2016-0010。

### 2.2 化学合成

2-((2-氯吡啶-4-基)氧基)-1-(四氢-2H-吡喃-4-基)乙-1-酮(2)

氩气保护下,将化合物 1 (1.45 g, 7.0 mmol) 的无水 DMF (5 mL) 溶液加入到 2-氯-4-羟基吡啶 (0.91 g, 7.0 mmol), 碳酸钾 (1.48 g, 14.0 mmol) 和无水 DMF (20 mL) 的混合物中,升温至 90 °C 反应 2 h。降至室温,加入饱和食盐水,乙酸乙酯萃取,无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥,减压除去溶剂得红色油状物 1.47 g, 收率 82%, ESI-MS (*m/z*): 257.1 [M+H]<sup>+</sup>。

(*E*)-2-((2-氯吡啶-4-基)氧基)-3-(二甲基氨基)-1-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)丙-2-烯-1-酮(**3**)

将化合物**2**(1.47 g, 5.74 mmol), 1,1-二甲氧基三甲胺(3.24 mL, 24.4 mmol)加热至100℃回流反应2 h。冷却,加入乙酸乙酯,饱和食盐水洗涤,无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,旋干溶剂得棕色油状物1.78 g,收率99%,ESI-MS(*m/z*):312.0 [M+H]<sup>+</sup>。

2-氯-4-((3-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)-1*H*-吡啶-4-基)氧基)吡啶(**4**)

将化合物**3**(1.78 g, 5.74 mmol)溶于醋酸溶液60 mL中,冰浴下用恒压滴液漏斗加入水合肼(3.0 g, 60.0 mmol),室温反应过夜。加入乙酸乙酯,饱和碳酸氢钠溶液洗涤,无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,减压除去溶剂得棕色粗品1.05 g,无需纯化,直接用于下一步,ESI-MS(*m/z*):281.1 [M+H]<sup>+</sup>。

2-氯-4-((1-环丙基-3-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)-1*H*-吡啶-4-基)氧基)吡啶(**5**)

将2,2'-联吡啶(0.70 g, 4.4 mmol),乙酸铜(0.80 g, 4.4 mmol)和1,2-二氯乙烷(10 mL)于75℃反应25 min,冷却至室温。加入化合物**4**(1.12 g, 4.0 mmol),环丙基硼酸(0.69 g, 8.0 mmol)和碳酸钠(0.85 g, 8.0 mmol),氧气氛围下,75℃反应2 h。冷却至室温,加入饱和食盐水,二氯甲烷萃取,无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,减压除去溶剂,柱色谱纯化得黄色固体1.10 g,收率86%;mp:112~114℃。ESI-MS(*m/z*):320.1 [M+H]<sup>+</sup>。

4-((1-环丙基-3-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)-1*H*-吡啶-4-基)氧基)-*N*-(2-(三氟甲基)吡啶-4-基)吡啶-2-胺(**A1**)

氩气保护下,将化合物**5**(192 mg, 0.60 mmol),2-三氟甲基-4-氨基吡啶(119 mg, 0.78 mmol),4,5-双二苯基膦-9,9-二甲氧基杂蒽(69 mg, 0.12 mmol),醋酸钨(13.5 mg, 0.06 mmol),碳酸铯(293 mg, 0.90 mmol)溶于1,4-二氧六环15 mL,加热至100℃反应过夜。冷却,加入饱和食盐水,二氯甲烷萃取,无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,旋干溶剂,制备HPLC纯化得白色固体85 mg,收率31%;mp:168~170℃;纯度96.7%;<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.96(1H, s, pyrazole-H), 8.45(1H, d, *J*=5.4 Hz, pyridine-H), 8.25(1H, s, NH), 8.22(1H, d, *J*=5.7 Hz, pyridine-H), 7.90(1H, s, pyridine-H), 7.80(1H, d, *J*=4.4 Hz, pyridine-H), 6.70(1H, d, *J*=4.7

Hz, pyridine-H), 6.40(1H, s, pyridine-H), 3.83(2H, d, *J*=11.1 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.69(1H, s, CH), 3.30(2H, d, *J*=13.3 Hz, OCH<sub>2</sub>), 2.72(1H, m, CH), 1.67(4H, s, 2-CH<sub>2</sub>), 1.06(2H, s, CH<sub>2</sub>), 0.96(2H, d, *J*=6.0 Hz, CH<sub>2</sub>); HR-MS(ESI) for C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>F<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: Calcd. 446.1798; Found 446.1792。

4-(4-((4-((1-环丙基-3-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)-1*H*-吡啶-4-基)氧基)吡啶-2-基)氨基)吡啶-2-基)-2-甲基丁-3-炔-2-醇(**A2**)

制备方法同化合物**A1**,将2-三氟甲基-4-氨基吡啶换成4-(4-氨基吡啶-2-基)-2-甲基丁-3-炔-2-醇,得白色固体25 mg,收率18%;mp:110~112℃;纯度92.8%;<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.60(1H, s, pyrazole-H), 8.23(1H, d, *J*=5.5 Hz, pyridine-H), 8.18(1H, d, *J*=5.7 Hz, pyridine-H), 7.89(1H, s, pyridine-H), 7.89(1H, s, NH), 7.46(1H, d, *J*=4.5 Hz, pyridine-H), 6.64(1H, d, *J*=4.6 Hz, pyridine-H), 6.36(1H, s, pyridine-H), 5.57(1H, s, OH), 3.83(2H, d, *J*=11.1 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.67(1H, m, CH), 3.29(2H, s, OCH<sub>2</sub>), 2.86~2.66(1H, m, CH), 1.66(4H, s, 2-CH<sub>2</sub>), 1.48(6H, s, 2-CH<sub>3</sub>), 1.05(2H, s, CH<sub>2</sub>), 0.99~0.91(2H, m, CH<sub>2</sub>); HR-MS(ESI) for C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: Calcd. 460.2343; Found 460.2336。

*N*-(2-(1*H*-吡啶-4-基)吡啶-4-基)-4-((1-环丙基-3-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)-1*H*-吡啶-4-基)氧基)吡啶-2-胺(**A3**)

制备方法同化合物**A1**,将2-三氟甲基-4-氨基吡啶换成2-(1*H*-吡啶-4-基)吡啶-4-胺,得淡黄色固体65 mg,收率33%;mp:111~113℃;纯度97.7%;<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 13.02(1H, s, NH), 9.49(1H, s, pyrazole-H), 8.24(1H, d, *J*=5.6 Hz, pyridine-H), 8.18(1H, d, *J*=5.7 Hz, pyridine-H), 8.04(2H, s, pyrazole-H), 7.88(1H, s, NH), 7.85(1H, s, pyridine-H), 7.51(1H, d, *J*=5.3 Hz, pyridine-H), 6.61(1H, d, *J*=5.6 Hz, pyridine-H), 6.39(1H, s, pyridine-H), 3.83(2H, d, *J*=11.3 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.75~3.61(1H, m, CH), 3.33(2H, d, *J*=4.2 Hz, OCH<sub>2</sub>), 2.88~2.64(1H, m, CH), 1.67(4H, s, 2-CH<sub>2</sub>), 1.03(2H, s, CH<sub>2</sub>), 0.96(2H, m, CH<sub>2</sub>); HR-MS(ESI) for C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: Calcd. 444.2142; Found 444.2133。

2-(2-(4-((4-((1-环丙基-3-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)-1*H*-吡唑-4-基)氧基)吡啶-2-基)氨基)吡啶-2-基)苯基)丙-2-醇(**A4**)

制备方法同化合物 **A1**,将 2-三氟甲基-4-氨基吡啶换成 2-(2-(4-氨基吡啶-2-基)苯基)丙-2-醇,得白色固体 117 mg,收率 67%;mp: 195~197 °C;纯度 94.8%;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.61 (1H, s, pyrazole-H), 8.38 (1H, d, *J*=5.5 Hz, pyridine-H), 8.20 (1H, d, *J*=5.6 Hz, pyridine-H), 8.14 (1H, s, Ar-H), 7.92 (1H, s, NH), 7.90 (2H, s, Ar-H), 7.66 (1H, d, *J*=5.3 Hz, Ar-H), 7.58 (2H, d, *J*=7.8 Hz, pyridine-H), 6.63 (1H, d, *J*=5.7 Hz, pyridine-H), 6.41 (1H, s, pyridine-H), 5.09 (1H, s, OH), 3.84 (2H, d, *J*=11.2 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.68 (1H, m, CH), 3.33 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 2.75 (1H, m, CH), 1.69 (4H, s, 2-CH<sub>2</sub>), 1.47 (6H, s, 2-CH<sub>3</sub>), 1.06 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 0.96 (2H, m, CH<sub>2</sub>); HR-MS (ESI) for C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: Calcd. 512.2656; Found 512.2646。

4-(4-((4-((1-环丙基-3-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)-1*H*-吡唑-4-基)氧基)吡啶-2-基)氨基)吡啶-2-基)四氢-2*H*-吡喃-4-醇(**A5**)

制备方法同化合物 **A1**,将 2-三氟甲基-4-氨基吡啶换成 4-(4-氨基吡啶-2-基)四氢-2*H*-吡喃-4-醇,得白色固体 85 mg,收率 28%;mp: 92~94 °C;纯度 96.6%;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.53 (1H, s, pyrazole-H), 8.24 (1H, d, *J*=5.6 Hz, pyridine-H), 8.14 (1H, d, *J*=5.8 Hz, pyridine-H), 7.88 (1H, s, NH), 7.78 (1H, s, pyridine-H), 7.71 (1H, d, *J*=5.6 Hz, pyridine-H), 6.59 (1H, d, *J*=7.8 Hz, pyridine-H), 6.38 (1H, s, pyridine-H), 5.18 (1H, s, OH), 3.83 (2H, d, *J*=8.6 Hz, OCH<sub>2</sub>), 3.79~3.70 (4H, m, 2-OCH<sub>2</sub>), 3.70~3.63 (1H, m, CH), 3.31 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 2.79~2.63 (1H, m, CH), 2.17 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.66 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.40 (2H, d, *J*=12.9 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.04 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.00~0.86 (2H, m, CH<sub>2</sub>); HR-MS (ESI) for C<sub>26</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: Calcd. 478.2449; Found 478.2440。

4-(4-((4-((1-环丙基-3-(4,4-二氟环己基)-1*H*-吡唑-4-基)氧基)吡啶-2-基)氨基)吡啶-2-基)四氢-2*H*-吡喃-4-醇(**B1**)

制备方法同化合物 **A5**,将 2-溴-1-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)乙-1-酮换成 2-溴-1-(4,4-二氟环己基)乙

烷-1-酮,得白色固体 170 mg,收率 26%;mp: 56~58 °C;纯度 96.9%;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.52 (1H, s, pyrazole-H), 8.24 (1H, d, *J*=5.6 Hz, pyridine-H), 8.14 (1H, d, *J*=5.8 Hz, pyridine-H), 7.88 (1H, s, NH), 7.77 (1H, d, *J*=1.9 Hz, pyridine-H), 7.70 (1H, dd, *J*=5.6, 2.1 Hz, pyridine-H), 6.58 (1H, dd, *J*=5.8, 2.2 Hz, pyridine-H), 6.38 (1H, d, *J*=2.2 Hz, pyridine-H), 5.17 (1H, s, OH), 3.73 (4H, m, 2-OCH<sub>2</sub>), 3.67 (1H, m, CH), 2.68 (1H, m, CH), 2.16 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.01 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.86 (4H, m, 2-CH<sub>2</sub>), 1.68 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.40 (2H, d, *J*=12.7 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.04 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 0.97~0.92 (2H, m, CH<sub>2</sub>); HR-MS (ESI) for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>F<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: Calcd. 512.2468; Found 512.2466。

4-(4-((4-((3-(3-唑环[3.1.0]己-6-基)-1-环丙基-1*H*-吡唑-4-基)氧基)吡啶-2-基)胺基)吡啶-2-基)四氢-2*H*-吡喃-4-醇(**B2**)

制备方法同化合物 **A5**,将 2-溴-1-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)乙-1-酮换成 1-(3-氧杂环[3.1.0]己烷-6-基)-2-溴乙烷-1-酮,得白色固体 135 mg,收率 14%;mp: 63~65 °C;纯度 98.2%;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.52 (1H, s, pyrazole-H), 8.24 (1H, d, *J*=5.6 Hz, pyridine-H), 8.14 (1H, d, *J*=5.8 Hz, pyridine-H), 7.85 (1H, s, NH), 7.78 (1H, d, *J*=1.8 Hz, pyridine-H), 7.69 (1H, dd, *J*=5.6, 2.0 Hz, pyridine-H), 6.59 (1H, dd, *J*=5.8, 2.2 Hz, pyridine-H), 6.43 (1H, d, *J*=2.1 Hz, pyridine-H), 5.17 (1H, s, OH), 3.80~3.70 (6H, m, 3-OCH<sub>2</sub>), 3.69~3.64 (1H, m, CH), 3.59 (2H, m, OCH<sub>2</sub>), 2.17 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.87 (2H, d, *J*=8.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.62 (1H, t, *J*=7.8 Hz, CH), 1.41 (2H, d, *J*=12.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.04 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 0.96 - 0.92 (2H, m, CH<sub>2</sub>); HR-MS (ESI) for C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: Calcd. 476.2292; Found 476.2281。

4-(4-((4-((1-环丙基-3-苯基-1*H*-吡唑-4-基)氧基)吡啶-2-基)氨基)吡啶-2-基)四氢-2*H*-吡喃-4-醇(**B3**)

制备方法同化合物 **A5**,将 2-溴-1-(四氢-2*H*-吡喃-4-基)乙-1-酮换成 2-溴-1-苯乙烷-1-酮,得白色固体 65 mg,收率 21%;mp: 137~139 °C;纯度 99.6%;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.49 (1H, s, pyrazole-H), 8.23 (1H, d, *J*=5.6 Hz, pyridine-H),

8.16 (1H, d,  $J=5.8$  Hz, pyridine-H), 8.12 (1H, s, NH), 7.76 (1H, d,  $J=1.6$  Hz, pyridine-H), 7.70 (2H, d,  $J=7.4$  Hz, Ar-H), 7.66 (1H, dd,  $J=5.6, 1.9$  Hz, pyridine-H), 7.36 (2H, t,  $J=7.6$  Hz, Ar-H), 7.28 (1H, d,  $J=7.4$  Hz, Ar-H), 6.67 (1H, dd,  $J=5.8, 2.1$  Hz, pyridine-H), 6.43 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, pyridine-H), 5.17 (1H, s, OH), 3.82 (1H, m, CH), 3.79~3.63 (4H, m, 2-OCH<sub>2</sub>), 2.16 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.39 (2H, d,  $J=12.9$  Hz, CH<sub>2</sub>), 1.16 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.04 (2H, m, CH<sub>2</sub>); HR-MS (ESI) for C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: Calcd. 470.2187; Found 470.2180.

4-(4-((4-((1-环丙基-3-(2-氟苯基)-1H-吡唑-4-基)氧基)吡啶-2-基)氨基)吡啶-2-基)四氢-2H-吡喃-4-醇(B4)

制备方法同化合物A5,将2-溴-1-(四氢-2H-吡喃-4-基)乙-1-酮换成2-溴-1-(2-氟苯基),得白色固体32 mg,收率22%;mp: 67~69 °C;纯度93.6%;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.50 (1H, s, pyrazole-H), 8.23 (1H, d,  $J=5.6$  Hz, pyridine-H), 8.16 (1H, s, NH), 8.09 (1H, d,  $J=5.9$  Hz, pyridine-H), 7.76 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, pyridine-H), 7.67 (1H, dd,  $J=5.6, 1.9$  Hz, pyridine-H), 7.54 (1H, m, Ar-H), 7.44~7.35 (1H, m, Ar-H), 7.27~7.16 (2H, m, Ar-H), 6.57 (1H, dd,  $J=5.8, 2.2$  Hz, pyridine-H), 6.43 (1H, d,  $J=2.1$  Hz, pyridine-H), 5.19 (1H, s, OH), 3.90~3.81 (1H, m, CH), 3.80~3.64 (4H, m, 2-OCH<sub>2</sub>), 2.16 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.38 (2H, d,  $J=12.9$  Hz, CH<sub>2</sub>), 1.22~1.12 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.04 (2H, m, CH<sub>2</sub>); HR-MS (ESI) for C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: Calcd. 488.2092; Found 488.2085.

4-(4-((4-((1-环丙基-3-(3-氟苯基)-1H-吡唑-4-基)氧基)吡啶-2-基)氨基)吡啶-2-基)四氢-2H-吡喃-4-醇(B5)

制备方法同化合物A5,将2-溴-1-(四氢-2H-吡喃-4-基)乙-1-酮换成2-溴-1-(3-氟苯基),得白色固体28 mg,收率19%;mp: 117~119 °C;纯度99.8%;<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.51 (1H, s, pyrazole-H), 8.24 (1H, d,  $J=5.6$  Hz, pyridine-H), 8.17 (1H, d,  $J=5.9$  Hz, pyridine-H), 8.15 (1H, s, NH), 7.77 (1H, d,  $J=1.4$  Hz, pyridine-H), 7.67 (1H, dd,  $J=5.5, 1.8$  Hz, pyridine-H), 7.54 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, Ar-H), 7.48~7.35 (2H, m, Ar-H), 7.18~7.07 (1H,

m, Ar-H), 6.69 (1H, dd,  $J=5.8, 2.1$  Hz, pyridine-H), 6.44 (1H, d,  $J=1.9$  Hz, pyridine-H), 5.17 (1H, s, OH), 3.84 (1H, m, CH), 3.80~3.67 (4H, m, 2-OCH<sub>2</sub>), 2.16 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.40 (2H, d,  $J=12.9$  Hz, CH<sub>2</sub>), 1.22~1.15 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.09~0.98 (2H, m, CH<sub>2</sub>); HR-MS (ESI) for C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: Calcd. 488.2092; Found 488.2085.

### 2.3 ALK5激酶抑制活性评价

将化合物溶解于指示剂量的DMSO中(从10 μmol/L按3倍稀释),用Echo转移化合物100 nL到384孔反应板中。将ALK5激酶加入1倍激酶缓冲液(40 mmol/L Tris, pH 7.5, 0.10% BSA, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L DTT)中,形成2倍酶溶液,向384孔反应板中加入2.5 μL,室温孵育10 min。将FAM标记的多肽和ATP加入1倍激酶缓冲液,形成2倍底物溶液,并转移2.5 μL至384孔反应板,于28 °C孵育120 min。转移反应液5 μL到一块新的384孔板反应孔中,加入ADP-Glo试剂5 μL终止反应,于28 °C孵育120 min。转移激酶检测试剂10 μL到反应孔中,振荡1 min,室温静置30 min。在Envision上读取发光值。

### 2.4 NIH3T3细胞活性评价

Luc-Smad2/3-NIH3T3细胞于10 cm培养皿中正常培养至汇合度达90%,消化后收集至15 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min后,去除上清液,用培养基1 mL重悬后,稀释10倍计数,根据计数后的结果稀释细胞,将每孔4 000个细胞数传入96孔板中(每孔加入重悬细胞100 μL)。称取化合物2 mg,使用DMSO配制成4 mmol/L母液,用2% FBS培养基稀释,加入1×化合物溶液100 μL,使其终浓度分别为20 000, 5 000, 1 250, 312.5, 78.125, 19.53, 4.88, 1.22 nmol/L,每孔TGF β1终浓度为4 ng/mL,与化合物一起用2% FBS培养基稀释。然后移去细胞上清液,每孔加入Glo Lysis Buffer 100 μL,缓慢摇晃使其均匀溶解细胞,室温裂解5 min。每孔加入Bright-glo luciferase assay system 100 μL,室温孵育5 min,振荡2 min,将上清液180 μL转入白底96孔板,检测化学发光信号。

### 2.5 药代动力学评价

单次口服给药(*po*)组:10 mg/kg,0.2 mL/10 g;单次尾静脉注射给药(*iv*)组:1 mg/kg,0.1 mL/10 g,  $n=3$ ; *po*或给药后于5、15、30 min,1、2、6、10、24 h自

眼眶静脉丛采血于肝素化EP管(0.6 mL)中,暂置于碎冰上。然后以 8 000 r/min 离心 5 min,转移上层血浆 15  $\mu$ L,加甲醇-乙腈(1:1)150  $\mu$ L 沉淀(含 1 ng/mL 邻甲苯海拉明),振荡 3 min,4 500 r/min,离心 5 min,取上清液(容器:2 mL 深孔板)50  $\mu$ L,加入稀释剂(甲醇-水,1:1)500  $\mu$ L,振荡 3 min,4 500 r/min 离心 5 min,转移上清液 200  $\mu$ L 用 LC-MS/MS 进样分析。根据上述步骤所得血药浓度数据绘制血药浓度-时间曲线图,用 WinNonlin 软件求算药代动力学参数。

### 3 结果与讨论

目标化合物的体外活性结果如表 1 所示。在 A 系列化合物中,将 A 区叔醇替换成吸电子基(A1-A2),激酶抑制活性明显降低。当引入不同环状给电子基(A3~A5)时,抑制活性与阳性药相当或更优,其中化合物 A5 的抑制活性( $IC_{50} = 2.4$  nmol/L)最优,比阳性药提升 2.5 倍。A 区构效关系表明,引入给电子基有助于增强活性,而吸电子基的引入则会导致活性明显损失。在细胞活性测试中,化合物 A5 对 NIH3T3 细胞中 TGF $\beta$ -ALK5-SMAD2/3 信号通路表现出较好的抑制活性( $IC_{50} = 69.6$  nmol/L),于是确定四氢吡喃醇为 A 区优势基团。

通过固定四氢吡喃醇,利用生物电子等排,将 B 区四氢吡喃环替换成二氟环己烷(B1),相比于阳性药,抑制活性显著提高( $IC_{50} = 3.8$  nmol/L),可能是因为二氟甲基的体积较氧原子略大,疏水作用的加强导致抑制活性提高。引入桥环结构(B2)活性与阳性药相当,表明四氢吡喃环上位阻对活性影响相对较小。当用苯环替换四氢吡喃环时(B3),抑制活性得到显著改善,可能苯环与结合口袋中某些氨基酸残基存在  $\pi$ - $\pi$  堆积作用,使得结合力增强。此外,苯环上取代基及其位置对活性有一定影响,引入氟原子可进一步提高活性,且氟位于邻位时(B4)抑制活性更强( $IC_{50} = 1.4$  nmol/L),具有阳性药 31 倍的优势。在细胞活性测试中,化合

物 B4 对 NIH3T3 细胞中 TGF $\beta$ -ALK5-SMAD2/3 信号通路表现出最佳的抑制活性( $IC_{50} = 14.2$  nmol/L)。基于化合物 B4 良好的体外抑制活性,对其药代动力学性质做进一步考察。

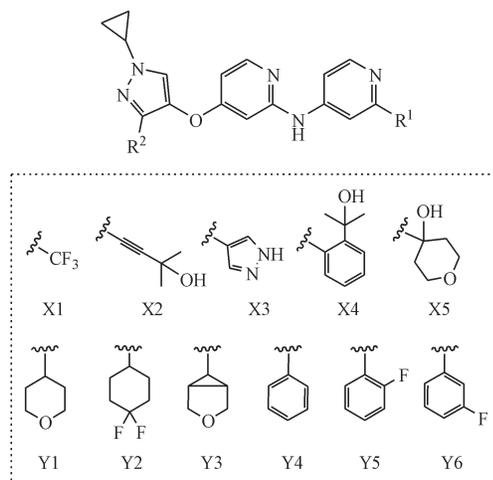


Table 1  $IC_{50}$  of the target compounds against ALK5 enzyme and NIH3T3 cell

| Compd.     | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> | ALK5/(nmol/L) | NIH3T3/(nmol/L) |
|------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|
| A1         | X1             | Y1             | 344           | ND              |
| A2         | X2             | Y1             | 179           | ND              |
| A3         | X3             | Y1             | 37            | ND              |
| A4         | X4             | Y1             | 36            | ND              |
| A5         | X5             | Y1             | 16            | 69.6            |
| B1         | X5             | Y2             | 3.8           | 58.2            |
| B2         | X5             | Y3             | 62            | 384.8           |
| B3         | X5             | Y4             | 5.4           | 27.1            |
| B4         | X5             | Y5             | 1.4           | 14.2            |
| B5         | X5             | Y6             | 2.4           | 22.2            |
| LY-3200882 |                |                | 41.1          | ND              |

ND: Not determined

药代动力学的评价结果如表 2 所示。化合物 B4 呈现较低的清除率( $CL = 5.2$  L $\cdot$ h<sup>-1</sup> $\cdot$ kg<sup>-1</sup>),暴露量( $AUC = 1 584.0$  ng/mL $\cdot$ h)良好,半衰期为 1.8 h,口服生物利用度达到 85.0%,基本具备每天一次口服给药的潜力。

Table 2 Pharmacokinetic parameters of compound B4<sup>a</sup>

| Compd. | po(10 mg/kg) |                        |                                      |        | iv (1 mg/kg)       |   |                   |                                    |
|--------|--------------|------------------------|--------------------------------------|--------|--------------------|---|-------------------|------------------------------------|
|        | $t_{1/2}$ /h | $c_{max}$ /<br>(ng/mL) | $AUC_{(0-t)}$ /<br>(ng/mL $\cdot$ h) | $F$ /% | $c_0$ /<br>(ng/mL) | $CL$ /<br>(L $\cdot$ h <sup>-1</sup> $\cdot$ kg <sup>-1</sup> ) | $V_d$ /<br>(L/kg) | $AUC_{0-t}$ /<br>(ng/mL $\cdot$ h) |
| B4     | 1.8          | 480.3                  | 1 584.0                              | 85.0   | 417.8              | 5.2   | 3.5               | 186.4                              |

<sup>a</sup> Compound in a solution of 20% PG, 5% EtOH, 5% solutol and 70% water

为了进一步说明化合物的构效关系,本研究使用分子对接方法研究了化合物 **B4** 与靶蛋白 ALK5 在活性位点的结合模式(pdb: 2wou)。通过图4可以看出,化合物 **B4**(紫色)保留了在 ALK5 激酶铰链区与 His283 的直接氢键作用,以及选择性口袋中水分子介导的氢键相互作用。另外发现化

合物 **B4** 与 LY-3200882(绿色)母核部分叠合良好,与 LY-3200882 不同的是,溶剂区吡喃环上的羟基与 Asp290 形成一个氢键作用,B 区苯环上的对位氢原子与 Lys337 形成一个非经典氢键。这些信息为后续 ALK5 抑制剂的设计提供了借鉴和理论基础。

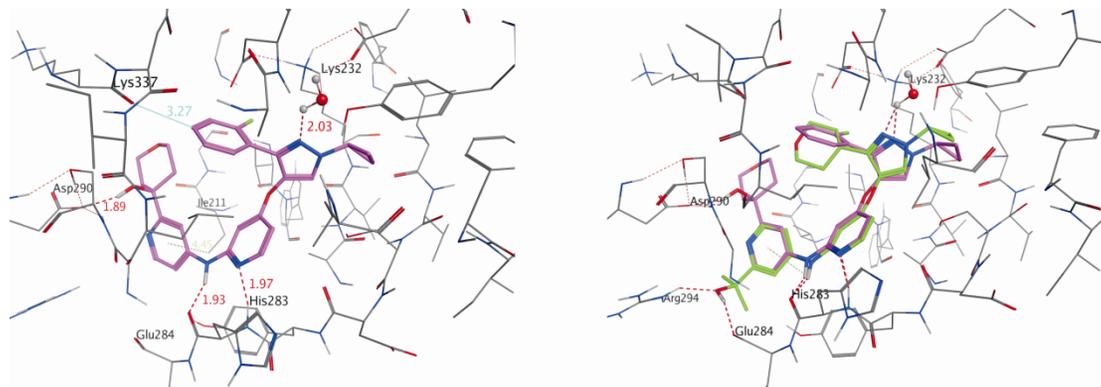


Figure 4 Proposed binding mode of **B4** (purple) and overlaid with LY-3200882 (green)

#### 4 小结

本研究通过分析 LY-3200882 与 ALK5 的结合模式,保留对活性起关键作用的母核区域,利用生物电子等排和构象限制等策略,设计并合成了 10 个目标化合物。通过两轮优化得到化合物 **B4**,不仅表现出显著的体外抑制活性,而且具备良好的药代动力学性质,具有进一步开发的潜在价值。

#### 参考文献

- [1] Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  family: context-dependent roles in cell and tissue physiology [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, **8**(5):a021873.
- [2] Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of transforming growth factor  $\beta$  superfamily signalling: background matters [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, **44**(3):469-474.
- [3] Xiaoling T, Wencai G, Lingyun Z, et al. Physical interaction of STAT1 isoforms with TGF- $\beta$  receptors leads to functional

crosstalk between two signaling pathways in epithelial ovarian cancer [J]. *J Exp Clin Oncol*, 2018, **37**(1):103.

- [4] Heldin CH, Moustakas A. Signaling receptors for TGF- $\beta$  family members [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, **8**(8):a022053.
- [5] Padua D, Massagué Joan. Roles of TGF $\beta$  in metastasis [J]. *Cell Res*, 2016, **19**(1):89-102.
- [6] Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGF $\beta$  in the tumor microenvironment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, **13**(11):788-799.
- [7] Battle E, Massague J. Transforming growth factor-beta signaling in immunity and cancer [J]. *Immunity*, 2019, **50**(4):924-940.
- [8] Pei H, Parthasarathy S, Joseph S, et al. LY3200882, a novel, highly selective TGF $\beta$ R1 small molecule inhibitor [J]. *Cancer Res*, 2017, **77**:955.
- [9] Goldberg FW, Ward RA, Powell SJ, et al. Rapid generation of a high quality lead for transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) type I receptor (ALK5) [J]. *J Med Chem*, 2009, **52**(23):7901-7905.

## 米拉贝隆的合成工艺改进

韩成群, 邹巧根\*, 孙茜, 夏云燕

(南京工业大学药学院, 南京 211800)

**摘要** 米拉贝隆是一种 $\beta$ -3肾上腺素受体的激动剂, 用于治疗膀胱过度活动症。本研究在文献方法的基础上, 对米拉贝隆的合成工艺进行了改进。以盐酸对硝基苯乙胺、(R)-扁桃酸和2-氨基噻唑-4-乙酸为起始原料, 经过酰胺缩合、羰基还原、硝基还原及酰胺缩合4步反应以及一步精制, 得到高纯度的目标产物, 总收率39%。将第3步硝基还原的氢源, 由氢气改为了甲酸铵, 增加了工业化可行性; 并且对米拉贝隆的精制进行了研究, 提高了米拉贝隆的纯度。改进后的工艺操作简化, 反应条件温和, 为米拉贝隆的制备和精制提供了一种新的方法。

**关键词** 米拉贝隆; 膀胱过度活动症; 硝基还原; 工艺改进; 合成

**中图分类号** R914 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)04-0449-05

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200409

引用本文 韩成群, 邹巧根, 孙茜, 等. 米拉贝隆的合成工艺改进[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 449 - 453.

Cite this article as: HAN Chengqun, ZOU Qiaogen, SUN Qian, et al. Improvement of synthesis process of mirabegron[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(4): 449 - 453.

## Improvement of synthesis process of mirabegron

HAN Chengqun, ZOU Qiaogen\*, SUN Qian, XIA Yunyan

School of Pharmaceutical Sciences, Nanjing Tech University, Nanjing 211800, China

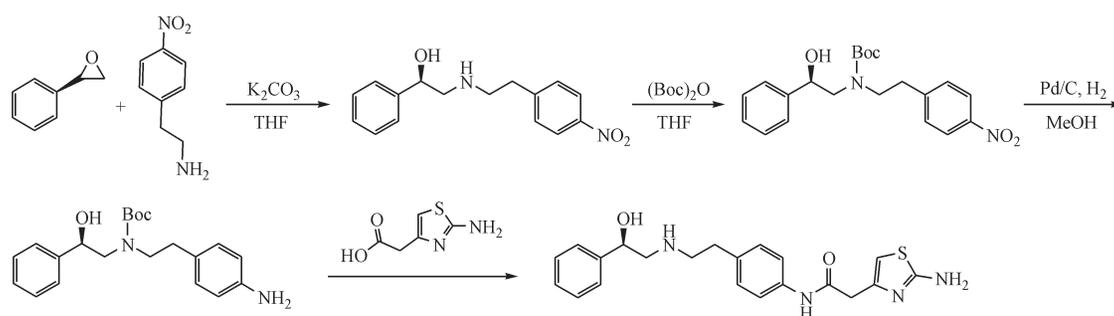
**Abstract** Mirabegron is an agonist of human  $\beta$ -3 adrenergic receptor used to treat symptoms of overactive bladder. In this study, the synthesis process of mirabegron was improved based on literatures. Using *p*-nitrophenethylamine hydrochloride, (*R*)-mandelic acid and 2-aminothiazole-4-acetic acid as starting materials, the target product with high purity was obtained through four steps of amide condensation, carbonyl reduction, nitro reduction and amide condensation, and one-step purification, with a total yield of 39%. In this study, the hydrogen source of nitro reduction in step 3 was changed from hydrogen to ammonium formate, which increased the feasibility of industrialization, and mirabegron was refined to improve the purity of the product. The improved process has the advantages of simplified operation and mild reaction conditions, which provides a new method for the preparation and purification of mirabegron.

**Key words** mirabegron; overactive bladder; nitro reduction; process improvement; synthesis

米拉贝隆(mirabegron, 1)是一种 $\beta$ -3肾上腺素受体的激动剂, 由其通过刺激 $\beta$ -3肾上腺素受体, 松弛逼尿肌平滑肌, 从而增加了膀胱容量, 用于治疗膀胱过度活动症(OAB)的症状, 如急迫性尿失禁、尿急和尿频<sup>[1]</sup>。2011年9月16日在日本上市, 2012年6月28日经FDA批准用于治疗成年人OAB<sup>[2-3]</sup>。米拉贝隆作为一种全新作用机制的药物, 对于OAB的治疗具有重要意义<sup>[4-7]</sup>。

文献报道的米拉贝隆的合成方法主要有以下4种。

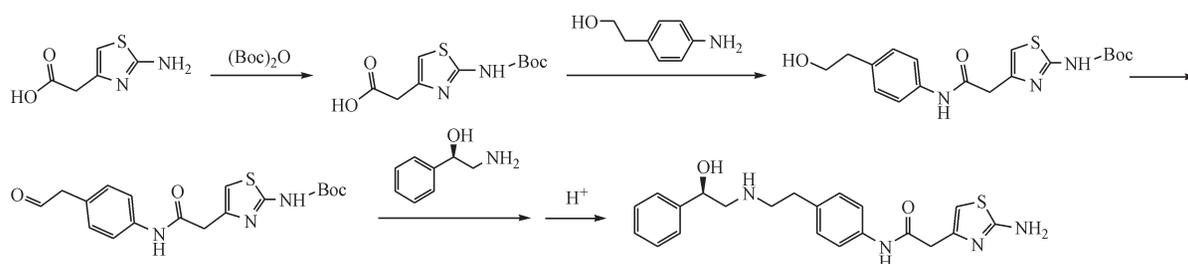
路线1<sup>[8-10]</sup>: 以(*R*)-氧化苯乙烯和对硝基苯乙胺为原料, 缩合得氨基醇, 然后经氨基保护、硝基还原、与2-氨基噻唑-4-乙酸缩合、脱保护基, 得到米拉贝隆。该路线使用的(*R*)-氧化苯乙烯属中等毒性化学品, 且价格比较昂贵; 另外使用氢气还原, 对设备和环境要求较高, 不适合大规模生产。



**Scheme 1** Synthesis of mirabegron by route 1

路线 2<sup>[11]</sup>: 2-氨基噻唑-4-乙酸为起始物料, 首先对氨基 Boc 保护, 再与 4-氨基苯乙醇缩合, 然后用氧化剂氧化成醛, 最后与 (*R*)-2-氨基-1-苯乙醇反应, 同时脱去 Boc, 得米拉贝隆。该路线使用的

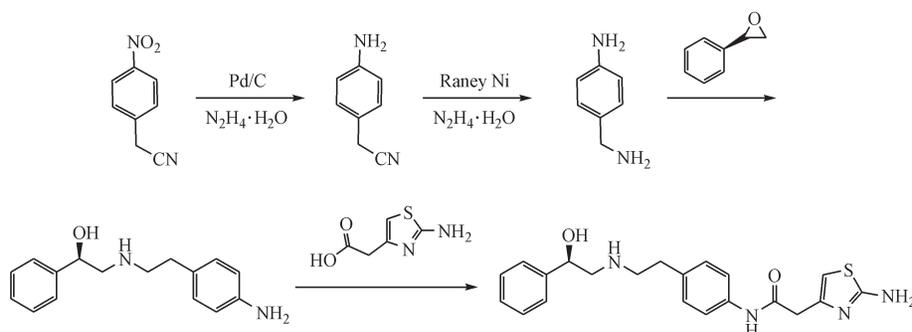
原料 (*R*)-2-氨基-1-苯乙醇价格昂贵, 考虑工艺成本, 不适合大规模生产; 另外, 第三步羟基氧化, 易引入不必要的杂质 (如酸的杂质) 等。



**Scheme 2** Synthesis of mirabegron by route 2

路线 3<sup>[12]</sup>: 以对硝基苯乙腈为起始物料, 经硝基还原、氰基还原、与 (*R*)-氧化苯乙烯缩合, 最后与 2-氨基噻唑-4-乙酸缩合得到米拉贝隆。本工艺

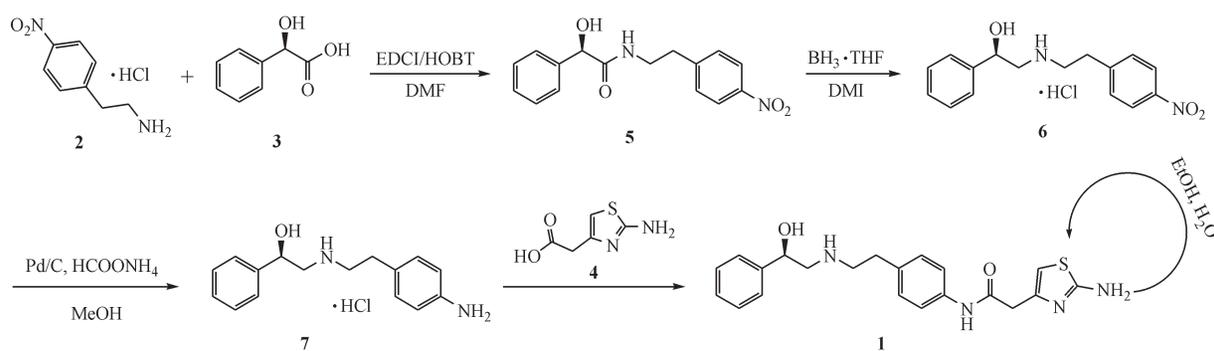
由于对氨基苯乙胺有两个活性基团, 故与 (*R*)-氧化苯乙烯反应时易产生杂质; 另外雷尼镍价格昂贵, 成本较大。



**Scheme 3** Synthesis of mirabegron by route 3

在分析文献方法的基础上<sup>[13-17]</sup>, 本研究对米拉贝隆的制备工艺进行了改进。以对硝基苯乙胺盐酸盐 (**2**)、(*R*)-扁桃酸 (**3**) 和 2-氨基噻唑-4-乙酸 (**4**) 为起始原料, 经过酰胺缩合、羰基还原、硝基还原及酰胺缩合 4 步反应。第三步的硝基还原反应文献

均采用氢气作为还原剂, 并且需要加压才能反应完全, 收率 90%, 本研究采用甲酸铵作为氢源, 收率 90%, 易于工业化生产。最后采用乙醇-水为重结晶溶剂对米拉贝隆进行精制, 为获得纯度更高的米拉贝隆提供了依据。



Scheme 4 Synthetic route of mirabegron

## 1 实验部分

### 1.1 仪器及试剂

Waters 高效液相色谱仪, Waters Q-TOF Micro™ 质谱仪(美国 Waters 公司); AV-300 型核磁共振仪(德国 Bruker 公司, TMS 为内标); WZZ-1 自动指示旋光仪(上海精密科学仪器有限公司)。

(*R*)-扁桃酸(芷威化学科技有限公司, 纯度 99.9%, 光学纯度 99.9%); 盐酸对硝基苯乙胺(芷威化学科技有限公司, 纯度 99.7%); 2-氨基噻唑-4-乙酸(芷威化学科技有限公司, 纯度 98.9%); 所用溶剂均为工业级(南京试剂有限公司); 其他所用试剂均为市售分析纯。

### 1.2 化学合成

**1.2.1 (*R*)-2-羟基-*N*-[2-(4-硝基苯基)乙基]-2-苯乙酰胺(5)的制备** 向 500 mL 反应瓶中加入 *N,N*-二甲基甲酰胺 100 mL, 然后水浴控制温度, 搅拌下依次加入对盐酸硝基苯乙胺(26.6 g, 0.13 mol, 2)、(*R*)-扁桃酸(20.0 g, 0.13 mol, 3)、三乙胺 13.3 g、1-羟基苯并三氮唑(HOBT) 17.7 g 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI) 27.7 g(有放热现象)。30 °C 搅拌反应, TLC 监控(GF<sub>254</sub> 薄层板, 展开剂: 乙酸乙酯-甲醇, 5:1)至 SMB 荧光点消失。反应液中加入水和乙酸乙酯萃取分相; 水相再用乙酸乙酯萃取, 合并有机相; 再分别用 1 mol/L 盐酸、20% 碳酸钾溶液和水洗涤。有机相用无水硫酸钠搅拌干燥 2 h, 抽滤。母液 40 °C 减压浓缩至干。

向浓缩物中加入甲苯 100 mL 搅拌, 加热使其溶解。降温至 20 °C, 保温搅拌 2 h, 过滤。50 °C 鼓风干燥至恒重, 获得黄色结晶性粉末 32.2 g, 收率: 81.6%。光学纯度 99.9%; mp 108~111 °C; ESI/MS

$m/z$ : 323.2 [M+Na]<sup>+</sup>, 299.2 [M-H]<sup>-</sup>。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) δ: 2.86~2.90 (2H, t, *J*=6.8 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.33~3.47 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.87~4.88 (1H, d, *J*=4.4 Hz, CH), 6.11~6.12 (1H, d, *J*=4.5 Hz, OH), 7.26~7.34 (5H, m, Ar-H), 7.37~7.40 (2H, d, *J*=8.5 Hz, Ar-H), 8.04~8.07 (3H, m, Ar-H, NH)。

**1.2.2 (*R*)-2-[[2-(4-硝基苯基)乙基]氨基]-1-苯乙醇盐酸盐(6)的制备** 向 500 mL 反应瓶中加入四氢呋喃 90 mL, 1,3-二甲基-2-咪唑啉酮(DMI) 90 mL, 搅拌下加入中间体 5(30.0 g, 0.10 mol) 至溶解。降低温度至 -15 °C, 滴加入 1 mol/L 甲硼烷合四氢呋喃溶液(BH<sub>3</sub>·THF) 200 mL。滴加完毕后, 混合物升至 70 °C 搅拌反应, TLC(GF<sub>254</sub> 薄层板, 展开剂: 乙酸乙酯)监控至中间体 5 荧光点消失。将反应液降低温度至 0 °C, 再向反应液中缓慢依次滴加入甲醇 15 mL 和浓盐酸 20 mL, 滴加完毕后, 反应液升至 65 °C, 搅拌淬灭 1 h。降低温度, 向反应液中加入 30% 碳酸钾溶液和乙酸乙酯萃取分相; 水相再用乙酸乙酯萃取, 合并有机相; 用水搅拌洗涤 3 次。有机相用无水硫酸钠搅拌干燥 2 h, 抽滤。母液 40 °C 减压浓缩至干。

向浓缩物中加入异丙醇 40 mL, 升温搅拌使其溶解。再滴加入浓盐酸 10.0 g, 有白色固体析出, 降低温度至 20 °C, 保温搅拌 5 h, 过滤。50 °C 鼓风干燥至恒重, 获得淡黄色结晶性粉末 29.0 g, 收率 89.9%。光学纯度 99.9%; mp 121~124 °C; ESI/MS( $m/z$ ): 287.3 [M-HCl+H]<sup>+</sup>。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz) δ: 3.01~3.25 (6H, m, CH<sub>2</sub>), 5.07~5.10 (1H, d, CH), 6.24 (1H, s, OH), 7.29~7.43 (5H, m, Ar-H), 7.56~7.59 (2H, d, *J*=8.3 Hz, Ar-H), 8.17~8.19 (2H,

d,  $J=8.3$  Hz, Ar-H), 9.48(2H, br, NH, HCl)。

1.2.3 (R)-2-[[2-(4-氨基苯基)乙基]氨基]-1-苯乙醇盐酸盐(7)的制备 在500 mL反应瓶中,加入甲醇250 mL,中间体6(25.0 g, 0.08 mol), 0.5% 钯炭(Pd/C)2.5 g, 甲酸铵25.0 g, 升温至50~60 °C反应, TLC(GF<sub>254</sub>薄层板, 展开剂: 乙酸乙酯-甲醇(4:1)监控至中间体6荧光点消失。降低温度, 过滤钯炭, 40 °C减压浓缩除去甲醇。向浓缩物中加入乙酸乙酯和饱和碳酸氢钠水溶液萃取分相; 水相再用乙酸乙酯萃取, 合并有机相; 再依次用水搅拌洗涤3次。有机相用无水硫酸钠搅拌干燥2 h, 过滤。母液40 °C减压浓缩至干。

向浓缩物中加入异丙醇180 mL, 升温搅拌使其溶解。再滴加入浓盐酸10.0 g, 有白色固体析出。降低温度至20 °C, 保温搅拌5 h, 过滤。50 °C鼓风循环干燥至恒重, 获得类白色结晶性粉末20.4 g, 收率90.0%。光学纯度99.9%; mp 130~133 °C; ESI/MS  $m/z$ : 257[M-HCl+H]<sup>+</sup>。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 2.87~2.90 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.97~3.16(4H, m, CH<sub>2</sub>), 5.06~5.09 (3H, m, OH, NH<sub>2</sub>), 6.22 (1H, s, CH), 6.55~6.57(2H, d,  $J=7.7$  Hz, Ar-H), 6.88~6.91 (2H, d,  $J=7.7$  Hz, Ar-H), 7.29~7.42(5H, m, Ar-H), 9.22(2H, br, NH, HCl)。

1.2.4 (R)-2-(2-氨基噻唑-4-基)-*N*-4'-[2-[(2-羟基-2-苯基乙基)氨基乙基]苯基]乙酰胺(米拉贝隆, 1)的制备 在500 mL反应瓶中, 依次加入纯化水200 mL, 浓盐酸6.6 g, 搅拌下加入中间体7(20.0 g, 0.07 mol)和2-氨基噻唑-4-乙酸(10.9 g, 0.07 mol, 4), 再加入1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI)14.4 g, 30 °C搅拌反应, TLC(GF<sub>254</sub>薄层板, 展开剂: 乙酸乙酯-甲醇, 5:1)监控至中间体7荧光点消失。向反应液中缓慢滴加NaOH水溶液, 滴加完毕后, 室温搅拌1 h, 过滤, 纯化水淋洗。

将固体湿品转入反应瓶中, 再加入纯化水200 mL, 搅拌打浆0.5 h, 抽滤, 纯化水淋洗至滤液的pH 7~8, 50 °C鼓风循环干燥至恒重, 获得类白色粉末状固体24.2 g, 收率89.4%。光学纯度99.9%; mp 141~143 °C(文献值<sup>[18]</sup>: 约144 °C); ESI/MS  $m/z$ : 397[M+H]<sup>+</sup>。

<sup>1</sup>H NMR(DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 1.64(1H, s, NH), 2.65~2.67(4H, m, CH<sub>2</sub>), 2.75~2.77(2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.48(2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.61~4.65(1H, br, CH), 5.27(1H, br, OH), 6.32(1H, s, Ar-H), 6.93(2H, s, NH<sub>2</sub>), 7.11~7.14(2H, d,  $J=7.7$  Hz, Ar-H), 7.20~7.24(1H, m, Ar-H), 7.27~7.35(4H, m, Ar-H), 7.51~7.54(2H, d,  $J=7.7$  Hz, Ar-H), 10.02(1H, br, NH)。

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300 MHz)  $\delta$ : 35.35, 39.49, 50.70, 57.47, 71.45, 102.53, 118.99, 125.81, 126.67, 127.83, 128.70, 135.08, 137.11, 144.54, 145.82, 167.73, 168.21。

文献值<sup>[15]</sup>: <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)  $\delta$ : 1.60 (1H, s), 2.59~2.66 (4H, m), 2.68~2.80 (2H, m), 3.45 (2H, s), 4.59 (1H, br), 5.21 (1H, br), 6.30 (1H, s), 6.89 (2H, s), 7.11 (2H, d,  $J=8.5$  Hz), 7.19~7.23 (1H, m), 7.27~7.33 (4H, m), 7.49 (2H, d,  $J=8.5$  Hz), 9.99 (1H, s)。  
1.2.5 米拉贝隆(1)的精制 在500 mL反应瓶中, 依次加入乙醇200 mL, 水200 mL, 米拉贝隆粗品20.0 g, 活性炭0.2 g, 升温至80 °C。加入保温搅拌1 h。趁热抽滤, 固体弃去。母液在室温下自然缓慢降温至20 °C, 然后保温搅拌析晶8 h。抽滤, 50%乙醇水溶液淋洗, 50 °C鼓风干燥至恒重, 获得类白色结晶性粉末13.2 g, 收率为66.0%, 纯度99.88%, 光学纯度99.92%,  $[\alpha]_D^{20}$ : -20.9°(文献值<sup>[18]</sup>: -19.8°)。

元素分析: C 63.83%, H 6.32%, N 13.86%(理论: C 63.61%, H 6.10%, N 14.13%)。

## 2 结果与讨论

本研究以盐酸对硝基苯乙胺(2)、(R)-扁桃酸(3)和2-氨基噻唑-4-乙酸(4)为起始原料, 经过酰胺缩合、羰基还原、硝基还原、酰胺缩合4步反应, 再通过乙醇/水为溶剂, 对米拉贝隆进行精制, 获得高纯度的米拉贝隆。经高效液相色谱法检测纯度为99.88%, 核磁共振谱图和质谱图分析均与米拉贝隆结构基本一致。经过改进后的合成工艺, 反应条件温和, 避免使用氢气的安全隐患, 并且未使用昂贵和较大毒性试剂, 为米拉贝隆的制备提供了一种安全可靠的新方法。

## 参 考 文 献

- [1] Zhou X, Cui SY, Run HL, *et al.* Meta-analysis of mirabegron in the treatment of overactive bladder [J]. *J Mod Urol*(现代泌尿外科杂志), 2015, **20**(7):498-504.
- [2] Tang QD, Gong P. Mirabegron [J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2012, **22**(6):544.
- [3] Fan M. Mirabegron, a treatment for overactive bladder [J]. *Prog Pharm Sci*(药学进展), 2012, **36**(3):133-135.
- [4] Andersson KE, Martin N, Nitti V. Selective  $\beta_3$ -adrenoceptor agonists for the treatment of overactive bladder [J]. *J Urol*, 2013, **190**(4):1173-1180.
- [5] Deng XL, Chen WH, Guan ZC. Research progress of  $\beta_3$ -adrenergic receptor agonist in the treatment of overactive bladder [J]. *Tianjin Med J*(天津医药), 2014, **42**(3):285-287.
- [6] Li HY, Zhou FH, Ma YL, *et al.* Mirabegron, a new treatment for overactive bladder [J]. *Chin J New Drug*(中国新药杂志), 2014, **23**(19):2215-2218.
- [7] Michel MC, Ochodnický P, Homma Y, *et al.*  $\beta$ -Adrenoceptor agonist effects in experimental models of bladder dysfunction [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2011, **131**(1):40-49.
- [8] Zhang H, Li Y, Cheng SJ, *et al.* Synthetic method of mirabegron(米拉贝隆的合成方法):103896872A[P]. 2014-07-02.
- [9] Maruyama T, Suzuki T, Onda K, *et al.* Amide derivatives or salts thereof:09920607[P]. 1994-04-29.
- [10] Maruyama T, Suzuki T, Onda K, *et al.* Amide derivatives or salts thereof:6346532[P]. 2002-02-12.
- [11] Hu F, Wang SY, Wang XJ, *et al.* (*R*)-4-(2-(2-hydroxy-2-phenylethylamine) ethyl) tert-butylanilinate ((*R*)-4-(2-(2-羟基-2-苯乙胺)乙基)苯胺基甲酸叔丁酯):103232352[P]. 2013-08-07.
- [12] Mao LF, Yuan LS, Yan MY, *et al.* Study on the synthesis of mirabegron [J]. *Chem Res Appl*(化学研究与应用), 2016, **28**(4):521-524.
- [13] Kawazoe S, Sakamoto K, Awamura Y, *et al.* Alpha-form or beta-form crystal of acetanilide derivative:1440969 [P]. 2004-07-28.
- [14] Mathad VT, Deshmukh DG, Varpe SP, *et al.* A process for preparation of mirabegron and alpha crystalline form thereof:2015044965[P]. 2015-04-02.
- [15] Takasu T, Sato S, Ukai M, *et al.* Therapeutic agent for hyperactive hyperactivity of bladder containing acetate phthalanilide as active ingredient(含乙酸酐基苯胺衍生物作为活性成分的膀胱活动过度的治疗药物):1711085A[P]. 2005-12-21.
- [16] Takasu T, Sato S, Ukai M, *et al.* Remedy for overactive bladder comprising acetic acid anilide derivative as the active ingredient:2004041276 [P]. 2004-05-21.
- [17] Zhou JC. Applications of ammonium formate and other derivatives of formic acid in the drug synthesis [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 1989(5):313-320.
- [18] Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Selective  $\beta_3$  adrenergic receptor agonist Mirabegron tablets (Betanis® Tablets 25 mg 50 mg) [EB/OL]. (2019-07-01) [2020-04-30]. <https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/GeneralList/2590014>.

## 滇重楼地上部分化学成分研究

陶俊杰, 杨杰, 闻晓东\*

(中国药科大学中药学院, 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 211198)

**摘要** 利用硅胶柱色谱、MCI柱色谱和制备高效液相色谱等技术对滇重楼地上部分的化学成分进行研究, 结果从滇重楼地上部分90%乙醇提取物的正丁醇萃取部分中分离得到6个甾体皂苷类化合物, 根据理化性质和波谱数据鉴定为26-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-kryptogenin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranoside (**1**), dioseptemloside G (**2**), polyphyllaside III (**3**), chonglouoside SL-19 (**4**), protodioscin (**5**), chonglouoside SL-5 (**6**)。其中化合物**1**为新化合物, 化合物**2**为首次从重楼属植物中分离得到。对以上化合物进行促血小板聚集活性以及细胞毒性评价, 结果发现: 6个化合物均未表现出明显的促血小板聚集作用; 化合物**2**和**4**对于人结肠癌细胞HT29具有较强的细胞毒性。

**关键词** 滇重楼; 甾体皂苷; 分离鉴定; 血小板聚集; 细胞毒性

中图分类号 R931.6 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0454-07

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200410

引用本文 陶俊杰, 杨杰, 闻晓东. 滇重楼地上部分化学成分研究[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 454 - 460.

Cite this article as: TAO Junjie, YANG Jie, WEN Xiaodong. Studies on the chemical constituents in the aerial parts of *Paris polyphylla* var. *Yunnanensis*[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(4): 454 - 460.

Studies on the chemical constituents in the aerial parts of *Paris polyphylla* var. *Yunnanensis*

TAO Junjie, YANG Jie, WEN Xiaodong\*

State Key Laboratory of Natural Medicines, School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

**Abstract** Six steroidal saponins were isolated from the *n*-butanol extract of 90% ethanol extract of the aerial parts of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* by silica gel for column chromatography, MCI column chromatography and preparative high performance liquid chromatography(HPLC). According to the physicochemical properties and spectral data, they were identified as 26-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-kryptogenin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranoside(**1**), dioseptemloside G(**2**), polyphyllaside III(**3**), chonglouoside SL-19(**4**), protodioscin(**5**), chonglouoside SL-5(**6**). Among these, compound **1** was a new compound, and compound **2** was obtained from *Paris* plants for the first time. The platelet aggregation activities and cytotoxicities of the above compounds were evaluated. The results showed that none of the isolated compounds showed significant platelet aggregation activity; compound **2** and **4** exhibited strong cytotoxicity against human colon adenocarcinoma cell line HT29.

**Key words** *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*; steroidal saponins; isolation and identification; platelet aggregation; cytotoxicity

This study was supported by National Key R&D Program of China (No. 2019 YFC1711000) and the National Natural Science Foundation of China(No. 81773877)

收稿日期 2020-02-13 \*通信作者 Tel: 025-86185045 E-mail: cpuwx@126.com

基金项目 国家重点研发计划资助项目(No. 2019YFC1711000); 国家自然科学基金资助项目(No. 81773877)

重楼是百合科(Liliaceae)重楼属(*Paris*)植物的总称,共有 26 个种及 14 个变种,广泛分布于欧亚大陆的热带至温带地区。我国分布有其中的 20 个种及数个变种,主要集中在西南各省区。重楼属植物药用历史悠久,早在《神农本草经》中就有记载,主治疗疮痈肿、蛇虫咬伤、跌扑伤痛等症<sup>[1-4]</sup>,是著名中成药云南白药、宫血宁胶囊的重要药物成分。现代药理研究表明,重楼所含有的甾体皂苷具有显著的止血作用<sup>[5-6]</sup>。滇重楼(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*)是重楼药材的重要基源植物,各版药典均有收录,但由于长期掠夺式的采挖,缺乏保护,滇重楼的野生资源日益枯竭。与此同时,滇重楼每年都可再生的地上部分一直被认为是非药用部位而被丢弃。为了扩大滇重楼植物的药用资源,本研究对滇重楼地上部分的甾体皂苷类成分进行了研究,为充分利用重楼属植物资源提供科学依据。

从滇重楼地上部分 90% 乙醇提取物中共分离得到 6 个甾体皂苷类化合物,利用 MS、IR、UV、1D 以及 2D NMR 等波谱技术对其结构进行鉴定,分别为 26-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-kryptogenin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\beta$ -D-glucopyranoside (**1**), dioseptemloside G (**2**), polyphylloside III (**3**), chonglouoside SL-19 (**4**), protodioscin (**5**), chonglouoside SL-5 (**6**)。其中化合物 **1** 为新化合物,化合物 **2** 为首次从重楼属植物中分离得到。对以上 6 个化合物进行促血小板聚集作用以及细胞毒性评价,结果发现:6 个化合物均未表现出明显的促血小板聚集作用;化合物 **2**、**4** 对于结肠癌细胞 HT29 具有较强的细胞毒性。

## 1 材料

### 1.1 仪器与试剂

Tensor 27 光谱仪、Bruker Avance DRX-500/600 核磁共振光谱仪(德国 Bruker 公司);Agilent 1100 series 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Alltech 2000 ES 蒸发光散射检测器(美国 Alltech 公司);R-100 旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司);LBY-NJ4 型血小板聚集仪(北京泰利康信公司);Multiskan FC 酶标仪、Forma 311 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国赛默飞世尔公司);D101-大孔吸附树脂(沧州宝恩吸附材料科

技有限公司);MCI-GEL 精细分离填料(日本三菱化学公司);ODS 柱色谱填料(日本 YMC 公司);薄层色谱硅胶板 GF<sub>254</sub> 及柱色谱硅胶(青岛海洋化工有限公司)。

### 1.2 药材

滇重楼药材于 2017 年 8 月采自云南腾冲地区,由中国药科大学中药分析系王强教授鉴定为百合科(Liliaceae)重楼属 *Paris* 植物滇重楼 *Paris. polyphylla* var. *yunnanensis* 的地上部分。药材标本保存于中国药科大学中药分析系。

### 1.3 动物与细胞株

SPF 级 KM 小鼠,雄性,体重(25 $\pm$ 5) g,由南京青龙山动物繁殖中心提供,合格证号:SCXK(苏)2017-0001。人结肠癌细胞株 HT29(上海中科院细胞库)。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

## 2 提取与分离

滇重楼药材 10 kg,用 90% 乙醇回流提取 4 次,合并滤液,减压浓缩回收乙醇,浓缩至 3 L,用水饱和正丁醇液萃取 4 次,合并正丁醇液,减压回收正丁醇至干,得滇重楼地上部分正丁醇萃取部位。取该部位 100 g 进行 D-101 大孔树脂柱色谱分离(乙醇-水),得到乙醇 30%、50%、70% 及 90% 4 个洗脱部位。70% 和 90% 两个部位合并后进行硅胶柱色谱分离(二氯甲烷-甲醇 20:1 $\rightarrow$ 1:1),洗脱液根据薄层色谱(TLC)检测结果合并、浓缩,共得到 9 个洗脱部位:1-9。取部位 9(CM 3:1)再进行硅胶柱色谱分离(二氯甲烷-甲醇,10:1 $\rightarrow$ 1:1),共得到 5 个洗脱部位:9-1-9-5,取部位 9-4(CM 3:1)进行 MCI 柱色谱分离(甲醇-水 20% $\rightarrow$ 100%),收集甲醇 30%、50%、70% 3 个洗脱部位,3 个部位再进一步经反相硅胶柱色谱反复分离(丙酮/甲醇-水),最后经过制备 HPLC 纯化(乙腈-水),其中 30% 部位得到化合物 **1**(27 mg)、**3**(13 mg)、**4**(28 mg),50% 部位得到化合物 **5**(42 mg),70% 部位得到化合物 **2**(17 mg)、**6**(9 mg)。化合物 **1**~**6** 的结构式见图 1。

## 3 结构鉴定

化合物 **1** 白色无定形粉末,HR-ESI-MS  $m/z$  1 191.579 8 [M-H]<sup>-</sup> (Calcd. for C<sub>57</sub>H<sub>91</sub>O<sub>26</sub>, 1 191.573 3),确定化合物 **1** 的分子式为 C<sub>57</sub>H<sub>92</sub>O<sub>26</sub>,

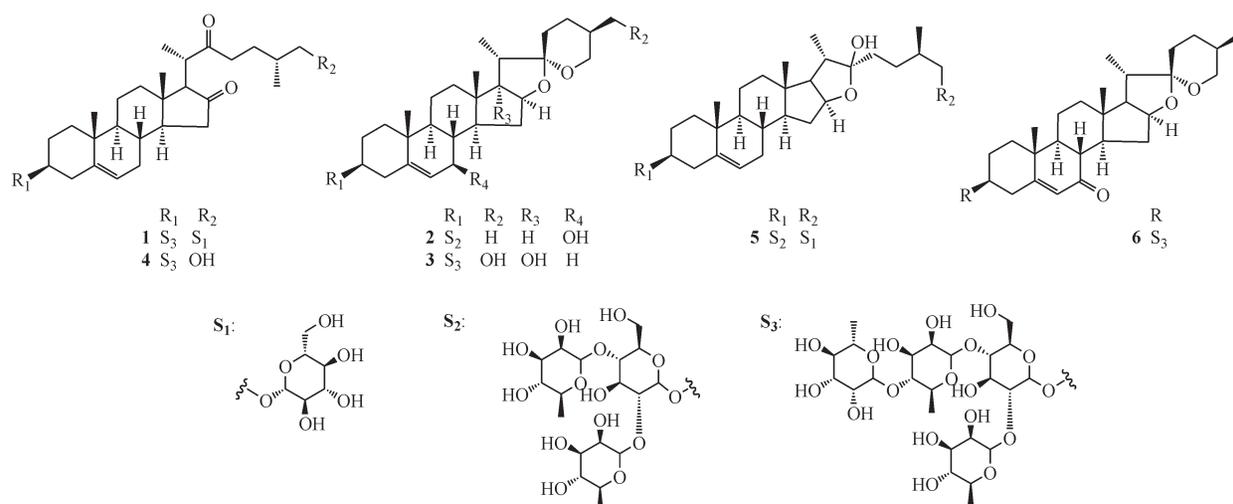


Figure 1 Chemical structures of compounds 1-6

不饱和度为12。 $[\alpha]_{D}^{-254.1}$  (c 0.30, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  255 (lg  $\epsilon$  3.22) nm; IR (KBr,  $\nu$ ): 3 420, 1 734, 1 040  $\text{cm}^{-1}$ 。 $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 150 MHz)共显示出57个碳原子信号,其中包括5组六碳糖单元信号和一组27个碳信号的苷元部分。结合 $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )以及HSQC图谱分析发现,化合物1的苷元部分具有4个甲基结构 [ $\delta_{\text{H}}$  0.71 (3H, s),  $\delta_{\text{C}}$  13.7;  $\delta_{\text{H}}$  1.07 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz),  $\delta_{\text{C}}$  16.5;  $\delta_{\text{H}}$  1.02 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz),  $\delta_{\text{C}}$  18.3以及 $\delta_{\text{H}}$  1.07 (3H, s),  $\delta_{\text{C}}$  20.2], 10个亚甲基结构, 2个羰基碳原子 [ $\delta_{\text{C}}$  214.6; 219.2]以及一对双键碳原子 [ $\delta_{\text{C}}$  122.3,  $\delta_{\text{H}}$  5.32 (1H, m),  $\delta_{\text{C}}$  141.7]。对比已知化合物 *anguivoside* XV<sup>[7]</sup>苷元部分的波谱数据,确定化合物1的苷元为 *kryptogenin* (3 $\alpha$ , 26-dihydroxycholest-5-ene16, 22-dione)。在1D NMR以及HSQC谱中,可以观察到5个糖分子的端基碳信号及其对应的质子 [ $\delta_{\text{H}}$  4.92 (1H, d,  $J = 6.2$  Hz),  $\delta_{\text{C}}$  101.0;  $\delta_{\text{H}}$  6.39 (1H, br. s),  $\delta_{\text{C}}$  102.9;  $\delta_{\text{H}}$  5.83 (1H, br. s),  $\delta_{\text{C}}$  103.0;  $\delta_{\text{H}}$  6.28 (1H, br. s),  $\delta_{\text{C}}$  103.9;  $\delta_{\text{H}}$  4.86 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz),  $\delta_{\text{C}}$  105.4],以及位于高场区的3个糖链甲基碳及其对应的质子 [ $\delta_{\text{H}}$  1.60 (1H, d,  $J = 5.8$  Hz),  $\delta_{\text{C}}$  19.4;  $\delta_{\text{H}}$  1.60 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz),  $\delta_{\text{C}}$  19.6以及 $\delta_{\text{H}}$  1.78 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz),  $\delta_{\text{C}}$  19.2],通过与已知化合物 *anguivoside* XV糖链部分比较,推测化合物1的糖链由3分子L-鼠李糖及2分子D-葡萄糖构成,由葡萄糖分子端基氢的偶合常数确定葡萄糖分子端基碳的构型为 $\beta$ 型,鼠李糖端基碳构型由

其C-5的化学位移确定为 $\alpha$ 型<sup>[8]</sup>。HMBC谱中观察到 $\delta_{\text{H}}$  6.28 (Rha III -H-1)与 $\delta_{\text{C}}$  81.0 (Rha II -C-4)、 $\delta_{\text{H}}$  5.83 (Rha II -H-1)与 $\delta_{\text{C}}$  78.3 (Glc I -C-4)、 $\delta_{\text{H}}$  6.39 (Rha I -H-1)与 $\delta_{\text{C}}$  78.9 (Glc I -C-2)、 $\delta_{\text{H}}$  4.92 (Glc I -H-1)与 $\delta_{\text{C}}$  79.0 (C-3)存在相关信号,说明Rha III连接在Rha II的4位,Rha II连接在Glc I的4位,Rha I连接在Glc I的2位,Glc I连接在苷元的3位上;另外, $\delta_{\text{H}}$  4.86 (Glc II -H-1)与 $\delta_{\text{C}}$  75.9 (C-26)相关,表明Glc II连接在苷元的26位碳原子上。

其他HMBC、HSQC以及 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY谱图(图2)进一步证实了对化合物1的结构推测。综合上述分析,将化合物1的结构鉴定为26-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-kryptogenin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-4)-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-2)]- $\beta$ -D-glucopyranoside。化合物1的 $^1\text{H}$  NMR和 $^{13}\text{C}$  NMR波谱数据全归属见表1。

化合物2 白色无定形粉末,ESI-MS ( $m/z$ ) 907.4 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ ,分子式 $\text{C}_{45}\text{H}_{72}\text{O}_{17}$ 。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz)  $\delta$ : 0.71 (3H, d,  $J = 5.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ -27), 0.90 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 1.04 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -19), 1.18 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 1.65 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Rha I), 1.77 (3H, d,  $J = 6.5$  Hz,  $\text{CH}_3$ -Rha II), 4.99 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz, Glc-H-1), 5.87 (1H, br. s, Rha II-H-1), 6.40 (1H, br. s, Rha I-H-1), 5.71 (1H, br. s, H-6);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 125 MHz)  $\delta$ : 37.78 (C-1), 30.45 (C-2), 78.37 (C-3), 39.06 (C-4), 141.92 (C-5), 129.20

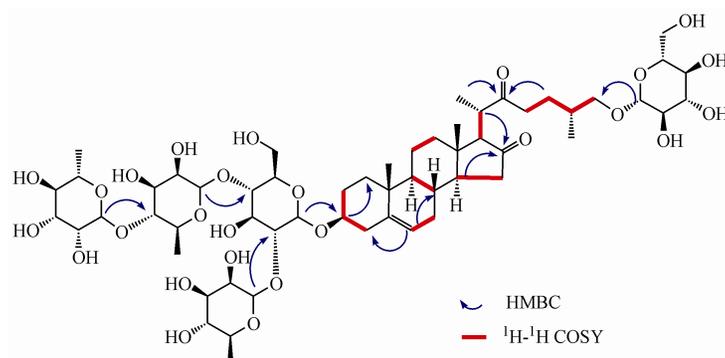


Figure 2 Key HMBC, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY correlations of compound 1

(C-6), 73.03 (C-7), 41.30 (C-8), 49.11 (C-9), 37.58 (C-10), 21.70 (C-11), 40.39 (C-12), 41.46 (C-13), 56.87 (C-14), 35.69 (C-15), 82.11 (C-16), 63.03 (C-17), 16.88 (C-18), 19.32 (C-19), 42.55 (C-20), 15.58 (C-21), 109.67 (C-22), 32.25 (C-23), 29.76 (C-24), 31.11 (C-25), 67.31 (C-26), 17.79 (C-27), Glc: 100.78 (C-1'), 78.37 (C-2'), 78.37 (C-3'), 79.11 (C-4'), 77.40 (C-5'), 61.78 (C-6'), Rha I: 102.56 (C-1''), 72.98 (C-2''), 73.34 (C-3''), 74.61 (C-4''), 69.94 (C-5''), 18.97 (C-6''), Rha II: 103.39 (C-1'''), 72.98 (C-2'''), 73.13 (C-3'''), 74.40 (C-4'''), 70.90 (C-5'''), 19.10 (C-6'''). 以上数据与文献报道<sup>[9]</sup>的数据基本一致,故化合物 2 鉴定为 dioseptemloside G。

化合物 3 白色无定形粉末,ESI-MS ( $m/z$ ) 1 069.4  $[M+Na]^+$ , 分子式  $C_{51}H_{82}O_{22}$ 。 <sup>1</sup>H NMR ( $C_5D_5N$ , 500 MHz)  $\delta$ : 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 1.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19), 1.27 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, CH<sub>3</sub>-21), 1.62 (3H, d,  $J = 5.0$  Hz, CH<sub>3</sub>-Rha I), 1.62 (3H, d,  $J = 5.5$  Hz, CH<sub>3</sub>-Rha II), 1.78 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, CH<sub>3</sub>-Rha III), 4.92 (1H, br. s, Glc-H-1), 5.83 (1H, s, Rha II-H-1), 6.28 (1H, s, Rha III-H-1), 6.39 (1H, s, Rha I-H-1); <sup>13</sup>C NMR ( $C_5D_5N$ , 125 MHz)  $\delta$ : 36.76 (C-1), 29.36 (C-2), 77.28 (C-3), 38.19 (C-4), 139.99 (C-5), 121.02 (C-6), 31.27 (C-7), 31.55 (C-8), 49.46 (C-9), 36.35 (C-10), 20.15 (C-11), 31.55 (C-12), 44.35 (C-13), 52.23 (C-14), 32.8 (C-15), 89.24 (C-16), 89.36 (C-17), 16.34 (C-18), 18.63 (C-19), 44.07 (C-20), 8.93 (C-21), 109.40 (C-22), 31.27 (C-23), 22.78 (C-24), 38.16 (C-25), 63.12 (C-

26), 63.58 (C-27), Glc: 99.49 (C-1'), 79.56 (C-2'), 76.14 (C-3'), 77.28 (C-4'), 76.91 (C-5'), 60.42 (C-6'), Rha I: 101.35 (C-1''), 72.08 (C-2''), 71.67 (C-3''), 73.31 (C-4''), 68.73 (C-5''), 17.58 (C-6''), Rha II: 101.42 (C-1'''), 72.44 (C-2'''), 72.01 (C-3'''), 77.20 (C-4'''), 67.53 (C-5'''), 17.80 (C-6'''), Rha III: 102.46 (C-1'''), 72.00 (C-2'''), 71.80 (C-3'''), 73.18 (C-4'''), 69.58 (C-5'''), 18.04 (C-6''')。以上数据与文献报道<sup>[10]</sup>的数据基本一致,故化合物 3 鉴定为 polyphyllloside III。

化合物 4 白色无定形粉末,ESI-MS ( $m/z$ ) 1 053.2  $[M+Na]^+$ , 分子式  $C_{51}H_{82}O_{21}$ 。 <sup>1</sup>H NMR ( $C_5D_5N$ , 500 MHz)  $\delta$ : 0.73 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 1.08 (3H, d,  $J = 8.0$  Hz, CH<sub>3</sub>-21), 1.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19), 1.14 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, CH<sub>3</sub>-27), 1.62 (3H, d,  $J = 3.0$  Hz, CH<sub>3</sub>-Rha I), 1.62 (3H, d,  $J = 3.0$  Hz, CH<sub>3</sub>-Rha II), 1.79 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, CH<sub>3</sub>-Rha III), 4.97 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, Glc-H-1), 5.84 (1H, s, Rha II-H-1), 6.29 (1H, s, Rha III-H-1), 6.40 (1H, s, Rha I-H-1); <sup>13</sup>C NMR ( $C_5D_5N$ , 125 MHz)  $\delta$ : 37.25 (C-1), 30.16 (C-2), 78.07 (C-3), 38.97 (C-4), 140.97 (C-5), 121.48 (C-6), 32.00 (C-7), 31.04 (C-8), 50.05 (C-9), 37.10 (C-10), 20.78 (C-11), 38.72 (C-12), 41.72 (C-13), 51.18 (C-14), 37.44 (C-15), 217.69 (C-16), 66.42 (C-17), 12.88 (C-18), 19.41 (C-19), 43.79 (C-20), 15.64 (C-21), 213.28 (C-22), 40.41 (C-23), 27.69 (C-24), 36.22 (C-25), 67.48 (C-26), 17.28 (C-27), Glc: 100.40 (C-1'), 78.05 (C-2'), 77.91 (C-3'), 77.76 (C-4'), 77.04 (C-5'), 61.32 (C-6'), Rha I: 102.21 (C-1''), 72.52 (C-2''), 72.88

**Table 1**  $^1\text{H}$  NMR(600 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR(150 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) spectral data of compound 1(*J* in Hz)

| No.                          | $^1\text{H}$ NMR             | $^{13}\text{C}$ NMR | No.                              | $^1\text{H}$ NMR | $^{13}\text{C}$ NMR |
|------------------------------|------------------------------|---------------------|----------------------------------|------------------|---------------------|
| 1                            | 0.99 m<br>1.72 m             | 38.0                | 4'                               | 4.39 m           | 78.3                |
| 2                            | 1.88 m<br>2.09 m             | 30.9                | 5'                               | 3.65 m           | 77.6                |
| 3                            | 3.90 m                       | 79.0                | 6'                               | 4.20 m<br>4.05 m | 62.1                |
| 4                            | 2.71 m<br>2.81 m             | 39.7                | 2'- <i>O</i> - $\alpha$ -L-Rha   |                  |                     |
| 5                            | –                            | 141.7               | 1''                              | 6.39 br.s        | 102.9               |
| 6                            | 5.32 m                       | 122.3               | 2''                              | 4.87 m           | 72.4                |
| 7                            | 1.51 m<br>1.75 m             | 32.7                | 3''                              | 4.65 m           | 73.1                |
| 8                            | 1.42 m                       | 31.8                | 4''                              | 4.35 m           | 74.5                |
| 9                            | 1.00 m                       | 50.8                | 5''                              | 4.97 m           | 69.2                |
| 10                           | –                            | 37.8                | 6''                              | 1.60 d(5.8)      | 19.4                |
| 11                           | 1.40 m<br>1.48 m             | 21.5                | 4''- <i>O</i> - $\alpha$ -L-Rha  |                  |                     |
| 12                           | 1.37 m<br>1.88 m             | 39.5                | 1'''                             | 5.83 br.s        | 103.0               |
| 13                           | –                            | 42.5                | 2'''                             | 4.51 m           | 73.5                |
| 14                           | 1.39 m                       | 51.9                | 3'''                             | 4.56m            | 73.5                |
| 15                           | 1.75 m<br>2.09 m             | 38.3                | 4'''                             | 4.45 m           | 81.0                |
| 16                           | –                            | 219.2               | 5'''                             | 4.97 m           | 69.2                |
| 17                           | 2.75 m                       | 67.2                | 6'''                             | 1.60 d(5.6)      | 19.6                |
| 18                           | 0.71 s                       | 13.7                | 4'''- <i>O</i> - $\alpha$ -L-Rha |                  |                     |
| 19                           | 1.07 s                       | 20.2                | 1''''                            | 6.28 br.s        | 103.9               |
| 20                           | 2.71 m<br>2.81 m             | 44.6                | 2''''                            | 4.92 m           | 72.5                |
| 21                           | 1.07 d(6.0)                  | 16.5                | 3''''                            | 4.55m            | 73.2                |
| 22                           | –                            | 214.6               | 4''''                            | 4.30 m           | 73.9                |
| 23                           | 2.81 m<br>2.95 m             | 40.9                | 5''''                            | 4.36 m           | 70.3                |
| 24                           | 1.99 m<br>1.73 m             | 28.5                | 6''''                            | 1.78 d(6.0)      | 19.2                |
| 25                           | 1.90 m                       | 34.2                | 26- <i>O</i> - $\beta$ -D-Glc    |                  |                     |
| 26                           | 3.90 m<br>3.98 dd(9.2, 14.9) | 75.9                | 1'''''                           | 4.86 d(7.9)      | 105.4               |
| 27                           | 1.02 d(6.5)                  | 18.3                | 2'''''                           | 3.60 m           | 74.7                |
| 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-Glc |                              |                     | 3'''''                           | 4.24 m           | 79.1                |
| 1'                           | 4.92 d(6.2)                  | 101.0               | 4'''''                           | 4.21 m           | 71.1                |
| 2'                           | 4.21 m                       | 78.9                | 5'''''                           | 3.97 m           | 79.0                |
| 3'                           | 4.23 m                       | 78.3                | 6'''''                           | 4.55 m<br>4.38 m | 63.5                |

(C-3''), 74.17(C-4''), 69.57(C-5''), 18.44(C-6''), Rha II: 102.28(C-1'''), 72.88(C-2'''), 73.30(C-3'''), 80.42(C-4'''), 68.39(C-5'''), 18.67(C-6'''), Rha III: 103.32(C-1''''), 72.66(C-2''''), 72.94(C-3''''), 74.03(C-4''''), 70.43(C-5''''), 18.90(C-6''''). 以上数据与文献报道的数据<sup>[11]</sup>基本一致,故化合物 4 鉴定为 chonglouoside SL-19。

化合物 5 白色无定形粉末, ESI-MS ( $m/z$ ) 1 071.5  $[M+Na]^+$ , 分子式  $C_{51}H_{84}O_{22}$ 。  $^1H$  NMR ( $C_5D_5N$ , 500 MHz)  $\delta$ : 0.88(3H, s,  $CH_3$ -18), 1.01(3H, d,  $J = 7.0$  Hz,  $CH_3$ -27), 1.07(3H, s,  $CH_3$ -19), 1.35(3H, d,  $J = 7.0$  Hz,  $CH_3$ -21), 1.65(3H, d,  $J = 6.0$  Hz,  $CH_3$ -Rha I), 1.78(3H, d,  $J = 6.0$  Hz,  $CH_3$ -Rha II), 4.83(1H, d,  $J = 8.0$  Hz, Glc I-H-1), 4.93(1H, d,  $J = 7.0$  Hz, Glc II-H-1), 5.88(1H, s, Rha II-H-1), 6.42(1H, s, Rha I-H-1), 5.32(1H, br. s, H-6);  $^{13}C$  NMR ( $C_5D_5N$ , 125 MHz)  $\delta$ : 38.00(C-1), 30.66(C-2), 78.26(C-3), 39.48(C-4), 141.27(C-5), 122.31(C-6), 32.83(C-7), 32.17(C-8), 50.85(C-9), 37.62(C-10), 21.59(C-11), 40.42(C-12), 41.27(C-13), 57.08(C-14), 32.95(C-15), 81.58(C-16), 64.34(C-17), 16.92(C-18), 19.88(C-19), 41.47(C-20), 16.94(C-21), 111.14(C-22), 37.62(C-23), 28.84(C-24), 34.77(C-25), 75.69(C-26), 17.95(C-27), Glc I: 100.79(C-1'), 78.61(C-2'), 77.41(C-3'), 79.10(C-4'), 78.26(C-5'), 61.78(C-6'), Rha I: 102.49(C-1''), 73.01(C-2''), 73.03(C-3''), 74.62(C-4''), 69.99(C-5''), 18.97(C-6''), Rha II: 103.39(C-1'''), 73.01(C-2'''), 73.21(C-3'''), 74.40(C-4'''), 70.90(C-5'''), 19.11(C-6'''), Glc II: 105.43(C-1''''), 75.74(C-2''''), 78.96(C-3''''), 72.20(C-4''''), 78.44(C-5''''), 63.32(C-6''''). 以上数据与文献报道的数据<sup>[12]</sup>基本一致,故化合物 5 鉴定为 protodioscin。

化合物 6 白色无定形粉末, ESI-MS ( $m/z$ ) 1 051.4  $[M+Na]^+$ , 分子式  $C_{51}H_{80}O_{21}$ 。  $^1H$  NMR ( $C_5D_5N$ , 500 MHz)  $\delta$ : 0.69(3H, d,  $J = 5.0$  Hz,  $CH_3$ -27), 0.86(3H, s,  $CH_3$ -18), 1.13(3H, s,  $CH_3$ -19), 1.15(3H, d,  $J = 5.5$  Hz,  $CH_3$ -21), 1.63(3H, d,  $J = 4.0$  Hz,  $CH_3$ -Rha II), 1.63(3H, d,  $J = 4.0$  Hz,  $CH_3$ -Rha I), 1.78(3H, d,  $J = 4.5$  Hz,  $CH_3$ -Rha III), 4.92(1H, br. s, Glc-H-1), 5.78

(1H, br. s, H-6), 5.87(1H, s, Rha II-H-1), 6.32(1H, s, Rha III-H-1), 6.46(1H, s, Rha I-H-1);  $^{13}C$  NMR ( $C_5D_5N$ , 125 MHz)  $\delta$ : 36.91(C-1), 30.22(C-2), 77.60(C-3), 39.31(C-4), 165.66(C-5), 126.75(C-6), 201.48(C-7), 45.48(C-8), 50.28(C-9), 39.18(C-10), 21.57(C-11), 39.18(C-12), 41.65(C-13), 50.46(C-14), 34.84(C-15), 81.81(C-16), 62.36(C-17), 16.93(C-18), 17.53(C-19), 42.40(C-20), 15.61(C-21), 109.76(C-22), 32.29(C-23), 29.70(C-24), 31.06(C-25), 67.26(C-26), 17.77(C-27), Glc: 101.05(C-1'), 78.14(C-2'), 78.04(C-3'), 78.06(C-4'), 77.49(C-5'), 61.70(C-6'), Rha I: 102.52(C-1''), 72.95(C-2''), 73.28(C-3''), 74.58(C-4''), 70.02(C-5''), 19.12(C-6''), Rha II: 102.72(C-1'''), 73.34(C-2'''), 73.78(C-3'''), 80.88(C-4'''), 68.82(C-5'''), 19.37(C-6'''), Rha III: 103.82(C-1''''), 73.14(C-2''''), 73.34(C-3''''), 74.49(C-4''''), 70.92(C-5''''), 18.92(C-6''''). 以上数据与文献报道的数据<sup>[13]</sup>基本一致,故化合物 6 鉴定为 chonglouoside SL-5。

## 4 生物活性检测

### 4.1 促血小板聚集活性检测

血小板聚集的浊度测量参考 Sun 等<sup>[14]</sup>的方法及仪器操作手册。用 3.8% 柠檬酸钠溶液抗凝,下腔静脉穿刺取小鼠血液。血液采集后用水平离心机 500 r/min 转速离心 5 min,待自然停止后取出,获得富血小板血浆 (PRP),小心吸取上层富含血小板血浆后,将剩余的血液 3 000 r/min 转速离心 10 min,待自然停止后取出,获得血小板缺乏血浆 (PPP),离心温度维持在 22  $^{\circ}C$ 。对 PRP 中的血小板进行计数后用生理盐水进行调整,将血小板浓度稀释到每升  $2 \times 10^{11}$  个。血小板聚集试验在制备 PRP 后 3 h 内完成。

在测定样品方杯中加入 1 个小磁棒和 PRP 300  $\mu L$ ,置恒温孔中预热 5 min,待仪器扣除背景且示数稳定后,用微量进样器吸取待测样品 5  $\mu L$  加入杯底,记录血小板聚集引起的光密度变化。聚合的程度是根据透光率的最大增加百分比来估计的,血小板缺乏血浆表示 100% 的透光率。以生理盐水为空白对照,以重楼皂苷 VII 为阳性对照。

#### 4.2 细胞毒性检测

取单层培养的HT29细胞,用含10%胎牛血清的DMEM培养基配成每毫升 $5 \times 10^4$ 个细胞悬液后接种于96孔板(每孔100  $\mu\text{L}$ ),于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 及饱和湿度的条件下静置24 h,待细胞贴壁后分别加入不同浓度(1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ )的化合物1~6及阳性药顺铂,并设空白组,同样培养条件下培养48 h后,每孔加入MTT(5 mg/L) 20  $\mu\text{L}$ 作用3 h,加入DMSO溶解形成的蓝紫色结晶,并于492 nm波长测定各孔细胞吸收度,并计算 $\text{IC}_{50}$ 。实验重复3次。

#### 4.3 生物活性测定结果

采用血小板聚集仪对已经分离鉴定的6个化合物进行促血小板聚集活性评价。研究结果表明,与空白对照组血小板最大聚集率(33.06%)相比,在20 mmol/L浓度下,化合物1(31.93%)、2(33.34%)、3(30.28%)、4(31.26%)、5(34.19%)、6(36.16%)均未显示出明显的促进血小板聚集的作用;在相同浓度下,阳性对照重楼皂苷VII血小板最大聚集率为63%。

采用MTT比色法对已分离鉴定的6个化合物进行细胞毒性评价。研究结果表明,化合物2 [ $\text{IC}_{50}$ ( $6.215 \pm 1.016$ )  $\mu\text{mol/L}$ ]、化合物4 [ $\text{IC}_{50}$ ( $17.750 \pm 1.304$ )  $\mu\text{mol/L}$ ]对于人结肠癌HT29细胞具有较强的细胞毒性,且化合物2的细胞毒性强于阳性药顺铂 [ $\text{IC}_{50}$ ( $11.145 \pm 1.109$ )  $\mu\text{mol/L}$ ]。其他4个化合物的 $\text{IC}_{50}$ 超过100  $\mu\text{mol/L}$ ,因此认为对该细胞株没有明显的细胞毒性。

### 5 结果与讨论

本研究对滇重楼(*Paris. polyphylla* var. *yunnanensis*)地上部分的化学成分进行了初步研究,分离并鉴定了6个化合物,其中包括1个新化合物。同时发现分离得到的化合物2和4对HT29细胞具有较强的细胞毒性,具有进一步研究的价值。本研究结果丰富了滇重楼的化学库,为其药用价值的开发利用提供了研究基础。但本研究对滇重楼地上部分的成分分离还不够全面,药理活性研究不够深入,亟待后续的进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Huang Y, Cui LJ, Wang Q, et al. Separation and identification of active constituents of *Paris vietnamensis* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2006, 41(4):361-364.
- [2] Yang YG, Zhang J, Zhang JY, et al. Research progress in chemical constituents in plants of *Paris L.* and their pharmacological effects [J]. *Chin Trad Herbal Drugs* (中草药), 2016, 47(18):3301-3323.
- [3] Wang YH, Niu HM, Li H, et al. Medicinal values and their chemical bases of *Paris* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2015, 40(5):834-839.
- [4] He Ms, Li X. Progress of pharmacological research on *Paridis* [J]. *World Chin Med* (世界中医药), 2015, 40(5):579-582.
- [5] Wang Q, Xu GJ, Cheng YB. Study on antibacterial and hemostatic activities of *Rhizoma Paridis* [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1989, 20(4):251-253.
- [6] Chen CX, Zhang YT, Zhou J. Steroid saponins of aerial parts of *paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1990, 12(3):323-329.
- [7] Takehiko H, Tsuyoshi I, Toshihiro N, et al. New steroidal glycosides from the fruits of *Solanum anguivi* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65:1918-1920.
- [8] Kong LY. *Spectrum analysis of complex natural products* (复杂天然产物波谱解析) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2012:656.
- [9] Liu XT, Xiao W, Wang ZZ, et al. Cholestane and spirostane glycosides from the rhizomes of *Dioscorea septemloba* [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69:1411-1418.
- [10] Chen CX, Zhou J, Hiromichi N, et al. Two minor steroidal saponins from the aerial parts of *paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1995, 17(2):215-220.
- [11] Qin XJ, Yu MY, Liu HY, et al. Steroidal saponins from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* [J]. *Phytochemistry*, 2016, 121:20-29.
- [12] Tan DW, Kang LP, Ma BP, et al. Study on Steroidal Saponins of *Dioscorea septemloba* Thunb [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2006, 29(11):1176-1179.
- [13] Qin XJ, Sun DJ, Liu HY, et al. Steroidal saponins with antimicrobial activity from stems and leaves of *Paris polyphylla* var. *Yunnanensis* [J]. *Steroids*, 2012, 77:1242-1248.
- [14] Sun CL, Ni W, Liu HY, et al. Steroidal saponins with induced platelet aggregation activity from the aerial parts of *Paris verticillata* [J]. *Steroids*, 2014, 92: 90-95.

## 透明质酸修饰天冬酰胺酶自组装仿生纳米囊的稳定性及其体内药代动力学

刘煜莹<sup>1</sup>, 李瑶<sup>2</sup>, 杨强<sup>1</sup>, 陈冉<sup>1</sup>, 李开铃<sup>1</sup>, 张景勍<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学重庆药物高校工程研究中心, 重庆 400016; <sup>2</sup>重庆市公共卫生医疗救治中心, 重庆 400036)

**摘要** 考察了透明质酸修饰的天冬酰胺酶(asparaginase, Asp)自组装仿生纳米囊(hyaluronic acid-modified asparaginase self-assembled bionic nanocapsules, ASNCs)的稳定性及药代动力学特性。使用分子自组装法制备ASNCs, 考察其形态、粒径、Zeta电位和抗胰蛋白酶稳定性。大鼠静脉注射给予游离Asp和ASNCs后, 取不同时间点下大鼠血浆样品测定Asp的活性。采用DAS药代动力学软件计算药代动力学参数。实验测定ASNCs的粒径为(99.17 ± 0.21) nm, 电位为-(13.13 ± 0.60) mV。在胰蛋白酶溶液中, ASNCs表现出更优异的稳定性。ASNCs的活性-时间曲线下面积AUC<sub>0-48h</sub>与天冬酰胺酶相比约提高了2倍, 平均滞留时间MRT<sub>0-48h</sub>约为Asp的1.7倍, 生物利用度为Asp的195%。研究结果表明, 透明质酸修饰的天冬酰胺酶自组装仿生纳米囊能提高天冬酰胺酶抗胰蛋白酶稳定性及生物利用度, 延长了Asp在体内的循环时间。

**关键词** 天冬酰胺酶; 透明质酸; 纳米囊; 药代动力学; 自组装; 药物递送

中图分类号 R945; R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0461-05

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200411

引用本文 刘煜莹, 李瑶, 杨强, 等. 透明质酸修饰天冬酰胺酶自组装仿生纳米囊的稳定性及其体内药代动力学[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 461 - 465.

Cite this article as: LIU Yuying, LI Yao, YANG Qiang, et al. Stability and pharmacokinetics of hyaluronic acid-modified asparaginase self-assembled biomimetic nanocapsules[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(4): 461 - 465.

### Stability and pharmacokinetics of hyaluronic acid-modified asparaginase self-assembled biomimetic nanocapsules

LIU Yuying<sup>1</sup>, LI Yao<sup>2</sup>, YANG Qiang<sup>1</sup>, CHEN Ran<sup>1</sup>, LI Kailing<sup>1</sup>, ZHANG Jingqing<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Chongqing Research Center for Pharmaceutical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016;

<sup>2</sup>Chongqing Public Health Medical Center, Chongqing 400036, China

**Abstract** The stability and pharmacokinetic properties of hyaluronic acid-modified asparaginase (Asp) self-assembled bionic nanocapsules (ASNCs) were preliminarily investigated. ASNCs were prepared by molecular self-assembly method to investigate their morphology, particle size, Zeta potential and antitrypsin stability. After intravenous injection of free Asp and ASNCs, rat plasma samples at different times were taken to determine Asp activity. Pharmacokinetic parameters were calculated by DAS pharmacokinetic software. The particle size of ASNCs was (99.17 ± 0.21) nm and the potential was -(13.13 ± 0.60) mV. In trypsin solution, ASNCs showed more excellent stability. The area under the activity-time curve (AUC<sub>0-48h</sub>) of ASNCs was about 2 times higher than that of Asp; the mean residence time (MRT<sub>0-48h</sub>) was about 1.7 times higher than that of Asp, and the bioavailability was 195% of Asp. The results showed that ASNCs could improve the stability and bioavailability of Asp against trypsin and prolong the circulation time of Asp *in vivo*.

**Key words** asparaginase; hyaluronic acid; nanocapsules; pharmacokinetics; self-assembly; drug delivery

收稿日期 2020-03-14 \*通信作者 Tel: 13308300303 E-mail: zjqrae01@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30973645); 重庆市委资助项目(No. CSTC2015jcyjBX0027); 重庆市教委资助项目(No. CYS19210)

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30973645), the Project Foundation of Chongqing Science and Technology Commission (No. CSTC2015jcyjBX0027) and the Project Foundation of Chongqing Municipal Education Committee (No. CYS19210)

天冬酰胺酶(asparaginase, Asp)是临床用于治疗淋巴细胞白血病的一线化疗药物<sup>[1]</sup>。Asp能将细胞内的门冬酰胺分解为门冬氨酸和氨,使肿瘤细胞因缺少生长所必要的门冬酰胺而引起蛋白质合成障碍,最终导致肿瘤细胞凋亡<sup>[2]</sup>。大量的临床研究显示,Asp能显著改善急性淋巴细胞白血病的预后,对提高急性淋巴细胞白血病的完全缓解率及长期无事件生存率等方面有显著贡献<sup>[3]</sup>。但是,Asp存在蛋白质类药物固有缺陷如活性低、半衰期短和易产生耐药性<sup>[4]</sup>,且有研究表明Asp在体内有一定的不良反应<sup>[5]</sup>,直接限制了其在临床上的广泛应用。

为了延长Asp在大鼠体内的滞留时间,研究人员采用葡聚糖/聚精氨酸层的CaCO<sub>3</sub>纳米粒装载Asp<sup>[6]</sup>,田明达等<sup>[7]</sup>用壳聚糖和油酸钠修饰的超顺磁性四氧化三铁纳米粒子装载Asp, Ashrafi等<sup>[8]</sup>用一种新型脂肪酸与Asp进行生物接合, Chien等<sup>[9]</sup>对Asp进行PEG化修饰等,这些针对Asp剂型的改造在一定程度上阻断了蛋白酶对Asp分解以及温度对Asp活性的影响,但是仍未解决Asp免疫原性高、生物相容性低和体内循环时间短等不足。因此构建一个既能提高Asp体内稳定性,同时又能提高其生物相容性及生物利用度的递送系统十分必要。透明质酸具有靶向性,可以和肿瘤细胞中的CD44受体结合<sup>[10]</sup>。自组装纳米系统载药量大,制备简单<sup>[11]</sup>。

为了提高Asp体内活性和生物利用度,本研究首次制备了透明质酸(HA)修饰Asp自组装仿生纳米囊(hyaluronic acid-modified asparaginase self-assembled bionic nanocapsules, ASNCs)。首先将PEG2000与HA分子偶联形成两亲性的HA-g-PEG,该两亲性HA-g-PEG与羟丙基-β-环糊精能自组装形成仿生膜,同时将Asp固定在仿生膜中,然后再一起包封于脂质纳米囊中。本实验对ASNCs的体外抗胰蛋白酶水解稳定性和体内药代动力学行为进行了考察,以期为大分子药物的临床研究提供依据。

## 1 材料

### 1.1 试剂

天冬酰胺酶(Asp,纯度:96%,批号:312PLASP 1,以色列Prospec公司);天冬酰胺、胆固醇(美国Sigma公司);磷脂(纯度:100%,德国Lipoid公司);羟丙基-β-环糊精(HPCD,纯度:98%,南京都莱生物技术有限公司);三羟甲基氨基甲烷(Tris)、考马斯亮蓝G-250(国药集团化学试剂有限公司);HA-g-PEG(实验室自制<sup>[12]</sup>);其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 仪器

85-2型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司);RE-52AA旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);pH计(上海精密科学仪器有限公司);UV-7504 PC紫外分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)。

### 1.3 动物

雄性SPF级SD大鼠,体重(200±20)g。由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号为SYXK(渝)2016-0001,所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

## 2 方法

### 2.1 ASNCs的制备及形态考察

按照处方量精确称取胆固醇和磷脂(物质的量比为1:3)放置于圆底烧瓶中,加入二氯甲烷15 mL使之溶解,于黑暗处放置30 min。将圆底烧瓶放置于旋转蒸发器上,30 °C减压旋蒸至形成均匀的薄膜,加入乙醚15 mL摇晃脱膜。将HA-g-PEG溶液(质量分数为1.0%)2 mL缓慢加入至HPCD饱和溶液(质量分数为6%)6 mL中形成的HA-g-PEG/HPCD溶液,精密称取处方量Asp 1 mg溶解于HA-g-PEG/HPCD溶液中,然后加入到上述圆底烧瓶中,使用水浴型超声仪超声,直至形成均匀带乳光的分散体系。将圆底烧瓶转移至旋蒸仪,30 °C减压蒸发,至形成凝胶状塌陷为均匀液体,取出液体加入至10 mL量瓶用pH 7.3的Tris-HCl缓冲液定容,即得ASNCs。用pH 7.3的Tris-

HCl 缓冲液将 ASNCs 稀释 10 倍后,于透射电镜下观察 ASNCs 的外观形态,马尔文激光粒度仪测定 ASNCs 的粒径和电位。

## 2.2 活性测定

Asp 的活性采用奈斯试剂法<sup>[13]</sup>进行测定。实验前,将底物天冬酰胺溶液预热 2 min,在底物天冬酰胺溶液中加入 Asp 溶液 0.1 mL,置于 37 °C 水浴锅中反应 10 min,即刻加入三氯醋酸溶液 0.1 mL 以终止反应,离心后取出上清液,取奈斯指示剂和适量蒸馏水加至上清液中,放置 10 min 后,于 480 nm 处测定吸收度。

## 2.3 抗胰蛋白酶水解稳定性

将 Asp 和 ASNCs 溶液分别与等量胰蛋白酶溶液混合,在 37 °C 条件下孵育,于一系列时间点 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min 时分别取出,按照“2.2”项下方法测定游离 Asp 和 ASNCs 中 Asp 的活性。

## 2.4 药代动力学考察

取 12 只雄性 SD 大鼠,随机分成 2 组,禁食 24 h 后,尾静脉分别注射游离 Asp 和 ASNCs (给药剂量以 Asp 计为 2 U/g)。在给药后 0.08, 0.17, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 h 眼静脉取血。采血(约 0.3 mL)注入肝素化的试管,4 000 r/min 离心 10 min 后分离血浆样品,于 -20 °C 保存待测定。DAS 软件分析处理数据,比较 Asp 和 ASNCs 之间药代动力学行为和生物利用度的差异。

## 2.5 统计学处理方法

游离 Asp 和 ASNCs 稳定性数据通过 SPSS 软件进行双向单侧 *t* 检验,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

# 3 结果

## 3.1 ASNCs 的微观形态

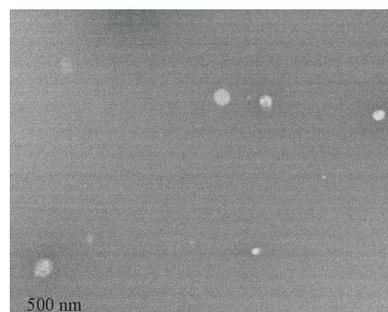
如图 1 所示,透射电镜下观察到的 ASNCs 呈均匀分布的圆形或椭圆形。

## 3.2 粒径和 Zeta 电位

经测定,ASNCs 粒径为  $(99.17 \pm 0.21)$  nm, Zeta 电位为  $-(13.13 \pm 0.60)$  mV,表明 ASNCs 的粒径适中且性质稳定( $n=3$ )。

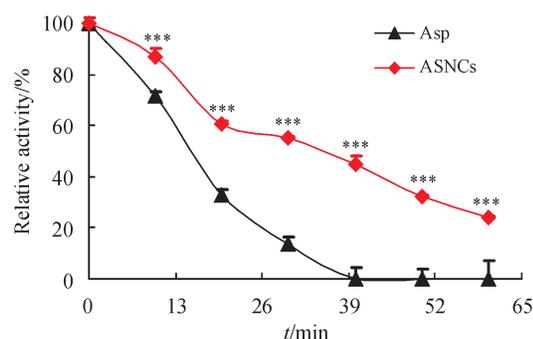
## 3.3 抗胰蛋白酶水解稳定性

如图 2 所示,Asp 和 ASNCs 在与胰蛋白酶接触后,活性均受到较大影响,但与 ASNCs 相比,游离



**Figure 1** Transmission electron microscopy image of hyaluronic acid-modified asparaginase self-assembled bionic nanocapsules (ASNCs)

Asp 受胰蛋白酶水解影响更大。在胰蛋白酶存在的外环境中,游离 Asp 活性下降迅速,降至仅存 50% 活性所需时间约为 15 min,而 ASNCs 活性降至 50% 所需时间大约为 35 min,40 min 时已无法检测到 Asp 活性,但此时 ASNCs 仍保持着 34% 的活性。这表明,ASNCs 较游离 Asp 有更好地抗胰蛋白酶水解的能力,更高的稳定性。



**Figure 2** Proteolytic stabilities of remaining activity of free asparaginase (Asp) and ASNCs ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

\*\*\* $P < 0.001$  vs Asp group

## 3.4 ASNCs 药代动力学行为

静脉注射游离 Asp 和 ASNCs 后,大鼠体内药物活性-时间曲线关系图见图 3。在静脉注射后,游离 Asp 和 ASNCs 活性整体呈下降趋势,且 ASNCs 活性始终高于游离 Asp。在 12 h 时,游离 Asp 活性几乎为零,而此时 ASNCs 活性为  $(1.46 \pm 0.375)$  U/mL,ASNCs 持续到 48 h 才完全失活。这些结果证实了 ASNCs 能延长 Asp 在体内的循环时间。

经过 DAS 软件计算得到,游离 Asp 和 ASNCs 主要的药代动力学参数见表 1(非房室模型)和表 2(房室模型)。分析非房室模型主要药代动力学参数可看出,ASNCs 与游离 Asp 相比,  $AUC_{0-48 h}$  和  $AUC_{0-\infty}$  分别增加了 44.72.32 和 47.82 U·h/mL,表

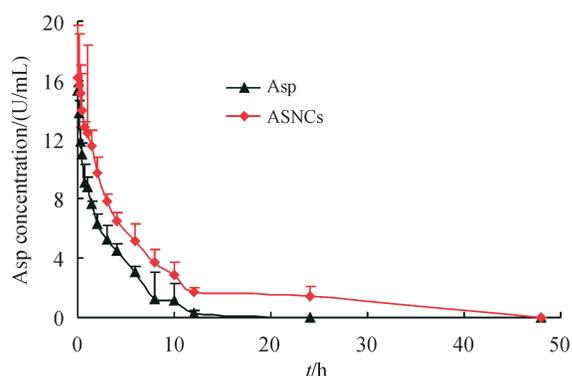


Figure 3 Activity-time curves of free Asp and ASNCs ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

明静注后吸收增加;  $MRT_{0-48h}$  和  $MRT_{0-\infty}$  分别增加了 2.32 和 2.71 h, 同时 ASNCs 的 CL 降低为游离 Asp 的 40%, 表明 ASNCs 体内的滞留时间增加。并且 ASNCs 的  $c_{max}$  为 Asp 的 1.3 倍, 说明 ASNCs 的活性更强。各项参数均表明 ASNCs 在体内的药代动力学行为优于 Asp。

Table 1 Non-compartment model pharmacokinetic parameters of Asp and ASNCs ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| Parameter                           | Asp                | ASNCs              |
|-------------------------------------|--------------------|--------------------|
| $AUC_{0-48h}/(U \cdot h/mL)$        | $46.993 \pm 6.634$ | $91.71 \pm 12.332$ |
| $AUC_{0-\infty}/(U \cdot h/mL)$     | $47.91 \pm 7.207$  | $95.729 \pm 8.426$ |
| $MRT_{0-48h}/h$                     | $3.311 \pm 0.437$  | $5.629 \pm 1.58$   |
| $MRT_{0-\infty}/h$                  | $3.521 \pm 0.532$  | $6.23 \pm 0.834$   |
| $t_{max}/h$                         | $0.248 \pm 0.035$  | $0.148 \pm 0.045$  |
| $c_{max}/(kU/L)$                    | $14.444 \pm 1.824$ | $18.345 \pm 2.901$ |
| $CL/(L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1})$ | $0.17 \pm 0.023$   | $0.084 \pm 0.007$  |
| $V/(L/kg)$                          | $0.461 \pm 0.057$  | $0.402 \pm 0.084$  |
| Relative bioavailability/%          | -                  | 195.15             |

室模型参数见表 2, 分析其主要药代动力学参数可看出, 游离 Asp 和 ASNCs 相比,  $AUC_{0-48h}$  和  $AUC_{0-\infty}$  分别增加了 53.62.87 和  $U \cdot h/mL$ , 表明静注后吸收增加;  $t_{1/2}$  增加了 2.31 h, ASNCs 的 CL 降低为游离 Asp 的 49%, 表明药物在体内停留时间增加。各项参数均表明 ASNCs 在体内的药代动力学行为优于 Asp。

分析非房室模型和房室模型主要药代动力学参数可看出, 游离 Asp 和 ASNCs 相比,  $AUC_{0-48h}$  和  $AUC_{0-\infty}$  均有明显增加, CL 均大幅降低, 从  $AUC_{0-48h}$  的比较看出, 与 Asp 相比, ASNCs 的相对生物利用度约为 195.15% (非房室模型) 或 213.54% (房室

Table 2 Compartment model pharmacokinetic parameters of Asp and ASNCs ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| Parameter                           | Asp                 | ASNCs                |
|-------------------------------------|---------------------|----------------------|
| $AUC_{0-48h}/(U \cdot h/mL)$        | $47.228 \pm 8.724$  | $100.85 \pm 16.754$  |
| $AUC_{0-\infty}/(U \cdot h/mL)$     | $52.839 \pm 15.097$ | $104.021 \pm 14.993$ |
| $V/(L/kg)$                          | $0.308 \pm 0.208$   | $0.6 \pm 0.118$      |
| $CL/(L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1})$ | $0.159 \pm 0.036$   | $0.077 \pm 0.015$    |
| $t_{1/2,\beta}/h$                   | $2.945 \pm 0.956$   | $5.262 \pm 0.931$    |
| $\alpha$                            | $9.988 \pm 3.881$   | $2.419 \pm 2.217$    |
| $\beta$                             | $0.252 \pm 0.068$   | $0.139 \pm 0.027$    |
| Relative bioavailability/%          | -                   | 213.54               |

模型)。非房室模型和房室模型得出的结果一致。用两种模型分析得到的结果可知, ASNCs 提高了 Asp 的体内活性, 降低了清除率, 延长了滞留时间, 从而提高了 Asp 的生物利用度。

#### 4 讨论

自组装纳米系统载药量大, 制备简单<sup>[11]</sup>, 是大分子药物的理想载体。本研究首先将抗肿瘤酶 Asp 封装于自组装仿生脂质纳米囊中, 并考察了 ASNCs 的微观形态、体外抗胰蛋白酶水解稳定性和体内药代动力学。从抗胰蛋白酶水解稳定性结果上看, ASNCs 具有比 Asp 更高的活性, 分析可能原因与封装于脂质纳米粒中的尿酸酶稳定性提高原因类似: 蛋白质类药物稳定性改变与空间结构如螺旋结构和三级结构变化有关<sup>[14]</sup>, 自组装仿生脂质纳米囊能保护 Asp 的空间结构, 使其构象不会因为外界条件变化而改变<sup>[15]</sup>。大鼠体内药代动力学行为显示, ASNCs 相对生物利用度为游离 Asp 的 2 倍左右, ASNCs 在大鼠体内的  $AUC_{0-48h}$  和  $c_{max}$  均较 Asp 高, 说明将 Asp 制备成 ASNCs 后确实可以提高酶在大鼠体内的相对生物利用度, 缓释效果明显。同时, 与黄永佳等<sup>[2]</sup>制备的 Asp 核壳型纳米粒相比 ( $AUC_{0-48h}$  为  $86.06 U \cdot h/mL$ ), ASNCs 的  $AUC_{0-48h}$  提高了  $5.65 U \cdot h/mL$ , 说明 ASNCs 具有更高的生物利用度。分析该纳米粒能提高 Asp 生物利用度的可能原因一是经过透明质酸修饰后的纳米囊生物相容性更高, 避免了 Asp 在体内由于免疫原性高失活的问题; 二是纳米囊能有效封装 Asp, 在进入血液后, 外界血液中的代谢酶对 Asp 的影响减小, 从而达到长效和高效的目的; 再者纳米囊能维持 Asp 的构象, 提高其稳定性和活性。

综上,本研究制备的透明质酸修饰的自组装仿生纳米囊,提高了 Asp 的稳定性和生物利用度,缓释效果明显,同时透明质酸具有靶向肿瘤细胞表面受体 CD44 的优点,磷脂和胆固醇作为内源性物质具有良好的生物相容性。因此,本实验为构建生物相容性、靶向肿瘤细胞的 Asp 递送系统提供了思路与方法,为 Asp 递送系统的进一步研究与应用奠定了理论基础。

### 参 考 文 献

- [1] Zhou XY, Liu JJ. Chemical modification of *Escherichia coli* L-asparaginase with polyethylene glycol[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2000, **31**(3): 230-233.
- [2] Huang YJ, Yang L, Li Y, et al. Pharmacokinetic study on asparaginase-evodiamine loaded core-shell lipidic nanoparticles [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2019, **35**(9): 1284-1289.
- [3] Shi PJ, Fang JP. Study of asparaginase in the treatment of acute lymphoblastic leukemia[J]. *Chin J Pract Pediatr* (中国实用儿科杂志), 2016, **31**(4): 268-274.
- [4] Einsfeldt K, Baptista IC, Pereira JC, et al. Recombinant L-asparaginase from *Zymomonas mobilis*: a potential new antileukemic agent produced in *Escherichia coli* [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(6): e0156692.
- [5] Borek D, Kozak M, Pei JM, et al. Crystal structure of active site mutant of antileukemic L-asparaginase reveals conserved zinc-binding site[J]. *FEBS J*, 2014, **281**(18): 4097-4111.
- [6] Karamitros CS, Yashchenok AM, Möhwald H, et al. Preserving catalytic activity and enhancing biochemical stability of the therapeutic enzyme asparaginase by biocompatible multilayered polyelectrolyte microcapsules [J]. *Biomacromolecules*, 2013, **14**(12): 4398-4406.
- [7] Tian MD, Zhu CM, Luo C, et al. Cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles modified by chitosan or sodium oleate[J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2014, **35**(4): 366-371.
- [8] Ashrafi H, Amini M, Mohammadi-Samani S, et al. Nanostructure L-asparaginase-fatty acid bioconjugate: synthesis, preformulation study and biological assessment [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, **62**: 180-187.
- [9] Chien WW, Allas S, Rachinel N, et al. Pharmacology, immunogenicity, and efficacy of a novel pegylated recombinant *Erwinia chrysanthemi*-derived L-asparaginase [J]. *Invest New Drugs*, 2014, **32**(5): 795-805.
- [10] Sun XF, Liu T, Ling Y, et al. Advances in research of hyaluronic acid modified nanomicelles for targeting tumor therapy and drug release behavior [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2019, **50**(6): 641-647.
- [11] He YJ, Tu TH, Su MK, et al. Facile construction of metallo-supramolecular poly (3-hexylthiophene)-block-poly (ethylene oxide) diblock copolymers via complementary coordination and their self-assembled nanostructures [J]. *J Am Chem Soc*, 2017, **139**(11): 4218-4224.
- [12] Meng XW, Ha W, Cheng C, et al. Hollow nanospheres based on the self-assembly of alginate-graft-poly (ethylene glycol) and  $\alpha$ -cyclodextrin [J]. *Langmuir*, 2011, **27**(23): 14401-14407.
- [13] Stellmach B. *Bestimmungsmethoden Enzyme* (酶的测定方法) [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1992: 85-88.
- [14] Zhou YL, Zhang M, He D, et al. Erratum: Uricase alkaline enzymosomes with enhanced stabilities and anti-hyperuricemia effects induced by favorable microenvironmental changes [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**: 46390.
- [15] Xiong HR, Zhou YL, Zhou QX, et al. Nanosomal microassemblies for highly efficient and safe delivery of therapeutic enzymes [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, **7**(36): 20255-20263.

## 盐酸利多卡因注射剂遗传毒性杂质研究

洗芷然<sup>1</sup>, 孙春萌<sup>2</sup>, 骆雪芳<sup>1\*</sup>, 钟文英<sup>1\*\*</sup><sup>1</sup>中国药科大学理学院药物质量研究中心, 南京 211198; <sup>2</sup>中国药科大学药学院, 南京 211198)

**摘要** 确定2,6-二甲基苯胺为盐酸利多卡因注射液中遗传毒性杂质, *N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺为潜在遗传毒性杂质, 建立LC-MS/MS方法, 用色谱柱Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)对原料、自制制剂及原研制剂进行遗传毒性杂质研究。研究结果表明自制制剂中杂质2,6-二甲基苯胺与*N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺除由原料引入外, 可能分别由氧化条件或碱性条件下降解引入, 为盐酸利多卡因注射液的遗传毒性风险评估和工艺优化提供参考与指导。

**关键词** 盐酸利多卡因注射液; 遗传毒性杂质; LC-MS/MS

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0466-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200412

引用本文 洗芷然, 孙春萌, 骆雪芳, 等. 盐酸利多卡因注射剂遗传毒性杂质研究[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 466 - 471.

Cite this article as: XIAN Zhiran, SUN Chunmeng, LUO Xuefang, et al. Profiling of genotoxic impurities in a lidocaine hydrochloride injection[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(4): 466 - 471.

## Profiling of genotoxic impurities in a lidocaine hydrochloride injection

XIAN Zhiran<sup>1</sup>, SUN Chunmeng<sup>2</sup>, LUO Xuefang<sup>1\*</sup>, ZHONG Wenying<sup>1\*\*</sup><sup>1</sup>Drug Quality Research Center, College of Science, China Pharmaceutical University;<sup>2</sup>School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, China

**Abstract** 2,6-dimethylbenzenamine was determined as a genotoxic impurity in lidocaine hydrochloride injection, and 2-chloro-*N*-(2,6-dimethylphenyl) acetamide was determined as potential genotoxic impurity. An LC-MS/MS method was established to research the profiling of genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients (API), homemade preparation and reference preparation on column Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The results show that in the homemade preparation the 2,6-dimethylbenzenamine and the 2-chloro-*N*-(2,6-dimethylphenyl) acetamide may be degraded under oxidation condition and alkaline condition in addition to the introduction from API preparation process. This study provides guidance for genotoxic risk assessment and prescription process optimization of lidocaine hydrochloride.

**Key words** lidocaine hydrochloride injection; genotoxic impurities; LC-MS/MS

盐酸利多卡因(lidocaine hydrochloride)为临床上常制成盐酸利多卡因注射剂应用于局部麻醉药<sup>[1]</sup>和抗心律失常药物等<sup>[2-3]</sup>。作为国内一致性评价药物目录的基本药物, 原料及制剂的系统杂质研究尚无文献报道, 对制剂中高风险杂质进行系统研究十分必要。

在小分子化学药物一致性评价中, 遗传毒性杂质因其毒性危害大, 在极微量水平即能与体内DNA分子反应诱发DNA突变或致癌, 是药物安全

性评价的重要内容。遗传毒性杂质在药物制剂中主要来源于原料工艺及原辅料降解, 本文根据盐酸利多卡因的结构及合成工艺, 结合相关文献及研究资料确定了2,6-二甲基苯胺为遗传毒性杂质, *N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺为潜在遗传毒性杂质。已有测定盐酸利多卡因中杂质2,6-二甲基苯胺的文献报道<sup>[3-4]</sup>, 现有药品标准中《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)(2015)<sup>[5]</sup>收录的盐酸利多卡因注射液中杂质2,6-二甲基苯胺质控限度为

收稿日期 2020-03-20 通信作者 \*Tel: 13770599176 E-mail: liuluo21998@126.com

\*\*Tel: 025-86185180 E-mail: wenyingshzhongnj@163.com

0.04%,《中国药典》(2015)、欧洲药典 9.0<sup>[6]</sup>收录盐酸利多卡因原料中杂质 2,6-二甲基苯胺质控限度为 0.01%,美国药典 40<sup>[7]</sup>对盐酸利多卡因原料中杂质 2,6-二甲基苯胺(质控限度:0.01%)与杂质 2,6-二甲基苯基乙酰胺(质控限度:0.1%)均进行了控制。暂无文献报道对遗传毒性杂质和潜在遗传毒性杂质同时进行控制。本研究通过建立 LC-MS/MS 方法,检测 2,6-二甲基苯胺和潜在遗传毒性杂质 *N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺在原料、自制制剂及原研制剂中的检出数量及含量,并通过强制降解试验确定遗传毒性杂质的来源和降解途径,评估降解风险,为该制剂的质量控制提供参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

EX125DZH 电子天平(美国奥豪斯公司);Agilent 1100 高效液相色谱仪配紫外检测器、柱温箱及自动进样器(美国安捷伦公司);AB API3000 单四极杆质谱检测器,配有电喷雾电离源(美国应用生物系统公司);MILLIPAK Millipore 超纯水仪(德国默克公司)。

### 1.2 试剂

甲醇(色谱纯,德国默克公司);水(超纯水,德国默克超纯水仪自制)。盐酸利多卡因原料药(山西新宝源制药有限公司,批号:201811009、201811012、201811016);盐酸利多卡因注射液自制制剂(实验室自制,批号:190502、190503,规格:100 mg:5 mL,原料批号 201811009);盐酸利多卡

因注射液参比制剂(德国费森尤斯集团,批号:6120311,规格:100 mg:5 mL)。*N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺(欧洲药典,批号:1366080,纯度 99%);2,6-二甲基苯胺(英国政府化学家实验室,批号:108951,纯度 99.8%)、2,6-二甲基苯基乙酰胺(批号:154427,纯度 99.98%)、*N*-2,6-二甲基苯基-2-乙基氨基乙酰胺(批号:142855,纯度 99.5%)、杂质 2-二乙基叠氮酰基-*N*-2,6-二甲基苯基乙酰胺(批号:833116,纯度 98.4%)(英国政府化学家实验室)。

## 2 方法

### 2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 检测色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORB-AX Eclipse Plus C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(80:20)等度洗脱,流速 0.3 mL/min,柱温 30 °C,进样体积 20 μL。

2.1.2 检测质谱条件 正离子模式;采集模式:MRM;雾化器指数:8;气帘:8;碰撞气:4;离子源压力:5 000 psi;离子源温度:400 °C。质谱参数见表 1。

2.1.3 强制降解试验色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相 A:4.85 g/L 磷酸二氢钾(氢氧化钠调节 pH 至 8.00),流动相 B:乙腈,流动相梯度:25% B→60% B;流速 1.0 mL/min;柱温 30 °C;检测波长:230 nm;进样体积 20 μL。

Table 1 Mass spectrometer of genotoxic impurities.

| Name   | Q1(Da) | Q3(Da) | DP(volts) | FP(volts) | EP(volts) | CE(volts) | CXP(volts) |
|--|--------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 2,6-Dimethylbenzenamine                            | 122    | 105.2  | 47.26     | 385.93    | 9.85      | 22.28     | 15.00      |
| 2-Chloro- <i>N</i> -(2,6-dimethylphenyl) acetamide | 198    | 122.3  | 47.33     | 260.92    | 14.70     | 28.78     | 15.00      |

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别取杂质 A 与杂质 B 对照品适量,以甲醇-水(80:20)的混合溶液溶解并定量稀释制成含杂质各 100 ng/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 原料药供试品溶液 取盐酸利多卡因原料药约 25 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇-水(80:20)的混合溶液,振摇使溶解,定容并摇匀即得。

2.2.3 制剂供试品溶液 另取自制制剂与参比制剂各适量(约相当于盐酸利多卡因 50 mg),置

50 mL 量瓶中,加甲醇-水(80:20)的混合溶液,定容并摇匀即得。

2.2.4 强制降解试验供试品溶液 取盐酸利多卡因原料药各约 50 mg,置于 10 mL 量瓶中,分别加入 1 mol/L HCl 溶液 2 mL、1 mol/L NaOH 溶液 2 mL、1% 双氧水 2 mL,于常温避光环境下各放置 24 h 进行酸、碱、氧化强制降解,另取各约 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,加入超纯水 2 mL 振摇使溶解,于 60 °C 烘箱、5 000 Lx 的光照试验箱下放置 24 h 进行高温

与光照强制降解。上述强制降解溶液破坏结束后加流动相A-流动相B(70:30)的混合溶液定容并摇匀即得。另取盐酸利多卡因原料药约50 mg,置于10 mL量瓶中,加入超纯水2 mL振摇使溶解,于常温避光环境下放置24 h后加流动相A-流动相B(70:30)的混合溶液定容并摇匀,得未破坏供试品溶液,精密量取上述溶液适量,加流动相A-流动相B(70:30)的混合溶液定量稀释,配制0.1%的自身对照溶液。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 遗传毒性杂质与潜在遗传毒性杂质的筛选

据文献[8-10]报道,利多卡因主要由两条合成

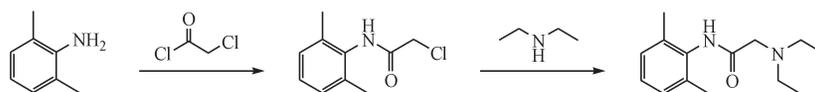


Figure 1 Synthesis route of lidocaine

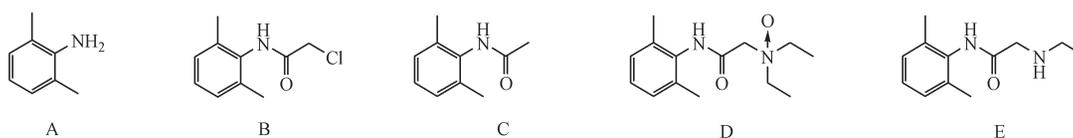


Figure 2 Structures of possible degradation products in lidocaine hydrochloride

A: 2,6-Dimethylaniline; B: 2-Chloro-*N*-(2,6-dimethylphenyl)acetamide; C: *N*-(2,6-dimethylphenyl)acetamide; D: 2-(Diethylazinoyl)-*N*-(2,6-dimethylphenyl)acetamide; E: *N*-(2,6-dimethylphenyl)-2-(ethylamino)acetamide

3.1.1 2,6-二甲基苯胺(下文简称杂质A) 杂质A为合成盐酸利多卡因的关键起始物料,其主要致突变/致癌基团为芳香胺,芳香胺易形成亲电氮离子与DNA反应产生基因突变和/或致癌。Kobets等<sup>[13]</sup>提出,大鼠慢性生物试验中表明杂质A会增加腺瘤和鼻腔癌的发生率,致癌性及体内遗传毒性均显示阳性。Koujitani等<sup>[14]</sup>的毒性研究数据表明,连续52周对大鼠的饮食中施以3 000 mg/kg的杂质A后,组织病理学评估结果显示该组的肿瘤发生率为33%,即TD<sub>50</sub>(median toxic dose,半数中毒剂量)大于3 000 mg/kg,根据ICH M7指导原则<sup>[15]</sup>按照TD<sub>50</sub>进行线性外推计算限度的方法,代入该值计算该杂质的限度为1%。而在已有药品标准中,《中国药典》(2015)<sup>[5]</sup>规定杂质2,6-二甲基苯胺在盐酸利多卡因注射液中的限度为0.04%,在盐酸利多卡因原料药中的限度为0.01%,欧洲药典9.0<sup>[6]</sup>、美国药典40<sup>[7]</sup>均规定盐酸利多卡因原料药中2,6-二甲基苯胺的限度为0.01%,在各国

路线制备,其中最常用合成路线见图1<sup>[8]</sup>,根据该合成路线推测降解杂质可能含起始物料2,6-二甲基苯胺(图2-A)、中间体*N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺(图2-B)及二乙基键断裂后降解产物*N*-2,6-二甲基苯基乙酰胺(图2-C);Li等<sup>[11]</sup>指出叔胺易氧化形成*N*-氧化物,故含叔胺结构的利多卡因易氧化降解形成2-二乙基叠氮酰基-*N*-2,6-二甲基苯基乙酰胺(图2-D);Li等<sup>[12]</sup>指出,利多卡因一步代谢可形成代谢产物2,6-二甲基苯胺与*N*-2,6-二甲基苯基-2-乙基氨基乙酰胺(图2)。

针对以上文献信息,本研究从5个降解杂质中筛选出一个遗传毒性杂质与一个潜在遗传毒性杂质,详细说明如下。

药品标准对该杂质的质控要求更权威及更严格的背景下,本研究按照从严控制原则,选择各药典中规定的最低限度0.01%对盐酸利多卡因注射液中该杂质进行控制。

3.1.2 *N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺(下文简称杂质B) 杂质B结构中含脂肪族氯代基团,电负性的氯使其邻位的α-C易失电子形成亲电基团,该亲电基团易与DNA等亲核物质发生反应,产生基因突变<sup>[16]</sup>。该杂质目前无确切致癌性及致突变性数据,本研究参考文献[17]中卤代物典型化合物的致癌性及致突变性试验数据中化学结构较相近的化合物4'-氯乙酰基乙酰苯胺的毒性数据来评估杂质B的遗传毒性风险。文献表明该化合物无致癌性TD<sub>50</sub>数据,但存在致突变性(AMES试验阳性),即无致癌性、有致突变性。根据ICH M7指导原则<sup>[14]</sup>中的分类标准,可将杂质B列为2类遗传毒性杂质,需将其控制在合适的毒理学阈值(threshold of toxicological concern, TTC)以下。按照指导原则

中相关说明,用于麻醉的药品,其药物治疗时长不超过 1 个月,遗传毒性杂质的可接受摄入量为 120  $\mu\text{g}/\text{d}$ ,结合盐酸利多卡因注射液最大日剂量 0.3 g 计算,杂质限度为 PDE/最大日剂量即 0.04%。因杂质 B 与杂质 A 同为利多卡因的可能降解产物,且其潜在遗传毒性未能准确评估,为更严格地控制杂质水平,将该杂质限度与遗传毒性的杂质 A 限度保持一致,即按 0.01% 控制。

**3.1.3 *N*-2,6-二甲基苯基乙酰胺(下文简称杂质 C)** 本研究暂未查到杂质 C 相关毒性资料,根据 ICH 的指导原则,在缺乏安全性数据的支持下,可采用“警示结构”<sup>[18]</sup>对杂质进行遗传毒性筛选并进行分类。经比对,发现杂质 C 中含有警示结构“芳胺的酰化物”,该结构在盐酸利多卡因原料药中亦存在。由于杂质 C 与原料药具有相同的警示结构,按照 ICH M7 的分类原则,应对其按 4 类杂质进行控制,即按非致突变杂质进行控制。

**3.1.4 *N*-2,6-二甲基苯基-2-乙基氨基乙酰胺(下文简称杂质 D)** 杂质 D 为盐酸利多卡因叔胺上 N 原子的氧化产物,目前暂未查到文献报道有关该杂质的遗传毒性数据,在 ICH M7 指导原则参考的警示结构列表中,无烷基叔胺氮氧化物结构,即表明在大量毒性试验中暂无证明此基团存在潜在遗传毒性的数据。综上所述,因杂质 D 不含警示结构,按遗传毒性分类原则将其分为 5 类杂质,不将其按照潜在遗传毒性杂质进行研究。

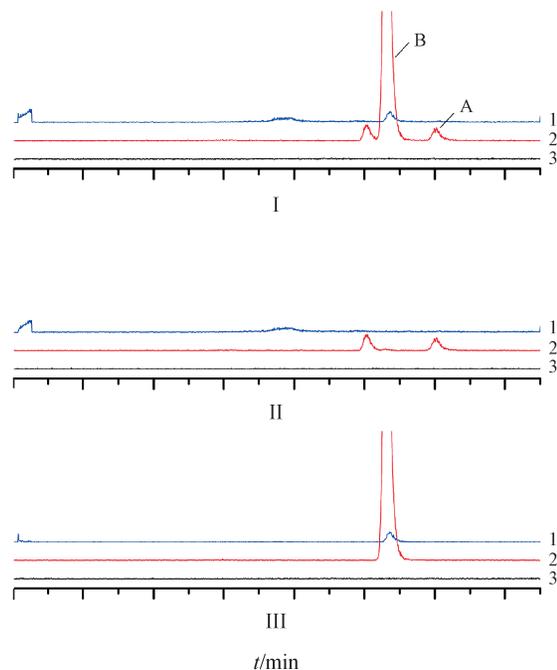
**3.1.5 2-二乙基叠氮酰基-*N*-2,6-二甲基苯基乙酰胺(下文简称杂质 E)** 与杂质 D 同理,对于暂无文献报告杂质 E 的遗传毒性数据,本研究通过与指导原则中的“警示结构”<sup>[18]</sup>比对来预测该杂质的遗传毒性,比对结果显示,杂质 E 亦无可匹配的警示结构,按遗传毒性杂质分类原则将其分为 5 类杂质,亦不列入潜在遗传毒性杂质范围。

综合以上分析,本研究最终确定盐酸利多卡因中遗传毒性杂质为 2,6-二甲基苯胺,潜在遗传毒性杂质为 *N*-氯乙酰-2,6-二甲基苯胺,二者在盐酸利多卡因原料药及注射液中检出均不得过 0.01%。

### 3.2 遗传毒性杂质与潜在遗传毒性杂质的检测

现行各国药典规定的盐酸利多卡因原料及注射液中 2,6-二甲基苯胺检查法所采用的流动相中均含磷酸盐<sup>[5-7]</sup>,不适用于质谱联用检测。本研究在建立遗传毒性杂质检测方法过程中,将流动相

中水相改为超纯水,有机相改为在质谱中较乙腈更易离子化的甲醇,流动相流速降为 0.3 mL/min,通过调整水相与有机相比比例使 API 与两个待测杂质实现良好分离。在优化的色谱条件下用液质联用仪进行一二级质谱碎片扫描,分别确定各杂质定量离子对并进行质谱参数优化,从而确定液相-质谱联用条件。由于 API 在两个待测杂质出峰后经色谱柱洗脱,因此在检测方法中杂质 A 与杂质 B 均出峰后设置通道切换,将后续含高浓度 API 的流出液作为废液排出,以保护质谱仪。在确定的色谱条件下,空白溶剂(80% 甲醇)、混合对照品溶液及供试品溶液杂质测定谱图见图 3,从图谱上看,在杂质 A 与杂质 B 特异性 Q1/Q3 定量离子对通道下,各相邻峰均不干扰该峰检测;该色谱及质谱条件下杂质 A 与杂质 B 的定量限分别为 43.91 与 40.39 ng/mL,约相当于 0.004% 的盐酸利多卡因,可满足本品质控限度要求。



**Figure 3** Chromatograms of potential genotoxic impurities tests

1: Test solution (Lot: 201811012); 2: Reference solution; 3: Blank solvent. A: Peak of impurity A; B: Peak of impurity B; I: Chromatogram of total ion current; II: Chromatogram of impurity A; III: Chromatogram of impurity B

取各杂质对照品及盐酸利多卡因原料药、自制制剂、原研制剂照“2.1”项下方法配制混合对照品溶液与供试品溶液,按照遗传毒性杂质检测方

法进样,以外标法计算各杂质含量,测定结果见表2。

**Table 2** Results of content of potential genotoxic impurities of lidocaine hydrochloride API, homemade preparations and reference preparations

| Form      | Batch No. | Impurity A/% | Impurity B/% |
|-----------|-----------|--------------|--------------|
| API       | 201811009 | 0.000 3      | 0.001 1      |
|           | 201811012 | 0.000 2      | 0.000 5      |
|           | 201811016 | ND*          | 0.001 0      |
| Homemade  | 190502    | 0.000 7      | 0.001 4      |
| Reference | 6120311   | 0.000 2      | ND           |

\*ND:Not detected

表中结果显示,批号201811009的原料药和由该批次制成的自制制剂及批号201811012的原料药中杂质A与杂质B均有检出,批号201811016原料药仅检出杂质B。与原料及自制制剂相比,原研制剂仅检出少量的杂质A。比对各组数据,两个杂质检出量均呈现自制制剂>原料药>原研制剂的趋势。对原料药与原研制剂杂质检出量进行比对分析可知,杂质可能来源于原料生产过程中的工艺杂质,也可能来源于原料储运过程中产生的降解。而由自制制剂与原料药杂质检出量的差异判断,从原料储存—制剂制备—制剂储存的途径中,盐酸利多卡因均存在降解产生杂质A与杂质B的趋势。综合以上分析,原料生产工艺与杂质的降解均可能是导致自制制剂与原研制剂遗传毒性杂质检出情况不一致的原因。本研究主要从杂质的降解方面入手,设计原料药的强制降解试验,进一步探究上述杂质的主要降解途径和降解程度,为注射液的制备工艺和储存条件提供参考。

### 3.3 强制降解试验

照上述“2.2.4”项下配制方法进行酸、碱、氧化、高温及光照强制降解试验,取各溶液于“2.1.3”条件下进样,计算强制降解供试品溶液各杂质含量与未破坏供试品溶液各杂质含量的绝对偏差,为更全面分析盐酸利多卡因降解途径,本研究将“3.1”项下涉及的5个降解杂质均进行了降解含量分析,结果如见表3。

结果显示,碱降解及氧化降解为盐酸利多卡因的主要降解途径,在较极端的酸、高温及光照条件下盐酸利多卡因较稳定。在氧化破坏条件下,主要降解产物为杂质D,其次为杂质E与杂质A,

**Table 3** Results of the forced degradation tests of lidocaine hydrochloride

| Name       | 1 mol/L HCl | 1 mol/L NaOH/% | 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /% | 60 °C heat | Light |
|------------|-------------|----------------|-------------------------------------|------------|-------|
| Impurity A | ND          | ND             | 0.001                               | ND*        | ND    |
| Impurity B | ND          | 0.001          | ND                                  | ND         | ND    |
| Impurity C | ND          | ND             | ND                                  | ND         | ND    |
| Impurity D | ND          | ND             | 20.399                              | ND         | ND    |
| Impurity E | ND          | ND             | 0.007                               | ND         | ND    |

\*ND:Not detected or changes of content ≤0.000%

据之前分析,杂质D与杂质E无潜在遗传毒性,对盐酸利多卡因遗传毒性风险影响较低。观察盐酸利多卡因化学结构,其中含有关键基团酰胺键,试验前期笔者初步预测盐酸利多卡因易发生酰胺键的水解反应降解形成杂质A而使原料药和制剂的遗传毒性风险大大增加,但根据试验结果可以看出,在各条件下杂质A均没出现较大的降解趋势,该现象的出现可能由于苯环上邻位的两个甲基形成的空间位阻对酰胺键起了一定的保护作用<sup>[12]</sup>。在碱性条件下仅杂质B有少量降解。结合上述原料药与自制制剂中杂质的检测结果分析,杂质A与杂质B在自制制剂的含量与原料药相比有所增加,与强制降解试验二者均有少量降解的结果一致,证明了前述对于杂质A与杂质B除了来源于原料工艺杂质外还会来源于盐酸利多卡因的降解这一推断。

综合强制降解试验结果可知,盐酸利多卡因主要在碱性条件和氧化条件下产生降解,形成杂质A和杂质B,遗传毒性风险增加。针对以上结果,可在本品制备和储存过程中针对含氧量与酸碱度进行条件优化,以减少盐酸利多卡因的降解。本研究对盐酸利多卡因自制制剂储存过程中的氧气接触时间进行了优化,在安瓿瓶熔封前向瓶内灌入高纯氮气,将瓶内注射液与空气隔绝,再进行熔封,制成批号为190503的小试批自制制剂。照“3.2”项下步骤测定两个待测杂质的含量,杂质A与杂质B检出量分别为 $5 \times 10^{-4}\%$ 与 $1.6 \times 10^{-3}\%$ 。与批号为190502的杂质含量检测结果进行比对分析,经过充氮保护后,盐酸利多卡因降解出杂质A的趋势有所下降,说明充氮保护对形成杂质A的降解途径有一定的抑制作用。而杂质B的检出量未降低,说明充氮保护不能抑制杂质B的降解。

除充氮保护外,有文献报道曾采用在制剂中添加如盐酸赖氨酸<sup>[19]</sup>、亚硫酸氢钠<sup>[20]</sup>等抗氧化剂或使用脱气水等手段来抑制注射剂的氧化降解,通过加入不同种类的 pH 调节剂并适当调节用量来抑制注射剂的酸降解或碱降解。若要实现上述技术在盐酸利多卡因注射液的制备工艺中的应用,需要多方面考察原辅料相容性、辅料自身的毒性与处方的详细用量等,目前仍有待进一步研究。

#### 4 结 论

本研究确定了盐酸利多卡因中遗传毒性杂质与潜在遗传毒性杂质,经检测原料药、自制制剂及原研制剂中遗传毒性杂质检出情况存在一定的差异,根据强制降解试验结果进一步确定该差异主要来源于原料生产工艺与原料药在氧化及碱性条件下的降解,通过充氮保护可一定程度减少杂质 2,6-二甲基苯胺的降解,本研究对盐酸利多卡因注射液的遗传毒性风险评估和处方工艺优化提供了理论参考。

#### 参 考 文 献

- [1] Long J, Etxeberria AE, Nand AV, *et al.* A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, **104**: 109873. doi: 10.1016/j.msec.2019.109873.
- [2] Chen YQ, Hong BH, Yi RZ. HPLC determination of contents and related substances in the tetrodotoxin lidocaine hydrochloride for injection [J]. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2016, **35**(3): 67-75.
- [3] Wang X, Li X, Xiao Y. A novel dispersive liquid-liquid micro-extraction method with high performance liquid chromatography for detection of 2,6-dimethylaniline in lidocaine hydrochloride injection [J]. *Se Pu*, 2018, **36**(3): 292-298. doi: 10.3724/SP.J.1123.2017.11049.
- [4] Deng ZH, Li AH, Hu WJ. Improvement of quality control of lidocaine hydrochloride injection [J]. *J Pharm Pract* (药学实践杂志), 2016(1): 72-75. doi: 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.01.019.
- [5] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia: Part 2 (中华人民共和国药典: 二部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 979-980.
- [6] European Pharmacopoeia 9.0: Volume III (欧洲药典 9.0: 卷 3) [S]. France: European Directorate for the Quality of Medicine & Healthcare, 2017: 2905-2906.
- [7] The United States Pharmacopoeial Convention. United States Pharmacopoeia 40 [S]. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2017: 4847-4848.
- [8] Yang RY, Yin XL, Liang M, *et al.* Microscale experimental study on preparation of lidocaine [J]. *Guangdong Chem Ind* (广东化工), 2010, **37** (5): 137, 149. doi: 10.3969/j.issn.1007-1865.2010.05.058.
- [9] Zhejiang Huineng Biological Co., Ltd. *Method for preparing lidocaine hydrochloride*: 201510738390.7 [P]. 2016-02-03.
- [10] Bengbu Fengyuan Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd. *Method for preparing lidocaine*: 201010579590. X [P]. 2011-05-25.
- [11] Li M. *Organic Chemistry of Drug Degradation* [M]. United Kingdom: CPI Group (UK) Ltd, Croydon, CR04YY, UK, 2012.
- [12] Li Q, Magers T, King B, *et al.* Measurement of lidocaine and 2,6-dimethylaniline in minipig plasma, skin, and dermal tapes using UHPLC with electrospray MS/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, **1087-1088**: 158-172. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.04.030.
- [13] Kobets T, Duan JD, Brunnemann KD, *et al.* DNA-damaging activities of twenty-four structurally diverse unsubstituted and substituted cyclic compounds in embryo-fetal chicken livers [J]. *Mutat Res*, 2019, **844**: 10-24. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.06.004.
- [14] Koujritani T, Yasuhara K., Kobayashi H., *et al.* Tumor-promoting activity of 2,6-dimethylaniline in a two-stage nasal carcinogenesis model in *N*-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine-treated rats [J]. *Cancer Lett*, 1999, **142**(2): 161-171.
- [15] The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk M7 (R1) [S/OL]. (2017-05-01) [2019-01-28]. <https://www.ich.org/fileadmin/>.
- [16] Heewon L. *Pharmaceutical industry practices on genotoxic impurities* [M]. US: CRC, 2015: 87-88.
- [17] Andrew T. *Genotoxic impurities strategies for identification and control* [M]. Canada: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2011: 44-46.
- [18] Benigni R, Bossa C. Structure alerts for carcinogenicity, and the Salmonella assay system: a novel insight through the chemical relational databases technology [J]. *Mutat Res*, 2008, **659** (3): 248-261. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.05.003.
- [19] Xia YL, Zhang AJ, Liu JP. Optimization of tiopronin formulation [J]. *Centr South Pharm* (中南药学), 2015, **13**(7): 739-740, 779.
- [20] Lei XX, Wang Y, Zhang JL, *et al.* Analysis of the addition and measurement of bacteriostatics and antioxidants in injection and eye drops [J]. *Mod Chem Res* (当代化工研究), 2017 (4): 143-144.

## GC-MS 法测定甲磺酸中 3 种甲磺酸烷基酯类遗传毒性杂质

陈忆铃<sup>1</sup>, 冯江江<sup>2</sup>, 杨海雪<sup>3</sup>, 时雅萍<sup>1</sup>, 李龙因<sup>2</sup>, 冯芳<sup>1\*</sup><sup>1</sup>中国药科大学药物分析系, 南京 211198; <sup>2</sup>无锡市药品检验所, 无锡 214028;<sup>3</sup>扬子江药业集团南京海陵药业有限公司, 南京 210049)

**摘要** 建立一种液液萃取 GC-MS 分析方法, 用于测定甲磺酸中遗传毒性杂质甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯。采用甲基聚硅氧烷毛细管色谱柱, 程序升温, 进样口温度 220 °C, 不分流高压进样; 质谱正离子模式, 选择性监测  $m/z$  56、 $m/z$  79、 $m/z$  80 及  $m/z$  123 离子。实验结果显示, 甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯对应色谱峰之间实现了基线分离, 空白提取溶液无干扰; 3 种遗传毒性杂质在 37~1 480 ng/mL 范围内线性关系良好, 且不同浓度水平平均回收率分别为 104.99%、107.26% 及 108.85%, RSD 均不超过 4.54%。该方法具有专属、灵敏、准确、稳定、通用性好的特点, 已用于多种不同来源市售甲磺酸中甲磺酸烷基酯类杂质的检测和控制。

**关键词** 甲磺酸; 甲磺酸烷基酯; 遗传毒性杂质; 液液萃取; GC-MS 法; 含量测定

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0472-07

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200413

引用本文 陈忆铃, 冯江江, 杨海雪, 等. GC-MS 法测定甲磺酸中 3 种甲磺酸烷基酯类遗传毒性杂质[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 472 - 478.

Cite this article as: CHEN Yiling, FENG Jiangjiang, YANG Haixue, et al. Determination of genotoxic impurities of alkyl methanesulfonates in methanesulfonic acid by gas chromatography - mass spectrometry[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(4): 472 - 478.

## Determination of genotoxic impurities of alkyl methanesulfonates in methanesulfonic acid by gas chromatography - mass spectrometry

CHEN Yiling<sup>1</sup>, FENG Jiangjiang<sup>2</sup>, YANG Haixue<sup>3</sup>, SHI Yaping<sup>1</sup>, LI Longnan<sup>2</sup>, FENG Fang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; <sup>2</sup>Wuxi Center for Drug Safety Control, Wuxi 214028; <sup>3</sup>Yangtze River Pharmaceutical Group Nanjing Hailing Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210049, China

**Abstract** An analytical liquid-liquid extraction-gas chromatography - mass spectrometry (LLE-GC-MS) method was established for the determination of genotoxic impurities including methyl methanesulfonate (MMS), ethyl methanesulfonate (EMS) and isopropyl methanesulfonate (IMS) in methanesulfonic acid. An Agilent HP-1MS capillary column (30 m × 0.32 mm, 1 μm) was used for separating the analytes by programmed heating with the inlet temperature of 220 °C. Mass spectrometry was operated in positive ion mode, and selective ion monitors were set at  $m/z$  80 for MMS,  $m/z$  79 for EMS,  $m/z$  123 for IMS and  $m/z$  56 for internal standard butyl methanesulfonate (BMS). Results showed that the baseline separation of MMS, EMS and IMS was achieved, and the blank extraction solution had no interference; good linearity was achieved in the range of 37-1 480 ng/mL for three alkyl methanesulfonates; The mean recoveries of MMS, EMS, IMS were 104.99%, 107.26%, 108.85%, respectively, with RSD ≤ 4.54%. The established method has the characteristics of good specific, sensitive, accurate, stable and versatility, and has been used for the detection and control of alkyl methanesulfonate impurities in methanesulfonic acid from a variety of manufacturers.

**Key words** alkyl methanesulfonates; genotoxic impurities; methanesulfonic acid; liquid-liquid extraction; GC-MS; determination of content

收稿日期 2020-05-08 \*通信作者 Tel: 13951682985 E-mail: fengfang@cpu.edu.cn

基金项目 国家药典委员会药品标准制修订研究课题资助 (No. ZG2018-4-03)

This study was supported by Chinese Pharmacopoeia Commission on the Research and Revision of Drug Standards (No. ZG2018-4-03)

甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯是DNA反应活性物质,在极低水平下仍存在致突变/致癌风险<sup>[1-4]</sup>,为此,全球药品监督管理部门高度重视,纷纷要求相关企业在药物研发、生产过程中对其严格控制<sup>[5-7]</sup>,国家药典委员会在即将执行的2020版《中华人民共和国药典》中新增了“遗传毒性杂质控制指导原则”<sup>[8]</sup>。

甲磺酸盐类药物中甲磺酸烷基酯杂质可能来源于副反应和起始物料甲磺酸。Teasdale等<sup>[9-10]</sup>通过实验研究,提出了在甲磺酸盐合成过程中最大限度的减少或消除甲磺酸烷基酯的策略。除酸碱化学计量比、酸度、温度、水分含量及反应时间等影响外,起始物料甲磺酸的质量十分关键。由于甲磺酸成盐反应主要发生在药物合成的最终阶段<sup>[11-12]</sup>,成盐过程中甲磺酸含有的甲磺酸烷基酯杂质很可能被带入药物终产物中,带来安全隐患。因此,对甲磺酸中可能存在的甲磺酸烷基酯进行分析监测,对于甲磺酸盐类药物的安全和质量控制十分重要。

有关甲磺酸中甲磺酸烷基酯类杂质检测的报道不多。Ramjit等<sup>[13]</sup>以乙腈为溶剂,采用直接进样GC-MS法测定了甲磺酸中甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸正丙酯及甲磺酸正丁酯,虽然方法简单,便于操作,但样本基质容易在气相进样口造成污染。Zhou等<sup>[14]</sup>尝试采用柱前衍生化-高效液相色谱法测定甲磺酸中甲磺酸烷基酯。由于所用衍生化试剂的亲核性较差,该法仅能测定供试品中的甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯,且每个样品分析需时30 min。欧洲药典采用二氯甲烷液液萃取后GC-MS法分析测定甲磺酸中的甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯<sup>[15]</sup>,方法表观简单,但实际应用时出现回收率偏低的问题。本研究在欧洲药典方法的基础上,通过改变对照品溶液的配制方法提高方法的定量准确度,并考察了质谱定量离子及检测方式、毛细管色谱柱及升温程序、进样方式及进样参数等方法专属性和灵敏度的影响,进一步通过比较单点校正法与标准曲线法的准确度,确立了内标定量方法,并将该方法应用于不同来源的甲磺酸质量控制与监测。

## 1 材料

### 1.1 仪器

GC-MS-QP2020气相色谱-质谱联用色谱仪,配有AOC-20i自动进样器,GC-MS solution 4.45版工作站(日本Shimadzu公司);BSA124S型电子天平、BT25S型电子天平(德国Sartorius公司)。

### 1.2 试剂

甲磺酸甲酯(99%,批号:A0356876)、甲磺酸乙酯(99%,批号:A0341901)、甲磺酸异丙酯(99%,批号:A0375206),均购自美国Acros Organics公司;甲磺酸正丁酯(98%,批号:AK114028,美国Ark Pharm公司);二氯甲烷(色谱/光谱级,批号:19045160,美国Tedia公司);甲磺酸( $\geq 98\%$ ,批号:10210923,美国Alfa Aesar公司);甲磺酸(99.5%,批号:F1801073、D1919052,阿拉丁试剂有限公司);其余均为市售分析纯试剂。

## 2 方法

### 2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 Agilent HP-1MS毛细管柱(固定液为100%二甲基聚硅氧烷,30 m  $\times$  0.32 mm,1  $\mu$ m);进样口温度220  $^{\circ}$ C;柱温:初始温度为55  $^{\circ}$ C,维持1 min,10  $^{\circ}$ C/min升温至95  $^{\circ}$ C,维持2 min;再以10  $^{\circ}$ C/min升温至135  $^{\circ}$ C,维持2 min;载气:高纯氦气;流速为2 mL/min;不分流高压进样:压力250 kPa,时间0.5 min;进样量:2  $\mu$ L。

2.1.2 质谱条件 电子轰击源(EI),离子源温度:230  $^{\circ}$ C;接口温度280  $^{\circ}$ C;四极杆质量分析器,选择离子监测(SIM)模式。检测离子、检测时间窗信息见表1。

Table 1 SIM mode of components to be tested

| Component | <i>m/z</i> | Acquisition period/min |
|-----------|------------|------------------------|
| MMS       | 80         | 4.30-4.80              |
| EMS       | 79         | 5.80-6.30              |
| IMS       | 123        | 6.70-7.20              |
| IS-BMS    | 56         | 10.30-10.80            |

MMS: Methyl methanesulfonate; EMS: Ethyl methanesulfonate; IMS: Isopropyl methanesulfonate; IS-BMS: Internal standard -Butyl methanesulfonate

## 2.2 溶液制备

2.2.1 空白溶液 于分液漏斗中精密加入水 5 mL 及二氯甲烷 5 mL, 振摇提取, 静置使分层; 取下层有机相加无水硫酸钠 0.7 g, 振摇, 静置 5 min, 取上清液, 即得。

2.2.2 内标溶液 量取甲磺酸正丁酯 7  $\mu$ L, 置 10 mL 量瓶中, 加二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀, 作为内标贮备液; 精密量取内标贮备液 5  $\mu$ L, 置 100 mL 量瓶中, 加二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 混合对照品溶液 精密称取甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯各 25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加内标溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品贮备液; 精密量取混合对照品贮备液 74  $\mu$ L, 置 10 mL 量瓶中, 加内标溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品中间贮备液; 精密量取上述溶液 100  $\mu$ L, 置 10 mL 量瓶中, 加内标溶液稀释至刻度, 摇匀, 备用; 于分液漏斗中精密加入 5 mL 水及上述溶液 5 mL, 振摇提取, 静置使分层; 取下层有机相

加无水硫酸钠 0.7 g, 振摇, 静置 5 min, 取上清液, 即得。

2.2.4 供试品溶液 取供试品 0.37 g, 精密称定, 置分液漏斗中, 精密加入水 5 mL, 摇匀, 冷却至室温; 精密加入内标溶液 5 mL, 振摇提取, 静置使分层; 取下层有机相加无水硫酸钠 0.7 g, 振摇, 静置 5 min, 取上清液, 即得。

## 3 结果

### 3.1 专属性考察

取空白溶液、混合对照品溶液、供试品溶液 ( $\geq 98\%$ , 批号: 10210923, 美国 Alfa Aesar 公司), 按“2.1”项下条件进样分析, 记录色谱图(见图 1)。结果表明, 甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯和甲磺酸正丁酯的保留时间分别为 4.63、5.99、6.89、10.46 min, 空白溶液(图 1-A)不干扰测定, 各相邻峰之间分离度良好(图 1-B、1-C), 方法专属性良好。

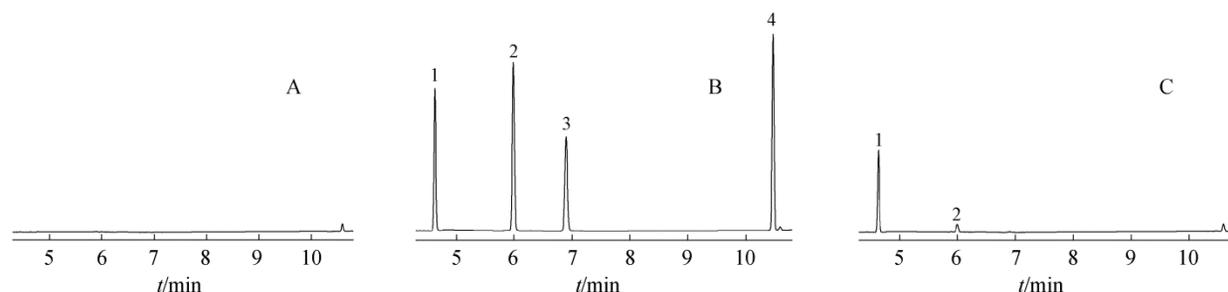


Figure 1 Characteristic GC-MS chromatograms of blank solution (A), standard solution (B) and test solution (C)

1: MMS; 2: EMS; 3: IMS; 4: IS-BMS

### 3.2 线性关系考察

取混合对照品中间贮备液适量加内标溶液稀释至刻度制得质量浓度约为 37, 74, 370, 740, 1 480 ng/mL 对照品溶液, 经萃取-干燥处理后制得

系列标准线性溶液, 按“2.1”项下条件进样分析, 以各待测物与内标峰面积比为纵坐标, 浓度为横坐标进行线性回归, 各甲磺酸酯在 37~1 480 ng/mL 范围内线性关系良好, 结果见表 2。

Table 2 Result of linearity test of three alkyl methanesulfonates

| Component | Linear equation          | <i>r</i> | Linear range/(ng/mL) | Residual sum of squares |
|-----------|--------------------------|----------|----------------------|-------------------------|
| MMS       | $y=0.015\ 05x+0.050\ 30$ | 1        | 36.75-1 470.0        | 0.006 992               |
| EMS       | $y=0.023\ 20x-0.011\ 97$ | 1        | 35.49-1 419.6        | 0.001 861               |
| IMS       | $y=0.016\ 28x-0.162\ 1$  | 0.999 9  | 36.14-1 445.6        | 0.056 33                |

### 3.3 定量限和检测限

MMS、EMS、IMS 的定量限分别为 36.75、35.49 和 36.14 ng/mL, 定量限精密度分别为 1.25%、0.68% 和 0.37%, 定量限准确度分别为 105.73%、

105.32%、101.53%。以信噪比约为 3:1 的相应浓度作为检测限, MMS、EMS、IMS 的检测限分别为 7.35、7.10 和 7.23 ng/mL。

### 3.4 进样精密度

取混合对照品溶液,连续进样5次,MMS、EMS、IMS与内标峰面积比的RSD分别为0.51%、0.43%和0.27%,仪器进样精密度良好。

### 3.5 回收率

取甲磺酸样本(批号:10210923)共9份,每份

0.37 g,精密称定,加水5 mL稀释,再分别加入质量浓度为37、370和1 110 ng/mL对照品溶液5 mL,经提取干燥制得低、中、高3种质量浓度的加样回收率溶液,每个质量浓度水平各3份,分别进样分析。另取混合对照品溶液,同法测定。回收率试验结果见表3,该方法准确度良好。

**Table 3** Recovery of three alkyl methanesulfonates

| Component | Level I       | Level II      | Level III     | Average recovery/% | RSD/% |
|-----------|---------------|---------------|---------------|--------------------|-------|
| MMS       | 101.55 ± 2.70 | 106.92 ± 0.10 | 106.51 ± 0.72 | 104.99             | 2.80  |
| EMS       | 105.05 ± 0.58 | 107.91 ± 0.47 | 108.83 ± 0.19 | 107.26             | 1.63  |
| IMS       | 102.82 ± 1.32 | 109.80 ± 1.07 | 113.92 ± 0.54 | 108.85             | 4.54  |

### 3.6 重复性

按“3.5”项下方法制备加标质量浓度分别为37、370和1 110 ng/mL的供试品溶液,分别进样分析,记录峰面积,计算得各浓度水平下各甲磺酸酯峰面积的RSD均不超过2.78%,该方法重复性良好。

### 3.7 稳定性考察

取混合对照品中间贮备液适量加内标溶液稀释至刻度制得质量浓度约为74、370、740 ng/mL对照品溶液,经萃取-干燥处理后,于室温(25 ℃)下放置0 h和8 h后连续进样分析( $n=3$ ),结果表明,各浓度水平下各甲磺酸酯与内标峰面积比3针平均值的相对偏差的绝对值均不超过1.63%,表明对照品溶液室温下放置8 h稳定。

### 3.8 耐用性考察

试验中分别考察了进样口温度变化±20 ℃、进样口压力变化±50 kPa、进样时间变化(0.3、0.5、0.7 min)、以及萃取静置时间(0~30 min)对同一甲磺酸样本含量测定结果的影响。结果表明,各项因素下各待测物峰面积的RSD均不超过3.22%,方法具有较好的耐用性。

### 3.9 样本测定

取各甲磺酸样本按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,每个样本平行制备两份,按“2.2.3”项下方法制备混合对照品溶液,上述溶液均按“2.1”项下条件GC-MS分析,内标法计算供试品中MMS、EMS、IMS的含量,结果列于表4 Lab 1对应栏目;复核单位验证测定结果列于表4 Lab 2对应栏目。两个实验室对相同甲磺酸供试品中甲磺酸烷基酯的测定结果的相对偏差不超过4.42%,表明所建方

法稳定性好、通用性强。

**Table 4** Result of content of three alkyl methanesulfonates in methanesulfonic acid samples

| Batch No. | MMS/(μg/g) |       | EMS/(μg/g) |       | IMS/(μg/g) |       |
|-----------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|
|           | Lab 1      | Lab 2 | Lab 1      | Lab 2 | Lab 1      | Lab 2 |
| KSCC904   | 5.08       | 4.84  | 1.65       | 1.57  | 0.31       | 0.31  |
| P1306518  | 1.98       | 1.86  | ND         | ND    | ND         | ND    |
| F1801073  | 11.19      | 10.64 | ND         | ND    | ND         | ND    |
| P1451200  | 13.33      | 13.81 | ND         | ND    | ND         | ND    |
| D1919052  | 1.89       | 1.73  | ND         | ND    | ND         | ND    |
| 20180306  | 11.88      | 11.06 | ND         | ND    | ND         | ND    |
| C10238789 | 4.11       | 3.83  | 1.77       | 1.88  | ND         | ND    |
| 10210923  | 0.88       | 0.87  | ND         | ND    | ND         | ND    |

ND: Not detected; Lab 1: China Pharmaceutical University; Lab 2: Wuxi Center for Drug Safety Control

## 4 讨论

### 4.1 溶剂和萃取剂选择

采用液液萃取预分离供试品中待测物与主成分,对于毛细管气相色谱法定量测定微量杂质十分重要。甲磺酸易溶于水或醇等溶剂,甲磺酸烷基酯则在弱极性有机溶剂中溶解更好。有文献报道<sup>[16]</sup>以正己烷为溶剂测定甲磺酸甲酯和甲磺酸乙酯,待测物峰形严重拖尾;Wollein等<sup>[17]</sup>用正己烷提取甲磺酸溴隐亭中甲磺酸烷基酯时回收率偏低,推测是因正己烷为非极性溶剂,不能有效提取水溶液中甲磺酸烷基酯。二氯甲烷微溶于水,与酯类互溶,沸点适宜,在本试验中被用作甲磺酸烷基酯杂质的萃取剂,水用作甲磺酸供试品的溶剂。

#### 4.2 质谱定量离子及定量方式确定

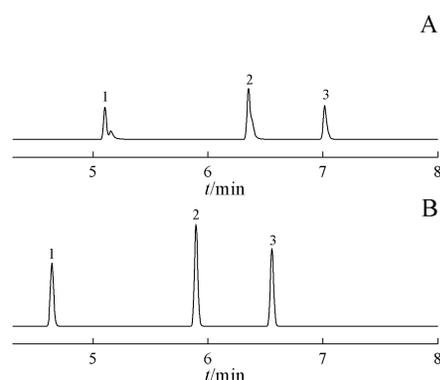
本试验采用质谱选择性离子监测模式定量测定各待测物。其中,甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、内标甲磺酸正丁酯分别采用丰度最高的  $m/z$  80、 $m/z$  79、 $m/z$  56 离子作为定量离子;而甲磺酸异丙酯,因丰度最高  $m/z$  43 离子在检测过程中极易受系统及溶剂等因素干扰<sup>[18]</sup>,影响测定的专属性,定量离子采用丰度略低、但质荷较大的  $m/z$  123 离子。为进一步提高检测灵敏度,试验时采用了分时段检测单个离子序列。

#### 4.3 进样方式的优化

甲磺酸中甲磺酸烷基酯的检测属于痕量分析范畴。为提高检测的灵敏度,本试验考察了不分流进样与脉冲不分流进样两种方式的影响,结果见图2。可见,不分流进样测得的色谱图(图2-A)中,各待测物响应偏小且峰的对称性差;采用脉冲不分流进样,当压力在200~300 kPa 范围内时,色谱峰位恒定,各色谱峰峰形对称,甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯对应峰的峰面积分别增加了约134%、77%、140%(图2-B)。这是由于进样口压力增加,各待测物在短时间内快速集中进入色谱柱,谱带展宽小,峰形尖锐且对称度提高。此外,进样口停留时间减少,也降低了待测物质发生热降解的可能。

#### 4.4 色谱柱的比较及采用

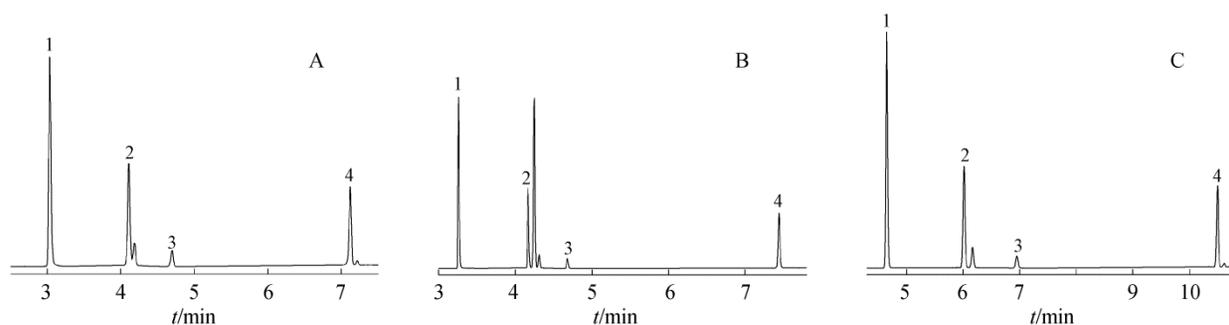
采用质谱选择性离子监测时,色谱分离对于



**Figure 2** GC-MS chromatograms of plitless injection(A) and pulsed splitless injection under 250 kPa(B)

1: MMS;2: EMS;3: IMS

甲磺酸中甲磺酸烷基酯的准确测定十分关键。试验初期,参考欧洲药典,采用100%甲基聚硅氧烷为固定液的非极性毛细管柱DB-1(15 m × 0.25 mm, 1 μm),进行分离分析。通过调整起始柱温、升温速率、流速等色谱条件,发现甲磺酸中待测物与相邻杂质的色谱峰之间很难实现基线分离(图3-A);改用5%苯基-95%甲基聚硅氧烷为固定液的毛细管柱Rxi-5ms(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm),并尝试优化色谱条件,结果(图3-B)杂质对甲磺酸乙酯色谱峰仍存在影响;当采用HP-1MS(30 m × 0.32 mm, 1 μm),并优化色谱条件后,甲磺酸供试品色谱图(图3-C)显示,各待测物峰形尖锐对称,各成分间分离度良好。故最终采用HP-1MS(30 m × 0.32 mm, 1 μm)柱。



**Figure 3** GC-MS chromatograms of test solution (Innochem, Batch No. KSCC904) in DB-1(A), Rxi-5ms(B) and HP-1MS(C)

1: MMS; 2: EMS; 3: IMS; 4: IS-BMS

#### 4.5 对照品溶液配制方式的改变

欧洲药典以对照品的二氯甲烷溶液作为参照,计算供试品中甲磺酸烷基酯的含量。据此试验,结果均显示:甲磺酸甲酯存在回收率偏低现象(约75%)。考虑到供试品溶液测定前经历了二氯

甲烷萃取-无水硫酸钠干燥过程,而对照溶液并无此操作的情况,本研究考察了对照品溶液制备时经萃取-干燥处理与不进行处理对测定结果的影响,结果见表5。

显然,改变对照品溶液配制方式,采用与供试

**Table 5** Comparison of average recovery before and after extraction-drying process of three alkyl methanesulfonates ( $n=9$ )

| Component | Average recovery/%               |                                 |
|-----------|----------------------------------|---------------------------------|
|           | Before extraction-drying process | After extraction-drying process |
| MMS       | 75.65                            | 104.99                          |
| EMS       | 91.74                            | 107.26                          |
| IMS       | 92.98                            | 108.85                          |

品溶液一样的萃取-干燥处理,可解决应用欧洲药典方法测定甲磺酸烷基酯时结果偏低的问题。

#### 4.6 定量下限的确定

现行版《中华人民共和国药典》要求分析方法的定量限须满足信噪比不小于10:1,且准确度、精密度符合要求。为此,本研究考察了甲磺酸烷基酯信噪比约10:1时对应的甲磺酸烷基酯质量浓度,约为14.8 ng/mL。进一步平行制备含此浓度的

供试品标准添加溶液,考察方法对甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯、甲磺酸异丙酯测定的准确度及精密度。结果发现,精密度均符合要求<sup>[8]</sup>,但甲磺酸异丙酯测得浓度与标准添加浓度存在的相对偏差达39.11%,说明方法对14.8 ng/mL质量浓度的检测达不到定量要求。提高验证用甲磺酸烷基酯浓度,确定方法的定量限对应质量浓度为37 ng/mL,此时各待测物测定的相对偏差均小于20%。

#### 4.7 标准曲线法和单点校正法的选择

药物中杂质的定量可采用内标标准曲线法或内标单点校正法,本研究对两种方法所得结果的准确度进行了比较。

表6分别列出了标准曲线法及单点校正法测得的甲磺酸烷基酯低、中、高浓度、理论浓度以及相对偏差。

**Table 6** Comparison of standard curve method and single-point calibration method in predicted concentration of three alkyl methanesulfonates

| Component | Actual concentration/<br>(ng/mL) | Standard curve method               |                      | Single-point calibration method     |                      |
|-----------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|
|           |                                  | Predicted concentration/<br>(ng/mL) | Relative deviation/% | Predicted concentration/<br>(ng/mL) | Relative deviation/% |
| MMS       | 36.75                            | 34.24                               | -6.83                | 36.95                               | 0.54                 |
|           | 73.50                            | 72.59                               | -1.24                | 73.50                               | 0.00                 |
|           | 367.5                            | 370.3                               | 0.76                 | 363.5                               | 1.09                 |
|           | 735                              | 747.9                               | 1.76                 | 723.3                               | 1.59                 |
|           | 1 470                            | 1 479                               | 0.61                 | 1 434                               | 2.45                 |
| EMS       | 35.49                            | 35.67                               | 0.51                 | 35.14                               | -1.49                |
|           | 70.98                            | 71.66                               | 0.96                 | 70.98                               | 0.00                 |
|           | 354.9                            | 354.4                               | -0.14                | 351.7                               | -0.90                |
|           | 709.8                            | 718.8                               | 1.27                 | 707.6                               | -0.31                |
|           | 1 420                            | 1 430                               | 0.70                 | 1 415                               | -0.35                |
| IMS       | 36.14                            | 42.61                               | 17.90                | 35.34                               | -2.21                |
|           | 72.28                            | 75.89                               | 4.99                 | 72.28                               | 0.00                 |
|           | 361.4                            | 354.6                               | -1.88                | 375.4                               | 3.87                 |
|           | 722.8                            | 723.2                               | 0.06                 | 768.7                               | 6.35                 |
|           | 1 446                            | 1 461                               | 1.04                 | 1 549                               | 7.12                 |

可见,在定量限浓度附近,两种方法的测得值与理论值的相对偏差均小于18%,中、高浓度水平时相对偏差均小于8%,符合现行版《中华人民共和国药典》对分析方法准确度的要求。鉴于测定的便捷性,内标单点校正定量最终被用于本研究建立的分析方法。

## 5 结论

本研究建立的液-液萃取结合GC-MS法具有简便、灵敏、专属、稳定且通用性好的特点,已成功用于甲磺酸中微量甲磺酸甲酯、甲磺酸乙酯和甲磺酸异丙酯的含量测定。

## 参考文献

- [1] Glowienke S, Friauff W, Allmendinger T, *et al.* Structure-activity considerations and *in vitro* approaches to assess the genotoxicity of 19 methane-, benzene- and toluenesulfonic acid esters[J]. *Mutat Res-Gen Tox En*, 2005, **581**(1/2): 23-34.
- [2] Clapp NK, Craig AW, Toya Sr RE. Oncogenicity by methyl methanesulfonate in male RF mice[J]. *Science*, 1968, **3844**(161): 913-914.
- [3] Pfister T, Chapelon AE. General 4-week toxicity study with EMS in the rat[J]. *Toxicol Lett*, 2009, **190**(3): 271-285.
- [4] Coffing SL, Kenyon MO, Ackerman JI, *et al.* Evaluation of the *in vivo* mutagenicity of isopropyl methanesulfonate in acute and 28-day studies [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2015, **56**(3): 322-332.
- [5] European Medicines Agency. The following letter is intended for all marketing authorization holders for medicinal products containing active substances in the form of mesitates, (di) isetonates, tosيلات or besitates (EMEA/44714/2008) [S]. London; European Medicines Agency, 2008.
- [6] Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products: recommended approaches (draft) [S]. Rockvill; U.S. Food and Drug Administration, 2008.
- [7] National Medical Products Administration. Technical guidance on genotoxicity testing (药物遗传毒性研究技术指导原则) [EB/OL]. (2018-03-12) [2020-05-07]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2138/300523.html>.
- [8] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia: Part 4 (中华人民共和国药典: 四部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 527-530.
- [9] Teasdale A, Eyley SC, Delaney ED, *et al.* Mechanism and processing parameters affecting the formation of methyl methanesulfonate from methanol and methanesulfonic acid; an illustrative example for sulfonate ester impurity formation[J]. *Org Process Res Dev*, 2009, **13**(3): 429-433.
- [10] Teasdale A, Delaney EJ, Eyley SC, *et al.* A detailed study of sulfonate ester formation and solvolysis reaction rates and application toward establishing sulfonate ester control in pharmaceutical manufacturing processes[J]. *Org Process Res Dev*, 2010, **14**(4): 999-1007.
- [11] Shen DD, Zhu JL, Wu GF, *et al.* Development of synthesis of phosphatidylinositol 3-kinases inhibitor puquitinib mesylate [J]. *Chin J Org Chem*(有机化学), 2019, **39**(9): 2676-2680.
- [12] Elder D, Facchine KL, Levy JN, *et al.* An approach to control strategies for sulfonate ester formation in pharmaceutical manufacturing based on recent scientific understanding[J]. *Org Process Res Dev*, 2012, **16**(11): 1707-1710.
- [13] Ramjitt HG, Singh MM, Coddington AB, *et al.* Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in the bismesylate salt of DPI 201-106, a positive inotropic agent for the treatment of heart failure[J]. *J Mass Spectrom*, 1996, **31**(8): 867-872.
- [14] Zhou J, Xu J, Zheng XY, *et al.* Determination of methyl methanesulfonate and ethyl methanesulfonate in methanesulfonic acid by derivatization followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. *J Sep Sci*, 2017, **40**(17): 3414-3421.
- [15] European Directorate for Quality and Medicines & HealthCare (EDQM). European Pharmacopoeia Supplement 7.1 [S]. Strasbourg; Council of Europe, 2011: 3321.
- [16] Zhang CZ, Huang L, Wu ZG, *et al.* Determination of sulfonate ester genotoxic impurities in imatinib mesylate by gas chromatography with mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2016, **39**(18): 3558-3563.
- [17] Wollein U, Schramek N. Simultaneous determination of alkyl mesitates and alkyl besitates in finished drug products by direct injection GC/MS[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, **45**(1/2): 201-204.
- [18] Qian C, Gou XL, Hu GH, *et al.* Determination of residual mesylate esters in lurasidone hydrochloride tablets by GC-MS/SIM[J]. *Anal Instru*(分析仪器), 2018(01): 199-203.

## 鹿瓜多肽注射剂质量评价与研究

苏喆\*, 周朝东, 马冰, 张晶, 伏圣青, 王冲, 税凤春, 黄哲魁

(天津市药品检验研究院, 天津 300070)

**摘要** 研究鹿瓜多肽注射剂的新鲜度、高相对分子质量物质、多肽含量测定、溶血与凝聚及生物学活性等指标,为鹿瓜多肽注射剂质量标准修订提供理论参考。首先,对影响终产品新鲜度的因素包括生物胺含量、黄曲霉毒素、甜瓜子原料的酸价和过氧化值等进行考察。建立丹磺酰氯柱前衍生-HPLC法测定鹿瓜多肽注射剂中8种生物胺的含量,方法学验证结果显示该法专属性、精密度、线性关系以及回收率等均良好,适用于鹿瓜多肽注射剂中生物胺类成分的检测,样品测定结果显示个别样品中检出较高浓度的尸胺;黄曲霉毒素、甜瓜子原料的酸价和过氧化值测定结果表明:部分生产原料甜瓜子存在霉变、酸败等问题,提示含动植物源性成分的多组分生化药质量标准应在新鲜度方面加强控制。其次,改进了鹿瓜多肽注射剂质量标准中高相对分子质量物质和多肽含量测定的方法。采用Tricine-SDS-PAGE电泳法代替凝胶色谱法测定高相对分子质量物质,提高了测定的准确性;采用试剂盒法代替福林酚法测定多肽含量,该法操作简便、专属性更强,可适用于高通量样品测定。最后,对鹿瓜多肽注射剂质量标准中缺失的溶血与凝聚、生物学活性测定项目进行了研究。研究结果显示,样品均无溶血与凝聚现象;鹿瓜多肽注射剂对单核巨噬细胞THP-1具有增殖抑制作用,且所检测样品的体外抗炎效果具有一定差异。优化后的检测方法更适用于鹿瓜多肽注射剂的质量检测,并为多组分生化药质量控制奠定了基础。

**关键词** 鹿瓜多肽注射剂;质量评价;生物胺;Tricine-SDS-PAGE法;多肽含量测定;活性测定

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0479-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200414

引用本文 苏喆,周朝东,马冰,等.鹿瓜多肽注射剂质量评价与研究[J].中国药科大学学报,2020,51(4):479-487.

Cite this article as: SU Zhe, ZHOU Chaodong, MA Bing, et al. Quality evaluation and specification research of Cervus and Cucumis polypeptide injection[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(4): 479 - 487.

## Quality evaluation and specification research of Cervus and Cucumis polypeptide injection

SU Zhe\*, ZHOU Chaodong, MA Bing, ZHANG Jing, FU Shengqing, WANG Chong, SHUI Fengchun, HUANG Zhesu

Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

**Abstract** To investigate the freshness, high molecular weight substances, the determination of polypeptide, haemolysis and agglomeration, biological activity of Cervus and Cucumis polypeptide injection; to provide the direction for improving the quality of products for enterprises; furthermore, to provide reference for the revision of the quality standards of Cervus and Cucumis polypeptide injection. Firstly, we investigated the factors affecting the freshness of the injection, including biogenic amines, aflatoxins, the acid value and peroxide value of the melon seeds. The method of dansyl chloride pre-column derivatization-HPLC was used to determine the content of 8 biogenic amines in Cervus and Cucumis polypeptide injection. The method validation results showed good specificity, precision, linearity and recovery rates, which was suitable for the determination of biogenic amines in Cervus and Cucumis polypeptide injection. The results of sample determination showed that relatively higher concentrations of cadaverine were detected in the products from company B. The results of aflatoxins, acid value and peroxide value showed that the melon seeds from some companies had rancidity, mildew and other problems,

收稿日期 2020-05-19 \*通信作者 Tel:022-23374073 E-mail:marilyn66@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 31970667);国家药典委员会药品标准制修订研究课题资助项目(No. 2019H03)

indicating that the quality standards of multi-component biochemical drugs containing animal- and plant-derived components should be controlled in terms of freshness. Secondly, the methods for the determination of high molecular weight substances and polypeptides in the quality standard were improved. Tricine-SDS-PAGE electrophoresis was used instead of gel chromatography to determine the high molecular weight substances, which improved the accuracy of determination. The kits were used instead of folin-phenol for the determination of peptide content, which is easy to operate, specific and suitable for high-throughput sample determination. Finally, the haemolysis, agglomeration, and biological activity of Cervus and Cucumis polypeptide injection were studied. The results showed that no haemolysis and agglomeration were found in all samples, and the inhibitory effect of samples on THP-1 proliferation *in vitro* from different companies was different to some extent. In conclusion, the optimized quality standard is more suitable for the detection of Cervus and Cucumis polypeptide injection, and can lay the foundation for improving the safety of multi-component biochemical drugs.

**Key words** Cervus and Cucumis polypeptide injection; quality evaluation; biogenic amine; Tricine-SDS-PAGE; determination of polypeptide content; activity determination

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31970667) and the Chinese Pharmacopoeia Commission-Enactment and Amendment of Standards (No. 2019H03)

鹿瓜多肽注射剂包括鹿瓜多肽注射液和注射用鹿瓜多肽,属于多组分生化药。鹿瓜多肽注射剂是从动物梅花鹿骨骼和中草药甜瓜子中分离、提取制成的灭菌水溶液或无菌冻干品。无菌冻干品的辅料为甘露醇或右旋糖酐40。鹿瓜多肽注射剂的主要成分鹿骨提取物中含有骨诱导多肽、多种游离氨基酸,以及钙、磷等活性因子,可以诱导成骨细胞的转化,促进骨折愈合;甜瓜子提取物富含多肽、不饱和脂肪酸,可以降低毛细血管通透、减少炎性渗出,有效缓解各种炎性症状。鹿瓜多肽注射剂临床上主要用于风湿、类风湿关节炎、强直性脊柱炎、各种类型骨折、创伤修复等<sup>[1]</sup>。

目前鹿瓜多肽注射剂在我国共有3家企业生产,7个国药准字批准文号。现行标准包括:国家药品标准 WS<sub>1</sub>-XG-002-2002-2005、试行标准 YBH12682005 (8 mg)/ YBH12432006 (16 mg)/ YBH13522006 (24 mg)、试行标准 YBH13342005 及补充申请批件 2006B01192。历版《中华人民共和国药典》及国外药典均未收载鹿瓜多肽注射剂。

国家药品监督管理局将鹿瓜多肽注射剂列入2019年国家药品评价性抽验计划,隶属于多组分生化药专项。此次国家药品监督管理局药品监督管理局共抽样鹿瓜多肽注射剂69批次,其中注射用鹿瓜多肽有4、8、16和24 mg 4种规格;鹿瓜多肽注射液有2 mL:4 mg和4 mL:8 mg两种规格。

在对生产企业进行实地调研及样品法定检验

时发现了如下问题:(1)现行标准暂无样品新鲜度质控项目。现场调研时发现甜瓜子原料存在霉变、酸败的现象,中间提取液存在反复冻融的情况,且企业未对生物胺、真菌毒素、酸价及过氧化值等影响产品新鲜度的指标进行控制;(2)现行质量标准 WS<sub>1</sub>-XG-002-2002-2005 未对高相对分子质量物质进行控制;其余质量标准均采用凝胶色谱法测定高相对分子质量物质。经法定检验发现,由于制剂成分非常复杂,色谱流出峰难以有效分离,对积分和定量都造成一定困难,导致测定结果不准确;(3)现行标准缺失溶血与凝聚、生物学活性测定项目,无法从安全性、有效性方面控制产品质量;(4)现行标准采用福林酚法测定多肽含量,该法存在辅料干扰、对照品和供试品溶解稀释所用溶剂不一致的情况。基于上述问题,本研究开展一系列探索,包括建立新鲜度质量属性的检测项目、优化高相对分子质量物质和多肽含量测定检测方法、考察溶血与凝聚及生物学活性测定,从安全性、有效性角度系统研究鹿瓜多肽注射剂的质量状况,以期对鹿瓜多肽注射剂质量标准的完善奠定理论基础。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

8种生物胺对照品,包括:组胺、酪胺、尸胺、腐胺、2-苯乙胺、色胺、精胺、亚精胺(纯度均大于

98.0%,美国Sigma-Aldrich公司);黄曲霉毒素混合对照品溶液(批号LC01086,含黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>质量浓度分别为:0.961、0.280、0.903、0.296 μg/mL,美国Supelco公司);黄曲霉毒素免疫亲和柱(AflaTest,1 mL,美国Vicom公司);核糖核酸酶A(批号E1624067,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);超低相对分子质量蛋白质Marker(3.3~20.1 kD,北京索莱宝科技有限公司);Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay多肽含量测定试剂盒(批号UD286404C,美国Thermo Fisher公司);牛血清白蛋白(批号SLBC3968V,美国Sigma-Aldrich公司);RPMI 1640培养基(批号0022919,以色列Biological Industries公司);胎牛血清(FBS)(批号1913445,以色列Biological Industries公司);CCK-8试剂盒(批号NY652,日本同仁化学研究所);乙腈、甲醇为色谱纯(德国Merck公司);实验用水为Millipore超纯水;其余试剂均为市售分析纯。鹿瓜多肽注射剂均为2019年国家药品抽验计划样品(69批,来自3个生产企业);鹿瓜多肽中间提取液、甜瓜子原料均由3个企业提供。

## 1.2 仪器

Waters e2695 高效液相色谱系统,配2489 UV/Vis 紫外检测器、Aura Industries 光化学衍生器(254 nm 紫外灯衍生光源)及2475 FLR 荧光检测器(美国Waters公司);T50 自动电位滴定仪、XS205 电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);Mini-Protean Tetra 垂直电泳系统及Universal Hood II 凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);Varioskan Flash 多功能酶标仪、HERAcell 240i 二氧化碳培养箱(美国Thermo Fisher公司);CF16RXII 冷冻离心机(日本Hitachi公司);R-215 专业型旋转蒸发器(瑞士Buchi公司);ECLIPSE TS100-F 倒置显微镜(日本Nikon公司);SpectraMax M2 多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);纯化水仪(美国Millipore公司)。

## 1.3 细胞株

人髓系白血病单核细胞株(THP-1),购自武汉普诺赛生命科技有限公司;以含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养,定期传代。

## 1.4 动物

家兔(2.5~3.3 kg,普通级)购自天津裕达实验动物养殖有限公司,合格证号:0010784。

## 2 方法

### 2.1 生物胺的测定

生物胺是食品或药材新鲜程度和被微生物污染程度的标志<sup>[2]</sup>。本研究以丹磺酰氯为衍生试剂,衍生化RP-HPLC法测定鹿瓜多肽注射剂中的生物胺类成分。

**2.1.1 溶液的制备** 对照品溶液:取8种生物胺对照品各适量,精密称定,分别置10 mL量瓶中,用0.1 mol/L 盐酸溶液制成每1 mL中约含各生物胺2.5 mg的溶液,作为对照品贮备液。分别量取各生物胺对照品贮备液1.0 mL,置同一25 mL量瓶中,用0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,制得生物胺混合对照品溶液(0.1 mg/mL);精密量取此混合对照品溶液0.01, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 mL,分别置10 mL量瓶中,用0.1 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度,摇匀,制得0.10, 1.00, 5.00, 10.00, 20.00, 50.00 μg/mL的系列混合对照品溶液。

供试品溶液:取鹿瓜多肽注射液(A企业),作为供试品溶液;取注射用鹿瓜多肽(B、C企业),用0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并稀释制成2 mg/mL的溶液(以多肽计),作为供试品溶液。

空白溶剂:取0.1 mol/L 盐酸溶液,作为空白溶剂。

衍生剂溶液:精密称取丹磺酰氯适量,用丙酮制成10 mg/mL的溶液,作为衍生剂溶液。

精密量取上述系列混合对照品溶液、供试品溶液和空白溶剂各0.5 mL,依次加入衍生剂溶液1 mL、饱和碳酸氢钠溶液0.3 mL与氢氧化钠溶液(2 mol/L)0.2 mL,60 °C水浴避光反应30 min,取出加入氨水(1:1)0.2 mL,室温避光反应30 min,加乙酸乙酯5 mL提取3次,合并提取液,40 °C水浴氮气吹干,加甲醇1.0 mL溶解残留物,用0.22 μm有机滤膜滤过,进行HPLC测定。

**2.1.2 色谱条件** 采用Inertsil ODS-3 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以水(A)-90%乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~30 min, 50% B→100% B; 30~38.5 min, 100% B; 38.5~39 min, 100% B→50% B; 39~43 min, 50% B),检测波长为254 nm,柱温30 °C,进样量30 μL。

**2.1.3 专属性** 取生物胺混合对照品溶液(10

$\mu\text{g/mL}$ )、供试品溶液(批号 120180407)和空白溶剂分别进行衍生,并进样分析。

2.1.4 线性关系、定量限及检测限 精密量取衍生后的系列混合对照品溶液各  $30\ \mu\text{L}$  进样分析,以 8 种生物胺质量浓度( $X$ )为横坐标,各生物胺的峰面积( $Y$ )为纵坐标建立标准曲线,考察各生物胺的线性关系。取上述衍生后的混合对照品溶液用甲醇适当稀释,以信噪比  $S/N=10$  和  $S/N=3$  分别作为定量限和检测限。

2.1.5 回收率 取批号为 220190106 的供试品溶液  $0.25\ \text{mL}$ ,共制 9 份,分成 3 组。分别精密加入  $1.00$ 、 $5.00$ 、 $10.00\ \mu\text{g/mL}$  混合对照品溶液  $0.25\ \text{mL}$ ,每个质量浓度重复 3 份,分别衍生后进样分析。

2.1.6 精密度 取混合对照品溶液( $10\ \mu\text{g/mL}$ )  $0.5\ \text{mL}$  进行衍生反应,平行制备 6 份,进样分析。

2.1.7 样品测定 取 3 个厂家的样品按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液及对照品溶液并分别进行衍生反应,按照“2.1.2”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,按外标法以峰面积计算各生物胺的含量。

## 2.2 黄曲霉毒素的测定

按照《中华人民共和国药典》(2015年版)四部通则 2351 黄曲霉毒素测定法指导原则及相关的文献<sup>[3-4]</sup>,建立了鹿瓜多肽注射剂及中间提取液中黄曲霉毒素的 HPLC 柱后光化学衍生测定方法。采用 Phenomenex Luna  $C_{18}$  色谱柱( $250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$ ,  $5\ \mu\text{m}$ ),荧光检测器(激发波长  $360\ \text{nm}$ ,发射波长  $450\ \text{nm}$ ),以甲醇-乙腈-水( $30:15:55$ )为流动相,柱温  $30\ ^\circ\text{C}$ ,进样量  $50\ \mu\text{L}$ 。将适宜浓度的黄曲霉毒素混合对照品溶液、鹿瓜多肽注射剂样品溶液及中间提取液分别通过免疫亲和柱,流速为每秒  $1\sim 2$  滴,用水  $20\ \text{mL}$  洗脱,弃去洗脱液,使空气进入柱子,最后用甲醇洗脱并进样分析。

## 2.3 甜瓜子原料酸价及过氧化值的测定

参考食品安全国家标准《食品中酸价的测定(GB 5009.229-2016)》及《食品中过氧化值的测定(GB 5009.227-2016)》,对甜瓜子原料(A 企业 3 批,B 企业 5 批)的酸价、过氧化值进行检测。首先将甜瓜子粉碎,用水搅匀并浸泡  $2\sim 3\ \text{h}$ ;再加入石油醚,浸泡过夜;经装有无水硫酸钠的滤纸过滤,取滤液置圆底烧瓶中,在  $40\ ^\circ\text{C}$  水浴中用旋转蒸

发仪蒸干石油醚,残留物即为待测油脂;用滴定法测定待测油脂的酸价和过氧化值。酸价测定采用乙醇制氢氧化钾滴定液( $0.1\ \text{mol/L}$ )进行电位滴定;过氧化值测定采用硫代硫酸钠滴定液( $0.002\ \text{mol/L}$ )进行电位滴定。

## 2.4 高相对分子质量物质

参考相关文献<sup>[5-6]</sup>,进行条件优化后采用 Tricine-SDS-PAGE 电泳法测定鹿瓜多肽注射剂的高相对分子质量物质。优化后的电泳条件为:  $16.5\%$  的分离胶,  $10\%$  的积层胶,  $4\%$  的浓缩胶;阳极缓冲液为 Tris-HCl 缓冲液( $\text{pH}\ 8.9$ ),阴极缓冲液为 Tris-Tricine-SDS 缓冲液;染色液为甲醇-冰醋酸-水( $200:50:250$ )、含  $0.2\%$  考马斯亮蓝 R-250;脱色液为  $0.5\ \text{mol/L}$  氯化钠溶液。实验时先用 Tricine-SDS-PAGE 分离供试品溶液中的多肽成分,然后用考马斯亮蓝 R-250 进行染色,对相对分子质量大于  $5\ 800$  的高相对分子质量蛋白进行定量。精密称取核糖核酸酶 A 适量,加水溶解并稀释制成含核糖核酸酶 A  $800$ 、 $600$ 、 $400$ 、 $200$ 、 $100\ \mu\text{g/mL}$  的系列溶液,作为蛋白对照品溶液  $1\sim 5$ 。以蛋白对照品溶液  $1\sim 5$  的蛋白含量为横坐标,灰度值为纵坐标进行线性回归,得出线性方程。根据供试品溶液中蛋白条带的灰度值计算出供试品中高相对分子质量物质的含量。

## 2.5 溶血与凝聚

取家兔耳动脉血,按《中华人民共和国药典》(2015年版)四部通则 1148 溶血与凝聚检查法制备  $2\%$  红细胞悬液,69 批鹿瓜多肽注射剂均按照  $2\ \text{mg/mL}$  多肽含量制备供试品溶液,同时设置阴性对照组(氯化钠注射液)和阳性对照组(灭菌注射用水)。采用直接观察法(试管内肉眼观察)考察受试物管中的溶液在  $3\ \text{h}$  内是否发生溶血和凝聚反应,直接观察法结束后,将供试品和对照组均以  $2\ 000\ \text{r/min}$  离心  $5\ \text{min}$ ,用酶标仪测定上清液在  $545\ \text{nm}$  波长处的吸收度。每管加样 3 个复孔,求其平均值。按公式[溶血率=(供试品管吸收度-阴性对照管吸收度)/(阳性对照管吸收度-阴性对照管吸收度) $\times 100\%$ ]计算溶血率,以溶血率大于  $5\%$  表示有溶血发生。

## 2.6 多肽含量测定

多肽含量测定试剂盒基于《中华人民共和国药典》(2015年版)四部通则 0731 蛋白质含量测定

第四法(BCA法)测定原理,对照品贮备液为牛血清白蛋白溶液,用水配制成下列质量浓度标准溶液:500、250、125、62.5、31.25、15.625和0  $\mu\text{g/mL}$ ,按试剂盒使用说明书操作并用酶标仪在480 nm波长处测定吸收度,同时绘制标准曲线。鹿瓜多肽注射剂用水溶解并稀释制成250  $\mu\text{g/mL}$ (以多肽计)的溶液,作为供试品溶液。将供试品溶液的平均吸收度代入上述对照品标准曲线中,计算出供试品溶液的多肽含量。

### 2.7 生物学活性测定

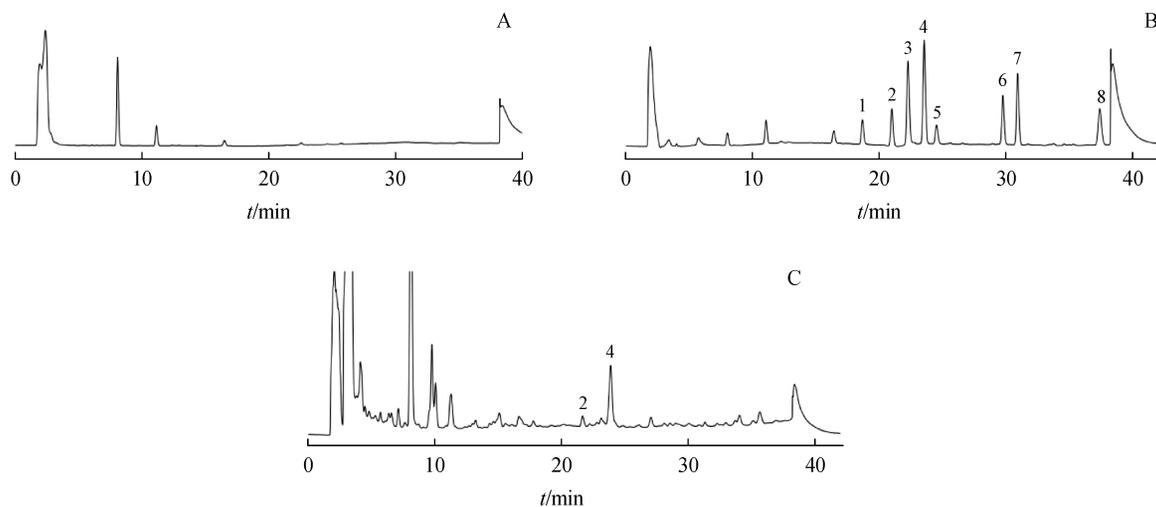
针对鹿瓜多肽注射剂的抗炎作用,并参考相关文献<sup>[7-8]</sup>,采用CCK-8法考察鹿瓜多肽注射剂抑制THP-1细胞增殖的作用,以此评价其生物学活性。取对数生长期的THP-1细胞,调整细胞浓度,以每孔0.1 mL接种于96孔板,在37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 条件下培养24 h,然后以每孔0.1 mL加入不同质量浓度的鹿瓜多肽注射剂受试物溶液,每个浓度设置3个复孔,同时制备阴性对照组(不加受试物溶

液,加入同体积的培养基)和空白组(不加细胞孔)。在37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 条件下培养72 h。终止培养前4 h,每孔加入CCK-8溶液10  $\mu\text{L}$ ,作用4 h后,用酶标仪在450 nm波长处测定吸收度,按公式[抑制率=(阴性对照组平均吸收度-空白吸收度)/(受试物组平均吸收度-空白吸收度) $\times 100\%$ ]计算抑制率,以此评价鹿瓜多肽注射剂对THP-1细胞的增殖抑制作用。

## 3 结果

### 3.1 生物胺的测定

3.1.1 系统适用性和专属性 取空白溶剂、混合对照品溶液(10  $\mu\text{g/mL}$ )和供试品溶液分别衍生后进样分析。结果表明,该方法专属性良好,空白溶剂在目标峰出峰位置无干扰,各生物胺色谱峰理论塔板数均大于10 000,各相邻峰的分度均大于1.5,色谱图见图1。



**Figure 1** HPLC chromatogram of blank solution (A), reference solution (B) and sample test solution (C) of Cervus and Cucumis polypeptide injection  
1: Tryptamine; 2: 2-Phenylethylamine; 3: Putrescine; 4: Cadaverine; 5: Histamine; 6: Tyramine; 7: Spermidine; 8: Spermine

3.1.2 线性关系、定量限及检测限考察 8种生物胺均在0.10~50.00  $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好;各生物胺的定量限在0.031~0.112  $\mu\text{g/mL}$ 之间;检测限在0.009~0.034  $\mu\text{g/mL}$ 之间,结果见表1。

3.1.3 回收率试验 结果显示8种生物胺的平均回收率在90.71%~97.88%之间,RSD在0.55%~2.04%之间,均符合《中华人民共和国药典》要求,

结果见表1。

3.1.4 精密度试验 结果组胺、色胺、2-苯乙胺、腐胺、酪胺、尸胺、亚精胺、精胺8种生物胺的衍生峰面积RSD( $n=6$ ,%)分别为0.73、0.21、0.47、0.47、1.01、1.32、0.23、0.81,表明色谱系统精密度良好。

3.1.5 样品检测结果 结果显示,A企业和C企业的鹿瓜多肽注射剂检出组胺、2-苯乙胺、腐胺、尸

**Table 1** Results of methodological validation tests for the content determination of biogenic amines

| Compound           | Linearity                  | <i>r</i> | LOQ/<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | LOD/<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Recovery test      |                     |
|--------------------|----------------------------|----------|------------------------------|------------------------------|--------------------|---------------------|
|                    |                            |          |                              |                              | Average recovery/% | RSD( <i>n</i> =9)/% |
| Histamine          | $y = 62\,248x - 30\,010$   | 0.999 6  | 0.112                        | 0.034                        | 90.71              | 1.35                |
| Tryptamine         | $y = 72\,170x + 11\,928$   | 0.999 9  | 0.103                        | 0.031                        | 91.25              | 1.97                |
| 2-Phenylethylamine | $y = 86\,185x - 7\,654$    | 0.999 9  | 0.052                        | 0.016                        | 95.67              | 1.23                |
| Putrescine         | $y = 213\,221x + 136\,021$ | 0.999 8  | 0.031                        | 0.009                        | 92.05              | 0.55                |
| Tyramine           | $y = 138\,949x + 2\,367$   | 1.000 0  | 0.054                        | 0.016                        | 93.15              | 2.04                |
| Cadaverine         | $y = 189\,176x + 146\,823$ | 0.999 8  | 0.043                        | 0.013                        | 97.39              | 1.89                |
| Spermidine         | $y = 170\,183x - 16\,274$  | 1.000 0  | 0.032                        | 0.010                        | 97.88              | 1.02                |
| Spermine           | $y = 147\,347x - 24\,022$  | 1.000 0  | 0.055                        | 0.017                        | 90.78              | 0.87                |

胺等生物胺,但含量均较低(0.004%~0.038%,占多肽注射剂均检出较高浓度的尸胺,范围从多肽标示量的百分比计);而B企业的10批鹿瓜0.265%~0.333%。各样品检测结果见表2。

**Table 2** Concentration of biogenic amines in 22 batches samples of Cervus and Cucumis polypeptide injection

| Manufacturing enterprise | Batch No. | Histamine/ % | Tryptamine/ % | 2-Phenylethylamine / % | Putrescine/ % | Tyramine/ % | Cadaverine / % | Spermidine/ % | Spermine/ % |
|--------------------------|-----------|--------------|---------------|------------------------|---------------|-------------|----------------|---------------|-------------|
| A                        | 181104    | n. a.        | n. a.         | 0.013                  | n. a.         | n. a.       | n. a.          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 180928    | n. a.        | n. a.         | 0.014                  | n. a.         | 0.004       | 0.021          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 181017    | n. a.        | n. a.         | 0.019                  | 0.009         | 0.006       | 0.022          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 181112    | n. a.        | n. a.         | 0.016                  | 0.004         | 0.004       | n. a.          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 180112    | n. a.        | n. a.         | 0.017                  | 0.004         | 0.016       | 0.028          | n. a.         | n. a.       |
| C                        | 1801303   | n. a.        | n. a.         | 0.017                  | n. a.         | 0.005       | 0.036          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 1902302   | 0.020        | n. a.         | 0.013                  | n. a.         | 0.006       | 0.025          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 1803301   | 0.018        | n. a.         | 0.010                  | n. a.         | n. a.       | 0.038          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 1801301   | 0.024        | n. a.         | 0.009                  | 0.007         | 0.005       | 0.033          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 1804301   | n. a.        | n. a.         | n. a.                  | 0.004         | n. a.       | 0.026          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 1803303   | 0.021        | n. a.         | 0.008                  | n. a.         | n. a.       | 0.027          | n. a.         | n. a.       |
| 1903304                  | 0.019     | n. a.        | 0.009         | 0.004                  | n. a.         | 0.027       | n. a.          | n. a.         |             |
| B                        | 120180407 | n. a.        | n. a.         | 0.034                  | n. a.         | n. a.       | 0.265          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 220180309 | n. a.        | n. a.         | 0.029                  | 0.023         | 0.023       | 0.326          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 220190108 | n. a.        | n. a.         | 0.010                  | n. a.         | 0.023       | 0.309          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 120180315 | 0.022        | n. a.         | 0.016                  | n. a.         | n. a.       | 0.333          | n. a.         | 0.004       |
|                          | 220190104 | 0.025        | n. a.         | 0.014                  | n. a.         | n. a.       | 0.321          | n. a.         | 0.015       |
|                          | 220190106 | n. a.        | n. a.         | 0.029                  | n. a.         | n. a.       | 0.301          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 220171112 | 0.016        | n. a.         | 0.032                  | n. a.         | 0.030       | 0.320          | n. a.         | 0.013       |
|                          | 220180118 | n. a.        | n. a.         | 0.029                  | n. a.         | 0.021       | 0.289          | n. a.         | 0.012       |
|                          | 120180317 | n. a.        | n. a.         | 0.038                  | n. a.         | 0.024       | 0.314          | n. a.         | n. a.       |
|                          | 220190416 | 0.020        | n. a.         | 0.036                  | 0.008         | 0.020       | 0.295          | n. a.         | n. a.       |

n. a. means that the detection limit has not been reached

### 3.2 黄曲霉毒素的测定

选取3个企业共30批鹿瓜多肽注射剂和8批甜瓜子提取液进行了黄曲霉毒素的测定,结果上述38批样品均未检出黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>和G<sub>2</sub>

(黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>的检测限分别为0.012、0.003 4、0.011、0.003 6 ng/mL)。

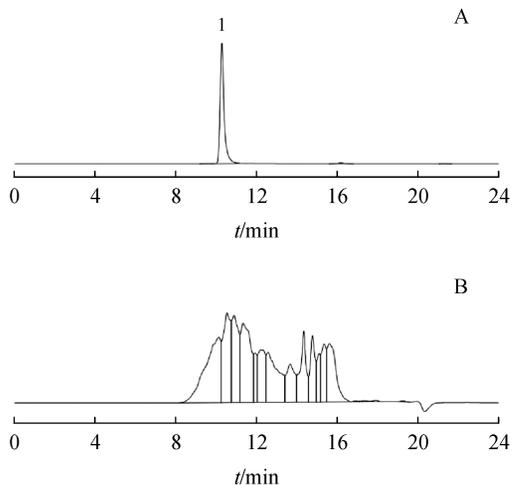
### 3.3 甜瓜子原料酸价及过氧化值的测定

通过对两个企业共8批甜瓜子原料进行测定,

过氧化值测定结果在 0.004~0.014 g/100 g 之间, 低于国标 GB 19300—2014 的限值 0.40 g/100 g。而酸价结果差异较大, 在 1.92~7.26 mg/g 之间(以 KOH 计), 其中 A 企业批号为 20180901 的甜瓜子原料酸价为 7.26 mg/g, B 企业批号为 1901002 和 1902003 的甜瓜子原料酸价分别为 3.14 和 3.06 mg/g, 均超过国标 GB 19300—2014 的限值 3.0 mg/g。

### 3.4 高相对分子质量物质的考察

凝胶色谱法测定高相对分子质量物质操作简便, 但对于成分复杂的多组分生化药并不适用。鹿瓜多肽注射剂色谱流出峰难以有效分离, 对积分和定量都造成一定困难(图 2), 导致测定结果不准确。

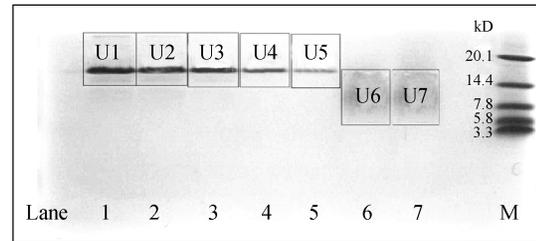


**Figure 2** SEC-HPLC chromatogram of reference substance (A, relative molecular weight 5800) and test sample (B, batch No. 181018) of Cervus and Cucumis polypeptide injection

1: Insulin standard

为了寻找比凝胶色谱法更准确的测定方法, 探索性研究尝试了 Tricine-SDS-PAGE 电泳(图 3)。因 A 企业现行标准中暂无高相对分子质量物质检查项, 故随机抽取 A 企业的 10 批样品进行高相对分子质量物质的测定, 测定结果见表 3。以对照品溶液 1~5 的蛋白含量为横坐标, 以扫描灰度值为纵坐标进行线性回归, 相关系数  $r$  值均大于 0.98; 10 批鹿瓜多肽注射剂样品高相对分子质量物质含量平均值为 16.36%。另经测定, B、C 企业的高相对分子质量物质含量均低于 2.0%。综上, 提示 A 企业应进一步改进超滤工艺, 降低高相对分子质

量物质的含量, 从而提高产品的安全性。



**Figure 3** Tricine-SDS-PAGE gel electrophoretogram of high molecular weight substance of Cervus and Cucumis Polypeptide Injection (batch No. 181018)

1-5: Protein standard solution 1-5; 6, 7: Test samples batch no. 181018; M: Ultra-low range molecular weight marker

**Table 3** Results of high molecular weight substance of Cervus and Cucumis polypeptide injection by Tricine-SDS-PAGE

| Batch No. | $r$     | High molecular weight substance/ % |
|-----------|---------|------------------------------------|
| 181028    | 0.986 4 | 15.29                              |
| 181202    | 0.984 4 | 17.93                              |
| 181202    | 0.993 5 | 17.03                              |
| 181017    | 0.994 0 | 14.85                              |
| 181010    | 0.985 4 | 14.06                              |
| 181111    | 0.996 0 | 16.31                              |
| 181206    | 0.986 4 | 12.67                              |
| 181206    | 0.985 9 | 13.88                              |
| 181113    | 0.993 0 | 19.84                              |
| 180628    | 0.997 5 | 21.78                              |

### 3.5 溶血与凝聚测定

实验结果表明, 所有批次供试品溶液和阴性对照管均无溶血与凝聚现象; 经酶标仪测定并计算溶血率, 结果所有供试品溶液溶血率均在 5% 以下, 表明本品无体外溶血作用。

### 3.6 多肽含量测定

试剂盒法测定多肽含量的方法学验证结果显示, 多肽在 15.63~1000  $\mu\text{g/mL}$  的质量浓度范围内与吸收度呈良好的线性关系; 平均加样回收率为 99.4%, RSD 为 3.0% ( $n=9$ ); 最低检测限为 15.63  $\mu\text{g/mL}$ 。

按法定标准福林酚法检验全部 69 批次样品, 结果多肽含量合格率为 100%。但由于现行标准只规定了含量测定值的下限而未设定上限, 不符合药品质量控制要求。拟将含量限度统一修订为“含多肽以牛血清白蛋白计, 应为标示量的 80%~120%”。按照修订后的限度规定, 用福林酚法和试

剂盒法测定69批样品的合格率分别为84.1%和81.2%,其中不合格样品均是含量超上限(图4)。

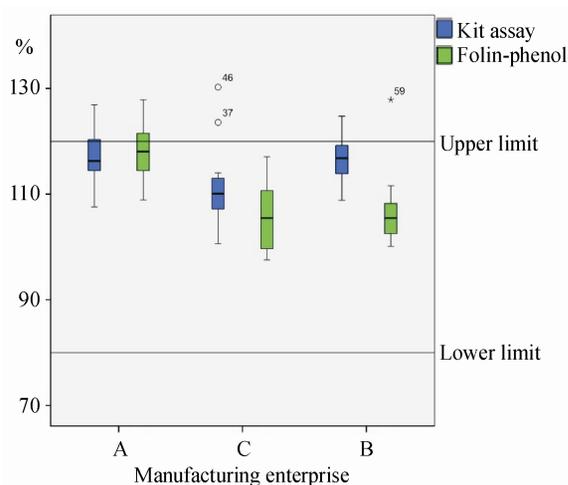


Figure 4 Results of peptide content determination of Cervus and Cucumis polypeptide injection

### 3.7 生物学活性测定

3.7.1 方法的建立 配制质量浓度为0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/mL的鹿瓜多肽注射剂受试物溶液,与THP-1细胞共同孵育24、48、72 h后测定吸收度。结果显示,同浓度下受试物溶液随着作用时间的延长,对THP-1细胞的抑制作用逐渐增大;在同一作用时间下,随着受试物溶液浓度的增加,对THP-1细胞的抑制作用亦逐渐增大。鹿瓜多肽注射剂受试物均表现出明显的量效和时效关系,最终选用质量浓度为2 mg/mL、作用时间为72 h对随机24批样品的细胞增殖抑制效果进行比较。

3.7.2 样品测定结果 经探索性研究,在本实验条件下,A企业样品的抑制指数为9.6~16.8,批次之间最大差异为4.5%;B企业样品的抑制指数为2.4~3.4,批次之间最大差异为11.6%;C企业样品的抑制指数为1.4~1.9,批次之间最大差异为17.7%。3个企业样品在相同条件下,体外抗炎效果有一定的差异。A企业鹿瓜多肽注射剂对THP-1细胞的抑制作用明显优于B、C企业。

## 4 讨论

### 4.1 与安全性相关的检测项目

4.1.1 生物胺 B企业鹿瓜多肽注射剂中检出高浓度的尸胺,经查阅相关文献<sup>[9-11]</sup>,尸胺具有致突

变性,其致癌性证据尚不充分。参考人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)M7及欧洲药物管理局(EMA)发布的《遗传毒性杂质限度指导原则》相关规定,尸胺的含量限度可以参照2类遗传毒性杂质(致癌性未知的已知致突变性物质)来控制。按照毒理学关注阈值(TTC)作为评价2类遗传毒性杂质的限度要求,经计算得知,鹿瓜多肽注射剂中含尸胺不得超过0.04%<sup>[12-13]</sup>。因此,B企业的鹿瓜多肽注射剂中尸胺含量均超过限度,提示该类动植物来源的多组分生化药在原料及中间提取液的新鲜度方面应给予重视。

4.1.2 其他安全性相关指标 经测定,鹿瓜多肽成品制剂及中间提取液中均未检出黄曲霉毒素残留,说明终产品尚不存在黄曲霉毒素污染的风险。但现场调研时发现甜瓜子的霉变现象,可能在提取纯化工艺中黄曲霉毒素被去除,或是霉变情况可能来源于其他真菌污染,如赭曲霉、青霉、镰刀霉等,因现场调研时未能及时留样,无从考证霉变的来源,未来将继续筛查其他真菌毒素的污染情况,进一步提升本品的安全性。

3家生产企业都有固定的甜瓜子供应商,并对甜瓜子进行自检,但其内控标准均未对酸价及过氧化值有要求。酸价和过氧化值在一定程度上可体现甜瓜子的新鲜程度<sup>[14-15]</sup>,因此有必要限量控制。甜瓜子属于易虫蛀、霉变、酸败的原料,放置温度、湿度等都会对其品质有所影响。调研结果显示个别企业会一次性购入大量同一批次的甜瓜子原料以备库存,但是随着时间的延长,甜瓜子发生酸败的概率也会随之加大。因此,建议生产企业加强对甜瓜子原料的内控标准制订,增加真菌毒素、酸价和过氧化值检查项,并关注储存条件与期限是否会对甜瓜子的品质造成影响。

### 4.2 与有效性相关的检测项目

4.2.1 多肽含量测定 鹿瓜多肽注射剂现行标准均采用福林酚法测定多肽含量,对该法产生干扰的物质较多,辅料右旋糖酐40和甘露醇在测定时均产生一定吸收度,导致结果不准确<sup>[16]</sup>。而经试剂盒法测定,辅料甘露醇对测定结果无影响;右旋糖酐40会产生轻微干扰,导致测定结果偏高。因此,无论是福林酚法还是试剂盒法,在计算含量时均应扣除辅料对结果的贡献,而试剂盒法相对于福林酚法干扰物质较少,重复性、专属性更强。

此外,由于试剂盒法无需配制反应试剂,且比福林酚法操作步骤少,同时采用 96 孔板并通过酶标仪实现高通量检测,尤其适用于大批量样品的快速测定。

4.2.2 生物学活性 临床上,多组分生化药起作用多为若干种机制协同作用的结果。鹿瓜多肽注射剂的作用机制主要包括促骨细胞增殖和抗炎活性两方面,有研究报道了基于骨细胞株的鹿瓜多肽注射剂体外活性的测定方法,该法选用大鼠骨肉瘤 UMR106 细胞株,考察样品对细胞的增殖刺激作用,针对鹿瓜多肽注射剂促骨细胞增殖的作用机制来建立细胞试验模型<sup>[17]</sup>。而本研究建立的方法选用单核巨噬细胞 THP-1 作为试验模型,考察样品对细胞的增殖抑制作用,针对其抗炎活性用于评价生物学活性,与其治疗类风湿关节炎的临床适应证一致,因此可以更为直观地反映出药物的效应及质量,且抑制作用明显,操作简便,为该类产品质量控制提供了实验依据。

## 5 总 结

本研究从生物胺的含量、黄曲霉毒素测定以及甜瓜子原料的酸价、过氧化值的考察等多角度评价了鹿瓜多肽注射剂的新鲜度,并改进了质量标准中高相对分子质量物质和多肽含量测定的方法,同时对建议增订项目溶血与凝聚、生物学活性的测定做了初步探索。通过上述工作,可以为鹿瓜多肽注射剂质量标准的完善提供理论依据,并为该类多组分生化药安全性的提升奠定基础。

## 参 考 文 献

- [1] Zhang XL. Clinical application research progress of luguapoly-peptide [J]. *Guide Chin Med* (中国医药指南), 2015, **13** (13): 50-52.
- [2] Ruiz CC, Herrero AM. Impact of biogenic amines on food quality and safety [J]. *Foods*, 2019, **8**(2): 62.
- [3] Hao AY, Zhao LY, Liu YH, et al. HPLC determination of aflatoxin residues in traditional Chinese medicine *Yinbian* with post column photochemical derivation and fluorescence detection [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2012, **32** (12): 2203-2207.
- [4] Zhang L, Dou X, Kong W, et al. Assessment of critical points and development of a practical strategy to extend the applicable scope of immunoaffinity column cleanup for aflatoxin detection in medicinal herbs [J]. *J Chromatogr A*, 2017, **1483**: 56-63.
- [5] Schagger H. Tricine-SDS-PAGE [J]. *Nat Protoc*, 2006, **1**(1): 16-22.
- [6] Fan F, Tu M, Liu M, et al. Isolation and characterization of lactoferrin peptides with stimulatory effect on osteoblast proliferation [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, **65**(33): 7179-7185.
- [7] Zhang Q, Han SX, Chen Y, et al. Quality control of ossotide for injection in inhibiting proliferation of monocyte-macrophages [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2018, **24**(13): 42-46.
- [8] Zhu P, Ding J, Zhou J, et al. Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, **7**(5): 1023-1033.
- [9] Maintz L, Novak N. Histamine and histamine intolerance [J]. *Am J Clin Nutr*, 2007, **85**(5): 1185-1196.
- [10] Seki S, Misumi H, Tanaka T, et al. Effects of some polyamines, polyanions and antitumor drugs on replicative DNA synthesis and unscheduled DNA synthesis *in vitro* [J]. *Acta Med Okayama*, 1979, **33**(3): 149-156.
- [11] Jellum E. Interaction of cystamine and cystamine derivatives with nucleic acids and nucleoproteins [J]. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 1965, **9**(2): 185-200.
- [12] ICH. M7: assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [EB/OL]. 2014. [2020-04-28]. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7\\_Step\\_4.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M7/M7_Step_4.pdf).
- [13] Del RB, Redruello B, Linares DM, et al. The biogenic amines putrescine and cadaverine show *in vitro* cytotoxicity at concentrations that can be found in foods [J]. *Sci Rep*, 2019, **9** (1): 120.
- [14] Gao MH, Wang M, Hou Z, et al. Determination of the composition and the contents of fatty acids in muskmelon seed by GC-MS and GC [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2015, **32**(7): 556-560.
- [15] Haman N, Romano A, Asaduzzaman M, et al. A microcalorimetry study on the oxidation of linoleic acid and the control of rancidity [J]. *Talanta*, 2017, **164**: 407-412.
- [16] Xue QR, Liang WY, Chen YK. Determination of peptide contents of hepatocyte growth-promoting factor for injection by acid hydrolytic method [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2011, **42**(4): 333-336.
- [17] Wang C, Dong SS, Wang ZQ, et al. Research on the method for determining the *in vitro* activity of *Cervus* and *Cucumis* polypeptide [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2018, **38** (7): 1196-1201.

## 苯甲酸阿格列汀中未知杂质的分离与鉴定

张贻伦<sup>1</sup>, 赵心怡<sup>1</sup>, 董淑波<sup>2</sup>, 董超<sup>2</sup>, 沈文斌<sup>1\*</sup>, 董海娟<sup>1\*\*</sup><sup>1</sup>中国药科大学药物科学研究所, 南京 210009; <sup>2</sup>江苏德源药业股份有限公司, 连云港 222000

**摘要** 通过硅胶柱色谱法、溶剂提取法及制备液相色谱法等分离分析方法, 从苯甲酸阿格列汀的大生产制备过程中分离得到4个新的有关物质, 并根据其理化性质采用核磁共振光谱法、高分辨质谱法、傅里叶变换红外光谱法等多种波谱鉴定方法对其进行分析确证。确定了从苯甲酸阿格列汀的合成过程各步骤中所产生的4个有关物质的化学结构, 将它们命名为杂质L、M、T、V, 这4个杂质均为首次发现的新杂质。本研究对于苯甲酸阿格列汀生产过程中的质量控制和生产工艺的优化具有重要意义。

**关键词** 苯甲酸阿格列汀; 2型糖尿病; 二肽基酶IV抑制剂; 有关物质; 分离鉴定

**中图分类号** R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)04-0488-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200415

**引用本文** 张贻伦, 赵心怡, 董淑波, 等. 苯甲酸阿格列汀中未知杂质的分离与鉴定[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 488 - 493.

**Cite this article as:** ZHANG Yilun, ZHAO Xinyi, DONG Shubo, et al. Isolation and identification of unknown impurities of alogliptin benzoate[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(4): 488 - 493.

## Isolation and identification of unknown impurities of alogliptin benzoate

ZHANG Yilun<sup>1</sup>, ZHAO Xinyi<sup>1</sup>, DONG Shubo<sup>2</sup>, DONG Chao<sup>2</sup>, SHEN Wenbin<sup>1\*</sup>, DONG Haijuan<sup>1\*\*</sup><sup>1</sup>Institute of Pharmaceutical Sciences, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;<sup>2</sup>Jiangsu Deyuan Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222000, China

**Abstract** By silica gel column chromatography, solvent extraction and preparative high performance liquid chromatography (HPLC), four new related substance were isolated and purified from the mass production and preparation process of alogliptin benzoate. Then it was analyzed and confirmed by various spectrum identification methods such as nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, high-resolution mass spectrometry (HR-MS) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) according to its physical and chemical properties. The chemical structures of the four related substances produced in each step of the synthesis process of alogliptin benzoate were determined, and they were named as impurities L, M, T, and V. These four related substances were new impurities which were found for the first time. The isolation and identification of these impurities are of great importance to the quality control of alogliptin benzoate, and the optimization of manufacturing process.

**Key words** alogliptin benzoate; type 2 diabetes; DPP-IV inhibitor; related substance; isolation and identification

苯甲酸阿格列汀(alogliptin benzoate, AB), 化学名为(R)-2-[[6-(3-氨基哌啶-1-基)-3-甲基-2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基]甲基]苯氧羧酸盐(图1), 是日本武田制药研发的一种治疗2型糖尿病的新药, 2010年4月在日本省首次获准上市, 商品名为Nesina, 2013年1月美国FDA批准阿

格列汀上市, 2013年7月我国CFDA批准进口阿格列汀上市, 商品名尼欣那。苯甲酸阿格列汀是一种高度选择性的丝氨酸蛋白酶二肽基酶IV(DPP-IV)抑制剂, 能够抑制胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)的分解, 促进胰岛素的分泌, 从而发挥降糖作用, 用于2

收稿日期 2020-06-05 通信作者 \*Tel: 025-83271233 E-mail: 13851645091@163.com

\*\*Tel: 025-83271233 E-mail: donghaijuan0618@163.com

型糖尿病患者血糖的控制。临床研究表明,患者对该药的耐受性良好,不良反应轻微<sup>[1-5]</sup>。目前,苯甲酸阿格列汀在各国药典中均尚未收录,对于苯甲酸阿格列汀的杂质研究相对较少,且侧重于药物的各种降解杂质的研究<sup>[6-10]</sup>。

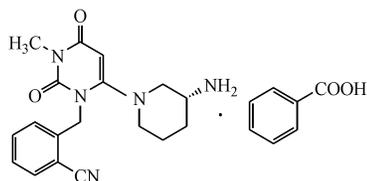


Figure 1 Structure of alogliptin benzoate

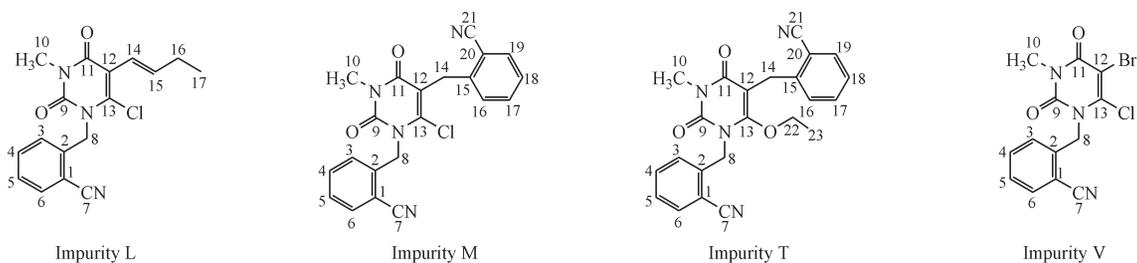


Figure 2 Impurities structures of alogliptin benzoate

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

KBr(光谱纯,国药集团化学试剂有限公司);柱色谱硅胶(青岛美高集团有限公司);薄层色谱硅胶板(GF254薄板,浙江台州市路桥四甲生化塑料厂);甲醇、乙腈(色谱纯,德国Merck公司),其他试剂均为市售分析纯,水为纯净水;(R)-3-氨基哌啶二盐酸盐(工业级,成都美德高制药有限公司);3-甲基-6-氯尿嘧啶(95%,药明康德新药开发有限公司)。

### 1.2 仪器

1260-6230 TOF LC-MS质谱仪(美国安捷伦公司);UV-2550 PC紫外光谱仪(日本岛津公司);TENSOR 27型红外光谱仪、AV-500型核磁共振仪(德国布鲁克公司);QuikSep-PO300DII制备高效液相色谱仪(北京惠德易科技有限责任公司);SP ODS-A制备柱(50 mm × 250 mm, 5 μm,北京惠德易科技有限责任公司)。

## 2 方法

### 2.1 苯甲酸阿格列汀的合成方法

本研究采用参考文献[11]的方法,对合成条

件及溶剂进行优化,以3-甲基-6-氯尿嘧啶为原料和2-氰基溴苄反应得2-[[6-氯-3-甲基-2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基]甲基]苯甲腈(中间体1),再与(R)-3-氨基哌啶二盐酸盐经亲核取代反应得(R)-2-[[6-(3-氨基哌啶-1-基)-3-甲基-2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基]甲基]苯甲腈(中间体2),最后与苯甲酸成盐得到苯甲酸阿格列汀,避免了氨基保护、脱保护的繁琐步骤,改进后的工艺反应步骤少、条件温和、操作简单,更适用于工业化生产。

本研究从苯甲酸阿格列汀大生产合成过程中分离纯化制备得到了苯甲酸阿格列汀的4种有关物质,根据其合成工艺和结构特点,经过核磁共振、高分辨质谱、红外光谱等多种光谱鉴定方法,确认了这4种化合物的结构(图2),这4种有关物质尚无文献报道,属于新发现的杂质。本研究中分离出苯甲酸阿格列汀生产工艺中产生的有关物质,确证其结构、积累充分的数据,对产品质量控制具有重要意义,同时也可确定合理的关键工艺步骤及参数范围提供参考依据。

件及溶剂进行优化,以3-甲基-6-氯尿嘧啶为原料和2-氰基溴苄反应得2-[[6-氯-3-甲基-2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基]甲基]苯甲腈(中间体1),再与(R)-3-氨基哌啶二盐酸盐经亲核取代反应得(R)-2-[[6-(3-氨基哌啶-1-基)-3-甲基-2,4-二氧代-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基]甲基]苯甲腈(中间体2),最后与苯甲酸成盐得到苯甲酸阿格列汀,避免了氨基保护、脱保护的繁琐步骤,改进后的工艺反应步骤少、条件温和、操作简单,更适用于工业化生产。

### 2.2 苯甲酸阿格列汀杂质的分离制备

杂质L的制备:产生于生产工艺第1步中,存在于中间体1及其母液中,可以传递至第2步反应中。杂质L主要是通过第2步二氯甲烷废液进行柱色谱分离得到。

收集中间体2制备过程中的二氯甲烷废液,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,析出固体,直至剩余母液体积约0.5 L,过滤分出滤饼,剩余母液采用湿法上柱,玻璃色谱柱直径3.3 cm,装柱高度约40 cm。先用二氯甲烷洗脱,至未吸附组分被完全冲出(此部分不收集),再用二氯甲烷-甲醇(20:1)洗脱,收集R<sub>f</sub>在0.4~0.9之间的一系列组分的混合液,减压浓缩,至二氯甲烷基本蒸出,体系为深棕色甲醇和杂质的悬浊液,过滤分离母液和滤饼。

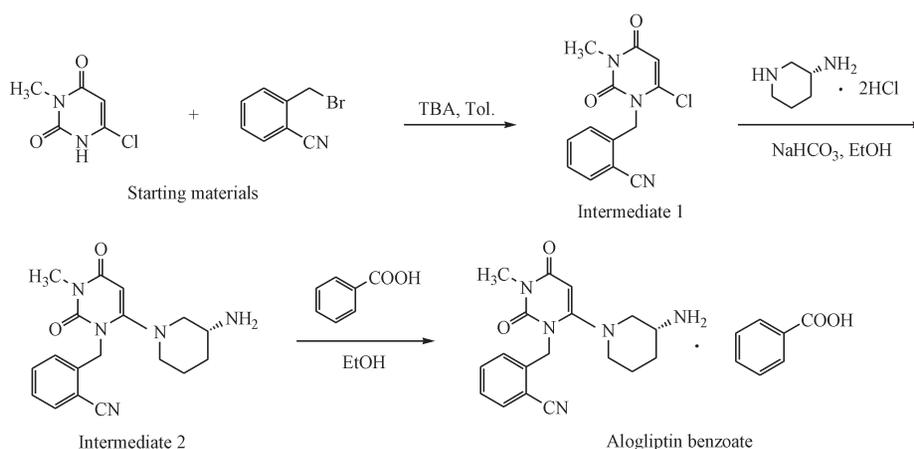


Figure 3 Synthetic route of alogliptin benzoate

将收集的母液用湿法上柱,正己烷-乙酸乙酯(5:1→1:1)冲柱,收集 $R_f$ 在0.6~0.8之间的组分,合并,减压浓缩至干,然后用干法制沙,上柱,正己烷-乙酸乙酯(15:1→1:1)冲柱,收集 $R_f$ 为0.8的组分,减压浓缩至干后即得杂质L。

杂质M的制备:产生于生产工艺第1步中,其制备过程基本与杂质L相同,在获得深棕色甲醇和杂质的悬浊液后过滤分离母液和滤饼。母液用于制备杂质L,而滤饼用于制备杂质M。滤饼烘干,取5.0 g,用二氯甲烷100 mL加热溶解,加入硅胶25 g,减压浓缩制沙。玻璃色谱柱直径约4 cm,使用120 g硅胶装柱,上样后用二氯甲烷-乙酸乙酯(20:1→10:1)冲柱,收集 $R_f$ 为0.8的洗脱液。将洗脱液减压浓缩至干,加入乙酸乙酯30 mL,回流打浆0.5 h,室温搅拌2 h,过滤。将滤饼置于50℃鼓风干燥箱干燥过夜,即得到杂质M。

杂质T的制备:产生于生产工艺第2步中,为中间体2相关杂质。取第2步反应二氯甲烷废液,减压浓缩至干,用残留物3倍质量的硅胶和适量二氯甲烷制沙,装柱,用乙酸乙酯-二氯甲烷-正己烷(1:1:7→1:1:2)洗脱,收集含有47.2 min组分的洗脱液,减压浓缩。将收集的浓缩物用甲醇溶解,配制成20 mg/mL的溶液,进样量3 mL,用制备液相进行分离。柱温30℃,以乙腈-水(60:40),流速40 mL/min,检测波长278 nm,收集主成分(17~19 min),减压浓缩至干,即得杂质T。

杂质V的制备:产生于生产工艺第1步中,是从中间体1的甲苯母液中分离获得。取第1步反应的甲苯母液2 L,用2 mol/L盐酸洗涤至洗涤液呈

酸性,然后将甲苯层用无水硫酸钠干燥,减压浓缩至干,加入残留物质量3倍的硅胶和适量二氯甲烷,加热搅拌使残留物溶解并吸附至硅胶上,然后减压浓缩除去二氯甲烷,得到负载上样品的硅胶,然后上柱。用二氯甲烷-乙酸乙酯(30:1→10:1)洗脱,收集中间体1检测方法下保留时间9.9 min的洗脱液。将洗脱液减压浓缩至干,即得杂质V。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 杂质L的结构鉴定

白色粉末状固体,由其高分辨质谱图得到准分子离子峰 $m/z$ : 330.099 44  $[M+H]^+$ (计算值: 330.100 38),化合物1的分子量为奇数,分子中应含奇数个N原子,同时由 $m/z$  332的峰强度约为 $m/z$  330峰强度的1/3,可以推断出杂质L含有一个氯原子,推断其分子式为 $C_{17}H_{16}ClN_3O_2$ ,不饱和度为11。在UV光谱中,最大吸收峰 $\lambda_{max}$ 在293.6 nm, 227.2 nm处,说明结构中含有共轭体系。在IR光谱中,显示出了羰基( $1712\text{ cm}^{-1}$ ),芳腈基( $2229\text{ cm}^{-1}$ ),碳碳双键( $1658, 1635\text{ cm}^{-1}$ ),苯环骨架且为1,2-取代苯( $1602, 1572, 1487\text{ cm}^{-1}$ ),以及嘧啶环呼吸振动( $1009\text{ cm}^{-1}$ )的特征吸收峰。

$^1\text{H NMR}$ (表1)谱中,给出10组峰,在低场区 $\delta_H$  8~7的4个质子 $\delta$  7.88(1H, d)、7.68(1H, t)、7.50(1H, t)和7.42(1H, d)为一个自旋体系,为邻-二取代苯上的4个芳质子,即2-氰基溴苄中的芳环质子。COSY谱表明 $\delta$  6.87(1H, m)、6.16(1H, d)、2.18(2H, m)和1.01(3H, t)它们为一个自旋体系,为片段 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$ 上的7个质子; $\delta$  5.46

(2H, s)和 3.24(3H, s)是 2 组孤立信号,  $\delta_{\text{H}}$  5.46(s, 2H)是 2 个质子,判断其为 2-甲基-苯氧单元中的仲碳质子;  $\delta_{\text{H}}$  3.26(s, 3H)是 3 个质子,可判断其为起始原料 3-甲基-6-氯尿嘧啶中的孤立甲基单元。

$^{13}\text{C}$  NMR (表 1)和 DEPT 谱提示化合物 1 的结构中,含有 17 个 C,其中包含 2 个伯碳、2 个仲碳、6 个不饱和叔碳和 7 个不饱和季碳。 $\delta_{\text{C}}$  28.4, 13.4 为两个甲基碳,  $\delta_{\text{C}}$  48.5, 26.5 为 2 个亚甲基碳;  $\delta_{\text{C}}$  138.2、133.7、133.2、128.2、126.6 和 119.4 为 6 个不饱和叔 C;  $\delta_{\text{C}}$  159.8、149.8、141.3、139.7、116.8、109.5 和 108.8 为 7 个不饱和季碳。 $\delta_{\text{C}}$  159.8 和 149.8 的 2 个季 C 为羰基碳, HMBC 谱中, H-10( $\delta_{\text{H}}$  3.24)与 C-11( $\delta_{\text{C}}$  159.8)和 C-9( $\delta_{\text{C}}$  149.8)相关, H-

14( $\delta_{\text{H}}$  6.16)与 C-11( $\delta_{\text{C}}$  159.8)相关,  $\delta_{\text{C}}$  159.8 的季碳为 C-11; H-14( $\delta_{\text{H}}$  6.16)和 H-15( $\delta_{\text{H}}$  6.87)与 C-12( $\delta_{\text{C}}$  108.8)相关,故 C-12 上连接  $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$  基团;  $\delta_{\text{C}}$  116.8 和 109.5 的 2 个季碳分别为 -CN 及与 CN 相连的季碳,  $\delta_{\text{C}}$  109.5 的季碳与 H-8( $\delta_{\text{H}}$  5.46)远程相关,为 C-1,则  $\delta_{\text{C}}$  116.8 为 C-7;  $\delta_{\text{C}}$  141.3 和 139.7 的两个季碳分别与 H-14( $\delta_{\text{H}}$  6.16)和 H-6( $\delta_{\text{H}}$  7.88)远程相关,因此它们分别为 C-13 和 C-2。该杂质比中间体 1(图 3)多出 1 个丁烯基,可能是合成第一步反应所得中间体 1 与三正丁胺反应得到的产物,确定该杂质为 (*E*)-2-[5-(1-丁烯-1-基)-3-甲基-6-氯-2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2*H*)-基]甲基苯甲腈。

**Table 1**  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR (500/500 MHz) data of Impurities of alogliptin benzoate

| No. | Imp L                                 |                     | Imp M                         |                     | Imp T                                 |                     | Imp V                         |                     |
|-----|---------------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|
|     | $\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)         | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)         | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (J in Hz) | $\delta_{\text{C}}$ |
| 1   |                                       | 109.5               |                               | 109.5               |                                       | 109.7               |                               | 109.5               |
| 2   |                                       | 139.7               |                               | 139.6               |                                       | 140.7               |                               | 139.2               |
| 3   | 7.42(1H, d, $J=8.0$ , Ar-H)           | 126.6               | 7.49(1H, d, $J=8.3$ , Ar-H)   | 126.7               | 7.41(1H, d, $J=7.5$ , Ar-H)           | 126.8               | 7.49(1H, d, $J=7.7$ , Ar-H)   | 126.7               |
| 4   | 7.68(1H, t, $J=7.7$ , Ar-H)           | 133.7               | 7.71(1H, t, $J=7.7$ , Ar-H)   | 133.7               | 7.69(1H, t, $J=7.7$ , Ar-H)           | 133.6               | 7.69(1H, t, $J=7.7$ , Ar-H)   | 133.7               |
| 5   | 7.50(1H, t, $J=7.6$ , Ar-H)           | 128.2               | 7.52(1H, t, $J=8.0$ , Ar-H)   | 128.2               | 7.49(1H, t, $J=7.6$ , Ar-H)           | 128.0               | 7.52(1H, t, $J=7.4$ , Ar-H)   | 128.3               |
| 6   | 7.88(1H, d, $J=7.7$ , Ar-H)           | 133.2               | 7.89(1H, d, $J=7.3$ , Ar-H)   | 133.2               | 7.86(1H, d, $J=7.6$ , Ar-H)           | 133.06              | 7.89(1H, d, $J=7.7$ , Ar-H)   | 133.2               |
| 7   |                                       | 116.8               |                               | 116.9               |                                       | 117.1               |                               | 116.8               |
| 8   | 5.46(2H, s, $\text{CH}_2$ )           | 48.5                | 5.47(2H, s, $\text{CH}_2$ )   | 48.7                | 5.24(2H, s, $\text{CH}_2$ )           | 44.4                | 5.46(2H, s, $\text{CH}_2$ )   | 49.8                |
| 9   |                                       | 149.8               |                               | 150.6               |                                       | 150.8               |                               | 150.1               |
| 10  | 3.24(3H, s, $\text{CH}_3$ )           | 28.4                | 3.24(3H, s, $\text{CH}_3$ )   | 28.5                | 3.20(3H, s, $\text{CH}_3$ )           | 28.1                | 3.26(3H, s, $\text{CH}_3$ )   | 29.4                |
| 11  |                                       | 159.8               |                               | 160.9               |                                       | 163.3               |                               | 157.7               |
| 12  |                                       | 108.8               |                               | 109.3               |                                       | 97.0                |                               | 98.2                |
| 13  |                                       | 141.3               |                               | 144.0               |                                       | 158.6               |                               | 144.4               |
| 14  | 6.16(1H, d, $J=15.8$ , CH)            | 119.4               | 4.02(2H, s, $\text{CH}_2$ )   | 31.1                | 3.89(2H, s, $\text{CH}_2$ )           | 27.9                |                               |                     |
| 15  | 6.87(1H, m, CH)                       | 138.2               |                               | 141.6               |                                       | 143.4               |                               |                     |
| 16  | 2.18(2H, m, $J=7.38$ , CH)            | 26.5                | 7.39(1H, d, $J=8.0$ , Ar-H)   | 128.1               | 7.36(1H, d, $J=8.3$ , Ar-H)           | 128.3               |                               |                     |
| 17  | 1.01(3H, t, $J=7.4$ , $\text{CH}_3$ ) | 13.4                | 7.61(1H, t, $J=7.7$ , Ar-H)   | 133.3               | 7.59(1H, t, $J=7.7$ , Ar-H)           | 133.13              |                               |                     |
| 18  |                                       |                     | 7.42(1H, t, $J=7.8$ , Ar-H)   | 127.2               | 7.39(1H, t, Ar-H)                     | 126.9               |                               |                     |
| 19  |                                       |                     | 7.80(1H, d, $J=7.6$ , Ar-H)   | 132.8               | 7.78(1H, d, $J=7.5$ , Ar-H)           | 132.7               |                               |                     |
| 20  |                                       |                     |                               | 111.5               |                                       | 111.3               |                               |                     |
| 21  |                                       |                     |                               | 117.6               |                                       | 117.7               |                               |                     |
| 22  |                                       |                     |                               |                     | 4.01(2H, q, $J=7.0$ , $\text{CH}_2$ ) | 72.2                |                               |                     |
| 23  |                                       |                     |                               |                     | 1.15(3H, t, $J=7.0$ , $\text{CH}_3$ ) | 14.7                |                               |                     |

### 3.2 杂质 M 的结构鉴定

类白色粉末状固体,由其高分辨质谱图得到准分子离子峰  $m/z$ : 391.095 27  $[\text{M}+\text{H}]^+$ (计算值: 391.095 63),杂质 M 的分子量为偶数,分子中应含偶数个 N 原子,同时由  $m/z$  393 的峰强度约为  $m/z$  391 峰强度的 1/3,杂质 M 中含有一个氯原子,推断

其分子式为  $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_2$ ,不饱和度为 16。在 UV 光谱中,最大吸收峰  $\lambda_{\text{max}}$  在 275.6 nm, 225.2 nm 处,说明杂质 M 的结构中含有共轭体系。在 IR 光谱中,显示出羰基( $1707\text{ cm}^{-1}$ ),腈基( $2225\text{ cm}^{-1}$ ),嘧啶环伸缩振动( $1647, 1622\text{ cm}^{-1}$ ),苯环骨架碳碳双键( $1622, 1601, 1487\text{ cm}^{-1}$ )和环呼吸振动( $980$

cm<sup>-1</sup>)的特征吸收峰。

由杂质M的<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR(表1)可知, δ<sub>H</sub> 3.24(3H, s)及δ<sub>C</sub> 28.5、δ<sub>C</sub> 150.6、δ<sub>C</sub> 160.9等表明杂质M中存在3,4-二氢-3-甲基-2,4-二氧化-1(2H)-嘧啶片段; COSY谱表明δ 7.89(1H, d)、7.71(1H, t)、7.52(1H, t)和7.49(1H, d)这4个芳质子为一个自旋体系, δ 7.80(1H, d)、δ 7.61(1H, t)、δ 7.42(1H, t)和δ 7.39(1H, d)这4个芳质子为一个自旋体系, δ<sub>H</sub> 5.47(2H, s)和δ<sub>H</sub> 4.02(2H, s)表明杂质M中存在两个邻氰基苄基片段。杂质M与中间体1相比,少了1个烯质子、多了1个邻氰基苄基片段,说明12位烯质子被邻氰基苄基所取代。这个结果与高分辨质谱得到的结果相吻合,即与中间体1相比,增加了8个碳原子、5个氢原子和1个氮原子。所以确定了杂质M为2-[5-(2-氰基苄基)-3-甲基-6-氯-2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基]甲基}苯甲腈。该杂质可能是生产工艺第一步中1分子3-甲基-6-氯尿嘧啶与2分子2-氰基溴苄反应得到的中间产物。

### 3.3 杂质T的结构鉴定

类白色絮状固体,由其高分辨质谱图得到其[M+Na]<sup>+</sup>峰 m/z: 423.142 61 [M+Na]<sup>+</sup>(计算值: 423.142 76),杂质T的分子量为偶数,分子中应含偶数个N原子,推断其分子式为C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>,不饱和度为16。

<sup>1</sup>H NMR(表1)谱可以看出其比杂质M多出一个自旋体系, δ<sub>H</sub> 4.01(2H, q)和1.15(3H, t)为乙氧基(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)上的5个质子,这正好与其分子式比化合物2的分子式多出C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O相吻合。在杂质T的<sup>13</sup>C NMR(表1), HMBC谱中, δ<sub>C</sub> 158.6的季碳与H-22(δ<sub>H</sub> 4.01)、H-14(δ<sub>H</sub> 3.89)、H-8(δ<sub>H</sub> 5.24)均远程相关,即为C-13; δ<sub>C</sub> 143.4、111.3和97.0的3个季碳均与H-14(δ<sub>H</sub> 3.89)远程相关,但其中只有δ<sub>C</sub> 97.0的C不与苯环上的质子远程相关,为C-12;由于连接基团的改变,杂质T中C-12、C-13的化学位移改变较大,因此确定了杂质T为2-[6-乙氧基-5-(2-氰基苄基)-3-甲基-2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基]甲基}苯甲腈。杂质T是在合成反应的第2步由杂质M与乙醇反应转化而来。

### 3.4 杂质V的结构鉴定

类白色粉末状固体,由其高分辨质谱图得到准分子离子峰 m/z: 353.964 40 [M+H]<sup>+</sup>(计算值:

353.963 94),同时由 m/z 356的峰强度约为 m/z 354峰强度的4/3,可以推断出杂质V中含有1个氯原子和1个溴原子,其分子式为C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>BrClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>,不饱和度为10。那么杂质V的分子式比中间体1多1个Br原子,少1个H原子,与杂质L的分子式相比少了C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>片段,多1个Br原子。

<sup>1</sup>H NMR(表1)谱中,其与杂质L相比少一个自旋体系,即片段CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH=CH-上的7个质子,这正好与其分子式比杂质L的分子式少了C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>相吻合。<sup>13</sup>C NMR(表1)谱, HSQC、HMBC相关谱中, δ<sub>C</sub> 157.7和150.1的2个季碳为羰基碳,它们来自于原料3-甲基-6-氯尿嘧啶结构单元; H-8(δ<sub>H</sub> 5.46)与C-13(δ<sub>C</sub> 144.4)、C-2(δ<sub>C</sub> 139.2)和C-1(δ<sub>C</sub> 109.5)的3个季C远程相关, C-2(δ<sub>C</sub> 139.2)还与H-6(δ<sub>H</sub> 7.89)远程相关; C-7(δ<sub>C</sub> 116.9)也与H-6(δ<sub>H</sub> 7.89)远程相关, δ<sub>C</sub> 98.2则为C-12, Br原子与12位碳相连, Br原子取代了12位的烯质子。所以确定杂质V为2-[5-溴-6-氯-3-甲基-2,4-二氧化-3,4-二氢嘧啶-1(2H)-基]甲基}苯甲腈。该杂质由中间体1的母液中分离制得,可能是中间体1与起始物料2-氰基溴苄降解后产生的Br<sup>2</sup>反应而来。

### 3.5 讨论

研究利用各种分离分析技术,从苯甲酸阿格列汀药物的大生产工艺过程中分离鉴定了4个新的有关物质,其中3个化合物为中间体1的相关杂质,1个化合物为中间体2的相关杂质。对于如何在生产工艺中控制这4个杂质的产生,有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] Feng J, Zhang Z, Wallace M B, et al. Discovery of alogliptin: a potent, selective, bioavailable and efficacious inhibitor of dipeptidyl peptidase IV[J]. *J Med Chem*, 2007, **50**(10): 2297-2300.
- [2] Zhang SF. Approval for marketing of the new diabetes drug, NE-SINA[J]. *Chin Lic Pharm* (中国执业药师), 2010, **12**(6): 54.
- [3] Scott L J. Alogliptin: a review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus [J]. *Drugs*, 2010, **70**(18): 2051-2072.
- [4] Li RF, Ouyang XY, lv F, et al. Analysis for patents of anti-diabetic dipeptidyl peptidase inhibitors [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2015, **24**(1): 8-17.
- [5] Shen D, Wang ZJ, Xu C, et al. Synthesis of alogliptin benzoate and its preliminary quality control [J]. *Central South Pharm* (中南药学), 2016, **14**(9): 813-816.
- [6] Lu YT, Yang DY, Li ZY, et al. Isolation and characterization of

related substances in alogliptin benzoate by LC-QTOF mass spectrometric techniques [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, **128**:253-263.

[7] Zhang K, Ma PQ, Jing WN, *et al*. A developed HPLC method for the determination of alogliptin benzoate and its potential impurities in bulk drug and tablets[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2015, **10**: 152-158.

[8] Zhou XY, Rong R, ZhaoYL, *et al*. Determination of related substances in alogliptinbenzoate by HPLC [J].*J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2016, **33**(6):444-449.

[9] Sun ZY, Qiao SQ, Luo ZL, Determination of related substances in alogliptin benzoate raw materials by HPLC [J]. *J China Pharm*(中国药房), 2014, **25**(33):3141-3143.

[10] Shao J, Gao S, Li XX, *et al*. Determination of alogliptin benzoate and its related substances [J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2015, **32**(10):780-785.

[11] Liu ZW, Wu LH, Wang EJ. Synthesis of alogliptin benzoate [J]. *Strait Pharm*(海峡药学), 2011, **23**(9):214-215.

·校园信息·

中国药科大学 2020 年 1~7 月获授权专利情况(3)

| 申请(专利)号          | 名称                                 | 发明(设计)人                                     |
|------------------|------------------------------------|---|
| CN201810192838.3 | 一种靶向 CD24 单克隆抗体与二乙胺偶氮鎓二醇盐的偶联物及其应用  | 张娟,黄张建,张鑫荣,王旻,马招兄,徐瑶                        |
| CN201711126478.9 | 抗 hTNF-α 全人源抗体及其用途                 | 姚文兵,童玥,钟升威,田滋,高向东                           |
| CN201610397275.2 | 一类 GLP-1R/GCGR 双重激动剂在用于降糖和减肥药物中的运用 | 黄文龙,钱海,周洁,戴雨轩,孙李丹                           |
| CN201710388463.3 | 一种莱鲍迪昔 KA 的制备方法                    | 吴旭日,陈依军,金月                                  |
| CN201710798280.9 | 咪唑并异吡啶类 IDO1 抑制剂、其制备方法及应用          | 赖宜生,孙其锐,邹毅,徐强,郭文洁,王燕,王芳,李月珍                 |
| CN201711347606.2 | 苯丙素糖苷 Smiglaside A 在制备治疗脓毒症的药物中的应用 | 贾爱群,庞涛,袁胜涛,徐渊,汪玮鑫                           |
| CN201710499848.7 | 衍生化 HPLC-UV 法测定甲磺酸中甲磺酸酯的方法         | 郑枫,柳文媛,周洁,冯锋                                |
| CN201711201487.X | 神经氨酸酶及抑制剂在制备抑制肝脏糖异生的药物中的应用         | 齐炼文,刘群,张蕾                                   |
| CN201810189592.4 | 一组与肺癌早期诊断相关的血浆代谢小分子标志物的应用          | 黄寅,张尊建,许风国,惠慧,华云飞,杨旭萍,李琳睿                   |
| CN201710317555.2 | 共递送药物和基因的纳米载体及其制备方法和用途             | 姜虎林,张兵锋,邢磊                                  |
| CN201710004234.7 | 以药物-磷脂-胆固醇三元复合物为基础的脂质体制备方法         | 柯学,王悦,陈默,钱康,侯玉婷,袁梦                          |
| CN201711201347.2 | 神经氨酸酶及抑制剂在制备治疗高血压的药物中的应用           | 齐炼文,张蕾,魏婷婷                                  |
| CN201710532732.9 | 食用菌菌根提取物及利用其制备的漱口水                 | 程抒劫,黄睿洁,胡凯宇,徐辉,崔晨,向雨,陈鞅亚,文质,李炳轩,蒋耀瑛,陈贵堂,王岁楼 |
| CN201711314446.1 | 利用食用菌来源复合敷料制备的粉饼及其制备方法             | 程抒劫,徐辉,曹崇江,郭子君,李敏,杨帆,温海鑫,陈贵堂,王岁楼            |
| CN201811073124.7 | 氘代-3-硝基苯硼酸及其制备方法与应用                | 郝海平,徐小为,郑秋凌,朱梦乐,韩佳玲                         |
| CN201710115432.0 | 一种银杏黄酮类化合物                         | 李萍,杨华,梁金秀,曲玮,宋慧鹏                            |
| CN201710164071.9 | 依帕司他在制备治疗高尿酸血症和痛风药物中的应用            | 王广基,阿基业,何骏                                  |
| CN201711201486.5 | 神经氨酸酶及抑制剂在制备治疗心肌纤维化和心室肥厚的药物中的应用    | 齐炼文,张蕾,李萍                                   |
| CN201810920129.2 | 叶黄素及其衍生物在制备抗脑胶质瘤药物中的应用             | 刘煜,闫忠辉,李小平,别雨薇,纪雪梅                          |
| CN201510946100.8 | 抗人 Delta like 4 单克隆抗体及其应用          | 王旻,吴旻,许卓斌,贾雪莲,王世静,王泽根,张娟,罗晨                 |
| CN201711097889.X | 一种双苯环类化合物、其制备方法和医药用途               | 张灿,康子圣,王聪,鞠曹云,薛玲静,韩晓琳,王斌                    |
| CN201711314432.X | 利用功能性食用菌来源敷料制备的面膜与制备方法             | 程抒劫,徐辉,曹崇江,郭子君,朱震茵,肖翰锟,向雨,陈贵堂,王岁楼           |
| CN201710565107.4 | 萘醌二聚体及其制备方法与应用                     | 谭宁华,汪哲,赵思蒙,宋立华,陈小强                          |
| CN201610814149.2 | 放射性同位素标记萘醌类在制备坏死心肌显像剂中的应用          | 殷志琦,赵苑余,段兴华,赵娟芝                             |
| CN201811501173.6 | 一种测定 C 反应蛋白的化学发光免疫方法               | 李萍,宗晨,张多多,杨华                                |
| CN201810013894.6 | 超临界抗溶剂法制备阿齐沙坦固体分散体的方法              | 王志祥,宋雅琴,徐文博,陈震,缪虹刚,王为彦                      |
| CN201810486482.4 | 一种包含 α-倒捻子素的化妆品组合物、其制备方法及其用途       | 王进欣,张婷婷                                     |
| CN201710187934.4 | 灵仙新苷在制备治疗或预防炎症性肠病的药物中的应用           | 李运曼,方伟蓉,胡雅慧,李丰文,刘丽芳,朱兴祥                     |
| CN201710947402.6 | 细胞自噬抑制剂及其制备方法与应用                   | 谭宁华,陈俐娟,宋立华,杨建洪,汪哲                          |

(图书与信息中心 顾东菡)

## 黄芪对小鼠心脑血管系统代谢稳态的影响

邓小颖<sup>1</sup>, 杨旭萍<sup>1</sup>, 刘佩芳<sup>2</sup>, 张尊建<sup>1\*</sup>, 黄寅<sup>1\*\*</sup><sup>1</sup>中国药科大学 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009;<sup>2</sup>哈尔滨医科大学附属第二医院 神经内科, 哈尔滨 150086)

**摘要** 研究中药黄芪对小鼠心脏、大脑及血液代谢稳态的影响, 从代谢调控角度阐明黄芪“修心健脑”的作用机制。13只ICR雄性小鼠随机分为两组, 分别连续10 d灌胃给予超纯水和黄芪水提液, 采用液相色谱-质谱(LC-MS)和气相色谱-质谱(GC-MS)联用分析全面表征小鼠血清、心脏和脑组织代谢指纹图谱, 结合多元统计分析与非参数检验筛选、鉴定差异代谢物, 聚焦相关代谢通路。多元统计分析表明, 与对照组相比, 黄芪干预后小鼠机体的代谢轮廓变化显著, 在血清、心脏、脑中分别鉴定出15、19和17个差异代谢物, 其中差异代谢物棕榈酸和LysoPC(20:3)为3种生物样本共有且变化趋势一致。代谢通路富集分析结果显示, 氨基酸代谢、磷脂代谢、脂肪酸代谢和三羧酸循环等通路受到显著影响。研究结果显示, 黄芪可能通过调节能量代谢、氨基酸代谢及脂代谢稳态发挥心脑血管保护作用。

**关键词** 黄芪; 心脑血管疾病; 代谢组学; 质谱

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)04-0494-08

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200416

引用本文 邓小颖, 杨旭萍, 刘佩芳, 等. 黄芪对小鼠心脑血管系统代谢稳态的影响[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(4): 494 - 501.

Cite this article as: DENG Xiaoying, YANG Xuping, LIU Peifang, et al. Effect of *Astragalus membranaceus* on metabolic homeostasis of cardio-cerebrovascular system in mice[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(4): 494 - 501.Effect of *Astragalus membranaceus* on metabolic homeostasis of cardio-cerebrovascular system in miceDENG Xiaoying<sup>1</sup>, YANG Xuping<sup>1</sup>, LIU Peifang<sup>2</sup>, ZHANG Zunjian<sup>1\*</sup>, HUANG Yin<sup>1\*\*</sup><sup>1</sup>Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (Ministry of Education), China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; <sup>2</sup>Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

**Abstract** To explore the effect of *Astragalus membranaceus*, a traditional Chinese medicine, on metabolic homeostasis of heart, brain and blood in mice, and to elucidate the cardio-cerebrovascular protective mechanisms of AR from the perspective of metabolic regulation. Thirteen ICR male mice were randomly divided into two groups which were intragastrically administered with ultrapure water and aqueous extract of *Astragalus membranaceus* for 10 consecutive days, respectively. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were used to comprehensively characterize the metabolic profiles of serum, heart and brain tissues. Multivariate statistical analysis combined with nonparametric tests were applied to screen and identify different metabolites, and then the related metabolic pathways were uncovered. Multivariate statistical analysis showed that the metabolic profiles of serum, heart, and brain tissues of mice after *Astragalus membranaceus* intervention significantly changed compared with the control group. A total of 15, 19, and 17 metabolites were identified in serum, heart, and brain tissues, respectively, among which palmitic acid and LysoPC (20 : 3) were screened out from all types of biological samples. The results of metabolic pathway enrichment analysis

收稿日期 2020-05-26 通信作者 \*Tel: 025-83271185 E-mail: zunjianzhang@hotmail.com

\*\*Tel: 025-83271185 E-mail: huangyin@cpu.edu.cn

基金项目 黑龙江省自然科学基金资助项目(No. QC2016109); 药物质量与安全预警教育部重点实验室开放课题资助项目(No. DQCP2017MS02)

showed that amino acid metabolism, phospholipid metabolism, fatty acid metabolism and tricarboxylic acid cycle were significantly affected. *Astragalus membranaceus* may protect the cardio-cerebrovascular system by regulating the metabolic homeostasis of amino acids, lipids and energy.

**Key words** *Astragalus membranaceus*; cardio-cerebrovascular disease; metabolomics; mass spectrometry

This study was supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. QC2016109) and the Open Program of MOE Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (No. DQCP2017MS02)

黄芪为豆科植物膜荚黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.] 或蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.)] 的干燥根,首载于《神农本草经》,药用历史已有 2000 多年<sup>[1]</sup>;2015 版《中华人民共和国药典》一部中收录的含黄芪中药制剂多达 163 个<sup>[2]</sup>。中医认为黄芪味甘,性微温,具有益气养元、养心通脉、祛邪扶正等功效。临床实践中,黄芪饮片、提取物及复方制剂被广泛用于治疗冠心病、心力衰竭、动脉粥样硬化、脑梗死等心脑血管疾病<sup>[3-4]</sup>。现代药理学研究表明<sup>[5-8]</sup>,黄芪通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 促进心肌细胞脂肪酸  $\beta$  氧化,提高心脏能量供应,改善心力衰竭;可上调葡萄糖转运体 4 (GLUT4) 及与葡萄糖代谢相关酶的表达改善 2 型糖尿病的糖耐量受损症状;可降低胆固醇合成关键酶 HMG-CoA 的表达抑制胆固醇的合成缓解高脂血症的症状;可抑制  $\beta$ -分泌酶 (BACE1) 活性,降低  $\beta$ -淀粉样多肽在阿尔茨海默病脑中的蓄积。目前,关于黄芪“修心护脑”作用的研究大多从分子药理学角度开展,聚焦于一些经典的信号通路,而对黄芪作用后机体循环血液及心脑血管等靶器官的代谢应答情况则鲜有研究。

代谢组学是一门利用现代分析技术,研究生物体受环境、疾病、药物等因素影响后内源性代谢物数量、种类及其变化规律的新兴学科<sup>[9]</sup>。中药多成分、多途径、多靶点的特点给中药现代化研究带来了巨大挑战,而代谢组学的系统生物学特点与中药的整体观相符合,为中药现代化研究提供了方向性新手段<sup>[10]</sup>。目前,代谢组学已在中药药效物质基础与作用机制、中药复方研究及中药安全性评价等方面得到了广泛运用<sup>[11-12]</sup>。本研究旨在整合运用气相色谱-质谱 (GC-MS) 和液相色谱-质谱 (LC-MS) 技术,全面表征小鼠灌胃给予黄芪后心脑血管系统代谢稳态的变化,筛选差异代谢物并

探讨黄芪发挥保护心脑血管作用的潜在机制。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

黄芪饮片(产地:甘肃,安徽协和成药业饮片有限公司);甲醇和乙腈(HPLC级,德国 Merck 公司);甲酸(HPLC级,美国 ROE Scientific 公司);乙酸乙酯(分析纯,南京化学试剂公司);氯化钠注射液(安徽双鹤药业有限责任公司);甲氧胺(MOX,纯度大于 99.9%)、*N*-甲基-*N*-(三甲基硅基)三氟乙酰胺(MSTFA,纯度大于 98.5%)、吡啶(纯度大于 99.9%)、内标(十七酸,格列本脲,纯度大于 99.9%)以及代谢物标准品均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

### 1.2 黄芪水提液制备

黄芪饮片经球磨机打粉后称取粉末 10 g,按质量体积比 1:10(g:mL)加入超纯水煎煮 2 次,每次 2 h,煎煮液经纱布过滤、合并滤液,冻干后保存于 -80 °C 冰箱。每次灌胃前用超纯水新鲜配制质量浓度为 1 g/mL 的黄芪水提取液(以生药含量计)。

### 1.3 仪器

超快速液相色谱-离子阱飞行时间质谱仪(UFLC-IT-TOF/MS)、GCMS-QP2010 Ultra 气相色谱质谱联用仪(日本岛津公司);5430R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);TMS-200 超级恒温混匀仪(杭州奥盛公司);低温恒温搅拌反应浴(郑州长城科工贸公司);离心浓缩仪、冷冻干燥机(德国 Lab-conco 公司);Milli-Q 超纯水制备系统(美国 Millipore 公司)。

### 1.4 动物

SPF 级 ICR 小鼠 13 只,雄性,体重(18~22)g,购自常州卡文斯实验动物有限公司(许可证:SCXK(苏)2016-0010),动物实验遵循中国药科大学伦理委员会批准的《实验动物管理办法》等相关规定。

小鼠饲养在标准动物房,每日光照 12 h,温度 20~25 ℃,湿度 40%~50%,给予标准饲料及饮用水。

## 2 方法

### 2.1 动物实验及样本采集

适应环境 1 周后,随机分为对照组(Con, 6 只)和黄芪组(AR, 7 只)。AR 组连续灌胃给予黄芪水提液 10 d, 剂量为 20 mL/(kg·d)(以生药含量计), Con 组灌胃给予同等体积生理盐水。最后一次灌胃结束后 24 h, 麻醉取血清, 处死后取心脏和脑组织, 所有样本于 -80 ℃ 冻存。

### 2.2 样品制备

2.2.1 组织匀浆液 取脑或心脏组织 100 mg 并剪碎, 加 80% 甲醇(甲醇-水, 8:2) 800  $\mu$ L 匀浆, 以 6.5 m/s 速度匀浆 10 s, 间隔 30 s, 重复 3 次。

2.2.2 LC-MS 分析前处理 样本室温解冻后涡旋 10 s, 取血清或组织匀浆液 20  $\mu$ L, 分别加沉淀试剂(甲醇-乙腈, 1:1, 含内标格列本脲 5  $\mu$ g/mL) 140 或 100  $\mu$ L, 涡旋后两次离心取上清液, 用于 LC-MS 分析。

2.2.3 GC-MS 分析前处理 取血清 10  $\mu$ L 或组织匀浆液 50  $\mu$ L, 加甲醇(含内标十七酸 10  $\mu$ g/mL) 100 或 50  $\mu$ L, 涡旋 15 min 后, 两次离心取上清液 80  $\mu$ L, 加 MOX (10 mg/mL) 25  $\mu$ L, 37 ℃ 孵育 90 min, 真空干燥, 加 MSTFA 120  $\mu$ L, 37 ℃ 反应 2 h 后, 将产物转移至进样小瓶用于 GC-MS 分析。

2.2.4 质控样本制备 为保证分析结果的可靠性, 分别从每只动物的血清、心脏和脑组织匀浆液中吸取等体积的样品混匀后制得质控(QC)样本。大批量分析时, 每间隔 4 个待分析样本插入一个 QC 样本, 同法处理分析。

### 2.3 仪器分析条件

2.3.1 LC-MS 分析条件 色谱柱为 XSelect HSS T3 XP(2.1 mm×100 mm, 2.5  $\mu$ m, 美国 Waters 公司), 0.01% 甲酸水溶液(A 相)和乙腈(B 相)为流动相进行梯度洗脱。梯度洗脱程序如下: 0.00~4.00 min, 95%~50% A; 4.0~10.00 min, 50%~15% A; 10.00~15.00 min, 15%~0% A; 15.00~20.00 min, 0% A; 20.00~20.01 min, 0%~95% A; 20.01~30.00 min, 95%A。流速: 0.4 mL/min, 柱温 40 ℃, 进样量 5  $\mu$ L。质谱采用电喷雾离子源(ESI)正负离子切换模式进行检测, 毛细管电压分别为 +

4.5 和 -3.5 kV; 鞘气(氮气)压力: 35 arb; 辅助气(氮气)压力: 15 arb; 离子传输毛细管加热温度: 320 ℃; 全扫描的质量范围为 100~1 000  $m/z$ , 扫描时间为 0.2 s。

2.3.2 GC-MS 分析条件 采用分流进样模式(血清样本分流比为 20:1, 组织匀浆液样本分流比为 50:1), 进样量 1  $\mu$ L。色谱柱为 Rtx-5MS(30 m×0.25 mm, 0.25  $\mu$ m), 载气为氦气, 流速为 1 mL/min。色谱柱升温程序为 70 ℃ 保持 2 min 后, 以 10 ℃/min 的速度加热至 320 ℃ 后再保持 3 min。进样口、接口、离子源的温度分别设置为 250、200、250 ℃。电离方式为电子轰击离子源(EI), 电压为 70 eV, 扫描范围为 45~600  $m/z$ 。

### 2.4 数据处理与分析

LC-MS 和 GC-MS 数据分别经 Profiling Solution 软件(日本 Shimadzu 公司)进行峰提取和峰匹配后生成由质荷比-保留时间-离子峰强度构成的三维数据矩阵。对数据进行扣空白、峰过滤、缺失值填补、总面积归一化等预处理后, 导入 SIMCA-P 软件(Version 13.0, 瑞典 Umetrics 公司)进行正交转换偏最小二乘法判别(OPLS-DA)分析, 计算变量投影重要性参数(VIP)。将数据导入 SPSS 软件(Version 17.0, 美国 IBM 公司), 进行两独立样本非参数检验(Mann-Whitney U 检验)。同时满足 VIP>1、 $P<0.05$  以及绝对变化倍数(IFCI)>1.2 的变量即为差异变量。依据保留时间、质谱裂解碎片等信息, 与 HMDB 数据库(<https://hmdb.ca/>)、NIST 谱库以及标准品图谱进行比对, 鉴定差异变量。所得差异代谢物输入到在线处理软件 MetPA(<https://www.metaboanalyst.ca/>)中进行富集分析, 并结合 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/>)绘制代谢通路图。

## 3 结果

### 3.1 数据可靠性考察

从血清、心脏、脑组织的 LC-MS 原始图谱中分别提取出 2 951, 2 395 和 1 912 个离子; 从 GC-MS 谱图中导出 2 802, 2 336 和 2 441 个离子。经计算比较发现, QC 样本的谱图重叠性较高(图 1), 超过 90% 的离子峰面积相对标准偏差(RSD)小于 30%。说明本研究采用的分析方法及过程稳定、可靠, 所得数据可用于进一步的分析。

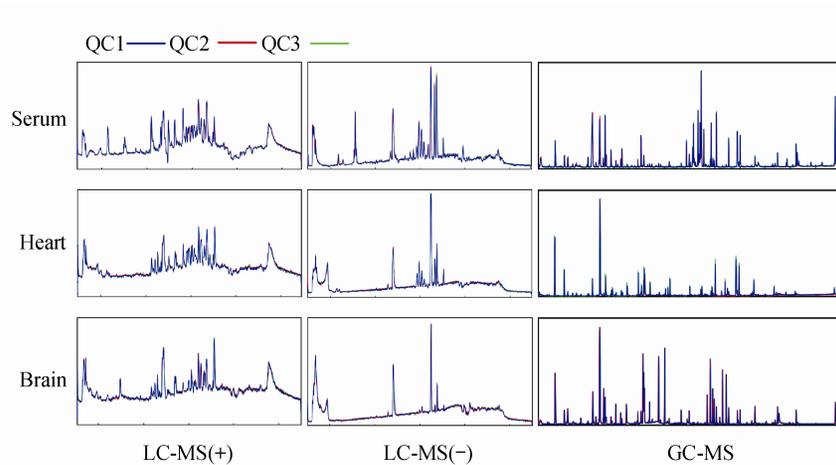


Figure 1 Total ion chromatography (TIC) of representative QC samples

### 3.2 差异代谢物筛选鉴定及代谢通路分析

OPLS-DA 分析结果如图 2 所示。3 种生物样本中, AR 组和 Con 组均区分明显 (LC-MS 模型参数: 血清—— $R^2X=0.517, R^2Y=0.990, Q^2=0.689$ ; 心脏组织—— $R^2X=0.463, R^2Y=0.981, Q^2=0.641$ ; 脑组织—— $R^2X=0.632, R^2Y=0.998, Q^2=0.842$ 。GC-

MS 模型参数: 血清—— $R^2X=0.541, R^2Y=0.979, Q^2=0.597$ ; 心脏组织—— $R^2X=0.486, R^2Y=0.998, Q^2=0.967$ ; 脑组织—— $R^2X=0.882, R^2Y=0.979, Q^2=0.763$ )。上述结果说明黄芪对小鼠血清、心脏和脑中的代谢物组都产生了显著影响。

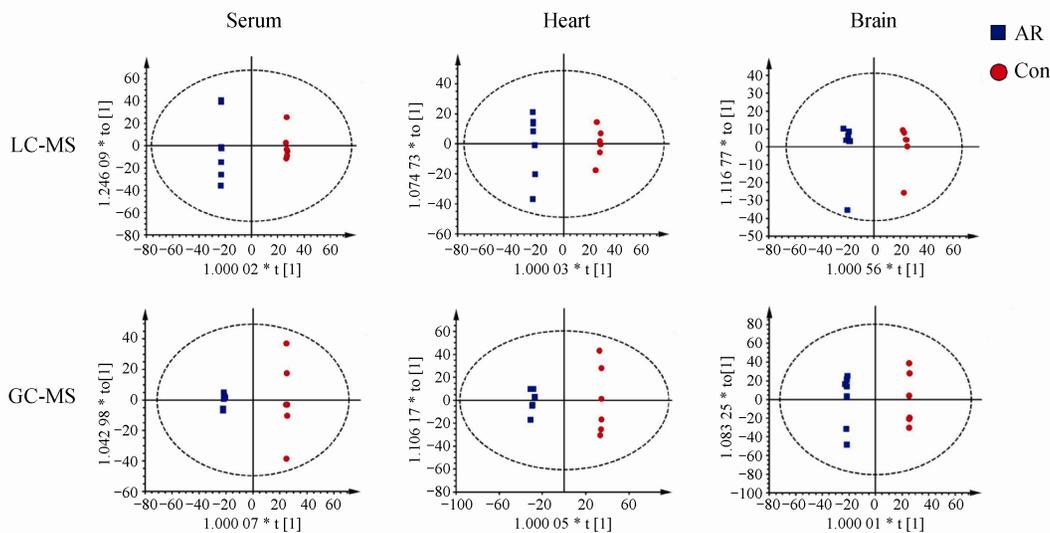


Figure 2 OPLS-DA score plots of serum, heart and brain samples from control (Con) and AR treated mice

从血清、心脏、脑组织中分别鉴定出 15、19 和 17 个差异代谢物 (表 1 和表 2)。经 3 种生物样本间比较分析, 结果如图 3 所示, 差异代谢物棕榈酸和 LysoPC(20:3) 为所有生物样本共有, 且含量变化趋势一致: 与对照组相比, 棕榈酸显著下降, LysoPC(20:3) 显著升高。此外, 甘氨酸为心脏与血清共有差异代谢物, 含量均显著增加; 丝氨酸、

苯丙氨酸为脑与血清共有, 丝氨酸均显著增加, 苯丙氨酸变化趋势则相反; 油酸、硬脂酸、LysoPE(20:4)、LysoPC(18:0) 为脑与心脏共有, 油酸、硬脂酸在两组织中均呈下降趋势, 而 LysoPE(20:4)、LysoPC(18:0) 在心脏中均显著增加, 在脑中则显著降低, 变化趋势则相反。

整合鉴定出的 40 个差异代谢物, 进行代谢通

**Table 1** Differential metabolites in serum, heart and brain samples detected by LC/MS

| Sample No. | Metabolite            | $t_{R/min}$ | $m/z$ (mode)  | VIP   | FC    |
|------------|-----------------------|-------------|---------------|-------|-------|
| Serum      | 1 LysoPC (16:1)       | 12.0        | 494.326 6 (+) | 1.716 | 1.854 |
|            | 2 LysoPC (18:1)       | 13.1        | 522.357 6 (+) | 1.779 | 1.204 |
|            | 3 LysoPC (20:3)       | 15.2        | 546.351 8 (+) | 1.680 | 1.791 |
|            | 4 LysoPC (20:4)       | 13.1        | 544.339 6 (+) | 1.573 | 1.256 |
|            | 5 Creatine            | 0.8         | 132.079 4 (+) | 1.140 | 0.82  |
|            | 6 L-Phenylalanine*    | 2.7         | 166.088 1 (+) | 1.305 | 0.703 |
|            | 7 Thymidine           | 9.7         | 243.099 5 (+) | 1.680 | 0.808 |
|            | 8 Urate               | 0.9         | 167.035 7 (-) | 1.344 | 0.684 |
| Heart      | 1 Hypoxanthine        | 1.4         | 137.047 5 (+) | 1.434 | 1.245 |
|            | 2 Tryptophan*         | 3.5         | 189.074 0 (+) | 1.222 | 1.232 |
|            | 3 Cytidine            | 0.8         | 244.092 2 (+) | 1.412 | 1.832 |
|            | 4 Sphingosine         | 10.1        | 300.289 7 (+) | 1.656 | 1.724 |
|            | 5 Inosine             | 2.3         | 269.088 5 (+) | 1.248 | 1.223 |
|            | 6 LysoPC (18:3)       | 12.5        | 518.323 1 (+) | 1.846 | 1.652 |
|            | 7 LysoPC (18:0)       | 13.5        | 524.370 1 (+) | 1.748 | 1.426 |
|            | 8 LysoPC (20:3)       | 15.2        | 546.354 7 (+) | 1.267 | 1.493 |
|            | 9 LysoPE (20:4)       | 13.1        | 502.291 7 (+) | 1.255 | 1.211 |
|            | 10 L-Acetylcarnitine  | 0.8         | 204.122 5 (+) | 1.794 | 0.775 |
|            | 11 L-Carnitine        | 0.2         | 162.1128 (+)  | 1.752 | 0.657 |
|            | 12 LysoPC (16:0)      | 12.6        | 496.340 5 (+) | 1.785 | 0.683 |
| Brain      | 1 L-Tyrosine*         | 1.0         | 182.080 9 (+) | 1.405 | 1.447 |
|            | 2 L-Phenylalanine*    | 2.6         | 166.0875 (+)  | 1.312 | 1.246 |
|            | 3 Isocitrate/citrate* | 0.9         | 191.007 3 (-) | 1.491 | 1.338 |
|            | 4 LysoPC (20:3)       | 13.8        | 546.356 8 (+) | 1.512 | 1.202 |
|            | 5 LysoPC (22:6)       | 12.4        | 568.338 3 (+) | 1.636 | 1.450 |
|            | 6 Inosine             | 2.2         | 267.057 1 (-) | 1.227 | 0.813 |
|            | 7 Adenosine           | 2.7         | 268.104 8 (+) | 1.563 | 0.738 |
|            | 8 LysoPE (20:4)       | 12.5        | 502.294 7 (+) | 1.595 | 0.764 |
|            | 9 LysoPC(18:0)        | 12.3        | 524.2772 (-)  | 1.450 | 0.732 |

\*Metabolites confirmed by the commercial standards

路富集分析(图3-C),发现氨基酸代谢、脂肪酸代谢等途径变化显著。在此基础上,初步构建了小鼠心脑血管系统受黄芪水煎液影响的代谢网络(图4)。

#### 4 讨论

经黄芪干预后,小鼠血清、心脏、脑的代谢变化主要涉及氨基酸代谢、脂代谢与能量代谢。脂代谢涉及的物质主要包括溶血磷脂酰胆碱类(LPCs)、不饱和脂肪酸(UFA)及饱和脂肪酸(SFA)。LPCs类物质可激活PPAR $\delta$ ,上调葡萄糖

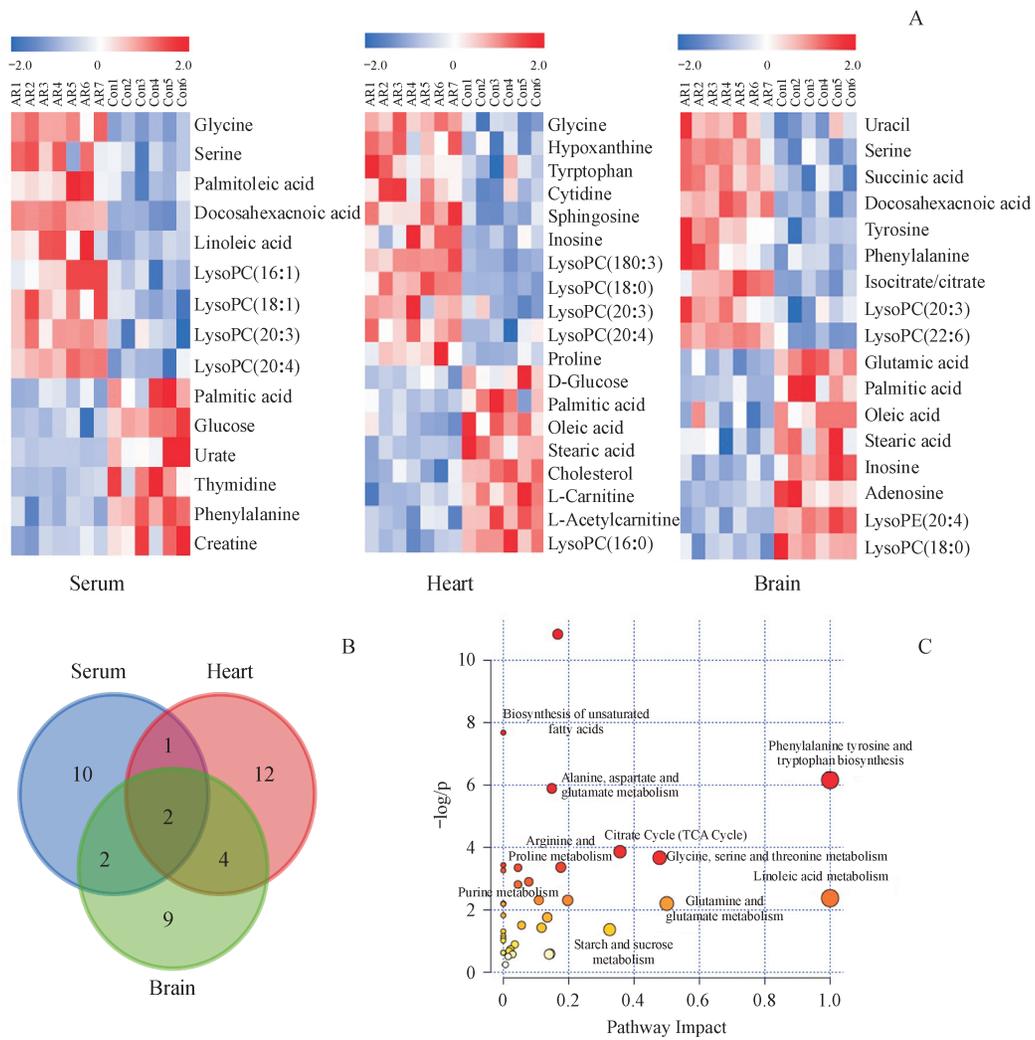
**Table 2** Differential metabolites in serum, heart and brain samples detected by GC/MS

| Sample No. | Metabolite              | $t_{R'/min}$ | MW     | VIP   | FC    |
|------------|-------------------------|--------------|--------|-------|-------|
| Serum      | 1 L-Glycine*            | 7.3          | 75.06  | 1.521 | 1.610 |
|            | 2 L-Serine*             | 11.1         | 105.09 | 1.662 | 1.350 |
|            | 3 Palmitoleic acid*     | 18.9         | 254.41 | 1.511 | 1.624 |
|            | 4 Palmitic acid*        | 19.1         | 256.42 | 1.413 | 0.748 |
|            | 5 Docosahexaenoic acid* | 23.8         | 256.42 | 1.975 | 1.466 |
|            | 6 Linoleic acid*        | 20.7         | 282.46 | 1.413 | 1.283 |
|            | 7 D-Glucose*            | 17.9         | 180.16 | 1.469 | 0.769 |
| Heart      | 1 L-Proline*            | 10.1         | 216.20 | 1.428 | 1.662 |
|            | 2 L-Glycine*            | 7.3          | 147.05 | 1.268 | 1.784 |
|            | 3 D-Glucose*            | 17.9         | 217.11 | 1.790 | 0.688 |
|            | 4 Palmitic acid*        | 19.1         | 134.07 | 1.700 | 0.699 |
|            | 5 Stearic acid*         | 21.0         | 132.11 | 1.656 | 0.712 |
|            | 6 Oleic acid*           | 20.8         | 146.10 | 1.227 | 0.634 |
|            | 7 Cholesterol*          | 28.5         | 314.03 | 1.360 | 0.654 |
| Brain      | 1 Uracil                | 10.8         | 112.09 | 1.260 | 1.366 |
|            | 2 L-Serine*             | 11.1         | 105.09 | 1.175 | 1.385 |
|            | 3 Succinic acid*        | 12.9         | 118.09 | 1.828 | 1.262 |
|            | 4 Docosahexaenoic acid* | 23.8         | 256.42 | 1.333 | 1.307 |
|            | 5 Glutamic acid*        | 14.5         | 147.13 | 1.236 | 0.803 |
|            | 6 Palmitic acid*        | 19.1         | 256.42 | 1.223 | 0.812 |
|            | 7 Oleic acid*           | 20.8         | 282.46 | 1.212 | 0.831 |
|            | 8 Stearic acid*         | 21.0         | 280.44 | 1.284 | 0.818 |

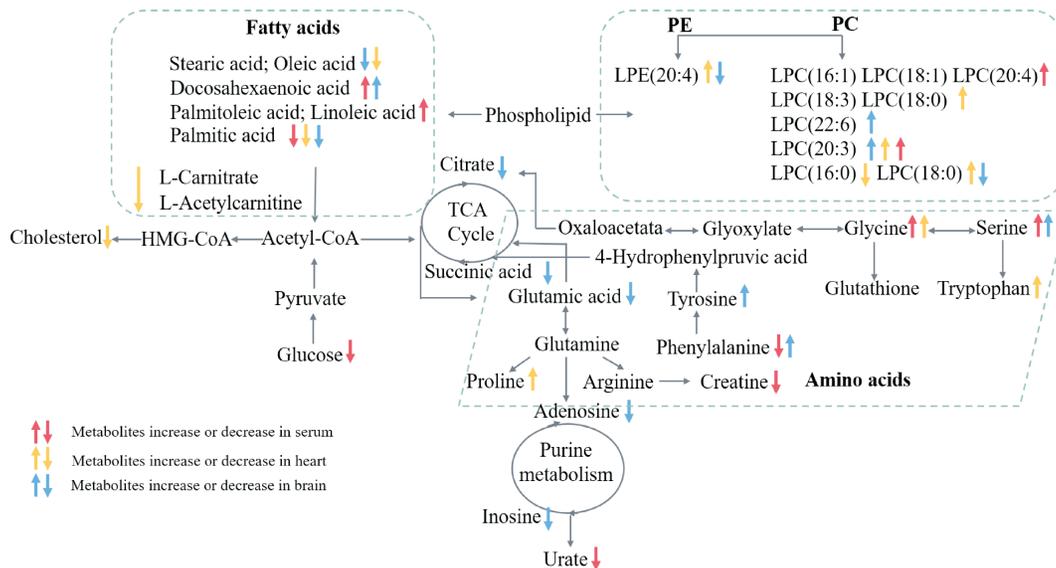
\*Metabolites confirmed by the commercial standards

转运体 GLUT4 的表达,维持脂质代谢稳态和胰岛素敏感性<sup>[13]</sup>。氧化应激损伤破坏神经元细胞膜,会导致侧链为不饱和脂肪酸的LPCs类物质含量显著下降<sup>[15-16]</sup>。本研究发现,相较于对照组,AR组小鼠血清中LysoPC(16:1)、LysoPC(18:1)、LysoPC(20:3)、LysoPC(20:4)含量显著升高;AR组小鼠脑中LysoPC(20:3)和LysoPC(22:6)水平上升,提示黄芪可能通过改善磷脂代谢提高机体胰岛素敏感性与缓解氧化应激造成的脑神经元损伤。

UFA在防治心脑血管疾病方面发挥重要作用,自由基氧化造成的血清UFA含量下降,易诱发高脂血症、动脉粥样硬化等血管疾病<sup>[17-18]</sup>。AR组小鼠血清中3种UFA:棕榈油酸、二十二碳六烯酸(DHA)和亚油酸(LA)含量上升,提示黄芪可通过抗氧化效应调节UFA稳态而发挥改善血管疾病的作用。黄芪中的活性成分黄芪甲苷可以激活过氧化物酶体增殖物激活型受体 $\alpha$ (PPAR $\alpha$ ),促进脂肪



**Figure 3** A: Heat-map of the differential metabolites in mice serum, heart and brain; B: Venn diagram; C: Results of metabolic pathway enrichment



**Figure 4** Effect of *Astragalus* on the metabolic homeostasis of the cardio-cerebrovascular system in mice

酸 $\beta$ -氧化,增强供能<sup>[5]</sup>。脂肪酸是心肌细胞主要能量代谢底物,有研究发现异丙肾上腺素诱导的心肌梗死模型动物心脏中长链脂肪酸 $\beta$ -氧化受损,发生蓄积<sup>[19]</sup>。AR组小鼠心脏中棕榈酸、油酸、硬脂酸含量呈下降趋势,提示黄芪可通过改善脂肪酸代谢治疗心脏疾病。

氨基酸不仅参与机体的能量代谢与蛋白质合成,还可合成多种生理活性物质。有研究发现,血中Gly和苯丙氨酸(Phe)可作为早期预测T2DM发生的生物标志物,胰岛素抵抗会导致患者血清中Gly水平显著降低,Phe含量增加<sup>[13, 19]</sup>。本研究中AR组小鼠血清中Gly含量上升,Phe含量降低的趋势提示黄芪可通过调节Gly与Phe代谢降低罹患T2DM的风险。谷氨酸(Glu)是哺乳动物中枢神经系统(CNS)中主要的兴奋性神经递质。疾病状态下Glu大量释放,会过度激活受体导致神经元兴奋、病变,产生兴奋性毒性,目前研究发现,Glu大量释放是多种脑部疾病的病理特征之一,包括脑缺血、AD、创伤性脑损伤等<sup>[20-22]</sup>。酪氨酸(Tyr)是合成儿茶酚胺类神经递质去甲肾上腺素和多巴胺的重要前体,可以增强认知灵活性与记忆功能,具有改善认知障碍的潜力<sup>[23]</sup>。Ser可促进细胞增殖,合成抗氧化剂谷胱甘肽与神经递质牛磺酸<sup>[24]</sup>。与对照组相比,AR组小鼠脑组织中Glu含量降低,Tyr、Ser、Phe含量增加,提示黄芪可调节多种氨基酸代谢,维持脑神经递质稳态而发挥脑保护效应。

大脑主要以葡萄糖供能,充足的糖代谢对维持大脑正常生理功能十分重要。AR组小鼠血清中葡萄糖的减少,脑中柠檬酸/异柠檬酸、琥珀酸水平的升高,反映了黄芪可提高脑中三羧酸循环代谢速率,增强能量供应。L-肉碱在心脏脂肪酸代谢中十分关键,它作为一种载体将脂肪酸从线粒体膜外转运至膜内进行 $\beta$ -氧化<sup>[25]</sup>,黄芪干预后小鼠心脏中L-肉碱含量降低,进一步提示黄芪可促进脂肪酸代谢,提高心脏能量供应。

本研究整合运用基于色谱-质谱技术的非目标代谢组学方法,考察小鼠灌胃给予黄芪水提液后机体的代谢变化,在血清、心脏、脑中分别发现了15、19、17个差异代谢物,并聚焦于氨基酸代谢、脂类代谢及能量代谢等通路,从代谢调控角度初步阐明了黄芪“修心护脑”的作用机制。

## 参考文献

- [1] Liu P, Zhao H, Luo Y. Anti-aging implications of *Astragalus membranaceus* (Huangqi): a well-known Chinese tonic [J]. *Aging Dis*, 2017, **8**(6): 868-886.
- [2] Li Y, Guo S, Zhu Y, et al. Comparative analysis of twenty-five compounds in different parts of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *Astragalus membranaceus* by UPLC-MS/MS [J]. *J Pharm Anal*, 2019, **9**(6): 392-399.
- [3] Fu J, Wang Z, Huang L, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi) [J]. *Phytother Res*, 2014, **28**(9): 1275-1283.
- [4] Liu Y, Xu W, Xiong Y, et al. Evaluations of the effect of HuangQi against heart failure based on comprehensive echocardiography index and metabonomics [J]. *Phytomedicine*, 2018, **50**(2): 5-12.
- [5] Dong Z, Zhao P, Xu M, et al. Astragaloside IV alleviates heart failure via activating PPAR $\alpha$  to switch glycolysis to fatty acid beta-oxidation [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 2691-2699.
- [6] Shanzad M, Shabbir A, Wojcikowski K, et al. The antioxidant effects of Radix Astragali (*Astragalus membranaceus* and related species) in protecting tissues from injury and disease [J]. *Curr Drug Targets*, 2016, **17**(12): 1331-1340.
- [7] Agyemang K, Han L, Liu E, et al. Recent advances in *Astragalus membranaceus* anti-diabetic research: pharmacological effects of its phytochemical constituents [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013(65): 46-48.
- [8] Wang X, Wang Y, Hu JP, et al. Astragaloside IV, a natural PPAR $\gamma$  agonist, reduces A $\beta$  production in Alzheimer's disease through inhibition of BACE1 [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, **54**(4): 2939-2949.
- [9] Yang Q, Zhang AH, Miao JH, et al. Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: a systematic review [J]. *RSC Advances*, 2019, **9**(64): 37245-37257.
- [10] Wu G, Zhang W, Li H. Application of metabolomics for unveiling the therapeutic role of traditional Chinese medicine in metabolic diseases [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, **242**(11): 2057.
- [11] Wang M, Chen L, Liu D, et al. Metabolomics highlights pharmacological bioactivity and biochemical mechanism of traditional Chinese medicine [J]. *Chem Biol Interact*, 2017, **273**(1): 33-41.
- [12] Han L, Wang P, Wang Y, et al. Rapid discovery of the potential toxic compounds in polygonum multiflorum by UHPLC-Q-Orbitrap-MS-based metabolomics and correlation analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2019, **10**(3): 2-9.
- [13] Wang R, Yu Z, Herder C, et al. Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics [J]. *Mol Syst Biol*, 2012, **8**(6): 15-21.
- [14] Frisardi V, Panza F, Seripa D, et al. Glycerophospholipids

- and glycerophospholipid-derived lipid mediators: a complex meshwork in Alzheimer's disease pathology [J]. *Prog Lipid Res*, 2011, **50**(4): 313-330.
- [15] Lin J, Liu WT, Li W, et al. Plasma metabolic profiling of Alzheimer's disease by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Clin Biochem*, 2010, **43**(12): 992-997.
- [16] Wu Q, Zhang H, Dong X, et al. UPLC-Q-TOF/MS based metabolomic profiling of serum and urine of hyperlipidemic rats induced by high fat diet [J]. *J Pharm Anal*, 2014, **4**(6): 360-367.
- [17] Song X, Wang J, Wang P, et al. (1)H NMR-based metabolomics approach to evaluate the effect of Xue-Fu-Zhu-Yu decoction on hyperlipidemia rats induced by high-fat diet [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, **78**(79):202-210.
- [18] Liu YT, Jia HM, Chang X, et al. The metabolic disturbances of isoproterenol induced myocardial infarction in rats based on a tissue targeted metabolomics [J]. *Mol Biosyst*, 2013, **9**(11): 2823-2834.
- [19] Chen T, Ni Y, Ma X, et al. Branched-chain and aromatic amino acid profiles and diabetes risk in Chinese populations [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**(20):59-64.
- [20] Ferrari F, Gornir A, Hoyer S, et al. Glutamate metabolism in cerebral mitochondria after ischemia and post-ischemic recovery during aging: relationships with brain energy metabolism [J]. *J Neurochem*, 2018, **146**(4): 416-428.
- [21] Yu J, Kong L, Zhang A, et al. High-throughput metabolomics for discovering potential metabolite biomarkers and metabolic mechanism from the APPswe/PS1dE9 transgenic model of Alzheimer's disease [J]. *J Proteome Res*, 2017, **16**(9): 3219-3228.
- [22] Fiandaca MS, Gross TJ, Johnsn TM, et al. Potential metabolomic linkage in blood between Parkinson's disease and traumatic brain injury [J]. *Metabolites*, 2018, **8**(3):50-52.
- [23] Sasaki K. Nutrition and dopamine: an intake of tyrosine in royal jelly can affect the brain levels of dopamine in male honeybees (*Apis mellifera* L.) [J]. *J Insect Physiol*, 2016, **87**(3): 45-52.
- [24] Yi L, Shi S, Wang Y, et al. Serum metabolic profiling reveals altered metabolic pathways in patients with post-traumatic cognitive impairments [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**(2): 13-20.
- [25] Li Y, Ju L, Hou Z, et al. Screening, verification, and optimization of biomarkers for early prediction of cardiotoxicity based on metabolomics [J]. *J Proteome Res*, 2015, **14**(6): 2437-2445.

## · 征订启事 ·

### 欢迎订阅 2020 年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由国家教育部主管、中国药科大学主办的药学中文核心期刊,主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药代动力学、药物生物技术、药理学、药事管理等学科的原创新研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉,目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, IC, EMBASE/Excerpta Medica, CAS)等所收录,被国内权威数据库:《中文核心期刊要目总览》(2017年版)、中国科学引文核心数据库(CSCD核心)、中国科技论文统计源数据库等列为药学类核心期刊,屡获原国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2008年,《中国药科大学学报》被评为中国精品科技期刊,2006、2008、2010年连续3次被教育部评为中国高校精品科技期刊。据中国科学技术信息研究所最新发布的《2017年版中国科技期刊引证报告(核心版)》,《中国药科大学学报》2016年度核心被引半衰期为9.1,在47种药学核心期刊中排名第一。学术影响力极高,在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊,128页。国际标准开本,国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅,漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32-1157/R

ISSN:1000-5048

国内邮发代号:28-115

定价:40元/期,全年240元

地址:南京市童家巷24号

邮政编码:210009

电话:025-83271566

传真:025-83271279

E-mail:xuebao@epu.edu.cn

http://www.zgykdxxb.cn

· 综述 ·

## 神经递质在肿瘤发生发展中的作用研究进展

田州彤, 倪嘉平, 胡唯伟\*

(中国药科大学药物科学研究院, 南京 211198)

**摘要** 精神、情绪等心理因素直接影响人类身体健康,慢性应激产生神经递质抑制机体免疫系统,机体内平衡被破坏,使细胞失去正常状态和功能,产生肿瘤细胞;肿瘤患者会经历慢性情绪压力,产生的神经递质会促进肿瘤的发生和发展。本文从神经递质正常生理功能和在肿瘤发生发展中的作用机制两方面系统总结了主要神经递质的研究进展。为进一步探索神经递质的作用新机制和开发阻断神经递质作用的药物提供理论思考。

**关键词** 神经递质;慢性应激;肿瘤;进展

**中图分类号** R730.2 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)04-0502-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200417

**引用本文** 田州彤,倪嘉平,胡唯伟.神经递质在肿瘤发生发展中的作用研究进展[J].中国药科大学学报,2020,51(4):502-508.

**Cite this article as:** TIAN Zhoutong, NI Jiaping, HU Weiwei. Research progress on the role of neurotransmitters in tumorigenesis and development[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(4): 502 - 508.

## Research progress on the role of neurotransmitters in tumorigenesis and development

TIAN Zhoutong, NI Jiaping, HU Weiwei\*

*Institute of Pharmaceutical Sciences, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China*

**Abstract** Mental, emotional and other psychological factors have a direct effect on human health, and chronic stress produces neurotransmitters to suppress the body's immune system, after which homeostasis is destroyed, lead to cells losing their normal state and function and cancer cells being produced. As a result, cancer patients will experience chronic emotional stress and consequently, neurotransmitters will promote the occurrence and development of tumors. This review systematically summarizes the research progress of major neurotransmitters from two aspects: the normal physiological functions and the mechanism of action in the tumor occurrence and development, providing some insights into further exploration of new mechanism of neurotransmitters and the development of drugs that block the neurotransmitters.

**Key words** neurotransmitter; chronic stress; tumor; advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81703561)

心理因素影响人类健康,古希腊著名内科医生 Galen 就提出,心理和生理是一个整体,通过心理治疗可以医治机体的器质性病变。神经主要通过将信息从中枢神经系统(CNS)传递到器官和组织,反之亦然。感觉神经、运动神经和自主神经

(交感神经和副交感神经)构成一个直接或间接与中枢神经系统相连的神经网络,使身体各部分之间能够进行功能交流<sup>[1]</sup>。肿瘤患者会经历慢性情绪压力,包括抑郁、焦虑和恐惧,这些因素都会影响肿瘤的发生和发展。慢性应激会通过神经递质

**收稿日期** 2020-08-01 \* **通信作者** Tel:025-86185620 E-mail:huww1989@163.com

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(No. 81703561)

对肿瘤增殖和侵袭相关基因调控来促进肿瘤的发生和发展,同时慢性应激还通过抑制免疫系统来促进肿瘤的发生发展<sup>[2-3]</sup>。神经递质(neurotransmitter)是神经元之间或神经元与效应器细胞之间传递信息的化学物质,脑内神经递质分为四类,生物原胺类、氨基酸类、肽类、其他类。生物原胺类神经递质包括:多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NA)、肾上腺素(A)、5-羟色胺(5-HT,也称血清素)。氨基酸类神经递质包括: $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)、甘氨酸、谷氨酸、组胺、乙酰胆碱(ACh)。肽类神经递质分为:内源性阿片肽、P物质、神经加压素、胆囊收缩素(CCK)、生长抑素、血管加压素和缩宫素、神经肽Y。其他类神经递质分为:核苷酸类、花生酸碱、阿南德酰胺、 $\sigma$ 受体( $\sigma$ 受体)。本文对主要的神经递质对肿瘤发生发展的调控研究进展进行总结。

## 1 生物原胺类神经递质

### 1.1 多巴胺

多巴胺(dopamine, DA)是大脑中重要的神经递质。共有两种类型的多巴胺受体:D1和D2。D1类受体可以通过Gs蛋白与腺苷酸环化酶正性偶联,激活腺苷酸环化酶。而D2类受体则抑制腺苷酸环化酶,并抑制Ca<sup>2+</sup>离子通道、激活K<sup>+</sup>离子通道、转换磷脂酰肌醇<sup>[4]</sup>。

DA与其受体同肿瘤的发生密切相关。调节性T细胞(Treg)是肿瘤逃逸宿主免疫系统的关键因子,DA通过D1型受体抑制人CD8<sup>+</sup>Treg功能,因此,多巴胺能通路可能作为药物靶点来开发抗肿瘤药物<sup>[5]</sup>。在非小细胞肺癌(NSCLC)中,DRD2在癌组织中的表达低于癌旁正常肺组织,激活DRD2能抑制肿瘤细胞的生长。体外实验表明,活化DRD2可通过抑制NF- $\kappa$ B信号通路NSCLC细胞株A549和SK-MES-1的增殖<sup>[6]</sup>。但是也有研究发现DRD2在多种肿瘤中高表达,同胰腺导管腺癌不良预后相关<sup>[7]</sup>。在胶质母细胞瘤中,DRD2在胶质瘤起始细胞中表达升高,激活缺氧通路,改变胶质瘤细胞的代谢<sup>[8]</sup>。在胃癌组织中,DRD2高表达的比例(51.2%)显著高于DRD2低表达的比例(39.3%),DRD2高表达的患者生存期较短,DRD2的表达与胃癌患者的预后呈负相关<sup>[9]</sup>。D2型受体拮抗剂能够抑制肿瘤生长、诱导自噬、影响脂质代

谢和促进肿瘤细胞凋亡等,但近日有报道提出了令人震惊的发现,D2受体拮抗剂的细胞毒作用所需的浓度比它们对该受体的亲和力高出几个数量级。因此,靶向D2样多巴胺受体可能只在极少数情况下产生用于肿瘤化疗的有用配体<sup>[10]</sup>。DRD5基因存在Q366R突变,该突变可以诱导肿瘤细胞凋亡。Prabhu等<sup>[11]</sup>证明DRD5是肿瘤对DRD2拮抗反应的调节剂。越来越多的证据表明,在乳腺癌、结肠癌、胃癌和肉瘤中,多巴胺或多巴胺受体激动剂与抗肿瘤药物如多柔比星或5-氟尿嘧啶(5-FU)<sup>[12]</sup>协同作用,并对肿瘤生长产生抑制作用。多巴胺通过DRD2抑制VEGR-2的磷酸化和阻止丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的激活来抑制肿瘤内皮细胞的增殖和迁移<sup>[13-14]</sup>。尽管报道多巴胺具有抗肿瘤作用,但是还存在争议,需要更多的研究才能达成共识。

### 1.2 肾上腺素和去甲肾上腺素

肾上腺素(adrenaline)和去甲肾上腺素(noradrenaline, NA)分别主要由肾上腺髓质和交感神经分泌。可以直接调节多种肿瘤的进展,如细胞增殖、存活和迁移。此外,还可以刺激内皮细胞、免疫细胞和成纤维细胞,因此对肿瘤的进展有广泛的影响。

神经系统参与对肿瘤的发生和发展的调控。一些实验表明交感神经系统的肾上腺素能纤维参与肿瘤进展的初始阶段。在卵巢癌细胞中,肾上腺素和NA可以调节细胞增殖、生存和肿瘤血管生成。 $\beta$ 肾上腺素受体( $\beta$ -AR)的激活能促进胸部、肺部、结肠和胰腺的肿瘤细胞迁移和侵袭,在多种肿瘤细胞中促进血管生成,促进血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素-6(IL-6)的分泌。长期慢性的压力会导致肾上腺素和去甲肾上腺素水平增加,促进肿瘤血管生成和肿瘤发生转移<sup>[15]</sup>。抑郁同样可以通过上调NA水平,激活 $\beta$ -AR,活化p38 MAPK信号通路,从而促进乳腺癌恶性发展。 $\beta$ 受体阻滞剂被认为一种抑制肿瘤转移的新策略<sup>[16]</sup>。相关研究揭示了 $\beta$ 受体阻滞剂可以起到预防肿瘤的作用,如非选择性 $\beta$ 受体阻滞剂普萘洛尔,可以降低头颈部、食道、胃癌、结肠癌和前列腺癌发生的风险<sup>[17-18]</sup>。儿茶酚胺促进ADRB2依赖性胰腺导管腺癌的发生和神经营养因子(NT)的分泌,进而促进肿瘤神经的生成,导致NA的分泌增加促进肿

瘤的生长<sup>[19]</sup>。

### 1.3 血清素

血清素也称为5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT),不到1%的血清素游离存在于血液中,其余储存在血小板,突触前神经元和肠嗜铬细胞中<sup>[20-21]</sup>。血清素的受体(5-HTRs)位于细胞膜上,存在于中枢神经系统、心脏、胃肠道、血管和血小板中<sup>[22]</sup>。

在胰腺导管腺癌(PDAC)中,5-HT合成和降解酶的失控导致5-HT水平升高,通过HTR2B受体进一步激活PI3K/AKT/mTOR信号,而不是经典的第二信使系统,从而增强Warburg效应<sup>[23]</sup>。此外,HTR2B的选择性拮抗剂SB204741在多种临床前动物模型中表现出显著的抗肿瘤活性,且无明显毒性。由于HTR2B在PDAC中升高,且预示预后不良,SB204741有望成为一种有前景的PDAC临床治疗药物<sup>[24]</sup>。5-HT1D在肝癌组织和细胞系中的表达水平显著上调,其表达水平与不良临床病理特征密切相关。5-HT1D可通过抑制泛素介导的降解来稳定磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚基1(PIK3R1)。5-HT1D与PIK3R1的相互作用通过PI3K/AKT信号通路促进FoxO6的表达,5-HT1D也可以不依赖于AKT的方式直接在转录水平激活FoxO6,揭示了5-HT1D在肝癌中潜在致癌作用<sup>[25]</sup>。在三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞中,5-HT通过5-HTR7受体促进细胞侵袭和增殖,且在转移的第一阶段(侵袭和转移期间)的作用比在局部浸润后的增殖作用更强<sup>[26]</sup>。抑郁往往会促使肿瘤患者免疫系统调节功能失调,加速肿瘤复发和转移。患有抑郁症的肺癌患者与非抑郁组相比,5-HT水平升高,5-HTR1表达增加,总生存率降低<sup>[27]</sup>。

## 2 氨基酸类神经递质

### 2.1 $\gamma$ -氨基丁酸

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)是中枢神经系统中主要的抑制性神经递质,还可以在神经发育过程中作为营养因子来调节神经细胞的增殖、迁移、分化和死亡<sup>[28]</sup>。根据GABA受体对激动剂及拮抗剂的敏感性不同,CNS内已鉴定出3种GABA受体(A、B、C三型)。

$\gamma$ -氨基丁酸氨基转移酶(ABAT)是GABA分

解代谢的关键酶。GABA介导的 $Ca^{2+}$ -NFAT1轴的活化使ABAT在基底细胞样型乳腺癌中表达下调,促进了肿瘤的发生和转移<sup>[29]</sup>。在胰腺导管腺癌中,GABA A型受体 $\pi$ 亚基(GABRP)的高表达促进了肿瘤的侵袭性,GABRP与KCNN4相互作用,诱导 $Ca^{2+}$ 内流,从而激活NF- $\kappa$ B信号,最终通过诱导CXCL5和CCL20的表达促进巨噬细胞的浸润<sup>[30]</sup>。同样,GABRP能够通过激活MAPK/ERK途径,来增强卵巢癌细胞的侵袭。GABRP-963CpG位点的DNA甲基化是卵巢癌侵袭性的标志之一,可以用来预测肿瘤转移<sup>[31]</sup>。GABA的过度生产可以直接调节核雄激素受体信号,造成代谢异常和促癌信号通路的活化,促进前列腺癌的发生<sup>[32]</sup>。GABA B受体以配体依赖的机制反式激活表皮生长因子受体(EGFR),促进前列腺癌细胞的迁移和侵袭,为通过靶向神经递质信号通路开发前列腺癌治疗的新策略提供了新方法<sup>[33]</sup>。GABA B受体拮抗剂可能通过不同的信号转导途径来促进细胞凋亡、细胞周期阻滞和失活 $Ca^{2+}$ 离子通道来发挥抗肿瘤作用,从而改善高级别软骨肉瘤的预后<sup>[34]</sup>。恶性肿瘤组织可以分解多种底物来应对代谢压力,胶质瘤的代谢改变受到广泛关注,尤其是与异柠檬酸脱氢酶(IDH)突变有关的代谢改变,以及与之相关的肿瘤代谢产物D-2-羟基戊二酸(2-HG)对新陈代谢、表观遗传和氧化还原反应的调控。琥珀酸半醛脱氢酶(SSADH)的表达可能参与了胶质瘤中GABA的氧化和消耗,而且GABA的氧化能力可能与胶质瘤的增殖和预后不良有关。此外,IDH突变和2-HG的产生抑制了胶质瘤细胞中GABA的氧化。基于这些数据,GABA氧化和SSADH活性可能成为胶质瘤/胶质母细胞瘤的新的治疗靶点<sup>[35]</sup>。

### 2.2 谷氨酸

谷氨酸(glutamic acid, mGluR)是哺乳动物中枢神经系统中主要的兴奋性神经递质。它的功能通过两类受体介导:离子型和代谢型。以前一直认为mGluRs特异性地定位于中枢神经组织,即大脑和脊髓。然而,近年来的更多研究表明,这些受体还存在于皮肤、乳腺、前列腺、胃肠和肝脏等外围组织<sup>[36]</sup>。越来越多的证据表明mGluRs参与了肿瘤的发展<sup>[37]</sup>。

恶性黑色素瘤中mGluR1的过度激活是致癌

的驱动因素,其作用独立于典型的黑色素瘤原癌基因 BRAF 或 NRAS。mGluR1 的表达促进了谷氨酸的产生和自分泌谷氨酸能信号,提示可以通过降低谷氨酸的生物利用度和依赖于 GLS 的谷氨酰胺到谷氨酸的转化来抑制肿瘤<sup>[38]</sup>。前列腺特异性膜抗原(PSMA)或叶酸水解酶 1 在前列腺癌组织中高表达,其表达与生存期呈负相关,并随肿瘤分级增加而增加。PSMA 羧肽酶活性能够从维生素 B9 和谷氨酸底物中释放谷氨酸,从而激活 mGluR1,激活的 mGluR1 随后通过 p110 $\beta$  的磷酸化诱导磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)的激活,PI3K 的 p110 $\beta$  亚型在前列腺癌的发病机制中起着特别重要的作用<sup>[39-40]</sup>。mGluR4 在正常膀胱细胞和膀胱癌细胞中均有表达,mGluR4 激活后,细胞周期蛋白 D1 表达降低,Caspase-8/9/3 表达增加,Bcl-2/Bax 表达失衡。研究表明,在膀胱癌细胞中,mGluR4 可能通过 cAMP/P13K/AKT 信号通路抑制细胞增殖和促进细胞凋亡,从而抑制膀胱癌的生长<sup>[37]</sup>。离子型谷氨酸受体 GRIK2 亚型诱导肿瘤细胞衰老<sup>[41]</sup>,在胃癌中可能起到抑癌作用<sup>[42]</sup>。

### 2.3 乙酰胆碱

乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)是副交感神经系统的神经递质,其生物活性受中枢和外周神经系统中烟碱(N-AChR)和毒蕈碱(M-AChR)乙酰胆碱受体的介导。AChRs 除了在中枢神经系统 and 外周神经系统、自主神经系统和神经肌肉接头中发挥重要的生理作用外,还在人体不同器官中的广泛表达<sup>[43]</sup>。

越来越多的证据表明,在不同的肿瘤中,AChRs 的过表达介导了肿瘤细胞的增殖、凋亡、血管生成和上皮-间充质转化(EMT)等过程。 $\alpha 7$  烟碱型乙酰胆碱受体( $\alpha 7$ -nAChR)是 N-AChR 家族的一员,广泛表达于胃上皮细胞<sup>[44]</sup>。在乳腺癌中, $\alpha 7$ -nAChR 和  $\alpha 9$ -nAChR 被报道为致癌基因<sup>[45]</sup>。尼古丁通过  $\alpha 7$ -nAChRs 增强口腔鳞癌细胞的存活和耐药<sup>[45]</sup>。ACh 可通过激活 M-AChRs,以自分泌或旁分泌的方式作为肿瘤细胞的生长因子<sup>[46]</sup>。胶质母细胞瘤倾向于侵袭被 ACh 支配调控丰富的大脑区域,AChRs 的激活不会直接促进肿瘤细胞的增殖或迁移,而是通过增加基质金属蛋白酶 9 的活性来促进肿瘤的侵袭。研究发现 M3 受体表达的增高与患者存活率的降低具有显著的相关性<sup>[47]</sup>。此

外,M-AChRs 在非致瘤性乳腺细胞和正常乳腺组织中的缺乏表达,但在乳腺肿瘤中上调,被认为是潜在的肿瘤治疗靶点<sup>[48]</sup>。ACh 能够促进 CD133 Y828 磷酸化,增加 CD133 与 PI3K 调节亚基 P85 之间的相互作用,激活 PI3K-Akt 信号通路。ACh 通过激活 CD133-Akt 通路增强 CD133<sup>+</sup>甲状腺癌细胞的自我更新能力,促进免疫调节因子 PD-L1 的表达,CD133<sup>+</sup>甲状腺癌细胞造成 CD8<sup>+</sup>T 细胞耗竭,增加 CD133<sup>+</sup>甲状腺癌细胞的自我更新和免疫逃逸能力<sup>[49]</sup>。

## 3 肽类神经递质

### 3.1 神经肽 Y

神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 是胰多肽家族中一个由 36 个氨基酸残基组成的多肽,广泛表达于中枢和外周神经系统,参与了多种生理过程,包括调节皮质兴奋性、昼夜节律、应激反应、痛觉、食物摄取和心血管功能。还与癫痫、焦虑抑郁、疼痛和镇痛、神经保护和神经形成有关<sup>[50]</sup>。

NPY 还能刺激细胞增殖,在多种恶性肿瘤中被认为是一种促生长因子。在这些肿瘤中,NPY 主要通过两种受体 Y2R 和 Y5R 来介导肿瘤细胞的增殖、存活、迁移以及血管生成。实体肿瘤缺氧激活了 NPY/Y2R/Y5R 轴,这种激活是由缺氧诱导的 Y2R/Y5R 表达上调和二肽基肽酶 IV(DPPIV)的刺激触发的,DPPIV 将 NPY 转化为选择性的 Y2R/Y5R 激动剂 NPY3-36<sup>[51]</sup>。在胃癌组织中,NYP 高表达,其过度表达与生存期减少和预后不良有关<sup>[52]</sup>。Alshalalfa 等<sup>[53]</sup>研究发现,相比于其他肿瘤,NPY 在前列腺癌中表达最高。此外,对于 NPY 和 ERG 融合程度低的患者,肿瘤发生转移的风险很高,并可能存在对雄激素剥夺疗法耐药的风险。本实验室前期研究发现抑郁能够诱导去甲肾上腺素,使其通过刺激肿瘤细胞表面的  $\beta 2$ -肾上腺素能受体来触发前列腺癌细胞分泌 NPY,进而募集衍生抑制细胞到肿瘤,间接诱导肿瘤细胞 IL6/STAT3 信号转导,从而刺激前列腺癌的生长。因此,抑制 NPY 可能是抑郁心理评分较高的前列腺癌患者的一种较好的治疗策略<sup>[54-55]</sup>。NPY 基因在某些肿瘤中经常发生超甲基化,基因启动子超甲基化与基因表达失活相关<sup>[56]</sup>。Jensen 等<sup>[57]</sup>提出可以把血浆 NPY 甲基化水平的检测作为一种普遍适用的方法用于转

移性结直肠癌患者 ctDNA 的监测。NPY 高甲基化水平与生存期呈负相关,可以用于预测结直肠癌早期疗效和晚期进展。

#### 4 展 望

神经递质在肿瘤中的作用是复杂和多样的,神经递质可以作用于肿瘤细胞和周围的环境,影响到药物的治疗,开展肿瘤化疗和靶向治疗时,要考虑神经递质的作用。同时提示用于治疗精神疾病的药物可能在治疗肿瘤方面发挥重要的作用,可以拓展神经药物的新用途,尽管神经递质/受体系统在肿瘤生物学中有重要的作用,但也调节人体的正常生理功能,这些药物的使用可能会产生不良反应,可以通过结合肿瘤特异性靶向策略来解决,但还需要更多的技术来支持。神经递质对肿瘤发生发展的作用还有许多问题需要解决:(1)不同类型的肿瘤中神经递质作用机制是否相同?(2)神经递质如何通过肿瘤微环境中的其他细胞(如:成纤维细胞,内皮细胞和免疫细胞等)来参与对肿瘤细胞的调控?(3)肿瘤中炎症反应同神经递质之间是否存在联系?(4)神经肿瘤信号中能否找到生物标志物分子,可以作为肿瘤发生前的预测,肿瘤进展的分期和患者预后分析的标志物?神经系统对肿瘤的作用在研究肿瘤发生发展机制和肿瘤治疗中是一个不可忽略的因素,不同的神经递质在不同类型肿瘤中作用的机制各不相同,未来还需要更多的研究来阐明。

#### 参 考 文 献

- [1] Havrda M. The purpose of Galen's treatise on demonstration [J]. *Early Sci Med*, 2015, **20**(3):265-287.
- [2] Antoni MH, Dhabhar FS. The impact of psychosocial stress and stress management on immune responses in patients with cancer[J]. *Cancer*, 2019, **125**(9):1417-1431.
- [3] Jobling P, Pundavela J, Oliveira SM, et al. Nerve-cancer cell cross-talk: a novel promoter of tumor progression [J]. *Cancer Res*, 2015, **75**(9):1777-1781.
- [4] Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Sibley DR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors [J]. *Pharmacol Rev*, 2011, **63**(1):182-217.
- [5] Nasi G, Ahmed T, Rasini E, et al. Dopamine inhibits human CD8<sup>+</sup>Treg function through D1-like dopaminergic receptors [J]. *J Neuroimmunol*, 2019, **332**:233-241.
- [6] Wu XY, Zhang CX, Deng LC, et al. Overexpressed D2 dopamine receptor inhibits non-small cell lung cancer progression through inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Cellular Physiol Biochem*, 2018, **48**(6):2258-2272.
- [7] Jandaghi P, Najafabadi HS, Bauer AS, et al. Expression of DRD2 is increased in human pancreatic ductal adenocarcinoma and inhibitors slow tumor growth in mice [J]. *Gastroenterology*, 2016, **151**(6):1218-1231.
- [8] Caragher SP, Shireman JM, Huang M, et al. Activation of dopamine receptor 2 prompts transcriptomic and metabolic plasticity in glioblastoma [J]. *J Neurosci*, 2019, **39**(11):1982-1993.
- [9] Mu J, Huang W, Tan Z, et al. Dopamine receptor D2 is correlated with gastric cancer prognosis [J]. *Oncol Lett*, 2017, **13**(3):1223-1227.
- [10] Weissenrieder JS, Neighbors JD, Mailman RB, et al. Cancer and the dopamine D2 receptor: a pharmacological perspective [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2019, **370**(1):111-126.
- [11] Prabhu VV, Madhukar NS, Gilvary C, et al. Dopamine receptor D5 is a modulator of tumor response to dopamine receptor D2 antagonism [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, **25**(7):2305-2313.
- [12] Sarkar C, Chakroborty D, Chowdhury UR, et al. Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(8):2502-2510.
- [13] Asada M, Ebihara S, Numachi Y, et al. Reduced tumor growth in a mouse model of schizophrenia, lacking the dopamine transporter [J]. *Int J Cancer*, 2008, **123**(3):511-518.
- [14] Ganguly S, Basu B, Shome S, et al. Dopamine, by acting through its D2 receptor, inhibits insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced gastric cancer cell proliferation via up-regulation of Kruppel-like factor 4 through down-regulation of IGF-IR and AKT phosphorylation [J]. *Am J Pathol*, 2010, **177**(6):2701-2707.
- [15] Krizanova O, Babula P, Pacak K. Stress, catecholaminergic system and cancer [J]. *Stress*, 2016, **19**(4):419-428.
- [16] Walker AK, Martelli D, Ziegler AI, et al. Circulating epinephrine is not required for chronic stress to enhance metastasis [J]. *Psychoneuroendocrinol*, 2019, **99**:191-195.
- [17] Chang A, Yeung S, Thakkar A, et al. Prevention of skin carcinogenesis by the blocker carvedilol [J]. *Cancer Prevention Res*, 2014, **8**(1):27-36.
- [18] Chang PY, Huang WY, Lin CL, et al. Propranolol reduces cancer risk: a population-based cohort study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2015, **94**(27):e1097.
- [19] Renz BW, Takahashi R, Tanaka T, et al.  $\beta$ 2 Adrenergic-neurotrophin feedforward loop promotes pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell*, 2018, **33**(1):75-90.
- [20] Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2008, **31**(3):

- 187-199.
- [21] Da Prada M, Picotti GB. Content and subcellular localization of catecholamines and 5-hydroxytryptamine in human and animal blood platelets: monoamine distribution between platelets and plasma[J]. *Br J Pharmacol*, 1979, **65**(4):653-662.
- [22] Nebigil CG, Choi DS, Dierich A, et al. Serotonin 2B receptor is required for heart development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**(17):9508-9513.
- [23] Jiang SH, Li J, Dong FY, et al. Increased serotonin signaling contributes to the warburg effect in pancreatic tumor cells under metabolic stress and promotes growth of pancreatic tumors in mice[J]. *Gastroenterology*, 2017, **153**(1):277-291.
- [24] Snyder SH. A life of neurotransmitters[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2017, **57**(4):1-11.
- [25] Zuo X, Chen Z, Cai J, et al. 5-Hydroxytryptamine receptor 1D aggravates hepatocellular carcinoma progression through FoxO6 in AKT-dependent and independent manners[J]. *Hepatology*, 2019, **69**(5):2031-2047.
- [26] Gautam J, Banskota S, Regmi SC, et al. Tryptophan hydroxylase 1 and 5-HT7 receptor preferentially expressed in triple-negative breast cancer promote cancer progression through autocrine serotonin signaling [J]. *Molecular Cancer*, 2016, **15**(1):75.
- [27] Liu Y, Zhang H, Wang Z, et al. 5-Hydroxytryptamine 1a receptors on tumour cells induce immune evasion in lung adenocarcinoma patients with depression via autophagy/pSTAT3[J]. *Eur J Cancer*, 2019, **114**:8-24.
- [28] Ring H, Mendu SK, Shirazi-Fard S, et al. GABA maintains the proliferation of progenitors in the developing chick ciliary marginal zone and non-pigmented ciliary epithelium[J]. *PLoS One*, 2012, **7**(5):e36874.
- [29] Chen X, Cao Q, Liao R, et al. Loss of ABAT-mediated GABAergic system promotes basal-like breast cancer progression by activating Ca<sup>2+</sup>-NFAT1 axis[J]. *Theranostics*, 2019, **9**(1):34-47.
- [30] Jiang SH, Zhu LL, Zhang M, et al. GABRP regulates chemokine signalling, macrophage recruitment and tumour progression in pancreatic cancer through tuning KCNN4-mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in a GABA-independent manner [J]. *Gut*, 2019, **68**(11):1994-2006.
- [31] Sung HY, Yang SD, Ju W, et al. Aberrant epigenetic regulation of GABRP associates with aggressive phenotype of ovarian cancer[J]. *Exp Mol Med*, 2017, **49**(5):e335.
- [32] Taylor RA, Watt MJ. Unsuspected protumorigenic signaling role for the oncometabolite GABA in advanced prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2019, **79**(18):4580-4581.
- [33] Xia S, He C, Zhu Y, et al. GABABR-induced EGFR transactivation promotes migration of human prostate cancer cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2017, **92**(3):265-277.
- [34] Kanbara K, Otsuki Y, Watanabe M, et al. GABAB receptor regulates proliferation in the high-grade chondrosarcoma cell line OUMS-27 via apoptotic pathways[J]. *BMC Cancer*, 2018, **18**(1):263.
- [35] Hujber Z, Horvath G, Petovari G, et al. GABA, glutamine, glutamate oxidation and succinic semialdehyde dehydrogenase expression in human gliomas [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, **37**(1):271.
- [36] Cerchio R, Chen S. Role of GPCRs in cancer [M]. *GPCRs*, 2020: 463-474.
- [37] Zhang Z, Liu Y, Wang K, et al. Activation of type 4 metabotropic glutamate receptor promotes cell apoptosis and inhibits proliferation in bladder cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(3):2741-2755.
- [38] Shah R, Singh SJ, Eddy K, et al. Concurrent targeting of glutaminolysis and metabotropic glutamate receptor 1 (GRM1) reduces glutamate bioavailability in GRM1<sup>+</sup> melanoma [J]. *Cancer Research*, 2019, **79**(8):1799-1809.
- [39] Kaittani C, Andreou C, Hieronymus H, et al. Prostate-specific membrane antigen cleavage of vitamin B9 stimulates oncogenic signaling through metabotropic glutamate receptors[J]. *J Exp Med*, 2018, **215**(1):159-175.
- [40] Palamiuc L, Emerling BM. PSMA brings new flavors to PI3K signaling: a role for glutamate in prostate cancer [J]. *J Exp Med*, 2018, **215**(1):17-19.
- [41] Wu CS, Lu YJ, Li HP, et al. Glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 silencing by DNA hypermethylation possesses tumor suppressor function in gastric cancer[J]. *Int J Cancer*, 2010, **126**(11):2542-2552.
- [42] Zhawar VK, Kandpal RP, Athwal RS. Isoforms of ionotropic glutamate receptor GRIK2 induce senescence of carcinoma cells[J]. *Cancer Genomics - Proteomics*, 2018, **16**(1):59-64.
- [43] Chen J, Cheuk IWY, Shin VY, et al. Acetylcholine receptors: key players in cancer development[J]. *Surg Oncol*, 2019, **31**:46-53.
- [44] Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, et al. Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2007, **35**(4):1139-1144.
- [45] Hsu CC, Tsai KY, Su YF, et al.  $\alpha 7$ -Nicotine acetylcholine receptor mediated nicotine induced cell survival and cisplatin resistance in oral cancer [J]. *Archives Oral Biol*, 2020, **111**:104653.
- [46] Sales ME, Espanol AJ, Salem AR, et al. Role of muscarinic acetylcholine receptors in breast cancer: Design of metronomic chemotherapy[J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2019, **14**(2):91-100.
- [47] Thompson EG, Sontheimer H. Acetylcholine receptor activation as a modulator of glioblastoma invasion [J]. *Cells*, 2019, **8**(10):1203.
- [48] Sales ME. Muscarinic receptors as targets for metronomic therapy in breast cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2016, **22**(14):2170-

- 2177.
- [49] Wang Z, Liu W, Wang C, *et al.* Acetylcholine promotes the self-renewal and immune escape of CD133+ thyroid cancer cells through activation of CD133-Akt pathway [J]. *Cancer Lett*, 2020, **471**:116-124.
- [50] Benarroch EE. Neuropeptide Y: its multiple effects in the CNS and potential clinical significance [J]. *Neurology*, 2009, **72** (11):1016-1020.
- [51] Tilan J, Kitlinska J. Neuropeptide Y (NPY) in tumor growth and progression: lessons learned from pediatric oncology [J]. *Neuropeptides*, 2016, **55**:55-66.
- [52] Zheng S, Yang L, Dai Y, *et al.* Screening and survival analysis of hub genes in gastric cancer based on bioinformatics [J]. *J Comput Biol*, 2019, **26**(11):1316-1325.
- [53] Alshalalfa M, Nguyen PL, Beltran H, *et al.* Transcriptomic and clinical characterization of neuropeptide Y expression in localized and metastatic prostate cancer: identification of novel prostate cancer subtype with clinical implications [J]. *Eur Urol Oncol*, 2019, **2**(4):405-412.
- [54] Mohammadpour H, Bucsek MJ, Hylander BL, *et al.* Depression stresses the immune response and promotes prostate cancer growth [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, **25**(8):2363-2365.
- [55] Cheng Y, Tang XY, Li YX, *et al.* Depression-induced neuropeptide Y secretion promotes prostate cancer growth by recruiting myeloid cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, **25**(8):2621-2632.
- [56] Zhang Y, Fang L, Zang Y, *et al.* Identification of core genes and key pathways via integrated analysis of gene expression and DNA methylation profiles in bladder cancer [J]. *Medical Science Monitor*, 2018, **24**:3024-3033.
- [57] Jensen LH, Olesen R, Petersen LN, *et al.* NPY gene methylation as a universal, longitudinal plasma marker for evaluating the clinical benefit from last-line treatment with regorafenib in metastatic colorectal cancer [J]. *Cancers*, 2019, **11**(11):1649.



# 中国药科大学学报

中国精品科技期刊 中国高校精品科技期刊  
中国中文核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

**药学前沿**

提供药学领域的前沿信息 反映最新的药学研究进展

**创新成果**

展示医药科技最新成果 构建学术交流的平台

**研究论文**

科学研究原创论文 国家重大药学研究基金产出论文

**邮发代号：28-115, 欢迎订阅, 欢迎投稿!**